東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

27-2

1976

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

序

編集委員諸氏および関係者の格段の努力と奉仕によって，ここに研究年報第27号をまとめることができました．

本年報は主に昨年度中に終了した研究成果および第26号発刊後最近までの間に他の専門雑誌に掲載した論文等を収めたものであります．今回も第26号の場合と同様，毒性部で実施した研究論文は第27-2号にまとめてのせることにしました．

当所の研究年報をその創刊号から通覧してみますと，感慨無量なものを感じます．終戦後の挫折，混乱，貧困の時代から今日の繁栄時代までの社会現象の変化，特に経済の高度成長に伴って発生した環境汚染問題や研究者，研究施設および研究費の充足状態の移り変り等を反映して，研究課題名およびその量と質の変遷を見逃すことはできません．正に隔世の感があります．

研究の課題，その質と量の変化とともに，それに対する評価もいろいろあろうと思いますが，どの時代にも，所員は則応して，一生懸命業務を遂行してきたことは変らない事実であります．

最近基礎医学の研究のあり方に関して，疾病の予防と治療という医学の指向する目的を忘れた研究に対する反省の声がきかれるようになりましたが，公衆衛生行政の科学的バックボーンとして責任の一端を担うわれわれは，住民の生命と健康を守るという基本的姿勢と目標を忘れてはならないと思います．

この研究年報には毒性部門を合せ113題の研究が報告されていますが，これらの研究報告に対する学術的および社会的批判を，われわれは謙虚に受け，それを更に将来発展への糧といたしたいと願っております．忌憚のない御意見，御叱正をいただければ誠に幸であります．

1976年（昭和51年）7月15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）の生体内運命（第1報）　経口投与によるラットの体内分布ならびに排泄…… 市川　久次，小林　博義，米山　允子，馬渕　依子，伊川三枝子，中川　好男…… 1

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第2報）　^{14}C-BHT の肝細胞内分布(1)
…… 中川　好男，伊川三枝子，平賀　興吾…… 5

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第3報）　^{14}C-BHT の腎細胞内分布
…… 伊川三枝子，中川　好男……10

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第4報）　ラットにおける体内分布ならびに排泄
…… 小林　博義，市川　久次，米山　允子，馬渕　依子，伊川三枝子，中川　好男，平賀　興吾……17

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラット肝臓および腎臓の酵素活性におよぼす影響
…… 馬渕　依子，伊川三枝子……20

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラットにおける2年間摂取実験の病理組織学的研究　BHT 慢性毒性試験の途中経過報告…… 藤井　孝，阿部　幸恵，矢野　範男，湯澤　勝広，平賀　興吾……28

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）に対する系統の異なるラットの感受性の相違に関する研究
…… 市川　久次，小林　博義，平賀　興吾……47

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラット赤血球浸透圧抵抗におよぼす影響に関する研究
…… 市川　久次，小林　博義，中尾　順子……53

クロム鉱滓水抽出物の経皮および経消化管吸収
…… 長井二三子，金西　信次，原　しげ子，樺島順一郎，中尾　順子，平賀　興吾……56

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与時にラット尿中に出現する桃色物質
…… 神谷　信行，市川　久次，中尾　順子，平賀　興吾……63

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のフェノバルビタール，イソニコチン酸ヒドラジド前処理ラットにおける肝臓におよぼす影響…… 福森　信隆，三栗谷久敏，平賀　興吾……67

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の細胞膜酵素活性に対する *in vitro* および *in vivo* での影響
…… 清水　麻里，中尾　順子……77

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）摂取ラットの出血機構（Ⅱ）
…… 鈴木　英子，高橋　省，中尾　順子，平賀　興吾……82

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の出血致死作用に対する直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）の効果…… 高橋　省，平賀　興吾……86

食品添加物の相乗毒性に関する研究（Ⅳ）　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）併用の急性毒性
…… 市川　久次，小林　博義，米山　允子，馬渕　依子，伊川三枝子，平賀　興吾……93

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT），直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）長期投与マウスおよびラットにおける細胞遺伝学的研究ならびに優性致死試験
…… 益淵　正典，高橋　昭夫，高橋　省，平賀　興吾… 100

直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）の亜急性毒性について
…… 米山　允子，馬渕　依子，伊川三枝子，小林　博義，市川　久次… 105

妊娠マウスに皮膚塗布されたドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の胎仔に及ぼす影響
…… 高橋　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，平賀　興吾… 113

クロムの毒性に関する研究　三酸化クロムの急性毒性
…… 小林　博義，神谷　信行，平賀　興吾… 119

クロム鉱滓水浸出液の眼粘膜一次刺激性について
…… 藤井　孝，坂本　義光，福森　信隆，阿部　幸恵，中村　弘，大橋　則雄，平賀　興吾… 124

クロム鉱滓水浸出液の皮膚一次刺激性について
…… 阿部　幸恵，藤井　孝，坂本　義光，福森　信隆，中村　弘，大橋　則雄，平賀　興吾… 129

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与ラットの赤血球浸透圧抵抗
…… 長井二三子，鈴木　英子，中尾　順子… 137
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　(3)ＤＥＨＰのラット肝および睾丸成分におよぼす影響…… 大石　真之，平賀　興吾… 140
化粧品用色素の短期毒性試験(1)　赤色219号およびだいだい色201号の雌性ラットにおよぼす影響
…… 福田　向江，高橋　　省，大石　真之，中尾　順子，平賀　興吾… 145
色素の微生物系における変異原性について…… 藤田　　博，水尾　昭江，平賀　興吾… 153
数種食品添加物の50％致死量について… 小林　博義，市川　久次，神谷　信行，吉田　誠二，平賀　興吾… 159
有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用　(3)細胞膜諸酵素に対する水銀化合物の阻害作用
…… 原　しげ子，中尾　順子… 161
赤血球膜 Na，K−ATPase および陽イオン輸送におよぼすフロリジンの影響……中川　敦子，中尾　順子… 166
黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH−RH）の雄ラット性腺および副腎におよぼす影響…… 大石　真之… 171
ラット血清アルカリフォスファターゼとその臓器由来について　1）仔牛小腸アルカリフォスファターゼ抗体の調製と仔牛小腸およびラット小腸アルカリフォスファターゼに対する作用
…… 樺島順一郎，中尾　順子… 176
ラット肝臓の薬物代謝酵素の活性測定法についての検討…… 川野　澄江，中尾　順子，平賀　興吾… 179
化学発ガン剤による培養細胞株 BALB/3Ｔ3 細胞のトランスホーメーション
…… 水尾　昭江，川野　澄江，中尾　順子，平賀　興吾… 185
ラットの発育推移に関する考察…… 福森　信隆，平賀　興吾… 191
ラットにおける体重，摂餌量，飲水量，糞量の日内および日間変動について
…… 林田　志信，井口　重孝，池田　虎雄… 198
ラットにおける体重増加と大腿骨長および骨重量の関係について… 坂本　義光，湯澤　勝広，平賀　興吾… 201
ラットの加令に伴う変化の組織学的検索…… 坂本　義光，平賀　興吾… 207
ラットにおける器官水分含有量とその固定後の重量変動の関連について
…… 矢野　範男，湯澤　勝広，長澤　明道，平賀　興吾… 214
電子顕微鏡観察のための基礎的研究　固定液と包埋剤…… 三栗谷久敏，福森　信隆，平賀　興吾… 218

学　会　発　表 …… 227

CONTENTS

REPORTS

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats 1. Distribution and Excretion after Oral Administration ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi, M. Yoneyama, Y. Mabuchi, M. Ikawa and Y. Nakagawa 1

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats 2. Subcellular Distribution of ^{14}C-BHT in Rat Liver (1) ..... Y. Nakagawa, M. Ikawa and K. Hiraga 5

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats 3. Subcellular Distribution of Butylated Hydroxytoluene in Rat Kidney ..... M. Ikawa and Y. Nakagawa 10

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats 4. Distribution and Excretion after Subcutaneous Administration ..... H. Kobayashi, H. Ichikawa, M. Yoneyama, Y. Mabuchi, M. Ikawa, Y. Nakagawa and K. Hiraga 17

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Enzymatic Activities of Rat Liver and Kidney ..... Y. Mabuchi and M. Ikawa 20

Histopathological Study of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Dietary Administration to Rats for 2 Years An Interim Report of Chronic Toxicity Studies of BHT in Rats ..... T. Fujii, Y. Abe, N. Yano, K. Yuzawa and K. Hiraga 28

Differences in Sensitivity of Two Strains of Rats to Butylated Hydroxytoluene (BHT) ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and K. Hiraga 47

Osmotic Fragility of Red Blood Cells in the Rats Administered with Butylated Hydroxytoluene (BHT) ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao 53

Absorption of Water Extract of Chromium Ore Dross from Skin and Gastrointestinal Tract ... F. Nagai, N. Kananishi, S. Hara, J. Kabashima, T. Nakao and K. Hiraga 56

Pink Coloured Substance in Urine Excreted by Rat Fed with BHT ..... N. Kamiya, H. Ichikawa, T. Nakao and K. Hiraga 63

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Liver of Phenobarbital or Isonicotinic Acid Hydrazide pretreated Rats ..... N. Fukumori, H. Mikuriya and K. Hiraga 67

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Enzymatic Activity in Plasma Membrane *in vitro* and *in vivo* ..... M. Shimizu and T. Nakao 77

Mechanism of Haemorrhage in Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT) (II) ..... H. Suzuki, O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga 82

Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) on Hemorrhagic Death by Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats and Mice ..... O. Takahashi and K. Hiraga 86

Studies on Toxicological Potentiation of Food Additives (IV) Acute Toxicities of the Combination of Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Rats ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi, M. Yoneyama, Y. Mabuchi, M. Ikawa and K. Hiraga 93

The Cytogenetic Studies and Dominant Lethal Tests of Long Term Administration with Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Mice and Rats .... M. Masubuchi, A. Takahashi, O. Takahashi and K. Hiraga 100

Subacute Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate ..... M. Yoneyama, Y. Mabuchi, M. Ikawa, H. Kobayashi and H. Ichikawa 105

Effects of Dermal Application of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) on Pregnant Mice and Their Fetuses ..... A. Takahashi, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 113

Toxicological Studies on Chromium Acute Toxicities of Chromium Trioxide ..... H. Kobayashi, N. Kamiya and K. Hiraga 119

Primary Eye Irritation Test by Extracts of Chromium Dross ..... T. Fujii, Y. Sakamoto, N. Fukumori, Y. Abe, H. Nakamura, N. Ohashi and K. Hiraga 124

Primary Skin Irritation Test by Extracts of Chromium Dross ..... Y. Abe, T. Fujii, Y. Sakamoto, N. Fukumori, H. Nakamura, N. Ohashi and K. Hiraga..... 129

Effect of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Osmotic Fragility of Rat Erythrocytes ..... F. Nagai, H. Suzuki and T. Nakao..... 137

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (3) Effect of DEHP on Biochemical Composition of Liver and Testis of Male Rats ..... S. Oishi and K. Hiraga..... 140

Short-term Toxicity of Cosmetic Dyes (1) Effect of Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein on Body and Organ Weights, and Clinical Values of Female Rats ..... H. Fukuda, O. Takahashi, S. Oishi, T. Nakao and K. Hiraga..... 145

Mutagenicity of Dyes in the Microbiol System .... H. Fujita, A. Mizuo and K. Hiraga..... 153

The Results on Acute Toxicities of Food Additives ..... H. Kobayashi, H. Ichikawa, N. Kamiya, S. Yoshida and K. Hiraga 159

Effects of Organic Mercury Compounds on Cell Membranes (3) Inhibition of Enzymes in Cell Membrane by Mercury Compounds ..... S. Hara and T. Nakao..... 161

Effects of Phlorizin on Na, K-ATPase and Cation Transport in Human Erythrocytes ..... A. Nakagawa and T. Nakao..... 166

Effect of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone on Gonad and Adrenal of Male Rats ..... S. Oishi..... 171

Tissue Source of Rat Serum Alkaline Phosphatase 1. Effect of Calf Intestine Alkaline Phosphatase to Rat Intestine Alkaline Phosphatase Activity ..... J. Kabashima and T. Nakao..... 176

Investigation for the *In Vitro* Assay Conditions of Rat Hepatic Drug Metabolizing Enzymes ..... S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga..... 179

Chemical Transformation of BALB/3T3 Cloned Cell Lines ..... A. Mizuo, S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga 185

Variation of Growth Curve in Rats ..... N. Fukumori and K. Hiraga..... 191

Circadian Variations of Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excretion in Rat ..... S. Hayashida, S. Iguchi and T. Ikeda..... 198

Relation between Body Weight Gain and Femur Length or Femur Weight in Rats ..... Y. Sakamoto, K. Yuzawa and K. Hiraga..... 201

Histological Studies of Age-Related Changes in Rats .... Y. Sakamoto and K. Hiraga..... 207

Relationship between Variation of Organ Weight after Fixation and Water Content of Organ in Rats ..... N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa and K. Hiraga..... 214

Fundamental Study for Electron Microscopic Observation Fixative and Embedding Resin ..... H. Mikuriya, N. Fukumori and K. Hiraga..... 218

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 227

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 1-4, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第1報）
経口投与によるラットの体内分布ならびに排泄

市川 久次，小林 博義，米山 允子，馬渕 依子
伊川 三枝子，中川 好男

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats
1. Distribution and Excretion after Oral Administration

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI*, MASAKO YONEYAMA*,
YORIKO MABUCHI*, MIEKO IKAWA* and YOSHIO NAKAGAWA*

The absorption, distribution and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) after oral administration were studied with BHT–^{14}C (toluene methyl–^{14}C) in the rats nontreated and pretreated orally with 0.6% of BHT for 4 weeks, and the following results were obtained.

1. BHT was absorbed in early time comparatively, and blood and tissues concentration were reached a maximum within 6-12 hrs after oral administration.
2. The distribution of BHT–^{14}C in the rat tissues showed high level in liver, subsequently in kidney, lung, fat and lower in heart, brain, testis and spleen. The distribution in pretreated group was lower than nontreated group generally, particularly it was apparent in kidney.
3. In pretreated, the exception of BHT–^{14}C was promoted, and it in feces was reduced.

化合物の安全性の判断において，その生体内運命（吸収，分布，排泄（蓄積性）ならびに代謝）を明らかにすることは，非常に有意義，重要なことである．ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は，食品添加物として酸化防止の目的で広く，多量に使用されているが，その安全性については，未だ問題点が指摘されつつあるのが現状である[1]．著者らは，現在まで BHT について，種々の面からの検討を加えてきている[2-5]．BHT の体内分布，排泄については，Daniel[6] らの報告があるが，経時的に詳細に検討を加えたものはないようである．今回，著者らは BHT の toluene methyl の炭素を放射性炭素（^{14}C）で置換した（これまでの報告は ^{3}H あるいは第3級 butyl 基の methyl の炭素が ^{14}C であり，水素交換あるいは脱炭酸により，不正確な結果が得られる可能性が少なくない）BHT-toluene methyl ^{14}C（以下BHT–^{14}Cと略す）を用いて，ラットに経口投与し（BHT前処理群，無処理群），その分布，排泄について経時的に検討し，若干の知見を得たので報告する．

実験材料ならびに方法

1. 使用動物

静岡実験動物農業協同組合産生の Wistar-SLC 系ラット雄（SPF）を用いた．生後4週令のものを購入し，4日間予備飼育を行い，一般状態，体重の増加に異状のないものを実験に供した．実験開始時（平均体重 150g）に，1群3匹としケージに入れ飼育し，実験に供した．

2. 試料ならびに試薬

試料として用いた放射性の BHT–^{14}C は，New England Nuclear 社に特別注文し，購入したもので，(specific activity 2.2μ Ci/mg)，BHT の toluene methyl の炭素が ^{14}C に置換されたもので，3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy toluene (toluene methyl–^{14}C) が正式の名称である．形態は白色結晶性粉末であった．その放射化学的純度は，Kiesergel G を担体に，展開液に石油エーテル (bp. 60—80°C) を用いた。薄層クロマトグラフィーで分離し，シュミット社製のスキャナーで radio activity をスキャンし，放射化学的に単一であることを確認し

* 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

た．BHT前処理群に投与した非放射性の BHT は，和光純薬製の白色結晶性粉末 mp 69.5°C (Lot No. KIK 5562) のものを使用した．シンチレーター用の PPO は東京化成製のものを，Dimethyl-POPOP は和光純薬製（ドータイト）を使用した．また，放射能測定用サンプル調整用に，組織溶解剤 BBS-2 (Beckman, 血液に使用)，Soluene-350 (Packard, 他の組織)，尿測定用に，Insta-Gel，糞測定用に Carbo-Sorb，Parmaflour-V，化学発光阻止剤に Dimilume-30 (以上 Packard 社製) を使用した．他の溶媒，試薬はすべて JIS 特級を用いた．

3. 投与方法ならびに期間

BHT-^{14}C はオリブ油に 11μ Ci/ml になるように調整し，ラット1匹当り 1.0 ml を胃ゾンデを用いて経口投与した．BHT 前処理群は，生後5週目より 0.6% の BHT を含む飼料 (CE-2) を4週間投与した後，BHT-^{14}C 投与の実験に供した．BHT-^{14}C の投与は1回とし生後9週目の無処理群（投与後 1, 3, 6, 12, 24時間，7日目に屠殺）と BHT 前処理群（投与後，3, 6, 12, 24時間，7日目に屠殺）に分け，各処理時間群は同時投与した．投与後7日処理群はそれぞれ個別に代謝ケージに入れ，経時的に尿，糞を採取した．ラットは投与前16時間は除餌した．

4. 放射能の測定方法

屠殺処理したラットの血液，血清を採取し，脳，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，精巣，脂肪，糞，尿を摘出，採取したのち容量，重量を測定したのち，血液は 25μl を vial にとり精製水 0.1 ml を加え溶血させ，BBS-2 1.0ml を加え，血清は 0.3ml を，各臓器は精製水を加えて10倍のホモヂネートを調整し，脳，心臓，精巣は 1.0ml を，肺，肝臓，腎臓，脾臓は 0.5ml を vial にとり，減圧下で乾燥させたのち，精製水 0.1ml を加えて残渣を湿潤させ，Soluene-350 を1.0ml 加え，オーブンにて 50°C で一夜加温溶解させ，室温に冷後，脳，心臓，精巣，腎臓にはトルエンシンチレーター（トルエン 1l 中，PPO 5 g, Dimethyl-POPOP 300mg 含有)，肺，肝臓，脾臓には Dimilume-30 を 10ml 加えた．脂肪は，石油エーテルを加えて10倍の溶液を調整し，その 1.0ml を vial にとり，トルエンシンチレーター 10ml を加えた．尿は 1.0ml を vial にとり（濁りがある時は減量し，精製水を加えて全量 1.0ml とした) Insta-Gel 15 ml を加えてよく混合した．糞は，ホットプレート上で乾燥し（約 90°C, 24時間放置)，重量を測定し，その50 mg をとり，ベックマン社製，サンプルオキシダイザー (BMO) にて燃焼させ，生ずる $^{14}CO_2$ ガスを Carbo-Sorb 8ml に吸収させ，Parmaflour-V 12ml で vial 中に注ぎ込ませた．放射能の測定は，液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製，LS-355）にてAQCを作動させ，外部線源補正法にてクエンチングを補正し dpm を算出した．測定値は1群3匹の平均値で表わした．

実験結果

1. 体内分布

BHT-^{14}C を投与後，種々時間における放射能の体内各組織への分布状態を Fig. 1, 2, 3, 4 に示した．

血液中の放射能は，無処理群，BHT 前処理群ともに6時間以内に最高値を示し，以後低下した．血清中は，

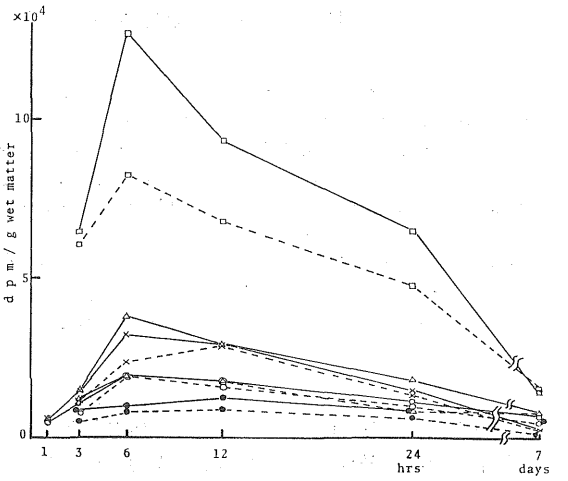


Fig. 1. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of BHT-^{14}C (11 μCi/Rat)
○ Blood × Serum △ Kidney □ Liver ● Heart
—— Nontreated --- Pretreated with 0.6% of BHT for 4 weeks. value=mean of 3 experiments

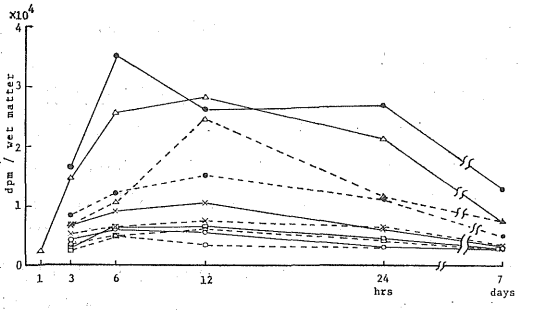


Fig. 2. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of BHT-^{14}C (11 μCi/Rat)
○ Brain × Spleen △ Fat □ Testis ● Lung
—— Nontreated --- Pretreated with 0.6% of BHT for 4 weeks. value=mean of 3 experiments

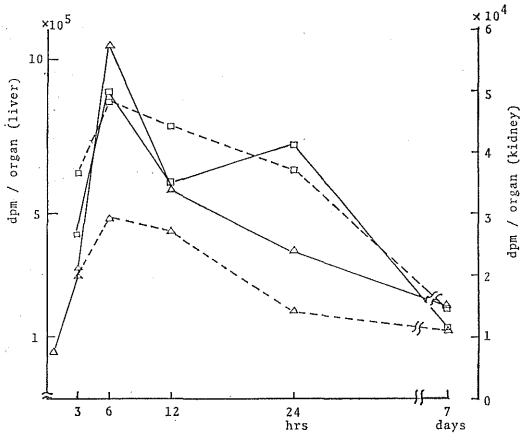


Fig. 3. Changes in Organ Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of BHT-^{14}C (11 μCi/Rat)
△ Kidney □ Liver —— Nontreated
--- Pretreated with 0.6% of BHT for 4 weeks.
value=mean of experiments

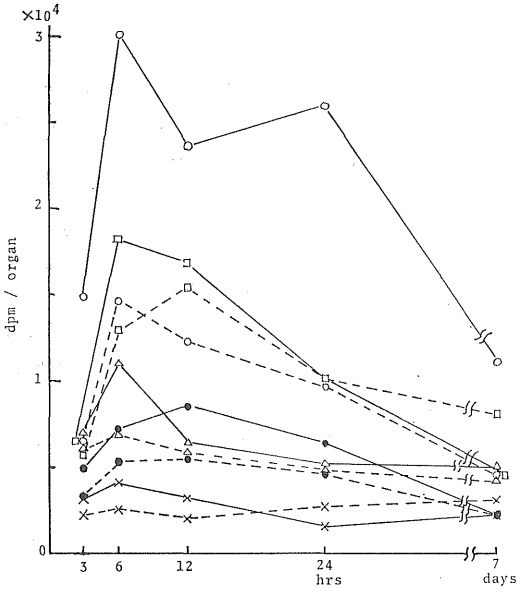


Fig. 4. Changes in Organ Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of BHT-^{14}C (11 μCi/Rat)
○ Lung △ Brain × Spleen □ Testis ● Heart
——Nontreated ---Pretreated with 0.6% of BHT for 4 weeks.
value=mean of 3 experiments

無処理群は6時間前，処理群12時間に最高値を示し(BHT前処理群の6時間とそれほど差はない)，血中への取り込みは6時間が最高値を示した．後述するように他の組織でもまた，血中と同様6～12時間に最高値を示し，同様な傾向を観察した．

臓器では，湿重量 g 当り，臓器当りともに肝臓への分布が著しく高く，次に排泄器官である腎臓への分布が高かった．一方，血中と同程度の放射能濃度を示す臓器，組織として，肺，脂肪が挙げられた．さらに低い放射能の分布は心臓，脾臓，精巣，脳で認められた．全体的にBHT前処理群の方が無処理群に比べ放射能分布は低い傾向があり，吸収の抑制を予想させた．とくに，腎臓の高分布時に認められた．また，7日目でみてみるとこの傾向が著しかったのは肺，心臓であった．また投与7日後に肝臓，腎臓，心臓，肺，脾臓，脳，精巣中の残存量を総計すると，無処理群は投与量の0.7%，BHT前処理群は0.9%のものが残存していた．また，ここではデータを示していないが，同量のBHT-^{14}C投与により28日目の残存量を，同じ臓器で検討した結果によると0.2%であった．

2. 尿ならびに糞中への排泄

BHT-^{14}C の経口投与，7日目までの recovery を Fig. 5 に示した．尿，糞ともに BHT 投与群は初期に

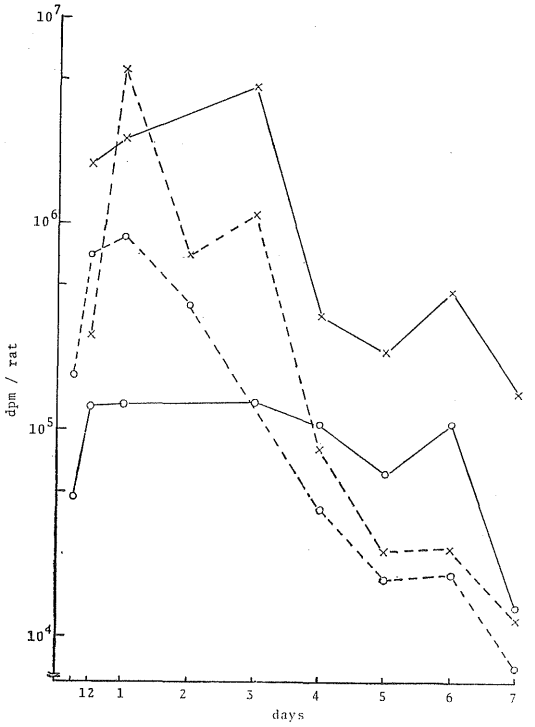


Fig. 5. Changes in Urine and Feces Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of BHT-^{14}C (11 μCi/Rat) ○ Urine × Feces
——Nontreated ---Pretreated with 0.6% of BHT
value=mean of 3 experiments

無処理群よりも放射能回収量が多く，その速度も，ＢＨＴ前処理群は24時間以内に最高点に達し，以後急激に減少した．無処理群は，比較的緩慢で４日目頃までゆるやかであった．尿中への排泄は４日までに無処理群は尿中全排泄量（７日間）の76.7%，BHT 前処理群は97.9%が排泄され，BHT 前処理群の尿中への排泄が促進されることが認められた．また，尿，糞中への７日間の総排泄量は，全投与に対し，尿では無処理群3.5%，BHT前処理群8.9%，糞では，無処理群42.2%，BHT前処理群31.6%であった．BHT 前処理により尿中への排泄が促進され，糞中への排泄が減少した．

総括ならびに考按

ラットを無処理，0.6% BHT ４週間投与のものとに分け，生体内で脱炭酸により，消失の危険性のない，toluene methyl の炭素が ^{14}C である BHT-^{14}C をオリブ油に溶解し，経口投与（11μ Ci/Rat）後経時的にその体内分布ならびに尿，糞への排泄を検討した．BHT の体内分布に関する報告は，Daniel[6]らの報告があるが，経時的に詳細に検討したものはないようである．

体内各組織，臓器への分布は，６～12時間で最高値に達し（比較的早い時期に吸収され），以後は低下した．臓器別では肝臓への分布が著しく高く，また，無処理群と BHT 前処理群の間には，臓器当りに換算するとほとんど差がないのに（Fig. 5），g 当りの放射能は無処理群の方が高く，BHT 前処理群は低い結果を示していた（Fig. 1）．これは，BHT の肝重量増加作用との関係で，細胞数が増加するのではなく，細胞１個当りの大きさが大きくなるという可能性が示唆され興味深い．次に高い分布を示したのは，排泄臓器である腎臓で，当然予想されるところであり，全体的にもいえることではあるが，とくに腎臓で BHT 前処理群の方が無処理群よりも放射能分布は低く，尿中への排泄との関係で注目された．また，投与７日後の主要臓器中の残存量は全投与量の 0.7%（無処理群），0.9%（BHT 前処理群）で，ほとんど７日後には残存していないと思われる（脂肪に関しては一般にかなり残存するといわれているが血中と同程度であった）．

尿，糞への排泄は，BHT 前処理により，初期に促進される傾向があり，特に尿では著しかった．これは前述の腎臓の分布が，BHT前処理により減少したことより，血中より腎臓組織内に入ったものが，すみやかに尿中へ排泄された結果であると考えられる．また，７日間の全投量に対する全排泄量の割合は，尿では無処理群 3.5% BHT 前処理群 8.9% で，BHT 前処理により尿中への排泄が促進されることが認められた．また，糞では無処理群 42.2%，BHT 前処理群 31.6% で糞中への排泄が BHT 前処理により糞中への排泄が減少することが認められた．BHT の前処理による排泄への影響は，BHT の腸肝循環（entero hepatic circulation），腸管からの吸収と直接糞への排泄，腎組織中での存在状態と排泄の難易等を明らかにすることにより解明の糸口が得られるかもしれない．また，全投与量の，45.7%（無処理群），40.5%（BHT 前処理群）が７日間のうちに，尿，糞中へ排泄され，投与された BHT-^{14}C は，約55～60%が体内に吸収されるものと考えられる．

文　献

1) Sciorra L. J., B. N. Kaufmann, and Roberta Maier : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 12, 33, 1974

2) 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，22，23，1971

3) 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，23，345，1973

4) 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，25，449，1972

5) 市川久次，小林博義，長井二三子，中川好男，厚井麻理，池田虎雄，矢野範男：東京衛研年報，26-2，1，1975

6) Daniel J. W. and J. C. Gage : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 405, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 5-9, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第2報）
^{14}C-BHT の肝細胞内分布（1）

中川 好男*, 伊川三枝子*, 平賀 興吾*

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats
2. Subcellular Distribution of ^{14}C-BHT in Rat Liver (1)

YOSHIO NAKAGAWA*, MIEKO IKAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT：3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene）は食品中の油脂等の酸化防止剤として現在用いられている．このBHTの安全性については数多くの報告[1]があり，当毒性部においてもラットなどを用いて長期間摂取による慢性毒性試験等から検討されている[2,3]．またBHTはウサギ[4]やイヌ[5]なども含めて生体内における代謝の面からも研究されている．これらの報告からBHTあるいはその代謝産物が肝臓に対して起こすいくつかの特異的な作用が知られている．それらは1）肝重量の増加，2）脂質代謝への影響，3）ミクロゾーム特に滑面小胞体の増殖および薬物代謝系酵素の誘導等である．このように複雑な作用を示すBHTが経口的に体内に取り込まれた場合，その主要な代謝臓器である肝における細胞内運命についてはいまだ明らかにされていない．そこで今回^{14}CでBHTをラットに経口投与し，肝細胞内におけるその挙動を放射能を追跡することにより検討した．

実験材料および方法

実験動物　雄性のSLC-Wistar（SPF）系ラット8週令，体重170～200g（平均180g）を用い1群3匹とした．

標識化合物　3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (toluene methyl-1-^{14}C)（以下^{14}C-BHTと略す）はNew England Nuclear Corp製，比放射能2.2μCi/mgを用いた．このものはラジオ薄層クロマトグラム上でBHT以外の放射性化合物の存在を認めなかった．

投与方法　^{14}C-BHTはオリーブ油に溶解後，一晩絶食したラットに5mg(2.2×5μCi)/bodyの用量で1回経口投与した．

肝細胞分画　^{14}C-BHTを投与したラットは一定時間毎に断頭した．肝は冷生理食塩水で洗浄した．秤量後すべての操作は4°以下で行なった．肝は0.25Mの蔗糖溶液でPotter型のテフロン製ガラスホモジナイザー（clearance 0.16mm）で，1000 rpm, 3回上下してホモジナイズし，ナイロン製の布で未破壊成分をろ過した後10%に定容した．得られたホモジネート（H）はde Duveらの方法[6]に準じ，冷却遠心分離機（トミナガ製RS-18P型・S-2ローター）と超遠心分離機（Beckman製L3-50型・50tiローター）で分別遠心し核（N），重ミトコンドリア(M)，軽ミトコンドリア(L)，ミクロゾーム(P)そして上清分画(S)の5分画に調製した．ホモジネートおよび各分画は酵素活性を測定した後−20°で凍結保存した．なお各実験の蛋白質量の回収率は90%以上であった．

血清の調製　血清はラットを断頭した時に放出する血液を採取し，室温で凝血後3000 rpm, 10分間の遠心分離から得た．

放射能の測定　Beckman製LS-355型液体シンチレーションカウンターで^{14}Cの放射能を測定し，外部線源法で計数効率を求めた．シンチレーターはToluenephosphar-Triton系のemulsion性を使用した[7]．0.5～1.5 $m\ell$の試料は適量の蒸留水とともに10 $m\ell$のシンチレーター中で可溶化した後測定に供した．なお各実験の放射能の回収率は90%以上であった．

ゲルろ過による分画　肝上清分画と血清は各々0.3 $m\ell$をSephadex G.25, Medium（pharmacia製）のカラム0.95×21cm（上清分画用）と0.95×45cm（血清用）に

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　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

負荷した．0.5M塩化ナトリウム含有の0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.0を溶出液として室温で2mlずつ分画した．

酵素活性　リソゾームの指標として酸性ホスファターゼ活性を p-nitorophenyl phosphate を基質として Bessey らの方法を若干改変して測定した[8]．またミクロゾームの指標としてグルコース-6-ホスファターゼ活性を glucose-6-phosphate を基質として用い[9]，トリクロル酢酸で除タンパク後の上清の無機リン酸を Fiske-Subbarow 法で測定した[10]．

蛋白質の定量　細胞分画は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[11]．ゲルろ過で得られた分画は牛血清アルブミンを標準物質として紫外部 280nm で定量した[12]．

結　果

^{14}C-BHT の肝細胞内分布　de Duve らの方法により得られた肝細胞分画の結果は Fig. 1 に示した．図の縦軸は各分画の蛋白質 1mg あたりの酵素の比活性を示し，横軸は全分画に対する各分画の蛋白質量を百分率で示した．そしてその面積に相当する部分が各分画の総活性である．その結果リソゾームの指標酵素である酸性ホスファターゼとミクロゾームの指標酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ活性の大部分は，それぞれが指標とする分画に局在した．なお以後の細胞分画の実験では酸性ホスファターゼ活性についてのみ図に示し，分画の状態と放射能の分布の指標とした．Fig. 2, 3, 4 は 5mg の

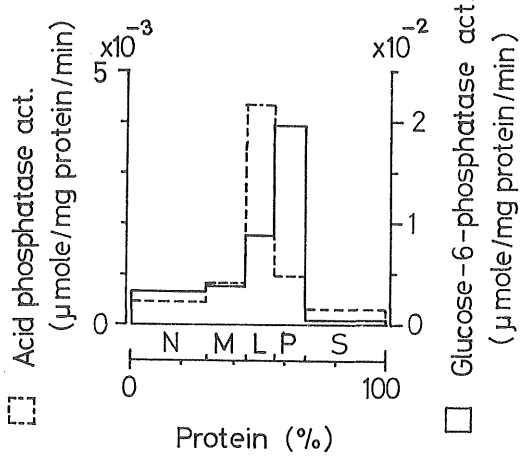


Fig. 1. Distribution of Acid Phosphatase and Glucose-6-Phosphatase in Nuclear (N), Heavy Mitochondrial (M), Light Mitochondrial (L), Microsomal (P), and Soluble (S) Fractions of Rat Liver Homogenate prepared in 0.25M Sucrose.

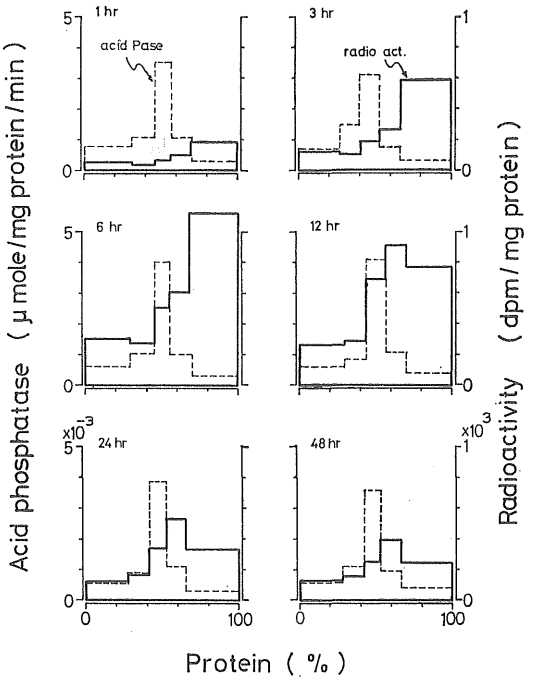


Fig. 2. Subcellular Distribution of Radioactivity of Rat Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT. The Solid Line and Dotted Line indicate Radioactivity and Acid Phosphatase Activity respectively.

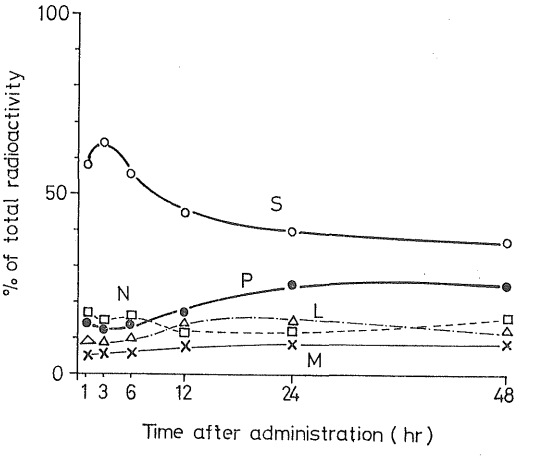


Fig. 3. Time-course of Changes in Radioactivity in Subcellular Fractions of Rat Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT.

^{14}C-BHT をラットに1回経口投与した後，肝細胞内分画の放射能を経時的に測定し分析した結果である．Fig. 2は放射能と酸性ホスファターゼの各分画における分布状態を示し，Fig. 3 は全放射能量に対する各分画の放

射能量の割合を百分率で表わし，Fig. 4 は各分画の蛋白質1mgあたりの比放射能を経時的に表わした．肝に取り込まれた放射能量はFig. 4のホモジネート(H)の挙動から，投与6時間後に最高値に達し以後緩慢に減少した．細胞内に取り込まれた放射能は，Fig. 2に示したように上清分画(S)にその大部分が局在した．しかし投与6時間以後放射能はミクロゾーム分画(P)に顕著に増加分布し，48時間後でも観察された．この現象を経時的に表わしたのが Fig. 3 である．肝に取り込まれた放射能は初期においてその大部分が上清分画(S)に分布したが，投与3時間後最高値に達し以後減少した．それに対してミクロゾーム分画の放射能は他の顆粒分画に比べ3時間以後も継続的に増加する傾向を示した．次に各分画に分布した放射能量を蛋白質 1mg あたりの比活性で経時的に観察すると，Fig. 4 に示したごとく，核(N)，ミトコンドリア(M)および特に上清分画(S)が投与6時間後で最高値に達し以後減少したのに対して，ミクロゾーム(P)と軽ミトコンドリア分画(L)が6時間以後も増加し12時間で最高値に達した．つまり肝細胞内に取り込まれた放射性BHTの分布が分画間で時間的なずれを生じた．

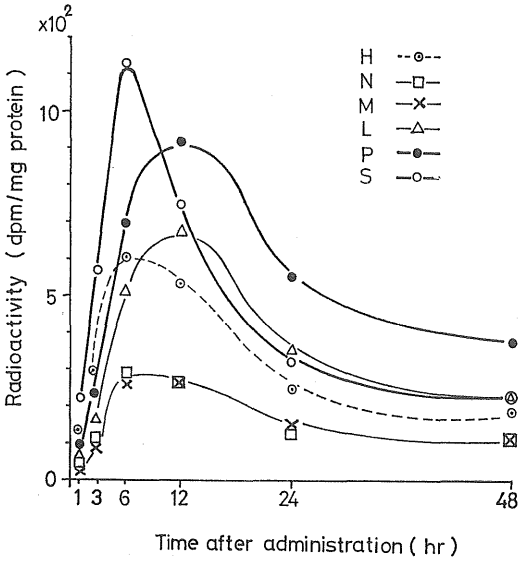


Fig. 4. Time-course of Changes in Specific Radioactivity in Subcellular Fractions of Rat Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT.

肝上清分画と血清のゲルろ過 肝の上清分画はSephadex G-25のカラムに負荷し，上清分画に存在するBHT の状態を放射能の溶出パターンから分析した．Fig. 5 はその結果である．放射能は蛋白質と共に溶出

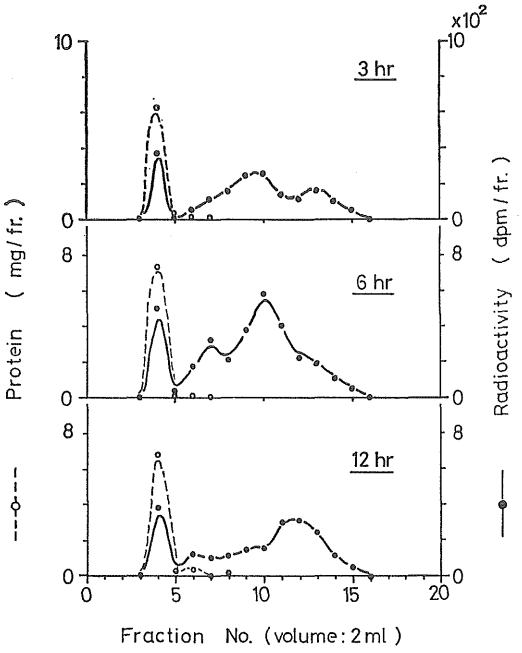


Fig. 5. Elution Patterns of Radioactive Material from Liver Supernatant Fraction on Sephadex G-25 after Oral Administration of ^{14}C-BHT.

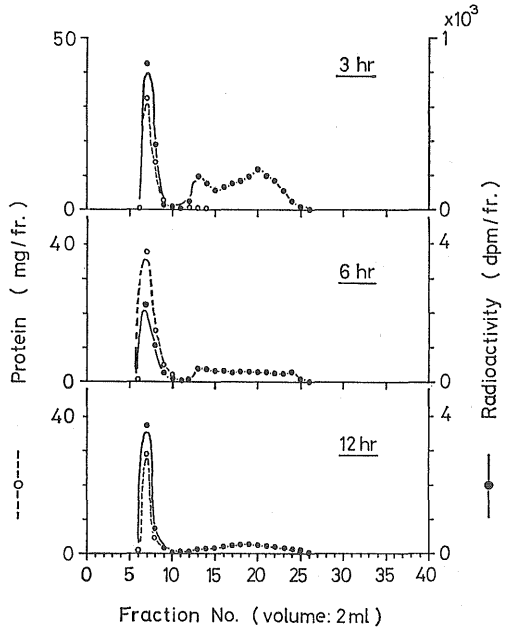


Fig. 6. Elution Patterns of Radioactive Material from Serum on Sephadex G-25 after Oral Administration of ^{14}C-BHT.

したいわゆる高分子分画とあとから溶出した低分子分画の2つの分布が認められた．低分子側に溶出した放射能のパターンは経時的に異なっていた．また Table 1 に示したごとく2つの型に分離溶出した上清分画の放射能

Table 1. Changes in Distribution of Radioactivity of Supernatant Fraction and Serum after Oral Administration of ^{14}C-BHT.

Time after administration (hr)	Protein-bound (%)	Free (%)	Total rad. act. (dpm)
Supernatant fr.			
3	21.7	78.3	1830
6	16.8	83.2	3180
12	19.6	80.4	2020
Serum			
3	39.5	60.5	3340
6	67.7	32.3	5610
12	56.0	44.0	6700
24	78.0	22.0	4210

は投与後の時間にかかわらず全体の80%が低分子分画に分布した．Fig. 6 は血清を Sephadex G-25 のカラムでゲルろ過した結果である．放射能は上清分画と同様に高分子分画および低分子分画の2つの型に溶出した．低分子側の放射能の溶出パターンは投与3時間後で2つのピークが認められたが，6時間と12時間後では著明なピークがみられず広がっていた．高分子および低分子の2つに分離溶出した放射能の分布は Table 1 に示したごとく蛋白質と共に溶出した高分子側の割合が経時的に増加した。

考　察

一般に動物体内に入った脂溶性の高い化合物は肝細胞の小胞体膜に存在する薬物酸化酵素により酸化され，次いで同じ細胞内の他の酵素系でグルクロナイドや硫酸エステル等の水溶性の高い化合物に変えられた後，尿あるいは胆汁を経て体外へ排泄される．今回用いた BHT も脂溶性の高い化合物であることから類似した代謝過程を経ることが推定される．そこで経口的に投与されたBHTが腸管から吸収され門脈を経て肝臓に取り込まれた後，いかなる肝細胞内運命をうけるか ^{14}C で標識したＢＨＴを用いて放射能を経時的に追跡し，BHTおよびその代謝産物の挙動を検討した．肝臓への BHT の取り込みは Fig. 4 のホモジネート(H)曲線が示すごとく投与6時間後を最高に以後減少したが2日後においてもかなりの放射能が残留していた．経口投与により腸管から吸収された BHT はその極性の観点から血清中ではリポ蛋白等の担体により肝に運搬されるといわれている．また Lloyd らは血清中においてアルブミン等の蛋白質と結合した化合物は高分子として挙動するためそのままでは細胞膜を透過しにくく，いわゆる endocytosis とよばれる機構により phagosome あるいは pinosome の形態で細胞内に取り込まれ，ついでリソゾーム顆粒に集められることを報告している[13]．この観点から BHT の肝細胞への取り込み方をみた場合，投与後初期から後期まで大部分の放射能が上清分画（S）あるいはミクロゾーム分画（P）に局在し，リソゾームの富む軽ミトコンドリア分画（L）には特異的な分布が認められなかった（Fig. 2）．それゆえに血清中の BHT は細胞膜において endocytosis の機構をとらずむしろ血清蛋白質と解離した形態で細胞内に入るものと思われる．

肝細胞に取り込まれた放射能は上清分画にその大部分が分布したが，経時的にみると減少した（Fig. 3）．これに対してミクロゾーム分画（P）の放射能は他の顆粒分画に比べ顕著な増加の傾向を示した．また各分画の蛋白質 1 mg あたりの比放射能は核，重ミトコンドリアおよび特に上清分画が投与6時間後に最高値に達した後急減した．それに対してミクロゾームと若干のミクロゾームが混入する軽ミトコンドリア分画は投与6時間後も増加を続け12時間後に最高値に達した（Fig. 4）．またその減少のしかたは上清分画に比べ緩慢であった．以上認められた細胞内の放射能の挙動から，肝上清分画に取り込まれた BHT は次にその代謝部位に相当するミクロゾームに移動することが示唆される．Gilbert[14] らは今回用いた約 1/2 倍量の BHT をラットに一回経口投与した場合，肝の BHT oxidase の誘導が投与6時間以後急に増加し，24時間後でも最初の3倍の活性を維持したことを報告しており，今回の実験でみられた BHT のミクロゾーム分画への移動と彼らの BHT 代謝酵素の誘導には経時的な相関のあることが認められた．細胞内で存在する場合とほとんど形態的に変わらずに調製できる核，ミトコンドリア，リソゾームなどの顆粒と異なり，ミクロゾーム分画とよばれるものは細胞内で三次元的に広がった膜系の小胞体として存在するため，細胞成分をホモジネートに調製する際に破壊され破片となった顆粒がその主体である．またこの分画には分画操作上ゴルジ体やリソゾーム等が混入することからミクロゾーム分画に取り込まれた BHT の局在に関してはさらにこの分画の密度勾配遠心法などによる細分化から検討する必要がある．

次に上清分画および血清中の BHT の挙動についてゲルろ過法を用いて検討した．上清分画中の放射能は全体の80%が低分子化合物として溶出した（Table 1）．この

低分子化合物に由来した放射能のピークは複数を示し，さらにその溶出パターンは経時的に変化した．このことは上清分画に存在する放射性物質が単一な物質よりはむしろ複数のBHTおよびBHTの代謝産物と考えられる．その成分の経時的な分析はラジオ薄層クロマトグラム等で検討する必要があろう．血清に存在した放射能は肝上清分画と同様に2つの型が認められた．肝によるBHTの代謝産物と考えられる低分子側の放射能は経時的に減少したが，蛋白質と共に溶出した高分子側の放射能は増加した(Table 1)．血清中において化合物と蛋白質の結合が増加することは，化合物の腎での糸球体ろ過や尿細管分泌が抑えられ，尿中への排泄が遅延するといわれている[15]．BHTあるいはこの代謝産物はもちろんかなりの量が胆汁から糞中に排泄されるが[16]，血清中の蛋白質と結合したBHTは，BHTの脂溶性であることと合せて生体組織への蓄積[17,18]を促しひいては生体からの排泄を抑える一因と考えられる．

今回BHTの細胞内運命を放射性化合物の量的な面から観察したが，さらに経時的に代謝産物を同定し，質的な面からも検討する必要があると思われる．

要　旨

BHTの肝細胞内運命について検討した．^{14}Cで標識したBHTをラットに1回経口投与し，経時的に肝細胞分画を行ない放射能の肝細胞内分布を追跡した．肝臓へのBHTの取り込みは投与6時間後に最高値に達した．細胞内での放射能の分布は投与初期において上清分画に大部分が存在したが，経時的に減少するに伴いミクロゾーム分画の放射能が増加した．上清分画および血清中の放射能は蛋白質と結合した高分子化合物と遊離した低分子化合物の2形態をとった．

謝　辞　本研究に御協力くださった当部の，市川久次，米山允子，馬渕依子，小林博義の諸氏に感謝いたします．

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，米山允子，藤井孝，池田虎雄，矢野範男：東京衛研年報，22，231，1970
3) 市川久次，小林博義，中川好男，長井二三子，厚井麻里，矢野範男，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，1，1975
4) Dacre, J. C. : *Biochemical J.*, 78, 758, 1961
5) Wright, A. S., A. A. Akintonwa, R. S. Corwne, and D. E. Hathway : *Biochemical J.*, 97, 303, 1965
6) De Duve, C., B. C. Pressman, G. R. Gianetto, R. Wattiaux, and F. Appelmans : *Biochemical J.*, 60, 604, 1955
7) Patterson, M. S. and R. C. Green : *Analytical Chemistry*, 37, 854, 1965
8) Bessey, O. A., O. H. Lowry, and M. J. Brock : *J. Biol. Chem.*, 164, 321, 1946
9) Bergmeyer, H. U. : *Methods of Enzymatic Analysis*, Second English Ed., 876, 1975, Academic Press, New York
10) Fiske, C. A. and Subbarow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
11) Lawry, O., N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 267, 1951
12) 副島正美，菅原　潔：蛋白質の定量法，105，1971，東大出版会
13) Lloyd, J. B., F. Beck, A. Griffiths, and L. M. Parry : *in Biological Council Symp. on the Interaction of Drugs and Subcellular Particles in Animal Cell*, (Ed. P. N. Campbell), 171, 1968, J. and A. Churchill, London
14) Gilbert, D., A. D. Martin, S. D. Gangolli, R. Abraham, and L. Golberg : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 7, 603, 1969
15) La Du, B. N., H. G. Mandel, and E. L. Way : *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, 1971, The Wiliams & Wilkins Company, Bartimore
16) Ladomery, L. G., A. J. Ryan, and S. E. Wright : *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 388, 1967
17) Collings, A. Z. and M. Sharratt : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 409, 1970
18) Daniel, J. W. and J. C. Gage : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 405, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 10-16, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第3報）
^{14}C-BHT の腎細胞内分布

伊川 三枝子*, 中川 好男*

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats
3. Subcellular Distribution of Butylated Hydroxytoluene in Rat Kidney

MIEKO IKAWA* and YOSHIO NAKAGAWA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene, 以下BHTと略す）は，食品添加物の酸化防止剤としてのみならず，容器の酸化防止剤としても広く使用されている化学物質である．BHTに関しては，すでに多くの毒性試験や代謝についての研究[1,2]が行なわれてきたが，これらの報告では，BHTにより変化を受ける臓器としては，肝臓，副腎[3]などがあげられ，代謝に関しても肝臓に対する研究[4,5]が中心であった．しかし，当部で行なった亜急性毒性試験[6]の病理組織所見では，腎尿細管腔の拡張と尿細管上皮細胞の扁平化を報告している．

そこで今回われわれは，^{14}C-BHTをラットに経口投与し，腎臓の細胞内分布と存在形態の経時的変化，ならびに尿中代謝物の分離同定の検索を試みたのでその結果を報告する．

実験方法

1. 試薬 BHT：和光純薬，3, 5-di-*tert*-buthyl-4-hodroxyltoluene (toluene methyl-^{14}C)：NENC社で合成した比放射能 22μCi/mg を使用した．（以下 ^{14}C-BHTと略す），2,5-di-phenyloxazole（以下PPOと略す）：東京化成，1, 4-Bis〔2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)〕-benzene：和光純薬（以下 dimethyl POPOPと略す），ギブス試薬：2,6-dichloroquinone imide（和光純薬）25 mg を *iso*-propanol 50m*l* に溶解し，一週間毎に調製した．Sephadex G-25, Sephadex G-200：生化学工業，Thin Layer chromatography plates silica gel 60：E. Merck., 3,5-di-*tert*-buthyl-4-hydroxyl alcohol：Ardrich 社(以下 BHT *alc.* と略す)，3, 5-di-*tert*-buthyl-4-hydroxy benzaldehyde：Coppinger[7]らの方法により合成したものを使用した．（以下 BHT *ald.* と略す），3-5-di-*tert*-buthyl-hydroxy benzoic acid：Ardrich 社（以下 BHT *acid* と略す），X線フィルム：小西六写真工業，工業用Nタイプ，現像液：さくらエースドール，定着液さくらエースフィックス．

2. 機械 液体シンチレーションカウンター：Beckman LS-355，分光光度計：日立 124，冷却遠心機：TOMINAGA RS-18P，超遠心機：Beckman L3-50.

3. 実験動物と投与法 SLC-Wistar系ラット(SPF)雄，5週令，体重140gから160gのものを2群に分け使用した．1群は，0.6%BHT飼料で4週間飼育し，それを前処理群とし，4週間クレア固型飼料（CE-2）で飼育した群を対照群とした．4週間後に，^{14}C-BHTをオリーブ油に 11μCi/m*l* に溶解して，ラット当り 10μCi を経口投与した．また尿は，^{14}C-BHT 投与後24時間の尿を採取した．

4. 放射活性の測定 シンチレーターは，Patterson[8]らの方法にしたがってトルエン系シンチレーター（PPO：4g, dimethyl POPOP：100mg, トルエン 1*l*）2容に，Triton X 1容を混合したものを使用した．細胞分画の放射活性は，シンチレーター 10m*l* に対して試料 0.5 m*l*, 蒸留水 0.5m*l* を加えて測定した．また，Sephadexカラム溶出液の放射活性は，溶出液 1m*l*, 蒸留水 0.5m*l* にシンチレーター 10m*l* を加えて測定した．なお，すべての計数値は外部線源 channel ratio 法で quenchingの補正を行なった．

5. オートラジオグラフィー[9] 試料展開後のTLC板の展開溶媒を充分除去した後，X線フィルムを密着さ

* 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

せ，カセットに入れて適当な時間露出しておき，現像した．現像条件は室温下で3.5分とし，その後3%酢酸溶液で停止させ，定着時間は2分とした．

6. タンパク定量法 Lowry[10]らの方法で行ない，ウシ血清アルブミンを標準物質として使用した．

実験1．腎細胞内放射活性の分布と経時変化 ^{14}C-BHT投与後 1, 3, 6, 12, 24, 48時間目（前処理群は，3, 6, 12, 24時間目のみ）に各群3匹を断頭により採血後，腎臓を摘出した．腎臓は，0.25M庶糖—1mM EDTA液で10% ホモジネートを調製し，Duve[11]らの方法により，核(N)，重ミトコンドリア(M)，軽ミトコンドリア(L)，ミクロソーム(P)，上清(S)の5分画を得た．得られた各分画部について放射活性およびタンパク量を測定した．

実験2．腎上清および血清の Sephadex によるゲルろ過 1) Sephadex G-25によるゲルろ過 実験1で得られた腎上清に存在する放射活性のうち，タンパクに結合している部分と，遊離部分と分離し，その割合を調べ，かつそのパターンの経時的変化をみるために，Sephadex G-25 によるゲルろ過を行なった．Sephadex G-25 は，1×45cm のカラムに詰め，腎上清1.0m*l* をのせて，0.1 Mリン酸緩衝液で 0.15m*l*/min の速度で溶出し，2m*l* ずつ分画した．各分画について放射活性とタンパク量を測定した．

2) Sephadex G-200 によるゲルろ過 腎上清のタンパクに結合している放射活性物質に関して，タンパク結合特異性の有無を調べるため，Sephadex G-25 により分離されたタンパク結合部分を濃縮して，Sephadex G-200 によるゲルろ過を行なった．カラムは 1.5×42cm を用い，0.13m*l*/min の流速とし，他の条件は Sephadex G-25 と同じにした．血清についても同様に行なった．なお，腎上清 2.0m*l* を Sephadex G-25 により分離し，タンパク結合部分を集め，1.5m*l* に濃縮したものを試料とし，血清は 0.45m*l* を試料とした．

実験3．尿中代謝物の検索 尿中代謝物の抽出方法は，Daniel[2]らの方法にしたがって行なった．その方法の詳細を Chart 1 に示す．得られた F_1 から F_5 の分画部分を濃縮し，TLC を行なった後，ギブス試薬で発色させ，オートラジオグラフィーにより放射活性部位を確認した．各分画の展開溶媒は次のものを使用した．F_1, F_2–ベンゼン：エタノール，(9：1)，F_3–2N アンモニア飽和ブタノール，F_4, F_5–n–ブタノール：酢酸：水 (12：3：5)

実験結果

実験1．腎細胞内放射活性の分布と経時変化 Fig. 1 は投与後の各時間における腎細胞内の比放射活性の分布を示した図である．また Fig. 2 は，各分画の比放射活性の経時変化をあらわしている（対照群のみ）．対照群においては，すべての時間で上清分画の比放射活性は高い値を示したが，その経時的変化は，6時間目をピーク

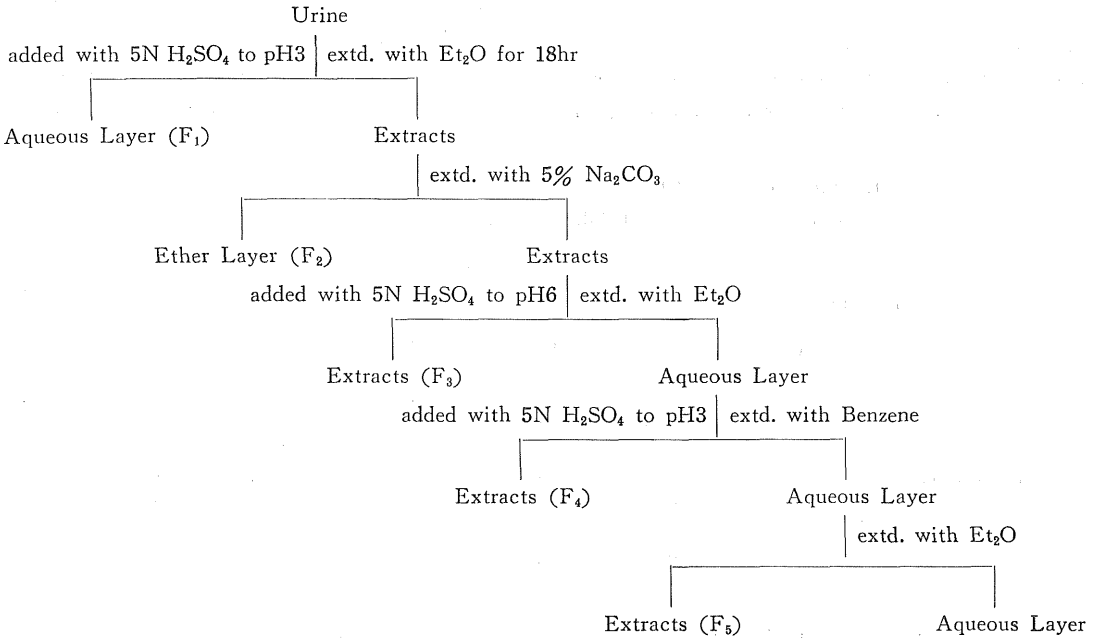


Chart 1. Solvent Fractionation of Metabolites in Rat Urine

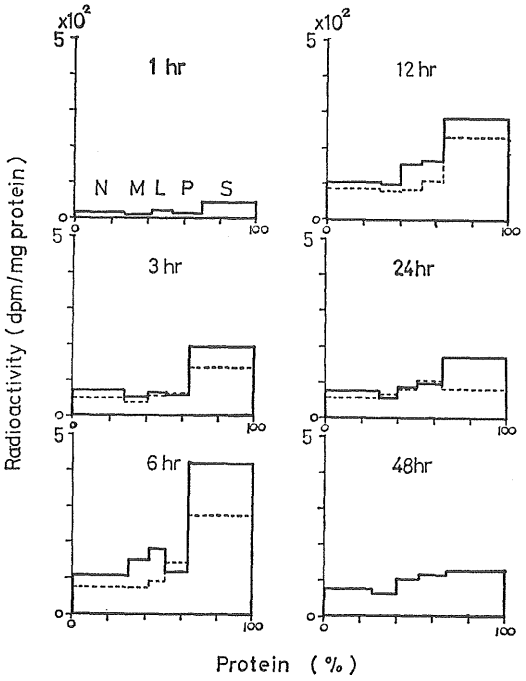


Fig. 1. Subcellular Distribution of Radioactivity of Rat Kindney after Oral Administration with ^{14}C-BHT
——: single oral administration with ^{14}C-BHT
– – –: pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks before single oral administration with ^{14}C-BHT

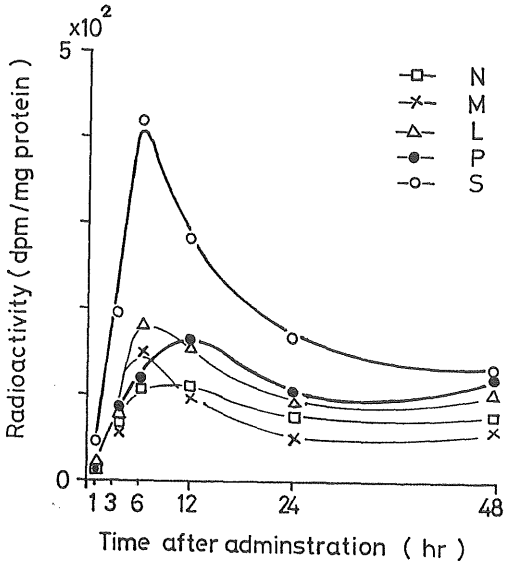


Fig. 2. Time-course of Changes in Specific Radioactivity in Subcellular Fractions of Rat Kidney after Oral Administration with ^{14}C-BHT

にその後は急速に減少した．また，核，重ミトコンドリア，軽ミトコンドリア分画の経時変化も同様に6時間目にピークを持つが，ミクロソーム分画だけは，12時間目にピークを有していた．特にミクロソーム分画は，24時間目より48時間目の方が高い比放射活性を示した．前処理群では総放射活性は常に対照群より低くなっていた．経時変化は，軽ミトコンドリア，ミクロソーム，上清は6時間目にピークを持ち，核，重ミトコンドリアは12時間目にピークを持っていた．Table 1 は，各分画の放射活性の分布を経時的にあらわしたものである．対照群，前処理群ともに総放射活性の約60%が上清中に，約20%が核分画中に存在していた．核，重ミトコンドリア中の

Table 1. Time-course of Changes in Radioactivity in Subcellullar Fractions of Rat Kidney after Oral Administration with ^{14}C-BHT

	Fraction group		Time after administration (hr) 1	3	6	12	24	48
% of Total radioactivity	N	C	18	18	20	19	19	20
		T	—	18	15	18	18	—
	M	C	8	6	5	7	6	9
		T	—	5	5	7	7	—
	L	C	8	4	5	8	7	13
		T	—	5	5	7	7	—
	P	C	8	8	6	12	14	16
		T	—	10	12	10	15	—
	S	C	58	64	64	54	54	42
		T	—	62	63	58	51	—

C: single oral administration with ^{14}C-BHT
T: pretreated with 0.6% BHT in diet for four week before single oral administration with ^{14}C-BHT

放射活性の割合の時間変動はあまりないが，上清は6時間目をピークに減少し，ミクロソーム分画は，わずかに増加の傾向を示した．

実験2．腎上清および血清の Sephadex によるゲルろ過 1) Sephadex G-25 によるゲルろ過 ^{14}C-BHT投与後 3, 6, 12, 24時間目の腎上清分画を Sephadex G-25 で分析した結果を Fig. 3, 4 に示す（前処理群は 6, 12時間のみ）．投与後各時間とも，void volume の位置（ピークA）と低分子領域に放射活性が認められ，ピークAとタンパクのピークは一致した．このことより，腎上清中にはタンパク結合の放射性物質と遊離型の放射性低分子化合物が存在することがわかった．ピークA，低分子領域の放射活性ともに6時間目が最も高い値を示すが，時間経過にともなって，低分子領域の放射活性が消失するので，Aはその比率が相対的に増加する傾向がみられた．各時間における，総放射活性に対するAの割合を Table 2 に示した．前処理群は，対照群より常に高い割合を示した．^{14}C-BHT 投与後3時間目の低分子領域における放射活性は低いため，はっきりしたピークは認められないが，6時間目になると Fraction No. 15 に明らかなピークB，Fraction No. 23-24 にピークCを生じた．24時間には，低分子領域の放射活性が低下するが，わずかにピークB，Cは存在していた．

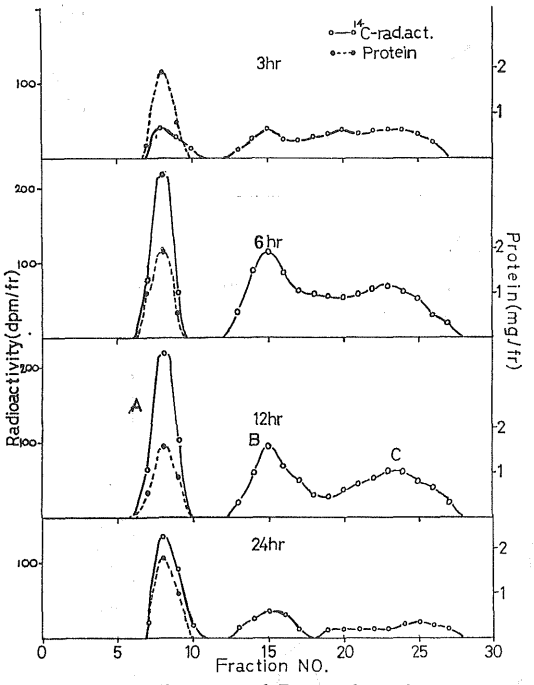


Fig. 3. Gel Filtration of Rat Kidney Supernatant Fraction on Sephadex G-25 after Oral Administration with ^{14}C-BHT

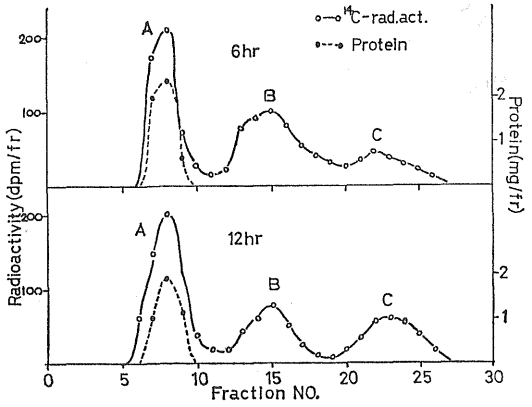


Fig. 4. Gel Filtration of Rat Kidney Supernatant Fraction of Sephadex G-25 after Oral Administration with ^{14}C-BHT (pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks)

Table 2. Time-course of Changes in Radioactivity binding Protein in Rat Kidney Supernatant Fraction after Oral Administration with ^{14}C-BHT

% of Radioactivity binding Protein

Group	Time after administration (hr) 3	6	11	24
C	14	27	32	55
T	—	36	45	—

C: single oral administration of ^{14}C-BHT
T: pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks before single oral administration with ^{14}C-BHT

2) Sephadex G-200 によるゲルろ過 タンパクに結合している放射活性物質のパターンをさらに詳しく調べるために行なった．^{14}C-BHT 投与後6時間目の前処理群の腎上清を Sephadex G-200 で分画した結果を Fig. 5 に示した（対照群も同じパターンを示した）．放射活性はA，B，Cの3つの大きなピークに分離されたが，タンパクは，2つのピークと Fraction No. 27 に肩がみられた．ピークA，Bはタンパクのパターンとほぼ一致している．また，ピークCは，タンパクの肩と一致しており，他の2つのピークの比放射活性にくらべて高いことがわかった．

Fig. 6 は，6時間目の前処理群の血清について Sephadex G-200 で分画した結果である（これも対照群，前処理群とも全く同じパターンであった）．血清で

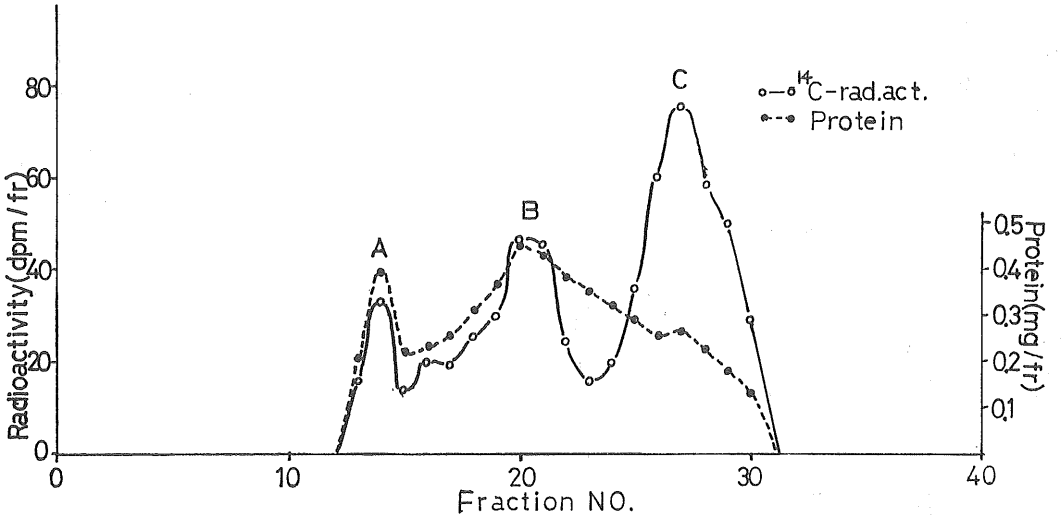


Fig. 5. Gel Filtration of Rat Kidney Supernatant Fraction of Sephadex G-200 after Oral Administration with ^{14}C-BHT (pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks)

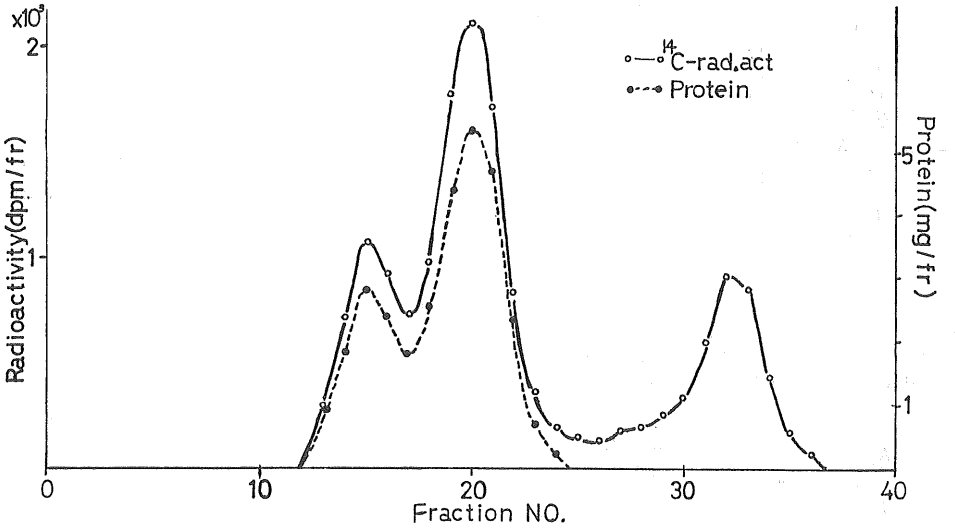


Fig. 6. Gel Filtration of Rat Serum of Sephadex G-200 after Oral Administration with ^{14}C-BHT (pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks)

は，放射活性のピークとタンパクのピークが全く一致することから，^{14}C-BHT およびその代謝物と，タンパクとの結合性には特異性がないと考えられる．しかし，対照群と前処理群の比放射活性を計算すると，前者では254dpm/mg protein であるのに対して，後者では 385 dpm/mg protein と約1.5倍にもなっていた．

実験3．尿中代謝物の検索 Fig. 7 は Daniel[2]らの抽出法にしたがって得た各分画をそれぞれの展開溶媒で展開した後，1週間オートラジオグラフィーにかけた図である．標品は，ギブス試薬により発色させたスポットを示した，F_1 は原点に放射活性スポットが存在し，F_2 は，Rf 値 0.56, 0.47, 0.40 と異なる3点に放射活性スポットを認めたが，標品のいずれとも一致しなかった．F_3 は Rf 0.45 の位置に大きなはっきりしたスポットとしてあらわれ，BHT acid のRf 値と一致することからそれと考えられる．また，F_4, F_5 もそれぞれ，Rf 0.80, 0.86 にスポットがあったが，標品の値と一致しなかった．

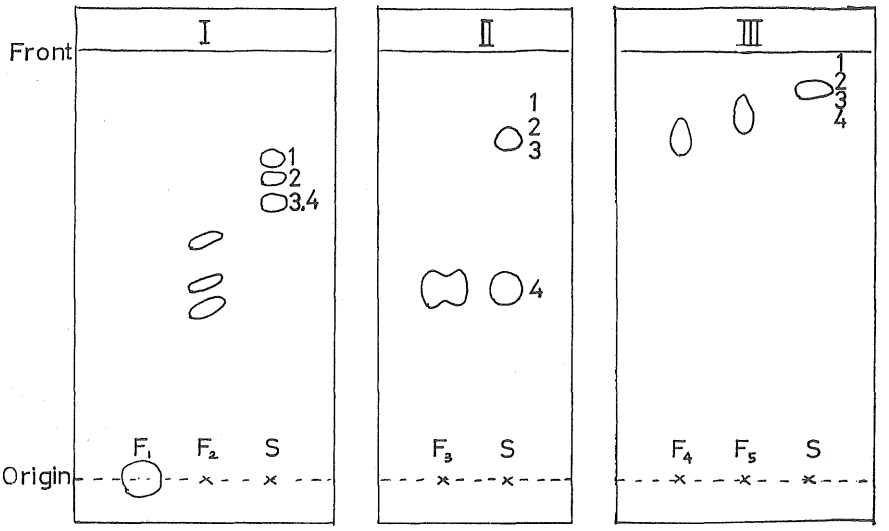


Fig. 7. Thin Layer Autoradiograms of Solvent Fraction of Metabolites in Rat Urine
Develop solvent; I. benzene : ethanol (9 : 1)
II. n-butanol saturated with 2N-NH_3
III. n-butanol : acetic acid : water (12 : 3 : 5)
S; Standard 1) BHT 2) BHT ald. 3) BHT alc. 4) BHT acid.

考　　察

実験1の結果が示すように，腎臓における総放射活性は^{14}C-BHT 投与後6時間目に最も高い値を示し，細胞内の分布は，上清分画に約60%と最も多く，核，ミクロソームの順で少なくなり，重ミトコンドリアと軽ミトコンドリアはほぼ同量であった．対照群では，ミクロソームのピークは12時間目にあるのに対し，前処理群では，軽ミトコンドリア，上清と同じ6時間目にピークが移行していること，およびミクロソームの比放射活性の上昇（24時間目より48時間目の方が高い値を示している）などから，上清分画中の放射活性物質の，ミクロソーム分画への移行も考えられるが，詳細な検討が必要である．

前処理群では，総放射活性がすべての時間で対照群にくらべて低くなっているが，これはBHT 投与ラットの肝ミクロソーム薬物代謝活性が上昇するという報告[11]などを考えると，前処理によって，BHT の肝臓代謝が促進されているためと思われる．

腎細胞内で最も高い放射活性をもつ上清中の放射活性物質の挙動を調べるために Sephadex G-25 を用い，タンパク結合型と遊離型の放射活性物質に分け，そのパターンを時間を追って調べた結果，各時間におけるタンパク結合型の割合が増加することが実験2より明らかになった．薬物が尿中排泄される際には，糸球体ろ過と，近位尿細管分泌によりおこなわれ，タンパクに結合した薬物はろ過されずに低分子の物質だけがろ過される．尿細管に入った後は尿細管上皮細胞の脂質関門の性質から極性代謝物およびイオンは，ほとんど再吸収されずに尿中に排泄される．また中川[2]らの報告によれば，^{14}C-BHT 投与ラット血清中の放射活性のタンパク結合型と遊離型の比率および経時的変化は，ピークにずれはあるが，腎上清と大変良く似たパターンを示している．これらのことから，腎上清中および血清中のタンパク結合型放射活性の増加は，低分子領域の極性代謝物が尿中に排泄されることによると考えられる．

腎上清分画におけるタンパクに結合している放射活性物質は，Sephadex G-200 により3つのピークに分かれ，ピークA，Bの比放射活性は，ほぼ同じであるが，ピークCは高い値を示した．結合しているタンパクの性質や結合部位，さらには，これら3つのピークの経時的変化なども今後さらに検討の必要がある．

血清中のタンパク結合部分の放射活性は，2つのピークを持ち，タンパクのパターンと全く一致することから結合タンパク特異性は認められなかったが，前処理群では，比放射活性が対照群の1.5倍もの値を示している．前処理により，血清タンパクの比放射活性が高くなることは，BHT の長期投与における蓄積性や，毒性発現の原因の一つとも考えられる．

BHT の尿中代謝物の分離，同定に関しては多くの報

告[2,13,14]があるが今回の実験においては，腎中の ^{14}C-BHT の代謝物との相関関係を調べるために尿中代謝物の分離を行なった．今回の実験においては，尿中の主な代謝物であるとされている BHT acid が分離，検出されたが，他の分画部分については，標品と一致せず，確認されなかった．Daniel[2] らは pH 3 でほぼ完全に加水分解が行なわれた，F_1 には約 10% 程度の放射活性しか認めていないが，今回の実験では，F_1 には約 50% の放射活性が残存していた．これは，pH 3 では，グルクロン酸抱合などは加水分解されないと考えられるので，さらに酵素処理によるなど抽出法を改良して検討してみたい．尿中代謝物は，抽出操作中の artifact によるスポットである可能性もあるのではっきりしないが，F_2 に 3 個，F_1, F_3, F_4, F_5 にそれぞれ 1 個ずつ，合計 7 つの代謝物が存在することも考えられるので，今後腎中の遊離の代謝物の分離，同定もあわせてさらに検討していきたい．

結　語

^{14}C-BHT の投与により，腎細胞内分布および腎上清中の放射活性物質の挙動と時間的変動，尿中代謝物の検索を行なった．

謝辞　本研究にあたり御協力下さった当部の小林博義氏，米山允子氏，馬渕依子氏，市川久次氏に感謝いたします．

文　献

1) Ladomery, L. G., A. J. Ryan, and S. E. Wright : *J. Pharm.*, 19, 383, 1967

2) Daniel, J. W. Goge, and D. I. Jones : *Biochem. J.*, 106, 783, 1968

3) Johnson, A. R. and F. R. Hewgill : *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 39, 353, 1961

4) Johnson, A. R. and E. S. Holdsworth : *J. Nurt. and Diet.*, 5, 147, 1968

5) Creaven, P. J., W. H. Davies, and R. T. Williams : *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 485, 1966

6) 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, 1970

7) Coppinget, G. M. and T. W. Campbell : *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 743, 1953

8) Patterson, M. S. and R. C. Green : *Analytical Chem.*, 37 854, 1965

9) 平田　明：オートラジオグラフィー，放射線医学総合研究所養成訓練部全課程テキスト

10) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, R. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951

11) Gilbert, D. and I. Golberg : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965

12) 中川好男，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2, 5 1976

13) Akagi, M. and I. Aoki : *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 161, 1962a

14) Akagi, M. and I. Aoki : *Ibid.*, 10, 200, 1962b

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 17-19, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命（第4報）
ラットにおける体内分布ならびに排泄

小林 博義*, 市川 久次*, 米山 允子*, 馬渕 依子*, 伊川 三枝子*
中川 好男*, 平賀 興吾*

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats
4. Distribution and Excretion after Subcutaneous Administration

HIROYOSHI KOBAYASHI*, HISATSUGU ICHIKAWA*, MASAKO YONEYAMA*, YORIKO MABUCHI*, MIEKO IKAWA*, YOSHIO NAKAGAWA* and KOGO HIRAGA*

The absorption, distribution and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) were studied with subcutaneous dose of BHT-^{14}C in rats, and the following results were obtained.

1) Absorption and distribution of BHT-^{14}C in tissues after subcutaneous dose were slow and low, excretion of it in urine and feces for 3 days was only about 5 percent of total amount of administration.

2) Olive oil solution of BHT-^{14}C injected subcutaneously was stayed for a long time, after 3 days the olive oil solution was found around the injection point. Radioactivity of the skin (g wet tissue) around the injection point was 11.6% of total injection dose.

緒　　言

著者[1-4]らは，これまで酸化防止剤として広く用いられているジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体におよぼす影響について検討を加え報告してきた．BHTの体内分布，排泄については，経口投与によるDaniel[7]らの報告があるが，皮下投与による結果の報告はないようである．化合物の生体に対する性質を明らかにするには，種々の投与経路での検討が要求される．今回著者らは，BHT-^{14}Cを用いて，ラットに皮下投与し，投与後の体内分布ならびに排泄，さらに皮下注射部位における滞留についても検討を加えたので報告する．

実験材料ならびに方法

1. 使用動物

Wistar-SLC系ラット雄(生後8週令，体重297±18g)を用い，温度25±1℃，湿度55±1%に調整された飼育室にて，1群3匹とし各群金属ケージに入れ，飼料は日本クレア製固型飼料（CE-2）を，水は水道水を自由に摂取させた．

2. 試薬ならびに試料

使用した試薬ならびに試料（BHT-^{14}C）は市川[6]らと同様のものを使用した．

3. 投与方法ならびに測定方法

1群3匹とし，ラットの背部にBHT-^{14}Cオリーブ油溶液を皮下投与（2.2 μCi/0.2 ml/rat）し，投与後1, 3, 6, 12, 24, 72時間，7日後に屠殺し血液，血清，各種臓器（肝臓，腎臓，脾臓，心臓，肺，小腸，脳，精巣，脂肪）を採取した．尿，糞については72時間にわたって代謝ケージを用いて採取した．

放射能の測定法は，市川[6]らの方法に準じて行なった．

結果ならびに考察

BHT-^{14}Cをラットの皮下に投与し，投与後経時的に放射能の体内各組織への分布ならびに尿，糞への排泄，さらに投与部位皮下への滞留について検討し結果はFig. 1, 2, Table 1に示した．血液中の放射能は7日間にわたって徐々に増加し，血清中は12時間までは急激な増加

* 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. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Subcutaneous Dose of BHT-^{14}C (2.2μCi/Rat)

Tissues	Blood	Serum	Spleen	Liver	Kidney	Heart	Intestine	Lung	Brain	Testis	Fat	Urine	Feces	Skin
Hours														
1	14080[1)]	1700	925	1160	1111	873	730	1074		667	447	1370	640	195450[2)]
3	15240	2601	914	1520	1685	803	1850	1321	1613	649	504	677		
6	15640	4689	1086	2022	1681	929	2663	1678	960	679	608	828	173	
12	18680	5127	1317	2950	1849	971	3124	2184	1028	741	770	2395	40345	
24	17000	4905	1487	3090	2239	980	3580	3049	645	889	967	5653	83057	133930
72	19400	5838	1550	3200	2902	1281	3225	5283	874	832	1312	4392	104927	546510
168	25400	6918	1990	3522	3039	1348	2227	9072	992	992	1826			

1) dpm/g wet Tissue, value=mean of 3 experiment,
2) just after administration.

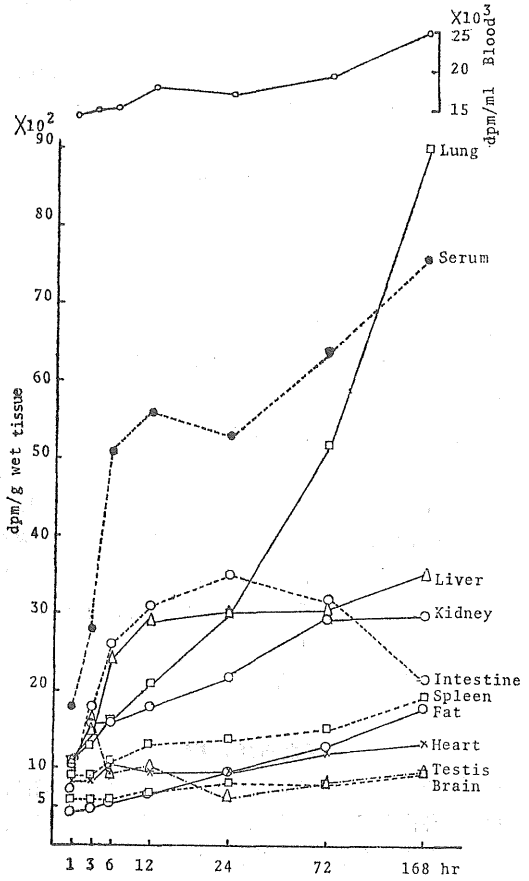


Fig. 1. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Subcutaneous Dose of BHT-^{14}C (2.2μCi/Rat)

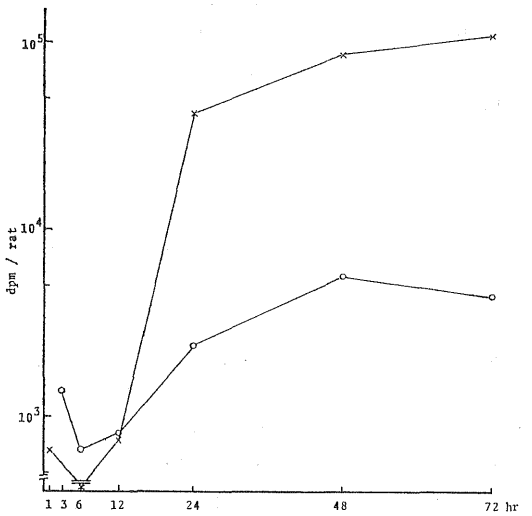


Fig. 2. Changes in Urine and Eeces Level of Radioactivity with Time after Subcutaneous Dose of BHT-^{14}C (2.2μCi/Rat)
○ Urine × Feces

が以後は比較的緩慢な増加であった.

臓器では肺を除いては全体的に低く（湿重量g当りの放射能），血中の濃度と相関しているものと考えられ，7日間にわたって，徐々に増加するのが認められた（Fig. 1では小さなピークがあるようにみえるが，量そのものが低く，とくに意味あるものとは思えない）が，その中でも，肝臓，腎臓，小腸(糞への排泄器官)の24時間以後に比較的高く分布していた．これは，肝臓は解毒器官として，腎臓，小腸は後述するように，尿，糞への排泄が時間的には遅いが，かなり認められ，これらは排泄器官としての意味をもつものであると考えられる．経口投与[6)]における場合と比較すると吸収（分布）は時間的にも遅く，その量も非常に少ない．とくに肝臓において初期には少なく，この結果は鈴木[5)]らによる BHT の経口，

皮下投与時にみられた肝重量増加に対する相違を説明可能にするものと考えられる．肺については時間とともに直線的に増加することが認められたが，この意味については明らかではない．

尿，糞への排泄は24時間以後急速に高まり，とくに糞への排泄は尿に比べかなり高く，3日間の総排泄量は全投与量の5.0％に達した．しかし血液，臓器への吸収分布は非常に遅く，尿，糞への排泄も約5％ということから，皮下投与の場合は吸収そのものがほとんどされていないことが予想された．

皮下投与注射部位の皮膚を切除し，その湿重量g当りの放射能を検討したところ Table 1 に示した如く，皮膚切除時における技術的問題は残るが，3日後も注射部位周辺の皮下に湿重量g当り全投与量の約11.6％のものが残存していた（皮膚切除時注射部位周辺に投与したオリーブ油溶液と推定できる油状物質が認められ）ことより，皮下投与においては，ほとんど吸収されていないと推定される．これは，1. BHT の問題であるのか，2. オリーブ油溶液の問題であるのか，3. 皮下投与という投与方法の問題であるのか，の3点について検討を加え，経口投与における場合との相違について明らかにしたいと考えている．

文　献

1) 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，22，231，1970

2) 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

3) 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

4) 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：東京衛研年報，26-2，1，1975

5) 鈴木英子：未発表

6) 市川久次，小林博義，米山允子，馬渕依子，伊川三枝子，中川好男：東京衛研年報，27-2，1，1976

7) Daniel, J. W. and J. C. Gage : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 405, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 20-27, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラット肝臓および腎臓の酵素活性におよぼす影響

馬渕 依子*, 伊川三枝子*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Enzymatic Activities of Rat Liver and Kidney

YORIKO MABUCHI* and MIEKO IKAWA*

緒　言

油脂等の抗酸化剤として使用されているジブチルヒドロキシトルエン（以下 BHTと略す）が，肝臓重量を著しく増加させることはよく知られており，この増加は，粗面小胞体の増加ならびに薬物代謝酵素が誘導されるフェノバルビタール型の肝臓肥大であり，肝臓の組織にどんな障害もおこさないといわれている[1-5]．また肝臓の酵素に対する影響を調べた一連の報告も出されていてラットへのBHT投与によってグルコースフォスファターゼ（G6Pase）の減少と，グルコース6フォスフェイト脱水素酵素（G6P-DH）の活性の上昇が報告されている[6-9]．

一般に，毒性試験を行う場合，肝臓および腎臓の検査としては血清中の酵素の測定という間接的な方法によっている．今回我々は，肝臓および腎臓自体の何種類かの酵素活性を直接測定することによって，BHT をある程度高濃度（飼料中1％）で投与した時，肝臓および腎臓にどんな影響を及ぼすかを検索した．

実験材料ならびに実験方法

Ⅰ．使用動物，試料および投与期間：日本クレア K. K. のSD-JCL系ラットの雄を生後4週令で入手し，一週間予備飼育後5匹ずつ金網ケージに収容し室温25°，湿度55％の環境下で実験を開始した．BHT は和光純薬製特級を用い，日本クレア製粉末飼料 CE-2に，0％，1％の割合で混合し固型飼料化して，対照群および投与群に自由摂取させた．投与期間は1，2，4週間とし，投与群対照群共各期間について10匹ずつ，合計60匹を使用した．なお，水も自由に摂取させた．ラットはすべて断頭によって屠殺後解剖し，肝臓および腎臓を採取した．

Ⅱ．検査項目および検査方法

1．体重，飼料摂取量，器官重量の測定

摂取量および体重は投与期間4週間のものについて毎週測定し，また解剖時に肝臓および腎臓重量を測定した．

2．血清生化学検査

総たんぱく質（TP と略），グルコース量（GLU），尿素窒素（UN），総コレステロール量（CHO），アルブミン量（ALB），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（GOT），アルカリホスファターゼ（ALP），コリンエステラーゼ（ChE），について自動分析装置：日立M-400により測定を行った[10]．

3．肝臓成分および酵素の定量

肝臓を冷した0.25Mしょ糖，1mM EDTA でかん流した後，こまかく切って，ポッター型のテフロンホモジナイザーでホモジナイズし10％ の肝臓ホモジネイト（0.25M しょ糖，1mM EDTA中）を作成した．操作はすべて氷の中で冷しながら行った．このホモジネイトの一部を Sorvall の冷凍遠心機で，9,000 g，20分遠心し，沈でんをさらに2回 0.25M しょ糖，1mM EDTA 液で洗い，上清を集めて Beckman の超遠心機 L3-50 で105,000 g 1時間遠心し，沈でんをミクロソーム分画とした．G6Pase，G6P-DH，乳酸脱水素酵素（以下 LDHと略す），マレイン酸脱水素酵素（MDH），イソサイトレイト脱水素酵素（ICDH），コハク酸脱水素酵素（SDH），酸性ホスファターゼ（ACP），GPT，GOT については10％ホモジネイトで活性を測定し，P-450，アニリン水酸化活性（以下 AHと略す），アミノピリン脱メチル活性（APDM），ニトロアニソール脱メチル活性

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　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

(NADM) についてはミクロソーム分画で測定を行った．なおすべて，酵素活性の測定は，あらかじめ検討した至適条件に従って行った．

なお使用した動物数は，P-450, AH, APDM, NADM についてのみ対照群，投与群各8匹ずつ，それ以外の全項目については10匹ずつであった．

① 肝臓成分

DNA および RNA：肝臓に氷冷精製水を加えホモジナイズして 10% ホモジネイトとし，この 2 ml をとり Schmidt-Thannhauser-Schneider 法[11] で，酸可溶性画分および脂質の除去を行い，5%トリクロル酢酸(TCA)中で 90° 15分加熱して全核酸を加水分解し，遠心分離して得た上清について糖成分によりDNA[12]およびRNA[13]をそれぞれ定量した．

水分：肝臓を60°で乾燥させ水分を重量法で定量した．

全たんぱく量およびミクロソームたんぱく量：得られた10% ホモジネイトおよびミクロソーム分画について Lowry 法[14]によってたんぱく質の定量を行った．

② 肝臓酵素

G6Pase：Baginski[15] らの方法により活性の測定を行った．反応液の組成は，25 mM グルコース6リン酸，10 mMヒスチジン緩衝液 (pH 6.5)，0.5 mM EDTA，125 mM しょ糖から成り，遊離したリンは，Fiske-Subbarow 法[16]で，定量した．

G6P-DH：Balinsky[17] らの方法により，あらかじめ 25° に保温しておいた反応液にホモジネイトを加え厚さ 1cm の石英セルに入れて直ちに 340nm の吸収の増加をの分光光度計により測定した．各々の試薬の最終濃度は，2mM グルコース6リン酸(以下G6Pと略す)，0.8 mM酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP)，100 mM トリス緩衝液 (pH 8.3) であった．

GPT および GOT：GPT および GOT は，血清生化学検査と同じく，自動分析装置（日立 M-400）を使って測定した．

LDH：Wröblewski らの方法[18]により測定を行った．あらかじめ25° に保温した反応液にホモジネイトを加え直ちに，Cary 17 により 340 nm の吸収を測定した．試薬濃度は，52mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)，0.66mM ピルビン酸，0.18mM還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) であった．

MDH：MDH の測定は，25°で5分以上保温しておいた反応液にホモジネイトを加え，直ちに Cary 17 で 340 nm の吸光度を測定した．各試薬濃度は，91 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)，38 mM L-アスパラギン酸，1.2mM α-ケトグルタレイト，0.22mM NADH であった[19]．

ICDH：あらかじめ 25° に保持した反応液にホモジネイトを加え，直ちに 340nm の吸光度の上昇を測定した[20]．試薬濃度は，トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.5) 80mM，DL-イソサイトレイト 3.7mM，塩化ナトリウム 42mM，NADP 0.32mM, 硫酸マンガン 3.9mM であった．

SDH：25° にした反応液にホモジネイトを加え，直ちに Cary 17 により 400nm の吸光度の減少を測定した[21]．反応液中の試薬濃度は，26mM コハク酸ナトリウム，10mM シアン化カリ，1mM フェリシアン化カリ，0.14 Mリン酸緩衝液であった．

ACP：Bessey らの方法[22]により Triton X-100 を使用してライソゾームをこわし，ACP の全活性を測定した．試薬濃度は，60mM 酢酸緩衝液 (pH 4.7)，2.5mM パラニトロフェノールリン酸，0.15% Triton X-100 であり，遊離したパラニトロフェノールを，アルカリで発色させて測定した．

③ 薬物代謝酵素

P-450：リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に，ミクロソームを均一に分散させ，厚さ 1cm のセル2本に分注し（緩衝液の最終濃度は 0.1M)，Cary 17 により 500nm から 400nm までのベースラインをかいた後，一方のセルにヒドロサルファイドを約 6mg 加え混ぜ対照セルとし，試料セル側に，一酸化炭素ガスを20秒通気した後ヒドロサルファイドを同様に加え，直ちに 500nm から 400nm までの吸光度をかき，ベースラインで補正して450nm と490nmの差をよみ取った[23]．

AH：Table 1 の様な組成の反応液にミクロソームを加えた 3 ml を，37° 10分間保温したあと，塩化ナトリウム 1 g，エーテル 25ml を加え10分振とうし，遠心してエーテル層を 20ml とり，1%フェノール (0.1 N 水酸

Table 1. Composition of incubation mixtures

	Enzyme activity measured		
	AH	APDM	NADM
Phosphate buffer (mM)	100 (pH7.4)	100 (pH7.4)	100 (pH7.9)
$MgCl_2$ (mM)	10	10	10
NADP (mM)	0.27	0.13	0.13
G6P (mM)	6	3	3
G6PDH (IU/ml)	0.5	0.5	0.5
Substrate and concn. (mM)	Aniline 10	Amino-pyrine 16.7	Nitro-anisole 6.7
Semicarbazide (mM)	—	5(pH7.4)	—

Table 2. Body, liver and kidney weights of male rats fed diets containing 1% BHT for 1, 2 and 4 weeks

Weeks		Body weight (g)	Liver weight (Right) g	Liver weight (Right) g/100gB.W.	Kidney weight (Right) g	Kidney weight (Right) g/100gB.W.	Kidney weight (Left) g	Kidney weight (Left) g/100gB.W.
1	Control	191±11	9.6±1.1	5.03±0.50	0.80±0.07	0.42±0.04	0.77±0.08	0.41±0.04
	BHT	162± 9***	11.2±0.9***	6.89±0.54***	0.70±0.05***	0.43±0.02	0.69±0.07**	0.42±0.03
2	Control	240±13	12.4±1.4	5.19±0.59	0.99±0.10	0.41±0.05	0.99±0.08	0.41±0.04
	BHT	203±12***	16.6±1.9***	8.14±0.74***	0.88±0.09*	0.43±0.04	0.87±0.12**	0.43±0.05
4	Control	323±15	14.1±1.4	4.36±0.28	1.06±0.09	0.33±0.02	1.02±0.09	0.32±0.02
	BHT	277±22***	16.9±1.9***	6.11±0.41***	1.00±0.13	0.36±0.03***	0.97±0.13	0.35±0.03***

Values are the mean ± S.D.
* Significantly different from control $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Table 3. Food and drug consumption of male rats fed diets containing 1% BHT for 4 weeks

Duration of feeding (days)	Food g/rat/day		Drug g/kg B.W./day
	Control	1% BHT	1% BHT
4— 6	19.6	15.9	1.16
11—13	23.8	22.2	1.15
18—20	21.3	23.2	0.97
26—28	24.3	25.3	0.87

化ナトリウム）3.0ml 加えて，5分振とうした．遠心分離して得たフェノール層の620nmの吸光度を30分後に測定した[24]．AHは，パラアミノフェノール生成量として測定した．なお，Table 1は，文献をもとに至適条件を検討し，基質濃度などを一部変更したものである．

APDM：この活性はホルムアルデヒド生成量によって定量した[25]．反応液を37° 10分インキュベートした後，15%硫酸亜鉛を 1.0ml 加え，5分放置後，飽和の水酸化バリウムを 1.0ml 加え5分おいたのち遠心分離して上清 2.5ml とり，Nash 試薬[25] を 1.0ml 加えて 60° 30分加熱後，415nmの吸光度を測定した．Nash 試薬は，2mM 酢酸アンモニウム，0.05M酢酸，0.02Mアセチルアセトンから成る溶液である．

NADM：この活性はニトロフェノール生成量により測定した[3]．反応液を 37° 10分保温したあと，塩化ナトリウム 2g と，エーテル20ml，加え10分振とう後遠心分離したエーテル層を16ml とり，0.1N水酸化ナトリウムを2.0ml 加えて10分振とうした後，水酸化ナトリウム層の 430nm の吸光度を測定した．

4. 腎臓酵素の定量

腎臓を，肝臓同様10%ホモジネイトを作成し，このホモジネイトについて，肝臓と同じ測定方法を使って，ICDH, LDH, MDH, SDH, G6Pase, ACP, GOT, GPTを定量した．また，Na, K-ATPase の定量も行った．

Na, K-ATPase：140mM 塩化ナトリウム，14mM塩化カリウム，5mM塩化マグネシウム，3mMアデノシントリホスフェイト（ATP），50mM イミダゾール塩酸（pH 7.2）を含む酵素液と，阻害剤として0.5mM，ウワバインを入れた酵素液を別々に 37° で10分インキュベート[26]し，遊離したリンについて定量し[16]，ウワバインで阻害された活性を Na, K-ATPase 活性とした．

結　果

1. 体重，飼料摂取量，器官重量の測定

体重，肝臓および腎臓重量について得られた結果は，Table 2 に，飼料摂取量は Table 3 に示した．投与開始直後の投与群に体重の減少がみられ，4日目以降は，体重増加の速度も摂取量も対照群にほぼ近くなったが，投与群の体重は対照群に比べ小さかった．

肝臓重量は，絶対量も，体重 100g あたりの重量も，投与1週間目から顕著に大きくなるのがみられた．

腎臓重量は，絶対量では投与1週目で左右とも投与群が小さく，2週目でも小さいがその程度は1週目よりは対照群に近く，4週目では差がみられなかった．体重 100g あたりでは，1，2週目では差がなく，4週目のものでは投与群の方が大きくなっていた．

2. 血清生化学検査

結果は Table 4 に示した．GLU が1週目から減少し，UNは，やはり1週目から有意な増加がみられた．またCHOは，1週目に最大に増加し，2週目は増加量が少なくなり4週目では有意差がみられなかった．また，ALP と ChE は，2，4週目のもので増加してい

Table 4. Biochemical values in serum of male rats fed diets containing 1% BHT for 1, 2 and 4 weeks

Weeks		T-P (g/dl)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	CHO (mg/dl)	ALB (g/dl)	GPT (K.U./ml)	GOT (K.U./ml)	ALP (KA-U/dl)	ChE (ΔpH)
1	Control	6.1±0.3	172±13	21.0±1.7	61.1± 4.7	4.2±5.8	47.9±5.8	147±16	69.4±17.4	0.16±0.02
	BHT	5.9±0.3	144± 8***	22.8±1.4**	84.8±14.9***	3.9±0.3*	53.4±5.7	144±13	92.0±44.4	0.17±0.04
2	Control	6.3±0.2	187±11	21.0±1.2	64.9±12.3	4.3±0.2	39.6±5.5	129±14	59.0±15.8	0.13±0.03
	BHT	6.5±0.4	158±14***	23.3±1.7***	78.9±13.0*	4.4±0.2	41.1±5.8	132±11	108.3±18.9***	0.17±0.04***
4	Control	6.7±0.1	192±20	21.3±2.2	61.0± 7.3	4.5±0.1	39.5±4.4	111±16	55.4± 9.6	0.12±0.03
	BHT	6.7±0.3	172± 7***	25.0±2.1***	61.8±11.3	4.4±0.3	39.9±3.7	112± 7	105.7±10.1***	0.18±0.03***

Value are the mean ± S.D.
* Significantly different from control $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Table 5. Weight of some components (water, protein, DNA, RNA) in rat liver fed diets containing 1% BHT for 1, 2 and 4 weeks

Weeks			Water content (g)	Total protein (g)	DNA (mg)	RNA (mg)	Microsomal protein (mg)
Weight/g Tissue	1	Control	0.716±0.004	0.192±0.019	1.48±0.12	8.36±0.69	32.4±2.8
		BHT	0.727±0.016	0.196±0.020	1.32±0.09***	7.76±1.41	34.6±3.6
	2	Control	0.749±0.011	0.163±0.013	1.35±0.04	6.50±0.25	41.3±3.1
		BHT	0.750±0.015	0.161±0.014	1.09±0.08***	5.53±0.38***	44.5±5.2
	4	Control	0.742±0.016	0.150±0.011	0.88±0.19	7.09±0.58	30.9±2.5
		BHT	0.745±0.017	0.150±0.014	0.64±0.17***	5.91±1.05***	30.9±3.5
Weight/Liver	1	Control	6.85±0.75	1.83±0.27	14.2±2.0	80.5±13.6	310±38
		BHT	8.06±0.67***	2.17±0.15***	14.7±1.1	86.6±18.1	387±63***
	2	Control	9.31±0.98	2.02±0.25	16.8±2.1	80.9± 9.4	511±38
		BHT	12.42±1.50***	2.67±0.45***	18.1±2.7	91.7±13.5	739±139***
	4	Control	10.45±1.02	2.11±0.27	12.3±2.8	99.6± 9.4	434±45
		BHT	12.61±1.42***	2.54±0.40**	10.8±3.1	99.8±20.2	520±63***

Values are the mean±S.D.
** Significantly different from control $P<0.01$, *** $P<0.001$

るのが観察され，GPT, GOT はどの例についても有意な差がみられなかった．

3. 肝臓成分および酵素の定量

① 肝臓成分

DNA，RNA量，水分，全たんぱく量，ミクロソームたんぱく量についての結果は Table 5 に示した．肝臓1g あたりの水分，全たんぱく質量，ミクロソームたんぱく質量は，対照群と投与群の間にどれも差がみられなかった．しかし，投与群の肝臓は対照群に比べ，大きくなっていたため肝臓あたりのそれらはすべて，1，2，4週間投与群とも有意の差がみられた．また，肝臓1g あたりの DNA 量はすべて有意差が 0.001 以下で投与群で減少していたが，肝臓あたりでは対照群との間に差がみられなかった．

なお，ここでみられた対照群と投与群の間の有意な差は，2週間投与のもので最大で，4週目のものでは逆に，1週目より下がっている傾向がみられた．

② 肝臓酵素

Table 6. Changes in liver enzyme activities brought about by 1% BHT

	Weeks		G6P ase $\times 10^1$	ACP	G6P-DH	LHD $\times 10^2$	GOT $\times 10^3$	GPT $\times 10^3$	MDH $\times 10^2$	ICDH	SDH
Activities/g Tissue	1	Control	54.4±14.9	92.4±6.0	10.18±1.26	15.9±3.7	55.1±4.3	15.0±2.5	16.0±1.2	41.0±3.9	1.84±0.33
		BHT	59.5±11.5	*** 82.1±7.9↓	*** 17.70±3.71↑	** 11.4±3.5↓	*** 43.6±4.1↓	*** 23.5±4.0↑	*** 13.6±1.1↓	** 45.8±3.9↑	1.80±0.25
	2	Control	73.3±0.9	100.6±18.7	9.51±2.10	15.2±1.6	54.8±5.6	20.0±6.0	14.4±2.0	36.8±3.0	2.21±0.38
		BHT	*** 48.2±4.7↓	*** 77.9±9.2↓	*** 7.10±1.11↓	*** 11.1±0.8↓	*** 38.7±1.5↓	20.4±1.7	*** 11.°±1.3↓	37.1±3.8	2.14±0.21
	4	Control	85.8±10.0	104.6±13.7	8.42±1.98	14.1±1.7	58.1±5.6	22.8±3.6	12.8±2.3	32.2±1.3	2.03±0.18
		BHT	*** 54.5±4.2↓	*** 82.6±6.8↓	*** 3.18±0.30↓	*** 9.2±1.6↓	*** 35.8±2.9↓	25.8±3.6	*** 9.9±1.5↓	31.0±2.8	*** 1.79±0.14↓
Activities/Liver	1	Control	523±162	883±93	97±18	150±36	526±62	143±28	153±15	403±61	17.7±4.2
		BHT	* 656±8.5↑	910±47	*** 197±50↑	128±44	484±37	*** 260±36↑	151±17	*** 509±44↑	20.2±3.8
	2	Control	908±119	1,235±158	117±24	187±17	679±84	248±87	178±23	450±57	27.3±4.4
		BHT	* 794±98↓	1,292±224	118±24	183±24	641±76	*** 337±39↑	182±29	*** 616±105↑	*** 35.4±5.3↑
	4	Control	1207±170	1,468±179	120±37	200±38	815±77	321±61	179±32	453±39	28.6±3.5
		BHT	*** 922±116↓	1,397±189	*** 54±9↓	* 157±38↓	*** 606±79↓	*** 435±75↑	167±35	*** 523±58↑	30.1±3.1

Values are given in ΔE/min. for G6P-DH, LDH, MDH, ICDH and SDH, μmoles of decomposed substrates per hour for G6Pase and ACP, and K.U. for GPT and GOT as means±S.D.

* Significantly different from control $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

G6Pase, G6P-DH, GPT, GOT, LDH, MDH, ICDH, SDH, ACP について得られた結果は，Table 6 に示した．各酵素は主として，G6Pase はミクロソームに，ACP はライソゾームに，G6P-DH, LDH は上清に，GPT, GOT, MDH は上清とミトコンドリアに，ICDH, SDH はミトコンドリアに存在する．

肝臓1g あたりの活性は，LDH, GOT, ACP で1週間投与のものですでに減少しているのがみられた．この減少の度合は，2週間投与群でさらに大きくなり4週目では最も減少していた．G6Pase は，1週目で対照群との間に差はみられなかったが，2週間，4週間投与では，対照群の60%前後にまでおちていた．これも，2週目より4週目の方がその減少の割合は大きかった．G6P-DH と GPT は，1週間投与群で活性の著しい上昇がみられた．しかし，2週間，4週間投与群では，GPT の活性は対照群のレベルまで下がった．一方，G6P-DH は，2, 4週間投与群では逆に，著しい活性の減少がみられ，4週間のものでは，対照群の4割以下の活性しか示さなかった．ICDH も，1週目で活性の上昇がみられたが，GPT 同様，2, 4週では差がみられなかった．MDH は，1, 2, 4週とも活性の減少が測定された．SDH は，1, 2週では差がなかったが，4週目で活性の低下が観察された．

肝臓あたりの全活性量の面からこれらの酵素をみると，投与群の肝重量は1週間目から顕著に増加していたため，ACP, MDH は，1g あたりの活性が著しく減少していたにもかかわらず，どの群にも対照群との間の差はみられなかった．LDH, GOT もやはり，1, 2週間投与群では対照群との間に差がみられなくなった．しかし，4週間投与群では，肝重量の著しい増加にもかかわらず全活性量は，顕著に低下していた．G6Pase も，1週目で上昇したが，2週目で対照群より有意に全活性量が少なくなり4週目では，その低下がより顕著であった．G6P-DH は，1週目では全活性量が対照群の2倍にも上昇したが，2週目で同レベルに下がり，4週目では半分以下にまでおちていた．GPT と ICDH の肝臓の全活性量は，全期間を通じて対照群より高レベルであったが，その差は，1週目より2週目，2週目より4週目の方が減少していた．SDH は2週目に対照群より増加していたが，1, 4週では差がみられなかった．ICDH, SDH でみるかぎり，ミトコンドリアの酵素は他と比べ影響を受けにくい様に思われた．

③ 薬物代謝酵素

薬物代謝酵素活性の結果は，Table 7 に示した．P-

Table 7. Processing enzyme activities in rats fed diets containing 1% BHT for 1, 2 and 4 weeks

Weeks		per mg microsomal protein				per liver			
		P-450	AH	APDM	NADM	P-450	AH	APDM	NADM
1	Control	15.4±3.5	23.0±3.1	402±63	72.5±9.5	4.14±1.39	6.04±0.84	106±15	19.3±4.3
	BHT	17.0±4.7	22.4±3.8	425±69	70.9±7.3	5.62±2.72	6.92±1.13	133±23**	22.6±6.5
2	Control	21.1±1.6	21.2±1.4	289±30	94.5±9.2	6.89±0.99	7.07±0.85	94±14	30.0±3.3
	BHT	23.7±3.3	23.4±0.9*	348±36***	91.6±7.5	10.80±2.86***	11.31±2.29***	159±41***	39.2±9.5
4	Control	36.3±4.7	41.0±5.3	310±20	120.7±15.6	11.57±1.81	12.84±1.74	99±13	39.4±8.6
	BHT	38.3±4.2	39.5±2.7	321±30	144.8±15.2***	14.55±2.79*	14.89±2.31	121±21	55.2±11.6**

Values are given for μmoles of decomposed substrates per hour for AH, APDM and NADM, and absorbance of 450nm for P-450 as means ±S.D..

* Significantly different from control $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Table 8. Changes in kidney enzyme activities brought about by 1% BHT

	Weeks	G6P ase	ACP	Na, K-ATP ase	LDH	GOT	GPT	MDH	ICDH $\times10^{-3}$	SDH $\times10^{-4}$
Activities/mg protein	1 Control	3.84±0.60	1.32±0.21	4.58±0.91	0.390±0.053	172±38	16.9±2.6	1.06±0.14	69± 7	62± 9
	1 BHT	4.39±0.47*↑	1.36±0.23	4.50±0.93	0.349±0.035	142±23*↓	17.8±2.6*	0.92±0.12*↓	73±14	59± 8
	2 Control	3.28±0.54	1.29±0.22	3.63±0.88	0.291±0.060	142±21	14.4±2.0	1.02±0.11	77±27	76±15
	2 BHT	3.17±0.53	1.26±0.25	2.57±0.70**↓	0.259±0.049	119±18*↓	13.2±2.0	0.91±0.09*↓	81±18	76±11
	4 Control	3.71±0.41	1.52±0.27	6.88±0.86	0.262±0.040	163±19	16.2±2.1	1.32±0.16	89±17	93±15
	4 BHT	3.20±0.30***↓	1.39±0.23	5.80±0.85**↓	0.245±0.033	136±46	15.1±3.3	1.15±0.15*↓	94±31	97±22

Values are given in ΔE/min. for LDH, MDH, ICDH and SDH, μmoles of decomposed substrates per hour for G6P ase, ACP and Na, K-ATP ase, and K.U. for GPT and GOT as means ±S.D..

* Significantly different from control $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

450 は，投与群のミクロソームたんぱく質あたりの活性は，1，2，4週間投与とも上昇の傾向はみられたが有意な差はなかった（$P<0.05$）．しかし，肝臓あたりの活性は，ミクロソーム量の増加を反映して 2, 4 週目とも上昇していた．AH は，ミクロソームあたりの活性は，2週間投与群で有意に上昇し，肝臓あたりでも2週目が最も上昇していた．APDM も，ミクロソームあたりではAH同様に，2週目で著しい上昇を示したが，1，4週では有意な差がみられなかった．しかし，肝臓中の全活性は上昇していた．NADM は，4週目のみ，ミクロソームあたりも肝臓あたりも上昇しているのがみられた．P-450 も AH も APDM も，2週間投与群が最も高い活性を示し（ミクロソームたんぱく質あたりも，肝臓の全活性も）ていて，4週間投与群では下がってきていた．NADM のみが，例外的に4週目ではじめて上昇が観察された．

4. 腎臓酵素の定量

得られた結果は，Table 8 に示した．腎臓の場合は肝臓の様な肥大はないので，値はすべて，たんぱく量(mg)あたりとして示した．ACP, LDH, GPT, ICDH, SDH はどれも有意な差はみられなかった．G6Pase は1週目は，投与群の方が上昇していたが，2週目で差がなくなり，4週目では逆に減少していた．G6Pase と同じくミクロソームに含まれる酵素である Na, K-ATPase は，腎臓の機能に対して大きな役割をはたしている酵素であるが，1週目では差はみられなかったが，2, 4 週では投与群の減少がみられた．GOT は，1週目，2週目で有意に減少し，4週目はその傾向はみられたが有意差はなかった．MDH はすべて投与群に活性の低下がみられた．

考　　察

肝臓は，物質代謝に関連した一連の複雑な機能をいとなむ器官であり，薬物等の物質が体内に取り込まれた時すみやかに肝臓に運ばれ代謝され，腎臓によって排泄される．その際，肝臓及び腎臓が，薬物によって影響を受ける可能性は他の器官より大きいと考えられる．ふつう毒性試験では，肝臓および腎臓の機能検査として血清酵素を測定している．

今回我々は，肝臓および腎臓が，なんらかの影響を受けている場合，それを検出するためのひとつの試みとして肝臓および腎臓のいくつかの酵素あるいは成分について検討した．

BHT による肝肥大は，先に述べたように，生体側のポジティブな反応であり組織的にはどんな悪影響も及ぼさないとされている[1-6]．しかし，これはもちろんBHTの濃度と投与の期間の長さによって左右されると考えられる．そこで我々は，飼料中に１％の濃度で BHT を混ぜるというかなり高負荷をかけた実験を行い，肝臓および腎臓について調査した．この濃度では投与群の体重は対照群に比べかなり低かったため正確な意味での比較はできなかったが，肝臓１g あたりと肝臓あたりの酵素活性およびたんぱく質量，水分，核酸量など，対照群と投与群の比較を行った．

Table 5 に示された結果からみて，BHT投与による肝臓重量の増加は，主としてたんぱく合成の増加にともなう細胞の肥大であり，細胞数の増加が主原因とは考えられない．また BHT 投与により肥大した肝臓においては，ミクロソームたんぱく量も増加はしているが，それ以外のたんぱく質の増加もまた顕著であったことからみて，BHT 投与により誘導されることが知られているミクロソームの薬物代謝酵素の増加だけではなく，ミクロソーム中の他の酵素，およびミクロソーム以外に存在する酵素の活性が上昇している可能性が示唆された．しかし，肝臓1g あたりで考えると，投与１週目のもので活性の上昇がみられたものもいくつかあったがすでに減少していたものもあり，２週目，４週目になるに従い，測定したほとんどすべての酵素の活性が顕著に減少していた．また，肝臓の全活性量を考えた場合も，肝臓重量の著しい増加にもかかわらず，全活性量が顕著に減少しているものが投与４週目のものでは多くみられ，たんぱく合成等が活発に行われ重量が顕著に増加した状態においてすら対照群に及ばないことがわかった．また薬物代謝酵素も，投与２週目のものでは増加しているが４週目になるとその度合が下がっていた．これらのことを考えあわせると，飼料中に混合した１％ BHT をラットに投与した場合，投与期間と共に，肝臓中のいくつかの酵素活性が著しくおさえられ，肝臓の肥大にもかかわらず機能の低下がみられた．BHT は，抗酸化剤として広く食品中に添加され長期的に人体に摂取されていることを考えると，肝臓の酵素活性を含め肝臓に及ぼす影響をさらに検討していく必要があると考えられる．

また，Feuer ら[6]は，BHT を投与すると G6P-DH が上昇し，G6Pase が減少するとしている．今回の実験でもはじめは G6P-DH の上昇がみられたが２週目からは減少していたことや他の多くの酵素もまた減少していたことからみて，G6P-DH と G6Pase のみが BHT 投与によって特異的に変動するものとは考えられない．

また，肝臓自体の酵素と比較する意味で，従来行われている血清による肝機能検査を行ったが，GPT，GOT は対照群との間に全く差がみられなかった．これはさらに肝臓自体の GPT, GOT の量の変動とも考えあわせ今後検討していかねばならない．また ChE の上昇がみられたが，雄ラットのこの活性は非常に低く，測定値自体に問題があるので検討する必要がある．

BHT による腎障害は，市川ら[27]により報告されている．今回の実験でも，腎臓中の酵素の活性が Table 8 に示したとおり減少しており，血清中の UN の上昇もみられ，肝臓同様，腎機能の低下が示唆された．なお肝臓に比べ活性の低下の度合が低いのは，BHT の両器官中の濃度差によると考えられる[28]．

しかし，これらの酵素活性の低下が，肝臓機能の低下，つまりこれらの酵素の合成の低下ではなくて，BHT あるいはその代謝物による直接的な酵素の阻害の可能性もある．その場合，組織中の BHT 量が減少すれば酵素活性は回復するから，今後，回復実験を行ったり，測定法を検討して，BHT を酵素液から除く方法も考える必要がある．また今回は，薬物代謝酵素以外は，ホモジネイト自体を使って測定し，肝臓あたりの活性を出したが，今後，細胞分画を行い，各分画あたりの活性を比較検討し，系統だった検査方法を確立していかねばならない．

要　　約

１％BHT(飼料中)を 1，2，4 週間，ラットに投与し，肝臓および腎臓への影響を，これらの組織のホモジネイトについて何種類かの酵素活性をはかることにより検討した．その結果，肝臓ではほとんどの酵素活性の著しい低下が投与時間が長くなるに従いあらわれ，腎臓でもその程度は肝臓ほどではないが，同様な傾向がみられ，BHT の肝臓および腎臓への影響が示唆された．

謝　辞　本研究にあたり御協力下さった当部の小林博

義氏，米山允子氏，市川久次氏に感謝いたします．

文　献

1) Deichmann, W. B., J. J. Clemmer, R. Rakoczy, and J. Bianchine : *Archs. Ind. Hyg.*, 11, 93, 1955
2) Brown, W. D. A. R. Johnson, and M. W. O'-Halloran : *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 37, 533, 1959
3) Gilbert, D. and L. Golberg : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965
4) Lane, B. P. and C. S. Lieber : *Lab. Invest.*, 16, 342, 1967
5) Botham, C. M., D. M. Conning, J. Hayes, M. H. Litchfield, and T. F. Mcelligott : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 1, 1970
6) Feuer, G., L. Colberg, and J. R. LePelley : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 235, 1965
7) Gaunt, I. F., G. Feuer, F. A. Fairweather, and O. Gilbert : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 433, 1965
8) Gaunt, I. F., D. Gilbert, and D. Martin : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 445, 1965
9) Feuer, G., I. F. Gaunt, L. Golberg, and F. A. Fairweather : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 457, 1965
10) 中川好男，福田向江，柴　英子，平賀興吾：東京衛研年報，25, 599, 1974
11) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, 164, 747, 1946
12) Dische, Z. : *Mikrochemie*, 8, 4, 1930
13) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, 161, 293, 1945
14) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
15) Baginski, E. S., P. P. Foa, and B. Zak : *Anal. Biochem.*, 21, 201, 1967
16) Fiske, C. A. and Y. Subbarow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
17) Balinsky, O. and R. E. Bernstein : *Biochim. Biophys. Acta.*, 67, 313, 1963
18) Wroblewski, F. and J. S. Ladue : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90, 210, 1955
19) Bergmeyer, H. U. : *Methods of Enzymatic Analysis*, 613, 1967, Academic Press, New York
20) Bregmeyer, H. U. : *Methods of Enzymatic Analysis*, 624, 1967, Academic Press, New York
21) Slater, E. C. and W. D. Bonner : *Biochem. J.*, 52, 185, 1952
22) Bessey, O. A., O. H. Lowry, and M. J. Brock : *J. Biol. Chem.*, 164, 321, 1946
23) Omura, T. and R. Sato : *J. Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964
24) Kato, R. and J. R. Gillette : *J. Pharmac. Exptl. Therap.*, 150, 279, 1965
25) Nash, T. : *Biochem. J.*, 55, 416, 1953
26) Nakao, T., M. Nakao, N. Mizuno, Y. Komatsu, and M. Fujita : *J. Biochem.*, 73, 609, 1973
27) 市川久次，林田志信，米山允子ら：東京衛研年報，23, 345, 1971
28) 市川久次，小林博義，米山允子ら：東京衛研年報，27-2, 1, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 28-46, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラットにおける2年間摂取実験の病理組織学的研究．BHT慢性毒性試験の途中経過報告

藤井　孝*, 阿部幸恵*, 矢野範男*, 湯澤勝広*, 平賀興吾*

Histopathological Study of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Dietary Administration to Rats for 2 Years An Interim Report of Chronic Toxicity Studies of BHT in Rats

TAKASHI FUJII*, YUKIE ABE*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

Butylated Hydroxytoluene（以下 BHT と略す）は食品添加物としてばかりでなく合成樹脂などの安定剤としても用いられ，その安全性については多くの関心を集めている．これまで当部では BHT に関して主にラットを用いた種々の実験を行い結果を得ている．ラットでは経口急性毒性（LD_{50}）は雌雄とも 2.0 g/kg であり，3カ月間の添加飼料摂取実験では特に雄の肝臓の体重比重量が増加し組織所見では肝細胞の腫脹が認められた[1]．6カ月間の実験でも肝臓重量の増加がみられたほか，組織所見では腎臓の尿細管上皮細胞の変化が認められた[2]．また BHT 摂取による出血傾向も確認された[3-6]．今回はラットを用い2年以上にわたる長期連続摂取実験を行い BHT の最大無作用量の推定，催腫瘍性の有無などの検討を試みた[7]．本報告は実験開始後2年目までの病理組織学的検索の結果である．

実験材料および実験方法

実験動物ならびに飼育環境：日本クレア株式会社にて barrier-system 下で生育された SD-JCL ラット雌雄で生後4週のものを購入した．1週間予備飼育後，実験開始時の平均体重は雄 105 g，雌 96g であった．動物は室温 25±1℃，湿度 50±5%，照明を午前6時より午後6時までに制御した barrier-system 飼育室にて前面と床が網のステンレス製個別飼育ケージに収容し自動給水装置（細菌ろ過器付）のついたベルト式飼育架台で飼育した．

試料および投与方法：BHT は和光純薬株式会社製（Lot No. PAK 3582, KIK 5562）の結晶性粉末（mp. 69.5℃）を用いた．BHT は濃度が 0.005%，0.02%および0.32%になるよう飼料に添加し，これら各濃度の添加飼料を動物に自由に摂取させることにより投与を行った．飼料は日本クレア株式会社製粉末飼料 CE-2（粗蛋白 24.0%，粗脂肪 3.5%，粗繊維 4.5%，粗灰分 6.0%，可溶性窒素物 56.0%，カルシウム 1g/100g，リン 1g/100 g，マグネシウム 0.23 g/100g，ナトリウム 0.40 g/100g，カリウム 0.63 g/100g）を用いこれに BHT を混合し固型飼料化した．対照としては BHT を混合しない固型飼料 CE-2 を用いた．

投与期間および群別：投与期間は 3, 6, 12, 24カ月間および終生とした．動物は摂取する飼料中の BHT 濃度によって 0.00（対照群），0.005, 0.02 および 0.32%群の4群に分け 3, 6, 12カ月間投与では各群雌雄5匹，24カ月間投与では各群雌雄10匹，終生投与では，対照群，0.005% 群は雌雄25匹，0.02, 0.32% 群は雌雄15匹とした．

検索方法：投与期間終了または頻死と認めた動物は断頭屠殺し採血を行った後，解剖し肉眼的所見をとった．摘出器官・組織は 3, 6, 12カ月の投与期間終了時は心臓，肝臓，腎臓，脾臓，甲状腺，副腎，盲腸であり24カ月ではこれらに脳，下垂体，肺，胃，小腸，膵臓，膀胱，精巣，前立腺，精嚢，子宮，卵巣および腫瘍発生部位を加えた．終生投与を含めてそれぞれの投与期間途中での死亡例または頻死と認め屠殺した例は剖検を行い死後変化（自己融解）の強いものを除いて諸器官・組織，腫瘍発生部位を摘出した．摘出した器官・組織，腫瘍は

* 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

10%緩衝ホルマリン液で12時間振盪固定後，静置して1週間固定を行った．その後，定法に従ってパラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン重染色，PAS染色標本の他，必要に応じてアザン・マロリー染色，鍍銀染色標本，凍結切片による脂肪染色標本などを作製，これらにより病理組織学的検索を行った．

実験結果

病理組織学的検索の結果は Table 1，2 に特に腫瘍については Table 3 に示した．実験開始後12カ月までの投与終了時の屠殺解剖例での組織変化は少数の例外を除いて24カ月に比べて変化の程度も弱く，変化の多様性にも乏しかった．組織検索の結果は 1. 各投与期間終了時の屠殺解剖例の一般組織所見，2. 各投与期間途中および終生投与の頻死屠殺あるいは死亡解剖例の一般組織所見，3. 腫瘍の発生状況，に分けて詳述する．

1. 各投与期間終了時の屠殺解剖例

肝臓では小葉中間部から周辺部の肝細胞に軽度な腫脹が認められ，3カ月の0.32%群雄に5例中3例，雌に1例，6，12カ月の0.32%群雄に各5例中1例みられたが24カ月では認められなかった．この変化は雌雄とも0.32%群にのみ認められた．小葉周辺の肝細胞の空胞化が12，24カ月の対照群を含む雌雄の各群でみられた．空胞は小滴からそれらが合体して大きくなったものまでみられ24カ月では殆どの例で変化部位の肝細胞は印環細胞様となりその容積を増していた．空胞は Sudan black 染色で陽性の脂質であった．この変化は12カ月では雌で投与量に比例してやや顕著になる傾向を示したが雄では対照群，0.32%群で僅かに強いのみで雌のような傾向は認められなかった．24カ月では雌雄とも投与量との関連は判然とせず変化の程度は対照群雄，0.005%群雌雄，0.02%群雌，0.32%群雄で強くなっていた．小葉中間部から周辺部の肝細胞で細胞質の好塩基性物質が軽度に減少し細胞膜周辺に凝集して核周囲がやや明調化しているのが6，12カ月の雄の投与群にのみ認められた．6カ月では0.32%群に1例であったが12カ月では0.005，0.02%群に各1例，0.32%群に3例認められ投与量に比例して増加し，6カ月よりも多く出現した．この変化は24カ月では認められなかった．単核球の小集簇とそれを囲むエオジン濃染・均質化した細胞質をもつ肝細胞とから成る小巣が散在しているのが対照群を含む雌雄の各群でみられた．変化は3カ月から24カ月までみられ3カ月と24カ月の雄の各群では中等度の変化を示す例も散見された．小胆管の軽度な増殖が12カ月でみられ24カ月では中等度以上の増殖を示す例も認められた．変化は対照群を含む雌雄各群にみられ雌よりも雄に，12カ月より24カ月に多く出現した，この他，12カ月まではみられず24カ月で認められた変化としては小葉周辺部肝細胞の細胞質の網状化が雄の対照群を含む各群に，また微小肉芽腫，胆管周囲の線維化などが対照群を含む雌雄の各群にみられた．これら24カ月での変化は雌よりも雄に多く認められた．

腎臓では糸球体・尿細管の小変性巣が皮質に散在しているのがみられ，糸球体の軽度萎縮，ボーマン嚢外葉との癒着，尿細管上皮細胞の水腫様変性，間質の軽度細胞浸潤などを包含していた．この変化は対照群を含む雌雄の各群でみられ，3，12カ月の雄では投与量に比例して強くなる傾向が認められたが雌では判然とせず雄に比べ各群とも変化も弱く出現例数も少なかった．24カ月では変性巣は少なくなり，代って線維化を伴う限局性壊死巣が各群に散見された．遠位尿細管および集合管の管腔拡張が一部の上皮細胞の扁平化を伴って対照群を含む雌雄各群で3カ月から認められ，12，24カ月と経過するにつれて変化は強くなる傾向を示したが雌雄とも投与量との関連は判然としなかった．エオジン淡染または濃染の蛋白円柱が尿細管中に認められ管腔の拡張を伴う例もみられた．変化は対照群を含む雌雄各群で6カ月からみられ，12，24カ月とやや強くなる傾向を示したが雌雄とも投与量に比例して強くなる傾向は認められなかった．主部尿細管上皮細胞の軽度の腫脹が雄では3，6カ月の対照群を除く各群に，雌では3，6カ月の対照群を含む各群にみられたが投与量に比例して例数が増加する傾向は示さず，雌雄とも12カ月では認められなかった．主部尿細管上皮細胞の空胞変性が3カ月の対照群雌雄，6カ月の対照群雄を除く各群にみられ3カ月の雌では投与量に比例して変化が強くなる傾向を示した．腫脹，空胞とも3，6カ月では雄よりも雌に多く出現し12カ月では雌雄とも認められなかった．24カ月では上皮細胞の変性は腫脹，空胞，エオジン濃染蛋白滴の出現，好塩基性の著増など多彩であり対照群を含む各群の約半数に認められた．ボーマン嚢外葉上皮細胞が立方上皮化している腎小体が3～6個みられる例を12カ月では雄の対照群を含む各群に，24カ月では雌の0.32%群を除く各群に認めたが投与量との関連は判然としなかった．ボーマン嚢および尿細管の基底膜の肥厚が12カ月では雌の対照群を除く各群に，24カ月では雌雄の対照群を含む各群にみられた．12カ月では雌より雄に多く出現し24カ月でもこの傾向はみられたが投与量との関係は判然としなかった．この他に24カ月になると変化が極度に顕著となり嚢胞腎とした例もみられた．これは体積を増した腎臓で観察視野全体にエオジン淡染あるいは濃染の蛋白円柱で充填され拡張した尿細管・嚢胞が多数みられそれらを区切るように肥厚した基底

膜，線維が走り，また染色性が低下・消失，部分的に融解した糸球体が散在し，間質には限局性の細胞浸潤がみられるなど多彩な変化を示すものであった．この変化は対照群を含む雄の各群で散見されたが雌では0.02%群で1例みられたのみであった．また出現例数は0.005%群雄で多かったが投与量に比例して例数が増加したり出現率が上昇する傾向はみられなかった．

心臓では限局性の心筋変性とその部位への細胞浸潤とが認められた．心筋はエオジン濃染で核は濃縮しており，浸潤細胞はリンパ球，組織球で軽度な線維化もみられた．この変化は雄では対照群を含む各群に3カ月からみられ，12，24カ月と顕著になる傾向を示し線維化も強くなったが雌では12カ月の0.32%群に1例，24カ月の対照群に1例みられたのみであった．この他，24カ月では対照群雄，0.02%群雌に各1例の血管周囲炎を認めた．

甲状腺ではろ胞の増加が雌雄とも3カ月から12カ月まで対照群を含む各群に散見されたが12カ月の対照群雌で2例みられた他は1例ずつの出現であり投与量との関連は判然としなかった．

副腎では皮質の内出血が12カ月の対照群，0.32%群の雌に各1例認められた．変化は24カ月で強くなり内出血巣も大きく数も増し皮質細胞の壊死を惹起し，これらが脱落した跡は空洞化していた．これは雄では0.005%群に1例みられたのみであるが雌では対照，0.02%群に各5例，0.005，0.32%群各1例と雄よりも雌に多く認められた．しかし投与量との関連はみられなかった．24カ月ではこの他に皮質細胞の結節性増殖が0.005%群雌に1例，髄質細胞の結節性増殖が0.005%群雄に2例，0.02%群雄に1例認められた．

胃では24カ月の対照群雄に1例，前胃部粘膜下織の結合織の増殖がみられた．

脾臓では24カ月の雌雄の対照群を含む各群に顕著な髄外造血像が投与量と関連なく散見された．

精巣では24カ月で大きさを減じ精細管の縮小，精子・精細胞などの消失を示す例が0.005%群に2例，0.02%群に1例みられ，血管周囲炎が0.02%群を除く各群に1例ずつ認められた．

子宮では24カ月で内膜のポリープ様増殖が対照群に2例，0.02，0.32%群に各1例みられた．

2. 各投与期間途中および終生投与死亡例

ここでの死亡例とは頻死と認め屠殺した例も含めてある．3カ月投与では死亡例はみられなかった．6カ月投与では0.02%群雄で1例が投与14週間で死亡したが自己融解のため組織所見は得られなかった．12カ月投与では，0.32%群雄で1例が投与2週で死亡し肉眼的に胸腔内出血を認めたが自己融解のため組織所見は得られなかった．また対照群雌で1例（Rat No. 1113, 29週令）が投与24週で死亡し，胸腺腫，肝臓細網肉腫の発生を認めた．24カ月および終生投与での死亡例の例数と腫瘍を除く組織所見は Table 2 に示す如くである．組織変化は投与終了時の解剖例でみられたものとほぼ同様であるが死亡までの投与期間によって各例の変化像には差異が認められた．死亡例は投与18カ月以後に集中しており組織変化もこの時期から各器官・組織で顕著になった．腎臓では対照群を含む各群で嚢胞腎が散見されるようになり心臓では心筋の限局性線維化，血管周囲炎も認められるようになった．またこれ以後，脾臓の間質増殖，血管周囲炎，精巣の間質性浮腫，血管周囲炎，副腎の皮質細胞の壊死などがみられたが，いずれの変化も投与量との関連を示す傾向は判然としなかった．ただ0.005%群，特に雄では肝細胞の空胞変性，腎臓の変化などの強い例が他の各群に比べ多くみられたのが目立った．24カ月および終生投与の各群の死亡数を合計して24カ月までの死亡率を算出すると下表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	25.7% (9/35)	45.7% (16/35)	24.0% (6/25)	28.0% (7/25)
雌	28.5% (10/35)	40.0% (14/35)	28.0% (7/25)	48.0% (12/25)

これを18カ月までででみると次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	2.8% (1/35)	5.7% (2/35)	8.0% (2/25)	4.0% (1/25)
雌	0% (0/35)	14.2% (5/35)	8.0% (2/25)	12.0% (3/25)

また対照群では雄は投与76週，雌は投与79週で最初の死亡例を認めたが投与各群ではそれ以前に1～5例の死亡がみられた．

3. 腫瘍の発生状況

腫瘍の発生状況については Table 3 に示す如くである．腫瘍は組織検索で確認したもののみとし自己融解などで検索できなかった例は除外した．このため腫瘍発生率などの算出に用いた母数は解剖例数とは必ずしも一致しない．3，6，12カ月投与での腫瘍発生は前述した如く12カ月の対照群雌に1例（Rat No. 1113, 29週令）胸腺腫，肝臓細網肉腫が認められたのみであった．24カ月投与終了時解剖例の腫瘍発生率(腫瘍をもっていた動物数/組織検索を行った動物数）は次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	55.5% (5/9)	28.5% (2/7)	80.0% (4/5)	28.5% (2/7)
雌	83.3% (5/6)	66.6% (4/6)	80.0% (4/5)	100.0% (3/3)

組織検索では皮下の線維腫が対照群雄，0.02%群雌に各1例，線維肉腫が0.02%群雄に1例（Rat No. 1142）認められた（Fig. 1, 2）．乳腺の腫瘍が雌にのみ認められ腺腫が対照群に1例，線維腺腫が対照，0.02%群に各3例，0.005%群に4例，0.32%群に1例みられた（Fig. 3, 4）．耳垢腺腫瘍が0.02%群雄に1例（Rat No. 1154）認められた．これはZymbal腺腫瘍とも呼ばれ僅かに皮脂腺構造を残し多くは乳頭腫または孤立性角化を示す扁平上皮癌であった（Fig. 5）．唾液腺癌が0.32%群雄に1例(Rat No. 1137)認められた．この腫瘍は充実性でやや豊富な結合織で明瞭に結節を形成しており腺房構造は消失し内出血，壊死を呈する部分もみられた．細胞は核が染色質に富み異型性が認められ分裂像も多く，巨細胞も混在していた．またこの動物は肝癌も保持していた．これは肝臓にヘマトキシリンやや濃染の細胞質をもつ細胞形不整，大小不同の肝細胞が結節を形成していたもので，これらの多くは周囲の肝細胞より大型で核は不整に陥凹し分裂像も認められた．下垂体では色素嫌性腺腫が対照群雌雄と雌の投与群に各3例，雄の0.005, 0.02%群に各1例みられた（Fig. 7）．また巨細胞が散見され腺癌とした例が対照群雌(Rat No. 1189), 0.32%群雄(Rat No. 1137）に各1例認められた（Fig. 8）．甲状腺では腺腫が対照群雄，0.005%群雌に各1例みられた(Fig. 9)．副腎では褐色細胞腫が対照群雌雄に各2例，0.005%群雌雄，0.02, 0.32%群雄に各1例認められた(Fig. 10)．24カ月投与途中および終生投与死亡例の腫瘍発生率は次の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	57.1% (4/7)	53.3% (8/15)	75.0% (3/4)	66.6% (4/6)
雌	100.0% (9/9)	85.7% (12/14)	83.3% (5/6)	90.0% (9/10)

組織検索では皮下の線維腫が対照群雌雄，0.005%群雌，0.32%群雌に各1例，0.32%群雄に3例，間葉腫（良性）が0.32%群雄に1例みられ，線維脂肪腫が0.005%群雌に1例認められた．乳腺では腺腫が対照，0.005%群雌に各2例みられ，線維腺腫が対照群雌に3例，0.005%群雌雄，0.32%群雌に各2例，0.02%群雌雄に各1例認められた．唾液腺では0.005%群雄に1例（Rat No. 1258, 101週令）腺癌がみられた．これは多くは乳頭腫状であるが部分的に角化を伴う扁平上皮癌であった（Fig. 6）．胸膜からの中皮腫が瀰漫性に増殖し胸腔内で大きな部分を占めているのが0.02%群雄に1例(Rat No. 1153, 101週令）みられた．これは腫瘍細胞が単層の管状配列を成して増殖しており間質結合織は比較的少量であった．肺では0.005%群雌で1例（Rat No. 0032, 108週令）に線維肉腫が，0.32%群雄で1例（Rat No. 1223, 97週令）に細網肉腫が認められた．腸間膜の線維肉腫が0.32%群雄に1例（Rat No. 1210, 100週令）みられた．これは紡錘形細胞が束状または渦巻状を呈して並びその間隙に比較的多数の脂肪細胞が認められたもので血管も豊富で出血，壊死も顕著であった．肝臓では細網肉腫が対照群雌に2例（Rat No. 1186, 86週令；Rat No. 1275, 96週令），0.32%群雄に1例（Rat No. 1223, 97週令）認められた（Fig. 11）．膵臓では島細胞腫が0.005%群雄に1例みられ，外分泌腺癌が0.005%群雄（Rat No. 0020, 102週令），0.02%群雌（Rat No. 1283, 104週令）に各1例認められた．腺癌は前者は嚢胞を形成して異型性の高い細胞と壊死，出血などを内包しており，後者は一部乳頭腫状を示すが多くは扁平上皮癌の像を呈するものであった（Fig. 12）．この他，間質の線維肉腫が0.005%群雌に1例（Rat No. 0032, 108週令）みられた．これは肝臓，脾臓にも及んでおり核小体のあるやや円形の核をもつ紡錘形細胞から成っていた．なおこの例は肺の線維肉腫ももっていた．胃では腺胃粘膜下織の線維肉腫が対照群雄に1例（Rat No. 0011, 102週令），リンパ肉腫が0.005%群雄に1例（Rat No. 1124, 104週令）認められた．下垂体では色素嫌性腺腫が対照群雄に2例，雌に6例，0,005%群雄に2例，雌に9例，0.02%群雄に1例，雌に4例，0.32%群雌に7例みられた．また色素嫌性腺癌が0.02%群雌に1例（Rat No. 1173, 95週令）みられた．副腎では褐色細胞腫が対照群雄，0.005%群雄に各1例認められた．腎臓では腎芽細胞腫が0.005%群雄に1例（Rat No. 0018, 22週令）みられた（Fig. 13）．膀胱では乳頭腫が0.32%群雌に1例（Rat No. 1269, 82週令）みられ腎臓の腎盂，乳頭にも移行上皮細胞の乳頭腫が認められた．膀胱の乳頭腫は上皮細胞が多層性に増殖して腔内に充満し細胞核にはやや異型性がみられ悪性化の傾向を示していた（Fig. 14）．子宮では平滑筋肉腫が対照群に1例（Rat No. 1182, 86週令）認められた（Fig. 15）．白血病細胞の浸潤が肝臓，腎臓，心臓，脾臓などで認められるのが対照群雄に1例（Rat No. 1222, 108週令）みられた（Fig. 16）．死亡例での腫

瘍を発見した時期によって分類すると，投与12カ月未満（52週，57週令）では18週で0.005%群雄（Rat No. 0018, 22週令）に腎芽細胞腫，43週で0.32%群雄（Rat No. 1150, 48週令）に皮下の間葉腫，45週で0.005%群雌（Rat No. 1187, 50週令）に下垂体の色素嫌性腺腫が認められた．投与12カ月以上18カ月未満（52週以上78週未満，57週令以上83週令未満）では55週で0.02%群雌に1例（Rat No. 1185, 60週令），68週で0.005%群雌に3例（Rat No. 1317, 1198, 1172, 73週令），74週で0.32%群雌に1例（Rat No. 1184, 79週令）下垂体の色素嫌性腺腫が認められた．対照群では雌雄とも投与18カ月（78週，83週令）まで腫瘍は認められず，0.02%群雄にもみられなかった．投与18カ月を過ぎると腫瘍をもった動物が増加し，同一個体で複数の腫瘍をもつ例も多くなった．

総括ならびに考察

以上の成績は Butylated Hydroxytoluene（BHT）の0.00, 0.005, 0.02, および0.32%添加飼料をSD-JCLラットに長期間連続して摂取させる実験の2年（104週）までの病理組織学的検索の結果である．実験は現在も続行しており，終生投与の動物についての観察を行っている．腫瘍を除く一般所見では投与12カ月までにBHTの影響と思われる変化が肝臓，腎臓で認められた．肝臓では肝細胞の軽度な腫脹，空胞変性，細胞質中の好塩基性物質の軽度減少・凝集であり，これらは投与群にのみ認められた変化で投与量に比例して出現例数が増加したり変化が強くなる傾向を示した．24カ月ではこれらの変化のうち空胞変性のみが認められたが投与量との関連はみられず，また投与群にのみ病的変化が生じていたり投与量に比例して変化が強くなる傾向も認められず12カ月までにみられた肝細胞の腫脹・空胞変性などが24カ月の時点で，どのような影響を肝臓に及ぼしたのかは判然としなかった．このことからBHTは投与12カ月までは前述のような変化を肝臓に惹起させるが，これが病的変化，障害へ移行するものではないことを示唆していると考えられる．また福森ら[8]が本実験の中で12カ月の0.32%群の肝細胞を電顕レベルで検索したところ滑面小胞体の増殖がみられたと報告していることからも12カ月までに投与群でみられた肝細胞の腫脹・空胞変性などは化学物質に対する生体の適応現象であろうと思われる．さらに24カ月での肝臓の組織変化は空胞変性（脂肪変性）を含め小胆管の増生，肉芽腫など加令に伴い現われる変化であり，これらが投与によって対照群より早期に顕著になる傾向も認められなかったことを考え併せると腫瘍を除く一般組織検索の結果からはBHT 0.32%添加飼料の24カ月間連続摂取では肝臓に害作用を与えることは殆どないと思われる．腎臓では3カ月で皮質の限局性変性が雄で投与量に比例して顕著になり，尿細管上皮細胞の空胞変性も特に雌で同様の傾向を示したが6，12カ月ではこれらの傾向は認められず加令に伴って現われる尿細管の蛋白円柱，基底膜の肥厚などが対照群を含む各群に散見された．24カ月では加令に伴う変化が対照群を含む各群に顕著に認められたが，いずれも投与量との関連はみられなかった．また投与によって加令に伴う変化が促進される傾向は認められず腫瘍を除く一般組織検索の結果はBHT 0.32%添加飼料の24カ月間連続摂取による腎臓への害作用は殆どないことを示唆していると思われる．投与24カ月までの腫瘍発生状況は結果に述べた如くである．この間に頻発した腫瘍は雌雄の下垂体腺腫，雌の乳腺の腺腫・線維腺腫などであった．下垂体腫瘍（腺腫，腺癌）の発生率（下垂体腫瘍をもっていた動物数／細織検索を行った動物数）は24カ月投与終了時解剖例では次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	33.3% (3/9)	14.2% (1/7)	20.0% (1/5)	14.2% (1/7)
雌	66.6% (4/6)	50.0% (3/6)	60.0% (3/5)	100.0% (3/3)

また24カ月投与途中および終生投与死亡例では次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	28.5% (2/7)	13.3% (2/15)	25.0% (1/4)	0% (0/6)
雌	66.6% (6/9)	64.2% (9/14)	83.3% (5/6)	70.0% (7/10)

これらの表から下垂体腫瘍の発生率は雄では対照群に比べ投与群が低く，投与量との関連は認められず，雌では0.32%群でやや高いがほぼ同率で顕著な差ではない．下垂体腫瘍の自然発生は西部[9]は20カ月のSD-JCLラット雄で9.8%（4/41），雌で22.2%（8/36）としており，森井ら[10]はSD-JCLラット雄(平均670日令，約95週令)で20.3%（22/108），雌（平均701日令，約100週令）で46.9%（60/128）と報告している．初めて下垂体腫瘍を認めた時期は雄では対照群91週（96週令）0.005%群97週（102週令）0.02%群79週（84週令）0.32%群発生なし，雌では対照群79週（84週令）0.005%群45週（50週令）0.02%群55週（60週令）0.32%群74週（79週令）であった．また対照群で下垂体腫瘍が認められる以前に雄

では0.02%群に1例，雌では0.005%群に4例（50週令1例，73週令3例），0.02，0.32%群に各1例みられており雌では対照群に比べ投与群は早期に発生する傾向を示した．

自然発生の下垂体腫瘍の初発時期は Gilbert[11] らは Wistar 系ラットで14カ月（約61週令），西部[9]は SD-JCL ラット雌で14カ月（約61週令），前川[12]らは ACI/N ラットで雄は103週令雌は74週令と報告している．このことから0.005%群雌の50週令での1例がやや早い発生と思われるがその他の例は自然発生時期の範囲内にあると考えられる．また0.005%群雌では対照群より早期に4例の発生をみたが24カ月の時点での発生率は対照群66.6%，0.005%群64.2%と僅かではあるが対照群が高くなっており，早期の発生が発生率を高くする結果とはなっていない．これらのことから投与群での下垂体腫瘍の発生率，発生時期は対照群でのそれと顕著な差異があるとは思えず，下垂体腫瘍の発生と投与との関連を積極的に疑うには至らない．この他，乳腺，副腎での腫瘍も下垂体腫瘍と同様の検討を加えたが投与との関連は見出せなかった．観察した全腫瘍を病理組織学的に良性，悪性に分類し，悪性腫瘍の発生率（悪性腫瘍をもっていた動物数／腫瘍をもっていた動物数）を求めると24カ月投与終了時解剖例では次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	0% (0/5)	0% (0/2)	50.0% (2/4)	50.0% (1/2)
雌	20.0% (1/5)	0% (0/4)	0% (0/4)	0% (0/3)

また24カ月投与途中および終生投与死亡例では次表の如くであった．

	対照群	0.005%群	0.02%群	0.32%群
雄	50.0% (2/4)	55.5% (4/7)	33.3% (3/1)	50.0% (2/4)
雌	33.3% (3/9)	9.0% (1/11)	40.0% (2/5)	11.1% (1/9)

これらの表から対照群に比べ雄では僅かながら投与群の発生率が高く，雌では低くなる傾向を示しているが投与量に比例した変動はみられず悪性腫瘍の発生率と投与量との関連は認められない．悪性腫瘍は対照群では白血病，胃の線維肉腫，下垂体腺癌，子宮平滑筋肉腫が各1例，肝臓細網肉腫が2例であった．また投与群にのみ認められたのは唾液腺癌，膵臓外分泌腺癌が各2例の他，主なものは耳垢腺癌，胸膜中皮腫，肝癌，悪性化を示す膀胱乳頭腫など各1例であった．投与群にのみ認められた悪性腫瘍の自然発生は，唾液腺癌は Glucksmann ら[13]によれば稀であるとしているが前川ら[12]によれば103週令のACI/Nラット雌で唾液腺癌を1例，Gilbert ら[11]は18～20カ月（約78～87週）の Wistar 系ラット雌で顎下腺癌を1例報告している．膵臓外分泌腺癌は Roe ら[14]によれば12カ月（約52週）を過ぎた Wistar 系ラットに3例，Gilbert ら[11]は Wistar 系ラット雄に1例認めている．耳垢腺の扁平上皮癌は Snell ら[15]が21カ月（約91週）の OM ラットに2例，M520 ラットに2例，また Tannenbaum ら[16]が SD系ラットに3例報告している．中皮腫は前川ら[12]が139週令の ACI/N ラット雄で1例に腹膜の中皮腫を観察している．膀胱腫瘍は Snell ら[15]によれば自然発生はいまだに観察していないとしているが前川ら[12]は ACI/N ラットで雄に2例（115～143週令），雌に8例（40～126週令）の乳頭腫を，雌に2例（40～126週令）の移行上皮癌を報告している．このように今回，投与群で観察された悪性腫瘍は殆ど自然発生腫瘍として報告されており，その発生時期にも著明な差異は認められない．さらに投与群の悪性腫瘍は唾液腺癌，膵臓外分泌腺癌が各2例，その他は1例と同一器官・組織での発生例数が少なく，しかもそれらが各群に分散しており特定の悪性腫瘍の発生と投与との関連は窺うべくもない．これらのことから BHT 投与によって悪性腫瘍が誘発される可能性は現時点では無いと思われる．投与24カ月までの死亡状況（3，6，12カ月投与の死亡は除く）は対照群に比べ投与群での死亡が早期に出現する傾向がみられたが24カ月での死亡率には大差なく投与量との関連も認められず BHT 投与による影響はみられなかった．

まとめ

Butylated Hydroxytoluene (BHT) 0.005, 0.02, 0.32%添加飼料で2年間飼育した SD-JCL 系ラットの病理組織学的検索を行った．BHT はラットに著明な組織障害を起さず，腫瘍を誘発しなかった．

文献

1) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22，231，1971
2) 市川久次ら：東京衛研年報，23，345，1972
3) 福森信隆ら：東京衛研年報，25，557，1974
4) 坂本義光ら：東京衛研年報，25，577，1974
5) 中川好男ら：東京衛研年報，25，599，1974
6) 藤井　孝ら：東京衛研年報，25，609，1974
7) 市川久次ら：東京衛研年報，26-2，1，1975
8) 福森信隆ら：東京衛研年報，26-2，22，1975
9) 西部忠幸：奈医誌，27，1，1976
10) 森井外吉ら：実験動物，22，127，1973

11) Gilbert, C., *et al.* : *S. Afr. J. Med. Sci.*, 23, 257, 1958

12) Maekawa, A., *et al.* : *J. Nat. Cancer Inst.*, 55, 1437, 1975

13) Glucksmann, A., *et al.* : *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*, (Turusov, V. S., eds.), 75, 1973, International Agency for Research on Cancer, Lyon

14) Roe, F. J. C., *et al.* : *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*, (Turusov, V. S., eds.), 141, 1973, International Agency for Research on Cancer, Lyon

15) Snell, K. C. : *The Pathology of Laboratory Animals*, (Ribelin, W. E., and McCoy, J. R. eds.), 241, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois

16) Tannenbaum, A., *et al.* : *Cancer Res.*, 22, 1362, 1962

Table 1. Histopathology—summary of observations

Duration of feeding		3 months								6 months								12 months							
		Male				Female				Male				Female				Male				Female			
Concentration	*	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
LIVER	**																								
Focal hepatocyte degeneration/	NO	1	2	5	—	2	4	2	3	3	3	1	5	4	—	4	3	1	4	3	3	2	4	4	2
cellular infiltration	SL	3	2	—	3	3	1	3	2	2	2	3	—	1	5	1	2	3	1	2	1	2	—	1	3
	MO	1	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—
Proliferation of small	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4	3	3	4	4	5	5
bile ducts	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	1	—	1	—	—
Swelling of hepatocytes	NO	5	5	5	2	5	5	5	4	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
	SL	—	—	—	3	—	—	—	1	—	—	—	**1**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Aggregation and decreasing	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	4	4	1	4	5	5	5
in basoplasms of hepatocytes	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**1**	—	—	—	—	—	1	1	3	—	—	—	—
Vacuolation of hepatocytes	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	2	2	3	1	2	1	3	1
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	2	2	2	4	—	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	1	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
KIDNEY																									
Focal degeneration	NO	5	5	3	2	5	5	4	5	2	3	3	3	5	4	3	2	—	—	1	1	3	4	4	4
	SL	—	—	1	2	—	—	1	—	2	2	1	2	—	1	1	3	5	2	3	1	1	1	1	1
	MO	—	—	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	3	1	1	—	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Dilatation of tubules	NO	5	4	5	4	2	5	4	3	2	4	3	5	4	5	5	4	5	1	3	1	2	2	4	3
	SL	—	1	—	1	3	—	1	2	2	1	1	—	1	—	—	1	—	1	1	1	1	2	1	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	1	2	1	1	—	1
Urinary casts	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	2	4	4	5	5	2	3	3	1	—	2	1	2	2	3	3
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3	1	2	2	2	1	—	1	1	2	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	1	—	2	3	2	2	1	2	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Swelling of tubular epithelium	NO	5	3	5	5	4	3	4	4	5	5	4	4	3	5	3	3	5	5	5	4	4	5	5	5
	SL	—	2	—	—	1	2	1	1	—	—	—	1	2	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Vacuolation of tubular	NO	5	4	5	2	5	4	3	—	5	5	4	1	2	4	5	3	5	5	5	4	4	5	5	5
epithelium	SL	—	1	—	3	—	1	2	3	—	—	—	4	3	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thickening of epithelium of	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	—	—	—	1	4	5	5	5
Bowman's capsule	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	5	3	—	—	—	—
Thickening of basement	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	—	—	2	—	4	3	4	3
membrane	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	3	3	—	2	1	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
HEART																									
Focal cellular infiltration	NO	4	5	2	4	5	5	5	5	3	2	2	2	5	5	5	5	4	1	2	4	4	5	5	4
	SL	1	—	3	1	—	—	—	—	—	2	2	1	—	—	—	—	1	3	2	—	—	—	—	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	2	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—
THYROID																									
Proliferation of follicules	NO	5	4	4	5	5	4	4	5	5	4	4	4	5	5	4	5	5	4	5	4	2	5	5	5
	SL	—	1	1	—	—	1	1	—	—	1	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	2	—	—	—
ADRENAL																									
Hemorrhage in cortex	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5	4
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1

cf. * C; BHT 0.00%, L; BHT 0.005%, M; BHT 0.02%, H; BHT 0.32%
** NO; No change, SL; Slight changes, MO; Moderate changes, SE; Severe changes

Table 2. Histopathology—summary of observations

Duration of feeding	24 months group																Life-long group							
	T								D								D							
	Male				Female				Male				Female				Male				Female			
Concentration*	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats examined	9	7	5	7	6	6	5	3	1	3	3	3	4	4	4	5	6	12	1	3	5	10	2	5
No. of rats not examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2	2	1	0	1	1	0	0	0
LIVER																								
Focal necrosis	1	1	1	—	—	2	—	—	—	—	1	1	—	—	—	1	1	1	—	—	1	1	1	—
Proliferation of small bile ducts	4	1	3	4	1	1	1	1	—	1	—	—	1	—	1	3	2	—	—	—	—	3	1	3
Periviliary fibrosis	4	3	3	1	2	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	2	3	1	—	—	3	—	3
Nodular hyperplasia	2	—	1	—	1	2	1	1	1	1	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—
Small granuloma	3	2	2	3	1	1	1	—	—	—	—	1	1	1	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—
Vacuolated/distended hepatocytes	3	—	—	3	1	2	4	1	1	1	1	1	2	3	1	2	2	4	—	—	3	4	—	3
Cellular infiltration	2	3	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
STOMACH																								
Proliferation of submucosa	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ulcer in fore-stomach	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
PANCREAS																								
Focal necrosis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Proliferation of interstitium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Perivasculitis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
SPLEEN																								
Marked extramedullary hematopoiesis	1	2	1	1	2	2	1	1	—	1	—	—	1	—	1	1	1	1	—	—	1	3	—	1
Marked hemosiderosis	—	—	—	1	—	1	1	1	—	—	1	—	—	1	1	1	1	3	—	—	1	2	—	2
KIDNEY																								
Polycystic kidney	2	4	1	2	—	—	1	—	—	1	2	1	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	1
Focal necrosis	1	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	3	3	—	1	1	2	—	—
Cellular infiltration	3	1	1	2	1	1	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—	4	4	—	1	—	—	—	—
Urinary casts	4	1	4	5	3	2	3	1	—	1	1	—	3	1	1	2	3	8	1	2	1	5	1	3
Dilatation of tubules	6	3	3	5	3	2	4	1	—	2	1	—	3	—	—	3	4	7	—	1	—	2	1	—
Degeneration of tubular epithelium	6	4	4	5	3	3	4	1	—	2	1	—	3	1	1	3	4	7	—	2	2	5	1	2
Thickening of epithelium of Bowman's capsules	3	2	3	1	4	1	1	—	—	1	1	1	—	—	1	—	5	5	1	—	—	—	—	—
Thickening of basement membrane	6	5	4	5	5	2	3	1	—	2	1	—	4	1	—	4	5	8	—	2	—	2	1	1
HEART																								
Cellular infiltration/fibrosis	3	3	4	3	1	—	—	—	1	2	2	1	1	—	—	—	1	7	—	—	1	1	—	—
Perivasculitis	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
LUNG																								
Pneumonia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	1
PITUITARY																								
Hemorrhage	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chromophobe hyperplasia	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
THYROID																								
Follicular hyperplasia	1	2	—	2	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ADRENAL																								
Cortical hyperplasia	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—
Medullary hyperplasia	—	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—	—	—
Cavitating in cortex/hemorrhage	—	1	—	—	5	1	5	1	—	—	1	—	1	—	2	2	—	4	—	—	1	6	—	—
TESTES																								
Atrophy	—	2	1	—					—	—	1	—					—	2	—	—				
Edema	—	—	—	—					—	—	—	—					—	1	—	—				
Proliferation of interstitial cells	—	—	—	—					1	—	—	—					—	—	—	—				
Perivasculitis	1	1	—	1					—	1	1	—					1	—	—	—				
UTERUS																								
Polyp					2	—	1	1					—	—	—	—					—	—	—	—

cf. T; Rats killed at termination D; Rats dying during 24 months
* C; BHT 0.00%, L; BHT 0.005%, M; BHT 0.02%, H; BHT 0.32%

Table 3. Distribution of tumors—summary of observations

Duration of feeding	24 months group								Life-long group							
	T								D							
	Male				Female				Male				Female			
Concentration *	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats examined	9	7	5	7	6	6	5	3	1	3	3	3	4	4	4	5
No. of rats not examined**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2
No. of rats bearing tumors	5	2	4	2	5	4	4	3	0	2	2	2	4	4	4	5
SUBCUTIS																
Fibroma	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	2	—	—	—	—
Fibrolipoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Fibrosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mesenchyoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MAMMARY																
Adenoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fibroadenoma	—	—	—	—	3	4	3	1	—	—	—	—	1	—	—	2
EAR DUCT (CERUMINOUS GL.)																
Squamous cell carcinoma	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SALIVARY GL.																
Adenocarcinoma	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PLEURA																
Mesothelioma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
MESENTERY																
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LUNG																
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LIVER																
Hepatoma	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
PANCREAS																
Islet cell adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Exocrine adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
STOMACH																
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Lymphosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
PITUITARY																
Adenoma	3	1	1	—	3	3	3	3	—	—	1	—	3	4	3	5
Adenocarcinoma	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
THYROID																
Adenoma	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ADERENAL																
Pheochromocytoma	2	1	1	1	2	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
KIDNEY																
Papilloma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nephroblastoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
URINARY BLADDER																
Papilloma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
UTERUS																
Leiomyosarcoma					—	—	—	—					1	—	—	—
LIVER, SPLEEN etc.																
Leukemia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Duration of feeding	Life-long group							
	D							
	Male				Female			
Concentration *	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats examined	6	12	1	3	5	10	2	5
No. of rats not examined**	2	1	0	1	1	0	0	0
No. of rats bearing tumors	4	6	1	2	5	8	1	4
SUBCUTIS								
Fibroma	1	—	—	1	1	1	—	1
Fibrolipoma	—	—	—	—	—	—	—	—
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—
Mesenchyoma	—	—	—	1	—	—	—	—
MAMMARY								
Adenoma	—	—	—	—	2	2	—	—
Fibroadenoma	—	2	1	—	1	2	1	—
EAR DUCT (CERUMINOUS GL.)								
Squamous cell carcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—
SALIVARY GL.								
Adenocarcinoma	—	1	—	—	—	—	—	—
PLEURA								
Mesothelioma	—	—	—	—	—	—	—	—
MESENTERY								
Fibrosarcoma	—	—	—	1	—	—	—	—
LUNG								
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	1	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	1	—	—	—	—
LIVER								
Hepatoma	—	—	—	—	—	—	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	1	1	—	—	—
PANCREAS								
Islet cell adenoma	—	1	—	—	—	—	—	—
Exocrine adenocarcinoma	—	1	—	—	—	—	1	—
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	1	—	—
STOMACH								
Fibrosarcoma	1	—	—	—	—	—	—	—
Lymphosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—
PITUITARY								
Adenoma	2	2	—	—	3	5	1	2
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—
THYROID								
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—
ADERENAL								
Pheochromocytoma	1	—	—	—	—	—	—	—
KIDNEY								
Papilloma	—	—	—	—	—	—	—	1
Nephroblastoma	—	1	—	—	—	—	—	—
URINARY BLADDER								
Papilloma	—	—	—	—	—	—	—	1
UTERUS								
Leiomyosarcoma					—	—	—	—
LIVER, SPLEEN etc.								
Leukemia	1	—	—	—	—	—	—	—

cf. T; Rats killed at termination D; Rats dying during 24 months

* C; BHT 0.00%, L; BHT 0.005%, M; BHT 0.02%, H; BHT 0.32%

** On account of autolytic changes

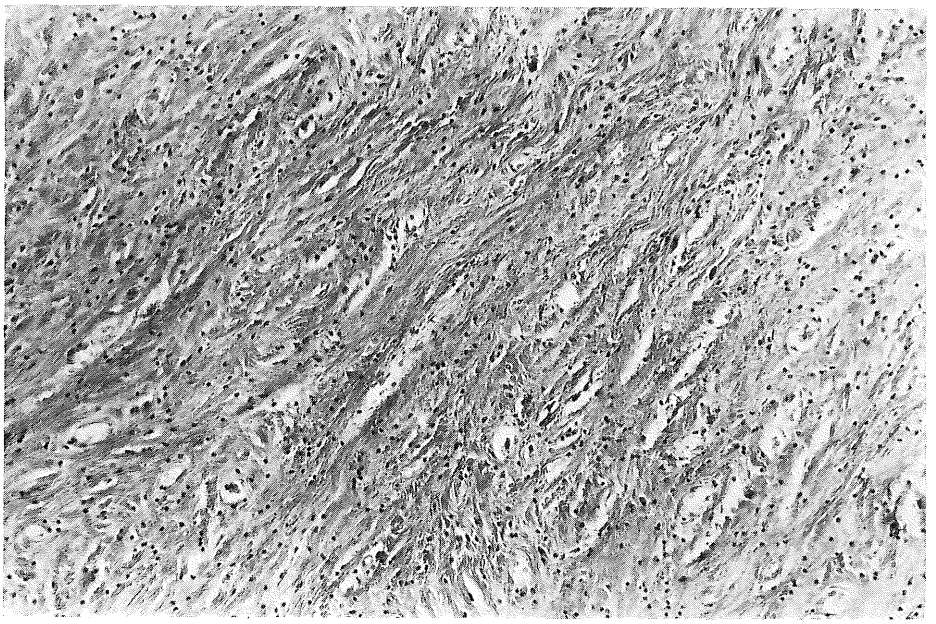


Fig. 1. Fibroma of subcutis H.E. ×100

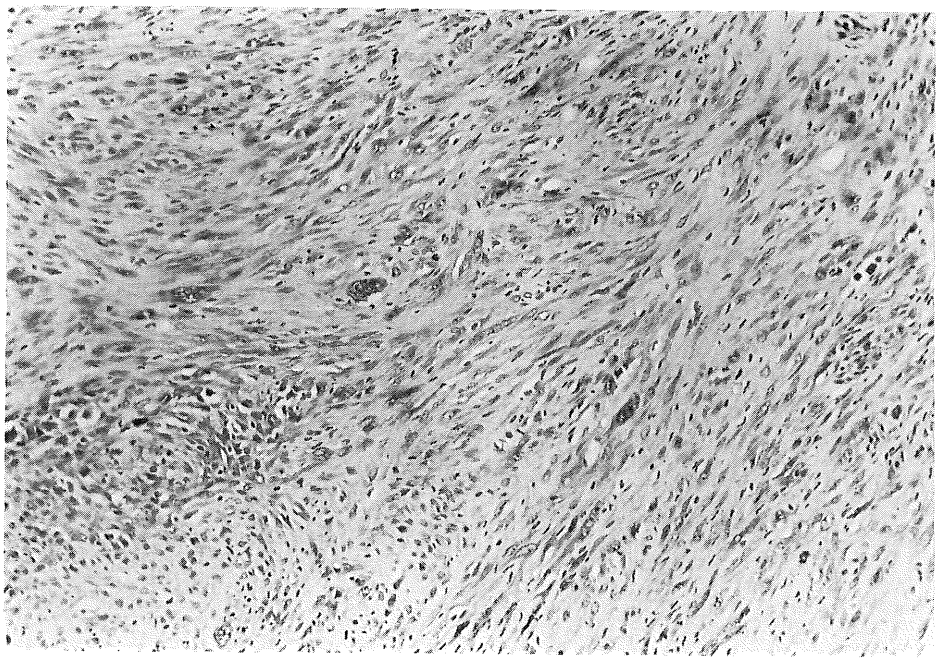


Fig. 2. Fibrosarcoma of subcutis H.E. ×100

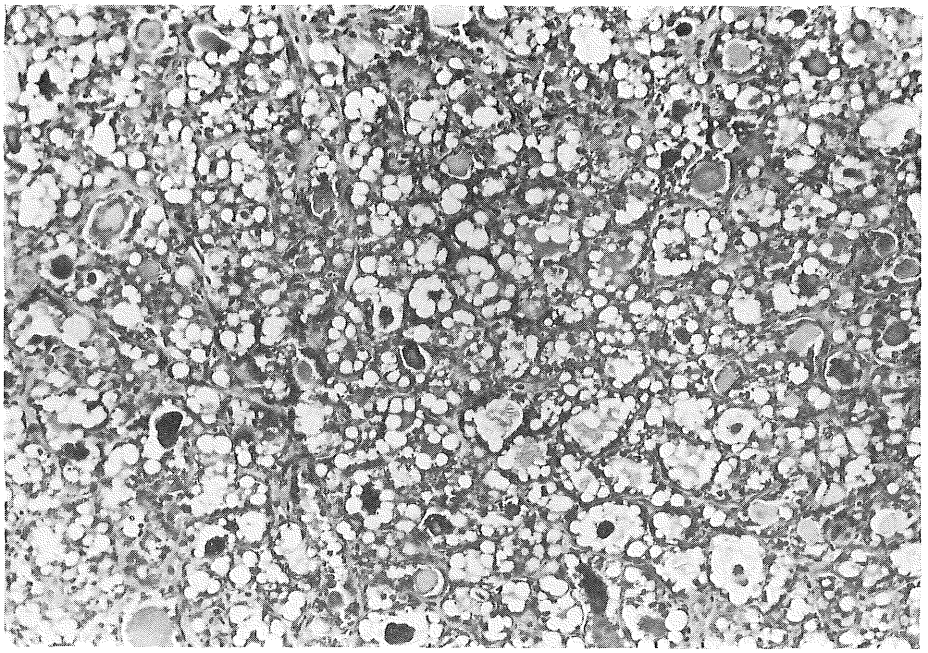


Fig. 3. Adenoma of mammary glands H. E. ×100

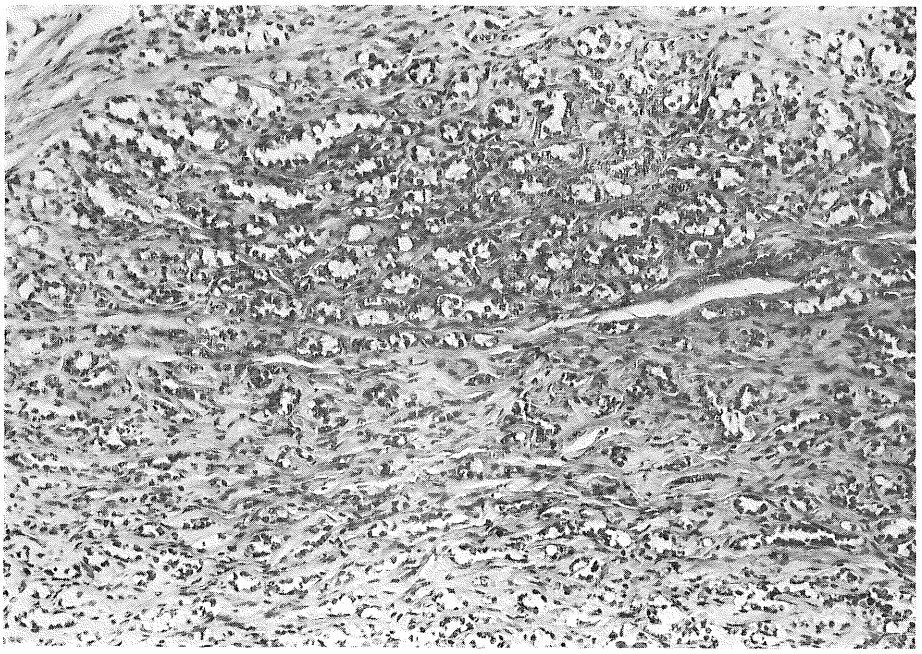


Fig. 4. Fibroadenoma of mammary glands H. E. ×100

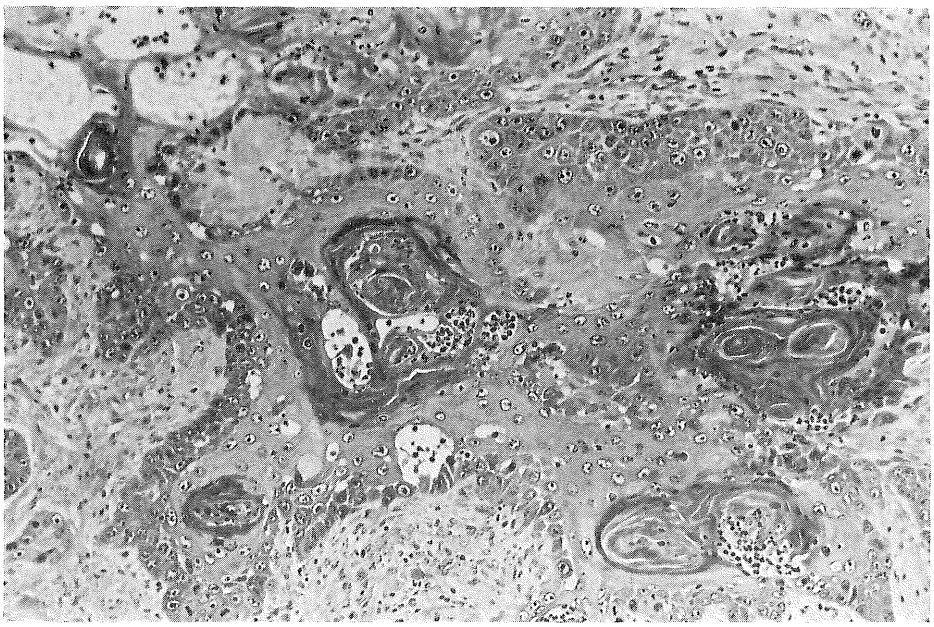


Fig. 5. Adenocarcinoma of seruminous glands H. E. ×100

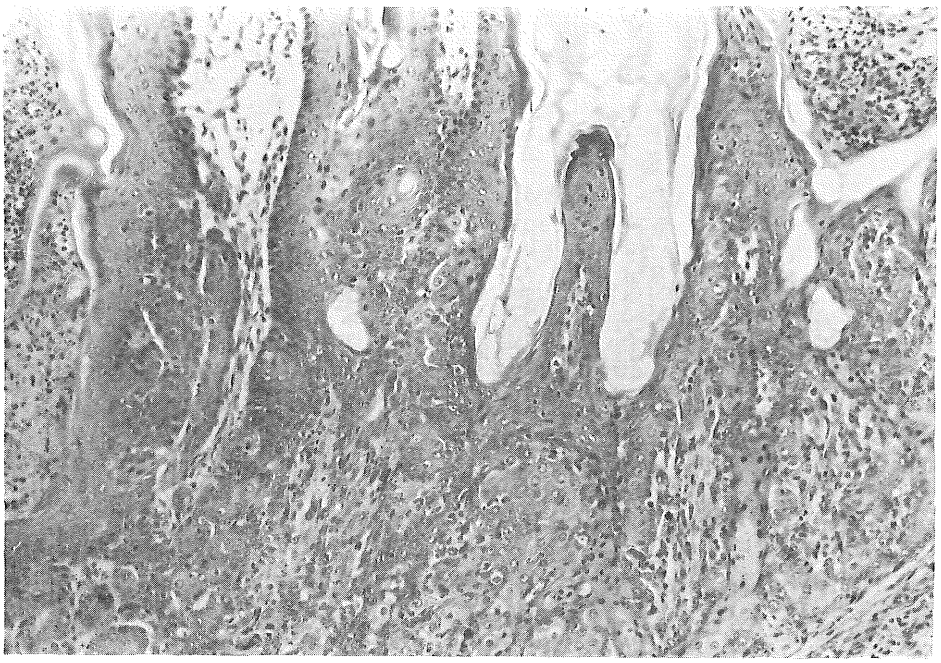


Fig. 6. Adenocarcinoma of salivary glands H. E. ×100

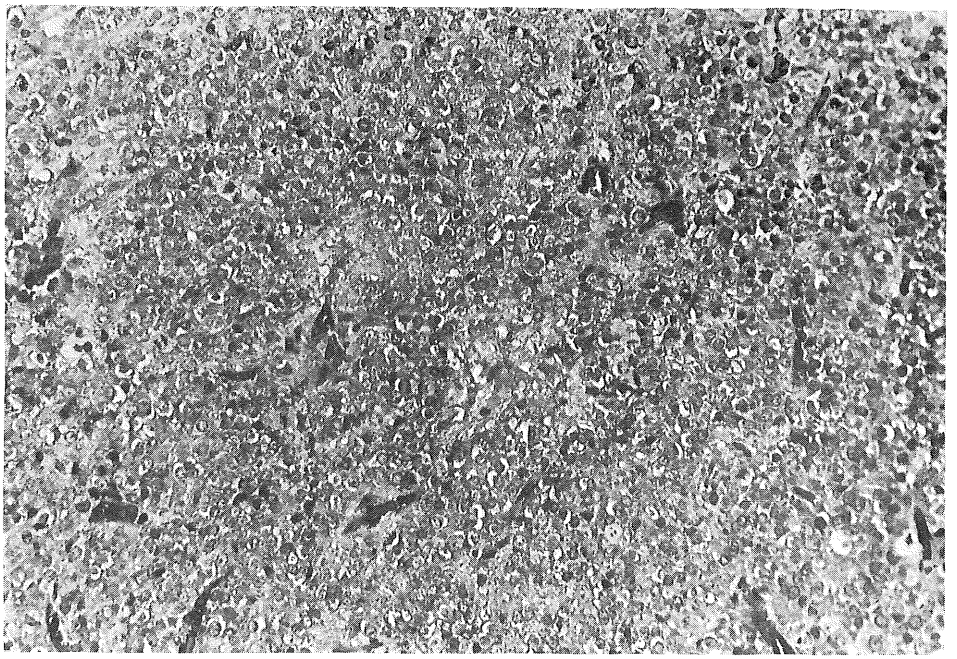


Fig. 7. Adenoma of pituitary glands H. E. ×200

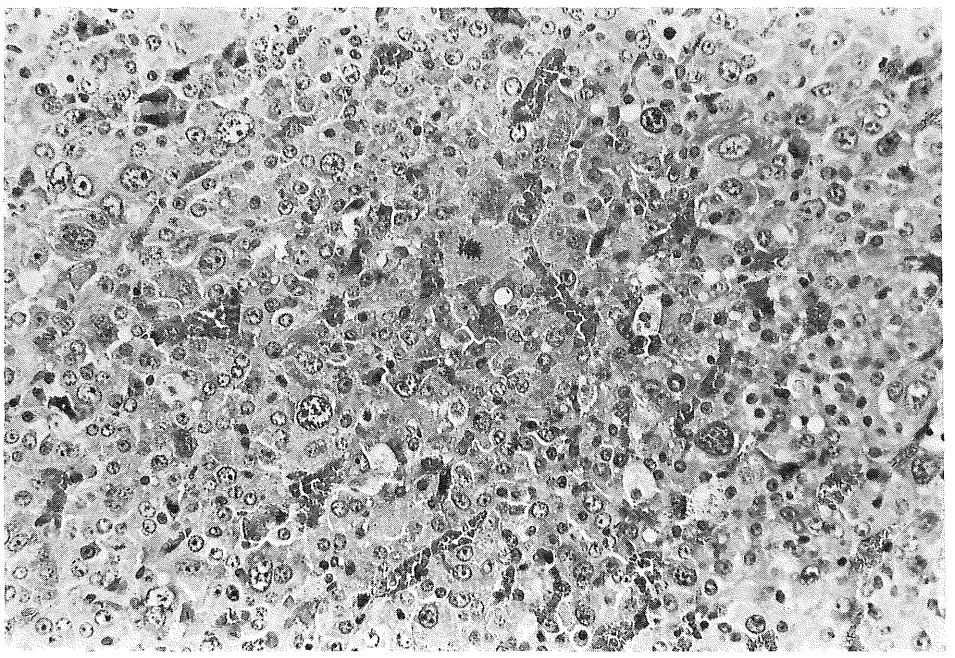


Fig. 8. Adenocarcinoma of pituitary glands H. E. ×200

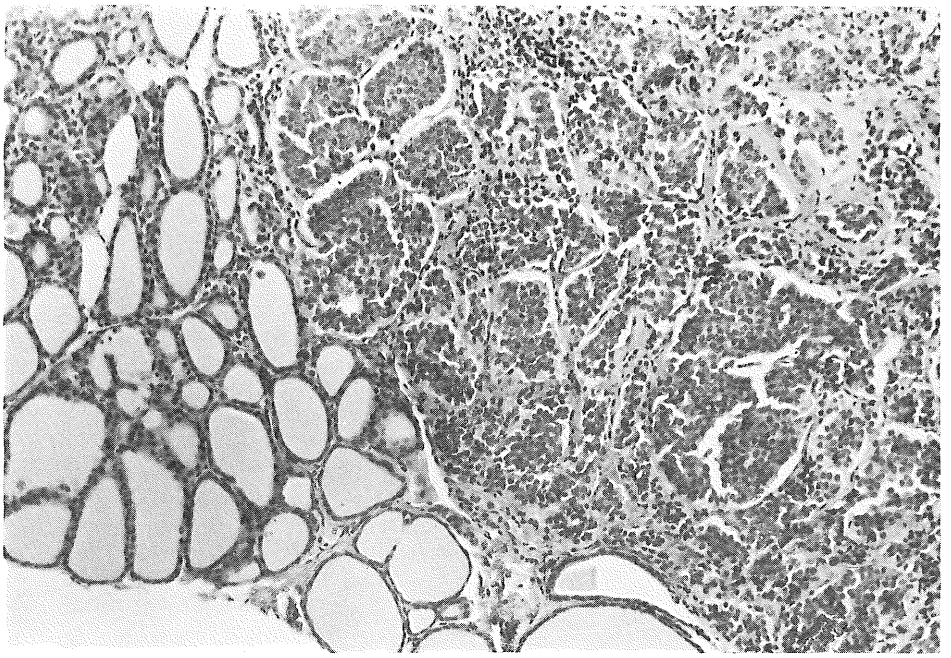


Fig. 9. Adenoma of thyroid glands H.E. ×100

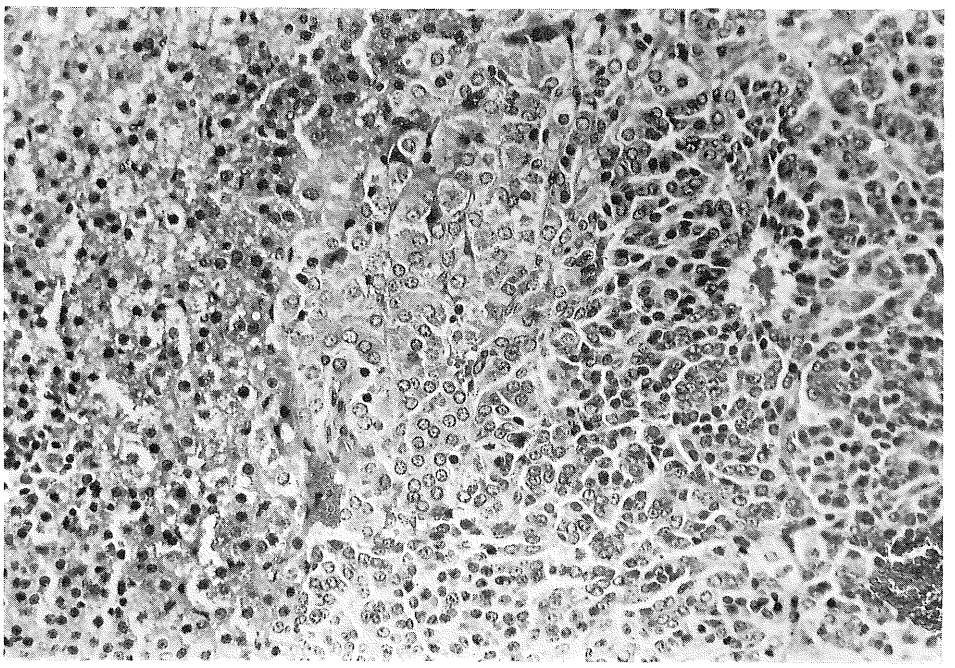


Fig. 10. Pheochromocytoma of adrenal glands H.E. ×200

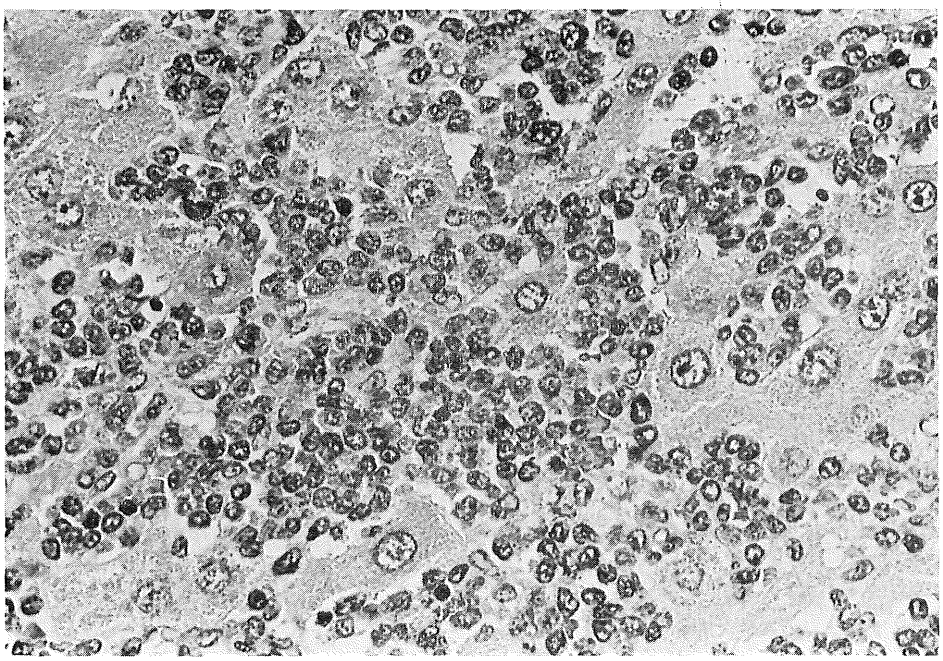


Fig. 11. Reticulosarcoma of liver H. E. ×400

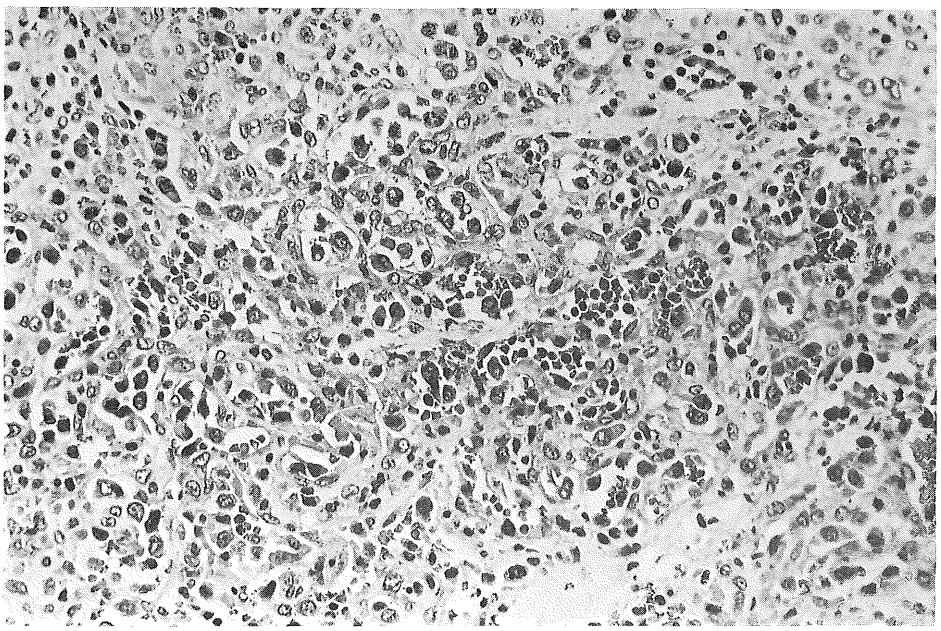


Fig. 12. Exocrineadenocarcinoma of pancreas H. E. ×200

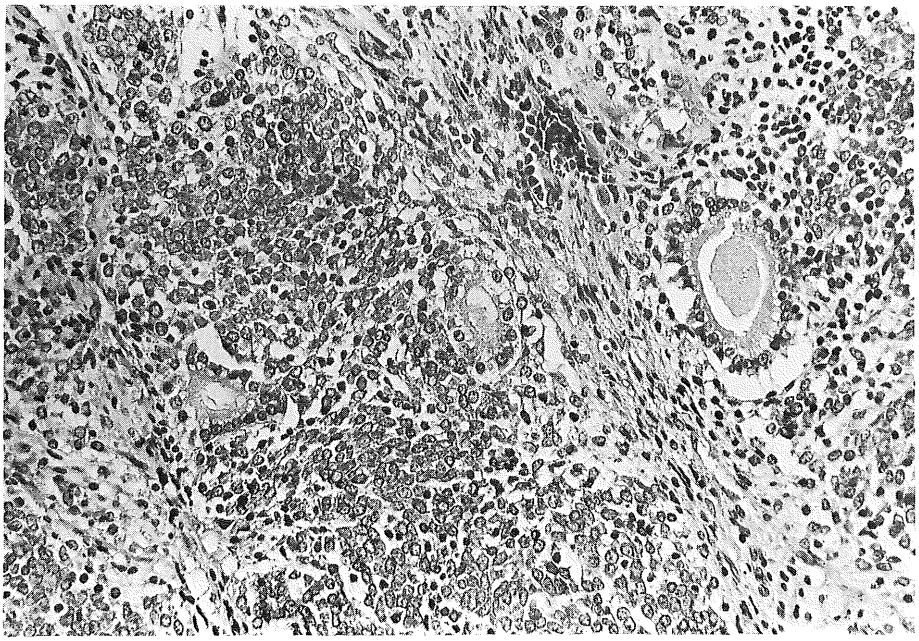


Fig. 13. Nephroblastoma of kidney H. E. ×200

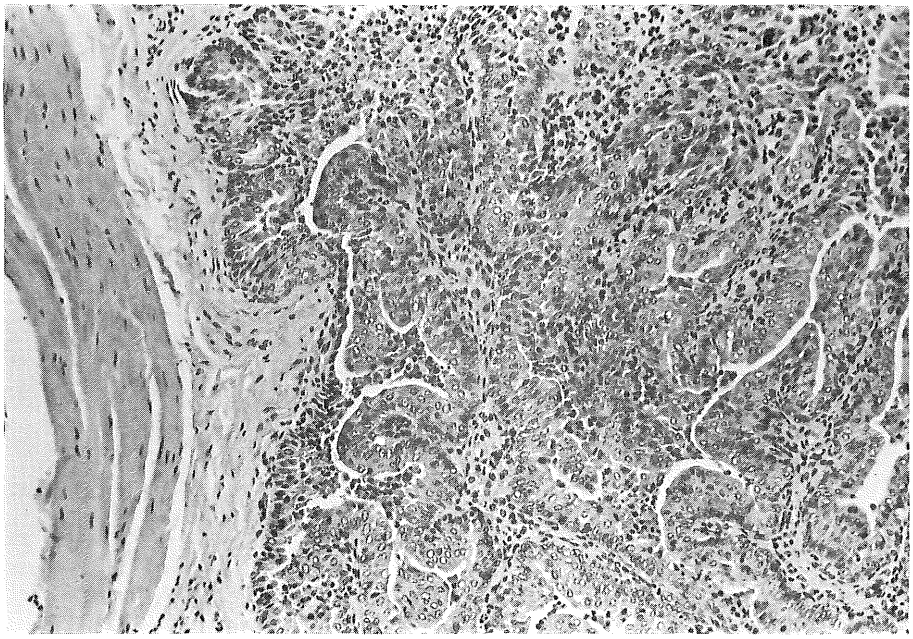


Fig. 14. Papilloma of urinary bladder H. E. ×100

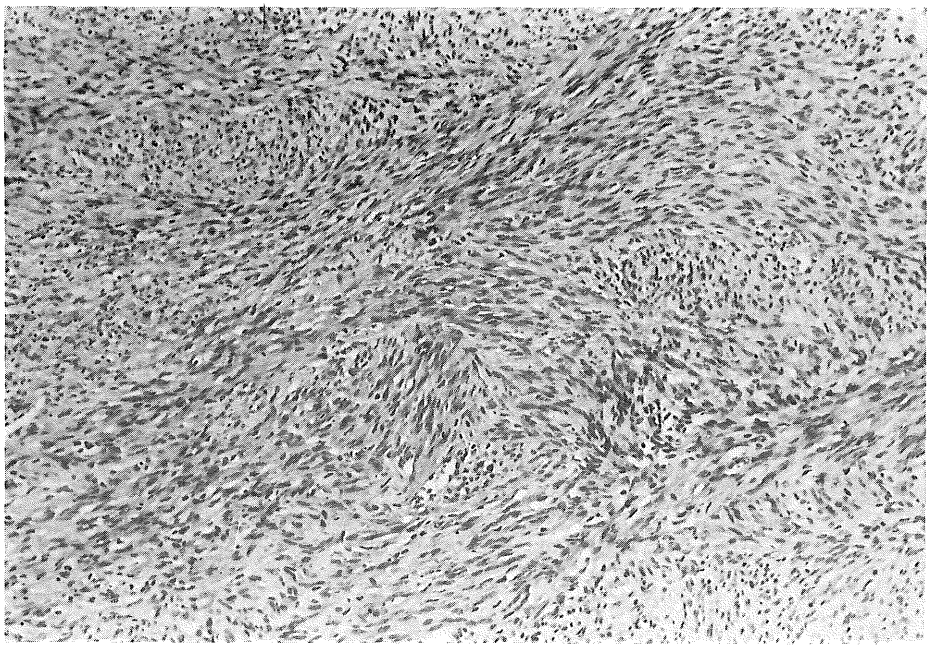


Fig. 15. Leiomyosarcoma of uterus H. E. ×100

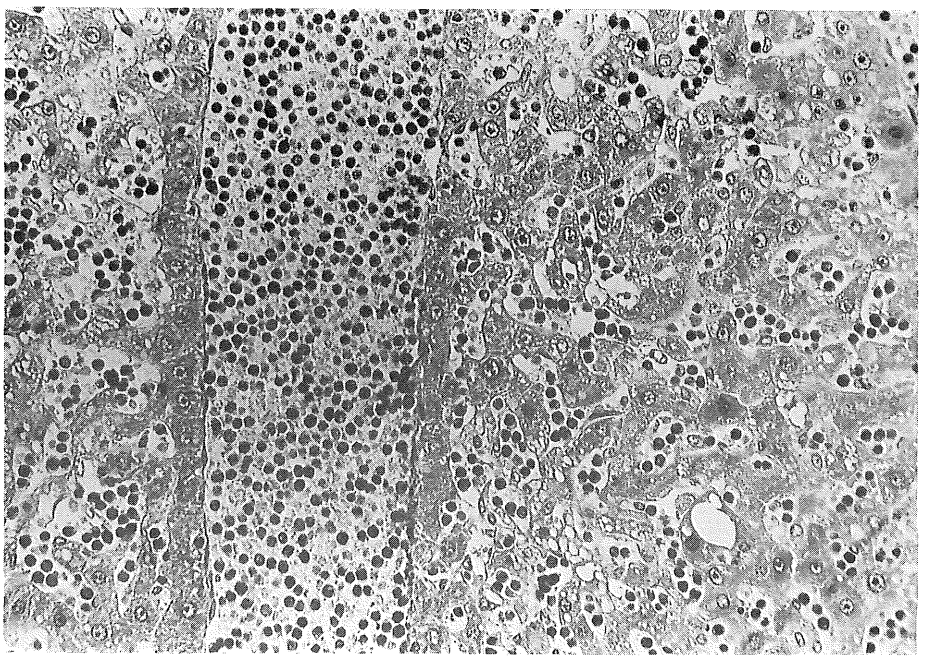


Fig. 16. Leukemic cells infiltration of liver H. E. ×200

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 47-52, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）に対する系統の異なるラットの感受性の相違に関する研究

市川 久次*, 小林 博義*, 平賀 興吾*

Differences in Sensitivity of Two Strains of Rats to Butylated Hydroxytoluene (BHT)

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and KOGO HIRAGA*

Differences of sensitivity to butylated hydroxytoluene (1.5% BHT) in tow strains of rats (JCL-SD [Sprague Dawley] and Wistar, male and female) were examined, and the following results were obtained.

1. A clear difference in mortality was recognized for 4 weeks, SD-male only was 4/5, the others were 0/5.

2. Hematological, clinical chemical tests and measurement of organ weights in the survival rats fed contained 1.5% BHT for 4 weeks were put in operation, although there were several changes, effects on kidney in Wistar were larger than SD strain.

実験動物の基礎的生理学的研究は，毒性試験結果の判断にとって，不可欠のものであり，これまで多くの研究者によって種々の条件により研究がなされてきており，その成果は毒性試験に多大なる貢献をもたらしてきている．著者[1,2]らはこれまでにもこの分野における研究を行ってきたが，今回は生産所が同一である，系統の異なるラットのジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）に対する感受性を検討したので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 使用動物：日本クレアKK生産のJCL-SD, Wistar系ラット雌雄を用いた．生後4週令にて購入し，1週間予備飼育後，体重増加，一般状態に異状のないものを実験に供した．実験開始時（平均体重；JCL-SD系雄108g，雌105g；JCL-Wistar系雄115g，雌103g）に各群5匹ずつケージに入れ，水道水は自由に摂取させ，温度25±1℃，湿度55±5%に調整された室内にて飼育した．

2. 試料：和光純薬製（Lot No. KIK 5562）結晶性粉末でmp 69.5℃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1.5%の割合で日本クレアKK製粉末飼料(CE-2)に混合し，固型飼料とし，対照群には日本クレア製粉末飼料（CE-2）を固型飼料としたものを自由にラットに摂取させた．投与期間は，1週間ならびに4週間に分けた．

4. 検査項目ならびに検査方法

i) 体重の測定；投与開始時，2日後，1，2，3，4週後に通常の方法により行った．

ii) 血液学的検査（血球成分）；Coulter Counter Model-Sを使用して行った[2]．

iii) 血清生化学的検査；Na^+, K^+ はBeckman製KLiNa炎光分光度計を用いて測定し，他は自動分析装置（Hitachi M-400 Automatic Analyzer）を用いて行った[2]．

5. 剖検：肉眼的観察

6. 臓器重量の測定：心臓，肝臓，腎臓（左，右），脾臓，副腎（左，右），睾丸（左，右），卵巣，子宮を摘出し，電子天秤（PE 162, HE-20）にて秤量した[2]．

実験結果

1. 体重の推移

体重の増加についてはFig. 1, Table 1に示したごとく，対照群は両系統，雌雄とも順調な成育を示したのに反し，1.5% BHT投与群は各群(系統，性)とも，2日後に体重の減少がみとめられ，その後徐々に増加を示した．JCL-Wistar系雄は2日後に体重の減少がみとめられたが，その後の発育は対照群と同様な増加を示した．

* 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

Table 1. Body Weights Gain

Strain	SEX	DOSE	No. of Rats	Initial B. W. (g) mean±S. E.[1]	Final B. W. (g) mean±S. E.	Growth Rates (%)[2]
JCL-SD	M	C	5	107.00±1.304	292.00±5.701	273.10±6.722
		T	5—1	109.20±0.860	230.00	215.8
	F	C	5	105.40±1.327	204.60±3.970	194.10±2.563
		T	5	105.20±1.158	170.20±6.560***	161.68±5.255***
JCL-Wistar	M	C	5	115.40±0.872	286.00±12.037	246.53±10.164
		T	5	115.60±1.116	242.00± 6.197*	209.25± 3.662***
	F	C	5	103.00±2.191	204.20±7.214	198.08± 3.664
		T	5	102.80±1.281	174.00±1.703**	122.27±22.743***

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

* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

JCL-SD 系の雄は，途中で5匹中4匹が死亡し（2～3週で1匹，3～4週で3匹）体重の増加も JCL-Wistar 系雄に比べ鈍かった．両系統の雌は，ほぼ同様の推移を示し系統による差異はほとんどなかった．

2. 死亡数ならびに死亡時剖検所見

各群の4週間の1.5% BHT 投与による死亡数は以下の如くであり，JCL-SD 系雄のみが，1.5% BHT 投与4週間以内に80%が死亡し，JCL-Wistar 系雄との間に

系統	性別	用量	死亡数/開始時数	死亡率 (%)
JCL-SD	雄	Control	0/5	0
		1.5%BHT	4/5	80
	雌	Control	0/5	0
		1.5%BHT	0/5	0
JCL-Wistar	雄	Control	0/5	0
		1.5%BHT	0/5	0
	雌	Control	0/5	0
		1.5%BHT	0/5	0

明らかなる差異が認められた．また途中死亡時の剖検所見は，胸腔出血2例，睾丸出血1例，他の1例は不明であった．

3. 血液学的検査

血液学的検査の結果は Table 2, 3 に示した如くであるが，投与後1週間で各群とも変化したものは，平均赤血球容積(MCV)で，いずれも対照群に比し有意に減少した．また，JCL-SD系雄においては，ヘマトクリット値の減少，平均赤血球血色素濃度（MCHC）の増加が，雌では白血球の増加が，JCL-Wistar 系雌では平均赤血球血色素量（MCH）の減少が認められた．投与4週後では，両系とも雌群に変化が認められた（JCL-SD 雄は生存1例であったので差異の検討は不可能），JCL-SD 系では赤血球の減少が，Wistar 系ではヘモグロビン，ヘマトクリット値の減少が認められ，貧血症状が認められた．

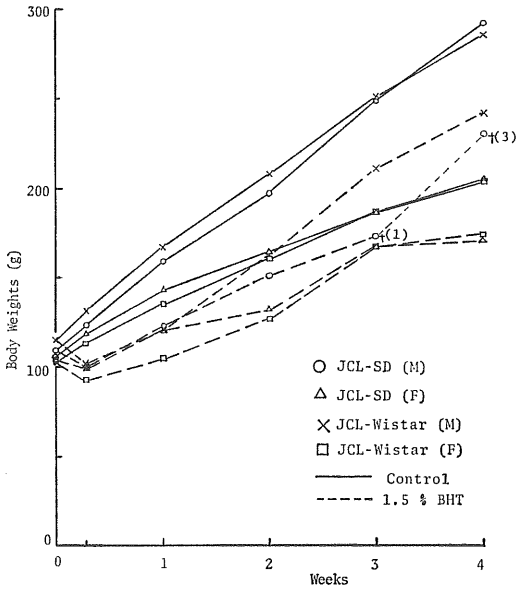


Fig. 1. Curves of Growth in the Rats Administered Orally with 1.5% BHT

Table 2. Hematology (after 1 week)

Strain	SEX	DOSE	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 (%)
JCL-SD	M	C[1]	5	7.94±0.537[3]	5.73±0.054	12.66±0.273	37.06±0.554	64.80±0.583	22.28±0.380	34.32±0.418
		T[2]	5	9.64±0.780	5.70±0.100	12.00±0.170	34.04±0.460**	60.20±0.583***	21.28±0.248	35.40±0.158*
	F	C	5	5.90±0.748	5.89±0.123	13.20±0.261	36.62±0.749	62.40±0.872	22.52±0.412	35.98±0.325
		T	5	9.20±0.672*	6.03±0.094	12.90±0.063	35.94±0.330	59.80±0.663*	21.58±0.296	36.00±0.354
JCL-Wistar	M	C	5	6.88±0.649	5.65±0.055	12.64±0.154	36.72±0.528	65.20±0.633	22.60±0.145	34.62±0.203
		T	5	7.48±0.631	5.92±0.168	12.74±0.361	36.46±0.768	62.00±0.548**	22.00±0.321	35.42±0.273
	F	C	5	6.92±1.665	5.92±0.056	13.40±0.100	38.08±0.678	64.60±0.812	22.80±0.170	35.26±0.567
		T	5	7.10±0.950	5.86±0.168	12.76±0.469	35.52±1.121	60.80±0.735*	21.94±0.248*	36.04±0.269

1) Control 2) 1.5% BHT 3) mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Table 3. Hematology (after 4 weeks)

Strain	SEX	DOSE	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 (%)
JCL-SD	M	C[1]	5	7.76±0.269[3]	7.47±0.211	15.28±0.414	42.93±1.721	58.00±0.816	20.66±0.060	35.83±0.463
		T[2]	1	6.10	6.89	15.10	41.80	61.00	22.10	36.10
	F	C	5	10.08±0.215	8.11±0.199	22.50±5.981	47.00±0.919	59.00±0.316	20.60±0.207	35.10±0.212
		T	5	13.00±1.653	7.33±0.071**	15.48±0.500	43.52±1.408	60.20±1.562	21.30±0.493	35.56±0.349
JCL-Wistar	M	C	4	5.93±0.970	6.41±0.714	15.27±0.067	39.83±0.260	56.67±0.882	21.60±0.404	38.33±0.338
		T	5	8.53±1.915(4)	6.67±0.581	14.84±1.016	40.20±2.187	61.80±3.277	22.64±0.785	36.76±0.665
	F	C	5	7.62±1.211	8.00±0.131	17.30±0.438	46.56±1.048	58.20±0.860	21.76±0.346	36.96±0.163
		T	5	7.64±0.615	7.17±0.102	15.22±0.392*	40.42±0.535***	57.50±1.030	21.54±0.488	37.58±0.511

1) Control 2) 1.5% BHT 3) mean±S.E. ( ) No of rats * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Table 4. Serum Biochemical Tests (after 1 week)

Strain	SEX	DOSE	No. of Rats	TP (g/l)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GPT (U/ml)	GOT (U/ml)	ALP (U/dl)	Chol (mg/dl)	ChE (⊿pH)	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)
JCL-SD	M	C[2]	5	5.48±0.086[1]	127.80±6.560	37.60±1.631	41.60±8.060	198.00±5.630	85.00±12.194	69.00± 1.817	—	148.00± 2.00	11.4±0.400
		T[3]	5	4.84±0.129***	108.00±5.655	45.00±0.894**	68.00±3.564	200.60±7.096	125.40±14.682	105.60±11.303*	0.05±0.009(3)	138.00± 0.245**	21.9±1.240***
	F	C	5	5.90±0.063	129.00±8.246	43.80±2.267	42.00±0.949	179.80± 8.089	65.00± 5.225	68.60± 2.804	0.08±0.012(4)	150.00± 0.158	10.8±0.255
		T	5	5.42±0.066**	105.60±3.311*	52.20±1.715*	68.20±3.184***	150.00±31.793	94.00±15.966	88.80± 8.021*	0.04±0.017(3)	143.00± 1.225*	16.9±0.915**
JCL-Wistar	M	C	5	5.40±0.063	130.60±4.523	33.80±2.035	41.60±2.135	176.80± 6.748	65.20± 7.749	86.80± 4.934	—	156.00± 4.85	9.3±0.605
		T	5	5.08±0.073*	88.60±2.159***	49.00±1.581***	58.40±3.444	179.80± 6.028	87.60± 9.621*	131.80± 7.851***	0.05±0.020(2)	160.00±13.565	15,2±2.135*
	F	C	5	5.76±0.150	110.80±5.142	36.40±2.561	38.40±1.208	162.60±12.512	48.40± 4.501	84.20± 5.248	0.15±0.019(3)	158.00± 3.00	8.8±0.300
		T	5	5.36±0.163	95.00±2.449*	45.20±1.562*	53.00±3.194**	139.20±19.533	82.80± 7.038**	127.60±10.142***	0.06±0.000(2)	160.00±7.745	11.3±0.585**

1) mean±S.E. ( ) No. of Rats * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$
2) Control 3) 15% BHT

Table 5. Serum Biochemical Test (after 4 weeks)

Strain	SEX	DOSE	No. of Rats	TP (g/l)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GPT (U/ml)	GOV (U/ml)	ALP (U/dl)	Chol (mg/dl)	ChE (⊿pH)	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)
JCL-SD	M	C	5	6.32±0.058	135.80±7.095	48.00±2.846	45.80±2.200	182.00± 3.209	62.00± 3.924	67.60±2.542	—	—	—
		T	1	6.50	105.00	54.00	43.00	177.00	95.00	65.00	0.03	—	—
	F	C	5	6.78±0.058	123.60±5.056	55.60±4.675	40.20±1.881	192.20±4.923	46.60±4.082	59.20±5.113	0.52±0.042	—	—
		T	5	6.80±0.100	100.25±8.645*(4)	49.60±2.379	48.20±7.235	189.60±4.082	55.20±6.102	89.80±6.938*	0.27±0.048**	—	—
JCL-Wistar	M	C	5	6.40±0.007	105.00±7.570	42.50±2.713	41.80±1.744	176.20±4.769	48.80±4.259	79.20±2.267	0.08±0.017	—	—
		T	5	6.40±0.110	93.20±4.420	50.60±1.778*	47.20±4.684	167.20±1.772	65.20±12.002	130.40±6.698***	0.10±0.015	—	—
	F	C	5	6.54±0.112	109.00±5.320	37.00±0.447	38.40±1.435	182.20±3.080	28.40±4.844	74.60±3.059	0.52±0.114	—	—
		T	5	6.54±0.238	90.80±4.480*	46.40±2.293**	39.40±1.990	164.20±13.392	46.20±1.530	146.80±3.639***	0.45±0.065(4)	—	—

1) mean±S.E. ( ) No. of Rats * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$
2) Control 3) 1.5% BHT

Table 6. Organ Weights (after 4 weeks)

Strain	SEX	DOES	No. of Rats	Heart mg / mg/100g[3]	Liver g / g/100g	Kidney mg / mg/100g L	Kidney mg / mg/100g R	Spleen mg / mg/100g	Testis (L) ovary / Tests (R) uterus mg / mg/100g	Adrenal mg / mg/100g L	Adrenal mg / mg/100g R
JCL-SD	M	C[1]	5	1051.8±22.59	13.150±0.3589	1123.6±30.49	1067.4±11.71	670.2±45.29	1333.4±20.27 / 1347.6±27.49	13.00±1.141	11.20±1.655
				360.0± 8.47	4.498±0.0789	385.0±12.01	365.6± 6.79	228.4±12.27	456.8± 9.71 / 461.0± 7.05	4.42±0.389	3.80±0.579
		T[2]	1	841.0	16.760	864.0	919.0	488.0	420.0 / 1279.0	18.00	18.00
				365.0	7.280	375.0	339.0	212.0	182.0 / 556.0	7.80	7.80
	F	C	5	762.2±15.29	8.664±0.1899	768.6±21.19	783.8±37.35	494.2±31.03	93.40±9.973 / 359.60±17.783	16.80±2.289	13.80±1.113
				372.0± 3.43	4.222±0.0743	375.2± 9.05	382.4±13.69	241.6±15.93	45.58±4.639 / 175.94± 9.225	8.10±1.005	6.68±0.475
		T	5	626.6±14.19	11.760±0.4769***	646.8±33.43*	662.0±17.67*	432.0±34.15	66.25±6.115 / 264.40±47.203	13.00±0.633	13.00±0.979
				369.4±12.81	6.912±0.1397***	379.6±11.49	389.8± 9.77	256.2±27.67	38.67±4.045 / 154.16±56.209	7.62±0.567	7.94±0.919
JCL-Wistar	M	C	5	955.8±38.31	12.801±0.6797	1010.0±35.91	994.4±32.47	669.6±34.31	1417.6±51.65 / 1508.2±82.03	13.80±1.655	12.40±1.805
				335.2±14.51	4.552±0.3723	353.2± 6.87	348.4± 9.79	233.6± 5.87	496.6±16.07 / 535.8±54.23	4.80±1.253	4.26±1.147
		T	5	840.8±32.07	18.700±0.6987***	874.8±37.49	907.2±51.63	517.0±18.99	1354.6±37.31 / 1370.0±38.45	11.60±1.289	12.00±1.379
				346.6± 4.99	7.724±0.2285***	360.4± 6.15	374.0±18.43	213.0± 6.51	560.4±44.19 / 566.2±27.79	4.76±1.269	4.92±1.259
	F	C	5	740.4±31.57	8.520±0.4675	776.8±21.87	760.6±22.99	529.2±35.37	118.80±12.047 / 407.00± 0.003	19.40±2.891	18.20±2.557
				361.8± 6.95	4.170±0.1873	380.6± 9.25	373.0±11.69	258.9± 9.89	57.68± 4.119 / 199.26±42.841	9.34±1.163	8.80±1.009
		T	5	629.4±21.97	12.570±0.4337***	613.2±28.43**	628.0±14.75*	380.6±11.35**	100.20± 7.221 / 233.00±31.903	13.80±1.157	11.40±0.245
				361.4±12.73	7.212±0.1933***	351.4±13.75	360.4± 7.73	218.0± 4.93*	57.48± 3.791 / 133.74±17.991	7.86±0.633	6.50±0.187

1) Control 2) 1.5%BHT 3) Body weights *$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$

4. 血清生化学的検査

血清生化学的検査の結果は，Table 4，5 に示した如くであるが，投与1週間では，各群ともに変化したものは，尿素窒素量（増加），コレステロール量（増加），K^+（増加）であった．また，他に JCL-SD 系雌雄，Wistar 系雄の総蛋白量（減少），SD 系雄，Wistar 系雌雄のグルコース量（減少），両系の雌の GPT 活性（増加），Wistar 系の雌雄の ALP 活性(増加)，SD 系雌雄の Na^+ 量（減少）であった．投与4週間後では，各群ともに変化があったのは（JCL-SD系の雄は1例のため比較不可能）コレステロール量（増加）で，他に両系の雌のみのグルコース量(減少)，Wistar 系雌雄の尿素窒素(増加)，SD 系雌のコリンエステラーゼ（減少）であった．

5. 臓器重量

各臓器の絶対重量ならびに体重 100g 当りの体重比重量（投与4週後）は Table 6 に示した如くであった．各群とも変化を示したものは（JCL-SD 系雄は1例のため比較不可能）肝臓で絶対重量，体重比重量ともに増加が認められた（SD系雄でも著明な増加が認められた）．他に両系雌においてのみ腎臓の絶対重量の減少が認められ，Wistar 系雌のみ脾臓の絶対重量，体重比重量の減少が認められた．

総括ならびに考按

実験動物の基礎的生理学的研究として，また，BHT の毒性試験の一環として，生産所が同一で，系統の異なる（JCL-SD, Wistar）ラット雌雄を用いて，1.5%BHT を4週間投与し，その影響を検討した．

体重の推移については各群ともに投与2日後まで減少を示し，その後徐々に増加した．Wistar 系雄においては順調と考えられるほどの増加を示したが，SD 系雄は途中で5匹中4匹が死亡し，体重の増加も緩慢であり，SD 系と Wistar 系の間には明らかな差異が認められた．雌においては両系とも差異は認められなかった．

死亡率については，雄において SD 系と Wistar 系間に明らかな差があり，系統の違いによる感受性が異なることが認められた．

血液学，血清生化学的検査ならびに臓器重量の測定についての結果を総合して考えてみると，一見，推計学的には差異があるものがかなりみられたが，傾向等を合せ考察を加えると特別に両系統間に差異があるとは考えられなかった．しかし，投与4週後の Wistar 系雌雄は血清尿素窒素量が増加し，腎臓の重量の減少が認められ（雌絶対重量は有意），BHT の腎臓に対する影響は，Wistar 系の方が SD 系よりも大であると考えられる．

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) 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
3) 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：東京衛研年報，26-2，1，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 53-55, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のラット赤血球浸透圧抵抗におよぼす影響に関する研究

市川 久次*, 小林 博義*, 中尾 順子*

Osmotic Fragility of Red Blood Cells in the Rats Administered with Butylated Hydroxytoluene (BHT)

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

Effects of dietary 1.5% of butylated hydroxytoluene (BHT) for 4 weeks on osmotic fragilities of rat red blood cells differed from strains (JCL-SD, Wistar (male and female)) using Coil Planet Centrifuge (CPC) method were examined, and the following results were obtained.

1. In Wistar-male group, after 1 week fall of the start point of hemolysis and decrease of the width of it were found, after 4 weeks fall of the end point of it and increase of the width of it were found, it was suggested that resistance of red blood cells hemolyzed in the neighborhood of the start point of hemolysis to osmotic pressure was strengthened and the red blood cells with more stronger resistance to osmotic pressure were produced.

2. In the other groups (after 4 weeks 4/5 of SD-male group treated with 1.5% of BHT was dead), no effect of BHT on osmotic fragilities of red blood cells was clear.

著者[1]らは最近新しく開発された，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膜浸透圧抵抗を測定する Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による赤血球膜浸透圧抵抗の測定法について動物の新鮮血液について検討し，毒性試験への応用ならびに実験動物の基礎的生理値の検討を企図し，研究を行ってきたが，今回，比較的高濃度を投与すると出血傾向が著明になることが認められているジブチルヒドロキシトルエン（以下 BHT と略す）についてラットを用いて，その赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響について検討し，若干の知見を得たので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 使用動物：日本クレア生産の JCL-SD ならびに JCL-Wistar 系ラット雌雄を用いた．生後4週令にて購入し，一週間予備飼育後，体重増加，一般状態に異状のないものを実験に供した．実験開始時(平均体重，JCL-SD 系雄 108g，雌 105g；JCL-Wistar 系雄 115g，雌 103g）に各群5匹ずつケージに入れ，水道水は自由に摂取させ，温度 25±1℃，湿度 55±5%に調整された室内にて飼育した．

2. 投与方法ならびに投与期間：試料（BHT）を1.5%の割合で日本クレア製粉末飼料（CE-2）に混合し，固型飼料とし，対照群には日本クレア製粉末飼料（CE-2）を固型飼料としたものを自由に摂取させた．投与期間は，投与後1週間，4週間に分けた．

3. 赤血球膜浸透圧抵抗の測定方法：連続濃度勾配食

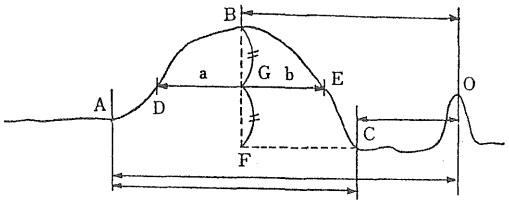


Fig. 1. Pattern of Hemolysis
H. S. P—Start point Hemolysis ($\overline{AO}$)
H. M. P—Maximum point of Hemolysis ($\overline{BO}$)
H. E. P—End point of Hemolosis ($\overline{CO}$)
H. W.—Width of Hemolysis ($\overline{AC}$)
a/b—Shape of Hemolysis

* 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. Osmotic Fragility of Erythrocytes in the Rats Administered with 1.5% BHT for 1 week

Strain	SEX	DOSE	No. of Rats	HSP[1]	HMP[1]	HEP[1]	HW[1]	a/b
JCL-SD	M	C[2]	5	100.80±3.007[4]	90.00±2.915	76.40±1.720	24.40±1.720	0.85±0.084
		T[3]	5	101.60±1.208	87.80±0.970	75.60±1.122	28.00±1.844	0.98±0.036
	F	C	5	107.40±0.678	94.60±0.927	80.00±0.447	27.80±0.860	0.90±0.058
		T	5	108.40±0.678	92.40±0.510	78.20±0.374*	30.20±0.860	1.09±0.048*
JCL-Wistar	M	C	5	113.00±0.949	96.40±1.327	81.20±1.356	31.80±0.860	1.01±0.101
		T	5	108.20±0.800**	94.00±1.225	79.00±0.837	29.20±0.374*	1.10±0.072
	F	C	5	112.20±3.023	97.80±1.744	82.20±1.068	30.00±2.608	1.21±0.174
		T	5	109.40±1.503	94.20±1.908	78.40±0.927*	31.00±1.140	1.14±0.129

1) mOsM 2) Control 3) 1.5% BHT 4) mean±S.E.
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

Table 2. Osmotic Fragility of Erythrocytes in the Rats Administered with 1.5% BHT for 4 weeks

Strain	SEX	DOSE	No. of Rats	HSP[1]	HMP[1]	HEP[1]	HW[1]	a/b
JCL-SD	M	C[2]	5	109.20±2.177[4]	96.80±2.354	75.80±1.393	33.20±1.319	0.67±0.108
		T[3]	1	110.0	96.0	75.0	35.0	0.61
	F	C	5	109.20±1.685	96.20±2.154	75.60±1.470	33.60±0.510	0.67±0.141
		T	5	112.00±1.378	97.00±1.049	76.40±0.927	35.60±0.678*	0.68±0.039
JCL-Wistar	M	C	5	110.00±0.632	95.80±1.158	76.80±1.068	33.20±0.583	0.68±0.097
		T	4	109.50±1.190	94.00±1.683	71.00±1.000**	38.50±1.658*	0.59±0.077
	F	C	5	116.60±1.030	90.80±1.319	76.40±1.077	40.20±1.393	1.97±0.353
		T	5	122.20±1.881*	94.60±0.927*	78.20±0.860	44.00±1.225	1.79±0.317

1) mOsM 2) Control 3) 1.5% BHT 4) mean±S.E.
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

塩液（低張側 30mOsM，高張側 170mOsM）の作製，ラットからの採血，血液のコイルへの注入，溶血浸透圧の読み取り方法（Fig. 1）等については市川ら[1]の方法に準じて行った．

実験結果

生産所は同じであるが，系統（JCL-SD, Wistar）の異なるラットを用いて，1.5% BHT を投与し，その赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響を検討したところ，Table 1, 2 に示した如くである．推計学的に対照との間に変化が認められたのは，投与1週後においては，SD系雌の溶血終了値（HEP）の低下ならびに溶血の形状を示す a/b の増大であった（$p<0.05$）．Wistar 系雄においては溶血開始値（HSP）の低下ならびに溶血幅（HW）の減少が認められ（$p<0.05$），溶血開始値（HSP）付近の赤血球の浸透圧抵抗が強くなることが認められた．雌では，溶血終了値（HEP）のみが低下していた（$p<0.05$）．また，投与4週後においては SD 系雄においては，投与群の5匹中4匹が途中で死亡し，1例のみの測定で，対照群との差異を検討することはできなかったが，雌では溶血幅（HW）のみが増加していた（$p<0.05$）．Wistar 系の雄においては，溶血終了値（HEP）の低下（$p<0.01$）ならびに溶血幅（HW）の増加（$p<0.05$）が認められ，浸透圧抵抗の強い赤血球が出現していた．雌では，溶血開始値（HSP）の上昇ならびに溶血最大値（HMP）上昇が認められた．各群に共通なる変化は認められなかったが，Wistar 系雄の投与群において，赤血球浸透圧抵抗が強力になる結果を得た．

考　察

CPC (Coil Planet Centrifuge) 法を用いて，ラットに BHT を投与し，その赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響について検討したところ，Table 1，2 に示した如く，各群に共通に変化したものは認められなかったが，とくに明記すべきものは，Wistar 系雄において，投与1週後では，溶血開始値 (HSP) の低下ならびに溶血幅 (HW) の減少が認められ，溶血開始値 (HSP) 付近の浸透圧抵抗をもつ比較的弱いものが強くなることが認められた．また，投与後4週では，溶血終了値 (HEP) の低下ならびに溶血幅 (HW) の増加が認められた．これは，浸透圧抵抗の強い赤血球の新たな出現によると考えれば説明ができる．しかし，溶血の形状に変化がなかったという結果についての解釈は，今後の問題として検討を要する．また，全体として投与群は浸透圧抵抗が強くなる傾向があるが，投与4週後の両系の雌においては逆の傾向を示した．このことのもつ意義については，今後の検討により明らかにできるかもしれない．

理論的に，溶血パターンのみについての変化を考えれば，溶血開始値 (HSP) あるいは溶血終了値 (HEP) のみの変化は，溶血幅 (HW) の変化を引き出し，溶血最大値 (HMP) のみの変化は溶血の形状 (a/b) の変化を引き起し，溶血開始値 (HSP)，溶血終了値 (HEP) が変化し，溶血幅 (HW) に変化がない場合は溶血の平行移動ということが考えられる．今回の著者らによって得られた結果のうち，前述の Wistar 系雄の投与群に認められた変化以外の群の変化については，動物の個体差が実験結果（推計学的処理）に反映したものか，赤血球の浸透圧抵抗（溶血抵抗）の生理的本質に起因するのかについては不明であるが，この点は今後の研究課題として検討すべき問題点であると考えられる．

結　論

CPC (Coil Planet Centrifuge) 法を用いて，系統 (JCL-SD, Wistar) の異なる雌雄のラットに，BHT 1.5 % を含む飼料を4週間にわたって摂取させ，投与後1，4週に，赤血球浸透圧抵抗を検討したところ，次の結果を得た．

1. Wistar 系雄の投与1週後において，溶血開始値の低下ならびに溶血幅の減少が認められ，溶血開始値付近の浸透圧抵抗をもつ赤血球の浸透圧抵抗が強くなった．また，投与4週後においては，溶血終了値の低下ならびに溶血幅の増加が認められ，強い浸透圧抵抗をもつ赤血球の新たな出現を示唆した．

2. 他の群（投与4週後の SD 系雄は 4/5 が死亡）においては，BHT のラット赤血球浸透圧抵抗におよぼす影響については明らかでなかった．

文　献

1) 市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，26-2，203，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 56-62, 1976

クロム鉱滓水抽出物の経皮および経消化管吸収

長井 二三子*, 金西 信次*, 原 しげ子*, 樺島 順一郎*
中尾 順子*, 平賀 興吾*

Absorption of Water Extract of Chromium Ore Dross from Skin and Gastrointestinal Tract

FUMIKO NAGAI*, NOBUZI KANANISHI*, SHIGEKO HARA*,
JUNICHIRO KABASHIMA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

最近クロム鉱滓埋め立てによる6価クロム汚染が大きな問題になっている[1,2].

クロムは地殻中に 80～200ppm 存在し，重金属では鉄，マンガンについで多い[3]. 人体にとっても不可欠な元素[3,4]であり，ある種のクロム化合物がインシュリンの作用を強める働きをするとされている[5].

多量のクロムに接したときの健康障害は多く報告されており，一般に存在する2価，3価，6価のクロムのうち6価が吸収されやすく，しかも毒性が強いとされている[3,4,6]. 被害としては1800年代からクロム取り扱い作業従事者に皮膚粘膜障害，鼻中隔穿孔などが認められ，1935年ドイツ，1945年アメリカ，1956年イギリスにおいて肺ガンの発生も認められた[1]. しかし微量のクロム接触による慢性的な人体への影響に関する文献をみいだすことは困難である.

著者らはクロム鉱滓の人体への影響に関する調査研究の一部を分担し，鉱滓水抽出物中の6価クロムの吸収をマウスを用いて検討した. すなわちクロムの放射性同位元素である ^{51}Cr を指標とし，微量のクロム鉱滓水抽出物の経皮および経消化管吸収率，臓器分布，排泄について標準品のクロム酸カリウムのそれと比較検討した.

実験材料ならびに方法

実験材料

クロム鉱滓水抽出物：江東区大島9丁目都営地下鉄工事現場より採取した鉱滓を砂粒大まで粉砕し，粉砕した鉱滓 100g に対して水 100g を加え1～2時間振とうした. 24時間後に吸引ろ過をし，ろ液をクロム鉱滓水抽出物とした. 本実験に用いた抽出物は水質研究科より分与されたものであり，6価クロム濃度 590ppm，pH 12.5 であった.

クロム酸カリウム (K_2CrO_4)：和光純薬試薬特級

クロム酸ナトリウム ($Na_2{}^{51}CrO_4$) 注射液：第一ラジオアイソトープ研究所

ICR・JCL マウス：4週令のものを購入し，実験に供するまで約一週間，室温 25±1℃，湿度 55±5%，照明1日8時間の部屋で一つのケージに10匹ずつ収容し，CE-2の飼料ならびに水道水を自由摂取させて飼育した.

実験方法

経皮吸収：分与された抽出物を6価クロム濃度にして 354ppm，70.8ppm，7.08ppm に再蒸留水で薄め，それぞれの液に $Na_2{}^{51}CrO_4$ を同量ずつ加えた. K_2CrO_4 液も抽出物と同様に Na_2CrO_4 を含んだ抽出物と同濃度のものを作った.

あらかじめマウスを固定し，消毒用アルコールで清拭した耳に上記の液を 10μl しみこませた直径 6mm の東洋ろ紙 No. 2 を密着させ伴創膏でとめた. 貼付したろ紙には ^{51}Cr を 140,000 cpm 前後（バイオガンマによる測定値）含むよう調整した. 一定時間ののち，耳を切り落として貼付した ^{51}Cr を除去したあと，断頭屠殺し，血液，肝，腎，脾，脳を取り出し重量を測定した. 吸収率は貼付した ^{51}Cr を含むマウス全体の放射能と，取り出した血液，肝，腎，脾，脳およびその残屍体を合わせたもの（未吸収クロムを除去したもの）の放射能をそれぞれパッカード・アニマルカウンターを用いて測定し，その割合から求めた. 臓器分布は取り出した臓器の ^{51}Cr

* 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

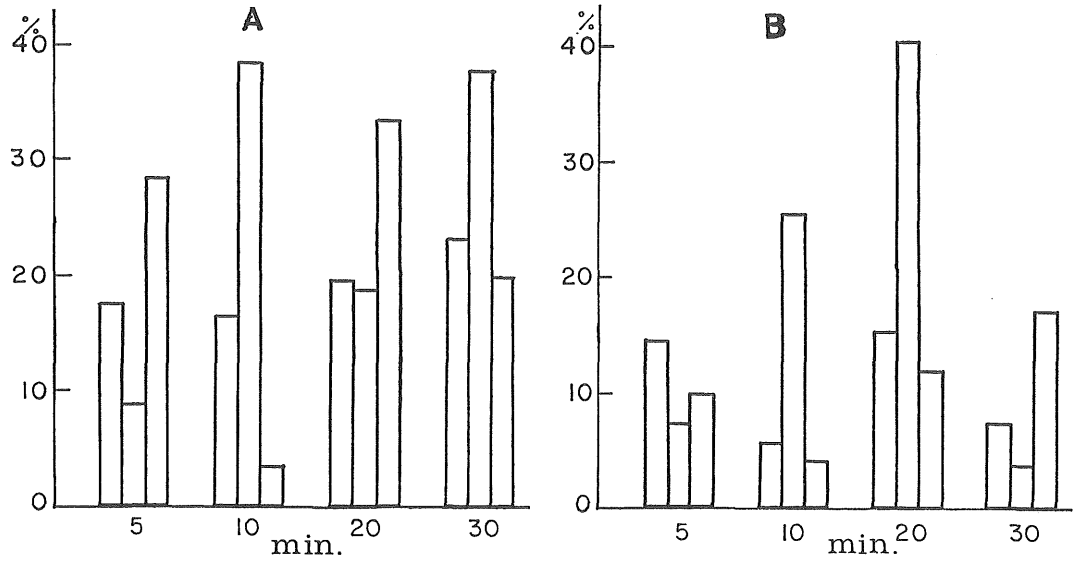


図1. 経皮吸収：貼付時間を変えた時のクロムの吸収率，(A) 抽出物，(B) 標準品 K_2CrO_4
^{51}Cr を含む鉱滓抽出物または標準品の K_2CrO_4 を時間を変えて貼付し，それぞれの吸収率を下式により求めた．
吸収率$=\frac{貼付\,^{51}Cr^{*}-未吸収\,^{51}Cr}{貼付\,^{51}Cr^{*}}\times 100$，貼付クロム濃度は 7.08ppm，たて軸は吸収率(%)，横軸は時間(分)を表わす．1つのカラムは1匹の値である．
* 貼付 ^{51}Cr は未吸収 ^{51}Cr と吸収された ^{51}Cr の和で示した．

を個々にベックマン・バイオガンマ（ウエルタイプのシンチレーションカウンター）で測定し，示した．尿および糞中排泄した ^{51}Cr はマウスを一匹ずつステンレス製カゴに入れ，ろ紙を敷いたバット上におき，水および飼料を与えながら飼育し，一定時間内に排泄した尿および糞を集め，アニマルカウンターで測定した．

経消化管吸収：皮膚吸収の実験に用いた 7.08ppm の濃度の抽出物および K_2CrO_4 液 0.3m*l* を一夜絶食させたマウスにゾンデで投与した．投与液 0.3m*l* 中に 140,000 cpm 前後の ^{51}Cr を含むように調整した（バイオガンマによる測定値）．投与後直ちに飼料および水を自由摂取させて一定時間経過したのち，エーテル麻酔下開胸開腹し，心臓穿刺により採血後，注意深く臓器および食道を含む消化管を取りはずし，経皮吸収実験と同様に臓器重量，吸収率，臓器分布，排泄を調べた．また投与後1日以上経過して測定する動物については尿と糞を分離し，各々 ^{51}Cr をアニマルカウンターで測定した．吸収率は，投与量に対する消化管を除いた残屍体の ^{51}Cr 量の割合で求める方法と投与量に対する尿中に排泄された ^{51}Cr 量の割合で求める方法で示した．本実験では投与後5時間までの吸収率は前者，一日以上経過したものについては後者の方法で示した．

結　果

経皮吸収率

1) 吸収率　図1に示したような経皮吸収は比較的早く，抽出物は貼付後20～30分でプラトーに達し，吸収率は20～30% であった．標準品の K_2CrO_4 は貼付後20分で15～20%程度であった．抽出物の方が標準品に比べてやや高い吸収率を示した．なお抽出物，標準品ともに貼付クロム濃度を変化させて吸収率の測定を試みたが，濃度による吸収率の差はみいだせなかった．

2) 臓器分布　貼付時間と臓器中のクロム量は，図2に示したように，まず血液で上昇し，ついで肝，腎で上昇する傾向にあった．また吸収されたそれぞれの臓器中のクロムは時間により増減し，図3に示したように固有の波形を示すことが観察された．この傾向は血液で最も顕著であった．

3) 排泄　経皮吸収されたクロムは表1に示したように1～5時間では徐々に減少する傾向があった．クロムは血流によって移動し腎から排泄されるものと考えられた(図3)．表には示さなかったが，吸収されたクロムの約75%は24時間以内に排泄された．抽出物と標準品の排泄の差はみいだせなかった．

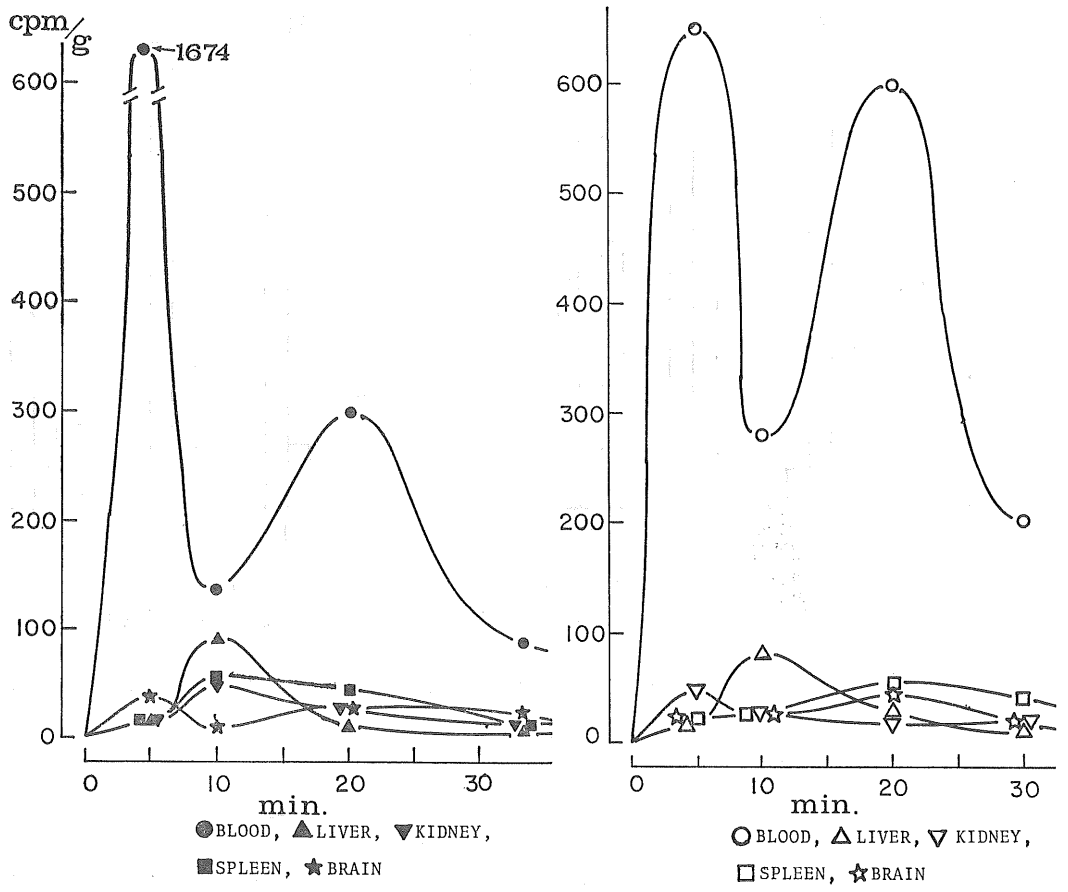


図2. 経皮吸収：貼付時間と臓器分布

貼付クロム濃度は 7.08ppm である．たて軸は臓器グラム当りの ^{51}Cr のcpm，横軸は時間（分）を示した．黒印は抽出物，白ヌキは標準品 K_2CrO_4 である．マウス3匹の平均値で示した．

表1. 経皮吸収クロムの体内残存率

^{51}Cr を含むクロム鉱滓抽出物または標準品の K_2CrO_4 を各々耳に一時間付着させたあと，耳を切り落として未吸収のクロムを除去した．未吸収クロム除去後，1，2，3，5時間後に断頭屠殺し，経時的に体内残存クロムを測定し，貼付した量に対する割合を示した．貼付したクロム濃度は抽出物，標準品ともに7.08ppmである．貼付方法は「実験方法」に示した．

未吸収クロム除去後の時間	残存率（%）	
	鉱滓抽出物	標準品（K_2CrO_4）
1（時間）	33.0± 5.0	—
2	28.9± 2.6	27.6± 1.4
3	24.7± 2.7	18.2± 7.4
5	13.8±16.7	26.4±11.9

マウス3匹の平均値±標準偏差

表2. 経消化管吸収率

吸収率は下式により計算した．投与クロム濃度は，抽出物，標準品ともに．7.08ppm.

$$\text{吸収率} = \frac{\text{個体より消化管を除去したときの測定値(cpm)}}{\text{個体の測定値(cpm)}} \times 100$$

投与後経過時間（時間）	吸収率（%）	
	鉱滓抽出物	標準品（K_2CrO_4）
1	2.1±1.3	3.4±1.4
3	2.6±1.2	3.3±1.6
5	3.3±1.0	2.5±0.6

マウス3匹の平均値±標準偏差

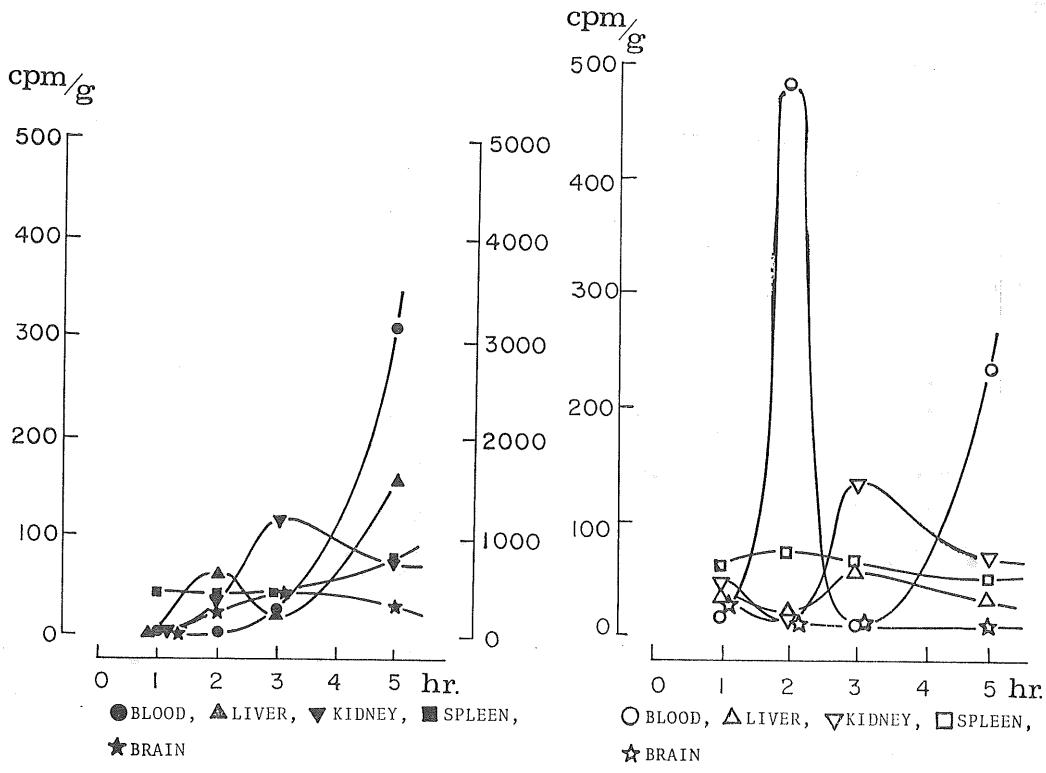


図3. 経皮吸収されたクロム臓器分布

表1に示した方法で未吸収クロムを除去後，吸収されたクロムの臓器中の変動を調べた．貼付クロム濃度は7.08ppmである．たて軸は臓器グラム重量あたりの^{51}Cr(cpm)，横軸は未吸収クロム除去後の時間(時間)を示す．黒印は抽出物，白ヌキは標準品 K_2CrO_4 である．抽出物貼付群の血液は他の臓器の10分の1のスケールで表わした．マウス三匹の平均値で示した．

経消化管吸収

1) 吸収率 経皮吸収に比べて比較的遅い吸収を示し，1～5時間の観察では消化管をはずした残りの体内への吸収は常に投与した量の3%程度であった（表2）．しかし24時間後尿中への排泄量から求めた吸収率は抽出物21.5%，標準品30.1%になった（表3）．投与後一週間経過時までに尿中に排泄されたクロムは投与量に対して抽出物 22.5%，標準品 31.6% であった．抽出物中の6価クロムは標準品に比べて吸収されにくいという結果である．

2) 臓器分布 経皮吸収においてもまず血液中のクロムが上昇したのと対照的に消化管吸収では，図4に示した如く，投与5分後，他の臓器でまだ ^{51}Cr が測定できないとき，すでに肝中にかなり存在していた．その後も肝中のレベルは他の臓器より高かった．肝中クロムレベルの上昇のしかたに抽出物と標準品で差があり，抽出物の方が標準品よりおくれて上昇した．また臓器中のクロムは時間によって増減したが，経皮吸収のように臓器間でその増減の波形がずれるようなことはなかった．脳にはほとんど吸収されなかった．

表3. 経消化管吸収（投与量に対する尿中排泄量）
投与クロム濃度は抽出物，標準品ともに7.08ppm.

投与後日数	尿中排泄量の投与量に対する割合(吸収率, %)	
	鉱滓抽出物	標準品 (K_2CrO_4)
1日	21.5 ±12.7 (24)	30.1±15.8 (24)
2	0.7 ± 0.4 (24)	1.1± 0.5 (24)
3	0.2 ± 0.1 (21)	0.2± 0.1 (21)
5	0.1 ± 0.1 (18)	0.1± 0.1 (18)
7	0.03± — (15)	0.1± 0.1 (15)
合計	22.5	31.6

平均値±標準偏差，( ) は動物数

3) 排泄 投与後9日までは尿と糞を分離してそれぞ

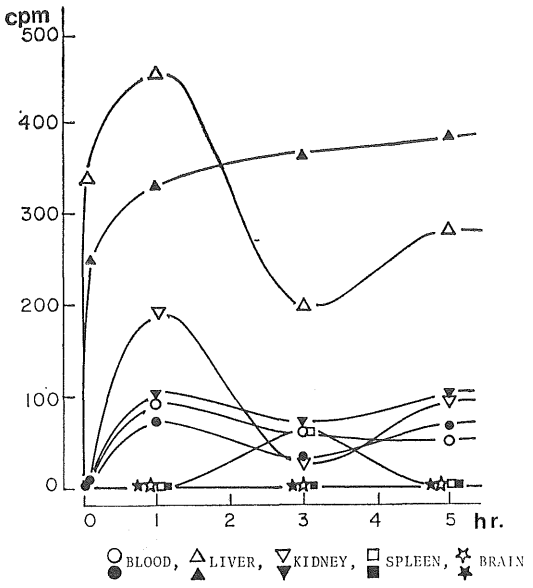


図 4. 消化管より吸収されたクロムの臓器分布の経時変化

経口投与後，経時的に各臓器のクロムを測定し，マウス 3 匹の平均値で示した．たて軸は臓器あたりの ^{51}Cr(cpm)，横軸は時間を表わす．黒印は抽出物，白ヌキは標準品 K_2CrO_4 を示す．

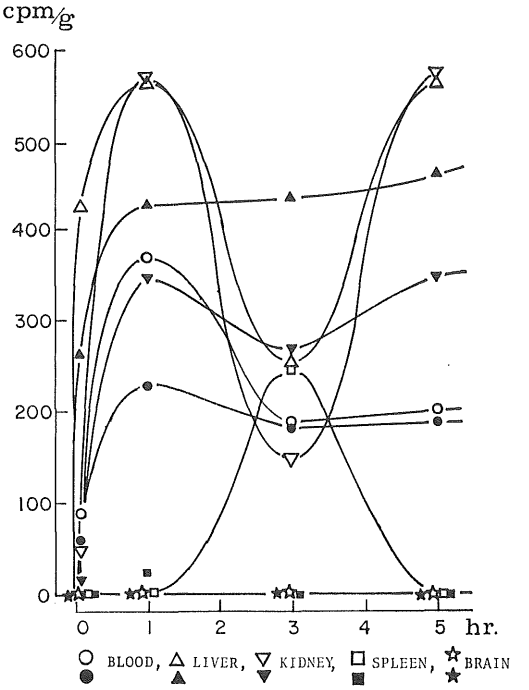


図 5. 消化管吸収されたクロムの臓器分布の経時変化

図 4 のグラフを臓器グラム重量あたりの ^{51}Cr の cpm で示した．横軸は経口投与後の時間（時間）を示す．黒印は抽出物，白ヌキは標準品 K_2CrO_4 である．マウス 3 匹の平均値で示した．

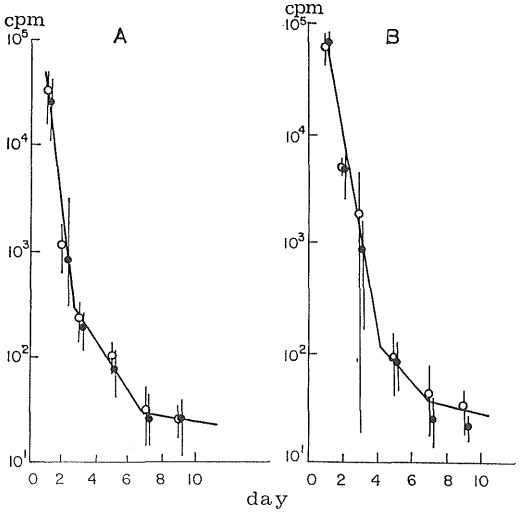


図 6. 消化管吸収：クロムの尿中および糞中への排泄，(A) 尿中，(B) 糞中の ^{51}Cr

マウス 3 匹を 1 群とし投与後 1 日目は各々 9 群の平均値，その後 1 群ずつ殺して 9 日目は 4 群の平均値である．たて軸は ^{51}Cr 量，横軸は投与後の日数を表わす．

● クロム鉱滓抽出物，　○ 標準品 K_2CrO_4

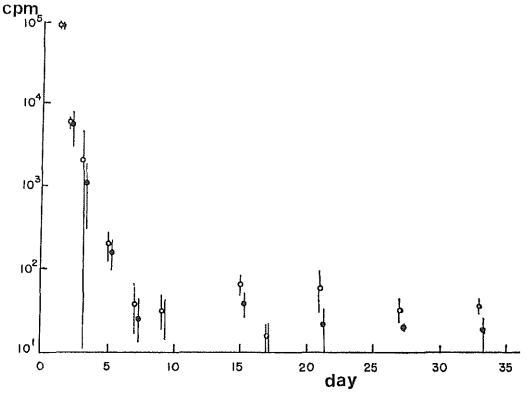


図 7. 消化管吸収：排泄物中のクロム（尿および糞中に排泄された ^{51}Cr の和）

マウス 3 匹を 1 群とし，投与後 1 日目は各々 9 群の平均値，その後 1 群ずつ殺して最終日は 2 群の平均値である．たて軸は ^{51}Cr (cpm) 横軸は投与後の日数，

● クロム鉱滓抽出物，　○ 標準品 K_2CrO_4

れの ^{51}Cr を測定した（図6）．以後は尿と糞を合わせたまま数日分をまとめて測定した（図7）．投与クロムの大部分は24時間以内に尿および糞中に排泄された．吸収されたクロムは24時間以内に95%以上尿中に排泄された．排泄速度は尿，糞ともに投与後3日と7日に折れ曲がり点を示した．抽出物の吸収率は標準品に比べてやや低かったが，排泄速度においては両者の違いをみいだすことは出来なかった．

4) 臓器重量　投与後4，5日間は肝，腎，脾重量において抽出物投与群が標準品 K_2CrO_4 投与群に比べて軽かった．飼料が入った状態で測定した消化管の重量も臓器と同様に抽出物投与群が標準品より軽かった．いずれの場合も，4，5日経過時からは，差がみられなくなった．

考　察

クロム鉱滓水抽出物の経皮吸収は短時間でおこり，貼付後20～30分でそのプラトーに達した．吸収率は20分の時点で平均25%前後である．実験方法上 ^{51}Cr が完全に皮膚表面に付着したとは考えにくいので，実際に付着したクロムに対する吸収率はもっと高くなると考えられる．

消化管吸収は表2に示した計算方法で吸収率を求めると，3～4%となり，経皮吸収の場合よりかなり低い．しかし尿中に排泄された量から吸収率を求めると抽出物が22.5%，標準品 K_2CrO_4 が31.6%になる．消化管吸収の場合には吸収速度は経皮の場合より遅く，排泄速度とのバランスが保たれた状態であると考えれば，体内に存在する量は時間的増減が少なく，ピークを示さないことは説明できる．

抽出物と標準品の吸収率を比較すると，経皮の場合は抽出物が高く，経消化管では逆に標準品が高い．この相違はクロム鉱滓抽出物に混在する6価クロム以外のものの影響だと想像されるが，結論を出すためには抽出物のくわしい分析結果を得る必要がある．

経皮吸収され血中に入ったクロムは時間によって増減し波形を描いた．臓器中でも血液ほど著明ではないが波形を示す．吸収されたクロムは血流によって肝や腎に取り込まれ，最終的には腎から排泄されると考えられた．腎では再吸収されるクロムもあるという報告[7]から考えると，血中クロムの増減は再吸収によるものとも考えられる．生体のリズムとの関連性が示唆され，興味深い．

消化管より吸収されたクロムは他の臓器よりも早く，しかも多量に肝に集まる．臓器に存在するクロムを臓器グラム重量当りで比較した結果では肝と腎は，ほぼ同量のクロムを含んでいたが，経皮の場合のように，血中濃度が他の臓器より高くなるようなことはなかった．以上のことから消化管より吸収されたクロムは門脈を通って肝に達し，その後，血流によって全身に分散するものと考えられた．経皮吸収されたクロムの臓器分布は個々の臓器間で時間的にずれた波形を示したが，消化管吸収の場合はそのような傾向は見られなかった．経皮吸収では，一定時間中に吸収されたクロムの臓器分布を調べたのに対して，消化管吸収は，投与したクロムが長時間にわたって消化管内に存在し，持続的に吸収される．吸収されたクロムについては経皮吸収と同じ挙動を示すものと考えられるが，見かけ上は，臓器分布の時間的ずれはなかった．

経口投与後10日間の臓器重量を比較すると肝，腎，脾いずれも抽出物投与群が標準品投与群より軽い．これについてはさらにくわしく検討する予定である．また飼料が入った状態で測定した消化管の重量も抽出物投与群が軽くなっていた．鉱滓水抽出物にはクロムの他にも多くの物質が含まれると考えられ，それらの物質の作用が両者の吸収率，臓器重量，食餌摂取などにおいて違いを生んだ原因であろうと思われる．くわしい分析結果を待ってさらに討論したい．

経皮吸収されたクロムは24時間以内に75%以上排泄された．しかしこの事についてはくわしく調べなかったので今後検討してみたい．

消化管より吸収されたクロムは24時間以内に95%以上尿中に排泄された．その後クロムは3日と7日に折れまがり点をもつ排泄速度を示した．吸収されたクロムには，まったく変化を受けることなく排泄されるもの，生体の代謝にかかわるもの，タンパクに結合するものなどが考えられ[1]，それぞれのものにターンオーバーの違いがあるのは当然であろうと思われる．排泄に関しては抽出物と標準品 K_2CrO_4 との違いをみいだすことができなかった．

要　約

ここに述べたクロムの放射性同位元素（^{51}Cr）を指標にした低濃度のクロム鉱滓水抽出物の吸収および排泄に関する実験から次のようなことが要約される．

1) 皮膚に貼付したクロムは短時間のうちに吸収され20～30分でそのプラトーに達し，その時点での吸収率は，クロム鉱滓水抽出物で貼付量の20～30%，標準品 K_2CrO_4 で15～20%であった．

2) 消化管吸収は比較的遅く，投与後5時間以内では常に3%程度存在し，排泄と一定の比率が保たれていた．尿中に排泄された量から吸収率を求めると抽出物22.5%，標準品31.6%であった．吸収されたクロムの

95%以上は24時間以内に排泄された.

3) クロム鉱滓水抽出物の吸収は標準品 K_2CrO_4 の吸収とはかなりの違いがあり，純粋に6価クロムとして問題にすると同時に，混在する物質についても検討を要する.

4) 皮膚吸収の結果が示すように排泄は一定のリズムを持っている.

文　献

1) 渡部真也，福地保馬：科学，45，688，1975

2) 寺尾　悟，渡辺和美，鈴木淑充，渡辺直大，玉置勉，伊谷昭幸：東京都医師会雑誌，28，584，1975

3) Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants : *Chromium*, 1, 1974, National Academy of Science, Washington, D. C.

4) Merz, W. : *Physiological Reviews*, 49, 163, 1969

5) Merz, W. : *Nutrition Reviews*, 33, 129, 1975

6) 東京大学医学部保健学科内ニッケル，クロム研究班：ニッケルおよびクロムの人間への影響に関する研究，67，1974

7) Collins, R. J., P. O. Frcnm, and W. D. Collings *Amer. J. Physiol.* 201, 795, 1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 63-66, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与時にラット尿中に出現する桃色物質

神谷 信行*, 市川 久次*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Pink Coloured Substance in Urine Excreted by Rat Fed with BHT

NOBUYUKI KAMIYA*, HISATSUGU ICHIKAWA*,
TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は油脂等の酸化防止剤，ゴム，プラスチック製品等の安定剤として広く使用されている．先に平賀[1]ら，市川[2]らはラットを用いたBHTの毒性試験において，BHTを投与したラットの尿が餌コボシ測定用ろ紙を桃色に染める事実を認め報告した．今回，著者らはこの桃色物質の検索を試みるとともに，BHTをラットに投与した時の主な尿中代謝物質の分離を試み，若干の知見を得たので報告する．

実験材料

動物：SLC-Wistar系（SPF）ラットの雄を4週令で購入し，1週間一般飼料 CE-2（日本クレア）で予備飼育後，順調な発育を示したものを使用した．飼育環境は，室温 25±1°，湿度 55±5％ に調整された飼育室で，1匹ずつアルミ製代謝ケージ（岡崎産業）に収容飼育した．尿は毎日午前中に採取した．

試料：BHTは東京化成工業製（Lot. No. AMO3）を用い，濃度が1.5％になるように粉末飼料 CE-2に混合して投与し，コントロール群にはCE-2を自由に摂取させた．なお飲料水は水道水を自由に摂取させた．

実験方法

試薬：3, 5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-ald) は Coppinger[3]らの方法にしたがって合成し，3, 5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acd) は Yohe[4]らの方法にしたがって合成した．また 3, 5, 3′, 5′-Tetra-*tert*-butylstilbene-4, 4′-quinone (BHT-qui) は Cook[5]らの方法にしたがって合成した．3, 5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylalcohol (BHT-alc)：Aldrich Chemical Co. エチルエーテル：残留農薬試験用（和光純薬）．その他の試薬は試薬特級を使用した．

抽出操作：採取した尿はろ過したのち，5N 硫酸で pH 2.0に調整し，エチルエーテル 150m*l* で3日間振とう，静置をくり返して抽出した（画分 A）．エーテル層は減圧下で留去したのち，残留物は メタノール 1 m*l*，およびエチルエーテル 10m*l* を順次加えて溶解し，さらに石油エーテル 100m*l* を注いでかるく振りまぜ，1時間静置したのちろ過した．ろ液は飽和炭酸水素ナトリウム溶液 20m*l*，4％炭酸ナトリウム溶液 10m*l*，10％水酸化カリウム溶液10m*l* を用い，順次それぞれ3回ずつ抽出し，各抽出画分は5N硫酸で酸性にしたのち，エチルエーテル20m*l*ずつでそれぞれ3回抽出した（画分B，C，D）．

薄層クロマトグラフィー（TLC）：シリカゲルプレート（厚さ0.25mm，シリカゲル60）を用いた．画分Aはクロロホルムおよびクロロホルム・アセトン混液（1：1）で展開した．

画分 B, C およびDと BHT-alc, BHT-ald, BHT-acd, および BHT-qui については石油エーテルおよび石油エーテル・エチルエーテル混液（1：1）で展開した．プレートは風乾したのちヨード蒸気に曝露し，かっ色のスポットの有無を確認した．

分取薄層クロマトグラフィー（PLC）：シリカゲルプレート（厚さ2mm）を用いた．画分Aをバンド状にスポットしたのち，石油エーテル，クロロホルム，クロロホルム・アセトン混液（1：1）の順に多重展開し，薄層クロマトグラム上の桃色のバンドをかき取りエタノールで抽出したのち，ガラスろ過器（G3）でろ過した（画分E）．

ガスクロマトグラフィー（GLC）：画分 A，E および BHT-qui について次の条件で行った．装置：島津GC-4BMPF（水素炎イオン化検出器）．カラム：1.5％ SE-

* 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

30 on Chromosorb G(AW-DMCS), ガラスカラム3mm×2m. 温度：カラム 230°, 検出器 270°. キャリアーガス：N_2, 40ml/min.

実験結果

コントロール群のラットから採取した尿についてChart 1のとおり抽出を行ったところ，画分Aは淡黄色，画分B, C, D は無色であった．同様に BHT 投与群では画分Aは赤かっ色を，画分B，CおよびDは黄色を示した．

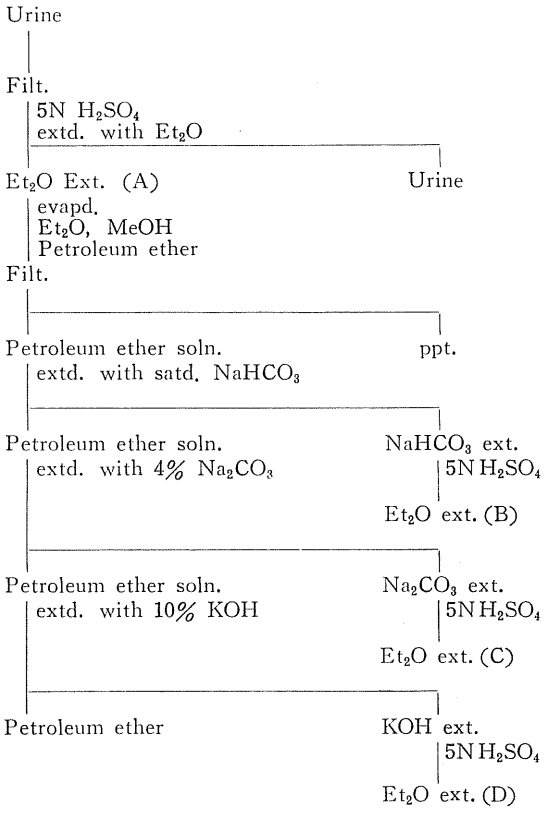


Chart 1. Separation of BHT metabolites

Table 1. Rf values of BHT metabolites on TLC plate

Compound	Petroleum ether	Petroleum ether•Ether
BHT-alc	0.14	0.25
BHT-ald	0.29	0.42
BHT-acd	0.01	0.16
BHT-qui	0.52	0.92

画分Aの TLC には展開溶媒はクロロホルム・アセトン混液 (1：1) が，また画分B，CおよびDの場合の展開溶媒は石油エーテル・エチルエーテル混液 (1：1) が良好な結果をあたえた．(Table 1, Fig. 1).

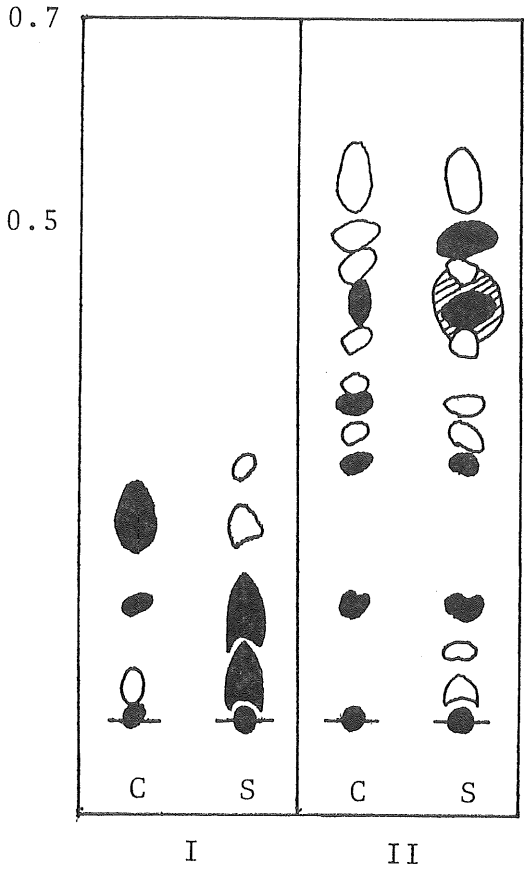


Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Fraction A
C : control S : sample
Deveroper : I chloroform,
II chloroform-acetone (1 : 1)

A, B, CおよびDの各画分の TLC プレート上には桃色のスポットは認められなかったが，多量の画分Aを処理して PLC を行ったところ，桃色のバンド状スポットが確認できた．

TLC により画分Bからは BHT-acd が，画分Cからは BHT-alc が，画分Dからは BHT-alc と BHT-ald がそれぞれ確認されたが，いずれの画分からも BHT-qui は確認されなかった．(Fig. 2). また画分Aからも BHT-qui と Retention Time (R. T.) が一致する GLC のピークは見られなかった (Fig. 3). また PLC で得られた画分Eの桃色物質については Fig. 4 に示すガスクロマトグラムが得られたが，ピークはBHT-qui のそれとは一致しなかった．

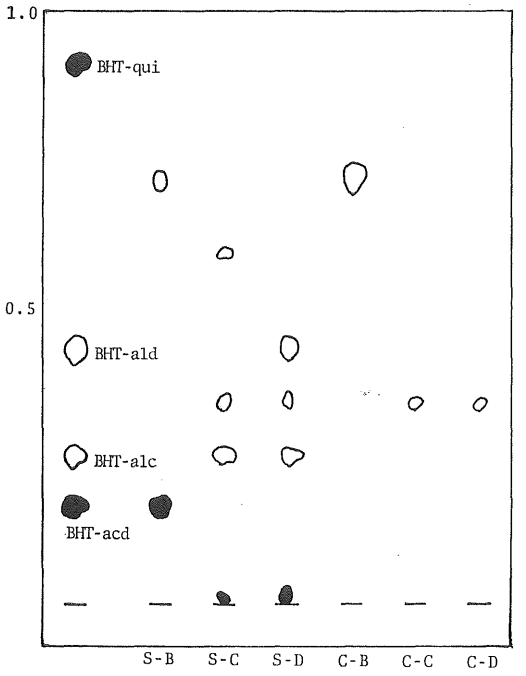


Fig. 2. Thin-Layer Chromatogram of BHT metabolites and Fraction B, C, D,
C : control S : sample
Deveroper : petroleum ether•ether (1 : 1)

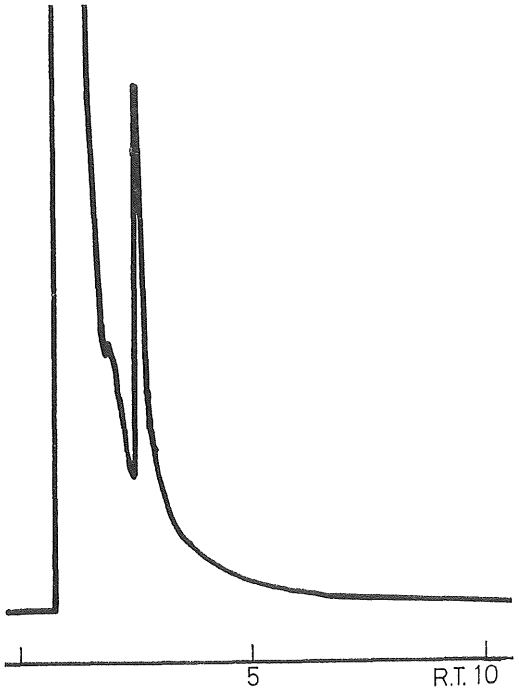


Fig. 4. Gas Chromatogram of Fraction E

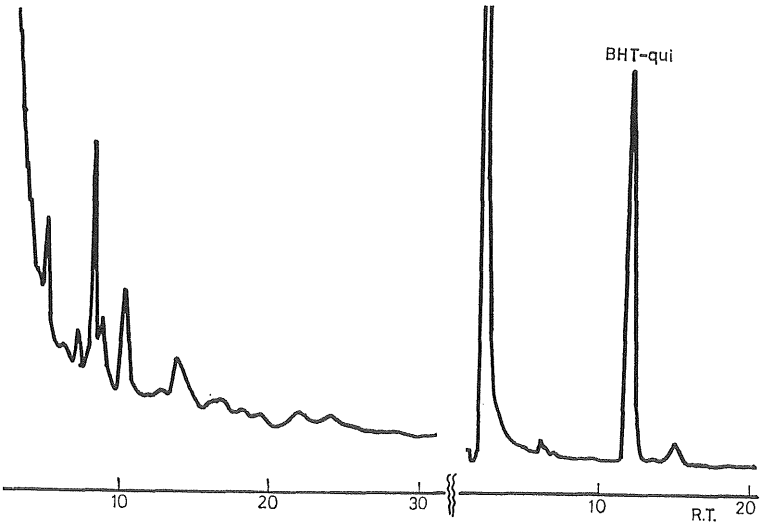


Fig. 3. Gas Chromatogram of Fraction A and BHT-qui

総　括

ラットにおけるBHTの代謝物質として，グルクロン酸抱合体や，BHT-alc, BHT-ald, BHT-acdのほかに1, 2-Bis-(3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) ethane (BHT-ethane)が報告[6]されている．このBHT-ethaneに紫外線を照射することによって，赤かっ色のBHT-quiが生成するとの報告[7]がある．BHT摂取ラット尿はろ紙上で一定時間放置後はじめて桃色に発色することから，この桃色物質は，BHT-ethaneが空気あるいは光によって酸化されたBHT-quiではないかと推定し分離を試みた．しかし，今回の結果からは，画分A, B, C, DおよびEのどの画分からもBHT-quiと一致するTLCのスポットおよびGLCのピークは認められなかった．今後は桃色物質の色調などから側鎖の変化した2量体やsemi quinone体等の可能性も考えられるのでガスクロマトグラフ質量分析計等を用いて構造の検討を加えるつもりである．

文　献

1) 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

2) 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：東京衛研年報，26-2, 1, 1975

3) Coppinger, G.M. and J.W. Campbel : *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 734, 1953

4) Yohe, G.R., J.E. Dunbar, R.L. Pedrotti, F.M. Scheidt, F.G.H. Lee, and E.C. Smith : *J. Org. Chem.*, 21, 1289, 1956

5) Cook. C.D., N.G. Nash, and H.R. Flanagan : *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1783, 1955

6) Holder, G.M., A.J. Ryan, T.R. Watson, and L.I. Wiebe : *J. Pharm. Pharmac.*, 22, 832, 1970

7) 原納靖子，星野乙松，浮田忠之進：衛生化学，13, 197, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 67-76, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のフェノバルビタール，イソニコチン酸ヒドラジド前処理ラットにおける肝臓におよぼす影響

福森 信隆*, 三栗谷 久敏*, 平賀 興吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Liver of Phenobarbital or Isonicotinic Acid Hydrazide pretreated Rats

NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）はその酸化防止作用により食品およびゴム，石油製品に対する抗酸化剤，安定剤として広く使用されている．先に当部ではラットにみられる出血傾向[1]，BHT高濃度での体重抑制[2]を報告し，BHTの作用について検討を加えつつあるが，今だ作用機序は明らかでない．BHTの肝臓に対する作用は肝重量と体重および生化学的検索の両面からの報告[3]があり，また肝重量の増加，滑面小胞体（SER）の増殖[4,5]がみられ，共に薬物代謝酵素を誘導せしめ機能亢進と解されている[6,7]．

今回，BHTの肝臓に対する作用機作を解明する目的の一環として，薬物代謝酵素を誘導するフェノバルビタール-Na(PB)および阻害するイソニコチン酸ヒドラジド（INH）でラットを前処理した後BHTを投与し，BHT単独投与との関連において肝機能および肝細胞の微細構造変化について比較検討した．

実験方法

動物はbarrier system下に生育されたSD-JCL系雄ラットを使用し，室温25°±1°，湿度50%±5%の環境下でケージに5匹ずつ収容して，飼育用固型飼料（日本クレア，CE-2）を与え，水とともに自由に摂取させた．飼育は一般飼育室にて行い，1週間馴化飼育後，生後5週齢から1群10匹としてBHT（和光純薬，Lot No. ACL 5024）250mg/kgをオリーブ油（和光純薬）に溶解させ，午前9時，午後4時の1日2回，2日，4日，6日間経口投与した．同時にPB（藤永製薬）およびINH（東京化成）水溶液各30mg/kgをBHT投与30分前に腹腔内投与した．対照はオリーブ油を用い，BHT投与と同一の条件にて行った．なお，PB, INH単独投与群のみ各5匹ずつ6日間投与して，検索の参考に供した．

体重：午前9時，午後4時の日2回薬物投与時に測定を行った．

肝重量：断頭放血屠殺後，速やかに肝臓を摘出し肝重量を測定した．

血清生化学的検査：1群5匹のラットを用い放血時の血液から定法に従い血清を調整し，Reitman-Frankel変法によるヘパテストA（第一化学）を用い，GOT, GPT活性のみ比色定量した．なおGOT活性は高単位のため，2倍希釈して行った．

睡眠時間延長作用：1群5匹のラットを用い，ヘキソバルビタール（帝国化学）100mg/kgを屠殺前に腹腔内投与し，正向反射の消失までの時間および正向反射消失時より再び出現するまでの時間（消失持続時間）を測定比較した．

電子顕微鏡用試料作製：放血屠殺後，肝方形葉左下端部を摘出し，細切後3%パラホルムアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.4）で3時間前固定を行い，0.1Mリン酸緩衝液中で一晩氷室内洗浄後，1% OsO_4で後固定を1.5時間行った．エタノール脱水後，定法に従いEpon 812-Araldyte Mに包埋した．包埋した電顕試料の厚さ約1μの切片をトルイジン青にて染色し光顕的に観察後，肝小葉中間帯の超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し，HU-12A型電子顕微鏡にて観察した．なお電顕的観察は6日間投与のみ行った．

実験結果

期間中BHT・PB投与で2例の死亡を認め，両眼出

* 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

Table 1. Body weight and liver weight of rats treated with BHT and other drugs

Days	Drugs	No. of rats	Body weight			Liver weight	
			Initial (g)	Final (g)	Growth rate (%)	(g)	(g/100g b.w.)
2	Control	10	114.9±1.38	129.3±2.05	112.4±0.89	5.80±0.24	4.47±0.14
	BHT	10	112.4±2.62	118.3±3.34*	105.2±1.19*	7.53±0.31*	6.34±0.11*
	BHT+PB	10→9	114.8±1.06	116.7±4.08*	101.6±3.31*	7.82±0.30*	6.57±0.10*
	BHT+INH	10	116.3±2.19	120.5±3.06*	103.6±1.51*	7.27±0.30*	6.01±0.14*
4	Control	10	112.3±1.87	142.2±2.33	126.6±0.46	6.39±0.17	4.49±0.09
	BHT	10	116.1±1.91	134.9±3.78	115.9±1.99*	8.56±0.29*	6.34±0.09*
	BHT+PB	10→9	111.9±1.73	134.6±4.81	119.6±3.07*	9.87±0.31*	7.35±0.14*
	BHT+INH	10	114.5±1.30	116.6±5.70*	101.8±4.83*	7.40±0.28*	6.40±0.21*
6	Control	10	116.0±1.42	160.3±3.14	138.1±1.73	7.07±0.29	4.40±0.12
	BHT	10	115.2±1.74	144.0±4.14*	124.9±2.86*	8.64±0.42*	5.97±0.14*
	BHT+PB	10	116.8±2.56	155.8±4.59	133.2±2.29	10.88±0.32*	6.99±0.11*
	BHT+INH	10	113.2±1.84	134.9±3.83*	119.2±3.11*	7.75±0.25	5.74±0.06*
	PB	5	113.8±3.59	164.4±5.68	144.4±1.48*	9.14±0.58*	5.54±0.19*
	INH	5→4	116.2±1.72	162.2±3.88	138.3±2.32	7.74±0.14	4.77±0.07

mean±SE　　* $p<0.05$

血，貧血症候を呈した．また INH 群で1例死亡した．

体重：Table 1 に各群の初期体重および投与後の体重値，成長率を示した．投与後2日で対照群に比べ薬物投与群は有意な体重の抑制を同程度に認めその差が著しくないが，6日後では BHT・INH 群の抑制が大きく，BHT・PB 群は比較的軽度の抑制を示した．PB 群は対照群に比し，成長率に増加を認め，INH 群では体重差がみられなかった．6日間投与の体重変動の詳細な動態を別報[8]に記載し群相互の体重推移を比較した．

肝重量：肝重量は2日目から薬物投与群で著しく増加し，時間経過に従い増加傾向を示した．全期間を通じ，BHT・PB 群の増加が顕著であり，また BHT・INH 群の増加が BHT 群の増加に比べ若干軽度であった．体重比重量での対照群は，体重増加に比例して肝重量も増加するためほぼ一定の値であるが，薬物投与群では投与後2日から体重比重量の増加がみられ，4日後にその増加が大きな値を示した．PB 群は6日間投与で肝重量，体重比重量とも有意に増加し，INH 群では対照群と差がみられなかった (Table 1)．

血清生化学的検査：Fig. 1 に血清 GOT, GPT 活性の動態を示した．GOT 活性は投与後2日で BHT 群，BHT・PB群で増加を示し，4日で各群に差を認めないが，6日で BHT 群のみ有意な増加を認めた．GPT 活性は投与後急激な上昇を呈し，BHT 群，BHT・PB 群で顕著であった．この2群は全期間を通じ活性の上昇を認めており，一方 BHT・INH 群では2日目に有意な増加を示したが，時間経過に伴い対照群と同程度の活性を認めた．また PB 群，INH 群とも6日間投与で対照群に比べ差がみられなかった．

睡眠時間延長作用：ヘキソバルビタール睡眠時間に及ぼす影響を Table 2 に示した．正向反射の消失に要する

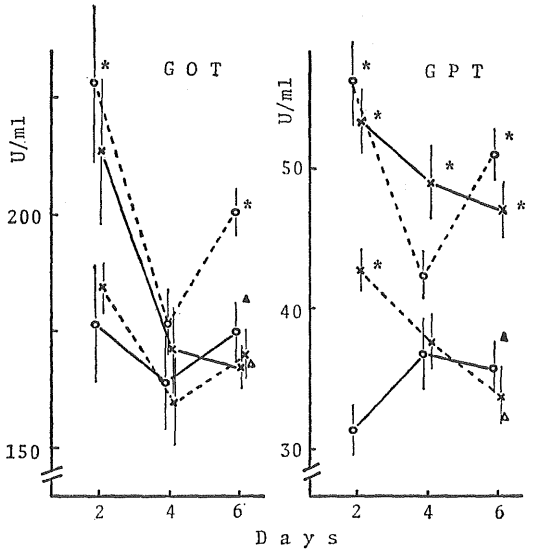


Fig. 1. Serum biochemical changes of treated rats —○— Control. --○-- BHT. —×— BHT+PB. --×-- BHT+INH. ▲ PB. △ INH.
mean±SE * $p<0.05$

Table 2. Effect of BHT and other drugs on hexobarbital sleeping time of rats

Days	Drugs	No. of rats	Time to loss of righting reflex (sec)	Time from loss of righting reflex to awakening (sec)
2	Control	5	77.0±12.70	1508.0± 65.47
	BHT	5	127.6±11.21*	1053.2±157.83*
	BHT+PB	4	172.5±20.05*	968.7±157.32*
	BHT+INH	5	170.2±24.49*	1142.2±219.27
4	Control	5	112.0± 7.51	1317.0±88.35
	BHT	5	147.0±22.28	669.4±49.55*
	BHT+PB	4	216.2±23.55*	408.2±45.08*
	BHT+INH	5	148.0±15.05	741.0±90.95*
6	Control	5	123.6± 5.93	1264.4±80.42
	BHT	5	161.0±10.41*	599.0±89.47*
	BHT+PB	5	352.8±38.36*	269.6±60.30*
	BHT+INH	5	161.6±13.28*	736.6±49.72*

mean±SE　　* $p<0.05$

時間は，投与後2日で薬物投与群に延長を認め，BHT・PB群，BHT・INH 群に同程度の 延長を認めたが，BHT群はそれより若干短縮していた．4，6日間でBHT群，BHT・INH群の延長はほぼ同程度であるが，BHT・PB 群は顕著な延長を示した．一方消失持続時間は，対照群も時間経過に伴い若干短縮しているが，BHT・PB群ではその短縮が著しかった．また BHT 群，BHT・INH群では対照群に比べ短縮がみられ，わずかにBHT群の短縮が大きい感を得た．投与6日間の PB 群は消失に要する時間を延長させ，消失持続時間を短縮させる傾向を示したが，INH 群では対照群に近かった．

電顕的所見：BHT 群は6日間投与で glycogen 野に SER の増殖が認められ，vesicle 状，tubule 状ともに存在し，顕著な増殖野での glycogen 顆粒は減少した．伸長した SER は発達した Golgi 装置と区別が明らかでなく，連結と思われる像も観察された．また拡張したSERは，軽度ではあるが小空胞の形成を惹起せしめた．一部糸粒体の異型がみられ，粗面小胞体 (RER) で囲繞される傾向を示す糸粒体も SER 増殖野に隣接して認められた．核小体は良好な発達を呈し，周囲の chromatin の凝集が明瞭であった．毛細胆管周囲の細胞質に secondary lysosome の増加がみられ，microbody も軽度に増加を認めた (Photo. 1, 2).

BHT・PB 群では SER の増殖が顕著であり，それに伴いglycogen 顆粒の著減を認めた．増殖した SER は，glycogen 野に密集して vesicle 状あるいは tubule 状の網状構造を呈し，ribosome を離脱した RER との連接像もみられた．RER は層状配列の乱れがみられ，SER 増殖野で RER の消失傾向を認めた．また長型化した糸粒体が散在し，microbody の軽度な増加もみられ，小 myelin 様構造を含む小空胞も散見された．核，核小体は何れも肥大傾向を呈した (Photo. 3, 4).

BHT・INH群では，SERは対照に比べ増加し，ほぼ BHT 群と同程度でありその形態は多く vesicle 状を呈した．RER は層状配列の乱れを認めず，糸粒体も多く対照に近かった．Glycogen 顆粒は若干減少がみられたが，なお存在を認めた．また SER 増殖部に膜様構造物を封入した小空胞が散見され，myelinの初期像とも思われる細胞もあった．核は細胞により肥大性のもの，萎縮傾向のものが観察された (Photo. 5, 6).

PB 群は glycogen 野に SER の顕著な増殖がみられ，vesicle 状，tubule 状ともに密集しており，glycogen 顆粒の減少を認めた．また隣接部の RER は層状配列の乱れがあり RER の消失もみられた．糸粒体はやや長型化を呈したが，顆粒に変化を認めなかった．核，核小体も対照に比べ変化を認めなかった．

INH 群は SER の増殖を認めず，glycogen 顆粒の存在が顕著であった．核は細胞により萎縮を認めるものもあり，若干不整な核膜が散見された．糸粒体は長型，くびれ像などの異型を呈し，一部に cristae の崩壊，小空胞形成を認めたが，他の organelles の変化はみられなかった．

考　察

ある種の脂溶性薬物は肝臓の薬物代謝機構に作用し，生体機能に異なる影響を与える．代謝活性の増加で無毒化されるストリキニーネや反対に代謝されることにより毒性が増強される薬物もあり，薬物代謝活性は毒性の強弱および生体反応の出現に多大な影響を与える[9]．さらに臨床面からも薬効に変化を及ぼすと考えられ，ことに食品として日常頻繁に摂取する機会の多い食品添加物などは，その相乗性，蓄積性をも加味して考慮する必要がある．

このような観点から，本実験は薬物代謝酵素の誘導剤で cyt. P-450 含量，NADPH-cyt. c reductase 活性を増加させる PB[10]，阻害剤であるヒドラジン誘導体の INH[11]で前処理した後 BHT を投与し，BHT の作用に対する影響について比較した．またBHTは，cyt. P-450 含量，aminopyrine demethylase 活性の上昇を認めており[6,7]，薬物代謝酵素活性の増加と SER の増殖との関係も報告されている[5]．今回特にBHTに対する相乗，拮抗作用に関して肝小胞体の機能と形態について検索した．

体重と肝重量の関係で，BHT 群は体重増加を抑制したが肝重量を増加させ，そのため体重比肝重量を著しく増加させた．これに対し，PB 群は6日間で体重増加の抑制を認めず，成長率では逆に増加しており，また肝重量の増大も認められる．このことから BHT と PB では，肝重量の増加が同程度でも体重増加に異なった影響を与えると思われ，PB の体重の増加は中枢神経抑制による自発運動の減少のためとも推察される．BHT・PB 群は初め体重増加を抑制したが，漸次増加傾向を示し対照群に接近した．これは肝重量の増加が顕著なため，体重値に肝重量の増加分をも包含されているものと考えられる．INH群は体重，肝重量に影響を与えないが，BHT・INH 群で体重増加を抑制した．また肝重量ではさほど増加が顕著でなく，体重比肝重量が増大しているのは，主に体重抑制に起因すると考えられる．これらの事実から PB 前投与による BHT の作用は，BHT 単独に比し体重の強い抑制をみないで肝重量を著しく増加させ，また INH 前処理で，体重の抑制がみられ，肝重量の増加がさほど大きくないことがわかった．つまり PB は BHT の体重増加の抑制に対してやや拮抗的に，INH は相乗的に作用し，肝重量の増加に対しては PB が相乗的に働くと示唆される．肝重量は体重に伴って変化すること[3]から考えると，PB, INH 前処理で異なる結果を得たことは興味深い．

血清GOT, GPT活性は BHT により上昇が認められ，その変動は肝障害の指標とされる．若干 GOT 活性が全体に高かったのはヘパテストAを用いたためと思われる．肝機能は主に GPT に反映されるといわれ，その活性は投与後2日で BHT を加えた群で高く，特に BHT 群，BHT・PB群で高単位を示し，6日後でも両群の活性が高かった．これらは肝重量の増加と関連があると考えられるが，PB 群では高活性を認めないため明らかでない．BHT・INH 群ではGPT 活性が2日後高単位を示したものの時間経過に伴い対照群と差がなく，他のBHTを投与した群と異なる変動を示した．このことは電顕的観察で BHT 群，BHT・PB 群の SER の増殖，glycogen 顆粒の著減がみられたことに比べ，BHT・INH 群はSERの増殖を認めながらもglycogen顆粒が残存していたことと何んらかの関係があると思われる．しかしPB 群はSER の増殖，glycogen 顆粒の減少があるにもかかわらず，GPT 活性の上昇を認めなかったことは先に述べた肝重量の増加との関連から考えても BHT と PB は異なる作用を持つと思われる．PB 前処理により SER が増殖し薬物代謝活性酵素が誘導され，そこに相乗的に BHT が作用したため，肝重量の増加，GPT 活性の上昇を呈したと推測される．

一方，ヘキソバルビタール睡眠時間の測定は中枢系抑制の効力を基準として，肝臓での代謝速度の増減を把握したもので肝 SER の増殖と密接に関係する．正向反射消失持続時間は対照群に比べ，BHT・INH群, BHT群, BHT・PB 群と順に減少しており，このことは肝細胞の SER の増殖の程度に非常に合致するため，薬物代謝活性酵素の誘導形成作用に基づくと考えられる．PB は BHT の効力に協力的に作用しており，INH は BHTに対しやや拮抗的に作用するが機能的には BHT 単独と差異がないと思われる．しかし肝由来の強い血清 GPT 活性が BHT 群で上昇し，BHT・INH群で対照群と同程度になったことの意義づけは困難で，血液中に放出された酵素と細胞内微細構造あるいは肝機能との相関は明らかでない．

BHT 単独投与での SER の増殖は Lane[4]，Botham ら[5]の報告があり，先に著者ら[12]も経時的に検討を加えており，今回とほぼ同様な所見を得ている．BHT は肝小葉中間帯の腫脹が先行することから[13]，中間帯の細胞を観察対照とした．PB 前処理で BHT の作用に相乗的に作用し，glycogen 野で SER の顕著な増加が認められ，このことは肝重量の増加，睡眠持続時間の短縮を裏付けていると思われる．また SER の形態は tubule 状が密に連接して，RER の層状配列を乱し消失した部もみられ，若干 BHT 単独より organelles の変化が強い印象を得た．INH 前処理で BHT の作用は，SER の増殖を認めるが glycogen は存在しており，ほぼ BHT 単独と同様な所見であった．核小体の発達は BHT を加えた群にみられたが，BHT・INH 群では細胞により異なっているため，核への作用の相違も考えられる．

何れも形態変化は細胞に甚大な障害を与えず SER の増殖の程度が肝重量，睡眠時間に影響を与えていると考えられるが，BHT による SER の増殖が脂質成分の変動を示唆する報告[14]からも今後形態変化と機能代謝について詳細な検討を要すると思われる．BHT は低用量で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，それ故 SER の増殖が軽度である投与2日目で[12]睡眠時間の延長をも伴っている．その際肝重量の増加が著しいが，これはＳＥＲ増殖の膜成分より肝細胞の腫脹による容積成分に多く依存していると思われる．

短期投与で薬物代謝系に異なる作用を持つ PB, INH で処理した後，BHT の作用を検討したが，毒性という観点からではその影響の有無を論じ難かった．PB 前処理で四塩化炭素の肝臓に対する障害が増強される報告[15]

もあり，今後出血傾向，死亡率などを比較して長期的に検索する必要があると思われる．

結　論

薬物代謝活性酵素の誘導剤PBおよび阻害剤INHの前処理がBHTの作用におよぼす影響について雄ラットを用い，肝重量，機能，細胞形態から検討した．

1. BHTの体重抑制に対し，軽度ではあるがPBは増加し，INHは抑制した．

2. BHTの肝重量増加に対し，PBはさらに増加し，INHはやや増加を抑制した．INHは体重比でBHT単独と同程度であり，これは体重抑制に起因した．

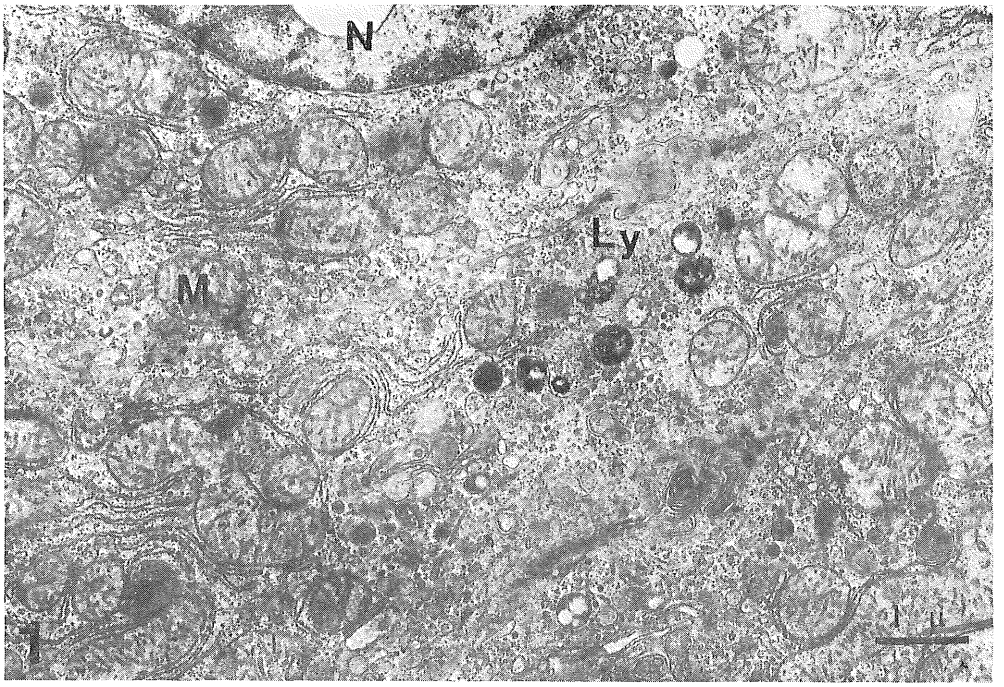
3. BHTの血清GPT，GOT活性の上昇に対し，PBは同程度の上昇を認めるが，INHはやや低下させた．

4. BHTのヘキソバルビタール睡眠時間の短縮に対し，PBはさらに短縮させ，INHは若干延長させたがBHT単独と大差を認めなかった．

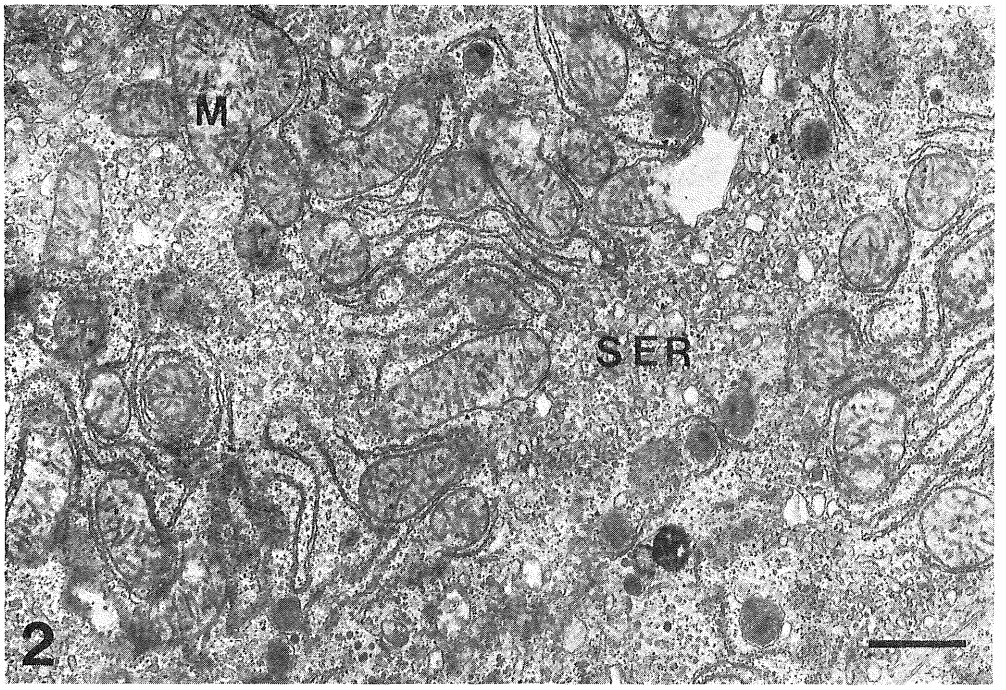
5. BHTの肝細胞変化はSERの増殖，glycogenの減少，核小体の良好な発達が主で，PBによりSERが顕著に増殖を増しglycogen顆粒の消失，RERの層状配列の乱れ，小空胞の散見がみられた．INHによりSERの増殖程度はBHT単独と同様であるがglycogen顆粒は存在した．

文　献

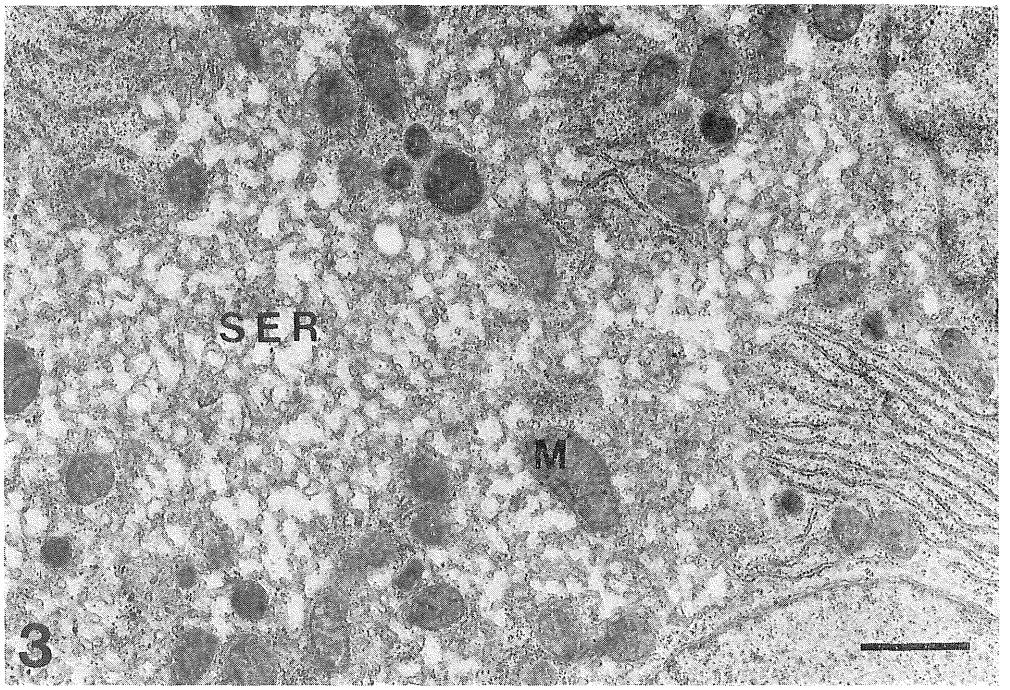
1) 藤井　孝ら：東京衛研年報，26-2，36，1975
2) 福森信隆ら：東京衛研年報，25，557，1974
3) 坂本義光ら：東京衛研年報，26-2，16，1975
4) Lane, B. P. and C. S. Lieber : *Lab. Invest.*, 16, 342, 1967
5) Botham, C. M., D. M. Conning, J. Hayes, M. H. Litchfield, and T. F. Mcelligott : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 1, 1970
6) 有吉敏彦，高畠英伍：食衛誌，4，75，1973
7) Gilbert, D. and L. Golberg : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965
8) 福森信隆ら：東京衛研年報，27-2，191，1976
9) 加藤隆一：化学の領域増刊，105，89，1974
10) Remmer, H. and H. Merker : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 123, 79, 1965
11) Kato, R., A. Takanaka, and H. Shoji : *Jap. J. Pharmac.* 19, 315, 1969
12) 福森信隆ら：東京衛研年報，26-2，22，1975
13) 藤井　孝ら：東京衛研年報，25，609，1974
14) 中川好男ら：東京衛研年報，26-2，31，1975
15) Reynolds, E. S., H. J. Ree, and M. J. Moslen: *Lab. Invest.*, 26, 290, 1972

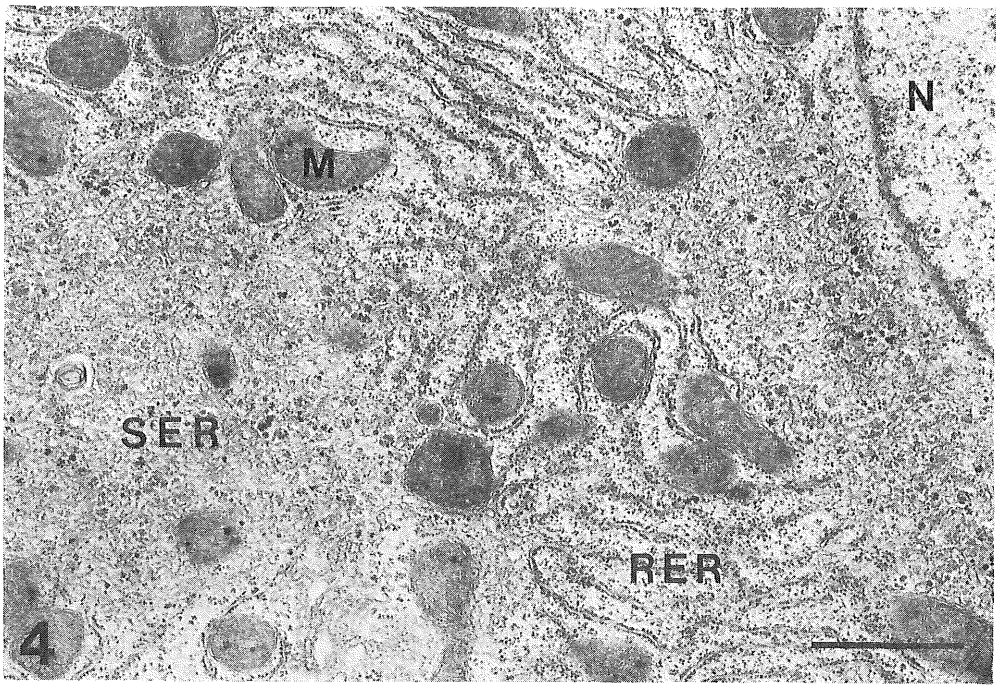


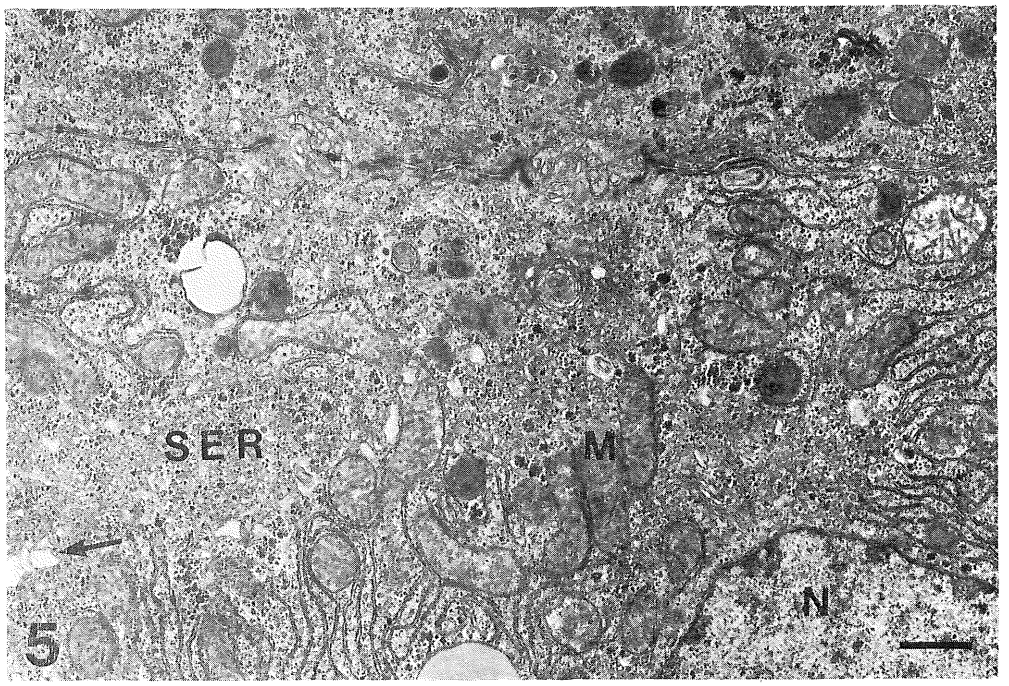
1

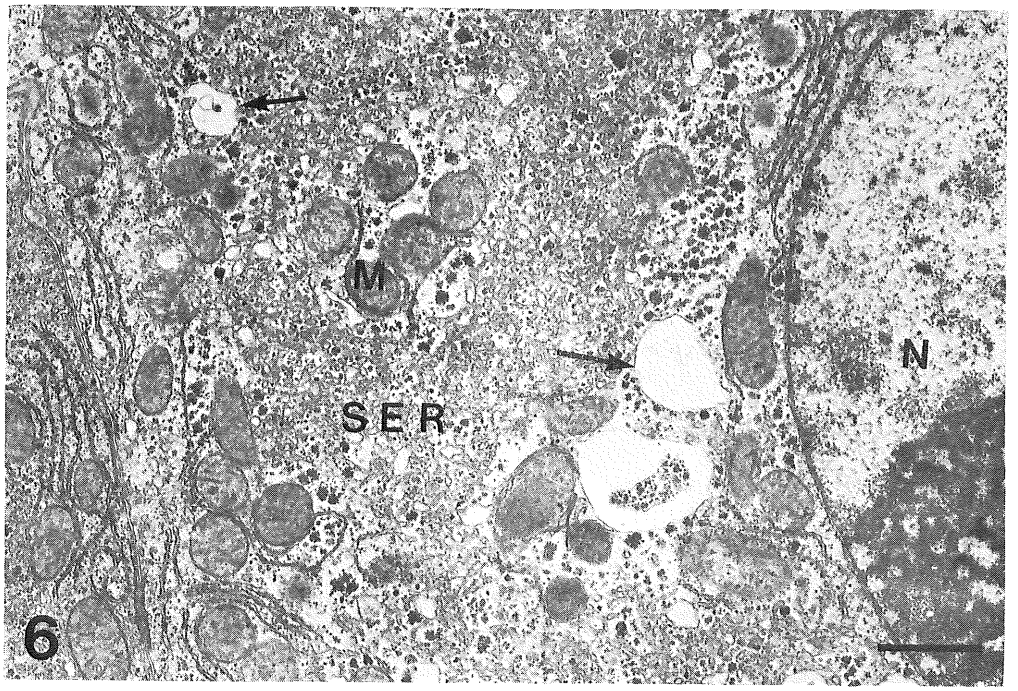


2


SER
M
3


N
M
SER
RER
4


SER
M
N
5


M
N
SER
6

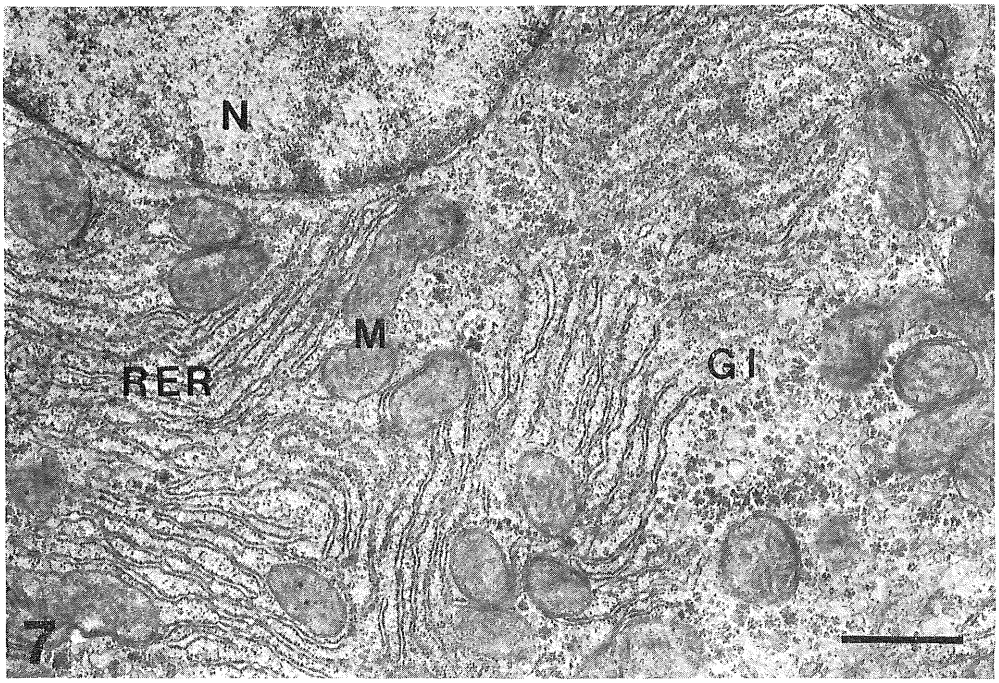


Photo. 1, 2. Hepatocyte following BHT administration (250mg/kg, PO, twice a day) in normal rat for 6 days. Proliferation of smooth endoplasmic reticulum (SER), anomalous mitochondria (M) and relatively increased secondary lysosomes in close vicinity to bile canaliculus are observed.

Photo. 3, 4. Hepatocyte following BHT administration in phenobarbital-pretreated rat for 6 days. Severe proliferation of tubular SER forms the networks. There is glycogen depletion. Aggregates of SER occupy glycogen areas. Scattered rough endoplasmic reticulum (RER) and anomalous mitochondria (M) are seen.

Photo. 5, 6. Hepatocyte following BHT administration in isonicotinic acid hydrazide-pretreated rat for 6 days. Aggregates of SER are seen in glycogen areas. Glycogen particles are present. A number of vacuoles (arrows) are observed in the cytoplasmic matrix.

Photo. 7. Hepatocyte of the intermediate areas in normal rat.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 77-81, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の細胞膜酵素活性に対する *in vitro* および *in vivo* での影響

清水 麻里*, 中尾 順子*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Enzymatic Activity in Plasma Membrane *in vitro* and *in vivo*

MARI SHIMIZU* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

先に *in vitro* の実験においてウマ腎 Na, K-ATPase 活性に対する dibutylhydroxytoluene (BHT) の半阻害濃度が 5×10^{-5}M であり[1]，10^{-8}M 以下の低濃度ではこの酵素をわずかながら活性化する[2] ことを報告した．

今回，主として *in vivo* での影響を検討したので報告する．

材　料

a) 酵素実験　*in vitro* ではウマ腎より調製したヨウ化ナトリウム処理酵素およびルブロール処理酵素を用いた．*in vivo* では SD-JCL 雄ラットの脳および腎より細胞膜酵素標品としてミトコンドリア分画およびミクロゾーム分画を用いた．

b) 生化学的検査　SD-JCL 雄ラットの血清および尿を用いた．

c) 試薬　主なものを下記に示した．

BHT；和光純薬工業㈱, Lot No. ACL 5025　ethanol；和光純薬工業㈱, 試薬特級　Sodium desoxycholate (DOC)；DIFCO　g-strophanthin(ouabain)；MERCK, Art. 7896　粉末飼料；日本クレア製，CE-2

方　法

(I)　1) Na, K-ATPaseの精製法

既報[3]に従いウマ腎ミクロゾーム分画より floating による方法でヨウ化ナトリウム処理を行ない酵素標品を得た．続いてこれを Lane らの方法[4]に従い DOC およびグリセリン処理した．ここで得た標品をルブロール処理[3]後，Jørgensen の庶糖密度勾配法[5]に基づきさらに精製した．

2)　酵素活性測定法

活性の測定法は既報[1]と同様に行なった．BHT による活性阻害実験を次のように行なった．ヨウ化ナトリウム処理酵素タンパク 4 μg，ルブロール処理酵素タンパク 1.5μg を用い，その各々と BHT のエタノール溶液 5 μl とを assay medium[1] (0.5ml) に加え，37℃，5分間孵置後，遊離してくる無機リン量を Fiske & Subba-Row の方法[6]で測定した．

(II)　1) BHT 投与ラットの細胞膜酵素調製法

BHT を 1.5% の濃度で粉末飼料に混合し固型化したものをラット（5週令）に自由に摂取させた．17日目に断頭，瀉血屠殺し，直ちに脳，腎を摘出し，9倍容の 0.32M sucrose, 5mM EDTA を加え，テフロンホモジナイザーで粉砕し，Sorvall SS-34 のローターで，7,500 rpm，15分遠心した．ここで得た沈殿をミトコンドリア分画とした．一方，上清を Sorvall SS-34 のローターで，20,000 rpm，30分(腎)，60分(脳)遠心して得た沈殿をミクロゾーム分画とした．各々を，1mM Tris-EDTA, pH7.3 に懸濁し酵素標品とした．

2)　血清および尿の生化学的検査法

断頭瀉血により血液を採取し，血清中の血糖，アセチルコリンエステラーゼ活性，コレステロール量，Na^+, K^+ 濃度を測定した．尿は断頭直前に腰部を軽く刺激してビニール上に採取し，Na^+, K^+ 濃度，クレアチニン量，pH を測定した．

結　果

i)　ウマ腎 Na, K-ATPase の精製結果

表1にウマ腎 Na, K-ATPase の精製過程を示した．最終的に比活性 1,073±42 μmoles Pi/mg/hr の標品を得た．これをルブロール抽出後アミノエチルセルローズ

* 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

表1. ウマ腎 Na, K-ATPase の精製過程

酵素	総タンパク量 (%)	総活性量 (%)	総比活性 μmoles Pi/mg/hr	10^{-4}Mウワバイン阻害(%)
ミクロゾーム分画	100	100	57± 2	77
ヨウ化ナトリウム処理	33±5[1)]	125± 8	233± 4	93
DOC処理	14±1	94±20	360±16	98
グリセリン処理	4.6±0.1	63± 2	769±41	98
ルブロール処理	2.2±0.4	44± 6	1073±42	>99

1) mean±S.E. (5例)

カラムに通した結果，比活性 3,000 μmoles Pi/mg/hr 以上の標品を得たが，酵素活性が不安定のため再現性に乏しかった．

表2にヨウ化ナトリウム処理酵素およびルブロール処理酵素の活性に対する BHT およびウワバインの半阻害濃度を示した．BHT はヨウ化ナトリウム処理酵素に対し半阻害濃度 5.6×10^{-5}M，ルブロール処理酵素に対し 5.7×10^{-5}M を示し，ほとんど差はみられないが，ウワバインは前者に対し 2.7×10^{-7}M，後者に対し 6.5×10^{-7} Mと顕著な差が観察された．

ii) BHT 投与ラットの酵素活性

a) Na, K-ATPase, Mg-ATPase

BHT 投与により脳 Na, K-ATPase 活性および腎 Mg-ATPase 活性がそれぞれ 15%，22% ($p<0.05$)上昇した．これを表3に示す．表中活性はミトコンドリア分画とミクロゾーム分画の活性値の和（全活性）で示してある．

このような活性化の原因として BHT が細胞膜の脂質に作用し，酵素活性を溶出したということが考えられる．そこで膜を可溶化する代表的物質として DOC を用いた．すなわち，BHT 投与，無投与群各々の脳(腎)のホモジネート（タンパク濃度 2.0mg/ml (1.5mg/ml)）を 0.03% (0.05%) の DOC に溶解し，30分室温に放置し，その時の活性を測定した．一方，対比のため BHT 投与，無投与群について DOC 無処理時の活性を各々測定した．その結果，DOC は BHT 投与群の脳 Na, K-ATPase, 脳 Mg-ATPase を 50% 程度 ($p<0.05$) 活性化した（表4）．

表2. BHT およびウワバインのウマ腎 Na, K-ATPase 活性に対する半阻害濃度

	ヨウ化ナトリウム処理	ルブロール処理
BHT	5.6×10^{-5}M	5.7×10^{-5}M
Ouabain	2.7×10^{-7}M	6.5×10^{-7}M

次に，BHT 投与ラット腎細胞膜酵素活性の安定性を検討した．酵素標品調製時に対する2カ月（−80℃，凍結保存）後の活性を BHT 投与，無投与群について示した（表5）．BHT 無投与群のミトコンドリア分画 Na, K-ATPase は保存により活性が 140% となり，BHT 投与群では 169% となった．さらにミクロゾーム分画 Na, K-ATPase でも BHT 無投与群では保存により活性が 68% になったのに対し，BHT 投与群では 76% にとどまった．一方，Mg-ATPase ではミトコンドリア分画，ミクロゾーム分画とも BHT 無投与群，投与群の間に保存による活性の差は観察されなかった．

b) アセチルコリンエステラーゼ

表3. BHT 投与後のラット細胞膜酵素活性

	Na, K-ATPase				Mg-ATPase			
	Brain	%	Kidney	%	Brain	%	Kidney	%
Control (5)	2002±71[1)]	100	1118±41	100	1233±8	100	1224±83	100
BHT (5)	2300±91	115*	1152±62	103	1296±105	105	1490±65	122*

( ) ラット数　1) μmoles Pi/hr/g tissue,　mean±S.E.　$p<0.05$

ouabain : 10^{-4}M (Brain), 10^{-3}M (Kidney)

表4. BHT 投与後のラット細胞膜酵素活性に対する DOC の影響

	Na, K-ATPase					
	Brain			Kidney		
	DOC 無処理[a]	DOC 処理[b]	b/a×100 活性の比	DOC 無処理	DOC 処理	活性の比
BHT 無投与 (5)	2,002±71[1)]	2,182±262	109	1,118±41	1,722±122	154**
BHT 投与 (5)	2,300±91	3,176±278	138*	6,152±61	1,763± 98	153**
	Mg-ATPase					
	Brain			Kidney		
	DOC 無処理[a]	DOC 処理[b]	b/a×100 活性の比	DOC 無処理	DOC 処理	活性の比
BHT 無投与 (5)	1,233±8	1,591±173	129	1,224±83	1,285±31	105
BHT 投与 (5)	1,296±105	2,048±192	158**	1,490±65	1,550±45	104

( ) ラット数 1) μmoles Pi/hr/g tissue, mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

表5. BHT 投与ラット腎細胞膜酵素活性の安定性

	Na, K-ATPase					
	ミトコンドリア分画			ミクロゾーム分画		
	調製時[a]	2カ月後[b]	b/a×100 活性の比	調製時	2カ月後	活性の比
BHT 無投与 (5)	586±58[1)]	820±82	140*	532±31	362±32	68**
BHT 投与 (5)	637±38	1,077±83	169**	515±67	391±26	76
	Mg-ATPase					
	ミトコンドリア分画			ミクロゾーム分画		
	調製時	2カ月後	活性の比	調製時	2カ月後	活性の比
BHT 無投与 (5)	896±62	771±21	86	328±28	338±23	103
BHT 投与 (5)	1,112±78	956±33	86	378±21	382±26	101

( ) ラット数 1) μmoles Pi/hr/g tissue, mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

BHT 投与後のラット血清アセチルコリンエステラーゼ活性値を表6に示した. BHT による変化はみられなかった.

iii) 血清および尿の生化学的検査

表7に BHT 投与後のラット血清および尿中の無機イオン濃度を示した. BHT により血清中の K^+ が40%前後増加し, 有意差 ($p<0.02$) があった. Na^+ は変化なく, Na^+/K^+ 値が減少した. 一方, 尿では Na^+, K^+ ともに減少し, Na^+/K^+ 値に顕著な変化はみられなかった.

表8にみられるように BHT 投与によりラット血清中グルコース濃度および尿中クレアチニン量に顕著な差は

観察されなかった．またBHT投与により尿のpH値が有意（$p<0.01$）に下降した．

表9に示すようにラット血清中コレステロール量はBHT投与により30%増加し有意差があった（$p<0.01$）．

なお，ここでは示さなかったが，ラット血清タンパクのSDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動の結果，BHT投与によりアルブミンより低分子部分が若干増加した．

表6. BHT投与後の血清中アセチルコリンエステラーゼ活性

	AChE	%
Control (9)	0.131±0.009[1]	100
BHT (8)	0.128±0.010	98

（ ）ラット数 1) ΔpH, Serum, mean±S.E.

表7. BHT投与後のラット血清および尿中の無機イオン濃度

	Serum					Urine				
	Na^+	%	K^+	%	Na^+/K^+	Na^+	%	K^+	%	Na^+/K^+
Control	145±2[1](9)	100	6.6±0.3(8)	100	22.0	173± 8(4)	100	164±16(4)	100	1.05
BHT	143±2(8)	99	9.2±1.0(6)	139*	15.5	139±11(7)	80	137± 6(7)	84	1.01

1) mEq/l, mean±S.E. （ ）ラット数 * $p<0.02$

表8. BHT投与後のラット血清中グルコースおよび尿中クレアチニン，pH値

	Serum		Urine			
	Glucose	%	Creatinine	%	pH	
Control	118±4[1](8)	100	517±51[2](4)	100	8.0±0.2(8)	
BHT	169±9(6)	90	580±38(7)	112	6.9±0.2*(13)	

1) mg/dl, mean±S.E. 2) mg/l, mean±S.E.
（ ）ラット数 * $p<0.01$

表9. BHT投与後のラット血清中コレステロール

	Cholesterol	%
Control (9)	64.0±1.2[1]	100
BHT (6)	83.7±1.9	131*

1) mg/dl serum, mean±S.E.
（ ）ラット数 * $p<0.01$

総括および考察

BHTに関してはその排泄器管としての腎に対する障害が報告されている[7]．Na, K-ATPaseは腎の尿細管に高い活性を示し，イオンの再吸収に重要な働きを持つ酵素である．Na, K-ATPaseの活性が高い尿細管は組織学的にBHT投与により強く障害を受ける[7),8)]．

既報[3]でウマ腎より大量のNa, K-ATPase精製酵素を得る方法を発表した．今回，さらに精製を進めて新しい知見を得た．この精製法に基づきラット腎および脳細胞膜酵素標品を得，BHT投与の膜酵素に対する影響について検討した．

in vivo でBHT投与によりラット脳Na, K-ATPase活性の上昇が観察され，BHTに中枢への作用があることが示された（表3）．一方，ラット腎Na, K-ATPase活性への影響は観察されず，従って腎障害との関連は酵素活性でみる限りMg-ATPaseの方にある可能性が高い（表3）．しかし，*in vitro* で低濃度のBHTがウマ腎Na, K-ATPase活性を上昇させたので[2]，腎障害は組織到達時のBHT濃度に依存していることも考えられる．

BHTはラット腎Na, K-ATPaseの保存に対し有効であるが（ミトコンドリア分画で29%，ミクロゾーム分画で8%），これはBHTが膜の脂質の酸化防止としての役割[9]を果しているからであると推察される（表5）．

ラット脳においてBHTはNa, K-ATPaseを活性化し，さらにDOCによる活性の溶出作用をMg-ATPaseに対しても相乗的に助けていることが観察された（表4）．腎ではこのような作用は観察されない．BHTが脳の脂質もしくは脂質組成に変化を与えていることが示唆される．

BHT投与による血清および尿中の無機イオン濃度の変化を表7に示した．無機イオンの再吸収を担っている腎Na, K-ATPaseはBHTの影響を受けないので（表

3)，尿中の無機イオン濃度の変化はさらに高次の部位に対するの BHT 効果も考えられる．BHT が脳 Na, K-ATPaseを活性化する事実はこの関連を強く示唆する．

なお，参考として血清中グルコース，コレステロール，尿中クレアチニン，pH の変動を表8，9に挙げた．

謝 辞 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．

文 献

1) 厚井麻里ら：東京衛研年報，25，697，1974
2) 厚井麻里ら：東京衛研年報，26-2，152，1975
3) 厚井麻里，長井二三子，中尾順子，中尾 真：第47回生化学会発表，生化学，46，643，1974
4) Lane, L. K., J. H. Copenhaver, Jr., G. E. Lindenmayer, and A. Schwartz : *J. Biol. Chem.*, 248, 7197, 1973
5) Jørgensen, P. L. : *Biochem. Biophys. Acta*, 356, 36, 1974
6) Fiske, C. H. and Y. SubbaRow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
7) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22，231．1970
8) 市川久次ら：東京衛研年報，23，345，1971
9) 第三版食品添加物公定書

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 82-85, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）摂取ラットの出血機構（II）

鈴木 英子*, 高橋 省*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Mechanism of Haemorrhage in Rats fed Butylated Hydroxytoluene (BHT) (II)

HIDEKO SUZUKI*, OSAMU TAKAHASHI*,
TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

当部では食品添加物で油脂類の酸化防止剤として使用されるジブチルヒドロキシトルエン（BHT）がラットに出血傾向をおこすことを初めて記載した[1,2]．この発生機構解明の一環として，前年度の報告においてBHT摂取ラットの血漿プロトロンビンの電気泳動による解析を行い，ジクマロール投与ラットの場合と同様なプロトロンビンバンドの消退と，それのVitamin K投与による回復を明らかにした[3]．

今回，さらにジクマロールとの比較において発生機構を検討する目的で以下の実験を行った．

実験材料および実験方法

1. 実験動物：JCL：SD系雄ラット（SPF）を4週令で購入，室温 25±1℃，湿度 55—60%，照明 6a.m.—6p.m.の環境下で5匹ずつステンレス金網ケージに収容，クレアCE-2飼料および水道水を自由に与え飼育した．

2. 試料：BHT：和光純薬，Lot. ACL 5024, mp 69.5° を用いた．ラットへの投与に当っては，1.5% の割にクレアCE-2粉末飼料に添加後固型飼料化し，通常飼料に代えて自由摂取させた．この際，対照ラット用固型飼料も同時に同一飼料粉末より製造した．

ジクマロール（3, 3′メチレンビスヒドロキシクマリン）：和光純薬，Lot. ACP8621 を使用した．ラットには10mgを1%トラガント液 1 ml に懸濁し，胃ゾンデにて経口投与した．

Vitamin K_2：エーザイ製ケイツー注を用いた．

3. 実験方法

a) 血漿プロトロンビン活性測定法：Seegers 2段法[4]を用いた．エーテル麻酔下心臓穿刺により 0.1ml 0.1M クエン酸ナトリウムを入れた注射器を用い．1 ml 採血し，3,000rpm, 15分間遠心後採取した血漿を用い検査した．

6) 肝臓切片による第Ⅶ因子の合成法[5,6]：体重200—300gのラットをネンブタールで麻酔し，直ちに開腹してカニューレを門脈に挿入し，下大静脈を切断した後，培養液（NaCl 95, KCl 10, $NaHCO_3$ 40, $CaCl_2$ 10mM/l）50ml を室温で70cmの水圧下に灌流する．直ちに肝臓を摘出し，水道水で洗浄後，スライサーで 0.5mm の切片を作り培養液中に投入する．6—10gを作製し，余分な第Ⅶ因子を除くため上澄をすてて培養液100ml入り三角フラスコ中に移し，室温で5分間振とうする．この操作を再びくり返す．ついで切片をろ紙上にとり，1g ずつ秤量し，それぞれを培養液10ml入り三角フラスコに入れ，フラスコ内の空気を95% O_2—5% CO_2 の混合ガスで置換，密栓して 37°C，振とう下で培養する．

検体（ジクマロール，BHT 投与ラット肝の抽出物，その他）は，切片を入れる以前にフラスコ内に加えておく．培養後，2% EDTA を 5 ml の培養液に対して1 ml の割に加える．この培養液中に遊離してきた第Ⅶ因子を測定するため0.2mlを試験管にとりこの液に直ちに同量のイミダゾール緩衝液，pH 7.3 を加え，測定するまで 4℃に保つ．

肝切片の組織中に存在する第Ⅶ因子も測定する場合は，培養フラスコ中の組織と残りの液を一緒にホモジネートし，0.2ml 試験管にとり上と同様に操作する．

第Ⅶ因子の測定は Owren and Aas[7] の方法を用いた．この際，トロンボプラスチンの代わりにトロンボプラス

* 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

チン，第Ⅴ因子，フィブリノーゲン，カルシウムを含むSimplastin A (General Diagnostics) を用い．これは0.01M 塩化カルシウムで希釈した．第Ⅶ・Ⅹ欠乏血漿はシグマ製を用い，スタンダードはラットの10培希釈血清を100Uとし，(培養液5：2% EDTA 1）で希釈して，両対数グラフの縦軸に凝固時間を，横軸に希釈血清濃度をとり，1—100Uまで直線の検量線を作製した．

なお，阻害実験では肝臓により合成能が異なるので常に同一ラット肝を用い，阻害物を添加しないものを対照とし，2時間培養で判定した．

c) 肝臓中の阻害物の抽出法と濃縮

① アセトン処理

湿肝臓を約10倍量のアセトンとともに磨砕し，室温で4時間放置後，吸引ビンでろ過し，アセトン層は別の器に移す．沈殿はまずアセトンで，次いでエーテルで充分洗浄する．洗浄後直ちに五酸化リンを入れたデシケーター中で真空乾燥する．以上の如くして得られたアセトン粉末は，荒い繊維を含んでいるのでこれをピンセットで除く．アセトン層は，エバポレーターで減圧濃縮し，アセトンを除く．

② 細胞分画と限外ろ過[8]

肝臓を約10倍の0.25M蔗糖液で磨砕し，Schneiderらの方法[9]により細胞分画を行った．上清分画は，ダイアフロー膜UM10（アミコン社，残留分子量10,000）で限外ろ過を行い，およそもとの肝臓重量と同程度まで濃縮する．

以上の操作はすべて 0—4℃ で行う．

実験結果と考察

I. BHTとジクマロール投与ラットのVitamin Kによるプロトロンビン活性の回復時間の比較

1群6匹のラットを用い，1.5% BHT 添加飼料を7日間摂取させた後，エーテル麻酔下 Vitamin K 10mg/rat を尾静脈より投与し，15，30，60分後採血し，プロトロンビン活性を測定した．

ジクマロールは24時間前に 10mg/rat 投与し，BHTの場合と同様に試験した．

結果は Fig. 1 に示すように両者とも30分頃より回復がみられた．ジクマロールの場合は30分まではBHT投与に比べ急激な回復がみられたが，これは0時におけるプロトロンビン活性がBHTより低かったことによるもので，両者の回復様式に大差はないように思われる．

II. 肝臓切片の第Ⅶ因子合成能におよぼすBHT，ジクマロールの影響

BHT あるいは BHT 摂取ラットの肝臓中に第Ⅶ因子を阻害するものの存在を予想し，実験を行った．

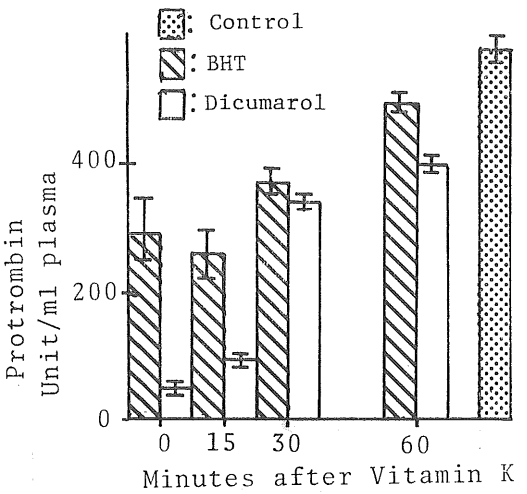


Fig. 1. Plasma prothrombin concentration after Vitamin K_2 administration to hypoprothrombinemic rats. BHT treated rats or Dicumarol treated rats were administered Vitamin K_2 (10mg/rat) via a tail vein at a zere time. Values are means ±S.E. for six rats as a group.

Table 1. Effect of BHT and Dicumarol on factor VII synthesis by rat liver slices.

	Assay Clotting Time for Medium (sec)	Factor VII Units
Control	110	7
BHT 0.1M	115	6
BHT 0.2M	107	7.4
Dicumarol	＞300	＜1

1) 肝切片の第Ⅶ因子合成能におよぼすBHT，ジクマロールの影響

BHTは0.1，0.2M，ジクマロールは0.1Mの濃度で培養液中に添加しその影響をみた．

結果は Table 1 のように[6] ジクマロールは完全に阻害作用がみられたが，BHTは阻害しなかった．なお，ジクマロールは培養液中で懸濁状態になるが，BHTは結晶がそのまま浮いているようにみえた．BHTを培養液中に溶解あるいは懸濁させる方法を検討したが，成功しなかった．従ってBHTが阻害しなかったことは断定できない．

2) 正常ラットとBHT摂取ラット肝切片の第Ⅶ因子合成能

正常ラット肝切片の第Ⅶ因子合成能は4時間までは上

Table 2. Comparison between factor VII synthesis in BHT treated and control rat liver

Incubation Time (hr)	Assay Clotting Time for Medium (sec)		Units of Factor VII in Medium		Assay Clotting Time for Homogenate (sec)		Units of Factor VII in Homogenate	
	Control	BHT	Control	BHT	Control	BHT	Control	BHT
0	>300	>300	<1	<1	175	>300	3	<1
2	150	>300	4	<1	128	255	5.4	1.4
3	145	255	4.4	1.4	125	225	5.6	1.9
4	140	270	4.6	1.3	120	235	6.2	1.7
5	141	270	4.5	1.3	125	235	5.6	1.7

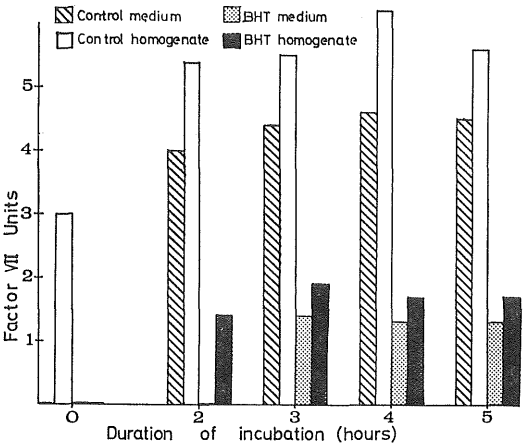


Fig. 2. Comparison between factor VII Synthesis in BHT treated and control rat liver.

Table 3. Effect of BHT treated rat liver homogenate on factor VII synthesis by rat liver slices

		Assay Clotting Time for Medium (sec)	Factor VII Units
Homo-genate	Control	165	2.8
	BHT	>300	<1
	Control	170	2.5

昇するが，その後は低下し始めた．1.5% BHT を12日間摂取させたラットの肝臓切片を作製し，同様に実験を行い，両者を比較した結果は Table 2 および Fig. 2のようにBHT 摂取ラット肝は，正常のラット肝に比べ合成能は非常に低下していた．

3) 肝切片の第Ⅶ因子合成能におよぼす摂取ラット肝の影響

1.5% BHT を摂取させたラットの血漿プロトロンビン時間が1分以上の肝臓1g を培養液 10m*l* で磨砕し，これを培養液とした正常ラット肝切片の第Ⅶ因子合成を測定した．対照は正常ラット肝臓を磨砕し同様に実験した．

結果は Table 3 のように BHT 摂取ラット肝臓中には第Ⅶ因子合成阻害物があることがわかった．

III. BHT摂取ラット肝中の第Ⅶ因子合成阻害物の抽出

1) 1.5% BHT を摂取させ，血漿プロトロンビン時間が1分以上の肝臓 20g を 200m*l* のアセトンを用い c-①の方法に従いアセトン粉末約 5g とアセトン抽出液約 1m*l* をえた．アセトン粉末は 200mg，抽出液は 0.7m*l* を培養液中に加え第Ⅶ因子合成を測定した．対照ラットのアセトン処理も同様に行い，比較した．

結果は Table 4 のように阻害物はアセトン粉末中に含まれていることがわかった．なお BHT 摂取ラット肝のアセトン粉末を蒸留水で磨砕し，遠心して UM 10 で濃縮した上清と沈査の第Ⅶ因子合成阻害作用を測定すると対照と同じであった．この結果から，アセトン粉末中に含まれている阻害物は水に不安定であることが予想される．

2) BHT 摂取ラットの血漿プロトロンビン時間が1分以上の肝臓 20g を c-② の方法により細胞分画した．核 (Nw)，ミトコンドリア (Mw) は容量にして 4.5m*l*，

Table 4. Effect of Acetone-dried powders of BHT treated rat liver on factor VII synthesis by rat liver slices

		Assay Clotting Time for Medium (sec)	Factor VII Units
Powders	Control	172	2.5
	BHT	>300	<1
	Control	205	1.6
Extracts	BHT	175	2.4
	Control	190	2.0

Table 5. Effect of Fraction of BHT treated rat liver homogenate in 0.25M sucrose on factor VII synthesis by rat liver slices

		Assay Clotting Time for Medium (sec)	Factor VII Units
Nw	Control	180	2.2
	BHT	200	1.7
Mw	Control	220	1.4
	BHT	210	1.5
Pw	Control	210	1.5
	BHT	193	1.9
S	Control	193	1.9
	BHT	>300	<1
	Control	160	3

マイクロゾーム分画 (Pw) は 1.5g, 上清(S)は約 20ml をえた. 上清を除く他の分画は全体の約 1/3, 上清は 2 ml を培養液中に加えて第Ⅶ因子の合成を測定した.

結果は Table 5 のように阻害物は上清分画にあることがうかがわれる.

以上の結果から, BHT 摂取ラット肝臓中には, 第Ⅶ因子合成阻害物が存在し, この物質の性質の一部として分子量は1万以上であり, 水にとけるが不安定, アセトンには溶けないことがわかった.

この阻害物を精製することが今後の課題であるが, 高分子で, 水に不安定であるから, 蛋白質が変化したものか, あるいは BHT の代謝物が蛋白質と結合してこのような阻害作用をもつのか, またはまったく新しい物質であるか, 今後の検討を必要とする.

要　旨

BHT とジクマロールを投与した場合の Vitamin K によるプロトロンビン活性の回復時間の比較と, 肝臓切片の第Ⅶ因子合成における BHT 投与ラット肝臓中の阻害物の検討を行った.

BHT とジクマロールを投与したラットの Vitamin K によるプロトロンビン活性の回復時間は両者とも30分頃より回復を始め, 同様な様式を示した.

BHT 投与ラットの肝臓中には第Ⅶ因子合成阻害物が存在していることが判明した.

阻害物質は, 肝細胞分画の上清にあり, 分子量は1万以上でアセトンに不溶, 水に溶けるが不安定なものであった.

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, 499, 1972
3) 鈴木英子ら：東京衛研年報, 26-2, 49, 1975
4) Seegers, W. H., R. I. McClanghry, and J. L. Fahey : *Blood.*, 5, 421, 1950
5) Judith, G. Pool and J. Robinson : *Am. J. Physiol.*, 196, 423, 1959
6) Judith, G. Pool and C. F. Borchgrevink : *Am. J. Physiol.*, 206, 229, 1964
7) Owren, P. A. and K. Aas : *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.*, 3, 201, 1951
8) 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善蔵, 松橋通生, 松本重一郎：基礎生化学実験法 2, 75, 1974, 丸善株式会社
9) Schneider, W. C. and G. H. Hogeboom : *J. Biol. Chem.*, 183, 123, 1950
10) 赤堀四郎：酵素研究法Ⅰ, 第9版, 17, 1955, 朝倉書店

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 86-92, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の出血致死作用に対する直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）の効果

高橋　省*, 平賀 興吾*

Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) on Hemorrhagic Death by Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats and Mice

OSAMU TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

米山[1]らは，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ネート（LAS）を同時に飼料中に混ぜ，亜急性毒性試験を行った際に，とくに雄性ラットにおいて，単独投与群には認められない出血致死が生じたことを報告した．その後，平賀[2]および鈴木[3]らによって，もっぱら，血液凝固レベルでの研究がなされ，BHT と LAS の同時投与という条件での全血凝固時間，プロトロンビン時間の延長，プロトロンビン複合体量の低下を示している．又，別に，高橋ら[4,5]は，LAS のトロンビン阻害効果を示している．このように断片的な知識が集積する一方，藤井ら[6,7]は，BHT単独投与でも出血致死の生じることを示し，その出血部位の観察を行っている．又，鈴木ら[3]は，血液凝固の面から，BHT 単独投与ラットの血漿プロトロンビンの低下を見ている．さらに高橋ら[8]は，実験条件を検討改良して，BHT 単独投与で短期間の出血発現と，死亡率における用量反応関係の成立を示している．以上のごとく，BHT と LAS の同時投与により生じた出血傾向は，その主要な役割を BHT が担っていると思われるが，明確な形での BHT の出血致死作用に対する LAS の増強作用が示されているのは，米山ら[1]の報告が唯一である．もし，薬理作用における相乗性という観点で，その機構を解明するならば，その前提となる現象の再現性が確認されなければ，断片的な知識はその基盤を失うし，当然，現象を説明するものともならないと思われる．

本報告は，BHT の出血致死作用に対し，LASが増強効果を持つかどうかについて再検討をしたものであり，同時に，SD 系および Wistar 系ラットに対する効果の差，ラット，マウス間の種差についても検討を加えたものである．

実験方法

動物は，SD, Wistar 系雄ラット，ICR 系雄マウス（いずれも日本クレア）を4週齢で購入し，5～7日間予備飼育後，9カ月間投与を行った．ラットは個別飼い，マウスは5頭飼いとし，SPF バリヤーシステム下で，水および飼料を自由摂取させた．

BHT は東京化成工業製の 2, 6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール AK 02を，LAS は花王アトラス，ネオペレックス F60 Lot 171（水分含量 42.8%）を用いた．基本飼料は日本クレア CLEA CE-2（粗蛋白 24%）を用い，BHT, LAS を添加後，固型飼料として投与した．それぞれの群と，用いた動物数を以下に示す．

	ラット SD	ラット Wistar	マウス ICR
対　照	5	5	10
0.3% LAS	5	5	10
0.6% LAS	5	5	10
0.9% LAS	5	5	10
0.5% BHT	10	10	20
1.0% BHT	10	10	20
1.5% BHT	10	10	20
0.3%—0.5% LAS-BHT	10	10	20
0.6%—0.5% LAS-BHT	10	10	20
0.9%—0.5% LAS-BHT	10	10	20
0.3%—1.0% LAS-BHT	10	10	20
0.6%—1.0% LAS-BHT	10	10	20
0.9%—1.0% LAS-BHT	10	10	20
0.3%—1.5% LAS-BHT	10	10	20
0.6%—1.5% LAS-BHT	10	10	20
0.9%—1.5% LAS-BHT	10	10	20

* 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

表1. 死亡数および出発個体数に対する9カ月間の死亡率

群	SD系ラット		Wistar系ラット		ICR系マウス	
	死亡日	死亡率	死亡日	死亡率	死亡日	死亡率
		%		%		%
対照		0		0	230	10
0.3% LAS		0		0	254	10
0.6% 〃		0		0	199, 247	20
0.9% 〃		0		0	246, 246	20
0.5% BHT		0		0		
1.0% 〃	**41, 247**	20		0	139, 263	20
1.5% 〃	**20, 22, 22, 30, 31, 53, 133**	70	**19, 51, 134**	30	95, 137, 233	15
0.3%—0.5% LAS-BHT		0		0	**179**, 270	10
0.6%—0.5% 〃		0		0	262	5
0.9%—0.5% 〃		0		0	247	5
0.3%—1.0% 〃		0		0	232	5
0.6%—1.0% 〃		0		0	161, 169, 169, 211	20
0.9%—1.0% 〃	**102**	10	**62**	10	232, 256	10
0.3%—1.5% 〃	**34, 40, 63**	30		0	166, 247	10
0.6%—1.5% 〃	**17, 20, 39**	30	**59**	10	172, 270	10
0.9%—1.5% 〃	**179**	10	267	10	201, 263, 263	15

太字は出血による死亡と考えられるものを示す.

飼育期間中は，出血を中心に一般症状を観察し，死亡数を記録した．死亡個体については可能な範囲で出血部位を記録した．さらに9カ月後，高濃度群のみについて，生存動物の解剖を行い，出血の有無などにつき検討した．

結　果

1) **死亡率**　投与期間中の死亡数および出発個体数に対する死亡率を表1に示す．ラットでは，SD系，Wistar系ともに1.5% BHT投与群において最高死亡率が得られているが，SD系の方がWistar系にくらべて死亡率が高い．表から明らかなように，単独投与群にくらべLASを添加した群が，高い死亡率を示していることはない．ここで，Wistar系の0.9—1.5% LAS-BHT群での267日目の死亡は出血によるものではない．マウスでは，とくに，有意に高い死亡率を示した群はない．

2) **死体解剖**　投与期間中に死亡した個体について，出血などを示す．

SD系ラット　1.5% BHT群（以下，数字は例数）腹腔内大出血2，胸腔内大出血2，外部へ大出血3；皮下，筋肉，外部，胸腔，脳，膵臓，腹腔，精巣上体，精巣への出血，それぞれ1，2，5，1，2，1，3，6，4．**1.0% BHT群**　外部（ツメ）大出血；脳室，筋肉，精巣，肝臓，膵臓への出血，胃内血液貯留それぞれ1．**0.9—1.5% LAS-BHT群**　外部へ大出血1．**0.6—1.5% LAS-BHT群**　腹腔内大出血1，胸腔内大出血1，外部大出血1；皮下，筋肉，外部，胸腔，胸腺，腹腔，脳，膵臓，精巣上体，精巣への出血，それぞれ．2，2，2，1，1，1，1，2，3，2．**0.3—1.5% LAS-BHT群**　腹腔内大出血1，胸腔内大出血2；皮下，筋肉，腹腔，脳，膵臓，精巣上体，精巣への出血，それぞれ．1，1，1，1，2，2，2．**0.9—1.0% LAS-BHT群**　腹腔内大出血；皮下，筋肉，膵臓への出血それぞれ1．

Wistar系ラット　1.5% BHT群　腹腔内大出血1，外部大出血1；筋肉，外部，肝臓，胸腺，膵臓，精巣上体，精巣への出血，それぞれ1．**0.9—1.5% LAS-BHT群**　耳下腺に卵大の腫瘍1．**0.6—1.5% LAS-BHT群**　胸腔内大出血；外部，膵臓，精巣上体への出血，それぞれ1．**0.9—1.0% LAS-BHT群**　胸腔内大出血；眼，脳室，腸間膜，精巣上体，精巣への出血，それぞれ1．

ICR系マウス　0.3—0.5% LAS-BHT群　腹腔内出血1．その他の死亡例では出血は認められず，死体が膨満，肝臓黒褐色，腸黒褐色のもの，あるいは被毛全体が黄褐色で水に濡れたようなものが多かった．

3) **症状**　出血が生じるまでの特に投与初期の一般症状を示す．

SD系ラット　投与開始後6日目　0.9—1.5% LAS-BHT No. 5右眼拡大薄橙色　**13日目**　1.5% BHT No. 3左眼底出血・首2カ所に出血，0.9—1.5% LAS-BHT

No. 6右眼拡大，BHT を高用量で含有する群は行動において興奮気味 **15日目** 0.5% BHT No. 10左眼白化，0.6—1.5% LAS-BHT No. 9右眼底出血 **16日目** 0.5% BHT No. 8 左眼球周辺部白味がかる．右眼突出，1.5% BHT No. 1 眼球白味がかる・顎下黒色，No. 4 眼球突出（白味がかる），No. 5 右眼球突出，No. 6 眼球突出，No. 8 眼球突出，0.3—1.0% LAS-BHT No. 7 眼球突出，0.6—1.5% LAS-BHT No. 3 頭部および前肢に外出血，No. 5 眼球突出 **17日目** 0.6—1.5% LAS-BHT No. 3 死亡 **18日目** 1.5% BHT No. 3 首外出血・附近に血液付着，No. 9 首外出血 **19日目** 1.0% BHT No. 9 右肩外出血 **20日目** 1.0% BHT No. 9 右肩外出血，1.5% BHT No. 3 両肩外出血，No. 5 ケージ内血痕多数（鼻出血），No. 8 鼻出血，No. 9 左肩外出血，0.6—1.5% LAS-BHT No. 4 ケージ内に血痕付着，No. 7 両眼蒼白・横臥・その後間もなく死亡 **21日目** 1.5% BHT No. 1 下半身麻痺，No. 5 外部へ出血 No. 6 鼻出血，No. 8 外部へ出血，0.6—1.5% LAS-BHT No. 4 右耳出血 **22日目** 1.5% BHT No. 3 肩の皮膚剥離，No. 5 眼球白色，No. 9 右肩外出血，No. 1 死亡，No. 8 死亡，0.3—1.0% LAS-BHT No. 1 左肩外傷，0.6—1.5% LAS-BHT No. 4 右耳出血 **23日目** 1.5% BHT No. 2ケージ内出血痕，0.9—1.0% LAS-BHT No. 4 鼻出血，0.3—1.5% LAS-BHT No. 5 首外出血 **24日目** 対照 No. 5 頭に赤色物付着，0.5% BHT No. 2 右肩外傷 **25日目** 1.5% BHT No. 4 鼻耳出血，以後40日頃まで死亡多数であるが，それより後実験終了時まで目立った症状は見られなかった．

Wistar 系ラット **11日目** 0.3% LAS No. 1 眼瞼炎 **12日目** 1.5% BHT No. 4 右眼底出血，No. 7 左眼底出血，0.3—1.5% LAS-BHT No. 3 左眼底出血，0.3% LAS No. 1 眼瞼炎回復 **15日目** 1.5% BHT No. 9 左眼底出血 **16日目** 0.3—1.5% LAS-BHT No. 3 左眼出血 **17日目** 1.5% BHT No. 1 貧血・呼吸荒し，0.3% LAS No. 3 眼瞼炎 **19日目** 1.5% BHT No. 9 両眼蒼白となり死亡 **23日目** 1.5% BHT No. 8 外部へ出血，0.9—1.5% LAS-BHT 右眼出血 以後40日目頃まで死亡が見られるが，その後は目立った症状がない．しかし9カ月目に0.9—1.5% LAS-BHT 群に1例耳下腺に腫瘍を生じ死亡した．

ICR 系マウス **投与開始後 1, 2日目** BHT を含む群で眼の色調がわずかに暗化・被毛の荒れが認められるものあり．**95日目** 1.5% BHT 群1例死亡，以後，死亡多く，出血は大部分認められず．

表2. SD 系ラットの 0, 7, 77日目の体重および高用量群の6カ月目の体重
（単位はg，カッコの中は個体数を示す）

	投与日数 0日	7日	77日
対照	114.2±3.3 (5)	180.4±5.3 (5)	512.0±14.8 (5)
0.3% LAS	113.6±2.9 (5)	179.0±3.7 (5)	517.2±23.4 (5)
0.6% LAS	113.2±2.6 (5)	172.2±3.4 (5)	483.2±22.5 (5)
0.9% LAS	113.0±2.4 (5)	174.4±3.4 (5)	468.4±11.4 (5)
0.5% BHT	111.8±1.8 (10)	171.6±3.5 (10)	502.1±13.5 (10)
1.0% BHT	112.0±1.6 (10)	158.7±1.8 (10)	461.7±38.2 (9)
1.5% BHT	112.1±1.6 (10)	140.1±2.8 (10)	365.0±11.7 (3)
0.3%—0.5% LAS-BHT	112.1±1.5 (10)	169.1±2.8 (10)	465.0±10.8 (10)
0.6%—0.5% LAS-BHT	112.0±1.5 (10)	167.2±1.9 (10)	463.6± 7.3 (10)
0.9%—0.5% LAS-BHT	112.2±1.4 (10)	165.7±2.5 (10)	453.3±10.2 (10)
0.3%—1.0% LAS-BHT	112.2±1.4 (10)	155.4±2.6 (10)	440.4±14.6 (10)
0.6%—1.0% LAS-BHT	112.4±1.4 (10)	154.8±2.5 (10)	426.8±15.8 (10)
0.9%—1.0% LAS-BHT	112.3±1.3 (10)	151.7±1.5 (10)	336.5±15.3 (10)
0.3%—1.5% LAS-BHT	112.2±1.3 (10)	146.3±2.0 (10)	386.3±14.4 (7)
0.6%—1.5% LAS-BHT	112.2±1.3 (10)	135.8±2.3 (10)	331.3±14.4 (7)
0.9%—1.5% LAS-BHT	112.4±1.3 (10)	129.4±1.8 (10)	250.8±13.5 (10)

		9カ月
対照		692.0±26.9 (5)
9カ月	0.9% LAS	604.0±14.4 (5)
	1.5% BHT	445.0± 5.0 (2)
	0.9%—1.5% LAS-BHT	314.0±37.1 (5)

値は平均値±標準誤差で示してある．

表3. Wistar系ラットの 0, 7, 77日目の体重および高用量群の9カ月目の体重
(単位はg, カッコの中は個体数を示す)

	投与日数 0日	7日	77日
対照	126.6±4.7 (5)	181.6±6.8 (5)	493.0±23.1 (5)
0.3% LAS	125.0±3.5 (5)	181.0±5.1 (5)	476.8±20.1 (5)
0.6% LAS	125.0±3.5 (5)	175.6±4.5 (5)	459.8±11.1 (5)
0.9% LAS	124.6±3.4 (5)	174.6±4.0 (5)	469.0±17.7 (5)
0.5% BHT	123.3±2.1 (10)	169.1±4.3 (10)	457.3± 8.7 (10)
1.0% BHT	123.2±2.0 (10)	156.8±4.1 (10)	446.4±11.6 (10)
1.5% BHT	123.2±2.0 (10)	138.6±2.2 (10)	417.4±10.1 (10)
0.3%—0.5% LAS-BHT	123.5±2.0 (10)	169.4±2.5 (10)	462.9± 6.4 (10)
0.6%—0.5% LAS-BHT	123.6±1.9 (10)	166.2±2.3 (10)	442.3±13.4 (10)
0.9%—0.5% LAS-BHT	123.5±1.9 (10)	164.1±3.3 (10)	427.4±11.1 (10)
0.3%—1.0% LAS-BHT	123.6±1.9 (10)	149.9±2.4 (10)	414.7± 7.6 (10)
0.6%—1.0% LAS-BHT	123.7±1.6 (10)	147.5±2.9 (10)	407.1±14.6 (10)
0.9%—1.0% LAS-BHT	123.7±1.5 (10)	146.8±2.4 (10)	368.0±15.6 (9)
0.3%—1.5% LAS-SHT	123.6±1.5 (10)	135.5±2.9 (10)	386.6±12.9 (10)
0.6%—1.5% LAS-BHT	123.4±1.5 (10)	125.5±1.8 (10)	348.2±12.8 (9)
0.9%—1.5% LAS-BHT	123.4±1.6 (10)	122.7±2.5 (10)	305.4±11.3 (10)

9カ月		
	対照	620.0±22.6 (5)
	0.9% LAS	572.0±19.3 (5)
	1.5% BHT	518.4±11.0 (5)
	0.9%—1.5% LAS-BHT	397.4±11.8 (5)

値は標準値±標準誤差で示してある.

表4. ICR系マウスの体重 (単位はg, カッコの中は個体数を示す)

	投与日数 0日	3日	7日	180日
対照	24.5	27.8	29.5	43.6±1.3 (10)
0.3% LAS	24.4	27.7	29.6	42.3±0.6 (10)
0.6% LAS	24.3	27.1	29.6	43.2±1.6 (8)
0.9% LAS	24.2	25.5	28.5	42.3±0.6 (10)
0.5% BHT	23.8	21.5	26.7	43.4±0.8 (20)
0.1% BHT	23.7	19.0	23.9	41.3±0.6 (19)
1.5% BHT	23.7	18.5	20.2	41.3±0.8 (19)
0.3%—0.5% LAS-BHT	23.7	22.0	26.8	41.6±0.8 (19)
0.6%—0.5% LAS-BHT	23.8	24.6	27.8	42.6±0.6 (20)
0.9%—0.5% LAS-BHT	23.8	24.5	27.5	40.8±1.0 (19)
0.3%—1.0% LAS-BHT	23.8	20.3	25.1	41.7±0.8 (18)
0.6%—1.0% LAS-BHT	23.8	19.1	22.8	40.9±0.6 (15)
0.9%—1.0% LAS-BHT	23.8	19.2	23.4	42.1±0.9 (18)
0.3%—1.5% LAS-BHT	23.8	18.4	20.9	41.2±0.9 (19)
0.6%—1.5% LAS-BHT	23.8	18.8	19.4	41.2±0.6 (19)
0.9%—1.5% LAS-BHT	23.9	20.1	21.8	41.0±1.0 (20)

0, 3, 7日の値は平均値のみ, 180日の値は平均値±標準誤差で示してある.

表5. 9カ月目における高用量投与群ラットの肝および脾臓重量
(A) は絶対重量，(B) は体重 100g あたりの相対重量

(A)

群（数）	SD系 肝臓	SD系 脾臓	Wistar系 肝臓	Wistar系 脾臓
対照（5）	19.1±0.4	1.026±0.099	22.6±1.6	1.020±0.064
0.9% LAS（5）	19.1±0.9	0.904±0.055^{++}	20.1±0.6^{+}	0.816±0.038*
1.5% BHT (2, 5)	16.0±0.5**	0.505±0.016*	25.8±0.8^{+}	0.792±0.023*
0.9%—1.5% LAS-BHT（5）	15.9±1.3	0.588±0.066**	22.9±0.8	0.728±0.038**

(B)

群（数）	SD系 肝臓	SD系 脾臓	Wistar系 肝臓	Wistar系 脾臓
対照（5）	2.78±0.15	0.150±0.019	3.64±0.17	0.164±0.004
0.9% LAS（5）	3.16±0.07^{+}	0.150±0.010	3.53±0.13^{+++}	0.143±0.009^{+}
1.5% BHT (2,5)	3.59±0.08*	0.113±0.000	4.99±0.23**	0.153±0.006^{+}
0.9%—1.5% LAS-BHT（5）	5.29±0.65**	0.193±0.026	5.80±0.27***	0.183±0.009

値は平均値±標準誤差で示してある。 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$（対照に対して），
$^{+}$ $p<0.05$, $^{++}$ $p<0.01$, $^{+++}p<0.001$（0.9%—1.5% LAS•BHT に対して）で有意差があることを示す。

赤色尿はラットでは両系統とも3日目より見られ，マウスでは認められなかった。

4) **体重** 初期での体重を表2，3，4に示す。

SD 系ラット（表2） 7，77日ともに投与量に従った体重抑制が見られるが，2つの物質を同時に投与した群の体重抑制が単独投与群の抑制を全般的には相加的に反映しているのに対し，0.3—1.5% LAS-BHT 群では，BHT の抑制効果に着目すれば，LAS はむしろ阻害的に働いている。

Wistar 系ラット（表3） 7，77日ともに投与用量に従った体重抑制が見らた，2つの物質を同時に投与した群での抑制は相加的である。

ICR 系マウス（表4） 7日においては LAS 単独投与群を除き，体重の抑制が見られるが，BHT 単独投与群以外の用量反応関係は不明瞭である。7日においては BHT の体重抑制効果に対し LAS はむしろ阻害的であり，又，180日では殆んど影響を与えていない。

5) **9カ月目での高濃度投与生存個体の剖検 SD 系ラット** 対照群5例中例5肝脂肪蓄積，1.5% BHT 群2例中1例右精巣萎縮，膵臓出血，1例左精巣上体脂肪および膵臓出血，0.9—1.5% LAS-BHT 群5例中1例左右精巣水腫・精巣上体出血，1例左右精巣水腫

Wistar 系ラット 対照群5例中1例右水腎，0.9% LAS 群5例中1例右水腎，1.5% BHT 群5例中2例右水腎，5例中1例胃中出血物，0.9—1.5% LAS-BHT 群5例中2例右水腎，5例中3例精巣上体出血，1例皮下出血

ICR 系マウス 対照群5例中1例脾臓肥大，0.9% LAS 群3例中1例脾臓肥大，肝臓左葉大豆大ののう瘍，1.5% BHT 群5例中5例肝臓黄褐色，1例黄色脂肪，0.9—1.5% LAS-BHT 群5例中4例肝臓緑色，1例脾臓肥大，1例方形葉にのう瘍，以上が観察された。

6) **ラットにおける肝，脾重量** 9カ月目における高用量投与群ラットの肝および脾臓重量を表5に示す。

SD 系 体重 100g あたりの相対重量について，1.5% BHT および 0.9—1.5% LAS-BHT 群の肝臓で有意（$p<0.05$, $p<0.01$）な上昇がみられる。

Wistar 系 同様に，肝臓の相対重量で 1.5% BHT および 0.9—1.5% LAS-BHT 群において有意な上昇がみとめられた（$p<0.01$, $p<0.001$）。

肝臓は絶対重量，相対重量ともに全群において Wistar 系の方が高値を示している。

考 察

結果より明らかなように，今回の実験においては，BHT の出血致死作用に対する LAS の増強効果は，まったく観察されない。むしろ，単独で出血致死を高率に起こすような BHT の濃度領域では，LAS は阻害的に働くようであり，SD 系ラットの初期における体重でも見られるところがある。平賀ら[2]の実験では BHT 単独群がとっていないので明確なことは言えないが，今回の

実験から考えても，又，米山ら[1]の報告と比較しても，0.8% の BHT を単独で市販飼料に添加した場合，高率で死亡が発生するとは考えにくいから，この平賀ら[2]の報告はある程度相乗的効果を反映していると思われる．従って，BHT と LAS の微妙な濃度関係においてのみ，相乗的な効果が期待できるのかもしれない．又，今回の実験で見られた諸性質の系統間における大きな差を考えると，このような効果があったとしても，米山らが用いた Wistar-SLC といった限定された系統にのみ起こる可能性は強い．しかしながら，いずれにせよ，広い濃度範囲での単純な意味での増強効果があることは，むしろ否定されたと考える．このような結果は，精製飼料を用いても示されている．又，プロトロンビン量に限っても，鈴木ら[3]によって示されているように，BHT 単独投与にくらべ LAS を加えた群が低値を示しているということはなく，むしろ単独群の方が，低いように見える．しかし，LAS を単独投与したラットの血漿カルシウム再加時間が延長すること[5]，LAS がトロンビンを阻害し[4,5]，トロンビン時間を延長させる[4]こと，僅かではあるが，低 LAS 濃度で，フィブリンのゲル化を阻害すること[5]，又，LAS と BHT の同時投与群では，凝固してくるフィブリンが，単独群にくらべわずかではあるが低値を示し，フィブリノーゲン自体のわずかな低下も疑えること[4]など出血性素因を誘発する作用を LAS は持っていること，あるいは又，LAS の未だ検討していない性質を考え併せれば，前述のように，むしろ，LAS の低い濃度，および BHT のある程度，低い濃度領域で，相乗的な出血が起こることは可能なこととして否定出来ない．

以上のように，今回の実験においては，LAS による増強作用は，見られなかったのであるが，高濃度の BHT 単独での出血致死という現象に限れば，又，別に，多少の知見を得るところがあった．従って，以後は，むしろ，BHT 単独の出血致死作用を中心にした考察となる．

SD 系雄ラットに対する BHT の出血致死作用は，実験条件を改良することによって，用量と死亡率の間に綺麗な dose response があることが分り[8]，その後の実験で，他の酸化防止剤には見られない再現性ある作用である[9]ことが確認されているが，結果で示したごとく，この効果はマウスについては起らないようである．血液凝固系への作用などについては，さらに追求する必要はあるが，少なくとも出血という形では，症状は現われていない．アスピリンもラットに出血致死効果を持つ[9]が，それらを含め，クマリン系抗凝固剤などのマウスに対する作用も今後検討して行きたい．9カ月の高濃度投与個体の解剖でマウスに緑色肝，黄色肝がみられたことは，血液凝固を離れて一般毒性の面から考慮される必要がある．又，ラットにおいても，SD 系と Wistar 系では反応の量的差違が認められる．SD 系の方が Wistar 系にくらべ，明らかに強く反応するが，出血致死効果を受けるという点では，同じである．

BHT によるラットの出血は，15日頃から始まって，1，2カ月を頂点として，4カ月頃までには終了してしまう．遺伝的耐性によるものか，年令によるものかなどについての検討も必要かと思われる．

出血部位については，藤井らの報告[7]に詳しく，今回も部位的には，ほぼ同一と考えられる．藤井らによって報告されている動物は1ケージ5頭飼育であり，その場合には，皮下・外傷などに関係した出血に，別の動物が大きく影響を及ぼすものと考える．今回のは，個別ケージであったが，ケージの作りに関連した外傷がみられている．結果で示したとおり，胸腔，腹腔，外部，精巣，精巣上体，膵臓，脳室内，皮下，眼球への出血がみられるのは，藤井らの報告と同様である．眼球が白化して後々まで生存した個体もあった．精製飼料に BHT を添加して投与した時には，眼球への出血および眼球の膨化・白化は殆んど見られず，又，皮下出血も極めて少ない[8,9]．従って厳密な意味では，市販飼料に添加した場合と，精製飼料に添加した場合とでは，同じ出血でも，同一現象を見ているとは考えられない点もある．

以上のような諸点を考慮すると，むしろ，出血現象の機構を研究する基盤としては，再現性の明瞭な，BHT 単独投与の場合を，それも，飼料組成を十分コントロール出来て，低濃度で早期に出血の起こしうる精製飼料に添加して実験を行うべきであると考える．

9カ月目における高用量群投与ラットの肝臓重量は，SD 系，Wistar 系ともに，BHT，LAS+BHT 群での相対重量の増加が認められる．SD 系と Wistar 系とを比較した場合，Wistar 系の方が肝重量が大きく，このようなことも 1.5% BHT 投与群での反応性のちがいに関係しているのかもしれない．

要　約

BHT の出血致死作用に対する LAS の増強効果の有無を見る為，SD 系，Wistar 系雄ラットおよび ICR 系雄マウスに，0.3，0.6，0.9%LAS，0.5，1.0，1.5% BHT，0.3—，0.6—，0.9—0.5%LAS-BHT，0.3—，0.6—，0.9—1.0% LAS-BHT，0.3—，0.6—，0.9—1.5%LAS-BHT を市販配合飼料に混じ，SPF バリヤーシステム下で9カ月間投与した．死亡率において，LAS

の増強効果は，まったく見られなかった．1.5%のBHTを含む群においてはLASはBHTの致死作用を抑制した．BHTの出血致死作用はマウスにおいては見られなかった．又，ラットにおいて，SD系は，Wistar系より死亡率が高かった．

謝　辞　本研究にあたり，いろいろと御協力頂いた当部の大石真之，池田虎雄，久保喜一の諸氏に感謝致します．

文　献

1) 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，24，449，1972
2) 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
3) 鈴木英子，平賀興吾，中尾順子：東京衛研年報，26-2，49，1975
4) 高橋　省，柴　英子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，637，1974
5) 高橋　省，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，54，1975
6) 藤井　孝，阿部幸恵，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，25，609，1974
7) 藤井　孝，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，26，1975
8) 高橋　省，平賀興吾：第49回日本薬理学会講演要旨集，23，1976
9) 高橋　省，未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 93-99, 1976

食品添加物の相乗毒性に関する研究（IV） 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）併用の急性毒性

市川 久次*, 小林 博義*, 米山 允子*, 馬渕 依子*
伊川 三枝子*, 平賀 興吾*

Studies on Toxicological Potentiation of Food Additives (IV) Acute Toxicities of the Combination of Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Rats

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI*, MASAKO YONEYAMA*, YORIKO MABUCHI*, MIEKO IKAWA* and KOGO HIRAGA*

Synergistic effect of linear alkylbenzene sulfonate (L) on the acute toxicity of butylated hydroxytoluene (T) was examined, and the following results were obtained.

1. LD_{50} values of T and the combination of T and L (LT) (L = 0.800 g/kg) were 1.906 g/kg and 1.318 g/kg (male), 2.255 g/kg and 1.695 g/kg (female) respectively. From this results, the combination of T and L had synergistic effect on lethal activity.

2. In the survival rats after treated with T and LT (44 days after), hematological, clinical chemical tests and measurement of organ weights were put in operation, no significant change between T and LT was observed.

ジブチルヒドロキシトルエン（(BHT) 以下 T と略す）は食品添加物として，直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（(LAS) 以下 L と略す）は合成洗剤として，広範囲に使用され，われわれの体内には経常的にかつ長期間摂取されているが，両者の単味の毒性に関してはこれまでに多く人々によって研究されてきており，現在その安全性については未だ確立されておらず，また，両者の併用のものについては殆んど研究されていない[1,2]．そこで今回は相乗毒性の研究の一環として，LとTの併用（以下LTと略す）の急性毒性について検討し若干の知見を得たので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1. 使用動物；静岡実験動物農協産生のSPFラット，SLC-Wistar系ラット雌雄を用いた．生後4週令にて購入し，3週間予備飼育し，体重増加，一般状態に異状のないものを実験に供した．実験開始時平均体重(投与時) 雄 157g 雌 110g であった．

2. 試料；Tは和光純薬製（Lot No. KIK 5562 結晶性粉末で mp. 69.5℃ のものを，Lは花王アトラスKK製ネオペレックスF（Lot No. 127）を併用した．

3. 試験方法；試料の投与用量は公比1.2の割合で増量しTを5用量を用い，併用の場合には5用量のTにそれぞれLAS 0.800g/kg（死亡率0％の最大無作用量と考えられる用量）を加えた．投与形状はT単独はオリブ油溶液とし，併用のものは，Lを水にとかしたものの中にTのオリブ油溶液を加えブレンダーで撹拌し白色乳液とし，対照に用いた（LD_{50}の場合）．L（0.800 g/kg）は同様にオリブ油をL水溶液中に加え乳状としたものを使用した．なお水とオリブ油の割合は 1：2 の割合であった．投与容量は1.5m*l*/kgとなるように調整し，胃ゾンデにて経口投与した．動物は1群（1用量8匹）とし，実験前日午後5時に除餌し，水のみを与え，午前10時より投与を開始し，投与2時間目より餌（日本クレア CE-2）を再び与え20日間にわたって症状観察，体重測定を行う

* 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

とともに，この間の死亡数をもとに，プロビット法にて50% 致死率を算出し，また，Litchfield Wilcoxson[3] 法を用いて，用量致死率曲線の平行性ならびに効力比についての推計学的検討を行った．死亡例は直ちに，生存例は44日後に（T-1, 3, 5, L-4, L T-1, 3, 5 群につき）屠殺し，定法に従って，血液学，血清生化学的検査ならびに臓器重量を測定を行い，すべて結果は推計学的処理を行った[4]．対照群には無処理のものを選んだ．

各投与群は次のように表記した．

投与群	用量 (g/kg)	投与群	用量	投与群	用量
	BHT		LAS		BHT+LAS
T-1	2.700	L-1	1.382	LT-1	2.700+0.800
T-2	2.250	L-2	1.150	LT-2	2.250+0.800
T-3	1.875	L-3	0.960	LT-3	1.875+0.800
T-4	1.562	L-4	0.800	TL-4	1.562+0.800
T-5	1.302	L-5	0.600	LT-5	1.302+0.800

実験結果

1. D_{50} ならびに用量—致死率の関係

各投与用量における死亡率は以下に示す．

投与群	死亡率 ♂	♀	投与群	死亡率 ♂	♀	投与群	死亡率 ♂	♀
T-1	8/8	7/8	L-1	1/8	0/8	LT-1	6/8	8/8
T-2	5/8	4/8	L-2	2-8	0/8	LT-2	7/8	8/8
T-3	4/8	1/8	L-3	2-8	1/8	LT-3	7/8	5/8
T-4	0/8	0/8	L-4	0/8	0/8	LT-4	5/8	1/8
T-5	2/8	0/8	L-5	0/8	0/8	LT-5	3/8	3/8

TにL 0.800g/kg を加えたLTとTの用量—致死率曲線はFig. 1, 2に示した如く，雌雄ともLTの方がTよりも強力な致死作用を示すことが認められた．LD_{50} は，LTのTの用量で表示すると，雄の場合は，LT 1.318 g/kg, T1.906g/kg, 雌の場合はLT1.695g/kg, T2.255 g/kgでLTはTに比べかなりの低下が認められた．この時の用量—致死曲線の勾配は雌雄ともにLTとTの間の平行性は否定できず，その効力比は雄，1.45, 雌1.33（T/LT）は有意であり，LTにおいて両者の協力作用が認められた．

2. 体重の変化

試料投与後の生存ラットの体重の変化は，Fig. 3., Table 1 に示したごとく各群とも，多くは投与2日後までは減少した．増加したものも鈍い増加であった．3日以後回復が認められたが，T-3の生存例の増加は緩慢で4日後まで体重の減少が続き（雄），44日後の体重（雄），体重増加率（雌）に変化が認められた．

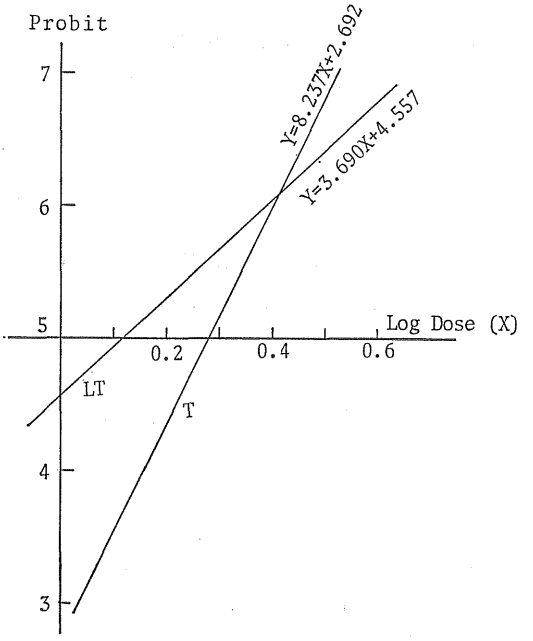


Fig. 1. Relationship between Mortality and Dose in the Rats Administered Orally with T and LT (Male)
T: BHT LT: BHT+LAS (0.800g/kg)

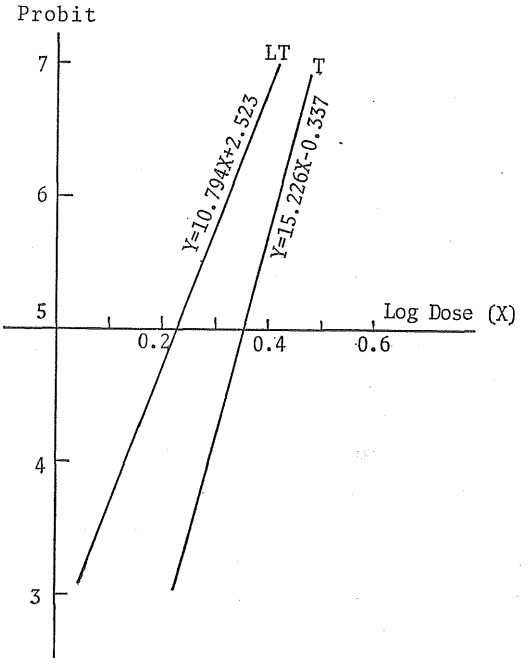


Fig. 2. Relationship between Mortality and Dose in the Rats Administered Orally with T and LT (Female)
T: BHT LT: BHT+LAS (0.800g/kg)

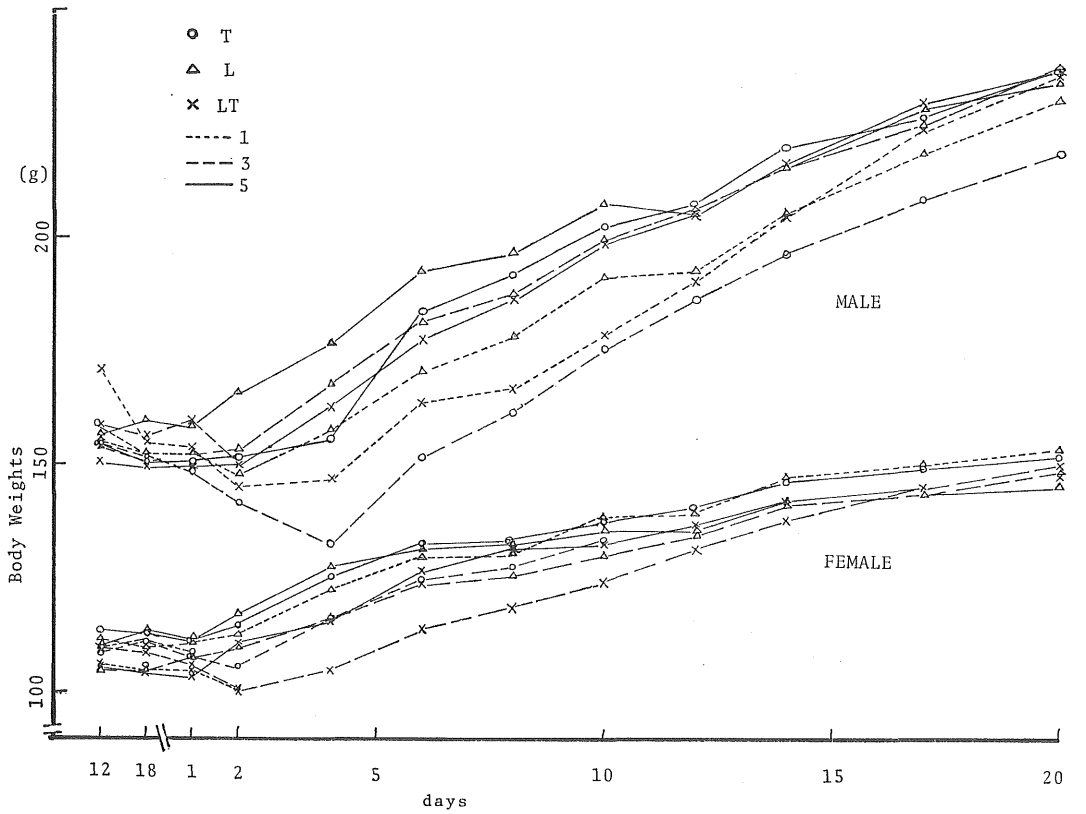


Fig. 3. Mean Body Weights of Survival Rats Treated Orally with BHT, LAS and BHT+LAS (0.800g/kg)
T : BHT 1.....2.700 g/kg, 3.....1.875 g/kg, 5.....1.302 g/kg
L : LAS 1.....1.382 g/kg, 3.....0.960 g/kg, 5.....0.600 g/kg
LT : BHT+LAS (0.800g/kg)

Table 1. Body Weights Gain of Survival Rats

Sex	Dose	No. of Rats	Initial B.W. (g) mean ± S.E.[1]	Final B.W. (g) mean ± S.E.	Growth Rates (%)[2]
Male	Control	72	157.26±1.280	311.00±7.853(4)	198.09± 5.002
	T-3	8→4	153.13±4.125	279.25±9.750*	191.25± 4.035
	T-5	8→6	154.75±2.630	299.50±5.691	191.59± 1.010
	L-4	8→8	155.75±3.337	293.75±7.316	180.16±10.170
	LT-1	8→1	158.50±3.827	269.00	176.97
	LT-3	8→1	160.13±4.545	335.00	197.05
	LT-5	8→5	154.63±2.946	298.00±7.239	191.73± 2.522
Female	Control	72	110.40±0.647	164.60±4.142(5)	149.64± 3.766
	T-1	8→1	111.38±2.179	179.00	146.72
	T-3	8→5	108.25±2.242	174.67±3.947	162.96± 3.182*
	T-5	8→8	112.25±2.938	175.25±5.398	156.04± 1.552
	L-4	8→8	107.63±2.383	171.37±2.865	159.42± 1.738
	LT-3	8→3	110.88±1.817	175.33±1.764	163.71± 5.129
	LT-5	8→6	109.25±2.282	171.00±2.671	155.37± 2.073

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

*$p<0.05$ ( ) No. of Rats

T−1=BHT 2.700g/kg, T−3=BHT 1.875g/kg, T−5=BHT 1.302g/kg L−4=LAS 0.8g/kg, LT−1=BHT 2.700g+LAS 0.8g/kg, LT−3=BHT 1.875g+LAS 0.8g/kg, LT−5=BHT 1.302g+LAS 0.8g/kg

Table 2. Hematology

Sex	Dose	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 (%)
Male	Control	4	5.00±0.319[1)]	6.13±1.295(3)	14.90±0.354	31.00±7.822	51.25±0.629	34.00±5.909	38.53±3.062
	T-3	4	5.02±0.426	7.60±0.306	15.18±0.680	38.70±1.766	52.25±0.479	20.25±0.202	36.98±2.223
	T-5	6	7.32±0.606*	7.67±0.200(5)	15.06±0.294(5)	38.68±0.946(5)	52.40±0.678(5)	20.16±0.299*(5)	38.78±0.362(5)
	L-4	8	6.63±0.415*	7.54±0.331	14.73±0.565	37.69±1.489	51.50±0.267	19.95±0.231**	38.88±0.378
	L T-1	1	5.600	7.25	15.00	36.40	51.00	20.90	41.20
	L T-3	1	—	—	—	—	—	—	—
	L T-5	5	6.20±0.363(4)	6.79±0.500	14.02±1.061	34.04±2.531	51.00±0.316	20.72±0.269*	40.94±0.592
Female	Control	5	4.16±0.374	6.84±0.170	14.16±0.336	35.52±0.865	53.00±0.000	20.90±0.192	39.66±0.308
	T-1	1	5.600	3.55	12.60	18.90	53.00	35.90	68.30
	T-3	5	4.60±0.813	5.86±0.964	15.08±0.480	29.08±4.656	52.40±0.400	34.44±5.466*	41.34±0.769
	T-5	8	4.24±0.339	7.04±0.105	15.11±0.175*	36.88±0.501	53.43±0.202(7)	21.56±0.219(7)	41.07±0.408*(7)
	L-4	8	4.75±0.249	7.41±0.221	15.64±0.468	38.89±1.101	53.63±0.324	21.29±0.211	40.00±0.517
	L T-3	4	5.48±0.522	7.04±0.245	15.45±0.096*	37.03±1.516	53.50±0.645	22.18±0.706	41.70±1.607
	L T-5	6	4.72±0.453	6.63±0.284(5)	14.90±0.259(5)	35.55±1.873(4)	53.50±0.500(4)	22.32±0.890(5)	47.68±5.947(5)

1) Mean±S.E. *$P<0.05$ **$P<0.01$ ( ) No. of Rats
T-1=BHT 2.700g/kg, T-3=BHT 1.875g/kg, T-5=BHT 1.302g/kg, L-4=LAS 0.800g/kg, LT-1=BHT 2.700g+LAS 0.800g/kg, LT-3=BHT 1.875g+LAS 0.800g/kg, LT-5=BHT 1.302g+LAS 0.800g/kg

Table 3. Serum Biochemical Tests

Sex	Dose	No. of Rats	Total Protein (g/dl)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GOT (Unit/ml)	GPT (Unit/ml)	ALP (Unit/dl)	Cho (mg/dl)	ChE (△pH)	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)
Male	Control	4	6.13±0.293[1)]	97.50±7.030	43.75±1.031	88.00± 4.062	25.00±0.408	42.25±2.358	58.50±3.663	0.03±0.005	146.00±4.509(3)	7.47±0.617(3)
	T−3	4	6.75±0.473	110.00±4.243	47.25±3.146	102.00± 7.990	28.00±0.707*	54.00±2.449*	64.50±4.173	0.08±0.009	138.50±3.014	7.35±0.166
	T−5	6	6.93±0.092**	123.00±1.366***	55.17±0.946***	98.67± 2.704	27.00±0.447*	55.33±2.472**	69.33±2.216*	0.07±0.012	148.50±4.500	7.68±0.375
	L−4	8	6.79±0.289(7)	115.00±5.251(7)	48.00±2.182(7)	97.57± 2.487(7)	24.75±1.473	52.57±3.243(7)	65.57±2.680(7)	0.04±0.006(7)	143.43±2.159(7)	6.76±0.200(7)
	LT−1	2	6.30±0.100	100.50±3.500	38.00±1.000*	61.00±24.000	24.50±0.500	44.00±2.000	62.00±1.000	0.04±0.005	147.50±1.500	7.55±0.650
	LT−3	1	6.60	115.00	43.00	89.00	25.00	53.00	67.00	0.04	144.00	6.5
	LT−5	5	6.26±0.314	118.60±7.494	44.40±2.379	89.20± 5.229	24.00±2.345	45.80±1.241	60.00±1.975	0.20±0.154(4)	140.80±2.396	7.56±0.346
Female	Control	5	6.18±0.156	124.80±1.241	41.60±0.600	87.60± 2.421	25.00±0.707	45.20±1.594	77.80±5.886	0.63±0.148	142.67±2.603(3)	7.00±0.404(3)
	T−1	1	6.20	94.00	49.00	99.0	27.00	47.00	89.00	0.12	144.00	6.50
	T−3	7	6.77±0.121*	109.86±2.738**	52.29±1.085***	99.14± 2.747*	24.57±0.202	50.71±1.475*	91.86±1.908*	0.67±0.089	143.33±1.647(6)	7.55±0.272(6)
	T−5	8	6.51±0.190	109.38±2.712**	50.00±1.690**	92.25± 1.780	21.88±1.529	48.88±1.767	84.38±3.316	0.82±0.041	145.40±3.108(5)	7.42±0.350(5)
	L−4	8	6.71±0.149*	119.88±4.116	51.00±1.722**	93.88± 3.810	25.00±0.535	59.13±6.924	79.25±2.374	0.78±0.050	141.83±1.721(6)	7.07±0.143(6)
	LT−3	3	6.30±0.153	114.67±3.844*	46.67±2.333*	86.67± 5.044	22.00±3.055	49.67±4.910	77.67±1.333	0.68±0.052	141.00 (1)	6.10 (1)
	LT−5	6	6.48±0.128	126.50±2.907	44.67±1.764	89.67± 3.252	24.33±0.333	47.33±2.552	77.83±1.721	0.70±0.043	141.50±2.964	6.80±0.407

1) Mean ±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ ( ) No. of Rats

T−1 =BHT 2.700g/kg, T−3 =BHT 1.875g/kg, T−5 =BHT 1.302g/kg, L−4 =LAS 0.800g/kg, LT−1 =BHT 2.700g+LAS 0.800g/kg, LT−3 =BHT 1.875g+LAS 0.800g/kg, LT−5 =BHT 1.302g+LAS 0.800g/kg

Table 4. Organ Weights

Sex	Dose	No. of Rats	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(L) (mg)	Kidney(R) (mg)	Adrenal(L) (mg)	Adrenal(R) (mg)	Spleen (mg)	Testis or Ovary (L) (mg)	Testis or Ovary (R) (mg)
Male	Control	4	11.79±0.235[1]	848.75± 9.268	1204.75±94.761	1108.50±63.894	22.50± 1.555	22.50±2.217	624.00 ±30.890	1432.25±25.529	1393.75±29.070
			3.79±0.042[2]	273.39± 7.009	386.79±25.809	355.62±12.095	7.22±0.392	7.23±0.680	200.35± 5.499	461.57±16.164	448.75±11.595
	T−3	4	10.44±0.483*	736.75± 7.920***	988.25±67.867	996.25±40.826	19.75±2.287	20.75±1.493	482.25±25.905*	1304.25±85.188	1247.75±82.693
			3.73±0.064	264.54± 6.900	353.29±16.723	357.20±12.335	7.15±0.994	7.42±0.406	172.48± 4.994**	466.15±19.557	445.89±18.758
	T−5	6	11.17±0.236	736.67±10.311***	976.00±17.612*	973.50±32.106	18.83±0.980	20.00±1.183	503.50±26.816*	1348.50±18.961*	1341.33±19.815
			3.73±0.042	246.21± 3.736**	326.13± 5.397*	324.96± 7.982	6.31±0.385	6.68±0.377	167.99± 8.173*	450.63± 5.953	448.39± 8.176
	L−4	8	10.82±0.454	735.25±22.719*	1010.00±46.548	967.00±38.500	20.14±1.969(7)	18.38±1.238	550.00±19.794	1366.13±32.147	1354.38±27.421
			3.67±0.077	250.16± 3.397**	343.19±11.049	328.97± 9.291	6.95±0.797(7)	6.32±0.535	187.02± 3.721	465.94±10.017	461.96± 8.176
	LT−1	2	11.93±1.690	845.00±78.000	1105.00±39.000	1044.00±44.000	21.50±4.500	13.00 (1)	685.50±13.500	825.50±41.500	827.00±3362.0
			3.73 (1)	285.10 (1)	396.28 (1)	371.74 (1)	6.31 (1)	4.83 (1)	249.81 (1)	322.30 (1)	292.19 (1)
	LT−3	1	12.70	8.20	1025.00	1022.00	15.00	12.00	540.00	1338.00	1348.00
			3.79	2.44	305.97	305.07	4.47	3.58	161.19	399.40	402.38
	LT−5	5	12.07±0.436	809.00±28.348	1053.80±50.443	1127.00±68.635	19.80±0.917	19.40±1.077	585.40±14.696	1291.00±32.218*	1312.00±41.361
			4.04±0.057*	271.56± 8.056	353.74±15.761	378.14±21.804	6.65±0.293	6.53±0.427	196.53± 3.197	434.49±16.667	440.55±11.569
Female	Control	5	5.37±0.190	469.40±13.526	603.20±36.353	560.80±21.451	21.80±1.114	21.60±0.678	381.00±10.881	27.80±0.860	21.80±2.177
			3.26±0.046	285.47± 7.594	367.75±25.637	341.76±16.309	13.33±0.946	13.19±0.737	231.73± 6.352	16.97±0.920	13.19±1.171
	T−1	1	6.24	549.00	666.00	632.00	21.00	25.00	385.00	—	43.00
			3.48	306.70	372.06	353.07	11.73	13.96	215.08	—	24.02
	T−3	7	5.98±0.143	491.00±10.468	635.14±20.644	633.00±18.216	22.57±1.784	23.86±0.962	359.86± 7.288	24.14±1.710	28.67±1.801*(6)
		6	3.45±0.062	285.69± 2.279	373.17± 6.778	362.15± 6.546	13.63±0.744	14.07±0.618	209.06± 4.976	14.01±0.999	16.41±0.929
	T−5	8	6.10±0.199*	515.00±11.466*	656.63±21.637	679.25±29.124*	25.50±2.027	25.38±1.164*	394.00±15.641	27.13±1.619	30.00±1.669*
			3.48±0.046**	294.72± 5.753	376.70±15.439	389.24±18.608	14.60±1.161	14.54±0.699*	224.47± 2.292	15.44±0.668	17.19±1.021*
	L−4	8	6.03±0.198*	520.38± 6.769**	743.25±26.628**	716.88±25.762**	22.43±0.751(7)	21.00±1.134	396.50±18.831	27.75±1.359	29.63±2.492
			3.52±0.091	304.09± 5.342	434.66±17.339	419.75±18.326*	13.19±0.632(7)	12.24±0.605	231.11± 9.301	16.19±0.755	17.24±1.339
	LT−3	3	6.57±0.378*	521.33±20.699	746.33±42.191*	771.67±29.486**	23.67±1.202	25.67±2.963	399.67±30.607	28.00±2.000	27.33±2.404
			3.74±0.194*	297.17± 9.056	425.35±20.477	439.92±13.192**	13.49±0.640	14.61±1.553	227.65±15.234	15.95±1.000	15.58±1.314
	LT−5	6	6.09±0.175*	517.83±15.404*	735.67±48.152	667.33±25.905*	22.83±1.138	20.83±1.956	407.33±19.969	26.33±0.615	28.17±1.579*
			3.56±0.058**	303.32±11.122	429.12±23.597	390.55±15.369	13.34±0.558	12.12±0.992	237.80± 9.133	15.42±0.454	16.48±0.895*

1) Weights 2) Weights/100g B.W. ( ) No. of Rats * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

T−1=BHT 2.700g/kg, T−3=BHT 1.875g/kg, T−5=BHT 1.302g/kg, L−4=LAS 0.800g/kg, LT−1=BHT 2.700g+LAS 0.800g/kg, LT−3=BHT 1.875g+LAS 0.800g/kg, LT−5=BHT 1.302g+LAS 0.800g/kg

3. 血液学的検査

結果は，Table 2 に示した如く，いずれの検査においても著明な変化は認められなかったが，貧血の傾向が散見された．

4. 血清生化学的検査

結果は，Table 3 に示した如く，著明な変化を示したものはなかったが，雌雄ともに，T-3, T-5 において変化したものが多かった．

5. 臓器重量

結果は，Table 4 に示した如くであるが，雌雄各群に比較的多く変化が認められたものは，雄の心臓の絶対重量，体重比重量の減少，(T-3, T-5, L-4)，脾臓の絶対重量，体重比重量の減少（T-3, T-5)，雌では，肝臓の絶対重量，体重比重量の増加（T-5, L-4, LT-3, LT-5)，心臓の絶対重量の増加（T-5, L-4, LT-5)，腎臓（右）の絶対重量，体重比重量の減少（T-5, L-4, LT-3, LT-5)，他に卵巣（右）の重量増加がみられた．

総括ならびに考按

食品添加物として広く多量に使用されているTならびに合成洗剤の主成分として使用されているLの併用の急性毒性について検討した．

50%致死率（LD_{50}）は，死亡ということを指標とする限りにおいては，使用した，L 0.800 g/kg は無作用量として考えてよい．LT の LD_{50} の低下はTとLの間に致死作用について協力作用があると考えられる．その効力比についてもLitchfield Wilcoxson法によって検討し有意であることが認められた．しかし用量—致死曲線 (Fig. 1, Fig. 2) について考察を加え，それらの協力作用の機序について考えてみると，雌の場合は図の上からも明らかに平行移動しているのが認められ，Lは単に界面活性剤として作用していると考えれば説明はつく．雄の場合には複雑でTが高濃度になるとLによって致死作用が弱められるという結果が得られた（実際の死亡率においてもLT-1とT-1では低濃度における場合の逆である)．これは，T の低濃度の場合はLが加わることによって，Lが界面活性剤として作用し，Tの吸収が促進されるのに対して，Tが高濃度になると，逆に抑制されたと考えられるが，この様に単純なものでなく生体側に起因する機序も考えられ，この結果の解釈は非常に困難である．Litchfield Wilcoxson法により平行性が否定できないという点を重要視すれば，Fig. 1 の結果は，その協力作用について Fig. 2 の結果となんら差はなく単に界面活性剤として，Lは作用すると説明がつくものと考えられる．

生存ラットの，体重の変化，血液学的，血清生化学的検査ならびに臓器重量の検討を行ったところ，特別に意味のある変化は認められなかったが，44日経た後もTとL，LT の影響が種々の面で残存しているものが認められた．

文　献

1) 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, 1972

2) 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

3) Litchfield, J. T., JR and F. Wilcoxson : *J Pharmacol. Expeptl. Therap.*, 96, 99, 1949

4) 福田向江，中川好男，平賀興吾：東京衛研年報，26-2, 196, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 100-104, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT），直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）長期投与マウスおよびラットにおける細胞遺伝学的研究ならびに優性致死試験

益淵 正典*，高橋 昭夫*，高橋 省*，平賀 興吾*

The Cytogenetic Studies and Dominant Lethal Tests of Long Term Administration with Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Mice and Rats

MASANORI MASUBUCHI*, AKIO TAKAHASHI*,
OSAMU TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

1970年来，当部では食品添加物としてのジブチルヒドロキシトルエン（以下 BHT）と合成洗剤の主剤である直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（以下 LAS）の一般毒性研究が続けられている．

最近，BHT に染色体異常誘発性のあることや[1,2]，LAS に催奇性のうたがいのあることが報告[3,4]されているが，これらを含む特殊毒性に関する研究は非常に少なく，さらに広範囲な調査を行なうことが望まれる．

BHT および LAS はその使用法から考えて，一般にはごく微量ずつ長期にわたって経口的に体内に取り込まれることが考えられ，実際に即した条件下での検討がなされる必要がある．今回，BHT の出血致死作用に対する LAS の増強効果を調べるために長期間（9カ月）添加飼料により飼育された2系統のラットおよびマウスを細胞遺伝学的研究ならびに優性致死試験に利用する機会を得たので報告する．

普通，優性致死試験では雄に1回（急性試験）あるいは7日連続（亜急性試験）被検物質を投与，その後6～8週間無処理雌と交配しつづけ，胎仔調査が行なわれるが，長期（8週間以上）投与による影響が調べられた例はない．一方，*in vivo* 細胞遺伝学研究においても単一腹腔内投与後6～48時間（急性試験），24時間間隔5回腹腔内投与後6時間目（亜急性試験）に染色体分析が行なわれているのみで，慢性試験の例はほとんどない．

実験方法

1. 動物

JCL-Wistar 系および JCL-SD 系の雄ラット，JCL-ICR 系の雄マウス（いずれも日本クレア株式会社）を4週令で購入し，5～7日の予備飼育後，実験に供した．それぞれバリアーシステム下（温度 25±1°，湿度 55±5%，12時間／日定時照明）で，ラットは個別飼い，マウスは5匹飼いとし，水道水および飼料を自由摂取させた．

2. 検体

BHT は 2, 6-ジ-tert-ブチル-P-クレゾール AK02（東京化成工業株式会社製），LAS はネオペレックス F60（花王アトラス株式会社製）を用いた．以上の検体は，次の割合で飼料原末・CE-2（日本クレア製）に混合後，固型化して使用した．

BHT（1.5%）添加群
LAS（0.9% あるいは，0.6%）添加群
BHT（1.5%）+LAS（0.9%）添加群
Control（無添加）群

先にも述べたように，用いた動物はもともと出血致死作用に対する BHT と LAS の効果を調べるために計画されたものであり，他に種々の実験群がもうけられているが（詳細は高橋と平賀の報告[5]を参照されたい），今回はそれぞれ最高量投与群のみを対象とした．各群の投与量の目安として，BHT 添加飼料を摂取した場合，その1日摂取量は経口急性毒性の LD_{50} 値（Rats：2g/kg 体重[6]）の75% 程度，また LAS のそれは経口急性毒性の LD_{50} 値（Rats; 1.5g/kg 体重[7]）と同程度と考えられる．

* 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

3. 細胞遺伝学的観察

i) 使用動物数は次のごとくである.

Groups	Rats		Mice
	Wistar	SD	
Control	5	5	5
BHT (1.5%)	5	5	5
LAS (0.9%)	5	5	3
BHT (1.5%) +LAS (0.9%)	5	5	5

ii) 大腿骨骨髄細胞染色体分析

分裂中期像を集めるため, 屠殺の2時間前に 1.0% コルヒチン溶液 1ml/kg 体重を腹腔内に投与した. 屠殺後, 大腿骨を取り出し両端をハサミで切り, 生理食塩水を入れた注射器で液と一緒に骨髄細胞を遠心沈殿管に洗い出した. 低張液 (37° の 0.075M KCl 水溶液) で15分間処理したのち, acetic-alcohol (acetic acid 1 : ethanol 3) で固定した. 染色体標本は火焔乾燥法により作成し, Giemsa 染色ののち検鏡に供した. よく拡がったきれいな分裂中期像のみを顕微鏡下で観察し, 染色体異常の有無について分析した.

4. 優性致死試験

i) 使用動物：JCL-ICR 系マウスの雌雄を用いた. 動物数は次のとおりである.

Groups	male	female
Control	9	18
BHT (1.5%)	10	20
LAS (0.6%)	7	14
BHT (1.5%) +LAS (0.9%)	10	20

なお雌は使用時10週令に達したものを用いた.

ii) 交配および胎仔調査方法：雌の交配適期を問わず, 雄1匹につき雌2匹を1ケージ内に同居させた. 4日間同居させたが, その間毎朝膣栓の確認を行ない, 膣栓の認められたものから別ケージに個別分離飼育した. 胎仔調査は, 膣栓を認めた日を妊娠0日とし, 13日目に母獣を解剖し行なった. 卵巣と子宮内の胎仔を摘出し, 黄体数, 生存胎仔数, 初期および後期死胚数について調べた.

iii) 優性致死誘発率の算出：上記方法で得られた値から, Röhrborn (1970)[8] の方法にしたがい優性致死誘発率〔(J)×100〕を次の方法で求めた.

$$J[A]=1-\frac{\text{生存胎仔数/全着床数 (処置群)}}{\text{生存胎仔数/全着床数 (対照群)}}$$

$$J[B]=1-\frac{\text{雌1頭あたりの生存胎仔数 (処置群)}}{\text{雌1頭あたりの生存胎仔数 (対照群)}}$$

得られた結果はすべて t 検定および χ^2 検定を行ない. 対照群との有意差を検討した.

結　果

1. 細胞遺伝学的観察

1個体あたり50個の分裂中期像について, break (chromatid, isochromatid), gap (chromatid, isochromatid), その他の異常 (exchange, ring chromosome, pulverization) などの異常を有する細胞の出現数を調べた. 結果は Table 1 のごとくである.

BHT 投与群で染色体異常として認められるのは gap で, break はまったく観察されなかった. なお gap では他の投与群にみられぬ isochromatid type のものがマウスと Wistar ラットで観察されたが, その数は少なく, Control 群に比して有意差はない. gap を生じた染色体・染色体部位は一定していなかった.

LAS 投与群では chromatid および isochromatid type の break が観察されたが, その出現はマウスに限られ, しかもそれぞれ1細胞においてのみであった.

BHT+LAS投与群においても有意な染色体異常をともなう細胞の出現は認められなかった.

一方, 各種動物およびその投与群において, exchange, ring chromosome, pulverization などの染色体異常はまったく観察されなかった.

2. 優性致死試験

ICR 系マウスにおける試験結果を Table 2 に総括して示す.

雄のうち交尾を認めた (雄1匹に対し雌2匹の毎朝の膣栓確認による) 割合は, それぞれ Control 群 77.8%, BHT 群 100%, LAS 群 85.7%, BHT+LAS 群 90.0%で, 交尾能力の低下はみられなかった. また各投与群において, 交配雌数のうち受胎の認められた割合も BHT 群 60%, LAS 群 78.6%, BHT+LAS 群 75.0% であり, Control 群 66.7%に比べむしろ高い値を示した. なお, 膣栓の確認された雌数と受胎雌数とはほぼ一致し, 妊娠率は 100% に近かった.

投与群の1母体あたりの黄体数は 12.7～14.2 で Control 群とほぼ一致し, また1母体あたりの着床数も 11.3～13.5 で Control 群との有意差は認められなかった. このことから, 各投与群とも着床以前における卵の死亡率〔(黄体数−着床数)/黄体数〕×100も投与群で最低 2.6% から最高 5.1%であり, Control 群の 3.1% となんら有意差は認められなかった. また, 着床数に対する生存胎仔数と死胚数は表裏一体の関係を示すが, 今回の

Table 1. Chromosome studies of bone marrow cells after long term administration (9 months) with dietary BHT and/or LAS in mice(ICR) and rats(Wistar,SD)

Animals	Chemicals and doses (%)	No. of animals	No. of cells observed	No. of cells with breaks		No. of cells with gaps		No. of cells with other aberrations[1)]
				chromatid	iso-chromatid	chromatid	iso-chromatid	
Mice (ICR)	Control	5	250	2	0	5	0	0
	BHT (1.5)	5	250	0	0	3	3	0
	LAS (0.9)	3	150	1	1	4	0	0
	BHT (1.5) + LAS (0.9)	5	250	1	0	4	1	0
Rats (Wister)	Control	5	250	1	0	3	0	0
	BHT (1.5)	5	250	0	0	2	1	0
	LAS (0.9)	5	250	0	0	3	0	0
	BHT (1.5) + LAS (0.9)	5	250	0	0	1	0	0
Rats (SD)	Control	5	250	0	0	4	0	0
	BHT (1.5)	5	250	0	0	2	0	0
	LAS (0.9)	5	250	0	0	4	0	0
	BHT (1.5) + LAS (0.9)	5	250	0	0	2	0	0

1) exchange, ring chromosome, pulverization

実験ではControl群における初期死胚数が多く，むしろ各投与群におけるそれを上まわった．

一方，優性致死誘発率のA法における値は各投与群ともマイナスをしめし，B法におけるそれはBHT群とBHT＋LAS群でプラスの値が得られたが，有意な差となっていない．

考　察

放射線やある種の化学物質により誘発される突然変異は，そのほとんどが有害な作用をもち，先天異常や発癌と密接な関連をもちうることが明らかにされつつある．

これら突然変異の検出には，微生物を用いる方法と，哺乳動物およびその培養細胞を用いる方法があるが，後者では遺伝子突然変異を検出することは非常に困難で，現在のところ遺伝子の集合体である染色体の数や形の変化（染色体異常）を調べてその手がかりとしている．それには，骨髄細胞の染色体分析と生殖細胞に生じた染色体異常を受精卵または胚胎仔の死亡から推定する優性致死試験などが行なわれている．

はじめに述べたように，優性致死試験としては被検物質で処理した雄動物を無処理の雌と6～8週間交配しつづけ，精子形成段階の初期から後期に至る間の突然変異誘発の強さとその時期的特異性を調べている．今回は，その精子形成の期間中被検物質を投与しつづけ（実際には9カ月間行なった），無処理雌と交配することにより優性致死の誘発性を調べる方法を試みた．被検物質の作用時期特異性は調べられぬが，優性致死誘発性を検定するスクリーニング法としては非常に有効な方法かと思われる．

さて，今回のICRマウス，Wistar, SDラットの骨髄細胞染色体分析では，各投与群ともその異常はgapがほとんどで，その出現数は250個の細胞中0～4個の低さであり，またbreakも0～1個にみられたのみである．これらはすべてControl群の値よりも低く，BHT, LAS, BHT＋LAS投与による染色体への影響はなかったと判断される．BHTの染色体異常誘発性については，フィトヘマグルチニン処理したヒト白血球細胞の *in vitro* 実験で，染色体の凝縮性（coiling）がさまたげられ，また染色体断片化などの形態的異常を伴なうことが報告されているが[2)]，今回筆者らが行なった観察ではその傾向はみられなかった．*in vitro* と *in vivo* の条件の

Table 2. Results of dominant lethal test after long term administration (9 months) with dietary BHT and/or LAS in ICR mice

Chemicals and doses (%)	No. of males		No. of females		No. of females with dead embryo		No. of corpora lutea		No. of implants			No. of live fetus				No. of dead embryos		% of Dominant Lethals (A)[1]	% of Dominant Lethals (B)[2]
	mating	copulation	mating	pregnant	total	per pregnant female	total	per pregnant female	total	per pregnant female	per total corporalutea	total	per pregnant female	per total corporalutea	per total implants	early	late		
Control	9	7	18	12	10	83.3	161	13.4	156	13.0	96.9	143	11.9	88.8	91.7	12	1		
BHT (1.5)	10	10	20	12	5	41.7	140[3]	12.7[3]	135	11.3	88.6[3]	127	10.6	82.9[3]	94.1	6	2	− 2.62	11.19
LAS (0.6)	7	6	14	11	6	54.6	156	14.2	148	13.5	94.9	142	12.9	91.0	96.0	4	2	− 4.67	− 8.33
BHT (1.5) + LAS (0.9)	10	9	20	15	6	40.0	191	12.7	186	12.4	97.4	176	11.7	92.2	94.6	8	2	− 3.22	1.54

1) $\left[1 - \frac{\text{No. live fetus per all implants in test group}}{\text{No. live fetus per all implants in control group}}\right] \times 100 = \%\ (A)$

2) $\left[1 - \frac{\text{No. live fetus per pregnant female in test group}}{\text{No. live fetus per pregnant female in control group}}\right] \times 100 = \%\ (B)$

3) Values are total or means of 11 pregnant females

差かもしれない．またさらにSciorra (1974) によると，上記条件下で細胞分裂周期の短縮がみられる[2]．この分裂周期時間の短縮に関連していると思われる現象に，マウス肺においてBHT投与後DNA合成が促進されるという報告[9]がある．現在，今回作成した染色体標本について，さらに染色体数の異数性，分裂指数の算定，中間期核の形態的変異などを検討中であり，この結果に関しては後日あらためて報告する．

一方，優性致死試験においては，BHT，LAS，BHT＋LAS投与群ともControl群に比べ，着床数，生存胎仔数，早期・後期死胚数とも何ら異常は示されなかった．ただしBHT投与群において，母体あたりの着床数および生存胎仔数の低下がみられ，また優性致死誘発率〔B〕が11.19とやや高い値を示している．しかし，Röhrborn[8]によると，優性致死試験において被検物質がほとんど突然変異性を示さない場合，実験群の平均生存胎仔数が対照群の値よりも99%の確率で20%以上の低下を示す場合に，はじめてその物質が弱い突然変異誘発性を有するとみなされることから考えると，BHTの影響はないものと思われる．

今回用いた動物は，BHT(1.5%)添加，LAS(0.6%)添加，BHT (1.5%)＋LAS (0.9%)添加飼料で9カ月間飼育されたものであるが，はじめに述べたごとく，その一日薬物摂取量は経口急性毒性のLD_{50}値に近いと考えられ，日常一般的な使用法では考えられぬほどの高濃度である．これら一連の結果を総括すると，本実験条件下では，BHT，LASはマウスおよびラットに対しなんら遺伝的障害を与えないものと考えられる．

要　約

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ネート(LAS)の突然変異誘発性を調べるため，経口的に長期間投与されたICRマウス，Wistarラット，SDラットにおける *in vivo* 細胞遺伝学的研究およびマウスにおける優性致死試験を行なった．

投与は，BHT (1.5%)，LAS (0.6%あるいは0.9%)，BHT (1.5%)＋LAS (0.9%)添加飼料により9カ月間飼育することにより行なった．

染色体分析には大腿骨骨髄細胞を用いたが，BHTおよびLAS投与に起因すると考えられる異常は認められなかった．

一方，優性致死試験は，投与雄マウス1匹につき無処理雌マウス2匹を交配させ，妊娠13日目に開腹して，黄体数，着床数，生存および死亡胎仔数を調べた．その結果，各投与群とも妊娠率，卵および胚胎仔の死亡率，生存胎仔数，優性致死誘発率にはControl群に比べ推計学的有意差は認められなかった．

以上一連の結果から，本実験条件下では，BHT, LASはマウスおよびラットに対し，なんら遺伝的障害を与えないと結論された．

文　献

1) Sciorra, L. J. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 12, 33, 1974

2) Sciorra, L. J. and R. T. Maier : *Cytologia*, 41, 63, 1976

3) 三上美樹，永井　広，坂井義雄，福島早苗，西野平：先天異常，9，230，1969

4) 三上美樹，坂井義雄：解剖誌，48，77，1973

5) 高橋　省，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，86，1976

6) 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，22，231，1970

7) 小林博義，市川久次，藤井　孝，矢野範男，紺野敏秀，平賀興吾，中村　弘，渡辺悠二，三村秀一：東京衛研年報，24，397，1972

8) Röhrborn, G. : *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970, Springer-Verlag, Berlin

9) Witschi, H. and W. Saheb : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147, 690, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 105-112, 1976

直鎖型アルキルベンゼンスルホネート（LAS）の亜急性毒性について

米山 允子*, 馬渕 依子*, 伊川 三枝子*, 小林 博義*, 市川 久次*

Subacute Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate

MASAKO YONEYAMA*, YORIKO MABUCHI*, MIEKO IKAWA*,
HIROYOSHI KOBAYASHI* and HISATSUGU ICHIKAWA*

緒　言

合成洗剤，直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）と分枝鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS）の亜急性毒性試験については，先に報告した[1]．近年，水道水中の合成洗剤の汚染が，問題とされる中で，飲料水中のLASの毒性試験は，千葉ら[2]が，ラットを使用して慢性毒性試験を行い．特筆すべき所見のなかったことを報告している．我々は，LASの毒性をさらに吟味するために，飲料水に溶解したLASをラットとマウスに9カ月摂取させ，肝臓と腎臓を中心に，生体に与える影響を検討したので報告する．

実験材料及び方法

（試料）　LAS（Linear Alkylbenzene Sulfonate）は，花王アトラスK・K製ネオペレックスP-60, Lot. No. 171を使用した．

（実験動物）　Wistar JCL系ラット4週令 SLC-ICR系マウス4週令を静岡実験動物農業協同組合から購入し，1ケージに5匹飼いで1週間予備飼育後実験を開始した．投与開始時の体重は，ラット雄（100～124g），雌（82～100g），マウス雄（24～31g），雌（20～25g）であった．

（投与方法，投与期間）　LASを日本クレア製飼料CE-2に，0.6%，1.8%になるよう混和し，飲料水には，0.07%，0.2%，0.6%，1.8%になるよう溶解し，ラット，マウスに各々自由摂取させた．餌及び飲料水中のLASの濃度は，次のように表わす．LAS 0.6%を含む餌は，0.6F，1.8%を含む餌は，1.8F，LAS 0.07%を含む飲料水は，0.07W，0.2%，0.6%，1.8%は各々0.2W，0.6W，1.8W．動物は室温25±1℃，湿度50～60%，照明時間6—18時の飼育条件下で上記の飲料水，餌を自由摂取させ9カ月間飼育した．飼育期間中，毎週体重，飼料及び試料摂取量，飲水量及び試料摂取量を測定し症状観察を行った．1.8F，1.8Wのマウス，0.6W，1.8Wのラットは，体重の減少がひどく投与開始後2週目でLAS投与を中止した．実験終了時に次の項目について検討した．マウスは，断頭後解剖による肉眼的観察を行い，次の項目の臓器重量を測定し，実重量と実験終了時の体重から100g体重当りの重量を求めた．重量測定臓器：心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，精巣，子宮．肝臓，腎臓については次の酵素活性を測定した[3]，肝臓の測定酵素：グルコース6フォスファターゼ（G6Pase），乳酸脱水素酵素（LDH），GPT，GOT．腎臓の測定酵素：G6Pase，LDH，GPT，GOT，ALP，アシドフォスファターゼ（ACP），Na, K-ATPase，マレイン酸脱水素酵素（MDH）．蛋白質の定量はLowryら[4]の方法に従った．

ラットは，断頭採血後，肉眼的所見観察を行い，血液学的，血清生化学的検査，臓器重量測定及び100g体重当りの重量，肝臓，腎臓の酵素学的検査を行った．血液学的検査：断頭時放出する血液をヘパリン塗布試験管に採取後，Coulter Counter Model Sを用いて次の項目を測定した．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（MCHC）．血清生化学的検査：採血後3000rpm 10分遠心分離，血清を採取し，日立自動分析装置M400を用いて次の項目について測定した．①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）②グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT, Reitman-Frankel変法）③グルコース量（GLU，グルコースオキシダーゼ法）④尿素窒素法（UN，ウレアーゼインドフェノール法）⑤総コレステロール量（CHO, Lieber-

* 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

man-Burchard 法) ⑥アルブミン量 (ALB, ブロムクレゾールグリーン法) ⑦アルカリフォスファターゼ (ALP, Kind-King変法) ⑧コリンエステラーゼ (CHE, ΔpH 法). 重量測定臓器：脳，心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓，副腎，精巣，子宮，盲腸．測定した肝臓の酵素は，マウスで測定した酵素の他にグルコース6フォスフェト脱水素酵素 (G6P-DH)，腎臓の酵素は，マウスと同じ酵素を測定した．

結　果

① 一般症状，体重増加：(ラット) Table 1 に示すように，1.8F では雄雌とも体重増加が，対照に比べ有意に抑制され，0.2W では，雄のみが有意な抑制を示した．他の投与群では，対照に比べ有意な差はなかったが，0.07W, 0.2W の雌に抑制の傾向がみられた．個体当りの1日の飼料摂取量は，いずれの投与群でも対照に比べ差はなかった．飲水量については，雄の 1.8F と 0.2W で増加が認められた．LAS を含む飲料水を摂取したラットは，雄雌とも顔面の毛先がうすい赤色を示し，全体に粗毛であった．(マウス) Table 2 に結果を示した．0.6W では，雄雌とも対照に比べ有意な体重増

Table 1. Body Weight Gain, Food, Water and Sample consumption of Rats on Administration of LAS for 9 Months

		No. of Rats	Initial Body wt. (g)	Final Body wt. (g)	Body wt. Gain (%)	Food g/rat/day	Water g/rat/day	Sample g/kg B. W/day
Male	Control	8	113.1±1.156	421.6±8.542	372.6±5.889	15	23	
	0.6F	8	110.6±0.925	413.5±7.356	373.8±6.380	16	23	0.234
	1.8F	8	109.2±2.218	341.1±8.008	312.5±6.518**	14	33	0.747
	0.07W	9	110.6±1.572	411.0±5.255	371.9±6.908	17	29	0.051
	0.2W	9	108.3±1.900	385.1±5.453	356.1±6.346**	15	33	0.148
Female	Control	8	92.3±1.592	212.6±4.508	230.5±5.420	10	18	
	0.6F	8	92.1±1.663	216.1±7.705	234.3±5.753	10	17	0.287
	1.8F	8	90.6±1.463	184.8±4.278	204.3±5.791**	9	18	0.969
	0.07W	9	92.7±1.770	206.0±3.555	222.4±4.478	11	20	0.082
	0.2W	9	91.6±1.893	209.3±5.383	228.4±3.857	12	18	0.173

Values are the mean±S.E. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 2. Body Weight Gain, Food, Water and Sample Consumption of Mice on Administration of LAS for 9 Months

		No. of Mice	Initial Body wt. (g)	Final Body wt. (g)	Body wt. Gain (%)	Food g/rat/day	Water g/rat/day	Sample g/kg B. W/day
Male	Control	8	27.5±0.567	48.6±1.870	180.4±9.383	3.2	5.6	
	0.6F	9	27.0±0.667	55.5±2.473	207.8±12.322*	5.0	10.4	0.545
	0.07W	9	27.5±0.580	56.0±2.279	204.2±10.130*	4.6	7.5	0.093
	0.2W	9→5	27.2±0.278	46.2±4.066	171.2±15.195	5.1	6.4	0.278
	0.6W	9	27.0±0.624	41.7±1.255	155.3±5.798**	4.0	4.0	0.585
Female	Control	8	21.5±0.267	47.6±2.267	221.6±10.514	2.0	6.0	
	0.6F	8	21.7±0.453	45.5±2.726	209.5±12.814	3.7	4.4	0.493
	0.07W	9	22.2±0.662	49.8±2.781	226.3±13.574	3.1	7.6	0.106
	0.2W	9	22.3±0.553	45.8±2.058	206.8±11.352	3.7	5.7	0.248
	0.6W	9	22.5±0.530	38.5±1.857	172.0±9.849**	2.9	6.0	0.935

Values are the mean±S.E. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 3. Blood Components of Rats on Administration of LAS for 9 Months

		WBC ($\times 10^3$)	RBC ($\times 10^6$)	HGB (gm)	HCT (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
Male	Control	5.5±0.414	5.7±0.142	10.9±0.195	28.0±0.663	49.0±0.189	19.5±0.247	39.5±0.504
	0.6F	4.2±0.221*	5.9±0.159	11.2±0.291	29.2±1.059	49.6±0.778	19.4±0 436	38.9±0.851
	1.8F	4.9±0.461	5.8±0.076	10.7±0.118	27.8±0.561	49.2±0.250	19.1±0.268	38.5±0.499
	0.07W	4.7±0.209	5.9±0.072	11.3±0.094	29.1±0.317	49.2±0.147	19.1±0.210	38.6±0.447
	0.2W	4.9±0.304	6.0±0.119	11.3±0.141	29.3±0.566	48.8±0.200	19.1±0.238	38.7±0.493
Female	Control	2.6±0.297	5.6±0.163	11.0±0.243	28.8±0.859	51.7±0.164	20.0±0.364	38.4±0.689
	0.6F	2.5±0.150	5.7±0.265	11.2±0.485	29.3±1.400	51.2±0.313	19.8±0.356	38.5±0.699
	1.8F	3.7±0.556	5.6±0.294	10.5±0.599	28.2±1.546	50.0±0.378**	18.9±0.193*	37.5±0.294
	0.07W	2.4±0.213	6.0±0.302	11.5±0.556	30.5±1.551	51.5±0.176	19.5±0.159	37.7±0.299
	0.2W	2.7±0.328	5.6±0.100	11.0±0.176	28.9±0.624	52.0±0.463	20.0±0.349	38.3±0.601

Values are the mean±S.E. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 4. Biochemical Values in Serum of Rats on Administration of LAS for 9 Months

		GOT (K.U/ml)	GPT (K.U/ml)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	CHO (mg/dl)	ALB (g/dl)	ALP (KA-U/dl)	ChE (△pH)
Male	Control	151.3±7.285	107.5±8.177	163.0±11.488	21.0±0.333	77.5±3.417	4.87±0.055	41.3±1.308	0.166±0.010
	0.6F	133.2±5.573	102.3±8.485	132.2±4.139*	21.0±0.684	71.6±2.314	47.2±0.075	44.7±2.782	0.187±0.013
	1.8F	126.7±6.439*	93.0±3.665	144.7±10.099	23.1±0.490**	53.0±1.282**	44.7±0.068**	82.2±3.731**	0.281±0.007**
	0.07W	142.8±10.111	108.5±12.381	131.6±3.088*	22.8±0.647*	68.2±2.527*	47.5±0.059	44.0±1.239	0.131±0.015
	0.2W	143.8±9.041	103.3±9.513	165.1±14.043	21.0±1.462	62.5±2.534**	43.2±0.251	34.4±3.193	0.171±0.008
Female	Control	142.3±14.359	104.2±12.474	135.5±5.246	23.2±0.793	95.8±4.778	47.1±0.265	45.0±5.728	0.963±0.073
	0.6F	116.1±5.244	68.7±2.670*	126.4±3.657	21.5±0.602	86.7±4.230	4.85±0.095	40.7±1.539	1.056±0.023
	1.8F	133.6±4.007	88.1±4.362	130.8±3.945	26.7±1.935	67.8±7.472**	42.8±0.097	73.8±11.808*	0.861±0.053
	0.07W	121.2±7.003	74.2±13.529	127.2±2.035	21.9±0.872	95.0±3.755	49.0±0.187	45.6±12.960	0.881±0.171
	0.2W	128.5±12.209	85.7±9.362	136.1±10.070	21.7±0.950	77.2±8.826	46.8±0.155	44.0±5.576	1.053±0.042

Values are the mean±S.E. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 5. Organ Weight of Male Rats and Male Mice on Administration of LAS for 9 Months

		Brain g g/100g	Heart g g/100g	Lung g g/100g	Liver g g/100g	Spleen g g/100g	Kidney(R) g g/100g	Kidney(L) g g/100g	Adrenal(R) mg mg/100g	Adrenal(L) mg mg/100g	Testis(R) g g/100g	Testis(L) g g/100g	Caecum g g/100g
Rat	Control	1.987±0.011	1.026±0.018	1.263±0.033	12.7±0.341	0.698±0.014	1.162±0.040	1.184±0.041	18.3±1.117	18.1±0.934	1.591±0.023	1.643±0.027	1.238±0.068
		0.463±0.008	0.239±0.005	0.294±0.008	2.9±0.039	0.162±0.003	0.270±0.008	0.275±0.007	4.2±0.217	4.2±0.225	0.370±0.006	0.382±0.005	0.281±0.015
	0.6F	1.982±0.011	0.971±0.022*	1.269±0.042	12.9±0.310	0.682±0.019	1.210±0.026	1.214±0.032	19.6±1.900	17.6±1.602	1.563±0.019	1.585±0.027	1.303±0.057
		0.473±0.007	0.231±0.004	0.302±0.005	3.0±0.049	0.162±0.002	0.290±0.006	0.289±0.007	4.7±0.435	4.2±0.416	0.373±0.004	0.378±0.007	0.305±0.010
	1.8F	1.827±0.131	0.825±0.026*	1.040±0.025**	11.5±0.352*	0.501±0.163**	0.977±0.022**	0.982±0.017**	17.5±1.370	17.0±0.654	1.455±0.027**	1.491±0.033**	2.205±0.141**
		0.521±0.037	0.235±0.003	0.295±0.002	3.2±0.043**	0.143±0.003**	0.279±0.007	0.281±0.007	5.0±0.481	4.8±0.146	0.415±0.004**	0.425±0.004**	0.647±0.032**
	0.07W	1.995±0.016	0.981±0.031	1.287±0.021	13.2±0.258	0.682±0.009	1.221±0.018	1.254±0.012	18.6±0.680	19.2±1.024	1.606±0.022	1.566±0.056	1.338±0.040
		0.471±0.006	0.232±0.008	0.304±0.007	3.0±0.052	0.161±0.002	0.288±0.005	0.296±0.005*	4.4±0.156	4.5±0.262	0.379±0.006	0.370±0.015	0.314±0.009
	0.2W	1.881±0.108	0.975±0.183	1.154±0.037*	11.6±0.184	0.595±0.013**	1.124±0.025	1.154±0.031	18.4±0.914	17.5±1.309	1.483±0.059	1.589±0.013	1.210±0.035
		0.478±0.028	0.247±0.003	0.293±0.007	2.9±0.042	0.150±0.002	0.286±0.007	0.293±0.008	4.6±0.232	4.4±0.354	0.377±0.016	0.404±0.005	0.309±0.008
Mouse	Control	—	0.229±0.016	0.265±0.013	2.56±0.088	0.209±0.028	0.440±0.038	0.416±0.044	—	—	0.132±0.006	0.120±0.008	—
			0.492±0.036	0.573±0.039	5.490±0.183	0.449±0.059	0.942±0.078	0.891±0.090			0.284±0.018	0.257±0.018	
	0.6F	—	0.251±0.026	0.316±0.024	3.85±0.234**	0.240±0.029	0.444±0.031	0.426±0.032	—	—	0.148±0.004	0.140±0.005	—
			0.487±0.078	0.587±0.038	7.09±0.203**	0.423±0.039	0.825±0.056	0.800±0.070			0.279±0.019	0.270±0.021	
	0.07W	—	0.226±0.016	0.269±0.016	3.21±0.275*	0.249±0.036	0.421±0.026	0.418±0.026	—	—	0.134±0.007	0.153±0.020	—
			0.389±0.023*	0.478±0.019*	5.69±0.366	0.440±0.061	0.761±0.055	0.753±0.051**			0.240±0.010	0.291±0.062	
	0.2W	—	0.237±0.015	0.303±0.007	2.88±0.382	0.238±0.068	0.432±0.019	0.428±0.027	—	—	0.160±0.015	0.133±0.005	—
			0.529±0.025	0.688±0.053	6.28±0.284*	0.504±0.097	0.970±0.044	0.819±0.124			0.369±0.056	0.300±0.022	
	0.6W	—	0.188±0.018	0.265±0.018	2.54±0.131	0.212±0.023	0.401±0.020	0.370±0.010	—	—	0.124±0.009	0.124±0.007	—
			0.482±0.037	0.673±0.041	6.46±0.275*	0.546±0.064	1.021±0.039	0.942±0.014			0.302±0.016	0.315±0.010	

Values are the mean ±S.E. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Table 6. Organ Weight of Female Rats and Female Mice on Administration of LAS for 9 Months

		Brain g g/100g	Heart g g/100g	Lung g g/100g	Liver g g/100g	Spleen g g/100g	Kidney(R) g g/100g	Kidney(L) g g/100g	Adrenal(R) mg mg/100g	Adrenal(L) mg mg/100g	Ovary(R) mg mg/100g	Ovary(L) mg mg/100g	Uterus g g/100g	Caecum g g/100g
Rat	Control	1.853±0.023	0.647±0.013	0.870±0.026	6.2 ±0.150	0.441±0.016	0.650±0.021	0.650±0.021	24.8±1.381	25.7±1.385	29.3±2.738	31.2±4.007	0.687±0.037	0.828±0.010
		0.846±0.016	0.294±0.003	0.397±0.012	2.8 ±0.051	0.201±0.006	0.296±0.006	0.296±0.008	11.2±0.443	11.7±0.487	13.4±1.226	14.2±1.857	0.313±0.017	0.377±0.005
	0.6F	1.859±0.011	0.595±0.019*	0.810±0.032	6.6 ±0.355	0.425±0.010	0.648±0.023	0.655±0.026	25.8±1.563	24.8±1.641	23.3±3.504	32.8±3.120	0.660±0.033	0.859±0.064
		0.845±0.027	0.269±0.006**	0.367±0.015	2.9 ±0.061	0.193±0.009	0.292±0.004	0.296±0.008	11.7±0.820	11.3±0.863	10.8±1.740	14.9±1.380	0.301±0.020	0.381±0.015
	1.8F	1.788±0.031	0.455±0.008	0.761±0.028	7.1 ±0.195**	0.351±0.012**	0.580±0.015	0.586±0.021*	19.6±1.981*	21.3±1.487*	25.3±2.853	31.5±2.322	0.588±0.066	1.436±0.080**
		0.954±0.015**	0.242±0.002	0.405±0.009	3.8 ±0.082**	0.187±0.004	0.309±0.003	0.312±0.007	10.3±0.924	11.3±0.609	13.4±1.417	16.7±1.165	0.312±0.034	0.775±0.039**
	0.07W	1.854±0.019	0.611±0.011*	0.801±0.027	6.3 ±0.139	0.424±0.007	0.669±0.017	0.677±0.010	22.0±1.619	21.0±1.763	30.0±1.490	31.7±2.300	0.729±0.051	0.785±0.051
		0.844±0.016	0.277±0.004**	0.365±0.014	2.8 ±0.063	0.193±0.004	0.304±0.006	0.308±0.005	10.0±0.720	9.8±0.790	13.6±0.780	12.2±1.200	0.331±0.022	0.358±0.024
	0.2W	1.691±0.112	0.593±0.015	0.817±0.040	6.1 ±0.220	0.428±0.014	0.651±0.015	0.670±0.020	23.2±1.495	24.3±1.154	28.4±1.633	28.6±1.900	0.644±0.032	0.800±0.045
		0.810±0.053	0.287±0.004	0.393±0.021	2.9 ±0.071	0.205±0.006	0.312±0.006	0.321±0.008*	11.1±0.677	11.6±0.431	13.6±0.821	13.7±0.830	0.308±0.014	0.379±0.026
Mouse	Control	—	0.173±0.010	0.278±0.014	1.93±0.134	0.168±0.016	0.249±0.009	0.232±0.009	—	—	—	—	0.195±0.013	—
			0.373±0.014	0.608±0.041	4.16±0.173	0.361±0.027	0.540±0.020	0.503±0.021					0.424±0.035	
	0.6F	—	0.147±0.007	0.291±0.018	2.15±0.105	0.162±0.012	0.216±0.010	0.211±0.009	—	—	—	—	0.212±0.029	—
			0.350±0.033	0.702±0.089	5.10±0.397*	0.389±0.045	0.516±0.047	0.505±0.049					0.526±0.115	
	0.07W	—	0.174±0.010	0.318±0.022	2.28±0.146	0.208±0.018	0.271±0.011	0.266±0.019	—	—	—	—	0.271±0.041	—
			0.367±0.025	0.664±0.030	4.76±0.205*	0.447±0.040	0.576±0.027	0.559±0.035					0.596±0.110	
	0.2W	—	0.156±0.006	0.301±0.027	2.26±0.115	0.176±0.015	0.255±0.011	0.244±0.015	—	—	—	—	0.268±0.035	—
			0.341±0.009	0.667±0.064	4.98±0.245*	0.393±0.042	0.561±0.025	0.536±0.034					0.593±0.079	
	0.6W	—	0.152±0.007	0.309±0.022	2.13±0.162	0.173±0.017	0.255±0.011	0.250±0.011	—	—	—	—	0.227±0.032	—
			0.413±0.011*	0.853±0.072	5.77±0.262**	0.467±0.036*	0.703±0.042**	0.683±0.029					0.631±0.095	

Value are the mean ±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

加抑制を示し，雄の 0.6F, 0.07W では，むしろ有意な増加を示した．0.2W では，雄雌とも対照に比べ有意差はみられなかったが，体重が抑制されていた．個体当りの一日摂取量は，対照に比べいずれの投与群でも増加し，飲水量は，雄の0.6W，雌の0.6F，0.2Wで減少し，雄の0.6F，0.07W，0.2W，雌の 0.07W で増加していた．0.2W の雄は，途中，飼育管理上の事故により9匹から5匹に減った．

② 血液学的検査：Table 3 に示すように，ラット雄では 0.6F に WBC の有意な減少がみられ，雌では 1.8F に MCV，MCH の有意な減少がみられた．

③ 血清生化学的検査：結果は Table 4 に示した．CHO は，雌の 0.07W を除いて雄雌に有意な減少あるいは減少の傾向を示している．GPT は，雌の 0.6F に有意な減少を示し，雌の他の投与群でも減少の傾向を示した．GOT は，雄 1.8F に有意な減少を示し，他の投与群には雄雌とも減少の傾向がみられた．AlB は，雄 1.8F に有意な減少，0.2W に減少の傾向がみられ，雌でも 1.8F に減少の傾向がみられた．

④ 臓器重量：Table 5, 6 に結果を示した．（ラット）全体として注目すべき値はなかったが，1.8F の雄の肝臓が対照に比べ絶対重量に有意な減少，体重比重量に有意な増加，脾臓では絶対重量，体重比重量とも有意な減少を示した．1.8F雌では，肝臓の絶対重量，体重比重量に有意な増加を示している．（マウス）雄の肝臓の 0.6F, 0.07W の絶対重量に有意な増加，0.6F, 0.2W, 0.6W の体重比重量に有意な増加，0.07W の体重比重量に増加の傾向を示した．雌の肝臓では，すべての投与群の体重比重量に有意な増加を示した．

⑤ 肝臓の酵素学的検査：得られた結果は，ホモジネイトの蛋白量当りとし，Table 7 に示した．（ラット）G6Pase は，雄雌とも 1.8F で減少し，G6P-DH は，雄雌とも 0.6F, 1.8F で減少，その割合は，1.8F の方が大であった．LDH は，雄では 0.6F, 1.8F, 0.2W

Table 7. Liver Enzyme Activities of Rats and Mice on Administration of LAS for 9 Months

			G6 Pase μmoles Pi/mg protein/hr	G6P-DH(×10⁻³) △E/mg protein /min	LDH △E/mg protein /min	GPT(×10²) KU/mg protein	GOT (×10²) KU/mg protein
Rat	Male	Control	3.77±0.22	60.3±9.9	11.33±0.53	4.06±0.345	5.80±0.525
		0.6F	3.82±0.50	40.9±9.1**	10.28±0.84*	3.94±0.484	5.49±0.810
		1.8F	2.60±0.15**	36.0±7.7**	9.26±0.99**	3.09±0.225**	4.95±0.510**
		0.07W	3.57±0.36	68.0±15.1	10.92±0.91	3.89±0.360	5.61±0.410
		0.2W	3.71±0.35	56.8±14.9	9.28±0.71**	4.10±0.420	6.16±0.545
	Female	Control	2.73±0.57	143.6±30.0	70.6±11.6	2.71±0.405	4.91±0.635
		0.6F	2.67±0.51	100.7±39.9*	63.4±14.2	2.60±0.505	4.30±0.560
		1.8F	2.17±0.15*	58.5±12.2**	62.2±4.7	2.37±0.225	4.05±0.450**
		0.07W	2.61±0.20	138.3±41.0	65.8±8.5	2.57±2.290	5.61±0.410*
		0.2W	2.76±0.28	120.9±27.6	66.5±11.3	2.89±0.195	6.16±0.545**
Mouse	Male	Control	3.43±0.87	—	4.87±0.67	3.69±0.445	3.51±0.310
		0.6F	2.81±0.83	—	4.06±0.49**	3.29±0.585	3.43±0.265
		0.07W	3.03±0.89	—	4.74±0.92	3.36±0.380	3.51±0.205
		0.2W	2.89±1.21	—	4.71±0.71	3.48±0.305	3.60±0.140
		0.6W	3.26±1.58	—	5.39±0.97	3.61±0.335	3.58±0.230
	Female	Control	1.81±0.94	—	4.81±1.72	4.30±0.550	4.39±0.405
		0.6F	2.10±0.63	—	4.28±1.33	4.43±0.585	4.16±0.265
		0.07W	1.76±0.84	—	5.00±1.33	4.18±0.425	4.29±0.280
		0.2W	1.69±0.83	—	4.66±1.44	4.31±0.600	4.18±0.190**
		0.6W	1.70±0.57	—	5.07±1.74	4.11±0.275	3.89±0.195

Values are the mean±S.D. *$p<0.05$ **$p<0.01$

Table 8. Kidney Enzyme Activities of Rats and Mice on Administration of LAS for 9 Months

			ALP μmoles/mg /hr	ACP μmoles/mg /hr	G6Pase μmoles/mg /hr	Na, K-ATPase μmoles/mg/hr	GPT KU/ml	GOT KU/ml	LDH △E/mg/min	MDH △E/mg/min
Rat	Male	Control	16.37±1.984	1.80±0.188	3.97±0.590	3.94±0.613	23.99±5.300	192.11±35.741	0.339±0.043	2.308±0.447
		0.6F	14.44±2.046	1.72±0.141	3.92±0.618	3.63±0.640	23.16±5.885	199.95±22.869	0.334±0.050	2.325±0.575
		1.8F	15.74±1.933	1.78±0.179	3.47±0.732	3.32±1.311	21.11±4.690	194.18±13.668	0.358±0.070	2.354±0.554
		0.07W	14.73±2.387	1.85±0.194	4.26±0.547	3.52±1.170	23.85±4.640	207.39±21.308	0.347±0.098	2.617±0.628
		0.2W	15.03±1.169	1.66±0.109	4.03±0.428	3.09±0.224*	24.44±3.535	202.94±15.708	0.362±0.058	2.679±0.740
	Female	Control	15.94±3.369	2.02±0.182	3.96±0.545	4.29±1.027	28.27±4.407	188.33±21.189	0.350±0.035	2.387±0.601
		0.6F	17.11±2.919	2.03±0.179	3.63±0.521	4.29±0.656	30.26±5.736	196.48±21.273	0.338±0.044	2.231±0.433
		1.8F	16.86±2.396	1.85±0.195	3.13±0.426**	3.19±0.613*	32.60±3.737	184.89±11.276	0.291±0.025**	2.181±0.404
		0.07W	16.24±2.381	1.98±0.218	3.72±0.443	4.14±1.452	27.19±3.319	198.09±29.803	0.322±0.035	2.052±0.306
		0.2W	15.02±3.244	1.90±0.136	3.45±0.651	4.59±1.154	27.03±4.430	187.36±20.235	0.316±0.052	2.070±0.362
Mouse	Male	Control	19.85±3.676	0.56±0.100	2.63±0.400	4.28±0.903	33.36±9.253	127.54±7.462	0.391±0.029	2.250±0.136
		0.6F	20.53±4.387	0.46±0.081*	2.40±0.369	3.62±0.747	26.88±5.703	113.84±16.432	0.364±0.013	2.247±0.124
		0.07W	24.44±3.386*	0.54±0.065	2.62±0.296	4.58±1.082	33.02±6.128	127.66±15.925	0.366±0.025	2.208±0.127
		0.2W	21.02±2.533	0.48±0.045	2.23±0.368	3.75±1.376	25.56±4.928	128.46±20.791	0.409±0.040	2.205±0.188
		0.6W	19.80±2.688	0.52±0.068	2.02±0.400*	4.19±1.028	30.05±10.178	124.64±13.974	0.396±0.015	2.548±0.183
	Female	Control	23.88±2.560	0.86±0.126	2.89±0.522	7.08±0.669	31.59±9.000	175.69±12.761	0.137±0.015	1.905±0.185
		0.6F	25.08±2.464	0.87±0.061	2.55±0.347	7.66±0.639	33.51±9.781	172.73±21.106	0.148±0.020	2.053±0.214
		0.07W	26.05±3.704	0.92±0.094	2.79±0.370	7.52±1.201	27.15±5.975	176.84±21.278	0.153±0.024	2.121±0.140*
		0.2W	27.86±3.242*	0.88±0.088	2.63±0.475	8.54±0.551**	32.48±13.513	189.89±19.087	0.164±0.022*	2.246±0.281
		0.6W	23.71±4.500	0.80±0.137	2.11±0.377**	6.93±0.854	26.75±9.849	162.85±23.037	0.125±0.152	1.832±0.242

Values are the mean±S.D. *$p<0.05$ **$p<0.01$

で明らかな活性の減少がみられたが雌では，1.8F に減少の傾向がみられた．GOT, GPTは，雄でやはり明らかな低下がみられ，雌では，GPTで1.8Fに低下の傾向があったのみで，GOTは0.07W，0.2Wで活性が上昇し，1.8F では低下していた．（マウス）結果は，個体によりかなりの幅がみられ，雄の 0.6Fの LDH と 0.6W の GOT の活性の低下のみが有意であった．

⑥ 腎臓の酵素学的検査：結果は Table 8 に示した．（ラット）雄の 0.2W で Na, K-ATPase に有意な低下がみられ，他の投与群でも減少の傾向を示していた．G6 Pase も有意な差はみられなかったが，摂取量増加に伴う低下の傾向を示した．雌では1.8F のG6 Pase, Na, K-ATPase, LDH に有意な減少を示し，G6 Pase, LDH は他の投与群でも低下の傾向がみられた．（マウス）G6 Pase は，対照に比べ 0.6W 雄雌において有意な減少を示し，他の投与群でも減少の傾向がみられた．

考　　察

LAS を飲料水に溶解あるいは餌に混和し，ラット，マウスを使用して9カ月間の亜急性試験を行った．LASの高濃度における肝臓及び腎臓の重量変化，組織障害は先に報告した[1]．今回の実験では，肝臓の測定酵素の活性が，ラット 1.8F で著しく低下していることから，肝機能低下が考えられ，酵素合成の低下，LAS あるいはその代謝物による直接の酵素阻害が推測される．血清中のコレステロールの低下は，雌の 0.07W を除いたすべての投与群に有意な減少あるいは減少の傾向がみられ，肝細胞の障害[5]が推測されることからさらに検討の必要がある．マウスについては，今回血液検査を行えなかったが，肝臓の比重量が雌雄とも有意に増加していることから，やはり肝臓への影響が考えられる．肝臓の酵素学的検査では，ラットほど明らかな差がみられなかったのは，かなりの個体差がマウスにみられたことと種差による違いも考えられ，測定法の検討を要する．腎臓への影響は，顕著ではなかったが，酵素学的検査において，ラット，マウスとも，G6 Pase の活性の低下の傾向，Na, K-ATPase の活性がラットにおいて低下の傾向を示していることから，尿細管[6]における再吸収の低下が考えられるが，今後，機能検査も行うことによって酵素活性との関連を検討する必要がある．飲料水中の LAS と飼料に混和した LAS の生体に及ぼす影響の差は，濃度が異なるので特にラットでは比較できないが，マウスの雄の0.6Fと0.6W では，LAS の摂取量が大きく差がないにもかかわらず，0.6F では，体重が有意に増加し，0.6W では，有意に減少している．ラット雄では 0.2W が 0.6F より摂取量が少ないにもかかわらず体重が有意に減少していることから飲料水中の LAS の方に吸収の点から影響が強くでると考えられる．

要　　旨

LAS のラット，マウスに対する影響を調べるために LAS 濃度0.07%，0.2%，0.6%の飲料水，LAS 濃度0.6%，1.8%の飼料を投与し，9カ月間の亜急性試験を行い次の結果を得た．

① ラット，マウスの肝重量の変化，ラットにおける肝臓酵素活性の低下．

② 腎臓の G6Pase, Na, K-ATPase 活性の低下．

①，② から LAS による肝臓，腎臓の機能低下が推測された．

文　　献

1) 米山允子ら：東京衛研年報，24，409，1972
2) 千葉昭二：食衛誌，13，509，1972
3) 馬渕依子ら：東京衛研年報，27-2，20，1976
4) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
5) 林　康之：肝機能検査，44，1974，医学書院
6) Pollak, V. E. : *Arch. Int. Med.*, 109, 473, 1962

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 113-118, 1976

妊娠マウスに皮膚塗布されたドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の胎仔に及ぼす影響

高橋 昭夫*, 安藤 弘*, 久保 喜一*, 平賀 興吾*

Effects of Dermal Application of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) on Pregnant Mice and Their Fetuses

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

合成洗剤およびその主成分である界面活性剤のアルキルベンゼンスルホン酸塩（ABS），直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）等の催奇形性については多くの報告[1-12]がある．当部では市販台所用洗剤（LAS系）およびLASの催奇形性試験を行ない[13,14]，大量で妊娠率の低下，胎仔の発育遅延等が認められたが，催奇形性についてはそれを認めなかった．また高級アルコール系洗剤の主成分である界面活性剤の催奇形性試験もいくつか報告[5,9,15]されており，催奇形性について多くは否定的であるのに対し，三上[16]らは市販の高級アルコール系台所用洗剤を用いての催奇形性試験で催奇形性のあることを報告している．今回，著者らは高級アルコール系の界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）のマウス皮膚塗布による催奇形性試験を行ない，その結果を得たので報告する．

試験材料および試験方法

(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8～13週令（体重 26.0～34.0g）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，水道水とともに自由に摂取させた．

(3) 試 料

実験に用いたドデシル硫酸ナトリウム（以下 SDS と略す）は，E. Merck 社，Lot. No. 3949586 (SDS 98％, Na_2SO_4 0.5％, NaCl 0.1％, H_2O 0.1％）である．

(4) 交配および妊娠の確認

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，翌朝膣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．

(5) 投与方法，投与期間，投与量

投与期間は妊娠6～13日の8日間とし，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で得られた最大耐量を参考に，SDS 濃度で 0.4％，4.0％，6.0％ となるように精製水にて希釈溶解し投与した，対照群には精製水のみを用いた．投与方法は投与開始前日（妊娠5日）午後4時に背部を電気バリカンにて 3×3cm になるように剪毛を行ない，翌日の午前中同一時刻に胃ゾンデを用いて各試料 1.5ml/kg の割合に塗布した．なお投与期間中に再度刈りとることはせず，また動物が塗布部位をなめることを防止する方法は特に講じなかった．

(6) 観察方法

母体は妊娠0日より胎仔観察時まで，毎日1回午前中同一時刻に体重測定するとともに一般症状を観察した．妊娠18日に母体をエーテル麻酔下に屠殺開腹し，着床数，生存胎仔数，死亡吸収胚数を調べるとともに生存胎仔については体重測定，口腔を含む外部形態の異常の有無を観察した．その後胎仔を開腹し剖検後，95％エタノールで固定し，Dawson[17]の変法によりアリザリンレッドS染色により骨格異常の有無並びに化骨の進行状態を観察した．母体については胎仔摘出後剖検し，胸腹部臓器を観察するとともに，肝・肺・心・脾・腎臓および副腎・卵巣について重量測定を行なった．

* 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

Table 1. Effect of SDS on organ weights of pregnant 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	[1]2.7±0.33 9.5±0.97	126.2±11.7 451.1±33.7	131.8±30.4 470.4±102.2	162.4±16.6 579.9±41.6	208.7±26.2 745.8±82.3	223.5±28.5 797.5±76.2	2.9±0.60 10.5±2.28	2.7±0.58 9.8±2.18	8.1±1.73 29.0±5.63	9.0±2.20 32.0±6.74
2. Distilled water	2.6±0.24 9.1±0.69	124.1±9.53 429.8±27.4	131.4±30.1 455.8±106.6	157.8±8.07 547.1±28.3	205.7±18.6 713.0±63.3	223.9±19.5 775.1±51.1	3.3±0.47 11.3±1.76	3.1±0.63 10.8±1.96	8.5±1.99 29.4±7.00	9.5±2.31 32.8±7.98
3. SDS(0.4%)	2.8±0.29 9.5±0.76	127.9±8.71 431.8±27.8	128.0±24.8 429.7±71.8	164.1±10.8 553.8±33.5	226.7±26.3 746.2±72.5	235.9±22.2 795.0±52.7	3.4±0.46 11.5±1.68	3.1±0.53 10.6±1.83	8.1±1.15 27.5±4.18	10.2±1.64 34.2±5.14
4. SDS(4.0%)	2.6±0.29 9.2±0.83	128.6±12.5 451.1±30.8	144.3±38.7 504.1±122.0	161.0±10.8 565.2±27.0	221.7±22.0 779.8±86.2	228.9±19.4 803.6±54.0	3.4±0.68 11.9±2.29	3.2±0.55 11.3±1.91	8.3±1.94 29.3±6.75	9.3±1.52 32.7±5.63
5. SDS(6.0%)	2.6±0.25 8.9±0.71	126.4±13.1 436.1±34.2	134.4±41.1 461.4±127.2	160.0±16.7 551.7±33.2	213.7±23.3 736.6±50.0	229.3±32.1 789.8±82.6	3.5±0.53 12.0±1.89	3.1±0.45 10.9±1.66	8.2±1.93 28.3±5.70	8.5±1.94 29.4±6.39

1) Mean±S.D.

Table 2. Effect of SDS on rates of pregnancy and embryonic development in mice

Group	No. of females with vaginal plug	No. of dams (%)	Total No. of imolantations (Mean±S.D.)	Total No. of survived fetuses (Mean±S.D.)	Total No. of dead & resorved fetuses (%)	Mean body weight of survived fetuses Mean S.D.
1. Non treatment	48	39(81.3%)	450 (11.5±2.45)	424 (10.9±2.18)	26(5.8%)	1.36±0.11
2. Distilled water	21	19(90.5%)	218 (11.5±2.70)	205 (10.8±2.37)	13(6.0%)	1.29±0.12
3. SDS (0.4%)	21	20(95.2%)	244 (12.2±1.79)	228 (11.4±1.85)	16(6.6%)	1.28±0.12
4. SDS (4.0%)	21	17(81.0%)	198 (11.6±1.32)	180 (10.6±1.70)	18(9.1%)	*** 1.21±0.15
5. SDS (6.0%)	21	** 11(52.4%)	126 (11.5±1.37)	116 (10.6±1.69)	10(7.9%)	*** 1.21±0.15

*** $p<0.001$

** $p<0.01$

以上により記録された数字は集計し，精製水群を対照として統計的に検討した．

試 験 結 果

試験結果として掲載の各表には参考として本実験の条件にあうと思われる無処置妊娠マウスより得られた資料の一部を併記した．

〔1〕 母体に対する影響

(1) 体重および一般症状の推移

体重はSDS 4.0% 群，6.0% 群で投与期間中に増加率の低下を認めた．その傾向は6.0%群で強くあらわれた (Fig. 1)．

一般症状は皮膚のよごれが4.0%群，6.0%群に認められたが，著者らが同濃度の LAS を用いて行なった時に比べるとよごれの程度は軽く，皮膚に与える刺激もLASよりは弱いように見受けられた．

(2) 剖検および臓器重量

受胎を確認した母獣の臓器重量を Table 1 に示す．

剖検所見および臓器重量に特記すべきことは認められなかった．

(3) 受胎率

Table 2 に示すように，膣栓を確認した雌マウスは各群21匹でそのうち開腹時（妊娠18日）に胎仔の存在を認めた母獣数（受胎率）は精製水群19匹 (90%)，SDS

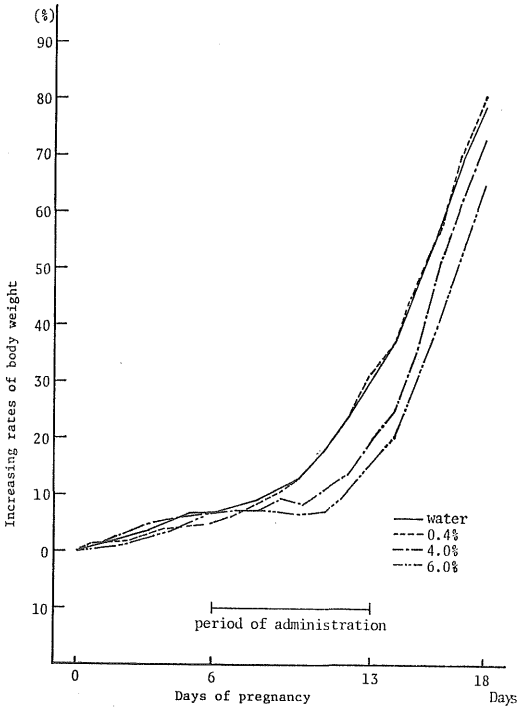


Fig. 1. Increasing rates of body weight in pregnant mother mice

Table 3. Effect of SDS on external anomalies of fetuses

Group	Non treatment	Distilled water	SDS 0.4%	SDS 4.0%	SDS 6.0%
No. of fetuses examined	426	205	228	180	116
No. of abnormal fetuses	1) 16(3.8) 2) 13(27.1)	8(3.9) 7(36.8)	9(4.0) 7(35.0)	14(7.8) 9(52.9)	7(6.0) 5(45.6)
Brain hernia	0	0	1(0.4) 1(5.0)	0	0
Abdominal hernia	0	1(0.5) 1(5.3)	0	0	0
Cleft palate	0	0	1(0.4) 1(5.0)	4(2.2) 4(23.5)	5(4.3) 4(36.4)
Open eyelids	10(2.4) 7(14.6)	7(3.4) 6(31.6)	5(2.2) 3(15.0)	9(5.0) 6(35.3)	1(0.9) 1(0.9)
Poly-dactylia	1(0.2) 1(2.1)	0	1(0.4) 1(5.0)	0	0
Bent tail	2(0.5) 2(4.2)	0	0	0	1(0.9) 1(9.1)
Club foot	3(0.7) 3(6.3)	0	1(0.4) 1(5.0)	0	0
Subcutaneous bleeding	0	0	0	0	0
Digital nomalies	0	0	0	1(0.6) 1(5.9)	0

1) No. of fetuses (%)
2) No. of mother mice (%)

0.4%群20匹（95%），4.0%群17匹（81%）であったが，6.0%群では11匹（52%）で有意に小さかった．

開腹時，胎仔の存在を認めなかったマウスのうちSDS 4.0%群で2例，6.0%群で6例が投与期間中の体重の減少から流産とみられたが，その中で肉眼的に着床痕の確認ができたのは6.0%群の1例のみであった．

〔2〕 胎仔に対する影響

(1) 着床数，生仔数，死亡吸収胚数，胎仔重量

結果は Table 2 に示すとおりである．

着床数，生仔数，死亡吸収胚数では SDS 投与群のいずれにも対照群に比して有意な差は認められなかった．しかし胎仔重量では4.0%群と6.0%群において有意に小であった．

(2) 外形異常

外形異常の型と出現数，また異常仔を持った母獣数を Table 3 に示す．

精製水群では臍ヘルニア1（母獣数1）例，開眼7(6)例，SDS 0.4%群では脳ヘルニア1(1)例，口蓋裂1(1)例，開眼5(3)例，多指1(1)例，反足1(1)例が認められ，4.0%群では口蓋裂4(4)例，開眼9(6)例，指曲1(1)例が，また6.0%群では口蓋裂5(4)例，開眼1(1)例，曲尾1(1)例が認められた．精製水群，0.4%群，4.0%群に開眼が多発している．さらに4.0%群，6.0%群の口蓋裂の発生がやや多かったが推計学的には有意ではなかった．

(3) 内臓および骨観察

Table 4. Effect of SDS on skeletal development of mouse fetuses

Group	Non treatment	Didtilled water	SDS 0.4%	SDS 4.0%	SDS 6.0%
Degree of ossification					
No. of caudal vertevrae	[1]8.13±2.465	8.81±1.726	8.70±1.885	8.41±2.617	8.08±2.244
Fore paw					
No. of proximal phalanx (L)	3.90±0.616	3.97±0.192	3.94±0.282	3.84±0.577	3.86±0.456
(R)	3.91±0.601	3.99±0.145	3.95±0.236	3.87±0.458	3.89±0.378
No. of middle phalanx (L)	2.69±1.218	1.97±1.018	1.69±1.188	1.90±1.157	1.55±1.155
(R)	2.81±1.263	2.16±0.932	1.98±1.148	2.07±1.155	1.79±1.198
Hind paw					
No. of proximal phalanx (L)	4.54±1.383	4.59±0.775	4.53±0.831	3.96±1.486	4.20±1.170
(R)	4.57±1.218	4.64±0.716	4.56±0.819	4.18±1.256	4.18±1.174
No. of middle phalanx (L)	1.02±1.578	0.46±0.927	0.47±1.058	1.02±1.619	0.52±1.026
(R)	1.16±1.609	0.43±0.887	0.51±1.116	1.02±1.598	0.54±1.037
Separation of sternevrae	[2]12(7.4)	3(1.6)	3(1.5)	17(10.8)	12(12.4)
Absence of cervical bodies	21(13.0)	15(7.9)	26(12.6)	32(20.4)	14(14.4)
Defective development of sternevrae	33(20.4)	2(1.1)	6(2.9)	13(8.3)	13(13.4)
Delayed ossification					
of talus (L) (R)	142 133 (87.7)(82.1)	177 172 (96.2)(94.0)	172 171 (78.2)(87.2)	122 119 (89.7)(88.2)	84 84 (94.5)(93.3)
of calcaneous (L) (R)	60 55 (30.7)(34.0)	49 45 (26.6)(24.6)	53 49 (24.1)(25.0)	53 48 (39.6)(35.8)	42 40 (47.7)(44.4)
Variation					
Surplus of sternevrae	15(9.3)	17(9.0)	31(15.1)	17(10.8)	7(7.2)
Asymmetry of sternevrae	56(34.5)	30(15.9)	33(16.0)	23(14.7)	11(11.3)
Cervical rib	54(33.3)	9(4.8)	4(1.9)	16(10.2)	15(15.5)
No. of rib 14	63(38.9)	105(55.7)	132(64.1)	77(49.0)	47(48.5)
No. of lumber vertevrae 7		1(0.53)	11(5.34)	1(0.64)	5(5.2)
Split of atlas & axis		45(23.8)	62(30.1)	38(24.2)	24(24.7)
Anomalies					
Adhesion of ribs			2(0.1)		
Absence of cervival vertevrae				1(0.6)	

1) Mean±S.D.
2) No. of fetuses

胎仔開腹等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.

骨の化骨，変異，異常については Table 4 に示した. SDS 濃度が高くなるにしたがい化骨遅延の傾向が認められた. また0.4%群に2例，肋骨の癒合，分岐しているものが認められ，4.0%群に1例，右頸椎数の不足しているものが認められた. しかし種々の化骨変異では対照群間の変動と比較し増減に有意性を認めなかった. Table 4 の骨観察では骨染色時，一部に処理時間の過誤による四肢欠失により左右で観察数が異なった.

総括および考察

高級アルコール系界面活性剤である SDS について JCL/ICR 系マウスを用い背部皮膚塗布による催奇形性試験を行なった. 母体に対する影響として，試料投与期間中に SDS 4.0%群，6.0%群で体重増加率の低下が認められた. しかしながら著者らが同濃度の LAS を用いて行なった皮膚塗布試験に認められたような塗布部位の痂皮形成は観察されず，また他の一般症状からもSDS皮膚塗布は LAS 皮膚塗布よりも母体に与える影響は軽度であった. 剖検時の肉眼的所見と臓器重量には特記すべき変化は認められなかった. 受胎率では SDS 6.0%群が52%で他群に比して低かった. その原因として，当部で LAS 高濃度を妊娠初期に投与した場合にみられた受胎マウス数の減少も関連して，別に，SDS 6.0%を試料投与開始時期を1日ずらし，妊娠7～14日，と妊娠8～15日に皮膚塗布を行ない，その結果，妊娠7～14日処理では10例中10例（100%），妊娠8～15日処理では9例中7例（78%）と受胎率の低下は認めなかった. このことから妊娠6日では受精卵の着床が未だ不充分であり，そこに LAS の場合と同様に SDS 高濃度処理による何らかの影響が加わって妊娠を維持できずに流産したものと考えられる. 受精卵の着床に関しては今後さらに検討を加えてゆきたい.

胎仔に対する影響としては，胎仔重量で4.0%群，6.0%群に対照群に比して有意な差を認め，発育遅延の傾向にあった. 胎仔の肉眼的観察では外形異常としての開眼の発生が対照群を含め全ての群で目立った. これは過去2～3年の JCL/ICR 系マウスの生産場での自然発生奇形データ[18]をみると開眼は増加の傾向にあり現在よく認められる異常と考えられる. しかしながら従来 ICR 系マウスの自然発生奇形としてよく観察された口蓋裂は生産場でのデータではその発生頻度が低く，その意味では SDS 4.0% 群，6.0%群に認められた口蓋裂数は統計的な有意性はなかったもののさらに検討する必要があるかと思われる. 胎仔の骨観察では SDS 高濃度群に化骨遅延の傾向が認められた. また安田[14]らの催奇形性の指標となるという腰肋の増加やその他の化骨変異においても，その増減に対照群間の変動と比較し有意と認めなかった. 骨異常では肋骨の癒合，分岐2（母獣数2）例が0.4%群に，右頸椎数の不足1例が4.0%群に認められたが6.0%群ではそのような異常は認めなかった.

以上のことから SDS の催奇形性に関しては，SDS が微生物における変異誘起性有りとの報告[20]もあり，また本実験での口蓋裂の発生や着床などの問題も含め，経口投与で行なってみる必要性があり，今後さらに充分な検討を加えてゆきたい.

要　旨

SDS のマウス皮膚塗布（妊娠6～13日処理）による催奇形性試験を行なった.

母体に対する影響では ①試料投与期間中 SDS 4.0%群，6.0% 群に体重増加率の低下を認めた. ② 一般症状などの観察から SDS は LAS より母体に与える影響は弱い. ③臓器の肉眼的観察，重量測定では特記すべき変化は認められなかった. ④SDS 6.0%群で受胎率の低下をみた.

胎仔に対する影響として①着床数，生仔数，死亡吸収胚数に推計学的な有意差は認めなかったが，胎仔重量で SDS 4.0%群，6.0%群が有意に低下し，発育遅延を認めた. ②外形異常では開眼が対照群も含め全ての群でみられた. 推計学的に有意ではなかったが SDS 4.0%群，6.0% 群で口蓋裂の発生が目立った. ③骨観察で SDS 高濃度群に化骨遅延の傾向を認めたが，化骨変異・異常に特に変化は認められなかった.

文　献

1) 大森義仁，桑村　司，田中　悟，川島邦夫，中浦慎介：食衛誌，9，473，1968
2) 三上美樹，永井　広，坂井義雄，福島早苗，西野平：先天異常，9，230，1969
3) 三上美樹，坂井義雄：解剖誌，48，77，1973
4) 小谷新太郎，千葉昭二，今堀　彰，塩原正一，北川富雄，千葉裕典，柳田美子，山本和子：日公衛誌，20，165，1973
5) Palmer, A.K. and M.A. Readshaw：食衛誌，14，638，1973
6) 飯森正秀，井上駿二，矢野恭子：油化学，22，807，1973
7) 桝田文八，岡本暉公彦，井上邦夫：食衛誌，14，580，1973
8) 桝田文八，岡本暉公彦，井上邦夫：食衛誌，15，349，1974

9) Palmer, A. K., M. A. Readshaw, and A. M. Neuff : *Toxicology*, 3, 91, 1975
10) Nolen, G. A., L. W. Klusman, L. F. Patrick, and R. G. Geil : *Toxicology*, 4, 231, 1975
11) 三上美樹，坂井義雄，宮本　勇，北村小夜子，藤島弘子，和具芳雄，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
12) 西村秀雄，亀山義郎，沢野十蔵，三上美樹：厚生省 LAS の催奇性に関する合同研究報告，1976
13) 佐藤　薫，安藤　弘，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，24，441，1973
14) 高橋昭夫，佐藤　薫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，67，1975
15) 桝田文八，井上邦夫：食衛誌，17，158，1976
16) 三上美樹，坂井義雄：解剖誌，49，33，1974
17) Dawson, A. B. : *Stein technol.* 1, 123, 1926
18) 実験動物中央研究所：JCL/ICR の自然発生奇形データ，1963-1975
19) 安田峯生，前田広由：先天異常，13，174，1973
20) Inuzuka, N., S. Nakamura, M. Inuzuka, and M. Tomoeda : *J. Bacteriol.* 100, 827, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 119-123, 1976

クロムの毒性に関する研究　三酸化クロムの急性毒性

小林 博義*, 神谷 信行*, 平賀 興吾*

Toxicological Studies on Chromium　Acute Toxicitiees of Chromium Trioxide

HIROYOSHI KOBAYASHI*, NOBUYUKI KAMIYA* and KOGO HIRAGA*

Oral acute toxicities of chromium trioxide were examined in rats and mice, and the following results were obtained.

1) LD_{50} values of chromium trioxide in rats 86-107 mg/kg (44-56 mg/kg as chromium[VI]) male, 80-114 mg/kg (41-59) female, in mice 163-177 mg/kg (84-91) male, 135-151 mg/kg (70-78) female respectively.

2) Observed main symptoms were hair stand, diarrhea, cyanosis, abdominal and/or cheyne-stokes breathing, necrosis of tail, blooding and ulcer in stomach, change of eye colour into black, tail up in rats and mice.

3) Death time in rats was within 3-35 hours. In survival animals, recovery of the symptoms was found from 7 hours after and that of deceased body weights were found from 3 days after administration. Macroscopic findings in survival rats for 36 days after treated showed no change. Weights of liver and testis were increased a little.

緒　　言

六価クロム（三酸化クロムとして）の急性毒性について Gleason[1] らの報告によると，Very Toxic (LD_{50}=50～500mg/kg, Hodge らの分類で[2] Moderately Toxic) としているが，急性毒性，特に経口急性毒性について，ほとんど報告をみない，よって六価クロムの毒性研究の一環として，三酸化クロムのマウスおよびラットにおける経口急性毒性検討を行なったので報告する．

実験材料および実験方法

試料：三酸化クロム (CrO_3) 試薬特級，関東化学㈱ Lot. No. 71160557.

実験動物：JCL-ICR マウスならびに JCL-Wistar ラットを用いた．いずれも生後4週のものを購入，室温 25±1° 湿度 55±5%，照明午前6時より午後6時の飼育室にて，マウスは10匹，ラットは5匹を金網型ステンレスケージに収容，日本クレア製 (CE-2) 固型飼料と水道水を自由に与え飼育，成育良好なものを実験に供した．

実験方法：試料の濃度は公比 1.1～1.2 の割合で増量し，7～10段階用量を用いた．投与容量はマウス，ラットとも 10ml/kg となるよう精製水で溶解調整し，胃ゾンデにて経口投与した．投与溶液 pH は 1.6～1.8 であった．動物は1用量当り10匹とし，前日午後5時より除餌し水のみを与え，午前10時より試料の投与を開始した．投与後2時間目より餌を与え，以後20日間にわたって症状を観察するとともにこの間の死亡率にもとづいて Litchfield and Wilcoxson 法[6] により 50%致死量 (LD_{50} と略す) を求めた．生存例については，投与後20日目，死亡例については直ちに剖検を行なった．別に LD_{50} にもとづいて，その前後量をラットに投与し30日間にわたり体重変化の推移を観察した．終了後に心臓，肝臓，脳，腎臓，精巣，卵巣，脾臓の器官重量を対照（精製水投与）のそれと比較した．

実験結果および考察

症状：**マウス**では，投与直後，伏臥閉眼，立毛，ついで鎮静様と同時に目が黒くなり，さらに歩行困難，チェーンストーク様呼吸や腹式呼吸などが投与量に比例してみられ，後軀麻痺，挙尾，体温低下を経て致死する例が

* 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

多く，致死直前に強直性様けいれんをするものが少数に認められた．

高濃度投与群（300～400mg/kg）で投与後48～90時間にわたり眼瞼が白濁性分泌物におおわれると同時に，四肢に冷感を認めるものがあった．またこれら一部に尾端の壊死などを伴って伏臥姿勢のまま致死するものが認められた．

ラットでは，マウスの症状に加え，前後肢下肢部チアノーゼ，流涙，遊泳様運動，嗄声，急に歩き出すものなどがみられた．死を免れたラットは投与後7～10時間で症状は回復に向うようにみえた．

剖検：マウス 104～125mg/kg 投与群の死亡例で，肝臓にチョコレート色の針頭大の斑点，腎臓に髄質外帯部の赤変が認められた．胃では小彎をはさんで両側の腺胃，筋胃の境界部近くに直径2～3mmの潰瘍が数個みられた．膵臓がゼリー状を呈したもの1例，胆のう容積の増大したもの（長さ3～5mm幅2～3mm）3例が認められた．生存例については投与後20日後の剖検時には肉眼的著変は認められなかった．

ラット Table 1 に示した．（**投与後5～8時間で死亡したもの**）胃には水様液が充満し膨大していた．肝臓はチョコレート色で全面に黒色針頭大の斑点が認められ，腎臓髄質外帯，膵臓の赤変，睾丸の血管が非常に明瞭に見え，卵巣，子宮は全例に充出血様変化がみられ，小腸は透明感がありこれらの変化は，1～5時間死亡例より顕著であった．腸の内容物はゼリー状であった．

（**投与後10～13時間で死亡したもの**）この頃より高濃度群の雄の小腸にリング状の出血がみられるようになった．腎では表面が粗で髄質外帯の赤変等がみられた．胃では水様液が充満し容積膨大とともに腺胃部に出血がみられ外観がくるみ紋様に見えた．盲腸にも線状の充出血があり腸管は透明感があった．

Table 1. Changes in Macroscopic Findings in Rats

Organ	Changes	7–8 [1)]	10–12	13–15	16–18	20–24	48～	150～
Spleen	Reduction					+		+
	Deepred							+
Liver	Deep red	+	+	+	+	+	+	
	Congestion	+	+	+	+	+	+	
	Rough			+	+	+	+	+
	Roundvt							+
Kidney	Hyperemia	+	++	+	+	+	+	+
Testis	Clear blood-vessels	+	+	+	+	+		
Lung	Livid red				+	+		
Brain	Hyperemia						+	
Uterus	Bleeding	+	+	+	+	+	+	+
Ovary	Bleeding	+	+	+	+	+	+	+
Pancreas	Pale red	+						+
Blind gut	Bleeding		+	+	+	+	+	
Intestine	Clear	+	+	+				
	Hyperemia			+	+	+	+	
	Bleeding		+	+	+	+	+	
Stomach	Fullness of watery	+	+	+	+	+	++	++
	Hyperemia		+	+	+	+	++	++
	Bleeding				+	+		
	Deep red			+	+	+	+++	+

1) Hours

Table 2. Acute Toxicities(LD_{50}) of Chromium Trioxide in rats and mice

Animals	Week	Sex	B. W. ±SD	Dead Time onset	peak	end	Slope function	LD_{50} (po) mg/kg	Confidence Limits (p=0.05) mg/kg
JCL ICR mouse	10	♂	27±0.3				1.111	177(91.98)*	159.3—196.6
		♀	24±0.63				1.266	135(70.15)	110.1—170.9
	11	♂	28±0.1	2	3, 22	71	1.068	163(84.76)	152.0—174.0
		♀	22±1.0	2	3, 8	94	1.093	151(78.52)	138.1—165.0
JCL WISTAR rat	8	♂	226±1.4				1.433	107(55.6)	89.2—128.2
		♀	160±1.0				1.179	114(59.28)	102.9—126.2
	13	♂	248±1.0	2	9, 13	58	1.340	86(44.72)	71.7—103.0
		♀	168±1.2	5	12	144	1.455	80(41.60)	62.0—103.1

* as chromium (VI)

(投与後17～20時間で死亡したもの) 胃の水様物による容積膨大が継続し，腺胃部の出血はさらに増強して赤色より暗紫色を呈していた．直腸では糞塊の形成が始められているのが見られたが，小腸，盲腸の充出血はさらに増強されていた．卵巣は充血し，肝臓は暗赤紫色で黒色点状斑が明瞭に認められた．

(投与後48時間以上で死亡したもの) 一部に脾臓の小さいものが見られた，また大脳血管にも充血様変化が認められた．

(投与後150時間以上で死亡したもの) 腎臓乳頭部は灰白色で髄質外帯部は黒色を帯び，肝臓は各葉の辺縁が鈍化し表面が粗となっており膵臓は桃色を呈し，脾臓，卵巣，子宮は暗赤色を呈した．胃，腺胃部充出血は継続し，肺臓は呼気状態のままのものがほとんどであった．

LD_{50} 結果は Table 2 に示すように，マウス雄 163～177mg/kg (六価クロムとして 84～91mg/kg) 雌 135～151mg/kg (70～78mg/kg) ラット雄 86～107mg/kg (44～55mg/kg) 雌80～114mg/kg(41～51mg/kg) であった．致死時間はマウスでは投与後2時間より94時間にわたり最多死亡時間は，3，22～26時間であった．

ラット致死開始時間は投与後雄2，雌5時間，最終時間は雄58時間雌144時間，最多致死時間は雄雌ともに12時間前後に認められた．

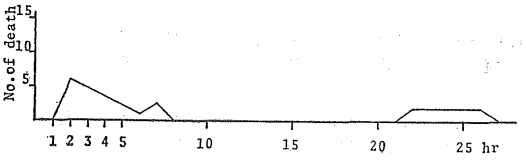


Fig. 1. Distribution of Death after Oral Administration with Chromium Trioxide in mice (male+female)

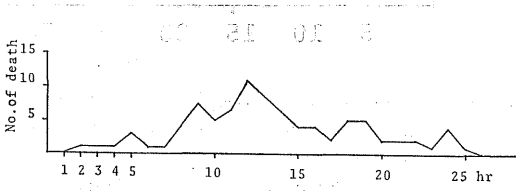


Fig. 2. Distribution of Death after Oral Administration with Chromium Trioxide in rats (mate+female)

体重の推移と器官重量 投与群の体重は対照にくらべて，投与日より2～3日までは低下し，その後増加し始めた．特に 119.5mg/kg 投与群では雄雌ともに投与後3日目まで体重は低下したが（雌は一匹であった）投与25

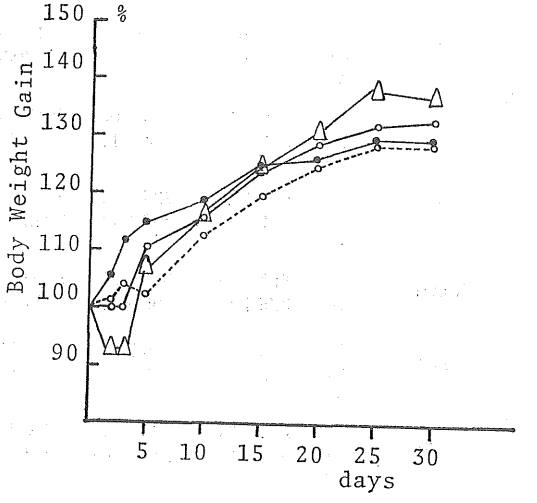


Fig. 3. Changes of Body Weights Gain of Survival Rats Administered Orally with Chromium Trioxide (male)
○--○ 75mg/kg ○——○ 95mg/kg
△——△ 119mg/kg ●——● Control

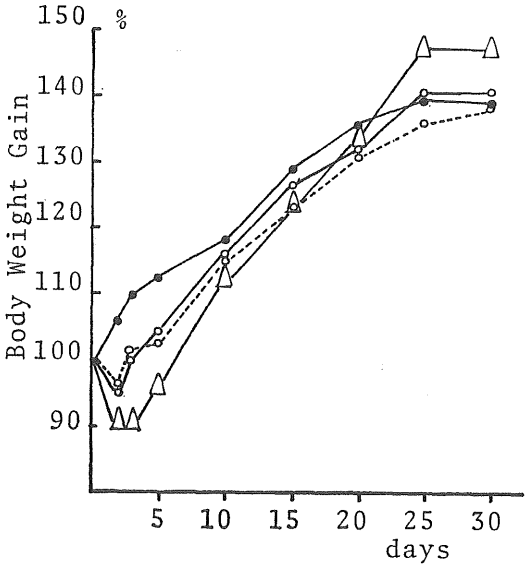


Fig. 4. Changes of Body Weights Gain of Survival Rats Administered Orally with Chromium Trioxide (female)
○---○ 75mg/kg ○——○ 95mg/kg
△---△ 119mg/kg ●——● Control

日以降においては対照以上の体重増加率を示した.

器官重量　検体投与後30日目においての器官体重比重量で，雄の睾丸，雌の肝臓，脾臓に差が認められた.

考　察

三酸化クロムのマウスならびにラットにおける経口投与による LD_{50} は，マウス雄 163～177 mg/kg (六価クロムとして 84～91mg/kg) 雌 135～151mg/kg (70～78 mg/kg)，ラット雄 86～107mg/kg (44～56mg)，雌 80～114mg/kg (41～59mg/kg) であった. この値は緒言でふれた Gleason らの評価[1] Very Toxic の範囲に入るもので，その評価の妥当であることを確認した. 急性症状として鎮静状態，立毛，下痢，チアノーゼ，チェーンストーク様呼吸ならびに腹式呼吸，特にマウスでは眼の色が黒ずんでみられ，挙尾，尾端の壊死等もみられた. 死亡例の剖検では胃の出血，潰瘍，水様液充満，腸の出血，腎臓，肝臓をはじめとする臓器の充出血等がみられた. これらの症状は局所刺激，呼吸障害，末梢血行障害を暗示し，これは主として六価クロムの酸化作用による刺激，腐蝕性[1]に由来するように思われる. また六価クロムは赤血球に特異的親和性をもち血球内で三価に還元

Table 3. Organ Weights of Rats after 30 days Administered with Chromium Trioxide

	Dose mg/kg	No. of Rats	Heart	Spleen	Liver	Brain	Kidney R	Kidney L	Testis (Ovary) R	Testis (Ovary) L
M	Control	5/5	1115±48 [1] / 307± 6 [2]	638±34 / 176± 7	14502±692 / 4000±141	1900±34 / 526±16	1406±70 / 388±13	1378±56 / 380±10	1431±41 / 395± 9	1466±38 / 405± 9
	119	3/10 (1)	1336 / 316	760 / 180	16630 / 3940	2048 / 485	1620 / 383	1564 / 370	1625 / 385	1688 / 400
	95	5/10 (4)	1195±40 / 329±18	704±53 / 194±17	14512±368 / 3987±148	1991±38 / 546±12	1427±66 / 391±20	1398±73 / 385±26	1617±57 / 444±20	1618±48 / 444±18
	75	7/10 (6)	1688±14 / 311± 4	724±52 / 206±14	13783± 39 / 3935± 75	1867±79 / 533±19	1282±50 / 366±11	1266±32 / 361±7	1607±63 / 459±18	1648±50 / 471±17
F	Control	5/5	853±37 / 326±10	535±23 / 205± 9	8903±239 / 3411± 49	1785±114 / 685± 45	921±48 / 352±13	928±44 / 355±13	68±14 / 26± 5	61± 8 / 23± 3
	119	1/10 (1)	814 / 336	527 / 236	9871 / 4078	1903 / 797	892 / 368	1024 / 423	57 / 23	49 / 20
	95	2/10 (2)	802±27 / 361±22	474±12 / 213±0.6	8630± 10 / 3881±108	1880±60 / 844± 2	772± 3 / 347± 8	839±36 / 378±27	41±14 / 18± 5	42±14 / 18± 5
	75	5/10 (5)	705±18 / 348±14	495±20 / 244± 8	7816±327 / 3855±139	1683±75 / 833±49	840±55 / 415±29	806±48 / 399±28	47± 4 / 23± 2	48± 7 / 23± 3

1) Mean organ weight±S.D. (mg)
2) Mean organ weight to 100g body wt. ±S.D. (mg)

されヘモグロビンと結合すると同時に酵素系への影響も大きいといわれ，これらが呼吸障害に関与しているように考えられる．

死亡の大多数は投与後3時間から25時間の間にみられ，死をまぬがれた動物の症状は投与後7時間ころより回復に向った．また生存動物では投与後2～3日までみられた体重の減少はその後急速に回復し，10日後にはむしろ対照に優る発育を示した．更に30日後の剖検では肉眼的変化はほとんど認められず，わずかに肝臓と睾丸の重量増が認められた．長井[5]らは標識クロム（^{51}Cr）経口投与による吸収排泄の研究で，投与量の約25％が吸収され，その90％以上が24時間以内に急速に排泄することを報告している．この排泄の早いことが，症状の回復の早いことの要因であろう．また同時に以上の所見は六価クロムの急性作用は激しいが，作用の残留性は小さいことを示しているように思われる．

文　献

1) Gleason, M. N., R. E. Gosselin, H. C. Hodge, and R. P. Smith : *Clinical Toxicology of Commercial Products, Acute Poisoning*, 3*rd Ed.*, 1969, *The Williams & Wilkins Co., Baltimore*
2) Hoge, H. : *Am. Ind. Hyg. Assoc., Qurt* 10, 93, 1949
3) Mertz W. : *Physiological Rev.*, 49, 163, 1969
4) 既存化学物質データ要覧，一般化学品編，1974，海外技術資料研究所
5) 長井二三子ら：東京衛研年報，27-2，56，1976
6) Litchfield J. T. Jr. and F. Wilcoxson. : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 124-128, 1976

クロム鉱滓水浸出液の眼粘膜一次刺激性について

藤井　孝*, 坂本 義光*, 福森 信隆*, 阿部 幸恵*, 中村　弘**
大橋 則雄**, 平賀 興吾*

Primary Eye Irritation Test by Extracts of Chromium Dross

TAKASHI FUJII*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUTAKA FUKUMORI*,
YUKIE ABE*, HIROSHI NAKAMURA**, NORIO OHASHI** and KOGO HIRAGA*

緒　言

1975年4月，六価クロムを含む鉱滓の投棄による環境汚染は大きな社会問題となり，投棄地周辺住民の健康に対する不安を惹き起した．当部ではクロム鉱滓の生体に与える影響を検討するため各種の実験を企画した．今回はその一環としてクロム鉱滓の水浸出液の眼粘膜に対する刺激性をウサギの眼粘膜を用いて検索し結果を得たので報告する．

実　験

眼粘膜一次刺激試験　1.

クロム鉱滓の水浸出液と中性の六価クロム1000ppm水溶液及びソーダ石灰飽和水溶液との比較

眼粘膜一次刺激試験　2.

クロム鉱滓の水浸出液の濃度と刺激反応性

実験材料及び方法

眼粘膜一次刺激試験　1.

実験動物　白色雄性家兎（体重 2.8～3.2kg）

試料検体　当所水質研究科にて調整したクロム鉱滓の水浸出液を用いた．これはクロム鉱滓（都内江東区大島9丁目の都営地下鉄工事現場より採取）を砂粒大まで粉砕後，鉱滓 100g に蒸留水 100m*l* の割合で加え1～2時間振盪し24時間放置，その後吸引ろ過した液（以下鉱滓液と略す）で六価クロムが1000ppm含まれておりpHは12.8であった．また鉱滓液の対照として中性を示す六価クロム 1000ppm 水溶液（以下クロム対照液と略す）とpH 12.7 の液（以下 pH 対照液と略す）とを用いた．クロム対照液は予め六価クロムの 1000ppm 溶液としておいたクロム酸ナトリウム水溶液（pH 8.9）と重クロム酸ナトリウム水溶液（pH 4.9）とを混合して pH 7.4 の水溶液を調整した．pH 対照液はソーダ石灰飽和水溶液を用いた．

Table 1.

群　名	匹数	投与検体
鉱　滓 I	5	クロム鉱滓の水浸出液
鉱　滓 II	3	(六価クロム1000ppm, pH12.8)
クロム対照 I	5	六価クロム1000ppm水溶液
クロム対照 II	3	(pH 7.4)
pH 対　照 I	5	ソーダ石灰飽和水溶液
pH 対　照 II	3	(pH 12.7)

群別・投与検体　Table 1 に示す如くである．

実験方法　眼粘膜刺激性試験としては Draize 法が汎用されているが[1]，今回は下記の方法で行い反応の評価は Table 4 に拠った[2]．ウサギは各検体毎に8匹ずつを用い5匹（I 群）と3匹（II 群）の2群に分け各々の右眼に検体を0.1m*l*点眼し，左眼は無処置対照とした．検体を点眼後，I 群は5分後に II 群は24時間後に約 300m*l* の滅菌済微温蒸留水で洗眼し検体を除去した．また検体点眼後はウサギにポリエチレン製の首枷をはめてウサギの四肢が眼に触れる事を妨げた．判定は I 群では洗眼後 1, 4, 24, 48, 72時間目，7, 14, 21日目で行った．なお 14, 21日目の判定は鉱滓群のみ行った．その他 I 群では1，72時間目，7日目，II 群では 24, 72時間目，7日目で判定後フルオレッセインナトリウムの2％水溶液（以後フルオレッセイン液と略す）を1滴点眼し数秒後に約 20m*l* の滅菌済微温蒸留水で洗眼し角膜の損傷の有無を確認した．判定は Table 4 に拠って行った．また各検体点眼後の結膜，角膜などの組織変化を観察するために上記実験

* 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
** 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

Table 2.

処置時間*	検体		
	鉱滓浸出液	六価クロム 1000ppm水溶液	ソーダ石灰飽和水溶液
1	2	2	2
4	2	1	1
24 **	2	2	2
48	2	0	0

*：点眼後の経過時間
**：24時間目は眼球摘出前にフルオレッセイン液を点眼した.

とは別のウサギを用いて点眼後1，4，24，48時間目に屠殺し，眼瞼，眼球を摘出し10%緩衝ホルマリン液で固定した．その後セロイジン・パラフィン包埋し，薄切後ヘマトキシリン・エオジン重染色を施して組織標本を作成，これを鏡検した．標本数その他は Table 2 の如くである.

実験結果　Table 2 に示す如くである．各検体ともⅠ群は5分間，Ⅱ群は24時間曝露しており判定時間はⅠ群では洗眼後，Ⅱ群では点眼後の時間を示している.

角膜に異常が認められたのは鉱滓Ⅱ群のみで24時間目で3例全部がフルオレッセイン液で角膜に直径4～6mmの円または半円形の螢光を発する部分を生じた．48時間目では全例に混濁が認められ2例は虹彩の細部まで判然と見える軽度なものであったが，残る1例は見難くやや中等度の変化であった．72時間目では2例に軽度の混濁がみられ，またフルオレッセイン液で直径3～4mmの半円形の部分に螢光が認められたが残る1例にはいずれの変化もみられなかった．7日目では1例に局所的で軽度な混濁がみられたがフルオレッセイン液での反応はなく残る2例には変化が認められなかった.

虹彩に異常が認められたのは鉱滓Ⅰ，Ⅱ群，pH 対照Ⅱ群であった．鉱滓Ⅰ群では1～24時間目まで軽度な充血が全例の約半数にみられたが48時間目以後は変化が認められなかった．鉱滓Ⅱ群では軽度な充血が，1，4時間目は3例中1例，24時間目は2例，48時間目は3例，72時間目は2例に認められたが7日目以後は変化が認められなかった．pH 対照Ⅱ群では軽度な充血が1時間で3例中2例にみられたが，Ⅰ，Ⅱ群ともそれ以後は変化が認められなかった.

結膜に異常が認められたのはクロム対照Ⅰ群を除く全ての群であった．鉱滓Ⅰ群では結膜の発赤は血管走行が著明になる軽度の変化が4時間目で5例中4例に，24，48時間目で全例にみられたが，7日目以後は全例で変化が認められなかった．浮腫は1～24時間目まで全例にみられ，1時間目では眼瞼の一部が外反するやや中等度の変化が1例でみられた他はいずれも軽度な変化であり，48時間目以後は全例で変化が認められなかった．鉱滓Ⅱ群では結膜の発赤は4時間目で3例中2例が軽度な変化を示し，48時間目では個々の血管走行が不鮮明になり結膜全体が赤くなる中等度の変化を示したのが2例，これより強い赤色化を呈する重度の変化を示したのが1例であった．72時間目では重度の変化が1例，中等度の変化が1例，軽度な変化が1例であり，7日目でも軽度な変化が1例みられたが14日目以後は全例で変化が認められなかった．浮腫は1～24時間目まで全例にみられ1時間目の2例，4時間目の1例がやや中等度の変化，24時間目の1例がこれらより強い変化を示した他は全て軽度な変化であった．その後48時間目で2例，72時間目で1例が軽度な変化を示した他は変化がみられず，7日目以後は全例に変化は認められなかった．クロム対照Ⅱ群では軽度な発赤が24時間目で1例みられたのみで，浮腫は全例に認められなかった．pH 対照Ⅰ群では軽度な発赤が1時間目で2例，4時間目で1例みられ24時間目以後は全例に変化は認められなかった．浮腫は軽度な変化が1時間目で4例，4時間目で3例みられたが，24時間目以後は全例で変化が認められなかった．pH対照Ⅱ群では，軽度な発赤が1時間目で1例，4時間目で全例，24時間目で2例，48時間目で全例にみられ，72時間目以後は全例に変化は認められなかった．浮腫は1，4時間目で全例に軽度な変化がみられたが24時間目以後は全例に変化は認められなかった．組織所見はいずれも24時間曝露であり，鉱滓群では24時間目に角膜上皮の剝離，粘膜上皮・固有層への細胞浸潤などがみられたが，クロム対照群，pH 対照群ではともに著変は認められなかった.

眼粘膜一次刺激試験　2.

実験動物　白色雄性家兎（体重 2.8～3.2kg）

検体　実験1と同一の鉱滓液を用い，これの2倍，4倍希釈液を調整した．つまり検体は鉱滓液（六価クロム 1000ppm 溶液）と2倍希釈液（六価クロム 500ppm 溶液）及び4倍希釈液（六価クロム 250ppm 溶液）の3検体である．なお 1000ppm 溶液は pH 12.8，500ppm 溶液は pH 12.7，250ppm 溶液は pH 12.4 であった.

群別・投与検体　Table 3 に示す如くである.

実験方法　実験1と同様に Table 4 に拠って反応を観察し，判定した．ウサギは各群5匹を用い各々の右眼に検体を 0.1ml 点眼し，左眼は無処置対照とした．検体を点眼後24時間目に約 300ml の滅菌済微温蒸留水で洗眼し検体を除去した．検体点眼後はウサギにポリエチ

Table 3.

群名	匹数	投与検体
1000ppm	5	クロム鉱滓の水浸出液 (六価クロム1000ppm溶液)
500ppm	5	クロム鉱滓の水浸出液 (六価クロム500ppm溶液)
250ppm	5	クロム鉱滓の水浸出液 (六価クロム250ppm溶液)

レン製首枷をはめてウサギの四肢が眼に触れることを妨げた．判定は点眼後 1, 4, 24, 48, 72時間目，7，14日目で行った．また24，72時間目，7日目では判定後フルオレッセイン液を1滴点眼し数秒後に約 20m*l*（24時間目は検体除去のため 300m*l*）の滅菌済微温蒸留水で洗眼し角膜の損傷の有無を確認した．

実験結果 Table 6 に示す如くであった．**250ppm 群**では角膜，虹彩，結膜は点眼後7日目まで全例に変化は認められなかった．**500ppm 群**では結膜の軽度の発赤が24時間目で5例中2例，48時間目で1例にみられ72時間目以後は全例に変化は認められなかった．また浮腫は点眼後 1, 4, 24時間目で各1例に軽度な変化が認められたが48時間目以後は全例に変化が認められなかった．角膜，虹彩に異常は認められなかった．**1000ppm群**では角膜には24時間目で5例全部にフルオレッセイン液で直径5～6mm の半円形または米粒大の長円形の螢光を発する部分を生じた．48時間目では3例に虹彩の細部まで判然とみえる軽度な混濁がみられたが，残る2例には変化が認められなかった．72時間目では角膜の混濁の軽度なもの1例，やや中等度のもの1例がみられ後者はフルオレッセイン液で反応を示した．この他混濁はみられなかったがフルオレッセイン液で反応を示したものが1例で，いずれの変化も認められなかったものが2例であった．7日目以後は全例に変化が認められなかった．虹彩は1～24 時間目まで5例中3例に軽度の充血がみられ48時間目ではそのうちの1例の変化が強くなった．72時間目では軽度の充血，強い充血各1例であり，7日目以後は全例に変化は認められなかった．結膜の発赤は軽度な変化が1時間目で5例中2例に，4時間目で全例にみられた．24時間目では個々の血管走行が不鮮明になり全体が赤くなるような中等度の変化が4例，これより強い赤色化を呈した重度の変化が1例であった．48時間目では軽度，中等度の変化が各2例，重度の変化が1例であった．72時間目では軽度な変化が1例，中等度の変化が3例で，変化の認められなかったものが1例であった．7日目以後は全例で変化が認められなかった．結膜の浮腫は1～24時間目まで全例にみられ，1，4時間目では軽度な変化が1例，眼瞼の一部が外反するやや中等度の変化が4例であり，24時間目では5例とも軽度な変化であった．48時間目では2例に軽度な変化がみられ，他の3例には変化がみられなかった．72時間目以後は全例で変化が認められなかった．

小括及び考察

実験結果から各検体の眼粘膜刺激性を比較してみると，5分間曝露では洗眼後24時間目で鉱滓液は5例全部に，pH 対照液は1例に結膜の軽度の充血・浮腫を起し，クロム対照液は変化を生ぜしめなかったこと，72時間目も鉱滓液は3例に結膜の軽度の充血を起していたが，他の検体は変化を生ぜしめなかったことから鉱滓液が最も強くクロム対照液は刺激性がほとんど無いと考えられる．pH 対照液はクロム対照液よりやや強いと言う程度と思われる．24時間曝露は各検体とも5分間曝露より変化は強くなっていたがクロム対照液はほとんど変らなかった．24時間曝露では点眼後24時間目で鉱滓液は3例全部に角膜の糜爛（組織所見で角膜上皮のみの欠損像であった）を起しており虹彩・結膜の浮腫を生ぜしめたが，クロム対照液，pH 対照液は結膜の軽度の充血をそれぞれ1，2例起したのみであった．72時間目でも鉱滓液は2例に角膜の糜爛を起し，結膜の充血も全例に生ぜしめたがクロム，pH の両対照液は変化を起していなかった．これらのことから特に鉱滓液は24時間曝露では5分間曝露よりも変化は顕著に強くなる傾向を示し，曝露時間に比例して変化が強くなると思われる．以上のことからクロム鉱滓の水浸出液は眼粘膜に対し強い刺激性と軽度の腐蝕性を有すると言える．pH 12.7 のソーダ石灰飽和水溶液は刺激性を僅かにもつ程度であり，中性の六価クロム 1000ppm 水溶液は刺激性がほとんど無いと言える．これはクロム鉱滓の水浸出液の眼粘膜刺激性および腐蝕性が pH や六価クロムのみによるものではないことを示唆していると思われる．またクロム鉱滓の水浸出液は点眼後5分間で洗眼した場合は結膜に軽度の発赤・腫脹を起すが角膜には影響を与えず，点眼後短時間での洗眼は腐蝕性を無くし刺激性を軽減する効果があると考えられる．

鉱滓の水浸出液中の六価クロムを指標とした 1000, 500, 250ppm の濃度の各液の24時間曝露による眼粘膜に及ぼす影響を比較すると，250ppm は何ら変化が認められず，500ppm でも24時間目までに5例中2例に結膜の軽度の充血・浮腫がみられ72時間以後は全例に変化が認められず，5例中3例は終始変化を示さなかったことから 250ppm の刺激性は無く，500ppm でも極く軽度の刺

激性であると考えられる．1000ppm については実験1でも述べたが，実験2の結果もほぼ同じであり強い刺激性と軽度の腐蝕性をもっていると思われる．クロム鉱滓の水浸出液は4倍希釈ではほとんどその作用がみられなくなり，その刺激，腐蝕作用は希釈によって著明に軽減されることが明らかになった．

ま と め

クロム鉱滓の水浸出液（六価クロム 1000ppm, pH 12.8）の眼粘膜に対する一次刺激試験をウサギを用いて行った．

クロム鉱滓の水浸出液は強い刺激性と軽度の腐蝕性を有するが，この作用は六価クロムや pH のみによるものではなくその他の含有物またはそれら全ての複合的な作用によると思われる．またこの作用は曝露時間の短縮，希釈によって著明に減少する．

文 献

1) Draize, J. H. : *Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics*, 46, 1965, Association of Food and Drug Officials of the United States

2) 森川藤凰：新しい毒性試験と安全性の評価，444, 1975, ソフトサイエンス社

Table 4. Grades for Ocular Reactions

a) CORNEA	Grade
No ulceration or opacity	0
Scattered or diffuse areas of opacity, details of clearly visible	1 (1)
Easily discernible translucent areas of opacity, details of iris slightly obscured	2 (1)(2)
Nacreous areas of opacity, no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3 (1)(2)
Complete corneal opacity, iris not discernible	4 (1)(2)
Ulceration, absence of a grosspatch of corneal epithelim	4 (2)
IRIS	
Normal	0
Marketedly deepened folds, congestion, swelling, moderate circumcorneal injection (any of these or combination of any thereof), iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1 (1)
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these)	2 (1)

b) CONJUNCTIVAE	Grade
Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae excluding cornea and iris):	
Vessels normal	0
Some vessels definitely injected	0
Diffuse, crimson red, individual vessels not easily discernible	2 (1)
Diffuse beefy red	3 (1)
Chemosis :	
No swelling	0
Any swelling above normal (includes nictitating membrane)	1
Obvious swelling with partial eversion of lids	2 (1)
Swelling with lids about half closed	3 (1)
Swelling with lids more than half closed	4 (1)
Ulceration or necrosis of palpebral and bulbar conjunctivae or nictitating membrane	4 (2)

(1) Grades considered positive for irritation.

(2) Grades considered positive for corrosiveness. In addition, grade 1 opacity evident for any 6 or more days will also be considered as corrosive.

Table 5. Result of primary eye irritation test (1)

Group	Grade	Chromium dross								Chromium control						pH control					
		Observation time								Observation time						Observation time					
		Hour					Day			Hour					Day	Hour					Day
		1	4	24	48	72	7	14	21	1	4	24	48	72	7	1	4	24	48	72	1
I [1]	Cornea	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Iris	0	3	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		1	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Conjunctivae	0	4	1	0	0	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	2	5	5	5	5
	Redness	1	1	4	5	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0
		0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	3	5	5	5	5
	Chemosis	1	4	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
		2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II [2]	Cornea	0	3	3	3	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Opacity	1	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	*		/	/	3	/	2	0	/	/	/	/	0	/	0	0	/	/	0	/	0	0
	Iris	0	2	1	1	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3
		1	1	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Conjunctivae	0	1	0	0	0	0	2	3	3	3	3	2	3	3	3	2	0	1	0	3	3
		1	2	3	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	2	3	0	0
	Redness	2	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	3	3	3	3
	Chemosis	1	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
		2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Group I : 5-minute exposure (5 rabbits)
2) Group II : 24-hour exposure (3 rabbits)
* : Reaction with sodium fluorescein solution.

Table 6. Result of primary eye irritation test (2)

	Grade	250ppm						500ppm						1000ppm					
		Observation time						Observation time						Observation time					
		Hour					Day	Hour					Day	Hour					Day
		1	4	24	48	72	1	1	4	24	48	72	1	1	4	24	48	72	1
Cornea	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	3	5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	*	–	–	0	–	0	–	–	–	0	–	0	–	–	–	5	–	2	–
Iris	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	2	2	3	5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Conjunctivae	0	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	5	5	3	0	0	1	2	5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2	5	0	1	0	0
Redness	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	3	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	0	5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	0	0	0	3	5	5
Chemosis	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	5	2	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0

* Reaction with sodium fluorescein solution.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 129-136, 1976

クロム鉱滓水浸出液の皮膚一次刺激性について

阿部 幸恵*, 藤井 孝*, 坂本 義光*, 福森 信隆*, 中村 弘**
大橋 則雄**, 平賀 興吾*

Primary Skin Irritation Test by Extracts of Chromium Dross

YUKIE ABE*, TAKASHI FUJII*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*,
NOBUTAKA FUKUMORI*, HIROSHI NAKAMURA**,
NORIO OHASHI** and KOGO HIRAGA*

緒　言

都内に投棄されたクロム鉱滓の生体影響が問題になっており多方面からの調査研究がなされている．本報告はクロム鉱滓水浸出液の皮膚への影響を検討する目的でウサギを用いて行った皮膚一次刺激性試験の結果である．

実験材料及び方法

試料検体　クロム鉱滓の水浸出液：東京都江東区大島9丁目の都営地下鉄工事現場より採取したクロム鉱滓を砂粒大に粉砕し，鉱滓 100g に対し蒸留水を 100ml の割合で加え1～2時間振とうし，24時間放置，得られた上清を吸引ろ過した．この液には六価クロムが 1000ppm 含まれており pH は 12.8 であった．以上の調製は当所水質研究科においておこなった．鉱滓液の対照として次の2種を用いた．六価クロム 1000ppm 水溶液：六価クロム濃度 1000ppm に調整したクロム酸ナトリウム水溶液（pH 8.9）と重クロム酸ナトリウム水溶液（pH 4.9）とを混合し pH 7.4 の水溶液（以下クロム対照液と略す）とした．pH 12.7 の水溶液：クロム鉱滓中に多量のソーダ石灰が含まれていたためアルカリとして pH 12.7 のソーダ石灰飽和水溶液を用いた．また上記3検体に共通の溶媒として用いた蒸留水を対照とした．

実験方法　従来皮膚刺激性試験には Draize 法[1]が広汎に使用されているが今回は改良法[2,3]を参考にして実験を行った．体重 2.8～3.2kg の白色雄性ウサギの背部の毛を電気バリカンにて広さ約 10×15cm 刈り，皮膚に発赤などの異常がみられない個体を8匹選択した．剃毛の影響を考え24時間放置後テスト部位を4つに区分し右上背部をⅠとして時計の針の回転方向にⅡ，Ⅲ，Ⅳとした．

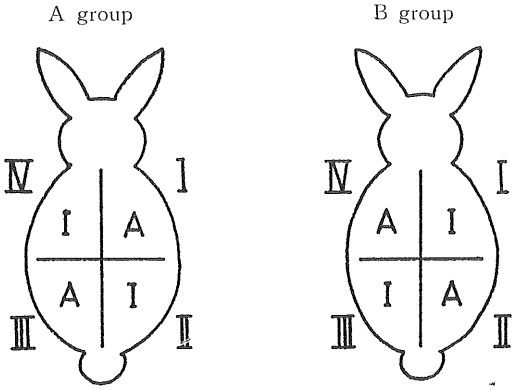


Fig. 1. Pre-treatment of cutis
A : Abraded,　I : Intact

ウサギ8匹を2群に分け Fig. 1 に示したようにA群にはⅠ，Ⅲの部位に，B群にはⅡ，Ⅳの部位に滅菌済メスを用いて真皮に障害を与えない程度に井桁状の傷を作った．以下傷をつけた部位を処置部位，傷をつけなかった部位を無処置部位とした．

ウサギを固定台に固定し 4×4cm のリント布に試料をそれぞれ 0.8ml 適用し，Table 1 に示したように皮膚に貼布した後，油紙で被い絆創膏でX型に固定し弾性包帯でゆるく巻いた．4時間経過後リント布その他を取り去り最初の観察を行い，30° 前後の微温湯でテスト部位を清拭した．以後，24, 48, 72, 96, 120, 144, および168時間目に観察を行い，Table 2 に従い紅斑，浮腫，痂皮形成などから検体の皮膚一次刺激性を検討した．

168 時間目の観察終了後にウサギをエーテル麻酔下で

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

Table 1. Application of samples

Region	A group				B group			
	Rabbit No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ⅰ	C	Cr	pH	E	C	Cr	pH	E
Ⅱ	E	C	Cr	pH	E	C	Cr	pH
Ⅲ	pH	E	C	Cr	pH	E	C	Cr
Ⅳ	Cr	pH	E	C	Cr	pH	E	C

C : Control (distilled water)
E : Extracts of chromium dross
pH : Soda lime, saturated aqueous (pH12.7)
Cr : Chromium, aqueous (1000ppm)

放血屠殺し，試験部位の皮膚を摘出，リリーの緩衝ホルマリン液にて固定，セロイジン・パラフィン包埋，4μに薄切，ヘマトキシリン・エオジン重染色し組織学的に検索した．

実験結果

結果は一括して Table 3 に示した．すり傷を与えた処置部位と無処置部位とに於ける紅斑の出現，浮腫の形成にはほとんど差がなかった．すなわち鉱滓水浸出液，pH 対照液，クロム対照液が皮膚に与えた刺激性は角質層の除去により影響されない事がわかった．そこで処置部位と無処置部位とに関係なく結果を詳述すると次のようである．

対照群では何ら変化がみられなかった．

鉱滓群では，個体間でほとんど差がなく，パッチ適用後4時間で軽度の浮腫がみられ指で軽く触れると浮腫特有の弾力感が感ぜられた．24時間後浮腫は顕著となり局所的には 1mm 以上の隆起がみられた．またパッチの大きさに一致した境界明瞭な紅斑がみられその部位は熱感を伴った．48時間後，浮腫，紅斑は強さを増し紅斑は暗調を帯びた赤色を呈した．72時間後，浮腫は軽度となり紅斑は部分的に鉄さび様の褐色を呈した．96時間後，浮腫は消失し紅斑は淡褐色を呈し皮膚は緊張し，部分的にカサカサしたうろこ状を呈した．以後貼布部全体がうろこ状となりこれが剥離した部位には新しい皮膚がみられた．

pH 対照群では24時間後に軽度の紅斑がみられその後紅斑はすみやかに消失した．浮腫の形成はみられなかった．

クロム対照群では個体間で差があり，反応が弱く現れた個体では24時間後に軽度の紅斑がみられ，その後紅斑は強さを増すことなく72～96時間後に消失した．浮腫の形成はみられなかった．反応が強く現れた個体では，4時間後に軽度の浮腫がみられ24時間後には紅斑がみられた．その後浮腫，紅斑は強さを増し，浮腫は 96 時間後に，紅斑は 144 時間後に消失した．紅斑は鉱滓群でみられた反応と同程度の強さであったが，浮腫の形成は鉱滓群に比較し軽度であった．120～144時間後に皮膚はうろこ状を呈しこれが剥離した部位では新しい皮膚がみられた．

組織学的検索結果

対照群では変化がみられなかった．鉱滓群では表皮の肥厚がみられ，通常で表皮にみられる細かい起伏が消失し表面は平坦になり，基底部では真皮の乳頭が不明瞭になり表皮は帯状を呈していた．また胚芽層では細胞の肥大，核の膨化が顕著であり明瞭な核小体を複数個有する核が多数存在した．表皮の肥厚が顕著にみられた部位では毛包外根鞘の上皮の増生も併見された．肥厚した表皮に近接した真皮乳頭層では結合組織線維の密度が疎になり多数の線維芽細胞がみられた．表皮の上方に変性し

Table 2. Evaluation of skin reactions

(1) Erythema and eschar formation
- No erythema ····· 0
- Very slight erythema (barely perceptible) ····· 1
- Well defined erythema ····· 2
- Moderate to severe erythema ····· 3
- Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) ····· 4

(2) Edema formation
- No edema ····· 0
- Very slight edema (barely perceptible) ····· 1
- Slight edema (edges of area well defined by definite raising) ····· 2
- Moderate edema (raised approximately 1 mm) ····· 3
- Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure) ····· 4

Table 3. Result of primary skin irritation test

Rabbit No.	Samples	Region	Erythema and Eschar formation								Edema formation								hours
			4	24	48	72	96	120	144	168	4	24	48	72	96	120	144	168	
1	Cont.	Ⅰ(A)*	0[1)]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅱ(Ⅰ)**	0	2	3	3	1	1	0	0	2	3	3	1	0	0	0	0	
	pH cont.	Ⅲ(A)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅳ(Ⅰ)	0	2	3	3	1	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	
2	Cont.	Ⅱ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅲ(A)	0	2	2	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	
	pH cont.	Ⅳ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅰ(A)	0	2	3	2	1	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
3	Cont.	Ⅲ(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅳ(Ⅰ)	0	2	3	2	1	0	0	0	1	3	3	1	1	0	0	0	
	pH cont.	Ⅰ(A)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅱ(Ⅰ)	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
4	Cont.	Ⅳ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅰ(A)	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	pH cont.	Ⅱ(Ⅰ)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅲ(A)	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
5	Cont.	Ⅰ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅱ(A)	0	1	2	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
	pH cont.	Ⅲ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅳ(A)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	3	2	1	0	0	0	0	
6	Cont.	Ⅱ(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅲ(Ⅰ)	0	2	2	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
	pH cont.	Ⅳ(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅰ(Ⅰ)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	Cont.	Ⅲ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅳ(A)	0	2	2	2	2	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
	pH cont.	Ⅰ(Ⅰ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅱ(A)	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	Cont.	Ⅳ(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Chromium	Ⅰ(Ⅰ)	0	2	2	2	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	pH cont.	Ⅱ(A)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cr cont.	Ⅲ(Ⅰ)	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

(A)* : Abraded, (Ⅰ)** : Intact, 1) : Scores in Draize scoring system
Cont. : control (distilled water), Chromium : extracts of chromium dross
pH cont. : soda lime, saturated aqueous (pH 12.7), Cr cont. : chromium, aqueous (1000ppm)

た核を多数含むエオジン濃染物質の塊がみられこの中には浅部の毛包も含まれていた．pH 対照群では変化がみられなかった．クロム対照群では表皮の肥厚はみられず，真皮乳頭層に少数の線維芽細胞がみられた．表皮の上方には前記のエオジン濃染物質がわずかにみられた．

考　察

組織学的検索で表皮の上方に変性した核を多数含むエオジン濃染の角化物質がみられ，表皮の肥厚が認められた．これは検体適用により引き起こされた変化であり，皮膚の角化亢進に続き表皮の剥離が起こりその後表皮が再生された事を示していると考えられる．皮膚一次刺激性試験で，鉱滓群では全個体に紅斑及び浮腫の形成がみられ反応は時間の経過と共に消失し，剥離した表皮はすみやかに再生された．クロム対照群では反応の出現に個体間で差がみられ，反応が強く現れた個体では鉱滓群と同程度の反応を示していたが，反応が弱く現れた個体では軽度の紅斑がみられたのみで浮腫の形成はみられず，全体的に紅斑，浮腫の形成は鉱滓群に比較し軽度であった．また pH 対照群では反応がほとんどみられなかった．この種の実験ではウサギの個体差，観察者の主観が結果に反映されやすいとされているが[4)]，今回の実験に於ても個体差によるであろうと思われる判定のバラツキ

は明らかに認められ，この傾向は特にクロム対照群で明らかであった．有効性や中毒性が強い化学物質の場合は個体差がそれほど問題にならないが[5]，作用が弱い化学物質の場合には，個体差によるバラツキが顕著に現われてくるものと思われる．以上より鉱滓水浸出液には中等度の刺激性が，クロム対照液には軽度の刺激性があり，pH 対照液には刺激性がないと考えられる．すなわち鉱滓水浸出液の皮膚刺激性は pH によるものではなく主にクロムによるものであり，鉱滓中のクロム以外の成分も刺激性に影響を与えていると考えられる．

今回の実験はウサギを用いての実験であるが，人と動物に於ける被刺激性には相関があり，人に対する刺激物は動物に対しても刺激性をもつという事が知られており[6]，ウサギに対して中等度の刺激性を示したクロム鉱滓水浸出液は，人に対しても何らかの刺激性を示すであろうと思われる．

まとめ

クロム鉱滓水浸出液の皮膚刺激性を検討する目的で，ウサギを用いて皮膚一次刺激性試験を実施した．

クロム鉱滓の水浸出液（六価クロム濃度 1000ppm）には中等度の皮膚刺激性があり，その作用は主にクロムによるものであるが鉱滓中のクロム以外の成分も刺激性に影響を与えていると考えられる．

文献

1) Draize, J. H. : *Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics*, 46, 1965, Association of Food and Drug Officials of the United States

2) 森川藤凰：新しい毒性試験と安全性の評価，444, 1975, ソフトサイエンス社

3) 田村豊幸：薬理学実験法，512, 1972, 共同医書出版社

4) Carrol S. Weil and Robert A. Scala : *Toxicol. and Pharmacol.*, 19, 276, 1971

5) 森川藤凰，斎藤昌二，中嶋啓介ら：実験動物，21(2)，58, 1972

6) 森川藤凰：日皮会誌，82,(9)，794, 1972

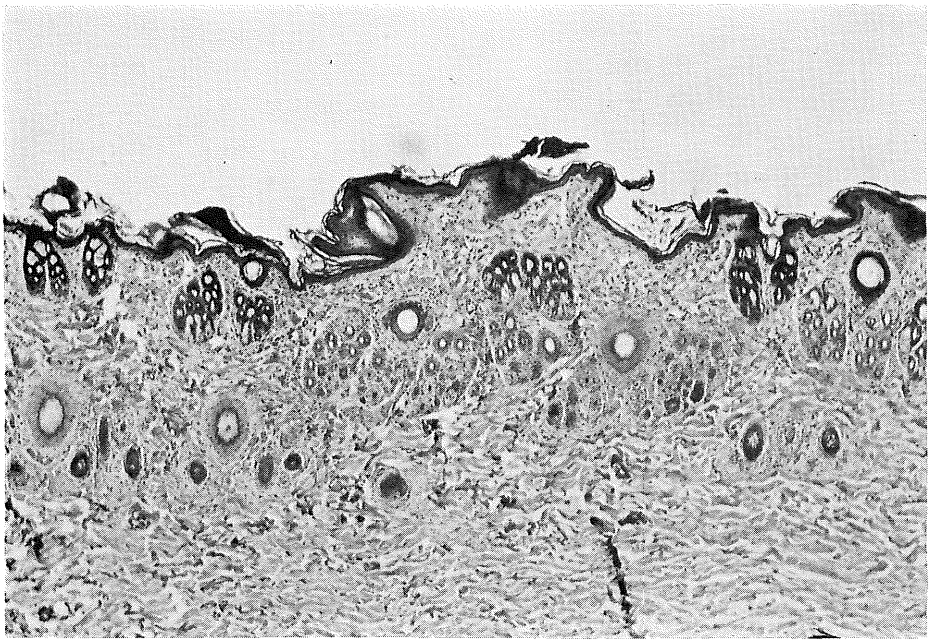


Fig. 2. Cutis of rabbit treated with distilled water. H. E. stain. Original magnification ×40.

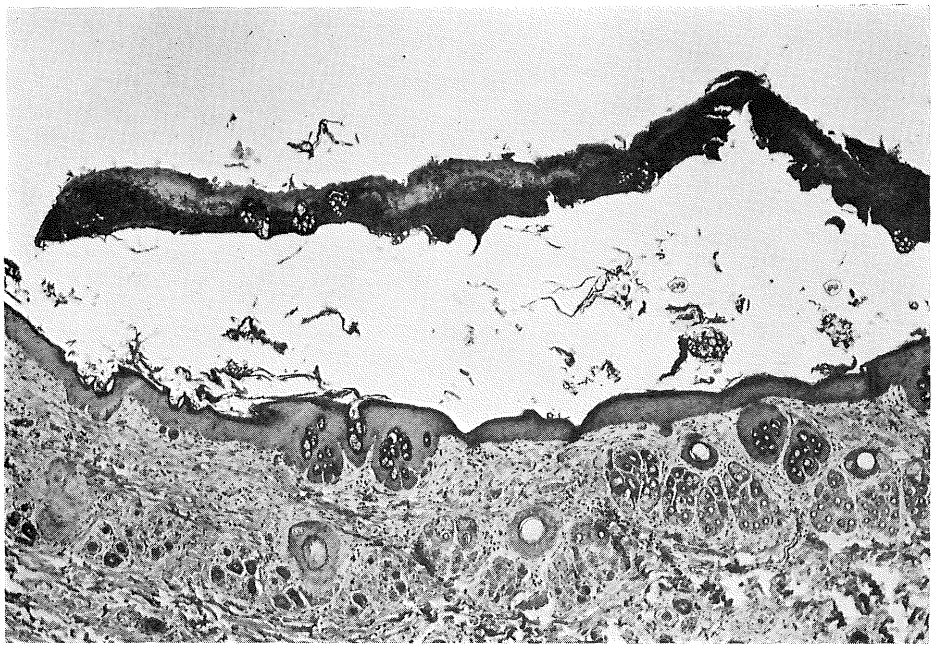


Fig. 3. Epidermolysis in rabbit treated with extracts of chromium dross. H. E. stain. Original magnification ×40.

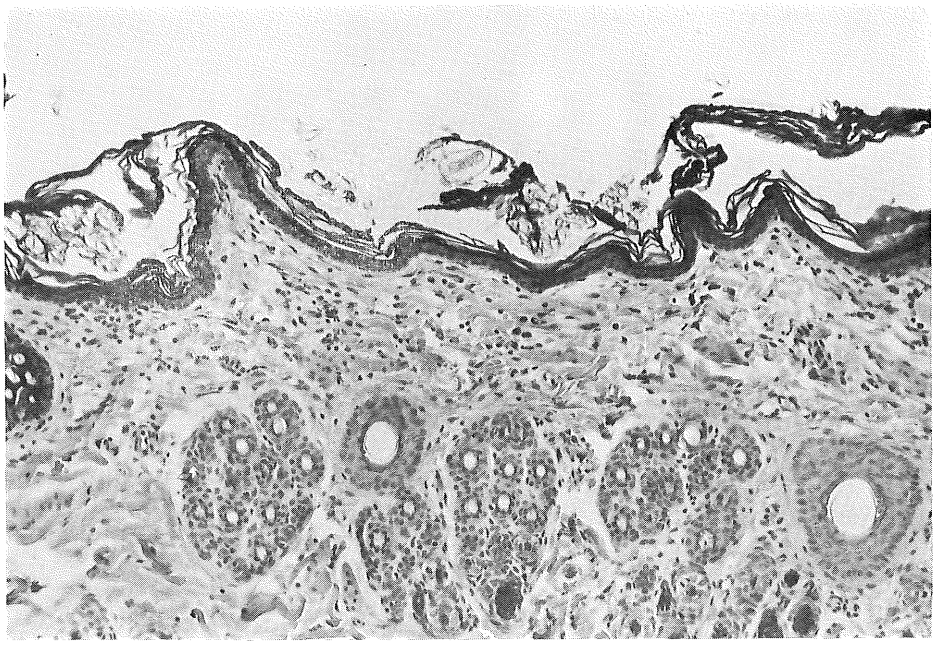


Fig. 4. Cutis of rabbit treated with distilled water. H. E. stain. Original magnification ×100.

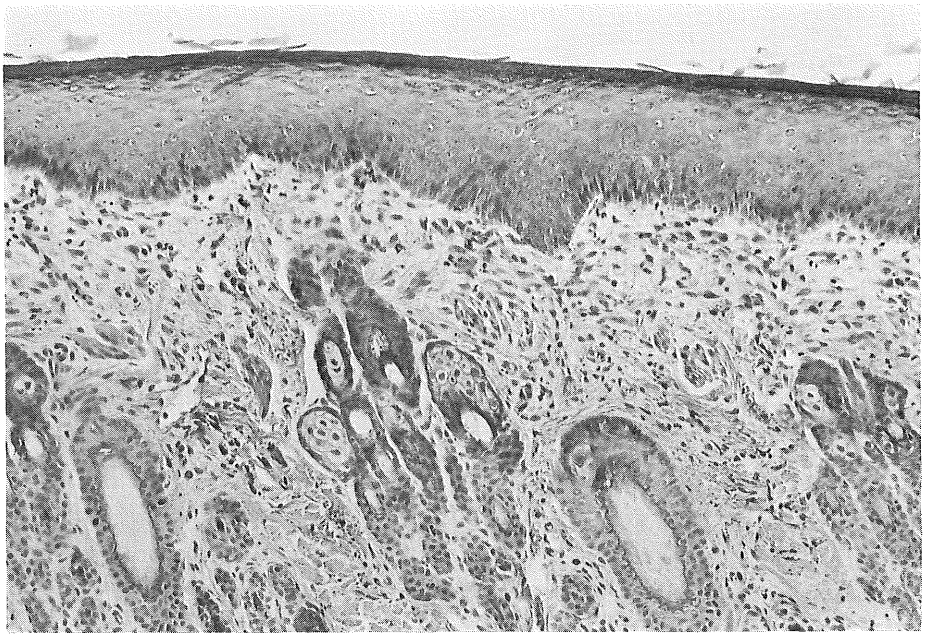


Fig. 5. Thickening and flattening in epidermis of rabbit treated with extracts of chromium dross. H. E. stain. Original magnification ×100.

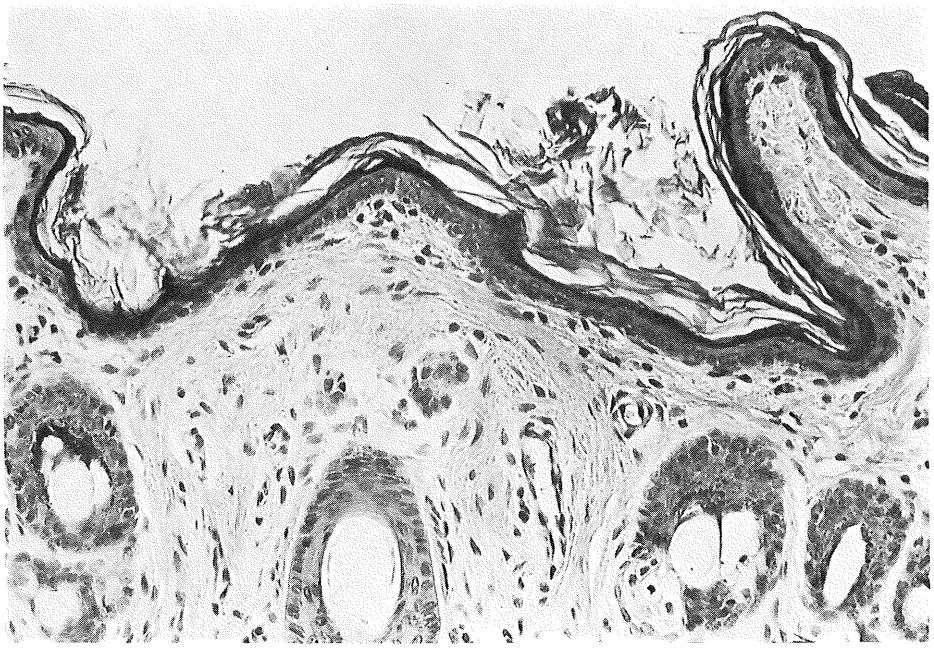


Fig. 6. Cutis of rabbit treated with distilled water. H. E. staiu. Original magnification ×200.

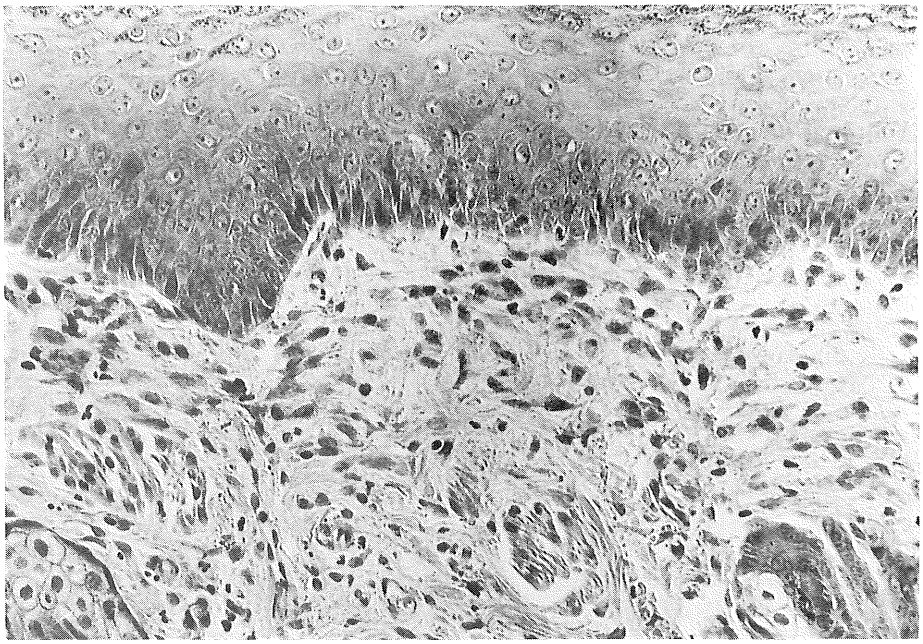


Fig. 7. Hypertrophy in epidermal cells and proliferation of fibroblasts in papillary layer of rabbit's cutis treated with extracts of chromium dross. H. E. stain. Original magnification ×200.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 137-139, 1976

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与ラットの赤血球浸透圧抵抗

長井 二三子*, 鈴木 英子*, 中尾 順子*

Effect of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Osmotic Fragility of Rat Erythrocytes

FUMIKO NAGAI*, HIDEKO SUZUKI* and TOSHIKO NAKAO*

赤血球の浸透圧抵抗を測定する方法としては，一定稀釈濃度の食塩水に血液を加え，溶出してくるヘモグロビンのパーセントを読む Sanford 法[1]，Parpart 法[2]などが広く用いられてきた．この方法は赤血球に対する低浸透圧溶液による変化を総体的に表現しているにすぎず，微細な変化や溶血過程を分析把握するには不充分である．

最近 Coil Planet 型遠心器（以下 CPC と略す）[3,4]を使用し，連続的な浸透圧濃度勾配をもつ食塩水の中で赤血球を高浸透圧側から低浸透圧側に移動させ，生じた溶血のパターンから浸透圧抵抗を測定する方法が開発された．CPC については市川ら[5]が昨年の本年報に報告した．この方法は微量の検体（一本のコイルに 8μl の血液）で精度よく浸透圧抵抗値を測定できるだけでなく，連続的な浸透圧勾配に対する血球の動態を間断なく計算し，抵抗曲線を記録できるので溶血過程の微細な変動を観察するのに適している．

著者らは，CPC 法が毒性研究に応用できるのではないかと考え，まず BHT 投与ラット赤血球に変化があるかを調べた．

食品の酸化防止剤として広く使われているジブチルヒドロキシトルエン（BHT）がラットに出血傾向を生ぜしめることは既に報告[6-9]されているが，著者らは 1.5% BHT 添加飼料で飼育し，出血傾向を示している SD・JCL 系雄ラットの血液の浸透圧抵抗を CPC 法で測定し，対照に比べ，顕著な抵抗増強を認めた．また浸透圧抵抗が増強した赤血球膜および血清のコレステロールを測定し，コレステロール含量が対照に比べ増加していることもみいだした．赤血球溶血抵抗の増強例として報告する．

実験方法

実験用血液の調製

SD・JCL 系雄ラット 4 週令を購入し，一週間一般飼料で予備飼育後，1.5% BHT 含有飼料で約一カ月飼育し，無麻酔下で頸静脈から ACD 液を入れた注射筒を用いて，ACD 液 1 に対して血液 4 の割合になるように採血し，4°に保存した．動物飼育についての詳細は鈴木[10]が述べたとおりである．ACD 液は水 100ml 中に 1.33g のグルコース，0.43g のクエン酸，1.32g のクエン酸ナトリウムを含む．

連続浸透圧濃度勾配

市川ら[5]が報告した方法にもとづき，CPC コイルに NaCl 150mOsM から 30mOsM の連続濃度勾配液を作成した．

血液注入および遠心法

使用に際し，4°に保存した血液をベックマンミクロフュージ 152 で 10,000 rpm，45秒遠心し，血漿を除去後，コイルの高張側（150mOsM）から血球を落差を利用して 2cm 注入した．その際，勾配液と血液との間に 1～3 mm 程度の空気泡を入れ勾配液と血液が混ざらないようにした．コイル 2 cm の長さはほぼ 4μl の容量に相当する．注入したコイルは両端を封じ，37°, 10分間加温したあと，CPC を用いて 37°，10分間遠心した．遠心法は市川ら[5]の報告に準じた．

溶血抵抗値の測定

先に述べた方法で得た溶血パターンは，ジョイスレーブル社クロモスキャン 200 デンシトメーターにより，フィルター，5-049 を使用して記録し，得た曲線より最小抵抗値（溶血開始値），最大抵抗値（溶血終了値），溶血幅，溶血中間値を示すと同時に，溶血パターンの変動，溶血波形の変化についても観察した．

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　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

赤血球膜の調製

ラット赤血球を 0.9% NaCl で3回洗い，Dodgeら[11]の方法に準じ赤血球膜を調製した．ヘマトクリット値50%になるように 0.9% NaCl に浮遊させた赤血球に20倍容の 0.98mM ベロナール塩酸緩衝液を加え，時々撹拌しながら5分間放置し，Sovall SS-34 のローターで，13,000 rpm，30分間遠心し，上清を駒込ピペットなどで注意深く取り除いた．次に同じ緩衝液をもとと同じ量加えてよく撹拌し，5分間放置したのち再び遠心した．この洗浄操作を3回くり返して赤血球膜を得た．遠心したときに遠心管の底部に生じる赤い魂はそのつどすてた．この操作はすべて 4°で行った．

コレステロールの定量

BHT 投与群と対照群から得た赤血球膜懸濁液に17倍容のクロロホルム・メタノール（2：1）を加えて一晩冷暗所に放置し，東洋ろ紙 No.1 でろ過し，ろ液を集めた．残渣を赤血球膜懸濁液の2倍量のクロロホルム・メタノール（2：1）で洗い，洗液をろ液に合わせた．この液に5分の1量の蒸留水を加えて充分振とうしたあと遠心し，下層を集めて蒸発乾固し，クロロホルム・メタノール（2：1）に溶かした[12,13]．この抽出液のコレステロールを Zak-Henly 変法[14]により測定した．血清コレステロールについても Zak-Henly 変法で定量した．

結　果

赤血球浸透圧抵抗

150mOsM から 30mOsM のNaCl連続濃度勾配中の溶血のパターンを図1に示した．BHT 投与群ラットの溶血部位は同時に飼育した同系統ラットの溶血部位に比べ，低張側にずれている．このコイルをデンシトメーターにかけて抵抗曲線を書いた（図2）．さらにこの図から最小抵抗値，最大抵抗値，溶血幅，溶血中間値を測定し結果を表1に示した．BHT 投与群の最小抵抗値，最大抵抗値，溶血中間値は対照群に比べ低張側に有意な差をもって移動した．波形については顕著な差を見出せなかった．

赤血球膜および血清のコレステロール含量

BHT 投与群の赤血球膜コレステロールは 155μg/赤血球膜タンパクmg，対照群は 101μg/赤血球膜タンパクmg であり，BHT 投与群のコレステロール含量は無投与群よりも多くなっていた．血清コレステロールの測定結果を表2に示した．血清コレステロール含量も BHT 投与群がやや多い傾向にあった．

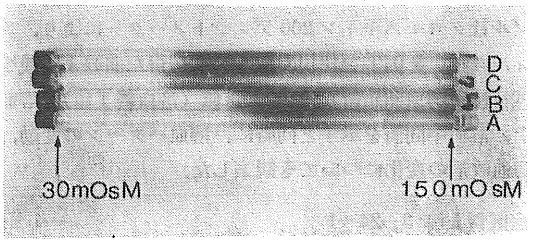


図1．CPC 法による溶血パターン
A，B：対照ラット，　C，D：BHT 投与ラット

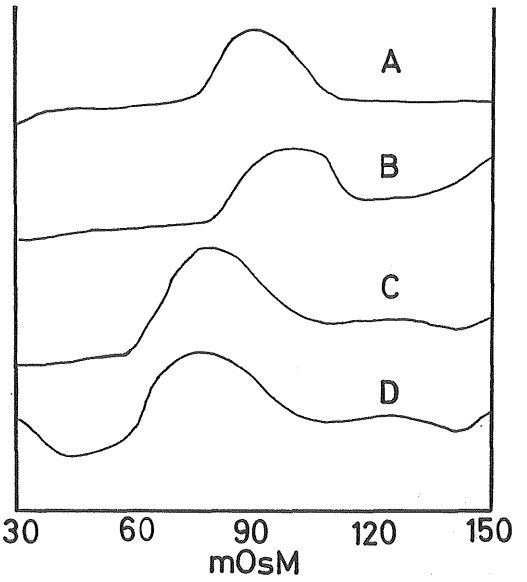


図2．CPC コイルのデンシトメトリー
A，B：対照ラット，　C，D：BHT 投与ラット

表 1．BHT投与ラットの赤血球浸透圧抵抗

	ラット数	最小抵抗値 (mOsM)	最大抵抗値 (mOsM)	溶血幅 (mOsM)	溶血中間値 (mOsM)
対照（無投与群）	4	120.3±3.2	76.8±2.4	43.5±2.9	98.8±2.4
BHT投与群	5	109.0±2.0	60.6±1.2	49.8±3.1	84.5±1.1

平均値±標準誤差　最小抵抗値とは溶血開始点，最大抵抗値とは溶血終了点，溶血幅とは最大抵抗値と最小抵抗値の浸透圧差，溶血中間値とは最大抵抗値と最小抵抗値の中間の浸透圧を示す．

表 2．BHT投与ラットの血清コレステロール含量

	ラット数	コレステロール(μg)／血清タンパク(mg)
対照(無投与群)	4	8.27±1.97
BHT 投与群	15	11.16±0.84

平均値±標準誤差

討　論

CPC 法は，溶血性貧血や肝疾患々者の赤血球浸透圧抵抗の変化などを従来の方法に比べてより明瞭に観察できることなど，臨床診断面においては有効性を示すデータが蓄積されつつあるが[15-17]，著者らは毒性研究への応用を試みた．

1.5% BHT 含有飼料で飼育した SD 系雄ラットは陰嚢内，腹腔内などに出血をきたし死にいたるものがあらわれることを見出し，BHT 含有飼料が血液凝固系因子になんらかの変化を与えたのであろうと報告[6-9,18-20]している．

また 1.5% BHT 含有飼料投与ラットにおいて血清中のグルコース，コレステロール，アルカリフォスファターゼ活性が増加し，投与初期におけるトランスアミナーゼ活性の増加もあげられていた[7,8]．BHT による肝障害を示唆している．

今回の実験から BHT 投与群の赤血球浸透圧抵抗は最小抵抗値，最大抵抗値ともに低浸透圧側に移動していることを見出した．また赤血球膜および血清の総コレステロールも増加していることを確認した．

赤血球膜の主要な脂質であるリン脂質やコレステロールは膜の流動性の調節に関与し，37°ではコレステロールは細胞膜を堅くするといわれている[21]．

肝疾患々者において赤血球膜コレステロールが増加すること，また膜コレステロールの増加により浸透圧溶血抵抗が増加することが知られており，赤血球浸透圧抵抗は肝実質細胞の障害や胆道閉塞の程度を反映しているといわれている[22,23]．

BHTがコレステロールの生合成を促進するという報告[24]もあるが，本実験での BHT 投与による浸透圧溶血抵抗の増強，コレステロール含量増加の原因はまだ明らかではない．

しかし BHTが 1.5%と相当に高濃度であること，血清中のアルカリフォスファターゼ活性，トランスアミナーゼ活性が上昇していること[8]を合わせると何らかの肝障害が生じているのではないかと考えられる．今後は血清中の胆汁酸塩の定量，肝細胞の障害などを検討しなければならないであろう．また赤血球膜の脂質分析も行い，赤血球浸透圧抵抗増強との関係をくわしく調べる予定である．

赤血球のイオントランスポートを ^{86}Rb を用いて調べた．この結果は BHT 投与群と対照群に差をみいだせなかった．

文　献

1) 三輪史朗：臨床検査技術全書，3，1972，医学書院
2) Parpart, A.K., D.B. Lorenz, E.R. Parpart, T.R. Gregg, and A.M. Chase : *J. Clin. Invest.*, 26, 636, 1974
3) Ito, Y., M.A. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, and E. Kimura : *Nature*, 212, 985, 1966
4) Harada R., Y. Ito, and E. Kimura : *The Jap. Jour. Phys.*, 19, 306, 1969
5) 市川久次ら：東京衛研年報，26-2，203，1975
6) 福森信隆ら：東京衛研年報，25，557，1974
7) 坂本義光ら：東京衛研年報，25，577，1974
8) 中川好男ら：東京衛研年報，25，599，1974
9) 藤井　孝ら：東京衛研年報，25，527，1974
10) 鈴木英子ら：東京衛研年報，27-2，82，1976
11) Dodge, J.T., C. Mitchell, and D.J. Hanahan : *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963
12) Folch, J., I. Ascoli, M. Lees, J.A. Mealth, and F.N. LeBaron : *J. Biol. Chem.*, 191, 833, 1951
13) Kawai, K., M. Nakao, T. Nakao, and M. Fujita : *J. Biochem.*, 73, 979, 1973
14) 柴田　進，北村元仕：日常臨床生化学定量法，137，1963，中山書店
15) 北島和彦：医学と生物学，87，265，1973
16) 北島和彦：医学と生物学，87，119，1973
17) Horiguchi, S., K. Treramoto, H. Nakano, K. Shinagawa, G. Endo, and I. Kiyota : *Osaka City Med. Journal*, 20, 51, 1974
18) 平賀興吾ら：東京衛研年報，25，631，1974
19) 米山允子ら：東京衛研年報，24，449，1972
20) 鈴木英子ら：東京衛研年報，26-2，49，1975
21) 野沢義則：生化学，47，52，1975
22) Cooper, R.A. : *J. Clin. Invest.*, 48, 1820, 1969
23) Mubride, J.R., and H.S. Jacob : *Brit. J. Heamat.*, 18, 383, 1970
24) Frawley, J.P., F.E. Kohn, J.H. Kay, and J.C. Callandra : *Fed. Cosmet. Toxicol.*, 3, 377, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 140-144, 1976

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 （3） DEHP のラット肝および睾丸成分におよぼす影響

大石 真之*, 平賀 興吾*

Toxicological and Endocrinological Investigations of Short-Term Effects of Administering Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (3) Effect of DEHP on Biochemical Composition of Liver and Testis of Male Rats

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

フタル酸エステル類は，プラスチック製品の可塑剤として大量に用いられているが，その毒性については「実用上ほとんど無害[1]」とされており，安全性の高い化学物質として評価されている[2]．しかし，1940年代に既にHodge ら[3]が，フタル酸エステル類は毒性を有する物質であることを報告している．その後近年に至るまで，より詳細な毒性学的検討を加えた報告は散見されるにとどまっている．

1970年前後よりフタル酸エステル類の環境汚染[4,5]や食品汚染[6]の進行が憂慮され始めるとともに，その毒性についても再検討する必要があると提案されている[7,8]．

わが国においてもフタル酸エステル類の生産は非常に多く，可塑剤総生量の90%近くを占めている[9]．なかでもジ-2-エチルヘキシルフタレート（DEHP）が最も多く，全フタル酸エステル生産量の約60%となっている[10]．

DEHP の毒性については，催奇形性[11]，優性致死法による突然変異原性[12]，副腎および性腺を中心とした内分泌器官への影響[13]等を含めて，いくつかの報告がみられる．それらの結果より，DEHP は，肝の肥大[14,15]および高濃度投与時の睾丸萎縮[15]が報告されている．今回これらの点について臓器の生化学的組成の面から検討を行った．

実験材料および実験方法

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内で1匹ずつ予備飼育し，環境馴化を行った．実験開始時の平均体重は約146g（5週令）であった．

試薬 実験に用いた DEHP は，東京化成特級試薬（Lot. No. AK02）であった．その他の試薬はすべて，和光純薬特級試薬を用いた．

投与方法および投与期間 DEHP を0%（対照群），1%（DEHP 1%群），2%（DEHP 2%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．

検査方法 実験開始10日後に，ラットを断頭により屠殺，解剖し，肝，睾丸を摘出，秤量後，一部を用いて水分含量を測定し，他は測定時まで −80° に凍結保存した．

水分含量の測定は，110° で恒温になるまで乾燥し，重量法で行った．グリコーゲン量の測定は臓器をポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし，5%冷トリクロル酢酸（TCA）を加え，3000 rpm で10分間遠心し，その上清についてアンスロホン法で行った[16,17]．脂質の定量は，クロロホルム—メタノール(2：1, v/v)で2回抽出後精製水で逆抽出を行い，重量法により測定した[18]．タンパク量の測定は，グリコーゲン抽出後の TCA 沈澱を用いて Lowry 法[19]により行った．核酸は Schmidt-Thannhauser-Schneider 法[20]により分画を行い，デオキシリボ核酸（DNA）は Burton 法[21]により，リボ核酸（RNA）はオルシノール法[22]により測定した．

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．

* 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. Body weights, absolute and relative organ weights of male rats fed the diet containing 1% or 2% of DEHP for 10 days

	Control	Dietary Level 1% DEHP	2% DEHP
Liver (g)	11.0±0.495	20.1±0.592**	19.2±0.811**
(g/100g B. W.)	4.67±0.178	8.37±0.101**	8.90±0.198**
Testes (g)	2.35±0.078	2.32±0.051	1.25±0.109**
(g/100g B. W.)	1.00±0.027	0.97±0.014	0.58±0.039**
Seminal Vesicles (g)	0.21±0.015	0.16±0.014*	0.14±0.011**
(g/100g B. W.)	0.09±0.006	0.07±0.006	0.06±0.004**
Ventral Prostates (g)	0.13±0.014	0.13±0.007	0.10±0.008
(g/100g B. W.)	0.06±0.005	0.05±0.002	0.04±0.003
Initial B. W. (g)	145.7±5.62	147.4±3.78	143.9±3.84
Final B. W. (g)	230.2±7.04	230.7±5.66	203.3±7.60*

Value given are the mean±SE for 9–10 rats.
* Values are significantly different from control value at $p<0.05$.
**Values are significantly different from control value at $p<0.001$.

Table 2. Effect of DEHP on liver composition of male rats

	Control	Dietary Level 1% DEHP	2% DEHP
Water (%)	69.98±0.310	69.72±0.447	70.01±0.349
Glycogen	41.07±4.00	37.02±3.42	28.80±1.70*
Lipid	49.67±3.46	46.98±2.66	50.94±1.68
Protein	209±10.9	217±14.1	203±6.47
DNA	1.27±0.03	1.10±0.07*	1.00±0.02**
RNA	4.35±0.15	3.74±0.81	3.71±0.84**

Values are expressed as mg/g wet weight of tissue except water.
Values given are the mean±SE for 8–10 rats.
* Values are significantly different from control at $p<0.05$.
**Values are significantly different from control at $p<0.001$.

Table 3. Effect of DEHP on liver composition of male rats

	Control	Dietary Level 1% DEHP	Ratio	2% DEHP	Ratio
Glycogen (mg/liver)	347±52	566±51*	1.63	423±44	1.22
Lipid (mg/liver)	544±41	951±65**	1.75	972±44**	1.79
Protein (g/liver)	2.27±0.12	4.37±0.30**	1.93	3.85±0.17**	1.70
DNA (mg/liver)	13.6±0.67	23.0±1.53**	1.69	19.1±0.67**	1.40
RNA (mg/liver)	47.4±1.65	69.6±7.46*	1.47	71.2±3.35**	1.50

Ratios are expressed as treatment group/control group.
Values given are the mean±SE for 8–10 Rats.
*Values are significantly different from control at $p<0.01$.
**Values are significantly different from control at $p<0.001$.

Table 4. Effect of DEHP on testicular composition of male rats

	Dietary Level		
	Control	1% DEHP	2% DEHP
Water (%)	83.81±0.369	83.95±0.202	81.52±1.302
Lipid	24.15±0.729	28.60±4.064	31.90±1.369*
Protein	142.7±3.33	139.1±3.92	149.5±2.85
DNA	3.73±0.105	3.85±0.097	4.07±0.151
RNA	6.02±0.433	6.31±0.257	6.72±0.294

Values are expressed as mg/g wet weight of tissue except water content.
Values given are the mean±SE for 8–10 rats.
*Valueis significantly different from control at $p<0.001$.

Table 5. Effect of DEHP on testicular composition of male rats

	Dietary Level				
	Control	1% DEHP	Ratio	2% DEHP	Ratio
Lipid (mg/testes)	56.4±1.80	65.9±9.24	1.17	40.5±4.51*	0.72
Protein (mg/testes)	328±9.39	324±12.0	0.99	187±18.4**	0.53
DNA (mg/testes)	8.52±0.26	8.96±0.33	1.05	5.13±0.57**	0.60
RNA (mg/testes)	13.89±0.59	14.65±0.60	1.05	8.47±0.89**	0.61

Ratios are expressed as treatment group/control group.
Values given are mean±SE for 8–10 rats.
* Value is significantly different from control at $p<0.01$.
**Values are significantly different from control at $p<0.001$.

実 験 結 果

臓器重量 肝臓および性腺系臓器の重量を Table 1 に示した．肝臓重量は絶対重量，相対重量ともに有意に増加が認められた．性腺系では，睾丸重量の減少と精嚢，前立腺重量の減少傾向が観察された．

飼料摂取量より計算した DEHP の摂取量は，DEHP 1%群で 0.9—1 g/kg/day，DEHP 2%群では 1.5—1.8 g/kg/day であった．

肝臓成分 単位湿重量当りの成分含量では，DEHP 投与によりグリコーゲン，DNA，RNA ともに有意な減少が認められたが，水分含量，脂質量，タンパク量はいずれも対照群と有意な差はみられなかった(Table 2)．

肝臓当りの成分含量では，タンパク量，脂質量，DNA 量，RNA 量ともに有意な増加が観察されたが，グリコーゲン量については，ごくわずかの増加にとどまった (Table 3)．また，DEHP 2% 群の対照群に対する肝重量，および各成分の増加率をみると，肝重量は1.74，タンパク量，脂質量は 1.7—1.8，DNA 量，RNA 量は 1.4—1.5 であり，肝重量，タンパク量，脂質量は DNA 量，RNA 量に比し増加率がより大きかった．

睾丸成分 単位睾丸湿重量当りの成分含量では，脂質量が有意に増加した以外，水分含量，タンパク量，DNA 量，RNA 量とも有意な変化はみられなかった (Table 4)．

睾丸両側当りの含量では，DEHP 2% 投与群で，タンパク量，脂質量，DNA量，RNA量とも対照群に比べ有意な減少が認められたが，DEHP 1% 群ではいずれも対照群と有意な差はみられなかった．対照群に対する DEHP 2% 群の睾丸重量および各成分の増加率は，重量比が 0.57，DNA 量，RNA 量が 0.6 前後，タンパク量，0.53，脂質量 0.72 であった (Table 5)．

考 察

今回の肝臓および睾丸の生化学的成分の分析結果によれば，肝の肥大 (Enlargement) にともない，肝臓当りのタンパク量，脂質量，DNA量，RNA量は増加しているものの，単位湿重量当りでは，グリコーゲン量，DNA 量，RNA 量ともに減少が認められ，タンパク量，脂質量については減少が認められていない．山田ら[23]によれば，ジオクチルフタレート (DOP) 5 ml/kg/day を 3 週間経口投与した際に，単位重量当りのグリコーゲン量

の著明な減少と，タンパク量，脂質量には変化のみられないことを報告しており今回の実験結果と一致している．

Lottsfeldtら[24]は，ラット肝臓中のDNA量は細胞数とよく相関することを報告しており，今回の実験でDNA量の増加率よりもタンパク量の増加率がより大きいことは，肝臓の肥大（Enlargement）の原因としては，細胞数の増大（Hyperplasia）よりもむしろ細胞の肥大（Hypertrophy）によるものが，より多く寄与しているものと考えられる．すなわち，DEHP 2%群でみるとDNA量，RNA量の増加率が1.4—1.5であるのに対し，タンパク量は1.70であり肝重量の増加率1.74とほぼ一致しており細胞肥大を示唆しているものと考えられる．なおこの肥大は，回復実験[23]や血清生化学的検索結果[15]より，機能性肥大（Functional hypertrophy）の可能性が考えられる．

太田ら[25]はDEHPを2.5%添加した飼料をマウスに1カ月摂取させた場合，肝小葉の配列の不規則状，細胞の萎縮，類洞の拡張，一部細胞の溷濁性，肝小葉細胞の空胞変性，わずかな脂肪滴および単細胞の核濃縮を認めたことを報告している．DEHP投与マウスの核濃縮がどのような原因により生じるものか不明であるが，タンパク量の増加率と核酸類の増加率に差のあることが何らかの影響を与えている可能性が考えられる．さらに組織学的にわずかの脂肪変性が認められているが今回の分析では単位湿重量当りの脂質量に変化は認められなかった．また組織学的には細胞萎縮が報告されているが，生化学的分析結果からはむしろ細胞肥大と考えられる．この差がマウスとラットの種差によるものか否か不明である．

睾丸成分については，DEHP 2%群で，単位湿重量では脂質量の変化が認められる以外に顕著な変化は認められなかった．

睾丸両側当りでみると，タンパク量，脂質量，DNA量，RNA量ともに0.6前後と，睾丸重量の増加率0.57と一致しており，睾丸萎縮は，細胞の大きさの減少（Atrophy）によるよりもむしろ細胞数の減少（Hypoplasia）によるものと考えられる．タンパク量の減少率が0.53とDNA量の減少率に比べやや低いことは，細胞数の減少とともに細胞の萎縮もわずかに生じていることを示唆している．

太田ら[25]によれば，DEHP投与マウスでは睾丸の精上皮の変性，精母細胞の減少脱落と精子形成がまったく認められないことを報告している．さらに，大石ら[15]は睾丸組織中テストステロンに変化がみられないことを報告しており，睾丸萎縮は主に精細管萎縮であり，ライディヒ細胞の萎縮はあまり大きくないものと考えられる．

肝においては脂質量の増加は認められなかったが，睾丸においては有意な増加が認められた．岩松ら[26]は，ジブチルフタレート（DBP）はヒト胎児肺由来培養細胞系で細胞のトリグリセリド合成を促進することを報告しているが，睾丸中の脂質量の増加がトリグリセリドの増加によるものか否かは今後検討を要する．

要　旨

DEHP 1%および2%を添加した飼料を10日間ラットに摂取させ，肝および睾丸の生化学的成分の変化を検討した．臓器重量では肝重量の増加，睾丸重量の減少が認められ，単位湿重量当りでは，肝でグリコーゲン量，DNA量，RNA量の減少，睾丸では脂質の増加が認められた．肝の肥大および睾丸の萎縮は，生化学的成分の分析からは，肝細胞の肥大および睾丸の細胞数の減少によるものと考えられた．

文　献

1) Glason, M. N., R. E. Gosselin, H. C. Hodge, and R. P. Smith : *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 3rd Ed., 4, 1969, The William and Willkins Co., Baltimore

2) Smith, C. C. : Arch. *Ind. Occupa. Med.*, 7, 310, 1953

3) Hodge, H. C., M. R. Goldstein, and M. Wrightington : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49, 471, 1942

4) Jaeger, R. J. and J. R. Rubin : *Science*, 170, 460, 1970

5) Mayer, F. L., D. L. Stalling, and J. L. Johnson: "Phthalate Esters : An Environmental Contaminant", Report, 1971, Fish-Pesticide Research Laboratory, Bureau of Sport Fishers and Wildlife, U. S. Dept. Interior, Columbia

6) 森田昌敏，中村　弘，三村秀一：東京衛研年報，24, 357, 1972

7) Marx, J. L. : *Biol. Imp. Uncer. Sci.*, 1, 178, 1972

8) 片瀬隆雄：科学，42, 349, 1972

9) 工業調査会：1970年プラスチック年鑑，603，工業調査会，東京

10) ポリマー工業研究所：塩ビとポリマー，No. 1, 1973

11) Singh, A. R., W. H. Rawrence, and J. Autian : *J. Pharm. Sci.*, 61, 51, 1972

12) Singh, A. R., W. H. Rawrence, and J. Autian : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29, 35, 1974
13) 大石真之，平賀興吾：第49回日本薬理学会総会，1976, 3. 29-31, 大阪
14) 山田直樹：日衛誌，29, 178, 1974
15) 大石真之，平賀興吾：東京衛研年報，26-2, 131, 1975
16) Hodge, A. W. and B. J. Wilson : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 481, 1970
17) Carrol, N. V., R. E. Longley, and J. H. Roe : *J. Biol. Chem.* 220, 583, 1956
18) Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley : *J. Biol. Chem.* 226, 497, 1957
19) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
20) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, 164, 747, 1946
21) Burton, K. : *Biochem. J.*, 62, 315, 1956
22) Mejbaum, W. : *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117, 1939
23) 山田明男，谷田　繁，上田重雄：第34回日本薬理学会近畿部会，1968, 11. 30, 大阪
24) Lottsfeldt, F. I. and R. F. Labbe : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119, 226, 1965
25) 太田秀夫，恩田祐行，児玉博和，山田直樹：日衛誌，29, 519, 1974
26) 岩松良枝，鈴木康夫，松本　亮：第48回日本生化学会，1975, 10. 15, 福岡

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 145-152, 1976

化粧品用色素の短期毒性試験(1) 赤色219号およびだいだい色201号の雌性ラットにおよぼす影響

福田 向江*, 高橋 省*, 大石 真之*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Short-term Toxicity of Cosmetic Dyes (1) Effect of Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein on Body and Organ Weights, and Clinical Values of Female Rats

HISAE FUKUDA*, OSAMU TAKAHASHI*, SHINSHI OISHI*
TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

今日，香粧品は日常広く使用されており，それにつれてその種類は多岐にわたり，原料組成は複雑化してきている．香粧品のうちで化粧品は需要，生産とも年々増加しているが，日常使われている化粧品の中でも，口紅は経口的に体内にとりこまれる可能性が非常に高いと考えられる．しかしながら，口紅に使用されている色素は食用色素ほどには毒性が報告されていない．

そこで今回，口紅に比較的多量に用いられている外用医薬品および化粧品用赤色219号(Brilliant Lake Red R)と外用医薬品および化粧品用だいだい色201号 (Dibromofluorescein)について，短期毒性試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4週令の JCL-Wistar 系雌性ラットを環境馴化のため1週間予備飼育した後，以下の実験に用いた．実験開始時の体重は 135±6g (5週令) であった．動物は一般動物飼育室 (室温 22—25°, 湿度 50—60%, 照明8時間) 内でラット用代謝ケージ (岡崎産業製) に1匹ずつ入れて飼育した．

2. 投与色素 Brilliant Lake Red R は東京化成工業K. K. 製 (Lot. AE01) を，また Dibromofluorescein も東京化成工業K. K. 製 (Lot. AD01) を使用した．

3. 投与方法および投与期間

Brilliant Lake Red R, 或いは Dibromofluorescein を0% (対照群), 1%, および2%を飼育用紛末飼料(クレア CE-2) に添加し，21日間自由摂取させた．水も自由摂取させた．以下，Brilliant Lake Red R 1%添加飼料摂取群を R-1, 同じく2%添加飼料摂取群を R-2, Dibromofluorescein 1% 添加飼料摂取群を O-1, 同じく2%添加飼料摂取群を O-2 と略す．

4. 検査方法

a. 体重，飼料摂取量，糞量，飲水量，尿量，尿pHを毎日測定し，症状観察を行った．

b. 実験開始21日後に，ラットを断頭，採血し，解剖して肉眼的観察を行い，脳，心臓，肺，胸腺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，卵巣，子宮の各臓器については重量測定を行った．

c. 血清生化学的検査 総タンパク量 (以下 TP と略す—Biuret 法), グルコース量 (Glu—Glucose-Oxidase 法), 尿素窒素量 (UN—Urease-Indophenol 法), アルカリホスファターゼ活性 (Al-P—Kind-King 変法), コリンエステラーゼ活性 (ChE—ΔpH 法), ロイシンアミノペプチダーゼ活性 (LAP—竹中・高橋法) の測定は，自動分析装置 (HITACHI M-400 Automatic Analyzer) で行った．カリウム量 (K), ナトリウム量 (Na) の測定は炎光光度計 (Beckman KLINA) で行った．グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT—UV 法), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (GPT—UV 法) の測定は第一化学薬品 K. K. 製「UV セット第一」を用いて行った．

d. 血液学的検査 白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘマトクリット(Hct), 平均赤血球容積 (MCV) の測定は Coulter Counter Model-S (Coulter Electric INC) で行った．

e. 検査結果はすべて Student's t-test により推計学的検討を行った．

* 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

結果および考察

実験に用いた色素および Erythrosine の化学構造を Fig. 1 に示す.

体重の変化を Fig. 2 に示す. R-1, R-2 とも対照群に比較して体重には有意な差はなかった. O-1, O-2 の体量については, 投与1日めから有意な差がみられ, 21日間の投与期間中, 対照群より有意に低かった. また, O-1, O-2 とも投与4日まで体重は減少したが, その後徐々に回復した.

飼料摂取量の変化を Fig. 3 に示す. 投与7日めの R-1, 10日めの R-1 および R-2 においていずれも対照群に比較して摂取量が少なく, 17日めの R-1 では逆に多かった. O-1 では投与11日まで, また O-2 では10日までそれぞれ対照群に比較して摂取量は少なかった. それ以後は O-2 で投与19日めに少なかった以外, 対照群との間に有意な差はみられなかった. O-1, O-2 は, 2

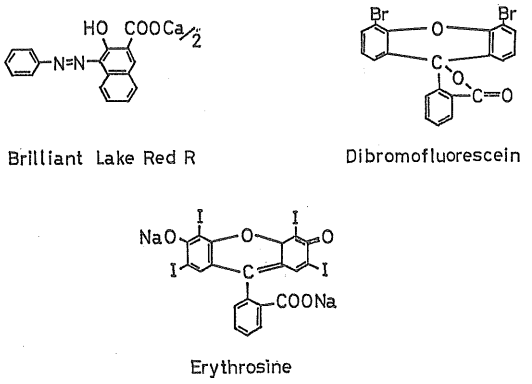


Fig. 1. Chemical structures of dyes

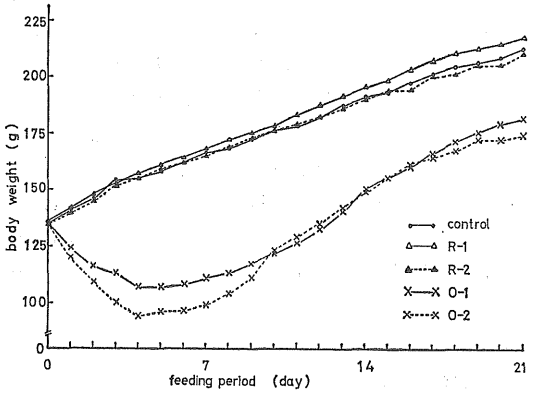


Fig. 2. Changes in body weight of female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 7–10 rats.

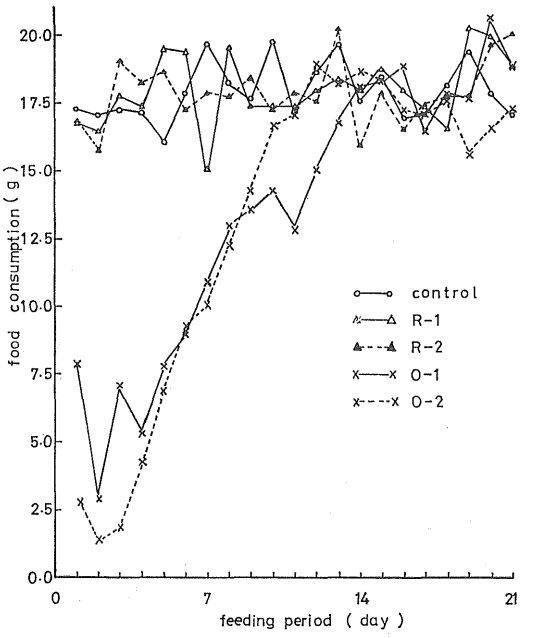


Fig. 3. Food consumption in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 7–10 rats.

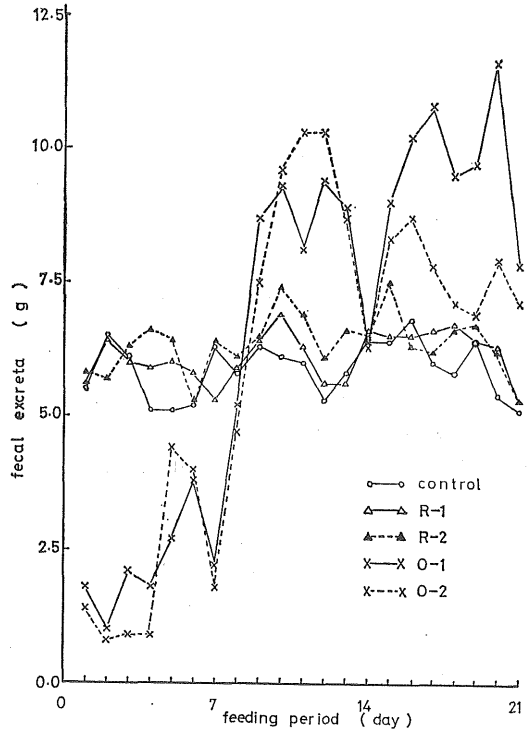


Fig. 4. Fecal excreta in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 4–10 rats.

日めの摂取量が最少であり，3日めからふえ始めたが，体量が5日から増加し始めたのは飼料摂取量の増加によるものと考えられる．

糞量の変化を Fig. 4 に示す．R-1 の糞量は全期間，対照群に比較して有意な差はみられなかった．R-2 では投与4，14および15日めに対照群より糞量が多かったが，それ以外に有意な差はみられなかった．O-1 では投与7日めまで対照群より少なかったが，10，12，13，15および17日以降で対照群より多かった．O-2 では投与4日めまでおよび7日めが対照群より少なかったが，10日めから13日めの間は対照群より多かった．糞量の変化は飼料摂取量の変化とよく一致している．ただし，O-1，O-2 の糞は3日めくらいから軟便状で排泄されているが，測定は湿重量として行っているので乾燥重量にして対照群との間に差があるか否かについては不明である．なお，この糞―軟便―は，いわゆる下痢状ではなく，形態のはっきりとした固体に粘液が混ざったような様子をしており，表面は粘液のために光沢があり，排泄に際しては2つあるいは3つくらい連なっているものが多くみられた．

飲水量の変化を Fig. 5 に示す．R-1 および R-2 は対照群に比較して飲水量には有意な差はなかった．O-1 では投与6日め以降，対照群に比べて飲水量の増加がみられた．O-2 では3日めまで低下し，3日めの飲水量は対照群に比べて有意に少なかったが，その後増加し，5，6日と8日以降の飲水量が対照群に比べて多量であった．

尿量の変化を Fig. 6 に示す．R-1，R-2 の尿量は対照群に比べて有意な差はなかった．O-1，O-2 とも1日め

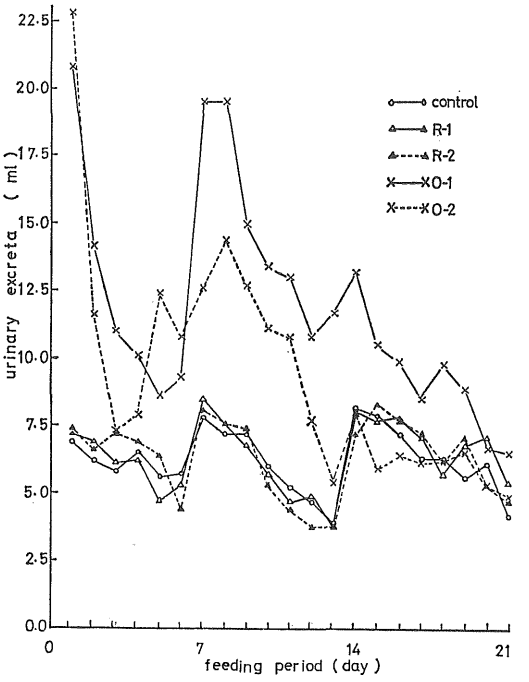


Fig. 6. Urinary excreta in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 4–10 rats.

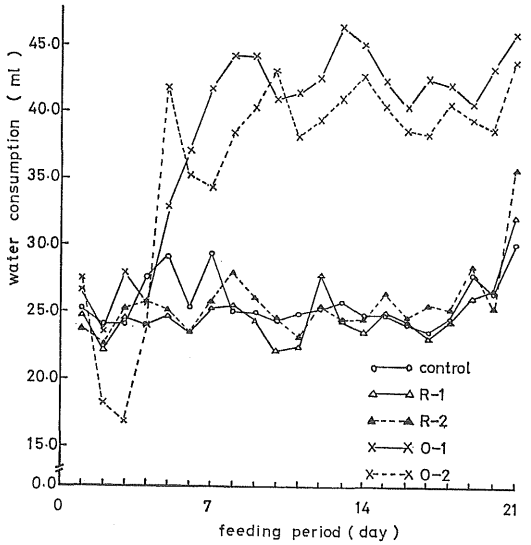


Fig. 5. Water consumption in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 7–10 rats.

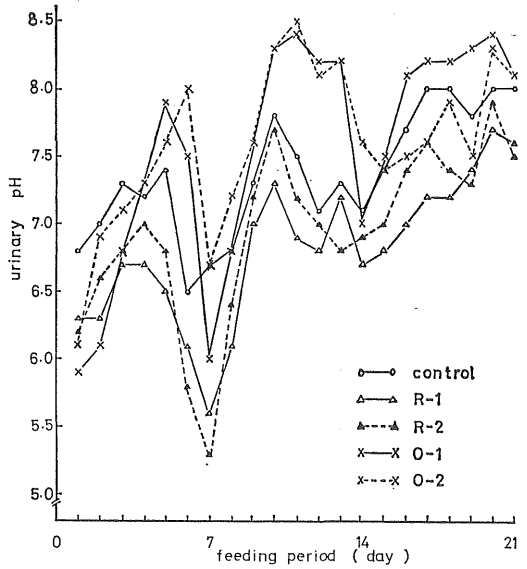


Fig. 7. Urinary pH in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein. Values indicate the mean for 4–10 rats.

Table 1. Absolute and relative organ weights in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein

		Control	R-1	R-2	O-1	O-2
Absolute Organ Weights	Brain (g)	1.90±0.080	1.90±0.096	1.88±0.184	1.76±0.055***	1.77±0.101**(7)
	Heart (g)	0.76±0.069	0.80±0.069	0.77±0.073	0.62±0.053***	0.62±0.076**(7)
	Thymus (g)	0.60±0.084	0.63±0.107	0.57±0.067(9)	0.49±0.094*	0.44±0.080***(7)
	Lungs (g)	1.11±0.074	1.13±0.113	1.06±0.067	0.99±0.139	1.04±0.144(7)
	Liver (g)	9.94±0.902(8)	10.1±0.989	10.2±0.868	8.27±0.827***	7.75±0.825***(7)
	Kidneys (g)	1.85±0.119	1.90±0.135	1.89±0.102	2.01±0.115**	2.06±0.158**(6)
	Spleen (g)	0.52±0.074	0.57±0.057	0.56±0.073	0.55±0.057	0.53±0.085(7)
	Adrenals (mg)	66.4±17.58	69.3±15.20	71.1±23.54	53.1±9.515*	50.7±19.30*(7)
	Ovaries (mg)	99.7±11.41	102±18.19	105±27.07	73.2±12.95***	71.3±7.740***(7)
	Uterus (g)	0.54±0.146(9)	0.57±0.197	0.53±0.148	0.46±0.117	0.39±0.197(7)
	Caecum (g)	0.71±0.098(4)	0.71±0.092(4)	0.71±0.055(4)	1.10±0.131**(4)	1.16±0.243*(2)
Relative Organ Weights	Brain (g/100g B.W.)	0.90±0.064	0.88±0.067	0.90±0.077	0.98±0.096*	1.02±0.087**
	Heart (g/100g B.W.)	0.36±0.064	0.37±0.031	0.37±0.035	0.35±0.017	0.36±0.036
	Thymus (g/100g B.W.)	0.29±0.037	0.29±0.045	0.27±0.032	0.27±0.042	0.26±0.052
	Lungs (g/100g B.W.)	0.53±0.040	0.52±0.027	0.51±0.032	0.55±0.076	0.60±0.094
	Liver (g/100g B.W.)	4.66±0.211	4.67±0.237	4.84±0.252	4.57±0.212	4.46±0.298
	Kidneys (g/100g B.W.)	0.88±0.062	0.88±0.042	0.90±0.041	1.11±0.069***	1.20±0.125***
	Spleen (g/100g B.W.)	0.25±0.026	0.26±0.024	0.27±0.031	0.31±0.017***	0.31±0.037**
	Adrenals (mg/100g B.W.)	31.3±7.87	32.0±6.59	34.0±11.34	29.3±3.66	29.2±10.66
	Ovaries (mg/100g B.W.)	47.1±4.27	46.9±6.27	50.4±12.46	40.4±5.67**	41.2±5.36*
	Uterus (g/100g B.W.)	0.25±0.057	0.26±0.087	0.25±0.073	0.26±0.076	0.23±0.111
	Caecum (g/100g B.W.)	0.35±0.044	0.35±0.050	0.34±0.027	0.62±0.039***	0.66±0.109**

Values indicate the mean±SD for 10 rats except where noted numbers in parentheses.
Numbers in parentheses indicate number of rats.
The marks mean significantly different from control.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$

がもっとも多量であった．O-1では14日めまで，O-2では12日めまで対照群より多量であったが，その後，有意な差はみられなくなり対照群と同程度まで減量した．飲水量と尿量の変化は必ずしも一致しておらず，飲水量の多いにもかかわらず尿量が増加していないことからみてDibromofluoresceinは体内での水分代謝に何らかの影響を与えることが考えられる．

尿 pH の変化を Fig. 7 に示す．R-1, R-2 とも尿 pH は対照群より常に低い傾向を示した．R-1 では5日および7日めに，また R-2 では7日めにそれぞれ尿 pH は対照群より有意に低かった．O-1 では1日めに対照群より有意に低く，6日めおよび11日めから13日めの間と19日めは逆に有意に高かった．O-2 では，6, 12 および13日めに有意に高かった．

実験期間中の一般的な症状観察では，前肢前腕に出血したものが対照群に1例，R-1 に3例，R-2 に4例，O-1 に8例，O-2 に7例あり，鼻に出血したものが，R-1, R-2 に各4例，O-1 に8例，O-2 に7例あり，耳に出血したものが R-2 に1例，O-1 に3例，O-2 に1例あった．O-2 では頭部に軽度の脱毛が1例みられた．また，O-2 では投与5日めまでに死亡が2例あった．O-1, O-2 とも投与2～3時間後には尿が色素で着色しており，かつ1日後には糞も着色し始めていることから腸管からの吸収・排泄速度は速いと思われる．

臓器重量の値を Table 1 に示す．R-1 および R-2 は絶対重量および体重相対重量ともに対照群との間に有意な差はみられなかった．絶対重量では，対照群に比べて，O-1, O-2 ともに腎臓および盲腸に重量増加がみられ，脳，心臓，胸腺，肝臓，副腎，卵巣に，加えて O-1 のみ肺にも重量の減少がみられた．体重相対重量では対照群に比べて O-1, O-2 ともに脳，腎臓，脾臓，盲腸の重量増加が，また卵巣に重量減少がみられた．脳は絶対重量が対照群より低かったが，体重相対重量では対照群より有意に高くなった．心臓，胸腺，肺，肝臓，副腎は絶対重量が対照群より有意に低かったが，体重相対重量では対照群との間に有意差がなくなった．これは，体重が増加抑制をうけたと同程度に心臓，胸腺，肺，肝臓，副腎の各臓器も増加抑制をうけたことが考えられる．卵巣は絶対重量，相対重量とも対照群より有意に低いが，これは卵巣の発育が体重が抑制をうけたより以上に抑制されていたか，あるいは萎縮をおこしたことが考えられる．

解剖時の観察については，各投与ラットとも，皮下・臓器などが色素に染っていた．R-1 に1例，R-2 に2例の卵巣水腫（いずれも左側）がみられた．O-2 では腸間膜リンパ節のうっ血が1例みられた．O-1, O-2とも盲腸が拡張しているのが見られた．食品添加物用着色料として使われている食用赤色3号 (Erythrosine) は Dibromofluorescein と化学構造が類似している (Fig. 1) が，これを飼料に1%添加して食べさせたラットに盲腸の拡張のみられた[1]ことが Hansen らによって報告されており，今回の Dibromofluorescein 投与と同様な結果が得られている．対照群と O-2 のラットの解剖例を Fig. 8 に示す．盲腸が大きくなっており，かつ位置が変化していることがみうけられる．O-2 では肝臓の辺縁が鈍であった (Fig. 8)．

血清生化学的検査の結果を Table 2 に示す．R-1 では対照群に比べて全ての項目について有意な差はみられなかった．R-2 では Al-P 活性が対照群より有意に上昇していた．O-1 では UN が有意に上昇していた．O-1, O-2 とも TP, Kが対照群より有意に上昇しており，ChE 活性が有意に低下していた．O-2 では LAP 活性が有意に低下していた．ChE 活性と LAP 活性の低下および GOT, GPT 活性に上昇傾向のみられることから肝臓障害が疑われる．また，肝臓障害以外にこれらの色素が ChE 活性および LAP 活性に直接的な阻害をおこす可能性も考えられる．血清K値の上昇，UN の上昇傾向，尿量増加および腎臓の重量増加から，Dibromofluorescein は腎臓に障害をおこすことが示唆される．

血液学的検査の結果を Table 3. に示す．RBC, Hct ともに O-1, O-2 で減少しており，貧血のあることが考えられる．Bowie らは，食用赤色3号投与ラットに赤血球数，ヘモグロビン量に減少を生じた[2]ことを報告している．一方，Hansen らは食用赤色3号を飼料に 0, 0.5, 1.0, 2.0 および 4.0%の濃度で添加してラットに投与した2年間の長期試験において，0, 3, 6, 12 および18カ月の検索で，ヘモグロビン量，赤血球数に影響のみられなかった[3]ことを報告している．Hansen らの検索は投与3カ月以後の結果であり，今回の実験は1カ月未満であるので，投与1カ月から3カ月の間に赤血球数等について薬物に対するなれによる回復のあったことが推測されるが，化学構造が類似はしているものの同一色素による実験ではないので，その影響については断定はできないであろう．

Brilliant Lake Red R のラットに対する毒性は今回の実験ではさほど強くないと思われるが，投与濃度は人間が摂取する濃度よりかなり高く，より低い濃度での検討と共に，より詳細な多方面の毒性試験が必要かと思われる．Dibromofluorescein を投与したラットでは特に腎臓重量が増加し，卵巣重量の減少したことが目立ったが，

Table 2. Biochemical values of serum in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein

		Control	R-1	R-2	O-1	O-2
TP	g/d*l*	6.4±0.45	6.6±0.92	6.4±0.52	5.8±0.35**	5.8±0.34**[1)]
Glu	mg/d*l*	126±15.4	143±22.1	143±20.7	126±10.6	121±11.9[1)]
UN	mg/d*l*	24±3.0	24±3.6	24±2.7	29±5.9*	29±8.1[1)]
Cho	mg/d*l*	83±9.8	79±9.6	85±9.8	89±10.2	81±6.8[1)]
GOT	K-U	117±21	116±20	113±23	122±18	150±64[2)]
GPT	K-U	26±6.4	28±4.9	28±1.9	28±5.9	30±6.4[2)]
A1-P	KA-U	37±7.9	43±11.7	45±8.2*	36±7.3	39±5.8[1)]
ChE	△pH	0.51±0.095	0.50±0.137	0.48±0.109	0.34±0.127**	0.30±0.071***[2)]
LAP	U	22±2.9	23±8.3	25±4.5	20±2.9	17±2.9**[2)]
Na	meq/*l*	142±4.7	141±2.7	143±5.6	143±3.6	140±3.9[2)]
K	meq/*l*	6.6±0.35	6.5±0.42	6.9±0.61	7.1±0.58*	7.2±0.41*[2)]

Values indicate the mean±SD for 10 rats except where noted.
1) Values indicate the mean±SD for 7 rats.
2) Values indicate the mean±SD for 6 rats.
The marks mean significantly different from control.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$

Table 3. Hematological values in female rats fed Brilliant Lake Red R or Dibromofluorescein

	Control	R-1	R-2	O-1	O-2
WBC ($\times 10^3$)	6.02±3.24[1)]	5.49±1.95	5.89±2.69	4.39±1.31[1)]	4.40±1.38[2)]
RBC ($\times 10^6$)	6.75±0.15[1)]	6.98±0.32	6.86±0.23	6.12±0.30***	6.17±0.30***[2)]
HCT (%)	38.8±1.04[1)]	39.3±1.661	39.3±0.61	35.0±2.07***	35.1±2.16***[2)]
MCV (μ^3)	58.6±1.01[1)]	57.4±0.97*	58.2±1.55	58.1±1.27	57.9±1.35[2)]

Values indicate the mean±SD for 10 rats except where noted.
1) Values indicate the mean±SD for 9 rats.
2) Values indicate the mean±SD for 7 rats.
The marks mean significantly different from control.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$

Dibromofluorescein の場合も Brilliant Lake Red R と同様に投与濃度は高かったので，より低い濃度でのより詳細な検討が必要かと思われる．

要　旨

外用医薬品および化粧品用色素として使用されている Brilliant Lake Red R，或いは Dibromofluorescein を飼料に 0，1.0，2.0% 添加して雌性ラットに食べさせ，短期毒性試験を行った．今回の実験では，Brilliant Lake Led R を投与したラットには顕著な影響は認められず，Dibromofluorescein を投与したラットでは腎臓重量増加と卵巣重量減少等がみられた．

（本研究の概要は日本薬理学会第54回関東部会1976年6月で発表した．）

文　献

1) Hansen, W. H., R. E. Zwickey, J. B. Brouwer, and O. G. Fitzhugh : *Fd Cosmet. Toxicol.*, **11**, 527, 1973
2) Bowie, W. C., W. C. Wallace, and H. V. Lindstrom : *Fedn Proc.*, **25**, 556, 1966
3) Hansen, W. H., K. J. Davis, S. L. Graham, C. H. Perry, and K. H. Jacobson : *Fd Cosmet. Toxicol.*, **11**, 535, 1973

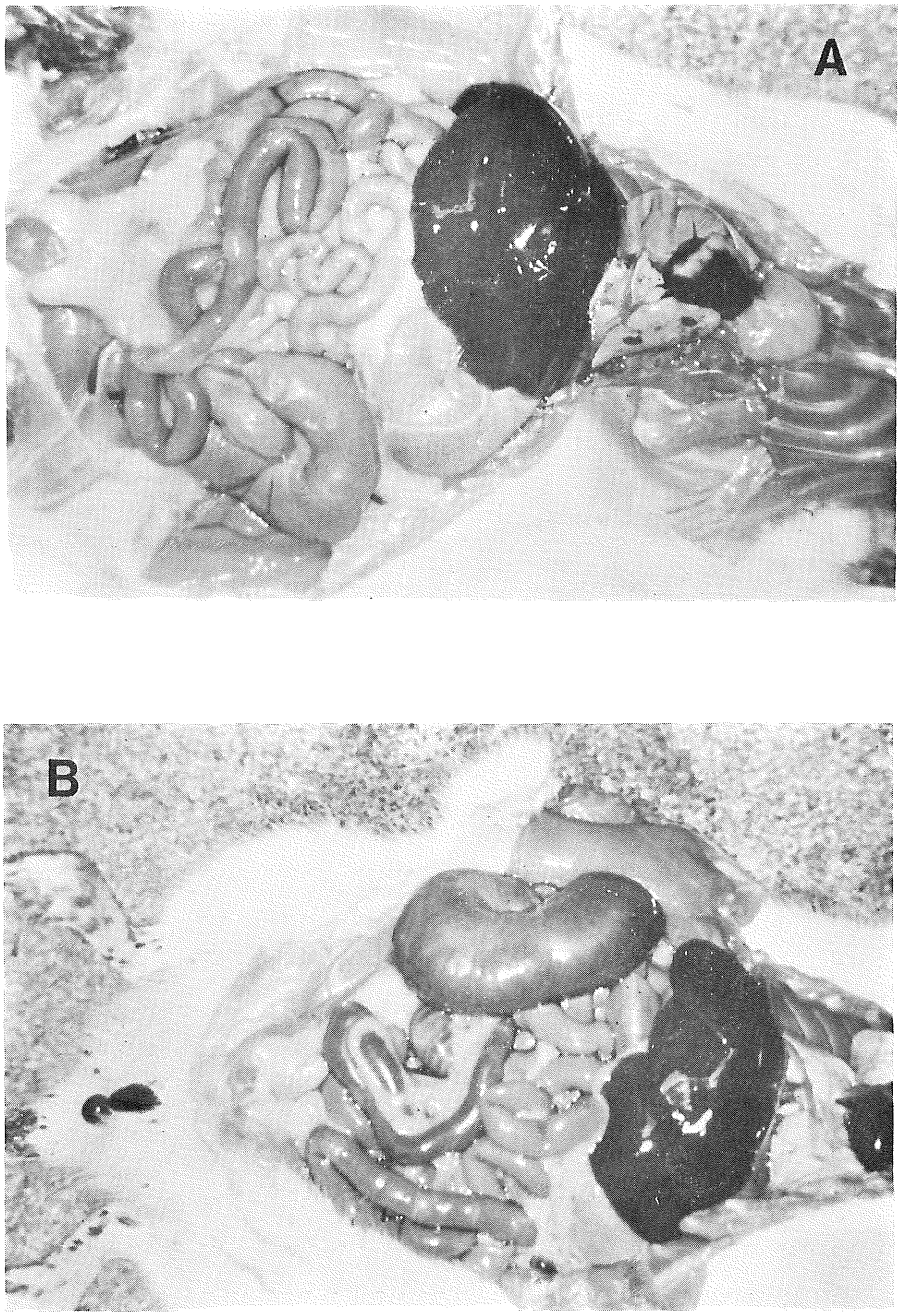


Fig. 8. Caeca and livers of female rats receiving food contained with 2% of Dibromofluorescein. A : control, B : treatment group

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 153-158, 1976

色素の微生物系における変異原性について

藤田 博*, 水尾昭江*, 平賀興吾*

Mutagenicity of Dyes in the Microbiol System

HIROSHI FUJITA*, AKIE MIZUO* and KOGO HIRAGA*

食品添加物，化粧品，医薬品等に使われる色素[1,2]は十分に安全性が確認されなければならない．これまでにアクリジンオレンジ[3]，フロキシン[4]，バターイエロー[5]などの多くの色素が変異原性を有することが明らかにされて来た．そこで本報告では62色素の変異原性を，枯草菌を用いた rec assay および大腸菌，サルモネラ菌を用いた mutation test により検索することを試みた．同時に，色素に光増感作用[6] (Photodynamic action) が存在することを考慮して光照射下での培養もあわせ行なったので報告する．

実験材料および実験方法

試薬 肉エキス（極東薬品製），ポリペプトン（大五栄養製），寒天 (Difco 製)，ジメチルスルホオキシド（以下DMSO と略す，和光純薬製），G-6-P, G-6-PD, NADPH（以上オリエンタル酵母製），フェノバルビタール（吉田製薬製）．

試料 以下の62色素について変異原性の検討をした．

Acid red, Acid violet 6B, Amaranth, Azo rubine, Brilliant blue FCF, Eosin, Erythrosin, Fast green FCF, Fast red S, Fluorescein, Guinea green B, Indigo carmine, Naphthol yellow S, New coccine, Orange I, Orange II, Phloxine, Ponceau R, Ponceau 3R, Ponceau SX, Rose bengal, Sunset yellow FCF, Tertrazine, Tetrabromo fluorescein（以下 TBF と略す），Tetrachloro tetrabromo fluorescein（以下 TTF と略す）（以上国立衛生試験所標準品），Acid fuchsin, Alizarin, Alkali blue 6B, Aniline blue, Bromothymol blue, Carmine, Crystal violet, Gentian violet B, Methyl blue, Methylene blue, Methyl red, Pyronin G, Safranin, Thionin, Thitan yellow GR, Vesuvine, Water blue（以上 Merck 製），Amido black 10B, Aurantia, Cresyl violet, Fuchsin, Junus green, Light green SF, Naphtanil diazo blue B, Naphthol green B, Orange G, Phenol phthalein, Trypan blue（以上和光純薬製），Acid fast green, Alizarin cyanine green, Azure blue V, Bordeaux red, Chromotrope 2R（以上東京化成製），Alician blue 8GS, Bismarck brown（以上 CROMA 製），Erioglaucine X, Quinoline yellow（以上関東化学製）．

培地 a) ブロス：肉エキス 5g，ポリペプトン 10g，塩化ナトリウム 5g に蒸留水を加え 1000m*l* とし，水酸化ナトリウムにて pH 7.0 とした．

b) ブロス寒天培地：ブロス 1000m*l* に寒天 15g を加えた．

c) 最少寒天培地：硫酸アンモニウム1g，リン酸二水素ナトリウム 10g，硫酸マグネシウム 0.1g，クエン酸ナトリウム 0.5g に蒸留水を加え 1000m*l* とし，水酸化カリウムにて pH 7.0 とした．これにグルコース 20g，寒天 15g を加えた．

d) 軟寒天[7]：塩化ナトリウム 5g，寒天 7g に蒸留水を加え 1000m*l* とした後，100m*l* のヒスチジン 5mM，ビオチン 5mM 溶液を加えた．

菌株 a) 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) H17A (*rec*$^+$), M45T (*rec*$^-$)[4]．

b) 大腸菌 (*Escherichia coli*) B/r WP2 (*trp*$^-$, HCR$^-$)[4,8]．

c) サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA-100 (*hisG*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$), TA98 (*hisD*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$)[9,10]．

以上の５株は，国立遺伝学研究所，変異遺伝部より分与された．

枯草菌による rec assay 組み換え修復能を欠くM45-T (*rec*$^-$) 株は，H17A (*rec*$^+$) 株に比べ DNA に障害を与える薬物によって高い致死性を示す．rec assay 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

表 1. 枯草菌 H17A, M45T による rec assay の阻止帯の長さ

色素 (2mg/ろ紙)	溶媒[1]	阻止帯 (mm) 暗 H17A	暗 M45T	明 H17A	明 M45T	色素 (2mg/ろ紙)	溶媒	阻止帯 (mm) 暗 H17A	暗 M45T	明 H17A	明 M45T
Acid fast green		0	0	0	0	Indigo carmine		0	0	0	0
Acid fuchsin		0	0	0	0	Junus green	D	9	10	16	22
Acid red		0	0	0	0	Light green SF		0	0	0	0
Acid violet 6B		0	0	0	0	Methyl blue		0	0	0	0
Alician blue 8GS	D	0	0	0	0	Methylene blue		6	6	10	17
Alizarin	D	0	2	1	4	Methyl red	D	6	10	7	11
Alizarin cyanine green		0	0	0	0	Naphtanil diazo blue B	D	6	7	6	7
Alkali blue 6B		0	0	2	2	Naphthol green B		0	0	0	0
Amaranth		0	0	0	0	Naphthol yellow S		0	0	0	0
Amido black 10B		0	0	0	0	New coccine		0	0	0	0
Aniline blue		0	0	0	0	Orange I		0	0	0	0
Aurantia	D	16	19	16	20	Orange II		0	0	0	0
Azo rubine		0	0	0	0	Orange G		0	0	0	0
Azure blue V		0	0	0	0	Phenol phthalein	D	3	3	3	3
Bismarck brown	D	1	1	1	1	Phloxine		1	2	20	23
Bordeaux red		0	0	0	0	Ponceau R		0	0	0	0
Brilliant blue FCF		0	0	0	0	Ponceau 3R		0	0	0	0
Bromothymol blue	D	3	3	3	3	Ponceau SX		0	0	0	0
Carmine	D	0	0	0	0	Pyronin G		11	13	14	17
Chromotrope 2R	D	0	0	0	0	Quinoline yellow		0	0	0	0
Cresyl violet	D	0	1	1	5	Rose bengal		10	12	23	26
Crystal violet	D	14	17	17	20	Safranin		5	7	15	18
Eosin		0	0	9	17	Sunset yellow FCF		0	0	0	0
Erioglaucine X		0	0	0	0	Tertrazine		0	0	0	0
Erythrosin		5	5	15	18	TBF[2]	D	0	0	9	13
Fast green FCF		0	0	0	0	TTF[3]	D	0	0	12	16
Fast red S	D	0	0	0	0	Thionin		1	1	4	6
Fluorescein	D	0	0	2	2	Thitan yellow GR		0	0	0	0
Fuchsin	D	11	13	11	13	Trypan blue		0	0	0	0
Gentian violet B	D	13	17	14	18	Vesuvine		0	0	0	0
Guinea green B		0	0	0	0	Water blue		0	0	0	0

1) : 無記入 (蒸留水)　D (ジメチルスルホオキシド)
2) : Tetrabromo fluorescein
3) : Tetrachloro tetrabromo fluorescein

この性質に着目しDNAに障害を与える薬物を検出する方法[4]である．本報告では，賀田によりさらに改良された新しい方法を用いた．

H17A, M45T 株のブロス培養液 (37° 18時間振とう培養) にグリセリン 12.5% (v/v) を加えた後，−80° にて凍結保存した．この保存菌液を実験時解凍し，そのまま用いた．一枚のブロス寒天培地に H17A, M45T 菌液を一本 (約 0.01 ml) ずつ「ハ」の字状にストリークした．乾燥後，両菌液の近接端に DMSO 又は蒸留水に溶かした色素溶液 0.02ml をしませた円形ろ紙 (直径 13 mm) を置いた．このプレートを冷蔵庫 (4°) 中に 24時間放置した後，明所および暗所にて一夜培養し，阻止帯の長さをろ紙辺縁より測定した．

大腸菌による mutation test　大腸菌 WP2 (*trp*⁻) 株より *trp*⁺ 株への復帰突然変異をマーカーにして変異原性を検出する[4]．

WP2 *trp*⁻ 株のブロス培養液（37° 18時間振とう培養）0.1m*l* を最少寒天培地に広げ乾燥した後，DMSO 又は蒸留水に溶かした色素溶液 0.02m*l* をしませた円形ろ紙（直径 13mm）をプレート中央に置いた．明所および暗所にて2日間培養し，生じた復帰コロニーを計数した．

サルモネラ菌による mutation test TA100 は塩基置換型（Base pair substitution）の，TA98 はフレムシフト型（Frameshift）の変異により *his*⁻株から *his*⁺株への復帰突然変異体を生じる．この両株は，Ames らにより開発された株で R 因子（pkM 101）を持ち突然変異物質に高い感受性を示す[9,10]．さらに肝ホモジェネート“S 9”[11]の併用（代謝活性化）により薬物の代謝後の変異原性を検出することができる．

TA100，TA98株のブロス培養液（37° 18時間振とう培養）0.1m*l*，DMSO 又は蒸留水に溶かした色素溶液 0.1m*l*，さらに代謝活性化する場合には 0.5m*l* の S 9-Mix[10]., しない場合には，リン酸緩衝液（0.25M pH7.4）を 0.5m*l* 加え，30分間 37° で振とう培養後，45° に保温した軟寒天 2m*l* を加え十分混合後，最少寒天培地に重層した．明所および暗所にて2日間培養し，生じた復帰コロニーを計数した．

肝ホモジェネート“S9”の調整[10] Wistar-JCL ラットの5週令雄5匹（平均体重 172g）に 0.1% のフェノバルビタール溶液を飲水として1週間与えた．断頭により屠殺し，肝臓を摘出，0.15M塩化カリウムで灌流した．肝重量1g あたり 3m*l* の 0.15M 塩化カリウムを加え細切後，ホモジェナイズした．これを 9.500r.p.m.(Sorvall SS-34 ローター)，10分間遠心し，上澄（S 9）を分離，ドライアイス-アセトンで凍結後，−80°にて保存した．

S9-Mix.[10]は，1m*l* あたり，S9 0.3m*l*，塩化マグネシウム 8μmole，塩化カリウム 33μmole，G-6-P 5μmole，G-6-PD 0.5単位，NADPH 4μmole，リン酸緩衝液（pH7.4）100μmole に調整した．

明所培養の光照射 室内灯を点灯した室内の机上に置いたプレート上約 30cm から3灯の螢光灯にて光を照射した．ただし，プレートの上蓋はしたままであった．この場合プレート面での温度は 30～34° であった．

結果および考察

枯草菌 H17A，M45T を用いた rec assay の結果を表1に示す．暗所培養の結果および明所培養の結果を比較検討すると，62の色素はおおむね4群に分類することができる．

第1群は，Eosin，Erythrosin，Junus green，Methylene blue，TBF，TTF，Thionin からなり，暗所培養では菌株間に阻止帯の差が見られず（Junus green はわずかではあるが差が見られる），明所培養においてその差が現われ，同時に，両株とも阻止帯が著しく増加した．

表 2. 大腸菌 WP2 *trp*⁻ による mutation test の復帰コロニー数

色　素	色素量[1]	暗[2]	明[3]
Alizarin	0.4	11(9)	17(20)
Aurantia	0.08	18(14)	39(29)
Cresyl violet	0.08	9(14)	44(29)
Crystal violet	0.08	13(14)	28(29)
Eosin	0.08	10(9)	25(29)
Erythrosin	0.08	9(9)	17(29)
Fuchsin	0.08	18(14)	49(29)
Gentian violet B	0.08	7(14)	44(29)
Junus green	2.0	16(11)	65(24)
Methylene blue	0.08	8(10)	15(16)
Methyl red	0.08	11(10)	18(14)
NDBB[4]	0.4	5(10)	12(14)
Phloxine	0.4	5(9)	18(20)
Pyronin G	0.08	8(10)	30(16)
Rose bengal	0.4	12(9)	13(19)
Safranin	0.08	18(11)	14(19)
TBF	0.08	7(9)	17(20)
TTF	0.4	10(9)	14(20)
Thionin	0.08	11(10)	16(16)

1)：mg/ろ紙
2)：コロニー数/プレート
3)：コントロール，コロニー数/プレート
4)：Naphtanil diazo blue B

第2群は，Alizarin，Cresyl violet，Crystal violet，Gentian violet B，Methyl red，Phloxine，Pyronin G，Rose bengal，Safranin からなり，明所培養において両株の阻止帯に増加が見られたが，その菌株間の阻止帯の差は暗所と同程度であった．

第3群は，Aurantia，Fuchsin，Naphtanil diazo blue B からなり，暗所，明所培養間の阻止帯および各々の菌株間の阻止帯の差はほぼ同程度であった．

第4群は，残る43色素からなり，暗所，明所培養とも阻止帯に差が見られなかったか阻止帯が全く見られなかった．

再現性のある 2～3 mm の差を示す物質は DNA に直接ではなく，DNA 合成に影響を与えている可能性が高い[12]と言われるが，本実験では 3 mm 以内の差を示した色素も変異原性を有する可能性を考慮して陽性とすることとした．従って，第1群から第3群までの19色素に，暗所，明所培養の一方又は両方において菌株間に阻止帯

表 3. サルモネラ菌 TA100, TA98 による mutation test の復帰コロニー数

色素	色素量 μg/プレート	TA100				TA98			
		S9+		S9−		S9+		S9−	
		暗	明	暗	明	暗	明	暗	明
Alizarin	80	220[1]	1480	150	930	131	231	150	174
		177[2]	1312	155	952	137	164	115	151
Aurantia	80 (16)	1700**	2000	(263)	(1420)	2340**	1920**	(150)	(196)
		177	1312	135	1211	137	164	95	122
Cresyl violet	80(3.2)	176	4196*	(174)	(1276)	72	222	(80)	(112)
		154	1434	135	1211	91	127	95	122
Crystal violet	16(0.64)	113	3960*	(109)	(2000)	155	1394**	(105)	860**
		131	1813	135	1211	146	184	95	122
Eosin	3.2	119	1210	111	1072	78	48	110	102
		179	1199	139	885	94	105	89	125
Erythrosin	3.2	174	1726	140	2180*	58	132	70	127
		179	1199	139	885	94	105	89	125
Fuchsin	16	161	1650	131	1190	208	229	123	165
		131	1813	150	1161	146	184	130	235
Gentian violet B	16(0.64)	123	6820*	(109)	(2278)	241	980**	(70)	722**
		131	1813	135	1211	146	184	95	122
Junus green	400	179	4120*	147	1360	170*	772**	105*	146*
		123	1175	110	1024	54	95	41	71
Methylene blue	16	143	3754	52	592	85	532*	74	256
		165	1965	140	1126	61	139	80	148
Methyl red	400	143	1152	121	1238	227*	268*	57	131
		123	1175	110	1024	54	95	41	71
Naphtanil diazo blue B	400(80)	267*	1390	(136)	(720)	78	376*	(327)**	(451)**
		123	1175	110	1024	54	95	41	71
Phloxine	3.2	132	963	142	1680	73	142	73	170
		179	1199	139	885	94	105	89	125
Pyronin G	80(3.2)	169	3158	(107)	(1012)	168*	346*	(65)	(172)
		165	1965	140	1126	61	139	80	148
Rose bengal	3.2	152	1130	145	950	83	82	79	115
		179	1199	139	885	94	105	89	125
Safranin	16	150	5200*	109	9	96	1080**	56	1070**
		160	1965	140	1126	61	139	80	148
TBF	16	158	1994	113	609	65	99	38	62
		165	1771	127	1221	58	129	50	137
TTF	16	160	2174	113	471	35	103	48	74
		165	1771	127	1221	58	129	50	137
Thionin	16	−	2364	130	1616	91	114	80	140
		165	1965	140	1126	61	139	80	148

1)：コロニー数/プレート　2)：コントロール，コロニー数/プレート
*：2倍以上の増加　**：5倍以上の増加

の差が見られたことから，これらは DNA に対して何らかの影響を与えていると考え陽性とした．

また，第1群，第2群の色素は明所培養で阻止帯が増加した．Methyl red を除いてこれらの色素は Methylene blue で代表されるアクリジンの誘導体，Rose bengal に代表されるキサンチン系色素，および Crystal violet のトリフェニールメタン系色素である．これらの色素は光増感作用を有することが報告[13-16]されている色素である．従って，この光増感作用による致死性の増強が阻止帯の増加として現われたと思われる．特に，第1群の色素では，暗所培養において見られなかった菌株間の阻止帯の差が明所培養にて現われたことから，この光増感作

用により色素がDNAに何らかの影響を与えるようになった可能性が予想される．プロテウス菌の修復系を欠く変異株（*rec*⁻）と正常株に Methylene blue を作用させた時に，光存在において前者に高い致死が見られたという報告[17]に一致するものと思われる．

Rec assay により陽性の結果を得た19色素の大腸菌による mutation test の結果を表2に示す．

Junus green, Pyronin G は明所培養において *trp*⁺ 復帰コロニーが阻止帯の外側にリング状に生じ，わずかではあるがコロニー数に増加傾向が見られた．これは，これらの色素が変異原性を有する可能性を示唆する．他の色素に増加傾向は見られなかった．

ここで用いた実験方法は簡便ではあるが，感度はあまり高くないので弱い変異原性の検出はあまり期待できない．確認のためには同菌株を用いての定量的実験が必要であろう．

サルモネラ菌 TA100, TA98 を用いての mutation test の結果は表3のとおりである．

暗所培養において *his*⁺ の復帰コロニー数の増加が見られた色素は，Aurantia, Naphtanil diazo blue B, Methyl red, Junus green, Pyronin G であった．前2者は rec assay により第3群に分類された色素であり，明所培養においても同程度の増加であることから光増感作用は認められず rec assay の結果と一致すると思われる．Methyl red の場合は第2群に分類されたが，サルモネラ菌では光増感は明確には見られず rec assay の結果との関係は明らかではない．また，Junus green, Pyronin G では暗所，明所培養を比較すると，わずかではあるが明所培養が高い．光増感作用によるかどうかは明らかではないが，rec assay, 大腸菌での結果をあわせて考えると可能性は考えられる．

Crystal violet, Gentian violet B, Safranin, Methylene blue は rec assayでは第1群又は第2群に属し，復帰コロニー数の増加が見られたのはいずれも明所培養におけるところから光増感作用が関係していることが予想される．また，前3者に共通して見られる特徴として，S9の存在に関係なく TA98 にフレムシフト型の，S9の存在により TA100 に塩基置換型の突然変異を起すこともあげられる．

Alizarin, Cresyl violet, Eosin, Erythrosin, Phloxine, Rose bengal, TBF, TTF, Thionin は復帰コロニー数の増加は認められず陰性と考えられるが，rec assay の結果を考慮して結論は今後の検討に待ちたい．

結局，rec assay で陽性と判定された19色素のうち9色素の変異原性が確認された．

賀田らによる色素の rec assay の結果[4]で陰性であった色素のうち Crystal violet, Eosin, Erythrosin, Gentian violet B, Junus green, Methylene blue, Rose bengal が rec assay で陽性となった．これは，今回用いられた rec assay の方法が賀田により改良された新しい方法で感度が高くなっていること，光照射培養を行なったこと，阻止帯の差の判定規準を3 mm 以内でも陽性としたことに原因すると思われる．これらの色素のうち Crystal violet, Gentian violet B, Junus green, Methylene blue の変異原性が確認された．しかし，Phloxine は rec assay 陽性で一致し，賀田により大腸菌を用いて変異原性が確認されているにもかかわらず，本報告のサルモネラ菌では陽性の結論は得られなかった．

最後に，rec assay により第4群に分類された色素についても大腸菌，サルモネラ菌を用いた mutation test を試みることも重要である．また，rec assay 陽性と判定された色素中食品添加物として現在使用されている色素，Erythrosin, Rose bengal については十分に検討する必要がある．

要　旨

62色素の変異原性について，枯草菌を用いた rec assay，大腸菌，サルモネラ菌を用いた mutation test により検索した．同時に，色素の光増感作用を考慮して光照射培養も行なった．その結果，rec assay にて62色素中19色素（Alizarin, Aurantia, Cresyl violet, Crystal violet, Eosin, Erythrosin, Fuchsin, Gentian violet B, Junus green, Methylene blue, Methyl red, Naphtanil diazo blue B, Phloxine, Pyronin G, Rose bengal, Safranin, Tetrabromo fluorescein, Tetrachloro tetrabromo fluorescein, Thionin）が陽性であった．さらに，mutation test により19色素中9色素（Aurantia, Crystal violet, Gentian violet, B, Junus green, Methylene blue, Methyl red, Naphtanil diazo blue B, Pyronin G, Safranin）が陽性であった．

謝　辞　貴重な菌株を分けて頂いた国立遺伝学研究所変異遺伝部長，賀田恒夫博士に感謝致します．

文　献

1) 日本薬学会編：衛生試験法注解，351, 1973, 金原出版
2) 奥田　治，西郷宗之助，斎藤修二，竹中英雄編：香粧品化学，125, 1970, 廣川書店
3) Ratnayak, W. E.: *Mutation Res.*, 5, 271, 1968
4) Kada, T., K. Tutikawa, and Y. Sadaie: *Mutation Res.*, 16, 165, 1972
5) Commoner, B., A. J. Vithayathil, and J. I.

Henry : *Nature*, 249, 850, 1974
6) 伊藤 隆，土門正治訳：不活性化と回復，166, 1972，みすず書房
7) Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durstone : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 782, 1973
8) Bridge, B. A., R. E. Dennis, and R. J. Munson : *Genetics*, 57, 897, 1967
9) MaCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 979, 1975
10) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20, 1178, 1975
11) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281, 1973
12) 田島弥太郎，吉田俊秀，賀田恒夫：化学物質の突然変異性検出法，35, 1973，講談社
13) 上原喜八郎：化学の領域，27, 922, 1973
14) Martin, B. : *Mol. Gen. Genet.*, 120, 171, 1973
15) Williams, D. S. and T. F. Slater : *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 200, 1973
16) Kondo, M. and M. Kasai : *Photochem. Photobiol.*, 19, 35, 1974
17) Jacob, H. E. : *Photochem. Photobiol.*, 21, 445, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 159-160, 1976

数種食品添加物の50%致死量について

小林 博義*, 市川 久次*, 神谷 信行*, 吉田 誠二*, 平賀 興吾*

The Results on Acute Toxicities of Food Additives

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

緒　言

当部では，ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)[1]，ブチルヒドロキシアニソール (BHA)[1]，アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS・LAS)[2]，ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)[3]，亜硝酸塩 ($NaNO_2$・KNO_2)[4]，硝酸塩 ($NaNO_3$・KNO_3)[5]，クロム (Cr Ⅵ)[8]，パラヒドロ安息香酸ブチル (PHBB)[7]，バナジウム ($NaVO_3$–$4H_2O$)[6]，の毒性研究の一環として行なった急性毒性試験の詳細を報告して来た．今回7種の食品添加物の経口急性毒性試験で得た50%致死量のみを一括記載し今後の研究資料に供することとした．

試　料

プロピオン酸カルシウム（東京化成工業株式会社　試薬特級 Lot, AD01)，ソルビン酸カリウム（和光純薬株式会社　試薬特級 Lot. OF 6995)，亜塩素酸ナトリウム（和光純薬株式会社　試薬特級 Lot. TN 4135)，デヒドロ酢酸ナトリウム（東京化成工業株式会社　試薬特級 Lot. AF 01)，硫酸銅（関東化学株式会社　試薬特級 Lot. 411A5713)，塩化第二鉄（和光純薬株式会社　試薬特級 Lot. LN 3312)，亜硫酸ナトリウム（和光純薬株式会社　試薬特級 Lot DO 4241)

実験動物

ラットは，Wistar SLC, Wistar JCL, SD JCL, マウス ddYS を用い生後4週間目のものを購入，温度 25±1℃，湿度 55±5%，照明午前6時より午後6時の飼育室にて，ラットは金網ケージに5匹，マウスはアルミ箱型（カンナクズ床敷）ケージに10匹を収容，飼料は船橋農場 (F-Ⅱ) ないし日本クレア (CE-2) ラット，マウス用固型飼料を用い，水は水道水を自由に飲用させた．予備飼育1週間以降より用いた．

実験方法

投与試料は容量を一定 (10～15 ml/kg) とし濃度を公比 1.1～1.7 にて6段階以上を設定した．動物は生後5～10週間の動物を用いて，1用量（1群）当り雌雄をそれぞれ10匹を原則とした．投与前日午後5時より除餌して水のみを与え，午前10時より試料を胃ゾンデで経口投与した．投与後2時間目より餌を与え，2週間までの死亡率を観察した．50% 致死量 (LD_{50}) は Litchfield and Wilcoxson[9] 法により求めた．

結　果

経口投与による50%致死量は Table 1, 2 に示した．

謝　辞　本実験を行なうにあたり，多大なる援助をいただいた毒性部諸氏に御礼申し上げます．

文　献

1) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22, 231, 1950
2) 小林博義ら：東京衛研年報，24, 397, 1972
3) 小林博義ら：東京衛研年報，25, 633, 1974
4) 市川久次ら：東京衛研年報，25, 535, 1974
5) 伊川三枝子ら：東京衛研年報，25, 541, 1974
6) 小林博義ら：東京衛研年報，26-2, 83, 1975
7) 馬渕依子ら：東京衛研年報，26-2, 103, 1975
8) 小林博義ら：東京衛研年報，27-2, 119, 1976
9) Litchfield, J. T. Jr. and F. Wilcoxson.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949
10) 刈米達夫：第二版食品添加物公定書注解，1968，金原出版株式会社，東京

* 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. Acute Toxicities (LD_{50}) of Food Additives in Rats and Mice

	Animals	Sex	B. W. ±SD	Dead Time onset	peak	end	Slope function	LD_{50} (po) mg/kg	Confidence Limits p=0.05mg/kg	LD_{50} [1]
Calcium Prepionste	ddYS mouse	♂	28±2				1.250	2600	2190-3080	3340 mouse
		♀	22±1				1.237	2900	2700-3120	
		♂	30±1				1.265	2350	2040-2700	
		♀	25±1				1.235	2400	2200-2620	
	Wistar rat	♂	211±14				1.247	4380	3910-4910	
		♀	142±9				1.365	4040	3540-4610	
		♂	225±14				1.175	4280	3890-4910	
		♀	145±7				1.420	3920	3380-4550	
Potassium Serbate	ddYS mouse	♂	32±1				1.215	3800	3330-4330	5860 mouse
		♀	26±1				1.225	5600	4960-6330	
		♀	27±3				1.147	4340	3840-4900	
	Wistar rat	♂	188±11				1.400	4340	3699-5121	
		♀	122±4				1.414	5210	4491-6044	
Sodium Sufite, Anhydrous	ddYS mouse	♂	29±2	0.5	1	1	1.239	900	783-1035	
		♀	24±2	0.5	1	1	1.120	820	775- 868	
		♂	30±2	0.5	1	1	1.351	920	728- 924	
		♀	23±1	0.5	1	1	1.150	903	799-1020	
Sodium Chlorite	ddYS mouse	♂	28±1	1	3	4	1.219	341	314- 367	
		♀	22±1	1	5	5	1.396	379	340- 422	
		♂	28±1	0.5	2	4	1.366	365	333- 399	
		♀	23±1	0.5	1.2	4	1.337	372	339- 408	

1) The literature on this LD_{50} No. 10.

Table 2. Acute Toxicities (LD_{50}) of Food Additives in Rats and Mice

	Animals	Sex	B. W. ±SD	Dead Time onset	peak	end	Slope function	LD_{50} (po) mg/kg	Confidence Limits p=0.05mg/kg	LD_{50} [1]
Sodium Dehydro-acetate	ddYS mouse	♂	30±1				1.451	1640	1450-1850	1050 mouse
		♀	23±1				1.193	1800	1670-1940	
		♂	31±1				1.284	1620	1460-1800	
		♀	25±1				1.159	1750	1630-1880	
	Wistar rat	♂	180±18				1.200	880	805- 962	
		♀	134±11				1.200	800	805- 962	570 rat
		♂	161±17				1.123	1000	943-1060	
		♀	123±10				1.094	960	916-1008	
Cupric Sulfate	JCL SD rat	♂	215±9				1.196	700	598- 818	300 rat
		♀	154±8				1.311	650	513- 823	
Ferric Chloride	ddYS mouse	♂	31±2	1	2	28	1.135	895	784-1010	
		♀	25±1	2	2	21	1.138	1050	923-1195	
		♂	31±2	1	4	14	1.087	985	914-1062	
		♀	24±2	2	4, 8	13	1.095	1139	1040-1247	
	Wistar rat	♂	215±16	1	1, 6, 8	26	1.160	2080	1793-2413	
		♀	146±10	2	2, 3, 15	25	1.078	1870	1735-2061	

1) The literature on this LD_{50} No. 10.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 161-165, 1976

有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用
(3) 細胞膜諸酵素に対する水銀化合物の阻害作用

原 しげ子*, 中尾 順子*

Effects of Organic Mercury Compounds on Cell Membranes
(3) Inhibition of Enzymes in Cell Membrane by Mercury Compounds

SHIGEKO HARA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

有機水銀化合物は神経組織に特異的な親和性を示し，重篤な神経障害を引き起こすことが知られている[1-4]．水銀化合物の各種酵素に対する阻害作用の研究は多く，SH基に対して親和性が高いことが明らかにされている[5]．しかし，細胞膜固有の機能を通しての毒性が観察されている報告は少ない[6,7]．そこで私共は，水銀化合物の毒性発現機序を細胞膜機能障害として解明すべく，細胞膜諸酵素に対する阻害を調べた．

前報[8,9]ではブタ脳，ウマ腎，ウマ脳の細胞膜画分を用い，細胞膜の"marker enzyme"である，Na, K-ATPase, 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等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）の阻害を検討した．その結果，Na, K-ATPase, Mg-ATPase と K-PNPPase のみが三種の水銀化合物で強く阻害され，阻害の強さは塩化第二水銀＞PCMB＞塩化メチル水銀の順であった．阻害には動物種，臓器による差はみられなかった．

本報告ではウマ脳，ラット肝の細胞膜画分を用い，膜に固く結合した酵素でホルモン，神経機能などに関係の深いアデニレイトサイクラーゼのほか，やはり膜固有の酵素と言われる5′-ヌクレオチダーゼ，グルコース-6-フォスファターゼに対する三種水銀化合物の阻害を調べ，細胞膜障害について考察した．

Storm, Gunsalus[10] らによれば，塩化メチル水銀はラット肝アデニレイトサイクラーゼを無機水銀の1/10, PCMB より 1/500 の低濃度で半阻害すると報告した．そこで，彼らの結果との比較も試みて，彼らとは異なった結果を得た．

方　法

試薬　塩化第二水銀（和光純薬，含量 99.5% 以上）は再留水に 10^{-2}M の濃度に溶かした．PCMB（半井化学製，含硫蛋白質研究用特製試薬）は 0.04M 水酸化ナトリウムに 10^{-2}M の濃度に溶かし，pH は塩酸で9に合わせた．これを各々の酵素反応液に含まれる緩衝液で稀釈し用いた．塩化メチル水銀（東京化成工業，含量99.5%）は 0.9% 塩化ナトリウムに 10^{-3}M の濃度に溶かした．水銀化合物溶液は無炎原子吸光法で総水銀量を測定し，メチル水銀はさらにガスクロマトグラフィ-ECD検出法でメチル水銀量を検定して用いた．水銀化合物溶液は4°で保存した．

アルミナカラムは Neutral Chromatographic Aluminum Oxide W200 (ICN 社製) を使用した．

〔α-^{32}P〕ATP (12.5 Ci/m mol) と 〔8-^{3}H〕cyclic-AMP (20 Ci/m mol) は Radiochemical Centre 製を使用した．

酵素標品の調整

1) ウマ脳細胞膜画分 Schwartz の方法[11]を改変して用いた．ウマ脳半個分を9倍量の 0.32M 蔗糖，1 mM EDTA (pH 7.2) 溶液中でワーリングブレンダーで破砕し，Sorvall GSA ローターで 8500 rpm 15分間遠心し，その上清を Sorvall SS-34 ローターで 20,000 rpm 60分間遠心した．沈殿を 1mM EDTA で洗い同じローターで 20,000 rpm 60分間遠心し沈殿を再留水に懸濁して −80° に保存した．

* 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

2) ラット肝細胞膜画分 Neville[12] の方法に従い Step 11 まで精製し，1mM $NaHCO_3$ に懸濁して −80° で保存した．

酵素活性測定法 Total ATPase, Na, K-ATPase, アルカリフォスファターゼ活性測定は前報[9]に従った．なお Na, K-ATPase は 1mM ウワバイン存在下のウワバイン感受性 ATPase 活性で求めた．

グルコース-6-フォスファターゼ活性は Swanson[13] の方法を改変して用いた．反応液は全量 0.5m*l* とした．

5′-ヌクレオチダーゼ活性は終濃度 5mM 5′-AMP, 5mM 塩化マグネシウム，50mM トリス-塩酸 (pH 7.5) の反応液 0.5m*l* 中で，37° で反応させた．酵素反応により遊離した無機リン酸を Fiske-SubbaRow[14] の方法で測定した．

混在するタンパクの濁りは SDS を加えて消した[15]．SDS は混在するタンパク量により 0.6〜1% 加えた．

アデニレイトサイクラーゼ活性は Rodbell[16]らの方法を改変して用いた．(1)水銀化合物の作用が複雑になるのを避けるためATP再生系を反応系から除いた．(2)ATP 濃度は 2.5mM にし，時間—活性曲線の直線部分で測定を行なった．反応液は終濃度 2.5mM [α-^{32}P] ATP (10〜20 cpm/p mole), 5mM 塩化マグネシウム，9 mM テオフィリン，1mM c-AMP，15mM フッ化ナトリウム，50mM トリス-塩酸 (pH 7.5) を含み全量 0.1m*l* とし，反応は 30° で行なった．反応の停止には，40mM ATP，1.4mM c-AMP，2%SDS, pH 7.5 を 0.1m*l* 添加した．cyclic AMP の分離は Rodbell[16] らの方法 C に従い，Dowex 50WX4 カラムを使用した．

水銀化合物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 5 分間予備加温し，それに基質を加え反応させた．

蛋白質定量法 Lowry[17]らの方法で行ない，ウマ血清アルブミンを標準物質として用いた．

結　果

Table 1 にウマ脳，ラット肝から得られた細胞膜画分の各々の酵素活性を比活性で表わした．5′-ヌクレオチダーゼ，グルコース-6-フォスファターゼ活性はラット肝細胞膜で高く，一方フッ化ナトリウム存在下のアデニレイトサイクラーゼ活性は両標品でほぼ等しい比活性を示した．フッ化ナトリウムによる活性化はウマ脳細胞膜画分で2.3倍，ラット肝細胞膜画分で11.1倍であった．フッ化ナトリウムで活性化されたウマ脳細胞膜画分のアデニレイトサイクラーゼは安定性がよく，6か月経過後も活性の減少がみられなかった．これに反し，ラット肝細胞膜画分のアデニレイトサイクラーゼは不安定で −20° 4 週間で活性は半分に低下した．そこで，水銀化合物の阻害実験には，5′-ヌクレオチダーゼとグルコース-6-フォスファターゼはラット肝細胞膜画分を用い，アデニレイトサイクラーゼはラット肝およびウマ脳細胞膜画分を用いた．

Table 1. 細胞膜画分の酵素活性

	ラット肝 細胞膜画分	ウマ脳 細胞膜画分
Total ATPase*	54.7	53.7
Na, K-ATPase*	4.7	43.4
5′-Nucleotidase*	18.0	0.2
Glucose-6-phosphatase*	4.1	n. d.
Alkaline-phosphatase*	1.4	0.5
Adenylate cyclase**		
−NaF	0.4	2.4
+15mM NaF	5.0	5.6

比活性は * μ mole Pi/mg protein/h,
** *n* mole c-AMP/mg protein/10min. で表示した．
Na, K-ATPase は 1mM ウワバイン存在下のウワバイン感受性 ATPase 活性で求めた．
n. d. : not detected.

Fig. 1 は，ラット肝細胞膜画分の 5′-ヌクレオチダーゼに対する阻害である．5′-ヌクレオチダーゼは用いた水銀濃度範囲では三種の水銀化合物による阻害がみられなかった．同じ酵素標品中のグルコース-6-フォスファターゼ活性は，三種の水銀化合物で阻害された (Fig. 2)．塩化メチル水銀は高濃度側で阻害がやや弱く，PCMB と塩化メチル水銀の阻害曲線はよく類似していた．

ウマ脳アデニレイトサイクラーゼに対する三種水銀化合物の阻害は，塩化第二水銀，PCMB，塩化メチル水銀の阻害に大きな差がなく，半阻害濃度は 10^{-5}M の桁であった (Fig. 3)．

Storm, Gunsalus[10]らは塩化メチル水銀が他の水銀化

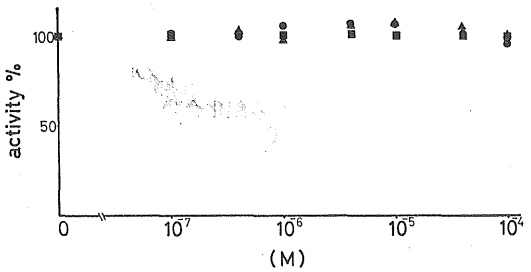


Fig. 1. ラット肝 5′-ヌクレオチダーゼに対する水銀化合物の阻害　タンパク量 32μg/m*l*, 横軸は各種水銀濃度を示す
● $HgCl_2$, ▲ CH_3HgCl, ■ PCMB

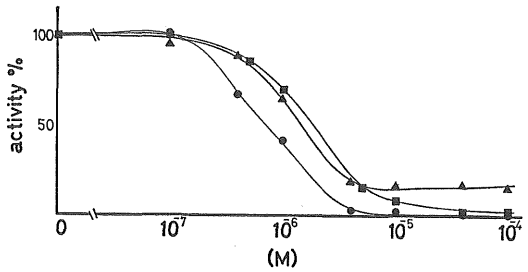


Fig. 2. ラット肝グルコースフォスファターゼに対する水銀化合物の阻害
タンパク量 29μg/ml, -●- $HgCl_2$, -▲- CH_3HgCl, -■- PCMB

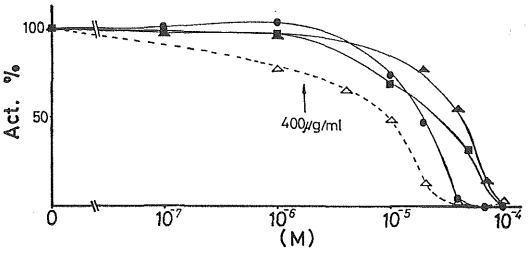


Fig. 3. ウマ脳アデニレイトサイクラーゼに対する水銀化合物の阻害 タンパク量 1200μg/ml, -●- $HgCl_2$, -▲- CH_3HgCl, -■- PCMB
破線はタンパク量 400μg/ml で求めた塩化メチル水銀の阻害曲線

合物に比べ特異的にラット肝アデニレイトサイクラーゼを阻害すると報告しているが，私共の実験ではそのような結果が得られなかった．彼らの報告とくい違う理由として，次の3点について検討した．1) Storm らと同じタンパク濃度で測定した半阻害濃度は 10^{-5}M で Storm らの報告の 10^{-7}M より100倍高濃度であった．Fig. 3 にメチル水銀の阻害曲線を破線で示した．2) Storm らの実験は水銀化合物と酵素を予備加温した後，25倍に稀釈，遠心して未反応の水銀化合物を除去している．そこで，同様な操作を行ない阻害曲線を求めた (Fig. 4)．遊離水銀化合物を除去しても，阻害の強さの順，半阻害濃度は前述の結果とほぼ一致し，違いはみられなかった．3) 彼らは酵素標品として Neville[12] の方法に従って得たラット肝細胞膜画分を用いた．一方，私共はウマ脳細胞膜画分を用いて実験を行なってきた．酵素標品により差があるかもしれないので，ラット肝細胞膜画分のアデニレイトサイクラーゼ阻害を調べた．Fig. 5 で示すようにウマ脳とよく似た阻害を示した．これらの検討の結果，Storm らの報告のように塩化メチル水銀が特に低濃度で阻害するという結果は得られなかった．

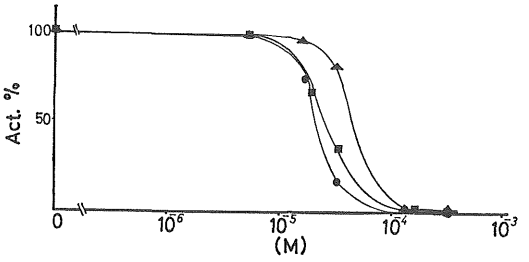


Fig. 4. ウマ脳アデニレイトサイクラーゼに対する水銀化合物の阻害 未反応の水銀化合物を除去した後，活性を測定した．
タンパク量 1200μg/ml, -●- $HgCl_2$, -▲- CH_3HgCl, -■- PCMB

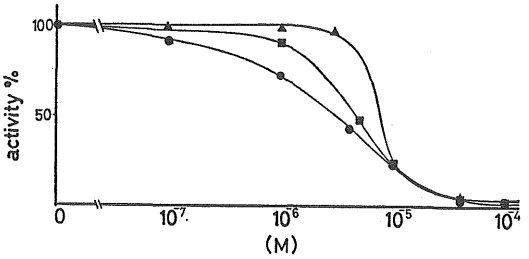


Fig. 5. ラット肝アデニレイトサイクラーゼに対する水銀化合物の阻害
タンパク量 500μg/ml, -●- $HgCl_2$, -▲- CH_3HgCl, -■- PCMB

前報[9] で報告したように，水銀の半阻害濃度はタンパク濃度に依存して変わる．Fig. 2～4 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．アデニレイトサイクラーゼ，Na, K-ATPase，グルコース-6-フォスファターゼはすべて三種の水銀化合物により，10^{-7}M の桁で半阻害された．アデニレイトサイクラーゼに対する阻害には種，臓器による差はみられなかった．阻害の強さは塩化第二水銀>

Table 2. 細胞膜画分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
NaF-Adenylate cyclase	H. B.	1.2	3.0	1.7
	R. L.	0.5	1.3	0.8
Na, K-ATPase	H. B.	1.9	7.2	4.5
Glucose-6-phosphatase	R. L.	3.2	6.1	5.4

Protein 8μg/ml
H. B.; horse brain, R. L.; rat liver

PCMB>塩化メチル水銀の順であった.

考　察

私共は，水銀化合物の細胞膜諸酵素に対する阻害作用を調べてきた．本報告ではさらにウマ脳，ラット肝のアデニレイトサイクラーゼ，5′-ヌクレオチダーゼ，グルコース-6-フォスファターゼに対する作用を調べた．5′-ヌクレオチダーゼは用いた水銀濃度範囲では無機，有機水銀化合物何れでも阻害されなかった．アデニレイトサイクラーゼとグルコース-6-フォスファターゼは三種水銀化合物で強く阻害され，阻害は Na, K-ATPase と同程度であった．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をなすため，水銀化合物の到達のしやすさに差異があるためかはわからない．しかしながら，前報[9]と本報告の結果をまとめてみると，細胞膜諸酵素は三種の水銀化合物による阻害の様式から次の三群に分けることができる．(a)いずれの水銀化合物でも阻害されるもの，(b)塩化第二水銀でのみ阻害されるもの，(c)いずれの水銀化合物でも阻害されないもの．a 群には，Na, K-ATPase, アデニレイトサイクラーゼ, Mg-ATPase, K-PNPPase, グルコース-6-フォスファターゼが含まれる．a 群はいずれも膜機能と密接な関係を有する酵素であるから，これらの酵素に対する阻害は膜機能障害を反映しているものと考えられる．また，これらの酵素は SH 剤で活性の回復がみられることから[8,18,19,23]，阻害には SH 基が関係していると思われる．b 群はアルカリフォスファターゼが含まれる．無機水銀の阻害は Zn イオン共存下で消失することから，この酵素の塩化第二水銀による阻害は Zn イオン結合部位[20]と関係があるのかもしれない．c 群はアセチルコリンエステラーゼと 5′-ヌクレオチダーゼが含まれる．この二つの酵素は実験に用いた水銀濃度範囲ではまったく阻害されなかった．

次に水銀の側から酵素に対する作用を考えてみると，阻害の強さは常に塩化第二水銀＞PCMB＞塩化メチル水銀の順で，塩化メチル水銀に比べ塩化第二水銀の方が酵素に対する親和性が強い．塩化第二水銀の方がメチル水銀よりも分子半径が小さく，反応基に近づき易いためと思われる．

アデニレイトサイクラーゼ阻害で得られた結果は Storm[10] らの報告と大きくくい違い，塩化メチル水銀が特異的に阻害するという結果は得られなかった．彼らとの違いが生じた理由が，操作上または酵素標品の差によるのかもしれないと考え検討したが，いずれの場合も Storm らと一致した結果は得られなかった．なお彼らが遊離水銀化合物を除くのに用いている遠心条件は 20,000g 10分間で，これは膜分画を完全に沈殿させるには不充分であることが予想される．水銀化合物が結合していない酵素はこの遠心条件で充分に落ちないということがあれば，彼らとのくい違いの一部は説明できるかもしれない．

また，水銀化合物溶液は保存により濃度が変化しやすいという報告がいくつかある[21,22]．私共が使用した水銀溶液の濃度は，あらかじめ無炎原子吸光法とガスクロマトグラフィー法より検定した．それゆえ水銀の濃度が変化していたという可能性はない．

最近，Mavier と Hanoune[23]はラット肝細胞膜のアデニレイトサイクラーゼに対する水銀利尿剤(マーサリル，PCMB，p-ヒドロオキシマーキュリー安息香酸等)の阻害作用を報告しているが，PCMB については彼らの報告と私共の結果とよく一致していた．

要　約

前報に続いて，ウマ脳およびラット肝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，種々の膜酵素に対する阻害で調べた．

アデニレイトサイクラーゼ，グルコース-6-フォスファターゼは三種水銀化合物で阻害され，その阻害は Na, K-ATPase と同程度であった．一方，5′-ヌクレオチダーゼは三種の水銀化合物でまったく阻害されなかった．

文　献

1) Hunter, D., R. R. Bomford, and D. S. Russel : *Quart. J. Med.*, 9, 193, 1940
2) Hunter, D. and D. S. Russel : *J. Neurol. Neurosourg. Psychiat.*, 17. 235, 1954
3) Takahashi, T., T. Kimura, Y. Sato, H. Shiraki, and T. Ukita : *J. Hyg. Chem.*, (*Japan*) 17, 93, 1971
4) Bcikir, F., S. F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N. Y. AI-Rawi, S. Tikriti, H. I. Dhahir, T. W. Clarkson, J. C. Smith, and R. A. Doherty : *Science*, 181, 230, 1973
5) Webb, J. L. : Enzymes and Metabolic Inhitor vol. 2. *Academic Press*, 1966
6) Weed, R., J. Eber, and A. Rothstein : *J. Gen. Phy.*, 45, 395, 1962
7) White, J. F., and A. Rothstein : *Toxicol. Appli. Pharma.*, 36, 370, 1973
8) 矢ヶ崎しげ子，原　論吉，中尾順子：東京衛研年報，25, 691, 1974

9) 矢ヶ崎しげ子, 原 論吉, 中尾順子：東京衛研年報, 26-2, 148, 1975
10) Storm, D. R. and R. P. Gunsalus : *Nature*, 250, 778, 1974
11) Schwartz, A., H. S. Bachelard, and H. Mcilwain : *Biochem. J.*, 84, 626, 1962
12) Neville, D. M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 154, 540, 1968
13) Swanson, M. A. : Methods in enzymology, Vol. II, 541, *Academic Press*, 1955
14) Fiske, C. H. and Y. H. SubbaRow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
15) Tashima, Y., N. Yoshimura, and H. Hasegawa : *Seikagaku (in Japanese)*, 46, 643, 1974
16) Salomon, Y., C. Londons and M. Rodbell : *Anal. Biochem.*, 58, 541, 1974
17) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and B. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
18) Skou, J. C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10, 79, 1963
19) Nordllie, R. C. and P. T. Johns : *Biochem. J.*, 104, 37p, 1968
20) Cathala, G., C. Brunel, D. Chappelet—Tordo, and M. Lazdunski : *J. Biol. Chem.*, 250, 6046, 1975
21) 末永泉二, 福井昭三, 藤田昌彦：環境汚染分析法, 5, 50, 1973, 大日本図書
22) Arah, R. O. and B. McDuffie : *Anal. Chem.*, 48, 195, 1976
23) Mavier, P. and J. Hanoune : *Eur. J. Biochem.*, 59, 593, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 166-170, 1976

赤血球膜 Na, K-ATPase および陽イオン輸送におよぼすフロリジンの影響

中川 敦子*, 中尾 順子*

Effects of Phlorizin on Na,K-ATPase and Cation Transport in Human Erythrocytes

ATSUKO NAKAGAWA* and TOSHIKO NAKAO*

フロリジンは植物に存在する配糖体で腎細尿管に作用し腎性糖尿を引起す．このことから細胞での糖輸送を抑える物質として特に生理学者に注目され，糖の輸送機構の解明に重要な物質とされてきた．

糖の輸送には2つの型がある．1つは脂肪細胞，赤血球，エールリッヒ細胞など多くの組織でみられる，糖の濃度勾配に従った細胞内への取込みで担体を介した促進拡散 (facilitated diffusion) である．もう1つは小腸および腎細尿管でみられるナトリウムに共役した糖の取込みである．この型では膜に存在する担体がナトリウムと糖で三重複合体を形成し，濃度勾配に従ってナトリウムが細胞内へ取込まれるのに伴い糖も取込まれる．細胞内に取込まれたナトリウムは漿膜側に存在するナトリウムポンプで細胞外へ排出されるため，結果としては糖が濃度勾配に逆って細胞内に蓄積される．糖の輸送に直接エネルギーが使われていないという点でこれも一種の促進拡散と考えられる．しかし最近 Kimmich[1,2] により糖の輸送にも直接 ATPase のエネルギーが使われているという報告がでている．フロリジンは前者に対しては非競合的に，後者に対しては競合的に阻害する．

一方，フロリジンが Na, K-ATPase 活性を阻害することが Renzo Rendi[3] により初めて明らかにされ，その後 Na, K-ATPase の部分反応であるカリウム依存性ホスファターゼ活性を促進することが藤田ら[4] によりみつけられた．この複雑な反応に対し Robinson[5] はフロリジンが酵素のナトリウムに対する親和性を下げ，カリウムに対する親和性を上げるためであると説明し，糖の輸送にもこの作用が影響していると推測している．

ここでは糖の輸送と Na, K-ATPase の関係を調べる目的で，フロリジンの陽イオン輸送および Na, K-ATPase に対する影響についてヒト赤血球を用いて観察した．

実験方法

赤血球膜酵素標品の調製 Dodgeらの方法[6]に従った．すなわちヒトの4週間保存血に9容量の 0.9% NaCl を加え，3,000 rpm 10分間遠沈 (Marusan Model 50M) し，吸引により血漿と白血球層を除く．同様な操作で3回洗った赤血球に9容量の冷再溜水を加えて溶血し，時々撹拌しながら30分間放置する．20,000 r.p.m. 25分間遠沈 (Sorvall SS-34 rotor) して上清を除き，沈殿を 2.5mM Tris-HCl (pH 7.45) で3回洗う．得られた乳白色の沈殿に冷再溜水を加え，テフロンホモジナイザーで10回上下したものを赤血球膜酵素標品として使用した．

ATPase 活性の測定 中尾らの方法[7]に従った．反応液の組成は 140mM NaCl, 14mM KCl または RbCl, 5mM $MgCl_2$, 3mM ATP-2Na, 1mM GEDTA, 0.5 mM EDTA, 40mM Tris-HCl (pH 7.5) および酵素標品とし全量を 500μl とした．37℃に加温して反応を開始し，30分間インキュベート後，0℃で反応を停止し，10% SDS 50μl を加えて，遊離した無機りん酸を Fiske Subbarrow 法[8]で測定した．10^{-3}M ウアバインで阻害される活性を Na, K-ATPase 活性とした．タンパク質の測定は仔ウシ血清アルブミンを標準液として Lowry 法[9]に従った．酵素の比活性は μmole Pi/mg prot./hr. で表わした．用いた酵素標品の Na, K-ATPase 比活性は 0.5～1.5であった．

ヒト赤血球の可逆溶血 ヒト保存血は採血後4週間以内に使用した．可逆溶血した赤血球は Whittam の方法[10]で得た．すなわち，酵素標品を得る時と同条件で洗

* 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

った赤血球に8容量の 5mM ATP, 6mM $MgCl_2$ を加えて低張にし，室温で10分間時々撹拌しながら溶血する．3M NaCl を適量加えて等張にもどし，37℃で40分間インキュベートして膜を回復させる．20,000 r.p.m. 5分間遠沈 (Sorvall SS-34 rotor) して上清を吸引で除き，沈殿を 0.9% NaCl で3回洗う．沈殿に溶液A (80mM NaCl, 100mM Sucrose, 0.1mM GEDTA, 1.1mM Glucose, 20mM Imidazole-HCl (pH 7.4)) を加えて懸濁したものを可逆溶血した赤血球として使用した．フロリジンを取込ませた赤血球は，溶血時に 5×10^{-4}M または 8×10^{-4}M フロリジンを加えて同様に調製した．

可逆溶血した赤血球における ^{86}Rb の取込み　反応液の組成は溶液A，1mM ^{86}RbCl (5,000～10,000 c.p.m./tube) 可逆溶血した赤血球 0.5ml (赤血球として 0.42～0.45ml) とし全量を 1ml にする．37℃で90分間インキュベート後 0℃で反応を停止し，直ちに 17,000 r.p.m. 20分間遠沈 (Tominaga RS-18 No. 3 rotor) して赤血球を分ける．上清 200μl をプランシェットに移して乾燥後 GM カウンター (Aloka) で放射能を測定する．上清の放射能の減少を赤血球に取込まれたものとみなし赤血球 1ml あたりの ^{86}Rb の取込みとして表わした．10^{-3}M ウアバインで抑えられる ^{86}Rb の取込みをウアバイン感受性 ^{86}Rb の取込みとした．フロリジンを取込ませた赤血球は溶血時のフロリジン濃度を 5×10^{-4}M として調製した．

可逆溶血した赤血球の ATPase 活性　反応液の組成は赤血球膜 ATPase 活性の測定と同様として，可逆溶血した赤血球 0.2ml (赤血球として 0.15～0.17ml) を加えて全量を 1ml とする．37℃で30分間インキュベート後，0℃で反応を停止し，50% トリクロル酢酸 0.1ml を加えて除タンパクする．0℃で10分間放置後，3,000 r.p.m. 10分間遠沈 (Marusan Model 50M) し，上清 0.5ml を用いて無機りん酸を測定した．りん酸を測定した残りに 2N NaOH 0.5ml を加え，室温に放置して沈殿を溶かしタンパク質を測定した．フロリジンを取込ませた赤血球は溶血時のフロリジン濃度を 8×10^{-4}M として調製した．

可逆溶血した赤血球内の ATP 含量の測定　ATP 測定キットを使用した．可逆溶血した赤血球1容に冷却した6N過塩素酸4容を加えて ATP を抽出する．3,000 r.p.m. 10分間遠沈 (Marusan Model 50M) した上清についてATP 濃度を測定した．反応はキュベットに溶液 I (500mM Triethanol amine (pH 7.6), 4mM $MgSO_4$, 6mM Glycerate-3P) 3ml, 溶液 II (2.5mM NADH) 0.2ml, 赤血球の過塩素酸抽出液0.1mlを加えて混和する．これに溶液III (GAPDH 7 mg/ml, PGK 1 mg/ml, GDH/TIM 2 mg/ml) 20μl を加えて反応を開始し 340mμ における吸光度の減少を測定した．

試薬　フロリジンはシグマ社，^{86}Rb は New England Nuclear 社，ウアバインはメルク社，GEDTA は和光純薬工業，ATP は協和発酵工業，ATP 測定キットはベーリンガー・マンハイム社の製品を使用した．

実験結果

フロリジンの赤血球膜Na, K-ATPase活性に対する濃度阻害曲線を図1に示した．みかけの半阻害濃度は 1.5×10^{-4}M でブタ脳[11]およびラット脳[5]の酵素に対する半阻害濃度 (6×10^{-5}M) に比べてやや高い．フロリジンの水に対する溶解性が低いので高濃度の範囲については検討できなかったが，赤血球膜酵素標品についても脳の酵素と同様に完全阻害はみられなかった．フロリジンのブタ脳 Na, K-ATPase 活性に対する影響はナトリウムに対するカリウムの比が小さい時に促進され，通常の活性

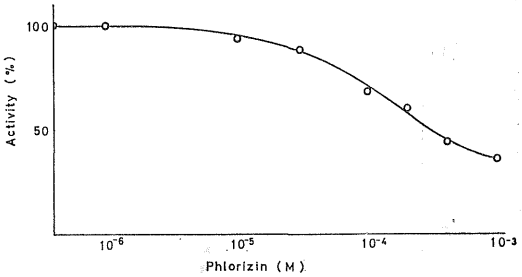


図1　赤血球膜 Na, K-ATPase に対するフロリジンの濃度阻害曲線
フロリジン無添加時の活性を100% とした相対活性で表した．

測定条件下 (140mM Na, 14mM K) では阻害される．ルビジウムは Na, K-ATPase においてカリウムの代りになり得るがフロリジン存在下でも同様な効果があるかどうかを検討した (図2)．この図では 140mM NaCl, 14 mM KCl または RbCl で得られた活性を 100% として表わしたが，いずれのイオンでも低濃度の範囲でフロリジンによる活性の促進がみられた．なお最適条件下での Na, Rb-ATPase 活性は Na, K-ATPase 活性の約60% であった．

Na, K-ATPase は膜における陽イオンの能動輸送を行う酵素である．^{86}Rb の細胞内への取込みに対するフロリジンの阻害を無傷赤血球で観察すると，Na, K-ATPase 活性が60%阻害される濃度のフロリジン (2×10^{-4}M) で ^{86}Rb の取込みは 7～15% しか阻害されなかった[11]．酵素活性とイオン輸送に対する阻害の違いはフロ

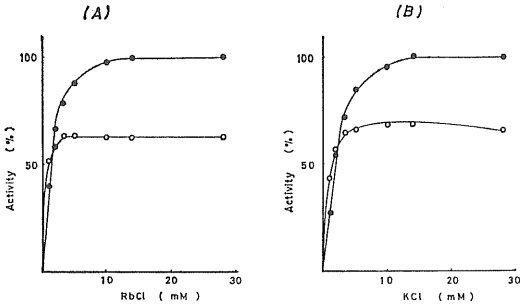


図2 Na, Rb-ATPase 活性(A) および Na, K-ATPase 活性(B)におよぼすフロリジンの影響
NaCl 140mM, KCl または RbCl 14mM でフロッシンを加えない時の活性を100%とした相対活性で表した.
●——●：フロリジン無添加,
○——○：2×10^{-4}M フロリジン添加.

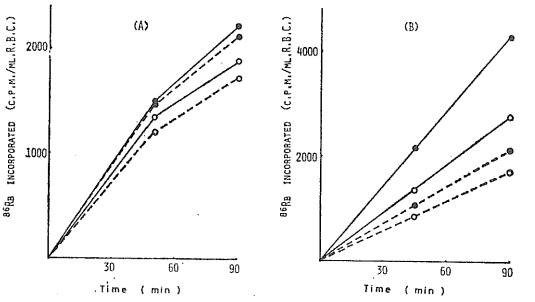


図4 可逆溶血した赤血球における ^{86}Rb の取込み
(A)反応液に5×10^{-4}Mフロリジンを加え赤血球外から作用させたとき, (B)溶血時に5×10^{-4}Mフロリジンを加え赤血球内から作用させたとき, ——：フロリジン非存在下, ----：フロリジン存在下, ●：全 ^{86}Rb 取込み, ○：ウアバイン感受性 ^{86}Rb 取込み

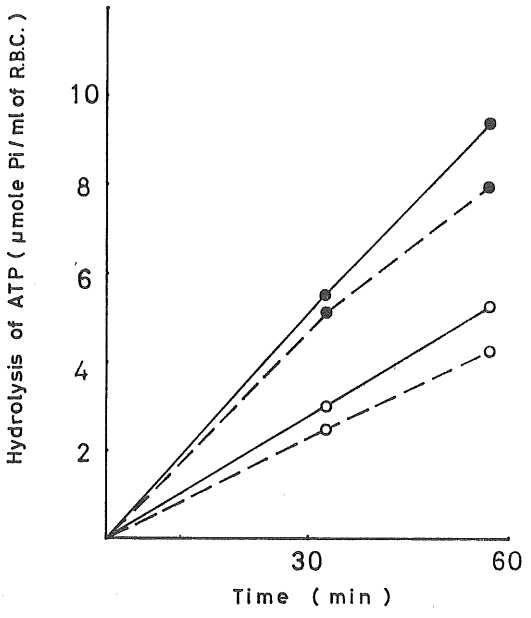


図3 可逆溶血した赤血球における細胞内外 ATP の水解
——：反応液に 3×10^{-3}M ATP を添加したとき, -----：反応液に ATP を添加しないとき, ●：全ATPase活性, ○：Na, K-ATPase 活性

リジンの作用部位による違いと考え, 可逆溶血によりフロリジンを取込ませた赤血球を用いて ^{86}Rb の取込みに対する影響を観察した. ATPaseは細胞内 ATP のみを基質とするので可逆溶血した赤血球の表裏が正常であるかどうかを細胞内および細胞外の ATP 水解の差で確か

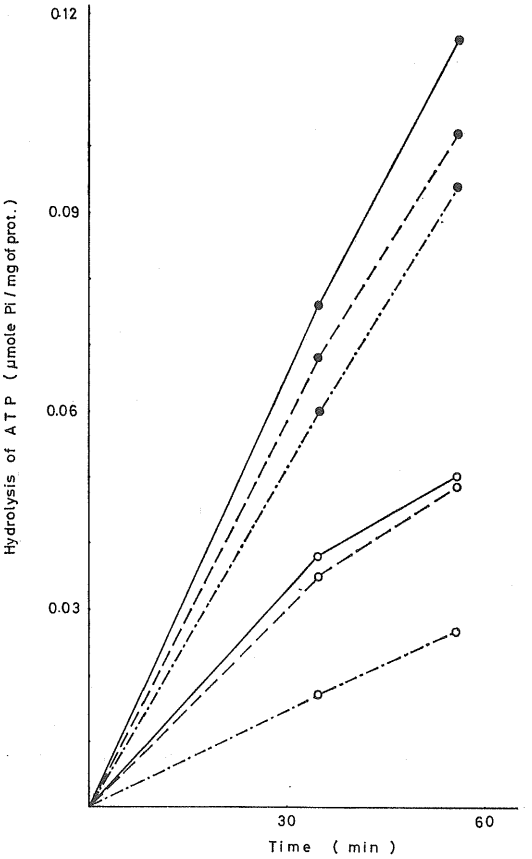


図5 可逆溶血した赤血球の ATPase 活性
——：フロリジン無添加時の活性, -----：フロリジンを赤血球外から作用させたときの活性, ——--：フロリジンを赤血球内から作用させたときの活性, ●：全 ATPase 活性, ○：Na, K-ATPase 活性

めた．図3に示したように反応液に加えたATPの水解は細胞内ATPの水解に比べて低く，可逆溶血した赤血球の大部分は膜の表裏を正常に保っていたと考えられる．可逆溶血した赤血球内のATP濃度を測定した結果は2～3×10^{-3}MでATPaseに対するATPのKm値3×10^{-4}Mに比べ充分な量であった．またフロリジンを取込ませた赤血球でも同様な結果が得られた．

可逆溶血した赤血球の ^{86}Rb の取込みに対するフロリジンの影響を図4に示した．外側に加えたフロリジンによる^{86}Rbの取込みに対する阻害は無傷赤血球でみられたのと同程度（図4-A）であったが，内側のフロリジンでは強く阻害された（図4-B）．可逆溶血した赤血球のATPase活性が細胞内および細胞外のフロリジンで阻害される程度を図5に示した．赤血球内のフロリジンは赤血球外のフロリジンに比べて，全ATPase活性に対してもNa,K-ATPase活性に対しても強い阻害作用を示した．

考　察

フロリジンの赤血球膜 Na, K-ATPase 活性に対する阻害と，Na, K-ATPase によって発現される陽イオン能動輸送に対する阻害の間に差がみられた[11]のは赤血球膜におけるフロリジンの作用部位による違いかもしれない．フロリジンは小腸粘膜[12]および可逆溶血した赤血球[13]で膜を通過しないことが確かめられているので，可逆溶血によりフロリジンを取込ませた赤血球を用いてフロリジンの作用が膜の内外で差があるかどうかを検討した．その結果赤血球内のフロリジンは外から加えたフロリジンに比べて，^{86}Rb の取込みおよびATPase活性を共に強く阻害した．赤血球内のフロリジンによる阻害の程度は両反応とも赤血球膜 Na, K-ATPase 活性に対する阻害にほぼ見合うものであった．さらに Na, K-ATPase 活性に対するフロリジンの阻害は基質であるATP濃度を上げることにより回復し，その反応は競合的な形に近い[11]．以上のことから赤血球膜 Na, K-ATPase および陽イオン輸送に対するフロリジンの作用部位は赤血球膜の内側であることが強く示唆された．

赤血球膜における糖の輸送に関してはフロリジンのアグリコンであるフロレチンを用いた Beneš らの実験[14]がある．糖の取込みに対するフロレチンの阻害作用は膜の内外で等しく，糖に対して膜の反対側で作用すると結論を出している．陽イオン輸送に対するフロリジンの作用は膜の内側でのみ有効で糖輸送に対する阻害とは異なっていた．またフロリジンは赤血球における硫酸イオンの流出[13]をフロレチンはりん酸イオンの流出[15]を外側から阻害し，ウレア[16]および塩素イオンの輸送[17]には同じ側から阻害する．フロリジンの糖の輸送に対する阻害と，これら陰イオン輸送に対する阻害の関係は今のところわからない．

可逆溶血した赤血球におけるウアバイン非感性 ^{86}Rb の取込み（全 ^{86}Rb 取込みからウアバイン感受性取込みを差引いたもの）も細胞内のフロリジンで阻害された（図4-B）．ウアバイン非感受性ATPaseはインシュリンが膜に作用するときの第1段階に関与しているとの報告[18]もあるので，糖輸送との関係で興味ある問題として残されている．これらの点に関しては赤血球の糖輸送に対して競合的な阻害作用を示し，阻害力も強いフロレチンを用いた方がより効果的である．

最近は小腸粘膜および腎細尿管におけるフロリジン受容体の性質が明らかにされつつあり，ここから糖輸送の担体を精製しようという試みがなされている[19]．一方赤血球においても種々の方法で膜タンパク質を溶かし，担体と立体特異的な糖との結合を利用して糖輸送の担体を精製する試みがなされ，担体の膜内での配向性についても検討されている[20]．これらと合わせてフロリジンあるいはフロレオチンの作用部位を考えてみる必要もあろう．

膜に対する薬物の作用を考える場合その作用部位と作用機作は重要な問題となる．その点で可逆溶血した赤血球は他の薬物の作用を研究するうえで有効な材料となり得ると思われる．

要　約

Na, K-ATPase と陽イオン輸送に対するフロリジンの作用が赤血球膜の内外いずれであるかを可逆溶血した赤血球を用いて検討した．

1) フロリジンの赤血球膜 Na, K-ATPase に対する半阻害濃度は 1.5×10^{-4}Mであった．

2) 可逆溶血した赤血球の大部分は元の赤血球の表裏を保っていた．

3) 可逆溶血した赤血球における ^{86}Rb の取込みは赤血球内フロリジンで阻害され，阻害の程度は赤血球膜 Na, K-ATPase に対する阻害に見合うものであった．

4) 可逆溶血した赤血球の Na, K-ATPase 活性は赤血球内フロリジンで阻害され，阻害の程度は赤血球膜 Na, K-ATPase に対する阻害に見合うものであった．

以上の結果，Na, K-ATPase および陽イオン輸送に対してフロリジンは膜の内側でのみ作用することが示唆された．これは糖輸送に対し膜の内外で同じ阻害効果を示すフロリジンの作用とは異なっていた．

謝　辞

本研究にあたり御指導，御助言をいただきました東京医科歯科大学医学部中尾　真教授，および保存血の入手

に御協力をいただきました東京医科歯科大学臨床検査室佐野喜代子博士に深く感謝の意を表します.

文　献

1) Kimmich, G. A. : *Biochem.*, 9, 3659, 1970
2) Kimmich, G. A. : *Biochem.*, 9, 3669, 1970
3) Rendi, R. and M. L. Uhr : *Biochim. Biophys. Acta.*, 89, 520, 1964
4) Fujita, M., T. Nakao, Y. Tashima, N. Mizuno, K. Nagano, and M. Nakao : *Biochim. Biophys. Acta*, 117, 42, 1966
5) Robinson, J. D. : *Mol. Pharmacol.*, 5, 584, 1969
6) Dodge, T. M., C. Mitchell, and D. J. Hanahan : *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963
7) Nakao, T., K. Nagano, K. Adachi, and M. Nakao : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 444, 1963
8) Fiske, C. H. and Y. H. Subbarrow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
9) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and B. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
10) Whittam, R. : *Biochem. J.*, 84, 110, 1962
11) 中川敦子：お茶の水医学雑誌, 22, 23, 1974
12) Stirling, C. E. : *J. Cell. Biol.*, 35, 605, 1967
13) Lepke, S. and H. Passow : *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 529, 1973
14) Beneš, I., J. Kolínská, and A. Kotyk : *J. Memb. Biol.*, 8, 303, 1972
15) Schatzmann, H. J. : *Exper.*, 20, 551, 1964
16) Macey, R. I. and R. E. L. Farmer : *Biochim. Biophys. Acta*, 211, 104, 1970
17) Wieth, J. O., J. Funder, R. B. Gunn, and J. Brahn : *in Comparative Biochemistry and Physiology of Transport*, 317, 1974, North-Holland Publishing
18) Jarret, L. and R. M. Smith : *J. Biol. Chem.* 249, 5195, 1974
19) Glossmann, H. and D. M. Neville. : *J. Biol. Chem.*, 247, 7779, 1972
20) Kahlenberg, A : *J. Biol. Chem.*, 251, 1582, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 171-175, 1976

黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）の雄ラット性腺および副腎におよぼす影響

大石 真之*

Effect of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone on Gonad and Adrenal of Male Rats

SHINSHI OISHI*

下垂体ゴナドトロピンの分泌が，視床下部神経細胞から分泌される放出ホルモンによって支配されていることは，既に明白な事実として認められている．放出ホルモンは視床下部の中央隆起で下垂体門脈系に入り，下垂体細胞に達して下垂体ホルモンの放出を促進することもよく知られている．

視床下部の神経細胞で作られる黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)を分離する試みは，かなり以前から行われていたが，その含量が少ないため非常に困難であった．1971年 Shally ら[1,2] はブタ視床下部より LH-RH の精製に成功し，次いでMatsuoら[3]により化学構造の決定がなされた．その構造は (Pyro)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 である．さらに化学合成がアメリカ，日本，ドイツ，フランスなどで行われ[4,5]，それとともにLH-RHの生理的，臨床的研究が行われている．またLH-RHは下垂体機能や性腺系機能の検査に臨床的応用も行われているが[6]，LH-RHを一定期間投与しつづけた場合の影響についてはほとんど知られていない．特に臨床応用面では雌性性腺系に対する研究が主であり，雄性性腺系に対する研究はほとんどない．そこで今回雄ラットを用いて，LH-RH の内分泌系におよぼす影響について実験を行った．

実験材料および実験方法

実験動物 実験にはWistar-Imamichi系雄ラットおよびWistar-JCL 系雄ラット（日本クレア）を用い，屠殺時に12週令になるようにした．飼料摂取および飲水は自由に行わせた．

試薬 実験に用いた合成LH-RH は第一製薬株式会社より提供されたものを，また人絨毛性ゴナドトロピン(HCG)は帝国臓器ゴナトロピンを使用した．抽出に使用したジクロルメタンは，硫酸洗浄，水洗，脱水し，2回蒸溜し，使用直前さらに1回蒸溜したものを用いた．硫酸は和光純薬精密分析級，標準ステロイドは Sigma Chemical Co. を用いた．デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)-7α-^{3}H (20.8 Ci/mmole) は New England Nuclear Corp. を薄層クロマトグラフィ (TLC) で精製（ベンゼン：酢酸エステル＝2：1）を行った後使用した．POPOP〔1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene〕およびPPO (2,5-di-phenyloxazole) は Packard Instrument Co. またペントバルビタール（ネンブタール）は Abott Lab. を用いた．その他の試薬はすべて和光純薬精密分析級あるいは特級を使用した．

投与方法 以下投与に用いたLH-RH およびHCGはすべて生理食塩水に溶解し，対照群は生理食塩水のみを投与した．動物数は1群5—10匹を使用した．

1. ラットに LH-RH 200μg/kg を1回腹腔より投与し，0分，3分，6分，10分，15分，30分，60分後にネンブタール麻酔下に睾丸静脈血を採取した後に睾丸重量を測定し，血漿および睾丸についてはテストステロン測定時まで−80°に保存した．

2. LH-RH 2μg/kg，20μg/kg，200μg/kg を腹腔より投与し，投与1時間後および24時間後にネンブタール麻酔下に睾丸静脈血を採血した後，睾丸および前立腺重量を測定し，睾丸および血漿はテストステロン測定時まで−80°に保存した．

3. 2とまったく同様にLH-RHを投与した動物を1時間後および24時間後にネンブタール麻酔下副腎静脈血を採血し血漿はコルチコステロンおよび11-deoxy 17ケ

* 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

トステロイド(11-deoxy 17KS) 測定時まで−80°に保存した.

4. LH-RH 2μg/kg/day, 20μg/kg/day, 200μg/kg/day を1日1回7日間または14日間連続投与し，最終投与の24時間後に睾丸静脈血を採血し，睾丸，前立腺重量を測定し，血漿および睾丸は−80°に保存した.

5. 4と同様にLH-RHを投与し最終投与の24時間後に副腎静脈血を採血した. 血漿はホルモン測定時まで−80°に保存した.

6. HCG 10 I.U./rat/dayあるいは1000 I.U./rat/day を1日1回10日間連続投与し，最終投与の24時間後に睾丸静脈血を採血し，睾丸，前立腺，精嚢重量を秤量し，血漿および睾丸はホルモン測定時まで−80° に保存した.

睾丸静脈血の採血は大沢ら[7] の方法に従い，副腎静脈血の採血は Lipscomb and Nelson[8] の方法に従った.

測定法 睾丸中および睾丸静脈血漿中のテストステロンの測定はジクロルメタン抽出しアルカリ洗浄後 TLC により精製し赤色螢光法[9] により行った.

副腎静脈血中コルチコステロンの測定はジクロルメタン抽出し螢光法[10]で行った.

副腎静脈血漿中非抱合型11-deoxy 17KSはジクロルメタン抽出し Radioimmunoassay を行った. Radioimmunoassay用の抗 DHEA-3-BSA 抗血清は関原ら[11]により作製されたものを使用した. Assay 法はチャートに示した.

1. 10μl of plasma diluted with water to 2ml and extracted with 10ml of CH_2Cl_2
2. Evaporated to dryness under N_2
3. Dissolved in 1ml of CH_3OH
4. 0.5ml of CH_3OH solution transferred to assay tube and evaporated
5. 0.3ml of antiserum solution containing ^{3}H-DHEA, BSA, and bovine gamma-globulin
6. Incubated at 37°C for 30min.
7. Salting out with 0.3ml of saturated $(NH_4)_2SO_4$
8. 0.3ml of supernatant taken into counting vial
9. Bray's scintillator added and counted

チャート1. 血漿非抱合型11deoxy 17KS の radioimmunoassay 法

結　果

1. DHEA を標準物質とした時の非抱合型 11-deoxy 17KSの標準曲線を図1に示した. 本測定法の Precision

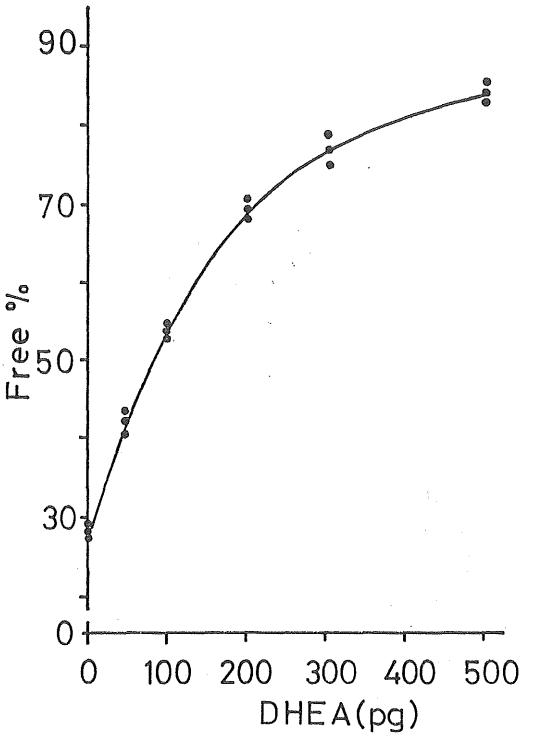


図 1. 11deoxy 17KS測定用標準曲線(DHEA当量)
抗 11deoxy 17KS-3-BSA 抗血清 5000倍稀釈

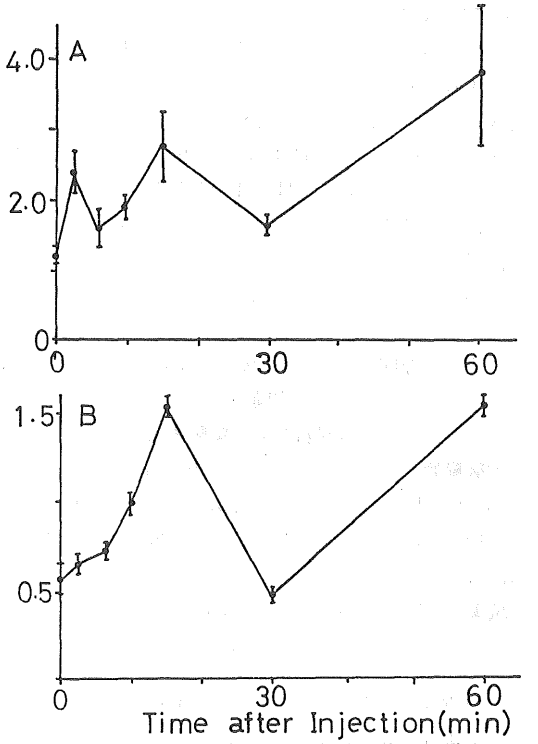


図 2. LH-RH200μg/kg 1回投与後の睾丸組織中および睾丸静脈血漿中テストステロン濃度の変化

は変動係数にして 13.5, Accuracy は 114% であった. DHEAを標準物質とした場合, 抗 DHEA-3-BSA 抗血清5000倍稀釈で0-500pgの範囲で測定可能であった.

2. LH-RH 200μg/kg 1回投与後の睾丸組織中および睾丸静脈血漿中テストステロン濃度の経時的変化を図2に示した. 睾丸静脈血漿中テストステロン濃度はLH-RH 投与後ただちに増加を始め, 15分で極大に達し, 30分後に一過性の減少がみられ再び増加した. 睾丸組織中のテストステロン濃度も睾丸静脈血漿中濃度とほぼ同様な変化を示した.

3. LH-RH 連続投与時の雄ラットの体重, 睾丸および前立腺重量におよぼす影響については表1, 表2および表3に示した. 体重, 睾丸重量, 前立腺重量のいずれも14日連続投与後も対照群と有意な差は認められなかった.

表 1. LH-RHの雄ラット体重におよぼす影響(g)

投与量 (μg/kg)	1時間	24時間	7日間	14日間
0	466±22	456±22	442±29	451±9.9
2	450±26	428±12	432±39	429±30
20	450±81	414±43	458±51	437±29
200	454±23	423±30	467±25	462±21

動物数 4-5 匹の平均±標準誤差

表 2. LH-RHのラット睾丸重量におよぼす影響(g)

投与量 (μg/kg)	1時間	24時間	7日間	14日間
0	3.04±0.27	2.89±0.23	2.94±0.30	2.84±0.09
2	2.78±0.10	3.07±0.09	2.85±0.36	2.99±0.20
20	2.88±0.31	2.92±0.16	3.11±0.24	3.10±0.25
200	3.09±0.24	2.90±0.17	2.98±0.15	2.98±0.25

動物数 5 匹の平均±標準誤差 (両側重量)

表 3. LH-RHのラット前立腺重量におよぼす影響(g)

投与量 (μg/kg)	1時間	24時間	7日間	14日間
0	0.687±0.112	0.479±0.316	0.526±0.229	0.596±0.172
2	0.625±0.160	0.496±0.089	0.617±0.087	0.440±0.060
20	0.609±0.276	0.392±0.139	0.647±0.080	0.634±0.115
200	0.790±0.138	0.547±0.169	0.693±0.115	0.547±0.122

動物数 5 匹の平均±標準誤差

4. LH-RH 連続投与時のラット睾丸静脈血漿中テストステロン濃度の変化を表4に示した. 睾丸静脈血漿中テストステロン濃度は1日, 7日連続, 14日連続のいずれもLH-RH 投与により減少傾向がみられた.

表 4. LH-RHのラット睾丸静脈血漿中テストステロン濃度におよぼす影響(μg/ml)

投与量 (μg/kg)	24時間	7日間	14日間
0	1.11±0.46	0.99±0.42	0.77±0.53
2	0.76±0.23	0.75±0.21	0.59±0.55
20	0.88±0.24	0.65±0.12	0.80±0.40
200	0.68±0.40	0.57±0.24	0.31±0.12*

動物数 4-5 匹の平均±標準誤差 *$p<0.05$

5. 睾丸組織中テストステロン濃度の変化を表5に示した. 睾丸組織中テストステロン濃度は, LH-RH 投与1時間で各投与群とも増加がみられたが, 1日後, 7日および14日連続投与後では逆に高い投与群で減少が認められた.

表 5. LH-RHの睾丸組織中テストステロン濃度におよぼす影響 (μg/g)

投与量 (μg/kg)	1時間	24時間	7日間	14日間
0	1.28±0.99	1.56±0.35	1.84±0.36	2.13±0.30
2	3.02±2.06	1.35±0.58	1.49±0.55	1.52±0.18
20	2.82±2.10	1.25±0.39	1.97±0.49	2.42±0.47
200	4.31±1.92*	0.90±0.36*	1.18±0.14**	0.91±0.27*

動物数 4-5 匹の平均±標準誤差
*$p<0.05$, **$p<0.01$

6. 副腎静脈血漿中コルチコステロン濃度を表6に示した. コルチコステロン濃度は変動が大きく有意な差は認められなかった.

表 6. LH-RHのラット副腎静脈血漿中コルチコステロン濃度におよぼす影響 (μg/dl)

投与量(μg/kg)	1時間	7日間	14日間
0	86±77	447±292	203±271
2	172±179	333±138	425±372
20	155±81	426±260	381±217
200	365±321	414±211	274±232

動物数 2-5 匹 平均±標準誤差

7. 副腎静脈血漿中非抱合型11-deoxy 17KS濃度を表7に示した. 非抱合型11-deoxy 17KSは7日連続投与後に有意な上昇がみられた.

表 7. LH-RHの副腎静脈血漿中非抱合型 11-deoxy 17KS濃度におよぼす影響(DHEA eq. μg/dl)

投与量	1時間	24時間	7日間
0	0.98±0.21	0.92±0.27	0.79±0.38
2	0.94±0.36	0.54±0.25	0.94±0.23
20	1.14±0.38	0.99±0.45	1.20±0.28
200	0.94±0.26	0.81±0.33	1.49±0.41*

動物数4-5匹の平均±標準誤差, *p<0.05

8. HCG 連続投与時の体重, 前立腺, 精嚢および睾丸重量を表8に示した. HCG 投与により睾丸重量の減少と前立腺および精嚢重量の増加が観察された.

表 8. HCG のラット体重および副性器重量におよぼす影響 (g)

投与量 (I.U.)	体重	睾丸	精嚢	前立腺
0	324±5.7	3.43±0.05	0.67±0.03	0.55±0.03
10	318±4.4	3.00±0.14*	1.69±0.07**	0.92±0.03**
1000	313±4.2	2.58±0.20**	1.67±0.10**	0.81±0.04**

動物数10匹の平均±標準誤差
*p<0.01, **p<0.001

9. HCG 連続投与時の睾丸静脈血漿中テストステロン濃度を表9に示した. HCG 投与により睾丸静脈血中テストステロン濃度に上昇が認められた.

表 9. HCG のラット睾丸静脈血中テストステロン濃度におよぼす影響

投与量(I.U.)	テストステロン濃度(μg/ml)
0	0.31±0.09
10	0.87±0.17*
1000	1.43±0.19**

動物数8-10匹の平均±標準誤差
*p<0.01, **p<0.001

考　察

LH-RH 1回投与後の睾丸静脈血漿中および睾丸組織中テストステロン濃度の経時的変化は, 投与後ただちに上昇しはじめ, その分泌パターンは2相性を示している. LH-RH 投与後における雄ラット睾丸静脈血中あるいは睾丸組織中のテストステロン分泌の経時的変化についてはほとんど報告がないが, 大石ら[12]は HCG あるいは LH を雄ラットに投与した際に分泌されるテストステロンが2相性を示し, 合成パターンもまた2相性であることを認めている. さらに大沢ら[7]は LH をマウスに投与した際に, 睾丸組織中のテストステロン濃度がやはり2相性を示すことを報告している. これら視床下部ホルモンあるいは下垂体ホルモンにより刺激され分泌される性ステロイドホルモンが2相性の合成分泌パターンを示す機構については, グルコース刺激時にみられるインスリン分泌の2相性パターンとは異なり, 第1のピークも第2のピークもともにテストステロンの新規合成によるものとする大石ら[12]の仮説が発表されているもののまだ不明である.

LH-RH を14日間 200μg/kg まで連続投与した場合, 睾丸および前立腺重量の増加は認められなかったが, 睾丸静脈血漿中および睾丸組織中テストステロン濃度の減少傾向が認められた. 矢内原ら[13]は幼若ラットに LH-RH を連続投与した際にテストステロン濃度の減少と副性器重量の減少を報告している.

HCG を連続投与した場合, 前立腺および精嚢重量の増加と睾丸重量の減少, 睾丸静脈血漿中テストステロン濃度の増加がみられることより, LH-RH 投与による睾丸からのテストステロン分泌の減少をきたす機構は, LH-RH により分泌された LH の睾丸に対する作用よりもむしろ LH-RH が直接視床下部あるいは下垂体に LH 分泌低下[14]等何らかの影響を与え, その機能低下を起こさせた可能性が示唆される.

LH-RH の副腎皮質ホルモンに与える影響については, 11-deoxy 17KS が7日間連続投与群で増加傾向が認められた. Bardin および Peterson[15] は雄ラットを去勢後1週間で副腎静脈血中にアンドロゲンの増加を認めたことを報告しており, LH-RH を連続投与した際, 睾丸テストステロンの減少を生じさせると同時に副腎11-deoxy 11KS の増加がみられたことは多くの示唆を含むものと考えられる.

大石ら[16]によれば, ラット末梢血中の11-deoxy 17KS は副腎静脈血漿中の濃度の 1/5-1/10 であり, 又 Lipscomb-Nelson 法によるデキサメサゾン抑制ラットにおいてACTH 刺激を行うと, 副腎11-deoxy 17KS とコルチコステロンの分泌増加を認め, さらに副腎 11-deoxy 17KS は主に Δ^4-アンドロステンジオンであることを報告している. LH-RH 刺激により増加した11-deoxy 17KS も主に副腎由来であり, その大部分は Δ^4-アンドロステンジオンと考えられる.

今回の実験結果より, LH-RH を連続投与した際には LH-RH が LH を分泌しさらにテストステロン分泌を増加させる本来の性質とは逆に, テストステロン分泌の減少作用を生じることが示唆されており, その臨床応用に

は多大の注意が必要であろう.

要　旨

雄ラットに合成LH-RHを1回投与した際の睾丸より分泌されるテストステロン濃度の経時的変化ならびに14日間まで連続投与した際の性腺および副腎機能に与える影響について検討を行った. 1回投与後のテストステロン濃度の経時的変化は2相性の分泌パターンを示した. また14日間までの連続投与では, テストステロン分泌の減少傾向がみられ, 副腎より分泌される非抱合型 11-deoxy 17KSの増加が認められた.

謝辞 本研究を行うにあたり終始指導を賜った東京大学医学部第三内科大沢仲昭博士に謹んで感謝の意を表する. 本実験に多大の協力援助をいただいた実験動物中央研究所内分泌研究室の諸氏, 抗 DHEA-3-BSA 抗血清の提供を受けた東京大学医学部第3内科関原久彦博士に感謝する.

(本研究の概要は第46回日本内分泌学会総会1973年4月で発表した.)

文　献

1) Matsuo, H., Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arima, and A. V. Schally : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 43, 1334, 1971
2) Baba, Y., H. Matsuo, and A. V. Schally : *ibid.*, 44, 459, 1971
3) Matsuo, H., A. Arima, R. M. G. Nair, and A. V. Schally : *ibid.*, 45, 822, 1971
4) Kimura, T., Y. Kishida, T. Kusama, and S. Sakaibara : Proc. 9th Symp. Peptide Chem. 90, -1972
5) Geiger, R., W. Konig, H. Wissman, K. Geisen, and F. Enzmann : *Biochem. Biophys.* Res. *Comm.*, 45, 767, 1971
6) 斎藤幹, 熊坂高弘：ホルモンと臨床, 秋季増刊号, 25, 1975
7) 大沢仲昭：日内分泌誌, 46, 645, 1970
8) Lipscomb, H. S., and D. H. Nelson : *Endocrinology*, 71, 13, 1962
9) Ohsawa, N., K. Kageyama, and H. Ibayashi : *Excerpta Medica*, 210, 102, 1970
10) Guillemin, R., G. W. Clayton, H. S. Lipscomb, and J. D. Smith : *J. Lab. Clin. Med.*, 53, 830, 1959
11) Sekihara, H. and N. Ohsawa : *Steroids*, 23, 245, 1974
12) 大石真之, 影山喜世子, 大沢仲昭：日内分泌誌, 50, 146, 1974
13) 矢内原巧, 大島博幸：第23回日本内分泌学会東部部会総会, 1975, 9, 東京
14) 中川光二：第46回日本内分泌学会総会, 1974, 4, 京都
15) Bardin, C. W. and R. E. Peterson : *Endocrinology*, 80, 38, 1967
16) 大石真之, 影山喜世子, 大沢仲昭：日内分泌誌, 49, 385, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 176-178, 1976

ラット血清アルカリフォスファターゼとその臓器由来について 1) 仔牛小腸アルカリフォスファターゼ抗体の調製と仔牛小腸およびラット小腸アルカリフォスファターゼに対する作用

樺島順一郎*, 中尾順子*

Tissue Source of Rat Serum Alkaline Phosphatase 1. Effect of Calf Intestine Alkaline Phosphatase to Rat Intestine Alkaline Phosphatase Activity

JUNICHIRO KABASHIMA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

血清アルカリフォスファターゼは，臨床分析化学的な診断の重要な指標になるとされている．毒性研究においても，血清アルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた場合に，その由来臓器を検討することは，毒性発現の指標として重要な手段になると考えられる．

酵素を抗原とする抗原抗体反応は，酵素活性の低下として捕えることができる．このため酵素活性が容易に測定できる酵素では，その抗原抗体反応の有無が容易に判断できる．血清中に出現するアルカリフォスファターゼがいくつかの臓器から由来することは，すでに臨床化学的に知られている．骨や肺その他のガン組織から由来するものは，その診断に重要な役割を果たしている．

当部では，直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウムの毒性試験において，ラット血清中に小腸由来のものと思われるアルカリフォスファターゼのバンドが出現することを見出した．これを同定するため免疫学的方法を考え，まず手はじめに仔牛小腸アルカリフォスファターゼ標品を抗原として，ウサギによる抗体を調製した．この抗体を用いて，免疫反応が特異性の高いものか否かをラット臓器のアルカリフォスファターゼと反応させてしらべた．

実験材料および方法

1. 抗体の調製　抗原（仔牛小腸アルカリフォスファターゼ，Boehringer製）1 mg/ml とFreundの完全アジュバンドを等量混合し，混合液100μlをウサギ（白色在来種）の背部皮下に注射し，以後3週間に1回の割で3回抗原のみを50μl注射した．最後の投与から8日目に採血（約10ml）した．採血後再び免疫し8日後に再び採血した．その後，動物は約3週間そのまま飼育して免疫し，8日目採血，再度免疫，8日後採血をくり返した．採血後，血液は室温で30分以上放置し，3,000 rpm で10分間遠心し，分離した血清を約4°の低温室で，飽和硫酸アンモニウム溶液（アンモニアでpH 7.0に調整）を等量，徐々に加えて塩析法によりグロブリンを析出させ，10,000 rpm で10分間遠心して沈殿を得た．この沈殿に0.9%食塩水を血清時の容量の1/2～1/4量加えて溶かし，ビスキングセルロースチューブ中で0.9%食塩水に対して一夜透析を行なった[2]．透析液を抗体として使用した．タンパク量の測定はLowry法を用いた[3]．

2. 酵素の調製　ラット小腸を摘出し，0.05Mバルビタール緩衝液pH8.6中でホモジナイズし，同量のn-ブタノールを加えて抽出後，37°で30分間インキュベーションし，10,000rpmで60分間遠心分離し，水層をビスキングセルロースチューブ中で緩衝液に対して一夜透析を行ない，さらに透析液を3,000rpmで遠心分離し，ろ紙を用いてろ過した液を酵素として使用した[4]．

ラットの肝臓，腎臓，脾臓，骨（後肢）についても同様の方法で酵素の調製を行なった．

3. 酵素活性の測定　酵素液の一定量と抗体を混合し，これに0.9%食塩水を加えて，液量を一定にし，37°で10分間インキュベーションしたものを酵素液として使用し

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　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. 仔牛小腸アルカリフォスファターゼ抗体の仔牛小腸およびラットアルカリフォスファターゼアイソザイムに対する影響

グロブリン(μg)		仔牛小腸		ラット小腸		ラット肝臓		ラット骨(後肢)		ラット腎臓		ラット脾臓	
C-γG	A-γG	T. P.	%*	T. P.	%*	T. P.	%*	T. P.	%*	T. P.	%*	T. P.	%*
11.4	0.0	11.4	100.0	12.7	113.1	573.1	99.0	17.6	107.9	15.4	97.5	104.4	100.4
22.8	0.0	22.8	99.5	24.1	116.0	584.5	105.0	29.0	108.9	26.8	102.1	115.8	100.2
68.5	0.0	68.5	99.8	69.8	118.8	630.2	102.4	74.7	110.8	72.5	102.3	161.5	100.4
228.4	0.0	228.4	102.2	229.7	113.8	790.1	98.8	234.6	113.3	232.4	102.5	321.4	99.5
685.1	0.0	685.1	100.0	686.4	118.1	1246.8	93.8	691.3	117.2	689.1	101.7	778.1	97.5
0.0	10.9	10.9	45.6	12.2	109.6	572.6	100.5	17.1	112.3	14.9	103.8	103.9	100.2
0.0	21.8	21.8	43.4	23.1	114.9	583.5	104.8	28.0	110.3	25.8	100.6	114.8	97.7
0.0	65.5	65.5	38.8	66.8	117.7	627.2	99.5	71.7	103.9	69.5	101.9	158.5	97.1
0.0	218.4	218.4	34.2	219.7	119.1	780.1	98.6	224.6	101.5	222.4	100.8	311.4	95.0
0.0	655.3	655.3	28.2	656.6	126.6	1217.0	93.1	661.5	95.6	659.3	88.0	748.3	81.1
0.0	0.0	0.0	100.0	1.3	100.0	561.7	100.0	6.2	100.0	4.0	100.0	93.0	100.0

*：グロブリン無添加アルカリフォスファターゼに対する比活性(%)
C-γG：対照ウサギ血清グロブリン
A-γG：抗原投与ウサギ血清グロブリン
T. P.：総タンパク量 (μg/Tube)

た．基質はp-ニトロフェニルリン酸2ナトリウムを，50 mMグリシン緩衝液pH10.0（1 mM硫酸マグネシウムを含む）に溶かし，25 mM 溶液として，37°に加温した溶液1.5 ml を使用した．37°で15分間インキュベーションし，10%トリクロル酢酸溶液0.75 ml を加え反応を停止した後，ただちに，3,000 rpm で10分間遠心し，上清を2 ml 分取し，これに 0.5 ml の4 N 水酸化ナトリウム溶液を加えたものを，ギルフォード300N 分光光度計により 410nm での吸光度を測定した．

結果および考察

仔牛小腸アルカリフォスファターゼに対する，抗原投与ウサギ血清グロブリン(以下A-γGと記す）の影響は表に示たように，対照ウサギ血清グロブリン（以下 C-γGと記す）と混合したものでは，グロブリンを加えなかったものと比較して差はみられないが，A-γG を加えたものでは，明らかに活性の低下が認められ，また血清グロブリン量の増加によって活性の低下が増大している．このことは，仔牛小腸アルカリフォスファターゼに対する抗体の産生がなされている可能性を示している．

ラット小腸アルカリフォスファターゼに対する，ウサギ血清グロブリンの影響は，C-γGおよびA-γGのいずれの血清グロブリンとの混合液についても酵素活性の低下は認められず，両者の間の差が認められない．また他の臓器由来のアルカリフォスファターゼアイソザイムに対しても，C-γGを加えたものおよびA-γGを加えたものの間に差は認められなかった．

これらのことから，仔牛小腸アルカリフォスファターゼを抗原として投与したウサギの血清グロブリン分画に含まれる，アルカリフォスファターゼ阻害物質は，仔牛小腸アルカリフォスファターゼに対する抗体であり，この抗体は，ラットのアルカリフォスファターゼアイソザイムに対しては，抗体として作用しなかったことを示している．これは，アルカリフォスファターゼが生物界に広く分布している酵素ではあるが，種特異性はかなり高いことを示している．

基質として用いたニトロフェニルリン酸2ナトリウムは，トリクロル酢酸で極めて不安定であることが判明した．このため，トリクロル酢酸を加えた後，ただちに冷却，遠心し，水酸化ナトリウムを加えて液性をアルカリ性にする必要がある．

今後の課題として，上記方法を用いて，ラット各種臓器由来のアルカリフォスファターゼに対する抗体を調製し，各アイソザイムの同定を試み，免疫拡散法による定性的および定量的な関係を検討し，毒性発現の機序を血清アルカリフォスファターゼの由来臓器を明らかにすることによって解明したい．

結　語

ラット小腸および各種臓器アルカリフォスファターゼに対して，抗仔牛小腸アルカリフォスファターゼウサギ血清グロブリン分画はまったく阻害を示さなかった．

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) Clausen, J.：生化学実験法 3. 免疫学的同定法（佐々木實，村地　孝　訳），98，1973，東京化学同人，東京

3) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and B. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951

4) 米山允子，中尾順子：東京衛研年報，26-2，62，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*. 27-2, 179-184, 1976

ラット肝臓の薬物代謝酵素の活性測定法についての検討

川野 澄江*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Investigation for the *In Vitro* Assay Conditions of Rat Hepatic Drug Metabolizing Enzymes

SUMIE KAWANO*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

肝ミクロソームに局在する薬物代謝酵素は，種々の化合物の水酸化，N-脱アルキル化，O-脱アルキル化，脱アミノ化，イオウの酸化，アゾ基やニトロ基の還元等，きわめて多岐にわたった反応を触媒する，基質特異性のきわめて低い酵素であり[1]，また，その酵素の活性は，ホルモン，医薬品，農薬，食品添加物，発ガン性物質等，200種以上の化合物によって誘導される[2]ことが明らかにされている．近年，生体内で代謝をうけた化合物が，発ガン性，変異原性，細胞え死，メトヘモグロビン血症等の直接の原因物質である例が多数報告されるようになっており[1,3]，環境中における種々の化合物による酵素誘導は，毒性と深いかかわりあいをもっていると考えられる．われわれは，このような方向に沿った研究に着手したが，この酵素がミクロソームの膜に存在して電子伝達系と複雑に共役している，可溶化の非常に困難な酵素であること，また種々の化合物を基質として用いる基質特異性の低い酵素であることを考慮すると，*in vitro* における活性の変化を調べようとする場合，まずはじめに，個々の基質についての反応条件を厳密に検討する必要がある．本報告では，*p*-ニトロアニソール，アミノピリン，アニリンを基質として用いたときの活性の測定法についての検討を行い，ほぼ満足するに足る反応条件を決めることができた．

実験材料および方法

1. 実験動物および試薬 動物は Wistar-JCL系成熟雄ラットを用いた．ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド・フォスフェート（NADP）は，オリエンタル酵母株式会社，グルコース-6-リン酸（G-6-P）およびG-6-P デヒドロゲナーゼは，Sigma Chemical Co. の製品を使用した．基質として用いたアミノピリン（AP）は，三晃製薬工業株式会社の局方品，アニリンおよび*p*-ニトロアニソール（*p*-NA）は和光純薬工業株式会社の製品である．

2. 肝ミクロソーム分画の調製 動物は断頭によって屠殺し，摘出した肝臓を3倍容の1.15%塩化カリ溶液とともにホモジナイズした．10,000gで20分遠沈した上清を Beckman Model L3-50 型超遠心機を用いて 105,000 g でさらに60分間遠沈を行った．生じたペレットを1.15%塩化カリ溶液にけん濁させ，もう一度 105,000g で60分間遠沈した．ペレットを5倍容の1.15%塩化カリ溶液にけん濁させ，軽くホモジナイズしたのち，−80° で凍結保存し，活性の測定に供した．

3. 薬物代謝酵素の活性の測定法 標準的な反応溶液の組成は，NADP 0.8mM, G-6-P 4mM, G-6-P デヒドロゲナーゼ 0.2 U/m*l*, ニコチンアミド 5mM, 塩化マグネシウム 5mM, リン酸緩衝液（pH 7.4）56mM, ミクロソーム分画（反応溶液 1m*l* 中に肝臓 80mg に相当するミクロソーム分画を含む）および基質からなり，全容量は 1.25m*l* とした．基質の濃度は，*p*-NA 1.2mM, AP 4mM, アニリン 0.5mM とした．

反応容器は，直径 26mm の広口ビンと 10m*l* の先細遠心管とを比較しても差がなかったため，後者を使用した．また，酸素気相下と空気相下とを比較しても差がなかったため，後者で測定を行った．

基質を除いた反応溶液は，37° で正確に5分間加温後，アセトンに溶かした基質を AP の場合は 10μl，他の基質の場合は 5μl 添加し，10分間振とうして反応を行わせたのち，10%トリクロル酢酸（TCA）を 1.25m*l* 加えて反応を停止させた．2,800 r.p.m. で15分間遠沈した上清を用いて反応生成物の定量を行った．

* 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

p-NA デメチラーゼ活性の測定は，Kato and Gillette (1965)[4] の方法によって行った．TCA 沈澱上清 2m*l* に 1N NaOH 0.67m*l* を加えてアルカリ性にし，生成物 *p*-ニトロフェノールの 410nm における吸光度を測定した．AP デメチラーゼ活性の測定は，生成物ホルムアルデヒドを定量する Cohin and Axelrod (1959)[5] の方法（硫酸亜鉛沈澱法を TCA 沈澱法に変更）を用いて行った．TCA 沈澱 2m*l* に Nash 試薬B(1*l* 中に酢酸アンモニウム 150g，酢酸 3m*l* アセチルアセトン 2m*l* を含む) 2m*l* を混和し，60° で30分間反応を行わせたのち，415nm の吸光度の測定を行った．アニリン・ヒドロキシラーゼの活性の測定は，生成物 *p*-アミノフェノールを定量する Schenkman (1967)[6] の方法によって行った．TCA沈澱上清 2m*l* に 2M炭酸ナトリウム溶液 0.5m*l* と 3％フェノールを含む 1N 水酸化ナトリウム溶液 0.5m*l* を添加し，室温で30分以上放置したのち，620nm における吸光度の測定を行った．

実 験 結 果

Fig. 1 に *p*-NA，AP，およびアニリンを基質として用いたときの薬物代謝酵素の活性の経時変化を示した．アニリン・ヒドロキシラーゼ活性の場合には，20分までかなり直線に近い関係が認められたが，*p*-NA および AP デメチラーゼ活性の場合には，5分ですでに直線性からの離反が認められた．

薬物代謝酵素の活性が *in vitro* の反応条件下できわめて不活性化しやすいことが明らかになったため，この不活性化がミクロソーム標品および緩衝液中の不純物によるのか，それとも NADPH 生成系との接触によるのかを明らかにするため，ミクロソーム分画と緩衝液のみを 37° で 5—60分インキュベートした後，基質と NADPH 生成系を加えて 10分間反応を行わせたときの AP デメチラーゼ活性と，基質のみを除いた反応系を 5—65 分インキュベートした後，基質を加えて10分間反応を行わせたときの活性とを比較した．その結果を Fig. 2 に示したが，ミクロソーム標品のみを 37° でインキュベートしても活性の低下はごくわずかで，60分後でも78％の活性が残存していた．一方，NADPH 生成系とともにインキュベートしたときには，非常に速やかに活性の低下が起り，65分では活性はほとんど認められなかった．

このような酵素の不活性化が NADPH 生成系中の金属イオンによって起っている可能性が考えられたため，0.5mM の EDTA を添加してプレインキュベートしたときの AP デメチラーゼおよびアニリン・ヒドロキシラ

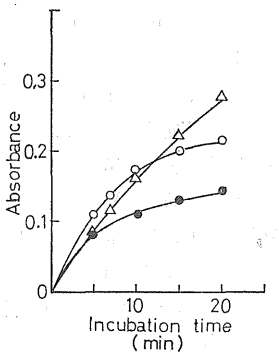


Fig. 1. Metabolism of *p*-nitroanisole, aminopyrine and aniline by rat liver microsomal fraction in relation to time. *p*-nitroanisole (○); aminopyrine (●); aniline (△).

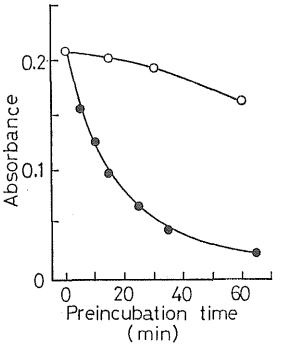


Fig. 2. Effect of aging of rat liver microsomes with (●) or without (○) NADPH-generating system on the rate of aminopyrine demethylation.

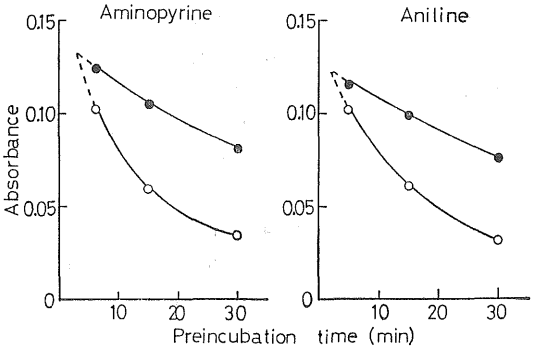


Fig. 3. Effect of aging of rat liver microsomes with NADPH-generating system in the presence or absence of EDTA on the rate of aminopyrine demethylation and aniline hydroxylation
left, aminopyrine demethylase.
right, aniline hydroxylase.
○, EDTA 0mM; ●, EDTA 0.5mM.

ーゼの活性を Fig. 3 に示した．このように EDTA の添加によって酵素の失活が相当軽減されることが明らかになった．また，図示しなかったが EDTA の効果は，0.25—1mM の濃度では差がなく，2mM ではやや減少することがわかった．

そこで，反応の経時変化への 0.5mM の EDTA の添加効果を検討した(Fig. 4)．*p*-NA デメチラーゼおよびアニリン・ヒドロキシラーゼの場合には，EDTA の添加は，経時変化曲線を直接に近づけたが，AP デメチラーゼの場合には，EDTA 添加時の方が高い吸光度を示しはするものの，両曲線の曲がり具合には変化がないようであった．このようにプレインキュベート中の酵素の失活が EDTA の添加によって相当軽減されるにもかかわらず，基質とインキュベートしたときの反応の経時変化曲線には必ずしも影響がない結果が得られた．この点については考察の中で詳しく述べることにするが，基質を添加しないで NADPH 生成系とインキュベートすると膜の破壊が起って酵素の失活が起るが，このような膜の破壊は基質の添加によっても防止されると言われ[7]，基質無添加の場合の失活は基質添加の場合の失活とは別の問題のようである．

EDTA の添加によって，プレインキュベート中の活性の低下が軽減され，基質によっては反応の経時変化曲線も直線に近づくことが明らかになったため，次に，基質濃度と活性との関係に関する EDTA の添加効果について検討を行った (Fig. 5)．EDTA 無添加時では，0.0625mM のアニリンを除いては，用いられた濃度範囲において 1/S と 1/v との間に直線関係が認められた．EDTA 添加時では，*p*-NA 2.4mM，アニリン 1mM では直線からはずれ，基質阻害があると考えられる．従って，*p*-NA 1.2mA，AP 4mM，アニリン 0.5mM の濃度は，基質阻害を起さない最高の濃度と考えられる．

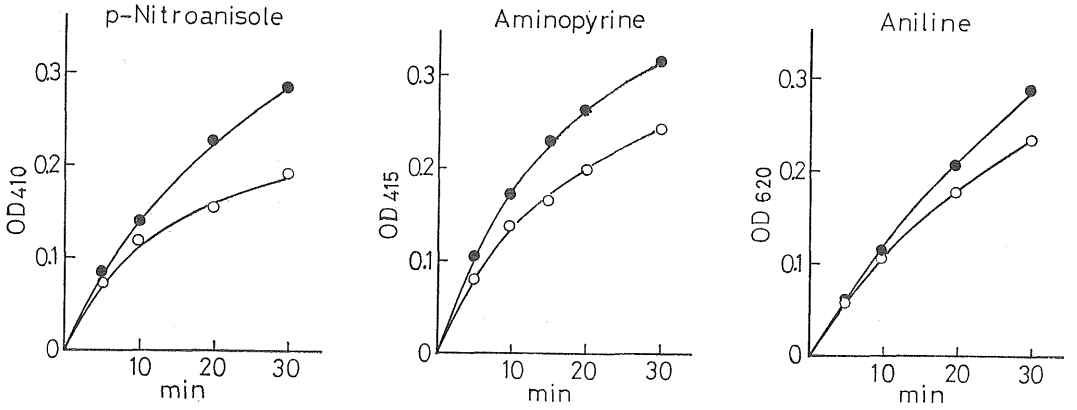


Fig. 4. Effect of EDTA on time course linearity of *p*-nitroanisole and aminopyrine demethylation and aniline hydroxylation by rat liver microsomal fraction.
○, EDTA 0mM; ●, EDTA 0.5mM.

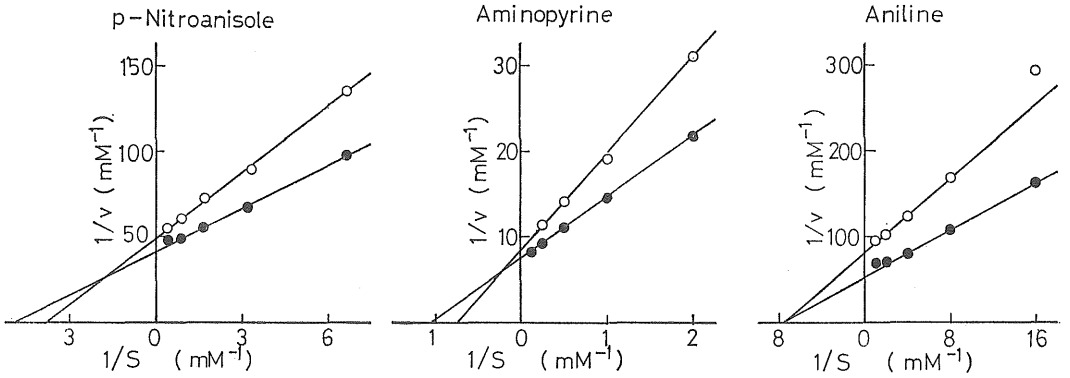


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots of *p*-nitroanisole and aminopyrine demethylation and aniline hydroxylation by rat liver microsomal fraction in the presence (●) or absence (○) of 0.5mM EDTA.

Table 1. Effects of EDTA on Km and VMAX values of *p*-nitroanisole, aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase.

	Concen. of microsomal protein (mg/ml)	V MAX formed metabolites for 10 min. (n moles/mg protein)		K m (mM)	
		−EDTA	+EDTA	−EDTA	+EDTA
p-Nitroanisole demethylase	2.75	7.38	8.91	0.258	0.206
	1.72	8.37	10.06	0.264	0.189
Aminopyrine demethylase	2.50	48.0	53.3	1.35	0.95
	1.56	52.2	59.6	1.44	1.02
Aniline hydroxylase	2.50	4.90	7.48	0.133	0.129

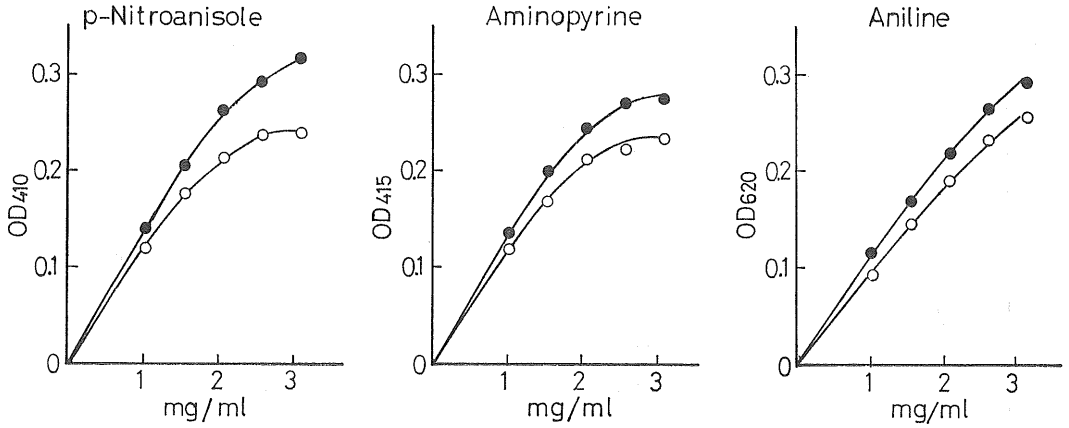


Fig. 6. Drug metabolizing activity as a funtion of microsomal protein concentration in the presence (●) or absence (○) of 0.5mM EDTA.

EDTA添加時および無添加時の最大反応速度，VMAXとミカエリス定数，Km値を Table 1に示した．アニリン・ヒドロキシラーゼの Km 値は EDTA の添加によって変化しなかったが，*p*-NA および AP のデメチラーゼ活性の Km 値は EDTA の添加によって減少し，基質と酵素との親和性が増加したと考えられる．また，反応の最大速度も，アニリン・ヒドロキシラーゼでは53%と大きく増加したが，デメチラーゼ活性の増加は10%程度にとどまった．

通常，活性を測定する場合，一定の肝重量に相当するミクロソーム分画について測定を行っているが，薬物による酵素誘導を考える場合，ミクロソームのタンパク量自体が増減することを考慮しなければならない．従って，測定に用いるタンパク量の範囲内において，タンパク量と活性との間に十分に直線関係があることが確かめられねばならない．通常，1ml の反応溶液中に 80mg の肝臓に相当するミクロソーム分画を含むような条件下で活性の測定を行うようにしてきたが，Fig. 6 の結果からタンパク濃度がそれ以上（ミクロソーム・タンパク量 2 mg/ml）になると直線から相当はずれてしまうことがわかった．従って，薬物投与によってミクロソーム・タンパク量が増加するような場合には，タンパク濃度のもう少し低いところで活性の測定を行った方がよいと思われる．

Fig. 7 に NADPH 生成系の各成分の濃度と AP デメチラーゼ活性との関係を図示したが，通常用いている濃度，NADP 0.8mM, G-6-P 4mM, G-6-P デヒドロゲナーゼ 0.2 U/ml, ニコチンアミド 5mM, 塩化マグネシウム 5mM は，至適条件に近いと考えられる．

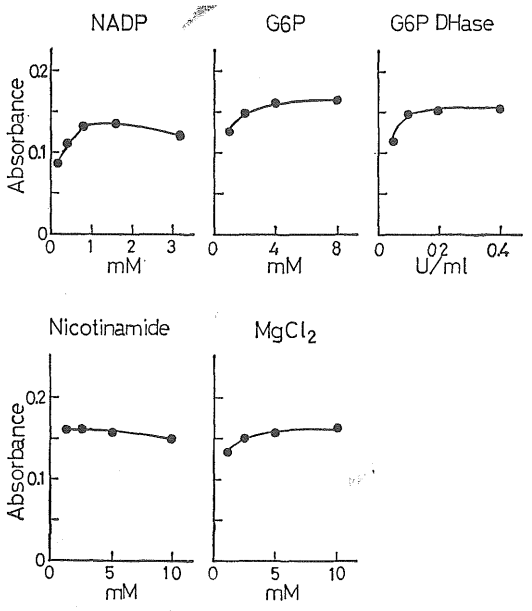


Fig. 7. Aminopyrine demethylating activity at various levels of each component of NADPH-generating system.

考　　察

肝臓のミクロソームの薬物代謝酵素の活性を *in vitro* で測定する場合の条件は，研究者によりかなり異なっており，アニリン・ヒドロキシラーゼのKm値が測定者により 14—200μM と非常に大きな差があるのも測定方法の違いに起因するものと思われる[8]．この酵素が膜に存在する可溶化の非常に困難な酵素であり，電子伝達系と複雑に共役しており，また，種々の基質を酸化，還元する基質特異性のきわめて低い酵素であることを考えると，反応条件の厳密な検討がなされないで薬物による酵素誘導が調べられても，その結果が意味のないものになる可能性が十分考えられる．Fouts[9] はフェノバルビタールを投与したラットのヘキソバルビタールの分解活性が上昇しない原因を検討する中で，よりよい反応条件を選んで測定を行うことにより，十分活性の上昇が起ることを確かめている．そこで，本報告では，*p*-NA，APおよびアニリンを基質としたときの反応の経時変化，タンパク濃度，基質濃度，NADPH 生成系の各成分の濃度等についての検討を行い，ほぼ満足するに足る反応条件を得た．

基質を添加せずに酵素標品と NADPH 生成系のみを混ぜてインキュベートしたとき，非常に速やかに酵素の失活が起る．その原因は，NADPH によって促進されたミクロソームの脂質の過酸化に伴う膜構造の破壊によると考えられる．Kamataki and Kitagawa[10] は，脂質の過酸化の阻害剤である EDTA，*o*-フェナンスロリン，*a*, *a*-ジピリジル，塩化コバルト，塩化マンガン等が薬物代謝酵素の不活性化も同時に防止することを確かめている．本実験でも 0.5mM の EDTA がプレインキュベート時の酵素の失活を相当軽減することを確認した．しかしながら，脂質の過酸化は，ある種の薬物代謝酵素の基質によっても抑えられ，AP の場合には特にその抑制効果が強いことが報告されている[7]．従って，基質を添加せずにインキュベートしたときに速やかな失活が起っている場合でも，添加後は必ずしも同じような速度で失活が続いているとは考えられない．反応の経時変化曲線の直線性に基質による差が大きく，脂質の過酸化をよく防止するAPを基質としたとき直線からの離反が最も大きいことを考えると，脂質の過酸化による膜構造の破壊による酵素の失活よりも，もっと特異性のある失活の機構を考えた方がよいのではないか．

Sasame and Gillette[11]は，ラットの肝臓のミクロソーム分画は NADPH ピロフォスファターゼ活性が非常に高く，この酵素によるNADPHの代謝産物がNADPH-チトクロームC・リダクターゼを強く阻害すると報告しており，NADPH の代謝物が AP デメチラーゼ活性を特異的に阻害している可能性も考えられる．Fig. 7 の結果からも，NADPH の濃度が高くなると活性の低下が起るようである．

Fig. 6 のミクロソーム・タンパク量と活性との関係は，タンパク量が 2mg/m*l* を超えると急に直線からはずれてくることを示している．Fouts もヘキソバルビタールの代謝速度の測定でタンパク濃度が重大な影響を及ぼすことを指摘している．通常 1m*l* 中に 80mg の肝臓に相当するミクロソーム分画を含むような条件下で活性を測定するようにしてきたが，この濃度は直線性を示す上限の濃度に近く，もう少し濃度の低いところで活性を測定した方がよいと考えられる．しかしながら，薬物代謝酵素は，一般に活性がかなり低いため，測定の感度から考えるとあまりタンパク量を下げることは難しい．タンパク量と活性との間にこのような微妙な関係があることから，薬物による酵素誘導の測定では，各投与群についてそれぞれタンパク量と活性との間の比例関係を確認することが必要になるかもしれない．

本報告では，主として EDTA の添加効果について検討した．Kamataki and Kitagawa[10] は，EDTA の添加によりエチルモルフィン・デメチラーゼの経時変化曲線が直線に近づくことを認めているが，Wills[17] は，AP

デメチラーゼ活性は EDTA 添加によってむしろ低下する結果を得ており，必ずしも一致がみられない．本実験の結果からみると，EDTA にはプレインキュベート中の酵素の失活を抑え，経時変化曲線を直線に近づけて活性を上昇させる効果があり，少なくとも，AP，*p*-NA およびアニリンを基質として用いた場合には反応系に添加した方がよいと考えられる．

要　約

ラット肝臓の *p*-NA，AP，アニリン代謝酵素の活性の測定法について検討した．NADPH 生成系の各成分の濃度は，NADP 0.8mM，G-6-P 4mM，G-6-P デヒドロゲナーゼ 0.2 U/m*l*，ニコチンアミド 5mM，塩化マグネシウム 5mM がほぼ適当である．基質濃度は，*p*-NA 1.2mM，アニリン 0.5mM，AP 4mM が適当で，前二者ではそれ以上の濃度では基質阻害が認められた．プレインキュベート中に酵素の失活が非常に速やかに起ることから，プレインキュベートの時間を正確にとることが重要である．ミクロソーム・タンパク量と活性との比例関係は，2mg タンパク/m*l* 以下ではほぼ認められるようだが，それ以上の濃度では認められない．EDTA は，通常は反応系に添加されないが，少なくともこれらの基質についてはプレインキュベート中の活性の低下を抑え，反応の経時変化曲線を直線に近づけて活性を高めるため，添加した方がよいと考えられる．

文　献

1) Gillette, J. R., J. R. Mitchell, and B. B. Brodie : *Ann. Rev. Pharmacol.*, 12, 57, 1972
2) 北川晴雄，野口照久，伊藤隆太：くすりの代謝，171，1971，南江堂
3) Heidelberger, C. : *Federation Proc.*, 32, 2154, 1973
4) Kato, R. and J. R. Gillette : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150, 279, 1965
5) Cochin, J. and J. Axelrod : *J. Pharmacol.*, 125, 105, 1959
6) Schenkman, J. B., H. Remmer, and R. W. Estabrook : *Mol. Pharmacol.*, 3, 113, 1967
7) Wills, E. D. : *Biochem. J.*, 113, 333, 1969
8) Lenk, W. : *Biochem. Pharmacol.*, 25, 997, 1976
9) Fouts, J. R. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 48, 1970
10) Kamataki, T. and H. Kitagawa : *Biochem Pharmacol.*, 22, 3199, 1970
11) Sasame, H. A. and J. R. Gillette : *Arch. Biochem. Biophys.*, 140, 113, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 185-190, 1976

化学発ガン剤による培養細胞株 BALB/3T3 細胞のトランスホーメーション

水尾 昭江*, 川野 澄江*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Chemical Transformation of BALB/3T3 Cloned Cell Lines

AKIE MIZUO*, SUMIE KAWANO*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

動物を用いた発ガン性試験は，通常3年間という長い年月と，ぼう大な費用と労力とを要するため，現在望まれている，ほとんど無限ともいえる生活関連物質の発ガン性をこの方法だけを用いてチェックしていくことは不可能である．そこで何らかの生物学的活性をマーカーとして選び，それが陽性にでた場合にのみ動物実験に移すことが考えられている．その中で，微生物に対する変異原性および哺乳動物細胞の染色体異常の発現は，かなり有効な手段となりつつある．しかし，これらの方法と発ガン性との対応は必ずしも明らかではなく，動物実験にとってかわりうる，迅速で簡便な発ガン性そのものをテストする新たな方法の開発が望まれている．発ガン性物質による培養細胞の特異的な形態変化（トランスホーメーション—正常な細胞は整然と配列した一層の細胞集団を構成するが，ガン化された細胞は，数層に重なりあったり（Pile-up），配列の乱れ（criss-cross）を示す）と，動物への戻し移植による腫瘍の形成との関連がいくつかのグループによって報告されており，新しい発ガン性のスクリーニングの方法として期待されている．その方法は，大別すると，ハムスターの二代培養細胞を用いる方法[1-4]と，純系のマウスに由来する細胞株を用いる方法とに分れる．後者には，Chen and Heidelberger の C3H マウスの前立腺由来の細胞株を用いた実験[5,6]，DiPaolo らおよび Kakunaga[8] の BALB/C マウス胎児由来の細胞株（BALB/3T3）を用いた実験，Reznikoff らのマウス胎児由来細胞株（C3H/10T 1/2）を用いた実験[9]などが報告されている．ハムスターの系は二倍体細胞で，処理後10日でトランスホーメーションを確認できる利点があるが，純系でない動物に由来した雑多な細胞集団を取り扱っていることになる．一方，細胞株を用いた系は，染色体が異数性である難点はあるが，遺伝子が標準化された純系の動物に由来する細胞であり，株化により安定した形質を維持することができるため，再現性の高い実験が可能となる．また，クローニングなどの培養技術を駆使することも可能となる．

そこで，われわれは，BALB/3T3 細胞を用いて，発ガン性をスクリーニングする *in vitro* の系を確立することを目標にして実験を行ってきたが，発ガン剤処理によらない，自然発生性のトランスホーメーションが頻発するという困難に遭遇した．また，クローニングにより，十分に接触阻止を起し，モノレイアーを形成するような細胞を得ても，その性質を継代中に維持することは困難であった．また，細胞の形態は培地中の血清のロットが変るだけでも大きく変化することが明らかになった．本報告では，培養細胞を用いた発ガン性試験の方法を開発する過程で生じてきた問題点について述べる．

実 験 方 法

1. **培養系** 大阪大学の角永武夫博士から供与された BALE/3T3 細胞の Cl. A31-714 を用いて実験を行った。10%の仔牛血清を含む 5m*l* の Eagle の MEM 培地を添加した 60mm の予研型ガラス製ペトリ皿を用い，37°の炭酸ガスふ卵器中で培養を行った．仔牛血清は極東純薬工業株式会社，Eagle の MEM 培地はダイゴ栄養化学株式会社の製品を使用した．

2. **クローニング** 20%の仔牛血清を加えた Eagle の MEM 培地を 5m*l* 添加したペトリ皿に50または100個の細胞をまき，炭酸ガスふ卵器で約2週間培養を行った．接触阻止を十分に起し，コロニーの周辺の細胞配列に乱れがなく，よく生育したコロニーを選んだ．培地を捨て，下面にシリコングリースを塗ったペニシリンカップを，穴の中にコロニーが十分におさまるように載せ，0.5% のトリプシン溶液をペニシリンカップの中にいっぱいになるまで加え，パラフィン伸展器上で加温した．毛細管ピペットで細胞をばらばらにした後，培地を

* 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

加えたシャーレに細胞懸濁液を添加し培養を行った．細胞が十分に増殖したら培養ビンに移しかえて継代を続けた．

3. トランスホーメーションの判定

1) コロニーの形態で判定する方法　10%の仔牛血清を加えたEagleのMEM培地5m*l*を添加した60mmのシャーレに2×10^2個の細胞をまき，翌日発ガン剤処理を行った．benzo[*a*]pyrene(BP)処理は，10 μg/m*l*の濃度で24時間，N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 処理は，1 μg/m*l*の濃度で3日間，7, 12-dimethyl benzanthracene (DMBA)処理は，0.5 μg/m*l*の濃度で3日間とした．発ガン剤処理後，培地を捨て，MEM培地で1度洗ったのち，新しい培地を添加して，培養開始時から約2週間，3日に1度培地を交換しながら培養した．ホルマリン固定，ギムザ染色を行い，コロニーの細胞配列を顕微鏡で観察した．

2) フォーカスで判定する方法　5m*l*の培地を添加した60mmのシャーレに10^4個の細胞をまいた．翌日，MNNG (2.5または5.0μg/m*l*)，または4-hydroxy aminoquinoline-N-oxide (4HAQO—0.25または0.5 μg/m*l*)を添加し，2日間培養後，培地を捨て，5m*l*の新しい培地を加え，3日おきに培地を交換しながら，4～6週間培養を行った．ホルマリン固定後，ギムザ染色を行い，肉眼および顕微鏡で観察した．〔正常な細胞は，接触阻止とよばれる性質により，シャーレをすっかりおおうまで増殖を続けるが，その後は，生存していても分裂を停止し，一層の細胞のシートを構成する．一方，トランスホームした細胞は，接触阻止を起さず，増殖し続けるため，何層にも細胞が重なったフォーカスが生じ，肉眼的にも観察しうる〕

結果と考察

1. 接触阻止を十分に起すクローンの単離

角永氏より供与された細胞のコロニーの形態を観察すると，ほとんど著しいPile-upを起しており，モノレイアーを形成しているのはほんのわずかなコロニーにすぎなかった．そこで，後者の細胞を選びだすことを目的としてクローニングを行った．1回目のクローニングで24個のクローンをとり，2回目のクローニングでそれぞれからさらに3個ずつのクローンをとり，合計72個のクローンを得た．

2. 発ガン剤処理によるコロニーの形態の変化　上記の72個のクローンの中から，細胞の接触阻止を十分に示し，細胞形態に違いのありそうなクローン7個を選び，コロニーの形成率，およびコロニーの形態に及ぼす発ガン剤の効果について検討した．Table 1 に示したように，これらのクローンは，使用した濃度の発ガン剤によってコロニー形成率の低下を来たさなかった．また各コロニーは，比較的よくモノレイアーを形成していたが，細胞の密度や形態にはクローンによる差が著しかった．しかしながら，発ガン剤処理の効果は認められなかった．

Table 1. Effect of carcinogens on the plating efficiency of different subclones of BALB/3T3 cells clone A31-714

Clone	Plating Efficiency		
	Control(%)	Treatment	(%)
5-5	25	BP	19
8-2	13	BP	13
15-2	49	MNNG	46
15-2	49	DMBA	49
20-2	31	BP	31
22-2	65	BP	60
24-2	45	BP	46
24-2	63	MNNG	56
34-6	12	BP	10

* Cells were treated with BP (10μg/m*l*), MNNG (1μg/m*l*) or DMBA (0.5μg/m*l*) for 24, 72 or 72 hours, respectively.

3. フォーカスによって判定する方法　上述のように，コロニーの形態で判定する方法が成功しなかったので，フォーカスによって判定する方法について検討した．上記のようにして得られたクローンは，2週間の培養ではよくモノレイアーのコロニーを形成し，接触阻止を十分起しているようにみえた．しかし，その中で最も良好と思われるクローン(Cl.) 24—2の場合でも，2×10^3個の細胞をまき，4週間の培養を行うと，一層の部分と，数層に重なった部分とが生じ，接触阻止が認められなかった．そこで，Cl. 24—2をもう一度クローニングし，その中から7個のクローンをとり，そのうち4個のクローンについてテストを行った．

Cl. 101, 105, 106, 109のそれぞれの細胞を1枚のシャーレに10^4個ずつまき，MNNG 2.5および，5.0μg/m*l*，4HAQO 0.25および0.5 μg/m*l*で2日間処理し，6週間培養を行った．これらのクローンは4HAQOとMNNGに対する感受性は比較的高く，高濃度の添加群では，添加直後にほとんどの細胞が死滅し，低濃度の添加群でも，かなりの細胞死が認められた．Fig. 1 a-dに無処理のコントロールの細胞形態の顕微鏡写真（50倍）を示した．同一のクローン（Cl. 24—2）から得られたク

ローンでも，接触阻止を十分に示すもの（Cl. 105）と著しいPile-upを示すもの（Cl. 101, 106, 109）とに分れた．後者では，コントロールでも接触阻止が起らないため，発ガン剤による変化を見分けることはできなかった．Cl. 105では，6週までモノレイアーがよく維持され，器壁から剥離することもないようであった．しかし，染色後の細胞を検鏡してみると，細胞が萎縮し，核と細胞質が染め分けられない細胞が多く，6週間まで細胞が生存し続けていたかどうか明らかでなかった．肉眼的に観察すると，全体にうす紫に染まった中に，ところどころ濃く染まった部分がフォーカスとして認められた．

Table 2. Transformed foci in 4HAQO- and MNNG-treated BALB/3T3 cloned cell line (subclone 105)

Group		No. of foci						
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean
Control	10^4cells/dish	2	0	0	1	0	1	0.67
	10^3cells/dish	0	1	0	0	−	−	0.25
4HAQO	0.25μg/ml	7	0	7	−	−	−	4.7
	0.5μg/ml	0	0	0	−	−	−	0
MNNG	2.5μg/ml	3	2	2	2	−	−	2.25
	5μg/ml	0	0	2	−	−	−	0.67

Table 2 に，4HAQO, MNNG処理によるフォーカスの数の変化を示した．低濃度の処理群ではわずかに増加の傾向が認められるようだが，コントロールでもかなりの頻度でフォーカスが認められ，また，よく観察すると，小さなフォーカスは多数あり，明瞭なフォーカスとの区別は必ずしも容易ではなかった．高濃度の処理群では，発ガン剤の処理によりほとんどの細胞が死滅し，生存細胞数が非常に少なくなることにもよると思うが，ほとんどフォーカスが認められなかった．また，4週以後の培養中に，トランスホームを起した細胞が急速に増殖しているようにはみえなかった．以上の諸点を考慮すると，これらのフォーカスをトランスホームをひき起した細胞と考えることは必ずしも妥当でなさそうである．

4. 細胞の接触阻止に及ぼす血清の影響 Cl. 105は，6週間の培養では萎縮を起し，すでに死滅しかかっている可能性も考えられたため，血清のロットを変えることにより，初期のよりよい生育と増殖停止後のよりよい維持が可能になるのではないかと考え，2カ月継代培養後の細胞を用いて，6つのロットの血清の比較を行った．しかし，2カ月注意深く継代培養を行ったにもかかわらず，細胞の性質に変化が生じ，前実験と同一のロットの血清を使用した場合にも，Pile-up を起してしまった．このように非常な労力を費やしてクローニングを行っても，その性質がすぐに変化してしまうことは，この種の実験で一つの重大な障害といえよう．

血清のロットの違いと接触阻止との関係を明らかにするため，Cl. 105 をもう一度クローニングして得た Cl. 1052, 1053, 1054, 1056 の4つのクローンを用いて実験を行った．Fig. 2 a–d に4週間培養後の Cl. 1054 の顕微鏡写真を示した．ロット 408281(a), 411061(b), 411251(d) ではいずれも著しい Pile-up を起したが，ロット 411201(c) では接触阻止がよくかかり，モノレイアーを形成した．このモノレイアーは6週まで維持され，細胞の形態にもそれほど大きな変化は認められなかった．Cl. 1054 は4週間以上培養を続けるとガラス壁への密着性が非常に悪くなり，6週間後の固定の際，ほとんどの細胞が剥離してしまった．

Fig. 3 a–d に Cl. 1056 の結果を示した．ロット 408281 の場合にはほとんど細胞同志の重なりは認められなかったが，細胞質に萎縮の傾向がみられ，あまり良好な生育の状態とはいえなかった．ロット 411201 の場合にはよくモノレイアーを形成し，細胞質の萎縮も認められず，かなり良好な生育を示しているようであった．これに対して，ロット 411061 と 411251 では全体に細胞質の萎縮がはなはだしく，また，細胞同志の重なりあいもみられた．

図示しなかったが，Cl. 1052 では Cl. 1054 によく似た結果が得られた．Cl. 1053 では，いずれのロットにおいても，2週頃から細胞質の萎縮が起って生育が悪くなり，次第に細胞が死滅していき，細胞がシャーレの全面をおおうまでいたらなかった．

以上述べてきたように，細胞の接触阻止の現象は，血清成分の著しい影響を受ける．細胞の増殖は，細胞表面の性質の発現を調節している数多くの因子の複雑な相互作用によって決定されている[10,11]．接触阻止を解除する因子としては，インシュリン，ヘパリン，ヒスタミン，セロトニン，コルチコステロイド，種々のプロテアーゼ[12–14]や成長促進因子[15,16]とよばれるものなどが挙げられる．また，接触阻止を起す因子としては，サイクリック AMP，フォスフォジエステラーゼの阻害剤，PG-E_1, PGE_2，プロテアーゼ[17,18]やヒアルニダーゼの阻害剤，コンカナバリンAなど，種々の物質が挙げられる．天然物である仔牛の血清中にはこれらの種々の因子のかなりのものが含まれており，細胞の接触阻止という性質は，細胞自身の性質のほかに，血清中のこれらの成分の影響を強く受けていると考えられる．従って，再現性の

ある実験を行うには，これらの因子の量をコントロールすることが不可欠になってくる．

これらの因子の中にはタンパク性の因子が多数含まれている．そこで血清成分をコントロールする試みの一つとして，血清の加熱処理による非動化を行った．加熱処理条件は 56° で30分とした．Fig. 4 a, b は，非動化の前(a)，後(b)の血清（ロット 501131）を添加して4週間培養した細胞（Cl. 1054）の顕微鏡写真である．非動化前の血清では写真のような Pile-up の個所が相当認められたのに対して，非動化後の血清では，そのような個所はほとんどなく，モノレイアーに近い増殖が示された．Fig. 4 c, d はロット 411201 についての結果である．非動化前の血清(c)でも Pile-up はみられないが，ある程度の細胞同志の重なりはみられた．一方，非動化後の血清(d)では，よくモノレイアーを形成した．以上の結果が示すように，血清の非動化は，明らかに細胞の接触阻止に有効であるが，非動化だけで血清のロットによる違いをすべて取除くことはできなかった．

結　論

純系マウス胎児由来の培養細胞株 BALB/3T3 細胞を用いて，*in vitro* の発ガン実験系を確立することを目標とした実験を行った．

クローニングによって接触阻止を十分に示すクローンを得た．

接触阻止の性質は血清のロットによって非常に相違し，また，継代培養によって消失することが明らかになった．

発ガン剤（4 HAQO, MNNG）によるトランスホーメーションを明確に捉えることはできなかった．

今後，正常な細胞の接触阻止に必要な血清中の因子やトランスホームした細胞の成長に必要な因子について十分検討がなされ，血清成分のコントロールが可能にならないかぎり，再現性のある実験系をうちたてることは困難であると考えられた．

文　献

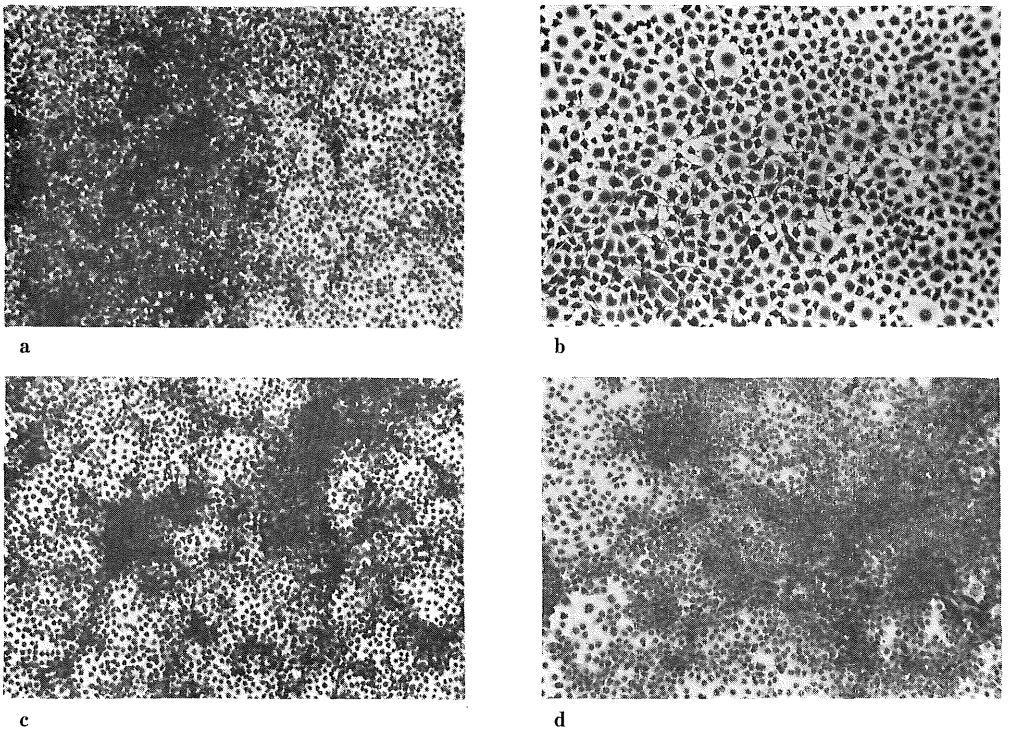
1) Berwald, Y. and L. Sachs : *J. Natl. Cancer Inst.*, 35, 941, 1965
2) DiPaolo, J. A., P. Donovan, and R. Nelson : *J. Natl. Cancer Inst.*, 42, 867, 1969
3) DiPaolo, J. A., R. L. Nelson, and P. J. Donovan : *Cancer Res.*, 31, 1118, 1971
4) DiPaolo, J. A., R. L. Nelson, and P. J. Donovan : *Nature*, 235, 278, 1972
5) Chen, T. T. and C. Heidelberger : *J. Natl. Cancer Inst.*, 42, 915, 1969
6) Chen, T. T. and C. Heidelberger : *Int. J. Cancer*, 4, 166, 1969
7) DiPaolo, J. A., K. Takano, and N. C. Popescu : *Cancer Res.*, 32, 2686, 1972
8) Kakunaga, T. : *Int. J. Cancer*, 12, 463, 1973
9) Reznikoff, C. A., J. S. Bertram, D. W. Brankow, and C. Heidelberger : *Cancer Res.*, 33, 2339, 1973
10) Lipkin, G., M. Rosenberg, and M. E. Knecht : *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1333, 1976
11) Pardee, A. B. : *Biochem. Biophys. Acta*, 417, 153, 1975
12) Burger, M. M. : *Nature*, 227, 170, 1970
13) Sefton, B. M. and H. Rubin : *Nature*, 227, 843, 197,
14) Teng. M. N. H. and L. B. Chen : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 413, 1975
15) Gospodarowicz, D. : *Nature*, 249, 123, 1974
16) Dulak, N. C. and H. M. Temin : *J. Cell Physiol.*, 81, 153, 1973
17) Troll, W., A. Klassen, and A. Janoff : *Science*, 169, 1211, 1970
18) Chou, H. N., P. H. Black, and R. O. Robin : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1748, 1974

Fig. 1. Subclones derived from BALB/3T3 A31-714 cells and cultivated for 6 weeks. a, clone 101; b, clone 105; c, clone 106; d, clone 109. (×50)

Fig. 2. BALB/3T3 cells subclone 1054 cultivated for 4 weeks in Eagle's MEM supplemented with various lot of calf serum. a, lot 408281; b, lot 411061; c, lot 411201; d, lot 411251.

Fig. 3. BALB/3T3 cells subclone 1056 cultivated for 4 weeks in Eagle's MEM supplemented with various lot of calf serum. a, lot 408281; b, lot 411061; c, lot 411201; d, lot 411251.

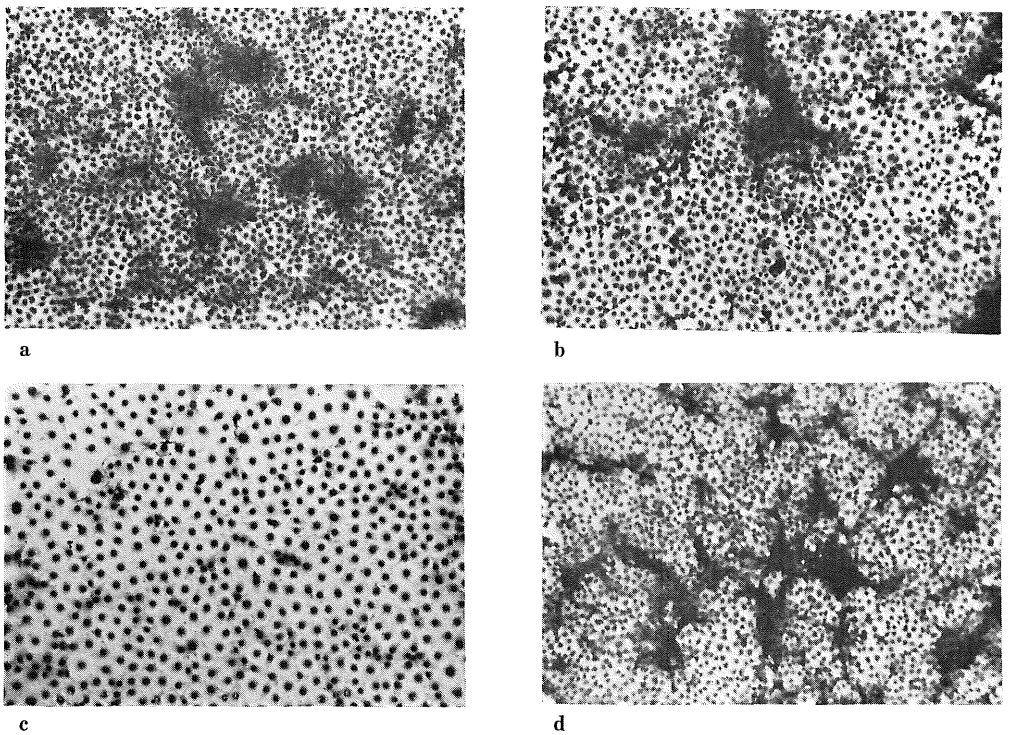
Fig. 4. Effect of heat-inactivation of calf serum on the cell growth of BALB/3T3 cells subclone 1054. a and b, calf surum lot 501131; c and d, calf serum lot 411201; a and c, non-treated serum; b and d, heat-inactivated serum.



a b

c d

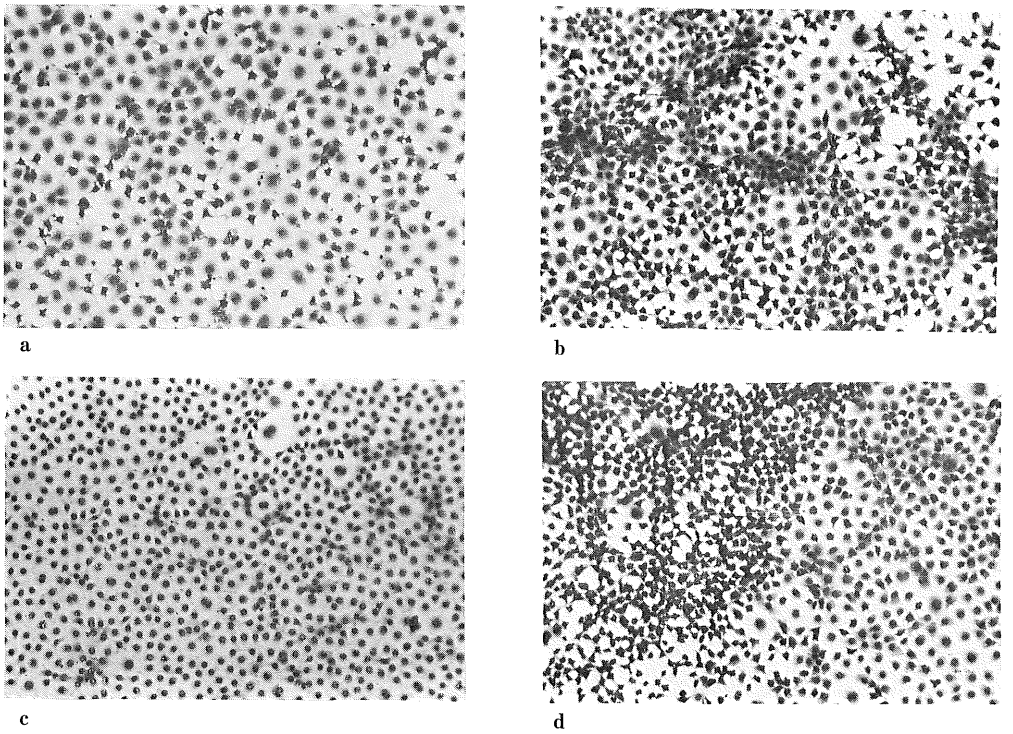
Fig. 1.



a b

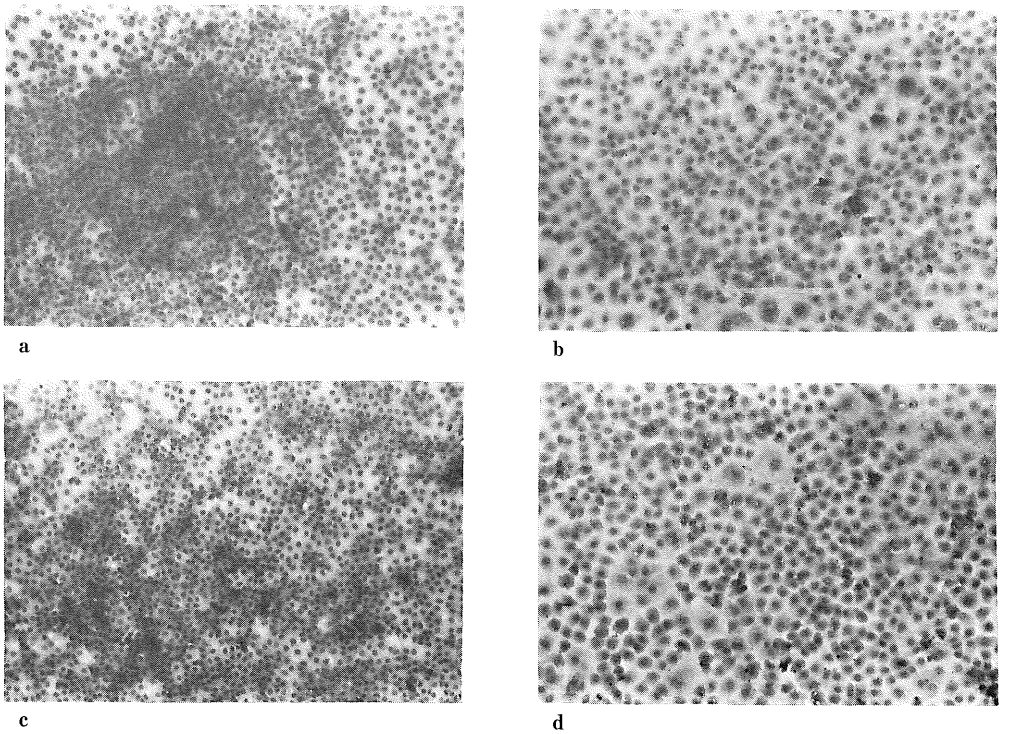
c d

Fig. 2.



a b c d

Fig. 3.



a b c d

Fig. 4.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 191-197, 1976

ラットの発育推移に関する考察

福森 信隆*, 平賀 興吾*

Variation of Growth Curve in Rats

NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

緒　言

実験動物の成長発育は，個体内の生体情報を把握し得る最も有効な観察手段である．殊に，飼育環境の影響および適用された化学物質の作用を経時的に「推移変動」として把握でき，一定の成長パターンを比較することで動物体の生理機能変化の異常を推察することが可能である．毒性検索法の中で，臓器重量，病理組織，多量の血液を必要とする血液性状検査などの諸検索は，動物の屠殺が不可欠であるのに対して，体重測定は検索時から同一動物で定期的に変動を記録できるため，毒性評価に症候観察と共に重要な指標を提供する．

先に，著者ら[1]は同一系統で生育場を異にするラットの成長過程を比較し，当部の林田ら[2]も体重増加が一定の規則性をもつ変動の繰り返しの組み合せであると報告した．また，平賀ら[3]は成長に伴う増加過程にみられる一定の変動が刺激に対する生体反応を規制しており，それを発育リズムと仮称した．

今回，素朴な観点に基づきラット体重の推移変動の種々条件下における変化および同一週令の動物で生後4週目にみられた体重差がその後の成長発育に及ぼす影響について観察したので報告する．

実　験　方　法

実験環境は室温25°±1°，湿度50%±5%，照明午前6時から午後6時までとし，クレア飼育用固型飼料（CE-2）および細菌ろ過水道水を自由に摂取させて，下記の実験を一般飼育室にて行った．

実験Ⅰ．集団飼育，個別飼育の発育推移

Barrier system下に生育されたSD-JCL系雌雄ラットを集団飼育は各5匹，個別飼育は各1匹をステンレスケージに入れ，4週令から一般飼育室にて約9週令まで飼育した．体重は2日間隔で午前9時に測定した．

実験Ⅱ．薬物負荷による発育推移

Barrier system下に生育されたSD-JCL系雄ラットを5匹ずつ集団飼育し，各群10匹とし別報[4]に示す条件で，butylated hydroxytoluene(BHT), phenobarbital(PB), isonicotinic acid hydrazide(INH)の薬物適用時の体重を午前9時，午後4時の日2回測定した．測定は4週令から行い，1週間予備飼育後各薬物を適用し，その後1週間毎日測定を行った．

実験Ⅲ．4週令動物でみられた体重値の大小に起因する発育推移と負荷時の影響

Barrier system下に生育されたSD-JCL系雄ラットを4週令で体重値の大（67.0g±2.79g），小（51.3g±4.81g）により2群に分別し，ケージに5匹ずつ収容して各群10匹の体重を測定した．測定期間は12週令まで行い，体重値の大小を各CL群，CS群とした．また同様に分別を行い5週令からBHT添加飼料（BHT 1.5%濃度で飼料へ混合し固型化したもの）を与えた負荷群をTL群，TS群として，毎日午前9時に体重を測定した．なお各週の飼料摂取量を測定し，飼料効率を算出した．

実験結果および考察

実験Ⅰの個々動物の発育推移をFig. 1, 2に示した．集団，個別飼育を比較すると，雌雄とも個々の成長曲線に大差を認めなかった．これらの発育推移をみると，体重増加の微細な緩急の変動がみられ，この細かな生理的増加の繰り返しもまた飼育匹数により差異があるとは思えなかった．しかしながら，この微細な変動を体重増加分としてFig. 3に個々の動物で示したところ，一見差異があると思えなかった発育曲線に雌雄差および飼育条件による差異が含蓄していることがわかった．つまり，5匹飼育雄ラットの増加分の変動は，飼育後2週まで個々の大小の増加を示すが，その後漸次変動の同一性傾向を示

* 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

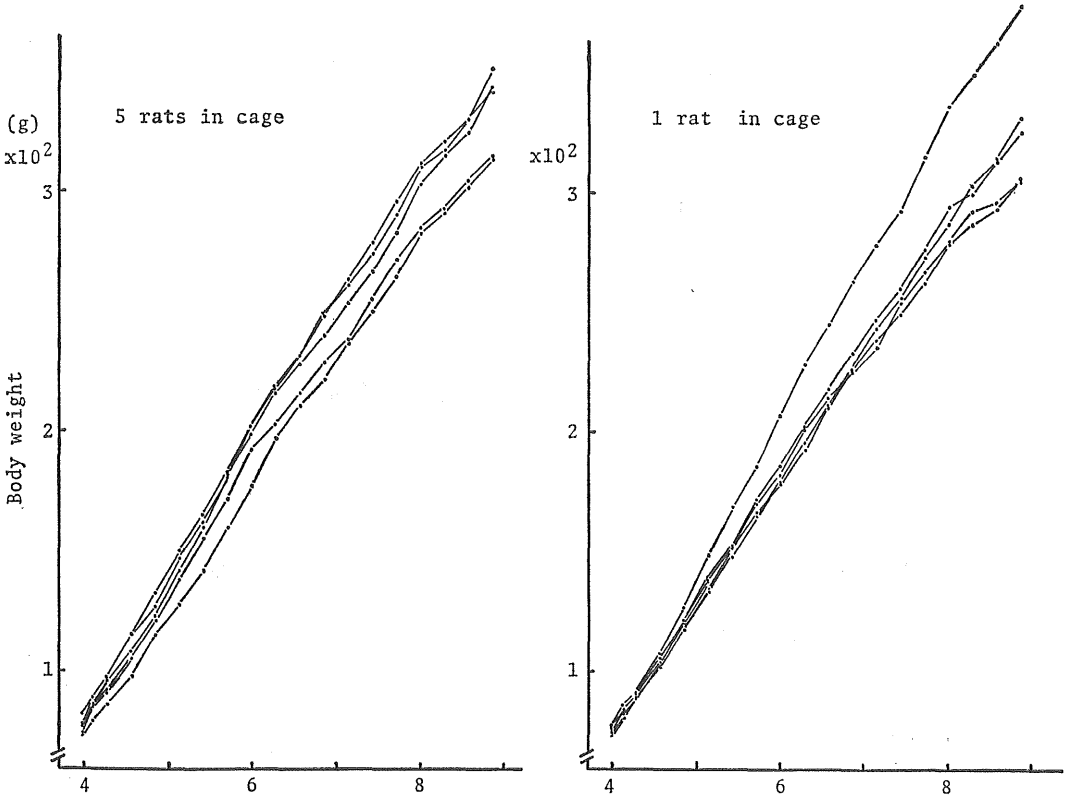


Fig. 1. Growth curves of individual male rat caged in groups or singly

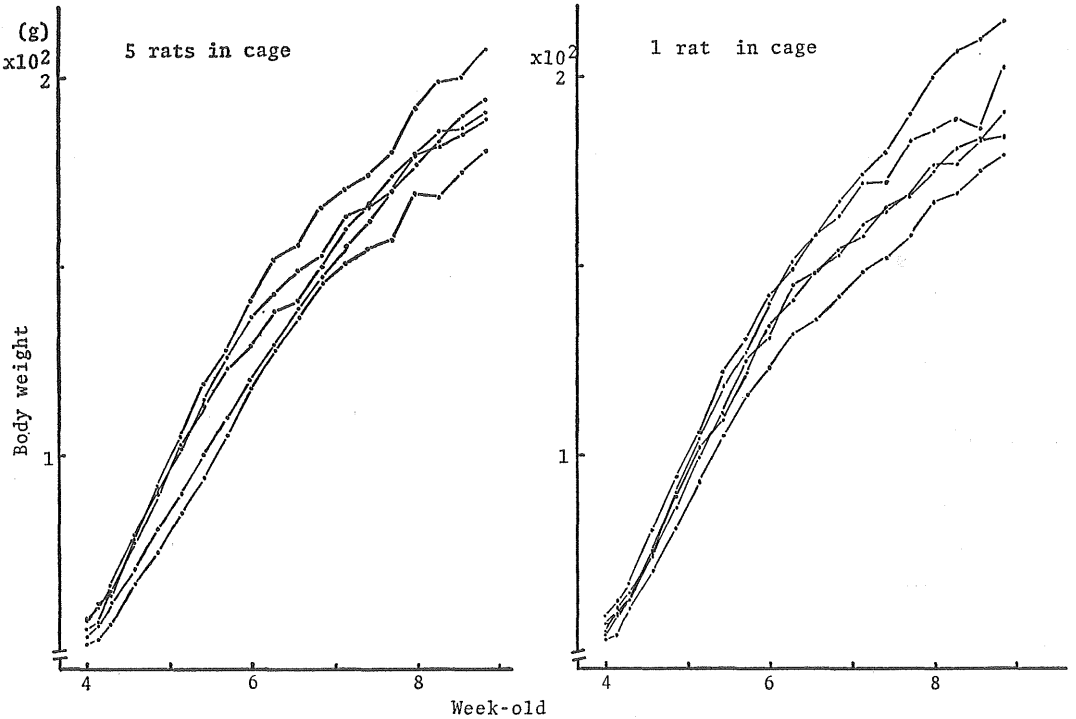


Fig. 2. Growth curves of individual female rat caged in groups or singly

した．これに対し，1匹飼育では個々の動物が終始異なった増加変動を継続した．このことは明らかに個別，集団飼育で相違があることを示唆しており，特に集団飼育の適応に相当期間が必要であると思われる．一方，雌の動態は雄ほど顕著でなかった．また集団飼育，個別飼育で変動の大きな動物，小さな動物が存在して個々の動物が異なる変動幅をもっていることがわかった．変動はかなり規則的であるため，その変動の異常が何らかの個体の変化を反映していると思われる．Fig. 3 の個別飼育雌ラットの変動異常（矢印）を呈した動物は，翌日死亡に致っている．成長曲線では，これらの変化まで把握することが困難であり，まして図示を省略したが動物の平均成長曲線では，増加変動の把握さえ明らかでない．

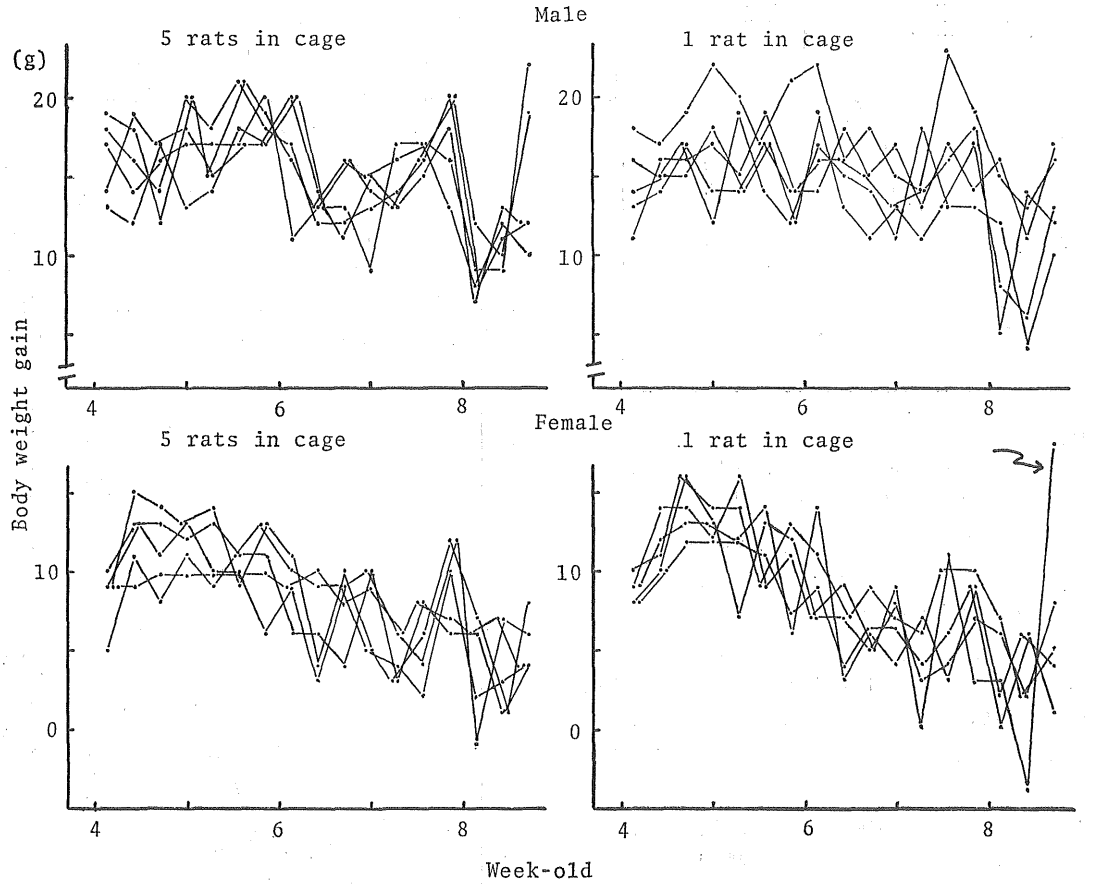


Fig. 3. Changes of body weight gain in individual rat caged in groups or singly

集団飼育と個別飼育では，飼育動物数による環境差つまり運動量，摂餌飲水の影響など動物の発育を左右する因子が存在すると考えられるが，成長曲線のみでは明らかでなく，個々の動物に基づく分析が必要であると考える．おそらく，顕著な差異として表現されないのは，他の環境（温度，湿度，気流，飼料……）が良好であるため，発育変動に与える影響を最小限にしたと思われる．

実験Ⅱは薬物を負荷した時の発育推移に対する影響を調べたもので，動物の体重は午前から午後に減少するという知見に基づき日2回測定し，体重および薬物投与時を基準とした成長率の各動物の平均をFig. 4に示した．投与前は規則的な律動が各群とも同程度に認められたが，薬物負荷によりそれぞれの薬物に特有な発育推移を示した．PBは対照より若干良好な体重増加をし，午後の減少がほとんど認められないのが特徴的であった．これはPBの中枢神経抑制による自発運動の低下が示唆される．また，BHTは体重増加の抑制を認め，特に負荷直後，午後の減少も大きく，翌日の増加も幾分抑制を示した．BHTとPBないしINHを同時負荷した場合，BHT単独よりPBは増加し，INHは抑制が強くみられた．

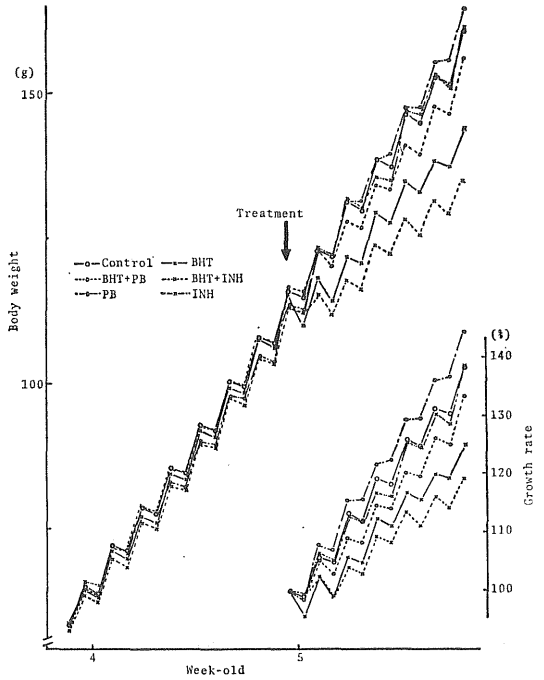


Fig. 4. Changes of absolute weight and growth rate weighed at 9 a.m. and 4 p.m. in male rats treated with BHT

このことは動物体における異種の代謝機能変化の反映であることが推測される．成長率で示すと顕著に把握でき，INH の同時投与で午後の減少が強く認められた．また，肝臓で滑面小胞体を増殖させ薬物代謝機能に影響を与えるといわれているPBとBHTは，発育推移に関する異なった動態を示すことから，代謝亢進という現象のみで両者を同一に論じ得ないと考える．詳細は別報[4]に述べた．

上述のことは，単なる体重変動の中にも微細な日内変動の相違があり，種々の増加および抑制の程度が重なり合って発育推移の大きなパターンを形成すると考えられる．このことは，発育推移を詳細に分析すると薬理作用に対応する一定の変動パターンが期待し得るが，一方薬物量および栄養供給の相関が大きく関与するため，発育推移のみで薬物の影響を言及し難いと考える．

実験Ⅲは同週令動物で4週令でみられた体重値の大，小に基づいて作為的抽出を行い2群に分別し，体重の大小がその後の成長に与える影響の有無を12週令まで飼育観察した．Fig. 5は各群の平均発育曲線を示した．実験Ⅰでみられた体重の微細な緩急の増加変動も認められCL群，CS群間に大差を認めなかった．これらの日々の微細な緩急の増加変動の中には若干大きな変動もみられたが，平均曲線のため林田らの報告[2]する規則的な周期性を持った動揺と必ずしも断定し得なかった．絶対重量を比較するとCL群が終始優ってほぼ平行関係を呈するが，BHT 負荷時を基準とした成長率の推移は CS 群の増加が優位であった（Fig. 6）．

Fig. 7 に示した両者の飼料効率と 100g 体重当たりの飼料摂取量（体重比飼料摂取量）を比べると，CL，CS 群で同様な推移がみられ，各体重に見合った必要飼料量を摂取していることが理解される．

一方，5週令から1.5% BHTを負荷したTL，TS群では一時的に体重減少を認め，次第に増加傾向を示し，絶対重量，成長率とも同様なパターンがみられた（Fig. 5, 6）．負荷時の発育推移は不規則な変動が大きく，特に途中死亡例があり動物が欠失した時，急激な増加を認める（Fig. 6 矢印）．この例から，甚だしく衰弱した1匹の動物が，他の動物の体重を引っ張るため死亡前後の統計的処理は一考を要すると思われる．飼料変動は対照群に比べ，TL，TS 群で大きな起伏を示し，交差しなが

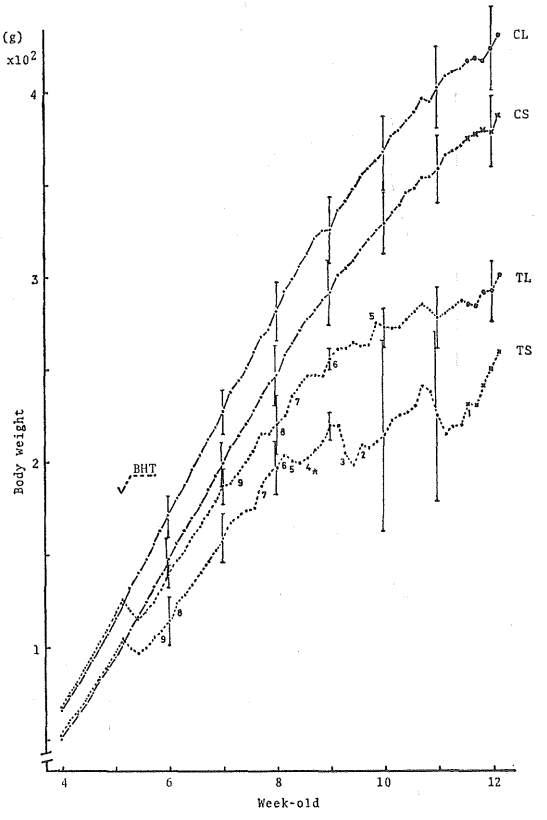


Fig. 5. Growth curves of non treatment rats and BHT treatment rats between different body weights. vertical bars show S.D.
* No. of rats

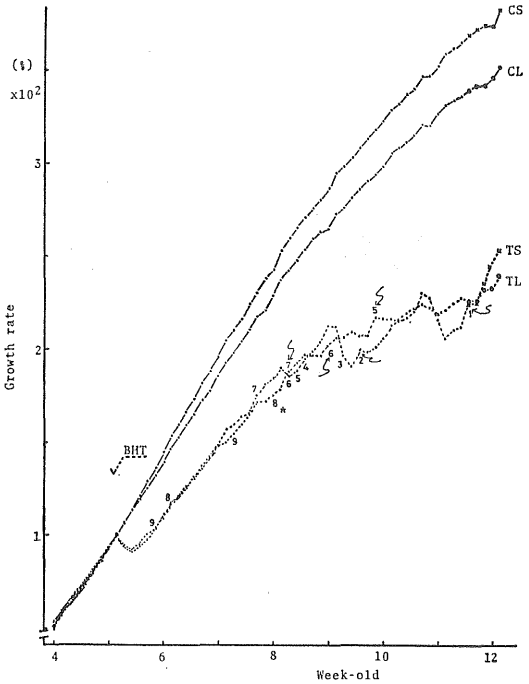


Fig. 6. Changes of growth rate in non treatment rats and BHT treatment rats between different body weights *No. of rats

らほぼ同様な傾向を認めた．飼料効率は8，9週令でピークがあり，この時期の死亡と関係があると考えられる（Fig. 7）．

なお，TL群では10匹中5例の死亡がみられたが，この5例は5匹ずつ収容した一方のケージの全例で，他方のケージの5匹には全く死亡を認めなかった．実験Ⅰ，Ⅱから推察して全例死亡ケージに他の動物に影響を与えた，つまり大きな不規則な変動を示す動物が混在していたか両ケージを比較し調べた．平均発育曲線は死亡前まで同様な推移を呈して個々の動物も大きな変動を認めなかった．Fig. 8に死亡ケージ，生存ケージの任意に抽出した個々の動物の発育曲線を示した．死亡は負荷後2週目からみられ，死亡ケージに若干体重差を認めるが，生存ケージの動物と異なる変動推移がみられなかった．飼料摂取を分析すると，4週令から7週令までの生存ケージ2日間の体重増加量各週令14.5，13.8，14.4，−3.0g，また飼料摂取量26.8，30.2，39.6，40.2gで，飼料効率を算出すると54.1，45.7，36.4，−7.5%を得た．一方，死亡ケージでは体重増加量16.1，17.1，17.6，10.0g，飼料摂取量25.6，29.0，35.4，25.6g，これから飼料効率は62.9，59.0，49.7，39.1%を得た．以上の数値から経時的に検討すると死亡ケージの飼料効率が生存ケージ

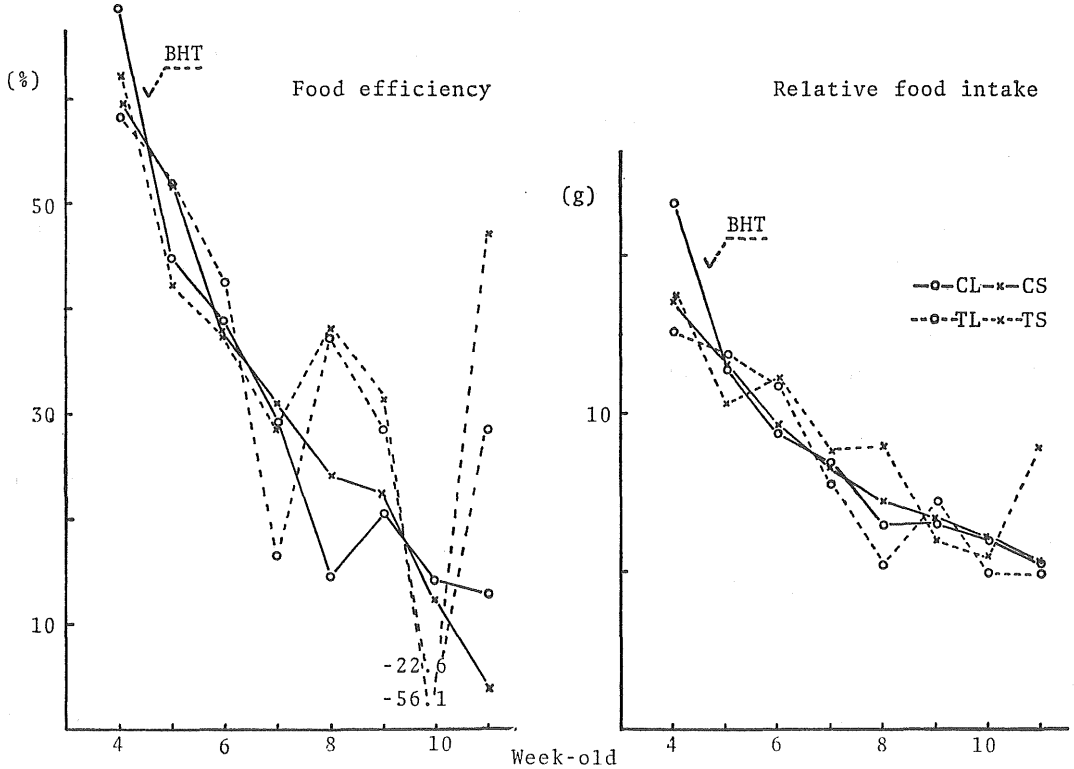


Fig. 7. Changes of food efficiency and relative food intake in non treatment rats and BHT treatment rats between different body weights

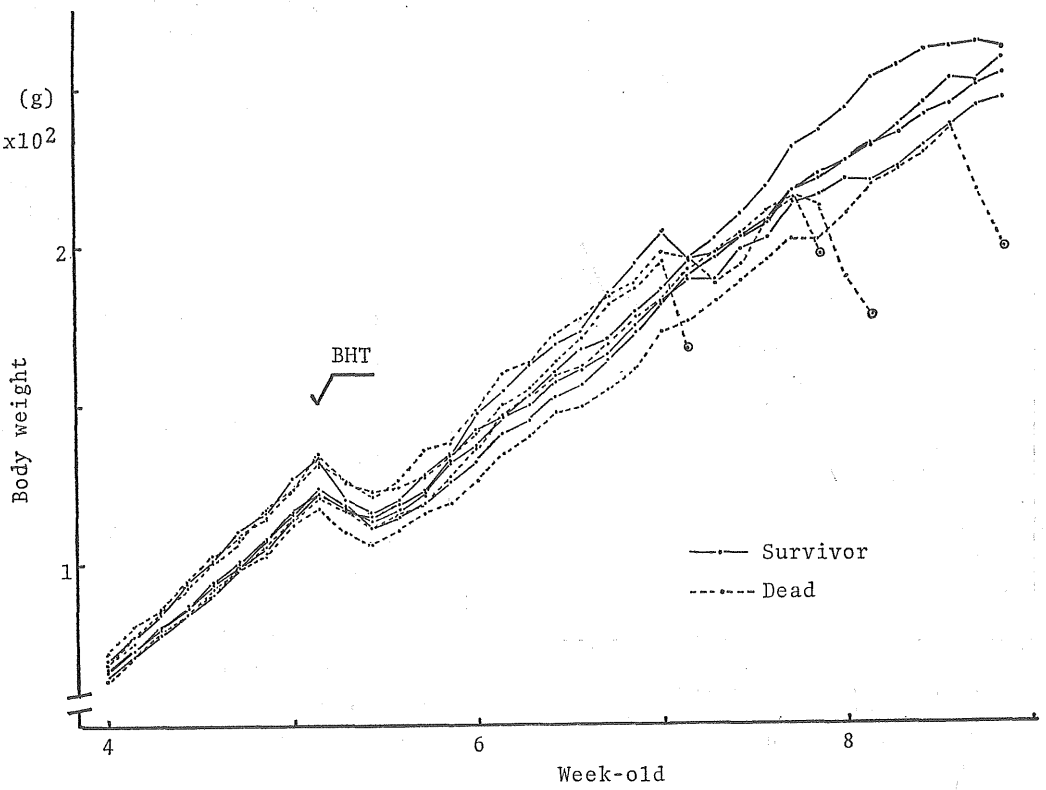


Fig. 8. Growth curves of survivor and dead rats treated with BHT

より優位であり，このことは飼料摂取量が少ないにもかかわらず体重増加量が大きいことに起因する．また，体重比飼料摂取量は生存ケージで13.0, 12.2, 11.5, 9.2g, 死亡ケージで12.3, 11.6, 10.2, 6.0gを示すことから，死亡に関して単に飼料に混入した薬物の摂取差が問題となるのではなく，死亡を惹起する生体の他の因子が偶然にも死亡ケージに集結したと思われる．

BHTの死亡動物の発育推移は，死亡2,3日前に貧血症候，自発運動抑制，呼吸異常を呈し，体重の急激な減少を伴い死亡に至る．それ故，発育推移の観察は，動物体の異常変化の表現として死亡の推定が可能と考えられる．

以上の知見から動物の発育推移の詳細なパターンの分析は病態生理機能異常あるいは薬理作用の差異などを把握するため，生存個体での観察が可能である．また今日，実験評価に統計的処理が主要を占める中で個々動物の分析という最も基本的評価方法を再検討する余地もあろう．例えば衰弱の甚だしい動物が群中に存在する時，その1匹が他の動物の平均体重を減少させ，標準偏差を拡大してもどれほど意味を持つであろうか．特に長期飼育で動物の個体差が顕著となる実験では，個々の動物の検索もまた重要であると思われる．平均発育曲線は個々動物の変動の累積表現であるため，顕著な規則的変動を認め難い．しかし実験Ⅱの如く，群全体が一定の反応を示す時には有効であり，また実験Ⅰの増加分の変動も発育曲線を注視することにより把握が可能である．個別飼育，集団飼育による死亡率の異なることも知られており，動物の発育推移のパターン分析は検索目的に応じて飼育条件，測定期間を考える必要がある．

実験動物の体重変動は，飼育環境，飼育管理条件に由来する外因要因および動物体の生理機能を表現する内的要因の微妙な影響を受け易い[5]．さらに動物系統差，時代の変遷に伴う成長曲線の向上など種々の条件により異なる発育推移を描く．強制経口投与，不完全飼育，罹患動物の各条件で異なる発育推移を観察した報告[6]もあり，外的要因が確立され飼育状態が良好に改善された昨今，動物体の内的変化の把握を主目的とした経時的発育推移の観察が毒性検索の評価に今後新たな方向性を与えると期待する．

結　　語

成長発育におけるラットの体重変動を推移として把握し，種々条件に対する発育推移を経時的に観察することは，実験動物の病態生理機能変化および薬理作用の検索に有用であると思われる．

文　　献

1) 福森信隆ら：東京衛研年報，25，557，1974
2) 林田志信ら：東京衛研年報，26-2，186，1975
3) 平賀興吾ら：東京衛研年報，26-2，181，1975
4) 福森信隆ら：東京衛研年報，27-2，67，1976
5) Paget, G. E. : *Methods in Toxicology*, 13, 1970, Blackwell Scientific Publications
6) 星川英夫：東京医科大学雑誌，18，951，1960

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 198-200, 1976

ラットにおける体重，摂餌量，飲水量，糞量の日内および日間変動について

林田 志信*, 井口 重孝*, 池田 虎雄*

Circadian Variations of Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excretion in Rat

SHINOBU HAYASHIDA*, SHIGETAKA IGUCHI* and TORAO IKEDA*

前報[1]において，ラットの成長過程における体重の変動に検討を加え，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，週間変動の組合せによって構成されるとの推定を得，これを報告した．今回は，体重とともに摂餌量，飲水量，糞排泄量の日内および日間変動を観察したので報告する．

観察方法

実験動物はbarrier system下に日本クレアにて生育されたJCL-SD系ラット雄を20匹用いた．動物は4週令で購入，前面と床が網の一匹飼いステンレスケージに収容，温度25°±1，湿度55±5%，照明午前6時から午後6時までの一般飼育室において日本クレアCE-2飼料および細菌ろ過水道水を自由に与え飼育した．

体重は1g感度の天秤で測定し，体重増加量は前回測定値との差で示した．摂餌量は，投与前の飼料重量から測定時残存飼料とケージ下の受皿にコボした飼料重量を引いた値とした．飲水量は投与前給水瓶重量から測定時給水瓶重量を引いた値で表した．糞量は，受皿中の糞を乾燥することなく，ただちに測定した重量を用いた．

日内変動は，6週令時と9週令時に，2日間にわたり，日間変動は6週令時より17日間にわたって観測した．

観察結果と考察

図1（6週令時日内変動）図2（9週令時日内変動）および図3（日間変動）に平均値（太線）と20匹中任意に抽出したNo. HI 007（細線），No. HI 012（破線）で2個体の値を示した．

日内変動：6週令時と9週令時の各変動は大体同傾向を示したので一括して述べる．

体重増加量は前報[1]で述べたと全く同様な変動を示し，16時より22時の間の増加量が最も大きく，ついで22時より4時の間，4時より10時の間，であり，10時から16時の間は逆に減少がみられた．従って日内の体量は4時より10時が最高で，16時が最低となった．

摂餌量は大体体重と同様の変動パターンを示し，1日総餌飼量の大半は16時から4時の間の夜間に摂取した．

飲水量は22時から4時の間が最も多く，摂餌量のピークより遅れ，10時から16時の間が最も少なかった．

糞排泄量は，摂水量の変動パターンと似ており，22時から4時の間が最も多く，10時から16時の間が最も少なかった．

以上より体重増加量，摂餌量，飲水量，糞排泄量はラットの活動する夜間に多く昼間は少なく，体重は10時より16時にかけて減少することがわかった．また体重増加量は摂餌量に伴って変動し，飲水および排糞は摂餌後に増加することが判明した．10時から16時の間は，排糞は極めて少なく（平均0.71 g），摂餌（平均2.6 g）および飲水（平均2.4 g）はわずかながらあるにかかわらず体重が減少（平均5.0 gの減少）することは，この間に排尿あるいは蒸泄が多くなっていることを暗示し，今後検討したい．

日間変動：体重については前報のように大きい増加と小さい増加の繰り返しがみられた．摂餌量は体重増加量のような変動は少なかった．また，体重増加に伴う摂餌量の増加傾向はほとんどみられなかった．飲水量も日間変動は少なく，一定の傾向は見出せなかったが，体重増加に伴う増加が認められた．なお，飲水量に関しては，飲水以外の給水瓶よりのコボシを完全に排除出来ず，ある程度の不正確はさけられなかった．糞排泄量では排泄の多い日と少ない日の繰り返しがみられた．しかし，体重増加量の変動との対応は明確にはいえないようであっ

* 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

た.

また，摂餌量の場合と同様に体重増加に伴う糞量の増減傾向はほとんどみられなかった.

以上，体重増加量，摂餌量，飲水量，糞排泄量の日間変動における相互関係は明らかでなかった．しかし，体重の増加（成長）に伴う摂餌量の増加や糞排泄量の変化はほとんどなく，飲水量がこれに伴っていたことは興味深く，成長に伴い食餌効率のよくなることが示唆された.

要　　約

ラット（JCL-SD系雄，6週令および9週令）について体重増加量，摂餌量，飲水量，糞排泄量の日内変動および日間変動を観察した.

日内変動は，いずれも夜間が高く，昼間が低い周期がみられた．体重増加量は摂餌量に伴った周期を示し，飲水量および糞排泄量の周期における高ピーク時のピーク時より遅れたが，いずれも午後4時が低いピークであった．体重（増加量ではない）は午前4時から10時の間が最高で，午後4時が最低であった.

日間変動は，体重増加量および糞排泄量において大小の波形変動がみられたが，摂餌量および飲水量では顕著でなかった.

体重増加（成長）に伴った飲水量の増加傾向がみられたが，摂餌量および糞排泄量においては，その傾向はほとんどみられなかった.

文　　献

1) 林田志信，井口重孝，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，186，1975

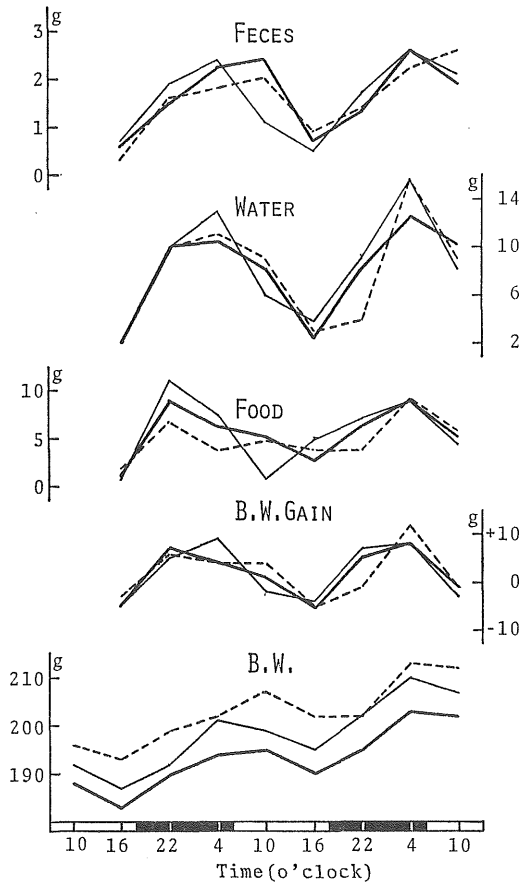


Fig. 1. 体重，体重増加量，摂餌量，飲水量および糞排泄量の日内変動（6週令JCL-SDラットさ）
：20例平均，——：No. HI007ラット，
……：No. HI012ラット

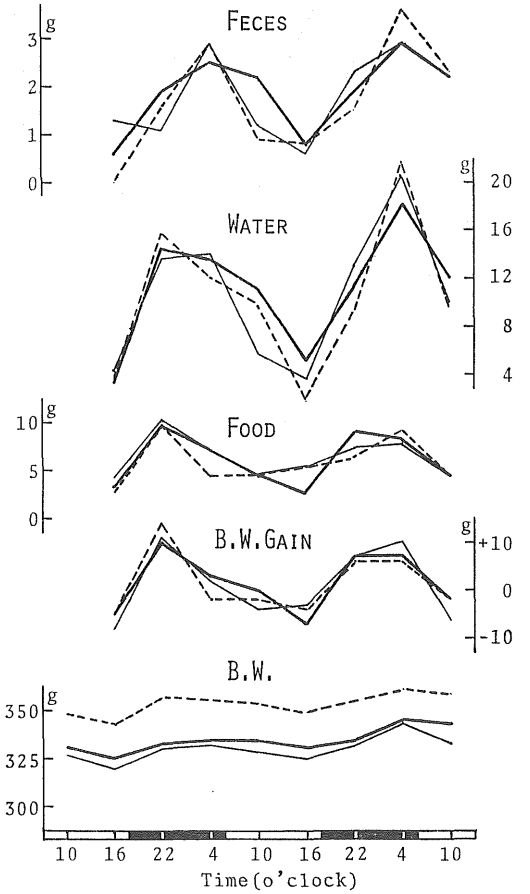


Fig. 2. 体重，体重増加量，摂餌量，飲水量および糞排泄量の日内変動（9週令，JCL-SDさ）
——：20例平均，——：No. HI007ラット
……：No. HI012ラット

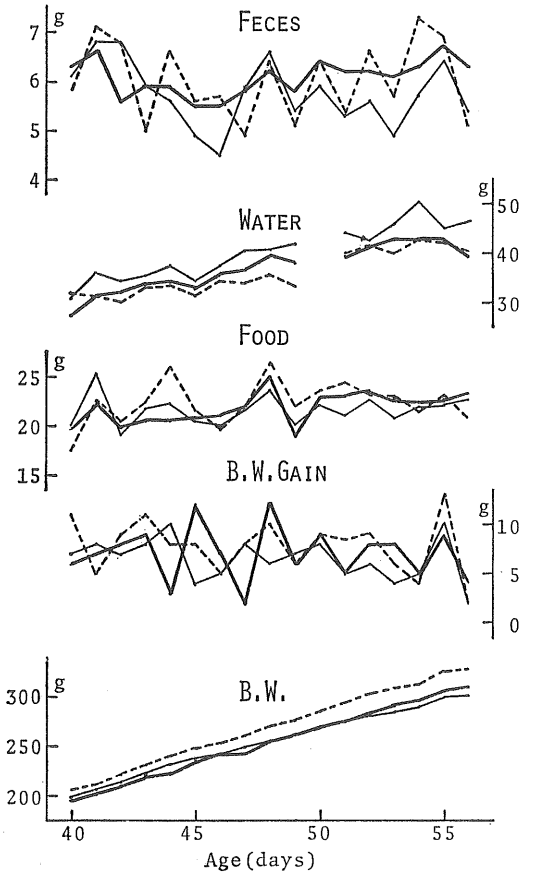


Fig. 3. 体重，体重増加量，摂餌量，飲水量および糞排泄量の日間変動（6—9週令，JCL-SDラット♂）
——：20例平均，——：No. HI007ラット
……：No. HI012ラット

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 201-206, 1976

ラットにおける体重増加と大腿骨長および骨重量の関係について

坂本 義光*, 湯澤 勝広*, 平賀 興吾*

Relation between Body Weight Gain and Femur Length or Femur Weight in Rats

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

動物の体長および体重を維持している骨格を構成する骨の重量や大きさについては，それが成長の指標または体重変動の指標として検討されているのみで，それらの測定値の表わす性質に触れた報告はない．藤井ら[1]は成長の旺盛な年令のラットを用いて，その大腿骨重量および骨長の成長の指標としての有用性について検討した際，骨重量，骨長の発育・成長に伴う増加推移には固有の性質があり，これが体重の増加推移と平行していることを報告している．

従来から著者[2-4]らはラットの発育・成長に伴う体重および諸器官重量の増加推移には，その増加量の大小に由来する一定の変動があることに注目し，これがその動物の性状の一端を表わすものと考えてきた．

今回，大腿骨重量および骨長の増加推移にみられる変化を観察し，さらに従来から当部で毒性試験を行なっている Butylated hydroxytoluene を投与し，体重が増加抑制された場合の骨重量および骨長の変化と合せ，ラットの発育・成長に伴う骨重量および骨長の増加推移に現われる性質について検討した．

実験動物および方法

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（w 25×*l* 140×h 16cm に5匹ずつ収容し，自家製固型飼料（日本クレア社製粉末飼料 CE-2 より製造）および水道水を自由に摂取させて飼育した．

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，両群180匹ずつとした．体重はA群が 66.7±2.9g，B群が 51.8±3.7g であった．さらにこれら2群のラットを，各々，無処置群と butylated hydroxytolueue（以下 BHT と略す）を摂取させた BHT 摂取群とにわけた．この群には5週令より BHT を 1.5% の濃度で粉末飼料に混合し固型化したものを摂取させた．

検査は，無処置群は4週令より1週間単位で13週令まで計10回，また BHT 摂取群は6週令，つまり BHT 摂取1週間目より無処置群とともに1週間単位で計8回，各群10匹ずつ検査に供した．

動物は体重測定後，断頭放血し，右大腿骨を摘出した．摘出した大腿骨は10% ホルマリン液で2日間固定後，骨に付着している筋，結合織を出来るかぎり除去し，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 PH 162 型電子天秤によって mg 単位で測定し，湿重量とした．また乾燥重量は乾燥器内 110° で恒量になるまで加熱・乾燥して測定した．

実験結果

無処置群（以下 CA，CB と略す）および BHT 摂取群（以下 TA，TB と略す）の各週令における体重，大腿骨長（以下骨長と略す）および体重 100g 当りの骨長を Table 1 に，また大腿骨重量（以下骨重量と略す）および体重 100g 当りの骨重量を Table 2 に示した．また BHT 摂取群では，実験期間中に死亡した固体があり，例数は減っている．

体重　Table 1 に示すように，終始 CB に比べ CA が大きく，また Fig. 1 にみられるように，ほぼ直線的に両群平行して増加し，CA，CB の増加推移には大きな差異はなかった．

BHT 摂取によって TA，TB ともに増加が抑制され，

* 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, Tokyo, 160 Japan

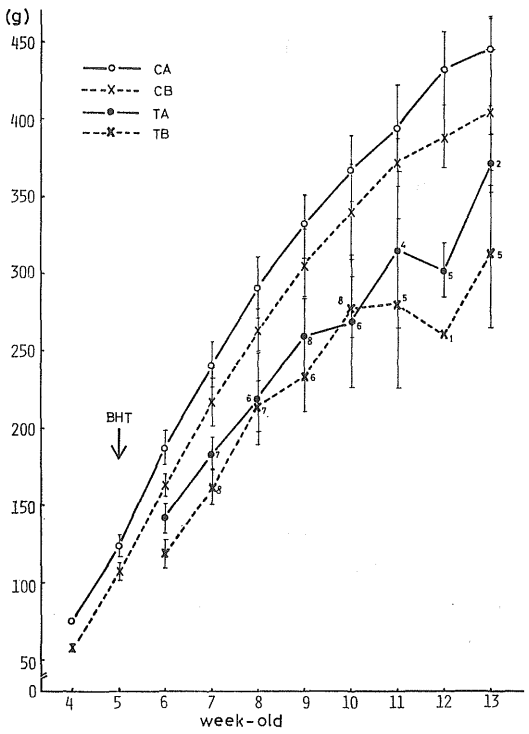


Fig. 1. Increasing curve of body weight
CA : A group control, CB : B group control,
TA : A group BHT treated,
TB : B group BHT treated

各週令の値は CA, CB に比較して小さかった．また TA, TB の増加推移には，TA では8週令より，TB では7週令より，増加の割合の大きい期間と小さい期間がみられた．またその変動には両群でほぼ1週間のズレがあった．

骨長 Table 1 に示すように骨長は CB に比べ終始 CA が大きかったが，体重比はCB が大きいかまたはその傾向を示した．Fig. 2 に示すようにその増加推移は CA, CB で大きな差異はなく，徐々にその傾きは小さくなる傾向を示した．また体重比曲線は，ほぼ6週令まで急な減少を示し，その後徐々に減少の割合が小さくなった．また TA, TB の各週令の値は各々 CA, CB に比べ小さく，骨長の増加が抑制されているが，体重比は CA, CB より大きな値を示し，その抑制のされ方は，体重の抑制の割合に比べ小さいものであった．TA, TB の骨長の増加推移には大きな変化はみられないが，体重比の推移には TA で9週令，TB で8週令から減少の割合の大小のくり返しがみられた．

骨重量 Table 2 に示すように終始 CA が CB に比べ大きいかまたはその傾向を示したが体重比では両群に差はみられなかった．TA, TB の骨重量は各々 CA, CB に比べ小さかった．体重比をみると，TA では6，7週令で，TB では6週令で各々 CA, CB の値より大きかった．また TA は10週令で CA より小さかった．その他の週令では特に差がなく，また Fig. 3 に示した体重比曲線には大きな変化はみられず，CA, CB のそれとほぼ一致しており，BHT による骨重量の増加が抑制された割合は体重のそれと同程度であったことが示された．

また CA, CB の骨重量の増加推移には，図中(↓)で示したように CA では9から10週令に，CB では10から11週令に特に増加の割合が大きく，体重のそれに先行する期間がみられた．また TA ではその期間が10から11週令でみられた．TB では例数が1例であったため，その傾向がとらえられなかった．

水分含量 湿重量と乾燥重量の差を水分含量とした．Fig. 4 に示すように CA, CB ともほぼ7週令まで増加を示し，その後10から11週令にかけて減少し，さらにほぼ8週令の値まで増加した．TA, TB では，増加の程度が CA, CB に比べ小さいが，10から11週令で CA, CB の8週令の値に近づく傾向を示した．

考　察

ラットの発育・成長に伴う体重や器官重量の増加推移に現われる，わずかな変動の意義を明らかにするためには，それらの変動を動物の性状に由来する真の変動としてとらえることが必要である．しかしその観察には，体重や器官重量の変動が，飼育環境や動物の個体差などに影響されやすいために，かなりの困難を伴うものと思われる．既に報告したように著者[2-4]らは生育場を異にする同一系統，週令のラットを同時に入手し，その性状を比較することによって，発育に伴う体重，器官重量の増加推移には，一定の変動があることを見い出した．これは使用した動物に本質的な差はなかったが，発育の程度に差があったために，一定の変動を，増加推移にみられる変動のズレとして検出できた例である．このように動物の性状の真の現われとしての体重や器官重量の増加推移の変動を観察するためには，本質的には差がないが，発育の程度に差のある動物を二群以上設定し，比較することは有用な方法と思われる．さらに薬物投与などによって体重や器官重量の増加推移にみられる変動の影響の受け方を各群間で比較，観察し，それらの変動に普遍性を見い出すことは，その変動の真実性をより確実なものにすると思われる．

本実験では，前報で述べた経験にもとづき，同一系統，同一週令のラットを体重の大小によって2群に分け

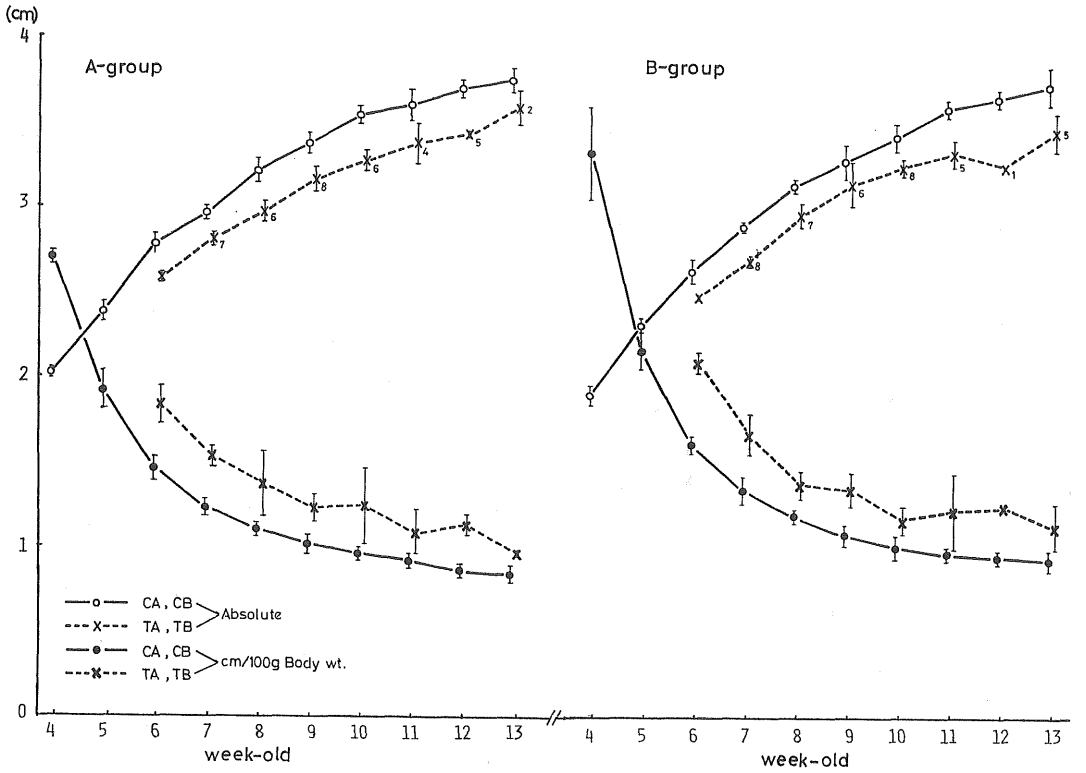


Fig. 2. Increasing curve of femur length CA: A group control, CB: B group control, TA: A group BHT treated, TB : B group BHT treated

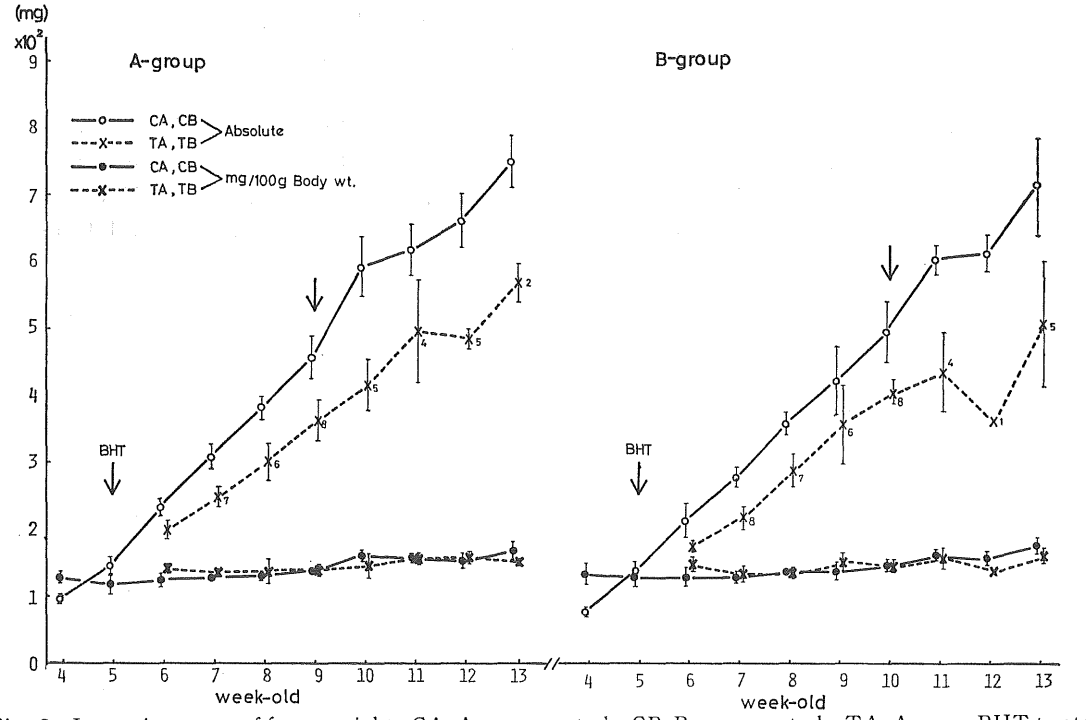


Fig. 3. Increasing curve of femur weight CA: A group control, CB: B group control, TA: A group BHT treated, TB : B group BHT treated

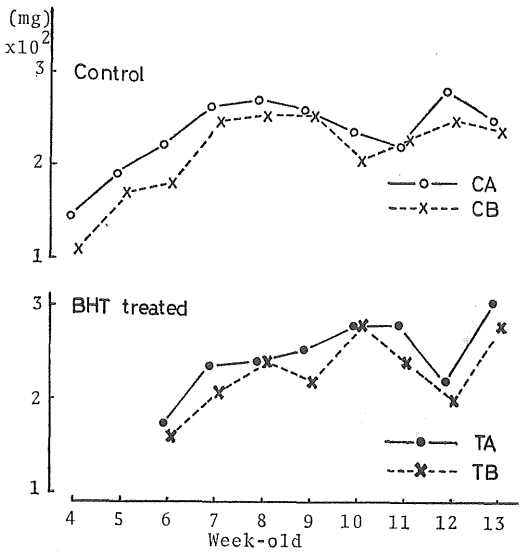


Fig. 4. Increasing curve of water content in femur
CA : A group control
CB : B group cotntrol
TA : A group BHT treated
TB : B group BHT treated

それらの発育に伴う大腿骨重量および骨長の増加推移にみられる変動を観察した.

骨重量では，体重が約 370g の時点で，その増加推移に変化がみられたが，これは体重の大小で分けた2群に1週間のズレを有して認められたが，この変動が，水分含量が一定になる時期と一致していることから，発育成長に伴う骨の構築の仕方などの骨の性状の変化が骨重量に現われたものと推定される．この増加推移にみられた変化は，体重や骨長の増加推移にも大きく現われない骨重量に固有のものと思われる．さらに BHT 摂取によって，体重の増加抑制に伴って骨重量の増加が抑制された場合でも，その変化が1週間遅れて認められたことは，体重の大きい群にみられた変化が，小さい群で1週間遅れて現われることと同様で，骨の本質的な性状は保たれていることから，BHT は特に骨に対する作用はないものと思われる.

骨長は体重や骨重量に比べ，その増加の割合は小さく，また体重の変動の影響を受けにくかったが，この骨長の増加のしかたは他の器官のうちで，特に脳のそれに似た性質を示している[2]. つまり骨重量が，その週令での体重の大きさによく伴うのに対して，骨長は体重に規定されるより，むしろ週令によって，その大きさが規定されていると思われ，二つの測定値の性質は，多少差異が認められた.

以上のように重量または長さの増加推移の観察結果から，骨の性質について推論したが，これらの変動の本態については，組織学的，生化学的方法によって追求されるべきであるが，今後，高齢期のラットでの観察を行ない見極めていきたいと思う.

要　旨

4週令 wistar 系雄ラットを用い，体重の大小によって2群に分け，さらに各々の群を，無処置と，5週令より BHT を摂取させた BHT 摂取群とに分け，この4群で，発育・成長に伴う大腿骨重量および骨長の増加推移にみられる変動を．比較，観察し，骨重量，骨長の示す性質について検討した.

文　献

1) 藤井　孝ら：東京衛研年報，26-2，190，1975
2) 福森信隆ら：東京衛研年報，25，557，1974
3) 坂本義光ら：東京衛研年報，25，577，1974
4) 平賀興吾ら：東京衛研年報，26-2，181，1975

Table 1. Body weight and femur length of control and BHT treated rats

Week-old	Body weight				Femur length			
	CA	TA	CB	TB	CA	TA	CB	TB
4	75.0±2.1(8)[1]		57.3±3.4(9)†		2.02±0.03(8) 2.70±0.04[2]		1.89±0.06(9)† 3.31±0.27†	
5	124.1±6.8(10)		107.4±6.4(10)†		2.38±0.06(10)[3] 1.92±0.11		2.30±0.04(10)† 2.15±0.11†	
6	187.2±11.3(10)	141.7±9.8(10)*	163.4±7.1(9)†	119.1±9.1(10)*†	2.78±0.06(10) 1.46±0.07	2.58±0.03(10)* 1.83±0.11*	2.62±0.07(9)† 1.60±0.05†	2.47±0.00(10)*† 2.08±0.16*†
7	241.3±14.8(9)	183.6±10.9(7)*	217.1±15.6(10)†	162.1±11.8(8)*†	2.96±0.04(9) 1.23±0.05	2.81±0.04(7)* 1.53±0.06*	2.88±0.03(10)† 1.33±0.08†	2.68±0.03(8)*† 1.66±0.12*†
8	290.9±19.3(10)	219.3±29.7(6)*	263.5±14.0(10)†	214.8±16.8(7)*	3.21±0.07(10) 1.10±0.04	2.97±0.06(6)* 1.37±0.19*	3.12±0.04(10)† 1.18±0.04†	2.95±0.07(7)* 1.37±0.08*
9	330.4±20.3(10)	259.0±25.2(8)*	306.8±22.1(10)†	234.6±23.6(6)*	3.37±0.06(10) 1.02±0.05	3.16±0.07(8)* 1.23±0.08*	3.26±0.10(10)† 1.07±0.06	3.13±0.13(6) 1.34±0.10*
10	367.9±21.6(10)	269.5±42.9(6)*	340.2±30.9(10)†	278.7±19.5(8)*	3.54±0.05(10) 0.96±0.04	3.27±0.06(6)* 1.24±0.22*	3.40±0.08(10)† 1.00±0.07	3.23±0.05(8)* 1.16±0.08*
11	394.1±27.9(10)	315.6±50.3(4)*	372.0±15.6(10)†	281.1±54.8(5)*	3.60±0.09(10) 0.92±0.04	3.37±0.12(4)* 1.08±0.14*	3.57±0.05(10) 0.96±0.04	3.31±0.08(5)* 1.21±0.22*
12	432.7±23.7(10)	302.4±17.3(5)*	388.8±20.2(10)†	261.0 (1)	3.69±0.05(10) 0.86±0.04	3.42±0.01(5)* 1.13±0.06*	3.63±0.05(10)† 0.94±0.04†	3.23 (1) 1.24
13	448.1±39.9(9)	371.5±19.0(2)*	405.2±39.8(8)†	311.4±46.3(5)*	3.74±0.07(9) 0.84±0.05	3.58±0.10(2)* 0.96±0.00*	3.70±0.11(8) 0.92±0.06†	3.43±0.11(5) 1.12±0.13*

1) : Absolute weight, 2) : mg/100 Body weight, 3) : Number of rats
Statistical significance : * ; CA vs TA, CB vs TB, † ; CA vs CB, TA vs TB, *† ; $P<0.05$
CA : A group control, CB : B group control, TA : A group BHT treated, TB : B group BHT treated

Table 2. Femur weight of control and BHT treated rats

Week-old	Wet weight				Dry weight			
	CA	TA	CB	TB	CA	TA	CB	TB
4	235.0±20.0(8)[1]		186.0±20.1(9)†		97.0±7.5(8)		76.0±7.5(7)†	
	312.0±24.4[2]		324.0±36.3		129.0±9.3		133.0±15.9	
5	336.0±20.1(10)[3]		308.0±29.6(10)†		145.0±14.5(9)		138.0±12.4(9)	
	271.0±17.1		287.0±27.0		118.0±14.3		129.0±14.7	
6	452.0±27.0(10)	373.0±38.6(10)*	394.0±42.4(9)†	334.0±22.5(10)*†	234.0±13.4(10)	200.0±14.5(10)*	211.0±26.8(7)†	174.0±7.5(10)*†
	242.0±22.5	263.0±20.4*	241.0±23.2	281.0±27.5*	125.0±9.6	142.0±7.4*	128.0±13.3	147.0±11.6*
7	572.0±41.4(9)	485.0±29.3(7)*	523.0±28.9(10)†	423.0±21.9(8)*†	309.0±18.3(9)	249.0±14.7(7)*	276.0±14.7(9)†	216.0±16.7(8)*†
	237.0±10.4	264.0±11.8*	241.0±14.8	262.0±20.0*	128.0±5.1	136.0±2.7*	128.0±7.8	133.0±10.5
8	651.0±35.4(10)	540.0±38.4(6)*	610.0±43.1(10)†	525.0±35.4(7)*	381.0±18.3(10)	301.0±27.7(6)*	357.0±17.1(9)†	287.0±23.9(7)*
	224.0±13.7	250.0±40.4	231.0±14.8	245.0±11.4	131.0±7.1	139.0±18.3	136.0±4.6	134.0±6.7
9	717.0±38.0(10)	615.0±51.8(8)*	674.0±85.8(10)	572.0±86.1(6)*	457.0±32.0(10)	363.0±30.6(8)*	420.0±49.7(10)	355.0±58.7(6)*
	217.0±7.7	238.0±15.7*	20.0±21.8	243.0±19.1	138.0±4.3	140.0±7.6	137.0±12.9	151.0±13.3
10	828.0±66.8(10)	693.0±41.8(6)*	701.0±70.0(10)†	683.0±41.3(8)	592.0±44.2(10)	415.0±39.0(5)*	494.0±44.7(10)†	404.0±17.9(8)*
	225.0±12.0	262.0±38.4*	206.0±13.2†	246.0±20.5*	161.0±7.9	146.0±18.9*	146.0±8.8†	145.0±9.5
11	839.0±60.6(10)	773.0±107.2(4)	829.0±33.1(10)	674.0±82.9(5)*	617.0±38.2(10)	495.0±77.5(4)*	600.0±20.6(10)	434.0±58.7(4)*†
	213.0±9.3	245.0±8.3*	223.0±10.5†	244.0±32.1	157.0±17.4	157.0±7.6	162.0±8.1	157.0±16.4
12	941.0±59.2(10)	702.0±21.7(5)*	859.0±41.2(10)†	560.0(1)	660.0±40.0(10)	484.0±14.6(5)*	610.0±26.5(10)†	362.0(1)
	218.0±17.5	233.0±9.9	221.0±10.5	214.6	153.0±11.6	160.0±7.6	157.0±8.7	138.7
13	996.0±58.3(9)	870.0±56.5(2)*	950.0±117.0(8)	782.0±139.8(5)*	749.0±38.7(9)	567.0±28.3(2)*	713.0±78.2(8)	505.0±92.5(5)*
	223.0±16.1	234.0±3.1	234.0±15.9	250.0±12.6	168.0±12.9	153.0±0.2	176.0±12.2	161.0±11.0*

1) : Absolute weight, 2) : mg/100 Body weight, 3) : Number of rats
Statistical significance : * ; CA vs TA, CB vs TB, † ; CA vs CB, TA vs TB, *† ; $P<0.05$
CA : A group control, CB : B group control, TA : A group BHT treated, TB : B group BHT treated

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 207-213, 1976

ラットの加令に伴う変化の組織学的検索

坂本 義光*, 平賀 興吾*

Histological Studies of Age-Related Changes in Rats

YOSHIMITSU SAKAMOTO* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

毒性試験では，ラットやマウスなどの実験動物が使用されることが多いが，飼育期間中これらの動物の諸臓器に，薬物などを摂取させた処理群だけでなく，その対照群の動物にも種々の病的な組織変化や腫瘍などが発生することが知られている[1-5]．またこれらの自然発生的な病変が，薬物の影響の観察を妨げる場合も少なくない．

薬物の毒性の評価は，動物の薬物に対する反応について得られた個々の試験成績を総合的に検討して得られるものであるが，そのためには，特に毒性試験に使用される実験動物の性状について十分な観察も必要である．

また自然発生的な病変など，動物の固有している性状は，その飼育された環境によっても変化するものと考えられ，他のデーターを参考にするだけでなく各研究施設で，その環境下で飼育した動物についてのデーターをも集積する必要がある．

当部では従来から毒性試験に使用されるラットの性状について，種々の報告をしてきたが，いずれも4～9週令までの若齢期のものであった[4]．

今回，さらに長期間飼育したラットの性状を知るために，当部で行なわれた毒性実験の際に対照群として用いられた雌雄ラットの諸臓器にみられた種々の変化を，飼育期間を追って観察し，その発生時期，頻度および程度の加令に伴う変動，またそれらについて認められる性差などについて検討したので報告する．

実験材料および方法

動物は静岡県実験動物農業組合の wistar-SLC 系ラット雌雄で生後4週令のものを購入し，当部 barrier-system 飼育室において飼育した．動物は，飼育期間中粉末飼料 CE-2 を固型化したもの，および水道水を自由に摂取させ，室温25°±1°，湿度50～60%，照明を午前6時より午後5時まで制御した環境下で飼育した．

動物は生後5週令より1，3，6，12，24ヶ月目に，無麻酔下，断頭屠殺後，解剖し，心臓，肝臓，腎臓，胃，小腸，大腸，盲腸，副腎，脾臓を摘出し，10%緩衝ホルマリンに投入，固定した．組織標本の作製は定法に従い，パラフィン包埋，薄切，ヘマトキリン-エオジン染色，PAS 染色を行ない，その他必要に応じて鉄染色（ベルリン青法），リポフスチン染色（ナイル青法），脂肪染色（ズダン黒法）を行なった．また12ヶ月目のラットの腎臓について，酸性ホスファターゼを，Barka-Anderson 法[6,7]によって検出した．

なお動物は各群5匹ずつとし，24ヶ月飼育群については13匹とした．また各飼育群のラットの週令は，各々9，18，32，57，109週令に相当する．なお本文中では，各群を飼育期間で述べた．

実験結果

特に顕著な組織変化を示した肝臓，腎臓および心臓，腎臓にみられた組織変化について，その発現例数と程度を Table 1～4 に示し，副腎，脾臓については本文で述べた．

また12ヶ月以降24ヶ月までの飼育期間中に雌雄各々3匹ずつの死亡例があり，飼育24ヶ月目の動物については，生存例雌雄各々10匹の諸臓器について得られた組織学的所見を Table に示した．死亡例については本文中に述べた．

肝臓　小葉に限局性巣状に見られる肝実質の壊死は雄で6ヶ月目から発現し，12ヶ月ではその程度が強くなった．雌では12ヶ月のみで認められ，雌雄とも24ヶ月飼育群では全く認められなかった．

限局性の変性巣は，白血球やリンパ球などの単核，小円形細胞の小巣の周囲にエオジン好染性の均質な細胞質

* 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

を示し，細胞境界の不明瞭な肝細胞が存在している変化で，浸潤細胞に混じって，好酸性小体の存在も認められた．この変化は雌雄ともに飼育6ヶ月目から認められ，その程度の変化は12ヶ月を頂点として以後減少する傾向を示した．

肉芽腫は変性萎縮した肝細胞が，単核小円形細胞やKupffer細胞などと共に，ほぼ円形を呈して存在し，その周囲には変性巣をとり囲むように浸潤細胞が存在している場合もあり，周囲の実質との区別は明瞭である．この変化は雌で6ヶ月目より認められ，12ヶ月では例数，程度とも増加し，24ヶ月では減少したのに対して，雄では12ヶ月目より認められ，24ヶ月で例数，程度の増加を示した．

肝細胞の単細胞的壊死は中心静脈の周辺で，単核小円形細胞や白血球を伴った1個又は数個の肝細胞の壊死像が認められたもので，雌雄とも飼育1ヶ月目から12ヶ月目まで認められ，雌でその程度は強いようであった．

肝細胞の空胞化は雌雄ともに24ヶ月で散見され，小葉の周辺から中間部にかけてみられた．さらに雄では空胞が融合して，さらに大きな空胞を形成し，風船細胞様を呈している肝細胞も見られ，空胞化の程度は雄で強かった．またこの空胞は，脂肪滴の存在と一致し24ヶ月では脂肪滴の蓄積が多くなることを示した．

細胆管の増生は，雌雄とも6ヶ月から認められ，加令に伴ってその発現例数，程度が増加しており，その傾向は雄で強かった．増生した細胆管は集簇して，その全体が単核小円形細胞や線維芽細胞などによって囲まれて，小葉周辺部に島状を呈して存在した．さらに一定量増生すると，それ以上増生することはなく，むしろ胆管上皮は腫張または偏平化を示して崩壊し，その部分が線維によって置換されている像もみられた．この線維化は12ヶ月目から認められ，雄で強く現われた．

肝細胞の結節状の増生は，正常より小さく好塩基性物質の多い肝細胞が結節状に集簇している変化で，細胞質に空胞の存在している肝細胞もみられた．この変化は雌雄ともに12ヶ月より見られ，24ヶ月では発現例数，程度ともに増加し，その傾向は雄で強く現われた．

グリソン鞘内の細胞浸潤は雌雄ともに1ヶ月飼育群より認められ12ヶ月目よりその程度が強くなった．また類洞内の単核小円形細胞の浸潤は小葉に散在してみられるもので，程度の強い場合は，肝細胞を押し退け集簇巣をつくって存在しているものも見られた．グリソン鞘内の細胞浸潤とともに加令に伴い増加した．

個体別に各変性の程度については表示しなかったが，1個体での各変化を比較すると，限局性の変性巣の程度が強い場合，類洞内に単核の小円形細胞などが多く存在し，また胆管の増生がみられるグリソン鞘では，やはり浸潤細胞が多くみられたが，その他の変化には，程度に相関は認められなかった．

腎臓　24ヶ月飼育群の雄では，10例中4例が嚢胞腎であり，それらを除いた6例についての所見をTable 2, 3に示した．組織学的所見は，尿細管，間質，糸球体に分けて示した．近位尿細管上皮細胞の変性は，雄では3ヶ月，雌では6ヶ月目から認められ，ともに加令に伴って発現例数，程度が増加した．この変化は，上皮細胞の核の膨化，細胞質のエオジンの染色性の低下，細胞質の腫張，基底膜の肥厚などがみられ，さらには尿細管上皮の壊死も認められるもので，特に尿細管上皮の壊死は雌雄とも12ヶ月目より認められ，24ヶ月ではより顕著になった．この近位尿細管の変性の程度の増加に伴って，12ヶ月目より，主に遠位尿細管で上皮細胞の偏平化，管腔拡張，尿細管円柱の存在が観察された．また糸球体も尿細管の各変化と同様に12ヶ月よりボーマン嚢基底膜の肥厚，糸球体の萎縮，崩壊が認められた．またこれらの変化を示す糸球体は尿細管の一連の変化が特に強く見られる部位に限局性にみられた．間質の浸潤細胞巣も皮質の変化の強い部位にみられ，これらの変化はいずれも雄で強く現われた．

その他の尿細管の変性としては，皮髄境界部の近位尿細管上皮の腫張がみられた．この変化は，雌雄ともに飼育初期から認められ，ともに加令に伴って程度が強くなった．

尿細管上皮の硝子様変性は，上皮細胞の胞体内にエオジン好染性で，形は不整，大小不同の均質無構造物質が存在する変化で，管腔中にその物質が存在している像もみられたがその場合はエオジンの染色性は低くかった．この変化は雄では1ヶ月目から12ヶ月まで認められ，特に3，6ヶ月でその程度が強かったのに対して，雌では1ヶ月目にのみ認められた．この変性に関して12ヶ月飼育群の動物を用いて尿細管の酸性ホスファターゼ活性を見ると，雄では尿細管上皮細胞細胞質で，ライソゾームの集簇が多くみられ，さらに赤色の反応物が拡散している部分も存在した．また硝子様の無構造物質も同様に反応物の拡散のために赤色を呈していた．管腔中に存在している場合には，その濃度は薄かった．また雌の12，24ヶ月飼育群に多く見られた，エオジン好染色のタンパク滴も，酸性ホスファターゼの活性が認められた．

黄または黄褐色の色素顆粒の沈着は鉄反応陰性と陽性のものがあり，前者は雌で3ヶ月，雄で6ヶ月目より認められた黄褐色の顆粒状または微細滴状で，変性を起し

ていない尿細管や皮髄境界部の尿細管上皮細胞に存在し，加令に伴い増加した．この色素顆粒は，PAS反性陰性，ナイル青染色では，青緑色から暗青色を呈した．また鉄反応陽性の色素顆粒は変性した尿細管上皮細胞の細胞質および壊死した尿細管周囲の間質に認められ，尿細管の変性，壊死の程度に伴って増加した．

心臓　浸潤細胞を伴った心筋の変性が，12ヶ月の雌雄，24ヶ月雄に散見され，限局性の線維化は雄では12ヶ月よりみられ加令に伴ってその発現例数は多くなった．

胃　胃底腺腺上皮細胞の偏平化および腺腔の拡張が1ヶ月目より雌雄でともにみられ，12，24ヶ月では発現例数，程度とも増加した．また小腸，大腸，盲腸には加令に伴った変化はみられなかった．

副腎　飼育期間を通して雄では束状層から網状層にかけての皮質細胞に，全体的に空胞がみられたのに対し，雌では24ヶ月で空胞の存在が皮質に限局性にみられる副腎が散見された．雄では24ヶ月で髄質の類洞の拡張したものが10例中2例みられたが，雌では特に変化はなかった．また雄には褐色細胞腫が1例認められた．

脾臓　飼育1ヶ月目より全期間を通してヘモジデリンの沈着が雄に比べて雌で多くみられた．また24ヶ月群では，雌雄に髄外造血像，充血が散見された．

死亡例　雌雄各々3例のうち雌1例は途中死亡例であり，その他は屠殺死亡例である．これらの動物の週令は，雄では，84，104，106週令，雌では75，84，103週令であって，雌103週令のものが途中死亡例である．

死亡例にみられた組織変化のうち，24ヶ月飼育群と特に異なった様相を示したのは肝臓であった．全例で小葉の周辺から中間部にかけて空胞が多く24ヶ月に比べその程度は強く現われていた．また小葉中心性の肝実質の壊死の顕著な例が，屠殺死亡例の雌雄各々1例ずつ認められた．類洞の拡張およびビマン性の細胞浸潤の顕著な例が，雄に1例，雌に2例みられ，このうち雌1例は中心性壊死の顕著な例であった．また小葉にビマン性の細胞浸潤の顕著な例は，剖検の際に脾臓の腫大を示した例と一致していた．胆管の増生の程度は24ヶ月飼育群とほぼ同程度であったが，前述した脾臓の腫大を示した例で，さらに細胆管が，小葉周辺の肝細胞間に散在性に増生している像がみられた．

腎臓は雄の106週令のものが嚢胞腎であった以外は，24ヶ月飼育群と比較して特に著変はみられず，尿細管の変性をはじめとする一連の変化が，死亡例で強いという傾向はなかった．

心臓，胃は24ヶ月飼育群と比較して著変はみられなかった．

副腎は雄に褐色細胞腫が1例認められた以外，雌雄ともに著変はなかった．

脾臓は剖検の際，腫大を示したものが雄1例，雌2例認められ，髄外造血像の顕著な例が雄に1例認められた．

総括および考察

肝臓はその機能の複雑さを反映して種々の変性が認められ，また肝実質の損傷の受け方も若齢期と高齢期では異なっているように思えた．今回観察された変性のうちで限局性の壊死，変性巣および肉芽腫は一時期多発し，またその程度も強くみられ，その後軽減する傾向を示したが，これらの変性について報告された例[5]をみても同様の傾向を示しており，このような変性にみられる経過は，限局性の組織変化の示すひとつのパターンであると考えられ，また肝臓ではこのような変性が他の臓器と比較しておこりやすいと考えられる．また藤井ら[4]は10週令以下のSD系ラットでも，これらの変性を観察しており，動物の性状に関して大きな意味はないと思われる．また逆に，加令に伴う動物の性状の変化を考える場合，このような変性が生じても回復しうる動物の性状に注目したいと思う．

加令に伴ってその発現例数，程度が増加したものは，細胆管の増生，結節性の肝細胞の増殖，グリソン鞘内および類洞内の散在性の浸潤，空胞化であったが，このうち空胞化は脂肪の蓄積によるもので，24ヶ月目から認められ，加令に伴いさらにその程度は増加すると思われ，高齢時の肝細胞の変性の一成因となっているものと思われる．

肝臓は小葉の各部位によってその部位を構成する肝細胞の機能に差があり，薬物などによる肝障害の場合，その機能の差を反映して各小葉に規則的に変性が現われるが，今回観察した24ヶ月飼育群や死亡例にみられる空胞化，つまり脂肪蓄積や小葉中心性の壊死なども同様に小葉に規則的に現われる傾向を示した．このことは結節性の肝細胞の増生で，異常な肝細胞が出現することと合せて，高齢期では，若齢期とは異なった変性のパターンを示し加令に伴って肝機能の低下や異常が生じていることを反映していると思われる．

腎臓で加令に伴って発生した尿細管や糸球体にみられた一連の変性は，今回用いたwistar系だけでなく，SD系，Donryu系のラットでもその発生がみられることが知られている[1,2,4,5]．いずれも雄で高度に認められ，加令に伴って頻度，程度ともに増加し嚢胞腎への経過をたどるものと思われる．この変性の成り立ちについては不明な点が多いが糸球体基底膜の肥厚を初期像とする報告や尿細管の円柱形成に始まるとする報告がある．今回の実験

では，主部尿細管上皮の変性が初期像としてみられたが，それに続く尿細管上皮の偏平化，管腔拡張，円柱形成および糸球体の変性などいずれも腎臓の構造の特徴を反映したものと思われる．また雄に強く表われることに関しては，腎の構造，生理的機能における性差が考えられる．飼育初期より雄の尿細管上皮細胞にみられた硝子様の変性[8]は，細胞質が変性したものか，再吸収されたタンパク質の変性したものかは不明であるが，いずれにせよ，積極的なライソゾームの関与が考えられる変化であるが，この変化も腎機能における性差を示すものと思われる．

その他，心臓，胃などにも加令に伴った変性が認められたが，今回観察された種々の変性を総合してみると，その多くが加令に伴って発生しているが，変性の種類によっては，発生時期やその程度の変化する経過は異なっていた．また大きくは，消退する変性とそうでないものとに分けられると思われる．このことはその変性の性質にもよるが，さらには，その年令におけるラットの性状にも大きく関わっていると考えられる，つまりほぼ12ヶ月目（約59週令）を境としてラットの性状が大きく変化し，種々の変性が現われやすい素地が生じると思われる．

老化は偶発的に起る組織の微損傷と，それを補う組織の再成能力とがあいまって進行すると考えられているが，今回観察した高齢期の変性は，内因性のものであるか，外因性のものであるか，その起点に関しては，不明な点が多く，またそれを老化現象としてとらえる事には疑問もあるが，いずれもラットの性状を反映し，老化を進める要因になっていると考えられる．また若齢期にみられた変性の程度は雌で強く現われたものもあるが，高齢期の変性は，そのほとんどが雄に強く表われていた．これらは，雌雄の下垂体や副腎などのホルモンを介しての生理的な差がこれらの変性の基盤をなしていると思われるが，この性差が，ラットの寿命にどのように影響するかは今後の興味ある問題と思われる．

結　　語

4週令wistar系ラット雌雄を用い，5週令より24ヶ月間飼育し，飼育後1，3，6，12，24ヶ月目のラットの肝臓，腎臓，心臓，胃，小腸，大腸，盲腸，副腎，脾臓にみられる組織変化を観察し以下の結果を得た．

1）加令に伴って発現例数，程度の増加を示したのは肝臓では，細胆管の増生，肝細胞の結節状の増生，脂肪蓄積による空胞化，グリソン鞘内および類洞内のビマン性の細胞浸潤，腎臓では，近位尿細管上皮細胞の変性，壊死，尿細管上皮の偏平化，管腔拡張，尿細管円柱，色素顆粒の沈着，間質の細胞浸潤巣，糸球体基底膜の肥厚，萎縮，崩壊，心臓では浸潤細胞を伴う限局性の心筋の変性，間質の線維下，胃では胃腺腺上皮の偏平化と腺腔の拡張であった．これらの変化はいずれも雄で強く現われた．

2）発現例数および程度の変化が加令に伴わない変性は，肝臓では限局性の壊死，変性巣，肉芽腫，中心静脈周辺の肝細胞の単細胞的壊死で，肉芽腫を除いて12ヶ月以前からみられ高齢期には消退した．腎臓では尿細管上皮の硝子様の変性で，特に雄に高度にみられ，高齢期には消退した．

3）雄の副腎では飼育1ヶ月目から束状層および網状層の細胞に空胞が多くみられ，雌では24ヶ月にのみ限局性に空胞がみられる副腎が散見された．24ヶ月では雄に髄質の類洞の拡張，褐色細胞腫が散見された．

4）脾臓は，全期間を通してヘモジデリンの沈着が雌で多くみられた．24ヶ月では雌雄に髄外造血像，充血が散見された．

5）死亡例では，24ヶ月飼育群と比較して，肝臓の変性が強く現われた．腎臓は特に変性が強くなるという傾向はみられなかった．

6）以上の結果から種々の変性の発現時期，程度の変化のしかた，それらにみられる性差などを観察しラットの性状について考察を加えた．

文　　献

1) 江角吉造，須田沖夫，西村　毅，東　稔広：実験動物，20，196，1971
2) 田中寿子，飯塚　壮：実験動物，23，204，1973
3) 西部忠幸，蒔田徳太郎，螺良義彦：実験動物，25，203，1973
4) 藤井　孝，阿部幸恵，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，25，609，1974
5) 西部忠幸：奈医誌，27，1，1976
6) Barka, T. and P. J. Anderson : *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 741, 1962
7) 渡辺慶一，鈴木　裕：モダンメディア，17，141，1971
8) 二木力夫，菊池セイ子，高橋信子，高垣善男：実験動物，23，204，1973

Table 1. Summary of microscopic changes in liver

		Male					Female				
Months		1	3	6	12	24	1	3	6	12	24
No. of preparations		5	5	5	5	10	5	5	5	5	10
Focal necrosis	NO**	5	5	2	1	10	5	5	5	2	10
	SL	—	—	3	1	—	—	—	—	2	—
	MO	—	—	—	3	—	—	—	—	1	—
Focal degeneration	NO	5	5	4	—	7	5	5	3	—	6
	SL	—	—	1	4	3	—	—	2	3	4
	MO	—	—	—	3	—	—	—	—	2	—
Granuloma	NO	5	5	5	4	5	5	5	4	1	6
	SL	—	—	—	1	3	—	—	1	2	4
	MO	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—
Unit cellular necrosis in central lobule	NO	4	2	4	4	10	2	2	3	4	10
	SL	1	3	1	1	0	3	2	2	1	—
	MO	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Vacoulation of liver cells	NO	5	5	5	5	4	5	5	5	5	7
	SL	—	—	—	—	4	—	—	—	—	2
	MO	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Prolifiration of small bile ducts	NO	5	5	1	—	—	5	5	4	1	—
	SL	—	—	4	—	—	—	—	1	1	3
	MO	—	—	—	4	5	—	—	—	3	5
	SE	—	—	—	1	5	—	—	—	—	2
Degeneration and fibrosis of small bile ducts	NO	5	5	5	3	—	5	5	5	4	1
	SL	—	—	—	2	2	—	—	—	1	8
	MO	—	—	—	—	7	—	—	—	—	1
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Nodular hyperplasia of liver cells	NO	5	5	5	4	2	5	5	5	4	1
	SL	—	—	—	1	5	—	—	—	1	4
	MO	—	—	—	—	2	—	—	—	—	5
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Cell infiltration in Glisson's capsule	NO	3	3	2	—	—	3	4	2	—	—
	SL	2	2	2	5	5	2	1	3	3	6
	MO	—	—	1	—	5	—	—	—	2	3
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Increasing of small round cells in sinusoid	NO	5	5	5	3	—	5	5	3	1	2
	SL	—	—	—	2	6	—	—	2	3	6
	MO	—	—	—	—	4	—	—	—	1	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1

** Grade of change, NO;NO Chage, SL;Slight, MO;Moderate, SE;Severe

Table 2. Summary of microscopic changes in kidney (I)

		Male					Female				
Months		1	3	6	12	24	1	3	6	12	24
No. of preparations		5	5	5	5	6	5	5	5	5	10
Urinary tubules Degeneration	NO	5	3	2	—	—	5	5	3	1	—
	SL	—	2	3	3	—	—	—	2	3	—
	MO	—	—	—	2	3	—	—	—	1	7
	SE	—	—	—	—	3	—	—	—	—	3
Necrosis	NO	5	5	5	1	—	5	5	5	4	—
	SL	—	—	—	4	2	—	—	—	1	7
	MO	—	—	—	—	3	—	—	—	—	2
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
Squamatization of epithelium	NO	5	5	5	—	—	5	5	5	2	—
	SL	—	—	—	4	2	—	—	—	2	8
	MO	—	—	—	1	4	—	—	—	1	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Dilatation of lumina	NO	5	5	5	1	—	5	5	5	3	—
	SL	—	—	—	3	1	—	—	—	1	4
	MO	—	—	—	1	4	—	—	—	1	6
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Eosinophilic casts in lumina	NO	5	5	4	—	—	5	5	5	2	—
	SL	—	—	1	1	2	—	—	—	2	6
	MO	—	—	—	4	3	—	—	—	1	3
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
Eosinophilic droplets in epithelium	NO	5	5	5	3	3	5	5	2	—	4
	SL	—	—	—	2	3	—	—	3	2	3
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Swelling of epithelium at juxtamedullary zone	NO	5	4	1	—	—	3	1	2	—	—
	SL	—	1	4	5	2	2	4	1	2	4
	MO	—	—	—	—	3	—	—	2	3	6
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Hialine like degeneration of epithelium	NO	—	—	—	—	6	1	5	5	5	5
	SL	5	1	3	5	—	4	—	—	—	—
	MO	—	4	2	—	—	—	—	—	—	—

Table 3. Summary of microscopic changes in Kidney (II)

		Mele					Female				
Months		1	3	6	12	24	1	3	6	12	24
No. of preparation		5	5	5	5	6	5	5	5	5	10
Urinary tubules	NO	5	5	—	—	—	5	3	—	—	—
Deposition of pigments	SL	—	—	5	5	2	—	2	5	5	2
a) iron reaction negative	MO	—	—	—	—	4	—	—	—	—	8
	NO	5	3	4	1	—	5	5	5	4	—
b) iron reaction positive	SL	—	2	1	4	2	—	—	—	1	9
	MO	—	—	—	—	3	—	—	—	—	1
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
	NO	5	5	5	1	—	5	5	5	3	—
Interstitium	SL	—	—	—	3	2	—	—	—	1	6
Focal cell infiltration	MO	—	—	—	1	3	—	—	—	1	4
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
	NO	5	5	5	2	—	5	5	5	2	—
Glomerulus	SL	—	—	—	3	1	—	—	—	3	8
Thickning of basement membrane	MO	—	—	—	—	3	—	—	—	—	2
	SE	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
	NO	5	5	5	1	—	5	5	5	4	—
Atrophy and destruction	SL	—	—	—	4	4	—	—	—	1	8
	MO	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2

Table 4. Summary of microscopic changes in Heart and Stomach

		Male					Female				
Months		1	3	6	12	24	1	3	6	12	24
No. of preparations		5	5	5	5	10	5	5	5	5	10
Heart	NO	5	5	5	4	8	5	5	5	4	10
Focal cell infiltration and degeneration	SL	—	—	—	1	2	—	—	—	1	—
	NO	5	5	5	3	2	5	5	5	5	7
Focal fibrosis	SL	—	—	—	2	7	—	—	—	—	3
	MO	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
	NO	3	4	4	1	1	4	3	4	1	0
Stomach	SL	2	1	1	4	5	1	2	1	3	5
Dilatation of glands	MO	—	—	—	—	3	—	—	—	1	5
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 214-217, 1976

ラットにおける器官水分含有量とその固定後の重量変動の関連について

矢野 範男*, 湯澤 勝広*, 長澤 明道*, 平賀 興吾*

Relationship between Variation of Organ Weight after Fixation and Water Content of Organ in Rats

NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

前報[1]で，ラットの器官重量が10%緩衝ホルマリン固定の過程において，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について検討した結果を報告した．今回はラットの系統を変え観察する器官組織の種類を増し固定後の重量変化の態度と水分含量との関係を検討した．

実験材料ならびに方法

実験動物は7週令のSD-JCL系ラット雌雄各5匹(平均体重：雌 158g，雄 215g) を用いた．観察器官組織は脳，心臓，肺，腎臓，肝臓，脾臓，胸腺，副腎，精巣，卵巣，筋肉，皮膚とし，ラットを断頭放血後解剖し摘出した．脳，心臓，脾臓，胸腺は正中線にそって右側を固定に，左側を水分測定に，筋肉（腹筋），皮膚（腹部）は白線から分けて右側を固定に，左側を水分測定に，肝臓（正中葉）肺（左葉）を2分し片方を固定に他方を水分測定に，腎臓は右側に半分割を入れ固定に，左側を水分測定に，副腎，精巣，卵巣は右側を固定に，左側を水分測定に用い処理後は直ちに重量を測定した．固定には10%緩衝ホルマリン液を用い，液量は一匹当り150ml とし，室温で24時間振とうし，途中で固定液の交換は行なわず，その後は静置し固定を続けた．重量は固定開始後3，6時間及び1，2，3，4，5，7，9日の計9回測定した．この際，付着した固定液はろ紙，ガーゼを用いて拭き去ったのち測定し固定前重量を100として表現した．器官組織の水分含有量は器官組織を110℃の乾燥器に入れ72時間乾燥，その重量減少分を水分含有量とし百分率にして表した．

実験結果ならびに考察

結果は Table.1 および Fig.1 に示す通りである．**固定後の重量変化**は，脳および肝臓において，固定開始より増加が認められ，脳では3時間目がピークで以降漸減，肝臓ではわずかに増加傾向が続いた．腎臓および卵巣では3時間でやや増加したが以降減少傾向を示した．卵巣は減少の変動が大きく5日では97.4%であったが，7日では82.8%を示した．肺，胸腺，および皮膚は初期に減少し後増加の傾向がみられ，肺では4日後120% 前後にも達し以降やや減少に向った．皮膚は変動が大きかった．心臓，脾臓，精巣および筋肉は初期よりそれぞれ同程度の減少を維持した．精巣の減少は僅かで98.9%から97.6%の間であった．副腎は6時間までは雌雄同様に漸減したが，以降において雄は大きい変動を示しながら増加後約100%を維持した．これに対し雌は減少状態のまま大きい変動がみられた．

前報[1]では脳，腎臓，肝臓，心臓，脾臓，精巣の固定後の重量変化を報告したが，今回得た成績と比較すると腎臓を除いて極めてよく一致している．前報で腎臓は雄においては減少したのに対し雌では増加し雌雄間では相反する所見を得たが今回は雌雄間で大差なく初期増加以降漸減をみた．この原因としてラットの系統差，週令差を無視出来ず，このことは腎機能ともかかわることと考えられるので今後再検討をすべきことのように思われる．**水分含有量**は器官組織によって変動がみられたが，80%以上の含有量を示すものは雄のみに存在し胸腺80.2%，肺80.9%，副腎85.0%，精巣87.0%であった．70%以下のものは，肝臓雄69.8%，皮膚雄61.6%雌60.5%であり，肝臓雌70.1%，副腎雌71.3%であった以外は75.5%

* 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

から79.8%の間にあった．雌雄を比較すると脳が雌雄とも79.8%で全く差がなかったほかは肝臓と腎臓を除き雄が大の傾向がみられ，差が大きく注目されたのは副腎で雄の85.0%に対し雌は71.3%であった．肺は雄80.9%雌79.6%，皮膚は雄61.6%，雌60.5%，筋肉は雄76.4%，雌75.5%，心臓は雄78.7%，雌77.9%，腎臓は雄78.5%，雌79.2%の差を示した．各器官組織水分含有量のバラツキを相対標準偏差によってみると精巣が最も小で，0.13%，次いで雄脾臓0.23%，雌肝臓0.23%，雌脳0.24%，雄脳0.31%，雌脾臓0.32%，雌心臓0.47%，雄肝臓0.51%，雌雄腎臓0.65%，雄心臓0.8%，雌胸腺0.81%，雄筋肉1.07%，雄肺1.07%，雄胸腺1.14%，雌肺1.46%，雌筋肉2.05%，雌皮膚5.27%，雄皮膚7.54%，雄副腎10.96%，卵巣12.07%，雌副腎20.65%であった．副腎，卵巣，皮膚，筋肉にバラツキの大きいことが注目される．バラツキの原因としてはその器官組織の機能状態と関連し機能変化のはげしい器官組織ほどバラツキが大きくなるものと考えられる．**固定後の重量増減と水分含有量の関係**をみると前表のようになり，水分含有量の段階によって固定後の重量増減がわかれた．このことは水分含有量が，固定後の重量増減を微妙に規定していることを示すようで興味深い．また，水分含有量のバラツキと固定後の重量変動の態度をみると，水分含有量のバラツキの大きかった卵巣，副腎，皮膚等の重量変動は大きく，バラツキの最少であった精巣の重量変動は非常に小さかったことにより，水分含有量が固定後の重量変動にも関与していることがうかがえた．

水分含有量	固定後の重量増減	器官・組織
85.0—87.0	減少するが軽微	精巣・雄副腎
79.8—80.9	増加	脳，肺，胸腺
75.5—79.5	減少	心臓，腎臓，脾臓，雌副腎，卵巣，筋肉
69.8—70.1	増加	肝臓
61.6—60.5	増減半ば	皮膚

要旨

1. ラット（SD-JCL系7週令雌雄）を用い，10%ホルマリン固定後の器官，組織の重量と器官，組織の水分含有量を測定した．

2. 固定後の重量変化と水分含有量との関連を検討し，固定後の重量増減変動には水分含有量の関与が大きいとの示唆を得た．

文献

1) 矢野範男，湯澤勝広，藤井 孝，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，211，1975

Table 1. Percentage of organ weight after fixation

	Organ	*	0	3	6	1	2	3	4	5	7	9	Water content
Male	Brain	5	100	104.2±1.6	105.4±1.2	105.8±1.5	105.2±0.9	105.0±1.4	104.7±1.6	104.1±1.4	103.6±1.6	103.0±1.5	79.8±0.31
	Thymus	5	100	97.2±1.9	98.5±2.3	103.3±2.6	105.6±3.5	105.3±2.1	105.9±2.6	107.3±1.3	105.1±3.5	104.7±2.6	80.2±1.14
	Heart	5	100	93.3±1.2	92.5±1.4	93.0±1.6	92.1±0.9	93.6±2.1	92.1±1.7	91.2±1.5	92.2±0.9	91.3±1.8	78.7±0.80
	Lung	5	100	90.1±2.8	93.5±3.8	105.4±3.0	112.8±2.3	115.8±8.6	118.9±9.9	115.3±9.4	112.6±10.3	109.0±10.8	80.9±1.07
	Liver	5	100	103.8±1.9	103.6±1.3	102.6±1.5	103.1±1.4	103.7±1.5	104.5±1.0	104.7±0.9	105.9±1.1	105.9±1.4	69.8±0.51
	Kidney	5	100	102.1±1.2	100.2±1.0	99.6±1.2	98.6±1.6	99.1±1.8	98.2±1.9	97.3±1.3	97.0±1.9	96.2±1.2	78.5±0.65
	Spleen	5	100	91.2±1.8	90.4±1.3	91.4±1.7	91.4±1.1	92.8±0.6	94.0±1.8	93.5±0.7	93.4±1.7	93.0±1.4	78.2±0.23
	Adrenal	5	100	94.4±5.4	93.3±19.0	93.4±9.9	99.0±12.2	95.5±11.9	100.0±12.8	99.0±8.4	101.8±8.6	99.3±10.3	85.0±10.96
	Testis	5	100	97.8±0.4	98.2±0.2	98.9±0.8	98.6±0.5	98.3±0.4	98.2±0.3	97.9±0.4	97.7±0.5	97.6±0.7	87.0±0.13
	Skin	5	100	94.8±2.3	95.0±2.8	97.0±6.1	99.1±8.6	106.0±11.5	106.7±13.2	98.6±7.9	105.5±16.5	99.6±10.8	61.6±7.54
	Muscle	5	100	94.4±1.9	94.4±0.8	94.0±1.8	94.1±5.0	93.9±1.4	94.3±0.9	92.0±0.8	93.3±5.4	90.9±2.0	76.4±1.07
Female	Brain	5	100	105.4±1.7	105.7±1.6	105.3±1.8	104.3±1.6	103.6±1.9	102.9±1.8	102.9±3.3	101.3±2.8	100.8±3.0	79.8±0.24
	Thymus	5	100	98.6±1.5	99.8±2.5	103.8±3.8	104.4±2.1	104.0±1.5	103.9±1.6	103.7±2.0	102.2±1.5	103.3±2.4	79.8±0.81
	Heart	5	100	94.6±0.8	93.1±1.1	94.1±0.3	94.1±1.1	94.2±0.8	94.8±1.3	94.9±1.5	94.2±1.4	94.1±2.2	79.9±0.47
	Lung	5	100	89.8±1.9	93.2±2.5	107.4±5.1	113.0±5.3	120.6±4.6	122.8±4.5	120.3±3.3	117.2±5.3	115.3±3.9	79.6±1.46
	Liver	5	100	103.2±2.4	101.4±1.4	101.6±1.5	102.6±1.9	103.3±2.0	104.3±1.6	104.7±2.0	104.2±1.6	104.8±2.2	70.1±0.23
	Kidney	5	100	101.1±1.5	97.7±1.8	98.8±1.5	97.3±2.6	97.0±1.8	97.8±2.5	97.1±5.4	94.9±2.8	95.5±2.4	79.2±0.65
	Spleen	5	100	93.2±2.5	92.5±2.4	92.3±1.9	93.4±3.1	94.5±2.1	95.9±1.5	95.7±1.8	95.4±1.7	95.2±2.8	78.1±0.32
	Adrenal	5	100	95.4±11.8	94.7±3.7	87.3±9.9	92.6±2.5	82.6±16.6	96.1±10.8	94.4±3.9	84.8±10.2	94.2±18.1	71.3±20.65
	Ovary	5	100	101.8±8.9	93.6±3.5	97.3±8.9	94.7±4.1	94.5±9.4	96.7±11.5	97.4±6.6	82.8±15.4	88.9±16.9	77.8±12.07
	Skin	5	100	94.7±1.0	93.6±1.3	93.1±3.4	93.5±5.9	98.3±7.8	102.8±7.6	97.0±9.7	97.1±8.5	98.0±10.1	60.5±5.27
	Muscle	5	100	95.4±1.3	95.3±1.6	93.1±0.9	94.4±4.6	94.6±2.4	94.4±2.6	93.7±2.0	93.4±3.6	93.3±1.3	75.5±2.05

*No. of organs, 1)Percent, 2)Mean±S.D. 3)Mean ± Relative standard deviation (%)

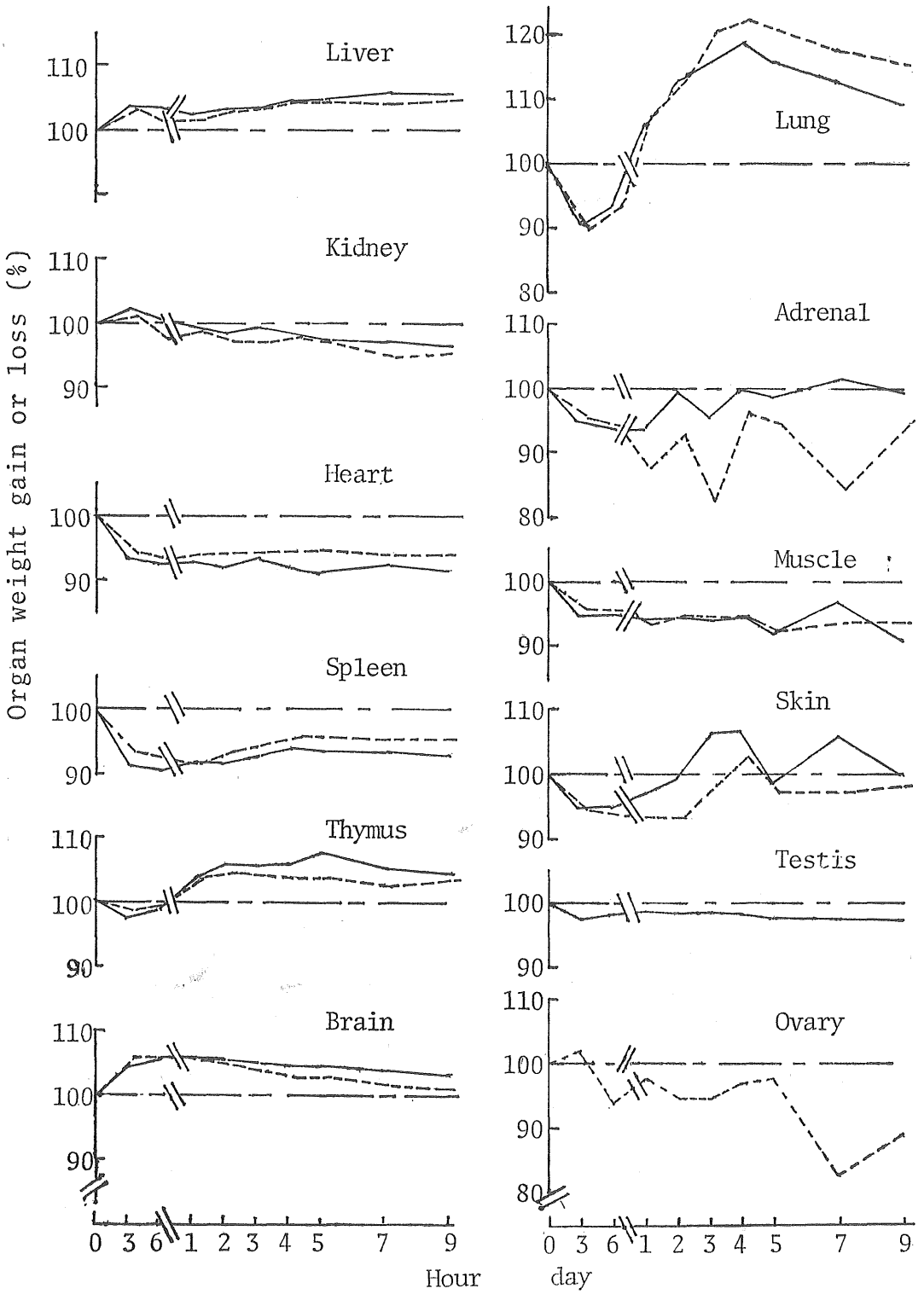


Fig. 1. Changes of organ weight gain or loss after fixation
——— ; male, - - - - - - - ; female, —·—·— ; line of 100%

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-2, 218-226, 1976

電子顕微鏡観察のための基礎的研究
固定液と包埋剤

三栗谷 久敏*, 福森 信隆*, 平賀 興吾*

Fundamental Study for Electron Microscopic Observation
Fixative and Embedding Resin

HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

電子顕微鏡技術の発展に伴い，医学・生物学の面でも固定法，包埋剤の改良が加えられている．現在，固定法はアルデヒド系のホルムアルデヒドやグルタールアルデヒドなどで前固定を行い，オスミウム酸で後固定する二重固定法が，また包埋剤としてはエポキシ系樹脂が盛んに用いられている．しかし，固定液の種類あるいは固定液の濃度・浸透圧によって細胞の微細構造が微妙に変化し，また包埋剤では樹脂の種類あるいは同一樹脂を用いた包埋剤でも組成によって硬さ，薄切の難易，細胞の微細構造の保存性などに変化を生ずることは周知の事実である[1,2]．

今回，著者らは動物組織の微細構造を最も良好な条件で観察するために，包埋剤の選択および固定液の濃度・浸透圧について以下に述べる一連の実験を行い検討したので報告する．

実　験　方　法

試料はラットの肝臓方形葉を約1 mm^3の細片として用い，固定法は下記の実験目的に応じてショ糖濃度を変えた0.1Mリン酸緩衝液（PH7.4）の各固定液を使用した．以下定法に従いエタノール脱水，QY-1を通して，各包埋樹脂に包埋した．包埋blockは超薄切片を作製後，酢酸ウランおよびクエン酸鉛にて二重染色を施し，肝小葉中間帯をHU-12A型電顕にて観察した．また光顕的には厚さ約1μの切片を作製し，トルイジン青染色を施し観察に供した．同時に包埋blockの硬さ，超薄切の難易などもあわせて検討した．なお，実験Ⅲ，Ⅳで固定液の浸透圧をアドバンス浸透圧計（MODEL 3W）にて測定した．

実験Ⅰ．包埋樹脂の検討

前固定：①4.5%ショ糖加2%グルタールアルデヒド（GA），②4.5%ショ糖加4%パラホルムアルデヒド（PFA）

後固定：4.5%ショ糖加1%オスミウム酸（OsO_4）

包埋樹脂：Table 1に示したA～Iの組成が異なる9種類の包埋剤に包埋した．

実験Ⅱ．前固定液濃度の検討

前固定：①ショ糖無添加2% PFA，②ショ糖無添加4%PFA，③8%ショ糖加4%PFA

後固定：8%ショ糖加1%OsO_4

包埋樹脂：実験ⅠのH樹脂使用

実験Ⅲ．前固定液浸透性の検討

固定法

1. 前固定：ショ糖無添加3%PFA，後固定：4.5%ショ糖加1%OsO_4
2. 前固定：4.5%ショ糖加3%PFA，後固定：4.5%ショ糖加1%OsO_4
3. 前固定：ショ糖無添加3% PFA，後固定：1%ショ糖加1%OsO_4

包埋樹脂：実験ⅠのH樹脂使用

実験Ⅳ．後固定液浸透性の検討

前固定：ショ糖無添加3%PFA

後固定：①ショ糖無添加1%OsO_4，②1%ショ糖加1%OsO_4，③3%ショ糖加1%OsO_4，④9%ショ糖加1%OsO_4

包埋樹脂：実験ⅠのH樹脂を使用してシリコンカプセル（SC）とゼラチンカプセル（GC）に包埋した．

なお，洗浄用の緩衝液は0.1Mリン酸緩衝液をショ糖にて，無添加～9%ショ糖を含む1% OsO_4の浸透圧に

* 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

対応するよう調製した.

実験結果

実験I. 包埋樹脂の検討

各blockの硬さ，超薄切の難易はTable 1のcommentに示した.

光顕的には，block **D, E** の染色性が悪く，組織像はやや不鮮明であり，またGC包埋したblock **I** は樹脂の共染を呈した.他のblockは比較的良好な染色性を示した.

電顕的にblock **A**～**G** 及び **I** の樹脂では，全体的に細胞小器官の膜構造が不明瞭である（特に糸粒体で著明）が，他の微細構造の保存は比較的良好であった. Block **H** では細胞小器官の膜構造も明瞭であり，微細構造も良好であった. またblock **D, E** のAraldite-M樹脂はグリコーゲン顆粒の保存が良好であるが，糸粒体では長形，くびれ像の特徴的形態を示した（Fig. 5).

前固定のGAは光顕的染色で組織内部の染色性が悪く，類洞の拡張が種々の包埋樹脂で全般に見られた(Fig. 2). それに比べPFA固定は組織内の浸透も良好であり，染色性もほぼ均一であった.

これらの所見より，各blockの樹脂とも総合的に顕著な差異は認められないが，超薄切の容易さ，光顕的染色性および微細構造の保持という観点からみると，block **H** が他に比して良好であり，前固定液はPFAが良い結果を得た.

実験II. 前固定液濃度の検討

光顕的所見：ショ糖無添加2％PFA固定では，一部に組織中心部の類洞拡張が認められたが，細胞の染色性および保存状態はほぼ良好であった. 良染部の細胞質成分は微細顆粒状を呈し，粗大凝集や淡明化は認められなかった. また核の状態も良好であった.

ショ糖無添加4％PFA固定では，組織の染色性は中心部がやや濃染しており，それに伴い細胞質成分は微細顆粒状から核周囲への粗大凝集傾向を呈していた. また全体的に組織像は不明瞭であった.

8％ショ糖加4％PFA固定では，組織像は全体的に鮮明で良染しているが，中間部から中心部にかけての細胞質成分は粗大凝集傾向を呈し，細胞質はあたかも虫食い状の感があった. 特に核の周囲で顕著であった (Fig. 3).

電顕的所見：ショ糖無添加2％PFAとショ糖無添加4％PFA固定では，グリコーゲン顆粒の消失および一部粗面小胞体（RER），滑面小胞体（SER）の小嚢状の拡張が認められたが，微細構造は比較的良好に保たれており，膜，他の顆粒の保存も良好であった. また両者とも糸粒体はほぼ円形のものが多く，基質は比較的電子密度が高かったが，クリステや糸粒体内顆粒は明瞭であった (Fig. 6).

8％ショ糖加4％PFAでは，グリコーゲン顆粒は消失していたが，小胞体腔の拡張は認められなかった. しかし，細胞質成分の凝集が見られ，特に核周囲の細胞質成分の消失が顕著であった. また糸粒体は円形のほかに桿状，くびれ状のものが多く存在し，基質もショ糖無添加2％，4％PFA固定に比較すると電子密度が高く，やや濃縮の感があった. それに伴い膜構造や糸粒体内顆粒は不明瞭であった. 核質はショ糖無添加2％，4％PFAに比較してやや粗鬆であった.

これらの結果から，ショ糖無添加の2％PFAおよび4％PFA固定を比較すると，固定液の浸透は4％PFA

Table 1. Composition and properties of individual embedding blocks

Block	Epon 812 (g)	Araldite-M (g)	DDSA (g)	MNA (g)	DMP-30 (%)	Dibutyl phthalate (ml)	Comment	
							Hardness	Cutting
A[1]	26.7	31.7	13.8	27.8	1.0	—	H	M. D
B[1]	27.3	32.8	24.2	16.2	1.0	—	M	E
C[1]	33.8	20.3	27.5	18.4	1.0	—	M	E
D[1]	—	60.9	23.4	15.6	1.0	—	H	D
E[11]	—	40.0(ml)	40.0(ml)	—	1.2	4.0	S to M	E
F[2]	25.0(ml)	15.0(ml)	55.0(ml)	—	—	3.0	S to M	E
G	25.0(ml)	20.0(ml)	60.0(ml)	—	1.6	2.0	S to M	E
H[1]	16.9	40.7	25.4	17.0	1.0	—	M	E
I[10]	51.6(ml)	—	24.0(ml)	30.0(ml)	1.0	—	M	E

H : Hard, M : Medium, S : Soft, M. D : Most difficult, D : Difficult, E : Easy
Epon 812 (Polysciences), Araldite-M (CIBA-GEIGY), DDSA (Polysciences)
MNA (Polysciences), DMP-30 (Polysciences), Dibutyl phthalate (CIBA-GEIGY)

で良好であり，また両者ともグリコーゲン顆粒の消失を認めたが，他の細胞質成分は2％PFAで変化が少なかった．8％シヨ糖加4％PFAでは，細胞質成分の変化が著しく，従って前固定液濃度は，2％，4％の中間で良好な結果が期待できシヨ糖無添加が優れていた．

実験III．前固定液浸透性の検討

各固定液の浸透圧を次に示した．

- シヨ糖無添加3％PFA　1139mOsm
- 4.5％シヨ糖加3％PFA　1236mOsm
- 4.5％シヨ糖加1％OsO_4　358mOsm

光顕的所見：シヨ糖無添加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定では，組織の染色性は中心部がやや濃染していたほか，比較的良好であった．細胞質成分は中間部から中心部にかけて若干粗大凝集が見られたが，ほぼ微細顆粒状を呈した．また核においても，核質の濃縮や淡明化は認められなかった．

4.5％シヨ糖加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定では，組織はほぼ均一に染っており，染色性が良好であった．しかし，中間部から中心部にかけての細胞質成分は，核周囲あるいは細胞膜側への粗大凝集傾向を呈していた．核の状態もまた良好であった．

シヨ糖無添加3％PFA・1％シヨ糖加1％OsO_4固定では，組織はほぼ均一に染っていた．また細胞質成分は若干粗大凝集傾向を呈したが，4.5％シヨ糖加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定と比較して明らかでなかった．他はシヨ糖無添加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定とほぼ同様の所見を示した．

電顕的所見：シヨ糖無添加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定では，グリコーゲン顆粒が消失しており，小胞体腔の軽度な拡張が認められたが，他の微細構造の保存は比較的良好であった．糸粒体は円形および一部桿状形のものが認められ，基質はやや電子密度が高い感があったが，クリステ，糸粒体内顆粒は明瞭であった．核質の分布はほぼ均一であった．

4.5％シヨ糖加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定では，一部グリコーゲン顆粒の残存が認められたが，大部分は消失しており，また核周囲の細胞質基質および細胞小器官の消失，減少が見られた．糸粒体は円形のものが多く，一部桿状，くびれ状のものも見られ，基質の電子密度はシヨ糖無添加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定より高く，やや濃縮感があった．またRERの層状配列の乱れが若干認められた（Fig. 7）．

シヨ糖無添加3％PFA・1％シヨ糖加1％OsO_4固定では，グリコーゲン顆粒が分散状に認められた．他はシヨ糖無添加3％PFA・4.5％シヨ糖加1％OsO_4固定と同様の所見を示した．

これらの結果より，前固定液にシヨ糖無添加が微細構造は比較的良好であり，また後固定液のシヨ糖の状態によってグリコーゲンが移動することを認めた．

実験IV．後固定液浸透性の検討

1％OsO_4固定液に添加したシヨ糖と浸透圧の関係はFig. 1に示した．

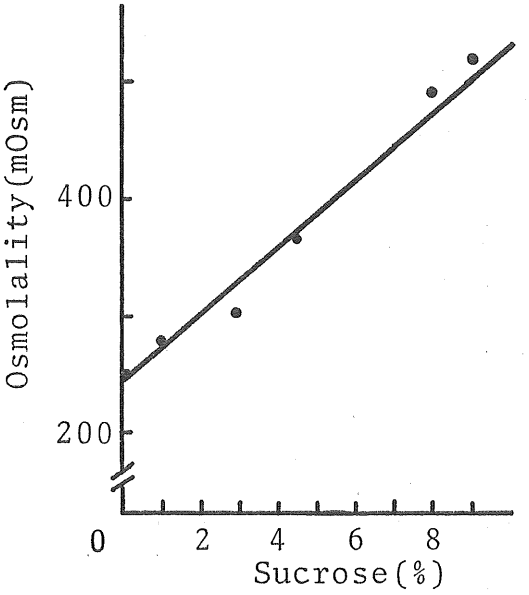


Fig. 1. The relationship between osmolality and concentration of sucrose contained with 1%OsO_4

光顕的所見：シヨ糖無添加でSC包埋，GC包埋とも組織の染色性は比較的良好であるが，中心部はやや濃染しており，それに伴い細胞質成分は微細顆粒状から粗大凝集傾向を呈していた．核において膨化，核質の淡明化は認められなかった．組織像としてはSC包埋がやや鮮明であった．

1％シヨ糖加ではSC包埋，GC包埋とも無添加の場合とほぼ同様の所見を呈したが，細胞質の微細顆粒は無添加の場合と比較してやや鮮明に観察された（Fig. 4）．

3％シヨ糖加ではSC包埋，GC包埋とも良染していたが，組織像は包埋SCが鮮明であった．細胞質成分の粗大凝集傾向はほぼ組織全体に及び，中心部ほど著明であった．SC，GC包埋とも核の状態は良好であった．

9％シヨ糖加はSC包埋，GC包埋とも組織全体がやや濃染傾向を示し，これらは無添加～3％添加したものに比して顕著であった．特に核周囲の細胞質成分が細胞膜側へ凝集しているのが散見された．ともに核の状態は良

好であった.

組織の染色性はショ糖添加濃度による顕著な差異は認められなかったが，細胞質成分の粗大凝集傾向は添加濃度の増加に伴ってやや著明であった．またSC包埋，GC包埋による差異は，GC包埋で組織像がやや不鮮明であったほか明らかでなかった.

電顕的所見：ショ糖無添加のSC包埋では，微細構造は良好に保存されており，膜，顆粒の状態も良存であるが，SER腔の拡張が認められた．糸粒体は円形および桿状形で，基質の電子密度は比較的高いが，クリステや糸粒体内顆粒は明瞭に認められた．グリコーゲン顆粒は分散状に分布しており，また核の状態も良好で，核質の分布はほぼ均一であった（Fig. 8）．GC包埋では，SC包埋とほぼ同様の所見を示したが，全体的に膜系が不明瞭であり，また糸粒体においては異型のものが散見され，基質の電子密度もSC包埋に比して高かった.

1％ショ糖加のSC包埋では一部SER腔の拡張が認められる以外，微細構造の保存は良好で，糸粒体もほぼ円形のものが多く，基質の電子密度は無添加に比してやや低かった．グリコーゲン顆粒は分散状に分布しており，核の状態も良好であった（Fig. 9）．GC包埋ではSC包埋とほぼ同様の所見を示したが，糸粒体の異型が散見され，基質の電子密度もSC包埋に比して高かった.

3％ショ糖加のSC包埋，GC包埋ともほぼ同様の所見を示した．すなわち，グリコーゲン顆粒は一部を残し消失しており，また細胞質基質はやや淡明化しているが，他の微細構造の保存は良好で，SER腔の拡張も著明には認められなかった．糸粒体は円形，桿状形が多く，基質の電子密度は1％添加に比してやや高かった．核の状態は良好であった.

9％ショ糖加のSC包埋，GC包埋ともグリコーゲン顆粒は消失しており，また細胞質基質は淡明化していた．特に核周囲の細胞質基質の淡明化が著しく，細胞小器官が消失しているのが散見された．糸粒体の基質は電子密度が高く，やや濃縮の感があった．他は3％添加と同様の所見を示した（Fig. 10）.

これらの所見より，ショ糖添加濃度の上昇に伴いグリコーゲン顆粒の消失および細胞質基質の淡明化が著明であった．またSER腔の拡張は低濃度で著明であった.

考　察

エポキシ樹脂は樹脂の硬化に伴う収縮がほとんどなく，またその性質上種々の利点を持っており[3]，そのため組織の変性破壊が少ないことで現在賞用されている．しかしながら，Geiselmanら[1]，Mollenhauer[2]はAraldite-MとEpon812を用いて，樹脂の種類あるいは同一樹脂を用いた組成の異なる包埋剤で硬さ，超薄切の難易，微細構造の保持・コントラストなどに変化を生ずると報告している.

実験Ⅰでblock **D, E**は同じAraldite-M樹脂を使用しているが，硬さ，超薄切の難易性で著明な差異が見られ，これは明らかに組成の差によるものと思われる．また光顕的にもblock **D, E**は他のblockに比べ染色性がやや劣り，電顕的にも糸粒体の長形，くびれ像が他のblockに比べ多く認められた．これらはAraldita-M樹脂の持つ特質ではないかと考えられる．Block **I**のGC包埋で，光顕的に樹脂の共染が認められたが，これは何らかの原因で重合が不完全であったためと推察される.

Araldite-MとEpon812の混合比（量）による差異は，光顕的に著明でなく，また電顕的には樹脂の硬化と関係あると考えられ，硬化が増すほど薄切困難で微細構造の保存にやや難があると思われる.

GAはSabatiniら[4,5]によってその優秀性が認められて以来，最も多用されている固定剤であるが，組織への浸透が悪く，また変質し易く，効力が一定しない．実験ⅠのGA固定で各blockとも光顕的に組織中心部の類洞の拡張が認められているが，このことはGAの浸透性の弱さに起因していると思われる.

PFAは近年電顕レベルでの固定剤として，微細構造の保存性，組織への浸透性などの点で見直されて来ており[6,7]，今回実験ⅠでもPFAの浸透性はGAに比べ優れていた.

山本ら[9]は前固定液PFA濃度（浸透圧）と微細構造の状態について検討した結果，4％PFAで核，糸粒体に軽度の濃縮が，また1％PFAで核，糸粒体に軽度の膨化が認められ，2％PFA固定の微細構造が対照（1％OsO_4固定）に類似し良好であると報告している．実験Ⅱの所見では，PFA固定液の2％濃度は浸透性に難があり，4％濃度は細胞質成分に変化を及ぼしている．そこで山本ら[9]の報告と実験Ⅱの結果から，前固定液PFA濃度は3％程度が適当ではないかと考え，実験Ⅲで検討した.

山田[8]は固定液の浸透圧を調整するためショ糖を加えることは，固定液のモル濃度を増加させ，その結果浸透性が低下すると述べている．しかし，実験Ⅱで4％PFAに8％，実験Ⅲで3％PFAに4.5％のショ糖を加えたところ，光顕的に細胞質成分の粗大凝集が見られたが，浸透性は良好であった．このことは，OsO_4に比べPFAの浸透性が優れているため，4.5％あるいは8％程度のショ糖量では浸透性に与える影響が少なかったものと思われる.

実験Ⅱ，Ⅲにおいて，実験Ⅲのショ糖無添加3％PFA・1％ショ糖加1％OsO_4固定を除き，PFAへのショ糖添加，無添加に拘らず，程度の差は若干あるがグリコーゲン顆粒の消失が認められた．この時，1％OsO_4へのショ糖添加は実験Ⅱで8％，実験Ⅲで4.5％である．これらのことから，グリコーゲン顆粒の消失は，前固定液の影響よりも，後固定液の浸透圧（ショ糖添加濃度）に起因するものと考え，実験Ⅳでは前固定液を一定にし，後固定液の浸透圧を変化させ，浸透圧と微細構造の保存に関して検討した．

高張液に細胞を浸漬した際収縮が起こり，低張の場合膨化する．また化学的薬剤による固定は多少とも固定時間がかかるため，固定が完成される前に組織や細胞が浸透圧の差によって変化することが予想される．それによる変化を防止するには等張の固定液を使用することが合理的と考えられる[12]．そこで今回の実験Ⅳでは，ラット肝細胞の等張浸透圧を哺乳動物の体液浸透圧 300mOsm 付近と考えた．その結果，OsO_4固定液ショ糖添加濃度3％でやや高張，9％で高張，無添加，1％でやや低張であった（Fig. 1）．

ショ糖添加によるOsO_4浸透圧の上昇に伴い，光顕的に細胞質成分の粗大凝集傾向が増し，電顕的にはグリコーゲン顆粒が消失傾向を呈しており，また細胞小器官の軽度な濃縮，細胞質基質の淡明化が認められ，特に9％ショ糖加では核周囲の基質および細胞小器官の消失が散見された．これらの変化は，固定液が高張であるため細胞に収縮が生じ，それに伴い細胞質成分の凝集，脱出が起ったものと考えられる．その際，PFAによる細胞質基質のタンパク固定によって二次的に保存されていたグリコーゲンが[13]，高張OsO_4固定によって溶出されたものと思われる．なお，ショ糖無添加3％PFA固定液はかなり高張であるが，組織の外側から固定が進行し，良好な浸透性のため，細胞質成分，特にグリコーゲンの脱出に影響を及ぼさないと考えられる．

一方低張OsO_4固定では，光顕的に細胞質成分はほぼ微細顆粒状を呈し，電顕的には軽度なSER腔の拡張が認められたが，グリコーゲン顆粒は存在していた．SER腔の拡張はOsO_4が低張のため，SERの膨化に起因すると思われる．

組織や細胞の固定の際，目的とする組織や細胞の浸透圧は正確に得られ難いし，また正確に得られたとしても，それが浸漬固定の段階で固定作用の種々の要因により，個々の組織，細胞自体の持つ浸透圧と異なることが考えられる．今回実験Ⅳでは，ラット肝細胞浸透圧を300mOsm 付近と考えたが，前固定液では 300mOsm より高張で，後固定液はやや低張で良好な結果を示した．この結果は前述のことを示唆しているものと思われる．

以上より，固定液の濃度・浸透圧と微細構造に関しては，前固定液ショ糖無添加3％PFA，後固定液1％ショ糖加1％OsO_4が良好な結果を示したが，まだ検討の余地が残されており，今後詳細な検討を要すると思われる．

結　語

電子顕微鏡の試料作製に用いる固定液および包埋剤について一連の実験を行い，次の成果を得た．

①包埋剤は Araldite-M—Epon812（Araldite-M：40.7g, Epon812：16.9g, DDSA：25.4g, MNA：17.0g, DMP-30：1.0％）樹脂が硬さ，超薄切の容易さおよび光顕的，電顕的に組織・細胞に対して良好であった．

②前回固定液は，パラホルムアルデヒドが浸透性，扱い易さの点でグルタールアルデヒドに優った．

③固定液の条件は，前固定液ショ糖無添加3％パラホルムアルデヒド，後固定液1％ショ糖加1％オスミウム酸が，光顕的・電顕的とも良好な結果を示した．

文　献

1) Geiselman, C. W. and C. N. Burke : *J. Ultrastruct. Res.*, 43, 220, 1973
2) Mollenhauer, H. H. : *Stain Technol.*, 39, 111, 1964
3) 串田　弘：生体の科学, 6, 436, 1974
4) Sabatini, D. D., K. Bensch, and R. J. Barrnett : *J. Cell Biol.*, 17, 19, 1963
5) Sabatini. D. D., F. Miller, and R. J. Barrnett : *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 57, 1964
6) Yasuzumi, G. and R. Sugihara : *Exetl. Cell Research*, 33, 578, 1964
7) 山本一郎：細胞, 4(2), 33, 1972
8) 山田英管：電子顕微鏡生物試料作製法, 6, 1975, 丸善, 東京
9) 山本一郎，高橋政寿，中川進：日本電子顕微鏡学会第31回学術講演会予稿集, 110, 1975
10) Luft, J. H. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409, 1961
11) Glauert, A. M. and R. H. Glauert : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 409, 1958
12) 山田英管：電子顕微鏡生物試料作製法, 10, 1975, 丸善, 東京
13) Baker, J. R. : *Principles of Biological Microtechnique*. A Study of Fixation and Dyeing, 1958, Methuen and Co., Ltd., London

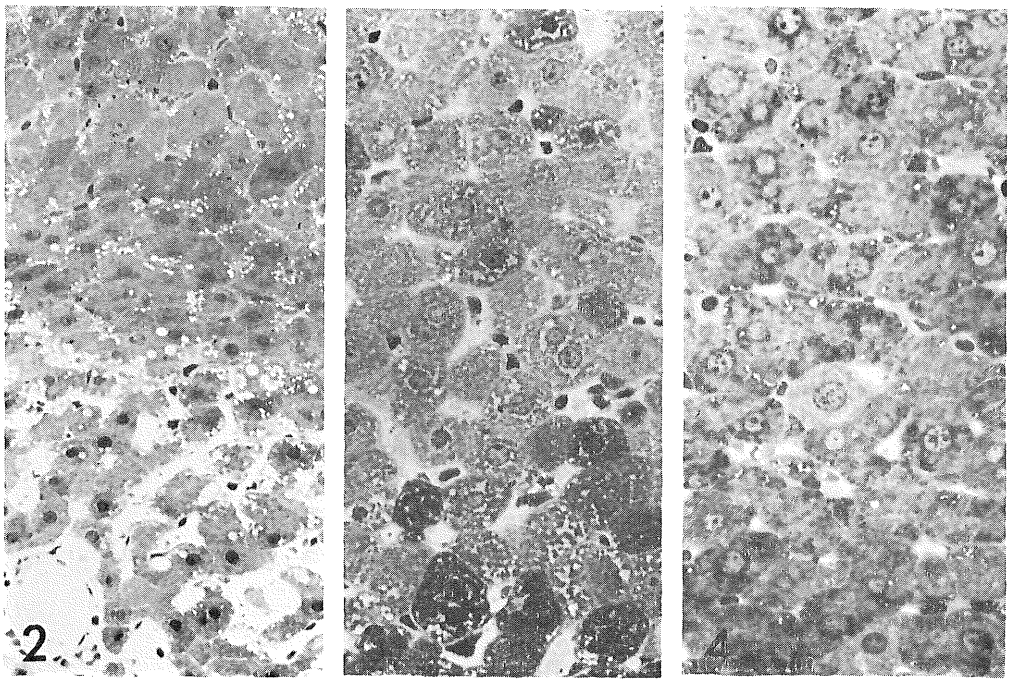


Fig. 2. Rat liver fixed in 2%GA (4.5%sucrose) and 4.5%OsO_4 (4.5%sucrose) (Original X 100)
Fig. 3. Rat liver fixed in 4%PFA (8%sucrose) and 1%OsO_4 (8%sucrose) (Original X 400)
Fig. 4. Rat liver fixed in 3%PFA (——) and 1%OsO_4 (1%sucrose) (Original X 400)

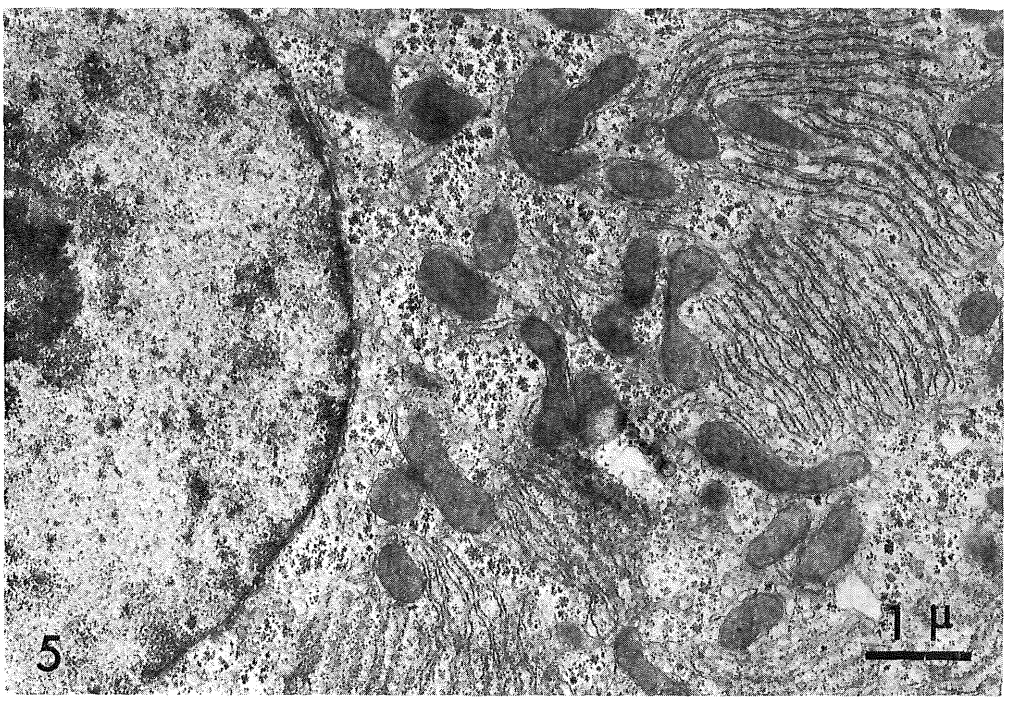


Fig. 5. Rat liver fixed in 4%PFA (4.5%sucrose) and 1%OsO_4 (4.5%sucrose), embedded in Araldite-M resin

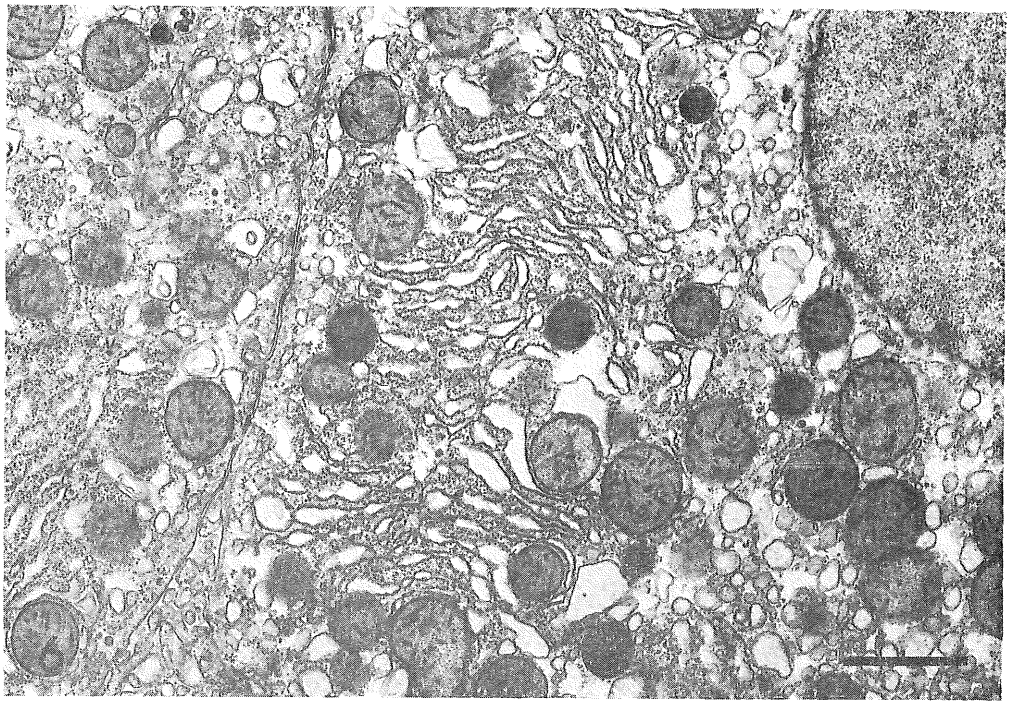


Fig. 6. Rat liver fixed in 2%PFA (——) and 1%OsO_4 (8%sucrose)

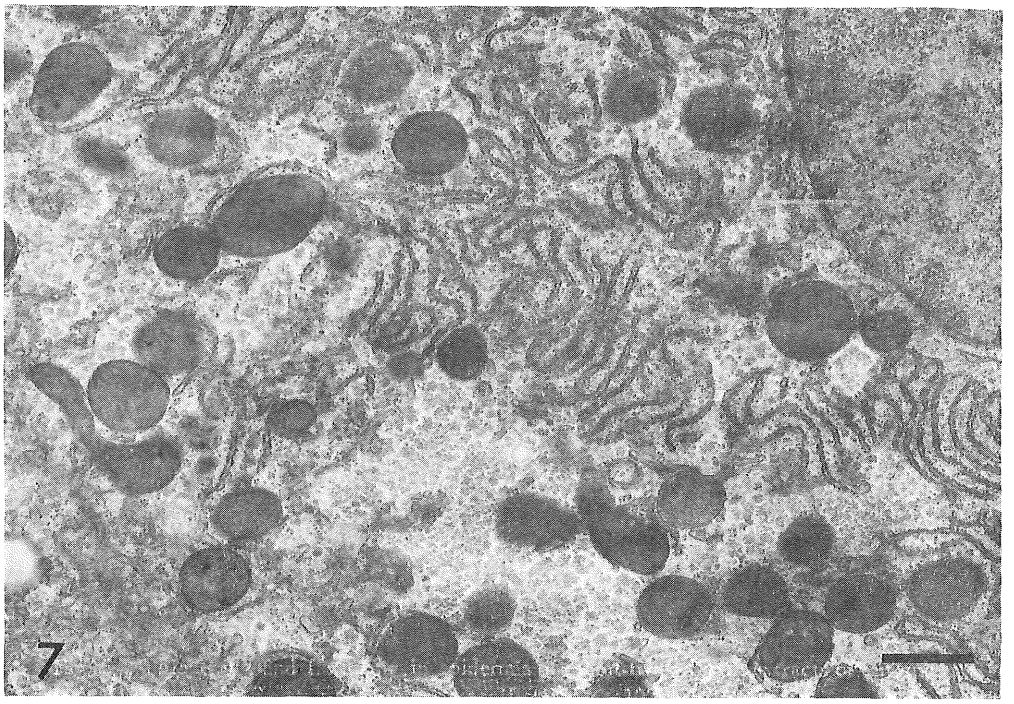


Fig. 7. Rat liver fixed in 3%PFA (4.5%sucrose) and 1%OsO_4 (4.5%sucrose)

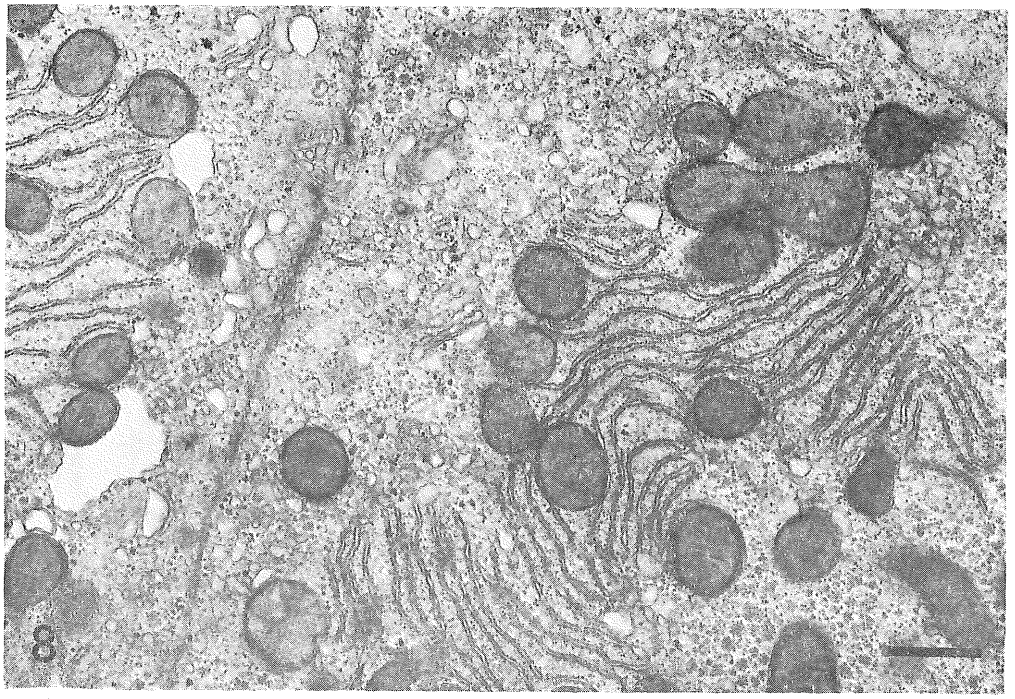


Fig. 8. Rat liver fixed in 3%PFA (——) and 1%OsO_4 (——)

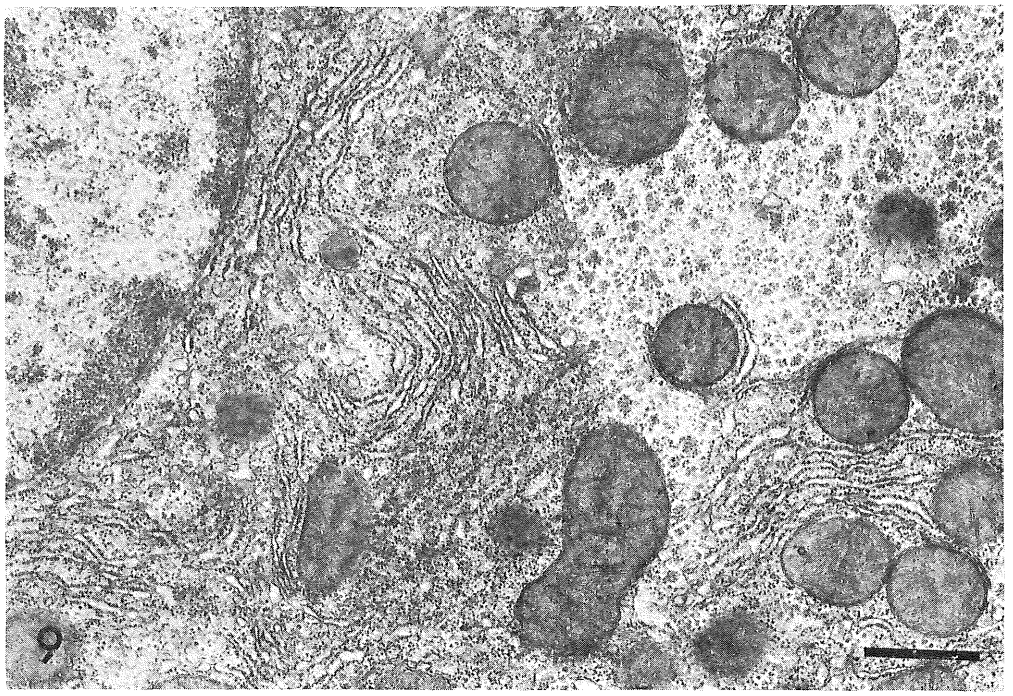


Fig. 9. Rat liver fixed in 3%PFA (——) and 1%OsO_4 (1%sucrose)

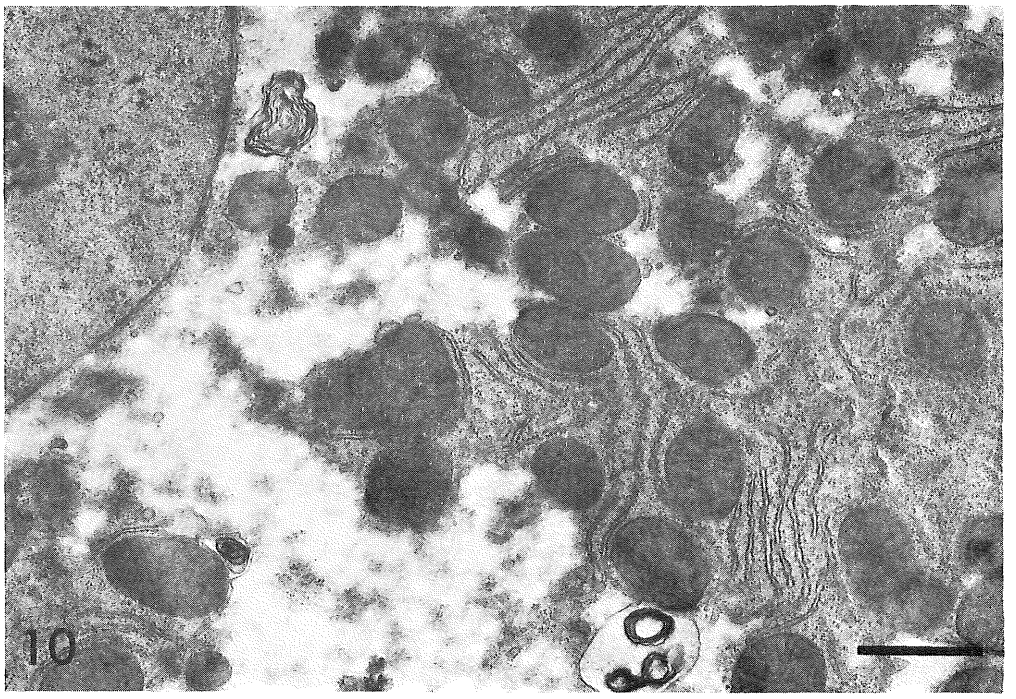


Fig. 10. Rat liver fixed in 3%PFA (——) and 1%OsO_4 (9%sucrose)

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

藤井　孝，中川好男，坂本義光，福森信隆，平賀興吾：**Butylated Hydroxytoluene (BHT) によるラットの出血傾向について　ラットにおける発育リズムの提唱**
第48回日本薬理学会総会（1975. 4）

福森信隆，三栗谷久敏，平賀興吾：**Butylated Hydroxytoluene (BHT) によるラット肝細胞の電子顕微鏡的観察（I）**
日本電子顕微鏡学会・第31回学術講演会（1975. 5）

坂本義光，中川好男，藤井　孝，福森信隆，平賀興吾：**Butylated Hydroxytoluene (BHT) のラット肝に及ぼす影響**
日本薬理学会・第52回関東部会（1975. 6）

矢ヶ崎しげ子，原　諭吉，中尾順子，中尾　真：**メチル水銀の動物細胞膜に対する作用　続I**
日本生化学会（1975. 10）

中尾　真，太田英彦，原　諭吉，小松喜子，松本順二，中尾順子，矢ヶ崎しげ子：**水銀化合物の細胞膜透過性**
毒作用研究会（1976. 2）

中尾　真，原　諭吉，中尾順子，長井二三子，厚井麻里：**8-置換 ATP 誘導体の合成とその応用**
日本生化学会（1975. 10）

大石真之，平賀興吾，大沢仲昭：***in vivo* におけるラット睾丸の Testosterone 合成分泌に及ぼす 20α Hydroxypregn-4-en-3-one の効果について**
第48回日本内分泌学会総会（1975. 6）

大石真之，平賀興吾：**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**
日本薬理学会第53回関東部会（1975. 11）

高橋　省，平賀興吾：**Butylated Hydroxytoluene (BHT) の出血致死作用について**
第49回日本薬理学会総会（1976. 3）

大石真之，平賀興吾：**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（第2報）**
第49回日本薬理学会総会（1976. 3）

大石真之，平賀興吾，大沢仲昭：***in vivo* におけるラット睾丸の Testosterone 合成分泌に及ぼす 20α Hydroxypregn-4-en-3-one の効果について（第2報）**
第49回日本内分泌学会総会（1976. 6）

高橋　省，平賀興吾：**1.0%の Butylated Hydroxytoluene (BHT) を含む飼料で飼育したラットの尿および糞中のフェノール量および尿成分等**
日本薬理学会第54回関東部会（1976. 6）

福田向江，高橋　省，大石真之，中尾順子，平賀興吾：**化粧品用色素の毒性について（1）**
日本薬理学会第54回関東部会（1976. 6）

大石真之，森田昌敏，福田向江，中尾順子，平賀興吾：**ポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の毒性（1）**
第46回日本衛生学会総会（1976. 7）

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

直　井　家寿太

大　井　　玄

三　村　秀　一

平　賀　興　吾

昭和51年12月20日　発行

規格表　第 2 類
印刷番号 (51) 808
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第27-2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　大東印刷工業株式会社
東京都墨田区向島3—33—5
電話　625—7481(代)