図書室
収受
55. 6. 4
東京都衛生研究所

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

28-2

1977

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

序

最近，環境汚染物質の安全性など，保健衛生に関するいろいろな疑問が住民の側から投げかけられていて，今後ともそれは増えていく傾向にあります．

行政当局は提起された問題に対応しなければなりませんが，社会学的な問題は別として，公衆衛生の分野では特に人体に及ぼす影響に関する問題が多いので，衛生研究所に，参考資料の提供，助力・助言を求めてくることが非常に増えて参りました．

ただ，日常痛切に感ずることは，これらの問題は科学的によく分っていないことが多すぎるということであります。そして，極めて身近な問題でさえ科学的調査・検討が充分なされていないことがあり，行政当局の要望・期待に応えられない場合があるのは残念なことであります．衛生研究所の業務に関連のある公衆衛生領域の学問の現状は，地域住民の期待する線からはほど遠いものであることを感じさせられます．いたずらに基礎的な研究に走り，実際に必要な，面倒な調査・研究を敬遠することも，こういう事態を招く一つの原因であると思います．われわれはもっと足元の問題についての調査・研究を怠ってはならないと思います．

研究する者は俗事に超然としているのが当然と考えていた時代もあり，今でもそう考えている人もありましょうが，少なくとも公立試験研究機関に職を奉ずる科学者にはそのような考え方は許されないことであります．国民や地域住民のニードに応えようとする姿勢がないならば，もはや公立試験研究機関としての存在の意義はないと考えてよいと思います．

何か問題があった場合には，いつでも，整理された引出しを開けて資料をとり出し，その解明，解決に応じ得るように，引出しの中味を質量ともに充実すべく，調査・研究を強化していくのがわれわれの責任であり使命であるといえましょう．

さて，以上のような考え方と背景の下に，当所で行われた最近の調査・研究の成果を研究年報第28号として完成できましたのは誠に喜びにたえないところであります．都合により第28-1号と第28-2号の2分冊としましたが，第28-2号は特に毒性部の研究業績をまとめたものであります．

本報告書の刊行に当っては編集委員諸氏の献身的な奉仕をいただきました．ここに深く感謝の意を表します．

1977 年 7 月 20 日

東京都立衛生研究所長　辺野喜　正　夫

目　　次

報　　文

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）添加飼料によるラット終生飼育実験
…… 市川　久次，小林　博義，中川　好男，長井二三子，清水　麻里，池田　虎雄
矢野　範男，平賀　興吾…… 1

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）添加飼料を終生摂取させたラットの病理組織学的検索
…… 藤井　　孝，阿部　幸恵，矢野　範男，長澤　明道，平賀　興吾……19

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与ラットにおける回復実験（第１報）
…… 市川　久次，小林　博義，平賀　興吾……33

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の生体内運命　^{14}C-BHT の肝細胞内分布（第２報）
…… 中川　好男，伊川三枝子，福森　信隆，平賀　興吾……37

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウスを用いた催奇形性試験
…… 高橋　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吾……45

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）とその代謝物質の微生物系における突然変異誘起性について
…… 藤田　　博，小嶋　昭江，平賀　興吾……53

微生物系における酸化防止剤の突然変異誘起性試験
…… 小嶋　昭江，藤田　　博，平賀　興吾……56

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）およびその他の酸化防止剤投与ラット肝細胞の電子顕微鏡的研究
…… 福森　信隆，高橋　　省，三栗谷久敏，平賀　興吾……61

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の出血致死効果におよぼす直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)，アスピリン，四塩化テルルおよび塩化ランタンの影響
…… 高橋　　省，中尾　順子，平賀　興吾……69

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）添加飼料によるラット終生飼育実験
…… 米山　允子，益淵　正典，大石　真之，高橋　　省，伊川三枝子
吉田　誠二，大石　向江，三栗谷久敏，湯澤　勝廣，平賀　興吾……73

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）添加飼料を終生摂取させたラットの病理学的検索
…… 藤井　　孝，坂本　義光，阿部　幸恵，三栗谷久敏，湯澤　勝廣，平賀　興吾……85

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）のラット血清脂質への影響
…… 米山　允子，平賀　興吾… 109

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）の微生物系における突然変異誘起性試験
…… 藤田　　博，小嶋　昭江，平賀　興吾… 112

放射性三価および六価クロムの経皮吸収
…… 長井二三子，中川　敦子，原　しげ子，金西　信次，道源　正子，中尾　順子… 115

三価クロムの経消化管吸収
…… 中川　敦子，長井二三子，原　しげ子，金西　信次，道源　正子，中尾　順子… 118

クロム鉱滓水浸水液による家兎角膜の微細構造におよぼす影響
…… 福森　信隆，三栗谷久敏，平賀　興吾… 121

クロム鉱滓水浸出液の皮膚累積刺激性（第１報）
短期塗布による皮膚反応と臓器内クロム蓄積の相関性
…… 福森　信隆，樺島順一郎，井口　重孝，平賀　興吾… 129

粉塵吸入実験装置の試作…… 坂本　義光，調　　武久，平賀　興吾… 135

クロム鉱滓粉塵のラットによる28日間吸入実験
…… 坂本　義光，神谷　信行，伊川三枝子，池田　虎雄，平賀　興吾… 142

サッカリンナトリウムによる誘発染色体異常
…… 益淵　正典，縄井寿美子，吉田　誠二，平賀　興吾… 149

サッカリンナトリウムの優性致死作用
…… 益淵　正典，高橋　昭夫，高橋　　省，吉田　誠二，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吉… 154

サッカリン不純物の染色体異常誘発性
…… 益淵　正典，縄井寿美子，平賀　興吾，広門　雅子… 159
人工甘味料の培養細胞における細胞遺伝学的研究
…… 吉田　誠二，益淵　正典，平賀　興吾… 162
サッカロース，マルチトール，キシロース，ソルビットおよびサッカリンナトリウムの急性毒性試験
…… 林田　志信，高橋　博，川野　澄江，井口　重孝，神谷　信行，池田　虎雄，平賀　興吾… 165
アカゲザルにおけるアクリルアミドの毒性
…… 井口　重孝，川野　澄江，高橋　博，平賀　興吾… 170
ポリ塩化ジベンゾフラン——ラット肝薬物代謝酵素の強力な誘導物質
…… 川野　澄江，平賀　興吾… 175
ミカンコミバエの不妊化に関する放射線生物学的研究
…… 金西　信次，土生　昶毅，伊賀　幹夫，渡部　真… 181
JCL-ICR マウスにおけるマイトマイシン C(MMC) の優性致死作用
…… 高橋　昭夫，益淵　正典，吉田　誠二，安藤　弘，久保　喜一，平賀　興吾… 187
JCL-ICR マウスにおけるエチルメタンスルホネート (EMS) の優性致死作用
…… 吉田　誠二，益淵　正典，高橋　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，平賀　興吾… 192
マレイミド誘導体抗生物質 Showdomycin の Na, K-ATPase 阻害
…… 原　しげ子，中尾　順子… 196
アデニレートシクラーゼの精製（第1報）　アデニレートシクラーゼの分布および可溶化
…… 中川　敦子，中尾　順子… 201
ラット包皮腺腫瘍の微細構造…… 三栗谷久敏，福森　信隆，平賀　興吾… 205
ラットの末梢血中に見られた異常細胞の検討…… 阿部　幸恵，藤井　孝，平賀　興吾… 215
ラット内分泌機能に与える制限食の影響…… 大石　真之，平賀　興吾… 221
ラット血液成分に及ぼすエーテル麻酔の影響…… 大石　向江，大石　真之，平賀　興吾… 224
ラット尿中の蛋白質（第1報）…… 中尾　順子，道源　正子，樺島順一郎… 227
Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による幼若マウス，ラットの赤血球膜浸透圧抵抗について
…… 市川　久次，小林　博義，中尾　順子… 230
ラットの成長過程における体重の変動について（第2報）
…… 林田　志信，高橋　博，平賀　興吾… 236
幼若ラットの血液成分と器官重量…… 小林　博義… 239
マウス眼窩採血法による採血と血液学的経時変化…… 小林　博義… 244

他　誌　発　表 …… 247

学　会　発　表 …… 249

CONTENTS

Reports

Toxicological Studies with Butylated Hydroxytoluene (BHT) by Dietary Administration for Life-Span in Rats ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi, Y. Nakagawa, F. Nagai, M. Shimizu, T. Ikeda, N. Yano and K. Hiraga 1

Histopathological Examination on Rats Fed with Butylated Hydroxytoluene for their Lifespan ..... T. Fujii, Y. Abe, N. Yano, A. Nakagawa and K. Hiraga 19

Effects of Discontinuation on Administration with Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats (I) ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and K. Hiraga 33

Studies on Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats Subcellular Distribution of ^{14}C-BHT in Rat Liver (II) ..... Y. Nakagawa, M. Ikawa, N. Fukumori and K. Hiraga 37

Teratological Tests of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Mice ..... A. Takahashi, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 45

Mutagenicity of Butylated Hydroxytoluene (BHT) and its Metabolites in the Microbiol System ..... H. Fujita, A. Kojima and K. Hiraga 53

Mutagenicity Screening of Antioxidants in the Microbiol System ..... A. Kojima, H. Fujita and K. Hiraga 56

Comparison of Ultrastructural Alterations induced by Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Other Antioxidants in Rat Hepatocytes ..... N. Fukumori, O. Takahashi, H. Mikuriya and K. Hiraga 61

Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS), Aspirin, Tellurium Tetrachloride or Lanthanum Chloride on Hemorrhagic Death by Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Male Rats ..... O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga 69

Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Dietary Administration for Life-Span to Rats ..... M. Yoneyama, M. Masubuchi, S. Oishi, O. Takahashi, M. Ikawa, S. Yoshida, H. Oishi, H. Mikuriya, K. Yuzawa and K. Hiraga 73

Pathological Examination on Rats Fed with Linear Alkylbenzene Sulfonate for Their Lifespan ..... T. Fujii, Y. Sakamoto, Y. Abe, H. Mikuriya, K. Yuzawa and K. Hiraga 85

Effect of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Serum Lipid in Rats ..... M. Yoneyama and K. Hiraga 109

Screening Tests of Mutagenicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in the Microbiol System ..... H. Fujita, A. Kojima and K. Hiraga 112

Absorption of Radioactive Chromic chloride and Sodium chromate from Skin ..... F. Nagai, A. Nakagawa, S. Hara, N. Kananishi, M. Dogen and T. Nakao 115

Absorption of Chromic Chloride from Gastrointestinal Tract ..... A. Nakagawa, F. Nagai, S. Hara, N. Kananishi, M. Dogen and T. Nakao 118

Fine Structure Alteration on Cornea by Water Extract of Chromium Ore Dross in Rabbit ..... N. Fukumori, H. Mikuriya and K. Hiraga 121

Cumulative Skin Irritation Test by Water Extract of Chromium Ore Dross (I) Relation between Skin Changes and Accumulation of Chromium in Short Term Application ..... N. Fukumori, J. Kabashima, S. Iguchi and K. Hiraga 129

Development of Dust Inhalation System ..... Y. Sakamoto, T. Shirabe and K. Hiraga 135

Inhalation Experiment of Chromium Ore Dross Dust to Rats for 28 Days ..... Y. Sakamoto, N. Kamiya, M. Ikawa, T. Ikeda and K. Hiraga 142

In vivo and *in vitro* Chromosome Aberrations Induced by Saccharin Sodium ..... M. Masubuchi, S. Nawai, S. Yoshida and K. Hiraga 149

Dominant Lethal Effects of Saccharin Sodium in ICR Mice ..... M. Masubuchi, A. Takahashi, O. Takahashi, S. Yoshida, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 154

Lack of the Cytogenetic Effects of Saccharin and its Imprities on CHO-K1 Cells M. Masubuchi, S. Nawai, K. Hiraga and M. Hirokado 159

In Vitro Cytogenetic Studies of Artificial Sweeteners on Cultured Cell ..... S. Yoshida, M. Masubuchi and K. Hiraga 162

Acute Oral Toxicities of Saccharose, Maltitol, Xylose, Sorbitol, and Saccharin Sodium S. Hayashida, H. Takahashi, S. Kawano, S. Iguchi, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga 165

Toxicity of Acrylamide in Rhesus Monkeys ..... S. Iguchi, S. Kawano, H. Takahashi and K. Hiraga 170

Polychlorinated Dibenzofurans—— Potent Inducers of Rat Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes ..... S. Kawano and K. Hiraga.... 175

Radiobiological Study on the Sterility of Oriental Fruit Flies ..... N. Kananishi, N. Habu, M. Iga and M. Watanabe 181

Dominant Lethal Effects of Mitomycin C in JCL-ICR mice ..... A. Takahashi, M. Masubuchi, S. Yoshida, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 187

Dominant Lethal Effects of Ethylmethane sulfonate (EMS) in JCL-ICR mice ..... S. Yoshida, M. Masubuchi, A. Takahashi, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 192

Inhibition of Na,K-ATPase by Maleimide Related Antibiotic Showdomycin ..... S. Hara and T. Nakao 196

Purification of Adenylate Cyclase (I) Distribution and Solubilization of Adenylate Cyclase ..... A. Nakagawa and T. Nakao.... 201

Fine Structure of Preputial Gland Tumor in Rat ..... H. Mikuriya, N. Fukumori and K. Hiraga 205

Investigation of Abnormal Cells in Peripheral Blood of Rat ..... Y. Abe, T. Fujii and K. Hiraga 215

Effects of Food Restriction on Endocrine Functions in Rats .... S. Oishi and K. Hiraga.... 221

Effects of Ether Anesthesia on Toxicological Parameters of Rats ..... H. Oishi, S. Oishi and K. Hiraga 224

Proteins in Rat Urine (I) ..... T. Nakao, M. Dogen and J. Kabashima.... 227

Osmotic Fragility of Young Mouse and Rat Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge (CPC) Method ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao.... 230

Changes of Body Weight in Growing Rats (II) ..... S. Hayashida, H. Takahashi and K. Hiraga 236

Organ Weight and Blood Components of Young Rats ..... H. Kobayashi.... 239

Hematological Variation by Continuous Blood Collecting Method from Orbital Vein in Mice ..... H. Kobayashi.... 244

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 247

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 249

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 1-18, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）添加飼料によるラット終生飼育実験

市川久次*, 小林博義*, 中川好男*, 長井二三子*
清水麻里*, 池田虎雄*, 矢野範男*, 平賀興吾*

Toxicological Studies with Butylated Hydroxytoluene (BHT) by Dietary Administration for the Life-Span in Rats

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

ジブチルヒドロキシトルエン（以下 BHT と略す）は，油脂，プラスチック，ゴムその他の酸化防止剤，安定剤として広く用いられ，食品添加物としても認められている．

BHT の毒性に関する研究は多数あり[1-25]，WHO/FAO の報告[26-27]に詳しく，1日摂取許容量を 0—0.5 mg/kg 体重としている．

Deichman ら[4]は BHT 0.8%添加飼料（ラード1%含有），Brown ら[7]は BHT 0.1%添加飼料（水素添加，やし油 10% 含有）で，2年間ラットを飼育し，toxic effect を認めていない．また，Harman[15]は BHT 0.25 ならびに 0.5% 添加半合成飼料でマウスを終生飼育し，寿命の著明な延長を認めている．しかし，短期試験で，10—20%ラードを併用した場合 BHT 0.1%でも体重増加抑制，肝臓重量増加，副腎重量増加，血清コレステロールの上昇，ストレス状態での脱毛，無眼球仔の発生等の報告[6,7,9]がある．当部での Wistar 系ラットを用いた BHT 1.35, 0.45, 0.15, 0.05%添加飼料による 110 日間の飼育試験では肝臓重量が用量-反応の関係で増大し，0.05%でも有意な増加であった．

BHT による肝臓重量増加はよく知られているところであり，滑面小胞体の著明な増殖，薬物代謝系諸酵素活性の増加等が認められ，多くは生理的反応と考えられている[17-24]．しかし肝臓重量増加と肝脂質の増大が平行したとの報告[9]もある．

本実験では，BHT の毒作用の指標を発育，死亡率，寿命の変化ならびに腫瘍の発生に置き，0.320, 0.020, 0.005% 添加飼料により，ラットを3，6，12，24カ月ならびに終生にわたって飼育した．

なお，病理組織学的検討ならびに腫瘍の発生等については別に報告[28]する．

実験材料ならびに方法

1. 試料 BHT (3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene) は和光純薬製 (Lot No. PAK 3582, KIK 5562) 白色結晶性粉末で mp 69.5° のものを使用した．

BHT を，それぞれ0%(対照)，0.005%，0.020%，0.320%の割合で（株）日本クレア製粉末飼料 CE-2（粗蛋白24.5%，粗脂肪 4.5%，粗繊維 4.0%，粗灰分6.6%，可溶性窒素物 52.4%，カルシウム 1.01g/100g，リン 0.85g/100g，マグネシウム 0.26g/100g，ナトリウム 0.28g/100g，カリウム 0.77g/100g）に添加後固型化し実験飼料とした．

2. 実験動物 （株）日本クレアにおいて barrier system 下に生育された JCL：SD 系ラット雌雄を4週令で購入し使用した．動物は，室温25±1°，湿度55±5%，照明6時から17時，換気毎時10回の barrier 飼育室において，前面および床が網のステンレス製個別飼いケージに収容，自動給水（細菌沪過器経由）装置付ベルト式飼育架台にて飼育した．

3. 観察法 各実験飼料によるラットの飼育期間を3，6，12，24カ月ならびに終生とし，ラット雌雄をそれぞれ，3，6，12，カ月飼育各群に5匹，24カ月飼育各群に 10匹，終生飼育各群に15匹を割り当てた（Table 1）．この際，飼育期間別に各群間で動物をランダムに配列し，1週間一般飼料により飼育，5週令より実験飼料の投与を開始，水道水とともに自由に摂取させた．動物の一般状態は毎日観察し，体重ならびに飼料摂取量は終生飼育各群の雌雄各15匹について飼育3カ月まで毎週，4—8カ月まで2週毎，9—24カ月まで4週毎に測定した．

* 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. Summary of Animal Groupings and Dosage of BHT

Dose[2]	0		0.005		0.020		0.320	
Months	M	F	M	F	M	F	M	F
3	5[1]	5	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	5	5	5	5	5
12	5	5	5	5	5	5	5	5
24	10	10	10	10	10	10	10	10
24～	15	15	15	15	15	15	15	15
Total	40	40	40	40	40	40	40	40

1) No. of rats 2) %

3，6ならびに12カ月飼育各群では，飼育終了解剖時に肝臓，腎臓，心臓，脾臓，甲状腺，副腎，盲腸の重量測定，血液学的検査，血清生化学的検査，尿検査を行った．

24カ月飼育各群では飼育終了時剖検後，脳，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，下垂体，甲状腺，副腎，精巣，前立腺，卵巣，子宮，盲腸の重量測定，血液学的検査，血清生化学的検査，尿検査を行うとともに死亡率（生存率）を求めた．

終生飼育を含む全群ラットにおいて，瀕死状態と判定されたものは屠殺して諸検査を行うよう努めた．

死亡率（生存率）ならびに生存週数の算定に当っては，瀕死屠殺例も死亡に含めた．

4. 検査方法 体重，飼料摂取量：体重測定は，午前10時より行い，飼料摂取量は飼料投与量と2日間摂取後の残余量ならびにケージ受皿への飼料コボシ量をメトラーデジタル電子天秤（PE 1200）を用いて測定し｛投与量－(残余量＋コボシ量)｝/2 により求めた．

ラットの解剖：無麻酔下断頭放血後行った．

血液学的検査：断頭時放出する血液をあらかじめヘパリンナトリウムを塗布したガラス試験管に摂取，軽く振とう後自動希釈機（York 社製）にてその 44.7μl をとり希釈液（Isoton, Coulter Counter 用血球希釈液）を加えて全量を 10.0ml とし，血球測定機 Coulter Counter Model S (Coulter Counter Electric 社製）を用い，標準血液（4C：Coulter Electric 社製）による精度照合下に，白血球数（WBC，コ/mm^3），赤血球数（RBC，コ/mm^3），ヘモグロビン量（HGB, g/dl），ヘマトクリット値（Hct，%），平均赤血球容積（MCV, μ^3），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH, $\mu\mu$g），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC，%）を測定した．

血清生化学的検査：断頭により放出する血液をガラス製遠心管にとり，パラフィルムをかけて水分の損失を防ぎ室温に30分放置，ついで氷中に60分放置，血液上面に出たフィブリン膜を除去して冷却遠心機（Tomy Seiko, RS-71A, Swing Rotor）で遠心分離（0°C, 3,000rpm, 10 min）し，その上清を血清とした．

総蛋白量（TP, Biuret 法, g/dl），グルコース量（GLU, glucose oxidase 法，mg/dl），尿素窒素量（UN, urease indophenol 法，mg/dl），トランスアミナーゼ活性（GOT ならびに GPT, Reitman-Frankel 変法，Karmen unit/ml），アルカリフォスファターゼ活性（ALP, Kind-King 変法，K-A unit/dl），総コレステロール量（CHO, Liberman-Bucherd 法，mg/dl），コリンエステラーゼ活性 ChE, ΔpH 法，ΔpH/ml/hr）を日立自動分析装置 M-400 にて測定した．測定用試薬はアナセラムシリーズ（第一化学薬品製）を使用し，測定条件精度照合には凍結プール血清（コンセーラ：日水製薬製）を用いた．

血清ナトリウム量（Na^+，炎光光度法，mEq/l），カリウム量（K^+，炎光光度法，mEq/l）の測定には KLiNa 炎光光度計（Beckman 社製）を使用し，血清用標準液（Na^+：140mEq/l，K^+：5,0mEq/l）を用いて補正した．

尿検査：ラットを一匹づつ採尿用バット付ステンレス網ケージに入れ，餌ならびに水を断ち，必要な尿量が得られるまで放置した．

pH，蛋白（mg/dl），グルコース（g/dl），ケトン体（mg/dl），ビリルビン（mg/dl），ウロビリノーゲン（Ehrich unit/dl），潜血反応を Ames 社製尿検査試験紙，Labstix, Ictostix, Urobilistix を用いて測定した．

検査結果の推計学的検討にあたっては危険率を5%に置いた．

実験結果

1. 一般状態 対照群との間に認めるべき差異はなかったが，尿が飼料コボシ量測定用沪紙を桃色に染める[16]ものが飼育12カ月過ぎより 0.320% 群の雌雄各1例にみられた．また，対照群を含めて飼育12カ月頃より後肢にタコができるものが多く認められた．

2. 体重 定期的に体重を測定した終生飼育各群24カ月間の体重の推移を Fig. 1，2に，3，6，12ならびに24カ月目における体重と増加率を Table 2 に示した．BHT 摂取各群雌雄とも増加率で対照群との間に有意差はなかった．

各飼育期間毎の定時解剖時の体重は Table 3 に示した通りで，体重増加率でみると24カ月飼育 0.320% 群雄が有意に大きかった以外対照群との間に差は認めず，また BHT 摂取量との関連での増減傾向もみられなかった．

Table 2. Body Weight Gain in Rats Fed for the Whole Life

Sex	Dose／Months	0	3	6	12	24
M	Control	106±5.2[1] (15)[3] 100±0[2]	464±37.7 (15) 434±37.6	555±58.3 (15) 519±51.6	664±78.9 (15) 620±65.7	724±86.6 (10) 682±87.8
	0.005	105±3.6 (15) 100±0	463±35.7 (15) 441±44.0	556±39.5 (15) 530±46.3	666±50.1 (15) 634±54.2	694±72.5 (8) 669±63.4
	0.020	103±5.4 (15) 100±0	451±47.7 (15) 436±42.1	531±56.4 (15) 513±50.9	639±79.2 (15) 618±77.0	721±157.6 (14) 696±149.4
	0.320	104±5.5 (15) 100±0	465±37.8 (15) 446±33.6	550±47.1 (15) 528±46.5	649±61.4 (15) 624±61.4	724±121.3 (11) 703±115.8
F	Control	98±2.7 (15) 100±0	251±20.0 (15) 255±24.1	290±28.5 (15) 294±31.0	361±66.2 (15) 366±69.7	504±127.5 (12) 509±132.8
	0.005	95±2.9 (15) 100±0	256±20.9 (15) 267±25.5	295±32.4 (15) 309±38.8	373±62.5 (15) 390±72.5	547±145.6 (10) 572±165.1
	0.020	94±3.7 (15) 100±0	265±30.5 (15) 270±38.5	294±47.6 (15) 310±58.1	389± 90.8 (15) 412±111.0	509±145.9 (13) 542±173.8
	0.320	95±4.1 (15) 100±0	250±20.9 (15) 262±20.0	295±29.3 (15) 309±28.9	365±48.0 (15) 382±46.9	512±111.1 (11) 535±113.9

1) absolute weight g., mean ± SD 2) growth rats %, mean ± SD 3) No. of rats

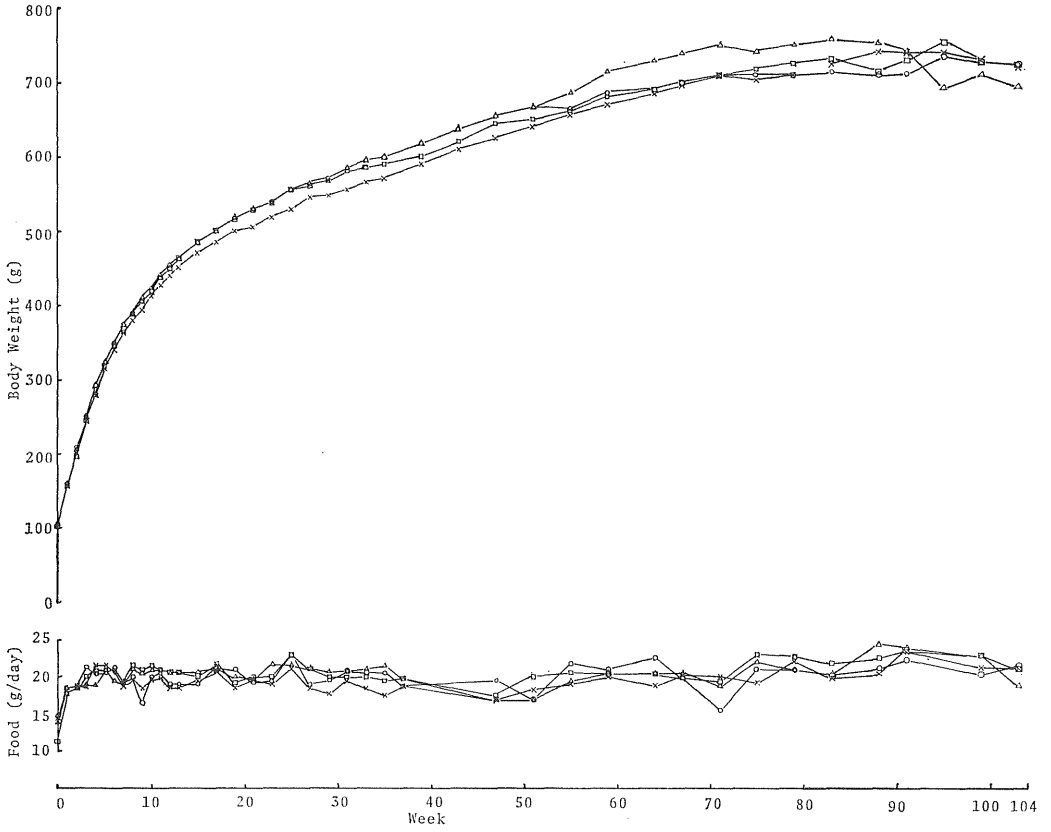


Fig. 1. Curves of Growth and Food Intake of rats Administered Orally with BHT (Male)
—○— Control, —△— 0.005%, —×— 0.020%, —□— 0.320%

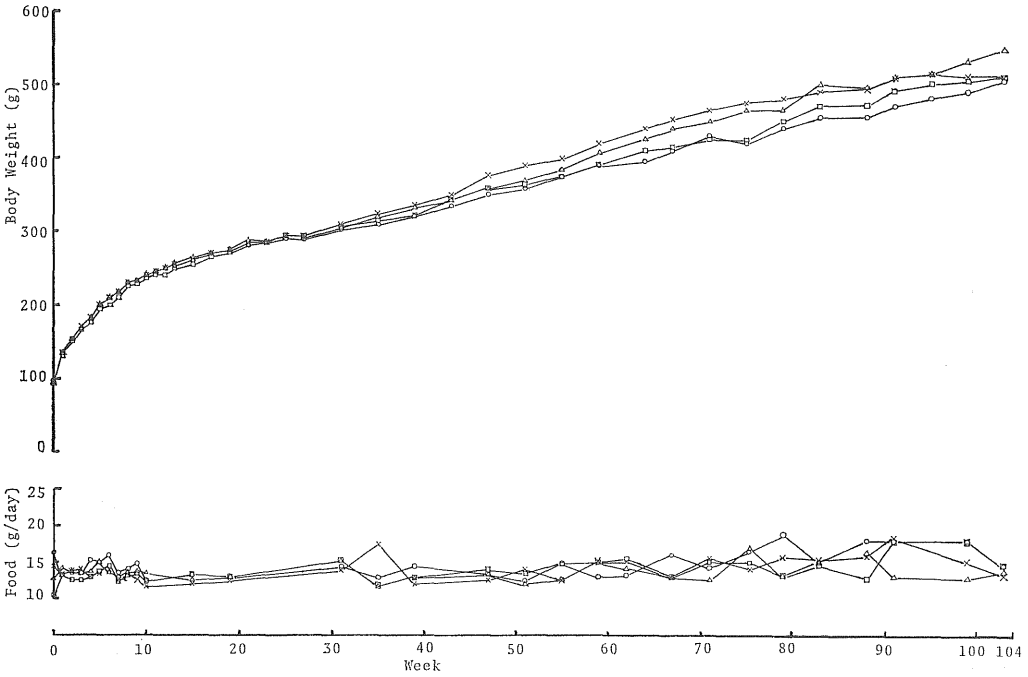


Fig. 2. Curves of Growth and Food Intake of Rats Administered Orally with BHT (Female)
—○— Control, —△— 0.005%, —×— 0.020%, —□— 0.320%

Table 3. Body Weight Gain in Rat Treated Periodically

Sex	Dose/Months	3		6		12		24	
M	Control	509±41.6[1] 467±46.1[2]	(5)[3]	581±51.7 544±54.9	(5)	704±58.2 664±42.2	(5)	712±82.3 666±96.6	(9)
	0.005	451±49.1 447±62.1	(5)	600±29.6 568±44.9	(5)	712±50.1 683±55.9	(5)	799±91.6 772±98.9	(7)
	0.020	492±34.6 469±33.1	(5)	591±57.3 557±49.8	(4)	703± 97.2 659±102.6	(5)	803±213.2 738±185.3	(5)
	0.320	459±12.6* 446±24.0	(5)	583±45.1 549±41.7	(5)	706±119.0 677±126.3	(4)	882±156.4* 826±137.5*	(7)
F	Control	263±13.1 277±32.9	(5)	299±36.9 317±28.3	(5)	382±73.4 394±69.8	(4)	540±115.3 551±107.9	(8)
	0.005	251±17.3 267±16.4	(5)	291±17.5 306±25.6	(5)	420±115.7 462±133.0	(5)	555±123.2 581±131.2	(6)
	0.020	242±10.2* 260±19.1	(5)	323±45.6 338±66.7	(5)	413±57.6 434±67.3	(5)	588±119.7 592±116.1	(5)
	0.320	257±21.6 267±12.4	(5)	345±26.7 360±41.7	(5)	363±66.6 372±57.7	(5)	474±96.1 481±73.2	(3)

1) absolute weight g., mean ± SD 2) growth rats %, mean ± SD 3) No. of rats
* $p<0.05$

3. **飼料ならびにBHT摂取量** 摂取量の推移をFig. 1, 2に24カ月間の平均1日摂取量をTable 4に示した. 飼料摂取量においてBHT摂取各群雌雄とも対照群との間に大差は認められず, BHTの体重当り1日平均摂取量は, 0.005% 群雄 2.14mg/kg, 雌 2.49mg/kg; 0.020% 群雄 9.61mg/kg, 雌 10.26mg/kg; 0.320%群雄 144.76mg/kg, 雌 170.86mg/kg で推定摂取量0.005%群 2.5mg/kg, 0.020% 群 10.0mg/kg, 0.320% 群 160.0mg/kg と略々一致した.

4. **死亡, 死亡率, 生存期間** 3カ月飼育各群では死亡例なく, 6カ月飼育では0.020% 群雄 No. 045が飼育14週で死亡, 左腎臓の腫大と膀胱内出血が認められた. 12カ月飼育では対照群雌 No. 113が飼育25週で, 0.320%群雄 No. 087が飼育2週で死亡し, 対照群例 (No. 113) では胸腺腫大が, 0.32% 群例 (No. 087) では胸腔内出血が認められた.

24カ月飼育群ならびに終生飼育群の瀕死-屠殺例を含めた. 飼育開始 (実験飼料摂取開始) 後死亡までの週数, 飼育103週 (24カ月飼育群定時解剖直前) における死亡率ならびに終生飼育群の平均生存週数を Table 5 に, 終生飼育群の死亡率 (生存率) の推移を Fig. 3 に示した.

死亡発生を24カ月飼育群でみると, BHT 摂取各群雌雄とも対照群に較べて多く, 特に雌では dose-response の関係をもって多くなっており, 0.32%群の死亡率は対照群と比較して有意に大であった. (Fisher の直接確率計算). しかし, 終生飼育群の飼育103週までの各群死亡率には大差なく, 24カ月飼育と合計した死亡率におい

Table 4. Food and BHT Intake of Rats Fed BHT for 24 Months

Sex	Dose (BHT %)	No. of rats	Food Intake (g)		BHT (mg)		Food dropped (g)
			/rat/day	/kg/day	/rat/day	/kg/day	/rat/day
M	Control	15→10	19.8	44.2	—	—	1.3
	0.005	15→ 8	20.2	44.0	0.9	2.1	1.2
	0.020	15→14	19.4	46.0	3.8	9.6	1.0
	0.320	15→11	20.3	45.2	65.0	144.7	1.0
F	Control	15→12	14.6	53.2	—	—	0.7
	0.005	15→10	13.5	52.5	0.6	2.4	0.7
	0.020	15→13	13.9	51.5	2.7	10.2	0.7
	0.320	15→11	13.8	53.4	44.2	170.8	0.8

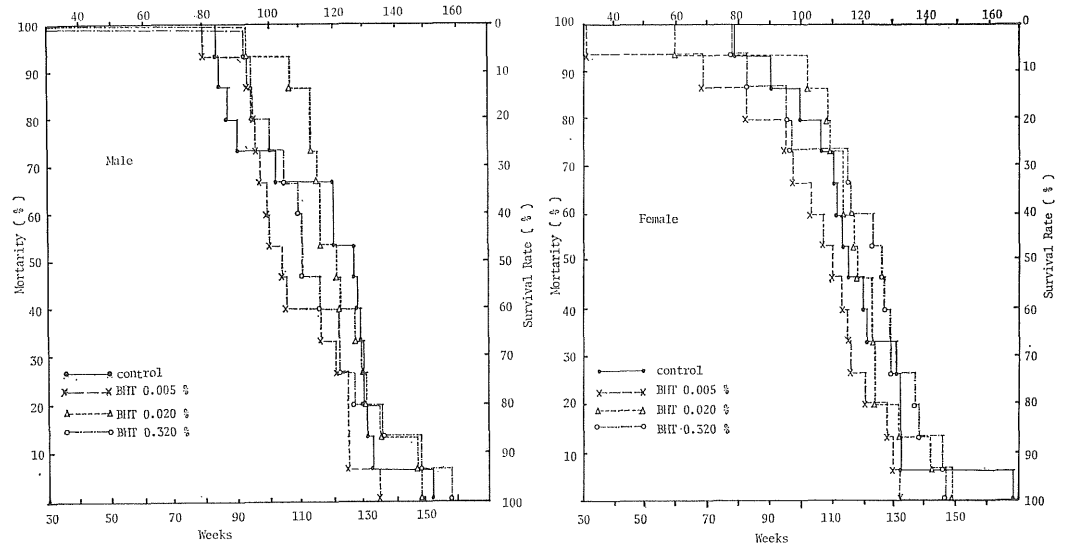


Fig. 3. Mortality of Rats Treated Orally with BHT for the Life-Span

Table 5. Survival Time and Mortality of Rats Treated with BHT for 24 Months and Life-Spans

Group			No. of rats	Survival time from start of feeding to decease (weeks)	Mortarities after 103 weeks[1]		Survival time (weeks) mean ± SD
Sex	BHT %	term treated			24 months or life span	total (%)	
M	0 (Control)	24 months	10	76	1/10(10)	6/25	—
		life span	15	83, 84, 87, 90, 102 | 120, 120, 127, 128, 129, 130, 130, 131, 133, 152	5/15(33)	(24)	116.4±21.5
	0.005	24	10	79, 98, 103	3/10(30)	10/25	—
		life span	15	79, 93, 95, 96, 97, 99, 100 | 104, 105, 116, 121, 125, 125, 125, 136	7/15(46)	(40)	107.6±15.8[2]
	0.020	24	10	67, 73, 79, 96, 103	5/10(50)	6/25	—
		life span	15	93 | 106, 113, 113, 115, 116, 116, 121, 122, 128, 131, 132, 136, 148, 149	1/15(6.7)	(24)	122.6±15.1
	0.320	24	10	42, 79, 103	3/10(30)	7/25	—
		life span	15	92, 94, 95, 100 | 104, 109, 110, 110, 116, 122, 122, 127, 136, 148, 159	4/15(26)	(28)	116.2±19.6
F	0 (Control)	24	10	86, 100	2/10(20)	5/25	—
		life span	15	78, 90, 99 | 106, 110, 111, 113, 115, 120, 121, 131, 132, 132, 132, 169	3/15(20)	(20)	117.2±21.3
	0.005	24	10	45, 68, 68, 89	4/10(40)	10/25	—
		life span	15	31, 68, 82, 95, 97, 103 | 107, 110, 113, 115, 116, 121, 128, 130, 132	6/15(40)	(40)	103.2±26.6[2]
	0.020	24	10	55, 80, 90, 99, 102	5/10(50)	7/25	—
		life span	15	59, 101 | 108, 109, 113, 113, 117, 118, 123, 123, 124, 124, 132, 142, 149	2/15(13)	(28)	117.0±20.4
	0.320	24	10	74, 80, 83, 97, 97, 102, 103	7/10(70)*	11/25	—
		life span	15	77, 82, 95, 96 | 115, 116, 123, 126, 127, 129, 129, 137, 138, 146, 147	4/15(26)	(44)	118.8±22.0

* Fisher's exact probability test $p=0.0349$

1) No significance by 2×4 χ^2 test among mortalities of groups

2) No significance by Wilcoxon signed rank test to control group

ても対照群との間に有意な差はなく，用量と関連した死亡率の大小の傾向も認められなかった．

終生飼育各群の死亡発生の推移（Fig. 3）において，0.005% 群雌にやや左方移動がみられるが，いずれも近似のシグモイドカーブを描いており，平均生存週数は対照群雄 116.4±21.5，雌 117.7±21.3 に対し0.005%群は雄 107.6±15.8，雌103.2±26.6 とやや短かかったが有意差はなく（t 検定，順位和検定），0.020%群，0.320%群ではほとんど同等の値を示し，0.020%群雄122.6±15.1，雌 117.0±20.4；0.320% 群雄 116.2±19.6，雌 118.8±22.0 であった．

5. 血液学的検査所見 3カ月，6カ月，12カ月ならびに24カ月飼育各群の定時解剖例の血液学的検査結果は Table 6, 7 に示した．各飼育期間を通じて BHT 摂取量と関連する変動は認められなかった．

24カ月ならびに終生飼育各群の瀕死-屠殺例の所見には異常値が散見されたが，対照群と BHT 摂取各群間に顕著な差は認められなかった[29]．

6. 血清生化学的検査所見 3カ月，6カ月，12カ月ならびに24カ月飼育各群の定時解剖時の血清生化学的検査結果は，Table 8, 9 に示した．諸検査で，各対群値に対し推計学的に有意と認められたのは，K^+ が3カ月飼育 0.005%，0.020%，0.320% 群雄，0.320% 群雌で高いこと，コレステロールが0.005% 群雌の12カ月飼育で高く，24カ月飼育で低いこと，GOT 活性が 0.320% 群6カ月飼育雄で低いことであった．12カ月飼育 0.320%群雄はいずれの検査においても高値を示しているが，これは1例がいずれも異常高値を示したためであった．また，24カ月飼育各群では諸検査結果に異常値が散在し，群間の平均値にやや大きい差がみられたものがあったが t 検定，順位和検定で有意差が認められる変化はなかった．

コレステロール値に関しては，飼育12カ月まで BHT 摂取ラットにおいてやや高い傾向があり，特に6カ月飼育群雌では dose-response の関係がみられ，BHT の関与がうかがえる．また，K^+ については，飼育3カ月 0.320% 群では雌雄とも有意な高値を示し，BHT 摂取量との関連もわずかにみられたことから，飼育初期における BHT の影響がうかがえる．

24カ月飼育ならびに終生飼育各群の瀕死-屠殺例の所見は，群間に差を見い出すことは困難であった[29]．

7. 器官重量 3カ月，6カ月，12カ月ならびに24カ月飼育各群定時解剖例の器官重量の測定結果は，Table 10-14 に示した．推計学的に有意性を示すものが散見されたが，臓器重量の特性を考慮し，絶対重量ならびに体重比重量を総合的にみて BHT 摂取量との関連において，また各飼育期間を通して一定の変化としてみられる変化は，0.320% 群の肝臓重量がやや大きいことのみであった．

24カ月飼育各群瀕死-屠殺を含む途中死亡例ならびに終生飼育各群において測定して得た結果[29]からは，臓器重量分布において群間に顕著な差はなく，定時解剖の場合にみられた0.320% 群の肝臓重量の増加あるいは増加傾向も全く認められなかった．

8. 尿検査 3カ月，6カ月，12カ月ならびに24カ月飼育各群の定時解剖例の尿検査の結果は Table 15 に示した．いずれの検査においても対照群との間に顕著な差を示すものは認められなかった．

考　察

BHT 0.005, 0.020, 0.320%添加飼料による JCL：SD 系ラット雌雄の3，6，12ならびに24カ月飼育を併せて終生飼育実験を行った．

本実験では終生飼育により BHT の毒作用の指標をラットの発育，途中死亡率，寿命，腫瘍の発生に求めた．いかに微量でも生体は，その化学物質を摂取すれば反応し何らかの変化が起るはずであり，無作用はありえない．毒作用の検索とは，その変化が生理的適応的変化にとどまるか，障害的結果をもたらす変化となるかを知ることと思うが，その判別は容易ではい．発育，死亡の推移ならびに寿命の変化は生体のあらゆる変化による障害の発生を総合的に表現するものと考えている，発育，死亡率，寿命，腫瘍発生を毒作用の指標とする場合，実験動物ならびにその摂育環境のランダム化が特に重要であり，また摂餌量は発育とともに寿命に大きい影響を与え，摂餌量の低下は平均寿命を延ばすことがある[29]といわれ，これらの点に留意して，実験を行った．

BHT 0.320% 群では飼育12カ月まで肝臓重量，血清コレステロールの増加ないし増加傾向を，飼育3カ月において血清 K^+ の上昇を示したが，BHT 摂取各群とも対照群と比較して，摂餌量，発育（体重増加），一般状態に差を認めなかった．

死亡率は24カ月飼育群，とくに雌において用量-反応の関係で高かったが，終生飼育群の飼育24カ月における各群の死亡率，また24カ月飼育群と終生飼育群を合併した各群の死亡率には有意差はなく，BHT 摂取量と関連した一定の傾向もみられなかった．

終生飼育群での死亡（生存）曲線は各群近似のS字状を示し，死亡の初発ならびに最終に大差を認めず，実験開始（5週令）後の平均生存週数±標準偏差は，対照群雄 116.4±2.5，雌 117.2±21.3；0.005%群雄 107.6±

Table 6. Blood Components in BHT Fed Rats (Male)

Group		No. of rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	HGB g/d*l*	HCT %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
BHT %	Months								
Control	3	4	7.4±2.78[1)]	7.92±0.599	15.7±0.29	29.5±18.84	50±1.8	30.0±18.63	48.6±16.09
	6	5	7.5±2.84	7.59±0.398	16.2±1.10	39.6±2.25	53±1.1	21.3±0.93	40.8±1.77
	12	5	—	6.99±1.018	15.6±2.22	37.3±5.71	54±1.3	22.5±0.46	41.7±2.26
	24	9	10.1±4.44	7.10±1.566	14.5±2.94	40.5±7.93	58±3.6	20.9±1.42	35.8±1.27
0.005	3	5	7.3±2.82	7.50±1.043	15.1±2.26	38.3±5.74	51±1.8	20.0±0.44	39.3±0.50
	6	5	7.0±1.41	7.27±0.391	14.9±0.66	37.2±2.48	52±1.5	20.5±0.86	40.0±1.60
	12	5	—	7.32±0.217	16.3±1.32	38.7±1.89	54±1.5	22.2±1.40	42.0±2.10
	24	7	13.4±6.56	6.42±1.267	13.3±2.23	36.6±4.81	58±5.7	21.1±1.68	36.3±2.27
0.020	3	5	7.0±2.53	7.60±0.521	12.3±6.90	38.9±2.83	51±1.6	16.6±8.46	31.7±16.83
	6	4	8.4±1.35	7.43±0.217	15.8±1.21	39.3±2.33	54±2.1	21.2±0.97	40.0±1.82
	12	5	8.9±3.72	7.03±0.523	17.4±2.23	38.9±5.82	56±5.3	24.6±1.98	44.7±2.68
	24	5	12.8±8.17	6.37±1.437	13.2±2.52	36.3±5.86	58±4.9	21.6±1.46	37.0±1.39
0.320	3	5	5.4±1.01	7.46±0.845	15.4±0.76	38.0±3.97	51±0.4	20.8±1.37	40.7±2.39
	6	5	6.5±0.50	7.28±0.278	15.2±0.42	37.7±0.42	52±0.8	20.9±0.49	40.3±0.53
	12	4	8.9±1.97	6.18±0.855	17.3±6.82	33.2±2.49	55±4.6	29.5±16.73	42.0±3.54
	24	7	12.6±9.54	6.21±1.801	13.4±3.29	36.7±8.20	60±6.5	22.3±3.63	36.3±2.26

1) mean ± SD

Table 7. Blood Components in BHT Fed Rats (Female)

Group		No. of rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	HGB g/dl	HCT %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
BHT %	Months								
Control	3	5	6.3±1.34[1)]	6.77±0.536	15.2±0.22	35.3±3.01	53±0.8	22.7±1.60	43.2±3.56
	6	5	7.5±2.84	7.59±0.398	16.2±1.10	39.6±2.25	53±1.1	21.3±0.93	40.3±0.95
	12	4	—	6.72±0.632	15.3±1.59	36.8±3.49	55±1.0	22.6±0.80	41.4±0.99
	24	8	13.2±8.44	5.38±1.756	12.5±2.61	34.6±7.47	67±10.0	24.6±4.37	36.5±2.63
0.005	3	5	3.2±0.45*	7.37±0.518	15.7±0.23*	45.7±19.16	52±0.8	29.5±17.31	44.8±6.35
	6	5	7.0±1.41	7.27±0.391	14.9±0.66	37.2±2.48	52±1.5	20.5±0.86	40.6±2.75
	12	5	—	6.38±0.286	15.3±0.88	35.2±1.51	55±1.4	23.9±1.16	43.4±2.62
	24	6	10.8±4.09	4.66±1.637	10.3±2.88	29.1±7.56	63±5.0	22.9±1.90	35.6±0.89
0.020	3	5	3.9±0.86*	6.23±2.718	16.0±0.63	23.3±20.21	53±1.9	26.2±20.06	54.3±16.58
	6	4	8.4±1.35	7.43±0.217	15.8±1.21	39.3±2.33	54±2.1	21.2±0.97	38.5±1.02*
	12	5	—	6.32±0.379	15.7±1.79	35.2±2.82	56±2.8	24.8±2.47	44.5±2.43*
	24	5	10.9±4.83	5.63±1.084	13.0±1.58	34.6±4.51	62±5.4	23.8±3.69	37.9±2.72
0.320	3	5	5.0±1.17	6.87±0.613	15.3±0.58	35.6±2.67	52±1.1	22.3±1.47	42.9±2.35
	6	5	6.5±0.50	7.28±0.278	15.2±0.42	37.7±1.12	52±0.8	20.9±0.49	39.8±0.56
	12	5	—	5.85±0.567	14.8±2.39	32.6±3.05	56±2.4	25.3±4.40	45.5±6.19
	24	3	14.3±10.58	5.16±1.738	11.5±2.32	32.7±5.69	65±9.5	23.4±3.50	35.4±1.24

1) mean ± SD * $p<0.05$

Table 8. Biochemical Data on the Serun of Rats Treated with BHT (Male)

Group BHT %	Months	No. of rats	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT K-U/ml	GOT K-U/ml	ALP K•A-U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l
Control	3	5	6.8±0.08[1)]	126.4±5.30	16.4±1.15	29.4±3.57	95.4±8.77	25.6±9.29	64.2±12.79	141.2±1.79	6.9±0.32
	6	5	6.8±0.39	123.0±10.48	14.8±2.77	26.2±4.09	91.2±10.37	21.8±11.37	75.8±10.83	148.0±3.17	7.0±0.43
	12	5	6.7±0.08	126.4±12.75	15.2±1.93	35.6±11.71	98.4±26.51	18.6±7.27	70.4±13.03	146.6±5.67	7.5±1.05
	24	9	7.1±0.39	155.5±30.57	30.4±29.37	52.7±10.09	128.7±19.21	21.1±5.89	195.5±103.07	145.3±5.43	8.0±0.69
0.005	3	5	6.5±0.52	121.6±6.31	16.0±1.87	26.2±5.77	100.6±14.35	24.2±5.85	66.8±13.77	142.4±1.13	7.4±0.23*
	6	5	6.8±0.26	132.4±15.59	14.8±1.79	27.2±5.45	91.0±11.83	29.2±8.41	81.2±14.55	147.8±3.03	6.9±0.41
	12	5	6.9±0.35	121.2±17.09	14.8±1.65	28.6±2.51	86.2±10.29	17.4±3.97	87.8±19.15	147.4±5.99	7.6±0.40
	24	7	6.6±0.64	133.1±15.89	25.0±11.13	46.4±6.63	126.4±16.57	20.0±7.51	198.4±75.23	143.4±2.23	7.9±0.77
0.020	3	5	6.8±0.31	125.6±15.63	16.0±2.45	26.4±1.79	96.0±8.15	29.8±6.23	73.0±21.09	144.4±4.15	7.4±0.23*
	6	4	6.8±0.12	118.0±6.68	15.5±1.00	29.7±4.79	96.2±6.61	19.2±6.13	70.5±5.45	146.2±2.63	6.8±0.16
	12	5	6.8±0.20	132.6±14.63	16.4±1.67	38.6±15.03	84.4±23.01	21.4±8.99	87.6±23.51	146.0±5.95	7.9±1.02
	24	5	6.6±0.77	142.8±28.85	34.2±40.73	47.0±13.27	131.4±26.33	23.0±14.15	150.8±34.61	144.0±8.29(4)	7.7±0.83(4)
0.320	3	5	6.7±0.34	121.8±10.75	16.2±1.79	27.4±2.61	94.2±11.57	28.2±4.03	72.2±9.67	144.0±2.65	7.5±0.29*
	6	5	6.8±0.21	117.8±3.03	13.4±1.67	25.0±3.67	97.8±11.87	22.4±8.97	76.4±16.91	148.0±1.99	7.1±0.16
	12	4	8.4±3.12	147.0±50.29	17.2±2.63	84.2±117.21	332.2±607.33	31.0±18.05	229.5±297.63	141.5±13.23	8.2±1.12
	24	7	7.1±1.04	140.7±19.99	17.4±5.69	42.2±10.17	124.0±27.15	21.7±6.15	156.7±77.37	145.0±3.51	7.8±0.61

1) mean ± SD * $p<0.05$

Table 9. Biochemical Data on the Serum of Rats Treated with BHT (Female)

Group BHT %	Months	No. of rats	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT K-U/ml	GOT K-U/ml	ALP K. A-U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l
Control	3	5	6.9±0.34[1)]	117.8±12.19	15.6±1.51	30.6±5.59	114.0±10.71	25.8±11.41	71.8±12.03	140.8±0.83	6.7±0.27
	6	5	7.3±0.54	141.0±16.97	14.4±1.67	28.6±4.39	92.4±8.97	15.2±6.73	81.4±18.35	145.0±1.57	6.5±0.80
	12	4	7.7±0.29	123.2±7.81	14.2±2.99	30.7±5.43	78.5±10.67	13.7±4.27	83.2±10.21	143.7±0.95	7.2±0.76
	24	8	7.1±0.60	125.0±27.69	16.5±2.39	50.3±19.63	130.0±27.41	18.1±8.69	121.2±18.15	142.0±2.27	6.9±0.28
0.005	3	5	7.3±0.38	131.8±9.03	13.6±1.35	25.4±2.89	105.2±6.53	18.4±4.87	76.8±14.75	142.5±1.29(4)[1)]	6.6±0.17
	6	5	7.6±0.73	129.2±3.56	15.6±0.55	32.6±10.31	94.2±19.95	19.2±5.77	88.6±18.93	144.2±1.79	6.4±0.41
	12	5	7.6±0.11	122.2±11.95	14.8±2.05	39.2±11.25	86.4±16.25	17.4±9.07	108.4±12.31	143.4±5.37	7.0±0.50
	24	6	6.7±0.88	128.6±18.37	20.1±11.43	36.5±7.37	113.3±17.31	18.5±9.91	95.5±23.81	144.5±5.07(4)	7.2±1.47(4)
0.020	3	5	7.2±0.33	124.6±10.93	13.0±2.45	25.2±2.59	103.2±17.85	23.0±9.85	70.8±9.67	143.4±2.70	6.9±0.62
	6	5	7.8±0.29	130.4±11.65	13.4±2.31	25.6±3.51	85.0±14.21	14.4±6.31	94.6±25.67	145.8±2.69	6.6±0.39
	12	5	7.4±0.53	130.4±7.27	15.0±2.35	28.4±10.39	87.8±33.01	17.2±8.29	87.8±22.97	143.4±1.13	7.8±0.55
	24	5	7.5±1.58	142.6±46.29	16.6±5.17	105.6±119.41	218.8±153.09	24.8±20.37	128.8±48.63	140.5±5.68(4)	7.3±0.97(4)
0.320	3	5	7.4±0.49	128.0±16.01	14.6±2.61	23.0±4.35	99.4±13.83	18.0±7.59	82.5±3.41	141.3±0.57(3)	7.3±0.28*
	6	5	7.8±0.73	131.0±12.38	14.2±3.91	24.4±5.41	75.6±10.17	12.2±2.59	100.8±8.17	147.0±2.45	6.5±0.35
	12	5	8.0±0.23	118.0±12.05	11.6±2.71	23.6±3.91	77.4±11.49	18.0±10.65	107.8±27.47	145.4±2.30	7.1±0.36
	24	3	7.3±0.90	120.3±14.97	14.0±1.73	37.3±5.33	115.6±3.51	17.6±8.33	110.6±31.35	146.3±4.73	6.6±0.15

1) mean ±SD * $p<0.05$ ( ) No. of rats

Table 10. Organ Weights of Rats Fed Diets Containing BHT for 3 Months

SEX	Group (BHT %)	No. of rats	Heart mg mg/100g	Liver g g/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Thyroid mg mg/100g	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Caecum mg mg/100g
M	Control	5	1416±153.5[1]	17.41±2.157	1588±187.9	1562±165.1	798±181.9	16.0±3.17	27.0±3.20	25.8±4.65	1572±168.3
			277±21.4[2]	3.40±0.174	310±27.1	543±23.3	155±29.7	3.1±0.73	5.2±0.58	5.0±0.80	308±25.5
	0.005	5	1300±184.7	15.32±1.526	1448±169.6	1400±135.8	702±155.3	14.4±2.29	22.1±3.14	20.5±3.96	1232±167.5
			287±29.2	3.39±0.149	320±21.1	315±27.1	155±34.9	3.2±0.73	4.8±0.63	4.5±0.85	273±33.7
	0.020	5	1330±142.1	17.15±1.000	1502±166.9	1510±178.1	766±82.9	16.3±2.11	25.3±5.04	23.4±3.20	1390±623.9
			269±18.4	3.49±0.275	304±24.9	306±27.0	155±20.6	3.2±0.40	5.1±0.87	4.6±0.45	283±76.1
	0.320	5	1270±78.7	17.51±1.244	1494±68.0	1516±72.3	724±32.0	18.7±2.53	23.8±2.75	22.6±1.95	1420±147.4
			276±15.1	3.80±0.229*	325±11.5	329±12.7	157±10.5	4.0±0.64	5.1±0.68	4.9±0.52	309±32.3
F	Control	5	820±73.1	8.38±0.899	906±49.7	868±51.6	482±55.4	10.4±2.78	27.8±3.76	25.1±1.33	1022±63.4
			310±12.6	3.17±0.295	344±17.5	329±11.3	183±29.2	3.9±1.17	10.5±0.99	9.5±0.23	388±24.2
	0.005	5	824±52.2	8.50±0.577	858±55.4	854±67.6	472±37.0	14.8±2.18*	29.5±3.36	28.3±3.53	888±88.9*
			328±33.8	3.37±0.063	342±36.7	339±30.4	187±20.4	5.8±0.66*	11.7±1.15	11.1±0.67*	353±37.6
	0.020	5	744±73.6	7.81±0.399	794±69.8*	792±69.0	526±162.1	11.7±2.64	28.3±3.15	24.4±3.71	810±251.4
			307±24.6	3.22±0.145	327±17.1	326±21.0	217±70.7	4.8±1.19	11.6±1.11	10.0±1.32	332±95.5
	0.320	5	798±43.2	10.06±0.892*	914±99.6	892±46.5	508±113.0	12.5±2.65	28.3±6.85	24.9±5.12	1088±168.8
			310±11.6	3.91±0.164*	354±14.8	347±21.7	196±37.1	4.9±1.26	11.1±3.10	9.7±2.07	421±48.2

1) Absolute weight, mean ± SD 2) weight/100g body weight * $p<0.05$

Table 11. Organ Weights of Rats Fed Diets Containing BHT for 6 Months

SEX	Group (BHT %)	No. of rats	Heart mg mg/100g	Liver g g/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Thyroid mg mg/100g	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Caecum mg mg/100g
M	Control	5	1524±227.3[1]	16.48±3.931	1638±201.0	1672±219.3	728±177.3	22.0±3.04	28.3±4.51	24.7±4.19	1568±589.8
			260± 16.4[2]	2.80±0.433	281±19.4	287±23.7	124±25.0	3.7±0.43	4.9±1.07	4.2±0.97	269±84.6
	0.005	5	1476±127.7	18.72±2.079	1738±114.9	1604±519.4	780±67.8	21.0±1.79	21.9±1.25	23.1±1.52	1746±633.6
			246±28.1	3.10±0.243	289±26.9	268±62.0	129±9.1	3.4±0.32	3.6±0.12	3.8±0.30	290±58.8
	0.020	4	1452±91.5	19.34±2.144	1692±241.0	1710±191.4	827±77.1	21.2±1.57	22.2±3.73	23.7±2.89	1530±516.1
			245±13.7	3.26±0.230	285±23.4	288±15.3	140±12.1	3.6±0.63*	3.7±0.78	3.9±0.29	260±65.3
	0.320	5	1524±113.4	17.64±1.577	1634±176.1	1586±135.5	844±108.0	19.5±3.35	24.2±3.62	19.1±4.61	1628±288.6
			261±22.0	3.02±0.202	280±30.5	272±23.9	145±21.8	3.3±0.41	4.1±0.67	3.2±1.00	279±50.1
F	Control	5	874±145.1	8.96±0.756	942±75.6	956±86.4	538±60.1	18.3±3.70	28.1±3.51	26.0±3.78	1156±182.8
			290±21.8	3.00±0.217	317±36.1	320±29.8	182±40.2	6.1±1.58	9.3±0.42	8.6±0.63	390±82.5
	0.005	5	900±74.8	8.99±1.026	904±53.6	940±63.2	464±74.0	18.5±4.07	29.0±1.63	23.1±4.25	1154±270.5
			308±12.7	3.07±0.174	310±19.4	322±7.9	158±21.6	6.3±1.04	9.9±0.54	7.9±1.42	393±78.2
	0.020	4	976±132.2	10.05±1.252	988±96.5	984±101.3	534±91.2	16.9±1.31	28.3±2.63	26.1±4.54	1156±151.9
			301±20.8	3.10±0.131	308±41.0	306±34.6	166±30.9	5.2±0.87	8.8±1.42	8.1±1.77	360±52.7
	0.320	5	1024±124.4	11.48±1.235*	1096±101.3	1108±113.6	528±57.6	18.7±3.86	32.2±9.76	28.1±5.62	1152±118.8
			296±31.0	3.31±0.257	317±27.9	321±34.3	153±22.3	5.4±1.31	9.2±2.52	8.1±1.66	333±23.7

1) absolute weight, mean ± SD 2) weight/100g body weight * $p<0.05$

Table 12. Organ Weights of Rats Fed Diets Containing BHT for 12 Months

SEX	Group (BHT %)	No. of rats	Heart mg mg/100g	Liver g g/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Thyroid mg mg/100g	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Caecum mg mg/100g
M	Control	5	1558±52.6[1]	18.97±2.162	1704±171.8	1679±161.8	869±112.5	21.7±2.30	25.8±1.35	24.5±1.35	1207±94.6
			221±12.2[2]	2.69±0.202	242±21.2	238±24.4	123±17.1	3.0±0.35	3.6±0.38	3.4±0.40	172±22.1
	0.005	5	1598±87.4	20.14±0.598	1834±246.0	1777±213.5	841±79.9	17.2±3.80	23.1±3.30	21.9±2.85	1430±519.4
			224±9.1	2.83±0.192	257±37.1	249±30.5	117±9.9	2.4±0.64	3.1±0.27	3.0±0.25	199±39.7
	0.020	5	1552±163.8	19.01±2.064	1752±120.1	1759±165.1	829±110.4	17.2±4.28	24.2±4.20	22.6±3.95	1161±266.6
			222±22.3	2.71±0.134	253±41.2	254±46.3	119±23.9	2.4±0.57	3.4±0.78	3.2±0.66	166±40.2
	0.320	4	1642±293.2	26.38±1.959	2220±179.6	2148±134.4	834±146.6	26.0±3.80	33.1±17.06	30.7±14.33	1553±576.3
			234±44.6	3.73±1.333	317±143.3	306±133.8	117±5.5	3.6±0.34*	4.7±2.65	4.4±2.26	232±75.6
F	Control	4	902±86.0	10.06±1.741	954±127.8	986±90.9	516±140.0	23.1±4.15	29.3±6.39	27.5±5.55	957±144.2
			242±55.7	2.64±0.212	255±55.7	265±54.7	135±26.2	6.0±0.88	7.9±3.01	7.4±2.50	254±43.5
	0.005	5	1078±248.1	11.60±2.880	1101±235.6	1139±262.5	539±57.6	16.8±4.04	29.7±3.72	26.5±4.17	998±82.8
			258±11.6	2.77±0.145	265±18.5	274±17.3	133±27.5	4.0±0.75*	7.3±1.23	6.4±0.77	243±38.8
	0.020	5	1020±111.8	11.36±1.311	1082±166.5	1050±118.3	551±94.1	18.2±1.53	27.0±4.62	26.1±3.49	1032±103.0
			247±14.2	2.75±0.089	261±9.8	255±9.6	133±12.8	4.4±1.04	6.7±2.29	6.3±1.34	252±38.2
	0.320	5	947±139.7	11.83±3.101	1065±191.0	1080±148.6	540±76.8	19.7±3.09	31.0±4.75	27.5±6.43	922±68.2
			262±22.6	3.21±0.370*	294±31.1	300±33.7	150±18.0	5.5±0.99	8.6±1.41	7.4±0.55	262±66.2

1) absolute weight, mean ± SD 2) weight/100g body weight * $p<0.05$

Table 13. Organ Weights of Rats Fed Diets Containing BHT for 24 Months

SEX	Group (BHT %)	No. of rats	Brain mg mg/100g	Heart mg mg/100g	Liver g g/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Caecum mg mg/100g	Hypophysis mg mg/100g	Thyroid mg mg/100g
M	Control	9	2316±84.9[1)]	1802±166.7	20.47±1.233	2364±811.5	2308±703.9	1327±382.9	1529±137.7	17.4±9.11	30.7±4.49
			327±27.9[2)]	256±38.1	2.91±0.453	344±158.5	335±141.7	191±69.3	215±26.3	3.0±1.65	4.3±0.89
	0.005	7	2361±65.5	1987±273.7	22.59±2.45	2524±699.5	2504±665.3	1834±1002.5	1279±173.7*	27.1±19.45	28.4±3.93
			298±36.9	249±35.9	2.84±0.379	317±92.9	316±90.9	226±118.7	159±17.3*	3.3±2.49	3.5±0.57
	0.020	5	2305±83.3	2091±252.5*	22.09±2.099	2906±1761.1	2817±1444.9	1221±273.1	1271±157.7*	18.9±2.35	32.3±4.65
			301±70.3(4)	276±52.9(4)	2.93±0.755(4)	419±341.5(4)	395±288.7(4)	149±54.7(4)	161±45.7(4)	2.4±0.73(4)	4.0±1.19(4)
	0.320	7	2291±42.7	1894±213.1	24.07±5.219	2253±483.3	2286±505.3	1593±975.3	1472±462.7	27.2±20.27	29.0±7.15
			265±40.9*	218±37.5	2.72±0.490	258±58.3	261±59.5	186±129.1	171±66.3	3.2±2.95	3.2±0.77*
F	Control	8	2110±125.5	1646±346.5	16.90±4.209	1289±220.1	1343±181.0	1359±650.1	1203±104.9	88.9±95.15	28.0±11.93
			407±98.5	310±67.5	3.13±0.577	243±45.1	255±45.7	264±137.7	229±45.1	18.0±21.61	5.3±2.61
	0.005	6	2105±96.7	1437±300.9	17.45±7.433	1371±340.3	1300±304.5	1858±1713.9	1110±157.5	54.7±45.65	21.0±3.67
			391±69.5	259±28.7	3.05±0.819	248±54.1	236±47.9	348±349.7	205±44.5	21.0±3.67	3.9±1.17
	0.020	5	2098±73.5	1386±189.9	19.92±4.075	1359±216.1	1402±233.7	916±229.5	1041±161.9	67.5±81.47	25.3±5.81
			369±85.1	238±26.7	3.51±1.159	236±45.7	242±39.3	158±37.7	179±22.5*	13.7±19.55	4.4±1.47
	0.320	3	2170±66.1	1489±39.3	15.69±1.615	1282±154.1	1315±36.3	1220±647.1	1176±20.7	39.0±22.51	25.2±2.49
			469±92.5	321±57.1	3.37±0.589	274±45.5	285±65.5	272±154.3	255±56.1	9.0±6.75	5.3±0.61

1) absolute weight, mean ± SD 2) weight/100g body weight * $p<0.05$
( ) No. of rats

Table 14. Organ Weights of Rats Fed Diets Containing BHT for 24 Months

SEX	Group (BHT %)	No. of rats	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Testis (L) mg mg/100g	Testis (R) mg mg/100g	Prostate mg mg/100g	Ovary (L+R) mg mg/100g	Uterus mg mg/100g
M	Control	9	35.1±8.25[1]	37.6±22.53	1707±256.7	1643±358.9	357.8±143.95		
			4.9±1.23[2]	5.3±3.27	238±19.7	230±43.1	51.4±24.75		
	0.005	7	34.2±5.65	31.9±7.19	1488±395.1	1510±141.7	491.4±183.09		
			4.2±0.75	3.9±1.00	185±49.5*	191±33.7	62.8±27.55		
	0.020	5	41.5±7.97	34.1±5.29	1786±381.3	1558±393.9	503.6±232.47		
			5.4±1.89(4)	4.1±0.57(4)	236±18.5(4)	209±91.3(4)	59.3±31.67(4)		
	0.320	7	45.9±27.73	30.7±8.77	1591±379.9	1706±473.3	409.8±202.75		
			5.3±3.73	3.5±1.27	187±60.9*	197±61.5	48.6±27.29		
F	Control	8	46.3±21.63	35.0±4.31				58.0±24.21	1080±224.15
			8.6±3.43	6.6±1.17				10.6±3.45	211±104.97
	0.005	6	47.4±19.27	41.5±15.65				59.2±30.11	867±190.19*
			8.4±3.23	7.3±2.01				10.9±6.35	161±45.19
	0.020	5	37.1±8.75	43.5±10.15				71.0±23.91	1002±189.91
			6.7±3.03	7.7±2.89				12.9±7.17	187±136.79
	0.320	3	34.1±1.31	34.5±6.39				72.2±20.71	783±209.61
			7.3±1.49	7.2±0.65				15.0±2.40	175±81.97

1) absolute weight, mean ± SD 2) weight/100g body weight * $p<0.05$

( ) No. of rats

Table 15. Urinalysis

	SEX	Male															
	Months	3				6				12				24			
	Dose %	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320
pH	5																
	6	4[1]	4	2	2	4	3		3	1	5	1	1	6	3	5	3
	7	1	1	2	3		2	1	1	2		3	1	3	3		4
	8			1		1		3	1	2		1	2		1		
Protein	—	1		1	1	2	3	2	3	1	1	1					
	30mg/dl>	1		2	1		2	1	1	1	1						
	30mg/dl	3	4	2	2	1			1			1		1			
	100mg/dl		1		1	2				1		2		6	1		1
	300mg/dl							1		2	3	1	3	2	3	3	6
													1		3	2	
Glucose	—	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	4	9	7	5	7
	0.25g/dl																
Ketone-Body	—	2	1	1	3	4	5	4	4	4	2	3	3	9	7	5	7
	10mg/dl<	3	4	4	2	1			1	1	3	2	1				
Occult Blood	—	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	3	9	7	5	6
	5[2]												1				
	10																1
Urobilin	0.2mg/dl>	4	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	4	9	7	5	7
Bilirubin	0.2mg/dl<	1		1													
Urobilin	0.1~1E.U.[3]	5	5	5	3	3	5	4	5	5	5	5	4	9	7	5	6
	1 E.U.<				2	2											1

	SEX	Female															
	Months	3				6				12				24			
	Dose %	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320	0	0.005	0.020	0.320
pH	5	1								1		1					
	6		4	3	2	4	2	2	1	3	4	3	3	8	4	4	3
	7	3	1	2	2		1		1		1		1		2	1	
	8	1			1	1	2	3	3			1	1				
Protein	—	1		1	1	4	3	3	3	2	3	3	4	1			
	30mg/dl>	1		2	1		1	3			1		1	1	2		1
	30mg/dl	2	5	2	3	1			2					2	2		
	100mg/dl						1			2		1		2			
	300mg/dl											1		1	2	2	1
														1		3	1
Glucose	—	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	8	6	5	3
	0.25g/dl																
Ketone-Body	—	3	4	2	2	5	4	4	5	3	4	5	4	7	6	5	3
	10mg/dl<	2	1	3	3		1	1		1	1		1	1			
Occult Blood	—	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	7	3	5	3
	5[2]										1	1		1	3		
	10												1				
Urobilin	0.2mg/dl>	5	5	5	5	5	4	5	5	3	4	5	5	8	6	5	3
Bilirubin	0.2mg/dl<						1			1	1						
Urobilin	0.1~1E.U.[3]	5	4	5	4	5	5	5	5	4	5	5	5	7	6	5	3
	1 E.U.<		1		1									1			

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

15.8, 雌 103.2±26.6; 0.020% 群雄 122.6±15.1, 雌 117.0±20.4; 0.320%群雄116.2±19.6, 雌118.8±22.0であった. 0.005%群雌雄においてやや短かく, 0.002%群雄でやや長かったが, 有意ではなく, Harman[15] がマウスで認めたような平均寿命延長はみられなかった.

以上の実験成績を総合すると24カ月飼育群雌における死亡率の BHT 摂取用量に伴った増大はむしろ偶発的とみられ, 途中経過でみられた肝臓重量, 血清コレステロール量ならびに K^+ 量の増加ないし増加傾向は障害につらなる変化ではなかったと考えられる. すなわち, 本実験条件下において BHT 0.320%添加飼料摂取(160mg/kg/day) はラットに特に害的影響を与えなかったと考えられる.

要　約

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の長期摂取による生体に対する影響を明らかにするため, 毒作用の指標を発育, 生存率ならびに寿命に置き, 0, 0.005, 0.020, 0.320% 添加飼料による JCL：SD 系ラット雌雄の3, 6, 12, 24カ月と終生にわたる飼育実験を行った.

飼育途中において BHT 0.320%添加飼料摂取ラット(0.320% 群)では肝臓重量, 血清コレステロール, 血清 K^+ の増加ないし増加傾向を認めたが, BHT 摂取各群とも対照群(0%群)と比較して, 飼料摂取量, 体重増加, 一般状態, 生存率, 寿命に差を認めなかった.

以上より, 本実験において BHT 0.320%添加飼料摂取 (BHT 160mg/kg/day) は, ラットに害的影響を与えなかったと結論した.

文　献

1) 高田亮平, 永田年臣：ビタミン, 5, 203, 1952
2) 中尾　健ら：Shell "Ionol" Ditertiary Butyl Paracresol の毒性に関する実験, 1956, 東京慈恵医科大学薬理学教室
3) Grahan, W. D. and H. C. Grice : *J. Pharm. (Lond.)*, 7, 126, 1955
4) Deichman, W.B., J.J. Clemmer, R. Rakoczy, and J. Bianchine : *A.M.A. Arch. Ind. Health*, 11, 93, 1955
5) Ames, S.R., M.I. Ludwig, W.J. Swanson, and P.L. Harris : *Proc. Soc. exp. Biol.*, 93, 39, 1956
6) Day, A.J., A.R. Johnson, M.W. O'Halloran, and C.J. Shwartz : *Austral. J. exp. Biol.*, 37, 295, 1959
7) Brown, W.D., A.R. Johnson, and M.W. O'Halloran : *ibid.*, 37, 533, 1959
8) Karplyuk, I.A. : *Voprosy Pitaniya*, 18, 24, 1959, (C.A. 54, 14479, 1960)
9) Johnson, A.R. and F.R. Hewgill : *Aust. J. exp. Biol.*, 39, 353, 1961
10) Sporn, A. and O. Schöbesch : *Igiena*, 9, 113, 1961
11) Johnson, A.R. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 371, 1965
12) Frawley, J.P., F.E. Kohn, J.H. Kay, and J.C. Calandra : *ibid.*, 3, 377, 1965
13) Clegg, D.J. : *ibid.*, 3, 387, 1965
14) Gaunt, I.F., G. Feuer, F.A. Fairweather, and D. Gilbert : *ibid.*, 3, 433, 1965
15) Harman, D. : *J. Geront.*, 23, 476, 1968
16) 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
17) 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, 1971
18) Feuer, G., L. Golberg, and J.R. Le Pelly : *Fd Cosmet. Toxicocol.*, 3, 235, 1965
19) Gilbert, G. and L. Golberg : *ibid.*, 3, 417, 1965
20) Gaunt, I.F., G. Feuer, F.A. Fairweather, and D. Gilbert : *ibid.*, 3, 433, 1965
21) Gaunt, I.F., D. Gilbert, and D. Martin : *ibid.*, 3, 455, 1965
22) Creavan, P.J., W.H. Davies, and R.T. Williams : *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 485, 1966
23) Gilbert, D. and L. Golberg : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 5, 481, 1967
24) 高仲　正, 加藤隆一, 大森義仁：食衛誌, 10, 260, 1969
25) Botham, C.M., D.M. Conning, J. Hayes, M.H. Litchfield, and T.F. McElligott : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 8, 1, 1970
26) FAO : *Nutrition Meeting Report Series* No. 53A, p. 156–169, 1974
27) WHO : *Technical Report Series* No. 599, p. 11–12, 1976
28) 藤井　孝, 阿部幸恵, 矢野範男, 湯澤勝広, 平賀興吾：東京衛研年報, 28-2, 19, 1977
29) 市川久次, 小林博義, 中川好男, 長井二三子, 清水麻理, 池田虎雄, 矢野範男, 平賀興吾：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 19-32, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）添加飼料を終生摂取させたラットの病理組織学的検索

藤井　孝*，阿部幸恵*，矢野範男*，長澤明道*，平賀興吾*

Histopathological Examination on Rats Fed with Butylated Hydroxytoluene for Their Lifespan

TAKASHI FUJII*, YUKIE ABE*, NORIO YANO*,
AKEMICHI NAGASAWA* and KOGO HIRAGA*

Toxicity and carcinogenicity of butylated hydroxytoluene have been tested by the long term dietary administration on both sexes of SD-JCL rats. Rats were fed with diets containing 0.005, 0.02 and 0.32% of the test material for 24 months or their lifespan. Histopathological examination revealed no evidence of a treatment-related toxic effect on any tissue examined as well as on the spontaneous tumor incidence of rats. It is concluded that under the conditions of this histopathological examination, butylated hydroxytoluene has no toxic and carcinogenic effects for rats.

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（以下，BHT と略す）は食品の酸化防止剤，ゴム・プラスチックなどの安定剤・抗酸化剤として広く用いられており[1]，BHT の摂取がヒトにどのような影響を及ぼすかについては多大の関心を集めている．当部では BHT の0.05，0.15，0.45 および 1.35% 添加飼料を 3 カ月間，0.0125，0.05，0.2 および 0.8% 添加飼料を 6 カ月間ラットに摂取させ，とくに 1.35および 0.8%添加飼料を摂取したラットに体重増加の抑制，肝臓重量の増加，肝細胞の腫脹などを認めている[2,3]．Deichmann[4] らはラットに 0.2，0.5，0.8 および 1.0% BHT 添加飼料を 2 年間摂取させ 1.0% 添加飼料を摂取したラットに体重増加の抑制，脳・肝臓などの体重比重量の増加をみたが病理学的には摂取と関連した障害像・腫瘍の発生を認めていない．また Harman[5] は LAF_1 マウス雄に 0.25 および 0.5% BHT 添加半合成飼料を終生摂取させ，やや体重増加抑制がみられたが平均寿命は著明に延長したと報告している．このように BHT 添加飼料をラットに 2 年間，マウスに終生摂取させた実験は行われたがラットに終生摂取させた実験は報告がみられない．そこで今回は BHT 添加飼料をラットに終生摂取させて BHT がラットの平均寿命および腫瘍発生にどのような影響を与えるかを検討した．本報告はこのうちの病理組織学的検索の結果である．

試験材料および試験方法

試料　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°C）を用いた．BHT を 0.00（対照），0.005，0.02 および 0.32% の割合で粉末飼料中に添加後固型飼料化して試験飼料とした．粉末飼料は日本クレア株式会社製 CE-2（平均分析値：水分 8.0%，粗蛋白質 24.5%，粗脂肪 4.5%，粗線維 4.0%，粗灰分 6.6%，可溶性無窒素物52.4%，348.1cal/100g）を用いた．

実験動物および飼育環境　日本クレア株式会社の JCL:SD 系ラット雌雄（バリアー環境下で生育）を 4 週令で購入した．1 週間の予備飼育後（5 週令時）の平均体重は雄 105 g，雌 96 g であった．ラットは前面と床が網状で他は板状のステンレス製懸垂式個別ケージに 1 匹ずつ収容し自動給水装置（細菌ろ過器経由水道水）のついたベルト式飼育架台で飼料・水を自由に摂取させて飼育した．飼育室はバリアー区域内に設置し，室温25±1°C，湿度 50—60%，給気は HEPA フィルターを通して行ない，換気回数は 1 時間に10回，照明時間は午前 6 時から午後 5 時までにそれぞれ制御した．

試験方法　BHT 投与は 1 週間予備飼育後，ラットが 5 週令になった時点より試験飼料を自由に摂取させることによって開始した．ラットは摂取する飼料中の BHT 濃度によって 0.00（対照），0.005，0.02 および 0.32%

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

の4群に分けた．各群のラット匹数は3，6および12ヵ月間摂取では雌雄5匹ずつ，24ヵ月間摂取では雌雄10匹ずつ，終生摂取では対照，0.005% 群は雌雄25匹ずつ，0.02，0.32%群は雌雄15匹ずつとした．終生摂取では一定の摂取期間を定めずにラットが死亡あるいは瀕死状態になるまで摂取させ続けた．

病理学的検索方法　既定の摂取期間を終了したラットは断頭屠殺し採血後解剖に附し肉眼的検索を行ない器官・組織を摘出した．また摂取期間途中あるいは終生摂取のラットが瀕死状態で発見された場合は直ちに同様の処置を行なった．摂取期間途中あるいは終生摂取のラットが死亡後に発見された場合は解剖し肉眼的検索を行なった後に死後変化（自己融解）の強度な例を除いて器官・組織を摘出するよう努めた．摘出した器官・組織は3，6および12ヵ月間摂取終了時では心臓，肝臓，腎臓，脾臓，甲状腺，副腎，盲腸であり24ヵ月間摂取終了時ではこれらに脳，下垂体，肺，胃，空・回腸，結腸，膵臓，膀胱，精巣，前立腺，精嚢，子宮，卵巣および腫瘤・結節形成部位を加えた．終生摂取および摂取期間途中の死亡・瀕死屠殺解剖例の摘出器官・組織は24ヵ月間摂取終了例と同様にした．摘出した器官・組織および腫瘤などは10%緩衝ホルマリンで12時間振とう固定し，液交換を行なった後静置して1週間固定した．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・エオジン重染色を肝臓・腎臓はPAS染色も行なった．このほか必要に応じてアザン・マロリー染色，鍍銀染色標本，また凍結切片による脂肪染色標本なども作製し，これらによって病理組織学的検索を行なった．

結　果

病理組織学的検索の主な結果は一般組織所見をTable 1～3に，腫瘍発生状況をTable 4に示した．試験飼料摂取開始後3，6，12および24ヵ月（2年）目に定時屠殺解剖し検索を行なったものを3ヵ月群，6ヵ月群，12ヵ月群および2年群とし，定時屠殺解剖以前の途中死亡ないし瀕死屠殺例は終生摂取と併合して終生群とした．

3，6，12カ月群および2年群の一般組織所見　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た．腫脹は0.32% 群にのみ観察され，3ヵ月群雄の3/5（5例中3例の意，以下同様）雌の1/5，6ヵ月群雄の1/5，12ヵ月群雄の1/4にみられBHT摂取との関連を示したが24ヵ月群では認められなかった．小葉周辺部に空胞変性を示す肝細胞がみられた．空胞はSudan black染色で陽性の脂質で，肝細胞は肪脂変性を呈していた．脂肪変性は12ヵ月群，2年群で対照群を含む各群にみられ雌に顕著であった．12ヵ月群では小脂肪滴を有する肝細胞が少数みられたが2年群では大脂肪滴を有し印環細胞様になった肝細胞が多数認められた．変化はBHT摂取との明らかな関連を示さなかった．小葉中間部から周辺部の肝細胞に核周囲の明調化が認められた．これは細胞質の好塩基性物質が軽度に凝集するとともに細胞膜周辺に偏在したためで6および12ヵ月群の投与群雄にみられたが2年群では認められなかった．変化は6ヵ月群 0.32% 群雄の1/5，12ヵ月群 0.005，0.02% 群雄の1/5，0.32%群雄の3/4にみられBHT摂取との関連を示した．限局性の小壊死巣が散在しているのがみられた．壊死部は明るく網状を呈しており残存する肝細胞は泡沫状となり核は濃縮していた．変化は2年群の対照群を含む各群でみられ雌よりも雄に顕著であったがBHT摂取との関連は明らかではなかった．小葉周辺部に軽度に腫脹し，細胞質内に好塩基性物質がほとんどみられない泡沫細胞状を呈する肝細胞の小巣が散見された．核は軽度の濃縮を示す程度であったが，この点を除けば前記の小壊死巣の残存肝細胞に似ていた．変化は2年群で投与群を含む雌雄に認められ雌よりも雄に顕著であった．変化は雌では 0.32% 群にみられず雄でも摂取量に伴う増加は認められず雌雄ともBHT摂取量との関連は判然としなかった．このほか2年群では肝細胞の結節性増生，微小肉芽腫，小胆管周囲の線維化などが雌雄の対照群を含む各群で摂取との関連なく認められた．胃では胃腺基底部の腺腔拡張が雌雄の対照群を含む各群で12ヵ月群に極く少数，2年群で多数みられたが摂取との関連は示さなかった．腎臓では近位尿細管上皮細胞の腫脹・空胞化が3，6ヵ月群でみられ空胞化は3ヵ月群雌雄，6ヵ月群雄では投与群にのみ認められ 0.32% 群に顕著であった．尿細管上皮の変性は12ヵ月群では著明にみられず，2年群では部位によっても異なるが腫脹，空胞化，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雌雄とも対照群を含む各群に摂取との明らかな関連なく認められた．尿細管腔の拡張は主に遠位でみられ12ヵ月群，2年群で顕著であった　12ヵ月群雄では投与群にのみ認められたが12ヵ月群雌，2年群雌雄では対照群を含む各群にみられ，12ヵ月群雄を含め変化はBHT摂取量との関連を明らかに示さなかった．このほかに蛋白円柱は12ヵ月群，2年群で，糸球体の萎縮，限局性壊死・線維化などは2年群で対照群を含む各群にみられたが，いずれも摂取量と関連する一定傾向は認められなかった．また2年群では各変化が強く，嚢胞腎様となり実質が殆んど認められない例もあり，これを腎障害として区分した．腎障害像を呈したのは雄のみで対照群

Table 1. Microscopical Findings—Summary of Observations

Treatment period[1]		3 months								6 months								12 months							
		Male				Female				Male				Female				Male				Female			
Treatment group[2]		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
HEART	[3]																								
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	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	2	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—
LIVER																									
Swelling of hepatocytes	NO	5	5	5	2	5	5	5	4	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	3	4	5	5	5
	SL	—	—	—	3	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Vacuolization 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
Aggregation of basoplasms of hepatocytes	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
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	3	—	—	—	—
Focal hepatocyte degeneration/ cellular infiltration	NO	1	2	5	—	2	4	2	3	3	3	1	5	4	—	4	3	1	4	3	3	2	4	4	2
	SL	2	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 bile ducts	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
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	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	—	—	—	—
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
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	2	1	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	1	2	1	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	—	—	—	—	—	—	—	—
Vacuolization of tubular epithelium	NO	5	4	5	4	5	4	3	—	5	5	4	1	2	4	5	3	5	5	5	4	4	5	5	5
	SL	—	1	—	3	—	1	2	3	—	—	—	4	3	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thickening of basement membrane	NO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	—	—	2	—	4	3	4	3
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	3	3	—	2	1	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	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	5	3	5	5	4
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1

1) Rats treated with BHT (butylated hydroxytoluene) for each periods and examined at termination.
2) C: Rats received diet containing 0.00% BHT, L: Rats received diet containing 0.005% BHT, M: Rats received diet containing 0.02 %BHT, H: Rats received diet containing 0.32% BHT.
3) NO: No change, SL: Slight changes, MO. Moderate changes, SE: Sever changes.

Table 2. Microscopical Findings—Summary of Observations (1)

Treatment period		Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
		Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]		C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		9	7	5	7	8	6	5	3	26	28	21	19	28	29	20	22
SPLEEN[4]	[5]	9	7	5	7	8	6	5	3	17	21	13	15	25	20	11	14
Enlargement	NO	8	6	4	6	6	4	5	2	15	16	11	13	19	18	10	12
	SL	—	1	1	1	2	2	—	1	—	2	2	2	3	—	1	1
	MO	1	—	—	—	—	—	—	—	1	3	—	—	3	2	—	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Atrophy	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	15	19	8	12	20	15	10	10
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	3	3	4	5	1	4
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	—	—	—
Focal fibrosis	NO	8	7	5	7	8	6	5	3	15	17	5	12	24	16	11	11
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	7	2	—	4	—	3
	MO	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1	1	—	—	—
Infarct	NO	8	7	5	7	8	6	5	3	16	21	13	15	24	20	11	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—
	MO	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hemorrhage/necrosis	NO	8	7	5	7	8	6	5	3	16	21	12	15	25	20	11	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Lymphatic folicles/ indistinguishable	NO	8	7	5	7	7	6	5	3	16	20	11	15	19	19	10	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	3	1	1	1
	MO	1	—	—	—	1	—	—	—	1	1	1	—	4	—	—	—
Extramedullary hematopoiesis	NO	4	1	2	—	2	—	—	—	13	13	11	9	10	10	5	7
	SL	4	5	3	6	3	2	4	2	2	5	2	5	12	7	6	7
	MO	1	1	—	1	2	4	1	1	2	1	—	1	3	2	—	—
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	2	—	—	—	1	—	—
Hemosiderosis	NO	3	2	3	3	5	5	2	1	9	9	3	8	10	7	2	5
	SL	6	4	2	3	5	5	2	1	9	9	3	8	10	7	2	5
	MO	—	1	—	1	—	—	—	—	1	1	4	—	2	3	2	3
HEART[4]		9	7	5	7	8	6	5	3	20	23	15	15	25	20	10	15
Focal calcification/cardiac muscles	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	18	23	14	13	24	19	10	15
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	2	1	1	—	—
Focal calcification/vascular wall	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	19	23	15	15	25	20	10	15
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Perivasculitis	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	19	23	15	15	25	20	10	15
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Clots in atrium	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	19	23	13	13	24	20	10	15
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	2	—	1	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—
Interstitial fibrosis/focal	NO	8	6	4	7	8	6	5	3	15	20	14	15	23	20	10	15
	SL	1	1	1	—	—	—	—	—	5	3	1	—	1	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Focal cell infiltration	NO	9	7	4	7	8	6	4	3	17	22	15	12	23	20	10	15
	SL	—	—	1	—	—	—	1	—	3	1	—	3	—	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—

LIVER[4]	[5]	9	7	5	7	8	6	5	3	18	23	15	15	25	22	10	16
Focal necrosis	NO	7	7	4	2	7	6	5	3	18	19	9	8	14	16	6	7
	SL	2	—	1	4	1	—	—	—	—	3	6	4	4	6	4	8
	MO	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	3	7	—	—	1
Diffuse necrosis	NO	9	7	5	7	7	6	5	3	14	18	13	13	22	22	10	16
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	1	2	—	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	2	—	—	—
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—
Foam cell-like hepatocytes	NO	8	5	4	3	7	5	3	3	18	23	15	15	25	22	10	16
	SL	1	1	1	1	1	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MO	—	1	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vacuolization of hepatocytes	NO	6	7	5	6	6	4	2	2	8	14	7	10	15	6	6	9
	SL	2	—	—	1	1	1	2	1	6	4	6	2	2	7	5	6
	MO	—	—	—	—	1	1	1	—	2	3	—	2	4	1	1	—
	SE	1	—	—	—	—	—	—	—	2	2	2	1	4	6	—	1
Nodular hyperplasia	NO	7	7	4	6	6	5	3	2	16	23	15	15	24	22	10	15
	SL	2	—	1	1	2	1	2	1	2	—	—	—	1	—	—	3
Hyperplasia of small bile ducts	NO	9	6	5	5	8	6	4	3	16	20	12	14	24	19	10	12
	SL	—	1	—	2	—	—	1	—	2	3	3	1	1	3	—	4
Small granuloma	NO	7	2	4	6	5	5	5	2	18	23	15	15	25	22	10	16
	SL	2	4	1	1	3	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	MO	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Peribiliary fibrosis	NO	9	7	4	7	8	6	5	2	15	20	10	11	23	19	9	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	1	3	3	5	4	1	3	1	2
	MO	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Cellular infiltration	NO	9	7	5	7	8	6	5	3	17	22	15	15	22	22	10	16
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	3	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Tumor		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—

1) Rats treated with BHT (butylated hydroxytoluene) for 24 months.
2) Rats treated with BHT until dying or being moribund.
3) C: 0.00% BHT, L: 0.005% BHT, M: 0.02% BHT, H: 0.32% BHT.
4) No. of rats examined.
5) NO: No Change, SL: Slight Changes, MO: Moderate changes, SE: Sever changes.

を含む各群に1，2例ずつであり摂取との関連は明らかではなかった．心臓ではエオジン濃染で軽度な核濃縮を示す心筋細胞と浸潤細胞よりなる限局性小巣が少数みられる像と軽度の限局性線維化が6，12カ月群雄，2年群雌雄で認められた．変化は対照群にもみられ出現例数は少なく摂取との関連は示さなかった．脾臓では3，6および12カ月群に著変がみられず2年群では髄外造血，ヘモジデリン沈着などが雌雄の対照群を含む各群に比較的多発していた．変化は対照群にも多数みられBHT摂取量との関連は示さなかった．下垂体では3，6および12カ月群に著変は認められなかった．2年群では雌雄の対照群を含む各群で限局性の出血・壊死が多くは腺細胞の腫瘍性増生に伴って認められた．また腺細胞の増生が対照群雄の1/9，雌の1/8，0.32%群雌の1/3にみられ，腫瘍の発生が認められなかった0.02%群雄で3/5にみられた．甲状腺では沪胞の軽度な増生が3，6，12カ月群および2年群雌雄の対照群を含む各群に1，2に例ずつ散見された．副腎では皮質で出血がみられ複数の小血腫や血栓が存在する例，血腫や壊死細胞の脱落による腔形成を伴う例などが認められた．変化は12カ月群雌の対照群，0.32%群に各1例，2年群では雄の投与各群，雌の0.32%群に各1例，雌の対照群，0.005，0.02% 群に4—5例みられたが，いずれもBHT摂取量との明らかな関連は認められなかった．このほか2年群で皮質細胞および髄質細胞の軽度な増生が少数例散見された．精巣では精細管数の減少，管径の縮少，管壁の皺襞などがみられ管内の精子・精細胞が減少・消失している萎縮像がみられた．萎縮は2年群の0.005%群で2/7，0.02%群で

Table 3. Microscopical Findings—Summary of Observations (2)

Treatment period		Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
		Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]		C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		9	7	5	7	8	6	5	3	26	28	21	19	28	29	20	22
KIDNEY[4]		9	7	5	7	8	6	5	3	20	23	15	15	25	22	11	15
"Nephropathy"	[5]	2	2	1	1	—	—	—	—	7	4	6	5	—	—	—	—
Focal necrosis	NO	1	2	1	2	5	6	4	3	5	7	5	4	15	17	9	9
	SL	5	2	—	3	3	—	1	—	7	11	4	5	8	4	2	6
	MO	3	3	4	1	—	—	—	—	5	5	5	4	1	1	—	—
	SE	—	—	—	1	—	—	—	—	3	—	1	1	1	—	—	—
Focal fibrosis	NO	1	1	1	—	4	6	3	3	9	12	5	4	24	16	9	8
	SL	2	1	—	4	3	—	2	—	7	6	2	2	1	5	1	6
	MO	5	2	4	2	1	—	—	—	4	5	3	5	—	1	1	1
	SE	1	3	—	1	—	—	—	—	—	—	5	3	—	—	—	—
Urinary casts	NO	—	1	—	—	3	3	1	2	2	2	2	3	20	13	6	7
	SL	7	2	3	4	4	3	4	1	10	16	6	5	5	6	4	7
	MO	—	4	1	3	1	—	—	—	6	4	5	3	—	3	1	1
	SE	2	—	1	—	—	—	—	—	2	1	2	3	—	—	—	—
Degeneration of tubular epithelium	NO	—	—	—	—	1	2	—	—	—	2	—	1	4	4	3	1
	SL	2	2	1	4	6	4	5	3	11	13	6	2	18	16	7	12
	MO	7	5	4	3	1	—	—	—	4	7	6	9	2	2	1	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	5	1	3	2	1	—	—	—
Dilatation of tubules	NO	—	2	1	—	4	5	2	2	2	2	3	5	17	11	7	7
	SL	4	1	2	6	3	1	3	1	9	17	5	4	6	8	3	8
	MO	4	3	2	1	1	—	—	—	5	4	4	3	2	3	1	—
	SE	1	1	—	—	—	—	—	—	4	—	3	2	—	—	—	—
Thickening of basement membrane	NO	—	—	1	—	4	6	3	2	—	3	2	2	16	12	7	6
	SL	1	2	3	—	2	—	3	1	15	12	5	5	9	8	3	7
	MO	8	5	4	4	2	—	—	—	5	8	8	7	—	2	1	2
Thickening/epithelium of	NO	2	—	3	5	7	5	5	3	15	12	9	13	21	19	11	13
Bowman's capsule, parietal layer	SL	7	—	2	1	1	1	—	—	2	8	4	1	4	3	—	2
	MO	—	—	—	1	—	—	—	—	3	3	2	—	—	—	—	—
Atrophy of glomeruli	NO	6	3	4	4	7	6	5	3	5	7	6	5	21	19	9	11
	SL	1	2	—	2	1	—	—	—	9	12	2	6	3	3	2	4
	MO	2	2	1	1	—	—	—	—	4	4	5	2	1	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	1	—	—	—	—
Cellular infiltration	NO	3	3	3	2	7	5	5	3	7	15	13	9	21	21	9	12
	SL	5	3	2	5	1	1	—	—	12	8	2	5	2	1	2	3
	MO	1	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Tumor		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
TESTES[4]	[5]	9	7	5	7	—	—	—	—	18	20	15	15	—	—	—	—
Atrophy	NO	9	5	4	6	—	—	—	—	9	13	6	10	—	—	—	—
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	6	1	—	—	—	—
	MO	—	2	1	1	—	—	—	—	4	2	2	4	—	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—
Perivasculitis	NO	7	6	5	6	—	—	—	—	15	17	12	15	—	—	—	—
	SL	2	1	—	1	—	—	—	—	3	3	3	—	—	—	—	—

UTERUS[4]	[5]	—	—	—	—	8	6	5	3	—	—	—	—	17	21	9	14
Endometrial polyp	NO	—	—	—	—	6	6	4	2	—	—	—	—	15	20	7	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	—
	MO	—	—	—	—	2	—	1	1	—	—	—	—	1	—	—	1
Tumor		—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
PITUITARY[4]		8	7	5	6	8	6	5	3	10	11	10	11	17	16	8	13
Hemorrhage/necrosis	NO	6	6	2	3	3	5	2	1	2	3	—	6	5	3	—	10
	SL	2	1	3	3	4	1	3	2	6	5	9	4	11	10	5	3
	MO	—	—	—	—	1	—	—	—	2	3	1	1	1	3	3	—
Hyperplasia of glandular cells	NO	4	5	2	5	1	3	3	—	3	4	—	5	1	3	—	2
	SL	1	—	3	—	1	—	—	1	1	2	1	1	1	—	1	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	2	—	—	—
Tumor		3	2	—	1	6	3	2	2	6	3	8	5	13	14	8	11
ADRENAL[4]		9	7	5	7	8	6	5	3	17	18	14	15	21	19	11	13
Hyperplasia of cortical cells	NO	9	6	5	7	8	6	3	3	17	16	14	15	20	18	11	13
	SL	—	1	—	—	—	—	2	—	—	2	—	—	1	—	—	—
Hyperplasia of medullary cells	NO	7	5	4	5	5	5	5	3	11	13	9	11	19	19	11	11
	SL	—	1	1	1	2	—	—	—	—	1	1	2	1	—	—	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	—	—	—	—	—
Tumor		2	1	—	1	1	1	—	—	4	4	3	2	1	1	—	—
Cavitation in cortex/thrombus	NO	9	6	4	6	3	2	—	2	16	12	9	12	9	8	8	7
	SL	—	1	1	1	3	2	1	1	1	3	4	3	4	6	3	6
	MO	—	—	—	—	1	1	3	—	—	3	1	—	6	3	—	—
	SE	—	—	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	3	2	—	—

1) Rats treated with BHT (butylated hydroxytoluene) for 24 months.
2) Rats treated with BHT until dying or being moribund.
3) C: 0.00% BHT, L: 0.005% BHT, M: 0.02% BHT, H: 0.32% BHT.
4) No. of rats examined.
5) NO: No Change, SL: Slight changes, MO: Moderate changes, SE: Sever changes.

1/5, 0.32%群で 1/7 に観察されたが BHT 摂取との関連は明らかではなかった．**子宮**では内膜のポリープ状増生が2年群の対照群に 2/8, 0.02%群に 1/5, 0.32%群に 1/7 みられたが摂取との関連は認められなかった．

終生群の一般組織所見　摂取開始後1年（52週）以前の死亡ないし瀕死屠殺例は対照群雌に1例，0.005% 群雄に1例，雌に2例，0.02%群雄に1例，0.32%群雄に2例の計7例であった．このうち対照群雌の1例は肝臓に細網肉腫，0.005% 群雄の1例は腎臓に腎芽細胞腫，雌の1例は下垂体の巨大化した色素嫌性腺腫がそれぞれ認められたが，0.005% 群雌の1例は顕著な組織変化を示さなかった．残る各例では自己融解のため組織所見が得られなかった．**摂取開始後1年（53週）以後**の死亡ないし瀕死屠殺例の腫瘍を除く組織変化は2年群で観察したのとほぼ同様であるが，生存期間（観察を行なうまでの摂取期間）の相違によって変化像には差異が認められた．**肝臓**では2年群でみられたと同様の限局性壊死巣が対照群雄を除く各群に認められ，雄よりも雌に多発した．変化は雄では BHT 摂取量に伴って増加する傾向を軽度ながら示したが雌では全く認められなかった．壊死に陥った肝細胞が小葉をつなぐように帯状に並んでいる像が雄の各群と雌の対照群でみられ，雌よりも雄に多発した．変化は雄では対照群に 4/18, 0.005%群に 5/23, 0.02%群に 2/15, 0.32%群に 2/15 と BHT 摂取量に伴って減少する傾向を軽度ながら示した．小葉周辺部の肝細胞の空胞変性（脂肪変性）が雄雌の対照群を含む各群に多発し，顕著な例を脂肪肝とした．脂肪肝は対照群雄 2/18, 雌 4/25, 0.005%群雄 2/23, 雌 6/22, 0.02%群雄 2/15, 雌 0/10, 0.32%群雄 1/15, 雌 1/16 であり BHT 摂取量との明らかな関連は認められなかった．肝臓での変化はいずれも摂取開始後90週以後に観察され，雌雄とも BHT 摂取と変化の観察時期（変化を観察するまでの摂取期間）との間に明らかな関連を示すものはなかった．**胃**では胃腺基底部の腺腔拡張が雌雄各群に比較的多数みられた．前・腺胃粘膜の糜爛，前胃粘膜下織の浮腫が雌雄の対照群を含む各群に散見された．各変化と

Table 4. Distribution of Tumors—Summary of Observations

Treatment period	Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
	Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats	9	7	5	7	8	6	5	3	26	28	20	18	28	29	20	22
CUTANEOUS/SUBCUTANEOUS																
Basal cell tumor	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—
Trichoepithelioma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Fibroma	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	1	1	—	—
Lipoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Fibrosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	—	—	—
Liposarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
EAR DUCT																
Ceruminous carcinoma	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Squamous cell carcinoma	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MAMMARY																
Adenoma	—	—	—	—	2	2	1	1	1	—	—	—	3	2	—	2
Fibroadenoma	—	—	—	—	3	2	2	—	—	—	1	—	6	6	3	6
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2	1	—
Squamous cell carcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
THORACIC CAVITY																
Mesothelioma, benign	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Mesothelioma, malignant	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
ABDOMINAL CAVITY																
Mesothelioma, benign	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Leiomyosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Liposarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Reticulum cell sarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Angiosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
PITUITARY																
Chromophobe adenoma	3	2	—	1	5	3	2	2	6	2	7	4	12	11	7	11
Eosinophil adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	1	—	—
Chromophobe carcinoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	—
THYROID																
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
ADRENAL																
Cortical adenoma	1	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	1	—	—
Medullary adenoma	1	—	—	1	1	1	—	—	3	3	3	2	1	—	—	—
BRAIN																
Astrocytoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—
LUNG																
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
LIVER																
Hepatoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reticulum cell sarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—

PANCREAS				
Islet cell adenoma	— — — —	— — — —	— 1 — —	— — — —
Islet cell carcinoma	— — — —	— — — —	— — — —	1 — — —
Acinar cell carcinoma	— — — —	— — — —	— — — —	— 1 — —
STOMACH/INTESTINE				
Fibrosarcoma	— — — —	— — — —	1 — — —	— — — —
Malignant lymphoma	— — — —	— — — —	— — — —	— — — 1
KIDNEY				
Nephroblastoma	— — — —	— — — —	— 1 — 1	— — — —
BLADDER				
Papilloma	— — — —	— — — —	— — — —	1 — — 1
OVARY				
Granulosa cell tumor		— — — —		1 — — —
Angioma		— — — —		1 — — —
UTERUS				
Leiomyoma		— — — —		1 — — —
Leiomyosarcoma		1 — — —		— — — —
Carcinosarcoma		— — — —		— — — 1
LIVER/SPLEEN etc.				
Leukemia	— — — —	— — — —	— — — —	1 — — —

1) Rats treated with BHT (butylated hydroxytoluene) for 24 months.
2) Rats treated with BHT until dying or being moribund.
3) C: Rats received diet containing0.00% BHT. L: Rats received diet containing 0.005%BHT. M: Rats received diet containing 0.02% BHT. H: Rats received diet containing 0.32% BHT.

も観察例数，観察時期と BHT 摂取量との明らかな関連を示さなかった．**腎臓**では2年群でみられた腎障害像が雄では対照群を含む各群で多数観察されたが雌では認められなかった．雄での腎障害は対照群 7/20，0.005%群 4/23，0.02%群 6/15，0.32%群 5/15 で各群の間に著差はみられず，摂取開始後2年（104週）以前では対照群 2/8，0.005%群 3/15，0.02%群 1/4，0.32%群 1/5 で投与群に早期に観察されてもいないことから BHT 摂取量との関連は認められなかった．そのほかの変化は各例で程度が異なり BHT 摂取と明らかに関連する一定傾向を示すものは認められなかった．**心臓**では心筋の限局性石灰変性が対照群雄 2/20，雌 1/20，0.005%群雌 1/20，0.02%群雄 1/15，0.32%群雄 2/15 に観察された．観察時期は対照群雄 124・134 週，雌 108 週，0.005% 群雌 132 週，0.02% 群雄 117 週，0.32% 群雄 120・126 週であり観察例数，観察時期などに BHT 摂取量との関連は認められなかった．このほか心房内に線維成分を混じた凝血塊が充填されている像，間質での限局性線維増生像などが対照群雌雄を含む各群に散見されたがいずれも BHT 摂取量との関連を示さなかった．**脾臓**では腫大，萎縮，限局性線維症，髄外造血およびヘモジデリン沈着症などが対照群雌雄を含む各群で多数観察されたが BHT 摂取量との関連は認められなかった．**下垂体**では腫瘍が多発し，これに伴う出血・壊死が対照群雌雄を含む各群に多くみられた．腺細胞の増生は対照群雌，0.005%群雄にやや多く認められた．**副腎**では皮質部の小血腫および血栓が雌の対照群，0.005% 群に多数みられ変化も顕著であった．皮質および髄質細胞の増生が対照群を含む各群で1，2例ずつ散見された．副腎での変化はいずれも BHT 摂取量との関連は明らかに示さなかった．**精巣**では2年群でみられたと同様の萎縮像が対照群を含む各群に多数認められた．萎縮は摂取開始後2年（104週）目までに対照群 3/6，0.005% 群 5/11，0.02% 群 1/3，0.32%群 0/6 と 0.32% 群にみられず，0.32% 群では 120 週が最初の観察例であった．萎縮は 0.32% 群で他の各群より遅く観察された以外は各群の観察例数にも差異はなく BHT 摂取量との関連は認められなかった．**子宮**では内膜のポリープ状増生が各群に1，2例ずつ認められたが観察時期にも差異はなく BHT 摂取量との関連はみられなかった．

腫瘍発生状況　腫瘍の発生は3，6および12カ月群には認められなかった．腫瘍が多発したのは雌の乳腺，雌雄の下垂体，雄の副腎であり，そのほかの器官・組織では試験期間を通して1，2例と散発的発生であった．**皮膚・皮下組織**では基底細胞腫が終生群対照群雄 1/26，0.005%群雄 1/28 に，毛嚢上皮腫が終生群対照群雌1/28

に，線維腫が2年群対照群雄1/9，終生群対照群雄1/26，同々雌 1/28，同 0.005%群雄 1/28，同 0.02%群雄 1/20，同 0.32%群雄 1/18 に，脂肪腫が終生群 0.02%群雄 1/20 に認められた．また腹筋からの横紋筋肉腫が2年群 0.02% 群雄 1/5，終生群 0.32% 群雄 1/18 に（Photo 1），線維肉腫が終生群で対照群雄 1/26，雌1/28，0.32%群雄 1/18 に，脂肪肉腫が終生群対照群雌 1/28 にそれぞれ観察された．**耳道・耳垢腺**では皮脂腺癌が2年群 0.32% 群雄1/7に，扁平上皮癌が2年群 0.02%群雄1/5に認められた（Photo 2）．**乳腺**では雌に腫瘍が多発したが雄では終生群で対照群に腺腫，0.02%群に線維腺腫が各1例観察されたのみであった（Photo 3）．雌での線維腺腫の発生は，終生群では発生率（腫瘍をもっていたラット数／検索したラット数）が対照群32% (9/28)，0.005%群 27% (8/29)，0.02%群15% (3/20)，0.32%群 36% (8/22) で対照群と 0.32% 群はほぼ同率であった．また発生時期（腫瘍を観察するまでの摂取期間）は初発が対照群94週，0.005%群113週，0.02および 0.32% 群 113 週と各群間に著明な差は認められなかった．腺腫は線維腺腫よりも発生が少なかったが雌では終生群 0.02% 群を除く各群に1～3例ずつみられ，雄では終生群対照群に1例認められた．腺癌は終生群雌にみられ対照群 10% (3/28)，0.005% 群 6% (2/29)，0.02%群 5% (1/20)，0.32%群 0% (0/22) の発生率で BHT 摂取量の増加に伴い低下する傾向を示したが発生例数は少なかった．また扁平上皮癌が終生群0.02%群雌に 1/20 みられた．**胸腔内**では良性中皮腫が終生群対照群雄に 1/26，悪性中皮腫が終生群 0.02%群雄に 1/20 認められた．**腹腔内**では良性中皮腫が終生群 0.32%群雌に 1/22，平滑筋肉腫が終生群対照群雄に 1/26，脂肪肉腫が終生群 0.32% 群雄に 1/18，細網肉腫および血管肉腫が終生群 0.005%群雄に各1/28観察された．**下垂体**では2年群，終生群とも色素嫌性腺腫が多発したが（Photo 4），2年群，終生群とも雄よりも雌に多く観察された以外は発生率，観察時期などに BHT 摂取量と関連する一定傾向は認められなかった．エオジン好性腺腫は終生群で対照群雌，0.005% 群雌雄，0.32%群雄に各1例みられた．色素嫌性腺癌は2年群対照群雌，終生群 0.005% 群雌，同 0.02% 群雄，同々雌に1例ずつ合計4例認められた．**甲状腺**では腺腫が終生群 0.005% 群雄で1例みられた．**副腎**では髄質細胞腫（Photo 5）が終生群雄で各群に2，3例ずつ観察されたが BHT 摂取量との関連は認められなかった．皮質細胞腫が2年群・終生群雄の対照・0.005%群，終生群 0.005% 群雌に1例ずつ合計5例みられた．**脳**では星状膠腫が終生群で 0.005% 群雄，0.02% 群雌，0.32% 群雄に各1例みられた．**肺**では腺腫が終生群 0.32% 群雌に1例観察された．**肝臓**では肝細胞癌が2年群対照群雌，終生群対照群雌に各1例，細網肉腫が終生群対照群雌に1例認められた．**膵臓**では島細胞腫が終生群 0.005% 群雄に1例，島細胞癌が終生群対照群雌に1例，外分泌腺の腺房細胞癌（Photo 6）が終生群 0.005% 群雌に1例それぞれ認められた．**胃・腸**では胃粘膜下織の線維肉腫を終生群対照群雄に1例，回腸から盲腸部の管壁および腸間膜にかけての悪性リンパ腫を終生群 0.32% 群雌に1例観察した．**腎臓**では腎芽細胞腫が終生群 0.005%群雄，同 0.32%群雄に1例ずつ認められた（Photo 7）．**膀胱**では乳頭腫が終生群対照群雌，同 0.32% 群雌に各1例みられた．**卵巣**では顆粒膜細胞腫および血管腫が終生群対照群で各1例観察された．**子宮**では平滑筋腫が2年群対照群に，平滑筋肉腫が終生群対照群に，癌肉腫（Photo 8）が終生群 0.32% 群にそれぞれ1例ずつ認められた．**肝臓・脾臓**などで白血病細胞の浸潤がみられ白血病としたのは終生群対照群雌の1例であった．

総括ならびに考察

BHT 0.005，0.020 および 0.320% 添加飼料を3，6，12，24ヵ月間および終生摂取させた JCL:SD 系ラット雌雄を病理組織学的に検索した．

腫瘍を除く一般組織所見で BHT 摂取との関連が認められた変化は肝臓の肝細胞の軽度な腫脹，肝細胞質の好塩基性物質の凝集・細胞膜周辺への偏在，腎臓の尿細管上皮の空胞変性であった．肝臓では摂取開始後3ヵ月で肝細胞の軽度な腫脹が，6ヵ月で肝細胞質の好塩基性物質の凝集が 0.32 %群に多くみられたが，両変化とも24ヵ月では認められなかった．また24ヵ月間および終生摂取では BHT 摂取に関連した肝細胞の変化は認められなかった．このことは BHT 摂取を続けても両変化が肝細胞の退行性および進行性病変に直結せず，老化に伴う変化を促進しなかったことを示唆していると思われる．さらに福森ら[5]は本実験で摂取12ヵ月の 0.32% 群ラットの肝細胞を電顕的に検索し滑面小胞体の増殖をみており，これを適応現象であるとしている．これらのことから BHT 摂取ラットの肝細胞にみられた変化は肝臓の形態的適応現象であろうと考えられる．腎臓での尿細管上皮の空胞変性は上記の肝細胞の変化よりも早く消失しており一過性の可逆的変化であり BHT 摂取に対する腎臓の形態的適応現象であろうと思われる．

腫瘍で比較的多発したのは雌の乳腺の線維腺腫，雌雄の下垂体の色素嫌性腺腫および雄の副腎の髄質細胞腫で対照群を含む各群で認められた．これら腫瘍の自然発生

は多くの報告があり[7-14]，腫瘍発生はBHT摂取量増加に伴う頻発傾向あるいは発生抑制傾向を示さずBHT摂取による影響とは考え難い．このほかの腫瘍は発生例数が少なく頻発・抑制傾向を検討するには至らなかった．発生例数は少ないがBHT摂取ラットにのみ認められた悪性腫瘍は皮下の横紋筋肉腫，腎臓の腎芽細胞腫が各2例，耳道・耳垢腺の扁平上皮癌と皮脂腺癌，乳腺の扁平上皮癌，胸腔内の悪性中皮腫，腹腔の脂肪肉腫・細網肉腫・血管肉腫，膵臓の腺房細胞癌，腸管壁の悪性リンパ腫，子宮の癌肉腫が各1例であった．これらの腫瘍の自然発生の報告例は皮下の横紋筋肉腫が前川ら[7]がACI/Nラット雌で0.4% (1/209)に，Colemanら[8]がF344ラット雌で0.7% (2/143)にみている．腎臓の腎芽細胞腫は西部[9]がSD系ラット雄で0.4% (1/214)，Wistar系ラット雄で2% (1/50)に，森井ら[10]はSD系ラット雌で0.7% (1/128)に，Thompsonら[11]はSD系ラット雌で1.2% (1/82)としている．耳道・耳垢腺の腫瘍は扁平上皮癌をSnellら[12]がOMラットの約3.7% (3/約80)，M520ラットの約2.5% (2/約80)に，腺癌をThompsonら[11]がSD系ラット雄の4.4%(2/45)雌の1.6% (1/60)に，Gilbertら[13]がWistar系ラット雌の0.14% (1/701)にそれぞれ認めている．乳腺の扁平上皮癌はBullockら[14]が角化傾向を示す扁平上皮を含んだ腺癌として2,450匹中の2匹のラットにみたとしている．胸腔内の悪性中皮腫はGilbertら[13]が心膜・胸膜の中皮由来および胸腺・リンパ節の細網細胞由来を合併して縦隔洞腫瘍としてWistar系ラット雄の4.8% (31/641)，雌の2.8% (20/701)に，前川ら[7]がACI/Nラット雄の1.8% (1/55)に腹膜の中皮腫(良・悪は不明)を観察している．腹腔内の脂肪肉腫，細網肉腫，血管肉腫は軟部組織からの発生と思われるが，ラットの軟部組織でのこれら腫瘍の自然発生頻度はCarter[15]によれば0.1%以下としている．しかしGuérin[16]は胸腔内の脂肪肉腫を1例，McCoy[17]は頸部・精巣・大腿骨付近の血管肉腫を1例それぞれ報告している．膵臓の腺房細胞癌はGilbertら[13]がWistar系ラット雄に0.15% (1/641)，Snellら[12]がM520ラットに約1.2% (1/約80)，Rowlattら[18]がChester Beatyラット雄に0.19% (2/1026)雌に0.4% (1/226)としている．腸管壁の悪性リンパ腫はThompsonら[11]がSD系ラット雌の1.2% (1/82)に胃・小腸・膵臓などの悪性リンパ腫を，Snellら[12]がBUFラット雄の約2.5% (2/約80)に盲腸そのほかのリンパ肉腫を，Crain[19]がRochester-Wistar系ラット雄の7.2% (4/55)雌の1.1% (1/84)に結腸および腸間膜の悪性リンパ腫を認めている．子宮の癌肉腫は村岡ら[20]がSD系ラットに1.3% (1/73)，Bullockら[14]が4例とし，Crain[19]はRochester-Wistar系ラットに1.1% (1/84)の中胚葉性腫瘍をみたと報告している．このようにBHT摂取ラットにのみ発生した悪性腫瘍はいずれも自然発生の報告例があり，2例みられた皮下の横紋筋肉腫，腎臓の腎芽細胞腫は同一群での発生ではなく，このほかの腫瘍も1例のみの発生であったことからBHT摂取による誘発とは考えられない．

以上の如く本試験での病理組織学的検索の結果からはBHT添加飼料を終生摂取（体重kg当り1日のBHT摂取量は雌雄とも0.005%群2.5mg，0.02%群10mg，0.32%群160mg[21]）したラットに摂取と関連した組織障害像および腫瘍の誘発・発生促進は認められなかった．すなわち本試験の条件下ではBHTがラットに著明な害的影響を及ぼさなかったと結論される．

文　献

1) 食品添加物公定書注解委員会：食品添加物公定書注解，Ⅲ，386，1974，金原出版
2) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22，231，1971
3) 市川久次ら：東京衛研年報，23，345，1972
4) Deichmann, W. B., J. J. Clemmer, R. Rakoczy, and J. Bianchine : *A. M. A. Arch. Ind. Health*, 11, 93, 1955
5) Harman, D. : *J. Geront.*, 23, 476, 1968
6) 福森信隆ら：東京衛研年報，26-2，22，1975
7) Maekawa, A. and S. Odashima : *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 1437, 1975
8) Coleman, G. L., S. W. Barthold, G. W. Osbaldiston, S. J. Foster, and A. M. Jonas : *J. Geront.*, 32, 258, 1977
9) 西部忠幸：奈医誌，27，1，1976
10) 森井外吉，藤井登志之：実験動物，22，127, 1973
11) Thompson, S. W., R. A. Huseby, M. A. Fox, C. L. Davis, and R. D. Hunt : *J. Natl. Cancer Inst.*, 27, 1037, 1961
12) Snell, K. C. : *The Pathology of Laboratory Animals* (Riebelin, W. E. and J. R. McCoy eds.) 241, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois
13) Gilbert, C. and J. Gilman : *S. Afr. J. med. Sci.*, 23, 257, 1958
14) Bullock, F. D. and M. R. Curtis : *J. Cancer Res.*, 14, 1, 1930
15) Carter, R. L. : *Pathology of Tumors in Labo-*

ratory Animales (Turusov, V. S., eds,), 151, 1973, International Agency for Research on Cancer, Lyon

16) Guérin, M. : *Tumerus Spontanes des Animaux de Laboratorie* (Souris-Rat-Poule), 1954, Legrand, Parls （12)より引用)

17) McCoy, G. W. : *J. Med. Res.*, **16**, 285, 1909. （12)より引用)

18) Rowlatt, U. and F. J. C. Roe : *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 17, 1967

19) Crain, R. C. : *Amer. J. Path.*, **34**, 311, 1958

20) 村岡義博，伊藤真貴子，山本富士子，林裕造：実験動物，**26**, 13, 1977

21) 市川久次ら：東京衛研年報，**28-2**, 1, 1977

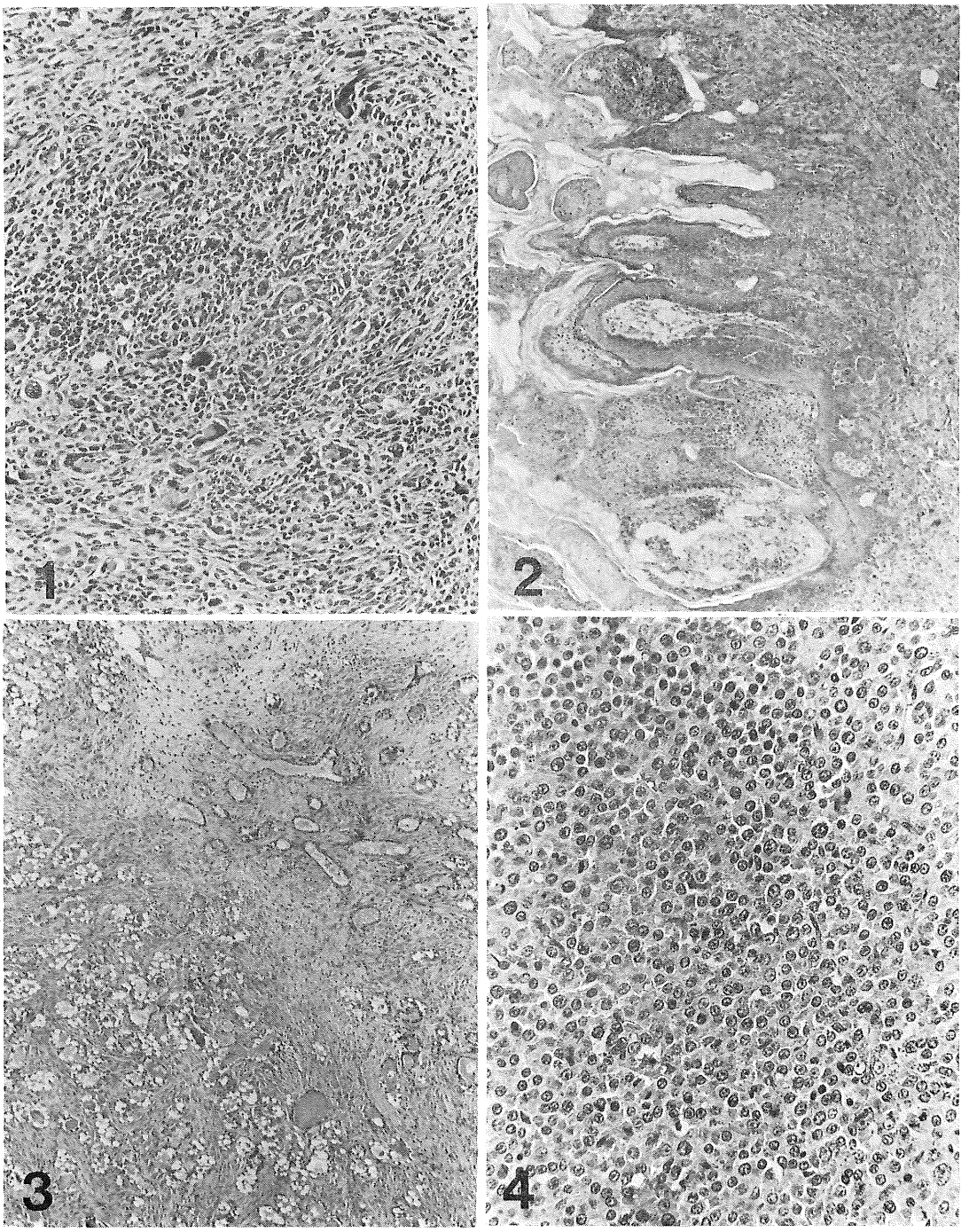


Photo 1. Rhabdomyosarcoma in muscles. H-E stain. ×100
Photo 2. Squamous cell carcinoma in ear duct. H-E stain. ×40
Photo 3. Fibroadenoma in mammary glands. H-E stain. ×40
Photo 4. Chromophobe adenoma in pituitary. H-E stain. ×200

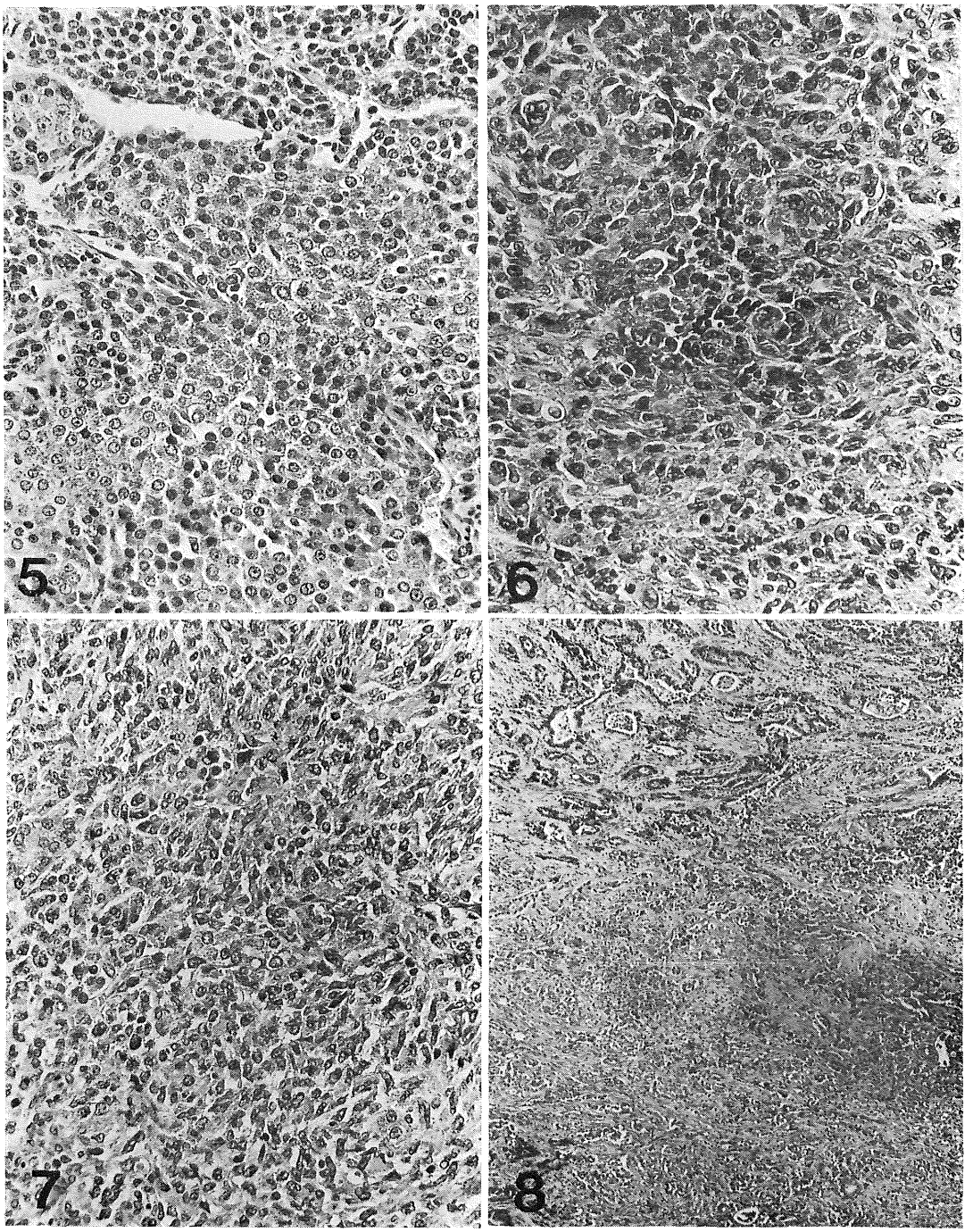


Photo 5. Medullary adenoma in adrenal. H–E stain. ×200
Photo 6. Acinar cell carcinoma in pancreas. H–E stain. ×200
Photo 7. Nephroblastoma in kidney. H–E stain. ×200
Photo 8. Carcinosarcoma in uterus. H–E stain. ×40

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 33-36, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）投与ラットにおける回復実験（第1報）

市川久次*, 小林博義*, 平賀興吾*

Effects of Discontinuation on Administration with Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats (I)

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and KOGO HIRAGA*

ジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）は，油脂等の酸化防止剤，ゴム，プラスチック等の安定剤として広く使用されている．その安全性については多数の研究がなされているが，投与を途中で中止し，以後の回復，影響について検討することは，安全性の評価のうえに非常に意義深いものであると考えられる．これまでこの方面よりの検討については Gaunt ら[1]が，arachis oil に BHT を溶かしたもの（500mg/kg）を用いてラットに対して行った報告のみのようである．今回，著者らは，BHT 1.5% というかなり高濃度を飼料に混入し，摂取させ途中で対照群と同じ飼料に切換え，その後の影響を検討し，若干の知見を得たので報告する．

なお，BHT 濃度をさらに低くし，体重増加に変化をおよぼさない用量を含めて現在検討中であるので後日続報として報告する．

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-Wistar系ラット雄を用いた．生後4週令にて購入し，16日間予備飼育後，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 202g）5匹を一群として，ステンレス網ケージに入れ実験に供した．

2. 試料 BHTは和光純薬KK製(Lot No. KIK5562) 結晶性白色粉末で mp. 62.5° 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%, 可溶性無窒素物 56.0%, カルシウム 1g/100g, リン 1g/100g, カリウムに 0.63g/100g）に混合し，固型飼料に形成[2]し，対照群には日本クレアKK製粉末飼料 CE-2 を固型飼料に形成したものを自由に摂取させた．投与期間は Table 1 に示した如くである．水は細菌沪過器を通した水道水を自由に摂取させた．

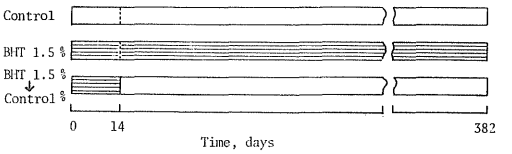


Fig. 1. Treatment Shedules and Group Labelling

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

5. 測定項目ならびに測定方法

1) 体重の測定 体重は実験初期の14日間と BHT 1.5% を対照飼料に切換えてから14日間（28日間）は毎日，以後は90日まで10日ごとに，90日以後は一般症状の観察，給餌を行った．

2) 血球成分の測定 白血球数(WBC と略)，赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（HGB），ヘマトクリット値（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤白球ヘモグロビン濃度（MCHC）の7項目について，市川ら[3]の方法に従って行った．

3) 血清成分ならびに血清酵素活性の測定 総蛋量（TP），グルコース量（GLV），尿素窒素量（UN），トランスアミナーゼ活性（GOT ならびに GPT），アルカリフオスファターゼ活性（ALP），総コレステロール量（CHO），コリンエステラーゼ活性（ChE），Na^+ 量，K^+ 量について，市川ら[3]の方法に準じて行った．

4) 剖検 肉眼的所見観察

5) 臓器重量の測定 心臓，脾臓，肝臓，腎臓（左，右），副腎（左，右），甲状腺，精巣(左，右)，脳，胃，盲腸を附着する血液，脂肪等を除去し，メトラ製デジタル電子天秤（PE 162）にて秤量した．

測定値はすべて推計学的処理を行った．

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験結果

1. 体重．一般症状の推移 体重増加については，Table 1, Fig. 2 に示した如く，BHT 1.5% 投与群は投与開始直後体重は減少し，3日後最少値を示し，その後除々に増加し，実験開始時の体重レベルにもどるのに約9日間を要した．実験開始後14日目に BHT 1.5%群の一つを対照群と同じ飼料に切換えたが，その後この群は BHT 1.5% 摂取時よりも急速な体重増加を示し，飼料切換え後26日（実験開始後40日）位で対照との間に有意差（$p<0.05$）がなくなるまでに成長し，以後順調な体重増加を示し，382日後（実験終了時）には，対照群とほぼ同じまでに成長した．また，実験開始後の14日目の飼料切換時ならびに実験終了時382日目の BHT 1.5% 投与群の体重は対照に比し，有意に低かった($p<0.001$, Table 1).

一般症状は，BHT 1.5% 投与群を除いて認むべきものはなかった．BHT 1.5% 投与群において，削痩，被毛の粗剛，下腹部および口周辺の被毛が赤褐色に汚染された．さらに，BHT 1.5% 投与群は5例中3例が死亡し，うち1例は，胸腔内出血，胞腺，精巣上体に出血があった．

2. 血球成分 血球成分の測定結果は Table 2 で示した如くであるが，いずれの測定項目においても，著明な変化はなかったが，BHT 1.5% から対照飼料への切換え群において，ヘモグロビン量ならびにヘマトクリット値が対照に比し大であった（$p<0.05$).

3. 血清成分ならびに血清酵素活性 血清成分ならびに血清酵素活性の測定結果は Table 3 に示した如くである．尿素窒素量は，BHT 1.5%投与群ならびにBHT 1.5% から対照飼料に切換えた群において，対照群に比

Table 1. Body Weight Gain

Group	No. of rats	Initial B. W. mean±SD	B. W. after 14 days mean±SD	Final B. W. mean±SD	Growth rates[2] mean±SD
Control	5	201.8±6.22[1]	293.0±13.00	608.6±67.76	301.3±29.02
BHT 1.5%	5→2	202.8±9.70	224.6±10.23(5)***	513.5±41.71	247.2±10.83
BHT 1.5% ↓ Control	5	202.8±6.26	222.6±12.21***	601.4±63.18	297.1±36.57

1) g. 2) Final B. W. /Initial B. W.)×100 3) % *** $p<0.001$

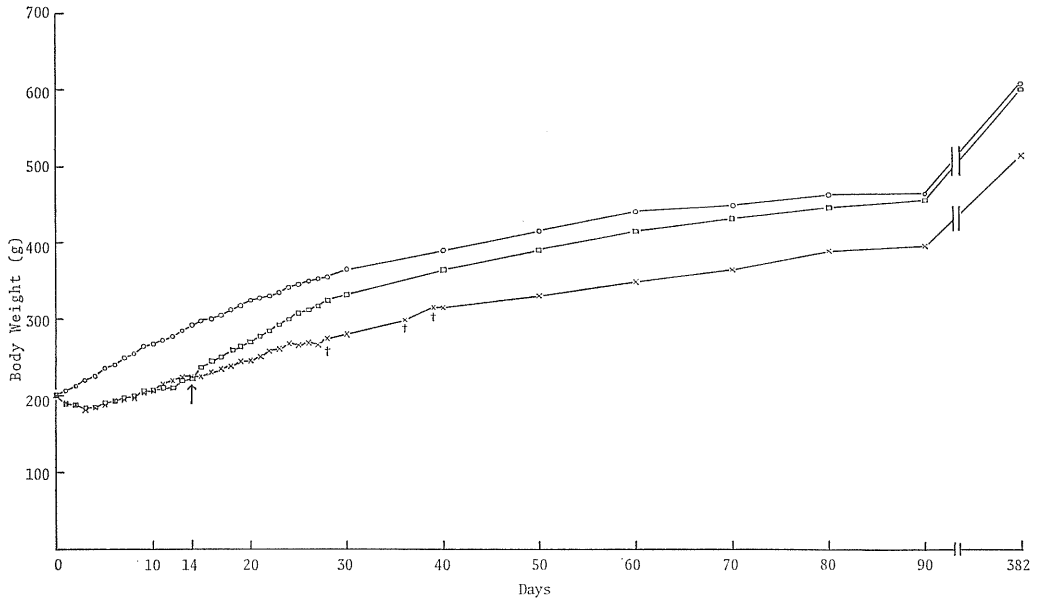


Fig. 2. Curves of Body Weights Gain of Rats
○ control × BHT 1.5% □ BHT 1.5% ⟶ control † dead rats and No.
Arrow indicates the change of food (from BHT 1.5% to control)

Table 2. Blood Components

Group	No. of rats	WBC ×10³/mm³	RBC ×10⁶/mm³	HGB g/dl	Hct %	MCV μ³	MCH μμg	MCHC %
Control	5	8.1±0.87[1]	7.17±0.180	14.6±0.30	36.6±0.57	52±0.7	20.6±0.29	39.9±0.37
BHT 1.5%	2	7.0±1.30	7.42±0.165	14.9±0.50	38.2±1.90	52±1.5	20.4±0.20	38.9±0.65
BHT 1.5% ↓ Control	5	8.9±1.55	7.92±0.359	16.0±0.51*	41.0±1.47	53±0.4	20.4±0.33	38.8±0.34

1) mean±SD * $p<0.05$

Table 3. Blochemical Tests

Group	No. of rats	TP g/dl	GLU mg/dl	UN mg/dl	GOT u/ml	GPT u/ml	ALP u/dl	CHO mg/dl	ChE ΔpH	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l
Control	5	6.78±0.182	104.4±2.73	33.0±2.19	135.8±8.13	41.8±7.34	19.6±2.15	94.6±4.41	0.07±0.038	141.0±0.44	6.5±0.14
BHT1.5%	2	7.05±0.250	112.5±14.50	47.5±3.50*	119.5±10.50	37.5±6.50	30.5±7.50	107.0±15.00	0.21±0.092	141.5±0.50	7.6±0.35*
BHT1.5% ↓ Control	5	6.94±0.163	107.2±6.12	39.4±1.43*	138.6±10.77	51.2±9.36	22.8±2.13	115.0±8.58	0.14±0.025	140.8±0.58	6.6±0.13

1) mean±SD * $p<0.05$

Table 4. Organ Weights (1)

Group	No. of rats	Heart[1]	Spleen[1]	Liver[2]	Kidney[1] L	Kidney[1] R	Adrenal[1] L	Adrenal[1] R
Control	5	1457±90.5[3]	911±32.9	17.24±0.540	1722±33.8	1792±94.8	20.7±2.28	19.8±1.59
		246±17.3[4]	150±4.3	2.85±0.126	285±13.9	295±13.1	3.4±0.49	3.26±0.20
BHT 1.5%	2	1390±28.0	930±60.0	24.42±1.865**	2016±2.0**	1853±38.0	25.5±0.50	20.0±2.00
		271±21.0	181±1.2*	4.75±0.090***	393±23.0**	362±28.2	4.9±0.38	3.93±0.61
BHT 1.5% ↓ Control	5	1430±35.9	1017±71.7	16.99±1.292	1653±150.1	1632±67.8**	12.4±2.94	11.8±1.65**
		239±9.4	170±15.1	2.82±0.154	274±18.0	272±11.2	2.0±0.48	1.9±0.28

1) mg 2) g 3) mean absolute weights±SD 4) mean weights/100g B. W. ±SD
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Table 5. Organ Weights (2)

Group	No. of rats	Thyroid[1]	Testis[1] L	Testis[1] R	Brain[1]	Stomach[1]	Caecum[1]
Control	5	17.4±2.76[2]	1947±74.7	1973±52.0	2289±56.4	1983±42.5	868±41.6
		2.9±0.52[3]	322±14.9	326±14.3	378±12.4	328±14.1	143±4.2
BHT 1.5%	2	27.5±2.50	1497±462.0	1347±473.0	2276±80.5	2382±92.5**	857±101.0
		5.3±0.18	287±73.4	257±77.2	443±9.8*	446±8.6**	166±10.1
BHT 1.5% ↓ Control	5	14.0±3.39	1338±250.1	1222±233.0*	2275±45.2	1793±136.0	661±77.1
		2.3±0.50	219±37.1	200±36.2	381±21.1	298±20.4	101±10.8**

1) mg 2) mean absolute weights±SD 3) mean weights/100g B. W, ±SD
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

して有意に高い値を示した．すなわち，切換え群では対照飼料に切換えた後，約12ヵ月経ても尿素窒素量は対照と同じレベルになっていないことを認めたが，他の血清成分，血清酵素活性は対照とほぼ同じレベルを示した．なお，BHT 1.5% 投与群の K^+ 量は対照に比し，有意に高かった．

4. 臓器重量 各臓器の絶対重量ならびに体重比重量（体重 100 g 当りの重量）は，Table 4, 5 に示した如くである．肝臓，腎臓(右)，胃は絶対重量ならびに体重比重量において，BHT 1.5% 投与群は対照群に比して有意に大きく（$p<0.01$），飼料切換え群は対照群との間に有意差はなかった．また，精巣（左，右）において，BHT 1.5%投与群（推計学的には有意ではないが），飼料切換え群（$p<0.05$）は絶対重量ならびに体重比重量がかなり小であった．他の臓器においても，推計学的に差があるものが散見されたが，特に意味あるものとは認められなかった．

5. 剖検所見 実験期間中途中死亡例では，明らかな所見が得られたのは1例で，胸腔内出血，胸腺，精巣上体の出血であった．

考　　察

医薬品，食品添加物，環境汚染物質等において，これらの使用中止後の推移は，これらの安全性を評価するうえにおいて，非常に意義あるものと考え，今回，BHT 1.5% という比較的高濃度を使用して，途中で投与を中止し，その後の影響について検討した．

体重の増加については，Table 1, Fig. 2 に示した如く，BHT 1.5% 投与群は実験初期に減少をしたがその後増加し，14日後に対照群と同じ飼料に切換えると，急速な増加を示し切換え後26日目には対照と間に有意なる差を認めないレベルにまで回復し（$p<0.05$），その後も順調な発育を続け，実験終了時 368 日目（切換え後）においては，対照群とほぼ同じであり，体重増加に関する限り，BHT の摂取中止により，対照レベルまで回復することができるという結果を得た．Gaunt[1] らの報告によれば，500mg/kg を arachis oil に溶かしたものを14日間投与し，その後対照と同じ条件に切換えた場合の体重の変化は，投与中止後の方が対照に比し成長が悪い傾向を示していたが，著者らも現在，体重に変化を与えない濃度として，BHT 0.5%，さらに高濃度群として1.0%を飼料に混入したものを用いて，検討中であるので，その結果を待ちたい．

血球成分については，全般的に著名な変化はなかったが，BHT 1.5% を対照飼料え切換えた群において，ヘモグロビン量，ヘマトクット値の上昇が認められ，BHT 1.5% 投与群においても上昇の傾向が認められた．これは，これまでの報告[4] と逆の結果であった．

血清成分ならびに血清酵素活性については，尿素窒素量において，BHT 1.5% 投与群ならびに BHT 1.5% から対照飼料へ切換えた群はともに対照群に比べ有意に高かった．これは腎臓に対する BHT の高濃度が不可逆的に作用をする可能性を示すものとして，今後の検討に期待したい．

臓器重量については，BHT の代表的作用の一つに肝臓重量増加作用が報告[5] されているが，今回の著者らの結果も肝臓の重量増加が BHT 1.5%投与群において著明であった．しかし，BHT 1.5% から対照飼料への切換えた群においては，対照群との間に有意なる差はなく，また肝臓機能の評価基準となる血清酵素活性に変化がなかったことを合せ考察を加えると，肝臓に対する BHT の作用は，可逆的なものと考えられる．また腎臓の重量についても同様の傾向が認められたが，腎臓の機能に対する作用と重量におよぼす影響については今後の検討課題の一つである．

一般症状，剖検所見については，これまで報告されてきたものと大差なく，特に記すべきものはないと考えられる．

結　　論

BHT 投与を途中で中止し，その後の影響を検討する目的で，BHT 1.5% 含有飼料を14日間ラットに投与した後，対照飼料に切換え，その影響を検討したところ，次の結論を得た．

1. 体重増加は，飼料切換え後約26日で対照との間に有意な差がなくなった．
2. 血清中の尿素窒素量は，飼料切換え後約1年経っても対照に比し高く，不可逆的であった．
3. 肝臓重量は絶対重量，体重比重量ともに，飼料切換え後約1年経った後には，対照群との間に差がなくなった．

文　　献

1) Gaunt, I. D., D. Gilbert, and D. Martin : *Fd. Cosmet Toxicol.*, 3, 445, 1965
2) 池田虎雄，水尾照江，久保喜一，林田志信，小林博義，平賀興吾：東京衛研年報，25, 527, 1974
3) 市川久次，小林博義，中川好男，長井二三子，清水麻里，池田虎雄，矢野範男，平賀興吾：東京衛研年報，28-2, 1, 1977
4) 市川久次，小林博義，平賀興吾：東京衛研年報，27-2, 47, 1976
5) Gilbert, D. and L, Golberg : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 37-43, 1977

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

中川好男*, 伊川三枝子*, 福森信隆*, 平賀興吾*

Studies on Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats
Subcellular Distribution of ^{14}C-BHT in Rat Liver (II)

YOSHIO NAKAGAWA*, MIEKO IKAWA*, NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

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）の生体内での代謝については，Hathway[1]により総説されている．しかし消化管から吸収されたBHTが肝細胞内でいかなる代謝をうけるのか，またBHTあるいはその代謝産物が細胞の機能にいかなる影響をおよぼすかについては充分に明らかにされていない．前報[2]では^{14}Cで標識したBHTをラットに経口投与し，経時的に肝を細胞分画して放射能の分布を検討した．その結果，肝に取り込まれた放射性物質はまず上清分画にその大部分が局在したが，ミクロゾーム分画にも経時的に増加した．本報告では(1)あらかじめBHTを経口投与したラットに更に^{14}C-BHTを一回経口投与し，この動物と前処置していない動物の肝細胞内における放射能の分布様式を比較した．(2)前報にて認められたミクロゾーム分画の放射能の局在性を，この分画の細分化により検討した．

実験材料および方法

実験動物　雄性のSLC-Wistar (SPF) 系ラットを用いた．

標識化合物　3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (toluene methyl-^{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．

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Patterson[3]らの組成を用いた．試料は0.5-1.5m*l*を適量の蒸留水とともに10m*l*のシンチレーターに加え放射能を測定した．

細胞分画法　前法[2]に準じ，10%ホモジネートはde Duve[4]らの方法により分画した．

ミクロゾームの細分画法　粗面および滑面ミクロゾームはImaiら[5]の方法を若干改変して分離した．肝は30 mM塩化カリウムを含む0.25M蔗糖溶液でPotter型ホモジナイザーを用い20%ホモジネートに調製した．このホモジネートは10,000×gで15分間遠心分離し，得られた上清を同蔗糖溶液で20%に定容した．その5m*l*を6m*l*の2.1Mおよび13m*l*の1.23Mの不連続蔗糖密度勾配上に重層し，Beckman L3-50型遠心分離機(60tiローター)で178,000×g，270分間の遠心分離を行なった．分離後上の界面部を滑面ミクロゾーム分画，下の界面部を粗面ミクロゾーム分画として分取した．得られた両分画は蒸留水で0.25Mの蔗糖濃度になるまで希釈し，105,000×gで90分間遠心分離した，さらに両分画の沈殿部は1.15%，塩化カリウム溶液で洗浄し同条件で再度遠心分離した．両分画は最終的に0.25M蔗糖溶液中にけん濁した後RNA，蛋白質および放射能の測定に供した．またこの方法で得られた両ミクロゾームは電子顕微鏡で同定した．

薬物代謝酵素活性の測定　酵素標品は肝を0.25M蔗糖溶液で20%にホモジナイズした後，10,000×gで15分間遠心分離して得られた上清を用いた．BHT酸化活性（以下BOと略す），アミノピリン脱メチル活性（APDM）およびアニリン水酸化活性（AH）はTable 1に示した組成液に酵素標品を加え，37°で予備加温後各基質を加えて反応させた．BOはGilbertら[6]の方法に準じ生成した3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol量により定量した．インキュベーション後反応液に2gの塩化

* 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. Composition of Incubation Mixtures

	BO[1]	APDM[2]	AH[3]
Phosphate buffer(mM) (pH7.4)	125	125	125
$MgCl_2$ (mM)	3.3	4.2	6.4
Nicotinamide (mM)	16.6	8.3	12.5
NADP (mM)	0.08	0.10	0.13
Glucose-6-phosphate (mM)	2.5	1.7	2.5
Glucose-6-phosphate dehydrogenase(IU/ml)	0.12	0.11	0.12
Substrate and concn (mM)	Butylated hydroxytoluene 0.45	Aminopyrine 0.83	Aniline 3.13
Semicarbazide (mM)	—	7.5	—
10000×g-sup. (ml)	0.3	0.5	0.5
Final volume (ml)	3.0	3.0	4.0

1) Butylated hydroxytoluene oxidase
2) Aminopyrine demethylase
3) Aniline hydroxylase

ナトリウムとヘプタン（1.5% *iso* アミルアルコールを含む）10ml を加え振とうした．ヘプタン層 8 ml を分取しこれに 0.2% 炭酸ナトリリム 1 ml と Gibbs 試薬（5 mg/dl・エタノール）1 ml を加えて振とう後水層を 580 nm で測定した．APDM はホルムアルデヒド生成量により定量した[7]．反応液は 15% 硫酸亜鉛 2 ml を加え 5 分間後飽和水酸化バリウム 2 ml を加えた後，遠心分離して得た上清 5 ml に Nash 試薬（100ml の蒸留水に酢酸アンモニア 30 g とアセチルアセトン 0.4ml）2 ml を加えた．この溶液は 60° で30分間加熱後 410nm の吸光度を測定した．AH は P-アミノフェノール生成量により定量した[8]．反応液に 20% TCA 2ml を加え10分間氷冷後遠心分離した．この上清 1 ml に 10%炭酸ナトリウム 0.5ml と 2%フェノール（0.2N 水酸化ナトリウムを含む）1 ml を加え 37° で 30 分間加温した後 640nm の吸光度を測定した．

RNA の定量 ミクロゾーム中の RNA は Schneider[9] の方法により抽出し，オルシノール反応[10]で定量した．

蛋白質の定量 牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法[11]により定量した．

実験 I. ^{14}C-BHT の肝細胞内分布

SLC-Wistar 系ラット雄を 5 週令時（体重 140～160 g）に 2 群に分けた．その一群は 0.6% BHT 添加飼料（クレア CE-2 粉末飼料に微粉末化した BHT を混合）を 4 週間自由摂取させ，この群を前処置群とした．他の一群は無添加飼料で飼育しこれを無処置群とした．^{14}C-BHT はオリーブ油で比放射能が11μCi/ml になるように調製後，この 1 ml を一晩絶食したラットに経口投与した．投与後経時的に各動物の肝を前報[2]に準じて細胞分画を行ない，得られた各分画は放射能および蛋白質量を測定した．なお各実験での放射能および蛋白量の回収率は90%以上であった．また上記 2 群のラットの一部に，オリーブ油に溶かした非放射性の BHT（5 mg/ml/rat）を経口投与し，12 時間後の肝薬物代謝酵素の活性を測定した．

実験 II. ^{14}C-BHT のミクロゾーム内分布

体重 175-190 g のラット（8 週令）に，オリーブ油に溶かした ^{14}C-BHT を 32μCi/rat の用量で経口投与し，経時的に肝をミクロゾームの細分画に供した．得られた粗面および滑面ミクロゾーム分画は放射能，蛋白質および RNA 量の測定に用いた．なお放射能の回収率は 70%以上であった．

結　果

実験 I. ^{14}C-BHT の肝細胞内分布

0.6% BHT 処置および ^{14}C-BHT 投与後の体重，肝重量，肝蛋白量は Table 2 に示した．前処置群の体重は無処置群に比べ 5-10% の減少を示したが，逆に肝重量は 140-150% の増加を示した．肝蛋白量は 12 時間後の群を除いて差はみられなかった．

^{14}C-BHT 投与後の肝の放射能は Table 3 に示した．肝に取り込まれた全放射能およびその比放射能は両群とも 6 時間後に最高値に達した．両群の肝に存在する全放射能を比較すると投与 3 時間後の前処置群が 140% 高かったが，以後両群には差はみられなかった．また比放射能は 3 時間後では差はなかったが，それ以後前処置群が顕著な減少を示し，特に 6 時間後では肝グラムあたりの比放射能が無処置群の53%，またタンパクあたりで 46%の減少であった．これらの比放射能の減少は肥大した前処置群の肝に存在した全放射能が無処置群に比べ顕著な差を示さなかったことに起因するものと思われる．

次に ^{14}C-BHT 投与後の肝細胞分画における比放射能を Table 4 に示した．上清分画の放射能は両群とも 6 時間後に最高値になったが，ミクロゾームおよび軽ミトコンドリア分画では両群とも12時間後に最高値になった．また核分画では両群とも 6 時間後に，重ミトコンドリア分画では 6-12 時間後にそれぞれ最高値に達した．また各時点における各分画の比放射能を比較すると一般に前処置群が無処置に比べ低く，特に 6 時間後では無処置群の約50%の放射能であった．いずれにしても前処置群の各分画の比放射能は無処置群に比べ低いが，経時的な推移は無処置群と並行した．

Fig. 1 は全分画の総放射能に対する各分画の放射能の

Table 2. Body and Liver Weight and Liver Protein of Rats fed Diets containing 0.6% BHT for 4 wk

Time hr	Body weight g		Liver weight g		Liver protein mg/g. liver	
	C[1]	T[2]	C	T	C	T
3	199±9	182±7	6.8±0.6	10.5±0.6	274±4	274±8
6	216±14	194±23	7.2±0.9	11.1±1.8	253±5	259±8
12	187±3	181±6	8.3±0.3	11.8±0.9	206±3	225±10

All values are mean±S.D. of groups of three rats
1) non-treated
2) pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks

Table 3. Time-course of Changes in Radioactivity of Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT

Time	Total liver radioactivity dpm/liver[1]		Specific Radioactivity dpm/g. liver[2]		dpm/mg. protein	
	C[3]	T[4]	C	T	C	T
3	5.10±0.10	7.33±0.77	7.40±0.54	6.87±0.21	276±16	250±15
6	12.82±1.75	11.30±1.59	17.72±1.04	9.35±0.62	702±53	330±61
12	8.40±0.28	8.24±1.65	10.25±0.12	7.55±1.03	497±2	333±34

1) $\times 10^5$ 2) $\times 10^4$
3) single oral administration with ^{14}C-BHT (11μCi/rat)
4) pretreated with 0.6% BHT in diet for four weeks before single oral administration with ^{14}C-BHT

割合を百分率で表わした．放射能は両群とも主に上清分画に分布したが経時的に減少し，相対的にミクロゾーム分画で増加した．両群の各分画に分布した放射能を比較すると上清分画では前処置群の方が低く，またミクロゾームおよび核分画では前処置群の方が高かった．

0.6% BHT 前処置および5mg の BHT 投与による肝薬物代謝酵素活性の影響を Table 5 に示した．その結果前処置群の酵素活性は BO が 313%（全活性で 430%），APDM が 170%（237%），AH が 156%（214%）の上昇を示した．また ^{14}C-BHT を一回投与した場合と同一用量の非放射性 BHT を経口投与すると，12時間後の各酵素活性は若干ではあるが上昇する傾向（BO, APDM が 110%，AH が 106%上昇）が認められた．

実験 II. ^{14}C-BHT のミクロゾーム内分布

ミクロゾーム分画の放射能が経時的に増加することから，"10,000×g 上清" と呼ばれている上清分画を不連続蔗糖密度勾配の遠心分離により細分画した．滑面および粗面ミクロゾーム分画の放射能，RNA および蛋白質量を Table 6に示した．粗面ミクロゾームの RNA 含量は滑面ミクロゾームの6-7倍であった．また得られた両ミクロゾーム分画の電子顕微鏡像はこれら両ミクロゾームが本質的に分離されたことを示した (Fig. 2)．滑面ミクロゾームの比放射能は投与6時間まで粗面ミクロゾー

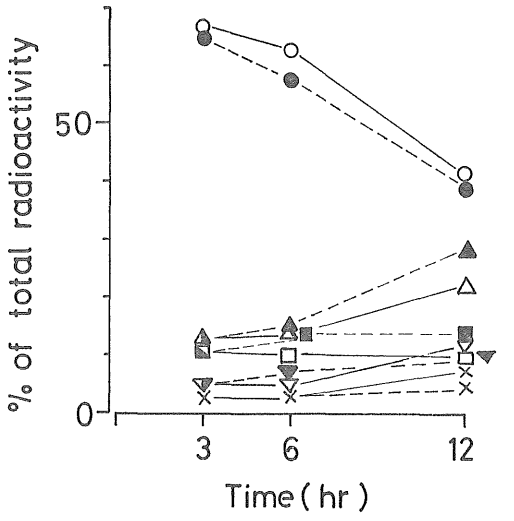


Fig. 1. Time-course of Radioactivity in Subcellular Fractions of Rat Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT
□ Nuclear △ Microsomal
× Heavy mitochondrial ○ Sepernatant
△ Light mitochondrial
The solid line and dotted line indicate nontreated groups and pretreated groups.

Table 4. Subcellular Distribution of Radioactivity of Liver after Oral Administration of ^{14}C-BHT

Fraction	Specific radioactivity (dpm/mg. protein)									
	Nuclear		Heavy mitochondrial		Light mitochondrial		Microsomal		Supernatant	
hr	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
3	116±7	119±10	110±11	90±3	186±30	129±8	240±16	227±36	515±66	541±76
6	287±40	166±16	254±25	157±48	451±66	225±77	669±110	302±95	1350±98	627±140
12	224±17	198±8	268±17	193±13	630±50	361±41	1031±10	630±33	644±12	433±28

Table 5. Drug-metabolizing Enzyme Activities in Rats fed Diets containing 0.6% BHT for 4wk

Group	Body weight	Liver weight	Protein	Enzyme assay (μ mole/g. liver/hr)		
	g	g	mg/g. liver	BO[a]	APDM[b]	AH[c]
Control[1](5)	202±6	6.7±0.3	211±6	1.07±0.08	4.88±0.93	0.63±0.07
Control[2]+BHT(4)	206±9	6.7±0.4	214±6	1.19±0.07	5.40±0.44	0.67±0.09
Pretreated+BHT(5)	201±4	9.2±0.4*	215±8	3.35±0.23*	8.41±0.50*	0.98±0.10*

1) nontreated
2) 12 hr after single oral administration (5mg/rat)
3) pretreated with 0.6% BHT in diet for 4 wk, and 12hr after single administration (5mg/rat)
Figures in parentheses are number of rat
* Significantly different from control $P<0.001$

a) Butylated hydroxytoluene oxidase
b) Aminopyrine demethylase
c) Aniline hydroxylase

Table 6. Submicrosomal Distribution of Radioactivity of Rat Liver after Administration of ^{14}C-BHT

Time after administration hr	Protein (mg/g. liver)		RNA (μg/mg. protein)			Radioactivity (dpm/mg. protein)		
	Smooth	Rough	Smooth	Rough	Ratio(R/S)	Smooth	Rough	Ratio(S/R)
3	8.83	8.50	28.1	196.7	7.0	700	500	1.40
6	8.40	8.11	27.5	202.4	7.4	1690	1040	1.64
12	8.36	8.05	25.6	178.1	6.9	1440	1460	0.99
24	7.20	8.55	29.7	186.9	6.3	1070	1220	0.88

Rats were orally administered with ^{14}C-BHT at a level of 15mg/rat (33μCi). Values are the means of two animals.

ムより高（140-160%）かった．しかし12時間後両ミクロゾームの比放射能はほぼ均等であった．また滑面ミクロゾームの放射能は投与6時間後に最高値になったが，粗面ミクロゾームでは12時間後に最高値になった．

考　察

BHT が病理組織学的な肝障害を伴わず肝重量を増加させることはすでに報告されている[12,13]．この重量増加は細胞数の増加よりむしろタンパク合成の促進に伴う細胞肥大がその主要な原因とされている[14,15]．また細胞内において特に滑面小胞体の増殖[16]とこれに付随して薬物代謝酵素の誘導[17]が認められている．今回 0.6% BHT（飼料）を4週間投与した結果，体重が若干減少したにもかかわらず，肝重量は 140-150% 増加した．またこの時点の薬物代謝酵素活性は顕著な上昇（特に BHT 酸化活性は肝全体で4.3倍）を示し，BHT 処置により肝の肥大と薬物代謝酵素の誘導が確認された．この様な条件下にある動物に ^{14}C-BHT を一度経口投与し12時間までの肝における放射能の挙動を検討した．その結果肝全体に存在した放射能は前処置群および無処置群とも大差が認められなかった．しかし前処置群の肝の比放射能は組織の肥大に起因して無処置群に比べ著明な低下を示した．このことは主要な異物代謝をつかさどる肝がその組織の肥大という現象により，取り込まれた異物の組織中濃度を低下させ，更に誘導された薬物代謝酵素により異物代謝を促進させるものと考えられる．市川ら[18]は今回の実験と同一条件下で ^{14}C-BHT の生体からの排泄を報告している．その結果尿および糞中への放射能の排泄は投与初期において前処置群の方が無処置群より多く，し

かも尿中への放射能の排泄が無処置群の2.6倍を示した．このことはBHT処置の結果誘導された肝薬物代謝酵素により，極性の高いBHT代謝産物が尿中に排泄したことを示唆する．

各細胞分画における比放射能は全般に前処置群の方が低かったが，経時的推移では両群とも同様の傾向を示した．一方，細胞内における放射能の分布は両群とも上清分画が最も多く，この分画の放射能が経時的に減少するに伴い両群のミクロゾーム分画の放射能が相対的に増加した．この様に肝細胞内に取り込まれた放射能の経時的推移と分布は，前処置群が比放射能の低下を示したにもかかわらず本質的には両群とも同様の傾向を示すことが認められた．またミクロゾーム分画に分布した放射能は前処置群が経時的に増加する傾向を示し，BHTあるいはその代謝産物のミクロゾームに対する親和性が増したことが示唆されるが，今後ミクロゾームに対するBHTあるいはその代謝産物の結合様式を検討する必要があろう．

ミクロゾーム分画に取り込まれた放射能は薬物代謝酵素が局在する滑面ミクロゾームに高く分布した．またこのミクロゾームの放射能は経時的に粗面ミクロゾームに移動するかに見られたが，今回のデータではこの現象を決めるには充分ではなく今後さらに検討する必要がある．

要　旨

0.6% BHT(飼料中)を前処置したラットに^{14}C-BHTを一度経口投与し肝細胞内における放射能の経時的挙動について検討した．

BHT前処置により肝は肥大し薬物代謝酵素は誘導された．肝全体に分布した放射能は前処置群，無処置群とも大差がなかったが，比放射能では前処置群が低かった．細胞内における前処置群の比放射能は全般に無処置群より低かったが，放射能の経時的推移および各分画間での分布は両群とも並行した．またミクロゾーム分画の放射能は滑面ミクロゾームに高く分布したが，経時的に粗面ミクロゾームとの差はなくなった．

謝辞　本研究にあたり御協力下さった当部の市川久次，米山允子，小林博義の諸氏に感謝致します．

文　献

1) Hathway, D.E.: *Adv. Food Res.*, 15, 1, 1966
2) 中川好男，伊川三枝子，平賀興吾：東京衛研年報，27-2, 10, 1976
3) Patterson, M.S. and R.C. Green: *Anal. Chem.*, 37, 854, 1965
4) De Duve, C., B.C. Pressman, G.R. Gianetto, R. Wattiaux, and F. Appelmans: *Biochemical J.*, 60, 604, 1955
5) Imai, A. and R. Sato: *J. Cell Biol.*, 40, 179, 1969
6) Gilbert, D. and L. Golberg: *Food Cosmet. Toxicol.*, 5, 481, 1967
7) Nash, T.: *Biochemical J.*, 55, 416, 1953
8) Schenkmen, J.B., H. Remmer, and R.W. Estabrook: *Mol. Pharmacol.*, 3, 113, 1967
9) Schneider, W.C.: *J. Biol. Chem.*, 164, 747, 1946
10) Brown, A.H.: *Arch. Biochem.*, 11, 269, 1946
11) Lowry, O.H., N.J. Resebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
12) Deichman, W.B., J.J. Clemmer, R. Rokoczy, and J. Bianchine: *Archs. ind. Hyg.*, 11, 93, 1955
13) Brown, W.D., A.R. Johnson, and M.W. O'Halloran: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 37, 533, 1959
14) Pascal, G.: *Arch. Sci. Physiol.*, 24, 37, 1970
15) 馬渕依子，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2, 20, 1976
16) Lane, B.P. and C.S. Lieber: *Lab. Investigatio*, 3, 342, 1967
17) Gilbert, D. and L. Golberg: *Food Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965
18) 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

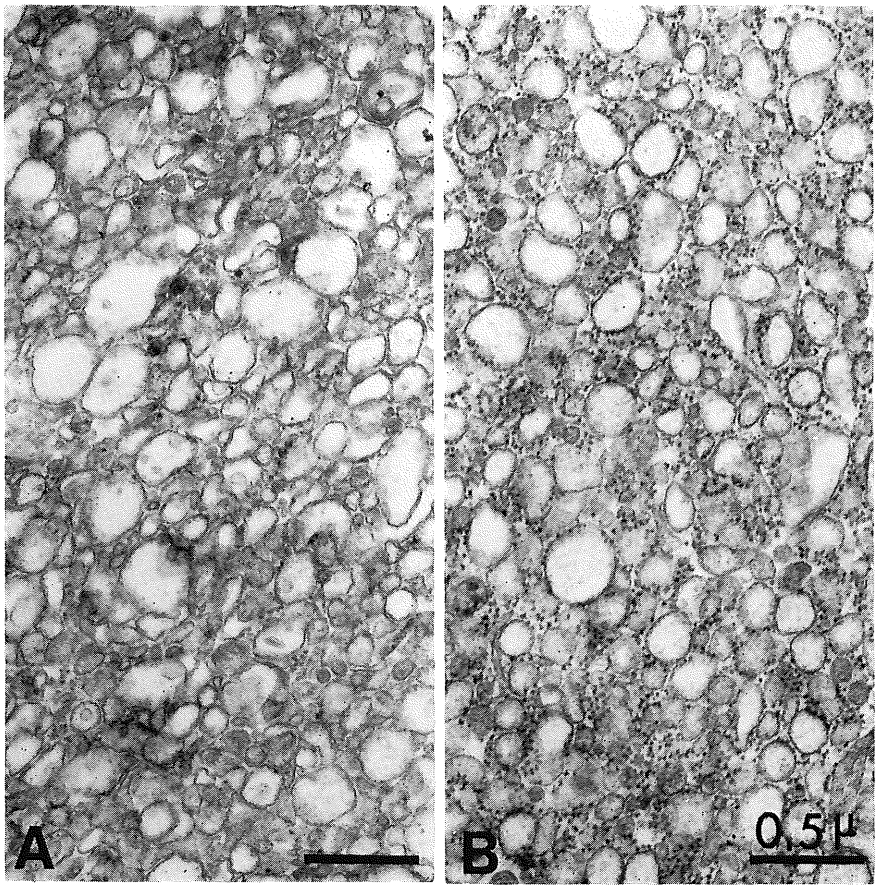


Fig. 2. Electron Micrographs of Liver Microsomal Subfraction obtained by a Discontinuous Sucrose Gradient Centrifugation
(A) smooth microsomal fraction
(B) rough microsomal fraction

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 45-52, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウスを用いた催奇形性試験

高橋昭夫*, 安藤 弘*, 久保喜一*, 平賀興吾*

Teratological Tests of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Mice

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

抗酸化剤ジブチルヒドロキシトルエン（BHT, 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene）の催奇形性に関しては Brown ら (1959)[1] の BHT 添加飼料を与えた Norway Hooded 系ラットの30母体中3母体の産児に眼球欠除を認めた報告がある．しかし，この報告にもとづく Johnson (1965)[2], Clegg (1965)[3], Frawley ら (1965)[4] のラットあるいはマウスを用いた詳細な研究では BHT に催奇形性を認めていない．また最近田中ら[5] がラットを用いて行なった実験においても BHT の催奇形性を示す所見は得られていない．

本試験ではマウスを用い，従来の報告よりさらに大量を投与することにより BHT の催奇形作用の有無を確かめようとした．

試験材料ならびに方法

1. 実験動物 JCL-ICR マウス雌雄を日本クレア㈱より4週令時に購入，8-13週令（体重26.0-36.0g）に達した発育良好なものを選び試験に供した．

2. 飼育条件 温度25±1°，湿度55±5%，照明午前9時～午後5時，換気毎時10回の飼育室にて日本クレア製固型飼料 CA-1 および水道水を自由に与え，試験開始（交配）時までアルミケージに10匹，交配後はプラスチックケージにて1匹飼いとした．ただし雄マウスは交配前1週間より1匹飼いとした．

3. 交配方法 1：1 終夜同居により，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日とした．

4. 試料 ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は和光純薬㈱製 Lot No. 6993，食品添加物用を使用した．溶媒は日本薬局方オリーブ油（山田製薬 Lot No. DD 01-3）を用いた．

5. 試料投与量の決定 未経産雌マウスを用い，毎日1回2週間連続経口投与により求めた BHT の LD_{50} は約 300mg/kg/day（LD_1 約 50mg, LD_{99} 約 1,800mg/kg/day）であった．また，妊娠マウスでの妊娠7日より13日目の7日間にわたる連続経口投与では BHT 670 mg/kg/day を与えても母体および胎児（外表観察）に何ら変化を認めなかった．また当部のマウスにおける BHT の1回経口投与による LD_{50} は 2,400mg/kg[9] であったことを参考とした．

6. 観察方法 妊娠7日より13日までの7日間毎日1回経口投与する試験（7日投与試験）と妊娠9日に1回経口投与の試験（1日投与試験）とを行なった．

7日投与試験では妊娠マウスをAからEまでの5群に26-30匹を無作為に割り当て，A群は BHT 8.0% 油溶液（800mg/kg/day）投与，B群 2.4% 液（240mg）投与，C群 0.7%液（70mg）投与，D群オリーブ油のみ（10ml/kg/day）投与，E群は無処置とした．

1日投与試験では妊娠マウスを無作為にFからHまでの3群に19-20匹を割り当て，F群は BHT 18% 油溶液（1.8g/kg/day）投与，G群 12%液（1.2g）投与，H群は無処置とした．

体重測定および一般状態の観察を毎日行ない，妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し，次の検索を行なった．

屠殺後直ちに開腹，子宮を開き着床痕，吸収胚，死亡胎児，生児数を数え，生児は体重測定，性の判別を行ない外表の異常を点検，次に母体の卵巣の黄体数を数え，重要器官の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した．

5つの母体を無作為に選び，その生児をブアン液で固定し内臓異常の有無を観察[6]，残る母体の生児は95%エチルアルコールで固定後アリザリンレッドSで骨格染色[7]を行ない骨格異常の有無をしらべた．

7. 結果のまとめ方 西村の報告[8]に準拠して行なった．

試験結果

I 7日投与試験

1. 母体の所見 1) 体重および一般症状の推移：妊

* 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

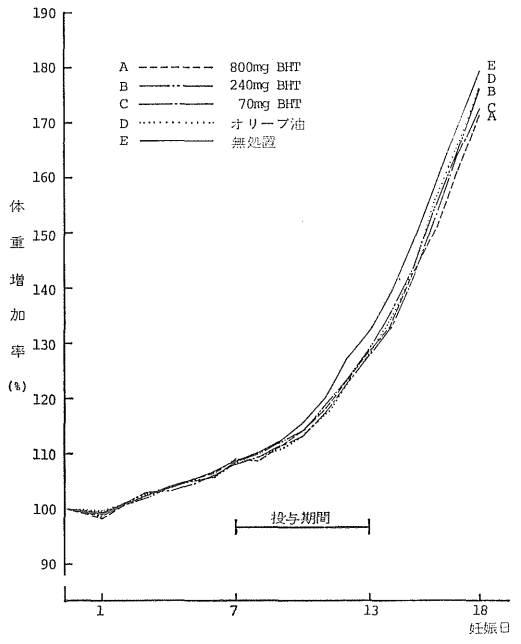


図 1. 臨界期日投与試験
(妊娠7-13日, 7回投与)

娠0日の体重を100とした体重の推移は図1に示す通りで，無処置のE群に較べA，B，C，D群では投与開始後やや抑制がみられるようであるが，BHT 用量との関連なくオリーブ油のみ投与のD群と全く同じ推移を示した．一般状態においては各群間に特記すべき差異を認めなかったが，D群の1例は投与の失敗により妊娠14日に死亡した．

2) 剖検所見および器官重量：妊娠の成立を確認したマウスの解剖所見では特記する変化を認めなかった．器官重量は表1に示す通りで，BHT 最高用量のA群において無処置のE群と較べ脾臓重量が有意に重く，腎臓重量が有意に軽かった．その他では有意な，また用量相関のうかがえる変動はなかった．

2. 胎児に係る所見 1) 妊娠の成立：D群における途中死亡の1例を除き，妊娠18日の屠殺開腹時に妊娠(着床)成立を確認した母体はA群 24/26 (92.3%)，B群 23/26 (88.5%)，C群 26/26 (100%)，D群 24/25 (96%)，E群 29/30 (96.7%) で，群間に有意差なく，妊娠の成立した母体のすべてに生児を認めた(表2)．

2) 妊娠黄体数，着床痕数，生児数，死亡児頻度(早期・後期)および性比：いずれも各群間に有意と認められる多少高低の差はなかった(表2)．

3) 生児体重：無処置のE群に対しB群およびD群の雄が有意に大きく，オリーブ油のみ投与のD群に対してA群およびC群の雄が有意に小さかった．しかし，用量に伴う大小の一定傾向は認められなかった(表2)．

4) 生児外表奇形・異常：A群口蓋裂2(母体数2)，開眼3(3)，曲尾2(2)；B群口蓋裂1(1)，開眼2(2)，反足1(1)；C群口蓋裂1(1)，開眼1(1)，多指1(1)，短尾1(1)，曲尾2(2)；D群口蓋裂4(2)，開眼5(5)，外脳1(1)；E群口蓋裂2(2)，開眼4(4)，外脳1(1)，多指1(1)，曲尾1(1)，反足1(1)が認められた(表3)．表中に示した頻度(%)は各母体単位での数値を平均して群の値としたものであるが，1匹の胎児に2種以上の奇形を併発したものは1として数えた．対照であるD群，E群に対しBHT投与のA，B，C群のいずれにおいても奇形・異常の発生数に推計学的有意性なく，発生した奇形に特異性も認められなかった．

5) 骨格奇形・異常：奇形としては胸椎および肋骨の癒着がD群の1例に認められたのみであった．

変異を有するものの出現頻度では，対照であるD群，E群に較べA群で過剰胸骨核が低く，頸肋が高く，無処置対照のE群に対してB群の胸骨核不相称および腰肋が低く頸肋が高かった．またオリーブ油のみ投与のD群の頸肋が無処置のE群に比し有意に高かった．なお，その他の骨格異常としてD群に胸椎核および腰椎体の形成不全を夫々1例認めたが，これは骨格奇形のみられた胎児と同一個体であった(表4)．

化骨進行度では有意な変動は認められなかった(表4)．

6) 内部器官異常：全群に異常を認めなかった．

II 1日投与試験

1. 母体の所見 1) 体重および一般症状の推移：妊娠0日の体重を100とした各群妊娠成立マウスの平均体重の推移は図2に示す通りで，無処置のH群に較べF群，G群はBHT投与前より体重増加率はやや低かったが，投与2日後より有意な体重増加の抑制がみられた．しかし，F群とG群との体重増加の推移に差は認められなかった．F群では妊娠11日に3匹，14日，15日に夫々1匹計5匹(25%)が，G群では妊娠11日と15日に夫々1匹計2匹(10%)が死亡した(BHT 1,800mg/kg：25%，1,200mg/kg：10%，670mg/kg：0%の死亡率にもとづき，妊娠9日のマウスにおける1回経口投与によるBHTの LD_{50} 値をprobit法により求めると 2,600 mg/kg となる)．

2) 剖検所見および器官重量：妊娠18日に妊娠成立を確認した母体の解剖所見ではG群の1例の子宮が小さかったほかは特記する所見はなかった．器官重量は表5に

表 1. 臨界期7日投与試験，妊娠18日母体器官重量

群 投与量	母体数	肝臓 g g/100g	心臓 mg mg/100g	脾臓 mg mg/100g	腎臓（左） mg mg/100g	腎臓（右） mg mg/100g
A BHT800mg/kg	24	3.1±0.39[1)] 10.1±1.11[2)]	134.9±12.1 445.0±33.0	171.6±30.5** 566.4±99.1**	229.2±27.4 755.6±77.2*	227.3±21.3* 750.1±64.3*
B BHT240mg/kg	23	2.9±0.30 9.5±0.83	132.5±8.8 442.9±32.2	141.3±21.4 471.2±66.7	237.5±34.6 790.5±87.8	248.1±33.9 825.5±81.4
C BHT 70mg/kg	26	2.8±0.24 9.3±0.68	132.8±11.9 441.1±35.0	149.8±46.2 496.1±137.6	237.4±39.3 786.1±106.3	244.9±52.1 811.5±158.8
D オリーブ油	24	2.8±0.29 9.2±0.88	139.2±14.2 453.2±38.4	149.6±22.0 487.2±69.2	249.0±30.1 811.9±97.0	254.5±34.0 829.1±106.2
E 無処置	29	2.9±0.15 9.6±0.88	135.4±14.1 453.7±35.1	140.9±33.0 469.1±85.5	244.8±39.0 819.0±107.5	248.0±32.2 831.8±100.2

群 投与量	母体数	肺 mg mg/100g	副腎（左） mg mg/100g	副腎（右） mg mg/100g	卵巣（左） mg mg/100g	卵巣（右） mg mg/100g
A BHT800mg/kg	24	186.2±21.4 613.1±52.7	4.4±1.08 14.7±3.78	4.3±1.14 14.2±3.79	11.1±2.42 36.7±7.39	11.1±2.17 36.6±6.85
B BHT240mg/kg	23	185.1±18.7 617.1±46.1	4.2±0.79 13.9±2.88	3.9±0.92 12.9±3.20	10.2±2.39 33.8±7.07	12.2±2.81 40.5±8.70
C BHT 70mg/kg	26	181.6±18.8 603.7±59.0	3.8±0.58 12.6±1.78	3.6±0.68 11.9±2.14	10.3±2.70 34.1±7.43	10.9±1.86 36.2±5.73
D オリーブ油	24	189.9±24.7 618.6±74.7	4.1±0.80 13.5±2.72	3.9±0.80 12.8±2.39	11.0±2.37 35.7±6.00	12.1±2.57 39.1±7.47
E 無処置	29	186.1±25.3 623.3±71.7	4.1±0.91 13.6±2.90	3.8±1.02 12.6±3.20	10.9±3.64 36.1±10.40	11.1±2.76 37.1±8.64

1) 絶対重量平均±SD　2) 妊娠0日体重100gに対する重量平均±SD
* E群と比較してp<0.05, **p<0.01

示す通りで，H群と比較してF群では脾臓および肺が絶対重量で重く，左卵巣が体重（妊娠0日）比重量で軽く，G群では肺が絶対重量で重く，肝臓，心臓，右腎臓が体重比重量で軽かった．しかし，絶対重量，体重比重量の用量との関連および左右器官重量の比較において総合判断し，一定の変化とみられるのは肺重量と1,800 mg/kg 群の脾臓重量の増加であった．

2. 胎児に係る所見 1) 妊娠の成立：F群5例，G群2例の途中死亡マウスを除き，妊娠18日の開腹時妊娠を確認した母体数はF群 15/15 (100%)，G群 15/18 (83.3%)，H群 19/19 (100%) であった．G群の1母体に胎児全例の早期死亡を認めたほかはいずれの母体にも生児がみられた．すなわち，生児の認められた母体数はF群15，G群14，H群19である（表6）．

2) 妊娠黄体数，着床痕数，死亡児頻度，生児数，性比，生児体重：表6に示すようで，いずれも群間に有意差なく，用量関連も認められなかった．

3) 生児外表奇形・異常：F群口蓋裂3（母体数3），開眼6（4）；G群口蓋裂8（2），開眼2（2）；H群口蓋裂2（2），開眼6（4）；短尾1（1），肛門閉鎖1（1），外脳1（1）で，出血，四肢方向異常，曲尾等のその他の異常は各群において認めなかった．奇形児頻度はF群3.1%，G群 7.1%，H群 4.3% となり，その頻度に有意差を認めなかった（表7）．

4) 生児内部器官の奇形・異常：各群に奇形・異常を検出しなかった（表7）．

5) 生児骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形はF群で頸椎癒着3，肋骨癒着1，G群で0，H群で肋骨癒着1

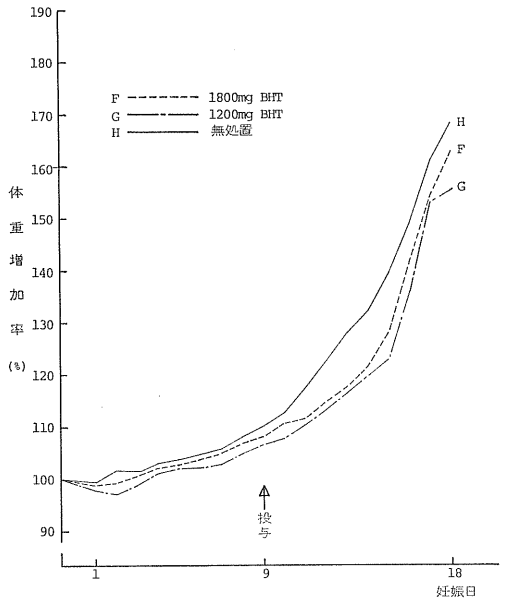


図 2. 臨界期1日投与試験
(妊娠9日1回投与)

がみられ，発生頻度は 3.8±5.2%，0%，0.7±2.6% で群間に有意差を認めなかった．変異では第1第2頸椎弓の分裂・分岐の出現頻度がF，G群とも対照H群に比して低く推計学的に有意であった．化骨進行度では対照H群に対しG群では各観察指標で有意な遅延が認められ，高濃度 BHT 投与のF群でも遅延の傾向がみられたが，腰椎後椎骨の化骨数のみが有意に少なく，用量と化骨遅延の関連は明らかでなかった．

総括と考按

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の妊娠マウス母体および胎児におよぼす影響，特に催奇形作用の有無を臨界期大量経口投与により試験した．試験は，妊娠7日から13日までの7日間毎日1回投与（7日投与試験）と妊娠9日1回投与（1日投与試験）とにより，母体体重の推移と妊娠18日の母体，胎児の異常を検索した．投与量は7日投与試験では母体体重増加に影響しない最高用量と考えられる 800mg/kg/day と 240mg および 70mg/kg/day とし，1日投与試験では致死量に近いと考えられる 1,800mg および 1,200mg/kg とした．

7日投与試験では，母体の体重増加，一般状態，妊娠18日の肉眼的解剖所見に異常なく，器官重量において 800mg/kg 群の脾臓が重く，腎臓が軽かった以外対照群と比較して有意な変動はなかった．胎児に係る所見で，平均着床数，死亡児発生頻度，平均生児数，胎児の性比に有意な変動なく，生児体重では雄に有意に軽い群があったが BHT 用量との関連がみられず，特に意味ある変

表 2. 臨界期7日投与試験

群 (BHT mg/kg)	a) 交尾成立雌数	b) 死亡雌数	c) 妊娠成立雌数 (%)	d) 生れた児の認められた母体数	生児を認められた母体の観察								
					e) 平均妊娠黄体数 ±SD	f) 平均着床痕数 ±SD	死亡児頻度±SD g) (%) 合計	早期1)	後期2)	h) 平均生児数 ±SD	i) 性比* ♂/♀×100 ±SD	平均生児体重 j) ±SD ♂	♀
A (800)	26	0	24 (92.3)	24	13.1 ±3.6	11.3 ±2.7	6.3 ±5.7	4.6 ±5.5	1.7 ±4.3	10.6 ±2.7	141.7 ±106.4	1.30△△△ ±0.12	1.22 ±0.13
B (240)	26	0	23 (88.5)	23	12.5 ±1.7	11.6 ±1.6	5.0 ±6.6	4.3 ±6.7	0.7 ±2.4	11.0 ±1.8	104.6 ±63.2	1.34° ±0.10	1.26 ±0.11
C (70)	26	0	26 (100)	26	12.7 ±1.9	11.7 ±2.4	7.9 ±9.6	6.4 ±9.3	1.5 ±3.6	10.9 ±2.7	116.0 ±66.8	1.28△△△ ±0.12	1.22 ±0.11
D (オリーブ)	26	1 投与ミス	24 (96.0)	24	12.9 ±1.8	12.0 ±2.0	6.8 ±9.9	5.2 ±8.6	1.6 ±4.4	11.2 ±2.4	174.9 ±213.5	1.34° ±0.09	1.24 ±0.10
E (無処置)	30	0	29 (96.7)	29	12.0 ±2.0	11.5 ±1.9	6.6 ±6.6	5.0 ±6.3	1.6 ±3.6	10.8 ±2.1	140.6 ±112.6	1.31 ±0.14	1.24 ±0.10

a) 膣栓を確認したもの　b) 交尾後屠殺までに死亡したもの　c) 検索の際，着床のあとが認められるもの
d) 1匹以上の生児を有した母体の数　e)-j) 生児の認められた母体d)について算出する
g)1) 着床痕および無定形の胚塊の認められるもの　g)2) 頭部・四肢の認められるもの
* 各母体単位での数値を平均して群の値とする
(統計) a)-d)：χ^2検定　e)f)：t検定　g)：順位和検定　h)：t検定　i)：順位和検定　j)：t検定
E群と比較して　°$p<0.05$,　D群と比較して　△△△$p<0.001$

表3. 臨界期7日投与試験

群 (BHTmg/kg)	外表観察 奇形児[a] 頻度(%)±SD*	各型とその数	その他の異常を示した児[b] 頻度(%)±SD*	各型とその数	内部器官の観察 奇形児[c] 頻度(%)±SD*	各型とその数	その他の異常を示した児[d] 頻度(%)±SD*	各型とその数
A (800)	1.8±3.6	口蓋裂：2 開眼：3	0.94±3.3	曲尾：2	0		0	
B (240)	1.1±2.3	口蓋裂：1 開眼：2	0.40±1.9	反足：1	0		0	
C (70)	1.4±3.7	口蓋裂：1 開眼：1 多指：1 短尾：1	0.70±2.5	曲尾：2	0		0	
D (オリーブ)	3.3±6.6	口蓋裂：4 開眼：5 外脳：1	0		0		0	
E (無処置)	2.2±4.1	口蓋裂：2 開眼：4 多指：1 外脳：1	0.5±1.9	曲尾：1 反足：1	0		0	

* 各母体単位での数値を平均して群の値とする　b) 尾・四肢等の方向異常，血腫，浮腫，その他の病変
d) 腎盂の拡大，精巣の下降不全，左臍動脈，体腔その他における出血など
(統計)　a)b)c)d)：順位和検定

表4. 臨界期7日投与試験

群 (BHT mg/kg)	観察胎児数	骨格観察 奇形児[a] 頻度(%)±SD	型とその数	変異を有する児の頻度±SD)%)* 前頭間骨[b]	胸骨核不相称[c]	過剰胸骨核[d]	頸肋[e]	腰肋[f]	第一、第二頸椎分岐弓の分裂・癒合[g]	仙椎前異常椎骨数[h]	椎体の縮小・分裂[i]	胸椎体形成不全・腰椎[j]	化骨進行度±SD* 前肢指骨平均 化骨数(基節骨+中節骨)[k]	後肢趾骨平均 化骨数(基節骨+中節骨)[l]	腰椎平均後化骨数[m]
A (800)	184	0		0.6 ±2.5	9.9 ±13.3	1.4 ±3.0 △△○○	11.1 ±10.2 △○○○	34.2 ±32.1	17.0 ±18.4	0.5 ±1.8	0	0	左 2.4±1.22 右 2.5±1.21	2.0±1.15 2.0±1.14	11.8 ±2.6
B (240)	157	0		0	3.3 ±7.0 ○	10.4 ±13.8	3.0 ±4.5 ○	34.6 ±23.2 ○	29.1 ±18.2	1.1 ±3.0	0	0	左 2.7±1.25 右 2.8±1.26	2.5±1.09 2.6±1.10	13.2 ±2.5
C (70)	164	0		0	11.0 ±12.2	15.5 ±15.3	0.5 ±2.1	47.3 ±30.5	25.2 ±18.8	0	0	0	左 2.6±1.21 右 2.7±1.24	2.2±1.17 2.3±1.15	12.3 ±2.4
D (オリーブ)	188	0.4 ±1.8	胸椎癒着：1 肋骨癒着：1 (同一胎児)	0.7 ±2.8	8.0 ±9.1	12.6 ±14.4	4.3 ±7.6 ○	44.1 ±26.2	21.8 ±14.9	0.5 ±1.9	0	0.4 ±1.8	左 2.6±1.22 右 2.6±1.18	2.2±1.15 2.2±1.16	12.4 ±1.8
E (無処置)	256	0		1.1 ±3.0	8.5 ±8.6	11.1 ±11.9	1.1 ±5.2	51.1 ±23.9	25.2 ±17.0	0	0	0	左 2.5±1.12 右 2.6±1.20	2.3±1.11 2.3±1.10	12.5 ±2.3

c) 最長胸骨核で左右の核の間にその長さの½以上のずれのあるもの
f) 腰肋の定義はKimmel and Wilson (Teratology, 8, 309—316, 1973) に従う
h) 頸椎数＋胸椎数＋腰椎数の合計に異常のあるもの　　m) 化骨した仙椎数＋尾椎数の合計
* 各母体単位での数値を平均して群の値とする
(統計)　a)-j)：順位和検定　　k)-m)：t検定
E群と比較して ○ $p<0.05$, ○○ $p<0.01$, ○○○ $p<0.001$　　D群と比較して △ $p<0.05$, △△ $p<0.01$

表5. 臨界期1日投与試験，妊娠18日母体器官重量

群 投与量	母体数	肝臓 g g/100g	心臓 mg mg/100g	脾臓 mg mg/100g	腎臓（左） mg mg/100g	腎臓（右） mg mg/100g
F BHT1, 800mg/kg	15	2.7±0.29[1] 8.2±0.92[2]	131.2±10.5 398.7±47.5	156.4±68.9* 474.6±214.5	213.9±25.5 647.2±70.1	218.8±23.0 665.0±85.1
G BHT1, 200mg/kg	15	2.5±0.35 7.8±1.14*	123.2±8.6 385.0±25.0**	119.4±23.2 372.8±70.4	205.5±18.3 641.1±39.7	205.6±25.5 641.8±71.4**
H 無処置	19	2.6±0.20 8.5±0.72	125.6±11.8 415.0±32.9	120.5±22.2 399.0±75.8	204.4±17.7 676.2±58.2	214.4±20.5 710.0±73.1

群 投与量	母体数	肺 mg mg/100g	副腎（左） mg mg/100g	副腎（右） mg mg/100g	卵巣（左） mg mg/100g	卵巣（右） mg mg/100g
F BHT1, 800mg/kg	15	199.1±42.5** 604.9±138.7	3.3±0.70 10.0±1.98	3.1±0.74 9.4±2.19	8.0±2.05 24.2±5.95**	10.3±1.78 31.2±5.88
G BHT1, 200mg/kg	15	193.2±48.4* 603.6±147.4	3.5±0.49 10.9±2.03	3.1±0.64 9.9±2.29	8.9±2.31 27.8±7.71	9.2±2.78 28.8±8.76
H 無処置	19	160.7±21.9 532.2±75.0	3.3±0.70 10.7±1.86	3.1±0.82 10.0±2.24	9.2±2.09 30.2±6.43	9.1±1.92 29.9±6.47

1) 絶対重量平均±SD　2) 妊娠0日体重100gに対する重量平均±SD
* H群と比較して $p<0.05$, ** $p<0.01$

表6. 臨界期1日投与試験

群 (BHT mg/kg)	a) 交尾成立雌数	b) 死亡雌数	c) 妊娠雌成立数(%)	d) 生ら数児れのた認母め体(%)	生児を認められた母体の観察 e) 平均妊娠黄体数±SD	f) 平均着床痕数±SD	死亡児頻度±SD g)(%) 合計	早期[1]	後期[2]	h) 平均生児数±SD	i) 性比* ♂/♀×100±SD	平均生児体重 j)±SD ♂	♀
F (1,800)	20	5	15 (100)	15 (100)	12.4 ±2.1	12.1 ±2.1	10.2 ±7.1	4.8 ±4.7	5.5 ±7.2	10.8 ±1.8	124.6 ±0.14	1.21 ±0.14	1.12 ±0.12
G (1,200)	20	2	15 (83.3)	14 (93.3)	12.5 ±2.4	10.9 ±2.5	16.0 ±25.8	10.0 ±26.0	6.0 ±10.4	9.5 ±3.5	156.5 ±222.6	1.12 ±0.19	1.11 ±0.16
H (無処置)	19	0	19 (100)	19 (100)	13.0 ±2.2	11.1 ±3.0	11.4 ±14.4	8.8 ±10.2	2.3 ±5.6	10.0 ±3.4	130.8 ±73.9	1.25 ±0.11	1.19 ±0.11

a) 膣栓を確認したもの　b) 交尾後屠殺までに死亡したもの　c) 検索の際，着床のあとが認められるもの
d) 匹以上の生児を有した母体の数　e)-j) 生児の認められた母体d)について算出する
g)[1] 1着床痕および無定形の胚塊の認められるもの　g[2] 頭部・四肢の認められるもの
* 各母体単位での数値を平均して群の値とする
(統計) a)-d)：X^2検定　e)f)：t検定　g)：順位和検定　h)：t検定　i)：順位和検定　j)：t検定

表7. 臨界期1日投与試験

群 (BHTmg/kg)	外表観察 奇形児[a] 頻度(%) ±SD*	奇形児 各型とその数	その他の異常を示した児[b] 頻度(%) ±SD*	その他の異常を示した児 各型とその数	内部器官の観察 奇形児[c] 頻度(%) ±SD*	奇形児 各型とその数	その他の異常を示した児[d] 頻度(%) ±SD*	その他の異常を示した児 各型とその数
F (1,800)	3.1±6.3	口蓋裂：3 開眼：2	0		0		0	
G (1,200)	7.1±15.4	口蓋裂：8 開眼：2	0		0		0	
H (無処置)	4.3±6.4	口蓋裂：2 開眼：6 短尾：1 外脳：1 肛門閉鎖：1	0		0		0	

* 各母体単位での数値を平均して群の値とする　　b) 尾・四肢等の方向異常，血腫，浮腫，その他の病変
d) 腎盂の拡大，精巣の下降不全，左臍動脈，体腔その他における出血など
(統計) a)b)c)d)：順位和検定

表8. 臨界期1日投与試験

群 (BHT mg/kg)	観察胎児数	骨格観察 奇形児[a] 頻度(%)* ±SD	奇形児 型とその数	変更を有する児の頻度±SD(%)* 前頭間骨[b]	胸骨核不相称[c]	過剰胸骨核[d]	頸肋[e]	腰肋[f]	第一頸・第一胸椎弓の分岐・分裂[g]	異常仙椎前椎骨数[h]	分裂椎体の縮小[i]	体形成不全・腰椎胸椎[j]	化骨進行度±SD* 前肢指骨平均 化骨数(基節骨+中節骨)[k]	後肢趾骨平均 化骨数(基節骨+中節骨)[l]	腰椎平均後化骨数[m]
F (1,800)	106	3.8 ±5.2	頸椎癒着：3 肋骨癒着：1	0	11.5 ±9.8	5.1 ±11.8	3.6 ±4.8	29.1 ±23.7	13.1 ±11.3°°	0	0	0	左 2.3±0.97 右 2.4±0.98	1.7±1.17 1.8±1.14	10.7° ±1.8
G (1,200)	104	0		0	8.7 ±7.2	3.8 ±6.8	5.1 ±13.1	32.0 ±16.9	14.9° ±13.7	0	0	0	左 1.8±1.11°° 右 1.9±1.10°	1.4±1.36° 1.4±1.37	10.3° ±2.5
H (無処置)	137	0.7 ±2.6	肋骨癒着：1	0	7.7 ±10.4	11.9 ±20.0	4.3 ±8.2	43.7 ±32.7	33.8 ±20.2	0	0	0	左 2.5±0.75 右 2.5±0.81	2.3±0.99 2.4±0.94	12.1 ±1.5

c) 最長胸骨核で左右の核の間にその長さの½以上のずれのあるもの
f) 腰肋の定義は，Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309—316, 1973) に従う
h) 頸椎数＋胸椎数＋腰椎数の合計に異常のあるもの　　m) 化骨した仙椎数＋尾椎数の合計
* 各母体単位での数値を平均して群の値とする
(統計) a)-j)：順位和検定　　k)-m)：t 検定
H群と比較して ° $p<0.05$, °° $p<0.01$

動とは考えられなかった．胎児の外表奇形・異常には特異的なものはなく口蓋裂，開眼，多指等が対照群を含めて少数例にみられた．骨格では奇形はみられず，変異の出現頻度で800mg/kg群の過剰胸骨核が1.4%で有意に低く，頸肋が11.1%で有意に高かった．この出現頻度は当部での背景データよりみて特に意味ある変動とは考えられず，化骨進行度は群間に大差を認めなかった．内部器官については全群とも変化をみなかった．

1日投与試験では，1,800mg/kg群，1,200mg/kg群ともに母体の体重増加抑制が認められ，死亡が1,800mg/kg群で25%（5/20）に，1,200mg/kg群で10%（2/20）にみられ，妊娠18日の器官重量では1,800mg/kg群の脾臓と肺の増加，1,200mg/kg群の肺の増加が認められた．1,200mg/kg群の生存母体の1例に全胎児の早期死亡がみられた．生児については骨格の変異発生頻度に有意な低下をみたもの，また化骨進行に有意な遅延をみたものもあったが，外表，内部器官および骨格における奇形発生頻度に有意とみられるものはなかった．1,200mg/kg群母体の1例にみられた全胎児早期死亡は，同群の他の母体，1,800mg/kg群の母体で死児の増加傾向を全く認めなかったこと，交配に用いた雄は以前の数回の交配で，いずれの母体の胎児にも異常のなかったことより，BHTや雄の影響によるものではなく母体側の遺伝的あるいはその他の要因によるものと考えられる．当部で，ウレタンを臨界期に単一投与した場合，妊娠9日の投与で最も多彩な奇形・異常を高頻度に誘発することを観察している．また，本試験および予備試験よりBHTの経口一回投与による妊娠9日マウス（JCL-ICR）におけるLD_{50}（probit法による）は，2,800mg/kgと推定され，1,800mg/kgはLD_{25}値に相当することがわかった．すなわち，催奇形作用に対し感受性が高いと考えられる妊娠9日にLD_{25}相当の大量を投与して胎児に化骨進行の遅延はあったが奇形の誘発を認めなかった．田中らは妊娠ラットに経口投与した^{3}H-BHTは胎盤関門を容易に通過して胎児に移行すると述べている．マウスにおいても同様と考えられるが，以上2つの試験結果からBHTはマウスに対し催奇形作用はないと判断した．

要　旨

抗酸化剤ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)のJCL-ICRマウスにおける催奇形作用を臨界期経口投与により試験した．

妊娠7日から13日までの7日間投与には，800mg，240mgおよび70mg/kg/dayを，妊娠9日1回投与には1,800mg/kg（LD_{25}相当量）および1,200mg/kgを用い，特に妊娠18日の胎児について外表・骨格・内部器官の奇形・異常を検索した．

母体の体重増加抑制，器官重量の増減，胎児の化骨進行の遅延等を認めたがBHTの催奇形作用を示す所見は得られなかった．

文　献

1) Brown, W. D., A. R. Johnson, and M. W. alloran : *Aust. J. exp. Biol.*, 37, 533, 1959
2) Johon, A. R. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 371, 1965
3) Clegg, D. J. : *ibid.*, 3, 387, 1965
4) Frawley, J. P., F. E. Kohn, J. H. Kay, and J. C. Calandra : *ibid.*, 3, 377, 1965
5) 田中　悟，小野田欽一，川島邦夫，中浦慎介，長尾重之，桑村司，大森義仁：日本食品衛生学会第31回学術講演会，1976，東京
6) Wilson, J. G. : *Principles and Techniques*; Teratology ed. by Wilson, et al., 262, 1964, Univ. of Chicago Press, Chicago
7) Dawson, A. B. : *Stain Tech.*, 1, 123, 1927
8) 西村秀雄：先天異常，16，175，1976
9) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 53-55, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）とその代謝物質の微生物系における突然変異誘起性について

藤田　博*，小嶋昭江*，平賀興吾*

Mutagenicity of Butylated Hydroxytoluene (BHT) and its Metabolites in the Microbial System

HIROSHI FUJITA*, AKIE KOJIMA* and KOGO HIRAGA*

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は，食品，プラスチック容器等の酸化防止剤として使用されており，その安全性に関心がもたれている．当部においても様々な角度から安全性の検討がなされてきた[1-3]．

BHT の遺伝毒性については，培養細胞の染色体異常の誘発[4]，ショウジョウバエの γ 線による劣性致死突然変異の増感[5] の報告がある．一方，サルモネラでの mutation test では代謝活性化を行なっても突然変異誘起性は見られないという[6]．従って，微生物系でのBHTの突然変異誘起性については，さらに検討する必要があろう．その一つの試みとしてBHTの代謝物質の突然変異誘起性について検討を加えた．

BHT の代謝物質は，Daniel[7]，Ladomery[8] により数種類存在することが報告されているが，その内，試薬として市販されている化合物3種類とBHTについて，枯草菌での repair test (rec assay) およびサルモネラでの mutation test により検索したので報告する．

実験材料および実験方法

菌株　a) *Bacillus subtilis* H17A，M45T 株[9]．

b) *Salmonella typhimurium* TA98，TA100株[10]．なお，これらの株の性質のうち，deep rough をクリスタルバイオレット感受性により，R因子をアンピシリン抵抗性により確認した[11]．

試料　3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT，和光純薬)，3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol (BHT-alcohol，シェル化学)，3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-aldehyde，Aldrich Chemical)，3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acid，Aldrich Chemical)．溶媒はジメチルスルホキサイドを用いた．

陽性コントロールとして，アセチルアミノフルオレン (AAF)，ベンツ(a)ピレン (BP)，フリルフラマイド (AF-2) を用いた．

試薬　肉エキス（極東薬品），ポリペプトン（大五栄養），寒天 (Difco)，ヒスチジン，ビオチン（以上，和光純薬），G-6-P，G-6-PD，NADPH（以上，オリエンタル酵母），フェノバルビタール (PB，吉田製薬)，アロクロール1254 (PCB，三菱モンサント化成)．ジメチルスルホキサイド（和光純薬）．

培地　1)　ブロス寒天培地：肉エキス 0.5%，ポリペプトン1%，塩化ナトリウム 0.5%，寒天 1.5%，pH 7.0．

2)　最少寒天培地：硫酸アンモニウム 0.1%，リン酸二水素カリウム1%，硫酸マグネシウム 0.01%，クエン酸ナトリウム0.05%，寒天 1.5%，グルコース2%，pH 7.0．

3)　軟寒天：塩化ナトリウム 0.5%，寒天0.7% 溶液に，0.5mM ヒスチジン—0.5mM ビオチン溶液を 1/10 量加えた．

枯草菌による repair test　賀田の改良された rec assay により行なった[9]．

サルモネラによる mutation test　代謝活性化のための S9 は，PB および PCB により薬物代謝酵素系を誘導したものを用いた．JCL-Wistar ラット雄（平均体重 210 g）に，PB (0.1%) は7日間飲水として与え，PCB はコーンオイルに溶かし肝臓摘出の5日前に 500 mg/kg を腹腔投与した．S9 の分離は前報[12]によった．mutation test の方法は，Ames の方法[13] を一部変えて行なった．

小試験管に 0.1m*l* の試料溶液を取り，これに 0.5m*l* の S9-Mix[11,13] (PB-S9 150μl 又は PCB-S9 50μl，塩化マグネシウム 4μmole，塩化カリウム 16.5μmole，G-6-P 2.5μmole，G-6-PD 0.25 単位，NADPH 2μmole，リン酸緩衝液 (pH 7.4) 50μmole) を加えた．

* 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

また，代謝活性化しない場合には，0.5m*l* のリン酸緩衝液（0.25M，pH 7.4）を加えた，これに TA98，TA 100 の一夜培養液 0.1m*l* を加え，30分間，37°C でインキュベートした．このインキュベーション溶液に，45°C に保温した軟寒天 2m*l* を加え，十分に混合した後，最少寒天培地に重層した．このプレートを 37°C で2日間培養し，生じた復帰コロニーを計数した．

陽性コントロールとして，PB-S9 の場合 AAF を，PCB-S9 の場合 BP を，活性化しない場合 AF-2 を用いた．

結果および考察

rec assay の結果（表1）について見ると，BHT，BHT-alcohol，BHT-aldehyde は，H17A，M45T 株に対して全く生育阻止を示さなかった．しかしこれらの化合物の培地中への拡散を検出できなかった[14]ことから，直ちに陰性であるとは言い難く，今後の検討を待ちたい．このような水に難溶の化合物について rec assay

表1. BHT とその代謝物質の枯草菌による rec assay

試料	mg/ろ紙	生育阻止帯	
		H17A	M45T
BHT	10	—	—
	1	—	—
	0.1	—	—
BHT-alcohol	10	—	—
	1	—	—
	0.1	—	—
BHT-aldehyde	10	—	—
	1	—	—
	0.1	—	—
BHT-acid	10	+	+
	1	+	+
	0.1	+	+
Control	0	—	—
AF-2	0.1[1)]	+	++

1) μg/ろ紙

表2. BHT とその代謝物質のサルモネラにおける mutation test

菌株	試料	S9	μg/プレート					陽性コントロール		
			0	1	10	100	1000	BP 5[2)]	AFF 10[2)]	AF-2 0.05[2)]
TA100	BHT	PCB-S9	204[1)]	242	224	226	137	1090	—	—
		PB-S9	202	223	215	219	169	—	5488	—
		—	239	219	228	216	192	209	219	1910
	BHT-alcohol	PCB-S9	204	204	242	222	204	1090	—	—
		PB-S9	202	223	195	243	179	—	5488	—
		—	239	254	262	251	133	209	219	1910
	BHT-aldehyde	PCB-S9	207	237	269	226	236	1140	—	—
		PB-S9	206	236	251	244	237	—	5096	—
		—	218	285	256	270	277	242	278	1070
	BHT-acid	PCB-S9	190	206	224	224	226	816	—	—
		PB-S9	213	255	217*	227	252	—	3584	—
		—	264	216	209	212	223	277	228	740
TA 98	BHT	PCB-S9	54	65	52	47	56	498	—	—
		PB-S9	55	42	52	43	51	—	7280	—
		—	33	35	32	33	35	47	30	490
	BHT-alcohol	PCB-S9	42	42	—	59	44	446	—	—
		PB-S9	36	39	36	34	24	—	11760	—
		—	25	26	25	28	27	29	25	398
	BHT-aldehyde	PCB-S9	42	50	46	54	47	446	—	—
		PB-S9	36	35	30	39*	35	—	11760	—
		—	25	25	19	30	25	29	25	398
	BHT-acid	PCB-S9	42	45	59	43	46	446	—	—
		PB-S9	36	44	39	42	49	—	11760	—
		—	25	30*	38	37	32	29	25	398

1) 復帰コロニー数/プレート（3枚の平均値　但し*は2枚の平均値）　2) μg/プレート

を行なう場合には，それぞれ寒天培地中への拡散について検討する必要があると考えられる．次に，BHT-acidは，両株に対して生育阻止を示した．しかし，その阻止帯は，両株ともろ紙付近では完全な生育が阻止されていたが，離れるに従って徐々に生育が見られ，陽性コントロールで見られたような明瞭な生育阻止を示さなかった．従って，生育阻止帯の測定は不可能であった．この様な不完全な阻止帯が見られる原因については明らかではなく今後検討する必要がある．

サルモネラでの mutation test の結果（表2）では，BHT は代謝活性化の有無にかかわらず復帰コロニー数に増加は見られず，突然変異誘起性は検出できなかった．これは，Litton Bionetics の報告[6]の結果と一致するものである．また，3種の代謝物質についても復帰コロニー数に増加が見られず，BHT 同様突然変異誘起性は検出できなかった．

BHT の代謝物質は，本実験で採り上げた3種以外にも存在する[7,8]ことから，今後 BHT 投与ラットの尿の突然変異誘起性についての検索も試みたい．

要　旨

BHT および代謝物質の突然変異誘起性について，枯草菌での repair test，サルモネラでの mutation test により検索した．

repair test では，BHT，BHT-alcohol，BHT-aldehyde は生育阻止が見られず，BHT-acid は，生育阻止が見られたが結論は得られなかった．mutation test の結果は4試料とも突然変異誘起性は検出できなかった．

文　献

1) 市川久次，小林博義，中川好男，長井二三子，厚井麻理，池田虎雄，矢野範男，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，1，1975
2) 藤井　孝，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，36，1975
3) 益淵正典，高橋昭夫，高橋　省，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，100，1976
4) Sciorra, L. J., B. N. Kaufmann, and R. Maier : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 12, 33, 1974
5) Prasad, O. and O. P. Kamra : *Int. J. Radiat. Biol.*, 25, 67, 1974
6) Litton Bionetics, Report : PB-245 487, 1975
7) Daniel, J. W., J. C. Gage, and D. I. Jones : *Biochem. J.*, 106, 783, 1968
8) Ladomery, L. G., A. J. Ryan, and S. E. Wright : *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 388, 1967
9) Kada, T., K. Tutikawa, and Y. Sadaie : *Mutation Res.*, 16, 165, 1972
10) McCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 979, 1975
11) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178，1975
12) 藤田　博，水尾昭江，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，153，1976
13) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281, 1973
14) 小嶋昭江‥未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 56-60, 1977

微生物系における酸化防止剤の突然変異誘起性試験

小嶋昭江*, 藤田 博*, 平賀興吾*

Mutagenicity Screening of Antioxidants in the Microbial System

AKIE KOJIMA*, HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

緒 言

最近，ポリプロピレン製食器より溶出する酸化防止剤について関心がもたれてきた．

これらの安全性研究の一環として，全国ポリオレフィン等衛生協議会より提出された所属各社製酸化防止剤，ジブチルヒドロキシトルエン(BHT) ほか8種20検体の突然変異誘起性について，枯草菌での repair test および大腸菌，サルモネラ菌での mutation test により検討した．サルモネラ菌による mutation test においては代謝活性化を併用した．

実験材料および実験方法

試料 BHT：3,5-di-*tert*-4-hydroxytoluene 6検体，Irg 1076：*n*-octadecyl-3-(4′-hydroxy-3′, 5′-di-*tert*-butylphenyl) propionate 1検体，Irg 1010：tetrakis-〔methylene-3-(3′, 5′-di-*tert*-butyl-4′-hydroxyphenyl) propionate〕methane 1検体，AntageW300：4,4′-butylidene-bis-(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) 3検体，Topanol CA：1, 1, 3-tris-(2-methyl-4-hydroxy-5-*tert*-butylphenyl) butane 1検体，DLTDP：dilauryl thiopropionate 4検体，DMTDP：dimyristyl thiopropionate 1検体，DSTDP：distearyl thiopropionate 3検体

菌株 1) 枯草菌(*Bacillus subtilis*) H17A(*rec*$^+$)，M45T(*rec*$^-$)[1]，2) 大腸菌 (*Escherichia coli*) B/r WP2 (*trp*$^-$, HCR$^-$)[1,2]，3) サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 (*his*G$^-$, *uvr*B$^-$, *rfa*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$)，TA98(*hisD*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$)[3,4,5] アンピシリン抵抗性によってR因子の存在を[4]，クリスタルバイオレット感受性によって deep rough を[6] 確認した．

試薬 肉エキス (極東薬品)，ポリペプトン (大五栄養)，寒天 (Bacto-Agar, Difco)，ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す，和光純薬吸収スペクトル用溶媒)，メチルエチルケトン (以下 MEK と略す．和光純薬特級)，アセトン (和光純薬特級)，AF-2 (上野製薬)，PCB (アロクロール1254，三菱モンサント化成)，フェノバルビタール (以下 PB と略す，吉田製薬)，ベンツ(a)ピレン (以下 BP と略す，和光純薬)，アセチルアミノフルオレン (以下AAFと略す，東京化成)，G6P (オリエンタル酵母)，G6PD (オリエンタル酵母)，NADPH (オリエンタル酵母)

培地 1) ブロス：肉エキス5g，ポリペプトン 10g，塩化ナトリウム5g，水酸化ナトリウム適量 (pH 7.0 に調整) を精製水に溶解して 1,000m*l* とした．

2) ブロス寒天培地：上記のブロス 1,000m*l* に 15g の寒天を加えた．3) 最少寒天培地：Ⅰ．硫酸アンモニウム1g，リン酸二水素カリウム10g，硫酸マグネシウム 0.1g，クエン酸ナトリウム 0.5g，水酸化カリウム 2.7g (pH 7.0 に調整)，精製水 150m*l*，Ⅱ．グルコース20g，精製水 250m*l*，Ⅲ．寒天 15g，精製水 600m*l* Ⅰ，Ⅱ，Ⅲを高圧滅菌後混合した．4) 軟寒天：塩化ナトリウム6g，寒天8gを精製水 1,000m*l* に溶解，高圧滅菌した．使用時にこれを加熱溶解し，1/10量の 0.5 mM-ヒスチジン 0.5mM ビオチン溶液を加えた．

枯草菌による repair test *Bacillus subtilis* H17A (*rec*$^+$)，M45T(*rec*$^-$) 株を用い，賀田の方法[1] によって rec assay を行った．両株のブロス培養液 (37° 18時間振とう培養) をブロス寒天プレート上に「ハ」の字状にストリークし，接点に 0.02m*l* の試料溶液を浸ませた直径8mm のろ紙 (薄型感受性ディスク) をおいた．このプレートを24時間冷蔵庫に放置後，一夜 37° で培養し，増殖阻止帯の長さを測定した．溶媒は試料の溶解性により DMSO，MEK，アセトンを用いた．陽性対照には AF-2 を使用した．

大腸菌による mutation test *E. coli* B/rWP2 (*trp*$^-$, HCR$^-$)[1,2] 株のブロス培養液を遠心し，等量の 1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に浮遊させ，その 0.9 m*l* を小試験管にとり，試料溶液 0.1m*l* を加え，37° 30分間インキュベートした．その0.1m*l* をブロス2%添加

* 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

の最少寒天培地に広げ，37° 2日間培養後，復帰体を計数した．またインキュベーション溶液の適当希釈液 0.1 m*l* をブロス寒天培地に広げ，生菌数を求めた．この復帰体数と生菌数から生菌数あたりの復帰体数を求めた．DSTDP を除く各試料は DMSO に溶解し，DSTDP は MEK に溶解後 DMSO で希釈した．各試料1検体について試験を行い，溶解性により最高を 5,000μg/m*l* から 100μg/m*l* とし，あるいは4段階量を用いた．陽性対照としては AF-2 を用いた．

サルモネラ菌を用いた mutation test *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 を用い，Ames の方法を一部変えて mutation test を行った[3,6]．代謝活性化には PCB および PB で薬剤代謝酵素誘導をしたラットの肝臓の S9 分画を用いた．

試料液 0.1m*l* を小試験管にとり，代謝活性化する場合には S9-Mix，しない場合にはリン酸緩衝液 0.5m*l*，TA100 または TA98 のブロス培養液 0.1m*l* を加え，37° 30分間インキュベートした．これに 45° に保温した軟寒天 2 m*l* を加え，最少寒天培地に重層し，2日間培養後復帰体数を数えた．試料の溶媒は大腸菌の場合と同じで，用量は最高を 1,000μg あるいは 100μg/プレートとし，3あるいは4段階とした．なおプレートは各濃度3枚ずつとした．代謝活性化しない場合の陽性対照としては AF-2 を，PCB-S9 代謝活性化の場合は BP を，PB-S9 代謝活性化の場合は AAF を用いた．

肝ホモジネート (S9)，S9-Mix の調整[6] PCB または PB を JCL-Wistar ラット（雄，4—6週令）に投与し，S9 を調整した．PCB はコーンオイル溶液として 500mg/kg を5日前に腹腔内に投与し，PB は 0.1%水溶液を7日間飲水として与えた．投与ラットは断頭屠殺後，肝臓を摘出し0.15M塩化カリウムで灌流した．この肝臓1gあたり3m*l* の 0.15M塩化カリウムを加え細切後ホモジナイズした．これを 9,000×g 10分間遠心して上清を分離（S9 分画）し，ドライアイス-アセトンで凍結後−80° にて保存した．凍結した S9 は用時解凍し，NADPH 系を加えて S9-Mix を調整した．S9-Mix は 1m*l* あたり S9 100μ*l* (PCB-S9) または 300μ*l* (PB-S9)，塩化マグネシウム 8 μmole，塩化カリウム33μmole，G6P 5 μmole，G6PD 0.5単位，NADPH 4 μmole，リン酸緩衝液 (0.25M, pH 7.4) 100μmole に調整した．

結果と考察

repair test 溶媒は，BHT，Irg 1076，Irg 1010，AntageW300 および TopanolCA に DMSO を，DLTDP，DMTDP にアセトンを，DSTDP に MEK

表1. rec assay

試料（溶媒）	検体番号	用量 mg/ろ紙	増殖阻止帯(mm) H17A (*rec*$^+$)	M45T (*rec*$^-$)
BHT(DMSO)	1	10	0	0
		1	0	0
	2	10	0	0
		1	0	0
	3	10	0	0
		1	0	0
	4	10	0	0
		1	0	0
	5	10	0	0
		1	0	0
	6	10	0	0
		1	0	0
Irg1076(DMSO)	7	5	0	0
		0.5	0	0
Irg1010(DMSO)	8	5	0	0
		0.5	0	0
AntageW300(DMSO)	9	5	<1	<1
		0.5	<1	<1
	10	5	<1	<1
		0.5	<1	<1
	11	5	<1	<1
		0.5	<1	<1
TopanolCA(DMSO)	12	5	0	0
		0.5	0	0
DLTDP(Acetone)	13	10	0	0
		1	0	0
	14	10	0	0
		1	0	0
	15	10	0	0
		1	0	0
	16	10	0	0
		1	0	0
DMTDP(Acetone)	17	2	0	0
		0.2	0	0
DSTDP(MEK)	18	0.2	0	<1
	19	0.2	0	<1
	20	0.2	0	<1
AF-2(水)		0.1μg	5	10
DMSO		0.02m*l*	0	0
Acetone		0.02m*l*	0	0
MEK		0.02m*l*	0	<1

を用いた．DMSO，アセトン 0.02ml/ろ紙は致死作用を示さなかったが，MEK 0.02ml/ろ紙は M45T (*rec*⁻) 株で1mm 以下の増殖阻止帯が認められた．

試料の最高用量は溶解度により 10mg–0.2mg/ろ紙とした．結果は表1に示すとおりである．BHT, DLTDP の各検体は 10mgおよび1mg/ろ紙，Irg 1076, Irg 1010, TopanolCA の各検体は 5mg および 0.5mg/ろ紙，DMTDP は 2mg および 0.2mg/ろ紙の適用で，いずれも H17A，M45T 両株に対して致死作用を示さなかった．DSTDP 各検体は 0.2mg/ろ紙適用で M45T 株に1mm 以下の阻止帯を認めた．この阻止帯は溶媒の MEK による阻止帯の幅と一致しており，両株間における阻止帯の差は DSTDP 自体に由来するものではないと考えられる．AntageW300 各検体は 5mg および0.5 mg/ろ紙の適用で，両株に対しいずれも1mm 以下の阻止帯を示した．

なお，阻止帯を認めなかった BHT，Irg 1076, Irg 1010, TopanolCA, DLTDP および DMTDP の6種の試料については培地への拡散の有無を検討したが，いずれも検出することはできなかった．従って，これらの試料が rec assay で直ちに陰性とは言い難く，今後検討を続けたい．

大腸菌を用いた mutation test 結果は表2に示すとおりで，いずれも生菌数あたりの復帰体の数は対照と大差なく，陽性を示すものはなかった．

サルモネラ菌を用い代謝活性化を併用した mutation test TA100，TA98による結果を表3に示した．いずれの検体，いずれの用量，S9 処理の有無にかかわらず対照と比較して復帰体の増加は認められなかった．

以上，rec assay については試料の培地への拡散を確認することはできなかったが，大腸菌および代謝活性化を併用したサルモネラ菌による mutation test において酸化防止剤 BHT，Irg 1076，Irg 1010，Antage W300, TopanolCA，DLTDP，DMTDP および DSTDP が突然変異誘起性を示したと考えられる成績は得られなかった．

要　旨

ポリプロピレン食器等に使用される8種の酸化防止剤の突然変異誘起性を枯草菌を用いた repair test (rec assay)，大腸菌および代謝活性化を併用したサルモネラ菌による mutation test により検索した．結果は，いずれも陰性であったが，rec assay においては試料の培地への移行を確認できず，その結果の評価は困難であった．

表2. 大腸菌 B/r WP2 *trp*⁻, HCR⁻ による Mutation Test

試料（溶媒）	用量 μg/ml	1ml中の生菌数 ×10⁸	プレートあたりの *Trp*⁺ 復帰体数（二枚の平均）	10⁷生菌数あたりの復帰体数
	0	7.0	40	5.7
BHT	8	6.8	41	6.0
(DMSO)	40	7.2	44	6.1
(1)[1]	200	7.5	42	5.6
	1000	4.2	37	8.8
	0	7.2	45	6.3
Irg 1076	10	6.6	44	6.6
(DMSO)	100	6.0	43	7.1
(7)	1000	6.5	45	6.8
	5000	6.7	44	6.6
	0	10.0	41	4.0
Irg 1010	10	7.9	41	5.1
(DMSO)	100	11.0	46	4.1
(8)	1000	6.1	37	6.1
	5000	6.9	42	6.0
	0	10.0	41	4.0
AntageW300	10	6.9	43	6.2
(DMSO)	100	8.7	49	5.6
(9)	1000	9.9	51	5.1
	5000	9.2	40	4.3
	0	10.0	41	4.0
TopanolCA	10	10.0	55	5.5
(DMSO)	100	9.8	39	3.9
(12)	1000	9.9	39	3.9
	5000	8.6	41	4.7
DLTDP	0	7.2	45	6.3
(DMSO)	10	6.7	52	7.7
(13)	100	8.0	48	6.0
DMTDP	0	7.2	45	6.3
(DMSO)	10	6.8	54	7.7
(17)	100	7.5	48	6.3
DSTDP	0	7.2	45	6.3
(MEK–DMSO)	10	6.6	44	6.7
(18)	100	6.5	52	8.0
AF-2(水)	0.025	6.2	87	14.0
		5.1	120	23.5

1) 検体番号

表3-1. サルモネラ菌による Mutation Test
（プレート3枚平均の復帰体数）

試料	溶媒	検体番号	TA 100						TA 98					
			0[1]	1	10	100	1000	AF-2[2]	0	1	10	100	1000	AF-2
BHT	DMSO	1	227	211	206	204	126	474	42	34	30	32	27	197
		2	234	244	247	255	214	1274	25	26	23	22	26	326
		3	244	250	225	246	217	1302	40	39	36	39	34	432
		4	244	236	216	209	158	1302	40	25	30	30	32	432
		5	190	244	261	241	160	1024	25	29	26	29	31	403
		6	190	206	203	197	173	1024	25	31	22	28	31	403
Irg 1076	DMSO	7	190	219	217	262	218	1440	31	40	36	23	28	546
Irg 1010	DMSO	8	217	227	242	234*	214	626	28	33	35	27	25	297
Antage W300	DMSO	9	255	227	261	193	217	1140	32	28	33	29	27	398
		10	190	269	250	222	247	1024	25	35	31	24	25	403
		11	195	243	236	236	238	737	28	30	25	18	19	428
Topanol CA	DMSO	12	255	218	231	235	216	1140	32	29	27	19	13	398
DLTDP	DMSO	13	227	233	245	216	—	474	42	41	41	38	—	197
		14	244	226	220	216	—	1302	40	31	32	36	—	432
		15	195	226	250	230	—	737	29	28	27	34	—	428
		16	195	201	221	205	—	737	28	24	25	23	—	428
DMTDP	DMSO	17	190	198	209	186	—	1440	31	37	46	31	—	546
DSTDP MEK-DMSO		18	194	193	208	200	—	645	33	29	30	34	—	361
		19	204	194	176	190	—	1274	32	31	28	25	—	326
		20	204	201	216	186	—	1274	32	31	23	27	—	326

1) プレート1枚中の薬物量 μg/プレート　2) AF-2 0.05μg/プレート（各1枚）　* プレート2枚の平均

表3-2. サルモネラ菌による代謝活性化（PB-S9）Mutation Test
（プレート3枚平均の復帰体数）

試料	溶媒	検体番号	TA 100						TA 98					
			0[1]	1	10	100	1000	AAF[2]	0	1	10	100	1000	AAF
BHT	DMSO	1	218	267	268	311	174	2280	36	42*	35*	36*	33	11760
		2	232	188	197	229	131	4032	27	27	28	31	40	9016
		3	239	248	241	230	178	3136	42	40	31	49	53	8400
		4	239	226	176	180	140	3136	42	41	38	49	41	8400
		5	188	201	265	186	148	4704	26	25	31	23	31	6720
		6	188	163	190	193	157	4704	26	26	22	25	29	6720
Irg1076	DMSO	7	204	250	262	180	169	4959	35	27	44	35	37	11400
Irg1010	DMSO	8	220	213	214	234	228	4648	46	60*	46	43	38	11480
AntageW300	DMSO	9	206	256	266	227	241	5096	36	37*	37*	40*	40*	11760
		10	188	241	230	256	264	4704	26	22	20	27	38	6720
		11	194	194	211	210	204	5040	39	35	36	32	32	11200
TopanolCA	DMSO	12	206	200	216	248	226	5096	36	39*	40*	37*	—	11760
DLTDP	DMSO	13	218	225*	221*	231*	—	2280	42	65*	52*	57*	—	11970
		14	239	191	179	216	—	3136	42	44	41	38	—	8400
		15	194	211	208	226	—	5040	39	33	30	32	—	11200
		16	194	196	116	169	—	5040	39	33	29	39	—	11200
DMTDP	DMSO	17	204	175	190	191	—	4959	35	38	46	47	—	11400
DSTDP MEK-DMSO		18	209	205	174	211	—	1852	44	41	41	34	—	4600
		19	219	237	171	188	—	4032	35	38	33	22	—	9016
		20	219	233	235	185	—	4032	35	26	28	31	—	9016

1) プレート1枚中の薬物量 μg/プレート　2) AAF 10μg/プレート（各1枚）　* プレート2枚の平均

表 3-3. サルモネラ菌による代謝活性化（PCB-S9）Mutation Test
（プレート3枚平均の復帰体数）

試料	溶媒	検体番号	TA 100						TA 98					
			0[1]	1	10	100	1000	BP[2]	0	1	10	100	1000	BP
BHT	DMSO	1	207	298	187	274	170	1030	43	44*	54*	54*	47*	482
		2	219	184	207	193	143	866	44	47	43	45	45	552
		3	227	234	225	240	166	1054	42	47	60	50	56	278
		4	227	187	202	208	159	1054	42	49	50	51	47	278
		5	186	194	199	193	156	810	38*	35	26	37	43	323
		6	186	193	181	195	159	810	38*	41	42	41	46	323
Irg1076	DMSO	7	168	208	201	224	217	502	56	53	47	36	31	243
Irg1010	DMSO	8	200	224	222	201	218	684	43	58	46	51	38	482
AntageW300	DMSO	9	207	200	206	207	206	730	42	50	55	57	38	562
		10	186	263	269	230	220	810	38*	44	43	40	40	323
		11	181	195	230	190	222	578	38	36	42	42	33	278
TopanolCA	DMSO	12	207	217	222	223	188	730	42	43	43	44*	24	562
DLTDP	DMSO	13	207	289*	250*	217*	—	1030	53	61*	56*	74*	—	706
		14	227	190	192	190*	—	1054	42	46	50	51	—	278
		15	181	199	227	202	—	578	38	38	36	33	—	278
		16	181	171	156	176	—	578	38	36	41	40	—	278
DMTDP	DMSO	17	168	184	213	184	—	502	56	47*	58*	60*	—	243
DSTDP	MEK-DMSO	18	184	217	182	185	—	762	48	49	49	50	—	352
		19	164	191	193	176	—	866	49	46	48	47	—	552
		20	164	199	174	188	—	866	49	41	49	40	—	552

1) プレート1枚中の薬物量 μg/プレート　2) BP 5μg/プレート（各1枚）　* プレート2枚の平均

文　献

1) Kada, T., K. Tutikawa, and Y. Sadaie : *Mutation Res.*, 16, 165, 1972
2) Bridges, B. A., R. E. Dennis, and R. J. Munson : *Genetics*, 57, 897, 1967
3) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281, 1975
4) McCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 979, 1975
5) Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 782, 1973
6) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 61-68, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）およびその他の酸化防止剤投与ラットにおける肝細胞の電子顕微鏡的研究

福森信隆*, 高橋 省*, 三栗谷久敏*, 平賀興吾*

Comparison of Ultrastructural Alterations induced by Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Other Antioxidants in Rat Hepatocytes

NOBUTAKA FUKUMORI*, OSAMU TAKAHASHI*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

Fine structure alterations in the hepatocytes of the Sprague-Dawley male rats were studied after the administration of BHT and other antioxidants for 3 weeks. The alterations after 5.45 mmol BHT feeding were observed considerable proliferation of SER in the glycogen area, decrease of glycogen particles, scattered lamella of RER, anomalous mitochondria surrounded by RER. Among other antioxidants, fine structure alterations by 5.44 mmol 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline (ethoxyquin) and 1.26 mmol 2,5-di-*tert*-butylhydroquinone (DBH) per 100g diet respectively were similar to these by BHT feeding considerably. But alterations by 5.44 mmol butylated hydroxyanisole (BHA) and 5.46 mmol N,N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) were generally undetectable in comparison with control rats. In the feeding of 1.72 mmol 1,3,5-trimethyl-2,4,6-tris (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) benzene (Ionox 330), an increase in number of fatty droplets was seen. These results suggest that hepatic fine structure alterations by BHT are not common alterations in antioxidants.

緒　言

種々の酸化防止剤は一部の食品およびゴム，石油製品に使用され，品質の安定化に寄与するところが大きい．特に食品中の油脂の酸敗を防止し保存期間を延長することから，現在指定製品につき使用が許可されている[1]．著者らはこれまで酸化防止剤ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）が肝臓の微細構造におよぼす影響について観察を行い，それが滑面小胞体（SER）の増殖を主とした肝機能亢進の反映であると推察した[2]．一方，BHT はラットで出血傾向を持つことがわかり，鈴木ら[3]，高橋ら[4]によって BHT の持つ出血発現の機序について検討が加えられつつある．中でも興味あることは，BHT 投与ラットの肝臓に血液凝固に関与する第Ⅶ因子合成阻害物質の存在が確認されたことで[3]，肝臓は単なる BHT の解毒代謝の場であるばかりでなく，薬物代謝の過程を経る中で血液凝固に影響を与える因子の存在の可能性が推測される．

このような観点から，種々の酸化防止剤を用いて肝臓の微細構造変化と出血作用[5]の関連について比較し，BHT による肝細胞変化が他の酸化防止剤と共通した変化を示すか否かを形態学的見地に基づき検討した．

実験方法

動物は SD-JCL 系雄性ラットを使用し，室温 25±1°，湿度 50±5％の環境下で水を自由に摂取させ飼育した．6週令の動物にカゼイン基本飼料群を対照とし，飼料 100g に各 5.45 mmol BHT，5.44 mmol butylated hydroxyanisole (BHA)，1.72mmol 1,3,5-trimethyl-2,4,6-tris (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) benzene (Ionox 330)，1.26 mmol 2,5-di-*tert*-butyl-hydroquinone (DBH)，5.44 mmol 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl quinoline (ethoxyquin)，5.46 mmol N,N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) を加えた自家製添加飼料で3週間自由摂取させた[5]．試料は生存動物のみ各群3匹を放血屠殺し，肝方形葉左下端部から採取した．細切後3％パラホルムアルデヒド（0.1 M リン酸緩衝液，pH 7.4）で3時間前固定を行い，氷室内の緩衝液中で一晩洗浄後，1％ OsO_4 液で後固定を1.5時間行った．エタノール脱水後，定法に従って Epon

* 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

樹脂に包埋した．包埋した電顕試料の厚さ約1μの切片をトルイジン青で染色し光顕的に観察後，超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛で重染色を施し，肝小葉中間帯を HU-12A 型電子顕微鏡にて検鏡した．

実験結果

肝臓は小葉内の部位により機能的および形態的相違が若干あるといわれ，従って本実験では BHT による細胞腫脹が比較的初期に発現する肝小葉中間帯の肝実質細胞を検索の対象とした．

カゼイン基本飼料　糸粒体は円形ないし長円形を呈し，cristae が発達して正常像を示した．Glycogen 顆粒は organelles の間に凝集して存在が認められ，粗面小胞体（RER），lysosome，microbody，Golgi 装置にも異常形態がみられなかった．しかしながら，一部に滑面小胞体（SER）の軽度な拡張，細胞質内の小空胞形成を認めるがその程度において正常構造と大差がみられなかった．脂肪滴は若干多く分布していた．

BHT　Glycogen 野で SER の著明な増殖がみられ vesicle 状を呈し，増殖の顕著な部では tuble 状に移行する像がみられ network を形成した（Fig. 1）．SER の増殖に伴い，その間の glycogen 顆粒は減少した．多くの RER は，層状な平行配列が乱れ ribosome を脱落し，消失傾向を呈した．RER の末端は膨化し SER と連結がみられ，残存する RER は糸粒体をとりまく傾向を示した．一部の糸粒体は，伸長巨大化して中央部のくびれ像を認めた．また膨化した糸粒体は cristae の崩壊がみられ，基質が空胞化し膜構造の不明瞭な形態を呈する細胞も散見された（Fig. 2）．Secondary lysosome，microbody は軽度な増加を示した．核，核小体の多くは肥大傾向を呈するが，SER の増殖が著しい部では核膜が消失し chromatin の凝集がみられ萎縮した退行像を認めた．細胞内脂肪滴は全体的に減少がみられた．

BHA　SER の増殖はみられず，glycogen 顆粒の減少も認められなかった．糸粒体は基質の軽度な空胞化を認める細胞が一部にみられたが，形状，染色性など正常像に近かった．Lysosome，microbody は若干増加傾向を示したものの，他の organelles の変化は対照と比べ著変を認めなかった．

Ionox 330　全体的に細胞質の organelles の分布が疎の感を呈し，glycogen 顆粒の減少がみられたが，糸粒体，RER，lysosome，microbody の変化は認められず SER の増殖もみられなかった（Fig. 3）．しかしながら，Ionox 330 は細胞質内に脂肪滴の増加を惹起せしめ，他の organelles を圧迫する傾向がみられた．

DBH　SER の増殖は比較的顕著で，その形態は vesicle 状を呈しているものの莢状に移行し出芽様構造を示した連接像がみられた（Fig. 4）．Glycogen 顆粒は軽度に減少し，やや大きく凝集して増殖した SER 間に散在した．RER は層状配列の乱れが少なく，比較的配列が保持されているが，一部に消失傾向がみられ末端部では vesicle 状となり SER への移行像を呈した．糸粒体は著しい変化を認めなかったが，基質の電子密度が中等度を呈し，伸長したもの，くびれ像など若干散見された．Lysosome は軽度に増加を示した．

Ethoxyquin　SER は glycogen 野で増殖がみられ vesicle 状を呈して分布し，SER の増殖部で glycogen 顆粒の減少を認めた．RER は層状配列が不規則となり，末端部が SER に連接して，糸粒体をとりまく傾向がみられた．また RER の消失した部もみられ，ribosome が脱落し curling 状を呈した（Fig. 5）．糸粒体の一部は膨化し，基質の淡明化，cristae の崩壊がみられ，長形くびれ像を呈する所見が観察された（Fig. 6）．Secondary lysosome，microbody は増加を認めた．核，核小体は全体に良好な発達がみられたが，一部萎縮傾向を呈し，核膜の不明瞭な細胞が散見された．なお細胞質内脂肪滴は減少した．

DPPD　SER の増殖はほとんどみられず，glycogen 顆粒も比較的良好に残存していた．RER は糸粒体をとりまく傾向がみられたが，配列の変化は少なかった．糸粒体はやや長形化を呈したが，著変がみられなかった．また細胞質内に大小様々な小空胞の出現が散見された（Fig. 7）．

これらの所見から BHT による肝細胞変化は，他の酸化防止剤と必ずしも共通した形態変化を示すのではなく各酸化防止剤間で異なる変化様態を呈し，その形態変化は類別されることがわかった．なお，細胞質内にみられた小空胞は対照群を含めて全投与群に若干みられ，中でも DPPD 群に多い感を得た．

考　察

BHT は経口投与で出血傾向がみられ，出血致死作用と投与量とに用量反応関係を持つことが明らかにされている[6]．従って投与量と出血傾向に相関が認められたことから，体内に吸収された BHT は血液凝固系に対して投与量に見合った作用を有し，その作用物質として中間代謝物あるいは代謝過程に生成される他の合成物の関与が示唆される．一方，肝臓は薬物代謝を行うに主要な位置をしめ，生体に吸収された体外異物を排泄するため極性化機構を行っている．このように肝臓は体外異物の解毒に不可欠な臓器であるため，肝臓の組織像を検索することは化学物質の生体に与える影響を評価する上で有意義な

示唆を与える．特に微細構造の観察は，その生理学的，生化学的見地から機能との関係を論ずる上で重要である．このような立場から，BHT および他の酸化防止剤が肝細胞におよぼす微細構造変化を比較し並びに出血傾向との関係について検討した．

今回用いたBHT添加のカゼイン飼料による形態変化は，著者らがこれまで行ったオリーブ油にBHTを溶解させ経口投与し[2]，飼育用固型飼料（CE-2）で飼育した動物の変化と本質的に異なる変化を認めなかった．この変化はオリーブ油に溶解したBHT 300 mg/kgを3週間連続投与したSD-JCL系雄ラットの肝細胞変化に類似していた．5.45 mmolのBHT摂取では死亡例が多数みられたため[5]，試料を摘出した生存動物の肝細胞変化は死亡動物の変化に比べ若干軽度であろうと思われる．しかし，出血傾向と組織変化に直接的な因果関係をみい出すことは困難であるため断定し難い．

BHTと他の酸化防止剤の肝細胞変化を比較すると3群，つまりBHTの変化と非常に類似した群，全く異種の変化を呈した群，対照構造に類似して化学物質の作用がほとんど認められなかった群に類別される．

BHTと類似変化を示す物質は，ethoxyquin，DBHで，特にBHTとethoxyquinが良く類似してその形態変化は強く認められた．一方，DBHは出血効果が強く飼育期間終了前に死亡することから，1.26 mmolの低濃度で混入した飼料を摂取させた．従ってBHTと類似変化を呈したものの，形態変化の強弱を論じることは困難であると思われる．これらの物質に共通した形態変化は，glycogen野でのSERの増殖，glycogen顆粒の減少，RERの層状配列の乱れおよび末端部でのSERへの移行像，糸粒体の異型化などであった．SERの増殖はglycogen顆粒の減少，RER末端でのSERへの移行像から考えて，主にglycogenがエネルギー供給源となり，糸粒体でのATP合成に利用され，その結果RER末端での膜新生が起こると考えられる．またこのことはRERの層状配列が不規則となり，糸粒体への接近あるいはとりまく形態変化からもSERの増殖時の膜新生に密接に関与していると推察される．RER末端部の膨化によりSERの移行型を呈する像はphenobarbital投与の際でも散見されることから[7]，あるいはBHTで有吉らが薬物代謝酵素活性の上昇を報告[8]していることと合わせて考えると，これらのSERの増殖は合目的的な形態変化であり，肝機能の反映を意味する像と思われる．SERの形態は増殖初期ではvesicle状を呈して，漸次連接してtuble状に移行するが，その形態変化の意義は明らかでない．糸粒体の腫大，長形化，くびれ像はSERの増殖部で多くみられ，RERの接近を伴っていることから，薬物代謝を円滑に行わしめるための機能的異型と思われる．しかし一部の細胞でみられたcristaeの崩壊，糸粒体基質の淡明化は糸粒体の機能の低下を意味すると思われる．またsecondary lysosomeの増加は細胞内産物の排泄に関与し，細胞内での活発な代謝活動が示唆される．Microbodyは尿酸酸化酵素を結晶構造に持ち，脂質代謝に関与することから，これらの酸化防止剤と何んらかの関係が考えられる．また糸粒体の呼吸活性低下によってmicrobodyの数が増加することから[9]，糸粒体の機能低下が示唆される．EthoxyquinとBHTの形態変化は良く類似してSERの増殖，RERの消失，糸粒体の異型，核，核小体の肥大傾向などみられるが，これらの変化はethoxyquinが薬物代謝酵素を誘導させ肝肥大を起こすというCawthorneら[10]の報告から機能的にもBHTの作用と類似していると考えられる．

一方BHTと異なる変化を呈するIonox 330はorganellesの変化が少なく，細胞質内に脂肪滴の増加を認めた．BHT，ethoxyquinが脂肪滴を減少させるのに対し，Ionox 330の脂肪滴の蓄積は肝細胞での代謝過程の相違が考えられ，またIonox 330は経口投与で生体への吸収が極めて悪い[11]ということからも他の酸化防止剤と異なる生体作用を持つと思われる．

BHA，DPPDは肝細胞の変化がほとんど認められず，DPPDで若干の小空胞がみられたが，その量から推察すると胞体に与える作用は軽度であると思われる．BHAはSERの増殖がみられずglycogen顆粒も存在することから，BHTと代謝様式が異なると思われ，代謝速度，抱合体形成の相違が考えられる[12]．

次に出血傾向に関して高橋らは死亡数，プロトロンビン指数を測定してこれらの酸化防止剤を比較したところ，DBH，BHT，ethoxyquinに出血を認め，中でもDBHが強い出血傾向を持つことをみつけた[5]．この群は上述した如く微細構造変化が類似して，特にSERの増殖が著明に認められた．この点に関し，出血傾向と形態変化に密接な関係が考えられ，適応代謝を行う増殖したSER像は出血発現に何んらかの関与が示唆される．今後，出血発現の機作が解明されるにつれ，形態との相関も明らかにされるであろう．

本実験では主にSERの増殖に注視し，他のorganellesの変化を加味して酸化防止剤の類別を行った．SERの増殖に関して，例えばcarbon tetrachloride，thioacetamideなど肝細胞壊死を起こす際の前駆変化とみなされることから[13]，BHTなどの適応変化としてSER増殖を惹起する場合と比較すると同一変化を呈しても細胞傷

害の程度が大きく異なることは熟考すべき意味を持つと思われ，さらに長期での形態観察が必要になろう．

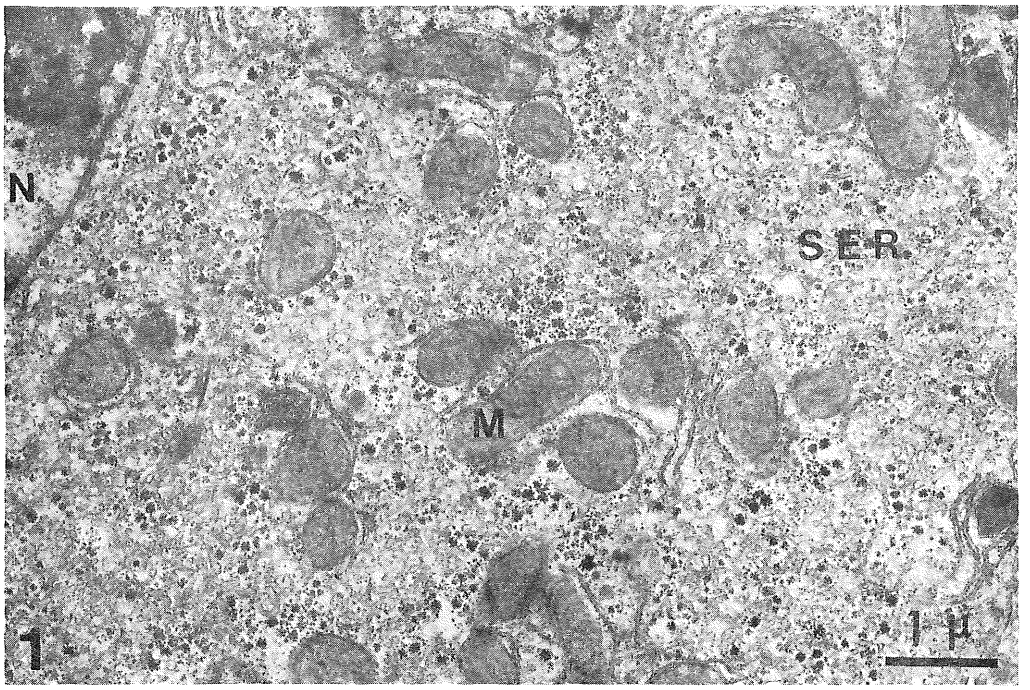
結　　語

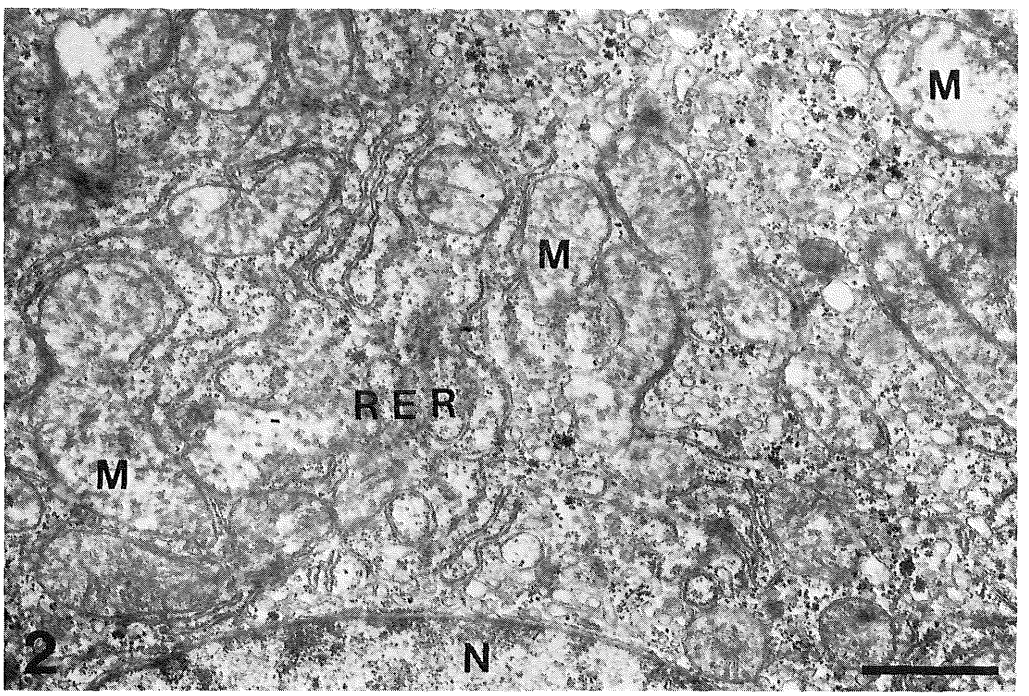
BHT は適応変化として，glycogen 野で SER の増殖を惹起せしめ glycogen 顆粒を減少させた．また RER では層状配列が乱れ，ribosome の脱落，SER への移行がみられた．特に SER の増殖が顕著な部では核の萎縮像が散見され，糸粒体の異型を認めた．他の酸化防止剤との比較では，ethoxyquin，DBH が BHT と類似変化を認め，BHA，DPPD は著変がみられなかった．Ionox 330 は脂肪滴の増加を認めた．このことは BHT による細胞変化は，他の酸化防止剤と必ずしも共通した形態変化ではなく，各酸化防止剤で異なる変化様態を呈したことは吸収あるいは代謝機構の相違が示唆される．

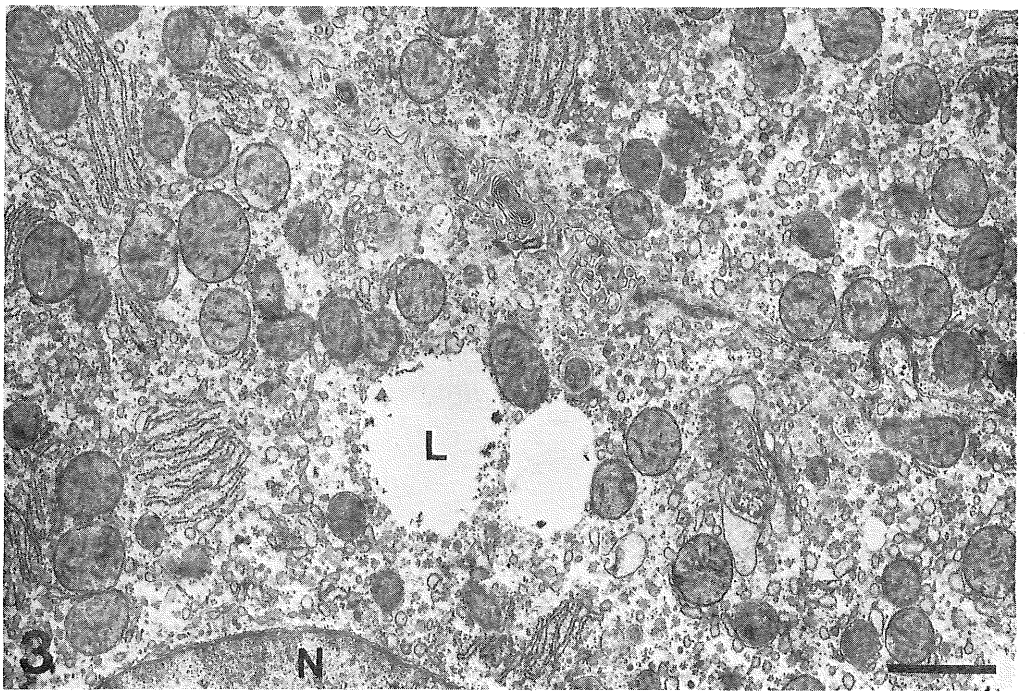
（本研究の概要は日本電子顕微鏡学会第33回学術講演会　1977年5月で発表した．）

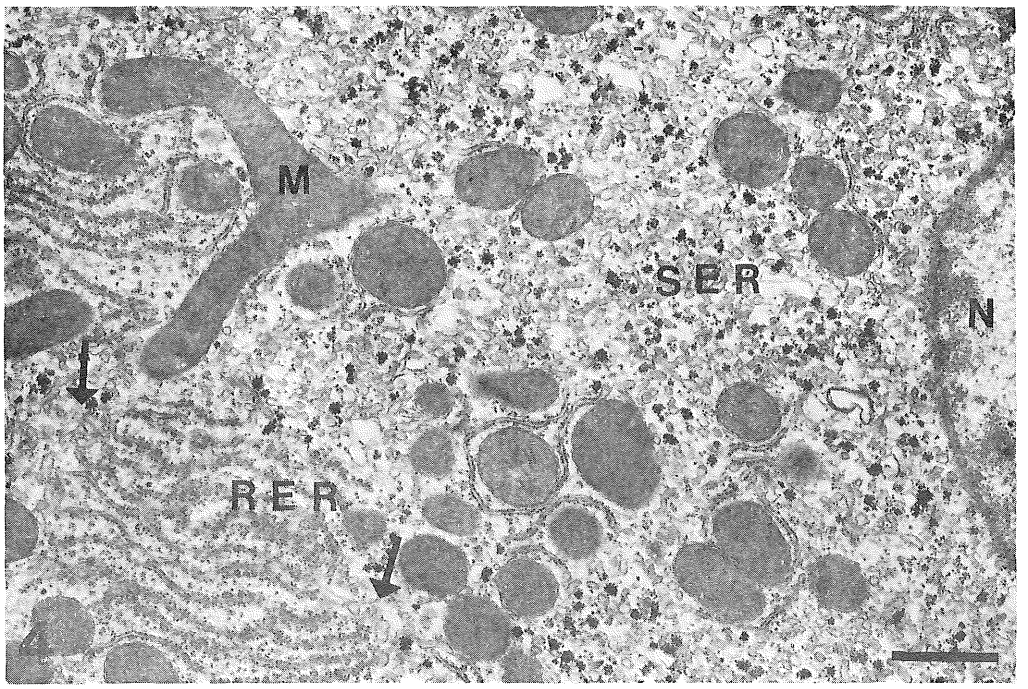
文　　献

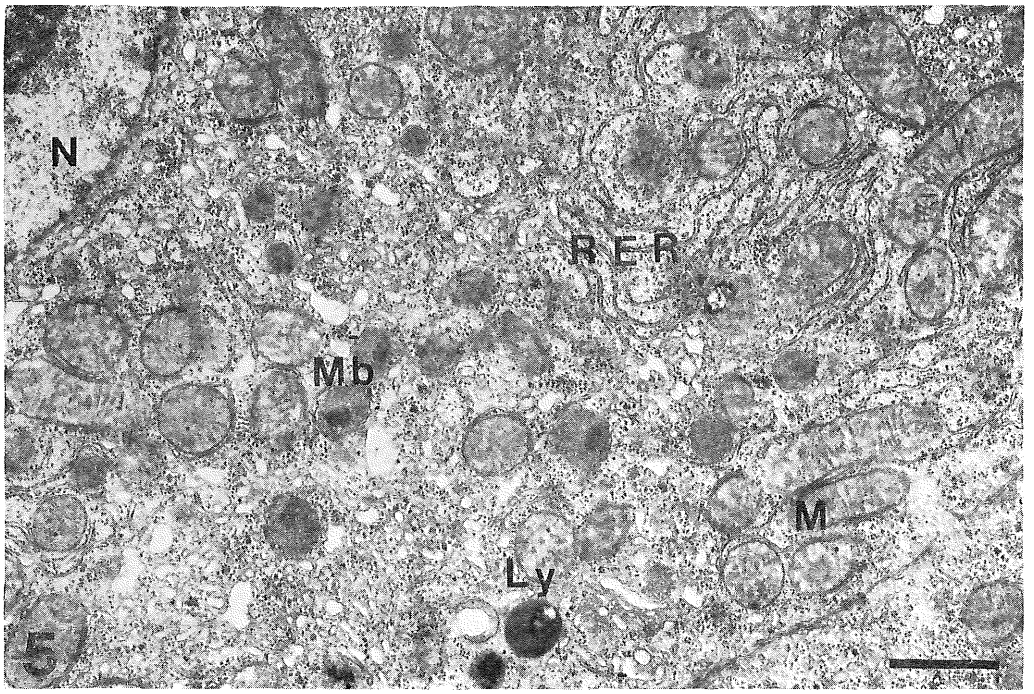
1) 厚生省：食品添加物公定書，第3版，560，1974
2) 福森信隆ら：東京衛研年報，27-2，67，1976
3) 鈴木英子ら：東京衛研年報，27-2，82，1976
4) 高橋　省ら：東京衛研年報，27-2，86，1976
5) 高橋　省，福森信隆，平賀興吾：第50回日本薬理学会講演要旨，311，1977
6) Takahashi, O. and K. Hiraga : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press
7) Stäubli, W.: *J. Cell. Biol.*, 42, 92, 1969
8) 有吉敏彦，高畠英伍：食衛誌，4，75，1973
9) Baudhuin, P: *Handbook of Molecular Cytology*, 1179, 1969, North-Holland, Amsterdam
10) Cawthorne, M. A., J. Bunyan, M. V. Sennitt, J. Green, and P. Grasso : *Br. J. Nutr.* 24, 357, 1970
11) 塩ビ食品衛生協議会：プラスチックと食品衛生，188，1976，工業調査会
12) 青木　勇：食衛誌，3，120，1962
13) Smuckler, E. and M. Arcasoy : *International Review of Experimental Pathology*, 7, 305, 1969, Academic Press, New York

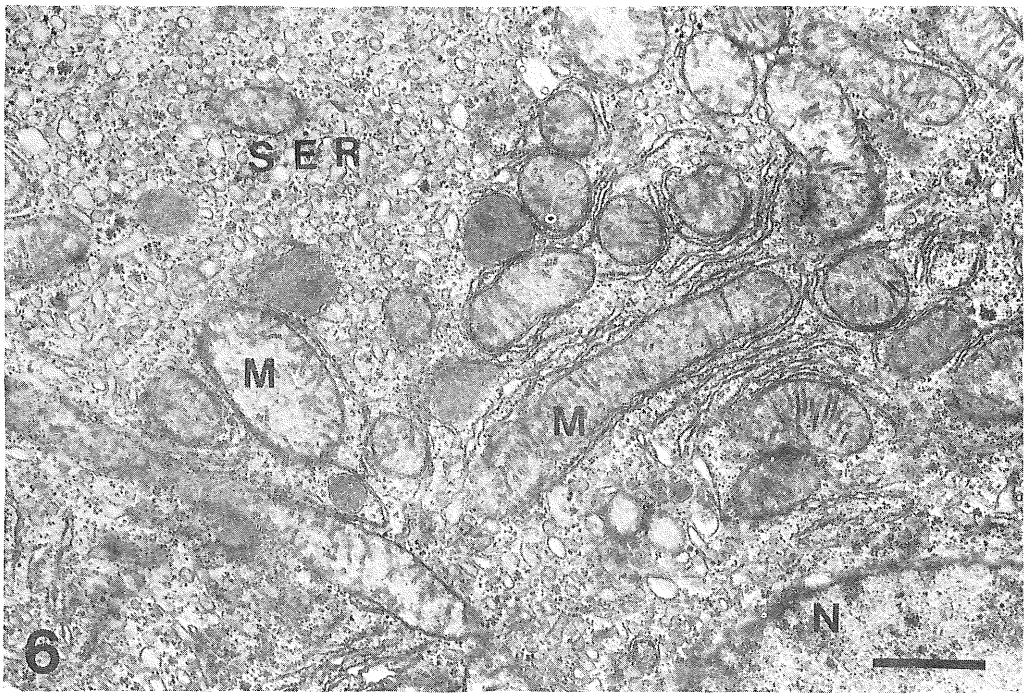

N
SER.
M
1
1 μ


M
M
RER
M
2
N


L
N


M
SER
N
RER


N
RER
Mb
M
Ly
5


SER
M
M
N
6

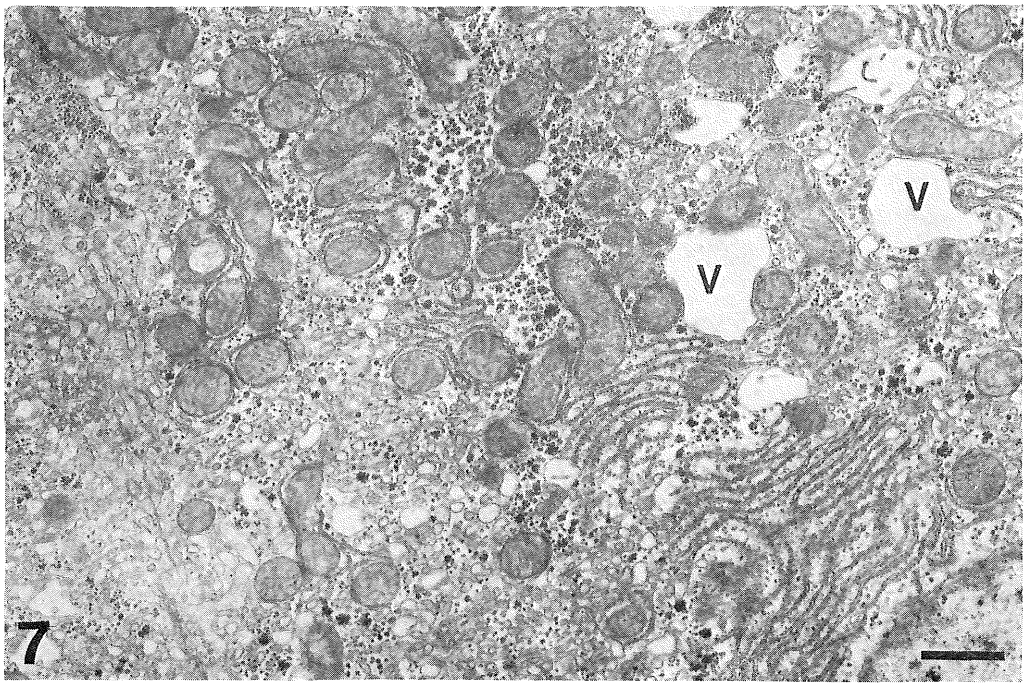


Fig. 1. Hepatocyte after 5.45 mmol BHT feeding for 3 weeks. Marked proliferation of smooth endoplasmic reticulum (SER) and formation of the networks are seen.

Fig. 2. Hepatocyte after 5.45 mmol BHT feeding for 3 weeks. Scattered-lamella of rough endoplasmic reticulum (RER) and anomalous destruction of mitochondria (M) are observed.

Fig. 3. Hepatocyte after 1.72 mmol Ionox 330 feeding for 3 weeks. There is glycogen depletion. Increase of lipid droplet (L) are seen in cytoplasm.

Fig. 4. Hepatocyte after 1.26 mmol DBH feeding for 3 weeks. Proliferation of vesiclar SER, slight disappearance of RER are seen. The end of RER is linked to SER (arrows).

Fig. 5. 6. Hepatocyte after 5.44 mmol ethoxyquin feeding for 3 weeks. Proliferation of SER, scattered RER, deformation and swelling of mitochondria (M) are seen.

Fig. 7. Hepatocyte after 5.46 mmol DPPD feeding for 3 weeks. The changes of organelles are slight, but formation of vacuole (V) is scattered.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 69-72, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の出血致死効果におよぼす直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS），アスピリン，四塩化テルルおよび塩化ランタンの影響

高橋　省*，中尾順子*，平賀興吾*

Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS), Aspirin, Tellurium Tetrachloride or Lanthanum Chloride on Hemorrhagic Death by Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Male Rats

OSAMU TAKAHASHI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT) は，ラットにおいて，用量反応関係を持って出血致死効果を持つ[1,2]．この効果は，BHT の主要な代謝中間体である 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol (BHT-alcohol), 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-aldehyde), 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-acid) については，BHT と比較してはるかに弱く，BHT-alcohol が精巣上体への出血効果を，他の二者がプロトロンビン時間延長効果を持つにすぎない[3-6]．また，遊離基連鎖停止剤としての，化学的性質と生物学的効果との関連において，他のフェノール系およびアミン系の酸化防止剤については，1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline (ethoxyquin) が，BHT-alcohol なみの出血効果を持つほか，2,5-di-*tert*-butylhydroquinone が症状のかなり異なる強い出血致死効果を持つこと，N,N′-diphenyl-*p*-phenylene diamine (DPPD) が出血効果を持たずにプロトロンビン時間延長効果を持つことを除き，ブチルヒドロキシアニソール (BHA), 1,3,5-trimethyl-2,4,6-tris (3,5-di-*tert*-butylhydroxybenzyl) benzene には，出血効果，プロトロンビン時間延長効果がなく，したがって，かならずしも一般の酸化防止剤に共通の性質ではなく，BHT に特異的な効果であることが分ってきた[7,8]．

そして，この出血致死効果は，BHT と化学構造の類似している 2,6-di-*tert*-butylphenol および 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol についても質的に同様なものであり，したがって，出血致死効果について，BHT を含む一群の新らしい物質群が存在するであろうことが推測される[9]．さらに，BHT，トリブチルフェノールについては，ラット，マウス，ゴールデンハムスター，イヌについて，種差の検討も行った[10,11]．

ところで，BHT の毒性は，短期・長期毒性，遺伝毒性などを通じて，許容基準の範囲内では安全であると考えられているが[12-14]，この出血現象に関しても，出血を惹き起こす用量がきわめて高いこと (LD_{50} (40日)＝760 mg/kg)[2]，あるいは，基本飼料の組成[2]や，動物種[10]により，その効果が変動することから，現実的な情況で，この毒性が問題となる可能性は少ないと考えられるが，もし，問題があるとすれば，1つは，相乗的に出血効果が起こり，したがって，作用する BHT の用量が低下した場合か，もう1つは，主体側に特殊な潜在的遺伝形質があるか，あるいは，病的素因がある場合に限るであろうと思われる．ここでは，前者の問題に関連して，BHT の出血致死効果に対する2，3の化合物の影響を見た．このことは，実際面のみならず，基礎的な意味においても，BHT の出血致死効果の機構解明の一助ともなると思われる．

すでに，BHT と LAS の相互作用については報告[15-18]があるが，今回は，精製飼料を基本食として，再び LAS あるいはアスピリン，四塩化テルル，塩化ランタンの，BHT の出血致死効果に対する影響を見た．結論としては，塩化ランタン，四塩化テルルが，BHT の出血致死効果に対して阻害的と思える影響を与えたのみで，相乗的な効果は認められなかったが，記録に残す必要があると思われるので記載する．

実験方法

動物は JCL-SD 系雄ラット（日本クレア）を4週齢で購入し，2週間予備飼育後3週間投与を行った．ラットは個別ケージに入れ，水および飼料を自由摂取させた．

* 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

基本飼料の組成は，すでに報告した24%カゼイン食[2]であるが，大豆油は日本薬局方品を用いた．

BHT は東京化成製，LAS はライオン油脂製，アスピリン（ASA）は日本薬局方品，四塩化テルルおよび塩化ランタンは和光純薬製を用いた．

それぞれの群と用いた動物数を以下に示す．

	動物数
対　照	4
0.83% BHT	10
0.20% LAS	4
0.50% ASA	4
5 ppm $TeCl_4$	10
$LaCL_3$（3日目に腹腔内へ10mg/kgを注射）	8
0.20—0.83% LAS-BHT	10
0.50—0.83% ASA-BHT	10
5 ppm—0.83% $TeCl_4$-BHT	10
10 mg/kg—0.83% $LaCl_3$-BHT	10

飼育期間中は，出血を中心に一般症状を観察し，体重，飼料摂取量，死亡数，死亡および生存動物の出血を記録した．また，実験終了時に，生存動物の肝臓重量も測定した．

LT_{50}（50%致死時間）の計算および平行性の検定は，Litchfield 法[19]に従った．

結　果

1. 死亡率　各投与群の生存曲線を図1に示す．BHT 群および LAS-BHT 群，ASA-BHT 群の LT_{50}，勾配，有意差および並行性の検定結果を表1に示す．BHT 群の LT_{50} と LAS-BHT 群，ASA-BHT 群の LT_{50} の間に有意差はなく，テルル，ランタンは，BHT の致死効果に阻止的に働いた．

2. 死体解剖　投与期間中に死亡した個体は，全例に出血が認められた．部位は，外部出血のほか，鼻腔，頭蓋腔，胸腔，腹腔，消化管内への出血，皮下，筋肉，眼，脊髄，胸腺，肺，肝臓，膵臓，膀胱，精巣，精巣上体出血などで群間に差異はなかった．

3. 生存動物の出血　BHT 群，精巣および精巣上体への出血 2/2，LAS-BHT 群，精巣出血 1/2，ASA-BHT 群，精巣出血 1/1，テルル-BHT 群，精巣および精巣上体出血 5/6（精巣の萎縮が2例見られる），ランタン-BHT群，7/8（精巣萎縮が5例）．

4. 症状　出血以外の症状としては，BHT の入った飼料で飼育した全群に軽度の下痢が見られ，また，塩化ランタンの腹腔注射後，全例に，数秒間の昏睡が見られた．

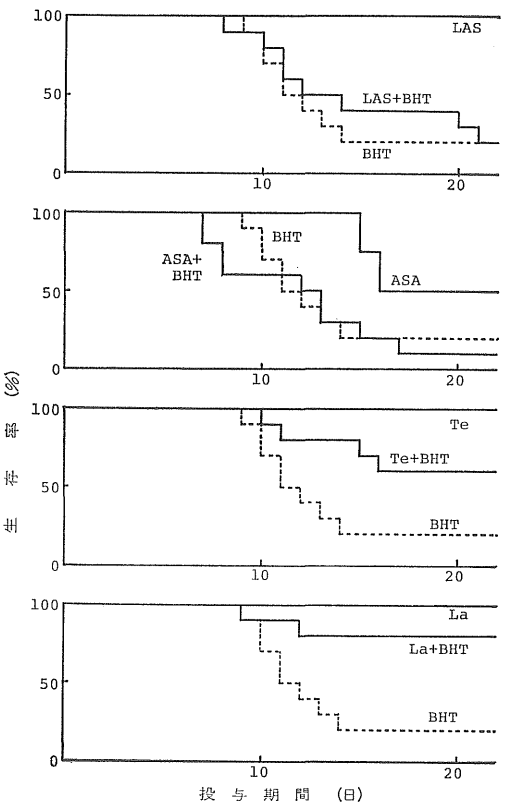


図 1.　BHT，LAS，テルルおよびランタンを投与したラットの生存曲線

表 1.　BHT，LAS+BHT および ASA+BHT 投与ラットの LT_{50} および勾配

	BHT	LAS+BHT	ASA+BHT
LT_{50}	11.5(9.1–14.5)	13.0(10.3–16.4) 有意差なし	10.0(7.7–13.0) 有意差なし
勾配	1.4(1.2–1.7)	1.5(1.2–1.7)	1.5(1.3–1.9)
平行性		有意差なし	有意差なし

カッコ内は95%信頼限界を示す。

5. 体重　飼料摂取量，薬物摂取量，体重などのデータを表2に示す．

6. 肝臓重量　相対重量は BHT，LAS，テルル群で有意な上昇が認められる．併用投与群の肝臓相対重量は，BHT 単独投与群と有意差はない．

考　察

精製飼料を基本飼料として用いた場合の BHT の用量と出血致死率との関係はすでに報告した[2]が，その時，0.8%の BHT は LD_{50}(40日)の約70%に相当していた．今回の実験では，用量反応関係が，すでに報告した直線と比べ，並行的に低用量側に移動していると考えられ

表2. 1日あたりの平均飼料摂取量および薬物摂取量ならびに生存動物の体重および肝臓重量

	平均飼料摂取量 g	平均薬物摂取量 mg/kg		生存動物数	体重 g	肝臓重量 g	
		BHT	その他			絶対	相対
対照	19.3	—	—	4	328.3±15.8	12.8±0.7	3.89±0.18
BHT	12.7	511	—	2	228.5±4.5*	14.6±0.2	6.41±0.20**
LAS	16.5	—	131	4	319.5±10.5	15.7±1.0	4.90±0.19**
ASA	14.3	—	326	2	239.5±10.5*	10.3±0.8	4.31±0.16
Te	21.2	—	0.414	10	308.4±6.3	15.0±0.8	4.84±0.18**
La	16.5	—	10(single)	8	317.1±1.8	13.2±0.5	4.16±0.17
LAS+BHT	10.6	434	105	2	192.0±31.0	12.7±0.8	6.71±0.65
ASA+BHT	7.7	364	219	1	207.0	12.8	6.18
Te+BHT	12.4	512	0.309	6	196.8±8.9	13.1±0.4	6.67±0.20
La+BHT	13.3	568	10(single)	8	206.7±11.5	11.1±1.1	5.32±0.33

値は平均±標準誤差で示した. *$p<0.05$, **$p<0.01$. (ただし, 単独投与群は対照と併用群はBHT単独投与群と比較した.)

る. これに関与する因子はラットの性状, 基本飼料の影響が大きい. しかし, いずれにしても, 相乗効果を見る場合には, 本来, 単独投与群で, 着目している反応が低頻度で生じる用量を使用するべきであり, 従って, 本実験のBHTの用量は高過ぎたきらいがある.

LASとBHTの出血現象における相互作用については, 前報[18]で議論しておいたが, 今回の実験でも相乗的な結果は得られていない. 飼料摂取量のばらつきに基づくBHT摂取量のばらつき, およびLD値の信頼限界の幅を考慮すれば, 少くともLASとの併用群で, BHTの摂取量の出血致死率を変化させるに有意な低下は起っていないと考えられる.

ASAとの併用群では, BHTの摂取レベルは, かなり低くなっているが, 生存曲線を見ると, 有意差はないが, BHT単独投与群より強い効果が出ている傾向にある. ASAは, 肝臓でのプロトロンビン合成の阻害作用[20,21], 血小板機能への阻害的作用[23-26]が分っており, 本実験でも, ASA単独群で出血致死が認められることから, ASAとBHTはむしろ相加的な方向で働いていることが予想される.

テルルは, BHTの効果に阻害的である. 様々な薬物を動物に与えた場合, 脂溶性ビタミンやビタミンCのような補酵素作用の不明瞭なビタミン類の要求量が増加することが報告されつつある[27]. ビタミンEについて同様な実験を行った例は知らないが, 少くとも過酸化脂質などを投与した場合には, ビタミンE要求量は増していると考えても良い. BHTを大量に投与した場合にビタミンE要求量が増すかどうかは検討していないが, 薬物代謝酵素の上昇に伴ってビタミンC要求量は増すだろうし, 出血現象と関連して, ビタミンKの要求量も上ってくる時, ビタミンEの要求量が上ってくる可能性もなくはない. 本実験は, 直接それを検討したものではないが, セレンの拮抗剤であるテルル[28]を投与して, ビタミンE作用を持つ[27,29,30], セレンに拮抗させたつもりで, その出血現象への関与を検討した. 5 ppmのテルルは, わずかに, 肝臓肥大を惹起したのみで, 3週間ではなんら明瞭な毒性を示してはいないが, BHTと併用した時にも, 出血現象に関し, 相乗的な方向を示すことはなかった.

ランタンもBHTの効果に阻害的であった. ランタンはカルシウムの拮抗剤[31-33]であり, カルシウムは凝固系で第Ⅳ因子として働いており, もっとも単純に過ぎる考え方として, そのカルシウムと拮抗して相乗的な結果が現われることを期待したが, そういうことは全然なかった.

テルル, ランタンともに, BHTと併用した場合, 睾丸萎縮が認められる. 睾丸萎縮の現象は, 別の実験で, BHT単独投与の場合にも観察しているが, 睾丸萎縮が起こる時には, 死亡率は低下する傾向がある. この萎縮は, 初期における精巣間質への出血の結果生じたものと考えられ, 黄褐色を呈し線維化が認められる.

睾丸摘除ラットに, 一方はテストステロンを, 他方はエストロジエンを注射しつづけながら, ビタミンKフリーの飼料を与えた場合, プロトロンビン濃度の低下はテストステロン群に強く見られることが報告されている[34]. BHTの出血現象についても性差が認められることから[10], 精巣萎縮とホルモンとの関連, さらには出血致死率の低下には, 金属とBHTの相互作用の一つとし

て興味深い問題を含んでいるかも知れない.

BHT, LAS, テルルの単独投与群で, 肝臓相対重量の有意な増加が認められる. また, 併用群は BHT 単独群と差がない.

要　約

SD 系雄ラットに, 24%カゼイン食を基本飼料とし, 0.20% LAS, 0.50% ASA, 5 ppm $TeCl_4$ をそれぞれ 0.83% BHT と併用添加して与え, あるいは, 10mg/kg の $LaCl_3$ を1回腹腔内に注射して, BHT の出血致死効果への影響を見た. LAS はなんらの効果も与えず, ASA は相加的傾向を示し, テルルおよびランタンは阻害的であった.

文　献

1) Takahashi, O. and K. Hiraga : *Japan. J. Pharmacol.*, 26, 87p, 1976
2) Takahashi, O. and K. Hiraga : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press
3) 高橋　省, 平賀興吾：日薬理誌, 73, 51p, 1977
4) 高橋　省, 平賀興吾：日本薬理学会第27回北部会口演要旨集, 38, 1976
5) 高橋　省, 平賀興吾：日本薬理学会第55回関東部会口演要旨集, 55, 1976
6) 高橋　省, 平賀興吾：日本農芸化学会52年度大会口演要旨集, 394, 1977
7) 高橋　省, 福森信隆, 平賀興吾：第50回日本薬理学会総会口演要旨集, 311, 1977
8) 福森信隆, 高橋　省, 三栗谷久敏, 平賀興吾：日本電子顕微鏡学会第33回学術講演会講演予稿集, 44, 1977
9) 高橋　省, 平賀興吾：日本薬理学会第56回関東部会口演要旨集, 51, 1977
10) Takahashi, O., A. Takahashi, K. Hiraga, and T. Nakao : *J. Toxic. Sci.*, 2, 66, 1977
11) 高橋　省：未発表
12) Branen, A. L. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59, 1970
13) Daniel, J. W. : *Proc. Inter. Congr. Fd. Sci. Technol.*, 3rd ed., 793, 1970, Washington, D. C.
14) *FAO Nutrition Meeting Report Series*, No. 53A, 156, 1974, Rome
15) 米山允子, 藤井　孝, 伊川三枝子, 柴　英子, 坂本義光, 矢野範男, 小林博義, 市川久次, 平賀興吾：東京衛研年報, 24, 409, 1972
16) 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
17) 高橋　省, 柴　英子, 中尾順子, 平賀興吾：東京衛研年報, 25, 637, 1974
18) 高橋　省, 平賀興吾：東京衛研年報, 27-2, 86, 1976
19) Litchfield, Jr., J. T. : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 97, 399, 1949
20) Link, K. P., R. S. Overman, W. R. Sullivan, C. F. Huebner, and L. D. Scheel : *J. Biol. Chem.*, 147, 463, 1943
21) Quick, A. J. and L. Clesceri : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 128, 95, 1960
22) Weiss, H. J. : *Prog. Hemostasis Thromb.*, 1, 199, 1972
23) Sutor, A. H., E. J. W. Bowie, and C. A. Owen : *Mayo Clin. Proc.*, 46, 178, 1971
24) Mielke, C. H., J. C. Ramos, and A. F. H. Britten : *Am. J. Clin. Path.*, 59, 236, 1973
25) Zucker, M. B. and J. Peterson : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 547, 1967
26) Rosenberg, F. J., P. E. Gimber-Phillips, G. E. Groblewski, C. Davison, D. K. Phillips, S. J. Goralnick, and E. D. Cahill : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 179, 410, 1971
27) 日本農芸化学会昭和52年度大会, シンポジウム講演要旨集, 469, 1977
28) Hill, C. H. and G. Motrone : *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 29, 1474, 1970
29) Bieri, J. G., H. Dam, I. Prange, and E. Sφndergaard : *Acta Physiol. Scand.*, 52, 36, 1961
30) Yoshida, M. and H. Hoshii : *J. Nut.*, 107, 35, 1977
31) Holmsen, H., J. Whaum, and H. J. Day : *Experimentia*, 27, 451, 1971
32) Haksar, A., D. V. Maudsley, F. G. Pérson, and E. Bedigian : *J. Cell Biol.*, 68, 142, 1976
33) Van Breemen, C. and B. R. Farinas : *Circ. Res.*, 30, 44, 1972
34) Matschiner, J. T. and A. K. Willingham : *J. Nut.*, 104, 660, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 73-84, 1977

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）添加飼料によるラット終生飼育実験

米山允子*, 益淵正典*, 大石真之*, 高橋省*, 伊川三枝子*
吉田誠二*, 大石向江*, 三栗谷久敏*, 湯澤勝廣*, 平賀興吾*

Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Dietary Administration for Life-Span to Rats

MASAKO YONEYAMA*, MASANORI MASUBUCHI*, SHINSHI OISHI*, OSAMU TAKAHASHI*, MIEKO IKAWA*, SEIJI YOSHIDA*, HISAE OISHI*, HISATOSHI MIKURIYA*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）は合成洗剤の主成分として現在最も広く用いられている界面活性剤で，日常生活と深いかかわりをもっており，その人体への影響について多くの関心がもたれている．

LASの急性，亜急性あるいは慢性毒性について，これまでいくつかの報告がある．kayら[1]はLAS 0.02, 0.1および0.5%添加飼料による雌雄ラット90日間の飼育実験でLAS摂取量と関連した影響を認めなかったとし，Oserら[2]はLASの経口急性（LD_{50}）はラット雌雄で0.65g/kgであり，LAS 0.05および0.25g/kg/day, 12週間の雌雄ラットの飼育実験で0.25g/kg/day摂取雌ラットにおいてわずかに肝臓重量の増大を認めたが，組織学的変化はなかったとしている．Buehlerら[3]はLAS 0.02, 0.1および0.5%添加飼料による2年間の雌雄ラットの飼育実験と3世代にわたる繁殖性試験を行い，いずれもLASに起因すると考えられる悪影響はみられず，腫瘍の発生についても対照との間に差はなかったと述べている．千葉[4]はLASの雄マウスにおける経口LD_{50}は2.30g/kgであり，また，LAS 0.01, 0.05および0.1%添加飲料水を雄ラットに2年間飲ませた結果，腫瘍の発生についてはふれていないが，LASによると考えられる中毒所見はなかったとしている．なお，Michael[5]は，ラットにおいて経口投与した$LA^{35}S$は消化管より容易に吸収され，その代謝物および未変化体は主として尿に排泄，72時間後にはすべての器官・組織から^{35}Sを検出しなかったことを報告している．

以上は，LASの吸収，代謝，排泄は比較的早く，250 mg/kg/dayの摂取はラットに特に害的影響を与えないことを示唆している．当部でもLASの安全性研究の一環として急性および亜急性毒性試験を行い，LD_{50}はラット雌雄で0.40–1.82g/kg，Wistar系ラット雌雄による26週間の飼育実験では1.8%添加飼料摂取群（1.8%群）において体重増加の顕著な抑制，肝臓重量の増加，腎臓の中等度組織障害，貧血等を，0.6%群で体重増加のわずかな抑制，盲腸重量の増加，血清アルカリフォスファターゼ活性の上昇，腎臓の軽度な組織変化を，0.2%群で盲腸重量の増加と腎臓の軽微な組織変化を認め，0.07%群ではほとんど変化を認めない結果を得ている[6,7]．

本報告では，LAS 0.04, 0.16および0.6%添加飼料によるSlc-Wistarラットの1，3，6，12，24カ月および終生飼育試験を行い，LAS長期摂取の生体影響をラットの発育，死亡率および寿命の観点から考察した．

なお，本試験における病理組織学的検索結果および腫瘍発生情況については別に藤井ら[8]が報告する．

試験材料および試験方法

試料 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）は花王アトラス株式会社製ネオペレックスF-60, Lot No. 141 (C_{10} 10.6%, C_{11} 34.1%, C_{12} 27.7%, C_{13} 19.0%, C_{14} 8.7%, 有効成分 60±2%, 未反応油分15%以下, 無機塩類4.0%以下, 水分38%, pH（1%）7.1, 平均分子量 345.8）を用いた．使用に当っては有効成分（LAS）濃度を60%として，その濃度が0.04, 0.16および0.60%になるよう飼料に添加した．

飼料は日本クレア株式会社製CE-2（水分 8.0，粗蛋白質24.5，粗脂肪 4.5，粗繊維 4.0，粗灰分6.6，可溶性無窒素物 52.4%，348.1 Cal/100g）を用い，この粉末にLASを混合後固型化した．

実験動物 静岡県実験動物農業協同組合において

* 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

barrier system 下に生育された Wistar Slc ラット雌雄で，生後4週のものを購入した．

動物は室温 25±1°C，湿度 50～60%，照明を午前6時より午後5時までに制御した barrier system 飼育室において，前面および床が網のステンレス製個別飼いケージに入れ，自動給水（細菌沪過器経由）装置付ベルト式飼育架台にて飼育した．

観察法 各試験飼料ごとにラット雌雄をそれぞれ50匹用い，1，3，6および12カ月飼育に各5匹，24カ月および終生飼育に各15匹をランダムに割りつけ，更に飼育期間別に各試験飼料群を通してランダムに飼育架台に配置した．1週間予備飼育後（5週令より）試験飼料を与え，水道水とともに自由に摂取させた，

動物の一般状態は毎日観察し，体重および餌料摂取量は24カ月飼育群について15週まで毎週，25週まで隔週，以降4週毎に測定した．

1，3，6および12カ月飼育群では飼育終了時剖検後肝臓，腎臓，副腎，心臓および盲腸の重量測定，血清生化学的検査，血液学的検査を行った．

24カ月飼育群では飼育終了時剖検後脳，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，下垂体，副腎，精巣，前立腺，子宮，卵巣および盲腸の重量測定，血清生化学的検査，血液学的検査を行った．24カ月および終生飼育群ラットにおいて瀕死とみられるものは屠殺し，諸検査を行うよう努めた．

検査 体重測定は午前10時より，ラットの配列順に行った．飼料摂取量は，飼料投与量と2日間摂餌後の残余量およびケージ受皿への飼料コボシ量を測定し｛投与量－(残余量＋コボシ量)｝/2 により求めた．解剖は無麻酔下断頭放血屠殺により行い，この際放出する血液を採取し血液学的および血清生化学的検査に用いた．

血液学的検査：断頭時放出する血液の1滴で塗抹標本を作製，また，5－6滴を予めヘパリンナトリウムを塗布乾燥したガラス試験管に採取，次いで自動希釈器(York 社製）にて 44.7*ul* をとり Coulter Counter 用血液希釈液(Isoton)を加えて全量を 10*ml* とし，Coulter Counter Model S (Coulter Electric 社製）にて白

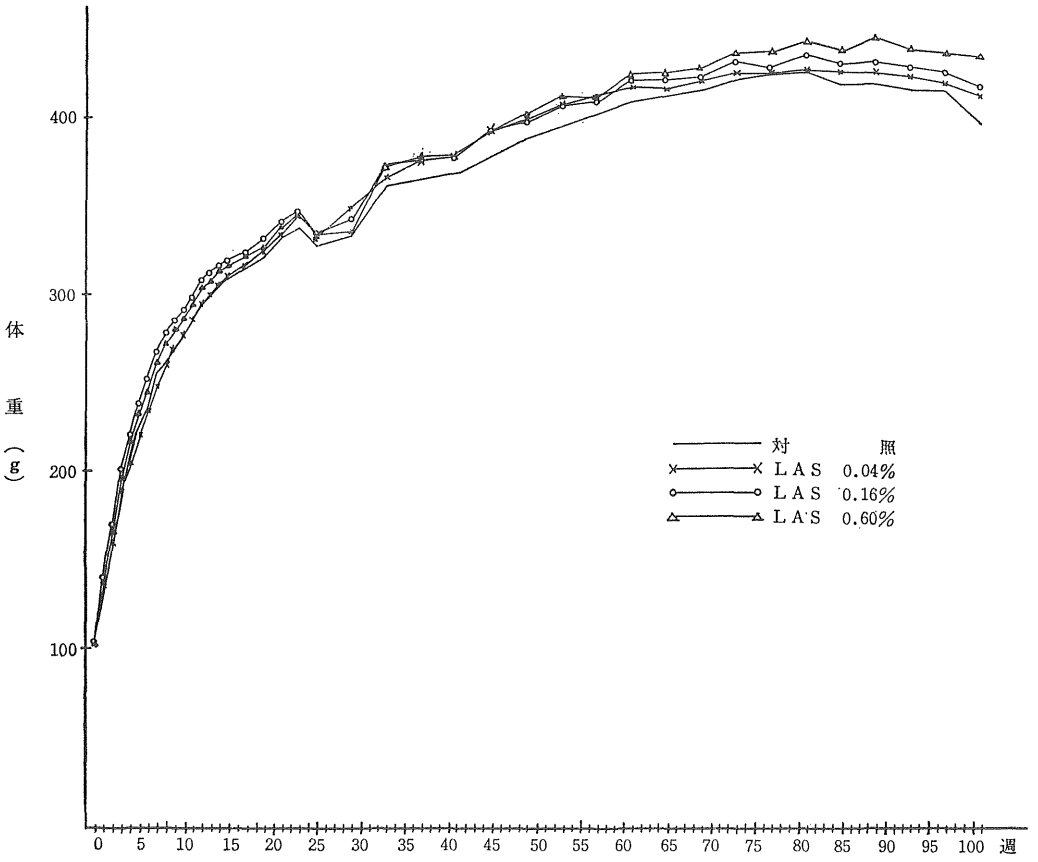


図 1-1. 体　重（雄）

血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（HGB），ヘマトクリット（HCT），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）を測定，血液塗抹標本はメイ・グリユンワルド氏液にて染色，鏡検した．

血清生化学的検査：断頭時放出する血液をガラス製遠心管にとり，室温30分間放置，次いで氷中に60分間置き血液上面のフィブリン膜を除去後冷却遠心機（0°C, 3,000 rpm, 10分）で遠心分離を行い，上清を血清として日立自動分析装置 M-400（日立製作所）により総蛋白質量（TP，Buiret 法），グルコース量(GLU, glucose oxidase 変法)，尿素窒素量（BUN, urease indophenol 法)，総コレステロール量（CHO, Liberman-Burcherd 法)，トランスアミナーゼ活性(GOT, GPT, Rieman-Frankel変法(およびアルカリフォスファターゼ活性(ALP, Kind-King 変法）を測定した．

測定・検査結果の推計学的検討に当っては危険率を5％に置いた．

結　　果

一般状態　飼育開始後第25週に4日間自動給水不全があり，対照群を含む全群において摂餌不良と体重減少がみられた．また，終生飼育の対照群雌雄，0.04％群雄，0.16％群雌雄の各1例と0.6％群雄の2例は自動給水装置が不良であったので実験より除外した．以上のほかは全飼育期間を通じてラットは良好に維持され，試料摂取各群とも対照群ラットとの間に外観，行動，その他の差は認められなかった．

体重　表1および図 1-1，2 に示すように，試料摂取全群雌雄とも24カ月の飼育期間を通して対照群にやや勝る体重増加傾向であった．

飼料および LAS 摂取量　表2に示すように，飼料摂取量は試料摂取各群雌雄ともに対照群と有意差なく，また，成長に伴う飼料摂取量の増加はほとんどみられず，1日の摂取量は雄で12—15 g，雌で7—10 g であった．従ってラット当り1日試料摂取量は 0.04％ 群雄 5 mg，雌 3 mg，0.16％群雄20mg，雌12mg，0.6％群雄75mg，雌 45mg で，雄 250g，雌 150g（生後 12 週，試料摂取開始後7週前後の体重で，発育曲線の勾配がゆるやかになる時期）での体重 kg 当り1日試料摂取量は雌雄ともに 0.04％群 20mg，0.16％群 80mg，0.6％群 300mg と概算された．

死亡率および生存期間　削痩，貧血様，体温下降等の症状を示し瀕死と判断したものは屠殺し，死亡として扱った．

1，3，6および12カ月飼育各群においては飼育終了時まで死亡例はなかった．

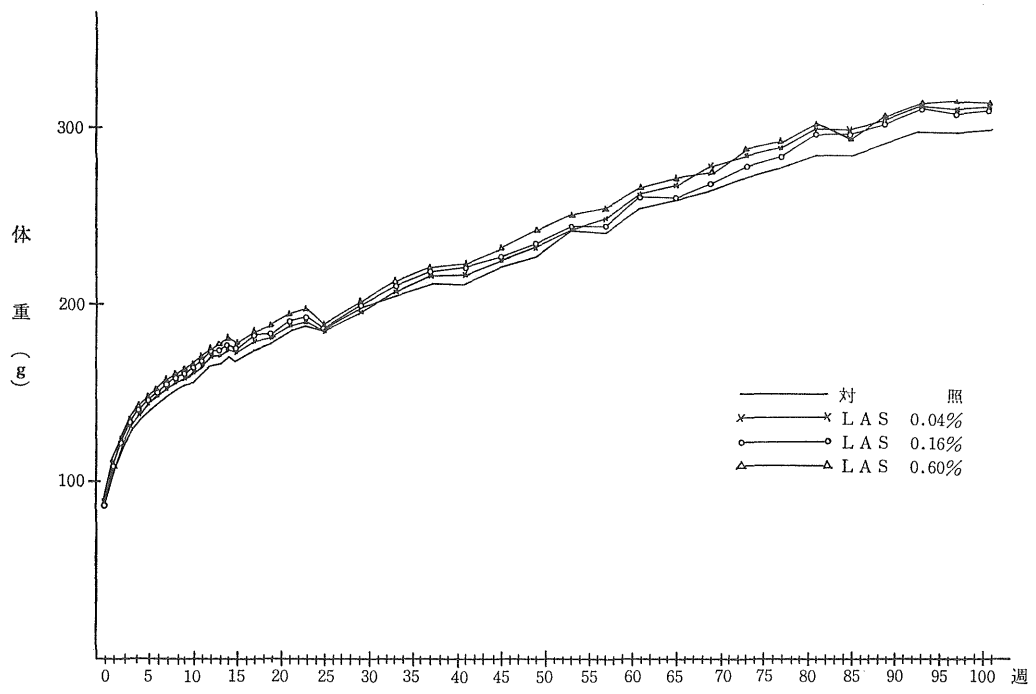


図 1-2.　体　　重（雌）

表 1. 体 重 (24 カ 月 飼 育 群)

	LAS% \ 週	0	1	3	5	11	17	29
♂	0	103.5± 6.7 [1]	135.4±12.8	191.6±26.9	225.9±35.2	284.2±42.4	314.2±40.9	333.6±53.9
		(100.0± 0)[2]	(130.2± 6.8)	(184.3±21.3)	(217.2±31.3)	(274.3±36.9)	(303.5±35.3)	(322.0±51.1)
	0.04	104.6± 4.5	136.2± 7.1	189.0±17.4	222.4±25.0	284.8±25.2	316.8±24.0	345.1±40.2
		(100.0± 0)	(129.8± 5.3)	(180.1±15.4)	(212.4±22.9)	(272.8±23.3)	(302.7±21.1)	(329.6±38.5)
	0.16	108.8± 4.6	142.6± 8.4	203.0±14.8	239.6±16.1	298.5±16.2	324.2±14.5	342.4±48.5
		(100.0± 0)	(130.4± 4.1)	(186.0± 8.4)	(219.6± 9.6)	(274.4± 9.9)	(298.3±10.5)	(314.3±43.8)
	0.60	107.0± 6.8	140.6±11.6	197.8±22.4	234.9±24.8	295.7±23.9	322.0±22.5	334.8±63.0
		(100.0± 0)	(131.0± 5.1)	(184.1±14.1)	(218.7±14.6)	(276.1±10.9)	(300.8± 8.4)	(312.1±54.5)
♀	0	88.9± 3.8	106.8± 4.3	129.4± 6.8	140.7± 8.3	160.2±11.1	174.7±11.1	198.8±10.3
		(100.0± 0)	(119.7± 3.6)	(144.9± 5.7)	(157.7± 6.7)	(180.3±11.9)	(196.6±12.7)	(223.5±15.3)
	0.04	89.2± 4.0	109.1± 5.1	132.7± 5.6	145.4± 7.1	166.7±11.0	179.1± 9.9	196.9±12.1
		(100.0± 0)	(121.9± 2.5)	(148.5± 4.8)	(162.7± 8.3)	(187.0±12.4)	(201.4±14.0)	(220.2±15.8)
	0.16	88.4± 4.1	108.8± 4.6	133.7± 5.6	146.9± 6.5	169.2±10.1	183.0±15.4	199.3±13.7
		(100.0± 0)	(122.5± 2.7)	(150.7± 5.4)	(165.8± 7.8)	(191.6±12.5)	(207.1±15.3)	(225.2±19.0)
	0.60	91.1± 3.7	110.5± 5.9	133.3±10.0	147.1±12.3	170.6±18.8	184.0±16.9	201.5± 9.9
		(100.0± 0)	(120.8± 3.5)	(145.6± 6.2)	(160.7± 8.7)	(187.0±16.6)	(201.6±13.3)	(221.1±16.3)

	LAS% \ 週	41	53	65	77	88	92	104
♂	0	368.0±42.7	395.1±42.0	411.3±39.5	424.4±43.2	419.8±42.4	415.3±42.6	389.2±50.8
		(355.2±37.9)	(381.2±34.8)	(397.2±34.6)	(409.8±37.4)	(406.6±36.9)(14)	(388.0±59.8)(14)	(381.4±44.5)(12)
	0.04	378.0±25.3	407.4±22.3	416.5±22.3	425.4±24.7	426.0±27.4	423.8±27.3	410.5±28.4
		(360.8±19.7)	(388.7±15.8)	(397.7±17.8)	(406.1±19.5)	(406.6±19.9)	(396.0±34.3)	(394.8±25.8)(12)
	0.16	376.7±20.8	406.8±19.8	421.9±21.7 [3]	429.9±18.7	431.2±15.9	429.7±16.0	412.0±20.9
		(345.9±17.7)	(373.7±19.5)	(389.3±22.0)(14)	(396.7±21.7)(14)	(398.1±22.9)(14)	(383.5±33.6)(14)	(380.4±27.6)(14)
	0.60	378.8±25.3	410.1±27.5	425.1±26.6	437.7±36.8	445.0±40.0	439.0±37.0	420.4±32.8
		(353.5±15.7)	(382.8±14.4)	(396.8±13.9)	(408.6±23.8)	(415.2±24.9)	(405.2±20.8)	(393.0±30.1)(15)
♀	0	212.7±11.1	242.2±17.4	259.4±23.3	278.6±22.5	291.0±25.2	297.3±24.9	296.5±23.7
		(239.1±14.5)	(272.6±25.5)	(291.7±29.4)	(314.3±30.7)(14)	(326.6±23.8)(13)	(336.0±32.6)(13)	(332.5±32.9)(12)
	0.04	216.7±11.6	242.7±13.1	268.5±16.8	289.0±19.8	304.1±20.3	312.2± 5.6	310.6±28.4
		(242.6±12.8)	(271.9±16.8)	(301.0±21.2)	(325.2±26.0)(14)	(342.2±26.6)(14)	(351.3±37.9)(14)	(353.1±36.6)(11)
	0.16	220.2±12.5	243.8±19.4	261.1±23.5	284.0±27.6	303.5±27.8	311.2± 6.1	307.7±29.0
		(248.8±17.0)	(275.4±21.9)	(295.2±29.7)	(322.9±34.5)(14)	(345.3±35.1)(14)	(353.0±35.5)(14)	(348.4±38.0)(12)
	0.60	223.4±14.6	251.0±23.2	270.2±23.8	293.8±27.1	306.5±31.8	313.7±30.3	308.0±33.3
		(244.6±10.4)	(274.7±19.3)	(296.0±20.7)	(320.7±22.4)(14)	(334.5±23.9)(12)	(341.0±22.3)(12)	(336.0±25.1)(12)

飼育開始時の各群ラット数は 15匹　　1) 実重量平均±SD　　2) 体重増加率(%)平均±SD　　3) ラット数

表 2. 飼料およびLAS摂取量(24カ月飼育群)

	LAS%	a) 週	0	1	3	5	9	13	25	88	104
♀	0	F	11.4±0.3 1) (111± 3)2)	13.1±1.1 (96± 4)	14.6±1.1 (73± 3)	13.1±0.6 (55±10)	13.5±1.3 (46± 3)	14.3±1.2 (44± 2)	14.6±2.9 (41±10)	12.8±0.8 (30± 2)	14.9±0.4 (36± 2)
		S									
	0.04	F	11.0±0.9 (109±11)	11.6±1.7 (86± 7)	12.4±2.0 (66± 5)	12.5±0.7 (55± 2)	14.7±0.5 (46± 3)	13.4±0.7 (44± 2)	14.4±0.9 (44± 3)	12.0±0.3 (27±1.3)	14.2±0.8 (34± 2)
		S	4.4±0.8 3) (43± 4)4)	4.6±1.2 (34± 3)	4.9±1.0 (26± 2)	5.0±0.5 (21± 1)	5.8±0.5 (18± 3)	5.4±0.2 (18± 1)	5.8± 0 (18± 3)	4.5± 1 (11± 1)	5.6± 1 (14± 1)
	0.16	F	13.1±0.6 (118± 2)	12.5±1.5 (87± 5)	13.8±2.3 (69±7.0)	13.9±3.3 (59±11)	12.9±0.7 (46± 1)	13.9±0.1 (46± 2)	12.7±1.1 (39± 2)	12.3±0.8 (29±1.8)	15.0±2.0 (38± 4)
		S	21± 1 (188± 4)	20± 2 (140± 9)	22± 3 (109±11)	22± 5 (94±17)	20± 1 (74± 2)	22± 0 (73± 3)	20± 1 (62± 4)	20± 2 (47± 3)	24± 3 (60± 7)
	0.60	F	11.6±1.4 (114±14)	12.0±0.6 (90± 5)	12.9±0.2 (69± 5)	11.9±0.5 (54±3.7)	12.1±0.4 (46±2.1)	13.7±0.8 (48± 5)	11.4±2.8 (36± 9)	11.7±0.6 (28± 2)	15.4±0.5 (37± 2)
		S	69± 7 (682±82)	72± 3 (540±30)	77± 1 (416±31)	71± 3 (323±22)	72± 2 (277±12)	82± 5 (285±28)	68±16 (213±53)	71± 4 (171±14)	92± 3 (220±11)
♂	0	F	8.6±0.4 (100± 4)	8.9±1.3 (87± 1)	9.2±0.8 (74± 2)	8.0±1.2 (58± 7)	7.7±1.3 (51±3.4)	8.7±1.6 (52± 5)	7.9±0.1 (44± 5)	10.0±0.5 (35± 4)	11.2±0.8 (36± 5)
		S	———	———	———	———	———	———	———	———	———
	0.04	F	11.9±0.9 (137±19)	8.2±2.6 (78±27)	9.5±0.5 (73± 6)	7.5±1.1 (52± 9)	7.9±1.9 (51± 7)	7.8±0.9 (47± 2)	8.1±0.6 (46± 1)	9.3±0.8 (34± 4)	13.5±3.1 (46±15)
		S	4.7±0.5 (55± 8)	3.2±1.0 (31±21)	3.8±1.0 (29± 5)	2.5±1.0 (20± 2)	3.1±1.0 (20± 3)	3.1± 0 (19± 1)	3.2± 0 (18± 1)	3.7±1.0 (14± 2)	5.4±1.0 (18± 6)
	0.16	F	10.2±0.6 (113± 8)	9.8±0.4 (90± 3)	9.6±0.6 (71± 3)	7.9±0.6 (53±4.1)	7.6±1.7 (48± 9)	8.8±1.8 (52±10)	9.1±0.5 (54± 4)	9.7±1.6 (34± 4)	11.6±0.2 (39± 2)
		S	16± 1 (181±13)	15± 1 (144± 5)	15± 1 (114± 5)	12± 1 (86± 6)	12± 2 (76±15)	14± 3 (82±15)	14± 1 (80± 6)	15± 3 (55± 8)	18± 0 (67± 4)
	0.60	F	10.3±0.1 (115±6.9)	9.4±1.2 (87± 7)	9.8±1.6 (75±10)	8.7±0.4 (60±4.2)	8.1±0.5 (50± 4)	8.1±1.7 (47± 5)	8.1±0.6 (44± 3)	6.4±0.9 (23± 4)	12.4±0.9 (41± 3)
		S	61± 1 (689±42)	56± 7 (521±39)	58±10 (446±63)	52± 2 (360±25)	48± 3 (302±22)	50± 9 (282±28)	49± 3 (262±16)	39± 8 (139±27)	74± 5 (246±18)

a) F：飼料摂取量，S：試料(LAS)摂取量，各群3例
1) 飼料摂取量平均±SD(g)　2) 体重Kg当り飼料摂取量平均±SD(g/Kg)　3) 試料摂取量平均±SD(mg)
4) 体重Kg当り飼料摂取量平均±SD(mg/Kg)

表3. 24カ月飼育群および終生飼育群ラットの生存期間

群 性	LAS %	飼育	ラット数	飼育開始（5週令）後の個別死亡（瀕死—屠殺を含む）週数	飼育104週の死亡率（%） 飼育期別	合計[1]	終生飼育群の生存期間 平均週数±SD (平均月数±SD)
♂	0 (対照)	24カ月	15	79, 99, 101 ‖	20.0	27.5	107±21.8
		終生	14	57, 74, 99, 100, 101 ‖ 105, 105, 106, 113, 120, 123, 128, 134, 136	35.7		(24.7±5.0)
	0.04	24カ月	15	94, 98, 102 ‖	20.0	24.1	118±18.2
		終生	14	87, 90, 97, 103 ‖ 113, 116, 119, 120, 124, 130, 135, 138, 139, 142	28.5		(27.2±4.2)
	0.16	24カ月	15	64 ‖	6.6	24.1	114±23.2
		終生	14	78, 78, 87, 92, 100, 102 ‖ 121, 129, 133, 133, 135, 135, 136, 139	42.8		(26.3±5.4)
	0.60	24カ月	15	‖	0	7.1*	123±21.3
		終生	13	80, 97 ‖ 105, 109, 113, 124, 129, 132, 133, 133, 141, 150, 154	15.3		(28.4±4.9)
♀	0 (対照)	24カ月	15	70, 79, 98 ‖	20.0	24.1	112±26.7
		終生	14	52, 77, 86, 100 ‖ 109, 113, 114, 117, 122, 131, 131, 136, 143, 147	28.5		(25.8±6.2)
	0.04	24カ月	15	72, 97, 100, 104 ‖	26.6	23.3	123±20.1
		終生	15	85, 85, 94 ‖ 108, 122, 123, 131, 133, 135, 135, 136, 137, 138, 139, 144	20.0		(28.4±4.6)
	0.16	24カ月	15	68, 98, 98 ‖	20.0	24.1	117±22.2
		終生	14	74, 86, 98, 104 ‖ 107, 109, 114, 129, 135, 135, 138, 138, 138, 145	28.5		(27.0±5.1)
	0.60	24カ月	15	76, 78, 85 ‖	20.0	30.0	114±26.2
		終生	15	58, 83, 100, 100, 102, 103 ‖ 109, 118, 118, 121, 122, 123, 148, 150, 161	40.0		(26.3±6.0)

‖ 飼育104週の時点を示す

1) 2×4 x^2検定で群間に有意差なし　　* 対照と比較して $p<0.05$ (2×2 x^2検定)

24カ月および終生飼育群の飼育開始後死亡までの個体別飼育週数，飼育104週（24カ月）における死亡率および終生飼育群の平均生存期間を表3に示した．飼育104週，24カ月飼育群定時解剖時までの死亡発生時および発生数は，0.6% 群雄を除く各群間に大差なく，24カ月飼育群と終生飼育群とを合計し算定した死亡率は25%前後であった．0.6%群雄の24カ月飼育群では死亡例なく，終生飼育群では13例中2例の死亡で，合計した死亡率は7.1%であり，対照群の27.5%の死亡率と較べて有意に小であった（2×2 χ^2 検定）．しかし各群を通した 2×4 χ^2 検定では群間の死亡率に有意差は認められなかった．

終生飼育各群105週以降の死亡の推移には大差はなかった．飼育開始後の平均生存期間はLAS摂取各群が対照群より長かったが推計学的には有意な延長とは認められなかった．

血清生化学的検査所見　1，3，6および12カ月飼育群の所見を表4に示した．対照群と比較して推計学的に有意な変動を示すものが散見されたが，LAS摂取量との関連がみられ，かつ各飼育期間を通して一定の変動傾向として捉えられるのは0.6%群雌雄におけるGPTおよびALP活性が高いことだけであった．

24カ月飼育群定時解剖例の所見は表5上段に示す．対照群を含めて群内変動の大きいものがみられ，対照群と比較して分散比に有意性を示す場合が多かった．平均値で推計学的（t検定）に有意であったのは0.04% 群雄のGOT活性と0.6%群雄のGPT活性とが高いことであった．

順位和検定ではBUNが0.6%群雄において有意に低かった．推計学的に有意性は認められないが0.6%群のALP活性に上昇傾向がみられ，1，3，6，12カ月飼育群の成績と関連して，GPT活性の上昇ともともに意味ある変動と考えた．

血液学的検査所見　表6に示すように1，3，6および12カ月飼育群においては推計学的に有意な変動を示すものが散見されるが，LAS摂取量との関連が特にみられる変化はなかった．

24カ月飼育群定時解剖例では，表5下段に示すように対照群との分散比に有意性を認めるものが多かったが，LAS摂取量との関連がみられる変化はなかった．

器官重量　表7-1，2に示すように1，3，6および12カ月飼育群において推計学的に有意な変動と認められたのは1カ月飼育0.6% 群雄の肝臓と0.16% 群雄の脾

表4. 1，3，6および12カ月飼育群血清生化学的検査

	飼育月	LAS %	ラット数	TP g/dl	GLU mg/dl	BUN mg/dl	GPT Karmen U/ml	GOT Karmen U/ml	ALP King-Armstrong U/dl	CHO mg/dl
♂	1	0	5	6.3±0.2[a)]	131±6	20.4±0.7	59.6±10.3	122±19	53.8±3.5	64.8±6.7
		0.04	5	6.2±0.2	133±5	20.0±1.3	58.0±4.0	116±7	56.8±3.8	61.0±5.3
		0.16	5	6.3±0.2	131±5	20.2±1.6	59.8±9.4	126±15	50.0±2.6	66.0±6.4
		0.60	5	6.3±0.2	130±4	21.4±0.9	86.4±4.2*	137±10	70.4±7.8*	56.0±1.5*
	3	0	5	7.4±0.4	137±12	21.6±1.1	74.6±15.6	135±12	41.2±5.3	58.4±5.8
		0.04	5	7.4±0.4	140±9	22.6±1.1	75.8±11.1	126±14	43.6±3.8	57.8±8.5
		0.16	5	7.3±0.4	126±7	21.0±0.7	89.8±11.8	139±20	68.6±59.0	57.8±5.1
		0.60	5	7.0±0.4	127±10	20.8±1.5	94.4±15.8	124±16	45.0±4.2	57.6±2.0
	6	0	5	8.3±0.7	137±4	23.8±2.2	120.8±20.3	143±11	46.8±5.3	85.8±5.6
		0.04	5	7.6±0.9	126±17	21.6±2.2	113.2±17.6	139±8	45.0±9.4	76.0±8.2
		0.16	5	7.1±0.4*	121±9*	20.0±2.7	104.6±31.5	130±17	41.4±6.2	73.4±8.9*
		0.60	5	8.7±0.7	150±10*	23.4±2.2	138.4±17.6	139±10	53.2±12.7	86.2±9.4
	12	0	5	7.1±0.2	125±8	18.2±1.1	99.6±35.1	135±19	36.2±5.1	98.2±11.8
		0.04	5	7.2±0.2	126±8	19.2±0.4	100.8±37.9	143±18	39.6±4.2	96.4±15.8
		0.16	5	7.0±0.2	125±4	19.4±0.7	81.0±13.1	119±9	38.4±6.7	88.2±6.4
		0.60	5	7.2±0.4	132±10	20.0±1.6	103.2±10.0	124±14	46.4±12.0	85.0±11.6
♀	1	0	5	6.1±0.2	128±3	18.8±2.0	45.6±5.1	115±11	36.8±7.8	76.4±12.5
		0.04	5	5.9±0.2	133±4	17.0±1.3	44.2±8.4	112±17	39.0±6.7	75.8±10.0
		0.16	5	5.9±0.2	128±3	17.2±2.0	47.2±6.4	117±15	39.6±4.0	76.6±10.9
		0.60	5	5.8±0.2	133±5	17.2±0.4	65.4±11.4*	116±7	43.0±8.2	75.2±4.9
	3	0	5	6.9±0.9	122±14	17.2±1.3	53.2±16.5	107±4	35.6±6.4	72.6±6.4
		0.04	5	6.9±0.4	126±11	15.8±1.6	52.0±24.2	107±12	34.0±3.5	66.0±10.9
		0.16	5	6.7±0.7	124±18	17.5±2.0	55.5±23.7	88±7*	37.7±8.0	56.0±15.7[1)]
		0.60	5	6.5±0.4	119±8	16.7±1.1	60.7±24.8	94±8*	42.7±2.9	69.0±— [2)]
	6	0	5	7.8±0.7	132±10	20.0±1.3	59.2±4.9	101±9	37.6±4.0	102.5±7.8
		0.04	5	8.2±1.3	133±23	20.0±1.6	59.4±9.1	107±6	45.4±2.4*	103.4±10.7
		0.16	5	8.1±0.2	135±3	19.8±2.9	50.6±6.7*	97±7	47.4±8.2*	100.6±2.6
		0.60	5	7.7±0.4	132±9	20.0±1.3	73.8±6.4*	93±3	47.4±4.9*	92.6±10.0
	12	0	5	7.3±0.2	123±5	16.0±0.7	60.0±20.5	90±18	27.0±3.5	132.0±20.5
		0.04	5	7.3±0.2	123±5	16.8±2.0	56.8±12.7	96±17	29.8±5.1	121.6±16.7
		0.16	5	7.4±0.4	124±3	17.0±1.3	66.4±24.3	102±13	32.4±1.5	121.2±26.6
		0.60	5	7.2±0.2	125±5	17.4±1.3	68.0±11.6	93±17	36.4±7.8	103.2±6.2

a) 平均±SD　1) 3匹　2) 1匹　* $p<0.05$

表5. 2年群（24カ月飼育群定時解剖例）血清生化学的検査および血液学的検査

	LAS %	ラット数	TP g/dl	GLU mg/dl	BUN mg/dl	GPT Karmen U/ml	GOT Karmen U/ml	ALP K—A U/dl	CHO mg/dl
♂	0	12	6.8±0.4[a)]	107±25	24.5±12.9	51.5±11.8	111±10	22.0±5.9	180±80
	0.04	12	6.9±0.8	116±24	19.0±4.8[1)]	52.2±15.1	126±19[1),2)]	26.0±8.3	181±39[1)]
	0.16	14	6.7±0.5	118±12[1)]	20.7±9.3	52.5±14.0	117±16	26.0±9.0	168±55
	0.60	15	6.7±0.5	104±22	15.7±3.7[1),3)]	66.8±15.4[2)]	114±15	27.4±9.1	161±81
♀	0	12	7.4±0.4	121±13	15.5±3.9	66.7±32.4	181±242	25.8±7.4	158±46
	0.04	11	7.7±0.7	121±18	16.5±3.9	47.5±9.0[1)]	100±13[1)]	25.7±7.5	178±41
	0.16	12	7.2±1.6[1)]	116±16	15.8±2.2[1)]	64.2±59.4[1)]	195±278	29.1±12.0	192±80[1)]
	0.60	12	7.5±0.8[1)]	125±18	16.5±3.7	59.6±12.3[1)]	103±14[1)]	30.5±8.6	160±33

	LAS %	ラット数	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	HGB g/dl	HCT %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
♂	0	12	6.9±3.6[a)]	6.47±0.74	13.2±1.4	34.2±2.7	53.7±1.9	20.6±1.1	38.4±1.9
	0.04	12	6.3±1.5[1)]	6.88±1.23	14.0±2.3	36.3±5.5[1)]	53.6±3.2[1)]	20.6±1.2	38.5±1.2
	0.16	14	6.2±1.0[1)]	7.15±0.68[2)]	14.2±1.4	37.1±3.7[2)]	52.2±1.2[2)]	19.8±0.9	38.2±1.4
	0.60	15	7.6±5.8	7.17±0.98	14.3±2.1	37.2±4.4	52.4±1.7	19.9±1.2	38.1±1.6
♀	0	12	7.5±12.8	6.31±1.59	13.1±2.4	34.6±6.1	58.2±12.0	21.9±4.1	37.6±1.0
	0.04	11	3.2±1.0[1)]	6.78±0.56[1)]	13.6±1.2	35.6±3.0[1)]	53.7±0.5[1)]	20.4±0.3	38.4±0.9
	0.16	12	3.4±0.8[1)]	6.71±0.64[1)]	13.5±1.3	34.6±2.8[1)]	53.3±0.8[1)]	20.3±0.6	38.1±1.2
	0.60	12	3.4±0.7[1)]	6.79±0.45[1)]	13.4±1.0	35.7±2.6[1)]	53.0±1.0[1)]	19.9±0.4	37.5±0.7

a) 平均±SD　1) 分散比 $p<0.05$　2) t検定 $p<0.05$　3) 順位和検定 $p<0.05$

臓の各比重量，3カ月飼育 0.6%群雌の左腎臓比重量と0.04%群雌の右腎臓重量とがそれぞれ大きかったことである．

推計学的には有意性が認められなかったが 0.6%群雌の肝臓と 0.6% 群雌雄の盲腸が全飼育期間を通じて大きい傾向を示した．

24カ月飼育群定時解剖例においては表 8-1, 2 に示すとおりで，対照群を含めて異常値が散在し，群内変動の大きいものがあり，対照群との分散比に有意性を示す場合が多かった．平均値においては対照群との間に大きい差を示すものもあったが，体重比重量で有意と認められたのは 0.16% 群雌の盲腸重量が小さかったことだけであった．順位和検定では 0.6% 群雌の左卵巣比重量が有意に小さかった．なお，1，3，6，12カ月飼育 0.6% 群雌にみられた肝臓重量増加傾向は，この群においても認められるようであった．

瀕死一屠殺例の所見　血清生化学的検査，血液学的検査，器官重量測定において異常値を示すものが多かったが，試料摂取各群と対照群との間に特徴的な差を見出すことはできなかった．

考　察

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）0.04, 0.16 および0.6%添加飼料による Slc-Wistar ラット雌雄の1，3，6，12，24カ月飼育を併せた終生飼育実験を行った．

LAS 摂取量との関連で，あるいは飼料24カ月までの各時期を通して一定の傾向として認められた変化は：肝臓重量が1カ月飼育 0.6% 群雄で有意に重く，雌では全期間を通して重い傾向，盲腸重量が 0.6%群雌雄で12カ月まで重い傾向，血清トランスアミナーゼ GPT 活性およびアルカルフォスファターゼ活性が 0.6% 群雌雄の全期間にわたる上昇あるいは上昇傾向であった．

飼育24カ月の死亡率は，0.6% 群雄が 7.1%で，対照群の 27.5% と比較して有意に低かったほかは各群 25%

表 6. 1，3，6および12カ月飼育群血液学的検査

	飼育月	LAS %	ラット数	WBC ×10³/mm³	RBC ×10⁶/mm³	HGB g/dl	HCT %	MCV μ³	MCH μμg	MCHC %
♂	1	0	5	5.6±0.9[a)]	7.31±0.24	16.7±0.7	38.0±1.6	52.8±0.4	22.7±0.4	43.6±1.1
		0.04	5	5.2±0.9	7.51±0.26	16.4±1.1	38.9±1.6	52.6±0.7	21.7±0.4*	41.9±0.9*
		0.16	5	4.8±1.1	7.49±0.62	17.0±1.1	38.9±3.4	52.4±0.7	22.6±1.1	43.6±2.5
		0.60	5	5.2±1.3	7.82±0.44	16.8±0.2	40.4±1.6*	52.8±0.9	21.4±1.3	41.2±2.0
	3	0	5	5.8±1.1	7.75±0.17	16.0±0.2	40.1±0.2	53.0±0.7	20.7±0.4	39.6±0.9
		0.04	5	6.0±0.9	7.95±0.26	16.4±0.9	40.9±1.8	52.8±0.9	20.6±0.4	39.8±0.4
		0.16	5	5.9±2.0	8.17±0.20*	16.9±0.4	42.1±1.3*	52.8±0.9	20.7±0.4	40.0±0.9
		0.60	5	5.9±1.8	8.15±0.49	16.5±0.9	42.0±2.5	52.6±0.9	20.2±0.4	39.0±0.4
	6	0	5	5.6±1.3	7.48±0.33	16.2±0.4	38.0±1.6	51.6±0.7	21.5±0.9	42.5±1.5
		0.04	5	4.8±1.1	7.42±0.11	15.4±0.4*	37.4±0.9	51.4±0.7	20.8±0.4	41.1±0.9
		0.16	5	4.9±1.3	7.58±0.22	16.1±0.2	38.3±0.9	51.4±0.7	21.2±0.9	41.9±1.8
		0.60	5	4.0±0.9	7.56±0.20	15.8±0.4	38.5±1.1	52.0±0.7	20.9±0.7	40.9±1.1
	12	0	5	4.9±2.2	7.97±0.38	16.2±0.7	40.5±1.8	51.8±0.4	20.3±0.4	39.9±0.9
		0.04	5	4.0±1.6	7.97±0.33	16.3±0.4	40.3±1.8	51.8±0.4	20.5±0.4	40.3±1.1
		0.16	5	4.3±1.6	7.73±0.22	15.7±0.4	39.1±1.6	51.6±0.9	20.4±0.2	40.2±0.9
		0.60	5	2.9±0.4	7.78±0.26	15.6±0.7	38.9±1.6	51.0±0.7	20.1±0.2	40.1±0.4
♀	1	0	5	4.2±1.6	6.40±0.22	16.6±1.1	33.7±1.1	53.2±0.4	25.6±1.1	48.9±2.2
		0.04	5	3.5±0.4	6.50±0.38	16.6±1.1	34.1±1.8	53.0±0.7	25.4±2.0	48.5±3.4
		0.16	5	4.5±1.1	6.67±0.26	16.5±0.9	35.1±1.3	53.0±0.7	24.5±0.9	46.9±1.6
		0.60	5	3.8±0.4	6.67±0.47	16.5±1.6	34.8±2.7	52.6±0.7	24.6±1.3	47.1±2.2
	3	0	5	4.5±0.7	7.50±0.47	16.7±1.1	42.0±3.1	56.6±0.7	22.2±0.2	39.7±0.9
		0.04	5	4.2±0.9	7.16±0.73	15.6±1.1	40.9±3.8	57.2±1.1	21.9±1.1	38.4±1.6
		0.16	5	3.5±0.2*	6.41±1.14	14.2±2.2*	36.3±5.8	56.2±0.7	22.2±0.9	39.4±1.3
		0.60	5	3.4±0.4*	7.06±0.49	15.1±1.1	40.0±2.7	56.5±0.7	21.5±0.4	38.2±0.9*
	6	0	5	2.6±0.2	7.00±0.29	15.9±1.1	36.8±1.6	53.4±0.7	22.7±1.1	43.2±2.2
		0.04	5	3.2±0.7	7.06±0.17	15.7±0.7	37.0±1.1	53.2±0.4	22.1±0.7	42.1±1.6
		0.16	5	3.0±0.4	7.03±0.33	15.6±0.4	36.6±1.6	52.8±0.9	21.4±0.9	41.0±1.3
		0.60	5	2.9±0.4	6.99±0.42	15.2±1.1	36.6±2.5	53.0±1.1	21.8±1.3	41.5±2.5
	12	0	5	2.3±0.4	6.96±0.35	14.5±0.4	37.7±1.6	55.2±0.9	20.8±0.7	38.4±1.3
		0.04	5	2.7±0.9	7.38±0.20	15.4±0.4	39.6±1.3	54.6±0.7	20.8±0.4	38.7±0.7
		0.16	5	4.8±2.9	7.28±0.29	15.5±0.9	39.6±2.2	55.4±1.6	21.3±0.9	39.1±1.3
		0.60	5	2.8±2.0	7.03±0.40	14.5±0.7	39.1±4.0	53.6±1.6	20.6±0.7	39.1±0.7

a) 平均±SD　　* $p < 0.05$

表 7-1. 1，3，6および12カ月飼育群器官重量（雄）

飼育月	LAS %	ラット数	肝臓 g (g/100g B.W.)	左腎臓 mg (mg/100g B.W.)	右腎臓 mg (mg/100g B.W.)	右副腎 mg (mg/100g B.W.)	脾臓 mg (mg/100g B.W.)	心臓 mg (mg/100g B.W.)	盲腸 mg (mg/100g B.W.)
1	0	5	9.85±0.67 a) (4.28±0.09)	872±42 (379±12)	844±50 (367±16)	16.0±3.8 (6.9±1.5)	492±43 (214±9)	727±64 (316±25)	1085±119 (472±41)
	0.04	5	9.80±0.51 (4.32±0.07)	840±38 (370±13)	822±40 (362±18)	15.7±1.4 (6.9±0.5)	504±31 (222±9)	720±22 (317±9)	1065±165 (472±87)
	0.16	5	8.87±0.51 (4.13±0.20)	828±46 (386±20)	816±48 (380±18)	13.5±5.2 (6.2±2.3)	494±10 (230±8)*	697±19 (324±8)	969±61 (452±36)
	0.60	5	10.65±0.42 (4.58±0.04)*	886±35 (381±10)	848±54 (364±20)	12.4±4.1 (5.3±1.8)	480±25 (206±10)	732±22 (315±17)	1205±221 (519±103)
3	0	5	11.94±1.01 (3.49±0.20)	1143±66 (334±13)	1115±86 (326±19)	21.1±3.7 (6.1±1.0)	705±62 (206±15)	913±54 (267±11)	1433±173 (419±47)
	0.04	5	11.10±1.14 (3.52±0.09)	1066±102 (339±19)	1018±139 (323±20)	21.5±4.5 (6.7±0.9)	664±28 (212±13)	848±51 (270±17)	1310±233 (421±92)
	0.16	5	10.86±1.21 (3.37±0.33)	1056±61 (327±7)	1046±40 (324±6)	18.9±6.5 (5.7±1.8)	633±48 (205±9)	917±61 (284±10)	1522±468 (466±136)
	0.60	5	11.30±1.07 (3.52±0.25)	1050±91 (328±19)	1035±96 (323±22)	14.8±3.8 (4.6±1.2)	619±58 (193±12)	897±55 (280±15)	1511±199 (471±52)
6	0	5	10.80±1.21 (3.28±0.07)	1092±79 (332±39)	1059±56 (323±25)	21.6±4.6 (6.5±1.1)	633±40 (193±19)	863±92 (263±25)	1392±205 (423±41)
	0.04	5	10.70±0.67 (3.23±0.09)	1042±79 (313±22)	1082±70 (325±8)	17.6±2.0 (5.2±0.4)	624±14 (188±13)	898±70 (270±14)	1342±306 (403±90)
	0.16	5	11.16±13.0 (3.23±0.11)	1101±126 (319±17)	1072±129 (311±23)	22.1±3.0 (6.4±0.9)	631±68 (183±6)	868±51 (253±16)	1503±258 (435±51)
	0.60	5	11.31±1.23 (3.25±0.29)	1120±26 (323±10)	1081±56 (311±11)	19.4±6.2 (5.5±1.7)	609±77 (175±19)	900±51 (259±15)	1524±187 (440±61)
12	0	5	12.60±1.25 (3.10±0.13)	1218±114 (304±19)	1206±116 (301±24)	17.9±5.0 (4.5±1.5)	672±43 (167±3)	962±61 (240±12)	1342±158 (334±27)
	0.04	5	11.90±1.14 (3.10±0.09)	1201±55 (315±28)	1183±44 (310±27)	22.5±3.8 (5.9±1.1)	644±36 (168±14)	979±51 (256±21)	1224±368 (322±98)
	0.16	5	13.22±1.12 (3.20±0.18)	1235±92 (305±24)	1193±89 (294±20)	19.5±6.3 (4.7±1.4)	686±70 (169±4)	1002±49 (247±11)	1184±38 (292±14)
	0.60	5	13.39±0.78 (3.30±0.18)	1228±33 (303±12)	1224±49 (302±12)	18.0±6.9 (4.5±1.8)	644±44 (159±15)	984±57 (243±14)	1471±270 (362±58)

a) 平均±SD　　*p＜0.05

表 7-2. 1，3，6および12カ月飼育群器官重量（雌）

飼育月	LAS %	ラット数	肝臓 mg (g/100g B.W.)	左腎臓 mg (mg/100g B.W.)	右腎臓 mg (mg/100g B.W.)	右副腎 mg (mg/100g B.W.)	脾臓 mg (mg/100g B.W.)	心臓 mg (mg/100g B.W.)	盲腸 mg (mg/100g B.W.)
1	0	5	5.04±0.49 a) (3.55±0.29)	546±19 (385±12)	533±24 (377±24)	19.1±4.1 (13.3±2.3)	378±25 (267±15)	510±34 (361±38)	820±103 (581±87)
	0.04	5	4.97±0.51 (3.46±0.22)	548±31 (382±17)	548±32 (382±23)	15.1±4.5 (10.5±3.2)	367±21 (256±12)	485±30 (338±21)	790±83 (551±48)
	0.16	5	4.87±0.72 (3.49±0.13)	545±66 (392±14)	522±64 (376±16)	11.7±8.9 (8.0±5.4)	370±40 (266±17)	475±67 (341±15)	774±55 (562±62)
	0.60	5	5.34±0.56 (3.72±0.34)	564±20 (393±12)	545±27 (380±17)	18.2±4.2 (12.5±2.6)	375±24 (261±9)	485±30 (338±19)	791±94 (552±70)

3	0	5	5.55±0.42 (3.23±0.29)	599±53 (348±18)	560±43 (325±17)	23.6±4.7 (13.7±2.7)	455±35 (265±18)	572±56 (332±28)	1030±118 (598±50)
	0.04	5	6.12±0.38 (3.27±0.16)	659±51 (352±22)	641±45* (343±18)	28.3±2.4 (15.2±1.9)	474±14 (254±16)	630±64 (337±26)	1046±142 (562±92)
	0.16	5	5.67±0.38 (3.14±0.18)	614±34 (341±24)	598±37 (332±27)	24.4±1.3 (13.5±0.8)	475±32 (264±24)	573±17 (318±19)	963±147 (536±86)
	0.60	5	6.42±0.85 (3.74±0.36)	641±37 (374±5)*	582±66 (339±28)	22.0±5.8 (12.9±3.7)	441±45 (257±27)	527±54 (307±25)	1086±156 (638±127)
6	0	5	5.76±0.49 (3.09±0.20)	672±66 (360±27)	704±82 (377±35)	25.6±2.5 (13.7±1.3)	462±41 (248±15)	613±77 (328±35)	948±136 (511±87)
	0.04	5	5.60±0.74 (2.97±0.31)	695±48 (369±21)	691±65 (367±30)	25.0±1.3 (13.3±1.0)	467±44 (248±23)	622±75 (331±40)	1053±304 (557±150)
	0.16	5	6.46±0.38 (3.23±0.11)	721±42 (360±12)	734±49 (367±21)	27.0±8.9 (13.5±4.4)	489±38 (244±13)	681±64 (339±25)	1086±141 (542±64)
	0.60	5	6.15±0.07 (3.27±0.11)	675±46 (359±22)	693±18 (368±7)	23.8±1.9 (12.6±0.8)	487±46 (258±17)	614±45 (326±23)	1148±108 (611±57)
12	0	5	7.66±0.72 (3.18±0.11)	818±77 (340±14)	813±68 (338±9)	28.4±3.4 (11.7±0.6)	532±28 (223±24)	698±53 (290±9)	908±116 (379±50)
	0.04	5	7.42±0.63 (3.24±0.27)	788±77 (343±24)	784±83 (342±28)	25.6±4.4 (11.2±2.5)	450±26 (198±31)	647±37 (295±29)	884±153 (391±94)
	0.16	5	7.59±1.10 (3.33±0.13)	808±79 (357±31)	782±78 (346±31)	26.7±4.2 (11.8±2.1)	512±73 (226±27)	687±73 (303±20)	916±140 (409±89)
	0.60	5	8.12±0.51 (3.37±0.13)	793±22 (330±13)	779±34 (324±20)	28.6±2.1 (11.9±1.3)	565±28 (219±21)	670±40 (278±14)	1143±175 (477±86)

a) 平均±SD　　*p＜0.05

表 8-1.　2年群（24カ月飼育群定時解剖例）器官重量

	LAS %	ラット数	脳 mg (mg/100g B.W.)	心臓 mg (mg/100g B.W.)	肝臓 g (g/100g B.W.)	左腎臓 mg (mg/100g B.W.)	右腎臓 mg (mg/100g B.W.)	脾臓 mg (mg/100g B.W.)	下垂体 mg (mg/100g B.W.)
♂	0	12	2038±104[a] (530±59)[a]	1071±134 (278±39)	13.55±2.91 (3.46±0.51)	1550±284 (406±116)	1568±306 (411±123)	1141±345 (292±87)	21.4±14.6 (5.9±5.6)
	0.04	12	2085±42 [1] (510±32)[1]	1094±90 (266±18)[1]	14.55±1.54[1] (3.54±0.34)	1580±147[1] (384±24)	1601±190 (389±37)[1]	1452±943 [1] (361±251)[1]	15.8±5.8 [1] (3.9±1.6)[1]
	0.16	14	2086±59 [1] (507±19)	1107±88 (268±16)[1]	15.17±2.02 (3.69±0.60)	1553±157[1] (377±45)[1]	1537±147[1] (374±48 [1]	1134±657 [1] (276±161)[1]	14.1±4.7 [1] (3.4±1.2 [1]
	0.60	15	2068±58 (494±36)	1130±131 (269±35)	14.56±2.00 (3.46±0.38)	1557±252 (369±40)[1]	1538±222 (365±35)[1]	1056±323 (253±85)	23.9±17.9 (5.4±3.8)
♀	0	12	1922±53 (652+56)	813±57 (275±34)	9.39±1.40 (3.16±0.39)	1014±81 (342±24)	1012±88 (341±31)	1031±1568 (353±556)	27.6±28.5 (9.5±10.2)
	0.04	11	1910±38 (619±54)	818±50 (264±20)[1]	9.67±1.09 (3.12±0.41)	1046±99 (338±34)	1015±84 (328±31)	558±51 [1] (181±28)[1]	31.0±38.3 (10.8±15.3
	0.16	12	1923±61 (630±70)	857±99 [1] (280±43)	12.35±4.45[1],[2] (4.05±1.57)[1]	1134±265[1] (368±76)[1]	1110±232[1] (361±66)[1]	1506±1541 (550±1016)[1]	42.0±49.6 [1] (13.3±15.2)
	0.60	12	1902±58 (623±59)	806±70 (262±20)	10.68±1.08[2] (3.49±0.51)	1067±121 (349±51)[1]	1069±95 (350±46)	777±638 [1] (264±252)[1]	60.7±80.9 [1] (21.0±28.8)[1]

a) 平均±SD　　1) 分散比 p＜0.05　　2) t 検定＜0.05

表 8-2. 2年群（24カ月飼育群定期解剖例）器官重量（つづき）

	LAS %	ラット数	左副腎 mg (mg/100gB.W.)	右副腎 mg (mg/100gB.W.)	♂左精巣 ♀左卵巣 mg (mg/100gB.W.)	♂右精巣 ♀右卵巣 mg (mg/100gB.W.)	♂前立腺 ♀子宮 mg (mg/100gB.W.)	盲腸 mg (mg/100gB.W.)
♂	0	12	35.4±11.5 (9.5±5.1)	30.8±9.5 (8.0±3.2)	1690±863 (429±218)	2077±727 (513±509)	156.7±104.5 (41.6±29.0)	1491±206 (375±57)
	0.04	12	114.9±129.8[1] (27.8±57.1)[1]	29.5±7.5 (7.1±1.8) [1]	2203±1513[1] (531±364)	1660±956 (413±251)[1]	163.8±106.9 (39.6±26.2)	1448±163 (352±34) [1]
	0.16	14	31.9±7.0 [1] (7.8±2.0) [1]	28.7±8.1 (6.9±2.0)	2052±726 (503±191)	2062±1015 (502±247)[1]	136.9±100.0 (33.4±24.5)	1338±135 [2] (325±36) [2]
	0.60	15	34.4±8.9 (8.1±2.0) [1]	50.4±65.6 [1] (11.9±15.2)[1]	1824±1434[1] (429±310)	1650±1016 (400±260)[1]	153.6±97.0 (35.9±21.3)	1559±468 [1] (370±101)[1]
♀	0	12	33.9±4.8 (11.4±1.7)	28.7±6.1 (9.6±2.0)	54.7±47.8 (19.4±20.1)	50.3±20.6 (17.2±8.4)	731±109 (249±54)	1178±278 (397±84)
	0.04	11	37.7±10.3[1] (12.3±3.8)[1]	33.8±6.1 (10.9±2.6)	40.9±15.2[1] (13.1±4.9)[1]	45.4±12.5[1] (14.7±4.1)	711±91 (232±38)	1256±217 (405±70)
	0.16	12	36.0±7.2 (11.8±2.7)	33.8±6.5 (11.0±2.0)	42.4±19.8 (13.6±6.1)	52.3±32.0 (17.0±10.5)	744±139 (243±67)	1326±340 (432±117)
	0.60	12	40.2±9.3[1],[2] (13.1±3.2)[1]	34.3±6.8[2] (11.2±2.4)	36.6±17.1[1] (11.6±4.9)[1],[3]	51.7±40.4[1] (16.8±13.5)	774±99 (254±45)	1270±256 (411±79)

a) 平均±SD 1) 分散比 $P<0.05$ 2) t 検定 $P<0.05$ 3) 順位和検定 $P<0.05$

前後であり，また死亡発生の推移にも対照群のそれと大差を認めなかった．さらに終生飼育群の平均生存期間も対照群と有意差なく，対照群を下回るものはなかった．

摂餌量の減少は平均寿命の延長をきたすことがあるが[9]，本実験では0.6%群でも摂餌量の低下はみられず，発育（体重増加・行動）も対照群と変ることはなかった．

発育の変化，特に小動物では内的状態の変化を鋭敏に反映し，寿命の変化とともに生体の障害発生を総合的に表現するものと考えている．生体が異物を摂取すれば，必ずそれに対応する変化が起るはずであり，毒性学的には，その変化が障害となるかが問題となる．しかし本終生飼育実験の途中経過で認められた諸変化は，飼料摂取量，発育，死亡率，平均寿命の観点から障害に結ぶものはなかったと考えられる．すなわち，本実験においてLAS 0.6%添加飼料摂取（LAS 300mg/kg/day）はラットに特に害的影響を与えなかったと結論できよう．

要　約

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）0，0.04，0.16および0.6%添加飼料によるSlc-Wistarラットの終生飼育実験を行った．

ラットは1，3，6および12カ月飼育にそれぞれ雌雄各5匹，24カ月および終生飼育にそれぞれ雌雄各15匹，計400匹を用い，生後5週より試験飼料を与えた．

途中経過で，LAS 0.6%添加飼料摂取ラットにおいて肝臓および盲腸重量の軽度の増加，血清，GPT，アルカリフォスファターゼ活性の軽度の上昇等を認めたが，飼料摂取量，体重増加，一般状態，死亡率の推移，平均生存期間において対照群に劣ることはなかった．

以上の結果よりLAS 0.6%添加飼料摂取（LAS 300 mg/kg/day）はラットに害的影響を与えないと結論した．

文　献

1) Kay, J.H., F.E. Kohn, and J.C. Calandra : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 812, 1965
2) Oser, B. L. and K. Morgareidge : *ibid.*, 7, 819, 1965
3) Buehler, E. V., E. A. Newman, and W.R. King : *ibid.*, 18, 83, 1971
4) 千葉昭二：食衛誌，13，509，1972
5) Michael, W.R. : *Toxicol, Appl. Pharmacol.*, 12, 473, 1968
6) 小林博義，市川久次，藤井　孝，矢野範男，細野敏秀，平賀興吾，中村　弘，渡辺悠二，三村秀一：東京衛研年報，24，397，1972
7) 米山允子，藤井　孝，伊川三枝子，柴　英子，坂本義光，矢野範男，小林博義，市川久次，平賀興吾：東京衛研年報，24，409，1972
8) 藤井　孝，坂本義光，阿部幸恵，三栗谷久敏，湯澤勝廣，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，85，1977
9) Silberberg, M. and R. Silberberg : *Physiol. Rev.*, 35, 347, 1955

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 85-108, 1977

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）添加飼料を終生摂取させたラットの病理学的検索

藤井　孝*, 坂本義光*, 阿部幸恵*, 三栗谷久敏*
湯澤勝廣*, 平賀興吾*

Pathological Examination on Rats Fed with Linear Alkylbenzene Sulfonate for Their Lifespan

TAKASHI FUJII*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, YUKIE ABE*,
HISATOSHI MIKURIYA*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

Feeding test of linear alkylbenzene sulfonate was conducted on S1c: Wistar rats for it's toxicity and carcinogenicity. The test material was mixed with feed in a concentration of 0.04, 0.16 and 0.60%, and fed for 24 months or lifespan to the groups of both 15 male and 15 female rats respectively. Histopathological examination revealed that there was no evidence of a treatment-related effect on any tissue examined. Whereas a variety of tumors were observed in both linear alkylbenzene sulfonate treated and control rats, none was attributed for the exposure to linear alkylbenzene sulfonate. There was no relationship among the dosage groups, sex, type of tumor, or the site of occurrence. Thus, it was concluded that under the conditions of this pathological examination, linear alkylbenzene sulfonate was not toxic nor carcinogenic for rats.

緒　言

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下，LAS と略す）は合成洗剤の主成分として分岐鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムに代って用いられるようになった界面活性剤で，合成洗剤の急速な普及によって日常生活に密着した化学物質となっている．このため LAS 摂取による人体への影響および安全性については身近な問題として多くの関心を集めている．LAS の安全性に関する実験報告はいくつかみられ，ラットを用いた短期および長期連続摂取実験ではいずれも摂取に関連した著明な変化を認めていない[1-5]．しかしLASの連続摂取がラットの特に生存期間および腫瘍発生にどのような影響を及ぼすかについては更に検討が加えられるべき問題であると思われる．そこで今回はこれらの点を検討すべくラットに LAS 添加飼料を終生摂取させる試験を行なった．本報告はこの試験での病理学的検索の結果である．

試験材料および試験方法

試料　LAS は花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60, Lot. No. 141 を用いた．これの各種の分析値は炭素の重量百分率が C_{10} 10.6%, C_{11} 34.1%, C_{12} 27.7%, C_{13} 19.0%, C_{14} 8.7%であり有効成分は 60±2%，未反応油分 15%以下，無機塩類 4.0%以下，水分 38%，1%水溶液の pH は 7.1，平均分子量は 345.8 であった．これに基づき試料の LAS 濃度(有効成分量)を 60% として濃度が 0.00(対照)，0.04, 0.16 および0.60%となるように飼料中に添加した．飼料は日本クレア株式会社製粉末飼料 CE-2（平均分析値：水分8.0%，粗蛋白質 24.5%，粗脂肪 4.5%，粗線維 4.0%，粗灰分 6.6%，可溶性無窒素物 52.4%，348.1 cal/100g）を用い，これに試料をそれぞれの濃度で混合した後固型飼料化した．

実験動物および飼育環境　静岡実験動物農業協同組合の SIc: Wistar 系ラット雌雄(バリアー環境下で生育)

* 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. Macroscopical Findings—Summary of Observations

Treatment period	Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
	Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats	12	12	14	15	12	11	12	12	17	17	15	13	17	19	17	18
GENERAL																
Pollar	—	—	—	—	1	—	—	—	2	5	4	3	6	5	4	3
Emaciation	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	2	4	2	2	4	6
CUTANEOUS/SUBCUTANEOUS																
Mass	1	1	2	2	—	—	2	—	5	6	5	5	4	9	5	3
Mass in base of ear	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
PREPUTIAL GL.																
Enlargement	—	—	—	—	—	1	1	—	1	2	4	2	1	3	3	2
Nodule	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—
ABDOMINAL CAVITY																
Fluid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1	2	—	—
Nodules/disseminated	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—
PLEURAL CAVITY																
Fluid	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	4	1	2	4	2	1
HEART																
White stripes in wall	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	1	3	1	—	—	—
Clots	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	3	2	1	5	1	1
FORE-STOMACH																
Thickening of wall	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4	2	1	2	—	2	1
Petechiae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	1	1	—	1	1	—
Ulcer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4	3	1	—	—	—
Perforation	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—
GLANDULAR STOMACH																
Thickening of wall	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	2	—	—	—	—
Petechiae	—	—	1	1	1	—	—	—	3	4	6	4	4	1	3	3
Ulcer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—
INTESTINE (ILEUM)																
Mass in wall	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
LIVER																
Yellowish brown	3	1	—	1	1	1	1	1	3	3	2	3	8	5	3	4
Dark brown	—	—	2	1	—	1	—	—	—	1	2	2	—	4	1	1
Red spots/diffuse	—	—	—	—	—	—	1	—	2	1	—	4	3	2	1	—
White spots/diffuse	2	1	—	1	1	—	3	3	3	2	—	3	3	2	1	5
Irregular surface	2	2	1	—	1	—	2	—	4	2	4	2	8	6	3	3
Enlargement	—	—	—	—	—	—	1	—	2	—	1	2	2	1	2	1
Thickening of edge	—	—	1	—	—	—	1	—	3	4	4	2	4	6	3	4
Atrophy	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	3
PANCREAS																
Hemorrhage/ecchymoses	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1	—
Small hematoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—
Small nodule	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1	—	3	1	—	—	—

SPLEEN																
Enlargement	1	2	1	—	1	—	2	1	5	7	4	2	7	6	6	4
Atrophy	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	1
Depression	—	—	1	2	—	—	—	—	3	1	1	2	1	2	—	—
Nodule	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—
KIDNEYS																
Yellowish brown	8	5	2	3	—	—	1	—	6	7	2	5	4	1	3	3
Dark brown	—	1	3	3	2	—	1	2	—	—	1	2	—	7	3	4
Granular surface	5	5	5	4	1	—	2	2	7	8	4	5	4	6	2	2
Enlargement	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	3	2	1	1	—	—
Calculus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	1	—
Edema	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1	2	1
TESTES																
Enlargement/nodules	3	6	6	7					6	5	6	5				
Atrophy/nodules	1	4	2	5					3	3	5	3				
Atrophy	3	2	—	2					4	10	4	4				
VAGINA																
Mucus					—	—	—	—					5	5	3	5
UTERUS																
Polyp					1	—	3	—					1	3	3	3
Mass in wall					—	1	—	—					—	—	2	2
OVARY																
Edema					1	—	2	1					—	2	2	2
Nodule					—	—	—	—					—	1	—	1
PITUITARY																
Enlargement	4	1	—	5	7	4	6	6	5	5	5	8	12	11	10	13
Hemorrhage/hematoma	—	2	2	1	—	1	—	—	1	1	1	—	—	2	1	1
THYROID																
Enlargement	—	—	—	—	—	1	—	—	1	2	1	1	1	1	1	1
ADRENAL																
Enlargement	2	1	—	—	—	—	—	—	4	5	4	5	4	3	4	2

1) Rats treated with LAS (linear alkylbenzene sulfonate) for 24 months and killed at termination.
2) Rats treated with LAS until dying or being moribund.
3) C: Rats received diet containing 0.00% LAS.
   L: Rats received diet containing 0.04% LAS.
   M: Rats received diet containing 0.16% LAS.
   H: Rats received diet containing 0.60% LAS.

を4週令で購入した．1週間の予備飼育後（5週令時）の平均体重は雄105g，雌89gであった．ラットは前面と床が網状で他は板状のステンレス製懸垂式個別ケージに1匹ずつ収容し自動給水装置（細菌ろ過器経由水道水）のついたベルト式飼育架台で飼料・水を自由に摂取させて飼育した．飼育室はバリアー区域内に設置し，室温 25±1°C，湿度 50—60%，給気は HEPA フィルターを通して行ない，換気回数は1時間に10回，照明時間は午前6時から午後5時までにそれぞれ制御した．

試験方法　LAS 投与は1週間予備飼育後，ラットが5週令になった時点より添加飼料を自由に摂取させることによって開始した．ラットは摂取する飼料中の LAS 濃度によって 0.00（対照），0.04，0.16 および 0.60% の4群に分け各群とも雌雄それぞれ50匹ずつとした．各群はさらに摂取期間の相異によって1，3，6および12カ月間摂取は雌雄5匹ずつ，24カ月間と終生摂取は雌雄15匹ずつに分けた．終生摂取では一定の摂取期間を定めずにラットが死亡あるいは瀕死状態になるまで摂取させ続けた．

病理学的検索方法　既定の摂取期間を終了したラットは断頭屠殺し採血後解剖に附し肉眼的検索を行ない器官・組織を摘出した．また摂取期間途中あるいは終生摂取のラットが瀕死状態で発見された場合は直ちに同様の処置を行なった．摂取期間途中あるいは終生摂取のラットが死亡後に発見された場合は解剖し肉眼的検索を行なった後に死後変化（自己融解）の強度な例を除いて器官・組織を摘出するよう努めた．摘出した器官は1，3，6および12カ月間摂取終了時では肝臓，胃，大・小腸，腎臓，心臓，脾臓および副腎であった．24カ月間摂取終了時では上記の器官のほかに脳，下垂体，眼球，ハーダー氏腺，耳下腺，顎下腺，大舌下腺，甲状腺（上皮小体を含む），気管，食道，肺，膵臓，精巣，前立腺，精嚢，子宮，卵巣，リンパ節および腫瘤・結節形成部位を加えた．終生摂取および摂取期間途中の死亡・瀕死屠殺解剖例の摘出器官・組織は24カ月間摂取終了例と同様にした．摘出した器官および腫瘤などは10%緩衝ホルマリン液で12時間振とう固定し液交換を行なった後静置して1週間固定した．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・エオジン重染色を，肝臓と腎臓は PAS 染色も行なった．このほか必要に応じてアザン・マロリー染色，鍍銀染色また凍結切片による脂肪染色（ズダンB）を施しこれらによって病理組織学的検索を行なった．

結　　果

結果は肉眼的検索，組織学的検索および腫瘍の発生状況に分けて述べる．なお以後は24カ月間摂取終了時の解剖例を2年群とし，24カ月間摂取途中での死亡および瀕死屠殺の解剖例を終生摂取と併合して終生群として扱うことにする．

肉眼的検索結果　1，3，6および12カ月間摂取終了時の検索では特記すべき変化は認められなかった．2年群および終生群でみられた主な所見は Table 1 に示した．全身状態の観察では可視粘膜および虹彩の蒼白化，体温降下，体重減少などが終生群で多く認められた．これらの症状を顕著に示す場合には瀕死状態と見做して屠殺・解剖を行なった．**皮膚および皮下**の腫瘤は乳腺からの発生も含めて腋窩，胸部，鼠径，腹側部などで多く認められた．腫瘤の多くは白色～黄白色で凹凸のある球形をしており大きなものは鶏卵大以上にもなっていた．表面は滑沢な被膜に被われており周囲組織からの剥離は比較的容易であったが一部には皮膚潰瘍を併発している例もみられ剥離が困難なものもみられた．これは対照群を含め雌雄の各群に多発した．**耳根部**の腫瘤は投与群の雄に1例，雌に3例みられた．これは片側性に発生し皮膚潰瘍，痂皮形成または出血を伴っており黄白色の大小の結節が集合したようにみえた．腫瘤は滑沢な被膜を有し弾力性があり耳根部または耳根部から頬部・下顎にかけて存在していた．これらは雌の1例を除き周囲組織からの剥離は困難であった．**包皮腺**の腫大は片側性にみられ皮膚潰瘍，出血などを伴う例も多かった．腫大が顕著な例では 45×28×14mm，9.47gにも達していた．表面は滑沢な被膜で被われ黄色，黄白色，黄褐色などを呈していた．形状は厚みのある長楕円形が多く，嚢状を呈するほぼ球形のものもみられた．弾力性のある部分と軟らかな粘土様の感触の部分とがあり両者の割合は個々の例で異なっていた．割面は全体に淡黄色を呈して充実性の部分と緑白色～黄白色を呈する土塊状物の部分とがみられた．腫大は対照群にもみられ雄は9例，雌は11例であった．**腹腔**では腹壁に多数の大小の結節が播種状または瀰漫性に発生し腹膜が肥厚しているのが投与群に3例，対照群に1例みられた．結節が膵臓漿膜，陰嚢内壁，精巣被膜に及んでいる例もみられた．**心臓**では左心房が腫大し内腔にやや弾力性のある凝血塊を容れているのがみられた．また心筋壁に灰白色の細い線が心筋走向に沿って断続的な縞模様を描いているのがみられた．両変化とも終生群の対照群を含む雌雄の各群で認められた．**舌**では2年群 0.04% 群雌の1例の舌根部に小さな疣贅様物の小集団がみられた．**胃**では壁の肥厚，潰瘍が腺胃よりも前胃で顕著にみられた．肥厚は充実性で弾力性のある例と浮腫状の例とが認められた．潰瘍は微小なものが散在

する例とやや大きなものが限局性に発生する例とがみられ後者では穿孔に至っている例も認められた．壁の肥厚，潰瘍は対照群を含む各群でみられ雌よりも雄に多く，穿孔は雄のみに認められた．**腸**では終生群 0.04% 群雄の1例の回腸外壁に大豆大の白色充実性結節がみられた．**肝臓**では表面が顆粒状あるいは大小の結節状に隆起し色調は黄褐色でやや弾力性のある硬さを有し容積を減じていたり，辺縁が鈍になり容積を増している変化などがみられた．各変化とも対照群を含む各群でみられ，小さくなっていた例が雌にのみ認められたのを始めとして変化はいずれも雄よりも雌に顕著であった．**膵臓**では点状・斑状出血が対照群を含めて各群に散見され終生群雄では小血腫も2例認められた．**脾臓**では腫大が対照群を含む雌雄各群でみられ顕著な例では長軸 10.5cm，重量 26.2 g に達し赤黒色で弾力性があり被膜は緊張し割面は膨隆した．また部分的に滑沢で灰白色を呈し陥凹しているのが対照群を含む各群にとくに雄に多くみられた．**腎臓**では表面が細顆粒状になって黄～暗褐色などを呈し腫大または萎縮しているのが多数みられた．変化は対照群を含む各群に認められ雌よりも雄に多く程度も強かった．**精巣**では黄色や褐色の大小不同の結節を内包して腫大あるいは萎縮しているのが片側性，両側性に認められた．変化は対照群を含む各群に頻発した．**子宮**では角の一部が膨隆したり赤色を呈し腔内に赤色の軟らかい米粒大から小豆大の内膜と連続した小塊（ポリープ）を内包しているのが認められた．これは対照群を含む各群にみられた．子宮角や子宮体に大きなものは胡桃大に達する充実性で弾力のある腫瘤のみられる例が投与群に5例認められ，そのうちの4例は複数個の腫瘤をもっていた．腫瘤の割面は膨隆し光沢のある灰白色と淡紅色の部分とがみられ腔の位置は判然としなかった．**下垂体**では腫大が対照群を含む雌雄の各群にとくに雌に多発した．腫大の顕著なものは桜桃大にもなっており多くは出血を伴い血腫様を呈する例も頻発した．**甲状腺**では腫大が対照群を含む雌雄で散見された．腫大は片側性にみられ褐赤色で弾力性があり大豆大に達している例も認められた．**副腎**では腫大が対照群を含む雌雄の各群でみられた．腫大は片側性，両側性に起り大豆大以上に達している例も認められた．

組織学的検索結果　1，3，6および12カ月間摂取終了時（以下，それぞれ1，3，6および12カ月群と略す）の検索では2年群，終生群に比べると変化の認められる器官は少なく著明な変化も少数であった．**肝臓**では1カ月群で投与群の小葉中心部から中間部の肝細胞が小型化し細胞密度が高くなっているのが認められた．そこで

Table 2. Number of Hepatocytes and Binuclear Hepatocytes

LAS(%)	Treatment period (month) 1	3	6	12
Male				
0.00	56[a]/4[b]	61/4	61/3	52/3
0.04	57/4	62/3	56/4	56/3
0.16	78*/8*	60/3	55/4	54/3
0.60	86*/9*	65/3	56/4	54/4
Female				
0.00	56/3	75/3	77/6	62/3
0.04	58/4	69/3	75/6	67/4
0.16	73*/7*	72/3	66/5	67/5
0.60	77*/6*	70/3	66/4	60/3

a) No. of hepatocytes in an average of 5 rats of each group.
b) No. of binuclear hepatocytes in an average of 5 rats of each group.
* $p<0.05$
Note: No. of hepatocytes and binuclear hepatocytes were in an average of 2 fields (1 field $=4\times10^{-2}mm^2$) in each rat.

1，3，6および12カ月の全例について肝小葉の中心部から中間部で単位面積（$200\mu\times200\mu$）当りの肝細胞数および2核肝細胞数を測定し結果を各群毎の平均値で表わし Table 2 に示した．なお測定は1例につき2個の異なる肝小葉で行ない平均値を求めた．1カ月群では雌雄とも 0.16 および 0.60% 群の肝細胞数，2核肝細胞数は対照群に比べ有意に増加していたが3，6および12カ月群雌雄では投与群と対照群の間に数的差異は認められなかった．1カ月群 0.16 および 0.60% 群雌雄での肝細胞数の増加は分裂像は顕著ではなく，細胞も小型であったが細胞質は好塩基性に富み核・細胞質比も核優位であり増生傾向を示すものであった．しかし肝細胞が小型であるために細胞の数的肥大が肝臓全体の肥大を顕現化するには至らなかった．このほかに1カ月群0.16および0.60%群雌雄では対照群に比べ，中心静脈周辺の肝細胞の単細胞壊死が顕著に認められた．この変化は3，6および12カ月群では投与群と対照群との差異は認められず各群に散見された．1，3および6カ月群では肝細胞の変性・壊死が限局性小巣を形成している像，小葉中間部から門脈周囲野およびグリソン鞘内への細胞浸潤などが，12カ月群では限局性の肝細胞壊死，肝内小胆管の増生などが対照群を含む雌雄各群で散見された．肝臓での変化は1カ月群雌雄の肝細胞の増生傾向および肝細胞の単細胞壊死を除いていずれも投与と関連した一定の傾向は示

Table 3. Microscopical Findings—Summary of Observations (1)

Treatment period		Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
		Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]		C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		12	12	14	15	12	11	12	12	17	17	15	13	17	19	17	18
SPLEEN[4]	[5]	12	12	14	15	12	11	12	12	10	13	12	11	14	17	15	14
Enlargement	NO	10	10	12	13	11	10	10	11	7	7	9	8	6	11	8	10
	SL	1	2	1	2	1	1	—	1	1	3	1	2	7	2	4	2
	MO	—	—	1	—	—	—	2	—	1	3	2	1	1	4	3	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Atrophy	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	9	9	10	8	11	15	13	11
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4	2	3	1	2	2	3
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
Extramedullary hematopoiesis	NO	12	11	14	15	11	11	12	12	6	8	12	9	10	11	11	8
	SL	—	1	—	—	1	—	—	—	1	3	—	2	2	3	4	4
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—	—	1	2	—	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	1	—	—
Hemosiderosis	NO	10	5	11	9	1	4	3	5	2	7	4	3	7	6	7	4
	SL	2	7	3	6	4	5	8	6	8	3	6	7	5	10	7	4
	MO	—	—	—	—	7	2	1	1	—	3	2	1	2	1	1	6
Focal fibrosis	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	7	8	9	5	12	11	13	10
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	1	4	2	2	2	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	—	3	—	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	1	—	—
Lymphatic folicles/ indistinguishable	NO	12	12	14	15	10	11	10	12	10	12	10	9	10	13	9	12
	SL	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	2	3	3	3	2
	MO	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—	—	1	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	3	—
LUNG[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	15	12	10	14	17	15	11
Thickening of alveolar wall	NO	10	10	14	13	11	9	10	12	9	11	9	4	10	12	10	7
	SL	2	2	—	2	1	2	—	—	1	4	2	6	2	3	4	3
	MO	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	1	—	2	2	1	1
HEART[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	12	11	14	17	15	14
Focal calcification of cardiac muscles	NO	12	11	14	15	12	11	11	12	9	12	10	7	13	17	15	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	1	3	1	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Clots in atrium	NO	12	12	13	14	12	11	12	12	9	12	9	8	13	12	14	13
	SL	—	—	1	1	—	—	—	—	1	2	3	3	1	5	1	1
Cell infiltration	NO	12	12	14	15	12	11	11	12	8	13	12	10	14	17	10	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	—	4	—
	MO	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—

LIVER[4]	[5]																
Focal necrosis	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	17	15	13	11	15	17	15	14
		12	11	14	14	11	11	11	9	5	5	10	4	10	13	9	6
	SL	—	1	—	1	1	—	1	3	3	7	3	7	1	3	5	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	3	1	1	2
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	1	—	—	1
Diffuse necrosis	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	8	15	10	10	11	13	12	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	1	2	3	2	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	—
Vacuolization	NO	10	8	10	10	11	11	11	10	4	8	8	6	11	8	8	7
	SL	1	3	4	5	—	—	—	2	1	4	3	5	1	7	4	4
	MO	1	1	—	—	1	—	1	—	4	2	2	—	2	1	3	3
	SE	—	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—
Nodular hyperplasia	NO	10	12	11	11	8	8	8	6	9	13	13	10	13	16	15	12
	SL	2	—	2	4	3	3	3	6	1	2	—	—	2	1	—	2
	MO	—	—	1	—	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Bile duct hyperplasia	NO	5	10	3	5	5	6	5	3	—	2	2	1	5	8	2	4
	SL	6	—	7	8	7	5	5	8	5	7	7	8	7	7	11	7
	MO	1	1	4	2	—	—	2	1	2	5	2	2	3	2	2	3
	SE	—	1	—	—	—	—	—	—	3	1	2	—	—	—	—	—
Peribiliary fibrosis	NO	5	—	3	4	2	5	4	2	—	3	2	2	6	6	2	3
	SL	7	10	11	10	10	6	6	9	4	8	9	5	6	9	10	8
	MO	—	2	—	1	—	—	2	1	5	2	1	4	3	2	3	3
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	1	—	—	—	—	—
Inflammatory cell infiltration	NO	12	11	14	15	11	10	12	10	3	11	11	9	10	13	12	11
	SL	—	—	—	—	—	1	—	1	1	1	—	1	3	—	1	1
	MO	—	1	—	—	—	—	—	1	5	1	1	1	2	3	—	1
	SE	—	—	—	—	1	—	—	—	1	2	1	—	—	1	2	1
Leukemic cell infiltration	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	12	11	14	15	13	14
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	2	2	—

1) Rats treated with LAS (linear alkylbenzene sulfonate) for 24 months and killed at termination.
2) Rats treated with LAS until dying or being moribund.
3) C: 0.00% LAS, L: 0.04% LAS, M: 0.16% LAS, H: 0.60% LAS.
4) No. of rats examined.
5) NO: No change, SL: Slight changes, MO: Moderate changes, SE: Severe changes.

Table 4. Microscopical Findings—Summary of Observations (2)

Treatment period		Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
		Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]		C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		12	12	14	15	12	11	12	12	17	17	15	13	17	19	17	18
PANCREAS[4]	[5]	12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	12	11	15	15	14	14
Focal necrosis	NO	11	10	14	15	12	11	10	12	8	11	8	9	11	15	11	13
	SL	1	2	—	—	—	—	2	—	1	1	4	—	2	—	2	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	2	1	—	1	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Atrophy of acinar cells	NO	10	8	9	13	11	7	9	10	9	9	10	8	13	14	14	14
	SL	2	3	5	2	1	4	3	1	—	5	2	3	1	1	—	—
	MO	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	1	—	—	—
Edema	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	11	9	14	13	12	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	1	—	1
FORE STOMACH[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	13	11	15	17	15	14
Hyperplasia of submucosa	NO	12	12	14	15	12	11	12	10	9	13	12	10	14	15	14	13
	SL	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1	—	—	1	2	1	1
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—
Edema in submucosa	NO	9	12	14	14	12	11	12	12	9	12	13	11	13	16	13	14
	SL	3	—	—	1	—	—	—	—	1	2	—	—	2	1	1	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Erosion in mucosa	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	13	9	11	15	16	14	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	1	1	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Ulcer in mucosa	NO	11	12	14	15	12	11	12	12	9	11	13	7	15	15	15	14
	SL	1	—	—	—	—	—	—	—	1	3	—	2	—	2	—	—
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—
Focal calcification in musclaris (fore, glandular)	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	9	13	13	10	14	17	15	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	—	—
GLANDULAR STOMACH[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	13	11	15	17	15	14
Hyperplasia of submucosa	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	13	13	10	14	17	15	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	—	—
Erosion in mucosa	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	8	8	14	15	13	12
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—	2	2	2
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	—	—	—
Ulcer in mucosa	NO	12	12	14	15	12	11	12	12	10	14	13	11	14	17	15	14
	SL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
KIDNEY[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	15	13	11	14	17	15	14
"Nephropathy"		—	—	2	1	—	—	—	—	7	12	4	6	4	1	1	2

	[5]																
Focal necrosis	NO	12	10	8	13	12	10	11	11	3	2	6	3	9	12	6	11
	SL	—	2	6	1	—	1	1	1	1	2	6	3	1	2	4	2
	MO	—	—	—	1	—	—	—	—	5	7	1	5	4	3	2	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4	—	—	—	—	—	—
Focal fibrosis	NO	4	4	5	11	11	7	10	11	2	3	6	3	9	11	10	10
	SL	5	7	9	3	1	4	2	1	1	2	5	3	1	4	3	3
	MO	3	1	—	1	—	—	—	—	6	8	2	5	3	2	1	1
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	1	—	—	—
Urinary casts	NO	—	—	—	1	4	4	5	5	1	—	—	1	6	9	6	5
	SL	7	5	9	10	6	6	5	6	1	3	6	3	4	2	4	5
	MO	4	7	4	3	2	1	1	1	2	4	7	4	1	5	5	4
	SE	1	—	1	1	—	—	1	—	6	8	—	3	3	1	—	—
Dilatation of tubules	NO	—	—	—	1	4	4	5	5	1	—	1	1	6	7	6	5
	SL	7	5	9	10	6	6	5	6	1	3	5	4	3	3	4	5
	MO	4	7	5	3	2	1	2	1	1	5	7	3	2	6	4	4
	SE	1	—	—	1	—	—	—	—	7	7	—	3	3	1	1	—
Degeneration of tubular epithelium	NO	—	—	—	—	2	1	2	—	—	—	—	—	3	—	3	1
	SL	4	2	5	8	8	8	7	11	2	2	3	7	6	12	7	8
	MO	7	9	8	6	2	2	3	1	2	5	6	3	1	4	4	4
	SE	1	1	1	1	—	—	—	—	6	8	4	1	4	1	1	1
Thickening of basement membrane	NO	2	—	—	—	5	1	2	5	—	—	1	—	7	1	6	4
	SL	4	4	11	10	7	8	9	6	2	6	4	5	3	12	7	9
	MO	5	8	3	5	—	2	1	1	5	6	8	6	4	4	2	1
	SE	1	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—
Atrophy of glomeruli	NO	3	—	4	6	6	3	8	5	1	2	4	3	8	6	8	7
	SL	6	11	8	7	6	8	4	6	1	4	4	2	3	11	6	6
	MO	2	1	2	2	—	—	—	1	7	8	5	6	3	—	1	1
	SE	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—
Cell infiltration	NO	3	—	4	6	8	9	8	12	2	1	9	4	4	9	10	10
	SL	4	6	6	7	4	1	4	—	2	8	3	5	6	6	5	2
	MO	5	6	3	2	—	1	—	—	5	5	—	—	2	2	—	1
	SE	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	1	2	—	—	—	1

1) Rats treated with LAS (linear alkylbenzene sulfonate)for 24 months and killed at termination.
2) Rats treated with LAS until dying or being moribund.
3) C: 0.00% LAS, L: 0.04% LAS, M: 0.16% LAS, H: 0.60% LAS.
4) No. of rats examined.
5) NO: No change, SL: Slight changes, MO: Moderate changes, SE: Severe changes.

Table 5. Microscopical Findings—Summary of Observations (3)

Treatment period		Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
		Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]		C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats		12	12	14	15	12	11	12	12	17	17	15	13	17	19	17	18
PREPUTIAL GL.[4]	[5]	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	4	5	2	5	3	3
Cystic change	NO							—		—	1	—	—	1	1	—	—
	SL							1		2	—	1	3	1	2	1	3
	MO							—		—	2	3	2	—	2	2	—
Hyperplasia of acinar cells	NO							1		1	1	3	5	1	2	—	—
	SL							—		—	—	—	—	—	—	—	2
(Tumor)								—		1	2	1	—	1	3	3	1
TESTES[4]		12	12	14	15					10	15	10	10				
Atrophy	NO	—	1	3	5					—	3	2	1				
	SL	2	7	2	6					—	1	2	3				
	MO	4	1	—	2					6	6	4	2				
Edema	NO	3	8	5	13					6	11	6	6				
	SL	2	1	—	—					—	—	1	—				
	MO	1	—	—	—					—	—	—	—				
Hyperplasia of interstitial cell	NO	4	6	4	3					3	6	5	2				
	SL	2	3	1	8					2	4	1	4				
	MO	—	—	—	2					1	1	1	—				
(Tumor/unilaterally)		4	7	2	5					3	6	4	3				
(Tumor/bilaterally)		6	3	7	2					4	4	3	4				
PROSTATE[4]		12	12	13	15					10	11	7	10				
Atrophy	NO	9	10	11	12					7	9	6	9				
	SL	3	2	2	3					3	2	1	1				
SEMINAL VESICLE[4]		12	12	13	14					9	11	7	9				
Hyperplasia of epithelium	NO	7	10	9	6					9	10	4	9				
	SL	5	2	4	8					—	1	3	—				
UTERUS[4]						12	11	12	12					14	16	14	14
Endometrial polyp	NO					11	10	8	12					12	13	8	9
	SL					1	1	2	—					2	—	4	5
	MO					—	—	2	—					—	2	2	—
	SE					—	—	—	—					—	1	—	—
Hyperplasia of endometrium	NO					12	11	12	12					13	15	14	14
	SL					—	—	—	—					1	1	—	—
PITUITARY[4]	[5]	12	12	13	15	12	11	12	12	9	15	9	9	13	14	13	13
Hemorrhage/necrosis	NO	9	9	12	11	6	6	6	9	7	5	5	5	4	4	5	1
	SL	2	3	1	3	5	4	3	3	1	3	2	2	3	5	4	6
	MO	—	—	—	1	1	1	3	—	1	1	1	2	2	4	3	5
	SE	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	3	1	1	1
Hyperplasia of glandular cell	NO	7	10	11	10	5	6	7	8	6	5	4	2	4	5	4	1
	SL	—	1	1	—	—	1	—	—	1	1	1	—	—	—	1	—
	MO	—	—	—	1	—	—	2	2	—	—	—	3	—	2	—	2
(Tumor)		5	1	1	4	7	4	3	2	2	5	4	4	9	7	8	10

THYROID[4]		12	12	13	14	12	11	12	12	10	10	9	6	13	11	12	13
Folicular hyperplasia	NO	9	12	11	13	11	10	11	11	7	8	8	4	11	9	11	11
	SL	1	—	—	—	1	—	—	—	2	—	—	2	1	2	—	—
(Tumor)		2	—	2	1	—	1	1	1	1	2	1	—	1	—	1	1
ADRENAL[4]		12	12	14	15	12	11	12	12	10	13	10	11	14	16	13	14
Cavitation in cortex/thrombus	NO	11	11	12	13	11	6	9	9	8	9	9	5	6	8	7	9
	SL	1	1	2	2	1	5	2	2	1	2	1	2	4	6	5	5
	MO	—	—	—	—	—	—	1	1	1	2	—	3	4	2	1	—
	SE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Hyperplasia of cortical cell	NO	12	12	14	12	12	11	12	11	9	12	10	11	14	16	13	13
	SL	—	—	—	3	—	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	1
Hyperplasia of medullary cell	NO	11	10	13	12	12	8	10	12	7	6	8	7	7	12	10	10
	SL	1	2	1	3	—	3	2	—	3	6	2	4	7	3	2	3
	MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1
(Tumor)		1	2	2	2	—	1	1	—	2	3	2	4	7	3	2	5

1) Rats treated with LAS (linear alkylbenzene sulfonate) for 24 months and killed at termination.
2) Rats treated with LAS until dying or being moribund.
3) C: 0.00% LAS, L: 0.04% LAS, M: 0.16% LAS, H: 0.60% LAS.
4) No. of rats examined.
5) NO: No change, SL: Slight changes, MO: Moderate changes, SE: Severe changes.

さなかった．腎臓では1カ月群雌雄の投与群に近位尿細管腔の軽度な狭窄と上皮細胞の腫脹が散見されたが対照群には認められなかった．3，6カ月群では対照群にも認められたが投与群にやや顕著であった．このほかの変化としては皮質の限局性変性像，尿細管上皮の扁平化，蛋白円柱，糸球体の萎縮などが対照群を含む雌雄各群でみられた．これらの変化は摂取期間に比例して程度が強く出現例数も多くなる傾向を示したが投与との関連は認められなかった．胃では12カ月群の対照群を含む雌雄の各群で腺腔の拡張，腺上皮の扁平化が散見された．このほかの諸器官については特記すべき変化は認められなかった．

2年群および終生群の組織学的検索結果は Table 3—4に示した．脾臓では充血あるいは単核球の増生などによる腫大，貧血・リンパ沪胞の減少などがみられる萎縮が認められた．このほか髄外造血，ヘモジデリンの顕著な沈着，限局性線維化などが対照群を含む雌雄の各群にみられた．2年群ではヘモジデリン沈着と腫大が雄の投与群に比較的多く認められたが投与量の増加に伴う増減傾向は示さなかった．終生群では各変化とも2年群より多く強くなっていたが投与との関連を示す変化は認められなかった．また終生群の動物を死亡あるいは瀕死屠殺時までの摂取期間によって摂取2年目まで（104週間まで，以下，前期と略す）とそれ以後（105週間以上，以下，後期と略す）とに分けると各変化とも前期より後期に多発し程度も顕著になっていたが前・後期とも投与との関連を示す変化は認められなかった．肺では肺胞壁が上皮細胞の腫脹，毛細血管の拡張などによって肥厚しているのがみられた．2年群，終生群および前・後期とも投与と関連した変化とは認められなかった．心臓では心筋および血管壁の限局性石灰変性（Photo 1），心房内の線維成分を混じた大きな凝血塊および間質への細胞浸潤などがみられた．2年群では各変化とも投与群にのみ認められたが出現例数が極めて少なく投与との関連は明らかではなかった．終生群では雄で心筋の石灰変性，心房内凝血塊が投与群に多くみられたが雌ではこの傾向が認められなかった．変化は雌雄とも後期に多く出現していた．肝臓では肝細胞の壊死が小巣状にあるいは小葉間をつなぐ帯状に起っていた（Photo 2）．肝細胞の空胞変性が小葉周辺にみられ顕著な例では小葉間をつなぐように空胞化した細胞が並んでいた．肝内小胆管の増生は多くが周囲の線維化を伴っており限界の明瞭な小塊状を呈していた．2年群では雄で空胞変性，雌雄で小胆管の増生・周囲の線維化が多く認められたが投与との関連は明らかではなかった．終生群では2年群に比べ変化は顕著であり出現例数も多くなっていたが各変化とも投与との関連は判然としなかった．後期では肝細胞の結節性増生を除いて変化は前期より顕著で例数も多くなっていたが投与との関連は前・後期とも認められなかった．膵臓では限局性に腺房細胞の壊死小塊がみられた．腺房細胞の

Table 6. Distribution of Tumors—Summary of Observations.

Treatment period	Treated for 2 years[1]								Treated for lifespan[2]							
	Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats	12	12	14	15	12	11	12	12	17	17	15	13	17	19	17	18
No. of rats examined[4]	12	12	14	15	12	11	12	12	11	15	13	11	15	17	15	14
CUTANEOUS/SUBCUTANEOUS																
Fibroma	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—	1
Lipoma	—	1	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Fibrosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	1	—
EAR DUCT																
Squamous cell carcinoma	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
MAMMARY																
Adenoma	—	—	—	—	—	—	1	1	1	2	1	1	4	4	2	3
Fibroadenoma	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	—	1	2	1	—
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	1	—
PERITONEUM																
Mesothelioma, benign	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—
PITUITARY																
Chromophobe adenoma	5	1	1	4	—	3	4	3	1	4	2	2	9	5	7	8
Eosinophil adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Chromophobe carcinoma	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1	2	—	—	—	1	1
Eosinophil carcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	1
THYROID																
Adenoma	2	—	2	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	1	—
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	1
ADRENAL																
Medullary adenoma (Pheochromocytoma)	1	2	2	2	—	1	1	—	2	3	2	4	1	—	2	—
BRAIN																
Glioma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Squamous cell carcinoma (metastatic)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
LUNG																
Adenoma	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	1	1	—	—
Squamous cell carcinoma (metastatic)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
TONGUE																
Papilloma	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LIVER																
Cholangioma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
PANCREAS																
Islet cell adenoma	1	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	2	—	—	—	—
Islet cell carcinoma	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

INTESTINE																
Adenomatous polyp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Leiomyoma	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Leiomyosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
TESTES																
Interstitial cell tumor	10	10	11	7					7	10	7	7				
OVARY																
Granulosa cell tumor					—	—	—	—					—	1	—	1
UTERUS																
Leiomyoma					—	1	—	—					—	—	—	—
Leiomyosarcoma					—	—	—	—					—	—	2	—
PREPUTIAL GL.																
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	1	2	1
Adenoacanthoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	2	1	—
LIVER, SPLEEN etc.																
Lymphoma	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Leukemia	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	1	2	2	2
No. of rats bearing tumors	11	11	12	13	8	7	8	4	8	14	11	10	13	15	14	11

1) Rats treated with LAS (linear alkylbenzene sulfonate) for 24 months and killed at termination.
2) Rats treated with LAS until dying or being moribund.
3) C: Rats received diet containing 0.00% LAS. L: Rats received diet containing 0.04% LAS.
M: Rats received diet containing 0.16% LAS. H: Rats received diet containing 0.60% LAS.
4) NO. of rats examined histologically.

萎縮は限局性に認められ腺房は細胞が萎縮・扁平化したため導管様の形態を呈していた．このほか間質の浮腫，限局性の線維化，ランゲルハンス島の肥大などが認められた．2年群では腺房細胞の萎縮が対照群を含む雌雄各群にやや多くみられたが投与との関連は明らかではなかった．終生群では限局性壊死が対照群を含む雌雄各群にやや多くみられたが投与との関連は明らかではなかった．各変化とも前期より後期に多く出現し程度の強いものがみられた．間質の浮腫は後期では投与群にのみ認められたが極めて少数例であったため投与との関連は判然としなかった．**胃**では粘膜下織の結合織増生または浮腫による前・腺胃壁の肥厚が認められた．粘膜には出血，糜爛および潰瘍などが認められた(Photo 3)．胃腺基底部の腺腔拡張が2年群，終生群の対照群を含む各群に頻発していた．2年群では胃腺腔の拡張を除いて変化を示した例数は極く僅かであり投与との関連は認められなかった．終生群では雄で前・腺胃粘膜の出血性糜爛，潰瘍が対照群よりも投与群に多発し変化も顕著になる傾向がみられ雌でも微弱ながらこの傾向は認められた．しかし投与量の増加に伴う例数の増減，変化程度の強弱などの一定傾向はみられず投与との関連は必ずしも判然としなかった．**腎臓**では糸球体が減少し尿細管の多くは腔内に蛋白円柱を容れて拡張しあるいは嚢胞化していた．尿細管上皮は変性・脱落・扁平化あるいは再生し重層化している部位もあり基底膜は肥厚していた．間質では限局性の線維化，細胞浸潤などがみられた．これらの変化の全てあるいは大部分が顕著に認められた例を腎障害とした(Photo 4)．腎臓での変化は尿細管に比べ糸球体は軽度であり発現時期も遅かった．2年群では腎障害が雄の0.16%群に2例，0.60%群に1例みられたがその他の各群では認められなかった．終生群では腎障害が対照群を含む雌雄各群でみられ特に雄に多発していた．腎障害は前期よりも後期に多くみられた．腎臓での変化は腎障害を始めとしていずれも投与と関連した変化は認められなかった．**包皮腺**は肉眼的に腫大が認められた例のみを組織検索した．腫大が認められた例で腫瘍ではなかった例では壊死細胞を含む分泌物の貯留嚢胞あるいは膿胞の形成が認められた．また腺房細胞の軽度な増生を併発し

Table 7. Distribution of Tumors—Summary of Observations.

	Former term[1]								Latter term[2]							
	Male				Female				Male				Female			
Treatment group[3]	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats	8	7	7	2	7	7	7	9	9	10	8	11	10	12	10	9
No. of rats examined[4]	4	5	5	1	7	5	7	6	7	10	8	10	8	12	8	8
CUTANEOUS/SUBCUTANEOUS																
Fibroma	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	1
Lipoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Fibrosarcoma	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
EAR DUCT																
Squamous cell carcinoma	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
MAMMARY																
Adenoma	—	—	—	—	—	1	—	—	1	2	1	1	4	3	2	1
Fibroadenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	2	1	—
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	1	—
PERITONEUM																
Mesothelioma, benign	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
PITUITARY																
Chromophobe adenoma	—	2	—	1	4	3	2	4	1	2	2	1	5	4	5	4
Eosinophil adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Chromophobe carcinoma	—	—	1	—	—	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—
Eosinophil carcinoma	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
THYROID																
Adenoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	1	—
Adenocarcinoma	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
ADRENAL																
Medullary adenoma (Pheochromocytoma)	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	2	4	1	—	2	—
BRAIN																
Squamous cell carcinoma (metastatic)	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LUNG																
Adenoma	—	—	—	—	1	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—
Squamous cell carcinoma (metastatic)	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
LIVER																
Cholangioma	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PANCREAS																
Islet cell adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	2	—	—	—	—
INTESTINE																
Adenomatous polyp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Leiomyoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Leiomyosarcoma	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—

TESTES																
Interstitial cell tumor	3	1	1	—					4	9	6	7				
OVARY																
Granulosa cell tumor					—	—	—	—					—	—	—	1
UTERUS																
Leiomyosarcoma					—	—	2	—					—	—	—	—
PREPUTIAL GL.																
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	1	2	1
Adenoacanthoma	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—
LIVER, SPLEEN etc.																
Lymphoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Reticulosarcoma	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leukemia	—	1	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	2	1	—
No. of rats bearing tumors	3	4	3	1	6	5	6	5	5	10	8	9	7	10	8	6

1) Rats dying or being moribund until 24 months (104 weeks) after the beginning of treatment of LAS (linear alkylbenzene sulfonate).
2) Rats dying or being moribund over 24 months (105 weeks) after the beginning of treatment of LAS.
3) C: Rats received diet containng 0.00% LAS. L: Rats received diet containing 0.04% LAS. M: Rats received diet containing 0.16% LAS. H: Rats received diet containing 0.60% LAS.
4) No. of rats examined histologically.

ている例もみられた．変化は雌雄とも対照群より投与群に多く認められたが出現例数が少ないため投与との関連は判然としなかった．**精巣**では腫瘍が多発したため両側とも腫瘍の場合はこの項での例数から除いた．精細管の萎縮は管径の短縮，管壁の皺襞形成，精上皮細胞の減少などがみられたもので間質の浮腫を伴う例も認められた．関質では間質細胞（ライディッヒ間質細胞）が小塊状を成して増生しているのが散見された．間質細胞の増生が2年群0.60%群に多発したが，終生群では著明に認められず，そのほかの各変化は2年群，終生群とも投与との関連を明らかに示さなかった．**前立腺**では萎縮，腺上皮の変性などが散発的にみられたが2年群，終生群とも投与との関連は認められなかった．**精嚢**では上皮細胞の軽度な増生がみられたが細胞分裂像は認められなかった．増生は2年群では対照群，0.60%群に多発しており投与との関連は示さなかった．終生群では後期に0.04%群に1例，0.16%群に3例が認められたのみであった．**子宮**では内膜の増生が出血および炎症細胞の浸潤などを伴ってみられ壊死が顕著な例も認められた．増生はほとんどがポリープ状であった（Photo 5）．2年群では対照群，0.04%群に各1例，0.16%群に4例みられたが0.60%群では認められなかった．終生群では2年群より多発しており対照群よりも投与群にやや顕著であった．前期より後期に多数出現し，後期では投与群に多発していた．**下垂体**では腫瘍が多発しそのほかの所見としては腺細胞の増生および出血・壊死であった．2年群，終生群ともに変化は雄よりも雌に顕著であった．2年群では腺細胞の増生が雌雄とも投与群にのみ認められた．終生群では出血・壊死が投与群雄に，腺細胞の増生が投与群雌雄に顕著であった．**甲状腺**では沪胞の増生が散見された．2年群では対照群雌雄に各1例みられたのみであった．終生群では対照群を含む雌雄各群に2年群よりも多発し，前期より後期に多く認められたが投与との関連は示さなかった．**副腎**では皮質に出血がみられ血腫を形成して大きな部分を占めている像，細胞が脱落して空洞化し腔隙を形成している像などが認められた．実質細胞の増生は皮・髄ともにみられ髄質細胞が顕著であった．2年群では皮質の出血が雄よりも雌に多発し雌では投与群に顕著であった．皮質細胞の増生は0.60%群雄に3例，同雌に1例みられたのみであった．髄質細胞の増生は各群に1—3例と散発的であったが雌では投与群にのみ，雄でも投与群にやや多く認められた．終生群では皮質細胞の増生を除いて変化は2年群よりも顕著になっていた．皮質の出血は雄よりも雌に多発し，後期では雄の投与群および雌の対照群にそれぞれ変化が顕著であった．髄質細胞の増生は雌にやや多くみられ早期に出現してい

た．終生群での各変化はいずれも投与との関連が明らかではなかった．

腫瘍発生状況　腫瘍の発生状況は Table 6,7 に示した．腫瘍は1，3，6および12カ月群ではみられず2年群，終生群にのみ発生していた．腫瘍が頻発した器官は雌の乳腺，雌雄の下垂体それに精巣であり比較的多発したのは雌雄の甲状腺および副腎であった．また発生が極めて稀な包皮腺腫瘍が対照群を含む雌雄各群で認められた．**皮膚・皮下組織**で肉眼的に腫瘤として認められた例のうち乳腺腫瘍を除くと線維腫が5例，脂肪腫が5例，線維肉腫が4例であった．また耳根部から頬部にかけての皮下腫瘤で出血，皮膚潰瘍，痂皮形成が認められた例では耳道・耳垢腺の扁平上皮癌が2年群 0.60% 群雄，終生群 0.16% 群雌，0.60% 群雌に各1例みられた（Photo 6）．**乳腺**では腺腫20例，線維腺腫7例，腺癌が3例発生していた（Photo 7,8）．2年群では腺腫2例，線維腺腫1例が雌の投与群にのみ発生した．終生群では腺腫が対照群を含む雌雄各群にみられ雄よりも雌に多発した．腺腫は雌で対照群よりも投与群でやや早期に発生する傾向を示したが最終的な発生例数に差はみられず雌雄とも投与との明らかな関連は認められなかった．乳腺腫瘍で腺上皮の増生が乳頭状を呈して著明にみられ構造異型が顕著であった例を腺癌とした．腺癌は終生群後期の 0.16% 群雌に1例，0.60% 群雄に2例発生した．**腹膜**で肉眼的に播種状あるいはび漫性に小結節が散在し膵臓漿膜，陰嚢内壁などに及んでいるのがみられた例は良性中皮腫であった．これは2年群対照群雄，終生群 0.04% 群雌，0.16，0.60% 群雄に各1例認められた．**下垂体**で腫大，出血がみられた例には腫瘍が多くその大部分は色素嫌性腺腫であった．色素嫌性腺腫は2年群，終生群とも雄より雌に多発し発生も早期に起る傾向がみられた．しかし雌雄とも対照群と投与群の間で発生数および発生時期に差異は認められなかった．エオジン好性腺腫は終生群 0.60% 群雄で1例みられたのみであった．下垂体で腺細胞の顕著な増生とともに細胞の大小不同性が明らかで巨細胞が散在していた例を腺癌とした．色素嫌性腺癌は2年群 0.04，0.60% 群雌に各1例，終生群 0.04% 群雄に1例，0.16% 群雄に2例，0.16，0.60%群雌に各1例といずれも投与群に発生していた（Photo 9）．エオジン好性腺癌は終生群の対照群雄，0.60%群雌雄に各1例認められた．**甲状腺**で腫大が認められた例の大部分に沪胞上皮の腫瘍性増生がみられ腺腫とした．上皮細胞の増生が乳頭状を呈し構造異型が顕著に認められた例を腺癌とした（Photo 10）．腺腫，腺癌ともに2年群，終生群の対照群を含む雌雄各群に1，2例づつ散発しており投与との関連は認められなかった．**副腎**で腫大が認められた例には比較的腫瘍が多く，その全てが髄質細胞腫（褐色細胞腫と思われる）であった（Photo 11）．**脳**では神経膠細胞腫（星状膠細胞腫）が2年群対照群雌に1例みられた．また耳道の扁平上皮癌をもっていた終生群 0.16% 群雌の1例の脳に転移あるいは浸潤と思われる扁平上皮癌が認められた．**肺**では腺腫が2年群 0.60% 群雄，終生群の対照群雌，0.04%群雌雄，0.60%群雄に各1例ずつ発生した．また耳道の扁平上皮癌をもっていた終生群 0.60% 群雌の1例の肺に転移と思われる扁平上皮癌が認められた．**舌**では肉眼的所見で舌根部に疣贅様物を認めたが，これは乳頭腫であり2年群 0.04% 群雌に1例みられた．**肝臓**では胆管腫が終生群の対照群雄，0.60%群雌に各1例の発生をみた．**膵臓**で肉眼的に白色小結節・小血腫を認めた例のなかに島細胞腫，島細胞癌がみられた（Photo 12）．島細胞腫は2年群の対照群，0.60% 群，終生群の対照群，0.04%群に各1例，終生群 0.60% 群に2例といずれも雄に発生し，島細胞癌も2年群対照群雄に1例と雌での発生はみられなかった．**大・小腸**では結腸の腺腫性ポリープが終生群 0.04% 群雄に1例，盲腸の平滑筋腫が2年群 0.16% 群雌，終生群 0.60% 群雄に各1例，小腸（回腸部）の平滑筋肉腫が終生群 0.04 %群雄に1例認められた．**精巣**で肉眼的に褐色・黄色・白色などの大小不同の結節を包含して腫大あるいはやや萎縮していた例は殆どが間質細胞腫であり片側性，両側性，ほぼ同数の発生をみた（Photo 13）．腫瘍は投与開始後2年以上で多発していた．2年群では 0.60% 群の発生が少ないが終生群では対照群と同等であり投与との関連は明らかではなかった．**卵巣**で肉眼的に卵胞が結節状を呈し腫大してみられた例はいずれも顆粒膜細胞腫で終生群の 0.04，0.60%群に各1例認められた．**子宮**で肉眼的に壁の腫瘤が認められた例は1例は平滑筋腫で2年群 0.04 %群に，2例は平滑筋肉腫で終生群 0.16% 群にそれぞれ発生した（Photo 14）．**包皮腺**で腫大および出血・皮膚潰瘍が認められた例は腫瘍であった．腫瘍は終生群にのみ発生しており前期に2例，後期に10例認められた．前期では対照群雌，0.04%群雄に腺類癌が各1例みられた（Photo 15）．後期では腺腫が対照群雄，0.04%群雌雄，0.16%群雄，0.60%群雌に各1例，0.16%群雌に2例みられ，腺類癌が 0.04% 群雌に2例，0.16%群雌に1例認められた．このように発生は雌に多かったが雌雄とも投与との関連は明らかではなかった．**肝臓・脾臓・リンパ節**などでははリンパ腫が2年群 0.16% 群雌，終生群の対照群雌，0.60%群雄に各1例認められた．細網

肉腫は2年群の 0.16% 群雌，0.60%群雄，終生群対照群雌に各1例みられた．白血病は2年群対照群雌，終生群の対照群雌，0.04%群雄，0.16%群雄に各1例，終生群雌の 0.04，0.16%群に各2例の発生を認めた（Photo 16）．白血病は対照群を含む各群に1，2例ずつ散発しており投与との明らかな関連は認められなかった．

総括ならびに考察

以上の如く，直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）の 0.00，0.04，0.16 および 0.60% 添加飼料を SIc：Wistar ラットに長期間連続して摂取させた試験の病理学的検索を行なった．

腫瘍を際く組織検索で投与群にのみ認められた変化は摂取開始後1カ月の肝臓の肝細胞の増生，腎臓の近位尿細管の上皮細胞の腫脹・管腔狭窄であった．また対照群よりも投与群に多発した変化は終生群雄の心臓の心筋の石灰変性，終生群の胃粘膜の出血性糜爛，2年群・終生群の子宮内膜のポリープ状増生であった．摂取開始後1カ月で 0.16 および 0.60% 群雌雄にみられた肝細胞の増生は投与量の増加に比例して顕現化しており LAS 摂取と関連した変化と思われる．またその後投与を続けても変化は著明化せず消失してしまったことから一過性の可逆的変化であったと考えられる．さらに摂取開始後3カ月以後の検索では投与群の肝臓に LAS 摂取と関連した変化および腫瘍の頻発は認められず1カ月での肝細胞の増生が晩発性の肝障害の遠因とはならなかったと思われる．これらのことから摂取1カ月で投与群雌雄に認められた肝細胞の増生は LAS 摂取に対する肝臓の形態的適応現象であったと考えられる．腎臓で摂取1カ月の投与群雌雄に認められた近位尿細管の上皮細胞の腫脹・管腔狭窄は軽度な変化であり前述の肝細胞の増生と同様に適応現象であったと推定される．終生群でみられた心臓の心筋の石灰変性は対照群雄に 10%（1/10），対照群雌に7%(1/13)，0.04%群雄に 21%（3/14），0.16% 群雄に 16%(2/12)，0.60% 群雄に 27%(3/11) と雄では投与群にやや多発したが投与量に比例した多発傾向は認められない．Farris ら[6] は自然発生障害として Gray Norway ラット(平均105週令）の7%(25/336)に，Wistar ラット（平均126週令）の1%(7/807) に心筋の変性・壊死を観察し，その部位で顕著な石灰変性や軟骨化生を認めたと報告している．今回みられた心筋の石灰変性の発生時期（摂取開始時より変化が観察されるまでの摂取期間）の平均値は対照群雄123週，雌117週，0.04%群雄 125週（98–142 週），0.16% 群雄 134週（133，136週），0.60% 群雄139週（132–154 週）であり上記報告例の発生時期とほぼ一致しているが，発生率は母数に差があり参考にはでき得ない．石灰変性は摂取開始後98週で最初の1例（0.04%群雄）が軽度な変化を示したがそれ以後に観察された例は全て中等度以上の変化であり，104週の1例（2年群，0.16% 群雌）が軽度であったことを考慮に入れると石灰変性の程度は投与量ではなく摂取期間に関係があるのではないかと思われる．因に終生群ラットの摂取開始後の平均生存期間は対照群雄107週（14例），雌112週（14例），0.04%群雄118週（14例），雌123週（15例），0.16%群雄114週（14例），雌117週（14例），0.60%群雄123週（13例），雌114週（15例）となっており[7]，雌雄とも投与群が対照群をやや上回っていた．これらのことから今回観察された心筋の石灰変性は老化に伴う自然発生的変化であったと思われる．このために雄では対照群よりも生存期間の長かった投与群に多発したのであって LAS 摂取による直接的影響であるとは考え難い．終生群で雄では投与群にのみ雌では投与群に顕著に認められた前・腺胃粘膜の出血性糜爛は対照群雌6%(1/15)，0.04%群雄7%(1/14)，雌17%（3/17)，0.16%群雄 46%（6/13)，雌 13%(2/15)，0.06% 群雄 27%(3/11)，雌 14%（2/14）であり雌雄とも投与量の増加に比例した多発傾向は示していない．糜爛が観察されたのは前述の心筋の石灰変性が認められた時期に近似しており，各例とも個体間で程度の差はみられるが腎障害，心疾患の像を示していた．ヒトでは胃粘膜の出血性糜爛は炎症，中毒性疾患，慢性うっ血などによって起るといわれている[8]．糜爛を呈したラットは104週令（24カ月令）を越えており腎臓，心臓などの老性変化に伴う慢性うっ血が生じていた可能性は大であると思われる．これらのことから今回観察された胃粘膜の出血性糜爛は LAS 摂取の直接的影響ではなく循環器系などの老性変化が基盤となって生じたものと考えられる．2年群・終生群で投与群に顕著にみられた子宮内膜のポリープ状増生は対照群 11%(3/26)，0.04%群 14%（4/27)，0.16%群 38%（10/26)，0.60%群 19%（5/26）に認められ 0.16% 群に多発したが投与量の増加に比例した多発傾向は明らかではない．ポリープが観察されるまでの平均摂取期間は対照群118週（104–136週），0.04% 群121週（104–144週），0.16%群110週（74–138週），0.60%群131週（78–161週）であり投与群と対照群の間に顕著な差はみられない．著明なポリープ状増生が認められた例は 0.04% 群3例，0.16%群4例で観察された時期は摂取後 104–109 週に4例，131–144週に3例であり変化の程度は投与量および摂取期間に比例した一定の傾向は示していない．村岡ら[9] は SD–JCL ラット，125週令で 12.2%(6/49) に子宮内膜のポリープ状増生を認め

ており今回の発生もほぼ同一週令であり 0.16% 群を除いて発生率にも著差はない．これらのことから今回観察された子宮内膜のポリープ状増生は現時点では明らかにLAS 摂取と関連があるとは考え難い．このように腫瘍を除く組織検索では LAS 摂取と関連した変化として摂取1カ月の肝細胞の増生，尿細管上皮の腫脹がみられたが，いずれも形態的適応現象であり晩発性の肝臓および腎臓障害に直結しておらず，LAS 摂取は組織障害を惹起しなかったと考えられる．

腫瘍は多くの器官・組織に発生した．多発したのは乳腺の腺腫，下垂体の色素嫌性腺腫，甲状腺腫，副腎の髄質細胞腫，精巣の間質細胞腫であった．これらの腫瘍は投与群に多発する傾向は示さず，投与量の増加に伴い発生例数が増減する傾向もみられず，発生時期（観察するまでの摂取期間）も投与群と対照群の間に差異は認められない．さらに西部[10]の SIc:Wistar ラットでの自然発生腫瘍の報告と比較しても発生頻度，発生時期に著差は認められないことからこれらの腫瘍の発生に LAS 摂取との関連は考え難い．これらの腫瘍の悪性化例は乳腺癌が0.16群雌に1例，0.60%群雄に2例，下垂体の色素嫌性腺癌が 0.04% 群雌雄に各1例，0.16%群雄に2例，雌に1例，0.60%群雌に2例と投与群にのみ認められた．乳腺癌の自然発生は Wistar 系ラットで西部[10]は雌に 0.4% (1/243)，Crain[11]は雌に 1.2%(1/84)，Gilbert ら[12]は雄に 0.15%(1/641)，SD 系ラットで村岡ら[13]は雌に 6.9% (5/73)，森井ら[14]は雌に 5.4% (7/128)，ACI/N ラットで前川ら[15]は雌に 3.8%(8/209) と報告している．下垂体の腺癌は SD 系ラットで村岡ら[13]は雄に 2.6%(2/77)，雌に 1.4%(1/73)，ACI/N ラットで前川ら[15]は雌に 0.9%(2/209) と報告している．これらの報告から乳腺癌，下垂体腺癌とも自然発生が稀ではないとみられ今回の発生も投与量の増加に伴う発生例数の増減傾向も認められないことから，LAS 摂取による誘発とは考え難い．甲状腺癌は対照群雄，0.04%群雌雄，0.16%群雌，0.60%群雌に各1例みられたが LAS 摂取量との関連は認められない．また Gilbert ら[12]は Wistar 系ラット雄で 9.8%(63/641)，雌で 7.8%(55/701)，森井ら[14]は SD 系ラット雄で 1.8% (2/108)，雌で 0.8% (1/128) の自然発生を報告しており投与群での発生が特に問題となる点はないと考えられる．対照群での発生はみられず投与群にのみ2例以上認められた腫瘍は皮下組織の脂肪腫・線維肉腫，耳道の扁平上皮癌，子宮の平滑筋肉腫，卵巣の顆粒膜細胞腫であった．これらはいずれも各群での発生例数が少なく投与量の増加に伴う発生例数の増減傾向は窺うべくもない．これらのうち悪性腫瘍に関する自然発生例の報告をみると，皮下組織の線維肉腫は Gilbert ら[12]が Wistar 系ラット雄で 0.16% (1/641)，SD 系ラットでは村岡ら[13]が雄に 1.3% (1/77)，雌に 4.4%(3/67)，森井ら[14]が雄に 1.8% (2/108)，雌に 0.8%(1/128)としている．耳道の扁平上皮癌は Snell ら[16]が OM ラットに2例（約80例中），M520 ラットに2例（約80例中），腺癌は Gilbert ら[12]が Wistar 系ラット雌で 0.14%(1/701)，Tannenbaum ら[17]が SD 系ラットで 2.9%(3/105) としている．子宮の平滑筋肉腫は Wistar 系ラットで Gilbert ら[12]が 0.26%(2/701)，螺良ら[18]が7%(7/100)，SD 系ラットで Thompson ら[19]が 1.2%(1/82)，ACI/N ラットで前川ら[15]が0.9%(2/209)，Sass ら[20]が Fischer 系ラットで 0.5% (1/192) としている．このようにこれらの悪性腫瘍は発生頻度が低いものの自然発生例があり，今回の発生が投与各群を合計しても線維肉腫4例，耳道の扁平上皮癌3例，子宮平滑筋肉腫2例と少なく，摂取量との関連も認められないことから LAS 摂取による誘発とは考えられない．包皮腺の腫瘍は対照群を含む各群で合計12例観察され腺腫7例，腺類癌5例と診断した[21]．ラット包皮腺の自然発生腫瘍は1930年に Bullock ら[22]が 0.04%(2/2450)に癌を認めたとしている．その後1967年に Jacobs ら[23]が Fischer 系ラットで 0.5%(1/194) に筋上皮腫を観察したが，これまでに報告例数は少なく発生頻度が低いことから包皮腺腫瘍の自然発生は稀であると思われた．しかし最新の J. Gerontology (Vol. 32, No. 3, 1977) に Coleman ら[24]が F344 ラット雄の 7.1%(10/140) に自然発生の腺腫を認め12カ月令以前の1例を含め24カ月令までに5例を観察したと報告している．このため現時点では包皮腺腫瘍の自然発生の報告例は依然として少ないが発生頻度が低いとすることはできないと考えるに至った．また本試験での発生頻度，観察時期も Coleman ら[24]の報告と著明な差異は認められない．さらに組織学的に悪性とした腺類癌は対照群に1例みられたが 0.60% 群では認められず摂取量に比例した頻発傾向も示さず悪性化が投与群に著明であったとは思われない．これらのことより包皮腺腫瘍の発生が LAS 摂取による誘発であったとは考え難い．このように今回観察した腫瘍のうちで LAS 摂取によって誘発され，あるいは発生を促進されたと思われる腫瘍は認められない．

以上の如く本試験での病理学的検索の結果から LAS は添加飼料を終生摂取（体重 kg 当り1日の LAS 摂取量は雌雄とも 0.04%群 20mg，0.16%群 80mg，0.60% 群 300mg[7]）したラットに摂取と関連した組織障害像および腫瘍発生が認められなかった．すなわち LAS はラ

ットに肉眼的・組織学的障害像を惹起せしめるような著明な害的影響を及ぼさなかったと結論される.

文　献

1) Kay, J. H., F. E. Kohen, and J. C. Calandra : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 812, 1965
2) Oser, B. L. and K. Morgareidge : *ibid.*, 7, 819, 1965
3) Buehler, E. V., E. A. Newman, and W. R. King : *ibid.*, 18, 83, 1971
4) 米山允子ら：東京衛研年報，24，409，1972
5) 米山允子ら：東京衛研年報，24，449，1972
6) Farris, E. J., E. H. Yeakel, and M. A. Seitner : *Amer. J. Path.*, 22, 613, 1946
7) 米山允子ら：東京衛研年報，28-2，73，1977
8) 鈴江　懐，小林忠義編：病理学各論 I，480，1966，医学書院
9) 村岡義博，伊藤真喜子，前田ユミノ，林　裕造：実験動物，26，1，1977
10) 西部忠幸：奈医誌，27，1，1976
11) Crain, R. C. : *Amer. J. Path.*, 34, 311, 1958
12) Gilbert, C. and J. Gilman : *S. Afr. J. med. Sci.*, 23, 257, 1958
13) 村岡義博，伊藤真喜子，山本富士子，林　裕造：実験動物，26，13，1977
14) 森井外吉，藤井登志之：実験動物，22，127，1973
15) Maekawa, A. and S. Odashima : *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1437, 1975
16) Snell, K. C. : *The Pathology of Laboratory Animals* (Riebelin, W. E. and J. R. McCoy eds.) 241, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois
17) Tannenbaum, A., S. D. Vesselinovitch, C. Maltoni, and D. S. Michell : *Cancer Res.* 22, 1362, 1962
18) 螺良義彦，豊島桂次，渡辺聡子：医学のあゆみ，78，677，1971
19) Thompson, S. W., R. A. Huseby, M. A. Fox, C. L. Davis, and R. D. Hunt : *J. Natl. Cancer Inst.*, 27, 1037, 1961
20) Sass, B., L. S. Labstein, R. Madison, R. M. Nims, R. L. Peters, and G. J. Kelloff : *J. Natl. Cancer Inst.*, 54, 1449, 1975
21) Hiraga, K. and T. Fujii : *Gann*, 68, 369, 1977
22) Bullock, F. D. and M. R. Curtis : *J. Cancer Res.*, 14, 1, 1930
23) Jacobs, B. B. and R. A. Huseby : *J. Natl. Cancer Inst.*, 39, 303, 1967
24) Coleman, G. L., S. W. Barthold, G. W. Osbaldiston, S. J. Foster, and A. M. Jonas : *J. Gerontol.*, 32, 258, 1977

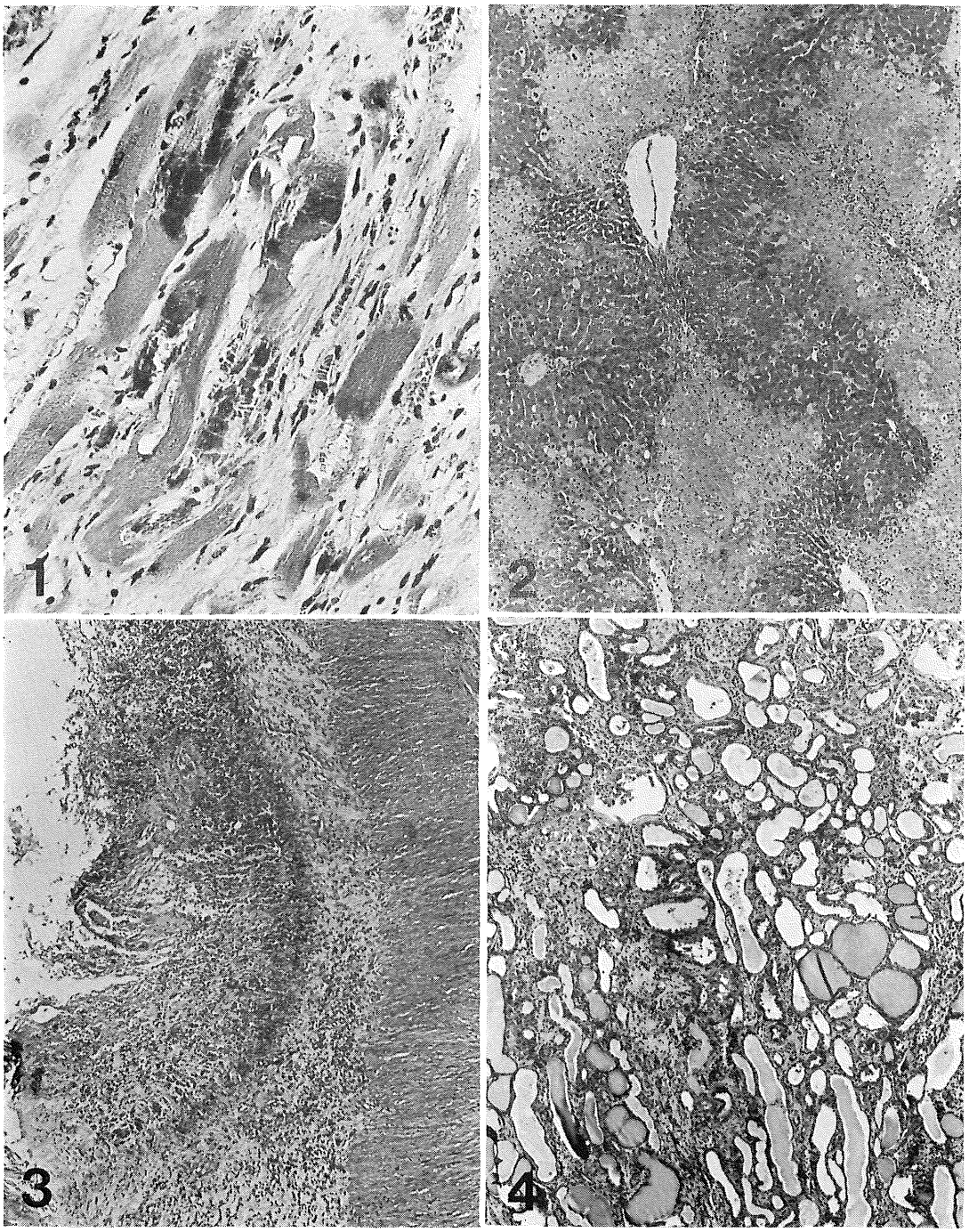


Photo 1. Calcification of cardiac muscles. H–E stain. ×200
Photo 2. Diffuse necrosis of hepatocytes. H–E stain. ×40
Photo 3. Ulcer in stomach. H–E stain. ×40
Photo 4. Nephropathy. H–E stain. ×40

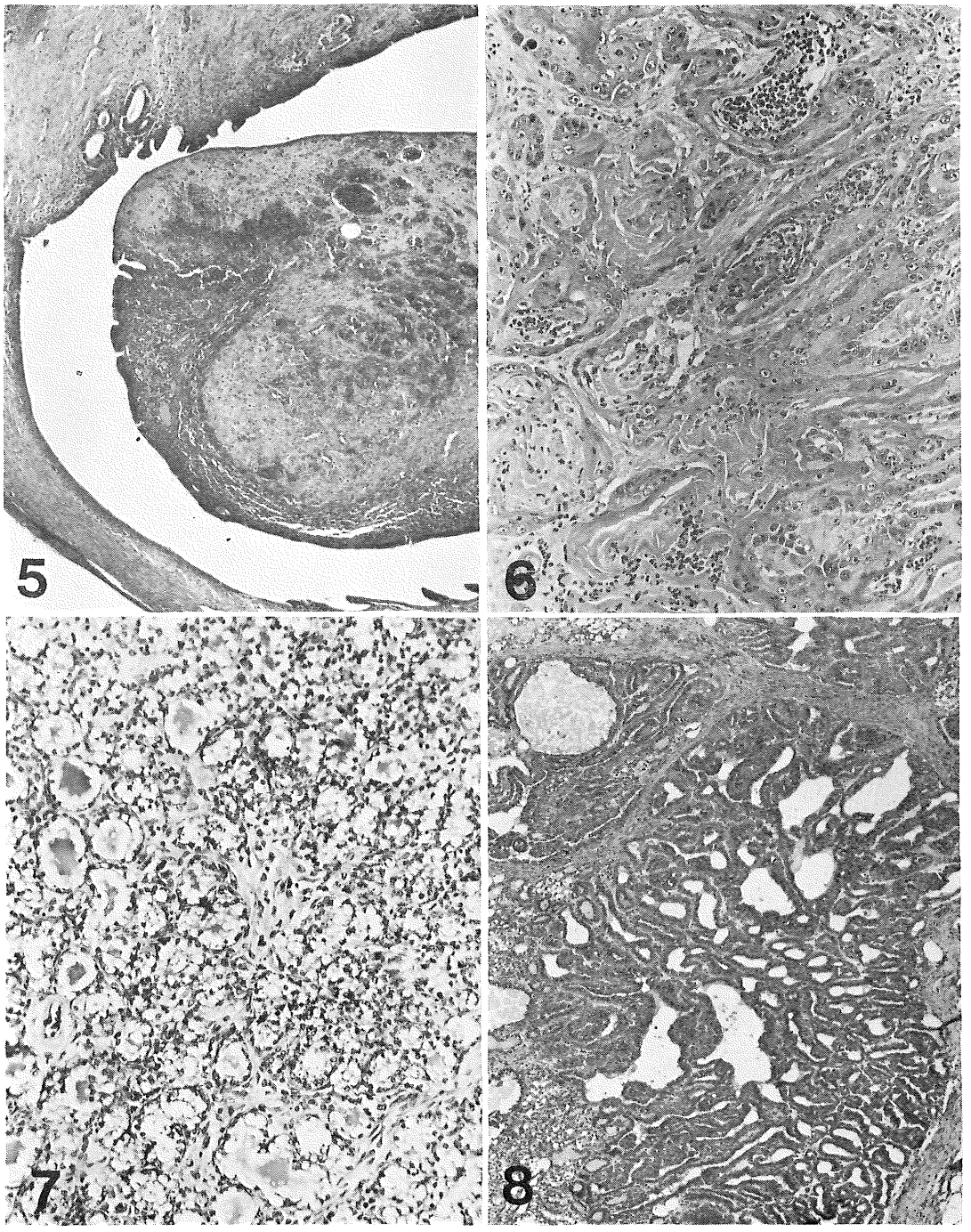


Photo 5. Endometrial polyp in uterus. H–E stain. ×40
Photo 6. Squamous cell carcinoma in ear duct. H–E stain. ×100
Photo 7. Adenoma in mammary glands. H–E stain. ×100
Photo 8. Adenocarcinoma in mammary glands. H–E stain. ×100

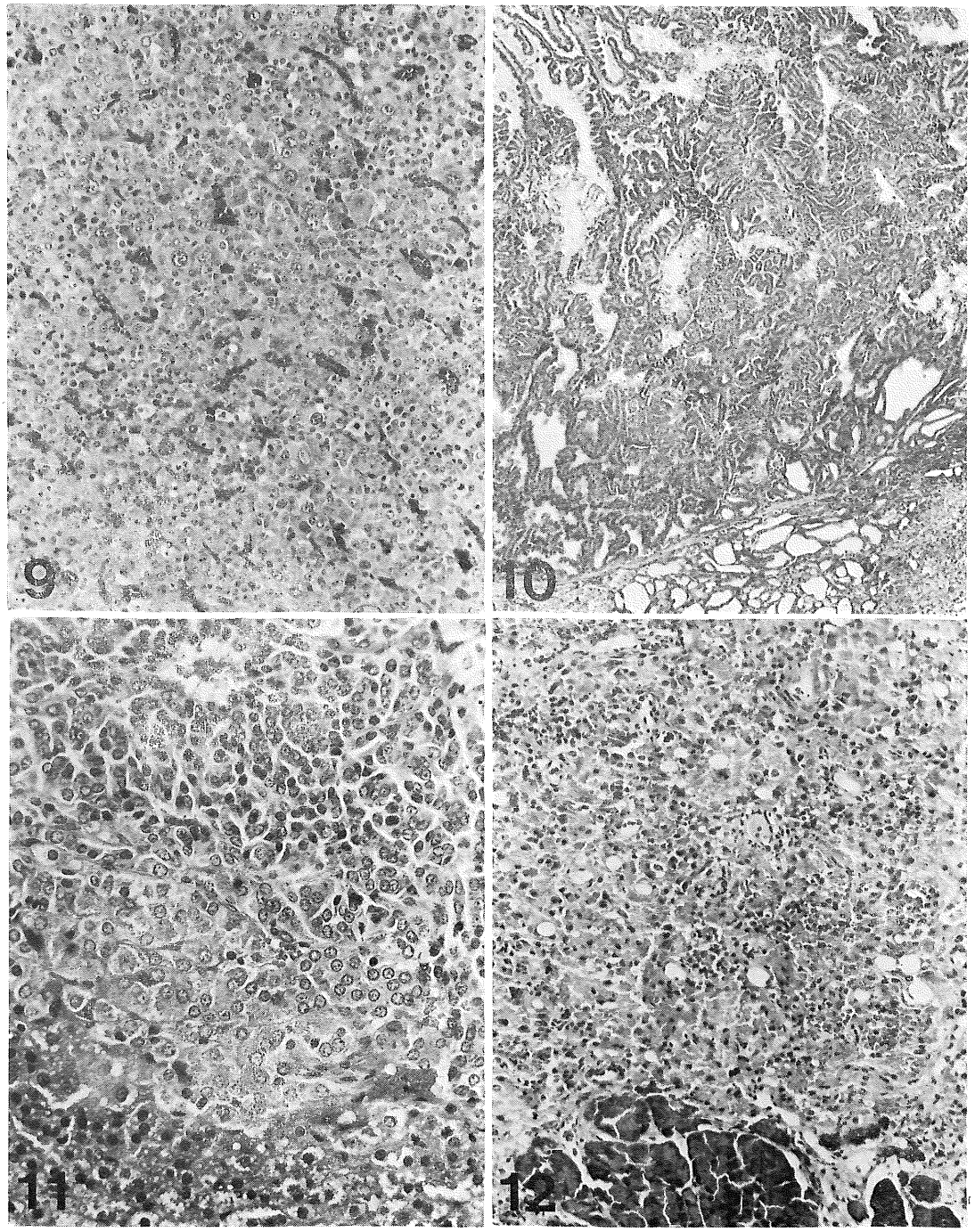
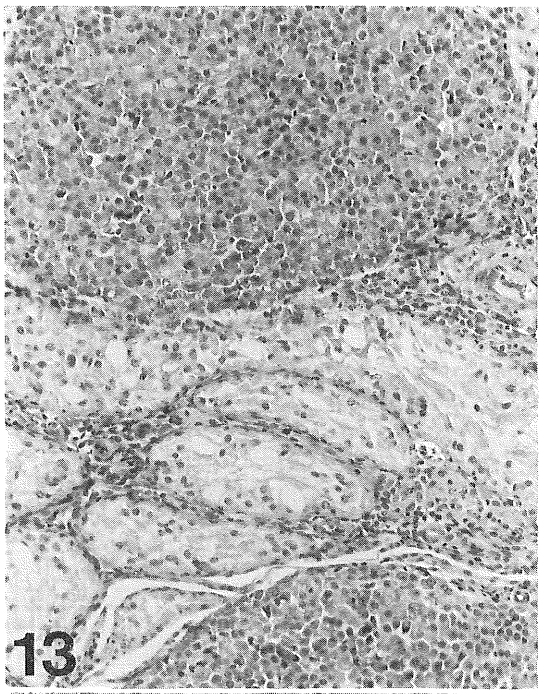
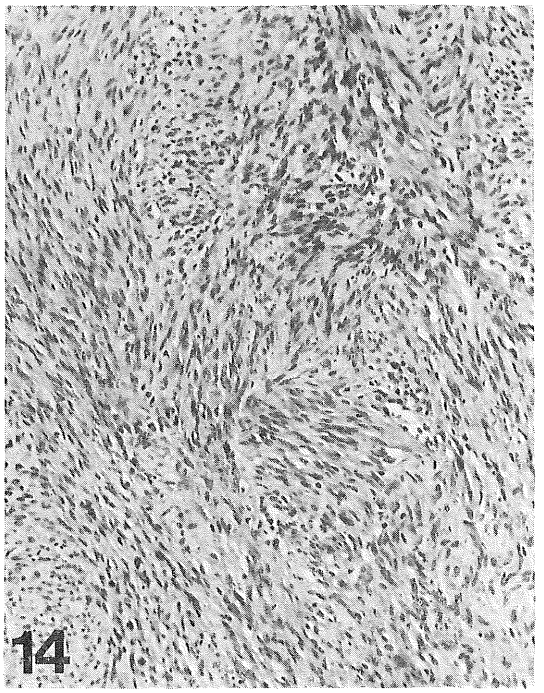
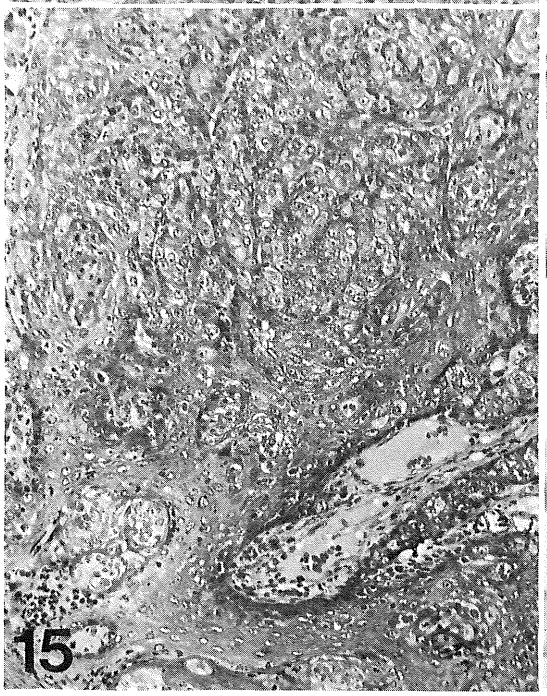


Photo 9. Chromophobe carcinoma in pituitary. H-E stain. ×100
Photo 10. Adenocarcinoma in thyroid. H-E stain. ×40
Photo 11. Pheochromocytoma in adrenal. H-E stain. ×200
Photo 12. Islet cell carcinoma in pancreas. H-E Stain. ×100







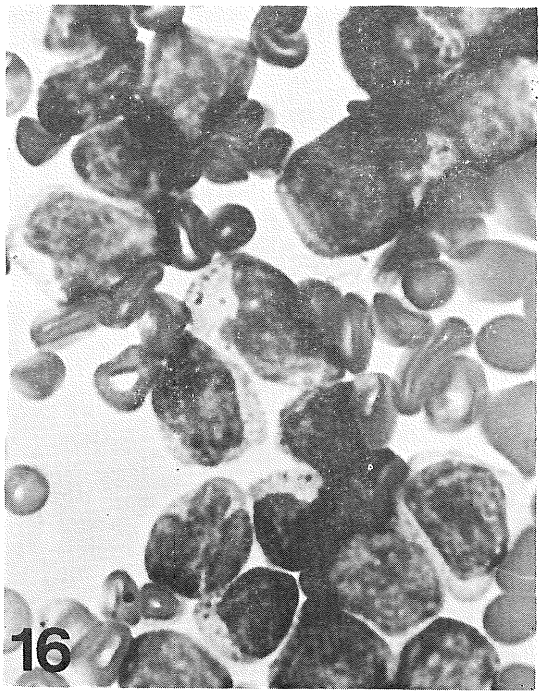


Photo 13. Interstitial cell tumor in testis. H–E stain. ×100
Photo 14. Leiomyosarcoma in uterus. H–E stain. ×100
Photo 15. Adenoac anthoma in preputial gland. H–E stain. ×100
Photo 16. Leukemia. Peripheral blood smear, May-Giemsa stain. ×1000

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 109-111, 1977

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）のラット血清脂質への影響

米山允子*, 平賀興吾*

Effect of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Serum Lipid in Rats

MASAKO YONEYAMA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)が，血清脂質量を低下させることは，先に報告した[1]．高級アルコール系洗剤の1つであるドデシル硫酸ナトリウムについて福沢[2]らが，血清と肝臓の脂質量を測定し，肝臓のトリグリセライドの増加を述べている．著者らは，LAS投与の血清が，コントロールに比較し清澄であることも考慮し，血清脂質成分について分析した．血清脂質量の低下が，食餌性による外因性のものか，肝に起因する内因性のものか検討したので報告する．

実験材料及び方法

試料　LASは，花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60, Lot No. 171(C_{10} 10.6%, C_{11} 34.1%, C_{12} 27.7%, C_{13} 19.0%, C_{14} 8.7% 有効成分 60±2%, 未反応油分 15% 以下, 無機塩量 (345.8) を用いた．

実験動物　Wistar SLC系ラット雄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．

投与方法，期間　LASを日本クレア製飼料 CE-2に 0.6, 1.2, 1.8% になるように混和し，各々自由摂取させた．投与後，2，4週目に断頭後，血清と肝臓を脂質分析に用いた．

検査方法　血清は，断頭後採血し，3000rpmで，10分遠心分離した．摘出した肝臓は，テフロン製ガラスホモゲナイザを用い，蒸留水で30%ホモジネートに調整し，Carlson[3]の方法に従いクロロホルム・メタノール（2：1）を用いて，脂質を抽出した．抽出した肝臓脂質，血清脂質の定量は，下記の方法に従った．Triglyceride (TG) Van Handel-川出変法[4]に従い定量した．Phospholipid (PL) Lowry, Ernsterの方法[5]で定量し，Pi値に25を乗じた値をリン脂質とした．Choresterol (CH) Zak, Henly変法[6]を用いて定量した．Freefatty-acidは，Duncombeの法[7]に従い定量した．TG, PL, CHについて定量した値の総和を総脂質量とした．

^{131}I-トリオレインを用いた消化吸収試験について[8][9]　^{131}I-トリオレイン（比放射能 0.001mCi/mg）は，第一ラジオアイソトープ研究所から購入し，オリーブ油に1 μCi/ml になるよう調整した．前記の方法で，0.6, 1.2, 1.8% LASを自由摂取させ，投与後2，4週目のラットを一夜絶食後，上記の ^{131}I-トリオレインを，ラット一匹当り 1.0ml 経口投与し，吸収のピーク時である6時間後，固定しヘパリナイズした注射筒で頸静脈から一定量採血した．血液中の放射能の測定は，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）で測定した．ラットは，各群3匹を用い，コントロールに対する投与群の吸収率をパーセントで表わした．

結　果

体重増加，餌摂取量，肝重量　Table 1に示すように体重は，4週目で1.8%群に有意な減少がみられた．餌の摂取量は，2週目で濃度が高くなるに従い減少する

Table 1. Food Consumption and Weight of Body and Liver on Administration of LAS for 2 and 4 Weeks

W	%	No. of Rats	Body wt. g	Food g/rat/day	Liver g/100gB. W.
2	0	5	176.8±3.8	16.7	4.68±0.09
	0.6	5	182.0±3.4	15.7	4.97±0.07
	1.2	5	177.6±3.1	14.8	5.19±0.11**
	1.8	5	166.2±2.8	11.3	5.19±0.06**
4	0	5	230.8±6.4	25.2	4.19±0.10
	0.6	5	236.2±5.9	19.3	4.31±0.04
	1.2	5	230.4±4.0	17.0	4.69±0.08**
	1.8	5	201.4±10.9*	19.2	4.59±0.13*

Values are mean±S.E.　*$p<0.05$　**$p<0.01$

* 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 2. Composition of Rat Serum Lipids on Administration of LAS for 2 and 4 Weeks

W	%	TG		PL		CH		FFA	Total lipid
		mg/100ml	%	mg/100ml	%	mg/100ml	%	mEq/l[1]	mg/100ml
2	0	196.4±19.4[2]	48.0±1.6	125.0±10.0	30.7±1.0	85.0±2.0	21.1±1.0	207±36	406±46
	0.6	91.7±3.4**	31.4±1.2**	121.0±14.7	40.6±2.4	81.2±1.6	27.9±1.2**	165±8	293±19**
	1.2	93.2±9.8**	37.1±2.0**	80.5±10.4**	31.8±2.8	76.4±1.6**	31.0±1.7**	152±20	250±14**
	1.8	84.4±2.0**	37.9±0.9**	69.0±6.6**	30.6±1.9	69.6±1.1**	31.3±1.1**	203±18	223±8**
4	0	213.4±24.4	50.3±3.5	117.5±3.7	28.9±2.2	83.3±1.8	20.6±1.3	266±31	414±49
	0.6	202.6±26.2	48.6±4.9	112.0±4.5	29.7±2.9	83.4±0.8	21.6±2.0	292±32	398±47
	1.2	172.7±26.5	45.4±2.0**	108.5±5.7	32.0±1.6	75.8±3.3	22.5±0.4	314±16	357±41
	1.8	95.9±7.7**	34.2±1.2**	95.6±4.0**	34.4±2.0	87.1±14.3	31.3±2.4**	216±15	278±16

1) $\times 10^{-3}$ 2) Values are mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

Table 3. Composition of Rat Liver Lipids on Administration of LAS for 2 and 4 Weeks

W	%	TG		PL		CH		Total lipid
		mg/g liver	%	mg/g liver	%	mg/g liver	%	mg/g liver
2	0	3.56±0.4	16.7±1.7	13.3±0.5	63.0±1.4	4.29±0.05	20.3±0.7	21.1±0.7
	0.6	4.21±0.2	17.9±0.3	15.9±0.8*	68.2±2.8	3.97±0.12*	17.0±0.7*	23.3±1.0
	1.2	4.30±0.1	17.9±0.8	15.6±0.9	64.7±1.6	4.12±0.13	17.1±0.8	24.0±1.0
	1.8	5.02±0.07*	19.9±0.5	16.2±0.6**	63.5±0.6	4.23±0.15	16.6±0.2*	25.4±0.8
4	0	3.09±0.1	18.6±2.0	11.1±2.0	57.6±5.6	3.20±0.07	19.0±1.5	17.3±2.0
	0.6	4.01±0.2**	22.8±0.8	10.2±0.2	56.6±1.9	3.14±0.04	18.0±0.5*	17.4±0.5
	1.2	3.73±0.2	21.4±0.9	10.1±0.2	58.9±0.9	3.32±0.08	19.2±0.5	17.2±0.4
	1.8	4.39±0.1**	23.4±0.4	10.7±0.4	57.3±1.1	3.54±0.18	19.0±1.2	18.6±0.4

1) Values are mean±S.E. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

が，4週目では濃度間の差はなかった．肝重量は，2，4週目とも 1.2，1.8% 群で有意な増加がみられ，0.6%群では，増加の傾向を示した．

血清，肝脂質 血清脂質は，Table 2 に示した．TG は，2週目で各濃度群とも顕著な減少を示し，4週目では，1.8% 群にのみ有意な減少がみられたが，0.6，1.2%群でも明らかな減少の傾向を示している．PL は，2週目で 1.2，1.8% 群に有意な減少を示し，4週目では，1.8% 群に有意な減少を示した．TC は，2週目で 1.2，1.8%群に有意な減少を示し，4週目では，差がみられなかった．FFA は，いづれの週でも有意な差を示していなかった．肝脂質は，Table 3 に示した．TG は，2週目で 1.8%群に有意な増加を示し，4週目では，0.6，1.8%群に有意な増加を示している．PL は，2週目で 0.6，1.8% に有意な増加を示し，4週目では差を示していない．TC は，2週目で 0.6%群のみに有意な減少を示した．

^{131}I-トリオレインによる消化吸収試験 Table 4 に示すように，血液中の ^{131}I-トリオレイン量は，2週目では，1.8% 群に増加の傾向がみられ，4週目では，0.6，1.2，1.8%群に増加の傾向がみられた．

Table 4. Radioactivity of Blood after Oral Administration of ^{131}I-Toliolein

W	%	cpm	%
2	0	10015[1]	
	0.6	8857	88
	1.2	10271	102
	1.8	13870	138
4	0	7056	
	0.6	8176	115
	1.2	10336	146
	1.8	9621	136

1) Value are the mean of 3 rats.

考　察

LAS 投与によるラット血清・肝臓脂質の変化，腸間

膜吸収阻害について，経時的に調べた．血清脂質は，2週目で TG，PL，TC も濃度段階に比例して減少しているが，TG が顕著に低下し，4週目でも同様のことがいえる．血清あるいは血漿中に存在する脂質の大部分は，リポ蛋白の状態で溶解し，トリグリセライドは，主に小腸で合成されるカイロミクロン及び肝で合成される超低比重リポ蛋白（VLDL）に含まれている．従って，血清トリグリセライドの増減は，食餌性によることが多いといわれている[10]．餌の摂取量は，投与群で減少の傾向を示しているが，4週目では，血清 TG が LAS 濃度の増加に比例して減少するにもかかわらず，摂取量の顕著な差はみられなかった．^{131}I-トリオレインを用いた消化吸収試験によるデータからも LAS 投与時に生じる腸間粘膜障害[11]による脂肪の吸収阻害は，推測されず，富山ら[12]が述べているように吸収促進がみられた．肝臓脂質は，投与後，2週目で PL，TG の蓄積を示し，あるいは推測されるが，4週目では，TG の蓄積がみられた．LAS が高濃度で肝臓酵素活性を低下させ，肝重量を増加させるのは，先の報告[1]から明らかである．今回の実験からも肝肥大は，1.2，1.8%群にみられた．LAS が，肝臓酵素系に変化を及ぼす結果，脂質の増加あるいは蓄積が予測されるが，体量の減少，肝重量の増加がみられない 0.6% 群が，TG の肝臓での増加，血清における減少を示していることから，LAS が，主に脂質代謝系に作用していると予測される．以上のことから，LAS によるラット血清脂質の低下は，肝臓に脂肪が蓄積するためと推測された．

文　献

1) 米山允子ら：東京衛研年報，27-2，105，1976
2) 福沢健治ら：第48回日本薬学会，中国・四国支部例会
3) Carlson，L. A.：*J. Atheroscler. Res.*，3，334，1963
4) 川出真坂：臨床化学分析Ⅲ，40，1973，東京化学同人
5) 春日誠次：臨床化学分析Ⅲ，98，1973，東京化学同人
6) 吉川春寿，北村元仕：医学のあゆみ，33，375，1960
7) Duncombe W. G.：*C. C. A.*，9，122，1964
8) Slanley，M. M.，and S. T. Thannhauser：*J. Lab. Clin. Med.*，341，1634，1949
9) 片山健志：日医放会誌，33，203，1973
10) 水原舜爾ら：新生化学，551，1966，医学書院
11) 米山允子ら：東京衛研年報，24，409，1972
12) 富山新一：油化学，16，40，1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 112-114, 1977

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）の微生物系における突然変異誘起性試験

藤田 博*, 小嶋昭江*, 平賀興吾*

Screening Tests of Mutagenicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in the Microbial System

HIROSHI FUJITA*, AKIE KOJIMA* and KOGO HIRAGA*

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)の毒性に関して，これまで当部において検討が加えられてきた[1-3]．その一環として，微生物系での突然変異誘起性について，枯草菌を用いた repair test (rec assay) および大腸菌，サルモネラを用いた mutation test により検索したので報告する．

実験材料および実験方法

菌株 a) *Bacillus subtilis* H17A および M45T 株の2株[4]．

b) *Escherichia coli* B/r WP2 (*trp*⁻, HCR⁻) 株[4,5]．

c) *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1538, TA100 および TA98 株[6,7]．なおこれらの株の性質のうち，deep rough をクリスタルバイオレット感受性により，R因子をアンピシリン抵抗性により確認した[8]．

試料 LAS（純度 99.5%，当研究所にて精製）を滅菌蒸留水にて 200mg/m*l* 溶液とし，実験濃度は，致死性が現われる濃度を基準として段階希釈して用いた．

陽性コントロールとして，アセチルアミノフルオレン (AAF)，4-ニトロキノリン-1-オキサイド (4NQO)，ベンツ(a)ピレン (BP)，フリルフラマイド (AF-2) を用いた．

試薬 肉エキス（極東薬品），ポリペプトン（大五栄養），寒天 (Difco)，ヒスチジン，ビオチン（和光純薬），G-6-P，G-6-PD，NADPH（以上オリエンタル酵母），フェノバルビタール (PB，吉田製薬)，アロクロール 1254 (PCB，三菱モンサント化成)，AAF（東京化成），4NQO（岩井化学），BP(和光純薬)，AF-2(上野製薬)．

培地 a) ブロス寒天培地：肉エキス 0.5%，ポリペプトン1%，塩化ナトリウム 0.5%，寒天 1.5%，pH 7.0．

b) 最少寒天培地：硫酸アンモニウム 0.1%，リン酸二水素カリウム1%，硫酸マグネシウム0.01%，クエン酸ナトリウム 0.05%，寒天 1.5%，グルコース 2%，pH 7.0．

c) 軟寒天[6]：塩化ナトリウム 0.5%，寒天 0.7% の溶液に，0.5mM ヒスチジン-0.5mM ビオチン溶液を 1/10 量加えた．

枯草菌による repair test 賀田の改良された rec assay により行なった[4]．

大腸菌による mutation test スポットテスト：WP2 株の一夜培養液 0.1m*l* を最少寒天培地に広げ乾燥後，LAS 溶液 0.02m*l* をしみこませた円形ろ紙(直径 8mm)をプレート中央に置いた．37° で2日間培養し，生じた復帰コロニーを計数した．

陽性コントロールは，4NQO を用いた．

サルモネラによる mutation test 1) スポットテスト：TA1535, TA1538, TA100, TA98 の一夜培養液各 0.1m*l* を試験管にとり，45° に保温した軟寒天 2 m*l* を加え最少寒天培地に重層した．このプレートの中央に LAS 溶液 0.02m*l* をしみこませた円形ろ紙（直径 8 mm）を置き，37° で2日間培養し，生じた復帰コロニーを計数した．

陽性コントロールは，4NQO を用いた．

2) 代謝活性化：代謝活性化のための S9 は，PB および PCB により薬物代謝酵素系を誘導したものを用いた．JCL-Wistar ラット雄（平均体重 210g）に PB (0.1%) は7日間飲水として与え，PCB はコーンオイルに溶かし肝臓摘出の5日前に 500mg/kg を腹腔投与した．S9 の分離は前報[9]によった．mutation test の方法は，Ames の方法[10]を一部変えて行なった．

小試験管に 0.1m*l* の LAS 溶液を取り，これに 0.5 m*l* の S9-Mix[8,10] (S9 150μl, 塩化マグネシウム 4 μmole, 塩化カリウム 16.5μmole, G-6-P 2.5 μmole,

* 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. LASの枯草菌による rec assay

試料	mg/ろ紙	生長阻止帯 (mm)	
		H17A	M45T
LAS	4	7	7
	1	6	6
	0.2	4	4
Control	0	0	0
AF-2	0.1[1]	5	10

1) μg/ろ紙

表 2. LASの大腸菌とサルモネラによる mutation test (スポットテスト)

試料	mg/ろ紙	大腸菌	サルモネラ			
		WP2	TA1535	TA1538	TA100	TA98
LAS	4	11[1]	30	23	35	23
	1	16	27	15	210	24
	0.2	15	15	16	254	36
Control	0	19	36	16	260	37
4NQO	0.3[2]	40	134	21	346	30

1) 復帰コロニー数/プレート
2) μg/ろ紙

表 3. LASのサルモネラによる mutation test (代謝活性化)

試料	mg/プレート (μg/プレート)	TA100			TA98		
		PB-S9	PCB-S9	S9-	PB-S9	PCB-S9	S9-
LAS	5	238[1]	243	0	6	2	0
	1	231	289	14	52	47	1
	0.5	254	254	107	50	52	18
	0.1	281	269	295	58	49	40
Control	0	266	287	303	43	45	38
AAF	(10)	4400	—	—	15000	—	—
BP	(10)	—	2300	—	—	672	—
AF-2	(0.05)	—	—	2600	—	—	472

1) 復帰コロニー数/プレート (3枚平均値)

G-6-PD 0.25単位, NADPH 2 μmole, リン酸緩衝液 (pH 7.4) 50μmole) を加えた. また, 代謝活性化しない場合には, 0.5m*l* のリン酸緩衝液 (0.25M, pH 7.4) を加えた. これに TA98, TA100 の一夜培養液 0.1m*l* を加え, 30分間, 37° でインキュベートした. このインキュベーション溶液に, 45° に保温した軟寒天 2 m*l* を加え, 十分に混合した後, 最少寒天培地に重層した. このプレートを 37° で2日間培養し, 生じた復帰コロニーを計数した.

陽性コントロールとして, PB-S9 の場合 AAF を, PCB-S9 の場合 BP を, 活性化しない場合 AF-2 を用いた.

結果および考察

枯草菌の H17A, M45T を用いた rec assay の結果を表1に示す. LAS は両株に対して生育阻止を示したが, その生育阻止帯の長さに差は見られなかった.

大腸菌, サルモネラでの mutation test の結果を表2, 表3に示した. スポットテストでは, 大腸菌, サルモネラ共に復帰コロニー数に増加は見られなかった. また, 代謝活性化によっても, TA98, TA100 共に復帰コロニー数に著しい増加は見られなかった. 従って, LAS の大腸菌, サルモネラに対する突然変異誘起性は検出できなかった.

LAS の遺伝毒性については, 益淵ら[2] により染色体異常, 優性致死試験の結果, 遺伝的障害は見られないことが報告されている. 本実験での微生物においても同様の結果であった.

要旨

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)の突然変異誘起性について, 枯草菌での repair test, 大腸菌, サルモネラでの mutation test を行なった結果, いずれの方法でも検出できなかった.

文献

1) 米山允子, 馬渕依子, 伊川三枝子, 小林博義, 市川久次: 東京衛研年報, 27-2, 105, 1976
2) 益淵正典, 高橋昭夫, 高橋 省, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 100, 1976
3) 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
4) Kada, T., K. Tutikawa, and Y. Sadaie: *Mutation Res.*, 16, 165, 1972
5) Bridges, B. A., R. E. Dennis, and R. J. Mun-

son : *Genetics*, 57, 897, 1967

6) Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 782, 1973

7) McCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 979, 1975

8) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178，1975

9) 藤田　博，水尾昭江，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，153，1976

10) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 115-117, 1977

放射性三価および六価クロムの経皮吸収

長井二三子*, 中川敦子*, 原しげ子*, 金西信次*
道源正子*, 中尾順子*

Absorption of Radioactive Chromic chloride and Sodium chromate from Skin

FUMIKO NAGAI*, ATSUKO NAKAGAWA*, SHIGEKO HARA*,
NOBUZI KANANISHI*, MASAKO DOGEN* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

著者らはクロム鉱滓埋め立て[1,2]による人体への影響を調べる目的で，クロム鉱滓水抽出液[3]（以下クロム鉱滓液と略す）中の六価クロムの経皮および経消化管吸収について，標準品クロム酸カリウム（以下 K_2CrO_4 と略す）と比較検討し，前報[3]に報告した．しかし経皮吸収についてはクロム鉱滓液，標準品 K_2CrO_4 ともに吸収率が3-25%と非常に高く，しかも個体差が大きいこと，肝，腎，脾，脳などに検出されたクロム量はマウス全体に存在するクロム量に比べ非常に少ないことなどの解釈できない問題を残したままで結論づけてしまった．そこで経皮吸収を前報[3]に改良を加えた方法を用いて調べなおし，データのくい違う点について新たな結果を得た．またクロムの毒性を考えるためには，六価クロムとともに自然界に多く存在し，安定な型である三価クロム[4-6]の吸収についても調べる必要があると考え，経皮および経消化管吸収実験を行った．本報では経皮吸収の結果を示す．

実験材料ならびに方法

実験材料　クロム酸カリウム（K_2CrO_4）和光純薬試薬特級，塩化クロム（$CrCl_3 \cdot 6H_2O$）関東化学試薬特級，放射性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製，放射性塩化クロム（$^{51}CrCl_3$）NEN 製，ICR マウス（♂）7週令体重 34 g 前後

実験方法　前報[3]での経皮吸収率の個体差は ^{51}Cr の毛髪への汚染が原因ではないかと考え，二三の改良を加えた．すなわち耳周辺部の毛を刈り取ったあとマウスの耳に 7.08ppm の $K_2{}^{51}CrO^4$ 液 10μl または 7.08ppm の $^{51}CrCl_3$ 10μl をしみこませた直径 6 mm のろ紙を絆創膏ではりつけた．一定時間のち耳を切除しパッカードアニマルカウンターで動物への放射能の取り込みを測定した．耳を切除したあとのマウスを放射性クロムの三価，六価とも3群に別け各々一つのケージにいれて28日間飼育し，一定時間ののちに排泄物を集めてアニマルカウンターで測定した．臓器分布は採血に注意した．前回は断頭により行ったため，血液への汚染があると考えたので，今回は経消化管吸収[3]と同様に心臓穿刺により採血し，肝，腎，脾，脳を取り出し，ベックマンバイオガンマでそれぞれの放射能を測定した．またマウスの頭部の皮膚をはく離し，左右に切り離して放射能をはかり，頭部に残存する ^{51}Cr の存在部位を調べた．

結果ならびに考察

前報[3]と同じ方法で六価クロムの吸収を測定すると，耳を取り除いた体部に吸収されたクロム量は 14.4% と 21%になった．このとき頭部に存在する ^{51}Cr はそれぞれ吸収量の 97% および 80% であった．このうちの約 75%ははりつけた耳の周囲の皮膚に存在することが明らかになった．この値は耳を切除して ^{51}Cr を除いたあと24時間後も同じであった．また調べた全臓器に存在する ^{51}Cr が全吸収量の 0.3% 程度であり，吸収率との差が非常にあることを合わせて考えると，皮膚表面への単なる汚染も一緒に測定し，見かけ上吸収率を高くしていた可能性が考えられる．

改良を加えた方法で試みた六価クロムの経皮吸収率を表1，臓器分布を図1に示した．頭部毛髪の除去，採血法を断頭から心臓穿刺に変えたことなどにより汚染を防止することができた結果，吸収率および血中の ^{51}Cr 量は前報[7]より低くなったものと考えられる．臓器レベルは大差なかった．

六価および三価クロムの吸収と排泄の関係について検討した．表3は表1，2に示したマウスを前述の如く，28日間飼育し，その間の排泄物の ^{51}Cr を測定し，得た結

* 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

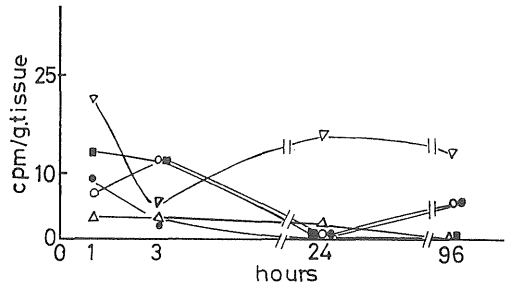


図 1. 臓器分布，K_2CrO_4 を15分間貼付したのち，耳を切り離して未吸収クロムを除去し，1時間，3時間，24時間，96時間後の ^{51}Cr の cpm を示した．各群ともマウス5匹の平均値で示した．
○：血液，△：肝臓，▽：腎臓，□：脾臓，●：脳

表 1. 六価クロムの経皮吸収

動物番号		貼付$^{51}Cr^{a)}$ cpm/mouse	吸収$^{51}Cr^{b)}$ cpm/mouse	吸収率$^{c)}$ %
A	1	53,210	22	0.04
	2	55,522	21	0.04
	3	55,712	30	0.05
	4	54,416	95	0.17
	5	56,377	59	0.10
	6	53,477	8	0.02
B	7	54,796	186	0.34
	8	56,155	172	0.31
C	9	55,104	1,202	2.18
	10	54,157	855	1.60

a) 貼付 ^{51}Cr とは耳切除前の ^{51}Cr のカウント
b) 吸収 ^{51}Cr とは耳切除後の ^{51}Cr のカウント
c) 吸収率$=\frac{\text{吸収}^{51}\text{Cr(cpm)}}{\text{貼付}^{51}\text{Cr(cpm)}}\times 100$
貼付時間は30分である

果である．マウスの体へ吸収された ^{51}Cr 量が少ない群では，ほぼ排泄物に回収された量と吸収された量が一致しており，この群については耳切り離し後，体内に吸収された ^{51}Cr はほぼ完全に排泄されたと考えてよい．表3のＡＢＣ群のうち吸収の多いＣ群の排泄物中の放射能の回収が他の群に比べて低いのは一部汚染も考えられる．しかし排泄物中の放射能を調べた結果は，汚染が生じたとみられるものはマウス10匹中1または2匹のみであった．三価クロムについても同様のことを試み，表2および表3に示した．経消化管吸収[7] でみられた六価と三価の吸収の差はこの実験結果からはみいだせなかった．この経皮吸収と経消化管吸収の結果のくい違いは皮

表 2. 三価クロムの経皮吸収

動物番号		貼付$^{51}Cr^{a)}$ cpm/mouse	吸収$^{51}Cr^{a)}$ cpm/mouse	吸収率$^{a)}$ %
D	1	16,351	22	0.13
	2	29,025	71	0.24
	3	15,438	46	0.30
	4	10,928	21	0.19
	5	16,366	47	0.29
E	6	10,875	62	0.57
	7	16,386	46	0.28
	8	14,797	72	0.49
F	9	18,597	199	1.08
	10	20,860	131	0.63

a) 表1の場合と同様に示した，貼付時間は30分である．

表 3. 六価および三価クロムの排泄

	動物数	吸収^{51}Cr cpm/cage	吸収率 %	排泄物^{51}Cr cpm/cage/28days	排泄量$^{a)}$/貼付量 %
六価クロム K_2CrO_4 A	6	235	0.07	306	0.09
B	2	358	0.32	340	0.31
C	2	2,057	1.85	1,207	1.09
三価クロム $CrCl_3$ D	5	207	0.23	340	0.43
E	3	180	0.43	208	0.49
F	3	330	0.84	315	0.80

a) $\frac{\text{排泄物中の}^{51}\text{Cr(cpm/cage/28 days)}}{\text{耳切除前のカウント (cpm)}}\times 100$

膚と消化管における物質の透過性の違いを示すものか，あるいは吸収面積が極端に小さいために比放射活性の高いクロムの使用によってもなお誤差の範囲を出なかったのかは，今後の実験によって明らかにされなければならない．いづれにしろ吸収されたクロムは28日間までにほとんど排泄された．吸収量と排泄の間の差異はアニマルカウンターの測定効率が低いため，自己吸収などにより完全に測定されていないことによると考えられた．従って精度をあげるためには動物全体の測定にもっと効率の良い方法を考えなければならない．

総　括

1. 六価および三価クロムの経皮吸収率は約0.4%であり，両者の吸収率の差は認められなかった．

2. 臓器分布は，血液を除いて前報[3] と大差なかった．

3. 前報の六価クロムの吸収率，および血中レベルが高かったのは，汚染したクロムを含んでいたためであろ

う.

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) 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：東京衛研年報，27-2，56，1976
4) Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants : *Chromium*, 1, 1974, National Academy of Science, Washington, D. C.
5) Merz, W. : *Physiological Reviews*, 49, 163, 1969
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) 中川敦子，長井二三子，原しげ子，金西信次，道源正子，中尾順子：東京衛研年報，28-2，118，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 118-120, 1977

三価クロムの経消化管吸収

中川敦子*, 長井二三子*, 原しげ子*, 金西信次*
道源正子*, 中尾順子*

Absorption of Chromic Chloride from Gastrointestinal Tract

ATSUKO NAKAGAWA*, FUMIKO NAGAI*, SHIGEKO HARA*,
NOBUZI KANANISHI*, MASAKO DOGEN* and TOSHIKO NAKAO*

最近東京都内においてクロム鉱滓埋立てによる六価クロムの人体に対する影響が問題となり，先に私達はマウスを用いて鉱滓抽出液と六価クロム溶液の吸収，排泄，臓器分布について比較し報告した[1]．六価クロムは生体膜を容易に透過し毒性も強いことが指摘されている[2-4]．一方三価クロムは最も安定な形で，自然界にも多く存在すること，六価クロムも皮膚および体内で容易に還元されて三価クロムとして存在すると考えられていること[5]，さらにクロムは生体に必須な元素であること等[2,3]から三価クロムの生体内運命についても知る必要があると考え，前報と同じ方法で本実験を行い六価クロムの場合と比較した．

実験材料および方法

動物 4週令のJCR-ICR系マウス（♀）を購入し一週間予備飼育後実験に使用した．予備飼育の条件は室温25±1°C，湿度55±5％，照明1日8時間とし1ケージ10匹ずつ収容してCE-2の飼料および水道水を自由に摂取させた．

試薬 塩化クロム（$CrCl_3 \cdot 6H_2O$）は関東化学試薬特級，放射性クロム（$^{51}CrCl_3$）はニューイングランドヌクレア社，麻酔エーテルは三楽オーシャン社のものを使用した．

実験方法

一夜絶食したマウスに7.08ppm塩化クロム溶液0.3 ml（約50,000cpm，アニマルカウンターによる測定値）をゾンデを用い経口投与した．投与後5時間までは水だけを，その後は水と餌を自由に摂取させた．投与後5時間から15日目までは糞と尿を分けて放射能を測定し，それ以後は糞尿合わせて測定した．投与後一定時間経過したらエーテルで軽く麻酔して開胸開腹し，心臓穿刺により採血した．次に傷つけないように注意深く消化管を取り，続いて肝臓，腎臓，脾臓，脳をとり各臓器の重量を測定した．クロムの臓器分布を調べるため各臓器に取込まれた放射能をバイオガンマ（ベックマン社）で測定した．一方動物によるクロムの吸収率，排泄の割合を調べるにはクロム投与直後の動物全体の放射能，消化管を除いた残屍体の放射能（即ち未吸収クロムを除去したもの），および排泄物中の放射能をアニマルタウンター（パッカード社）で測定した．動物は1群5匹とし結果は5匹の平均値で表わし，吸収率および排泄の割合は次式で計算した．

$$\text{吸収率} = \frac{\text{消化管を除いたマウスの放射能}}{\text{クロム投与直後のマウス全体の放射能}} \times 100$$

$$\text{排泄の割合} = \frac{\text{排泄物中の放射能}}{\text{クロム投与直後のマウス全体の放射能}} \times 100$$

実験結果

1. 吸収 三価クロムの吸収率を六価クロムと比較して表1に示した．投与後5時間迄の三価クロムの吸収率は0.88％で六価クロムの3％に比べて低かった．また尿中排泄の割合を表2に示した．1日目における三価クロムの排泄の割合は1.9％で六価クロムの30.1％に比べると非常に低かった．尿中のクロムは一度体内に吸収されたものであり，この値から吸収の程度を推測すると三価クロムの吸収は六価クロムに比べて低いことが示唆された．

2. 排泄 投与後15日迄は糞と尿を分離して測定し（表2），以後は糞尿合わせて測定した（表3）．投与した三価クロムの約85％が24時間以内に糞中に排泄され六価クロムの場合と同程度であった．投与量に対する尿中排泄の割合は15日間で2.75％となり吸収された三価クロムの70％が24時間以内に排泄された．これは吸収された六価クロムの24時間以内に排泄される割合が95％以上であるのに比べて低かった．

* 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

表 1. 経消化管吸収率

投与後経過時間	吸収率（%） Cr^{6+}	Cr^{3+}
1時間	3.4±1.4	0.83±0.42
3時間	3.3±1.6	0.84±0.80
5時間	2.5±0.6	0.98±0.63

三価クロムの吸収率はマウス5匹の平均値±標準偏差．六価クロムの吸収率は前報[1]を引用．

表 2. 尿中排泄の割合

投与後日数	投与量に対する1日当りの尿中排泄量の割合（%） Cr^{6+}	Cr^{3+}
1 日	30.1±15.8	1.91±0.71
2 日	1.1±0.5	0.14±0.11
3 日	0.2±0.1	0.09±0.05
4—5日	0.1±0.1	0.07±0.04
6—7日	0.1±0.1	
6—8日		0.06±0.07

三価クロムの尿中排泄の割合はマウス5匹の平均値±標準偏差．六価クロムの値は前報[1]を引用．

表 3. 糞尿中への排泄の割合

Cr^{6+} 投与後日数	投与量に対する1日当たりの糞尿中排泄量の割合(%)	Cr^{3+} 投与後日数	投与量に対する1日当たりの糞尿中排泄量の割合(%)
1 日	84.8±8.48	1 日	84.9±5.1
2 日	5.34±0.76	2 日	3.18±2.8
3 日	1.78±4.16	3 日	4.12±4.6
4—5日	0.17±0.06	4—5日	0.30±0.25
6—7日	0.03±0.02	6—8日	0.59±0.62
8—9日	0.03±0.02	9—10日	0.16±0.19
10—15日	0.06±0.01	11—13日	0.08±0.09
16—17日	0.01±0.01	14—15日	0.07±0.07
18—21日	0.05±0.03	16—19日	0.16±0.20
22—27日	0.03±0.01	20—22日	0.02
28—33日	0.03±0.01	23—24日	0.04
		25—29日	0.01

マウス5匹を1群とし，投与後1日目は8群の平均値，その後1群ずつ殺して20日目以後は1群の値である。六価クロムの値は前報[1]より求めた。

3. 臓器分布 放射性クロムの臓器分布および減衰の様子を図1，図2に示した．クロム投与後血中クロムがまず上昇すると考えられ，その後急速に減少して種々の臓器に取込まれた．臓器重量あたりの蓄積量は腎臓が最も高く，次に脾臓と肝臓で脳は最も低かった(図1)．腎臓，肝臓，脾臓への取込みは血中濃度以上であった．臓器に取込まれた三価クロムは六価クロムと同様に増減の波形を描きながら減衰した(図2)．

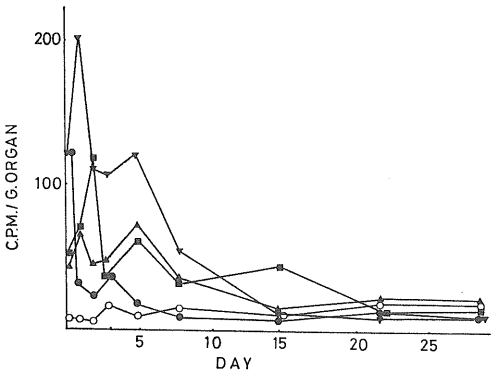


図 1. 三価クロムの臓器中濃度の変化
各臓器のクロム量をグラム重量あたりのc.p.mで表わした．マウス5匹の平均値で示し，●—●は血液，▼—▼は腎臓，■—■は脾臓，▲—▲は肝臓，○—○ は脳を表わす．

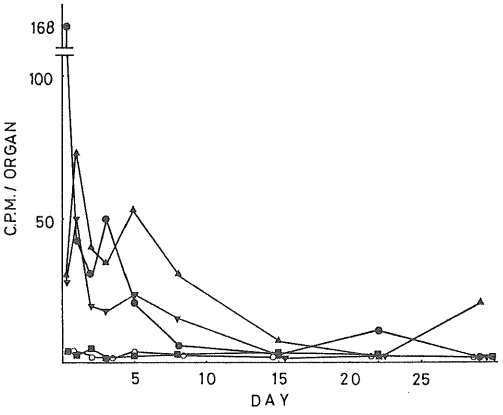


図 2. 臓器中の三価クロムの減衰
マウス5匹の平均値で示し，●—● は血液，▼—▼ は腎臓，■—■ は脾臓，▲—▲ は肝臓，○—○ は脳を表わす．

4. 臓器重量 肝臓，腎臓，脳は実験群と対照群（クロム無投与群）の間に差はなかった．脾臓はクロム投与後4日目までは減少したが，それ以後回復し対照群との差はなくなった．

考 察

投与後5時間までの三価クロムの吸収率は0.88%，15日間の投与量に対する尿中排泄の割合は 2.75% となり吸収に関する他の報告と一致した[6-8]．三価クロムを経口投与した時の吸収および排泄を六価クロムの場合と比較すると，三価クロムは吸収率が低く（表1）尿中排泄

の速度も遅かった(表2). 三価クロムが六価クロムに比べて吸収されにくいということはラット[7]やモルモット[9]を用いた吸収の測定, および赤血球の膜透過で[7,10]明らかにされている. 三価クロムは膜透過性が低いため吸収も排泄もされにくいと考えられる.

腸管から吸収されたクロムはまず血中に続いて種々の臓器に移行した. 移行後の脳以外の臓器中濃度は血中濃度以上に濃縮されていた(図1). 腸管におけるクロム吸収の機構は不明であるが, 吸収後は血漿タンパクであるシデロフィリンに結合[11]して体内を移動し, 肝臓, 骨髄等主として細網内皮系組織に取込まれ時間とともに脾臓に蓄積する[3]と言われている. またラットに少量のクロムを静注して臓器分布を調べると脾臓, 腎臓が最も高く, 次に肝臓で, 肺, 心臓, 膵臓, 脳は低いという報告[12]もあり本実験とも一致していた. またどの臓器に取込まれたクロムも15日以内に大部分が排泄された(図2).

三価クロムを経口投与した場合の毒性は非常に低いことが報告されている[13,14]. しかし非常に低濃度のクロムを投与した実験は少ない. 本実験では 7.08ppm という低濃度の放射性クロムを経口投与し, その吸収, 排泄, 臓器分布について観察した. 三価クロムの毒性という点からは皮膚におけるアレルギー反応が問題視されている[2]. 六価クロムも皮膚に接触して皮膚のメチオニン, システイン, システチン等と反応して三価に還元され, これがハプテン—タンパク複合体を形成するという報告[15]もあり今後検討しなければならない問題であろう.

謝辞 クロムの経口投与に御協力をいただきました毒性部病理研究科の林田志信氏に深謝いたします.

文　献

1) 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：東京衛研年報, 27-2, 56, 1976
2) *Committee on Biologic Effects of Atomospheric Pollutants* : *Chromium*, 1, 1974, National Academy of Science, Washington, D. C.
3) Merz, W. : *Physiol. Rev.*, 49, 163, 1969
4) 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
5) Feldman, F. J. : *Fed. Proc.* 27, 482, 1968
6) Visek, W. J., I. B. Whitney, U. S. *G.* Kuhn Ⅲ, and C. L. Comar : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 84, 610, 1953
7) Donaldson, R. M. and R. F. Barreras : *J. Lab. Clin. Med.* 68, 484, 1966
8) Merz, W., E. E. Roginski, and R. C. Reba : *Am. J. Physiol.* 209, 489, 1965
9) Wahlenberg, J. E. and E. Skog : *Arch. Derm.* 92, 315, 1965
10) Gray S. J. and K. Sterling : *J. Clin. Invest.* 29, 1604, 1950
11) Hopkins, L. L. Jr., and K. Schwarz : *Biochim. Biophys. Acta.*, 90, 484, 1964
12) Hopkins, L. L. Jr. : *Amer. J. Physiol.* 209, 731, 1965
13) Akatsuka, K. and L. T. Fairhall : *J. Ind. Hyg.* 16, 1, 1934
14) Conn, L. W., H. L. Webster, and A. H. Johnson : *Am. J. Hyg.* 15, 760, 1932
15) Mali, J. W. H., W. J. Van Kooten, and F. C. J. Van Neer. : *J. Invest. Derm*, 41, 111, 1963

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 121-128, 1977

クロム鉱滓水浸出液による家兎角膜の微細構造におよぼす影響

福森信隆*, 三栗谷久敏*, 平賀興吾*

Fine Structure Alteration on Cornea by Water Extract of Chromium Ore Dross in Rabbit

NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

既に当部では，環境汚染を引き起こしたクロム鉱滓の生体影響を検討する一環として，クロム鉱滓水浸出液の家兎眼粘膜[1]および皮膚[2]に対する一次刺激性に関して報告した．

今回，クロム鉱滓水浸出液による角膜の初期変化の過程を解明する目的で微細構造の変化を，六価クロム対照液およびpH対照液による場合と比較観察した．

実験方法

動物は体重約3kgの白色雄性家兎を用い，検体を点眼した後，首枷をつけ四肢による擦過を防いだ．検体の調整は1,000ppm六価クロムを含むクロム鉱滓の水浸出液(以下クロム鉱滓液と略す)，重クロム酸ナトリウムとクロム酸ナトリウムの混和によってpHを中性に調整した1,000ppm六価クロム水溶液(クロム対照液と略す)およびpH 12.7のソーダ石灰飽和水溶液（pH対照液と略す）とし，前報[1]と同一の溶液を使用した．各検体は0.1m*l*を左眼に点眼し，24時間経過した後，フルオレスセンナトリウムの2％水溶液（フルオと略す）を1滴点眼した．数秒後約20m*l*の滅菌済微温蒸留水で洗眼し，フルオによる螢光を確認した後屠殺し，外眼角に近い角膜を摘出した．螢光を発した角膜（陽性部と略す）とその周囲の螢光を発しない部（陰性部と略す）の2カ所の組織を採取した．また，クロム鉱滓液は点眼後48時間経過についても行い，同時に点眼をしない未処置眼球（未処置と略す）も試料に供した．試料は3％パラホルムアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.4）で1時間固定後，細切し3時間同液にて再固定を行った．氷室内の緩衝液中で一晩洗浄，1％ OsO_4 液で1.5時間後固定，エタノール脱水後定法に従いAraldite樹脂で包埋した．包埋した電顕試料はトルイジン青染色を施し光顕的に観察した後，超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を行い，HU-12A型電子顕微鏡にて観察した．

実験結果

フルオ陽性部はクロム鉱滓液点眼後24，48時間とも半円形状で下眼瞼側の角膜に認められ，ほぼ全例にみられた．クロム対照液，pH対照液では螢光を認めなかった．なお陽性部の螢光は前固定液による浸透固定中に退色した．

未処置　正常角膜は角膜上皮，前境界板，固有層，後境界板，角膜内皮の5層より成っているが，前境界板は明確でなかった．角膜上皮は重層扁平上皮で構成されており，表層の上皮細胞は扁平化が著しく，深部の基底面に行くほど細胞は円柱状となり，核は入り込んだ不整形な形態を呈した．互いに隣接する細胞では小突起により嵌合を形成しdesmosomeを認めた（Fig. 1）．細胞内小器官はribosome，tonofilamentsを除いて全体に明確でなく，少数の不明瞭な糸粒体が散在していた．固有層は膠原線維が平行に走り層を形成し，各層が交互に直交してその間に細長い線維芽細胞を認めた（Fig. 2）．後境界板は無構造な中等度の電子密度を有する層をなし，角膜内皮は単層に配列され一定の厚みを形成して，長形な核を持った細胞であった．

クロム鉱滓液　点眼後24時間のフルオ陽性部では，角膜上皮細胞の隣接細胞間隙に拡張がみられ，表層部の角膜上皮が離脱する傾向が認められた．残存する角膜上皮は扁平状を呈する細胞が少なく，ほとんど円柱状を認めた．トルイジン青染色を行った光顕的観察で染色性が低下し離脱しつつある細胞は，電顕的に変性が著しく，核の消失，細胞質の淡明化がみられ，多数のtonofilamentsを認めるに過ぎなかった．この細胞の表層面の小突起は全く消失していた（Fig. 3）．また基底膜に近い上皮基底面の上皮細胞に種々の大きさの小空胞が基底膜に沿ってみられた．一部，基底層の細胞まで離脱し基底膜が露になった上皮細胞の剥離した面も観察された（Fig. 4）．角

* 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

膜固有層は膠原線維の平行走行が乱れ，離開した部もみられたが，浸潤細胞の出現はさほど顕著でなかった．後境界板，角膜内皮では著変がみられなかった．

点眼後24時間のフルオ陰性部では角膜上皮の多層配列に変化を認めないが，最表層部の淡明化がみられ変性を起こし，自由表面の小突起は背が低く融合して欠損部もみられた．しかしながら，上皮細胞間の離開は少なく，基底層での小空胞もみられず，正常像に近かった．また固有層では膠原線維の乱れが少なく角膜内皮の変化も認められなかった．

点眼後48時間のフルオ陽性部では，角膜上皮細胞は基底層まで離脱しており，上皮部と固有層を分ける基底膜部が露出していた．固有層の膠原線維は平行配列が乱れ，比較的電子密度の高い横断面の線維が散在し，離開した間隙では均質な無構造物質を認めた（Fig. 6）．また固有層内に多数の炎症性細胞の浸潤がみられ，上皮側の固有層に比較的多く認められた．後境界板は著しい変化がみられなかったが，角膜内皮では長円形の小空胞が細胞内に観察された．

点眼後48時間のフルオ陰性部での角膜上皮は，基底層の上皮細胞内に基底膜に沿って小空胞がみられ，一方表層部に移行するにつれ細胞間隙は離開を伴い，最表層の上皮細胞では小突起を欠損し細胞質の電子密度が顕著に低下して淡明となり tonofilaments の残存が認められた．網状構築を有する tonofilaments は細胞全体に分布がみられ，その間に糸粒体の残渣と思われる小円形顆粒の散在を認めた（Fig. 5）．核膜，chromatin は消失する傾向を示した．これらの上皮細胞の変化は細胞により異なり，必ずしも隣接する細胞に同様な変化を惹起せしめていなかった．角膜上皮の中間層では層状配列を保持していた．固有層は，一部に上皮側で膠原線維の軽度な離開，炎症性細胞の出現がみられたがあまり顕著でなかった．離開部は均質な物質で満たされていた．角膜内皮は一部に小空胞を認めたほか著変がなく，後境界板も正常像に近かった．

クロム対照液　点眼後24時間のフルオ陰性部では，角膜上皮の離脱がみられず，層状構造を保持して細胞間隙の離開も顕著でなかった．最表層の小突起の欠損，細胞質の淡明化はみられなかったが，一部の細胞では小空胞を認めた．固有層は膠原線維の離開を呈する部もみられたが，細胞浸潤は著しくなかった．後境界板，内皮細胞の変化は認められなかった．なおフルオ陽性部は確認されなかった．

pH 対照液　点眼後24時間のフルオ陰性部での角膜上皮は，最表層部の細胞質に淡明化をみるが，離脱および小突起の欠損，細胞間隙の離開は認められなかった（Fig. 7）．固有層，角膜内皮とも著変がみられず，フルオ陽性部も確認されなかった．

考　察

クロムによる腐蝕性，刺激性すなわち皮膚，粘膜の障害が惹起されることは以前から知られており，これまで産業衛生面からの疫学的研究が多くなされてきた[3,4]．先に東京都に埋立てられたクロム鉱滓が極めて不完全な処理方法で投棄されたことから，地域住民に好ましくない影響を及ぼす可能性がでてきた．眼粘膜に対しては雨水などに浸出したクロムが飛散したり，あるいはクロム鉱滓の微細な粉塵が眼に飛び込んで障害を引き起こすことが考えられる．前報の結果[1]から推測すると，刺激性に関して 500ppm 以下のクロム鉱滓液では障害を認められず，フルオですべて陰性を呈したため，角膜の障害は高濃度で発現すると思われる．従って今回の実験では，明らかに損傷を確認できる 1,000ppm 濃度のクロム鉱滓液を用いて変化を観察した．

眼球ではその機能により，角膜，結膜を常時涙液が潤滑し粘膜を保護して，外的刺激に対して速やかに過量な涙液の分泌が起こり，粘膜を洗浄保護するものと思われる．クロム鉱滓液点眼によりフルオ陽性部と陰性部がみられたが，陽性部は下眼瞼側の角膜に多く認められた．このことはクロム鉱滓液が涙液によって完全に洗浄されず下眼瞼側に貯留した結果，眼球角膜が比較的長く曝露されたため組織の損傷が強くあらわれたと考えられる．

電顕的観察で，フルオ陽性部は角膜上皮が基底部まで完全に剥離するかあるいは細胞間隙が著明に離開した退行様構築を呈した部にみられ，前者は特に点眼後48時間で多くみられた所見で，後者は24時間後に比較的多く観察された．フルオによる螢光は上皮細胞の欠損部を染色することからも[5]，フルオ陽性部での角膜上皮の離脱は陰性部と比較して顕著であった．これに対して，陰性部では上皮細胞の脱落が表層部で若干みられたに過ぎず，層状構造の多くは保持されていた．

角膜剥離の機作過程を考察すると，一つには検体に直接曝露された表層部の角膜上皮から起こると思われる．角膜上皮は一様な変化を呈するのではなく，細胞個々で異った変性段階を示しているため，離脱した部位では間隙が拡大され凹凸状の遊離面が形成される．基底部の細胞間隙に比べ表層部では離開がみられることからも，検体は表層から深層へ浸透し，漸次内部の細胞におよぶものと思われる．さらに剥離に導く他の過程は，点眼後24時間のフルオ陽性部，48時間のフルオ陰性部でみられた基底膜に沿った小空胞形成が考えられる．この小空胞は

細胞損傷に伴って増加がみられ，上皮基底部の細胞を基底膜からの分離を容易にならしめて，最終的にはフルオ陽性部でみられた角膜上皮の完全な剥離を呈した像に移行するものと思われる．基底膜は異物刺激に対し角膜固有層を保護する重要な役割を持ち，また剥離部の角膜上皮の修復に関与している[6]．

変性した上皮細胞は小突起の減少，消失傾向にあり，特に表層自由面での小突起の欠損は本来涙液を小突起間に保持させ，潤滑の役目を行うことからも，眼球の保護機能に影響を与えていると考えられる．細胞内では，ribosome の減少がみられ，細胞質の電子密度が著しく低下して tonofilaments の網状構造が明瞭になっている．これは変性脱落の過程を経る中で，恐らく水腫の状態となり，固定脱水を行う間に細胞質成分の脱出が考えられる．

角膜固有層の変化は，膠原線維の平行配列が乱れ，離開した部に電子密度の低い均一な物質が蓄積されていた．この現象は炎症に基づく浮腫が想定され，滲出液が膠原線維の間に貯留した結果，線維の離開，乱れが生じたと思われる．この傾向はフルオ陽性部で顕著であり，中でも48時間後が著しかったが，陰性部においても少なからず認められることから，比較的早期から起こる変化と考えられる．また炎症性細胞の浸潤を伴って，角膜上皮側の固有層に顕著であったことから，上皮細胞層からの侵襲と思われる．なお，離開部に多くみられた電子密度の高い膠原線維の断面が意味するところは明らかでない．

後境界板，角膜内皮の変化はフルオ陽性部においても著変がみられず，1,000 ppm 六価クロムを含むクロム鉱滓液1回の点眼では角膜深層部にまで損傷が至らないと思われる．

点眼後24時間のクロム対照液および pH 対照液では変化が軽度であり，角膜上皮表層部の膨化，固有層での離開を一部に認めたものの未処置角膜と著変がなく，明らかにクロム鉱滓液の作用が強いことがわかった．六価クロムはそれ自体刺激性，腐蝕性を有しているが[3]，このような反応差が認められたことは，クロム鉱滓液には前報[1]の考察の如く六価クロム以外の他の含有物の作用かあるいはそれとの協力作用が考えられるが明らかでない．また検体の粘性の差によって，上述した様に外部刺激による流涙の際，洗眼の程度に相違が生じたためとも推察される．今後の検討に待ちたい．

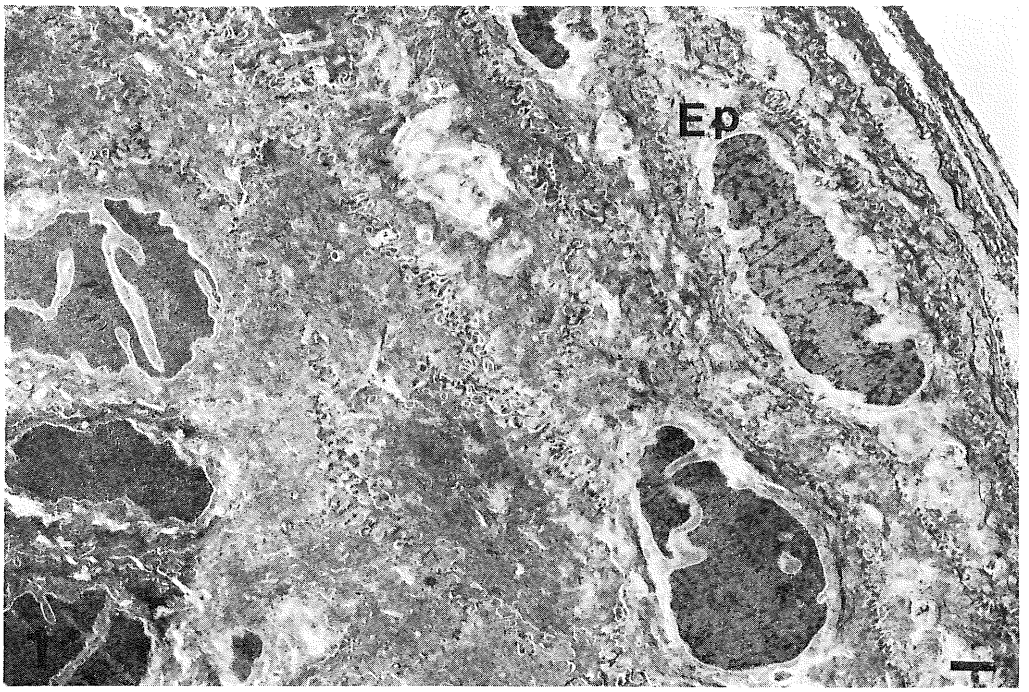
ま と め

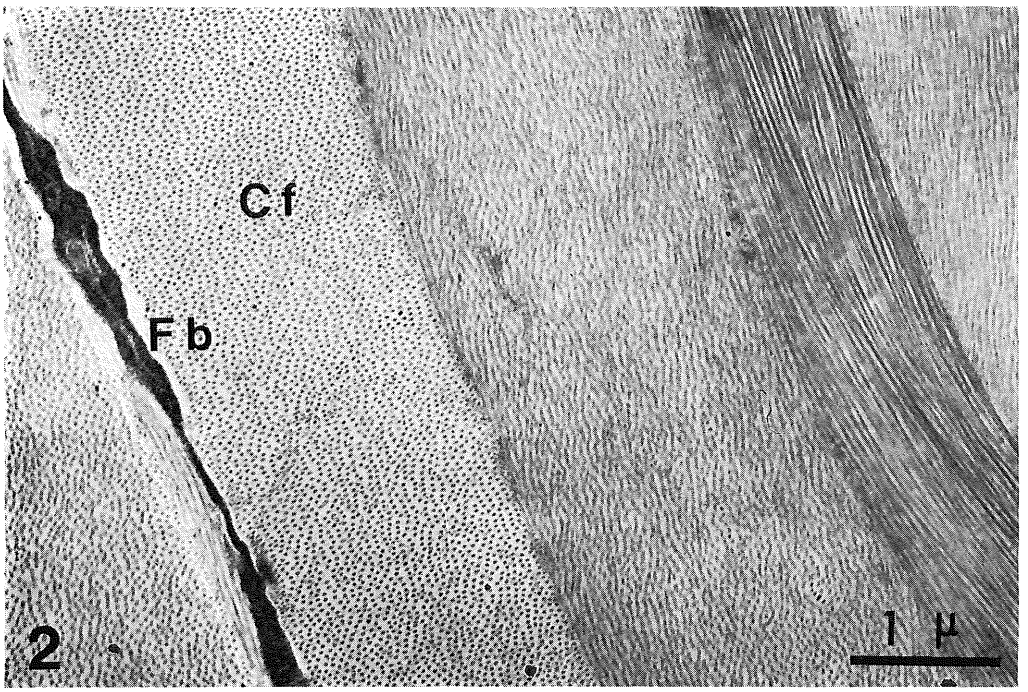
クロム鉱滓水浸出液(1,000ppm 六価クロム，pH 12.8)による家兎角膜の微細構造変化を観察し，クロム対照液，pH 対照液と比較した．クロム鉱滓水浸出液では，角膜上皮の離脱，細胞質の淡明化，基底部での小空胞形成，固有層内膠原線維の離開，浮腫がみられ，特にフルオレスセン反応陽性部で著しかった．また角膜上皮の剥離過程は，表層部の上皮細胞の変性と基底部上皮細胞の基底膜に沿う小空胞形成が関与していると示唆された．クロム対照液，pH 対照液の変化はほとんど認められなかった．クロム鉱滓水浸出液の刺激性，腐蝕性は，六価クロムを含めた他の成分あるいは粘性などの性状に起因すると推察される．

謝辞 本研究にあたりクロム鉱滓水浸出液の検体を提供された環境保健部水質研究科の諸氏に感謝致します．

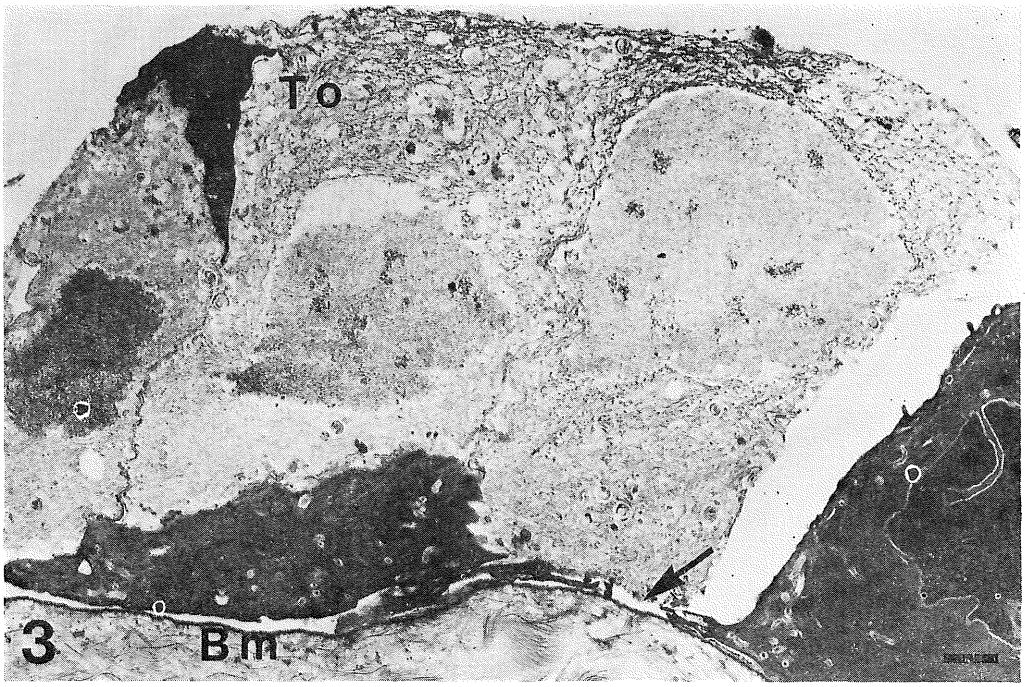
文 献

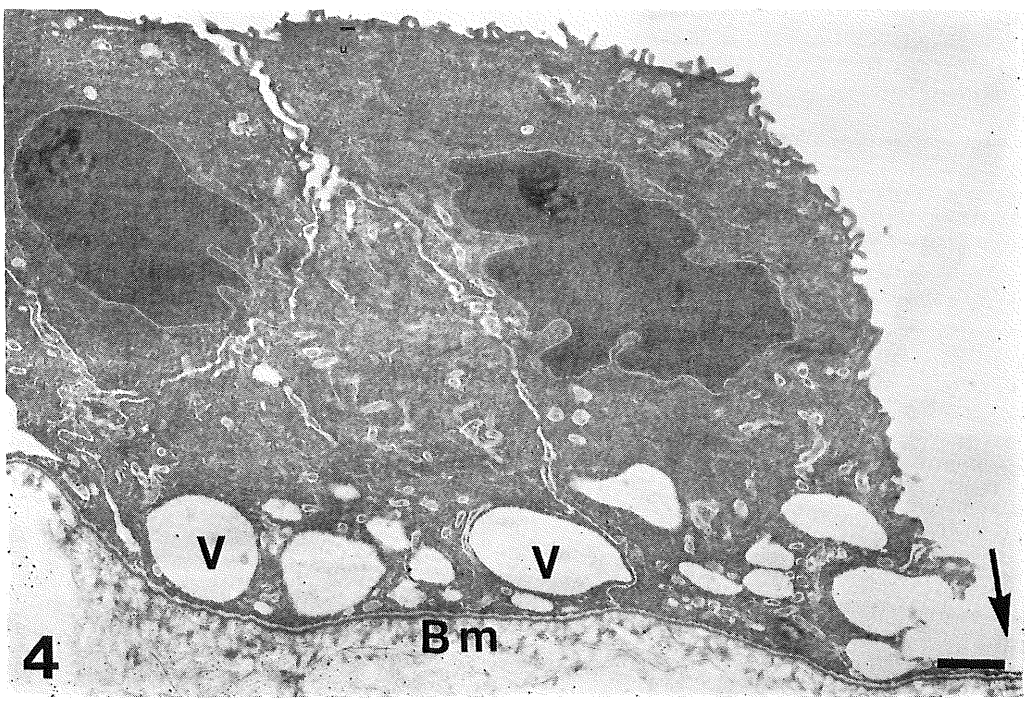
1) 藤井 孝，坂本義光，福森信隆，阿部幸恵，中村弘，大橋則雄，平賀興吾：東京衛研年報，27-2, 124, 1976
2) 阿部幸恵，藤井 孝，坂本義光，福森信隆，中村弘，大橋則雄，平賀興吾：東京衛研年報，27-2, 129, 1976
3) Browning, E.: *Toxicity of Industrial Metals*, 2th Ed., 119, 1969, Butterworths, London
4) 渡部真也，福地保馬：科学，45, 688, 1975
5) 内田幸男：角膜疾患の臨床，8, 1975, 金原出版
6) Khodadoust, A. A., A. M. Silverstein, K. R. Kenyon, and J. E. Dowling: *Am. J. Opthalm.*, 65, 339, 1968

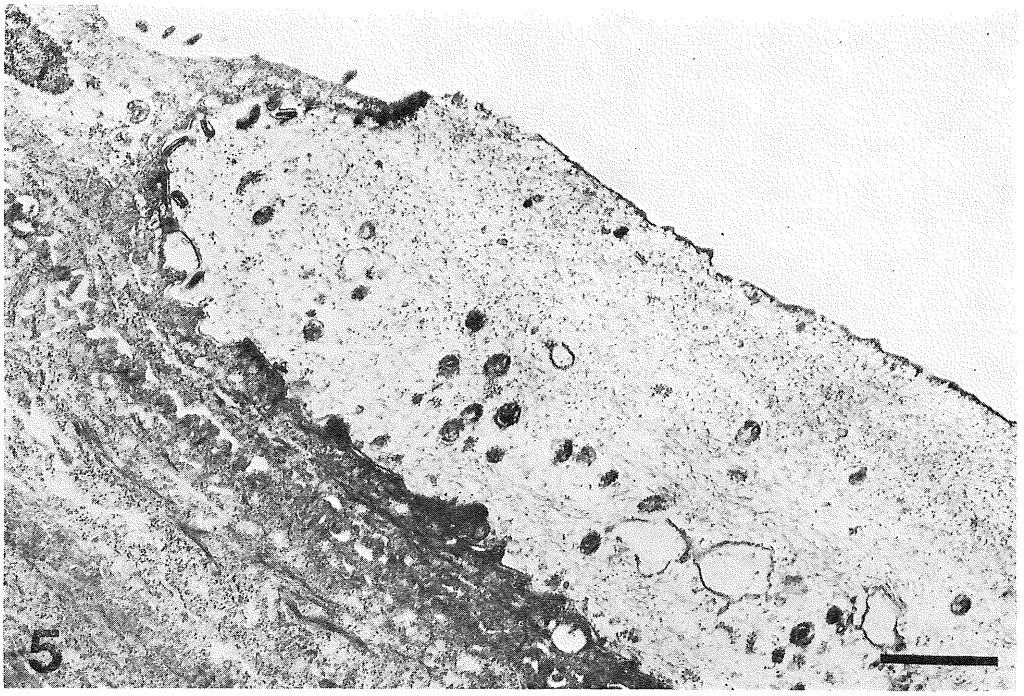


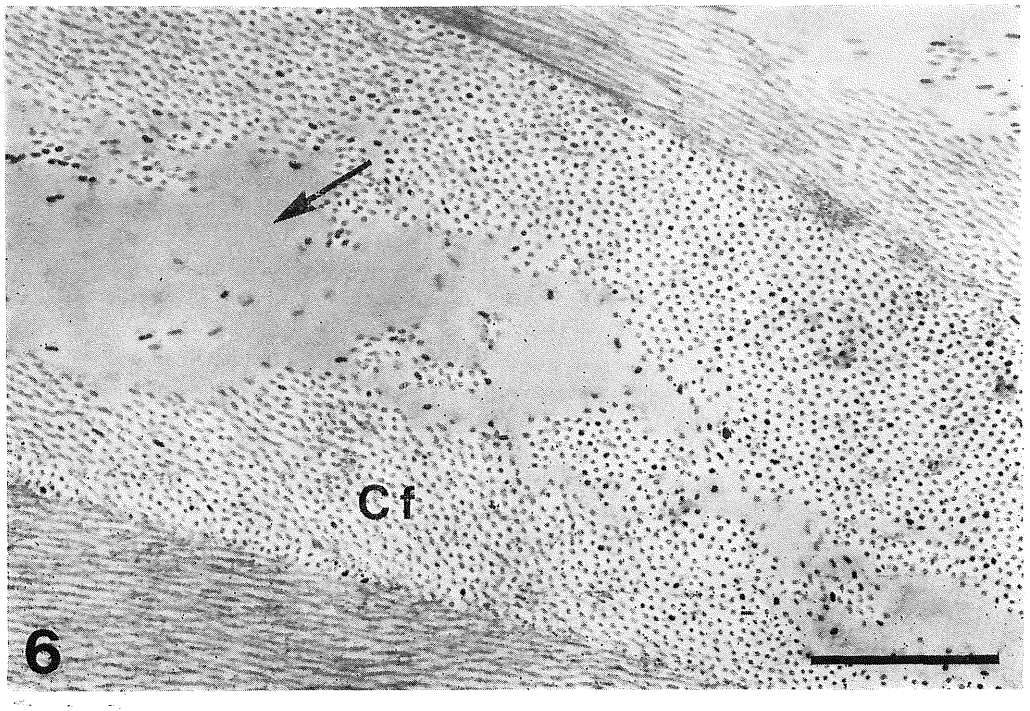


2.


To
3
Bm


V
V
4
Bm


5


Cf
6

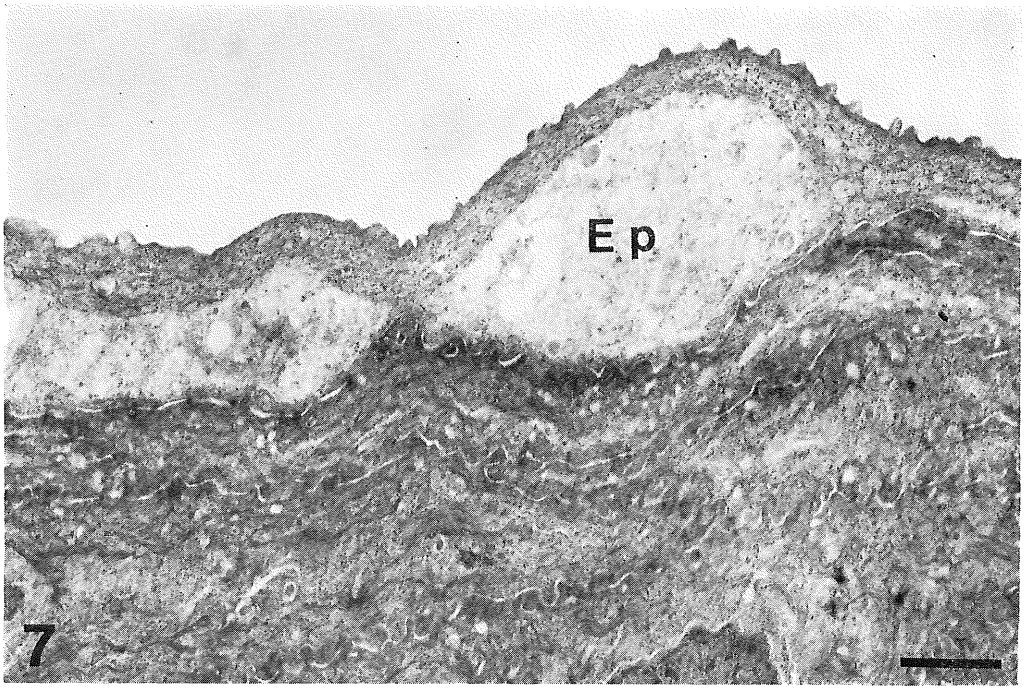


Fig. 1. Corneal epithelium of the eye in non-treatment rabbit. The surface layer of epithelial cells (Ep) are flat.

Fig. 2. Substantia propria of the eye in non-treatment rabbit. Fibroblast (Fb) is seen in collagen fiber layer (Cf).

Fig. 3. 4. The basal layer of corneal epithelium in positive portion of fluorescein stain after 24 hr treated with water extract of chromium ore dross. Denuded surface of basement membrane (Bm) (arrows), distinct tonofilaments (To), vacuolization (V) are seen in degenerated epithelial cells.

Fig. 5. The apical layer of corneal epithelium in negative portion of fluorescein stain after 48 hr treated with water extract of chromium ore dross. In degenerated epithelial cell, low density is seen.

Fig. 6. Substantia propria in positive portion of fluorescein stain after 48 hr treated with water extract of chromium ore dross. Unstructural substance (arrow) is observed among collagen fiber (Cf).

Fig. 7. The apical layer of corneal epithelium after 24 hr treated with Na_2CrO_4 and $Na_2Cr_2O_7$. Swelling of epithelial cells (Ep) are seen.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 129-133, 1977

クロム鉱滓水浸出液の皮膚累積刺激性（第1報）
短期塗布による皮膚反応と臓器内クロム蓄積の相関性

福森信隆*, 樺島順一郎*, 井口重孝*, 平賀興吾*

Cumulative Skin Irritation Test by Water Extract of Chromium Ore Dross (I) Relation between Skin Changes and Accumulation of Chromium in Short Term Application

NOBUTAKA FUKUMORI*, JUNICHIRO KABASHIMA*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

クロムによる皮膚粘膜障害は職業病としてかなり以前から疫学的関心が持たれ，労働衛生学的調査がなされてきた[1]．1975年4月，東京都に埋立てされた六価クロムを含むクロム鉱滓が安全な状態で投棄処理が行われなかったため，住民に対し健康上の不安が生じクロム鉱滓の生体への影響を検討する必要性が起った．既に皮膚に対しては，家兎背部でのクロム鉱滓水浸出液の一次刺激性試験を行い中等度の刺激性を報告した[2]．さらに皮膚刺激性の影響を検索する目的で，今回短期連続塗布により経皮毒性をも考慮した累積刺激性試験を実施した．

実験材料および方法

動物は体重 2.4–3.8kg の白色在来種雌雄家兎（東京都畜産試験場産）を用い，室温23±1°，湿度50±5％の環境下で飲水を自由に与えた家兎専用飼育室にて飼育した．2週間予備飼育後，背部を家兎用電気バリカンにて剃毛し，体重より体表面積を定め，体表面積の約10％（体重3kgのとき 8cm×14.5cm）を塗布面積とした．剃毛後，皮膚の発赤，擦過傷など操作による影響が少ない動物を選択し，クロム鉱滓水浸出液（以下クロム鉱滓液と略す）を塗布した．Table 1 で示す様に，動物には No. を付し，雄4匹雌5匹を用い No. 1C–4C までを対照群，No. 5T–9T までを塗布群とし記号T（treatment）を用いて表した．

検液は江東区大島9丁目の地下鉄工事現場から採取し，当所水質研究科で調整された前報[2]に記載した1.000 ppm 濃度の六価クロムを含有するクロム鉱滓水浸出液（pH 12.8）を用いた．また対照として再蒸留水を使用した．

実験期間は3週間とし，血液性状の経時変化を把握するため塗布前に耳静脈より採血を行った後剃毛して，剃毛の影響がほとんどみられなくなった4日後に1回目の塗布を行った．塗布は隔日あるいは2日間隔で週3回行い，7回目の塗布を行った翌日屠殺した．塗布方法はあらかじめ体表面積の約10％にあたる四すみに墨汁を皮膚に刻み込んだ塗布面積の指標点を定め，柔軟な刷毛を用いて約2 ml の検体を塗布した．

検査は次の項目について実施した．

症状観察　塗布前後の家兎の行動，皮膚の状態などを観察の対象とした．

体重　週1回採血時に測定を行った．

皮膚反応　塗布部位の局所反応を中心に皮膚表層面の性状，発毛状態，血管の変化などを肉眼的に観察した．

臨床生化学的検査　塗布前に耳静脈より採血し，その後塗布期間中週1回採血を行った．すなわち塗布期間内での採血は，1，4，7回目の塗布翌日に実施した．測定項目はグルコース（グルコースオキシダーゼ法），尿素窒素（ウレアーゼインドフェノール法），総コレステロール（Lieberman-Burchard 法），グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（Reitman–Frankel 変法），アルカリフォスファターゼ（Kind-King 変法），コリンエステラーゼ（Δ pH 法）を日立自動分析装置（M–400）を用いて測定した．

血液学的検査　臨床生化学的検査時と同様に採血を行い，白血球数，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット，平均赤血球容積，平均赤血球ヘモグロビン量，平均赤血球ヘモグロビン濃度を Coulter Counter Model–S を用いて測定した．

* 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

臓器中のクロム含量 測定は肝臓，腎臓，脾臓，膵臓，血液についてフレームレス原子吸光分析法によるクロムの微量定量を行った．屠殺後充分に放血させた臓器を摘出し，洗浄済ビーカーに入れ80°で数日乾燥させた後，恒量になったことを確認し，乾燥重量を測定して2日間 200° で加熱を行い検体とした．血液は一定量を採血後，洗浄済試験管に入れ等量の脱イオン再蒸留水を加え血球を破壊させた後検体とした．

検体は湿式分解法によりケルダールフラスコに秤量した臓器および血液を入れ，硝酸 15m*l*，硫酸 4 m*l* を加え除々に加熱し，固形物がなくなるまで加熱を続けた．その後褐色の煙が出たら放冷し過塩素酸 2 m*l* を加え白煙に変り検液が無色透明あるいは淡黄色になるまで加熱した．硝酸 15m*l* で完全に分解が完了しなかった臓器は，さらに硝酸を加えて透明状となるまで加熱を続けた．透明色となった検体は正確に脱イオン再蒸留水を用いて 10m*l* にメスアップした後，洗浄済試験管に入れ測定検液とした．対照は検体を入れず，加えた硝酸量に応じて同様な操作を行った．試薬はすべて有害金属測定用（和光純薬）を使用し，クロム標準液は原子吸光分析用標準液（1,000ppm，関東化学）を用いた．実験に供した容器はすべて新規に購入し洗剤で洗浄後，希釈した特級硝酸槽で浸透洗浄を行ったものを使用した．また検体の摘出，移動にはステンレスなど金属と接触しないよう出来る限り注意を払い，摘出も速やかに操作を行った．ケルダールフラスコは硝酸槽で浸透洗浄した後，特級硝酸（関東化学）で6回，超特級硝酸（関東化学）で3回，有害金属測定用硝酸（和光純薬）で1回，計10回の加熱洗浄を行い，洗浄群から数本を抜き取りフレームレス原子吸光分析を行って洗浄を確認した．

測定装置は Jarrell Ash 社製原子吸光分光光度計（AA-8500）にフレームレス分光装置を付属させた機器を使用した．分析機器の測定条件は波長 3578Å，クロム光源 10mA，チタン光源 20mA，drying・20A・20秒，ashing・80A・40秒，atmizing・320A・7秒にて行い，測定検液はチップを用いたマイクロピペットで20μlを graphite tube に注入した．測定操作は3-6回繰り返して行い，安定した数値を測定値として読み取った．

実験結果

症状観察 塗布群は塗布直後，塗布面の中央に体長と直角の方向で皺を寄せる傾向がみられた．飼育中ケージの壁に体を凭れ掛ける動物がみられたが，特に擦過する様子はなかった．また一部に側腹に近い塗布面を後肢で撫で，顔面部に後肢を持って行き嘗める動作をする動物がみられたが，背部中央では他との接触が少なく，これらの動作も側腹に近い部位に限られ塗布直後にのみ認められた．対照は行動などに異常を認めなかった．

体重 各週の経時変化を Table 1 に示した．塗布群，対照群とも多少の増減がみられるが大差を認めなかった．しかし，No. 6T，7T，8T の動物は若干減少傾向を示した．

Table 1. Changes of Body Weight (kg) in Rabbit painted with Extract of Chromium Ore Dross

Groups		Animal No.	Duration (weeks) 0	1	2	3
Control	Male	1 C	2.70	2.75	2.74	2.70
		2 C	2.40	2.30	2.40	2.40
	Female	3 C	2.80	2.85	2.88	2.99
		4 C	3.18	3.15	3.16	3.20
Treatment	Male	5 T	3.00	3.00	3.10	3.03
		6 T	3.30	3.25	3.22	3.15
	Female	7 T	3.30	3.30	3.24	3.20
		8 T	3.80	3.70	3.75	3.71
		9 T	2.70	2.75	2.72	2.80

皮膚反応 クロム鉱滓液塗布により塗布部の皮毛は淡黄色を呈した．塗布3回目頃より No. 5T，6T，8T の皮膚に直径 2-3 mm 程度の丘疹がみられその周囲は軽度に発赤を認めた．丘疹の程度は 5T，8T の家兎に強く認められ塗布経過に伴い増加がみられた．No. 7T，9T ではじめ紅斑状を呈したが，漸次 7T は軽度ではあるが小丘疹を散在性に認め，9T では落屑がみられた．対照は何ら変化を認めなかった．Fig. 1 に反応が顕著な動物（5T，8T）および軽度な動物（9T）の背部皮膚の状態を示した．

臨床生化学的検査 経時的採血により対照群に比べ塗布群の差を認め難く，また塗布による経時的変化も明らかでなかった．

血液学的検査 対照群，塗布群間で差がみられず経時的変化も著明に認められなかった．

臓器中のクロム含量 Table 2 に7回塗布後の臓器内クロム含量を臓器は乾燥重量，血液は容量あたりの ppb 値で示した．塗布群は対照群に比較してすべての臓器で高い測定値がみられ，特に腎臓，脾臓で高かった．参考に対照群，塗布群の雌雄を含めた平均値を括弧内に示した．肝臓は 5T が対照の 15 倍のクロム含量を呈し，続いて 8T，6T が多く，比較的少ない 9T でも対照の約3倍の値を示した．腎臓は蓄積が最も大きく 5T が 100 倍の高値を認め，8T，6T を含め塗布群全体に非常に高か

Table 2. Distribution of Chromium in Rabbit painted with Extract of Chromium Ore Dross

Groups		Animal No.	Organs (ppb)				
			Liver	Kidney	Spleen	Pancreas	Blood
Control	Male	1 C	40.4	39.7	158.6	54.9	44.1
		2 C	48.6	37.8	92.0	27.9	55.1
	Female	3 C	43.0	21.9	78.3	87.6	45.3
		4 C	64.8	14.9	112.5	27.3	53.2
		(Mean)	(49.2)	(28.5)	(110.3)	(49.4)	(49.4)
Treatment	Male	5 T	717.3	2745.8	3230.2	188.8	154.1
		6 T	307.4	1365.6	219.2	120.0	89.4
	Female	7 T	236.6	755.3	575.3	41.3	80.4
		8 T	379.0	1916.9	828.6	76.1	82.6
		9 T	153.8	527.3	234.4	103.5	52.1
		(Mean)	(358.8)	(1462.1)	(1017.5)	(105.9)	(91.7)

った．脾臓は対照群においても他の臓器に比べ含有量が若干高かったが，塗布群では2倍以上を示し中でも 5T の蓄積量が高い値を示した．脾臓，血液では対照群に比べ塗布群で約2倍の値を示した．塗布によるクロム含量の値で雌雄差は認められず，個体による差が顕著に認められた．また臓器内のクロム蓄積量が多い動物（No. 5T, 8T）ほどクロム鉱滓液による皮膚反応は著明に出現した．

考　察

六価クロムは三価クロムに比べ毒性が強いといわれ，特に刺激性に関しては細胞膜透過性が速やかなことがその理由と考えられている[3]．六価クロムは皮膚において，皮膚構成成分の含硫アミノ酸により還元され三価クロムの状態で結合しているという報告がみられる[4]．本実験は皮膚反応を主に観察し，六価クロム 1,000ppm を含むクロム鉱滓水浸出液の生体影響を短期連続塗布により検討した．

皮膚反応は，塗布3回目頃より丘疹，周囲の発赤，紅斑が散在性にみられ，次第に増大することからクロム鉱滓液の刺激による変化と考えられる．これらの変化は前報[2]のパッチを用いた一次刺激性の変化と若干異なり，浮腫の形成はみられなかった．この差は湿潤したパッチで長時間皮膚面を覆ったのに比べ，刷毛を用いて塗布後比較的早く乾燥状態としたことの相違が考えられる．

塗布による動物の動作は，塗布時背部中央に皺を寄せることから皮膚刺激性の強いことを示しており，塗布面を後肢で撫でる行為は刺激のため疼痛あるいは掻痒感による動作か，塗布液を取り除く行為と解される．何れも個体差があり皮膚感受性と習性の問題が加味されると考えられる．

体重は若干減少を示した動物もあるが，皮膚反応の強さと相関がみられなかった．臨床生化学的および血液学的検査では対照群と差がみられず，経時的にも変化を示さないことから血液性状には影響を与えないと思われ，体重をも考慮して推察すると全身作用はほとんどなかったとみられる．

クロム7回塗布後の各臓器のクロム含量は，腎臓，脾臓に著しく，次に肝臓であった．クロムは赤血球に親和性が強く，取り込まれて三価に変化しヘモグロビンと結合して全身を循環するという報告[5]から，脾臓での蓄積の多かったことは赤血球の破壊による血球成分の残留または細網内皮系の食作用によると思われる．Wahlberg ら[6]は三価および六価クロムの経皮吸収を比較し，また当部でクロム鉱滓水浸出液の経皮吸収を検討した結果，クロムは短時間のうちに吸収され 20–30 分で頂点に達し約25％の吸収率がみられ，排泄も速やかであるという[7]．しかし，今回行った累積塗布はクロムが皮膚に常時付着しているため，吸収も継続的に行われて，そのため臓器内クロム含量が高値を示したと考えられる．興味あることは各塗布動物の個体によりクロム含量の程度にかなりの差がみられ，この蓄積量の増加の程度と皮膚反応の強弱とを比較すると，皮膚反応が顕著にみられるほどクロム蓄積量が多く強い相関を認めた．これらの事実から経皮吸収と皮膚反応の関係は，皮膚の強い感受性により反応が顕著に起ったため皮膚の表皮，真皮に影響を与え吸収を増加させるのか，あるいは本来皮膚性状が良好な吸収を持つ性質のため吸収が良く，従って強く反応が出現したと推察される．何れも個体の皮膚の問題が重要と思

われるが，今後検討したい．

結　論

クロム鉱滓液（1,000ppm 六価クロム，pH 12.8）による皮膚累積刺激性を検討する目的で短期連続塗布試験を行った．クロム鉱滓液は丘疹，紅斑など皮膚反応を惹起せしめ，その反応が顕著に出現するほど臓器内クロム蓄積量も増加し，密接な相関が示唆された．塗布群のクロムは腎臓，脾臓に多く蓄積された．体重，血液性状の変化はほとんどみられなかった．

謝辞　本研究にあたり御助言をいただいた環境保健部環境衛生研究科の藤谷和正，長嶋親治両氏およびクロム鉱滓水浸出液の検体を提供された水質研究科の諸氏に感謝の意を表します．

文　献

1) 渡部真也，福地保馬：科学，45，688，1975
2) 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：東京衛研年報，27-2，129，1976
3) Mertz, W.: *Physiological Reviews*, 49, 213, 1969
4) Samitz, M.H. and S.Katz: *J. Invest. Derm.*, 43, 35, 1964
5) Mertz, W.: *Physiological Reviews*, 49, 188. 1969
6) Wahlberg, J.E. and E. Skog: *Arch. Derm.*, 92, 315, 1965
7) 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：東京衛研年報，27-2，56，1976

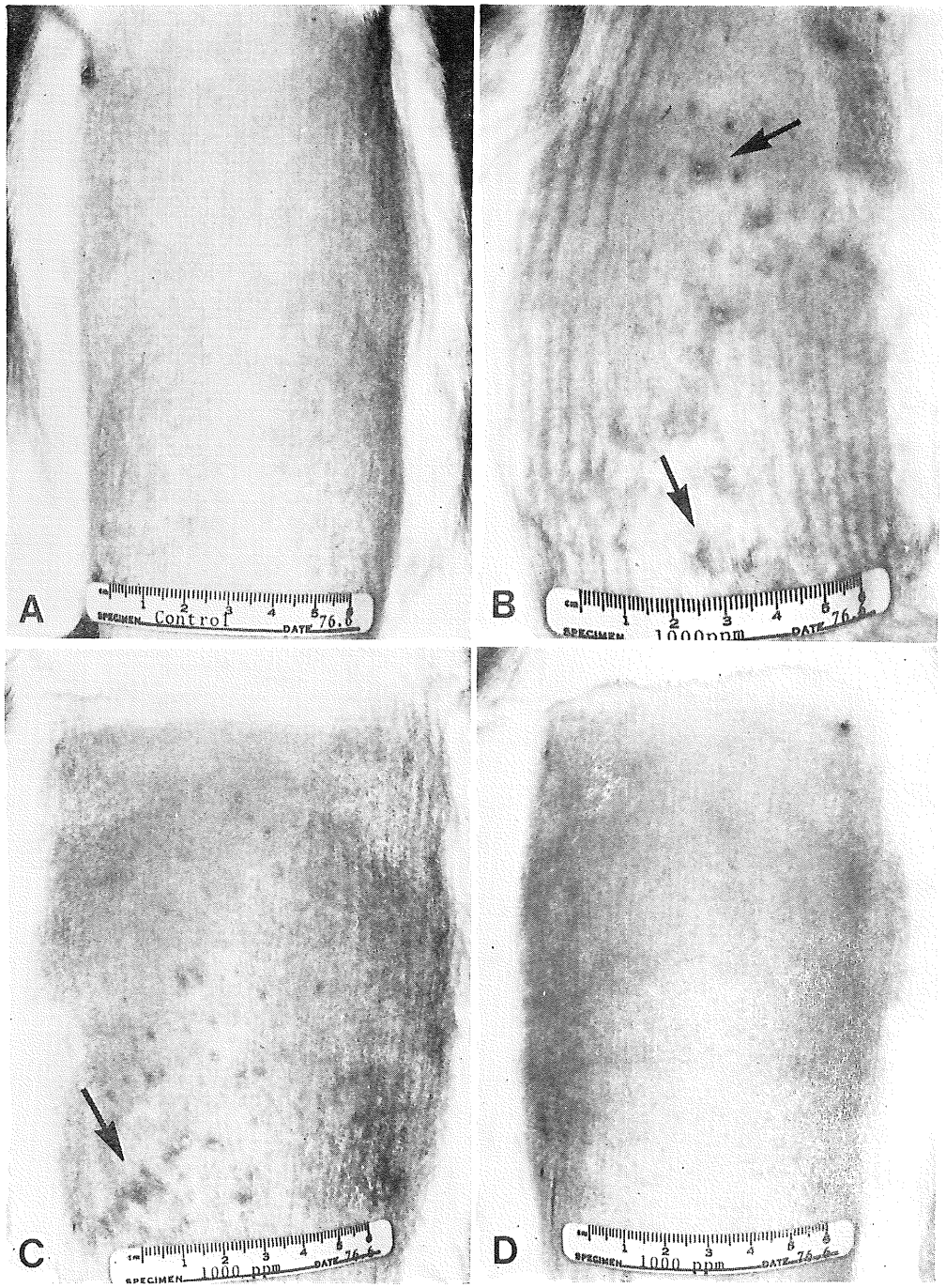


Fig. 1. Photographs of Skin Reaction by Water Extract of Chromium Ore Dross in Rabbit. Eruptions are seen (arrows). Control: A–No. 2C, Treatment: B–No. 5T, C–No. 8T, D–No. 9T.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 135-141, 1977

粉塵吸入実験装置の試作

坂本義光*, 調 武久**, 平賀興吾*

Development of Dust Inhalation System

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, TAKEHISA SHIRABE** and KOGO HIRAGA*

はじめに

経気道により摂取される物質の影響を評価する目的で行なわれる吸入毒性実験において，従来からその対象とされていた労働環境の汚染に加えて，最近の一般生活環境における汚染物質の増加，および多様化に伴ない，その状況を反映した長期間連続吸入実験が望まれている．現在このような吸入実験を目的として，各種エアロゾルのための実験装置が開発試作され，実験も行なわれている[1-3]．しかし，そのうちで，ガス，金属ヒュームなどに比べ，粉塵を目的吸入物とした長期吸入実験の例は少ないようである[4]．当部では鉱物等の粉塵を目的吸入物とした長期吸入実験装置を試作しているが，今回，一応の完成をみたのでその装置の構造，および種々の特性について報告する．

1. 粉塵吸入装置の概要

装置構成の概要を図1に示した．本装置は HEPA フィルターを通した空気で毎時10回換気され，温度 23–24°C，湿度 45–55% に空調された実験室に設置されている．そのため実験装置には，特に空調設備は考えず，直接室内より給気している．図に示すように，装置は吸入箱（D）を中心に，粉塵供給系として，粉塵発生装置（A），蓄積槽（B），混合槽（C），デジタル粉塵計（E），粉塵濃度制御装置（G），粉塵発生装置用タイマー（H），排気系として，水シャワーによる粉塵処理槽（K），プレフィルター（i），ヒーター（j），HEPA フィルター（k），排気用シロッコファン（l）を組み込んだフィルターユニット（L），さらに監視系として，デジタル粉塵計（F），粉塵濃度記録計（I），打点式温湿度記録計（J）から構成されている．吸入箱は，粉塵吸入用3台，実験室からの供給空気のみの対照用1台の計4台であり，各々吸入箱は粉塵供給系が独立しており，目的吸入物の濃度段階の設定に加え，陽性対照の設定が可能である．

図2に実験室内の装置の配置を示した．コントロールボックス（M）には，濃度制御装置，粉塵濃度記録計，温湿度記録計，差圧計および各種スイッチ類をまとめて配置した．

2. 吸入箱

図3に蓄積槽（B）と混合槽（C）を伴なった吸入箱（D）の前面および側面を示した．吸入箱はステンレス製（SUS 304）で，上部給気部と下部排気部を角錘とした，たて型，気積 670 *l* で，懸架式動物飼育用ケージ（W350×L500×H230）を2個収容し，吸入箱の開放の機会を少なくするためのパスボックス（②），作業用グローブ（③），その他ガラス製観察窓（①），観察窓をかねた扉（④），内部照明用螢光灯（⑤），自動給水ノズル（⑧）を取りつけた．さらに動物の尿尿はケージ下部の内壁周囲に取りつけた汚物洗浄用のシャワーパイプ（⑨）により洗浄し，汚物処理槽に流した．

この吸入箱には，4台同時に使用した場合，毎分 0–235 *l* の送風が可能で，換気回数を毎時 8–9 回（90–100*l*/min）とした時の吸入箱内陰圧は −0.5–−2 mm Hq であった．吸入箱を通過した粉塵を含んだ空気は，粉塵処理槽（図1，K）で浄化しフィルタユニット（図1，L）を通し室内に排気した．なお吸入箱内は，照度がケージ内で 100–160Lux，騒音は 50 フォン以下であった．

3. エアロゾルの発生および供給

粉塵発生装置として図4に示すような，エアポンプ（a），電磁弁（b）および粉体を入れる 200m*l* の三角フラスコ（C）を用いた．エアポンプと電磁弁の作動時間と作動間隔は，タイマー（図1，H）によって設定される．この装置により，フラスコ内の粉体を瞬間的に蓄積槽内に分散させた．蓄積槽内に生じたエアロゾルは，蓄積槽（透明塩ビ製，気積 970 *l*）と混合槽（透明塩ビ製，気積 71 *l*）の給気口（図1，a, b）からの給気と混合，希釈され，各シロッコファン（図1，g, h, l）により吸入箱に送られる．この際，吸入箱へのエアロゾルの供給は，給気流量調節バルブ（図1，c, d）により調節

* 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
** 夏目製作所

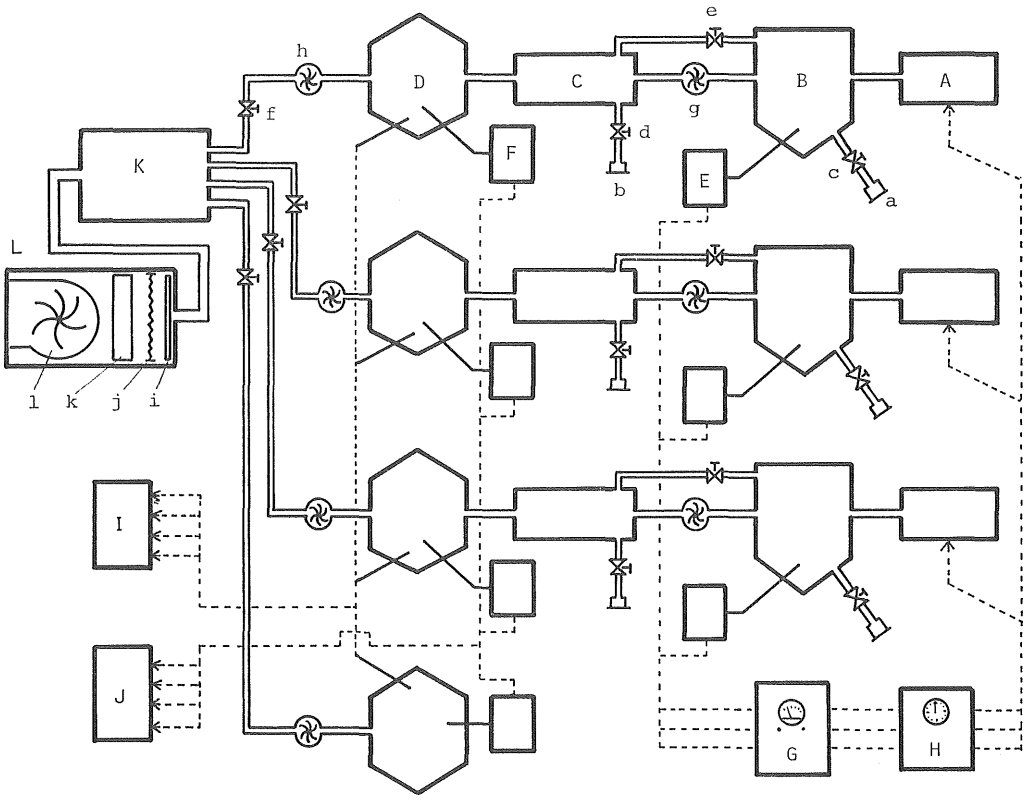


図 1. 装置構造の概要

A 粉塵発生装置　B 蓄積槽　C 混合槽　D 吸入箱　E, F 粉塵計　G 濃度制御装置　H 粉塵発生装置用タイマー　I 打点式温湿度記録計　J 粉塵濃度記録計
K 粉塵処理槽　L フィルターユニット
a, b 給気口　c, d, e, f 給気流量調節バルブ　g, h, l シロッコファン
i プレフィルター　j ヒーター　k HEPA フィルター

される．吸入箱内の粉塵濃度は常時粉塵計（F）で測定され，濃度記録計（J）に記録される．

4. 吸入箱の工学的性質

吸入箱のエアロゾル充満，排出時間と，吸入箱内のエアロゾル濃度分布を，JIS Z 8901第11種粉体（関東ローム）を用いて調べた．

a) エアロゾル充満，排出時間．20mg/m³ の濃度のエアロゾルを換気回数5回および10回で与えた時の吸入箱内のエアロゾル濃度の推移を図5に示した．換気回数5回で，充満時間は20分，排出時間は40分，換気回数10回では，各々10分と20分要した．吸入箱のエアロゾルの充満，排出時間は吸入箱の構造および換気量に支配され，特に短期間および間歇曝露実験では重要な性質であり，その合計は全吸入時間の 1/10 をこえない程度がのぞましいとされている[5]．本装置では，以上の性質から7時間以上の間歇吸入実験が可能であるが，著者らの目的としている長期連続実験では，特に問題となる長さではない．

b) エアロゾル濃度分布．吸入箱を表1に示すように分割し，38点について濃度を測定した．各点の値は平均濃度からの偏りを百分率で表わし，表に示した．濃度分布は垂直方向でみると，吸入箱上部で高く，下部で低い性質を示し，各平面については，特にきわだった性質を示さなかった．このような吸入箱のエアロゾル濃度分布にみられる性質は，野崎ら[3]の試作した吸入箱でも同様であって，給排気部を角錘とした，たて型の吸入箱に共通した性質と思われる．

5. 吸入箱内エアロゾル濃度の制御

蓄積槽内濃度を一定のレベルに保つことにより，吸入箱内を設定濃度に維持することができるという基礎実験結果にもとづき，図6に示すような，蓄積槽（B）から粉塵発生装置（A）への負帰還回路を設けた．図に示す

ように，蓄積槽の設定濃度に対して，あらかじめ制御装置（G）に任意に設定した，上，下限値（High および Low）と粉塵計（E）によって常時測定される蓄積槽内濃度を比較し，その値が下限値より不足した場合，2台の粉塵発生装置（A：High, Low）が，また上，下限値の間にある場合，2台のうち1台の発生装置（A：High）が作動する．また上限値以上の場合発生装置の作動は停止し，粉塵は発生しない．これらの操作は，タイマー（H）を介して行なわれる．

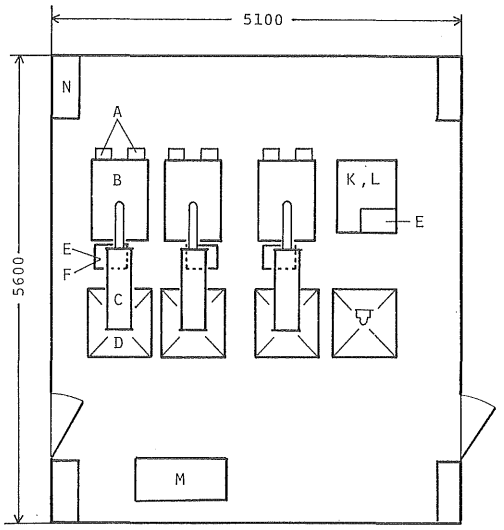


図 2.　吸入実験装置配置図
A　粉塵発生装置，B　蓄積槽，C　混合槽，D　吸入箱，E，F　粉塵計，K　粉塵処理槽，L　フィルターユニット，M　コントロール・ボックス，N　室内換気用排気口

図7に JIS Z 8901 第11種粉体を用い，吸入箱内濃度を 20mg/m³ に設定した場合の32時間の調節効果を示した．蓄積槽および吸入箱内濃度とも安定しており，吸入箱内のエアロゾル濃度を，設定濃度に対して±10%以内の変動幅で保つことが可能であった．さらに長期間の実験例として，図8に当部で調製したクロム鉱滓粉塵と JIS 粉体による28日間連続吸入実験[6]での結果を示し

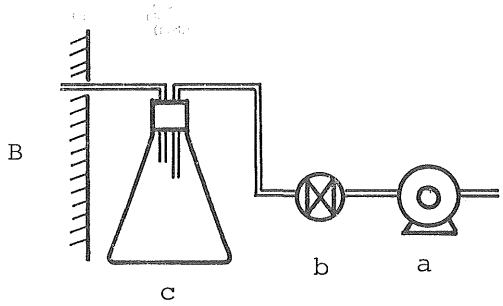


図 4.　粉塵発生装置
a　エアポンプ，b　電磁弁，C　200ml 三角フラスコ，B　蓄積槽

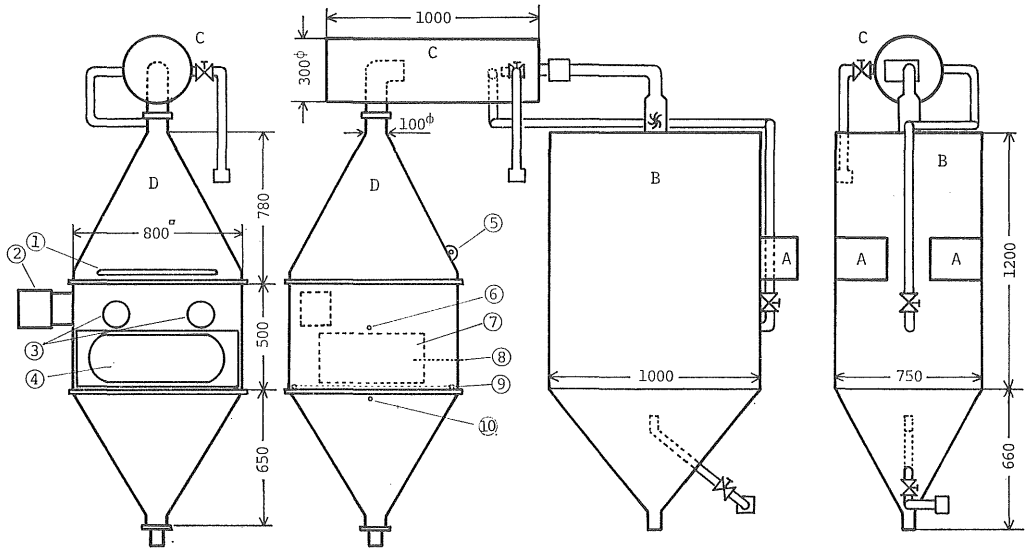


図 3.　吸入箱，蓄積槽および混合槽
A　粉塵発生装置格納箱，B　蓄積槽，C　混合槽，D　吸入箱
①　観察用窓，②　パスボックス，③　作業用グローブ取付口，④　観察用窓及び扉
⑤　内部照明用螢光灯，⑥　粉塵計用採取口，⑦　動物ケージ，⑧　自動給水ノズル
⑨　汚物洗浄用シャワーパイプ，⑩　粉塵計用排気口

た．図に示すように各エアロゾル濃度は28日間の平均濃度に対して，変動幅±10%の範囲内で安定しており，またクロム鉱滓粉塵では，1.47mg/m³ の低濃度での調節も可能であった．

なお吸入箱内のエアロゾル濃度が異常に高くなった場合のために，この装置には，吸入箱内濃度によって蓄積槽からのエアロゾルの供給を止める非常用電磁バルブが蓄積槽と混合槽の間に設置されているが，過剰制御系としてまだ不完全であり，本報告では説明を除いた．

その他吸入箱内濃度の変動原因としては，粉塵発生装置フラスコ内の粉体の状態によって，粉塵の発生量が，その時々で異なることがあげられるが，これが極端な場合，吸入箱内濃度に影響するようである．図8の各エアロゾルにみられるやや大きな濃度変化は，以上の性質の現われと思われる．現在発生量を一定にするために，粉塵発生装置に改良を加えている．しかし，発生量の変化が吸入箱へ影響するのは，蓄積槽が本来の意味でのエアロゾルの貯蔵槽として役立っていないことも考えられるが，この事は，吸入物が，平均粒径や粒度分布の大きい粉体である事を考えると，避けられない性質であると思われる．

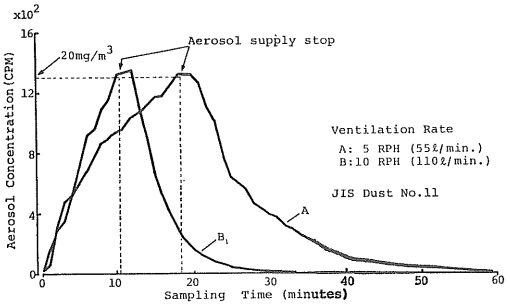


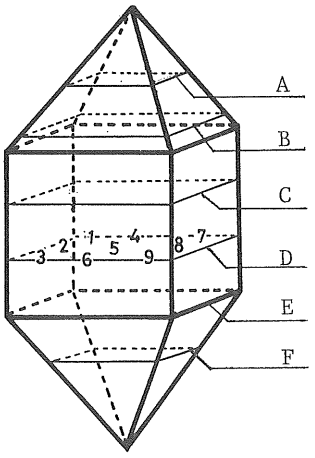
図 5. 吸入箱のエアロゾル充満時間および排出時間

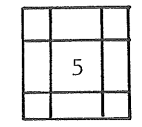
表 1. 吸入箱内エアロゾル濃度分布

Vertical \ Horisontal (Sampling Position)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A					4.23				
B		3.68		4.09	4.20	3.28		3.79	
C	3.46	0.03	2.30	1.64	2.92	5.36	0.58	1.46	3.61
D	0.03	-1.60	-2.11	0.25	1.97	0.87	0.87	-0.47	-1.24
E	-2.70	-4.70	-6.17	-3.79	-2.59	-4.23	-1.46	-2.88	-2.70
F		-2.99		-3.28	-4.16	-3.14		-1.60	

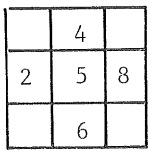
SD: ±3.11

38 points sampling
Ventilation Rate,8 RPH
JIS Dust No.11

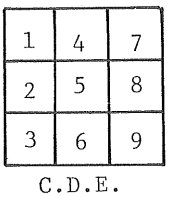




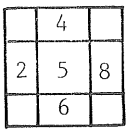
A



B



C.D.E.



F

6. 吸入箱内飼育環境

a) 換気回数と温湿度，CO_2，NH_3 濃度の関係，平均 400 g の Wistar 系雄ラット10匹を飼育した場合の換気回数と温湿度，CO_2，NH_3 濃度の関係を図9に示した．温湿度は1日の平均値を示し，CO_2，NH_3 濃度は午前9時に検知管を用いて測定した．湿度は換気回数の増加に伴なって減少し，実験室内（供給空気）の値に近づく性質を示すが，それに対し温度は，換気回数の変化に関係なく，常に 2-3°C 高い値に固定していた．CO_2，NH_3 濃度は換気回数が7回以下に低下すると，上昇する傾向を示すが，許容以下であった．

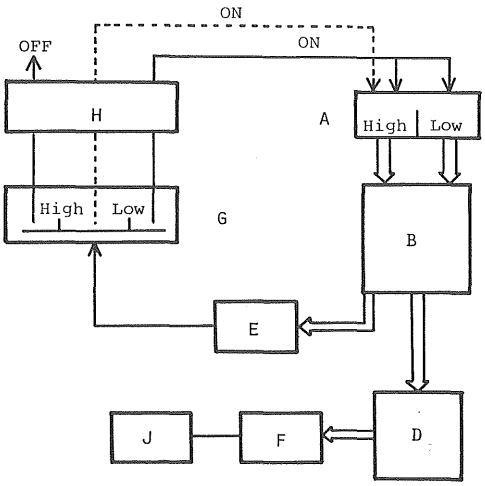


図 6. 粉塵濃度コントロールの構成
A 粉塵発生装置，B 蓄積槽，D 吸入箱，E，F 粉塵計，G 濃度制御装置，H 粉塵発生装置用タイマー，J 粉塵濃度記録計

以上示した性質から本装置では粉体消費と飼育環境維持のためには 8-9 回以上の換気回数が適当と考えられる．

b) 吸入箱内温，湿度の日内変動．平均 100 g または 200g の Wistar の系雄ラット各々20匹を換気回数9回で飼育した際の晴天と雨天における温度および湿度の変化を図10と図11に示した．なお汚物洗浄水は午前2，6，10時，午後4，6，10時に30秒間流した．

吸入箱内温度は図10にみられるように，シャワーの影響により一時的に約 0.5-1°C 低下するために，その変動推移に高低のくり返しを示しているが，給気温に比べ，100 g 飼育で 1.5-2°C，200 g 飼育で 2-2.5°C 上に固定し，ほぼ安定している．また 200 g 飼育では，夕刻から夜間にかけて，動物の活動によると思われる温度上昇がみられるが，100 g 飼育では，夜間のシャワーの影響が 200 g 飼育に比べ強く，その傾向は抑制されている．

湿度は，晴天では，100 g 飼育で 50-55%，200 g で 50-60%，また雨天では，晴天の場合に比べて，各々5

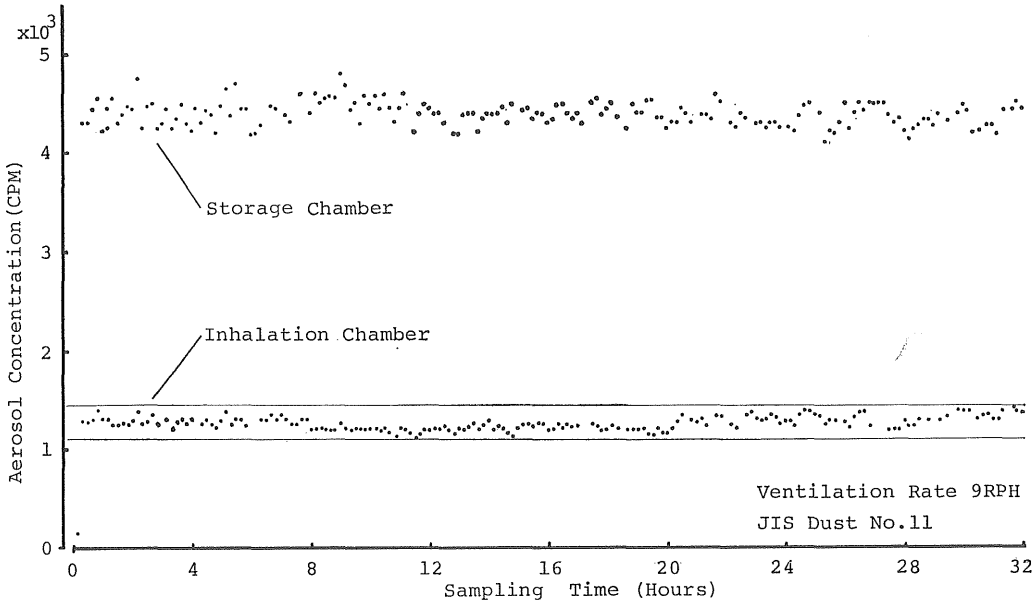


図 7. 吸入箱および蓄積構内粉塵濃度の24時間の制御効果
図中吸入箱内濃度に印した平行線は，設定濃度に対し±10%の変動幅を示している．

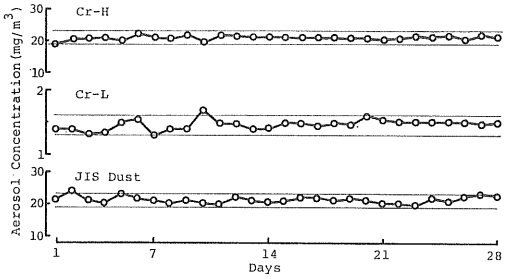


図 8. 28日間連続吸入実験における，クロム鉱滓粉体（Cr-H，Cr-L）と JIS 試験用粉体11種（JIS-Dust）の濃度変化．28日間の平均濃度はCr-H：21mg/m³，Cr-L：1.47mg/m³，JIS Dust：21mg/m³ であり，図中に示した平行線は，各々の平均濃度に対して±10%の変動幅を示す．

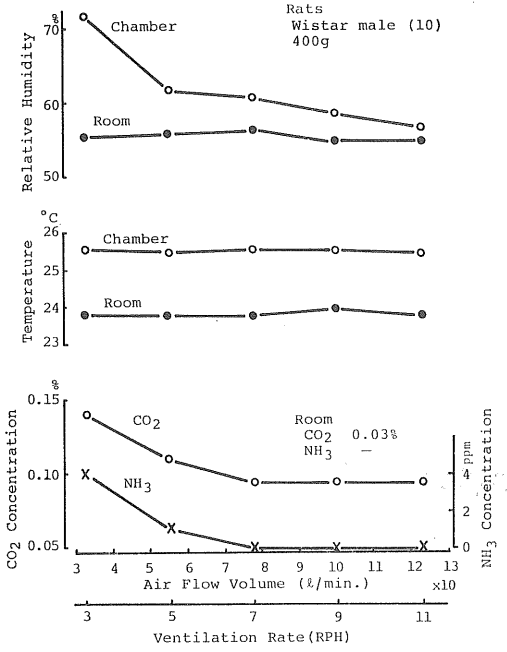


図 9. 換気回数と湿度，温度，CO_2，NH_3 濃度との関係，温，湿度は1日の平均値を示した．CO_2，NH_3 は検知管による午前9時の測定値を示した．

-10%高くなっている．また吸入箱内の湿度の変化は実験室内の変動にほぼ平行しているが，夜間における吸入箱内の上昇は実験室内の変動に加えて，動物の活動による上昇も考えられる．

以上のように，吸入箱内の環境は，換気量，動物の大きさおよび数，実験室内環境によって左右されている．吸入実験における吸入箱内の飼育環境に関しては，現在

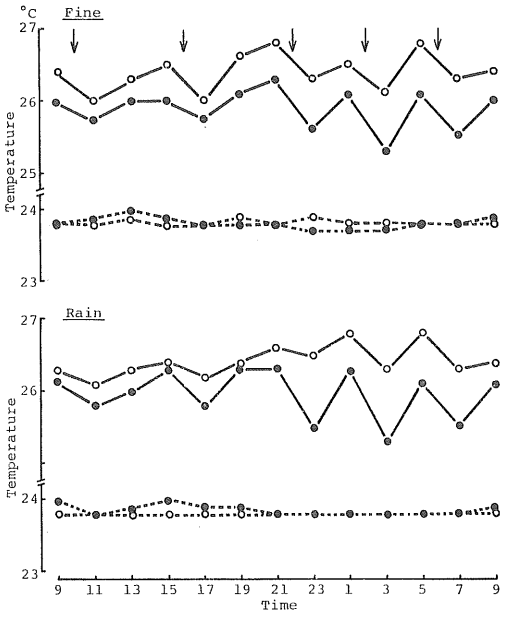


図 10. 吸入箱内（—）および実験室内（…）の温度の日内変動．吸入箱内には平均 200 g（○）または 100 g（●）の Wistar 系雄ラット各 20匹を収容し，晴天と雨天の際の変化を示した．洗浄用シャワーの時間を矢印で示した．

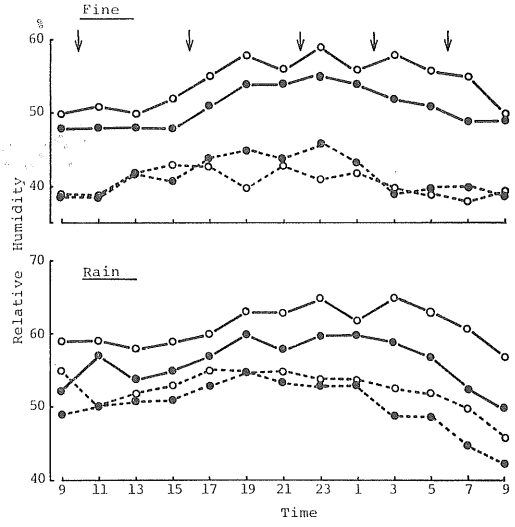


図 11. 吸入箱内（—）および実験室内（…）の湿度の日内変動．吸入箱内には，平均 200 g（○）または 100 g（●）の Wistar 系雄ラットを各20匹収容し，晴天と雨天の際の変化を示した，洗浄用シャワーの時間を矢印で示した．

のところ一般飼育室の環境条件を参考にして考えられている[7,8]が，本装置の吸入箱内環境は，現状では，飼育環境条件として許容の範囲であると考えられる．また吸入箱内温度が給気温度より高い値に固定することや，湿度の夜間の上昇，天候の影響などによる吸入箱内環境の変化などが，どの程度まで許容できるかは，今後の問題として，動物の発育や動物の生理学的および病理学的観察などから検討したい．

あとがき

鉱物等の粉塵を目的吸入物とした長期吸入実験装置を試作した．装置および吸入物の性質上，エアロゾルの発生，供給，濃度制御の操作に経験的な要素が多く，また粉塵発生装置をはじめとして，まだ完成されたものとは言えないが，現状でのエアロゾル濃度の維持および吸入箱内の飼育環境の維持の点からも，一応の目的は達しえたと思われる．さらに，この装置を使って，粉塵濃度21mg/m³ および 1.46mg/m³ での 28 日間の連続吸入実験を行うことができたことからも，この装置による，より長期間の吸入実験が可能であることが示唆された．

謝辞 本装置の試作および基礎実験にあたり有益なご助言を頂いた，当研究所環境衛生研究科長溝口 勲氏ならびに同科佐藤泰仁氏に感謝いたします．

（本報告の概要は，第4回毒作用研究会昭和52年6月24日で発表した）

文 献

1) 安藤 剛，中島泰知：労働衛生工学，12，31，1970
2) 野崎亘右：労働衛生工学，12，35，1970
3) 野崎亘右，福田一男，河合清之：第11回日本労働衛生工学会抄録，32，1971
4) Fraser, D. A., R. E. Bales, M. Lippman, and H. E. Stokinger : *US. Pub. Hlth. Monograph*, No. 57
5) 河合清之，野崎亘右：新しい毒性試験と安全性の評価，395，1975，ソフトサイエンス社
6) 坂本義光，神谷信行，伊川三枝子，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，142，1977
7) 環境調節実験室委員会・小動物班：実験動物，15，17，1966
8) 河合清之，野崎亘右，福田一男：実験動物，21，64，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 142-148, 1977

クロム鉱滓粉塵のラットによる28日間吸入実験

坂本義光*, 神谷信行*, 伊川三枝子*, 池田虎雄*, 平賀興吾*

Inhalation Experiment of Chromium Ore Dross Dust to Rats for 28 Days

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*, MIEKO IKAWA*, TORAO IKEDA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

昭和50年東京都においてクロム鉱滓の不安全投棄によって，投棄地区周辺での大気および土壌などの一般生活環境におけるクロム濃度が対照地区に比べ高いことが報告された[1].

既に当部ではクロム鉱滓の性状，および生体におよぼす影響については種々の観点からの報告をしている[2-4]. 著者らは，その研究の一環として，経気道により摂取されるクロム鉱滓粉塵の生体におよぼす影響を観察するために粉塵長期吸入実験装置を試作し，一応の完成をみた[5]. 今回，この装置を使用し，クロム鉱滓粉塵の短期間の吸入実験を行なった.

実験はクロム鉱滓粉塵の他に対照として，エアロゾルとした時の粒度分布がほぼ等しい関東ローム粉体を設定し，28日ないし29日間連続で行なった. 曝露28日目のラットについて，一般毒性試験に用いられる検査法を適用し，29日目のラットについて，血液および諸臓器中のクロム含量分析を行なった.

本報告では，28日ないし29日間曝露したラットの体重および臓器重量の測定，血液学および血清生化学検査，病理組織学および組織化学的検査結果について報告する.

実験材料および方法

1. **動物**　体重 90－95 g（5週令）の Slc：Wistar 系ラット80匹を用い，1群20匹として，対照群（実験室内空気），JIS-Dust 群（関東ローム粉体，21mg/m³），Cr-L 群（クロム鉱滓粉塵，1.46mg/m³），Cr-H 群（クロム鉱滓粉塵，21mg/m³）の4群に分けた.

2. **粉体**

1) 粉体の調製. クロム鉱滓粉体は，東京都江東区大島9丁目都営地下鉄工事現場より採取した鉱滓塊を乳鉢で砂粒大まで粉砕し，さらにボールミル（ドイツ，Alfrad Fritsch 社，実験用遊星型，タングステンカーバイド製）を用いて，約8時間，エタノールを用いた湿式法で粉砕した.

関東ローム粉体は日本粉体工業会より，JIS Z 8901試験用粉体11種を入手した. なお両粉体は，100°C で1晩乾熱してから実験に用いた.

2) 粉体の物理的性質. 各粉体の比重は，クロム鉱滓 2.79，関東ローム，2.97であった. また原粉体の粒度分布は Table 1 に示した. 平均粒径はクロム鉱滓 3.3μ，関東ローム 1.72μ であり，鉱滓粉体では粒径の大きな粒子が多い. 比重および粒度分布の測定は，セイシン企業に依頼し，粒度分布は同社製光透過式粒度分布測定器によった.

Table 1. Particle Size Distributions of JIS Dust No. 11 and Pulverized Chromium Ore Dross

Diameter μ	Weight Percent (%) JIS Dust[a]	Cr Dust[b]
0— 1	35.6	26.2
1— 2	18.9	13.2
2— 4	19.5	12.5
4— 8	26.0	15.5
8—20	0	20.4
20—30	0	11.4

a) JIS Z8901 Dust No. 11 for industrial testing
b) Pulverized chromium ore dross

3) 粉体の化学的性質. クロム鉱滓粉体中に存在する金属は，原子吸光測定により，Ca 21.2%，Fe 6.1%，Cr 2.9%で，その他螢光X線分析によって，Si，Al，Ti，Mn，Pb，Ni などの金属が検出されているが，その存在量については現在分析中である.

関東ローム粉体の組成は，「試験用粉体 JIS Z 8901工業標準改正案」によれば，SiO_2 30–40%，Fe_2O_3 17–23%，Al_2O_3 26–32%，CaO 0–3%，MgO 3–7%，TiO_2

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

0-4%である．Crは原子吸光測定により検出されなかった．

粉体の溶解性について，各粉体1gを10mlの生理食塩水に加え，37°Cで1晩振とうした後，pore size 0.01μのフィルターを用いて回収しその減量を測定した．関東ローム粉体では，減少量は0mgであったが，クロム鉱滓粉体では15mgの減少を示した．またこの際，クロム鉱滓の溶液はpH 11-12であった．

3. 吸入実験装置 粉塵用吸入箱3台と，供給空気のみの対照用吸入箱を使用して行なった．なお装置の詳細は前報[5]で述べた．

4. 吸入箱内飼育条件 換気回数は毎時8－9回（90-100ml/min）に調節し，実験期間中，温度25-26°C，湿度50-65%であった．吸入箱内の照明は，実験室と同様午前6時より午後6時までとし，飼料はクレア製固型飼料CE-2を，また水は吸入箱の給水ノズルにより自由に摂取させた．

5. エアロゾル濃度および粒度分布 吸入箱内エアロゾル濃度は，関東ローム（JIS Dust）は20mg/m³，クロム鉱滓低濃度（Cr-L）および高濃度（Cr-H）は各々1.5，20mg/m³を当初の目標としたが，結果的には29日間の平均濃度±SDは，JIS Dust 21±1.2mg/m³，クロム鉱滓は1.46±0.14，21±2.5mg/m³であった．また曝露期間中の各々の濃度の変動幅は平均濃度に対し約±10%であった．

各エアロゾル粒子の粒度分布は，アンダーセンサンプラー（吸引量28.3l/min）を用いて測定した．Table 2に示すようにJIS DustとCr-Hでは，ほぼ等しい分布を示している．またCr-Lでは，Cr-Hに比べ3μ以上の粒子が少なく，3－1μの粒子の占める割合が多かった．（これは，吸入箱内濃度を下げるために，吸入箱へのエアロゾルの供給を制御する結果，粒径の大きい粒子が吸入箱へ到達する以前に沈降するためと考えられる）．各エアロゾル粒子の形状はFig. 1に示したとおりである．またクロム鉱滓粉塵中の化学組成は，原粉体と同様であった．

Table 2. Particle Size Distributions of Aerosol in Inhalation Chamber by Andersen's Sampler

Stage No.	Diameter μ	Weight Percent (%) Cr-H	Cr-L	JIS Dust
0	<11.0	1.21	0	1.39
1	11.0 — 7.0	2.14	0.82	2.85
2	7.0 — 4.7	11.08	1.92	12.08
3	4.7 — 3.3	23.20	9.66	21.39
4	3.3 — 2.1	26.27	31.68	28.06
5	2.1 — 1.1	20.08	36.20	22.69
6	1.1 — 0.65	11.66	16.20	9.56
7	0.65— 0.43	2.46	2.40	1.16
8[a)]	0.43>	1.20	1.11	0.80

a) Backup filter

6. 検査 曝露28日目ないし29日目のラットについて次に示す諸検査を行なった．

1) 体重測定．曝露開始時，および28日目ないし29日目に測定した．

2) 血液学的検査．ラットを背位に固定し，股関節動静脈の切開によって放出する血液を採取した．ラットはそのまま脱血死させた．採取した血液について，血球測定器（Coulter Counter Model-S）を用い，白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（HGB），ヘマトクリット値（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）を測定した．さらに血液については，プロトロビン時間と部分トロンボプラスチン時間を測定した．

3) 血清生化学検査．上述した方法により採取した血液から定法により調製した血清について，自動分析装置（HITACHI M-400）により，総タンパク量（TP），アルブミン（Alb），総コレステロール量（CHO），グルコース量（Glu），尿素窒量（UN），トランスアミネーゼ活性（GOT，GPT），アルカリホスファターゼ活性（Alp）を測定した．

4) 剖検．肉眼的観察

5) 臓器重量の測定．心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓（左右），副腎（左右）の実重量と，曝露28日目，および29日目の体重にもとづいて体重比重量を求めた．

6) 病理組織学検査．重量測定臓器と，その他に胃，大小腸，胸腺，鼻腔，気管についても定法により組織標本を作製した．

7) 組織化学的検査．肺についてのみ，標本を作製した．後葉を細切し，10%ホルモールカルシュウム液（pH 7.2-7.3），4°Cで1晩固定し，さらにHoltの高張シュ糖液[6]に1晩浸漬，固定液を洗浄した後，クリオスタット切片を作製した．切片はHE染色と，Barka-Anderson，渡辺変法[7]により，ナフトールAS-BIホスフェートを基質として酸性ホスファターゼ反応を行なった．

実験結果

1. 体重 曝露開始時，および曝露28日，29日目の体重をTable 3に示した．各群とも対照に比べ変化はな

く，良好な発育を示した．

2. **血液学検査** Table 4 に示すように Cr-H 群で対照に比べヘマトリット値（Hct）と平均赤血球容積（MCV）の有意な増加がみられた他は，特に変化はなかった．なおプロトロンビン時間および部分トロンボプラスチン時間も変化は認められなかった．

3. **血清生化学検査** 各群の結果を Table 5 に示したが，いずれも問題となる変化はみられなかった．

4. **剖検** JIS Dust 群で，肺がやや暗赤褐色を呈していた他は，各群の諸臓器に著変はみられなかった．

5. **臓器重量** 曝露28日および29日目の結果を Table 6 にまとめて示した．JIS Dust 群と Cr-H 群の肺の実重量および体重比が，対照に比べ有意な増加を示した．

Table 3. Initial Body Weight and Body Weights at Inhalation Periods of 28 and 29 days

	Initial weight (20)	Final weight (10)	
		28 days	29 days
	g	g	g
Control	95±5.5[a)]	218±10.3	225±14.0
JIS Dust	90±6.0	226±10.2	223±12.1
Cr-L	95±6.0	225±11.1	227±13.7
Cr-H	94±4.9	217± 9.9	219±12.5

a) mean±S.D., ( ): No. of rats

またその増加の程度は Cr-H 群で大きかった．その他，副腎（右）で，JIS Dust 群では実重量が，Cr-H 群では体重比が，対照と比べ大きかった．

6. **病理組織学検査** 本報告では，肺の凍結切片について得られた所見だけを述べた．他の諸臓器については現在検索中である．

JIS Dust 群では，対照に比べ軽～中等度の肺胞上皮の腫張，肺胞壁間質の軽度な浮腫がみとめられた．また肺胞腔内には，大食細胞数が多く，その胞体内は，貪食した粉塵粒子で満たされ，形状も対照群のものに比べ，やや大きい細胞が多かった．肺胞内の粉体粒子は肺胞上皮表面に沈着しているものも見られるが，ほとんどが大食細胞に貪食されているようであった（Fig. 3）．

Cr-L 群では，部分的な肺胞上皮細胞の軽度な腫張，粉塵粒子を貪食した大食細胞の腫張の傾向がみられた．肺胞腔内の大食細胞数は対照と差がなかった（Fig 4）．

Cr-H 群では，肺胞上皮細胞の腫張に加えて肺胞上皮細胞の脱落による肺胞壁の菲薄化，肺胞壁間質の浮腫，さらには肺胞壁自体の崩壊により，正常な構造が損なわれている肺胞も多くみとめられた．また大食細胞の数は，JIS Dust 群と同様多くなっているが，胞体内に貪食された粉塵粒子は，JIS Dust 群に比べ著じるしく少なかった．また Cr-H の大食細胞の多くは腫大しており，核も他の群に比べ大きく，細胞質は微細な泡状を呈していた．さらに崩壊したものも多くみられた．以上の

Table 4. Results of Hematological Examination of the Rats Exposed to the Aerosols of JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Dross Dust for 28 Days

Group	Number of rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	Hgb g/dl	Hct %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
Control	(10)	9.06±1.51[a)]	8.48±0.29	16.49±0.33	44.55±1.36	53.60±0.70	19.78±0.38	36.83±0.68
JIS Dust	(10)	9.25±1.07	8.48±0.28	16.60±0.37	45.05±0.91	54.40±0.97	19.82±0.44	36.66±0.44
Cr-L	(10)	8.52±1.73	8.30±0.35	16.26±0.49	43.87±1.70	54.10±0.60	19.82±0.36	36.89±0.55
Cr-H	(10)	9.15±1.00	8.53±0.33	16.58±0.44	46.01±3.11*	55.10±2.51*	19.72±0.37	35.92±1.97

a) mean±S.D. * Statistical significance $p<0.05$

Table 5. Results of Blood Biochemical Examination of the Rats Exposed to the Aerosols of JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Dross Dust for 28 Days

Group	Number of rats	TP g/dl	Alb g/dl	CHO mg/dl	Glu mg/dl	UN mg/dl	GOT K-U/ml	GPT K-U/ml	Alp K. A-U/dl
Control	(10)	6.30±0.34[a)]	4.65±0.22	52.2±3.5	227±24	10.5±0.5	105±20	56.1±21	58.1±3.6
JIS Dust	(10)	6.40±0.25	4.72±0.25	54.8±5.2	236±30	10.6±0.7	105±6.3	54.6±5.4	58.3±5.2
Cr-L	(10)	6.31±0.28	4.66±0.18	54.5±2.7	240±24	11.6±3.1	104±5.9	55.5±7.2	62.4±4.1*
Cr-H	(10)	6.26±0.36	4.66±0.25	52.2±3.1	225±33	10.8±0.9	101±9.8	50.9±6.8	59.0±3.6

a) mean±S.D. * Statistical significance $p<0.05$

Table 6. Organ Weights of the Rats Exposed to the Aerosols of JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Dross Dust for 28 and 29 Days

Group	Heart mg	Lung mg	Liver g	Spleen mg	Kidney (R) mg	Kidney (L) mg	Adrenal gl. (R) mg	Adrenal gl. (L) mg	Brain mg
28 Days									
Control	702±40[a]	825±40	8.81±0.82	497±38	709±48	731±49	14.62±1.95(9)	15.74±2.27	
(10)	311±25[b]	366±49	3.90±0.48	220±18	314±27	324±29	6.46±1.05	6.98±1.07	
JIS Dust	720±51	1069±53**	9.16±0.67	508±40	753±48	761±39	16.38±1.15*	17.31±1.30	
(10)	318±16	473±22**	4.05±0.17	225±18	333±10	336±13	7.25±0.53	7.66±0.49	
Cr-L	731±80	846±76	9.40±0.64(9)	505±24	728±39(9)	735±41	15.60±1.78	16.75±1.43	
(10)	324±12	375±26	4.17±0.14	224± 8	325±39	326±13	6.93±0.78	7.44±0.65	
Cr-H	683±31	1149±50**††	8.78±0.56	483±31	710±30	712±38	15.97±1.68	16.83±1.89(9)	
(10)	314± 6	529±15**††	4.04±0.08	222±11	327±13	327±13	7.35±0.66*	7.70±0.87	
29 Days									
Control	694±69	787±44	9.38±0.84	488±30	722±46	738±51			1803±43
(10)	307±16	350±16	4.16±0.16	216± 9	320± 7	327±14			802±45
JIS Dust	696±44	1033±91**	9.24±0.78	489±32	715±39	723±45			1772±68
(10)	312±14	462±24**	4.14±0.17	219± 7	320±13	324±12			796±51
Cr-L	690±90	836±82	9.44±0.70	496±38	735±43	725±37			1833±39
(10)	303±38	367±30	4.14±0.12	217± 9	323±15	318±10			790±40
Cr-H	652±52	1133±69**†	8.81±0.83	479±37	703±47	716±52			1779±37
(10)	304±13	529±15**††	4.11±0.15	224±16	329±15	334±11			833±39

a) Absolute weight, mean±S.D. b) mg(g)/100g Body weight, mean±S.D. ( ): No. of samples
Statistical significance *p<0.05, **p<0.01 (Control vs JIS Dust, Cr-L, Cr-H)
†p<0.05, ††p<0.01 (JIS Dust vs Cr-H)

変化により，肺胞腔内には，崩壊した細胞などの残渣が存在し，大食細胞の崩壊によって放出された粉塵粒子も混在していた (Fig. 5).

また JIS Dust 群および Cr-H 群では，肺胞内に，白血球の数が多くなっていた.

7. 組織化学的検査 酸性ホスファターゼ活性は，対照群では，肺胞腔内に遊離して存在する大食細胞に，顆粒状に強い活性がみられた他，細気管枝上皮細胞の細胞質にも，微細顆粒状に弱い活性が認められた．また肺胞上皮細胞には，ほとんど活性はみられなかった．各粉塵曝露群での活性の変化は，主に大食細胞で顕著であった．以下その観察結果を述べる．JIS Dust 群および Cr-H 群では，ほとんどの細胞で，活性は細胞質に拡散し，低下していた．また全く活性の消失している細胞も多くみられた．Cr-L 群では，粉塵粒子を貪食し，対照と比べ，腫張の傾向を示しているような細胞では，軽度な活性の細胞質への拡散，低下を示していた．またこのような傾向を示す細胞が多かった.

考　察

クロム鉱滓粉塵の肺に対する作用は，大食細胞の腫大および崩壊，肺胞壁の崩壊など，同濃度の関東ローム粉塵に比べ強く現われた．また肺の重量増加の程度が大きいことから，組織全体としての浮腫の程度も強いと思われる．クロム鉱滓では，大食細胞の胞体内に残存する粉塵粒子が少ないことから，肺胞内に到達する粒子の溶解性が高いことが考えられるが，肺にみられた組織変化は，この可溶性成分中の六価クロムによる作用も大きいと思われる．しかし鉱滓水浸出液のウサギ眼粘膜および皮フに対する刺激作用について，それが六価クロムだけでなく，液性や他の成分との複合的な作用として考えられており[3,4]，クロム鉱滓粉塵の肺に対する作用に関しても，以上の性質を考慮する必要があろう.

今回得られた結果のうち，赤血球容積の増加は，六価クロムの赤血球に対する親和性との関係が考えられる．吸入物質の溶解性については，物質の溶解部位における局所作用だけでなく，血液をはじめ，血液を介しての他

の諸臓器への影響についても観察する必要がある.

肺以外の諸臓器について，その重量変化をみると，今回の実験では，特にクロム鉱滓の影響と思われる変化は認められなかった．またクロム鉱滓と関東ローム粉塵で副腎（右）が増加の傾向を示したが，これは粉塵の性質に関係なく，高濃度の粉塵の曝露という，物理的な作用に対する生体の生理的な反応の現われと思われる.

今回の短期吸入実験については，さらに，クロム鉱滓粉塵成分の分析，鼻腔および気管を含めた諸臓器の病理組織学検査，血液および諸臓器中のクロム含量分析など，現在検索中であるが，今後これらの結果を総合し，クロム鉱滓粉塵の短期間曝露による，呼吸器および全身におよぼす影響について，検討を加えていく予定である.

ま と め

クロム鉱滓粉塵を 21mg/m³ および 1.46mg/m³，比較対照としての関東ローム粉塵を 21mg/m³ の濃度で吸入箱内のラットに28日間ないし29日間曝露し，経気道進入による，クロム鉱滓粉塵の生体におよぼす影響を観察した.

鉱滓粉塵高濃度と，関東ローム粉塵曝露による肺の組織変化が主であったが，鉱滓粉塵による組織変化は，同濃度の関東ローム粉塵に比べ強く，その肺胞および大食細胞にみられる変化から，鉱滓粉塵の可溶性成分による局所作用を示唆するものと考えられた.

文 献

1) 東京都公害局編：六価クロム鉱滓による環境汚染調査結果報告書，1974

2) 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：東京衛研年報，27-2，56，1976

3) 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：東京衛研年報，27-2，124，1976

4) 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：東京衛研年報，27-2，129，1976

5) 坂本義光，調 武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，'1977

6) Holt, S. T.: *Exp. Cell Res.*, Suppl, 7, 1, 1959

7) 渡辺慶一，鈴木 裕：モダンメディア，17，149，1970

たが，細胞隣接部のデスモゾームは比較的良好に認められた．核は円形に近いもの，楕円形のものなど大小種々みられ，また核小体は発達したもの，帯状を呈するものなどみられたが，正常腺房細胞（Fig. 8）が通常有する大きく円形な核，発達した核小体と大差は認められなかった．細胞質では，正常腺房細胞（Fig. 8）で多くみられた脂肪滴，dense granule および特徴的な結晶様構造をもつ crystalloid[2,3] の著しい減少を認めた．またゴルジ装置，滑面小胞体（SER）もほとんど認められなかった．粗面小胞体（RER）の多くは不規則な配列を示す細管状を呈して散見された．本来，腺房細胞はその分化に伴って多数の小胞体，ゴルジ装置，分泌物を有し，腺の分泌機能に関与しているが，これらの所見はその分泌機能が低いことを意味するものと思われる．また細胞質に指紋体（finger print body）[9] と思われる RER の特殊構造物を認めた（Fig. 2）．糸粒体はやや腫大し円形のものが多かったが，クリステなどに強い乱れは認められなかった．糸粒体内顆粒は正常腺房細胞（Fig. 8）の糸粒体に比べむしろ明瞭に認められた．糸粒体の増減に関しては明らかでなかった．また興味ある所見として，内部に暗顆粒を有する直径約 0.5μ のミクロボディ様構造物が散見された（Fig. 2）．遊離リボゾームは正常腺房細胞に比べ増加していた．Fig. 3 は細胞分裂と思われる像を示している．細胞境界はやや不明瞭で，細胞内小器官も少量で貧弱であった．

扁平上皮化生を示す部分（Fig. 4）では腺房の基底膜は不明瞭となり，細胞配列も不規則な感があった．核は複雑な切れ込みを呈したものが多く，核質に線維構造を認めるものもあった．また核小体の多くは核仁糸の網状構造を失い，細顆粒状の小さな集団として認められた．細胞質には扁平上皮細胞の一つの特徴である tonofibrils が良好に発達しており（Fig. 4, 5），またやや複雑に入り込んだ細胞境界では細胞質内に嵌入した不規則な配列を示すデスモゾームが認められた（Fig. 6）．小胞体はSERがほとんど認められず，不規則な配列を示す細管状の RER が散見された．時として同心円状配列を呈する小胞体がみられた（Fig. 7）．これは前記の指紋体と同様 RER の特殊構造物と思われ，細胞の変性に伴う出現[9] と考えられる．糸粒体はやや腫大し円形または楕円形のものが多かったが，クリステなどに強い乱れは認められなかった．また糸粒体内顆粒も明瞭にみられた．遊離リボゾームは蜂巣状増殖を示す部分の細胞と同様増加していた．また細胞質には正常腺房細胞（Fig. 8）でみられた脂肪滴，dense granule および crystalloid[2,3] はほとんど認められなかったが，限界膜直下に明帯を伴う直径 0.3–0.6μ 程度の電子密度が高い小顆粒を散在性に認めた（Fig. 5）．この小顆粒は蜂巣状増殖を示す部分の細胞内にも若干認められたが，この部位ではより明確であった．

結　語

ラット包皮腺に発生した腫瘍で，組織学的に adenoacanthoma と診断されたものについて電顕的に形態を観察した．その主要所見は，蜂巣状増殖を示す部分では腺房基底膜の切断，分泌物の減少，ミクロボディ様小顆粒および指紋体の出現などが，扁平上皮化生を示す部分では腺房基底膜の消失，tonofibrils の発達，同心円状小胞体の出現，細胞質に嵌入したデスモゾームの出現などがみられた．

文　献

1) Beaver, L. D.: *J. Exp. Zool.*, 143, 153, 1960
2) Beaver, L. D.: *Anat. Rec.*, 146, 47, 1963
3) Dangelo, G. J. and B. L. Munger: *J. Ultrastruct. Res.*, 11, 230, 1964
4) Brown, J. C. and J. D. Williams: *Acta. Anat.*, 81, 270, 1972
5) Bullock, F. D. and M. R. Curtis: *J. Cancer Res.*, 14, 1, 1930
6) Jacobs, B. B. and R. A. Huseby: *J. Natl. Cancer Inst.*, 39, 303, 1967
7) Coleman, L. G., S. W. Barthold, G. W. Osbaldiston, S. J. Foster, and A. M. Tonas: *J. Gerontology*, 32(3), 258, 1977
8) Hiraga, K. and T. Fujii: *Gann*, 68, 369, 1977
9) 小野江為則，布施裕輔，森　道夫：電子顕微鏡による細胞組織図譜，6，28，1971，医学書院，東京

Explanation of Figures

Fig. 1. Electron micrograph of adenoacanthoma with marked alveolar hyperplasia.

Fig. 2. Finger print body (Fb) and microbody like figure (arrow) in a part of alveolar hyperplasia are seen. N: nucleus, M: mitochondria.

Fig. 3. The cell division in a part of alveolar hyperplasia is seen.

Fig. 4. Electron micrograph of adenoacanthoma with marked squamous metaplasia.

Fig. 5. Tonofibrils (To) and dense granules (Gr) in a part of squamous metaplasia are observed.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 205-213, 1977

ラット包皮腺腫瘍の微細構造

三栗谷 久敏*, 福森信隆*, 平賀興吾*

Fine Structure of Preputial Gland Tumor in Rat

HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

Preputial gland adenoacanthoma obtained from female rat was examined by electron microscopy. The adenoacanthoma consisted of two components, alveolar hyperplasia and squamous metaplasia. As noticeable findings, disappearance in a part of basement membrane, decrease of secretory granules and dense granules were observed in alveolar hyperplasia area. Disappearance of basement membrane, development of tonofibrils and rough surfaced endoplasmic reticulum with concentric arrangement were observed in squamous metaplasia area.

緒　　言

包皮腺は毛包に付属しない脂腺の一つで，ラット，マウスなどげっ歯類に雌雄とも良く発達している．この腺は複合胞状型の腺構造を持つ全分泌腺[1]に属し，その形態に関しては Beaver[2], Dangelo ら[3], Brown ら[4] などの報告がある．腫瘍に関する報告は稀で，現在までに Bullock ら[5] による carcinoma（ラット 2,450 例中2例），Jacobs ら[6]による myoepithelioma（ラット191例中1例），極く最近では Coleman ら[7] による adenoma（雄ラット140例中10例）の報告を数えるに過ぎない．また包皮腺腫瘍の微細構造に関する報告は皆無である．

当部の平賀ら[8]は直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）添加飼料による終生飼育試験中，対照を含むラットに包皮腺腫瘍の発生を観察し，組織学的に adenoma および adenoacanthoma（腺類癌）と診断した．今回著者らはこれら包皮腺腫瘍の中で，adenoacanthoma と診断されたものについて，その微細構造を電顕的に観察する機会を得たので報告する．

観察材料および方法

試料　当部で行なった LAS 添加飼料による終生飼育試験中の Slc：Wistar ラット包皮腺に発生した腫瘍[8]で，組織学的に adenoacanthoma と診断された5例中ホルマリン固定後の組織保存が比較的良好であった1例（140週令，雌，LAS 0.16% 添加，No. 236）を用いた．なお，正常構造の参考に供した包皮腺は同系の成熟雌ラットから摘出し，パラホルムアルデヒド固定したものを用いた．

方法　電顕試料は固定された組織を約 1 mm^3 の細片とし，0.1M 燐酸緩衝液（pH 7.3）で10分間ずつ3回洗浄，同衝液中で1晩氷室内放置後冷1%オスミウム酸（0.1M 燐酸緩衝液，pH 7.3）で1.5時間後固定した．以下定法に従い，エタノール脱水，QY-1を通して Epon 812-Araldite M 混合樹脂で包埋，超薄切片を作製，酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛にて重染色を施し，HU-12A 型電顕にて観察した．なお，電顕観察の参考に供するため，包埋した試料より約1μの準超薄切片を作製し，トルイジン青染色を施して光顕的に観察した．

観察所見および考察

肉眼的および光顕的所見

左側包皮腺に発生した腫瘤で重さ 2.78 g の厚みのある台形（長さ 20mm，最大幅 19mm，最小幅 3 mm，厚さ 9 mm）を呈し，割面では貯留分泌物に比べ実質成分の多い充実性の結節であった．光顕的所見では実質部分で腺房細胞の蜂巣状増殖がみられ，部分的に角化傾向を示す扁平上皮化生が認められた．蜂巣状増殖を示す部分では細胞密度が高く細胞分裂像が散見された．一方，扁平上皮化生を示す部分では腺房細胞が乳頭状構造を呈して増生しており，細胞分裂も比較的著明であった．また細胞に異型性も認められた．これらの所見から扁平上皮化生傾向を顕著に示す adenoacanthoma と診断された．また細胞増殖は浸潤性ではなく圧排性の様相を呈していた．

電顕的所見

蜂巣状増殖を示す部分（Fig. 1）では若干肥厚が認められる基底膜は切断個所がみられ，その部の腺房構造は明確さを欠いていた．また細胞境界もやや不明瞭であっ

* 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

いが，ルブロール抽出酵素にある種のりん脂質を加えると感受性が回復するという報告[14]もありルブロールによる可溶化は酵素精製に有効な方法と考えられる．

要　旨

1) ACase 活性を種々の臓器で比べると脳が最も高かった．

2) Na, K-ATPase の精製法に従い脳ミクロソームを DOC, NaI 処理すると精製に伴ない ACase 活性は低下した．従って ACase は DOC, NaI に対して Na, K-ATPase とは異った感受性を持つと考えられた．

3) 脳をホモゲナイズ後遠心分画すると 3,000×g 10分間の沈殿画分に活性の50%以上が回収され，比活性も高かった．

4) ACase の可溶化には非イオン性界面活性剤のルブロール PX およびルブロール WX が有効であった．

5) 可溶化の条件は 0.1M Sucrose, 50mM Glycylglycine buffer, 3mM DTT 存在下で1%ルブロールで抽出し，タンパク濃度は約 5 mg/ml が適当であった．

6) 可溶化によりブタ脳 ACase 比活性は3－4倍にラット脳の比活性は8－11倍に上昇した．

7) 1%ルブロールにより活性の95%以上，タンパクの約60%が上清に回収された．

謝辞　ブタ脳の入手に御協力下さいました帝国臓器株式会社の生方氏に深く感謝いたします．

文　献

1) Sutherland, E. W., I. φye, and R. W. Butcher : *Recent Progr. Hormone Res.*, 21, 623, 1965

2) 西塚泰美，兼子俊男：cyclic AMP —基礎と臨床—，199，1970，中外医学社

3) Bennett, V., E. O'keefe, and P. Cuatrecasas : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 33, 1975

4) Sahyoun, N., and P. Cuatrecasas : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 3438, 1975

5) Sharma, S. K., W. A. Klee, and M. Nirenberg : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 3092, 1975

6) Takai, K., Y. Kurashina, S. C. Hori, H. Okamoto, and O. Hayaishi : *J. Biol. Chem.*, 249, 1965, 1974

7) Salomon, Y., C. Londos, and M. Rodbell : *Anal. Biochem.*, 58, 541, 1974

8) Nakao, T., K. Nagano, K. Adachi, and M. Nakao : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 444, 1963

9) Fiske, C. H. and Y. H. SubbarRow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925

10) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and B. J. Randoll : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951

11) Dodge, T. M., C. Michell. and D. J. Hanahan : *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963

12) Nakao, T., Y. Tashima, K. Nagano, and M. Nakao : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 755, 1965

13) Johnson, R. A., and E. W. Sutherland : *Methods in Enzymol.*, 38, 135, 1974

14) Levey, G. S. : *Methods in Enzymol.*, 38, 174, 1974

表 2. Na, K-ATPase 精製法を用いた時の ACase 活性の変化

Ms. の処理方法	Na, K-ATPase 活性	ACase活性	
		Basal	+NaF
	μ molePi/mg/hr	*n*mole/mg/10min.	
DOC 非処理 Ms.	24.2	1.205	5.067
DOC 非処理, NaI 処理 Ms.	79.9	0.917	1.743
DOC 処理 Ms.	71.9	0.841	3.034
DOC 処理, NaI 処理 Ms.	135	1.173	2.163

表 3. ブタ脳 ACase の細胞内分布

	タンパク量	比活性		全活性	
		Basal	+NaF	Basal	+NaF
	mg	*n* mole/mg/10min.		*n* mole/10min.	
3000×g 沈殿	2449	1.957	6.857	4793	16792
48000×g 沈殿	1254	2.000	4.900	2508	6145
48000×g 上清	2761	0.614	0.657	1695	1814

い ACase の細胞内分布を調べた（表3）．ブタ脳では 3,000×g 沈殿分画に全 ACase 活性の 52% が検出され比活性も高かった．ラット脳でも同様な結果であった．

ブタ脳の 3,000×g 沈殿分画を用い界面活性剤による可溶化の条件を検討した．図1に ACase 活性におよぼす界面活性剤の影響を示した．ルブロール PX および WX は 0.03-0.3% の範囲で酵素活性を強く促進した．Na, K-ATPase の精製に使われる濃度の DOC，および SDS は阻害作用を示した．次にルブロール抽出の条件を検討し図2に示した．0.1M Sucrose, 50mM Glycylglycine 3mM DTT の存在下で活性，タンパクともに最もよく抽出された．抽出に用いるルブロール濃度を検討し図3に示した．ルブロール濃度は 0.5-1.5% がよく本実験では1%を使用した．以上の結果から 0.1M Sucrose, 50mM Glycylglycine buffer, 3mM DTT 存在下で1%ルブロールPX で可溶化し，活性測定にはルブロール可溶化酵素を反応液の 1/10 容加えて反応液中ルブロールの濃度を0.1% にするのが最も良いことがわかった．1%ルブロール抽出による活性およびタンパクの収率はそれぞれ96%と 56% であった．この条件で抽出した ACase の比活性はブタ脳で抽出前の約4倍，ラット脳では約10倍になった．ラット脳の活性が高いのはルブロールによる活性化の程度が高いためである．ルブロール抽出により NaF 感受性やホルモン感受性がなくなった．これは酵素そのものが変化した結果かもしれな

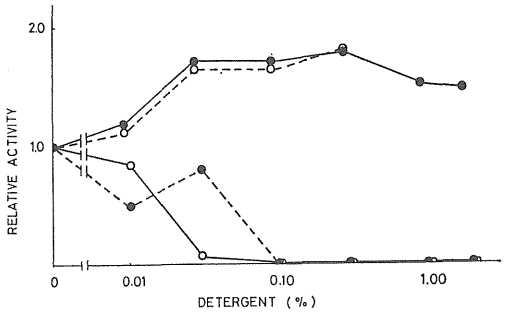


図 1. ACase 活性におよぼす界面活性剤の影響
界面活性剤無添加時の活性を 1.0 として相対活性で表わした．
●—● はルブロール-PX, ○…○ はルブロール-WX
●…● は DOC, ○—○ は SDS を表わす．

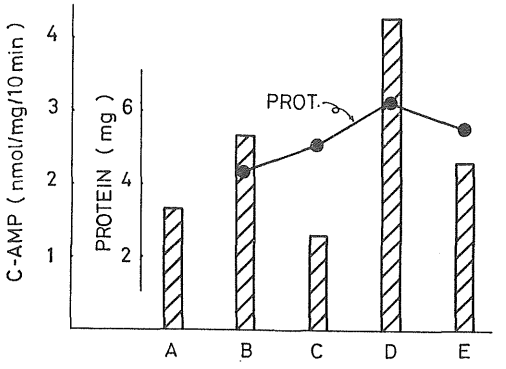


図 2. ルブロール-PX による ACase 抽出条件
棒グラフは比活性を，●—● は抽出されたタンパクを表わす．抽出に用いたミクロソームは 11.58mg である．
A：未処理のミクロソーム B：1mM EDTA
C：1mM EDTA, 50mM Tris-HCl
D：0.1M Sucrose, 50mM Glycylglycine, 3mM DTT
E：1mM EDTA, 3mM DTT

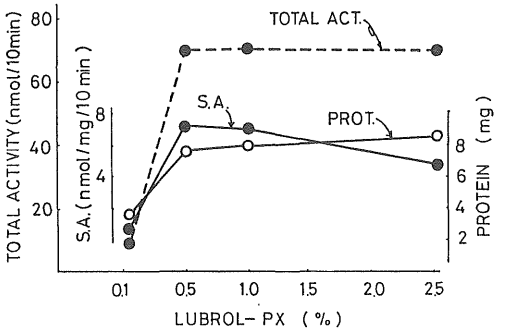


図 3. ACase 抽出におよぼすルブロール濃度の影響

えてから無機りん酸の定量を行なった．Na, K-ATPaseの比活性は μmole Pi/mg/hr. で表わした．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Lowry法[10]で行なった．

ミクロソーム分画の調製

ラットの肝臓は門脈から 0.9% NaCl を通して灌流して血液を除去後 −50°C で保存，脳と腎臓は 0.9% NaCl で洗い −50°C で保存したものを材料とした．ミクロソームの調整は各臓器に9容量の 0.32M Sucrose, 1mM EDTA を加えて warling blender で2分間ホモゲナイズし，10,000r.p.m. 15分間遠沈 (Sorvall SS-34 ロータ) する．この上清を 20,000r. p. m. 30分間遠沈 (Sorvall SS-34 ロータ) した沈殿を再溜水で2回洗い (20,000r. p. m. 40分間)，再溜水に懸濁してミクロソーム標品とした．

赤血球膜片の調製

ラットに体重 200g当り 0.3ml のネンブタールを腹腔内注射した後頸静脈より採血した．凝固を防ぐため注射器内および試験管を 3.13% クエン酸ソーダで洗い，血液には 1/10 容の 3.13% クエン酸ソーダを加えた．赤血球膜片の調製は採血後直ちに Dodge らの方法[11]で行なった．血液に 0.9% NaCl を9容量加え 3,000r. p.m 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，時々攪拌しながら30分間放置する．20,000r.p.m 25分間遠沈 (Sorvall SS-34 ロータ) 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1mM EDTA を加え，テフロンホモゲナイザーで10回上下したものを赤血球膜片とした．

DOC 処理ミクロソームの調製

ブタ脳に9容量の 0.1% DOC, 1mM EDTA を含む 0.25M Sucrose を加え warling blender でホモゲナイズする．9,000r. p. m 60分間遠沈 (Sorvall GSA ロータ) した上清を 20,000r.p.m 60分間遠沈 (Sorvall SS-34ロータ) し，沈殿を 1mM EDTA で1回洗う．これを DOC 処理ミクロソームとした．

NaI 処理ミクロソーム

DOC 処理あるいは DOC 非処理ミクロソームを用い中尾らの方法[12]で NaI 処理をした．

可溶化した AC ase の調製

−50°C あるいは −80°C で凍結保存してあるラットあるいはブタの脳を材料とし主として Johnson, R. A. らの方法[13]に従って調製した．脳に9容量の 0.25M Sucrose, 0.1M Glycylglycine buffer (pH 7.5), 3mM DTT 溶液を加えて warling blender でホモゲナイズし 3,000×g 10分間遠沈 (Sorvall SS-34 又は SE-12 ロータ) する．更に同条件で2回洗った沈殿を可溶化の材料に使用した．可溶化は 0.1M Sucrose, 50mM Glycylglycine buffer (pH 7.5), 3mM DTT 存在下で，タンパク約5 mg/ml に対し10%ルブロール PX 0.1ml を加えテフロンホモゲナイザーで均質化する．これを105,000×g 50分間遠沈 (Beckman 40A ロータ) し上清部分を可溶化した ACase 標品とした．

試　薬

[α-^{32}P]-ATPはラジオケミカルセンター(英), ATP, c-AMP, DTT はシグマ社，ルブロール PX は半井化学薬品，ルブロール WX は General Biochemicals, SDS は和光純薬特級，Dowex 50W-X4 (200-400 メッシュ) はダウケミカル，中性アルミナは Tochtergesellschaft der ICN Pharmaceuticals, NaI は小室化学試薬特級を使用した．ルブロール PX およびルブロール WX は過酸化物等を除くため陰イオン交換樹脂と陽イオン交換樹脂を通して精製したものを使用した．10%溶液にして−30°C で保存した．

実験結果および考察

ACase 活性は脳や神経組織に高いと言われている．表1に種々臓器のミクロソーム分画，および赤血球膜片の ACase 活性を示した．動物種に関係なく脳の活性は高かった．しかし NaF による活性化の程度は他の臓器に比べ低かった．酵素精製には活性の高い材料が有効と考え以後の実験にはブタおよびラットの脳を使用した．

ACase は Na, K-ATPase と同様に細胞膜に存在する酵素である．ブタ脳を Na, K-ATPase の精製と同じ方法で DOC および NaI 処理をして ACase 活性を測定した(表2)．DOC 処理 NaI 処理により ACase 活性は低下し，Na, K-ATPase の精製法は本酵素には不適当であった．

Johnson らの方法[13]に従ってブタ脳の細胞分画を行な

表 1. 種々臓器における ACase 活性

臓　器	比　活　性	
	Basal	+NaF
		n mole/mg/10min.
ラット肝 Ms.	0.166	1.780
ラット赤血球膜	0.034	0.260
ラット腎 Ms.	0.461	1.164
ラット脳 Ms.	2.537	6.446
ウ マ 脳 Ms.	1.889	3.286
ブ タ 脳 Ms.	2.557	7.870

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 201-204, 1977

アデニレートシクラーゼの精製（第1報）
アデニレートシクラーゼの分布および可溶化

中川敦子*, 中尾順子*

Purification of Adenylate Cyclase (I)
Distribution and Solubilization of Adenylate Cyclase

ATSUKO NAKAGAWA* and TOSHIKO NAKAO*

ホルモン作用に関係ある物質として Sutherland, E. W.[1] により c-AMP が発見されて以来その研究は急速に進み，c-AMP の多岐にわたる作用が明らかになった．現在では c-AMP はホルモン作用のセカンドメッセンジャーとして位置づけられている．臨床面での生体内 c-AMP 濃度の変動および排泄の増減に関する研究は多く，即時型および遅延型アレルギー，乾癬症，ホルモン不反応症，筋ジストロフィー等で減少することが報告[2]されているがその機構は不明で推測の域を出ない．c-AMP の合成に関与するアデニレートシクラーゼ（ACase）に直接作用し生体反応との関連が分子レベルでかなり明らかにされている例としては，コレラ毒素による下痢症状[3,4]およびモルヒネ等麻酔剤に対する耐性[5]がある．ACase は細胞膜に存在し，環境に応じて微妙に変動するホルモンや薬物の影響を敏感に細胞内に伝えるための最初のステップに位置している．本酵素は微生物膜からは高井ら[6]により精製され性質も詳しく検討されているが，動物細胞膜からの単離は困難でその精製はまだほとんど進んでいない．本酵素の作用および性質を明らかにするには精製が必要と思われる．その手初めとして酵素の分布を調べるためラット赤血球膜，ラット肝，ラット腎，ラット脳，ウマ脳，ブタ脳ミクロソーム分画の ACase活性を測定し，脳を材料にして可溶化について検討した．

実験方法

ACase 活性の測定

1) ACase 活性の分析 Salomon, Y. らの方法[7]に従った．反応液の組成は 40mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 3.6mM [α-^{32}P]-ATP (40-50c. p. m/*p* mole), 8 mM テオフィリン, 1 mM c-AMP, 1 mM EDTA および酵素タンパクで全量を 100μl とする．反応液をミキサーで混和後 37°C に加温して反応を開始する．10分間インキュベート後冷却し直ちに反応停止液 (40mM ATP, 1.4mM c-AMP, 2% SDS) 100μl を加えて生成した c-AMP を測定する．NaF 添加時の測定は反応液中の終濃度を 10mM とした．ルブロール抽出酵素の活性を測定する時は，酵素の失活を防ぐため1 mg/m*l* BSA および1mM DTT を反応液中に加えた．この条件で c-AMP の生成は反応時間15分間，酵素タンパク量 100μg まで直線であった．

2) c-AMP の分離 反応終了後の試料に水 0.8m*l* を加えこれを1 m*l* の Dowex 50W-X4 をつめたカラム (0.4×10cm) にかける．反応液の流出後水 2.5m*l* を流し，次に c-AM^{32}P を含む分画を水 3.0m*l* で溶出する．溶出液に 1.5M Imidazole-HCl (pH 7.2)を 0.2m*l* 加えて pH を合わせ，続いて0.6ｇの中性アルミナをつめたカラム (0.4×10cm) にかけてわずかに混っている AT^{32}P を除く．試料が完全にカラムを通過した後0.1M Imidazole-HCl (pH 7.5)を更に1 m*l* 流す．試料溶出液と 0.1M Imidazole 溶出液は予め 12m*l* の Bray Medium を入れたバイアルびんに受け，液体シンチレーションカウンター（ベックマン社）で放射能を測定する．

3) Dowex 50W-X4 およびアルミナの処理 Dowex 50W-X4 は使用前に約10倍量の 2N NaOH および 2N-HCl で洗い充分水洗して酸を除く．実験中の再処理は使用後直ちに 1N HCl 2m*l* を流し，使用前に 10—15m*l* の水で酸を除く．アルミナは使用前に 0.6ｇにつき8—10m*l* の 0.1M Imidazole-HCl (pH 7.5) を流す．実験中の再処理も同様に行なう．酵素の比活性は c-AMP *n* mole/mg/10min. で表わした．

Na, K-ATP ase 活性の測定

中尾らの方法[8]に従い遊離した無機りん酸を Fiske-SubbarRow 法[9]で測定した．反応液中に発色を妨げる量のタンパク質が存在する時には，10% SDS 20μl を加

* 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

14) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
15) Aldridge, W. N. : *Biochem. J.*, 46, 451, 1950
16) Hart, W. M. JR. and E. O. Titus : *J. Biol. Chem.*, 248, 1365, 1973
17) Izumi, F., K. Nagai, and H. Yoshida : *J. Biochim.*, 60, 533, 1966
18) 原　論吉：お茶の水医学雑誌, 23, 25, 1975
19) Matsui, H. and A. Schwartz : *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 655, 1968
20) Hegyvary, C. and R. L. Post : *J. Biol. Chem.*, 246, 5234, 1971
21) Kaniike, K., E. Erdmann, and W. Schoner : *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 901, 1973
22) Patzelt-Wenczler, R., H. Pauls, E. Erdmann, and W. Schoner : *Eur. J. Biochem.*, 53, 301, 1975

Pを添加すると阻害速度は3倍以上増加した．このATPの作用は，ATP 以外のヌクレオチド（ADP, UTP, GTP, CTP, ITP）やリン酸化合物（PNPP）で代用することができた．これらの結果，もしNa+Mg+ヌクレオチドの三者存在下でできる型の酵素が，ATP 水解反応に関与するならば，この型になる前後の反応で，酵素の構造の大きな変化を伴うことが示唆された．一方，Titus ら[16]は，Na+Mg+ATP 存在下で NEM の結合量が変化することを報告している．

ここで得られた初速度の変化は，SH 基の阻害剤に対する反応性の変化によるのか，あるいは阻害剤と反応するSH基の個数の変化によるのかはわからない．しかし，いずれにしても酵素の構造変化に由来するものであるから，初速度の変化は酵素の構造変化の指標になると考えられる．

ATP+Na+Mg 存在下で，阻害速度 k が大きな値を示すことは，この条件で酵素がリン酸化されることを考慮すると興味深い．Mg に対する $K_{0.5}$ が0.04mM であることから，E_1-P あるいはそれ以前の型の酵素が SH 阻害を強く受けやすいことが示唆される．しかし，ATP 以外のヌクレオチドでも阻害促進作用があることから，酵素のリン酸化は阻害促進に必ずしも必要でないのかもしれない．

PNPPase活性は，ATP+Naが存在すると，K^+に対するKmが減少し，そのpH依存性は消失し，ATPaseのK^+に対するKmの性質に近づく[17,18]．その際，ATPを他のヌクレオチドに置き換えることができ，SMの阻害促進と同じメカニズムが働いていることが示唆される．また酵素に対するdigoxinの結合もNa+Mg+ATPで増加し，ATP以外のヌクレオチドでも代用し得る[19]．

酵素への ATP binding の実験から，酵素と ATP は1対1に結合し[20]，ADP あるいは他のヌクレオチドは ATP と同一の部位に結合することも報告されている[21,22]．従って，上記の結果は，E_1-P 形成に先立ち形成される酵素—ヌクレオチド複合体が，阻害剤に対し高い反応性を持つことが示唆された．

要　約

1) ShowdomycinによるNa, K-ATPaseの阻害速度を指標にして，Na, K-ATPaseに対する各種リガンド（Na, K, Mg, ATP）の作用を調べた．showdomycinはブタ脳Na, K-ATPaseを疑似1次反応（pseudo first order）で阻害し，リガンド無添加の場合の阻害の速度定数（k）は$4.5\times10^{-2}mM^{-1}$, min^{-1}であった．

2) リガンド条件を変えると速度定数（k）に変化がみられた．Na, K, Mgの各種組み合せをつくり，showdomycin を作用させた．その結果，Na イオンは初速度を減少し，Mg イオンは初速度を増加させる傾向を示した．

3) 上記リガンドの組み合せにATPを添加すると，Na+Mg 以外の系では反応速度は減少し，ATP の保護作用が得られた．これに対し，Na+Mgの組み合せは，ATP 添加により阻害速度が3倍以上増加し，大きな k 値を示した．

4) この阻害促進作用は，ATP を他のヌクレオチド（ADP, UTP, GTP, CTP, ITP）やリン酸化合物（PNPP）に置き換えても得られた．

5) 阻害促進作用に対する Mg, Na, ATP の $K_{0.5}$ を求めたところ，それぞれ0.04mM, 2mM, 0.15mMであった．

以上の結果から，阻害速度 k と酵素の構造との関係について考察した．

文　献

1) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 161, 1976

2) Whittam, R. and K. P. Wheeler : *Ann. Rev. Physiol.*, 32, 21, 1970

3) Bonting, S. L. : *in "Membranes and Ion Transport"* (ed. E. E. Bittar), Vol. 1, 257, Wiley-Interscience, New York, 1970

4) Skou, J. C. : *Bioenergetics*, 4, 1, 1973

5) Skou, J. C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 234, 1974

6) Banerjee, S. P., S. M. E. Wong, V. K. Khama, and A. K. Sen : *Mol. Pharmacol.*, 8, 8, 1972

7) Robinson, J. D. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 139, 164, 1970

8) Banerjee, S. P., S. M. E. Wong, and A. K. Sen : *Mol. Pharmacol.*, 8, 18, 1972

9) Schoot, B. M., A. F. M. Schoots, J. J. H. H. M. DE PONT, F. M. A. H. Schuurmans Stekhoven, and S. L. Bonting : *Biochim. Biophys. Acta*, 483, 181, 1977

10) Darnell, K. R., L. B. Townsend, and R. K. Robins : *Chemistry*, 57, 548, 1967

11) Tobin, T. and T. Akera : *Biochim. Biophys. Acta*, 389, 126, 1975

12) Nakao, T., Y. Tachima, K. Nagano, and M. Nakao : *J. Biochem.*, 73, 609, 1973

13) Fiske, C. H. and Y. H. SubbaRow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925

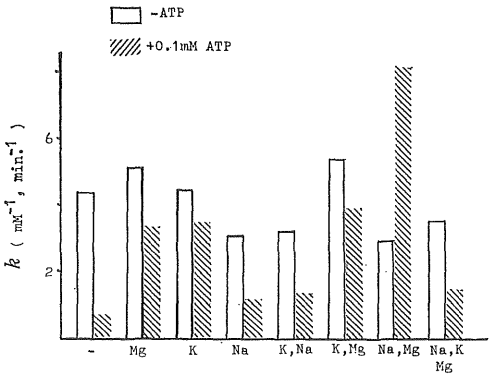


Fig. 6. 種々のリガンドの阻害速度に対する影響
2mM SM, 140mM Na, 14mM K, 5mM Mg

各種のリガンド組み合せに 0.1mM ATP を添加したところ，阻害速度の減少を示した (Fig. 6). 減少の程度はリガンドの組み合せにより異なった．これに対し，Na+Mg の組み合せでは，ATP 添加により，逆に阻害速度が増加した (Fig. 6). この ATP による阻害促進効果は，ATPを他のヌクレオチド (1mM) やリン酸化合物 (1mM) で置き換えても得られた．Table 1 に示すように，ATP, ADP, UTP, GTP, CTP, ITP, PNPP は阻害促進作用がみられるが，AMP, PNP, Pi は阻害促進作用を示さなかった．NEM の場合も，Na+Mg に ATP を添加すると阻害が促進したが，SM に比べ小さかった．

次に阻害促進作用に対する Mg, Na, ATP 各々の

Table 1. 阻害促進作用

	ligand (lmM)	rate constant(k) (mM^{-1}, min^{-1})
SM 2mM	—	3.3×10^{-2}
	ATP	11.2
	ADP	8.2
	AMP	2.7
	UTP	7.2
	GTP	9.6
	CTP	10.4
	ITP	10.8
	PNPP	7.9
	PNP	3.6
	Pi	3.0
NEM 2mM	—	5.4
	ATP	9.2

PNP : p-nitrophenol
PNPP: p-nitrophenylphosphate

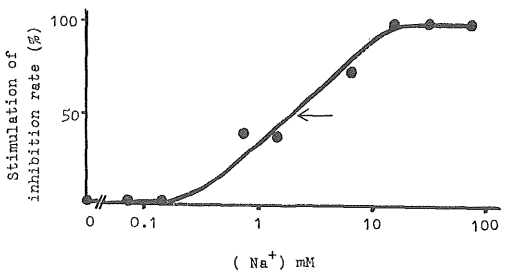


Fig. 7. Na の阻害促進作用
5mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 2mM SM, 0.1mM EDTA, 50mM Tris-Cl, PH 7.5 存在下の条件で求めた．

$K_{0.5}$ (半阻害促進濃度)を求めた．Fig. 7 に 5mM $MgCl_2$ 1mM ATP 存在下における Na の阻害促進作用を示した．図から求めた Na の $K_{0.5}$ は約2mM であった．同様な方法で Mg および ATP に対する $K_{0.5}$ を求めた．140 mM NaCl, 1mM ATP 存在下における Mg の $K_{0.5}$ は 0.04mM で，140mM NaCl, 5mM $MgCl_2$ 存在下で ATP の $K_{0.5}$ は 0.15mM であった．

考　察

SH 阻害剤としてよく用いられる NEM の阻害を SM の阻害と比較すると，阻害速度および ATP の効果の点で，SM の方が実験の目的に適していた．SM はヌクレオチド構造を持つため，ATP 結合部位に対し NEM より特異的に作用するのかもしれない．この結果は，Tobin ら[11]の報告と一致する．

Na, K, Mg, ATP などのリガンドを色々に組み合せて，SM の阻害速度に対する影響を調べた (Fig 6). Naイオンが存在すると，Na 無添加の場合より阻害速度が減少した．以前 Banerjee ら[6]は，NEM を用いた実験で，Na は ATP 水解反応と脱リン酸化反応に対する NEM の阻害を増強させると報告し，私共の結果とは異なる．Banerjee らは，一定時間内での阻害の到達度を指標にし，一方私共は阻害の初速度を指標にしているため違いが生じたのかもしれない．

Mg イオンは阻害速度を増加させる傾向があった．Shoot ら[9]は NEM の阻害で，同様に Mg が阻害速度を増加させると報告している．

種々のリガンドの組み合せに ATP を添加すると，Na+Mg の系以外は阻害の速度の低下が得られた．ATP による k の減少は，buffer のみの場合が一番大きく，それにリガンドが添加されると保護作用は弱くなる．このATPの保護作用に対するリガンドの影響については，Skou[5]の結果と部分的に一致する．Na+Mg の系にAT

Fig. 3 に示すように，SM の Na, K-ATPase に対する阻害の時間経過は疑似1次反応に従い，阻害は SM 濃度に比例して増加した．また，Fig. 4 で，50%阻害に要する時間は SM 濃度の逆数に比例していた．これらのことから，SM と酵素の反応は2分子反応[15]であることが推測され，従って阻害速度 (k) は次の式で表わされる．

$$k=\frac{1}{tI}\ln\frac{100}{b}$$

I = molar inhibitor concentration, t = time in min, b = percentage residual activity

Fig. 3 で示すように，0 time を含む4点を通る直線を最小2乗法で求め，その傾きから速度を上式に従って計算した．

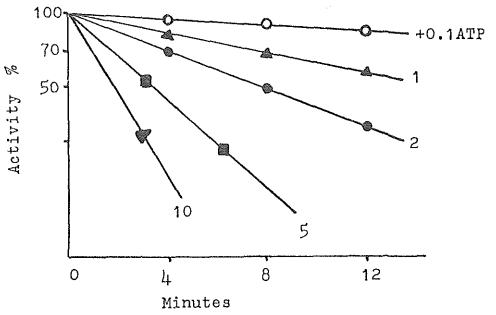


Fig. 3. showdomycin の Na, K-ATPase に対する阻害 SM の濃度 1mM -▲-, 2mM -●-, 5mM -■-, 10mM -▼- ： -○- は 2mM SM に 0.1mM ATP を添加した．

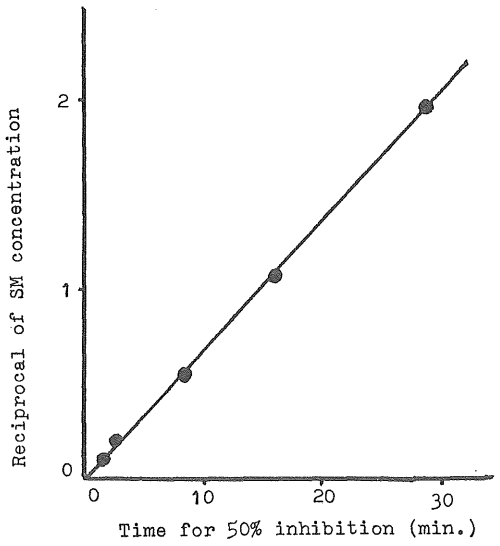


Fig. 4. 半阻害に要する時間と SM 濃度の関係

結　果

SM はブタ脳 Na, K-ATPase を阻害し，その阻害曲線は NEM を用いた場合とよく一致していた (Fig. 2)．半阻害濃度は SM が 4.4×10^{-4}M, NEM が 3.1×10^{-4}M であった．

Fig. 3 のリガンド無添加の場合 (50mM トリス-塩酸, pH 7.5, 0.1mM EDTA) の SM の阻害速度定数 (k) は 4.5×10^{-2}mM^{-1}, min^{-1} であった．反応液中に ATP が存在すると反応速度は非常に減少し，ATP による保護作用がみられた (Fig. 3)．ATP は低濃度でも保護作用があり，0.1mM ATP 存在下の阻害速度定数は 0.6×10^{-2} mM^{-1}, min^{-1} で，ATP 無添加の場合に比べ k は約1/7に減少した．

SM の非糖部分と類似構造を持つ NEM の阻害と比較した．阻害速度を SM と同じ方法で求めた (Fig. 5A)．ATP 無添加の場合は 7.4×10^{-2}mM^{-1}, min^{-1} で，0.1mM ATP 存在下では 4.4×10^{-2}mM^{-1}, min^{-1} であり，ATP 添加で約1/2に減少した．このように NEM は SM に比べ阻害速度が速い．また preincubation の time course は曲がりやすい (Fig. 5B)．さらに，ATP の保護作用は SM の場合に比べ小さかった．以上の理由で，本実験では SM を使用した．

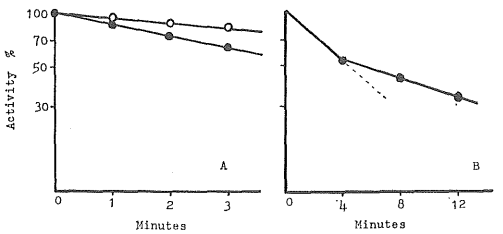


Fig. 5. NEM の Na, K-ATPase に対する阻害 -●- 2mM NEM, -○- 2mM NEM に 0.1mM ATP を添加した．

次に，preincubation のリガンドの組み合せを変え，SM の阻害速度に対するこれらリガンドの影響を調べた．Na^+(140mM), K^+(14mM), Mg^{2+}(5mM) の各種組み合せをつくり，2mM SM を作用させ初速度を求めた (Fig. 6)．

Na イオンは阻害速度を減少させた．すなわち，buffer, K, Mg, K+Mg の系は Na 添加により k が小さくなった．一方，Mg イオンの添加は阻害速度の増加を起こす傾向があった．すなわち，buffer, K, K+Na の系に Mg を添加すると k は増加した．しかし，Na+Mg は Na のみの系より k 値はやや減少した．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 196-200, 1977

マレイミド誘導体抗生物質，Showdomycin の Na, K-ATPase 阻害

原 しげ子*, 中尾順子*

Inhibition of Na,K-ATPase by Maleimide Related Antibiotic, Showdomycin

SHIGEKO HARA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

有機，無機水銀化合物は細胞膜諸酵素の中で，活性にSH基の関係する酵素を特に強く阻害する[1]．それらの中には，Na, K-ATPase, Adenylate cyclase 等が含まれる．Na, K-ATPaseは，膜を横切って存在し，Na^+とK^+の能動輸送を行ない，細胞の生命維持に関する重要な酵素である[2-4]．私共は水銀化合物の Na, K-ATPase 阻害機構を調べてきたが，さらに詳細に知るためには，Na, K-ATPase の反応機構について詳しい知見を得る必要がある．

従来，Na, K-ATPase の反応機構を知る一手段として，N-ethylmaleimide などの SH 阻害剤がよく用いられ[5-9]，イオンあるいは ATP の Na, K-ATPase に対する作用が調べられて来た．しかし，これらの実験はいずれも，一定時間内の阻害到達度で比較したものである．そこで私共は，showdomycin[10] (Fig. 1) が脳 Na, K-ATPaseを不可逆に阻害し，疑似1次反応 (pseudo first order) に従うこと[11]を利用して阻害の初速度を求め，各種イオンや ATP の初速度に対する影響を調べた．

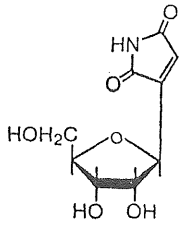


Fig. 1. showdomycin の構造

方　法

試薬　showdomycin(以下 SM と略す) はシグマ社製，N-ethylmaleimide (以下 NEM と略す) はイーストマン社製を使用した．ヌクレオチド及び，リン酸化合物はトリス塩を使用した．

ブタ脳 Na, K-ATPase は中尾らの方法[12]に従い NaI 処理標品を用いた．Na, K-ATPase 活性の測定は前報[1]に従った．反応液は終濃度 140mM NaCl, 14mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 3mM ATP, 0.5mM EDTA, 50mM トリス塩酸(pH7.3)を含み全量を0.5m*l* とした．遊離無機リン酸を Fiske-SubbaRow の方法[13]で測定した．ブタ脳 Na, K-ATPase の比活性は230μmole Pi/mg protein/h. であった．タンパクは Lowry ら[14]の方法で測定した．

阻害の初速度の求め方　50mM トリス-塩酸(pH7.5), 0.1mM EDTA に Na, K, Mg, ATPを種々の組み合せで添加した反応液に，約100μgのブタ脳 Na, K-ATPase 標品を加え37°で3-4分予備加温した．2mM SM を添加して反応を開始した．一定時間おきに，反応液から20μlを取り，あらかじめ37°に加温した，1mM β-mercaptoethanol を含む Na, K-ATPase 活性測定液に加え16分間反応させ活性を測定した．酵素活性測定時の阻害剤の終濃度は 8×10^{-5}M になり，活性測定中に阻害がさらに進行することは無視できた (Fig. 2).

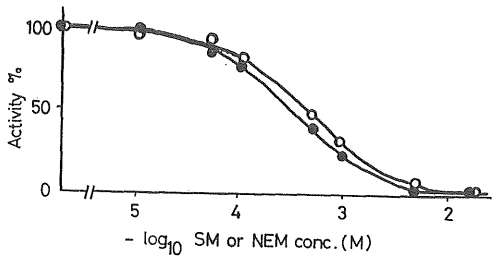


Fig. 2. showdomycin と NEM の Na, K-ATPase に対する阻害曲線　あらかじめ基質を除いた反応液中で，酵素と SH 阻害剤を 37°30 分間予備加温し，基質を加えて15分間反応させた．SH 阻害剤無添加の活性を 100 として残りの活性を百分率で表わした．-○- SM, -●-NEM

* 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

Control 群に比べ，各観察項目とも何ら有意な変化は認められなかった．

優性致死誘発率（J）

Röhrborn の方式に従い，算出した結果を図1に示したが，強い変異原性を有する物質に関しては，Jが20をこえる値で明らかな変異原性をもつとみなされる．投与後10日のA—E群で誘発性が示され，また，それには用量相関が認められた．しかし，30日目においては各群ともJが−3.52から14.75であり，誘発性はないと思われる．

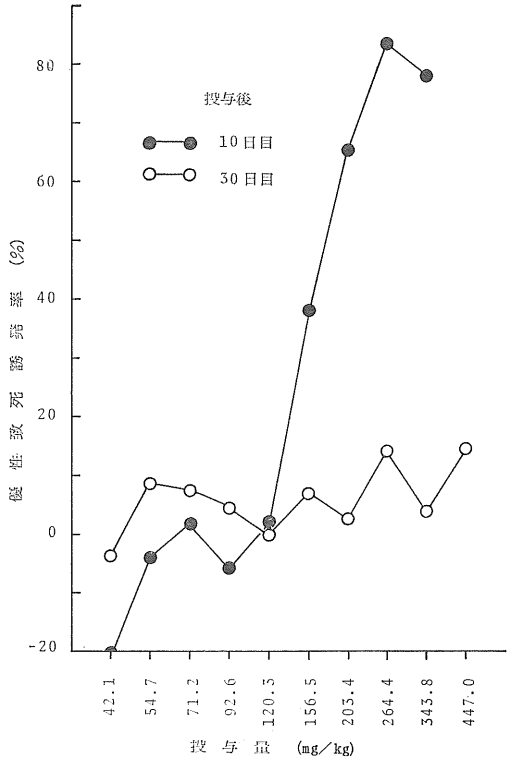


図1．投与量と優性致死誘発率（J）の関係

$$J=\left(1-\frac{\text{交尾を認めた♀1頭あたりの生存胎仔数(処置群)}}{\text{交尾を認めた♀1頭あたりの生存胎仔数(対照群)}}\right)\times 100$$

以上の結果よりEMSは，従来の報告どおり，精子形成段階の後期，すなわち精子および後期精細胞に特異的に作用し，強い優性致死誘発性を示すことがわかった．また，JCL-ICR マウスにおける，EMS の最適用量と最小作用量は，それぞれ200mg 前後，90mg 前後と考えられた．

考　察

EMS は，優性致死試験において有効な陽性対照物質として広く用いられている[2]．これは作用時期が精子形成段階の後期に特異的に作用し，また優性致死作用に対する用量相関が明確であることなどである．このことは，今回の ICR 系マウスを用いての試験でも再確認された．今回の結果から著者らは，EMS の ICR 系マウスにおける陽性対照としての最適投与量を200mg/kg 前後，また最少作用量を 90mg/kg 前後とした．その理由としては①交尾，妊娠率に低下を見ないこと，②着床数に顕著な減少を見ないこと，また③死胚の有意な増加を伴なうことなどであった．普通，近交系あるいはクローズドコロニー系動物における優性致死試験において，EMS が陽性対照物質として用いられた場合，その投与量は 250—400mg/kg が一般的である．今回著者らは，JCL-ICR マウスを用い，さらに低投与量でも充分な評価が得られることを確認した．

要　旨

JCL-ICR マウスにおけるエチルメタンスルホネート（EMS）の優性致死作用，特にその用量—作用反応関係を調べるため，42mg—447mg/kg 間に 10 群を設け，投与後10日目と30日目に交配，胎児観察を行なった．その結果，投与後10日目に顕著な優性致死作用を認めた．

この時期では，交尾率には変化が見られぬが，妊娠率は，264mg/kg 以上で，また着床数においても，156mg/kg 以上で有意な減少を認めた．さらに死胚数に関しては 54mg—92mg/kg でも有意性のある増加を見た．また優性致死誘発率（J）は 200mg/kg 以上で特に高い値（J＝65以上）を示した．

これらの結果をもとに，優性致死試験における陽性対照としての EMS 最適量および最小作用量を，それぞれ200mg/kg 前後，90mg/kg 前後と判断した．

文　献

1) 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，講談社，1973

2) Ray, V. A., H. E. Holden, D. S. Salsurg, J. H. Ellis, L. J. Just, and M. L. Hyneck : *Toxicology and Applied Pharmacology*, 30, 107, 1974

表 3. 予備交配，投与後10日目，30日目における胎児および黄体観察

投与群		黄体数[4]	着床数[4]	生存胎児数[4]	早期死胚数[4]	総死胚数[4]
A	Pre[1]	12.87±2.23	12.33±1.92	11.20±1.97	0.33±0.49	1.13±0.74
	10 d[2]					
	10 d[3]	11.50	11.50	10.00	1.50	1.50
B	Pre	12.79±1.65	12.42±1.39	11.53±1.68	0.42±0.61	0.90±0.74
	10 d	14.00±2.16	11.50±4.20	8.50±5.92	3.00±1.83	3.00±1.83[c]
	30 d	13.43±1.74	11.57±2.59	11.29±2.56	0.21±0.43	0.29±0.51
C	Pre	13.70±1.66	12.85±1.75	12.07±1.92	0.56±0.64	0.78±0.70
	10 d	9.62±3.97[c]	7.62±3.91[c]	4.00±5.05	3.62±2.63	3.62±2.63[c]
	30 d	13.52±1.90	12.12±2.46	11.28±2.30	0.64±0.70	0.84±0.80
D	Pre	13.62±1.65	12.77±1.56	12.31±1.59	0.51±0.37	0.46±0.65
	10 d	13.96±1.77	10.30±3.00[c]	4.30±2.83	5.82±2.50	6.00±2.54[c]
	30 d	12.82±1.72	12.00±1.49	11.43±1.75	0.54±0.69	0.57±0.69
E	Pre	12.86±2.85	12.29±3.05	11.68±3.01	0.36±0.62	0.61±0.83
	10 d	13.39±2.55	11.23±2.93[c]	8.85±3.48	2.23±1.75	2.39±1.86[c]
	30 d	13.93±2.25	12.14±2.01	11.31±2.11	0.00	0.10±0.31
F	Pre	12.77±2.61	12.17±2.60	11.50±2.66	0.37±0.67	0.67±0.80
	10 d	15.17±3.19	13.60±1.50	11.90±1.77	1.43±1.38	1.70±1.39[b]
	30 d	13.59±2.11	12.90±1.66	12.14±1.73	0.62±0.68	0.76±0.69
G	Pre	12.76±2.76	12.24±2.70	11.59±2.81	0.31±0.54	0.66±0.72
	10 d	14.57±2.78	13.37±1.61	11.67±1.47	1.43±1.19	1.70±1.21[b]
	30 d	13.96±2.50	12.67±1.69	12.00±1.92	0.56±0.97	0.67±1.07
H	Pre	12.79±1.89	12.21±1.37	11.71±1.44	0.14±0.36	0.50±0.65
	10 d	14.06±1.95	12.00±2.40	10.81±2.61	0.63±0.89	1.19±1.17
	30 d	13.87±2.17	12.07±2.02	11.67±2.32	0.27±0.46	0.40±0.51
I	Pre	13.93±2.79	12.00±2.18	11.57±2.17	0.29±0.47	0.43±0.53
	10 d	14.79±1.85	13.00±1.30	11.50±1.74	1.35±1.65	1.50±1.74[a]
	30 d	14.50±2.11	13.42±1.24	12.50±1.38	0.92±1.17	0.92±1.17
J	Pre	14.31±2.06	12.77±1.74	12.31±2.18	0.23±0.60	0.46±0.60
	10 d	16.21±2.61[c]	14.50±1.74	13.36±1.55	0.57±0.65	1.14±0.95
	30 d	14.29±2.56	13.00±1.84	12.14±2.14	0.64±0.75	0.86±0.66
Cont.	Pre	12.75±1.48	12.18±1.47	11.82±1.70	0.21±0.42	0.36±0.60
	10 d	14.10±2.23	13.41±1.59	12.55±1.74	0.66±0.72	0.86±0.83
	30 d	13.48±1.89	12.47±2.13	11.73±2.50	0.69±1.04	0.73±1.11

1) 予備交配　2) 投与後10日目　3) 投与後30日目　4) mean±S.D

a; $p<0.01$　*b*; $p<0.005$　*c*; $p<0.001$

生殖におよぼす影響

交尾率，妊娠率を表2に示す．

予備交配の結果，交尾率，妊娠率は，ほぼ100％であった．EMS投与後10日目における妊娠率は，A群0％(0/4)，B群28.6％(4/14)，C群46.4％(13/28)であり，顕著な減少が見られた．EMS投与後30日目における交尾率，妊娠率は，85.7—100％であり，Controlとの有意性は見られなかった．

胎児および黄体観察

予備交配，EMS投与後10日目，30日目における胎児および黄体観察結果を表3に示す．

予備交配により調べた各群の雄の自然保有致死因子は，著者らがこれまで得ている約1,000匹のICR系マウスのそれ（1母体当りの死胚数0.72±0.93）とよく一致した．

投与後10日目に強い優性致死作用が認められた．すなわち，着床数がC，D，E群で，また生存胎児数が，B，C，D，E群で著しく減少した．優性致死作用評価の重要な指標となる死胚に関しては，さらに低投与量群（C，D，E，F，G，I群）まで，その有意な増加を認め，それは，用量相関のある変化を示した．特に，B，C群ではすべて早期死胚であった．EMS投与後30日目では，

表 2. 予備交配，投与後10日目，30日目における生殖学的検索

投与群		使用雄	使用雌	交尾確認雄[2]	交尾確認雌	交尾率 (A)[3]	交尾率 (B)[4]	妊娠雌数	妊娠率[5]
Pre.[1]	—	130	260	130	251	100	96.5	243	96.8
A	10 d[6]	1	2	1	2	100	100	0	0
	30 d[7]	1	2	1	2	100	100	2	100
B	10 d	7	14	7	14	100	100	4	28.6
	30 d	7	14	7	14	100	100	14	100
C	10 d	14	28	14	28	100	100	13	46.4
	30 d	14	28	14	27	100	96.4	25	92.6
D	10 d	15	30	15	29	100	96.7	27	93.1
	30 d	15	30	15	29	100	96.7	28	96.6
E	10 d	15	30	15	29	100	96.7	26	89.7
	30 d	15	30	15	30	100	100	29	96.7
F	10 d	15	30	15	30	100	100	30	100
	30 d	15	30	15	30	100	100	29	96.7
G	10 d	15	30	15	30	100	100	30	100
	30 d	15	30	15	29	100	96.7	27	93.1
H	10 d	8	16	8	16	100	100	16	100
	30 d	8	16	8	16	100	100	15	93.8
I	10 d	7	14	7	14	100	100	14	100
	30 d	7	14	7	14	100	100	12	85.7
J	10 d	7	14	7	14	100	100	14	100
	30 d	7	14	7	14	100	100	14	100
Cont.	10 d	15	30	15	30	100	100	29	96.7
	30 d	15	30	15	30	100	100	30	100

1) 予備交配　2) 雌2匹に対して一匹以上の交尾を認めた雄数

3) $\frac{\text{交尾確認雄}}{\text{使用雄}} \times 100$　4) $\frac{\text{交尾確認雌}}{\text{使用雌}} \times 100$　5) $\frac{\text{妊娠雌}}{\text{交尾確認雌}} \times 100$　6) 投与後10日目　7) 投与後30日目

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 192-195, 1977

JCL-ICR マウスにおけるエチルメタンスルホネート（EMS）の優性致死作用

吉田誠二*, 益淵正典*, 高橋昭夫*, 安藤弘*
久保喜一*, 平賀興吾*

Dominant Lethal Effects of Ethylmethanesulfonate (EMS) in JCL-ICR Mice

SEIJI YOSHIDA*, MASANORI MASUBUCHI*, AKIO TAKAHASHI*,
HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

エチルメタンスルホネート（以下 EMS と略す）は，強力な変異原物質として，哺乳類における *in vivo*, *in vitro* での染色体異常誘発性および優性致死誘発性が報告されている[1]．

著者らはこれまで EMS を優性致死試験における陽性対照物質として用いてきたが，動物種およびその系統により，また使用する動物のコロニーによりその作用の現われ方に差が見られた．

著者らは毒性試験結果を人へ外挿するため，遺伝的に不均一とされているクローズドコロニー動物を多数用いることにより，より普遍的な安全性の評価がなされると考えており，ICR系マウスを使用してきた．したがって，EMS を陽性対照物質として有効に用いるため，ICR系マウスにおけるその優性致死作用をさらに詳しく検討しておく必要性を認めた．今回特に用量―作用反応関係を明らかにし，またその最適用量および最小作用量を求めるため，多数の投与群を設けて検討した．

材料および方法

1. **供試薬物**：Ethylmethanesulfonate（以下EMSと略す）．EASTMAN KODAK Co. Lot No. 711-2A

2. **実験動物および飼育条件**：雌雄ともJCL-ICR系マウスを用い，4週令で購入，予備飼育後10週令で実験に供した．飼育条件は，温度25±1°，湿度55±5%，照明9時間に制御された動物室で，固型飼料 CE-2 および水道水の自由摂取とした．予備飼育期間中1ケージ10匹飼いとした．使用動物数は表1に示す．

3. **薬物投与**：EMSは投与直前に滅菌蒸留水で溶解，公比1.3の割合で10の濃度段階を設定した（表1）．投与容量はすべて10ml/kgとし，腹腔内1回投与した．なおControlは無処置とした．

4. **交配方法**：EMS を投与した雄は1匹飼いとし，投与後10日目，30日目にそれぞれ無処置未経産の雌2匹と4日間同居させた．毎朝プラグ観察により交尾の有無を記録し，最終日にはその有無にかかわらず雌2匹を雄単位に別ケージにて分離飼育した．

5. **胎児および黄体観察**：プラグを確認した日を妊娠0日として，12—13日目で屠殺開腹し，黄体数，着床数，生存胎児数，早期および後期死胚数を調べた．

6. **予備交配**：雄の自然保有致死因子を調べるため，8週令の時点で雌を4. と同様の方法で交配し，胎児および黄体観察を行なった．

7. **統計処理**：統計処理は，t 検定および χ^2 検定を用い，Control との有意性を検討した．

結　果

EMS投与後，A群7匹（7/8），B群3匹（3/10），C群1匹（1/15）が死亡し，生存した雄を用いて優性致死作用を調べた．（表1）

表 1.　投与量と死亡数

投与群	投与量 (mg/kg)	動物数	死[1]	生[2]
A	447.0	8	7	1
B	343.8	10	3	7
C	264.4	15	1	14
D	203.4	15	0	15
E	156.5	15	0	15
F	120.3	15	0	15
G	92.6	15	0	15
H	71.2	8	0	8
I	54.7	7	0	7
J	42.1	7	0	7
Control	0	15	0	15

1) 投与後48時間以内に死亡
2) 優性致死試験に用いた

* 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

総括と考按

JCL-ICR マウスを用いた優性致死試験で，マイトマイシン C（MMC）を陽性対照として使用する際の最適投与量，最小作用量を決定することを目的に実験を行なった．

実験は雄の精子形成段階の初期および後期に受けた影響を調べるために，腹腔内1回投与後10日目，30日目に交配し，妊娠13-14日に開腹し黄体数および胎児観察を行なった．投与量は 3.85mg-0.37mg/kg とし，その間に10群を設けた（表1）．

投与後10日目交配では，生殖生物学的所見および黄体数，胎児に係わる調査のいずれにも対照群と比較して有意な多少高低を認めなかった．投与後30日目交配では，各群とも交尾率に有意な低下を認めなかった．しかし，妊娠率はA，B群に有意な低下を認め，またA-D群間に用量相関のうかがえる変動をみた．黄体数および胎児に係わる調査では黄体数，死胚数に有意と認められる増減はみられず，また用量相関も見られなかったが，A-C群間に着床数の有意な減少，それに伴なう生存胎児数の減少，未着床数の増加を認めた．優性致死誘発率（J）ではA-C群に用量相関のある高い値を認めた．

以上のことからMMCは精子形成段階の初期（精原細胞，精母細胞）に特異的に作用することがわかった．また妊娠率の低下，着床数の減少，優性致死誘発率（J）などから総合判断して，JCL-ICR マウスにおけるMMCの最適投与量は 2.96-2.28mg の間にあり，最小作用量は 2.28-1.75mg の間にわたるものと判断した．

一方，死胚は，優性致死現象を正しく評価する際の最も重要な指標であるが，今回のように多数の群を設定したにもかかわらず，推計学的に有意と認められる死胚の増加を見なかった．このことは妊娠率，着床数にも変化がなく，しかも着床したものについては致死作用があらわれるという最適投与量の幅が非常にせまいことを示している．これはMMCのように精子形成段階の初期に作用する物質では，作用を受けた生殖細胞がその後の成熟段階で死に至りやすいためであり，従来の試験法だけではそれが突然変異原物質であるという正しい評価をくだすことはむずかしい．妊娠率，着床数に顕著な減少を示す物質に関してはさらに他の試験による確認が必要と考えられる．

要　旨

JCL-ICR 系マウスを用いた優性致死試験で，マイトマイシン C（MMC）を陽性対照として使用する際の最適投与量，最小作用量を決定する実験を行なった．腹腔内1回投与後，10日目，30日目に優性致死誘起作用を調べた．30日目交配で妊娠率の低下，着床数の減少，それに伴う生存胎児数の減少および未着床数の増加を認め，本物質は，精子形成段階の初期に強い作用を示すことがわかった．一方，優性致死誘発の重要な指標になる死胚数には変動をみなかったことからMMCの優性致死性について検討を加えた．

（本研究の概要は日本環境変異原研究会第2回優性致死分科会1977年6月10日で発表した）

文　献

1) Cohen M. M. and M. W. Shaw : *J. Cell Biol.*, 23, 386, 1964
2) Natarajan A. T. and W. Schmid : *Chromosoma (Berl.)*, 33, 48, 1971
3) Adler I. D. : *Mutation Res.*, 23, 369, 1974
4) Manyak A. and E. Schlelermacher : *Mutation Res.*, 19, 99, 1973
5) Walker V. K. and J. H. Williamson : *Mutation Res.*, 28, 227, 1975
6) Adler I. D. : *Mutation Res.* : 35, 247, 1976
7) 土川　清：薬理と治療，2，179，1974
8) Ehling U. H. : *Mutation Res.*, 11, 35, 1971
9) 菊池康基，水谷正寛，梶原　彊：武田研報，30，762，1971
10) Röhrborn G. : *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel F. and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970 Springer-Verlag, Berlin

表 3-1. 排卵数および胎児に係わる所見 投与後10日目

薬投与物群	黄体数 [13] 総数 平均±SD	着床数 [14]	未着床数 [15]	生存胎児数 [16]	早期死胚数 [17]	後期死胚数 [18]	総死胚数 [19]
A	158 13.17±1.27	143 11.92±1.93	15 1.25±1.82	132 11.00±1.86	7 0.58±0.67	4 0.33±0.49	11 0.92±0.79
B	231 12.83±1.25	208 11.56±1.82	23 1.28±1.57	195 10.83±2.18	6 0.33±0.59	7 0.39±0.50	13 0.72±0.83
C	384 13.24±1.50	364 12.55±1.50	20 0.69±1.42	342 11.79±1.66	17 0.59±0.63	5 0.17±0.47	22 0.76±0.69
D	376 13.43±2.12	341 12.18±1.34	35 1.25±2.15	318 11.35±1.57	18 0.64±0.83	5 0.18±0.48	23 0.82±0.91
E	355 13.15±2.58	301 11.15±3.15	54 2.00±2.99	280 10.37±3.53	17 0.63±1.15	4 0.15±0.46	21 0.78±1.16
F	344 13.23±1.75	313 12.04±2.39	31 1.19±2.23	296 11.39±2.58	15 0.58±0.76	2 0.08±0.27	17 0.65±0.80
G	351 13.50±1.88	327 12.58±1.77	24 0.92±1.29	300 11.54±2.42	17 0.65±0.94	10 0.39±0.57	27 1.04±1.15
H	182 13.00±1.24	166 11.86±1.83	16 1.14±1.41	150 10.71±1.68	14 1.00±1.24	2 0.14±0.36	16 1.14±1.17
I	164 13.67±1.67	145 12.08±1.88	19 1.58±1.17	133 11.08±1.62	10 0.83±0.72	2 0.17±0.39	12 1.00±0.74
J	192 13.71±1.44	177 12.64±3.10	15 1.07±2.92	166 11.86±3.09	8 0.57±0.85	3 0.21±0.58	11 0.79±0.89
無処置	362 13.41±1.99	332 12.30±1.64	30 1.11±1.65	295 10.93±3.09	8 0.30±0.47	29 1.07±2.42	37 1.37±2.41

13-19) 各投与群ごとの総数および平均±SD　17) 肉眼的所見において脱落膜腫のみのもの
18) 肉眼的に少しでも胚塊の認められるもの
(統計) 13), 14) t 検定　15-19) x^2および順位和検定

表 3-2. 排卵数および胎児に係わる所見 投与後30日目

薬投与物群	黄体数 [13] 総数 平均±SD	着床数 [14]	未着床数 [15]	生存胎児数 [16]	早期死胚数 [17]	後期死胚数 [18]	総死胚数 [19]
A	72 14.40±2.07	47 * 9.40±3.44	25 *** 5.00±2.92	42 8.40±2.97	5 1.00±0.71	0	5 1.00±0.71
B	103 * 11.44±4.30	81 * 9.00±5.24	22 2.44±3.01	70 7.78±5.02	8 0.89±0.60	3 0.33±0.50	11 1.22±0.50
C	314 13.65±1.58	257 * 11.17±2.89	57 2.48±2.81	234 10.17±2.84	20 0.87±0.87	3 0.13±0.34	23 1.00±1.00
D	416 14.35±2.38	361 12.45±2.32	55 1.90±2.27	317 10.93±2.25	33 1.14±1.25	11 0.38±1.25	44 1.52±1.24
E	403 13.90±1.70	365 12.59±1.80	38 1.31±1.80	332 11.45±1.96	27 0.93±0.96	6 0.21±0.49	33 1.14±1.03
F	388 13.86±2.65	345 12.32±2.31	43 1.54±2.29	323 11.54±2.37	17 0.61±0.69	5 0.18±0.48	22 0.79±0.79
G	369 13.67±2.06	339 12.56±1.60	30 1.11±1.72	315 11.67±1.71	22 0.82±1.04	2 0.07±0.27	24 0.89±1.05
H	198 14.14±1.17	180 12.86±0.86	18 1.29±1.27	169 12.07±0.62	10 0.71±0.61	1 0.07±0.27	11 0.79±0.70
I	189 13.50±2.88	167 11.93±3.32	22 1.57±2.28	154 11.00±3.28	9 0.64±0.84	4 0.29±0.47	13 0.93±1.21
J	196 14.00±2.39	177 12.64±2.10	19 1.36±1.60	170 12.14±2.18	6 0.43±0.51	1 0.07±0.27	7 0.50±0.52
無処置	402 13.68±2.10	362 12.48±2.61	40 1.38±1.86	325 11.21±2.85	28 0.97±0.94	9 0.31±0.54	37 1.28±1.03

13)-19) 各投与群ごとの総数および平均±SD　17) 肉眼的所見において脱落膜腫のみのもの
18) 肉眼的に少しでも胚塊の認められるもの
(統計) 13), 14) t 検定　15)-19) x^2および順位和検定　* $p < 0.05$　*** $p < 0.001$

表 2-1. 生殖生物学的所見　投与後10日目

薬物投与群	使用動物数 ♂ 投与匹数[1]	♂ 死亡[2]	♂ 交配匹数[3]	♀ 交配匹数[4]	交尾確認動物数 ♂[5]	♀膣栓確認日と数 交配開始後 1日目	2日目	3日目	4日目	合計[6]	交尾率(%) ♂交尾/交配[7]	♀交尾/交配[8]	妊娠動物数 ♂妊娠させた[9]	♀妊娠した[10]	妊娠率(%) ♂妊娠させた/交尾[11]	♀妊娠した/交尾[12]
A	8	0	8	16	8	3	2	8	2	15	100	93.8	8	12	100	80.0
B	10	0	10	20	10	5	2	9	3	19	100	95.0	10	18	100	94.7
C	15	0	15	30	15	7	5	16	2	30	100	100	15	29	100	96.7
D	15	0	15	29[a]	15	5	7	14	3	29[a]	100	100	15	28	100	96.6
E	15	0	15	30	15	10	4	12	3	29	100	96.7	15	27	100	93.1
F	15	0	15	30	15	7	4	13	6	30	100	100	14	26	93.3	86.7
G	15	0	15	29	15	5	3	16	4	28	100	96.6	15	26	100	92.9
H	8	0	8	16	8	3	2	8	2	15	100	93.8	8	14	100	93.3
I	7	0	7	14	7	3	1	6	4	14	100	100	7	12	100	85.7
J	7	0	7	14	7	3	2	7	2	14	100	100	7	14	100	100
無処置	15	0	15	30	15	3	6	16	5	30	100	100	15	27	100	90.0

1) 試料投与した匹数　2) 投与後死亡した匹数　3) 1)−2)=3)　4) 3) に同居させた雌の合計匹数
5) 同居させた雌2匹に膣栓が確認されない時は除く　6) 膣栓を確認した4日間の雌の合計　7) 5)/3)
8) 6)/4)　9) 開腹時，雌に着床痕の認められたものに対する雄数　10) 開腹時，着床痕の認められた雌数
11) 9)/5)　12) 10)/6)
(統計)　x^2検定
a) 1匹逃亡

表 2-2. 生殖生物学的所見　投与後30日目

薬物投与群	使用動物数 ♂ 投与匹数[1]	♂ 死亡[2]	♂ 交配匹数[3]	♀ 交配匹数[4]	交尾確認動物数 ♂[5]	♀膣栓確認日と数 交配開始後 1日目	2日目	3日目	4日目	合計[6]	交尾率(%) ♂交尾/交配[7]	♀交尾/交配[8]	妊娠動物数 ♂妊娠させた[9]	♀妊娠した[10]	妊娠率(%) ♂妊娠させた/交尾[11]	♀妊娠した/交尾[12]
A	8	0	8	16	8	2	2	8	3	15	100	93.8	3	5	37.5***	33.3***
B	10	0	10	20	10	2	4	10	2	18	100	90.0	5	9	50.0**	50.0***
C	15	0	15	30	15	8	3	10	7	28	100	93.3	13	23	86.7	82.1
D	15	0	15	30	15	9	8	10	3	30	100	100	15	29	100	96.7
E	15	0	15	30	15	8	5	13	4	30	100	100	15	29	100	96.7
F	15	0	15	30	15	7	6	13	3	29	100	96.7	14	28	93.3	96.6
G	15	0	15	30	15	4	8	15	2	29	100	96.7	15	27	100	93.1
H	8	0	8	16	8	1	5	7	1	14	100	87.5	8	14	100	100
I	7	0	7	14	7	0	4	5	5	14	100	100	7	14	100	100
J	7	0	7	14	7	1	3	8	2	14	100	100	7	14	100	100
無処置	15	0	15	30	15	8	2	19	1	30	100	100	15	29	100	96.7

1) 試料投与した匹数　2) 投与後死亡した匹数　3) 1)−2)=3)　4) 3)に同居させた雌の合計匹数
5) 同居させた雌2匹に膣栓が確認されない時は除く　6) 膣栓を確認した4日間の雌の合計　7) 5)/3)
8) 6)/4)　9) 開腹時，雌に着床痕の認められたものに対する雄数　10) 開腹時，着床痕の認められた雌数
11) 9)/5)　12) 10)/6)
(統計)　x^2検定　　** $p<0.01$　　*** $p<0.001$

表 1. 投与群，投与量および使用匹数

	MMC (mg/kg)	使用動物数 ♂	♀
A	3.85	8	(16×2)
B	2.96	10	(20×2)
C	2.28	15	(30×2)
D	1.75	15	(30×2)
E	1.35	15	(30×2)
F	1.04	15	(30×2)
G	0.80	15	(30×2)
H	0.62	8	(16×2)
I	0.48	7	(14×2)
J	0.37	7	(14×2)
Cont.	0	15	(30×2)
Total		130	(520)

ない本実験に入った．予備交配を含め調査した項目はi) 生殖生物学的所見として交尾率，妊娠率，ii) 排卵数，胎児に係わる調査として黄体数，生存胎児数，早期・後期死胚数等である．詳細は各々表2－1，2，表3－1，2の脚注に記した．

調査は雌の膣栓確認日を妊娠0日とし，12，13日目に頸椎脱臼により屠殺開腹し，子宮および卵巣を摘出して行なった．この時，観察者によるデータのバラツキをなくすため，解剖，胎児観察，黄体観察担当をそれぞれ定めて行なった．

試験結果

1. 生殖生物学的所見（表2－1，2）

1) 交配使用動物数

実験期間中投与雄に死亡は見られず，交配使用匹数は投与開始時と変わらなかった．

2) 交尾率

10日目，30日目交配ともにMMC投与によると思われる交尾率の有意な低下は認められなかった．

3) 妊娠率

10日目交配（表2－1）では，各群とも対照群と比較して有意な低下を認めず，また用量相関のうかがえる変動もなかった．しかし，30日目交配（表2－2）になるとA，B群に有意な低下を認め，またA-D群間に用量相関のうかがえる変動を認めた．

2. 排卵数および胎児に係わる調査

1) 黄体数（排卵数）

10日目，30日目交配ともに対照群との間に有意差なく，黄体数は各群平均して13前後であった．

2) 着床数

10日目交配では各群に対照群と比較して有意な着床数の減少は認められず，また用量相関のうかがえる変動もみられなかった．しかし，30日目交配になるとA-C群に対照群との間に有意な着床数の減少を認めた．

3) 生存胎児数

10日目交配では，投与群のいずれにも対照群に比して有意と認められる生存胎児数の減少は認められず，また用量相関のうかがえる変動もみられなかった．30日目交配では前述の着床数の減少に伴なう生存胎児数の減少が認められた．

4) 死胚数

10日目，30日目交配ともに早期・後期・総死胚数のいずれにも対照群に比して有意と認められる増加はなく，また用量相関のうかがえる変動もなかった．

5) 優性致死誘発率（J）

Röhrborn の方式[10]に従い，Jを求めた．算出法は図－1に示す．

10日目交配では有意と認められる増加はなく，用量相関のうかがえる変動も認められなかった．30日目交配ではA（J=74.1），B（64.1），C（22.8）群に用量相関のある高い値を認めた（図－1）．

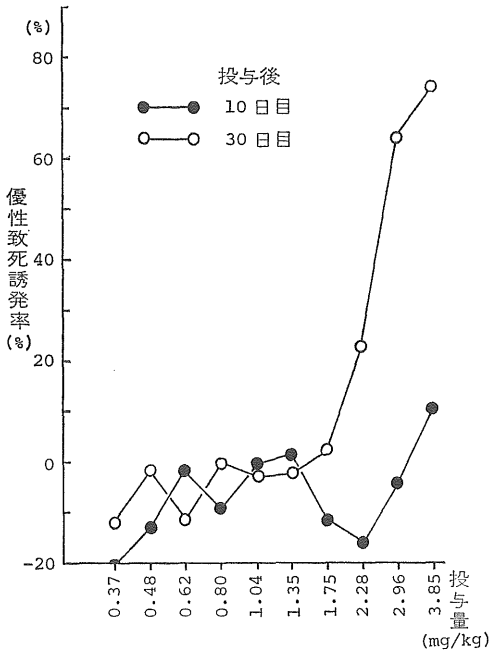


図 1. MMC投与量と優性致死誘発率（J）の関係

$$J=\left(1-\frac{\text{交尾を認めた♀1頭あたりの生存胎児数(処置群)}}{\text{交尾を認めた♀1頭あたりの生存胎児数(対照群)}}\right)\times 100$$

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 187-191, 1977

JCL-ICR マウスにおけるマイトマイシン C (MMC) の優性致死作用

高橋昭夫*, 益淵正典*, 吉田誠二*, 安藤 弘*
久保喜一*, 平賀興吾*

Dominant Lethal Effects of Mitomycin C in JCL-ICR mice

AKIO TAKAHASHI*, MASANORI MASUBUCHI*, SEIJI YOSHIDA*,
HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO* and KOGO HIRAGA*

マイトマイシンC（以下MMCと略す）は微生物生産物で，抗腫瘍剤として用いられるが，また強力な突然変異原物質であることが種々の動物および培養細胞系で知られている[1-6]．優性致死誘発性についての報告も多く[7-9]，その作用は精子形成段階の初期（精原細胞，精母細胞）に特異的に働く．

我々も数回の実験で同様の結果を得ているが，またいくつかの問題点を残して来た．すなわち，MMC を文献値通り投与しても，交尾はしているが着床が認められない，あるいは評価しうるほどの胎児が得られない等の現象を生じることがあり，生殖細胞を介しての突然変異誘発性を正しく評価することが困難であった．そこで今回 MMC の最も優性致死誘発性の高い初期（精原細胞，精母細胞）と，それの低い後期（精細胞，成熟精子）に的をしぼり，投与量と作用反応関係を調べ，最適投与量を見つけ出すとともに，最小作用量（はじめて致死作用の出現する投与量）を決定した．また同時にMMCを陽性対照に用いることの是非を検討した．

一方我々は，毒性試験結果をヒトへ外挿するために，遺伝的にあるいは生理的にバラツキの多いといわれるクローズドコロニー動物を用い，その使用数をふやすことにより，最も普遍的な安全性の評価を行なうべきだと考えている．しかし，我国におけるクローズドコロニー動物を用いての報告は少なく，今後これらの動物を用いての優性致死試験を行なう場合，さらに詳細な資料のあることが望まれる．したがって，今回 JCL-ICR マウスを用い，MMC の優性致死作用を調べた．

試験材料ならびに方法

1. **実験動物** JCL-ICR マウス雌雄を日本クレア㈱より4週令時に購入し，8週令に達した発育良好なものを選び実験に供した．

2. **飼育条件** 温度25±1°，湿度55±5%，照明午前8時—午後5時，換気毎時10回の飼育室にて日本クレア製飼育用固型飼料（CE-2）および水道水を自由に与えた．雌雄とも試験開始時までアルミケージにて10匹飼いとし，さらに雄は予備交配前日にプラスチックケージにて1匹飼いとした．雌は交配後，プラスチックケージに2匹飼いとした．

3. **交配方法** 交配は精子形成段階の初期および後期（各々試料投与後30日目，10日目）の2回とした．各時期とも雌は発情適期を問わず，交配第1日目午後4時—5時の間に，雄1匹に対し2匹を同居させた．その後4日間毎朝9時に膣栓の確認を行ない交尾の有無を記録した．膣栓確認期間を4日としたのは雌の性週期を考慮したもので，これまでの成績では4日の間にほぼ100%の交尾が認められている．

4. **試料** マイトマイシンC（MMC）は協和醗酵工業株式会社製 Lot No. 45Z を使用した．

5. **試料投与量の決定** 投与量の決定要因として，i) 通常陽性対照として1群を設ける場合，2.5-3.5 mg/kg が用いられている．ii) MMC そのものの性質を知るためにさらに高投与量を設けたい．iii) 作用反応を示す最少投与量を決定するため，また連続投与の場合の種々の条件を考慮するため，無作用と思われる投与群を特に多数設定する．以上に基づき，公比1.3で10段階の投与量を決定した．表1に投与群，投与量および投与動物匹数を示す．

6. **投与方法** 腹腔内1回投与とし，MMC は投与直前，滅菌蒸留水にて投与容量が10ml/kg になるよう希釈調整した．使用器具はすべて滅菌したものを用い，雄マウスは投与直前に体重測定を行ない，投与部位を消毒用エタノールで消毒した後投与した．

7. **観察方法** 使用する雄の自然致死因子保有の有無を検討するため，試料投与前にあらかじめ予備交配を行

* 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

adication, 1971, IAEA. *Stelility Principle for Insect Control 1974*, IAEA

6) Elkind, M. M., W. K. Sinklair : *Current Topics in Radiation Research*, eds. M. Ebert, A. Howard, vol. 1, 165, 1965, North-Holland Publish Co.,Amsterdam

7) 伊賀幹夫，土生昶毅：小笠原諸島におけるミカンコミバエの生態研究報告，1，1974

8) Walker, D. W., H. Singh, K. P. Mackay : *Sterility Principle for Insect Control 1974*, 585, 1975, IAEA

9) 大羽　滋，北川　修：小笠原諸島におけるミカンコミバエの生態研究報告，54，1973，東京都経済局

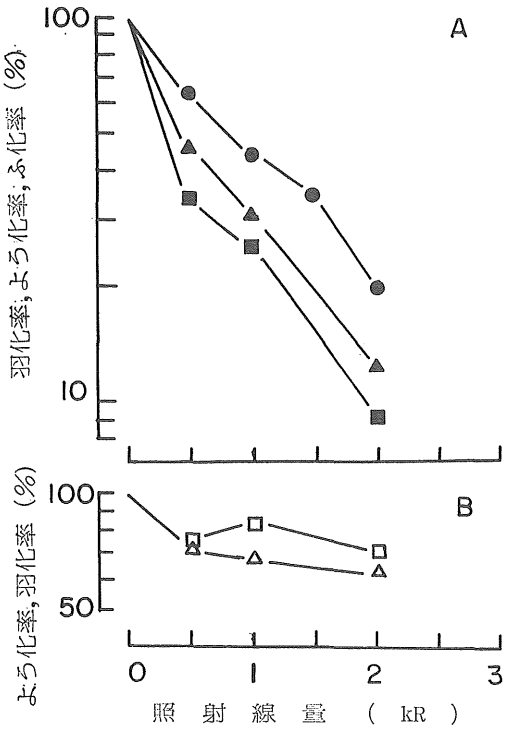


図7．蛹化ならびに羽化に対する卵照射の影響
A：照射卵数に対する蛹化率▲，羽化率■，ふ化率●
B：幼虫の蛹化率△，蛹の羽化率□

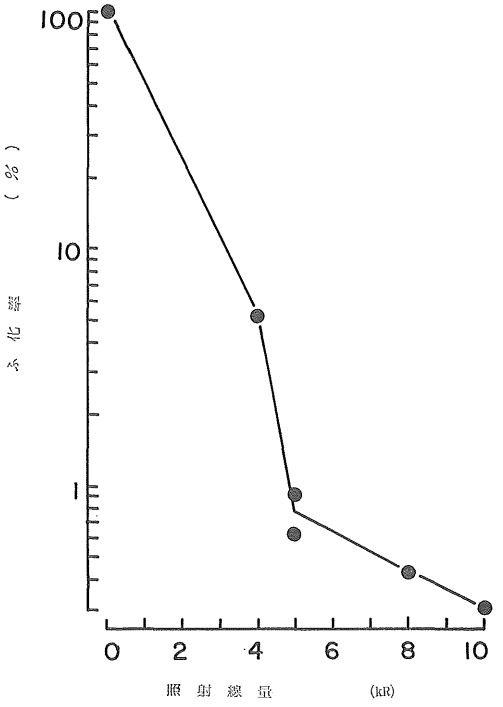


図8．雄不妊化の線量効果関係
第8日令蛹に照射し非照射雌との交配による卵のふ化率

行の防除計画では，不妊化のために8–10kRを照射する予定であり，さらに線量を高めればそれだけ実効があがると考えられている．しかし高線量の照射は，不妊化効率をそれ程高めることなく，むしろ交尾の競争力を弱める場合も考えられる[7]．なおこの実験条件では照射雌雄とも交尾行動はおこなう．

不妊化に対する分割照射の効果について，Walkerら[8]は，蜜蜂の害虫ハチノスツヅリガ *Galleria mellonella* L. で雌の不妊化を増大するが，雄には効果がないことを報告している．我々はたとえ不妊化について分割照射は効果がなくとも，性的競争力は回復できるのではないかと考えて実験した．今回は時間的制約のため十分なデーターを得ることができなかったが，ミカンコミバエ雄の不妊化は6時間以内の短時間の分割照射（5kR＋5kR）では回復は見られず，さらに長い時間々隔の分割照射によって，ようやく回復がおこなわれる可能性がある．なお産卵数には分割照射の効果はなかった．

大羽らは，同じミカンコミバエにX線を照射し，8kRでは生存率（羽化後の寿命）がいくぶん減少することを報告している[9]．

以上ミカンコミバエを用いて短時日で行い得るいくつかの実験を行なったが，放射線不妊化を効果的に実施するに際しては，発生分化の時期と対応づけつつ，最適照射条件を決定する等，放射線生物学的基礎研究がなお一層必要である．

謝辞　この研究に際して貴重な資料をお貸し下さった東京都立大学　大羽　滋先生，都立アイソトープ総合研究所　平野　正先生に感謝申し上げます．

文　献

1) 小笠原諸島ミカンコミバエ防除事業計画書，昭和50年度，東京都経済局
2) 岩橋　統，伊賀幹雄，平野哲夫：小笠原諸島におけるミカンコミバエの生態研究報告，1，1973，東京都経済局．岩橋　統，伊藤嘉照，木場　訓：科学 46，436，1976
3) 梅谷献二，関口洋一，潮　新一郎：応動昆，17，63，1973
4) 田島弥太郎：放射線細胞生物学，菅原　勉ほか編集，1968，朝倉書店，東京
5) *Sterility Principle for Insect Control or Er-*

照射卵の蛹化ならびに羽化　24時間採卵した卵にγ線を照射し，そのふ化率を調べ，さらにふ化した幼虫をその後も飼育を続けて，蛹化率および羽化率を調べた．図6に実験系統図を示し，その結果の概要を表1にまとめた．

非照射卵のふ化率は83.2%で，この卵716個から226頭の蛹が得られ，その割合は31.6%であった．その中からさらに197頭が羽化し成虫となった．すなわち卵から成虫に羽化した割合は27.5%であった．c列ならびにe列には，非照射卵から蛹化あるいは羽化したものを100%として換算した各照射線量による，蛹化率あるいは羽化率を示した．また図7Aにそれらの関係をプロットした．一方，卵期に照射された幼虫が蛹になる割合，ならびにその後蛹が羽化する割合を表1のf列とh列とに示した．非照射卵の幼虫の蛹化率は37.9%であり，蛹の羽化率は87.2%であった．この蛹化率，羽化率を100%としたときの幼虫数に対する蛹化率，あるいは蛹の数に対する羽化率はそれぞれg列，i列に示し，図7Bにそれをプロットした．卵の時期における照射により，そのふ化率は線量とともに直線的に減少し，さらにその卵の蛹化率，羽化率は，ふ化率と同様に減少する．しかしふ化することができた幼虫は，0.5-2kRの範囲の照射線量では線量依存性を示さず，ほぼ同じ割合（60-70%）で蛹化する（表1，g列，図7B白三角）．さらに蛹となったものも同様に，線量依存性を示さずに70-80%が羽化する（表1，i列，図7B白四角）．

要約するとミカンコミバエは，卵期に照射された場合，そのふ化に対して大きな影響があるが，いったんふ化することができれば，ほとんどの幼虫はその後蛹となり，成虫に羽化することができる．さらに幼虫の放射線感受性等で得られた結果等と合せて考察すると，ミカンコミバエはいずれの変態の場合も，次の変態の準備期の初期に受けたγ線照射により大きく影響を受ける．しかし変態が完了したものは続く変態がほぼ可能である．また変態準備期の後期に照射されたときには次の変態に対して極めて抵抗性を持つが，それ以降の変態において，各変態の初期に照射を受けたのと同様に大きな影響を受ける．

放射線による不妊　ミカンコミバエの防除を目的とした放射線不妊化のために，第8日令の蛹を照射する理由は，外観上休眠状態にあって一回に多量の蛹を照射できるという取扱い易さとともに，図3に示したように第8日令蛹の羽化に対する放射線抵抗性が極めて高く，10kR以内の照射ではほとんど影響を受けないという点にある．

第8日令の雌の蛹に4kR以上照射した場合，羽化後非照射雄と一緒に飼育しても，ほとんど産卵しない．雄の不妊化の結果は図8に示した．すなわち照射雄と共に飼育した非照射雌の卵のふ化率を示している．各点は約1000個の卵を計数した．線量効果曲線は，5kR以上で感受性が低下し，二相性を示す．これは第8日令の蛹の精巣中の生殖細胞が均一でないことを示し，放射線不妊化に対して抵抗性の細胞が存在するものと考えられる．現

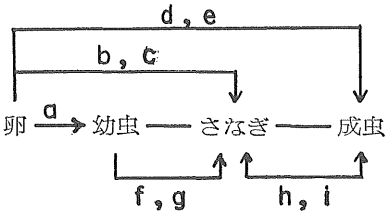


図6．蛹化ならびに羽化に対する卵照射の影響の実験図

表1．蛹化ならびに羽化に対する卵照射の影響

線量 (kR)	卵数	ふ化率 (a)	蛹 数	蛹 率 (b)	蛹 率 (c)	成虫 数	成虫 率 (d)	成虫 率 (e)	幼虫→蛹 率 (f)	幼虫→蛹 率 (g)	蛹→成虫 率 (h)	蛹→成虫 率 (i)
0	716	83.2	226	31.6	100	197	27.5	100	37.9	100	87.2	100
0.5	802	52.4	115	14.3	45.4	75	9.4	34.0	27.4	72.3	65.2	74.8
1	836	36.9	80	9.6	30.3	59	7.1	25.7	26.0	68.6	73.8	84.6
1.5	660	28.5										
2	411	16.3	16	3.9	12.3	10	2.4	8.9	23.9	63.1	62.5	71.6

a：(%) 別の実験より得たデーター
b：(蛹数/卵数) ×100 (%)
c：(照射b/非照射b) ×100 (%)
d：(成虫数/卵数) ×100 (%)
e：(照射d/非照射d) ×100 (%)
f：(蛹数/(卵数×ふ化率)) ×100 (%)
g：(照射f/非照射f) ×100 (%)
h：(成虫数/蛹数) ×100 (%)
i：(照射h/非照射h) ×100 (%)

共1.3kRであった．すなわちこの日令の幼虫の蛹化に関しては，γ線抵抗性が高いが，その蛹の羽化に関しては放射線感受性が高くなる．しかし幼虫の成熟度に関して，飼料の状態，幼虫の飼育密度のばらつきなどによって個体差があり，その点を考慮した実験方法をさらに検討すべきである．

蛹の放射線感受性　飛び出し行動の翌日を蛹の日令第1日と数えた場合，第10日令で羽化し成虫となる．各日令の蛹に種々の線量のγ線を照射し，蛹化後15日間飼育し，それぞれの羽化率を計算し，線量効果曲線を描いて，それぞれの放射線感受性を調べた．図3はその一例で，第8日令の蛹の羽化に対する線量効果関係を示す．同様にそれぞれの日令の蛹の線量効果曲線より37%羽化線量を求めて，日令との関係をプロットすると図4のようになる．すなわち第3日令までは羽化に対する放射線感受性は高く，37%羽化線量は1.2kRである．第4日令以後から放射線抵抗性は高くなり始め，第8日令の37%羽化線量は43kRである（図3，4）．また第2日令から第8日令までの蛹にそれぞれ等線量（10kR）のγ線を照射し，羽化率を調べたのが図5である．羽化率はいずれも蛹化後15日経たものについて測定しており，正常な場合には十分羽化が完了する日数である．照射蛹から羽化した成虫の中には完全に羽の延びきらないものがあり，これらを異常羽化として計数すると図5の白四角で示した曲線となる．異常羽化率は，羽化に対する放射線抵抗性が高くなり始めた4日令の蛹が最も高い．異常羽化率が蛹の特定の時期に最も高いことから，哺乳動物胎児の放射線による奇型の形成と同様，器官形成の時期と結びついている可能性がある．すなわち羽化率の放射線抵抗性が変化する時期と異常羽化の発生率が高い時期とが一致していることから羽の形成と羽化を決定する要因との間に，何らかのつながりがあるものと考えられる．

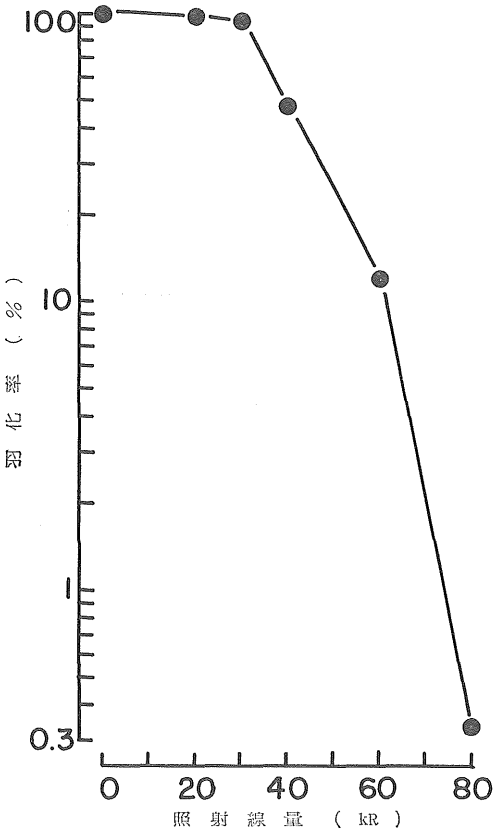


図3．第8日令蛹の放射線感受性

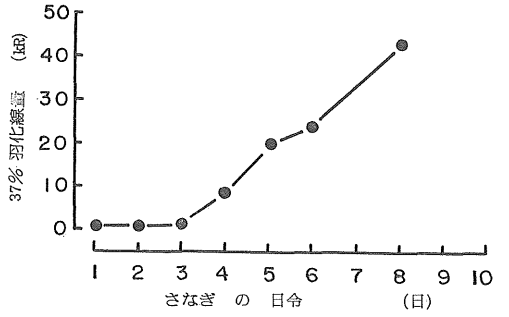


図4．蛹の放射線感受性
蛹化後の日令による37%羽化線量の変化

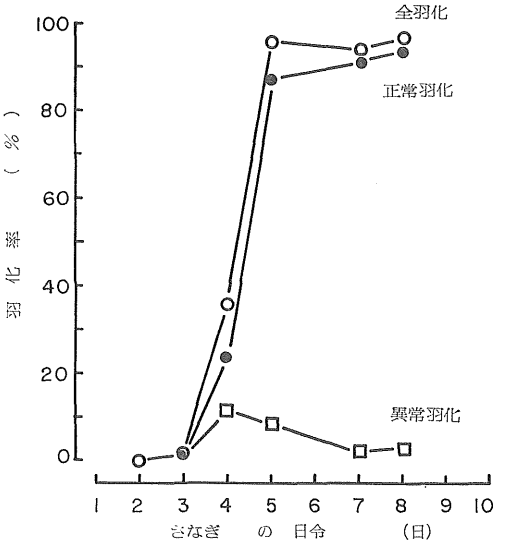


図5．蛹化後の日令による10kR照射正常羽化率と異常羽化率の変化

個の蛹と250m*l*のオガ屑を入れ，飼育する．飛び出し行動の翌日を蛹の第1日令とみなした場合，通常第10日令で羽化する．飛び出し行動後13–15日目の羽化成虫数と未羽化蛹数とから羽化率を計算した．

(7) 不妊化率の測定：8日令の蛹にγ線を照射し，2日後から羽化し始めた成虫をケージに移す．羽化3日後に雌雄を50頭ずつ分別し，同令の非照射雄または雌をそれぞれ同数ずつ入れて飼育する．羽化後14日目と16日目とに採卵管を挿入し，24時間採卵して，2回分を合わせてふ化率を測定した．

(8) γ線照射：小笠原父島害虫研究室の1300Ci, ^{60}Co–ガンマーセルにて照射，線量率は毎分1380R．

結果と考察

卵の放射線感受性　図1AならびにBは，卵のふ化に要する時間について調べたものである．8時より10時まで2時間採卵し，直ちにシャーレの中に並べて培養し，採卵後の時間を追ってふ化率を調べた．卵は産卵後32時間目よりふ化し始め（図1A），34–35時間目に1時間当りのふ化率が最高になる（図1B）．37時間後までに80%の卵がふ化する．

図2は同様に2時間採卵し，採卵後直ちにγ線を照射した場合と，24時間湿潤ろ紙上に培養した後に照射した場合との，それぞれのふ化率の放射線感受性を比較したものである．非照射卵のふ化率（85–90%）を100%に換算して図示した．産卵直後の卵は極めて放射線感受性が高く，線量効果曲線は直線で肩を持たない．この直線から読み取ることのできる37%ふ化線量（37%の卵がふ化しうるγ線の照射線量）は0.2kRである．24時間培養後の卵は，放射線に対して高い抵抗性を持つようになり，8kRでもまったくふ化率の低下がない．さらに産卵直後から順次一定の時間を経た卵に，それぞれ種々の線量のγ線を照射して，ふ化率に対する線量効果曲線をプロットし，37%ふ化線量と産卵後の経過時間との関係をまとめたのが図1Cである．産卵後12時間目まではふ化に対する放射線感受性は高く，その後の9時間で，37%ふ化線量が53kRという極めて高い放射線抵抗性を示すようになる．この時期の線量効果曲線は肩をもっている．このように肩をもつ曲線は，一般に放射線による初期損傷からの回復があるためであると考えられている[6]．短時間のうちにこれほど放射線感受性が大きく変化することは，放射線生物学的にも興味深い現象であり，この時期の発生分化との関連づけが今後の課題である．

幼虫の放射線感受性　幼虫は約8日で蛹となる．第5日令および第7日令の幼虫にγ線を照射したところ，10kRまではほぼ100%が蛹化した．さらに飼育を続け，その後の羽化率を測定して描いた線量効果曲線から得た37%羽化線量（蛹の37%が羽化しうる照射線量）は，両者

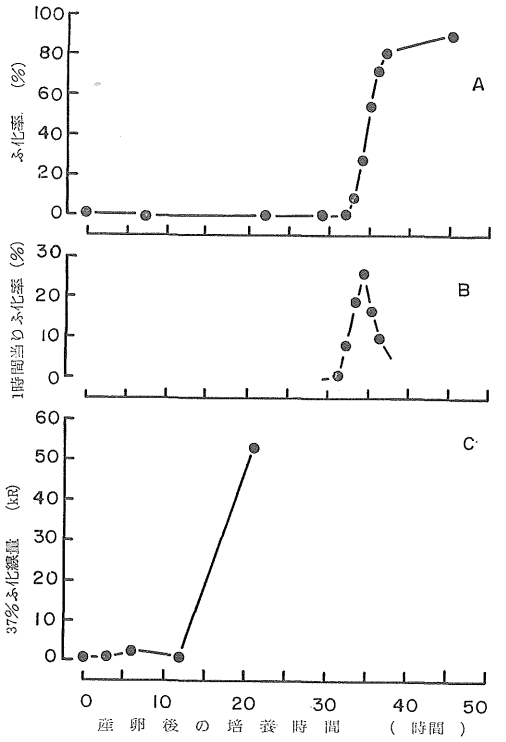


図1．卵のふ化時間と放射線感受性の変化
A：ふ化の時間的変動
B：1時間当りふ化の時間的変動
C：産卵後の時間経過による37%ふ化線量の変化

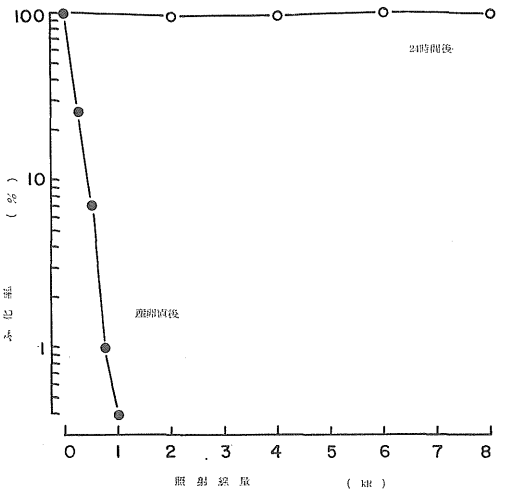


図2．卵の放射線感受性
産卵直後と24時間後に照射し，ふ化率を調べたもの

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 181-186, 1977

ミカンコミバエの不妊化に関する放射線生物学的研究

金西信次*, 土生昶毅**, 伊賀幹夫**, 渡部 真***

Radiobiological Study on the Sterility of Oriental Fruit Flies

NOBUZI KANANISHI*, NOBUTAKE HABU**, MIKIO IGA**
and MAKOTO WATANABE***

ミカンコミバエは小笠原ならびに沖縄等南西諸島に発生する害虫で，バナナ・パパイヤ・柑橘類等に寄生し，多くの被害を与えている．東京都では小笠原諸島の農業振興をはかる目的で，この害虫の撲滅を計画し，既にその一部を実施している[1]．その計画は始めに，ミカンコミバエの雄成虫がメチルオイゲノールに誘引されることを利用し，これにジブロム殺虫剤を混入して綿ロープに浸み込ませ，野外に散布して誘殺し，撲滅をはかろうとするものである．しかしメチルオイゲノールに誘引されない個体が存在する可能性があることと[2]，メチルオイゲノールが性成熟よりおくれて誘引性を持つようになることがあるために[3]，誘殺される以前にも交尾を終えている可能性がある等の理由から，この方法では完全に撲滅することはできない．この方法が占領下における小笠原において，米軍によって2回実施されたにもかかわらず，完全撲滅を期することができなかった原因もこの点にあったと考えられる．しかし従来のこの方法でひとまず集団の大きさを縮少させた後，残った集団の中に，別に飼育し，放射線で不妊化させたミカンコバエを多量に放飼し，その結果野外にいる正常な雄が交尾する以前に不妊雄が交尾することによって，子孫の再生産を低下させ，撲滅しようとする新しい方法が計画されている．

この計画では，取扱い易さから8日令の蛹を照射し，雌雄共に放飼する．その線量では照射雌は正常雄と交配しても産卵しない．雄の不妊化の原因は，染色体の転座による優性致死と一般に考えられている[4]．放射線不妊化による害虫の防除については世界各地で試みられ，いくつかの成功例を見ることができる．しかしながら撲滅に失敗した例も少くなく，多くの課題が残されている[5]．放射線不妊化に関する放射線生物学的な基礎が十分でないことも問題点の一つである．そこで我々は放射線生物学的手法を応用して，若干の実験を行なった．

材料および方法

小笠原父島の害虫研究室において飼育中のミカンコミバエ *Dacus dorsalis* HENDEL を使用した．

(1) 成虫の飼育：30×30×45cmのケージを用い，温度25±1°，湿度70—85%，日周条件として2時30分より14時30分まで12時間照明，14時30分より16時30分まで2時間薄明，16時30分より2時30分まで10時間暗黒下で飼育した．飼料はフィトン，イーストエキストラクト，黒砂糖，水である．

(2) 採卵：径 200μ 前後の多数のピンホールをもつポリチューブ（径4.5×30cm）に，レモンの小片を入れて，成虫の飼育ケージに差込み産卵させる．この採卵管の内側にピンホールを通して産みつけられた卵を水で洗い出す．

(3) 卵の飼育とふ化率の測定：シャーレの中に水に浸したろ紙および黒紙を敷き，その上に卵を並べて計数し，24±1°，湿度 80-90%，8時より9時まで1時間薄明，9時より22時まで13時間照明，22時より8時まで10時間暗黒下で飼育した．3日後に未ふ化卵並びにふ化卵を計数してふ化率を測定した．

(4) 幼虫の飼育：人工飼料（1万頭当り，イースト 50 g，砂糖 50g，紙 30g，トーモロコシ末 500g，アルコール 40m*l*，塩酸 2m*l*，水 800m*l*）を容器に入れて 2-2.5cm の厚さとし，その上に卵をまいて，前記 (3) と同一条件で飼育した．ふ化した幼虫は飼料の中に入り，成長する．

(5) 蛹の飼育：幼虫は老熟すると，餌の表面に這い出して特有の跳ね方をする（飛び出し行動）．これをオガ屑の中に受ける．幼虫はその中に潜り込み，翌日には蛹化する．この蛹を卵と同一条件で飼育した．

(6) 羽化率の測定：約 500m*l* のポリ容器に，200-300

* 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
** 東京都小笠原支庁害虫研究室
*** 東京都立アイソトープ総合研究所

結果は，PB型に近い誘導とみなされる．また，PCBの純品を用いた実験の結果[19-21]は，PB型の誘導を示しているようにみえる．以上のことから，PCB市販品による3-MC型の誘導が例外的に強い誘導物質，PCDFおよびPCDDの微量の混在によっている可能性も考えられる．

PCDFおよびPCDDは，フェノールの塩素化の過程で容易に副産物として生成するため，ポリ塩化フェノール製品中およびそれを原料とする農薬等[22]の中に，不純物として検出されている．PCDFおよびPCDDが，上述のような薬物代謝酵素の強力で，しかも典型的な3-MC型の誘導物質である事実は，今後これらの微量の不純物の検出に役立つかもしれない．

PCDF投与中止後の肝薬物代謝酵素の経時的変化を観察したが，PCB投与の場合と同様に少なくとも2週間は，高いレベルの維持が認められた．この事実は，PCDFの体内における長期にわたった残留を示しているものと思われ，PCDFの毒性を評価する上で重要な事実と考えられる．

結　論

市販PCB製品中の不純物として知られるポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）のラット肝薬物代謝酵素の誘導作用について検討した．その結果，PCDFがきわめて強力な酵素誘導物質であることが明らかにされた．10μg/kg 3日間投与によって，肝チトクロームP-450は著明に上昇した．また，本実験で用いた最高用量，1,000μg/kgの投与では，P-450は2.1倍に，*p*-ニトロアニソール（*p*-NA）・デメチラーゼ活性は3.2倍に上昇した．また，PCDFは，以下の諸点からみて，3-メチルコランスレン型の誘導物質であると推定される．(1)基質特異性の変化：*p*-NAデメチラーゼ活性は著しく上昇したが，アミノピリン・デメチラーゼ活性は全く上昇しなかった，(2)特異的阻害剤の影響：α-ナフトフラボンによって強い活性の阻害が認められた，(3)エチルイソシアニド差スペクトルの変化：455nm/430nm 比の著しい上昇が認められた．

また，PCDF（100μg/kg）3日間投与によって誘導された酵素活性は，少なくとも2週間は高いレベルを維持した．この事実は，この化合物の長期の体内残留性を示しているものと思われる．

謝辞　PCDF標品のガスクロマトグラフィーをお願いした，当研究所水質研究科，中川順一氏に感謝の意を表します．

（本研究の概要は日本農芸化学会昭和52年度大会1977年4月で発表した．）

文　献

1) Roach, J. A. G. and I. H. Pomerantz : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 338, 1974
2) Bowes, G. W., M. J. Mulvihill, B. R. T. Simoneit, A. L. Burlingame and R. W. Risebrough : *Nature*, 256, 305, 1975
3) Nagayama, J., M. Kuratsune and Y. Masuda : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 9, 1976
4) 中川順一，森田昌敏，秋山和幸，樋口育子，三村秀一：東京衛研年報，27-1，316，1976
5) Nilsson, C.-A. : *J. Chromatogr.*, 89, 325, 1974
6) Buser, H.-R. : *J. Chromatogr.*, 107, 295, 1975
7) Vos, J. G. and J. H. Koeman : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 656, 1970
8) Vos, J. G., J. H. Koeman, H. L. van der Maas, M. C. ten Noever de Brauw and R. H. de Vos : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 625, 1970
9) 川野澄江，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，179，1976
10) Omura, T. and R. Sato : *J. Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964
11) Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley : *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957
12) Allen, R. J. L. : *Biochem. J.*, 34, 858, 1940
13) Conney, A. H. : *Pharmacol. Rev.*, 19, 317, 1967
14) Mannering, G. J. : *Metabolism*, 20, 228, 1971
15) Nebert, D. W., J. R. Robinson, A. Niwa, K. Kumaki, and A. P. Poland : *J. Cell. Physiol.*, 85, 393, 1975
16) Poland, A. and E. Glover : *Mol. Pharmacol.*, 9, 736, 1973
17) Poland, A. and E. Glover : *Mol. Pharmacol.*, 10, 349, 1974
18) Alvares, A. P., D. R. Bickers, and A. Kappas : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1321, 1973
19) Goldstein, J. A., J. D. McKinney, G. W. Lucier, P. Hickman, H. Bergman, and J. A. Moore : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 81, 1976
20) Johnstone, G. J., D. J. Ecobichon, and O. Hutzinger : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 66, 1974
21) 藤田節治，辻　宏，加藤敬太郎，佐伯清太郎，塚元久雄：福岡医誌，62，30，1971
22) Kimbrough, R. D. : *Arch. Environ. Health*, 25, 125, 1972

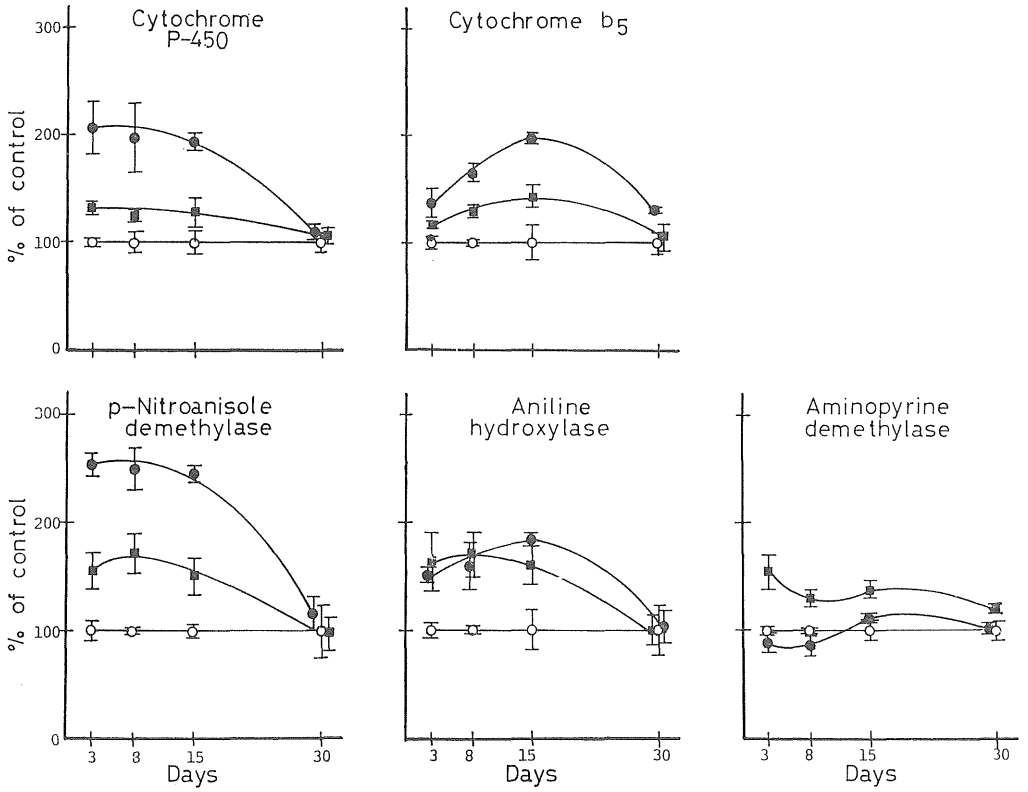


Fig. 4. Time Course of Induction of Microsomal Hemoproteins and Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Liver after Administration of PCDFs and PCBs

After administration of PCDFs (100μg/kg), PCBs (100mg/kg) or solvent (olive oil) alone i. p. on day 0, 1 and 2, the animals were killed on day 3, 8, 15 or 30. Each point represents the mean for 4 animals. ○, Control; ●, PCDFs; ■, PCBs.

もどった．アニリン・ヒドロキシラーゼおよびチトクローム b_5 は，2週間にわたって徐々に上昇し，対照の約2倍に達したのち減少しはじめ，4週間では対照と差がなくなった．APデメチラーゼ活性には，4週間の間それほど大きな変化は認められなかった．

PCBの投与では，PCDFの投与と異なり，すべての成分のほぼ一様な上昇が起り，この上昇は少なくとも2週間持続したのち，4週間目までにほぼ対照レベルにもどった．

考　察

本実験の結果，PCDFが肝薬物代謝酵素のきわめて強い誘導物質であることが示された．その誘導能力は，従来知られている強力な誘導物質，3-MCの約200倍，PCB（KC-500）の約1,000倍と推定される．このような強力な誘導能力は，ほかには，3-MCの30,000倍の強さをもつと言われる[16,17] PCDDが知られているだけである．

また，PCDFによって誘導された酵素は，以下の諸点において3-MCによって誘導された酵素にきわめてよく類似している．すなわち，(1)基質特異性：*p*-NAの脱メチル化活性はきわめて強いが，APの脱メチル化活性は弱い，(2)阻害剤の影響：α-ナフトフラボンによる特異的阻害，(3)エチルイソシアニド差スペクトル：455nm/430 nm比の著しい増大の諸点である．

PCDDとPCDFは，互に構造的に類縁関係にあるだけでなく，薬物代謝酵素の誘導作用（誘導能力の驚異的な強さおよび3-MC型の誘導様式[17]）においても，共通の性質を示している．

PCBの誘導様式に関しては，現在まで結論が出されていない．Alvaresら[18]は，市販PCB製品（Aroclor 1254）によって誘導されたP-450は，PB型とも3-MC型とも異なる別種のものか，それとも両型のP-450の混合物であろうと示唆している．本実験のKC-500を用いた

ゼ活性を著しく増大させたが，後者の増加は，前者のそれをはるかに上まわった．1,000μg/kg の投与で，前者は対照の2.1倍，後者は3.2倍の最高値を示した．一方，チトクローム b_5 含量およびアニリン・ヒドロキシラーゼ活性は，最小投与量 1μg/kg でも明らかな上昇を示したが，投与量との関係は明確でなく，投与量をそれ以上ふやしてもあまり大きな上昇は認められなかった．また，アミノピリン(AP)・デメチラーゼ活性には，上記成分の増加とは逆に，投与量の増加に伴なって活性の低下が認められ，1,000μg 投与時の活性は，対照の59%にすぎなかった．

II. 基質特異性の比較 薬物代謝酵素の誘導物質は，二つのグループに大別されると言われる[13,14]．その一つは，PB によって代表されるもので，非常に多くの化合物を基質とする．もう一つは，3-MC によって代表されるもので，比較的わずかの化合物を基質として用いる．Fig. 2では，PCDF によって誘導された酵素の基質特異性を，典型的誘導物質，PB，3-MC，PCB によって誘導された酵素のそれと比較した．

4種の誘導物質は，いずれもP-450 含量を著明に増大させた．PB および PCB によって誘導された酵素は，*p*-NA，アニリン，APのいずれを基質としたときにも，活性の著しい上昇を示した．一方，PCDFおよび3-MC によって誘導された酵素の場合には，*p*-NA デメチラーゼ活性は著しく増大したが，アニリン・ヒドロキシラーゼ活性の上昇はそれほど大きくなく，AP デメチラーゼ活性には全く変化が認められなかった．

III. 阻害剤の影響 3-MC によって誘導された酵素（ベンツピレン・ヒドロキシラーゼ）は，阻害剤に対する感受性に関しても，誘導前の酵素とは非常に異なっていると言われる．すなわち，α-ナフトフラボンの場合には，前者は後者の 100 倍以上も阻害を受けやすいのに別の阻害剤，メチラポンの場合には，逆に，後者の方が強く阻害されると言われる[15]．

そこで，上記の4種の化合物によって誘導された *p*-NA デメチラーゼ活性に及ぼす両阻害剤の影響について検討を行った（Table 2）．PCDF および 3-MC によって誘導された酵素は，10^{-4}M のα-ナフトフラボンによって約70%の阻害を受けたが，対照およびPBまたは PCB によって誘導された酵素は，20—40%阻害されたにすぎなかった．一方，低濃度（10^{-4}M）のメチラポンは，後者の活性は20%以上阻害したが，前者の活性は10%以下の阻害を示したにすぎなかった．

IV. エチルイソシアド差スペクトル エチルイソシアニドは，還元型のチトクローム P-450 と結合し，430nm と 455nm に2つのピークをもつ差スペクトルを生じる．3-MC によって誘導された P-450 は，455nm のピークが著しく上昇し，455/430 のピーク比が増大すると言われる[14]．そこで，上記の4種の化合物によって誘導された酵素のエチルイソシアニド差スペクトルを Fig. 3 に示した．対照，PB および PCB によって誘導された P-450 の 455/430 比は，それぞれ，0.32, 0.31, 0.44といずれも小さいが，3-MC および100μg，1000μg の PCDF によって誘導された P-450 の 455/430 比は，それぞれ 0.92, 0.99, 1.14 と著しく高い値を示した．

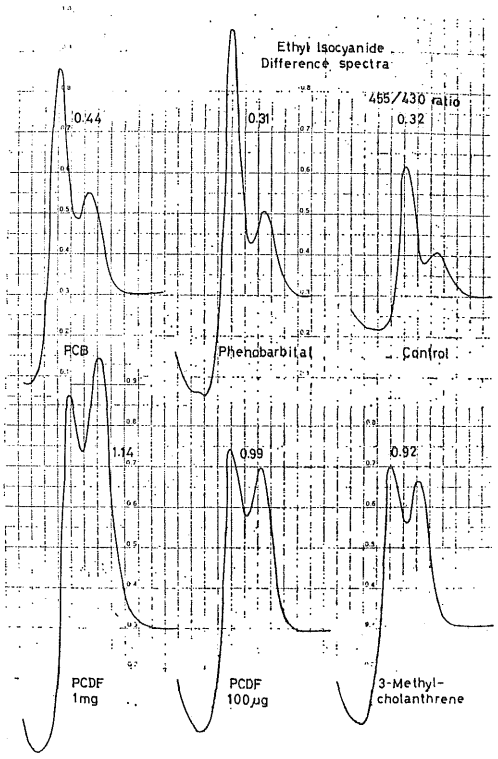


Fig. 3. Microsomal Ethyl Isocyanide Difference Spectra in Liver of Rats Administered with PCDFs, PCBs, PB or 3-MC

Treatment is described in the legend to Fig. 2. Numbers in the figure mean 455nm/430nm peak ratios of ethyl isocyanide difference spectra.

V. 投与中止後の酵素活性の経時的変化 PCDF (100 μg/kg) または PCB (10mg/kg) を3日間投与し，その後の活性の変化を追跡した(Fig. 4)．PCDF の投与では，チトクローム P-450 レベルおよび *p*-NA デメチラーゼ活性はすみやかに上昇し，8日目に，それぞれ，対照の2.2倍および2.8倍の最高値に達した．この上昇は，約1週間持続したのち減少しはじめ，4週間で対照レベルに

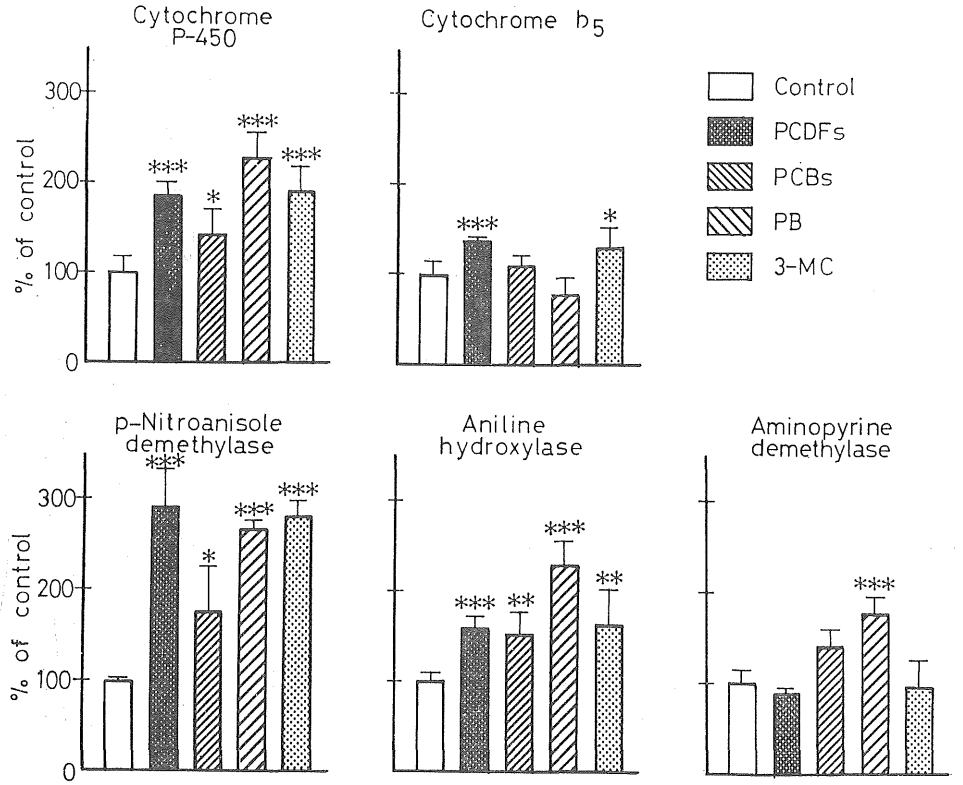


Fig. 2. Comparative Effects of PCDFs, PCBs, PB and 3-MC on the Induction of Microsomal Hemoproteins and Drug-Metabolizing Enzymes

Rats were administered i. p. with PCDFs (100μg), PCBs (KC-500, 10mg), PB (60mg) or 3-MC (20mg/kg/day) for 3 days. Each bar and vertical line represent mean and SD from 5 animals, respectively. Measurements were divided by the mean of the control values, and the mean and SD of each group was calculated from these values. Values are significantly different from respective control values, *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$. Control values are as follows: cytochrome P-450, 1.02 *n* moles/mg of microsomal protein: cytochrome b_5, 0.41 *n* moles/mg of microsomal protein: *p*-nitroanisole demethylase, aniline hydroxylase and aminopyrine demethylase, 13.6, 8.34 and 94.6 *n* moles of formed metabolite per mg of microsomal protein for 10 min, respectively.

Table 2. Effects of α-Naphthoflavone and Metyrapone *in vitro* on *p*-Nitroanisole Demethylase in Liver of Rats Administered with PCDFs, PCBs, PB or 3-MC

Treatment T	Percent Inhibition					
	α-Naphthoflavone			Metyrapone		
		10^{-5}M	10^{-4}M		10^{-4}M	10^{-3}M
Control	(11.8)	4.1±2.5	20.2±0.3	(12.3)	20.4±1.5	44.0±1.6
PCDFs (100μg)	(34.8)	28.5±3.7	68.3±0.8	(33.9)	8.5±1.9	58.3±1.3
PCBs (10mg)	(22.3)	11.9±7.6	33.8±7.8	(21.1)	26.1±3.6	54.8±0.2
PB (60mg)	(37.9)	4.2±3.7	22.2±5.7	(37.5)	23.7±1.4	56.1±1.8
3-MC (20mg)	(42.6)	58.0±14.8	72.4±3.5	(42.6)	9.6±5.7	55.5±5.4

Treatment is described in the legend to Fig. 2.
Each value represents mean±SD from 2 animals.
Valuesin parentheses are the mean rates of *O*-demethylation in *n* moles per mg of microsomal protein per 10 min, when inhibitors are absent.

Table 1. Effects of PCDF Treatment on Body Weight and Some Hepatic Components

Dose	Body weight		Liver weight	Hepatic component (mg/g liver)		
(μg/kg)	Initial (g)	Final (g)	g/100g body weight	Protein	Microsomal protein	Phospholipids
Experiment 1						
0	118±4.4	142±9.6	6.83±1.05 (100)	193±5.7 (100)	24.3±2.2 (100)	
1	106±1.0	126±7.0	6.27±0.40 (92)	194±5.0 (101)	24.0±1.2 (99)	
10	114±4.8	137±7.1	7.18±0.49 (105)	189±10.2 (98)	27.0±1.1 (111)	
Experiment 2						
0	140±9.7	159±9.1	7.62±0.63 (100)	181±5.5 (100)	24.2±1.4 (100)	28.3±1.1 (100)
100	140±20.3	163±17.7	9.67±0.83** (127)	173±11.1 (96)	23.0±2.2 (95)	29.3±1.3 (104)
1000	140±21.1	158±17.8	9.33±1.28* (122)	174±1.9* (96)	19.8±2.3** (82)	30.8±1.8 (109)

Rats were administered with 0, 10, 100 or 1000μg/kg of PCDFs per kg of body weight per day for 3 days. Each value represents mean±SD from 3 (1 μg group) or 5 animals. Values in parentheses are percentages of control values. Values are significantly different from control values, *$P<0.05$, **$P<0.01$.

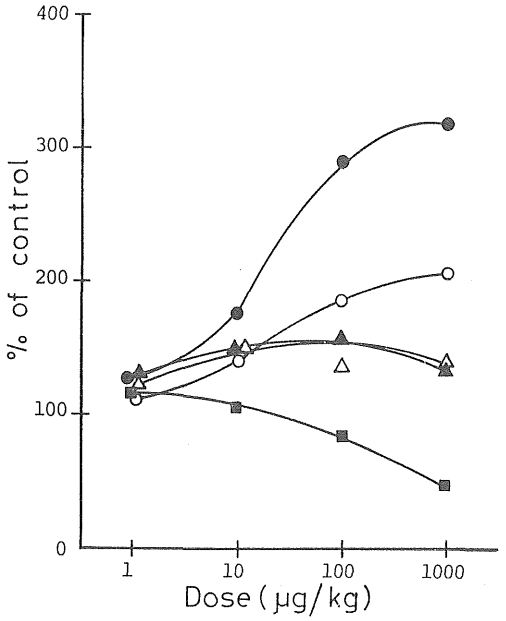


Fig. 1. Log Dose-response Curves for Induction of Microsomal Hemoproteins and Drug-Metabolizing Enzymes by PCDFs

Treatment is described in the legend to Table 1. Control values of the lower (1 and 10μg) and the higher (100 and 1000μg) dose groups are as follows: cytochrome P-450, 0.87 and 1.02 *n* moles/mg of microsomal protein; cytochrome b_5, 0.37 and 0.41 *n* moles/mg of microsomal protein; *p*-nitroanisole demethylase, 13.9 and 13.6 *n* moles of formed *p*-nitrophenol/mg of microsomal protein/10min; aminopyrine demethylase, 90.7 and 94.6 *n* moles of formed formaldehyde/mg of microsomal protein/10min; aniline hydroxylase, 6.62 and 8.34 *n* moles of formed *p*-aminophenol/mg of microsomal protein/10 min, respectively. Each point represents the mean for 3 (1μg) or 5 animals. ○, Cytochrome P-450; △, cytochrome b_5; ●, *p*-nitroanisole demethylase; ▲, aniline hydroxylase; ■, aminopyrine demethylase.

実験結果

I. 用量・作用関係 Table 1 に 1—1,000 μg/kg の PCDF を3日間腹腔内投与したときの体重，肝重量，肝臓タンパク含量，ミクロソーム・タンパク含量，フォスフォリピッド含量の変化を示した．PCDFの投与によって体重には変化が認められなかったが，肝重量には 100μg 以上の投与で著明な増加が認められた．肝臓成分—タンパク含量，ミクロソーム・タンパク含量，フォスフォリピッド含量—にはそれほど大きな変化は認められなかった．

PCDF 投与による肝ミクロソーム・ヘムタンパク含量および肝薬物代謝酵素活性の変化を Fig. 1 に示した．PCDF は，投与量の増大とともにチトクローム P-450 レベルおよび*p*-ニトロアニソール(*p*-NA)・デメチラー

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 175-180, 1977

ポリ塩化ジベンゾフラン—ラット肝薬物代謝酵素の強力な誘導物質

川野澄江*, 平賀興吾*

Polychlorinated Dibenzofurans— Potent Inducers of Rat Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes

SUMIE KAWANO* and KOGO HIRAGA*

市販ポリ塩化ビフェニール（PCB）製品中には，微量のポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）が不純物として存在している[1-4]．また，カネミ油症の原因になったライスオイル中に，特に高濃度の存在が確認されたことから[3,4]，カネミ油症の真の原因物質ではないかとの疑いももたれている．また，塩素化フェノール中にも高濃度の存在が知られるようになり[5,6]，関連物質，ポリ塩化ジオキシン（PCDD）とともに，フェノールの塩素化の過程で容易に副産物として生成されるものと推定される．しかしながら，この化合物の毒性に関しては，Vos ら[7,8]によって，きわめて強い毒性が示唆されてはいたものの，現在までほとんど検討されていない．

生活環境における強毒性化合物，PCDFのこのような広範な存在は，産業衛生上，公衆衛生上からみて重大な問題であると考えられる．そこで，今回，われわれは，その毒性に関して，肝薬物代謝酵素の誘導作用を中心として検討を行った．その結果，PCDFがきわめて強い酵素誘導物質であること，また誘導された酵素の性質が3-メチルコランスレン(3-MC)によって誘導された酵素のそれに非常によく似ていることが明らかにされた．

実験材料および方法

I. 試薬 PCDF標品は，和光純薬工業製，試薬1級品（Lot 16-839）で，ガスクロマトグラフィーによって，四塩化物12.0%，五塩化物88.0%の混合物であることを確かめた．PCB標品は，鐘ヶ淵化学製，カネクロール（KC)-500を使用した．3-MCは東京化成工業の製品，フェノバルビタール（PB）は三晃製薬工業の日本薬局方品を使用した．

エチルイソシアニドは，Sigma Chemical Company から購入し，蒸留して使用した．阻害剤，α-ナフトフラボンおよびメチラポンは，それぞれ，東京化成工業および Aldrich Chemical Company から購入した．その他の試薬に関しては，昨年の年報[9]に記載した．

II. 実験動物および投与方法 動物は，Wistar-JCL系雄ラット，5週令，体重105—165gを使用した．PCDFは，オリーブ油に溶かし，1, 10, 100または1,000μg/kgの投与量で1日1回，3日間にわたって腹腔内に投与した．PCBは10mg/kg，PBは60mg/kg，3-MCは20mg/kgの投与量で，同様な経路で投与を行った．特に記載のない場合には最終投与後，約24時間目に動物を殺して肝ミクロソーム分画を調製した．

III. 酵素活性の測定法 肝ミクロソーム分画の調製法および薬物代謝酵素の活性の測定法に関しては，昨年の年報[9]に記載した．反応溶液の組成は，NADP 0.8mM，グルコース-6-リン酸 4 mM，ニコチンアミド 5 mM，$MgCl_2$，5 mM，グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ 0.2U/ml，リン酸緩衝液（pH 7.4）56mM，EDTA 0.14 mM，肝臓50mgに相当するミクロソーム分画および基質（*p*-ニトロアニソール1.2mM，アミノピリン 4 mM またはアニリン 0.5mM）からなり，37°で 10分間反応を行わせた．

IV. 差スペクトルの測定 チトクロームb_5含量は，ジチオナイト還元型および酸化型のミクロソームの差スペクトルから，波長425nmと490nmの間の分子吸光係数を171$mM^{-1}cm^{-1}$として計算した．チトクロームP-450含量は，Omura and Sato[10]の方法に従い，ジチオナイト還元型ミクロソームのCO差スペクトルから，波長450nmと490nmの間における分子吸光係数を91$mM^{-1}cm^{-1}$として計算した．pH 7.0におけるエチルイソシアニド差スペクトルは，COガスを通気するかわりに3.45mMのエチルイソシアニドを添加して同様に吸収スペクトルをかかせた．

V. 肝フォスフォリピッドの定量 Folchら[11]の方法に従って抽出し，過塩素酸で灰化後，生じたリン酸をAllenら[12]の方法で定量し，25を乗じて，フォスフォリピッド含量とした．

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

ラットについては Fullerton[7] らおよび McCollister[4] らの報告がある．前者は飼料中にアクリルアミドを混入して投与し，1日15—30mgの投与量で総投与量420—630 mg/kg，10—14mgでは約1,000mg/kg，6—9mgで2,100 mg/kgで後肢の運動障害を観察した．後者もほぼ同様な経過を得ている．ラットの場合は，高投与量（15—30 mg）では，一定の総投与量で後肢の運動障害が起ると考えられるが，この値はサルと比較するとやや大きいと思われる．しかしながら，低投与量（6—14mg）では，発症までに長期間を要し総投与量は著しく増大した．

本実験および他の研究者の実験結果[4-6]からみて，アクリルアミドによる運動障害ならびに腱反射の消失は，1日の投与量の多少にかかわらず，一定の総投与量に達したときに発生するものと思われる．Hashimoto[8] らによる^{14}C-アクリルアミドの体内分布，排泄に関する実験結果からみると，アクリルアミドは，初期の排泄は比較的速いが，総投与量の30%程度は長期にわたって体内に残留していると考えられる．また，座骨神経，脊髄，血球中に多く分布し，しかも，これらの組織からの減少は遅いとみられる．総投与量と発症との関係は，以上に述べたアクリルアミドの蓄積性によって説明されるかもしれない．

本実験では，1日の投与量が多い場合（20mg，10mg）には，明らかに後肢の障害が早く現われ，腱反射の消失はそれよりかなり遅れて発生した．一方，1日の投与量が3mgと低い場合には，後肢の障害は全くみられずに，腱反射の消失のみが認められた．アクリルアミドによる神経障害は，末梢神経および脊髄の変性に起因する[5,9,10]と言われ，その発症機序としては，アクリルアミドの神経タンパクとの結合，axonal flow の障害への進展が有力視されている．腱反射の消失は，このような末梢神経および脊髄の変性に起因する後肢の障害とは別の機作によっている可能性も考えられる．また，3mgという低濃度で発症したことは，作用部位におけるアクリルアミドの特異的蓄積を示すのかもしれず，さらに低い濃度におけるより長期にわたった実験が必要とされる．

要　約

アクリルアミドによる，腱反射の消失および運動障害についてサルを用いて検討した．20および10mg投与では，最初に後肢の運動障害が発症し，ほぼ同じ時期に体重の減少がみられ，1—3週間後に前肢の運動障害，腱反射の消失が観察された．この時点で，投与を中止もしくは10mgを3mgに変更して回復過程を観察した．投与を中止すると体重，前・後肢の障害および腱反射は徐々に回復した．一方3mg投与を続けると体重，前肢には回復がみられたが，腱反射および完全な後肢の回復は認められなかった．

20および10mgでは総投与量240—320mgで後肢の運動障害がみられたが，3mgでは認められなかった．20，10および3mgでは総投与量310—432mgで腱反射の消失が観察された．

文　献

1) 藤田篤雄，柴田　貢，中沢恒幸ら：日医新報，1869，37，1969
2) 橋本和夫：医学のあゆみ，70，250，1969
3) Garland, T. O. and M. W. H. Patterson : *Brit. Med. J.*, 4, 134, 1967
4) McCollister, D. D., F. Oyen, and V. K. Rowe: *Toxicicol. Appl. Pharmacol.*, 6, 172, 1964
5) Hopkins, A. : *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 33, 805, 1970
6) Kuperman, A. S. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123, 180, 1958
7) Fullerton, P. M. and J. M. Barnes : *Brit. J. Industr. Med.* 23, 210, 1966
8) Hashimoto, K. and W. N. Aldridge: *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2591, 1970
9) Prineas, J. : *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 28, 598, 1969
10) Suzuki, K. and L. D. Pbabb : *Acta Neuropath.*, 24, 197, 1973
11) Pleasure, D. E., K. C. Mishler, and W. K. Engel : *Science*, 166, 524, 1969

すみやかに体重の増加がみられ，20mgでは8—12週目，10mg では15—23週目に投与時の体重に回復した．

10mg から3mg に投与量を変更した場合にも，投与を中止した場合と同様な体重の回復が観察された．

3mg 投与では，徐々に体重の増加が観察された．

III. 後肢の障害および膝蓋腱反射の消失と総投与量との関係 後肢の運動障害および腱反射の消失と総投与量との関係を Table 2 に示した．

20mg 投与では総投与量 240—260mg/kg，15—16日，10mg および 10mg から 3mg に変更した群では240—320 mg/kg，30—45日とほぼ一定の総投与量で後肢の運動障害の発症が観察された．しかしながら，3mg投与では実験終了時（総投与量777mg）まで後肢の障害は観察されなかった．

次に，腱反射の消失と総投与量との関係をみると，10 mgおよび10mgから3mgに変更した群の6頭では，総投与量310—423mg/kg，44—57日で腱反射の消失が認められた．3mgから10mgに変更した群では，432mg/kg，91日，3mg投与群では，345mg/kg，157日の投与で腱反射の消失が観察された．20mg 投与群では，腱反射の消失より前肢の運動障害が先に発症し投与を中止したために，腱反射消失までの投与量ではないが，340mg/kg，35日で腱反射の消失を認めた．

以上の結果から，1日の投与量にかかわらず，総投与量約300—450mg/kgで腱反射の消失が起きるものと推定される．一方，投与中止後の腱反射の回復は，発症に要した総投与量と関係していなかった．

IV. 血漿生化学的および血液学的検査 血漿生化学的検査の，TP，GLU，UN，CHE，CHO については，特に変化が認められなかった．GOT，GPT では測定時におけるばらつきが非常に大きくて変動の有無を判定できなかった．ALP には投与後，数例に活性値の低下の傾向を認めたが，投与期間中および中止直後の採血回数が少なく結論は下せない．

血液学的検査の RBC，Hb，Ht には異常が認められなかったが，WBC では投与直後に数例に減少の傾向がうかがえた．投与期間中および投与直後の採血回数をもっと多くして，さらに検討を続ける必要がある．

考　察

アクリルアミドをサルに投与した報告は Hopkins[5] と McCollister[4] らの2例がある．前者はヒヒを用いて果物中にアクリルアミドを注入して投与し，総投与量 320—680mg/kgで後肢の運動障害，480—1,100mg で前肢の運動障害，910—1,640mg で腱反射の消失を認めている．また，後者はサルに強制投与し，総投与量410mg で後肢の運動障害を観察している．

本実験では総投与量 260—342mg/kg で後肢の運動障害，340—670mg で前肢の運動障害，340—432mg で腱反射の消失を観察した．諸症状の発症，腱反射の消失にいたるまでの総投与量における Hopkins との差は，本実験では確実に胃内に投与したのにたいして，彼らは果物にアクリルアミドを注入して投与を行っているため，果物のこぼしなどがあり，アクリルアミドの損失があったためではないかと推測される．

ネコを用いて，アクリルアミドを投与した報告は McCollister[4] らと Kuperman[6] ら2例がある．前者は飼料中にアクリルアミドを混入して投与し，1，3 および10mg の投与量で総投与量105—200mg/kgで後肢の運動障害を認めている．後者は腹腔および静脈内投与し，1—50mg の投与量で総投与量 73—132mg/kg で，運動失調を認めている．本実験のサルと同様にネコも一定の総投与量で運動失調が発症すると，考えられるが，サルと比較してネコはアクリルアミドに対する抵抗性が弱いと推測される．

Table 2. Cumulative Dose Before Hindlimb Signs Appeared or Knee Jerks Disappeared

Monkey		11	14	5	16	6	17	10	19	18	9
Daily dose (mg/kg)		20	20	10	10	10	10	10→3*	10→3*	3	3→10
Appearance of hindlimb signs	Day	15	16	37	37	38	45	30	38	None	78
	Cumulative dose (mg/kg)	240	260	290	290	270	320	240	300	(777)	348
Disappearance of knee jerks	Day	35	35	44	56	44	54	45	57	157	91
	Cumulative dose (mg/kg)	340	340	340	420	310	390	329	423	345	432
Day knee jerks recovered		91	91	165	147	177	162	None	None	—	—

* In monkeys No. 10 and No. 19 the daily dose of acrylamide was changed from 10mg to 3mg on the days 40 and 54, respectively

と金網を登った.

20mg 投与では, 腱反射の消失する前に前肢の障害の発症が観察された. なお, このサルは3週目には全くケージ内で動けず, 1日中横臥しており, 餌も食べられない状態になったため, カテーテルを用いて強制的に給餌した.

3mg投与では, 後肢および前肢の運動障害は観察されなかったが, 投与13週頃から腱反射が徐々に弱まり, 22週で全く消失した.

2. 回復過程 前肢の運動障害が発症した時点で, 投与を中止または10mgから3mg へ変更し, 症状の回復を観察した. 上記の症状が1—2週間続いたのちにサルは回復のきざしをみせ, 体重の増加, ケージ内での正常な行動, 腱反射の出現という順序で, 徐々に回復した.

20mg投与群では, 投与中止後4週頃から正常な行動, 10週頃から腱反射の出現が観察された.

10mg 投与群では10—16週頃から正常な行動, 14—16週頃から腱反射の出現が観察された.

10mgから3mgに投与を変更した群では, 変更後8—10週頃から体重の回復, 症状の軽快が観察された. しかしながら, 後肢の完全な回復はみられず, 少しぎこちなさが残り, 正常な行動, 腱反射の出現は45—47週にいたっても観察されなかった.

表には示さなかったが, 耳介反射, 眼瞼反射, 瞳孔反射, バビンスキー反射, 瞳孔径, 音および人に対する反応, 呼吸および脈拍の諸検査を試験期間を通して行ったが, 特に異常は認められなかった.

No. 19のサルは, 大腿および下腿部の筋肉の退縮を示し, また下肢が屈曲したまま固定して, 元の状態にもどらなくなった. しかし, これをX線でみても骨には異常を認めなかった. また, 座わっている時の姿勢を観察すると, 胸椎・腰椎の部分が, 少し腹側にわん曲しているようであった.

II. 体重の変化 体重変化を Fig. 2 に示した. 20mg および 10mg 投与群では, 大部分のサルが3—7週目に体重の急激な減少を示した. 投与を中止しても, さらに減少が続き, 中止後2—4週で最低値を示し, 投与前と比べて12—23%の減少であった. この時期以後, 比較的

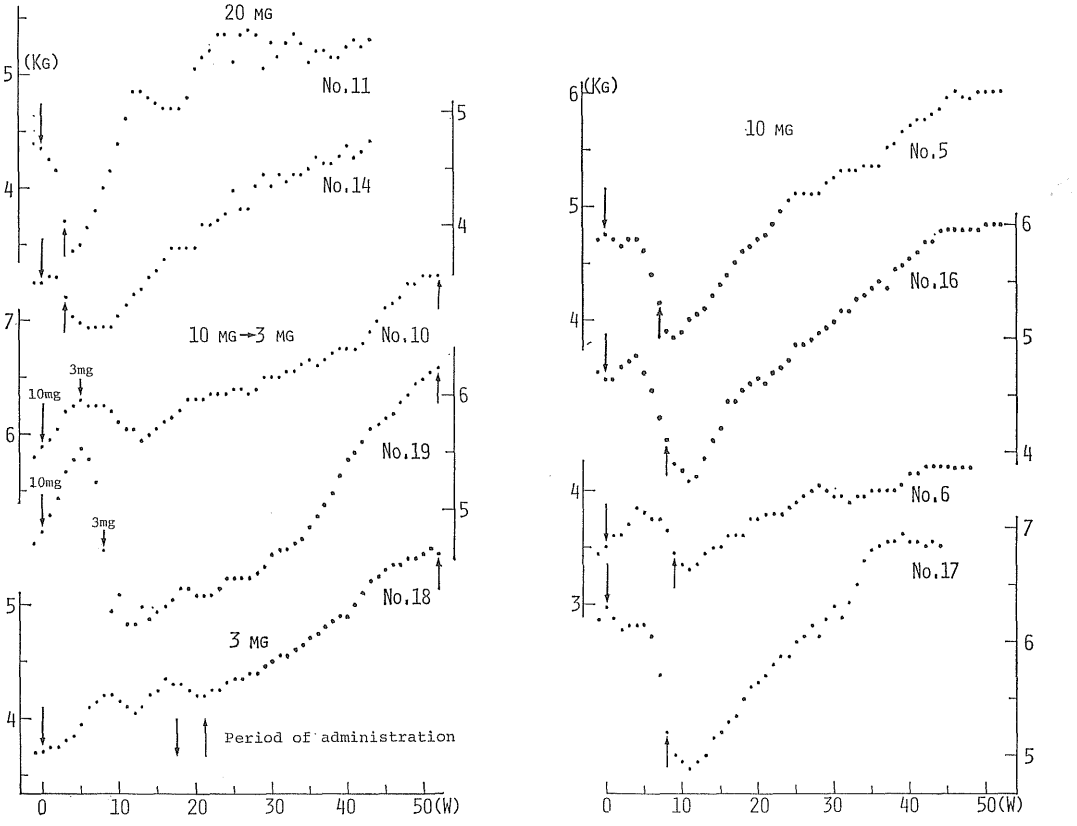


Fig. 2. Body Weight Changes in Monkeys Administered with Acrylamide.

Table 1. Summary of Main Features of Clinical Illness of Monkeys Intoxicated by Acrylamide*

Monkey	11	14	5	16	6	17	10	19	18	9
Sex	F	F	M	M	M	M	M	M	M	M
Daily dose(mg/kg)	20	20	10	10	10	10	10→3**	10→3**	3	3→10
Duration of administration(days)	19	19	46	53	62	54	39→329**	53→315**	368	43→48
Cumulative dose(mg/kg)	340	340	370	420	460	400	1001	1071	777	442
Initial body weight(kg)	4.4	3.5	4.7	4.7	3.5	6.3	5.9	4.7	3.7	3.6
Intoxication										
Onset of hindlimb signs	15	16	37	37	38	45	30	38	None	98
Commencement of body weight loss	17	17	35	35	70	42	64	45	None	78
Absence of knee jerks	35	35	44	56	44	54	45	58	156	91
Onset of forelimb signs	21	21	56	50	61	53	67	64	None	None
Lying position	21	21	None	None	None	None	None	None	None	None
Recovery										
Recovery from lying position	23	23	—	—	—	—	—	—	—	—
Commencement of body weight loss	29	70	71	85	85	94	109	105	—	—
Normal behavior	46	46	155	154	148	127	None	Nono	—	—
Recovery of knee jerks	91	91	165	147	177	162	None	None	—	—

* The numbers tabulated represent days after beginning administration of acrylamide

** In monkeys No. 10 and No. 19 the daily dose of acrylamide was changed from 10mg to 3mg on the day 40 and 54, respectively

捕捉後モンキー・チェアーに固定し，膝蓋腱反射（以下腱反射と略す），耳介反射，眼瞼反射，瞳孔反射，バビンスキー反射，瞳孔径，音および人に対する反応，呼吸および脈拍の検査を実施した．検査後，体重を測定した．

2. 血漿生化学的および血液学的検査 血漿生化学的および血液学的検査は毎月1回行った．ヘパリン処理したシリンジを用いて股静脈より約5 m*l* を採血した．

血漿生化学的検査としては，GOT (Reitmen–Frankel 法)．GPT (Reitmen–Frankel 法)，アルカリフォスファターゼ (ALP, Kind–King 法)，コリンエステラーゼ (CHE. *4*pH法)，総タンパク量 (TP, Biuret法)，グルコース (GLU, Glucose–oxidase)法，尿素窒素 (UN, Urease–indophenol 法)，コレステロール (CHO, Liberman–Burehard 法) を日立自動分析装置 M—400にて測定し，血液学的検査としては赤血球数 (RBC)，ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット (Ht), 白血球数(WBC) を Coulter Counter Model S にて測定した．

結　　果

I. 一般臨床症状 アクリルアミド投与時ならびに投与中止後の回復期にみられたサルの一般臨床疾状の概要を Table 1 に示した．

1. 発症過程 アクリルアミド投与前のサルは，扉を開けると，ケージのとまり木から反対側の金網に勢いよく跳びつき，Fig. 1 に示した捕捉場所を俊敏な動作（とびはねるように動く）で逃げまわる．

20mgおよび10mg のアクリルアミドの投与でみられる初期の特徴的変化は後肢の運動失調であった．最初の徴候は，実験者が捕捉場所でサルを捕捉する時にみられる後肢のふらつきと，逃げる時の動作のやや緩慢な動きとして観察された．上記の症状が発生するまでの投与期間は，20mgでは約2週，10mgでは4—6週であった．さらに，投与を続けると跳躍力が減退し，しばしば顔面を金網にぶつけるようになり，また金網を伝わって逃げる時に後肢を交叉させるようになった．さらに症状が進行すると，もはや反対側の金網には跳びつけず，扉をゆっくり伝わるようにしてケージから外に出て，金網を伝い歩きするようになった．

大部分のサルは，この時期になって，体重の急激な減少を開始したが，少数のサルはこれより1ヶ月以上もおくれて，体重の減少を示した．

10mg投与では，後肢の運動失調から1—3週間後に，腱反射の急激な減少が起り，数日後には全く消失した．前肢は後肢に比べて障害をうけにくく，後肢の障害が認められてから2—3週間後にはじめて観察された．この時期になると，サルは床の上をゆっくりとした動作で逃げまわるようになり，サルを追いかけて強制的に金網を登らせると，前・後肢をゆっくりと動かして，よろよろ

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 170-174, 1977

アカゲザルにおけるアクリルアミドの毒性

井口重孝*, 川野澄江*, 高橋 博*, 平賀興吾*

Toxicity of Acrylamide in Rhesus Monkeys

SHIGETAKA IGUCHI*, SUMIE KAWANO*, HIROSHI TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

アクリルアミドポリマーは合成樹脂，合成ゴム，合成繊維，染色糊料，接着剤，写真材料，紙質増強剤として広く利用され，また最近凝集剤として廃水処理などへの利用が有望視されている．過去において，アクリルアミドポリマーは地盤凝固剤として広く利用されていたが，このアクリルアミドが地下水に溶けこみ，附近の井戸使用の住民に手足のしびれ，知覚異常，歩行障害などがみられ，地盤凝固剤としての使用は禁止された．また，アクリルアミド生産工場で，アクリルアミド中毒を起したという報告が，国内・国外にかかわらず多数例ある[1-3]．

アクリルアミドポリマーは一般的に毒性が低いといわれているが，モノマーは $CH_2=CH-CO-NH_2$ の化学式で表わされる化合物で，神経障害および皮膚障害等を起こす比較的毒性の強い物質として知られている．

アクリルアミドポリマー製品は，未重合のモノマーを多量に含有しており，アクリルアミド生産過程ばかりでなく，ポリマーを利用した製品を取り扱うに際しても，配慮が必要と考えられる．

サル[4,5]，ネコ[4,6]，ラット[4,7]等，種々の動物で，アクリルアミドの神経障害が報告されているが，本報告ではアカゲザルを用いて膝蓋腱反射および運動障害と投与量との関係について実験を行なった．

実験材料および実験方法

I. 動物および飼育管理 動物はアカゲザル（*Macaca mulatta*，以下サルと略す）インド産：推定年令4—5才の雄4頭（No.5, No.6, No.9およびNo.10），中国産：推定年令4—5才の雄4頭（No.16, No.17, No.18およびNo.19）と雌2頭（No.11およびNo.14）の合計10頭を使用した．なお，サル購入時および飼育時には人畜共通伝染病（結核，細菌性赤痢，寄生虫等）について厳重な検疫を実施した．

飼育室の環境条件は，温度：26±1°，湿度：65±5％，換気毎時10回，照明時間：午前7時—午後10時とした．

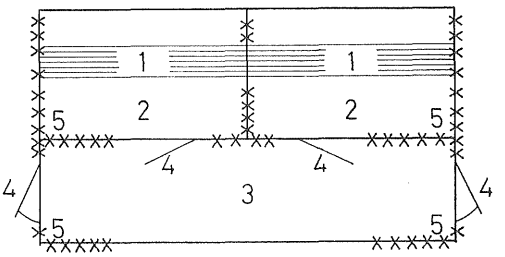


Fig. 1. Cage and Catching Place.
1. Roost; 2. cage;3. catching place; 4. door; 5. wire netting.

ケージはFig.1に示すように，集団ケージ（間口：2.3m，奥行：1.3m，高さ：1.7m）二連式で，前面，上面および両側面はステンレス製金網で仕切られ，90cmの高さにとまり木が設置されている．ケージの前方には，捕捉，運動等に利用する金網檻（間口：1.5m，奥行：2.6m，高さ：1.9m）が設けられている．

1ケージ2—4頭飼育とし，飼料としては，1頭あたりバナナ100g，オリエンタル酵母製サル用ビスケット100gをケージごとに給与した．水は水道水を自動給水ノズルにより自由に摂取させた．

II. 試薬および投与方法 アクリルアミドはMerck社製（Lot 104546）を使用した．10, 5および1.5mg/mlの水溶液として調製し，体重kg あたり2mlの割合で投与した．

サルを朝9時に捕捉し，モンキー・チェアーに固定し，上記のアクリルアミド溶液または蒸留水（対照）のいずれかをカテーテルを用いて，胃内に強制投与した．

月曜日から金曜日までの週5回投与とし，投与期間と投与量についてはTable 1に示した．

III. 観察および検査方法

1. **行動の観察** サルを捕捉する前に，捕捉場所でサルを充分に動かして行動を精細に観察した．

* 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

が，雌では赤血球・ヘマトクリットの増加がみられた．血清生化学検査では各試料に共通してグルコースが雌雄ともに低下がみられた．

文　献

1) 益淵正典，縄井寿美子，吉田誠二，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，149，1977
2) 益淵正典，高橋昭夫，高橋　省，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，154，1977
3) 益淵正典，縄井寿美子，平賀興吾，広門雅子：東京衛研年報，28-2，159，1977
4) 吉田誠二，益淵正典，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，162，1977

表 3. 血 液 学 的 検 査

	試 料	ラット数	WBC $\times 10^3$	RBC $\times 10^6$	Hgb g/dl	Hct %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu$g	MCHC %
雄	対照(水) (15ml/kg)	5	8.9±1.8	8.1±0.5	17.0±1.0	42.3±2.9	53.4±2.1	21.3±1.5	40.1±0.7
	サッカロース (9g/kg)	5	9.0±2.4	7.9±0.4	15.9±0.4	39.8±2.1	51.2±0.5*	20.4±0.7	40.0±1.2
	マルチトール (9g/kg)	5	8.3±0.6	8.0±0.4	15.9±0.4	40.3±1.8	51.6±0.6	20.3±0.5	39.3±0.9
	キシロース (9g/kg)	5	8.7±1.8	7.6±0.2	15.8±0.4*	38.9±1.1*	52.2±0.5	21.0±0.5	40.4±0.8
	ソルビット (7.5g/kg)	5	8.9±2.3	8.2±0.3	15.8±0.6	41.3±1.7	51.2±0.5*	19.7±0.3*	38.3±0.8**
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	9.1±1.1	8.0±0.4	15.9±0.4	40.4±1.8	51.6±0.6	20.2±0.7	39.1±0.6*
雌	対照(水) (15ml/kg)	5	7.1±1.0	6.8±0.2	15.4±0.2	35.4±0.9	53.0±1.0	22.9±0.4	43.4±0.7
	サッカロース (9g/kg)	5	8.4±0.5*	7.3±0.3*	15.7±0.3	37.5±1.8*	52.2±0.5	21.8±0.4**	41.6±1.1*
	マルチトール (9g/kg)	5	7.8±2.4	7.1±0.1**	15.7±0.3	37.2±1.2*	53.0±0.7	22.3±0.3*	42.1±0.6*
	キシロース (9g/kg)	5	8.0±2.1	6.8±0.4	15.5±0.7	35.7±1.6	53.2±0.5	23.0±0.8	43.6±1.0
	ソルビット (7.5g/kg)	5	8.8±1.1*	7.2±0.2**	15.9±0.9	36.9±0.7*	52.2±0.5	21.7±0.4**	41.9±0.5**
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	7.0±0.8	8.3±0.8**	15.2±0.4	39.5±2.1**	53.6±1.5	18.7±2.3**	38.4±1.5***

値は平均値±標準偏差で示してある. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

表 4. 血 清 学 的 検 査

	試 料	ラット数	Ch-E (ΔpH)	Glu (mg/dl)	UN (mg/dl)	GOT (K. U/ml)	GPT (K. U/ml)	Al-P (K,A,U/ml)	Cho- (mg/dl)	TP (g/dl)
雄	対照(水) (15ml/kg)	5	0.14±0.01	145±15.6	22.2±2.2	174±39.9	50.6±5.8	49.2±6.6	58.0±3.1	7.3±0.26
	サッカロース (9g/kg)	5	0.13±0.02	126±7.2*	20.6±0.9	164±20.3	47.0±2.6	40.8±3.6*	58.0±7.1	6.8±0.26*
	マルチトール (9g/kg)	4	0.14±0.01	124±4.9*	20.3±1.0	153±11.0	47.8±2.9	45.8±3.3	51.8±0.5**	6.9±0.10*
	キシロース (9g/kg)	5	0.12±0.02	137±22.8	21.6±0.6	178±22.6	48.8±5.2	46.2±3.7	53.2±2.2*	7.0±0.15
	ソルビット (7.5g/kg)	5	0.14±0.01	128±10.0	20.6±0.6	167±11.0	45.4±3.8	43.6±3.8	51.6±2.4**	6.9±0.21
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	0.13±0.01	126±6.6*	19.6±1.7	94±66.9*	43.4±4.8	38.4±4.6*	56.4±7.8	6.8±0.22*
雌	対照(水) (15ml/kg)	5	0.84±0.18	135±8.8	22.2±3.3	194±43.2	58.4±2.7	48.4±6.5	75.8±9.9	7.1±0.27
	サッカロース (9g/kg)	5	0.79±0.05	122±5.5*	20.2±1.5	190±18.4	52.4±6.5	40.0±3.9*	70.2±4.1	7.0±0.27
	マルチトール (9g/kg)	5	0.73±0.05	122±6.1*	20.2±2.2	201±18.9	49.2±6.1*	38.0±3.9*	68.8±5.5	6.7±0.29*
	キシロース (9g/kg)	5	0.71±0.09	128±7.3	22.0±2.2	198±13.6	52.0±4.6*	41.8±3.0	68.6±4.3	6.8±0.26
	ソルビット (7.5g/kg)	5	0.77±0.04	127±9.9	19.8±0.8	205±34.5	57.2±8.3	38.6±4.5*	71.2±4.6	6.9±0.28
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	0.75±0.07	121±9.4*	20.8±3.1	124±89.7	52.8±3.5*	36.2±2.2**	71.8±4.6	7.0±0.22

値は平均値±標準偏差 *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

表 2. 器　官　重　量

	試料	ラット数	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	腎臓 (mg) 右	腎臓 (mg) 左	副腎 (mg) 右	副腎 (mg) 左	精巣 (mg) 右	精巣 (mg) 左	前立腺 (mg)
雄	対照(水) (15ml/kg)	5	9.24±0.92[1]	520±54	840±81	810±87	16.9±1.26	16.6±1.91	1170±446	1160±462	277±188
			3.64±0.27[2]	210±22	330±35	320±34	6.7±0.65	6.5±0.75	460±180	460±187	107±64
	サッカロース (9g/kg)	5	9.64±0.39	560±23	800±45	840±29	19.4±3.80	18.0±3.28	1240±280	1290±306	269±82
			3.69±0.13	210±11	310±13	320±11	7.4±1.14	6.9±1.06	480±114	500±123	104±37
	マルチトール (9g/kg)	5	9.51±0.57	570±43	860±65	860±77	19.1±2.50	18.0±1.55	1390±61	1460±55	233±45
			3.61±0.19	220±15	330±19	320±22	7.2±1.01	6.9±0.55	530±29	550±20	88±13
	キシロース (9g/kg)	5	9.83±0.88	560±26	860±101	850±93	19.4±3.09	18.1±1.34	1360±48	1440±54	237±36
			3.76±0.20	210±10	330±20	320±23	7.5±1.25	6.9±0.54	520±29	550±29	91±11
	ソルビット (7.5g/kg)	5	9.73±0.85	560±38	840±78	860±100	20.1±4.56	17.5±3.90	1340±121	1440±74	221±23
			3.60±0.14	210±8	310±9	320±15	7.4±1.44	6.5±1.14	500±49	530±25	82±8
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	9.36±0.54	570±19	820±42	840±36	19.5±2.57	20.3±4.67	1360±54	1410±48	282±82
			3.60±0.24	220±13	310±15	320±20	7.4±0.91	7.8±1.93	520±19	540±15	108±31

	試料	ラット数	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	腎臓 (mg) 右	腎臓 (mg) 左	副腎 (mg) 右	副腎 (mg) 左	卵巣 (mg) 右	卵巣 (mg) 左	子宮 (mg)
雌	対照(水) (15ml/kg)	5	5.46±0.19[1]	380±18	550±25	570±33	22.3±0.94	20.5±1.51	32.8±11.1	28.9±13.5	391±128
			3.25±0.11[2]	230±14	330±15	340±23	13.3±0.54	12.2±0.94	19.5±6.4	17.2±7.9	233±75
	サッカロース (9g/kg)	5	4.98±0.42*	380±27	530±17	530±24	23.7±2.70	20.4±3.38	26.3±5.2	29.7±3.2	361±60
			3.06±0.34	240±27	320±27	320±29	14.6±1.94	12.8±2.45	16.2±3.6	18.3±2.7	224±52
	マルチトール (9g/kg)	5	5.30±0.28	390±36	540±43	550±47	24.4±1.62*	21.3±0.99	34.4±9.4	30.1±5.1	403±63
			3.27±0.35	240±27	340±40	340±41	15.0±1.52	13.1±0.87	21.3±6.8	18.6±4.1	247±32
	キシロース (9g/kg)	5	4.80±0.32**	360±29	510±26	500±23**	18.2±2.43**	19.1±0.97	23.9±4.1	25.8±7.4	243±33*
			3.12±0.36	230±20	330±33	320±30	11.9±2.23	12.4±0.78	15.5±2.5	16.5±4.3	160±27
	ソルビット (7.5g/kg)	5	5.08±0.12**	390±17	530±29	530±41	23.3±4.21	23.1±3.47	29.0±11.2	32.7±6.1	314±59
			3.14±0.14	240±19	330±28	330±35	14.5±3.10	14.3±2.58	17.9±6.8	20.3±4.0	195±40
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	5	4.82±0.23**	380±27	510±28	510±30*	22.4±3.57	21.3±3.20	30.2±3.8	29.8±4.7	388±71
			2.96±0.07	230±16	310±11	310±11	13.8±2.30	13.1±1.34	18.5±2.0	18.3±2.6	238±43

1) 器官重量　2) 器官重量/100g体重，値は平均値±標準偏差で示してある．　*p＜0.05　**p＜0.01

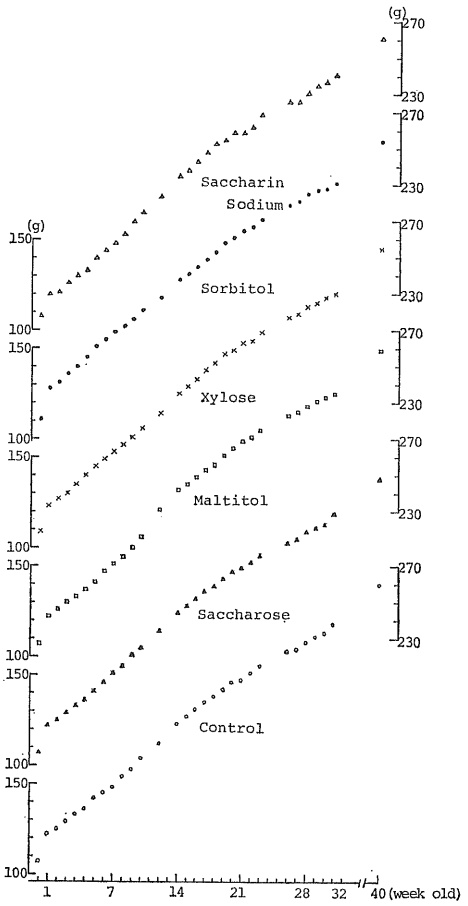


図 1. 体 重

歩き廻る．3日目軟便，4日目で全例回復，以後異常なし．

投与後40日目の解剖所見・器官重量・血液学的・血清生化学的所見 器官重量を表2，血液学的検査所見を表3，血清生化学的検査所見を表4に示す．

肉眼的解剖所見 各試料群雌雄とも異常を認めなかった．

器官重量 肝臓，脾臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，卵巣，子宮において 100 g 体重比重量で対照群と比較して有意な増減を示すものは各群雌雄ともになかった．

血液学的検査所見 各試料群雄において対照群と比較すると赤血球数に大差はないにかかわらずヘモグロビン (Hgb) 量およびヘマトクリット値 (Hct) に低下あるいは低下傾向がみられ，雌では赤血球数および Hct に増加あるいは増加傾向が認められたが Hgb 量には変化がなかった．このことは雄では小赤血球性貧血であり，雌においては赤血球数の増多により貧血を防止したことを意味するのか，偶然により雄では対照群の Hgb 量および Hct が高く，雌では赤血球数が少く Hct が低かったためであるかを今後吟味する必要があろう．

表 1. 試料投与時および投与後40日目観察終了時体重

	試 料	ラット数	投与前(g)	終了時[1](g)
雄	対照(水) (15ml/kg)	10	108±6.5	260±15.3
	サッカロース (9g/kg)	10	107±10.3	258±12.0
	マルチトール (9g/kg)	10	107±6.3	259±20.3
	キシロース (9g/kg)	10	109±11.1	265±10.1
	ソルビット (7.5g/kg)	10	112±9.5	264±16.0
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	10	108±8.1	261±7.3
雌	対照(水) (15ml/kg)	10	94±4.1	166±4.3
	サッカロース (9g/kg)	10	87±5.3	160±9.9
	マルチトール (9g/kg)	10	91±6.5	161±9.7
	キシロース (9g/kg)	10	87±5.5	155±8.9
	ソルビット (7.5g/kg)	10	90±5.3	158±9.2
	サッカリンナトリウム (6g/kg)	10	93±4.8	163±3.8

1) 投与から40日目
値は平均値±標準偏差で示してある．

血清生化学的検査所見 グルコースが試料投与各群雌雄において低値ないしその傾向を示した．このほか総蛋白量 (TP)，コレステロール (Cho)，トランスアミナーゼ GOT・GPT 活性，アリカリフォスファターゼ (Alp) 活性に低下ないし低下傾向が認められるものがあり，このことはサッカリンナトリウム投与群に著しかった．これら変化の意味することは不明であり，今後検討を加えたい．

ま と め

サッカロース 9 g/kg，マルチトール 9 g/kg，キシロース 9 g/kg，ソルビット 7.5g/kg およびサッカリンナトリウム 6 g/kg を JCL-Wistar ラット雌雄に1回経口投与し，症状および体重を40日間観察後器官重量測定，血液学的，血清生化学的検査を行った．

主症状はいずれも投与直後よりの下痢で，2―5日で回復し死亡するものはなかった．体重増加，器官重量においてはいずれも著変なく，血液学的検査では各試料に共通して雄ではヘモグロビン量，ヘマトクリットの低下

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 165-169, 1977

サッカロース，マルチトール，キシロース，ソルビットおよびサッカリンナトリウムの急性毒性試験

林田志信*，高橋　博*，川野澄江*，井口重孝*
神谷信行*，池田虎雄*，平賀興吾*

Acute Oral Toxicities of Saccharose, Maltitol, Xylose, Sorbitol and Saccharin Sodium

SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI*, SUMIE KAWANO*, SHIGETAKA IGUCHI*, NOBUYUKI KAMIYA*, TORAO IKEDA* and KOGO HIRAGA*

甘味料の安全性点検の一環[1-4]として天然甘味料サッカロース，マルチトール，キシロース，ソルビットおよび合成甘味料サッカリンナトリウムについて，ラットを用い経口1回大量投与による急性作用を観察したので，その結果を記載し毒性資料として供することとした．

観察方法

1. **試料**：サッカロース　和光純薬試薬特級Lot No. 196-00015，マルチトール　日研化学マルビトーLot No. 6067868，D(+)キシロース　岩井化学薬品特級試薬 Lot No. 51021，ソルビット　岩井化学薬品試薬特級 Lot No. 500213，サッカリンナトリウム　大東化学工業食添用

2. **動物**：日本クレア JCL-Wistar 系ラット(SPF)雌雄を4週令で購入，1週間予備飼育後発育の良好な動物を試験に供した．

3. **動物飼育環境**：室温：25±1°C，湿度：50±5%，換気：10回/時，照明：午前5時-午後5時，飼料：日本クレア CE-2 固型飼料自由摂取，飲用水：細菌ろ過器経由水道水自由摂取，ケージ：前面・床網のステンレス製（縦40cm×横25cm×高さ16.5cm）にて5匹収容．

4. **試料投与方法**：サッカロース，マルチトール，D(+)キシロールはそれぞれ60%水溶液，ソルビット50%水溶液，サッカリンナトリウム40%水溶液とし，いずれも 15m*l*/kg を胃ゾンデにより強制経口投与した．ラットは各試料当り雌雄それぞれ10匹を用い，投与に当っては一夜絶食とした．対照ラットには精製水 15m*l*/kg を投与した．

5. **観察・検査**　一般症状生死の観察，毎日体重測定，投与40日後屠殺剖検，器官重量測定，血清生化学的検査（コレステロール Cho，グルコース Glu，尿素窒素 UN，総蛋白量 TP，トランスアミナーゼ GOT，GPT 活性，アルカリフォスファターゼ Alp 活性，コリンエステラーゼ ChE 活性），血液学的検査（白血球数WBC，赤血球数 RBC，ヘモグロビン量 Hgb，ヘマトクリット Hct，平均赤血球容積 MCV，平均赤血球ヘモグロビン量 MCH，平均赤血球ヘモグロビン濃度 MCHC）を行った．血液は断頭屠殺時放出する血液を用いた．

結　果

マルチトール投与ラットの1例が投与の失敗により死亡したほかは対照群を含む各群に死亡例なく，図1および表1に示すように投与後40日目の観察終了時(解剖時)まで各群とも対照群と変ることのない体量増加を示した．

症状：サッカロース　投与後全例に下痢が，少数に立毛がみられた．2日頃より下痢は回復に向い4-5日で全例回復，その後は全く異常を認めなかった．

マルチトール　投与後全例に下痢，少数に立毛，あまり歩き廻らず元気なし，投与後2日目より下痢は回復に向い4日目には完全回復し，毛なみもよく，その後異常なし．

キシロース　投与後全例下痢，しかし元気に歩き廻る．2日目で軟便，3日目で全例回復，以降異常なし．

ソルビット　投与後少数下痢，その他軟便，少数に立毛，2日目で全例回復，以後異常なし．

サッカリンナトリウム　雄ラット―全例下痢，立毛，元気なくうずくまる．2日目は元気に歩き廻る．3日目より下痢回復に向う．4日目立毛なく軟便．5日目で回復，以後異常なし．雌ラット―全例下痢，立毛，元気に

* 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

血球[7] 及び皮膚[8] の培養細胞で染色体異常を生ずることが報告されている．今回の実験ではその異常細胞出現に有意性が見られたもののその頻度は低く，しかもそのほとんどがギャップであったため，本物質の変異原性に関してはさらに検討を要する．

Sorbit, Gly. 2Na, Gly. 3Na, Xylose については，わずかながら染色体異常が見られるものの，Control に比べて有意な差とはなっておらず，突然変異性はないものと考えられる．

要　旨

人工甘味料の培養細胞における細胞遺伝学的検討を行なった．その結果，Saccharin Sodium に強い染色体異常誘発性が見られた．

Sodium Cyclamate は，弱い染色体異常誘発が見られ，その変異原性が示唆された．D-Xylose, Dulcitol, Disodium Glycyrrhizinate, Trisodium Glycyrrhizinate, Calcium Cyclamate らの人工甘味料の染色体異常誘発性は見られなかった．

文　献

1) Price, I. M., C. G. Biava, B. L. Oser, E. E. Vogin, I. Steinfeld, and H. L. Ley : *Science*, 167, 1131, 1969
2) Preliminary Report, Project E405/405E, Toxicology Research Division, Health Protection Branch, Ottawa Canada, 1977
3) 益淵正典，吉田誠二，平賀興吾，縄井寿美子：第5回日本環境変異原研究会講演要旨集，1976
4) 益淵正典，縄井寿美子，吉田誠二，平賀興吾：東京衛研年報，28-2. 149, 1977
5) 越智尚子，外村　晶：第5回日本環境変異原研究会講演要旨集，1976
6) Sax, K., and H. J. Sax : *Japan J. Genet.*, 43, 89, 1968
7) Catanach, B. M., : *Mutation Res.*, 39, 1, 1976
8) Stone, D., E. Lamson, Y. S. Chang., and K. Pickering : *Science*, 164, 568, 1977

表 1. ID50(mg/ml)

Cyclo. C_a	3.4
Cyclo. Na	26.0
Gly. 2Na	26.0
Gly. 3Na	24.0
Dulcitol	40.0
Sorbit	48.0
Xylose	54.0
S-Na	29.0
Sucrose	N.D

び S-Na は 24-29mg/ml 前後で，また Dulcitol, Xylose, Sorbit は 40-50mg/ml で最も弱い阻害を示した．また Sucrose は40mg/ml でもコロニー形成には影響を与えなかった．

各群のコロニーの大きさは，Control の直径 2-3mm に比べ差はなかった．用量作用関係は，Cyclo. Ca で顕著であった．

染色体に及ぼす影響

分析結果を表2で示す．

人工甘味料である Xylose, Dulcitol, Gly. 2Na, Gly. 3Na, Cyclo. Ca, Sorbit 及び天然甘味料である Sucrose の 24 時間処理は，Gly. 2Na に環状染色体が1例見られたのみで，それぞれ Control に比べ染色体の形態的異常に関し何ら有意な増加を示さなかった．また数的異常に関しても同様であった．

S-Na は，20 mg/ml で異常細胞が高頻度で出現し，これまでの報告とよく一致した[3,4]．

Cyclo. Na に関しては予備実験で染色体異常誘発性が示唆されたため，処理の量及び時間群をふやしさらに検討した．その分析結果を表3に示す．

表 2. 検体24時間処理による染色体異常の内訳

検体	処理量 (mg/ml)	観察細胞数	異常細胞数	ギャップ 染色分体型	ギャップ 染色体型	切断 染色分体型	切断 染色体型	その他
Cyclo. Ca	0.4	200	2	1	1	0	0	0
	2.0	200	4	4	0	0	0	0
	10.0	200	10	7	1	2	0	0
Gly. 2Na	1.2	200	5	3	1	1	0	0
	6.0	200	10	7	1	1	0	1[1)]
Gly. 3Na	1.2	200	6	5	1	0	0	0
	6.0	200	8	6	0	2	0	0
Dulcitol	4.0	200	1	1	0	0	0	0
	20.0	200	11	9	0	2	0	0
Sorbit	4.0	200	11	8	1	2	0	0
	20.0	200	7	4	0	3	0	0
Xylose	4.0	200	0	0	0	0	0	0
	20.0	200	9	9	0	0	0	0
S-Na	20.0	200	57	44	0	50	1	0
Sucrose	2.0	100	0	0	0	0	0	0
	10.0	200	0	0	0	0	0	0
Control	0	200	8	7	1	0	0	0

1) 環状染色体

表 3. Cyclo. Na による染色体異常の内訳

処理時間	処理量 (mg/ml)	観察細胞数	異常細胞数	ギャップ 染色分体型	ギャップ 染色体型	切断 染色分体型	切断 染色体型	その他
6	0	200	3	3	0	0	0	0
	2.0	200	0	0	0	0	0	0
	10.0	200	13	13	0	0	0	0
12	0	200	5	5	0	0	0	0
	2.0	200	6	6	0	0	0	0
	10.0	200	7	6	0	1	0	0
24	0	200	0	0	0	0	0	0
	2.0	200	1	1	0	0	0	0
	10.0	200	14	14	0	0	0	0
48	0	100	0	0	0	0	0	0
	2.0	60	0	0	0	0	0	0
	10.0	0	—	—	—	—	—	—

Cyclo. Na は，10mg/ml 6時間処理でギャップ，切断を伴なう細胞の有意な増加が見られ，24時間処理で最も高い値を示し，染色体異常誘発性が確認された．48時間処理では，細胞分裂の阻害が見られ観察に要する分裂細胞数が得られなかった．なお，この 10mg/ml 処理量は，ID30 に相当する．2 mg/ml 処理ではいづれの処理時間においても，Control に比べ有意な増加を示さなかった．

考　察

今回の実験で，S-Na と Cyclo. Na により誘発された染色体異常が見られた．S-Na については，先にマウス骨髄細胞及び培養細胞における染色体異常誘発性，またヒト培養細胞における不定期DNA合成の報告がある[3-5]．今回の結果もこれらとよく一致しており，S-Na の突然変異原性が再確認された．

一方，Cyclo. Na は，タマネギの根端細胞[6]，ヒト白

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 162-164, 1977

人工甘味料の培養細胞における細胞遺伝学的研究

吉田誠二*, 益淵正典*, 平賀興吾*

In Vitro Cytogenetic Studies of Artificial Sweeteners on Cultured Cell

SEIJI YOSHIDA*, MASANORI MASUBUCHI* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

人工甘味料として使用されたズルチンは長期毒性試験において肝腫瘍が認められ（FDA, 1951年），またサッカリンとサイクラミン酸塩の混合物でも膀胱癌の発生することが報告された[1]．さらに最近，アメリカ・カナダの実験によりサッカリンに発癌性のあることが明らかにされ[2]，人工甘味料の安全性が再び問題となってきている．

一方，発癌性物質は，突然変異原物質であることが最近次々と明らかにされ，またその変異原物質の大部分は，染色体異常を誘発することが知られている．そこで今回著者らは，一連の人工甘味料の変異原性に関する報告がほとんどないことから，哺乳動物培養細胞を用い，その染色体異常誘発性を調べ，突然変異原性の有無を検討した．

材料及び方法

細胞　チャイニーズ・ハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞を用い，F12 Mediumに仔牛血清10%, Streptmycin 100μg/m*l*, Penicillin 100U/m*l* を加えたもので培養した．

検体　用いた物質は次の様である．

D-Xylose（以下 Xylose と略す）；岩井化学薬品株式会社製，Lot No. 500520

Dulcitol；和光純薬工業株式会社製，Lot No. 042-06262

Disodium Glycyrrhizinate（以下 Gly. 2Na と略す）；YASHIMA KASEI.

Trisodium Glycyrrhizinate（以下 Gly. 3Na と略す）；YASHIMA KASEI・

Sodium Cyclamate（以下 Cyclo. Na と略す），東京化成工業株式会社製，Lot No. C-487

Calcium Cyclamate（以下Cyclo. Caと略す）；SIGMA製，Lot No. 53C-2380

D-Sorbitol（以下 Sorbit. と略す）；岩井化学工業株式会社製，Lot No. 500213

Saccharin Sodium（以下 S-Na と略す）；育和化学工業株式会社製），Lot No. 230201

Sucrose；和光純薬工業株式会社製，Lot No. K1K 3925

コロニー形成に及ぼす影響

F12 Medium 5m*l* を入れた直径 60mm の Petri dish に，約100個の細胞をまき，培養を開始した．6時間後F12 Mediumをすて，種々濃度に調整した検体添加 Medium 5m*l*で16時間処理を行なった．処理後，P. B. S. で数回細胞面を洗ったのち，再び無添加 Medium にて培養を続行した．7日後，10%ホルマリン溶液で固定，0.1%クリスタル・バイオレットで染色したのち，コロニー数を調べた．培養はすべて，37°，5 % CO_2 条件下で行なった．

染色体に及ぼす影響

コロニー形成率により算出された，ID50（50%コロニー形成阻害量）を基準として種々の検体処理濃度を設定した．培養瓶当り 3-4 $\times 10^5$ 個の細胞をまき2日培養後，P. B. S. で細胞面を洗ったのち，種々の濃度に調整した検体添加 Medium 10m*l* にて培養を続けた．

検体処理時間は原則として24時間とした（Cyclo. Naのみ6，12，24，48時間処理を行なった）．染色体標本作製90分前にコルセミド（0.5μg/m*l*）を添加した．

Control は Medium のみとした．処理後，細胞をトリプシンによりガラス面よりはがし，0.075 M KCl溶液で低張処理を行なった．カルノア液で固定後，火焔乾燥法で標本作製し，ギムザ染色した．分析は各群ともよく拡がった分裂中期の細胞200個について行なった．

結　　果

コロニー形成に及ぼす影響

各検体の ID50 を表1で示す．

Cyclo. Ca が 3.4mg/m*l* で，検体中最も強いコロニー形成阻害を示した．Gly. 2Na，Gly. 3Na，Cyclo. Na，及

* 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

その結果，サッカリンナトリウムが高い有意性（$p<0.001$）をもって染色体異常誘発性を示したのに対し，その染色体異常誘発性の疑われた3種の不純物については，何ら有意な差は見られなかった．したがって，サッカリンナトリウムの染色体異常誘発性は，その不純物ではなくサッカリンナトリウムそのものに基づくものであると結論した．

文　献

1) 益淵正典，縄井寿美子，吉田誠二，平賀興吾：28-2, 149, 1977
2) Hicks, R. M., J. St. J. Wakefield, and J. Chowaniec : *Nature*, 243, 247, 1973
3) Hicks, R. M., J. St. J. Wakefield, and J. Chowaniec : *Nature*, 243, 424, 1973
4) Kennedy, C., O. E. Fancher, J. C. Calandra, and R. E. Keller : *Food and Cosmet. Toxicol.*, 10, 143, 1972
5) Minegishi, K. I., M. Asahina, and T. Yamaha : *Chemical and Phermaceutical Bulletin* 20, 1351, 1972
6) 蕨岡小太郎：月刊薬事，17, 1887, 1975

Table 1. Cytogenetic Effects on CHO-K1 Cells treated with Saccharin Sodium or its Impurities for 24 hrs

Chemicals	Dose (μg/ml) (μl/ml)[a] (mg/ml)[b]	No. of cells analyzed	No. of cells with breaks	No. of cells with gap	No. of cells with other aberrations
Control	0	200	0	4	1
Dimetylsulfoxide	5[a]	200	0	4	0
Saccharin Sodium	20[b]	200	38[c]	38[c]	2
o-Toluenesulfonamide	400	200	1	6	0
	200	200	0	4	0
	14	200	0	4	0
	0.9	200	0	2	0
p-Toluenesulfonamide	400	200	0	6	1
	200	200	0	3	0
	14	200	0	5	1
o-Sulfobenzoic Acid	200	200	0	9	1
	200	200	0	7	0
	14	200	1	7	2
o-, +*p*-Toluenesulfonamide +*o*-Sulfobenzoic Acid	(each 14)	200	0	3	0

c, significantly different from Control ($p<0.001$)

o-TSA 400mg/m*l* 群で1個と，わずかな gap および他の異常が出現したのみで，対照群に対し何ら有意な差は認められなかった．

以上の結果から，S-Na の不純物として考えられる *o*-TSA など3種については，染色体異常誘発性は認められず，先の実験[1] および今回の実験において見られた染色体異常誘発性は S-Na に基づくものであることが確認された．

考　察

これまでの S-Na の変異原性に関する研究は少なく，また結果についてはさまざまであり[6]，その確かな安全性評価が急がれている．Hicks らの S-Na 発癌実験[2] 以来，結果が陽性であった実験についても S-Na そのものの毒性ではなく，*o*-TSA を主とする不純物によるものであろうとの推測がなされてきた[3]．その理由は S-Na が体内ではほとんど代謝されず不活性のままであるということ[4,5]，またその不純物が既知の発癌因子と類似構造をもっているという点などである[6]．筆者らはこの点に関し，明確な結論を得ておくことが，S-Na についての安全性を論議する上で必要であると考え，その不純物による細胞遺伝学的影響の有無を検討した．

S-Na は Remsen-Fahlberg 法によりトルエンから製造され，その過程で *o*-TSA と少量の *p*-TSA，さらに *o*-TSA の酸化過程で *o*-SBA などが不純物として残存する．この不純物含量は，欧米産のもので 6,000-810 ppm といわれているが，国産のものは食品衛生法により 100ppm 以下とされている．筆者らが用いた S-Na は分析の結果，純度 99.93%，特に疑いがもたれている *o*-TSA については 45ppm というわずかなものであった．今回これらの分析結果に基づき不純物の細胞遺伝学的研究を行った結果，S-Na が強い染色体異常誘発性を示したのに対して，これら不純物では全く認められなかった (Table 1)．

要　旨

サッカリンおよびそのナトリウム塩の発癌性，染色体異常誘発性に関しては，その不純物が原因ではないかとの疑問がもたれている．そこで今回，細胞遺伝学的研究において，不純物3種，オルトおよびパラトルエンスルホンアミド，オルトスルホ安息香酸アンモニウムについて，*in vitro* での染色体異常誘発性の有無を調べた．薬物処理時間は24時間とし，処理量の設定は，サッカリンナトリウムに含有される不純物量に基づいた．対照には，無処理群，および調整に用いた DMSO 群，さらに陽性対照としてサッカリンナトリウム 20mg/m*l* 群を設けた．観察は各群 200 細胞について行い，break，gap などの異常を調べその有意性を χ^2 検定で検討した．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 159-161, 1977

サッカリン不純物の染色体異常誘発性

益淵正典[*1], 縄井寿美子[*1], 平賀興吾[*1], 広門雅子[*2]

Lack of the Cytogenetic Effects of Saccharin and its Imprities on CHO-K1 Cells

MASANORI MASUBUCHI[*1], SUMIKO NAWAI[*1], KOGO HIRAGA[*1] and MASAKO HIROKADO[*2]

筆者らは先に，サッカリンナトリウム (saccharin sodium, 以下 S-Na と略す) に関する *in vivo*, *in vitro* 細胞遺伝学的研究から，S-Na に染色体異常誘発性のあることを認め報告した[1]．S-Na の安全性については，その発癌試験の結果からもさまざまな論議がなされてきたが，Hicks らの膀胱腫瘍を認めた試験では，S-Na の不純物，ことにオルトトルエンスルホンアミドに疑問が投げかけられた[2]．しかしその毒性，とくに発癌性や変異原性についてはまだ明らかにされていない．先の筆者らの結果からも，*o*-トルエンスルホンアミドを主とする不純物の影響の有無の確認が早急に必要であると考えられた[1]．そこで今回我々は S-Na の不純物と考えられるもののうち，*o*-トルエンスルホンアミド (*o*-toluenesulfonamide, 以下 *o*-TSA と略す)，*p*-トルエンスルホンアミド (*p*-toluenesulfonamide, 以下 *p*-TSA と略す)，*o*-スルホ安息香酸 (*o*-sulfobenzoic acid, 以下 *o*-SBA と略す) について，CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* 系での染色体異常誘発性の有無を調べた．

材料および方法

1. **試供薬物** Saccharin sodium (S-Na); 育和化学工業株式会社製 Lot. No. 23021, *o*-Toluenesulfonamide (*o*-TSA); 東京化成工業株式会社製, *p*-Toluenesulfonamide (*p*-TSA); 東京化成工業株式会社製, *o*-Sulfobenzoic acid monoammonium salt (*o*-SBA); 東京化成工業株式会社製, Dimethylsulfonide (DMSO); 和光純薬工業株式会社製

2. **細胞および培養** CHO-K1 細胞を用い，仔牛血清10%添加の F-12 培地で培養した．

3. **薬物調整および処理** S-Na については培地中に直接，*o*-TSA, *p*-TSA, *o*-SBA については DMSO に溶解し，Table 1 に示す最終濃度とした．なお DMSO を使用したものについてはその最終濃度が 0.05ml/ml となるよう統一した．以上の添加培地で24時間処理した．

4. **標本作成** 標本作成2時間前にコルセミドを 0.5 μg/ml 加えた．標本作成法は筆者らが先に行った方法[1]に準じた．

結　果

今回の実験群設定は，以下の理由によった．S-Na の 20mg/ml 量は顕著な染色体異常誘発性を示す量であり，今回はこの量をすべての基準とした．したがって不純物3種の 400μg/ml 量は S-Na 20mg/ml に対しての公定書基準値として許可されている不純物の2%に当る量である．14μg/ml は今回使用した S-Na の純度が 99.93%であったことから，その 20mg/ml 中に各々が最大量 (0.07%) 含有されたと考えた場合の量である．また *o*-TSA の 0.9μg/ml 量は分析の結果今回使用した S-Na 中の含量である．これに加えて，不純物3種の相互作用を調べるためそれぞれ 14μg/ml を混合した群を設けた．なお対照には溶媒として用いた DMSO 0.05ml/ml 添加群と，無処理群の2つを置いた．

薬物処理したどの群も，よく細胞増殖し，すべて染色体分析が可能であった．今回用いた細胞は，その多くが20本の染色体を保有していたが，時に19本，21本を示すものも見られた．

結果を総括して Table 1 に示す．

無処理群および DMSO 添加群には break は見られず，各々4個の gap と無処理群に他の異常が1個見られたのみであった．一方陽性対照として用いた S-Na 群では，調べられた200個の細胞中 gap, break を伴なう異常細胞がそれぞれ38個観察され，非常に高い有意性が認められた．しかし3種の不純物については，break が

[*1] 東京都立衛生研究所毒性部　[*2] 生活科学部食品添加物研究科　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

mation Service, U. S. Dept. of Commerce, 5285 Port Royal Road, Springfield VA22151 (U. S. A))

3) Machemer, L. and D. Lorke : *Humangenetik*, 19, 193, 1973
4) Sanjeeva Rao, M. and A. B. Qureshi : *Indian J. Med. Res.*, 60, 599, 1972
5) Srám, R. J. and Z. Zudová : *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 12, 186, 1974
6) Kramers, P. G. N : *Mutation Res.*, 32, 81, 1975
7) Ehling, U. H : *Mutation Res.*, 11, 35, 1971
8) Ray, V. A., H. E. Holden, D. S. Salsburg, J. H. Ellis, Jr., L. J. Just, and M. L. Hyneck : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 107, 1974
9) Ilse-Dore, A : *Mutation Res.*, 35, 247, 1976
10) 菊地康基，水各正寛，梶原　彊：武田研報，30, 762, 1971
11) 高橋昭夫，益淵正典，吉田誠二，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，28-2, 187, 1977
12) 吉田誠二，益淵正典，高橋昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，28-2, 192, 1977
13) Röhrborn, G : *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970 Spring-Verlag, Berlin
14) 日本製薬工業協会・安全性委員会基礎研究部会・第5チーム：月刊薬事，19, 773, 1977
15) Kristofferson, U : *Hereditas*, 70, 271, 1972
16) 越智尚子，外村　晶：日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨集，32, 1976

増加が観察された.

一般に，弱い変異原性を示すと思われる物質の作用評価の目安として優性致死誘発率，

$$J=\left(1-\frac{\text{生存胎児数／全着床数(処置群)}}{\text{生存胎児数／全着床数(対照群)}}\right)\times 100$$

が用いられ，10%を越えた場合，明らかに陽性と判定される[13,14]．今回の結果よりその値を算出したところ，1週目後半 10.08%，2週目前半 10.33%であり，優性致死誘発性が認められたが，この時期は精子形成段階の後期にあたる．すなわち精子あるいは後期精細胞に相当する生殖細胞が遺伝障害を受けたこととなり，陽性対照として用いた既知変異原物質 EMS の作用時期と非常に類似している．

S-Na の哺乳動物における変異原性に関しては，これら優性致死試験によるほか，*in vivo*, *in vitro* 細胞遺伝学的研究がなされ，チャイニーズハムスター培養細胞での染色体異常誘発性[1,15]，ヒト培養細胞での不定期 DNA 合成[16]，マウス生体骨髄細胞[1]および生殖細胞[5]での染色体異常が報告されている．特に Srám と Zudová[5] による雄マウス生殖細胞で見られた減数分裂染色体異常の報告は，優性致死現象とも密接な関連をもつものである．

今回，S-Na p.o. 群では対照群に比べ有意な優性致死作用は示されなかった．しかし，i.p. 群で作用の認められたと同じ時期に，生存胎児の減少と早期死胚の増加を認めており，他の研究報告結果とも総合し，S-Na には弱いながらも優性致死誘発性のあることが示唆された．

（本研究は日本環境変異原研究会第5回研究発表会1976年10月で発表した）

文　献

1) 益淵正典，縄井寿美子，吉田誠二，平賀興吾：東京衛研年報，28-2, 149, 1977

2) Newell, G.W. and W.A. Maxwell: *XPBRC No. 221824/6, U.S. Government Report*, 1972 (available through National Technical Infor-

表 2. JCL-ICR マウスにおけるサッカリンナトリウム（S-Na）の優性致死試験結果（その3）

投与後の交配時期	試薬および投与経路	雄数 交配使用	雄数 交尾確認	雌数 交配使用	雌数 交尾確認	黄体数 合計	黄体数 母体当り(平均)	着床数 合計	着床数 母体当り(平均)	着床数 黄体数当り%	生存胎児数 合計	生存胎児数 母体当り(平均)	生存胎児数 黄体数当り%	生存胎児数 全着床数当り%	死児数 早期死胚	死児数 後期死胚
5週目 前半	Control	10	9	20	12	152	12.7	145	12.1	95.4	128	10.7	84.2	88.3	16	1
	EMS i.p.	10	9	20	10	118	11.8	108	10.8	91.5	101	10.1	85.6	93.5	5	2
	MMC i.p.	10	3	20	3	27	9.0	18	6.0	66.7[a]	18	6.0	66.7[a]	100.0	0	0
	S-Na i.p.	10	10	20	11	151	13.7	139	12.6	92.1	119	10.8	78.8	85.6	20	0
	S-Na p.o.	10	8	20	10	111	11.1	102	10.2	91.9	97	9.7	87.4	95.1	4	1
後半	Control	10	7	20	8	96	12.0	91	11.4	94.8	85	10.6	88.5	93.4	6	0
	EMS i.p.	10	7	20	11	135	12.3	127	11.6	94.1	118	10.7	87.4	92.9	8	1
	MMC i.p.	10	1	20	1	13	13.0	11	11.0	84.6	11	11.0	84.6	100.0	0	0
	S-Na i.p.	10	9	20	11	136	12.4	122	11.1	89.7	105	9.6	77.2[a]	86.1	17	0
	S-Na p.o.	10	10	20	13	157	12.1	153	11.8	97.5	146	11.2	93.0	95.4	7	0
6週目 前半	Control	10	9	20	10	131	13.1	125	12.5	95.4	114	11.4	87.0	91.2	9	2
	EMS i.p.	10	10	20	11	152	13.8	142	12.9	93.4	138	12.6	90.8	97.2[a]	4	0
	MMC i.p.	10	1	20	1	8	8.0	1	1.0	12.5[c]	1	1.0	12.5[c]	100.0	0	0
	S-Na i.p.	10	10	20	10	122	12.2	116	11.6	95.1	108	10.8	88.5	93.1	8	0
	S-Na p.o.	10	9	20	11	143	13.0	133	12.1	93.0	125	11.4	87.4	94.0	7	1
後半	Control	10	9	20	13	162	12.5	140	10.8	86.4	131	10.1	80.9	93.6	8	1
	EMS i.p.	10	7	20	10	117	11.7	108	10.8	92.3	95	9.5	81.2	88.0	13	0
	MMC i.p.	10	0	20	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S-Na i.p.	10	11	20	18	219	12.2	207	11.5	94.5[c]	184	10.2	84.0	88.9	23	0
	S-Na p.o.	10	7	20	12	142	11.8	115	9.6	81.0	107	8.9	75.4	93.0	8	0

a, *b*, *c*; Control との間にそれぞれ $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ の有意性があったことを示す.

93.7%, 99.0%であるのに対して有意に減少した. また, 着床した胚・胎児のうち, すでに死亡しているものの割合は生存胎児のそれと表裏の関係にあるが, そのうちでも特に発生初期の段階で死に至ったもの（早期死胚）が, 1週目後半 14.8%($p<0.001$), 2週目前半 11.2% ($p<0.01$)認められ, 対照群がそれぞれ0%, 1%であるのに対して, 顕著に増加していた.

S-Na p.o. 群では1週目, 2週目を通じ着床数当りの生存胎児数が減少し, 早期死胚数は増加する傾向が見られる. しかしそれは対照群に比べ有意な増減とはなっていない.

サッカリンの哺乳動物における優性致死誘発性については, すでにいくつかの報告がある. そのうち, 結果が陰性であったものにはマウスに S-Na 5g/kg/日を水溶液にして5日間飲ませた Machemer と Lorke の報告[3], またラットにサッカリン 30, 2,500, 5,000mg/kg を懸濁液として経口投与した Newell と Maxwell の報告[2]があり, それぞれ妊娠率, 着床数および死胚数に変化を認めていない.

一方, 結果が陽性であったものもあり, Sanjeeva Rao と Qureshi[4] は水溶液にて約 200mg/kg/日の S-Na を30日間与え続けた後交配し, 4週目に対照群に比べ約5倍の死胚出現を見ている. また, Srám と Zudová[5]は, 1,000mg/kg 1回 i.p. 投与, 200mg/kg 24時間間隔5回 i.p. 投与, 50mg, 100mg, 200mg/kg 12時間間隔5回 i.p. 投与群を設け, 8週間にわたり胎児調査を行ったが, 優性致死誘発性は1回投与<24時間間隔5回投与<12時間間隔5回投与の順に高くなっていた. また, 12時間間隔5回投与群では2, 3, 4, 7, 8週目に, 24時間間隔5回投与群では1, 4, 5週目に有意な優性致死誘発性の増加を見ているが, 特に 200mg/kg 12時間間隔5回投与群では約2倍の誘発率を示している.

今回の実験では, 妊娠が成立し, 着床した胚・胎児のみについてその生死を調べ, 優性致死作用を検討した結果, i.p. 投与後1週目後半および2週目前半で S-Na に起因すると見られる生存胎児の減少ならびに早期死胚の

表 2. JCL-ICR マウスにおけるサッカリンナトリウム（S-Na）の優性致死試験結果（その2）

投与後の交配時期	試薬および投与経路	雄数 交配使用	雄数 交尾確認	雌数 交配使用	雌数 交尾確認	黄体数 合計	黄体数 母体当り(平均)	着床数 合計	着床数 母体当り(平均)	着床数 黄体数(%)	生存胎児数 合計	生存胎児数 母体当り(平均)	生存胎児数 黄体数(%)	生存胎児数 全着床数(%)	死児数 早期死胚	死児数 後期死胚
3週目	Control	10	6	20	9	119	13.2	107	11.9	89.9	101	11.2	84.9	94.4	5	1
前半	EMS i.p.	10	6	20	8	94	11.8	91	11.4	96.8	79	9.9	84.0	86.8	12[c]	0
	MMC i.p.	10	5	20	6	75	12.5	68	11.3	90.7	56	9.3	74.7	82.4[a]	12[b]	0
	S-Na i.p.	10	8	20	11	140	12.7	110	10.0	78.6[a]	99	9.0	70.7[b]	90.0	11	0
	S-Na p.o.	10	6	20	8	99	12.4	92	11.5	92.9	90	11.3	90.7	97.8	2	0
後半	Control	10	6	20	7	87	12.4	80	11.4	92.0	74	10.6	85.1	92.5	6	0
	EMS i.p.	10	8	20	12	144	12.0	132	11.0	91.7	120	10.0	83.3	90.9	11	1
	MMC i.p.	10	4	20	5	59	11.8	46	9.2	78.0[a]	40	8.0	67.8[a]	87.0	5	1
	S-Na i.p.	10	5	20	7	87	12.4	81	11.6	93.1	77	11.0	88.5	95.1	3	1
	S-Na p.o.	10	8	20	9	104	11.6	90	10.0	86.5	82	9.1	78.9	91.1	8	0
4週目	Control	10	8	20	10	123	12.3	118	11.8	95.9	113	11.3	91.9	95.8	4	1
前半	EMS i.p.	10	8	20	10	125	12.5	119	11.9	95.2	114	11.4	91.2	95.8	5	0
	MMC i.p.	10	3	20	4	48	12.0	22	5.5	45.8[c]	19	4.8	39.6[c]	86.4	3[a]	0
	S-Na i.p.	10	7	20	9	110	12.2	100	11.1	90.9	91	10.1	82.7[a]	91.0	9	0
	S-Na p.o.	10	6	20	9	106	11.8	101	11.2	95.3	94	10.4	88.7	93.1	4	3
後半	Control	10	10	20	12	149	12.4	137	11.4	92.0	129	10.8	86.6	94.2	8	0
	EMS i.p.	10	10	20	12	149	12.4	131	10.9	87.9	128	10.7	85.9	97.7	3	0
	MMC i.p.	10	3	20	3	40	13.3	24	8.0	60.0[c]	21	7.0	52.5[c]	87.5	3	0
	S-Na i.p.	10	9	20	11	142	12.9	134	12.2	94.4	125	11.4	88.0	93.3	8	1
	S-Na p.o.	10	9	20	14	176	12.6	155	11.1	88.1	142	10.1	80.7	91.6	13	0

a, *b*, *c*; Control との間にそれぞれ $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ の有意性があったことを示す.

結果および考察

結果を総括して表2に示した.

全群とも6週間の交配期間中に雄の死亡は見られなかったが, 5週以後からMMC群の数匹に腹水が見られた.

一方, 雄の交尾率は6週間わたる12回の交配で, 対照群 60–100%, EMS群 30–100%, MMC群 30–90%, S–Na i.p.群 50–60%, S–Na p.o.群 60–80% であった. EMS群では投与後1—2週, MMC群では3–6週でそれぞれ低い交尾率を示し, 薬物の影響が考えられたが, 両物質について4日間同居交配法により行った我々の結果[11,12]では交尾率の低下は見られなかった. さらに, 妊娠の確認された雌の数も, 使用した20匹の雌のうち, 対照群7–13匹, EMS群4–12匹, MMC群0–11匹, S–Na i.p.群7–18匹, S–Na p.o.群8–14匹と少なかった. 前述した4日間同居交配法により無処置対照群では, 使用した雌の交尾成立は3日目が最も高く約50%であるが, 初日には約20%と非常に低い. これらの交尾した雌に関してはほぼ 100% の妊娠率を示している.

今回は交配適期の雌を選択したにもかかわらず, 低い交尾率を示したことは, 雌の選択法ならびに交配法の不適格さによるものと思われる. したがって, 今回の結果からは薬物投与におけるこれらの作用の有意性を検討することは避けた.

優性致死作用 EMS群では投与後1, 2週目に, またMMC群では4–6週目に排卵数（黄体数より推測）当りの着床数および着床数当りの生存胎児数に顕著な減少を示し, 従来の報告[7–10]通りの強い優性致死作用が認められた.

S–Na i.p. 投与群では, 全交配期間を通じ, 母体当りの平均排卵数, 排卵数当りの着床数に何ら対照群との有意な差は認められなかった. また母体当りの平均着床数も同様であった. しかし, 着床した胚・胎児のうち, 生存胎児の占める割合は1週目後半 84.3%($p<0.05$), 2週目前半88.8% ($p<0.01$) であり, 対照群がそれぞれ

表 2. JCL–ICR マウスにおけるサッカリンナトリウム (S–Na) の優性致死試験結果（その1）

投与後の交配時期	試薬および投与経路	雄数 交配使用	雄数 交尾確認	雌数 交配使用	雌数 交尾確認	黄体数 合計	黄体数 母体当り(平均)	着床数 合計	着床数 母体当り(平均)	着床数 黄体数当り%	生存胎児数 合計	生存胎児数 母体当り(平均)	生存胎児数 黄体数当り%	生存胎児数 全着床当り%	死児数 早期死胚	死児数 後期死胚
1週目 前半	Control	10	9	20	10	129	12.9	122	12.2	94.6	118	11.8	91.5	96.7	3	1
	EMS i.p.	10	3	20	4	65	16.3	42	10.5	64.6	40	10.0	61.5	95.2	2	0
	MMC i.p.	10	8	20	9	111	12.3	104	11.6	93.7	99	11.0	89.2	95.2	3	2
	S–Na i.p.	10	10	20	14	186	13.3	167	11.9	89.8	153	10.9	82.3	91.6	10	4
	S–Na p.o.	10	10	20	14	181	12.9	175	12.5	96.7	161	11.5	89.0	92.0	7	7
1週目 後半	Control	10	10	20	12	163	13.6	143	11.9	87.7	134	11.2	82.0	93.7	0	9
	EMS i.p.	10	5	20	5	62	12.4	52	10.4	83.9	29	5.8	46.8^{c}	55.8^{c}	21^{c}	2
	MMC i.p.	10	9	20	9	120	13.3	112	12.4	93.3	110	12.2	91.7^{a}	98.2	1	1
	S–Na i.p.	10	8	20	10	133	13.3	108	10.8	81.2	91	9.1	68.4^{b}	84.3^{a}	16	1
	S–Na p.o.	10	8	20	10	134	13.4	126	12.6	94.0	113	11.3	84.3	89.7	11^{c}	2
2週目 前半	Control	10	7	20	9	116	12.9	99	11.0	85.3	98	10.9	84.5	99.0	1	0
	EMS i.p.	10	5	20	6	82	13.7	64	10.7	78.1	30	5.0	36.6^{c}	46.9	32^{c}	2
	MMC i.p.	10	6	20	8	103	12.9	80	10.0	77.7	70	8.8	68.0^{b}	87.5^{b}	8^{b}	2
	S–Na i.p.	10	6	20	7	98	14.0	89	12.7	90.8	79	11.3	80.6	88.8^{b}	10^{b}	0
	S–Na p.o.	10	7	20	10	132	13.2	114	11.4	86.4	109	10.9	82.6	95.6	4	1
2週目 後半	Control	10	10	20	12	154	12.8	141	11.8	91.6	130	10.8	84.4	92.2	7	4
	EMS i.p.	10	9	20	12	150	12.5	126	10.5	84.0^{a}	99	8.3	66.0^{c}	78.6^{b}	25^{c}	2
	MMC i.p.	10	9	20	11	134	12.2	120	10.9	89.6	109	9.9	81.3	90.8	11	0
	S–Na i.p.	10	9	20	12	155	12.9	137	11.4	88.4	125	10.4	80.7	91.2	11	1
	S–Na p.o.	10	8	20	12	168	14.0	150	12.5	89.3	137	11.4	81.6	91.3	9	4

a, *b*, *c*; control との間にそれぞれ $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ の有意性があったことを示す.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 154-158, 1977

サッカリンナトリウムの優性致死作用

益淵正典*, 高橋昭夫*, 高橋 省*, 吉田誠二*
安藤 弘*, 久保喜一*, 平賀興吾*

Dominant Lethal Effects of Saccharin Sodium in ICR Mice

MASANORI MASUBUCHI*, AKIO TAKAHASHI*, OSAMU TAKAHASHI*,
SEIJI YOSHIDA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*
and KOGO HIRAGA*

筆者らは先に，サッカリンナトリウム (saccharin sodium, 以下S-Naと略す) に関する *in vivo*, *in vitro* 細胞遺伝学的研究から，S-Naに染色体異常誘発性のあることを認め報告した[1]．

一方，サッカリンおよびS-Naの生殖細胞におよぼす影響については，減数分裂染色体分析や優性致死試験などにより検討され，いくつかの報告があるが[2-5]，統一的見解は得られていない[6]．この生殖細胞で生じた異常は，次世代での遺伝的障害と最も密接な関係にあることからさらに検討を要する問題だと考えられる．そこで今回我々は，S-Naの優性致死作用の有無をICR系マウスを用いて調べたので報告する．

材料および方法

1. 試供薬物 S-Naは育和化学工業株式会社製 Lot No. 230201 を用い，使用直前に滅菌蒸留水で希釈調製した．本物質は不純物として45ppmの *o*-toluenesulfonamide を含んでいたが，その純度は 99.93 %で，非常に精製されたものである．一方，陽性対照として既知変異原物質である ethylmethanesulfonate (以下EMSと略す，Eastman Kodak Co. 製，Lot No. 711—212) と mitomycin C (以下MMCと略す，協和発酵工業株式会社製 Lot No. 316) を用い，それぞれ使用直前に生理食塩水にて希釈調整した．

2. 動物 雌雄ともJCL-ICRマウスを用い，4週令で購入後予備飼育し，10週令で実験に供した．実験期間中，雄はチップ敷のプラスチック製ケージで1匹飼いとし，雌は交配前まで金網ケージで10匹飼い，交配後は雄と同様の条件で2匹飼いとした．また全期間を通じ固型飼料 CE-2 (日本クレア製) と水道水を自由摂取させた．

3. 実験群の設定 あらかじめ数種類の濃度のS-Naを雄に投与し，その後の生死および交尾の成否に影響のないことを確かめ，EMS, MMCについては文献値[7-10]を参考に投与濃度を決定した．各物質の投与量と使用動物数は表1に示す．

表 1. 物質，投与量，投与経路および使用動物数

物質	投与量と投与経路	動物数 雄	動物数 雌[a]
Control (無処置)		10	240
Ethylmethanesulfonate(EMS)	250mg/kg i. p.	10	240
Mitomycin C (MMC)	3mg/kg i. p.	10	240
Saccharin Sodium (S-Na)	2000mg/kg i. p.	10	240
Saccharin Sodium (S-Na)	5000mg/kg p. o.	10	240

a; 雄1匹に対し雌2匹を週2回，6週間にわたって交配

4. 交配方法 投与翌日から毎週2回，月曜日と木曜日に，無処置未経産の雌と6週間にわたり交配を続けた．交配は雄1匹に対し雌2匹を一夜同居させて行ったが，雌は各週とも10週令に達したものの中から膣口観察により交配適期のものを選別し用いた．翌朝膣栓観察により交尾の確認を行い，交尾の有無にかかわらず，交配した雌を2匹ずつ新しく用意したケージで分離飼育した．

5. 黄体および胎仔観察 妊娠第13日目に母体を頸脱により屠殺後開腹し，卵巣と子宮を摘出，卵巣については黄体数を，子宮については着床数，生存胎児数，早期・後期死胚数を調べた．

6. 統計処理 得られた値はそれぞれの項目について，母体当り，黄体数当り，着床数当りの頻度を求め，また χ^2 検定により対照群との有意性を検討した．

* 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

出現を見，その内訳は break (3.6%, $p<0.01$) と gap (3.3%) で対照群との有意性を認めた．次に 0～1,600 mg/kg に8群を設け，12時間間隔5回 i.p. 投与後分析した．400mg/kg 以上で対照群に比し有意な ($p<0.05$) 異常出現を見たが，その用量反応関係は認められなかった．

in vitro 系：20mg/ml 添加後6—48時間目に分析し，24，48時間目に高い異常出現を見た．その内訳は break (19.5%, $p<0.001$)，gap (25.5%, $p<0.01$) であった．さらに0—40mg/ml に8群を設け，添加24時間目に分析したが，10mg から break を伴う異常細胞出現の上昇を見，15mg から対照と有意性 ($p<0.01$) を示し，顕著な用量反応関係を認めた．

以上から，サッカリンナトリウムには染色体異常誘発性があるものと結論した．

（本研究は日本環境変異原研究会第5回研究発表会1976年10月で発表した）

文　献

1) Voogd, C. E., J. J. J. A. A. Jacobs, and J. J. van der Stel : *Report 15/73 Chemo*, Dutch State Institute of Public Health, 1973
2) Newell, G. W. and W. A. Maxwell : *XPBRC No. 221824/6, U. S.* Government Report, 1972
3) Stone, D., E. Lamson, Y. S. Chang, and K. W. Pickering : *Science*, 164, 568, 1969
4) Kristofferson, U : *Hereditas*, 70, 271, 1972
5) Machemer, L. and D. Lorke : *Humangenetik*, 19, 193, 1973
6) Sanjeeva Rao, M. and A. B. Quresi : *Indian J. Med. Res.*, 60, 599, 1972
7) Srám, R. J. and Z. Zudová : *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 12, 186, 1974
8) Kramers, P. G. N : *Mutation Res.*, 32, 81, 1975
9) Ilse-Dore, A : *Mutation Res.*, 35, 247, 1976
10) 益淵正典，縄井寿美子，吉田誠二：東京衛研年報，26-2, 161, 1975
11) 益淵正典，高橋昭夫，高橋　省，平賀興吾：東京衛研年報，27-2, 100, 1976
12) Pitkin, R. M., D. W. Anderson, W. A. Reynold, and L. J. Filer : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 803, 1971
13) Kennedy, C., O. E. Fancher, J. C. Calandra, and R. E. Keller : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 10, 143, 1972
14) Minegishi, K. I., M. Asahina, and T. Yamaha : *Chem. Pherm. Bull.*, 20, 1351, 1972
15) 越智尚子，外村　晶：日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨集，1976
16) de Vreis, G. F. and M. C. T. Kragten : *Fd Cosmet. Toxicol*, 13, 177, 1975
17) Allen, M. J., E. Boyland, C. E. Duckes, E. S. Horning, and J. G. Watson : *Brt. J. Cancer*, 11, 212, 1957
18) Campton, R. F : *Toxicology, I.* 233, 1973
19) Hicks, R. M., J. St. J. Wakefield, and J. Chowaniec : *Nature*, 243, 247, 1973
20) Hicks, R. M., J. St. J. Wakefield, and J. Chowaniec : *Nature*, 243, 424, 1973
21) 蕨岡小太郎：月刊薬事，17, 1887, 1975

の関連をはっきりさせておくことが重要かと思われる．

一般に動物を用いた *in vivo* の実験では薬物感受性などに対する個体差，あるいは使用しうる動物数に制限のあることなど種々の条件により量的な関係を把握するのは困難である．その点，均一化された培養細胞を用いる *in vitro* の実験では，処理濃度および処理時間など厳密にコントロールできる条件が多々あり，作用を分析するのに都合がよい．

さて，S–Na は生体内では代謝されず，摂取後短時間でそのほとんどが尿中に排泄されるという報告が多数[12–14]ある．この点から，*in vivo* で染色体異常誘発性が認められれば，*in vitro* で直接細胞に作用させても生体内での反応と同じ結果の得られることが充分期待される．そこで，チャイニーズハムスター由来の培養細胞株 CHO–K1 を用いて検討を加えたが，処理48時間で最も異常が見られ（Table 3），また出現頻度と処理濃度との間に顕著な相関関係を認めた（Table 4）．

これらの結果は，染色体異常を指標とした光学顕微鏡レベルでの変異であり，さらに不可視レベルの検出法が確立されれば，低投与量でもその遺伝的障害の検出される可能性が考えられる．現に越智と外村[15]により，ヒト培養細胞の S–Na 低濃度処理で不定期ＤＮＡ合成が観察されている．これはＤＮＡ傷害を受けたことを示すものである．

これまでサッカリンの変異原性，特に細胞遺伝学的研究に関する報告はきわめて少なく，結果もまちまちである[8]．*in vivo* では，チャイニーズハムスターに 1.5g/kg/day の S–Na を3日間経口投与し，骨髄細胞での染色体分析が行われたが，数的あるいは構造的に何ら有意な異常は認められていない[16]．ラットでは，1g/kg の S–Na 投与で染色体異常は生じていない[17]．同じくラットで，サッカリン 30，2,500，5,000mg/kg 投与後，6～48時間に染色体分析を行い，有意な染色体異常出現が認められているが，それは6時間目の 2,500mg/kg 投与群に限られ[2]，薬物に依存した作用であるかどうかは判断しがたい．一方 Srám と Zudová[7]は，雄マウスに 200mg/kg の S–Na を12時間間隔で5回連続投与後，その生殖細胞染色体分析を行い，1.6%の転座，4.5%の X–Y 不対合などの異常を認めている．さらに彼らは上記実験と平行して優性致死試験を行い，投与後1，4週目に有意な死胚の増加を認め，またそれは連続投与することにより（1000mg/kg 1回投与よりも 200mg/kg 5回投与）作用が強く現われ，その投与間隔は短いほど（24時間よりも12時間）作用の強いことを報告している．今回我々は，投与量と作用関係を調べるのに彼らの知見を参考とした実験を行ったが，その結果は，4,000mg/kg 1回投与で 3.6%（$p<0.01$）の break 保有細胞を認めたのに対し，800mg，1,600mg/kg 12時間間隔5回連続投与ではそれぞれ 1.6%（$p<0.01$），2.0%（$p<0.05$）であり，むしろ逆の現象が観察された．

さて，ヒトリンパ球細胞をサッカリン 500μg/m*l* 添加培地で3日間培養した *in vitro* 実験では，染色体異常を示唆する有意な値は得られていない[3]．一方，今回用いたと同様のチャイニーズハムスター由来細胞を，S–Na 濃度 100，250，500，1,000μg/m*l* 添加培地で1～3日間処理した Kristofferson の実験では，明らかに S–Na に起因すると思われる染色体異常出現の報告がある[4]．彼によると，処理日数による変動は顕著でないが，2日処理の例では 1,000μg/m*l* 群と対照群との間に約3倍の，また 100–1,000μg/m*l* の平均としては約 1.4 倍の染色体異常を認め，さらに処理濃度との間に有意な相関性を見い出している．

サッカリンによる発癌性の示唆された報告では，その原因となる物質がサッカリンに含まれる不純物，特に *o*–toluenesulfonamide ではないかという疑いがもたれている[18,19]．上記実験に用いられたサッカリンの成分分析では 810ppm の *o*–toluenesulfonamide が含まれていた[20]．一般に欧米産サッカリン中の不純物含量は高いといわれ，国産のものは食品衛生法により 100ppm 以下と定められている[21]．この欧米産 S–Na を用いたと思われ，変異原性があるとした Kristofferson の報告[4]に見る投与量を本実験のそれと比較すると，本実験では *in vivo* で約4倍，*in vitro* では約15倍の量を用いている．今回用いた S–Na の *o*–toluenesulfonamide 含量が 45 ppm であったことを考えると，示された変異原性は S–Na そのものではなく，その不純物によることが充分考えられ，早急にこれら *o*–toluenesulfonamide を含めた不純物の検討のなされることが望まれる．また，次世代に最も関連性をもつ生殖細胞での減数分裂染色体異常が報告されていることから[7]，優性致死試験による変異原性の検討がなされる必要がある．

要　約

in vivo 系として雄マウス（ICR，7週令）を，また *in vitro* 系として CHO–K1 細胞を用い，サッカリンナトリウムの染色体におよぼす影響を調べた．両系とも，まず高用量投与あるいは添加後，最も染色体異常の多発する時期を決定し，次にその時期について異常出現の用量反応関係を検討した．

in vivo 系：まず 4,000mg/kg（LD_{50} 値）i.p. 投与後，6–48時間目に分析したが，24時間で最も高い異常

用関係は認められず，また1回投与による先の実験に比べ，その出現頻度が高くなるという結果は得られなかった．出現した異常のほとんどは chromatid type のものであった．

2. *in vitro* 系実験

① 処理時間と染色体異常出現 (Table 3)

break を伴う細胞の出現頻度は処理48時間で最も高く (対照群の 8.5 倍)，次いで 24 時間 (対照群の 3.3 倍) であったが，6時間では有意な増加は見られなかった．gap を伴う細胞は処理6時間から有意に増加した．他の異常としては dicentric chromosome, ring chromosome などが観察されたが，有意な差とはなっていない．

② 処理濃度と染色体異常出現 (Table 4)

対照群に対する異常出現頻度の差の大きいのは処理48時間目であるが，24時間目においても高い有意性を認めたため，分析はこの時期について行った．break を伴う細胞の出現は 10mg/m*l* から上昇し，15mg/m*l* から有意性を示した．gap は高い有意性をもって 10mg/m*l* から出現した．さらにこれらは処理量と異常出現の間に顕著な相関関係を示した．なお，40 mg/m*l* 処理では細胞の増殖は見られず，分析は不可能であった．

以上の結果から，S-Na は *in vivo*, *in vitro* においても染色体異常誘発性を示すことが明らかとなった．

考　察

今回，S-Na をマウスに投与後骨髄細胞で染色体分析した結果，異常出現は投与後24時間で最も顕著であったが(Table 1)，その出現率は高濃度投与により高められるものの，投与量と作用との間に明瞭な相関関係を見い出すことはできなかった (Table 2)．しかし薬物の安全性評価の上では，薬物に依存すると思われる反応と投与量

Table 3. Time-relationships for Chromosome Aberrations in CHO-K1 Cells treated with Saccharin Sodium (20mg/m*l*) for 6, 24, 48 hrs

Time (hrs)	Dose (mg/m*l*)	No. of cells analyzed	No. & (%) of cells with breaks	No. & (%) of cells with gaps	Total No. of breaks cell	No. of breaks per aberrant
6	0	200	4(2.0)	9(4.5)	7	1.75
	20	200	7(3.5)	27(13.5)[b]	9	1.29
24	0	200	12(6.0)	21(10.5)	16	1.33
	20	200	39(19.5)[c]	51(25.5)[c]	119	3.05
48	0	200	4(2.0)	8(4.0)	6	1.50
	20	200	34(17.0)[c]	57(28.5)[c]	76	2.24

a; Significantly different from controls ($p<0.05$)　*b*; ($p<0.01$)　*c*; ($p<0.001$)

Table 4. Dose-relationships for Chromosome Aberrations induced by Saccharin Sodium at various Concentration for 24 hrs in CHO-K1 Cells

Does (mg/m*l*)	No. of cells analyzed	No. & (%) of cells with breaks	No. & (%) of cells with gaps	Total No. of breaks	No. of breaks per aberrant cell
0	200	5(2.5)	9(4.5)	7	1.40
1	200	6(3.0)	10(5.0)	15	2.50
5	200	5(2.5)	0(4.5)	4	0.80
10	200	10(5.0)	30(15.0)[b]	12	1.20
15	200	21(10.5)[b]	41(20.5)[c]	35	1.67
20	200	44(22.0)[c]	68(34.0)[c]	87	1.98
30	200	112(56.0)[c]	88(44.0)[c]	213	1.90
40	—	—	—	—	—

a; Significantly different from Controls ($p<0.05$)　*b*; ($p<0.01$)　*c*; ($p<0.001$)

それぞれ24時間処理時に染色体分析を行った.

結　果

1. *in vivo* 系実験

① 染色体異常出現の経時的変化 (Table 1)

S-Na 投与群では24時間目に最も高い染色体異常出現を見た. それらのほとんどは breakとgap であり, それぞれ chromatid, isochromatid type の異常を示した. その他の異常としては48時間目に exchange が1例見られたのみであった. 各時間群に6—9個体を用いたが, それぞれにおいて個体差は認められなかった.

MMC 群では, 各時間とも顕著な異常を示した. 特に24時間では異常保有細胞が60%と著しく増加した. これらには break, gap の他に, exchange (8.5%), pulverization (4.5%), ring chromosome (1.0%) など多種が観察され, これまでの報告[9] とよく一致した.

対照の各経時群とも break は1例も見られず, gap がわずかに出現したのみであった. またこの gap も軽度のものであり, これらは我々がこれまでに得ている JCL-ICR 系マウスでの値[10,11]によく一致する.

② 投与量と染色体異常出現 (Table 2)

break は 400mg/kg×5 以上で, また gap は 800mg/kg×5 群以上で有意な出現を見たが, 顕著な投与量—作

Table 1. Time-relationships for Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells of JCL-ICR Mice induced by Saccharin Sodium (4000mg) and Mitomycin C (3mg/kg) at 6, 24, 48 hrs after Single i.p. Injection

Time after injection (hrs)	Drugs	No. of animals analyzed	No. of cells analyzed	No. & (%) of cells with breaks	No. & (%) of cells with gaps	No. & (%) of cells with other aberrations	No. of breaks per aberrant cell
6	Control	6	300	0(0)	5(1.7)	0(0)	0
	MMC	6	300	8(2.7)^b	13(4.3)	0(0)	1.0
	Saccharin	5	250	4(1.6)^a	2(0.8)	0(0)	2.25
24	Control	5	250	0(0)	4(1.6)	0(0)	0
	MMC	4	200	102(51.0)^c	48(24.0)^c	34(17.0)^c	3.81
	Saccharin	9	450	16(3.6)^b	15(3.3)	0(0)	1.19
48	Control	6	300	0(0)	2(0.7)	0(0)	0
	MMC	5	250	17(6.8)^c	19(7.6)^c	3(1.2)	4.41
	Saccharin	7	350	7(2.0)^a	5(1.4)	1(0.3)	1.14

a, Significantly differnt from Controls ($p<0.05$), *b*, ($p<0.01$), *c*, ($p<0.001$)

Table 2. Dose-relationships for Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells of JCL-ICR Mice induced by various Dose of Saccharin Sodium after the repeated i.p. Injection at Intervals of 12 hrs

Dose (mg/kg)	No. of animals analyzed	No. of cells analyzed	No. & (%) of cells with breaks	No. & (%) of cells with gaps	No. of breaks per aberrant cell
0×5	5	250	0(0)	2(0.8)	0
25×5	5	250	1(0.4)	2(0.8)	1.0
50×5	5	250	0(0)	6(2.4)	0
100×5	5	250	1(0.4)	4(1.6)	1.0
200×5	5	250	3(1.2)	7(2.8)	1.0
400×5	5	250	6(2.4)^a	4(1.6)	1.2
800×5	5	250	4(1.6)^a	19(7.6)^c	1.0
1600×5	5	250	5(2.0)^a	9(3.6)^a	1.0

a; Significantly different from Controls ($p<0.05$) *b*; ($p<0.01$) *c*; ($p<0.001$)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 149-153, 1977

サッカリンナトリウムによる誘発染色体異常

益淵正典*, 縄井寿美子*, 吉田誠二*, 平賀興吾*

In vivo and in vitro Chromosome Aberrations Induced by Saccharin Sodium

MASANORI MASUBUCHI*, SUMIKO NAWAI*, SEIJI YOSHIDA* and KOGO HIRAGA*

サッカリンの突然変異原性に関しては，微生物での直接および宿主経由法による試験[1,2]，ゲッ歯類を主とした哺乳動物の培養細胞および生体細胞での細胞遺伝学的研究や[2-4] 優性致死試験[2,5-7]が行われているが，結果はまちまちで統一的見解を得るまでには至っていない[8]．

今回筆者らは，サッカリンナトリウムの突然変異原性の有無を検討するため，染色体分析を主とする *in vivo*, *in vitro* 細胞遺伝学的研究を行った．実験に際して特に留意したのは，もしS-Naに染色体異常誘発性があるとすれば，投与量と染色体異常出現との間に相関関係（dose-response）があるか否かであった．したがって，実験は *in vivo*, *in vitro* とも ①高濃度投与あるいは処理（*in vivo* では LD_{50} 相当，*in vitro* では ID_{50} 相当）後，最も高頻度に染色体異常の出現する時期を決定し，②次いで①の時期について種々の濃度段階を設け，投与量と染色体異常出現との関連を調べた．

材料および方法

1. 試供薬物 サッカリンナトリウム（S-Na, 育和化学工業株式会社，Lot No. 23021）は，滅菌蒸留水および培養液にて使用直前に調整した．また，陽性対照として既知変異原物質，Mitomycin C（以下 MMC と略す，協和醗酵工業株式会社，Lot No. 316）を用い，使用直前に生理的食塩水および培養液にて調整した．

2. 動物 7週令の JCL-ICR 系（SPF）雄マウス（日本クレア生産）を用いた．予備飼育および実験期間を通じ，環境条件を一定にした動物室（温度25±1°，湿度55±5%，照明8時間／日）で，固型飼料 CE-2（日本クレア製）と水道水を自由に与え飼育した．

3. 細胞 チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1 細胞を用い，仔牛血清10%添加の F-12 培地で培養した．本細胞の染色体数は20ないし21で，その細胞分裂周期は13-16時間である．

4. 染色体標本作成 分裂中期像を得るため *in vivo* 系では，標本作成の2時間前に0.5% コルヒチン溶液 1 ml/kg を腹腔内投与し，また *in vitro* 系では2時間のコルセミド（0.5μg/ml）処理を行った．常法により細胞を集め，両系とも低張液（37°, 0.075M KCl 水溶液）で15分間処理した後，カルノア液（酢酸 1：メタノール 3）で固定した．標本は火焔乾燥法により作成し，ギムザ染色後検鏡に供した．

5. 観察および結果の評価 観察には，*in vivo* 系では1個体につき50個，*in vitro* 系では1処理群につき200個のよく広がった分裂中期像を対象とした．

異常としては chromatid, isochromatid type（染色分体，染色体型）の break（切断）と gap（ギャップ，不染色性間隙），さらに exchange（交換型異常），ring chromosome（環状染色体），dicentric chromosome（二動原体染色体），pulverization（染色体細片化）などを主として調べた．

得られた結果はすべて χ^2 検定により，陰性対照群との有意性を検討した．

6. 実験計画

1) ***in vivo* 系実験**

① S-Na 4,000mg/kg, MMC 3.0mg/kg と無処置の3群を設け，それぞれ腹腔内1回投与後，6，24，48時間目に染色体分析を行った．

② S-Na 0-1,600mg/kg 間に8群を設け（Table 2），12時間間隔5回連続投与後12時間目に染色体分析を行った．この実験設定は，連続投与することにより優性致死作用が強められるとする報告[7]に基づいた．

2) ***in vitro* 系実験**

① 細胞播種12時間後に 20mg/ml の S-Na を添加，6，24，48時間後に染色体分析を行った．

② S-Na 0-40mg/ml 間に8群を設け（Table 4），

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

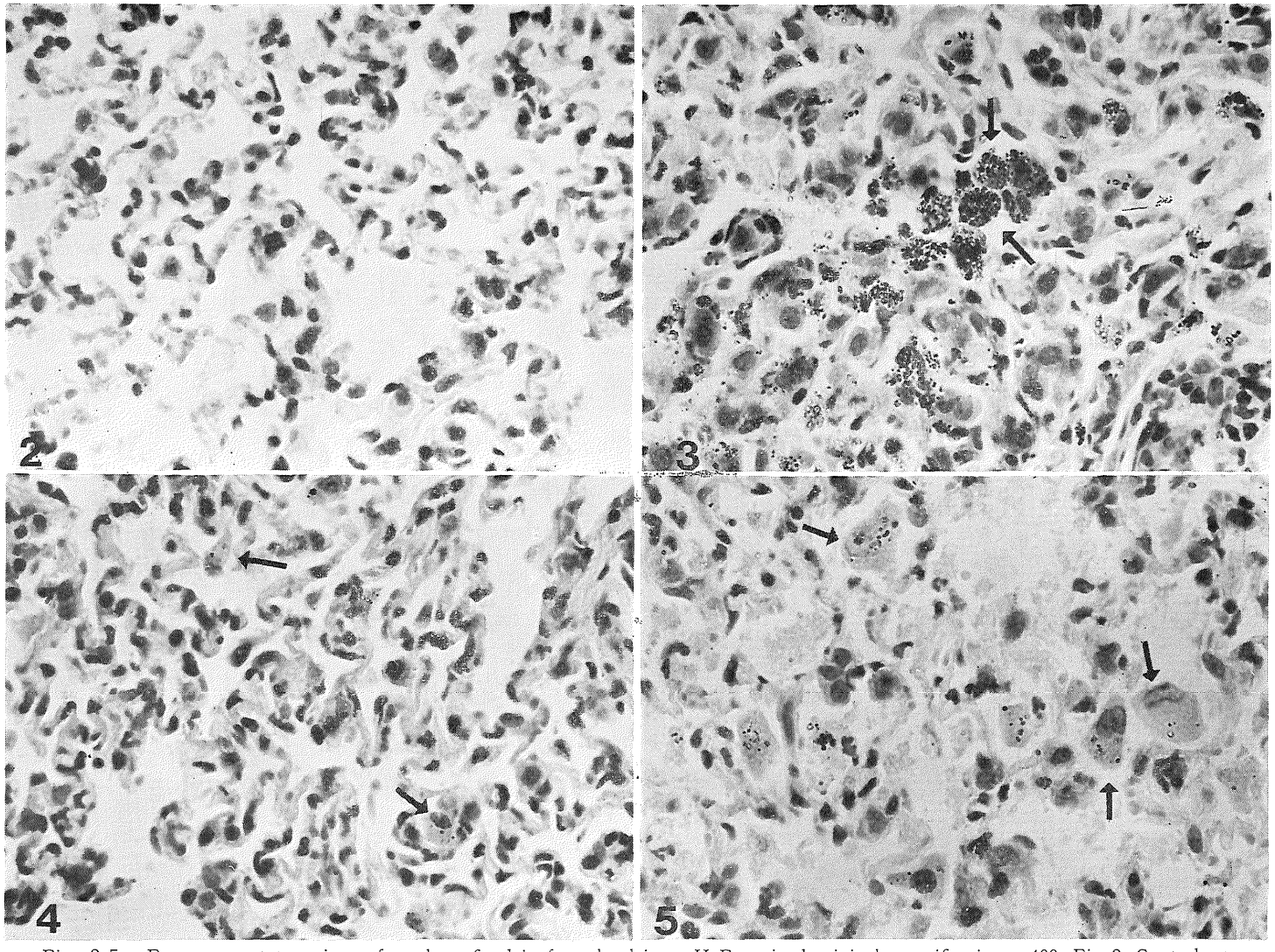


Fig. 2–5. Frozen cryostat sections of rat lung fixed in formol calcium, H. E. stained, original magnification ×400. Fig. 2. Control rat.
Fig. 3. JIS Dust No. 11, 21mg/m³. Moderate swelling of alveolar epithelium are observed. Macrophages (arrows) are filled with dust particles and slightly enlarged. Fig. 4. Chromium ore dross dust, 1.46mg/m³. Slight swelling of alveolar epithelium are observed. Macrophages (arrows) are small in size and a few dust particles are seen in cytoplasm of the cells.
Fig. 5. Chromium ore dross dust, 21mg/m³. Thinning and destruction of alveolar wall are observed. Macrophages (arrows) are markedly enlarged. These cytoplasm are contained a little dust particles.

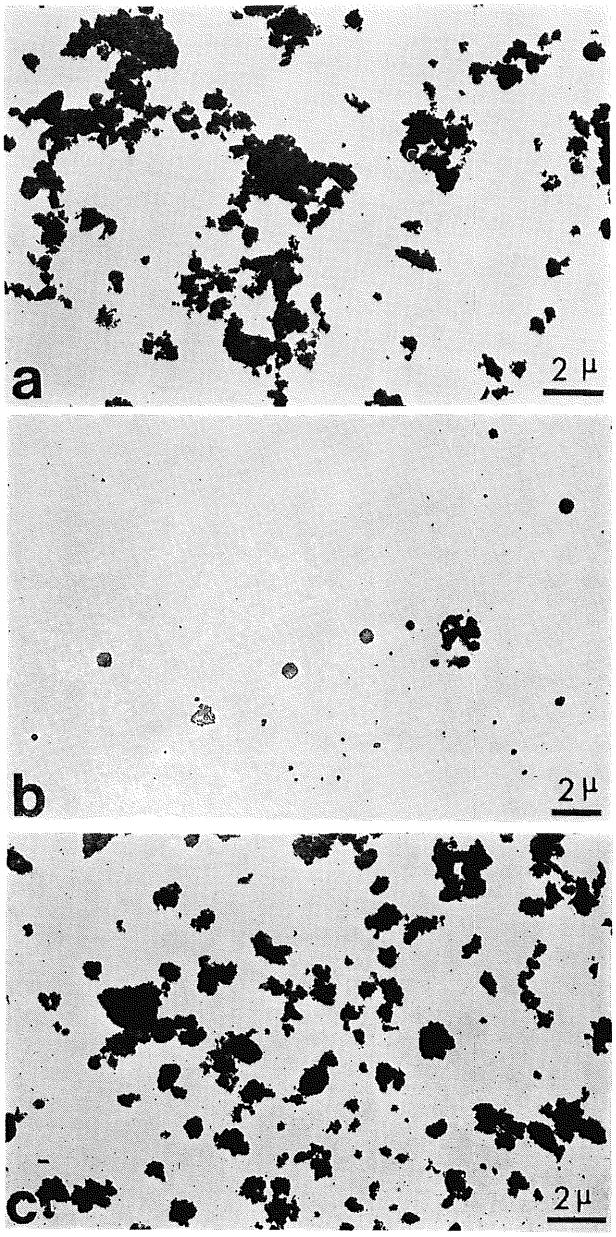


Fig. 1. Electron Micrograph of Aerosol Particle in Inhalation Chamber

a) JIS dust No. 11, 21mg/m³

b) Chromium ore dross, 1.47mg/m³

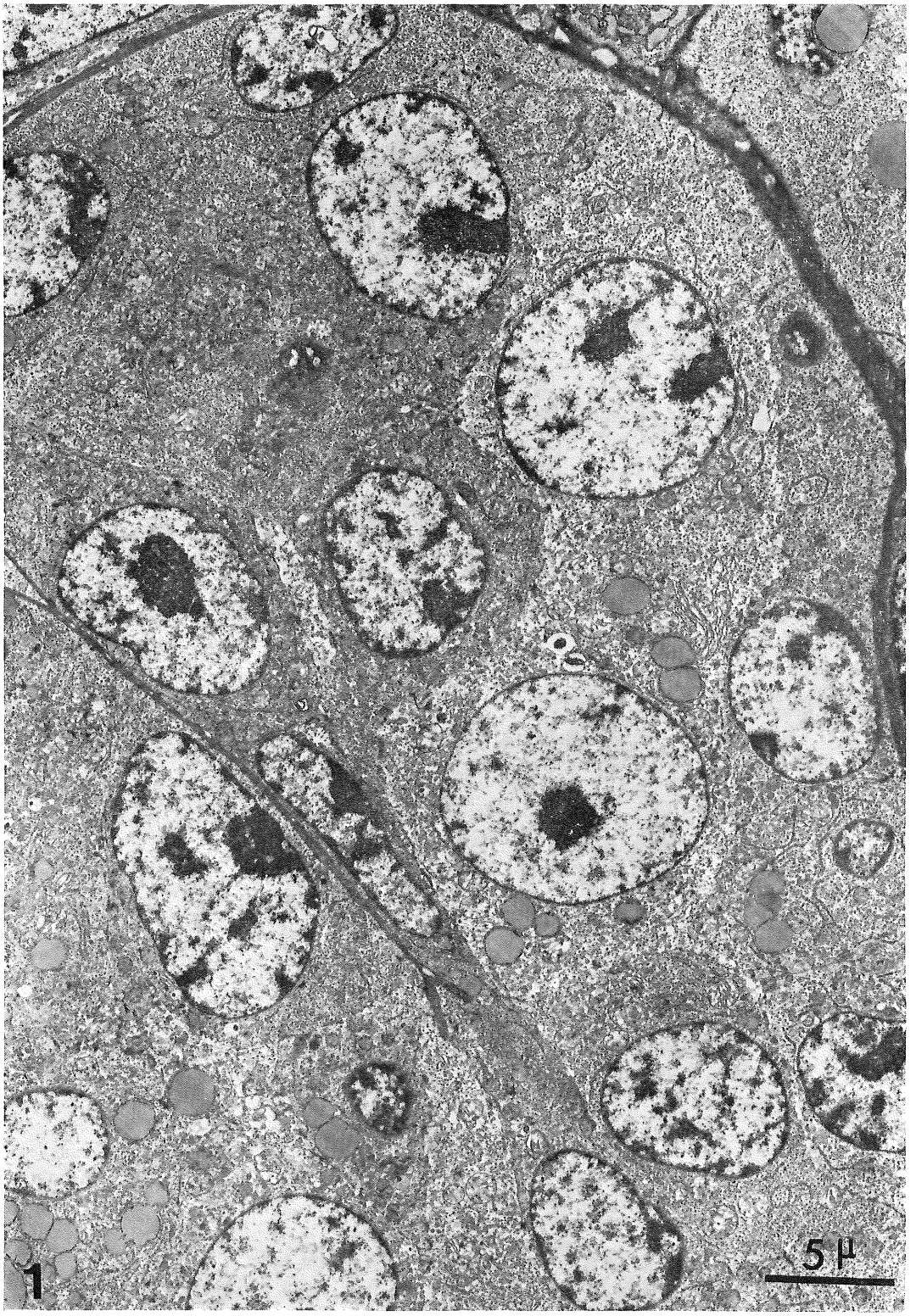
c) Chromium ore dross, 21mg/m³

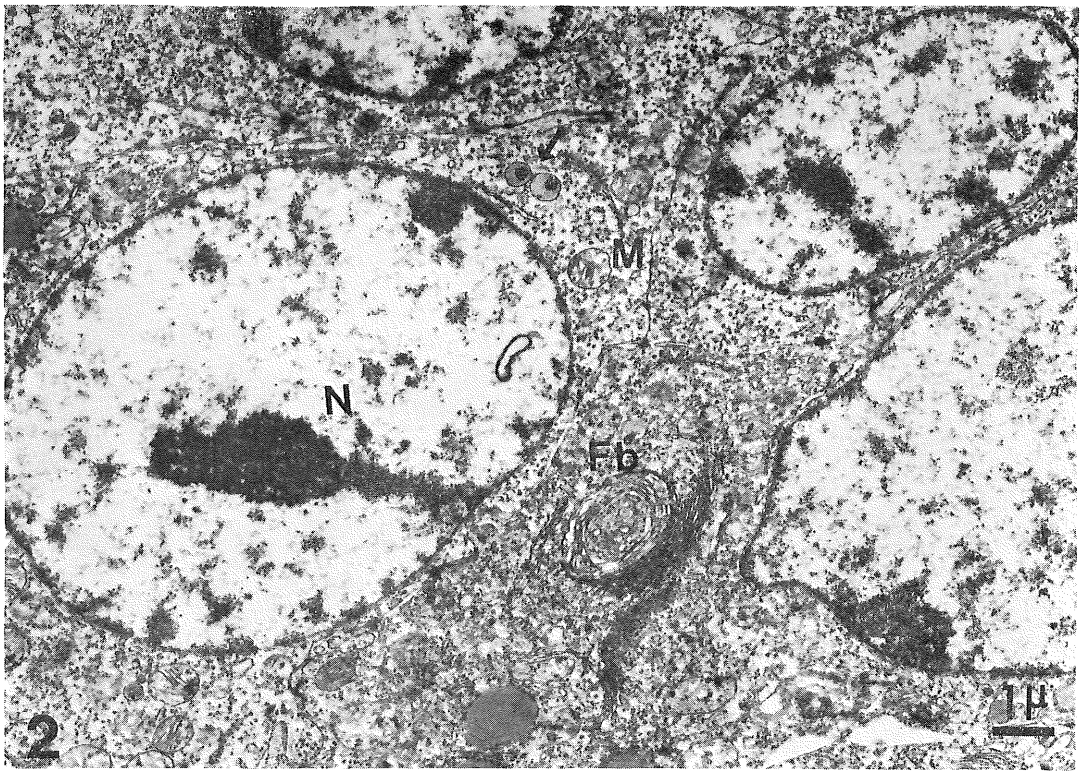
Arrow : desmosome, N : nucleus, M : mitochondria.

Fig. 6. Desmosome in cytoplasmic matrix of a part of squamous metaplasia is seen (arrow).

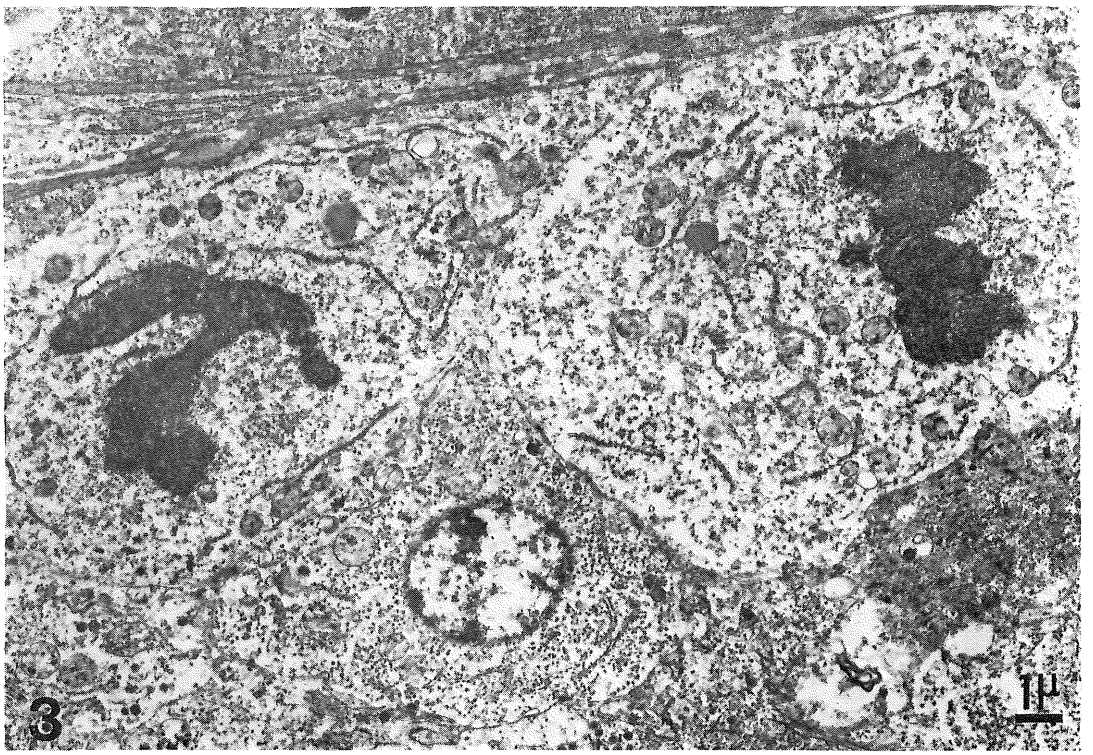
Fig. 7. Rough surfaced endoplasmic reticulum (RER) in a part of squamous metaplasia showing concentric arrangement. N:nucleus.

Fig. 8. Differentiated acinar cell in normal rat. N: nucleus, M : mitochondria, G : Golgi apparatus, Li : lipid droplet, D : dense granule, C : crystalloid, Bc : basal cell, Bm : basement membrane, RER : rough surfaced endoplasmic reticulum, Arrow : desmosome.

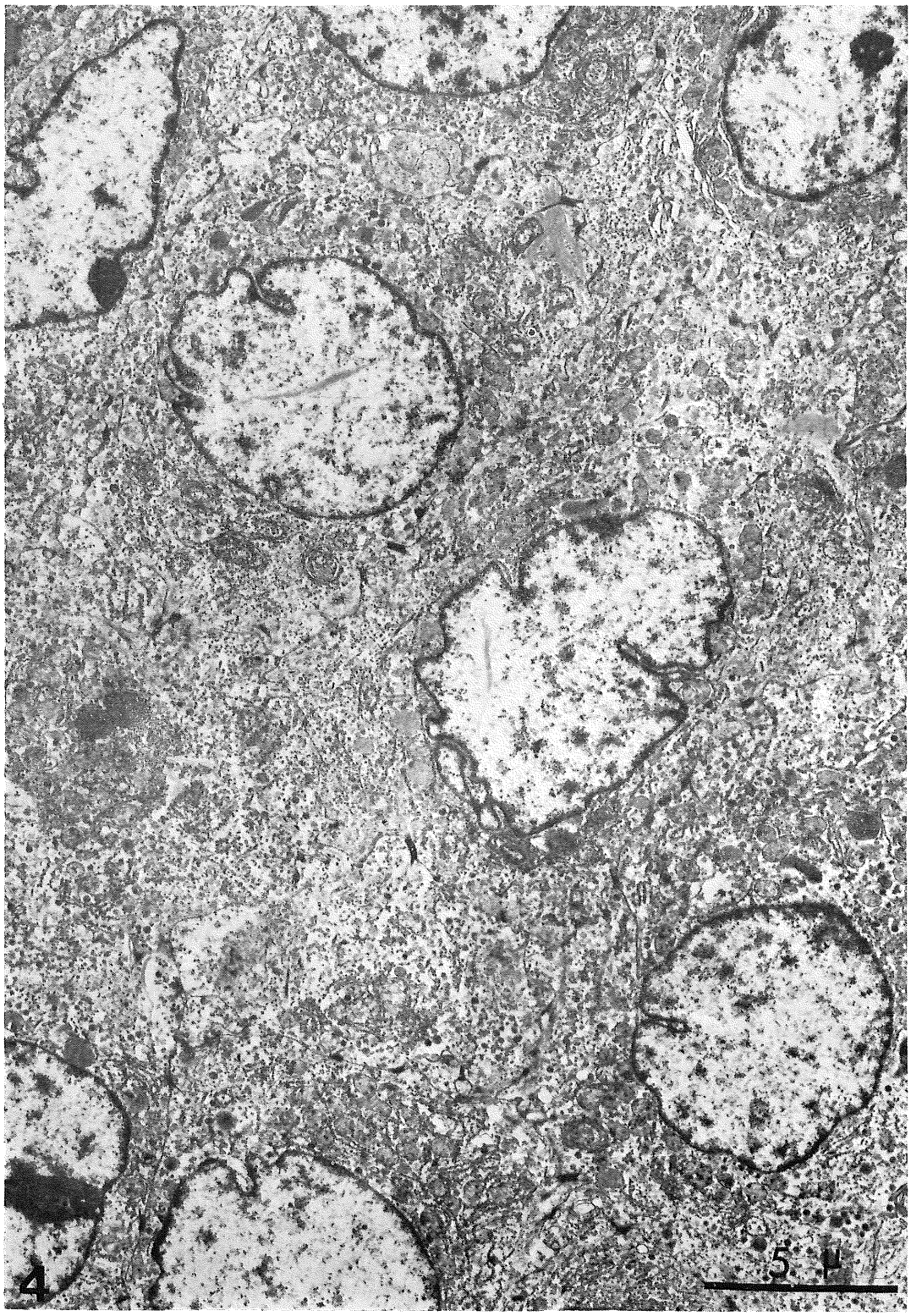

1
5μ

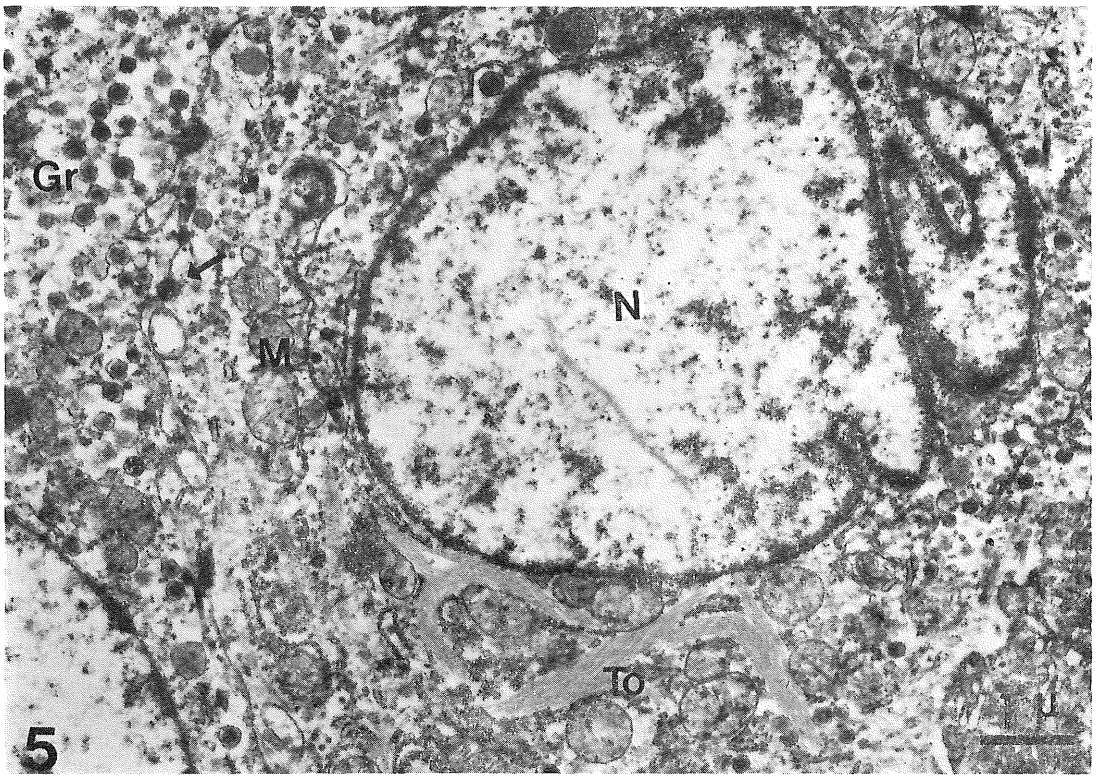


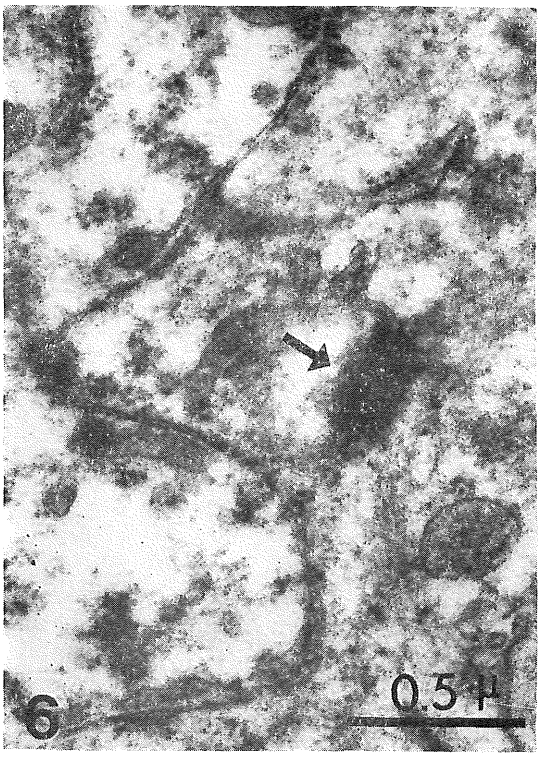
2

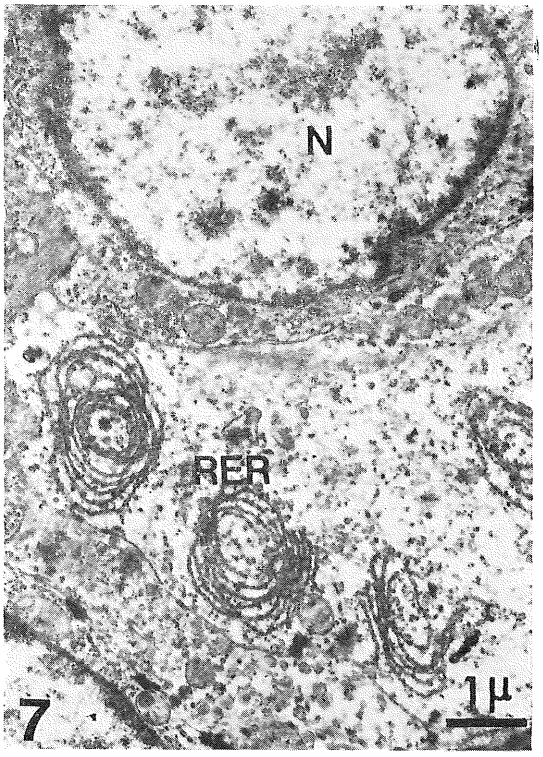


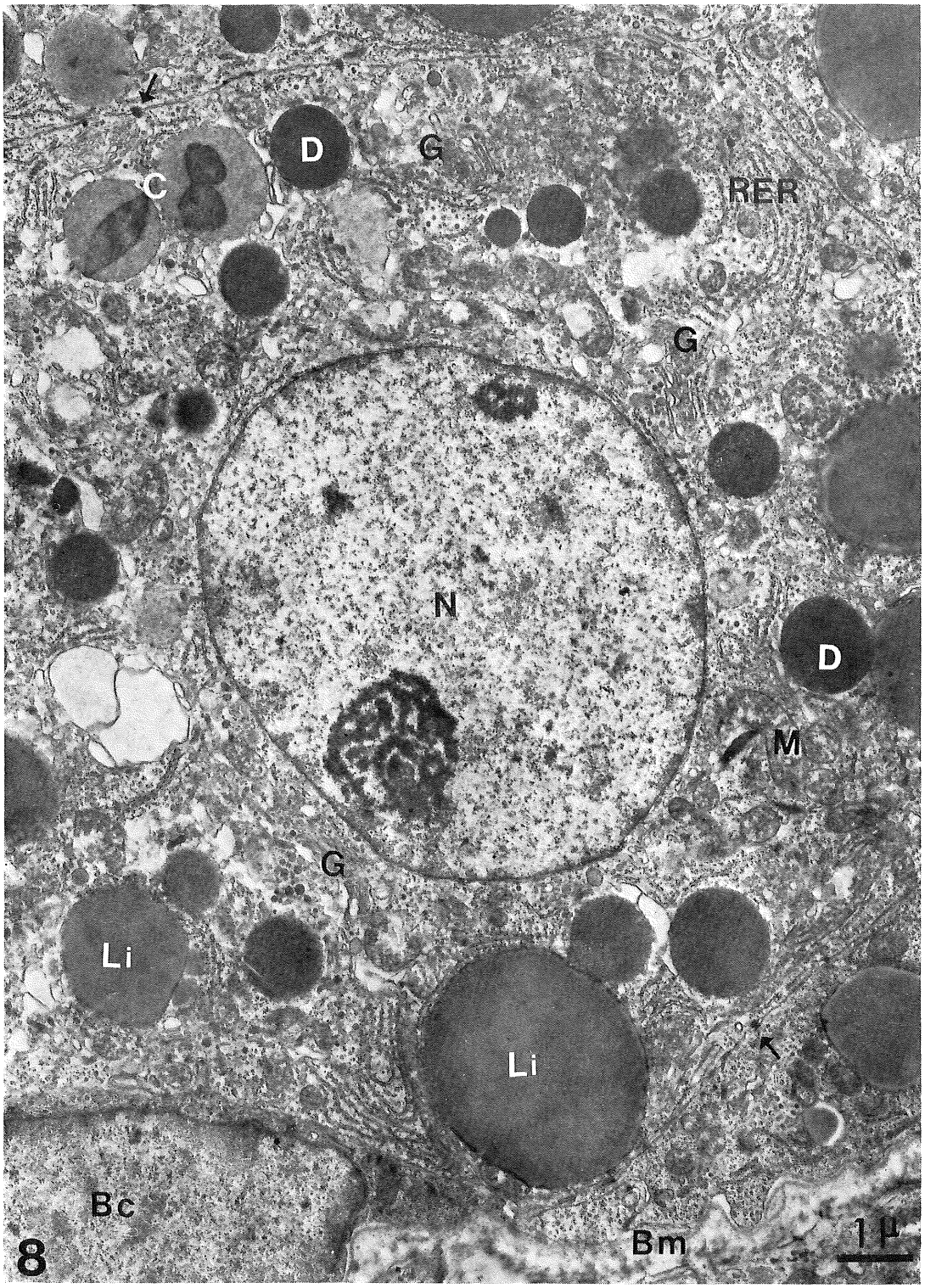
3


4
5 μ


Gr
M
N
To
5
1μ


0.5μ
6


N
RER
7
1μ


D
G
C
RER
G
N
D
M
G
Li
Li
Bc
Bm
1μ
8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 215-220, 1977

ラットの末梢血中に見られた異常細胞の検討

阿部幸恵*, 藤井 孝*, 平賀興吾*

Investigation of Abnormal Cells in Peripheral Blood of Rat

YUKIE ABE*, TAKASHI FUJII* and KOGO HIRAGA*

緒 言

ラットを用いた毒性試験において末梢血を形態的に検索したところ，数例の末梢血中に正常では見られない幼若細胞，異常細胞が認められた．ヒトの場合正常状態で末梢血中に幼若細胞が出現することはなく，幼若細胞が出現した際には第一に白血病を疑って検索を進めるのが通常である．しかしマウス，ラットでは髄外造血が容易に発現するため[1]，骨髄系の幼若細胞が生理的にも末梢血中に出現するという現象が希に見られ[1]，幼若細胞の出現を直ちに白血病と結びつけて考えることは誤まりとされている[2]．そこで今回は末梢血中に幼若細胞，異常細胞が見られたラットのうち白血病が否定された個体を選択的に取り上げ，末梢血中の細胞を観察すると共に，骨髄，脾臓，リンパ節，肝臓の観察を併せて行ない，白血病以外で末梢血中に見られた幼若細胞，異常細胞の帰属とこれら器官との関連を検討した．

実験方法

毒性試験で末梢血の形態的検索を行なったJCL: Wistar系の雌雄ラット250例中，白血病以外で末梢血中に幼若細胞，異常細胞が見られた10例を抽出し観察対象とした．対象としたラットにつき末梢血の白血球百分率を求め，同時に出現した細胞，赤血球，血小板の形態を光顕的に観察した．併せて骨髄塗抹標本と，脾臓，リンパ節，肝臓の組織標本の光顕的観察を行なった．

末梢血塗抹標本は断頭屠殺時に頸動脈，頸静脈より流出した血液の始めの2－3滴を捨て，その後流出した血液にて作製し，乾燥後 May-Grünwald-Giemsa 染色した．骨髄塗抹標本はラットの解剖時に右大腿骨を摘出し骨髄を塗抹し，乾燥後 May-Grünwald-Giemsa 染色した．脾臓，リンパ節，肝臓の組織標本は通常のパラフィン切片を作製し，Hematoxylin-Eosin 染色した．

白血球百分率を求める際の基準は Schermer に従ったが[3]，末梢血中で見られる正常の顆粒球系細胞は後骨髄球以後の成熟段階の細胞とし，骨髄球以前の成熟段階の細胞を異常細胞とした．また異型性を示したリンパ球も異常細胞に含めた．

実験結果

結果は表1に示した．

末梢血に出現した細胞を観察した結果，異常細胞は，Ⅰ）正常状態で骨髄中に見られる骨髄系の幼若細胞，Ⅱ）リンパ系の細胞，Ⅲ）異型性の強い核を有する骨髄系の細胞，Ⅳ）帰属が不明な細胞の4種に大別された．そこで末梢血中に出現した異常細胞の帰属によりラットを4群に分け，以下末梢血，骨髄，脾臓，リンパ節，肝臓を観察した．

末梢血

Ⅰ群 末梢血中に骨髄系の幼若細胞が見られたもので，ラット No. 8 がこれに属した (Photo 1)．幼若細胞は白血球百分率で8.5％を占め，内訳は骨髄芽球2.5％，前骨髄球6％で，細胞形態にも異常は認められなかった．

Ⅱ群 末梢血中にリンパ系の細胞が見られたもので，ラット No. 3, No. 4, No. 10 がこれに属した (Photo 2)．細胞は輪郭が鮮明な8ないし10μの円形細胞で，核は円形ないし類円形で細胞により切れ込みが見られた．核網工は細顆粒状から粗大顆粒状を呈し，核小体を有する細胞もわずかに見られた．核・細胞質の比率（核の長径／細胞の長径で表した．以下核細胞質比と略す．）は2/3 ないし3/4で，帯灰青色の細胞質には少数のアズール顆粒が見られた．

Ⅲ群 末梢血中に異型性の強い核を有する骨髄系の細胞が見られたもので，ラット No. 1, No. 2, No. 5, No. 7, No. 9 がこれに属した (Photo 3)．細胞は輪郭がやや不鮮明な10ないし23μの類円形の細胞で，核は円形，長円形，腎形，片面に凹凸のある円形と様々であり，偽足様の小突起を有する核も相当数見られた．核網工は繊細網状を呈し核小体を有する細胞も見られた．核細胞質比は1/2ないし1で，胞体に比較し核が小型の細

* 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. Microscopical Findings of Peripheral Blood, Bone Marrow, Spleen, Lymph node and Liver

	Male							Female		
Rat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Week old	78	83	140	144	144	155	159	31	69	140
Blood[1]										
Anemia	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+
No clots of platelets	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+
Erythrocytes										
Anisocytosis	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Polychromasia	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Poikilocytosis	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Erythroblast[2]										
Proerythroblasts	0	0	0	0	0	0	0	2.5	0	0
Basophilic erythroblasts	1.5	0	0.5	0	1.5	0	1.0	18.0	14.0	4.0
Polychromatic erythroblasts	0.5	32.0	1.0	19.5	5.0	0	3.0	16.5	85.0	35.5
Orthochromatic erythroblasts	1.5	11.0	1.0	13.0	2.5	1.0	4.5	1.0	252.5	8.0
Percentages of leukocytes										
Metamyelocytes	1.5	0	0	0	0	0	4.0	1.5	0	0
Stab cells (neutrophils)	3.0	11.0	5.0	5.5	3.0	2.5	9.0	9.0	17.0	11.0
Segmented cells (neutrophils)	1.5	11.0	13.0	28.0	12.5	0.5	11.5	5.0	8.0	31.0
Lymphocytes	3.5	2.0	3.5	1.5	6.0	3.0	7.5	74.0	5.5	5.0
Monocytes	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0	0
Eosinophils	0	0.5	0	0	0	0	0	1.0	0	0
Basophils	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abnormal cells	90.5	75.5	78.5	65.0	78.5	94.0	68.0	8.5	69.5	53.0
Bone marrow cells										
Erythrocytic cells	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	→	↑	↓
Granulocytic cells	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	→	↓	↓
Abnormal cells	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+
Spleen										
Disappearance of l.f.[3]	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−
Extramedullary hematopoiesis	−	−	−	+	+	−	−	+	−	−
Lymph node										
Enlargement	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
Liver										
Cell infiltration	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Parts of cell infiltration[4]	S	S	S	S	S	S	G		S	G

1) Blood sampling was done no anticoagulant., 2) erythroblast counts/100 leukocyte counts,
3) l.f.: lymphatic follicles 4) S: Sinusoid, G: Glisson's capsule.

胞から胞体の大部分を核が占める細胞まで見られた．帯灰青色および帯紫青色の細胞質中には細かいアズール顆粒が多数見られた．No. 1, No. 2, No. 5, No. 7 の細胞では細胞質中に多数の小空胞が見られ，No. 1, No. 5, No. 7 の細胞ではアズールエオジンに淡染した均質無構造の小顆粒が見られた．また No. 5, No. 7, No. 9 では赤血球を貪食した異常細胞が認められた．

Ⅳ群 末梢血中に帰属が不明な細胞が見られたもので，ラット No. 6 がこれに属した (Photo 4)．細胞は15ないし25μの類円形の細胞で，互いに付着するか，周囲に赤血球を付着するかで細胞自体の輪郭が不明瞭であった．核は類円形ないし長円形で異型性が弱く，核網工は大塊状を呈した．核細胞質比は 3/4 ないし 4/5 で比較的一定し，灰青色の細胞質には多数の小空胞と前述した淡紅色の均質構造物が見られた．

赤血球，血小板の異常は各群に関係なく認められた．

No. 8 を除く 9 例で赤血球の大小不同が見られ，全例で多染性赤血球，赤芽球の出現が見られた．特に No. 6 では赤紫に濃染した均質無構造の核を有する橙赤色の異常赤芽球が認められた．また No. 8 では核と細胞質の成熟がアンバランスな赤芽球が見られ，核網工が太い糸状を呈しながら細胞質が帯赤色の赤芽球が目立った．血小板の形態的な異常は認められなかったが，強度の貧血を示した No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 9, No. 10 では血小板の凝集塊が見られず，抗凝固剤を使用せずに血液採取したにもかかわらず，血小板が個々に離れて存在した．

骨髄

Ⅰ群の No. 8 では異常が見られず，赤芽球系，顆粒球系の各成熟段階の細胞が認められた (Photo 5)．

Ⅱ群の No. 3, No. 4, No. 10 では末梢血中で見られたリンパ系の細胞が骨髄細胞の大半を占め，正常の顆粒球系細胞，赤芽球系細胞はほとんど見られなかった (Photo 6)．このため正常では変化に富んだ色調を呈する骨髄塗抹標本が単調な染色像を呈した．また No. 10 では赤芽球系細胞に異常が見られ，クローバー状の核，不整形の核を有する赤芽球が多数見られた．

Ⅲ群の No. 1, No. 5, No. 7 では末梢血中で見られた異型性の高い核を有する骨髄系の細胞が骨髄塗抹細胞の大半を占め，正常の顆粒球系細胞，赤芽球系細胞はほとんど見られなかった (Photo 7)．No. 2, No. 9 の骨髄では末梢血中で見られた異常細胞の増生が見られず，赤芽球系の細胞が多く認められた．特に No. 9 では核と細胞質の成熟がアンバランスな大型の赤芽球が目立ち，多染性赤芽球の成熟段階で核網工が糸状を呈した未熟な核を有する細胞が多く見られた．しかし悪性貧血の際に出現する巨赤芽球ほど大型ではなく，形態的にも相違が見られた．

Ⅳ群の No. 6 では末梢血中で見られた帰属が不明な細胞が骨髄塗抹細胞の大半を占め，正常の顆粒球系細胞，赤芽球系細胞はほとんど見られなかった (Photo 8)．わずかに見られた赤芽球系細胞は，末梢血で見られたと同様の異常な形態を呈したものが多かった．

脾臓

解剖の際Ⅱ群の No. 4, No. 10, Ⅲ群の No. 1, No. 2, No. 5, No. 7, No. 9 の脾臓では腫脹が見られた．また光顕的には以下の変化が認められた．

Ⅰ群の No. 8 では赤脾髄に髄外造血巣が見られたのみで他に著変がなく，リンパ沪胞も明瞭であった．

Ⅱ群の No. 3 ではリンパ沪胞の消失が見られ，脾全体に線維が増生し，線維の網眼中にリンパ球，赤血球がわずかに見られた．No. 4 では線維肉腫が見られた．また線維肉腫以外の脾組織ではリンパ沪胞の消失が見られ，赤脾髄，白脾髄の区別なく赤血球が均等に存在し，それらの赤血球中に播種したように単核細胞，核の変性した細胞，壊死細胞が混在した．No. 10 では結節性に単核細胞の増生が見られ結節と脾組織との境界は明瞭であった．単核細胞は粗網状および細顆粒状の核網工で細網細胞に類似した核を有したが，細網細胞ほど大型でなく輪郭も明瞭であった．細胞間にはエオジン淡染の細い線維様物質が見られた．また結節間の脾組織では線維の増生およびリンパ沪胞の消失が見られた．

Ⅲ群では全例に単核細胞および壊死細胞と赤血球が混在するというⅡ群の No. 4 で見られたと同様の変化が認められた．その他に見られた変化として No. 5 では赤髄に類円形，腎形，馬蹄形の核を有する細胞が多く見られ，髄外造血巣も少数認められた．また No. 7 では限局性に線維の増生が見られ脾組織との境界が不明瞭で，増生した線維中に島状にリンパ沪胞が見られた．

Ⅳ群の No. 6 では線維の増生が軽度に見られ，中心動脈周囲で形質細胞の小集簇が認められた．またリンパ沪胞の消失が見られ赤血球が脾臓の大部分を占め，有核細胞はほとんど見られなかった．

リンパ節

リンパ節は解剖の際に異常が見られたものを摘出し検索した．

Ⅱ群の No. 10 では解剖の際凹凸が見られ，光顕的にはリンパ球の増生が認められた．増生したリンパ球を小塊状に区分するように，粗網状の核網工で長円形の膨満した核を有する細胞が見られ，この細胞が大部分を占めたリンパ節も存在した．

Ⅲ群の No. 1, No. 2 では解剖の際腫脹が見られ，光顕的にはリンパ球の顕著な増生と周辺洞，髄洞の消失が認められた．No. 7 では解剖の際うっ血が見られ，光顕的にはリンパ小節の中央部に帯褐黄色の微細顆粒が見られた．

肝臓

肝臓では肝細胞の壊死，空胞変性，胆管の増生，線維の増生など様々な変化が見られたが，以下細胞浸潤を中心に観察した．

Ⅰ群の No. 8 では細胞浸潤が見られなかった．

Ⅱ群の No. 3, No. 4 では類洞に濃縮あるいは変性した核を有するエオジンに濃染した細胞が多く見られた．これらは変性あるいは壊死に陥いり肝細胞索から脱落した肝細胞であると思われた．また単核の浸潤細胞も少数認められた．No. 10 ではグリソン鞘の胆管と結合織との

間に，明瞭な点状の核網工の円形ないし類円形核を有する細胞が密に見られ，これらはリンパ球であると思われた．

Ⅲ群の No. 1, No. 5 では類洞に変性した肝細胞が多数見られた．また単核の浸潤細胞も少数認められた．No. 2, No. 7 では円形ないし類円形の核を有する細胞質の少ない細胞が類洞に相当数見られた．また不明瞭な核網工の円形核を有し，細胞質がエオジンに淡染した細胞も見られた．No. 9 では輪郭が不鮮明な類円形ないし不整形の核を有する細胞質のやや多い細胞が見られた．また赤血球を貪食した細胞および赤芽球も認められた．

Ⅳ群の No. 6 では輪郭が鮮明な類円形ないし腎形の核を有する細胞が類洞に相当数認められた．

一般に細胞浸潤が認められた肝臓では，各中心静脈を結ぶ帯状の領域に肝細胞壊死が見られその部分では肝臓の網状構造が目立ち，浸潤細胞および変性した肝細胞は類洞ばかりでなく網眼中にも多く見られた．

考　察

末梢血中に異型性の強い核を有する骨髄系の細胞が見られたⅢ群の No. 1, No. 2, No. 5, No. 7, No. 9 の脾臓ではリンパ泸胞の消失が見られ，赤血球，単核細胞，核の変性した細胞が混在する変化が認められた．特に No. 2, No. 9 では脾臓でこの変化が見られたのみで，骨髄，リンパ節，肝臓では末梢血の異常細胞出現に関与すると思われる変化が認められなかった．以上から，末梢血での異型性の強い骨髄系細胞出現と上述した脾臓の変化とは何らかの関連があると考えられた．

ヒトとラットの骨髄を比較した場合，ラットでは大部分の骨髄が赤色髄で占められ，過形成時に必要とする髄腔が少なく，このため髄外造血が容易に発現するとされているが[4]，今回検索した10例中，末梢血中で見られた異常細胞が髄外造血によるものであろうと推測されたのは No. 8 1例であった．

No. 8 を除く9例の末梢血中で見られたリンパ系細胞，骨髄系細胞は，正常で見られる細胞と比較し様々な形態的変化を示した．また No. 1, No. 3–7, No. 10 の骨髄では末梢血中で見られたと同様の形態を示す細胞がモノトーンに増殖した像が認められた．一般に，幼若血球の末梢血中への出現および白血球増多などの状態は類白血病反応と呼称されるが[5]，類白血病反応では出現する幼若細胞に異型性が見られず，骨髄への細胞浸潤も認められないか極めて軽度であるとされている[6,7]．これらを考慮した際に末梢血での異常細胞出現をいかに解釈すべきか明らかでなく，今後の血液検索を進めていく上でさらに検討を深める必要があると思われる．

ま と め

白血病が否定されたラットの末梢血中に出現した幼若細胞，異常細胞を形態学的に検索し，骨髄組織，リンパ組織，および肝臓との関連を検討した．

末梢血では個体により様々な細胞が見られたが，大別すると骨髄系の幼若細胞，リンパ系の細胞，異型性の強い核を有する骨髄系の細胞，帰属が不明な細胞の4種に分けられた．末梢血中に幼若細胞，異常細胞が見られた個体の骨髄では，末梢血で見られたと同様の形態を示す細胞がモノトーンに増生した像が見られることが多く，骨髄中で増生した細胞が末梢血中に流出したものと考えられた．しかし，末梢血への異常細胞出現に関しては，その原因および発現機構などに不明な点が多く，今後さらに検討を深める必要があると思われる．

文　献

1) 服部絢一：臨床血液学，312，1966，医学書院
2) 妹尾左知丸，小川勝士：病理学各論Ⅰ，155, 1966，医学書院
3) Siegmund Schermer : *The Blood Morphology of Laboratory Animals*, 3rd Ed., 41, 1967, F. A. Davis Company, Philadelphia
4) 臼居敏仁：新しい毒性試験と安全性の評価，244，1975，ソフトサイエンス社
5) 木村禧代二：臨床血液学，742，1966，医学書院
6) 北村四郎：日血会誌，22(5)，30，1959
7) Hill J. M. and Duncan C. N. : *Amer. J. Med. Sci.*, 201, 847, 1941

Explanation of Photos

Photo 1–8 : Smear preparation stained with May–Grünwald–Giemsa, original magnification ×1000

Photo 1. Neutrophilic promyelocyte and polychromatic erythroblasts in peripheral blood. (Rat No. 8)

Photo 2. Lymphatic cells in peripheral blood. (Rat No. 3)

Photo 3. Myelocytic cells in peripheral blood. (Rat No. 7)

Photo 4. Abnormal cells of no differential diagnosis in peripheral blood. (Rat No. 6)

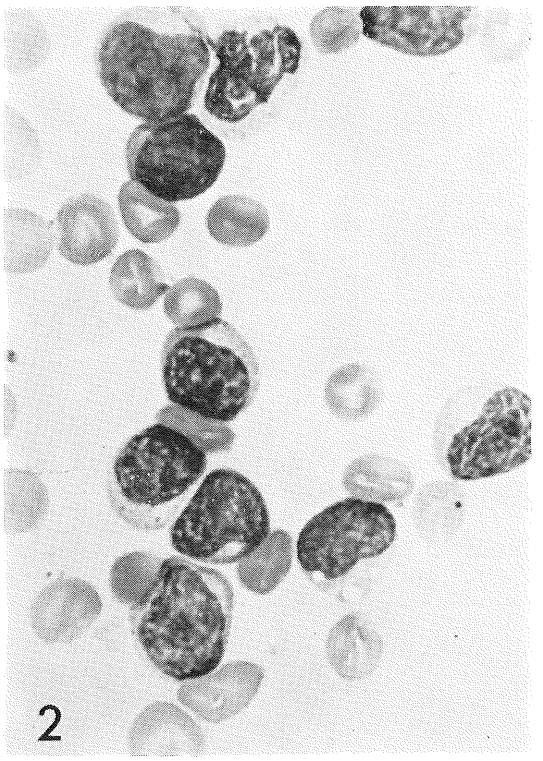
Photo 5. Appearance of bone marrow cells of rat No. 8.

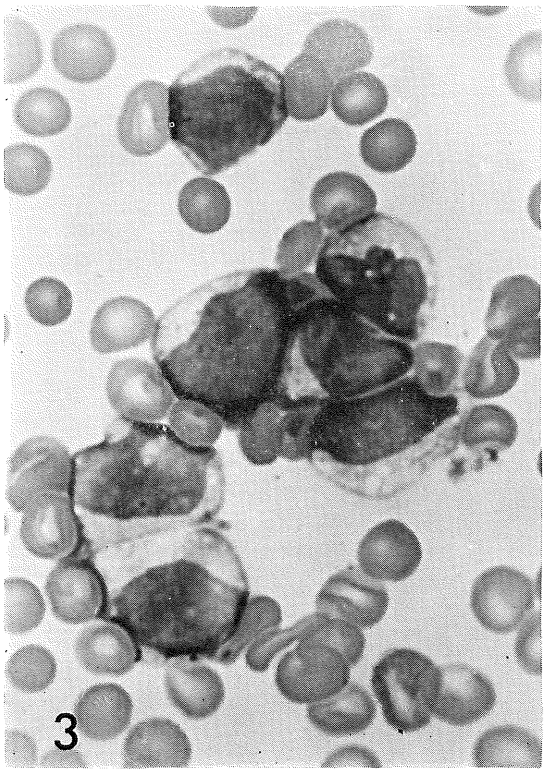
Photo 6. Appearance of bone marrow cells of rat No. 3.

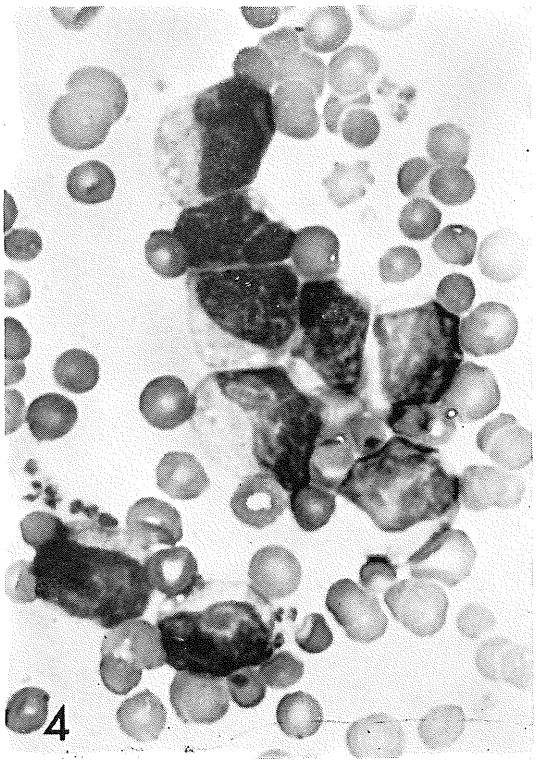
Photo 7. Appearance of bone marrow cells of rat No. 7.

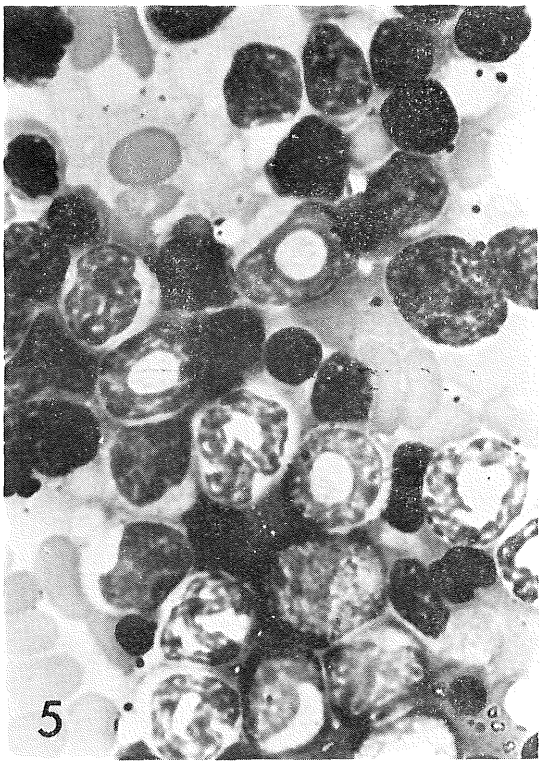
Photo 8. Appearance of bone marrow cells of rat No. 6.

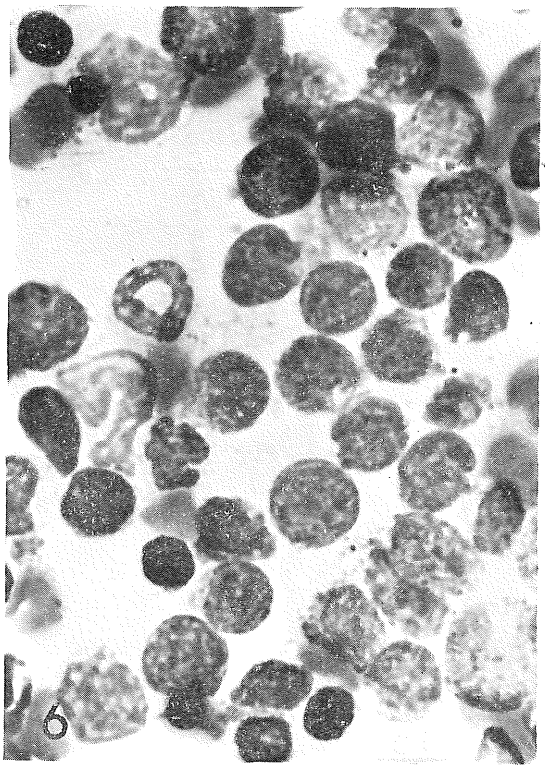
1


2

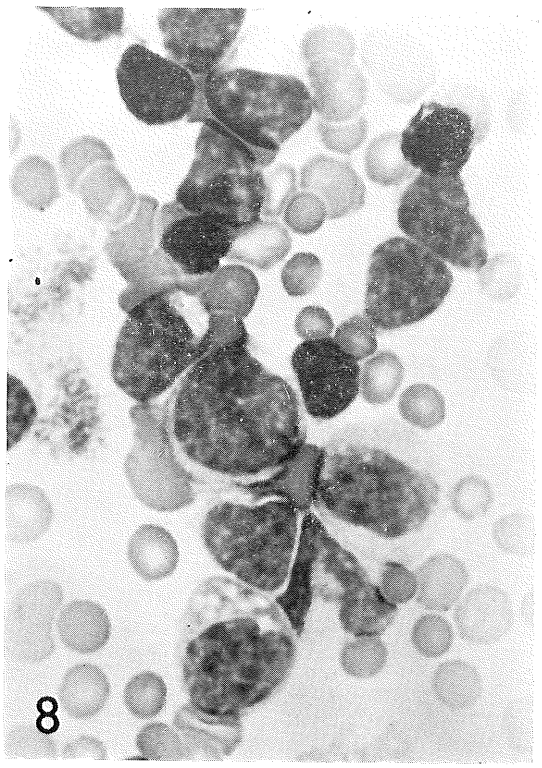

3


4


5


6

7


8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 221-223, 1977

ラット内分泌機能に与える制限食の影響

大石真之*, 平賀興吾*

Effects of Food Restriction on Endocrine Functions in Rats

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

毒性試験の際，もっとも一般的にみられる現象の一つとして飼料摂取量の低下がある．精神安定剤や睡眠薬，中枢神経刺激剤を投与された動物は充分に摂食できないとされ，また苦味のある物質を飼料に添加したり，抗コリン作働性物質投与によっても摂取量の減少が起ることが報告されている[1]．毒性試験中に生じた摂取量の低下は，その程度に応じて，成長抑制，体重減少，臓器重量，血液，尿成分および組織の変化としてあらわれると考えられる．それゆえ摂取量の変化が生じた場合，毒性試験のデータの解析には充分な配慮がなされねばならない．しかし飼料摂取の低下が動物に与える影響については，栄養学的な研究は非常に多いにもかかわらず，毒性学的見地から検討を行なったものはほとんどない．そこで従来われわれが行なってきた化学物質の内分泌系へおよぼす影響が，亜急性的な飼料摂取の低下でどのように変化するかを検討した．

制限食の性腺系に与える影響については，今まで主に雌動物について若干の研究がなされているが[2-7]，雄動物への影響をみたものはほとんどない．今回は特に実験を雄動物にかぎって行なった．

実験材料および実験方法

Wistar-JCL 系雄ラットを1週間環境馴化を行なった後，実験に使用した．実験開始時の平均体重は 122.6 g（5週令）であった．飼料摂取の方法はラットを4群（1群各10匹）にわけ，クレア製粉末飼料（CE-2）を1日1匹あたり 15 g，10 g，5 gおよび自由摂取させた．飲水は自由に行なわせた．4週間後に断頭により屠殺，採血した．血清中コルチステロンの分析は Guillemin ら[8]の方法に準じて行なった．精巣組織中テストステロンの測定は螢光法[9]によった．

結　　果

体重，精巣，精嚢，前立腺重量を表1に示した．体重および各臓器とも飼料摂取量の低下に従って減少が認められた．特に精嚢および前立腺は体重比重量においても自由摂取群に比べて有意に減少がみられた．逆に精巣は体重比重量においては制限食群で有意に増加が認められた．精巣組織中テストステロン濃度を表2に示した．精巣1側あたりのテストステロン濃度は 15g/日 摂取群では，あまり影響を受けないが，10g/日，5g/日 群では有意な減少が認められた．また精巣単位重量あたりの濃度においても同様な傾向がみられ，さらに体重 100 g あたりの濃度でも（自由摂取群＝0.050 μg/100g，15g/日群＝0.059 μg，10g/日群＝0.036 μg，5g/日群 0.033 μg）全く同様な傾向が認められた．

副腎重量および血清中コルチコステロン濃度を表3に示した．副腎の絶対重量では摂取量の低下に従って減少の傾向がみられ，相対重量では 5g/日群で増加が認められた．血清中コルチコステロンは 15g/日群，10g/日 群とも非常に有意な上昇が認められた．

考　　察

飼料摂取の低下が雄内分泌機能におよぼす影響については，あまり報告がない．Schörer[10] により，精巣の絶対重量は亜急性的な飼料摂取の低下により減少するが，相対重量は増加し，副生殖器官は，絶対重量，相対重量とも減少することが報告されている．さらに Pazos および Higgins[11]，Scott と Scott ら[12]も制限食による副生殖器重量減少の報告をしている．今回の実験でも精巣絶対重量の減少，相対重量の増加と副生殖器官の絶対重量，相対重量の減少が認められた．Trieb ら[13]によると精巣の相対成長速度は他の臓器と異なり，体成長速度よりも大きいとしている．すなわち臓器重量の増加（成長）を一般的に $y=ax^b$（a, b は定数，x＝体重）であらわした場合，多くの臓器において b の値が1以下であるのに対して，精巣は 1.02 であるとしている．これらの点より精巣の相対成長速度が体成長速度より大きいため，飼料摂取の低下により相対重量で増加がみられたとも考えられる．

食料摂取を制限した条件下での精巣組織中テストステ

* 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. 制限食のラット精巣，前立腺，精嚢重量に与える影響

	精 巣(g)	前立腺(g)	精 嚢(g)	体 重(g)
自由摂取群	3.2±0.092 (1.01±0.024)	0.39±0.034 (0.12±0.011)	0.54±0.030 (0.17±0.010)	320±6.5
15 g/日	3.1±0.10 (1.32±0.030)***	0.25±0.032** (0.10±0.014)	0.38±0.027*** (0.14±0.011)*	238±5.4***
10 g/日	2.7±0.38* (1.55±0.058)***	0.13±0.008*** (0.07±0.004)**	0.26±0.047*** (0.15±0.026)	176±2.4***
5 g/日	1.9±0.097*** (1.85±0.086)***	0.05±0.009*** (0.05±0.008)***	0.08±0.013*** (0.08±0.011)***	103±1.4***

値は10匹の平均±標準誤差 *$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$
( ) 内は体重100 g あたりの重量

表 2. 制限食のラット精巣組織中テストステロン濃度に与える影響

	μg/精巣1側	μg/g
自由摂取群	0.163±0.017	0.132±0.015
15 g/日	0.140±0.036	0.112±0.024
10 g/日	0.063±0.011***	0.064±0.011***
5 g/日	0.034±0.005***	0.066±0.022**

値は10匹の平均±標準誤差
**$p<0.01$ ***$p<0.001$

表 3. 制限食のラット副腎重量および血清中コルチコステロン濃度に与える影響

	副腎重量 (mg)	コルチコステロン (μg/dl)
自由摂取群	55±6.6 (17±1.9)	83±7.0
15 g/日	48±11 (20±4.9)	493±39***
10/g 日	37±2.1* (21±1.2)	818±85***
5 g/日	35±1.6** (34±1.5)***	——

値は10匹の平均±標準誤差，( ) 内は体重100 g あたりの重量
*$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$

ロン濃度についての報告は今までなされていない．Mann ら[14]によれば，飼料摂取を自由摂取群の33%に2カ月間抑制した雄仔牛の精巣静脈血中テストステロン濃度は，自由摂取群の25%に減少したことを報告している．また Grewal ら[15]によれば SD 系ラットで飼料摂取量を自由摂取群の50%に抑制すると，8週間後には血清テストステロン濃度が自由摂取群の31%に減少したことを報告している．今回の実験でも，精巣組織中テストステロン濃度は飼料摂取量の減少にともなって減少することが認められた．またこの傾向は精巣単位重量あたり，体重 100 g あたりでもみられた．しかし Widdowson ら[16]は精子形成は摂食量の減少に比較的影響を受けにくいとしている．精巣は重量において飼料摂取低下の影響を他の臓器よりも受けにくいにもかかわらず，その内分泌機能については大きな影響を受けているものと考えられる．そしてテストステロン濃度の減少が，副生殖器重量の減少をひきおこす原因の一つと考えられる．雌ラットでは視床下部黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) は制限食下では変化せず[17]，下垂体黄体形成ホルモン (LH) 濃度も変化しないが血中 LH が減少することが報告されている[4,6,17]．これより雄動物でも同様な傾向があるものと考えられ血中 LH の減少により，精巣中でのテストステロンの合成が減少したものと考えられる．

次に副腎重量についてみると，絶対重量では飼料摂取量の低下にともなって減少がみられたが，相対重量では 5g/日 群で増加が認められた．ラットでは亜急性あるいは慢性的な飼料摂取量の低下が絶対重量の低下と相対重量の増加をひきおこすことが報告されている[10,18]．モルモットでは栄養状態が悪化すると，副腎の索状層，網状層の肥大と球状層の萎縮が生じることが報告されている[19]．

実験動物での亜急性的な飼料摂取制限の血中コルチコステロン濃度に与える変化についての報告はほとんどない．今回の実験では，15g/日 群でも非常に高値を示した．Selye[20]によればストレスに対する反応として副腎皮質ホルモンの上昇が生じるとされており，食餌量を強

制的に減少させると大きなストレスが生じることが示唆される．また畝木ら[17]によっても雌ラットで制限食下では血中のコルチコステロンの上昇することが報告されている．さらに絶食条件下ではラット血中コルチコステロンの上昇が認められ[21]，低タンパク質を与えた豚では血中コルチゾールの上昇することが知られている[22,23]．

以上の結果，ラットでは飼料摂取量の低下により臓器重量の変化，テストステロン濃度の低下，コルチコステロン濃度の上昇が生じることが確認された．これら内分泌器官の変化が，さらに二次的に血液成分や病理組織学的変化をひきおこすことも充分考えられ，毒性試験の際，飼料摂取量に変化がみられた場合には，そのデータの解析には，充分な検討が必要であろう．

文　献

1) Zbinden, G. : *Advances in Pharmacology*, 2, 1, 1963
2) Nakanishi, Y., J. Mori, and H. Nagasawa : *J. Endocr.*, 69, 329, 1976
3) Cooper, K. J., N. B. Haynes, and G. E. Lamming : *J. Reprod. Fertil.*, 22, 293, 1970
4) Howland, B. E. : *J. Reprod. Fertil.*, 27, 467, 1971
5) Howland, B. E. : *J. AnimalSci.*, 34, 445, 1972
6) Gombe, S., J. Apgar, and W. Hansel : *Biol. Reprod.*, 9, 415, 1973
7) Purvis, K., K. J. Cooper, and N. B. Haynes : *J. Reprod. Fertil.*, 27, 167, 1971
8) Guillemin, R., G. W. Clayton, H. S. Lipscomb, and J. D. Smith : *J. Lab. Clin. Med.*, 53, 830 1959
9) 大石真之，影山喜世子，大沢仲昭：日内分泌誌，49, 385, 1973
10) Schärer, K. : *Toxicology*, 7, 45, 1977
11) Pazos, R. and C. Higgins : *Endocrinol.*, 36, 416, 1945
12) Scott, P. P. and M. G. Scott : *J. Reprod. Fertil.*, 8, 270, 1964
13) Trieb, G., G. Pappritz, and L. Lützen : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35, 531, 1976
14) Mann, T., L. E. A. Rowson, R. V. Short, and J. D. Skinner : *J. Endocrinol.*, 38, 455, 1967
15) Grewal, T., O. Mickelsen, and H. D. Hafs : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138, 723, 1971
16) Widdowson, E. M., W. O. Mavor, and R. A. McCance : *J. Endocr.* 29, 119, 1964
17) 畝木東陽子，高原二郎，大藤信子，薬師寺渉，柚木　昌，山根行雄，景山甚郷，大藤　真，細木秀美：日内分泌誌，53, 305, 1977
18) Quimby, F. H. : *Endocrinol.* 42, 203, 1948
19) D'angelo, S. A., A. S. Gordon, and H. A. Charipper : *Endocrinol.*, 42, 399, 1948
20) Selye, H. : *Perspec. Biol. Med.*, 2, 403, 1959
21) Mlekush, W., W. Truppe, W. Beyer, and B. Paletta : *Experimentia*, 31, 1135, 1975
22) Baldijão, C., T. Antinmo, W. G. Pond, and R. H. Barnes : *J. Nutr.*, 106, 952, 1976
23) Westhuysen, J. M. VAN DER, P. D. Belonje, A. P. D. DE Stage, and D. H. Holnes : *South African J. Animal Sci.*, 6, 101, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 224-226, 1977

ラット血液成分に及ぼすエーテル麻酔の影響

大石向江*, 大石真之*, 平賀興吾*

Effect of Ether Anesthesia on Toxicological Parameters of Rats

HISAE OISHI*, SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

動物実験はエーテル麻酔下に採血・手術・屠殺等の処置を施すことが多い．毒性試験ではエーテル麻酔を行なったとき血液・組織に変化の生じることが考えられ，検査結果の解釈に誤りをおこすことが考えられる．エーテル麻酔が実験動物に及ぼす影響については既にいくつかの報告[1-6]があるが，毒性試験的観点から調べられたものは少ないように見受けられる．そこでここでは，毒性試験で一般的に測定される血液・血清成分がうける影響を知るため以下の実験を行なった．

実験材料および実験方法

1. **実験動物** 生後4週令の JCL-Wistar 系雄・雌性ラット（体重 75-85 g）を日本クレアより購入した．動物は一般動物飼育室（室温 25±1°，湿度 50-60%，照明12時間）内でステンレス製ケージに5匹ずつ入れて飼育した．

2. **麻酔法** 上記の方法で6週間飼育したラット（10週令，体重：雄性 297-365 g，雌性 198-232 g の雄・雌性をそれぞれ2群（各10匹）にわけ，1群はグロッケ内に1匹ずつ入れ，エチルエーテル（和光純薬特級）で深麻酔をかけ（約2分）断頭・採血した．他の1群の麻酔をかけない雄・雌性ラットを対照群として捕獲後すみやかに断頭・採血した．

3. **検査方法**

a. 血液学的検査 白血球数（以下 WBC と略す），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hgb），ヘマトクリット（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球血色素量（MCH），平均赤血球血色素濃度（MCHC）の測定は Coulter Counter Model-S (Coulter Electric INC) で行なった．

b. 血清生化学的検査 総タンパク質量（TP-Biuret 法），グルコース量（Glc-Glucose-Oxidase 変法），尿素窒素量（UN-Urease-Indophenol 法），コレステロール量（Cho-Liebermann-Burchard 法），グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性（GOT-Reitman-Frankel 変法），グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT-Reitman-Frankel 変法)，アルカリ性ホスファターゼ活性（Al-P-Kind-King 変法）およびコリンエステラーゼ活性(ChE-高橋・柴田法)の測定は自動分析装置（HITACHI M-400 Automatic Analyzer）で行なった．カリウム量(K）およびナトリウム量(Na)の測定は炎光光度計（Beckman KLINA）で行なった．トリグリセライド量（TG）はアセチルアセトン法[7]，無機リン量（Pi）は Fiske Subbarow 法[8]およびカルシウム量（Ca）は OCPC 法[9]で測定した．コルチコステロン量は螢光光度法[10]で測定した．

c. 測定結果はすべて Student の t-test により推計学的検討を行なった．

結　果

血液学的検査の結果を表1に示す．雌性の麻酔群の MCV および MCH が対照群と比較して有意に減少した．麻酔群の WBC は雄・雌性とも減少傾向がみられた．麻酔群の RBC, Hgb, Hct, MCHC においては雌雄ともに，また MCV, MCH の雄性については対照群に比較していずれも有意な差はなかった．

血清生化学的検査の結果を表2に示す．麻酔群の雄・雌性の Glc および雌性の Na が有意に上昇した．麻酔群の雄性の Cho, TG, Pi および雌性の GOT および雄・雌両性のKが対照群に比較して有意に減少した．麻酔群のコルチコステロン量は雄・雌両性ともに上昇傾向が認められた．TP, UN, Ca, GPT, Al-P および ChE について，また雄性の Na および GOT について，また，雌性の Cho, TG および Pi については麻酔群では対照群に比較していずれも有意な差はみられなかった．

考　察

血液学的検査の結果，雌性の MCV および MCH に有意な減少がみられたが，いずれも雌性のみで，減少の理由は不明である．

* 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

表 1. エーテル麻酔によるラット血液学的検査値の変化

	雄性		雌性	
	対照群	麻酔群	対照群	麻酔群
WBC ($\times 10^3$)	8.02±3.06	6.58±2.59	4.47±0.888	3.67±1.13
RBC ($\times 10^6$)	7.86±0.405	7.60±0.455	7.47±0.271	7.43±0.355
Hgb (gm)	16.2±0.636	15.9±1.10	15.9±0.348	15.5±0.827
Hct (%)	43.6±1.80	43.0±2.75	41.2±1.55	39.8±2.03
MCV (μ^3)	56.6±1.94	57.5±1.08	56.3±1.34	54.4±1.21**
MCH ($\mu\mu$g)	20.9±0.967	21.1±0.533	21.6±0.580	21.1±0.415*
MCHC (%)	37.2±0.618	36.8±0.615	38.5±1.11	38.9±0.500

値は平均値±標準偏差値を示す　*p<0.05　**p<0.01

表 2. エーテル麻酔によるラット血清成分の変化

	雄性		雌性	
	対照群	麻酔群	対照群	麻酔群
TP (g/dl)	6.8±0.24	6.6±0.63	6.8±1.03	6.6±0.59
Glc (mg/dl)	120±8.52	161±19.2***	126+23.5	156±11.4**
UN (mg/dl)	22±1.7	22±2.3	22±3.9	21±2.9
Cho (mg/dl)	85±9.3	70±4.7***	70±12.2	72±12.5
TG (mg/dl)	293±60.3	190±75.3**	179±55.0	185±54.4
Na (mEq/l)	133±1.52	133±5.35	130±3.50	133±2.38**
K (mEql)	7.5±0.39	5.7±0.59***	6.5±0.29	5.1±0.33***
Pi (mg/dl)	10.6±0.74	9.3±0.76**	8.1±0.61	7.8±0.55
Ca (mg/dl)	10.4±0.57	9.8±0.83	10.9±0.60	10.7±1.86
コルチコステロン (μg/dl)	115±93.5	153±82.4	119±65.8	155±76.6
GOT (K.U)	110±15.3	110±17.8	117±25.6	96±8.3*
GPT (K.U)	37±5.0	37±5.6	35±9.3	30±2.3
Al-P (K.A-U)	42±12.4	39±10.9	33±6.0	26±9.9
ChE (ΔpH)	0.17±0.027	0.17±0.029	0.59±0.17	0.59±0.18

値は平均値±標準偏差値を示す　*p<0.05　**p<0.01　***p<0.001

雌雄とも，Glc が有意に上昇したが，Brewster ら[5]や Bunker[4] によってエーテルを犬に曝露した場合にも Glc の上昇することが報告されている．エーテルがストレスとなって脳下垂体を刺激し，カテコールアミンの分泌を増加させ，それがアデニルサイクラーゼを活性化し，cAMP を増加させることによりホスフォリラーゼ活性などが上昇し肝臓中のグリコーゲンを分解して血中の Glc が増加したことが考えられる．更に，カテコールアミンの増加がインシュリンの分泌を抑制し，血糖値の上昇を更に多くしているものと考えられる[11]．Porte ら[12]はエーテル麻酔によりインシュリン分泌が抑制され，そのため血糖が上昇してもインシュリンが増加しなかったと報告している．Van Brunt ら[2]によれば，エーテルを犬に曝露した場合に ACTH の上昇により 17-hydroxy-corticoid の上昇することが報告され，Vandan ら[1]によって，それは麻酔群の深さに比例することが報告されている．また，Price[3] によると同じくエーテルを犬に曝露した場合に血中にエピネフリンの増加することが報告されている．更に Greene[13] によれば，エーテルが交感神経系を刺激して肝臓のグリコーゲン分解が促進されると考えられている．

麻酔群の雄性の Cho および TG が有意に減少した．急激なエピネフリンの上昇が血中コレステロールの減少をもたらすことが Cosma[14]，Davidson ら[15]により報告されており，エーテルにより急激に上昇したエピネフリンにより血中のコレステロールが減少したことが考えら

れる．雌性では有意差はなかったが，エーテルに対する副腎の感受性に性差のあることも考えられる．

雌雄のWBCに減少傾向がみられたが，これはストレスによって副腎皮質ホルモンの増加したことによると考えられる．

麻酔群の雌性のNaが有意に上昇し，両性のKおよび雄性のPiが有意に減少した．エーテルがストレスとなってACTHが上昇し，コルチコステロンの分泌を増進し，NaおよびKの平衡を乱したことが考えられる．腎臓のNa，K平衡にはアルドステロンが関与するが，コルチコステロンも血中に多く，その作用が無視できない．アルドステロンは測定していないが，上昇している可能性が考えられる．今回の結果ではコルチコステロンに上昇傾向がみられたのみで有意差はなかったが，値のばらつきが大きく，そのために有意差のみられなかったことが考えられる．Virtueら[16]によれば，ヒトではエーテル麻酔によりコルチゾールが上昇することが報告されている．ラットでは副腎皮質の主要なグルココルチコイドはコルチゾールではなくコルチコステロンとされており，今回の実験でもコルチコステロンの上昇傾向がみられた．

今回用いたエーテルは化学用であり，過酸化物の影響も考えなければならないが，毒性試験においては結果の正確な評価を期すため，エーテル麻酔によって採血した場合，データの解釈に慎重な配慮が必要であると考えられる．

文　献

1) Vandan, L.D. and F.D. Moore : *Anesthesiology*, 21, 531, 1960
2) Van Brunt, E.E. and W.F. Ganong : *Anesthesiology*, 24, 500, 1963
3) Price, H.L. : *Physiol. Rev.*, 45, 187, 1960
4) Bunker, J.P. : *Anesthesiology*, 24, 515, 1963
5) Brewster, W.R. Jr., J.P. Bunker, and H.K. Beecher : *Am. J. Physiol.*, 171, 37, 1952
6) Bellinger, L.L. and V.E. Mendel : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 5, 1975
7) Fletcher, M.J. : *Clin. Chim. Acta*, 22, 393, 1968
8) Fiske, C.H. and Y. Subbarow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
9) Connerty, H.V. and A.R. Briggs : *Am. J. Clin. Path.*, 45, 290, 1966
10) Guillemin, R., G.W. Clayton, H.S. Lipscomb and J.D. Smith : *J. Lab. Clin. Med.*, 53, 830, 1959
11) Robison, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland : *Cyclic AMP*, 145, 1971, Academic Press, New York
12) Porte, D., A.L. Graber, T. Kuzuya, and R.H. Williams : *J. Clin. Invest.* 45, 228, 1966
13) Greene, N.M. : *Inhalation anesthetics and carbohydrate metabolism*, 1963, Williams and Wilkins, Baltimore
14) Cosma, J. : *Amer. J. Physiol.*, 161, 550, 1950
15) Davidson, I. W.F., J.M. Salter, and C.H. Best : *Amer. J. Clin. Nutr.*, 8, 540, 1960
16) Virtue, R.W., M.L. Helmreich, and M.L. Gainza : *Proc. Roy. Soc. Med.*, 41, 549, 1957

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 227-229, 1977

ラット尿中の蛋白質（第1報）

中尾順子*, 道源正子*, 樺島順一郎*

Proteins in Rat Urine (I)

TOSHIKO NAKAO*, MASAKO DOGEN* and JUNICHIRO KABASHIMA*

緒　言

小動物を用いた化学物質，重金属，薬物などの毒性の研究は究極的には人間への毒性を評価すべき手段であり，動物の個体差はもとより，種族間の差異は毒性評価上の最大の難点であると考えられる．

腎臓は排泄臓器としての性質上，毒物の標的器官としてしばしば障害が現れ，その結果高血圧，動脈硬化などの多彩な症状の発現と重篤な結果を招く．カドミウム，鉛，水銀などの中毒はその著明な例であり，その発生機序も現在明らかでない．人間の腎疾患の診断の指標である尿検査は，小動物実験ではほとんど使用されない．検尿上の困難さ，すなわち飼料の混入や，糞中物質の混入などにより結果を不確実にしている．更にラットの場合は人間の尿に比べて蛋白質の含有量が高い．

私共はこの点に注目し，容易に，確実に検尿できる方法を確立すべく，代謝ケージ内で粉末飼料で飼育した場合に，飼料中のタンパクの混入があるか否かをしらべた結果その影響が殆んどないことを確めたので報告する．

実験材料および方法

ラット　JCL-SD 系8週令 125-145g の7匹を一群とし，温度，湿度をコントロールした当研究所毒性部動物飼育室の代謝ケージ中で飼育した．飼料は粉末飼料とし，水は自由に摂取できるようにした．飼料はA，B，Cの3種に分け，A群：オリエンタル酵母ビタミンフリーカゼイン調合飼料，B群：同ミルクカゼイン調合飼料，C群は日本クレア粉末飼料 CE-2 を与えた．

尿の分析　尿はクロロホルム添加24時間尿を採取した．3,000回転20分間遠沈し沈澱物を除き，上澄の部分を尿用テストペーパー（ラブステックス，マイルス—三共製）で蛋白量，pH，糖などをしらべた．尿量を測定し，各群ごとに混合しその7 m*l* をゲルろ過により分画した．

ゲルろ過　セファデックス G75 カラム 2.4×31cm を用い 0.05M の pH 7，リン酸緩衝液を Bed volume の3倍以上流して飽和させ，前述の上澄液7 m*l* をゲル上端にのせて1分間1 m*l* の速度で 0.05M リン酸緩衝液で分画を行なった．LKB 社フラクションコレクターで5 m*l* ずつの分画とした．カラムの Void volume は Blue dextran を用いて，Exclusion volume は ATP を用いて測定した．分子量測定の標準物質としてヘモグロビン (m.w. 64,000)，卵アルブミン (m.w. 45,000)，チトクロムC (m.w. 13,000) を用いた．

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)　Weber Osbone 法[1]に従い 0.1% SDS 存在下に 7.5% アクリルアミドゲルを用いて分析を行なった．標準タンパクとして分子量165,000，155,000 の E. coli Coa enzyme のサブユニット，68,000の牛血清アルブミン，39,000 の RNA ポリメラーゼ，21,500 のトリプシンインヒビターを用い，各分画の 0.1m*l* を用い，電流はゲル1本当り 8 mA とし，約4時間泳動を行なった．泳動先端はブロムフェノールブルーを用いてしるした．0.25%ブリリアントクマジーブルーで1時間染色し，醋酸メタノール，水，7.5：5：87.5 で脱色した．

アミノ酸分析　セファデックスによる各分画を原尿として約 0.2m*l* に相当する量を 6N HCl 中で24時間加水分解し，フラッシェンエバポレーターで HCl を除去後クエン酸緩衝液で稀釈して，日本電子アミノ酸分析機 (JCL6AH) で中酸性アミノ酸の分析を行なった．

結　果

ラブステックスによるテストの結果は表1にした．人尿とことなりラットの場合は正常尿で±から卅までの間にあった．このテスト紙はタンパク 40mg/100m*l* 尿で±となるように調製されており，この表からラット尿はタンパク 40mg-200mg/100m*l* 尿の程度に排出されることになる．

セファデックス G75による分画のパターンは図1に示した．A，B，Cは与えた飼料の違いを示した．縦軸のタンパク mg 数は24時間に一群7匹の排泄するタンパク

* 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. Labstix Test of Rat Urine

A		B		C	
Rat No.	grade	Rat No.	grade	Rat No.	grade
1	++	1	+	1	+++
2	++	2	±	2	++
3	±	3	+	3	++
4	+++	4	±	4	++
5	+	5	+	5	+
6	++	6	++	6	++
7	+	7	+	7	++

Surpernatant of centrifuged rat urine was tested by Labstix.

総量で示した．A，Bの飼料ではほとんど等しい量の排泄量であったがCについてはやや多い値を示した．この図に見られるように大，小2つの山に分れ，fraction の早い方の小さい山は電気泳動でタンパクとして分子量7万−1万5千までに分布する（図2）．ゲルろ過のパターンでもこの大きさはほぼ同様であった．fraction のおそい方の山は大きく蛋白量の10倍程度であるが，これはSDS-PAGE で色素では染色されない．従って蛋白以外の Lowry 発色物質である．

ゲルろ過で分けられた分子量の7万から1万数千までのタンパクは1日当り7匹のラットの排泄する総量に換算すると表2のようになりほぼラブステックスの値に見合う量となった．

SDS-PAGE の左端に示したのはカゼインの電気泳動像で，A，B，C は各飼料群のラットの尿 7m*l* をゲルろ過したものを各分画 0.1m*l* を電気泳動したものである．各ピーク共にカゼインそのものとは全く異った移動度を示し(図3)，アミノ酸分析の結果も cystein を含むタンパクであることがわかった．アミノ酸分析の結果については他の報告にくわしくのべる．予備的実験結果からアルカリフォスファターゼはゲルろ過のはじめの2−3分画に高いことがわかった．従って排泄されたタンパクはラット体内で代謝された産物であると考えられる．

考　察

ラット尿中の蛋白質を分析する目的で代謝ケージ内で尿を採取し，分析した結果から，この条件で充分に尿の蛋白の分析ができることがわかった．飼料中の蛋白の混入は遠沈，ゲルろ過ののちに分析した結果全く認められなかった．

ラット尿中の蛋白は人間に比べて高い．このことは近位尿細管のミクロパンクチャーの結果からも既に明らかである．尿中の窒素化合物の分析は栄養学上の問題として古くから研究の対象としてとりあげられてきているが，分子レベルでの解析は行なわれていない．最近佐野ら[2]は正常人尿中のタンパク質について研究をすすめ殆んど大部分が分子量 60,000 のアルブミンに相当するもので，極く一部がミクログロブリンに相当するとのべている．また，人間では 100mg 以上のタンパクが1日に排泄されるとの報告もある[3]．今回得られた結果は各種

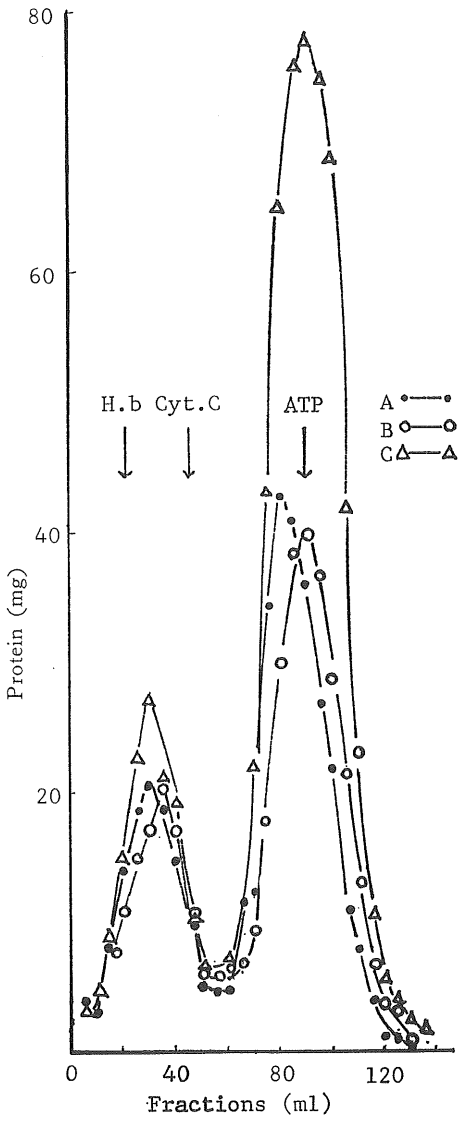


Fig. 1. Gelfiltration on Sephadex G75
7m*l* of collected rat urine was applied to Sephadex G75 column of 24×31cm. Each 5m*l* of fraction was collected by LKB fraction collector and protein concentration was estimated by Lowry's method.

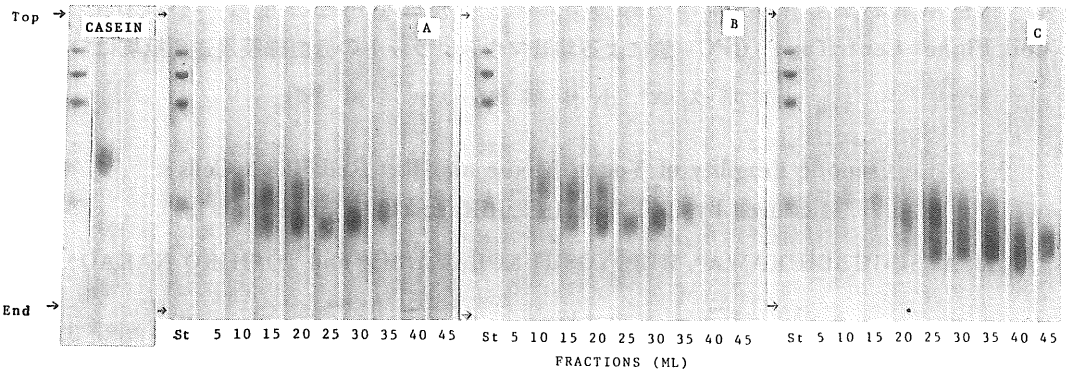


Fig. 2. SDS-Polyacrylamide Gelelectrophoresis
Standard protein(St) from top to end are E. coli cort protein, Phosphorylase a, BSA (Bovine serum albumin) E. coli RNA polimerase and Trypsin inhibitor. Each 0.1m*l* of fraction was electrophoresed as described in methods.

Table 2. Urinary excreted protein per 7 rats

Date		A		B		C	
		mg/100m*l*	mg/day	mg/100m*l*	mg/day	mg/100m*l*	mg/day
May	30	44	39	48	58	51	36
June	1	83	60	65	80	75	42
	8	66	114	63	120	189	146
	10	61	108	69	132	239	167
	11	58	57	78	60	266	178

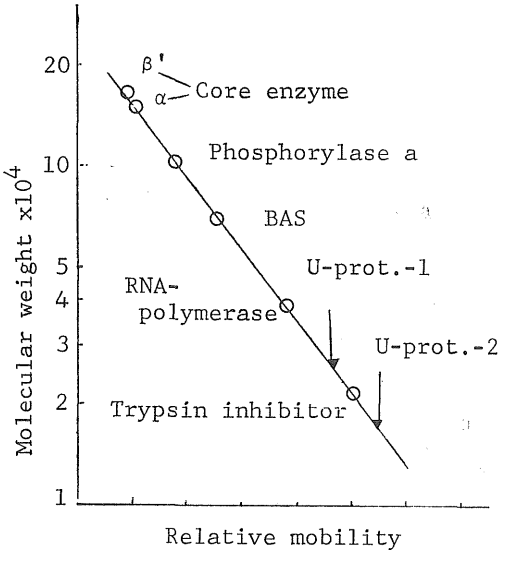


Fig. 3. Molecular Weight of Proteins in Rat Urine (U-Prot-1, U-Prot-2) calculated from SDS-Polyacrylamide Gelelectrophoresis (Fig. 2).

腎障害の発生の機序解明に利用すべく計画中である.

文 献

1) Weber, K. and M. Osborn : *J. of Biol. Chem.* 244, 4406, 1969
2) 佐野紀代子ら：生物物理，印刷中
3) 荻田善一ら：第28回電気泳動学会，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 28-2, 230-235, 1977

Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による幼若マウス，ラットの赤血球膜浸透圧抵抗について

市川久次*，小林博義*，中尾順子*

Osmotic Fragility of Young Mouse and Rat Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge (CPC) Method

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

著者ら[1,2]はこれまで，従来とは異なる勾配溶血という原理に基づく，新しく考案された Coil Planet Centrifuge (CPC と略) 法を用いた赤血球膜浸透圧抵抗測定法の毒性試験，研究への応用を目的として，マウス，ラットを用いて基礎的研究を行なってきたが，今回，幼若マウス，ラットにおいて，これまでに，未だ報告されていない高張部での特異な溶血現象を見い出したので報告する．

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 ICR 系マウスならびに静岡実験動物農場生産の Wistar 系ラット4週令雌雄を購入し，生殖可能な時期まで飼育した後，自家繁殖し，兄妹交配による F_3-F_4 を使用した．使用した飼料は，全期間にわたって，日本クレアKK製固型飼料 (CE-2) を摂取させ，ラットは生後3週目に母親より離し，独立させた．

2. 採血方法 幼若マウスならびにラット（生後3週未満）からの採血は，断頭により頸部動静脈より放出する血液を，生後3週以後のラットからの採血は，無麻酔下背位に固定し，大腿部を剪毛後切開し，伏在静脈を露出させ，静脈用注射針 1/4 にて穿刺し，噴出する血液をヘパリン処理したヘマトクリット測定用キャピラル（以下ヘマトクリット管と略—Propper 社製）を用いて，管の 1/2-2/3 ほど採血し（約30-40μl），直ちに固化を防ぐために10回程転倒し，ヘマトクリット管の一端を専用のパテで封じ，氷中にて保存し，すべての採血が終了した後，遠心分離し (900rpm, 5min.)，固化した血液，フィブリンならびに白血球，血小板の集合部分のバフィーコート部分より 2-3 mm 下の位置で切断し，残余の固化しない血球部分（殆んど赤血球）を実験に供した．

3. 連続濃度勾配食塩液の作製法 CPC のコイル中への連続濃度勾配をもつ食塩溶液の充填は，CPC コイル充填器(三鬼エンヂニアリン製)にて，高張液に170 or 280mOsM NaCl 溶液（＝0.9%NaCl 溶液，生理的に等張），低張液に30mOsM NaCl 溶液（以下280/30mOsM，170/30mOsM）を用いて，市川ら[1]の方法に従って行ない．使用時まで密封して冷蔵庫内に保存した．

4. CPC コイルへの血液の注入ならびに CPC（遠心機）の操作法 前記ヘマトクリット管を用いて，調整した血球部分（血泥）を使用し，市川ら[1]の方法に従って行なった．

5. 溶血帯の測定 前述の CPC を操作して得た溶血帯は，CPC コイル用に特に市川らによって考案されたアダプターを用いて，クロモスヤンデンシドメーター（ジョイスレーブル社製)にて行なった．測定条件はフィルター：5-049，スリット：0503，Wedge：2.00，感度：2.0である．

実験結果

1. 幼若マウスの赤血球膜浸透圧抵抗 ICR系幼若マウス雌雄（生後0日＝出産直後-生後5日）の赤血球膜浸透圧抵抗を170/30ならびに280/30のコイルを用いて，CPC 法ならびに各一例をデンシドメトリーにて検討し，代表的な例として，生後0日ならびに生5日の測定結果を Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6 に示した．注目すべきは，コイルの白キャップ側端 (170 or 280mOsM，以下高張部分）において，生後2日までは，濃淡に個体差があるがわずかながら特徴ある溶血がみられ（肉眼でみられる），生後3-5日には，この高張部分の特徴ある溶血は殆んど消失し，その変化は生後数十時間という短期間内であった．

2. 生後4週ならびに12週目のラットの赤血球膜浸透圧抵抗の比較 Wistar 系ラット生後4週ならびに12週目雄の赤血球膜浸透圧抵抗について170/30mOsMのコイルを用いて，同時に採血し検討した結果は Fig. 7 に示した如くである．高張部分において，生後4週目では，特徴ある溶血がみられたのに対し生後12週目では，この特

* 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

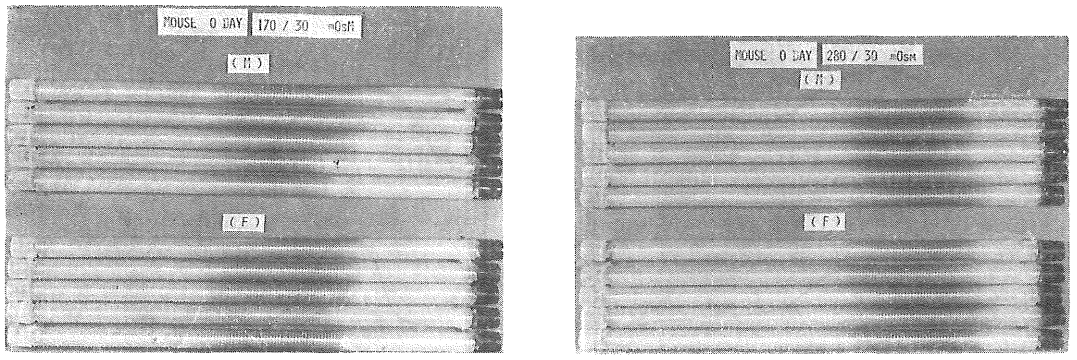


Fig. 1. Osmotic Fragility of Mouse Red Blood Cells at 0 day After the Birth
From the left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

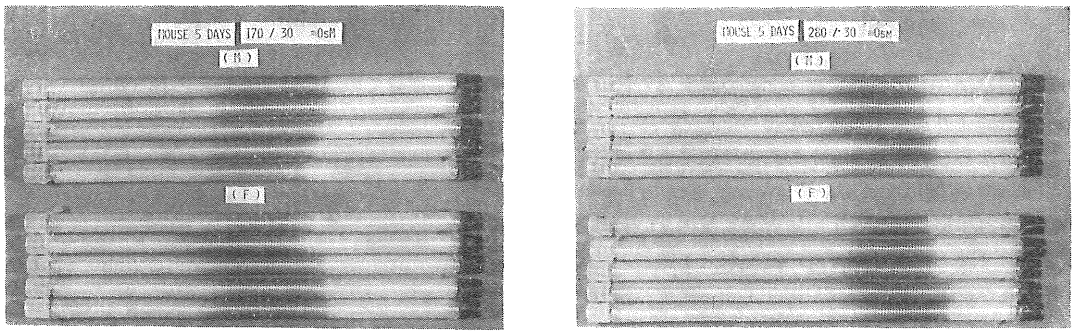


Fig. 2. Osmotic Fragility of Mouse Red Blood Cells at 5 Days After the Birth
From the left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

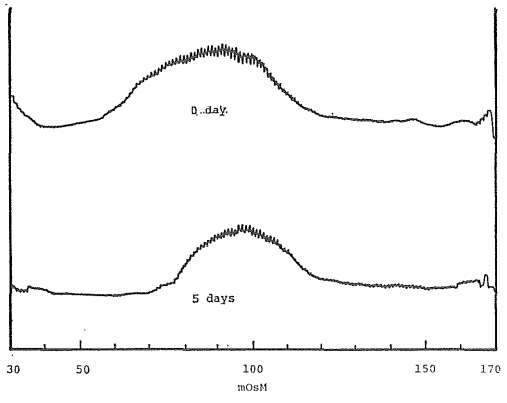


Fig. 3. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young Male Mice
The days under the curve indicates the days after the birth.

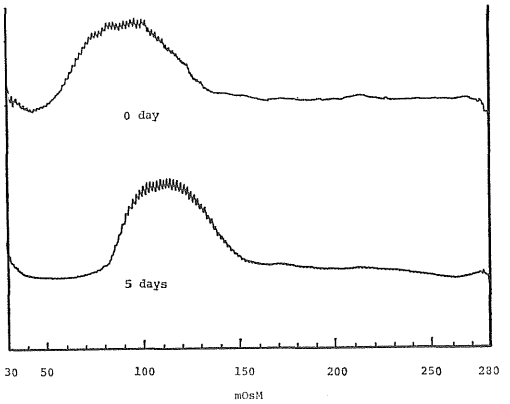


Fig. 4. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young Male Mice
The days under the curve indicates the days after the birth.

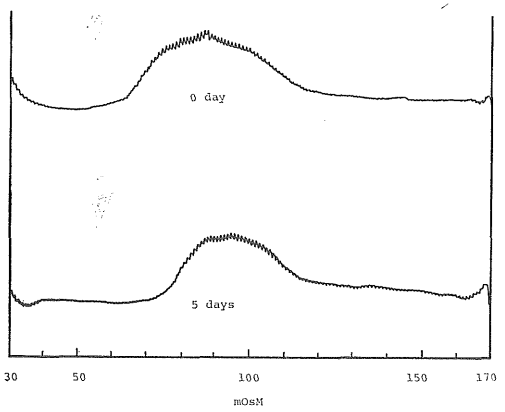


Fig. 5. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young Female Mice
The days under the curve in dicates the days after the birth.

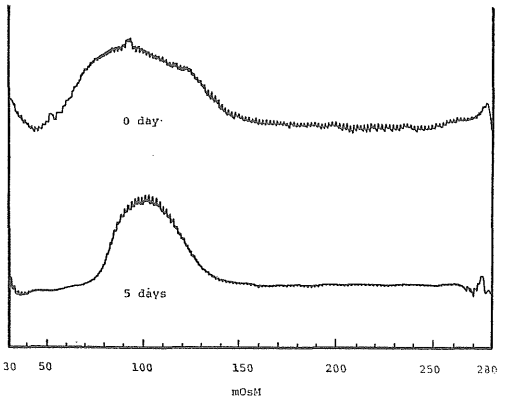


Fig. 6. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young Female Mice
The days under the curve indicates the days after the birth.

徴ある溶血は消失していた．高張部分の特徴ある溶血は動物の加令により消失することを認めた．

3. 幼若ならびに成熟ラットの赤血球膜浸透圧抵抗

170/30mOsM と280/30mOsM のコイルを用いて，Wistar 系ラット雌雄生後0日より生殖能力的に成熟といわれる生後8週目までの赤血球膜浸透圧抵抗を，1週ごとにCPC 法ならびに各一例をデンシドメトリーにて測定し，代表的な例として生後0日，3週目，5週目，8週目の結果を Fig. 8–15 に示した．注目すべきは，生後0日においては，濃淡の個体差がみられるが，高張部分の特徴ある溶血が生後1週から4週まで明瞭に継続し（生後4週においては淡くなる傾向の個体がある），生後4週—5週において，個体により差があるが消失していき，生後6週—8週においてほぼ完全に消失した．また前述の Fig. 7 においてみられる如く，生後12週では，この特徴ある高張部分での溶血は全く認められなかった．

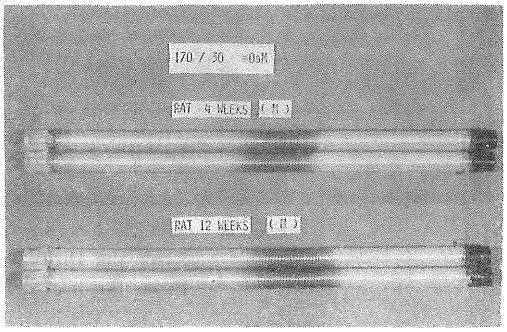
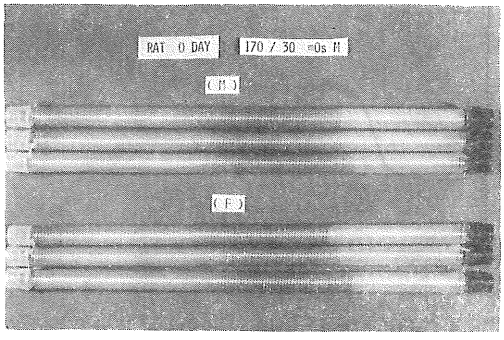


Fig. 7. Comparison of Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 4 Weeks and 12 Weeks After the Birth
From the left to right : 170–30m OsM NaCl



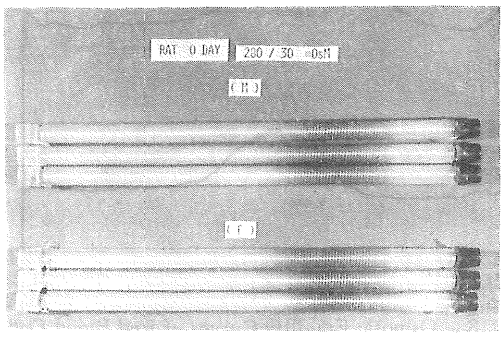


Fig. 8. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 0 day After the Birth
From the left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

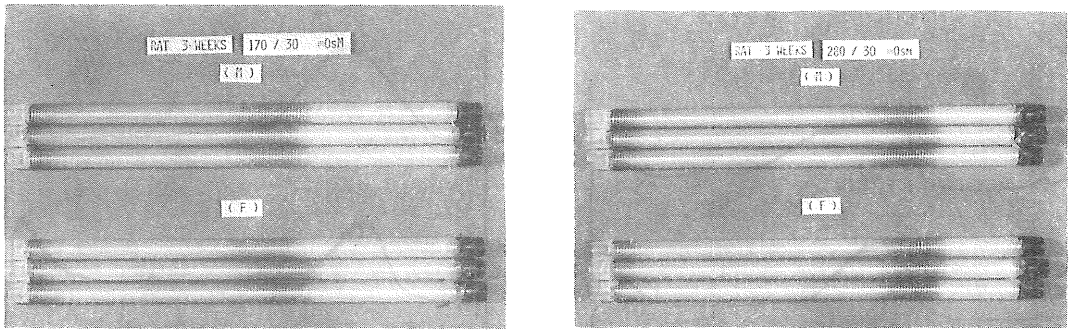


Fig. 9. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 3 Weeks After the Birth
From the left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

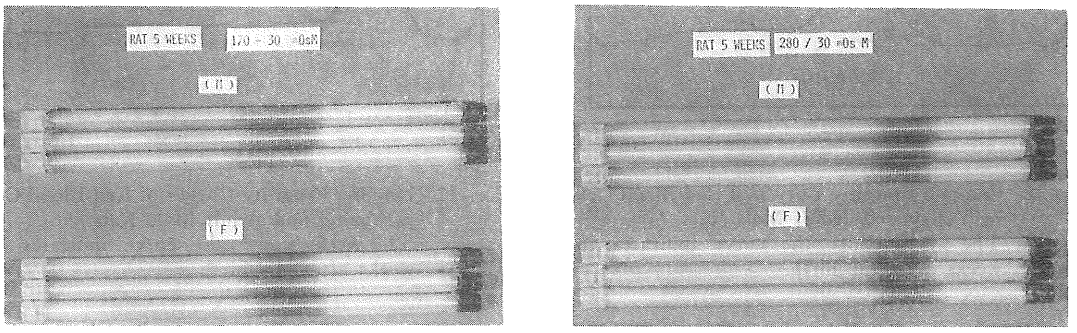


Fig. 10. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 5 Weeks After the Birth
From the left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

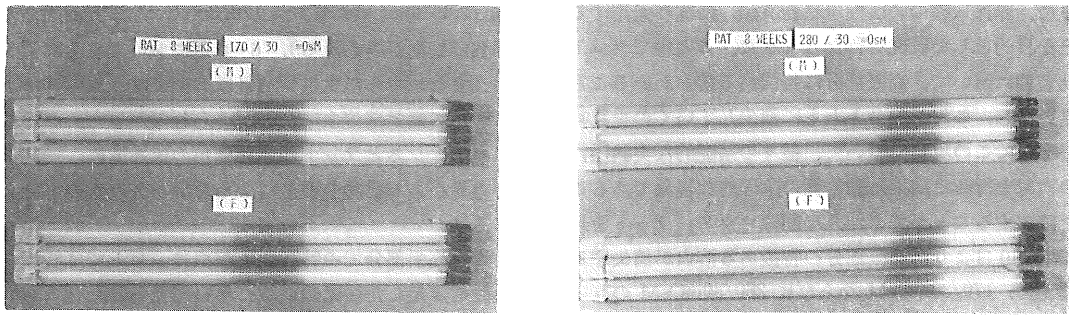


Fig. 11. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 8 Weeks After the Birth
From thə left to right : 170 or 280–30m OsM NaCl

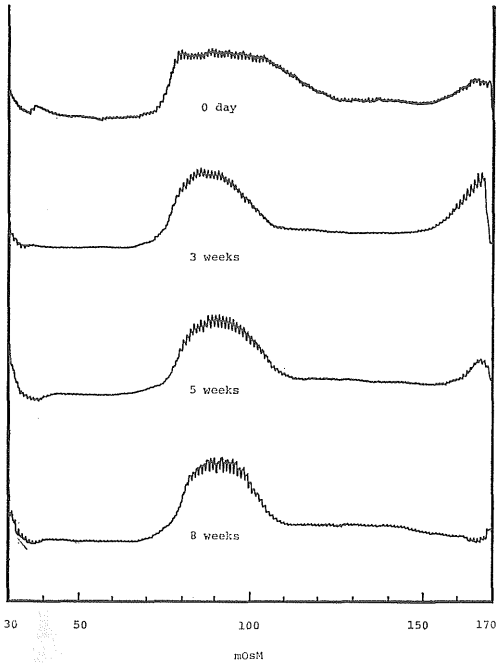


Fig. 12. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young and Adult Male Rats
The weeks under the curve indicates the weeks after the birth.

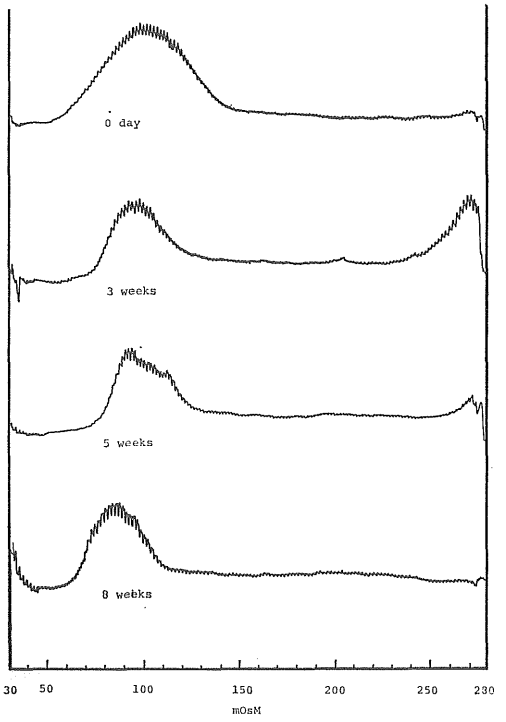


Fig. 13. Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young and Adult Male Rats
The weeks under the curve indicates the weeks after the birth.

4. 幼若マウス，ラットのコイル中間部における溶血パターンの変化 詳細については，他の機会に報告するが，幼若マウス，ラットのコイル中間部における溶血パターンは，170/30mOsM，280/30mOsM ともに加令とともに溶血幅が減少し，溶血開始点が明瞭に認められるようになる傾向があった．

考　　察

新しい原理に基づく CPC 法[3] を用いて，著者らはこれまで，赤血球膜の脆弱性を毒性試験，研究へ適用することを目的とした研究を行なってきた．この中でラットの幼若期において，高張部分に特徴ある溶血があることを見い出し，これが加令とともに消失していくのを認めた．そこでこの現象について，種々の基礎的な実験操作上の検討を行った結果，動物側の生理的な現象であることを確認することができた．今回はマウス，ラットを用いて生後0日より，高張部分の特徴ある溶血が消失する時期まで，170/30mOsM ならびに 280/30mOsM のコイルを用いて，高張部分の溶血について再吟味した．

マウスでは，高張部分の溶血の消失時期はコイルの高張部分の濃度による差はなく，生後3－5日目であり，その時期は非常に速く，出生後数十時間以内に消失し，その変化が非常に速いことがわかった．このことは，マウスにおいては，赤血球膜の浸透圧抵抗が出生後，非常な速さで成熟するということが考えられ，今後，加令との関係で他の因子との比較検討する必要があると考えられる．

ラットにおいては，この溶血の消失時期は，マウスに比べてかなりの長時間を要し，生後5－6週で消失し始め（280/30mOsM の方が 170/30mOsM より消失の割合が強い傾向がみられる）．6－8週において完全に消失した．また，さらに生後12週目においても，170/30mOsM において高張部溶血は全く認められなかった．このことより，マウスとラットの赤血球膜の成熟度に，一部大きな差異があり動物の種差による差異があるものと考えられる．

この高張部分での特徴ある溶血は，ヒトでは妊娠5カ月位で流産した胎児の血液において見られたという報告[4] があり（出生後のヒトにおいては見い出されていない），ラットの幼若期におけるこの特徴ある溶血現象について詳細に検討し，その生理学的意義，機序を明らか

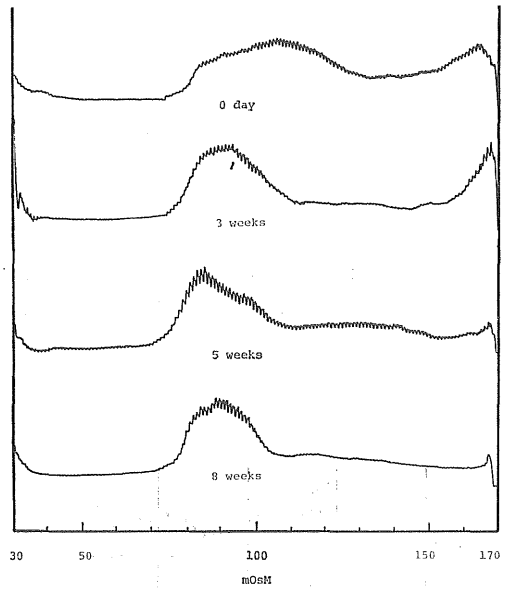


Fig. 14. The Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young and Adult Female Rats
The weeks under the curve indicates the weeks after the birth.

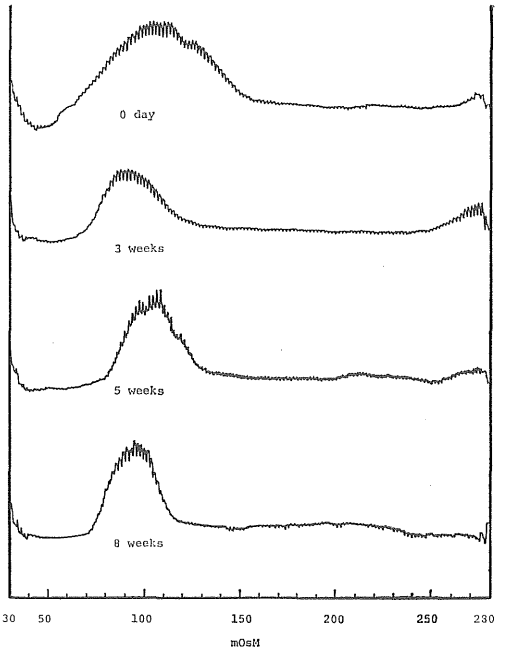


Fig. 15. The Osmotic Fragility Curves of Red Blood Cells in Young and Adult Rats
The weeks under the curve indicates the weeks after the birth.

にすることは，ヒト胎児の赤血球膜浸透圧抵抗に対する種々の化学物質の影響を，ラットの幼若期を用いて推定することを可能にするかもしれない．

また，ヘモグロビン (Hb) は成長につれて，HbF (ヘモグロビンF型=fetal) から HbA (ヘモグロビンA型=adult) に変化することが知られており，ヒトにおいては，妊娠3カ月頃より HbF は胎児血中に出現し，出生後減少する．HbA は胎児において徐々に増加し，出生後も漸次増加し成熟すると報告されている[5]．また赤血球は，胎生初期では胎盤で，胎生中期では肝臓ならびに脾臓で，さらに胎生後期，出生後は骨髄で産生されるといわれているが，本論文で報告された，高張部分における溶血中のヘモグロビンについて検討し，その組成等について明らかにすることは，生化学的だけでなく，脾臓の生理機能との関係[6]ならびに HbF と HbA の非破壊的分離法の解明，開発の可能性への興味がもたれ，今後，種々の観点より検討を加えたい．

さらに，280mOsM の NaCl 溶液は生理的に等張であり，この濃度において溶血が起るということは，生理学的に意味があるかもしれない．この現象については，別の観点からの検討が加えられることを要するものと考えられる．また，コイル中間における溶血パターンの幼若期における変化については現在詳細に検討中であるので，他の機会に報告する予定である．

結　論

CPC 法を用いて，幼若マウス・ラットの赤血球浸透圧抵抗性を検討し，次の結論を得た．

1. 高張部分において，幼若マウス，ラット雌雄に特徴ある溶血を認めた．

2. この溶血は加令により消失し，マウスにおいては，生後3－5日，ラットにおいては6－8週で，その消失時期に動物種の間に差があった．

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
2) 市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 53, 1976
3) Ito, Y., M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, and K. Nunogaki : *Nature*, 212, 985, 1966
4) 荻田幸雄：私信
5) Huehns, E.R. and E.M. Shooter : *J. Med. Genet.*, 2, 48, 1965
6) Nagasawa, T. : *Osaka City Med. J.*, 22, 1, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 236-238, 1977

ラットの成長過程における体重の変動について（第2報）

林田志信*, 高橋 博*, 平賀興吾*

Changes of Body Weight in Growing Rats (II)

SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

毒性研究において実験動物の体重変化は化学物質の毒作用を総合的に表現する指標として重視される[1]．一方，成長過程には一定の体重変動があり，これが化学物質等の外因性刺激による生体反応の強さと関連するふしがある[2,3]．しかし実験動物の成長過程における生理的体重変動に関して詳細な観察はあまりないようである．

著者らは，先に，ラットについて生後13週までの体重増加曲線を検討し「体重増加曲線は規則性をもった日内変動，日間変動，週間変動の組合せによって構成される」ことを報告した[4]．今回は，その後2カ年間毎日体重を測定して得た雄ラット体重増加曲線について検討を加えた．

観察方法

動物は barrier system 下に生育された JCL-Wistar

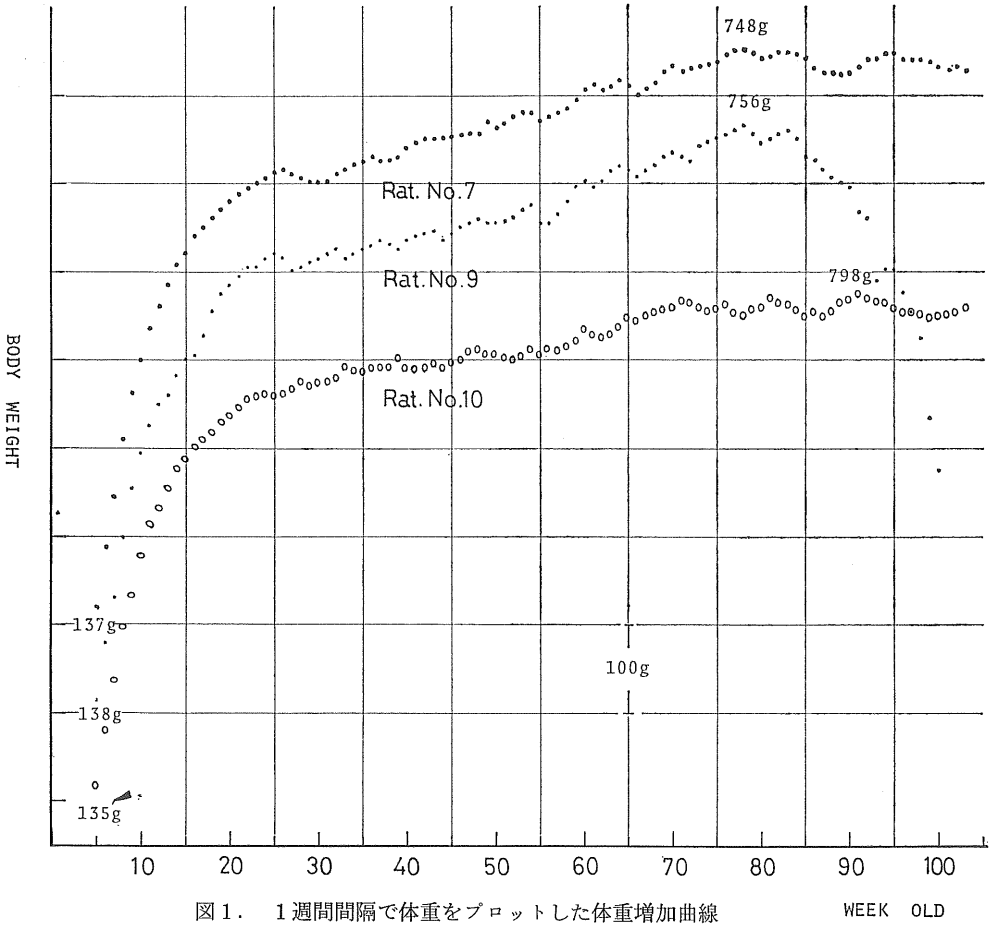


図1． 1週間間隔で体重をプロットした体重増加曲線

* 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

系雄ラット20匹を用いた．4週令で購入，barrier system 飼育室で，個別に前面および床が網のステンレス製ケージ（縦40cm，横25cm，高さ16.5cm）に収容，ベルト式架台にて，日本クレア製 CE-2 固型飼料および細菌ろ過器経由水道水を自由に与え飼育した．飼育環境条件は，室温25±1℃，湿度50±5%，換気10回/時，照明午前6時から午後7時とした．

体重は，1g感度天秤を用い，毎日午前10時に測定し，不定期の刺激が加わらないよう注意した．

観察結果と考察

1. 1週間間隔の体重からみた体重増加曲線 図1に1週間間隔で体重をプロットした3例の体重増加曲線を示した．生後4週から104週（2カ年）までの体重増加曲線を大きくみると **I期**：13週（前後）までの急峻な体重増加を示す期間（この期間に最高体重の65—70%の体重を獲得），**II期**：13週から25週にかけての急な体重増加を示す期間（この時期までに最高体重の80%前後を獲得），**III期**：25週以降75週（約1年6カ月）から104週（2カ年）にかけたゆるやかな体重増加で最高体重に到達するまでの時間，**IV期**：最高体重到達以降やや体重を減じて同程度を維持する期間（4–15週間），**V期**：死に向って体重が急激にあるいはゆるやかに減少下降する時期，の5期にわけられるようであった．

次に1週間間隔の体重を細かくみると，I期においては週間の体重増加量に大小はあるが（この詳細は前報[4]で述べた），前週の体重に対して減少をみることは一般にはない．II期の終り頃以降では前週の体重に対して減少する場合がみられ，約6週間の周期で，ゆるやかなS字状（図1，ラット，No. 7），N字状（図1，ラットNo. 9）あるいはW字状（図1．ラットNo. 10）の波形を描くようであった．

2. 毎日の体重からみた体重増加曲線 図2および3にラットNo. 7の毎日の体重をプロットした体重増加曲線を示す．図2にみられるようにI期では日々の体重増加量に大小の変動はみられるが（前報[4]で詳述），前日の体重に対して減少することは一般にない．II期以降では図3に示すように前日の体重に対して減少をみる場合があり，I期と比較して大きい体重増加曲線の変動が認められる．この変動は波形をなし，はじめは6日（前後）周期のようであり，週令を加えるに従って5日，4日，3日周期あるいはこれらの混在となり，V期においてもこの傾向は認められるようである．

以上，ラットの体重増加曲線は，前報の観察を含めて，日内，日間，週間単位の周期的変動の組合せによって構成されていることが明らかとなったと考える．この変動はおそらく内的生理機能状態と関連するものと推察

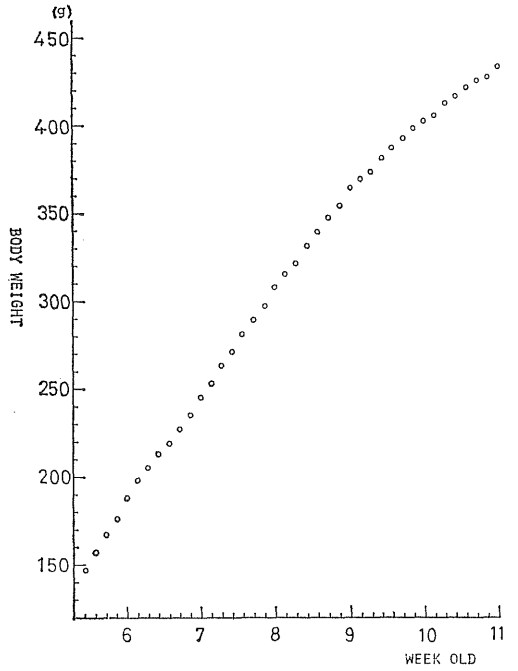


図 2. No. 7 ラットの毎日の体重をプロットした体重増加曲線(1)

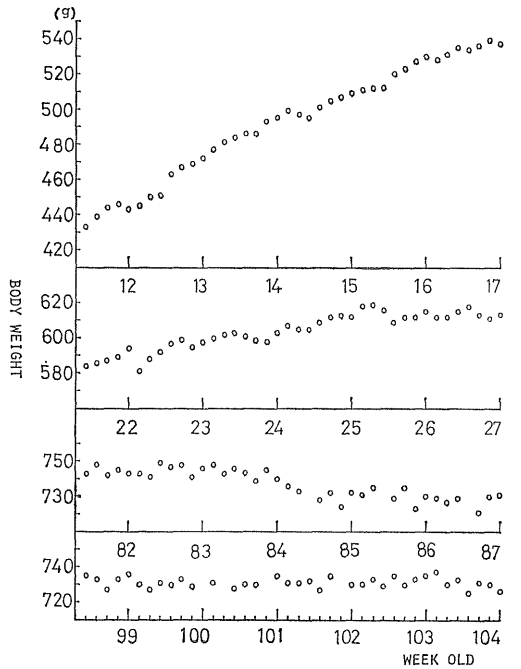


図 3. No. 7 ラットの毎日の体重をプロットした体重増加曲線(2)

しており，今後この関連について検討を加えたい．

ま と め

1) JCL-Wistar 雄ラットの生後104週までの体重増加曲線を解析し，その体重増加傾向を概括的にⅠ期よりⅤ期までにわけた．

2) 各期の体重増加には周期的な大小の変動がみられ，これらの変動の組合せによって体重増加曲線が構成されると結論した．

文 献

1) 福森信隆，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，191，1976

2) 坂本義光，三栗谷久敏，矢野範男，吉田誠二，平賀興吾：東京衛研年報，25，577，1974

3) 平賀興吾，藤井 孝，中川好男，福森信隆，坂本義光：東京衛研年報，26-2，181，1975

4) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 239-243, 1977

幼若ラットの血液成分と器官重量

小林博義*

Organ Weight and Blood Components of Young Rats

HIROYOSHI KOBAYASHI*

緒　　言

幼若期は各種機能が未発育の段階にある時であり，代謝面においても成獣と比較して著しくおとり，同時に胎児期機能残存もみられるなど[1,4]，成熟期と同一に考えることはできない．毒性試験，研究においても，幼若期と成熟期における結果は別のものと考えなければならないので，幼若期の動物を使用[2]しての毒性試験，研究は意義あるものと考えられる．そこで，今回ラットの幼若期（生後2－7週まで）の血液学的，血清生化学的検査ならびに体重，器官重量を測定したので報告する．

実験材料ならびに方法

動物　自家繁殖したJCL-Wistar系ラットを兄妹交配し，その2産仔の雌雄を用いた．動物は，室温25±1°，湿度55±5%，照明時間午前9時より午後5時までの飼育室において，カンナクズ床敷使用のプラスチックケージに雌雄別に5匹ずつ入れ，固型飼料 CE-2（日本クレア製）と水道水を自由に与え飼育した．

観察　2週令より7週令まで各週令ラット雌雄各5匹について血液学的，血清生化学的検査を行ない，体重は，体重測定用として別に雌雄各5匹を用意し，生後2週より7週まで毎週一定時間に測定した．また，各週令処理群の自家繁殖ラットについても体重の推移をみた．

血液学的ならびに血清生化学的検査

断頭屠殺時放出する血液を採取したのち，白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hgb），ヘマトクリット値（Hct），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）はCoulter Counter Model-S[3]により，血清総蛋白（TP），グルコース量（Glu），尿素窒素量（UN），総コレステロール量（Cho），GPT，GOT，ALP，コリンエステラーゼ活性（ChE）は自動分析装置（日立M-400）[3]によって測定した．

器官重量の測定　断頭放血後直ちに，心臓，脾臓，胸腺，肝臓，腎臓(左右)．副腎(左右)，精巣(左右)，卵巣(左右)，子宮を摘出し，メトラー電子天秤（PE-162，HE-20）にて秤量した．

実験結果

体重　結果は Fig. 1 に示した．生後2週目(平均体重雄27g，雌26g）から5週目（雄100g，雌96g）までは雌雄とも同じように著しい体重増加がみられたが，5週以後は雄が雌を上まわる増加を示した．Fig. 2 は実験に供した自家繁殖ラット雌雄すべてを生後0日より35日までの個体体重をプロットしたもので，生後1日目の体重は生後0日より減少した．しかし2日以降は増加がみられた．

血液学的検査　結果はFig. 3に示した．成長とともに，RBC は徐々に増加し，Hgb は2週より3週にかけ減少し3週より増加した．Hct は3週目より増加がみられた．MCV は成長とともに徐々に減少し，MCH は2週より3週にかけて急激に，それ以後は徐々に減少した．WBC は生後2週より5週にわたり急激な減少を示したが以後は多少の増減がみられる程度であった．これらの変化は雌雄ともに認められ性差はなかった．

血清生化学的検査　結果は Fig. 4 に示した．GPT 活性は成長による変化がほとんどなく，これに対し GOT 活性は雄において成長にともない急激な減少がみられた．雌では増減の変動が大きく，一定の変化があるとは言えない．ALP 活性は生後2週より4週までは活性上昇を示し，その後一定して6週まで高値を示し生後6週より7週にかけて低下した．Cho は生後2－3週において急激に減少し，以後はわずかな増減であった．TP は成長するにしたがい，徐々に増加したが，GLU は4週目までは増加し，以後はほぼ変化がなかった．UN は生後2－4週はほとんど一定でほとんど変化がなく5－6週にかけて急増し，7週では2－4週値に復した．ChE は増減に大きい変動がみられるが全体的には成長にともない減少していく傾向がみられた．

器官重量　結果は Fig. 5, 6 に示した．いずれも成長に

* 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

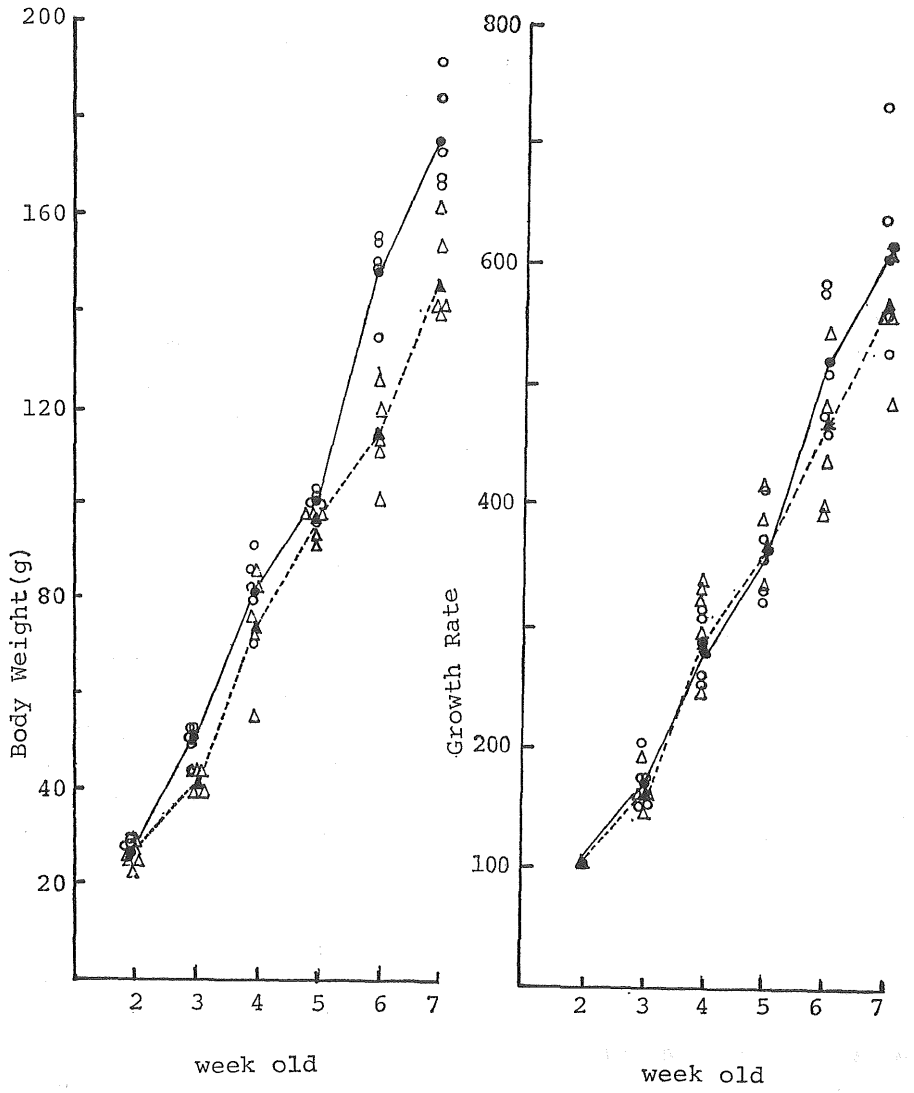


Fig. 1. Changes of Body Weight in Young Rats
Individual (male ○ female △)
Mean Body (male ●——● female ▲----▲)
Growth Rate : Weight/Weight at 2 weeks

ともない増大した．体重比重量では肝臓，卵巣，精巣を除いて減少を示した．子宮は絶対，比重量ともに4－5週にかけ急増した．

考　　察

動物は出産後生理的飢餓期（出産直後における授乳の不馴れや，不感蒸泄が大きいことなどによる体重減少の時期），乳児期，幼児期をへて，体内各機能が成体の能力に近づいていく．今回，ラット幼若期の体重変化でも飢餓期と思われる体重減少が出産翌日にみられたが（Fig. 2），2日目には出産時の体重をこえ増加が始まった．体重のその後の変化は週令とともに増加した．今回の実験で得られた変化のうち，赤血球の数的増加，MCV減少，Hgb，Hct の増加は，ヒト新生児期[5]では赤血球が初期においては大きいものが多く，成長とともに小さくなり，赤血球数は増加することと一致した．イヌにおいても同様の報告がある[5]．TP，Glu の生後3週以後における増加は離乳と飼料摂取による影響が考えられる．今回のラット生後0－7週までの観察で得た結果のうち体

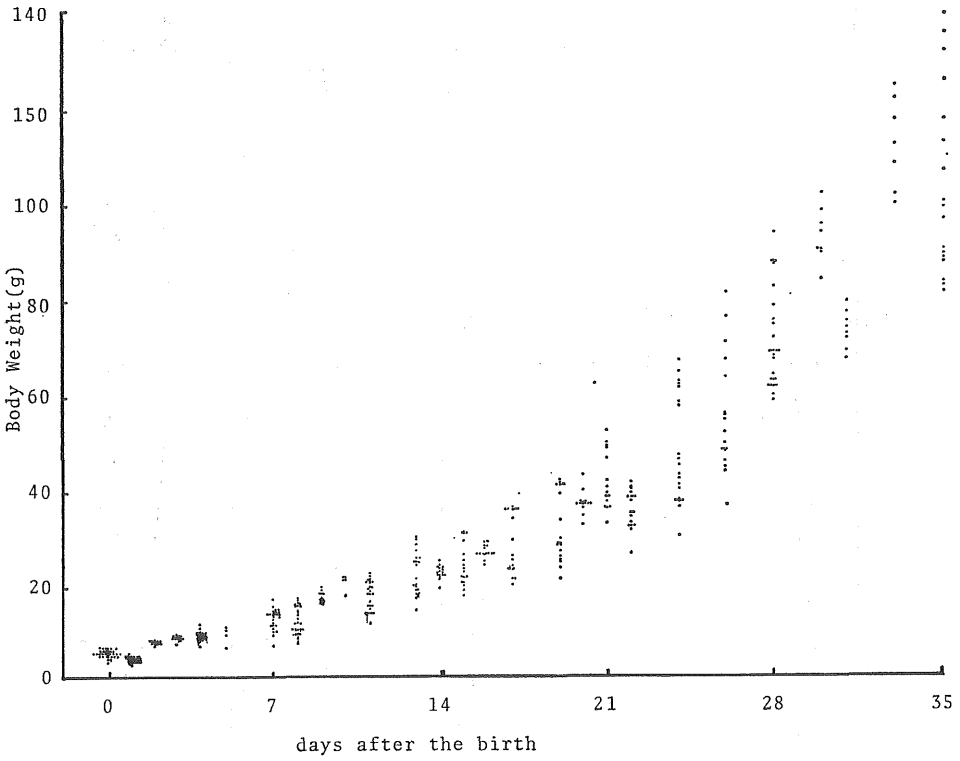


Fig. 2. Changes of Individual Body Weight Gain in Rats (male and female)

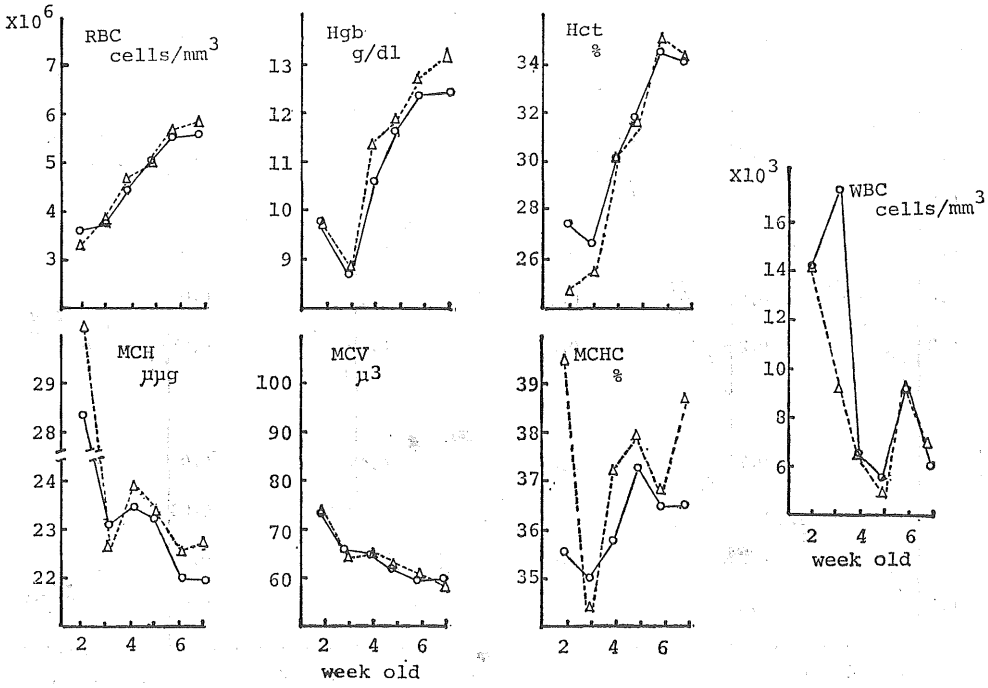


Fig. 3. Changes of Hematological Findings in Young Rats ○——○ male △----△ female

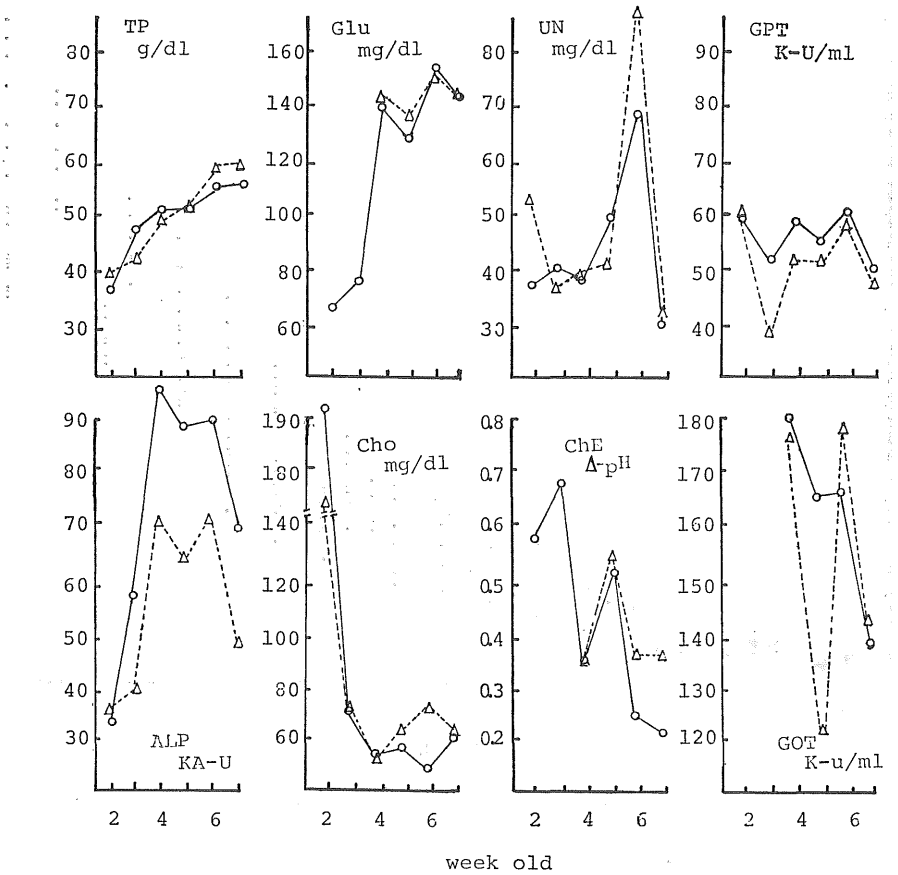


Fig. 4. Changes of Blood Biochemical Findings in Young Rats ○——○ male △----△ female

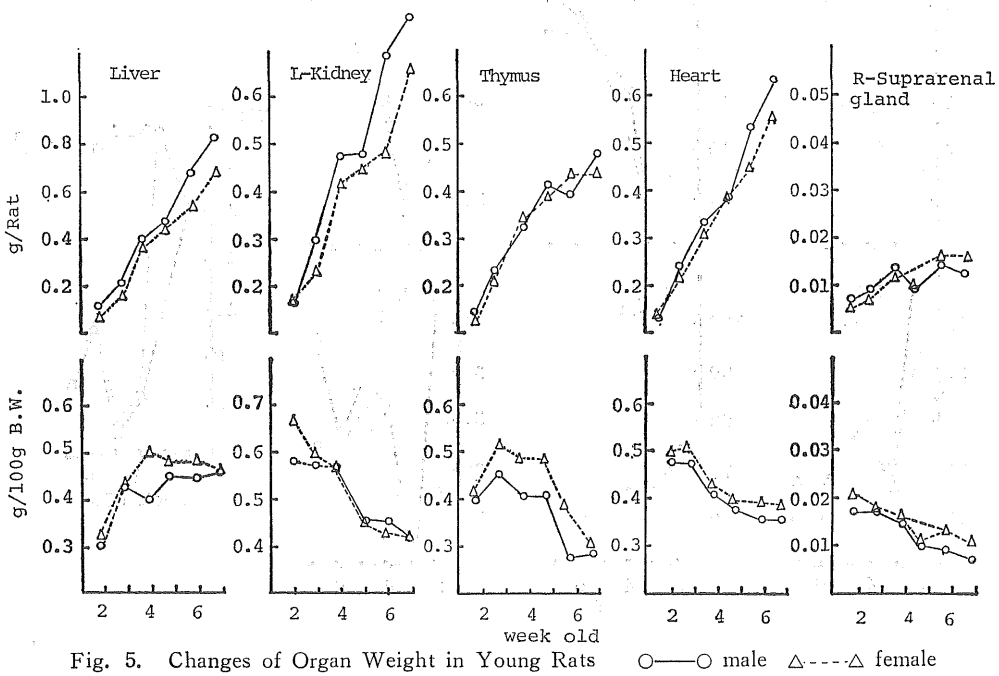


Fig. 5. Changes of Organ Weight in Young Rats ○——○ male △----△ female

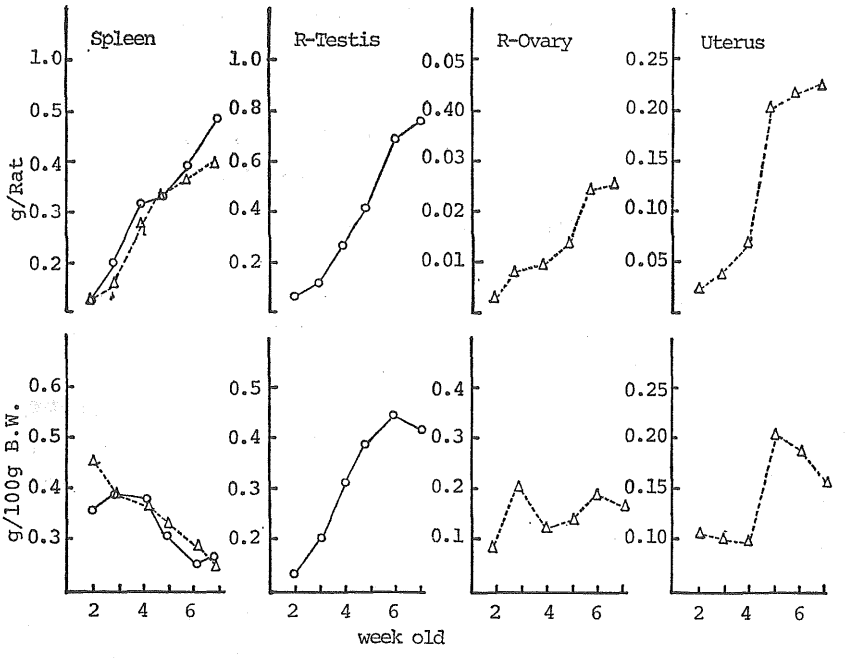


Fig. 6. Changes of Organ Weight in Young Rats ○——○ male △----△ female

重の出生直後における減少，成長にともなった血球数，赤血球容積の減少，ヘモグロビン，ヘマトクリットの増加および血清総蛋白の増加，コレステロール値の減少などはヒト新生児期[4,6,7]のそれと近似していた．一方成長途中の器官重量は成熟度をよくあらわしており，ラット性ホルモンの作用の影響は生後4週頃までは生殖器官に対して少なく5週目頃より発現し6週が最も高いといわれており，本実験の卵巣，精巣，子宮の重量変化はよくこれをあらわしていると考えられる．

文　献

1) 坂本正一，小林　登：胎児医学145，1975　同文書院
2) 吉岡　一：周産期医学，6(1) 9，1976
3) 中川好男，福田向江，柴　英子，平賀興吾：東京衛研年報，25，599，1974
4) 大谷敏夫：小児血液学，17，1967，金芳堂
5) 小動物研究会：犬の繁殖と仔犬に関する文献集，1，1968
6) 松村忠樹，海老名亮二：周産期医学，3(8) 5，1973
7) 工藤尚文，武田佳彦：周産期医学，3(8) 17，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **28**-2, 244-245, 1977

マウス眼窩採血法による採血と血液学的経時変化

小林博義*

Hematological Variation on Blood Collected at Interval from Orbital Vein in Mice

HIROYOSHI KOBAYASHI*

はじめに

実験動物の血液性状の変化を経時的に観察するに当って，イヌ，ウサギ，サルなどの中型実験動物では同一個体から適時採血し，その変化を観察することができる[1,2]．しかし小型実験動物であるラットやマウスでは，個体を対象にした頻回の採血は困難なことが多いため[3]，多くの場合群単位の実験で検討されてきた，今回著者は同一マウスの眼窩静脈叢より毎週採血を行ない血液学的変化の検討を行なったので，その結果を報告する．

実験材料と方法

使用動物　自家繁殖したJCL-ICR系マウス雌雄各10匹を実験に供した．マウスは10匹ずつプラスチックケージに入れ，床敷はカンナクズを使用し，固型飼料 CE-2（日本クレア製）と水を自由に摂取させた．飼育環境条件は室温25±1°，湿度50±5%，照明は午前9時より午後5時までとした．

採血　同一マウスを用い，生後5週より21週まで，7日間隔で静脈叢より採血した．

採血法　マウスの後頭部および背部の皮膚を親指，人差指，中指で体全体にわたって固定し，さらに薬指によって尾をつかんで保定する．次に消毒した針（1/3mm）注射針を切りとりエーゼにとりつけたものを眼瞼下方粘膜に針断面が外を向くようにして入れ，針を持った親指の所を中心に円をえがくように針先端を頬骨内側で上顎側より後頭部にむけて，手前に半円をえがくように引きながら静脈叢を切る．静脈叢が切られると眼全体をおおうようにして血液が噴出してくる，この時血液噴出を持続させるには針を眼窩に入れたまま，眼球を前頭骨側に針で軽くおしておく．噴出する血液を直接希釈器（York社製）で吸収採取した．採血終了後は針を眼窩より引きぬけば眼球圧により容易に止血する．

血液学的検査　Coulter counter (Model-S)[4] を用いて，白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン（Hgb），ヘマトクリット（Hct），平均赤血球血色素量（MCH），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球色素濃度（MCHC）について測定した．

実験結果ならびに考察

JCL-ICR系　マウスを用いて眼窩静脈より，同一個体について毎週採血を行ない血液学的検査を行なった．個々の動物について赤血球数の変化をみると全体的に変動が多かった．しかし，1，2の例外を除き，雄では5-7週において急激な増加がみられ，その後多少の増減はあったが10-11週までさらに増加し，以降バラツキながらも13週まで減少し，13週以後は再び増加し，15週以後は多少の増減がみられたが12-13週以下のレベルで安定した．雌には雄のような変化はみられなかった．このような変化はヘモグロビン値，ヘマトクリット値においてもみられた．MCV，MCH，MCHCはほとんど変化はなかった．また白血球数は多少の変動があったが雌では7-8週まで減少する傾向がみられた．平均値においても，個体についての変化と同様な傾向がみられた．(Fig. 1)

変化の原因については測定機器 Coulter-Counter (Model-S)および希釈器によるもの，採血の影響ならびに動物側の原因などが考えられる．測定機器，希釈器については適時標準血液による調整管理を行ない，また測定毎に調整し標準値をそのつど求めており信頼度は高いものと考えられる．採血法については，保定から血液希釈終了までの時間は完全に一致させることができないので，若干の時間差（1-2分）はやむをえなかった．動物側の因子としては，今回用いた生後5-7週のマウスは成長時期であり赤血球増加，赤血球容積減少[5]などの生理的変化が著しい時期と考えられ原因の一つともなり得る．さらに個体連続採血が動物に与える影響については，7日毎1回では採血前後の体重増減，飼料摂取量，飲水量に変化はなかったが，個体連続採血について検討

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

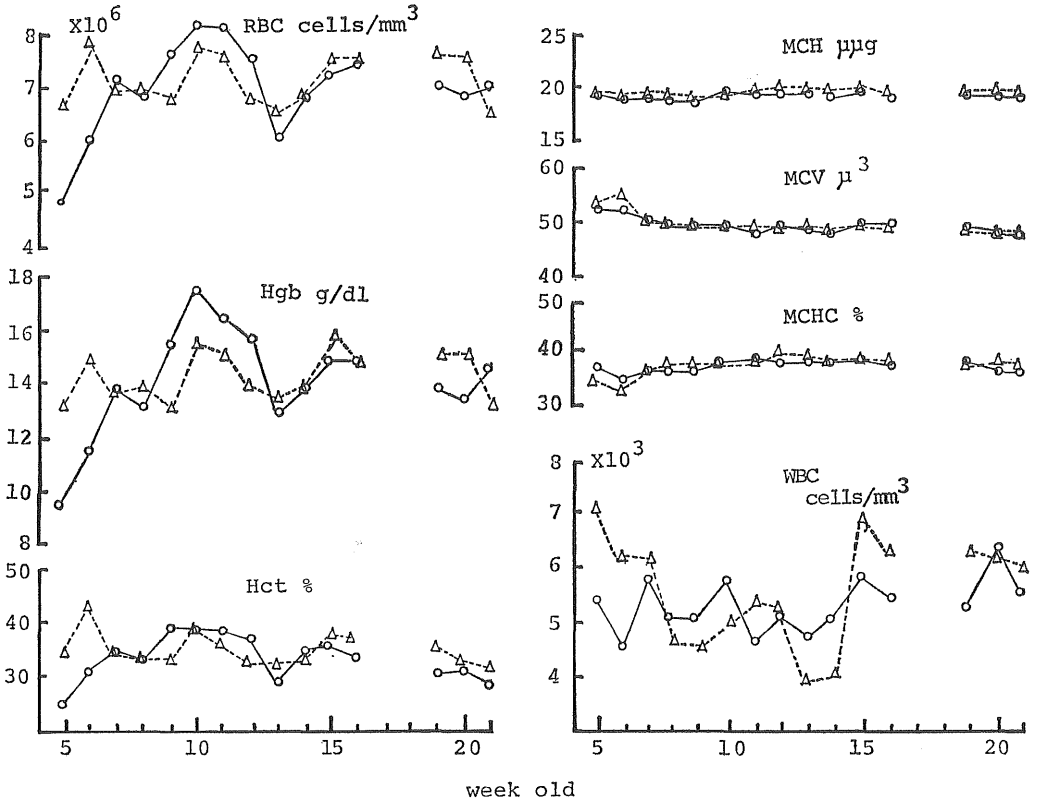


Fig. 1. Changes of Hematological Findings in Mice.
○——○ male △----△ female

を行なうには血臓学的変化の少ない成熟動物による検討によらなければならない.

文　献

1) 田嶋嘉雄：実験動物学総論，151，1970 朝倉書店
2) 田嶋嘉雄：実験動物学各論，459，1972 朝倉書店
3) 小山良修：動物学手技，68，1965 協同医書出版
4) 中川好男，福田向江，柴 英子，平賀興吾：東京衛研年報，25，599，1974
5) 小林博義：東京衛研年報，28-2，239，1977

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1976. 8—1977. 7)

Tumors of the Preputial Gland in Rats

K. Hiraga and T. Fujii : *Gann*, 68, 369, 1977

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)添加飼料によるラットの終生飼育試験で対照群を含む雌雄に包皮腺の腫瘍が観察された．ラットの包皮腺腫瘍の発生報告例は1930年に Bullock らが雌の2例に癌を認めたとして以来みられず稀な腫瘍と思われる．試験はLASを0.00，0.04，0.16および0.60%の濃度で飼料に添加し各濃度毎に SIc : Wistar ラット（バリアー環境下で生育）雌雄を15匹ずつ配した．ラットはバリアー環境下で飼育し，LAS 摂取は5週令時より開始した．包皮腺腫瘍は病理組織学的検索を行なったラット104匹中の12匹に認められ，そのうちの7例が腺腫，5例が腺類癌であった．最初の腫瘍は摂取開始後52週で対照群雌に腺類癌が1例，最後は148週で0.60%群雌に腺腫が1例であり，摂取後104週（2年）以前が2例，以後が10例の発生であった．包皮腺腫瘍の発生には LAS 摂取量と関連した頻発傾向は認められず現時点では LAS 摂取による直接的誘発とは考えられない．

Localization of the Phlorizin Site on Na, K-ATPase in Red Cell Membranes

A. Nakagawa and M. Nakao : *J. Biochem.*, 81, 1511, 1977

Phlorizin at 2×10^{-4}M inhibited Na^+ and Rb^+-activated ATPase activities in human red cell membranes by 43%. It inhibited the ^{86}Rb uptake activity of erythrocytes by only 15%. ^{86}Rb uptake into resealed ghosts was inhibited strongly when phlorizin and ATP were preloaded in the ghosts before resealing. Na, K-ATPase activity in the resealed ghosts was also inhibited in the presence of phlorizin inside but not outside the ghosts. These findings suggested that the phlorizin site is located inside the cell.

Differential Replication of the Chromosomes of *Pallavicinia longispina*, Liverwort

M. Masubuchi : *Cytologia*, 41, 523, 1976

染色体構成の異質染色質と真正染色質の違いについては長い間論じられて来たところであるが，複製時期の差が両染色質の特性の1つであり，特に異質染色質はDNA合成期（S期）の晩期に複製を完了すると考えられて来た．しかし，S期の初期に複製を完了する異質染色質の例がいくつか報告され（Hsu *et al.* 1964, Tanaka 1965, Tatsuno *et al.* 1970, Masubuchi 1971, 1973, 1974, Ray-Chaudhri 1972），異質染色質＝晩期複製の関係は成り立たなくなっている．

本論文では，この両染色質の違いを明らかにするために，両染色質が明瞭に区別される *Pallavicia longispina*（n=8）の染色体複製の様子を，H^3-thymidine オートラジオグラフィー法により解析した．その結果，異質染色質は真正染色質に比べ，①中間期において分散状態を呈している時間が短かい，②染色体のDNA量あるいは複製単位が多い，③複製に要する時間が短い，ことを明らかにした．

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1976. 8—1977. 7)

M. Nakao, T. Nakao, Y. Hara, F. Nagai, M. Shimizu and S. Hara : **Biospecific Chromatography of Na, K-ATPase**
10th International Congress of Biochemistry, Hamburg (1976. 8)

原しげ子，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Ⅱ）**
第49回日本生化学会（1976. 9）

中尾順子，長井二三子，原諭吉，清水麻里，中尾真：**クロマトカラムのアミン密度と Na, K-ATPase**
第49回日本生化学会（1976. 9）

原諭吉，中尾順子，中尾真，永倉貢一：**各種 ATP 誘導体と Na, K-ATPase**
第49回日本生化学会（1976. 9）

金西信次，渡部真：**ミバエの放射線不妊化と放射線感受性**
日本放射線影響学会（1976. 10）

益淵正典，吉田誠二，平賀興吾，縄井寿美子：**サッカリンナトリウム（S-Na）の突然変異誘起性について I. 細胞遺伝学的試験**
日本環境変異原研究会第5回研究発表会（1976. 10）

益淵正典，高橋昭夫，高橋省，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**サッカリンナトリウム（S-Na）の突然変異誘起性について II. 優性致死試験**
日本環境変異原研究会第5回研究発表会（1976. 10）

高橋省，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT）の代謝と出血致死効果（1） 3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde についての検討**
日本薬理学会第27回北部会（1976. 10）

大石真之，平賀興吾：**ジーユーエチルヘキシルフタレート(DEMP)の毒性学的研究（3） DEHPのラット肝および睾丸成分におよぼす影響**
日本薬理学会第55回関東部会（1976. 11）

福田向江，高橋省，大石真之，平賀興吾：**血清および肝臓中の酵素活性の相関について**
日本薬理学会第55回関東部会（1976. 11）

高橋省，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT）の代謝と出血致死効果（2） 2, 6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol についての検討**
日本薬理学会第55回関東部会（1976. 11）

益淵正典，高橋昭夫，高橋省，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT），直鎖型 Alkylbenzene sulfonate（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**
日本薬理学会第55回関東部会（1976. 11）

原しげ子，中尾順子，原諭吉，中尾真：**細胞膜諸酵素に対する有機水銀化合物の阻害作用**
第3回毒作用研究会（1976. 11）

高橋省，高橋昭夫，平賀興吾，中尾順子：**Butylated hydroxytoluene（BHT）の出血致死効果 雌ラットおよびマウスに対する影響**
第3回毒作用研究会（1976. 11）

長井二三子，原しげ子，金西信次，樺島順一郎，中尾順子，平賀興吾：**クロム鉱さい水抽出物の経皮および経消化管吸収**
第58回東京都衛生局学会（1976. 11）

高橋省，福森信隆，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT）の出血致死効果 酸化防止剤5種についての検討**
第50回日本薬理学会総会（1977. 3）

大石真之，平賀興吾：**ポリ塩化ビフェニル（PCB）とポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の比較毒性 PCB と PCDF のラット肝ポルフィリン合成におよぼす影響**
第50回日本薬理学会総会（1977. 3）

大石真之，平賀興吾：**ポリ塩化ビフェニル（PCB）とポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の比較毒性(3) PCB と PCDF のラット血清蛋白等におよぼす影響**
第47回日本衛生学会総会（1977. 4）

川野澄江：**ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)によるラット肝薬物代謝酵素の誘導**
日本農芸化学会昭和52年度大会（1977. 4）

高橋省，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT）および関連化合物の出血致死効果**
日本農芸化学会昭和52年度大会（1977. 4）

福森信隆，高橋省，三栗谷久敏，平賀興吾：**Butylated hydroxytoluene（BHT）およびその他の酸化防止剤によるラット肝細胞の電顕的観察**
日本電子顕微鏡学会第33回学術講演会（1977. 5）

大石真之，平賀興吾，大沢仲昭：**Estrone, Estradiol, Estriol のラット睾丸内直接注入の睾丸静脈血中 Testosterone 濃度におよぼす影響**
第50回日本内分泌学会総会（1977. 5）

原しげ子，中尾順子：**細胞膜諸酵素に対する水銀化合物の阻害作用**
第4回毒作用研究会（1977. 6）

坂本義光，調武久，平賀興吾：**粉塵吸入実験装置の試作**
第4回毒作用研究会（1977. 6）

高橋省，平賀興吾：**2,4,6-Tri-*tert*-butylphenol および 2, 6-di-*tert*-butylphenol の雄ラットに対する出血致死効果 butylated hydroxytoluene（BHT）との比較**
日本薬理学会第56回関東部会（1977. 6）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

西　川　洋　一　（委員長）
高　橋　保　二
坂　井　千　三
村　上　　一
直　井　家寿太
三　村　秀　一
平　賀　興　吾
中　尾　順　子

昭和52年12月20日　発行

規格表　第 2 類
印刷番号 (52) 815
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第28—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　03 (625) 7481 (代)