東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

26-2

1975

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.

刊行に当って

1974年（昭和49年）に終了した研究および同年中に他の専門誌に発表した論文の抄録をここにまとめて報告することにしました．乏しい研究費をやりくりしながら行った研究の成果であります．

衛生研究所で行う調査研究には，公衆衛生の発展推進に関する応用研究，公衆衛生に関係のある科学分野の基礎的研究，衛生行政上実施する試験検査に関連して行ういわゆる関連研究および試験検査方法の開発改善に関する研究等があり，かなり広範にわたるものであります．いずれにしても，ここで行う調査研究は，人の，地域住民の生命と健康を守ることに目標が置かれなければならないと思います．この研究報告をご覧になれば，衛生研究所の使命から発するユニークな動きを感じていただけると思います．

研究業績も年々増加し，昨年はついに740頁をこえましたが，これだけの論文を一冊に収めることは，この種の報告書としては限界であると思います．そこで，1975年発行のこの研究年報は26-1号と26-2号の2冊に分けることにしました．そして，26-1号には微生物学，衛生化学，環境衛生，環境医学等に関する論文を，26-2号には当所毒性部で実施した研究の結果をまとめた諸論文を載せることにしました．今後もこの体裁をつづけていくことになりましょう．

本研究年報に忌憚ない御意見または御批判をいただければ誠に幸いであります．

1975年8月20日

東京都立衛生研究所長　辺野喜　正　夫

目　　次

報　　文

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）の慢性毒性試験の途中経過報告
市川　久次，小林　博義，中川　好男，長井二三子，厚井　麻里，池田　虎雄，矢野　範男，平賀　興吾…… 1

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）のラット肝におよぼす影響
…… 坂本　義光，中川　好男，藤井　　孝，福森　信隆，平賀　興吾……16

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）によるラット肝実質細胞への影響に関する電子顕微鏡的研究
…… 福森　信隆，三粟谷久敏，平賀　興吾……22

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）長期投与ラットにおける血清及び肝臓脂質の変化について
…… 中川　好男，中尾　順子，平賀　興吾……31

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）によるラットの出血に関する病理解剖学的研究
…… 藤井　　孝，湯澤　勝広，平賀　興吾……36

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）添加飼料による飼育ラットの死亡率について
…… 藤田　　博，平賀　興吾……45

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）と直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）併用添加飼料摂取ラットの出血機構（Ｉ）ＢＨＴによる出血について
…… 鈴木(柴)英子，平賀　興吾，中尾　順子……49

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムのトロンビン阻害作用について（第２報）
…… 高橋　　省，中尾　順子，平賀　興吾……54

アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム投与ラットの血清アルカリフォスファターゼ上昇とその臓器由来について　(2) 小腸アルカリフォスファターゼの精製…… 米山　允子，中尾　順子……62

合成洗剤及び直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）の催奇性について
…… 高橋　昭夫，佐藤　　薫，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吾……67

ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）の亜急性毒性試験病理組織学的検討
…… 藤井　　孝，三粟谷久敏，湯澤　勝広，平賀　興吾……79

メタバナジン酸ナトリウムの急性毒性…… 小林　博義，神谷　信行，吉田　誠二，平賀　興吾……83

バナジウムの生体内運命　(1) 生体試料のバナジウム分析法と分布…… 伊川三枝子，馬渕　依子……90

バナジウムの生体内運命　(2) 蓄積性の有無…… 馬渕　依子，伊川三枝子……96

パラオキシ安息香酸ブチルの急性毒性
…… 馬渕　依子，川野　澄江，藤田　　博，水尾　昭江，樺島順一郎，中尾　順子，平賀　興吾 …103

パラオキシ安息香酸ブチルの亜急性毒性
…… 藤田　　博，川野　澄江，水尾　昭江，馬渕　依子，樺島順一郎，中尾　順子，平賀　興吾 …111

ラットの血液凝固系に対するパラオキシ安息香酸ブチルおよびその関連化合物の影響について
…… 水尾　昭江，川野　澄江，中尾　順子，平賀　興吾 …119

ヘキサクロルベンゼンの雄マウス生殖器官におよぼす影響…… 大石　真之，平賀　興吾 …123

ジ-2-エチルヘキシルフタレート（ＤＥＨＰ）の毒性学的，内分泌学的研究　(1) ＤＥＨＰ腹腔投与時のラット雄性性腺系におよぼす影響…… 大石　真之，平賀　興吾 …127

ジ-2-エチルヘキシルフタレート（ＤＥＨＰ）の毒性学的，内分泌学的研究　(2) 飼料中ＤＥＨＰの雄ラットにおよぼす影響…… 大石　真之，平賀　興吾 …131

四塩化炭素肝障害におけるリソゾーム酵素と血清酵素の変化について …… 中川　好男，福田　向江，坂本　義光，平賀　興吾 …139

馬腎臓髄質外帯 Na，K-ATPase の純化…… 長井二三子，厚井　麻里，中尾　順子 …143

有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用　(2) 細胞膜諸酵素に対する水銀化合物の阻害作用 …… 矢ヶ崎しげ子，原　論吉，中尾　順子 …148

有機フッ素化合物の細胞膜酵素活性に対する *in vitro* および *in vivo* の影響について …… 厚井　麻里，中尾　順子 …152

マウス胎仔の染色体標本作成法（Ｉ）…… 益淵　正典，高橋　昭夫，縄井寿美子，吉田　誠二 …158

マウス骨髄細胞染色体におよぼすウレタンの影響…… 益淵　正典，縄井寿美子，吉田　誠二 …161

ウレタンの培養細胞（L5178Y，CHO-Kl）における細胞遺伝学的研究 …… 吉田　誠二，益淵　正典，縄井寿美子 …166

遺伝物質に対する微量毒性物質の作用ならびにその障害回復機構の解析　(2) 潜在的障害とその検出 …… 金西　信次，渡部　真 …171

肝ホモジネート10,000g 上清処理による AF2 の分解と HeLa S3 細胞に対する毒性 …… 川野　澄江，中尾　順子，平賀　興吾 …175

発育リズムについて…… 平賀　興吾，藤井　孝，中川　好男，福森　信隆，坂本　義光 …181

ラットの成長過程における体重の変動について…… 林田　志信，井口　重孝，池田　虎雄，平賀　興吾 …186

成長に伴う大腿骨長及び大腿骨重量の増加の推移について …… 藤井　孝，湯澤　勝広，矢野　範男，平賀　興吾 …190

ラットの成長に伴う血液成分と血球性状の変化…… 福田　向江，中川　好男，平賀　興吾 …196

Coil Planet Centrifuge 法によるラットの赤血球浸透圧抵抗…… 市川　久次，小林　博義，中尾　順子 …203

ラットの断頭採血時の処理ならびに採血部位と血液成分について …… 市川　久次，中川　好男，小林　博義，平賀　興吾 …207

固定後の器官重量の変動について…… 矢野　範男，湯澤　勝広，藤井　孝，平賀　興吾 …211

電子顕微鏡用試料作製におけるブロック染色法の検討…… 三栗谷久敏，福森　信隆，平賀　興吾 …215

ヘマトキシリン・エオジン重染色標本の褪色について…… 阿部　幸恵，平賀　興吾 …223

他　誌　発　表 …… 227

CONTENTS

REPORTS

Chronic Oral Toxicity of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats (An Interim Report)
……H. Ichikawa, H. Kobayashi, Y. Nakagawa, F. Nagai, M. Koi, T. Ikeda, N. Yano and K. Hiraga …… 1

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Liver of Rats
…… Y. Sakamoto, Y. Nakagawa, T. Fujii, N. Fukumori and K. Hiraga……16

Ultrastructural Changes of Rat Hepatocytes treated with Butylated Hydroxytoluene (BHT)
……N. Fukumori, H. Mikuriya and K. Hiraga……22

Changes in Serum and Liver Lipids after Oral Administration of Butylated Hydroxytoluene (BHT) to Rats…… Y. Nakagawa, T. Nakao and K. Hiraga……31

Gross Anatomical Findings of Hemorrhage in Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT)
…… T. Fujii, K. Yuzawa and K. Hiraga……36

Mortality Rates of Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT) ……H. Fujita and K. Hiraga……45

Mechanism of Haemorrhage in Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) (I) Haemorrhage in Rats treated with BHT
…… H. Suzuki, K.Hiraga and T. Nakao……49

Inhibition of Thrombin by Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) (II)
…… O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga……54

Origins of Increased Serum Alkaline Phosphatase in Rats fed Alkylbenzene Sulfonates (2) Purification of Intestinal Alkaline Phosphatase…… M. Yoneyama and T. Nakao……62

Teratogenicity of Some Synthetic Detergent and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)
……A. Takahashi, K. Sato, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga……67

Subacute Toxicity Test of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Histopathological Study
…… T. Fujii, H. Mikuriya, K. Yuzawa and K. Hiraga……79

Acute Toxicity of Sodium Metavanadate
…… H. Kobayashi, N. Kamiya, S. Yoshida and K. Hiraga……83

Fate of Vanadium in Rat Organs (1) Analysis of Vanadium and Its Distribution in Rat Organs……M. Ikawa and Y. Mabuchi……90

Fate of Vanadium in Rat Organs (2) Vanadium Accumulation in Rat Organs
…… Y. Mabuchi and M. Ikawa……96

Acute Toxicity of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB)
Y. Mabuchi, S. Kawano, H. Fujita, A. Mizuo, J. Kabashima, T. Nakao and K. Hiraga…… 103

Subacute Toxicity of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB)
H. Fujita, S. Kawano, A. Mizuo, Y. Mabuchi, J. Kabashima, T. Nakao and K. Hiraga…… 111

Influence of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB) and Related Compounds on Blood Coagulation in Rats…… A. Mizuo, S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga…… 119

Effects of Hexachlorobenzene (HCB) on Reproductive Organs of Male Mice
……S. Oishi and K. Hiraga…… 123

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (1) Effects of Daily Intraperitoneal Dose of DEHP on Gonadal Function of Male Rats ..... S. Oishi and K. Hiraga 127

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (2) Effects of DEHP in Diet on Male Rats ..... S. Oishi and K. Hiraga 131

Changes in Lysosomal and Serum Enzymes in Experimental Hepatic Injury by Carbon Tetrachloride ..... Y. Nakagawa, H. Fukuda, Y. Sakamoto and K. Hiraga 139

Purification of Na, K-ATPase from Outer Medulla of Horse Kidney ..... F. Nagai, M. Koi and T. Nakao 143

Effects of Organic Mercury Compounds on Cell Membranes (2) Inhibition of Enzymes in Cell Membrane by Mercury Compounds ..... S. Yagasaki, Y. Hara and T. Nakao 148

Effects of the Organofluoro-Compounds on Enzymes in Plasma Membrane *in vitro* and *in vivo* ..... M. Koi and T. Nakao 152

Chromosome Preparations from Mouse Embryos (I) ..... M. Masubuchi, A. Takahashi, S. Nawai and S. Yoshida 158

Effect of Urethane on the Chromosomes of Bone Marrow Cells in Mice ..... M. Masubuchi, S. Nawai and S. Yoshida 161

In vitro Cytogenetic Studies of Urethane on Cultured Cells (L5178Y, CHO-K1) ..... S. Yoshida, M. Masubuchi and S. Nawai 166

Analysis of Micro-toxicant Damages on Genetic Substances (2) Detects of Potential Damage ..... N. Kananishi and M. Watanabe 171

Degradation of AF2 by 10,000×g Supernatant of Rat Liver Homogenate and Cytotoxicity to HeLa S3 Cells ..... S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga 175

Growth Rhythm ..... K. Hiraga, T. Fujii, Y. Nakagawa, N. Fukumori and Y. Sakamoto 181

Changes of Body Weight in Growing Rats ..... S. Hayashida, S. Iguchi, T. Ikeda and K. Hiraga 186

Changes in Increasing of Femur Length and Femur Weight with Growth ..... T. Fujii, K. Yuzawa, N. Yano and K. Hiraga 190

Changes in Blood Components with the Growth of Rats ..... H. Fukuda, Y. Nakagawa and K. Hiraga 196

Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge Method ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao 203

Effects of Different Blood-Collecting-Techniques on Rat Blood Components ..... H. Ichikawa, Y. Nakagawa, H. Kobayashi and K. Hiraga 207

Variation of Organ Weight after Fixation ..... N. Yano, K. Yuzawa, T. Fujii and K. Hiraga 211

Evaluation of Block Staining Method for Electron Microscopic Observation ..... H. Mikuriya, N. Fukumori and K. Hiraga 215

Fading of Preparations stained by Hematoxylin and Eosin ..... Y. Abe and K. Hiraga 223

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 227

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 1-15, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）の慢性毒性試験の途中経過報告

市川久次* 小林博義* 中川好男*
長井二三子* 厚井麻理* 池田虎雄*
矢野範男* 平賀興吾*

Chronic Oral Toxicity of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats (An Interim Report)

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI*,
YOSHIO NAKAGAWA*, FUMIKO NAGAI*, MARI KOI*, TORAO IKEDA*,
NORIO YANO* and KOGO HIRAGA*

ジブチルヒドロキシトルエン（以下ＢＨＴと略す）は油脂等の酸化防止剤，ゴム，プラスチック等の安定剤として広く使用されている。その安全性については，多数の検討がなされているが，ＦＡＯ/ＷＨＯ専門委員会はヒトに対する一日許容摂取量を 0−0.5mg/kg Body Weight[1] としているが，昭和45年の科学技術庁資源調査会報告[2]によれば体重を50kgとすれば，日本人の一人当り平均一日摂取量は 0.54mg/kg, B.W.（調査対象最高値は 2.22mg/kg B.W.）ということになり，許容量超過ということになる。最近の日本人の食生活の内容を考慮すれば，さらに摂取量は増加していると予想される．このためＢＨＴの安全性について検討することは意義あるものと考えられる．

これまで著者らはＢＨＴに関して，急性，[3] 亜急性毒性[4,5]をはじめ，種々の検討[6,7]を行なってきたが，今回は主に，最大無作用量の推定ならびに短期間投与における毒性試験において発見しなかった症状の検索を目的として慢性毒性の検討を試み，ここに途中経過ではあるが，投与開始後１年６ヶ月までの経過につき報告する。なお，病理組織学的検索については現在検討中であるので，今回は省略する．

実験材料ならびに実験方法

1. 使用動物：日本クレア K.K. 生産の SD-JCL 系ラット雌雄を用いた．生後４週令にて買入し，一週間予備飼育後，体重増加，一般症状に異状のないものを実験に供した．実験開始時（平均体重，雄 105g, 雌96g）に個別飼育用ケージに入れ実験に供した．

2. 試料：ＢＨＴは，和光純薬製（Lot No. PAK 3582, KIK5562）結晶性粉末で mp 69.5°C のものを使用した．

3. 投与方法ならびに投与期間

試料（ＢＨＴ）はそれぞれ，0.005%, 0.020%, 0.320%の割合で日本クレア K.K. 粉末飼料（CE−2, 粗蛋白24.0%, 粗脂肪3.5%, 粗繊維 4.5%, 粗灰分 6.0%, 可溶性無窒素物56.0%, カルシュウム 1g/100g, リン 1g/100g, マグネシュウム0.23g/100g, ナトリウム0.40 g/100g, カリウム 0.63g/100g）に混合し，固型飼料とし，対照群には日本クレア製固型飼料 CE−2 を自由にラットに摂取させた．投与期間は，３ケ月，６ケ月，12ケ月（各群雌雄５匹），24ケ月（各群雌雄10匹），終生飼育群（対照，0.05%群は雌雄25匹，0.020%，0.320%群は雌雄15匹）に分けた．この際各群動物は試験期間毎にランダムに配置飼育した．水は細菌沪過器を通した水道水を自由に摂取させた．

4. 飼育条件

室温 25±1°C, 湿度 55±5%に調整された飼育室内にて，ベルト式架台にて飼育した．

5. 検査項目ならびに検査方法

i) 体重，飼料摂取量の測定

体重は，終生飼育群 120 匹についてメトラーデジタル

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3−24−1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24−1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

電子天秤（PE1200）を用い，飼料摂取量は，{投与量－(残余量＋コボシ量)}/セット日数の式を用いて求めた．なお，これらの測定は3ケ月までは毎週，3～8ケ月までは2週毎，8ケ月以後は4週毎に測定した．

ii）血液学検査

採血は断頭により，頸部動静脈より放出する血液をあらかじめヘパリンナトリウムを塗布したガラス製試験管にとり軽く振盪後，自動希釈器（York 社製）にて血液44.7μl をとり希釈液（Isoton：Coulter Counter 用血球希釈液）を加えて全量10ml とし，血球測定機（Coulter Counter Model-S：Coulter Electric INC.,）を用いて次の7項目について測定した．a）白血球数（WBCと略），b）赤血球数（RBC），c）ヘモグロビン量（HGB），d）ヘマトクリット値（Hct），e）平均赤血球容積（MCV），f）平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），g）平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC），なお，測定条件の精度照合は標準血液（4C：Coulter INC.）を使用した．

iii）血清生化学検査

断頭により放出する血液をガラス製の遠心管にとり，遠心管にパラフィルムをかけ，水分の損失を防ぎ，室温にて30分間放置し，次に氷中に60分放置し，血液上面に生成したフィブリンの膜をガラス棒にてはく離し，冷却遠心機（Tomy Seiko, RS-71A・Swing Rotor）で0°C, 300rpm, 10min 遠心分離し，その上清を血清とし，自動分析装置（HITACHI M-400 Automatic Analyzer）を用いて次の項目について測定した．

a）総蛋白量（以下TPと略）—Buiret 法，b）グルコース量（GLU）—glucose oxidase 変法，c）総コレステロール量（CHO）—Liberman-Burcherd 法，d）尿素窒素量（UN）—urease indophenol 法，e）トランスアミナーゼ活性（GOT ならびに GPT）—Reitman-Frankel 変法，f）アルカリフォスファターゼ活性（ALP）—Kind・King 変法，g）コリンエステラーゼ活性（ChE）—Takahashi・Shibata 変法

なお，測定用試薬は，アナセラムシリーズ（第一化学薬品製）を使用し，測定条件の精度照合に凍結プール血清（コンセーラ：日水製薬製）を用いた．

iv）尿検査

動物を1匹づつケージに入れ，下に塩ビ製白色バットを置き尿を採取し，蛋白量，グルコース，ケトン体，潜血反応，ビリルビン，ウロビリノーゲンを試験紙 Labstix, Ictostix, Urobilistix（Ames 社製）を用いて測定した．

v）剖検

肉眼的所見観察

vi）臓器重量の測定

心臓，肝臓，腎臓（左，右），脾臓，甲状腺，副腎（左，右），盲腸を附着する血液，脂肪等を除去し，メトラーデシタル電子天秤（PE162, HE-20）にて秤量した。

測定値はすべて on line でコンピュータに送り推計学的処理をした．[8]

実験結果

1. 体重，飼料摂取量，一般症状の推移

体重増加については，Table 1, 2, Fig. 1, 2, に示した如く3ケ月目の処理時の体重において雄の0.320％投与群と雌の0.020％投与群において，対照群に比較して有意なる減少（$p<0.05$）を示したが，成長率においてはいづれも対照群との間に差は認められなかった．

飼料摂取量は，Table 2, Fig. 1, 2, に示した如く，いづれの群においても対照群との間に差は認められなかった．

試料摂取量は，Table 2 に示した如く，0.005％投与群の体重kg一日当りの摂取量は雄2.26mg，雌2.69mgであった．この値は科学技術庁の調査報告によれば，現実に調査を行った人の中に体重一日当り2.22mgを摂取していた人がいたということから，ほぼ実際に日本人が摂取している量として考慮する必要のある量であった．

コボシの量は Table 2 に示した如く対照群との間に差があるとはいえず，雄では0.90～1.25g/rat/day で，雌では0.05～0.75g/rat/day であった．

一般症状は，対照群との間に認めるべき差異はなかったが，尿が飼料コボシ測定用沪紙を桃色に染めたのは12ケ月後にはじめて0.320％投与群の雌雄に1例づつ認めた。また12ケ月目頃より後肢にタコができるのが数多く認められた．

1年6ケ月の間に処理時以外で死亡したものおよび腫瘍の発生状況は以下の通りであった。

	対照群		0.005％		0.020％		0.320％	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0～3ケ月						1(0)		
3～6ケ月		1*(1)**	1(1)		1(1)			
6～12ケ月			1(1)	1(1)				1(1) 0(1)
12～18ケ月	1(1)	1(1)	2(2)	3(3)	2(1)	2(1)		2(1)

* 期間中処理時以外に死亡した数

** 期間中処理時発見を含む腫瘍発生数

2. 血液学的検査

血液学検査の結果は Table 3 に示した如くであるが，いづれの検査においても著明な変化は認められなかったが，特に3ケ月処理時の雌において，白血球数が投与群

Table 1. Body Weights at Every Test Time

Group		Months 3	6	12
M	Control	509.6±18.63[1] (5)[4] 467.6±20.65[2] 464.1±9.73[3] (15)[4]	581.2±23.13 (5) 544.4±24.59 555.8±15.07 (15)	704.0±26.03 (5) 664.6±18.91 664.3±20.37 (15)
	BHT 0.005%	451.2±21.95 (5) 447.8±27.79 463.5±9.25 (15)	600.8±13.27 (5) 568.6±20.11 556.8±10.21 (15)	712.4±22.45 (5) 683.8±25.01 666.2±12.95 (14)
	BHT 0.020%	492.0±15.52 (5) 469.4±14.83 451.9±12.33 (15)	591.5±28.67 (4) 557.5±24.91 531.3±14.59 (15)	703.0±43.49 (5) 659.8±45.89 639.1±20.45 (15)
	BHT 0.320%	459.2±5.67* (5) 446.8±10.75 465.2±9.77 (15)	583.2±20.19 (5) 549.2±18.67 550.0±12.19 (15)	706.7±59.55 (5) 677.7±63.17 649.8±15.87 (15)
F	Control	263.2±5.89 (5) 277.2±14.73 251.1±5.17 (15)	299.6±16.51 (5) 310.0±±12.65 290.4±7.37 (15)	382.5±36.71 (4) 394.2±34.91 361.0±66.21 (14)
	BHT 0.005%	251.6±7.75 (5) 267.4±7.37 265.0±5.41 (15)	291.2±7.87 (5) 306.4±11.49 295.9±8.37 (15)	420.0±51.77 (5) 462.0±59.49 373.0±16.71 (13)
	BHT 0.020%	242.0±4.61* (5) 260.6±8.57 256.2±7.89 (15)	323.6±20.41 (5) 338.8±29.87 294.0±12.29 (15)	413.0±25.77 (5) 434.8±30.13 389.6±23.47 (14)
	BHT 0.320%	257.2±9.67 (5) 267.0±5.55 250.6±5.41 (15)	345.6±11.95 (5) 360.2±18.65 295.6±7.57 (15)	363.6±29.81 (5) 372.2±25.85 365.4±12.41 (14)

1) Body weights (g) at test time 2) Growth rate (%) 3) Body weights (g) of long term group 4) No. of rats *$p<0.05$

において対照群に比較して減少の傾向があるのが注目された.

3. 血清生化学検査

血清生化学検査の結果は Table 4 に示した如くであるが，成績を総合して顕著な変化を認めるものはなかったが，6ヶ月目処理時の雌のコレステロール量において，投与量の増加とともに増加するのが注目され，全体的にコレステロール量は投与群においては，対照群より

Table 2. Body Weight Gain, Food, Sample Intake and Weight of Droped Food

Group		No. of rats	Initial B.W. (g) mean±S.E.[1]	Final B.W. (g) mean±S.E.	Growth rates (%)[2]	Food (g) /rat /day	Food (g) /kg /day	Sample(mg) /rat /day	Sample(mg) /kg /day	Droped Food(g) /rat /day
M	Control	15	106.9±1.34	715.0±18.97	669.2±18.55	19.65	46.50	—	—	1.25
	BHT 0.005%	15→14	105.1±0.95	750.5±20.61	712.7±17.75	20.00	46.33	0.97	2.26	1.11
	BHT 0.020%	15	103.4±1.41	715.2±26.91	692.7±27.11	19.15	48.40	3.82	9.61	0.90
	BHT 0.320%	15	104.1±1.42	725.1±17.29	697.3±17.97	20.10	47.40	63.95	151.65	0.99
F	Control	15→14	98.4±0.72	440.9±25.03	446.5±25.81	14.21	56.81	—	—	0.64
	BHT 0.005%	15→13	95.6±0.75	467.2±30.41	488.3±33.95	13.43	56.52	0.64	2.69	0.63
	BHT 0.020%	15→14	94.9±0.97	482.3±34.65	512.6±40.81	13.61	55.23	2.63	11.04	0.55
	BHT 0.320%	15→14	95.5±1.06	449.3±22.57	471.4±22.21	13.49	57.28	43.15	183.24	0.75

1) $S.E.=\sqrt{\frac{\sum(X-\bar{x})^2}{N(N-1)}}$　　2) (Final B.W./Initial B.W.)×100

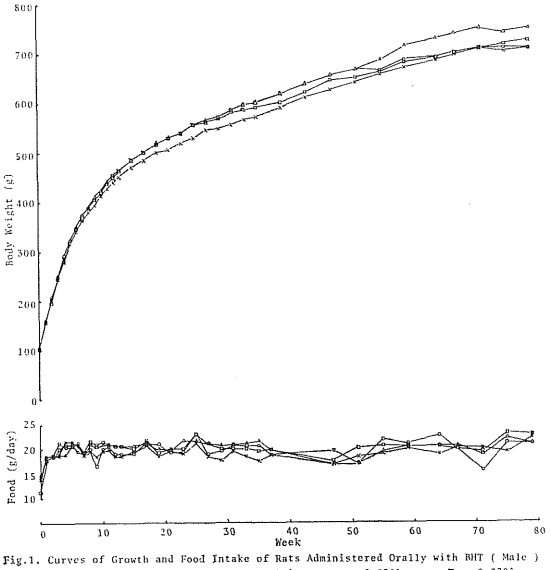


Fig.1. Curves of Growth and Food Intake of Rats Administered Orally with BHT (Male)
—o— Control, —△— 0.005 %, —×— 0.020%, —□— 0.320%

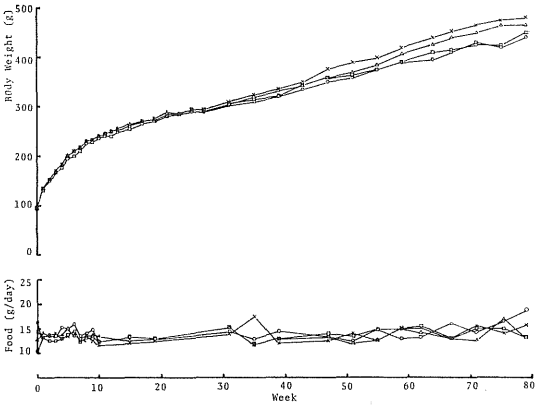


Fig.2. Curves of Growth and Food Intake of Rats Administered Orally with BHT (Female)
—o— Control, —△— 0.005%, —×— 0.020%, —□— 0.320%

も増加する傾向があった. また, 12ケ月目の雄の0.320%投与群において, GPT, GOT, CHO の値が異常に高かったが, これは1例だけが異常に高く, これを除いて計算すると GPT は25.6±0.02, GOT は83.0±11.01, CHO 81.0±13.65でいづれも対照群との間には差は認められなかった.

4. 尿検査

Table 5 に示した如く, いづれの検査においても対照群との間に顕著な差を示すものは認められなかったが, 12ケ月処理時の雄の 0.320 %投与群, 雌の投与群, 全体において潜血反応が散見された.

5. 剖検所見

実験期間中（18ケ月目まで）途中死亡例では, 明らかな所見が得られたのは, 主に, 下垂体腫瘍（対照群雄1例, 雌1例：0.005%投与群雄1例, 雌3例：0.020%投与群雄0例, 雌1例：0.320%投与群雄0例, 雌2例), 乳腺腫瘍（対照群雄0例, 雌1例：0.005% 投与群雄1例, 雌1例0.020%投与群雄0例, 雌0例：0.320%投与群雄1例, 雌1例), 脳腔内出血（0.320% 投与群雄1例), 胸腺腫瘍（対照群雄1例), 腎臓（右）腫瘍（0.005%投与群雄1例), 小腸腫瘍（0.005 %投与群雄1例), 睾丸出血（0.020%投与群雄1例）であった. また 3, 6, 12ケ月目の定期処理時屠殺解剖例では, 12ケ月目処理時腎う部に結石（対照群雌1例：0.320 %投与群雄1例, 雌1例）があった.

6. 臓器重量

各臓器の絶対重量ならびに体重 100 g 当りの体重比重量は Table 6, 7, 8, 9, 10, 11 に示した如くであった. 成

Table 3. Hematology

Group			No. of Rats	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	RBC ($\times 10^6/mm^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu g$)	MCHC (%)
	Months	BHT								
Male	3	Control	4	7.40±1.391[1)]	7.927±0.2990	15.77±0.149	39.80±0.870	50.7±0.95	19.90±0.830	39.50±1.110
		0.005%	5	7.30±1.263	7.502±0.4667	15.21±1.015	38.32±2.571	51.6±0.81	20.04±0.199	39.30±0.223
		0.020%	5	7.00±1.133	7.600±0.1330	12.32±3.087	38.94±1.296	51.8±0.73	16.68±3.785	31.76±7.527
		0.320%	5	5.48±0.453	7.466±0.3781	15.48±0.343	38.00±1.779	51.8±0.20	20.82±0.615	40.76±1.069
	6	Control	5	7.58±1.274	7.596±0.1781	16.24±0.493	39.66±1.009	53.4±0.51	21.34±0.417	40.80±0.795
		0.005%	5	7.02±0.633	7.288±0.1749	14.94±0.297	37.20±1.113	52.0±0.71	20.54±0.387	40.06±0.719
		0.020%	4	8.47±0.679	7.437±0.1087	15.85±0.607	39.37±1.167	54.1±1.07	21.27±0.487	40.07±0.911
		0.320%	5	6.50±0.225	7.286±0.1247	15.26±0.189	37.70±0.505	52.8±0.37	20.98±0.220	40.38±0.239
	12	Control	5	—	6.996±0.4555	15.68±0.995	37.38±2.555	54.2±0.59	22.54±0.207	41.70±1.013
		0.005%	5	—	7.320±0.0971	16.38±0.591	38.74±0.847	54.0±0.71	22.28±0.628	42.00±0.941
		0.020%	5	8.98±1.665	7.034±0.2343	17.48±1.001	38.98±2.605	56.2±2.39	24.66±0.889	44.72±1.203
		0.320%	4	8.97±0.985	6.187±0.4277	17.37±3.413	33.22±1.247	55.0±2.35	29.57±8.367	42.05±1.773
Female	3	Control	5	6.30±0.603	6.722±0.2399	15.28±0.101	35.38±1.347	53.4±0.40	22.74±0.719	43.22±1.595
		0.005%	5	3.28±0.203**	7.370±0.2317	15.78±0.107*	38.26±1.150	52.6±0.40	29.54±7.743	41.10±2.843
		0.020%	5	3.96±0.387*	6.234±1.2157	16.02±0.285	23.36±9.036	53.2±0.87	26.20±8.975	53.34±7.417
		0.320%	5	5.06±0.525	6.870±0.2743	15.30±0.261	35.64±1.197	52.6±0.51	22.32±0.657	42.96±1.053
	6	Control	5	5.48±1.337	6.414±0.1751	15.50±0.831	38.22±1.767	56.8±1.47	22.50±0.701	40.32±0.425
		0.005%	5	6.08±0.771	6.604±0.1243	15.02±0.283	36.92±1.043	56.8±1.31	22.68±0.365	40.62±1.237
		0.020%	5	4.90±0.449	7.026±0.0755	15.10±0.361	39.08±1.257	56.6±1.47	21.48±0.351	38.52±0.459*
		0.320%	5	3.96±0.469	6.794±0.1083	14.50±0.219	36.02±0.480	54.0±0.31	21.16±0.201	39.80±0.251
	12	Control	4	—	6.725±0.3161	15.32±0.799	36.82±1.747	55.5±0.50	22.67±0.403	41.42±0.495
		0.005%	5	—	6.382±0.1281	15.36±0.395	35.22±0.679	55.8±0.67	23.94±0.523	43.46±1.175
		0.020%	5	—	6.324±0.1699	15.78±0.801	35.26±1.265	56.6±1.29	24.82±1.109	44.58±1.091*
		0.320%	5	—	5.856±0.2537	14.84±1.073	32.62±1.365	56.4±1.07	25.38±1.969	45.56±2.771

1) Mean±S.E. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 4. Serum Biochemical Tests

Group	Months	BHT	No. of Rats	ChE (⊿PH)	Total Protein (g/dl)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GPT (Unit/ml)	GOT (Unit/dl)	ALP (Unit/dl)	Cho (mg/dl)
Male	3	Control	5	0.090±0.1190[1]	6.86±0.040	126.4±2.29	16.4±0.51	29.4±1.60	95.4±3.91	25.6±4.15	64.2±5.72
		0.005%	5	0.088±0.0073	6.50±0.235	121.6±2.83	16.0±0.83	26.2±2.57	100.6±6.41	24.2±0.20	66.8±6.16
		0.020%	5	0.106±0.0051	6.88±0.139	125.6±6.99	16.0±1.09	26.4±1.25	96.0±3.65	29.8±2.79	73.0±9.43
		0.320%	5	0.086±0.0075	6.74±0.087	121.8±4.81	16.2±0.80	27.4±1.17	94.2±5.17	28.2±1.80	72.2±4.33
	5	Control	5	0.094±0.0093	6.86±0.175	123.0±4.69	14.8±1.25	26.2±1.83	91.2±4.65	21.8±5.09	75.8±4.85
		0.005%	5	0.100±0.0063	6.82±0.120	132.4±6.98	14.8±0.80	27.2±2.43	91.0±5.29	29.2±3.77	81.2±6.51
		0.020%	4	0.087±0.0111	6.82±0.063	118.0±3.34	15.5±0.50	29.7±2.39	96.2±3.31	19.2±3.07	70.5±2.73
		0.320%	5	0.100±0.0105	6.80±0.094	117.8±1.36	13.4±0.75	25.0±1.65	97.8±5.31	22.4±4.01	76.4±7.57
	12	Control	5	—	6.78±0.037	126.4±5.71	15.2±0.87	35.6±5.25	98.4±11.87	18.6±3.25	70.4±5.83
		0.005%	5	—	6.96±0.160	121.2±7.65	14.8±0.73	28.6±1.13	86.2±4.59	17.4±1.77	87.8±8.57
		0.020%	5	—	6.88±0.091	132.6±6.55	16.4±0.75	38.6±6.73	84.4±10.29	21.4±4.01	87.6±10.51
		0.320%	4	—	8.40±1.561	147.0±25.15	17.2±1.31	84.2±58.61[2]	332.2±249.37[2]	31.0±9.03	229.5±148.81[2]
Female	3	Control	5	0.618±0.0771	6.94±0.153	117.8±5.45	15.6±0.67	30.6±2.51	114.0±4.79	25.8±5.11	71.8±5.38
		0.005%	5	0.626±0.0683	7.32±0.175	131.8±4.05	13.6±0.06	25.4±1.29	105.2±2.93	18.4±2.19	76.8±6.60
		0.020%	5	0.546±0.0457	7.22±0.149	124.6±4.89	13.0±1.09	25.2±1.15	103.2±7.99	23.0±4.41	70.7±5.59
		0.320%	4	0.590±0.0563	7.48±0.220	128.0±7.18	14.6±1.17	23.0±1.95	99.4±6.19	18.0±3.39	82.5±1.71
	5	Control	5	0.854±0.0861	7.32±0.246	141.0±7.59	14.4±0.75	28.6±1.97	92.4±4.01	15.2±3.01	81.4±8.21
		0.005%	5	0.942±0.0761	7.60±0.329	129.2±1.59	15.6±0.25	32.6±4.61	94.2±8.93	19.2±2.57	88.6±8.47
		0.020%	5	0.878±0.0749	7.86±0.133	130.4±5.21	13.4±1.03	25.6±1.57	85.0±6.35	14.4±2.83	94.6±11.47
		0.320%	5	0.686±0.0747	7.86±0.330	131.0±5.54	14.2±1.43	24.4±2.43	75.6±4.55*	12.2±1.15	100.8±3.65
	12	Control	5	—	7.70±0.147	123.2±3.91	14.2±1.49	30.7±2.71	78.5±5.33	13.7±2.13	83.2±5.11
		0.005%	5	—	7.64±0.051	122.2±5.35	14.8±0.91	39.2±5.03	86.4±7.27	17.4±4.05	108.4±5.51*
		0.020%	5	—	7.42±0.239	130.4±3.25	15.0±1.05	28.4±4.65	87.8±14.77	17.2±3.71	87.8±10.27
		0.320%	5	—	8.04±0.103	118.0±5.39	11.6±1.21	23.6±1.75	77.4±5.13	18.0±4.77	107.8±12.29

1) Mean±S.E. 2) one of the group: GPT=260 GOT=1080 Cho=675 *$p<0.05$

Table 5. Urinalysis

SEX		Male												Female											
Months		3				6				12				3				6				12			
Dose (%)		0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320
pH	5													1								1		1	
	6	4[1]	4	2	2	4	3		3	1	5	1	1		4	3	2	4	2	2	1	3	4	3	3
	7	1	1	2	3		2	1	1	2		3	1	3	1	2	2		1		1		1		1
	8			1		1		3	1	2		1	2	1			1	1	2	3	3			1	1
Protein	—	1		1	1	2	3	2	3	1	1	1		1		1	1	4	3	3	3	2	3	3	4
	30mg/dl>	1		2	1		2	1	1	1	1			1		2	1		1	3			1		1
	30mg/dl	3	4	2	2	1			1			1		2	5	2	3	1			2				
	100mg/dl		1		1	2				1		2							1			2		1	
	300mg/dl							1		2	3	1	3											1	
													1												
Glucose	—	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
	0.25g/dl																								
Keton-Body	—	2	1	1	3	4	5	4	4	4	2	3	3	3	4	2	2	5	4	4	5	3	4	5	4
	10mg/dl<	3	4	4	2	1			1	1	3	2	1	2	1	3	3		1	1		1	1		1
Occult Blood	—	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4
	5[2]												1										1	1	
	10																								1
Bilirubin	0.2mg/dl>	4	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	5	5	3	4	5	5
	0.2mg/dl<	1		1															1			1	1		
Urobilin	0.1~1E.U.[3]	5	5	5	3	3	5	4	5	5	5	5	4	5	4	5	4	5	5	5	5	4	5	5	5
	1E.U.<				2	2									1		1								

1) No. of Animals 2) No. of Red Blood Cells in the Range of View (×400) 3) E.U.=Ehrich Units/dl

Table 6. Absolute organ weights of rats fed diets containing BHT for 3 months

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Thyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	1,416±68	17.4±0.96	1,588±84	1,562±73	798±81	16.0±1.4	27.1±1.4	25.8±2.1	1,572±75
0.005	1,300±83	15.3±0.68	1,488±75	1,444±68	702±69	14.2±1.0	22.1±1.4	20.6±1.8	1,232±75
0.020	1,330±64	17.2±0.44	1,502±75	1,510±79	766±37	16.3±0.9	25.4±2.3	23.5±1.4	1,390±161
0.320	1,270±35	17.5±0.55	1,494±30	1,516±32	724±14	18.7±1.1	23.8±1.2	22.6±0.9	1,420±66
Female									
0	820±33	8.4±0.40	906±22	868±23	482±25	10.4±1.2	27.8±1.7	25.1±0.6	1,022±28
0.005	824±23	8.5±0.26	858±24	854±30	472±17	14.8±0.9*	29.5±1.5	28.4±1.6	888±40*
0.020	744±33	7.8±0.18	794±31*	792±31	526±73	11.8±1.1	28.3±1.4	24.5±1.7	810±112
0.320	798±19	10.1±0.39*	914±45	892±21	508±51	12.5±1.2	28.4±3.1	24.9±2.2	1.088±75

Table 7. Relative organ weights of rats fed diets containing BHT for 3 months

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Thyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	278±10	3.40±0.08	311±12	305±10	155±13	3.1±0.33	5.3±0.26	5.0±0.36	308±11
0.005	287±13	3.40±0.07	321±9	252±14	156±16	3.2±0.33	4.9±0.29	4.5±0.38	273±15
0.020	270±8	3.50±0.12	305±11	306±12	155±9	3.3±0.18	5.1±0.87	4.7±0.46	283±76
0.320	276±7	3.81±0.10*	325±5	330±6	157±5	4.0±0.29	5.1±0.67	4.9±0.53	309±33
Female									
0	310±6	3.18±0.13	344±8	329±5	183±13	3.9±0.52	10.5±0.45	9.5±0.11	388±11
0.005	328±15	3.38±0.03	342±16	340±14	188±9	5.9±0.29*	11.7±0.52	11.2±0.32*	353±17
0.020	307±11	3.22±0.07	327±7	327±9	218±32	4.8±0.53	11.7±0.50	10.0±0.59	332±43
0.320	311±5	3.91±0.74*	355±6	347±8	196±17	4.9±0.56	11.1±1.39	9.7±0.93	421±22

Table 8. Absolute organ weights of rats fed diets containing BHT for 6 months

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Tnyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	1,524±101	16.5±1.76	1,638±90	1,672±98	728±79	22.1±1.4	28.4±2.0	24.7±1.9	1,568±229
0.005	1,476±57	18.7±0.93	1,738±51	1,604±147	780±30	21.1±0.8	22.0±0.6	23.1±0.7	1,746±160
0.002	1,452±92	19.3±1.07	1,693±121	1,710±95	827±39	21.3±0.9	22.0±1.9	23.7±1.5	1,530±166
0.320	1,524±50	17.7±0.71	1,634±79	1,586±61	844±49	19.5±1.5	24.2±1.6	19.8±2.1	1,628±129
Female									
0	874±65	8.9±0.34	942±34	956±39	538±27	18.3±1.7	28.1±1.6	26.0±1.7	1,156±82
0.005	900±34	10.0±0.46	904±24	940±28	464±33	18.6±1.8	29.1±0.7	23.2±1.9	1,154±120
0.020	976±59	10.1±0.56	988±43	984±45	534±41	17.0±0.6	28.4±1.2	26.2±2.0	1,156±68
0.320	1,024±56	11.5±0.56*	1,096±45	1,108±51	528±26	18.7±1.7	32.2±4.4	28.1±2.5	1,152±53

Table 9. Relative organ weights of rats fed diets containing BHT for 6 months

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Thyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	260±7	2.80±0.19	281±9	287±11	124±11	3.7±0.19	4.9±0.48	4.3±0.43	269±38
0.005	246±13	3.10±0.11	289±12	268±28	129±4	3.5±0.14	3.6±0.06*	3.8±0.14	290±26
0.020	245±7	3.27±0.11	285±12	288±8	140±6	3.6±0.32	3.7±0.39	4.0±0.15	260±33
0.320	261±10	3.02±0.09	280±14	272±11	145±10	3.3±0.19	4.1±0.30	3.3±0.45	279±24
Female									
0	290±10	3.00±0.10	317±16	320±11	182±18	6.2±0.71	9.3±0.19	8.6±0.28	390±87
0.005	308±6	3.07±0.08	311±8	322±4	158±10	6.3±0.47	9.9±0.24	7.9±0.64	394±35
0.020	302±9	3.11±0.06	308±18	306±16	166±14	5.3±0.40	8.8±0.63	8.1±0.80	361±24
0.320	296±14	3.32±0.74	317±13	321±15	153±10	5.4±0.58	9.2±1.13	8.1±0.74	333±11

Table 10. Absolute organ weights of rats fed diets containing BHT for 1 year

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Thyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	1,558±24	19.0±0.97	1,705±77	1,679±72	869±50	21.7±1.0	25.8±0.6	24.5±0.6	1,207±42
0.005	1,598±39	20.1±0.60	1,834±110	1,777±97	842±36	17.2±1.7	23.1±1.5	21.9±1.3	1,430±147
0.020	1,553±47	19.0±0.92	1,752±54	1,760±74	829±49	17.2±1.9	24.2±1.9	22.6±1.8	1,161±119
0.320	1,643±140	26.4±3.42	2,221±340	2,148±443	834±73	26.0±1.9	33.2±8.5	30.7±7.2	1,553±254
Female									
0	902±43	10.1±0.87	954±64	987±45	517±70	23.1±2.1	29.3±3.2	27.5±2.8	957±72
0.005	1,078±111	11.6±1.29	1,102±105	1,139±117	539±26	16.9±1.8	29.7±1.7	26.5±1.9	998±83
0.020	1,024±50	11.4±0.59	1,082±74	1,051±53	551±42	18.3±0.7	27.1±2.1	26.1±1.6	1,032±46
0.320	947±63	11.8±1.39	1,065±85	1,081±66	540±34	19.7±1.4	31.0±2.1	27.5±2.9	922±31

Table 11. Relative organ weights of rats fed diets containing BHT for 1 year

Sex and(%) Dose levels	Heart mg/100g	Liver g/100g	Kidney(L) mg/100g	Kidney(R) mg/100g	Spleen mg/100g	Thyroid mg/100g	Adrenal(L) mg/100g	Adrenal(R) mg/100g	Caecum mg/100g
Male									
0	222±5	2.69±0.09	242±9	283±11	123±8	3.1±0.16	3.6±0.17	3.4±0.18	172±10
0.005	224±4	2.83±0.09	257±17	250±13	118±5	2.4±0.29	3.2±0.13	3.0±0.11	200±18
0.020	223±1	02.71±0.06	253±19	254±21	120±11	2.4±0.26	3.4±0.35	3.2±0.30	166±18
0.320	235±22	3.73±0.67	317±71	307±67	117±3	3.7±0.17*	4.8±1.32	4.4±1.13	232±38
Female									
0	242±28	2.64±0.11	256±28	265±27	135±13	6.0±0.44	7.9±1.51	7.4±1.25	254±22
0.005	259±5	2.77±0.06	266±8	274±8	134±12	4.1±0.34**	7.3±0.56	6.4±0.35	243±17
0.020	248±6	2.76±0.04	261±4	255±4	133±6	4.5±0.47	6.8±1.03	6.4±0.60	252±17
0.320	262±10	3.21±0.17*	294±16	300±15	150±8	5.5±0.44	8.6±0.63	7.4±0.25	262±30

績を総合して顕著な変化が認められたものはなかったが，肝臓は対照群に比較して増加する傾向があった．とくに6ヶ月処理時の雌においては投与量の増加とともに肝臓の絶対重量ならびに体重比重量の増加が認められた（0.320%投与群は$P<0.05$）．その他，甲状腺，副腎（左），腎臓（左），盲腸において絶対重量あるいは体重比重量が推計学的に有意な増減を示すものが散見されたが，BHTの投与量との関連を示すものは認められなかった．

総括ならびに考案

油脂等の酸化防止剤，ゴム，プラスチックの安定剤として広く使用されているBHTを飼料に添加し，長期間（18ヶ月現在）にわたって自由に摂取させ，その安全性について検討した．

投与量は，これまでの著者らのBHTに関する実験より，0.0125%において体重増加の抑制を認める例[4]があったので，最大無作用量は，さらに低い0.005%と推定し，公比を4とし0.020%，0.320%にした．実験は生後4週令のラット（SD—JCL系）を買入し，1週間予備飼育を行い，異状のものは除去し，試験期間毎に各群ラットをランダムに配置した．

体重の増加はTable 1., 2., Fig. 1., 2. に示した如く対照群との間に顕著な差異は認められないが，雌雄とも投与群の方が体重が増加する傾向が見られ，安全性との関係については今後の検討点の一つと考えている．飼料摂取量，飼料コボシ量は，いづれも対照群に比してほとんど差異が認められなかった．このことは体重の増加傾向が飼料摂取量によるものではないと考えられる．

試料摂取量はTable 2. の右から2番目のカラムに示した如くであるが，BHT0.005%投与群の体重1日当りの摂取量は，雄2.26mg，雌2.69mgであった．これは科学技術庁の調査報告[2]によれば，調査対象の中に体重1日kg当り2.22mg（体重を50kgとすると）に相当する人がおり，ほぼ同量であった，このため．BHT0.005%投与群はBHTの安全性について検討する上からいって非常に意義深い投与量であるといえる．

実験中死亡するものが多数あったが，死因は下垂体腫瘍，乳腺腫瘍が多く，これらは自然発生率の高いものといわれているものだけに今後慎重に検討を加えていきたいと考えている．また，コボシ測定用の沪紙を桃色に染めたのが12ヶ月目になってはじめて認められたが，これは使用したラットの系統差によるもの考えられる（Wistar—JCL系では投与後4日位で認められた[3]）．

血液学検査においては，全体的に著変を示すものはなかったが，投与群において，白血球数がとくに雌において対照群に比較して減少する傾向が見られ，一考を要するものと考えられる．

血清生化学検査においては，成績を総合して顕著な変化を認めるものはなかったが，6ヶ月処理時の雌において投与量の増加とともにコレステロール量が増加する傾向がみられ，他の処理時においても全体的に対照群に比較して投与群においてコレステロール量が増加する傾向が認められた．Frawley[9]らのBHTのcholesterol のacetate からの生合成促進作用を有するという報告よりこの血清コレスロールの増加は，コレステロールの長期間による生合成の促進の結果と考えることができよう．

尿検査では，顕著な変化は認めなかったが，12ヶ月処理時に，投与群においてのみ潜血反応を呈するものが散見されたが，これはこれまで著者ら[4,5]が報告した様にBHTの腎臓に対する作用に関連があることが推定される．

剖検所見では，途中死亡例では下垂体腫瘍，乳腺腫瘍，睾丸出血等が主なもので，処理時屠殺例では，12ヶ月目処理高濃度投与群に腎に変化がみられた以外は対照群と差異がなかった．この腎臓の変化はこれまでの著者らの報告[4,5]でも同様で，今後は注目して検討を加えて行きたいと考えている．

臓器重量の変化で興味ありと考えられたのは肝臓で，これまでにも多数の研究者によりBHTの肝臓重量増加は指摘されてきたが，とくに6ヶ月処理時の雌においてDose-response が見られ，同時に血清コレステロールの増加も平行して認められたことから，肝機能に対する作用との関連で興味深い．

BHT0.005%投与群の体重1日当りの摂取量は雄2.26，雌2.69mgで科学技術庁の調査報告によれば調査対象中の最高値がであることから，現実の問題として今後慎重に検討して行きたいと考えている．

文　献

1) Six Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1962

2) 科学技術庁資源調査会：食品添加物の現状と問題点，1970

3) 平賀興吾，林田志信，市川久次，米山允子，藤井孝，池田虎雄，矢野範男：東京衛研年報，**22**，231，1971

4) 市川久次，林田志信，米山允子，藤井孝，小林博義，坂本義光，池田虎雄，矢野範男，紺野敏秀，平賀興吾：東京衛研年報，**23**，345，1972

5) 米山允子，柴英子，藤井孝，伊川三枝子，市川久次，坂本義光，矢野範男，小林博義，平賀興吾：

東京衛研年報，24，449，1973
6） 平賀興吾，柴英子，藤井孝，米山允子，坂本義光，伊川三枝子，市川久次，矢野範男：東京衛研年報，25，631，1974
7） 福森信隆，水尾昭江，市川久次，小林博義，平賀興吾：東京衛研年報，25，557，1974
8） 中川好男，福田向江，市川久次，藤井孝，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，68，1974
9） Frawley, J.P., Kohn, F.E., Kay, J.H. and Calandra, J.C.：*Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 377, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 16-21, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）のラット肝におよぼす影響

坂本義光* 中川好男* 藤井　孝*
福森信隆* 平賀輿吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Liver of Rats

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, YOSHIO NAKAGAWA*, TAKASHI FUJII*,
NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

The sex difference in the effects of BHT on the liver of rats was observed. Male and female rats, 5-week-old, were fed BHT at 1.5% in the diets for 1 week and 4 weeks. Body weight increase in male was more depressed than in female with the duration of feeding. Liver absolute weights increased in female more than in male when they were compared with each control. Although the values of relative weights were equal in male and female rats. Liver weights increase by BHT depended upon body weight and concentration of BHT, regardless of duration of feeding.

The property in liver growth that liver weight increases with body weight was observed in BHT feeding rats similarly to control.

In histological, serum biochemical and histochemical observation, a small difference was found in both sex. The significance of the finding about the liver weight increase was discussed in relation to the effect of BHT on the liver. It was suggested that the specific damage to the liver was not particularly induced by BHT.

緒　言

食品添加物のうち油脂等の抗酸化剤として広く使用されているジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）の毒性については，当部でも界面活性剤ＡＢＳ，ＬＡＳとの併用，またはＢＨＴ単独で雄ラットに出血傾向を起すことを既に報告した.[1-3] その他，従来よりＢＨＴにはラットなどで肝重量を増加させる性質のあることが知られている.[4-7] この肝重量の増加に関しては，フェノバルビタールなどと同様に，脂溶性の高いＢＨＴでは，肝重量の増加に伴って粗面小胞体の増加，薬物代謝酵素系の誘導が起り，その場合，特に肝臓自体の組織的な障害は起らないとされている.[4,5,8-10] このような実験では，雌ラットが使用される場合が多く，雌雄で比較して論じた報告は少ない．ある種の薬物に対するラットの反応性には，雌雄で差があり，これが肝における薬物の代謝能の差[11]によることが知られているが，本実験では，ＢＨＴの肝への影響の表われ方について，雌雄ラットを用いて，一般毒性試験の結果から検討した．さらに食品添加物を含めて種々の薬物の毒性試験を行なった場合，体重及び肝重量の変動が主な結果として得られる場合も少なくないが，体重と肝重量の変動を雌雄で比較することによって，ＢＨＴによる肝重量の増加の性質について，重量面から考察を加え，今後の毒性試験結果を検討するうえでの参考にしたいと考えた．

実験材料および実験方法

動物は４週令の体重65ｇ前後のＳＬＣ－ＳＤ系ラット雌雄を用い，１週間飼育後，ＢＨＴを1.5％の濃度で飼料へ混合し，固型化したものを摂取させた．摂取１週間および４週間後に，各々断頭，放血屠殺し，下記の諸項について，検査を行なった。また対照群は日本クレア製の飼育用固型飼料（ＣＥ-2）を摂取させ，対照群，ＢＨＴ摂取群とも実験期間中水道水を自由に摂取させ，室温25°Ｃ±1°Ｃ，湿度50％±5％，照明時間午前９時から，午後５時までとした環境下の一般飼育室にて飼育観察

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

し，体重は毎日測定した．なお動物は，雄の1週間摂取群のみ5匹を用い，その他は各群10匹を用いた．

①血清生化学検査

放血の際に得た血液から定法[12]によって調製した血清を，自動分析装置（Hitachi M-400 Automatic Analyther）を用いて以下の成分について測定した．a）アルカリホスファターゼ活性（ＡＬＰ）—Kind-King 変法，b）トランスアミナーゼ活性（ＧＰＴおよびＧＯＴ）—Reitman-Frankel 変法．

②酵素組織学検査（肝ＡＬＰの検出）

2×5×5㎜大に細切した肝臓を10%ホルモールカルシュウム液[13]（pH7.2～7.3）中，4°Cで1晩固定した後，クリオスタット切片を作製し，Burstone-Watanabe 変法[14]によって，組織のＡＬＰ活性を検出した．

③病理組織学検査

摘出した肝臓は，直ちに重量を測定後，Lillie の緩衝ホルマリン液で固定し，ＨＥ染色，および脂肪染色を行なった．

実験結果

1） 体重および肝重量

体重（Fig. 1）は，雌雄で増加の抑制を示し，その程

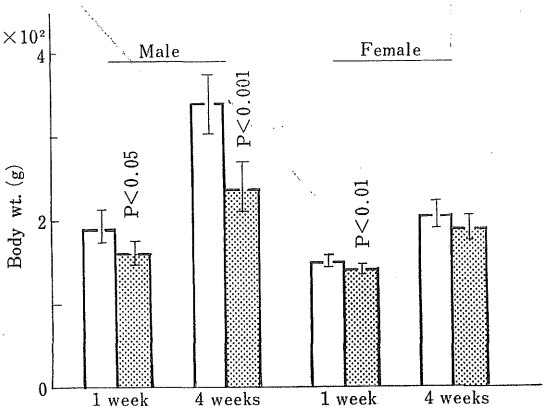


Fig.1 Effects of BHT on Body weights

: control : BHT : mean±SD

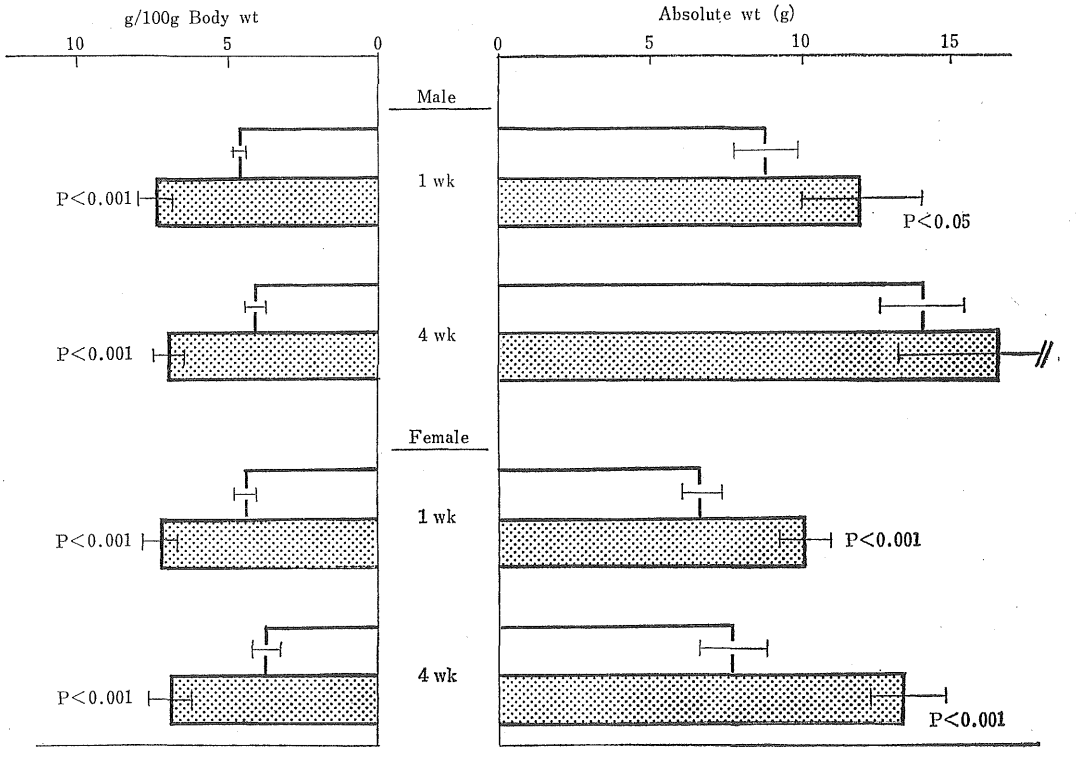


Fig.2 Effect of BHT on liver weight

: control : BHT mean±SD

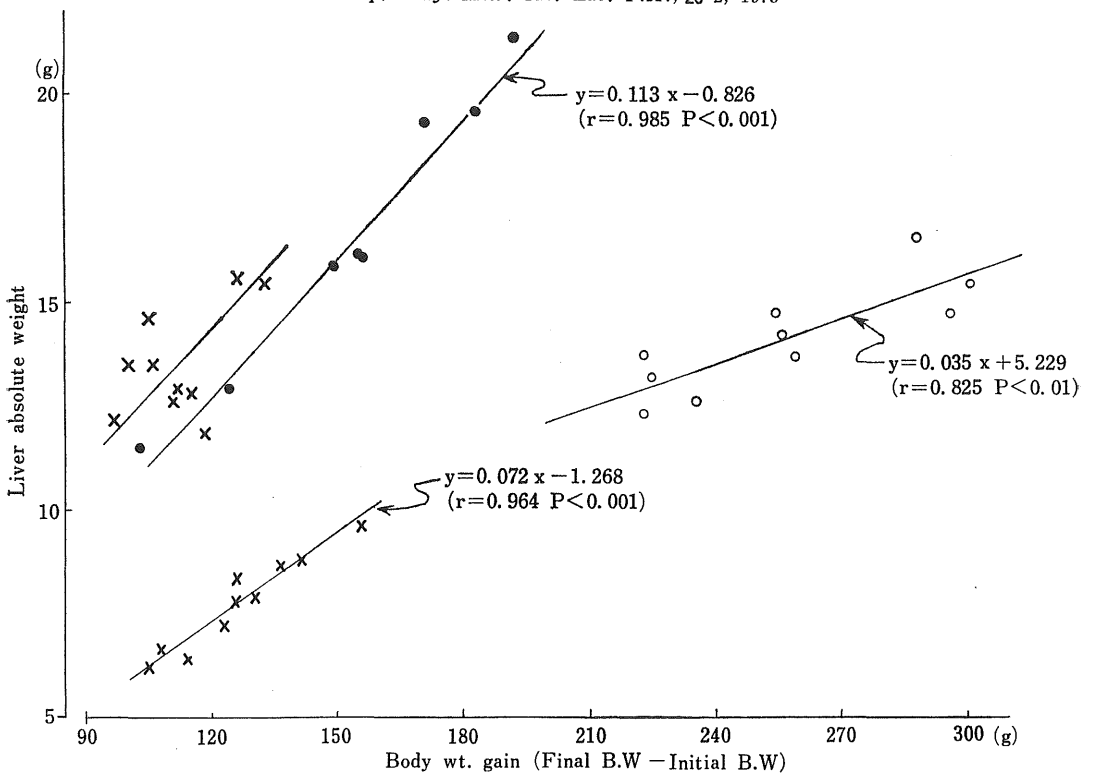


Fig. 3 Regression of liver absolute weights and body weights gain of rats fed BHT for 4 weeks. ○: male, ×: female (control),. ●: male, ✕: female (BHT)

度は雄では，摂取1週間に比べ4週間でより顕著であったのに対して，雌では1,4週間とも雄に比べて，その抑制の程度は小さく，4週間では対照と有意な差はみられず，体重の増加抑制は雄に強かった．

肝重量（Fig. 2）は，雌雄とも摂取1週間では，有意な増加を示し，4週間では雌でより著明な増加を示したのに対し，雄では対照群と有意な差はみられなかった．また体重比は，雌雄とも対照に比べ大きく，摂取群における雌雄の各値を比較すると，摂取期間に関係なくほぼ一致していた．

4週間摂取群の体重増加量と肝重量を，雌雄の各個体についてプロットすると，Fig. 3 に示したように，摂取によっても，体重増加量の大きい個体は肝重量も大きいという関係は，対照群と同様であるが，BHT摂取群では対照群に比べ，体重増加に対する肝重量の増加の割合が大きかった．

2) 血清生化学検査

Fig. 4 に示したように，摂取1週間の雌ではALP，GPT，GOTのすべてが，有意な活性の上昇を示したのに対し，雄ではGPTのみが有意に上昇し，他はその傾向を示した．また4週間では，雌雄ともALP，GPT活性は，対照群と比べ有意な上昇を示したが，その程度は1週間に比べ低く，また雄に比べ雌でより低かった．GOTは，雌雄とも対照群と差がみられなかった．

3) 酵素組織学検査

Table 1 に示したように，摂取1週間では，毛細胆管のALP活性の増加が，Rappaport の acinus 第1ゾーンから第2ゾーンにかけて認められ，その活性の在在する範囲は雄で広かった．また4週間では雌で活性が全く認められなかったが，雄では軽度の活性が，対照と比べ，第1ゾーンを中心にやや広い範囲に認められた．また雄では，対照群でも，第1ゾーンにわずかに活性の存在が認められた．

4) 病理組織学的所見

Table 2 に示したように肝では雌雄ともに，肝細胞の腫脹と細胞質の空胞化が認められ，腫脹は小葉の中間帯から門脈周囲野にかけてみられ，雌では摂取期間に比例してやや程度が強くなる傾向がみられたが，雄では顕著ではなかった．また雄では腫脹に伴って核周囲には好塩基性物質が見られなくなり，細胞質は微細顆粒状となっ

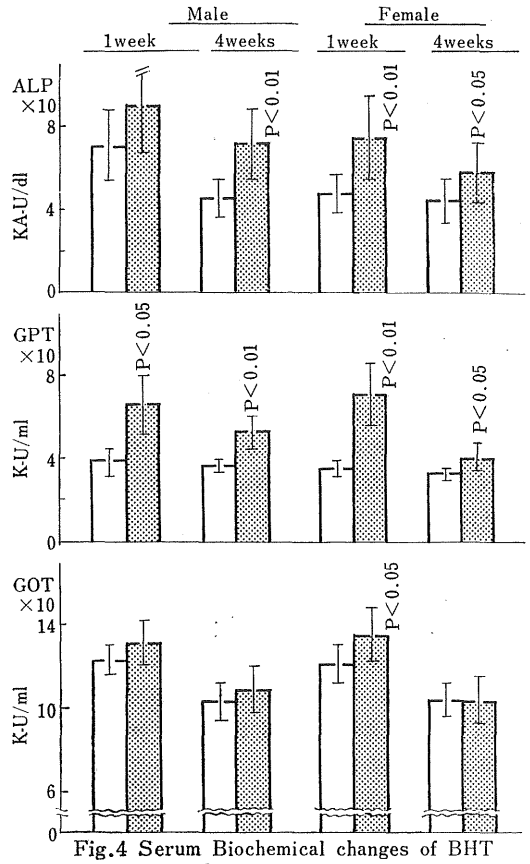


Fig.4 Serum Biochemical changes of BHT treated rats

Table 1 ALP activity of bile canaliculi

Sex		group →	1wK-C*	1wK-T**	4wK-C	4wK-T
		→ ↓*	3	4	3	4
Male	I		±±±	++++	+±±	±+++
	II		−−−	++++	±−−	−±±−
	III		−−−	+±−+	±−−	−−−−
Female	I		±−−	+±++	−−−	−±−−
	II		−−−	−−+±	−−−	−−−−
	III		−−−	−−±−	−−−	−−−−

* : control ** : BHT *** : No. of preparations
**** : Zone of Rappaport's lobular units

て明調化し，細胞膜に沿った部分にのみ好塩基，好酸性の細胞質が見られるような像を呈したが，雌ではそれ程明らかではなかった．空胞化は小葉中心部に見られ，これとともに細胞質は好酸性を増し，やや均質化して細胞の大きさも減じており，これは雄で顕著であったが雌では一部小葉に軽度に見られる程度であった．

考　察

ＢＨＴによって肝重量の増加を報告した文献は多く，Gilbert[4] らによれば，雌ラットにＢＨＴを毎日投与した場合，１週間以内に肝重量の増加及び薬物代謝酵素系の誘導を起す最低必要量は 25～75mg/kg であり，また 500mg/kg では，２～３日で重量増加が起るとしている．また Gaunt ら[5] は雌雄ラットに 0.1％添加飼料を16週間摂取させた場合，いずれも体重比重量の増加を認めているが，体重の増加抑制は示されていない．本実験では，体

Table 2 Summary of microscopic changes in liver cell

Microscopic changes	Sex →	Male				Female			
	Group →	1wK-C	1wK-T	4wK-C	4wK-T	1wK-C	1wK-T	4wK-C	4wK-T
	↓** * →	5	5	7	9	9	9	8	8
Swelling	SL	0	3	0	3	0	1	0	1
	MO	0	2	0	2	0	3	0	2
	SE	0	0	0	0	0	0	0	1
Aggregation of basoplasm	SL	0	1	0	1	0	3	0	4
	MO	0	4	0	8	0	1	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolation	SL	0	4	0	3	0	0	0	0
	MO	0	0	0	3	0	0	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0

* SL : Slight MO : Moderate SE : Severe
** No. of preparation

重の増加抑制がみられたが，当部で行った0.0125, 0.05 0.2, 0.8% BHT添加飼料による26週間摂取実験[7]では，肝重量はBHT濃度に比例して増加するが，0.8%では体重の増加が抑制され，さらに0.05, 0.15, 0.45, 1.35%，16週間摂取実験[6]でも，BHT濃度に比例して肝重量の増加がみられるが，1.35%では体重の減少が示されている．このように，BHT濃度の増加に伴い，肝重量は増加するが，体重は増加抑制または減少の傾向を示している．しかし，いずれも雌雄で，肝重量の変動に関して比較して論じられていない．

本実験では，雄で，体重の増加抑制が顕著で，それに伴い，絶対重量の増加の程度は雌に比べ小さかったが，体重比で比較した場合，雌雄の各値は等しかった。前述した亜急性実験においても，各濃度における雌雄の値は等しく，肝重量は雌雄の各々の体重に比例して増加しており，重量面から比較した場合，肝の影響の受け方には差がないように思われた．また体重比は，摂取期間に関係なく一定であり，前述したGaunt ら[5]の実験においても，摂取期間に伴う体重比の増加は示されていない．以上の事実は，少なくとも成長期の初期よりBHTが負荷された場合，BHTによる肝重量の増加のしかたが，雌雄に関係なく，その時点での体重およびBHT量によって決まり，またBHTの負荷が継続しても，同一濃度であれば，体重比は増加することがないことを示している．

正常動物において，肝臓は，心臓，腎臓などと同様，体重比で表わすと，群としてのバラツキが，絶対重量の場合に比べ小さくなり，その個体の大きさをよく表わす臓器である．

さらに重量増加の推移の傾向は，体重に比例的で，雌雄の体重比の推移は一致し，肝重量の増加は，雌雄に関係なく，体重に規定されていることを示している．[15,16]

BHTによる肝重量の増加の場合，体重増加に対する肝重量の増加の割合は，対照と比べ大きいが，正常動物にみられる，肝重量が体重に伴って増加するという基本的な性質は乱されていないと思われた．

本実験において，BHTによる肝の組織変化としては，多くの報告にあるように，主に肝細胞の腫脹が雌雄に共通して認められた．その他，雄で肝細胞の空胞化が顕著であったが，すでに報告した，1.5%BHT添加飼料摂取実験[2]では，雄で出血傾向がおこり，この変化との二次的な関連も考えられることから，BHTの直接的な肝への作用の結果かどうかは疑問の点が多い．また前述した亜急性試験[6,7]においても，出血傾向はみられず，濃度に比例して腫脹がみられる他は，特にその他の変化はみられていない．

血清の酵素活性の上昇および毛細胆管のALP活性の増加は，急性的な肝の変化を反映したものと思われるが，Leelingら[17]は，ある種の血管拡張剤により，肝の体重比重量の増加および薬物代謝酵素系の誘導がおこるが，特に肝に組織的な障害を起さない場合でも，肝由来の血清活性が上昇することを報告している．本実験の結果も，主に肝細胞の腫脹に伴ったものであると考えられる．

毛細胆管ALPは，血清ALPの上昇に反映していると思われるが，その活性の増加の機転に関しては，さらに詳細な研究にまちたい．

組織像，血清生化学及び組織化学検査結果には，いずれも雌雄で程度の差がみられたが，これがどのような意味をもつかは，考察できなかったが，特に異質な差はないと思われる．

今回，BHTの代謝に関して検討していないが，Tyeら[18]は，^{14}C-BHT を経口投与し，放射能の尿中への排泄される割合が雌で多く，また諸臓器および体脂肪中への蓄積量も雌で多いことを報告している．また Gilbertら[4]も 500mg/kg を投与すると2～3日以内に体脂肪中のBHT量が最高に達し，雌で多いが，薬物代謝酵素系の誘導に伴い減少し，さらにBHTを連続して投与しても，体脂肪中のBHT量は，雌雄ともほぼ等しい値に一定に保たれることを報告している．またBHT投与時に誘導される薬物代謝酵素系の活性の程度は，雌で強く，肝における代謝能には，一部では雌雄で差があると思われるが，BHTの蓄積量が一定に保たれることに関しては，雌雄で同様の傾向であって，BHTが同一濃度の場合，体重比が摂取期間に伴って増加しないという事実として，肝におけるBHTの代謝という機能の重量面への反映と思われる．

今回，BHTに対する肝の影響の受け方について，雌雄ラットを用いて比較したが，肝重量の増加のしかたについて示したように，BHT摂取によっても，肝重量が対照動物と同様に雌雄に関係なく，体重に伴って増加するという性質を保っていることは，BHTに対する肝の反応は，雌雄で本質的な差はなく，BHTは肝重量を増加させるが，特に肝障害を起さないという性質を示唆するものと考え，今後BHTの長期の摂取試験[19]，及び他の肝重量を増加させる薬物の結果と合せ，肝重量の増加の性質についてさらに検討を加えたい．

総　括

5週令の雌雄のラットを用い，BHT1.5% 添加飼料を1週間および4週間摂取させ，BHTのラット肝にお

よぼす影響の性差について観察した.

1) 体重はBHT摂取によって増加の抑制がみられ，雄では摂取期間に伴って顕著であったが雌ではその程度は小さかった.

2) 肝重量は増加し，絶対重量では，その増加の程度は雌で大きかったが，体重比で比較した場合，雌雄の値は，摂取期間に関係なくほぼ一致した．またBHTによる肝重量の増加のしかたは体重の増加に伴っていた.

3) 肝の組織変化は雌雄に共通して，主に肝細胞の腫脹と，細胞質の空胞化であった．摂取期間に伴って，腫脹の程度は雌で強く，また空胞化は雄で強くみられた.

4) 血清 ALP, GPT, GOT 活性は，肝の変化を反映して上昇した．その程度は1週間では雌で強く，4週間では，1週間に比べ雌雄ともに低下し，雌でより早く正常域に下る傾向を示した.

5) 毛細胆管ALPの活性は1週間で，小葉周辺部から中間帯にかけて顕著な増加がみられ，その程度は雄で強まった．4週間では，雌雄ともに活性は減少し，雌では全く認められなかった.

6) BHTによる肝重量の変動に関して得られた知見から，BHTの肝における作用について考察を加えた.

（本研究の概要は日本薬理学会第52回関東部会昭和50年6月7日で発表した）

文　献

1) 米山允子他：東京衛研年報，**24**，449，1972
2) 福森信隆他：東京衛研年報，**25**，609，1974
3) 平賀興吾他：東京衛研年報，**25**，631，1974
4) Gilbert, D. and Golberg, L.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 417, 1965
5) Gaunt, I.F., Feuer, G., Fairweather, F.A. and Gilbert, D.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 433, 1965
6) 平賀興吾他：東京衛研年報，**22**，231，1970
7) 市川久次他：東京衛研年報，**23**，345，1971
8) Kerr, R., Lefevre, A., Lane, B. and Lieber, C.S., : *Clin. Res.*, **14**, 299, 1966
9) Lane B.P. and Lieber, C.S., : *Lab. Invest.*, **16**, 342, 1967
10) Botham, C.M., *et al.*: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **8**, 1, 1970
11) 佐藤　了：薬物代謝，97，1973，講談社
12) 中川好男，福田向江，柴　英子，平賀興吾：東京衛研年報，**25**，599，1974
13) 鈴木　裕：臨床検査，**17**，133，1971
14) 渡辺慶一，鈴木　裕：モダンメデイア，**17**，149，1971
15) 坂本義光他：東京衛研年報，**25**，577，1974
16) Benitz. K.F., Moraski, R.M., and Cummings, J.R., : *Lab. Invest.*, **10**, 934, 1961
17) Leeling, J.L., *et al.*: *Toxicology*, **4**, 223, 1975
18) Tye, R., Engel, J.D. and Rapien, I.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 547, 1965
19) 市川久次他：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 22-30, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）によるラット肝実質細胞への影響に関する電子顕微鏡的研究

福森信隆* 三栗谷久敏* 平賀興吾*

Ultrastructural Changes of Rat Hepatocytes treated with Butylated Hydroxytoluene (BHT)

NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

Hepatic fine structural changes in the Sprague-Dawley rats were observed after the administration of butylated hydroxytoluene (BHT) used as an antioxidant for short and long periods. After BHT medication (250mg/kg, PO, twice a day) for 2 days, the early changes were showed slight swelling and an increase in number of mitotic figures of hepatocytes histologically. Ultrastructurally, slight proliferation of vesicular smooth endoplasmic reticulum (SER) and well-defined nucleolonemata surrounded by chromatin were observed. For 6 days, the remarkable changes in the swollen cells included proliferation of tubular SER, well-developed Golgi body, the appearance of small myelin figures. In addition, anomalous mitochondria was surround by rough endoplasmic reticulum (RER). Ultracytochemically, glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activity was still positive in SER for 2 days, but G-6-Pase activity was rather weak accompanying proliferation of SER gradually. In the prolonged feeding of BHT (12 months), the marked alterations were generally undetectable except for slight proliferation of SER, irregularly outlined nucleus on food containing 0.005%, 0.02% BHT. On the other hand, in the feeding of 0.32% BHT, abnormal proliferated SER formed the networks of the tubules and the continuity between SER and RER were seen. And then an increase in number of secondary lysosomes in the vicinity of flat microvilli in bile canaliculus, the development of myelin figures among the networks of proliferated SER were observed. Myelin figures appeared to be adjacent to microbody, multivesicular body. It may be that proliferation of SER, enlarged nucleus and nucleolus induced by BHT bring about the changes of other organelles indirectly, the enlargement of liver.

緒　　言

酸化防止剤ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は，食品添加物として油脂，魚介製品等に使用が許可されている．肝臓に及ぼす影響として，肝重量の増加が知られており，肝組織に何ら障害を与えない適応性増加であると認識されている．[1] また生化学的には，aminopyrine-demethylase，チトクロームP-450の薬物代謝酵素を誘導せしめる報告[2]があり，肝機能亢進と解されている．主にグルクロン酸，硫酸抱合体として尿中に排泄される．[3]

今回，脂溶性が高いBHTの主要な薬物代謝の場である肝実質細胞に及ぼす微細構造変化について短期，長期投与で比較観察した．また，短期については電顕組織化学的に glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 活性の局在についても検索したので報告する．

実験材料および実験方法

1. 短期投与実験

動物は Sprague-Dawley 系雄ラットを使用し，1週

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

間予備飼育後，生後5週齢からＢＨＴ（和光純薬製，Lot. No ACL5024）250mg/kg をオリーブ油（和光純薬製）溶液として，午前9時，午後4時の1日2回経口投与した．飼育は日本クレア製の飼育用固型飼料（ＣＥ-2）を用い，水道水を自由に摂取できるようにし，室温25°±1°，湿度50％±5％環境下の一般飼育室にて行った．ＢＨＴ投与は2日，4日，6日間とし，各3匹ずつのラットから断頭屠殺放血後，肝方形葉左下端部を摘出細切し試料とした．対照は無処置動物を用い，一部オリーブ油投与動物も検査に供した．

試料は0.14M蔗糖を含む冷2％グルタールアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.2）で2時間，氷浴中で浸透前固定を行い，その後0.14M蔗糖加0.1Mリン酸緩衝液で洗浄し，一晩氷室中に放置した．後固定は冷 Caulfield 液[4]で1.5時間行い，エタノール脱水後，Epon 812-Araldyte M（Epon 812 12.5m*l*，Araldyte M 10.0m*l*，dodecenyl succinic anhydride 30.0m*l*，dibutyl-phthalate 1.0m*l*，DMP-30 0.9m*l*）に包埋した．包埋した電顕試料の厚さ1μの切片を toluidine-blue にて染色し光顕的に観察後，超薄切片は酢酸ウラニウム・鉛二重染色を施し，HU-12A型電子顕微鏡にて観察した．肝組織の電顕用試料摘出隣接部位をホルマリン固定，hematoxylin-eosin 染色を行い光顕用標本とし，電顕観察の参考とした．

G-6-Pase 活性は0.14M蔗糖加冷2％グルタールアルデヒド（0.1Mカコジル酸緩衝液，pH7.2）で30分間氷浴固定，一晩洗浄後，tissue sectioner でおよそ50μの切片を得，Wachstein-Meisel 液[5]で37°15分間 incubation を行った．

2. 長期投与実験

Sprague-Dawley 系雌雄ラットを用い，ＢＨＴを0.005％，0.02％，0.32％の各濃度で飼料へ混合し，固型化したものを12ヶ月間自由摂取させた（ＢＨＴ慢性毒性試験の12ヶ月飼育群）．電顕試料作製は包埋樹脂を DER-Epon 812法[6]を使用したほか前述の方法に準じた．

実験結果

1. 短期投与実験

光顕的所見：ＢＨＴ投与により肝小葉中間帯での肝細胞の腫脹を認めた．その程度は，2日間投与で細胞により異なるが極めて軽度であり，経時につれ遂次腫脹を示した．著明に膨化した細胞は核周囲の細胞質が eosin 淡染であり，好塩基性顆粒の membrane 側への移行傾向を認めた（Fig. 1）．中心帯，Glisson 氏鞘周辺では対照と比較して著変を認め難かった．

また，全期間中核が大きく肥大性の核小体を小葉全体にびまん性に認めたが，特に腫脹した肝細胞で著しかった．2日間投与で核分裂像の増加がみられたが（Fig. 1），4日間投与以後は明らかでなかった．

その他炎症性細胞浸潤，Kupffer 星細胞の数的および質的変化，胆管増生など著変を認めなかった．オリーブ油投与では若干胞体中に脂肪小滴の増加がみられたほか著変はなかった．

電顕的所見：微細構造変化は膨化した中間帯を除き小葉の各帯相互間で特異な差異を認めないが，個々の細胞の構造変化の程度に起因するところが多かった．

2日間投与では，滑面小胞体（ＳＥＲ）が細胞質の glycogen 野に軽度に増殖し，vesicle 状を呈した．また腫脹した細胞では organelles が membrane 側に偏在する傾向を示す像もみられ，それらは粗面小胞体（ＲＥＲ）の層状配列の乱れ，離開による小空胞の形成を伴っていた．核小体はよく発達し，nucleolonemata が明瞭となり周囲の chromatin の凝集がみられた（Fig. 2）．

4日間投与では，ＳＥＲの増殖がより顕著となり，Golgi 装置が発達し周囲に multivesicular body が散見された．

6日間投与で，ＳＥＲの増殖はやや tubule 状を呈し相互に連結する傾向を示した．また細胞質に膜で囲まれた小空胞がみられ内に膜様構造物を封入した空胞もあり，中には初期の myelin 様構造と思われる像も認められた．これらの小空胞の多くは ribosome を脱落した high density なＲＥＲと接していた（Fig. 3）．変化の軽微な肝細胞に於いては，糸粒体が程度の差こそあれ腫大，変形を呈し，ＲＥＲで囲繞される傾向が観察された（Fig. 4）．Golgi 装置も毛細胆管周囲でよく発達し，microbody の増加もやや認められた．

G-6-Pase 活性の局在は，肝実質細胞で RER，SER の槽内，核膜にその活性が認められ，主に増殖の著しいＳＥＲを小葉中間帯で検索した．2日間投与でＳＥＲの増殖に伴い活性は存在するが，以後4日，6日とＳＥＲの増殖が多くなると若干活性の低下が認められた（Fig. 5）．またＲＥＲでは大差を認めないが，やや活性の低下を示した．

2. 長期投与実験

雄：対照は脂肪小滴を小葉全体に認め，やや中間帯に多い印象を得た．Organelles の不明瞭な構造をもつ細胞もみられた．

0.005％ＢＨＴ添加飼料群では，核，核小体の発達の良い細胞がみられ，それらの細胞では馬蹄型を呈する Golgi 装置，high density な物質を包み込んだ Golgi

槽，multivesicular body を認めた．しかしながら，ＳＥＲの増殖，肝細胞の腫脹とも著明でなかった．また一部にＲＥＲの loop 状構造を呈する所見もみられた．

0.02％群では，ＳＥＲの増殖がわずかに多くほぼ0.005％群の所見と同様であるが，Golgi 装置の発達，loop 状のＲＥＲが多くみられる細胞もあった．また coated vesicle も散見され，不整な核輪郭を呈する核も観察された．しかしながら，0.005％，0.02％群とも多くの細胞はその程度においてほとんど対照に近い所見であった．

0.32％群では，増殖したＳＥＲが tubule 状で連絡する傾向を示し，その間の糸粒体は大小不同，長型くびれ像を呈し，そのいくつかに cristae の長軸に沿う層状配列を認めた．核の一部は不整な輪郭を持ち濃縮とも思われる像もみられた．また毛細胆管周囲の Golgi 装置に coated vesicle がみられ，secondary lysosome もやや増加していた．興味ある所見として，増殖したＳＥＲの間に脂肪滴を封入した層状の膜構造からなる小体を有する細胞もみられた．腫脹を伴う細胞も散見されたが，核分裂像の増加は認められなかった．その他ＢＨＴ摂取により細胞質の脂肪小滴が若干減少する傾向が観察された．

雌：全体に雄に比べ脂肪滴は少なかった．

0.005％群では，対照に比べ著変を認めずＳＥＲの増殖も極めて軽度であった．また多くはＲＥＲの層状配列に変化を認めないが，loop 状を呈した例もみられた．核膜の不整もわずかに観察された．

0.02％群で光顕的にやや肝細胞の腫脹がみられたが，好塩基性顆粒の移行はなかった．電顕的にＲＥＲの配列は比較的正常であり，増殖したＳＥＲは glycogen 野で連接網状構造を形成していた．核質の明調化を呈する核も稀に観察された．

0.32％群では，細胞の腫脹，好塩基性顆粒の細胞周囲への移行がみられたがその程度は著しくなかった．ＳＥＲの増殖は著明であり伸長した tubule 状を呈し相互に連結した網状構造をつくり，ＲＥＲとの移行像も認められた．中には ribosome を脱落したＲＥＲと区別が明瞭でないＳＥＲもみられた（Fig. 6）．ＳＥＲの増殖が著しい部でのＲＥＲは層状配列の乱れ，消失を認めるものもあり，脱落した ribosome が curling を呈する所見も観察された．また細胞質に軽度ではあるが myelin 様構造の増加がみられ，その多くは microbody と隣接している感を得た（Fig.7）．毛細胆管周囲の細胞質では secondary lysosome の増加がみられた例もあり，この部での microvilli に拡張を認めた（Fig. 8）．核はその形態から肥大したもの，萎縮性のものと混在していた．

ＢＨＴによる形態変化は肝実質細胞が主であり，胆管上皮細胞，Kupper 星細胞では明らかでなかった．肝実質細胞では，暗調細胞より明調細胞に変化の程度が強い感をうけた．しかしながら，糸粒体の集合は暗調細胞で多くみられた．Glycogen の変動は対照と比べ著変を認めなかった．

考　察

生体内に取り込まれた化学物質の多くは，吸収，代謝，排泄の過程を経て体外へ排出される．その主要な過程をしめる肝臓はいわゆる解毒の場であり，小胞体膜での電子伝達系による酸化反応，抱合体の生成をなし，その一連の反応による化学物質の質的，量的変化，速度が生体での薬理作用発現の一端を担っていることは疑う余地もない．特にＢＨＴなどの脂溶性物質は排泄されるために極性化への反応が必要となり，家兎での尿中への排泄はグルクロン酸抱合37.5％，硫酸抱合16.7％の報告もある．[3]

本実験は短期，長期投与で取り込まれた化学物質により惹起された肝実質細胞の初期変化およびその後次第に適応，修復された細胞形態の微細構造変化の動態を比較観察した．

ＢＨＴ投与によりＳＥＲの増殖が明らかであり，短期，長期とも曝露時間および用量に伴ってその増加は顕著であった．Lane[7]，Botham[8]らも同様にＳＥＲの増殖を報告しており，これらのＳＥＲの増殖はＳＥＲの機能である薬物代謝の亢進によるものと思われる．このことを裏づける生化学的報告で有吉ら[2]は aminopyrine demethylase，チトクロームＰ-450等の酵素活性の上昇を示している．一方，ＳＥＲの増殖は phenobarbital，3-methyl-cholanthrene，3-4-benzo-pyrene，DDT によっても惹起され[9]，phenobarbital は他の organelles の損傷を伴わず薬物代謝酵素活性を上昇させるため，ＳＥＲの適応性増加といわれている．[10] 食品添加物では dehydroacetic acid がＳＥＲの増殖を伴っている．[11]

ＢＨＴ投与によるＳＥＲの形態は投与初期で vesicle 状を呈していたが，次第に伸長し，tubule 状となり相互に連接する傾向を示した．特に0.32％長期飼育群の雌に著しく，ribosome を脱落したＲＥＲと区別が明らかでなく移行像もみられている．曝露時間，用量によるこのような形態の移行が何を意味するのか，ＳＥＲの増殖がどこから由来するのか明らかでなく適応によるものと思われるが，何れにしても機能的要求によるものであろう．

肝細胞の腫脹は，光顕的に小葉中間帯から先行して出現し，核周囲の細胞質内 organelles を membrane 側へ移行する印象を与えた．中間帯からの先行に関して，phenobarbital 投与時では中心帯の細胞変化が早期に起こるという報告[12]がある．

G-6-Pase は実質細胞に局在しており glucose 代謝に関与し，その活性の程度を検索することにより増殖したＳＥＲの機能を把握するものである．ＢＨＴ２日間投与で，酵素化学的活性は存在したが，それ以後若干活性の程度が低下していたことから，ＳＥＲでの酵素変動が関与していると思われる．Feuerら[13]の生化学的報告では，500mg/kg 7 日間でG-6-Pase活性の低下を認めている．しかしながら，ＳＥＲでの薬物代謝酵素は上昇することから，G-6-Pase と薬物代謝酵素の活性に差異があり，必ずしもＳＥＲの増殖に伴って酵素活性が変動するとは限らないと考えられる．また酵素組織的に，ＳＥＲの増殖を起こす 3′-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene は増殖につれ活性が多少低下しており，[14] phenobarbital では活性の局在に変動を与えない報告もある．[15]

電顕的には対応できなかったが，光顕的に短期２日間投与で核の分裂像が対照に比べ増加していた．この分裂像は正常な状態で稀であり，電顕的に観察された核小体の nucleolonemata の明瞭化は，正常な代謝期では分離しないで不明瞭であるが核分裂前期，核に障害が与えられた時明瞭化するといわれている．[16] 同様に Lane も分裂の増加を報告している．[17] しかし，長期投与の場合分裂像の増加が認められず，核小体の肥大のみ観察された．中には核萎縮と思われる像がみられたが，加齢の影響もありＢＨＴによる作用がどの程度か明らかでない．

一方，限界膜を有する小空胞は処々にみられた．短期投与では ribosome を持たないＲＥＲの膜が離開して，徐々に拡張し，中に myelin の初期像を認めるものも存在した．これらのＲＥＲは層状配列を失ない細胞質内に分散していた．投与後初期から認められた故，伸長したＳＥＲに由来しているとは思われない．藤井ら[17]は肝小葉中間帯での腫脹，細胞質中の好塩基性物質の凝集，小葉中心帯での空胞変性を光顕的組織所見で観察しており，電顕でのこれらの小空胞形成がその後の空胞変性に関与する可能性が推察される．このことは，高木[18]による空胞変性成立の第Ｉ型としてＲＥＲの平行構造の粗開，分散，内腔の拡大と表面のＲＮＡ顆粒の脱落，その後均一無構造な内容をもつ限界膜に囲まれた空胞構造への発達ということで説明されよう．長期投与では特に雌で，ＳＥＲの増殖部の小空胞に myelin 様構造物を封入しており，増加した microbody に近接する傾向がみられた．Phenobarbital 投与時，myelin 像は投与初期でみられず10日後に認められる報告[12]からも，ＳＥＲの増殖が一定限度に到達した時 myelin 像を形成すると思われる．いずれも膜の増生に関与するものと思われ，ＢＨＴの特異的変化ではないと考える．

Golgi 装置の機能は主に小胞体で産生された物質の濃縮，貯蔵，放出であり，ＳＥＲで合成された trigriceride を lipoprotein に生成したり，胆汁分泌[19]に関与するといわれている．ＢＨＴ投与で Golgi 装置の発達はこれら分泌が関係していると思われ，coated vesicle, multivesicular body もみられたこと，また毛細胆管周囲に異物を取り込んだ secondary lysosome の増加がみられたこと等から，Golgi 装置の発達は肝細胞内での物質移動の反映と推測される．

一方ＳＥＲの増殖から，trigriceride の生成が増加していると思われるが，細胞質内で脂肪小滴の減少傾向が認められたことは合成過程，物質放出の両面から考えて興味深い現象である．高橋はＢＨＴが肝組織で trigriceride の蓄積を阻害する報告[20]をしており，生化学的検索からも脂質代謝に対する影響が示唆される．

糸粒体のＲＥＲの囲繞は産生されたエネルギーを享受し易い位置関係の保持と思われ，膜の形成に必要な蛋白合成に何んらかの影響を及ぼしていると考えられる．最近，ＲＥＲ上の ribosome では分泌蛋白の合成とともに膜蛋白の合成も行なわれているといわれており，この点からもＳＥＲの増殖に関して今後さらに検討を要すると思われる．

ＢＨＴ投与により肝重量の増加がみられるが，これまで述べたことからこの増加はＳＥＲの機能的増殖を伴った肝細胞の腫脹に起因すると思われる．Gilbertら[21]は肝肥大がミクロゾーム酵素の上昇と関連あることを報告し，Lane[7]は細胞分裂による細胞数の増加にしては重量増加が顕著過ぎると推察している．事実，今回の実験からも核分裂像はＢＨＴ投与初期でのみ多く認められることからも肝重量増加は，細胞の数的増加より増殖したＳＥＲの膜成分および膨化に伴う容積成分によることが示唆される．しかし低用量では肝重量の有意な増加がみられない場合でも薬物代謝酵素系の活性が増加することも知られており，必ずしも断定は不可能である．

細胞病理学への電子顕微鏡の導入は，従来の光学顕微鏡レベルで認識が不可能とも思える organelles の形態変化，特に質的変化を把握すること，および化学物質の作用機序を解明するための初期変化の観察などに中心がおかれるが，組織全体を把握する事が困難である．今回

の実験でもＳＥＲの増殖は光顕レベルでその形態をとらえることが困難で eosin の均一淡染がみられるのに比べ，電顕的には種々の様相を呈している．ところが検索をより微細にすると，organelles の形態変化がその細胞あるいは組織に対してどのような意味を持つのか明らかでない場合が多い．またそれらの微細構造変化が光顕レベルでの変性に移行する過程の複雑な細胞調節機構，組織として機能を維持するための最低限の微細構造の保持，生理的に許容されうる変化の限界等不可解な問題を含んでいる．そのほか細胞間で微細構造の変化にかなりの程度の差がみられており，組織内で細胞相互間に homeostasis が働いていると思われる．今後，生化学的検索方法と密接な連絡が必要であろう．

終わりにＢＨＴによる肝細胞変化は，ＳＥＲの増殖と投与初期での核分裂の増加が主であり，他の organelles の変化，myelin 様構造物の出現，小空胞の形成はＳＥＲの増殖による二次的変化と思える．Botham ら[8]はＢＨＴ投与中止後，ＳＥＲの増殖が減少することを報告していることからも，形態変化はおそらく組織的に許容しうる範囲内での表現像と考えられる．しかしながら，ＢＨＴが生体の脂肪組織に蓄積されやすいことから考えて，その曝露時間の持続，用量によっては肝細胞に少なからぬ負担を及ぼす可能性もあり，機能的適応という面のみからこれらの形態変化を無視することは好ましくないと思われる．かような観点からも形態と機能とを合致させる考慮が望まれよう．

結　論

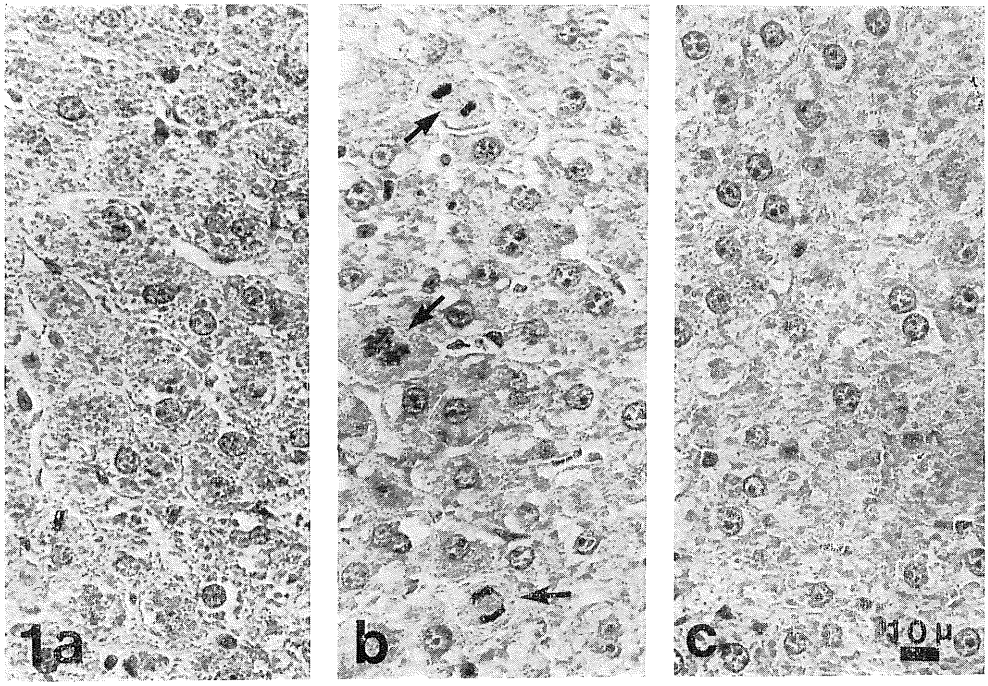
ＢＨＴがラット肝細胞に及ぼす微細構造変化を，短期，長期投与で比較観察した．肝細胞の腫脹，核，核小体の肥大が認められ，投与初期で核分裂像を観察した．電顕的にはＳＥＲの増殖があり，その形態は vesicle 状から遂次 tubule 状へ変動し，tubule 状のＳＥＲが連接網状構造を形成していた．その網状間には小空胞が散見され，myelin figures の封入もみられた．核小体の nucleolonemata は明瞭化し，その周囲に chromatin の附着が顕著であった．Golgi 装置の発達，multivesicular body，secondary lysosome の増加も軽度に認められた．短期投与での G-6-Pase 活性の局在は２日間投与で増殖したＳＥＲに存在していたが，その後若干ＳＥＲの増殖に伴い活性の低下を認めた．ＢＨＴは主にＳＥＲの増殖と核，核小体の肥大を惹起せしめ，これらの変化が実質細胞の腫脹，他の organelles の微細構造変化に影響を与えていることが示唆された．

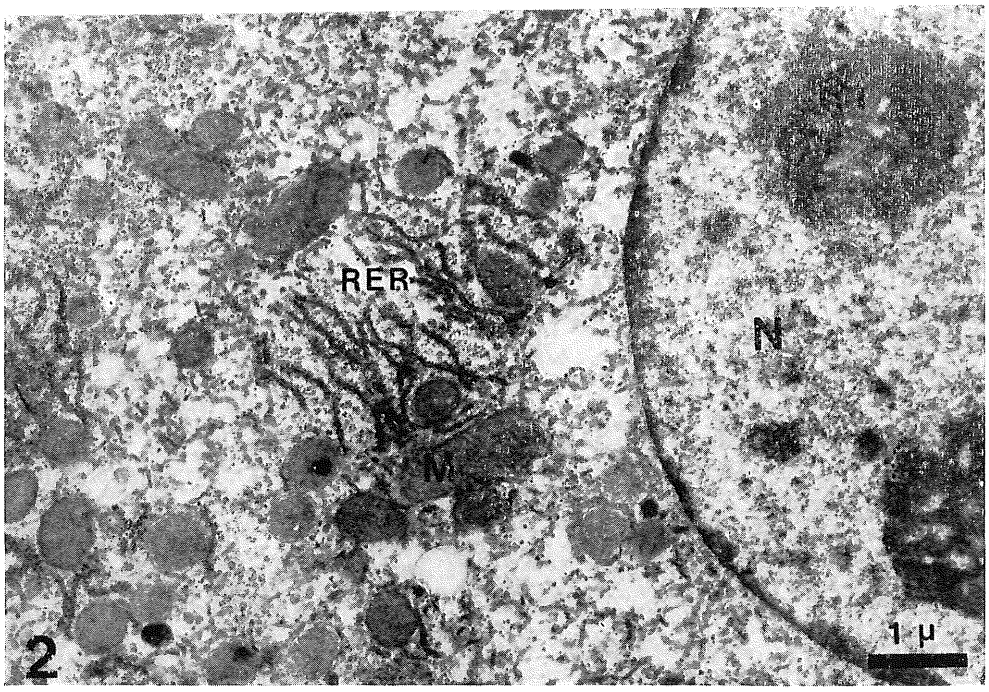
謝辞　長期投与実験の試料を提供していただきました当部ＢＨＴ慢性毒性試験グループの諸氏に深甚な感謝の意を表します．

（本研究の概要は電子顕微鏡学会第31回学術講演会1975年５月で発表した．）

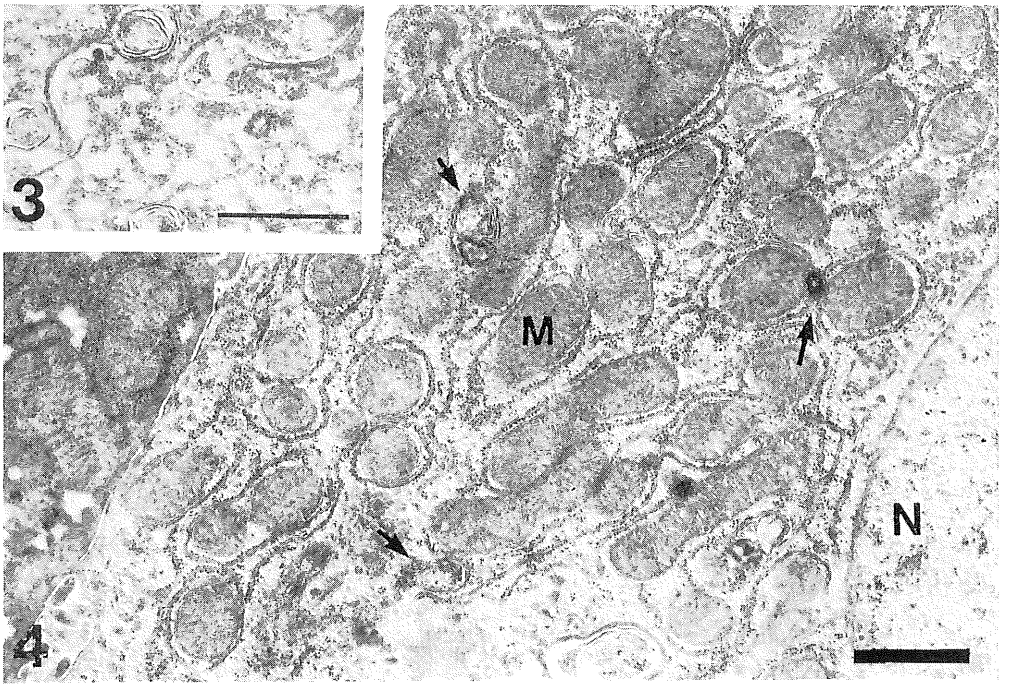
文　献

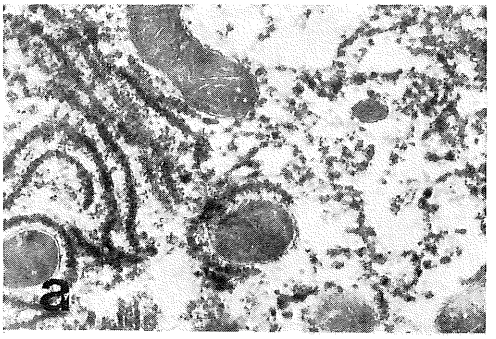
1) 高仲正他：食衛誌，10，260，1969
2) 有吉敏彦，高畠英伍：食衛誌，4，75，1973
3) Akagi, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 101, 1962
4) Caulfield, J.B.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 827, 1957
5) Wachstein, M. and Meisel, E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 592, 1956
6) Kushida, H.: *J. Electron Microscopy*, 16, 278, 1967
7) Lane, B.P. and Lieber, C.S.: *Lab. Invest.*, 16, 342, 1967
8) Botham, C.M., Conning, D.M., Hayes, J., Litchfield, M.H. and Mcelligott, T.F.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 1, 1970
9) Meldolesi, J.: *Biochem. Pharmac.*, 16, 125, 1967
10) Philips, M.J. and Dembitzer, H.M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 111, 87, 1963
11) 高畠英伍他：食衛誌，7，309，1966
12) Burger, P.C. and Herdson, P.B.: *Am. J. Path.*, 48, 793, 1966
13) Feuer, G., Golberg, L. and Pelley, J.R.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 235, 1965
14) 斉藤多久馬：関西医大誌，20，25，1968
15) Saito, T. and Ogawa, K.: *Okajimas Fol. anat. jap.*, 44, 11, 1967
16) 安澄権八郎：細胞，1，2，1969
17) 藤井孝他：東京衛研年報，25，609，1974
18) 高木文一：日病会誌，53，17，1964
19) 大北速男，堂野前崇：最新医学，20，710，1965
20) 高橋省：東京衛研年報，25，647，1974
21) Gilbert, D. and Golberg, L.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965

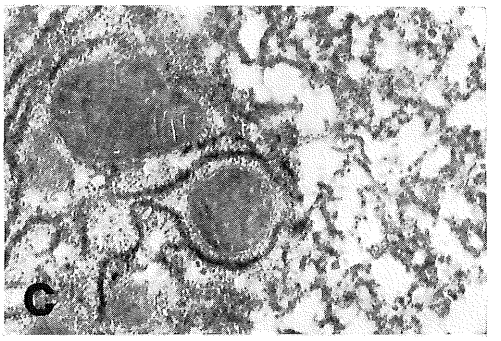

1a
b
c
10μ

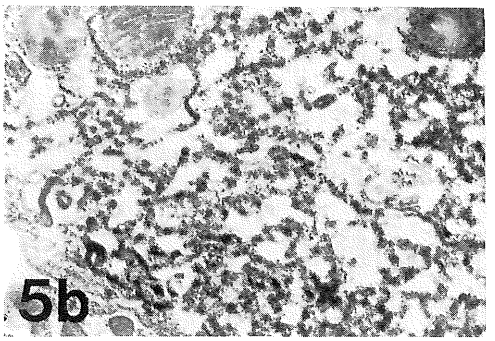

RER
N
M
2
1μ

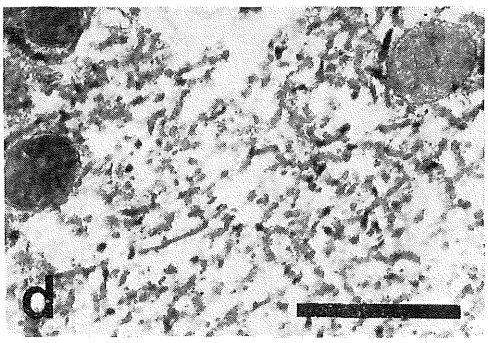
3

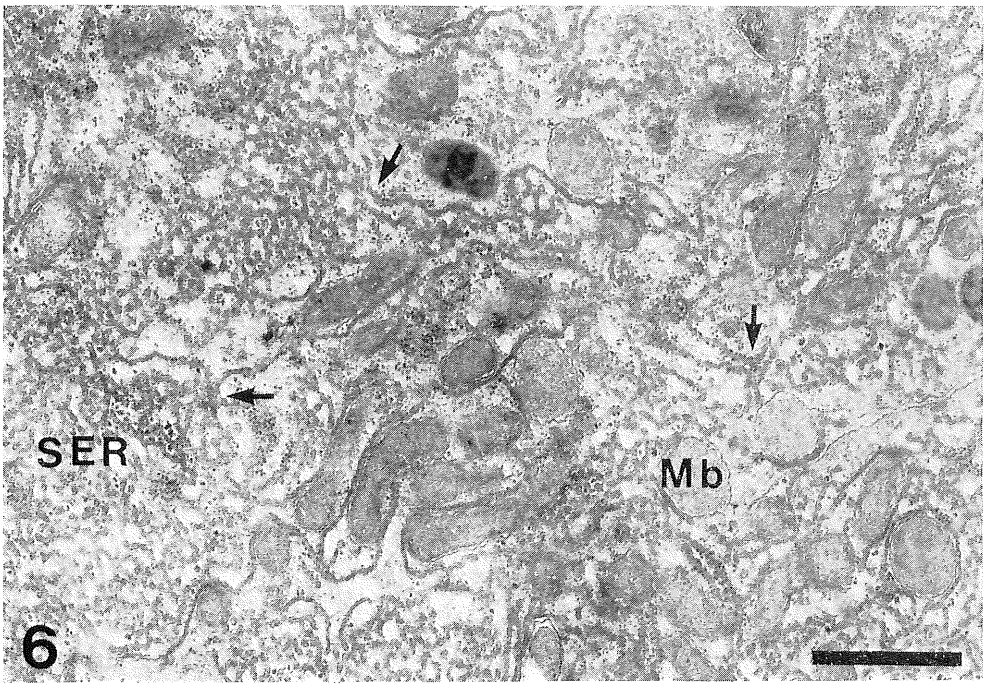

M
N
4

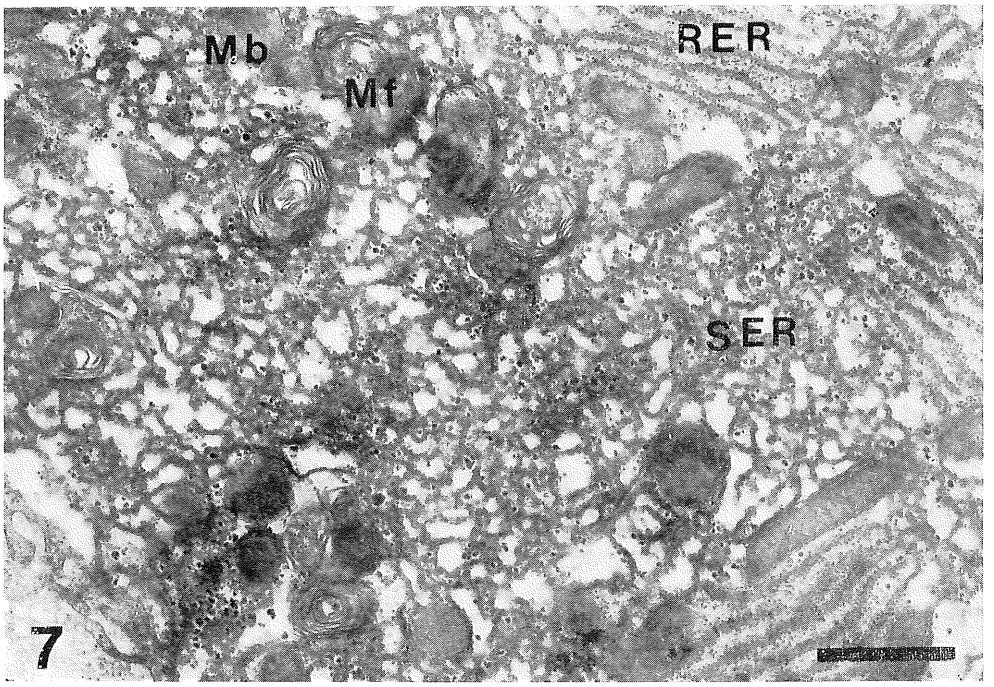

a


c


5b


d


SER
Mb
6


Mb
Mf
RER
SER
7

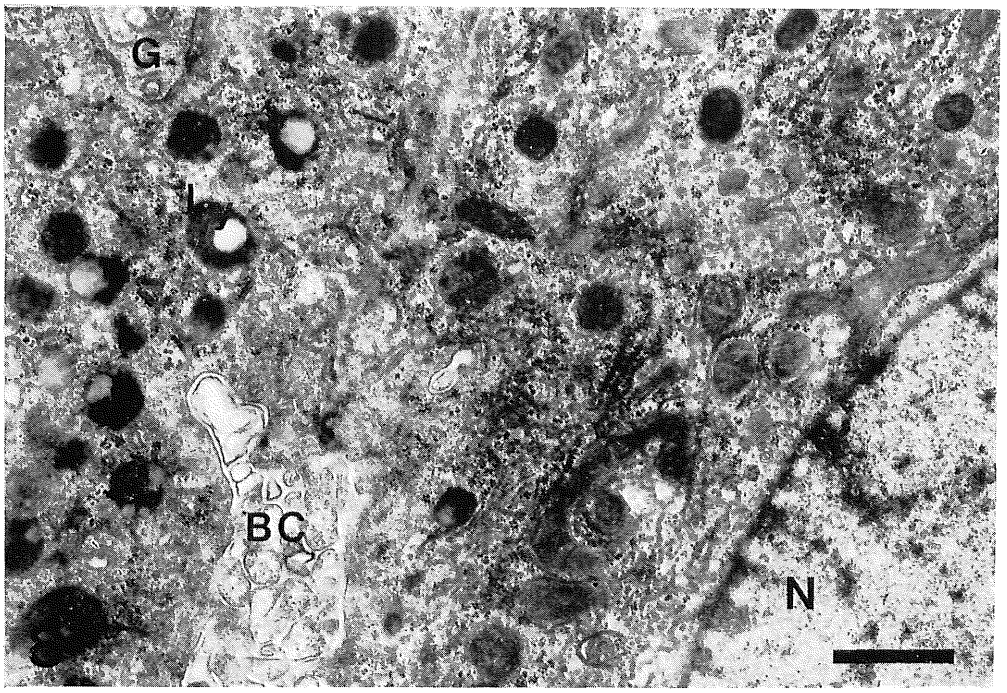


Fig.1 Histologic appearance of rat hepatocytes in the intermediate areas treated with BHT(250mg/kg,PO,twice a day).a:Liver of normal rat.b:After BHT administration for 2 days,slight swelling and a number of mitotic figures (arrows) of hepatocytes are observed.c:For 6 days,enlargement of nucleolus and swelling of hepatocytes are observed.

Fig.2 Hepatocyte after medication for 2 days.Slight proliferation of smooth endoplasmic reticulum(SER),scattered rough endoplasmic reticulum(RER) are seen.Enlarged nucleolus show well-defined nucleolonemata surrounded by chromatin.

Fig.3 A portion of a hepatocyte after medication for 6 days.Inclusions are observed in some of RER(?) accompanying disappearance of ribosomes.

Fig.4 Hepatocyte after medication for 6 days.RER surrounds anomalous mitochondria(M),and there are a number of myelin figures(arrows).

Fig.5 Changes of the activity of G-6-Pase in endoplasmic reticulum. a:Liver of normal rat.b:After medication for 2 days.c:After medication for 4 days.d:After medication for 6 days.

Fig.6 After 0.32% BHT feeding for 12 months,marked proliferation of SER and continuity between SER and RER (arrows) are seen.

Fig.7 After 0.32% BHT feeding for 12 months,proliferated SER tubules form the networks.Among the networks,myelin figures are seen.

Fig.8 After 0.32% BHT feeding for 12 months,secondary lysosomes are observed in the vicinity of flat microvilli in bile canaliculus (BC).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 31-35, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）長期投与ラットにおける血清及び肝臓脂質の変化について

中川好男* 中尾順子* 平賀興吾*

Changes in Serum and Liver Lipids after Oral Administration of Butylated Hydroxytoluene (BHT) to Rats

YOSHIO NAKAGAWA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Effect of long term administration of Butylated Hydroxytoluene or 3,5-*tert*-Butyl-4-Hydroxytoluene (BHT) on serum and liver lipids was studied. BHT was given to male and female rats at dietary levels of 0, 0.005, 0.020 and 0.320% for 1 year. No effects on body weight, liver weight, or liver protein was observed. Total lipids neither in liver nor serum increased. However, the phospholipid contents of both male and female rat liver increased and the triglyceride and cholesterol contents of male liver decreased significantly at a dosage of 0.320% BHT.

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT：3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene）は白い結晶性の無臭の固体で，油脂等の抗酸化剤として現在広く食品中に添加されている．BHTについての毒性試験は，今までラットなどを用いてかなり行なわれている．[1-3]今回の実験はBHTの慢性毒性試験の一環として行なわれ，投与1年後におけるラット血清および肝臓の脂質成分について分析した．BHTの血清脂質に対する影響についてはDay[4]やFrowly[5]らが，また肝脂質については Gaunt[6]らの報告がある．これらの実験および他の短期間投与の実験では，[7,8]一般にBHTを食物油等に溶解後動物に投与している．しかしこの実験では BHT を微粉末で飼料中に低濃度混入させた後，長期間ラットに投与した．このような条件下でBHTの脂質に対する影響をみた実験は少なく，ここにその結果を報告する．

実験材料および方法

実験動物は，雌雄のJCL-SD（SPF）系ラットを使用した．ラットは当研究所のバリアシステムの環境下[9]で1匹ずつ個別に飼育し，一定期間後実験に供した．（実験計画，飼育方法などの詳細については，当研究年報に掲載のBHT慢性毒性試験報告を参照）

BHTは和光純薬工業㈱製を使用した．乳鉢で微粉末状にしたBHTは，最終濃度が0.005, 0.020, 0.320%に各々なるようにクレア製CE-2飼料に混合させた後，固型飼料に成型した．このCE-2飼料の基本成分は，粗タンパク質24.5%，粗脂肪4.5%，可溶性無窒素物52.4%，粗灰分6.6%，水分8.0%からなり，100グラムあたりの熱量は348.1カロリーであった．

飼料および飲料水は，ラットに自由に摂取させた．なお対照群の動物には，CE-2固型飼料と水を自由に摂取させた．

以上のべた実験条件で1年間飼育した動物を，1群平均5匹づつを用いて血清および肝臓の脂質について分析した．

血清の調製

剖検時ラットを断頭した際，放出した血液を室温で凝血後，3000rpm，4°，10分間遠心分離して血清を得た．血清は分析直前まで−50°で凍結保存した．

肝ホモジネートの調製

肝臓は秤量後プラスチック製容器につめ，密閉後−50°で凍結保存した．分析直前に肝は室温で解凍し，テフロン製ガラスホモジナイザーを用いて蒸留水で30%ホモジネートに調製した．

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

肝脂質の抽出

肝臓からの脂質の抽出は，Carlson の方法を用いた.[10] 30%肝ホモジネート0.5m*l*を50m*l*の有栓遠沈管にとり，それにメチルアルコール（特級）5.0m*l*を吹きつけるように加えホモジネートを懸濁化した．さらにクロロホルム（特級）10m*l*を加え密栓して室温で24時間抽出した後，洗浄液として0.9%塩化ナトリウム水溶液15m*l*を重層させた．再び室温で24時間放置後，上層の洗浄液および中間層のタンパク質層の混入をさけながら下層のクロロホルム層だけをシリンジで分取し，これを脂質成分の分析に用いた．

＜上記の抽出法における脂質の回収率と洗浄液の影響＞ Carlson の抽出法に準じた脂質成分の回収率については，体重80g（肝重量6.3g）の雄ラットを用いて行なった．上記の方法に従って肝ホモジネートから脂質の抽出を用ない，下層のクロロホルム層（first extracts）と上層の洗浄液を分取した．洗浄液は60°で減圧乾固後エーテル（特級）で抽出した（first washing solvents）．残ったタンパク質層は，抽出操作を2度繰り返して脂質（second と third extracts）を抽出した．さらに最終残渣は5%水酸化カリウム溶液を加え1時間50°で処理後，エーテルで残留脂質（residue）を抽出した[11]．以上の抽出過程から得られた脂質は定量した後，回収率を求めた．またここで用いた洗浄液の脂質抽出におよぼす影響について，蒸留水，0.1～0.9%塩化ナトリウム溶液および0.04%塩化カリウム溶液を用いて検討した．

脂質成分の定量

肝脂質は抽出したクロロホルムの一定量をあらかじめ60°水浴上，窒素ガス気流下で蒸発乾固後，下記の方法で定量した．血清脂質は直接血清を用いて，下記の方法で定量した．

血清および肝脂質成分は，トリグリセリド（TG），リン脂質（PL），コレステロール（CH）について定量しその総和を総脂質量とした．

TGは検体をフロリジルで処理後，Van-Handel，川出変法を用いて定量した.[12]

PLは Lowry らの方法を用いて脂質を湿性灰化後，生じたオルトリン酸を Ernster の方法で定量した.[13] なお定量した Pi 値に25を乗じた値をリン脂質とした．

CHは Zak-Henly 変法を用いて定量した.[14]

タンパク質の定量

肝タンパク質は30%ホモジネートを蒸留水で希釈調製後，牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法で定量した.[15]

結　果

抽出操作における脂質の回収率と洗浄液の影響について

抽出操作における脂質の回収率は，Table 1 に示した．抽出操作を一度行なうことにより，TGが全体の95

Table 1 Extraction of Lipids by Carlson Method

Extraction Process	Triglyceride		Phospholipid		Cholesterol	
	mg/g•liver	%[1)]	mg/g•liver	%	mg/g•liver	%
First extracts	8.33	94.9	27.43	93.3	3.33	93.9
Second extracts	0.38	4.3	1.98	6.7	0.22	6.1
Third extracts	—	—	—	—	—	—
First washing solvents	—	—	—	—	—	—
Residue	0.06	0.8	—	—	—	—

1) percent of total

Table 2 Influence of Washing Solvents on Lipids Extraction

Washing solvents	Triglyceride mg/g•liver	Phospholipid mg/g•liver	Cholesterol mg/g•liver
Distilled Water	20.4±0.3	24.1±1.1	3.57±0.05
0.1% NaCl	20.3±0.3	24.2±0.5	3.42±0.05
0.5% NaCl	19.5±0.6	24.2±0.8	3.62±0.11
0.9% NaCl	21.7±0.6	24.1±1.1	3.58±0.04
0.04% $CaCl_2$	20.4±0.9	24.5±1.2	3.51±0.09

All values are mean±standard error

Table 3 Body and Liver Weights and Liver Protein of Rats fed Diets containing 0, 0.005, 0.020 or 0.320% BHT for 1 yr

Sex and dose level (%)	Body weight g	Liver weight g	Liver weight g/100g b.w.	Liver protein mg/g·liver	Liver protein mg/100g b.w.
Male					
0	704.0±26.0	18.98±0.97	2.69±0.09	196.6± 7.3	530.4±21.5
0.005	712.4±22.4	20.14±0.60	2.83±0.09	189.0± 7.7	546.0±33.4
0.020	703.0±43.4	19.02±0.90	2.71±0.06	212.5± 6.5	572.8± 5.2
0.320	706.8±59.5	26.38±4.74	3.73±0.67	204.9± 1.7	634.4±48.9
Female					
0	382.5±36.7	10.05±0.87	2.64±0.10	202.2± 6.6	550.5±27.2
0.005	420.0±51.8	11.60±1.29	2.77±0.06	206.6± 5.4	578.5±31.4
0.020	413.0±25.8	11.37±0.59	2.75±0.04	218.5±17.0	610.7±62.8
0.320	363.6±29.8	11.84±1.39	3.21±0.17*	214.1± 4.1	726.1±82.3

All values are mean ± standard error of groups of four or five animals. Those marked with asterisks differ significantly from untreated controls (0%); $P<0.05$

Table 4 Composition of Serum Lipids of Rats treated with BHT

Sex and dose level(%)	Triglyceride mg/100ml	Triglyceride %	Phospholipid mg/100ml	Phospholipid %	Cholesterol mg/100ml	Cholesterol %	Total lipid mg/100ml
Male							
0	141.4±13.6	37.8±1.3	160.4± 9.3	43.4±1.4	70.4± 5.8	18.9±0.6	372±35
0.005	198.8±34.5	39.3±2.5	207.4±17.9*	42.5±1.4	87.8± 8.6	18.1±1.3	494±58
0.020	201.7±31.6	42.4±2.5	180.2±14.1	38.9±1.6	87.6±10.5	18.7±1.2	469±53
0.320	182.3±62.1	39.8±3.5	181.0±34.9	41.0±2.2	81.0±13.7	19.2±1.5	439±112
Female							
0	175.8±68.1	32.6±9.0	234.0±19.0	50.0±6.0	83.3± 5.1	17.4±3.0	490±88
0.005	289.6±53.7	40.1±4.0	295.4±16.7	43.7±2.7	108.4± 5.3*	16.2±1.4	693±72
0.020	239.3±57.2	38.9±4.1	270.2±24.5	47.3±3.5	79.5± 7.8	13.8±0.8	589±87
0.320	151.6±30.1	27.3±2.3	261.4±37.3	52.0±2.1	107.8±12.3	20.7±0.7	546±80

All values are mean ± standard error of groups of four or five animals. Those marked with asterisks differ significantly from untreated controls; $P<0.05$

%，PLが94%，CHが93%の回収率を示した．また抽出過程で用いた洗浄液が，脂質の抽出に影響するかはTable 2 に示した．その結果0.9%塩化ナトリウム溶液は，蒸留水，0.1～0.5%塩化ナトリウム溶液，0.04%塩化カルシウム溶液を各々洗浄液とした場合と大差がなかった．

体重，肝重量および肝タンパク量

Table 3 に示したように，BHT投与により雌雄ラットの体重，肝重量および肝タンパク量は顕著な変化を示さなかった．しかし雌の0.320%群で，体重100グラムあたりの肝比重量が対照群に比べ122%の増加を示した．

血清および肝臓脂質

BHT投与による血清脂質への影響は，Table 4 に示した．総脂質量は雌雄の全濃度処置群とも対照群と差がなかった．TGは雌雄全濃度群とも対照群と差がなかったが，PLは雄の0.005%群で，またCHは雌の0.005%群でそれぞれ増加した．

BHT投与による肝臓脂質への影響は，Table 5 に示した．TGは雄の0.320%群で減少したが，雌では同濃度群で減少傾向を示したものの対照群と有意な差がみられなかった．PLは雌雄の0.320%群で増加した．CHは雄の0.320%群で減少した．しかし総脂質量は雌雄全濃度とも対照群と差がなかった．

Table 5 Composition of Liver Lipids of Rats treated with BHT

Sex and dose level (%)	Triglyceride mg/g•liver	Triglyceride %	Phospholipid mg/g•liver	Phospholipid %	Cholesterol mg/g•liver	Cholesterol %	Total Lipid mg/g•liver
Male							
0	37.4±6.0	52.4±3.9	25.9±0.4	38.1±3.9	6.6±0.5	9.4±0.3	69.9±6.1
0.005	36.8±4.8	52.9±3.1	25.4±0.5	37.7±3.2	6.6±0.5	9.4±0.2	68.7±5.0
0.020	26.5±3.9	44.7±4.1	26.3±1.1	45.9±4.2	5.4±0.5	9.3±0.7	58.1±3.7
0.320	21.9±3.1*	38.5±4.1	30.0±1.1*	53.3±3.7*	4.7±0.2*	8.3±0.5	56.7±2.0
Female							
0	13.6±4.3	31.9±4.7	25.6±0.8	59.2±3.5	3.8±0.2	8.9±0.7	43.4±2.5
0.005	12.5±2.7	30.0±4.3	24.4±0.6	60.9±4.0	3.7±0.2	9.1±0.4	40.6±3.4
0.020	11.3±1.1	27.4±2.4	26.3±0.8	64.2±2.1	3.4±0.1	8.3±0.3	41.0±0.8
0.320	9.5±1.0	20.7±2.0	32.5±0.8*	71.3±4.4*	3.7±0.1	8.1±0.2	45.7±0.5

All values are mean ± standard error of groups of four or three animals. * $P<0.05$

考　　察

ＢＨＴが病理組織学的な肝障害を伴わず，肝重量を増加させることはすでに報告されている.[16,17] 今回の実験では，雄の 0.320% 群の肝重量が若干増加する傾向を示したが，個体間のばらつきが大きいため対照群と有意な差を示すまでに到らなかった．また雌では 0.320% 群で肝比重量が増加したが，肝重量には影響がみられなかった．

ＢＨＴ投与により血清中の総脂質量（ＴＧ，ＰＬおよびＣＨの総和量）は，雌雄全濃度群とも対照群と差がなかった．脂質成分をみると雄の 0.005% 群でＰＬが増加し，雌の同濃度群でＣＨが増加した．しかし 0.020% 以上の濃度群ではＰＬとＣＨに顕著な変化がなく，これらの成分の増加傾向はＢＨＴの濃度段階と相関していないと思われる．一方肝臓脂質においては，総脂質量が雌雄全濃度群とも対照群と差がなかった．しかし脂質成分をみると0.320%群でＰＬが増加し，ＴＧとＣＨが減少する傾向を示した．この各成分量の相対的な増減により，総脂質量がほぼ一定のレベルに維持したと思われる．ＢＨＴの投与方法や投与期間などは異なるが，Gaunt らは[6] 500mg/kg/day の投与量（今回の実験では0.320% 群が約 100mg/kg/day に相当する）で肝ＰＬの増加とＣＨの減少を，また高橋は[11] 1％で肝ＰＬの増加とＴＧの減少を報告しており，今回の低濃度，長期間投与の実験からもこの傾向が認められた．ＢＨＴ投与ラット肝の電子顕微鏡による観察で，Lane や福森らは滑面小胞体の急激な増加を認めている.[18,19] また有吉らは肝ミクロゾーム分画のPLがBHT処置で増加したことを報告している.[20] これらの結果からBHTによる滑面小胞体の特異的な増加が肝ＰＬの増加に反映しているものと思われる．

今回の実験ではＢＨＴ処置により血清と肝臓脂質の変化に相関がみられなかった．0.005% 投与で雄の血清ＰＬと雌のＣＨが濃度段階と無関係に増加したことは，さらに慢性毒性試験の立場から検討せねばならない．いずれにしてもＢＨＴなど脂溶性の高い食品添加物は，いかに低用量といえども毎日摂取されることから，生体に何らかの影響がある場合には十分注意する必要があると思われる．

文　　献

1) Daniel, J.W.: *Proc. Inter. Congr. Food Sci. Technol.*, third Ed., 793, 1970, Washington, D.C.

2) 平賀興吾，林田志信，市川久次，米山充子，藤井孝，池田虎雄，矢野範男：東京衛研年報，**22**, 231, 1970

3) Golberg, L.: *Fd. Cosmt. Toxicol.*, 7, 603, 1969

4) Day, A.J., Johnson, A.R., O'halloran, M.W. and Schwartz, C.J.: *Aust. J. Exp. Biol.*, **37**, 295, 1959

5) Frowly, J.P., Kohn, F.E., Kay, J.H. and Calandra, J.C.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **3**, 377, 1965

6) Gaunt, I.F., Gilbert, D. and Martin, D.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **3**, 445, 1965

7) DiLuzio, N.R. and Castales, F.: *Expl. Mol. Path.*, 4, 141, 1965

8) Pascal, G.: *Arch. Sci. Physiol.*, 24, 37, 1970

9) 水尾昭江，池田虎雄，平賀興吾，新関治雄：東京衛研年報，**25**, 489, 1974

10) Carlson, L.A.: *J. Atheroscler. Res.*, 3, 334, 1963
11) 高橋 省：東京衛研年報, 25, 647, 1974
12) 川出真坂：臨床化学分析III, 40, 1973, 東京化学同人
13) 春日誠次：臨床化学分析III, 98, 1973, 東京化学同人
14) 吉川春寿, 北村元仕：医学のあゆみ, 33, 375, 1960
15) Lawry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R.: *J. Biol. Chem.*, 193, 267, 1951
16) Deichman, W.B., Clemmer, J.J., Rokoczy, R. and Bianchine, J.: *Archs. ind. Hyg.*, 11, 93, 1955
17) Brown, W.D., Johnson, A.R. and O'Halloran, M.W.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 37, 533, 1959
18) Lane, B.P. and Lieber, C.S.,: *Lab. Investigation*, 3, 342, 1967
19) 福森信隆：東京衛研年報, 26, 1975
20) 有吉敏彦, 高畠英倍：食衛誌, 14, 75, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 36-44, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）による ラットの出血に関する病理解剖学的研究

藤井　孝*　湯澤勝広*　平賀興吾*

Gross Anatomical Findings of Hemorrhage in Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT)

TAKASHI FUJII*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

著者らは食品の酸化防止剤として汎用されているジブチルヒドロキシトルエン（BHT）がラットに出血を起せしめることを先に報告した.[1-4]

今回は前回の実験で出血傾向が顕著であった雄ラットを用い，BHT摂取期間を前回より延長し．途中検索も多く設けて出血好発部位と発現時期，出血好発器官・組織の形態的共通性などを病理解剖学的に検討したので報告する.

実験材料および実験方法

実験動物は barrier-system で育成された4週令のSD-JCL系ラット雄（平均体重60g）を入手し，ステンレス鋼製ケージに5匹ずつ収容し，室温25±1°C，湿度50±5%の環境下で飼育した，飼料は日本クレア社製粉末飼料CE-2を当部で固型飼料化[5]したものを与え，水とともに自由に摂取させた．実験は5週令からBHTを上記の自家製飼料に1.5%の割合で添加したものを投与群に，対照群には引き続き同一飼料を摂取させて行なった．ラットは摂取開始後8週間まで，あらかじめ投与群，対照群とも摂取期間によってそれぞれ8群に分け各群20匹とし，各々の摂取期間を終了したラットは断頭し放血屠殺後，剖検を行ない内外の器官・組織を精査した.

実験結果

表1,2は生存例（既定の摂取期間終了時に生存しており屠殺解剖を行なった例）と，死亡例（既定の摂取期間途中で死亡した例）の解剖所見を，それぞれの解剖時点での摂取期間によって1週間単位でまとめたものである．以後の本文中では生存例には全てS（Sacrificed）の略号を用い摂取1週間の群は1S，2週間の群は2Sの如く以下8Sまで8群に，また死亡例には全てD（Dead）の略号を用い摂取1週間未満で死亡した群は1D，摂取1週間以上2週間未満で死亡した群は2Dの如く以下8Dまで8群に分けてそれぞれの各群は1S，1Dのように略号を用いて表わした．また2Dでの死亡は9例であったが解剖所見を得られたのは5例であったので，これらについてのみ結果に記載した．表1,2の各項目は器官・組織別の出血とその他の主要変化で，それ以外の所見は本文中で述べることとした．また対照群では，これらの所見がみられなかったので全て省略した．尚，出血に際しての血液性状は死亡例では時に胸腔，腹腔内に豚脂様凝固塊をみることもあったが，殆んどが凝固不全で，粘稠度が低くサラサラしており，解剖中も実質性出血の如く血液が滲み出て各腔内に徐々に貯留していくのが常であった．以下表中の各項目を中心に詳述する.

皮下組織の出血は主に斑状を呈し殆んどの部位でみられたが頭部，眼瞼周囲，腋窩で稍々多かった．眼瞼周囲，後肢では血腫を形成する例も認められ出血程度は顕著であった．血腫の形成は皮下組織よりも頭頂骨，前頭骨の骨膜で多く認められ中等度のものは3D，3S，4D，5Sで各1例，6Dで2例みられ顕著なものは3Dで2例，2S，4Dで各1例みられた，皮下組織の出血はDに多く1Dからみられ，3D，4D，5Dで顕著になり以後もみられたのに対し，SではDよりも少なく，1S，7S，8Sでの出現例はなかった.

筋の出血は殆んどの部位でみられたが特に舌骨筋，乳突筋などの頸筋，胸廓筋，後肢筋で多く，平面的には斑状を呈するが割面でみると，その部分全体に出血が及ん

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

でおり後肢筋では筋が膨満し血腫を形成する顕著な例も認められた．また顕著な筋内出血に伴い下腿部の筋間に豚脂様の凝固不全血液塊がみられる例もあった．筋出血はDに著明で，程度も強く2Dから7Dまで高率に発症したが，Sでは2Sからみられるが5Sでは出現例がなく，その他の群でも少なかった．

胸膜下組織の出血は胸椎，肋骨に沿って帯状に，またはそれらを中心に大斑状にみられ，胸廓筋の出血とは必らずしも合併していなかった．これはDでは2Dから7Dまでみられ，4Dでは顕著であったのに対しSでは4S，6Sで軽度なものが各1例みられたのみであった，

腹膜下組織の出血は腎臓周囲の壁側腹膜下に広く血性浸潤として，また前立腺，膀胱周囲の臓側腹膜下，胃・十二指腸の漿膜下にそれぞれ斑状出血，小血腫としてみられた．(Fig. 1)．これはSでは全群に1例ずつみられ，摂取期間に比例して程度は強くなる傾向をみせた．Dでは1Dではみられなかったが，他では程度も強く出現例も多くみられ，Sと同様摂取期間に比例して顕著な例が多くなった．

頭蓋腔内の出血は脳を摘出後の頭蓋底部に血液貯留が認められる例から脊髄硬膜下に血液が認められる例までであり，殆んどが脳の出血と合併していたが，出血程度の強弱は必ずしも一致しなかった．これはDに著明で2Dからみられ始め，3D，4Dで顕著であったが，Sでは3Sからみられ，顕著な例も少なく，出現例数も少なかった．

鼻腔内の出血は外部所見ではなく解剖時に鼻腔内に血液貯留のみられた例を表に記載した．顕著な例では，鼻腔後部から篩骨に至る範囲，特に篩骨迷路付近に血液が貯留しており，臭球の出血，頭蓋腔内の出血と合併している例もみられた．これはDのみで現われ，2Dからみられ3D以後顕著になっていた．また鼻・口周囲，前肢の先端などに血液様物の付着が顕著であったが，鼻腔内に血液の存在が確認できなかった例もDに極めて多く，3D，4Dでは各5例みられた．

胸腔内の出血は胸膜腔と心膜腔の出血を併せたもので全て縦隔結合織の出血，胸腺の出血を伴っており，顕著な例では腔内に8m*l*の血液貯留がみられた（Fig. 2)．これはDに多く程度も強くみられ2Dから現われ6Dを除いて7Dまで各群の約半数でみられた．またこの他に心膜腔内と縦隔結合織のみに出血がみられた例（Fig. 3）が3D，4D，7D，8Sで各1例，5Dでは2例あり，これらは表の胸腔内出血の例数から除外してある．

腹腔内の出血は全て膵臓の出血を伴っており少量の血液を混じた腹水のみられる例から凝固不全の豚脂様血液塊を含む中等度の血液貯留がみられる例まであったが胸腔内の出血に比し顕著な例でも血液貯留量は少なかった（Fig. 4）．これはSに著明で1Sからみられ，3S，4Sで顕著であった．

腔内の出血，血液貯留は上記の他に鼓室内が2D，3S，4S，5S，6Sで各1例，4D，5Dで各2例みられ，陰嚢内が3Sで2例，4S，6D，7D，8Sで各1例みられた．

胃内に黒色粒状の凝固血液を含む稍々粘性のある液体が貯留して，回腸部までこの液体が達する例もみられた．胃粘膜の肉眼的観察では変化がみられず，3Dの5例で腺胃部粘膜に微少赤色点の小集簇を認めた程度であった．これはDで多くみられ，1Dから現われ2D，3D，4Dと顕著になり，7Dではみられなかった．Sでは3Sで1例，5Sで3例軽度なものがみられたのみであった．

眼球内出血は片側のみに起っており，眼球が黒赤色を呈し膨満して突出しており，それに併せて眼窩内の脂肪に出血がみられる例もあった（Fig. 5)．これはSでは3S，4S，6Sで各1例，5Sで2例，散見されたがDでは4Dで3例，5Dで2例，集中してみられた．

脳の出血は硬膜を除去した脳でみられ主に広義の軟膜から実質にかけて起っていると思われるが細部については組織所見によらねばならない．血液は背面では臭球，小脳，大脳横裂部に，腹面では橋から視交叉までの部位に多くみられ，大脳表面の血管周囲に滲出している例，点状にまた全体に赤色を呈する例なども多かった（Fig. 6)．顕著な例では血液が脊髄まで及んでおり脳室から脊髄中心管にかけて血液が認められたものが2Dで1例，4Dで2例あった．脳での出血はDに多く2Dからみられ始め3D，4Dでは顕著であり以後もみられたのに対し，SではDと同様，各群にみられたが出現例数，程度ともに著明ではなかった，

脳腺の出血は点状出血から大血腫を形成するものまで程度の差が大きかったので便宜的に点状出血は別の項目とした．胸腺の出血は片側の1/2が黒赤色を呈し，容積の増加がみられないものから両側とも黒赤色で極度に膨満し稍々弾力性のある円錐を形成するものまでみられた(Fig. 2)．点状出血はSに多く1Sからみられ，6S，7Sを除いて各群とも40%近くの出現を示したが，Dでは1Dからみられるが出現例数は減少していき6D，7Dではみられなかった．出血は顕著な例がDに多く，2Dからみられ以後6Dを除いて各群で著明であったのに対し，Sでは1Sからみられ2Sで稍々顕著になるが各群ともDよりも著明ではなかった．

胸腺の変性萎縮は帯褐黄色で外側は稍々融解し，内側は硬くなって容積が極度に減少していたものであり，片側は萎縮，他側は血腫という例が2D，4S，4D，5D，7Dで各1例みられたが，これらはこの項に加えた．これは2D，3Sからみられ始めたが各群とも出現例数は少なく6Dで4例，7Sで3例と稍々多い程度であった．この他に胸腺では水腫様に容積を増し，滲んだ点状出血を呈するものが3S，4S，7Dで各1例みられた．

膵臓の出血は米粒大の点状出血から小血腫を形成する例までみられたが主として斑状であり，脾臓，胃，十二指腸部に稍々多発するが明らかな部位的特徴は示さず，出血面積の大小も部位による差異はなかった（Fig. 7）．これはDでは2Dから顕著にみられ以後7Dまで出現率はほぼ同じであったが程度の強い例は4D，5Dに多かった．Sでは1Sからみられ6Sまで出現率はDより低いが7Sでは同等となり程度の強い例もDと同様に4S，5Sで多かった．また摂取4週間以後では出血のみられる膵臓の一部が黄～黄褐色を呈する例がみられたが出血を主兆としてこの項に加えた．

膵臓の水腫は膵臓が稍々透明な感じで，厚みを増し，ブヨブヨとしていたもので，この中には全体に薄赤色を呈したり，点状出血のみられる例が1S，3Sで各2例，4Sで3例，6Sで1例みられたが，これらはいずれも出血の項に加え，この項からは除外した．水腫はDでは5Dの1例のみであるが，Sでは1Sで最も多く以後4Sまでみられたが以後はみられなかった．

精巣の出血は片側のみにみられる例が多く，出血程度も顕著なものは少なかった．これはDに多く4D，6Dで顕著であり，1D，2D，5D，7Dではみられず，Sでは5Sで稍々顕著で，1S，2S，3Sではみられなかった．

精巣の萎縮は精巣が弾力性を失いブヨブヨになり大きさを減じ，精細管の一部が不透明な白色を呈していたものであり片側のみにみられる例が多かった（Fig. 8）．片側が萎縮，他側が出血という例が3D，6S，6D，7S，7Dで各1例，8Sで2例みられたが，これはこの項に加え，出血の項からは除外した．萎縮でDでは3Dからみられ始め5Dから稍々著明になったのに対し，Sでは3Sでみられ，4Sではみられず5S以後8SまでDよりも高率で程度も顕著であった．

精巣上体の出血は両側にみられる例が多く頭部に最も多発し，次いで尾部であり，体部での出血は少なかった（Fig. 8）．これはS，Dともに出現例数が多く，特にDでは2Dから7Dまでの各群の全例にみられたが，Sでは摂取期間に比例して減少する傾向を示した．またこれに伴い精管内に血液を認めた例が，1S，2S，4S，7S，8Dで各1例あった．精巣上体では，この他に摂取5週間以後に頭，尾部が黄～黄褐色を呈する例，更に加えて容積が増大する例もみられた．

脂肪組織の出血が顕著で出現例も多かったのは精巣上体周囲であり，その他では腎臓周囲であった．これはSでは1Sでもみられるが全般的にDに多くみられ，1Dを除き2Dから7DまでSよりも著明であった．

その他，肝臓が稍々黄褐色を呈する例がSよりもDに多くみられ3Dで6例，4Dで4例と顕著であった．

以上，各器官・組織での出血又は変化について述べ，その中でそれらの相互の関連にも触れたが，これを更に明らかにする目的で表3，4を示した．これは全解剖例について個体別に出血個所を示したもので表1，2と同様の群別と略号を用い，出血個所の少ない個体の順に並べてある．これでみるとS，Dともに摂取期間が長くなると出血個所は多くなるが，この傾向はDよりもSで顕著であった．同一摂取期間内のSとDとの各個体の出血個所の数を比較するとSでは1S，2Sで各1例，5Sで2例，6Sで3例に出血がみられなかったのを始めとしてDよりも出血個所の少ない個体が多かった．次に個体別にどの部位に出血していたかをみると，1Sでは20例中，変化なしが1例，1個所のみに出血がみられた個体が4例で，そのうち精巣上体が3例，胸腺の点状出血が1例であり2個所に変化のみられたものが8例で各例とも精巣上体の出血は共通しており，それに加えて膵臓の水腫がみられたものが4例，胸腺の点状出血が2例，膵臓の出血，又は脂肪の出血の加わるものが各1例であった．3個所に変化のみられたものは5例で，これも精巣上体出血は各例に共通で，それに加えて胸腺の点状出血と膵臓の水腫がみられたのが4例，膵臓と胸腺の出血がみられたのが1例であった．4個所と5個所で変化のみられたのは各例で精巣上体，膵臓の出血，胸腺の点状出血が共通で前者では脂肪の出血，後者では腹膜下組織と腹腔内の出血がそれぞれ加わっていた．このように以下2S，3Sの各個体をみると出血個所の増加に伴い，1Sでみられた部位に加えて皮下，筋，腹腔内の出血が現われ，3Sでは脳の出血がみられ，胸腔内の出血例も多くなっていた．しかしDでは精巣上体，膵臓の出血は殆んどの例でみられたが，これらを含めて或る部位での出血程度が顕著な個体では他の部位の出血がみられないか，または軽度である例が多く，Sでみられたような出血個所の多少と出血部位の関連性は著明ではなかった．

総括および考察

以上の実験結果を出血発現の経過を追って総括すると，摂取1週目では精巣上体，胸腺，膵臓に軽度の出血がみられ，死亡例では他に胃内に血液様液体の貯留がみられた．摂取2週目では，それらに加えて精巣上体周囲の脂肪，筋，皮下組織，脳，胸・腹膜下組織の出血がみられ胸腔内・腹腔内出血も認められ，各死亡例の出血個所は生存例よりも多くなっていた．摂取3週目では1,2週目の出血部位での出血が顕著になり，出血個所は更に増加し，精巣・眼球内出血，それに死亡例では鼻出血がみられた．摂取4週目以後は生存例，死亡例ともに個体間で出血個所の多いものと少ないものとの差が大きくなる傾向を強めていった．概ね，このような経過を示したが，ここで出血によって失血死または衰弱死したと考えられる死亡例での出血状態を生存例のそれと比較してみると，先ず死亡例では生存例よりも出血個所が多く出血程度も顕著であるか，出血個所が少ない例では顕著な鼻出血，胸腔内出血がみられた点が異なっていた．このことから出血個所が多いか，または少ない場合は顕著な出血であること，それに出血が長時間持続することが死亡の主な要因となっていたと考えられる．更に今回ラットは1ケージに5匹飼育としたため，その中で特に出血傾向を強めた個体は他の個体から各種の影響を受けたと思われ，そのことが死亡の誘因となったとも考えられる．また生存例では顕著な出血を示さないものもみられ個体によって抵抗性に差異があることを示していると思われる．今回は前回と異なり自家製添加飼料を用いたためか，BHTの濃度は同じでありながら出血傾向は前回よりも激甚であり，出血は前回より短期間で起り，出血個所も多く程度も強かったので各器官・組織での出血発現までの経過，発現の順序などを観察するのには稍々不適当な実験であったと思われる．しかし部位による出血発現時期の相違と摂取1,2週間の各個体での出血部位と，その組み合わせから判断して，精巣上体，胸腺，膵臓が最も早く，次いで脂肪，筋，皮下組織，脳の順であると推察される．また摂取1週目から出血を起し，摂取8週間まで出現例数が常に多かった精巣上体，胸腺，膵臓が出血好発器官であると思われる．今回，出血のみられた器官・組織に敢えて形態的な共通性を求めれば，小血管，毛細血管の分布が豊富であるが，多くの血液[6]を貯蔵収容する余地が少ないということである．しかしそれよりも個体そのものが5週令から13週令までという発達・成長の著明な時期にあり，当然それを構成している各器官・組織も顕著に発達・成長しているという共通性の方がより大きな意味をもっていると思われ，この点からの検討も重要になってくると思われる．BHTによるラットの出血は，その血液性状の変化に基づくものである[7]が肉眼的解剖所見から出血好発器官・組織がみられ，出血が小血管周囲の漏出性出血・点状出血様であったことは，血液性状に加えて小血管での変化なども関与していることを示唆するものではないかと考えられ，今後，光顕，電顕レベルでの形態的変化を検討していきたい．

文　献

1) 福森信隆他：東京衛研年報，**25**，557，1974
2) 坂本義光他：東京衛研年報，**25**，577，1974
3) 中川好男他：東京衛研年報，**25**，599，1974
4) 藤井　孝他：東京衛研年報，**25**，609，1974
5) 池田虎雄他：東京衛研年報，**25**，527，1974
6) William, B. and Don, W.F.: *A Textbook of Histology*, 9th Ed. 1968, W.B. Sanders, Philadelphia
7) 平賀興吾他：東京衛研年報，**25**，631，1974

Table 1. Summary of gross findings.

Findings	week	1		2		3		4		5		6		7		8	
	*	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D
	No. of rats	20	2	16	5	16	15	14	13	14	10	9	6	6	3	7	0
Hemorrhage in the subcutis	SL			2	1	1	6	2	4	2	4	1	1		2		
	MO		1	1		1	1		1		1	1	1				
	MA			1			2	1									
Hemorrhage in the muscle	SL			1	1	5	5	3	1		4	1	2		1		
	MO			2	3	1	5	1	3		4		3	1		1	
	MA			1			3		5			1			2		
Hemorrhage in the subserosa of pleura	SL				1		1	1	5		1	1	1		1		
	MO						1		1		1		1		1		
Hemorrhage in the subserosa of peritoneum	SL	1		1	1						2						
	MO					1	3	1	2		3	1	1				
	MA								2	1	1		2	1	1	1	
Hemorrhage in the cranial cavity	SL						2	2	1	1	1						
	MO				1	1	6		5	1	1	1	1			1	
	MA				1	1	2		2		1		2		1		
Hemorrhage in the nasal cavity	SL						2		3		2						
	MO				1		4		2		2		5		1		
Hemorrhage in the thoracic cavity	SL				3	1	2	3	1		1	1	1				
	MO			1	1	1	2		3		2			1	1		
	MA						3		3		2				2		
Hemorrhage in the abdominal cavity	SL			1		2	1	2		1			1	1		1	
	MO	1		2	1	1	3	3			1			2		1	
	MA					2									1	1	
Dark bloody fluid in the stomach	SL		1		2	1	5		4	3	2		2				
	MO						4		4		1						
	MA				1												
Marked hemophthalmus						1		1	3	2	2			1			

* S : Sacrificed, D : Dead, SL : Slight, MO : Moderate, MA : Marked

Table 2. Summary of gross findings.

Findings	Week	1		2		3		4		5		6		7		8	
	*	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D
	No. of rats	20	2	16	5	16	15	14	13	14	10	9	6	6	3	7	0
Hemorrhage in the brain	SL					1	1		2							1	
	MO			1	2	2	6	2	5	1	4	1	5	1	1		
	MA				1		5		2								
Petechiae in the thymus	SL	9	1	8		6	1	5	1	4	1	1				2	
	MO		1		2		2		1	3						1	
Hemorrhage in the thymus	SL	1		3	1	2	1		2		2						
	MO			1			1				2						
	MA			2	1	1	6	3	7		3	1	1	1	2		
Degenerative atrophy in the thymus	SL							1	1				1		1		
	MO				1	2				1	2	1	3	2			
	MA													1		2	
Edema in the pancreas	SL							1									
	MO	9		5		1		4			1						
Hemorrhage in the pancreas	SL	6		7	3	9	10	4	6	6	3	5	2	4	3	1	
	MO				1	2	1	2	4		6		4			6	
	MA						1	1	1	2				1			
Hemorrhage in the testis	SL					1	4		5	3		1	3				
	MO								1				1	1			
Atrophy in the testis	SL					1					1	1					
	MO						1		1	3	2	1	2			3	
	MA											1		3	1	1	
Hemorrhage in the epididymis	SL	8	1	3	1	6	4	5	3	4	3	3	2	2		3	
	MO	10		7	4	4	5	1	4	3	6		1	2	1		
	MA			1		4	6	3	6	1	1		3		2		
Hemorrhage in the fats	SL	2			1	3	6	2	3		1		2	3			
	MO			4	1		1	1	4	1	2	1	2	1	2		
	MA						1				2						

* S : Sacrificed, D : Dead, SL : Slight, MO : Moderate, MA : Marked

Table 3. Gross findings in individual rats.

Findings \ Group		1S (20)	1D (2)	2S (16)	2D (5)	3S (16)	3D (15)
No change		0		0			
Epididymis	(H)	.0000000000000000000	.0	...0000000000.0	00000	0.000000.0000000	000000000000000
Thymus	(P)	0...00.....0000.00	00	0.00000..00....	0...0	0..0...000..0..	0.0.........0.
Thymus	(H)	.........0..	..	.....00..0000	.0.0.	.0.....0..0.	...000000.0...0
Pancreas	(E)	..00000000.0.	..	..0...0000....	.....	0.....	.....0.
Pancreas	(H)	0.....0.0	..	.0.00.....0000	.0000	0000..0000000	.0.00000.000000
Fats	(H)	0.....0.	..	.....0.....000	0..0.	000	.0....00..000.0
Brain	(H)	.	..	.....0..	..000	...0....00.	0.00000.00.0000
Subcutis	(H)	.	.0	.....0.0.00	..0..	00	.0..0.0.0000.00
Muscles	(H)	.	..	0.....0.00	000.0	..00..000.0	..0000000000000
Cranial cavity	(H)	.	..	.....	...00	...0....0.	..00.00.00.0000
Tympanic cavity	(H)	.	..	.....	0	.....0..	.....0....
Nasal cavity	(H)	.	..	.....	.....	.....	.....00.0000
Thoracic cavity	(H)	.	..	0	.0000	00	...000.00.00...
Pericardiac cavity	(H)	.	..	.....	.....	.....	0
Abdominal cavity	(H)	0	..	..000	...0.	0...0..00.0	.....0.0..0..0.
Pleura	(H)	.	..	.....	0	.....	.....
Peritoneum	(H)	0	..	0....	0	.....0....	.....0.00..
Stomach	(D)		00		00..0	.....0...	00....000.0.000
Testis	(H)				...	.0.....	0.....0.0..0..
Eye-ball	(H)				...	.0.....	.....
Thymus	(A)				0..	0.....0	.....
Testis	(A)					0.....	0.....

* No.of rats, 0:Present, .:Absent,
H:Hemorrhage, P:Petechiae, E:Edema, D:Dark bloody fluid, A:Atrophy,

Table 4. Gross findings in individual rats.

Findings \ Group		4S (14)	4D (13)	5S (14)	5D (10)	6S (9)	6D (6)	7S (6)	7D (3)	8S (7)
No change				00		000				
Epididymis	(H)	....000000.000	0000000000000	.0.0.00.0000	0000000000	0.0..0	000000	..0000	000	...0.00
Thymus	(P)	...00..00.0...	0.....0...	..0..000000.	0.....	..0..	.....	.....	...	0..0.0.
thymus	(H)	000	..00.0000.000	.....	.00.000.00	0	0.....	..0...	0.0	.....
Pancreas	(E)	000....0..0...	.....	.....	0.....	.....	.....	.....	...	.....
Pancreas	(H)	0.0..00.000	0.000.0000000	...0.0000000	.000000000	00000	000000	00.000	000	0000000
Fats	(H)	00.....0	...0000..00.0	.....0..	....000.00	0	.000.0	.0000	.00	.....
Brain	(H)	..0.0.	...000.0000.0	0	...0...000	0	.00000	0	.0.	...0..
Subcutis	(H)	..00.0	....0...0000.	00	....0.0000	..0.0	0....0	.....	0.0	.....
Muscles	(H)	..0000	..0..00000000	.....	..00000000	..0.0	000.00	0	000	0
Cranial cavity	(H)	00	...0.0.000000	.....0...0	000	0	...000	..0.0	.0.	....0.
Tympanic cavity	(H)	....0.	.....0...0.	.....0.	.....0.0..	0	.....	.....	...	.....
Nasal cavity	(H)	.....	...0....0.000	.....	.0.....000	.....	.00000	.....	.0.	.....
Thoracic cavity	(H)	...000	..0..0000..00	.....	..0.000..0	0	0.....	.0...	000	.....
Pericardiac cavity	(H)	.....	....0.....	.....	...0...0..	.....	.....	.....	..	0
Abdominal cavity	(H)	00.000	.....	.....0.	.....0...	...00	0	0..00	.0	.0..00
Pleura	(H)	.....	..0..000000..	.....	.....0..0	0	0...0.	.....	00	..0...
Peritoneum	(H)	..0..	.0.....0..00	0	...0000.00	0....	.000..	...0.	.0	..0...
Stomach	(D)	.....	..00000...000	....0..00...	0....0.0..	.....	.....	.....	..	.....
Testis	(H)	.....	00..0.0..0.0.	....0.0...0.	.....	0....	0.000.	0....	...	.....
Eye-ball	(H)	0....	000.....	0.....0....	0.....0	....	.....	..0	..	.....
Thymus	(A)	0....	0.....	...0	0...0..	..0.	.0000	000	0.	...0.0
Testis	(A)		0	00.0	0...00	0.00	0...0	000	0	00.00.

*No.of rats, 0:Present, .:Absent,
H:Hemorrhage, P:Petechiae, E:Edema, D:Dark bloody fluid, A:Atrophy,

Fig. 1 Hemorrhage in the subserosa of peritoneum.

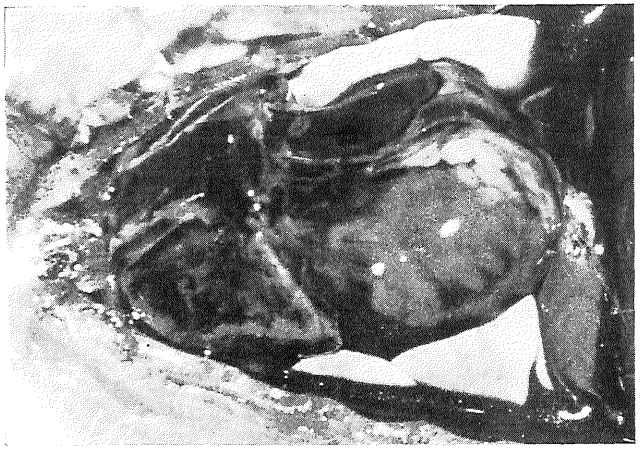


Fig.2 Hemorrhage in the thoracic cavity and the thymus.

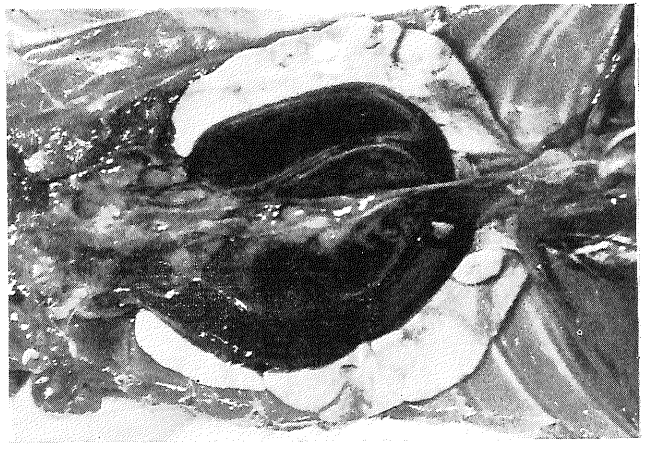


Fig.3 Hemorrhage in the cardiac cavity.

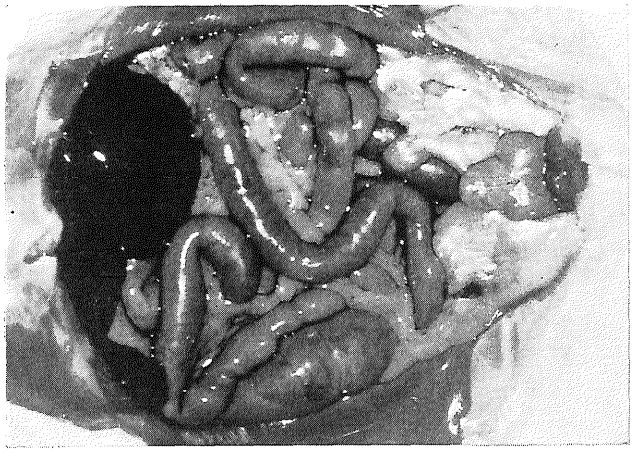


Fig.4 Hemorrhage in the abdominal cavity.

Fig.5 Hemophthalmus.

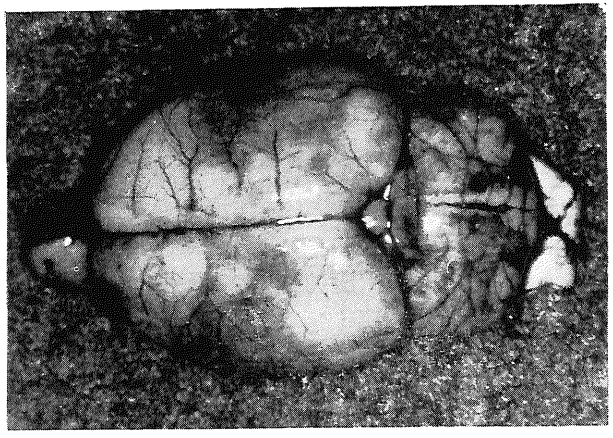


Fig.6 Hemorrhage in the brain.

Fig.7 Hemorrhage in the pancreas.

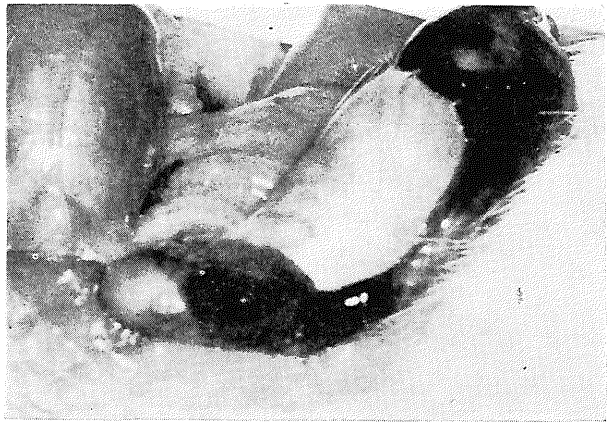


Fig.8 Hemorrhage in the epididymis and atrophy in the testis.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 45-48, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）添加飼料による飼育ラットの死亡率について

藤田　博* 平賀興吾*

Mortality Rates of Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT)

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン添加飼料によるラットの約2ケ月間の飼育実験において，多数の出血による死亡が見られた[1]．そこで飼育開始後の時間経過にともなう死亡率の算出をした．算出にあたって，飼育期間中に，解剖によるラットの欠失があったので，Life table 法[2]を用いて算出し，さらに，Probit 法[3]による分析を試みたので報告する．

実験方法

1. 実験動物：使用した動物は，SD-JCL系ラットの雄（4週令）で，購入日の体重によって，2群に分けた．A群は，体重66.8±3.0g，B群は，51.8±3.8gであった．A，B群ともに，180匹を，ステンレス製ケージに，5匹づつランダムに入れ，そのケージを，ベルト式飼育機にランダムに配置し，室温25°，湿度55±5％の一般飼育室で飼育した．

2. 飼料および飼育期間：ジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）は，和光純薬製 Lot. KIF5,562を用いた．これを，クレア製飼料粉末（CE-2）に1.5％に加え，十分混合後，固型飼料とした．また，対照群用飼料は，同粉末を，同様の操作で固型飼料とした．

A，B群のラットは，それぞれ，3グループに区分された．第1のグループは，S群と呼ばれ，入室日からBHT添加飼料で飼育し，9週間続けた．A，B群ともに各10匹である．第2のグループは，T群と呼ばれ，入室8日目からBHT添加飼料で飼育を行なった．ラット数は，A，B群とも各80匹で，10匹づつの8サブグループに分けられた．飼育開始後1週間目から，毎週1サブグループが解剖された．第3のグループは，C群と呼ばれ，対照群である．ラット数は，A，B群ともに各90匹で，9サブグループに分けられ，入室後毎週1サブグループが解剖された．

3. Life table 法：計算には，次の式を用いた．

$$q_x=\frac{d_x}{n_x}=\frac{d_x}{n_0-\left(\sum_{I=1}^{x-1} w_I+\sum_{I=1}^{x-1} d_I\right)}$$

$p_x=1-q_x$

$l_x=l_0\ p_1\ p_2\ p_3\ \cdots\cdots\cdots\cdots p_x\ (l_0=100)$

$m_x=100-l_x$

$$V(l_x)=l_x^2\sum_{I=1}^{x-1}\frac{d_I}{n_I\ (n_I-d_I)}$$

q_x：x 区間の死亡確率

d_x：x 区間の死亡数

n_x：x 区間スタート時の動物数

$\sum_{I=1}^{x-1} w_I$：$x-1$ 区間までの欠失動物合計

$\sum_{I=1}^{I-1} d_I$：$x-1$ 区間までの死亡動物合計

p_x：x 区間の生存確率

l_x：x 期の生存率

m_x：x 期の死亡率

$V(l_x)$：x 期の生存率の分散

二群の死亡率の差の検定には，次の式を用いた．

$$Z=\frac{l_xA-l_xB}{\sqrt{V\ (l_xA)+V(l_xB)}}$$

$Z>1.96$の時 $P=0.05$で有意

結果および考察

1. T群とC群の比較

C群では，死亡は，まったく見られなかった．T群

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. TA 群と TB 群の Life table

	期間（週）	死亡数 d_x	解剖数 w_x	動物数 n_x	死亡確率 q_x	生存確率 p_x	生存率 l_x(%)	分散 V(l_x)(%)
TA群	0—1	0	10	80	0.000	1.000	100	0.00
	1—2	7	8	70	0.100	0.900	90	0.00
	2—3	8	7	55	0.145	0.855	76.9	0.09
	3—4	6	8	40	0.150	0.850	65.4	0.20
	4—5	5	6	26	0.192	0.808	52.8	0.25
	5—6	2	4	15	0.133	0.868	45.8	0.38
	6—7	2	5	9	0.222	0.778	35.6	0.36
	7—8	0	2	2	0.000	1.000	35.6	0.76
TB群	0—1	2	10	80	0.025	0.975	97.5	0.00
	1—2	2	8	68	0.029	0.971	94.6	0.03
	2—3	7	9	58	0.121	0.879	83.2	0.05
	3—4	6	6	42	0.143	0.857	71.3	0.16
	4—5	5	8	30	0.167	0.833	59.4	0.25
	5—6	3	6	17	0.176	0.824	48.9	0.33
	6—7	0	3	8	0.000	1.000	48.9	0.63
	7—8	0	5	5	0.000	1.000	48.9	0.63

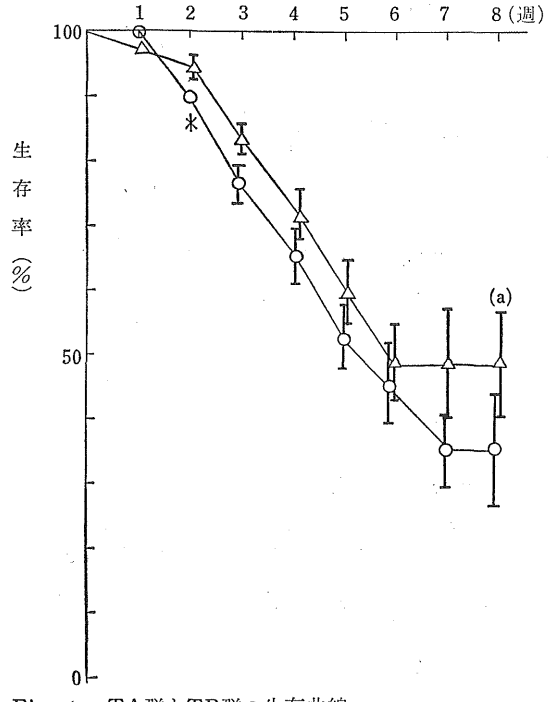


Fig. 1. TA群とTB群の生存曲線
○——○ TA群 △——△ TB群
*：P＝0.05で有意 (a)：S.E.

は，TA群で30匹，TB群で24匹の死亡が見られた．

2. TA群およびTB群の比較

TA群およびTB群の，各時期における死亡数，解剖数と，Life table 法による生存率，死亡率の計算結果を，Table 1 に示し，生存率（l_x）の変化を，Fig. 1 に示した．両群とも，2週間目から死亡数が増加し始め5週間目前後で，死亡確率（q_x）が大きくなっている．TA群とTB群の間の生存率に有意差が見られたのは，2週間目のみであったが，全体の傾向としては，TB群の生存率が高いのではないかと思われる．実験終了時には，TA群が36%，TB群が49%生存していたと推定される．各期ごとに死亡率の比較を行なうことは，可能であるが，途中でのラットの欠失のため，実験後期には，分散が大となり，精度が落ちることが予想される．そこで，全期間における死亡数の変化の比較のために，Probit 法での分析を試みた．この場合，飼育開始後の日数が薬物量に対応すると仮定し，log day と死亡率のプロビットによりプロットし，回帰式を求め，50%のラットが死亡した日数を推定すると，TA群は39日（95%信頼限界34—48日），TB群は47日（42—56日）で，8日間の差が見られた．また，平行性の検定により，平行性が認められたので，効力比を求めた（Fig. 2）．TB群のTA群に対する効力比は，0.82（95%信頼限界0.78—0.87）であった．これは，TB群の10日間の死亡数が，TA群の8.2日間の死亡数に相当すると言える．あるいは，50%のラットが死亡した日で比較するならば，TB群はTA群の約1.2倍の日数を要したとも言える．

この様に，同一週令であるが，体重の小さいTB群の

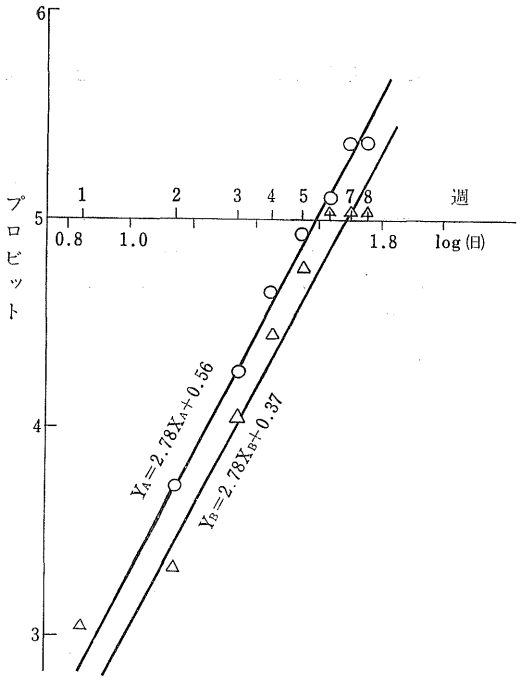


Fig. 2. ＴA群とＴB群のプロビット-log 日の回帰直線
○：A群の死亡率プロビット
△：B群の死亡率プロビット
LD_{50}：A群39日　B群47日
S_{SD} $=0.119<\chi^2_{(1)}$ $(P=0.05)=3.8$

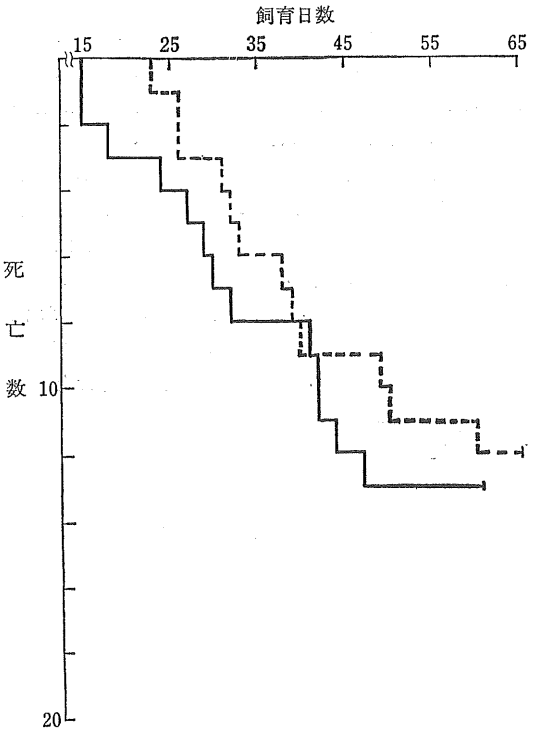


Fig. 3. S群と13T群の累積死亡数
－－－ S群 ——— 13T群

死亡率が体重の大きいＴA群の死亡率より小さかったことが，どの様な原因により生じたかは明らかではないが，可能性として，A群とB群を体重値により分けたための成長の程度によるＢＨＴに対する感受性の差，あるいは，薬物摂取量の差が考えられる．

3.　S群と13T群の比較

S群は入室日から，13T群は入室８日後より８週間ＢＨＴ添加飼料により飼育した群である．従って，S群と13T群は，飼育開始時において，１週令の差がある．飼育開始後の日数と死亡数の関係を Fig. 3 に示した．

最初に死亡が見られたのは，S群23日目，13T群15日目であり，実験終了時では，S群11匹，13T群12匹で，途中段階においても死亡数の変化にずれがあることがうかがえた．飼育開始後の各日におけるS群と13T群の死亡数の χ^2 検定を試みた．その結果，有意な差は全期間見られなかった．死亡数に大きな差の見られた日の値を Table 2 に示す．そこで全飼育期間の変化を見るために，Probit 法による分析を試みた．50%のラットが死亡した日は，S群47日（95%信頼限界は43—57日），13T群39日(35—50日)であった．両群の回帰式は平行性が

Table 2. S群と13T群の χ^2 検定

日	S　群		13 T 群		a) χ^2-統計量
	生	死	生	死	
20	20	0	17	3	3.243
25	19	1	16	4	2.057
30	17	3	13	7	2.133
45	11	9	12	8	0.902
48	11	9	13	6	2.174

a)　$\chi^2_{(1)}$ $(p=0.05)=3.84$で有意

認められ，S群 $Y_S=3.564X_S-1.019$ 13T群 $Y_T=3.564X_T-0.678$ であり，効力比0.82（95%信頼限界は0.80－0.83）であった．これは，S群の10日間の死亡数が，13T群の 8.2 日間の死亡数に相当することを意味する．

一般的に，幼若な動物では，薬物に対する感受性が大きいと言われているが，S群と13T群の比較においては，逆に，飼育開始日が１週早いS群に死亡が少なかった．このような現象が起った可能性として，ラット数が20匹と比較的少ないことを考慮するならば，S群にＢＨＴに対する抵抗性の高いラットが偶然に多かったとも考

えられるが，前述のＴＡ群とＴＢ群の比較においても発育が遅いと思われる体重の低いＴＢ群の方が抵抗性を示したことと合せ考えると，ＢＨＴに対する感受性が若いラットで低い傾向があることも推測される．

毒性試験においては，死亡は重要な情報の１つで，これを適確にとらえる必要がある．今回，ラットのＢＨＴ添加飼料による飼育実験で，多数の死亡が見られたので死亡率を Life table 法で求め，さらに，all or non の形で反応が見られる実験の解析のために確立された Probit 法を適用することを試みた．その結果死亡出現の傾向をある程度統計的にとらえることができたと思われる．また，ここで用いた計算方法は，毒性試験の中で，all or non の反応を示す変化，例えば，腫瘍の発生，特異的な症状有無などに応用できるものと思われる．

文　献

1) 藤井孝，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報 26-2，36，1975

2) Armitage, P.: *Statistical methods in medical research*, 408, 1973, Blackwell, Oxford and Edinnburgh

3) 佐々間昭：生物検定法，251，1964，東京大学出版会

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 49-53, 1975

ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）と直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）併用添加飼料摂取ラットの出血機構（Ⅰ）ＢＨＴによる出血について

鈴木英子* 平賀興吾* 中尾順子*
（柴）

Mechanism of Haemorrhage in Rats fed with Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) (I) Haemorrhage in Rats treated with BHT

HIDEKO SUZUKI*, KOGO HIRAGA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

先に，食品添加物で油脂類の酸化防止剤として使用されるＢＨＴ（dibutyl hydroxy toluene）と洗剤の主成分である直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ＬＡＳ）とを0.8％と0.2％乃至0.07％の割合に飼料に混合してラットに与えたところ雄において陰嚢内，腹腔内等に出血をきたし死亡するものがあらわれ，これらのラットは貧血と血液凝固時間およびプロトロンビン時間の延長が認められ，更に Vitamin K の投与によりプロトロンビン時間は完全に正常化されるが，血液凝固時間は回復しないことを報告した.[1,2]

今回はラットの系統を変えて追試するとともにＢＨＴ単独とＢＨＴ・ＬＡＳ併用の場合とにおけるプロトロンビン等凝固因子におよぼす影響の比較，更にＢＨＴの投与経路によるプロトロンビン時間への影響について検討した.

実験材料および実験方法

試料：1)ジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）一和光純薬 Lot No. ACL 5024, mp 69.5°

2) 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）一花王アトラスK.K.ネオペレックスF-60, Lot No. 127 (C_{10}—10.6％, C_{11}—34.1％, C_{12}—27.7％, C_{13}—19.0％, C_{14}—8.7％, 有効成分60±2％, 未反応油分1.5％以下, 無機塩類4.0％以下, 水分38％, ＰＨ（1％）7.1, 平均分子量（345.8), 有効成分60％として使用

1）および2）試料を次の割合で船橋農場製ラット・マウス用飼料ＦⅡあるいは日本クレア製ラットマウス用ＣＥ２の原末に混合後固型化し，実験動物に水道水とともに与えた．なお，対照用固型飼料も同時に同一飼料原末より製造した.

ＢＨＴ0.8％＋ＬＡＳ0.2％
（以下ＬＴと略す）
｛船橋農場，（以下ＬＴ－Ｆと略す）
｛日本クレア，（以下ＬＴ－Ｃと略す）

ＢＨＴ0.8％　日本クレア，（以下0.8％Ｔと略す）

ＢＨＴ1.5％　日本クレア，（以下1.5％Ｔと略す）

実験動物：ＪＣＬ：ＳＤ系（ＳＰＦ）雌雄ラットの４週齢のものを購入し，１週間一般飼料（ＣＥ２）にて飼育後実験に供した.

飼育環境は，25±1°，湿度55～60％，照明時間を午前６時から午後６時までとし，５匹ずつ同一ステンレス金網ケージに収容飼育した.

検査方法

ａ）血液凝固時間（Sahli-Fanio 法),[3] ｂ）プロトロンビン時間（Quick １段法),[4] ｃ）プロトロンビン（Owren),[5] ｄ）第Ⅶ・Ⅹ因子複合体（Koller).[6]

ｂ）はトロンボプラスチンあるいはシンプラスチンＡ（トロンボプラスチン，第Ⅴ因子，フィブリノーゲン，カルシウムと塩化ナトリウムを含む）を用いて測定を行ったが通常はシンプラスチンＡを用いた．なおプロトロンビン時間が300秒以上のものは無限大（∞）とした.

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

a）は断頭時放出する血液を用いた[7]．b）は無麻酔下，外頸静脈より，c），d）はエーテル麻酔，心臓穿刺により，b），c），d）いずれも0.1m*l*M/10クエン酸Na液を入れた注射器を用い1m*l*まで採血し，3,000 rpm，15分間遠心後採取した血漿を用い検査した．

e）ディスク電気泳動による血漿プロトロンビンの解析法

プロトロンビンの精製[8]

1） あらかじめ0.15M修酸カリウム1容を入れた注射器を用いて血液9容をとり4°，2,000rpm で30分間遠心して血漿を採取した．以下の操作はすべて0—4°で行なう．

2） 血漿10—15m*l* にメルク製硫酸バリウム粉末(血漿1m*l*に対し35mg)を加え，マグネチックスターラーで60分間ゆっくりふった後，20分間1,500rpm で遠心，上澄溶液は捨てる．

3） 残った硫酸バリウムは0.15M塩化ナトリウムに溶解した0.1M修酸カリウム0.5 plasma volume で洗い，1,500rpm，20分間遠心．この操作を2回くり返す．

4） 沈査は0.15M塩化ナトリウムで洗い，同様に1,500 rpm，20分間遠心．この操作も2回くり返す．

5） この硫酸バリウムを冷0.17Mクエン酸ナトリウムの0.067 plasma volume で30分間，マグネチックスターラーで回転することにより，硫酸バリウムからプロトロンビンを溶出させる．この操作を2回くり返す．

6） 溶出したプロトロンビンを集め，2,000 rpm，10分間遠心し，上澄溶液を採取する．

電気泳動[9]はアクリルアミドの終濃度7%，ゲル管は5×75mm を用い，泳動用緩衝液はトリスーグリシン，pH 8.3を用い，3mA/ゲルの電流を85分流した．ゲルを13%酢酸に溶解した0.25%アミドブラックで20分間染色後，脱色を行い，水道水で洗滌後，デンシトメーターでパターンを記録した．

実験およびその結果

I SD系ラットにおけるLT—F摂取による血液凝固時間，プロトロンビン時間の経日的変化とこれに対する正常飼料への転換の影響

(1) 5週齢のラットを用いてLT—Fにより飼育を開始し，7日間以後雌雄各5匹について血液凝固時間およびプロトロンビン時間を測定した．

結果は Table 1 に示すように両者とも1週間後より著明な延長がみられ，8日目頃より出血斃死するものが現われた．雌においては，2週間頃より延長が認められるが，次第に回復した．

LT—Fを11日間与えた出血を起こしてない雄ラットに通常飼料への転換を行ったところ40時間後には，血液凝固時間およびプロトロンビン時間は Table 2 に示すようほぼ正常に回復した。

Table 2 LT—F飼育ラットの正常飼料への転換による血液凝固時間およびプロトロンビン時間

飼料	血液凝固時間 平均±SE（分）	プロトロンビン時間 平均±SE（秒）
正常	2.50±0.22	36.0± 2.1
LT—F	8.05±1.08**	273.8±138.8
LT—F ↓ 正常	3.02±0.22	41.5± 1.7

各群ラット数：5匹 正常飼料に対して**P＜0.01

(2) 5週齢よりLT—Cにて飼育した雄ラットの1—4日間の血液凝固時間およびプロトロンビン時間を(1)と同様に測定した．

結果は Table 3 のようで3日後よりプロトロンビン時間の延長傾向がみられた．

Table 1 LT—F 飼育によるラットの血液凝固時間およびプロトロンビン時間

性	飼育開始後の日数(日)	血液凝固時間平均±SE（分）		プロトロンビン時間平均±SE（秒）	
		対照	LT—F	対照	LT—F
♂	7	2.35±0.26	10.21±1.30**	30.8±3.0	∞**
	13	2.50±0.22	8.05±1.08**	36.0±2.1	273.8±138.8
	25	4.33±0.44	9.90±1.35**	47.0±2.8	∞**
♀	7	2.49±0.20	2.51±0.07	36.8±3.9	42.8± 4.3
	13	2.20±0.20	2.51±0.42	37.0±1.4	136.5±53.7
	21	4.30±0.57	4.76±0.12	29.4±1.4	56.0±28.5
	54	4.58±0.31	4.77±0.57	26.4±8.5	35.7±10.5

各群ラット数：5匹，対照に対して *P＜0.05 **P＜0.01

Table 3　LT—C飼育による雄ラットの血液凝固時間およびプロトロンビン時間

飼育開始後の日数（日）	血液凝固時間 平均±SE（分）	プロトロンビン時間 平均±SE（秒）
対照	4.31±0.14	19.0± 2.9
1	4.33±0.21	17.6± 1.2
2	4.48±0.26	17.8± 1.8
3	5.04±0.50	162.5±72.5
4	4.89±0.52	117.6±83.2

II　T単独摂取とLT摂取のプロトロンビン，第Ⅶ・X因子複合体への影響とT摂取に対するVitamin Kの効果

(1) Vitamin K が生成に関与する凝固因子のプロトロンビンと第Ⅶ・X因子複合体とに対するLT—Cと0.8%T単独摂取の場合の影響をみた．

各群6匹の5週齢雄ラットを用い，各飼料による飼育を開始して1週間毎に同一ラットを用い検査した．

結果は Fig. 1～2 に示すようでLT—Cと0.8%Tの間には全く差がないか，むしろ0.8%Tの方が時期によって強い傾向を示した．

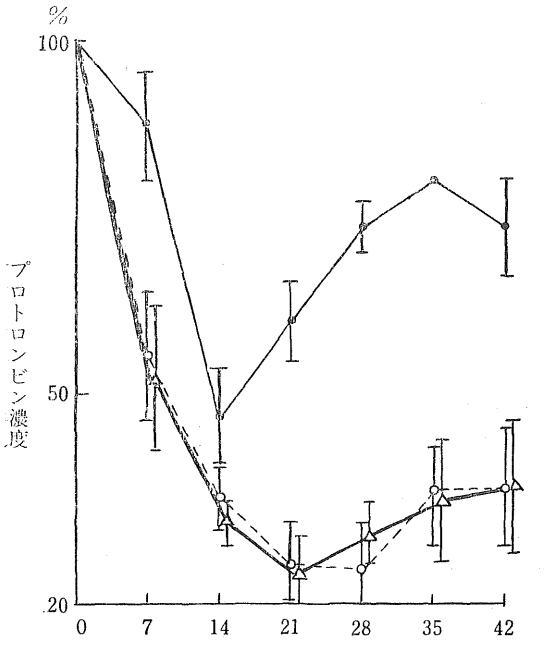


Fig. 1　LT-C, 0.8%T投与ラットのプロトロンビン濃度の経時的変化

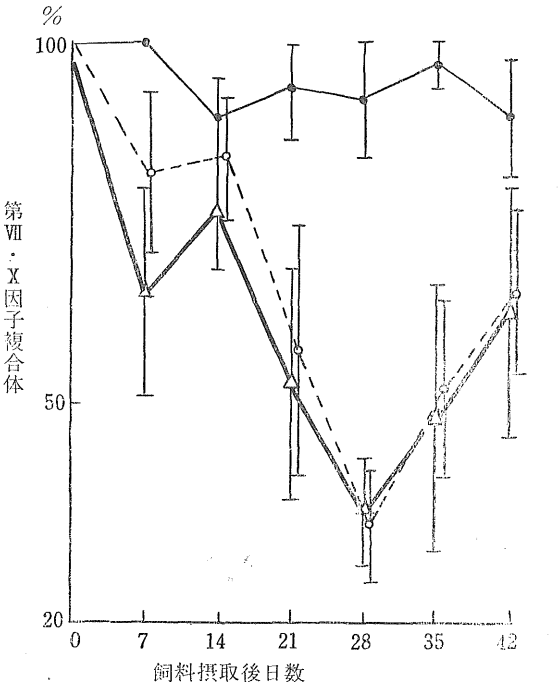


Fig. 2　LT-C, 0.8%T投与ラットの第Ⅶ・X因子複合体の経時的変化

(2) 1.5%Tで7日間飼育し，他群（一群5匹）には前日（1.5%T飼育6日後）に Vitamin K を投与して血液凝固時間およびプロトロンビン時間の測定を行った．

Vitamin K（和光純薬 Lot No. TPE 7742）10mgを10%アラビアゴム液（日局8）1 mlに懸濁，午前10時と午後4時の2回，腹腔内投与して翌朝9時より検査を行った．

結果は Table 4 に示すように1.5%T単独飼料でも7日間で血液凝固時間およびプロトロンビン時間の延長を来たし，Vitamin K 投与によっていずれも回復した。

Table 4　1.5%Tによる7日間飼育雄ラットの血液凝固時間およびプロトロンビン時間と Vitamin K の効果

実験飼料処置	血液凝固時間 平均±SE（分）	プロトロンビン時間 平均±SE（秒）
対照	4.11±0.40	14.7±0.9
対照 V.K.	4.41±0.43	14.7±0.7
1.5%T	5.81±1.57	31.6±7.5
1.5%T V.K.	3.79±0.44	11.3±0.5

Ⅲ 電気氷動法によるT摂取ラットのプロトロンビンの解析

1.5%Tを7日間雄ラットに与え，他群には検査前日（T摂取6日後）に，Vitamin K（エーザイK.K.ケイツー注）10mg/rat を腹腔内投与した．

ジクマロール（3.3′メチレンービスヒドロキシクマリン和光純薬 Lot. No. ACP 8621）をラットに10mg/rat 1—2回，（1回投与の場合は検査の40時間前，2回の場合は40時間および24時間前に胃ゾンデにて経口投与を行い検査した．他群にはBHTの場合と同様，検査前日 Vitamin K を10mg/rat 投与した．

ジクマロールは10mgを1%トラガント液1mlに懸濁し用いた。検査はすべて午前9時から始め，エーテル麻酔下，心臓穿刺により採血し，血漿分離後，各群ラットの血漿が10—15mlになるよう混合し，ディスク電気泳動法によりプロトロンビンを解析した．

Table 5 に示すように，プロトロンビン時間はジクマロール，BHT投与により著明な延長が認められたが Vitamin K 投与によって正常値への回復がみられた。

ディスク電気泳動法によるプロトロンビンの解析結果は Fig. 3 のようにBHTならびにジクマロール投与ラットにおいてはプロトロンビンのバンドは非常に薄く不明瞭である．これに対し，おのおのを処置したラットに Vitamin K を投与したものについてはバンドは対照あるいはより以上に明確に現われた．それは Fig. 4 のデンシトメーターによる記録で一層明らかとなった．

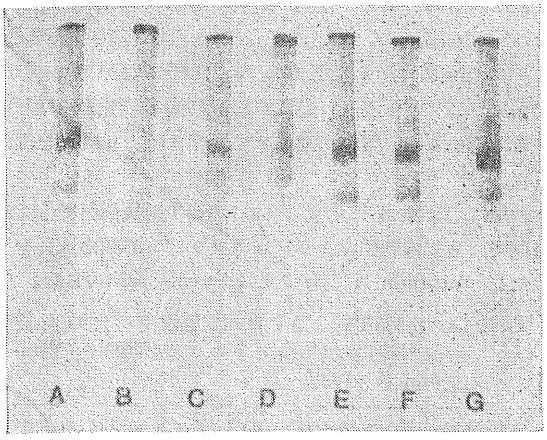


Fig. 3 1.5BHT，およびジクマロール投与ラット血漿プロトロンビン分画のディスク電気泳動図
A：対照 B：ジクマロール10mg×2 C：ジクマロール10mg D：1.5%BHT E：対照＋V.K. F：ジクマロール10mg×2＋V.K. G：1.5% BHT＋V.K. それぞれの血漿からプロトロンビンを精製し，その50ulをゲルの上端に添加した。

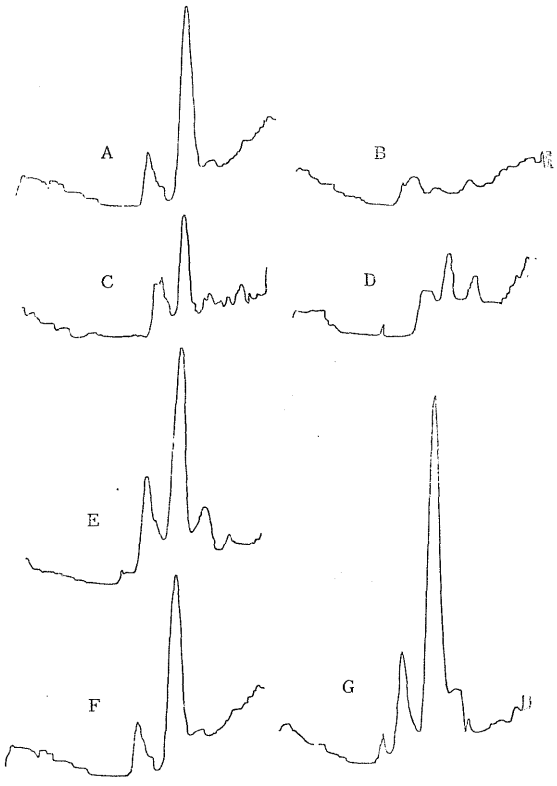


Fig. 4 Fig. 3 のゲルのデンシトメーターによるパターン

Table 5 ジクマロール，ジクマロール＋V.K.，BHT，BHT＋V.K. 処置ラットのプロトロンビン時間

処置	ラット数	プロトロンビン時間 平均±SE（秒）
対照	5	19.8±0.4
ジクマロール10mg ×1	4	∞
ジクマロール10mg ×2	6	∞
BHT	4	∞
ジクマロール10mg ×2＋V.K.	3	23.3±0.9
BHT＋V.K.	3	18.3±1.5

Ⅳ BHTを皮下ないし経口的に強制投与した場合のプロトロンビン時間への影響

オリブ油（日局8）100ml中にBHT30gを溶解し，2g/kgとなるよう雄ラットに毎日午前9時から胃ゾンデで強制経口投与ないし皮下投与を行った．経口投与では2日間でプロトロンビン時間の延長傾向を来たし，7匹中4匹死亡するものが現われた．皮下投与では7日間連続投与しても死亡するラットは現われず，プロトロン

ビン時間も全く延長が認められなかった．経口投与後3日，皮下注射後8日目にプロトロンビン時間を測定した結果を Table 6 に示した．

Table 6　BHT 2 g/kgを経口ないし皮下投与した場合のプロトロンビン時間

投与方法	処　置	ラット数	プロトロンビン時間 平均±SE（秒）
皮　下[1)]	オリブ油	5	12.0±0.4[a)]
	BHT	5	10.2±0.9[a)]
経　口[2)]	オリブ油	3	24.0±4.0[b)]
	BHT	3	50.3±9.8[b)]

1）投与開始後8日目，2）投与開始後3日目
a）：トロンボプラスチンにより測定　b）シンプラスチンAにより測定

総括と考按

JCL：SD系ラットを用い，BHT単独とBHT・LAS併用投与（添加飼料の摂取）が血液凝固時間，血漿のプロトロンビン時間，第Ⅶ・X因子複合体，プロトロンビンにおよぼす影響と，BHTの投与経路によるラットのプロトロンビン時間への効果について検討した．

BHT単独摂取で血液凝固時間およびプロトロンビン時間の延長が認められた．この傾向は雄ラットに強く出血致死するものがみられた．

BHT摂取による血液凝固時間とプロトロンビン時間の延長は Vitamin K 投与によって完全に回復した．

BHT（T）単独とBHTとLAS併用（LT）飼料摂取による Vitamin K が生成に関与するプロトロンビンないし第Ⅶ・X因子複合体への影響には差を認められなかった．

電気泳動によるBHT投与ラットのプロトロンビンバンドはジクマロール投与の場合と同じように消退し，Vitamin K 投与により対照と同じプロトロンビンのバンドが回復した．

BHT 2 g/kg 7日間連続皮下投与しても血液凝固時間，プロトロンビン時間に対する影響は認められなかったが，同量の経口投与では2日間でプロトロンビン時間の延長が現われた．

以上により，ラットのBHT，LAS併用摂取による出血はBHTの Vitamin K が生成に関与する凝固因子のプロトロンビンおよび第Ⅶ・X因子複合体の生成阻害と，LASの Vitamin K が関与しない血液凝固系因子への何らかの作用が相乗して発生することが考えられる。なお，LASに関しては当部の高橋ら[10)]がプロトロンビンの阻害を報告しているが，BHTとLASの相互作用は単純なものではないようである．

BHT摂取の場合のプロトロンビンの減少はクマリン投与の場合のメカニズムと同じであろうと推定されたが，今後より一層の解析が必要である．

BHTの皮下投与ではプロトロンビン時間の延長がみられなかったが，別の試験でBHT皮下投与では，経口投与でみられる肝重量の増大が全くみられなかったことより，先ずBHTの皮下よりの吸収について検討する必要がある．

要　旨

ラットにおけるBHT単独およびBHT，LAS併用飼料摂取が，血液凝固時間，プロトロンビン時間，第Ⅶ・X因子複合体およびプロトロンビンに及ぼす影響とこれに対する Vitamin K の作用を検討し，併せてBHTの経口および皮下投与によるプロトロンビン時間への影響を比較した．

文　献

1）平賀興吾ら：東京衛研年報，25，631，1974
2）米山允子ら：東京衛研年報，24，449，1972
3）金井泉，金井正光：臨床検査法提要，25，VI80，1970，金原出版，東京
4）Quick, A. J., Stanley-Brown, M. and Bancroft F. W.: *Am. J. Med. Sci.*, 190, 501, 1935
5）加々美光安：臨床病理，特16，90，1970
6）Koller, F., Loeliger, A. and Dukert, F.: *Acta haemat.*, 6, 1, 1951
7）柴英子：東京衛研年報，25，659，1974
8）Shah, D. V. and Suttie J. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA., 68, 1653, 1971
9）永井裕：蛋白質核酸酵素，11，744，1966
10）高橋省ら：東京衛研年報，25，637，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 54-61, 1975

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムのトロンビン阻害作用について（第2報）

高橋　省* 中尾順子* 平賀興吾*

Inhibition of Thrombin by Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) (II)

OSAMU TAKAHASHI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

前報において，ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）と直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）を同時に投与したラットの血漿中には，トロンビン阻害物質が存在し，それはLASそのものであることを示した.[1] 血液凝固の第3相は，トロンビンの作用でフィブリノーゲン中の特定のArg—Glyが切断され，フィブリノペプチドを生じながら，フィブリンモノマーを生成する反応，フィブリンモノマーが重合してポリマーを形成する過程および第XIII因子，カルシウムイオンの作用で酸不溶性の安定フィブリン塊を形成する反応等が含まれる.[2] 前報で示したLASのトロンビン阻害作用は，第XIII因子，カルシウムイオンの影響を除いたフィブリノーゲンから酸可溶性フィブリン塊に到る過程に限っても阻害が起るということであり，従って，その素過程は，トロンビンのプロテアーゼ作用，フィブリンモノマーの重合およびゲル化の3つの段階を含むことになる.

本報では，この3つの段階のどこにLASが作用してくるのかという点に着目して，それに関連した幾つかの実験を行い，LASの阻害作用について推論を試みた.

実験方法

1. 試薬類

LAS—ライオン油脂株式会社研究所製のものを精製して使用した.[1]

フィブリノーゲン—Sigma 社製ウシフィブリノーゲン Fr. I，トロンビン—持田製薬ウシトロンビン，トロンボプラスチン—Warner-Lambert Co. 製の Simplastin A，プロタミンフリーベース—Sigma 社製サケ精子プロタミン grade VI，ポリグルタミン酸ナトリウム—Sigma 社製 Type III—B（分子量50,000—100,000）

2. 分析機器

分光光度計（日立124）. Beckman pH ASAR-I digital pH meter, Coagulation Analyser 600, (Bio-Dynamics INC).

3. LAS，蛋白質の定量

前報に準じた.[1]

実験I．フィブリン塊形成に対するLASの影響について

水0.4m*l*，1％フィブリノーゲン（0.025M塩化ナトリウムを含む0.025Mトリス緩衝液 pH 8.2に溶解）0.1m*l*の混液に，トロンビン10単位を加え反応を開始させ，その0.01％LAS後0.1m*l*を加え，そのフィブリン塊形成に要する時間への影響を見た．ここで，LASおよびフィブリノーゲンの最終濃度はそれぞれ 4.71×10^{-5} M，0.164％であった．次に酢酸酸性溶液中でフィブリン塊を溶解し，フィブリンモノマーを作り，[2] 0.2M 酢酸緩衝液 pH 7.4を0.6m*l*および水0.1m*l*あるいは0.01％LAS 0.1m*l*を含む混液中にモノマー溶液を0.1m*l*添加し，フィブリン塊生成を Coagulation Analyser で測定した．一方，0.2M酢酸緩衝液 pH 7.4，0.4m*l* および水0.1m*l*あるいは0.01％LAS 0.1m*l*を含む混液中にモノマー0.1m*l*を加え，フィブリン塊生成を肉眼的に測定した．又，フィブリンゲルの濁度に対する影響を知る為，LASおよびフィブリノーゲンをそれぞれ 1.1×10^{-5}M，0.19％になるよう加え，それにトロンビン10単位を添加し，濁度を測定し，無添加のものと比較した.

実験II．蛋白質，脂質，トロンボプラスチンによるトロンビン阻害の回復

1％フィブリノーゲン200μl，1％LAS 100μlに蛋白質を100μl加えた混液にトロンビン50単位を添加し，フィブリン塊の生成時間を測定して，LASの阻害効果に

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

対する蛋白質の影響を見た。脂質の影響をみる為に，脱脂10%ウシ血清アルブミン15μl，0.1%ＬＡＳ10μl，1%フィブリノーゲン30μlに脂質乳濁液を加え，トロンビン10単位を添加し，フィブリン塊の生成時間を測定した．又，フィブリノーゲンおよびトロンビンの回復効果をみる為に，ウシ血清アルブミン1.5%，ＬＡＳ0.3mMになるようそれぞれを加え，最終容量を100μlになるよう基質と酵素を加えフィブリン塊生成時間を測定した．トロンボプラスチンの影響をみる為には，脱脂10%ウシアルブミン，3mM，ＬＡＳ0.1ml，1%フィブリノーゲン0.3mlおよび水0.45mlを加えた混液を作り，混液0.1mlに対し，Simplastin A，ケファリン，塩化カルシウム0.2mlを加えトロンビンを10単位添加して，Simplastin A の代りに水を加えたものと比較した．Simplastin A に2容のクロロホルム—メタノール（2：1）混液を加え，遠沈し，水層，中間固形物，クロロホルム層に分けた．それぞれの分画を乾固後，水で3mlにし，同様な方法でフィブリン塊生成への影響をみた．なお，アルブミンの脱脂は Dole の方法[3]に従った．

実験Ⅲ．界面活性剤のトロンビンへの作用

種々の界面活性剤のトロンビンへの作用を知る為，陰イオン系界面活性剤の場合には，1%フィブリノーゲン（0.025Mトリス緩衝液pH8.1に溶解）200μl，トロンビン50単位，界面活性剤100μlの反応系で行った．陽イオン，非イオン性界面活性剤については，1%フィブリノーゲン（0.02M酢酸緩衝液，pH 7.4に溶解）500μl，トロンビン100単位界面活性剤100μlの反応系で行った．

陽イオン性界面活性剤としては，ラウリルピリジニウムクロリド，ラウリルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド，陰イオン性界面活性剤としては，カルボン酸型が，オレイン酸ソーダおよびヂオキシコール酸ソーダ，硫酸エステルがラウリル硫酸ソーダ，スルホン酸が分岐型ＡＢＳおよび直鎖型ＡＢＳ，非イオン性活面活性剤として，ソルビタンモノラウレート（スパン20），ポリオキシエチレンモノラウレート（ツイン20），両イオン性のものとして卵黄レシチンを用いた（Fig. 1.）．

実験Ⅳ．フィブリノーゲンとＬＡＳの結合についてのpH 依存性[4]

フィブリノーゲンにＬＡＳを加え，フィブリノーゲンとの差スペクトルをとると，290mμ付近に，ＬＡＳ単独では存在しないピークが生じる（Fig. 2.）．このピークについての pH 依存性をみる為，水酸化ナトリウム1ml，0.2%フィブリノーゲン（0.15%塩化ナトリウム溶液）2mlの混液に0.2%ＬＡＳ1mlを加え，水1mlを加えたものとの差スペクトルを測定した。

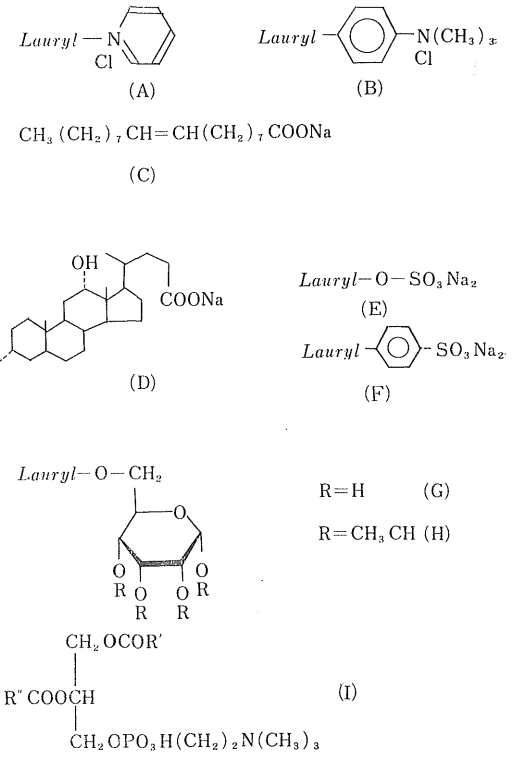


Fig. 1. Structural Fomulae of Detergents
(A) Laurylpyridinium chloride (B) Lauryltrimethylammonium chloride (C) Sodium Oleate (D) Sodium Deoxycholate (E) Sodium Laurylsulfate (F) Laurylbenzene Sulfonate (G) Span 20 (H) Tween 20 (I) Lecithin.

実験Ⅴ．フィブリノーゲンのトリニトロフェニル化（ＴＮＰ化）[5]

2%重炭酸ナトリウムに溶解した1%フィブリノーゲンに対し，トリニトロベンゼンスルホネートを加え，アミノ残基の化学修飾を行い，それに対するＬＡＳ添加の影響をみた．

結　果

実験Ⅰ．フィブリン塊形成に対するＬＡＳの影響

Fig. 3. において，横軸はトロンビン添加後のＬＡＳ添加時間を示してある．ただし，0秒については，ＬＡＳをトロンビン添加前に加えた場合の値をプロットしてある．縦軸は，ＬＡＳ無添加のフィブリン塊生成時間をＬＡＳ添加時の生成時間で割った相対速度で示してあるなお，この時，ＬＡＳ無添加のものが53秒でフィブリン塊を形成するよう各成分の濃度を調整してある．この図から明らかなように，ＬＡＳは反応の前段階でよく阻害効果を示し，むしろ後半では促進的である．又，前段階でもトロンビン添加後5，6秒後の方が，幾分，阻害が

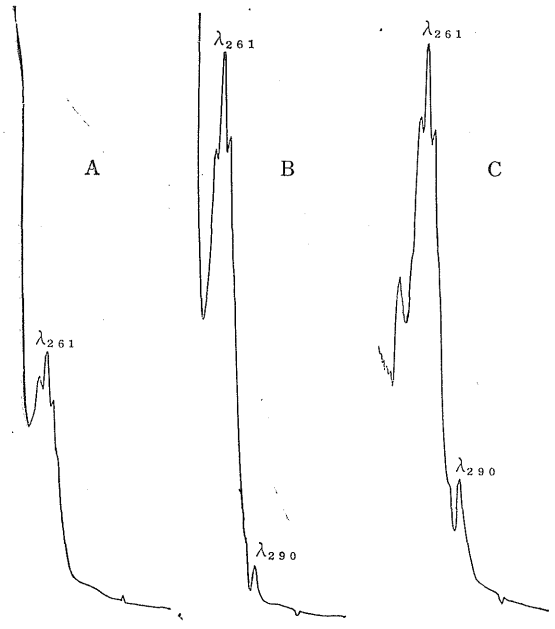


Fig. 2. Differential Spectrum of LAS and Fibrinogen Mixture
A; Spectrum of LAS, B; Differential Spectrum of Mixture (pH 9.55), C; (pH 12.32)

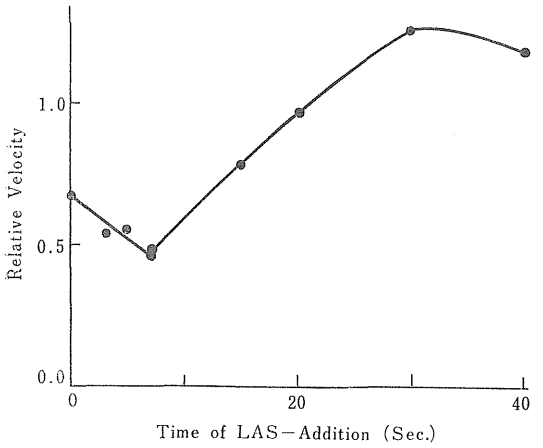


Fig. 3. Effect of LAS on Fibrin Clot Formation

強いようである.

Table 1. は別に調製したフィブリンモノマーを, pH を中性領域に変えることにより, 再重合させる場合での, LASの効果をみたものであるが, 比濁法を基礎とする Coagulation Analyser ではLAS添加により相対速度の延長を示すが, これは決して真のフィブリン塊生成時間をみていない. 肉眼的には pH の変化に伴い, 2秒以内にフィブリン塊を形成し, それに対して,

Table 1. Effect of LAS on Fibrin Polymerization

	Coagulation Analyser	Naked Eyes
LAS−	1.0 (14sec.)	1.0 (<2sec.
LAS+	0.4	1.0 (<2sec.

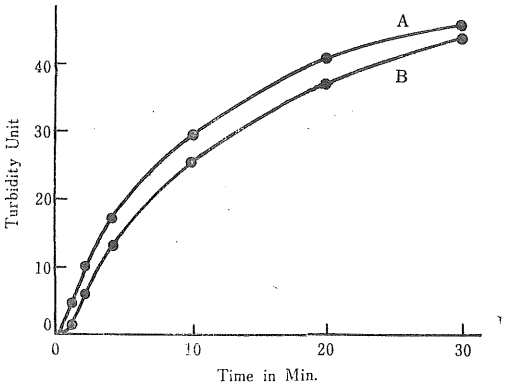


Fig. 4. Effect of LAS on Turbidity of Fibrin Clot
A; LAS −, B; LAS+

LASの影響はない.

Fig. 4. はフィブリンゲルの濁度への影響をみたもので, フィブリン塊形成でみた場合抗トロンビン作用を有さない低濃度のLASでゲルの濁度が, 無添加のものに比べ低下していることを示すものである.

実験II. LASによる阻害効果の回復

Table 2. はプロタミン, アルブミン, ポリグルタミン酸のLASによる阻害効果への影響を示したものである. 表から分るように回復効果はプロタミンが強く, ポリグルタミン酸は, 全く回復効果がない.

Table 2. Reversal of LAS Inhibition by proteins

proteins		LAS (mM)	Relative Velocity
0.066%			0.00
0.111%	protamine	6.36	0.08
0.222%			0.92
		6.39	0.00
2.22%	Albumin	5.81	0.5
		3.19	0.90
2.22%	poly-L-Glu	3.19	0.00

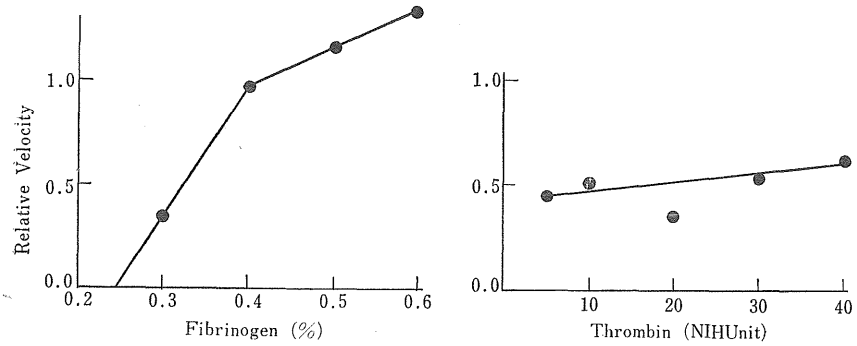


Fig. 5. Reversal of LAS Inhibition by Substrate and Enzyme Protein

Table 3. は同様に種々の脂質の回復効果を検討したもので，トリパルミチン，コレステロールにＬＡＳのトロンビン阻害作用に対する回復効果がみられる．

Table 3. Reversal of LAS Inhibition by Lipids

Lipids	Relative Velocity
Inhibitor −	1.0
Inhibitor only	0.55
1.2% Lecithin	<0.14
1.2% Cholesterol	1.5 (Small clot)
1.2% Palmitic acid	<0.21
1.2% Oleic acid	<0.21
1.2% Tripalmitin	1.2
0.4% Tripalmitin +0.4% Tween 20	1.15
0.8% Tripalmitin +0.8% Tween 20	1.30
1.2% Tripalmitin +1.2% Tween 20	2.85
1.2% Triolein	<0.21

Fig. 5. はフィブリノーゲン，トロンビンの回復効果を示したものである．ここで，フィブリノーゲン0.3%，トロンビン10単位の相対速度を1.0としてある．フィブリノーゲン量は相対速度に大きく影響し，ＬＡＳによる阻害作用を回復するが，トロンビンは倍にしても殆んど変化しない．

Table 4. はプロトロンビン時間の測定に用いるSimplastin A のＬＡＳ効果への影響をみたもので，相対速度を10倍以上に回復する．なお，クロロホルム—メタノール（２：１）で処理した Simplastin A は，その回復効果は水層に大きい．

Table 4. Reversal of LAS Inhibition by SimplastinA

	Relative Velocity
Water	1.0 (152sec.)
Simplastin A	12.4
Cepharin	0.0
$CaCl_2$	0.0
Fibrinogen	3.1
Chloroform-Methanol Treated Simplastin A	
Water Layer (586μg/ml of protein)	7.6
Chloroform Layer	0.0
Pellet (5.46 mg/ml of protein)	4.8

実験Ⅲ．種々の界面活性剤のトロンビンへの作用

Fig. 6. は各種界面活性剤のトロンビン阻害曲線であり，ラウリルピリジニウムクロリド，ラウリルベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの陽イオン性界面活性剤２種，およびカルボン酸型陰イオン性界面活性剤のオレイン酸ソーダは 10^{-2} M のオーダーに50%阻害濃度を持ち，カルボン酸型，デオキシコール酸ソーダは10^{-3}Mに50%阻害濃度を持つ．ラウソル硫酸ソーダ，ＡＢＳは10^{-4}Mのオーダーに，ＬＡＳは 10^{-5} Mに50%阻害濃度を持ち，トロンビン阻害作用はＬＡＳが一番大きい．なお，スパン20，ツイン20，レシチン等は阻害効果を示さなかった．

実験Ⅳ．フィブリノーゲンとＬＡＳの結合のpH依存

Fig. 2. で290mμ の吸収極大をフィブリノーゲンとＬＡＳの結合の結果生じたものであると考えれば，その

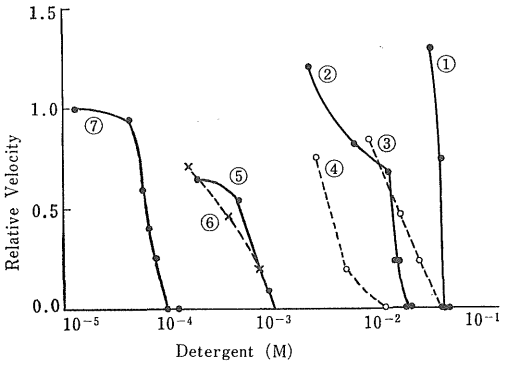


Fig. 6. Inhibition of Thrombin by Detergents
① Laurylpyridinium Chloride ② Laurylbenzyltrimethylammonium chloride ③ Sodium Oleate ④ Sodium Deoxycholate ⑤ Sodium Lauryl Sulfate ⑥ Branched Alkylbenzene Sulfonate ⑦ Linear Alkylbenzene Sulfonate. The thrombin was not inhibited by 44.4 mM of Span 20, 32.6 mM of Span 20, 32.6 mM of Tween 20 or 7.8 mM of Tween 20 or 7.8 mM of lecithin at least.

pH 依存性をみることにより，複合体形成に直接あるいは間接に関係する基の解離状態を推定しうる．Fig. 7. では，290 mμ での0.0を複合体形成量とみなしている，図に明らかなように，pH 依存性を示し，少くとも 1 つ，約10.9の pK 値が求まる．

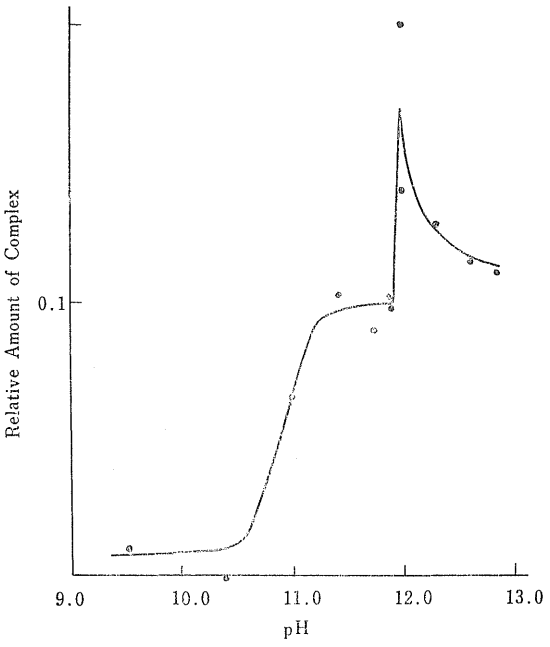


Fig. 7. pH Dependence of Fibrinogen and LAS Interaction

実験Ⅴ．フィブリノーゲンのＴＮＰ化

Fig. 8. はフィブリノーゲンのＴＮＰ化を示したものであり，Ａの無添加の対照に比べＢ，ＣのＬＡＳを添加したフィブリノーゲンではＴＮＰ化が阻害されている．又，ＣのようにフィブリノーゲンとＬＡＳを前もって，混合しておくと，その阻害はさらに強まる．

Fig. 9. はトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）の濃度とトリニトロフェニルフィブリノーゲンの関係を示したものであり，高濃度の TNBS では時間がたつと阻害が回復してくる．

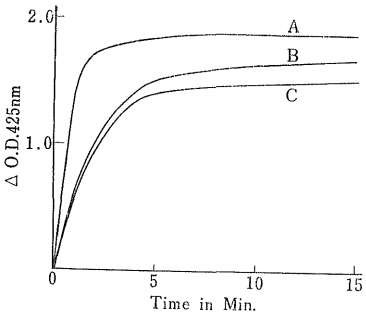


Fig. 8. TNP-lation of Fibrinogen
A; LAS−, B;LAS+, C; Preincubation of Fibrinogen with LAS

考　　察

トロンビンはフィブリノーゲンの Aα, Bβ 鎖のArg-Gly を切断しフィブリノペプチドＡおよびＢとフィブリンを生じる（Fig. 10.）.[2] フィブリンモノマーからの重合過程は，ある濃度以上のモノマーが存在すれば非常に速いと考えられる．実験Ⅰで示した様に，ＬＡＳの阻害効果はフィブリノーゲンとトロンビンの反応の初期段階で著しく，むしろ後期においては促進的に働く．従って，前報での推論どおりＬＡＳの阻害は，むしろ，トロンビンのプロテアーゼ作用に対してであると結論づけられる．

しかし，ここでフィブリンゲルの濁度を相対的なゲル量と考えた場合，Fig. 4. に示したようにトロンビンを阻害し得る濃度以下のＬＡＳで，30分間の酸可溶性フィブリンのゲル化速度が阻害されるから，例えトロンビンのプロテアーゼ作用への阻害が軽度で，フィブリン塊の生成時間が正常値領域内に入るとしても，そのフィブリン塊の強度に影響が及んでいる可能性が考えられてくる．実際の血液凝固では，第ＸⅢ因子，カルシウムイオンが関与した状態でのゲル化が起るので,[2] 今後第ＸⅢ因子への影響を知ることと同時に，そのゲル自体の強度についても検討を加える必要があると思われる．

すでに前報において述べた様にこのＬＡＳによるトロ

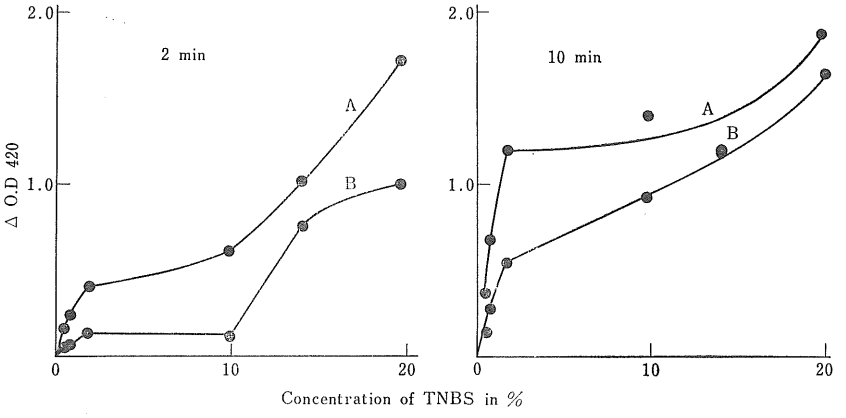


Fig. 9. Inhibition of TNP-lation by LAS A, LAS− B, LAS+

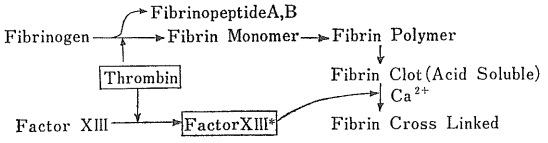


Fig. 10. Schema of Coagulation

ンビン阻害作用は，蛋白質により，ある程度回復し得る．これは，ＬＡＳと添加蛋白質とが結合する為であると考えられるが，この結合に蛋白質分子の極性アミノ酸残基が関与しているかどうかはＬＡＳのトロンビン阻害作用の機構を知る上で，興味深いことである．Table 2. で示したように塩基性蛋白質であるプロタミンはＬＡＳと良く結合してトロンビンの阻害を回復する．これはアルブミンによるより，はるかに強いものである．又，ポリ－Ｌ－グルタミン酸は全く結合性を示さない．

プロタミンとＬＡＳは不溶性の複合体を作るが，界面活性剤の極性基は逆荷電の大イオンと複合体を形成して極性を減じ沈澱するとされているから，[6] グアニジル基が連続した蛋白質表面にＬＡＳがスルホン基を介して結合し，解離基の減少に伴って溶解度を減少させると考えれば説明がつく．同様にポリ－Ｌ－グルタミン酸では，カルボキシル基が蛋白質表面に連続しているであろうから，スルホン基と反発して結合し得ない．ラウリル硫酸ソーダと蛋白質の結合に関する研究は多いが，Nelson, C. A. (1971) は，塩基性蛋白質であるキモトリプシノーゲンにより多くのラウリル硫酸ソーダが結合することを，又，酸性蛋白質のペプシンには結合量が少いことを，サクシニルＢＳＡ，グリオキサルＢＳＡ，カルバミルＢＳＡでは結合量が減じることを報告している．[7] 従って，ＬＡＳと蛋白質の結合において，少くともその初期段階では，極性基どおしの相互作用も，かなり重要な役割を演じていると考えられる．

Table 3. で明らかなように，脂質による回復効果は，脂質ミセルの大小の差によっている．つまり，乳濁した際，脂質ミセルあるいは粒子の大きいと考えられるトリパルミチン，コレステロール等は，ミセルの小さいレシチン，トリオレイン，オレイン酸等に比べ回復効果が著しい．むしろ，レシチン，トリオレイン，オレイン酸等ではＬＡＳ単独より阻害的に働く．ＬＡＳが脂質ミセルにとり込まれることは当然予想され，スルホン基を表面に露出させていると考えられる．この際，脂質ミセル（粒子）の大きさが問題となり，かなり小さければ，ＬＡＳ効果に対して促進的に，大きければ回復効果を示すのではないか．ここで特にＬＡＳ効果に促進的に働く場合を考えてみると，すでに基質なり酵素なりに結合しているＬＡＳにより脂質の蛋白質への効果が増大され，蛋白質の三次構造変化もしくは立体効果等により酵素阻害が発現するか，又は溶液中のＬＡＳモノマーを脂質ミセル表面に再配列することによってＬＡＳの阻害効果が増大する場合等が考えられる．脂質による血液凝固への作用は，血中での問題とも関連してくるので今後も検討すべきであると考える．

ＬＡＳの阻害効果に対して，フィブリノーゲン，トロンビンの影響をみたとき，トロンビンの活性単位を増しても阻害はあまり回復されず，フィブリノーゲン量を増す方が大きく作用する．これは，ＬＡＳが特異的にトロ

ンビン分子に作用しているとする考え方を否定する結果であり，むしろ，フィブリノーゲンに結合することによって阻害がかかると考えられる．

前報によれば，ＬＡＳ単独投与群でプロトロンビン時間の延長はみられなかった。これはトロンビン時間の延長が，ＬＡＳのトロンビン阻害によるとする考え方にとっては矛盾する事実である．これについては，添加するSimplastin AがｌＡＳの阻害効果を回復するとすれば説明がつく．実際，Simplastin AはＬＡＳの阻害効果を回復した．この回復作用は，Simplastin A中のカルシウムイオン，リン脂質，フィブリノーゲンに帰することは出来ず，何か別の物質によると考えられる（Table 4）．

Table 5. にO.3％ＬＡＳを投与したラットの血漿カルシウム再加時間[8]を示してあるが，対照に比べ有意な延長がみられ，血液凝固を全体的に見ても，阻害がかかることを示す結果となっている．

Table 5. Plasma Recalcification Test

	Body Gain %	Recalcification Time
Control	74.2±1.9	155.5±6.9
LAS Group	74.4±2.2	198.4±7.3**

The results are given as mean values±S.E.M for 10 rats. ** $p<0.01$

ＬＡＳ以外の界面活性剤によるトロンビンの阻害効果では，陰イオン性で硫酸エステル，スルホン酸の界面活性剤が強い阻害を示し，さらにその中でもＬＡＳが低い50％阻害濃度を持つ．ラウリルピリジニウムクロリド，ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド等の陽イオン性界面活性剤は高濃度でフィブリノーゲンと複合体を作り沈澱を生じるが，これはフィブリノーゲンの酸性残基とカチオン―アニオン複合体を作る為であろう．[6] Nozaki, Y. ら（1974）はＢＳＡに対するテトラデシルトリメチルアンモニウムクロリドの結合を検討し，ラリウル硫酸ソーダに対するより結合定数が小さいこと，又，界面活性剤が蛋白質と結合する際の側鎖の重要性を述べている．[9] Kurioka, S. ら（1975）はフィブリノーゲンと界面活性剤の相互作用を検討し，ドデシルピリジニウム，ドデシルアンモニウム，ドデシルトリメチルアンモニウム，ステアリルトリメチルアンモニウムで沈澱が生じることを示し，ドデシル硫酸，ドデシルベンゼンスルホネートで，トロンビン添加後，30分後に透明ゲルが生じることを示している．[10] 又，非イオン性界面活性剤は阻害効果を持たないが，Kurioka, S. らも同様に結合性のないことを示し，[10] 静電引力の重要性を述べている．界面活性剤とフィブリノーゲンの結合でＬＡＳによる結合部位がフィブリノーゲンの切断にとって重要なのであろう．実験Ⅱでの蛋白質との結合の結果を考え併せれば，ＬＡＳはフィブリノーゲンのグアニジル基，ε－アミノ基等となんらかの相互作用を持つはずであり，従って，それが阻害効果と密接に関係しているであろう．Fig. 2. で示した290 mμ近辺の差スペクトルのシャープな吸収極大はフィブリノーゲン中のトリプトファン残基に由来すると推定される．[11] 従って，フィブリノーゲンとＬＡＳの相互作用の結果，フィブリノーゲンになんらかの構造変化が生じ，差スペクトルにおいて，290mμ近辺に吸収極大が生じたと考えられる．さらに，実験Ⅳで示したごとく，この吸収は明らかなpH依存性を示し，少くとも１つ，約10.9のpK値を求める得る．10.9あたりのpK値はリジンのε－アミノ基が存在し，[12] ＬＡＳは少くとも，このε－アミノ基とは相互作用を行いそれが最終的にトリプトファン残基による差スペクトルの吸収極大を生じるものと考える．そして，ＬＡＳとε－アミノ基の相互作用はpH依存性を示すことになり，少くとも，ＬＡＳミセル（ＬＡＳクラスター）[9] とフィブリノーゲン分子の反応では，蛋白質中の極性基が意味を持っていることになる．

Pitt-Rivers, R.ら(1968)は大部分の蛋白質でドデシル硫酸ソーダと蛋白質の結合比が蛋白の種類によらず一定であるとし，[13] それを疎水的な結合の結果と考えているし，Jirgensons, B.（1961）は陰イオン界面活性剤と蛋白質との相互作用を旋光分散により調べ，疎水結合の結果，α―ヘリックス構造の増加を示している[14]が，これらの事実は，極性基の役割を否定するものではない．むしろ，静電引力に従い，ＬＡＳのミセルが陽イオン性アミノ酸残基に惹きつけられる可能性が強い．[15]

実験Ⅴではフィブリノーゲンのアミノ残基のトリニトロフェニル化に及ぼすＬＡＳの影響をみたものである．化学修飾剤としてＴＮＢＳが適当であるかどうかは，かなり問題であるが，同じアミノ基の修飾剤であるナフトキノンスルホン酸は蛋白質との結合後，その蛋白質の溶解度を下げるため，有機溶媒を加える必要があり，[16] 従ってＬＡＳのミセル状態を変えることになり，条件として好ましくない．ＴＮＢＳは構造的にも，ＬＡＳと拮抗的にアミノ基に作用すると推定されるが，ＴＮＢＳよりＬＡＳミセルの方がアミノ基に対する結合力が弱いらしく，かなり高濃度のＬＡＳを用いなければならない．それでも，最終的にはＴＮＢＳにとって代られるようである．又，ＬＡＳのトロンビン阻害効果の回復作用を殆ん

ど示さないアルギニンに対するトリニトロフェニル化もＬＡＳは阻害する.[17] ここで，ＴＮＢＳにとって代られるまでの時間はフィブリノーゲンより，はるかに速く，[17] そういう意味で，アミノ基近傍の疎水領域を含んだ複合ミセルの様な形での，立体阻害なり，三次構造の変化がＬＡＳのトロンビン阻害の実体ではなかろうかと思える．ＬＡＳのフィブリノーゲンへの結合部位がトロンビンにとって，ある程度致命的であるのは，0.67%のＬＡＳが16.7プロウグ単位のウロキナーゼの活性を阻害せず，同時に0.15%のＬＡＳが，ウロキナーゼにより活性化されたラット血漿中のプラスミンの0.8%カゼインに対する作用を全く阻害しないこと等[17]からも推定される．又，トリプシンの作用もある程度阻害する.[17] ＡＢＳについては，0.015%で，パンクレアチンの蛋白質消化活性を50%阻害するという報告がある.[18] その他，ロイシンアミノペプチダーゼの活性も阻害している.[17]

要　約

ＬＡＳのトロンビン阻害作用を検討し，それがもっぱら，トロンビンのプロテアーゼ活性に対してであることを示し，さらに，ＬＡＳとフィブリノーゲンの結合が，トロンビン阻害の実体であることを推定した．

（本研究の一部は，日本薬理学会第51回関東部会昭和49年11月30日発表した．）

文　献

1) 高橋省，柴英子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，637，1974
2) 岩永貞昭，中村伸：臨床科学，9，605，1973
3) 藤井節郎，奥田拓道：脂質代謝実験法，137，1967，共立出版
4) 林勝哉：蛋白質の電気的性質，49，東大出版会
5) Okuyama, T., Satake, K.: *J. Biochem.*, 47, 454, 1960
6) Hummel, D.: *Identification and Analysis of Surface-active Agents*, 23, 1962, John Wiley & Song, New York
7) Nelson, C. A.: *J. Biol. Chem.*, 246, 3895, 1971
8) 河合忠：血液凝固第２版，38，1973，医学書院
9) Nozaki, X., Reynolds, J. A., Tanford, C.: *J. Biol. Chem.*, 249, 4452, 1974
10) Kurioka, S., Inoue, F.,: *J. Biochem.*, 77, 449, 1975
11) 浜口浩三：蛋白質核酸研究法，1961，吉岡書店
12) Izatt, R. M., Christensen, J. J.: *Handbook of Biochemistry*, J-49, 1968, The Chemical Rubber Co.
13) Pitt-Rivers, R., Impiombato, F. S. A.: *Biochem. J.*, 109, 825, 1968
14) Jirgensons, B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 59, 1961
15) 今西幸男：酵素と高分子触媒，97，1973，化学同人
16) Matsushima, A., Hachimori, Y., Inada, Y., Shibata, K.: *J. Biochem.*, 63, 328, 1967
17) 高橋省：未発表
18) 科学技術庁研究調整局：中性洗剤特別研究報告（総論），7，1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 62-66, 1975

アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム投与ラットの血清アルカリフォスファターゼ上昇とその臓器由来について（2）小腸アルカリフォスファターゼの精製

米山允子* 中尾順子*

Origins of Increased Serum Alkaline Phosphatase in Rats fed Alkylbenzene Sulfonates (2) Purification of Intestinal Alkaline Phosphatase

MASAKO YONEYAMA* and TOSHIKO NAKAO*

序　論

ＡＢＳ，ＬＡＳ投与によるラット血清アルカリフォスファターゼの上昇が，ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法により，見かけ上，小腸及び腎由来であることは，既に報告した.[1] 我々は，血清アルカリフォスファターゼと各臓器酵素の相関性についてより正確な同定を行うために小腸アルカリフォスファターゼの精製を行った。小腸アルカリフォスファターゼが，ＳＤＳポリアクリルアミド中でも失活しないことを利用して分子量を測定した結果，分子量１×10^5と11.4×10^4のサブユニットから成っていることを認めたのでその性質とともに報告する.

実験材料及び方法

（精製法）ウイスター系ラット小腸粘膜湿重量100ｇを0.05M バルビタール緩衝液 pH8.6 でモホジナイズし，同量のブタノールで抽出後，37°Ｃで30分間インキュベート後，10000rpm で１時間遠心する。遠心後，水層をビスキングチューブ中で緩衝液に対し7°Ｃで透析を行い，透析液をダイアフロウＰＸ10を用いて濃縮した．1.5×100cmのカラムにセファローズ６Ｂを充てんし，溶出液を0.05Mバルビタール緩衝液pH8.6とし濃縮液を分画した．更に精製するために 0.01M バルビタール緩衝液 pH 7.4で平衡化したＤＥＡＥセファデックスカラム（1.5×30cm）にセファローズ６Ｂで分画したピークの部分をのせて，バルビタール緩衝液中に０から0.3M NaCl の密度こう配溶出液で吸着タンパクを溶出した．

（酵素活性測定法）0.001MMg^{2+} を含む0.05Mグリシンバッファー pH10,2mlに基質としてパラニトロフェニルリン酸塩0.1Mを溶かし，酵素液0.01mlを加え37°Cで５分間インキュベートし，0.2N NaOH 0.1mlで反応を停止し，410mμ の吸光度から対照を差し引いて，酵素より遊離したパラニトロフェノール量を算出した．

（蛋白質の定量）精製過程の蛋白質の定量は，ローリーの方法を用い，標準蛋白には，ＢＳＡ（Sigma）を用いた．

（ＳＤＳポリアクリルアミド電気泳動）ＳＤＳポリアクリルアミドゲル及び酵素活性染色は，前報[1]の方法で行った．

（分子量の測定）ＤＥＡＥセファデックスで精製した酵素の分子量の測定は，0.1％ＳＤＳを含む7.5％ポリアクリルアミドゲルを用い酵素と標準蛋白（リゾチーム，ＢＳＡ，フォスフォリラーゼａ）を同時に泳動し，マーカーのＢＰＢが11cm移動した所でストップし，酵素活性を染色後，活性部位を針で穴を開け，次ぎに蛋白を染色した．標準蛋白の移動度から分子量標準曲線を作成し，酵素の分子量を求めた．

結　果

小腸粘膜アルカリフォスファターゼは，Fig. 1 に示すようにディスクゲルでは，１本の活性のバンドを示し，0.1％ＳＤＳポリアクリルアミドゲルでは，２本のバンドを示している．ポリアクリルアミド５％，7.5％，10％の各々の濃度の0.1％ＳＤＳポリアクリルアミドゲルを用いて酵素活性を染色するとやはり２本のバンドを示した（Fig. 2）．

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

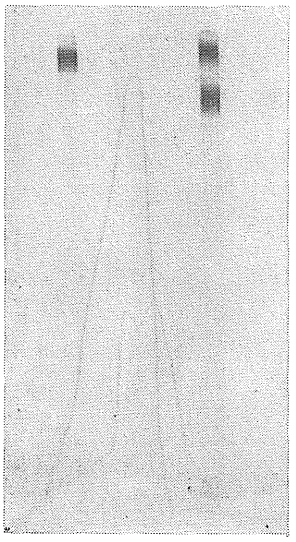


Fig. 1 Localization of Intestine alkaline phosphatase in polyacrylamide gel (left) and 0.1% SDS polyacrylamide gel (right)

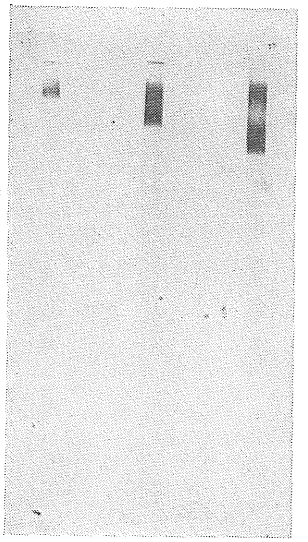


Fig. 2 Electrophoretic mobility of intestine alkaline phosphatase as a function of polyacrylamide concentration in 0.1% SDS polyacrylamide gel.
left : 10% polyacrylamide
middle : 7.5% polyacrylamide
right : 5.0% polyacrylamide

Table 1 Purification of intestine alkaline phosphatase

Fraction step	Total activity μ moles/min	Total protein mg	Specific activity μ moles/min/mg	Yield %	Purification factor
Whole homogenate from 100g intestine mucosa	592	1051.2	0.56		
n-butanol extract	980	840.0	1.16	165.0	2.0
Sepharose 6B Column chromatography					
Peak 1	263	39.5	11.86	44.4	21.0
Peak 2	64	1.0	2.20	10.8	3.9
DEAE-Sephadex Column chromatography					
Peak 1′	10	0.1	118.60	1.6	211.7
Peak 2′	113	1.6	143.70	19.1	254.7

精製段階については，Table 1 に示した．

ブタノール抽出物の SDS ポリアクリルアミドゲル上における酵素は，2本の活性部位（分子量の小さい方をA—1，大きい方をA—2と呼ぶ）を示し，A—1がA—2に比べ強い活性を示している（Fig. 3）．セファローズ6Bで分画した酵素液は，Fig. 4 に示すように44万附近に1つ（ピーク1）とBSA，カタラーゼの間，分子量約14万の所に1つ（ピーク2）の2つのピークが得られた．

各々のピークの酵素活性についてSDSポリアクリルアミドゲル上の位置をみれば（Fig. 3），ピーク1は，A—2に活性を示し，ピーク2は，A—1，A—2の2本の活性を示し，特にA—1に強い活性を示している。セファローズ6Bにサンプリングした同量の酵素液を0.1% SDSバルビタール緩衝液でゲル ろ過するとピーク1は，ピーク2に移動し（Fig. 5）SDSディスクゲル上

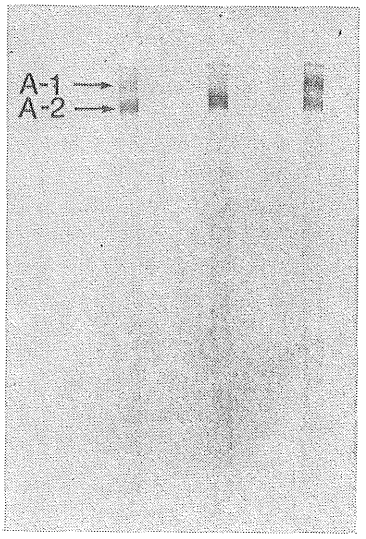


Fig. 3 Localization of alkaline phoshatase on 0.1% SDS polyacrylamide gel.
left : n-butanol extract
middle : peak 1 from Sepharose 6B fractionation
right : peak 2 from Sepharose 6B fractionation

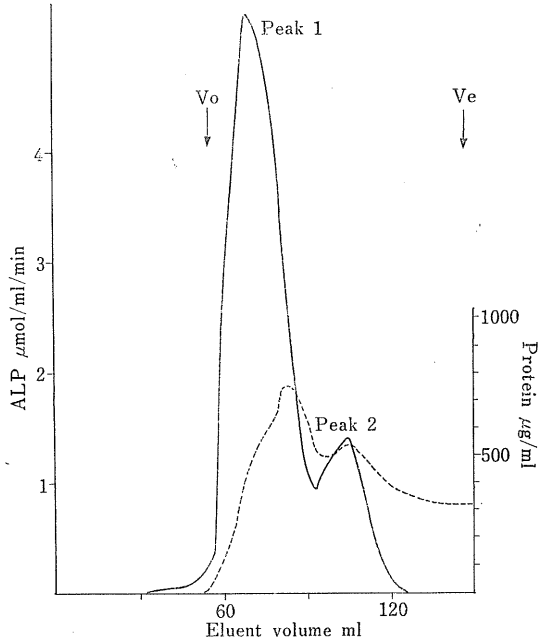


Fig. 4 Gelfiltration pattern of ALP in n-butanol extract from intestine
——— Activity ·····Protein

の活性の位置は，ブタノール抽出酵素液と同じになる．セファローズ6Bで分画したピーク1，ピーク2を更に

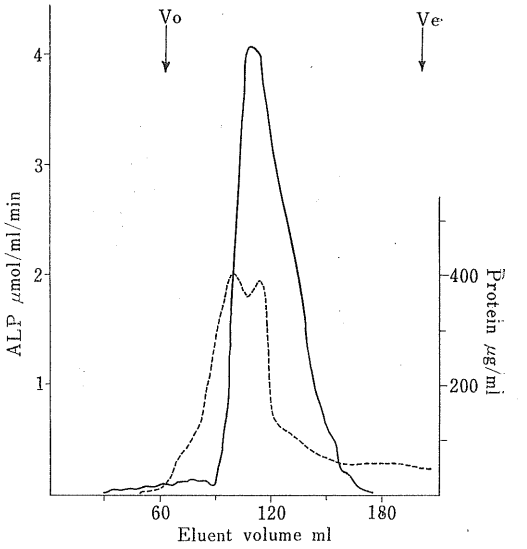


Fig.5 SDS gelfiltration pattern of ALP in n-butanol extract from intestine

——Activity -------Protein

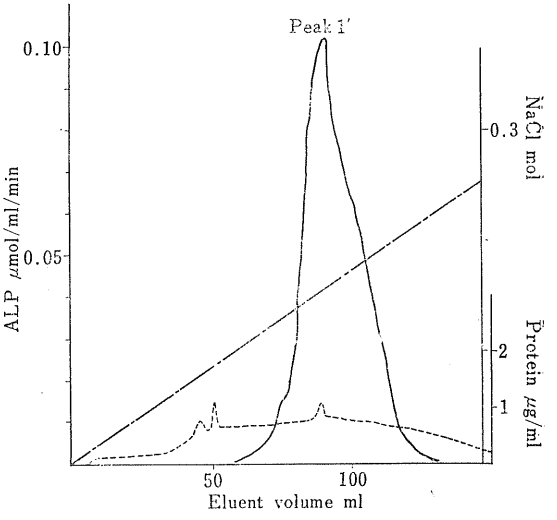


Fig.6 Chromatography of peak1 from sepharose 6B on DEAE sephadex

——Activity -----Protein ——·——NaCl

DEAEセファデックスで精製し，単一の蛋白のバンドを得た．

各ピーク1′，2′について次の性質を調べた．

1) 分子量の測定 Fig. 8 から小腸粘膜アルカリフォスファターゼの分子量は，A－1が1×10^5，A－2が11.4×10^4と推定した．

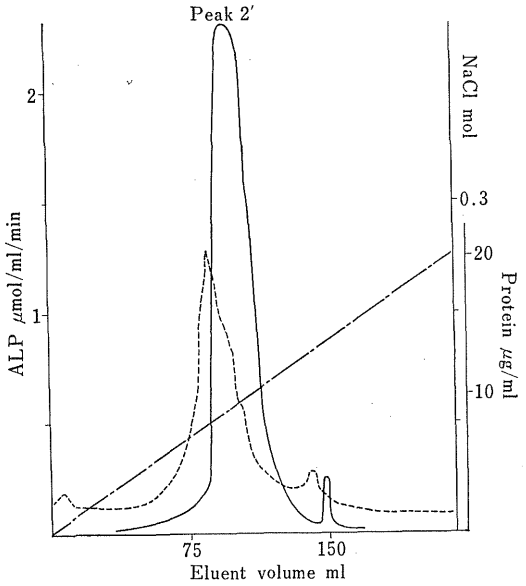


Fig.7 Chromatography of peak2 from sepharose6B on DEAE sephadex

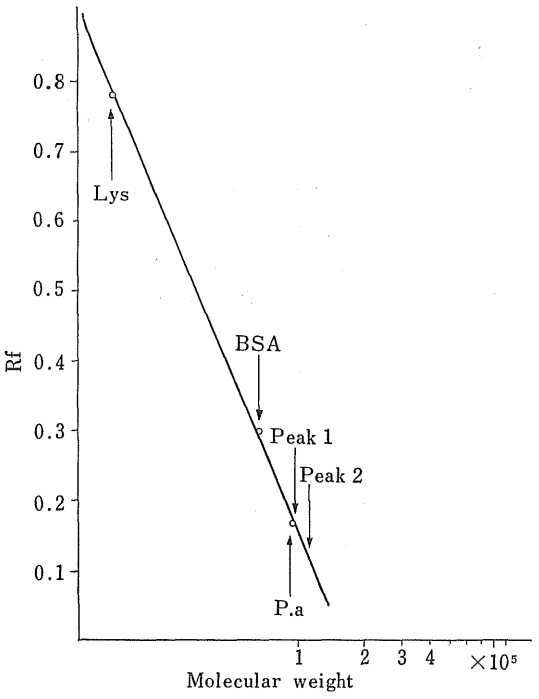


Fig.8 Determination of Molecular Weight of Intestine ALP by 0.2% SDS polyacrylamide gel

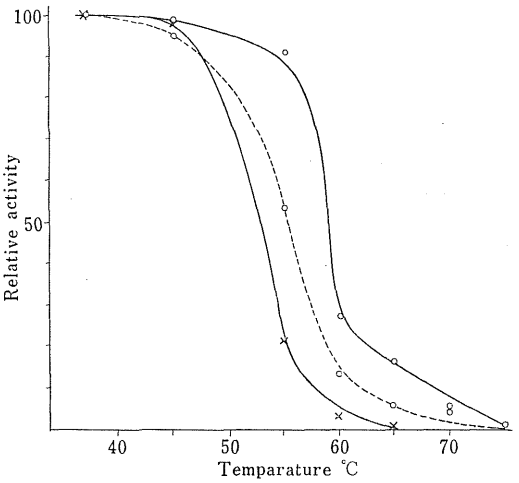


Fig.9 Heat stability of ALP of peak1′, peak2′ and n-butanol extract

2) 熱安定性 Fig. 9 に示す各温度で10分間前処理し，37°Cで10分間インキュベートし，酵素活性を測定した．いづれも，45°Cまでは安定であるがそれ以上では不安定となり，70°Cでは，ほとんど失活した．50％阻害は，ピーク1′は59°C，ブタノール抽出物は55°C，ピーク2′は53°Cであった．

3) 基質特異性 パラニトロフェニル燐酸塩，β—グリセロ燐酸塩，フェニル燐酸塩について調べ km（ミカエリス定数），Vmax（maximal velocity）値を Lineweaver-Burk のプロットより測定し Table 2 に示した．

4) L—フェニルアラニン，L—ロイシンによる阻害

ブタノール抽出物，ピーク1′，ピーク2′のL—フェニルアラニン，L—ロイシンによる阻害を Table 3 に示した．化合物については，L—ロイシンの方が，L—フェニルアラニンより強く阻害し，ピーク1′＞ピーク2′＞ブタノール抽出物の順に阻害が大である．L—フェニルアラニンでは，ピーク2′＞ピーク1′＞ブタノール抽出物の順に阻害が大である．

考　察

Fishman ら[2]は，硫安分画により人の小腸アルカリフォスファターゼが，2つのアイソザイムから構成されていることを報告している。我々は，ラット小腸アルカリフォスファターゼがディスクゲル中では，単一の活性を示し，0.1％ＳＤＳポリアクリルアミドゲル中では，2本の活性を示すことを報告した．標準蛋白を用いて分子量を求めれば，小腸アルカリフォスファターゼは，1×10^5

Table 2 Substrate specificity of alkaline phosphatase

Substrate	Km (mM)		Vmax (μmol/min per mg of protein)	
	Peak 1′	Peak 2′	Peak 1′	Peak 2′
p-Nitrophenyl phosphate	3.5	2.2	275	750
β-Glycerophosphate	16.6	16.6	125	183
Phenyl phosphate	3.8	1.4	525	927

Table 3 Inhibition of alkaline phosphatase

Inhibitor		Concentration of inhibitor (Relative activity) 1mM	10mM	Ki value (M)
L-Phenylalanine	Butanol extract	61.9	21.4	4.0×10^{-3}
	Peak 1′	69.2	25.3	6.0×10^{-3}
	Peak 2′	56.0	11.5	3.0×10^{-3}
L-Leucine	Butanol extract	55.7	12.3	3.0×10^{-3}
	Peak 1′	17.4	3.3	1.5×10^{-3}
	Peak 2′	42.4	9.9	2.0×10^{-3}

と11.4×10^4 の大きさの2つのサブユニットから成っている．ポリアクリルアミドの濃度を5%，7.5%，10%の3段階にわけ酵素を電気泳動すると，いづれのポアサイズでも2本の活性のバンドを示すことから人工的なものとは考えられない。ブタノール抽出物をセファローズ6Bで分画すると2つのピークになり各々の分子量は，ピーク1は，4.4×10^5，ピーク2は，1.4×10^5 となる。SDSポリアクリルアミドゲル上から計算された分子量では，ピーク1は，1×10^5，ピーク2は，1×10^5，11.4×10^4 となりゲルロ過から計算された分子量とは異なる．ピーク1は，SDSバルビタール緩衝液でゲルろ過すると，ピーク2の附近へ移動することから，約4.4×10^5と推定されるピーク1は，1×10^5 の大きさのものが重合したピークあるいは，糖等がついたものと推定される．DEAEセファデックスで分離精製したピーク1′，ピーク2′の性質について（基質特異性）ピーク1′，ピーク2′とも各基質に対して，親和力は変りがなかったが，β—グリセロ燐酸塩がパラニトロフェニル燐酸塩，フェニル燐酸塩に比べて親和力が低いのは，立体障害のためと考えられる．（L—フェニルアラニン，L—ロイシンの阻害）L—フェニルアラニンは，小腸アルカリフォスファターゼを特異的に阻害し，L—ロイシンは，人の胎盤アルカリフォスファターゼを阻害すると報告されている[3]が，L—ロイシンの方がピーク1′，ピーク2′に対して強い阻害を示している．以上の事から，ピーク1′，ピーク2′は，類似した性質を持ち大きな違いは認められなかった．ラット小腸アルカリフォスファターゼは，基本的には1×10^5 の分子量をもつ酵素であり，酵素活性に必須でない糖あるいは蛋白がついて11.4×10^4 の大きさの酵素，つまり，見かけ上2つのサブユニットから成っていると推定される．今後，2つのサブユニットの相違について詳しく検討していきたい．

文　献

1) 米山允子，伊川三枝子，中尾順子：東京衛研年報，25，655，1974
2) Fishman *et al.*: *C.C.A.*, 38, 75, 1972
3) Fishman: *Amer. J.Med.*, 56, 617, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 67-78, 1975

合成洗剤及び直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）の催奇性について

高橋昭夫* 佐藤　薫* 安藤　弘*
久保喜一* 平賀興吾*

Teratogenicity of Some Synthetic Detergent and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)

AKIO TAKAHASHI*, KAORU SATO*, HIROSHI ANDO*,
YOSHIKAZU KUBO* and KOGO HIRAGA*

先に，当部の佐藤ら[1]は市販台所用洗剤とその主成分である直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）の催奇形性についてddY/s系マウスを用い，交配により腟栓を認めた日から14日間皮膚塗布を行い試験した．その結果，市販台所用洗剤では妊娠率の低下と胎仔の軽度の発育（体重・化骨）遅延が，ＬＡＳでは胎仔の化骨遅延が認められた以外は胎仔の外形及び内部器官の異常はなかったことを報告した．

今回，著者らはマウスをＪＣＬ/ＩＣＲ系にかえて佐藤らと同様の試験を行うとともに，ＬＡＳについて皮下（背側・腹側）及び経口投与による母体及び胎仔に及ぼす影響を観察した．また佐藤らによって初めて報告された洗剤による妊娠率の低下を確認する為，交配成立初期にのみ試料を与え妊娠の成立についても観察した．

試験材料及び試験方法

(1) 試験動物

動物はＪＣＬ/ＩＣＲ系マウスを4週令で購入し順調な発育を示した9～13週令（体重27.0～35.0ｇ）未経産のものを使用した．

(2) 飼育条件

動物は全期間を通じ疾病管理され室温25±1°，湿度55±5％に調整された動物飼育室で1ケージ当り10匹ずつ飼育し，交配後は1匹ずつ分離飼育した．飼料は日本クレア固型飼料ＣＡ－1を用い水道水と共に自由に摂取させた．

(3) 試料

① 台所用洗剤：Ｌ社市販台所用洗剤ソフトタイプ2種（以下洗剤Ｒ及びＭと略す）

② 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下ＬＡＳと略す）：当研究所で精製した有効成分99.5％，未反応油分0.04％，無機塩類0.01％，水分0.00％，pH（1.0％）6.1，平均分子量364.0のものを使用した．

(4) 投与量・試料適用方法・適用期間

各試料の投与量は未経産雌マウスを用いた2週間の連続投与試験を参考に，各試験共にその最大耐量とみなされる量を上限とし，精製水にて稀釈あるいは溶解しTable 1 に示す投与量，適用法，適用期間とした．

(5) 交配及び妊娠の確認

外部生殖器の所見により交配適期とみられる雌1匹を同系統の雄1匹と一夜同居させ，翌朝腟栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日として起算した．

(6) 母体・胎仔の観察

母体は毎日体重を測定すると共に一般症状を観察し，妊娠18日目に開腹して胎仔を取り出し，胎仔は外形異常，骨異常等を観察した．

試験結果

〔1〕 母体に対する影響

① 体重及び一般症状の推移

体重は皮膚塗布，皮下，経口投与試験全般で，妊娠0～3日目にかけての多少の減少をみたが，その後は各試験共に群間に差なく順調に増加した．一般症状は皮膚塗布試験で洗剤群，ＬＡＳ群に皮膚のよごれが認められ，

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, 160 Japan

洗剤の高濃度群でその傾向は強く示された.
皮下投与試験ではＬＡＳ1.0％群で背側，腹側共に投与部位に壊死を認める母獣がほとんどであった.
経口投与試験ではＬＡＳ4.0％群に投与期間中，立毛を呈しうずくまる母獣が認められたが投与終了後２～３日目にはそれも認められなくなった.

②妊娠率

結果は Table 3 の第３列に示すように，皮膚塗布試験の洗剤第４(17.0％)，第５(20％)，第６(25.0％) 第９(26.0％)群，ＬＡＳ第11 (5.72％) 群に妊娠率の低下がみられ，特に第６及び９群は全く妊娠を認めなかった.
ＬＡＳの皮下・経口投与試験では臨界期投与群に妊娠率の低下は認められなかったが，妊娠初期投与の経口投与第14(4.0％)群，皮下投与(腹側)第26(1.0％)群に妊娠率の低下をみた.
当部　佐藤らの報告中ＬＡＳによる妊娠率の低下はみられていないが，これはＬＡＳの使用濃度が低かった為と思われる.

③剖検及び臓器重量

皮膚塗布，皮下投与試験の洗剤及びＬＡＳ群のいずれも高濃度群に投与部位皮下に軽度の充血を認めた．受胎を確認した母獣の臓器重量は Table 2 (１－２) に示すようで皮膚塗布第２(水)群左卵巣減，洗剤第３(13.0％)群心臓増，経口投与ＬＡＳ第14(4.0％)群心臓減，第16(0.4％)群右卵巣増，皮下投与(背側)ＬＡＳ第23(1.0％)群右卵巣増，及び皮下投与(腹側)ＬＡＳ第26 (1.0％)，第28(0.35％)，第29(1.0％) 群脾臓増に有意差を認めたが，以上のうち用量との関係で増減が認められたのは皮下投与(腹側)の脾臓の重量増加のみであった.

〔２〕 胎仔に対する影響

①着床数・死亡仔数・吸収胚数・胎仔重量

結果は Table 3 (１－２) に示すとおりである．皮膚塗布，皮下，経口投与試験共に妊娠したマウスについては着床数，死亡仔数，吸収胚数に有意な差は認められなかった。胎仔重量については皮膚塗布の第３(13.0％)第４(17.0％)第５(20.0％)及び第８(13.0％)群・経口投与ＬＡＳ第14(4.0％)群，皮下投与(背側)ＬＡＳ第19(0.35％)群において各対照第1，7，12，18群に比してわずかであるが有意に小さかった.

②外形異常

各試験共 Table 4 (１－２) に示すとおりである．洗剤及びＬＡＳに特異的と思われる外形異常は認められなかった．三上[2]らのいう皮下出血に関しても対照と比較し，特に注目すべき結果を認めることはなかった。

③内臓異常及び骨異常

胎仔開腹時における肉眼的所見では特記すべき内臓の変化は認められなかった。
骨異常については Table 5 (１－２) に示すように，皮膚塗布試験洗剤群に化骨遅延の傾向が認められたが，化骨変異，奇形という点からは特に異常と思われる傾向を認めることはできなかった．安田[3]らの催奇形性の指標となるという腰肋の増加も対照群間の変動と比較し，みられなかった.

総　括

市販台所用洗剤とその主成分であるＬＡＳについて，ＪＣＬ/ＩＣＲ系マウスを用い，皮膚塗布，皮下（背側・腹側），経口の各投与経路によって，母体，胎仔に及ぼす影響を試験した．各試験はいずれも２週間の連続投与試験を参考に試料濃度を決定した．又当部佐藤[1]らの報告した洗剤の皮膚塗布による妊娠率の低下に着目し，妊娠初期における試料投与も同時に行った.
母体に対する影響として試料投与期間中多少の体重減少があり，又皮膚塗布，皮下投与試験で投与部位に痂皮形成がみられたが，剖検時の肉眼的所見と臓器重量では，皮下投与（腹側）の脾臓に重量増加が用量との関係で認められた以外に著明な変化をみなかった.
妊娠率については洗剤，ＬＡＳの高濃度投与群で，投与経路の如何を問わずその低下乃至傾向を認めた．この妊娠率の低下については佐藤らの報告後やはり皮膚塗布で PALMER[4] や桝田ら[5]によって報告されているが，今回皮下・経口投与によっても起ることがわかった．この機作については現在検討中である.
胎仔の肉眼的観察では洗剤，ＬＡＳに特異的と思われる外形異常は認められなかった．骨の観察では洗剤，ＬＡＳ共に高濃度群に化骨遅延の傾向をみたが，化骨変異，奇形に関しては特に有意とみられるものはなく対照群と差はないと考えられた.
従来の洗剤，ＬＡＳ等の催奇形性については多くの[6-9]報告があるが，このうち催奇性を認めたものは三上教授一門の報告で，特に最近は上肢レベルでの背側正中部の出血，舌の異常（奇形），四肢の高度の奇形，椎骨棘突起の不形成等をあげている.[10] 以上のうち今回の試験で椎骨棘突起の形成不全については未だ検索が進んでいないので述べることは出来ないがこれ以外についての異常は認められなかった.

要　旨

市販台所用洗剤及びその主成分であるＬＡＳの母体，胎仔に及ぼす影響を交配マウス(ＪＣＬ/ＩＣＲ)を用い，皮膚塗布（洗剤・ＬＡＳ）経口（ＬＡＳ）皮下(ＬＡＳ)投与について母体の体重，一般症状，器官重量，妊娠

率，着床数，生仔体重，生仔数，外形異常，内臓異常，骨異常について検査した．

文　献

1) 佐藤薫，安藤弘，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，24，441，1973

2) 三上美樹，坂井義雄，宮本勇：先天異常，13，174，1973

3) 安田峯生，前田広由：先天異常，13，25，1973

4) Palmer A. K., and Readshaw, M. A.: 食衛誌，14，638，1973

5) 桝田文八，岡本暉公彦，井上邦夫：食衛誌，15，349，1974

6) 大森義仁，桑村司，田中悟，川島邦夫，中浦慎介：食衛誌，9，473，1968

7) 三上美樹，坂井義雄：解剖誌，48，77，1973

8) Palmer A. K., Readshaw M. A., and Neuff A. M.: *Toxicology*, 3, 91, 1975

9) Nolen G. A., Klusman L. W., Patrick L. F. and Geil R. G.: *Toxicology*, 4, 231, 1975

10) 三上美樹，坂井義雄，宮本勇，北村小夜子，藤島弘子，和貝芳雄，秋吉智，関口弘之，県勲，羽島昌美，今泉敏，谷憲夫，西村昇：三重大学医学部解剖学教室業績集，21，1，1973

TABLE 1 Dosing schedule for teratological test in mice

Group	Material	Concentration % w/v	Dosage volume ml/kg/day	Dosing period (days of gestation)
1. Non treatment				
Percutaneous a) administration				
2.	Disyilled water		0.5	0-13
3.	Deterdent(R) b)	13.0%	0.5	0-13
4.	Detergent(R)	17.0%	0.5	0-13
5.	Detergent(R)	20.0%	0.5	0-13
6.	Detergent(R)	25.0%	0.5	0-13
7.	Distilled water		0.5	0-13
8.	Detergent(M)	13.0%	0.5	0-13
9.	Detergent(M)	26.0%	0.5	0-13
10.	LAS	2.86%	0.5	0-13
11.	LAS	5.72%	0.5	0-13
Per os				
12.	Distilled water		10	0-6
13.	LAS	0.4%	10	0-6
14.	LAS	4.0%	10	0-6
15.	Distilled water		10	7-13
16.	LAS	0.4%	10	7-13
17.	LAS	4.0%	10	7-13
Subcutaneous inj. (dorsal portion)				
18.	Distilled water		20	0-3
19.	LAS	0.35%	20	0-3
20.	LAS	1.00%	20	0-3
21.	Distilled water		20	8-11
22.	LAS	0.35%	20	8-11
23.	LAS	1.00%	20	8-11
Subcutaneous inj. (abdominal portion)				
24.	Distilled water		20	0-3
25.	LAS	0.35%	20	0-3
26.	LAS	1.00%	20	0-3
27.	Distilled water		20	8-11
28.	LAS	0.35%	20	8-11
29.	LAS	1.00%	20	8-11

(a) Dosage volume ; 0.5ml/mouse/day Dosed area of skin; 4 × 4cm
(b) Commercial dish washing detergent

TABLE 2-1 Organ weight of pregnant mother mice

Group	Liver g g/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Lung mg mg/100g	Kidney(L)mg mg/100g	Kidney(R)mg mg/100g	Adrenal(L)mg mg/100g	Adrenal(R)mg mg/100g	Ovary(L)mg mg/100g	Ovary(R)mg mg/100g
1. Non treatment	3.0±0.08 10.2±0.21	154.9±3.99 522.8±9.34	125.8±10.0 423.9±32.1	186.7±7.43 630.5±23.5	253.6±6.89 856.0±18.1	266.3±7.60 899.2±20.7	3.9±0.27 13.2±1.07	3.8±0.23 13.0±0.83	10.7±0.45 36.0±1.23	11.0±0.49 37.3±1.72
2. Distilled water	3.0±0.08 9.7±0.29	151.9±2.75 497.6±13.0	114.7±6.46 377.0±23.4	184.2±3.97 603.7±17.7	262.2±7.53 855.4±22.2	275.3±7.98 899.5±26.6	4.4±0.22 14.2±0.69	3.8±0.22 12.6±0.81	9.2±0.41 * 30.1±1.47	9.9±0.62 32.8±2.03
3. Detergent(a) (13.0%)	3.1±0.08 10.3±0.27	170.2±3.53 ** 565.5±11.1	138.5±5.70 459.4±17.3	179.6±5.08 596.0±14.7	262.5±3.81 873.5±15.7	275.0±5.53 914.2±17.8	4.0±0.27 13.1±0.85	4.0±0.21 13.1±0.66	9.6±0.62 31.8±1.89	11.0±0.50 36.4±1.61
4. Detergent(R) (17.0%)	3.0±0.18 9.9±0.48	162.5±4.59 533.4±10.5	138.3±8.67 453.1±24.9	186.5±3.27 613.4±14.5	261.3±10.5 856.2±24.4	276.7±12.7 905.7±28.4	5.2±0.84 17.2±2.69	5.2±0.72 17.0±2.31	11.6±1.16 38.0±3.95	13.4±1.41 44.5±5.17
7. Distilled water	2.9±0.14 9.0±0.38	152.7±4.72 475.0±17.6	113.3±9.90 350.2±28.9	185.8±7.38 575.1±17.3	247.1±12.2 765.4±31.6	254.5±9.75 791.2±33.8	4.0±0.35 12.3±1.13	3.8±0.26 11.8±0.98	10.3±0.63 32.5±2.94	11.1±0.60 34.8±2.50
8. Detergent(M) (13.0%)	2.9±0.10 9.2±0.31	153.3±3.17 489.0±14.6	116.3±7.96 368.3±21.9	181.0±5.31 576.8±14.0	252.4±7.90 803.5±26.6	268.3±9.67 853.8±29.8	4.1±0.35 13.1±1.25	3.8±0.23 12.2±1.02	9.6±0.62 30.5±2.20	11.6±0.38 37.0±1.56
10. LAS (2.86%) P.O.	2.9±0.08 9.4±0.33	156.2±2.67 500.6±13.5	128.4±9.34 409.9±28.6	183.9±5.17 589.3±20.9	256.6±10.3 823.4±40.7	265.1±6.85 851.3±35.5	3.9±0.10 12.6±0.39	3.7±0.20 12.0±0.66	10.3±0.68 33.0±2.23	9.8±0.58 31.4±1.94
12. Distilled water	2.9±0.08 10.5±0.29	139.5±3.47 506.1±11.3	114.5±8.60 414.2±29.6	169.7±4.23 615.9±11.7	244.3±4.02 889.2±18.7	250.6±5.87 910.3±18.2	3.7±0.12 13.5±0.58	3.4±0.12 12.5±0.59	9.8±0.47 35.8±1.84	9.7±0.49 35.1±1.60
13. LAS (0.4%)	2.8±0.08 10.3±0.21	136.2±4.38 497.6±12.2	96.2±9.99 351.2±23.3	170.4±5.20 622.5±14.0	226.3±8.25 825.5±20.8	240.0±8.15 876.0±20.3	3.4±0.24 12.5±0.83	3.2±0.23 11.8±0.83	8.6±0.69 31.3±2.43	8.8±0.66 32.0±2.15
14. LAS (4.0%)	2.6±0.12 9.9±0.13	124.5±5.50 ** 479.6±14.0	101.1±7.86 390.4±28.4	159.7±4.05 617.7±20.1	232.7±8.22 899.5±32.0	232.9±8.79 899.0±28.5	3.5±0.32 13.9±1.83	3.4±0.31 13.3±1.69	8.3±0.38 31.8±1.00	9.2±1.00 35.3±3.21
15. Distilled water	2.5±0.10 8.8±0.35	133.1±4.18 479.0±15.2	99.2±6.82 354.1±23.1	163.4±3.13 539.6±17.5	245.8±7.67 882.3±22.4	250.7±9.59 897.9±23.9	3.6±0.23 12.9±0.78	3.2±0.21 11.5±0.66	8.8±0.88 31.6±2.91	8.7±0.57 31.3±1.88
16. LAS (0.4%)	2.7±0.09 9.5±0.26	132.3±3.17 473.6±11.7	90.4±6.28 323.2±22.1	172.9±2.92 619.4±12.2	232.4±6.25 833.0±25.9	236.5±4.59 847.8±20.4	3.7±0.19 13.3±0.70	3.3±0.19 11.0±0.66	8.8±0.52 31.3±1.65	10.8±0.47 * 38.6±1.26
17. LAS (4.0%)	2.6±0.11 9.3±0.30	132.7±3.68 476.3±9.60	103.7±10.4 373.3±39.2	170.6±2.71 613.6±9.31	237.3±5.38 853.3±18.4	244.2±6.08 876.4±13.0	3.8±0.12 13.7±0.57	3.4±0.11 12.4±0.52	8.5±0.55 30.6±1.91	9.8±0.52 35.1±1.96

(a) Commercial dish washing detergent (b) Mean ± S.E. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

TABLE 2-2 Organ weight of pregnant mother mice

	Group	Liver g g/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Lung mg mg/100g	Kidney(L)mg mg/100g	Kidney(R)mg mg/100g	Adrenal(L)mg mg/100g	Adrenal(R)mg mg/100g	Ovary(L)mg mg/100g	Ovary(R)mg mg/100g
18	Distilled water	(b) 3.1±0.07	154.0±2.09	111.5±5.49	184.6±4.23	253.7±7.76	270.4±7.35	3.8±0.19	3.7±0.16	9.6±0.49	11.7±0.84
		10.8±0.23	533.5±10.2	384.7±16.7	638.2±11.3	876.7±22.7	935.0±23.2	13.1±0.68	12.7±0.59	33.4±1.85	40.6±2.95
19	LAS (0.35%)	2.9±0.09	149.3±4.57	115.5±7.49	177.3±2.17	253.1±7.96	268.4±9.49	4.0±0.27	3.5±0.13	9.9±0.75	10.4±0.49
		10.2±0.28	519.5±16.3	402.2±26.8	617 1±9.71	880.0±25.8	933.7±32.0	13.9±1.0	12.3±0.46	34.4±2.46	36.2±1.61
20	LAS (1.00%)	2.9±0.07	144.2±3.29	112.6±3.71	185.4±7.04	240.1±5.82	251.3±6.69	3.6±0.17	3.5±0.19	9.7±0.44	9.3±0.51
		10.2±0.19	505.4±11.6	393.9±10.1	648.4±20.7	841.4±19.6	881.1±24.5	12.7±0.63	12.1±0.71	34.1±1.38	32.6±1.96
21	Distilled water	2.9±0.06	149.8±2.52	112.5±4.28	183.6±5.04	249.3±6.01	259.6±5.42	3.8±0.11	3.6±0.13	11.1±0.38	9.7±0.67
		10.0±0.21	517 3±9.65	388.4±14.8	632.8±14.2	861.0±22.9	895.7±18.4	13.0±0.42	12.5±0.63	38.4±1.39	33.4±2.07
22	LAS (0.35%)	3.0±0.11	147.7±4.66	111.5±3.84	190.0±6.72	240.7±7.76	254.1±7.01	3.4±0.29	3.3±0.28	10.0±0.79	10.0±0.73
		10.5±0.35	510.5±13.7	385.2±11.6	655.4±16.1	833.6±27.1	879.4±23.6	11.7±0.97	11.2±0.97	34.4±2.41	34.7±2.39
23	LAS (1.00%)	3.1±0.10	156.3±4.24	124 3±5.74	191.2±4.60	263.3±8.61	267.3±9.39	4.1±0.23	3.6±0.19	10.6±0.63	11.6±0.59
		10.7±0.26	539.1±9.41	430.4±19.7	660.1±12.2	908.9±25.4	921.3±24.5	14.0±0.72	12.5±0.64	36.8±2.17	40.1±1.91
24	Diatilled water	2.7±0.08	133.3±3.01	107.8±4.98	165.5±2.83	237.4±6.22	246.0±5.87	3.3±0.15	3.1±0.09	9.6±0.50	10.0±0.57
		9.8±0.29	485.8±10.2	394.0±20.3	602.7±8.41	864.0±18.7	895.4±17.0	12.2±0.66	11.3±0.37	35.2±1.96	36.4±2.03
25	LAS (0.35%)	2.9±0.11	136.0±4.18	120.3±7.75	173.5±4.42	234.4±7.14	250.0±6.39	3.1±0.09	2.8±0.15	9.6±0.62	9.5±0.42
		10.6±0.33	136.0±4.18	435.3±24.4	630.0±13.5	851.6±24.3	908.1±20.7	11.2±0.29	10.2±0.48	34.8±2.13	34.6±1.30
26	LAS (1.00%)	3.3±0.10	144.8±4.19	167.8±17.5***	183.4±6.34	246.0±4.29	259.2±7.45	3.5±0.13	3.3±0.19	9.4±0.75	10.0±0.44
		11.5±0.31	507.7±13.5	583.9±53.4	642.8±17.5	864.3±18.7	908.4±21.0	12.2±0.52	11.5±0.67	32.9±2.10	35.0±1.63
27	Distilled water	2.8±0.08	137.4±3.80	105.7±5.59	177.4±2.95	231.0±4.85	240.6±5.90	3.4±0.18	3.1±0.18	10.6±0.64	9.8±0.55
		9.4±0.21	460.6±13.4	356.0±22.0	594.8±12.1	773.8±16.3	805.8±19.4	11.4±0.74	10.4±0.71	36.0±2.73	32.8±1.82
28	LAS (0.35%)	2.9±0.08	136.2±2.38	152.1±9.81***	175.0±2.45	240.1±7.13	239.2±5.76	3.7±0.15	3.6±0.15	9.4±0.68	11.3±0.39
		9.8±0.20	456.6±9.62	508.8±31.6	587.3±12.9	803.2±20.4	801.4±19.2	12.6±0.69	12.1±0.60	31.5±2.36	37.9±1.40
29	LAS (1.00%)	2.9±0.06	135.7±3.54	162.6±10.7***	168.2±2.90	231.5±7.48	229.5±6.45	3.5±0.19	3.5±0.17	9.5±0.70	10.2±0.77
		9.8±0.24	463.6±13.3	559.3±37.5	574.8±10.9	791.5±27.6	784.4±24.3	11.9±0.62	11.9±0.58	32.5±2.45	34.9±2.73

(b) Mean± S.E. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

TABLE 3-1 Effect of commercial dish washing and LAS on rates of pregnancy and embryonic development in mice

Group	No. of females with vaginal plug	No. of dams (%)	Total No. of implantations (Mean ± S.E.)	Total No. of survived fetuses (Mean ± S.E.)	Total No. of dead & resorved fetuses (%)	Mean body weight of survived fetuses Mean ± S.E. (g)
1. Non treatment	20	19(95.0%)	249 (13.1±0.59)	224 (11.8±0.60)	25(10.0%)	1.30±0.008
2. Distilled water	19	17(89.5%)	215 (12.6±0.79)	204 (12.0±0.73)	11(5.1%)	1.28±0.008
3. Detergent(R)(a) (13.0%)	19	19(100%)	257 (13.5±0.61)	240 (12.6±0.62)	17(6.6%)	** 1.25±0.010
4. Detergent(R) (17.0%)	16	*** 8(50.0%)	100 (12.5±1.05)	88 (11.0±1.15)	12(12.0%)	** 1.16±0.026
5. Detergent(R) (20.0%)	15	*** 2(13.0%)	22 (11.0 1.00)	22 (11.0 1.00)	0	** 1.20 0.016
6. Detergent(R) (25.0%)	15	0				
7. Distilled water	10	10(100%)	133 (13.3±0.63)	122 (12.2±0.73)	11(8.3%)	1.27±0.011
8. Detergent(M) (13.0%)	10	9(90.0%)	109 (12.1±1.18)	97 (10.8±1.06)	12(11.0%)	** 1.22±0.011
9. Detergent(M) (26.0%)	10	0				
10. LAS (2.86%)	10	9(90.0%)	101 (11.2±1.01)	90 (10.0±1.04)	11(10.9%)	1.26±0.015
11. LAS (5.72%)	9	*** 2(22.2%)	29	23	6(20.7%)	
P.O.						
12. Distilled water	14	13(92.9%)	161 (12.4±0.47)	145 (11.1±0.63)	16(9.9%)	1.37±0.006
13. LAS (0.40%)	14	12(85.7%)	152 (12.7±0.64)	134 (11.2±0.52)	18(11.8%)	1.35±0.008
14. LAS (4.00%)	13	*** 6(46.2%)	71 (11.8±0.70)	63 (10.5±1.67)	8(11.3%)	** 1.28±0.012
15. Distilled water	13	12(92.3%)	148 (12.3±0.98)	131 (10.9±1.01)	17(11.5%)	1.31±0.011
16. LAS (0.40%)	13	13(100%)	176 (13.5±0.53)	154 (11.8±0.63)	22(12.5%)	1.30±0.008
17. LAS (4.00%)	14	13(92.9%)	159 (12.2±0.44)	136 (10.4±0.77)	24(15.1%)	1.29±0.010

(a) Commercial dish washing detergent ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TABLE 3-2 Effect of commercial dish washing and LAS on rates of pregnancy and embryonic development in mice

Group	No. of females with vaginal plug	No. of dams (%)	Total No. of implantations (Mean ± S.E.)	Total No. of survived fetuses (Mean ± S.E.)	Total No. of dead & resorbed fetuses (%)	Mean body weight of survived fetuses Mean ± S.E. (g)
18. Diatilled water	13	12(92.3%)	166 (13.8±0.44)	156 (12.9±0.56)	11(6.6%)	1.36±0.007
19. LAS (0.35%)	13	12(92.3%)	156 (13.0±0.69)	142 (11.8±0.69)	14(9.0%)	** 1.31±0.011
20. LAS (1.00%)	13	10(76.9%)	131 (13.1±0.48)	122 (12.2±0.47)	9(6.9%)	1.37±0.010
21. Distilled water	14	12(85.7%)	160 (13.3±0.68)	146 (12.2±0.63)	14(8.8%)	1.38±0.010
22. LAS (0.35%)	15	12(80.0%)	154 (12.8±0.41)	142 (11.8±0.56)	12(7.8%)	1.35±0.010
23. LAS (1.00%)	15	14(93.3%)	173 (12.4±0.61)	162 (11.6±0.73)	11(6.4%)	1.41±0.009
24. Distilled water	15	14(93.3%)	182 (13.0±0.50)	165 (11.8±0.58)	17(9.3%)	1.31±0.008
25. LAS (0.35%)	15	14(93.3%)	172 (12.3±0.51)	159 (11.4±0.58)	13(7.6%)	1.30±0.009
26. LAS (1.00%)	19	** 8(61.5%)	104 (13.0±0.42)	94 (11.8±0.56)	10(9.6%)	1.27±0.010
27. Distilled water	12	11(91.7%)	139 (12.6±0.53)	126 (11.5±0.59)	13(9.4%)	1.32±0.009
28. LAS (0.35%)	12	12(100%)	151 (12.6±0.74)	139 (11.6±0.92)	12(8.0%)	1.31±0.011
29. LAS (1.00%)	12	10(83.3%)	127 (12.7±0.47)	113 (11.3±0.50)	14(11.0%)	1.34±0.008

** $p < 0.01$

TABLE 4-1 Commercial dish washing detergent LAS : Group incidence of malformation and anomalies

Group	No. of fetuses examined	No. of abnormal fetuses	Open eyelids	Cleft palate	Exencephalia	Hydrocephalia	Anal atresia	Subcutaneous bleeding
1. Non treatment	226	8 (5)[a]	2 (2)	2 (2)				4 (4)
2. Distilled water	205	5 (2)	4 (1)			1 (1)		
3. Detergent(R) (13.0%)	240	11 (7)	3 (3)	1 (1)		1 (1)	3 (3)	3 (3)
4. Detergent(R) (17.0%)	89	17 (2)	1 (1)					16 (2)
5. Detergent(R) (20.0%)	22	2 (1)	2 (1)					
7. Distilled water								4 (2)
8. Detergent(M) (13.0%)								7 (3)
11. LAS (5.72%)	23	4 (1)	3 (1)					1 (1)
12. P.O. Distilled water	145	1 (1)						1 (1)
13. LAS (0.4%)	134	2 (2)	1 (1)					1 (1)
14. LAS (4.0%)	63	1 (1)						1 (1)
15. Distilled water	131	3 (3)	2 (2)	1 (1)				
16. LAS (0.4%)	155	6 (6)	1 (1)	2 (2)	1 (1)			2 (2)
17. LAS (4.0%)	136	11 (3)	1 (1)	3 (2)				7 (1)

(a) ( )No. of mother mice

TABLE 4-2 (Continued)

	Group	No. of fetuses examined	No. of abnormal fetuses	Open eyelids	Cleft palate	Exencephalia	Hydrocephalia	Anal atresia	Subcutaneous bleeding
18	Distilled water	155	9 (5)[a]		3 (1)		1 (1)		5 (3)
19	LAS (0.35%)	142	3 (1)						3 (1)
20	LAS (1.00%)	122	5 (3)	1 (1)					4 (2)
21	Distilled water	146	12 (4)	1 (1)			1 (1)		10 (4)
22	LAS (0.35%)	143	14 (5)		3 (2)	1 (1)	1 (1)		9 (4)
23	LAS (1.00%)	162	5 (3)	1 (1)					4 (2)
24	Distilled water	165	3 (3)	2 (2)					1 (1)
25	LAS (0.35%)	160	7 (5)	2 (2)	3 (3)				2 (2)
26	LAS (1.00%)	94	0						
27	Distilled water	126	4 (3)	3 (2)					1 (1)
28	LAS (0.35%)	139	2 (2)	2 (2)					
29	LAS (1.00%)	113	1 (1)						

(a) ( )No. of mother mice

TABLE 5-1 Effect of commercial dish washing detergent & LAS on skeletal development of mouse fetuses

Degree of ossification	1. Non treatment	2. Distilled water	3. Detergent (R)	4. Detergent (R)	5. Detergent (R)	7. Didtilled water	8. Detergent (M)	10. LAS	11. LAS
No of caudal vertevrae (a)	8.13±0.164	8.06±0.125	8.28±0.138	6.37±0.294 **	7.20±0.254 *	8.00±0.160	7.93±0.178	8.10±0.257	5.18±0.193 ***
Fore paw No of middle phalanges (L)	3.90±0.041	3.98±0.014	3.90±0.033	2.97±0.180 **	3.95±0.045	3.95±0.025	3.95±0.030	3.87±0.061	3.52±0.177
(R)	3.91±0.040	3.98±0.014	3.91±0.032	2.96±0.179 **	3.95±0.045	3.96±0.021	3.95±0.029	3.87±0.064	3.45±0.225
No of distal phalanges (L)	2.69±0.081	2.59±0.066	2.60±0.085	1.58±0.140 **	1.86±0.228 **	2.55±0.083	2.33±0.086	2.22±0.133 *	0.71±0.220
(R)	2.81±0.084	2.66±0.063	2.67±0.082	1.65±0.148 **	2.33±0.218 **	2.63±0.083	2.49±0.075	2.35±0.130	0.95±0.213
Hind paw No of middle phalanges (L)	4.54±0.092	4.70±0.056	4.63±0.058	3.27±0.221 **	4.36±0.168	4.62±0.075	4.51±0.088	4.21±0.122	3.05±0.320
(R)	4.57±0.081	4.73±0.049	4.66±0.057	3.29±0.222 **	4.38±0.176	4.64±0.073	4.59±0.082	4.26±0.117	3.18±0.299
No of distal phalanges (L)	1.02±0.105	0.63±0.084	0.88±0.085	0.49±0.010 **	0 ***	0.92±0.111	0.43±0.091 ***	0.75±0.137	0
(R)	1.16±0.107	0.72±0.091	1.14±0.094	0.60±0.109 **	0.05±0.048 ***	0.99±0.114	0.52±0.103 **	0.76±0.132	0
Defective adhesion of sternevrae (b)	42(25.9)	38(24.5)	39(21.3)	43(48.3)	7(31.8)	30(24.4)	33(32.4)	34(39.5)	11(50.0)
Separation of sternevrae	12(7.4)	19(12.3)	19(10.4)	19(10.4)	2(9.1)	7(5.7)	3(2.9)	6(7.0)	2(9.1)
Defective development of sternevrae	33(20.4)	35(22.6)	29(15.9)	32(36.0)	0	5(4.1)	12(11.8)	9(10.5)	6(27.3)
Delayed ossification of talus (L)	142 (87.7)	146 (94.2)	159 (86.9)	84 (94.4)	22 (100)	116 (94.3)	101 (99.0)	84 (97.7)	22 (100)
(R)	133 (82.1)	155 (100)	152 (83.1)	79 (88.8)	22 (100)	115 (93.5)	100 (98.0)	84 (97.7)	22 (100)
of calcaneus (L)	60 (37.0)	45 (29.0)	64 (35.0)	57 (64.0)	16 (72.7)	47 (38.2)	40 (39.2)	46 (53.5)	22 (100)
(R)	55 (34.0)	32 (20.7)	57 (31.2)	53 (59.6)	12 (57.0)	41 (33.3)	30 (29.4)	40 (46.5)	22 (100)
Absence of cervical bodies	21(13.0)	5(3.2)	15(8.2)	41(46.1)	1(4.5)	5(4.1)	4(3.9)	9(10.5)	11(50.0)
Variation									
Surplus of sternevrae	15(9.3)	11(7.1)	15(8.2)	2(2.3)	0	4(3.3)	5(4.9)	5(5.8)	0
Asymmetry of aternevrae	56(34.5)	36(23.2)	47(25.7)	21(23.6)	3(13.6)	24(19.5)	15(14.7)	12(14.0)	3(13.6)
Cervical rib	54(33.3)	43(27.7)	37(20.2)	13(14.6)	15(68.2)	36(29.3)	24(23.5)	19(22.1)	14(63.6)
No of ribs 14	63(38.9)	38(24.5)	81(44.3)	32(36.0)	17(77.3)	36(29.3)	35(34.3)	23(26.7)	2(9.1)
No of lumber vertebrae 7									
Anomalies									

(a) Mean ± S.E. (b) (%) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TABLE 5-2 Effect of LAS on skeletal development of mouse fetuses*

Degree of ossification	15.Distilled water	16.LAS	17.LAS	21.Distilled water	22.LAS	23.LAS	27.Distilled water	28.LAS	29.LAS
No of caudal vertebrae	(a) 8.72±0.176	8.53±0.165	8.51±0.184	9.37±0.162	9.10±0.144	9.27±0.139	8.94±0.163	8.44±0.205	8.49±0.156
Fore paw No of middle phalanges (L)	3.95±0.019	3.99±0.007	3.94±0.020	3.97±0.020	3.98±0.016	3.99±0.000	3.96±0.033	3.94±0.032	4.0
(R)	3.98±0.011	3.99±0.013	3.97±0.017	3.97±0.020	3.98±0.016	3.99±0.000	3.91±0.054	3.96±0.032	4.0
No of distal phalanges (L)	2.56±0.081	3.04±0.081	2.67±0.085	2.88±0.079	2.83±0.069	3.23±0.065	2.69±0.082	3.06±0.068	2.95±0.059
(R)	2.57±0.079	3.06±0.079	2.77±0.074	2.97±0.078	2.94±0.069	3.33±0.061	2.69±0.085	3.18±0.066	3.05±0.059
Hind paw No of middle phalanges (L)	4.72±0.057	4.92±0.037	4.63±0.085	4.80±0.063	4.73±0.072	4.88±0.045	4.70±0.077	4.61±0.094	4.84±0.037
(R)	4.73±0.059	4.94±0.035	4.65±0.084	4.81±0.063	4.75±0.071	4.90±0.037	4.69±0.078	4.74±0.078	4.85±0.033
No of distal phalanges (L)	0.88±0.112	1.58±0.113	0.90±0.115	1.32±0.112	0.99±0.108*	1.64±0.112	0.81±0.104	1.19±0.129	1.28±0.120
(R)	0.91±0.112	1.71±0.116	0.99±0.115	1.42±0.118	1.11±0.113	1.88±0.118	0.93±0.110	1.32±0.130	1.49±0.125
Defective adhesion of sternevrae	(b) 43(32.8)	60(39.0)	66(48.5)	41(28.1)	38(26.8)	60(37.0)	37(29.1)	33(23.7)	39(34.5)
Separation of sternebrae	0	1(0.6)	10(7.3)	3(2.1)	5(3.5)	3(1.9)	5(3.9)	0	2(1.8)
Defective development of sternebrae	7(5.3)	19(12.3)	9(6.6)	10(6.9)	20(14.1)	18(11.1)	2(1.6)	6(4.3)	2(1.8)
Delayed ossification of talus (L) (R)	103 99 (78.6)(75.6)	115 108 (74.7)(70.1)	106 124 (92.6)(91.2)	119 106 (81.5)(72.6)	124 115 (87.3)(81.0)	123 108 (75.9)(66.7)	104 100 (81.9)(79.4)	118 109 (86.1)(80.1)	106 99 (93.8)(87.6)
of calcaneus (L) (R)	43 36 (32.8)(27.5)	29 24 (18.8)(15.6)	54 47 (39.7)(34.6)	14 10 (9.6) (6.9)	17 13 (11.2)(9.2)	17 14 (10.5)(8.6)	21 14 (16.5)(11.1)	42 39 (30.7)(28.7)	18 16 (15.9)(14.2)
Absence of cervical bodies	13(9.9)	3(1.9)	6(4.4)	6(4.1)	5(3.5)	2(1.2)	5(3.9)	15(10.8)	6(5.3)
Variation									
Surplus of sternebrae	15	19(12.3)	19(14.0)	16(11.0)	23(16.2)	18(11.1)	27(21.3)	31(22.3)	17(15.0)
Asymmetry of sternebrae	11(8.4)	34(22.1)	22(16.2)	14(9.6)	31(21.8)	33(20.4)	12(9.4)	27(19.4)	23(20.4)
Cervical rib	25(19.1)	29(18.8)	22(16.2)	32(21.9)	33(23.2)	19(11.7)	8(6.3)	15(10.8)	23(20.4)
No of ribs 14	64(48.9)	29(18.8)	33(24.3)	40(27.4)	33(23.2)	46(28.4)	59(46.5)	55(39.6)	40(35.4)
No of lumber vertebrae									
Anomalies									

(a) Mean ± S.E. (b) (%) * $p < 0.05$

*excepting Group No.12.13,14,18,19,20,24,25,26.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 79-82, 1975

ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）の亜急性毒性試験病理組織学的検討

藤井　孝*　三栗谷久敏*　湯澤勝広*
平賀興吾*

Subacute Toxicity Test of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Histopathological Study

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, KATSUHIRO YUZAWA*
and KOGO HIRAGA*

緒　言

先に高級アルコール系洗剤の主要基剤であるドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略す）についてラットを用いた亜急性毒性試験を行ない，一般症状，血液学的・血清生化学的検索，剖検所見などについて報告した.[1] 今回はこの試験で得た器官組織の病理組織学的検索結果の報告である.

実験方法及び実験結果の要旨

詳細は前報[1]に記載してあるのでここでは要旨のみを記すに止める．実験動物はWistar-JCL系ラット(実験開始時５週令，平均体重；雄125g，雌108g)を用い barrier-area の内で個別ケージに収容し，飼料・水は自由摂取とした．実験はSDSを日本クレア社製粉末飼料ＣＥ-２に0.5，1.0，2.0%の割合で添加し当部で固型飼料化したものを摂取させ，対照群には無添加のものを与えた．ラットは対照群を含めて各群雌雄10匹ずつとし投与後２週間，４週間で半数を屠殺し検索に供した．その結果，投与期間中，体重増加抑制が２%群雄でみられたが他では著明ではなく，下痢症状は２%群にもみられなかった．剖検では特に顕著な変化は認められなかった．器官重量は２週間で２%群雌雄の甲状腺の体重比重量，肝臓の体重比・絶対重量，１及び２%群雌雄の腎臓の体重比重量で有意な増加がみられた.

４週間では２%群雄の胸腺の体重比・絶対重量，雌の0.5，1，2%群の肝臓と２%群雌の腎臓の体重比・絶対重量で有意な増加がみられた．血液学的・血清生化学的検索では４週間の１及び２%群雄のGOT，GPTが有意に上昇した.

病理組織学的検索方法及び結果

各群のラットは実験終了時，断頭・放血後，脳，下垂体，甲状腺，胸腺，肺，心臓，肝臓，胃，空腸，盲腸，結腸，膵臓，脾臓，副腎，腎臓，前立腺，精巣，卵巣，子宮の各器官を摘出し，10%緩衝ホルマリン液で24時間振盪後，静置して計７日間固定した．その後，各器官は定法に従ってパラフィン切片を作製，Hematoxylin-Eosin染色，肝臓・腎臓はその他にPAS反応も行なって光学顕微鏡下で病理組織学的な検討を加えた.

結果：SDS投与群の腎臓では対照群に比し稍々著明な変化がみられたが他の器官では顕著な変化は認められなかった．以下，各器官における変化の概略を述べる．脳，下垂体では著変は認められなかった．甲状腺は２週間２%群雌雄で体重比重量が増加したが濾胞の増大，新生濾胞などもみられず認むべき変化はなかった.

胸腺は４週間２%群雄で重量減少がみられたが組織所見では小葉の縮少，皮質細胞の減数・消失などもみられず著明な変化は認められなかった.

肺では断頭時嚥下したと思われる赤血球の存在が散見された他に認むべき所見はなかった．心臓では心筋の一部がエオジン好染を示し，核も稍々ヘマトキシリンに濃染しているのが各群で散見された以外，著変はなかった.

肝臓は２週間２%群雌雄，４週間の0.5，1，2%群の雌で重量増加が認められたが，これらの組織所見では対照群に比べ，いずれも局所的で軽度な肝細胞の腫脹及び細胞分裂亢進像がみられたのみで濃度の差異による程度

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

の強弱も著明には認められなかった(Fig. 1). 膵臓, 胃, 空腸, 盲腸, 結腸では対照群に比べ投与群の空腸で局所的な粘膜上皮細胞の軽度な融解が散見されたが (Fig. 2), その他の器官には認むべき変化はみられなかった.

脾臓, 副腎に著変は認められなかった.

雌雄生殖器系器官に著変は認められなかった. 腎臓の変化は殆んどが対照群でも認められ, 特異的な変化ではないが程度が強く, 出現例数も多かったのは次のような変化であった.

主部尿細管管腔中にエオジン淡染, PAS反応陰性の膠質様円柱がみられた (Fig. 3). 円柱は対照群に比べ2週間2%群雌雄, 4週間2%群雌で顕著であり, 4週間2%群雄は稍々顕著にみられた. その他2週間1%群雌雄にも軽度にみられたが, 2週間・4週間の0.5%群雌雄では著明ではなかった.

主部尿細管上皮細胞中に核の1/5から同程度の大きさまでの空胞がみられた(Fig. 4). この変化は局所性に皮質に散在していた. これは4週間2%群雌で顕著に, 同雄で稍々顕著にみられ, 4週間1%群雌雄で軽度であったが0.5%群では著明でなく, 2週間では2%群雌雄で軽度にみられた他は全て顕著ではなかった.

主部尿細管上皮細胞の細胞質中に微細顆粒状から核と同大までの球形でエオジン好染, PAS反応陰性 (但し, 微細顆粒状のものは陽性であった.) の顆粒がみられた (Fig. 5). これは4週間2%群雄で稍々顕著に, 同雌, 1%群雌雄で軽度にみられた. 2週間では各群とも著明に認められなかった.

主部からヘンレ係蹄部尿細管腔中にH. E. 染色で鉛色, PAS 反応陽性の板状または同心円状の物質がみられた (Fig. 6). これは雌に多くみられ2週間より4週間で, 1%群より2%群で著明にみられたが0.5%群, 対照群では判然としなかった.

皮質で尿細管・糸球体を含む斑状・帯状の壊死巣がみられた. これは被膜直下から皮髄境界部にかけて散在しており, 尿細管の崩壊, 結合織の増生を主兆としていた (Fig. 7). 変化は対照群と比べ2週間2%群雌雄で稍々顕著であり, 同雄, 1%群雌雄, 0.5% 群雌雄では軽度であった. 4週間では各投与群とも著明ではなかった.

糸球体の萎縮が対照群に比べ2%群雌雄に顕著に, 1%群雌雄に軽度にみられ, 2週間, 4週間で程度の差異は著明ではなかった. 0.5% 群雌雄は2週間, 4週間とも顕著ではなかった (Fig. 8).

遠位尿細管及び集合管の管腔が軽度に拡張し腔内に変性細胞残渣がみられた. これは1及び2%群雌雄で顕著であり, 2週間より4週間で著明になっていた. 0.5%群での変化は2週間, 4週間とも著明ではなかった.

以上, 述べた腎臓の変化のうち問題となるのは尿細管中の円柱, 尿細管上皮細胞の空胞変性, 尿細管中のPAS陽性物質(石灰変性), 糸球体の萎縮などで, これらの変化は対照群には殆んど認められないか, または極く軽度であった.

考　察

以上の病理組織所見からSDSがラットの各器官に及ぼしたと思われる形態的変化には特異的なものは認められず, 変化の程度も腎臓を除いて全て軽度であったと考えられる. 肝臓重量は増加傾向があり4週間投与群雌では特に用量と重量増加の関係が認められたが, 組織学的所見は軽度の肝細胞の腫脹と分裂亢進像であり恐らく適応現象であろうと思われる. 腎臓での尿細管上皮細胞の変性, 糸球体の萎縮は稍々病的な変化とみられるが局所的であったことは腎臓の排泄器官としての生理機能亢進が一部の腎単位に障害を与えた結果の像であって, 現時点では器官としての障害作用の形態的表現とは考え難い. またSDSによるラットの腎臓, 肝臓, 小腸の病理組織的変化像はABS, LASの像と酷似しており,[2] その変化の程度は摂取期間, 濃度など多くの実験条件が異なっているため, 比較することは困難であるが強いて述べれば質的に大差はないが量的にはSDSがLASよりも軽度な変化を示したと思われる.

文　献

1) 大石真之他：東京衛研年報, 25, 669, 1974
2) 米山允子他：東京衛研年報, 24, 449, 1972

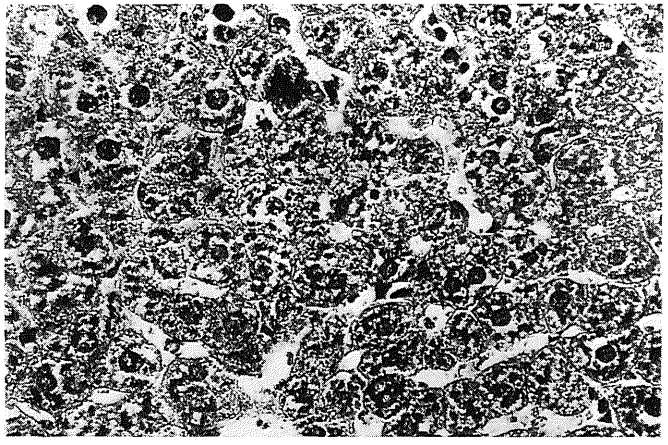


Fig.1 Slight swelling in liver cells of male rat treated with 2% S.D.S. for 2weeks. H.E.stain. Original magnification× 400.

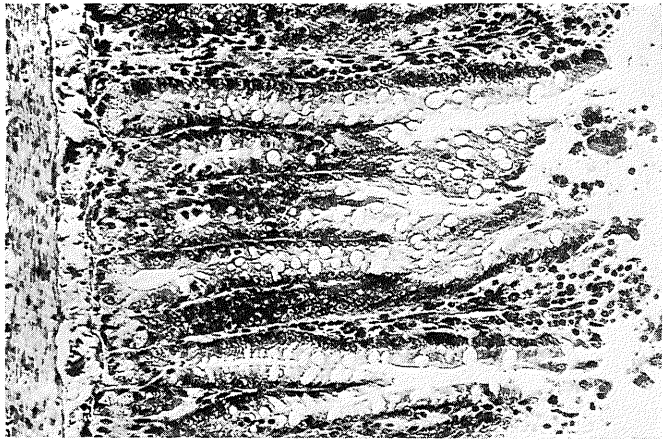


Fig.2 Slight colliquation in epithelium of small intestine of female rat treated with 2% S.D.S. for 2 weeks. H.E. stain. Original magnification ×200.

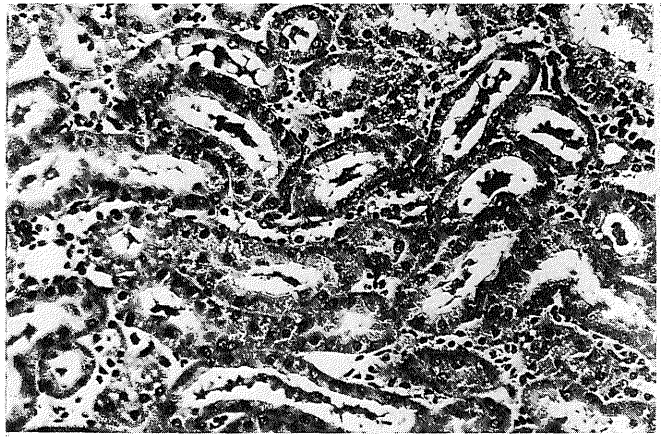


Fig.3 Urinary cast in urinary tubules of female rat treated with 2% S.D.S. for 2weeks. H.E.stain. Original magnification × 200.

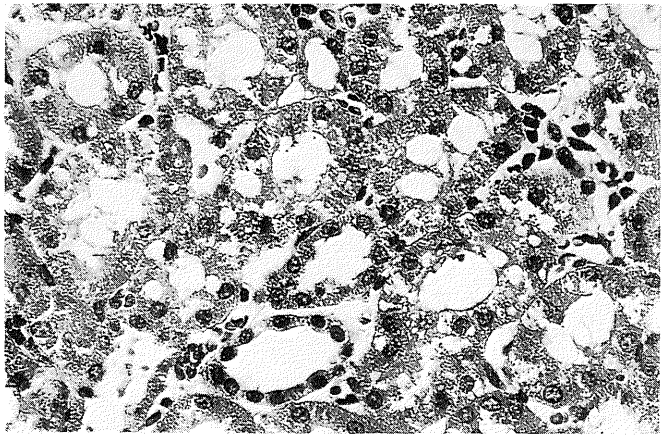


Fig.4 Vacuolation in epithelium of urinary tubules of female rat treated with 2% S.D.S. for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification × 400.

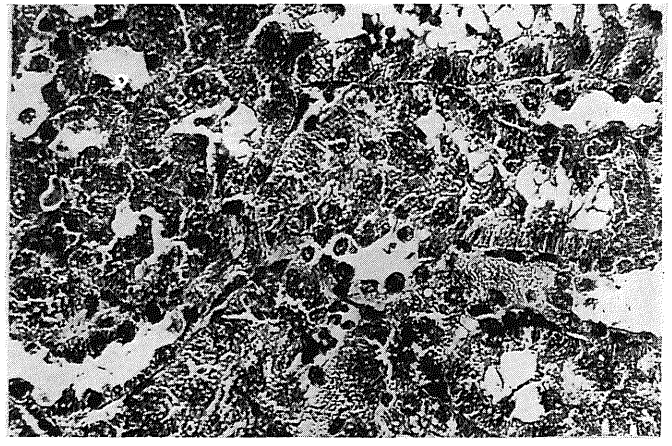


Fig.5 Eosinophilic droplets in epithelium of urinary tubules of female rat treated with 2% S.D.S. for 4 weeks. H.E.stain. Original magnification × 400.

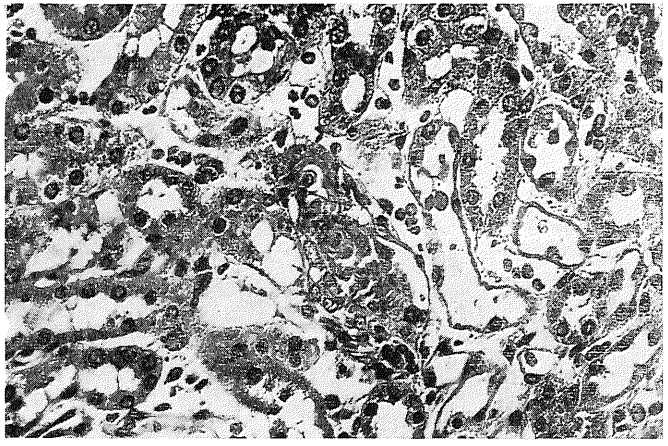


Fig.6 PAS positive materies in urinary tubules of female rat treated with 2% S.D.S. for 4weeks. H.E.stain. Original magnification × 400.

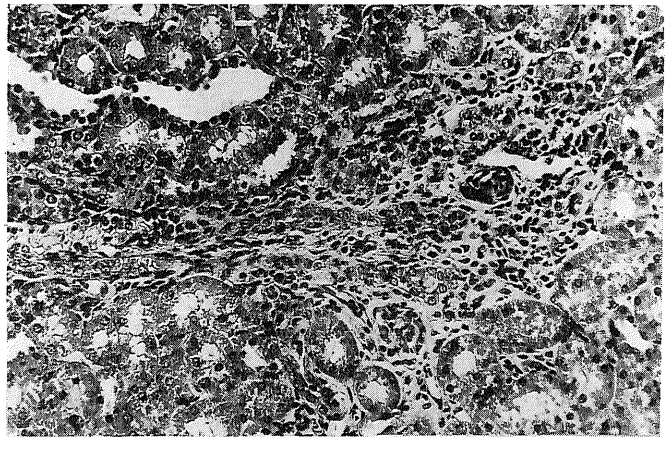


Fig.7 Focal necrosis in kidney of female rat treated with 2% S.D.S. for 4weeks. H.E. stain. Original magnification × 400.

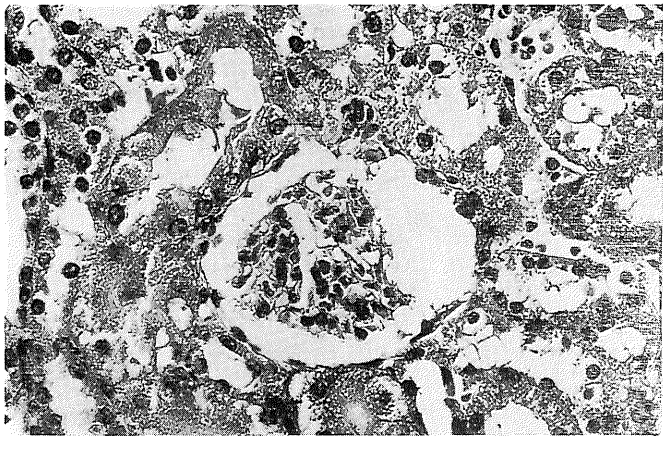


Fig.8 Atrophy in glomerulus of female rat treated with S.D.S for 4weeks. H.E. stain.Original magnification × 400.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 83-89, 1975

メタバナジン酸ナトリウムの急性毒性

小林博義* 神谷信行* 吉田誠二*
平賀興吾*

Acute Toxicity of Sodium Metavanadate

HIROYOSHI KOBAYASHI*, NOBUYUKI KAMIYA*, SEIJI YOSHIDA*
and KOGO HIRAGA*

Acute oral toxicites of vanadium (sodium metavanadate) by one time administration in rats and mice were examined, and the following results were obtained.

1) Main symtoms observed in either dead or survival animals were calmative, diarrhea and congestion of adrenal, brain, liver, and others, in survival rats the symtoms and the recovery of decreased growth rats were recognized from 4 or 5 days after administration.

2) LD_{50} values of rats (7 weeks after birth) was 25-33mg/kg as vanadium, in mice (8-9 weeks after birth) it was 68-81mg/kg as vanadium.

3) In the examinations of urinalysis, decrease of pH, increase of glucose and keton body and occult blood were found.

緒　言

重油輸入量，消費量の増大に伴い，原油に含まれる微量重金属による大気汚染が増大している．このうち通常バナジウムが最も多く，ついで銅，鉄，ニッケルなどが含まれている．東京地域での空気中浮遊粒子状のバナジウム量は，非汚染地区（小笠原）の８～21倍を示しており，[1] 近年これら重金属による環境汚染，生体への影響が問題にされ，疫学的調査や，臨床研究が求められている．

今回バナジウム経口投与による急性毒性を，ラットおよびマウスで観察したので報告する．

実験材料ならびに実験方法

試料： メタバナジン酸ナトリウム（$NaVO_3 4H_2O$）Merck 社製 Lot 1404208 を生理食塩水で溶解し，塩酸を用いて，pH 7.4 としたものを試料とした．

動物： ラットは雌雄の SLC-Wistar 系，JCL-Wistar 系および，JCL-SD 系のものをいずれも４週令で購入，温度25±1°，湿度55±5%，照明時間午前６時より午後６時までの環境下で，５匹ずつ，ステンレス網ケージに収容し固型飼料（ＣＥ-2）と水道水を与え飼育し，ＪＣＬおよび SLC-Wistar 系ラットは７週令，JCL-SD 系ラットは38週令で実験に供した．

マウスは，自家繁殖した JCL-ICR 系雌雄を，カンナクズ床敷使用，プラスチックケージに５匹ずつ収容したほかは，ラットと同一条件にて飼育し，8,9，および43週令時のものを実験に用いた．

実験方法： 予備実験の結果，50%致死量が，ラットで30～118mg/kg，マウスで198～297mg/kgと推定されたのでラットでは 50～275mg/kg，マウスでは 198～997 mg/kg の間に公比1.2～1.7の５段階の投与量を設定し，それぞれの投与容量が 10ml/kg となるようにした．投与は，胃ゾンデによる経口投与とし，動物はラット，マウスとも１用量（１群）10匹としたが，ＪＣＬ-ＩＣＲ・マウス43週令のみは１群５匹を用いた．投与前日午後５時より除飼して，水のみを与え，午前10時より投与を開始した．試料投与終了後２時間目より飼を与え，その後２～４週間にわたり症状を観察し，２週間までの死亡率により50%致死量（LD_{50}）を Lichfield-Wilcoxon 法に

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

より算出した．同時に致死動物は剖検を行なった．またＪＣＬ-Wistar 7週令雌雄各10匹を用い，100mg/kgを同様に経口投与後．3, 6, 12, 18, 24時間目の尿検査を行なった．JCL-Wistar 7週令 26mg/kg 投与群雌6匹雄7匹については，投与終了後28日目に血液学的，血清生化学的検査を行ない，SLC-Wistar 7週令ラットの生存例については，21日目まで体重を測定した．

血液検査：Coulter Counter Model S により白血球（ＷＢＣ）数，赤血球（ＲＢＣ）数，ヘモグロビン濃度（ＨＧＢ），ヘマトクリット（ＨＣＴ），平均赤血球容積（ＭＣＶ）平均赤血球ヘモグロビン濃度（ＭＣＨＣ）を測定した．

血清生化学的検査：日立自動分析機M-400により，総蛋白ＴＰ（ビユレット法），グルコーズＧＬＵ（グルコーズオキシダーゼ法）尿素窒素（ウレアーゼインドフェノール法）総コレステロール CHO (Lieberman-Burahard 法) GPT (Reitman-Frankel 変法) GOT (Reitman-Franke 変法) ALP (Kind-King 変法) コリンエステラーゼ CHE (pH 変法) を測定した．血液は断頭時の放出する血液を採取して用いた．

尿検査：個別に採尿し，エームス製のラブステックス (Lot 13310633) により pH，蛋白，ブドー糖，ケトン体，潜血を検査した．

試料量表示中（ ）内にバナジウム，量を記した．

結　　果

症状：ラットにおいて，各系統週令雌雄ともに観察された主症状は耳介，四肢，粘膜などが蒼白となる貧血様状態が投与量に応じてみられ，更に鎮静様状態，立毛，下痢などが投与後1時間から4時間後の頃までみとめられた．SLC-Wistar 7週令の致死を免がれた雄で12～18日の間に再び下痢がみられたが JCL-Wistar ではこのような下痢は認められなかった．JCL-SD 系 38 週令での 193 (52) mg/kg 以上の投与群では6時間後に後軀麻痺がみられ，同時にゼラチン様物と血液のまざった下痢がほとんど全例にわたり認められた．

マウスでは主症状はラットと類似していたが，43週令の雄で投与後30～60分頃より，上下眼瞼が反転し，充血した眼瞼粘膜の露出が多くみられたが雌では認められなかった．また同週令の雌雄において，投与後48時間頃に死亡したものに，肛門に糞塊がついたまま，後肢伸展姿勢で致死しているものが多く，死を免がれたものでも同様の糞塊をもちつづけているものが多数あり，そのものの糞塊を取り除いても肛門は完全には締らず，開いたままの状態が24時間近く続いてみられた．

剖検：死亡例のみ行なったが，ラットで投与後6時間までのものでは脳，副腎，腸管の盲腸上部までの充血，心耳，脾臓，腸間膜リンパの腫脹がみられ，肝臓は暗赤色，肺は紅色，腎臓の髄質外帯部は黒色を呈し，更に胃の腺胃部粘膜剝離と微細出血等が認められた．膀胱にはほとんどに尿の貯留をみなかった．24時間以降に致死したものでは，外陰部の汚れが多く認められ，腸管パイヤー板が白点様になっているのがみられ，脳，副腎，胃以外の変化はやや軽微となっていた．

マウスではラットの変化に加えて，胆嚢肥大が認められたほかは，育腸の充血がラットより軽微であった．

50%致死量：結果は Table 1 に示す通りで毒性は強く，ラット，マウスとも比較的早く死亡し始め，最終は約24～170時間にわたって認められた．

体重：SLC-Wistar 7週令ラットで死を免がれたものの投与後体重の推移は Fig. 1 のようで，投与量に比例して投与初期に体重の減少がみられた，しかし投与後5日目以降は対照とほぼ平行的な増加曲線を示した．

器官重量および血液学的，血清生化学的検査：JCL-Wistar 7週令100 (26) mg/kg 投与での各測定値は Table 2, 3, 4, に示した，器官重量については有意な変化を示すものはなく，血液学的変化は雌では認められなかったが，雄では赤血球および，ヘマトクリット値低下

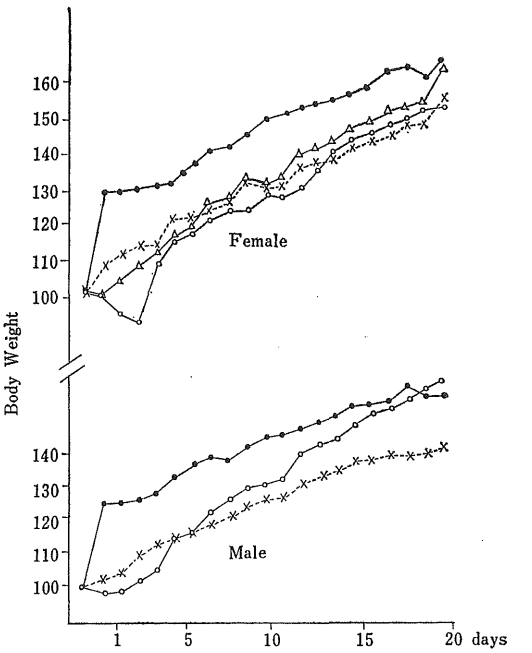


Fig.1. Change of Body Weight of Survival Rats Administered Orally with Vanadium (Sodium Metavanadate)

Table 1. Acute Toxicity (LD_{50}) of Vanadium (Sodium Metavanadate) in Rats, Mice

		Weeks	Sex	B. W.±SD	Dead Time onset	Dead Time peak	Dead Time end	Slope function	LD_{50} (po) mg/kg	Confidence Limits p=0.05 mg/kg
Rat	JCL wistar Rat	7	♂	180±11.7	16	20	129	1.243	125.6[a] (33.0)[b]	113.1(29.7) ～ 140.9(37.0)
			♀	142± 8.4	16	19	173	1.270	95.9 (25.2)	82.6(21.7) ～ 111.1(29.2)
	SLC-wistar Rat	7	♂	153± 9.5	2		48	1.839	124.9 (32.8)	61.6(16.2) ～ 247.5(65.0)
			♀	101±10.3	2		22	1.839	124.9 (32.8)	61.6(16.2) ～ 247.5(65.0)
	JCL-SD Rat	38	♂	625±43.6	3		77	1.763	65.8 (17.3)	49.1(12.9) ～ 87.5(23.0)
			♀	379±56.7	3		143	1.665	65.8 (17.3)	50.6(13.3) ～ 85.3(22.4)
Mouse	JCL-ICR Mouse	8	♂	31± 2.7	1	2	47	1.217	294.7 (77.4)	260.0(68.5) ～ 332.8(87.4)
			♀	25± 2.6	1	2	150	1.299	309.9 (81.4)	263.5(69.2) ～ 364.4(95.7)
		9	♂	33± 2.9	2	6	70	1.187	259.7 (68.2)	230.7(60.6) ～ 292.4(76.8)
			♀	29± 4.8	2	2	30	1.215	279.9 (73.5)	253.2(66.5) ～ 308.8(81.1)
		43	♂	40± 3.2	1	2—3	96	1.927	289.8 (76.1)	192.6(50.6) ～ 434.9(114.2)
			♀	38± 7.7	1	2	72	1.266	304.6 (80.0)	247.9(65.1) ～ 273.9(98.2)

a) Sodium Metavanadate
b) Vanadium

Table 2. Organ Weights of Rats after 28 days Administered Orally with Vanadium (Sodium Metavanadate)

	DOSE	No of	Heart	Spleen	Liver	Kidney mg		Suprarenal gland mg		Testis or Ovary mg		Uterus
	mg/kg	Rats	mg	mg	g	R	L	R	L	R	L	mg
Male	Control	5	1113±96[a] / 337±38[b]	688±55 / 209±26	13.82±0.6 / 4.19±0.3	1303±117 / 394±30	1245±1103 / 376±19	33.8±7.9 / 10.1±1.9	35.8±8.6 / 10.8±2.4	1617±61 / 490±25	1638±76 / 497±38	—
	100[c] (26)[d]	7	1066±75 / 322±20	718±122 / 216±31	14.02±1.3 / 4.28±0.1	1231±69 / 372±26	1252±105 / 378±16	37.8±5.3 / 11.4±1.5	39.8±6.2 / 12.0±1.8	1674±56 / 508±52	1704±50 / 517±54	—
Female	Control	5	760±60 / 349±25	499±29 / 230±18	7.99±0.2 / 3.08±0.1	858±35 / 395±14	833±51 / 383±23	40.8±6.1 / 18.7±2.7	38.8±5.0 / 17.8±2.4	93.8±10 / 43.3±4.8	99.6±9.9 / 45.8±4.3	531±59 / 245±31
	100 (26)	6	800±66 / 361±97	522±47 / 236±23	8.27±5.9 / 3.74±2.1	900±70 / 407±23	880±50 / 398±15	38.0±4.5 / 19.2±2.0	43.5±10.3 / 19.6±3.8	90.6±12.3 / 40.9±3.9	94.6±12.8 / 42.8±4.6	575±141 / 260±60

a) Mean Organ Weight±S.D.
b) Mean Organ Weight to 100g body weight±S.D.
c) Sodium Metavanadate mg/kg
d) Vanadium mg/kg

Table 3. Hematology of Rats after Administered Orally with Vanadium (Sodium Metavanadate)

	mg/kg	No of Rat	WBC XIO³/mm³	RBC XIO⁶/mm³	Hb g/dl	Ht %	MCV μ³	MCH μμg	MCHC %
Male	Control	5	9.4±1.8 a)	816.6±72.5 *	16.6±15.1	45.8±4.5 *	57.2±1.6	20.3±0.6	36.5±1.9 *
	100 b) (26) c)	7	7.9±1.6	754.2±31.5 *	15.5±0.5	41.5±1.7 *	56.2±1.1	20.5±0.3	37.2±0.5 *
Female	Control	5	7.6±1.6	741.0±27.2	15.7±0.5	40.9±1.4	56.6±1.1	21.1±0.3	38.3±0.3
	100 (26)	6	8.4±2.5	741.1±32.4	15.7±0.4	40.5±1.7	56.0±1.4	21.1±1.0	38.6±0.9

a) Mean±S.D. b) Sodium Metavanadate c) ( )…Vanadium
* P<0.05

Table 4. Biochemistry of Rats after Administered Orally with Vanadium (Sodium Metavanadate)

	DOSE mg/kg	No of Rat	TP (g/dl)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GPT (K-U/ml)	GOT (K-U/ml)	ALP (K-A-U/ml)	CHO (mg/dl)	CHE (PH)
Male	Control	5	72.0±19.4 a)	164.0±18.5 *	23.2±1.9	35.0±10.0	99.6±19.5	45.4±11.0	76.8±13.5	215.0±5.6
	100 b) (26) c)	7	62.0±18.9	144.0±9.5 *	24.0±3.5	35.5±5.2	105.7±14.9	43.4±11.2	79.1±9.3	218.4±3.7
Female	Control	5	65.8±15.0	153.2±10.5	21.6±1.8	33.4±6.7	112.2±15.1 *	31.2±9.7	74.4±9.5 *	168.8±11.8
	100 (26)	6	64.0±10.5	154.3±12.5	21.6±2.3	27.5±4.5	107.1±30.3 *	32.6±6.3	66.0±3.5 *	158.1±21.4

a) Mean±S.D. b) Sodium Metavanadate c) Vanadium
* P<0.05

平均赤血球ヘモグロビン濃度の上昇がみられた．血清生化学的変化は，雄のGLU減少，雌のGOT，CHO活性の低下が有意に（P<0.05）認められた．

尿検査：JCL-Wistar 7週令ラット100 (26) mg/kg経口投与後の尿変化を例数の百分率で Table 5 に示した．予備実験で，投与後48時間以降では著変が認められなかったので，投与後3, 6, 12, 18, 24時間値尿を測定した．6時間より18時間まで投与群は雌雄とも pH の変動が多く，蛋白，ブドー糖，ケトン体，潜血の出現などがみられ，特に潜血は対照群は全く陰性なのに対して，投与群で3～24時間にわたりその多くは6～12時間に認められるなど広い陽性がみられるが，24時間値では，対照と大差を

Table 5. Urinalysis of Rats after Administered with Vanadium (Sodium Metavanadate)[1)]

SEX		Male												Female											
DOSE		100mg/kg						Control						100mg/kg						Control					
Time (hr)		0	3	6	12	18	24	0	3	6	12	18	24	0	3	6	12	18	24	0	3	6	12	18	24
pH	6	40	88	60	30	44	80		20	20				50	75	60	25	57	100						
	7	60		20	30	44	10	60	60	40			40	20	25	10	25	28		40			40		60
	8		12	20	40	22	10	40	20	20	100	100	60	30		10	50	14		60	100	100	60	100	40
	9									20						20									
Protein	−	80	55	80	40	89	70	60	60	80	100	100	100	60	100	10	12	57	50	60	40	100	100	100	100
	+	20	44	20	40	11	20	40	40	20				40		90	12	14	33	40	40				
	++				20		10														20				
	+++																75	28	16						
Glucose	−	100	89	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	62	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	+		11												25	10									
	++														12										
Keton	−	100	100	80	90	100	80	80	100	100	100	100	100	100	75	50	75	100	100	80	100	100	100	100	100
	+			20	10		20	20							25	50	25			20					
Occult Blood	−	100	55		40	55	90	100	100	100	100	100	100	100	12		37	71	83	100	100	100	100	100	100
	+		33	100	60	44	10								75	80	50	28	16						
	++		11												12	10	12								
	+++															10									

1) In term of percentage No of Collect

Proten + 0-30mg/kg ++ 30-100mg/kg +++ 100-300mg/kg

Glucose + 0.25-0.50% ++ 0.50 over

Keton + 10mg/kg over

Blood + 5 ++ 10 +++ 30 (Visual field 400 X)

認めなくなった.

考　察

原油に含まれる重金属の中で最大値を示すバナジウムは,[1,3] 東京空気中に約0.230$\mu g/m^3$ 含まれ，粒径分布で1.6μ以下のものが50%前後含まれており呼吸器の深部にまで侵入する．新生児肺換気量は大人の114に対して360～405ml/kg，1才児で323ml/kgと約2.2～2.8倍であり，発育しつつある小児におよぼす影響は大きいと思われる.[4,6] 今回は，ラット，マウスでの経口投与実験であったが，毒性は比較的大きい分類に入り，LD_{50}値は，ラット7週令95～125(25～33) mg/kg，38週令 65.8 (17) mg/kg．マウス7～9週令，43週令とも 259.7～304.6 (68～80) mg/kg であった．バナジウムが他の動物でみられたLD_{50} は経口投与，ウサギ 100mg/kg，マウス（腹腔投与）10mg/kg と報告されている.[5]

バナジウムでみられる症状は，耳介，四肢の蒼白，鎮静，下痢などであったが，工場事故等でのバナジウム吸入時にあらわれる作用は頭痛，精神錯乱，視野，視神経異常および網膜炎等を起すといわれている．今回のラット，マウスを用いての経口投与実験で高濃度投与群では，5～6日後も，ラットで下痢，流涙，マウスで立毛などが残った．体重は3～4日目より増加し始めたが，投与群に抑制傾向が残った．JCL-Wistar 4週令雄で血液血清生化学的には，RBC，HCT 下降，MCHC の上昇がみられ，また JCL-SD 系38週令ラットでは WBC 下降傾向がうかがわれた．JCL-Wistar 系に投与4週間後での測定で雌 GOT，CHO 下降，JCL-SD 系38週令で雄UN，雌CHO上昇傾向がみられ，ラットでバナジウムの血液，血清生化学的成分への作用可能性も疑わしめたが今回は細部にわたる実験は行なわなかったが，バナジウム低用量は容易に排出され，96時間で約55%を排出し尿中にその46%がみられるとの報告や，吸入10分後には血中に多くみられるが，4日後にはその95%は血中より減少する[5]といわれており，経口投与により雌雄ともに尿中に潜血，蛋白などの出現がみられ，重度の腎障害を疑わしめた．

実験の結果・経口投与におけるバナジウムは，ラット，マウスともに，循環，消化器および肝臓，腎臓障害と更に副腎肥大充血，脳充血，マウスでの胆嚢肥大など，一般の重金属類と似た変化がみられたが，バナジウムの作用についてはより細部にわたった実験が必要であり今後の実験により解明したい．

謝辞　本研究に協力と援助とをして下さった，伊川三枝子，馬渕依子，市川久次の諸氏に御礼申し上げます．

文　献

1) 舟島正直，朝来野国彦，広野富雄，大平俊男：東京都公害研究所年報，5，11，1974
2) Lichfield, J.T., Jr and Wilcoxson, F.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **96**, 99, 1949
3) 常谷章雄：公害，**2**，2，1967
4) 現代小児科学大系，**5**，9，1966，中山書店
5) 堀口　博：公害と危険物，312，1970，三共出版
6) Heney L. Barnett: *Rediatrics*. 707, 1974, Appleton-Contury-Crofts., New York

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 90-95, 1975

バナジウムの生体内運命
(1) 生体試料のバナジウム分析法と分布

伊川三枝子* 馬渕依子*

Fate of Vanadium in Rat Organs
(1) Analysis of Vanadium and Its Distribution in Rat Organs

MIEKO IKAWA* and YORIKO MABUCHI*

緒　言

バナジウムは，土酸類に属する元素で，地球上に広く分布している．植物中にも存在して，ある種の植物の成長や緑藻類にとって必須であるとの報告[1]もあるが，まだ明らかではない．また，ホヤ等には，硫酸塩として3価のバナジウムが血液中に存在し，[2]酸素運搬の機能をはたしている．ラットやニワトリに，バナジウム欠乏食を与えると，発育が悪くなるなどの症状が発現し，バナジウム投与により回復することなどから，それらに対しては必須であるともいわれている．

工業的には，バナジウムと，その化合物は，特殊ガラス，特殊鋼，酸化触媒，顔料などに広く使用されている．しかし，最近，大気汚染の点からバナジウムが問題視されてきている．つまり，原油中，特に低イオウの原油中にはバナジウムがかなり多量に含まれており，（例えば，ベネズェラ産の原油では約 300ppm）燃焼によって，五酸化バナジウム(V_2O_5)のかたちで煤煙として大気中に放出される．東京のある測定地点では，0.296μg/m^3[3]という濃度が測定されており，工場周辺の大気中には局地的により高い濃度で存在する可能性のあることを示唆している．英国の23都市で，呼吸器疾患と重金属の相関関係を統計的に調査した結果として，バナジウムは，気管支炎，肺炎，肺癌および他の癌と有意な相関を示していると言われており，また，横浜喘息では，バナジウムは起因物質ではないが影響因子であると報告されている．[14]

今回われわれは，バナジウムが生体内に侵入した際に，どんな挙動を示すかを調べるために，ラットの腹腔内にメタバナジン酸ナトリウム（$NaVO_3$）を投与し，臓器中のバナジウム量を測定した．また同時に，生体試料におけるバナジウムの原子吸光分析法について，検討し改良してみた．

実験方法

1. 試薬および装置

バナジウム標準液，原子吸光分析用標準液(和光純薬，1000ppm）を再留水で希釈し，10ppm 溶液に調整．

Methyl iso-Buthyl Ketone（以下 MIBK と略す）：原子吸光分析用（和光純薬）

10%クペロン溶液：クペロン（半井化学）水溶液は用時調整．

メタバナジン酸ナトリウム：(E. Merck 社）腹腔注射（*i. p*）に使用の時は，試薬を0.9%塩化ナトリウム溶液に溶かし，塩酸で pH7.0 に調整．

硝酸，硫酸，アンモニア：(和光純薬，精密分析用，ＳＳＧ）

A液：生体試料分解サンプルと同条件の水溶液になるように，硫酸とアンモニアで pH2.5 に調節した水溶液．

原子吸光分光光度計：Perkin Elmer 403

振とう機：(池田理化）

実験動物：JCL-Wistar Rat(SPF) ♂（118—134ｇ），♀（106—121ｇ）

2. 実験Ａ：ＭＩＢＫ抽出によるバナジウム定量法

試料溶液を100mlの分液ロートに移し，少量の再蒸留水で洗い，洗液を分液ロートにあわせて，10%クペロン溶液１ml，MIBK２mlを加える．手で30秒間振りまぜた後，振とう機で５分間振とうし，二層に分離後ＭＩＢＫ層をとり，原子吸光用検液とする．種々の条件に対する影響を検討する時には，A液 30mlを分液ロートにと

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

り，バナジウム標準液を必要に応じて添加して操作した．

＜測定条件＞

Wavelength：318.4mμ, Slit：4, Lamp current：40mA, Burner：High Temperature Burner, Flame：Nitrous oxide (6.0 on flow meter) Acetylene (4.0 on flow meter)

3. 実験B：連続投与におけるバナジウムの体内分布

i) 連続投与ラットの体重変化および血液学的検査，血清生化学的検査．

Wistar 系ラット雌雄各5匹を1群として，2mgV/kgに調整したメタバナジン酸ナトリウム溶液を，1日1回7日間連続して腹腔注射を行った．コントロールとしては，生理食塩水を体重kg当り10m*l*腹腔投与したラットを用いた．実験期間中は，日本クレア製飼料（CE-2），水道水を自由摂取させ，毎日投与前に体重測定を行った．8日目に断頭採血し，肝臓，腎臓，心臓，肺，脳，膵臓，脾臓，胸腺，骨(背骨，大腿骨)，筋肉，小腸，胃，睾丸の各臓器と血球をバナジウム測定試料とした．血液は，Coulter Counter Model S により，次の項目について測定を行った．白血球数（WBC），赤血球数(RBC)，血色素（Hgb），ヘマトクリット（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）．

血清については，日立の自動分析機M400により，次の項目につき測定した．総タンパク量（T-P），グルコース（GLU），尿素窒素（U-N），コレステロール（CHO），グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT），グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素（GOP），アルカリ性フォスファターゼ（ALP），アルブミン（ALB）．

ii) 生体試料の分解法[4]

摘出臓器および血球は秤量し，30m*l*ビーカーに入れ，（肝臓，小腸は50m*l* ビーカー使用）ホットプレート（80°C）で一昼夜乾燥させて乾燥重量を測定する．その後250°Cで一昼夜加熱し，放冷後硝酸5～10m*l*を加え徐々に加熱し，溶解させる．（この時，肝臓と血球は，泡立ってあふれやすいので注意して操作する）完全に溶解した後，硫酸2m*l* を少量ずつ加えて色調が暗かっ色になるまで加熱を続ける．硝酸1～2m*l*をさらに添加すると，色調が淡くなるが，そのまま加熱を続けると再び暗かっ色になる．この操作を数回繰り返した後，冷却し，30%過酸化水素を3滴滴下して酸化を促進させる．さらに加熱を続けて硫酸の白煙が発生し，しかも液の色が淡黄色になるまで分解する．分解終了後放冷し，再蒸留水で希釈してアンモニアでpH2.5に調整し，全量30m*l*にする．この試液を実験Aの定量法にしたがってバナジウム量を測定した．

実験結果

実験A：MIBK抽出によるバナジウム定量法

1. pH の影響

バナジウム，クペロンキレートのMIBK抽出法の至適pHを調べるために，水溶液のpH値を変化させて抽出率を調べた．結果をFig. 1に示す．図に示すように，pH 2.7～4.8の範囲において最大かつ一定の値が得られた．しかし，水溶液のpH値は，10%クペロン溶液（pH 7.0）添加によって Table 1 のように変化することと，アンモニアによる pH 調整の際に，pH2.5 で安定しやすいことを考慮して，クペロン添加前の水溶液はpH2.5に調整することにした．

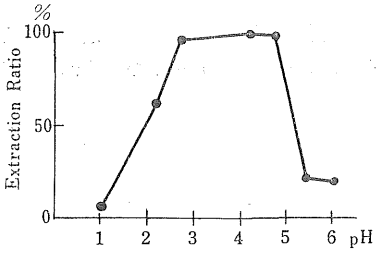


Fig. 1. Effect of pH on the extraction of Vanadium by cupferron in MIBK

Table 1 Change of pH by Cupferron

	pH					
Solution	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0
+Cupferron	1.0	2.2	2.7	4.2	4.8	5.9

2. クペロン濃度の影響

MIBK中のクペロン濃度変化によるバナジウム，ク

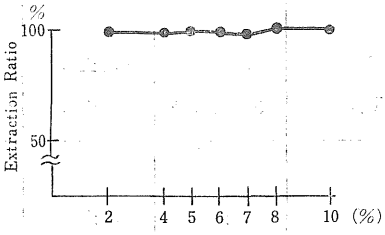


Fig. 2. Effect of Concentration of Cupferron on Extraction Ratio of V-Cupferron Complex

ペロンキレート抽出率への影響を調べた結果を Fig. 2 に示す．その結果，2％クペロン（in MIBK）以上ではほぼ一定の値が得られたが，共存塩の存在する場合は，クペロンを過剰に添加する必要があるとの報告[4]を考えあわせて，5％クペロン（in MIBK）を使用することにした．

3. 振とう時間による影響

試料水溶液にクペロンとＭＩＢＫを添加して30秒間手で振りまぜた後，シェーカーによる振とう時間を変化させて，バナジウムの抽出率を調べた．その結果，5分以上の振とうによる抽出率の差は認められず，二回目のＭＩＢＫ抽出によっても，ＭＩＢＫ層にはバナジウムは検出されなかったので5分間の振とう時間にした。

4. ＭＩＢＫ中のバナジウム，クペロンキレートの安定性．

実験Ａの定量操作に従って抽出をおこない，ＭＩＢＫ中のバナジウム，クペロンキレートの室温における安定性を経時的に調べた．Fig. 3 に示した様に，バナジウム，クペロンキレートはＭＩＢＫ中において1時間は安定であることがわかった．

5. 検量線

1から4の検討の結果をもとにして，定量操作を定め，バナジウム濃度と抽出キレートの原子吸光度との相関関係を調べた．Fig. 4 に示すように，0～10ppm において直線関係が得られ，検出限界は，0.2ppm であった．

実験Ｂ：連続投与によるバナジウムの体内分布

1. 体重変化

2mgV/kg 7日間連続投与による体重変化の有意な差（$P<0.05$）は，雌雄ともにみられなかった．また，同時に 4mgV/kg 投与もおこなったが，この群は，有意な体重減少がみられた．

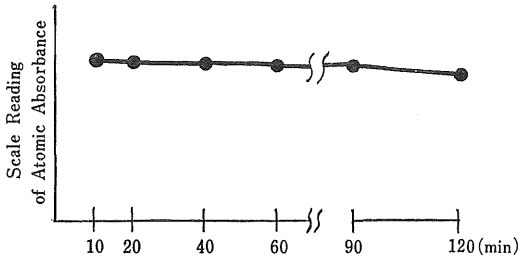


Fig. 3. Stability of V-Cupferron Complex in MIBK

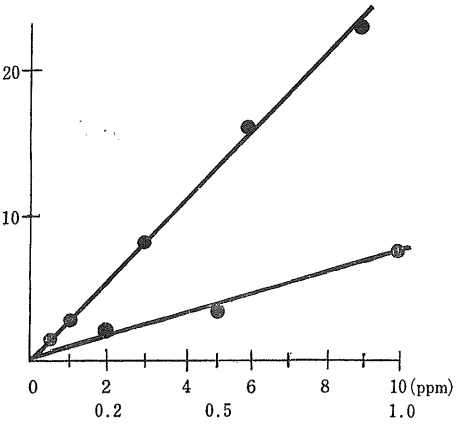


Fig. 4. Calibration Curves using the proposed method.

Table 2 Hematology of Rats Following Multiple Intraperitoneal Injections

	WBC ($\times10^3$)	RBC ($\times10^6$)	Hgb (gm)	Hct (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
Male							
Control	5.9±0.4	5.7±0.1	12.4±0.4	36.3±0.9	62.8±0.6	21.2±0.2	33.9±0.3
2mgV/kg	8.2±0.7*	5.4±0.1	11.5±0.2*	33.8±0.8	61.2±1.2	20.8±0.5	33.8±0.3
Female							
Control	6.6±0.4	5.7±0.2	12.4±0.2	35.0±0.6	60.4±1.3	21.3±0.5	35.1±0.3
2mgV/kg	6.2±0.7	5.6±0.1	12.1±0.3	34.1±0.7	59.0±0.8	20.8±0.3	35.0±0.1

Dosage : 2mgV/kg Once Daily for Seven Days
Values are mean±S.E. * Significantly different from control $p<0.05$

2. 血液学的検査（Table 2）

雄においては，WBC の有意な上昇と，Hgb の有意な下降がみとめられたが，雌については，いずれの項目においても有意な差は認められなかった．

3. 血清生化学的検査（Table 3）

ALPについてのみ雌雄共に有意な下降が認められたが，他はいずれも対照群に比較して有意な差は認められなかった．

Table 3 Determination of Serum Components of Rats Following Multiple Intraperitoneal Injections

	T-P (g/dl)	GLU (mg/dl)	U-N (mg/dl)	CHO (mg/dl)	GPT (K-U)	GOT (K-U)	ALP (KA-U)	ChE (⊿pH)	LAP (GR-U)	Alb (g/dl)
Male										
Control	7.4±0.5	168±15.9	19.5±2.1	75.4±5.4	34.8±4.2	122±8.3	67.6±1.8	2.5±0.2	56.0±0.1	4.5±0.2
2mgV/kg	6.9±0.1	143± 4.2	18.6±1.0	88.0±8.0	24.1±0.4	126±6.4	50.4±4.9*	2.6±0.4	53.6±4.7	4.3±0.1
Female										
Control	7.5±0.5	156±14.5	20.4±2.2	84.4±6.0	27.6±2.9	109±5.4	47.8±4.1	4.0±0.5	53.4±7.7	4.6±0.2
2mgV/kg	7.0±0.2	144± 5.0	16.9±1.4	80.6±4.7	23.0±1.5	120±8.8	35.4±1.9*	4.5±0.4	49.3±1.9	4.3±0.1

Dosage : 2mgV/kg Once Daily for Seven Days
Values are mean±S.E. * Significantly different from control $p<0.05$

4. 臓器中への添加回収率

対照群のラットから摘出した腎臓に，バナジウム標準液を1, 3, 5, 7, 10μg 各々添加し実験Bの生体試料の分解法により分解した後，実験Aの定量操作法に従って，回収実験を行ったところ，Table 4 に示すように102～106％の回収率を得た．

Table 4 Recovery of Vanadium

	Vanadium added (μg)				
Sample	1.00	3.00	5.00	7.00	10.00
founded(μg)	1.03	3.17	5.14	7.24	10.22
Recovery(%)	104	106	103	103	102

5. バナジウムの体内分布

7日間連続投与（*i.p.*）したラットについて，各臓器の単位g当りの蓄積量（μg）を測定した結果を Fig. 5 に示す．対照群の各臓器中からはバナジウムは，検出されなかった．各臓器別に比較すると，肝臓，腎臓，脾臓，膵臓，骨（大腿骨，背骨）等は他の臓器よりも相対的に高い蓄積値を示しているが，残りの臓器にも微量ながら全般的に分布している．しかし，骨には，雌雄共に著明なバナジウムの蓄積がみられた．また，腎臓は，臓器単位当りの蓄積量からみると肝臓の倍量を示し，骨の蓄積量についでいる．

考　察

バナジウムの溶媒抽出法としては，クペロンMIBK抽出法が適応できる．この方法は，陽，陰イオンの干渉を抑制できて，しかも感度を増加することが知られている．Crump-Wiesnerら[5]は，クペロンMIBK抽出法において至適 pH2.0 を報告しているが，われわれの実験では，pH2.0においてバナジウム，クペロンキレートのMIBK抽出率の低下がみられた．これはクペロンがpH 1～2では不安定なためと思われるので，われわれは至適 pH を2.5とし，5％クペロン（in MIBK）の条件で測定した．

連続投与実験において，2mgV/kg，生理食塩水投与と同時に，4mgV/kg 投与(*i.p.*)も行った．体重変化に関して 2mgV/kg 群では対照群と有意の差が認められなかったが，4mgV/kg投与群では，雄は投与4日目から，雌は3日目から有意な体重減少がみられた．（$p<0.01$）飲料水に微量のバナジウムを添加して飼育した際に，体重変化，生残率，寿命等に影響を及ぼさないという報告[6,7]がある．しかし，腸管からの吸収は低いが，肺からの吸収率は高いので，経口投与ではなく，暴露実験によるそれらに対する影響も検討する必要がある．

生化学的には，コレステロール値[8,9]や，コリンエステラーゼの抑制が報告されているが，2mgV/kg投与群では有意な差が認められなかったにもかかわらず，4mgV/kg

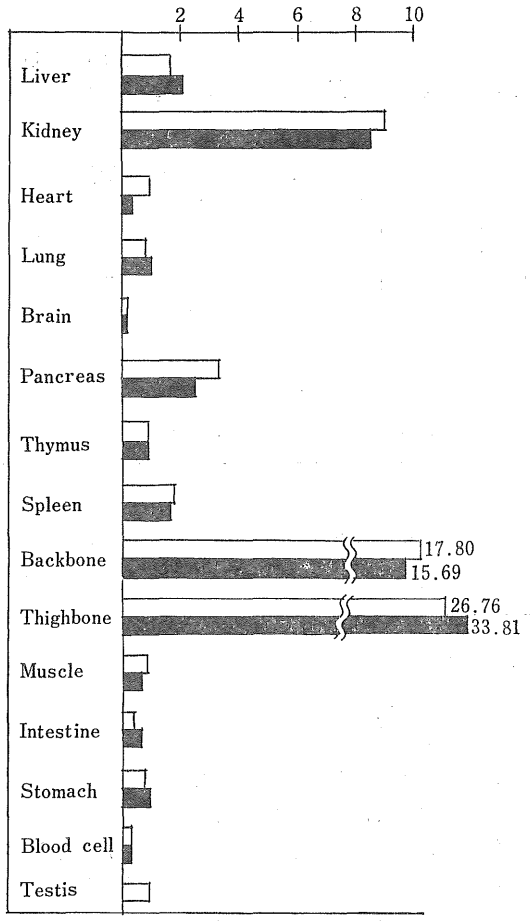


Fig. 5 Distribution of Vanadium by Rats Following Multiple Intraperitoneal Injection

□: Male ■: Female

投与群では，雌雄ともに有意な低下が認められた．($p < 0.01$)，コリンエステラーゼ活性抑制によるコリン欠乏症として，心筋の脂肪浸潤，血清アルブミン低下，肝の脂肪変性および肝硬変，腎障害がみられるが，投与期間が短かかったことにより，著明な変化は認められなかった．

各臓器の分解定量の際，分解が充分に行われていないと，アンモニアによるpH調整の時に沈殿が生じ，沈殿物をろ過することによって測定値の誤差が大きくなるので，特に肝臓などは充分に分解を行う必要がある．

連続投与によるバナジウムの分布については，Talvitie[10]，Hathcockら[11]の報告と同様に，われわれの実験においても，骨，腎，肝，脾，筋肉への蓄積が認められた．また，膵臓にも高い蓄積量を示したが，吸収されたのではなく腹腔投与による物理的な附着とも考えられる．骨は，他の臓器に比べて著しく高い値を示しているが，これは骨成分のリン酸カルシウムとバナジウムが入れ変ることによると考えられるので，今後検討したい．また，雌雄共に，腎臓が高い値を示しているのは，腎が主なる排泄器官であることから当然と思われる．雄の睾丸にも，比較的高い蓄積を示した．

腎臓蓄積に関して，皮質と髄質とのバナジウムの分布の割合を調べたが，皮質単位g当りのバナジウム量は，髄質のそれの約2倍量程度でカドミウムなどのような皮質への高い結合性はみられなかった．

また，腎臓はバナジウム投与により組織学的にも糸球体の充血や，曲尿細管の脂肪変性および壊死が観察されることが報告されている．[12]

肝臓にも，比較的多く蓄積されているため細胞分画して分布を調べた結果，乾燥重量当りのバナジウム量は，上清（95,500×g，1.5時間）に最も少なく，核（1,000×g，10分），ミトコンドリア（10,000×g，30分），マイクロゾームには，ほぼ同量蓄積されていた．しかし，投与後の時間経過に伴い，上清中に占める割合は，徐々に低下して，核とミトコンドリアに占める割合は，8日間変らないとの報告[13]がある．

バナジウムの腎臓からの排泄は非常に早いといわれているが，投与量の10～12%は少なくとも2週間は残存するとの報告や，上記の報告とも考え合わせると，投与後の各臓器の蓄積量変化や，存在形態も今後検討する必要がある．

謝辞　本研究の機会を与えて下さいました平賀興吾先生，中尾順子先生，ならびに有益な示唆を与えて下さいました小林博義さんに感謝します．

文　献

1) Arnon, D.I. and Wessel, G.: *Nature*., 172, 1039, 1953
2) Boeri, E. and Ehrenberg, A.: *Indian J. med. Res*., 20, 789, 1954
3) 朝来野国彦：東京スモッグ生成機序，植物被害に関する調査研究部会，中間報告第二報，323, 1972
4) 保田和雄，長谷川敬彦：原子吸光分析，212, 1972, 講談社
5) Wiesner, J.C. and Purdy, W.C.: *Talanta*, 16, 124, 1969
6) Schroeder, H.A. and Balassa, J.J.: *J. Nutrition*, 92, 245, 1967
7) Schroeder, H.A. and Mitchener, M.: *J. Nutrition*, 100, 59, 1969

8) Curren, G. L. : *J. Biol. Chem.*, 210, 765, 1954
9) Schroeder, H. A. : *J. Chron. Dis.*, 16, 1047, 1963
10) Talvitie, N A. : *Arch. Ind. Hyg.*, 9, 414, 1954
11) Hathcock, J. N. : *J. Nutrition*, 82, 106, 1964
12) Daniel, E. P. : *Public Health Rep.*, 53, 765, 1938
13) Hopkins, L. L. : *Amer. J. Physiol.*, 211, 169, 1966
14) 和田 攻：環境汚染物質とヒト 21, 代謝, 12, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 96-102, 1975

バナジウムの生体内運命 (2) 蓄積性の有無

馬渕依子* 伊川三枝子*

Fate of Vanadium in Rat Organs (2) Vanadium Accumulation in Rat Organs

YORIKO MABUCHI* and MIEKO IKAWA*

バナジウムは消化管からはほとんど吸収されず,[1-4]大部分が糞中に排泄される．しかし，大気汚染の面から警告されている様に，五酸化バナジウムとして肺中に侵入してきた時，気道を刺激し炎症をおこさせるだけでなく，急速に吸収され，血液によって各臓器へと運ばれる．血中に入ったバナジウムは，大部分が腎臓から短時間内に体外に排出される.[8,9]

今回我々は，ラットの腹腔内にメタバナジン酸ナトリウムを投与し，投与後の時間経過により，各臓器中のバナジウム量がどの様なパターンで増減するかを観察した．

また，前投与の致死量におよぼす影響もあわせて報告する．

実験動物および試料

日本クレアにおいて barrier system 下に生産された (SPF) Wistar-JCL 系の雌雄のラットを使用した．

試薬は，Merck 社のメタバナジン酸ナトリウム ($NaVO_3 \cdot 4H_2O$) を用い，これを生理食塩水に溶解し，塩酸で pH を7.0に調整したものを動物の腹腔内に (*i.p.*) 体重100gあたり，1m*l* 投与した．

試験方法

A) バナジウムの蓄積性について

①投与後，短時間内 (64hr以内) の，臓器中バナジウムの増減

各臓器中の蓄積および排泄のパターンを知るために，7週令のラット (平均体重，雄・210g，雌・163g) にメタバナジン酸ナトリウムを，バナジウム量で4mg/kg腹腔内に1回投与を行った．投与後，30分，1, 2, 4, 8, 16, 31, 64時間後に雌雄各5匹を断頭によって屠殺解剖し，肝臓，腎臓，心臓，肺，脳，膵臓，胸腺，脾臓，精巣，骨 (大腿骨，背骨)，筋肉，血液 (血球，血清) について，前報[10]の方法により，硫酸—硝酸による湿式分解を行い，クペロン—MIBK法で抽出して原子吸光分析を行った

②臓器中のバナジウムの減少パターン

6週令のラット (平均体重，雄163g，雌132g) に，試薬を，バナジウム量で，4mg/kg，腹腔内に1日1回，7日間連続投与し，投与後，1, 2, 5, 10, 23, 46, 90, 180日目に，雌雄各5匹を，断頭により屠殺解剖し，バナジウムの主な蓄積部位である肝臓，腎臓，骨 (大腿骨，背骨)，血液 (血球，血清) について，前報[10]の方法でバナジウム量を定量した．

B) 前投与の，致死量におよぼす影響

前投与によって，死亡数が減少するか (耐性の獲得)，増加するか (感受性の増加)，変わらないかを調べるため，本実験の投与の1日前，2日前，3日前に，前投与を行った．使用した動物は，雌雄各10匹，6週令 (平均体重，雄183g，雌147g) であり，前投与の dose は，雄3.4mgV/kg，雌3.1mgV/kgで，これを腹腔内に投与した．本実験の投与 (本投与) は，動物の，ほぼ50%致死量にあたる量 (雄20.3mgV/kg，雌18.6mgV/kg) を，同様に投与し死亡と症状の観察を行った．コントロールは前投与なしで，本投与のみを行った．

実験結果

A) バナジウムの蓄積性について

①の投与後，短時間内 (64時間以内) の，臓器中バナジウムの増減

バナジウム量で，4mg/kgをラットに投与すると，投与後，4, 5時間は血色が悪くなりうずくまって激しい呼吸

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

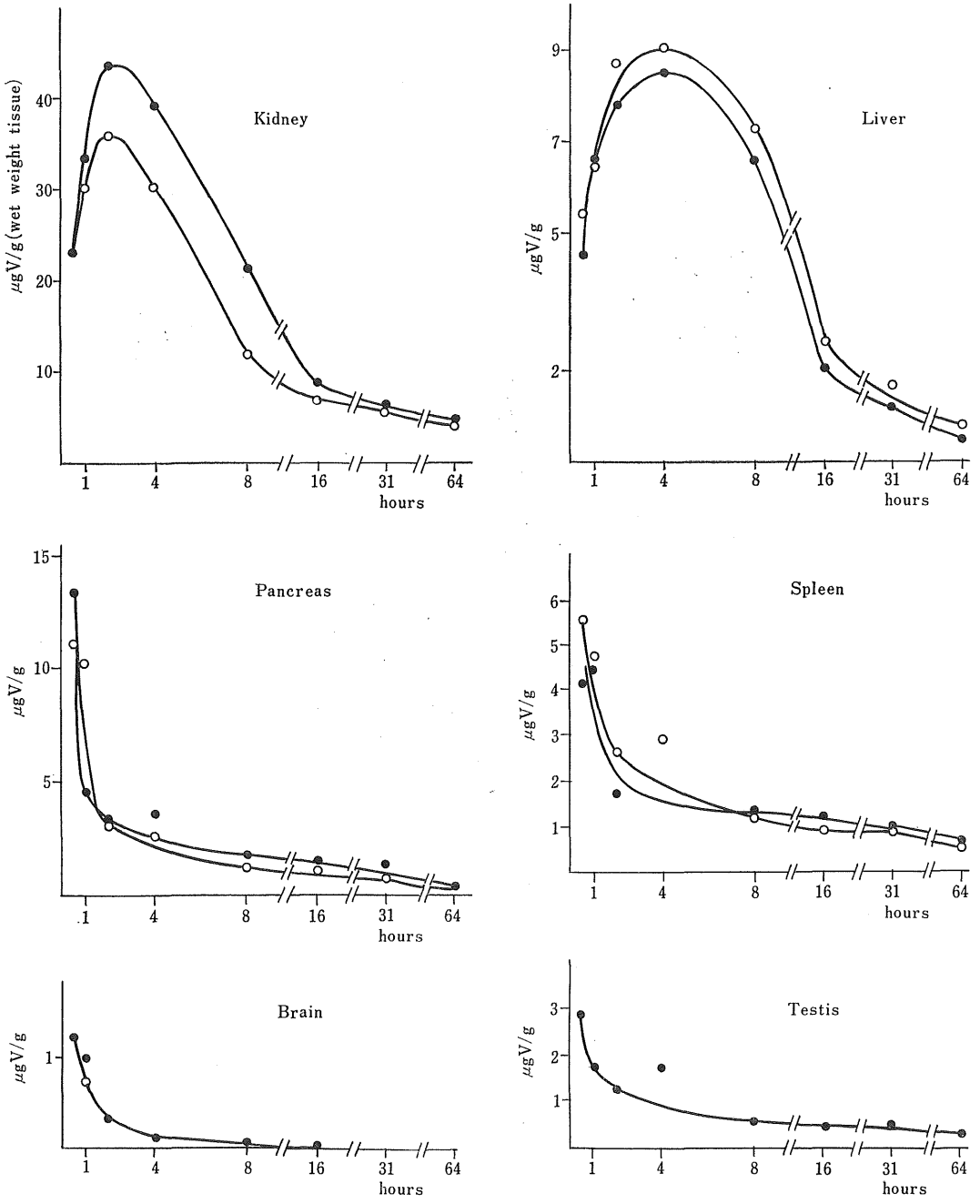


Fig. 1−1 Time course of content of intraperiotoneally injected vanadium in various rat organs (Dosage−4mgV/kg, one injection)

● Male, ○ Female

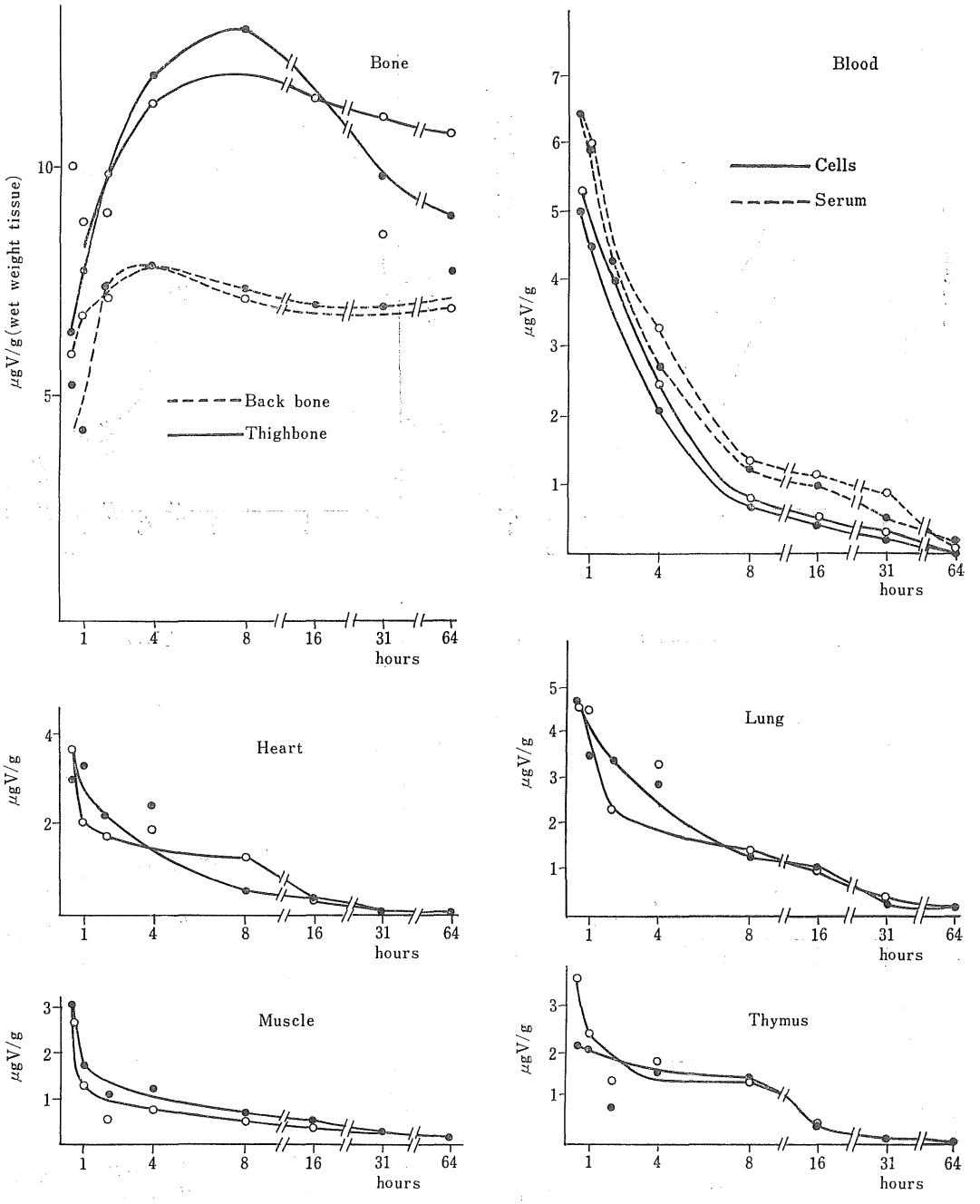


Fig.1—2 Time course of content of intraperiotoneally injected vanadium in various rat organs (Dosage—4mgV/kg, one injection)

● Male, ○ Female

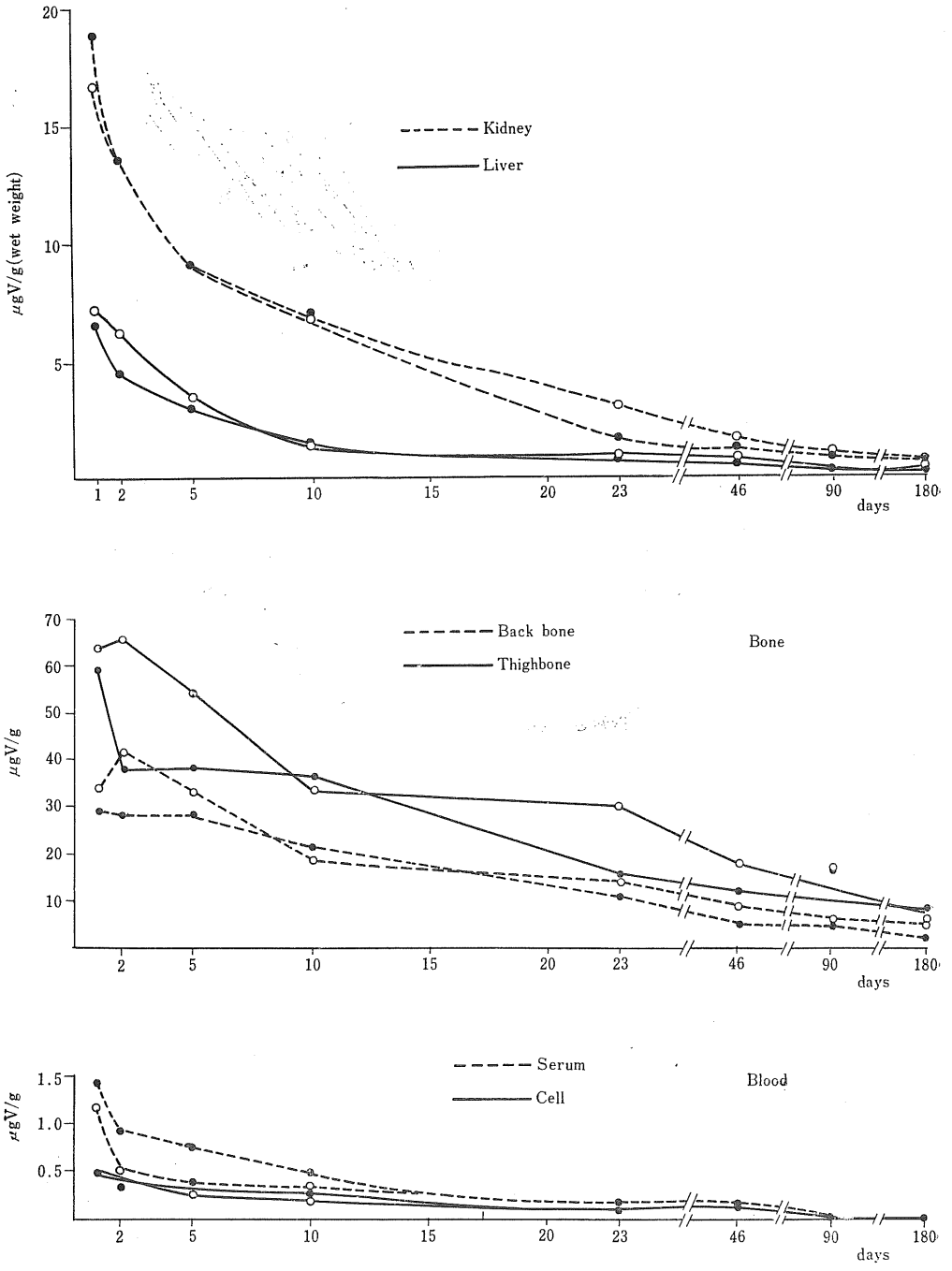


Fig. 3 Decrease in intraperiotoneally injected vanadium in rat organs
(Dosage—4mgV/kg. Repeated daily injections for one week.)

をしたが，その後は元気を回復した．各臓器中のバナジウム量の時間経過は，Fig. 1に，臓器の湿重量（g）あたりのバナジウム量（μg）として図示した（Fig. 1）．

臓器重量あたりのバナジウム量が高いのは肝臓，腎臓，骨（大腿骨，背骨）であった．腎臓は，臓器重量あたりのバナジウム量は，他の多くの臓器と比べ，10倍以上も高く，雌雄とも2時間後がピークで，8時間で1/2，16時間で約1/4というように急速に減少したが，その後の減少は比較的ゆっくりであった．肝臓は，4時間でピークになり，その後腎臓と似たパターンで減少した．骨は，他の臓器と比べ，ゆるやかに増加し，8時間でピークとなった．減少速度もおそく，64時間後も7—10μg/g前後のこっていた これは，他の臓器にはみられなかった傾向であった．その他の臓器はすべて，投与後，30分以内に最高値に達し，その後急速に減少し，64時間後にはほとんどがゼロに近かった．投与後30分では，膵臓が，13μg/gと，かなり高い値を示し，血清が6—5μg/g血球，脾臓，肺が5μg/g，筋肉，精巣，胸腺，心臓が約3μg/g，脳は最も低く，1μg/g であった．バナジウムは，投与後数時間は，分析したすべての臓器中に検出された．

②臓器中のバナジウムの減少パターン

4mgV/kg を，7日間連続投与された動物は，Fig. 2の様に，体重の増加が投与中とその後の数日おさえられた．その後の増加速度はコントロールと変わらなかったが，測定期間中に追いつくことはできなかった．

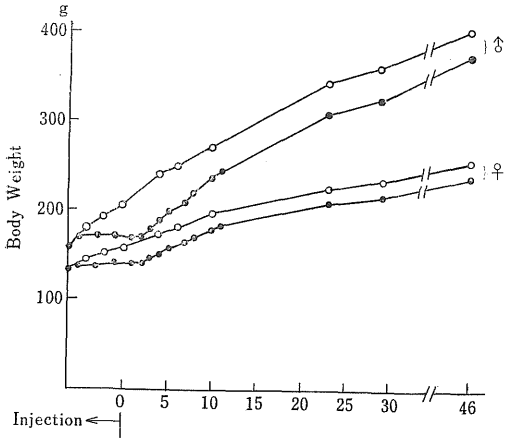


Fig.2 Increasing of body weight of rats following multiple intraperiotoneal injections (Dosage—4mgV/kg · Repeated daily injections for one week)

肝臓，腎臓，骨，血液のバナジウム量（μgV/g 湿重量）の変化は，Fig. 3 に示した．

骨以外は投与終了後，1日目が最も高く肝臓，腎臓とも，投与後5日で約1/2に急速に減少した．その後も，10日目頃までは，急速に減少したが，その後の減少速度はおそく，46日経過した後も，腎臓中には1μg/g 前後も残っており，肝臓中にも検出された．血液も急速に減少した．血清も血球も，バナジウム量は少いが血清中に幾分多く含まれていた．骨は，独特のパターンを示し，非常にゆっくり減少した．その値は，90日後で，背骨で，5μg/g，大腿骨で15μg/g，180日後ですら2—4μg/gと 7μg/g であった．

B）前投与の致死量におよぼす効果

本投与後，約10分でどの群の動物もすべて閉眼し腹臥姿勢でうずくまり，体色が白色化し，呼吸困難の様相を呈した．生存ラットではこの症状は7,8時間で回復にむかった．また，後肢の麻痺および下痢も数例観察された．1,2,3日前に前投与されたものと，コントロールの死亡率は，投与後2時間以内，1日，15日以内に分けて Fig. 4に示した．この実験において，本投与後の死亡は，投与後30

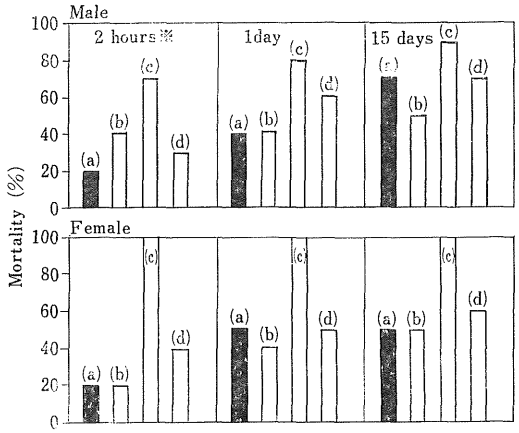


Fig. 4. Preinjection and Mortality
※Mortality within 2 hours after injection
(a) Control experiment
(b) Preinjected at one day before injection
(c) Preinjected at two days before injection
(d) Preinjected at three days before injection

分から2時間の間に集中している呼吸困難等による死亡と，24時間以降の下痢等による衰弱死のふたつのパターンに分けられる様に思えた．本投与の2日前に前投与した群は雌雄とも，投与後2時間以内の急速な死亡がコントロール群に比べ多かった（雄2対7匹，雌2対10匹）．1日前，3日前に前投与した群では，2時間以内の死亡

数は，コントロールと比べ幾分多い傾向はみられたが，24時間以降は，特に顕著な差はみられなかった．

考　察

バナジウムには，2—5価があり5価が最も毒性が強くしかも安定である．大気中の五酸化バナジウムも5価であり，今回の実験も五価のメタバナジン酸ナトリウムを使用した．

A）バナジウムの蓄積性について

血中のバナジウムは，急速に排泄され，従って臓器中のバナジウム量も急速に減少していくと考えられる．Talvitie[9]らは，ラットにメタバナジン酸ナトリウムを，0.5mgV/kg 腹腔内に投与して尿および糞中に排泄される速度を調べた．体内にとり込まれたバナジウムの主な排泄経路は腎臓であり，1日以内に57%が尿中に，4%が糞中に排泄され，2日以内には70%が尿中に，9%が糞中に急速に排泄されることをみた．我々の実験でもみられた様に，バナジウムが一時的にせよ腎臓中に高濃度に存在することは，腎臓の急速な排泄作用を考えると当然のことであり，また肝臓は解毒作用部位であるので投与直後はかなり高い値を示すが，これも時間経過と共に腎臓同様急速に減少する．今回分析した骨以外の臓器のすべてにこの傾向は観察された．このことは，バナジウムには，カドミウムにおけるメタロチオネインの様な重金属と特異的に強固に結合して，離れにくいたんぱく質を誘導する作用がなく従って蓄積性が低いことを示している．しかし，投与後，10日前後までは臓器中のバナジウム量は急速に減少したが，その後の減少速度は遅くなり，46日後，90日後にも，低濃度ながら検出されることから，肝臓や腎臓あるいはその他の臓器の機能が，なんらかの影響を受け続けている可能性を無視することはできない．また膵臓は投与直後かなり高い濃度を示す．しかしこれは腹腔内に投与された液が膵臓に機械的に付着している可能性も考えられる．腎臓，肝臓，骨以外のすべての臓器は，投与後30分以内に最高値を示し，以後急速に減少したが，これは血液のパターンと同じであり，active に蓄積するというより血中濃度の影響が強いと考えられる．

Scott[4]らは，1951年に，バナジウムが骨中に蓄積されることを指摘した．今回の実験でもバナジウムは，投与後急速に蓄積を始め，4から8時間でピークとなり，その後ゆっくり減少した．投与後180日経過しても，湿重量で 5μg/g 前後残っており，turnover は，他の臓器と比べ非常におそかった．骨は体液の塩類濃度の変動を緩衝し，カルシウムやリンの貯臓所としても働き，骨の無機物と体液のそれとの間には常に激しいイオンの変換があり，決して静止した組織ではない．また常に古い骨の破骨と新しい骨の生成が行われている．脊椎動物の骨結晶は，ヒドロキシアパタイト $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ であり，鉛，ラジウム，ウラニウム，ストロンチウムらの重金属は，生長しているヒドロキシアパタイトの結晶格子の中に取り込まれる．バナジウムもたぶん，血中濃度の上昇によって骨形成の際に，結晶格子の中にとりこまれると考えられ，減少速度は骨の turnover の速度と関連していると考えられる．

今回の投与はバナジウム量で 4mg/kg投与したが，これはラットにとっていくらか毒性のある量であり，蓄積性を調べる時はもっと低い量で検討を加える必要がある．

B）前投与の致死量におよぼす効果

前投与の効果は，本投与の2日前に前投与した群の雌雄ともに，死亡数の増加がみられた．前投与により死亡数が減る，すなわち耐性獲得のできる金属は，カドミウム，水銀，マンガン，鉛，銀，錫などであり，変わらないのが銅，ニッケル，セレン，タリウムであり，かえって増加する，すなわち感受性のあがる金属は，クロム，バリウム，鉄，亜鉛らである．[11] バナジウムは，最後のグループに入ると考えられるが，感受性増加の原因は，臓器中のバナジウム量からみても全く不明であり，さらに検討しなければならない．

なお，ラット，マウスは，バナジウムに対してウサギやモルモットに比べて10から20倍も抵抗性が高く，実験動物を変えての検討も考えなければならない．

要　約

1. 4mgV/kg をラットに1回投与（*i.p.*）し，30分，1, 2, 4, 7, 16, 31, 64 時間後に肝臓，腎臓，心臓，肺，膵臓，脾臓，胸腺，精巣，骨，筋肉，血液について原子吸光法でバナジウム量を測定した．腎臓が最も高濃度に骨，肝臓がそれに続いたが，骨以外の各臓器のバナジウム量はすべて，急速に増加し，急速に減少した．骨のバナジウム量は，他と比べ増加速度が遅く，また減少もゆるやかであった．

2. 4mgV/kg を1日1回，7日間連続投与し，1, 2, 5, 10, 23, 46, 90, 180 日後に，肝臓，腎臓，骨，血液中のバナジウム量を定量した．骨以外は，はじめの10日間は急速に減少するが，あとは減少速度は，おそくなり，180日後も，腎臓，肝臓はゼロにならない．また，骨の減少速度はおそく，180日後もかなり多く残っていた．

3. 投与の1日，2日，3日前に少量のバナジウム（雄で 3.4mgV/kg，雌で 3.1mgV/kg）を前投与し，雄20.3mgV/kg，雌18.6mgV/kg の投与（*i.p.*）を行い

死亡率をみた．投与の2日前に前投与された群は，雌雄とも死亡率の増加がみられた．

謝辞 本研究の機会を与えて下さいました平賀興吾先生，中尾順子先生，ならびに有益な示唆を与えて下さった小林博義さんに感謝します。

文　献

1) Daniel, E.P. and Lillie, R.D.: *Publ. Hlth. Rep.*, 53, 1648, 1938
2) Proescher, F., Seil. H.A. and Stillians, A.W.: *Amer. J. Syph.*, 1, 347, 1917
3) Ballotta, F.: *Med. d. Lavoro*, 22, 250, 1931
4) Scott, K.G., Hamilton, J.G. and Wallace, P.C.: *Univ. of California Radiation Laboratory, Report UCRI-1318*, 1951
5) Malfino, F.: *Rass. Med. Industr.*, 9, 362, 1938
6) Massmann, W.: *Arch. Toxikol.*, 16, 182, 1956
7) Sjöberg, S.G.: *Acta.Med.Scand.*, 138, 1, 1950
8) Kent, L. and McCance, C.A., *Biochem. J.* 35, 837, 1941
9) Talvitie, N.A. and Wagner, W.D.: *Arch. Industr. Hyg.* 9, 414, 1954
10) 伊川三枝子，馬渕依子：東京衛研年報，26-2, 90, 1975
11) 吉川　博：薬局，25, 29, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 103-110, 1975

パラオキシ安息香酸ブチルの急性毒性

馬渕依子* 川野澄江* 藤田博*
水尾昭江* 樺島順一郎* 中尾順子*
平賀興吾*

Acute Toxicity of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB)

YORIKO MABUCHI*, SUMIE KAWANO*, HIROSHI FUJITA*,
AKIE MIZUO*, JUN-ICHIRO KABASHIMA*, TOSHIKO NAKAO*
and KOGO HIRAGA*

パラオキシ安息香酸ブチル（以下，ＰＨＢＢと略す）は，保存料として，しょう油，酢，清涼飲料水，果実ソース，果実果菜の表皮などに添加され，日本においては広範囲に使用されている．しかし，他の国では，メチルエステル，エチルエステル，プロピルエステルが主として使用され，ブチルエステルはほとんど使用されていない．ＰＨＢＢに関しては，動物実験のデータも少く，[1-5] ＦＡＯ/ＷＨＯ専門委員会[6]も，「データ不足のため安全量を決めることができない」としている．そこで，われわれは，ＰＨＢＢの毒性について種々の角度から検討を加え，若干の知見を得た．[7,8] ここでは，急性毒性試験（致死量および，胃に対する影響）の結果について報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物および試料

Wistar-JCL 系ラットを使用し，室温25°C，湿度55%の環境下で，5匹ずつ金網ケージに収容し，日本クレア製固型飼料ＣＥ-２で飼育を行った．ラットはすべて，経口投与の約16時間前から絶食（飲水は自由）させておいた．

PHBB は，和光純薬工業株式会社特級試薬 Lot. No. K10 2284を使用した．PHBB を，懸濁状態で使用する時は，あらかじめ乳鉢ですりつぶし，100メッシュのふるいを通したものを使った．PHBB を，ナトリウム塩（以後 PHBB-Na）として使用する時は，PHBB と等モルの水酸化ナトリウムを加え，水溶液として使用した．

2. 実験方法

1) 致死量を求める実験

PHBB-Na：投与量は，PHBB として，6,760mg/kg から 2,366mg/kg までの５段階（公比1.3）とした．40%の PHBB を含む PHBB-Na 水溶液（pH11.3）を作成し，胃ゾンデで経口投与した．ラットは，６週令のもの（平均体重，雄125g，雌121g）を，各群雌雄５匹ずつ使用した．投与後，症状観察を行い，死亡例については，その都度，生存例は７日後に，すべて屠殺剖検した．なお，飼料は，投与後２時間目から摂取させた．LD_{50}値の計算は，Bliss のプロビット法[9]によって行った．

PHBB：PHBB は，水に不溶なので，５%アラビアゴム水溶液，および，ゴマ油に懸濁して使用した．予備試験の結果から，懸濁状態の PHBB の致死量は非常に高いことがわかったので，６週令の雌雄各10匹の動物（平均体重，雄181g，雌128g）に，ゴマ油および，５%アラビアゴム水溶液に懸濁させた PHBB を，8,000mg/kgの投与量で経口投与した．なお，投与試料は，胃ゾンデで投与可能な最高濃度である400mg/ml の懸濁液とした．投与後は，PHBB-Na と同様に観察し，７日後に屠殺剖検を行った．

2) 胃に対するＰＨＢＢの影響

PHBB-Na とグリシン緩衝液との比較：1）の実験の結果，PHBB-Na の投与によって，胃粘膜の出血と糜爛が見られた．これが，アルカリ（PHBB-Na 溶液は，pH11.3の強アルカリ性の緩衝液である）としての効果のみに起因するものかどうかを調べるために，グリシン

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

緩衝液との比較実験を行った．pH の等しい1 MのPHBB-Na，1 Mグリシン緩衝液（グリシン＋水酸化ナトリウム）を作り，5週令の雄ラット（体重96－115 g）に，体重100 gあたり1 m*l*を経口投与した．コントロールとして水を同様に投与した．1 M PHBB-Na の投与は，PHBB 量で1,942mg/kgに相当する．投与後2時間目から餌を与え，4時間目，1日，2日，4日および，8日後に，各3匹とコントロール1匹の胃内部の変化を観察した．

低濃度の PHBB-Na の胃に及ぼす影響：雌雄各11匹のラット（体重，雄202—246g，雌137—169g）に，体重100 gあたり 1m*l* の，PHBB-Na の，0.1, 0.2および0.4 M水溶液を投与し，4時間後に屠殺して胃内の出血の有無と pH（pH 試験紙による），内容物の量を調べ，低濃度での影響を検討した．なお，この投与量は，PHBB に換算すると，194，388および 776mg/kg となる．

懸濁状態の PHBBの影響：5週令の雄ラット（体重109—125 g）を用いた．PHBB のゴマ油懸濁液を，2,000，4,000，6,000 および 8,000mg/kgの投与量で，各群5匹の動物に経口投与し，24時間後に解剖し，胃粘膜の変化を観察した．

胃腸のレントゲン検査：PHBB によって胃の運動が影響を受けるかどうかみるため，硫酸バリウムと PHBB を同時に投与し，Softex-CMBW 型によって，レントゲン撮影を行い胃内のバリウムの有無を調べた．PHBB とバリウムを，2％カルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）中に懸濁し，7週令の雄ラット（体重187—221 g）に，各群3匹ずつ胃ゾンデにより経口投与した．投与量は，A）2,000mg/kg硫酸バリウム，B）4,000 mg/kg 硫酸バリウム，C）2,000mg/kg 硫酸バリウム＋2,000mg/kg PHBB とした．投与後，3, 6, 11 および24時間後にエーテル麻酔下で，Softex による撮影を行った．撮影条件は，40kV，3mA，25秒，距離 25cm であった．水は常時与えておいたが，餌は3時間後の撮影が終了してから給与した．

実験結果

1）致死量を求める実験

PHBB-Na：どの群のラットも，投与後数十分で鎮静状態に陥り，閉眼，腹臥姿勢をとった．高濃度では，立毛し，呼吸数も増加し，また，外部刺激に対する反応もにぶくなった．4,000，5,200mg/kg 投与では，下痢のみられたものもあった．4,000mg/kg 以下の投与では，2日目以降は，動き回わるなど，前日に比べかなり元気になり，体重の増加もみられた（Fig. 1）．死亡数は，Table 1 に示したとうりである．死亡は，投与後，3時間目から始まり，死亡のほとんどが24時間以内に起った．死後解剖例では，胃に，血液の混入した液体が多量にたまり，前胃部は薄く伸び，腺胃部は，あたかも表面が溶かされているような糜爛と，血餅の付着が観察された．腸管内にも血液の混入した液体が多く含まれ，腸管壁がやや赤味をおびていた．また胃と接した部分の肝臓，脾臓は白色化し，3日目以降の死亡例では，胃と，それに接した器官，組織の間に癒着がみられた．生存ラットの剖検の結果，胃粘膜，特に，前胃-腺胃境界部に出血がみられ，また，胃とそれに接した部分の器官，組織（胃，肝臓，脾臓，腹腔壁など）が偽膜を形成して癒着をおこしているのが観察された．その程度は，雄の方が著しかった．Bliss のプロビット法[7]で計算すると，LD_{50} 値は，雄，4,200mg/kg，雌約 5,100mg/kg であった．

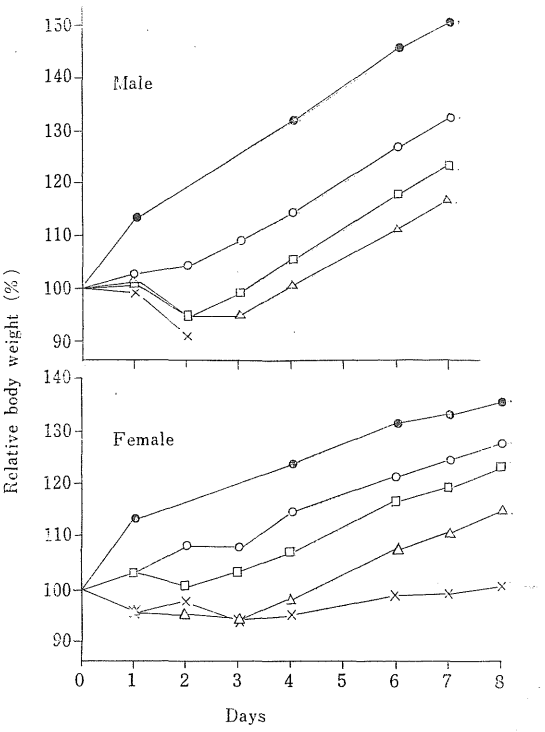


Fig. 1. Changes of body weight of survival rats orally administered with PHBB-Na as compared with initial body weight
Control (●), 2,366mg/kg (○), 3,076mg/kg(□), 4,000mg/kg (△), 5,200mg/kg (×)

PHBB：どの投与群にも，特に目立った異常はみられなかった．軽い下痢が，ゴマ油のコントロール，投与群の両方に，また，アラビアゴムの投与群の数例に観察された．400mg/m*l*というきわめて高濃度の懸濁液で多量

Table 1 Mortality ratios of rats orally administered with PHBB-Na and PHBB

A) PHBB-Na

Sex	Initial Body Weight Mean±S.D.(g)	Mortality Ratios[a] Dose (mg/kg) 2,366	3,076	4,000	5,200	6,760	LD_{50} mg/kg	Confidence limit at P=0.05 mg/kg
Male	135±7	0/5	1/5	1/5	4/5	5/5	4,200[b]	5,200—3,500
Female	121±6	0/5	0/5	0/5	4/5	5/5	about 5,100	

B) PHBB

Sex	Initial Body Weight Mean±S.D.(g)	Mortality Ratios[a] Dose (mg/kg) Oleum sesami 0	Oleum sesami 8,000	5% Arabia gum 0	5% Arabia gum 8,000	LD_{50} mg/kg
Male	181±7	0/5	0/10	0/5	0/10	8,000
Female	128±6	0/5	0/10	0/5	1/10	8,000

a) Mortality ratio expressed as number of animals that died (numerator) to those used (denominator)
b) Regression line of Y on x : Y=9.3x—29.0. c) Not determined.

の投与を行ったため，かなり投与の無理があり，また，PHBB の刺激性からか，胃からもどす傾向もあり，投与群の中に，気管への逆流のためか呼吸音の聞こえる動物が何例かみられた．8,000mg/kg を投与した40匹の動物の中で，死亡したものはアラビアゴム懸濁液投与の雌1匹のみであった（Table 1）．この動物は，激しい呼吸音の聞かれた動物で，肺の一部に出血がみられた．生存例の解剖では，8,000mg/kg（ゴマ油）の雌一匹の前胃，肝臓，腹腔壁，脾臓に癒着がみられたが，他の例には，異常は観察されなかった．体重変化は，Fig. 2 に示したように，投与群の雄で，投与後1日目，2日目，雌で1日目の体重の増加が，対照に比べておさえられていた．その後の増加は対照と近いが，測定期間中には，雄は対照群に追いつくことはなく，雌は，近づく傾向をみせた．

2) 胃に対する PHBB の影響

PHBB-Na とグリシン緩衝液の比較：投与後4時間では，PHBB-Na 投与の胃は，グリシン緩衝液やコントロールに比べ大きくふくらみ，血液の混入した液体が多量にたまり，前胃は薄く伸び，腺胃部は出血し糜爛がみられた．グリシン緩衝液では，胃内に液がほとんどなく，腺胃部のひだに，ところどころ血液がにじんでいたが，その程度は軽度であった（Fig. 3, 4）．グリシン緩衝液投与例では投与後2日目には，出血のあともみられず，全く正常であった．PHBB-Na 投与例では，胃の大きさは正常にもどっていたが，前胃－腺胃の境界部および，ひだに沿って出血のあとがみられた．

低濃度の PHBB-Na の胃に及ぼす影響：内容物の pH，重量，胃粘膜の状態は，Table 2 に示したとうりであり，388mg/kg投与では全例が，194mg/kg 投与でも数例が出血をおこしていた．内容物の pH は，776mg/kg の投与で，9前後，388mg/kgで，7.5前後でありアルカリ側であったが，194mg/kg では，4前後と，酸性であった．内容物の量は雌雄とも776mg/kg投与群では非常に多かったが，388mg/kg，194mg/kgでは，少なかった．しかし，コントロールではほとんど内容物がないことから，あきらかに差があると考えられる．

懸濁状態の PHBB の影響：8,000mg/kgおよび6,000 mg/kg の投与では，前胃，腺胃の粘膜のはく離が著しかったが，4,000mg/kg 投与では，その程度は軽度であった．2,000mg/kg では異常はみられなかった．

胃腸のレントゲン検査：得られた結果は，Table 3 に要約した．PHBB を投与した群では投与後3時間経過しても，バリウムが胃から移動した形跡はなく，11時

Table 2 Observations on gastric content and mucosa of rats orally administered with PHBB-Na

PHBB (mg/kg)		Male				Female				
		Gastric content		State of mucosa		Gastric content		State of mucosa		
		pH	Weight(g)	P. P.[a]	p. g.[b]	pH	Weight(g)	P. P.	p. g.
776	1.	9.0	6.76	dissolved thin bleeding sore	bleeding sore	8.4	3.05	dissolved thin bleeding sore	bleeding sore
	2.	8.8	6.33			8.6	3.73		
	3.	9.0	8.63			8.6	4.71		
388	1.	7.6	0.59	thin slightly bleeding	slightly bleeding sore	8.4	1.00	thin slightly bleeding	thin slightly bleeding
	2.	7.8	0.64			6.6	1.35		
	3.	8.2	1.67			8.0	0.26		
194	1.	4.0	0.06		slightly bleeding	3.6	0.49		slightly bleeding
	2.	3.4	0.37			4.0	0.15		
	3.	4.8	0.68			3.4	0.19		
0	1.	—	—			—	—		
	2.	—	—			—	—		

a) P. P. : pars proventricularis b) p. g. : pars glandularis

Table 3 The movement of $BaSO_4$ in the gastrointestinal tract of rats administered with PHBB

		0 hr			3 hr			6 hr			11hr			24hr		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Stomach	A. $BaSO_4$ 2,000	+++ a)	+++	++ b)		+ c)			+							
	B. $BaSO_4$ 4,000	+++	+++	+++	++	+		++			++			+		
	C. $BaSO_4$ 2,000 +PHBB2,000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+	+	++
Small intestine	A. $BaSO_4$ 2,000	++	+	+++	+++	+++	+++									
	B. $BaSO_4$ 4,000	+++	+++	+++	+++	+	++									
	C. $BaSO_4$ 2,000 +PHBB2,000				+											
Caecum	A. $BaSO_4$ 2,000							+++	+++	+++			+			
	B. $BaSO_4$ 4,000				++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++				
	C. $BaSO_4$ 2,000 +PHBB2,000															

+++ : plentifuly observed
++ : moderately observed
+ : slightly observed
A : 2,000mg/kg of $BaSO_4$
B : 4,000mg/kg of $BaSO_4$
C : 2,000mg/kg of PHBB and 2,000mg/kg of $BaSO_4$

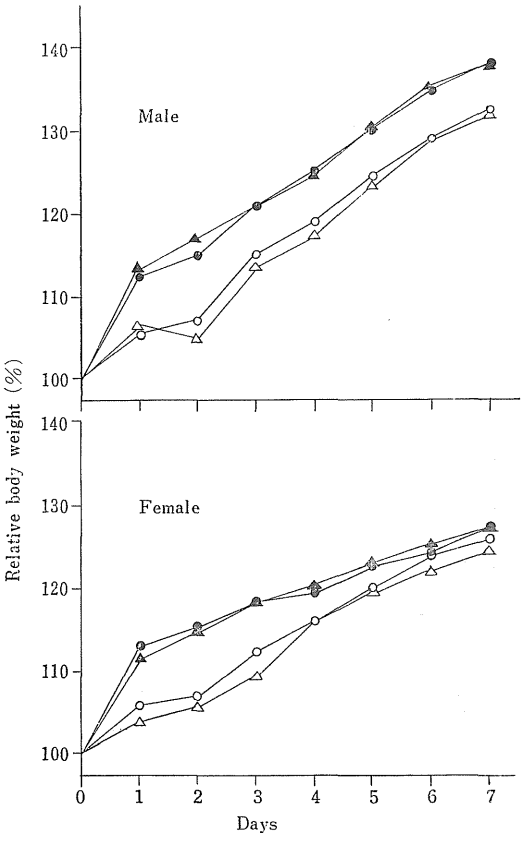


Fig. 2. Changes of body weight of survival rats orally administered with PHBB as compared with initial body weight
Control (oleum sesami), ●; 8,000mg/kg (oleum sesami), ○; control (arabia gum), ▲; 8,000 mg/kg(arabia gum), △

間経過してもかなりの量が胃内に存在し，24時間後も残っていた．小腸，盲腸中にはバリウムは検出されなかった．バリウムのみの投与では，投与直後から，胃だけでなく小腸にもかなり移行しており，3時間後には，胃の中にはほとんど認められずすでに盲腸への移行がみられた．6時間後では，ほとんどが盲腸に存在し，11時間後には糞中にかなり排泄され，24時間後には，体内にほとんどみとめられなかった（Fig. 5）．以上の結果から，PHBB 投与群では，コントロールに比べ，硫酸バリウムが胃から出ていく速度が，あきらかに遅くなることがわかった．

考　　察

PHBB-Na の経口投与による LD_{50} 値は，Matthews[1] らによると，マウスで950mg/kgである．われわれが今回ラットについて行った結果では，LD_{50} 値は，雄で4,200mg/kg，雌で約5,100mg/kgであり，マウスの値よりかなり高かった．彼らの結果との差は，動物種の違いによるものかもしれない．懸濁状態の PHBB の LD_{50} 値は，星野[2]が，マウスで 17.13g/kg，Sokol[3] が，やはりマウスで5,000mg/kgという値を出している．われわれの実験では，8,000mg/kg 以上の投与は不可能であった．8,000mg/kg 投与した40匹の動物のうち，アラビアゴム懸濁液投与の雌1匹に死亡が認められたが，この死亡は，投与の無理や試薬の刺激性が原因となって胃からもどした液が，一部，呼吸器に入ったことによる可能性も考えられる．Fig. 2 は，体重変化のグラフであるが，投与群では雌雄とも，投与後2日間の体重ののびが悪い．この理由はいろいろ考えられる．まず，PHBB によって胃の機能が抑制されることがウサギを使った実験で報告されており，[2] われわれの実験でも，硫酸バリウムの胃からの移動時間が，PHBB投与のものであきらかに遅れる傾向がみられた．以上のことから，PHBB が胃の中にあると，PHBBおよび飼料の胃からの移動がおくれ，食物の摂取量が減ることが考えられる．しかしながら，胃の粘膜のはく離，および呼吸器への液の逆流が，体重変化と関係している可能性も考えられる．いずれにせよ，LD_{50} 値は，8,000mg/kgより大きく，急性毒性作用はかなり低い．

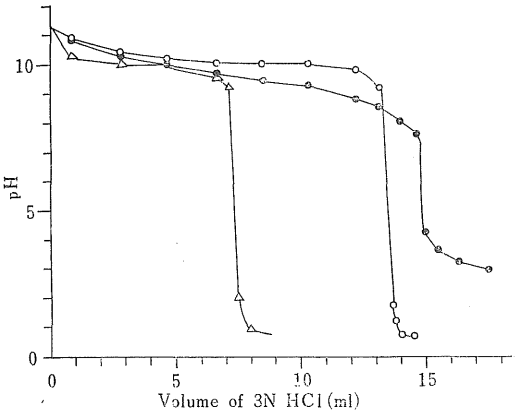


Fig. 6. The titration curves of 50m*l* of 0.5 M and 1.0M PHBB-Na, and 1.0M glycine-NaOH buffer with 3N HCl
1.0M PHBB-Na (○), 0.5M PHBB-Na (△), 1.0M glycine-NaOH buffer (●)

Fig. 3, 4 は PHBB-Na, および pH がそれと等しく，緩衝作用もほぼ等しい（Fig. 6）グリシン緩衝液を投与し，胃に対する影響を比較した結果である．PHBB-Na は，塩酸を加えていくと白色の沈でんを生じ，かなりの緩衝作用を有する．しかし，緩衝作用が 1M グリシン緩衝液とほぼ等しい PHBB-Na（1,942mg/kg 投与）も，作用が半分（776mg/kg）以下のものも，

胃に対する影響が，1Mグリシン緩衝液の投与と比べ，比較にならないくらい強く，単にアルカリとしての作用のみでは説明できない．グリシン緩衝液は，投与後4時間目にはすでに胃内の液量がほとんどないことからみて，短時間で小腸に移動したと考えられる．PHBB-Na は，レントゲン写真の結果（Table 3, Fig. 5）からみても，胃からの移行が，数時間ではほとんどないため，アルカリとしての効果が強められると考えられる．PHBB が，胃から小腸への物質の移動をおくれさせる原因として考えられるのは，(1)胃壁を麻痺し，胃のぜん動運動を阻害する働きがあること (2) PHBB が，幽門括約筋に働いて，幽門が閉じ，その結果，胃からの移動がおくれることなどが考えられる．PHBB-Na 投与による胃内の液量の増加は，飲水の有無にかかわらずみられることから，PHBB-Na が，胃の中に長時間滞留している間に，生体側の恒常作用が働き，胃液等の分泌が促進されることも関係しているものと思われる．

要　約

PHBB の急性毒性試験（致死量および胃に対する影響）について検討し，次のような結果を得た．

PHBB-Na のラットにおける LD_{50} 値は，雄で4,200 mg/kg，雌で約5,100mg/kgであった．PHBB を5％アラビアゴム水溶液およびゴマ油に懸濁した8,000mg/kg を投与した40匹の動物の中で，死亡したものは，アラビアゴム懸濁液投与の雌1匹のみであった．

PHBB-Na 投与ラットの主症状は，胃粘膜の出血と糜爛であるが，グリシン緩衝液との比較実験の結果から，単にアルカリとしての作用のみでは説明できないことがわかった．そこで，2,000mg/kg の PHBB と，硫酸バリウム投与し，レントゲンによりバリウムの動きを観察した結果，PHBB の投与により，胃からのバリウムの排出時間のおくれがあきらかに認められ，PHBB が胃壁を麻痺し，ぜん動運動を阻害する，あるいは，幽門括約筋に働いて幽門を閉じさせる働きのあることが示唆された．このことから，PHBB-Na の投与では，胃での滞留時間が長くなり，アルカリとしての作用が強化されるものと考えられる．

文　献

1) Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J.L. and Richardson, A.P.: *J. Amer. Pharm. Ass.*, **45**, 260, 1956
2) 星野　通：日本公衛誌，**8**, 7, 1961
3) Sokol, H.: *Drug Stand.*, **20**, 89, 1952
4) 東　弘臣：衛生試験所彙報，**50**, 47, 1938
5) Larsson, K.S. and Boström, H.: *Acta Padiat. Scand.*, **54**, 43, 1965
6) Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1974
7) 藤田博他：東京衛研年報，**26-2**, 111, 1975
8) 水尾昭江他：東京衛研年報，**26-2**, 119, 1975
9) 佐久間昭：生物検定法，251, 1964, 東京大学出版会

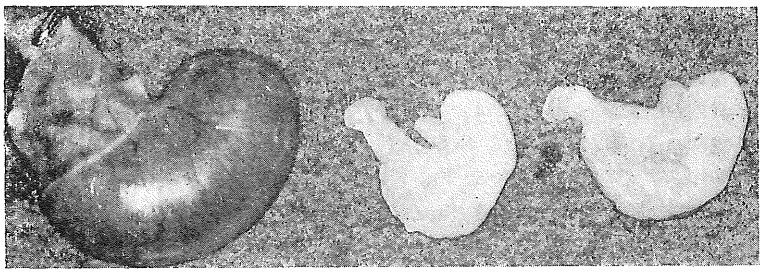


Fig.3 Stomachs of rats administered with PHBB-Na (left), water (center) and glycine-NaOH buffer (right)

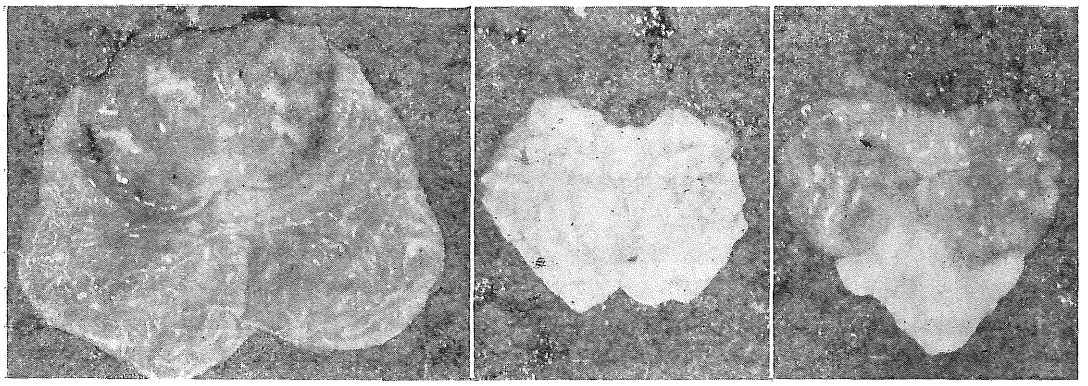


Fig.4 Stomach mucosa of rats administered with PHBB-Na (left), water (center) and glycine-NaOH buffer (right)

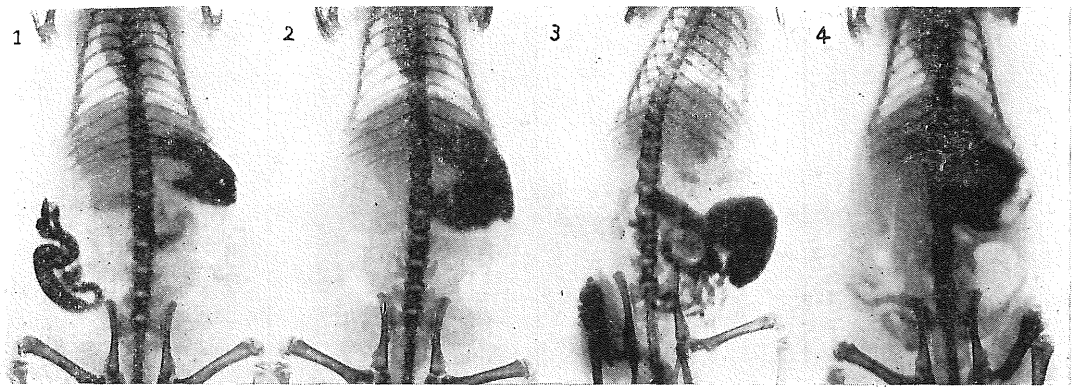


Fig.5 The X-ray photographs of rats administered with $BaSO_4$*(1,3), and $BaSO_4$ and PHBB**(2,4)
* : 4,000mg/kg $BaSO_4$ ** : 2,000mg/kg $BaSO_4$ and 2,000mg/kg PHBB
1,2 : Immediately after administration 3,4 : 3 hours after administration

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 111-118, 1975

パラオキシ安息香酸ブチルの亜急性毒性

藤田 博*　川野澄江*　水尾昭江*
馬渕依子*　樺島順一郎*　中尾順子*
平賀興吾*

Subacute Toxicity of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB)

HIROSHI FUJITA*, SUMIE KAWANO*, AKIE MIZUO*,
YORIKO MABUCHI*, JUN-ICHIRO KABASHIMA*, TOSHIKO NAKAO*
and KOGO HIRAGA*

急性毒性試験を行った結果,[1] パラオキシ安息香酸ブチル（PHBB）は，死亡率でみたときにはそれほど強い毒性を示す化合物であるとは考えられないが，胃に対する障害作用の可能性が示唆された．われわれは，ひきつづき PHBB 添加飼料による1ケ月飼育の亜急性毒性試験を行った．

ラットを用いた PHBB の亜急性試験に関する報告としては，Matthews ら[2] のものがほとんど唯一のものである．彼らは，2％および8％添加飼料による3ケ月飼育を行った結果，8％では多数の死亡例が認められたが，2％では何ら異常は認められなかったとしている．そこで，本実験においては，彼らの結果を参考にして投与量を8％および4％とした．

また，急性毒性試験の結果，PHBB ナトリウム塩は PHBB そのものよりも相当毒性が強いことがわかったため，特に両者を比較検討する立場から実験を行った．

実験材料および実験方法

1. 実験動物

Wistar-JCL 系ラットを用い，1週間の予備飼育後，5週令で実験を開始した．実験開始時の平均体重は，雄136 g，雌124 gであった．室温25°，湿度50%，照明時間7時—17時とした環境下の一般飼育室において，飼育を行った．全飼育期間にわたって，一般症状の観察および体重の測定を行い，飼料摂取量の測定を5回行った．

2. 試　料

実験に用いたパラオキシ安息香酸ブチルは，和光純薬製特級試薬，Lot. No. KIO 2284 (PHBB 98.0%以上) である．

3. 投与方法および投与期間

飼料の調整には，日本クレア製飼料原末ＣＥ—２を用いた．PHBB 添加飼料は，飼料原末に4％および8％の PHBB を加えて固型飼料とした（以下これを投与した群をそれぞれ4％投与群，8％投与群と呼ぶ）．PHBB ナトリウム塩（PHBB—Na）添加飼料は，4％および8％の PHBB に当モルの NaOH を加えて，PHBB-Na 溶液としたものを飼料原末と混合後，固型飼料とした（以下これを投与した群を Na—4％投与群，Na-8％投与群と呼ぶ）．各群雌雄共10匹（1ケージ5匹）のラットに以上の飼料を4週間自由摂取させた．また，水道水を自由に飲ませた．

4. 検査方法

1） ラットは，断頭後，血球および血清生化学的検査のための採血を行い，解剖による肉眼的観察を行った．

2） 器官重量：心臓，肺，胸腺，肝臓，脾臓，腎臓，盲腸，甲状腺，副腎，精巣，前立腺，精のう，卵巣および子宮は，摘出後秤量を行った．以上の器官および膵臓，胃，小腸，大腸，膀胱および精巣上体は，組織標本作製のためにホルマリン固定した．

3） 血液学的検査：断頭後，ヘパリン塗布試験管に採血を行い，Coulter Counter Model-S を用いて以下の7項目について測定を行った．①白血球数（ＷＢＣ），②赤血球数（ＲＢＣ），③ヘモグロビン量（Hgb），④ヘマトクリット（Hct），⑤平均赤血球容積（MCV），⑥平均赤血球ヘモグロビン量（ＭＣＨ），⑦平均赤血球ヘ

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

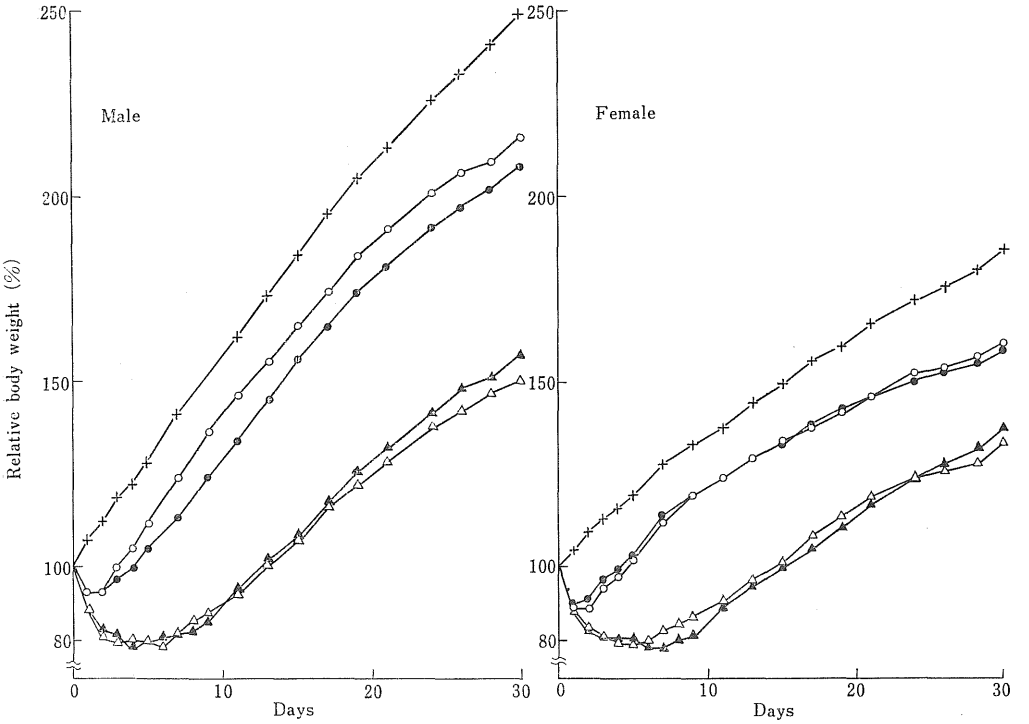


Fig .1. Changes of relative body weight of rats administered with PHBB and PHBB-Na in diets as compared with initial body weight

+ —— + Control —○—○— PHBB4% —△—△— PHBB8% —◉—◉— PHBB-Na4% —▲—▲— PHBB Na8%

モグロビン濃度（MCHC).

4) 血清生化学的検査：血液を室温で30分間放置後遠心分離機 M400 を用いて以下の10項目について行った．①総タンパク量（ＴＰ，ビュレット法），②グルコース量（ＧＬＵ，グルコースオキシダーゼ法），③尿素窒素量（ＵＮ，ウレアーゼインドフェノール法），④総コレステロール量（CHO, Lieberman-Burchard法），⑤アルブミン量（ＡＬＢ，ブロムクレゾールグリーン法），⑥グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT, Reitman-Frankel 変法），⑦グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素（GOT, Reitman-Frankel 変法），⑧アルカリホスファターゼ（ALP, Kind-King 変法），⑨コリンエステラーゼ（ChE, ⊿pH 法），⑩ロイシンアミノペプチダーゼ（LAP, Takenaka-Takahashi 法).

結果および考察

1. 一般症状

投与初期には，運動性の緩慢なラットがみられたが，これは体重の一時的減少による衰弱が原因と考えられ，体重の増加とともに回復が認められた．それ以外には対照群に比べて特に顕著な変化は認められなかった．投与開始後10日目に，Na-８％投与群の雌雄各１匹の死亡がみられた．ただし，この雄は，観察時までに，同ケージのラットによって捕食されていた．

2. 体重および飼料摂取量

体重の変化は，投与開始日の体重を100として Fig. 1 に，飼料摂取量は Table 1 に示した．体量増加曲線をみると，すべての投与群で対照群との間に大きな差が認められたが，PHBB 投与群と PHBB-Na 投与群との間の差は，雄の４％投与群を除くと無視できる程度で，雄の４％投与群では，Na-４％投与群よりやや大きかった．全投与群とも投与開始後数日間の体重減少はきわめて顕著であった．両４％投与群では２日目まで体重減少が続き，開始日の約90％まで減少した．その後，ほぼ対照群に平行した速度で増加したが，２週目頃から対照群との差がやや大きくなる傾向がみられた．両８％投与群では体重減少は７—10日目まで続き，対照群の約80％にまで低下した．特に死亡した動物の体重減少は大きく，開始日の55％にまで低下した．しかし，両８％投与群ともに，10日目頃からは体重の増加が起り，雌では対照群に平行した速度で，雄ではそれよりも遅い速度で増加した．Table 1 に示した飼料摂取量の結果から判断すると，体重減少の主な要因は，飼料摂取量の低下とみられる．おそらく，PHBB 添加飼料に対する動物の忌避があるのであろう．投与後半における体重増加の抑制傾向は，こ

Table 1. Food and drug consumption of rats administered with PHBB and PHBB-Na in diets for a month

	days	Food consumption g/rat/day					Drug consumption g/kg B.W./day				
		Control	PHBB 4%	PHBB 8%	PHBB-Na 4%	PHBB-Na 8%	Control	PHBB 4%	PHBB 8%	PHBB-Na 4%	PHBB-Na 8%
Male	0-2	17.8	5.3	0.9	5.6	1.0	0	1.76	0.67	1.87	0.71
	2-4	17.5	10.0	2.6	13.1	3.3	0	3.10	2.14	4.19	2.61
	10-12	20.4	15.6	10.6	17.2	9.7	0	3.27	7.34	3.85	6.62
	17-19	22.1	17.4	13.9	19.1	12.0	0	2.99	7.46	3.46	6.35
	24-26	21.8	17.8	13.8	18.4	12.3	0	2.68	6.34	2.91	5.47
Female	0-2	15.3	3.4	0.5	3.4	1.0	0	1.27	0.36	1.32	0.79
	2-4	15.2	9.9	2.6	10.5	2.8	0	3.50	2.24	3.68	2.42
	10-12	16.2	11.1	8.3	13.1	6.9	0	3.02	6.33	3.59	5.50
	17-19	15.4	11.2	10.2	11.1	10.7	0	2.68	6.30	2.72	7.00
	24-26	16.0	11.1	11.1	12.6	10.9	0	2.44	6.10	2.83	6.10

の時期に至っても飼料摂取量が同体重値の対照群のそれに比べて少ないことに起因するものと思われる.

投与群の実験終了時における体重値に基づいて判断すると，両4％投与群では約10日，両8％投与群では約20日の成長の遅れがあると考えられる.

3. 薬物摂取量

薬物摂取量は，飼料摂取量によって決まるため，投与初期の両8％投与群の摂取量は，両4％投与群のそれを下まわるが，飼料摂取量の増加にともなって逆転が起り，投与開始後24—26日目における薬物摂取量は，Na-4％投与群では 2.7 g/kg/day, Na-8％投与群では5.9 g/kg/day となる．この Na-8％ 投与群の摂取量は，LD_{50} 値，約4 g/kg[1]の1.5倍に相当するが，飼料に混和して徐々に摂取されるため，急性毒性でみられたような重篤な影響は生じなかったと考えられる.

4. 剖検所見

全投与群において，雌雄ともに胃に最も顕著な変化が見られたが，PHBB 投与群と PHBB-Na 投与群との間に差は認められなかった．前胃では，径1～2 mmの淡黄白色の小隆起がみられた．この小隆起は，弾力性がなく，力を加える事により容易に剝離した．その分布の状態をみると，両4％投与群では噴門付近に多くの小隆起が存在し，径約1 cmの島状の肥厚を呈していた．また，襞状縁に沿った部位にやや多い傾向がみられた．両8％投与群では，同様な小隆起は，ほぼ前胃全体にみられたが，特に噴門付近から襞状縁に沿って大彎に至る広い範囲に多数の小隆起が結合して存在し，顕著な肥厚を呈していた．なお，これらの変化は，病理組織学的には粘膜の肥厚であり，錯角化症をともなう角化亢進によるものであった.

腺胃では，粘膜襞が少なく，粘膜は全体的に白色を呈し，粘液の減少がみられた．投与量による差をみると，これらの変化の程度は，両8％投与群では両4％投与群に比べてやや強い傾向がみられた.

前胃および腺胃にみられたこれらの変化が，飼料摂取および消化に物理的な影響を与えている可能性は，十分に考えられる.

対照群を含めて，雄は30％，雌は6％のラットに水腎がみられたが，対照群と投与群における出現頻度および水腎の程度に差がみられなかったことから，PHBBによる影響ではないと思われる．また，雄の4％投与群に1例ではあるが，前立腺の肥大，出血が認められた.

雌の Na-8％投与群の死亡後の剖検の結果，腹水，胸水の貯留，胃の出血，卵巣，副腎の充血がみられ，小腸に血液の貯留が観察された.

5. 器官重量

器官の絶体重量および体重比重量は，Table 2 および3に示したとおりである.

絶対重量についてみると，すべての器官は，全投与群ともに対照群に比べて減少し，特に両8％投与群ではほとんどの器官が有意の減少を示した.

体重比重量についてみると，心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓，盲腸および精巣では，対照群に比べて，有意な増加ないしは増加の傾向がみられた．胸腺および精のうで

は対照群との間に差を認められなかった．副腎は，8％投与群以外は減少の傾向を示し，特に両4％投与群の減少は顕著であった．甲状腺は，両4％投与群では減少，両8％投与群では増加の傾向を示した．また，前立腺，卵巣および子宮では，両8％投与群の減少が顕著であった．

以上のように，投与群における絶体重量および体重比重量は，対照群に比べて顕著な変化を示した．しかし，これらの投与群では，体重減少から見た成長のおくれが著しいため，投与群の器官重量を対照群の同一体重を示す週令動物の器官重量と比較してみる必要がある．すなわち，両4％投与群では約10日，両8％投与群では約20日の成長のおくれがあるとみられる．週令と器官重量の変化については，坂本ら[3]のSD系ラットについての報告があるので，本実験で用いたラットとは系統による差があるので明確なことは言えないが，一応，それを参考にして，少々，検討を加えてみたい．5－9週令では，動物の週令にともなって器官の体重比重量が徐々に低下する器官が多いため，本実験の投与群の多くの器官で認められた絶対重量の減少と体量比重量の増加は，動物の成長の遅れによってよく説明されるかもしれない．

しかしながら，胸腺，副腎，精巣，卵巣，子宮および前立腺の重量の変化は，単なる成長の遅れによっては説明できないかもしれない．胸腺は約6週令で絶対重量の増加がほとんど停止すると考えてもよさそうであり，投与による成長の遅れがあっても，実験終了時の9週令までには絶対重量が対照群に十分追いついてよさそうであるが，実際には，投与群のそれは，対照群に比べて明らかに小さく，特に両8％投与群では減少がはなはだ大きく，投与による胸腺の萎縮を考えてもよいかもしれない．

また，両4％投与群で副腎の絶体重量が大きく減少し，体重比重量にも減少の傾向がみられたことから，投与により副腎が小さくなっている可能性も考えられる．

また，精巣の体重比重量は，他の器官に比べて両4％投与群，両8％投与群ともに，その増加が著しかった．この結果は，精巣の成長は，胸腺と逆に，体重増加の抑制状態においてもかなりよいと考えてよいかもしれない．

卵巣，子宮および前立腺の両8％投与群の体重比重量が顕著な減少を示したことは，体重増加の完全な停止が長期間続くというきわめて苛酷な条件下で，これらの器官の成長が特に抑えられている可能性が考えられる．

以上述べたような器官重量の変化は，どこまでが飼料摂取量の低下によるもので，どこからが，実際に薬物自体の影響によるものか明らかでない．また後者の場合にしても，薬物が直接その器官を障害しているのか，それとも大量の薬物の負荷というストレスに対する内分泌系等の関与した合目的的適応であるのかは明らかでなく，今後の検討が必要であろう．

6. 血液学的検査

結果をTable 4に示したが，RBC, Hct およびMCVには，対照群に比べて差を認められなかった．WBCには，雌の4％投与群で有意な増加が認められたが，全投与群をみわたしたとき，一定の傾向を認められなかった．Hgbは，雄ではほとんど変化がないが，雌では減少の傾向を示し，両8％投与群では有意な減少を示した．MCH，MCHCには，雌雄ともに有意な減少ないしは減少の傾向が認められた．

7. 血清生化学的検査

結果はTable 4のとおりである．TPには，雌雄ともに全投与群で有意な減少または減少の傾向がみられた．GLU には，減少の傾向が認められたが，投与群間で差がみられなかった．CHO は，一部の投与群で減少を示したが，一定の傾向は認められなかった．ALB は，すべての投与群で有意な減少，ないしは減少の傾向を示した．GPT は，全投与群で顕著な増加を示し，投与量との相関もうかがわれた．GOT には，有意ではないが増加の傾向が認められたが，投与群間に差は認められなかった．ALP は，雌雄とも，ほとんどすべての投与群で有意の増加を示した．ChE は，雄では有意の増加を示したが，雌では有意の減少を示した．LAP は，対照群との間にほとんど差が認められなかった．

血清生化学的成分にも成長にともない，かなり大きな変化がみられる[4]ことから，添加飼料摂取による成長の遅れを考慮に入れる必要がある．そこで，比較的成長の遅れの少ない4％の場合についてのみ対照群との比較を行うと，TP，ALB および雌の ChE の有意の減少もしくは減少の傾向が認められ，ALP および GPT には明らかな増加が認められた．以上の血清生化学検査の結果から，4％の投与レベルにおいて軽度の肝障害が起ている可能性も考えられる．

総　括

急性毒性試験の結果，PHBB-Na は，PHBB そのものよりも毒性が相当強いことがわかったため[1]，本実験では，飼料に混ぜて1か月間投与したときの両者の毒性についての比較を行った．その結果，体重変化，剖検所見，器官重量，血液学的検査および血清生化学的検査のいずれの結果においても，両者の間にはほとんど差が認められなかった．そこで，PHBB-Na は，飼料に混ぜ

て徐々に摂取させた場合には，強力なアルカリとしての作用を示さないと考えてよさそうである．

本実験では，4％および8％と，非常に薬物の添加量が多かったため，おそらく飼料に対する動物の嗜好性が原因と考えられる飼料摂取量の著しい低下，および，その結果としての成長の遅れが薬物そのものの影響を考える上で，結果の解釈を非常に困難にした．特に8％の投与では，5—6週令という成長の初期の段階で完全な体重増加の停止が10日近くも続いたことから，薬物そのものの影響よりも飼料を摂取しない影響の方がはるかに重大であると考えられる．事実，10日目頃から飼料摂取量の増加にともなって，体重の増加がみられた．そこで，薬物そのものの影響をみていく上では，むしろ，成長の遅れの少ない4％の投与群の結果を重視すべきであろう．

4％の投与において得られた著明な変化をまとめてみると，①体重変化からみた約10日の成長のおくれ，②剖検所見では，前胃粘膜における淡黄色の小隆起の観察，③器官重量では，体重からみた成長のおくれで説明できない胸腺，副腎および精巣の重量変化，④血清生化学的検査では，TP，ALB および雌の ChE の減少および GPT，ALP の増加があげられる．

以上のように，4％の投与で種々の変化が観察されたが，この投与量で明らかに飼料摂取量の低下が起るため，以上の変化を薬物そのものの影響であると断定することはできない．この点を明確にするためには，pair feeding のような実験を組んで，飼料摂取量の違いの影響をなくす必要があろう．飼料摂取量の違いを無視して，以上の変化が薬物の直接的影響であるとしてみても，これらの変化が，ある組織または器官への薬物の直接的な障害を示しているものか，それとも，大量の薬物の負荷というストレスに対する動物体の合目的的な適応を示すものか明らかでない．

Matthews ら[2]は，PHBB 8％添加飼料の3ヶ月投与により，多数の死亡を認めているが，本実験では，投与初期に著しい衰弱は認められたものの，死亡は1例も観察されなかった．このような著しい差を生じた原因としては，彼らが用いた動物は，実験開始時の平均体重が35gであり，本実験で用いた動物（約130g）に比べてはるかに小さいので，添加飼料に対して順応する前に衰弱して死亡したと考えられる．

終りに，本実験の結果，PHBB 4％添加飼料による1ヶ月飼育で，明らかな変化が認められたことから，もう少し低い濃度で，長期間投与したときの影響について，今後，検討していく必要があると思われる．

要　旨

パラオキシ安息香酸ブチル（PHBB）およびそのナトリウム塩の亜急性毒性を検討する目的で，両者を4％および8％の濃度で飼料中に添加して，Wistar-JCL 系ラットに1ヶ月間投与し，種々の測定を行った．その結果，PHBB とそのナトリウム塩との間にはほとんど差が認められなかった．8％の投与量では，初期の飼料摂取の忌避によると考えられる顕著な体重減少と，その後のはなはだしい成長の遅れが観察された．4％の投与によっても，成長の遅れ，胃粘膜（特に前胃），器官重量および血清生化学的検査における変化が認められたが，そのすべてが薬物そのものの影響によるものか，それとも飼料摂取量の低下によるものか明らかでない．

謝辞　胃粘膜の病理所見は，本研究所毒性部の藤井孝氏に依頼した．ここに感謝の意を表します．

文　献

1）馬渕　依子他：東京衛研年報，26-2，103，1975
2）Matthews, C., Davidson, J., Elizabeth, B., Morrison, J. L. and Richardson, A. P.：*J. Amer. Pharm. Ass.*, 45, 260, 1956
3）坂本　義光他：東京衛研年報，25，577，1974
4）中川　好男他：東京衛研年報，25，599，1974

Table 2. Absolute and relative organ weight in male rats on oral administration of PHBB and PHBB-Na for a month

	No. of rats	Control 10	PHBB 4% 10	PHBB 8% 10	PHBB-Na 4% 10	PHBB-Na 8% 9
Absolute Weights	Heart (g)	1.02±0.07	0.93±0.06*	0.67±0.06***	0.91±0.05**	0.73±0.07***
	Lung (g)	1.38±0.23	1.13±0.16*	1.12±0.24*	1.24±0.24	0.97±0.13***
	Thymus (g)	0.65±0.10	0.58±0.13	0.39±0.11***	0.53±0.09*	0.39±0.07***
	Liver (g)	15.23±1.68	15.58±1.68	11.19±1.38***	13.60±1.17*	10.59±1.73***
	Spleen (g)	0.78±0.11	0.67±0.08*	0.51±0.08***	0.67±0.08*	0.54±0.06***
	Kidney-R (g)	1.28±0.13	1.21±0.12	0.94±0.06***	1.17±0.08*	0.94±0.04***
	Kidney-L (g)	1.27±0.14	1.23±0.12	0.94±0.05***	1.15±0.09*	0.93±0.05***
	Ceacum (g)	0.94±0.13	0.89±0.13	0.83±0.10*	0.92±0.16	0.88±0.15
	Thyroid gl. (mg)	17.83±3.13	14.52±2.59	12.50±2.90**	14.26±2.77	13.80±2.36*
	Adrenal gl.-R (mg)	26.78±5.52	20.18±1.87*	16.94±1.86***	18.91±1.61**	16.29±1.75***
	Adrenal gl.-L (mg)	28.14±5.25	21.01±2.46***	18.76±1.70***	19.56±3.34***	17.29±2.57***
	Testis-R (g)	1.56±0.10	1.57±0.13	1.39±0.12**	1.51±0.10	1.36±0.06***
	Testis-L (g)	1.64±0.10	1.63±0.15	1.44±0.09***	1.56±0.11	1.41±0.07***
	Seminal vesicle (g)	0.24±0.05	0.24±0.08	0.15±0.02***	0.19±0.04*	0.15±0.02***
	Prostate gl. (g)	0.27±0.06	0.22±0.07	0.12±0.02***	0.23±0.07	0.14±0.04***
Relative Weights	Heart (g/100g B.W.)	0.29±0.01	0.31±0.02**	0.31±0.01***	0.32±0.02***	0.34±0.02***
	Lung (g/100g B.W.)	0.40±0.07	0.38±0.06	0.53±0.15**	0.43±0.08	0.45±0.05
	Thymus (g/100g B.W.)	0.19±0.03	0.20±0.04	0.18±0.04	0.18±0.04*	0.17±0.02
	Liver (g/100g B.W.)	4.35±0.23	5.21±0.42***	5.21±0.37***	4.72±0.33**	4.86±0.37**
	Spleen (g/100g B.W.)	0.22±0.03	0.23±0.03	0.24±0.02	0.23±0.03	0.25±0.02*
	Kidney-R (g/100g B.W.)	0.37±0.03	0.41±0.02**	0.44±0.03***	0.41±0.03**	0.43±0.04***
	Kidney-L (g/100g B.W.)	0.36±0.04	0.41±0.03**	0.44±0.05***	0.40±0.03*	0.43±0.04**
	Ceacum (g/100g B.W.)	0.27±0.03	0.30±0.04	0.38±0.03***	0.32±0.05	0.41±0.05***
	Thyroid gl. (mg/100gB.W.)	5.14±0.92	4.85±1.01	5.87±1.17	4.90±0.86	6.35±0.84*
	Adrenal gl.-R (mg/100g B.W.)	7.62±1.54	6.74±0.56	7.92±0.92	6.57±0.54	7.53±0.55
	Adrenal gl.-L (mg/100g B.W.)	8.06±1.45	7.04±0.85	8.78±1.00	6.80±1.18	8.00±1.05
	Testis-R (g/100g B.W.)	0.45±0.04	0.53±0.05***	0.65±0.08***	0.53±0.04***	0.63±0.08***
	Testis-L (g/100g B.W.)	0.47±0.04	0.55±0.06**	0.68±0.09***	0.54±0.04***	0.66±0.10***
	Seminal vesicle (g/100g B.W.)	0.07±0.01	0.08±0.03	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
	Prostate gl. (g/100g B.W.)	0.08±0.02	0.08±0.03	0.05±0.01**	0.08±0.03	0.07±0.01

Varues are the mean±S.D. * Significantly diffrent from control $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$,

Table 3. Absolute and relative organ weight in female rats on oral administration of PHBB and PHBB-Na for a month

	No. of rats	Control 10	PHBB 4% 10	PHBB 8% 10	PHBB-Na 4% 10	PHBB-Na 9% 9
Absolute Weights	Heart (g)	0.75±0.06	0.67±0.04**	0.56±0.03***	0.64±0.04***	0.59±0.06***
	Lung (g)	1.17±0.24	1.20±0.23	0.96±0.16*	0.95±0.10*	0.87±0.11**
	Thymus (g)	0.53±0.08	0.48±0.09	0.41±0.09**	0.47±0.08	0.43±0.09*
	Liver (g)	9.23±1.37	8.51±0.50	8.22±0.52	8.46±0.58	7.76±1.08*
	Spleen (g)	0.58±0.05	0.57±0.07	0.46±0.03***	0.53±0.05	0.46±0.06***
	Kidney-R (g)	0.89±0.06	0.81±0.05**	0.76±0.04***	0.79±0.06***	0.73±0.05***
	Kidney-L (g)	0.86±0.07	0.79±0.04***	0.76±0.04***	0.77±0.05**	0.70±0.04***
	Ceacum (g)	0.79±0.12	0.74±0.11	0.75±0.11	0.72±0.05	0.74±0.09
	Thyroid gl. (mg)	13.86±3.42	11.09±1.93	10.92±2.91	11.81±1.54	10.86±1.68
	Adrenal gl. -R (mg)	28.47±3.29	22.35±2.84***	20.24±1.46***	21.55±1.39***	18.13±1.96***
	Adrenal gl. -L (mg)	29.85±3.86	22.74±2.39***	21.72±1.79***	22.55±2.11***	18.50±1.78***
	Ovary -R (mg)	41.83±4.76	34.41±5.48**	27.83±6.40***	36.89±5.89	23.53±5.28***
	Ovary -L (mg)	40.32±6.75	33.76±5.83*	26.50±7.27***	34.07±8.99	23.67±4.48***
	Uterus (g)	0.42±0.05	0.35±0.16	0.22±0.04***	0.43±0.10	0.24±0.06***
Relative Weights	Heart (g/100g B.W.)	0.31±0.01	0.33±0.03	0.35±0.02*	0.33±0.02*	0.35±0.02***
	Lung (g/100g B.W.)	0.48±0.09	0.59±0.12*	0.56±0.10	0.48±0.05	0.51±0.07
	Thymus (g/100g B.W.)	0.22±0.03	0.23±0.04	0.24±0.04	0.24±0.03	0.26±0.05
	Liver (g/100g B.W.)	3.80±0.31	4.20±0.17**	4.80±0.33***	4.31±0.32**	4.56±0.39***
	Spleen (g/100g B.W.)	0.24±0.03	0.28±0.04*	0.27±0.02*	0.27±0.02*	0.27±0.02**
	Kidney-R (g/100g B.W.)	0.37±0.02	0.40±0.02**	0.45±0.03***	0.40±0.03*	0.43±0.04**
	Kidney -L (g/100g B.W.)	0.35±0.02	0.39±0.02***	0.44±0.03***	0.39±0.03**	0.42±0.04**
	Ceacum (g/100g B.W.)	0.32±0.04	0.36±0.04*	0.44±0.06***	0.37±0.02**	0.43±0.05***
	Thyroid gl. (mg/100g B.W.)	5.66±1.18	5.46±0.90	6.37±1.65	6.01±0.84	6.30±0.88
	Adrenal gl.-R (mg/100g B.W.)	11.76±0.76	11.09±1.76	11.87±0.85	10.98±0.94	10.71±1.12*
	Adrenal gl.-L (mg/100g B.W.)	12.34±1.12	11.28±1.56	12.68±1.05	11.48±1.20	11.06±0.75*
	Ovary -R (mg/100g B.W.)	17.40±2.29	16.93±2.07	16.17±3.23	18.75±2.90	13.55±2.29**
	Ovary -L (mg/100g B.W.)	16.85±3.48	16.77±3.36	15.37±3.76	17.32±4.51	14.07±3.20
	Uterus (g/100g B.W.)	0.18±0.03	0.17±0.09	0.13±0.02*	0.22±0.06	0.13±0.03

Values are the mean±S.D. * Significantly different from control $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$,

Table 4. Blood components, biochemical values in serum of rats on administration of PHBB and PHBB-Na for a month

		Control	PHBB 4%	PHBB 8%	PHBB-Na 4%	PHBB-Na 8%
Male	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	8.6±2.9	8.5±1.7	7.5±1.6	9.7±2.7	8.0±1.0
	RBC ($\times 10^6/mm^3$)	7.0±0.6	7.3±0.3	7.2±0.4	7.3±0.4	7.2±0.3
	Hgb (g/dl)	14.4±1.2	14.7±0.5	14.2±0.7	14.8±0.6	14.1±0.5
	Hct (%)	39.2±3.1	40.8±1.6	39.7±1.9	40.6±1.9	39.4±1.1
	MCV (u^3)	56.6±1.3	55.9±1.2	56.1±1.7	56.4±0.5	55.6±1.5
	MCH (uug)	20.7±0.6	20.1±0.6*	20.1±0.7	20.5±0.9	19.9±0.5**
	MCHC (%)	36.8±0.7	36.2±0.8	36.0±0.8*	36.5±1.5	36.1±0.8*
	TP (g/dl)	7.8±0.4	7.5±0.4	6.9±0.4***	7.4±0.5	7.1±0.4**
	GLU (mg/dl)	138±15	132±7	127±5	131±6	131±13
	UN (mg/dl)	20.0±2.0	22.3±2.7*	16.4±2.2**	22.5±1.9**	21.7±2.6
	CHO (mg/dl)	79.0±11.9	75.8±6.9	71.8±7.4	79.3±8.8	66.8±7.6*
	ALB (g/dl)	4.8±0.3	4.8±0.3	4.4±0.2***	4.7±0.3	4.6±0.2
	GPT (K.U/ml)	35.0±4.6	42.8±6.1**	48.9±4.5***	43.1±6.8**	53.7±5.0***
	GOT (K.U/ml)	124±17	130±21	130±13	135±9	132±20
	ALP (KA-U/dl)	41.4±6.5	60.6±18.6*	63.8±19.2**	61.6±11.5***	63.3±18.9*
	ChE (ΔpH)	0.09±0.02	0.13±0.05	0.14±0.02	0.13±0.03	0.14±0.03
	LAP (U/ml)	37.1±4.8	31.1±4.6*	36.8±7.7	36.2±6.8	38.9±10.23
Female	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	6.7±1.3	8.1±1.6*	7.9±1.4	6.9±1.7	7.9±2.6
	RBC ($\times 10^6/mm^3$)	7.2±0.6	7.4±0.3	7.1±0.6	7.3±0.7	7.1±0.4
	Hgb (g/dl)	15.1±0.8	15.0±0.5	14.4±0.7*	14.5±0.6	14.2±0.7*
	Hct (%)	40.4±3.8	40.1±2.5	39.6±3.2	39.8±3.4	38.9±1.5
	MCV (u^3)	56.2±1.7	55.7±2.3	56.1±1.8	55.1±1.0	55.2±1.0
	MCH (uug)	21.2±0.9	20.5±1.0	20.4±0.8	20.2±0.8*	20.1±0.9*
	MCHC (%)	37.9±2.0	37.1±1.7	36.6±1.5	36.8±1.8	36.5±1.2
	TP (g/dl)	7.7±0.5	7.2±0.2*	7.3±0.3*	7.4±0.5	7.2±0.3*
	GLU (mg/dl)	136±8	125±11*	122±10**	126±13	126±14
	UN (mg/dl)	20.1±3.7	20.7±2.2	19.4±2.5	19.5±2.3	22.2±3.4
	CHO (mg/dl)	76.3±7.5	73.6±8.5	63.0±7.7**	78.7±7.7	75.7±6.2
	ALB (g/dl)	4.9±0.3	4.7±0.2*	4.7±0.2	4.8±0.3	4.7±0.2
	GPT K.U/ml)	35.5±5.8	41.4±5.3	52.4±6.7***	41.2±6.9	51.0±8.3***
	GOT (K.U/ml)	138±19	141±15	142±24	142±16	142±15
	ALP (KA-U/dl)	29.2±5.7	43.4±10.7**	47.3±15.0**	51.2±12.9***	39.3±14.0
	ChE (ΔpH)	0.49±0.16	0.30±0.09	0.20±0.05	0.28±0.10	0.22±0.05
	LAP (U/ml)	36.6±8.1	34.6±6.3	39.1±9.3	36.6±6.9	38.4±7.4

Values are the mean±S.D. * Significantly different from control $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$,

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 119-122, 1975

ラットの血液凝固系に対するパラオキシ安息香酸ブチルおよびその関連化合物の影響について

水尾昭江* 川野澄江* 中尾順子*
平賀興吾*

Influence of p-Hydroxybutylbenzoate (PHBB) and Related Compounds on Blood Coagulation in Rats

AKIE MIZUO*, SUMIE KAWANO*, TOSHIKO NAKAO*
and KOGO HIRAGA*

緒　言

われわれはラットによるパラオキシ安息香酸ブチル（以下 PHBB と略す）の急性毒性試験，ならびに亜急性毒性試験を行ってきた（別報）．その結果，PHBB のナトリウム塩の投与により胃に出血が起ることが明らかにされたが，PHBB に構造が類似しているアセチルサリチル酸（以下 ASA と略す）およびサリチル酸については古くからその大量投与により，腸管における出血，血液凝固異常，低プロトロンビン症などが起ることが知られている．[1-5]

そこで本報告では，ラットを用いて PHBB の血液凝固系への影響を ASA およびサリチル酸と比較検討する実験を行った．まずはじめに実験Ⅰでは，PHBB（ゴマ油けん濁液）8,000mg/kg 1回投与の影響について検討した．ついで実験Ⅱでは，4％ PHBB, 0.5％ ASA, 0.5％サリチル酸添加飼料による1ケ月飼育の影響について検討を行った．飼料の添加量は，PHBB については，亜急性毒性試験の結果から，ASA とサリチル酸については予備試験の結果から，動物が比較的よく飼料を摂取する添加量を考慮して，それぞれ4％および0.5％とした．

実験方法

1. 動物および投与方法

実験Ⅰ　7週令の Wistar-JCL 系雄ラット（実験開始時の体重200～250g）22匹を用いて実験を行った．動物は3群にわけ，1群は無処置の対照群，2群はゴマ油投与群，3群は PHBB 投与群とした．各群の動物数は，それぞれ5，8および9匹である．投与前日の夕方から絶食させた動物に，体重100g当り2mlのゴマ油および PHBB ゴマ油けん濁液（400mg/ml）を胃ゾンデを用いて経口投与した．投与1時間後から固型飼料を与え，2日後に血液凝固能に関する測定を行った．なお，PHBB は和光純薬製特級試薬，Lot No. KIO 2284 である．

実験Ⅱ

1）飼料　添加飼料の調製には，日本クレア製飼料原末CE－2を用い，これに各薬物を添加後，固型飼料とした．用いた試薬は，PHBB：和光純薬製特級試薬，Lot No. KIO 2284, ASA：三晃製薬製局方品，Lot No. S 36181, サリチル酸：和光純薬製特級試薬，Lot No. IEM2254である．

2）動物　Wistar-JCL 系雄ラット40匹を4週令で購入し，1週間予備飼育後添加飼料を1ケ月与え，体重および飼料摂取量の測定を行った．各群の動物数は10匹とし，5匹飼いのケージで飼育した．実験開始時の平均体重は143gであった．

2. 採血および血漿，血清の分離

動物はエーテル麻酔下に固定して頸部を開き，外頸静脈より採血した．まず，血液凝固時間測定用に約0.5mlを採血し，続いて3.8％ クエン酸ナトリウム 0.2ml を入れた注射筒を用いて血液 1.8ml を採血し，血漿の分離に供した．さらに別の注射筒を用いて採血を行い，プロトロンビン消費試験用の血清の分離に供した．

3. 血液凝固能の測定

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町　3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Effect of a single dose of PHBB (8,000mg/kg) on blood coagulation

Group	Clotting time (min)		P. T. (sec)	P. C. T. (sec)
	Beginning	Ending		
Non treated	1.37±0.99[a)]	2.77±1.03	18.0± 4.6	33.8±20.7
Sesame oil	0.84±0.55	3.74±1.73	19.1± 5.4	76.7±38.3*[b)]
PHBB	1.93±1.96	4.41±1.65	24.8±10.4	122.6±36.8*** +[c)]

P. T.: Prothrombin time P. C. T.: Prothrombin consumption test

a) Mean±SD.

b) Significantly different from non treated * $P<0.05$ *** $P<0.001$

c) Significantly different from sesame oil + $P<0.05$

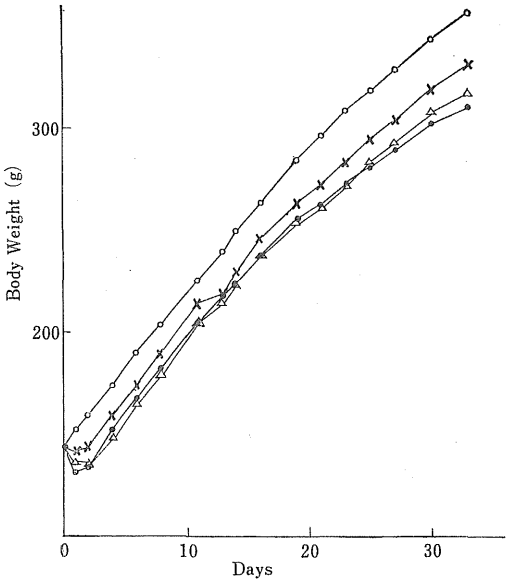


Fig.1. Changes in the mean body weight of rats after administration of PHBB, ASA and salicylic acid diets

○——○ Control diet
×——× 0.5%ASA diet
●——● 4%PHBB diet
△——△ 0.5%salicylic acid diet

血液凝固時間 (Sahli-Fonio 法), 血漿カルシウム再加時間(P. R. T.), プロトロンビン時間(P. T.), 部分トロンボプラスチン時間 (P. T. T.), プロトロンビン消費試験 (P. C. T.) の測定は臨床検査法提要[6] に従って行った. 用いた試薬は Simplastin A (Warner-Chilcott 社製), Platelin (Warner-Chilcott 社製), Bactothromboplastin (Difco 社製), Prothrombin free rabbit plasma (Dade 社製) である.

結 果

実験 I

1) 体重, 一般症状および剖検所見 PHBB 投与群では約7 gの体重減少がみられ, 2日目の測定時まで増加が認められなかった. PHBB 投与群の一般症状としては, 一部の動物で, 鼻血, 呼吸時の雑音が観察され, また, 解剖の結果, 胃の出血が全例にみられた.

2) 血液凝固能 測定結果を Table 1. に示した. 血液凝固時間については, PHBB 群の開始時間は対照群と差はなく, また, 完結時間は 4.4分で, 無処置群の 2.8分, ゴマ油群の3.7分に比較して差があるとは認められなかった.

プロトロンビン時間については, 無処置群の18.0秒, ゴマ油群の19.1秒に比較して, PHBB 群は 24.8 秒と延長の傾向を示したが有意の差とはいえなかった.

プロトロンビン消費試験については, PHBB 群は無処置群に対しては $P<0.001$ で, ゴマ油群に対しては $P<0.05$で有意の延長が認められた.

実験 II

1) 体重および飼料摂取量 Fig. 1. に投与後の体重変化を, Table 2. に1日当りの飼料と薬物の摂取量を示した. 体重は各投与群とも投与開始後1～2日間減少したが, これは飼料の摂取量の低下によるものと考えられ, その後, 摂取量の増加に伴なって対照群にほぼ平行した速度で増加した.

飼料摂取量は11日目頃から各群ともほぼ一定となったが, ASA 群およびサリチル酸群が対照群とほぼ同程度の摂取量を示したのに対して, PHBB 群の摂取量は対照群より少なかった. また11日～25日の体重増加量を摂取量でわって摂取効率を求めたところ, 対照群は33%, PHBB 群は 34%, ASA 群は 27%, サリチル酸群は 28%で, ASA 群およびサリチル酸群は対照群に比べて低

Table 2. Food and drug consumption of rats maintained on PHBB, ASA and salicylic acid diets

Days	Control		PHBB		ASA		salicylic acid	
	Food	Drug	Food	Drug	Food	Drug	Food	Drug
0— 2	16.8[a)]	0[a)]	5.2	0.21	9.8	0.05	6.9	0.03
4— 6	18.4	0	14.4	0.58	18.2	0.09	16.5	0.08
11—13	20.2	0	16.0	0.64	21.8	0.11	20.4	0.10
23—25	20.2	0	17.5	0.70	21.2	0.11	21.1	0.11

a) g/day

Table 3. Clotting tests of rats maintained on PHBB, ASA and salicylic acid diets for a month

Group	Clotting time (min)		P. R. T. (min)	P. T. (sec)	P. T. T. (sec)	P. C. T. (sec)
	Beginning	Ending				
Control	1.87±0.60	4.08±0.83	2.01±0.53	13.6±1.4	33.9±4.6	54.9±22.3
PHBB	1.90±0.38	4.15±0.79	2.19±0.37	15.1±1.9	32.7±4.9	79.6±30.3
ASA	1.84±0.58	4.19±0.85	2.18±0.33	15.7±1.7**	37.3±6.8	42.7±17.7
Salicylic acid	1.92±0.40	4.37±0.29	2.46±1.64	15.5±2.1*	38.4±7.7	44.0±14.6

PHBB, ASA and salicylic acid were added to diets at levels of 4, 0.5 and 0.5% respectively
P. R. T. : Plasma recalcification time P. T. : Prothrombin time
P. T. T. : Partial thromboplastin time P. C. T. : Prothrombin consumption test
Values are the mean±SD. * $P<0.05$ ** $P<0.01$

い値を示した．なおこの期間の薬物の1日平均摂取量はPHBB群は2,500mg/kg，ASA群は370mg/kg，サリチル酸群は388mg/kgであった．

2) 一般症状および剖検所見　1ケ月の投与期間中，各投与群いずれも一般症状の特に異常と思われる変化は認められなかった．剖検所見ではPHBB群全例の胃の噴門部に淡黄色の小隆起がみられたが，ASA群およびサリチル酸群ではそのような変化は認められなかった．

3) 血液凝固能　結果をTable 3. に示したが，血液凝固時間では，開始時間，完結時間ともに各投与群と対照群との間には差は認められなかった．また，より鋭敏な凝固時間の測定方法であるカルシウム再加時間（P. R. T.）の測定においても同様に差は認められなかった．

プロトロンビン時間（P. T.）については，PHBB群は有意の差はなかったが延長の傾向を示し，ASA群は$P<0.01$で，サリチル酸群は$P<0.05$で有意の延長を示した．しかし延長の程度は対照群の13.6秒に対して，ASA群は15.7秒，サリチル酸群は15.5秒で（それぞれ対照群の15%および14%の延長），それほど大きなものとはいえない．

部分トロンボプラスチン時間（P. T. T.）については，PHBB群では対照群との間に差がなく，ASAおよびサリチル酸ではわずかな延長の傾向が認められたが有意差はなかった．

プロトロンビン消費試験（P. C. T.）については，対照群の54.9秒に比較して，PHBB群は79.6秒と延長の傾向が認められたが，有意差はなかった．ASA群およびサリチル酸群では，それぞれ42.7秒，44.0秒と対照群と差がないか，むしろ短縮の傾向を示した．PHBB群は対照群に対しては有意差はなかったが，ASA群，サリチル酸群との間には，それぞれ$P<0.01$で有意の差が認められた．

考　察

PHBB，ASAおよびサリチル酸の血液凝固系への影響を比較する実験を行ったが，PHBB 8,000 mg/kgの1回投与，4% PHBB，0.5% ASA，0.5%サリチル酸添加飼料の1ケ月投与では，いずれも著しい凝固異常はみいだされなかった．PHBBでは，1回投与および1ケ月投与のどちらの場合にも，プロトロンビン時間およびプロトロンビン消費試験の延長ないしその傾向が認められた．また，ASAおよびサリチル酸の1ケ月投与で

は，プロトロンビン時間は延長したにもかかわらず，プトロンビン消費試験は短縮する傾向を示した．血液凝固時間，カルシウム再加時間，部分トロンボプラスチン時間では，各群とも対照群との間にそれほど大きな差は認められなかった．

上に述べたように，PHBB 投与によりプロトロンビン時間の比較的小さな延長とプロトロンビン消費試験の比較的大きな延長という結果が得られたが，この現象を，プロトロンビン（または第Ⅶ因子）以外の減少がない場合，プロトロンビン時間にわずかな延長を生じる程度のプロトロンビン（または第Ⅶ因子）量の減少が，プロトロンビン消費試験の値に大きく反映していると解釈してよいかもしれない．

また，ASA およびサリチル酸の投与では，プロトロンビン時間の延長とプロトロンビン消費試験の短縮傾向という PHBB 投与とは異った結果が得られたが，この場合，プロトロンビン以外の因子の減少の方が大きいためと考えてよいかもしれない．

従って，PHBB と，ASA およびサリチル酸の血液凝固系に対する作用の仕方には違いがあるのではないかと考えられるが，原因については今後検討したい．

ASA，サリチル酸によるプロトロンビン時間については多くの文献があり，特にリウマチ治療のための ASA 投与がプロトロンビン時間を延長させるという報告が多い．[1-4]

Quick ら[7]は健康人に85.7 mg/kg の ASA を6日間投与することによりプロトロンビン時間が12秒から15秒に延長し，出血時間，血小板数，プロトロンビン消費試験には変化はみられなかったとしている．また，12人の健康人に対し 650mg ASA の1回投与を行ったが，プロトロンビン時間に影響はなかったという報告もある．[8]

Link ら[9]はラットに対するサリチル酸の影響を調べているが，低ビタミンK飼料で飼育した場合は10mgの1回投与でプロトロンビンに時間が延長し，普通飼料では100mg でも延長は起きなかったとしている．また，60日連続投与では普通飼料で飼育した場合，100mg/day で軽い低プロトロンビン症をおこす例が少数あったと述べている．

また，Coldwell,[10] Zawidzka[11] の実験でも，ASA 100mg/kg の1回投与，あるいは連続投与を行ったラットでプロトロンビン時間の延長はなかったと報告している．このように，文献値からみても，ASA およびサリチル酸は，人間においても，ラットにおいても単独ではプロトロンビン時間のそれほど大きな延長を起さないとみてよさそうであり，飼料中のビタミンKの濃度が重要な意味を持っているものと思われる．本実験の結果でも，370～388 mg/kg/day の1ケ月投与の投与量は文献よりかなり多かったにもかかわらず，プロトロンビン時間の14～15%程度の延長がみられたにすぎなかった．

要　旨

PHBB, ASA およびサリチル酸の血液凝固系におよぼす影響についてラットを用いて検討を行った．その結果，血液凝固時間には変化が認められなかったが，PHBB の投与によりプロトロンビン時間およびプロトロンビン消費試験の値には延長の傾向がみられ，また，ASA およびサリチル酸の投与では，プロトロンビン時間の延長とプロトロンビン消費試験の短縮の傾向が認められた．この結果から，PHBB と ASA およびサリチル酸では，血液凝固系に対する作用の仕方に違いがあると考えてよいかもしれない．

文　献

1) Rapoport, S., Wing, M. and Guest, G. M. : *Proc. Soc. Experi. Biol. and Med.*, **53**, 40, 1943
2) Fashena, G. J. and Walker, J. N. : *Am. Jr. Dis Child.*, **68**, 369, 1944
3) Owen, G. C, and Bradford, H. A. : *Ann. Intern. Med.*, **25**, 97, 1946
4) Barrow, M. V., Ouick, D. T. and Cunning-ham, R. W. : *Arch. intern. Med.*, **120**, 620, 1967
5) Fausa, O. : *Acta med. scand.*, **188**, 408, 1970
6) 金井泉：臨床検査法提要，1970年度版，金原出版
7) Quick, A. J. and Cleseri, L. : *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **128**, 95, 1960
8) Yochem, D. E. and Roach, D.E.: *Angiology.*, **22** (2), 70, 1971
9) Link. K. L., Overman, R. S., Sullivan, W.R., Huebner, C. F. and Scheel, L. D. : Jr. *Biol. Chemi.*, **147**, 463, 1944
10) Coldwell, B. B. and Zawidzka, Z. : *Blood.*, **32**, 945, 1968
11) Zawidzka, Z. Z., Coldwell, B. B. and Grice, H. C. : *Experientia.*, **28**(12), 1482, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 123-126, 1975

ヘキサクロルベンゼンの雄マウス生殖器官におよぼす影響

大石真之* 平賀興吾*

Effects of Hexachlorobenzene (HCB) on Reproductive Organs of Male Mice

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

ヘキサクロルベンゼン（HCB）は，小麦の殺菌剤や，ゴムの添加剤として広く用いられており，1955—1957年にはトルコにおいて広範囲な中毒事件をひきおこしている.[1]

HCBの毒性は，ポルフィリン症が知られており，その他には光過敏症が主症状である.[2,3]

最近，HCB の環境汚染[4-6]や食品汚染[7-10]が報告され，又，全米科学アカデミー海洋専門部会が，将来予測される海洋汚染物質として，HCB を指定している.[11]

HCB の毒性は偶然の事故によって知られた上記の症状以外，余り知られていないが，最近になり，HCB の胎盤通過性[12]や，催奇形性[13]，優性致死法による変異原性[13]の研究が進められている．しかし塩素系農薬[14,15]で知られている雄性生殖器への影響をみたものはまだなく，その影響が懸念される．そこで今回は HCB の雄性生殖器への影響をマウスを用いて，内分泌系を中心に行った.

実験材料および実験方法

1. 実験動物　当衛生研究所毒性部で生まれた ICR 系雄マウス（生後2ケ月および5ケ月）を用いた．飼育条件は，室温25±1°，湿度50±5％の動物室で，プラスチックケージに各1匹ずつ飼育した．飼料（日本クレアCE—2）および水は自由に摂取させた.

2. 実験に用いた HCB は，東京化成1級試薬（Lot. FBM01）である．テストステロン抽出用のジクロルメタンは，関東化学特級試薬を硫酸洗浄後2回蒸留を行った．その他の試薬はすべて和光純薬特級を使用した.

3. 投与方法　HCB はオリーブ油に溶解し，5mg/kg，25mg/kg，50mg/kg を腹腔より1回投与した．対照群には，同容量のオリーブ油を投与した.

4. 検査方法　マウスは断頭採血後，肉眼的観察を行い，脳，肺，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，睾丸，精嚢の重量を測定した.

白血球数（WBC），赤血球数（RBC），血色素濃度（Hgb），ヘマトクリット（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）を，Coulter Counter Model S で測定した.

睾丸テストステロンの測定は，赤色螢光法[16]に多少の変更を加えて行った.

実験結果はすべて，Smirnoff の棄却検定および Student's *t*-test により推計学的な検討を行った.

実験結果

HCB投与24時間後の各臓器重量（体重比重量）は Table 1 に示した．HCB 25mg/kg 投与群において，肝臓，腎臓重量の増加が認められた．50mg/kg 投与群においては，増加傾向が認められたが，個体差が大きく，有意な差とはなっていない．HCB 投与24時間後の精嚢重量は，HCB の投与量とともに減少傾向がみられ，50mg/kg 投与群では，有意な差が生じていた.

HCB投与5日後の各臓器では，対照群と比べて，特に有意な差を生じたものは認められなかった（Table 2）．解剖時の肉眼的所見では，投与後24時間で，肝臓に，わずかに充血がみられた以外，特に異常は認められなかった.

HCB投与5日後の血液学的検査結果は，50mg/kg 投与群に，白血球数の減少が観察された．その他 RBC，Hgb，Hct，MCV，MCH，MCHC には有意な差はみられなかった（Table 3）.

投与24時間後の睾丸組織中テストステロンは，投与量

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Organ weights[1] 24hr after a single intraperitoneal dose of HCB

Organ	Control	HCB 25mg/kg	HCB 50mg/kg
Brain	1.09±0.03[2]	1.20±0.02	1.11±0.05
Lungs	0.69±0.07	0.64±0.04	0.63±0.02
Heart	0.51±0.02	0.61±0.05	0.57±0.04
Liver	4.71±0.11	5.30±0.23*	5.32±0.35
Kidneys	1.64±0.06	1.87±0.04**	1.81±0.07
Testes	0.79±0.04	0.75±0.02	0.78±0.04
Seminal vesicles	1.14±0.10	1.08±0.10	0.89±0.03*

[1]Organ weights are expressed as a percentage of body weight.
[2]Values given are the mean±SE for 5 rats.
* Values are significantly different from control value at $P<0.05$
** Value is significantly different from control value at $P<0.02$

Table 2. Organ weights[1] 5 days after a single intraperitoneal dose of HCB

Organ	Control	HCB 5mg/kg	HCB 50mg/kg
Brain	1.34±0.039[2]	1.35±0.074	1.39±0.030
Lungs	0.95±0.036	0.85±0.050	0.97±0.064
Heart	0.52±0.024	0.49±0.015	0.53±0.015
Liver	6.38±0.129	6.42±0.136	6.74±0.172
Kidneys	1.77±0.059	1.73±0.041	1.78±0.031
Spleen	0.36±0.026	0.34±0.023	0.34±0.017
Testes	0.74±0.018	0.73±0.054	0.74±0.025
Seminal vesicles	0.57±0.021	0.54±0.029	0.53±0.023

[1]Organ weights are expressed as a percentage of body weight.
[2]Values given are the mean±SE for 7 rats (control and 5mg/kg) or 8 rats (50mg/kg).

Table 3. Hematological values 5 days after a single intraperitoneal dose of HCB

	Control	HCB 5mg/kg	HCB 50mg/kg
WBC ($\times 10^3/mm^3$)	5.19±0.44[1]	5.32±1.05	4.13±0.22*
RBC ($\times 10^6/mm^3$)	8.80±0.22	8.86±0.12	8.76±0.10
Hgb (gm/dl)	16.2±0.24	16.2±0.29	16.6±0.27
Hct (%)	45.4±1.19	44.5±0.70	45.1±0.46
MCV (μ^3)	52.3±0.42	51.7±0.21	52.4±0.46
MCH ($\mu\mu g$)	18.7±0.32	18.8±0.29	19.1±0.21
MCHC (%)	35.8±0.63	36.4±0.58	36.5±0.32

[1]Values are the mean±SE for 7 rats (control and 5mg/kg) or 8 rats (50mg/kg).
* Value is significantly different from control at $P<0.05$.
Abbreviations; WBC: Leucocytes, RBC: Erythrocytes, Hgb: Hemoglobin, Hct: Hematocrit, MCV: Mean corpuscular volume, MCH: Mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration

Table 4. Testicuar testosterone level 24hr and 5 days after a single intraperitoneal dose of HCB

	Testosterone (μg/g)	
	24 hr	5 days
Control	4.53±1.98 (5)	5.09±1.37 (7)
25mg/kg	3.37±1.67 (5)	
50mg/kg	2.48±0.76 (5)	5.87±1.69 (8)

Values given are the mean±SE.
Numbers in parentheses indicates number of observations

の増加に伴い，減少傾向がみられたが，個体差が大きく有意な差とはなっていない．投与5日後には，テストステロン濃度は，対照群とまったく同一レベルであった (Table 4).

考　察

HCBはポルフィリン症をひきおこすことが教科書的[3]によく知られた事実であり，一連の塩素化ベンゼンと同様塩素痤瘡 (chloracne) をひきおこすと思われるため，内科学的，皮膚科学的研究が主に行われており，一般毒性試験はまだ少ない．今回の実験は，HCBを1回投与し，その後の臓器重量，血液学的，内分泌学的検査を行った．

臓器重量についてみると，投与24時間後において，肝臓，腎臓重量の増加がみとめられている．PCB (25mg/kg),[17] 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD, 2.5μg/kg)[17]では，1回投与10日後に肝臓重量の増加が認められており，塩素化芳香族化合物は主に肝臓に障害をおこすものと考えられる．しかし p-dichlorobenzene (PDCB, 50mg/kg) では投与24時間後の肝重量の増加はみられていない．[17]

投与5日後の肝重量は対照群と差はみられないが，これは，HCB 腹腔投与では投与後数時間で肝濃度は最高に達し，24時間で最高時の1/5程度となり，更に7日後には1/13に減少することが知られており，[18] HCBの肝濃度が肝重量に密接な関係を持っているものと考えられる．

TCDD や PCB 投与で明瞭に認められた脂肪肝[17]は，HCB ではみられなかった．

血液学的な検査では，WBC の減少傾向がみられたが，これはベンゼン，γ-BHC 等で知られている芳香族や，塩素化炭化水素特有の変化[19]とも思われるが，マウスを用いての PCB，TCDD[20]では，白血球の減少はみられていない．[17]

RBC は，HCB では有意差はみられないが，TCDD では減少傾向，[17] PCB では増加[17]というように，一定の関係はみられていない．

テストステロン濃度は，24時間後に減少傾向がみられ，精巣重量も減少している．しかしテストステロンの減少と精巣重量の減少に相関があるか否かは不明である．特に TCDD では1回投与 (2.5μg/kg) 10日後にテストステロン濃度の減少が知られている[17]が，精巣重量の減少はみられない．なお，24時間後と5日後で精巣重量に差があるのは，実験に用いたマウスが，2カ月令と5カ月令であり，年令に大きな差のあるためと考えられる．

塩素系農薬の雄性生殖器系におよぼす影響についてはいくつか報告があり，[14,15] その内分泌系への影響が示唆されている．HCB, TCDD でテストステロンレベルの減少がみられたことは，これら塩素系化合物の特徴とも考えられる．なお，HCB 中に TCDD が微量混入しているとの報告[20]がなされており，今回の実験において，TCDD が混入しているか否かは不明であるが，TCDD 単独投与の実験で，微量で (2.5μg/kg) テストステロンを減少させ，肝重量を増加させることを考えると，今回の実験においても，TCDD の影響を否定できない．

以上 HCB の毒性実験はまだ予備的段階を出ていないが，肝，内分泌系への影響があるものと考えられる。更に TCDD の混入の可能性も含めて今後検討を行いたい．

文　献

1) Can, C. and Nigogosyan, G.: *J. Am. Med. Ass.*, 183, 88, 1963
2) Ockner, R. K. and Schmid, R.: *Nature*, 189, 499, 1961
3) Goldstein, A., Aronow, L. and Kolman, S. M.: *Principles of Drug Action*, 453, 1968, Harper and Row, N. Y. 1968
4) Vos, J. G., Breeman, H. A. and Benschop, M.: *Meded. Rijksfaslandbowtench Gent.*, 33, 1263, 1968
5) Holden, A. V.: *Pesticides Monit. J.*, 4, 117,

1970

6) Zitko, V. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 464, 1971

7) Acker, L. and Schutt, E : *Naturwissenshaften*, **57**, 497, 1970

8) Stijve, T. : *Mitt. Geb. Labensmittelunters Hyg.*, **62**, 406, 1971

9) Goursaud, J., Luquet, F. M., Boudier, J. F. and Gosali, : *J. Ind. Aliment. Agr.*, **89**, 31, 1972

10) 森田昌敏他：食衛誌, **16**, 53, 1975

11) The Ocean Affairs Board of National Academy of Science - National Research Council : *Assessing Potential Ocean Pollutants*, 1975

12) Villenuve, D. C. and Hierlihy, S. L. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 489, 1975

13) Khera, K. S. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **12**, 471, 1974

14) Bulington. H and Lindman, V. F. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 48, 1950

15) Welch, R. M., Levin, W. and Conney, A. M. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **14**, 358, 1969

16) 大石真之，影山喜世子，大沢仲昭：日内分泌誌, **49**, 385, 1973

17) 大石真之：未発表データ

18) Morita, M. and Oishi, S. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 313, 1975

19) Report to Council on Drugs : *J. Am. Med. Ass.*, **179**, 888, 1962

20) Villanuev, E. C., Jenning, R. W., Burse, V. W. and Kimbrough, R. D.: *J. Agr. Fd. Chem.*, **22**, 916, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 127-130, 1975

ジ－2－エチルヘキシルフタレート（DEHP）の毒性学的，内分泌学的研究
（1） DEHP腹腔投与時のラット雄性性腺系におよぼす影響

大石真之* 平賀興吾*

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP)
(1) Effects of Daily Intraperitoneal Dose of DEHP on Gonadal Function of Male Rats

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

化学物質の環境汚染や食品汚染が，社会問題となるにつれ，その安全性の研究が重要になりつつある．

従来行われてきた毒性試験法は，一般毒性試験（急性，亜急性，慢性）および特殊毒性試験として，繁殖性，催奇形性，発癌性，変異原性[1-3]が主に行われているが，内分泌学的機能検査は，試験方法が未確立であり，又複雑であるため，ほとんど行われることはなかった．しかし，内分泌器官は生体機能の重要な調節器官であり，それに対する化学物質の影響を検索することは，毒性試験法の一つとして必須であると考えられている．

そこで今回，環境汚染や食品汚染[4,5]が進みつつあるフタール酸エステル類のうち，生産量のもっとも多い，ジ－2－エチルヘキシルフタレート（DEHP）を用いて，内分泌学的な毒性試験法（主に視床下部－脳下垂体－雄性性腺系）の確立のための予備的実験を行ったので報告する．

実験材料および実験方法

1. 実験動物，生後10週令の Wistar-JCL 系成熟雄ラット（体重330—420ｇ）を用いた．飼育条件は SPF 動物室内（室温25±1°，湿度50±5%）で 1ケージに1匹ずつ入れて飼育した．飼料（日本クレアＣＥ-2）および水は自由に摂取させた．なお動物室内の照明は12hr 明，12hr 暗である．

2. 試薬 実験に用いた DEHP は東京化成試薬特級（Lot. AK02）である．又，人絨毛性生殖腺刺激ホルモン（HCG）は，帝国臓器ゴナトロピン(Lot. FD5F1)を用いた．テストステロン抽出用のジクロルメタンは関東化学試薬特級を，硫酸洗浄後２回蒸留して用いた．その他の試薬はすべて和光純薬特級又は精密分析級を用いた．

3. 投与方法および投与期間

DEHP は，毎日午前10時に1.25g/kgを腹腔より投与した．対照群には同容量のオリーブ油を投与した．投与期間は５日間とし，最終投与の24時間後に以下の諸検査を行った．

4. 検査方法

(i) 睾丸静脈血の採血は，ネンブタール（30mg/kg, *ip*, Abbott Lab. U. S. A.）麻酔下ヘパリン 200 Uを投与，全身をヘパリナイズし，10分後に大沢ら[6]の方法により右睾丸静脈より行った．採血後，肝臓，腎臓，睾丸重量を測定した．睾丸静脈血は 3,000rpm，10分間の遠沈により，血漿を分離した．

(ii) HCG 刺激試験 ネンブタール麻酔下，HCG 100 I.U.を左大腿静脈より投与し，15分後に右睾丸静脈より採血を行った．なお採血10分前に右大腿静脈よりヘパリン200Uを投与し全身ヘパリナイズを行った．採血後，

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

肝臓，腎臓，睾丸重量の測定を行った．睾丸静脈血は(i)と同様にして血漿を分離した．

(iii) 睾丸静脈血漿中テストステロンの測定は赤色螢光法[7]に多少の変更を加えて行った（Fig. 1）．本測定法

0.1m*l* of plasma
↓diluted with water to 2ml
↓extracted with 7ml of dichloromethane
↓washed with 1ml of sodium hydroxide
↓washed with water
5m*l* of dichloromethane layer
↓evaporated to dryness under nitrogen gas
↓purified with thin layer chromatography (benzene-ethyl acetate=1：1)
↓testosterone fraction eluted with 3ml of ethanol
↓evaporated to dryness under nitrogen gas
↓1ml of sulfuric acid reagent (sulfuric acid-ethanol=70：30) added to sample
↓heated for 10min at 60°
↓cooled in ice bath
↓diluted with 2ml of ethanol
↓placed at room temperature for 30min
↓red fluorescence determined
exciting wave length 595nm
emission wave length 620nm

Fig. 1 Fluorometry of testosterone in testicular venous plasma

の Precision は変動係数にして14.2, accuracy は85.0±12.2（N=10）であり，感度は，0.001μg であった．

実験結果はすべて，Student's *t*-test により推計学的な検討を行った．

実験結果

1. DEHP 投与群の体重は，対照群と比べてまったく有意な差はみられなかった．

解剖時の肉眼的観察では，右腎臓に水腎症（Hydronephrosis）を発症しているものが，DEHP 投与群で10例中5例，又対照群に10例中2例認められた．更に DEHP 投与群においては，腹水が1例みられた．その他特に異常と思われる症状は認められなかった．

臓器重量（体重比重量）においても，肝臓，腎臓，睾丸のいずれも有意な差は認められなかった（Table 1）．

2. 睾丸静脈血中テストステロン DEHP 投与群において，対照群と比べて睾丸静脈血中テストステロン濃度は，明確な減少傾向がみられた（Table 2）．

3. HCG 負荷試験 DEHP 投与群においては，HCG 100 I.U. を投与した場合，対照群に比して，15分後の睾丸静脈血中に分泌されるテストステロン量が少なく，テストステロン合成分泌の抑制傾向が示唆された（Table 3）．

Table 1 Effect of daily intraperitoneal dose of DEHP for 5 days on organ weights[a] of male rats

	Control	Injected
Liver	4.26±0.17[b] (10)[c]	4.21±0.37 (9)
Kidneys	0.78±0.07 (10)	0.76±0.07 (9)
Testes	0.93±0.09 (10)	0.92±0.09 (9)

a) Organ weights are expressed as percentage of body weight.
b) Values are the mean±SE
c) Numbers in parentheses indicates number of observations.

Table 2 Effect of daily intraperitoneal dose of DEHP for 5 days on testosterne level in testiculor venous plasma of rats

	Testosterone(μg/m*l*)
Control	0.41±0.04[a] (10)[b]
Injected	0.29±0.04* (9)

a) Values are mean±SE
b) Numbers in parentheses indicates number of observations.
* Value is significantly differnt from Control value at $P<0.05$

Table 3 Effect of daily intraperitoneal dose of DEHP for 5 days on testosterone production of rats in response to HCG

	Testosterone (μg/m*l*)
Control	1.36±0.15[a] (7)[b]
Injected	0.96±0.09* (10)

a) Values are the mean±SE
b) Numbers in parentheses indicates number of observations
* Value is significantly different from control value at $P<0.05$

考　察

DEHP を飼料中に1％および2％添加し摂取させた

場合には肝重量の増大がみられることが報告されている[8]が，今回，1.25g/kg/day を5日間腹腔より連続投与した場合に，対照群に比較して特に有意な増大はみられなかった．なお1.25g/kg/day は，飼料中に DEHP を約1.5%添加した場合の1日の摂取量に相当するものと考えられる．DEHP 1.25g/kg *ip* で肝重量の増加がみられなかった事は，今回の実験では成熟ラットを使用した為か，あるいは投与部位の差によるものか明らかでないが，DEHPのLD_{50}は腹腔投与で 50g/kg,[9] 経口投与で 25g/kg[10] とされており，腹腔投与の方がLD_{50}が高く，この原因が，投与部位の差による代謝物の違いによるものとも考えられる．

腎臓では，水腎症がDEHP投与群に5例みられたが，対照群にも2例発生していた．この水腎症がDEHP投与によるものか否か明らかでないが，経口投与でも発生が報告[8]されており，注目すべきであろう．

睾丸に関しては，亜急性,[8,11] 慢性実験[12] において，睾丸萎縮，精細管萎縮が報告されているが，今回の腹腔投与実験では，特に萎縮は認められなかったのは成熟ラットを用いたためと考えられる．

睾丸静脈血中テストステロン濃度は，DEHP投与群で明らかな低下が認められ，HCG投与後も，その上昇率は対照群と比べて抑制されていた．ラットにおいては，HCG100 I.U. 投与で充分最大刺激に達し，テストステロン上昇はHCG投与後15分で最高値に達することが知られて[13]おり，今回の実験で投与したHCGは，量的，時間的に充分テストステロンレベルを上昇させていると考えられる．

HCGは，脳下垂体前葉より分泌される間質細胞刺激ホルモン（ICSH=LH）作用をもち,[14] 睾丸ライディヒ細胞のテストステロン合成系において，コレステロール側鎖切断酵素活性を高め，コレステロールよりプレグネノロンの合成を促進するとされている.[15,16] DEHP 投与群において，テストステロン合成分泌が抑制され，更にHCG投与においても上昇が抑えられるのは，睾丸中のステロイド合成系のうち，酢酸からコレステロール合成に至る系を阻害するよりもむしろ，コレステロールよりテストステロンに至る合成系の阻害が示唆される．

Singh らは，優性致死法により DEHP の腹腔投与が，ラット睾丸において精子形成の初期段階に致死的影響を与えることを報告[17]しているが，テストステロンが精子形成の初期段階に重要な効果をもつ[18,19]ことを考えると，DEHP が精子形成初期段階に阻害効果をもつことは，DEHP の精細管に対する直接作用の可能性とともも，内分泌系を通しての間接作用も示唆される．更にHCGが睾丸内テストステロン合成を促進する為には，まずHCGが睾丸間質細胞（ライディヒ細胞）のレセプターと結合し，アデニルシクラーゼ活性の上昇，サイクリックアデノシンリン酸（cAMP）量の増加が必要とされている.[20-22] 睾丸間質細胞のテストステロンレセプターと結合する物質として，すでに 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDD) が知られている[23]が，DEHP もまず間質細胞のテストステロンレセプターと非拮抗的に結合し，HCGの結合を阻止するために，テストステロン合成の阻害が生じる可能性が考えられる．

更に DEHP の内分泌学的な阻害作用は，睾丸ステロイド合成系以外にも，内分泌中枢である視床下部や下垂体にも作用することが考えられる．

現在までのところ，DEHP の内分泌学的なデータ，特に視床下部－下垂体－性腺系に関する報告は，本報告が唯一のものと考えられるが，DEHP の性腺系に対する影響が示唆されており，今後更に詳細な内分泌学的検討が必要とされるだろう．

文　献

1) Paget, G.E (Ed): *Methods in Toxicology*, 1970, Nankodo, Tokyo
2) Loomis, T. A.: *Essentials of Toxicology*, 2nd Ed., 1974, Lea and Febiger, Philadelphia
3) FAO/WHO: *Technical Report* No 144, 1958
4) Marx, J.L: *Science*, **178**, 46, 1972
5) Taborsky, R.G: *J. Agr. Fd. Chem.* **15**, 1073, 1967
6) 大沢仲昭：日内分泌誌，**46**, 645, 1970
7) 大石真之，平賀興吾，大沢仲昭：日内分泌誌，**51**, 349, 1975
8) 大石真之，平賀興吾：東京衛研年報，**26-2**, 131, 1975
9) Singh, A, R., Lawrence, W.H. and Autian, J: *J. Pham. Sci.*, **61**, 51, 1972
10) Patly, F, A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol 2, 1904, 1967, Interscience, N.Y.
11) Calley, D., Autian, J. and Guess, W.L.: *J. Pharm.* Sci., **55**, 158, 1966
12) Harris, R.S., Hodge, H.C., Maynard, E.A. and Blachet. H.J., Jr.: *A. M. A. Arch. Ind. Health* **13**, 259, 1956
13) 大石真之，影山喜世子，大沢仲昭：日内分泌誌，**50**, 146, 1974
14) Paulson, C.A.: *Textbook of Endocrinology*

4th Ed. (Ed. Williams, R. H.), 416, 1968, Saunders, Philadelphia

15) Forchielli, E., Menon, K. M. J. and Dorfman, R. I.: *The Gonad*. (Ed. Meckerns, K. W), 519, 1969 North-Holland Publishering, Amsterdam

16) Hall, P. F.: *Endocrinology*, 78, 690, 1966

17) Singh, A, R., Lawrence, W. H. and Autian, J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29, 35, 1974

18) Steinberiger, E.: *Physiol. Rev.*, 51, 1, 1971

19) Folman, Y., Sowell, J. G and Eik-Nes, K.B.: *Endocrinology*, 91, 702, 1972

20) Marsh, J. M.: *Progress in Endocrinology*, Intern. Congr. Ser. No. 184, 83, 1969

21) Marsh, J. M.: *J. Biochem. Chem.* 241, 5436, 1966

22) Marsh, J. M.: *Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins* (Ed, Beck. N), 213, 1968, Plenum Press, N. Y.

23) Jarabak, J. and Street, M. A.: *Endocrinology*, 89, 1407, 1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 131-138, 1975

ジ-2-エチルヘキシルフタレート（DEHP）の毒性学的，内分泌学的研究 （2） 飼料中DEHPの雄ラットにおよぼす影響

大石真之* 平賀興吾*

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (2) Effects of DEHP in Diet on Male Rats

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

1970年に Jaeger と Rubin[1] により，ジ-2-エチルヘキシルフタレート（DEHP）を可塑剤として使用したポリ塩化ビニル製血液バッグに貯蔵された血液の輸血を受けた後，死亡した患者の組織中に DEHP の存在が証明され，又，わが国においても，環境[2-6]や食品中[7-9]から DEHP が検出されて以来，DEHP をはじめとするフタール酸エステル類の毒性が懸念されている．

DEHP のラットにおける半数致死量（LD_{50}）は，腹腔投与で 50g/kg,[14] 経口投与で 25g/kg[11] と報告されており，「実用上ほとんど無害」[12] とされている．更に Shaffer ら[13] は，亜急性毒性による実験から，DEHP は 0.2g/kg/day で無害であると結論している．いずれにしても，DEHP の毒性は，他の環境汚染物質や食品添加物等に比しても低いものと考えられている．しかし最近 DEHP の催奇形性[14]や優性致死法による突然変異原性[15]等が示唆されており，フタール酸エステル類の毒性の再検討が必要とされている．

今回は，フタール酸エステル類のうち，もっとも生産量の多い DEHP[16] について，内分泌系を含めた毒性試験を行った．

実験材料および実験方法

1. 実験動物 Wistar-JCL 系雄ラット（日本クレア）を，実験開始1週間前より代謝ケージ（岡崎産業）内で1匹づつ飼育し，特に異常を認めないラットを実験に用いた．実験開始時の平均体重は145.7±5.6g（5週令）であった．動物室内の温度は25±1°，湿度は50±5%であった．

2. 試薬 実験に用いた DEHP は，東京化成特級試薬（Lot. AK02）である．テストステロン抽出用ジクロルメタンは，関東化学特級試薬を硫酸洗浄後，2回蒸留して使用した．17-ケトステロイド（17KS）測定用エタノールは，和光純薬特級を2,4-ジニトロフェニルヒドラジンおよび濃硫酸を加えて還流後，2回蒸留したものを用いた．その他の試薬はすべて和光純薬特級試薬を使用した．

3. 投与方法および投与期間 DEHP を0%（対照群），1%（1%添加群）および2%（2%添加群）添加した粉末飼料（日本クレアCE-2）を10日間自由に摂取させた．飲水も自由に行わせた．

4. 検査方法

(i) 体重，飼料摂取量，飲水量，尿量，糞量を毎日午前9—11時に測定した．

(ii) 実験開始10日後に，ラットを断頭，採血し，各臓器の肉眼的観察を行い，又，心臓，肺，腎臓，肝臓，脾臓，睾丸，前立腺，精嚢については重量を測定した．

(iii) 血液学的検査 血液は，Coulter Counter Model S により次の項目について測定を行った．白血球数（WBC），赤血球数（RBC），血色素濃度（Hgb），ヘマ

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

トクリット（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）.

(iv) 血液生化学的検査　血清は，日立自動分析機M400により，次の項目について測定を行った．総タンパク量（ビュレット法），グルコース（グルコースオキシダーゼ法），尿素窒素（ウレアーゼインドフェノール法），コレステロール（Lieberman-Burchard 法），グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT, Reitman-Frankel 変法），グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素（GOT, Reitman-Frankel 変法），アルカリ性ホスファターゼ（Alp, King-Kind 変法），コリンエステラーゼ（ChE, ΔpH 法）.

(v) 内分泌学的検査　実験開始1日後，および10日後の尿中17KSの測定を，Ryan ら[17]の方法を多少改変して行った.

睾丸組織中のテストステロンの測定は，硫酸赤色螢光法[18]により測定を行った.

実験結果はすべて，Student's t-test により推計学的な検討を行った.

実験結果

1. 体重（Table 1, Fig. 1）　体重の増加は，DEHP 1％添加群で実験開始後2日間わずかに増加抑制傾向がみられた．2％添加群では，投与開始後2日間はほぼ完全に体重増加が抑制されたが，その後は対照群とほとんど同率の増加を示した．屠殺時（10日後）には，2％添加群は対照群に比べ，まだ有意に体重が少なかった（$p<0.02$）.

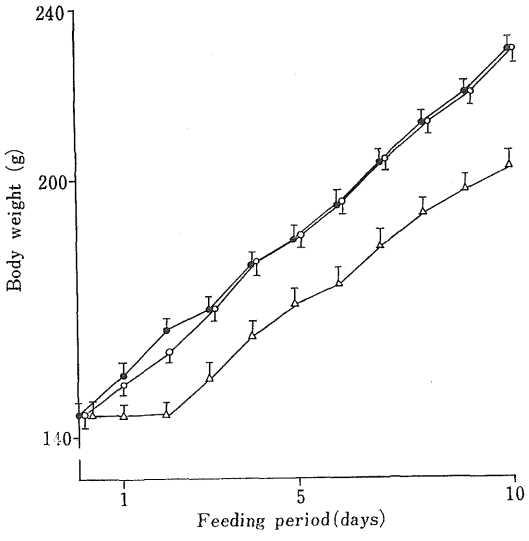


Fig. 1 Changes in body weight of male rats fed DEHP in diet
closed circles: control, open circles: DEHP 1%
triangles: DEHP 2%

2. 飼料摂取量（Table 1, Fig. 2）　飼料摂取量は，投与開始1日後には添加量の増加とともに減少する傾向がみられたが，3日以降は有意な差はみられなかった．しかし2％添加群では，10日後まで飼料摂取量は対照群に比べ低い傾向が認められた.

DEHP の摂取量は，投与1日後で，1％添加群が約1,000mg/kg/day，2％添加群が 1,500mg/kg/day であり，実験終了時には，それぞれ880mg/kg/day, 1,850/kg/day であった.

3. 飲水量（Table 1）　飲水量は1—3日は，2％添加群に増加傾向がみられたが個体差が大きく有意な差とはなっていない．4日以降は各群ともほぼ同量の飲水量であった.

4. 尿量（Table 1, Fig. 3）尿量は，投与1日後では，添加量が増すにつれ増加する傾向がみられ，2％添加群では非常に有意（$p<0.001$）な増加が認められた．2％添加群は2日後もまだ有意に多く，3日後に対照群のレベルに回復した.

5. 糞量（Table 1）　糞量については，各群とも有意な差は認められなかった.

6. 臓器重量（体重比重量）（Table 2）臓器重量は，1％添加群で，肝重量の非常に有意な増加が認められた．2％添加群では，肝重量の増加以外に腎重量の増加，睾丸重量，精嚢重量の減少（あるいは成長抑制）がみられた．なお腎臓については，1％添加群で水腎症（Hydronephrosis）が3例，2％添加群で1例（いずれも右腎）がみられた．対照群では水腎症は1例も認められなかった.

7. 血液学的検査（Table 3）　血液学的検査においては，白血球数のわずかな減少傾向が認められるが，有意な差ではなく，その他については，特に異常は認められなかった.

8. 血液生化学的検査（Table 4）　尿素窒素は添加量とともに増加し，2％添加群では，有意な差をみた．総タンパク量についても，増加傾向がみられ，1％添加群で $p<0.01$, 2％添加群で $p<0.001$のレベルで有意であった．コレステロールは，DEHP の添加量の増加とともに減少し，2％添加群では対照群に比して有意な低値を示した．グルコースについては対照群と DEHP 添加群で差は認められなかった.

酵素活性では，アルカリ性ホスファターゼが，DEHP の添加量とともに上昇し，2％添加群では $p<0.02$のレ

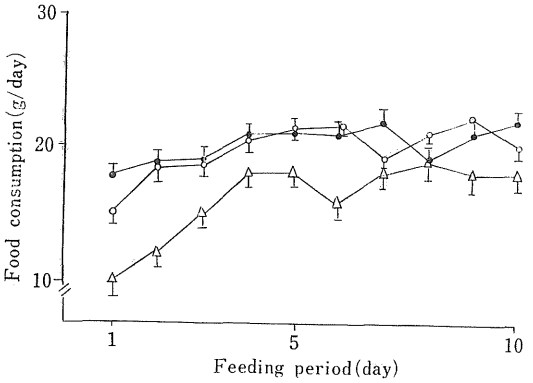


Fig. 2 Food consumption in male rats fed DEHP in diet;
closed circles: control, open circles: DEHP 1%, triangles: DEHP 2%

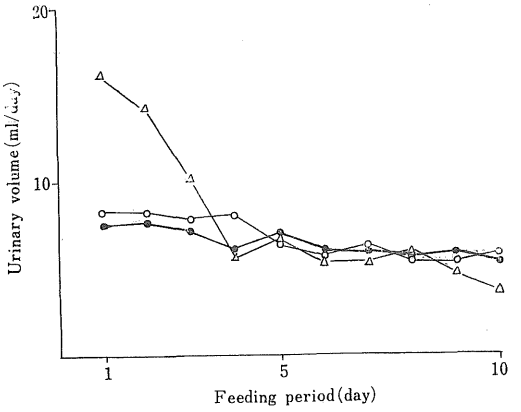


Fig. 3 Urinary volume in male rats fed DEHP in diet;
closed circles: control, open circles: DEHP 1%, triangles: DEHP 2%

Table 1 Food and water consumption, DEHP intake, urinary and fecal excreta, and body weight gain in male rats fed various dietary levels of DEHP for 10 days

	Length of feeding	Dietary level Control	DEHP 1%	DEHP 2%
Food consumption	1	18.4±0.63(8)[a) b)]	15.4±0.60(10)*	10.4±0.92(10)**
(g/24hr)	10	22.6±0.76(10)	23.1±0.77(9)	18.2±1.26(10)
Water consumption	1	23.6±1.52(8)	23.1±1.43(10)	31.3±3.13(10)
(ml/24hr)	10	28.4±1.13(10)	29.8±1.44(10)	26.4±1.23(10)
DEHP intake	1	0	1,003±26.3(10)	1,498± 113(10)
(mg/kg/24hr)	10	0	880±22.0(10)	1,849± 60(9)
Urinary excreta	1	7.48±0.71(10)	8.53±0.91(10)	16.5±2.02(9)**
(ml/24hr)	10	5.02±1.02(9)	5.67±0.87(10)	3.77±1.00(9)
Fecal excreta	1	4.3±0.54(10)	5.0±0.49(10)	3.8±0.82(9)
(g/24hr)	10	7.3±1.01(10)	6.9±0.50(10)	6.2±0.44(10)
Weight gain	1	10.5±1.28(10)	6.7±2.68(10)	1.8±1.58(10)**
(g/24hr)		(106.9±0.93)[c)]	(104.6±1.74)	(101.2±1.17)
	10	8.7±1.23(10)	9.8±0.77(10)	10.5±0.90(10)
		(104.0±0.62)	(104.2±0.32)	(105.1±0.90)

a) Values are the mean±SE.
b) Numbers in parentheses indicates number of observations.
c) Values in parentheses are the rate of increase for 24hr (%).
* Values are significantly different from control value at $p<0.01$
** Values are significantly different from control value at $p<0.001$

Table 2 Organ weights in male rats fed various dietary levels of DEHP for 10 days

Organ	Dietary level Control	DEHP 1%	DEHP 2%
Lungs	0.62±0.025	0.64±0.027	0.64±0.020
Heart	0.34±0.008	0.34±0.008	0.35±0.008
Liver	4.67±0.178	8.37±0.101**	8.90±0.198**
Kidneys	0.94±0.032 a)	1.01±0.019	1.02±0.020*
Spleen	0.33±0.008 a)	0.33±0.014	0.33±0.013
Testes	1.00±0.027	0.97±0.014	0.58±0.039**
Seminal Vesicles	0.09±0.006	0.07±0.006	0.06±0.004**
Ventrol Prostates	0.06±0.005	0.05±0.002	0.04±0.003

Values given are the mean ± SE for 10 rats except where noted (Organ weights are expressed as a percentage of body weight).
a) Values are the mean ± SE for 9 rats.
* Values are significantly different from control at $p<0.05$
** Values are significantly different from control at $p<0.001$

Table 3 Hematological values in male rats fed various dietary levels of DEHP 10 days

	Dietary level Control	DEHP 1%	DEHP 2%
WBC ($\times10^3/mm^3$)	5.48±0.18	4.99±0.23	4.79±0.51
RBC ($\times10^6/mm^3$)	5.88±0.43	5.80±0.05	5.77±0.16
Hgb (gm/dl)	13.8±0.20	13.3±0.21	12.8±0.28
Hct (%)	38.3±0.66	36.0±0.27	35.5±0.81
MCV (μ^3)	61.2±0.49	62.1±0.41	61.6±0.43
MCH ($\mu\mu g$)	22.1±0.24	22.8±0.18	22.7±0.35
MCHC (%)	35.9±0.20	36.6±0.22	36.3±0.19

Values given are the mean±SE for 10 rats.
Abrreviations; WBC : Leucocytes, RBC : Erythrocytes, Hgb : Hemoglobin, Hct : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

ベルで有意に高値を示した．コリンコステーゼは，1％添加群，2％添加群とも，非常に有意に活性の上昇が認められた．GOT，GPTについては異常は認められなかった．

9. 内分泌学的検査 尿中17KSは，DEHP投与1日後に，添加量の増加とともに増大し，1％添加群，2％添加群とも有意差が認められた．又，10日後でも，1％添加群，2％添加群とも有意差がみられた(Table 5)．

睾丸組織中テストステロンは，睾丸1側あたりのテストステロンレベルでは，1％添加群，2％添加群とも，対照群と有意な差は認められないが，組織重量あたりでは，2％添加群に有意な増加がみられた（Table 6)．

考　察

ラットに対するDEHPのLD_{50}は，経口投与では約25 g/kg[11]とされており，今回の実験ではDEHPの1日摂取量は，LD_{50}の3.5％—7.4％に相当していた．

ラットの体重増加におよぼすDEHPの影響は，亜急性実験では，0.75％添加飼料を90日間摂取させると，僅かな成長低下が生じることが報告されている.[13] 今回の実験においては，2％添加群において明らかな体重増加の抑制がみられたが，1％添加群に関しては，ほとんど影響がみられなかった．

DEHP 2％添加群における成長の遅れは，投与開始後数日間の飼料摂取量の減少に起因するものと考えられ

Table 4 Biochemical values of serum in male rats fed various dietary levels of DEHP for 10 days

	Dietary level		
	Control	DEHP 1%	DEHP 2%
Glucose (mg/dl)	144±3.8	146±4.8	148±7.4
Urea nitrogen (mg/dl)	18.0±0.84	20.6±0.84	22.4±0.81***
Total protein (g/dl)	5.37±0.07	5.85±0.13***	5.75±0.18****
Cholesterol (mg/dl)	79.8±3.32	71.5±4.11	69.2±3.30*
GPT (K-U)	33.5±2.40	33.5±1.79	39.4±2.48
GOT (K-U)	129±11.2	106±3.72	116±5.35
Alp (KA-U)	32.0±3.13	44.4±6.59	53.6±7.53**
ChE (ΔpH)	0.15±0.008	0.25±0.02****	0.28±0.02****

Values are the mean±SE for 10 rats
* Values are significantly different from control value at $p<0.05$
** Values are significantly different from control value at $p<0.02$
*** Values are significantly different from control value at $p<0.01$
**** Values are significantly different from control value at $p<0.001$
Abbreviations; GPT : glutamic-pyruvate transaminase, GOT : glutamic-oxalacetic transaminase
Alp : alkaline phosphatase, ChE : cholinesterase

Table 5 Urinary 17-KS in male rats fed various levels of DEHP for 10 days

	Length of feeding	
	1 day (μg/24hr)	10 days (μg/24hr)
Control	91.7±21.6(10)	31.5±4.68(10)
DEHP 1%	162.7±22.7(10)*	150.1±31.6(10)**
DEHP 2%	262.4±30.0(9)***	169.1±38.6(8)***

Values are the mean±SE.
Numbers in parentheses indicates number of observations.
* Values are significantly different from control value at $p<0.05$
** Values are significantly different from control value at $p<0.01$
*** Values are significantly different from control value at $p<0.001$

Table 6 Testicular testosterone levels in male rats fed various dietary levels of DEHP for 10 days

	Testosterone level	
	μg/testis	μg/g·tissue
	a), b)	
Control	0.159±0.020(9)	0.150±0.020(8)
DEHP 1%	0.180±0.025(10)	0.160±0.025(10)
DEHP 2%	0.166±0.015(10)	0.307±0.048(10)*

a) Values are the mean±SE.
b) Numbers in parentheses indicates number of observations.
* Values are significantly different from control value at $p<0.02$

る．4日以後飼料摂取量が増加するとともに，体重増加率は対照群とほぼ同率に回復している．

Harris ら[19]は，DEHP 0.5%添加飼料を長期に摂取させると，1年後には対照群と比べ50gの差を生じることを報告している．このことは，DEHPは長期にわたり摂取した場合，短期投与で影響のない1%以下の濃度でも成長阻害をおこすことを示唆している．

DEHPを経口的に投与した場合の尿量増加については，まだ報告がないが，DEHP 飽和食塩水を静脈投与することにより顕著な利尿効果の生じることが認められている．[20] しかし DEHPを腹腔投与した場合には，抗利尿作用をもつことが示唆されており，[20] DEHPの利尿作用に関しては，投与部位，投与条件に大きく影響をうけるものと考えられる．

経口投与による尿量増加の機構については，現在のところまったく不明であるが，尿中17KSの増加より副腎機能の亢進が考えられ，それにともなう多飲多尿，又は下垂体後葉－腎臓系等内分泌系の異常に基づく可能性が考えられる．

飲水量の増加は，利尿作用による副次的なものと考えられる．

DEHPの臓器重量におよぼす影響は，多くの薬物や脂溶性化学物質でしばしば観察される肝重量の増加[10,42,43]の他，腎臓，睾丸，精嚢に顕著であった．

肝臓では，雌ラットで1g/kg/day を3週間投与しても，有意な差はないとされている[21]が，今回の雄の実験では1%添加群（約1g/kg/day）で明らかな重量増加がみられた．又，最近，0.5g/kg/day 投与でも肝の肥大が報告されている．[22]

DEHP投与を中止すると，1週間で肝重量の肥大回復が報告されており，[21] 又 Harris[19] らは0.5%添加飼料を摂取させると，初期に肝重量の増加がみられるが，1年後には対照群との差はなくなることを報告している。これらのことより，肝重量の増加は一時的な代償性肥大とも考えられる．しかし，コレステロールの減少，尿素窒素，総タンパク量の上昇，Alp の上昇より肝実質の障害[30]が生じているものと考えられる．

DEHPの腎重量の変化におよぼす影響は，肝臓より弱いと思われるが，水腎症が，1%および2%添加群合計で4例みられ，腹腔投与の際にも水腎症が認められている[23]ことは注目すべきであろう．水腎症が右腎にのみ発生することは，右側尿管が背部の ileo-lumber の血管と腹部の精嚢血管の間に存在し，これによって圧迫されたためと考えられ，精嚢重量の減少が生じていることからも，DEHP がこれらの臓器に何らかの影響を与えているものと思われる．更にコリンエステラーゼの活性上昇がみられたことは，腎機能の異常によるもの[24,25]とも考えられる．

DEHPの経口投与による睾丸萎縮の報告は，ラットでは2.5g/kg/day で生じることが報告されている[22]以外亜急性レベルではほとんどなく，又，マウスでもCalley ら[26]が250mg/kg/day を6週間腹腔投与で生じることを報告しているにすぎない．慢性実験では，0.5%投与2年後に，一時的な病巣萎縮が1例報告されている．[19]

今回の実験では，2%添加群でほ全例に睾丸萎縮が認められた．これは投与開始後数日間の飼料摂取量減少による亜急性飢餓による萎縮[41]とは考えられず，DEHPの作用によるものと思われる．同時に測定した睾丸組織中テストテロンの減少がみられないことより，この萎縮は睾丸組織の90%[39]を占める精細管の萎縮が主であり，ホルモン産生細胞であるライディヒの間質細胞の減少は少ないものと考えられる．このことは組織重量あたりのテストステロン濃度が有意に上昇していることからも示唆されている．

しかし腹腔投与による実験では，睾丸静脈血中テストステロン濃度の減少が認められており，[23] 今回も前立腺重量，精嚢重量の減少傾向が認められたことから，睾丸組織の変性，損傷により間質細胞からのテストステロン分泌が合成に平衡して行われず血中テストステロンレベルの低下が考えられる．

更に，前立腺や精嚢重量の減少をおこす原因として，テストステロンの活性型[27,28]といわれる5α-ジヒドロテストステロン（5α-DHT）へのテストステロンからの転換阻害や，テストステロンキャリアタンパクへのの結合，[29] 又は副生殖器のテストステロンレセプターとDEHPの結合[40]等による不活性化が考えられる．

血清酵素に関しては，DEHP を5ml/kg/day を3週間経口投与した場合，GOT，GPT，Alp に異常がないことが報告されている．[21] 今回もGOT，GPTの上昇はみられなかったが，Alpは有意に上昇が観察された．なお最近 DEHP 0.5g/kg/day で Alp，尿素窒素の上昇が報告されている．[22] 肝重量の増加にもかかわらずGOP，GPT活性の上昇がみられないことは，DEHPは四塩化炭素等による肝障害にともなうGOT上昇[44]とは，肝障害の機構が異なることによるものか，あるいは，GOT，GPTは肝細胞の変性壊死の正常化に先行して酵素活性が正常化[31]したためと考えられる．

尿中17KSは投与直後より，1%，2%添加群とも著明に上昇し，10日後もなお高値を示している．尿中17KSの70—90%[32,33]は副腎性アンドロゲンに由来するとい

われ，副腎機能の良い指標である．Selye[34] 以来ストレス性刺激による副腎機能の亢進はよく知られているが，DEHP 投与による 17K S 上昇は肝臓や睾丸等の組織損傷ストレスによる副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）分泌，副腎コルチコイド上昇，副腎アンドロゲン上昇[35,36]に起因するものと考えられる．又，コレステロール減少，白血球数減少の傾向も考えると，DEHP 投与による消耗性ストレス[37]も相当大きいと思われる．なお対照群で，17K S の値が実験終了時に，開始時より低値なのは age dependent な変化[38]と思われる．

以上のごとく DEHP の毒性は従来考えられているよりもかなり強いと思われ，特に，下垂体，副腎，性腺系への影響が憂慮される。今後 DEHP を含めて，化学物質の毒性試験にほとんど行われることのなかった内分泌学的な見地からの検討が必要であろう．

謝辞　血液学的，血液生化学的検査に御協力をいただいた福田向江さんに感謝致します．

文　献

1) Jaeger, R. J. and Rubin, R. J: *Science*, **170**, 460, 1970
2) 片瀬隆雄：工業用水，**19**, 168, 1972
3) 喜田村正次ら：日衛誌，**28**, 128, 1973
4) 小川恒彦ら：日本海水学会，松山，1974
5) 脇本忠明ら：日本海洋学会，東京，1974
6) 立川涼ら：日本農芸化学会，東京，1974
7) 森田昌敏，中村弘，三村秀一：東京衛研年報，**24**, 357, 1972
8) 勝村馨ら：日本分析化学会，福岡，1973
9) 佐藤英二：日本薬学会，仙台，1974
10) Goldberg, L.: *Proceedings of European Society for the Study of Drug Toxicity*, Vol. Ⅶ, 171, 1966, Excerpta Medica, Amsterdam
11) Patty F. A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol. II, 1904, 1967, Interscience, N.Y.
12) Gleason, M. N., Gosselin, R. E., Hodge, H. C., and Smith, R. P.: *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 3rd Ed., 4, 1969, The William and Willkins Co., Baltimore
13) Shaffer, C. B., Carpenter, C. P., and Smyth, H. F., Jr.: *Arch. Indust. Hyg. Occupational Med.*, **8**, 219, 1953
14) Singh, A, R., Lawrence, W. H., and Autian, J.: *J. Pharm. Sci.*, **61**, 51, 1972
15) Singh A. R., Lawrence, W. H., and Autian, J.: *Toxicol, Appl. pharmacol.*, **29**, 35, 1974
16) 通産省化学工業年報
17) Ryan, W. T., Ferro, W. F., and Beyler, A. L.: *Clin. Chem.*, **10**, 191, 1964
18) 大石真之，影山喜世子，大沢仲昭：日内分泌誌，**49**, 385, 1973
19) Harris, R. S., Hodge, H. C., Maynard, E.A.. and Blanchet, H. J., Jr.,: *A. M. A. Arch, Ind. Health*, **13**, 259, 1956
20) Dillingham, E. O. and Pesh-Iman : unpublished data
21) 山田明男，谷口繁，上田重雄：日薬理誌，**65**, 180, 1969
22) 山田直樹，日衛誌，**29**, 178, 1974
23) 大石真之，平賀興吾：東京衛研年報，**26-2**, 127, 1975
24) Kunkel, H. G. and Ward, S. M.: *J. Exp. Med.*, **86**, 325, 1947
25) Varhaus, L. J. and Kark, R. M. : *Am. J. Med.*, **86**, 325, 1947
26) Calley, D., Autian, J. and Guess, W. L.: *J. Pharm. Sci.*, **55**, 158, 1966
27) Anderson, K. M. and Liao, S.: *Nature*, **219**, 277, 1968
28) Liao, S. and Willams-Ashman, H. G. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1956, 1962
29) 佐々木望：ホルモンと臨床，**18**, 666, 1970
30) Epstein, E. Z. and Green: *Arch. Int. Med.*, **58**, 860, 1936
31) 山村雄一：病理生化学，35, 1971, 岩波書店
32) Paulson, C. A.: *Textbook of Endocrinology* (Ed. Williams, R. H.), 416, 1968, Saunders, Philadelphia
33) 井林博：日内分泌誌，**44**, 858, 1968
34) Selye, H: *Perspect. Biol. Med.*, **2**, 403, 1959
35) Franeson, C. L. and Gemzell, C. A.: *J. Clin Endocr. Met*, **14**, 608, 1954
36) Bliss, E. L., Migeon, C. J., Eik-Nes, K., Sandberg, A. A. and Samuels, L. T.: *Metabolism*, **3**, 493, 1954
37) Walker, W. J., Lawry, E. Y., Love, D. E., Mann, G. V., Levine, S. A. and Stare, F. T. : *Am. J. Med.*, **14**, 654, 1953
38) 大沢仲昭：臨床病理，**10**, 487, 1974
39) Eguch, Y: *Endocrinology*, **96**, 504, 1975
40) Jarabak, J. and Street, M. A.: *Endocrinolo-*

gy, 89, 1407, 1971

41) Zbinden, G : *Advances in Pharmacology*, (Ed. Garattini, S. and Shore, P. A.) 1, 1963, Acad. Press. N. Y.

42) Kuntz, W., Schaude, G., Schimassek, H., Schmid, W. and Siess, M. : *Proceedings of European Society for the Study of Drug Toxicity*. (Ed. Alcock, S. J., Baker, C., Scoff, A. L. and Tucker, M. J.) 138, 1966, Excerpta Medica, Amsterdam

43) Platt, G. L., Rogers, L. A. and Fouts, J. R. : *Biochem. Pharmacol.* 16, 2257, 1967

44) Klinger, W. : *Experimental Model Systems in Toxicology and Their Significance in Man* (Ed, Duncan, W. A. M.), 283, 1974, Excerpta Medica, Amsterdam

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 139-142, 1975

四塩化炭素肝障害におけるリソゾーム酵素と血清酵素の変化について

中川好男* 福田向江* 坂本義光*
平賀興吾*

Changes in Lysosomal and Serum Enzymes in Experimental Hepatic Injury by Carbon Tetrachloride

YOSHIO NAKAGAWA*, HISAE FUKUDA*,
YOSHIMITSU SAKAMOTO* and KOGO HIRAGA*

緒　論

四塩化炭素は肝特異性の高い毒物であり，今までその作用機序については多数の病理組織学的，血清生化学的および細胞生化学的報告がなされているが，毒性の根源的な作用機序については今だ完全に解明されていない．今回の実験は四塩化炭素を投与したラットの血清生化学的変化を経時的に分析し，雌雄におよぼす影響について検討した．また四塩化炭素などによる肝壊死の開始には，各種の水解酵素を含有する細胞内顆粒つまりリソゾームの傷害が重大な役割を演じているといわれている.[1] そこでリソゾームの指標酵素の一つである酸性フォスファターゼ活性を経時的に測定し，四塩化炭素によるリソゾームへの影響を血清生化学的変化と合わせて検討した．

実験材料および方法

実験動物；動物は8週令の雌雄ＪＣＬ－ＳＤ系ラットを使用した．ラットは室温25±1°，湿度50±５％の環境下に一群５匹ずつ同一ケージで飼育し，飼料と飲料水は自由に摂取させた．

実験処置；四塩化炭素はオリーブ油で50％溶液にした後，0.2ml/kg B.W. の用量でラットの腹腔内に一度だけ注射した．また対照群のラットにはオリーブ油を同じ用量で注射した．投与後，ラットは１，４，８，24，48，72および168時間後に以下の実験に供した．

血清および肝ホモジネートの調製；血清は動物を断首した時放出する血液を遠沈管に分取し，室温で凝血後，3000rpm，4°，10分間遠心分離して得た．血清は分析の直前まで－50° で凍結保存した．肝ホモジネートは雄ラットの肝のみを用いて調製した．操作はすべて4°以下で行なった．肝は秤量後，鋏で破砕した．これに５倍容の0.25M蔗糖を加え，ポーター型ホモジナイザー（clearance 0.13mm）で1200rpm ３回上下してホモジナイズした．このホモジネートはナイロン布で沪過後，同蔗糖溶液を加えて10％に定容した．

血清生化学試験；血清は自動分析装置（日立M—400型）を用いて，次の７成分について分析した．ａ）トランスアミナーゼ（ＧＯＴおよびＧＰＴ）は Reitman-Frankel 変法，ｂ）アルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）は Kind-King 変法，ｃ）総タンパク質（ＴＰ）は Biuret 法，ｄ）グルコース（ＧＬＵ）は Glucose-Oxidase 変法，ｅ）総コレステロール（ＣＨＯ）は Liebermann-Burchard 法，ｆ）尿素窒素（ＵＮ）は Urease-Indophenol 法を各々用いて定量した.[2]

酸性フォスファターゼ活性の測定；肝ホモジネートの酸性フォスファターゼ活性は p-nitrophenyl-phosphate を基質として Bessey らの方法を若干改変して測定した.[3] 酸性フォスファターゼ活性は二つの操作で測定した．一つはホモジネートの酵素活性を0.1％ Triton X-100 の存在下で測定したものを全活性（total activity）とした．他方は Triton 非存在下，等張の条件下で測定した酵素活性を遊離活性（free activity）とした．反応はいずれも0.25M蔗糖を含む1/10M酢酸緩衝液（pH4.7）で行なった．なお全活性に対する遊離活性の比率（酵素遊離率）をもってリソゾーム傷害度の指標とした．

肝タンパク質の測定；タンパク質は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法を用いて測定した.[4]

結　果

血清生化学試験；四塩化炭素投与後の血清成分の経時的変動については，Table 1 および２に示した．血清

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1 Serum enzyme levels at various intervals after intraperitoneal administration of carbon tetrachloride in male and female rats.

Hours after CCl_4	GOT (U/m*l*)		GPT (U/m*l*)		ALP (U/d*l*)	
	male	female	male	female	male	female
Control (12)[a]	144±33	128±15	43±7	33±6	59±12	45±15
1 (5)	300±108*	319±24*	79±37*	71±14*	51±4	39±11
4 (5)	696±114*	478±66*	202±68*	179±51*	40±7*	39±11
8 (4)	1281±213*	1061±102*	515±71*	419±75*	53±16	35±12
24 (4)	911±511*	2462±103*	457±263*	634±139*	46±17	23±2*
48 (4)	622±261*	289±232	301±95*	173±130*	49±14	30±5
72 (4)	265±73*	130±9	208±84*	42±9	62±13	37±7
168 (4)	119±20	121±10	32±7	33±10	38±3*	46±12

Each value represents the mean ± SD
a) No. of rats examined * $P<0.01$ as compared to control groups

Table 2 Serum component levels at various intervals after intraperitoneal administration of carbon tetrachloride in male and female rats.

Hours after CCl_4	TP (g/d*l*)		GLU (mg/d*l*)		CHO (mg/d*l*)		UN (mg/d*l*)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
Control	7.0±0.8	7.1±0.7	171±19	166±20	83±10	73±9	19±4	17±3
1	5.7±0.6*	6.1±0.4*	215±63*	188±19*	58±14**	56±8**	23±5	20±3
4	5.6±0.3*	6.9±1.0	145±14*	187±24	48±6**	51±6**	29±6**	23±3**
8	6.2±0.8	6.7±1.2	135±27**	140±20*	26±3**	32±6**	33±11**	22±8
24	5.9±0.6*	6.2±0.3*	131±8**	103±30**	61±19**	58±12*	18±2	21±2*
48	6.3±0.6	6.8±0.9	155±8	171±13	92±10	73±15	19±5	17±5
72	6.9±0.4	6.4±1.5	166±20	155±15	115±22	68±11	16±3	13±3**
168	7.4±0.5	7.7±0.5	164±12	153±5	119±40*	81±20	18±1	22±2*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

中のＧＯＴとＧＰＴ活性は，雌雄ラットとも投与１時間後に有意な上昇を示した．雄ではその両活性が投与８時間後に最高値を示し，72時間後まで有意な高値を示した．これに対し雌での両酵素活性は，投与24時間後に最高値を示し，72時間後には対照群のレベルに戻った．ＡＬＰ活性はＧＯＴ，ＧＰＴ活性に比べ継続的な変化を示さなかった．雌雄ラットの血清ＴＰ，ＧＬＵ，ＣＨＯおよびＵＮは投与後24時間以内において顕著な変動を示した．ＴＰは，投与24時間後まで減少の傾向を示したが，以後対照群のレベルに戻った．ＧＬＵは投与１時間後に一過性に上昇したが，その後減少し，24時間後まで低値を示し，48時間以後対照群のレベルに戻った．ＣＨＯは投与１時間後から減少し，８時間後に最低値を示した後，48時間後に対照群のレベルに戻った．ＵＮは投与後上昇する傾向を示した．

酸性フォスファターゼ活性；四塩化炭素投与後の肝酸性フォスファターゼ活性の経時的変化を，Fig. 2に示した．処置群の全活性は投与24時間後に有意に減少した．また遊離活性は投与１時間後，有意な上昇を示した．全活性に対する遊離活性の百分率（遊離率）を Fig. 3 に示した．その結果，処置群の酸性フォスファターゼの遊離率は，投与４時間以後対照群に比べ上昇する傾向を示した．なお処置群の肝重量および肝タンパク量は，期間中対照群と差がなかった．（Fig. 1）

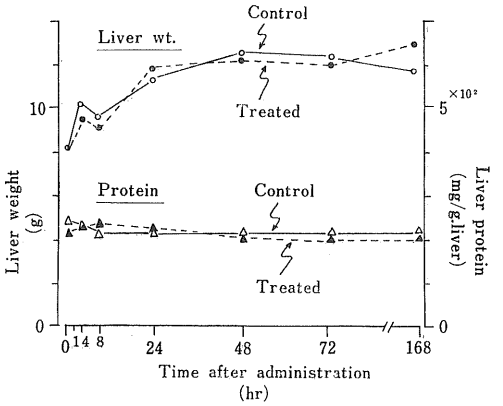


Fig 1. Effects of administration of carbon tetrachloride on liver weight and protein in male rats. Each point represents the average of two or more experiments.

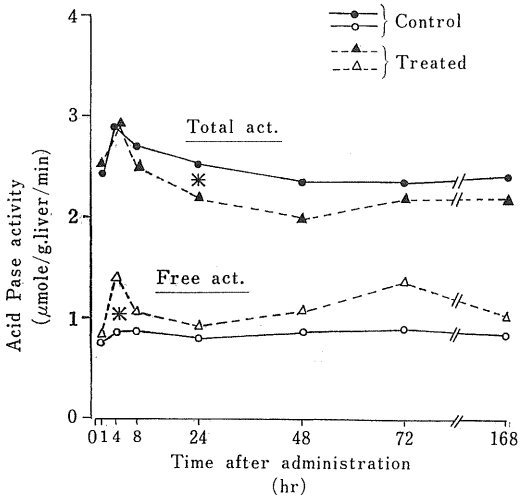


Fig 2. Acid phosphatase activities after administration of carbon tetrachloride to male rats. Each point represents the average of two or more experiments. * $P<0.01$

考　　察

四塩化炭素投与により肝が急性の肝障害を起こし，それに伴って血中にGOTやGPTなどの肝特異性の高い酵素活性が増加することについては多くの報告がある.[5-7] 肝障害の臨床的な指標酵素であるGOTとGPTは，肝細胞でミトコンドリア分画と上清分画の2ケ所に局在するアイソザイムから成っている.[8] ここで用いた両酵素活性の測定法は Reitman-Frakel 法であるため，その測定の対照は上清分画に由来した酵素活性を示している.[9] 四塩化炭素投与1時間後，雌雄ラットのGOTとGPT活性は同時に上昇したが，その後の経時的な挙動に雌雄差が認められた．雄の酵素活性は雌より早く最高値を示したが，雌の方が早く対照群のレベルに戻った．これは四塩化炭素処置により，肝上清酵素の血中への逸脱，あるいは本質的な肝壊死の程度に雌雄差があることを示すものと思われるが，これについてはさらに組織学的な観察が必要であろう．

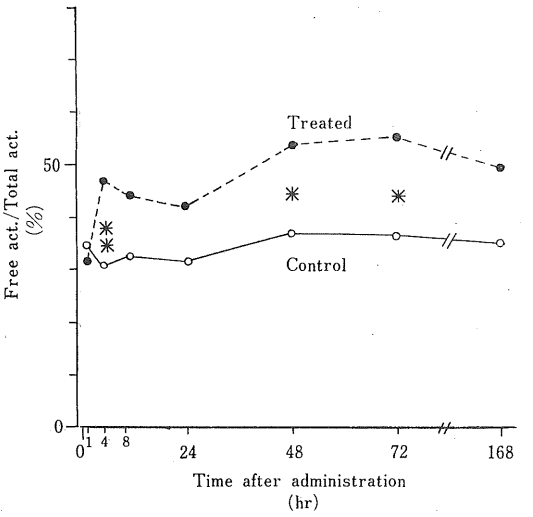


Fig 3. Acid phosphatase activities after administration of carbon tetrachloride to male rats.

Each point represents the average of two or more experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

血清中のTP，GLU，CHO，およびUNは四化炭素投与1時間後から24時間後において顕著な変化を示したが，各成分の経時的な挙動は雌雄とも同様の傾向を示した．四塩化炭素が肝のタンパク質の生合成阻害や脂質の蓄積など細胞レベルにおいてさまざまに影響することが知られている.[10,11] また肝は血清中のTP，GLU，CHO，UNなどの合成部位や調節部位に重要な役割りを演じているが，四塩化炭素による肝障害の結果，血清中のこれらの成分に影響が現われたものと思われる．しかし，雄ラットだけを分析した結果ではあるが，肝タンパク量と肝重量には対照群との間に差は認められなかった．

de Duve らは肝細胞に多数の加水分解酵素を含有する顆粒つまり lysosome が存在することを発見した．このリソゾームの傷害が細胞壊死の開始に重大な役割を演じていることが Beaufay らにより提唱された．[1] Slater らは四塩化炭素投与後リソゾーム酵素の遊離型／結合型の比率が上昇することを認めた．[13] 一般にリソゾーム酵素の遊離型／結合型の比率は，リソゾーム膜の傷害度の指標とされている．今回の実験ではリソゾームの指標酵素として酸性フォスファターゼを選び，ホモジネート中の全活性と遊離活性を測定し，全活性に対する遊離活性の比率(遊離率)を求めそれをリソゾーム膜の傷害度とした．四塩化炭素投与4時間以後処置ラットの遊離活性が上昇し，逆に全活性は減少する傾向を示した．その結果酸性フォスファターゼの遊離率は上昇を示し，投与72時間までその傾向が続いた．特に投与4時間後に遊離活性が急に上昇したが，これは血清GOT，GPT活性の上昇後であった．このことは投与後初期における肝上清分画中のGOT，GPTの血中への逸脱に，リソゾームが直接関与していないことを示唆すると思われる．また四塩化炭素による肝リソゾームの傷害は血清GOTやGPTの上昇期間と並行して継続したが，酸性フォスファターゼの遊離率はこれらの両酵素の経時的な推移と相関しなかった．四塩化炭素は投与後すみやかに核，ミトコンドリア，ミクロソームなどの細胞内顆粒にも作用しその生理機能を乱すことが知られており，[14-16] 細胞壊死とリソゾームの傷害とを一次的に結びつけることはむずかしく，さらに詳細な研究が必要とされる．

結　語

四塩化炭素肝障害における血清生化学的変化と肝リソゾーム酵素の挙動について，雌雄ラットを用いて検討した．

文　献

1) Beaufay, H., van Campenhout, E. and de Duve, C.: *Biochem. J.*, **73**, 617, 1959

2) 斎藤正行，北村元仕，丹羽正治：臨床化学分析Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，東京化学同人

3) Bessey,O.A., Lowry,O.H. and Brock,M.J.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 321, 1946

4) Lowry,O.H., Rosebrough,N., Farr,A. and Randall,P.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 267, 1951

5) Cameron,G.R. and Karunaratne,W.A.E.: *J. Pathol. Bacteriol.*, **42**, 1, 1936

6) Korsud, G. O., Grice, H. C. and Mc Laughlan, J. M.: *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **22**, 474, 1972

7) Zmmerman, H. J., Kodera, Y. and West, M.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **66**, 315, 1965

8) Fleisher,G.A., potter,C.S., Wakim,K.G., Pankow,M. and Oskone,D.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **103**, 229, 1960

9) Boyd,J.W.: *Biochem. J.* **81**, 434, 1961

10) Smuckler,E.A., Iseri, O.A. and Beneditt, E.P.: *Res. Commun.*, **5**, 270, 1961

11) Recknagel,R.O., Lombaride,B. and Schotz,M. C.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **104**, 608, 1960

12) de Duve,C., Pressman,B.C., Gianetto,R., Wa Hiaux,R. and Appelmans.: *Biochem. J.*, **60**, 604, 1955

13) Slater,T.F. and Greenbaum,A.J.: *Biochem. J.*, **98** 484, 1965

14) Roschlau,G.; *Arch. Pathol. Anat. U. Physiol. Virchow's.*, **336**, 122, 1962

15) Oberling,C.H. and Rouiller,O.H.: *Ann. Anat. Pathol.*, **1**, 401, 1956

16) Chritie,G.S. and Judah,J.D.: *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, **142**, 241, 1954

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 143-147, 1975

馬腎臓髄質外帯 Na, K-ATPaseの純化

長井二三子* 厚井麻里* 中尾順子*

Purification of Na,K-ATPase from Outer Medulla of Horse Kidney

FUMIKO NAGAI*, MARI KOI* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

細胞膜に存在し，細胞膜内外の Na^+ と K^+ の能動輸送を行っている Na,K-ATPase は細胞膜の構成成分をなしている．最近ホルモンや薬物，毒物の受容体が細胞膜に存在するという証拠が蓄積されつつあり，毒物が細胞膜に作用することによって障害が発現することも示されている．[1] 膜に存在する酵素の代表として Na,K-ATPase を取り上げ，この酵素に対する毒物の作用から毒物の細胞膜障害を推定することは毒性発現機序解明のために有用な方法であると考える．[2-5] しかし細胞膜が不溶性であることなどのために Na,K-ATPase の純化は非常に困難である．中尾ら[6,7]はブタ脳ミクロソームの NaI 処理酵素をルブロールで可溶化し，アミノエチルセルローズによるカラムクロマトグラフィーで最高比活性 7,000 μ mole pi/mg protein/hour（以下単位は省略する）という標品を得ている．しかし少量しかできないこと，活性が不安定なことなどの欠点があり，純化した酵素の性質を調べるためには大量に得る方法を工夫する必要がある．Skou,[8] Jørgensen[9] らはウサギ，羊，モルモットの腎臓髄質外帯から，Kyte,[10] Schwartz[11] は犬腎臓髄質から比活性 1,500 程度の Na,K-ATPase を得ている．著者らはウサギ，犬と形態が類似しており，髄質外帯を切り出しやすく，また大量処理に都合のよい馬腎臓を用いて Na,K-ATPase の純化を試み，比較的簡単な操作でウアバイン非感受性酵素をほとんど含まない比活性 2,000 程度の標品を得ることができた．これは先に中尾ら[7]が報告した標品に比活性ではおよばないが，安定性があり，比活性 1,000 程度のものは数ケ月間70%以上の活性を保っていた．また他の腎臓から得た標品[8-11]と違い，この標品は可溶化したものである．

実験方法

ATP-2Na は協和発酵製，ルブロールWXは General Biochemicals 社のものを中尾ら[6]の方法で処理して使用した．フォスフォセルローズ（以下P－セルローズと略す）は Whatman P 1 を使用した．馬腎臓は多摩食肉検査所八王子出張所の好意により屠殺放血後新鮮なものを採り出し－80° に保存し，実験に供した．実験に使った水はヤマト科学オートスチールWA 715 の装置で作った Pure Water をさらに藤原製作所石英二段蒸留装置で再蒸留して得た．

Na,K-ATPaseの活性は中尾ら[6]の方法により140mM 塩化ナトリウム，14mM塩化カリウム，5 mM塩化マグネシウム，3 mM ATP，50mM イミダゾール塩酸 pH 7.1を含む0.5m*l*酵素液とし，37°,5分または10分で遊離してくる無機リン酸を Fiske-SubbaRow 法[12]で測定した．ただしルブロール抽出酵素とP- セルローズ処理酵素は Fiske-SubbaRow 法[12]を行う前に10%重亜硫酸ソーダを含む4%ルブロール液を 0.05m*l* 加えた．タンパク測定は Lowry 法[13]により行った．

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber らの方法により 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略す），7.5%アクリルアミド，0.16%ビスメチレンアクリルアミドのゲルを使い2%SDSで処理したタンパク溶液を泳動し，クマジーブリリアントブルーで染色した．デンシトメトリーにはクロモスキャン 200 を使用した。

ミクロソームの調整は －80° に凍結保存した腎臓を融解し，うすいスライスにして髄質外帯（皮質と髄質の間の血管の多い暗赤色の層）を切り出し，ハサミで細くきざみ，9倍量の 0.32M シュクロース，5 mMトリスEDTA pH7.4 を加えてキネマティカ社製ポリトロンで

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

4.5の目盛に合わせ60秒ずつ2回破砕した(途中で冷却するために30秒とめる). 次にその液をテフロンホモジナイザーでペッスルを5回程度上下させてホモジナイズし, フランネルでろ過し, ろ液をソーバルSS-34ローターで5,400rpm15分遠心した. 上清をSS-34ローターで16,000rpm 35分遠心し, 沈殿を1mMトリスEDTA pH 7.4 に懸濁しミクロソームフラクションとした. ミクロソームの調整はすべて0°から4°の間で操作した.

NaI処理は中尾[6,15]らの方法に準拠し, 次のように改変した. ミクロソームを室温で2mg/mlタンパク濃度, 2Mヨウ化ナトリウム, 5mMトリスEDTA, 40mMトリス塩酸 pH8.0液にし, ベックマン 60Ti ローターで 50,000rpm 10°～20° で60分 遠心し遊離物を集め水に懸濁した. 次に 4°, 40,000rpm 15分3回洗浄し1mMトリス EDTApH7.4 に懸濁し NaI処理酵素とした.

ルブロール抽出は次のようにした. NaI酵素を4mg/mlタンパク, 4mg/mlルブロール, 17mMイミダゾール塩酸, 0.7mM EDTApH6.9にし, アイスバス中で時々攪拌しながら30分放置しベックマン40Aのローターで4°, 40,000rpm 60分遠心した. 沈殿を水に懸濁し同じように遠心してイオン, ルブロールを除去したあと今度はイオンを加えないで4mg/mlタンパク濃度とし0°, 20分放置し, ベックマン40Aローターで40,000rpm42分遠心, 上清を採集した. イオン存在中でのルブロール抽出液をルブロール抽出酵素(1), 2回目のイオンを加えないで抽出した液をルブロール抽出酵素(2)とした.

P-セルローズ処理は100mM塩化ナトリウム, 10mMヒスチジン塩酸 pH6.0を含むP-セルローズの懸濁液にタンパク濃度が 0.4mg/ml になるようにルブロール抽出液(2)を加え, 5分攪拌しベックマン50 Tiのローターで 50,000rpm 15分遠心し上清を取った. 下層のP-セルローズを含んでいる部分はろ過をしてP-セルローズを取り除いた. この操作はすべて0°～4°で行った. 上清をP-セルローズ処理酵素(1), ろ液をP-セルローズ処理酵素(2)とした.

結　果

馬腎臓髄質外帯の Na,K-ATPase の純化の段階における比活性および特異的阻害剤のウアバインによる阻害度などを Table 1 に示した. ミクロソーム, NaI処理酵素, ルブロール抽出酵素, P-セルローズ処理酵素と順次比活性が高くなり, またウアバイン非感受性ATPase もほとんど含まなくなっている.

Fig. 1-(A) はここで述べた方法で NaI処理を行ったもの, Fig. 1-(B) は従来の方法で NaI 処理をしたも

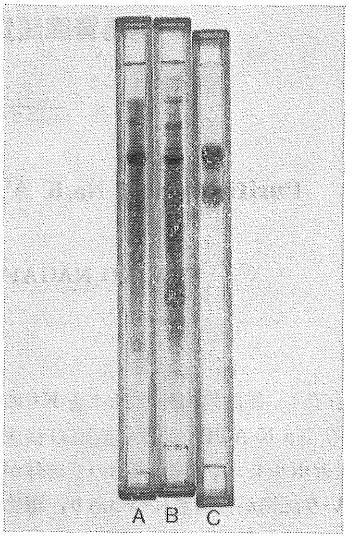


Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of preparations from the outer medulla of horse kidney (A) NaI treated enzyme with floating method, (B) NaI treated enzyme with Nakao's method, (C) std. PhosphorylaseA, Bovine serum albumin

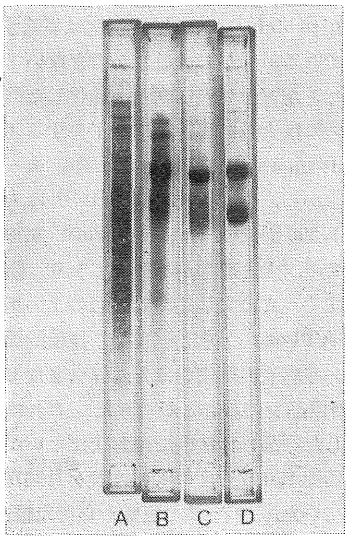


Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) Lubrol extract(1), (B) Lubrol extract(2), (C) P-cellulose enzyme(2), (D) std. PhosphorylaseA, Bovine serum albumin

Table 1 Purification of Na,K-ATPase from the outer medulla of horse kidney

Preparation	Total protein mg	Total activity μmoles Pi/hr	Specific activity μmoles Pi/mg prot./hr	Inhibition by Ouabain 10^{-4}M %
Microsome	31.8	5733.1	163.5	83.3(91.7)
NaI treated (float)	11.1	4311.5	353.8	97.5
1st Lubrol treated (ppt)	9.4	4222.1	457.7	>99
2nd Lubrol treated (sup)	2.1	2347.1	1095.1	>99
P-cellulose enzyme	0.36	944.7	2598.9	>99

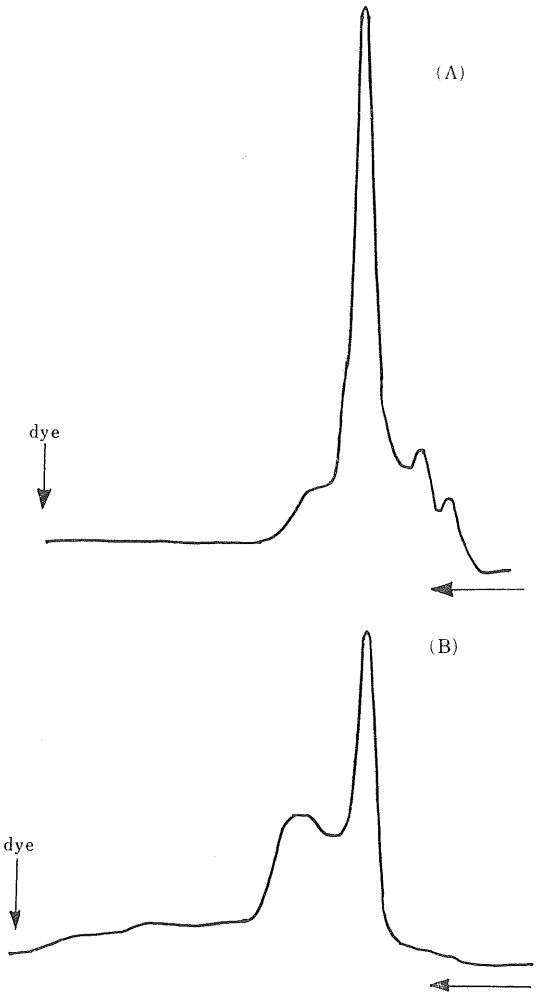


Fig. 3 Gel scans of Coomassie brilliant blue stained polyacrylamide gels (A) NaI treated enzyme, (B) Luburol extract (1) (C) Lubrol extract(2)

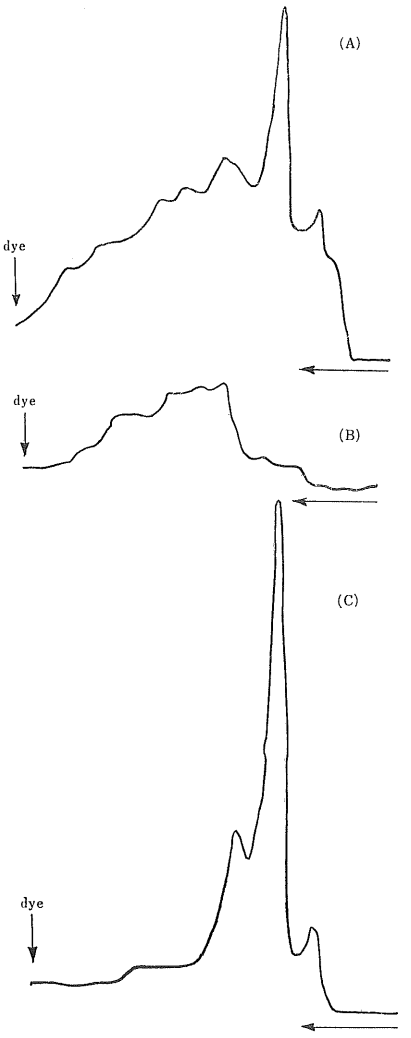


Fig. 4 Gel scans of Coomassie brilliant blue stained polyacrylamide gels (A) P-cellulose enzyme(1), (B) P-cellulose enzyme(2)

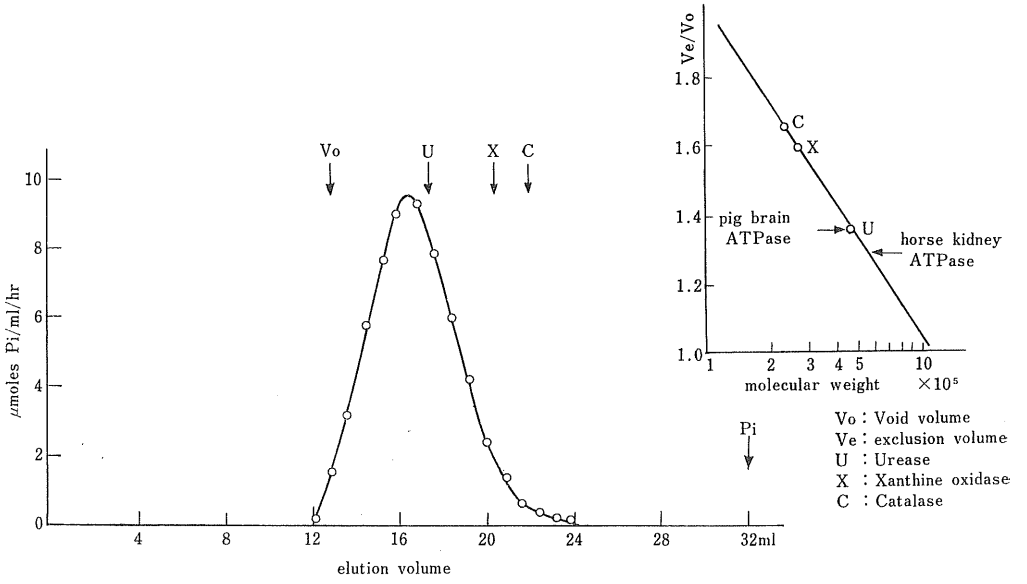


Fig. 5 Gel filtration on Sepharose 6B of Lubrol extracted enzyme

ののＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果である．(B)に比べて(A)は活性部位ではないとされているタンパクの混在が少い．次にルブロール処理の結果は Fig.2 に示した．(A)はイオン共存下でルブロール抽出をし，活性を持たないタンパクを抽出したもののゲルパターンである．活性部位だと考えられている10万のタンパクはほとんど含まれていない．ルブロール抽出酵素(2)は比活性が1,000程度であるが，ゲルパターンによると10万と７万の分子量に相当するタンパク以外はかなり少い．Ｐ－セルローズ処理をすると比活性は2,000以上になるが，ゲルパターンも，さらに10万と７万の分子量のタンパクの存在が顕著になった．

ＮａＩ処理酵素，ルブロール抽出酵素，Ｐ－セルローズ処理酵素のゲルパターンをデンシトメトリーした結果を Fig. 3, Fig. 4 に示した．先にのべたタンパクの存在がより明らかに示されている．

Fig. 5 はルブロール抽出酵素をセファローズ６Ｂでゲルろ過した結果である．馬腎臓 Na,K-ATPase は分子量が約57万であり，ブタ脳の標品が50万という値と比較して少し大きかった．ゲルろ過法は中尾ら[6]の方法で行った．

考　　察

馬腎臓よりNa,K-ATPaseを純化する方法はここに示したように，ブタ脳からの標品ほど比活性は高くない．しかしその他のいずれの報告よりも高く，また大量にとることができること，取れた標品が安定であることなど

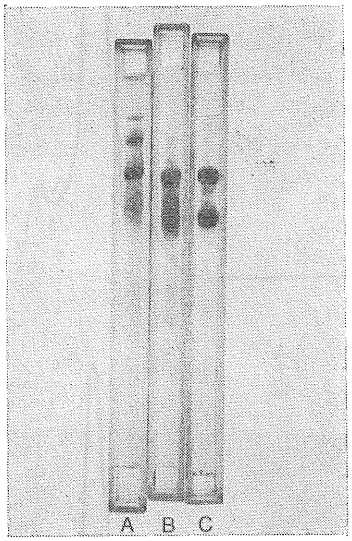


Fig. 6 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of P-cellulose treated enzyme (A) P-cellulose enzyme(1) (B) P-cellulose enzyme(2) (C) std. PhosphorylaseA Bovine serum albumin

の点ではブタ脳の方法よりも優れている．またこの標品は他の腎臓から得たNa,K-ATPase標品に比べてウアバイン非感受性酵素が非常に少い．この方法の特徴としては，ＮａＩ処理を Floating 法に変えたこと，室温で行ったことなどにより混在するタンパクを除くことができたこと，ルブロール抽出をはじめにイオン存在下で行い，

酵素タンパク以外のものを除去したことなどであろう．さらに Table 1 に示したように馬腎臓の髄質外帯はミクロソームの段階ですでにウアバイン非感受性 ATPase が少く材料として優れていることもある．

著者らの P-セルローズ処理標品はＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ10万と７万の分子量に別れる．10万のタンパクについては他の標品とよく一致しているが，小さい方については Jφrgensen,[9] Schwartz,[11] Kyte,[10] Hokin[15] などの５万～６万の値とかなり相違がある。現在 Na,K-ATPase は10万前後の分子量の活性部位と５万前後の糖タンパクの２つのサブユニットからなっているという[9-11,16,17]説が有力であり免疫学的方法[18,19]を用いて２つのタンパクともにサブユニットであると証明した報告もある．Fig.6—(A) に示した著者らの P-セルローズ処理酵素(1)はNa,K-ATPase 活性は，P-セルローズ処理酵素(2)よりも低いが７万のタンパクが非常に少い．このことは７万の糖タンパクはサブユニットではなく，酵素の安定化に必要なものではないかということを示唆しているとも考えられる．また10万のタンパクについては活性部位とそれ以外の同じ分子量のタンパクが混在している可能性を否定することができない．

謝辞 馬腎臓の採取にご協力いただきました東京都多摩食肉検査所八王子出張所の方々に感謝いたします．

（本研究の一部は日本生化学会第47回大会1974年10月で発表した）

文　献

1) Strom, D.R. and Gunsalus, R.P.: *Nature*, **250**, 778, 1974
2) 矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報 **25**, 691, 1974
3) 厚井麻里，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，**25**, 697, 1974
4) 矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報 **26**, 148, 1975
5) 厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，**26**, 152, 1975
6) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu, Y. and Fujita, M.: *J. Biochem.*, **73**, 609, 1973
7) Nakao, T., Nakao, M., Nagai, F., Kawai, K., Fujihira, Y., Hara, Y. and Fujita, M.: *J. Biochem.*, **73**, 781, 1973
8) Jφrgenesen, P.L. and Skou, J.C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 39, 1969
9) Jφrgensen, P.L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **356**, 36, 1974
10) Kyte, J.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4157, 1971
11) Lane, L.K., Copenhaver JR, J.H., Lindenmayer, G.E. and Schwartz, A.: *J. Biol. Chem.* **248**, 7197, 1973
12) Fiske, C.and SubbaRow, Y.H.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925
13) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rendall, B.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
14) Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 1969
15) Nakao, T., Tashima, Y., Nagano, K. and Nakao, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **19**, 755, 1965
16) Hokin, E.L., Dahl, J.L., Deupree, J.D., Dixon, J.F., Hachney, J.F. and Perdue, F.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2593, 1973
17) Rerrone, J.R., Hackney, J.F., Dixon, J.F and Hokin, L.E.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4178, 1975
18) Jean, D.H., Albers, R.W. and Koval, G.J.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 1035, 1975
19) Rhee, H.M. and Hokin, L.H.: *Biochem.. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 1139, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 148-151, 1975

有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用
(2) 細胞膜諸酵素に対する水銀化合物の阻害作用

矢ヶ崎しげ子* 原 諭 吉** 中 尾 順 子*

Effects of Organic Mercury Compounds on Cell Membranes
(2) Inhibition of Enzymes in Cell Membrane by Mercury Compounds

SHIGEKO YAGASAKI*, YUKICHI HARA** and TOSHIKO NAKAO*

緒 言

水銀化合物は，水銀利尿剤として腎細胞膜に作用すると考えられている．さらにメチル水銀による各種の神経症状[1-4]のように，細胞膜固有の機能と直接結びついた障害作用[5,6]が観察されている．水銀化合物の細胞膜に対する障害作用を研究することは毒性発現機序を知る上で重要と考えられる．

前報[7]で我々は，膜障害の指標の一つとして，膜を横切って存在することが確実な酵素タンパクである Na, K-ATPase に対する水銀化合物の阻害を調べた．

本報告では，Na,K-ATPase と，膜に存在すると考えられるその他の酵素に対する阻害を観察し，膜の障害作用との関係を調べた．

臓器は，前報で使用したブタ脳と，新たにウマ腎を使用した．ウマ腎は比較的活性の高い安定な酵素を得やすく，[8]また，腎の Na,K-ATPase は水銀利尿剤により阻害されると考えられていることから取り上げた．

ブタ脳，ウマ腎から細胞膜分画（ミクロソーム分画）を取り，膜の "marker enzyme" である Na,K-ATPase, K^+感受性 p-ニトロフェニルフォスファターゼ（以下K-PNPPase と略す），アルカリフォスファターゼ，アセチルコリンエステラーゼに対する塩化第二水銀，塩化メチル水銀，p-クロルマーキュリー安息香酸（以下PCMBと略す）の阻害を調べた．

方 法

試薬

塩化第二水銀（和光純薬 含量99.5%以上）再留水に 10^{-2} M の濃度に溶かし，4° に保存した．

PCMB（半井化学 含硫蛋白質研究用特製試薬）0.04 N 水酸化ナトリウムに 10^{-2}M の濃度に溶かし，4° に保存した．

塩化メチル水銀（東京化成工業 含量99.5%）0.9%塩化ナトリウムに10^{-3}Mの濃度に溶かし，4° に保存した。

酵素標品の調整

① ブタ脳細胞膜分画 前報[7]に従って調整し，得られた標品をさらに再留水で一回洗い，再留水に懸濁し，−80°に保存した．

② ウマ腎細胞膜分画 Schwartz[9]の方法を改変して用いた．凍結下でウマ腎髄質外帯を切り出し，9倍量の0.32Mショ糖，5mM EDTA（pH7.4）の溶液中でポリトロン破砕を120秒間行い，続いてテフロンオモゲナイザーにかけ3回上下させた．ろ液を Sorvall SS-34 ローターで 5,400rpm 15分間遠心し，上清を同じローターで 16,500rpm 35分間遠心した．沈殿を再留水で洗い再留水に懸濁し，−80° で保存した。

酵素活性測定法

水銀剤の阻害を測定する場合には，基質を除いた反応液に水銀化合物と酵素を加え 37° 5分間予備加温し，それに基質を加えて 37° で反応させた．

① Na,K-ATPase 活性測定法

前報の方法[7]に従った．

② K-PNPPase 活性測定法

反応液は終濃度 10mM 塩化カリウム，3 mM 塩化マグネシウム，10mM p-ニトロフェニルリン酸イミダゾール塩，50mM イミダゾール—塩酸（pH 7.2）を含み全量 0.5m*l*とした．反応により遊離した p-ニトロフェノール

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京医科歯科大学医学部生化学教室

（以下 PNP と略す）の吸光度を 410nm で測定した．塩化カリウムを含まない反応液の活性を差し引いて K^+ 感受性活性とした．

③ アルカリフォスファターゼ活性測定法

反応液は終濃度 3 mM 塩化マグネシウム，20mM β-グリセロリン酸2ナトリウム塩，50mM グリシン—水酸化ナトリウム（pH 10.0）を含み全量で 0.5ml とした．反応により遊離した無機リン酸を Fiske-SubbaRow の方法[10]で測定した．

④ アセチルコリンエステラーゼ活性測定

反応液に終濃度 30mM アセチルコリン，6 mM バルビタール—塩酸（pH 8.0）を含み全量で 2.8ml とした．37°で反応後 2.4mM エゼリンを 0.1ml 加え反応を止めた．遊離した酢酸による pH の変化を測定した．

⑤ 蛋白定量法

蛋白の定量は Lowry ら[11]の方法で行ない，ウシ血清アルブミンを標準物質として用いた．

結　果

ブタ脳，ウマ腎から得られた細胞膜分画の各々の酵素活性を比活性を用いて表わした．(Table 1) Na,K-ATPase, K-PNPPase は両酵素標品で高い活性を持つ．

Table 1　細胞膜分画の酵素活性

	ブタ脳 細胞膜分画	ウマ腎 細胞膜分画
Na, K-ATPase (*1)	40	122±20
K-PNPPase (*2)	4.3	10.7
Alkalinephosphatase (*1)	0.47	6.8
Acetylcholinesterase (*3)	0.51	0.07
5'-Nucleotidase (*1)	0.18	1.5

比活性は，(*1) μmole Pi/mg protein/h,
(*2) μmole PNP/mg protein/h,
(*3) ΔpH/mg protein/h で表示した。

一方，アルカリフォスファターゼはウマ腎で高く，アセチルコリンエステラーゼはブタ脳で高い．そこで，アルカリフォスファターゼ活性はウマ腎で，アセチルコリンエステラーゼ活性はブタ脳の酵素活性を測定した．5'-ヌクレオチダーゼは両標品ともに活性が低く，実験に用いることができなかった．

Fig. 1 は，ブタ脳細胞膜分画の Na,K-ATPase に対する阻害である．塩化メチル水銀，PCMB はほぼ同様な阻害曲線を呈する．塩化第二水銀は塩化メチル水銀，PCMB に比べ阻害が強く半阻害濃度は低い．

一方，ウマ腎の Na, K-ATPase に対する阻害は

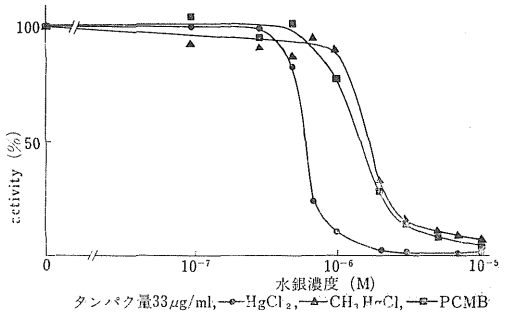


Fig. 1　ブタ脳 Na,K-ATPase に対する水銀化合物の阻害

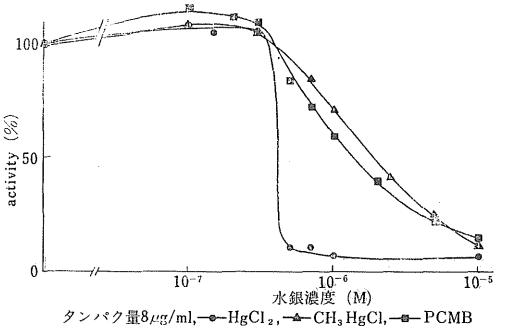


Fig. 2　ウマ腎 Na,K-ATPase に対する水銀化合物の阻害

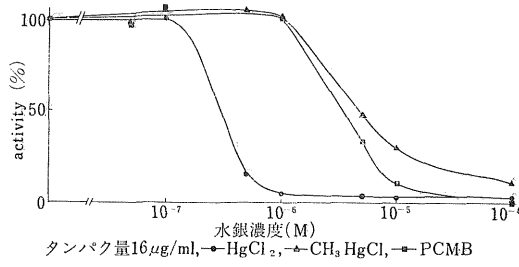
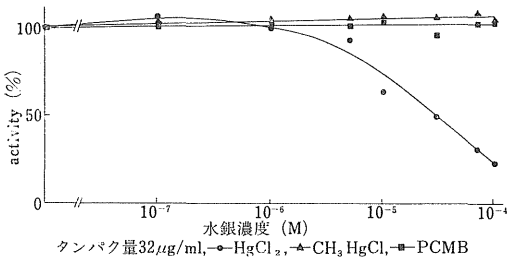


Fig. 3　ウマ腎 K-PNPPase に対する水銀化合物の阻害

(Fig. 2) ブタ脳の酵素とよく似た傾向を示した．

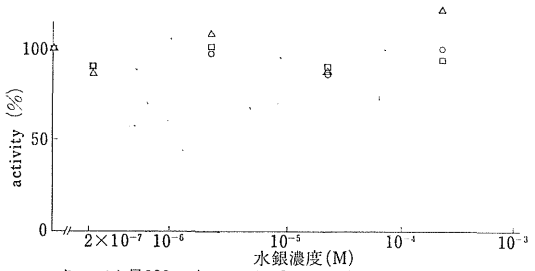
ウマ腎の K-PNPPase に対する阻害は(Fig. 3)，塩化メチル水銀と PCMB がほぼ同様な阻害曲線を示すこと，塩化第二水銀が他の有機水銀化合物より阻害が強い点が，Na,K-ATPase の場合と一致している．

Fig. 4 はアルカリフォスファターゼに対する阻害である．塩化第二水銀の半阻害濃度は 3×10^{-5}M であった．一方，塩化メチル水銀，PCMB は実験で用いた水銀濃度範囲では阻害がみられず，逆にわずかな（約5％）促



タンパク量32μg/ml,-o-$HgCl_2$,-▲-CH_3HgCl,-■-PCMB

Fig. 4 ウマ腎アルカリフォスファターゼに対する水銀化合物の阻害



タンパク量880μg/ml, ○$HgCl_2$, △CH_3HgCl, □PCMB

Fig. 5 ブタ脳アセチルコリンエステラーゼに対する水銀化合物の阻害

Table 2 細胞膜分画諸酵素に対する水銀化合物の阻害

		半阻害濃度 (×10^{-7}M)		
		$HgCl_2$	CH_3HgCl	PCMB
Na, K-ATPase	P. B.	1.7	4.5	4.0
Na, K-ATPase	H. K.	4.3	18.0	13.0
K-PNPPase	H. K	1.5	24.0	16.0
Alkaline-phosphatase	H. K.	75.0	—	—
Acetylcholine-esterase	P. B.	—	—	—

Protein 8μg/ml
P.B. ; pig brain, H. K. ; horse kidney

進がみられた.

アセチルコリンエステラーゼに対する阻害を Fig. 5 に示した. タンパク濃度880μg/ml で37° 40分間反応した時の pH の変化は 0.35～0.45 であった. 水銀濃度 10^{-7}～10^{-4}M の間では3種の水銀化合物の阻害がみられなかった.

前報[7] で報告したように, 水銀の阻害はタンパク濃度に依存し, タンパク量の増加に従い半阻害濃度は増加した. Fig. 1～5 の結果を, タンパク量 8μg/ml で反応させた時の半阻害濃度に換算し, Table 2 にまとめた. Na,K-ATPase は3種の水銀化合物で強く阻害され, 他の酵素に比べ最もよく阻害された. アルカリフォスファターゼに対する塩化第二水銀の半阻害濃度は 7.5×10^{-6} Mで, Na,K-ATPase に比べ20倍近く大きい. K-PNPPase は Na,K-ATPase と類似した阻害曲線を示し, 半阻害濃度も一致していた. K-PNPPase は Na,K-ATPase の部分反応と関係が深いために,[12] Na,K-ATPase の場合とほぼ同じ阻害を示したと考えられる.

無機水銀は有機水銀に比べ阻害が強く, 有機水銀の塩化メチル水銀と PCMB の間には差がみられなかった.

考 察

Na,K-ATPase とその他の2～3の細胞膜酵素に対する水銀化合物の阻害を調べたところ, 酵素により半阻害濃度にかなり差がみられ, Na,K-ATPase が最も感受性が高かった. アルカリフォスファターゼは用いた有機水銀濃度では阻害されなかった. しかし, 10^{-4}M塩化第二水銀で活性の80%が阻害された. アセチルコリンエステラーゼは無機, 有機水銀でともにまったく阻害されなかった. 水銀化合物の阻害にこのような差があるのは, 酵素の水銀化合物に対する親和性に差があるためか, あるいは使用している酵素標品が小胞 (vesicle) をなすため, 水銀剤の到達のしやすさに差異があるためかは分からない. なお, 前報[7] で報告したように, Na,K-ATPase は可溶化しても半阻害濃度は変化しない. それゆえ, Na, K-ATPase の水銀結合部位は, 小胞状の膜標品でも水銀化合物が接近しやすい部位にあるらしい.

水銀中毒は種々の神経症状を呈することが知られている. 水銀化合物は細胞膜の Na,K-ATPase を他の細胞膜酵素に比べ特異的に阻害することから, 水銀剤の神経系への障害の一部は, 水銀剤が神経細胞膜と反応してイオンの能動輸送を阻害することにより引き起こされる可能性が示唆された. ブタ脳の Na,K-ATPase はウマ腎に比べ強く阻害された.

近年, アデニルサイクラーゼの塩化メチル水銀による阻害が, 他の水銀化合物よりも1桁以上低い濃度で起ることが報告された.[13] 水銀化合物により膜への接近あるいは浸透の速度が異なることを考慮すれば, 脂溶性の高いメチル水銀が, 用いた酵素標品によっては強い阻害を示すことがあり得るだろう. またこれらの水銀剤の阻害は非可逆的であるため, その半阻害濃度を異なる実験間で単純に比較することはできないだろう.

フェニル水銀化合物の中毒症状は有機水銀でありながら無機水銀の症状に近いと言われている. 一方, 酵素に対する阻害では, PCMB は塩化メチル水銀とほぼ同じ

阻害を示し，無機水銀は有機水銀よりも強い阻害を示した．Changら[14]は *in vivo* で塩化メチル水銀，塩化第二水銀をラットに投与し，肝，腎，脳における種々の酵素活性を測定した．その結果アルカリフォスファターゼは両水銀化合物で活性が低下したことを報告している．このように *in vivo* と *in vitro* で酵素阻害に差があるが，*in vivo* では排泄速度と阻害部位への到達速度の影響を受けるので，*in vitro* とは必ずしも一致しないと思われる．

要　約

ブタ脳およびウマ腎の細胞膜標品に対するメチル水銀，塩化第二水銀，PCMB の障害作用を，種々の膜結合酵素活性を指標に観察した．

Na,K-ATPase は3種の水銀化合物で阻害されるが，アルカリフォスファターゼは無機水銀でのみ阻害され，アセチルコリンエステラーゼは3種の水銀化合物でまったく阻害されなかった．そこで，Na,K-ATPase の特異的阻害は，水銀化合物による中毒症状の原因の一部をなすと考えられた．

文　献

1) Hunter, D., Bomford,R.R. and Russel,D.S.: *Quart, J. Med.*, **9**, 193, 1940

2) Hunter, D. and Russel, D.S.: *J. Neurol. Neurosourg. Psychiat.*, **17**, 235, 1954

3) Takahashi, T., Kimura, T., Sato, Y., Shiraki, H. and Ukita, T.: *J. Hyg. Chem.*, (*Japan*) **17**, 93, 1971

4) Bcikir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaki,L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N.Y., Tikriti, S. and Dhahir, H.I., Clarkson, T.W., Smith, J.C. and Doherty R.A.: *Science*, **181**, 230, 1973

5) Kasuya, M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 136, 1972

6) Chang, L.W. and Hartmann, H.A.: *Exptl. Neurology*, **35**, 122, 1972

7) 矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，**25**, 691, 1974

8) 長井二三子，厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，**26-2**, 143, 1975

9) Lane, L. K., Copenhaver, J. H., Lindnmayer, G.E. and Schwartz, A.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7197, 1973

10) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y.H.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925

11) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall: *J. Biol. chem.*, **193**, 265, 1951

12) Fujita, M., Nakao, T., Tashima, Y., Mizuno, N., Nagano, K. and Nakao, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 42, 1966

13) Storm, D.R. and Gunsalus, R.P.: *Nature*, **250**, 778, 1974

14) Chang, L.W., Ware, R.A. and Desnoyers, P. A.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 283, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 152-157, 1975

有機フッ素化合物の細胞膜酵素活性に対する *in vitro* および *in vivo* の影響について

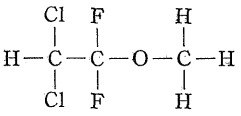
厚井麻里* 中尾順子*

Effects of the Organofluoro-Compounds on Enzymes in Plasma Membrane *in vitro* and *in vivo*

MARI KOI* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

Methoxyflurane (Penthrane®) は，1959年，コーネル大学の Artusio, Van Poznak, *et al.* によって発見された非引火・非爆発性を特徴とする吸入麻酔剤であり，下記の構造式を示す．



Methoxyflurane

(2, 2-dichloro-1, 1-difluoroethyl methyl ether)

現在，臨床的に広く使用されているが，1966年，Crandell[1] により麻酔後に生じる脱水状態を伴った腎障害について報告された．Methoxyflurane 麻酔下で長時間の大手術を行った老人患者に多くみられ，術後第1日目より血清の Na^+ の増加や浸透圧の上昇および低比重の多尿を特徴とする．患者は尿毒症で死亡するか，長く腎濃縮障害を残す．アイソトープでラベルした Methoxyflurane を吸入させた実験により一部は肝で代謝され，分解産物として F^- や oxalic acid が生じることが調べられているため，これら代謝産物が腎毒性を有していて，それが血中に増加し尿に排泄される結果，腎障害が生じるのではないかと考えられた．その後，Whitford[2] らは血中 F^- 濃度の上昇とは逆に腎髄質内帯の Na^+ 濃度の低下を認め，この低下で Henle 係蹄の上行脚での再吸収が阻害されるのが濃縮障害の原因であろうとした．しかし，Methoxyflurane 麻酔後の血清 F^- の増加には個人差が大きく，また Methoxyflurane を *in vitro* で代謝させた実験でも放出される F^- の量に個人差が大きいために，Methoxyflurane の投与量のみが代謝産物の F^- の量を決めるものかどうかは明らかでない．

本実験は，脱水症状を特徴とする腎障害が，細胞膜酵素の一部分が何らかの修飾を受けた結果として現われてくるのではないかと考え，その関連性を調べるために行ったものである．膜酵素としては，細胞膜に広く存在し膜の一部を構成しているカチオン能動輸送酵素を用い，活性に対する Methoxyflurane の影響をみた．既報の論文の結果は何れも麻酔後長時間経たものであるが，本実験では Methoxyflurane の直接作用と考え麻酔中または麻酔後短時間に測定したものである．その結果，Methoxyflurane の代謝産物による影響に先立って，Methoxyflurane による腎細胞膜障害が麻酔初期に起ることを想像させる結果を得たので報告する．

材　料

実験材料は，*in vitro* ではウマ腎を用い，前報同様に NaI 処理酵素を調整し，*in vivo* では雌雄モルモット（体重，260～320 g）の脳および腎より，細胞膜標品としてそれぞれミトコンドリア分画およびマイクロソーム分画を得た．

用いた試薬の主なものを下記に示した．

Methoxyflurane ; アボット社, Lot No. 844-1621
bp 104.6°C, mp −35°C,
d 1.4224 (25°C)

Ethyl Ether ; 関東化学（株), 特級

Dibutylhydroxytoluene (BHT) ; 和光純薬工業(株)
Lot No. ACL5025

Ethanol ; 和光純薬工業(株), 特級

assay medium ; 前報に同じ

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

方　法

i) *in vitro*

エタノールに溶かした Methoxyflurane および BHT を各々 5μl 含む assay medium (0.5ml) に，調整した NaI 処理酵素タンパク 4μg を加え，37°C, 10min 孵置して遊離してくる無機リンを Fiske & SubbaRow[3] の方法で測定した．エタノールのこの濃度では，酵素活性への影響はほとんど認められなかった．Methoxyflurane は 37°C での蒸気圧が高いため，活性の測定には特に注意を払った．dead space をゼロにし完全に密栓できる micro tube を用いて反応させた．BHT についても同じ方法で測定した．

ii) *in vivo*

モルモットを2匹ずつ chamber に入れ吸入麻酔を施した．Methoxyflurane 麻酔は，浅麻酔・1 hr, 2.5%-10min, 0.5%・4 hr 行い，吸入麻酔剤の control として Ether 麻酔を浅麻酔・1 hr 行った．動物は各々2匹使用した．

麻酔後直ちにモルモットに脳震盪を起させ，心臓採血により殺した．開腹後，尿を採取し脳，腎を摘出した．脳，腎に9倍容の0.32M sucrose, 5mM EDTA を加え Teflon Homogenizer により粉砕し，Sorvall SS-34 のローターで 8,500rpm, 15min 遠心して得た沈殿をミトコンドリア分画とし，上清を Sorvall SS-34 のローターで 17,000rpm, 30min 遠心して得た沈殿をマイクロソーム分画とし，各々1mM Tris-EDTA, pH 7.3に懸濁した．採取した尿は，Na^+, K^+ の濃度および creatinine の量を測定した．血液は，血清学検査，血清中の血糖，ChE 活性および Na^+, K^+ の濃度の測定を行った．

結　果

i) *in vitro*

活性の測定に用いた NaI 処理酵素は，98%が ouabain 感受性であった．Methoxyflurane のこの酵素に対する影響は，図1に示すように，高濃度で阻害し低濃度で活性化がみられた．市販の Methoxyflurane は抗酸化剤として0.01% (w/w) の BHT を含んでいるため，BHT のこの酵素に対する影響を図2に示したが，Methoxyflurane と良く似たパターンを示した．図3には Methoxyflurane と BHT との差を示したが，低濃度で若干の酵素活性化を示した．図4は市販品を蒸留して BHT を完全に除いたものであるが，低濃度で若干の活性化がみられた．

ii) *in vivo*

表1に homogenate の膜酵素活性を示した．ミトコ

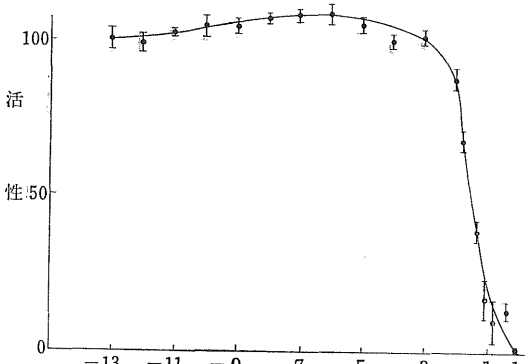


図1　Penthrane のウマ腎 Na^+,K^+-ATPase に対する影響（5点の平均値±S.E.）

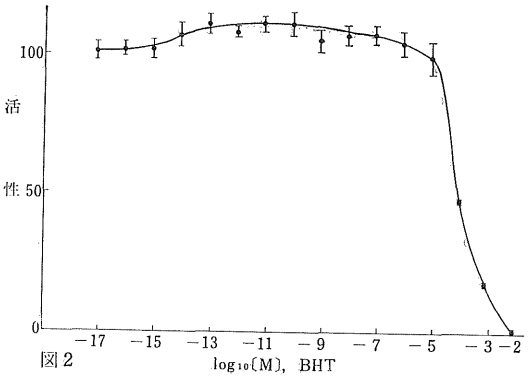


図2　BHT のウマ腎 Na^+, K^+-ATPase に対する影響（5点の平均値±S.E.）

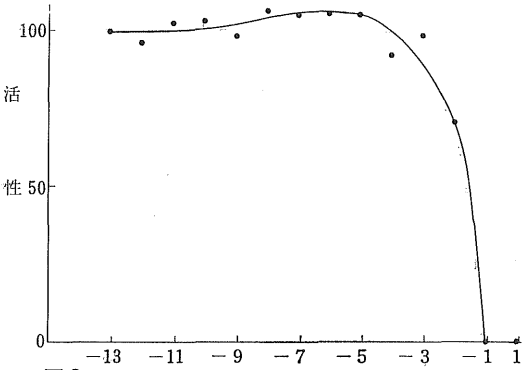


図3　図1と図2との差

ンドリア分画に ouabain 感受性の酵素が混入しているため，マイクロソーム分画の活性値と合わせた数値を homogenate の数値として表わしてある．Methoxyflurane は低濃度即ち浅麻酔・1 hr で腎の膜酵素活性を ouabain 感受性・非感受性ともに増加させる傾向にあ

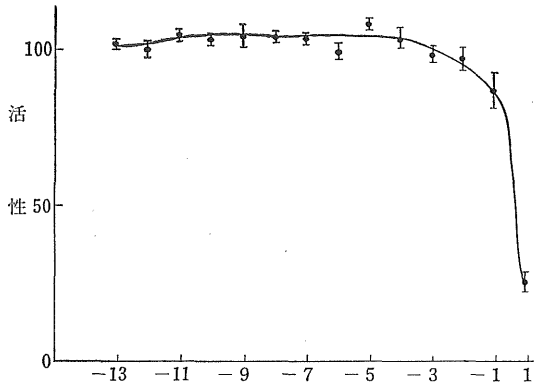


図4 蒸留した Penthrane のウマ腎 Na^+, K^+ -ATPase に対する影響(5点の平均値±S.E.)

り，高濃度即ち 2.5%・10min および 0.5%・4hr では ouabain 感受性において減少させる傾向にあった．一方，Ether 低濃度即ち浅麻酔・1 hr では変化が認められなかった．脳の膜酵素活性に対して Methoxyflurane 低濃度で ouabain 感受性に増加が，高濃度で ouabain 非感受性に減少が認められた．

Methoxyflurane および Ether で吸入麻酔を行った直後の血清および尿中の Na^+, K^+ の濃度は表2のようであった．血清の Na^+, K^+ への影響はほとんどなく，尿では K^+ に若干増加の傾向がみられた．

表3には homogenate および血清の ChE 活性を示した．Methoxyflurane および Ether の脳 homogenate に対する影響はみられなかったが，腎 homogenate の ChE 活性を増加させる傾向にあった．血清に対する影響は，個体差による値のバラツキが大きすぎるが減少の傾向にあった．

表4に示すように，血糖値への影響は Methoxflurane は減少させる傾向があり，Ether は増加させる傾向があった．

尿中の creatinine 量を同じく表4に示した．Methoxyflurane による減少の傾向がみられた．

表には示さなかったが，血液学検査の結果には全く変化が認められなかった．

次に，Metnoxyflurane が膜の脂質に作用し酵素活性を溶かし出したために低濃度での活性化(表1)がみられたのかもしれないので，膜を可溶化する代表的物質として DOC を用い，Methoxyflurane によって膜酵素の活性化がみられた腎の homogenate を 1.6mg/ml のタンパク濃度で0.05%DOC に溶かし，30min 室温に放置した後の活性を測定し表5に示した．結果は DOC による活性化が control と同程度であった．

なお，SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパタ

表 1 Methoxyflurane 吸入によるモルモット細胞膜酵素活性の変化

Activity / Anesthesia	Ouabain sensitive ATPase*		Ouabain insensitive ATPase*	
	Brain	Kidney	Brain	Kidney
Control	628, 715 **	1544 1225	765, 1099 **	983 875
Methoxyflurane 浅麻酔•1hr	884, 1055 **	1989 1831	821, 831 **	1278 1325
Control	1787 2010 1783 1905	1301 1059 1289 1256	1260 1268 1242 1276	845 1318 975 913
Methoxyflurane, 2.5%•10min	1789 1834	1103 949	836 981	1127 1315
Methoxyflurane, 0.5%・4hr	2200 1942	1114 1063	959 1017	1196 1006
Ether, 浅麻酔・1hr	1993 2100	1236 1286	1442 1315	994 963

* μmoles Pi/hr/g tissue

** この標品は白質を含んでいるために他よりも比活性が低くなっている。

表 2 Methoxyflurane 吸入後のモルモット血清および尿中の無機イオン濃度

Concentration / Anesthesia	Serum*		Urine*	
	Na^+	K^+	Na^+	K^+
Control	148	10.3	—	—
	141	8.2	104	126
Methoxyflurane, 浅麻酔•1hr	153	10.2	151	125
	142	7.4	102	173
Control	134	5.9	88	127
	134	5.0	15	91
	137	10.1	—	—
	134	10.7	—	—
Methoxyflurane, 2.5%•10min	136	9.0	20	127
	138	8.6	6	194
Methoxyflurane, 0.5%•4hr	139	5.0	136	127
	135	5.0	119	103
Ether, 浅麻酔•1hr	137	7.1	88	54
	134	5.4	15	167

* meq.

表 3 Methoxyflurane 吸入後のモルモット ChE 活性値

Activity / Anesthesia	ChE		
	Brain[1]	Kidney[1]	Serum[2]
Control	0.21	0.009	0.67
	0.28	0	0.83
Methoxyflurane, 浅麻酔•1hr	0.37	0.039	—[3]
	0.30	0.016	0.60
Control	0.43	0.020	0.37
	0.37	0.066	—
	0.23	0.004	0.60
	0.17	0.041	0.35
Methoxyflurane, 2.5%•10min	0.25	0.032	0.47
	0.26	0.103	0.10
Methoxyflurane, 0.5%•4hr	0.25	0.064	0.40
	0.33	0.033	0.58
Ether, 浅麻酔•1hr	0.20	0.053	0.18
	0.59	0.057	0.37

1) ⊿pH/mg protein
2) ⊿pH
3) 値が極めて小

表 4 Methoxyflurane 吸入後のモルモット血清中glucoseおよび尿中 creatinine

Concentration / Anesthesia	Glucose[1]	Creatinine[2]
Control	149	—
	151	420
Methoxyflurane, 浅麻酔•1hr	143	380
	147	267
Control	165	434
	155	—
	130	—
	130	—
Methoxyflurane, 2.5%•10min	125	—
	125	354
Methoxyflurane, 0.5%•4hr	150	360
	110	147
Ether, 浅麻酔•1hr	195	120
	155	—

1) mg/d*l* serum 2) mg/*l* urine

表 5 Methoxyflurane 吸入によるモルモット腎細胞膜酵素の活性化に対する DOC の影響

Activity / Anesthesia	ouabain sensitive ATPase*		after/before
	DOC treatment		
	before	after	
Control	1202	2111	1.76
	1144	2044	1.79
Methoxyflurane, 浅麻酔・1hr	1526	2593	1.70
	1403	2629	1.87

* Kidney Homogenate, μmoles Pi/hr/g tissue

ーンには脳，腎ともに変化がみられなかった．

考　察

腎の細胞膜酵素に対する Methoxyflurane の影響は，*in vitro* の実験において僅かではあるが 10^{-7}M 付近にピークのある活性化のカーブが得られた（図1）．麻酔剤としての Methoxyflurane には，抗酸化剤として 0.01%（w/w）の濃度で BHT が含まれている．そこで BHT 単独での同じ酵素に対する影響を調べると，10^{-11}M 付近にピークのある活性化のカーブが得られた（図2）．Methoxyflurane, 8.6×10^{-8}M は BHT, 6.45×10^{-12} M を含んでいるので，両者のピークはほぼ一致している．Methoxyflurane のカーブと BHT のカーブとの差を BHT を含まない Methoxyflurane そのものの作用と考えれば，Methoxyflurane 単独でも酵素活性化があり（図3），このことは，図4の結果によって明らかとなった．細胞膜酵素に対するこの麻酔剤の影響が単に BHT の膜安定化作用によることも考えられるが，Methoxyflurane との協力作用の結果の現われであるという見方もできる．

表5は Methoxyflurane に DOC 様の作用があるかどうかを調べようとして行った実験であるが，DOC による活性化は control と全く等しく，Methoxyflurane 麻酔による腎の膜酵素活性化は DOC 様の作用とは異なることを示している．DOC 処理に用いた酵素は麻酔後2カ月を経たものであるため，やや活性の低下はみられるが，Methoxyflurane 麻酔による活性化は完全に維持されており，この麻酔剤と腎との関係が強力であることを物語っている．*in vitro* で行った実験の結果，37°C での孵置を栓をはずして行うと，Methoxyflurane 高濃度での阻害が減少し孵置時間を長くしても同様であった．このことから高濃度での酵素活性への影響は可逆性があると思われる．低濃度における活性化は可逆的ではない傾向を示した．低濃度では Methoxyflurane よりも BHT の作用が強く働いている可能性もあり，Methoxyflurane の蒸気圧が高いという点から考えても膜酵素の脂質を残された BHT が還元し安定化していることも十分あり得る．低濃度での実験は今後アイソトープを用い合わせて検討する必要がある．

なお，Methoxyflurane 麻酔直後の変化を調べた実験結果は報告されていないので，直後に F^- が存在しているかどうかを調べなければならないが，NaF によるウマ腎膜酵素の活性化は認められなかったので，おそらく大部分は分解されないで Methoxyflurane の形で存在しているのであろう．また，Methoxyflurane の最終分解物である oxalic acid のウマ腎膜酵素の活性への影響は認められなかった．

in vitro での Methoxyflurane による腎細胞膜酵素の活性化が実際に吸入麻酔を行ったモルモットの組織についてもみられるかどうかを調べた結果，非常に浅い麻酔を 1 hr 行った場合に *in vitro* 同様に腎細胞膜酵素の活性化が認められた（表1）。活性化の程度は脳に比べ腎の方が大きく，麻酔剤と腎障害との関連性をうかがわせる．Ether による腎膜酵素への影響は全く認められなかったので，Methoxyflurane の腎への作用は有機溶媒様の作用ではないと思われる．

なお，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果，脳および腎の各分画のタンパクのパターンへの影響は認められなかった．

in vivo の実験は，*in vitro* での低濃度の Methoxyflurane による細胞膜酵素の活性化を確証するために現在行いつつあるもので，まだ不十分である．今後例数を増やすと同時に，市川[4]らの報告にも BHT と腎障害との関連が示されているように，BHT 単独投与群についても腎への影響を調べ比較検討してゆく．

なお，組織学的に Methoxyflurane 麻酔後の腎ミトコンドリアの膨化が認められており，[5] この点に関しても BHT 単独投与群と合わせ検討してゆかねばならない．

結　語

今回は臨床的に広く使われている有機フッ素麻酔剤およびその中に含まれている抗酸化剤の細胞膜酵素に対する影響を取上げた．今日，麻酔剤である Methoxyflurane による腎障害とは別に食品添加物である BHT による腎障害も知られており，用いた腎細胞膜酵素に与える Methoxyflurane 麻酔の影響は BHT 単独の作用であることも考えられるが，2つの化合物の協力作用である可能性も十分考えられる．今後，動物数を増して *in*

vivo の実験を積重ね *in vitro* の実験と合わせ更に深く検索してゆかねばならない.

謝辞 最後に, ウマ腎を提供して下さった東京都多摩食肉衛生検査所八王子出張所の方々に感謝致します. 吸入の装置を使わせて下さった環境衛生部溝口科長, 大沢研究員に感謝致します.

文 献

1) Crandell, W. B., *et al.* : *Anesthesiology*, **27**, 581, 1966

2) Whitford, G. M. and Taves, D. R. : *Anesthesiology*, **39**, 416, 1973

3) Fiske, C. H., SubbaRow : *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925

4) 市川久次他：東京衛研年報, **23**, 345, 1971

5) Mazze, R. I., *et al.* : *Anesthesiology*, **36**, 571, 1972

6) 厚井麻里他：東京衛研年報, **25**, 697, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 158-160, 1975

マウス胎仔の染色体標本作成法 (I)

益 渕 正 典* 高 橋 昭 夫* 縄 井 寿美子**
吉 田 誠 二*

Chromosome Preparations from Mouse Embryos (I)

MASANORI MASUBUCHI*, AKIO TAKAHASHI*, SUMIKO NAWAI**
and SEIJI YOSHIDA*

動物胎仔の染色体分析は，受精から器官分化の過程における発生学上の基礎的問題の研究手段にとどまらず，ヒトの先天異常に関連する染色体異常症候群の解明など臨床医学の方面にも広く利用されて来た．

最近，医薬品・食品添加物・農薬など人体にとりこまれる機会のある化学物質の安全性について，その評価の手段の開発がさかんに行なわれている．その中でも，突然変異誘発性の問題は人間の将来に対する危惧として，重要視されつつある．この突然変異誘発性を検定する手段として，培養細胞，哺乳類の末梢血・骨髄細胞などにおける染色体異常を調べる細胞遺伝学的研究法があるが，これら染色体異常を生じた細胞が次世代ではどのような行動をとるのか，とくに優性致死および催奇形性の問題とも関連して，その因果関係の解明がなされなければならない．また，人類環境内に存在する化学物質が，その種類・量ともに増加しつつある現在，予防医学的観点からも動物胎仔の染色体分析の必要性がますます増大する傾向にある．しかし，その認識の上にたちながらも，実現は困難な現状にある．

動物胎仔の染色体観察法は，これまでに Ford and Woollam (1963),[1] Wróblewska and Dyban(1969),[2] Evans, Burtenshaw and Ford (1972),[3] Ingalls and Yamamoto (1972)[4] らによって開発された．これらの方法は，低張処理および空気・焔乾燥法による手技であり，確かに良好な結果が得られ，種々の分野に応用されうるものであるが，毒性検定のために開発されたものは少ない．多数の動物を対象とし，その胎仔の染色体分析結果から化学物質の安全性の評価を目ざす毒性試験では，非常に手技が煩雑なため熟練と多大な時間を要し，またそのために良好な結果も得られない．そこで筆者らは，毒性研究の一環として多数の妊娠マウスおよびその胎仔の染色体分析を行なう場合，操作が簡単でしかも処理時間が少なくてすみ，また熟練を必要とせぬ方法の検討を続けて来たが，一応の成果を得たので報告する．

方　法

1. 妊娠第9日～13日（膣栓を認めた日を妊娠第0日とする）のマウスの，屠殺1～2時間前，0.1%コルヒチン溶液を 1ml/kg 腹腔内に投与する．この時期の胎仔の細胞は活発に分裂をくり返しているため，コルヒチンを用いなくとも比較的多数の分裂像が得られる．

2. 開腹後，子宮より胎仔のみを摘出する．

3. 摘出した胎仔を，小試験管（ϕ10mm×75mm）内で低張処理する．低張処理は，0.075M KCl 溶液 3 ml を用い，37°，15分～30分間行なう．この際，あらかじめ胎仔の大きさにより大まかに細断しておくとよい．また，処理に要する時間は胎仔の発育状態で異なる．

4. 低張液をすて，4°に冷却したカルノア固定液（メチルアルコール3容：氷酢酸1容）3 ml を加える．15分後，固定液を交換する．固定は 4° で1時間～2時間行ない，途中2～3度固定液を交換するのが望ましい．

5. 固定液をすて，ただちに50%乳酸1容：氷酢酸5容の混液 1.5ml を加える．

6. 3～4分後，胎仔表面の細胞が溶液中に遊離しはじめた時期に，Pasteur pipette を用い，ピペッティング（吸引，排出をくり返して攪拌）する．この操作によ

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 麻布獣医科大学生物学教室

り容易に浮遊細胞が得られる.

7. 標本作成に充分な細胞が得られたころをみはからい, ただちに, 冷固定液 1.5m*l* を加え, ピペッティングにより静かに攪拌する.

8. 遠沈 (1,000r.p.m, 3分) して上清液をすて, ふたたび固定液 2m*l* を加え, ピペッティングにより静かに攪拌する. この操作を, 乳酸・酢酸混液がなくなるまで1～2回くり返す.

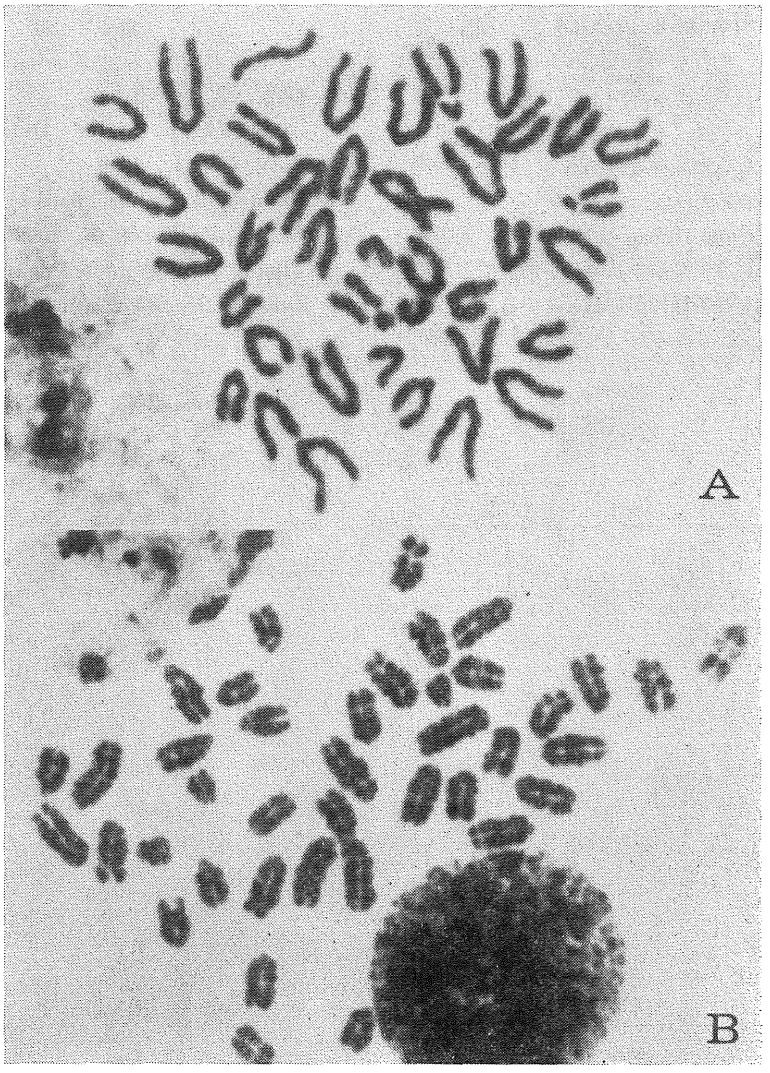
9. 最後にもう一度遠沈して, 適当な細胞濃度懸濁液になるよう固定液を加える.

10. きれいに洗浄し, 50%冷アルコール液に浸しておいたスライドグラス上に, 上記の細胞浮遊液を Pasteur pipette で数滴滴下する. ブンゼン灯の焔の上を通すことにより, スライドについたアルコールを燃やすと同時に瞬間的に材料を焔で乾かす. この時点で細胞は広がり, 充分に広がった染色体像が得られる.

11. 染色はギムザ染色など一般の染色方法による.

結果および考察

本方法により, 染色体分析に充分な分裂中期細胞数が得られた. また, 染色は phosphate buffer (pH 6.8)で希釈した2%ギムザ溶液で10分～20分間行なったが, 通常骨髄細胞などから得られる染色体像に劣らぬ鮮明なも



第1図　マウス胎仔 (妊娠第13日) より得られた染色体像. A, 分裂中期染色体. B, 分裂中期染色体. 各染色体の縦軸方向に横縞模様が観察される. ×1,700.

のであった（第1図A，B）．一方，個々の細胞について詳細に観察すると，染色体上の縦軸方向に横縞模様の見られるものがあった（第1図B）．この縞模様の出現機序については検討中であるが，各染色体上でそれぞれ特徴的であり，染色体を識別する際の一助となると考えられる．しかし，染色体異常を分析するには，gap や break などと混同しやすく，今後，細胞を浮遊させる際に用いる乳酸の濃度や乳酸に代わるものを検討してゆきたい．

これまで，染色体異常の mass screening に都合のよい方法として，Ingalls and Yamamoto の変法[4]がある．これは，妊娠第7日のマウス胎仔にも用いられ，材料が少ない場合でも有効である．しかし，その操作は低張処理・固定処理後，胎仔を時計皿に移し，乳酸・酢酸処理をほどこしながらピンセットの先端で1mm以内に細切したり，それをスライドグラスの上に移しピンセットで充分に広げるといった操作などがあり，熟練と時間を要するものであった．

また Wróblewska and Dyban の方法[2]では，低張処理・固定処理後，一度2％酢酸オルセイン溶液で仮染色し，その後遊離細胞を得る操作が加わっている．一方，Evans 等の方法[3]では，胎仔とともに amnion，yolksac などの胎膜を用いて染色体分析が可能であり，種々の応用面があるが，組織培養液での処理を必要としている．

先にも述べたごとく，毒性研究の一環として胎仔染色体分析が行なわれる場合，データ評価の面からどうしても対象動物数をふやさねばならず，また妊娠マウス一腹につき平均8～10匹の胎仔が得られることを考えあわせると，染色体観察用標本を作成することは容易ではない．その点今回報告した方法は，多少とも手技の煩雑さを軽減し，均一な標本が得られ，mass screening としての routine work に適した方法だと思われる．本方法をもとに，今後さらに改良を加えてゆきたい．

文　献

1) Ford, E.H.R. and Woollam, D.H.M. : *Stain Tech.*, **38**, 271, 1963
2) Wróblewska, J. and Dyban, A.P. : *Stain Tech.*, **44**, 147, 1969
3) Evans, E.P., Busuenshaw, M.D. and Ford, C.E. : *Stain Tech.*, **47**, 229, 1972
4) Ingalls, T.H. and Yamamoto, M. : *Arch. Environ. Health*, **24**, 305, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 161-165, 1975

マウス骨髄細胞染色体におよぼすウレタンの影響

益 渕 正 典* 縄 井 寿美子** 吉 田 誠 二*

Effect of Urethane on the Chromosomes of Bone Marrow Cells in Mice

MASANORI MASUBUCHI*, SUMIKO NAWAI** and SEIJI YOSHIDA*

近年，カフェイン，[1,2] lysergic acid diethylamide (LSD)，[3] サイクラミン酸ナトリウム，[4] AF-2[5] などの染色体に対する影響が報告された．以来，医薬品・食品添加物・農薬などによる遺伝的影響が憂慮されはじめている．その中でも注目されているものに，それら化学物質による突然変異誘発性の問題がある．

アメリカの FDA では，哺乳動物における化学物質の突然変異誘発性試験法として，(1)被検物質で処理した雄動物を無処理の雌と交配したのち，雌を妊娠中期に屠殺して，胎仔の死亡や発育状態を調べる優性致死試験，(2)検体処理動物の骨髄あるいは精巣の分裂細胞で染色体を調べる細胞遺伝学的研究，(3)微生物などを検体で処理した動物の腹腔に移植し，次いでこれらの微生物をとり出して突然変異を調べる宿主媒介試験などを提示している．これら3つの方法のうち，細胞遺伝学的研究に関する報告中では，*in vivo* による検出試験を第一とし，培養細胞などの *in vitro* による検出試験は補助的手段とされている．[6]

今回筆者等は，催奇形性[7] および発ガン性[8] の知られているウレタンに関し，マウスにおける *in vivo* 細胞遺伝学的研究を行なったので報告する．また，この実験結果をもとに，現在推奨されている試験方法についても考察を試みた．

材料および実験方法

1. 実験動物

ICR-JCL 系雌マウス（S.P.F，9週令）を用いた．飼育条件は，環境条件のほどこされた動物室（温度23±1°，湿度55±5%）で，アルミ製ケージ内チップ飼いとし，日本クレア製固型飼料 CA-1 および水道水を自由摂取させた．

2. 試 料

実験に供したウレタン（Urethane, $C_3H_7NO_2$）は，E. Merck 社製，Lot. No. 3049395 を用いた．

3. 最大耐量を求める実験

3回の実験を行なった．すなわち，大まかに投与量を設定し投与したのち，動物の生死を判定，その結果より生死のわかれる投与量間をさらに細かくわけて細胞遺伝学的試験としての最大耐量を求める方法をとった．

① 投与量および投与方法：ウレタンを蒸留水にて溶解後，10m*l*/kg B.W. の投与容量で投与量がそれぞれ500mg，1,000mg，1,500mg，2,000mg，2,300mg，2,650mg，3,050mg/kg B.W. となる様に経口一回投与した．

② 観察期間：投与後，染色体標本を作成するまでの期間（6時間～48時間）を考慮し，3日間の観察を行なって最大耐量を求めた．

4. 骨髄細胞の染色体におよぼす影響を観察する実験

(1) 投与方法：前述と同じ．

(2) 実験群および動物数：対照群（蒸留水），500mg，1,500mg，2,300mg/kg B.W. ウレタン投与群の計4実験群をもうけ，さらに投与後 6, 12, 24, 48 時間の処理時間組をもうけた．それぞれの群には3～5匹の動物を用いた．

(3) 染色体標本作成法：試料を投与したマウスは，投与後の各経過時に屠殺（断頭放血）し，骨髄を染色体標本の作成に供した．分裂中期像を集めるため，屠殺の2時間前に 0.1% コルヒチン水溶液 1m*l*/kg B.W. を腹腔内に注射した．骨髄細胞は大腿骨から採取した．大腿骨をとり出し両端をハサミで切り，37° の生理食塩水を入れた注射器で，液とともに骨髄細胞を遠心沈殿管に洗い出

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 麻布獣医科大学生物学教室

した．低張液（0.075M KCl 水溶液，37°）で15分間処理したのち，冷カルノア固定液（メタノール3容：氷酢酸1容，4°）で1.5時間～2時間固定した．染色体標本は火焔乾燥法により作成し，ギムザ染色ののちに検鏡に供した．

(4) 染色体観察：各投与群ともそれぞれ1個体につき50個のよく分散した分裂中期染色体像を用いて分析し，また写真撮影した．

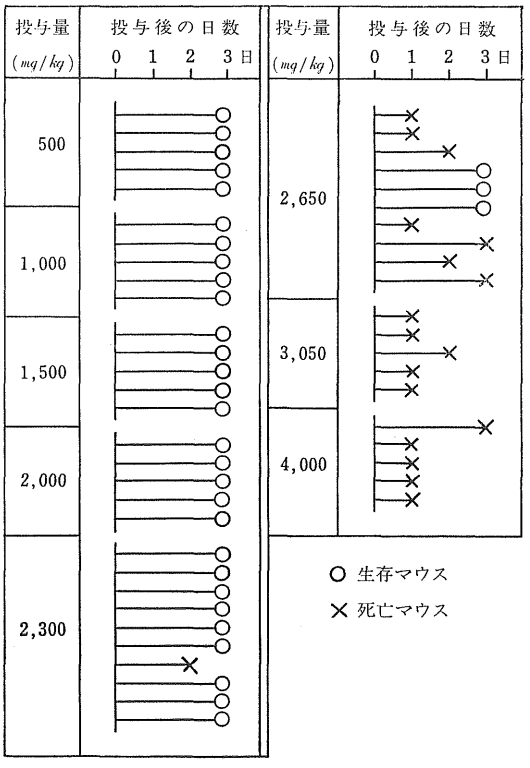
結　果

1. 最大耐量

ウレタンを経口1回投与した時のマウスの経時的生死判定は第1図に示す結果であった．この結果より，最大耐量は 2,300mg/kg B.W. と判断した．

2. 染色体異常分析

各々の細胞について，染色分体ギャップ（chromatid gap），染色体ギャップ（同位染色分体ギャップ，isochromatid gap），染色分体切断（chromatid break），染色体切断（isochromatid break），染色分体交換（exchange），その他（環状染色体 ring chromosome，染色体細片化 pulverization）などの染色体異常の有無について観察を行なった．結果を表1に示す．



第1図　ウレタン1回経口投与後のマウス死亡の経時的観察

投与後，12時間 2,300mg/kg B.W. 投与群の動物番号 No. 2 の個体は標本作成時までに死亡した．

ウレタンの各投与群での染色体数は，ほとんどの細胞で40であり，対照群と有意な差は認められなかった．染色体数には異常をきたさないものと思われる．

染色体異常を有する細胞の出現数は，各投与群とも24時間でもっとも高い値を示した．異常の大半はギャップと切断であった．また，投与後6時間では切断に比べギャップの出現数が高いが，時間経過とともに切断の出現数がそれを上まわる傾向が見られた．これは染色体異常が生じる際，ギャップが切断に先行することを示唆しているものと思われる．一方，染色体型の異常を示す細胞は少なく，そのほとんどは染色分体型の異常であった．交換型の異常は，1例も認められなかった．正常染色体とウレタン投与により出現した異常染色体像を第2図に示す．

各投与群中の3～5匹の動物は，それぞれ似通った異常値を示しているが，投与後24時間 1,500mg/kg B.W. 投与群中の動物番号 No. 1 の個体および48時間 2,300 mg/kg B.W. 投与群中の動物番号 No. 2 の個体は，それぞれ同一投与群中の他の4個体に比べ非常に高い染色体異常出現数を示した．このことは，同一コロニーより得られた同週令（9週令）の動物を用いたにもかかわらず，遺伝物質への影響という観点からも薬物感受性に個体差があることを示している．

考　察

1. 染色体異常分析

ウレタン投与後のマウス体内分布と時間経過による量的変動を測定した結果では，ウレタン濃度は臓器間で均一であり，一定速度で時間とともに低下し，24時間ではほとんどゼロとなる．また，誘発される各種障害（外表面奇形，内臓奇形，口蓋裂，合指など）と投与量との間に，明確な定量関係のあることが報告されている（Nomura and Okamoto 1972,[9] 野村 1974[8]）．今回の実験結果（先に述べた，24時間1,500mg と48時間2,300mg/kg B.W. 投与群中の極端に高い染色体異常出現を示した個体をのぞいて評価した）では，第3図に示すごとく染色体異常を有する細胞の出現は投与後6時間から認められ，どの投与群においても24時間でピークに達し，その後低下した．また，ウレタンの投与量と染色体異常誘発性との間には明瞭な dose response が認められた．これらのことは，ウレタンによる骨髄細胞染色体異常誘発性も，投与量および投与後の体内濃度変化との間に，明らかな定量関係があることを示唆している．投与量との関係は CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* 試験でも認

第1表　マウスにおけるウレタン投与後の染色体異常を有する分裂中期骨髄細胞の出現数と異常の内訳

経過時間	投与量 (mg/kg B.W.)	動物番号	観察細胞数	異常細胞数	ギャップ 染色分体型	ギャップ 染色体型	切断 染色分体型	切断 染色体型	環状染色体	細片化染色体
6	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0	0	0	0
	500	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	4	0	2	1	0	2	0
		3	50	1	1	0	0	0	0	0
	1,500	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0	0	0	0
		4	50	2	2	0	0	0	0	0
		5	50	0	0	0	0	0	0	0
	2,300	1	50	1	1	0	0	0	0	0
		2	50	3	2	1	0	0	0	0
		3	50	2	1	0	1	0	0	0
		4	50	3	3	0	0	0	0	0
		5	50	1	1	0	0	0	0	0
12	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0	0	0	0
	500	1	50	2	2	0	0	0	0	0
		2	50	7	4	0	2	1	1	0
		3	50	4	2	1	1	0	0	0
	1,500	1	50	6	5	0	1	0	0	0
		2	50	4	2	0	2	0	0	0
		3	50	3	3	0	0	0	0	0
		4	50	9	4	0	4	1	0	0
		5	50	1	1	0	0	0	0	0
	2,300	1	50	6	3	0	0	0	0	0
		2*	—	—	—	—	—	—	—	—
		3	50	4	1	0	0	0	0	0
		4	50	2	1	0	0	0	0	0
		5	50	11	3	0	0	0	0	0
24	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0	0	0	0
		3	50	1	1	0	0	0	0	0
	500	1	50	9	1	0	7	0	0	1
		2	50	5	4	0	1	0	0	0
		3	50	8	4	0	4	0	0	0
	1,500	1	50	31	11	0	22	3	1	2
		2	50	13	3	0	10	1	0	0
		3	50	15	9	0	7	1	0	0
		4	50	9	10	2	8	3	1	1
		5	50	14	3	0	11	0	0	0
	2,300	1	50	10	4	0	8	1	0	0
		2	50	14	11	0	5	0	0	0
		3	50	13	5	0	7	0	0	0
		4	50	9	1	1	17	1	0	0
		5	50	15	8	0	10	2	0	0
48	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0	0	0	0
	500	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0	0
		3	50	3	3	0	1	0	0	0
	1,500	1	50	2	1	0	1	0	0	0
		2	50	8	3	0	5	0	0	1
		3	50	3	0	0	3	0	0	0
		4	50	2	1	0	1	0	0	0
		5	50	12	4	0	6	0	1	3
	2,300	1	50	13	10	0	2	0	0	2
		2	50	33	6	1	23	0	0	11
		3	50	8	6	0	6	0	0	0
		4	50	12	8	1	3	1	0	3
		5	50	4	0	0	4	0	0	0

*　染色体標本作成前に死亡

められた.[10]

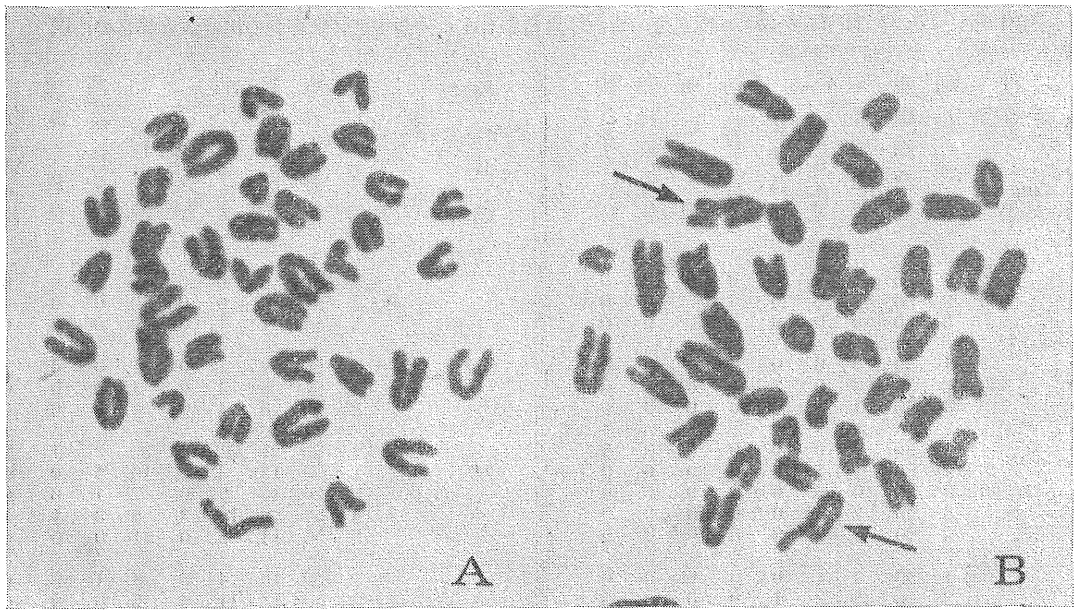
2. *in vivo* 細胞遺伝学的試験法

アメリカで設立された変異原検定のための染色体試験法に関する委員会（Ad Hoc Committee on Chromosome Methodologies in Mutation Testing）の報告では，投与群として，最大耐量，中間量，一般使用量，陽性対照，陰性対照群をもうけ，各群5匹ずつの動物を使用するように述べている．また処理時間として，6時間，24時間，48時間を提案している.[11]

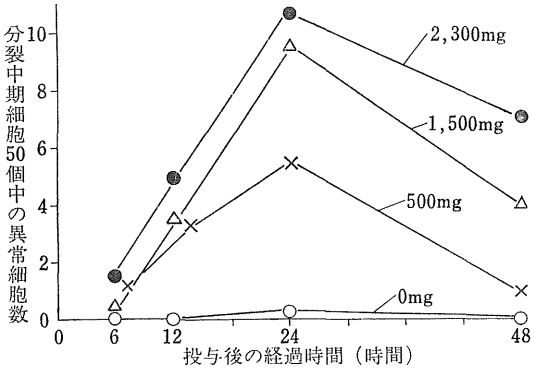
投与量と実験群

今回の実験では，2,300mg/kg B.W.（最大耐量），1,500mg/kg B.W.，500mg/kg B.W. 投与群をもうけた．1,500mg/kg B.W. 投与群をもうけたのはウレタンによる催奇形性試験がこの投与量で多く試みられ，種々の奇形を生じることが知られているからであった．また，500mg/kg B.W. 投与群は，通常，動物に麻酔をほどこす際 1,000mg/kg B.W. のウレタンが用いられており，無作用量としてそれよりもさらに低い投与量を選んだためである．そして結果は，どの投与群とも染色体異常を生じていた．

突然変異性検出の目的とするところは他の毒性試験と異なり，染色体に対する障害作用を調べるのが目的であ



第2図　ウレタン投与後のマウス分裂中期骨髄細胞染色体像．A，正常な核型を示す細胞．
B，染色体異常（矢印）を生じた細胞



第3図　マウスにおけるウレタン投与後の染色体異常を有する分裂中期骨髄細胞の出現数とその経時的変化

る．したがって，染色体分析に必要な期間生存できる可能なかぎり大量の薬物を投与した群（ここでは最大耐量投与群とした）についてのみ検定を行なってさしつかえないと思われる．すなわち，毒性試験として未知化学物質の突然変異誘発性のスクリーニングを行なう際には，この最大耐量投与群で検定を行ない，何らかの有意な異常の発生が認められればはじめて低濃度投与群をもうけ，その障害の強さや特徴を評価するのが，要する労力，時間および費用を考える場合能率的であろう．

使用動物数

今回の実験では，動物数を各群3～5匹とした．その中には前述したごとく，投与後死亡したもの1例，同一投与群の他の個体に比べ高染色体異常出現を示す個体が2例みられた．薬物感受性に関し強い個体差を示す動物の存在することが示唆されたが，このことから，スクリーニングとしては投与群の数を最低におさえ，その代りに使用する動物数をふやすことの方が有効かと思われる．

要　旨

ウレタンの突然変異誘発性を調べるために，ICR-JCL系雌マウス（9週令）の骨髄細胞中期染色体分析による細胞遺伝学的観察を行なった．

(1) 最大耐量（1回経口投与，3日間の観察）は2,300mg/kg B.W.であった．

(2) 0，500，1,500，2,300mg/kg B.W.のウレタン投与群について，投与後6，12，24，48時間経過時の染色体分析を行なった．

(3) 染色体異常を有する細胞の出現は，各投与群とも6時間で見られ，24時間で最高に達した．各投与量と染色体異常の出現数との間には顕著なdose responseが認められた．

(4) 染色体異常の内訳は，ギャップ，切断が多く，他に環状染色体，細片化染色体が観察された．染色体数には変化が認められなかった．

(5) 今回の結果をもとに，現在推奨されている試験方法について考察した．

文　献

1) Kihlman, B.A. : *Mutation Research*, **26**, 53, 1974

2) Palitti, F., Rizzoni, M., Gatti, M. and Olivieri, G. : *Mutation Research*, **26**, 145, 1974

3) Riley, H.P. and Neuroth, J.V. : *Heredity*, **61**, 283, 1970

4) Kristoffersson, U. : *Hereditas*, **69**, 298, 1971

5) Tonomura, A. and Sasaki, M.S. : *Japan J. Genetics*, **48**, 291, 1973

6) Legator, M.S. : *J.Heredity*, **61**, 239, 1970

7) Nishimura, H. and Kuginuki, M. : *Okajima Folia Anat. Jap.*, **31**, 1, 1958

8) 野村大成：放射線生物研究, **9**, 29, 1974

9) Nomura, T. and Okamoto, E. : *GANN*. **63**, 731, 1972

10) 吉田誠二, 益渕正典, 縄井寿美子：東京衛研年報, **26-2**, 166, 1975

11) Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**, 269, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 166-170, 1975

ウレタンの培養細胞（L5178Y, CHO-K1）における細胞遺伝学的研究

吉田誠二* 益渕正典* 縄井寿美子**

In Vitro Cytogenetic Studies of Urethane on Cultured Cells (L5178Y, CHO-K1)

SEIJI YOSHIDA*, MASANORI MASUBUCHI* and SUMIKO NAWAI**

筆者等は先にウレタンによって誘発される染色体異常について，マウス骨髄細胞を用いた *in vivo* 系で調べ，投与量と染色体異常誘発性との間に明瞭な does response が認められることを報告した.[1] 今回，マウス白血病細胞由来の L5178Y 細胞およびチャイニーズ・ハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を用いて，ウレタンの *in vitro* 細胞遺伝学的研究を行なった.

材料および方法

1. 細胞増殖におよぼすウレタンの影響

使用細胞株：L5178Y 細胞.

供試薬物：ウレタン（Urethane, $C_3H_7NO_2$), E. Merck 社製，Lot. No. 3049395.

培養液：馬血清（10%），ペニシリン・ストレプトマイシン混液（100μ/ml）添加の Fisher's Medium (Gland Island Biological Co.).

培養方法：5×10^4/ml 濃度の細胞浮遊液を 50ml 培養瓶5本にそれぞれ 40ml ずつ入れたのち，上記培養液に溶かしたウレタンを最終濃度 0, 0.2, 1.0, 5.0, 25.0 mg/ml になるように添加した．培養は，37° のふ卵器内で行なった.

細胞数の測定：細胞数は経時的（2, 4, 6, 8, 10, 24, 32, 48, 56, 72時間）に細胞浮遊液の 0.07ml をとり，Isoton で100倍に希釈したのち，Coulter Counter・Model Z (Coulter Electronics Inc.) で測定した.

2. コロニー形成率におよぼすウレタンの影響

使用細胞株：CHO-K1 細胞.

供試薬物：1に同じ.

培養液：仔牛血清（10%）添加の F-12 Medium (Grand Island Biological Co.).

培養方法：各種濃度（0, 0.2, 1.0, 5.0, 25.0mg/ml）のウレタン添加培地を 60mm Petri dish に 4.9ml 入れたのち，1×10^3/ml の細胞浮遊液を 0.1ml 加え，37° の CO_2 ふ卵器で培養を開始した．16時間経過後，それぞれのウレタン添加培養液をすて，P.B.S. で2回洗浄後，ウレタン無添加培養液にてさらに7日培養を続けた.

コロニー数の算定：培養終了後，培養液をすて，P.B.S. で数回洗浄し，10% Buffer ホルマリン溶液で固定後，0.1%クリスタルバイオレットで染色し，コロニー数の算定に供した.

また，陽性対照として ethyl methan sulfonate（以下EMSと略す）0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/ml 添加下についても同様の方法を試みた．なお各薬物処理群ともそれぞれ4個の Petri dish を用いて結果をもとめた.

3. 染色体におよぼすウレタンの影響

使用細胞株：L5178Y, CHO-K1 細胞.

供試薬物：1と同じ.

培養液：それぞれ，1, 2と同じ.

培養方法：各細胞種とも，0, 1.0, 5.0, 25.0mg/ml のウレタン添加培養液で，6, 12, 24時間培養した.

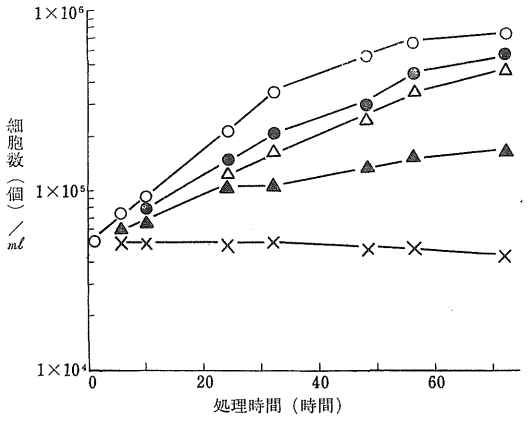
染色体標本作成：各時間培養終了2時間前に 5μg/ml のコルセミドを作用させたのち，トリプシン（0.05%）で細胞をガラス壁からはがし，0.075 M KCl 溶液で低張処理を行ない，カルノア液（メタノール3容：氷酢酸1容，4°）で固定し，火焔乾燥したのち，2% ギムザ液で染色した．よくひろがった分裂中期の細胞 200 個についてその染色体分析を行なった.

結　果

1. ウレタンの細胞増殖におよぼす影響

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 麻布獣医科大学生物学教室

L5178Y は浮遊培養細胞であり薬物処理も容易で，また今回のように，一培養瓶から経時的に細胞浮遊液をサンプルとして得られるため，細胞の増殖を計測するのに都合がよかった．各ウレタン濃度添加培養液中における細胞数の経時的変化は，第1図に示すごとくであった．



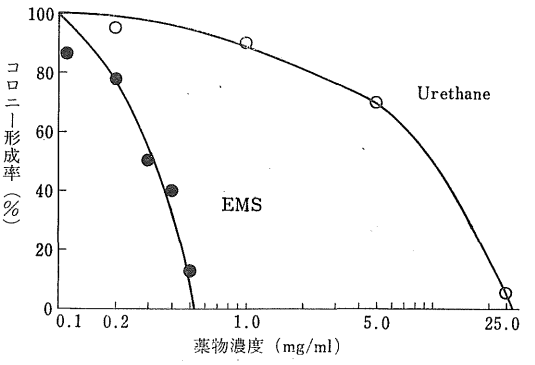
第1図　ウレタン処理における L5178Y 細胞の増殖曲線

○—○ 0mg,　●—● 0.2mg,　△—△ 1mg,
▲—▲ 5mg,　×—× 25mg/ml

ウレタンの細胞増殖抑制作用は，処理開始後6～8時間から認められはじめる．特に，25mg/ml処理群は，6時間までは他の処理群と同程度の増殖を示しているが，その後細胞数は減少し，処理開始時の細胞数よりも下まわった．これは細胞死を生じ，そののち細胞崩壊に至るためだと思われる．その他の処理群では，増殖が抑制されながらも細胞数は増加し，各処理群間で顕著な dose response を示した．

2. ウレタンのコロニー形成率に対する影響

L5178Y は浮遊培養細胞であるため，単層静置培養である CHO-K1 細胞を用いて，各ウレタン濃度添加下のコロニー形成率を求めた．CHO-K1 の1細胞分裂周期に要する時間は，平均12～13時間であることを考え，ウレタン処理をほぼ全周期にわたって行なった．その結果を第2図に示す．ここでも，コロニー形成率は顕著な dose response を示した．また，培養停止・染色後のコロニーの形状を観察すると，細胞数が多く直径1mm程度のコロニーから，細胞数が少なく直径0.2mm程度のものまで大きく変異していた．細胞浮遊液添加後，約6時間までに，細胞は Petri dish ガラス面に付着するが，その際ウレタンの作用を強くうけ死に至った細胞は付着不可能であり，また軽度の障害をもち付着した細胞は，その後の増殖に何らかの影響を受けていると考えられる．さらに，それぞれのコロニー内の細胞の形状にも種々が見られた．これらの詳細は現在検討中である．



第2図　CHO-K1 細胞における Urethane および EMS の濃度——コロニー形成率曲線．ただし細胞を16時間処理した場合の結果を示し，形成率は無処理群を100として比較した．

一方，ウレタンはEMSに比べ弱いコロニー形成阻害を示した．それぞれのコロニー形成率の曲線から50%コロニー形成阻害度（ID_{50}）は，EMS 0.32mg/ml，ウレタン 6.0mg/ml と計算された．EMS の ID_{50} 値はこれまでの報告[2]とよく一致した．

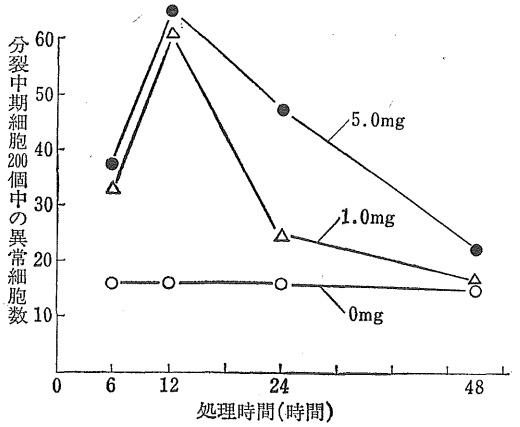
3. ウレタンの染色体におよぼす影響

L5178Y 細胞：第3図に示すごとく，ウレタン投与により種々の染色体異常が観察された．特に Endoreduplication を示す像が数多く観察され，また Endoreduplication を生じた細胞がその他の染色体異常を伴って出現した．この現象は，ウレタン濃度が高くなるにつれて高頻度で出現する傾向を示すことから，ウレタンの作用となんらかの関係があるものと思われる．しかし，無処理群でもわずかながら観察されるため，今回用いた L5178Y 細胞がこの様な異常を潜在的に多数もっていたことも考えられ，その原因および染色体異常に関する詳細な分析は今後の課題とした．

CHO-K1 細胞：各処理群，各経過時間の細胞について，染色体異常を伴う細胞の出現数および異常の内訳について観察を行なった．結果を第1表に示す．

染色体異常を示す細胞の出現数は，各処理群とも12時間でもっとも高い値を示した．また，ウレタン濃度と染色体異常を保有する細胞の出現数との間には明瞭な dose response が認められた（第4図）．無処理群でも200個中15～17個の異常細胞が観察されたが，これらは培養系細胞のもつ特徴だと思われる．

ウレタンによって誘発された染色体異常はおもにギャップと切断であった．また，染色分体交換型の異常が12時



第4図 CHO-K1細胞におけるウレタン処理による分裂中期染色体異常保有細胞の出現数とその経時的変化

間処理で高頻度に出現した．その他の異常として，細片化染色体，二動原体染色体，環状染色体，endoreduplication 型の染色体が認められた．これらの異常のうち，染色分体交換，二動原体染色体，endoreduplication 型の異常は *in vivo* 試験では出現しなかったものであり，[1] また今回の観察では無処理群にも観察されることから，培養系細胞で生じやすい異常だと思われる．それぞれの異常像を第5図に示す．

要　旨

ウレタンの突然変異誘発性を調べるために，L5178Y, CHO-K1 細胞を用いて *in vitro* 細胞遺伝学的観察を行なった．

(1) L5178Y 細胞を用い，0, 0.2, 1.0, 5.0, 25.0 mg/m*l* のウレタン添加下における増殖を調べた．増殖阻害は添加後6時間で認められ，また各添加濃度と増殖率の間には，dose response が認められた．

(2) CHO-K1 細胞を用い，0.2, 1.0, 5.0, 25.0mg/m*l* のウレタン16時間処理後のコロニー形成率を調べた．その結果，ID_{50} は 6.0mg/m*l* であった．

(3) CHO-K1 細胞を用い，0, 1.0, 5.0, 25.0mg/m*l* のウレタン添加下における染色体異常保有細胞の出現数とその異常の内訳を，6, 12, 24, 48時間処理について調べた．染色体異常保有細胞の出現は6時間で見られ，12時間後で最も多く見られた．各添加量と染色体異常の出現数との間には，顕著な dose response が認められた．

(4) 染色体異常の内訳は，ギャップ，切断が多く，他に二動原体染色体，細片化染色体，染色分体交換，endoreduplication 現象，環状染色体などが観察された．これらの異常のうち，染色分体交換，二動原体染色体，endoreduplication は *in vivo* 試験で出現しなかったものである．

文　献

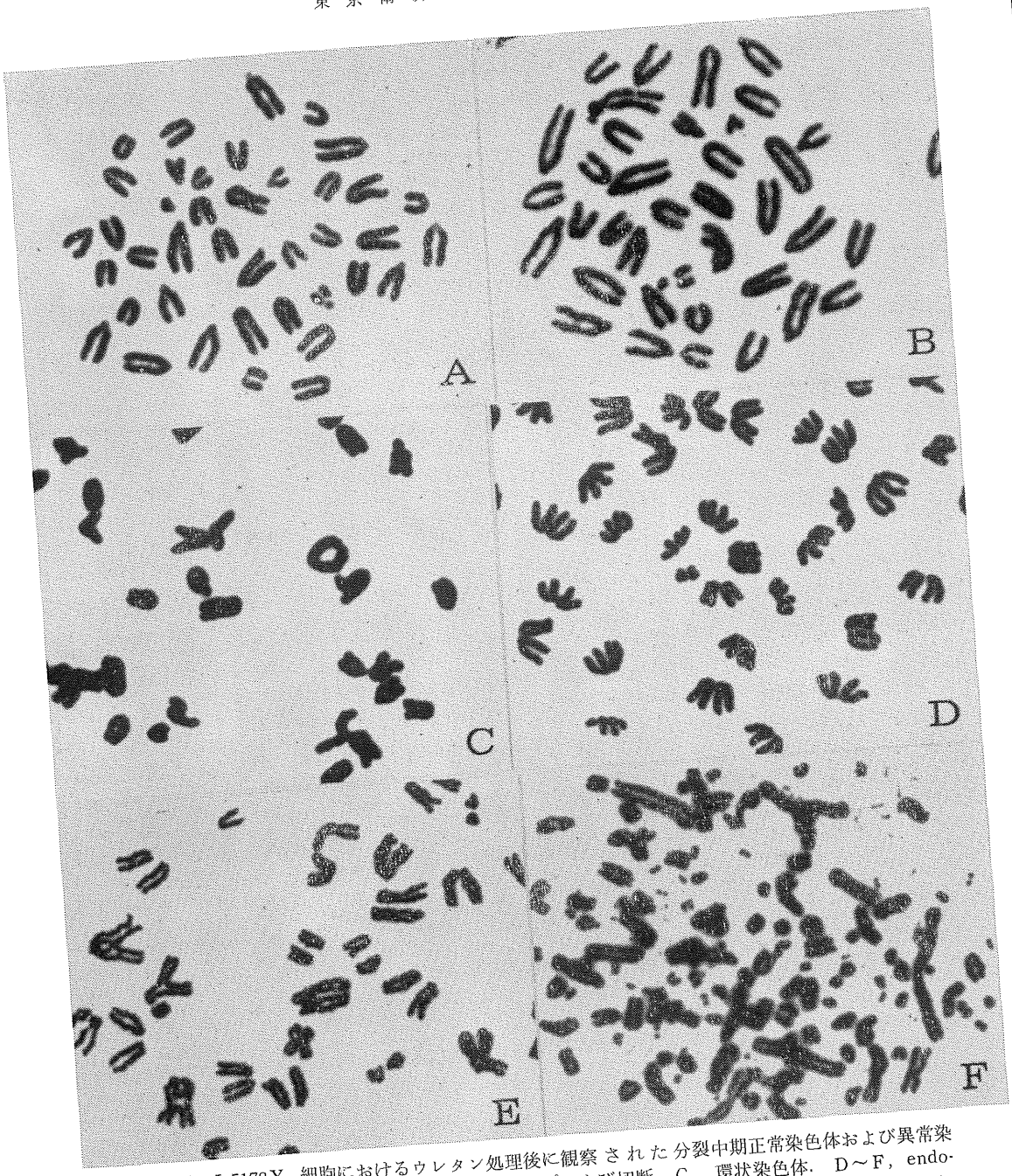
1) 益渕正典，縄井寿美子，吉田誠二：東京衛研年報，26-2, 161, 1975

2) Kao, F.T. and Puk, T.T.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **60**, 1275, 1968

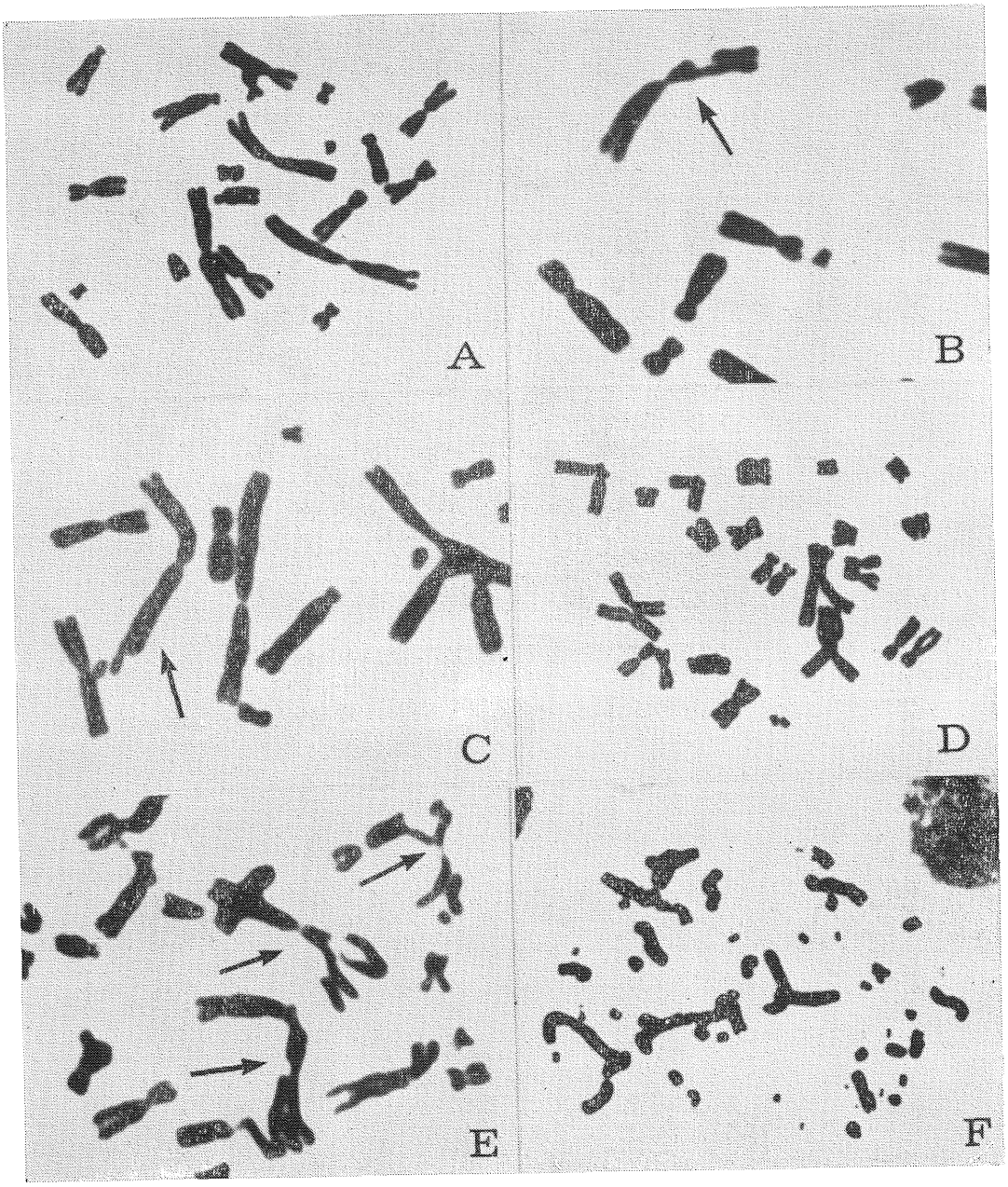
第1表 CHO-K1 細胞におけるウレタン投与後の染色体異常を有する分裂中期細胞の出現数と異常の内訳

処理時間	処理量 (mg/m*l*)	観察細胞数	異常細胞数	ギャップ		切断		染色分体交換	細片化染色体	二動原体染色点	環状染色体	E*・R・D型
				染色分体型	染色体型	染色分体型	染色体型					
6	0.0	200	17	9	0	6	1	5	0	2	0	1
	1.0	200	33	17	1	8	2	4	1	3	0	2
	5.0	200	37	20	4	9	4	3	2	1	1	1
12	0.0	200	16	10	4	5	0	2	0	0	1	0
	1.0	200	61	40	7	17	3	10	0	5	0	2
	5.0	200	65	35	4	32	1	15	1	5	1	1
24	0.0	200	16	12	1	4	0	1	0	0	0	0
	1.0	200	25	15	5	3	0	4	0	3	0	1
	5.0	200	47	32	7	10	3	4	0	3	0	1
48	0.0	200	15	9	2	4	0	0	0	0	0	0
	1.0	200	16	11	2	2	0	0	0	2	0	1
	5.0	200	21	17	2	3	0	0	0	2	0	2

* endoreduplication 型



第3図　L5178Y 細胞におけるウレタン処理後に観察された分裂中期正常染色体および異常染色体像．A，正常染色体像．B，ギャップおよび切断．C，環状染色体．D～F，endoreduplication 型の異常で，E，F はそれぞれ交換型，細片化染色体の異常を示す．×1,500.



第5図　CHO－K1 細胞におけるウレタン処理後に観察された分裂中期正常染色体および異常染色体像．異常を示す染色体を矢印で示す．
A，正常染色体像．B，ギャップ．C，切断．D，endoreduplication 型．E，交換型．F，細片化染色体．×1,100（A，D，F）×2,200（B，C，E）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 171-174, 1975

遺伝物質に対する微量毒性物質の作用ならびにその障害回復機構の解析
(2) 潜在的障害とその検出

金西信次* 渡部 真**

Analysis of Micro-toxicant Damages on Genetic Substances
(2) Detects of Potential Damage

NOBUZI KANANISHI* and MAKOTO WATANABE**

前報に述べた二つの課題を検証するためにわれわれは研究を進めている.[1] すなわち

（1） 微量の毒性物質による遺伝的障害（遺伝子および染色体突然変異），もしくは晩発性障害（発がん，寿命短縮，体質の脆弱化など）の誘発機構，ならびに作用量効果関係の解析

（2） これらの障害誘発の際に共存する化学物質の共同作用による相乗，相加，あるいは拮抗的効果の機構ならびに作用量効果関係の解析

今回は細胞性粘菌を用いて，微量の毒性物質による潜在的障害（potential damage）と細胞分裂後の回復との関連について調べた．DNAもしくは染色体など遺伝物質に作用する化学物質として，前報に述べた(A)，(B) 2群の薬剤に注目し,[1] (A)に属する薬剤としてマイトマイシン C, N-メチル-N′ニトロ-Nニトロソグアニジン（MNNG）を，(B) に属する薬剤としてカフェイン，エチジウムブロマイド，プロフラビンを，更に遺伝物質には直接作用しないが，蛋白質の合成を阻害する等の作用で細胞の増殖を抑制することが知られている薬剤としてサイクロヘキシミド，ピューロマイシンを加えて実験をおこなった．

材料および方法

培養法 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* Ax-2株を用い，前報で述べたように axenic 培養液で培養した．また寒天培地上で細菌とともに培養し，プラーク形成能により生存率を求めた.[1]

細胞数の測定 Coulter Counter Model ZB により測定した．

紫外線照射 15W殺菌灯（東芝GT-15）を用い，照射線量率は 8J/m²•sec である．

試薬 カフェイン：和光純薬工業(株)特級無水物，硫酸プロフラビン：和光純薬工業(株)，エチジウムブロマイド：Boots Pure Drug Co. LTD, MNNG：岩井薬品化学，マイトマイシンC：協和醗酵工業(株)，ピューロ

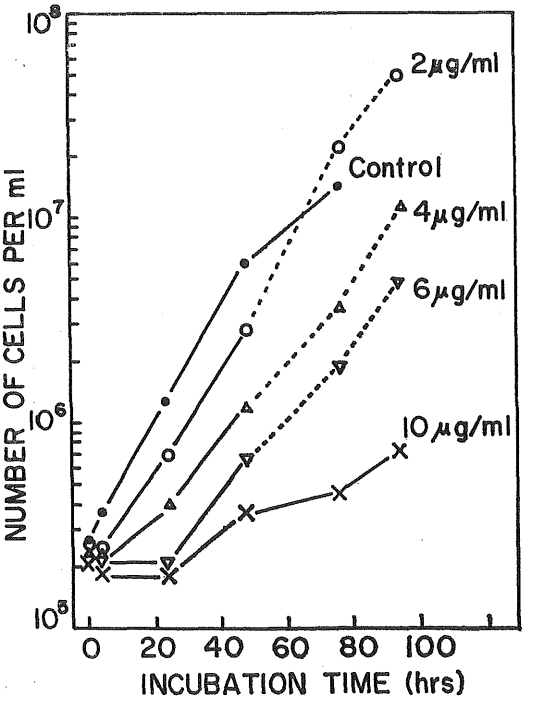


図 1 MNNG による増殖の阻害

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立アイソトープ総合研究所

マイシン：Makor Chemicals LTD，サイクロヘキシミド：Sigma.

実験結果および考察

MNNG による増殖の阻害 前報で述べたように細胞性粘菌は 25～250μg/ml の濃度の MNNG で10分間処理することによって生存率は著しく低下する．図1は増殖中の細胞に 2～10μg/ml 濃度に MNNG を添加培養して細胞数の変化を測定したものである．無添加の細胞(Control) は約10時間の倍加時間で増殖しており，2μg/ml では約8時間の分裂遅延の後，無添加の細胞とほぼ同じ速度で増殖する．4μg/ml 以上の濃度では，同様に数時間の分裂遅延があるが，その後の増殖も阻害される．点線部分は培養開始後48時間目に，増殖した細胞をそれぞれ同じ濃度の MNNG を含む培地に1/5に希釈して培養をつづけ，測定した細胞数より得たものである．

2μg/ml の濃度の MNNG では，明らかに分裂遅延はあるが，その後の分裂速度はコントロールとほとんど等しく，かつ MNNG 添加培地を新しくしても増殖速度は変わらない．このことから，培養中 MNNG が不活性化されていくのではなく，むしろ細胞が MNNG に抵抗性をもったのではないかと考え，これらの細胞集団中の生存細胞数を調べた．

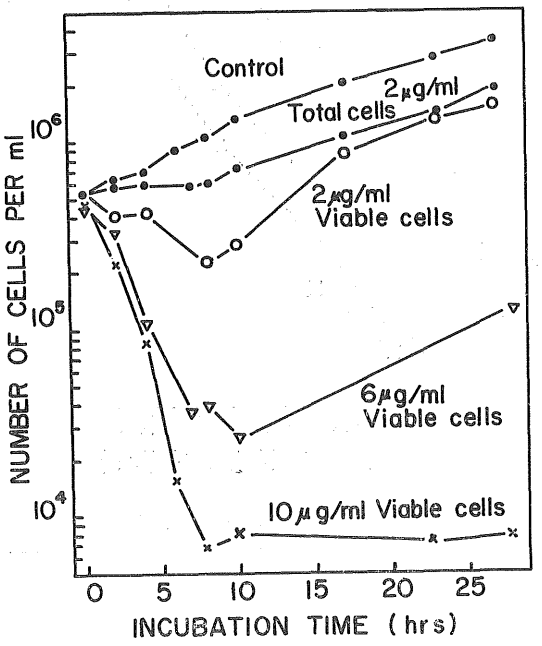


図 2 MNNG 添加培養の生存細胞数の変化

MNNG 添加培養の生存細胞数の変化 図2は増殖中の細胞に MNNG を添加，22°で振盪培養し，一定時間毎に一部を取り出して希釈し，寒天培地に細菌とともにまいてプラーク形成能を調べたものである．黒丸 Control は MNNG を添加しない細胞の増殖曲線であり，全ての点でプラーク形成能はほぼ100%である．黒丸 Total Cells は 2μg/ml の MNNG を添加して培養した全細胞数の増殖曲線で，約8時間の分裂遅延のあと無添加培養の細胞と同じ速度で増殖する．白丸はこのときのプラーク形成能による生存細胞数の変化を示したものである．すなわち生存細胞は培養時間とともに次第に減少するが，約8時間で極小値に達し，以後分裂しうる細胞は次第に増加していく．そして培養開始後24時間では約80%の細胞がプラーク形成能を有するようになる．これより濃度の高い MNNG でも生存細胞数の変化は同様なパターンをとる．

低濃度の MNNG を添加した培養により，一部の細胞は増殖能を失うが，他の細胞は MNNG が存在していても充分増殖することができる．

MNNG で前培養した細胞の MNNG 感受性 図3は 2μg/ml の MNNG を含む培養液中で24時間培養した細胞を 100～250μg/ml の MNNG で10分間処理し，MNNG を遠心分離により洗い，寒天培地に細菌とともにまいてプラーク形成能を調べたものである．黒丸はコントロールの MNNG に対する生存曲線で，白丸は MNNG で前培養した細胞の生存曲線である．図1,2の

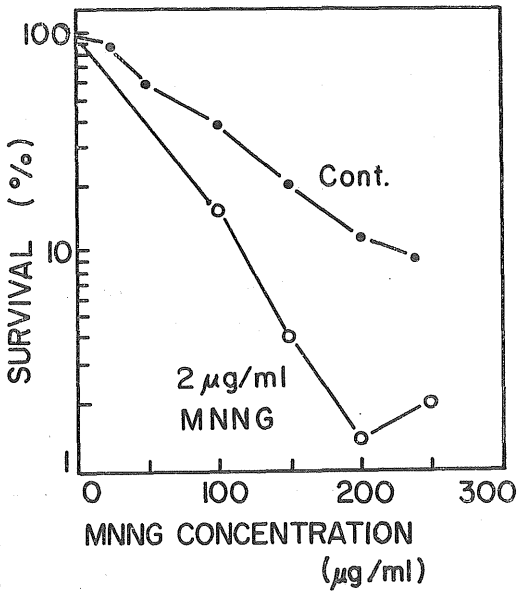


図 3 MNNG 前培養細胞の MNNG 感受性

実験ではMNNGに対して抵抗性を獲得したのではないかと考えられた．しかしMNNGで前培養した細胞を更に高濃度のMNNGで短時間処理したときは，逆に感受性が高くなるという結果が得られた．

このようにDNA等の遺伝物質に障害を起すことが明らかな化学物質中で細胞を培養しても，その化学物質が微量であるならば，障害は種々の方法で完全に修復され，細胞の分裂にはほとんど影響を与えないで増殖することができるものと考えられる．しかし微量の毒性物質と共存して分裂しているこれらの細胞の遺伝物質中には，潜在的な障害の一部が回復されないで，娘細胞にそのままうけつがれる可能性がある．細胞の分裂を介しても回復されないこのような潜在的な障害が，更にMNNG等の化学物質の処理による刺激によって拡大され，細胞死に至ったものと考えられる．[2]

薬剤を添加し前培養した細胞の紫外線抵抗性　細胞の増殖にほとんど影響を与えない最大薬剤濃度を求め，その薬剤濃度で24～30時間細胞を培養する．細胞の倍加時間は10～12時間で，薬剤添加培養液中で少なくとも2回以上は分裂している．この薬剤添加培養液中で前培養した細胞のプラーク形成能はほぼ100%である．図4は（A）に属する薬剤であるMNNG（1μg/ml）およびマイトマイシンC（Mit, 20μg/ml）で24時間，前培養し，紫外線を照射したときの生存曲線である．図5は（B）に属する薬剤のカフェイン(Caff. 0.2mg/ml)，プロフラビン(Prof, 6.5μg/ml)，エチジウムブロマイド（E.B.

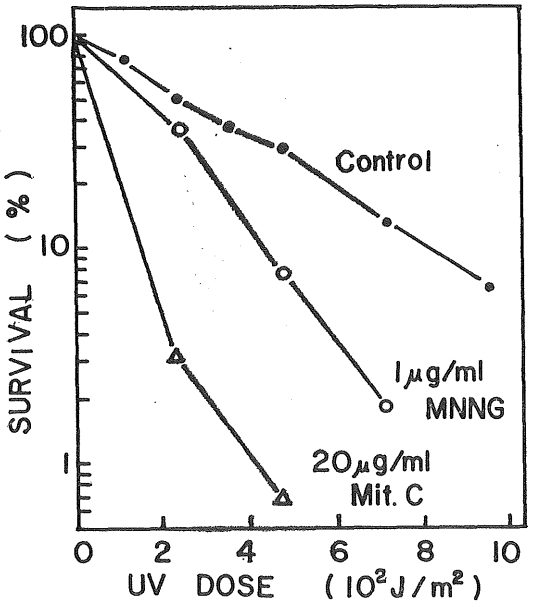


図4 （A）群前培養細胞の紫外線抵抗性

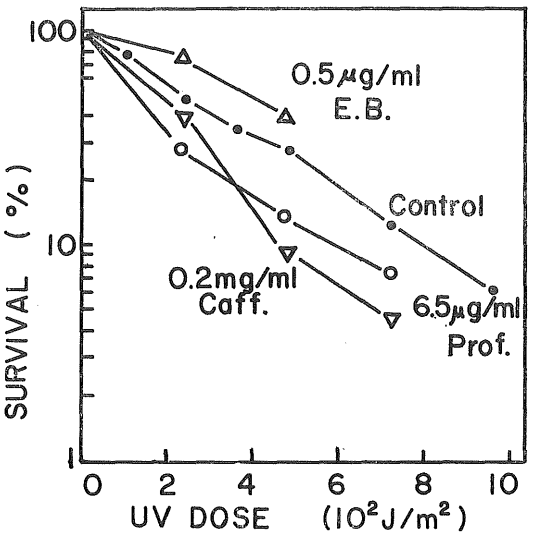


図5 （B）群前培養細胞の紫外線抵抗性

0.5μg/ml）で24時間，それぞれ前培養したあとの紫外線に対する生存曲線である．（A）群の薬剤の存在下で前培養した細胞は紫外線に対する感受性は高く，前培養によって作られた潜在的障害は，そのままではほぼ100%の生存率を有するが，MNNGの後処理の場合と同様に，紫外線照射によって障害が拡大され，生存率が大きく低下するものと考えられる．また（B）群の薬剤のカフェイン，プロフラビンの存在下で前培養した細胞は，紫外線に対する感受性が明らかに高くなるが，（A）群の薬剤ほどではない．エチジウムブロマイドは逆に多少抵抗性となっている．これらのことについては渡部ら[3]によって，DNAあるいは染色質のエチジウムブロマイドによる凝縮と，カフェインによる引き伸しの効果による可能性が示唆されている．またピューロマイシン(100μg/ml）やサイクロヘキシミド（10μg/ml）で前培養した細胞も，紫外線に対する増感度が少ない．

障害と回復との関係　細胞性粘菌ではγ線による障害からの回復に際し，亜致死損傷（sub-lethal damage）からの回復[4]と同時にカフェインを用いて検出された二段階の回復過程[1]があり，MNNGのような化学物質による障害からも同様に回復する．[1] 更に第2段階の回復がおこなわれる前に細胞数は増加することから，ある種の障害は残っていても細胞は分裂することが出来ると考えられる．細胞増殖にほとんど影響を与えない濃度のMNNGを添加して培養したときのように，遺伝物質に障害をもたらす毒性物質を長期間連続して，微量づつ摂取したとき，増殖中の細胞では，第1段階の回復過程によ

って障害が修復されると同時に，第2段階の回復過程によっても修復される．しかし第1回復は比較的短時間で終了するが，第2回復は細胞分裂後におこなわれるため比較的長時間を要する．図2,3あるいは4の実験の場合では，時間とともに新たな障害が次々に生じてくるため潜在的障害として蓄積され，回復との間に一定の平衡関係が生じるものと考えられる．この平衡状態にある潜在的障害は，新たな刺激によって回復不可能な程度まで拡大され，突然変異又は細胞死の増加につながるものと考えられる．これら潜在的障害の定量化とその実体の究明が今後の課題である．

文　献

1) 金西信次，渡部　真：東京衛研年報，**25**，685，1974

2) 金西信次，渡部　真：日本放射線影響学会第17回大会要旨集　2 A18

3) 渡部　真，金西信次，金城康人：東京アイソトープ研年報，印刷中

4) Kananishi, N. and Yanagisawa, K.: *Gamma Field Symposia* **9**, 19, 1970, Deering, R.A.: *Science* **162**, 1289, 1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 175-180, 1975

肝ホモジネート 10,000g 上清処理による AF2 の分解と HeLa S3 細胞に対する毒性

川野澄江* 中尾順子* 平賀興吾*

Degradation of AF2 by 10,000×g Supernatant of Rat Liver Homogenate and Cytotoxicity to HeLa S3 Cells

SUMIE KAWANO*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

昨年の年報で，2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid amide（以下 AF2 と略す）は，他の保存料とは比較にならないほど低い濃度で培養細胞を障害すること，また，この障害は，ラット肝ホモジネートの 10,000×g 上清と短時間インキュベートしただけでほぼ完全に取除かれることを報告した.[1] しかしながら，AF2 が実際この反応溶液中でどの程度まで分解されているのかは明らかでなく，高分子化合物との物理的結合等が細胞への AF2 の作用を妨害している可能性も考えられた.

そこで今回は，*in vitro* における AF2 の分解反応について検討を行い，実際に AF2 の分解が十分に起っていることを確かめたうえで，中間代謝物の培養細胞への影響を検討した．また，それに付加えて，中間代謝物ではなく，AF2 そのものが細胞のDNAに直接作用している可能性も考えられるため，その点についてもあわせて検討を行った.

実験方法

1. cis型AF2の合成 1g の trans 型の AF2 を沸騰水に溶解させたのち，オートクレーブで120°，1時間加熱した．放冷，濃縮後冷蔵庫中に放置して結晶を得，エタノールから2回再結を行った．このようにして得られた cis 型の AF2 は，可視部の吸収スペクトル(Fig. 1)ならびに赤外吸収スペクトル(Fig. 2)において文献値[2]と同一であると考えられた.

2. AF2 分解系の反応条件の検討 Wistar-JCL 系の成熟雄ラットの肝臓を生理食塩水で灌流後，3倍容の 0.25Mショ糖-0.03M Tris-塩酸緩衝液（pH 7.3，以下緩衝液と略す）とともにホモゲナイズした．このホモジネートの10,000×g，30分遠心分離後の上清を用いて，AF2 の分解反応の活性の測定を行った．H.V. Mal-

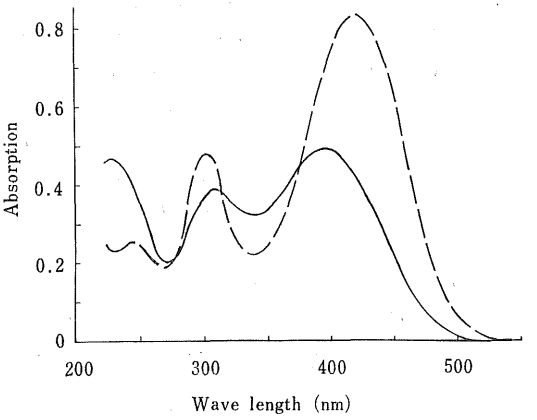


Fig. 1 Absorption spectra of AF2 (distilled water)
——trans-form, — —cis-form

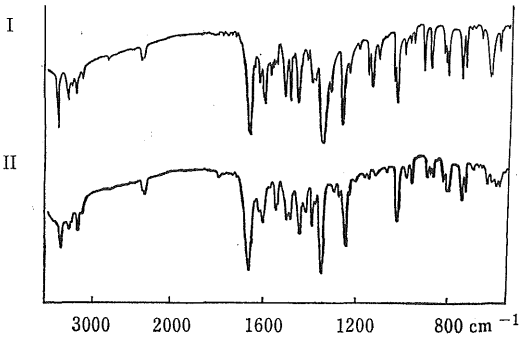


Fig. 2 Infrared absorption spectra of AF2 (KBr)
I：trans-form, II：cis-form

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ling[3] にならい，NADPH 生成系を用いずに NADPH のみを大量に加えた系で活性の測定を行った．その組成は，上清 0.2m*l*，NADPH 3.6 μmoles/m*l*，$MgCl_2$ 4.8 μmoles/m*l*，緩衝液 0.29m*l*，trans AF2 (20mg /m*l* DMSO) 0.01m*l* (1.61mM) である．なお，経時変化の検討にはこの2倍量を用いた．37° で10分間インキュベートを行ったのち反応溶液 0.1m*l* を取り出し，氷冷クロロホルム約 5m*l* で trans 型および cis 型の AF2 を抽出した．3,000rpm，15分遠沈後，クロロホルム層をとり，窒素気流下 40° でクロロホルムを蒸発，除去した．残渣を少量のアセトンに溶解させ，シリカゲル G (Merck 社製) の薄層上にスポットし，酢酸エチル—ベンゼン (3：2) で展開を行った．trans 型および cis 型の AF2 は，この溶媒系で完全に分離された．得られた2個の黄色のスポット (trans AF2，Rf≒0.5；cis AF2，Rf≒0.6) を削りとり，5m*l* の蒸溜水で抽出したのち，2,500rpm，15分遠沈後の上清を取り，分光光度計 (Gilford 300-N) を用いて，trans AF2 の場合には 390nm で，cis AF2 の場合には 420nm で吸光度の測定を行った．AF2 の分解速度は trans 型および cis 型，両者を合計したものの10分間の減少量で表示した．なお，タンパク質量の測定は，Lowry らの方法[4]によった．

3. HeLa S3 細胞に対する AF2 の細胞毒性 本報告では，コロニー形成率の阻害の程度によって細胞毒性を判定した．Fig. 6 では，10日間処理の trans 型および cis 型の AF2 のコロニー形成率に及ぼす影響について検討した．20%仔牛血清 (極東製薬工業) を含む Eagle の MEM 培地 (ダイゴ栄養化学) 5m*l* を添加した60mm のペトリ皿に約100個の HeLa S3 細胞をまき，さらに 3.2—7.2μM の trans AF2 および12—24μM の cis AF2 を添加して 37° の炭酸ガス培養器中で培養を行った．10日間培養後，ホルマリン固定，クリスタル・バイオレット染色を行い，形成されたコロニーの数を数えた．結果は無処理の対照を 100 としたときの %(R.P.E.) で表示した．

2時間処理の影響 (Fig. 7) については，細胞をまいた翌日に 20—160μM の trans AF2 で2時間処理を行ったのち，さらに10日間培養を継続した．

肝ホモジネートの 10,000×g 上清中で分解された AF2 の細胞毒性 (Fig. 8) については，細胞をまいた翌日，培地 0.5m*l* または 0.25m*l* を捨て，前記のような反応条件下で種々の時間 (5—60分間) インキュベートしたあとの反応溶液，0.5m*l* または 0.25m*l* をペトリ皿に添加した．この添加量は，反応開始時の AF2 濃度に換算するとそれぞれ160および 80μM に相当する．2時間培養後，培地を捨て，MEM培地5m*l* で1回洗ったのち，新しい培地を加えてさらに10日間培養を行った．

4. DNA の修復合成速度の測定 Balb/3T3 細胞と称するマウス由来の繊維芽細胞株の中から十分に接触阻止を起すクローンを選んで実験に用いた．J.E.Trosko and J.D.Yager[5] にならい，ヒドロキシウレアで，S期 (DNA合成期) の DNA 合成を抑えた条件下で ^{3}H-チミジンのとりこみの測定を行った．10%の仔牛血清を含む Eagle の MEM 培地 5m*l* を添加した 60mm のペトリ皿に 1×10^5 個の細胞をまき，9日間培養を行って完全に monolayer を形成させた．その後 1mM のヒドロキシウレアを添加して10時間培養を行ったのち，20—160μM の AF2 で2時間処理を行った．培地を捨て，MEM 培地で1回洗ったのち，新しい培地 5m*l* (ヒドロキシウレア 1mM を含む) とメチル-^{3}H-チミジン (The Radiochemical Centre Ltd) 1μCi/m*l* を添加し，さらに3時間培養を続けた．その後培地を捨て，5m*l* のリン酸緩衝液 (PBS) で2回洗ったのち，トリプシン—EDTA で処理して細胞をばらばらにした．細胞懸濁液を 10m*l* の遠沈管に移し，1,000rpm，5分遠沈後，上清を捨て，2m*l* の PBS に細胞を懸濁させた．次いで，10%トリクロル酢酸 2m*l* を加えて15分間放置した．なお，トリプシン処理後の操作は，すべて氷冷下で行った．その後，細胞をグラスファイバー・フィルター (Millipore 製) 上に移して吸引濾過を行い，5m*l* の5% TCA で3回洗浄したのち，フィルターをバイアル瓶に移し，10m*l* のシンチレーター (0.4%の PPO を含むトルエン溶液) を加え，液体シンチレーション・カウンター (Beckman LS-230) を用いて放射能を測定した．

5. フェノバルビタール投与ラットの AF2 分解活性の測定 7週令の雄の Wistar-JCL 系ラット (平均体重 236g) にフェノバルビタール (三晃製薬，局方品，Na 塩として使用) 100mg/kg を腹腔内注射した．投与後3日目に肝臓を摘出し，前記の方法で AF2 の分解活性を測定した．結果は，上清 m*l* 当り，上清タンパク質 mg 当りおよびミクロソームタンパク質 mg 当りの10分間の AF2 の分解量で表示した．ミクロソームタンパク質量の測定には，10,000×g の上清 0.5m*l* を用いた．これを2倍に稀釈したのち，104,000× g で1時間遠沈を行い，生じたペレットを 1N NaOH，10m*l* に溶かし，Lowry らの方法[4]を用いて定量した．

実験結果および考察

1. AF2 分解系の反応条件の検討 ラット肝 10,000×g 上清分画による AF2 分解反応の条件の検討を行った．まずはじめに，NADPH の存在下および非存在下に

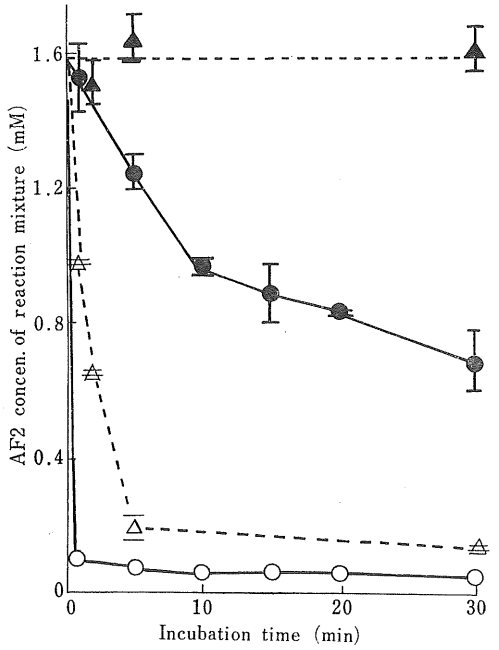


Fig. 3 Time course of AF2 degradation after treatment with rat liver 10,000×g supernatant fraction in presence or absence of NADPH
●—●, total (trans+cis)AF2, +NADPH
○—○, trans AF2, +NADPH
▲…▲, total (trans+cis) AF2, −NADPH
△…△, trans AF2, −NADPH

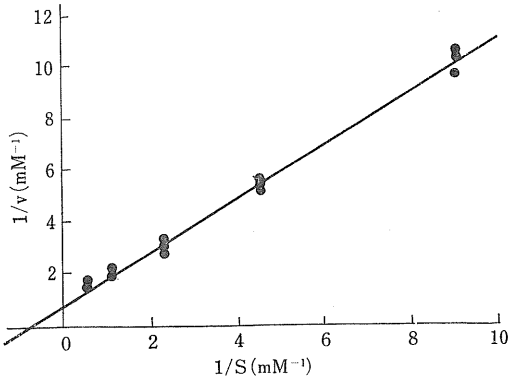


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of AF2 degradation after treatment with rat liver 10,000×g supernatant fraction

おける trans AF2 および全 AF2 (trans 型+cis 型) の反応溶液からの消失の経時変化を示した (Fig. 3). NADPH の非存在下でも 5 分以内に trans 型から cis 型への変換がほぼ完全になされたが，その後さらに反応を続けても cis 型の AF2 の減少は全く認められなかった．一方，NADPH の存在下では，1 分以内に trans 型から cis 型への変換が起り，さらに反応を続けると cis AF2 は非黄色物質にまで分解された．はじめの 10 分間はほぼ直線的な全 AF2 の減少が認められたため，以後の測定では反応時間を10分とした．Fig. 4 に AF2 分解の Linweaver-Burk プロットを示した．基質濃度 0.1—1.6mM で 1/S と 1/v との間に直線性が認められ，Km の値は 1.30mM と計算された．本測定法では，基質の減少量によって分解速度をもとめているので，基質の濃度を高くすると測定の精度が落ちるという欠陥があるため，以後の測定は，Km 値よりやや大きい 1.6mM の濃度で行った．

Fig. 5 に酵素溶液（上清）を 0.05m*l* から 0.3m*l* ま

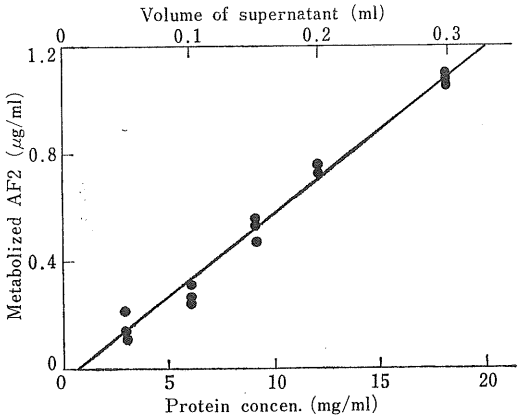


Fig. 5 AF2 metabolizing activity as a function of protein concentration of reaction mixture

で(タンパク質量にして 3—18mg/反応溶液 m*l*) 変えたときの AF2 の分解量を示した．この酵素量の範囲内では，酵素量と AF2 の分解量との間にほぼ直線的な関係が認められた．

以上の結果から，酵素溶液 0.2m*l*，NADPH 3.6 μmoles/m*l*，$MgCl_2$ 4.8 μmoles/m*l*，AF2 1.6 μmoles/m*l*，全容量 0.5m*l* の反応溶液で10分間反応を行わせた場合，trans AF2 は，ほぼ酵素量に比例した速度で非黄色物質にまで分解されると考えられたため，*in vitro* の酵素系における AF2 の分解と細胞毒性との関係を検討する以下の実験では，上記のような反応条件を採用した．

2. trans 型および cis 型 AF2 の細胞毒性の比較

上記のように，ラット肝ホモジネート 10,000×g 上清中で，trans AF2 の cis 型への変換が非常に速やか

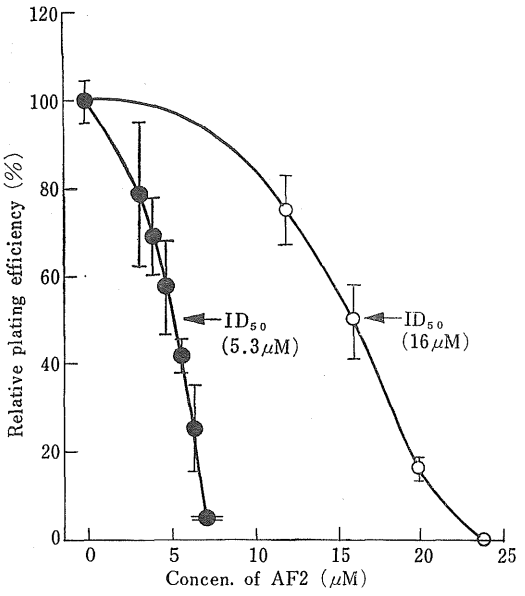


Fig. 6 Comparison of plating efficiency of HeLa S3 cells after 10 days exposure to trans and cis AF2
●—●, trans AF2 ; ○—○, cis AF2
Each point represents the mean ± SD of 4 measurements

に起ることが示されたため，両 AF2 の細胞毒性の比較を行った．結果を Fig. 6 に示したが，10日間処理の場合の trans 型および cis 型の AF2 の 50 % コロニー形成阻止濃度 (ID_{50}) は，それぞれ 5.3μM および 16μM で，前者は後者の約 3 倍の毒性を示した．それゆえ，上清中で速やかに trans 型から cis 型への変換が起ることを考えると，上清とのインキュベートによりまずはじめに細胞毒性の低下が起ると考えられる．しかし，cis AF2 がさらにそれ以上分解を受けたとき，細胞毒性の高い中間代謝物の生じる可能性は残されている．

3. ラット肝ホモジネート 10,000×g 上清中における AF2 の分解と細胞毒性の変化 上述の理由から，NADPH存在下でラット肝ホモジネートの 10,000×g 上清中で AF2 を分解させ，そのときの反応溶液を経時的にとりだして細胞に直接作用させることを試みた．反応溶液を細胞に作用させる時間が長いと，上清，NADPH，NADP 等反応系の成分自体が細胞を障害するため，細胞に作用させる時間を 2 時間とした．2 時間処理の AF2 のコロニー形成率の低下の程度（Fig. 7 に結果を示した）から，細胞に作用させる反応溶液の量を反応開始時の AF2 濃度に換算して，160および 80μM となるようにした．結果を Fig. 8 に示した．0 分の値は，無処置

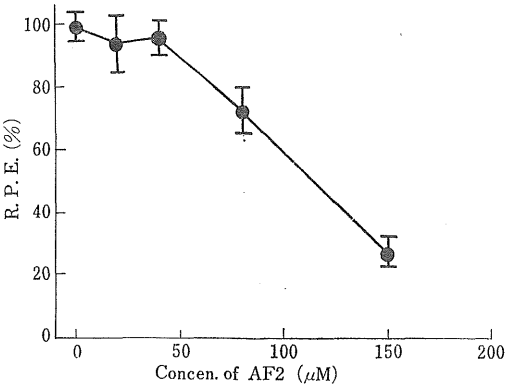


Fig. 7 Plating efficiency of HeLa S3 cells following 2 hr treatment with various concentrations of AF2
R.P.E. relative plating efficiency
Each point represents the mean ± SD of 4 measurements

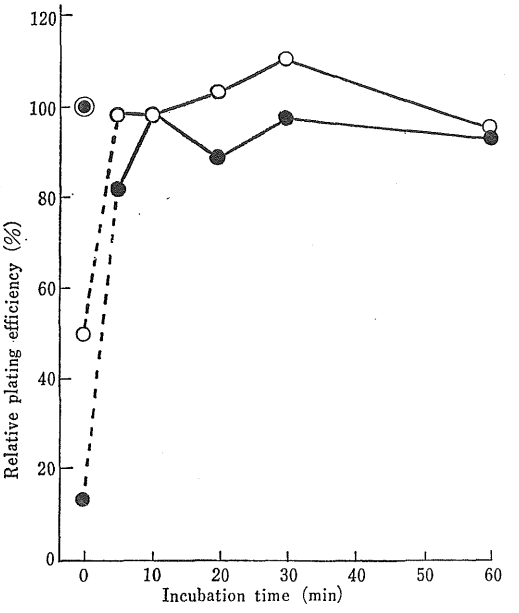


Fig. 8 Complete depression of cytotoxicity of AF2 after incubation with rat liver 10,000 ×g supernatant fraction
At various minutes of incubation, 0.5ml (●—●) and 0.25ml (○—○) of reaction mixture were added to the culture, which corresponded to 160 and 80μM AF2, respectively, as considered with the starting point of incubation.
0 min values are R.P.E. of nontreated control (◉) and those after treatment with 160μM (●) and 80μM (○)AF2.
Each point represents the mean of 4 measurements.

またはAF2のみを作用させたときの値で，無処置の対照のコロニー数（80±4個/ペトリ皿）に対する％で表示してある．反応時間5—60分の値は，AF2のみを除いた反応溶液で処理したときのコロニー数(76±20個/ペトリ皿）に対する％で表示してある．AF2単独の処理の場合，160および80μMのAF2は，R.P.E.をそれぞれ，13.5および55％に低下させたため，この濃度は，それぞれ，コロニー形成率を強度および中程度に阻害する濃度であると考えられた．上清とインキュベートすると，どちらのAF2濃度においても，5分以内に対照に近い値にまで回復を示した．しかし，反応時間を60分まで延長しても，R.P.E.の低下は全く認められなかった．

以上の結果から，先に予測したように，ラット肝ホモジネートの10,000×g上清中でAF2の分解を行わせると，速やかにtrans型からcis型への変換が起り，それに伴い，細胞毒性の低下が起ると考えられる．反応時間を延長しても再び細胞毒性が強くなる傾向が全く認められなかったことから，cis型AF2がさらに分解を受けても毒性の強い中間代謝物が生じていないか，もしくは，生成しても速やかに分解されて細胞毒性を示す十分な濃度に達していないものと推測される．

4. AF2によるDNAの修復合成の促進 以上の結果とバクテリアにおける突然変異の誘発，および培養細胞系における染色体異常の生起という事実を総合して考えるなら，中間代謝物ではなく，trans AF2そのものが細胞のDNAに作用し，その切断を起している可能性が考えられ，事実，A. Tonomura and M.S.Sasaki[6]は，ヒトの細胞でそのような結果を得ている．そこで本報告においては，接触阻止を十分に起すマウス由来の繊維芽細胞株Balb/3T3細胞の中から特に選び出したクローンを用いて実験を行った．結果をFig. 9に示したが，20μMの濃度でも明らかに修復合成の促進が認められた．160μMでは80μMより低い値が得られたが，顕微鏡で観察したところ，一部の細胞の器壁からの剝離がみられ，また形態の異常も認められたことから，^{3}H-チミジンのとりこみの低下は，細胞自体の死滅に起因すると考えられる．本実験系の問題点として考えられることは，無処置の対照のとりこみが447±19cpmと非常に高く，修復合成の促進によるとりこみの増加は，最高でもこの対照値の41％にすぎない．ヒドロキシウレアの濃度，AF2処理後TCA沈澱を行うまでの操作に時間がかかることなど問題があり，今後さらに実験条件を検討していく必要がある．

5. フェノバルビタール投与ラット肝のAF2分解活性の変化 賀田[7]は，AF2によるバクテリアの突然変異の誘発がフェノバルビタール投与ラットの肝ホモジネート（S9分画）によるAF2の代謝によって増強されると報告しているため，本実験では，100mg/kg体重のフェノバルビタールを1回腹腔内注射したラットの3日後のAF2分解活性を測定した．結果をTable 1に示したが，上清ml当りおよび上清タンパク質mg当りの活性は，

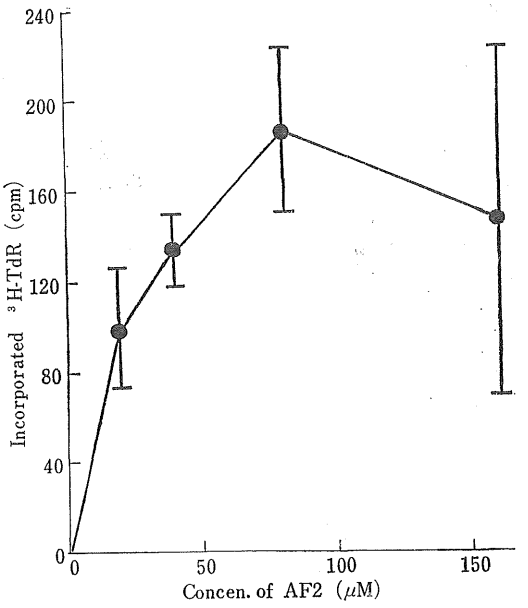


Fig. 9 Repair replication of Balb/3T3 cells after exposure to various concentrations of AF2
Each point represents the mean ± SD of 3 measurements

Table 1. Hepatic AF2 metabolizing activity in rats after single i.p. injection of phenobarbital

	Metabolized AF2 (μmoles/ml) Control	Treated[a)]	% of Control
per ml of supernatant	443±36[b)]	532±72[b)]**	120
per mg of supernatant protein	14.6±1.3	16.5±1.8*	113
per mg of microsomal protein	51.6±6.4	54.4±8.1	105

a) Phenobarbital (100mg/kg of body weight) was injected i.p. 3 days before measurement
b) Mean of 8 animals and SD
*, Significantly different from control $P<0.05$,
**, $P<0.01$

フェノバルビタール投与により有意の上昇を示したものの，その上昇の程度はわずかで，それぞれ対照の20および13％の増加にすぎなかった．また，活性をミクロソームタンパク質mg当りで示すと，わずか5％の増加にすぎなかった．以上の結果から，フェノバルビタール投与によっても肝臓のAF2分解活性はそれほど増強されないと考えられる．

6. 終りに *in vitro* の酵素系によるAF2の分解のカイネティックスについての報告はみあたらない．本実験では，trans型およびcis型のAF2を薄層クロマトで比較的容易に分離することに成功したため，酵素活性の測定が可能となった．肝ホモジネートの10,000×g上清分画を用いて，反応の経時変化，Km値，酵素量と分解量との間の比例関係についての知見を得た．

NADPHの非存在下においてもtrans型からcis型への変換が非常に速やかに行われることを示したが，予備的実験で確かめたところでは，この反応は，104,000×gの上清によっても容易に起り得るので，おそらくcis化にはミクロソームの酵素は関係していないであろう．また，NADPH非存在下で反応を長時間行ってもcis型AF2の減少が全く認められなかったことから，以後の分解は，ミクロソームの薬物代謝系の酵素によって行われていると推測される．

今回，AF2分解の中間代謝物の濃度を高める条件をさがすことを目的として，フェノバルビタールによる酵素活性の誘導について検討を行った．しかしながら，他の薬物代謝酵素の活性を十分上昇させる[8]ような条件下でもAF2の分解は，ほんのわずかに亢進したにすぎなかった．そこで，特にフェノバルビタール投与による利点は考えられなかったため，以後のAF2の中間代謝物の細胞毒性の検討には，通常のラットを使用した．

肝ホモジネート10,000×g上清によるAF2の分解過程で，まずAF2のcis化がきわめて短時間に起り，それに伴ってAF2の細胞毒性が低下すること，cis AF2がさらに分解されてもコロニー形成率の低下が起らないことを確かめた．賀田[7]はAF2によるバクテリアの突然変異が肝ホモジネートとのインキュベートにより著しく高められたと報告しているが，本実験の結果との矛盾は，コロニー形成率と突然変異では効果が異なること，また，バクテリアと培養細胞との違いで説明されるかもしれない．

また，AF2そのものが培養細胞のDNA鎖を切断している可能性を示したが，本実験では個々の細胞への^{3}Hのとりこみをみたわけではないので，一部の細胞がS期の合成を行ったため，全体としてのとりこみが高められた可能性もないわけではない．この点については，オートラジオグラフィーを使って検討する必要がある．また，より直接的にDNA鎖の大きさを測定する方法[9]により，DNAの切断の有無を明らかにする必要があろう．

要　旨

ラット肝ホモジネート10,000×g上清分画によるAF2の分解について検討を行った．その結果，trans型のAF2は，速やかにcis型に変換したのち，NADPHの関与のもとにさらに非黄色物質にまで分解されることを明らかにした．つぎに，その分解過程における中間代謝物のHeLa S3細胞のコロニー形成率に及ぼす影響について検討を行った．その結果，cis化に伴って速やかに阻害が取除かれること，また，その後の分解過程においても，再び阻害物質が生成されてはいないことを明らかにした．また，AF2によるBalb/3T3細胞のDNA修復合成の促進が示唆された．

文　献

1) 川野澄江，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，677，1974
2) 青山敏信，吉柳節夫，井口定男：衛生化学，13，130，1967
3) Malling, H.V.: *Mutation Res.*: 13. 425, 1971
4) 赤堀四郎編：酵素研究法1，第9版，166，1955，朝倉書店
5) Trosko, J.E. and Yager, J.D.: *Exptl. Cell Res.*, 88, 47, 1974
6) Tonomura, A. and Sasaki, M.S.: *Jap. J. Gen.*, 48, 47, 1974
7) 賀田恒夫：日本環境変異原研究会，第3回研究発表会講演要旨，8，1974
8) Ferdinand, R.T.L. and Fuller, G.C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 492, 1972
9) Abelson, J. and Thomas, C.A.: *J. Mol. Biol.*, 18, 262, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 181-185, 1975

発育リズムについて

平賀興吾* 藤井 孝* 中川好男*
福森信隆* 坂本義光*

Growth Rhythm

KOGO HIRAGA*, TAKASHI FUJII*, YOSHIO NAKAGAWA*,
NOBUTAKA FUKUMORI* and YOSHIMITSU SAKAMOTO*

いとぐち

先に，「毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究」の一環として「生育場を異にする同系統ラットにおける成長発育の比較からみた性状の研究」を報告した.[1-4] この研究は，barrier system 下で生育した4週令の SD-JCL 系（以下Jと略す）と SD-SLC 系（以下Sと略す）のラット雌雄，各群10匹，計120匹，を用い，同一環境下に9週間飼育し，この間の成長発達をみると同時に平行して5週令から9週令まで butylated hydroxytoluene（以下BHTと略す）1.5% 添加飼料を与える負荷試験を行い，両ラットの性状を比較したものである．このなかで，JとSの諸器官重量や体重の増加の推移とBHTに対するこれらの反応を詳細に比較検討した結果，成長に伴う体重や諸器官重量の増加の過程

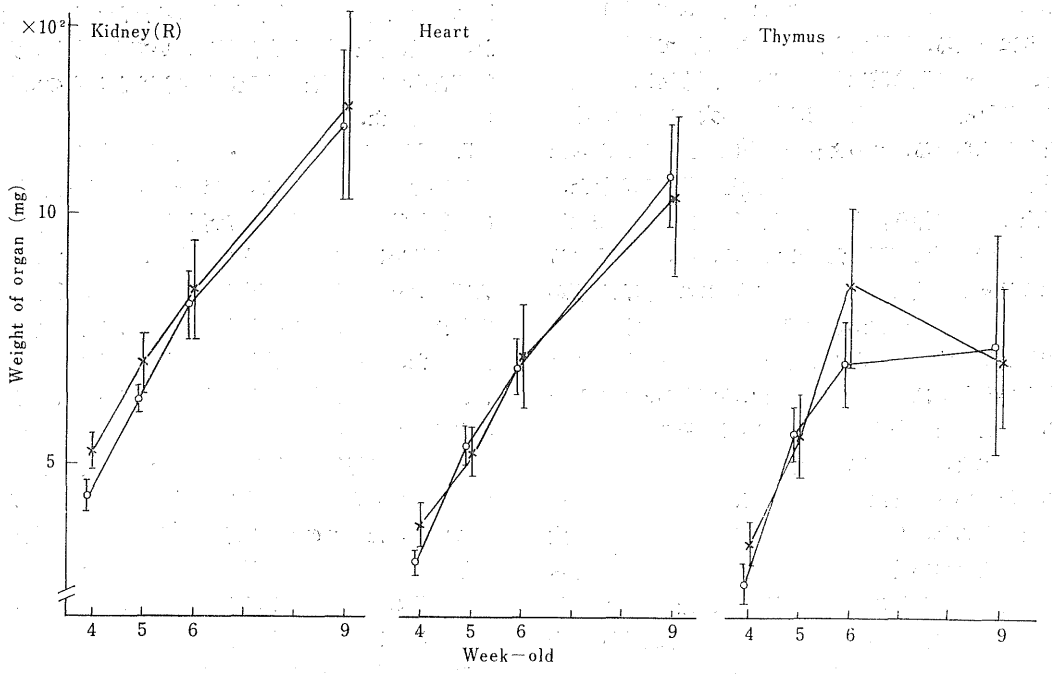


Fig. 1. Growth curves of kidney, heart and thymus in male control rats
—○—: J, —×—: S, vertical bars show S.D.

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

には急な時期と緩やかな時期が交互に存在し，この緩急はＢＨＴによる体重や器官重量増加抑制，減少を規制するということを推測した．この推測から，なお未熟ではあるが，**発育リズム**と仮称する概念を提起したいと考えるに至ったので，その経緯を報告する．

経　　緯

1. 成長に伴う諸器官の重量増加曲線

Fig. 1 はＪおよびＳ雄ラットの腎臓，心臓および胸腺の成長に伴う重量増加曲線で，J,S の曲線はそれぞれスムーズな重量増加を示しているようであり，また，両者を比較した場合推計学的に特に有意な点は殆んどなく，大体同様に推移しており，両者間の重量増加曲線には殆んど差がないと結論されるものである．しかしここで，両者を詳細に対比してみると，先ず腎臓では，特に４～６週令時のＪの重量増加直線の傾きはＳよりも大であり，６～９週にかけては逆にややＳがＪより大のようである．心臓では腎臓でみられたより更に著明で重量増加直線の傾きは４～５週令時はＪが，５～６週令時はＳが，６～９週令時はＪが，それぞれ大である．即ち，それぞれ増加量の大きい期間と小さい期間があり，ＪとＳがからみ合って，或いは１相のズレをもって増加しているようにみえる．胸腺でも大体同様の傾向で増加直線の傾きは，４～５週令時はＪが，５～６週令時はＳが大であり，それぞれの増加曲線では傾きの大きいとき，小さいときがみられる．このような傾向は，図示しなかったが雌の心臓，胸腺，肺臓，雄の肺臓その他にみられた．

以上の成長に伴う器官重量増加の推移は，個体では追えないので，群で観測したものである．従って，ＪあるいはＳラット単独での観測であれば，ここで得たわずかな重量増加曲線の変化からは，“器官重量増加の推移のなかで増加量の大きい期間と小さい期間で繰り返えされる”という見方は到底出来ないところである．しかしながら，ＪとＳとの多くの器官において，その重量増加曲線が時期によって互いに相反する増加勾配の繰り返しがみられたということは，偶然としては余りにも起り難いものと考えられ，“器官重量の増加過程には増加量の大きい時期と小さい時期が交互に存在する”事実を物語っているように思われる．一方，偶然ではなく事実であれば，この観測には，各ラットの群（標本）間の偏りが少なかった，飼育環境・管理がよかった，測定時点がよかった，ＪとＳとの発育に丁度よいズレがありた等々幾つもの好条件，いや幸運が重なっていたと思われる．測定時点が適当でなければ，あるいは発育にズレがなければ，ＪとＳの重量増加曲線は平行または重なって，以上の観測は出来なかったであろう．なお，ＪとＳの発育のズレは，同週令であったが，Ｓの方が体重が大きかったことと，試験開始時の精子形成状態で，Ｓの方が進んでいたことより推察された．

2. 成長に伴う体重増加曲線

諸器官重量の成長に伴う増加曲線の勾配には時期による大小の繰り返しのあることが推定されたので，個体で推移を追える体重増加の過程を分析した．

Fig. 2 はＪおよびＳの雄の４週令から９週令まで，２日間隔で測定した体重増加曲線であり，Fig. 2（Ａ）は６～７週令時の体重増加の推移を体重のスケールを拡大して示したものである．この図によるとＳは殆んど直線的に，Ｊではやや緩急の勾配をもって増加しているようである．この点を明確にするために，J,S の各期間毎の体重増加量（例：Ｊの雄の13日目の体重は 161g，15日目は 176g であるから，この期間の体重増加量は 15g）を求め，これを図示したのが Fig. 2（Ｂ）である．これでみるとＳにおいてもＪと同様に体重増加量が大きい期間と小さい期間とが交互に繰り返されて波形を呈していることがわかる．即ち，ＳはＪより増加量は大きいが，その期間毎の増加量の大小変動幅が小であったため Fig. 2 では殆んど直線的増加にみえたことが理解され，成長に伴う体重増加過程においても増加量の大きな期間と小さい期間とが交互に繰り返されるものであるとの確信を得た．

3. BHT に対する体重・器官重量の動態

ＢＨＴの大量摂取によってラットの体重や諸器官には，特異的に重量増加を来たす肝臓を除いて重量増加の抑制あるいは減少を示すものが多い．本実験では，ＪおよびＳラット雌雄の５週令時よりＢＨＴ 1.5％添加飼料を与え，１週後および３週後に体重および諸器官重量を測定した．その結果，上述の通り肝臓重量を除き体重および諸器官重量は対照の正常飼料摂取ラットとの比較で小さく，これをそれぞれの抑制率（1-ＢＨＴ摂取群の重量/対照群の重量）でＪとＳを比較するとＪの方が大きい器官もありＳの方が大きいものもあり，器官によって区々であった．このことはＪとＳとのＢＨＴに対する感受性の程度が器官毎に相違することを意味するのであろうか．そこで，ＢＨＴによる体重および器官重量の増加抑制あるいは減少を，投与前後の重量増加の変化，即ち，ＢＨＴ投与前期間の増加直線と投与後期間の増加(減少)直線の勾配の大小について比較した．Fig. 3 は体重，Fig. 4 は腎臓，心臓および胸腺重量のＢＨＴ投与前後期間の増加（減少）直線を示したものである．

Fig. 3（Ａ）の体重増加曲線において，BHT 投与開始前期間の体重増加直線の勾配はＳの方がＪより大であ

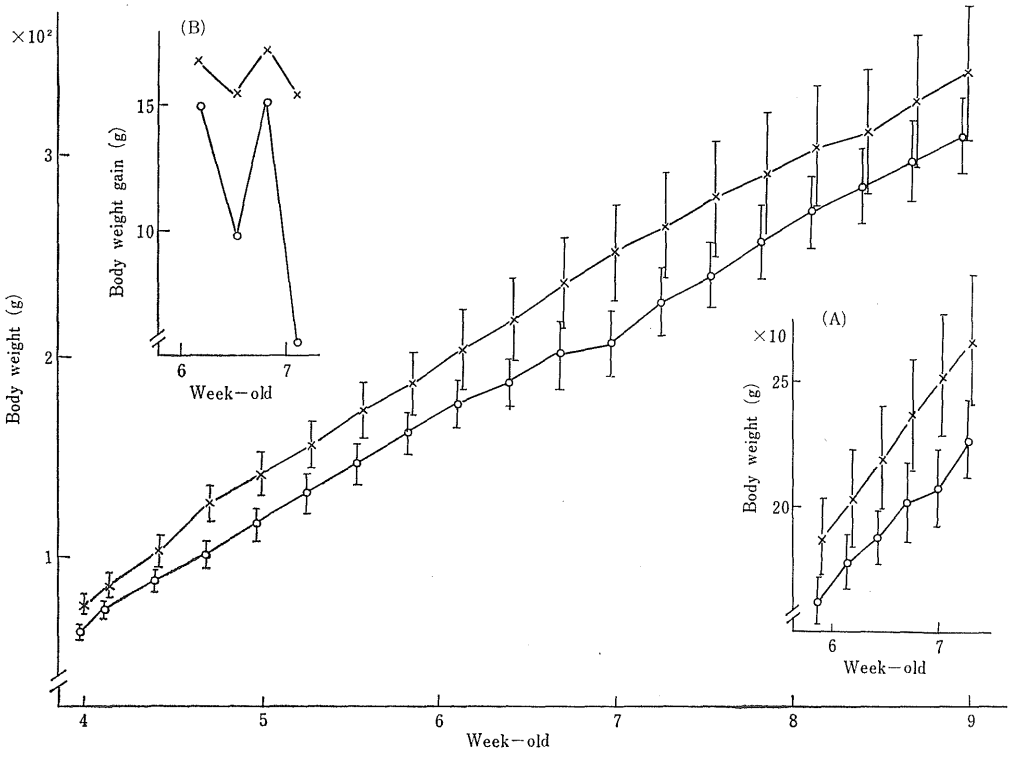


Fig. 2. Inceasing curves of body weight and body weight gain (B) in male control rats.
—○—: J, —×—: S, vertical bars show S.D.

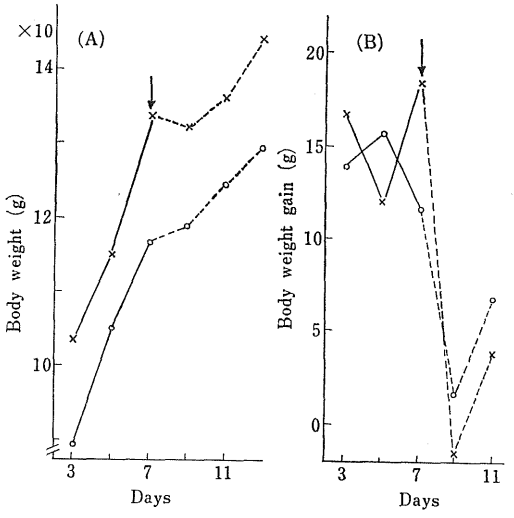


Fig. 3. Changes of body weight (A) and it's gain (B) in male rats by BHT treatment.
○: J, ×: S, —: control, ⋯: BHT treatment,
↓: start of BHT treatment

るが投与後期間の勾配はSはマイナスを示し，Jは小さいながらプラスの勾配を示している．即ちSでは体重の減少であったのに対しJでは増加抑制にとどまっている．この関係は，Fig. 3（B）の期間毎の体重増加量の推移を示した曲線によって一層明瞭に観察される．

次に，Fig. 4の器官において，先ず腎臓では，BHT投与前期間のJとSとの重量増加直線の勾配には著明な差はみられないが，Jの方がやや大きく，投与後期間の勾配はSの方が大きくJの方が小さい勾配を示している．心臓でも，BHT投与前期間の増加勾配はJの方が大きくSの方が小さいが，投与後期間ではJはマイナスの勾配であり，Sでは緩やかなプラスの勾配を示している．胸腺もBHT投与前期の増加勾配は，心臓の場合と同様にJが大きくSが小さいが，投与後期間ではJ,Sともにマイナス勾配で，Jの方が大きくSの方が小さい．このような傾向は雌の心臓，胸腺や雌雄の肺などでも更に著明にみられた．

先に，J,SのBHT投与による器官重量の変化の程度を，各々の対照群との増減率として比較した場合には，器官により区々であったと述べた〔これを Fig. 4 の腎臓，心臓，胸腺の例についてみると，それぞれの対照の重量は，6週令時点の◎(J)，⊗(S) で示してあり，腎臓および心臓での抑制（減少）はJにおいて大きく，胸

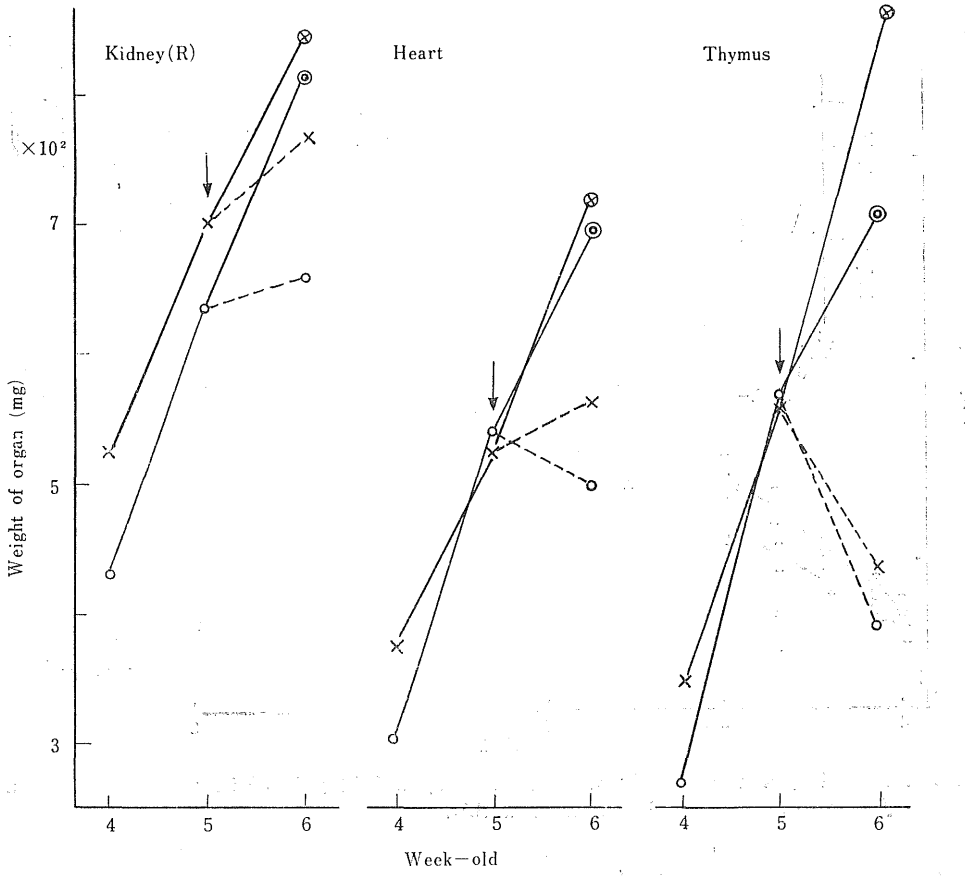


Fig. 4. Changes of kidney, heart and thymus weights in male rats by BHT treatment.
○ : J, × : S, — : control, ⋯ : BHT treatment, ↓ : start of BHT treatment,
◎(J), ⊗ (S) : control at 6 week-old

腺ではSが大であることが明らかである．胸腺においてSの方に抑制（減少）が強くみられたのは，対照動物の5から6週令間の重量増加は，心臓とともに大きい時期に相当しているが，特にそれが著しい時期であったためである．〕が，BHT投与前後期間の重量増加直線の勾配の変化の大小をBHTに対する反応性と考えて比較すると，Jの方がいずれも大きかったことになる．このことは，BHT投与前期の増加勾配の急であったJの器官がSよりも強く反応し，逆に，体重については，BHT投与前期間の増加勾配が大であったSの方が強く影響を受け，体重の減少を来たしたとみられる．

4. 考按と“発育リズム”（仮称）の提起

実験動物の体重や器官重量の成長に伴う増加の動態について，その大きい推移に関しては多数の報告があるが，これを詳細に分析し，大きい推移のなかの小さい変動については，体重の日内変動のほかは余り知られていないようである．これは体重について言えば，近隣環境の僅かな変化にも影響をうけて変動し易いので，体重の大きい推移のなかで僅かな変動があったとしても，それに意義をみつるけことは困難であり，まして器官重量の成長に伴う増加の推移は，個体で追うことが出来ず，群として追わざるを得ないので観察上の困難は大きく，微妙な変動を検出することの難しさにあると思われる．

著者らは，緒言および経緯で述べたように，生育場を異にするJCL(J)およびSLC(S)-SD系ラットの性状研究のなかで，成長に伴う体重および器官重量増加の推移を両者で比較したことと，好条件に恵まれたことによって，全く予期しない“ラットの成長に伴う体重および諸器官重量増加の推移のなかには増加の大きい時期と小さい時期があり，これを交互に繰り返しながら大きい重量増加の推移，所謂体重あるいは器官重量増加曲線を描く”ことが推測出来，また，BHTによる体重や諸器官重量の変動は，重量増加が大きいと推定された時期に投与されたものの方が例外なく大きい重量増加の抑制・減

少を示すことを知った．このことは逆に，“体重や器官重量の成長に伴う増加の過程には重量増加の大きい時期と小さい時期が存在する”という推定の真実性を裏書きするもの，即ち体重や器官重量は，その増加速度が速ければ速いほど，増加に対する障害であるＢＨＴの作用を強く受けるとの考えによるもので，成長過程で体重や器官重量は“一定の変動”を示しながら増加するとの推定は一段と確かなものになったと思う．

ここで，この推測を発展させ，“一定の変動”には恐らく体重にみられるような日内変動，日間変動，ここで観察した週間変動から，更に長期間の変動――大きくとらえた所謂体重あるいは器官重量増加曲線も一定の変動とみられよう――まで含め，“成長に伴う体重や器官重量増加過程において，刺激（薬物）に対する生体反応を規制する一定の変動が存在する”ことを**発育リズム**と仮称し，今後の試験研究を通して見極めて行きたいと考えるに至った．

むすび

成長に伴う体重や器官重量増加過程において，刺激に対する生体反応（重量の変化）を規制する一定の変動の存在を推定し，この一定の変動を**発育リズム**と仮称することを提起した．

（本研究の概要は日本薬理学会第48回総会昭和50年４月９日で発表した）

文献

1） 福森信隆他：東京衛研年報，**25**，557，1974
2） 坂本義光他：東京衛研年報，**25**，577，1974
3） 中川好男他：東京衛研年報，**25**，599，1974
4） 藤井　孝他：東京衛研年報，**25**，609，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 186-189, 1975

ラットの成長過程における体重の変動について

林田志信* 井口重孝* 池田虎雄*
平賀興吾*

Changes of Body Weight in Growing Rats

SHINOBU HAYASHIDA*, SHIGETAKA IGUCHI*, TORAO IKEDA*
and KOGO HIRAGA*

緒　　言

先に，著者らは自家製飼料によるラットの発育を観察中，体重増加の過程には或る周期性をもった重量増加の変動の存在を思わせるデータを得た.[1] また，当部の藤井らもラットの成長に伴う体重増加の過程には増加の大きい時期と小さい時期の繰返えしがあり，この大小が薬物による体重変動に関係があるらしいことを報告した.[2]

毒性研究等の動物実験において薬物の作用の観察に体重の変動についての記載を欠かすことがない程，体重の変動は生体の機能状態を表現する一つの指標として重視されるが，体重の生理については余り知られていないようである．そこで，体重の生理・薬理を知る第1歩として，上述のラットの成長過程における体重の変動について詳細に分析することを試みた.

実験動物と体重測定方法

動物は Barrier System 下に生育された JCL-Wistar 系および JCL-SD 系雄ラットを夫々20匹4週令で購入し，JCL-Wistar 系ラットは Barrier System の飼育室へ，JCL-SD 系ラットは一般動物飼育室へ，いずれも一匹飼ステンレスケージに入れ収容した．飼育室環境条件は，室温25°，湿度55±5%，照明午前6時より午後7時までとし，クレアC E-2飼料および細菌濾過水道水とともに自由摂取させて飼育した.

JCL-Wistar 系ラットは購入の翌日より毎日午前10時に体重を測定した.

JCS-LD 系ラットは体重が100g，200g および 300g 前後に到達した時点で夫々午前10時，午後4時，10時，午前4時に2日間にわたって体重を測定した.

体重は 1g 感度天秤にて 1g まで秤量し，体重測定期間中はラットに不定期の刺激が加わらないよう特に注意し，体重測定者も限定した.

結果と考察

1. JCL-Wistar 系雄ラットの体重の推移

Fig. 1 に20匹の平均体重の推移を，Fig. 2 に20匹中より任意に抽出した No. HI008 ラットの体重の推移（A）と（A）の7週令から10週令までの体重を拡大したもの（B）を示した.

Fig. 1 および Fig. 2（A）とともに一見単なる増加曲線にみられるが，これを詳細にみると，特に Fig. 2 において或る間隔で体重増加曲線にやや大きい変動がみ

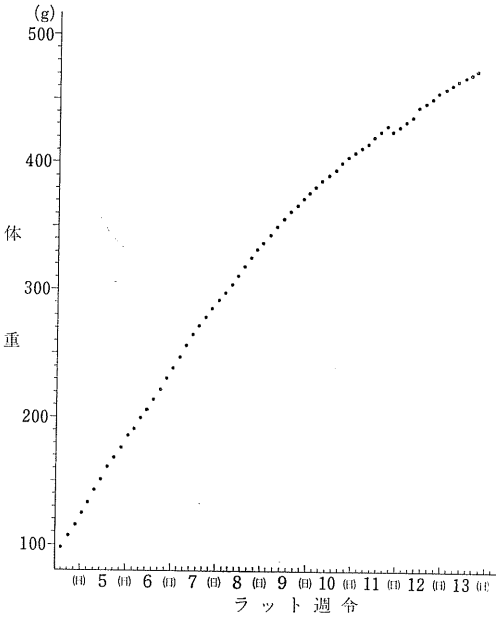


Fig. 1. JCL-Wistar 雄ラットの体重曲線（20匹の平均）（日）：日曜日

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

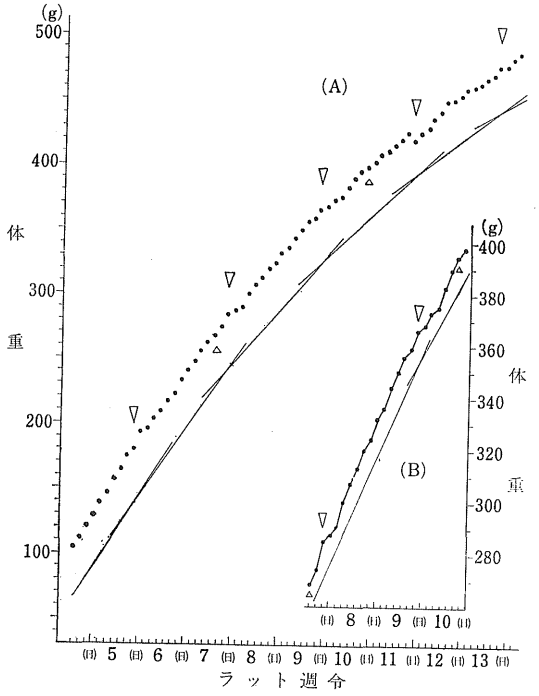


Fig. 2. No. HI008 ラットの体重曲線
▽体重増加の変曲点　(日)：日曜日，●：体重

られ，▽印で示した．この間隔を調べるといずれも週間間隔であった．これを更によくみると，週令が進むに従って各間隔の中間点においても，多少の変動がみられるようである．この規則正しい変動は土曜日，日曜日から月曜日にかけて起っている．動物実験をしている者であれば誰もが経験していると思われるが，月曜日の動物の体重は変動の大きいことが多い．これは土・日曜日の飼育室の環境が，実験者や飼育管理者の出入りが少ないため平日と変るためであろうと考えていたが，平日と同様土・日曜日も体重測定と飼育管理業務が行なわれており環境の変動も左程ないと考えられる．また，この大きい変動が隔週おきに起きていることから土・日曜日による環境変化のためとは考え難い．

次に，この大きい変動点間の体重増加曲線をみると，先に述べた中間点を中心に，週令が進む程波うってみえるが，大きくみれば変動点は体重増加曲線の変曲点のようでもあり，これを Fig. 2 に実線で示した．

2. 体重増加量について

体重増加量(今日の体重—前日の体重)を算定し Fig. 3 に20匹の1日平均増加量を，Fig. 4 に No. HI 008 ラットの1日分，4日分および7日分の増加量を示した．

日日の増加量をみると漸増漸減して行くものではなく増加量の大きい日と小さい日が交互に繰かえされていることがわかる．前述の体重変動期に一致してその振幅が大きくなっているのが，特に Fig. 4 でよくわかる．しかしながら，この増加量を推移としてみると Fig. 3 の実線および破線で示したような曲線，即ち波を描き，成長に伴う体重増加の過程に規則的な変動の存在の推定について緒言で述べたが，これを更に確かにしたように思われる．この波は，実線で示したのが14日，破線が7日周期で，10週令頃までは実線の14日周期が適合し，以降次第に破線の7日周期が適合して来ており，1の項で述べた週令が進むにつれて2週間間隔の大きい変動間の中間点を中心に体重増加曲線が波うつようにみえるということと符合する．

Fig. 4 上段の2つの曲線は4日分と7日分の体重増加量を結んだものであるが，これでも，発育過程での体重の増加には大きい時期と小さい時期が交互に一定の規律をもって繰返えされていることがわかる．

3. JCL-SD 系ラット体重の日内変動

Fig. 5 に体重の推移を，Fig. 6 に体重増加量（今回の測定値—前回の測定値）の推移を示した．

体重 100g，200g および 300g 前後の時点のいずれにおいても体重変動の推移には大差なく午前4時から10時が最高の重量を示し，午後4時を最低重量とする変動であった．

体重増加量は午後4時から10時までが最高で以下漸減し，午前10時から午後4時はマイナスの増加であった．

体重の日内変動と飼料摂取量，飲水量，糞量との関係については検討中で別に報告するが，この変動パターンとラットの副腎皮質コルチコステロンの日内変動のそれが殆んど一致しており，前述の観察とともに体重の変動が生体の機能状態を表現しているとの感が深い．

結　語

ラットの成長過程における体重の変動について，JCL-Wistar 系雄ラットを用い4週令より13週令にわたって毎日午前10時に体重を測定するとともに，JCL-SD 系雄ラットについて体重の日内変動を観察し，検討を加え，次の推定を得た．

ラットの体重増加曲線は，一定の規則性をもった体重の日内変動，日間変動，週間変動の繰返えしの組合せによって構成される．

文　献

1) 池田虎雄ら：東京衛研年報，25，527，1974
2) 藤井孝ら：第48回日本薬理学会口演要旨集，127，1975，神戸大学

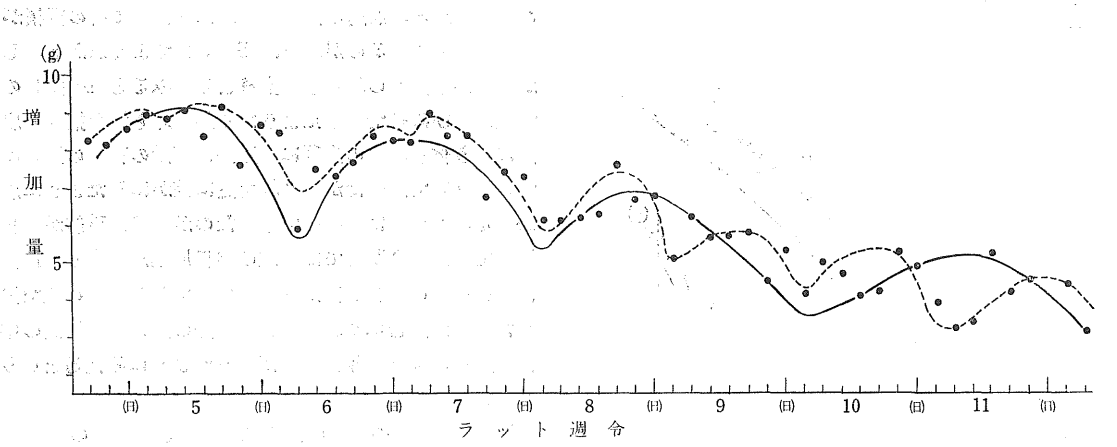


Fig. 3. 体重増加量　●：体重増加量　——2週周期　……1週周期　(日)：日曜日

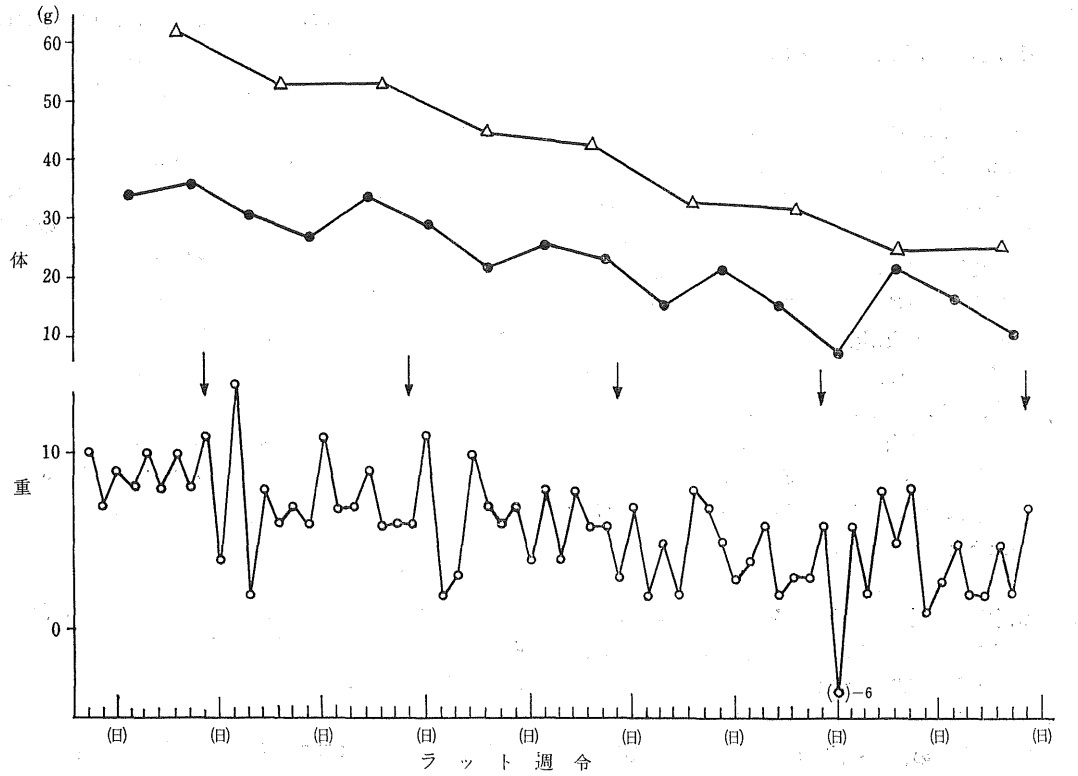


Fig. 4. No. HI 008 ラットの体重増加量
(日)：日曜日　—○—1日量　—●—4日量　—△—7日量

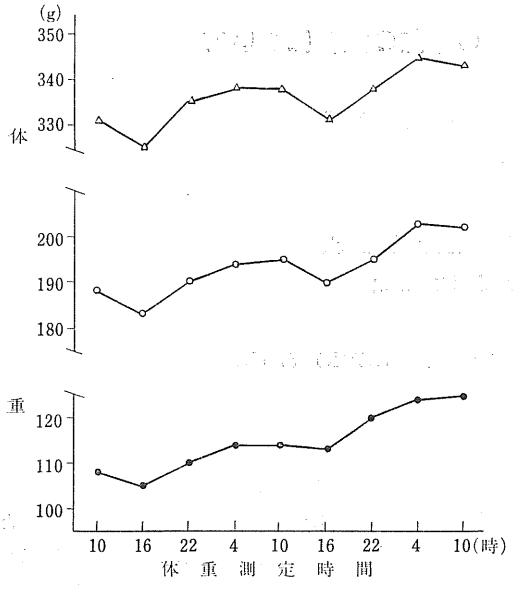


Fig. 5. JCL-SD 雄ラットの体重の日内変動
（20匹の平均）

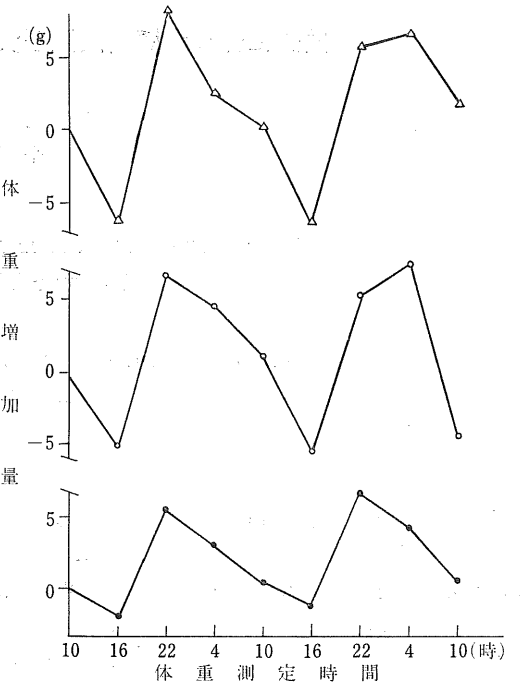


Fig. 6. JCL-SD 雄ラット体重増加量の日内変動
（20匹の平均）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 190-195, 1975

成長に伴う大腿骨長及び大腿骨重量の増加の推移について

藤井　孝*　湯澤勝広*　矢野範男*
平賀興吾*

Changes in Increasing of Femur Length and Femur Weight with Growth

TAKASHI FUJII*, KATSUHIRO YUZAWA*, NORIO YANO*
and KOGO HIRAGA*

緒　言

現在，動物を用いた各種の実験において動物の成長は主として体重の増加を指標としており，これに体重変動に対する指標として頭骨の長さ・幅，大腿骨長を用いた報告もみられる.[1] 著者らは毒性試験，特に長期毒性試験で，体重とともに成長の指標として，また成長後の体重変動に対する指標としての大腿骨長及び重量の有用性について検討を始めた．今回はその端緒として4～13週令の成長・発達の旺盛なラットを用い，成長に伴う大腿骨の長さ及び重量の増加の推移を観察し併せて体重増加の推移との異同を検討したので報告する．

実験動物及び実験方法

実験動物は barrier-system 下で育成された4週令のSD-JCL 系ラット雄を用い，室温25±1°，湿度50±5%の環境下でステンレス鋼製ケージ（w25×l40×h16cm）に5匹づつ収容し，自家製固型飼料（日本クレア社製粉末飼料 CE-2 より製造）及び水を自由摂取させ飼育した．ラットは入手時の体重の大小によって A,B の2群に分けた．体重はA群が66.7±2.9g，B群が51.8±3.7gであり両群100匹づつとした．両群のラットを入手翌日，4週令から1週令単位で13週令まで計10回，各回両群10匹づつ体重測定後に断頭放血し右大腿骨を摘出した．摘出した大腿骨は10%緩衝ホルマリン液で2日間固定後，骨に付着している筋・結合織を出来得る限り除去し，室温23±1°，湿度50±5%の実験室に2時間放置した．その後，大腿骨長はノギスによって大転子から内・外側顆までをmm単位で測定し，大腿骨重量は Mettler PE162型電子天秤によってmg単位で測定した．

実験結果

Table. 1は各週令での体重，大腿骨長(以後，骨長と略す)，大腿骨重量（以後，骨重量と略す），体重100g当りの骨長，骨重量それに骨長1cm当りの骨重量を示したもので，これらを図示したのが Fig. 1,2 である．これによると**体重**は終始AがBより大でありA・B間には4～13週令まで有意な差がみられたが，その推移にはA,B で著明な差異は認められず，両群とも4～11週令にかけて急激に，以後緩やかに増加した．**骨長**も終始AがBより大であり，11・13週令を除いて他の各週令では有意な差がみられた．しかしその推移には A,B で著明な差異は認められず4～8週令にかけて急激に増加し，以後Aでは10週令Bでは11週令から緩やかに増加した．**骨重量**も終始AがBより大であり，9・11・13週令を除いた他の各週令で有意な差がみられた．しかしその推移には著明な差異が認められず4～7週令にかけて急激に増加し，以後9週令からはAが大きく増加するときはBが小さく，Bが大きく増加するときはAが小さくというように両群で増加の大小の時期が異なって増加していた．**体重 100g 当りの骨長**は終始BがAより大であり，9～11週令を除いて他の各週令では有意な差がみられた．しかしその推移には著明な差異は認められず4週令を最大に以後減少していた．**体重 100g 当りの骨重量**は10週令ではAが有意に大であり，11週令ではBが有意に大であったが他の各週令ではBがAより大であった．また，その推移をみると両群とも4週令を最大として減少し，その後，稍々増加しており著明な差異は認められなかったが，減少から増加に変る週令がAでは12週令，Bでは

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

11週令と異なっていた．**骨長1cm当りの骨重量**は終始AがBより大であり，4・6・7・10・12の各週令で有意な差を示した．また，その推移をみると両群とも4～7週令まで急激に，7～9週令まで緩やかに増加しており両群で著明な差異は認められなかったが，9週令以後ではAがBより大きく増加するときと，BがAより大きく増加するときとが交互に繰り返されており，骨重量でみられたと同様に両群で増加の大小の時期が異なっていた．

以上の結果を更に詳細に検討するために体重，骨長，骨重量の各週令での増加量（前週令時より増加した量，例えばAの5週令の体重の増加量とは5週令時124.1g，4週令時75.0gであるから49.1gがこれに該当する．）と，その増加量が全体量に占める割合（例えばAの5週令の体重増加量は49.1gであり，これが5週令の体重124.1gに占める割合は49.1×100/124.1=39.5%となる．）を求めて，それらを図示したのがFig. 3, 4である．これによると**体重の増加量**は週令によってA, Bの大小は区々であったが両群とも6週令が最大で以後漸減するという推移に差異は認められず，8週令の増加量はAが，9週令はBが大であるというように増加量の大小の繰り返しが13週令までみられた．また両群で増加量が近似している連続した週令の集合がみられAでは7・8，9・10，Bでは6・7，8・9，10・11, 12・13がこれに該当し，これらを増加量の多い順序に並べたところ，Aの7・8，Bの8・9，Aの9・10，Bの10・11のようにA，Bが交互に並んだ．また**体重の増加量が全体量に占める割合**は10，12週令を除いて各週令ともBがAより大であったが，その差は5週令以外は顕著ではなく，両群とも5週令が最大で以後漸減するという推移に差異は認められなかった．**骨長の増加量**は週令によってA，Bの大小は区々であったが両群とも5週令が最大で以後減少するという推移に差異は認められなかった．また両群とも増加量が近似している連続した週令の集合がみられ，Aでは5・6，7・8，9・10，11～13，Bでは7・8，9～11，12・13がこれに該当し，これらの中でAとBの7・8，Aの9・10とBの9～11，Aの11～13とBの12・13の増加量が近似していた．その上，Aの10週令とBの11週令，Aの11週令とBの12週令が同じ値を示しており，AではBよりも早い時期に増加量の減少がみられた．その他に体重の増加量でみられたような，A，Bの増加量の大小の繰り返しが5～7週令，9～13週令でみられた．**骨長の増加量が全体量に占める割合**は週令によってA，Bの大小は区々であったが，両群とも5週令が最大で7週令まで急激に減少し，以後漸減するという推移に差異は認められなかった．しかしAでは7週令からBでは9週令から割合の大小の繰り返しがみられるようになり，10週令からはAが大きいときはBが小さいというように両群で大小の時期が異なっていた．またAの10週令とBの11週令，Aの11週令とBの12週令の値が近似しており，割合の減少がAに早く起っていた．骨重量の増加量は週令によってA，Bの大小は区々であり，両群とも週令によって大小の繰り返し，増減の傾向は一定しなかったが大小の繰り返しが規則的になったのはAでは8週令から，Bでは9週令からであった．そして，この大小の繰り返しはA，Bで時期的に異なっており逆の繰り返しを示していた．**骨重量の増加量が全体量に占める割合**はA，Bとも5週令が最大でAでは9週令まで，Bでは10週令まで著明に減少し，その後増減を繰り返す，つまり割合の大小が繰り返されていた．

総括及び考察

以上の実験結果から4～13週令までのラットの体重，大腿骨長，大腿骨重量の増加には，それぞれ固有の推移があるように思われた．即ち体重は4～11週令にかけて，特に5～6週令では急激に増加し，以後緩やかに増加した．また増加量の大小の繰り返しが8～13週令にかけてみられた．大腿骨長は4～8週令にかけて，特に4～5週令では急激に増加し，以後緩やかに増加した．また増加量の大小の繰り返しが7～9週令までを除いた期間でみられた．大腿骨重量は4～7週令にかけて急激に増加した後，急な増加と緩やかな増加を繰り返した．また顕著な増加量の大小の繰り返しが8・9週令から13週令までみられた．これらの増加の推移は4週令時の体重の大小で分けた両群に同じようにみられたもので両群間で著明な差異は認められなかった．しかし初期体重の大小によって増加の推移に差異はみられなかったが，体重増加量の減少が体重の大きい群で僅かではあるが早い時期にみられたことは小さい群よりも増加の経過を早く辿ったことを示し，そこには時間的なズレが生じていたと思われる．また大腿骨でも骨長の増加量の減少が体重の大きい群で稍々早い時期にみられ，骨重量の増加量の大小の規則的な繰り返しが体重の大きい群で早い時期にみられたことは体重と同様に大腿骨長・重量の増加でも体重の大きい群が小さい群より増加の経過を早く辿り，そこに時間的なズレを生じていたと思われ，このことは体重と大腿骨長・重量の増加の推移がこの時期（4～13週令時）平行していたことを示唆していると考えられる．次に大腿骨長及び大腿骨重量と体重の増加の推移を対比させてみると，大腿骨長と体重は増加が稍々鈍る時期が異なるものの双方とも滑らかな増加を示した．また初期体重の大小で分けた両群の大腿骨長と体重の増加量の大小

の繰り返しは10～13週令で全く一致しており，初期体重の大きい群の大腿骨長の増加量が大きいときは体重の増加量も同様に大きい群で大であり，次の期間では初期体重の小さい群の大腿骨長と体重の増加量がともに大きい群のそれらよりも大となっていて，これが繰り返されていた．大腿骨重量は一見して体重と異なり，特に9週令以後では増加が滑らかではないが，初期体重の大小によって分けた両群の大腿骨重量と体重の増加量の大小の繰り返しは9～13週令で全く一致しており，大腿骨長と同様の動きを示していた．このように4～13週令のラットの大腿骨長及び大腿骨重量と体重の増加の推移には増加量の大小の繰り返しがみられ，その繰り返し方が10～1_3週令にしろ三者が一致していたことは，先述した大腿骨長・重量と体重の増加の推移が平行していたことと併せ，三者間で増加の推移に著明な差異はなかったと考えられる．このことから大腿骨は解剖時に簡単に摘出でき，ホルマリン固定後でも骨長・骨重量の測定は可能で，特に骨長の測定は容易でもあるので今後体重とともに成長の指標として，また体重変動の指標として毒性試験で常用されるべきであると思われる．今回の実験では4～13週令の成長・発達の旺盛な時期のラットを用い比較的短期間での増加を観察したが，以後は更に長期間に亘っての大腿骨の骨長及び骨重量の増加の観察と薬物投与などによる影響について体重の変動とともに検討していきたい．

要　旨

毒性試験で体重とともに成長の指標として，また成長後の体重変動に対する指標としての大腿骨長・重量の有用性について4～13週令のラットを用い成長に伴う大腿骨長・重量の増加の推移を観察し，併せて体重の増加の推移との異同を検討した．

文　献

1) Benitz, K.F., Kramer, A.W. and Dambach, G.: *Toxic. appl. Pharmac.* 7, 128, 1965

Table 1 Changes of body weight, femur length & femur weight.

	Week-old	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	No. of rats	8	10	10	9	10	10	10	10	10	9
A	B.W. (g)	75.0± 2.1 a)	124.1±6.9	187.2±11.4	241.3±14.8	290.9±19.3	330.4±20.3	367.9±21.7	393.9±27.8	432.7±23.7	448.1±42.4
	F.L. (cm)	2.02±0.03	2.38±0.06	2.73±0.06	2.96±0.04	3.21±0.07	3.37±0.06	3.54±0.05	3.60±0.09	3.69±0.05	3.74±0.07
	F.W. (mg)	235.0±20.0	336.0±20.1	452.0±27.0	572.0±41.4	651.0±35.3	717.0±38.0	828.0±66.8	839.0±60.6	941.0±59.2	996.0±58.3
	F.L./B.W. (†)	2.70±0.004	1.92±0.11	1.46±0.07	1.23±0.05	1.10±0.04	1.02±0.05	0.96±0.04	0.92±0.04	0.86±0.04	0.84±0.05
	F.W./B.W. (‡)	312.0±24.4	271.0±17.1	242.0±22.5	237.0±10.4	224.0±13.7	217.0±7.7	225.0±12.0	213.0±9.3	218.0±17.5	223.0±16.1
	F.W./F.L. (§)	115.0±7.7	141.0±6.3	165.0±10.4	192.0±11.4	2.02±9.4	213.0±10.1	233.0±16.0	233.0±12.1	255.0±13.5	265.0±11.0
	No. of rats	9	10	9	10	10	10	10	10	10	8
B	B.W. (g)	57.3±3.4***	107.4±6.0***	163.4±7.1***	217.1±15.6**	263.5±14.0**	306.8±22.1*	340.2±30.9*	372.0±15.7*	388.8±20.2***	405.2±39.8*
	F.L. (cm)	1.89±0.06***	2.30±0.04**	2.62±0.07**	2.88±0.03***	3.12±0.04**	3.26±0.10*	3.40±0.08***	3.57±0.05	3.63±0.05*	3.71±0.11
	F.W. (mg)	186.0±20.1***	308.0±29.6*	394.0±42.4**	523.0±28.9**	610.0±43.1*	674.0±85.3	701.0±70.0***	829.0±33.1	859.0±41.2**	950.0±117.0
	F.L./B.W. (†)	3.31±0.27***	2.15±0.11***	1.60±0.05***	1.33±0.08**	1.18±0.04***	1.07±0.06	1.00±0.07	0.96±0.04	0.93±0.04**	0.92±0.06*
	F.W./B.W. (‡)	324.0±36.3	287.0±27.0	241.0±23.2	241.0±14.8	231.0±14.8	220.0±21.8	206.0±13.2**	223.0±10.5*	221.0±10.5	234.0±15.9
	F.W./F.L. (§)	97.0±7.7***	131.0±14.1	150.0±13.0*	181.0±7.7*	194.0±12.6	206.0±20.6	206.0±17.2**	232.0±8.7	237.0±8.8**	256.0±24.5

Key : B.W. ; Body weight. F.L. ; Femur length. F.W. weight.
a) ; mean±S.D. † ; cm/100g Body weight. ‡ ; mg/100g Body weight.
§ ; mg/cm * ; $P<0.05$. ** ; $P<0.01$. *** ; $P<0.001$

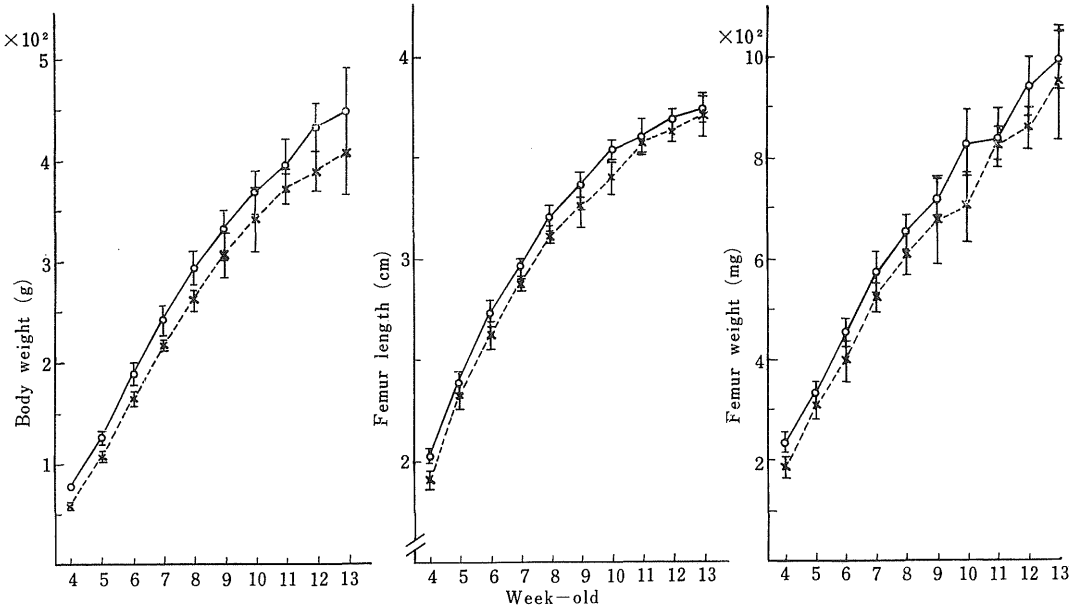


Fig. 1 Increasing curves of body weight, femur length & femur weight.
—•—; A, ···×···; B, vertical bars show S.D.

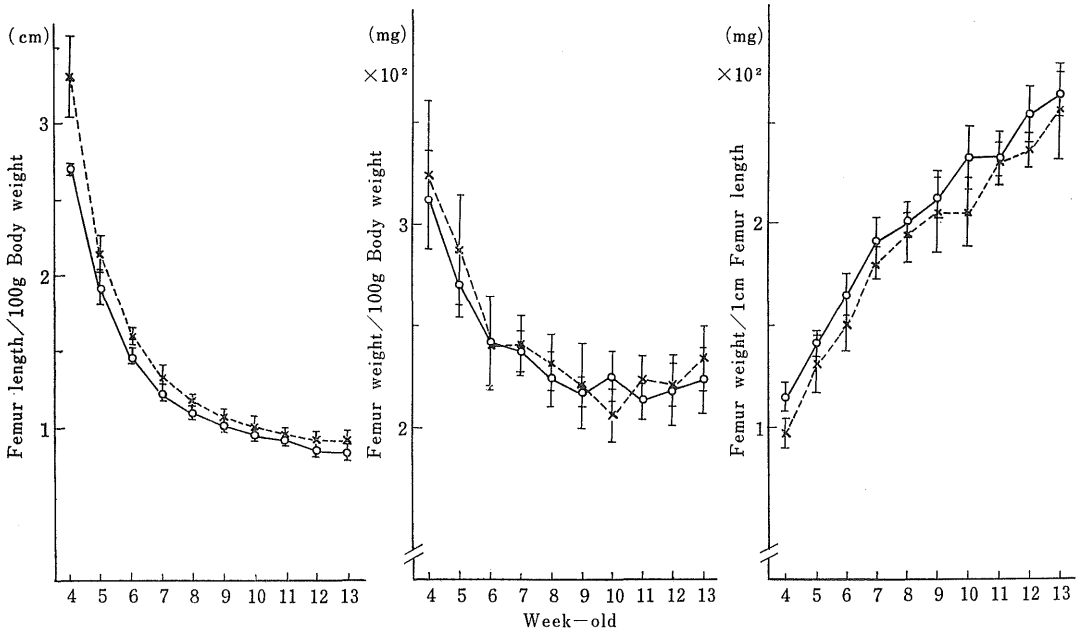


Fig. 2 Changes of ratio in femur length to 100g body weight, femur weight to 100g body weight and femur weight to femur length.
—•—; A, ···×···; B, vertical bars show S.D.

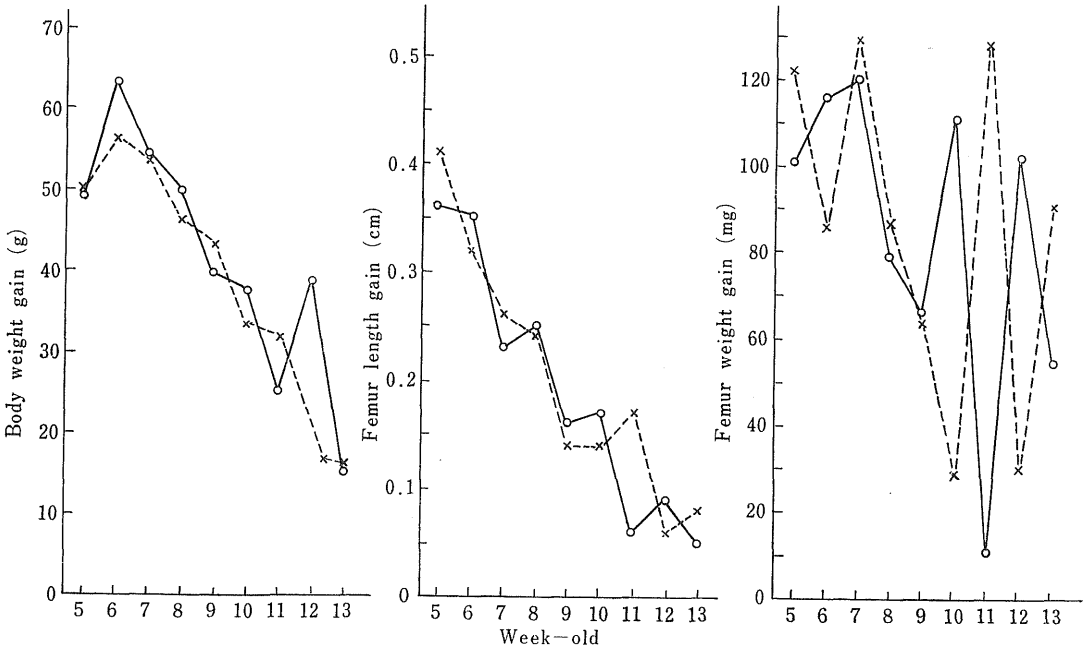


Fig. 3 Changes of body weight gain, femur length gain and femur weight gain.
—•—; A, ···×···; B,

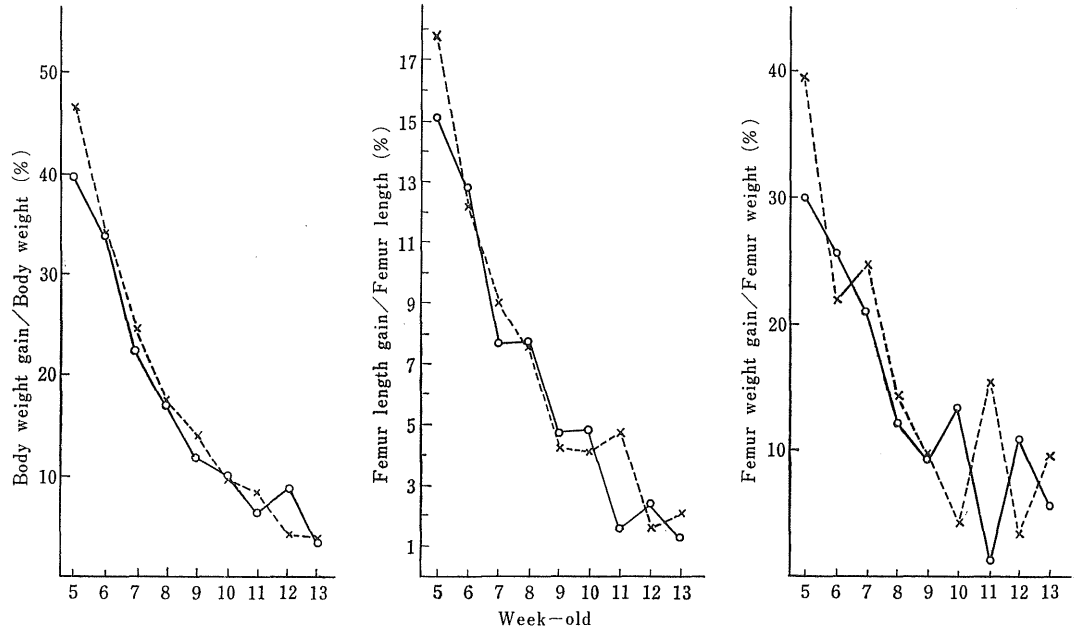


Fig. 4 Changes of percentage in body weight gain to body weight, in femur length gain to femur length and in femur weight gain to femur weight.
—•—; A, ···×···; B

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 196-202, 1975

ラットの成長に伴う血液成分と血球性状の変化

福田向江* 中川好男* 平賀興吾*

Changes in Blood Components with the Growth of Rats

HISAE FUKUDA*, YOSHIO NAKAGAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

毒性試験は医薬品，化学物質および生体での代謝産物の安全性を評価するために，実験動物を用いて発癌性，催奇型性や体液成分変化などの面から検討を加えて実施される．毒性試験の期間は短期間の急性毒性試験から長期間の慢性毒性試験まで各目的に応じて設定されるが，特に試験が長期間におよぶものでは，期間中も動物は成長を続けており，その成長に伴う様々の変化を無視することはできない．

体重の変動は特に生体の健康状態を如実に反映するものである[1]が，動物の成長に伴ってその生理代謝にどのような変化がおこるのかについてはまだ十分解明されてはいない．

そこで今回，幼小期において体重差のあるラットが，成長に伴ってその生体活動に如何なる変化を示すか，血清成分および血球性状の面から検討した．

また，血清中に存在する酵素は主に臓器から分泌することが報告されている.[2] トランスアミナーゼ（GOTおよびGPT）活性を測定することは，肝，胆道疾患を取り扱う上で，臨床的には不可欠な検査[3]とされている．GOTおよびGPTは細胞分画中，上清分画とミトコンドリア分画中に局在するアイソザイムから成っている[4-8]ことが知られている．負荷のない状態で動物が成長する際に，臓器中のGOTおよびGPTなどの逸脱酵素が如何なる変化を示すかについて検討するため，肝臓中のGOTおよびGPT活性をも測定したので，ここに併せて報告する．

実験材料および実験方法

1. 実験動物

4週令の雄性JCL-SD系ラットを体重の重い群（以下A群と略す：体重66.7±2.9g）と体重の軽い群（B群：体重51.8±3.7g）にわけて1週間予備飼育した後，5週令から以下の実験に用いた．

2. 実験方法

1) 飼育方法

前記の動物は5匹ずつ同一ケージにいれ，日本クレア製固型飼料（CE-2）および水道水を自由摂取させた．飼育は，室温25±1°，湿度50±5%，照明時間午前6時より午後6時までとした一般飼育室にて行なった．A，B両群は予備飼育後の実験観察期間を，1週（5週令）から9週（13週令）までとし，各週で各群10匹ずつを以下の実験に用いた．

2) 血液検査

血液の調整は既報の方法[9]に準じた．血液は Coulter Counter Model-S[10] (Coulter Electric INC) を用いて以下の七項目について測定した．

a）白血球数（以下WBCと略す）
b）赤血球数（RBC）
c）ヘモグロビン量（Hgb）
d）ヘマクリット（Hct）
e）平均赤血球容積（MCV）
f）平均赤血球血色素量（MCH）
g）平均赤血球血色素濃度（MCHC）

なお，精度管理は標準血液（4C：Coulter INC）を使用して行なった．

3) 血清生化学的検査

血清の調整は既報の方法[9]に準じた．血清は自動分析装置（HITACHI M-400 Automatic Analyzer[11]）を用いて次の六項目について測定した．

a）グルコース量（以下 Glu と略す）—Glucose-Oxidase 変法[20]

b）総コレステロール量（Cho）—Liebermann-Bur-

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

chard 法[21]

c）尿素窒素量（UN）—Urease-Indophenol 法[22]

d）トランスアミナーゼ活性（GOT, GPT）—Reitman-Frankel 変法[23]

e）アルカリホスファターゼ活性（Al-P）—Kind-King 変法[24]

なお，測定用試薬として第一化学薬品製のアナセラムシリーズを，また精度管理には，日水製薬製の凍結プール血清「コンセーラ」を使用した．

4） 肝臓トランスアミナーゼ活性の測定

試料は Boyd の方法[6]に準じて調整した．5, 7, 9, 11および13週令の A, B 両群ラットを4匹ずつ用いた．肝臓（方形葉）2 gはハサミで破砕した後，約 10ml の0.25M 蔗糖溶液中でPOLYTRON を用いてホモゲナイズした．さらにそれを超音波細胞破壊器(Branson Sonifier B-12 型）で50kw, 0°, 4分間処理した後，ナイロンメッシュで濾過し，0.25M蔗糖溶液で10%に定容した．

測定は Wróblewski らの方法[12,13]に準じた第一化学薬品製ＵＶセット「第一」を使用して行った．上記の試料を適当に 0.25M 蔗糖溶液で稀釈調整し，分光光度計 (HITACHI Double Beam Spectrophotometer 356)恒温セルホルダーを用いて30°で酵素活性を測定した．

5） 肝臓タンパク質の定量

肝臓タンパク質は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry ら[14]の方法により測定した．

結果および考察

1） 体重変化について

ラットの体重変化を Table 1 に示す．

Table 1 の上段に示した体重は一週毎に実験に供した動物の体重であり，下段に示した体重は13週令で実験に供した動物の各週における体重である．Kennedyによると成長率の偏差は生後一週末までに確立され，その時点で小さかったラットは以後の成長過程において大きいラットに追いつかないと報告している.[15] 今回の実験からもこの傾向が認められ，5週令以後13週令までの体重はほぼ平行した増加傾向を示したが，A, B 両群内における各個体間の体重差は成長とともに大きくなり漸次両群の値が接近する傾向がみられた．

2） 血球性状の変化について

血液学的検査の結果を Table 2 に示す．

ＷＢＣは5週令および9週令でA群が多かったが，それ以外は両群の間に有意な差が認められなかった．RBC は10週令で，また Hgb は5週令でA群が高かった．Hct, MCV, MCH, MCHC については全期間を通して両群の間に顕著な差がみられなかった．

次に，これら赤血球成分の経時変化をみると，RBC, Hgb および Hct は成長とともに増加した．これに対し，MCV および MCH は減少する傾向を示した．

Creskoff ら[16]は，出生時に 12.0g であったラットの Hgb が成熟期には 15.8g まで上昇し，また Williamsonら[17]は，生後10日のラットの Hgb が12.9±0.2gであったのが，生後240日では13.8±0.2g まで上昇することを報告している.[18] さらに，Creskoff ら[16]は，MCV は出生時に 90μ^3 であったが成熟期には 63μ^3 となり，成長に伴って減少することを報告している.[18] 今回得た結果でも成長に伴い Hgb の増加とＭＣＶの減少がみられた．

以上の結果から，同一週令において体重に差があっても，血球性状に顕著な差がみられなかった．また，成長に伴い，RBC, Hgb および Hct が増加し，MCV および MCH が減少する傾向を認め，著者らの既報の結果[9]と一致した．

3） 血清成分の変化について

血清生化学的検査の結果を Table 3 に示す．

Glu は5週令においてA群が有意に高かったが，その後差はみられなかった．Cho は5週令においてA群が有意に高かったが，8および9週令で逆にB群が有意に高かった．ＵＮは全期間を通して両群の間に有意な差がなかった．ＧＰＴは5週令でA群が有意に高かった．Al-P は10週令でA群が有意に高かった．

次に，これら血清成分を経時的にみると，Glu はほぼ一定した値をとっており，加令との直接的関係がみられなかった．ＵＮは成長に伴って上昇した．Al-P は5週令から6週令まで上昇したが，その後両群とも漸次低下した．

以上のように血清中の各成分はそれぞれ異なった挙動を示したが，同一週令においては，体重に差があっても血清成分には顕著な差はみられんなかった．

4） 肝臓GOT, GPT 活性の変化について

肝臓ＧＯＴおよびＧＰＴ活性の測定結果を Table 4 に示す．

ＧＯＴ，ＧＰＴとも A, B 両群の間に有意な差はみられなかった．

肝臓タンパク質1mgあたりのＧＯＴおよびＧＰＴ活性については，ＧＯＴ活性において，11週令でA群が有意に高かった．

以上の結果から，体重に差があっても肝臓ＧＯＴおよびＧＰＴ活性には顕著な差がみられなかった．

血清および肝臓ＧＯＴ，ＧＰＴ活性の関係については Fig. 1 に示す．

Table 1. Changes in body weight

group	age (weeks)								
	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A (g)	125.3±7.1	187.2±11.4	239.9±14.7	291.0±19.4	330.5±20.4	367.9±21.6	394.0±27.9	431.3±22.0	448.0±40.0
	***	***	**	**	*			***	*
B (g)	107.4±6.0	163.2± 6.8	217.2±15.7	263.5±14.1	306.8±22.1	340.3±31.0	372.1±15.7	388.8±20.3	401.1±37.7
A (g)	123.9±3.7	183.7± 9.3	237.9±13.6	289.6±18.0	333.0±24.5	368.2±26.4	398.5±29.9	423.5±33.8	448.2±40.0
	***	***	**	**	**	**	**	*	*
B (g)	104.2±9.4	156.8±17.9	205.7±22.0	253.8±26.1	293.0±28.4	326.1±30.2	354.1±31.4	379.0±35.3	401.1±37.7

Values indicate mean±S.D. for 10 rats.

The marks mean significantly different from A group.

* $p<0.05$ ** $p<0.005$ *** $p<0.001$

Values in an upper table indicate body weight of rats used in each week.

Values in a lower table indicate changes in body weight of rats used in last week.

Table 2. Changes in blood components

	group	age (weeks)								
		5	6	7	8	9	10	11	12	13
WBC ($\times 10^3/mm^3$)	A	8.5±1.0	6.0±1.7	6.1±1.1	5.8±1.2	7.3±1.2	6.4±1.2	6.8±2.0	6.1±1.4	7.2±3.1
	B	7.2±1.4 *	5.9±1.9	6.2±1.2	6.5±1.6	6.2±1.1 *	5.5±1.7	6.2±1.8	5.8±1.8	5.9±1.6
RBC ($\times 10^6/mm^3$)	A	4.90±0.22	5.48±0.28	6.09±0.16	6.16±0.14	6.61±0.29	7.36±0.38	7.19±0.18	7.10±0.68	7.49±0.42
	B	4.70±0.38	5.48±0.17	6.00±0.25	6.13±0.27	6.67±0.17	6.97±0.39 *	7.24±0.20	7.44±0.30	7.44±0.29
Hgb (g/dl)	A	12.5±0.5	11.8±0.4	13.1±0.4	13.0±0.5	13.5±0.4	14.3±0.5	14.3±0.4	14.1±1.3	14.3±0.4
	B	11.9±0.8 *	11.8±0.4	12.9±0.6	13.1±0.5	13.6±0.4	13.9±0.6	14.4±0.5	14.3±0.6	14.3±0.4
Hct (%)	A	30.5±1.1	34.3±1.6	37.9±1.0	36.7±1.1	38.8±1.3	42.9±3.1	40.5±0.9	41.7±3.8	40.8±2.1
	B	29.2±2.1	34.1±1.4	37.3±1.7	37.2±1.3	38.9±1.0	41.3±3.1	40.8±1.7	42.9±2.0	40.4±1.4
MCV (μ^3)	A	62.8±1.6	62.7±1.5	59.7±1.4	58.6±1.3	57.9±1.9	57.7±1.9	55.6±1.3	51.8±0.8	55.1±0.7
	B	62.5±2.2	62.5±1.6	59.6±0.9	59.6±1.2	57.6±1.3	58.4±2.2	55.6±1.4	51.3±1.0	55.0±0.8
MCH ($\mu\mu$g)	A	25.5±0.9	21.7±0.9	20.9±0.5	20.4±0.6	20.0±0.8	19.1±0.9	19.4±0.4	19.5±0.6	19.3±0.7
	B	25.2±1.0	21.6±0.4	21.0±0.4	20.7±0.5	19.9±0.5	19.6±1.3	19.4±0.3	19.4±0.4	19.4±0.6
MCHC (%)	A	41.1±0.8	34.7±1.0	34.1±0.2	34.8±0.6	34.4±0.5	33.2±2.3	35.0±0.3	38.6±1.4	35.1±1.1
	B	40.9±0.7	34.7±0.7	34.2±0.3	34.7±0.5	34.6±0.5	33.5±2.2	34.8±0.5	38.9±1.0	35.5±1.1

Values indicate mean±S.D. for 10 rats.
The marks mean significantly different from A group.
* $p<0.05$

Table 3. Changes in biological values in serum

	group	age (weeks)								
		5	6	7	8	9	10	11	12	13
Glu	A	138.4± 4.3	133.4±10.5	131.9± 7.4	129.0± 5.3	133.4± 6.9	132.9± 6.9	135.0± 6.0	133.9± 7.8	130.7± 9.9
mg/dl	B	130.4± 4.5***	132.1±10.7	136.7± 7.1	132.1± 9.8	138.2± 6.4	131.3±11.7	134.1± 8.1	133.2± 7.0	127.7± 6.0
UN	A	14.3± 1.9	15.2± 1.4	16.7± 2.0	16.9± 2.4	18.7± 1.8	17.3± 1.7	19.1± 1.2	17.9± 1.9	18.6± 2.4
mg/dl	B	14.8± 1.6	15.7± 2.6	17.5± 2.2	17.7± 2.0	18.1± 1.7	18.5± 2.6	18.8± 1.9	17.0± 1.4	17.6± 1.6
Cho	A	74.4± 6.3	72.1±11.8	64.4±10.9	58.8± 2.6	57.3± 5.7	65.4± 7.7	63.4± 8.1	68.9±10.9	60.7±12.2
mg/dl	B	68.6± 5.7*	81.6±12.0	65.4± 5.5	65.1± 6.9*	64.1± 6.1*	68.7±12.4	69.8± 9.6	64.5±14.4	60.1± 8.9
GOT	A	145.1±14.5	126.5±23.8	123.9±11.2	122.5±10.9	109.1± 7.0	107.8± 8.2	119.8±11.5	124.3±15.2	121.3± 7.7
KU/ml	B	143.4± 7.8	146.9±13.3*	125.1±13.1	128.1±18.8	109.4± 8.7	109.7± 6.7	118.9±12.6	120.1±13.7	120.0± 8.1
GPT	A	31.4± 3.9	36.3± 7.1	30.2± 3.3	31.9± 2.9	34.1± 5.4	31.1± 4.4	37.3± 4.8	41.2± 7.5	37.0± 7.0
KU/ml	B	26.5± 4.5*	38.4± 4.6	32.5± 4.9	35.6± 6.4	34.8± 3.5	31.9± 4.7	34.9± 6.2	37.6± 7.2	38.3± 9.3
Al-P	A	69.3±21.1	71.3±16.6	52.6± 8.5	51.4±11.2	49.2±12.6	49.8±16.3	42.0±10.4	44.1±12.1	46.6±10.5
KA-U/dl	B	66.0± 9.8	74.4±13.6	62.3±13.0	52.6±12.6	54.2±14.5	46.3±12.1**	48.6±13.1	40.7± 9.4	46.1±10.3

Values indicate mean±S.D. for 10 rats.

The marks mean significantly different from A group.

* $p<0.05$ ** $p<0.001$

Table 4. Changes in activity of GOT and GPT in liver

	group	age (weeks)				
		5	7	9	11	13
GOT	A	126.4±17.4	153.8±18.1	149.7±10.1	169.1±19.1	172.7±24.8
×10³mU/g. liver	B	149.6±18.2[1)]	133.1±11.7	151.7±14.6	150.8±30.8	147.9±15.9
GPT	A	91.5±35.3	94.3±38.6	131.1±50.7	183.2±45.7	221.4±68.6
×10²mU/g. liver	B	93.3±25.6	80.7±16.6	137.3±10.7	251.3±37.2	216.6±62.5
Protein	A	336.1±51.9	390.2± 8.0	350.4±28.6	346.0±31.4	389.8±74.8
mg/g. liver	B	355.7±50.7	376.6±60.6	336.1±56.0	395.1±34.2	365.5±23.7
GOT	A	378.3±40.4	394.2±47.2	427.7± 8.8	491.4±68.4 *	453.8±94.4
mU/mg. protein	B	445.1±46.3	365.3±99.4	455.2±36.2	379.7±52.0	407.7±63.8
GPT	A	27.4±11.4	24.1± 9.5	37.2±13.2	52.6±10.0	59.2±22.1
mU/mg. protein	B	26.2± 5.4	22.4± 8.4	41.5± 5.4	64.2±12.4	60.1±20.1

Values indicate mean±S.D. for 4 rats except where noted.
1) Values indicate mean±S.D. for 3 rats.
The marks mean significantly different from A group.
* $p<0.05$

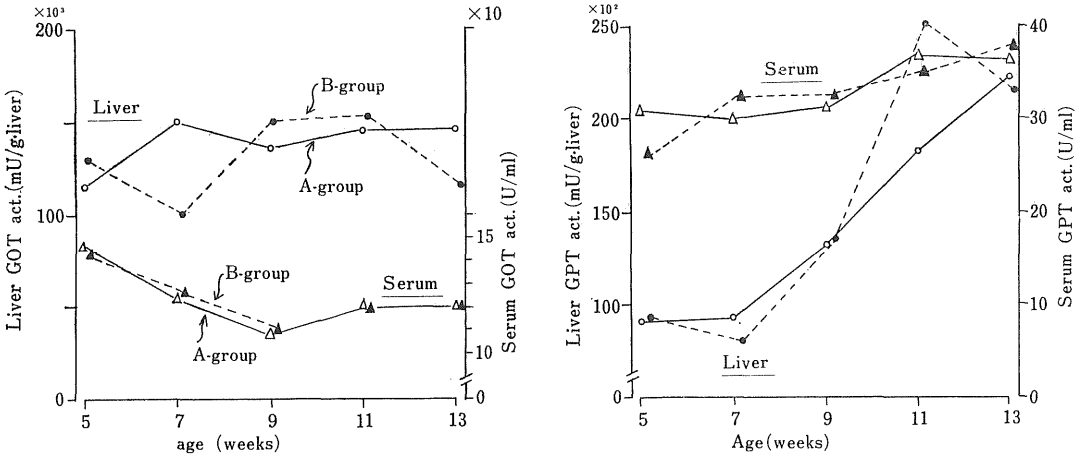


Fig. 1. Changes in Liver and Serum enzymes of normal rats. Points indicate mean.

血清および肝臓GOT活性の推移においては両者の間に相関した傾向はみられなかった．GPT活性は相関して上昇する傾向がみられた．肝臓におけるGOTおよびGPT両酵素は細胞分画上清分画とミトコンドリア分画に局在することが知られている.[4-8] また血清中に存在する両酵素は肝臓からの逸脱に由来することが知られている.[2,19] 今回用いた両酵素活性の測定法は，血清においては上清分画の活性を，また肝臓においては上清およびミトコンドリアの活性を対象としている．そのため，直接血清および肝臓の酵素活性を結びつけることはできないが，一般的な傾向をとらえた場合，GPTの挙動に相関がみられた．

ま と め

体重の異なる同一週令の二群のラットが，成長に伴って体重，血球性状，血清成分および肝臓酵素に如何なる変化を示すかを検討し，次の結果を得た．

1. 実験開始時において認められた同一週令の動物の体重差は，実験期間を通して継続した．

2. 血球性状については，RBC，Hgb および Hct は成長に伴って増加したが，ＭＣＶおよびＭＣＨは逆に減少した．

3. 血清成分については，Glu は成長とは無関係におよそ一定しており，ＵＮは成長とともに漸次増加した．Al-P は低下した．

4. 肝臓中のＧＯＴおよびＧＰＴ活性は，個体差が大きかった．血清中のＧＯＴおよびＧＰＴ活性と比較すると，ＧＰＴにおいてはその挙動は類似していた．

5. 同一週令においては，ラットの体重に差があっても，血球性状，血清成分および肝臓ＧＯＴ，ＧＰＴ活性には顕著な差がみられなかった．

文　献

1) 福森信隆，水尾昭江，市川久次，小林博義，平賀興吾：東京衛研年報，**25**，557，1974
2) 松村義寛：臨床病理，**XVI**，143，1968
3) 上野幸久，遠藤了一：臨床検査，**18**，5，1974
4) Fleisher, G.A., Potter, C.S., Wakim, K.G., Pankow, M. and Osborne, D.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **103**, 229, 1960
5) Boyde, T.R.C., and Latner, A.L.: *Biochem. J.*, **82**, 51, 1962
6) Boyd, J.W.: *Biochem. J.*, **81**, 434, 1961
7) 和田　博，鏡山博行：代謝，**2**，643，1965
8) Hook, R.H. and Vestling, C.S.: *Biochim. Biophys. Acta.* **65**, 358, 1962
9) 中川好男，福田向江，柴英子，平賀興吾：東京衛研年報，**25**，599，1974
10) 只野寿太郎：臨床検査，**17**，1290，1973
11) 奥田　清：臨床検査，**17**，1192，1973
12) Wróblewski, F., Karmen, A., and Ladue, J.S.: *Proc. Exptl. Biol. Med.*, **91**, 569, 1956
13) Karmen, A.: *J. Clin. Invest.*, **34**, 120, 1955
14) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.N., Farr, A.L. and Randall, B.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
15) 高橋日出彦：くすりの毒性，36，1972，南江堂，東京
16) Creskoff, A.J., Fitz-Hugh, and Farris, E.J.: *The rat in laboratory investigation*, 1949, J.B. Lippincott. Co., Philadelphia
17) Williamson, C.S. and Ets, H.N.: *Amer. J. Physiol.*, **86**, 480, 1928
18) 安東洪次，田嶋嘉雄：医学研究動物実験法，149，1956，朝倉書店，東京
19) 高久史麿：日本臨床，**30**，534，1973
20) 金井　泉，金井正光：臨床検査法提要，25版，Ⅶ-51，1968，金原出版，東京
21) Coleman, D.M., Mcpee, A.F.: *Am. J. Clin. Path.*, **26**, 181, 1956
22) Horn, D.B.: *Clin. Chim. Acta.*, **14**, 185, 1966
23) 柴田　進，佐々木匡秀：日常臨床化学超微量定量法，276，1969，金芳堂，東京
24) 柴田　進，北村元仕：日常臨床生化学定量法，340，1964，中山書店，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 203-206, 1975

Coil Planet Centrifuge 法によるラットの赤血球浸透圧抵抗

市川久次* 小林博義* 中尾順子*

Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge Method

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

赤血球の浸透圧抵抗を測定することは，臨床上，遺伝性球状赤血球症等[1]の診断に有力なものといわれている．また最近は胃癌をはじめとして腫瘍患者の貧血の診断にも応用されつつある．[2] 従来の方法は，いわゆる落差溶血という現象をもとにして測定する Ribière 法，Parpart 法が用いられてきたが，最近従来とは考え方を異にする連続濃度勾配をもつ塩溶液中を赤血球を移動させて，赤血球浸透圧抵抗を測定する濃度勾配溶血という現象をもとにする方法が開発され，今回著者らはラットを用いて，この方法による赤血球浸透圧抵抗を週令を追って検討したので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 原　理[3]

Coil Planet Centrifuge (CPC) 法の原理は，全長 320cm の細いポリエチレンチューブをコイル状にプラスチック棒に巻きつけて，これを遠心器（管）とし，コイル内に連続濃度勾配をもつ塩溶液を充填し，この一端から微量の血液を注入し両端を封じたのち，これをＣＰＣという特殊な遠心機（Fig. 1）にかけて作動させる．コイルはＣＰＣの主軸を中心に高速公転（1600rpm）すると同時にコイル自体も低速自転（16rpm）する．したがってコイルチューブ内の液体に浮遊する粒子はコイルの部位に関係なく一定の遠心力を受け，他端へ向って一定速度で移動する．これはちょうど 320cm の遠心管を用いた場合に相当する，赤血球では遠心力によりチューブ内を高張液側から低張液側へと進行し，ついには浸透圧低下に抵抗できずに溶血する．この際放出されたヘモグロビンは，その部位に留まって溶血帯を形成する．この溶血帯の位置，形状により，赤血球浸透圧脆弱性を測定することができる．

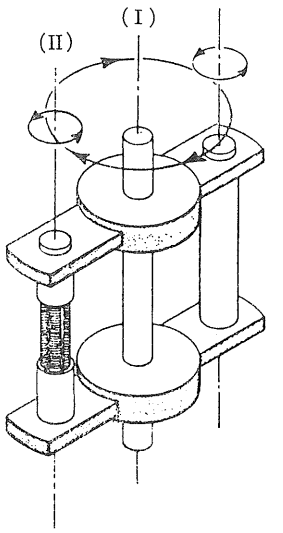


Fig. 1　Principle of C. P. C. Method
(I)—Revolution axis
(II)—Rotation axis

2. 使用動物

日本クレア生産のラット4週令（ＳＤ系ならびに Wistar 系）を購入し，3日間予備飼育後，一般症状，体重増加に異状のあるものは除き，各系雌雄5匹づつを1群として実験に供した．動物は日本クレア製粉末飼料ＣＥ-2を自家整型（固型）したものならびに水道水を自由に摂取させ，温度25±1°C，湿度 55±5% に調整された室内にて飼育した．

3. 採血方法

ラットを無麻酔下背位に固定し，大腿部を剪毛後切開し，伏在静脈を露出させ，静脈用注射針 1/3 にて穿刺し

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

噴出する血液をヘパリン処理したヘマトクリット測定用キャピラル（以下ヘマトクリット管と略す—Surgicot Inc. 製）を用いて，管の2/3ほど採血し（約40μl），直ちに固化を防ぐため5～6回転倒し，キャピラルの一端を専用のパテで封じ，冷蔵庫（約5°C）内に保存し，すべての採血が終了した後，遠心分離（1200rpm, 10min）し，固化した血液，フィブリンならびに白血球，血小板の集合部分のバフィーコート部分より 2～3mm 下の位置で切断し，残余の固化しない血球部分(殆んど赤血球)を実験に供した．

4. 連続濃度勾配食塩液の作製法

CPCのコイル中への連続濃度勾配をもつ食塩溶液の充填は勾配作成器（三鬼エンヂニアリング製）にて行った．すなわち低張側液に 30mOsM NaCl 溶液，高張側液に 170mOsM NaCl 溶液を用いて，勾配作成装置を作動させ，CPC遠沈コイル(三鬼エンヂニアリング製)の白キャップ側より注入し，赤キャップ側手前 2±2 巻で終了させ（注入前コイルは白キャップ側端より余分に 2cm のところでチューブを切断したものを用いた），赤キャップ側端をアルコールランプあるいはハンダゴテで加熱しピンセットで封じ水分の蒸発を防ぐためにビニール袋に入れ密封して冷蔵庫内に保存した．

5. 溶血帯の測定

血液の入ったヘマトクリット管の一端（バフィーコートを切断した側，パテの入った部分も切断）を塩溶液を充填したコイルの白キャップ側先端に連結し白キャップ側を上に，赤キャップ側を下にすると塩溶液は落下する，これに続いて血液が流入し，コイル中に注入することができる．2cm 血液が注入（血液の先端が白キャップ端に到達したら）されたらヘマトクリット管とコイル先端をはずし，そのまま落下させ血液終端がチューブの白キャップ側より一巻目にきたらコイルを水平にし両端をアルコールランプあるいはハンダゴテにて加熱して封じ，さらにコイルプレッシャー（三鬼エンヂニアリング製）にて封じる（血液注入の際コイル赤キャップ側チューブ先端を切断し，塩溶液が移動できるようにし，塩溶液先端を白キャップ側チューブ先端まで移動させ，血液注入時に反応がすぐ始まらないように約 2mm ほど血液と塩溶液の間に空気泡を入れる）．次に恒温器（三鬼エンヂニアリング製）にて 37°C，10分間加温し，温度制御ずみ(37°C)のCPC特殊遠心機（三鬼エンヂニアリング製)にセットし(白キャップ側を下に)，10分間作動させ，終了後赤キャップ内側より 3cm のところにマークをつけ，走査型光電光度計（三鬼エンヂニアリング製）にて測定記録する．

6. 溶血浸透圧値の読み取り方法

溶血帯の記録は Fig. 2 に示した如く溶血部がゆるやかなピークを画くように記録されるので，Fig. 2 に示した，溶血開始値（HSP），溶血最大値（HMP），溶血終了値（HEP）ならびに溶血幅（HW）を読み取り，それぞれを mOsM 値に換算した．

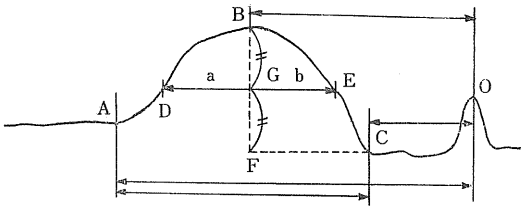


Fig. 2 Pattern of Hemolysis
H. S. P—Start point of Hemolysis ($\overline{AO}$)
H. M. P—Maximum point of Hemolysis ($\overline{BO}$)
H. E. P—End point of Hemolysis ($\overline{CO}$)
H. W. —Width of Hemolysis ($\overline{AC}$)
a / b —Shape of Hemolysis

実験結果

1. 注入血液の調製方法

血液は，血管外に出ると血液凝固反応系が働き数分のうちに固化してしまうために，全血を用いるためには，採血から遠心操作まで直ちに行なわなければならない，数多くの動物より採取する新鮮血液を取扱うためよりよい方法を検討したところ，実験方法において述べたが，ヘマトクリット管内で一部凝固した部分ならびに白血球，血小板，フィブリンを遠心分離（1200rpm, 10min）することにより得た血泥について検討したところ，Fig. 3 に示した如く全血を使用した場合よりも溶血幅が大きくなることが認められ，全血を用いた時には溶血幅が小さいために，重なって発見されなかったピークを血泥を使用することにより発見できる可能性が得られたので，以後遠心分離（1200rpm, 10min）した血泥を使用する

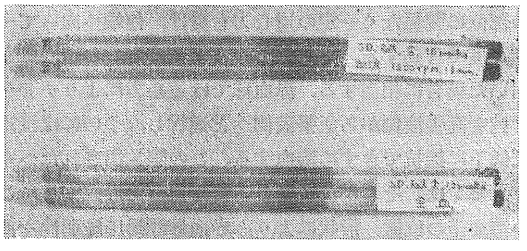


Fig. 3 Patterns of Hemolysis by C. P. C. Method when Blood Mud or Whole Blood Used as Sample.
the upper……sludge blood (1200r. p. m., 10min.)
the lower……whole blood

ことにした.

2. 実験期間中の動物の体重増加

一週間毎に採血（採血時出血量約 0.3～1ml）を行った場合の体重増加に与える影響を検討した結果 Fig. 4 に示した如く，実験期間中の体重は，Wistar-JCL 系雌群1例が採血後6目目に死亡した以外順調に増加を示した.

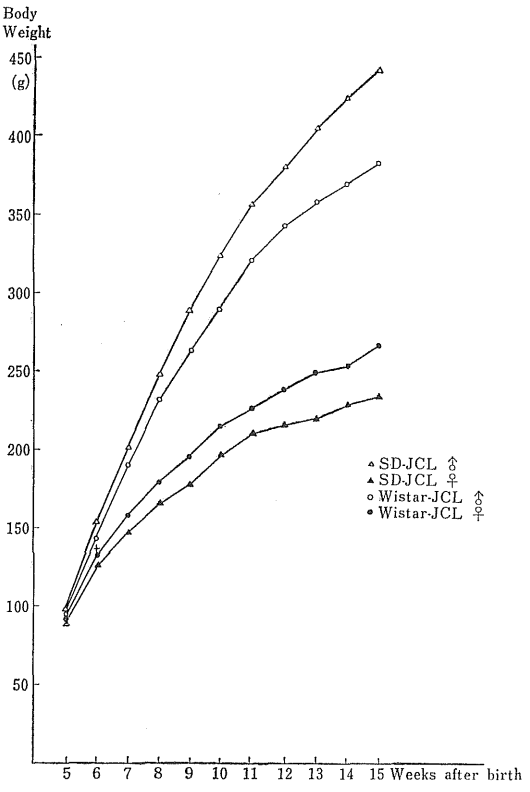


Fig. 4 Mean Body Weights of Rats extracted blood weekly. † One of the group was dead

3. ラットの週令と溶血パターンの変動

SD-, Wistar-JCL系ラット雌雄5匹づつを用い，5週令より15週令まで（Wistar-JCL 系雌群の1例は6週令直前で死亡），大腿部伏在静脈より採取した血液について，溶血パターンについて検討した結果 Fig. 5, 6 に示した如く，溶血開始（HSP），溶血最高値（HMP），溶血終了値（HEP），溶血幅（HW）において雌雄とも Wistar-JCL 系の方が SD-JCL 系よりも高（大）なる値を示す傾向があり，系統に差があることが認められた. 溶血最高値（HMP），溶血終了値（HEP）は各群とも生後5～15週令の間で比較的安定しており，したがって溶血幅（HW）の大小は，12週以降の雌において顕著にみられるように溶血開始値（HSP）に依存する傾向が認められた. また，溶血の形状（a/b）については Fig. 7 に示した如く，11週令以後は全体的に値が1に接近しながら安定化する傾向が認められた.

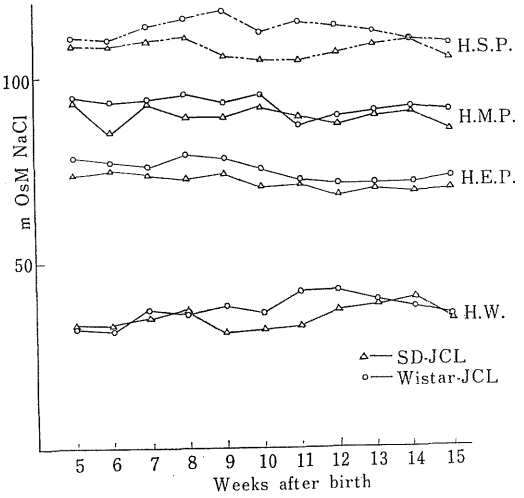


Fig. 5 Mean C.P.C. Values of Male Rats

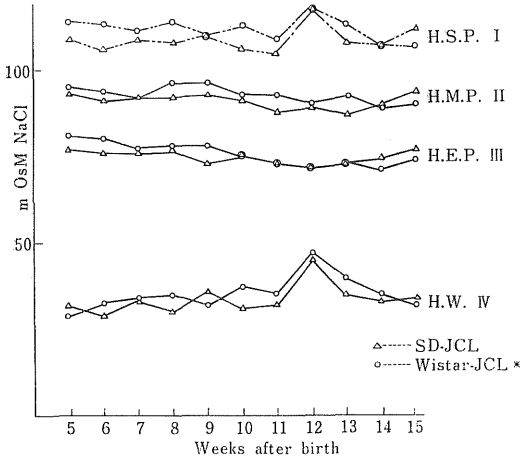


Fig. 6 Mean C.P.C. Values of Female Rats
* One of this group was dead 1 week after blood-letting started.

考　　察

CPC法をもちいてラットの成長期～安定期といわれている生後5～15週令について，赤血球の浸透圧抵抗を週令を追って検討した.

使用した血液を全血とせず，血泥（1200rpm, 10min 遠心）としたがこれは，前述のごとく溶血幅（HW）が

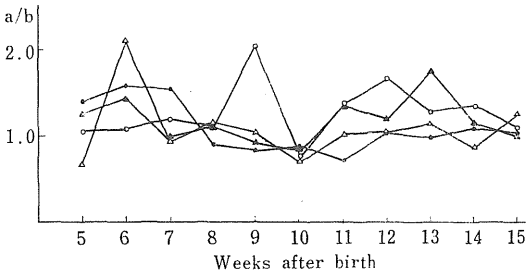


Fig. 7 Shape of Hemolysis with CPC
△SD-JCL♂ ○Wistar-JCL♂
▲SD-JCL♀ ●Wistar-JCL♀
No. of animals in every group was 5, but one of Wistar- JCL (♀) group was dead 1 week after blood-letting stared.

全血を使用するよりも大きくなるため，微妙な変化もより発見し易くなると判断したからである．また，この際 Fig. 3 に示したごとく全血の場合，血泥に比較して溶血開始値が低下しており，血清中に浸透圧抵抗を増強する物質があることを予想させた．

生後5～15週令のラットの溶血開始値（ＨＳＰ），溶血最高値（HMP），溶血終了値（ＨＥＰ），溶血幅（HW）において Fig. 5,6 に示した如く全体的に雌雄とも Wistar-JCL 系の方が SD-JCL 系よりも高（大）なる値を示す傾向が認められ，溶血値に系統差があることが認められた．また，溶血最高値（HMP），溶血終了値（ＨＥＰ）については各群ともに比較的安定しており，Fig. 6 に示した如く12週令以後の雌において顕著にみられるように，溶血幅（HW）の低下は溶血開始値（ＨＳＰ）の低下と平行な関係があることが認められる．溶血幅の大小は，溶血開始値（ＨＳＰ）の高低と密接な関係があると考える．また，溶血の形状（a/b）については Fig. 7 に示したごとく，11週令以後その値は1に接近しながら安定化する傾向がみられ，この点についてはさらに高令のものについての検討に待ちたい．また，5～10週令という時期は，体重の増加等より成長の著しい期間といわれ溶血の形状（a/b）は，赤血球の浸透圧抵抗値の分布の指標ともいえる値で，この値が加令とともに安定化する傾向が見られたことより，赤血球の膜成分とラットの成長との間の関連性を示すものとして興味深い．

なお，今回は生後5～15週令のものについて検討を行ったが，今後は生後4週令以前のものについて検討を加えるとともに，さらに高令のものについても検討を加えるつもりである．

要　旨

生後5～15週令のラット（SD-JCL ならびに Wistar-JCL 系雌雄）について，Coil Planet Centrifuge 法を用いて赤血球浸透圧抵抗について検討したところ，溶血開始値，溶血最高値，溶血終了値，溶血幅については雌雄とも全体的に Wistar-JCL 系の方が SD-JCL 系よりも高（大）なる値を示す傾向があった．

文　献

1) 金井正光，金井　泉：臨床検査法摘要，1970
2) 松野耕治：弘前医学，27，303，1975
3) 山中　学：ＣＰＣ彙報，P1，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 207-210, 1975

ラットの断頭採血時の処理ならびに採血部位と血液成分について

市川久次* 中川好男* 小林博義*
平賀興吾*

Effects of Different Blood-Collecting-Techniques on Rat Blood Components

HISATSUGU ICHIKAWA*, YOSHIO NAKAGAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and KOGO HIRAGA*

Effects of treatments (none, hit a head and anesthesia with ether) before decapitation and the positions of various veins (jugular, saphenous and dorsal digital vein of foot) extracted on blood contents in rats (JCL-SD strain 8 weeks age after birth, male 248 g, female 177 g) were examined, and the following results were obtained.

1. When the rats were anesthetized with ether, considerable changes of the blood contents in both male and female were found.

2. The blood contents (hemacyte) were increased as the extracted position moves to peripheral when jugular vein as control, and in the case of decapitation, they were lower than it.

動物の血液成分は採取時の処理ならびに部位によって変化があることはこれまでよくいわれていることであるが，系統的に検討したものはあまり見当らない．医薬品，食品添加物ならびに環境汚染物質の安全性（毒性）を検討するにあたって，それらの血液成分に対する影響を検索することは不可欠のことである．そこで，実際に当研究室で毒性の研究に用いられている Spraque-Dawley (SD) 系ラットを用いて，採血時の処理ならびに部位の相違による血液成分の差について検討することは血液を通じて毒性を判定する上に非常に有意義であると考え検討を行なったので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 使用動物：JCL-SD 系ラット生後8週令，体重雄248 g 雌177 g を用いた．

2. 採血時の処理ならびに部位

i）採血時の処理：断頭採血を行なう前の処理を①無処理②殴打③エーテル麻酔（エーテルをしみ込ませた綿を入れたグロッケ内にラットを入れる）に分けた．

ii）採血部位：ラットを背位に固定し，採血部位を剪毛切開し，各静脈を露出させ，注射針にて穿刺し採血した．各部位は①頸静脈②大腿部伏在静脈③足甲部背側指静脈④断題頸部とに分けた．採血順序による差をなくすために雌雄6匹ずつを用い以下のように採血した．

Rat No.	頸静脈	大腿部伏在静脈	背側指静脈	断頭頸部
1	1	2	3	4
2	3	1	2	4
3	2	3	1	4
4	1	2	3	4
5	3	1	2	4
6	3	2	1	4

3. 検査項目ならびに方法

採血時処理の違いによる血液成分の差を検討するものについては，血液学検査（血球成分：Coulter Counter Model-S）ならびに血清生化学検査（自動分析装置：日立M-400）を行なった.[1] また，採血部位による差の検討においては，血液学検査（血球成分）についてのみ行な

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

った.

4. 試薬：エーテルは和光純薬製特級エーテルを使用した.

測定結果はすべて推計学的処理を行なった.

実験結果

1. 断頭採血時の処理の相違による血液成分の差

断頭採血時，断頭する前に，①無処理，②殴打，③エーテル麻酔の処理をした場合の血液成分について検討した結果は Table 1, 2, 3, 4 に示したごとく，無処理のものに比較し差が認められたのは，血液学検査においてはエーテル麻酔処理時の雄の白血球数と平均赤血球血色素濃度，雌のヘモグロビン量，ヘマトクリット値（$P<0.05$）であった．雌雄間で差が認められたものは，無処理の白血球数，平均赤血球血色素濃度（$P<0.01$），殴打処理の平均赤血球容積（$P<0.01$），エーテル麻酔処理時のヘマトクリット値（$P<0.05$）であった．また血清生化学検査で，無処理に比較して差が認められたものは，雄ではエーテル麻酔処理時の総蛋白量，グルコース量（$P<0.01$），アルカリフォスファターゼ（$P<0.05$），雌ではエーテル麻酔処理時のグルコース量，尿素窒素量，GPT活性，GOT活性（$P<0.01$），殴打処理時のコレステロール値（$P<0.05$）アルカリフォスファターゼ（$P<0.05$）であり，雌雄間に差が認められたものは殴打処理時のコレステロール値（$P<0.01$），エーテル麻酔処理時のGPT活性（$P<0.05$），ALP活性（$P<0.01$）であった.

2. 採血部位による血液成分の差

Table 1 Effect of Treatments before Decapitation on Hemacytes in Rats

SEX	Treatment	WBC ($\times10^3$)	RBC ($\times10^6$)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
M	None(5)[1]	10.62±0.691[2]	6.62±0.102	14.40±0.337	40.18±0.731	61.0±0.83	21.96±0.373	36.04±0.175
	After hit a head(5)	11.62±0.653	6.84±0.133	14.74±0.279	41.66±1.165	61.2±0.49	20.20±1.955	33.02±3.433
	After Anesthetized with ether(5)	6.98±0.793*	6.59±0.131	14.36±0.197	38.96±0.495	59.6±0.67	21.96±0.240	36.82±0.243*
F	None(5)	7.54±0.459	6.72±0.128	14.76±0.255	39.60±0.701	60.0±0.71	22.14±0.147	37.28±0.265
	After hit a head(5)	9.38±1.057	6.64±0.195	14.76±0.437	38.72±1.299	59.0±0.31	22.46±0.283	38.22±0.521
	After Anesthetized with ether(5)	6.54±0.855	6.38±0.182	13.78±0.235*	37.14±0.461*	58.8±0.97	21.90±0.619	37.18±0.493

1) No. of rats 2) mean±S.E. * $p<0.05$

Table 2 Effect of Treatments before Decapitation on Hemacytes in Rats (male and female)

Treatment	SEX	WBC ($\times10^3$)	RBC ($\times10^6$)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
None	M[1]	10.62±0.691[2]	6.62±0.102	14.40±0.337	40.18±0.731	61.0±0.83	21.96±0.373	36.04±0.175
	F[1]	7.54±0.459**	6.72±0.218	14.76±0.255	39.60±0.701	60.0±0.71	22.14±0.147	37.28±0.265**
After hit a head	M[1]	11.62±0.653	6.84±0.133	14.74±0.279	41.66±1.165	61.2±0.49	20.20±1.955	33.02±3.433
	F[1]	9.38±1.057	6.64±0.195	14.76±0.437	38.72±1.299	59.0±0.31**	22.46±0.283	38.22±0.521
After Anesthetized with ether	M[1]	6.98±0.793	6.59±0.131	14.36±0.197	38.96±0.495	59.6±0.67	21.96±0.240	36.82±0.243
	F[1]	6.54±0.855	6.38±0.182	13.78±0.235	37.14±0.461*	58.8±0.97	21.90±0.619	37.18±0.493

1) No. of rats=5 2) mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

Table 3 Effect of Treatments before Decapitation on Serum Contents in Rats

SEX	Treatment	TP g/dl	GLU mg/dl	UN mg/dl	GPT U[3]/ml	ALP U[4]/dl	CHO mg/dl	GOT U[3]/ml
M	None(5)[1]	6.34±0.081[2]	140.8± 4.85	20.2±2.71	32.8±1.25	49.4±3.35	59.0±3.05	139.0±7.81
	After hit a head(5)	6.34±0.113	147.6± 2.61	20.8±0.73	32.2±1.53	65.8±8.03	60.4±1.57	118.0±6.61
	After anesthetized with ether(5)	5.88±0.087**	178.2± 4.19**	17.2±0.91	31.6±5.23	62.0±3.09*	57.8±3.03	114.2±7.05
F	None(5)	6.45±0.203	131.5±11.65	21.2±0.63	34.7±2.01	53.7±11.01	62.7±4.21	147.2±13.23
	After hit a head(5)	6.46±0.153	153.2± 5.75	20.0±1.15	32.8±1.15	51.2±3.87*	79.2±2.99*	138.0± 6.25
	After anesthetized with ether(5)	6.08±0.149	185.6± 4.57**	16.2±0.59**	24.0±0.55**	39.4±4.21	59.0±2.89	101.2± 4.05**

1) No. of rats 2) mean±S.E. 3) Karmen unit 4) K. A. unit
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

Table 4 Effect of Treatments before Decapitation on Serum Contents in Rats (male and female)

Treatment	SEX	TP g/dl	GLU mg/dl	UN mg/dl	GPT U[3]/ml	ALP U[4]/dl	CHO mg/dl	GOT U[3]/ml
None	M[1]	6.34±0.081[2]	140.8± 4.85	20.2±2.71	32.8±1.25	49.4±3.35	59.0±3.05	139.0±7.81
	F[1]	6.45±0.203	131.5±11.65	21.2±0.63	34.7±2.01	53.7±11.01	57.8±3.03	114.2±7.05
After hit a head	M[1]	6.34±0.113	147.6± 2.61	20.8±0.73	32.2±1.53	65.8±8.03	60.4±1.57	118.0±6.61
	F[1]	6.46±0.153	153.2± 5.75	20.0±1.15	32.8±1.15	51.2±3.87	79.2±2.99**	138.0±6.25
After anesthetized with ether	M[1]	5.88±0.087	178.2±4.19	17.2±0.91	31.6±5.23	62.0±3.09	57.8±3.03	114.2±7.05
	F[1]	6.08±0.147	185.6±4.57	16.2±0.59	24.0±0.55*	39.4±4.21**	59.0±2.89	101.2±4.05

1) No. of rats=5 2) mean±S.E. 3) Karmen unit 4) K. A. unit
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

採血部位による血液成分（血球）について採血順位による差がないよう考慮して検討した結果は，Table 5 に示したごとく，頸部静脈より採血したものを対照として，大腿部，足甲部静脈血，断頭採血した血液について比較検討したところ，雄においては，足甲部のヘマトクリット値（$p<0.05$），断頭採血の白血球数（$p<0.05$），赤血球数（$p<0.05$），ヘマトクリット値（$p<0.05$）であった．また雌においては，足甲部の赤血球数（$p<0.05$），大腿部，足甲部のヘモグロビン量（$p<0.05$），大腿部（$p<0.05$），足甲部（$p<0.05$）のヘマトクリット値，足甲部の平均赤血球容積（$p<0.05$），断頭採血の白血球数（$p<0.01$），赤血球数（$p<0.01$），ヘモグロビン量（$p<0.05$），平均赤血球容積（$p<0.05$），ヘマトクリット値（$p<0.05$）であった．

考　察

実験動物に関する基礎的研究の一つとして，また毒性研究への一指針としての目的で，JCL-SD 系ラット（生後8週令；体重雄247g，雌177g）を用いて，断頭採血時の処理ならびに採血部位の相違による血液成分の差について検討を行なったところ，処理（対照無処理），採血部位（対照頸静脈）により，推計学的に差があるものが数多く認められたが，成績を総合して考察を加えると，断

Table 5 Hemacytes of Various Veins Extracted

SEX		Jugular vein[1)]	Saphenous vein	Dorsal digital vein of foot	Decapitation
M	WBC ($\times 10^3$)	11.9±1.70	12.2±1.42	13.9±0.87	8.9±1.77*
	RBC ($\times 10^6$)	7.28±0.29	7.70±0.58	8.41±1.19	6.51±0.47*
	Hgb (g/dl)	15.6±0.33	16.7±1.15	17.9±2.26	14.7±1.53
	MCV (μ^3)	56.7±1.47	57.2±1.77	57.0±0.52	60.3±6.27
	Hct (%)	43.1±1.53	45.5±3.35	48.0±1.56*	39.2±3.4*
F	WBC ($\times 10^3$)	9.3±2.39	10.7±2.55	10.3±2.32	5.8±1.15**
	RBC ($\times 10^6$)	7.37±0.32	7.62±0.43	7.71±0.18*	6.75±0.26**
	Hgb (g/dl)	15.8±0.48	16.5±0.47*	16.7±0.80*	14.9±0.51*
	MCV (μ^3)	56.7±1.47	57.2±1.77	57.0±0.52*	58.7±2.67*
	Hct (%)	42.5±1.10	44.7±0.39*	44.5±1.53*	39.2±1.5*

1) control for the statistical treatment
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

頭採血時の処理の相違については，殴打よりもエーテル麻酔処理した場合の方が影響が大であることが認められ，特に雄では総蛋白量，グルコース，雌ではグルコース，尿素窒素量，ＧＰＴ，ＧＯＴ活性に１％の危険率をもって有意な差が認められた．このことは，処理開始より断頭までの時間が殴打の場合は直ちにであり，無処理の場合とそれほど差がないといえるが，エーテル麻酔の場合，麻酔期に入るまでに３～５分が経過しており，この間のエーテルの作用が肝臓に影響を及ぼし又，ストレッサーとして作用し白血球数へ影響を及ぼしているということも考えられるが，エーテル麻酔により採血する場合には十分留意する必要あることを認めた．また，採血部位の相違による血球成分の差については，頸静脈を対照とした場合，雄においては，足甲部のヘマトクリット値は有意に多く，断頭採血の白血球数，赤血球数，ヘマトクリット値が有意に低いことが認められ，雌においては，大腿部，足甲部のヘモグロビン量，ヘマトクリット値が有意に多く，断頭採血の白血球数，赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット値が有意に低いことが認められたが，全体的にみると，頸部→大腿部→足甲部のように中心部から末梢へ行くに従って血球成分値が増加することが認められた．このことは，毒性研究の結果の判定において，採血部位を留意する必要があるということを示唆するものである．また，断頭採血したものが全体的に頸静脈血よりも低下していたのは，採血順位が常に最後であったということによる影響も考えられるが断頭部位の血液が動静脈血の混合であることと組織液の混入も考えられこの点は今後の検討に待ちたい．

結　論

JCL-SD 系ラット（生後８週令；体重雄 248g，雌177 g）をもちいて，断頭採血時の処理ならびに採血部位の相違による血液成分の差異について検討したところ，次の結論を得た．

1. 断頭採血時の処理については，無処理を対照とした場合に，エーテル麻酔時に変化が生ずることが認められた．

2. 採血部位による差については，頸静脈を対照とした場合，末梢部へ行くにつれて血球成分は増加し，また断頭血液は頸静脈血よりも低いという結果を得た．

文　献

1) 中川好男，福田向江，柴　英子，平賀興吾：東京衛研年報，25，599，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 211-214, 1975

固定後の器官重量の変動について

矢野範男* 湯澤勝広* 藤井 孝*
平賀興吾*

Variation of Organ Weight after Fixation

NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, TAKASHI FUJII*
and KOGO HIRAGA*

緒 言

毒性試験で病理組織学的検索を行なう場合，先ず，良き光学顕微鏡用組織標本の作製を指向するのは当然であり，そのための努力は各方面から種々の技法を用いて行なわれている.[1,2] 私共も現在その作製過程中，最も基礎となる固定について検討しているが，今回は毒性試験での病理標本作製中に，ラットの器官を数種，10%ホルマリン液で固定後，偶々，その重量を測定したところ，固定前の重量と異なり，器官によって増減がみられることが分った．このことから今回は，ラットの各器官を用いて，それらの重量が固定の過程でどのように変動するか，またその変動は器官によって特異性があるかなどを検討したので報告する．

実験材料及び実験方法

実験動物は32週令の Wistar-JCL ラット（平均体重雌337 g 雄632 g）雌雄各10匹を用い，断頭放血後，解剖し脳，心臓，肝臓，脾臓，腎臓，精巣を摘出し，肝臓は左葉，腎臓は右側，精巣は両側，脳，心臓，脾臓は全体の重量を測定した．固定は肝臓が左葉の短軸方向に5ケ所，腎臓は最大割面がでるように1ケ所それぞれ割を入れた後，10%緩衝ホルマリン液を用いて行なった．固定液の量は上記の全器官の合計体積の10倍容量用い，振とう機に24時間かけ，途中で固定液の交換は行なわず，その後静置して固定した．固定中の器官重量の測定は，器官に付着した固定液はろ紙，ガーゼを用いて拭き去った後，Mettler PE162型電子天秤を用い，固定後1～7時間まで1時間毎に，その後9，12，15，18，21，24時間，2～7日まで毎日計19回，測定を行なった．

実験結果

各器官の固定前の平均重量は肝臓；雄6.37 g，雌3.62 g，脳；雄2.20 g，雌1.91 g，腎臓；雄3.36 g，雌1.84 g，精巣；3.61 g，脾臓；雄0.82 g，雌0.49 g，心臓；雄1.51 g，雌0.86 gであった．これらの各器官の重量を100として，固定途中での重量を百分率で表わし，その変動を示したのが Fig. 1，2である．これによると肝臓は固定前重量より増加し雄では固定後6時間目で105.9%，雌では3時間目で，104.1%まで増加した．雄ではその後3日目，104.5%まで漸減し，以後7日目まで僅かではあるが漸増傾向を示した．雌ではその後18時間目，102.5%まで漸減し，以後7日目まで雄より著明な漸増傾向を示した．脳は固定前重量より増加し雄では固定後1時間目は，99.5%と減少したが6時間目で104.7%，雌では6時間目で106.2%と急増した．雄ではその後18時間目105.5%まで漸増し，以後7日目まで小さな変動をみせながら漸減した．雌ではその後12時間目106.7%まで増加し，以後7日目まで小さな変動をみせながら雄よりは軽度に漸減した．腎臓は雄では固定前重量より減少し雌では増加した．雄では固定後1時間目で96.0%まで減少した後，12時間目で97.8%まで増加し以後7日目まで顕著な変動を示さずに横這いの状態が続いた．雌では固定後24時間目，102.1%まで漸増し，以後5日目を除いて7日目まで著明な変動を示さずに横這いの状態が続いた．精巣は固定前重量より減少し固定後1時間目で98.2%まで減少した後21時間目まで変動なく横這いの状態が続き，24時間目以後7日目まで非常に僅かながら漸減傾向を示した．脾臓は固定前重量より減少し雄では固定後6時間目で93.5%，雌では4時間目で94.3%まで減少した．雄ではその後21時間目，94.2%まで漸増し，24時間目に93.3%と減少したが以後7日目まで再び漸増傾向を示した．雌ではその後18時間目まで稍々横這いの

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

状態が続き，この時点から5日目97.6%まで増加した後，6，7日目は，96.4%と減少し雄より軽度な漸増傾向を示した．心臓は固定前重量より減少し雄では固定後6時間目で96.7%，雌では4時間目で95.6%まで減少した．雄ではその後21時間目97.7%まで漸増し，24時間目で95.4%と減少した後，緩やかな波形を描いて7日目まで横這いの状態が続いた．雌ではその後6時間目，96.6%と増加し，9時間目95.1%まで減少した後，24時間目96.4%まで漸増，以後7日目まで増減を繰り返しながらも横這いの状態が続いた．以上のように固定後の各器官の重量は増加するものと減少するものとがみられ，増減の幅にも器官による大小がみられた．固定後，重量が増加したものは雌雄の肝臓，脳，雌の腎臓で，減少したのは雌雄の心臓，脾臓，雄の腎臓それに精巣であった。増減の幅が大であったのは脾臓；雄6.7%，雌6.0%，脳；雄6.1%，雌6.7%，肝臓；雄5.9%，雌4.5%，心臓；雄5.0%，雌5.1%の各器官であり，腎臓は雄で4.1%と大きいが，雌では2.1%と小さく，精巣も2.7%であった．また固定後の重量は器官によってバラツキの大小がみられ，腎臓ではバラツキが大きく精巣は雄の腎臓と絶対重量が近似しているにも拘らずバラツキは小さかった．

考　察

以上の実験結果から固定後の器官重量の変動を24時間目までの1または3時間毎の変動と，7日目までの1日毎の変動とに分けてみると，時間毎の変動では各器官とも固定後，4～6時間で重量は増加，減少の著明な動きをみせ以後は緩やかな曲線を描くか，稍々増減の大小変動をみせながら24時間に至った．1日毎の変動は固定後1日目から，増減を繰り返しつつも軽微ながらも漸増，漸減の傾向をもって7日目に至った．また時間毎の変動で重量の増減に拘らず，各器官で雄よりも雌が先に著明な動きを了える傾向がみられたことは，固定前の重量の絶対値の大小によるものと思われる．次に器官によって固定後の重量が固定前よりも増加したり，減少したりする原因を，解剖組織学的に各器官の形態的な差異から考えてみると，増加した肝臓は肝細胞を主体に結合織は少なく，軟らかく脆い，同じく脳も神経細胞を主体に神経膠，神経線維より成り結合織は少なく，軟らかく脆いという特徴をもっており，一方，減少した脾臓は平滑筋，弾性線維より成る脾柱で網状構造を呈し，その網眼の中に脾細胞が充塡されており弾力性に富む，同じく心臓は少量の結合織をもつがその殆んどが心筋であり弾力性に富んだ器官である．また，精巣も被膜を含めて結合織は少なくなく弾力性に富んでいる．これらのことから固定によって重量が増加するのは結合織が少なく，軟らかく，脆い器官であり，減少するのはその反対の特徴をもった器官であると考えられる．腎臓は結合織は少ないが多数の尿細管，集合管より成る複合管状腺であり，尿細管系と集合管系とは発生を異にするという特徴をもっているが，この特徴と，雌雄で固定後の重量が増加と減少に分かれた原因は判然とせず，雌雄ともバラツキが大きかったことと併せて今後，検討してみたい．今回の実験で各器官で固定後の重量変化に差異があり，また4～6時間で著明な変動が終了することが分った．今後，これらの変化が今回とり上げなかった他の器官でもみられるのか，また，各器官での形態的特徴の差異の他，水分含量を測定し器官中の水分との関連性，これに付随してラットの週令による差異なども検討していきたい．

要　旨

ラットの脳，肝臓，心臓，腎臓，脾臓，精巣を10%緩衝ホルマリン液で固定後，その重量変化を1時間より7日間にわたって観察し，器官別，雌雄別の相違について検討を加えた．

文　献

1) 畠山　茂，萩島寿子，高田多津男：臨床検査，13，776，1969
2) 荒井　茂，三浦秀人，高橋とし子：臨床病理，19，367，1971

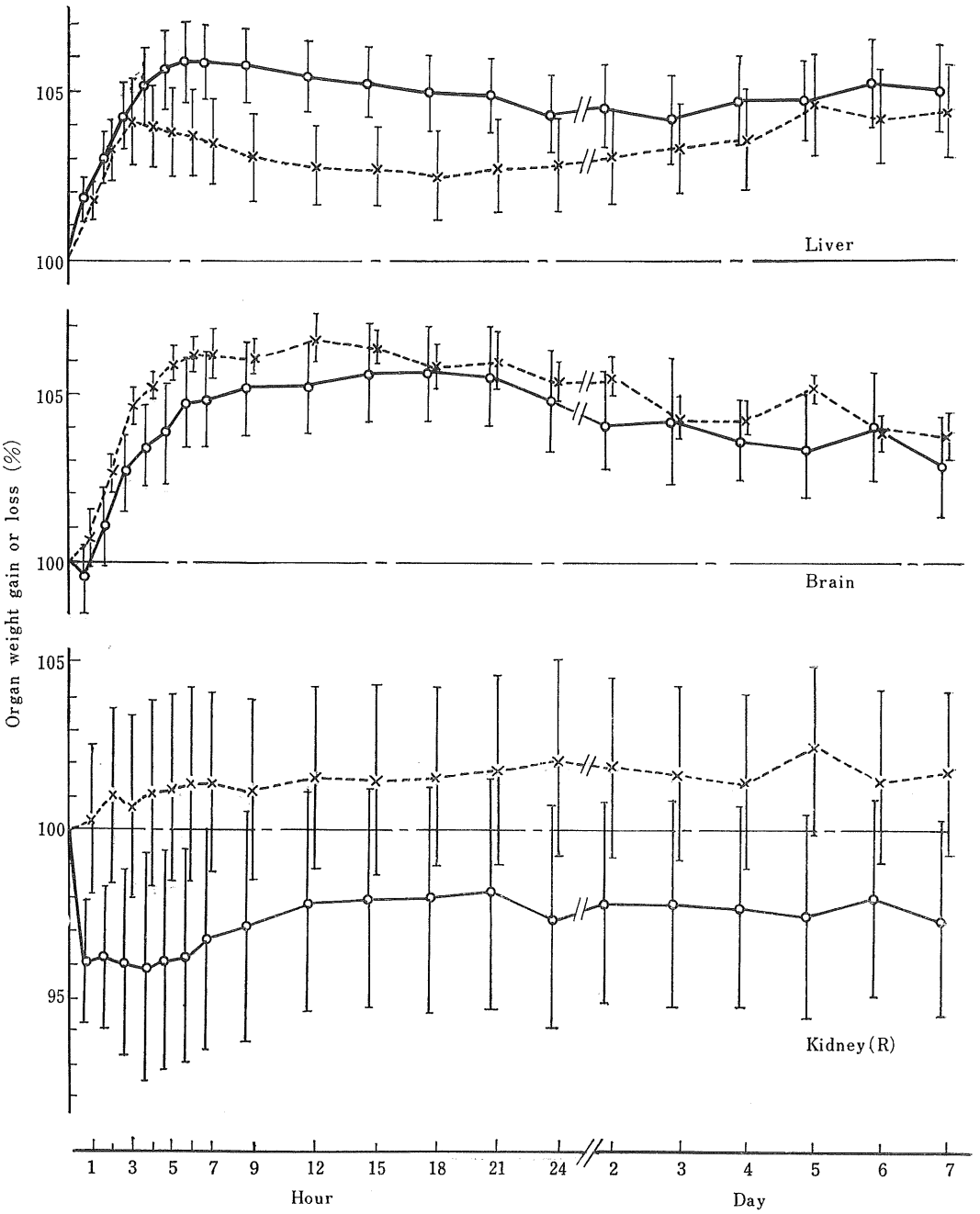


Fig. 1. Changes of organ weight gain or loss after fixation.
—○— : male, ···×··· : female, vertical bars show S. D.
— — — — — : line of 100%.

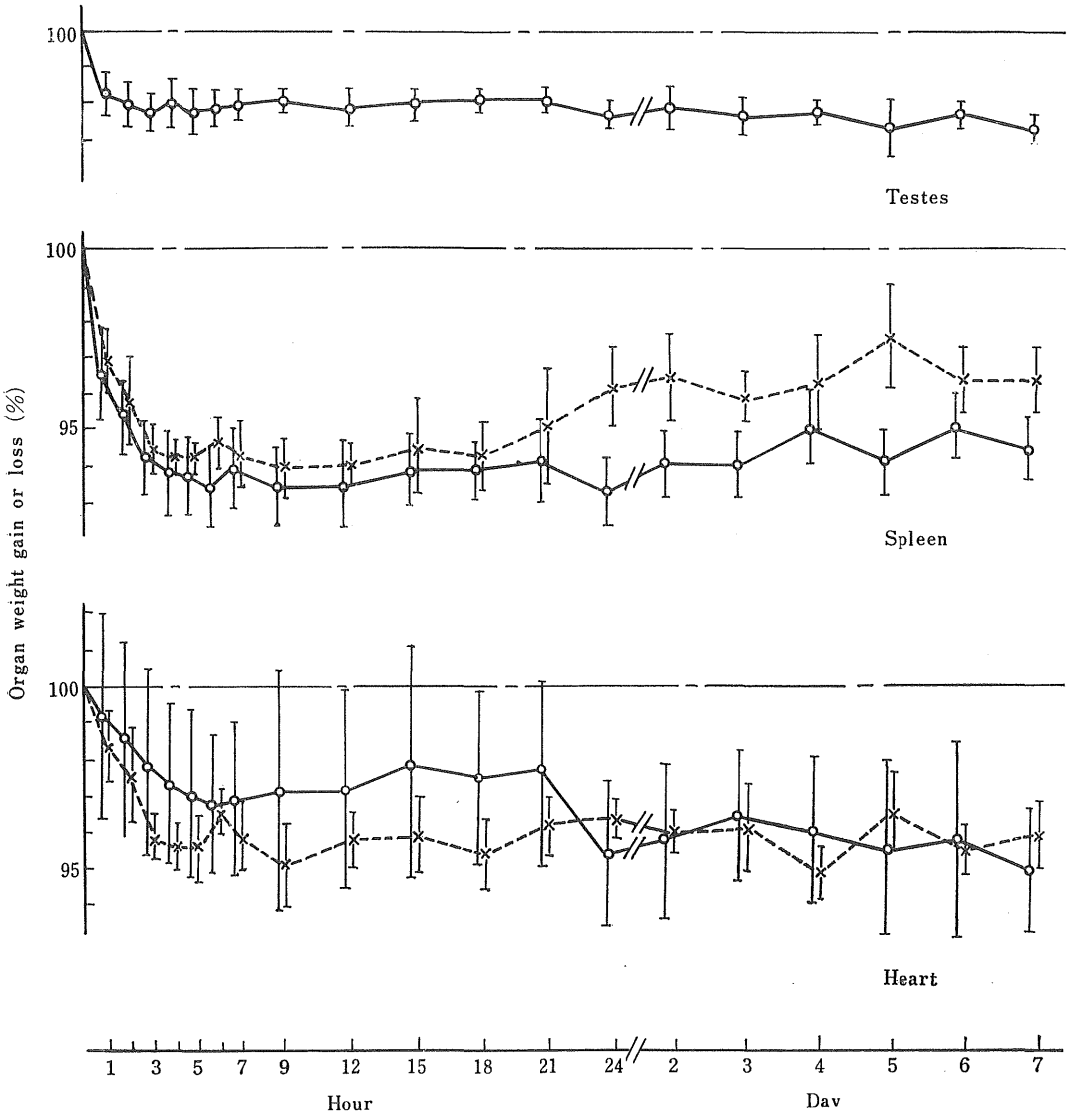


Fig. 2. Changes of organ weight or loss after fixation.
—o— : male, ···×··· : female, vertical bars show S. D.
— — — — — : line of 100%.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 215-221, 1975

電子顕微鏡用試料作製におけるブロック染色法の検討

三栗谷 久敏* 福 森 信 隆* 平 賀 興 吾*

Evaluation of Block Staining Method for Electron Microscopic Observation

HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUTAKA FUKUMORI*
and KOGO HIRAGA*

緒　　言

超薄切片法による電子顕微鏡的観察において，薄切後に通常行われているウラニル・鉛二重染色は，染色上の汚染を引き起こし易く，観察及び写真撮影上好ましくない影響を与えている．また，毒性試験への電子顕微鏡的観察の導入は，多くの試料を処理することから，試料作製時の操作を簡略化する必要がある．そこで，以上の点の解決策として，著者らは包埋までの試料作製過程で多数の試料を染色でき，かつ染色による汚染の少ないと言われているブロック染色法に注目した．

ブロック染色法は，燐タングステン酸法,[1] 酢酸ウラニル法,[2]鉛塩による方法[3] 等が報告されているが，今回 Kushida ら[4] の方法に準じて硝酸ウラニル・酢酸鉛同時二重染色を試み，染色液比及び染色時間差について，光学顕微鏡用切片の染色性，電子顕微鏡写真での解像力，コントラストの良否等を比較した．また同時に通常の二重染色法と比較することにより，ブロック染色法の毒性試験への有用性について検討した．

実験材料及び実験方法

染色液

Kushida ら[4] の方法に準じて，0.5％硝酸ウラニル（和光純薬）アルコール・アセトン等量混合液と飽和酢酸鉛（和光純薬）アルコール・アセトン等量混合液の混合比が，それぞれ，3：7（A液とする），1：1（B液とする）の染色液を調製した．

方法

成熟ラットを断頭，放血屠殺後肝臓及び腎臓を速やかに摘出，約1 mm^3 の細片にし，2％グルタールアルデヒド及び1％オスミウム酸で二重固定した．定法に従いエタノール脱水を行ない，A及びBの染色液で各1.5時間，2時間，2.5時間室温（20°）で染色した．染色終了後アルコール・アセトン等量混合液で15分間ずつ2回洗滌し，QY－1を通してエポン包埋した．ブロック染色を施した包埋ブロックは，Porter-Blum MT-2B型ウルトラミクロトームで超薄切片を作製後，HU-12A型電子顕微鏡にて観察した．また，酢酸ウラニル及びクエン酸鉛による通常の二重染色を施した試料について，ブロック染色と比較観察した．同時に包埋ブロックから厚さ約1μの切片を作製し，Cardno と Steiner のPAS－トルイジン青[5] にて染色，光学顕微鏡的に観察した．これらの観察は，肝及び腎の両臓器から比較検討を加えた．

実験結果

光学顕微鏡的所見

1. 染色液比3：7（A液）

(1) 1.5時間染色

ブロック染色を施さなかったもの（Fig. 1. a, Fig. 2. a）と比較して，細胞，核に若干の膨化が見られ，細胞質及び核質はやや淡明化しており，好塩基性顆粒の染色性の低下が認められた．また，肝でのPAS陽性物質の染色性の低下も見られた．

(2) 2時間染色

細胞，核に軽度の膨化が見られたが，組織像は比較的鮮明であった．細胞質は良染し，細胞質の好塩基性顆粒，核質及び肝臓でのPAS陽性物質の染色性も1.5時間染色に対して比較的良好だった（Fig. 2. c）．

(3) 2.5時間染色

肝臓，腎臓とも2時間染色の場合と比較すると，細胞，核の膨化，淡明化は増していたが，染色性は類似していた．また，腎臓では若干組織像の鮮明さに欠けているのが認められた．

* 東京都立衛生研究所毒性部　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

2. 染色液比1：1（B液）

(1) 1.5時間染色

ブロック染色を施さなかったもの（Fig. 1. a, Fig. 2. a）と比較して，細胞，核に軽度の膨化が見られ，全体的にやや鮮明さを欠くが，細胞質の好塩基性顆粒，核質及び肝臓でのＰＡＳ陽性物質の染色性も比較的良好であった（Fig. 1. b).

(2) 2時間染色

肝臓では細胞，核に膨化が見られ，細胞質及び核質が淡明化を増し，全体的に染色性が低下していた．特に核では，核質の染色性の低下が顕著であり，核小体の輪郭も不明瞭であった．また，ＰＡＳ陽性物質の染色性の低下も認められた（Fig. 2. b).

腎臓は1.5時間染色の場合と比較して，細胞，核の膨化，淡明化はやや程度を増しており，全体的に鮮明さを欠いていた．また，染色性はやや低下する傾向があった．

(3) 2.5時間染色

肝臓では細胞，核の膨化，淡明化が，2時間染色の場合ほど顕著ではないが，1.5時間染色の場合より若干程度を増していた．また，核質及び細胞質の好塩基性顆粒の染色性はやや低下していた．

腎臓は2時間染色の場合より核の膨化，淡明化が増しており，組織像は不鮮明であった．しかし，細胞はむしろ萎縮したような感を与え，染色性は不均一であるが若干増加していた（Fig. 1.c).

以上より，染色液比及び染色時間による差異は，肝臓，腎臓とも組織変化，染色性の度合から見て顕著ではなかった．しかしながら，B液2時間染色の肝臓及びB液2.5時間染色の腎臓にやや変化を認めたが，組織変化は染色時間が短かくなるほど比較的少なかった．

電子顕微鏡的所見

1. 染色液比3：7（A液）

(1) 1.5時間染色

細胞はやや膨化した感があり，細胞質基質及び核質は淡明化していた．また，通常の二重染色を施したもの（Fig. 3）に比較して，コントラストは顕著に低下し鮮明さに欠けていたが，糸粒体，グリコーゲン顆粒及び小胞体などの小器官，核の染色質は若干不明瞭ながら染まっていた（Fig. 6).

(2) 2時間染色

1.5時間染色と同様，細胞はやや膨化し，細胞質基質及び核質は淡明化していたが，コントラストは1.5時間染色のそれより良好で，グリコーゲン顆粒や細胞小器官は比較的明瞭であり，良好に染まっていた（Fig. 4).

(3) 2.5時間染色

1.5時間染色及び2時間染色の場合より，細胞質基質，核質の淡明化がやや増加した印象を受け，また糸粒体や小胞体などの小器官は若干濃染傾向を呈した．コントラストは他の染色時間のいずれよりも強く，一見鮮明である感を与えるが，特に糸粒体では基質がほぼ均一に濃染しており，クリステなどの構造が不明瞭であった．

2. 染色液1：1（B液）

(1) 1.5時間染色

細胞の軽度な膨化に伴い，細胞質基質及び核質は淡明化していた．また，コントラストは通常の二重染色を施したもの（Fig. 3）と比較して低く，グリコーゲン顆粒，糸粒体及び小胞体などの小器官の染まりも鮮明さを欠き，構造もやや不明瞭であった．しかし，核の染色質とリボゾームの染まりは良好で，他に比して目立つ像も見られた（Fig. 5).

(2) 2時間染色

細胞，核の膨化，淡明化の程度がやや増強していた．グリコーゲン顆粒や他の細胞小器官はコントラストを増し比較的鮮明であったが，糸粒体では基質が濃染気味で，クリステなどの構造は不明瞭であった．核の染色質は周辺部に凝集しており，1.5時間染色と同様，良好に染まっていた．

(3) 2.5時間染色

糸粒体や小胞体などの小器官の濃染傾向は2時間染色より若干強く見られ，コントラストも比較的強かったが，他はほぼ同様の所見が見られた．

以上の所見より，染色液比及び染色時間による差異は，核，リボゾームに関してA液よりB液が比較的良染しているが，他は明らかでなく，染色時間に連れて濃染傾向が認められた．

細胞構造は，通常の二重染色を施したものに比して，全体的に細胞小器官の変化が顕著でなかったが，構造は不明瞭な感を与えた．

染色性，細胞構造の保持と言う観点から見ると，A液2時間染色が他に比してやや良好であった．

考　　察

電子染色のメカニズムは完全には分っていない．しかし，一般的には，ウランでリボゾーム，核質などが良染され，鉛ではグリコーゲン顆粒，糸粒体などが比較的染まり易いと言われている．それら電子染色の機構に関して，鉛では Dalton ら[6] がリン酸基，カルボキシル基，スルフォヒドリル基から解離するH^+イオンがPb^{++}イオンにより置換されるからとその理由を説明している．また，ウランでは Huxley と Zubay[7] によりウラニルイオンが核酸のリン酸塩基に結合するためだろうと言われ

ている．大倉ら[8,9]によれば，ウラニルは溶解後，小径のウラニルイオンとなり染色性を有するが，一方被吸着力が弱く，分別の時洗い出され易い．にも拘わらずリボゾームや核質が良染して残るのは，それらが核酸蛋白に富み，負電荷が高いため，ウラニルカチオンが強く極性吸着し，洗い出され難いためであろうと報告している．

今回，電子顕微鏡的観察で，染色液比によって染色性の程度に若干の差異が認められた．即ちB液染色では，核染色質やリボゾームの染色の度合が他の小器官より強く，またA液染色による核染色質，リボゾーム及び他の小器官に比しても濃染していた．この事はB液でウラニルイオン濃度が高いため反応が短時間に起き，染色の度合も増し，洗滌によっても溶出され難かったものと考えられる．

このような染色液比によって，B液が核質やリボゾームを良染すると言う傾向は，Kushida ら[4]の報告と一致している．

一方，鉛の染色性の程度は，染色液比による著明な差はないと思われる．

光学顕微鏡的観察で，全体的に見て染色液比による差異は明らかでなかった．しかしながら，B液2時間染色で染色性の低下が若干認められたことは，細胞の膨化に起因しているものと考えられる．

染色時間から見ると，その増加に伴い，A及びB液ともコントラストが増していた．同時に核質，細胞質の淡明化も増しており，視覚的な感受性がコントラストの判断を左右し易いことから考えて，この核質や細胞質の淡明化がコントラストの増強に関与していると思われる．

核質や細胞質の淡明化は，核や細胞の膨化を伴って光学顕微鏡的（以下光顕的と略す）にも認められている．これらの現象はブロック染色を施さなかったものにはあまり認められないことから，固定，脱水に直接影響されるのではなく，染色及び洗滌によるものと思われる．

通常，アルコールやアセトンは組織に対して強い収縮・硬化作用があると言われているが，これらを混合液とした場合，単独使用とは異なった物理化学的性状を持つようになるとも考えられる．それ故，アルコール脱水後の長時間に及ぶ浸漬染色や洗滌は，細胞の膨化，細胞内成分の溶出などを引き起こすこともあながち否定できないのではないかと思われる．

また，細胞の膨化，淡明化は光顕用切片の染色性の低下に影響を与えているのではないかと考えられる．

以上の点から，染色性の良否，細胞構造の維持を総合的に判断すると，光顕用切片の染色性に関しては，ブロック染色処置によって全体的に染色性の低下が見られた．これらは染色液比による顕著な差が認められないが，染色時間は短い程比較的良好であると思われる．また，電子顕微鏡的（以下電顕的と略す）には各染色液比，染色時間とも汚染の少ない像が得られたが，コントラスト，細胞小器官の構造の明瞭性などから，染色液比3：7，染色時間2時間で比較的良好な結果が得られると思われる．即ち，染色液比は主に電顕的染色の良否に関係し，染色時間は細胞の構造に影響を及ぼしていると考えられる．しかし，いずれも通常の包埋，染色を施したものと比較すると，ブロック染色法は，染色液の汚染が少なく検鏡に極めて良好であるが，コントラスト，シャープさに若干欠けており，形態の保持状態が良好でないように感じられる．試料作製条件に影響を受け易い動物組織を用いる毒性試験でブロック染色法を活用するためには，さらに詳細な検討を加える必要があると思われる．

結　論

Kushida [4] らの方法に準じてブロック染色を試み，ブロック染色液比，染色時間差について，光顕的，電顕的に染色性の良否及び形態変化等を比較観察した．また同時にブロック染色を施さない通常の二重染色法と比較することにより，ブロック染色法の今後の有用性について検討した．

① 光顕的及び電顕的とも，程度の差はあるが細胞や核の膨化，淡明化が，染色液比及び染色時間によらず認められた．

② 光顕用切片の染色性は全体的に低下しており，染色時間が短い程比較的良好であったが，染色液比による差異は著明でなかった．

③ 電顕的には，染色性は染色液比3：7，染色時間2時間が他に比して比較的良好であったが，通常の二重染色を施したものと比較するとコントラストや明瞭性の点で劣っていた．

以上より，ブロック染色法の活用には若干の問題が含まれていると思われた．

文　献

1) Kushida, H. and Fujita, K.: *J. Electron Microscopy*, 16, 281, 1967

2) 水平敏知：電子顕微鏡，126，1971，医歯薬出版

3) Kushida, H.: *J. Electron Microscopy*, 15, 90, 1966

4) Kushida, H. and Fujita, K.: *J. Electron Microscopy*, 16, 323, 1967

5) Cardno, S. S. and Steiner, J. W.: *Amer. J. Path.*, 43, 1, 1965

6) Dalton, A.J. and Zeigel, R.F.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7, 409, 1960

7) Huxley, H.E. and Zubay, G.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 273, 1961

8) 大倉卓治,高塩 稔：電子顕微鏡試料技術集,334, 1971, 誠文堂新光社

9) Ohkura, T. and Takashio, M.: *Arch. histol Jap.*, 27, 49, 1966

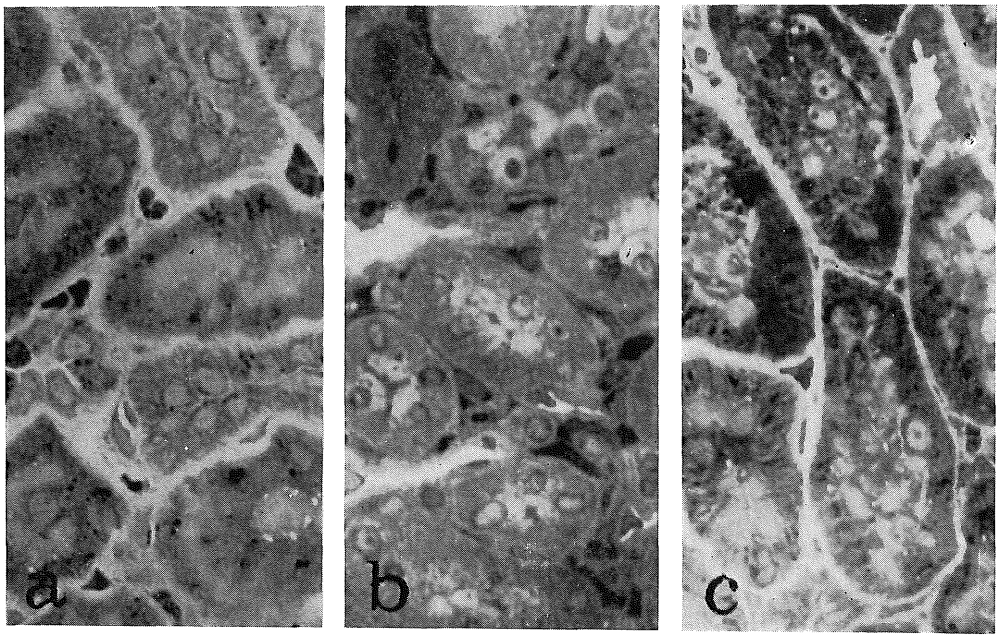


Fig.1 Rat kidney stained with PAS-toluidine blue after block staining at a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 1:1 (Original X 400). a:Non treatment. b:Staining for 1.5 hours. c:Staining for 2.5 hours.

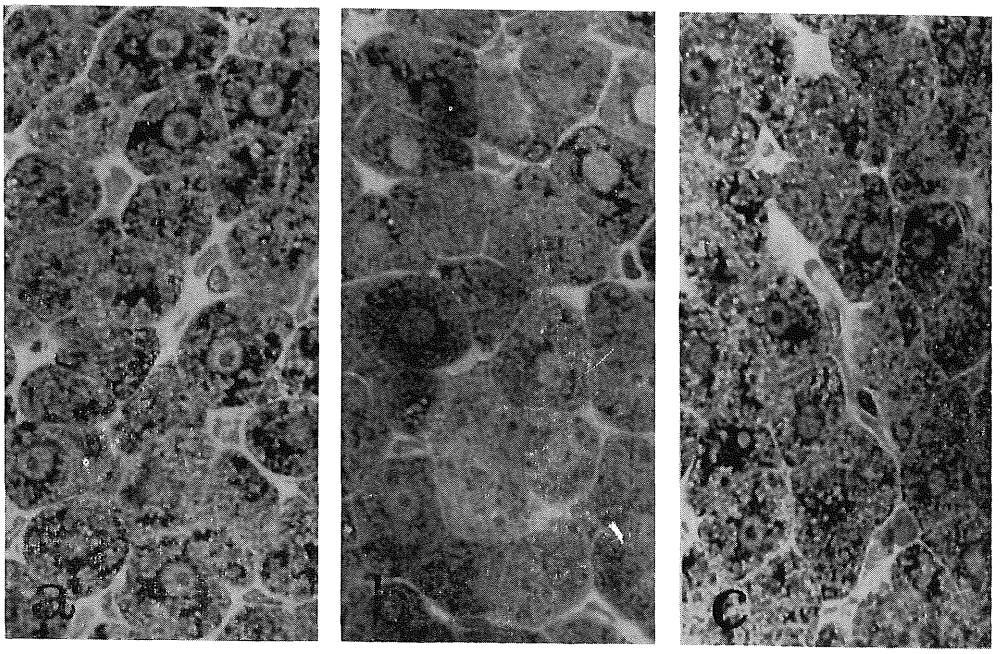


Fig.2 Rat liver stained with PAS-toluidine blue after block staining for 2.0 hours (Original X 400). a:Non treatment. b:At a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 1:1. c:At a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 3:7.

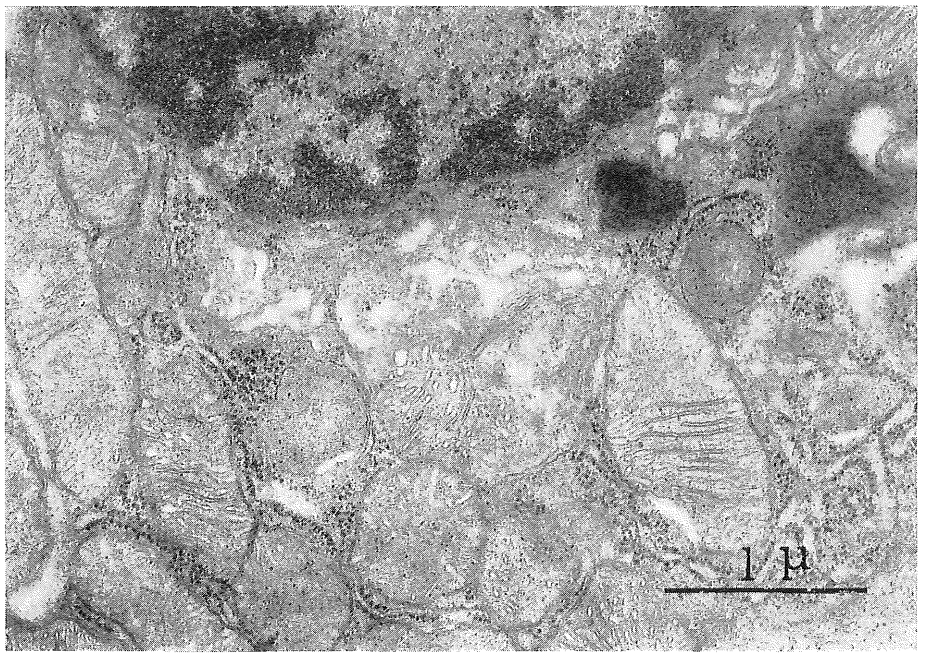


Fig.3 Rat kidney treated by usual double staining with uranyl acetate and lead citrate.

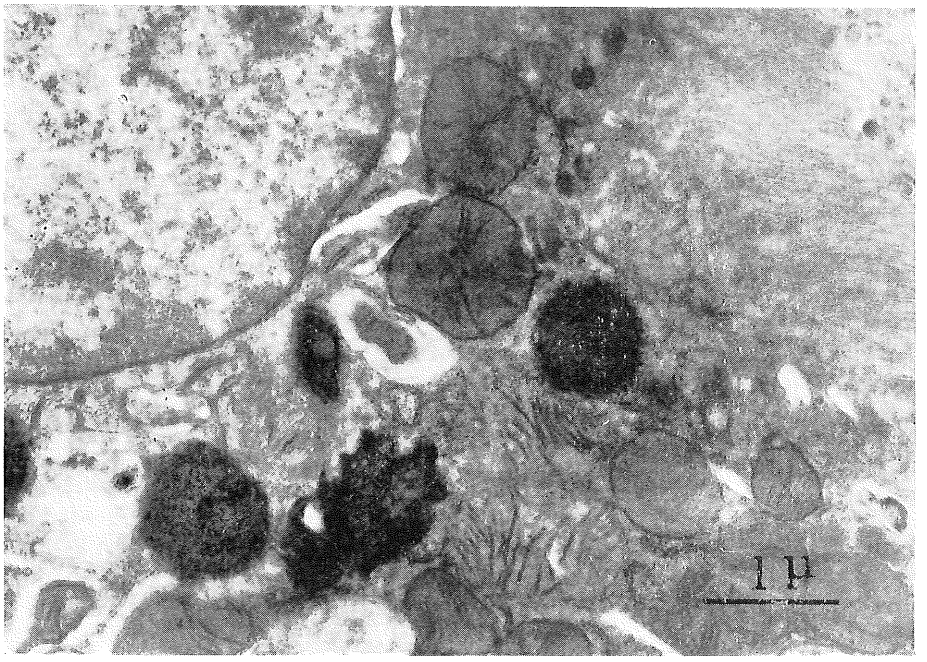


Fig.4 Rat kidney treated by block staining at a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 3:7 for 2.0 hours.

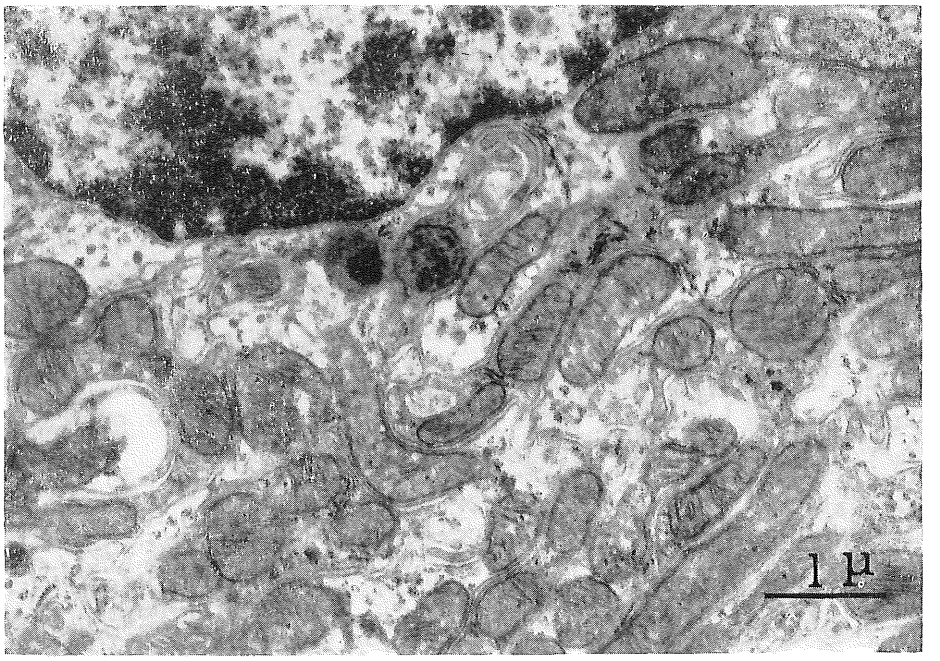


Fig.5 Rat kidney treated by block staining at a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 1:1 for 1.5 hours.

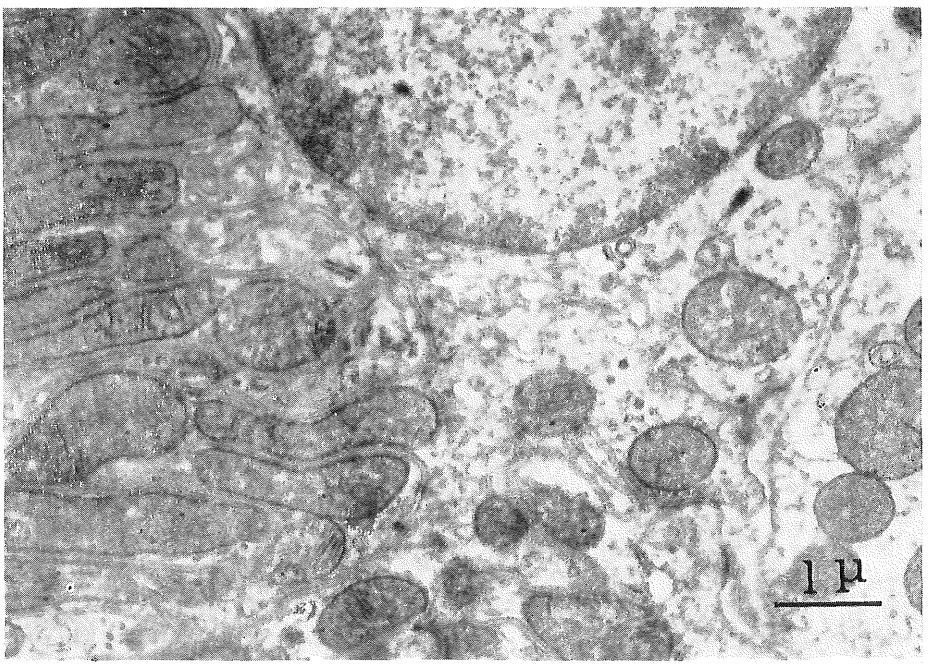


Fig.6 Rat kidney treated by block staining at a uranyl nitrate-lead acetate ratio of 3:7 for 1.5 hours.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-2, 223-226, 1975

ヘマトキシリン・エオジン重染色標本の褪色について

阿部幸恵* 平賀興吾*

Fading of Preparations stained by Hematoxylin and Eosin

YUKIE ABE* and KOGO HIRAGA*

緒　言

病理組織学的検索に際し，作製後年数を経過した標本の再見を迫られる事があるが，検鏡にあたり標本の褪色は重要な問題となる．褪色した標本は顕微鏡観察を困難にするばかりでなく組織変化を見誤らせる可能性もあり，検索結果に与える褪色の影響は非常に大きいと思われる．標本の褪色に関係する要因としては，1. 固定後包埋までの諸操作,[1] 2. 染色操作（脱水,透徹等），3. 染色液の種類，4. スライドグラス，カバーグラス，5. 封入剤，6. 保存条件等様々な事項が考えられる．今回はヘマトキシリン・エオジン重染色標本（以下H＆E標本と略す）を取り上げ，二種のエオジン染色液，二種の封入剤を用い，異なった保存法（明暗）を設定し，それぞれの条件下における標本の染色度の経時的変化をデンシトメータにより定量的に測定するとともに，標本の顕微鏡観察を行い，双方の結果より染色液，封入剤，保存法と褪色との関係を検討した．

実験方法

1) 標本作製法

ＳＤ系雄ラット３匹の肝臓，腎臓，心臓を摘出し，リリーの緩衝ホルマリン（pH＝7.2）で固定後，定法に従い,[2] パラフィン包埋，薄切し，卵白グリセリンを薄く塗布したスライドグラスに貼付した．脱パラフィン，脱キシロール，ヘマトキシリン染色（マイヤー),[3] 色出し水洗を全切片について同条件で操作し，エオジン染色段階で２群に分け一方をエオジンアルコール溶液,[3] 他方をエオジン—エリスロシン等量混合水溶液[1] にて染色した．封入段階でさらに２群に分け，合成樹脂を基材とする２種類の合成封入剤，ビオライト（Bioleit；高研製），オイキット（Eukitt；O. Kindler 製）を用いてそれぞれ封入し下記の方法にて保存した．以下ヘマトキシリン・エオジンアルコール溶液染色標本を H･Eo. 標本，ヘマトキシリン・エオジン—エリスロシン水溶液染色標本をH・Eo.-Ery. 標本と略す．実験に使用した色素，グラスは次のものである．

(1) 色素

ヘマトキシリン；メルク製（C. I. No. 75,290, Lot. No. 1,376）

エオジンＹ；メルク製(C. I. No. 45,380, Lot. No. 881)

エリスロシンＢ；和光純薬製（Lot. No. IG 6,620）

(2) グラス

スライドグラス；松浪 No. 2（0.9—1.2mm), R3,703

カバーグラス；松浪 No. 1（0.13—0.17mm), R37,021

2) 標本保存方法

明暗２ヶ所における保存方法を次の如く設定した．

(1)明所保存；北東に面する窓から水平に２m，室内光源(螢光燈白色40W×８本，照明は１日平均８—９時間）から垂直に 1.6m の距離にあり，照度1,300—2,000 ルクスの実験台上にマッペに並べた標本を設置した．なお

Hematoxylin Solution	Eosin solution	Mounting medium	Storage
Mayer	Alcoholic-eosin	Bioleit	Light
			Darkness
		Eukitt	Light
			Darkness
	Eosin-erythrosin	Bioleit	Light
			Darkness
		Eukitt	Light
			Darkness

* 東京都立衛生研究所毒性部　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

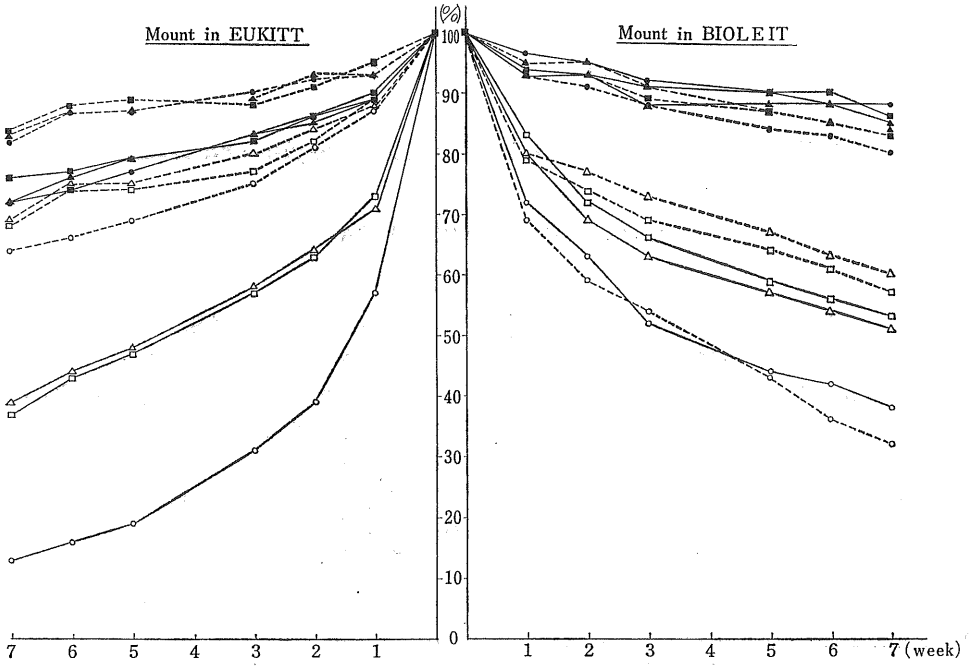


Fig. 1. Optical densities of tissues stained with hematoxylin and eosin, expressed as a percentage of the original. □■ ; Liver, △▲ ; Kidney, ○● ; Heart, ■▲● ; stored in darkness, □△○ ; exposed to light, —— ; H•Eo. preparation, ---- ; H•Eo.-Ery. preparation

これは検鏡の際標本を置く場所である.

(2)暗所保存；上記の実験台の引出内に，携帯用マッペと紙製封筒を用い二重に遮光した標本を収容した．実験期間は昭和49年12月5日～昭和50年1月23日，室内温度は21°±1°である．以上標本作製法における染色液，封入剤，保存法は前表に示した如くである.

3) 染色度の測定

H&E標本の染色度をデンシトメータ（ジョイスレーブル社製クロモスキャン，回路：反射型，波長：490nm，スリット；10mm×1mm）により測定した.[4] 第1回測定を封入剤の固化した染色1日後に行い，以後1週間毎に7週間にわたり測定し，各測定値を第1回測定値を100とした比率（%）で表わし標本の染色度とした．この際染色度の低下を褪色とした.

4) 顕微鏡による検索

7週間の染色度測定を終了した標本を顕微鏡観察し，各組織の染まり具合を検索した.

実験結果

1) デンシトメータによる測定結果

結果は Fig. 1 に示した通りであり，肝臓，腎臓，心臓は，染色液，封入剤，保存法の各条件下において同様の傾向を示していた．各条件下での比較を容易にするため，肝臓についてグラフを Fig. 2 に別記し詳述する.

明所保存標本では暗所保存標本と比較し，染色度の低下が顕著に認められた.

明所保存において，Bioleit 封入，H-Eo. 標本（Fig. 2—⑦）は5週間後測定で59%，7週間後測定で53%の染色度を示した．また Bioleit 封入，H•Eo.-Ery. 標本（Fig. 2—⑥）は5週間後測定で64%，7週間後測定で57%の染色度を示し，両標本では同程度の褪色が認められた．同じく明所保存において，Eukitt 封入，H•Eo. 標本（Fig. 2—⑧）は5週間後測定で47%，7週間後測定で37%の染色度を示した．また Eukitt 封入，H•Eo.—Ery. 標本（Fig. 2—⑤）は5週間後測定で74%，7週間後測定で68%の染色度を示し，染色液の種類により褪色程度に顕著な差が認められた.

暗所保存において，Bioleit 封入，H•Eo. 標本（Fig. 2—①）は5週間後測定で90%，7週間後測定で87%の染色度を示した．また Bioleit 封入，H•Eo.-Ery. 標本（Fig. 2—③）は5週間後測定で87%，7週間後測定

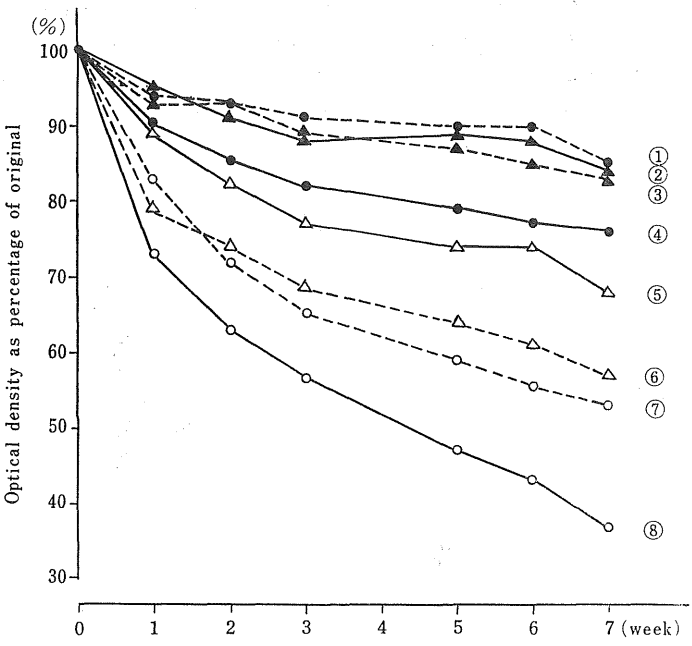


Fig. 2. Optical densities of tissues stained with hematoxylin and eosin, expressed as a percentage of the original.
●▲ ; stored in darkness, ○△ ; exposed to light,
○● ; H·Eo. preparation, △▲ ; H·Eo.-Ery. preparation,
---- ; mount in BIOLEIT, —— ; mount in EUKITT,

で83%の染色度を示し，両標本においては同程度の褪色が認められた．同じく暗所保存において，Eukitt 封入，H·Eo. 標本（Fig. 2—④）は5週間後測定で79%，7週間後測定で76%の染色度を示した．また Eukitt 封入，H·Eo.-Ery. 標本（Fig. 2—②）は5週間後測定で89%，7週間後測定で84%の染色度を示し，明所保存におけるほど顕著ではないが，染色液の種類により褪色に差が認められた．

各標本における褪色の推移をみると，染色後1週間のグラフの傾きが大きくその後小さくなる傾向を示し，最終測定で褪色が顕著にみられた標本においては特にこの傾向が強く認められた．

腎臓および心臓においても肝臓について詳述したと同様の結果が得られたが，褪色程度は臓器種により異なり，心臓の褪色は，肝臓，腎臓の褪色と比較し顕著に認められた．

2) 顕微鏡による観察結果

明所保存において，Bioleit 封入，H·Eo. 標本，Bioleit 封入，H·Eo.-Ery. 標本ではエオジンの褪色が認められ標本観察が困難であった．Eukitt 封入，H·Eo. 標本では，ヘマトキシリン，エオジンの褪色が顕著であり標本観察が不可能であった．Eukitt 封入，H·Eo.-Ery. 標本では褪色が軽度であり良好な結果が得られた．暗所保存標本ではいずれもヘマトキシリン，エオジンの褪色が感ぜられず，明所保存，Eukitt 封入，H·Eo.-Ery. 標本におけるよりもさらに良好な結果が得られた．

以上のようにデンシトメータによる測定結果と顕微鏡による検索結果とはほぼ一致しており，測定で70%以上の染色度を示した標本では顕微鏡観察でも良好な結果が得られた．また測定で45%以下の染色度を示した標本では，ヘマトキシリン，エオジンの褪色が顕著に認められ標本観察が不可能であった．

考　　察

Bioleit 封入標本ではエオジン染色液の種類に関係なく，同様の褪色経過を示したのに対し，Eukitt 封入標本ではエオジン染色液の種類により褪色に差が認められた．また H·Eo. 染色では，Eukitt 封入標本で Bioleit 封入標本より顕著な褪色が認められ，H·Eo.-Ery. 染色では，Bioleit 封入標本で Eukitt 封入標本より顕著な褪色が認められた．従来唯一の封入剤とされていたバル

サムは空気酸化によるpH低下のため，塩基性色素の褪色を招くとの報告がある.[5] この欠点が改良された合成封入剤はpHが7.0に保持され，褪色に関する問題は全くないとされている．しかしながら今回の実験においては，両封入剤にてそれぞれ封入した標本で上述した差が認められ，封入剤の化学的性質に相違がある事を示唆していると思われ，染色に関する問題は全くないとされている合成封入剤がH＆E標本の褪色に影響を与えている直接作用を否定する事はできないと考えられる．

明暗2ヶ所における保存方法を設定して検討した結果，明所保存標本では暗所保存標本と比較し褪色が顕著に認められ，その褪色程度は予想外の結果であった．今日顕微鏡標本作製に用いられる器材の品質向上は目覚しいものであり，封入剤においては無色透明な合成封入剤が開発され，屈折率はガラスとほぼ同値となり標本の観察，写真撮影を容易にしている．またスライドグラスは位相差顕微鏡，暗視野装置の普及に伴い非常に薄く，かつ均質なものとなった．器材の品質向上とは別に顕微鏡光源，照明器具が改善され，検鏡条件，室内照明は快適なものとなっている．しかし結果として組織切片自体の受光量は従来と比較にならない程増加したものと思われる．上述した結果で認められた褪色の原因の大半が光である事は明確であり，この事は従来から知られているところであるが,[6] 褪色が予想外に顕著であった点に関しては，器材の品質向上，室内照明の改善等による切片自体の受光量増加が影響していると思われる．

デンシトメータによる測定結果で心臓の褪色が顕著であったのは，今回の実験が主としてエオジンの褪色を測定するために波長 490nm を用いたものであり，このため組織の大部分が好酸性物質で占められている心臓で，褪色が顕現化したものと思われる．

以上のようにH＆E標本の褪色は，染色液，封入剤，光照射の作用，あるいはそれらの相互作用により影響されると考えられるが，その中でも光の照射による影響は非常に大きく，器材の品質改良が盛んに行われ顕微投影装置の使用が広く考えられる現在，それにより引き起こされる切片自体の受光量増加は標本褪色の原因として重要な問題になると思われる．

まとめ

H＆E標本の褪色と，染色液，封入剤，保存法(明暗)との関係を検討する目的でラットの肝臓，腎臓，心臓を用い，標本の染色度をデンシトメータにより測定し顕微鏡検索結果と併せて検討した．

(1) H＆E標本の褪色は光により強い影響を受ける．

(2) H＆E標本の褪色は染色液と封入剤の相互作用により影響される．

(3) H＆E標本の褪色は染色後1週間に急激に進行する．

文献

1) 佐野豊：組織学研究法，1970

2) 小林忠義，影山圭三：病理組織標本の作り方，3，1970

3) Lee G. Luna, H. T.: *Manual of Histologic Staining Methods of A.F.I.P.*, 3rd Ed., 35, 1968

4) 三浦秀人，荒井茂，船野文子：臨床病理，21，379，1973

5) 秋山太一郎，上野節子：臨床検査，10(11)，84，1966

6) W. T. Barr: *Stain Technol.*, 45(1), 9, 1970

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

オートラジオグラフィーによる染色体識別

益淵正典：遺伝，29(6)，13—18，1975

人類を含めた高等動植物の染色体に関する知識は，この20年ほどの間にめざましい発展をしている．遺伝現象と染色体変化の結びつきに関する研究が展開されたためであるが，その裏には染色体識別法の開発があった．

筆者は，「特集・染色体識別法の発展」の中で，高等動物におけるオートラジオグラフィーによる染色体識別の実際とその役割について解説した．

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

春　田　三佐夫　（委員長）
飯　田　　基
坂　井　千　三
西　川　洋　一
野　牛　　弘
平　賀　興　吾

昭和51年1月24日　発行

規格表　第 2 類
印刷番号(50)1606
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第26-2号

編　集
発　行：東京都立衛生研究所

所在地　〒160 東京都新宿区百人町3—24—1
電　話　363—3231(代)
印刷所　信陽堂印刷株式会社
東京都板橋区板橋2—3—20
電話　961—1641(代)