図書室
55. 6. 4
東京都衛生研究所

CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

29-2

1978

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

序

東京都立衛生研究所研究年報は第1巻が昭和25年5月に発行され，総頁数80頁の薄いものであったが，年代が進むに従って次第に厚さを加えてきた．また内容的にも充実してきたことと自己満足かも知れないが自認している．

今回の第29巻は論文総数114編と分厚なものとなるので，昨年と同様2分冊とされた．研究年報の分冊化はここ3年連続的に行われてきたが，これからは恒久的にならざるを得ないものと思われる．

数年前までは当研究所においても主たる研究論文は学会誌に専ら投稿し，研究年報には掲載されることが少なかったのは事実であるが，最近では研究年報への投稿が増加している．これは研究者の層の増加と，若くなったこと，研究意欲が旺盛なこと，着想が新鮮なことなどが原因と考えられる．

さて，日本における医学文献検索は急速に発展し，国内文献検索も相当広範囲にわたって行われるようになった．従って，いままで眼のとどかないところにあった研究論文は，国内はもとより国外においても検索の網にかかるようになり，しかもその論文が画期的な学術的な意義があれば広く認められ得るようになった．

衛生学界における文献情報検索がコンピューターにより迅速処理されることもあってか，当研究年報掲載の論文別刷も各地より送付方依頼が増加している．

研究年報には各研究室で行った調査の基礎データーも出来るだけ掲載するよう努力しているが，紙面の都合により掲載出来ないものが多々ある．これらは別に研究報告として印刷するつもりである．

研究年報とともに研究報告も御活用願えれば幸である．

おわりに，本報告書の刊行に当って，編集委員ならびに関係諸氏に献身的に御奉仕いただいたことに深く感謝の意を表する．

昭和53年7月20日

東京都立衛生研究所長　野　牛　　弘

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（続）
24カ月ならびに終生飼育群の個体別所見
…… 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によるオロチン酸脂肪肝の阻止
…… 高橋　　省，中尾　順子，平賀　興吾……22

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）とエタノールのラット肝におよぼす相互作用
…… 福森　信隆，三栗谷久敏，平賀　興吾……24

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の DT-diaphorase 活性に対する影響について
…… 鈴木　英子，中尾　順子，平賀　興吾……35

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を投与したラットの尿の突然変異誘起性について
…… 藤田　　博，平賀　興吾……38

突然変異物質の突然変異誘起性に対するジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の影響
…… 藤田　　博，平賀　興吾……40

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）および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6カ月間摂取させたラットの病理学的検索
…… 藤井　　孝，阿部　幸恵，長澤　明道，三栗谷久敏，矢野　範男，湯沢　勝廣，平賀　興吾……44

LAS，ABS 投与ラット腎皮質における有機酸および有機塩基の取り込み
…… 伊川三枝子，米山　允子，中尾　順子，平賀　興吾……51

ラット肝臓脂質合成能に及ぼす LAS の影響
…… 米山　允子，伊川三枝子，中尾　順子，平賀　興吾……55

種々の界面活性剤の亜急性毒性試験　　肝，腎酵素への影響
…… 伊川三枝子，米山　允子，中尾　順子，平賀　興吾……58

クロム鉱さい粉じんのラットによる28日間持続吸入実験（第2報）　　クロムの体内分布
…… 神谷　信行，坂本　義光，伊川三枝子，中尾　順子，平賀　興吾……64

クロム鉱さい粉じんのラットによる7日間持続吸入実験
…… 坂本　義光，神谷　信行，池田　虎雄，平賀　興吾……67

クロム鉱さい水浸出液の感作性試験（第1報）　　遅延型アレルギーの検索
…… 福森　信隆，井口　重孝，樺島順一郎，平賀　興吾……73

クロム鉱さい水浸出液の感作性試験（第2報）　　即時型アレルギーの検索
…… 福森　信隆，樺島順一郎，井口　重孝，平賀　興吾……81

柑きつ類カビ防止剤の微生物系における突然変異誘起性について
…… 小嶋　昭江，平賀　興吾……83

培養細胞における防カビ剤の細胞遺伝学的研究
…… 吉田　誠二，益淵　正典，平賀　興吾……86

オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩のマウスを用いた催奇形性試験
…… 小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吾……89

飼料中に添加したオルトフェニルフェノールナトリウムの定量およびその保存による影響の検討
…… 縄井寿美子，小縣　昭夫，吉田　誠二，安藤　　弘，久保　喜一，中尾　順子，平賀　興吾……97

オルトフェニルフェノールナトリウムのマウスにおける長期投与優性致死試験
…… 小縣　昭夫，吉田　誠二，縄井寿美子，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吾，益淵　正典……99

オルトフェニルフェノールの細胞毒性について　　放射性クロム酸ナトリウムを用いた細胞毒性の検索
…… 佐々木美枝子，縄井寿美子，中尾　順子… 104

オルトフェニルフェノールの *in vitro* 抗体産生におよぼす影響について
…… 佐々木美枝子，中尾　順子… 109

チアベンダゾール（TBZ）のマウスを用いた催奇形性試験
…… 小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，平賀　興吾… 112

アセトアミノフェンのラットを用いた亜急性毒性試験
…… 林田　志信，高橋　　博，平賀　興吾… 116

アセトアミノフェン添加飼料を13週間摂取させたラットの病理学的検索
…… 藤井　　孝，阿部　幸恵，湯澤　勝廣，三栗谷久敏，矢野　範男，長澤　明道，平賀　興吾… 125

ポリ塩化ジベンゾフランとポリ塩化ビフェニルの比較毒性
…… 大石　眞之，森田　昌敏，大石　向江，平賀　興吾… 137

短期間少量のポリ塩化ビフェニルおよびジベンゾフランを投与したラットにおける毒性
…… 川野　澄江，林田　志信，井口　重孝，平賀　興吾… 142

ショードマイシンの Na，K-ATPase 阻害機構（第2報）　　阻害に対する ATP の作用
…… 原　しげ子，中尾　順子… 147

アデニレートシクラーゼにおよぼすバナジウムの影響
…… 中川　敦子，中尾　順子… 151

赤血球の老化と細胞膜脂質成分の変化
…… 長井二三子，中尾　順子，中尾　　真… 155

ラット尿中の蛋白質（第2報）　　γ-GTP，LDH，ALP を示標とした腎障害と尿中酵素との関連
…… 中尾　順子，道源　正子，樺島順一郎… 158

マウス包皮腺の微細構造と去勢後の変化
…… 三栗谷久敏，福森　信隆，平賀　興吾… 161

姉妹染色分体交換（SCE）による変異原物質の検索（第1報）　　SCE 検査にあたっての基礎的研究
…… 縄井寿美子，吉田　誠二，益淵　正典，中尾　順子，平賀　興吾… 167

ラットの成長過程における体重の変動について（第3報）　　体重増加率
…… 林田　志信，高橋　　博，井口　重孝，平賀　興吾… 172

ラットの血液および血清成分の統計学的分析
…… 大石　向江，大石　眞之，平賀　興吾… 175

ラットにおける死後変化の経時的観察　　1　肉眼的検索
…… 阿部　幸恵，矢野　範男，湯澤　勝廣，長沢　明道，藤井　　孝，平賀　興吾… 180

他誌発表 …… 189

学会発表 …… 191

CONTENTS

REPORTS

Toxicological Studies with Butylated Hydroxytoluene (BHT) by Dietary Administration for the Life-Span in Rats (Supplement) Findings of Individual Rat for 24 Months and the Life-Span Groups ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi, Y. Nakagawa, F. Nagai, M. Shimizu, T. Ikeda, N. Yano and K. Hiraga 1

Prevention of Orotic Acid-Induced Fatty Liver by Butylated Hydroxytoluene ..... O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga 22

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Rat Liver Cells pretreated with Ethanol ..... N. Fukumori, H. Mikuriya and K. Hiraga 24

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on DT-diaphorase Activity ..... H. Suzuki, T. Nakao and K. Hiraga 35

Mutagenicity of Urine of the Rats Administered with Butylated Hydroxytoluene in Salmonella ..... H. Fujita and K. Hiraga 38

Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of Chemical Mutagens in the Salmonella/microsome Test ..... H. Fujita and K. Hiraga 40

Pathological Examination on Rats Fed with Butylated Hydroxytoluene and Linear Alkylbenzene Sulfonate for 6 Months ..... T. Fujii, Y. Abe, A. Nagasawa, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa and K. Hiraga 44

Up-take of Organic Acid and Organic Base by Renal Cortical Slice of Rats Treated with LAS and ABS ..... M. Ikawa, M. Yoneyama, T. Nakao and K. Hiraga 51

Effects of LAS on Incorporation of Acetate-1-^{14}C to Liver Lipids in Rats ..... M. Yoneyama, M. Ikawa, T. Nakao and K. Hiraga 55

Subacute Toxicity of Detergents Effect of Detergents on Liver and Kidney Enzymes in Rats ..... M. Ikawa, M. Yoneyama, T. Nakao and K. Hiraga 58

Inhalation Experiment of Chromium Ore Residue Dust to Rats for 28 Days (II) The Distribution of Chromium in Rat Tissues ..... N. Kamiya, Y. Sakamoto, M. Ikawa, T. Nakao and K. Hiraga 64

Inhalation Experiment of Chromium Ore Residue Dust to Rats for 7 Days ..... Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga 67

Allergic Sensitization to Chromium Ore Residue (I) Identification of Delayed-Type Hypersensitivity ..... N. Fukumori, S. Iguchi, J. Kabashima and K. Hiraga 73

Allergic Sensitization to Chromium Ore Residue (II) Identification of Immediate-Type Hypersensitivity ..... N. Fukumori, J. Kabashima, S. Iguchi and K. Hiraga 81

Mutagenicity of Citrus Fungicides in the Microbial System ..... A. Kojima and K. Hiraga 83

Cytogenetic Studies of Antimicrobials on Cultured Cells ..... S. Yoshida, M. Masubuchi and K. Hiraga 86

Teratological Tests of *o*-Phenylphenol (OPP) and Sodium *o*-Phenylphenol (OPP-Na) in Mice ..... A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 89

Quantitative Analysis of Sodium *o*-Phenylphenol Added into the Standard Animal Foods and Effect by Preservation ..... S. Nawai, A. Ogata, S. Yoshida, H. Ando, Y. Kubo, T. Nakao and K. Hiraga 97

Dominant Lethal Tests of Long Term Administration with Sodium *o*-Phenylphenol (OPP-Na) in Mice.....A. Ogata, S. Yoshida, S. Nawai, H. Ando, Y. Kubo, K. Hiraga and M. Masubuchi.....99

Cytotoxicity of *o*-Phenylphenol Assay of Toxicity by Using Radioactive Cr-Labeled Cell..... M. Sasaki, S. Nawai and T. Nakao 104

Effect of *o*-Phenylphenol on the Immune Response *in vitro* .....M. Sasaki and T. Nakao..... 109

Teratological Tests of Thiabendazol (TBZ) in Mice.....A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga 112

Subacute Toxicity of Acetaminophen by Food Administration to Rats.....S. Hayashida H. Takahashi and K. Hiraga..... 116

Pathological Study on Rats Fed with Acetaminophen for 13 Weeks.....T. Fujii, Y. Abe, K. Yuzawa, H. Mikuriya, N. Yano, A. Nagasawa and K. Hiraga 125

Comparative Toxicity of Polychlorinated Dibenzofurans and Biphenyls in Rats.....S. Oishi, M. Morita, H. Oishi and K. Hiraga 137

Toxicity of Small Amounts of Polychlorinated Biphenyls and Dibenzofurans in Rats Following Short-Term Exposure ..... S. Kawano, S. Hayashida, S. Iguchi and K. Hiraga..... 142

Inhibition of Na, K-ATPase by Showdomycin (II) Effects of ATP on the Inhibition..... S. Hara and T. Nakao 147

Effects of Vanadate on Adenylate Cyclase of Rat Brain .....A. Nakagawa and T. Nakao..... 151

Changes in Lipids of Stored Human Erythrocyte Membrane.....F. Nagai, T. Nakao and M. Nakao..... 155

Proteins in Rat Urine (II) Relationship of Kidney Function and Excretion of γ-GTP, LDH, and ALP in Rat Urine ..... T. Nakao, M. Dogen and J. Kabashima..... 158

Electron Microscopic Observations of Preputial Gland on Non-treated and Castrated Mice..... H. Mikuriya, N. Fukumori and K. Hiraga 161

Examination of Mutagens by Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) (I) Fundamental Experiments of Examination on SCE by Mutagens *in vitro*..... S. Nawai, S. Yoshida, M. Masubuchi, T. Nakao and K. Hiraga..... 167

Changes of Body Weight in Growing Rat (III) Growth Rate .....S. Hayashida, H. Takahashi, S. Iguchi and K. Hiraga 172

Statistical Analyses of Blood and Serum Components in the Rat .....H. Oishi, S. Oishi and K. Hiraga..... 175

Macroscopical Observations of Postmortem Changes on Rats in Course of Time .....Y. Abe, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, T. Fujii and K. Hiraga..... 180

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS..... 189

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS..... 191

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 1-21, 1978

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（続）
24カ月ならびに終生飼育群の個体別所見

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 (Supplement)
Findings of Individual Rat for 24 Months and the Life-Span Groups

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

緒　　言

前報[1]で，ジブチルヒドロキシトルエン（以下 BHT と略す）のラットを用いた慢性毒性試験（BHT0.005%，0.020%，0.320%添加飼料による3，6，12，24カ月および終生飼育実験）の結果を検討し報告した．その中で BHT 0.320% 添加飼料摂取ラット（0.320%群）では飼育途中において，肝臓重量，血清総コレステロール量，血清K^+量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と比較して，飼料摂取量，体重増加，一般状態，生存率の推移，寿命に差のないことを明らかにしたが，24カ月飼育群途中死亡．瀕死屠殺例，終生飼育群の瀕死屠殺・死亡例における一般検査については記載しなかった．長期毒性試験の結果の評価においては，定期解剖例における結果のみならず，途中死亡・瀕死屠殺例における所見も重要視すべきであると考えている．そこで，24カ月飼育群ならびに終生飼育群の個体別所見を記し，BHT の毒性評価の資料に供することとした．

実験材料ならびに方法

前報[1]に記載の通りである

BHTは和光純薬製，Lot No. PAK 3582, KIK 5562, 白色結晶性粉末，mp 69.5℃ を用い，それぞれ0%（対照），0.005%，0.020%，0.320%の割合で日本クレア製粉末飼料 CE—2 に添加後固型化し実験飼料とした．ラットは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，5週令より実験に供した．使用した動物数は以下の通りである．飼育は，室温25°±1°，湿度55±5%，照明6時から17時，換気毎時10回の barrier system 飼育室において，前面および床がステンレス製個別飼いケージに収容，自動給水（細菌ろ過器経由）装置付ベルト式飼育架台にて飼育した．検査方法は，瀕死状態と判定されたものは屠殺処理し，できるだけ諸検査を行うよう努めた．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採取し，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）を測定した．血清生化学的検査：総蛋白量(TP)，グルコース量（GLU），尿素窒素量(SUN)，トランスアミナーゼ活性(GOT ならびにGPT)，アルカリフォスファターゼ活性(ALP)，総コレステロール量（CHO），血清ナトリウム量(Na^+)，血清カリウム量(K^+)，コリンエステラーゼ活性（CHE）を測定した．

BHT 濃度	0%		0.005%		0.020%		0.320%	
期　間	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
24 カ 月	10	10	10	10	10	10	10	10
終　生	15	15	15	15	15	15	15	15
終生（特）	10	10	10	10	—	—	—	—

結果ならびに考察

24カ月ならびに終生飼育群の個体別所見を表1—1～12（器官重量，血液，血清生化学的検査所見）および表2—1～8（主要剖検所見）にまとめて示した．全体的に見て下垂体重量(雌群に比較的多い)，白血球数，GOT，総コレステロール量に異常値が，剖検所見では下垂体腫大が雌群に多くみられ，これらの変化は対照群にも認められ，BHT 摂取が起因であるような一定の傾向を顕著に示す結果は得られなかった．

* 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. 24カ月飼育群・終生飼育群ラット個体別検査所見(1)　器官重量，血液学的検査，血清生化学的検査

個 体 別 所 見1－1 （雄）

群 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	※	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(左) mg	精巣(右) mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC ×10³	RBC ×10⁶	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	CLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
0（対照）	24カ月	122	76	D	1,013																											
		127	104	ST	756	2,310	1,720	18.60	1,620	1,740	1,080	152	26.9	1,860	1,780	28.1	25.0	384.8	1,460	6.7	847	17.8	499	7.1	150	17	54	132	21	197	137	7.9	
		129	104	ST	708	2,320	1,770	20.65	1,930	1,920	2,020	143	29.7	1,710	1,710	43.6	90.6	466.4	1,660	19.9	5.68	11.6	34.8	6.5	122	17	54	156	16	95	153	8.3	
		133	104	ST	672	2,250	2,080	19.35	3,660	3,400	1,650	18.1	39.7	1,590	1,500	46.4	44.5	316.6	1,700	11.6	5.88	11.3	31.3	6.5	203	102	45	113	21	227	149	7.7	
		134	104	ST	732	2,400	1,880	20.96	1,990	1,950	1,200	18.9	27.6	1,670	1,950	25.1	11.0	145.1	1,650	10.5	7.23	16.0	44.6	7.3	156	16	38	123	22	150	153	7.7	
		136	104	ST	658	2,247	1,890	21.88	1,811	1,781	978	15.1	26.9	1,769	1,768	26.3	26.9	247.6	1,459	6.0	8.68	16.8	47.6	7.1	147	18	60	156	34	119	147	9.3	
		141	104	ST	757	2,366	1,920	21.73	2,242	2,211	1,248	33.5	26.5	1,786	966	42.0	39.5	206.0	1,320	12.6	7.40	14.5	41.1	7.5	121	18	70	117	17	157	139	8.6	
		146	104	ST	866	2,460	1,536	18.83	1,872	1,869	849	20.7	33.9	2,063	2,096	41.3	36.6	478.4	1,640	5.7	8.11	16.2	42.8	7.3	207	17	44	126	16	147	143	6.8	
		151	104	ST	566	2,181	1,606	21.25	3,828	3,608	1,705	38.4	31.6	1,121	1,212	33.5	41.1	594.5	1,230	10.5	4.11	9.7	26.6	7.6	145	53	48	98	17	443	142	7.8	
		155	104	ST	694	2,310	1,820	20.98	2,330	2,300	1,220		34.1	1,800	1,810	29.7	23.3	381.4	1,660	7.8	8.40	17.0	46.2	7.3	149	16	62	138	26	225	143	8.1	
	終生	240	83	S	850	2,342	1,806	11.74	1,997	2,103	867		19.1	1,455	1,648	28.4	18.1		1,411	3.16	4.47	10.2	26.9	6.3	350	58	50	120	26	91			
		237	84	D	612	2,228	1,820	23.18	4,336	3959	2,098		18.4	1,554	1,579	22.1	27.1		935														
		235	87	D																												
		221	90	S	614	2,310	1,920		2,650	2,780	955	90	27.0	1,520	1,600	37.9	43.4		1,070	27.0	7.71	14.5	40.1	6.0	114	24	33	117	9	54	166	7.7	
		222	102	S	568	2,292	1,914	11.70	1,793	1,680	6,395	153	19.0	1,169	1,394	55.4	4,797		1,168	9.8	6.31	17.3	34.1										
		260	120	D	561			34.38																								
		234	120	D	430		2,995	21.56	3,300	3,045	927		60.0			56.0	52.0															
		227	127	D	500		3,045		4,295	4,224				1,168	1,208																	
		217	128	S	566	2,228	1,850	14.18	1,982	1,958	717	46.5	34.8	1,518	1,492	126.1	125.5		1,822	17.8	7.83	15.6	43.1	8.2	68	12	20	100	4	74	126	5.1	0.11
		230	129	D	472																											
		207	130	D	552																											
		215	130	D	632																											

※ D：死亡　S：瀕死－屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—2 (雄)

群 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	*	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(左) mg	精巣(右) mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
0 (対照)	終生	208	131	S	628	2,259	1,992	20.38	3.155	3.157	1.092	21.0	4.90	1,500	1,555	5.80	6.90		1,532	10.7	7.01	16.0	40.0	6.9	114	19	10	92	5	79	147	4.4	1.23
		250	133	S	450	2,194	1,372	20.80	1.603	1.752	619	149.2	18.7	850	1,032	31.7	38.4		1,534	189	5.29	11.6	31.5	7.8	18	78	15	115	6	108	154	5.3	0.99
		219	152	D	—																											
	終生	0019	91	D	796	2,032	1,861	20.37	2.941	3.021	1.100	271.0	24.0	420	1.146	26.0	48.0		911														
		0011	96	S	310	2,057	2,006	17.40	2.270	2.222	1.251	34.1	33.8	512	525	45.4	63.4			4.8	6.28	13.2	38.4	7.4	128	15	6	109	16	65			
		0005	98	D	790	2,196	1,708	28.19	2.916	2.756	910	20.0	37.0	1,608	1,491	36.0	37.0		1,580														
		0017	99	D	865		2,316	29.58	2.311	2.426	4.649	46.0	25.0			58.3	42.9		1,091														
		0007	109	D	438	2,113	2.596		3.761		3,726		40.0		511	47.9																	
		0009	113	S	610	1,824	2,220	10.64		2,190	1,410	14.0	14.1	1,430	1,300																		
		0013	113	S	678	2,400	2,350	20.96	2.080	2.080	3,420	101.8	16.4	960	1,200	69.1	65.0		1,560	21.6	3.20	8.1	24.0	6.9	105	24	51	126	15	69	149	5.5	1.05
		0001	116	D	557	2,232	2,027	24.13	4.171	4.006	1,064	158.0	39.0	1,267	1,243	68.0	51.0		847														
		0015	117	D	576																											
		0003	118	S	436	2,289	2,530	18.69	3.590	3.440	927			570	652	67.4	84.5		1,101					6.6	9	96	6	108	3	189	163	5.0	1.26
0.005	24カ月	145	79	D	545		2,198	20.68	5.596	5.537	1,369		28.0	1,495	1,377	47.0	52.0		1,104														
		124	98	D	656																											
		143	103	D	1080		2,258	36.77	3.220	3.175	1.153			1,776	1,831	117.8	43.3		1,277														
		123	104	ST	802	2,430	2,560	25.48	2.250	2.270	3,930	28.3	25.3	1,520	1,520	42.9	43.2	221.5	1,510	27.0	4.27	9.9	30.2	5.5	99	30	46	157	28	125	142	9.0	
		130	104	ST	730	2,340	1,840	21.55	1.900	2.080	1,250	14.6	25.6	1,450	1,450	37.1	32.1	545.4	1,080	9.0	7.81	15.2	42.2	6.6	131	11	44	113	11	177	142	7.5	
		138	104	ST	742	2,404	1,774	22.27	3.575	3.524	1,251	18.1	33.2	646	1,696	29.8	31.0	412.8	1,184	10.9	7.28	16.2	40.8	6.6	146	46	48	126	20	307	147	9.0	
		140	104	ST	846	2,291	1,953	23.78	3.427	3.289	1,533	20.3	31.5	1,840	1,303	34.5	27.7	552.0	1,492	6.8	7.13	14.9	39.9	7.2	140	25	38	107	10	272	14	8.0	
		144	104	ST	784	2,392	2,039	25.45	2.484	2.584	1,431	70.3	32.4	1,552	1,463	37.5	39.9	441.4	1,179	12.7	5.12	11.4	30.7	7.5	134	25	57	137	25	200	142	7.2	

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—3（雄）

群 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(右) mg	腎(左) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(右) mg	精巣(左) mg	副腎(右) mg	副腎(左) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC ×10³	RBC ×10⁶	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
0.005	24カ月	152	104	ST	714	2.414	1,763	1886	1,884	1,872	1,142	19.1	23.3	1,748	1,692	25.6	23.5	824.1	1,150	12.5	6.67	13.9	35.1	7.0	143	21	52	125	18	213	141	7.3	
		156	104	ST	980	2.261	1,980	20.80	21.50	1,963	2.307	19.6	27.7	1,660	1,447	32.6	264.0	443.1	1,362	15.1	6.72	12.8	37.8	6.4	139	17	40	120	28	95	145	7.5	
	終生	248	79	S	626	2.614	2.014	21.13	3.586	3.721	1,310	14.0	51.0	1,529	1.516	40.0	44.0		1,290	8.3	6.15	11.7	32.8	15.0	333	66	195	183	39	312	166	8.3	
		228	93	D																													
		245	95	D	868	2.187	2.075	2583	2.662	2.694	1,524	13.7	36.7	1,690	1,697	35.0	29.5		1,464														
		258	96	S	386		1,718	9.14	1,448	1,505	696		19.5	1,215	1,272	27.2	26.3			11.5	6.60	12.2	33.9	6.9	174	9	15	85	6	54	143	6.4	
		244	97	D	630	2.219	1,874	1498	1,913	1,870	450	88.0	33.0	1,583	1,462	59.0	56.0		830														
		226	99	S	572	2.093	1,807	14.64	1,703	1,703	944	191.2	11.3	810	350	35.6	29.7		752	6.1	4.10	8.0	24.2	6.0	90	16	13	85	13	54	151	6.5	
		201	100	D	650	2.069	2.180	17.48	1.946	1,886	826	28.0	31.0	798	1,305	53.0	40.0		903														
		254	104	D	782		2,831	31.00	3,694	3,555	1,164	20.6	40.3	1,480	1,456	37.0	33.5		1,193														
		232	105	S		2.471	2.204	24.00	2.902	2,830	3,303	21.7	30.4	1,573	376	67.3	56.9	1384						6.5	107	33	49	84	46	120	143	7.0	
		212	116	S		2.345	1,205	5.375	1,440	1.577	633	44.1	14.5	512	506	42.2	40.2		1.583	44.8	2.48	7.3	21.6										
		216	121	D	662	2.361	2.120	27.04	3.641	3.900	1,373	9.0	56.0	1,697	1,579	50.0	64.0		1,984														
		239	125	D	516																												
		204	125	D	726		2.123	24.65	2.122	2.232	10870	24.0		1.247	1.411	53.0	64.0		1.163														
		255	125	D	489																												
		209	136	D	554																												
	終生（特）	0018	17	D	364		1,362	15.0			2.240			1.406	1,339	26.2	20.4																
		0004	73	S	538		1,730	17.25	1,620	1,670	1,840			1.010	1,050									4.0	103	43	2	80	30	66	138	6.7	
		0016	90	D	764	2.328	1,830	31.40	2.890	3,180	1,120	27.3	40.0	1,689	1,626	36.9	41.1		1,270														
		0006	91	D	875	2.206	2.336	33.04	3.105	2.737	1.495	17.0		2.559	527	37.0	21.0		936														

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—4 (雄)

餌	飼育	ラット番号	試料採取週	*	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	胃(空) mg	胃(充) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(空) mg	精巣(充) mg	副腎(空) mg	副腎(充) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/dl	GOT U/dl	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %																																
0.005	終生(等)	0012	92	S	478	2.136	1.165	9.36	1.475	1.470	489	248.0	17.0	807		21.0	25.0			7.7	4.98	10.3	30.7	7.8	88	28	29	38	20	110	147	6.5	0.26
		0020	96	S	634	2.372	2.547	14.50	2.275	2.272	2.472		30.0		1,626	38.0	31.4							8.4	141	27	51	144	21	111	144	6.0	
		0014	113	D	831	2.181	3.160	25.15	3.371	3.580	4.905	26.0		1.174	1.256	97.0	82.7		1.105														
		0008	114	D	600	2.610	1.930	18.81	2.120	2.090	1.110	28.6	39.0	1.910	1.890	37.2	35.9		1.010														
		0010	115	S	773	2.476	1.842	23.80	2.217	2.434	1.912	24.0	23.6	1.438	1.574	54.2	38.2		1.311	22.5	5.97	10.8	30.6	6.1	25	22	14	33	14	109	145	6.0	0.1
		0002	128	D	859	2.330	2.156	31.12	4.528	4.639	2.494	19.0	33.0	1.291	1.686	29.0	50.0		3.892														
0.020	24カ月	159	67	D																												
		131	73	D	610																												
		160	79	D	704	2.160	1.424	30.84	2.335	2.481	867	286.0	47.0	610	510	53.0	46.0																
		153	96	D	632		1.552	17.85			876		21.0	1.385	1.519	44.0	44.0		967														
		121	103	S	559	2.455	2.192	13.58	2.534	2.916	444	10.5	41.3	771	669	31.0	31.9		1.084					6.9	198	273	21	79	3	108	138	6.2	
		126	104	ST	784	2.440	2.150	22.79	1.990	1.960	960	20.1	32.3	1.900	1.770	33.9	36.3	807.0	1.200	9.0	7.93	15.3	41.4	7.6	191	17	68	168	43	153	141	7.9	
		142	104	ST	646	2.285	2.235	25.04	6.020	5.350	1.362	22.4	35.9	1.504	1.844	53.0	26.1	373.4	1.448	8.2	4.81	10.4	27.9	5.5	141	107	48	123	14	201	137	8.2	
		148	104	ST	672	2.295	1.812	19.70	1.799	1.851	1.200	16.3	26.3	1.734	1.690	35.0	31.5	331.0	1.050	11.1	6.28	12.8	36.7	6.8	137	18	46	149	33	107			
		154	104	ST		2.229	1.855	20.48	2.198	2.368	1.609	17.7	37.8	1.417	1.616	39.8	38.3	700.1	1.390	27.3	5.13	11.5	33.6	6.4	114	14	41	107	12	134	156	8.3	
		157	104	ST	1.110	2.210	2.403	22.46	2.527	2.560	977	18.3	29.6	2.378	870	45.9	38.4	306.7	1.271	8.5	7.73	16.4	42.1	7.0	131	15	32	110	13	159	142	6.5	
	終生	224	93	D	746	2.317	1.619	32.14	2.180	2.354	802	195.0	15.0	1.526	1.564	41.4	31.4		1.105														
		251	106	S	293	2.191	1.235	8.02	1.811	1.901	701	280.0	18.5	480	486	51.2	49.5	19.8	785	10.1	5.36	10.1	44.0	7.5	6	39	9	43	21	24	146	7.0	1.47
		259	113	D	884																												
		203	113	S	506	2.560	2.010	17.32	3.590	3.570	1.210		29.6	890	840	67.24	86.9		1.100	28.8	5.30	11.6	31.5	5.0	3	44	11	99	9	82	151	5.7	0.1
		253	115	S	436	2.085	2.430	27.20	5.180	4.755	1.248	39.5	71.0	702	610	58.6	60.6		1.121	6.4	4.67	9.6	26.3	7.8	75	60	72	117	18	261	150	6.6	1.08

＊ D：死亡　S：剖死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—5（雄）

群		ラット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(左) mg	精巣(右) mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/dl	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %	飼育																															
0.020	終生	229	116	D	812																											
		211	116	S	442	2.149	1,369	17.07	2.250	2.198	476	208.0	30.5	996	865	42.5	42.4		1,447	9.4	4.73	9.6	27.6	9.3	84	255	21	135	15	84	165	7.3	141
		256	121	D	430									907	335																	
		242	122	D	688																											
		238	128	S	255	2.542	1,002	7.06	1,127	1,240	384			624	402	36.0	33.0		933	6.6	6.05	10.8	29.9	5.4	61	47	10	138	5	66	146	6.0	0.11
		206	131	S	575																											
		243	132	S	389	2.415	1,214	11.00	1,878	1,713	582		29.0	1,622	498	43.0	44.0		796	27.6	7.53	15.4	37.8	9.0	36	110	21	88	6	171	144	9.5	1.11
		218	136	D	706																											
		214	148	D	532																											
		213	149	D	688																											
0.320	24カ月	150	42	D	602		1,360	18.68	1,800	1,860	870					22.0	23.0		1,920													
		158	79	D	540	2.675	1,570	22.08	6.571	6,801	1,594	15.0	54.0	1,637	1,584	44.0	41.0		1,301													
		147	103	D	591																											
		125	104	ST	962	2.340	1,890	27.21	2.420	2.530	1,130	19.3	24.2	1,830	1,980	39.1	22.7	116.9	1,600	8.5	7.66	15.5	42.3	8.0	141	19	60	183	25	198	144	7.8	
		128	104	ST	776	2.230	1,880	20.25	1,990	2.130	1,120	16.5	23.0	1,980	2.070	43.4	25.2	509.9	2.240	15.6	3.99	8.4	25.1	6.2	123	19	41	119	27	85	147	7.5	
		132	104	ST	1,180	2.280	1,940	27.24	2.130	2.150	1,420	19.8	38.2	1,200	1,960	35.3	30.0	403.1	1,286	7.1	7.75	16.0	44.4	7.0	169	18	50	117	23	147	152	7.5	
		135	104	ST	938	2.319	1,927	28.71	2.826	2.865	1,425	21.3	28.6	1,048	762	36.0	33.3	272.9	1,183	8.6	7.11	15.3	40.8	7.3	154	17	43	114	14	253	144	7.0	
		137	104	ST	732	2.334	1,466	14.22	1,537	1,447	844	72.9	22.9	1,372	1,387	32.2	29.3	286.0	755	7.7	5.35	10.4	31.0	8.9	144	6	29	126	12	67	142	8.9	
		139	104	ST	802	2.292	1,988	27.26	2.872	2.855	1,470	23.4	40.0	1,961	1,961	27.7	25.5	713.2	1,594	7.5	7.86	16.9	44.8	7.1	146	25	37	104	27	248	142	8.0	
		149	104	ST	790	2.246	2,172	23.61	1,997	2.038	3,746	17.5	26.7	1,750	1,827	107.8	48.9	566.9	1,650	33.2	3.80	11.4	28.7	5.8	108	18	36	105	24	99	144	8.3	
	終生	223	92	D	600	2.383	1,542	20.92	2.801	2.846	544	16.0	21.0	1,429	1,315	26.0	31.0		741														

＊ D：死亡　S：瀕死—屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—6（雄）

群		フット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	胸腺(左) mg	胸腺(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	精巣(左) mg	精巣(右) mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	前立腺 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %	飼育																															
0・320	終生	225	94	D	700																											
		210	95	S	632	2.139	2.036	17.21		1,500	1,456	12.9	14.7	1,536	1,518	36.4	39.3			23.2	1.78	3.5	10.9	6.6	74	25	81	159	21	66	146	6.2	
		202	100	S	572	2.163	1,469	13.44	4,520	5,448	916	9.6	19.0	68	1,347	33.1	34.7		1,382	14.0	6.45	13.5	34.2	7.5	141	138	15	67	21	44	151	5.6	
		246	104	D	361		2.998	18.16	4,399	4,025	590			727	647	47.0	46.0															
		220	109	D	446	2.408	1,488	16.20	2.368	2.418	412		3.9	1,061	1,118	19.2	37.3		905													
		233	110	D	576	2.134	1,880	30.40	4,103	4,168	1,800	285.0	42.0	1,086	1,412	64.0	70.0		1,086													
		247	110	D	600	2.451	2.240	18.80	3.443	2.417	1.558		22.0	944	1,045	71.0	84.0		1,309													
		236	116	D	666	2.149	3,113	21.77	2.232	2,404	509	28.0	33.0	1,046	316	38.0	39.0		1,064													
		257	122	S	407	2.235	1,295	11.34	1,867	1,888	699	200.0	19.9	799	926	32.7	28.5		1,371	16.1	7.00	14.0	37.6										
		241	122	S	351	2.176	1,741	11.54	1,559	1,515	1,087	10.0	25.0	320	1,096	5.0	45.0		2,141	9.1	8.14	14.7	42.1	4.1	54	25	5	84	19	72	142	5.3	0.18
		252	127	S	350	2.227	1,826	13.20	2.928	2.988	508	52.6	23.1	659	656	36.2	39.0		1,044	8.9	4.14	8.9	24.2	7.5	12	111	21	78	3	105	156	6.7	1.65
		231	136	D	346																											
		249	148	D	315																											
		205	159	S	339																											

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—7（雌）

群		ラット番号	試料採取週	※	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 L mg	卵巣 R mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %	飼育																															
0	24カ月	179	86	S	395	2.026	1.070	8.71	1.146	1.271	510	285.0	37.0	300.0 80.0	40.0	40.0	556	926	9.1	4.71	11.8	33.3	6.9	155	16	3	54	9	71	142	6.0	
		176	100	S	318	1.939	1.074	7.73	1.091	1.036	417	310.0	1.22	23.6	32.3	30.0	453	684	6.7	7.64	15.2	42.5	8.3	175	13	30	110	8	116	140	5.1	
		161	104	ST	722	2.000	1.750	16.60	1.230	1.280	990	26.4	30.6	99.9	35.6	34.9	1.169	1.400	3.8	8.16	17.3	46.1	7.7	174	19	91	175	17	159	142	6.5	
		170	104	ST	370	2.071	1.178	9.58	987	1.100	1.550	37.8	22.5	46.5	29.8	29.0	1.367	1.079	20.9	3.90	10.1	31.2	6.6	104	11	47	152	30	102	139	7.0	
		174	104	ST	450	2.379	1.630	14.38	1.130	1.140	1.160	315.5	22.5	63.8	43.2	35.7		1.286	15.4	5.16	12.6	35.5	7.4	105	17	39	108	28	113	143	7.1	
		175	104	ST	548	1.996	2.339	18.26	1.633	1.616	2.898	113.6	22.5	37.1	37.5	35.7	874	1.144	29.6	2.84	9.6	24.1	6.1	100	18	39	120	11	107	143	6.8	
		182	104	ST	490	2.080	1.354	13.52	1.080	1.276	1.182	56.7	56.7	33.6	32.7	30.3	1.427	1.240	7.4	5.87	12.9	36.3	7.5	146	17	40	111	7	131	146	7.2	
		186	104	ST	604	2.198	1.471	21.45	1.378	1.354	1.110	46.0	25.1	88.4	97.4	33.6	661	1.100	8.0	4.08	10.1	25.3	7.8	150	17	70	158	13	110	142	7.3	
		189	104	ST	656	2.061	1.691	21.44	1.400	1.464	1.093	52.3	22.0	48.6	46.9	42.5	645	1.180	10.1	5.94	13.4	37.7	6.8	108	16	40	113	26	124	142	7.1	
		200	104	ST	486	2.096	1.757	19.97	1.481	1.520	896	62.9	22.6	46.3	47.7	38.5	1.416	1.200	10.4	7.09	14.5	40.7	7.5	113	17	37	103	13	124	139	6.6	
（対照）0	終生	316	78	S	511	1.959	925	13.16	1.098	1.124	518	74.0	94.0	80.0 79.0	106	108	464		14.2	4.15	10.4	29.9	6.8	189	20	8	84	8	163	140	5.3	
		275	90	S	425	2.032	1.077	15.47	1.324	1.337	1.240	30.0	19.0	29.1	43.2	43.1	898	1.001	10.4	4.25	11.5	27.3										
		280	99	S	329	2.041		9.60	1.156	1.142	851	222.0		58.0	47.0	47.0	790	999	5.4	1.34	3.6	9.9	11.4	24	57	136	9	198	140	5.1		
		311	106	D	647	2.110	1.740	26.59	2.110	1.950	820	27.8	21.7	127.7 80.4	71.2	38.3	424	780														
		306	110	S	322	2.070	1.504	10.96	1.066	1.109	1.548	12.0	16.0	52.0 44.0	27.0	51.0	1.676	695	18.7	1.75	3.6	10.2	8.4	105	57	84	145	24	135	140	5.5	0.39
		295	111	D	556	2.148	1.497	18.70	1.468	1.496	1.257	35.9	27.1	65.6 73.9	32.8	51.1	1.274	716														
		289	113	D	775	2.222	1.731	24.56	2.080	2.259	1.026	19.4			30.2	35.0	490	1.562														
		292	115	S	534	1.990	1.430	12.73	1.210	1.250	850	129.5	23.8	20.6 22.2	36.8	39.1	670	1.380	7.7	3.82	7.1	26.2	5.7	76	29	8	93	5	79	138	5.0	0.26
		320	120	S	240																											
		300	121	D	454																											
		276	131	D	596																											

※ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—8 (雌)

餌 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	*	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC ×10³	RBC ×10⁶	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na⁺ mEq/l	K⁺ mEq/l	CHE ΔpH
0 (対照)	終生	318	132	D	441	1,888	1,579	18.31	1,799	1,785	1,613		14.0	25.0	30.0	28.0	411	818														
		271	132	S	829	1,886	1,558	19.92	1,244	1,290	845																					
		265	132	S	538	2.147	1,464	22.22			1,513	83.4	23.7		65.2	57.4		1,176	15.7	4.63	11.2	30.1	7.8	114	57	9	82	15	48	140	7.2	1.17
		307	169	D	455	2.049	1,284	13.38	1,379	1,356	792	32.10			76.0	30.8																
	終生(等)	0021	83	S	324	2.066	1,154	7.89	1,092	1,025	501	290.0	23.0	22.0 15.0	30.0	35.0	440	1,150	6.8	4.61	10.3	28.9	16.1	145	27	45	140	12	90			
		0037	99	S	742	1,880	1,600	18.10	1,700	2.060	3.060			44.2	44.1	44.6	540		6.2	4.06	9.1	25.1	4.5	9	32	9	127	21	24	155	10.0	
		0031	104	D	361	2.010	994	9.99	931	912	468	163.0	13.0	73.0	47.0	51.0	462	829														
		0033	107	S	370	2.145	920	10.27	1,019	1,020	563	124.0	29.0	22.0 27.0	24.0	24.0	506		8.9	6.17	13.3	35.3	7.3	135	12	9	41	4	110	140	6.4	
		0023	110	S	220	2.212	885	7.19	1,017	1,322	341		18.0	20.1 21.1	20.1	22.2	480															
		0035	111	S	497	1,830	1,414	13.22	1,371	1,409	471	291.0	26.6	18.5 32.4	55.6	58.6	554	864	7.8	5.72	11.2	30.5	10.1	55	31	7	126	13	118	141	8.0	0.17
		0029	122	D	260																											
		0025	128	D		1.983	1,828	29.59	2.046	2.148	1,222	45.0			79.0	20.0																
		0027	130	D	612			38.57			8,247																					
		0039	136	D	486			32.77																								
0.005	24カ月	187	45	S	288		660	8.48	919	901	304		25.6	39.7 22.6	30.4	26.8	248	3,580	5.3	7.01	14.9	36.2										
		198	68	S	402	2.093	764	9.20	1,201	1,204	508	319.0	28.8	37.6 32.9	38.5	33.8	760		6.0	6.75	15.6	36.5										
		172	68	S	238		778	7.15	789	812	304		19.3	12.4	32.5	31.3	511	934	13.1	5.06	12.4	29.0										
		180	89	S	344	2.054	1,201	8.30	919	904	378	71.0		22.0 86.7	24.0	22.0	735															
		162	104	ST	542	2.100	1,430	14.30	1,480	1,560	2.030	88.2	18.9	48.0	46.8	35.6	606	890	17.2	3.83	9.6	26.8	6.1	112	42	23	114	33	57	152	9.3	
		168	104	ST	556	1,900	1,380	19.64	1,164	1,140	835	122.0	23.8	47.1	51.0	51.8	1176	1,269	11.4	5.24	11.4	31.5	7.7	112	18	38	97	14	123			
		169	104	ST	500	2.182	1,584	20.08	1,728	1,480	5,205	69.1	21.1	32.7	69.9	48.1	958	1,047	12.3	3.26	7.3	21.9	6.2	117	16	43	114	27	98			

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—9 (雌)

群 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	*	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 mg	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
0.005	24ヵ月	177	104	ST	482	2.187	1,195	12.14	1,180	1,182	1,007	26.2	17.2	114.6	33.1	31.3	789	1,291	4.9	7.37	14.9	41.1	7.9	158	12	37	117	11	102	141	5.8	
		178	104	ST	456	2.032	1,095	8.81	916	825	626	9.7	26.9	41.2	18.8	19.7	863	1,004	8.5	5.25	11.4	32.8	6.9	139	11	43	143	7	113	143	6.8	
		183	104	ST	795	2.180	1,939	29.77	1,763	1,614	1,450	13.2	18.6	72.0	65.1	63.0	809	1,160	11.0	3.01	7.4	21.0	5.8	134	22	35	95	19	80	142	7.1	
	終生	308	31	S			852	10.73	1,104	1,054	612		4.4		36.7	33.5		1,229					9.2	158	18	32	103	24	66			
		317	68	S	550	2,344	999	16.98	1,167	1,150	766	29.1	22.8	26.0 21.0	51.0	45.3	896		26.2	4.42	12.5	28.8										
		266	82	S	277	1,900	880	6.63	969	1298	311	24.0	31.4	46.3 46.5	24.8	30.6	534	1,044	6.4	6.35	12.9	34.1										
		267	95	S	347		1,206	9.58	1,351	1,270	928		18.4	18.9	27.2	36.1	894	487	8.5	5.22	10.9	30.1	6.8	148	23	16	143	6	151			
		261	97	D																												
		299	103	S	319	2,551	964	6.17	990	972	339		16.7	23.6	20.8	27.4	436	484					7.5	154	12	18	111	7	129	140	5.9	
		313	107	S	408	1,828	1,136	6.92	1,040	1,045	429	77.1	19.4	12.8 12.6	27.5	25.0	331						7.4	410	21	7	93	4	81	142	6.4	0.21
		298	113	D	215	1,928	826	5.63	1,044	1,084	300	176.0	28.0	59.0 75.0	53.0	55.0	472															
		304	115	S	730	1,881	1,982	23.80	1,606	1,715	1,490	55.3	25.8	24.1 27.8	89.7	44.3	986	1,106	10.2	4.47	11.1	30.1	8.1	87	21	24	73	15	15	142	5.0	1.20
		301	116	D	374																											
		268	121	D	653																											
		297	110	D	671																											
		314	128	D	435	1,966	1,459	17.15	1,432	1,397	792	11.0	21.0	41.0	49.0	54.0	402	984														
		262	130	D	433																											
		272	132	S	264	2,146	982	5.49	873	918	718	248.0	20.0	19.0	65.0	27.0	624	703	7.1	5.12	10.8	27.5	7.4	109	20	17	98	8	113	144	5.4	0.19
	終生(等)	0022	63	S			1,434	15.86	2.318	2.435	312				46.0						9.2	50	122	31								
		0034	92	S		2.147	1,823	17.08	1,820	1,743	3,232	21.0	70.2	29.7 55.1	60.8	60.1	588	1,190	26.2	0.90	2.9	9.1	4.8	57	33	72	162	18	60	146	5.2	
		0030	96	S	287	2.022	1,024	8.21	1,070	1,100	344	337.0	33.8	22.0 13.0	34.0	33.0		1,320	10.2	5.23	11.1	30.6										

* D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—10（雌）

餌		ラット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %	飼育																														
0.005	終生（特）	0040	97	S	689	2.062	1,913	24.42	1,688	1,638	8,174	326.0	21.5		77.4	78.1	864	1,192	29.8	4.40	8.7	31.1	5.6	77	19	107	16	32	70	129	5.2	
		0036	99	S	346	1,961	1,006	9.63	1,125	1,080	634	21.24	21.26	25.0	24.5	25.1	483	927	15.5	5.31	12.3	31.8	6.8	104	27	9	126	21	92	141	6.4	
		0026	100	D	507																										
		0032	101	S	440	2.084	1,610						19.6																		
		0038	120	S	434	2.008	1,440	11.86	1,334	1,320	411	335.0	27.9	44.4 26.6	41.8	34.1	570	699	4.8	5.52	12.0	29.5	7.5	112	12		123	8	88	148	5.7	0.78
		0028	127	D	676	1,980	1,692	22.96	1,388	1,440	2,056	16.0	37.0	33.0 29.0	48.0	81.0	743	897														
		0024	132	S	710	2.131	1,574	19.98	1,744	1,923	1,986	51.7	22.8	17.4 32.5	54.0	49.6	688	948	16.5	5.07	10.4	29.3	6.0	102	40	5	86	22	75	149	5.7	0.05
0.020	24カ月	185	55	S	240																										
		164	80	S	274	1,938	690	4.85	741	740	338	286.0	15.0	21.0 12.0	24.0	26.0		511	4.3	8.03	16.0	43.8										
		173	90	S	288	1,962	897	9.73	1,307	1,322	477	331.2	11.0	38.4 11.25	38.9	35.5		979	7.9	5.76	12.6	33.5	9.0	141	21	24	112	15	57			
		195	99	S	318	3.323	1,133	9.50	1,027	1,106	1,084	711.0	11.0		10.2	26.3	485		35.2	2.14	6.3	16.4	6.0	90	16	13	85	13	54	151	6.6	
		196	102	D																											
		163	104	ST	640	2.008	1,627	19.36	1,714	1,772	1,321	77.9	34.6	40.9	32.9	33.6	676	953	18.3	4.69	14.0	32.9	10.2	213	22	316	477	57	211			
		167	104	ST	662	2.202	1,423	24.61	1,387	1,472	823	20.5	21.8	69.1	26.0	56.5	607	1,108	6.0	5.18	11.6	31.4	6.5	141	18	57	209	13	121	138	8.7	
		188	104	ST	714	2.087	1,488	17.75	1,286	1,345	834	16.0	21.3	73.1	38.8	33.5	686	1,280	7.6	7.30	14.5	39.7	7.5	114	18	58	149	32	127	138	7.3	
		190	104	ST	500	2.063	1,238	14.62	1,145	1,208	854	17.7	21.4	64.6	38.0	43.8	2.037	1,012	10.0	6.12	14.1	39.2	7.2	154	17	77	185	16	93	137	6.8	
		193	104	ST	428	2.134	1,157	23.28	1,265	1,213	750	205.7	27.5	107.5	49.8	50.2	1,005	855	12.6	4.86	11.1	30.0	6.2	91	8	20	74	6	92	149	6.5	
	終生	296	59	S	304		897	8.29	1,201	1,222	441	13.4	16.2		36.6	38.5			2.8	7.69	16.5	40.0										
		283	101	S	373	2.004	799	9.83	1,043	1,078	1,168	20.1	9.0		51.8	48.0		2,108	38.5	5.59	11.1	32.7	3.9	78	33	12	111	3	12	127	7.1	
		287	108	S	242	1,824	851	7.44	1,133	1,078	370	268.0	12.1	49.7	35.3	29.5	420	900	6.6	5.54	11.9	32.1	7.6	57	20	14	115	11	101	146	5.9	0.54
		264	109	D	850	2.280	2,730	29.36	1,800	1,741	908	40.0	20.0	53.79 22.0		44.0	1,027	813														

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—11（雌）

群 BHT %	飼育	ラット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(右) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 mg	副腎(右) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC ×10³	RBC ×10⁶	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
0.020	終生	294	113	S	318	2.070	1.180	7.04	1.190	1.120	510	1166	26.3	38.0 47.5	22.4	37.2		870	8.4	5.62	14.3	36.2	7.9	84	13	15	103	10	118	143	5.4	0.50
		293	113	S	356	2.398	1.560	11.12	1.390	1.475	1.036		14.6		50.6	47.6	601	886	6.4	5.14	12.4	31.0	7.7	163	18	2	75	6	116	145	5.8	0.27
		315	117	D	533	2.169	1.667	1831	1.211	1.238	3.917	182	20.1	20.2	47.7	54.5	511	840														
		302	118	D	454																											
		279	123	D	325																											
		305	123	D	562		1.928	21.49	1.665	1.715	1.757			36.0 24.0	60.0	52.0	656	752														
		284	124	D																												
		286	124	D	193							32.0																				
		278	132	S	405	2.132	1.621	15.27	1.578	1.600	1.091	94.2	31.2	84.0 45.8	49.2	46.7	473	1,007	28.0	5.67	17.1	41.3	4.6	122	29	6	63	22	64	144	5.8	0.30
		285	142	S	346																											
		281	149	D	333																											
0.320	24カ月	184	74	S	298	2.285	903	8.72	1.056	1.017	416	355.0	22.0	28.0 20.0	33.0	32.0	574	909	10.5	5.43	11.2	29.3										
		197	83	S	360	2.076	1.196	9.53	1.188	1.248	491	303.0	30.7	68.9 67.0	39.3	31.3	526		7.5	6.78	15.1	36.8	9.7	132	24	93	158	4	87			
		199	97	S	273		890	881	1.030	1.050	370	292.0		20.6		17.0	399	893	6.1	7.17	12.6	39.2	7.6	138	18	25	80	12	128	134	4.4	
		171	97	S	250	2.051	805	7.51	965	899	441	175.0		35.3	33.5	30.0	382	716	16.9	5.12	10.4	32.4	8.2	172	28	11	138	16	141	148	7.6	
		165	102	S	398	2.143	1.387	11.72	1.460	1.452	2.280	784	19.4	36.1	38.6	50.9	116	1,017					8.4	75	120	18	118	12	90	129	12.0	
		166	103	S	292	2.028	844	7.93	953	984	684	463.0	19.4	35.6	33.4	38.0	540	723														
		192	80	D																												
		181	104	ST	382	2.124	1.448	15.48	1.250	1.357	1.208	63.4	23.0	48.5	34.6	30.5	1,025	1,192	10.7	4.77	10.7	31.5	8.0	108	16	33	112	15	139	148	6.7	
		191	104	ST	574	2.141	1.526	17.41	1.450	1.294	580	190	27.9	86.7	35.1	41.9	655	1,153	6.1	7.06	14.2	38.9	7.7	116	13	43	119	27	116	150	6.8	
		194	104	ST	468	2.246	1.495	14.20	1.147	1.294	1.874	34.7	24.7	81.5	32.6	31.2	669	1,185	26.3	3.65	9.8	27.7	6.3	137	13	36	116	11	77	141	6.5	

＊ D：死亡　S：瀕死一屠殺　ST：定期屠殺

個体別所見 1—12（雌）

群		ラット番号	試料採取週	＊	体重 g	脳 mg	心 mg	肝 g	腎(左) mg	腎(右) mg	脾 mg	下垂体 mg	甲状腺 mg	卵巣 mg	副腎(左) mg	副腎(右) mg	子宮 mg	盲腸 mg	WBC ×10³	RBC ×10⁶	HGB g/dl	HCT %	TP g/dl	GLU mg/dl	SUN mg/dl	GPT U/ml	GOT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	Na^+ mEq/l	K^+ mEq/l	CHE ΔpH
BHT %	飼育期																														
		269	77	D																											
		263	82	S	269	2.022	720	7.60	925	972	421	33.84	27.6	22.0 20.0	24.8	23.8	630	1,151	8.3	756	14.4	40.0	9.7	156	38	39	125	20	70			
		273	95	S	280		990	6.72	1.020	1.040	606		16.0	23.8 43.2	28.7	16.1	609	700	4.3	3.90	10.4	26.6	7.4	37	11	21	105	6	62	141	6.2	
		274	96	S	616	2.188	1,421	14.57	1,120	1.078	745		19.1	22.6 15.3	41.2	14.3	1.004	737	13.1	4.78	11.0	35.6	7.9	153	20	37	108	15	126	142	7.4	
		270	115	S	708	2.210	1,910	29.15	1,450	1,500	1,020	28.4	8.4	20.3 13.4	50.6	42.8	460	1,390	13.0	3.79	9.1	25.2	6.1	98	39	24	123	20	77	142	5.4	0.21
	終	303	116	D	408	1.960	1,250		1,891	1,809	765	230.0	20.0		44.0	47.0																
0		282	123	S	213	2.006	1,048	10.41	1,275	1,308	426	315.0	23.0	41.0 35.0	30.0	22.0	452	1,314					6.9	93	32	6	105	35	71	143	5.3	0.14
・		309	126	S	398	2.242	1,740	18.42	1,689	2.011	4,144	20.7	26.1		76.6	56.5	388	1,206	12.8	6.15	12.7	34.8	6.9	24	123	21	282	12	96	146	13.7	1.47
3		291	127	D	538	1,824	1,395	18.14	1,370	1,337	646	425.0	42.0	199.0 131.0	47.0	40.0	621															
2		319	129	D	362																											
0	生	312	129	D	271	1,992	1,177	13.03	1,874	1,799	380		50.0	63.0	50.0	39.0	2,776	899														
		288	137	D																											
		290	138	D	598																											
		310	146	D																											
		277	147	D																											

＊ D：死亡　S：瀕死ー屠殺　ST：定期屠殺

表2. 24カ月飼育群・終生飼育群ラット個体別検査所見　主要剖所見

個体別所見 2—1

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見（雄）
0（対照）	24カ月	122	964	下垂体腫大
		127	779	頸部腫瘤，横隔膜に脂肪塊
		129	667	副腎右腫大，脾臓腫大
		133	605	腎臓左右黄土色，腫大
		134	677	肝臓うっ血，小腸充血
		136	609	肝臓うっ血，心臓一部黒い影有
		141	757	肝臓小葉が明瞭，うっ血，下垂体腫大
		146	794	肝臓小葉が明瞭
		151	500	下垂体腫大，前立腺黄褐色粒子状，腎臓黄土色腫大(左右)肝臓方形葉はんこん様
		155	614	腹部毛黄，脱毛
	終生	240	765	尾つけ根に腫瘤
		237	523	膵臓付近より出血，腹腔内に血腫散見
		235	—	—
		221	614	—
		222	521	胃出血，脾臓腫大
		260	572	肝臓腫大，右眼出血のあと
		234	394	腹水貯留 約7.0 mℓ
		227	431	腹腔中出血，胸水有，精巣左右萎縮，腎臓表面凸凹
		217	524	下垂体腫大，副腎左右腫大表面出血，腎臓灰色
		230	458	胸腔，腹腔内出血，膀胱出血
		207	511	下垂体腫大，膀胱—精のう癒着，胸腔内水貯留，腎臓表面凸凹
		215	601	膀胱—前立腺癒着，肺—横隔膜癒着，精巣左右萎縮
		208	592	肝臓正中葉腫瘤，脂肪肝様，副腎腫大凸凹
		250	436	下垂体腫大，肝臓各葉癒着，表面凸凹
		219	—	下垂体腫大（水腫様），右眼球周囲かさぶた，副腎血腫，腫大
	終生㊚	0019		下垂体腫大
		0011		副腎腫大
		0005		膀胱結石
		0017		下垂体腫脹，脾臓腫大，鼻出血，胃腫瘤
		0007		精巣左右萎縮
		0009		腎臓—小腸癒着（腫瘤），前立腺腫瘤
		0013		下垂体腫大，脾臓腫大，下腹部腫瘤
		0001		下垂体腫大
		0015		右側腹部腫瘤，胃底部出血
		0003		右腋窩，左後肢つけ根（側腹）に腫瘤

個体別所見 2—2

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雄)
0.005	24カ月	145	504	膵臓付近より出血，腸間膜リンパ充血（黒色）
		124	624	眼球より出血，肺腫瘤（小）
		143	990	下垂体腫大
		123	778	下垂体腫大，腎臓右結石，脾臓腫大
		130	722	—
		138	720	左腎臓黄土色腎う空胴，右腎臓皮質に穴，左精巣萎縮
		140	762	左腎臓やや黄土色，右腎臓腫大傾向
		144	739	下垂体腫大，肝臓小葉明瞭一部うっ血
		152	700	肝臓方形葉周辺チョコレート色，中央黄褐色，下腹皮膚に黄褐色と緑色の腫瘤
		156	989	右腎臓皮質に陥凹，左右精巣浮腫（水腫）
	終生	248	601	膵臓付近脂肪中出血（血腫）
		228	—	—
		245	768	死後変化著しく剖検不可能
		258	364	右前肢つけ根に腫瘤
		244	623	下垂体腫大
		226	520	下垂体腫大
		201	613	下垂体腫大（破水）
		254	730	下垂体腫大，副腎表面に白点
		232	—	肝臓赤と白の斑点模様
		212	—	下垂体腫大，腹水 12.6 mℓ
		216	636	腸間膜リンパ腫瘤
		239	477	肝臓全葉の表面に白点（φ 1mm），左頸部に腫瘤内味白い豆腐様（ボロボロ）
		204	698	腸間膜リンパ，脾臓腫大
		255	479	腹腔中出血，胸水有，前立腺出血
		209	537	下垂体腫大，腹腔中出血，胸水有，精巣左右萎縮
	終生（特）	0018		右腎臓腫大
		0004		小腸腫瘤
		0016		下垂体腫大
		0006		腎臓腫大（3.1g，2.9g）
		0012		下垂体腫大
		0020		腹腔内出血，腸間膜脂肪内出血（ブドウ球状血腫）
		0014		右腎臓水腎，脾臓・心臓肥大
		0008		右腎臓結石，鼻汚れ
		0010		右側腹硬化（腫瘤）
		0002		下垂体腫大（出血），口腔内右上顎側腫瘤

個 体 別 所 見 2—3

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雄)
0・020	24カ月生	159	—	精巣出血，鼻出血跡
		131	559	胃腫瘤，肝臓—横隔膜癒着（腫瘍），死後変化著しい
		160	690	下垂体腫大，精巣小
		153	607	肝臓，胸腺部腫瘤大
		121	503	右腎臓水胞，腹部脂肪中血腫
		126	706	心筋中に黒色影
		142	621	左右腎臓肥大黄色表面にボツボツ，右腎臓皮質に穴，右腎臓下方に鶏卵大腫瘤（表面出血）
		148	616	腸間膜リンパ腫大
		154	607	左下顎腫瘤，右胸乳房腫脹
		157	1009	心耳肥大，肝臓辺り白色帯，右精巣萎縮
		224	746	下垂体腫大，腹部腫瘤
		251	271	下垂体腫大，胃潰瘍，前立腺腫大
		259	833	死後変化著しく，内臓融解
		203	468	下垂体腫大，胃底に出血斑点
		253	458	下垂体腫大，左腎臓結石，前立腺出血，精巣萎縮
		229	820	下垂体腫大，右腋窩部腫瘤，小腸出血
		211	391	下垂体腫大，胃底部出血
		256	443	下顎腫瘤，胸部腹側腫瘤
		242	637	前立腺出血，結腸肥大
		238	250	下垂体腫大，精巣萎縮，副腎水胞状の袋（一部）
		206	527	下垂体腫大
		243	377	下垂体腫大
		218	659	下垂体腫大（中に水），前立腺硬化
		214	554	下垂体腫大，左下腹部に腫瘤
		213	688	下垂体腫大，左下腹部に腫瘤（一部出血），副腎腫大

個体別所見 2—4

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雄)
0.320	24カ月	150	573	右後肢背部に腫瘤
		158	486	腹腔内出血，腎黄褐色，表面凸凹
		147	591	胸腺腫大，下垂体腫大
		125	899	—
		128	732	—
		132	1092	肥満体
		135	868	肝臓うっ血（斑点状），右腎臓腫大黄色表面ボツボツ
		137	717	下垂体腫大，耳下腺附近腫大，肝臓全葉に出血点様小結節
		139	749	—
		149	731	心臓に黒色影，右腋窩，左下側腹部に腫瘤，左副腎腫大，左腎う結石
	終生	223	514	乳腺腫大，肝臓腫瘤，肺—横隔膜癒着
		225	659	—
		210	512	腹腔内出血約10mℓ，盲腸腫瘤
		202	499	腎臓水腫出血（左右），精巣萎縮
		246	368	死後変化著しく剖検不可能
		220	390	胃出血跡
		233	527	下垂体腫大，胸腔に血液貯留
		247	555	右腎臓結石，膀胱17.74g（内部に茶色液状物）
		236	659	腹腔に水貯留22.5mℓ，心耳肥大，精巣萎縮
		257	415	下垂体腫大
		241	319	左精巣萎縮，横隔膜水腫
		252	324	下垂体腫大，前立腺かたくて灰色，腎臓腫大
		231	360	腸間膜出血，胸水約3mℓ，肝臓正中葉に白点，心臓腫大
		249	342	下垂体腫大，脾臓腫大，精巣左右萎縮
		205	290	下垂体腫大，胸水有，前立腺黄色，副腎腫大表面ボツボツ

個 体 別 所 見 2—5

群 BHT %	飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雌)
0 (対照)	24カ月	179	372	下垂体腫大
		176	318	下垂体腫大
		161	707	肝臓紫色～白色，甲状腺萎縮 (不明)
		170	389	下垂体腫大，左卵巣水腫，子宮左重積
		174	469	下垂体腫大，子宮下部腫瘤，肝臓小葉明瞭，右腋窩腫瘤
		175	564	下垂体腫大，左腋窩部 (乳腺) 腫瘤，右下腹黒色かたまり
		182	515	下垂体腫大，右腎臓表面に凸状物皮質凹，右胸，右下腹部 (乳腺) 腫瘤
		186	604	下垂体腫大，左副腎腫大，肝臓小葉明瞭チョコレート色と黄褐色粒状分布
		189	676	下垂体腫大，左肩・腋窩・下腹 (乳腺) 腫瘤，肝臓小葉明瞭出血斑有
		200	486	下垂体腫大 (出血)，肝臓小葉明瞭で出血点，左右側腹(乳腺) 腫瘤 (大)
	終生	316	516	下垂体腫大，左腋窩 (乳腺) 腫瘤
		275	433	右下腹部 (乳腺) 腫瘤，下垂体腫大
		280	350	下垂体腫大，右下腹部 (乳腺) 腫瘤，胃噴門附近腫瘤
		311	673	下垂体腫大，左後肢つけ根腫瘤 (乳腺)，左腎臓結石
		306	338	左顔面腫瘤，左眼失明，肝臓白色，子宮 (左) にくびれ
		295	573	右下腹部腫瘤，左卵巣水腫
		289	775	左肩 (乳腺) 腫瘤，腸間膜より出血
		292	539	下垂体腫大，右側腹 (乳腺) 腫瘤
		320	247	下垂体腫大
		300	463	下垂体腫大，右側腹 (乳腺) 腫瘤
		276	573	下垂体腫大，膀胱癒着，胸・腹部 (乳腺) 腫瘤
		318	441	下垂体腫大，子宮出血跡，右腋窩 (乳腺) 腫瘤，胸部横隔膜上に腫瘤
		271	797	右肩，側腹 (乳腺) 腫瘤
		265	548	下垂体腫大 (出血)，下腹，右下側腹 (乳腺) 腫瘤
		307	464	左側腹，下腹 (乳腺) 腫瘤
	終生 (特)	0021		下垂体腫大
		0037		下垂体腫大
		0031		下垂体腫大，右腎う結石
		0033		腹腔内血液貯留，下垂体腫大 (淡赤色)
		0023		下垂体腫大，前立腺出血肥大
		0035		下垂体腫大，右腎結石
		0029		下垂体腫大，右側腹 (乳腺) 腫瘤，腹腔内腫瘤 (腹腔中央部)，副腎左右腫大
		0025		左右腋窩 (乳腺) 腫瘤，左下腹 (尻)(乳腺) 腫瘤，下垂体腫大
		0027		下垂体腫大，副腎左右肥大，脾臓肥大
		0039		下垂体腫大 (出血)，胸，右下側腹 (乳腺) 腫瘤，膀胱肥大

個体別所見 2－6

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率（%）	主要剖検所見（雌）
0.005	24カ月	187	300	下垂体腫大
		198	398	下垂体腫大
		172	253	—
		180	337	下垂体腫大，左卵巣水腫
		162	595	下垂体腫大，右下腹，左側腹（乳腺）腫瘤，腎臓黄色
		168	534	下垂体腫大，右腋窩（乳腺）腫瘤，子宮黒色かたまり（1×0.5 cm）2つ
		169	537	下垂体腫大，右肢窩（乳腺）腫瘤，左右腎う結石，右副腎肥大
		177	523	—
		178	465	—
		183	836	右前側（乳腺）腫瘍（360g），肝臓小豆大出血斑有り（数個）
	終生	308	—	左腎臓髄質に欠損有
		317	585	下垂体腫大
		266	294	下垂体腫大
		267	361	右下顎部腫瘤，胃小彎腫瘤
		261	—	—
		299	339	下垂体腫大
		313	412	下垂体腫大
		298	331	下垂体腫大，下腹部（乳腺）腫瘤
		304	730	下垂体腫大，左肩（乳腺）腫瘤
		301	374	下垂体腫大，下腹部（乳腺）腫瘤
		268	687	下垂体腫大，腎左右結石，下腹部（乳腺）腫瘤
		297	729	鼻，口出血，右腋窩・下腹部（乳腺）腫瘤
		314	478	下腹部（乳腺）腫瘤，右腎臓結石
		262	460	下垂体腫大，右側腹（乳腺）腫瘤
		272	280	下垂体腫大，子宮左中間にかたまり
	終生（特）	0022		左腰部より大きな弾力性ある腫瘤
		0034		下垂体出血，胃出血
		0030		—
		0040		右腋窩，側腹（乳腺）腫瘤
		0036		下垂体腫大，右側腹（乳腺）腫瘤
		0026		脾臓肥大，右側腹部スミ状かたまり
		0032		下腹部腫瘤，肝－脾－小腸癒着，腹腔内出血
		0038		下垂体腫大
		0028		右肩背部，左側腹（乳腺）腫瘤
		0024		下垂体腫大，胸側左右肩部（乳腺），右側腹（乳腺）腫瘤，右大腿前側腫瘤，左腎臓結石

個 体 別 所 見 2—7

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雌)
0.020	24カ月	185	237	下垂体腫大
		164	294	下垂体腫大
		173	288	下垂体腫大，卵巣水腫
		195	318	下垂体腫大，右後肢つけ根皮下腫瘤
		196	—	—
		193	653	下垂体腫大，右側腹，右下側肢・腋窩（乳腺）腫瘤，肝臓小葉明瞭，腎臓表面粗
		167	662	両肩前側（乳腺）腫瘤，副腎左右表面に白点
		188	706	左肩背部腫瘤，卵巣腫大
		190	510	左子宮腫瘤，左卵巣水腫，肝臓小葉明瞭うっ血（周囲，辺縁）
		193	432	左下腹（乳腺）腫瘤，左右副腎腫張（小白点），脾臓小葉明瞭（出血斑）
	終生	296	300	嗅脳部融合
		283	396	胃腸癒着腫瘍，右腎臓結石
		287	257	下垂体腫大，左腎盂に結石
		264	944	下腹部（乳腺）腫瘤，卵巣腫大
		294	334	下垂体腫瘤
		293	370	下垂体腫大，左右腎臓結石
		315	612	右側腹，左腋窩（乳腺）腫瘤，子宮ねん転
		302	477	下垂体腫大
		279	342	下垂体腫大，右腋窩（乳腺）腫瘤
		305	661	右半身腹側（乳腺）腫瘤（310g），脾臓肥大
		284	—	下垂体腫大，背下部腫瘤
		286	201	下垂体腫大，左子宮膨化
		278	426	下垂体腫大，右子宮充血膨化，胃噴門潰瘍，右胸，腋窩（乳腺）腫瘤
		285	346	胸腔内出血，心臓—肺臓癒着，脾臓腫大，右腋窩（乳腺）腫瘤
		281	343	下垂体やや腫大，肺出血，副腎腫大，左下腹（乳腺）腫瘤

個体別所見 2—8

群 BHT %	群 飼育	ラット No.	体重増加率 (%)	主要剖検所見 (雌)
		184	298	下垂体腫大，下腹部（乳腺）腫瘤，腸より出血
		197	371	下垂体腫大
		199	278	左下腹部腫瘤
	24	171	277	下垂体腫大
		165	423	下垂体腫大
	カ	166	310	左腎臓結石
		192	—	—
	月	181	402	下垂体腫大，左右腋窩腫瘤，子宮（右）出血点あり
		191	546	左右腎臓皮質黒色，副腎白色斑点，卵巣水腫
		194	497	左右副腎表面に白い斑点，肝臓出血点のようなボツボツあり
0		269	—	腎萎縮表面に凸凹あり結節状，腺胃粘膜発赤，尿管中に長円形黄色塊
.		263	286	下垂体腫大
3		273	311	腸間膜リンパ充血
2		274	641	下腹部腫瘤
0	終	270	737	下腹部左右腫瘤
		303	403	下垂体腫大，膵臓腫瘤，腹水約32 mℓ
		282	219	下垂体腫大，肝臓に白点
		309	403	左右腋窩腫瘤，右後肢前側腫瘤，左腎臓水腎
		291	554	下垂体腫大，腹腔内出血貯血，腸間膜腫瘤
		319	365	下垂体腫大，両眼周囲充血，右大腿腫瘤
	生	312	279	下垂体腫大，右顎，前側大腿腫瘤，左子宮上部血腫
		288	—	下垂体腫大，右側腹部腫瘤，右副腎腫大
		290	657	下垂体腫大，右下腹—大腿腫瘤
		310	—	下垂体腫大，前後肢つけ根附近腹側皮下腫瘤（中味乳白か黒黄色膿状），右下腹部腫瘤，脳出血
		277	—	下垂体肥大，死後変化著しく内臓剖検不可能

文献

1) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 22-23, 1978

ジブチルヒドロキシトルエンによるオロチン酸脂肪肝の阻止

高橋 省*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Prevention of Orotic Acid-Induced Fatty Liver by Butylated Hydroxytoluene

OSAMU TAKAHASHI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）がエタノールやコリン欠乏による脂肪肝を阻止することはすでに報告されている[1,2]．前報において BHT が，直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムを含む飼料を与えたラットの肝臓脂質（トリグリセリド）の蓄積を抑えることを報告した[3,4]．オロチン酸の脂肪肝生成に際して過酸化脂質含量の増加や高度不飽和脂肪酸の肝臓への蓄積に伴うチオバルビツール酸反応の変化が報告されている[5,6]．Torrielli & Vgazio は 50mg/kg の N, N′- ジフェニル-p-フェニレンジアミン（DPPD）の腹腔投与が，1.5% のオロチン酸を含む食餌を4日間与えたときに生じる脂肪肝を抑制することを報告し[7]，Bunyan らは 100ppm の食餌性の DPPD がオロチン酸脂肪肝を阻止しないことを報告している[8]．本報告においては，トリグリセリド蓄積型脂肪肝のモデルとして確立されているオロチン酸による脂肪肝への BHT の影響を検討した結果を述べる．

実験方法

200g 前後の Wistar 系雄ラット（日本クレア）を用いた．基本飼料は20%カゼイン，5%大豆油，0.3%DL-メチオニン，0.2%塩化コリン，4%塩混合，0.45%ビタミン混合および70.05%の α-デンプンを含んでいる[9]．ラットは3群に分け，次の実験食を与えた．

対照群，基本飼料

オロチン酸投与群，基本飼料＋1.0%オロチン酸

BHT投与群，基本飼料＋1.0%オロチン酸＋1.0%BHT

各群は5頭ずつで，10日間の投与後，断頭放血し屠殺し，肝臓を摘出し総脂質を定量した．総脂質は Folch らの方法[10]により抽出し，重量法に定量した．

結果および考察

結果は表1，2に示した．オロチン酸および BHT の投与は10日間の体重増加を抑制し，肝臓の相対重量は有意に上昇した．

オロチン酸は脂肪肝を生じさせ，肝臓総脂質量は湿肝臓重量に対する百分率で3.85倍，全肝臓脂質量で対照の4.10倍であった．

BHT の投与はオロチン酸による肝脂質の蓄積を阻止した．総脂質は湿肝臓の百分率で対照のレベルまで減少した．

表1. オロチン酸および BHT を同時投与したオロチン酸の体重あるいは肝臓重量への効果

	体重（g）		肝臓重量（g）	
	0日目	10日目	絶対	相対
対照	120.0±2.8	200.4±4.9	10.5±0.5	5.21±0.14
1%オロチン酸	120.2±2.8	177.2±3.9	11.3±0.5	6.34±0.21
		(P <0.01)*	(N. S.)*	(P <0.01)*
1%オロチン酸	119.8±3.0	137.8±4.4	10.1±0.6	7.26±0.22
＋1%BHT		(P <0.001)†	(N. S.)†	(P <0.05)†

値は5頭についての平均±標準誤差で示した．

* 対照との比較　† オロチン酸単独群との比較

* 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2. オロチン酸およびBHTを同時投与したオロチン酸の肝臓脂質含量への影響

	総脂質	
	% 湿肝臓	全脂質 mg
対照	4.47±0.38	470±52
1%オロチン酸	17.20±0.73	1,936±124
	(P <0.001)*	(P <0.001)*
1%オロチン酸	4.22±0.11	424±26
+1% BHT	(P <0.001)†	(P <0.001)†

値は5頭についての平均±標準誤差で示した.
* 対照との比較 † オロチン酸単独群との比較

これらの結果はBHTがオロチン酸による脂肪肝を阻止することを示しており，エタノール[1]，コリン欠乏[2]あるいはすでに報告した条件[3]での脂肪蓄積に対する効果と同様であると考えられた.

要約

オロチン酸による脂肪肝は1.0%のBHTにより阻止された.

文献

1) Di Luzio, N.R. : *Lab. Invest.* 15, 50, 1966
2) Newberne, P.M., M.R. Bresnahn, and N. Kula : *J. Nutr.* 97, 219, 1969
3) 高橋 省：東京衛生年報, 25, 647, 1974
3) Takahashi, O., T. Nakao, and K. Hiraga : *Japan. J. Pharmacol.* 25, 59p, 1975
5) Kinsella, J.E. : *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 205, 1967
6) Bloom, R.J. and W.W. Westerfeld : *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 669, 1971
7) Torrielli, M.V. and G. Vgazio : *Life Sci.* 9, 1, 1970
8) Bunyan, J., M.A. Cawthorne, A.T. Diplock, and J. Green : *Brit. J. Nutr.* 23, 309, 1969
9) Windmueller, H.G. and L.H. von Euler : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 98, 1971
10) Folch, J., M. Lee, and G.H. Sloane Stanley . *J. Biol. Chem.* 226, 497, 1957

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 24-34, 1978

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)とエタノールのラット肝におよぼす相互作用

福森信隆*, 三栗谷久敏*, 平賀興吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Rat Liver Cells pretreated with Ethanol

NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)はその酸化防止作用による抗酸化剤，安定化剤として使用されている．肝臓に対するBHTの作用は，肝重量の増加[1]，薬物代謝酵素の誘導[2]がみられ，形態的にはLane[3]の滑面小胞体(SER)の増殖が報告されている．一方著者らはSERの顕著な増殖とglycogen顆粒の減少に付随した他のorganellesの変化を観察し，これらの変化は肝細胞の機能的適応変化であると推察した[4]．さらに薬物代謝に影響を与えるフェノバルビタール(PB)およびイソニコチン酸ヒドラジド処理後のBHTによる肝臓への影響を調べたが[4]，他の物質との相互作用について明らかでない点が多い．今回，肝臓内脂肪蓄積を増加させることが知られているエタノールとの相互作用について電顕的観察を主に検討を加えた．

実験方法

動物は馴化した6週令のJCL：SD系雄性ラットを用い，室温25±1°，湿度50±5％の環境下で飼育用固型飼料（日本クレア，CE-2）および水を自由に与え飼育した．1回投与実験では1晩絶食後，50％エタノール（和光純薬，特級）25ml/kg BW，BHT（和光純薬，Lot No ACL 5024）500mg/kg BW（オリーブ油溶解）を与え，3週間連続投与実験では40％エタノール10ml/kg BW，BHT 300mg/kg BWおよび60mg/kg BWを経口投与し，併用処理ではエタノール投与1時間後にBHTを与えた．なお対照にはオリーブ油を用いた．1回投与実験では1日後屠殺し試料を作製して電顕的観察のみ行い，3週間連続投与実験では最終投与1日経過後屠殺し次の諸検査を実施した．動物は半数ずつ血清生化学的検査，電顕用試料および睡眠時間の測定に分けて供した．

体重　薬物投与(午前10時)および屠殺時に測定した．

肝重量　断頭放血屠殺後，速やかに肝臓を摘出し重量を測定した．

血清生化学的検査　断頭放血時の血液から定法に従い血清を分離し，総蛋白量(TP)：Biuret法，グルコース量(Glu)：グルコースオキシターゼ法，トランスアミナーゼ活性(GOTおよびGPT)：Reitman-Frankel変法，アルカリフォスファターゼ活性(ALP)：Kind-King変法，総コレステロール量(Cho)：Liberman-Burcherd法を自動分析装置（日立M-400）にて測定した．血清脂質は中性脂肪（TG）をTG-E（ヤトロン），リン脂質（PL）をPL-E（ヤトロン）を用いて測定した．

睡眠時間延長作用　ヘキソバルビタール（帝国化学）100mg/kg BWを腹腔内に投与し，投与時から正向反射の消失までの時間および正向反射消失時より覚醒までの時間（睡眠持続時間）を測定した．

電子顕微鏡用試料作製　放血屠殺後，肝方形葉左下端部を摘出し，細切後冷3％パラホルムアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.4)で3時間前固定を行い，緩衝液中で1晩氷室内洗浄後，1％オスミウム酸(0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.4)で後固定を1.5時間行った．エタノール脱水後，定法に従ってEpon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，肝小葉中間帯の超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し，日立HU-12A型電子顕微鏡にて検鏡した．

Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase)活性は細切した肝臓を冷2.5％グルタールアルデヒド(0.1Mカコジル酸緩衝液，pH 7.2)で約30分間氷浴固定，緩衝液で洗浄した後tissue sectionerでおよそ40μの切片を得，Wachstein-Meisel法[5]に準じて酵素組織化学的検索を行った．

実験結果

A　1回投与実験

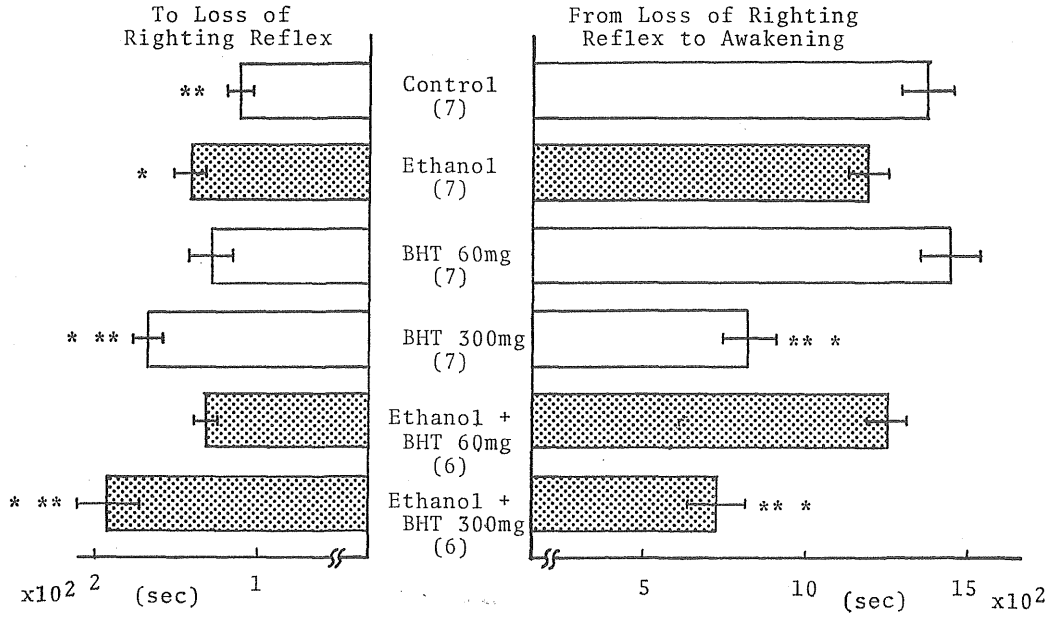
電顕的所見　エタノールは細胞質内に比較的微細な小脂肪滴の出現を増強せしめた．糸粒体は巨大長型化を呈し，全体に糸粒体膜が不明瞭となり消失傾向を認めた．またcristaeの崩壊が散見されたが，糸粒体内顆粒に変

* 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

Table 1. Body Weight and Liver Weight in Rats treated with BHT and Ethanol

Groups	No. of rats	Body weight			Liver weight	
		Initial (g)	Final (g)	Growth rate (%)	Absolute (g)	Relative (g/100g)
Control	14	200.0±3.10[a)]	342.0±6.63**	171.0±1.73**	14.7±0.49**	4.2±0.08
Ethanol	15	199.6±2.38	316.8±4.21*	158.7±1.40*	13.0±0.27*	4.1±0.06
BHT 60mg	15	201.0±1.98	333.2±4.22**	165.7±1.39***	15.7±0.35**	4.7±0.08***
BHT 300mg	15	196.6±1.84	318.0±4 20*	161.7±1.31*	17.4±0.44***	5.4±0.10***
Ethanol + BHT 60mg	12	196.4±2.64	307.0±7.32*	156.1±2.27*	13.8±0.39	4.5±0.06***
Ethanol + BHT 300mg	12	198.1±2.04	269.9±6.75***	136.2±3.28***	14.9±0.46**	5.5±0.11***

a) mean±SE, $p<0.05$: *–Control **–Ethanol



Ethanol Treatment, $p<0.05$: *-Control **-Ethanol, ( ): No of Rats

Fig. 1. Effect of BHT and Ethanol on Hexobarbital Sleeping Time in Rats

化を認めなかった．粗面小胞体 (RER) は多く消失がみられ離脱した ribosome の curling をみるが，SER の増殖は認められなかった．

BHT は glycogen 野で SER の増殖がみられその形態は vesicle 状を示し，それに伴って glycogen 顆粒の減少を認めた．糸粒体は膨化，長型を呈するものが多く一部基質の淡明化がみられた．RER は層状配列を乱し糸粒体を取り囲み末端部で SER への移行像が散見された．核，核小体の発達は良好であった．

エタノール・BHT 併用はエタノール単独でみられた胞体内脂肪滴の蓄積が著明でなく，また糸粒体の膜構築も消失が認められず明瞭であった．しかし一部の糸粒体は馬蹄型をなし中心に封入物を認めた．SER の増殖は軽度であり，BHT 単独に比べ著しくなかった．また RERは層状構築を乱し糸粒体を取り囲む像が多く，ribosome の離脱が比較的顕著であった．その他，microbody の増加傾向がみられ，核，核小体の良好な発達を認めた．

Table 2. Serum Biochemical Changes of Rats treated with BHT and Ethanol

Groups	No. of rats	TP g/dl	Glu mg/dl	GOT K-U/ml	GPT K-U/ml	ALP K, A-U/dl	Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl
Control	7	6.2±0.09[a)]	133.8±2.45	124.2±6.12	38.7±2.46	56.1±2.90**	60.4±1.85**	297.7±27.67	124.2±7.62**
Ethanol	8	6.0±0.10	127.3±3.68	123.3±5.27	36.3±1.17	37.7±2.65*	53.2±1.62*	306.8±23.11	107.0±3.67*
BHT 60mg	8	6.2±0.13	135.8±3.40	125.2±6.00	32.2±1.99	61.5±5.52**	53.3±1.86*	191.0±30.82**	91.8±5.14**
BHT 300mg	8	6.0±0.07	119.0±3.40*	133.5±4.21	52.7±8.97	81.1±7.63**	58.2±3.53	109.8± 9.36**	88.7±7.98**
Ethanol + BHT 60mg	6	6.0±0.08	123.6±3.59*	118.5±4.03	34.3±2.04	71.0±11.60**	62.0±2.47**	147.0±20.07**	94.3±5.31*
Ethanol + BHT 300mg	6	6.2±0.16	105.0±4.10**	133.6±9.95	48.6±4.73**	120.4± 7.80**	86.0±6.41**	141.0±20.74**	129.2±8.34**

a) mean±SE, $p<0.05$: *–Control **–Ethanol

B 連続投与実験

体重 Table 1 に各群の初期体重および投与後の体重値，成長率を示した．対照に比べエタノールおよびエタノール・BHT 併用で有意な抑制がみられ，また BHT 300mg の体重も抑制を示した．抑制の程度はエタノールとの併用でさらに顕著に増大し，特にエタノール・BHT 300mg 併用で著しい抑制を認めた．

肝重量 絶対量はエタノールで抑制がみられ BHT 投与で増加傾向を示した．エタノールと併用した BHT 60 mg および300mgでは BHT 単独に比べ抑制がみられ対照値に近い値を示した．一方，比体重でエタノールは若干の抑制を認めるが有意差はなく，BHT 60mg および 300mg では増加を示した．またエタノールと併用で増加がみられるが BHT 単独に比較してエタノールによる増強は認められなかった (Table 1)．

血清生化学的検査 Table 2 に検査値を示した．TP は各群で変化を認めず，Glu は BHT 300mg およびエタノールと併用で有意な低下がみられ特にエタノール・BHT 300mg 併用で著しかった．GOT は BHT 300 mg とその併用で若干の値の上昇を示すが有意でなく，また GPT も GOT と同様に BHT 300mg およびエタノール・BHT 300mg の併用で上昇を認めるが顕著でない．ALP はエタノールで低下がみられ，BHT 60mg および 300mg で上昇を示しエタノールと併用でさらに著しい上昇を認めた．TG, PL は BHT 60mg および300 mg で低下がみられたが，エタノールと併用で低下を抑制する傾向を示した．

睡眠時間延長作用 エタノールは軽度に睡眠持続時間の短縮をみるが著しくなく，BHT 60mg およびエタノール・BHT 60mg の併用で対照と大差を認めなかった．しかし BHT 300mg で正向反射消失までの時間延長がみられ睡眠持続時間の有意な短縮を認め，エタノールと併用でさらに短縮を強めた (Fig. 1)．

電顕的所見 3週間連続エタノール投与で胞体内に若干の小脂肪滴を認めるが1回投与時に比べ増加傾向は著しくなかった．一部の胞体では脂肪滴を多く有し周囲に myelin figure の形成が観察された．糸粒体は変型像をみるが膜の保持は良好で cristae の崩壊など認めなかった．SER は vesicle 状を呈して軽度に増殖を示すが，glycogen 顆粒の減少は顕著でなかった．RER は部分的に消失がみられ ribosome を脱落し，またやや拡張を示す RER は末端部で SER への移行像を観察した．

BHT 60mg では SER の増殖が軽度であり，glycogen 顆粒は多く残存していた．RER の層状配列はほとんど

乱れず正常構築に近かったが末端部で膨化し vesicle 状の SER への移行を認めた.

BHT 300mg では glycogen 野で密集した SER の著しい増殖がみられ vesicle 状から tubule 状を示し，それに伴い glycogen 顆粒は消失してわずかに凝集を認めるに過ぎなかった．RER は不規則な配列を呈し，一部で消失，ribosome の脱落を示した．糸粒体は長型，くびれ像など変型がみられ，その他 microbody の増加，核，核小体の良好な発達を認めた.

エタノール・BHT 60mg 併用で SER の軽度な増殖を認めるが，glycogen 顆粒は多く残存していた．RER は一般に配列を良好に保持しているが，BHT 単独より不規則となり消失がみられ ribosome を離脱する傾向を示した．また糸粒体の変型像を一部に認めた.

エタノール・BHT 300mg 併用で糸粒体はくさび状の外型を呈する像が多く基質の淡明化，cristae の崩壊が散見された．SER の増殖は顕著で glycogen 顆粒を減少させ，また RER は層状構造が不整な配列を示し部分的消失，SER への移行像を認めた．Microbody は大型化を示した．BHT と併用ではエタノール単独でみられた myelin figure が観察されなかった.

G-6-Pase 活性は各群とも活性の残存が認められ，増殖した SER で network を形成し，また RER では消失部を除き活性の局在を認めた.

考　察

肝臓は摂取された化学物質を代謝し，特に脂溶性物質の極性化を行うことにより腎臓での排泄を容易にさせる重要な解毒機構を持ち，さらに生体内での蛋白合成，糖，脂質代謝の主要な場である.

エタノールはアルコール脱水素酵素反応（ADH），カタラーゼ反応，microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) を経てアルデヒドに酸化されるが，その過程で脂肪酸合成の亢進，脂肪酸酸化の低下を生じ肝細胞内に脂肪の蓄積を増すことが知られている[6]．一方，長期間の摂取では脂質過酸化が肝障害の成因と考えられラジカル反応により膜障害を惹起させる[7].酸化防止剤ＢＨＴはその主作用にラジカル連鎖反応を停止させ自動酸化の進行を防止する作用を持つことから，BHT がエタノールによる肝障害を抑制すると推察され，その想定のもとに本実験を行った．またアルコールは我々の生活中に摂取する機会も多くその量，適応に個人差があり，臨床的には栄養素の摂取状態が肝障害を誘発させる一因と考えられている．さらにエタノールとＰＢの併用が肝臓内ＴＧを著しく増加させることから[8]，併用による障害の増減を把握することは重要な課題である．脂肪肝の発生初期は体内末梢脂質が動員され，以後食事性脂質に由来するといわれ[9]，その機転に相違が考えられるため，実験を１回および連続投与の両面から行った.

脂肪滴は１回投与で対照に比べ増加がみられたが，連続投与の肝細胞では著しくなかった．この差はエタノール代謝の adaptation によると思われるが，今回用いたエタノールが高濃度であるため，連続投与の際消化管粘膜の障害によって完全に吸収し得なかったことも考えられる．20％エタノールを４週間連続投与し脂肪滴の増加が認められなかった報告[10]からも，長期投与での脂肪肝の成立は必ずしも容易ではない．エタノール１回投与で出現した小脂肪滴は，BHT と併用で減少傾向を示したことから BHT の脂質代謝への関与が推察される．また３週間連続投与で脂肪滴に隣接して myelin figure の形成が認められたが BHT と併用ではみられなかった．この myelin figure の形成は脂質の過酸化により障害を受けた organelles の膜が貪食されずに再構成されて新たな膜を形成したものと思われ，BHT と併用でみられなかったことは BHT が脂質過酸化の進行を防止していると推察される．さらに３週間連続投与の血清ＴＧ，ＰＬは BHT 単独による低下をエタノールと併用で抑制する傾向を示すことから，エタノールの脂質代謝への関与が示唆される．有吉らは BHT を５日間投与して８時間後にエタノールを与えたところ，エタノールで増加された肝臓内ＴＧの抑制が認められなかったことを報告している[11]．おそらくエタノールの投与時より BHT の代謝がはやく行われたためと思われるが，今回の先にエタノールを投与した成績と比較すると興味ある結果を示している.

糸粒体はエタノール１回投与で巨大長型化を呈し，膜構築の消失傾向を認めたが，BHT と併用で膜の変化はみられなかった．１回の大量摂取により糸粒体のクエン酸サイクルの変調が急激に起こり[12]，形態に変化を与えたと思われる．エタノールによる糸粒体の変化に関して，異型，cristae の消失，基質の淡明化，糸粒体内顆粒の減少を特徴的に認める報告[13]があるが，糸粒体の長型などの変型構造は種々の薬物投与で観察される非特異的な現象で可逆的変化と思われる．またエタノールの連続投与では変型を呈したほか著変を認めなかったが，ＢＨＴ300 mg と併用で糸粒体膜のくさび状外型，cristae の崩壊がみられたことは，糸粒体の障害が考えられ機能的に影響をおよぼすと思われる．くさび状の外型は，モノフルオロ酢酸，亜砒酸，マロン酸などのクエン酸サイクル阻害剤によって出現する鋸歯状の形態と類似している[14]．BHT 60mg と併用でこれらの変化が認められず 300mg と併用でみられたことから，併用で糸粒体の変化をBHT が助長していると思われる.

SER はエタノール１回投与でほとんど増殖がみられないが連続投与で vesicle 状の SER の増殖を認めた．これらの変化は生化学的に薬物代謝酵素の誘導が１回あ

るいは短期間の投与でみられず，長期大量摂取で増加するということからも理解される[15]．従ってBHTは1回投与で著しい増殖がはじまり，連続投与で漸次 tuble 状を呈するのに対し，エタノールでは SER の vesicle 状が3週間投与に限りみられたことは形態的にもエタノールの SER と BHT の SER で増殖様式が異なると考えられる．連続投与の電顕的観察でエタノール・BHT 300mg の併用は SER の顕著な増殖を示し，その増殖は BHT 300mg と同程度と思われたが，SER の増殖の指標となるヘキソバルビタール睡眠持続時間の測定で BHT 300mg 単独よりさらに短縮がみられた．このことはエタノールにより軽度ではあるが SER の増殖を助長していると思われる．しかし，さきに著者らが行った BHT と PB を併用投与した時にみられた著しい増殖はみられなかった[4]．さらにエタノールで睡眠持続時間が若干短縮しているが顕著でないことに関して，ヘキソバルビタール水酸化酵素の変動がほとんどみられないという報告がある[16]．また SER の増殖に伴い glycogen 顆粒は減少しこの細胞内 glycogen 顆粒の挙動は血清 Glu 量の変動と合致していた．

RER の変化は槽の拡張を伴った末端部の SER への移行像が多く，適応要求に即した形態変化を示すが，エタノールおよびBHT 300mgで消失傾向がみられribosomeの離脱，curling を呈した．この変化は BHT 60mg 単独で認められずエタノール・BHT 60mg の併用でみられたことからエタノールの関与が強いと思われる．エタノールで RER は小胞状を伴って拡張し ribosome の不連続な付着を認める報告[13]からもエタノールの作用が考えられる．しかし，離脱した ribosome は細胞内に存在すること（polysome の形成？），血清ＴＰが変動しないことから蛋白合成機能は維持されていると考えられる．

一方，肝機能の指標とされる GOT，GPT は BHT 300mg およびエタノール・BHT 300mg で若干の上昇を認めるが有意でなく他の群の変化もみられず，さらに電顕的酵素組織化学の所見からも G-6-Pase 活性の失活がほとんど認められなかったことから，肝臓に重度な障害を与えていないと思われる．

体重はエタノールおよびエタノール・BHT 併用で体重増加の抑制がみられ，BHT 300mg 単独でも抑制しエタノールと併用でより顕著となった．肝重量の絶対量はエタノールで抑制，BHT で増加傾向がみられ，併用で BHT 単独より抑制した．さらに比体重でエタノールは若干の抑制があるが対照とほぼ同程度で BHT 60mg および 300mg で増加，エタノールと併用で増加を示すがエタノールによる増強は認められなかった．このことはエタノールと併用で体重は抑制され，肝重量では BHT 単独より抑制されるが，体重の抑制を考慮に入れた比体重では抑制効果が著しくない．従って併用で肝重量の増加は BHT の作用を主に反映したものと思われる．

以上のことから，今回行ったBHTとエタノールの併用は肝機能に強度な障害を与えることなく，エタノールによる脂質代謝障害をBHTが抑制していると思われるが，一方連続投与実験では併用で糸粒体の変化が認められることから必ずしも明らかでない．さらに併用により睡眠持続時間の短縮から解毒機構への影響が示唆された．形態的には細胞内 organelles の adaptation の表現と考えられ，今後化学物質に対する細胞障害を惹起するまでの細胞の耐久性からも検討したい．

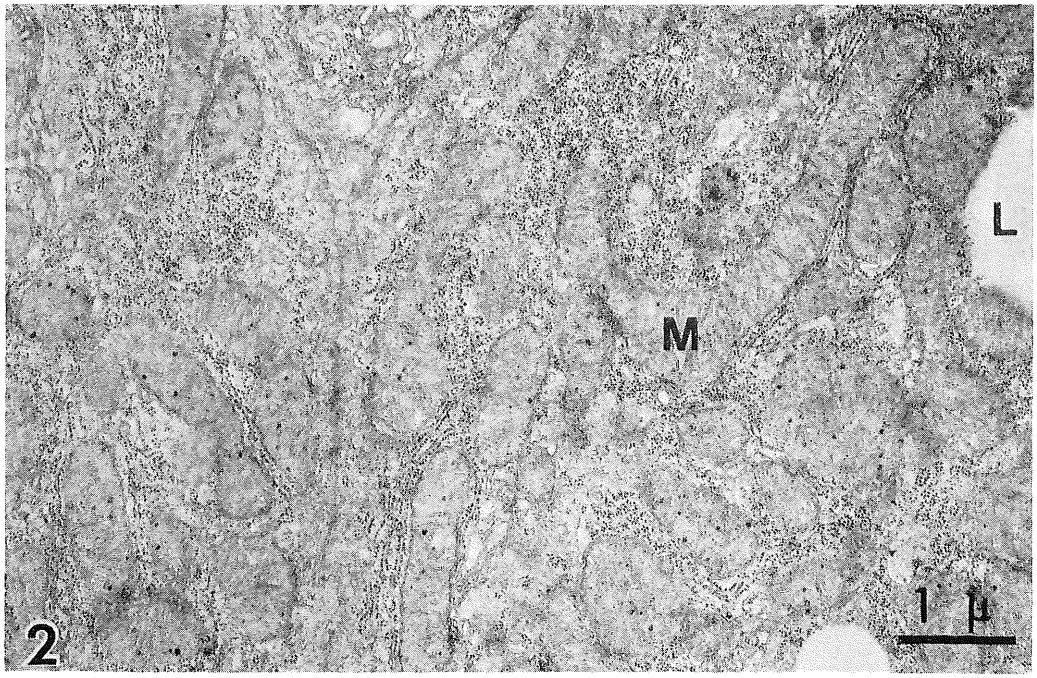
結　語

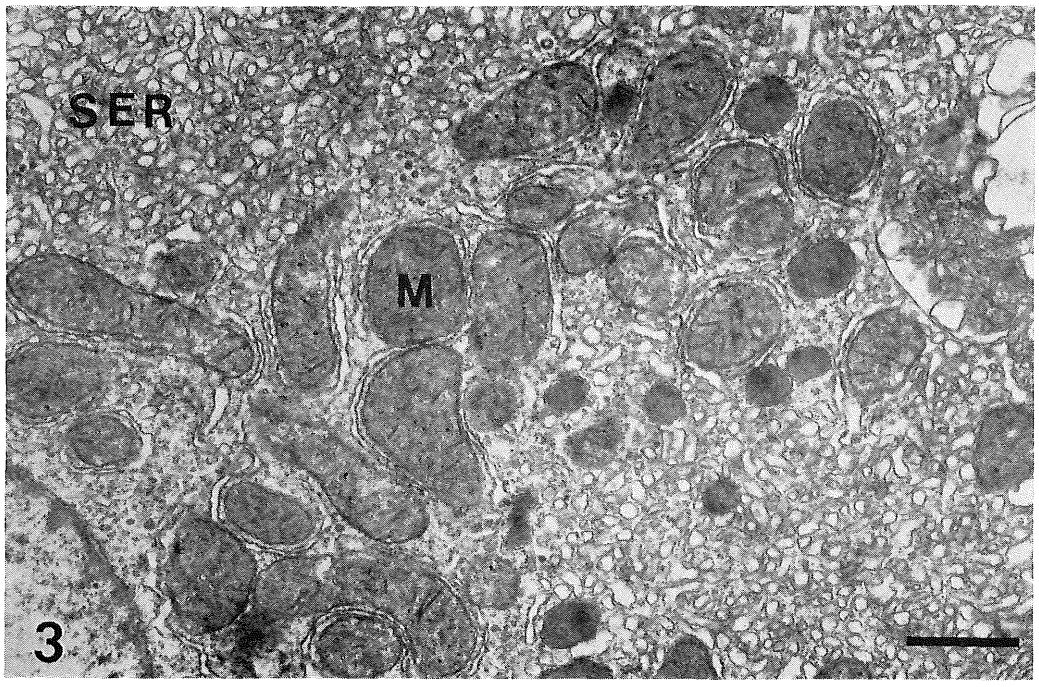
BHT とエタノールの肝臓におよぼす相互作用について検討した．電顕的にエタノール1回投与でみられた脂肪滴の増加，糸粒体膜の消失を BHT の併用で抑制した．3週間連続投与のエタノールで脂肪滴の増加は顕著でなかったが，周囲に散見される myelin figure をBHTの併用で抑制した．また併用で糸粒体膜の鋸歯状外型が多くみられた．血清ＴＧ，ＰＬはBHTで低下を認めたが，エタノールと併用で低下を抑制する傾向を示した．SER の増殖は BHT に比べエタノールで顕著にみられず，併用でＢＨＴと大差を示さないが，睡眠持続時間の短縮が BHT より強く認められた．血清 GOT，GPT の変動は各群で著しくなかった．以上のことから BHT とエタノールの併用は重大な肝障害を与えることなく脂質代謝と解毒機構への関与が示唆された．

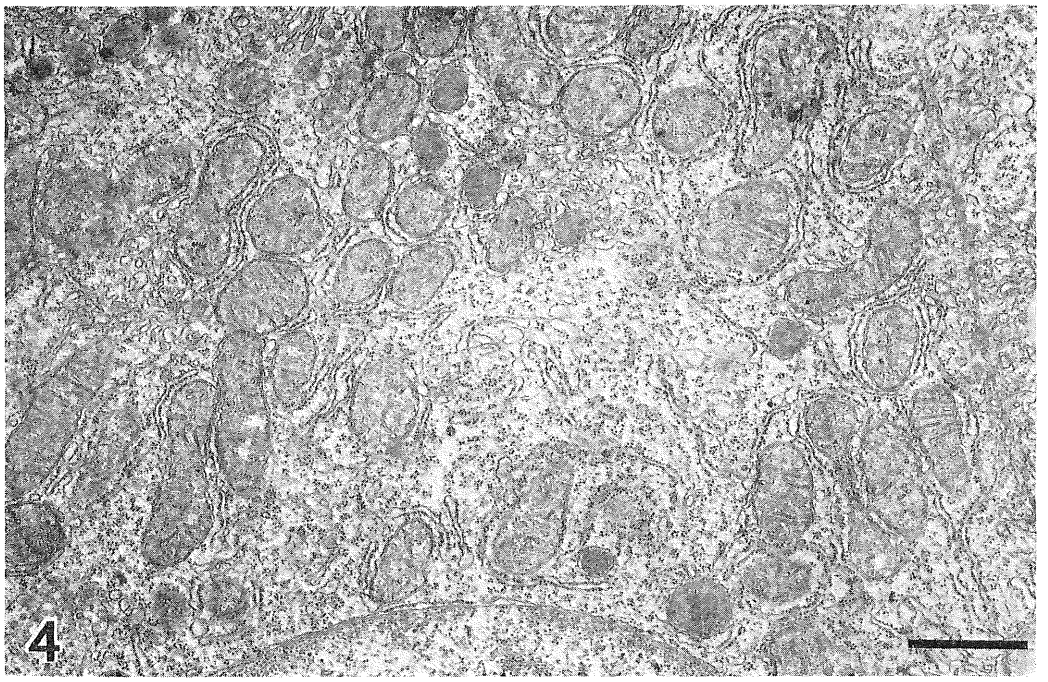
（本研究の概要は日本薬理学会第58回関東部会および日本電子顕微鏡学会第34回学術講演会　1978年6月で発表した．）

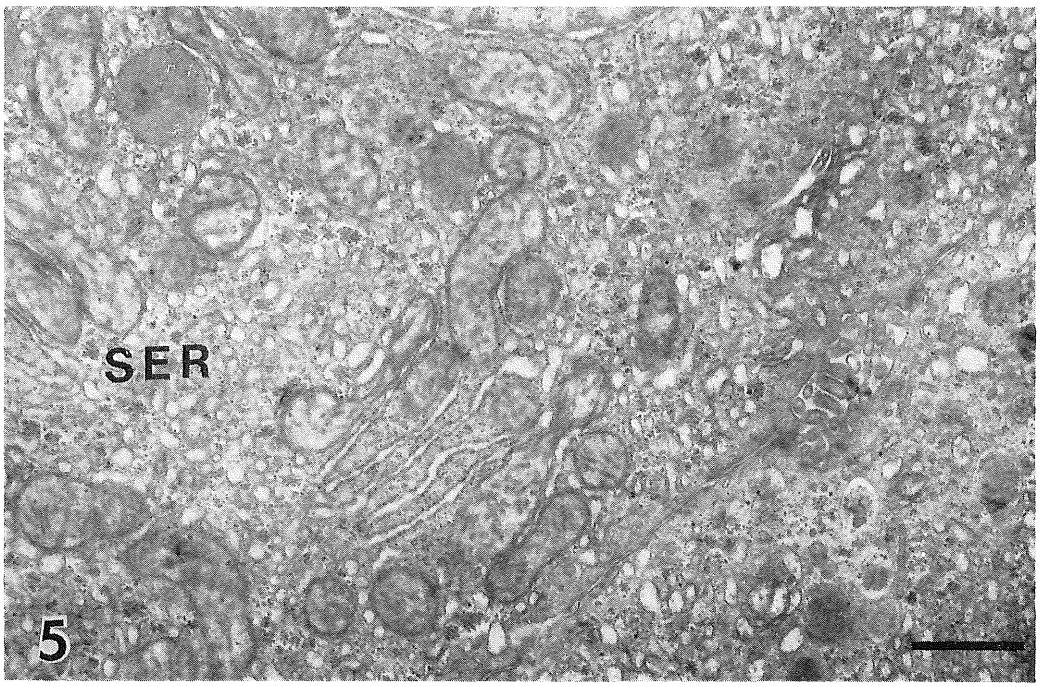
文　献

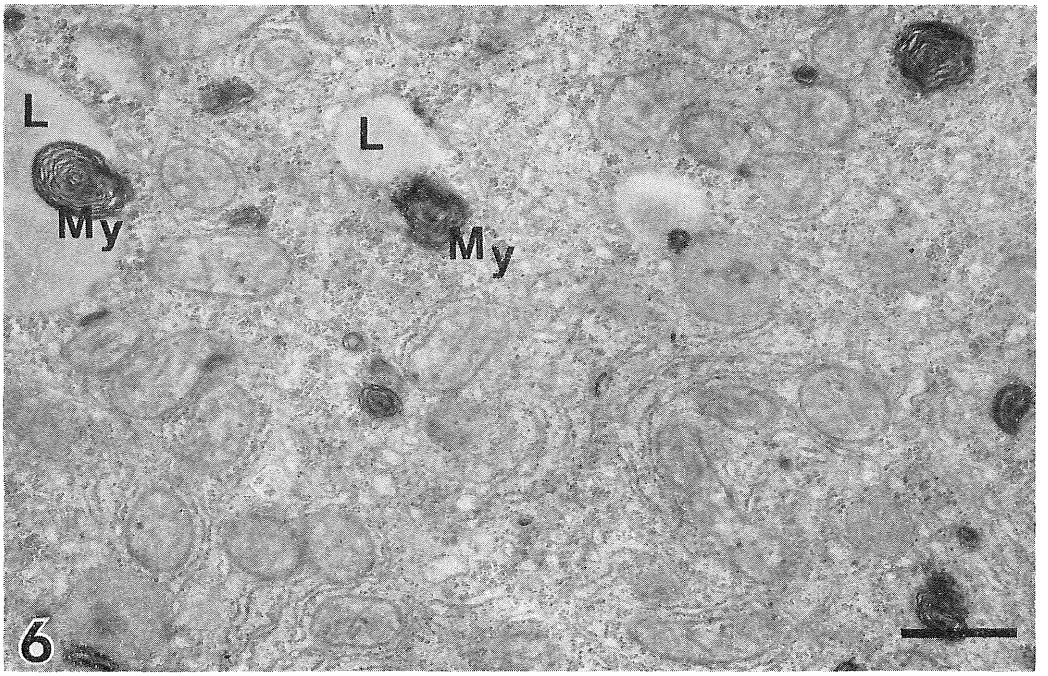
1) Gaunt, I. F., D. Gilbert, and D. Martin : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 445, 1965
2) Gilbert, D. and L. Golberg : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965
3) Lane, B. P. and C. S. Lieber : *Lab. Invest.*, 16, 342, 1967
4) 福森信隆，三栗谷久敏，平賀興吾：東京衛研年報，27-2，67，1976
5) Wachstein, M. and E. Meisel : *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 592, 1956
6) 中西穎央：最新医学，31，2086，1976
7) 蓮村　靖：医学のあゆみ，102，735，1977
8) Marsh, A. R., H. S. Fraser, A. Breckenridge, B. Lewis, and G. R. Thompson : *Clin. Sci. Mol. Med.*, 52, 219, 1977
9) 高田　昭：肝障害の病態モデル，101，1973，日本薬学会
10) 平野勝久：名古屋市大医学雑誌，19，609，1968
11) 有吉敏彦，新垣光雄，岩崎一秀：薬学雑誌，94，424，1974
12) 兼子俊男：代謝，7，902，1970
13) Iseri, O. A., C. S. Lieber, and L. S. Gottlieb : *Amer. J. Path.*, 48, 535, 1966
14) 藍沢茂雄，安田寛基：最新医学，20，719，1965
15) 加藤隆一：最新医学，31，2093，1976
16) Nakanishi, S., E. Masamura, M. Tsukada, T. Miyasawa, and R. Matsumura : *Med. J. Shinshu. Univ.*, 15, 91, 1970

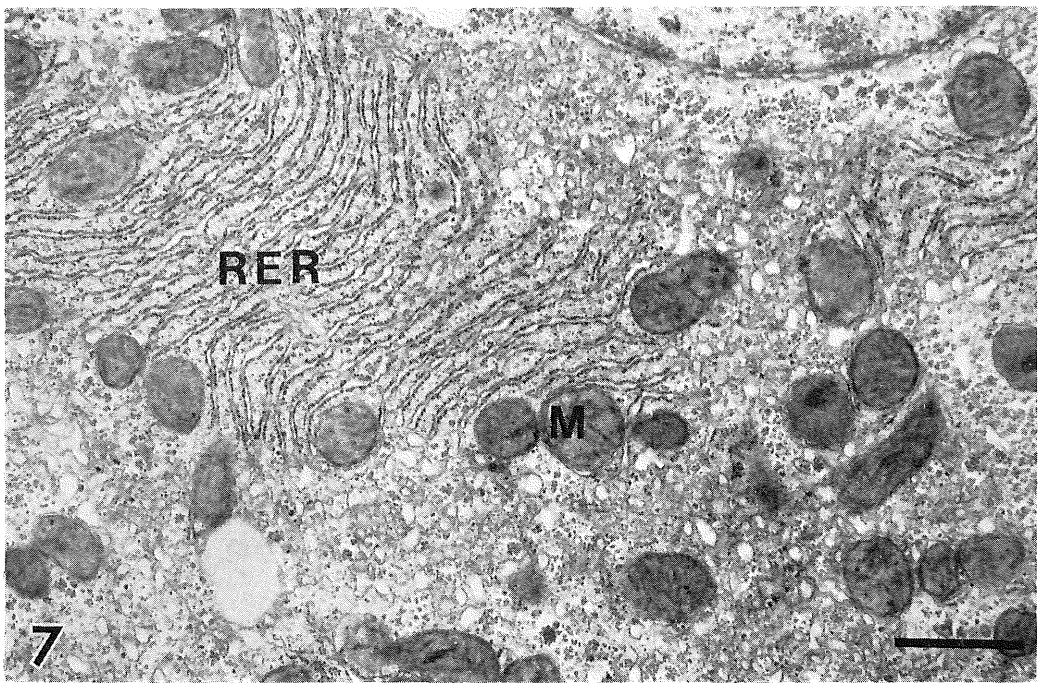

L
M
1 μ
2

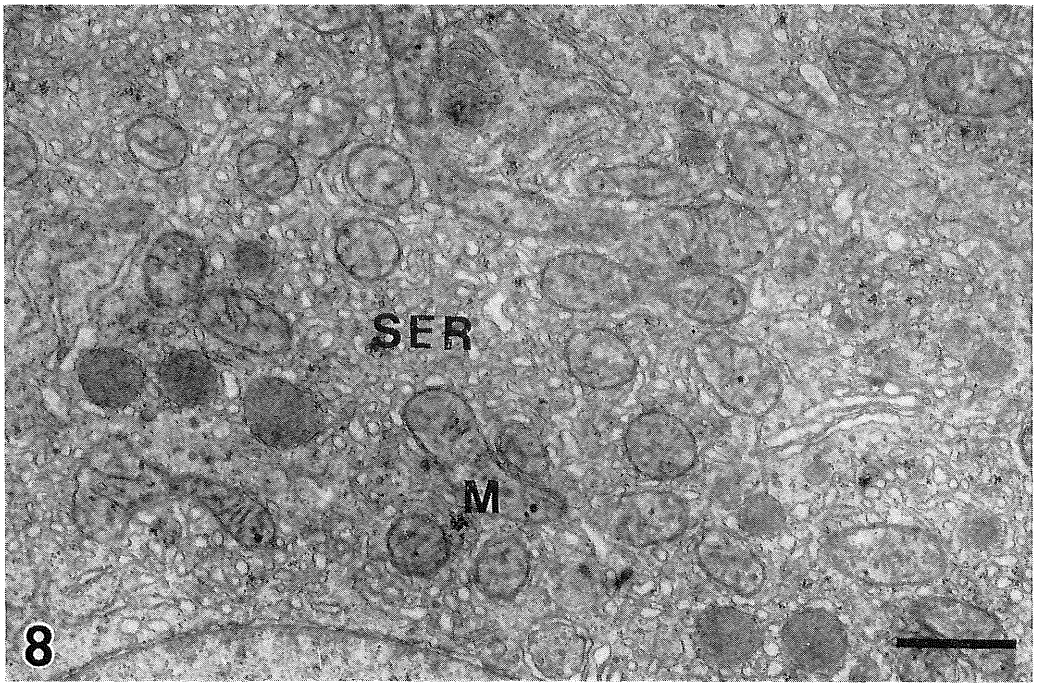

SER
M
3

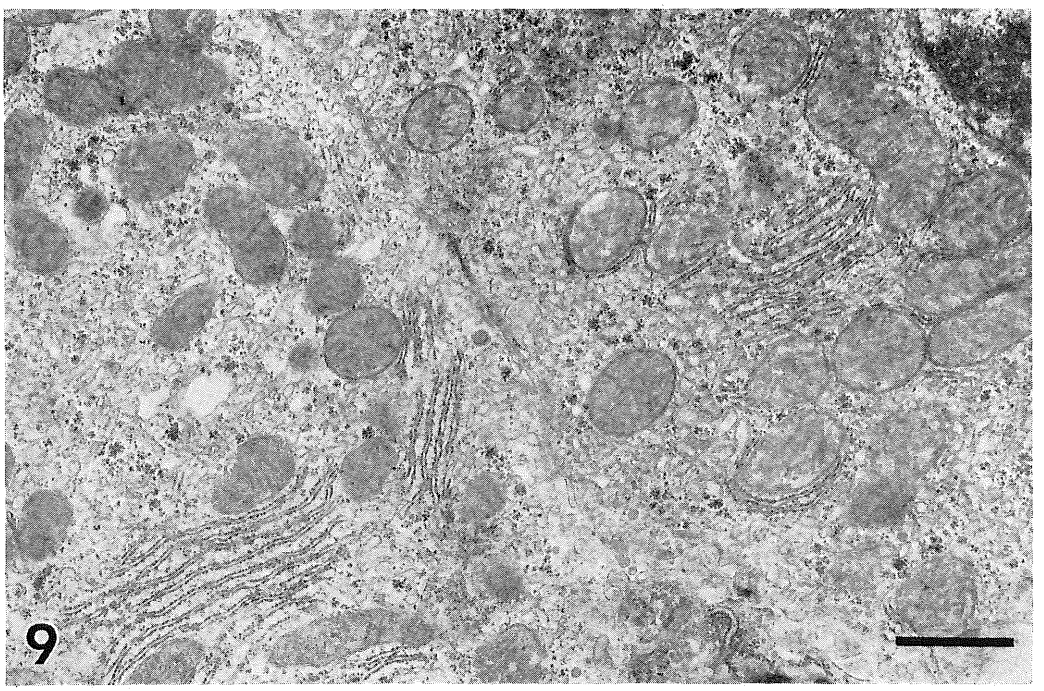

4

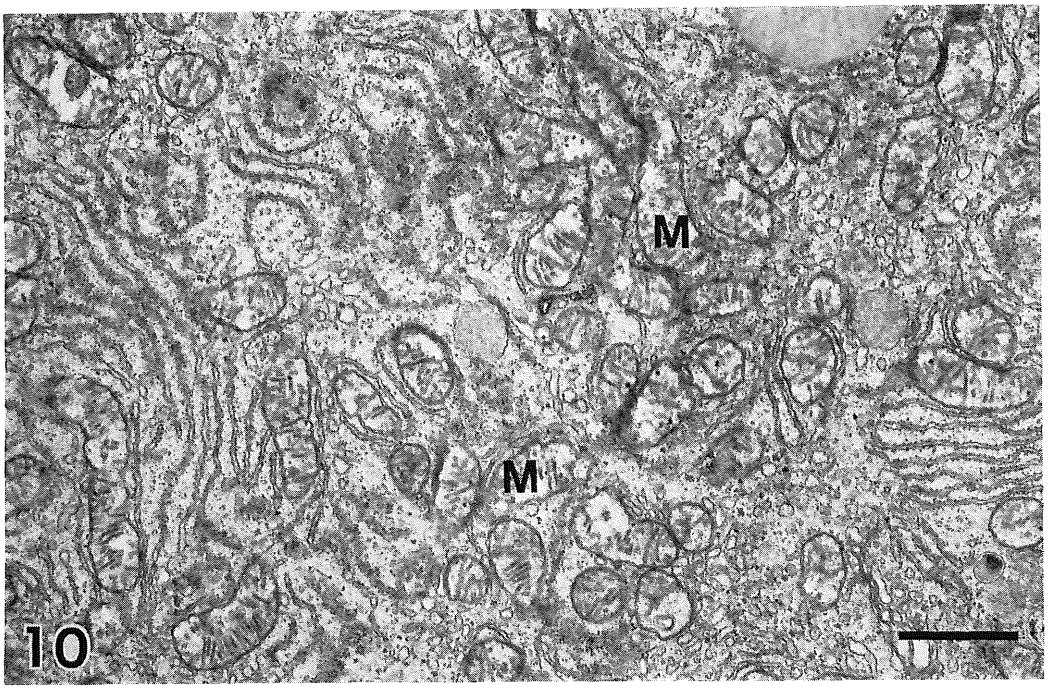

SER
5

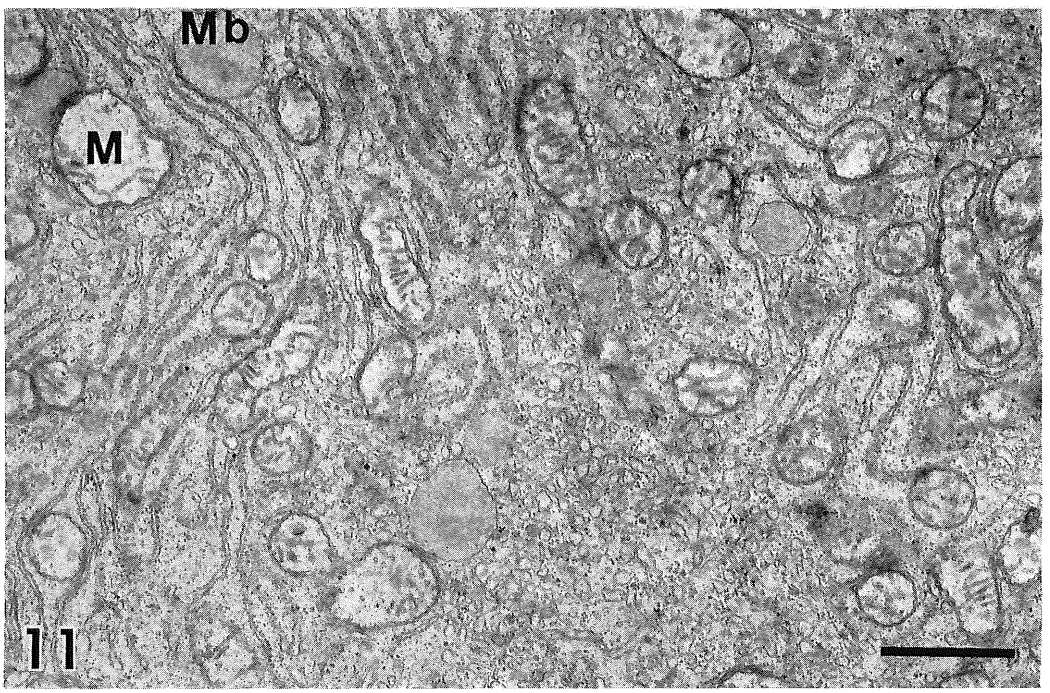

L
My
L
My
6


RER
M
7


SER
M
8


9


M
M
10


Mb
M
11

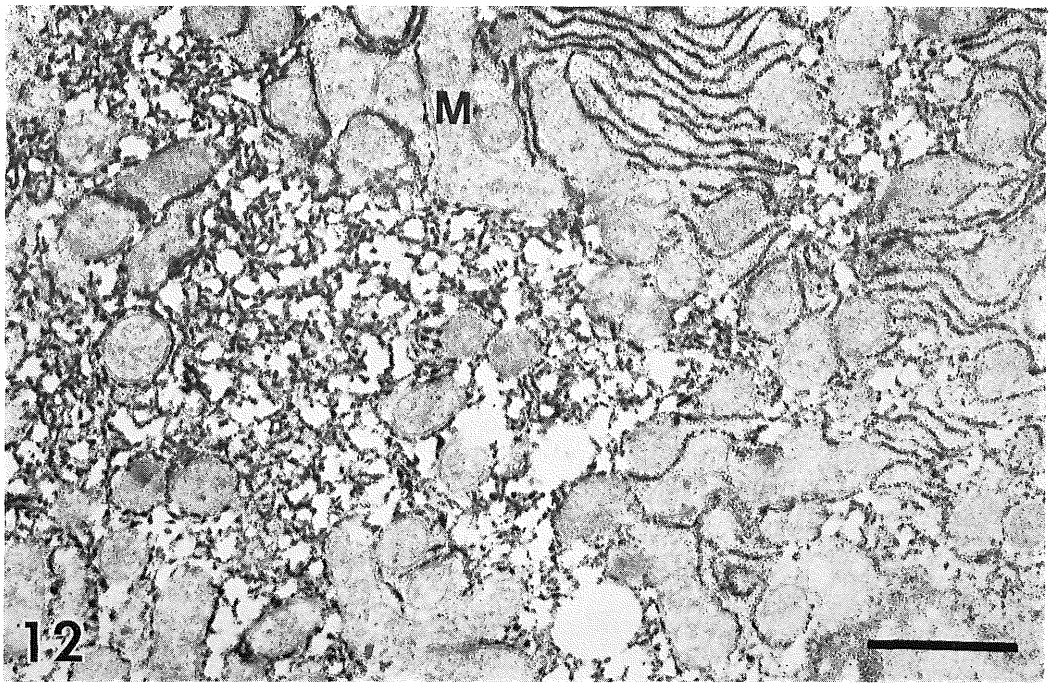


Fig. 2 to 4 are livers of rats in a single administration by stomach tube.

Fig. 2. Deformation of mitochondria (M) and disruption of membrane in liver of rat treated with ethanol. Lipid droplets (L).

Fig. 3. Proliferation of SER in liver of rat treated with 500mg BHT.

Fig. 4. Alteration of mitochondrial membrane are not seen in liver of rat treated with ethanol and 500mg BHT. Scattered-lamella of RER are prominent.

Fig. 5 to 12 are livers of rats in prolonged administration for 3 weeks once daily.

Fig. 5. 6. Slight proliferation of vesiclar SER and myelin figures (My) in close vicinity to lipid droplets are seen in liver of rat treated with ethanol.

Fig. 7. In liver of rat treated with 60mg BHT, alteration of organelles are slight.

Fig. 8. Proliferation of tubular SER and depletion of glycogen particles are seen in liver of rat treated with 300mg BHT.

Fig. 9. Slight proliferation of SER are seen in liver of rat treated with ethanol and 60mg BHT.

Fig. 10. 11. In liver of rat treated with ethanol and 300mg BHT, wedge-shaped membrane of mitochondria and anomalous mitochondria (M) are observed. Microbody (Mb) shows large size comparatively.

Fig. 12. Activity of G-6-Pase in endoplasmic reticulum is still positive in liver of rat treated with ethanol and 300mg BHT.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 35-37, 1978

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のDT-diaphorase活性に対する影響について

鈴木英子*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on DT-diaphorase Activity

HIDEKO SUZUKI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

抗酸化剤として食品中に幅広く使用されているジブチルヒドロキシトルエン（BHT）をラットに摂取させた場合，出血傾向を示すことをすでに報告した[1]．その出血はジクマロール投与ラットにみられる出血と類似していたため，ジクマロール投与ラットの出血機序と比較しつつBHT摂取ラットの出血機構の解明を検討してきた．すなわち，これまでに明らかにしたことは，1)BHT摂取ラットにおいてジクマロール投与の場合と同様，血漿プロトロンビン時間ならびに血液凝固時間の延長，プロトロンビン，第Ⅶ因子複合体の減少，2)ビタミンK投与による1)の現象の回復である[1,2]．

一方，ジクマロールがビタミンKの作用と拮抗し，プロトロンビンの生成を抑制する詳細な機構はいまだはっきり解明されていないが，Ernster らにより次のような報告がなされている．すなわち，プロトロンビンが生成される際，ビタミンKはビタミン K-epoxide に変換し，この epoxide は再度ビタミンKに変わり利用されている[3]．そのビタミン K-epoxide からビタミンKへの還元反応を触媒する酵素を阻害し，抗凝固作用を示すのがジクマロールであるとのべている[4]．さらにこのビタミンK還元酵素が DT-diaphorase (E. C. 1. 6. 99. 2) である可能性を示唆している[5]．

そこで，今回，我々はBHT摂取の影響をジクマロール投与ラットにおける DT-diaphorase 活性と比較しつつ検討した．

実験材料および方法

1. **実験動物**：JCL：SD 系雄ラット(SPF)を4週令で購入，室温25±1°，湿度55—60%，照明を午前6時より午後6時まで行なう環境下でステンレス金網ケージに5匹ずつ収容，クレアCE—2飼料および水道水を自由に与え飼育した．2週間予備飼育後実験に使用した．

2. **試料**：BHT：和光純薬，Lot No. ELF 3598，ジクマロール(3,3′メチレン—ビスヒドロキシクマリン)：和光純薬，Lot No. ACP 8621，ビタミンK_2：エーザイ製ケイツー注を用いた．

3. **投与方法**：BHT は0.8%および1.5%の割にクレアCE—2粉末飼料に添加し，その後固型飼料化した．このBHT添加飼料を通常飼料に代えて一週間自由摂取させた．この際，対照用固型飼料も同時に，同一の粉末飼料より製造した．ジクマロール（15mg/ラット）は15mgを1%トラガント液1 m*l* に懸濁し，BHT投与ラットと同一週令の対照ラットに胃ゾンデにて経口投与した．投与期間は Table 2 に示した如くである．ビタミンK_2（5 mg/ラット）は腹腔内投与した．

4. **実験方法**

血漿プロトロンビン時間　Quick- 段法[6] を用いた．0.1m*l* の 0.1M クエン酸ナトリウムを入れた注射器を用い，心臓穿刺法により 1 m*l* 採血した．血液を2500rpm，15分間遠心後採取した血漿を検査に用いた．

酵素の調整　採血直後，断頭により屠殺し，開復し，肝臓を摘出した．以下の方法は Ernster ら[5] に従った．摘出した肝臓を2倍容の0.25M Sucrose に浸し，Teflon Homogenizer によりホモジナイズし，Beckman Model L3-50 型超遠心機を用いて，105000×g 60min 遠心した．遠心上澄を酵素活性の測定にもちいる酵素液とした．

DT-diaphorase 活性の測定　Ernster らの方法[7] に従った．反応液の組成は 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.33mM KCN, 1 mM NADPH, 10mg Tween-20/m*l*, および 35 μM 2, 6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) からなり，全容量を 3.0m*l* とした．25° にした反応液に 10μ*l* の酵素液を加え，直ちに Cary 17により600nm の吸光度の減少を測定した．*in vitro* の実験では，反応液にエタノールに溶かした BHT，および0.1N NaOH に溶かしたジクマロール10μ*l* を加え，正常ラットの酵素液の酵素活性変化を検討した．DT-diaphorase 活性は他に menadione と cytochrome *c*[7] を使用した

* 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. Liver DT-diaphorase activities of rats treated with BHT

	DT-diaphorase*	Prothrombin time (sec)
Control	609	20
	655	37
	1111	23
	775	25
	1139	40
Mean :	857±112	29±4
0.8% BHT	2149	30
	3352	37
	3003	30
	4166	43
	3419	23
Mean :	3217±327	32±3
1.5% BHT	4026	55
	6024	255
	4504	>300
	5577	>300
	6472	>300
Mean :	5321±459	—

* nanomoles DCPIP reduced/min/mg protein

Table 2. Liver DT-diaphorase activities of rats treated with Dicoumarol

	DT-diaphorase*	Prothrombin time (sec)
None	1700	13
	2344	17
	1287	25
	1287	25
	965	25
Mean :	1517±237	21±3
Dicoumarol	997	>300
	1158	>300
	1053	270
	1357	>300
	1537	295
Mean :	1220±100	—

* nanomoles DCPIP reduced/min/mg protein

Dicoumarol (15mg/rat) was injected 2 and 1 days before sacrifice. Control rats were injected with the appropriate solvents.

測定法も用い測定した.

蛋白質定量法 Lowry らの方法[8]で行ない, 仔ウシ血清アルブミンを標準物質として用いた.

結果および考察

Table 1 に示したように, 1.5% BHT を7日間摂取させたラットの肝臓の DT-diaphorase 活性は5～7倍に上昇した. なお血漿プロトロンビン時間の延長もすでに報告[1]したように認められた. 0.8% BHT を7日間摂取したラットでは血漿プロトロンビン時間の延長はいまだはっきり認められないが, DT-diaphorase 活性は4～5倍に上昇した. なおこの酵素活性の上昇は, 他の測定法, すなわち, 水素受容体として, DCPIP の代りに menadione と cytochrome *c* を使用した場合でも観察された. 1.5% BHT を7日間摂取させたラットを殺す24時間前にビタミン K_2 を投与した場合, すでに報告したようにプロトロンビン時間は回復するが, 上昇した DT-diaphorase 活性への影響は見られなかった.

一方, Table 2 に示したように, ジクマロールを投与したラットにおいては, プロトロンビン時間の延長は認められたが, 肝臓の DT-diaphorase 活性は対照ラットのそれと比較して有意差は認められなかった.

一方, *in vitro* においては, 10^{-8}～10^{-3}M の濃度における BHT の DT-diaphorase 活性に対する影響は認められなかった. ジクマロールはすでに報告[5]されていると同様に我々の実験においても 10^{-7}M で50%の阻害が認められた.

以上の結果から, BHT とジクマロールの DT-diaphorase に対する *in vivo* での作用は異なっていることが示された. 先に報告したように[2], BHT 摂取ラットの出血は雌ラットでは非常におこりにくい. 一方ジクマロール投与ラットのそれは両性同様に現われる. 従って, これらの結果から, 我々は BHT とジクマロールの出血のメカニズムは異った経路によってひきおこされるものと推論する.

さらに, BHT 摂取ラットにおいての肝臓中の DT-diaphorase 活性の上昇は, *in vivo* において, ビタミンK欠乏症におけるビタミンKの要求量が増大している結果であることを示唆する. つまり, 何らかの形で BHT はラットにおいてビタミンKの吸収を阻害している可能性が考えられる. 現在, 我々は, BHT 摂取ラットにおけるビタミンKの吸収を検討中である.

一方, Table 2 に示したようにジクマロール投与ラットにおける肝臓の DT-diaphorase 活性は対照ラットと比較してほとんど差は認められなかった. 従って, この結果は, ジクマロールは *in vivo* では DT-diaphorase

を阻害することによって出血効果を現わすのではないことを示唆する.

要　旨

BHT およびジクマロールの DT-diaphorase に対する影響を検討し，次の事が明らかになった．BHTは *in vivo* で5～7倍に DT-diaphorase 活性を上昇させたが，*in vitro* では影響は認められなかった．一方，ジクマロールは *in vivo* では影響は見られず，*in vitro* では強い阻害を示し，K_i は 10^{-7}Mであった．BHT 摂取ラットにおける肝 DT-diaphorase 活性の上昇は，ビタミンK欠乏症によるビタミンKの要求量の増大と関連した現象と考えられる．

文　献

1) 平賀興吾ら：東京衛研年報，25，631，1974
2) 鈴木英子ら：東京衛研年報，26-2，49，1975
3) Matschiner, J. T., R. G. Bell and J. M. Amelotti : *Biochim. Biophys. Acta.*, 201, 309, 1970
4) Ernster, L., C. Lind and B. Rase : *Eur. J. Biochem.*, 25, 198, 1972
5) Ernster, L., L. Danielson and M. Ljunggren : *Biochim. Biophys. Acta.*, 58, 171, 1962
6) Quick, A. J., M. Stanley-Brown and F. W. Bancroft : *Am. J. M.* Sci., 190, 501, 1935
7) Ernster, L : *Meth Enzymol*, 10, 309, 1967
8) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 38-39, 1978

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)を投与したラットの尿の突然変異誘起性について

藤田 博*, 平賀興吾*

Mutagenicity of Urine of the Rats Administered with Butylated Hydroxytoluene in Salmonella

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）の突然変異誘起性の検索の一環として行ったBHTの代謝物質の突然変異誘起性については前報に陰性の結果を報告[1]した．すなわち，BHTの代謝物質であるBHT-alcohol, BHT-aldehydeおよびBHT-acidの3化合物はAmesのmutation testにおいて突然変異誘起性を示さなかった．しかし，Daniel[2]ならびにLadomery[3]によればBHTの代謝物質は上記3化合物以外にも存在することが報告されている．それらの代謝物質についても突然変異誘起性の検索を進めたいと考え，代謝物質の混合物としての尿の突然変異誘起性の検索を試みた．

Durston[4]ならびにCommoner[5]によって尿中に排泄された代謝物質の突然変異誘起性をラット肝ホモジネート(S9)およびβ-グルクロニダーゼ等を用いて検出する方法が報告されている．そこで今回はBHTを腹腔および経口投与したラットの尿について突然変異誘起性をDurston[4]の方法によって検索したので報告する．

実験材料および実験方法

試薬 ジブチルヒドロキシトルエン(和光純薬), mutation testの陽性コントロールとしてフリルフラマイド(AF-2, 上野製薬)およびアセチルアミノフルオレン(AAF, 和光純薬)を用いた．グルクロン酸結合の分解にβ-グルクロニダーゼ（シグマ，タイプV-A，153,000ユニット/g）を用いた．

BHT投与ラットの尿の採取 コーンオイルに溶かしたBHT（500mg/kgおよび250mg/kg）を，コントロールはコーンオイル（5ml/kg）をJCL-Wistarラット雄（平均体重380g）に投与した．腹腔投与の場合は各群3匹とし，2日間連続投与し，2日目の投与後24時間の尿を代謝ケージにて採取した．経口投与の場合は各群一匹とし，1日目と3日目に2回投与し，その間3日間の尿を24時間単位で採取し混合した．採取尿は−20°に凍結保存し，mutation testを行う直前に解凍し，ろ過滅菌後，試料として用いた．

mutation test 代謝活性化にはフェノバルビタール（PB）で薬物代謝酵素系を誘導したラット肝ホモジネート9,000g上清分画（S 9-分画）を150μl/プレートで用いた．また，グルクロン酸結合の分解にはDurstonの方法に従いβ-グルクロニダーゼを50mg/mlの溶液として用いた．mutation testはAmes法[6]の変法[1,7]によった．*Salmonella typhimurium* TA98またはTA100の菌液0.1mlに0.5ml S9-Mix[1,7], 0.1ml β-グルクロニダーゼ溶液，および0.1mlの尿を添加し，37°20分間の前培養後，最少寒天培地[1]に播種した．ただし，S9-Mixまたはβ-グルクロニダーゼ溶液を添加しない場合には同量の0.85%食塩水を加えて行った．

結果および考察

BHTを投与したラットから採取した尿の *S. typhimurium* TA98およびTA100を用いたmutation testの結果を表1に示す．BHT（500mg/kgまたは250mg/kg）を腹腔投与または経口投与したラットの尿はコントロール群に比較してTA98, TA100共に復帰コロニー数の増加を示さなかった．これらの尿にβ-グルクロニダーゼを添加した場合，S 9を添加した場合そして両者を添加した場合もコントロール群に比較してTA98, TA100共に復帰コロニー数の増加は見られなかった．

尿にβ-グルクロニダーゼを添加した場合TA98に対して腹腔投与500mg/kg群，TA100に対して腹腔投与500mg/kg群，経口投与の500mg, 250mg/kg投与群の尿はHis⁻コロニーの集合体であるlawnにかなりの致死性を示した．これはサルモネラに対して致死性を有する化合物がBHTを投与したラットの尿中にグルクロン酸結合した形で存在していることを示すと考えられる．さらに，lawnに対する致死性はS 9を添加することによって失われることからこの化合物はS 9中の薬物

* 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. BHTを投与したラットの尿の mutation test

試料	復帰コロニー数／プレート[1]											
	TA98						TA100					
	腹腔投与(mg/kg)			経口投与(mg/kg)			腹腔投与(mg/kg)			経口投与(mg/kg)		
	0	250	500	0	250	500	0	250	500	0	250	500
尿	60	40	40	54	61	59	267	246	298	127	158	141
尿＋β-グルクロニダーゼ	57	34	31*	52	63	58	338	233	244*	133	139*	112*
尿＋S 9	48	43	49	70	69	71	235	284	248	134	126	123
尿＋S 9＋β-グルクロニダーゼ	57	67	59	73	72	83	255	252	279	119	137	154
コントロール												
水	28			68			221			123		
水＋S 9	63			60			215			90		
水＋β-グルクロニダーゼ	41			49			272			131		
陽性コントロール												
AF—2 (0.05μg)	352			—			770			—		
AAF (10μg)	10080			11200			2148			1456		

1) プレート3枚の平均　　* lawnに致死が見られた

代謝酵素系によって代謝されて致死性を失う化合物であると考えられる.

Ladomery[8] は腹腔投与した BHT は投与後4日目までに32%が尿中に排泄されると報告し, Daniel[9] は経口投与した BHT は同じく4日目までに25%が尿中に排泄されると報告している. 従って本実験条件下の連続2回腹腔投与後の24時間の尿と1, 3日目2回経口投与の3日間の尿中にはかなりの量の BHT 代謝物質が排泄されていると考えられるが, mutation test に用いた尿が0.1mlであったことから十分な量の代謝物質が含まれていないという可能性は否定できない. 尿の濃縮, 分画分け等の前処理を行なうことも検討する必要があろう.

結局, 500mg/kg および 250mg/kg の BHT を投与したラットの尿はそのまま, β-グルクロニダーゼの添加, S 9の添加および両者の添加によっても突然変異誘起性を示さなかった. ただし, 500mg/kg 投与群の尿はTA 98, TA100に対して致死性を示す化合物がグルクロン酸結合した形で存在していた.

要　旨

BHT を投与したラットの尿の突然変異誘起性を Ames の mutation test によって検索した.

BHT(500mg, 250mg/kg) を腹腔投与または経口投与したラット尿は β-グルクロニダーゼ, S 9処理によっても *S. typhimurium* のTA98, TA100 に突然変異誘起性を示さなかった.

文　献

1) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾：東京衛研年報, 28-2, 53, 1977
2) Daniel, J. W., J. C. Gage, and D. I. Jones : *Biochem. J.*, 106, 783, 1968
3) Ladomery, L. G., A. J. Ryan, and S. E. Wright : *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 388, 1967
4) Durston, W. E. and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, 71, 737, 1974
5) Commoner, B., A. J. Vithayathil, and J. I. Henry : *Nature*, 249, 850, 1974
6) Ames, B. N., J. C. McCann, and E. Yamasaki : *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
7) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素, 20, 1178, 1975
8) Ladomery, L. G., A. J. Ryan, and S. E. Wright : *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 383, 1967
9) Daniel, J. W. and J. C. Gage : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 3, 405, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 40-43, 1978

突然変異物質の突然変異誘起性に対するジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の影響

藤田　博*, 平賀興吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of Chemical Mutagens in the Salmonella/microsome Test

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）の細菌に対する突然変異誘起性については既に陰性の結果を報告した[1,2]．しかし，BHTにはショウジョウバエのγ線による劣性致死突然変異を増加する作用[3]，アセチルアミノフルオレンの発ガン性を減少[4]あるいは増加[5]させる作用，さらにRahimutula[6]のサルモネラに対するアセチルアミノフルオレンの突然変異誘起性を減少させる作用などの報告が見られる．すなわち，BHTは単独では突然変異誘起性等の作用を示さないが，他の化学物質の作用を変動させる効果を示す．BHTが食品添加物として使用されることから，他の要因との相互作用という意味で人体にとっても重要な問題となると考えられる．

今回，Amesのmutation test系を用いてアセチルアミノフルオレン，ベンツ(a)ピレン，2-アミノアントラセンおよびアフラトキシンB_1の突然変異誘起性に対するBHTの効果を検討したところ，BHT量により突然変異が増加あるいは減少する結果が得られ，Rahimutulaの報告[6]とは異なっていたので報告する．

実験材料および実験方法

試薬　アセチルアミノフルオレン（AAF, 和光純薬），ベンツ(a)ピレン（BP，和光純薬），2-アミノアントラセン（2AA，和光純薬），アフラトキシンB_1（AfB_1, Makor chemicals）以上突然変異誘起物質，BHT（和光純薬），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（DMSO，和光純薬）

mutation test　菌株は*Salmonella typhimurium* TA98を用いAmes[7]法の変法[1,8]により行った．菌液にDMSOに溶かした突然変異誘起物質（0.01～10μg），S9-Mix[1,8]., BHT（10～100μg）を添加し，37°で20分間前培養し，最少寒天培地[1]に播種した．S9はPBまたはPCBにより誘導したラット肝ホモジネートの9,000g上清分画（S9-分画）を用いた．S9-Mix. 0.5m*l*中のS9分画の量はPB-S9は150μ*l*を，PCB-S9の場合は50μ*l*を用いた．

結　果

AAF，BP，2AAおよびAfB_1の突然変異誘起性に対するBHT添加による復帰コロニー数の変化を図1～4に示した．AAF（図1）についてはPB-S9の場合5μg AAF 10μg BHTで復帰コロニー数はわずかな増加を示すが，それ以上のBHTでは減少した．また1μg AAFでは50μg BHTで復帰コロニー数が最高値に達し，BHT無添加の約10倍の値を示した．PCB-S9の場合には10μg AAF 100μg BHTまで除々に増加し，1μg AAFではBHTによる変化は見られなかった．

BP（図2）についてはPB-S9の場合は10μg BPでわずかな増加を示したが，1μg BPでは変化が見られなかった．PCB-S9では5μg BPで5μg AAF (PB-S9)の変化に類似した傾向を示し，1μg BPではほとんど変化は見られず，AAFとBPではS9誘導試薬によって得られた効果が対称的であった．

2AA（図3）はPB-S9の場合5μg 2AA 50μg BHTで約4倍の増加を示したが，100μg BHTでは50μgのときより減少した．1μg 2AAもほぼ同様な傾向を示し，50μg BHTで約18倍に増加した．PCB-S9の場合5μg 2AA，1μg 2AA共にBHTの増加に伴い復帰コロニー数は増加した．

AfB_1（図4）は0.05，0.01μg AfB_1共に復帰コロニー数は10～50μg BHTで最大に達しBHT無添加の時に比較して約2倍に増加し，PB-S9，PCB-S9共にほぼ同様の傾向を示した．

考　察

図1～4に示すようにAmesのmutation testを用いAAF，BP，2AAおよびAfB_1の突然変異誘起を検出

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

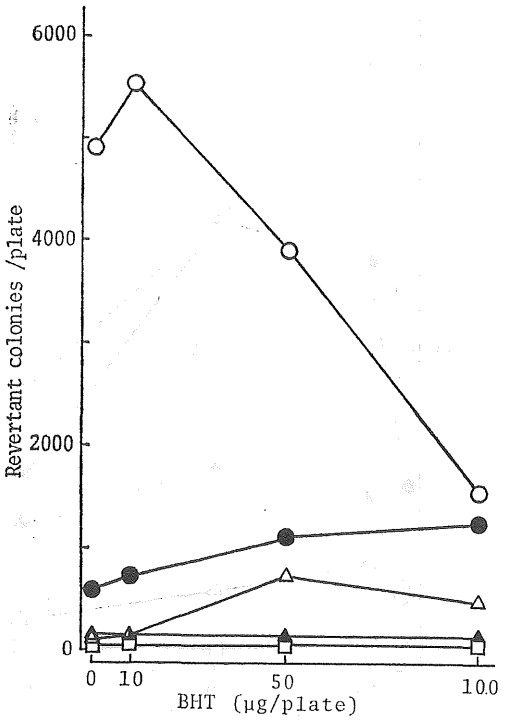


図 1. AAFの突然変異誘起性に対するBHTの影響
S. typhimurium TA98を用いた mutation test にBHTを添加した時の復帰コロニー数の変化を示す．○は5μg，△は1μgでPB-S9使用，●は10μg，▲は1μgでPCB-S9を使用した．□はコントロールを示す．

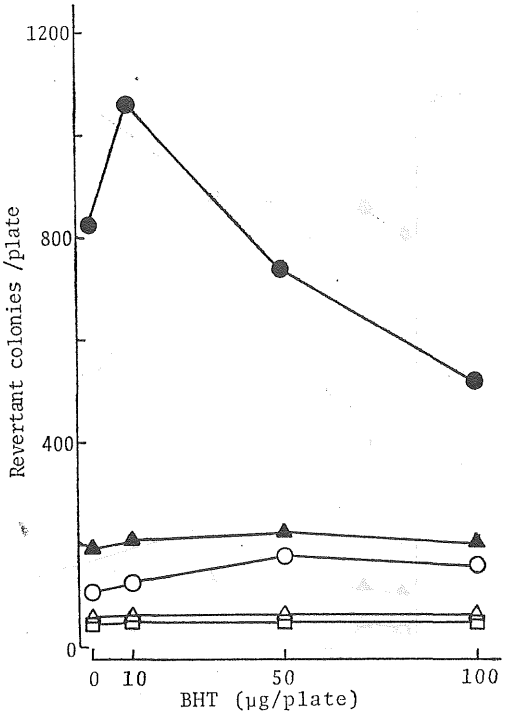


図 2. BPの突然変異誘起性に対する BHT の影響
S. typhimurium TA98を用いた mutation test にBHTを添加した時の復帰コロニー数の変化を示す．○は10μg，△は1μgでPB-S9使用，●は10μg，▲は1μgでPCB-S9を使用した．□はコントロールを示す．

する時にBHTが同時に存在することにより復帰コロニー数に変化が起ること が明らかとなった．すなわち，BHTの存在による復帰コロニー数はBHT量10～50μgで最高値を示し（2AA のPCB-S9 の場合は BHT 100μg 以上），それ以上の BHT は逆に復帰コロニー数を減少させる．特に 5μg AAF (PB-S9), 5μg BP (PCB-S9) で100μg BHT では明らかに無添加よりも復帰コロニー数は減少した．従って用いた突然変異誘起物質ならびに誘導したS 9の種類に多少の違いはあるが，突然変異誘起性の増加には最適濃度があり，ある濃度までは増加，それ以上の濃度では減少効果がある．

PB-S9とPCB-S9によるBHTの効果の相違は両S9中の薬物代謝酵素系に質的な違いがあり[9]，それぞれに対する突然変異誘起性物質の反応性の相違に起因するものと思われる．

BHT のこのような効果がどのような機構によるのかは明らかではないが，可能性としては，1) BHTの致死作用による復帰コロニー数の変化，2) DNA 損傷の修復系に対する作用，3)代謝酵素系に対する作用が考えられる．1)は mutation test において外見上 His^- コロニーの集合体である lawn にほとんど変化がないこと，予備実験として行った生菌数測定実験で生存率にほとんど変化がなかった[10]．2)については代謝活性化を必要としない突然変異誘起物質のフリルフラマイド，4-ニトロキノリン-1-オキシドおよびニトロソグアニジンに対してBHTの効果が見られなかった[10]．これらのことから1)と2)については一応除外されると考えられる．従ってもっとも高い可能性としては3)の場合で代謝活性化に用いられている肝ホモジネート中の薬物代謝酵素系に対する BHT の作用であろうと考えられる．

Yang[11]はBHTには薬物代謝酵素系の阻害作用があり，BHT がチトクローム P450 に結合すると報告し，Rahimutula[6] は mutation test においてBPの突然変異誘起性を下げることを報告し，薬物代謝酵素系の阻害作

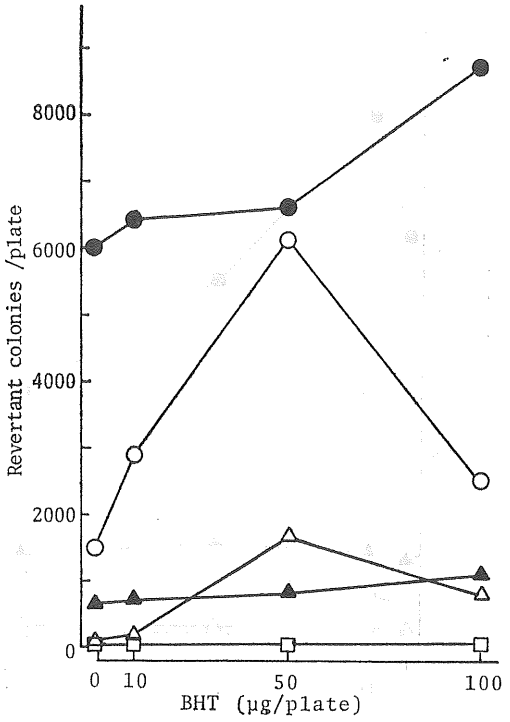


図 3. 2AA の突然変異誘起性に対するBHTの影響
S. typhimurium TA98を用いた mutation test にBHT を添加した時の復帰コロニー数の変化を示す．○は5μg，△は1μgでPB-S9使用，●は5μg，▲は1μgでPCB-S9を使用した．□はコントロールを示す．

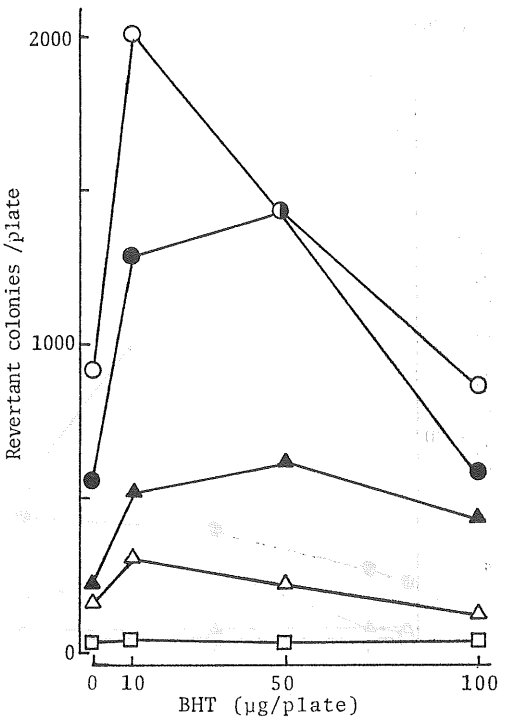


図 4. AfB_1の突然変異誘起性に対するBHTの影響
S. typhimurium TA98を用いた mutation test にBHT を添加した時の復帰コロニー数の変化を示す．○は0.05μg，△は0.01μg で PB-S9使用，●は0.05μg，▲は0.01μgでPCB-S9を使用した．□はコントロールを示す．

用が原因であるとした．彼らの mutation test は100μg/プレート以上のBHT で行われていることから本報告のAAF およびＢＰにおいて100μg BHT で見られた復帰コロニー数の減少は彼らの述べているBHT の薬物代謝酵素系の阻害作用によるものと考えられる．しかし，100μg 以下のBHT で見られた復帰コロニー数の増加はこのような作用では説明できないと思われる．

突然変異誘起性に影響を与えるBHT 以外の化学物質についていくつかの報告[12-15]が見られる．現在注目を集めている化学物質はトリプトファンの熱分解物中に見い出されたハーマンとノルハーマンである．Nagao[12]ならびに Matsumoto[13] はこれらの化学物質がＢＰ，ジメチルアミノアゾベンゼン等の突然変異誘起性を増加させると報告した．しかし，Levitt[14] は逆にＢＰの突然変異誘起性を減少させると報告し，両者の結果の相違は実験条件（S9 分画を採った動物の種差，前培養の有無）によるものであろうと述べている．また，Silverman は[15]胆汁酸中のリトコール酸が2AA の突然変異誘起性を増加させるが，AAF は減少させ，ＢＰは変化がないことを報告し，薬物代謝酵素系に対する作用を第一の原因と考えているが，リトコール酸の界面活性剤としての細菌の細胞膜に対する作用による化学物質の透過性の変化も予想している．以上のようにハーマンとノルハーマンに見られる研究者による結果の相違，すなわち増加と減少効果の二面性とリトコール酸に見られる 2AA での増加効果と AAF での減少効果の二面性（この結果は本報告の5μg 2AAF と5μg 2 AA での100μg BHT(図１，３）の結果によく一致する）は，現象的にはBHT の作用と一致する点が多いと思われることから，今後これらの化学物質と関連づけて検討を進めたい．

BHT による突然変異誘起性の増加効果については代謝酵素系との関連が予想されるが実体としてはまったく明らかではなく，1)少ない量（50μg/プレート以下）のBHT はこれらの酵素系を活性化する，2)突然変異誘起

性を持たない代謝物質への代謝を阻害する，3)本報告で用いられた突然変異誘起性物質の代謝物質は求電子的傾向が強いためにS9中の蛋白質に結合しやすい[16]，BHTがこの結合を阻害する等の可能性が考えられ，今後これらの点について検討して行く予定である．

要　旨

突然変異物質(AAF，BP，2AAおよびAfB$_1$)の突然変異誘起性に対するBHTの作用をAmesのmutation test系を用いて検討した．

BHTの添加により突然変異物質による復帰コロニー数が増加する場合と減少する場合が見られ，増加の最適BHT量は10～50μg/プレートであった．

文　献

1) 藤田　博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，53，1977
2) 小嶋昭江，藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，56，1977
3) Prasad, O. M. and O. P. Kamra : *Int. J. Radiat. Biol.*, 25, 67, 1974
4) Ulland, B. M., J. H. Weisburger, R. S. Yamamoto, and E. K. Weisburger : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 11, 199, 1973
5) Peraino, C., R. J. M. Fry, E. Staffeldt, and J. P. Christopher : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 15, 93, 1977
6) Rahimutula, A. D., P. K. Zachariah, and P. J. O'brien : *Biochem. J.*, 164, 473, 1977
7) Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki : *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
8) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20, 1178, 1975
9) Alveres, A. P., D. R. Bickers, and A. Kappas : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 1321, 1973
10) 藤田　博（未発表）
11) Yang, C. S., F. S. Strickhart, and G. K. Woo : *Life Sciences*, 15, 1497, 1975
12) Nagao, M., T. Yahagi, and T. Kawachi : *Proc. Japan Acad.* 53, 95, 1977
13) Matsumoto, T., D. Yoshida, and S. Mizusaki : *Mutation Res.*, 56, 85, 1977
14) Levitt, R. C., C. Legraverend, and D. W. Nebert : *B. B. R. C.*, 79, 1167, 1977
15) Silverman, S. J. and A. W. Andrews : *J. Natl. Concer Inst.*, 59, 1557, 1977
16) Takehisa, S. and S. Wolff : *Mutation Res.*, 45, 263, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 44-49, 1978

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）および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6カ月間摂取させたラットの病理学的検索

藤井　孝*, 阿部幸恵*, 長澤明道*, 三栗谷久敏*
矢野範男*, 湯澤勝廣, 平賀興吾*

Pathological Examination on Rats Fed with Butylated Hydroxytoluene and Linear Alkylbenzene Sulfonate for 6 Months

TAKASHI FUJII*, YUKIE ABE*, AKEMICHI NAGASAWA*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

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いる[1]．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用いられている界面活性剤である．BHT および LAS の毒性に関する報告は多数みられるが[2-15]，両者を併用してラットに摂取させる実験の報告は現在までみられない．そこで BHT および LAS を混合して飼料に添加，この添加飼料をラットに全生涯にわたって摂取させる実験を計画した．今回は本実験に並行して行なった同一濃度による6カ月間摂取試験の病理学的検索結果の報告である．

試験材料および試験方法

試料：BHT は和光純薬株式会社製の結晶性粉末を使用した．LAS は花王アトラス株式会社製ネオペレックスF-60を用いた．

実験動物および飼育環境：静岡実験動物農業協同組合にて barrier-system で生育された Slc：Wistar 系ラット雌雄を4週令で購入した．動物は室温25±1°C，湿度50～60%，換気回数を1時間に10回，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と床が網，他は板のステンレス製個別ケージに収容し，自動給水（細菌ろ過器経由）装置付ベルト式飼育架台で飼育した．飼料（日本クレア株式会社製固型飼料CE-2）と水は自由に摂取させた．

試験方法：BHT および LAS 投与期間は6カ月間とし，投与はこれらを飼料に添加して動物に自由に摂取させる方法とした．BHT および LAS の添加飼料中の濃度，1群のラット匹数，群の略号などを Table 1 に示した．投与は動物が5週令になった時点で飼料を添加飼料に切り替えて開始した．

Table 1. Design of BHT and LAS Feeding Studies

Group	No. of animals M	F	Materials and concentration in diets
Control	10	10	0.00% BHT and LAS
0.07T	10	10	0.07% BHT
0.20T	10	10	0.20% BHT
0.60T	10	10	0.60% BHT
LAS	10	10	0.20% LAS
0.07LT	10	10	0.07% BHT+0.20%LAS
0.20LT	10	10	0.20% BHT+0.20%LAS
0.60LT	10	10	0.60% BHT+0.20%LAS

病理学的検索方法：投与終了時，動物を断頭屠殺し放血後解剖した．肉眼的観察を行なった後，脳，下垂体，胸腺，心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，卵巣および子宮を摘出し重量を測定した．そのほか脊髄，耳下腺，顎下腺，大舌下腺，甲状腺（上皮小体を含む），気管，食道，膵臓，胃，大・小腸，膀胱，大腿骨，リンパ節などを摘出した．摘出した器官・組織は10%緩衝ホルマリン液で約6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．固定後の器官・組織は定法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し肝臓および腎臓は PAS 染色も行ない病理組織学的検索に供した．

結果および考察

試験期間途中の死亡例は認められなかった．

試験終了時の解剖では対照群を含む各群で下垂体の極く軽度な腫大，胸腺の点状出血，卵巣の水腫などが散見

* 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

されたが投与と関連した変化は認められなかった.

組織所見では Table 2 に示す如く投与に関連した変化が腎臓に両側性に認められた.

腎臓では髄質外帯から皮質の中間部にかけての尿細管中にエオジン好染, PAS 陽性の円柱が管腔を拡張し, 上皮細胞を変性あるいは扁平化して存在するのが認められた. 皮質では糸球体の萎縮, 糸球体とボウマン嚢外葉との癒着, 尿細管上皮細胞の変性・壊死, 糸球体および尿細管の基底膜の肥厚, 間質へのリンパ球浸潤などがみられ, これらの変化を示す大小の巣が散在していた. BHT 投与群雄では各変化とも用量・反応関係を示して出現したが顕著な変化は0.60T群のみにみられ, 0.07Tおよび0.20T群の変化は対照群と明らかな差異は認められず, とくに0.07T群は対照群よりやや軽度であった. 雌では対照群に変化はみられず投与群の変化もすべて軽度であり出現例数も少なかったため明らかな傾向は認められないが, 0.60T群に多くみられており軽微な用量・反応関係を示したと思われる. LAS投与群は対照群に比べ雄ではやや軽度であり雌ではほとんど同程度の変化を示していた. BHT・LAS 併用投与群雄では各変化とも用量・反応関係を示して出現し, 0.60LT群に顕著であった. 0.07および0.20LT群の変化は対照群と著明な差異はみられず, とくに0.07LT群は対照群よりやや軽度であった. 雌では0.60LT群にのみ軽度な変化が少数例みられた. 0.20T群とLAS群(0.20% LAS)とを比べると変化は雄ではT群がやや顕著であり雌では差異が認められなかった. T群とLT群の変化の程度, 頻度を比較すると雌雄とも0.07および0.20%では明らかな差異は認められなかったが0.60%ではT群がLT群よりやや顕著であった. このことからLASはBHT 単独投与時の変化を増強

Table 2. Microscopical Findings of Kidney

Materials[1] / Concentration (%)[2]		(Cont.) 0.00	BHT 0.07	BHT 0.20	BHT 0.60	LAS 0.20	BHT and LAS 0.07	BHT and LAS 0.20	BHT and LAS 0.60
No. of male rats		10	10	10	10	10	10	10	10
Urinary casts	NO[3]	4	3	2	–	7	6	5	–
	VS	4	6	2	1	1	2	–	–
	SL	2	1	6	4	2	2	5	6
	MO	–	–	–	5	–	–	–	4
Thickening of basement membrane	NO	–	3	3	–	5	3	2	–
	VS	5	6	2	–	2	5	3	–
	SL	5	1	5	7	3	2	5	10
	MO	–	–	–	3	–	–	–	–
Degeneration of tubular epithelium	NO	–	3	2	–	5	3	5	–
	VS	5	5	3	–	–	5	2	1
	SL	5	2	5	5	5	2	3	7
	MO	–	–	–	5	–	–	–	2
Atrophy of glomeruli	NO	3	5	3	1	7	5	5	–
	VS	4	4	2	2	2	3	1	2
	SL	3	1	5	7	1	2	4	8
No. of female rats		10	10	10	10	10	10	10	10
Urinary casts	NO	10	10	9	7	10	10	10	8
	VS	–	–	1	3	–	–	–	2
Thickening of basement membrane	NO	10	10	9	9	9	10	10	8
	VS	–	–	1	1	1	–	–	2
Degeneration of tubular epithelium	NO	10	10	9	3	9	10	10	8
	VS	–	–	–	6	1	–	–	2
	SL	–	–	1	1	–	–	–	–
Atrophy of glomeruli	NO	10	10	9	10	10	10	10	8
	VS	–	–	1	–	–	–	–	2

1) BHT : Butylated hydroxytoluene, LAS : Linear alkylbenzene sulfonate.
2) Concentration of materials in diets, BHT and LAS : Diets containing 0·20% LAS added each concentration of BHT.
3) NO : No change, VS : Very slight changes, SL : Slight changes, MO : Modorate changes.

しておらず，むしろやや減弱する傾向さえ示したと考えられる．腎臓で認められた変化は chronic nephritis[16]腎障害[17]，腎症[18,19]，nephrosis[20]，chronic nephropathy[21]などと記載されている像に類似しており，いずれも無処置ラットで加令とともに発症し経時的に変化が増強することが知られている．Coleman らは変化を chronic nephropathy とし，それを grade 1～4および末期の5段階に分類している[21]．今回の腎臓での変化をこれによって表わせば雄では0.60T群は grade 4 が3/10（10例中3例の意，以下同じ），grade 3が7/10，0.60LT群は grade 4が2/10，grade 3が8/10であり，対照群を含む他の各群は grade 2 が1，2例，grade 1が3，4例で残りは無変化に入るものであった．雌では0.60TおよびO.60LT群でも grade 1が1，2例で残りは無変化であり，そのほかの各群は全例が無変化であった．このように chronic nephropathy は投与に関連してとくに雄の0.60Tおよび0.60LT群に中等度の変化を示して頻発し，対照群，投与群とも雌よりも雄に際立って多く認められた．無処置ラットの“chronic nephropathy”は Slc：Wistar 系（本実験で使用したラットと同一系統）では5カ月令雄で6.2%（5/80），雌で2.5%（2/80）にみられ[19]，SD-JCL 系では圧倒的に雌よりも雄に多発し[17]，早期に発症する[18]との報告がある．今回検索したラットは全例が7カ月令であり無処置でも軽度なchronic nephropathy が散発する月令に達しており，投与群ラットの腎臓にはさらにBHTおよびLAS摂取による負荷が長期間連続して加わっていたと考えられる．このため高濃度群の0.60Tおよび0.60LT群雄ラットの腎臓は疲弊し老性変化を早め中等度の chronic nephropathy を発症したと思われる．さらに0.60Tおよび0.60LT群雄にのみ変化が顕著に現われたのは雄で0.20%と0.60%との間でBHT濃度(用量)とそれに反応する腎臓の組織変化の関係が或る閾値を越えたために顕現化したと推定される．また雌雄で変化の発現頻度および変化程度に大きな差異がみられたのは無処置ラットでの報告例または対照群での頻度および程度の雌雄差を反映したものと思われる．このため0.60Tおよび0.60LT群でも同一濃度でありながら雄にのみ変化が強く現われたと考えられる．

腎臓以外の器官・組織には投与に関連した変化はみられず，そのほかの著明な変化も認められなかった．

前回，0.005，0.02および0.32%BHT添加飼料をJCL：SD 系ラット雌雄に3，6および12カ月間摂取させたところ，6カ月間摂取終了時の検索では投与に関連した腎臓の変化はみられず[6]，今回の BHT 濃度 0.60%が腎臓に顕著な影響を与えたと思われる．また今回は肝臓に変化はみられなかったが，前回は0.32%群で3カ月に雄3/5，雌1/5，6カ月に雄1/5，12カ月に雄1/4が肝細胞の軽度な腫脹を示した[6]．腫脹は3カ月で頻度が高く，6カ月で低くなっており12カ月でも顕著な変化や変性・壊死を示しておらず，一過性の適応現象と思われた[6]．今回は0.60%と前回の約2倍の濃度であるが6カ月の時点で腫脹その他の変化は認められず，変化は6カ月以前に起り，この時点では消褪していたのではないかと考えられる．

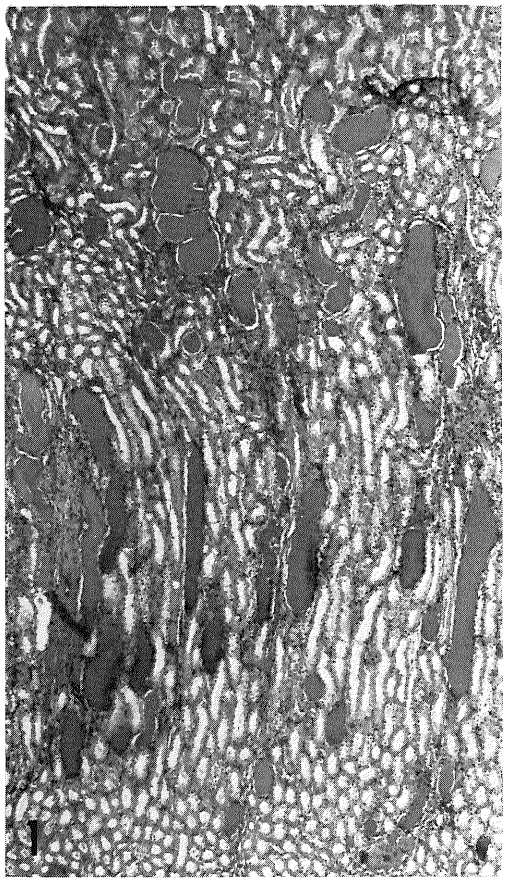
LASを0.04，0.16および0.60%添加した飼料をSlc：Wistar ラット雌雄に1，3，6 および12カ月摂取させる実験を行ない6カ月間摂取終了時の検索で投与に関連した変化を認めなかった[15]．今回の検索結果でも0.20% LAS 添加飼料摂取ラットに変化がみられず前回と同様の結果を示した．

以上，BHT および LAS 単独または両者混合の添加飼料をラット雌雄に6カ月間摂取させて病理学的検討を行なった．最高濃度の0.60% BHT および0.60% BHT +0.20% LAS 添加飼料摂取群ラット雄にのみ中等度の腎障害が頻発した．両群の発現頻度，変化程度の強弱を比較すると極く軽度ではあるが前者に顕著であった．0.60% BHT 摂取による腎障害は0.20% LAS を付加摂取しても増強する傾向は認められず，LAS は BHT の作用に対して著明な影響を及ぼさなかったと考えられる．

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) 福森信隆ら：東京衛研年報，26-2，22，1975
5) 市川久次ら：東京衛研年報，28-2，1，1977
6) 藤井　孝ら：東京衛研年報，28-2，19，1977
7) Deichmann, W. B., J. J. Clemmer, R. Rakoczy, and J. Bianchine : *A. M. A. Arch. Ind. Health*, 11, 93, 1955
8) Harman, D. : *J. Geront.*, 23, 476, 1968
9) Kay, J. H., F. E. Kohen, and J. C. Calandra : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 812, 1965
10) Oser, B. L. and K. Morgareidge : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 819, 1965
11) Buehler, E. V., E. A. Newman, and W. R. King : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 83, 1971
12) 米山允子ら：東京衛研年報，24，409，1972
13) 米山允子ら：東京衛研年報，24，449，1972

14) 米山允子ら：東京衛研年報, 28-2, 73, 1977
15) 藤井 孝ら：東京衛研年報, 28-2, 85, 1977
16) Snell, K. C. : *Pathology of Laboratory Rats and Mice* (Cotchin, E. and F. J. C. Roe eds.) 112, Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh. 1967
17) 村岡義博, 伊藤真喜子, 前田ユミノ, 林 裕造：実験動物, 26, 1, 1977
18) 田中寿子, 飯塚 壮：実験動物, 23, 204, 1974
19) 西部忠幸：奈医誌, 27, 1, 1976
20) Berg, B. N. : *Pathology of Laboratory Rats and Mice* (Cotchin, E. and F. J. C. Roe eds.) 479, Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, 1977
21) Coleman, G. L., S. W. Barthold, G. W. Osbaldiston, S. J. Foster, and A. M. Jonas : *J. Gerontl.*, 32, 258, 1977



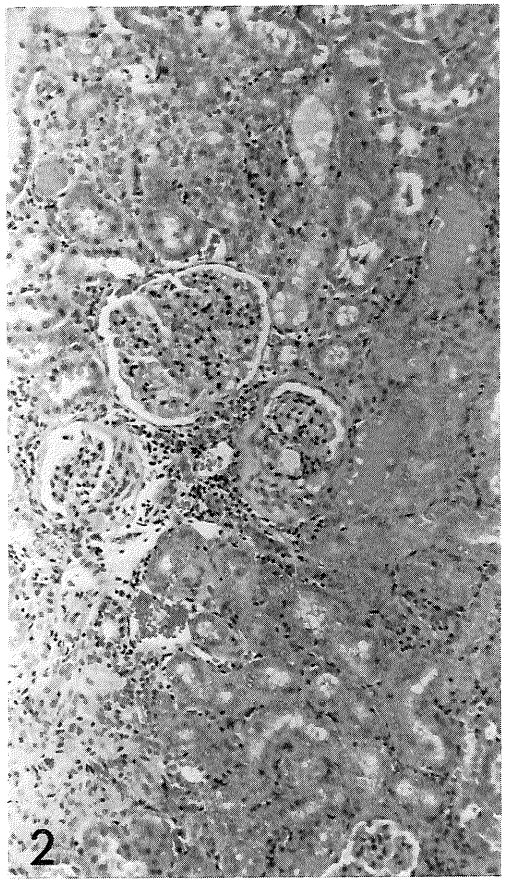


Photo 1. Neumerous urinary casts in kidney of male rat fed with 0.60% butylated hydroxytoluene (BHT) for 6 months. H–E stain × 100

Photo 2. Atrophy of glomeruli, degeneration of tubular epithelium and infiltration of lymphocytes in kidney of male rat fed with 0.60% BHT for 6 months. H–E stain × 100

Photo 3. Thickening of basement membrane of glomerulus and tubules in kidney of male rat fed with 0.60% BHT for 6 months. PAS stain × 200

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 51-54, 1978

LAS, ABS 投与ラット腎皮質における有機酸および有機塩基の取り込み

伊川三枝子*, 米山允子*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Up-take of Organic Acid and Organic Base by Renal Cortical Slice of Rats Treated with LAS and ABS

MIEKO IKAWA*, MASAKO YONEYAMA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

我々は，合成洗剤の界面活性剤として使用されている直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（以下LASと略す）と，分枝鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（以下ABSと略す）の種々の毒性試験[1-3]を行なってきたが，前回の毒性試験[2,3]では，腎臓，肝臓への影響を検索する手段として，臓器そのものの酵素活性を測定した．その結果，糖新生系の key enzyme の一つである Glucose-6-phosphatase, TCAcycleの*iso*citrate dehydrogenase, TCAcycle と解糖系を結ぶpyruvate の嫌気的代謝と関係を持つ Lactic dehydrogenase, Na, K-ATPase などの酵素活性に変化が認められた．

腎機能の検査法として，酵素を調べる方法[4-6]も多く報告されているが，機能との関連において把握するには難かしい点も多い．Phillips[7]らは，尿細管障害の検査に腎の糖新生系酵素活性の変動を調べるより，腎皮質切片による有機酸取り込み実験の方がより機能検査としての感度が良いと報告している．また，Berndt[8]も同様の報告をしていることから，尿細管の能動輸送を検索する一つの手段としてラット腎皮質切片を用いた有機イオンの取り込みを測定した．同時にLASの能動輸送への作用機序を調べる一環として，run-out（排泄）の実験および，N_2 下での取り込みの差異を検討したので報告する．

実験材料および方法

実験動物　SLC-Wistar 系ラット（SPF）の雄を4週令で購入し，1週間予備飼育後実験に供した．

投与方法，投与期間　(1)LAS, ABS を日本クレア製飼料(CE-2)に1.5%添加し，水と共に自由摂取させた．投与期間は1，2，4，12, 24週とし，1群4匹を使用した．

(2)LASを飲料水に0.4%になるよう溶解し，自由摂取させた．飼料はクレア固型飼料（CE-2）を自由摂取させ，投与期間は2，4，12週とし1群5匹を使用した．なお腎組織標を用いた有機イオンの run-out 実験，N_2 100%下での有機イオンの取り込み実験も，0.4%LAS 水溶液を12週間投与したラットを1群5匹使用した．

試薬　*p*-aminohippuric acid〔glycyl-1-^{14}C〕(^{14}C-PAH) 比放射能 44.75 mCi / mmol, *p*-aminohippuric acid〔glycl-2-^{3}H〕(^{3}H-PAH) 比放射能 1.395Ci/mmol, tetraethyl-ammonium bromide〔1-^{14}C〕(^{14}C-TEA) 比放射能 3.0mCi/mmol これらは，すべて New England Nuclear Corp 製を使用した．LAS, ABS は前報[3]に使用したものを用いた．その他の試薬はすべて和光純薬K. K製特級を使用した．

有機イオンの取り込み実験　ラットは断頭後腎蔵を採取し，直ちに冷却した0.25M Sucrose (1mMEDTA)に入れ，低温室（4℃）において皮質部分を Y-H slicer で厚さ0.5mmの腎皮質切片に切り，湿重量100～300mgを反応液 2.5m*l* の入った三角コルベンに入れ O_2 を100%封入し，30℃で反応させた．反応液は William ら[9]のものを改変した．組成はNa_2HPO_4, 6.66×10^{-3}M: NaCl, 8.7×10^{-2}M：KCl, 3.6×10^{-2}M：$CaCl_2$, 6.66×10^{-4}M：PAH or TEA, 1.2×10^{-5}M：pH 7.40 1時間 incubation 後0℃で反応を停止し，直ちに腎皮質切片をとり出し PAH および TEA を含まない反応液で10秒間洗浄し，10% trichloroacetic acid (TCA) で10% homogenate を作成する．反応液 0.1m*l* にも10% TCA 0.9m*l* を添加して，切片の homogenate と共に遠心する．10% homogenate は上清を10倍希釈して，反応液は上清をそれぞれ 0.1m*l* 採取して PAH および TEA の放射能を測定した．皮質切片 g 当りの放射能を反応液 m*l* 当りの放射能で割った値(Slice-to-medium ratio S/M)を取り込み量として表わした．

有機イオンの ron-uot 実験[10]　腎皮質切片 200mg を取り込み実験と同様に反応させ，90分間 incubation し

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

有機イオンを切片に取り込ませておく．皮質切片を反応液から取り出し洗浄しナイロンメッシュで作った網に入れる．有機イオンを含まない反応液5 m*l* をビーカーに入れ，その中に皮質切片を一定時間の間隔をおいて入れていき，それぞれの反応液中に流出した有機イオンの放射能を測定する．皮質切片は最後に取り込み実験と同様に処理して放射能を測定し，結果は皮質切片g当りの有機イオン残量を経時的に示した．

O_2 100%および N_2 100%封入下の有機イオン取り込み実験 同一ラットから皮質切片を2組作成し，取り込み実験と同じ反応液に入れ1組は O_2 100% 封入し，1組は N_2 100%封入した．その後の操作は，取り込み実験と同様に行ない，それぞれの S/M 値を求めた．

放射能の測定 試料は蒸留水と共に 0.5m*l* とし10m*l* のシンチレーター中で可溶化した後，Beckman 製 LS-355 型液体シンチレーションカウンターで測定し，外部線源法で計数効率を求めた．シンチレーターは Toluen-ephosphar-Triton 系[11] の emulsion 性を使用した．

実験結果

有機イオンの取り込み実験 (1)1.5% LAS，ABS 飼料投与ラットの腎皮質切片における有機イオンの S/M 値は Table 1 に示した．またこの種の実験は S/M 値にかなりの日変動があるとの報告[12,13]もあり，他の実験

Table 1. Uptake of PAH and TEA by Renal Cortical Slices of Rats Treated with LAS and ABS

		PAH up take (S/M ± S.E)	TEA up take (S/M ± S.E)
1 weeks	Control	1.86±0.24	3.58±0.31
	LAS	2.04±0.16	2.65±0.21*
	ABS	1.38±0.05	2.53±0.32*
2 weeks	Control	3.75±0.49	5.58±0.23
	LAS	4.05±0.34	5.30±0.20
	ABS	2.75±0.21*	6.78±0.32*
4 weeks	Control	3.67±0.41	6.44±0.47
	LAS	2.69±0.34	4.22±0.29**
	ABS	1.69±0.16**	3.75±0.66*
12 weeks	Control	2.00±0.10	4.75±0.34
	LAS	1.67±0.26*	4.73±0.28
	ABS	1.40±0.11**	4.02±0.25
24 weeks	Control	3.60±0.16	6.34±1.06
	LAS	2.51±0.17**	7.34±0.58
	ABS	2.33±0.10**	6.73±0.42

* $P<0.05$ ** $P<0.01$

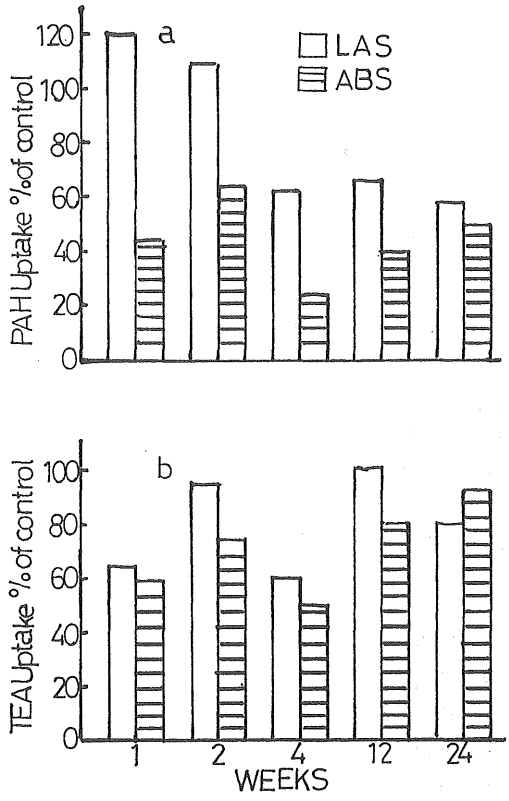


Fig. 1. A Time Course Study on the Effects of LAS and ABS on PAH(a) TEA(b) Uptake Calculated from Table 1

との比較のために対照群に対する投与群の S/M 値増減率を次の様に計算して Fig. 1 に示した．% of control value=100%−[(S/M) control−(S/M) treated]/ (S/M) control−1] ×100[9] LAS 投与群の PAH 取り込みは，1，2週目では対照群より高いが4週目には対照群の60%になりその後も回復しなかった．TEA 取り込みは，1，4週目にのみ有意の減少を認めた．ABS 投与群の PAH の S/M 値はすべての時期で有意に減少し，LAS 投与群より対照群に対する割合は常に低い値を示した．LAS 投与群の PAH 取り込みの対照群に対する割合は経時的に減少しているが，ABS 投与群は4週目において最低になり，以後徐々に減少率が少なくなっている．又ABS投与群のTEA取り込みはPAHと同じ経時的パターンを示しているが，対照群に対する減少率は PAH のそれより低く1，4週目にのみ有意差が認められた．

(2)0.4%LAS 水溶液投与ラットの腎皮質切片における有機イオンの S/M 値を Table 2 に，対照群に対する割合を Fig. 2 に示した．PAH 取り込みはすべてにおいて有意の減少を示し，対照群に対する減少率は2週目

Table 2. Uptake of PAH and TEA by Renal Cortical Slices of Rats Treated with LAS

		PAH up take (S/M ± S.E)	TEA up take (S/M ± S.E)
2 weeks	Control	4.76±0.27	8.86±0.15
	LAS	3.45±0.43*	5.65±0.71**
4 weeks	Control	3.54±0.10	5.49±0.20
	LAS	3.06±0.18*	3.98±0.24**
12 weeke	Control	6.02±0.65	7.86±0.37
	LAS	4.48±0.23*	6.87±0.34

* $P<0.05$ ** $P<0.01$

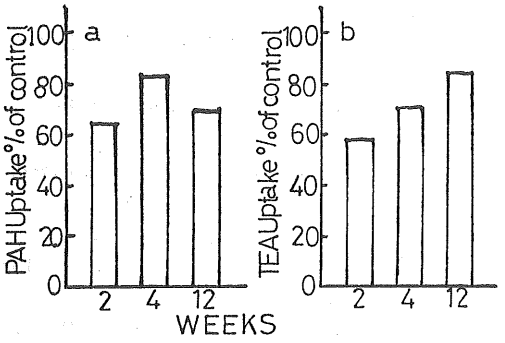


Fig. 2. A Time Course Study on the Effects of LAS on PAH(a) TEA(b) Uptake Calculated from Table 2

に最大になっている．TEA 取り込みも同様のパターンを示した．

有機イオンの ron-out 実験 いったん取り込まれた PAH, TEA の切片から反応液への流出を，腎皮質切片 1g 当りの有機イオン残量として片対数グラフを用いて表わした．(Fig. 3, Fig. 4) PAH 流出の型は，投与群，対照群との差異はなく最初の数分間の切片からの早い流出を示す部分と，その後直線的にゆっくり流出する部分の二つの成分が認められた．しかし TEA の流出パターンは，始めの早い流出部分が PAH ほど顕著に認められず，投与群の方が流出速度の低下の傾向を示した．

O_2 100%および N_2 100%封入下の有機イオン取り込み実験 O_2 100%，N_2 100% 封入下の対照群および投与群の S/M 値を Fig. 5 に示した．PAH S/M 値は，O_2 100%封入下では対照群との間に有意な差が認められるが，N_2 100%下では両者に差異は認められなかった．また TEA の S/M 値は両条件のいずれにおいても有意な差は認められなかった．

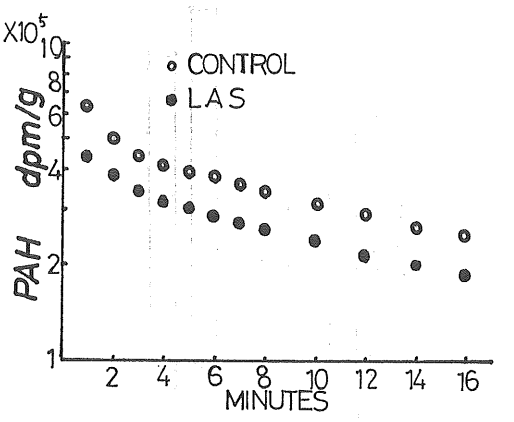


Fig. 3. Run-out of PAH from Renal Cortical Slices from Control and LAS Treated Rats

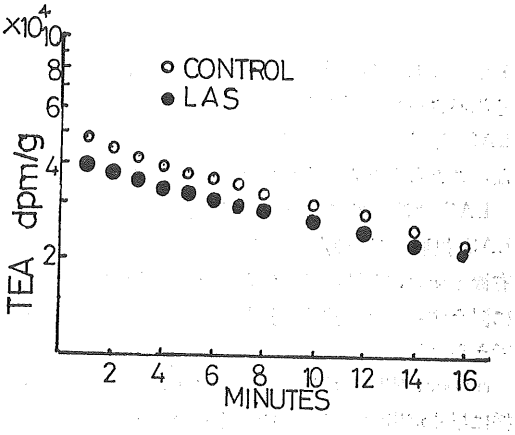


Fig. 4. Run-out of TEA from Renal Cortical Slices from Control and LAS Treated Rats

考　察

腎臓は複雑な構造を有し，様々な機能を営んでおり，腎毒性といっても腎機能全部が同時に同程度障害を受けるわけではないので，どの実験法が腎毒性に最も有効であるかを決めるのは困難である．我々は先の実験[2,3]で LAS, ABS による腎酵素の変動から腎代謝への影響を認めたので，今回は代謝エネルギーに多く依存し多種類の有機物質の吸収分泌を行なっている尿細管への LAS, ABS の影響を検討した．腎酵素への影響は ABS が LAS より強く 4 週目に最も激しい変化が現れたが，有機イオンの取り込み実験でも同様の結果が得られた．しかし酵素活性の変動は ABS が LAS より強く作用すること

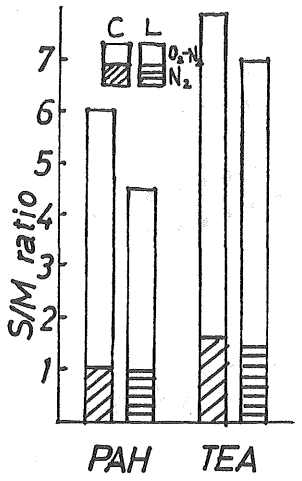


Fig. 5. Uptake of PAH and TEA by Renal Cortical Slices of Rats Treated with LAS

しか示唆しなかったが，LAS の PAH，TEA の取り込みパターンが ABS のそれと全く違っていたことから LAS と ABS の有機イオンの取り込みの作用機序が異なることも考えられるのでさらに検討する必要がある．

LAS 水溶液投与の場合，飼料混合の場合に比べて LAS 摂取量が約 1/2 であるにもかかわらず 2 週目から有機イオン取り込みが抑制された．(Fig. 2) これは飼料に混合するより水溶液で投与した方が吸収が良いためと考えられる．

run-out 実験の結果，PAH は Pegg らの報告[10]と同様に早く流出する成分とゆっくり流出する成分の二成分に区別できたが，TEA は早く流出する成分は認められなかった．Farah ら[14]によると PAH run-out の早い部分は細胞内でゆるく結合している PAH の流出によるものであり，直線的にゆっくり流出する部分は細胞内でより強く結合していることによると報告している．Fig. 3 が示すように対照群と LAS の反応係数[15]に差が認められないことから，LAS の PAH 取り込み抑制は，流出量の増加および細胞内に蓄積された PAH の結合性が弱いことによるものではないと考えられる．TEA の流出率は LAS によりわずかではあるが減少している傾向が認められるがさらに詳細な検討を要する．尿細管は有機酸や有機塩基を血管側より管腔側へ能動的に分泌するが，両者の輸送系は独立しており基底部膜には二種類の担体が存在するという[16]．また最近の研究では PAH の carrier-protein が近位尿細管の細胞膜に存在することを間接的に証明した実験[17-19]も多い．

N_2 封入下での有機イオンの S/M 値は対照群，投与群共にほぼ 1 を示したことから，N_2 封入下での有機イオンの取り込みは拡散によるものと考えられる．

腎皮質はミトコンドリアに富み好気的代謝を営み，その代謝エネルギーが能動輸送に用いられることは，cyanide や 2, 4-dinitrophenol によって有機イオンの分泌が阻害されることからも明らかであるが，LAS による有機イオン取り込みの抑制も好気的代謝抑制が一因であると推測される．他の原因としては，Na, K-ATPase の低下[3]や carrier-protein の合成阻害なども考えられるので今後さらに検討する必要がある．

文　献

1) 米山允子，藤井　孝，伊川三枝子：東京衛研年報，24，409，1972
2) 米山允子，馬渕依子，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2，105，1976
3) 伊川三枝子，米山允子：東京衛研年報，29-2，58，1978
4) Amador, F. and T. S. Zimmerman : *Ann. Int. Med.*, 62, 30, 1965
5) Chang, A. Y. and D. I. Scheider : *Biochim. Biophys. Acta*, 222, 587, 1970
6) 小林快三，加藤克己：日腎誌，11，755，1969
7) Phillips, R. and M. Yamauchi : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41, 407, 1977
8) Berndt, W. O. : *Environ. Health. Persect.*, 15, 73, 1976
9) William, M. W. and L. P. Gabriel : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 528, 1971
10) Pegg, D. G. and W. R. Hewitt : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 546, 1975
11) Patterson, M. S. and R. C. Green : *Analytical Chemistry*, 37, 854, 1965
12) Gross, R. J. and J. V. Taggart : *Amer. J. Physiol.*, 161, 181, 1950
13) Marchand, C. and M. Cantin : *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 47, 649, 1969
14) Farah, A. and M. Frazer : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 139, 120, 1963
15) Welch, L. T. and M. T. Bush : *Amer. J. Physiol.*, 218, 1751, 1970
16) 星猛：代謝，8，355，1971
17) Pegg, D. G. and J. B. Mook : *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 16, 1975
18) Krish, R. and G. Fleishner : *J. Clin. Invest.*, 55, 1009, 1975
19) Holohan, P. D. and N. I. Pessah : *J. Pharmacol.* Exp. *Ther.*, 195, 22, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 55-57, 1978

ラット肝臓脂質合成能に及ぼす LAS の影響

米山允子*, 伊川三枝子*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Effects of LAS on Incorporation of Acetate-1-^{14}C to Liver Lipids in Rats

MASAKO YONEYAMA*, MIEKO IKAWA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

LAS 投与ラットの肝臓における脂肪蓄積が，血清脂質量の低下をおこし，血清清澄化を示すことは，先に報告した[1]．肝脂質蓄積は，脂質代謝の異常によるものであり，その機構について数多くの文献[2,3]がある．私達は，今回，肝脂質合成能に及ぼす LAS の影響を調べるために acetate-1-^{14}C の脂質への取り込みを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）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　実験1　LAS を飲料水中に0.4%になるように溶解し，各々自由摂取させた．投与後，2週目に断頭，肝臓を脂質分析，脂質合成能の試験に用いた．

実験2　LAS を合成飼料に 0.4%になるように混和し，実験1と同様に試験に用いた．合成飼料の組成は次のとおりである．10%カゼイン，5%大豆油，4.0% 無機塩（ハーパー組成），0.45%ビタミン混合（パンビタン末），0.15%塩化コリン，80.4%シュークロース．

検査方法　肝臓脂質は，Folch らの方法[4]により抽出精製し，重量法で測定して総脂質量とした．脂質分画は，シリカゲルGに総脂質の1部をスポットし，石油エーテル：エーテル：酢酸（80：30：1）で展開した．展開後，ヨード蒸気中でプレート上の脂質の検出を行い，Phospho Lipid (P. L) は，Abramson らの法[5]で抽出し，他の脂質はエチルエーテルで抽出した．各脂質量の測定は，先に報告した方法[1]に従った．蛋白質の定量は，Lowry の方法[6]で行った．脂質合成能の測定　測定法は，小涼らの法[7]に従った．実験1，2のラットを断頭後，すみやかに肝臓を摘出，7℃低温室でYHスライサーを用いてスライスし，500mg を 0.5 μCi acetate-1-^{14}C（比放射能 704 μCi/mg NEN）を含む Krebs Ringer Phosphate buffer 中で3時間インキュベートし，1%酢酸ナトリウムを含む1%酢酸溶液で反応を停止した．冷水で洗滌した肝臓から，上記の方法に従って脂質を抽出精製し分画した．ヨード蒸気中で脂質を検出し，上記の溶媒で抽出後，溶媒を除去しトルエンシンチレーター 10m*l* を加え，液体シンチレーションカウンター（ベックマン）により放射能を測定した．

結　果

Table 1 に示す如く，実験1，2において体重，肝臓重量は，対照群に比べ有意差はなく，総脂質量は，実験1，2の両方とも対照群に比べ減少の傾向を示しているが，実験1では有意な減少を示した．各脂質分画を Table 2 に示した．中性脂肪（T. G）のみが実験1，2において有意な減少を示す他は，差がなかった．脂質への acetate-1-^{14}C の取り込みは，Table 3 に示した．総脂質，脂質 mg 当りの比放射能，蛋白 mg 当りの比放射能，体重100g 当りの全放射能，いずれも実験1，2において，LAS 投与群では，取り込みの増加を示し，特に実験2では，蛋白 mg 当りの比放射能，体重100g当りの全放射能は，有意な増加を示している．各脂質分画への acetate-1-^{14}Cの取り込みは，Table 4 に示した．実験1，2いずれも投与群のPL，TGへの取り込みに増加の傾向がみられ，実験1の LAS 投与群PLが有意な増加を示している．

考　察

先の報告で LAS の投与濃度は，1.8%という高濃度であったが，今回は濃度を0.4%におとし，飲料水に溶解させて摂取させた．LAS が脂質代謝に影響を及ぼすことは，高橋らの報告からも明らかである．低蛋白食による肝脂質の蓄積に与える LAS の影響を考慮し，0.4% LAS を低蛋白食に混和し摂取させた．総脂質量は，

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

実験1，2でも有意な減少，及び減少の傾向を示している．脂質分画の結果，中性脂質が実験1，2で有意な減少を示していることから中性脂質量の低下によるものと考えられる．脂質合成能について，取り込み量は，明らかに実験1，2において上昇し，各脂質への取り込み量は，リン脂質で増加し，コレステロール，エステル型コレステロールは，減少しているが中性脂質への取り込み量はかわらない．acetate-1-^{14}C 取り込み量の結果，リン脂質の比活性（実験1，control 960dpm/mg，LAS 1731.9dpm/mg 実験2，control 398.8dpm/mg，LAS 1111dpm/mg）が増加している．このことは，リン脂質の代謝回転の上昇を示していると考える．中性脂質の低下は，LAS が初期の脂質合成系に対する阻害的な作用の結果と考えられ更に短期実験による検討が必要である．又，脂質代謝と糖代謝は密接な関係にあり，脂質合成能の上昇，中性脂質の低下は，先に報告[9] した LAS

Table 1. Body Weight, Liver Weight and Liver Lipid

		Exp I		Exp II	
		Control	LAS	Control	LAS
Body Weight	(g)	182.2±8.3	172.0±8.4	138.6±2.8	137.8±5.1
Liver Weight	(g)	8.33±0.65	7.85±0.36	6.53±0.39	6.74±0.26
	(g/100g B.W)	4.57±0.18	4.56±0.14	4.70±0.22	4.89±0.08
Total Lipid	(mg)	369.5±20.9	335.6±24.5**	342.6±52.0	318.8±12.1
	(% Wet. Li)	12.2±1.0	12.7±0.5	15.3±0.9	14.6±0.3

Values are the mean ± SD. * Significantly different from control ** $P<0.1$

Table 2. Liver Lipid Composition

		Exp I		Exp II	
		Control	LAS	Control	LAS
P. L	mg/g Liv	18.9±1.6	20.1±1.3	16.8±0.9	16.3±0.7
	%	78.7±1.8	81.5±3.7	51.2±4.5	59.1±8.6
T. G	mg/g Liv	4.3±0.4	3.4±0.7**	14.7±3.1	11.0±3.7*
	%	17.4±1.3	13.9±2.8	45.4±6.1	38.6±8.8
CHO	mg/g Liv	0.9±0.1	1.0±0.2	0.9±0.5	0.6±0.1
	%	3.6±0.6	4.2±0.9	3.3±1.8	2.2±0.6

Values are the mean ± SD. * Significantly different from control * $P<0.2$ ** $P<0.1$

Table 3. Incorporation of Acetate-1-^{14}C into Liver Lipid

	Exp I		Exp II	
	Control	LAS	Control	LAS
Total Lipid, %[1]	6.52±1.75	13.82±3.38	2.90±0.74	7.64±2.84
Specific Activity[2]	1305.2±397.8	2032.1±1009.8	524.4±122.2	1500.8±484.8
Specific Activity[3]	281.8±80.7	429.4±234.2	160.8±29.3	446.7±151.7***
Total Activity[4] dpm × 10^{-3}	32.57±10.05	50.13±24.51	19.73±4.89	52.43±20.91***

1) (Total dpm in lipid of liver slice/total dpm incubated) × 100
2) dpm/mg lipid
3) dpm/mg protein
4) (Specific activity × total liver lipid/body weight) × 100
Values are means ± SD * Significantly different from control *** $P<0.01$

Table 4. Incorporation of Acetate-1-^{14}C into Each Liver Lipid

	Exp Ⅰ		Exp Ⅱ	
	Control	LAS	Control	LAS
Phospholipid				
% incorporation	1.92±0.55	3.70±0.52***	0.68±0.09	1.90±0.60
% of total lipid	29.38±1.78	31.52±7.01*	27.08±3.81	25.38±1.91
Cholesterol				
% incorporation	0.46±0.05	0.60±0.21	0.1±0.0	0.1±0.1
% of total lipid	8.16±2.04	5.40±1.94**	4.18±1.03	1.98±0.42**
Triglyceride				
% incorporation	1.02±0.56	1.70±1.26	1.00±0.32	2.22±1.22
% of total lipid	15.04±5.41	14.92±11.28	35.66±12.75	28.06±6.97
Triglyceride/Phospholipid	0.50±0.17	0.45±11.34	1.37±0.42	1.11±0.29
Cholesterol ester				
% incorporation	0.09±0.009	0.10±0.009***	0.10±0.00	0.1±0.00
% of total lipid	1.52±0.62	0.94±0.31**	3.93±1.06	1.82±0.8***

Values are the mean ± SD * Significantly different from control
* $P<0.2$ ** $P<0.1$ *** $P<0.01$

のG6P ase, G6PDHに対する抑制との関係が示唆される. LAS 1.8%投与ラット肝臓では脂肪の有意な蓄積を示した. 飲料水, 低蛋白飼料という違いはあるが, 0.4% LASでは, 逆に低下の傾向を示している. 従って, LASは高濃度で脂肪の蓄積をうながし, 低濃度で蓄積を阻害すると考えられる.

文 献

1) 米山允子：東京衛研年報, 28-2, 109, 1977
2) B. Lombardi., P. Pani and F. F. Schlunk : J. Lipid. Res., 9, 437, 1968
3) 矢ヶ崎一三：農芸化学, 49, 387, 1975
4) J. Folch., M. Leesand C. H. Sloane Stanley : J. B. C., 226, 497, 1957
5) D. Abramson and M. Bleicher : J. Lipid. Res., 5, 628, 1964
6) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr and R. J. Randall : J. B. C 193, 265, 1951
7) M. Ogura : Agr. Biol Chem., 36, 1159, 1972
8) 高橋省：東京衛研年報, 25, 647, 1974
9) 米山允子：東京衛研年報, 27-2, 105, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 58-63, 1978

種々の界面活性剤の亜急性毒性試験
肝，腎酵素への影響

伊川三枝子*，米山允子*，中尾順子*，平賀興吾*

Subacute Toxicity of Detergents
Effect of Detergents on Liver and Kidney Enzymes in Rats

MIEKO IKAWA*, MASAKO YONEYAMA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

合成洗剤の環境汚染が問題とされる中で，各種界面活性剤のウニ卵[1]や細菌[2]の発育に及ぼす影響を比較検討した報告はあるが，ラットにおける比較毒性試験はほとんど行なわれていない．我々は直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）と分枝鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS）の亜急性毒性試験[3,4]を行なってきた結果，血清生化学的検査項目のみならず，肝臓，腎臓の酵素活性にも変化が認められた．そこで我々は，LAS，ABS に加えて Sodium Dodecyl sulfate（SDS），脂肪酸ナトリウムの4種類の界面活性剤の比較毒性試験を行ない，肝臓と腎臓を中心に生体に与える影響を検討したので報告する．

実験材料および方法

実験動物　Wistar JCL 系雄ラット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．実験開始時の平均体重は118g であった．

試料　LAS-花王アトラスK. K製ネオペレックス P-60(Lot. No. 171)・ABS-和光純薬 K. K (Lot. No. 199-07445)，SDS-和光純薬 K. K (Lot. No. 196-02335)・脂肪酸ナトリウム—太陽油脂ＫＫの粉末石けん，脂肪酸ナトリウム含量98%（牛脂80%，ヤシ油10%，米ヌカ10%）(FA)

投与方法および投与期間　ABS，LAS，SDS，FA を日本クレア製飼料 CE-2 に 1.5% になるように添加し，自由摂取させた．投与期間は，2，4，12週とし投与群対照群共各期間について5匹ずつ用いた．飲料水も自由摂取させた．飼育条件は室温25±1℃，湿度50～60%，照明時間6～18時とした．

検査方法　1)体重，飼料摂取量，器官重量の測定　12週間投与のラットについて，飼育期間中体重，飼料および試料摂取量を測定し症状観察を行なった．ラットは断頭採血後解剖し，肝臓腎臓を採取し重量を測定した．

2)血清生化学的検査　総たんぱく量（ＴＰ），グルコース量（GLU），尿素窒素量（UN），総コレステロール量（CHO），アルブミン量（ALB），グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT），グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素（GOT），アルカリフォスファターゼ(Alp)，コリンエステラーゼ(ChE)，について日立自動分析装置 M400 を用いて測定した．

3)肝臓，腎臓酵素の測定[5]　腎臓は皮質と髄質に分離し，それぞれ10%ホモジネートとしたものを使用した．肝臓の測定酵素：グルコース6フォスファターゼ，（G6Pase），アシッドフォスファターゼ（Acp），グルコース6フォスフェト脱水素酵素（G6P-DH），乳酸脱水素酵素（LDH），イソクエン酸脱水素酵素（IDH），腎臓の測定酵素：G6Pase，5′ヌクレオチダーゼ(5′-Nucleotidase) Mg-ATPase，Na，K-ATPase，LDH，IDH，蛋白質の定量はLowry ら[6]の方法に従った．

実験結果はすべて Student's *t*-test により推計学的検討を行なった．

実験結果

体重，飼量摂取量，器官重量　Table 1 に示すようにABS，LAS，SDS は体重増加が，対照群に比べて有意に抑制され，FA にのみ増加の傾向がみられた．ラット一匹当りの1日の飼料摂取量はいずれの投与群でも対照群に比べて差はなかった．Table 2 に示すように，肝臓の絶対重量は有意な差が認められないが，体重比重量では投与2，4週でFAを除くすべての群に有意な増加が認められ，12週目では SDS，ABS が有意の増加を示した．腎重量は ABS のみが2，4週目に有意な減少を示しているが，体重比重量では，SDS が2，4，12週で増加の傾向を示し，ABS が2週目で減少，4，12週目で増加の傾向を示した．

四清生化学的検査　結果は Table 3 に示した．UN

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

Table 1. Body Weight Gain and Food Consumption of Rats on Administration of Detergents

	Initial Body wt. (g)	Final Body wt. (g)	Body wt. Gain (%)	Food g/rat/day	Sample g/kg B.W./day
Control	118.8±1.72	308.0±4.10	259.3±2.37	14	0.682
FA	119.8±1.59	320.8±6.34	268.1±7.33	13	0.608
SDS	113.6±3.67	270.2±4.58	238.8±4.65	14	0.777
LAS	117.8±2.06	279.4±5.61	236.4±4.06*	13	0.698
ABS	117.8±1.39	273.4±5.23	225.5±5.16*	12	0.659

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

は LAS 4週にのみ有意の増加がみられ，他の投与群は対照群に比べ有意の差は認められなかった．Alp は SDS，LAS，ABS の2，4，12週において有意な増加を示し，FA は12週目に有意な減少を示した．CHO は2，4週目の FA を除くすべての投与群で有意の減少が認められたが，12週目になると ABS のみが有意に減少した．TP は ABS が2，4週に，LAS が4，12週目に，FA が12週目に有意な減少を示した．ALB は ABS が2，4週に，LAS が4，12週に，FA が2，12週に有意な減少を示した．GPT については，ABS が4週，LAS が 2，4，12週，SDS が2，12週に有意な増加を示した．GLU，GOT はどの例についても有意な差は認められなかった．

肝臓，腎臓の酵素学的検査 得られた結果はホモジネイトの蛋白量(mg)当りの活性とし，Table 4，5 に示した．G6Pase は肝臓，腎臓共に2，4週の ABS，LAS で有意な減少が認められたが，肝臓では12週の LAS，SDS に，腎臓では12週の SDS に有意な減少を認めた．また2週目で抑制の割合は腎臓より肝臓の方が大であった．LDH は，肝，腎髄質で，2，4週の ABS で有意な減少を示しているが（腎皮質には有意差ない）12週目になると腎皮質，腎髄質で有意な増加を示した．12週の髄質中の LDH は，SDS，FA，LAS においても有意に増加した．皮質中 LDH は12週の LAS のみが有意の増加を示した．IDH については，肝，腎皮質ともに，2週目の ABS，LAS に，4週目の ABS，LAS，SDS に12週目の ABS，LAS（肝のみ），SDS，FA（肝のみ）有意な増加が認められた．しかし髄質中の IDH は2週の ABS，LAS で有意な減少を示し，4週には有意差がなくなり，12週目になると LAS，FA において有意な増加を示した．肝の Acp は2週目に ABS，4週目には ABS，LAS に有意な減少を示したが，4週目の SDS は有意の増加を示した，肝の G6P-DH は，2，4週の ABS，LAS に顕著な減少が認められたが，12週では差がなくなり，ABSでは増加の傾向を示した．腎皮質における 5′-Nucleotidase は ABS，LAS で各期間共有意な減少を示し，12週では SDS も有意な減少を示した．Mg-ATPase は4週目の ABS で腎皮質，髄質ともに有意の減少を示し，12週目 SDS では，皮質で減少し，髄質で増加した．また Na，K-ATPase は皮質中ではどの投与群も対照群との間に有意な差が認められなかったが，髄質では2週の ABS，LAS，4週の SDS，ABS，12週の SDS に有意な減少が認められた．

考　察

各種界面活性剤の3ヶ月の亜急性毒性試験を行ない肝臓，腎臓の酵素活性を中心に経時的に調べた．体重増加は，対照群に比べて，LAS，SDS，ABS と増加率が減少しており，FA のみが増加の傾向を示した．肝重量の顕著な増加は認められなかったが，体重比重量では2週目から SDS，LAS，ABS に有意の増加が認められることから，FA 以外の界面活性剤は肝臓を肥大させる．我々が先に行った LAS，ABS の亜急性毒性試験[1,2]において血清 Alp の上昇が認められたが，今回の実験でも FA を除いたすべての投与群で2週目から Alp の上昇がみられた．また腎皮質中の Alp も ABS，LAS で顕著な上昇が認められた．血清 Alp の臓器由来については，実験[7,8]が行なわれているが，まだ解明されていない．また ABS，LAS，SDS において，血清中のコレステロールが低下し，GPT が上昇していることからも肝細胞の障害が推測される．渡[9]らも LAS，および高級アルコール系洗剤を飲ませたマウスの肝障害を超微形態的に観察し肝細胞の病的変化を報告している．肝臓への影響は FA を除く SDS，LAS，ABS に肝肥大がみられ，G6Pase，G6P-DH の低下，IDH の上昇等から肝機能の異常が示唆された．腎臓は糸球体ろ過，尿細管再吸収，排泄の過程を営む重要な臓器であるが構造が複雑で部位による差異も大きい．前回の毒性試験においていくつかの酵素に変化を認めたので今回は皮質と髄質に分離し酵素活性を測定し薬物の腎機能への影響を調べた．腎皮質の代謝は遊離脂肪酸化と糖新生を特徴とし

Table 2. Organ Weight of Rats on Administration of Detergents

		Body Weight	Liver Weight		(R) Kidney Weight		(L) Kidney Weight	
		(g)	g	g/100g B.W.	g	g/100g B.W.	g	g/100g B.W.
2 Weeks	Control	187.80±10.257	8.04±0.595	4.28±0.145	0.69±0.019	0.37±0.014	0.68±0.031	0.36±0.021
	FA	182.20±8.289	7.54±0.566	4.14±0.154	0.66±0.036	0.36±0.017	0.68±0.044	0.37±0.019
	SDS	182.00±10.536	8.76±0.883	4.81±0.299**	0.68±0.061	0.37±0.028	0.69±0.023	0.38±0.021*
	LAS	173.60±10.502	8.39±0.787	4.83±0.189**	0.64±0.075	0.37±0.024	0.62±0.049*	0.36±0.009
	ABS	156.40±6.387**	7.31±0.425	4.67±0.168**	0.54±0.036**	0.35±0.010*	0.54±0.028**	0.35±0.006
4 Weeks	Control	229.40±11.327	9.72±0.846	4.23±0.205	0.77±0.075	0.34±0.020	0.79±0.052	0.34±0.011
	FA	230.20±9.834	9.63±0.532	4.18±0.105	0.79±0.056	0.34±0.027	0.80±0.064	0.35±0.016
	SDS	220.60±11.739	10.27±0.878	4.65±0.164**	0.81±0.065	0.37±0.013**	0.79±0.073	0.36±0.020*
	LAS	211.00±10.607**	9.78±0.764	4.63±0.178**	0.72±0.030	0.34±0.010	0.73±0.062	0.35±0.014
	ABS	163.80±7.294**	7.94±0.615	4.84±0.194**	0.57±0.031**	0.35±0.016	0.58±0.027**	0.36±0.019*
12 Weeks	Control	308.00±9.165	10.18±0.532	3.30±0.130	0.95±0.015	0.31±0.008	0.95±0.006	0.31±0.010
	FA	320.80±14.167	10.33±0.557	3.22±0.096	0.98±0.047	0.31±0.014	0.99±0.056	0.31±0.018
	SDS	270.20±10.232	10.91±0.594	4.04±0.098**	0.87±0.041	0.32±0.008	0.87±0.042	0.32±0.006
	LAS	279.40±12.542**	10.18±0.523	3.64±0.054	0.89±0.046	0.32±0.009	0.92±0.050	0.33±0.011*
	ABS	273.40±11.696**	10.48±0.609	3.83±0.117*	0.94±0.031	0.34±0.014**	0.94±0.027	0.35±0.015**

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

Table 3. Biochemical Values in Serum of Rats on Administration of Detergents

		UN	Glu	Alp	CHO	TP	ALB	GOT	GPT
2 Weeks	Control	22.00±1.414	116.80±11.649	70.60±8.877	51.40±3.050	60.80±0.837	46.20±0.837	127.20±11.189	37.60±6.348
	FA	19.75±0.500*	118.00±2.160	76.00±7.165	59.33±11.015	60.25±7.365	44.25±0.915**	134.75±11.117	41.00±10.739
	SDS	21.60±1.817	115.40±15.076	111.20±8.758**	43.60±4.037**	61.60±2.302	46.40±2.302	129.80±18.308	48.40±7.829*
	LAS	22.80±1.643	111.00±6.442	112.40±13.089**	37.60±13.831	55.60±7.162	44.40±1.673	119.40±13.903	56.80±10.402**
	ABS	23.75±1.893	104.5±11.561	102.00±6.481**	21.00±8.042**	51.50±5.508**	43.75±1.258**	117.00±22.583	37.75±8.500
4 Weeks	Control	25.20±0.837	126.40±8.620	70.40±4.159	53.00±2.828	67.00±1.000	50.40±0.894	131.80±11.862	48.00±7.714
	FA	24.00±1.414	132.40±6.693	71.00±6.083	52.40±3.363	67.40±1.673	50.20±0.837	131.40±14.809	45.80±4.087
	SDS	23.40±1.817	128.40±6.693	92.40±9.343**	40.40±1.517**	68.00±1.225	51.20±0.837	128.20±10.183	51.20±4.087
	LAS	27.60±0.894**	125.80±6.140	107.80±5.586**	43.40±1.146**	65.40±1.140*	49.00±1.000*	137.40±13.240	75.60±5.505**
	ABS	26.60±1.949	120.60±6.542	93.00±11.402**	33.60±3.362	64.00±1.000**	48.20±1.095**	140.60±14.622	56.80±1.095*
12 Weeks	Control	21.00±1.225	106.40±7.893	58.00±2.828	57.40±0.894	70.20±1.643	52.00±1.225	126.40±7.335	50.00±5.431
	FA	19.60±0.548	100.20±10.498	49.60±5.320*	61.00±3.808	67.40±1.673*	49.80±0.837**	117.80±6.686	44.00±3.873
	SDS	22.20±0.837	91.20±16.223	83.80±12.736**	52.00±6.442	68.20±5.762	50.60±3.130	131.00±4.416	75.20±16.690*
	LAS	22.40±1.140	97.60±7.301	91.40±10.922**	52.20±6.380*	65.60±3.578*	49.20±2.168*	119.80±5.975	81.60±4.669**
	ABS	21.40±1.140	108.40±13.903	75.80±7.694**	51.60±2.302**	70.40±3.362	52.40±2.191	117.80±4.658	60.60±9.659

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

Table 4. Liver Enzyme Activities of Rats on Administration of Detergents

		G6Pase[a]	T-Acpase[b]	G6P-DH[d] ($X10^{-3}$)	LDH[d] ($X10^{-3}$)	IDH[d] ($X10^{-4}$)
2 Weeks	Control	3.24±0.331[c]	1.64±0.250	49.19±5.121	5.13±0.401	7.87±0.932
	FA	3.62±0.274	1.79±0.177	45.72±4.482	5.31±1.322	8.05±0.941
	SDS	3.75±0.474	1.66±0.374	38.14±7.304*	6.91±1.129**	8.23±0.988
	LAS	1.20±0.268**	1.52±0.302	18.07±1.674**	6.19±2.059	10.20±1.899*
	ABS	1.56±0.095**	1.30±0.124*	15.06±6.621**	3.82±0.962**	10.11±0.632**
4 Weeks	Control	2.58±0.439	3.41±0.182	44.00±8.280	5.18±0.306	8.39±1.921
	FA	3.00±0.545	3.40±0.188	39.54±4.753	5.27±0.519	8.20±1.416
	SDS	2.96±0.415	3.77±0.245*	42.13±3.530	7.40±0.827**	10.80±0.649*
	LAS	1.85±0.346*	2.60±0.529*	20.92±5.207**	4.27±0.957	11.33±0.675*
	ABS	1.27±0.370*	2.64±0.323**	13.78±8.895**	3.86±0.469**	11.21±1.690*
12 Weeks	Control	4.67±0.542	5.82±0.303	24.29±9.016	9.91±0.390	7.21±0.694
	FA	4.78±0.562	5.76±0.582	24.43±8.721	9.72±0.299	8.26±0.731*
	SDS	2.76±0.339**	4.50±0.203	12.60±1.179*	11.16±0.328	10.67±0.985**
	LAS	2.81±0.324**	4.54±0.501	13.06±7.437	8.76±0.159	9.09±1.091*
	ABS	4.25±0.403	5.32±0.575	32.28±25.12	10.81±0.349	9.52±1.024**

a) μ moles/mg protein/hr b) m moles/mg protein/hr c) values are the mean ± S.E.
d) ΔE/min * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table 5. Kidney Enzyme Activities of Rats on Administration of Detergents

			G6Pase	5'Nucleotidae	Mg-ATPase	Na, K-ATPase	LDH	IDH
2 Weeks	Control	C	4.91±0.417	4.09±0.461	9.05±0.642	8.04±0.487	2.14±0.271	0.72±0.075
		M			11.09±1.915	15.64±0.950	2.86±0.411	0.90±0.125
	FA	C	4.75±0.454	4.00±0.267	10.11±0.818	8.07±0.701	2.14±0.192	0.78±0.091
		M			10.06±1.286	4.07±1.438	2.83±0.427	0.88±0.185
	SDS	C	4.75±0.290	3.62±0.212	9.57±0.857	7.72±2.983	1.97±0.182	0.79±0.042
		M			10.70±1.222	15.10±1.798	3.03±0.167	0.87±0.161
	LAS	C	4.11±0.348*	3.39±0.299*	9.28±1.961	8.11±2.018	1.89±0.137	0.86±0.054**
		M			10.58±1.170	12.20±1.225**	2.49±0.240	0.58±0.124**
	ABS	C	4.09±0.592*	3.27±0.473*	9.38±1.156	6.45±0.754**	2.16±0.183	0.88±0.044**
		M			12.15±1.723	11.12±1.896**	2.31±0.630*	0.57±0.147**
4 Weeks	Control	C	4.61±0.223	3.10±0.306	9.64±0.648	5.12±0.803	3.04±0.416	0.73±0.028
		M			13.92±1.540	13.58±1.327	4.16±0.342	0.95±0.050
	FA	C	4.48±0.508	3.11±0.351	9.74±1.160	4.89±0.203	2.89±0.441	0.76±0.041
		M			13.08±1.043	11.43±1.836	4.10±0.385	0.89±0.037
	SDS	C	4.71±0.275	2.90±0.246	8.98±0.820	4.79±0.569	2.68±0.150	0.80±0.031**
		M			14.36±1.335	11.30±1.100*	4.41±0.423	0.92±0.072
	LAS	C	3.75±0.211**	2.62±0.133*	9.04±1.259	5.45±0.191	2.78±0.443	0.85±0.090*
		M			13.22±0.987	10.87±2.514	3.94±0.121	0.92±0.049
	ABS	C	3.69±0.206**	2.31±0.247	7.57±0.732**	4.02±0.892	2.78±0.222	0.85±0.065**
		M			11.68±1.401**	9.80±0.219**	3.38±0.084*	0.88±0.041*
12 Weeks	Control	C	4.32±0.309	3.04±0.169	8.490±0.687	4.692±1.029	4.85±0.330	0.97±0.023
		M			11.884±1.040	8.436±2.679	6.91±0.231	0.74±0.021
	FA	C	4.72±0.785	3.04±0.411	9.076±0.465	5.751±0.926	5.12±0.471	0.96±0.036
		M			13.768±0.702**	8.106±0.293	7.87±0.193**	0.91±0.055**
	SDS	C	3.75±0.337	2.41±0.134*	7.248±0.434**	3.945±1.257	4.88±0.284	1.06±0.038*
		M			13.372±0.753*	6.512±0.809*	7.85±0.174**	0.74±0.023
	LAS	C	3.95±0.642	2.34±0.189**	8.132±0.511	4.407±1.428	5.38±0.339*	1.01±0.041
		M			12.324±2.134	9.924±1.818	7.86±0.192*	0.87±0.057**
	ABS	C	5.11±0.978	2.53±0.188**	7.964±0.324	3.993±0.732	5.90±1.044*	1.08±0.039**
		M			13.332±1.543	9.188±1.818	8.04±0.123**	0.81±0.024

C : Cortex M : Medulla Values are the mean ± S.E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$

た好気的なものである[10,11]．糖新生の最終段階に作用する Glucose-6-phosphatase 活性を測定したが，LAS，ABS で著しく低下していた．しかし，皮質中の IDH は ABS，LAS で2週目から SDS では4週目から上昇している．髄質においては，TCAcycle と解糖系を結ぶ pyruvate の嫌気的代謝と関係をもつ LDH が2，4週目の ABS，LAS で減少の傾向を示し，4週目では FA，SDS，LAS，ABS 全群で上昇を示している．また髄質中の IDH は2週目の ABS，LAS で減少しているが12週目には上昇している．以上のことから ABS，LAS の G6Pase，LDH の変化より糖新生能の減退が推測されるが，糖新生系の他の Key Enzyme である pyruvate dehyrogenase (TCAcycle と解糖系を結んでいる) や phosphoenol pyruvate carboxykinase(TCA cycle と糖新生系を結んでいる) の活性も測定し検討する必要がある．brush border membrane に存在する 5′-Nucleotidase[12] や髄質の Na，K-ATPase[13,14] が LAS，ABS，SDS で低下の傾向を示していることは，Na^+ 輸送や glucose 尿細管再吸収，有機酸の分泌の機能低下の可能性が示唆されるので今後更に詳細な検討を要する．

(本研究の概要は日本公衆衛生学会第36回1977年10月で発表した．)

文　献

1) 磯野直秀：サイエンス，7，10，1974
2) 小林　勇：日本公衆衛生誌，23，643，1976
3) 米山允子，藤井　孝，伊川三枝子：東京衛研年報，24，409，1972
4) 米山允子，馬渕依子，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2，105，1976
5) 馬渕依子，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2，20，1976
6) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough and R. J. Randall. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
7) 米山允子，伊川三枝子，中尾順子：東京衛研年報，25，655，1974
8) 樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，27-2，176，1976
9) 渡　仲三，高沢和義，金井美晴：合成洗剤研究誌，1，1，1977
10) Weidemann, M. J. and H. A. Krebs : *Biochem. J.*, 112, 149, 1969
11) Schmidt, D. and W. G. Guder : *Kidney International*, 9, 233, 1976
12) Kinne, R. and J. E. Schmitz : *Pflügers Arch.*, 329, 191, 1971
13) Ross, B. and A. Leaf : *Am. J. Physiol.*, 226, 624, 1974
14) Franke, H. and M. Mályusz : *Pflügers Arch.*, 353, 97, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 64-66, 1978

クロム鉱さい粉じんのラットによる28日間持続吸入実験（第2報）
クロムの体内分布

神谷信行*, 坂本義光*, 伊川三枝子*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Inhalation Experiment of Chromium Ore Residue Dust to Rats for 28 Days (II)
The Distribution of Chromium in Rat Tissues

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, MIEKO IKAWA*
TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

粉じんとして経気道により摂取されるクロム鉱さいの生体におよぼす影響を観察するために，著者らは粉じん吸入実験装置[1]を製作し，短期間の持続吸入実験を行って，その結果の一部について既に報告した[2]．本報では28日間にわたって曝露したラットについて，クロムの血液および臓器分布と，特に鉱さい中に最も多く含まれるカルシウムの体内への摂取について，血清中のカルシウム量を測定した結果を報告する．

吸入実験方法

動物　Slc-Wistar 系(SPF)ラットの雄を4週令で購入し，1週間予備飼育後，順調な発育を示したもので，体重90～95gのものを使用した．

粉じん　クロム鉱さい粉じんは江東区大島9丁目都営地下鉄工事現場より採取した鉱さい塊をボールミル(Alfrad Fritsch Co.)を用い，エタノール（特級）を使って湿式法で粉砕した．粉じんに含まれる主な成分については Table 1 に示した．

動物実験　粉じん吸入実験装置の詳細は前報[2]で述べた．吸入箱内の粉じん濃度は，1.5mg/m³（低濃度曝露群）および21mg/m³（高濃度曝露群）に設定，コントロールは供給空気のみとし，28日間持続吸入を行った．環境条件は，温度25～26°，湿度50～60%，換気回数8～9(回)/(時)，照明時間6時～18時に調整し，吸入箱あたり20匹飼育し，10匹を検体として本実験に用いた．飼料はCE-2（日本クレア）を，飲料水は水道水を自由に摂取させた．

29日目に大腿部動静脈を切開，採血し，屠殺後，肺，腎臓，肝臓，脾臓，脳の各臓器を摘出，秤量し，これら臓器および血餅，血清のクロムを測定した．また血清についてはカルシウムも測定した．

定量方法

試薬　硝酸，硫酸，過塩素酸は有害金属測定用（関東化学）を，塩化ランタン溶液は原子吸光分析用（和光純薬）を用いた．クロム標準液，カルシウム標準液は原子吸光分析用標準溶液（関東化学）をその都度希釈して用いた．水は蒸留水を石英二段蒸留装置（藤原製作所）で再蒸留したものを用いた．

装置　原子吸光分光光度計は Nippon Jarrell-Ash・AA-8500（フレームレスアトマイザー・FLA-100 を連携）および PERKIN-ELMER・MODEL 403 を使用した．

器具　試料の分解に用いた器具は，洗剤で洗浄したのち，特級硝酸に浸積し，その後，特級，超特級(UGR)，有害金属測定用の硝酸で加熱洗浄をそれぞれ2～4回行い，洗浄済のものの中から数個を抜きとり，原子吸光分析（フレームレス）を行って洗浄状態を確認した．

操作1（クロム）　摘出臓器および血餅は50mlの洗浄済ビーカーに入れ，デシケーター（五酸化リン）で減圧下，一昼夜乾燥させた．これに硝酸2ml，硫酸1mlを加え，ホットプレート上で徐々に加熱，溶解させたのち，放冷し，過塩素酸1mlを加え，さらに加熱を続けた．完全に溶解しなかった臓器は，なお硝酸1mlずつを加えて，淡黄色透明の液となるまでこの操作をくりかえした．分解終了後放冷し，再蒸留水で正確に10mlにメスアップして試験溶液とした．別に同様に操作した空試験溶液を調製した．血清は再蒸留水で正確に10mlにメスアップして試験溶液とした．

〈測定条件〉　波長・3578 Å，ランプ電流・10mA，Drying・20A・15秒・step，Ashing・60A・80秒・ramp Atomizing・260A・15秒・ramp で，Atomizing 時のみ Ar ガスを流す Mode 2 を使用し，バックグランド補正にはチタンランプ（電流20mA）を使用した．

操作2（カルシウム）：血清 200μl をとり，1%塩化ランタン溶液で正確に10mlにメスアップして試験溶液とした．

* 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

Table 1. Composition of Chromium Ore Residue Dust

	(%)
Ca	21.2
Fe	6.1
Cr	2.8
water soluble	0.6
acid soluble	2.2
Si	2.4
Al	1.8
Ni	0.3
Mn	0.08
Ti	0.04
Zn	0.03
Sr	0.005

Atomic Absorption Spectrophotometry

〈測定条件〉 波長・4227Å, ランプ電流・15mA, スリット・4, バーナー・スロットバーナー, フレーム・アセチレン—空気

実験結果

クロム量を臓器, 血餅は湿重量あたり, 血清は容量あたりの値で示した (Table 2). クロム鉱さい粉じん曝露群はコントロール群に比較しておおむね高い測定値がみられ, 高濃度曝露群と低濃度曝露群との間にも, 明らかな差が認められた. 臓器では肺, 腎臓, 脾臓に高く, 次いで肝臓で, 脳が最も低かった. 肺は他の臓器と比較しても著しく高く, 高濃度曝露群で平均68.5ppm, 低濃度曝露群で平均12.1ppmで, 次に高濃度であった腎臓のそれぞれ, 85倍, 171倍に達した. 腎臓では平均803.7ppb, 70.7ppb, 脾臓では平均273.7ppb, 45.8ppbで, これら

Table 2. Distribution of Chromium in the Rats exposed to Chromium Ore Residue Dust at 1.5mg/m³ and 21mg/m³ for 28 Days

Group	Rat Number	Lung ppm	Liver ppb	Kidney ppb	Spleen ppb	Brain ppb	Clot ppb	Serum ppb
	1	0.015	2.8	6.1	ND	ND	5.2	ND
	2	0.010	3.6	6.7	13.5	ND	8.0	4.4
	3	0.009	4.0	3.8	ND	10.6	10.4	7.6
	4	0.018	3.5	3.5	ND	8.9	8.4	ND
control	5	0.017	3.3	10.0	8.1	ND	9.1	ND
	6	0.010	6.5	11.0		ND	9.6	ND
	7	0.009	7.1	9.2	6.3	ND	11.8	3.2
	8	0.010	4.4	12.5		7.4	14.6	ND
	9	0.011	3.8	9.9		6.3	9.5	ND
	10	0.012	6.5	4.2	ND	ND	8.6	3.0
	mean±SD	0.012±0.003	4.6±1.6	7.7±3.2	4.0±5.4	3.3±4.4	9.5±2.5	1.8±2.7
	1	12.5	8.7	63.2	52.9	10.4	13.7	ND
	2	12.9	8.5	71.7	63.4	ND	19.0	ND
	3	11.3	17.7	66.4	31.4	ND	18.1	7.6
	4	5.6	6.8	54.2	33.0	10.7	15.3	5.2
1.5mg/m³	5	14.6	7.9	66.6	47.0	ND	19.0	ND
	6	12.6	8.9	74.5		10.5	19.1	ND
	7	10.7	10.6	56.9	59.1	6.9	17.8	ND
	8	14.5	16.2	69.9		4.6	12.0	8.7
	9	13.5	8.8	78.3		6.7	19.9	5.2
	10	13.2	8.3	105.1	33.8	ND	11.6	ND
	mean±SD	12.1±2.6	10.2±3.7	70.7±14.2	45.8±13.3	5.0±4.7	16.6±3.1	2.7±3.6
	1	86.0	47.2	875.0	294.1	12.1	65.5	20.5
	2	44.8	29.2	746.8	221.4	7.9	49.3	16.1
	3	61.6	33.2	954.7	291.1	9.3	50.4	16.7
	4	93.7	30.4	830.3	284.7	14.2	63.5	17.8
21mg/m³	5	46.6	36.7	624.9	264.2	13.2	75.1	20.7
	6	79.2	45.4	762.2		21.5	61.3	18.2
	7	66.3	41.8	682.5	300.7	10.7	62.1	25.6
	8	66.2	32.5	1009.6		10.8	61.5	20.5
	9	66.5	40.5	917.1		8.9	54.1	11.4
	10	74.1	51.5	634.1	259.8	9.1	51.6	27.5
	mean±SD	68.5±15.6	38.8±7.6	803.7±135	273.7±27.7	11.8±4.0	59.4±8.1	19.5±4.6

Table 3. Calcium Concentration in Serum of the Rats exposed to Chromium Ore Residue Dust at 1.5mg/m³ and 21mg/m³ for 28 Days

Rat Number	Inhalation Group		
	control	1.5mg/m³	21mg/m³
1	105.6	95.5	97.9
2	102.6	108.4	111.1
3	111.1	97.2	84.7
4	74.4	97.2	105.1
5	100.7	95.5	106.0
6	93.0	78.1	100.0
7	85.2	94.6	92.0
8	109.0	103.2	95.9
9	93.6	108.0	89.7
10	100.7	70.5	87.7
mean±SD	97.7±10.8	94.8±11.5	97.0±8.2(μg/ml)

3臓器は血球濃度以上であった．脳および血清では高濃度曝露群でのみ高い値を示し，低濃度曝露群はコントロール群と差がなかった．血清カルシウムの値はコントロール群に比較して特に変化は認められなかった（Table 3）．

考　察

各臓器へのクロムの分布は，肺，腎臓，脾臓，肝臓の順で高い値を示したが，肺は特に高濃度であった．これは前報[2]の結果からも肺胞内にとどまっているクロム鉱さい粉じんの不溶性成分のためと思われる（Table 1）．

六価クロムのギネアピッグの経気道投与では，肺，腎臓，脾臓，肝臓に蓄積するという報告[3]があり，また当部で行ったクロム鉱さい水浸出液による経皮吸収実験（ウサギ・ラット）[4,5]でも，腎臓，脾臓，肝臓に多く蓄積しており，本実験の結果と一致した．しかし同じく当部で行った経消化管吸収実験（ラット）[5]の結果では，肝臓に最も多くクロムが蓄積しており，投与経路の差の違いについては今後検討の余地がある．

経気道によって摂取されたクロムの吸収機構についてはほとんどわかっていない．粒子サイズが1μ以上のものは，ほとんど肺胞に到達しないと考えられており[6]，それ以下の粒子が肺胞内に達して，不溶性成分はそのまま組織にとどまり，可溶性成分はまず血中に続いて各臓器に移行する．吸収されたクロムはラットの場合，おもに血漿タンパク中のトランスフェリンと結合し[7]，あるいはすぐに赤血球に取込まれて体内を移動する．高濃度曝露群で血清にクロムが測定されたのは，過剰のクロムがトランスフェリンと結合した形で，あるいはその他の形で存在したものと考えられる．また脾臓での蓄積が高かったことは，赤血球の破壊による血球成分の残留，あるいは網内皮系の食作用によると考えられる．

今回の実験結果では，多くの臓器で高濃度の蓄積がみられたが，これが各臓器の機能障害とどの様に結びつくのか今後検討したい．またヒトの生活環境に近い低濃度の条件で，長期間持続吸入実験を行い，ヒトへの影響にいつでも類推してゆきたい．

ま と め

クロム鉱さい粉じんを，20mg/m³，1.5mg/m³の濃度で吸入箱内のラットに28日間連続で曝露し，経気道進入によるクロム鉱さい粉じんの生体におよぼす影響を調べる目的で，クロムの体内分布および血清カルシウムについて検討した．

臓器では肺，腎臓，脾臓に高く，次いで肝臓で，脳が最も低かった．

血液では血餅に高く，血清は高濃度曝露群でわずかに高かった．血清カルシウムには変化がなかった．

謝辞　本研究にあたり有益な御助言をいただいた理化学部微量分析研究科の江波戸舉秀氏に感謝の意を表します．

文　献

1) 坂本義光，調武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，1977
2) 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
3) Baetjer, A. M., C. Damron, and V. Budacz: *A. M. A. Archives of Industrial Health*, 20, 54, 1959
4) 福森信隆，樺島順一郎，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，129，1977
5) 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
6) Schroeder, H. A.: *Air Quality Monograph* #70-15, 28, 1970, American Petroleum Institute, Washington, D. C.
7) Hopkins, L. L. Jr., and K. Schwarz: *Biochim, Biophys. Acta.*, 90, 484, 1964

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 67-71, 1978

クロム鉱さい粉じんのラットによる7日間持続吸入実験

坂本義光*, 神谷信行*, 池田虎雄*, 平賀興吾*

Inhalation Experiment of Chromium Ore Residue Dust to Rats for 7 Days

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*, TORAO IKEDA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体におよぼす影響を観察する目的で，粉じん曝露用チャンバーを用いた昼夜連続の吸入実験[1,2]を行なっている．クロム化合物については，従来からクロム塩製造に従事する労働者に肺ガンの発生率が高いことから，その発ガン性が注目され，クロム鉱石[3]，鉱石焙焼物[4]および各種クロム化合物[5]の粉体について吸入装置を用いた曝露実験が行なわれている．しかし製造工程からの廃棄物である鉱さいについての報告はないようである．またこれらの実験は，その労働環境を反映した間歇曝露実験であり，著者らの行なっているような一般生活環境の状況を考慮した昼夜連続の吸入実験は粉じんに関してはその例をみない．著者らは鉱さい粉じんについては，すでに28日間持続（昼夜連続）実験を行なった．その結果は前報[2]で述べたように，鉱さい粉じん 21mg/m³ 曝露群では，肺重量の増加，血液学的検査で，Hct，MCV 値の増加，組織学的に肺実質の損傷を伴う変化をおこすことが観察された．本報では，以上の変化に注目し，より短い曝露期間における変化を観察するために，前実験[2]と同条件で行なった7日間の曝露実験の結果について述べる．実験は前実験で変化のみられなかった1.5mg/m³曝露群を除き，鉱さい粉じんおよび比較対照としての関東ローム粉体の21mg/m³と同濃度の曝露群を設定し，曝露後1，3，7日目の動物について，体重，肺重量の測定，血液学的検査，肺の組織学的観察を行なった．

実験材料および方法

動物は Slc：Wistar 系雄ラット，5週令（曝露開始時体重100-120g）を用い，1群18匹として，実験室内空気のみの対照群，比較対照としての関東ローム粉体（JIS 試験用粉体11種）19mg/m³曝露群（以下 JIS群），クロム鉱さい粉じん 19mg/m³ 曝露群（以下 Cr 群）の3群を設定した．

実験に用いた関東ローム粉体は日本粉体工業協会より入手し，平均粒径 2μ，比重2.97であった．また鉱さい粉じんは投棄地区より採取した鉱さい塊をボールミルで約8時間粉砕して調製し，平均粒径3μ，比重2.79であった[2]．粉体の化学的性状は前報および神谷ら[6]の報告に記載したとおりであるが，鉱さい粉じん中全クロム量は2.8%，そのうち水可溶性クロム0.6%，塩酸可溶性クロム 2.2% であった．

実験はすでに報告した吸入装置[1]により昼夜連続で7日間行ない，曝露開始後1,3,7日目に各群6匹ずつを検査に供した．実験期間中の各粉じん平均濃度±SDはJIS群19±1.5mg/m³，Cr 群19±1.4mg/m³ であり，吸入箱内エアロゾルの粒度分布は前実験[2]の各高濃度群と同様であった．また吸入箱内換気回数は9回（100l/min）とし，その間温度25～26℃，湿度50～60%であった．吸入箱内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，水は吸入箱内の給水ノズルにより自由に摂取させた．

各曝露期間終了後，動物は体重を測定し，大腿部動静脈を切断，放血屠殺した．肺は摘出秤量後，定法によりパラフィン切片を作製，HE染色を行ない組織学的観察を行なった．血液学的検査は諸臓器中のクロム含量分析のために，同条件で，別に行なった実験の対照群および Cr 群の動物の血液について，Coulter Counter Model S を用いて，Table 1 に示した各項目について測定を行なった．この実験では1群24匹とし，各曝露期間終了後，各群8匹を検査に用いた．

実験結果

1. 体重および肺重量　各曝露期間における体重および肺重量を Fig. 1 にまとめて示した．体重は JIS 群，Cr 群ともに各曝露期間で対照群と比べ差がなかった．肺重量は JIS 群では曝露7日目に対照群と比べ，絶対重量では差がなかったが，体重比では有意に大きく，重

* 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

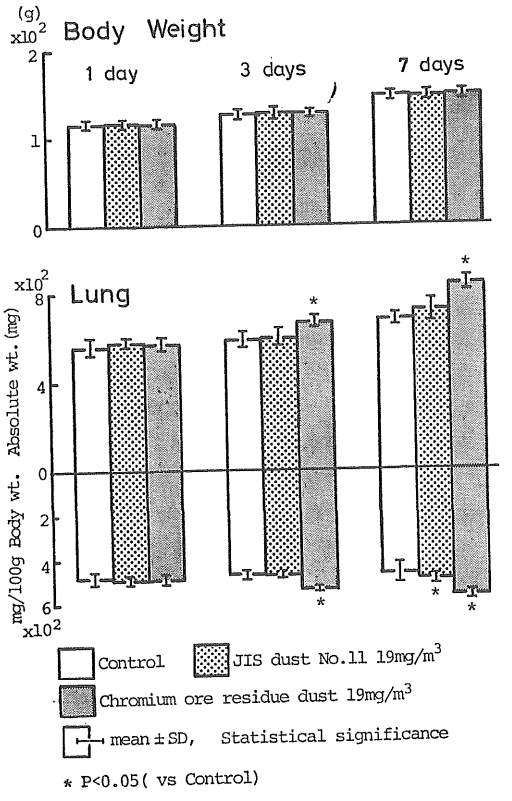


Fig. 1. Body Weight, Lung Absolute and Relative Weight of the Rats Exposed to JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Residue Dust

量増加の傾向を示した. Cr 群では曝露3日目より絶対重量, 体重比とも対照群に比べ有意に大きくなっており, 顕著な重量増加を示した.

2. 血液学的検査 28日間曝露実験[2]で Hct, MCV 値に変化のみ示した鉱さい粉じん曝露群についてのみ対照群と比較し, その結果を Table 1 に示した. 本実験では Table 1 に示したように各期間とも対照群に比べ変化はなかった.

3. 組織学的観察 結果をまとめて Table 2 に示した. 肺では肺胞上皮と肺胞腔の大食細胞の変化が主にみられ, Table 2 にはこれらの変化を各群で平均した総合的な変化として示した.

1) JIS 群 肺胞上皮細胞は1, 3日目では対照と比べ変化はみられなかったが, 7日目では軽度な腫大を示す細胞が散見された. 肺胞大食細胞は対照に比べ3日目よりその数が多くなっていた. 胞体内には1日目より貪食した粉じん粒子が認められ, 大食細胞数と同様曝露期間に伴い増加した. また7日目では粉じんを貪食した細胞で, その形がやや大きくなっているのが見られた. (Fig. 3)

2) Cr 群, 曝露3日目より軽度な腫大を示す肺胞上皮細胞が散見され, 7日目ではその程度が増強し, またその変化を示す細胞が多くみられた. このような変化を示しているのは, JIS 群と同様, Ⅱ型肺胞上皮であった. また7日目では肺胞壁から剥離し, 細胞質がエオジン淡染の微細顆粒状を呈している肺胞上皮も認められた. この変化を示している細胞がⅠ型かⅡ型肺胞上皮かは明らかでなかった. また肺胞上皮の剥離は同一期間の JIS 群ではみられなかった. 大食細胞の数は JIS 群に比べ全期間を通して少なかったが, 対照群に比べ7日目ではわずかに多くなっていた. 貪食された粉じん粒子数は曝露期間に伴って多くなっていたが, JIS 群に比べると全期間を通して少なかった. また曝露7日目では腫大した大食細胞が多くなっており, 胞体の崩壊したものも

Table 1. Results of Hematological Examination of the Rats Exposed to the Aerosols of JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Residue Dust for 1, 3 and 7 Days

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 %
1 Days								
Control	(7)	12.10±5.70[a)]	6.76±0.26	14.69±0.67	39.10±1.73	58.43±1.27	22.01±0.54	37.60±0.55
Chromium	(7)	9.37±1.10	6.81±0.65	14.87±1.46	39.29±3.64	58.29±0.95	22.11±0.40	37.81±0.36
3 Days								
Control	(5)	8.82±1.24	7.05±0.35	15.64±0.79	46.54±1.46	66.40±3.78	22.42±0.47	33.60±1.52
Chromium	(8)	7.85±1.11	7.09±0.30	15.73±0.83	46.21±3.47	65.88±3.39	22.40±0.36	34.07±2.10
7 Days								
Control	(7)	10.50±2.24	6.96±0.53	15.57±0.65	38.76±2.57	56.57±0.97	22.71±0.94	40.26±1.35
Chromium	(7)	11.46±2.30	6.82±0.16	15.19±0.44	38.07±1.00	56.43±0.53	22.51±0.30	39.89±0.58

a) : mean±SD

Table 2. Results of Histological Observation of Lung from the Rats Exposed to the Aerosols of JIS Dust No. 11 and Chromium Ore Residue Dust for 1, 3 and 7 Days

Changes	Duration of Exposure (days)								
	1			3			7		
	C[a]	JIS[b]	Cr[c]	C	JIS	Cr	C	JIS	Cr
Alveolar cell									
Enlargement	−	−	−	−	−	±	−	±	+
Desqumation	−	−	−	−	−	±	−	−	+
Alveolar macrophage									
Increase of number		−	−	−	±	−	−	+	±
Phagocytosed dust particle	−	+	−	−	++	+	−	+++	++
Enlargement	−	−	−	−	−	−	−	±	+
Disintegration	−	−	−	−	−	−	−	±	+
Presence of debris in air space	−	−	−	−	−	−	−	−	+

a) Control, b) JIS Dust No. 11 19mg/m³, c) Chromium Ore Residue Dust 19mg/m³
: Grade showed in table is described with mean of 6 samples.
: Symbols, − no reaction, ± very slight reaction, + slight reaction, ++ moderate reaction
+++ marked reaction

みられ，肺胞腔には，剝離した肺胞上皮や大食細胞の崩壊残渣の存在が認められた．(Fig. 4)

3) 粉じん粒子の存在，肺内に吸入された粉じん粒子は，各気管支上皮および肺胞の表面に遊離しているものも見られるが，そのほとんどが大食細胞に貪食された状態で存在していた．また Cr 群7日目では大食細胞の崩壊によって放出された粉じん粒子もその崩壊残渣に混在していた (Fig. 4).

両群とも曝露3日目より肺内のリンパ組織に粉じん粒子の存在がみられ，曝露期間に伴って多くなったが，Cr 群では JIS 群に比べその量は全体的に少なかった．また JIS 群7日目では，縦隔リンパ節中にも粉じん粒子の存在が認められたが，Cr 群では肺外のリンパ節中には認められなかった．

考　　察

すでに報告[2]したように，鉱さい粉じんを 21mg/m³ の濃度で28日間曝露すると，同濃度の関東ローム粉体を曝露した場合に比べて顕著な肺胞上皮の剝離，肺胞壁の非薄化など肺実質の損傷を伴う強い変化が認められた．これは鉱さい粉じん中の可溶性成分による直接的な作用の現われと考えられたが，本実験で鉱さい粉じん曝露群にみられた変化は，曝露期間に比例したいずれも前実験でみられた変化の軽度な，前駆的なものであると考えられる．

28日間実験では，鉱さい粉じんおよび関東ローム粉体曝露群でほぼ同等にみられた肺胞上皮の腫大は，粉じんの物理的な作用に対する生理的な反応，あるいは多量の粉じんに対して肺浄化機構が不十分なためにおこる肺組織の病理的な初期反応とも考えられる．本実験では鉱さい曝露群では同濃度の不溶性粉じんである関東ローム粉体曝露群に比べて腫大の程度は強く，より早期に認められることから，鉱さい粉じんによる肺胞上皮の腫大は，その可溶性成分による直接的な障害作用が単なる物理的作用に比べ比較的早く現われたものと思われる．また肺胞上皮はそのような化学的作用により早く反応するものと考えられる．さらに肺重量の増加の程度が大きく，早期に現われたことは，以上の組織の反応を反映したものと思われる．

Gross[7] によれば曝露された不溶性物質に対する肺組織の病理組織学的な初期変化として，間質性細網組織の増生を伴った肺胞上皮の増殖をあげている．鉱さい粉じんおよび関東ロームによる肺の組織変化がどのような経過をたどるかは，今後の長期曝露実験の結果に待ちたいが，鉱さい粉じんによる肺の組織変化は，不溶性粉じんに対する変化とは性質を異にするものと考えられ，長期曝露実験で，この両者を比較することは，肺の機能的な障害や病変の現われ方を知るうえで興味深い問題と思われる．

大食細胞数の増加やそれに貪食される粉じん量の増加は，粉じん濃度，曝露期間に比例して生じ，粉じん曝露時

に比較的早期に現われる肺浄化機構の一つであり，生理的な反応である．しかし鉱さい粉じんによる大食細胞の腫大，崩壊は貪食された粉じん量が少ないにもかかわらず認められた変化で，細胞毒性を有する粉じんの貪食によっておこるものと考えられ[8]，肺胞上皮の剝離，変性と同様に鉱さい粉じん成分の障害作用の現われと思われる．また鉱さい粉じん曝露群で大食細胞の胞体内に粉じん粒子の少ないことは可溶性粉じんの存在にもよると考えられるが，鉱さい成分の作用によって，その貪食能が障害されていることも考えられる．

リンパ組織およびリンパ節への粉じんの移行は，大食細胞と同様，肺の浄化機構の1つである[8,9]が，不溶性粉じんの濃度または蓄積量および曝露期間に比例して，この部位への粉じん粒子の移行が多くなるものと考えられる．今後鉱さい粉じんの長期曝露実験では，これらの部位への鉱さい中の不溶性クロムの蓄積についても注目する必要がある．

血液学的検査で28日間曝露実験で認められた鉱さい粉じん曝露群におけるヘマトクリット値および平均赤血球容積の増加については，クロムの赤血球に対する親和性[10]との関係が考えられたが，本実験では変化が認められなかった．これは曝露期間の短いこともあり，この問題については今後の長期実験においても検討していきたい．

まとめ

クロム鉱さい粉じん19mg/m³，比較対照としての関東ローム粉体 19mg/m³ の濃度で，1群18匹のラットを用いた7日間持続吸入実験を行ない，曝露後1，3，7日目に各群6匹ずつの動物について，体重，肺重量の測定，肺の組織学的観察を行なった．鉱さい粉じん曝露群についてのみ血液学的検査を行なった．体重および血液学的検査では各曝露期間で変化はなかった．肺重量の増加の程度，肺の組織変化の程度は，いずれも鉱さい粉じん曝露群で強く，またより早期から認められた．鉱さい粉じん曝露群にみられた組織変化はすでに行なった28日間曝露実験でみられた変化の前駆的なものであったが，鉱さい可溶性成分の直接的な作用が比較的早い時期から現われたものと考えられた．

文　献

1) 坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，1977
2) 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
3) Baetjer, A. M., J. F. Lowney, H. Steffee, and V. Budacz : *A. M. A. Arch. Indust. Health*, 20, 124, 1959
4) Steffee, C. H. and A. M. Baetjer : *Arch Environ Health*, 11, 66, 1965
5) Akatsuka, K. and L. T. Lairhall : *J. Indust. Hyg.* 16, 1, 1934
6) 神谷信行，坂本義光，伊川三枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，64，1978
7) Gross, P. : *Arch. Environ. Health*, 6, 48, 1963
8) Hatch, T. F. and P. Gross : *Pulmonary Deposition and Retention of Inhaled Aerosols*, 81, 1964, Academic Press, New York
9) 河合清之訳：新毒性学の基礎と応用，211，1975 ソフトサイエンス社
10) 木村正己，小野　哲，和田　攻訳：環境汚染物質の生体への影響，2，24，1977，東京化学同人

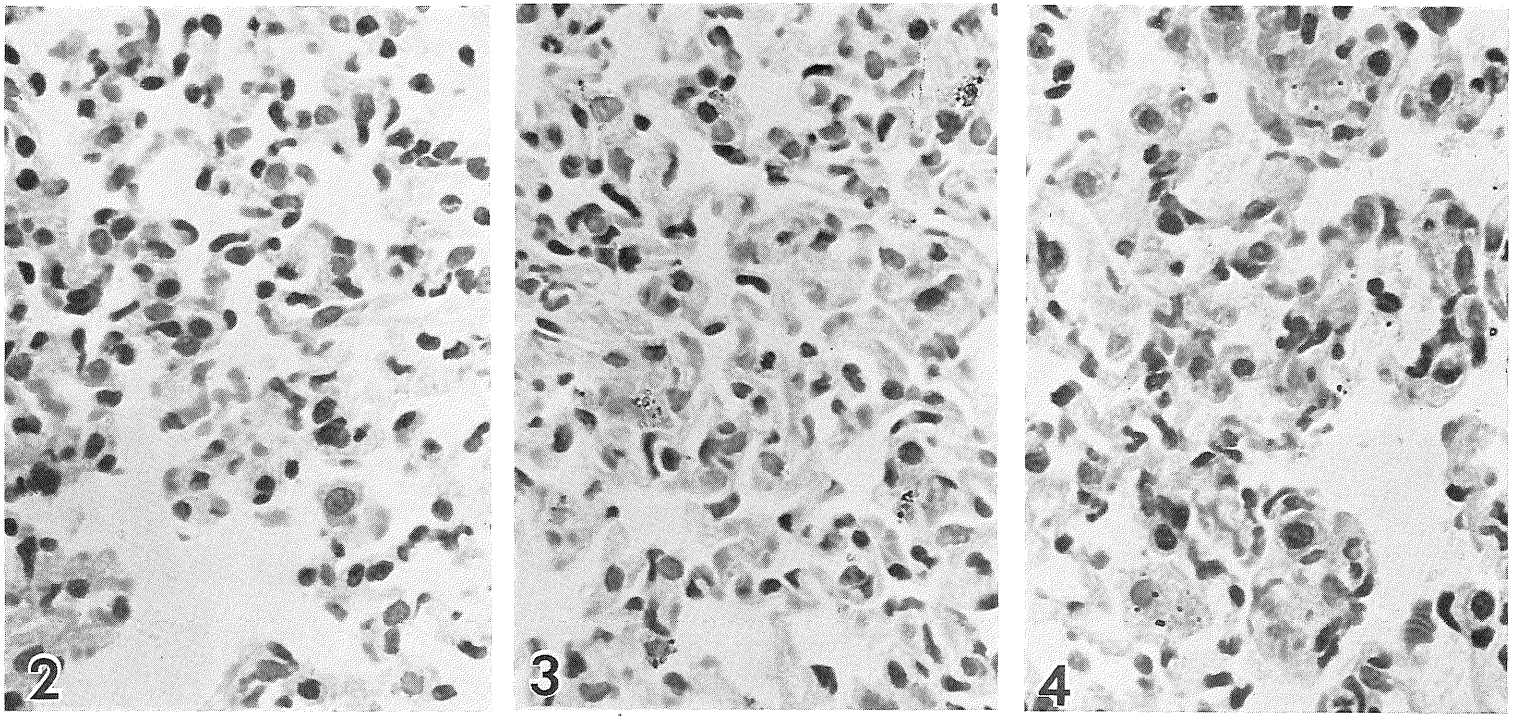


Fig. 2–4. H&E stained. ×600. Fig. 2. Control rat. Fig. 3. Rat exposed to JIS dust No. 11 at 19mg/m³ for 7 days. Alveolar cells are slightly enlarged. Macrophages phagocytosed dust particles are seen. Fig. 4. Rat exposed to chromium ore residue dust at 19mg/m³ for days. Alveolar cells are more enlarged than JIS dust exposure in Fig. 3. Enlarged and disintegrated macrophages are observed and their cytoplasm contain a few dust particles. The air spaces contain desquamated alveolar cells and debris.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 73-80, 1978

クロム鉱さい水浸出液の感作性試験（第1報）
遅延型アレルギーの検索

福森信隆*, 井口重孝*, 樺島順一郎*, 平賀興吾*

Allergic Sensitization to Chromium Ore Residue (I)
Identification of Delayed-Type Hypersensitivity

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

緒　言

1975年4月，東京都に埋め立てられた六価クロムを含むクロム鉱さいの安全性に疑問が持たれ，クロムの生体への影響を検討する必要性が生じた．クロムによる皮膚粘膜障害は産業衛生面から職業病として以前から疫学的関心が持たれていたが，皮膚障害の中にアレルギー性皮膚炎が発見されたのはかなり後である[1]．既に皮膚粘膜障害に対しクロム鉱さい水浸出液の一次刺激性[2]，短期累積刺激性試験[3]を行い中等度の刺激性を認め，皮膚反応が顕著に出現するほど生体内クロム蓄積量が増加することを報告した．今回，クロム鉱さい水浸出液の皮膚障害を検索する一環としてアレルギー感作試験を行った．本報では遅延型過敏症の代表である接触性皮膚炎を検出する目的で特にその検出力が優れ再現性に信頼のあるmaximization test[4,5]を実施したので報告する．

実験材料および方法

検液　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[2]六価クロム1000ppmを含有するクロム鉱さい水浸出液（pH 12.8）を用いた（クロム鉱さい液と略す）．クロム対照液はクロム酸ナトリウム（特級，和光純薬㈱）を注射用蒸留水で六価クロム濃度 1000ppm となるように調整し（クロム対照液と略す），positive 対照液として *p*-phenylenediamine（東京化成工業㈱）の水溶液を用いた（PPDA液と略す）．

動物　Barrier system下に生育されたハートレイー系雌性モルモット（チャールスリバー）を馴化飼育後，最高の感作能を持つ体重350～400g で実験に供した．飼育は室温23±1°，湿度50±5％の環境下で飼育用飼料（日本クレア，CG-3）と水を自由に与えた．

実施法

A.　本試験　動物は各群15匹，誘発時の対照に10匹を用い皮毛状態の良好で可能な限り穏健な動物を選択し，以下の順に従って実験を行った[4,5]．

1.　皮内注射による induction　モルモットの肩甲部を4×6cmの長方形に電気バリカンおよび円形回転刃による電気カミソリで剃毛し，剃毛部内2×4cmの長方形の四隅に印を付けその範囲内に皮内注射を行った．皮内注射は 0.05m*l* ずつ右左に，部位1では adjuvant (Freund's complete adjuvant, Difco 製) を等量の注射用蒸留水で乳化したものを，部位2では検液を中性とし Table 1 に示した濃度に注射用蒸留水で希釈後皮内注射を行い，部位3は部位1，2より若干注射部位を離して検液を等量の adjuvant で乳化したものを皮内注射した（Fig. 1）．

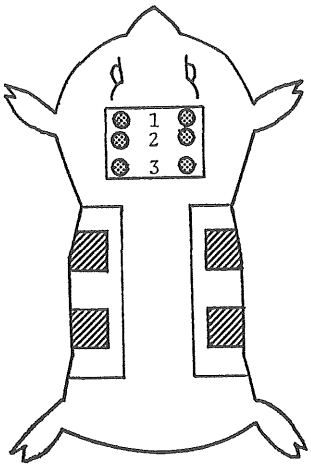
2.　塗布による induction　皮内注射を行った1週間後に肩甲部を剃毛して2×4cm のリント布に Table 1 に示す濃度で検液を 0.6m*l* 塗布し，その上を不浸透性絆創膏（Blenderm）で覆い弾性包帯で48時間閉塞貼布を行った．

3.　塗布による challenge　塗布による induction から2週間後にモルモットの側腹部を剃毛し，剃毛の際に付着した毛を除去する目的で絆創膏を用いて stripping を軽く2回行い，2×2cm のリント布に Table 1 に示した濃度で 0.3m*l* の検液を塗布し，その上を不浸透性絆創膏で覆い弾性包帯で24時間閉塞貼布を行った．

感作試験の対照は，検液を用いず注射用蒸留水で induction を行い，challengeの際に検液で閉塞貼布し一次刺激性の反応と比較した．貼布は片側に1あるいは2部位で実施し貼布除去後5日間継続して Table 2 に従い判定を行った．適用部位の概略を Fig. 1 に示した．

Table 1 の検液濃度は数回の予備試験を行い決定した．皮内注射による induction では注射部位に壊死や遺瘍を発生する濃度，全身毒性を生じる濃度は不適当であ

* 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



Induction: 0.05 ml of adjuvant 1, substance 2, substance in adjuvant 3
Challenge: 2×2 cm patch(oblique line)

Fig. 1. Schema of Application

Table 1. Concentration in the Guinea Pig Maximization Test

Substance	Total No.	Induction Intradermal conc.	Induction Topical conc.	Challenge Topical conc.
Chromium ore residue	15	100ppm	1000ppm	500, 100, 45, 20ppm
Sodium chromate	15	100ppm	1000ppm	500, 100, 45, 20ppm
PPDA	15	0.1 %	5.0 %	5.0, 1.0, 0.45, 0.2 %

Table 2. Evaluation of Reactions[4]

Grade	Reactions
0	No visible change
I	Slight or discrete erythema
II	Moderate and confluent erythema
III	Intense erythema and swelling

るため[5]，検液を希塩酸で中性化し注射後白色の壊死が生じない濃度を選んだ．また塗布による induction では軽度の炎症が感作能を増強させるため[5]，アルカリ性で一次刺激性反応の紅斑が軽度に出現する濃度で行った（クロム酸ナトリウムは希水酸化ナトリウム液でクロム鉱さい液の pH と同値に調整）．Challenge の濃度は濃度段階を設定し，最高濃度はアルカリ性で一次刺激による反応がみられない濃度を設定した．Challenge は15匹中8匹を2段階に，7匹を4段階に行った．

B. 交叉感作および再challenge 本試験のchallengeから約2週間経過後，炎症反応の消失した動物を選び，クロム鉱さい液およびクロム対照液各5匹ずつ用い，クロム鉱さい液には500ppm六価クロムを含むクロム対照液を，またクロム対照液には500ppm六価クロムを含むクロム鉱さい水浸出液で本試験の challenge と同様な方法で交叉感作を行った．さらに各群5匹の動物を用意し本試験の challenge の方法で再 challenge を行い貼布除去24時間の反応を確認した．その後心臓採血を行い血清を分離し PCA 反応，沈降反応の試料とした[6]．放血屠殺後各群の反応部位の皮膚を摘出しホルマリン固定を行い組織学的に検索した．

実験結果

A. 本試験 Table 3 に5日間判定の評点に基づいた動物数を記載した．クロム鉱さい液およびクロム対照液の 500ppm，100ppm，PPDA 液の5，1％は各15匹としその他は7匹で判定を行った．反応の強さは貼布除去時に比べ24時間後で強く認められ，漸次落屑，痂皮形成により回復したが，貼布除去後5日まで反応の評価が可能であった．

クロム鉱さい液は20ppmを除き全例に陽性反応がみられ，貼布除去24時間で 500ppm は顕著な紅斑，1 mm 以上の膨隆が貼布部全体にみられその周囲の発赤も認められた（grade Ⅲ）．特に反応の強い貼布の中心部では直径2～3 mm の白色の小水疱が3～10個集簇性にみられた（15例中5例）．100ppmの多くは貼布部全体に紅斑がみられるが，浮腫は著しくなかった（grade Ⅱ）．45ppmで紅斑の程度に個体差がみられるが全体に軽度であり，20ppmで7例中2例は反応を示さなかった．高濃度の反応は72時間まで紅斑が強く残存しているが以後回復がはやかった．20ppmの紅斑は軽度で，48時間までみられるが72時間以降では反応を示さなかった．Challenge 時の対照に用いた 500ppm 濃度で10例中2例に極めてわずかな紅斑がみられ，この範囲は貼布面積全体ではなく中央下部に限局してみられた．反応の程度は20ppmの感作動物に対する貼布時にみられた紅斑より弱く，また回復もはやかった．8例は全期間を通し反応が認められなかった．

クロム対照液の反応はクロム鉱さい液とほぼ同程度の反応を呈するが，その強さは若干弱かった．貼布除去24時間後の反応で，500ppmは14例に浮腫を伴った強度の紅斑がみられるが，100ppm は浮腫が顕著でなく紅斑も中等度であった．クロム鉱さい液でみられた白色の小水疱は15例中3例に認められその範囲，大きさはクロム鉱さ

Table 3. Classifications of Evaluation in the Guinea Pig Maximization Test

Hours[a]	Grade	Sensitization: Chromium ore residue (ppm)				Sensitization: Na_2CrO_4 (ppm)				Sensitization: PPDA (%)				Non-sensitization: Ore residue (ppm)	Non-sensitization: Na_2CrO_4 (ppm)	Non-sensitization: PPDA (%)		H_2O
		500	100	45	20	500	100	45	20	5.0	1.0	0.45	0.2	500	500	5.0	1.0	
0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	9	10	10	5	5
	I	0	5	3	5	0	8	7	3	0	0	0	2	1	0	0	0	0
	II	3	10	4	0	9	7	0	0	1	6	5	5	0	0	0	0	0
	III	12	0	0	0	6	0	0	0	14	9	2	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	8	9	6	5	5
	I	0	1	3	5	0	5	7	3	0	0	0	0	2	1	4	0	0
	II	0	12	4	0	1	10	0	0	0	3	0	7	0	0	0	0	0
	III	15	2	0	0	14	0	0	0	15	12	7	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	3	0	0	2	5	0	0	0	0	9	9	7	5	5
	I	0	9	6	4	0	14	5	2	0	0	0	5	1	1	3	0	0
	II	3	6	0	0	7	1	0	0	0	12	6	2	0	0	0	0	0
	III	12	0	0	0	8	0	0	0	15	3	1	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	5	7	0	3	5	7	0	0	0	0	10	10	10	5	5
	I	1	14	2	0	6	12	2	0	0	3	2	7	0	0	0	0	0
	II	14	1	0	0	8	0	0	0	0	12	5	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	1	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	10	7	7	0	12	7	7	0	0	0	0	10	10	10	5	5
	I	14	5	0	0	14	3	0	0	0	14	7	7	0	0	0	0	0
	II	1	0	0	0	1	0	0	0	15	1	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	No.	15	15	7	7	15	15	7	7	15	15	7	7	10	10	10	5	5

a) Hours after the patch is removed.

い液と同様であった．貼布除去24時間の紅斑部は疼痛，熱感があり，48時間以後では漸次落屑が生じ，次第に茶褐色を呈した．Challenge 時の対照である 500ppm 濃度は10例中1例に軽度な紅斑を認めた．

PPDA 群は貼布部で黒色を呈しその判定に細心の観察を必要とした．全例で陽性がみられ，貼布除去24時間の5％濃度では貼布部の浮腫が著明で周囲の発赤，腫脹も強く現われた．また黒色の貼布部はクロムの貼布時と異なり約1mm の白色の粒状で覆われた皮膚面を呈した．この現象は貼布除去時より24時間まで続き以後黒茶色に変化した．さらに48時間の貼布範囲で表面が硬化し，漸次痂皮に類似した様相と化した．1％で白色粒状を呈する動物が数例みられたが5％に比べ反応が弱かった．しかし24時間後の1％で15例中12例が著しい浮腫，紅斑を呈していた．0.45%，0.2% では皮膚の着色が薄れ反応の観察が容易となり，紅斑が著明に認められた．浮腫は0.45%の低濃度でも認められ，また浮腫は持続の長いことがPPDA液に特徴的であった．Challenge 時の対照ははじめ5％を用いたが10例中4例に軽度の紅斑が認められたため，濃度を1％とし再度 challenge したところ反応を示さなかった．なお対照の5％では白色粒状の皮膚面がみられなかった．

Table 4. Sensitization in the Guinea Pig Maximization Test

Substance	Pos./Total	Mean response[a]
Chromium ore residue (id. 100ppm, top. 1000ppm)	15/15	2.09
Sodium chromate (id. 100ppm, top. 1000ppm)	15/15	1.79
PPDA (id. 0.1%, top. 5.0%)	15/15	2.77

a) Allergic contact dermatitis in the guinea pig (Magnusson and Kligman)

以上の結果から mean response 値[4] を算出するとクロム鉱さい液は2.09でクロム対照液の1.79より高い値を示した．PPDA 液は反応が最も顕著であり，2.77 の値を示した(Table 4)．

B. 交叉感作および再challenge 本試験のchallenge から2週間後，反応の回復した動物に交叉感作を行った結果，本試験と同濃度の 500ppm 検液で貼布除去時か

ら強い反応がみられた．クロム鉱さい液で感作した動物に500ppm クロム対照液を用いて再 challenge したところ，5例中3例に白色の小水疱がみられ強度な紅斑，明瞭な境界を持つ1mm 以上の浮腫が48時間まで続いた．またクロム対照液の感作動物に500ppm クロム鉱さい液で再 challenge した結果，白色の小水疱は5例中2例に認められた．交叉感作の両者で反応の強さに差がみられなかった．

一方，2週間後の再 challenge でクロム鉱さい液，クロム対照液は 500ppm，PPDA 液は1％を用いて再 challenge を行った結果，本試験とほぼ同程度の結果が得られたが，貼布除去時から強い反応を示した．

組織学的検索は貼布除去24時間後に再 challenge で用いた濃度で行い，同濃度の challenge 時の対照と比較した．クロム鉱さい液では基底細胞の増生を伴った表皮有棘層の肥厚が顕著で軽度の核肥大がみられ，基底層に近い下層部では細胞間の離開，小空胞を認め浮腫を形成した．角化層は肥厚しいわゆる過角化の状態を限局性に認め，その部の表皮では膨隆がみられ表層に不全角化を示す顆粒細胞が密在し，内部に多数の多形核白血球が広範囲に散在していた．顆粒層の多くは顆粒が消失傾向を示した．真皮，皮下組織では多くの線維芽細胞，血管の増生および好中球，リンパ球の軽度な細胞浸潤がみられた．クロム対照液は全体的にクロム鉱さい液に比べ組織変化が軽度であるが，表皮基底細胞の増生，軽度の有棘層の肥厚がみられ，細胞間が離開し浮腫を呈した．クロム鉱さい液でみられた表皮が膨隆し多数の多形核白血球を入れた像はほとんど認められず，また顆粒層の顆粒も存在していた．真皮の乳頭層では好中球，リンパ球を含む細胞浸潤が限局してみられ，血管の増生，線維芽細胞の増加を認めた．PPDA 液では表皮の肥厚が著しく基底細胞の増生，有棘層の肥厚，核肥大がみられ細胞間の離開，小空胞の散在を認めた．離開した細胞間隙では真皮乳頭層に至るまでび漫性に多様な炎症性細胞浸潤が顕著にみられ，密在した部では赤血球を伴った．表皮の表層にみられた多形核白血球の集まった膨隆は多く毛の開口部に位置して大きく，真皮にまでおよぶ変化もみられ角化層の肥厚も伴っていた．真皮，皮下組織では血管の増生，線維芽細胞の増加を認めた．一般にこれらの炎症部では，表皮の表層が平担を示し表皮細胞間が離開して海綿状態を呈した．対照では，PPDA 液で皮膚面が薄茶色を呈したほか組織学的に著変を認めなかった．

考　　察

細胞性免疫が関与する遅延型過敏症は感作成立まで長時間を要し，かつ感作持続時間が長い．クロムはその取り扱い作業場で皮膚炎を惹起させ，皮膚障害のうちアレルギーに起因する接触性皮膚炎の罹患原因となる[1]．特にアレルギーによって誘発される皮膚炎は一次刺激性反応を起こさない低濃度でも炎症を生じせしめ，そのため環境中に感作原の存在は好ましくない．今回，クロム鉱さい水浸出液の感作性を証明するとともに，他のクロム化合物との強さの比較および一次刺激濃度と誘発濃度の相違などを相対的に検討した．

Maximization test は優れた検出力，再現性，実験期間の短縮などの長所を持ち，これまで行われてきた Landsteiner–Draize 法[7] で検出され得なかった化学物質をも検出が可能であることから，刺激性が弱く日常頻用される化粧品，洗剤などの過敏性試験に最適とされている[5]．

Maximization test を行った結果，感作動物の全例に反応がみられた．反応が強く，持続時間の長いchallenge 時の最高濃度は，感作をしていない動物で数例軽度な紅斑を認めたことから一次刺激性の限界濃度と思われ，動物の感受性差および剃毛時の皮膚損傷の程度により反応が出現したと思われる．クロム鉱さい液，クロム対照液の 500ppm 濃度は challenge 時と同様な方法で行った予備試験の際反応がみられず，また先に行った眼粘膜刺激性試験[8] および pH の影響を調べるため家兎皮膚の刺激性をみた実験[2] で反応が極めて軽度であることから，500ppm では刺激がほとんどないと思われる．PPDA 液は高濃度で皮膚を黒色に着色させ，感作動物の反応は対照に比べ著しかったが，それ自体刺激性を有することから5％濃度で対照の4例に軽度な反応がみられたと思われる．

対照の同濃度と比較して，感作動物の反応は著明な紅斑，浮腫を生じ明瞭に対照の反応と区別された．六価クロム濃度を同一としたクロム鉱さい液とクロム対照液を比べると紅斑，浮腫の強さとも若干ではあるがクロム鉱さい液で強く認められた．貼布除去24時間後で 100ppm の grade Ⅲはクロム鉱さい液に2例を認めるのに対し，クロム対照液ではみられなく，また低濃度の 20ppm で grade Ⅰはクロム鉱さい液5例，クロム対照液3例がみられることから，クロム鉱さい液で若干反応の強いことが把握される．また組織所見で，表皮表層部に多数の多形核白血球を入れた膨隆および顆粒細胞の顆粒の消失をクロム鉱さい液で認めたことからも反応の強さが示唆される．PPDA 液の反応は強度であり継続時間も長く，特に浮腫の形成は著しかった．0.2％の低濃度でgrade Ⅱの反応が全例にみられ，また回復時に硬化した痂皮を形成することからクロムによる反応と比べ強いと考える．

組織学的にはリンパ球，好中球などの細胞浸潤が最も多くみられた．これらの反応の強さは，Table 4 に示した反応の強さと反応部位を加味した mean response 値からも推察できる．各群とも grade Ⅲ の組織変化は表皮の肥厚，細胞間隙の浮腫，炎症性細胞の浸潤，血管の増生などを特徴とした．

交叉感作では反応がほぼ同程度にみられ，クロムの関与が証明された．また再 challenge の反応は本試験時と大差を認めないことから感作持続時間が長く遅延型アレルギーを示している．これらの反応は貼布除去24時間以後強い反応を呈するのではなく，除去時より強かったことから先の challenge の影響が考えられ，感作能が高まったと推察される．

感作動物に対する反応濃度は，クロム鉱さい液の 20 ppm においても 7 例中 5 例に軽度な紅斑を認めたことから，一次刺激濃度を仮に 500ppm に設定すると25倍の希釈倍数を持つことになり，低濃度でアレルギー性皮膚炎の発症が予測される．なお，誘発濃度は液性により反応出現に影響を与えアルカリ性が最も強いという報告[9]がみられる．

クロムは三価化合物でも感作性がみられ[10]，その強さは六価化合物が強いといわれ[11]，また六価および三価の交叉感作が認められている[12]．さらに高濃度の感作は challenge の反応を弱めることから[13]，複雑な免疫機序が関与し，従って感作持続時間の長い遅延型アレルギーでは環境中の種々の要因がその反応の出現に少なからぬ影響を与えると思われ，他の化学物質との交叉感作を検討することが今後必要と考えられる．

結　語

クロム鉱さい水浸出液の皮膚アレルギーを検出する目的でモルモットを用いて maximization test を実施した．クロム鉱さい水浸出液は遅延型過敏症が確認され，同濃度のクロム対照液と比べ若干反応が強度に現れた．またクロム鉱さい水浸出液とクロム対照液で交叉感作が成立した．このことはアレルギーに起因する接触性皮膚炎を惹起する可能性を示唆した．

謝辞　本研究にあたり御助言をいただきました資生堂研究所藤井誠史郎氏ならびにクロム鉱さい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) 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) 福森信隆，樺島順一郎，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，129，1977
4) Magnusson, B. and A. M. Kligman : *Allergic Contact Dermatitis in the Guinea Pig*, 1970, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A.
5) 森川藤鳳：新しい毒性試験と安全性の許価，453，1975，ソフトサイエンス社
6) 福森信隆，樺島順一郎，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，81，1978
7) Draize, J. H. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82, 337, 1944
8) 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
9) Skog, E. and J. E. Wahlberg : *Arch. Derm.*, 99, 697, 1969
10) Fregert, S. and H. Rorsman : *Arch. Derm.*, 90, 4, 1964
11) Fregert, S. and H. Rorsman : *Arch. Derm.*, 93, 711, 1966
12) Gross, P. R., S. A. Katz, and M. H. Samitz : *J. Invest. Derm.*, 50, 424, 1968
13) Jansen, L. H. and L. Berrens : *Dermatologica*, 137, 65, 1968

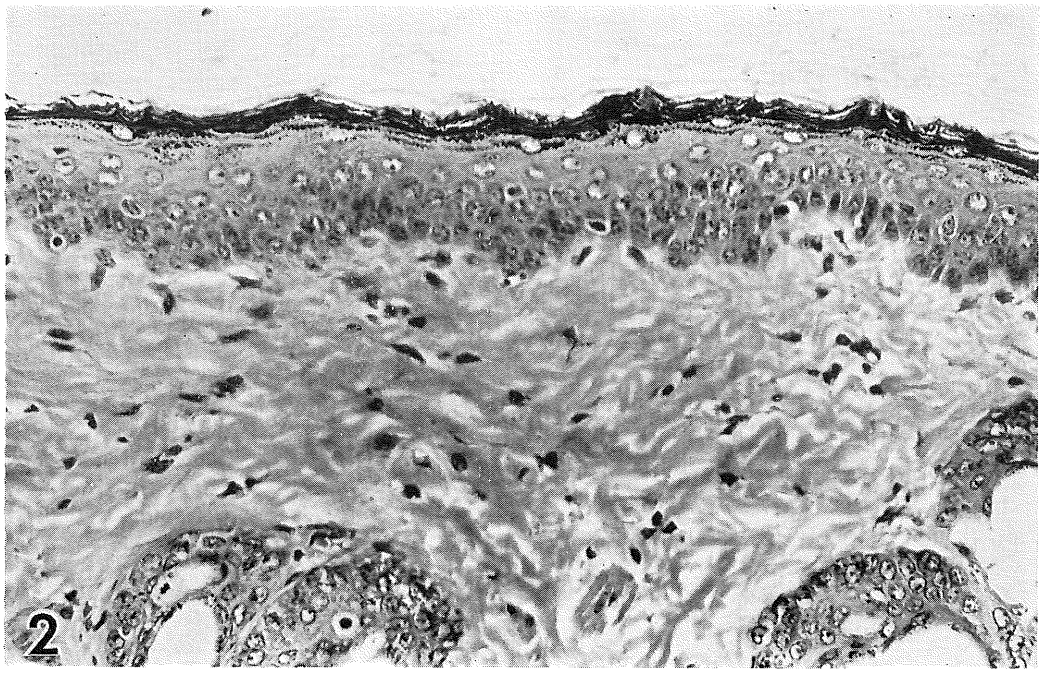


Fig. 2. Epidermis and cutis of control guinea pig skin. (H. E. × 200)

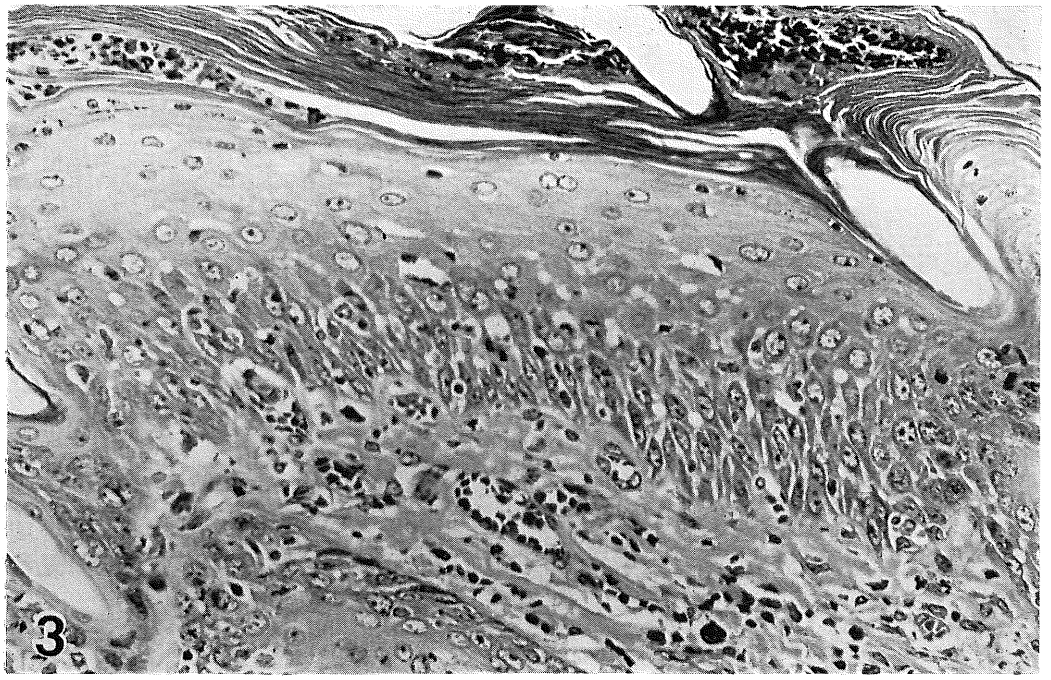


Fig. 3. Hyperkeratosis and intercellular edema in epidermis of guinea pig treated with 500ppm chromium ore residue. (H. E. × 200)

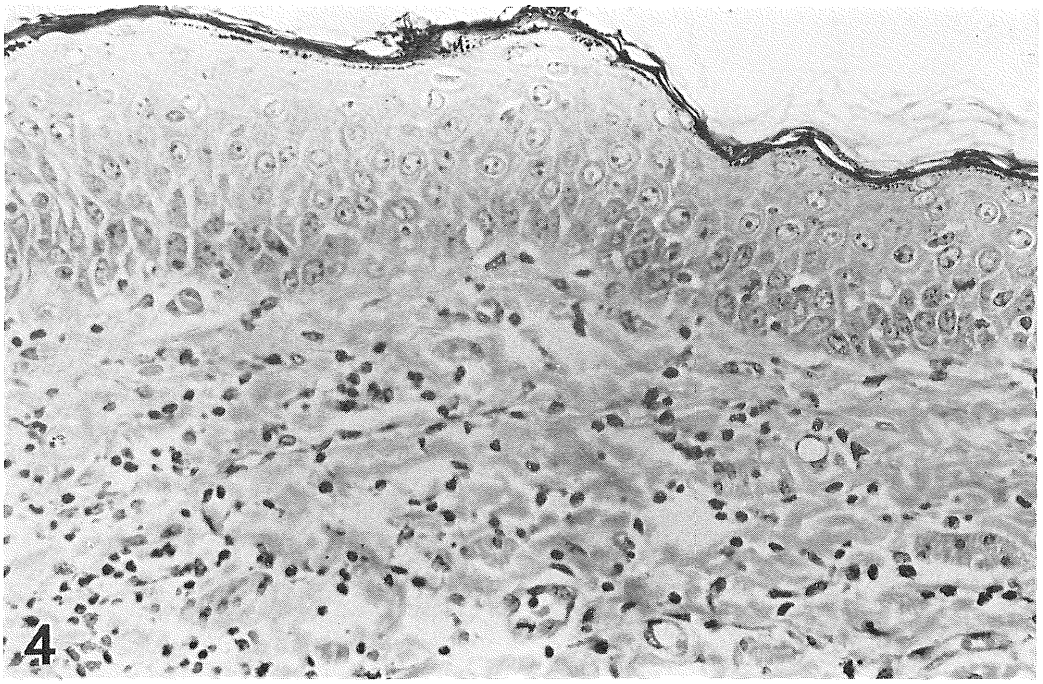


Fig. 4. Thickening in epidermis and invasion in papillary layer by mononuclear cells of guinea pig treated with 500ppm sodium chromate. (H. E. × 200)

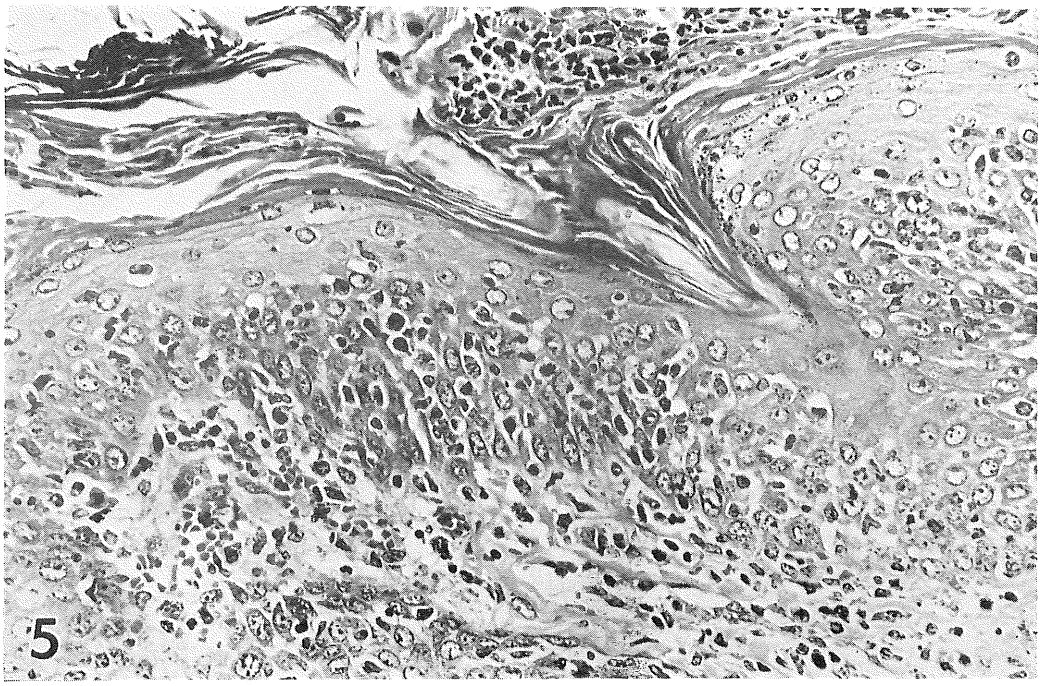


Fig. 5. Spongiosis and cell infiltration in epidermis of guinea pig treated with 1% PPDA. (H. E. × 200)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 81-82, 1978

クロム鉱さい水浸出液の感作性試験 (第2報)
即時型アレルギーの検索

福森信隆*, 樺島順一郎*, 井口重孝*, 平賀興吾*

Allergic Sensitization to Chromium Ore Residue (II)
Identification of Immediate-Type Hypersensitivity

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

緒　言

クロムの皮膚障害には高濃度の暴露でみられる腐食性のクロム潰瘍もあるが，多くはクロム皮膚炎でアレルギー性であるといわれる[1]．従って感作成立後は一次刺激に至らない低濃度で接触皮膚炎が誘発される．これまでにクロム鉱さい水浸出液の一次刺激性[2]，短期累積刺激性試験[3]を行い中等度の刺激性を認めた．今回，クロム鉱さい水浸出液のアレルギー性を検索する目的で感作試験を行った．本報では即時型過敏症を検出するPCA反応，沈降反応の結果について報告する．

実験材料および方法

抗血清の作製　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[2]六価クロム1000ppmを含有するクロム鉱さい水浸出液（pH 12.8，クロム鉱さい液と略す），クロム酸ナトリウム（特級，和光純薬㈱）をクロム鉱さい液と同濃度に調整された対照液（クロム対照液と略す）および *p*-phenylenediamine（東京化成工業㈱）の水溶液（PPDA液と略す）を用い，モルモットでmaximization testを実施し反応が陽性に認められた後，各群5匹を用いて約2週間を経て再challengeを行い貼布除去後24時間の陽性反応を確認してから採血を行い血清を分離し抗血清Ⅰとした[4]．

また，抗体価を高める目的で一度maximization testで陽性反応を認めた動物を5匹用意し，約3週間後に再inductionをadjuvant (Freund's complete adjuvant, Difco製) とともに皮内注射し，1週間後に中性とした200ppmクロム鉱さい液，200ppmクロム対照液，0.2% PPDA液を各0.5m*l*ずつ静脈内注射を行った．希釈はすべて注射用蒸留水を用い，静脈内注射から5日後に心臓採血を行い定法に従って血清を分離し抗血清Ⅱとした．また感作を行っていない動物の血清を対照血清として用いた．

実施法

A．PCA反応[5]　動物はbarrier system下に生育されたハートレイー系雌性モルモット（チャールスリバー）を馴化飼育後，体重350～400 gでmaximization testを行い，その後抗血清Ⅰの試験は体重450～500g，抗血清Ⅱの試験は体重500～550 gで各群3匹ずつに1匹当たり5匹分の抗血清を皮内注射した．

1．抗血清の皮内注射　モルモットの背部から側腹部にかけ電気バリカンおよび円形回転刃による電気カミソリで剃毛し，脊柱部を避け注射部位を赤色のマジックインキで左右各3列，縦6列に小さな点の印を付けた．皮内注射は各群の抗血清を phosphate buffer solution（1 *l* 当たり Na_2HPO_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, PBS と略す）を用いて2倍～32倍に2倍希釈を行い，印の上に無麻酔下で0.1m*l*ずつ行った．

2．抗原の惹起注射　皮内注射を行ったのち1匹を48時間後に，2匹を72時間後に抗原 0.5m*l* と1% evans blue 液 0.5m*l* を混合し，後肢の静脈に静脈注射を行った．抗原は希塩酸を用い中性にした1000ppmクロム鉱さい液および1000ppmクロム対照液，1%のPPDA液に10mg/m*l* となるように bovine albumin (miles) を加え37°恒温槽で4時間放置，時々振とうした後，色素液と混合した．抗原液の注射後30分で動物を断頭屠殺し放血した後皮膚を剝離して判定を行った．

B．沈降反応[6]　抗血清をPBSを用いて2倍～32倍に2倍連続希釈法で希釈しヘマトクリット管に吸い込み，次に泡を生じないように抗原液を続けて吸い込ませ，その後パテ台上に立て3日間室温で放置し境界面に出現する白色沈殿層を観察した．抗原液は中性にした1000ppmクロム鉱さい液およびクロム対照液，1%のPPDA液に3.5g/d*l* PBS, 7g/d*l* PBS, 14g/d*l* PBSの割でbovine albuminを加えたものと等量混合し，37°

* 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

恒温槽で4時間放置，時々振とうした後用いた．

以上の反応を抗血清Ⅰ，Ⅱについて実施した．

実験結果

A．PCA反応 抗血清ⅠおよびⅡで皮膚に色素の局在が認められず，全例で陰性であった．

B．沈降反応 抗血清ⅠおよびⅡで3日間観察した結果，抗原濃度によらず全例で陰性であった．

考察

モルモットの maximization test でクロム鉱さい液，クロム対照液，PPDA 液のアレルギー性接触皮膚炎が誘発され，クロムは遅延型過敏症の特質を持つことが示された[4]．皮膚で顕著な炎症反応を呈することから，この感作性の高い状態ではおそらく抗体産生が促進されているという推定のもとに，クロムは即時型過敏症を惹起させるかどうか抗原抗体反応を行って検索した．抗血清Ⅰの結果で全例に陰性を認めたことから，抗体価が低いためと考え，再度，皮内注射，静脈注射で induction を行ったが種々の条件にもかかわらず抗血清Ⅱでも全例が陰性であった．

反応を示さなかったひとつの理由に，一般の抗原は即時型あるいは遅延型のいずれか一方を持ち，つまり実際には反応が両方起こっているが一方が強く他方が弱いため現象として現われる反応は即時型か遅延型のいずれかであるといわれることから[7]，遅延型の反応が顕著に出現し，即時型の反応は検出されなかったとも考えられる．

また，クロムそれ自身は分子量が低いため抗原となりえずハプテンであり，タンパク質と結合してはじめて抗原性を持つと思われることから，今回 bovine albumin とクロムが完全に結合せず抗原抗体反応を起こさなかったためとも考えられる．タンパク質との結合は六価クロムに対し三価クロムは容易にタンパク質と結合してハプテンータンパク質複合体を形成する[8]が，今回用いた六価クロムの鉱さい液とbovine albuminの結合は弱いと思われ，抗原に三価クロムを用いることも今後検討する必要があると思われる．しかしながら，遅延型過敏症の貼布試験で六価クロムが三価クロムに比べ感作性が強いといわれる[9]のは，六価クロムでは細胞膜透過性が容易であるため拡散性が強く，生体内に取り込まれて三価に還元されタンパク質との複合体を形成し感作性を有するのに対し，三価クロムは表皮，真皮で強い親和性を持つこと[8]から生体内に入りにくく，従って感作性が六価クロムに比べ低下するものと思われる．さらに即時型あるいは遅延型過敏症の誘導は，感作抗原の侵入経路によって多くが決定されることから[7]，複雑な生体機構が関与していると思われる．

また動物の感受性が反応に影響を与えることから，今回実験に供した動物は体重が 500g に近く，最も鋭敏な反応を示す 300g 前後に比べ加令の影響によって感受性が低下していることが考えられる．しかし実験には示さなかったが，TNP 免疫血清による PCA 反応で色素沈着が認められたことから，反応性が残っていると思われる．さらにストレスが反応性を低下させるといわれ[10]，無麻酔下で行った注射による刺激が反応を抑制していることも考えられるが明らかでない．

PCA反応と沈降反応はIgG抗体を検出するが，PCA反応の72時間後では IgE が検出され，ともに即時型過敏症に重要とされている．抗体産生が促進された時，IgG，IgE の両者とも増加すると思われるが，今回の実験では PCA 反応，沈降反応とも陰性であったことから，抗体価が抗原抗体反応を起こす濃度まで到達していないと考えられ即時型過敏症の可能性が少ないことが示唆されるが，操作上の問題点もあり今後の検討を待ちたい．

結語

クロム鉱さい水浸出液の即時型過敏症を検出する目的で PCA 反応，沈降反応を行った．Maximization test で陽性後のモルモット抗血清の反応は操作上の若干の問題点があるが陰性を示し，再induction後の反応も陰性であった．クロム鉱さい水浸出液は遅延型過敏症を惹起させるが即時型過敏症の可能性が少ないことを示唆した．

謝辞 本研究にあたり御助言をいただきました当部の佐々木美枝子氏ならびにクロム鉱さい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) 木村正己，小野 哲，和田 攻訳：環境汚染物質の生体への影響，2，60，1977，東京化学同人
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) 福森信隆，樺島順一郎，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，129，1977
4) 福森信隆，井口重孝，樺島順一郎，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，73，1978
5) 右田俊介：免疫化学，235，1972，中山書店
6) 木村一郎：免疫学・アレルギー学実験法，250，1971，文光堂
7) 村松 繁，桂 義元訳：免疫学入門，124，1975，共立出版
8) Mali, J. W. H., W. J. Van Kooten, and F.C.J. Vanneer : *J. Invest. Derm.*, 41, 111, 1963
9) Fregert, S. and H. Rorsman : *Arch. Derm.*, 93, 711, 1966
10) Ovary, Z. : *Passive Cutaneous Anaphylaxis in Immunological Methods*, 259, 1964, Blackwell, Oxford

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 83-85, 1978

柑きつ類カビ防止剤の微生物系における突然変異誘起性について

小嶋昭江*, 平賀興吾*

Mutagenicity of Citrus Fungicides in the Microbial System

AKIE KOJIMA* and KOGO HIRAGA*

緒　言

柑きつ類のカビ防止剤の安全性点検の一環として，ジフェニール（DP），*o*-フェニルフェノール（OPP），*o*-フェニルフェノールナトリウム（OPP-Na），*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチルエステル（PHBB）およびチアベンダゾール（TBZ）の5種について微生物系による突然変異誘起性の再検討を行った．

これらの微生物系を用いた突然変異誘起性について，DP[1-3]，PHBB[4]，TBZ[4,5]はいずれも陰性とされている．

OPPについては，河内[3]，白須ら[6]は陰性としている．これに対し，花田[1]はrec assayおよび*Salmonella typhimurium* TA系を用いた実験で陽性であると報告している．また，西岡[2]は*Escherichia coli* WP2および*S. typhimurium* TA系を用いたreversion testでは陰性であるが，*E. coli*によるrepair testの系では陽性であると報告している．

OPP-Naについては河内[4]の陰性の報告がある．

実験材料および実験方法

試料　*o*-フェニルフェノール（OPP），*o*-フェニルフェノールナトリウム（OPP-Na），ジフェニール（DP），チアベンダゾール（TBZ）：以上東京化成㈱，*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチルエステル（PHBB）：和光純薬㈱　OPP，DP，TBZおよびPHBBはジメチルスルホキサイド（DMSO）に，OPP-Naは滅菌精製水に溶解して試料液とした．陽性のコントロールとして，フリルフラマイド（AF-2），ベンツ(a)ピレン（BP），2-アセチルアミノフルオレン（AAF）を使用した．

菌株　1) *Bacillus subtilis* H17A (*rec*$^+$)，M45T (*rec*$^-$)[7]

2) *Escherichia coli* B/r WP2 (*trp*$^-$，HCR$^-$)[8]

3) *Salmonella typhimurium* TA100 (*hisG*$^-$，*uvrB*$^-$，*rfa*$^-$，*gal*$^-$，*bio*$^-$)，TA98 (*hisD*$^-$，*uvrB*$^-$，*rfa*$^-$，*gal*$^-$，*bio*$^-$)[9-11]

rec assayおよびmutation testは前報[12]に従って行った．

結果および考察

表1にrec assayの結果を示した．OPP，OPP-Naは1 mg/ろ紙以上の濃度で，H17A，M45T株に生育阻止を示した．両株に対する生育阻止帯の差は2～3 mmであったが，阻止帯の境界が不明瞭なため，両株に対する生育阻止に差があるとは認められなかった．PHBBも1 mg/ろ紙以上で生育阻止がみられたが，両株に対する阻止帯の差はみられなかった．DP，TBZについては生育阻止はみられなかった．

E. coli B/r WP2によるmutation testの結果を表2に示した．OPP，OPP-Naについては1～100μg/m*l*で復帰コロニー数の増加は認められず，1 mg/m*l*では致死作用がみられた．DPについては100μg/m*l*以上で致死が認められ，10^7生菌当りの復帰コロニー数は増加した．しかし，DPの希釈段階を増して再度実験を行ったが，プレート当りの復帰コロニー数自体の増加は認められず，陽性とは判断できなかった．TBZ，PHBBについては，復帰コロニー数の増加は認められなかった．

S. typhimurium TA100，TA98によるmutation testの結果を表3に示した．ポリ塩化ビフェニール（PCB）-S9，フェノバルビタール（PB）-S9による代謝活性化の有無にかかわらず，どの試料についても，コントロールと比較して，復帰コロニー数の増加は認められなかった．

以上，本実験条件下では，5種のカビ防止剤の突然変異誘起性は認められなかった．

要　旨

o-フェニルフェノール（OPP），*o*-フェニルフェノールナトリウム（OPP-Na），ジフェニール（DP），チアベンダゾール（TBZ）および*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチルエステル（PHBB）の5種のカビ防止剤の突然変異誘起性について，*Bacillus subtilis* H17A，M45Tによる

* 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. Rec assay

試料	試料／ろ紙	生育阻止帯 (mm) H17A(*rec*⁺)	M45T(*rec*⁻)
OPP	10μg	0	0
	100μg	0	<1
	1mg	10	13
	10mg	10	13
OPP-Na	10μg	0	0
	100μg	0	<1
	1mg	8～10	10～12
	10mg	15～18	20～23
DP	1mg	0	0
	10mg	0	0
TBZ	1mg	0	0
	10mg	0	0
PHBB	100μg	0	0
	1mg	2～3	3～4
	10mg	3	3～5
DMSO	0.02ml	0	0
H_2O	0.02ml	0	0
AF-2	0.1μg	8	26

rec assay と *Escherichia coli* B/r WP2 (*trp*⁻, HCR⁻), *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 による mutation test を行った. いずれの方法においても突然変異誘起性は検出されなかった.

表 2. *E. coli* B/r WP2(*trp*⁻, HCR⁻) による mutation test

試料	μg/ml	生菌／プレート	復帰体／プレート	復帰体／10^7 生菌
OPP	0	6.4×10^7	19	3.0
	1	5.4×10^7	20	3.7
	10	5.4×10^7	18	3.3
	100	6.4×10^7	22	3.4
	1000	<10	0	—
	AF-2[1)]	5.4×10^7	69	12.8
OPP-Na	0	5.8×10^7	20	3.4
	1	5.8×10^7	22	3.8
	10	6.2×10^7	26	4.2
	100	6.0×10^7	15	2.5
	1000	<10	0	—
	AF-2	5.4×10^7	69	12.8
DP	0	3.3×10^7	15	4.5
	1	3.0×10^7	18	6.0
	10	3.3×10^7	19	5.8
	100	1.3×10^6	19	146.1
	1000	2.5×10^5	14	63.9
	AF-2	2.2×10^7	143	65.0
TBZ	0	1.2×10^8	37	3.1
	1	1.1×10^8	25	2.3
	10	1.4×10^8	28	2.0
	100	1.2×10^8	37	3.1
	1000	1.2×10^8	33	2.8
	AF-2	1.6×10^8	185	11.6
PHBB	0	1.2×10^8	37	3.1
	1	1.3×10^8	36	2.8
	10	1.3×10^8	34	2.6
	100	1.3×10^8	36	2.8
	1000	5.0×10^2	0	—
	AF-2	1.6×10^8	185	11.6

1) AF-2 0.05μg/ml

文　献

1) 花田信次郎：栄養と食糧, 29-1, 66, 1976
2) 西岡一, 小笠原一美：日本環境変異原研究会第6回発表会抄録集, 45, 1977
3) 河内　卓：遺伝変異原物質を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発, 厚生省がん研究助成金による研究報告, 1975
4) 河内　卓：遺伝変異原物質を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発, 厚生省がん研究助成金による研究報告, 1976
5) 白須泰彦, 寺本昭二, 森谷正明, 手塚英夫：第5回毒作用研究会抄録集, 1-26, 1978
6) 白須泰彦, 森谷正明, 加藤貴美江他：日本環境変異原研究会第5回研究発表会抄録, 35, 1976
7) Kada, T., K. TutikaWa, and Y. Sadaie : *Mutation Res.*, 16, 165, 1972
8) Bridges, B. A., R. E. Dennis, and R. J. Munson : *Genetics*, 57, 897, 1967
9) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281, 1973
10) McCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 979, 1975
11) Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 782, 1973
12) 小嶋昭江, 藤田　博, 平賀興吾：東京衛研年報, 28-2, 56, 1977

表 3. *S. typhimurium* TA100, TA98 による mutation test

試 料	S 9	TA 100								TA 98							
		0[1]	1	10	100	1000	BP[2]	AAF[3]	AF-2[4]	0	1	10	100	1000	BP	AAF	AF-2
	PCB[5]	225[7]	201	226	246	0	1020	—	—	60	64	54	60	0	258	—	—
OPP	PB[6]	260	263	230	274	0	—	4560	—	56	63	54	64	0	—	7410	—
	—	203	206	209	193	0	—	—	650	29	36	36	33	0	—	—	102
	PCB	168	185	176	183	0	810	—	—	53	46	33	59	0	292	—	—
OPP-Na	PB	207	202	209	201	0	—	4560	—	56	68	74	66	0	—	7410	—
	—	193	214	185	154	0	—	—	590	36	41	36	26	0	—	—	150
	PCB	236	229	270	230	91	666	—	—	39	42	40	54	0	250	—	—
DP	PB	247	273	258	254	95	—	3120	—	29	29	36	23	0	—	7150	—
	—	233	203	214	180	25	—	—	814	26	21	22	19	0	—	—	140
	PCB	174	178	187	194	152	755	—	—	38	52	50	43	38	362	—	—
TBZ	PB	203	166	188	215	194	—	4902	—	32	33	33	33	41	—	6231	—
	—	211	208	191	220	161	—	—	510	27	33	28	38	24	—	—	346
	PCB	169	157	157	153	0	874	—	—	52	43	45	52	0	299	—	—
PHBB	PB	185	226	198	222	126	—	3620	—	33	41	42	40	25	—	9766	—
	—	146	129	174	115	0	—	—	552	35	42	37	42	0	—	—	277

1) μg/プレート　2) BP 5μg/プレート　3) AAF 10μg/プレート　4) AF-2 0.05μg/プレート
5) PCB 誘導S9 50μl/プレート　6) PB 誘導S9 150μl/プレート　7) プレート3枚平均の復帰コロニー数

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 86-88, 1978

培養細胞における防かび剤の細胞遺伝学的研究

吉田誠二*, 益淵正典**, 平賀興吾*

Cytogenetic Studies of Antimicrobials on Cultured Cells

SEIJI YOSHIDA*, MASANORI MASUBUCHI** and KOGO HIRAGA*

緒　言

オルトフェニールフェノールおよびそのナトリウム塩（以下OPP, OPP-Naと略す）は，果実，果菜の防かび剤として，現在アメリカ，ヨーロッパなど世界各国で広く使用されている．OPPの毒性試験については，これまでいくつかの報告がある．Hodgeら[1]は，ラットを用いて急性毒性試験を行いLD50値を2.7g/kgとしている．また，慢性毒性試験については，OPP 0.02%, 0.2%, 2%の添加飼料による雌雄ラット2年間の飼育試験で2%群に若干の腎障害が見られたものの特に有害な作用を認めていない．OPPの催腫瘍性の有無についてはInnesら[2]が，陰性の結果を報告している．催奇形性については，寺本ら[3]が，ラットを用いてOPP 150, 300, 600, 1200mg/kgの用量で試験した結果，陰性の報告をしている．一方，発ガン性の有無の重要な指標である変異原性に関して，寺本ら[4]は微生物を用いた試験，ラットを用いた細胞遺伝学的試験，マウスを用いた優性致死試験を行い，いずれも陰性の結果を得ており，OPPの変異原性は認められない．しかし，花田[5]はOPPに変異原性のあることを示唆する発表を行っており，OPPの変異原性の有無について疑問を残している．変異原性を有する物質の多くは染色体異常を誘発することがよく知られている[6]．このことから，今回著者らはOPPを含む一連の防かび剤の細胞増殖におよぼす影響と染色体異常誘発性の有無を検討したので報告する．

材料および方法

1. **細胞**：チャイニーズ・ハムスター卵巣由来のCHO-KI細胞を使用した．

2. **培養液**：F12培養液に仔牛血清10%とペニシリン(100u)，ストレプトマイシン（100μg/ml）を添加し，pH 7.2-7.4に調整したものを使用した．

3. **供試薬物**：

o-phenylphenol（以下OPPと略す），東京化成工業株式会社製，Lot No. FB102

2-(4 Thiazol) benzimidazoie（以下TBZと略す），東京化成工業株式会社製，Lot No. A101

Diphenyl（以下DIPと略す），東京化成工業株式会社製，Lot No. A101

p-hydroxybenzoic acid *n*-butyl ester（以下PHBと略す），東京化成工業株式会社製，Lot No. AH101

4. **細胞の増殖におよぼす影響**　細胞をトリプシンによりガラス面よりはく離し，4×10^5/ml 濃度の細胞浮遊液を作製する．次に，上記薬物をDMSOに溶かした後，F12培養液にて種々の濃度に希釈調整し，チェンバー・スライド(Lab Tek社製）の各チェンバーに，その0.2ml を分注した．Controlは F12培養液のみとした．さらに，先に作製した細胞浮遊液を0.2ml 加え，よく混和後37℃・CO_2 Incubatorに入れ，培養を開始した．24時間後，各チェンバーの混和液をすてP.B.Sで1回細胞面を洗いホルマリン溶液で固定し，H.E染色を施した．障害度の判定は，Controlと同程度増殖したものを0，50%増殖阻止したものを2，細胞が完全に変性したもの，またはガラス面から脱落したものを4，それらの間を1，3，として表わした．

5. **細胞の増殖におよぼす影響**　4.と同様の方法で1×10^3/ml 濃度の細胞浮遊液を作製し，あらかじめF12培養液5 ml を分注してある ϕ6cm のPetri dishにその0.1ml を加えよく混和後，37℃の CO_2 Incubatorに入れ培養を開始した．8時間後培養液をすて，上記薬物を種々濃度に調整している薬物添加培養液にて培養を続行した．16時間処理後，薬物添加培養液をすてP.B.Sで数回洗浄後，F12培養液で再度培養を続けた．7日後固定，染色を行ないコロニーの数を調べた．

6. **染色体におよぼす影響**

培養後2日目の細胞を使用した．種々濃度の薬物添加培養液を作製し，その10ml を培養瓶に入れ培養を続けた．薬物濃度の設定は，細胞が分裂しうる最大耐量とそ

* 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
** 広島大学理学部植物学教室

の1/10量とした．6，24，48時間後，常法により染色体標本を作製し，ギムザ染色を施した．染色体分析は分裂中期で染色体のよく拡がった細胞200個について行った．

結　果

チェンバー・スライドを用いて調べた各種防かび剤の細胞増殖阻害度の結果を表1に示す．この試験の結果，DIPが今回用いた4種類の中で最も強い増殖阻害を示した．200μg/ml，100μg/ml 処理では，すべての細胞が変性もしくは壊死を起こしており，浮遊状態であった．50μg/ml処理でもその影響はみられ，大半の細胞は変性・壊死を起こしていた．25μg/ml 処理は，Control と同程度の増殖を示しており，細胞の増殖には何ら影響を与えなかった．OPP，PHB，TBZ の3種は，同程度の阻害を示した．0－1の判定は，Control に比べ若干の増殖阻害を示すものである．

次にコロニー形成率におよぼす影響を調べた．その結果を図1に示す．また増殖阻害の指標となるID50(50%コロニー形成阻害量）を表2に示す．この試験結果でもDIP が強い増殖阻害を示した．50μg/ml 処理で阻害が現われ，高濃度になるに従い強い阻害を示し，用量―作用関係が顕著であった．OPP は，DIP とよくにた増殖阻害を示しており，先のチェンバー・スライドで調べた結果と一致しない．TBZ の ID50は160でPHB とよく類似しているが，TBZ 100μg/ml 処理で20%前後の阻害が見られている．PHB の 100μg/ml 処理は阻害を全く見せておらず，TBZ の方が，若干強いと思える．

以上の結果より，DIP が2種の試験系で強い増殖阻害を示していることから，今回用いた4種類の防かび剤の中では，最も強い増殖阻害を示すものと考えられる．

次に染色体におよぼす影響を調べた．結果を表3に示す．OPP，TBZ，DIP，PHB の6，24，48時間処理は，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．

表 1.　防かび剤の CHO-KI 細胞の増殖におよぼす影響

Dose (μg/ml)	Chemicals			
	OPP	DIP	TBZ	PHB
200	4	4	4	4
100	4	4	4	4
50	0–1	4	0	0–1
25	1	0	0	0
12.5	0	0	0	0
6.2	0	0	0	0
3.1	0	0	0	0

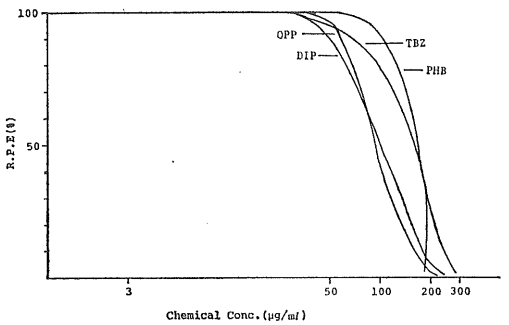


図 1.　防かび剤の CHO-KI 細胞におけるコロニー形成率

表 2.　防かび剤の CHO-KI 細胞の増殖におよぼす影響

Chemicals	ID50 (μg/ml)
OPP	94.0
DIP	100.0
TBZ	160.0
PHB	160.0

表 3.　防かび剤による染色体異常の内訳

処理時間	検体	処理量 (μg/ml)	観察細胞数	異常細胞数	Gap 染色分体型	Gap 染色体型	Break 染色分体型	Break 染色体型	その他
6	OPP	50	200	4	4	0	0	0	0
	DIP	25	200	7	5	0	2	0	0
	TBZ	50	200	3	4	0	0	0	0
	PHB	25	200	9	8	0	1	0	0
	Neg.	0	200	7	7	0	0	0	0
24	OPP	50	185	5	5	0	0	0	0
		5	200	2	2	0	0	0	0
	DIP	25	200	5	5	0	0	0	0
		2.5	200	2	2	0	0	0	0
	TBZ	50	108	2	2	0	0	0	0
		5	136	0	0	0	0	0	0
	PHB	50	133	5	6	0	0	0	0
		5	200	2	2	0	0	0	0
	Neg.	0	150	1	1	0	0	0	0
48	OPP	25	200	3	3	0	0	0	0
	DIP	12.5	200	4	4	0	0	0	0
	TBZ	25	182	3	3	0	0	0	0
	PHB	25	190	6	6	0	0	0	0
	Neg.	0	200	5	5	0	0	0	0

要　旨

防かび剤の培養細胞における増殖阻害と細胞遺伝学的検討を行った．その結果，Diphenyl が最も強い増殖阻害を示し，以下 *o*–phenylphenol, 2–(4 Thiazol) benzimidazoie, *p*–hydroxy benzoic acid *n*–butyl ester の順であった．

また染色体異常誘発性は，すべて陰性であり，小嶋らの微生物を用いた Mutation test の結果とよく一致しており，防かび剤4種の突然変異誘発性は，無いものと思える．

文　献

1) Hodge, C. Harold, A. Elliott, A. Maynard and J. Harvey : *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* : 104, 202, 1952

2) Innes. J. R. M., B. M. Ulland., G. Marison and L. Fishbein : *J. Nat. Cancer Inst.*, 42, 1101, 1969

3) 寺本昭二，金田昌博，白須泰彦：第3回毒作用研究会講演要旨集，1976

4) 寺本昭二，新宮暁子，白須泰彦：第5回日本環境変異原研究会講演要旨集，1976

5) 花田信次郎：第14回日本栄養食糧学会近畿支部大会講演要旨集，1975

6) Ishidate, M. J and S. Odashima : *Mut. Res.* : 48, 337, 1977

7) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，83，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 89-96, 1978

オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩のマウスを用いた催奇形性試験

小縣昭夫*, 安藤 弘*, 久保喜一*, 平賀興吾*

Teratological Tests of *o*-Phenylphenol (OPP) and Sodium *o*-Phenylphenol (OPP-Na) in Mice

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

緒　　言

防ばい剤オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩（以下 OPP および OPP-Na と略す）の催奇形性試験に関しては，寺本ら[1]が行なった OPP のラットを用いた臨界期強制経口投与による実験がある．その結果は最高投与量の OPP 1,200mg/kg で，11例中10例の死亡を，また 600mg/kg で有意な胎児死亡の増加と胎児体重の減少を認めたが，300mg/kg，150mg/kg では対照群に比し有意な変化を認めていない．一方，胎児観察では用量に相関性のない数例の異常を認めているだけで OPP の催奇形性は示されなかった．

本試験では一連の防ばい剤の再点検の一環として，マウスを用い，大量を投与することにより OPP および OPP-Na の催奇形作用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 25.0～37.0g）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 CE-2 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**　オルトフェニルフェノール（OPP）は東京化成㈱製 Lot No. FB103，オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na)は DOW Chemical 社製Lot No. MM01044 を使用した．またOPPの溶媒には日本薬局方オリーブ油(宮沢薬品㈱)Lot No. F. ハ. 09を，OPP-Na には蒸留水を使用した．

5. **試料投与量の決定**　OPP はラットを用いた LD_{50} 値が 2,700～3,000mg/kg[2] であること を参考とした．OPP-Na は当部のマウスにおける1回経口投与による LD_{50} が900mg/kg[3] であったことを参考とした．

6. **観察方法**　妊娠7日より15日までの9日間毎日1回経口投与を行なった．

OPP では妊娠マウスをAからDまでの4群に20～21匹を無作為に割り当て，A群は OPP 21％油溶液（2,100 mg/kg/day)投与，B群は17.4％液（1,740mg)投与，C群14.5％（1,450mg)，D群はオリーブ油のみ（10m*l*/kg/day）投与した．

OPP-Na では妊娠マウスを無作為にEからHまでの4群に20匹を割り当て，E群は OPP-Na 4％水溶液（400mg/kg/day）投与，F群2％液(200mg)投与，G群1％液（100mg)投与，H群蒸留水のみ（10m*l*/kg/day）投与とした．

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，早・後期死亡胎児，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．

OPP ではA群0匹，B群1，C群3，D群3，OPP-Na ではE群0匹，F群2，G群5，H群5匹の母体を選び，その生児をブアン液で固定し内臓異常の有無を観察[4]，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[5]を行ない骨格異常の有無を調べた．

7. **結果のまとめ方**　西村の報告[6]に準拠して行なった．

試験結果

I　OPP臨界期投与試験

1. **母体の所見**　1)体重および一般症状の推移：妊娠

* 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

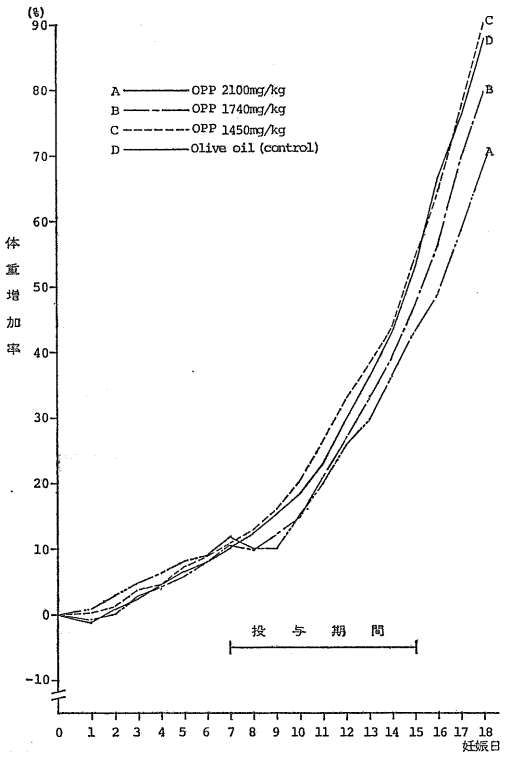


図 1. OPP 臨界期投与試験
(妊娠7—15日, 9回投与)

0日の体重を100とした体重の推移は図1に示す通りでオリーブ油のD群に較べA, B群では投与開始後抑制がみられOPP用量と相関してD群より低い値での体重増加がみられた. A群では妊娠8日に5匹, 9日に7匹, 11日, 12日に夫々2匹計16匹 (76%) が, B群では妊娠7日に4匹, 14日, 15日, 16日に夫々1匹, 計7匹 (33%), C群では妊娠11日, 15日に夫々1匹, 16日に2匹計4匹 (19%) が死亡した. また死亡したA群の2匹に膣口より出血が認められた.

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, A群, B群においてオリーブ油のD群と較べ心臓重量が有意に軽く用量相関のうかがえる変動を示した. また肝臓重量がB群とC群でD群に較べ有意に重く, その傾向はA群においても認められた. 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. 胎児に係わる所見 1) 妊娠の成立：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5/5 (100%), B群14/14 (100%), C群14/17 (82.4%), D群20/21 (95.2%) で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：B群, C群の死亡児頻度がD群

表 1. OPP 臨界期投与試験 (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 OPP 2,100mg/kg	5	2.8±0.35[1] / 10.2±1.25[2]	112.1±13.1* / 407.3±44.5**	121.3±32.8 / 438.8±110.3	198.5±19.1 / 720.2±50.2	202.7±21.9 / 735.7±61.3
B OPP 1,740mg/kg	14	2.8±0.28 / 10.3±0.95**	115.2±10.8** / 427.5±29.9**	127.1±34.9 / 472.5±128.3	200.1±25.7 / 742.0±73.7	206.5±25.3 / 765.7±71.3
C OPP 1,450mg/kg	14	3.0±0.42** / 11.0±1.61**	124.8±6.8 / 452.2±32.4	137.9±31.7 / 500.2±118.8	207.7±5.1 / 751.9±17.9	219.9±14.7 / 797.6±75.0
D オリーブ油	20	2.6±0.30 / 9.4±0.86	127.3±11.6 / 461.4±31.3	128.6±28.5 / 465.1±92.8	202.7±18.7 / 735.4±62.7	215.3±24.8 / 780.3±76.5

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 OPP 2,100mg/kg	5	170.0±12.4 / 617.5±28.9	3.7±0.89 / 13.4±2.91	3.3±0.60 / 12.1±1.92	9.5±3.77 / 34.4±13.07	9.1±2.38 / 33.2±8.97
B OPP 1,740mg/kg	14	163.2±17.7 / 605.6±54.4	3.5±0.79 / 12.9±2.64	3.2±0.75 / 11.7±2.66	8.8±2.11 / 32.6±6.97	10.3±3.61 / 38.2±12.92
C OPP 1,450mg/kg	14	172.8±21.2 / 626.0±82.0	3.7±0.66 / 13.4±2.35	3.4±0.79 / 12.4±2.68	10.4±2.54 / 37.7±9.34	10.7±2.62 / 38.6±7.94
D オリーブ油	20	170.3±12.7 / 618.2±49.2	3.5±0.65 / 12.8±2.37	3.4±0.71 / 12.2±2.53	9.3±1.66 / 33.6±5.92	10.3±2.19 / 37.1±6.77

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
* D群と比較して P<0.05　　** P<0.01　　*** P<0.001

表 2. OPP 臨界期投与試験

群 (OPP mg/kg)	a) 交尾成立雌数	b) 死亡雌数	c) 妊娠成立雌数	d) 生れた母体の認められた数	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 g ♂	♀
A (2.100)	21	16	5	5	13.2 ±1.79	12.8 ±1.92	11.6 ±13.1	6.3 ±6.9	5.0 ±11.2	11.2 ±1.10	153.4 ±56.83	1.08*** ±0.24	1.02*** ±0.24
B (1,740)	21	7	14	14	13.1 ±2.14	11.0 ±1.24	3.5* ±6.1	1.3* ±3.3	2.2 ±4.4	10.6 ±1.6	161.6 ±121.29	1.28*** ±0.13	1.23** ±0.11
C (1,450)	21	4	14	14	14.5 ±2.96	12.6 ±2.17	7.2 ±10.4	5.6* ±10.5	1.6 ±4.1	11.8 ±2.52	106.0 ±61.24	1.30** ±0.11	1.18*** ±0.15
D (オリーブ油)	21	0	20	20	13.5 ±3.12	12.4 ±2.89	14.1 ±16.0	11.8 ±15.4	2.3 ±4.2	10.9 ±3.23	124.2 ±76.16	1.35 ±0.12	1.28 ±0.12

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
(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
* $P<0.05$　** $P<0.01$　*** $P<0.001$

表 3. OPP 臨界期投与試験

群 (OPP mg/kg)	外表観察				内部器官の観察			
	奇形児 a)		その他の異常を示した児 b)		奇形児 c)		その他の異常を示した児 d)	
	頻度(%) ±SD 1)	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数
A (2,100)	3.64 ±4.98	口蓋裂：1 開眼：1	0	——	—	——	—	——
B (1,740)	6.14* ±5.96	口蓋裂：4 開眼：6	0	——	0	——	0	——
C (1,450)	6.21* ±8.03	口蓋裂：1 開眼：7 外脳症：6	0.60 ±2.23	反足：1	0	——	0	——
D (オリーブ油)	0.67 ±2.05	口蓋裂：1 開眼：1	0.50 ±2.24	曲尾：1	0	——	0	——

1) 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，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　* $P<0.05$

に較べ推計学的に有意な低値を認めた．その他では有意なまた用量相関のうかがえる多少高低の差はなかった(表2)．

3) 生児体重：オリーブ油のD群に対しA，B，C群の雌雄とも有意に小さく，雄では用量に伴なって認められた．また雌でもB群とC群の大小が用量とは逆転してはいるもののD群に較べ明らかに小さかった（表2）．

4) 生児外表奇形・異常：A群口蓋裂1（母体数1），開眼1（1）；B群口蓋裂4（4），開眼6（6）；C群口蓋裂1（1），開眼7（4），外脳症6（3），反足1（1）；D群口蓋裂1（1），開眼1（1），曲尾1（1）が認められた．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群に対しB群，C群に奇形の発生数に推計学的に有意な差を認めた（表3）．

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形はB群で肋骨癒着1，腰椎癒着1，C群で頸椎癒着1がみられ発生頻

表 4. OPP 臨界期投与試験

群 (OPP mg/kg)	観察胎児数	骨格観察 奇形児a) 頻度(%) ±SD△	奇形児a) 型とその数	変異を有する児の頻度±SD(%)△ 頭蓋骨形成不全b)	胸骨核不相称c)	過剰胸骨核d)	頸肋e)	腰肋f)	第一・第二頸椎弓の分裂・分岐g)	仙椎前異常数h)	胸骨核の縮小・分裂i)	胸椎体形成・不全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)	腰椎後椎骨平均化骨数m)
A (2,100)	55	0	——	5.45 ±12.20	10.35 ±9.51	6.15 ±13.76	16.97*** ±28.15	44.10 ±30.22	20.26 ±15.59	1.82 ±4.07	27.64* ±41.57	0	(左)1.89±1.09** (右)1.96±1.14**	(左)1.50±0.87** (右)1.52±0.88**	10.22±2.15**
B (1,740)	139	1.54 ±5.56	肋骨癒着:1 腰椎癒着:1	0	18.30 ±15.67	10.14 ±14.20	8.92** ±12.23	47.60 ±29.46	21.02 ±13.29	0	10.79* ±13.60	0	(左)2.66±0.41 (右)2.69±0.44	(左)2.06±0.44* (右)2.10±0.43*	12.10±1.24
C (1,450)	129	0.65 ±2.15	頸椎癒着:1	1.82 ±6.03	13.74 ±9.12	11.88 ±11.82	6.64** ±10.10	35.07 ±20.75	10.95** ±10.54	0.83 ±2.74	3.39 ±8.47	0	(左)2.37±0.43** (右)2.50±0.39**	(左)2.14±0.53 (右)2.18±0.51	12.07±1.89
D (オリーブ油)	177	0	——	0	11.81 ±11.96	12.01 ±11.04	0	54.11 ±28.64	30.68 ±23.32	0	2.08 ±4.70	0	(左)2.85±0.42 (右)2.95±0.44	(左)2.43±0.51 (右)2.47±0.51	12.94±1.24

c) 最長胸骨核で左右の核の間にその長さの1/2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　* $P<0.05$　** $P<0.01$　*** $P<0.001$

度はA群0%，B群1.54±5.55%，C群0.65±2.15%，D群0%で群間に有意差を認めなかった．変異では頸肋がA・B・C群とも対照D群に比して高く推計学的に有意であり，用量相関が認められた．また胸骨核の縮少，分裂がA，B群で有意に高く用量との関連が認められ，第一・第二頸椎弓の分裂，分岐でC群がD群に比し有意に低かった．その他の変異では有意な，また用量相関のうかがえる変動はなかった．化骨進行度では対照D群に対しA群では各観察指標で有意な遅延が認められたが，B群では後肢趾骨平均化骨数，C群では前肢指骨平均化骨数だけが有意に少ないのみで用量との関連は明らかでなかった（表4）．

6) 生児内部器官の奇形・異常：観察したB，C，D群に奇形，異常を検出しなかった．

Ⅱ OPP-Na 臨界期投与試験

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とした体重の推移は図2に示す通りで，対照のH群に較べ，E群では投与後強い抑制がみられ一時持ち直すかにみえたが妊娠14日頃から再び強い抑制を認めた．F群では妊娠11日頃から抑制がみられ，G群ではF群に1から2日遅れて抑制がみられた．また各群ともOPP-Na用量と相関してH群より有意な体重増加の抑制がみられた．E群では妊娠11日に1匹，12日に4匹，13日2匹，14日1匹，15日3匹，16日2匹，17日2匹，18日1匹，計16匹（80%）が，F群では妊娠15日に2匹，14日・16日に夫々1匹，計4匹（20%）が死亡した．死亡したマウスのほとんどは膣口より出血が認められた．

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特記する変化を認めなかった．器官重量は表5に示す通りで，OPP-Na最高用量のE群において水のH群と較べ肝・心・脾臓の絶対重量が有意に軽かった．またF群の肺の相対重量がH群に較べ有意に重かった．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. 胎児に係わる所見 1)妊娠の成立：妊娠18日の屠

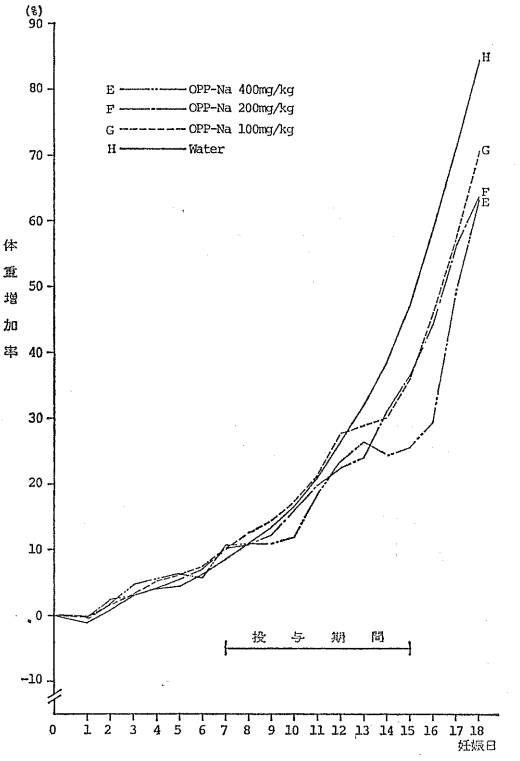


図 2. OPP-Na 臨界期投与試験
（妊娠7—15日，9回投与）

表 5.　OPP-Na臨界期投与試験（妊娠18日母体器官重量）

群 投与量	母体数	肝臓 g mg g/100g	心臓 mg mg/100g	脾臓 mg mg/100g	腎臓(左) mg mg/100g	腎臓(右) mg mg/100g
E OPP-Na 400mg/kg	4	2.4±0.24*[1] 8.2±1.19[2]	121.8±11.0* 410.4±46.6	100.4±31.8* 336.4±100.2	222.7±13.8 752.0±85.2	219.8±18.7 745.7±126.9
F OPP-Na 200mg/kg	13	2.7±0.38 9.0±1.09	130.7±11.0 438.9±46.8	135.4±39.4 448.9±111.7	224.1±20.6 751.5±64.0	236.8±22.9 794.2±74.7
G OPP-Na 100mg/kg	19	2.6±0.40 8.5±1.10	132.0±14.7 431.6±39.4	120.3±41.7 392.2±128.1	225.9±32.1 736.8±76.2	240.3±27.2 785.1±66.4
H 水	17	2.8±0.27 9.1±0.81	135.0±9.4 437.0±35.6	128.9±22.1 417.1±73.9	224.1±17.9 724.6±55.9	235.3±17.2 760.9±57.9

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
E OPP-Na 400mg/kg	4	186.9±7.4 630.8±62.6	4.1±0.67 13.8±1.39	3.9±0.69 13.2±1.80	9.5±2.42 32.1±9.22	12.6±1.66 42.1±4.44
F OPP-Na 200mg/kg	13	187.7±11.7 630.0±43.6*	4.1±0.67 13.8±2.61	3.8±0.61 12.7±2.14	10.0±2.47 33.8±8.60	10.5±1.83 35.1±5.71
G OPP-Na 100mg/kg	19	188.1±13.4 617.1±56.0	4.1±0.67 13.5±2.95	3.8±0.68 12.4±2.64	10.6±2.88 34.9±9.52	12.1±2.17 39.8±7.35
H 水	17	183.7±12.6 593.9±39.4	3.9±0.47 12.6±1.71	3.6±0.63 11.7±2.09	11.0±2.79 35.4±8.23	12.0±2.44 38.8±7.12

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

表 6.　OPP-Na 臨界期投与試験

群 (OPP-Na mg/kg)	交尾成立雌数[a]	死亡雌数[b]	妊娠成立雌数[c]	生児の認められた母体数[d]	生児を認められた母体の観察								
					平均妊娠黄体数[e] ±SD	平均着床痕数[f] ±SD	死亡児頻度±SD(%)[g] 合計	早期[1]	後期[2]	平均生児数[h] ±SD	性比[i] ♂/♀×100 ±SD	平均生児体重±SD[g] ♂	♀
E (400)	20	16	4	4	13.5 ±6.4	11.3 ±5.9	11.7 ±15.8	10.0 ±15.9	1.7 ±3.3	10.5 ±6.0	86.5 ±17.8	1.19*** ±0.26	1.10*** ±0.23
F (200)	20	4	15	13	13.1 ±2.2	11.0* ±3.9	10.1 ±11.2	4.9 ±9.7	5.3 ±6.4	10.0* ±4.0	107.9 ±68.1	1.29*** ±0.17	1.19*** ±0.16
G (100)	20	0	19	19	14.5 ±2.0	12.9 ±2.1	9.4 ±14.2	5.4 ±13.0	4.0 ±6.8	11.9 ±2.9	106.1 ±59.8	1.19*** ±0.21	1.14*** ±0.17
H (水)	20	0	17	17	14.5 ±2.1	13.2 ±1.6	5.0 ±4.9	3.7 ±6.8	1.3 ±2.9	12.6 ±1.8	138.1 ±70.3	1.40 ±0.10	1.30 ±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
（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
* P＜0.05　　*** P＜0.001

殺開腹時に妊娠（着床）成立を確認した母体はE群4/4（100%），F群15/16（93.8%），G群19/20（95%），H群17/20（85%）で，F群の2匹が着床痕のみであったのを除いて，妊娠の成立した母体に生児を認めた（表6）.

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：F群の平均着床数と平均生児数がH群に較べ有意に少なかったがその他には有意と認め

表 7. OPP-Na 臨界期投与試験

群 (OPP-Na mg/kg)	外表観察				内部器官の観察			
	奇形児[a]		その他の異常を示した児[b]		奇形児[c]		その他の異常を示した児[d]	
	頻度(%) ±SD	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数	頻度(%) ±SD	各型とその数
E (400)	5.77 ±11.54	口蓋裂：3	0	——	—	——	—	——
F (200)	3.21 ±8.01	口蓋裂：1 開眼：1	0	——	0	——	0	——
G (100)	12.45 ±23.56	口蓋裂：28 開眼：3 外脳症：1	0	——	0	——	0	——
H (水)	3.28 ±5.87	口蓋裂：1 開眼：6	0	——	0	——	0	——

1）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，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. OPP-Na 臨界期投与試験

群 (OPP-Na mg/kg)	観察胎児数	骨格観察											
		奇形児[a]		変異を有する児の頻度±SD(%)△								化骨進行度±SD△	
		頻度(%) ±SD△	型とその数	頭蓋骨形成不全[b]	胸骨核不相称[c]	過剰胸骨核[d]	頚肋[e]	腰肋[f]	第一の弓の分裂・第二頚椎分裂[g]	仙椎前異常[h]	胸骨核の縮小・分裂[i]	胸椎体成・腰椎不全[j]	前肢指骨平均数(基節骨+中節骨)[k]	後肢趾骨平均数(基節骨+中節骨)[l]	腰椎後椎骨平均数[m]
E (400)	42	0	—	5.77 ±11.54	9.59 ±7.70	6.25 ±12.50	4.20 ±4.88	5.76** ±4.01	24.32 ±20.64	0	54.55* ±53.01	0	(左)1.82±1.10** (右)1.89±1.09**	(左)2.05±2.14 (右)2.15±2.05	10.11±3.62**
F (200)	111	0	—	3.79 ±8.63	14.58 ±13.97	18.42 ±19.29	3.98 ±6.49	31.59 ±29.70	18.09 ±16.58	0	14.15 ±22.43	0	(左)2.36±0.95** (右)2.39±0.96*	(左)2.07±1.02* (右)1.97±1.08*	11.87±2.47
G (100)	171	0	—	4.29 ±16.04	20.65 ±19.00	5.77** ±10.68	2.86 ±8.95	36.73 ±29.93	18.32 ±17.09	0	16.76 ±26.45	0	(左)2.35±0.91** (右)2.42±0.90**	(左)1.88±0.69*** (右)1.94±0.71**	10.79±2.19**
H (水)	151	0	—	0	16.51 ±12.69	19.52 ±16.75	1.16 ±2.73	47.65 ±16.95	29.29 ±13.75	0.69 ±2.40	2.30 ±3.67	0	(左)3.20±0.38 (右)3.23±0.40	(左)2.80±0.50 (右)2.82±0.53	13.22±1.33

c）最長胸骨核で左右の核の間にその長さの1/2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）頚椎数＋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　　* $P<0.05$　　** $P<0.01$　　*** $P<0.001$

られる多少高低の差はなかった（表5）.

3) 生児体重：水のH群に対しE・F・G群の雌雄ともに有意に小さかったが用量に伴う一定傾向は認められなかった（表5）.

4) 生児外表奇形・異常：E群口蓋裂3（母体数1）；F群口蓋裂1（1），開眼1（1）；G群口蓋裂28（6），開眼3（1），外脳症1（1）；H群口蓋裂1（1），開眼6（5）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．各群奇形児頻度はE群5.8%，F群3.2%，G群12.5%，H群3.3%となり，G群では1母体の胎児16匹中15匹に口蓋裂がみられ，その結果出現頻度も高かったが推計学的に有意性は認めなかった（表7）.

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形は全群に認められなかった．変異を有するものの出現頻度では，対照であるH群に較べE群で腰肋が低く，胸骨核の縮小・分裂が高く，G群で過剰胸骨核が低かった．また有意差はないが頚肋が用量と関連して高くなる傾向を認めたが，その他の変異では有意な，また用量相関のうかがえる変動はなかった．化骨進行度では対照H群に対し，E群の後肢趾骨平均化骨数とF群の腰椎後椎骨化骨数を除いた各観察指標で有意な遅延が認められた（表8）.

6) 生児内部器官の奇形・異常：観察したF・G・H群に奇形，異常を検出しなかった.

総括と考按

オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩

(OPP および OPP-Na) 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15日までの９日間毎日１回投与により，母体体重の推移と妊娠18日の母体と胎児の異常を検索した．投与量は OPP，A群2,100mg，B群1,740mg，C群1,480mg，OPP-Na，E群400mg，F群200mg，G群100mg とした．

OPP 試験では，母体体重の抑制がA，B群に認められ，またA群16匹，B群７匹，C群４匹が妊娠18日の開腹時までに死亡した．一般状態では死亡したA群の２匹に膣口より出血がみられたが，妊娠18日の肉眼的解剖所見に異常はなく，器官重量で対照D群に対しA，B群の心臓が軽く，肝臓がB群とC群で重かった．胎児に係わる所見では死亡児頻度がB，C群で有意に低かった．一方生児体重ではA，B，C群の雌雄とも有意に小さく発育遅延が考えられた．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，外脳症等が対照群を含めてみられ，B，C群ではわずかであるが推計学的に有意な出現を認めたが一定傾向はみられなかった．骨格の奇形・変異・化骨進行度では奇形がB群で肋骨癒着，腰椎癒着が夫々１例，C群で頸椎癒着１例がみられたが群間に有意差を認めなかった．変異では頸肋がA，B，C群で対照D群に較べ有意な，また用量相関のある高い値を示した．また胸骨核の縮小・分裂がA，B群で用量と関連して有意に認められがC群の第一・二頸椎弓の分裂，分岐は対照D群より有意に低く，その他の変異では有意な，また用量相関のうかがえる変動はなかった．一方発育遅延の指標となる化骨進行度では対照D群に対しA群では各指標で有意な遅延が認められた．しかしB群では後肢趾骨平均化骨数で，C群では前肢指骨平均化骨数でのみ有意に少なく化骨進行度と用量との関連は明らかでなかった．生児内部器官の観察では奇形・異常を検出しなかった．

OPP-Na 臨界期投与試験ではE群（400mg），F群（200mg），G群（100mg）の投与群に母体体重の増加抑制が認められ，それは用量と相関して認められた．また死亡が，E群16匹，F群に４匹認められ死亡したマウスのほとんどは膣口よりの出血がみられ流産と考えられた．妊娠18日の母体の解剖所見では異常なく，器官重量ではE群の肝・心・脾臓重量が有意に軽く，F群の肺が重かった．生児に係わる所見ではF群で平均着床数，平均生児数が少なかったが，用量との相関性は認められず，死亡児頻度，性比などにも有意と認められる多少高低の差はなかった．生児体重では投与群全部が雌雄とも対照群に較べ有意に少なく発育遅延と認められた．一方生児の外表奇形・異常に特異的なものはなく推計学的に有意な出現をみなかった．G群で口蓋裂が28と多数出現したがこれは１例の母体が口蓋裂15匹の胎児を有していたためである．骨格の奇形・変異・化骨進行度では全群に奇形はみられず，変異である腰肋が対照群に較べE群で低く，胸骨核の縮小・分裂が同じE群で高く，過剰胸骨核がG群で低かった．また頸肋で有意差はなかったが用量相関性のある一定傾向を示した．しかしその他の変異に有意な，また用量相関のうかがえる変動はなかった．発育遅延の指標となる化骨進行度では，E群の後肢趾骨化骨数とF群の腰椎後椎骨数にのみ推計学的有意性を認めなかったものの，発育遅延をうかがわせる変動を示した．胎児内部器官の観察では奇形・異常は認めなかった．

本試験での OPP 量は寺本らのラットを用いた報告よりさらに大量を投与したが，生児体重・化骨進行度より胎児の発育遅延は認められるが，着床数に有意な減少がなく，死亡児頻度に用量と関連した増加も認められなかった．また外表奇形では，OPP 1,740mg 群，1,450mg 群で推計学的有意性はあったが発生頻度を高めた奇形の型が開眼であり，これは JCL-ICR マウスでよくみられる自然発生奇形であること，さらに最高用量の2,100mg 群での奇形発生頻度が低く，用量相関性が認められない．また骨格観察でも奇形の発現頻度に用量相関性がなく，最高用量の2,100mg群ではまったくみられなかった．変異でも頸肋が用量に関連して有意に増加した以外には有意なまた一定傾向の増加が認められなかった．また内部器官の観察でも異常は検出されなかった．一方OPP-Naは体内で Na^+ を遊離しOPPになると考えられるが，OPPと同様に胎児の発育遅延は認められたが，着床数のOPP-Na 200mg 群に有意な減少をみた他は死亡頻度にも有意性なく，外表奇形では OPP でみられた開眼の発現も少なく有意な増加もみられなかった．骨格観察でも奇形はみられず，変異にも意味のある増加は認められなかった．内部器官の観察でも異常は検出されなかった．

以上のことから総合判断して，本試験での OPP および OPP-Na の JCL-ICR マウスに対する催奇形作用は，陰性と考えられた．

要　旨

防ばい剤オルトフェニルフェノール (OPP) およびそのナトリウム塩(OPP-Na)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15日までの９日間，１日１回 OPP は，2,100mg/kg, 1,740mg/kg, 1,450mg/kgをまたOPP-Naは400mg/kg, 200mg/kg, 100mg/kg を投与し，妊娠

18日の胎児について外表・骨格の奇格・異常を検索した.

母体の体重抑制, 器官重量の増減, 胎児の発育遅延などを認めたが, OPP および OPP-Na の催奇形作用はなかった.

文　献

1) Teramoto, S., M. Kaneda, and Y. Shirasu : 第3回毒作用研究会発表抄録集, 1976
2) FAO/WHO Evaluation of some pesticide residues in food, 1969
3) 小縣昭夫：未発表
4) Wilson, J. G : *Principles and Techniques* : Teratologyed. by Wilson, et al, 262, 1964 Unir. of Chicago Press, Chicago.
5) Dawson, A. B : *Stain Tech*, 1, 123, 1927
6) 西村秀雄：先天異常, 16, 175, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 97-98, 1978

飼料中に添加したオルトフェニルフェノールナトリウムの定量およびその保存による影響の検討

縄井寿美子*, 小縣昭夫*, 吉田誠二*, 安藤弘*
久保喜一*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Quantitative Analysis of Sodium *o*-Phenylphenol Added into the Standard Animal Foods and Effect by Preservation

SUMIKO NAWAI*, AKIO OGATA*, SEIJI YOSHIDA*, HIROSHI ANDO*,
YOSHIKAZU KUBO*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

緒　言

柑橘類の防かび剤として使用されている*o*-フェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）について，今回マウスを用いて優性致死試験を行うこととなった．試験ではOPP-Na を添加した飼料を8週間にわたりマウスに与えるため，保存中の飼料からの OPP-Na の経時的減少の有無および実際の含有量の把握が問題となった．そこで筆者等は OPP-Na 添加飼料の定量を，今回の材料に適した方法を用い，経時的に試みたので報告する．

材料および方法

1. 試薬

OPP：東京化成工業㈱製，Lot No. FB102純度99.2%

OPP-Na：東京化成工業㈱製，Lot No. AL01，純度97.1%

内部標準溶液：2,3-ジメチルナフタリン（和光純薬特級）を 2,500ppm に n-ヘキサンに溶解したもの．

2. 試料

マウス粉末飼料に OPP-Na をそれぞれ4%，2%，1%，0.5%，0.25%，0.125%に添加，タブレットとしたものを試料とした．マウス粉末飼料(CE-2，日本クレア製）は成分として，蛋白質（魚粉，大豆粕など），脂肪（植物油など），炭水化物（とうもろこし，ふすま，小麦など），緑餌（アルファルファミール），各種ビタミン類およびミネラル類を含有する．OPP-Na 添加タブレットの作製は，OPP-Na を均一に混ぜた粉末飼料に，3秒間100℃の蒸気熱をかけて圧縮し固型としたものを，さらに40～60分間100℃で乾燥させる操作によった．作製飼料は飼料箱中に保存した．

試料は，OPP-Na 添加飼料6群を優性致死試験開始および終了時に採り，また4%，1%，0.25%の3群については，経時的変化を調べるためさらにその間3回採取した．飼料の採取にあたっては，各群ともそれぞれタブレットをランダムに採り，ただちに抽出操作に移した．なお優性致死試験採取飼料は，都合上脱気の上 N_2 ガス充填により測定時まで保管した．

3. 装置

ガスクロマトグラフ　島津4BMPF(FID)

4. 操作方法

飼料（タブレット）を採り，乳鉢で均一に摩砕後，その5～20g を正確に取って水約 100m*l* および塩化ナトリウム50g を加え，よく振り混ぜたのちさらに消泡剤として食添用シリコーンを少量加え，塩酸で酸性にし，水蒸気蒸留装置にかける．あらかじめ1N水酸化ナトリウム 10m*l* を加えておいた受器に 300m*l* まで蒸留し，留液 50m*l* を分取して塩酸を加えて酸性としたのち，n-ヘキサン50，20，20m*l* で抽出する．抽出液を合わせ，少量の無水硫酸ナトリウムを加えて完全に脱水したのち，内部標準液 2 m*l* を加えたメスフラスコに移し，全量を100m*l* とし，この2 μl をガスクロマトグラフで測定する．

5. 測定条件

カラム：1.5% SE30 (Chromosorv G，AW-DMCS) 内径3 mm，長さ2 m，ガラスカラム

カラム温度：150℃

注入口および検出器温度：100℃

キャリヤー：N_2，30m*l*/min

結　果

1. 試験法の検討

OPP 12.5mg，25mg，37.5mg，50mg，75mg を少量の1Nの水酸化ナトリウムで溶解したものを飼料5g に加えて，操作法に従い添加回収実験を行ったところ，12.5mg から 75mg までのいずれも95.9%～98%と良好

* 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

な回収率が得られ，またガスクロマトグラムも図1に示した通り，妨害物もみられずテーリングもない良好な結果を示したので，本法は試験法として十分に使用に耐え得ると思われる．

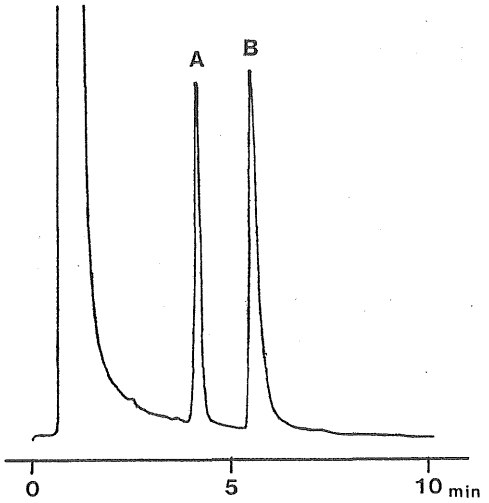


図 1. OPP-Na添加飼料より抽出したOPPのガスクロマトグラム
A：ジメチルナフタリン（内部標準）
B：o-フェニルフェノール（OPP）

表 1. 飼料中のOPP含有量

経過日数[1] (day)	OPP 含有量 (g/kg)					
	4%	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%
0	23.86 (38.60)[2]	11.70 (18.92)	5.51 (8.92)	2.14 (3.46)	1.19 (1.90)	0.62 (1.01)
10	22.42 (36.26)		5.30 (8.57)		1.18 (1.91)	
20	26.20 (42.38)		5.40 (8.74)		1.17 (1.89)	
30	25.60 (41.41)		5.45 (8.82)		1.27 (2.05)	
55	27.29 (44.14)	11.04 (17.85)	5.59 (9.04)	2.47 (3.99)	1.20 (1.94)	0.59 (0.96)
平均	25.37 (41.03)	11.37 (18.39)	5.47 (8.84)	2.31 (3.72)	1.20 (1.94)	0.61 (0.98)

1) 優生致死試験開始時を0日とした，飼料採取時までの日数を示す．
2) ( ) 内は添加したOPP-Naに換算した値を示す．

2. 試料分析

飼料中の OPP-Na の定量結果を表1に示す．数値は経過日数10日を除き，各飼料群とも2回測定した平均値を示した．この結果から明らかなように，OPP の量は各飼料群とも採取時までの日数経過には関係なくほぼ一定していた．

考　察

柑橘類からの OPP および OPP-Na の定量法についてはいくつかの報告[1,2] があり，また協定法として精油定量装置を用いての方法[3] が示されているが，それらはいずれも微量な OPP（およそ 10ppm 程度）を検出することを目的としたものである．今回は試料が高濃度に OPP-Na を添加した（1,250ppm～40,000ppm），蛋白，脂肪等の各種栄養素を含むマウス飼料であるところから，従来の方法に換えて水蒸気蒸留⟶n-ヘキサン抽出という簡便な方法が試みられた．この方法は添加回収実験でも良好な結果を示し，飼料からの OPP の分離抽出法としてはよく目的に叶ったものであると思われる．

試料の分析結果については，各飼料群とも OPP-Na 量の保存による経時的減少の傾向は認められず，飼料箱に保存した飼料中の OPP-Na は，少なくとも8週間という期間内では比較的安定であると考えられる．また各飼料群の平均含有量をみると，4%群で OPP-Na に換算して41.03g/kg と添加量よりやや高い値（1.03倍）を示したが，その他の各群についてはいずれも低く，全体で9回測定した3群を比べると，4%で1.03倍，1%で0.88倍，0.25%で0.78倍と dose が低くなるにつれて減少の割合がやや高くなる傾向がみられ，タブレット作製時における熱処理等の影響によるものかとも推察される．

謝辞　本研究にあたり種々の御援助を賜りました当研究所食品研究科冠政光，中里光男氏および毒性部神谷信行氏に感謝の意を表します．

文　献

1) 外海泰秀，佐野裕子，伊藤誉志男，慶田雅洋：食衛誌，16，397，1975
2) 原田基夫，川崎洋子：食品衛生研究，27，1079，1977
3) 日本薬学会：衛生化学，23，A-2，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 99-103, 1978

オルトフェニルフェノールナトリウムのマウスにおける長期投与優性致死試験

小縣昭夫*, 吉田誠二*, 縄井寿美子*, 安藤 弘*
久保喜一*, 平賀興吾*, 益淵正典**

Dominant Lethal Tests of Long Term Administration with Sodium *o*-Phenylphenol (OPP-Na) in Mice

AKIO OGATA*, SEIJI YOSHIDA*, SUMIKO NAWAI*, HIROSHI ANDO*,
YOSHIKAZU KUBO*, KOGO HIRAGA* and MASANORI MASUBUCHI**

緒 言

防ばい剤オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩（以下 OPP および OPP-Na と略す）の変異原性に関する報告は少ない．花田は微生物を用いた rec assay, reversion test において OPP が陽性であることを報告した[1,2]．しかし，白須らは微生物を用いた rec assay，ラットを用いた細胞遺伝学的試験，マウスを用いた優性致死試験において OPP の突然変異誘起性を認めていない[3]．一方，OPP-Na についても賀田の微生物を用いた rec assay および repair test，石館らの培養細胞を用いた染色体異常誘発試験，田島のカイコを用いた特定座位法などいずれの試験においても突然変異誘起性を認めていない[4]．

今回，筆者らは甘きつ類の防ばい剤として最も広く用いられている OPP-Na について，その変異原性の有無をマウスを用いた長期投与優性致死試験法で検討した．本方法は当部で開発され，従来の優性致死試験法に比べ検体の体内での代謝や蓄積性が加味され，さらに検出感度も高められたものである[5-7]．

試験材料ならびに方法

1. 実験動物 雌雄とも CD-1 マウス（日本チャールスリバー）を用いた．雄は4週令で購入し2週間の予備飼育後，また雌は雄購入時より5週後に4週令で購入し，4週間予備飼育したのち実験に供した．

飼育は温度25±1°，湿度55±5％，照明午前9時～午後5時，換気毎時10回の飼育室にて行った．雄はチップ敷のプラスチックケージに1匹飼い，雌は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2匹飼いとした．

2. 試料 OPP-Na は東京化成株式会社製 Lot No. AL01 を使用した．また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 Kodack Co. 製 Lot No. B4B を用いた．

3. 実験群の設定 表1に示す添加量群を設けた．dose-response があるか否かを検討するため，また長期投与により交尾能力が低下することを考慮し，可能な限り多数の群を設けた．OPP-Na 添加量の決定は，あらかじめ CD-1 マウスを用いた経口1回投与による急性毒性試験を行い，LD_{50} が雄で1,000mg/kg であることを参考にした．

4. OPP-Na 添加飼料と投与方法 OPP-Na は飼料 CE-2（日本クレア製）に添加使用した．雌雄とも飼料・水道水を自由摂取させたが，雄には6週令時より2カ月間添加飼料を，雌には全期間を通じ無添加飼料を与えた．

なお，添加飼料作製後，飼料中の OPP-Na 含量を経時的に測定し，その変動を調べた．測定回数は投与開始後0，10，20，30，55日目の5回とした．測定方法に関しては縄井の報告[8]による．

EMS は滅菌蒸留水にて調製し，交配1週間前に200 mg/kg を腹腔内に1回投与した．

5. 体重および飼料摂取量の測定 各群10匹の雄について，1週間毎に体重，摂取量を測定した．

6. 交配方法 雄1に対し雌2匹を4日間同居させて行った．毎朝膣栓の有無を確認し，膣栓の認められたものを妊娠成立とみなし，その日を妊娠0日とした．

7. 黄体および胎児の観察 妊娠12，13日の母獣を頸脱により屠殺開腹し，卵巣と子宮を摘出した．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・後期死胚数を調べた．

* 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
** 広島大学理学部

表 1. 投与群の設定

飼料添加 OPP-Na 濃度(%)	飼料投与 雄マウス 匹数	交配使用 雄マウス 匹数	交配使用 雌マウス 匹数
4.0	50	30	60
2.0	50	30	60
1.0	50	30	60
0.5	50	30	60
0.25	50	—	—
0.125	50	—	—
0	60	50	100
EMS 200mg/kg	50	30	60

表 2. OPP-Naの飼料中濃度および一日平均摂取量

計画時 OPP-Naの飼料中濃度(%)	投与開始後 0日目	10日目	20日目	30日目	55日目	OPP-Na 1日平均摂取量 (mg/kg) mean±SD
4.0	3.9	3.6	4.2	4.1	4.4	4008±1038
2.0	1.9	—	—	—	1.8	2125±180
1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	996±94
0.5	0.35	—	—	—	0.4	446±30
0.25	0.19	0.19	0.19	0.21	0.19	222±19
0.125	0.101	—	—	—	0.096	119±15

結　果

1. 飼料中 OPP-Na 添加量の経時的変化（表2）各群とも投与期間中その濃度に大きな変動はみられなかった.

2. 飼料摂取量（図1）および体重（図2）の経時的変化　雄1匹あたりの平均摂取量を図1に示す. 4.0% 群が摂取開始1週間で大きく減少し，その後も対照群に比してもどることなく低い値を示した. 2.0% 以下の群では対照群とほぼ同様の摂取量を示した. なお，投与期間全体を通じ摂取した OPP-Na 量を雄一匹当りの一日平均摂取量として換算した値を表2に示した.

一方，雄の平均体重の経時的変化は図2の様であった. 最高濃度である 4.0% 群に対照に比し有意な体重抑制が認められたが，その後漸時回復した. 1.0% 以下の群においては対照群と何ら変化がなかった.

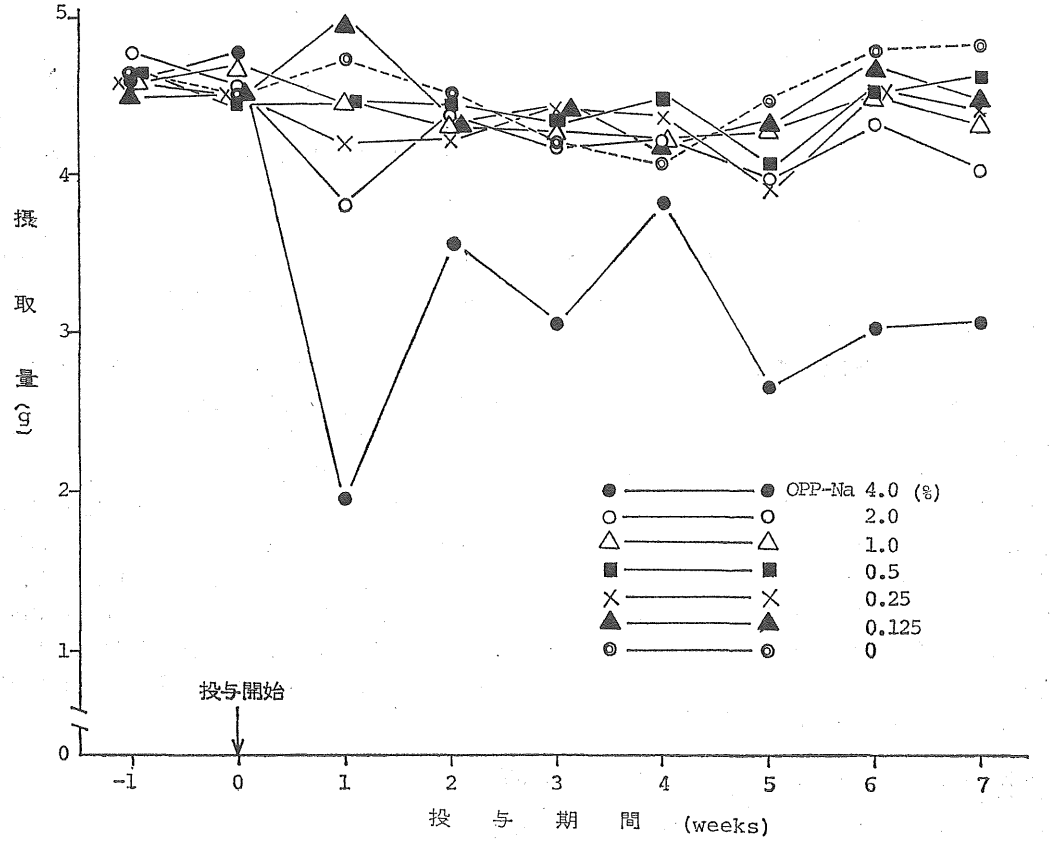


図 1. OPP-Na 添加飼料平均摂取量とその経時的変化

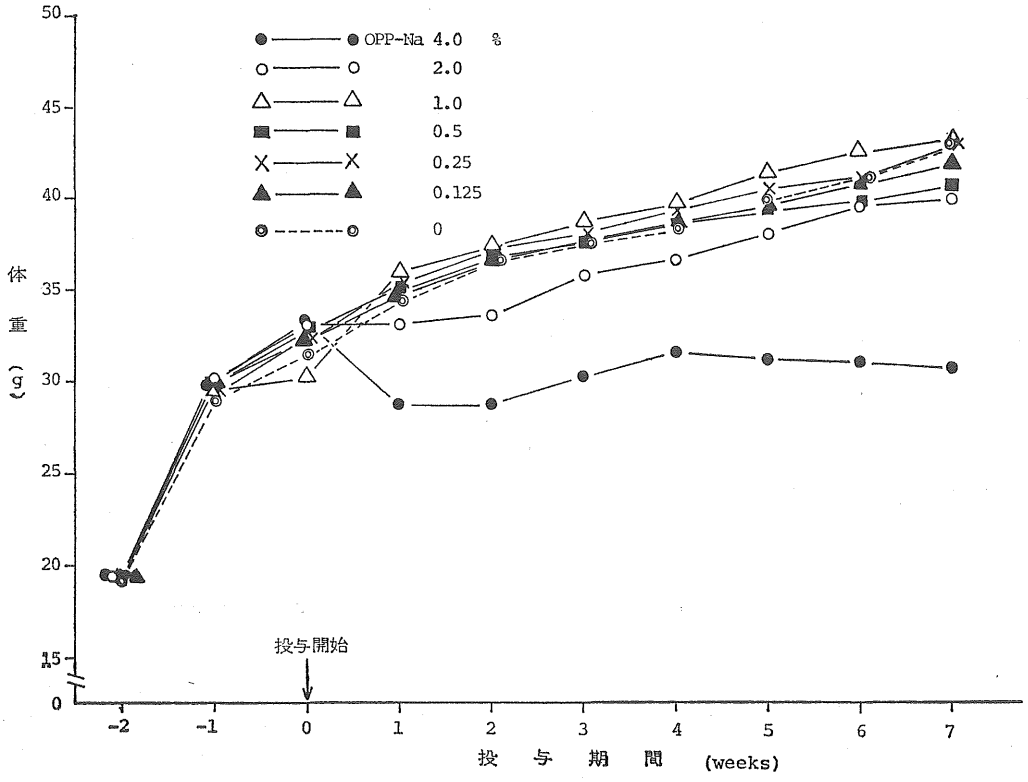


図 2. 雄マウス平均体重とその経時的変化

表 3. 生殖生物学的所見

薬物投与群	使用動物数 ♂ 投与匹数[1]	♂ 死亡匹数[2]	♂ 交配匹数[3]	♀ 交配匹数[4]	交尾確認動物数 ♂[5]	♀ 膣栓確認日と匹数 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[7]	♀交尾[8]	妊娠動物数 ♂妊娠させた[9]	♀妊娠した[10]	妊娠率(%) ♂交尾させた妊娠[11]	♀交尾した妊娠[12]
OPP-Na 4%	50	3	30	60	28	5	1	29	13	48*	93.3	80.0	25	41	89.3	85.4
2%	50	0	30	60	29	3	9	30	13	55	96.7	91.7	29	54	100	98.2
1%	50	0	30	60	30	14	6	23	14	57	100	95.0	30	57	100	100
0.5%	50	0	30	60	29	5	7	29	14	55	96.7	91.7	29	53	100	96.4
0%	60	1	49	98	48	20	14	36	21	91	98.0	92.9	46	84	95.8	95.5
EMS 200mg/kg	50	0	30	60	29	3	9	28	10	50	96.7	83.3	16	22***	55.2	44.0

1) 試料投与した匹数　2) 投与期間中死亡した匹数　3) 1)より選択　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) χ^2検定　* $P<0.05$　*** $P<0.001$

表4. 排卵数および胎児に係わる所見

薬投与物群	妊雌腹数	黄体数 総数 mean±SD	着床数 総数 mean±SD	未着床数 総数 mean±SD	生存胎児数 総数 mean±SD	早期死胚数[1] 総数 mean±SD	後期死胚数[2] 総数 mean±SD	総死胚数 総数 mean±SD
OPP-Na 4.0%	41	592 14.44±1.64	540 *** 13.17±1.69	52 1.27±1.52	507 *** 12.37±2.18	13 0.32±0.72	20 0.49±1.08	33 0.80±1.36
2.0	54	776 *** 14.37±1.56	720 *** 13.33±2.06	56 1.04±1.89	655 *** 12.13±2.85	18 0.33±0.78	47 0.87±1.18	65 * 1.20±1.41
1.0	57	846 ** 14.84±2.00	786 13.79±2.70	60 1.05±2.18	732 12.84±2.83	15 0.26±0.44	39 0.68±1.05	54 0.95±1.06
0.5	53	779 14.70±1.80	724 13.66±2.77	55 1.04±2.39	677 * 12.77±2.96	16 0.30±0.67	31 0.58±0.80	47 0.89±1.12
0	84	1226 14.60±1.81	1162 13.83±2.10	64 0.76±1.22	1099 13.08±2.52	7 0.08±0.28	56 0.67±1.01	63 0.75±1.00
EMS 200mg/kg	22	320 14.55±1.79	164 *** 7.45±3.96	156 *** 7.09±4.12	56 *** 2.55±3.38	61 ** 2.77±2.60	47 *** 2.14±2.12	108 *** 4.91±2.76

1) 肉眼的に脱落膜腫のみが認められるもの　2) 肉眼的に胚塊の認められるもの
(統計) t検定および順位和検定　* $P<0.05$　** $P<0.01$　*** $P<0.001$

3. 死亡動物例　飼料投与期間中，最高濃度である4.0%群に3例，また陰性対照として用いた0%群に1例の死亡をみた．

4. 生殖生物学的所見（表3）

(1) 交配使用動物数　投与終了後生存していた動物の中から無作為に選択し交配に用いた．4.0% 群では死亡3例と体重の増加抑制が認められたものの，その症状から交配への影響はないものと判断し交配に用い，以下2.0%，1.0%，0.5%，0%（陰性対照），EMS（陽性対照）群の計6群を交配群とした．

(2) 交尾率　4.0%群において交尾確認雌数が対照群に比し有意な減少を認めたが，2.0%群以下，EMS群とも有意な減少はみられなかった．

(3) 妊娠率　4.0% 群にわずかながら低下の傾向が認められるが対照群との間に有意差はなく，2.0% 以下の群ではむしろ対照群より高い値を示した．EMS群では，我々が報告してきた数回の試験結果[9,10]と同様，妊娠率は大きく有意に低下した．

4. 排卵数および胎児に係わる所見（表4）

(1) 排卵数，黄体数を測定することにより推定した．2.0%，1.0%，群で対照群に比し有意な多少をみたが，用量相関関係は認められなかった．

(2) 着床数　4.0%，2.0%群に有意な着床数の減少が認められた．EMS 群ではさらにそれが顕著であった．

(3) 生存胎児数　着床数同様4.0%，2.0%群に有意な減少を認めたが，用量相関関係はみられなかった．EMS群では有意な減少が認められた．

(4) 死胚数　EMS群で早・後期および総死胚数に，対照群に対し有意な増加を認めたが，OPP-Na 群では2.0%群の総死胚数に有意な増加を示したのみであった．

総括および考案

防ばい剤オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）の優性致死誘発性をマウスを用いて検討した．実験は OPP-Na 添加飼料を2ヶ月間雄マウスに摂取させ，その間の飼料摂取量・体重変化・死亡数を調べ，また無処置未経産の雌と交配し，妊娠12，13日目に開腹，黄体数および胎児観察を行った．

OPP-Na 添加飼料投与期間中，最高濃度である4.0% 群に3例，0%（群陰性対照）群に1例の死亡を認めた．また各群10匹について測定した雄の体重，飼料摂取量では，4.0% 群に有意な体重増加抑制と摂取量の低下が認められたが，2.0% 以下の群では対照群に比して大きな差はみられなかった．

生殖生物学的所見においては，4.0% 群に交尾雌数の有意な低下が認められ，また推計学的に有意な差は認められなかったものの妊娠率でやや低い値を示した．

排卵数（黄体数）および胎児に係わる調査では，2.0%，1.0% 群に黄体数の有意な多少が認められ，また生存胎児数において，4.0%，2.0%群が対照に比して推計学的に有意な減少を示した．しかしながら死胚数では2.0% 群の総死胚数に有意な増加をみたのみで，優性致死誘発性評価の重要な指標となる早期死胚数に有意な増加は認められていない．Röhrborn の方式[11]に従って優性致死誘発率を求めたが，2.0%群の3.8が最も高い値を示したにとどまり，影響はなかったものと思われる．ちなみに既知変異原物質である EMS では63.9と高い値を示した．

今回用いた試験法は，従来のそれに比べ，長期間摂取

し続ける可能性のある被検物質を，実際の生活に即した条件で検討することができ，しかも低濃度の被検物質を高感度で検出できるという点で非常に有効な方法である[5-7]．また，動物実験では個体差により値がバラツキ易いが，今回はその点を使用動物数を増やすことによりおぎなった．一方 OPP-Na の雄一匹当りの平均摂取量は，急性毒性試験結果から得られた LD_{50} 値（雄で1,000 mg/kg）よりはるかに多くなっている．以上，OPP-Na には優性致死誘発性の無いことが明らかとなった．

文　献

1) 花田信次郎：日本薬学会第96年会講演要旨集，7Q12-2，1976
2) 花田信次郎：第14回日本栄養食糧学会，近畿支部大会講演要旨，栄養と食糧，29-1，66，1976
3) 白須泰彦，森谷正明，加藤喜美江，手塚英夫，逸見令子，新宮暁子，金田昌博，寺本昭二：日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨集，35，1976
4) 河内　卓：遺伝変異原物質を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発，厚生省がん研究助成金による研究報告，1976
5) 益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：日本環境変異原研究会第6回研究発表会要旨集，1977
6) 益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：遺伝学雑誌，52，456，1977
7) 益淵正典：環境変異原研究　1，30，1978
8) 縄井寿美子：東京衛研年報，29-2，97，1978
9) 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
10) 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
11) Röhrborn, G：*Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed, by Vogel, F, and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970, Spring-Verlag, Berlin

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 104-108, 1978

オルトフェニルフェノールの細胞毒性について 放射性クロム酸ナトリウムを用いた細胞毒性の検索

佐々木美枝子*, 縄 井 寿美子*, 中 尾 順 子*

Cytotoxicity of *o*-Phenylphenol : Assay of Toxicity by Using Radioactive Cr-Labeled Cell

MIEKO SASAKI*, SUMIKO NAWAI* and TOSHIKO NAKAO*

Cytotoxicity of *o*-phenylphenol sodium salt (OPP-Na) on the spleen cells and erythrocytes from normal C3H/HeN mice, or on the cultured strain cell, CHO-Kl cell, was studied. These cells were labeled by radioactive sodium cromate and were incubated with various concentrations of OPP-Na, and then radioactivity of released ^{51}Cr from destroyed cells was counted after various incubation periods. By the addition of 200μg/m*l* of OPP-Na, all of these cells were destroyed perfectly. The destruction of cells by 100 and 50μg/m*l* of OPP-Na were partial and the dose response relationship was observed in all three sorts of cells. Lower dosages of OPP-Na, 20, 10 and 5 μg/m*l*, had no cytotoxic action on spleen cells *in vitro*. This effect of OPP-Na was considered to be nonspecific toxicity. However, spleen cells were killed by the addition of OPP-Na within very short incubation period and erythrocytes were more destroyed after long term culture with it. CHO-Kl cells were slightly less sensitive than the other cells. It was suggested that the cytotoxic effect of OPP-Na would be related with the stability of cells *in vitro* and/or the ability of cell division.

緒　　言

オルトフェニルフェノール(*o*-phenylphenol, OPP と略記する) は防カビ剤として半世紀近い歴史をもつ薬剤である[1]. 我国においては OPP はミカン, レモン, グレープフルーツなど柑橘類の表皮に塗布または噴霧してカビの発生を防ぐために用いられ, 食品添加物として認可されている.

先に著者らは *in vitro* 抗体産生系における OPP のナトリウム塩 (OPP-Na) の作用について調べ, OPP-Na が, 高濃度では抗体産生を阻害することを見出した[2]. この際, OPP-Na の細胞毒性には細胞選択性があるか否か, すなわちこの薬剤が特異的に抗体産生細胞を攻撃するのか, あるいは細胞一般に対する非特異的な毒性作用の結果として抗体産生が阻害されるか, を確かめることが先決の問題と考えられた. この点を明らかにするために, *in vitro* 抗体産生実験に用いたと同じマウスの脾臓細胞, 赤血球細胞および継代培養細胞を用いて, OPP-Na の *in vitro* での細胞毒性を調べた. 毒性の示標としては, 細胞に放射性クロムをとりこませ, 細胞の破壊により細胞外に解離した放射性クロムを測定する方法をとった[3]. OPP-Na の毒性は実験に用いた三種類の細胞に対しては大きな差はなく, その作用は非特異的なものと思われたが, 細胞の分裂能の有無や *in vitro* における安定性も OPP の作用に関係するらしいことが示唆された.

材料および方法

実験動物および細胞：近交系マウス C3H/HeN (日本チャールズリバー), 16—20週令, 雌の脾臓細胞, 赤血球細胞, およびチャイニーズハムスター卵巣由来の株化細胞である CHO-KI 細胞を用いた.

マウス脾臓細胞は, 脱血死させた動物より無菌的にとり出した脾臓を仔牛血清加リン酸緩衝食塩水 (以下, PBS-CSと記す) 中で滅菌注射器およびピンセットを用いて処理して内容物をほぐし出し, 150メッシュのステンレス網でろ過後, 1,000rpm, 10分間遠心して集めた. マウス赤血球は, 心臓穿刺により無菌的にとり出してヘパリン加 PBS に浮遊させ, 4°に保存した血液より調整した. 保存血液はヘパリンを加えない多量の PBS を用いて2～3回洗浄することによりヘパリンおよび溶血した細胞を除いた. なお脾臓細胞は調整後ただちに実験に使用し, 赤血球は採血後24時間以内に使用した. 両細胞とも, 3～5匹のマウスより採取したものをプールして

* 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

用いた.

CHO-KI 細胞は, 対数増殖期の細胞をトリプシン処理して浮遊状態にし, 1,000rpm, 5分間遠心して細胞を集め, 新たな培養液に再浮遊させて用いた.

オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na):東京化成の *o*-phenylphenol sodium salt ($C_6H_5C_6H_4ONa$, $4H_2O$, TCI-C. P. P202, Lot. AL01; T-OPP-Na とする) および Dow chemical company の Dowcide A (Sodium *o*-phenylphenate; D-OPP-Na とする) を用いた.

放射性クロム酸ナトリウム(^{51}Cr):第一ラジオアイソトープ研究所の放射性クロム酸ナトリウム注射液 (放射能濃度 1 mCi/m*l*, 比放射能110～150mCi/m*l*)を用いた.

細胞への放射能ラベル, 細胞培養および放射活性の測定方法:適当な濃度に調整した細胞を 10～20m*l* の培養液に浮遊させ, 100～200μCi の ^{51}Cr を加えて 37° 恒温槽で45分間おだやかに振とう培養することにより, 細胞に ^{51}Cr をとり込ませた. (ラベル時の細胞濃度は, 脾細胞は10^8 オーダー, 赤血球は10^9 オーダー, CHO-KI 細胞は 3×10^7/100～200μCi ^{51}Cr とした.) 振とう培養後, 氷中に細胞を5分間おいて反応を停止させ, 1,000rpm, 5分間遠心して細胞を集めた. 細胞は多量の PBS を用いて3回洗浄して, ラベルされなかった ^{51}Cr を除き, 培養液に再浮遊させて, 非特異的に吸着された^{51}Cr を除くために4°に30分間静置した. この後再び 1,000rpm 5分間遠心して集めた細胞を培養液に再浮遊させ, 細胞濃度を調整した. (脾臓細胞 $0.7\sim1\times10^7$/m*l*, 赤血球 $0.7\sim1\times10^8$/m*l*, CHO-KI 細胞0.5×10^6/m*l* とした.) この後ただちに ^{51}Cr でラベルされた細胞を滅菌プラスチックペトリディッシュに 5 m*l* ずつ分注し, 37°, 5% CO_2 の条件下で培養した. 適当な時間ごとに細胞をコマゴメピペットを用いて遠心管に移し, ペトリディッシュを 5 m*l* の PBS で洗浄してこの洗液も同一の遠心管に加えて, 1,000rpm, 5分間遠心した. 遠心後の上清 5 m*l* をγカウンター用のバイアルに 1 m*l* ずつ分注し, γカウンター (Beckman, BiogammaTM) でその放射活性を測定した. 細胞内にとりこまれた ^{51}Cr の総量を知るためにラベルされた細胞 5 m*l* を 1,000rpm, 5分間の遠心により集め, 蒸留水 10m*l* に浮遊させて凍結融解を三度以上くりかえして細胞を完全に破壊し, この遠心上清を同様にカウントした. (最大解離:max ^{51}Cr release とする)　細胞から解離した放射能濃度を表わすには, 以下の計算によって, % release (max release に対する百分率) および net release (対照群の自然解離をさしひいたもの) を求めた.

$$\%\ \text{Release}=\frac{*1\text{Release cpm} - *4\text{BG cpm}}{*2\ \text{Max release cpm} - \text{BG cpm}}\times100$$

$$\text{Net release}=\frac{\text{Release cpm} - *3\text{Control cpm}}{\text{Max release cpm} - \text{Control cpm}}\times100$$

*1　OPP-Na 添加実験群の cpm
*2　最大解離 cpm
*3　OPP-Na 非添加対照群の cpm
*4　Back ground cpm

OPP-Na の添加:OPP-Na は PBS に溶解し, ミリポアフィルター (pore size 0.45μ) を通して滅菌したのち適当な濃度に希釈し, 滅菌したマイクロピペットを用いて, 各 100μl ずつを培養開始時に細胞を分注したペトリディッシュに加えた.

培養液:脾臓細胞および CHO-KI 細胞の培養には仔牛血清を10%濃度に加えた MEM (GIBCO, F-11およびF-12) を用い, 赤血球細胞には仔牛血清加MEMまたは仔牛血清加 PBS を用いた. 細胞の洗浄には PBS を用いた. いずれの場合も, ペニシリンGを 100U/m*l* 加えている.

結　　果

図1は, C3H/HeN マウスの脾細胞 (7×10^6/m*l*)お

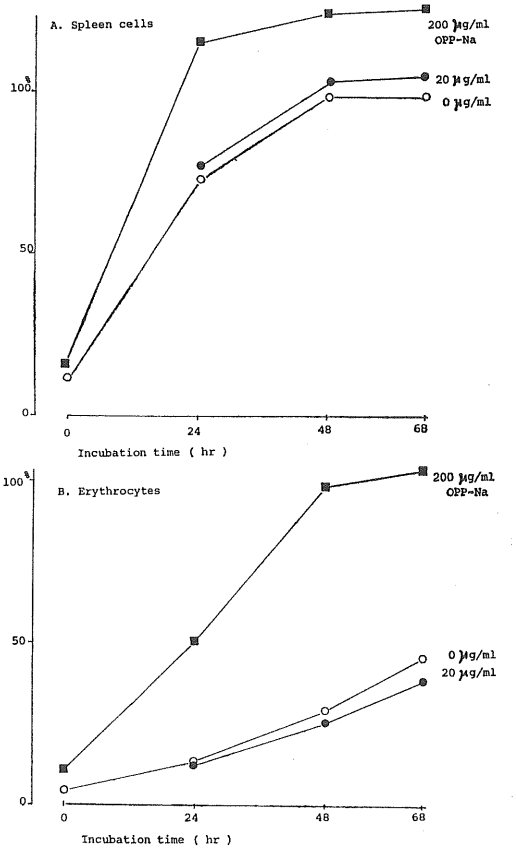


Fig. 1.　^{51}Cr Release from Spleen Cells and Erythrocytes incubated with OPP-Na

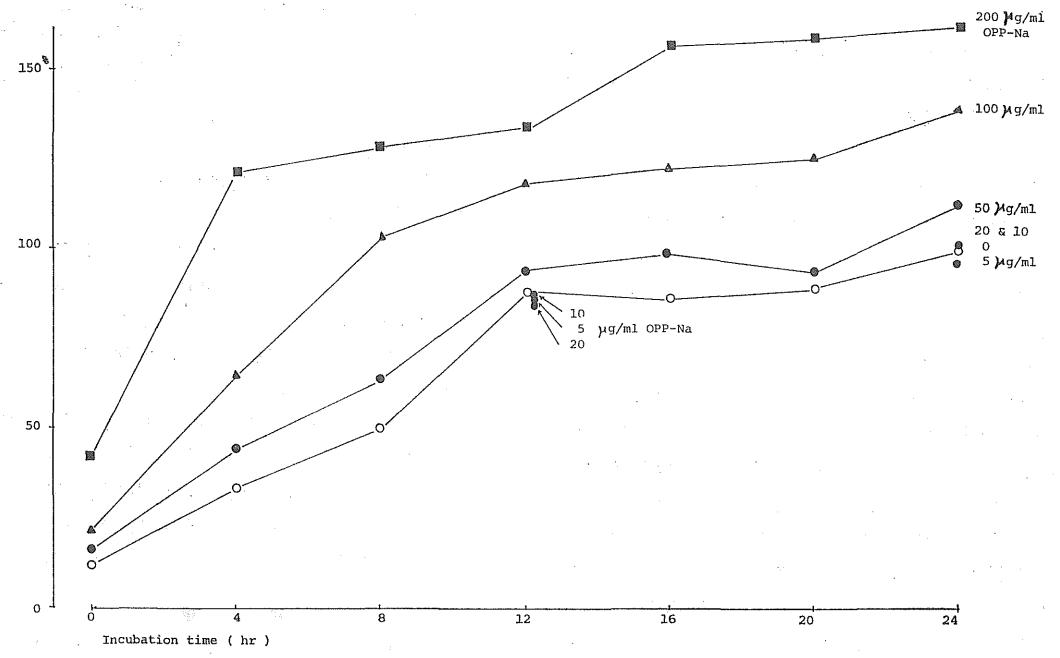


Fig. 2. ^{51}Cr Release from Spleen Cells incubated with OPP-Na

および赤血球（7×10^7/ml）に T-OPP-Na（東京化成）を 200μg, 20μg/ml 添加して培養し，0，24，48，68時間目に細胞を遠心して，上清中の ^{51}Cr を測定した結果である．得られた cpm は，前述したように，細胞を完全に破壊した場合の ^{51}Cr 解離を 100% としたときの百分率として示した．200μg/ml の OPP-Na は，脾細胞，赤血球に対して明らかな細胞毒性を示した．これに対して，20μg/ml の OPP-Na 添加では，^{51}Cr の解離は対照群との間にほとんど差がみられなかった．

脾細胞の場合，^{51}Cr の解離は対照細胞においても24時間以内に70～100%に達する．OPP-Na の効果のより詳しい時間経過を知るために，同じく C3H/HeN マウスの脾細胞を用いて，4時間各の測定を行った．培養細胞数は 0.9×10^7/ml とし，OPP-Na（東京化成）は，200μg, 100μg, 50μg, 20μg, 10μg, 5 μg/ml を培養開始時に添加した．結果を図2に示す．200μg/ml OPP-Na 添加群に0および4時間培養後に特に ^{51}Cr 解離が目立つほかは，200μg, 100μg, 50μg/ml の OPP-Na は添加量に比例した毒性を示し，直線的な用量反応関係が成立するものと思われる．これに対し，20μg, 10μg, 5 μg/ml の OPP-Na には，12および24時間目の測定では，対照との間に差は全く認められなかった．

表1は，マウス脾臓細胞（1×10^7/ml）および赤血球（1×10^8/ml）に対する T-OPP-Na（東京化成）および D-OPP-Na (Dowchemical : Dowcide A) 各50, 100 200μg/ml の毒性を比較したものである．脾臓細胞については培養4時間および24時間後に，赤血球については24時間および48時間後に，細胞からの ^{51}Cr 解離を測定した．脾臓細胞の場合，培養4時間後に，T-OPP-Na 添加細胞からの ^{51}Cr 解離は 50, 100, 200μg/ml 添加で各々79.7, 103.9, 119.6%と，D-OPP-Na の場合の各々54.4, 63.9, 86.4%よりもはるかに多かった．対照細胞からの ^{51}Cr 解離は40.4%と40.7%とほとんど差がないので，これは T-OPP-Na がより毒性が強いためと思われる．両者の差は対照細胞からの cpm をさしひいた net release %においてより明確である．しかしながらこの差は培養24時間後にはほとんどみられなくなり，両 OPP-Na の毒性はほぼ等しいと思われる．また，赤血球細胞については，24時間，48時間ともに，D-OPP-Na の方がより強い毒性を示した．特に 100μg/ml OPP-Na 添加細胞においてその差が著るしく，24時間目の net release は T-OPP-Na 14.8%であるのに対し，D-OPP-Na では 37.0%，48時間目には 80.4% に対し92.8%と明らかな差が認められた．しかしながら，脾臓細胞と赤血球細胞に対する両 OPP-Na の毒性を全体的にみると，各々の細胞毒性には大きな差はなく，両者の毒性はほぼ等しいと思われる．

ハムスター由来の継代培養細胞 CHO-KI 細胞を用い

Table 1. Cytotoxicity of OPP-Na on Spleen Cells and Erythrocytes of Mice

A. Spleen cells

OPP-Na	μg/ml	4 hr after		24 hr after	
		% release	Net release	% release	Net release
T-OPP-Na	0	40.4%	0.0%	82.0%	0.0%
	50	79.7	66.0	91.3	51.6
	100	103.9	114.5	96.8	82.4
	200	119.6	132.8	99.0	94.5
D-OPP-Na	0	40.7	0.0	83.0	0.0
	50	54.2	22.8	91.3	49.0
	100	63.9	31.9	96.1	77.0
	200	86.4	77.0	97.2	83.5

B. Erythrocytes

OPP-Na	μg/ml	24 hr after		48 hr after	
		% release	Net release	% release	Net release
T-OPP-Na	0	4.8%	0.0%	20.4%	0.0%
	50	6.7	2.0	67.5	59.1
	100	18.8	14.8	84.4	80.4
	200	98.3	98.3	101.9	102.3
D-OPP-Na	0	4.9	0.0	23.9	0.0
	50	7.0	2.2	65.5	54.7
	100	40.0	37.0	94.5	92.8
	200	99.8	99.8	101.7	102.2

Table 2. Cytotoxicity of OPP-Na on CHO-Kl Cells

OPP-Na	μg/ml	0-time	24 hr after	
		% release	% release	Net release
T-OPP-Na	0	2%	35.5%	0.0%
	50	—	44.0	13.2
	100	—	46.3	16.8
	200	6%	112.1	118.7
D-OPP-Na	0	—	35.5%	0.0%
	50	—	40.6	8.0
	100	—	44.8	14.5
	200	—	106.6	110.3

て同様の実験を行った．対数増殖期の細胞をトリプシンを用いて培養瓶のガラス面からはがして遊離細胞とし，リンパ球や赤血球の場合と同様に ^{51}Cr をラベルし，50, 100, 200μg/ml の T-OPP-Na および D-OPP-Na と共に CO_2 インキュベーターで培養した．24時間後に細胞を回収して遠心し，上清中に解離した ^{51}Cr をカウントした．この結果を表2に示す．OPP-Na 非添加対照群における ^{51}Cr 解離は 35.5%，50 および 100μg/ml OPP-Na 添加群では40%台の ^{51}Cr 解離がみられたが，200μg/ml OPP-Na 添加群では細胞はすべて破壊され，同量の細胞を凍結融解により強制的に破壊した場合の ^{51}Cr 解離と同程度となった．T-OPP-Na と D-OPP-Na との毒性の差は認められなかった．

考　察

オルトフェニルフェノールナトリウムは，放射性クロムをラベルした細胞からの ^{51}Cr の解離を測定する実験方法では，マウス脾細胞，赤血球および培養細胞である CHO-KI細胞に対して *in vitro* での50μg/ml 以上の添加により細胞毒性を示した．この用量は，*in vitro* 抗体産生系に対する毒性量[2]と一致する．また，吉田，縄井らにより，培養細胞に対する OPP-Na の細胞組織学的な毒性の検討がされているが，そのデータともほぼ一致すると思われる[4]．OPP-Naは200μg/mlの添加では *in vitro* で細胞を完全に破壊し，100μg/ml，50μg/ml では添加量に比例して毒性が増す．この用量反応関係は，primary culture cell である脾細胞や赤血球においても，継代培養細胞である CHO-KI 細胞においてもほぼ同様に認められた．しかしながら，赤血球細胞のように48時間の培養によっても対照細胞の自然破壊が20%台であるような安定した細胞と，リンパ球のように 24 時間以内に 70～100% の細胞が ^{51}Cr を解離してしまうような細胞とでは，自らその作用の様相が異なるかもしれない．この点を無視して，24時間後の ^{51}Cr の net release で OPP-Na の細胞毒性を比較すると，脾細胞では50% net release はほぼ 50μg/ml の添加でおこり，マウス赤血球および CHO-KI 細胞ではそれは 100μg/ml と 200μg/ml の間の添加量によりおこる．このデータのみから判断すれば，細胞の OPP-Na に対する感受性の高さは脾細胞，赤血球，CHO-KI 細胞の順になると思われる．一方，長時間培養しても対照細胞からの ^{51}Cr 解離が少ない赤血球では，100～200μg/ml の OPP-Na 添加により48時間以内にほぼ完全に細胞は破壊され，溶血がおこる．48時間での50% net release は 50μg/ml 付近である．一般にフェノール系薬剤は溶血性貧血の原因とされているが，赤血球細胞，あるいは骨髄細胞にはこの種の化学物質に対するレセプターがあるのかもしれない．

^{51}Cr は細胞内の蛋白と特異的に結合し，細胞の破壊により細胞外に放出されたのちには再利用はされないといわれている[3]．脾細胞を用いた実験において，100% よりはるかに高い解離がみられたが（図1および2），

この原因は不明である．最大解離を求めるための細胞の凍結融解による破壊が不完全だったためかもしれず，また，^{51}Cr が再利用されたためかもしれない．この点については今後さらに検討してゆくつもりである．これに関連して，赤血球のように分裂能力のもはやなくなった細胞と，脾臓細胞のようにいくつかの細胞の混在している細胞群，また安定した分裂能を有する継代培養細胞のすべてを，同一の実験条件下で比較したことにも検討の余地があると思われる．Crがラベルされる様式も細胞によって異なる可能性もある．一方，OPP-Naの添加についても，その時間や方法を変えることにより新たな知見が得られるかもしれない．これらの実験条件の検討も，今後さらにすすめてゆく必要があると思う．

OPP-Na が食品添加物として認可されるにあたり，その純度を示すためのいくつかの規格が設けられた[5]．D-OPP-Na (Dowcide A) はすべての点でこの規格に合致するが，T-OPP-Na は水酸化ナトリウム含量が規格より高く，また液性 pH もわずかに高い．(広門・溝入ら，未発表)この点を考慮してD-OPP-NaとT-OPP-Naの細胞毒性を比較したが，両者の脾細胞，赤血球，CHO-KI 細胞に対する毒性にはほとんど差がみられなかった．図2および表1-Aにおいて，培養4時間目にT-OPP-Na の毒性が特に著るしいのは，その高い pH に原因があるかもしれない．(液性 pH は T-OPP-Na では12，D-OPP-Na では11である．) しかし組織培養液は5％ CO_2 の条件下できわめて緩衝能が大きいので，この pH はかなり短時間で中性付近に修正されてしまう．このため，長時間培養では，pH12 と pH11 のアルカリ液を培養液5 mlに対して100μl 加えたための pH の差はほとんど問題とならないのであろう．一方，表1—Bに示したように，赤血球に対する毒性は 100μg/ml のD-OPP-Na の方が同濃度の T-OPP-Na よりもはるかに高くなっている．両者の細胞に対する毒性に差があるのかどうか，あるとすればそれは何に起因するものなのか，この点は OPP の毒性のメカニズムを追求してゆく上で是非検討しなければならない問題である．

OPP および OPP-Na の毒性を知るためには，慢性および急性毒性はもとより，突然変異誘発性，催奇形性，染色体異常や組織病理学的変化の検索など，多方面からの研究が必要である．OPP の細胞毒性の問題も，これらとの関連を考慮しつつ，これからの実験をすすめてゆく計画である．

結　論

オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩(OPP-Na) の *in vitro* における細胞毒性を，正常マウス脾臓細胞，赤血球細胞，および継代培養細胞である CHO-KI 細胞を用い，放射性クロム酸ナトリウムをラベルした細胞からの放射性クロム解離率を測定することにより検討した．OPP-Na 200μg/ml は各細胞に対してほぼ完全な細胞破壊をもたらした．100μg，50μg/ml では添加量に比例した細胞毒性がみられ，用量反応関係が成立した．

OPP-Na の毒性はこれらの細胞に対してほぼ同等と思われ，選択的にある細胞を攻撃する傾向はなかった．

また，水酸化ナトリウム含量の異なる二種類のOPP-Naの細胞毒性を比較したが，著るしい差はみられなかった．

参考文献

1) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J. Jr, Spencer, H. C. and Rowe, V. K. : *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **99**, 202, 1952
2) 佐々木美枝子，中尾順子：東京衛研年報，29-1, 109, 1978
3) Sanderson, A. R. : *Nature*, 204, 250, 1964
4) 吉田誠二，縄井寿美子（私信）
5) WHO/FOOD ADD/24. 65, FAO Nutrition Meeting Report Ser., No. 38A, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 109-111, 1978

オルトフェニルフェノールの *in vitro* 抗体産生におよぼす影響について

佐々木美枝子*, 中尾順子*

Effect of *o*-Phenylphenol on the the Immune Response *in vitro*

MIEKO SASAKI* and TOSHIKO NAKAO*

An effect of *o*-phenylphenol sodium salt (OPP-Na) on the primary immune response *in vitro* was examined. By the addition of 3000 and 300μg/m*l* of OPP-Na, PFC of cultured spleen cells from normal mice with sheep erythrocytes was reduced remarkably. The addition of 30 μg/m*l* of OPP-Na made a little influence on the antibody formation *in vitro*. This suppressive effect of OPP-Na on the immune response might be caused by its nonspecific cytotoxicity.

緒言

オルトフェニルフェノール (*o*-phenylphenol : OPPと略記) は柑橘類の防カビ剤として食品添加物としての使用が認可されている薬剤である. 当研究所毒性部ではOPP の安全性を確かめるために, 慢性および急性毒性, 変異原性, 催奇形性, 細胞毒性など各方面から検討をすすめているが, その一環として OPP の *in vitro* 抗体産生系におよぼす作用について調べた. 毒性研究において, 免疫系に対する影響については各種薬剤やいくつかの金属について個々に研究はなされているが, 確立された方向性は未だない. 本実験は, 今後この問題を追求してゆくうえでの第一段階として行ったものである.

材料および方法

動物 : 近交系マウス C3H/HeN (日本チャールズリバー), 16週令, 雌を用いた.

オルトフェニルフェノール : 東京化成オルトフェニルフェノールナトリウム塩 (*o*-phenylphenol sodium salt, $C_6H_5 \cdot C_6H_4ONa \cdot 4H_2O$, TCI-C. P. Lot. AL01) を用いた.

In vitro 抗体産生法 : *In vitro* における抗体産生は市販のマールブルック培養瓶を用いて, マールブルックにより記載された方法により行った[1]. マールブルック瓶は, 透析膜をへだてて外瓶と内瓶の培養液が接するように作られている培養瓶である. 通常, 内瓶に抗体産生細胞および抗原, 外瓶に十分量の培養液を入れ, 37°, 炭酸ガス培養器で数日間細胞培養を行うことにより, *in vitro* で抗体産生細胞を誘導することができる. 抗体産生細胞としては, 正常 C3H/HeN マウスの脾臓細胞を用いた. 脱血死させたマウスの脾臓を無菌的に剔出し, 仔牛血清を10%に加えた PBS (リン酸緩衝食塩水) 入りのペトリディッシュ内で, ピンセットを用いて細胞を PBS 中にしごき出し, 150メッシュの滅菌ステンレス網を通して組織塊を除いた. ついで低速遠心 (1,000 rpm, 10min) により細胞を集め, PBS を用いて二度洗浄後, 培養に用いる培養液に再浮遊させて, 10^7/m*l* に調整した.

培養液としては, MEM (Minimal Essential Medium GIBCO-F11) に必須アミノ酸, 非必須アミノ酸, ピルビン酸ナトリウム (すべて GIBCO 製品) を強化し, 非働化した牛胎児血清 (FCS : GIBCO) を20%濃度となるように加え, 炭酸水素ナトリウム溶液によりpH7.4としたものを用いた.

抗原としては, ヒツジ赤血球 (日本生物材料研究所, 緬羊保存血, SRBC と略記する.) を PBS を用いて二度洗浄した後, 培養液に再浮遊して 10% SRBC 浮遊液とした. この 10% SRBC を, 脾細胞浮遊液に対して 1/100vol 加えた (約10^7 SRBC/m*l*).

抗原を加えた 10^7/m*l* 脾細胞浮遊液 1 m*l* をマールブルック瓶の内瓶に入れ, 外瓶には 10m*l* の培養液を入れて37°, 5% CO_2 の条件で培養した.

OPP-Na は実験毎に新たに調整した. 10%, 1%, 0.1%(w/v)濃度に PBS に溶解したものを0.45μのミリポアフィルターを用いて滅菌し, 細胞培養開始時にその 0.03m*l* ずつをマールブルック内瓶に加えた. 対照としては, OPP-Na の代りに PBS 0.03m*l* を加えた.

用いたマウス脾細胞の back ground の抗体産生 (抗原を加えない場合の抗体産生) をみるために, SRBCを加えない脾細胞も同じ条件で同時に培養した.

* 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

抗体産生細胞数の測定：前述したような *in vitro* の第一次免疫系では，抗体産生細胞は培養2日目頃より出現し，4～5日目に最高数となる．適当な時期に，マールブルック内瓶よりパスツールピペットを用いて細胞を遠心用試験管に移し，内瓶を少量の培養液で洗い出した洗液も加えて低速遠心により細胞を集めた．回収した細胞は培養液で2度洗浄後，各々1 m*l* の新しい培養液に再浮遊させた．この細胞浮遊液を，予想される抗体産生細胞数に応じて適当に希釈したのち，その 0.4m*l* に50 % SRBC 0.05m*l* および補体（MILES，モルモット補体）0.05m*l* を加え，室温で十分混合した．混合細胞浮遊液各 0.1m*l* をカニンガムチェンバーに封じ，37°で30分から1.5時間培養し，抗体(SRBCに対する溶血素）を産生する細胞から放出される溶血素と補体の作用によりSRBCが溶血して肉眼的にプラークとして認められる溶血斑の数を抗体産生細胞数(PFC数——plaque forming cell number）とした．PFC は同一実験群について3～5回数え，その平均値をとった．

結　　果

OPP-Na 3，0.3，0.03mg/m*l*/10^7 spleen cells 添加群および非添加対照群の PFC 数を比較した2回の実験の結果を表に示す．抗原刺激をあたえなかった細胞（表のAg(−)）の back ground PFC 数は，培養4日目に夫々93±40と60±10であり，この価は使用した脾細胞が実験前に感作されていないこと，および正常の back ground をもつ細胞であることを示す．また OPP-Na を添加せず，抗原刺激のみをあたえた実験群の PFC 数は4日目に夫々1,450±50，2,425±1,316で，この実験条件により *in vitro* で十分な一次免疫反応がおこったことを示している．これに対して，OPP-Na 3 mg および 0.3mg を培養系に加えたものでは，抗体産生はほとんどおこらず，培養4日目の回収細胞はほとんどゼロである．0.03mg の OPP-Na 添加群では，2回の実験とも，対照よりやや少ない数の PFC が認められた．この実験結果から，OPP-Na の抗体産生細胞に対する LD_{50} は，300～30μg/m*l*/10^7 cells の間にあることが推定される．

考　　察

In vitro 抗体産生系に対して OPP-Na は 300μg 以上で抗体産生を完全に阻害するような毒性を有することが判ったが，この実験からは，この薬剤が抗体産生のどの段階に働いてその毒性を発揮するのかは不明である．低分子物質の抗体産生におよぼす効果については，いくつかの抗生物質などの医薬品や金属などについての報告が散見されるものの，その数は高分子物質のそれに比べてはるかに少ない．Koller らは methylmercury をウサギに経口投与した場合に抗体産生能がおちること[2]，および methylmercury を投与したマウスでは一次免疫反応のみが抑制されることから，この物質はB細胞あるいはプラズマ細胞に作用して IgM 抗体産生を抑制する可能性があると述べている[3]．また，瀬戸ら[4]も，*in vitro* 抗体産生系において同様の結果を得ている．しかしながら，OPP の場合，抗体産生系細胞に特異的な作用があるとはいいがたく，その毒性はむしろ細胞全般に対する非特異的な作用であると思われる．この点を明らかにするためには，まず OPP がどのような細胞を攻撃するかを調べる必要がある．OPP に特異的な細胞選択性があるか否かを明らかにした上で，*in vitro* 抗体産生に対するその毒性の本態を追求してゆく方向で今後の実験計画をすすめている．

Effect of OPP-Na on the Primary Immune Response *in vitro*

			recovered cell on day 4	PFC/culture on day 3	on day 4	on day 5
Exp. 1	Ag(−)	OPP-Na(−)	30.3±4.3×10^5		93±40	
	Ag(+)	OPP-Na(−)	47.8±2.3		1450±50	
		OPP-Na 3mg	0		0	
		0.3mg	10		50±0	
		0.03mg	44.3±2.3		604±131	
Exp. 2	Ag(−)	OPP-Na(−)		73	60±10	48
	Ag(+)	OPP-Na(−)		1250	2425±1316	1550
		OPP-Na 3mg		0	0	0
		0.3mg		15	0	5
		0.03mg		1000	1000±212	63

結　　論

OPP-Na の細胞毒性について，マウス脾臓細胞のヒツジ赤血球にする *in vitro* 抗体産生系を用いて検索した．3 mg/m*l*，0.3mg/m*l* の OPP-Na の添加により抗体産生が著るしく阻害されることがわかった．

参考文献

1) Marbrook, J.: *The Lancet*, 2, 1279, 1967
2) Koller, L.D., Exon J.H. and Arbogast, B.: *J. Toxicicol. Environment. Health.*, 2, 1115, 1977
3) Koller, L.D. *et al*: *Proc. Soc. Exp.* Biol. Med., 155, 602, 1977
4) 瀬戸　博，秋山和幸，溝口　勲：東京衛研年報，28-1, 212, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 112-115, 1978

チアベンダゾール（TBZ）のマウスを用いた催奇形性試験

小縣昭夫*, 安藤 弘*, 久保喜一*, 平賀興吾*

Teratological Tests of Thiabendazol (TBZ) in Mice

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

はじめに

防ばい剤再点検の一環として，チアベンダゾール（TBZ）の催奇形性をマウスを用いて検討した．

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24.0～31.0g）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 CE-2 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 チアベンダゾール（TBZ）は東京化成㈱製 Lot No. A101 を使用した．溶媒は日本薬局方オリーブ油（宮沢薬品㈱ Lot No. F. ハ09）を用いた．

5. 試料投与量の決定 マウスでの経口投与による LD_{50} が 3.6g/kg であることを参考にした．

6. 観察方法 妊娠7日より15日までの9日間毎日1回経口投与を行なった．妊娠マウスはAからDまでの4群に夫々16匹を無作為に割り当て，A群は TBZ 24％油溶液（2,400mg/kg/day）投与，B群13％液（1,300mg）投与，C群7％液（700mg）投与，D群オリーブ油のみ（10ml/kg/day）投与とした．

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，早・後期死亡胎児，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．

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[1]を行ない骨格異常の有無を調べた．

7. 結果のまとめ 西村の報告[2]に準拠して行なった．

試験結果

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とした体重増加率の推移は図1に示す通りで，オリーブ油のD群に較べ，A，B，C群では投与後抑制がみられ，それは TBZ 用量と関連して認められた．A群では妊娠11日，13日，17日に夫々1匹，14日，15日夫々2匹，16日3匹，計10匹（62.5％）が死亡した．D群の1匹は投与の失敗により妊娠10日に死亡した．また死亡したマウスおよび妊娠しなかったマウスのほとんどが膣口よりの出血を認めた．

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と妊娠しなかったマウスの解剖所見では，A群，B群のほとんどすべてとC群の1部のマウスの腎臓に腎単位での壊死を認めた．器官重量では表1に示す通りで，D群と比較してB群では肝臓が体重比重量で重く，肺・心・脾・左右腎臓が絶対重量，体重比重量でともに重かった．またC群では肝・肺・左右副腎が体重比重量で重く，心・脾・左右腎臓が絶対重量，体重比重量で重かった．すなわち，重量を測定した器官は副腎と卵巣を除き，すべて用量との関連をもって重量の増加が認められた．

2. 胎児に係わる所見 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1/6（16.7％），B群8/16(50％)，C群15/16（93.8％），D群14/15（93.3％）で用量増加に伴う低下が認められた．妊娠の成立した母体では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・後期）および性比：死亡児頻度は，A群は1母体であるが40％，B群21.0％でD群に対して有意，C群8.7％，D群4.2％で用量増とともに死亡児が増加した．逆に平均生児数は減少した．黄体数，着床数，性比には差を認

* 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

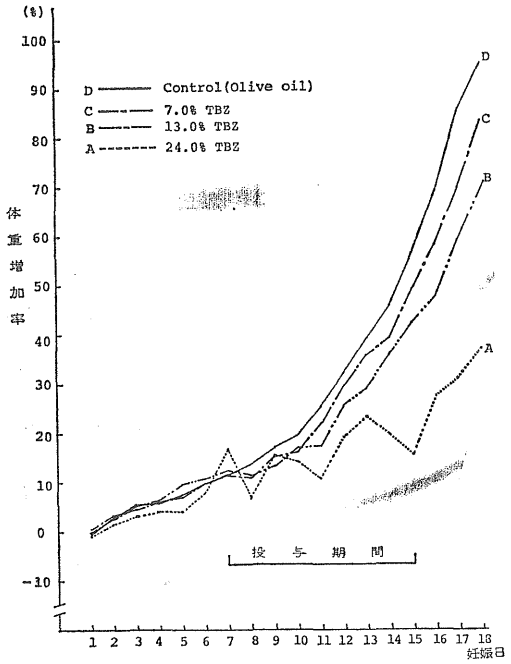


図 1.　TBZ臨界期投与試験
（妊娠7—15日，9回投与）

めなかった（表2）.

3)　生児体重：B群が雌雄ともD群と比較して有意に小さく，C群の雌重量がD群に較べ有意に小さく，用量増とともに小さい傾向を示した（表2）.

4)　生児外表奇形・異常：A群口蓋裂3（母体数1），B群口蓋裂27（6），開眼2（2）；C群口蓋裂17（8），開眼4（2）；D群口蓋裂1（1），開眼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群に対しTBZ投与のB，C群いずれにおいても奇形（口蓋裂）の発現数に推計学的有意性があり，用量—反応関係が認められた.

5)　骨核奇形・変異・化骨進行度・奇形としてはB群で胸椎および肋骨の癒着が夫々2例，C群で肋骨の癒着が2例認められ，発生頻度は0%，3.22±6.30%，1.25±3.37%，0%で群間に有意差を認めなかった. 変異を有するものの出現頻度では，対照であるD群に較べA群で頭蓋骨の形成不全が高く，B群で過剰胸骨核が低く，胸骨核の縮小，分裂が高く推計学的に有意であった. 化骨進行度では対照D群に対しB群では前肢指骨平均化骨数および腰椎後椎骨数で，またC群の腰椎後椎骨数で有意な遅延が認められ，高濃度TBZ投与のA群でも明らかに遅延の傾向が認められた.

総括および考按

チアベンダゾール（TBZ）の妊娠マウス母体および胎

表 1.　TBZ 臨界期投与試験

投与量	群	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	TBZ 2,400mg/kg	1	3.1[1] / 11.3[2]	152.4 / 562.4	313.2 / 1155.7	228.0 / 841.3	248.3 / 916.2
B	TBZ 1,300mg/kg	8	3.1±0.21 / 11.1±0.72**	142.3±10.6*** / 513.3±48.3***	240.0±104.8*** / 862.0±352.6***	235.5±32.3*** / 845.8±87.2***	241.4±31.6*** / 865.4±78.5***
C	TBZ 700mg/kg	15	3.0±0.29 / 10.8±0.67**	141.9±12.6*** / 506.8±26.1***	171.7±35.8*** / 611.4±106.6***	224.0±19.2*** / 801.4±19.2***	236.7±20.0*** / 846.9±61.6***
D	オリーブ油	14	2.8±0.16 / 10.0±0.71	130.7±4.9 / 471.9±33.5	135.8±25.1 / 489.1±90.7	206.7±13.1 / 745.4±56.9	215.4±16.1 / 777.0±69.2

投与量	群	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	TBZ 2,400mg/kg	1	228.6 / 843.5	3.3 / 12.2	2.4 / 8.9	7.8 / 28.8	10.4 / 38.4
B	TBZ 1,300mg/kg	8	210.8±28.6*** / 758.7±92.1***	4.1±0.67 / 14.8±2.16	3.6±0.90 / 12.9±2.78	10.6±2.70 / 38.5±10.95	11.1±2.39 / 40.1±8.41
C	TBZ 700mg/kg	15	194.4±18.6 / 694.7±44.1*	4.2±0.67 / 15.1±2.12*	3.9±0.50 / 14.0±1.89**	10.8±2.65 / 38.5±8.92	11.1±2.15 / 39.5±2.15
D	オリーブ油	14	191.2±58.4 / 684.9±180.1	3.8±0.65 / 13.7±2.32	3.4±0.65 / 12.3±2.41	10.9±2.18 / 39.1±7.19	10.8±1.61 / 38.8±5.44

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
* D群と比較して P<0.05　　** P<0.01　　*** P<0.001

表 2. TBZ 臨界期投与試験

群 (TBZ 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 g) ♂	♀
A (2,400)	16	10	1	1	13	9	40.0	0	40.0	3	♂3	1.0	
B (1,300)	16	0	8	8	13.0 ±2.07	12.1 ±2.75	21.0* ±26.7	7.3* ±9.4	13.7 ±22.7	10.4* ±3.11	115.0 ±54.82	1.09*** ±0.16	1.05** ±0.16
C (700)	16	0	15	15	13.9 ±2.23	13.0 ±2.39	8.7 ±6.8	2.9 ±5.5	5.8 ±6.1	12.0 ±2.39	111.4 ±48.40	1.25 ±0.10	1.15* ±0.10
D (オリーブ油)	16	1	14	14	13.4 ±1.91	12.3 ±1.86	4.2 ±7.2	0.9 ±3.3	3.3 ±4.7	11.9 ±2.13	131.1 ±69.01	1.34 ±0.12	1.27 ±0.11

a) 腟栓を確認したもの　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
(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
* $P<0.05$　** $P<0.01$　*** $P<0.001$

表 3. TBZ 臨界期投与試験

群 (TBZ mg/kg)	外表観察			
	奇形児 a)		その他の異常を示した児 b)	
	頻度(%) ±SD 1)	各型とその数	頻度(%) ±SD 1)	各型とその数
A (2,400)	100	口蓋裂：3	0	—
B (1,300)	22.98*** ±32.38	口蓋裂：27 開眼：2	0	—
C (700)	11.07* ±15.66	口蓋裂：17 開眼：4	0	—
D (オリーブ油)	1.34 ±3.48	口蓋裂：1 開眼：1	0	—

1) 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
(統計) a) b)：順位和検定 *$P<0.05$ ***$P<0.001$

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15日までの9日間毎日1回投与により，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2,400 mg/kg/day（A群）1,300mg（B群）700mg（C群）とした．母体体重は用量と相関して強い増加抑制が認められ，A群では10匹（62.5%）が妊娠18日までに死亡した．また死亡した動物を含め妊娠しなかった動物では腟口より出血がみられ流産と考えられた．妊娠18日の肉眼的解剖所見ではA，B群のほとんどすべての母体に，C群では1部の母体の腎臓に腎単位の壊死を認めた．母体器官重量においては卵巣および副腎を除いた主要器官に用量相関を示す増加が認められた．

胎児に係る所見では，黄体数，着床数の平均および性比に有意と認められる変動はみられなかった．死亡児発生頻度は用量増とともに高く，生児数は少なく用量相関のうかがえる変動を認めた．また生児体重は雌雄とも用量増と関連して小さくなった．胎児の外表奇形・異常では特異的な奇型の型は認められなかったが，口蓋裂の発生頻度の増加が用量—反応の関係で認められた．骨格観察ではB，C群に肋骨および胸椎の癒着がみられたが，全例（3匹）に口蓋裂を認めたA群（2,400mg/kg）の胎児に奇形はみられなかった．変異の出現頻度では頭蓋骨の形成不全，胸骨核の縮小，分裂に用量—出現関連がややうかがわれる程度であった．化骨進行度では明らかな用量と相関性のある遅延を認めた．

以上，本試験では極めて高用量で TBZ の催奇形性を示す結果を得た．Seiler[3] の総説によれば TBZ はマウスを用いた5世代にわたる飼育試験で飼料中濃度200 ppm まで，ラットを用いた3世代試験で 40mg/kg/day まで害的影響を与えなかったといわれる．一方，TBZ と同じ benzimidazole 化合物の Parbendazol に催奇形性があり，benzimidazole の誘導体とみなされる Thiophanate ではマウスで本試験の場合と同じ口蓋裂の発生を低頻度であるが認められたといわれ，benzimidazole

表 4. TBZ 臨界期投与試験

群 (TBZ mg/kg)	観察胎児数	骨格観察														
		奇形児[a]		変異を有する児の頻度±SD(%)△									化骨進行度±SD△			
		頻度(%)±SD	型とその数	頭蓋骨形成不全[b]	胸骨核不相称[c]	過剰胸骨核[d]	頸肋[e]	腰肋[f]	第一の分裂・第二頸椎分岐[g]	仙椎前異常[h]	胸骨核の縮小・裂[i]	胸椎体成・腰椎体不全[j]	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]	腰椎後椎骨平均化数[m]	
A (2,400)	3	0	——	66.67***	0	0	0	0	0	0	100.00	0	(左) 1.34 (右) 1.34	(左) 1.61 (右) 1.71	8.00	
B (1,300)	83	3.22±6.30	肋骨癒着：2 胸椎癒着：2	6.45±12.59	14.25±14.24	1.79*±5.05	8.00±12.45	37.23±21.80	30.37±20.08	4.18±6.32	38.13***±20.87	0	(左)2.03±1.02* (右)2.06±0.98*	(左)1.73±1.02 (右)1.72±1.14	9.70±1.81**	
C (700)	180	1.25±3.37	肋骨癒着：2	0	12.25±12.84	4.23±6.82	7.17±12.92	39.32±26.70	35.74±25.63	0	7.55±9.88	1.86±3.90	(左)2.83±0.46 (右)2.88±0.45	(左)2.19±0.33 (右)2.22±0.30	11.38±1.14*	
D (オリーブ油)	142	0	——	0	13.08±10.97	16.69±18.13	4.35±10.30	47.43±26.04	18.04±14.33	0.56±1.93	6.07±11.86	0.69±2.40	(左)2.86±0.68 (右)2.89±0.70	(左)2.54±0.76 (右)2.56±0.80	12.54±1.59	

c) 最長胸骨核で左右の核の間にその長さの1/2以上のずれのあるもの
f) 腰肋の定義は，Kimmel and Wilson (Teretology, 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　　* $P<0.05$　　** $P<0.01$　　*** $P<0.001$

化合物中には催奇形性を示すものが存在するようである．今後例数を増し，他系統，他種動物をも使用して，TBZ の催奇性の有無を確認したい．

要　旨

防ばい剤チアベンダゾール (TBZ)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15日までの9日間，1日1回 2,400mg/kg，1,300mg/kg，700mg/kg を投与し妊娠18日の胎児についての外表・骨格の奇形・異常を検索した．

母体の体重抑制・器官重量の増加・胎児の発育遅延などを認め，特に外表奇形で口蓋裂の用量相関性のある有意な増加を認めた．

文　献

1) Dawson, A. B.: *Stain Tech.*, 1, 123, 1927
2) 西村秀雄：先天異常，16, 175, 1976
3) Seiler, J. P.: *Mutation Res.*, 32, 151, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 116-124, 1978

アセトアミノフェンのラットを用いた亜急性毒性試験

林田志信*, 高橋 博*, 平賀興吾*

Subacute Toxicity of Acetaminophen by Food Administration to Rats

SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

Acetaminophen（以下 AAP と略す）はアニリン誘導体の解熱・鎮痛薬で1893年来治療に導入されている．同属には acetanilid や phenacetin があるが，これらの主代謝物は AAP であり，これが解熱・鎮痛効果を現す本態であるといわれている．AAP は治療量においては安全性が高いとみられているが，過量で致命的な肝臓の壊死を起し，また腎臓障害，低血糖性昏睡あるいは血小板減少症等がみられる[1,2]．最近 AAP に変異原性が認められ[3]，同属の phenacetin には癌原性が確認された[4]．

本報告はラットを用いた AAP の癌原性試験における最大投与量[5]を決めるために行った AAP 添加飼料による13週間にわたるラット飼育試験の結果である．AAP 添加量の決定は，同一系統ラットを用いて行った経口急性毒性試験（LD_{50}; 雄1.7-2.2g/kg，雌3.1-4.4g/kg）の結果を参考とした．

試験方法

試料 AAP を5，2.5，1.25，0.625および0.3125%の割に添加した日本クレア固型飼料 CE-2（水分8.0，粗蛋白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）の供与を国立衛生試験所より受けた．

試験用動物 日本チャールス・リバー社生育の近交系 Fischer ラット（F344/Du Crj）雌雄を4週令で購入，室温25±1℃，湿度50～60%，換気毎時10回，照明午前6時から午後5時までの barrier system 飼育室において，前面および床面が網のステンレス製個別飼ケージに収容，自動給水装置（細菌ろ過器経由）付ベルト式飼育架台にて飼育した．試験開始前の飼料には CE-2 を用いた．

観察法 各試験飼料毎に雌雄ラット夫々10匹を用い，飼育架台にランダムに配置し5週令時より試験飼料の投与を行い，水道水とともに自由摂取させた．

動物の一般状態は毎日観察し，体重は毎週，飼料摂取量および食水量は隔週に測定した．

試験期間は13週とし，終了時剖検後脳，心臓，肺，肝臓，腎臓（左右），脾臓，下垂体，副腎（左右），胸腺，卵巣（左右），子宮，精巣（左右），前立腺の重量を測定，血清生化学的検査，血液学的検査を行った．

一般状態の観察，体重測定は午前9時から10時の間に行い，飼料摂取量は飼料投与量と7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）〕/7により求めた．解剖に当ってはラットを背位に固定，そけい部を切開後大腿動・静脈を切り放出する血液を遠心管とヘパリン処理試験管に採取，放血致死せしめた．血液学的検査ではヘパリン処理試験管に採取した血液を用い Coulter Counter Model S（Coulter Electric 社製）により白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（HGB），ヘマトクリット（HCT），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球容積（MCV）および平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）を測定した．血清生化学的検査では遠心管に採取した血液より得た血清を味の素KK分析センターに委託し GOT，GPT，LDH，ALP，TTT，ChE 活性，総ビリルビン，総コレステロール，トリグリセライド，β-リポ蛋白，総蛋白量，A/G比，尿素窒素，クレアチニン，尿酸量，ナトリウム，カリウム，クロール濃度を測定した．

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．

（本試験においては解剖・病理組織学的検索も行ったが，これらの所見については藤井ら[6]が別に報告する）

結果

一般状態 5%添加飼料摂取ラット（以下5%群）は飼料のコボシが多く，試験開始後3日頃より痩せが目立ち亢奮様で鉛筆の先をケージに入れると攻撃的に咬むものが多かった．次第に衰弱し6日目雄の1例が死亡したのをはじめとして雄6日1，7日1，12日1，15日1，

* 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. 飼料摂取量（10例平均±SD）

実験週＼群		0%(対照)	5.0 %	2.5 %	1.25%	0.625%	0.3125%
♂	2	11.8±1.33[1] (95.5±7.43)[2]	3.5±0.43* (53.2±6.84)[6]*	6.1±0.84* (82.3±9.78)*	10.2±1.15* (99.2±10.43)	11.3±0.54 (97.3±5.17)	11.0±0.82 (90.7±7.40)
	4	13.8±2.65 (77.7±8.57)		5.1±1.06* (59.9±14.09)*	12.6±2.17 (91.4±10.01)*	13.9±1.33 (84.1±5.52)	13.5±1.72 (78.7±4.27)
	6	12.8±2.63 (60.0±6.76)		5.2±0.87* (60.7±10.27)	11.9±2.26 (72.0±6.09)*	13.5±1.32 (66.7±3.54)	13.3±1.88 (63.0±4.21)
	8	13.7±1.95 (58.2±3.90)		5.9±1.61* (67.0±19.61)	12.8±1.60 (69.0±3.33)*	13.6±1.06 (59.2±1.29)	13.5±1.52 (57.2±2.09)
	10	14.2±1.55 (55.1±2.08)		7.1±1.05* (72.9±10.62)*	12.9±1.07* (62.1±3.55)*	14.2±0.97 (56.8±2.31)	13.9±1.21 (54.3±1.94)
	12	14.5±1.25 (53.1±2.61)		6.9±1.76* (66.9±15.28)*	13.3±1.37* (59.0±4.45)*	14.0±0.59 (52.9±2.16)	13.8±1.22 (51.6±3.64)
♀	2	8.8±0.84 (88.6±9.05)	3.3±— (58.9±—)[1]	4.9±0.83* (77.7±10.94)*	9.0±0.97 (100.4±10.66)*	9.2±0.46 (94.3±5.18)	9.1±1.12 (92.2±5.96)
	4	9.5±0.70 (76.1±3.78)		4.5±1.07* (62.3±14.54)*	9.7±1.13 (85.2±7.90)*	10.0±0.72 (79.4±5.06)	9.9±0.97 (79.3±6.52)
	6	8.8±1.01 (63.8±5.65)		4.2±0.65* (60.1±9.19)	9.1±1.21 (71.1±5.44)*	9.2±0.79 (66.0±3.45)	8.7±1.19 (62.8±6.64)
	8	9.3±0.57 (63.6±1.41)		5.4±0.68* (76.8±6.80)*	9.6±1.10 (68.9±3.37)*	9.4±0.75 (62.9±2.86)	9.4±0.67 (63.3±2.53)
	10	9.5±0.75 (61.6±3.50)		5.2±0.91* (72.0±17.41)	9.5±1.02 (63.5±4.74)	9.7±0.60 (61.7±2.97)	9.6±0.84 (61.2±3.74)
	12	9.9±0.52 (62.1±4.35)		5.1±1.90* (66.5±21.58)	9.8±0.97 (62.9±3.59)	10.0±0.61 (61.6±3.22)	9.7±0.65 (59.8±3.26)

1) g/rat/day 2) g/kg/day * 対照と比較してP＜0.05

表 2. Acetaminophen 摂取量（10例平均±SD）

実験週＼群		5.0 %	2.5 %	1.25%	0.625%	0.3125%
♂	2	175±21.7 (2666±341.8)[6]	152±21.0[1] (2060±245.0)[2]	128±14.4 (1241±130.4)	71±3.4 (608±32.4)	34±2.6 (283±23.2)
	4		129±26.6 (1499±351.8)	158±27.1 (1143±125.0)	87±8.3 (526±63.7)	42±5.4 (245±13.4)
	6		130±21.8 (1519±256.9)	149±28.3 (900±76.1)	85±8.2 (417±22.1)	41±5.9 (196±13.2)
	8		147±40.3 (1678±492.4)	160±20.0 (863±41.5)	85±6.6 (370±8.1)	42±4.8 (179±6.4)
	10		179±26.4 (1825±265.8)	161±13.4 (777±44.1)	89±6.1 (355±14.4)	43±3.8 (169±6.1)
	12		172±43.0 (1675±382.2)	166±17.1 (738±55.9)	88±3.7 (331±13.5)	43±3.8 (161±11.3)
	平均		1709mg/kg/day	944mg/kg/day	435mg/kg/day	206mg/kg/day
♀	2	165±— (2946±—)[1]	124±20.7 (1945±273.4)	112±12.1 (1255±133.3)	57±2.9 (589±32.2)	28±3.5 (287±18.5)
	4		112±26.7 (1558±363.7)	121±14.1 (1065±98.8)	62±4.5 (496±31.5)	31±3.0 (247±20.3)
	6		105±16.3 (1504±229.7)	114±15.1 (889±67.9)	57±4.9 (412±21.6)	27±3.7 (195±20.6)
	8		135±17.2 (1923±170.3)	120±13.7 (862±42.2)	59±4.7 (393±17.9)	29±2.1 (197±8.0)
	10		130±22.9 (1802±435.9)	119±12.8 (794±59.2)	61±3.8 (385±18.6)	30±2.6 (191±11.8)
	12		128±34.6 (1663±538.9)	122±12.2 (787±44.7)	62±3.8 (385±20.3)	30±2.0 (186±10.1)
	平均		1732mg/kg/day	942mg/kg/day	443mg/kg/day	217mg/kg/day

1) mg/rat/day 2) mg/kg/day

表 3. 飲　水　量（10例平均±SD）

	実験週＼群	0％(対照)	5.0 ％	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
♂	2	16.2±1.9[1] (131.1±10.3)[2]	12.6±6.0 (197.9±5.2)*[8]	9.1±1.3* (123.0±15.2)	14.8±3.3 (143.2±30.2)	17.0±2.0 (145.7±16.9)*	16.2±2.1 (133.7±20.3)
	4	18.0±3.2 (101.4±10.6)		9.6±3.3* (111.8±44.6)	16.0±2.7 (116.2±11.8)*	17.8±2.0 (107.6±10.2)	17.3±3.1 (100.3±10.8)
	6	18.8±4.0 (88.3±11.2)		8.6±2.1* (100.2±24.4)	15.7±3.2 (94.9±9.9)	18.0±1.6 (88.9±6.3)	18.4±3.3 (87.0±9.4)
	8	19.5±3.4 (82.4±7.8)		10.5±4.9* (120.2±10.7)	17.7±4.0 (94.8±16.6)	21.2±1.6 (92.2±7.0)*	19.7±3.0 (83.1±7.6)
	10	20.5±3.7 (79.3±9.9)		11.1±3.1* (112.7±25.6)*	17.5±2.4* (84.0±8.0)	20.3±1.5 (81.4±4.3)	21.8±8.7 (85.2±64.1)
	12	20.6±2.2 (75.3±4.8)		11.6±1.7* (112.7±16.5)*	19.1±2.2 (84.5±6.5)*	21.0±1.2 (79.3±6.1)	19.2±1.8 (71.5±4.6)
♀	2	13.4±4.7 (135.8±35.1)	13.9±12.0 (262.5±61.1)	9.1±5.8* (147.9±44.6)	12.8±4.9 (142.6±56.7)	14.0±5.0 (141.9±60.1)	15.0±15.7 (151.3±11.7)
	4	15.3±1.6 (122.0±13.4)		7.3±2.8* (103.2±33.7)	14.9±2.9 (131.3±23.2)	16.1±1.4 (128.0±8.6)	14.6±2.3 (116.2±17.3)
	6	15.6±1.6 (113.4±12.5)		6.9±2.7* (99.5±44.6)	14.6±3.6 (112.6±21.5)	15.3±3.1 (109.4±18.4)	13.8±2.8 (98.7±18.1)
	8	17.1±1.7 (117.4±11.7)		8.0±0.9* (114.7±16.9)	15.5±3.2 (110.8±18.9)	21.0±17.0 (141.3±27.3)	15.1±2.5 (102.1±16.4)
	10	15.9±2.7 (103.0±14.7)		8.0±2.0* (110.0±32.7)	16.1±2.3 (107.4±13.2)	17.9±3.2 (113.1±16.9)	14.6±1.8 (93.1±10.4)
	12	16.3±1.6 (102.1±12.2)		7.5±1.9* (98.9±16.8)	17.8±2.9 (114.2±16.7)	17.3±1.9 (106.9±10.4)	16.5±2.3 (101.6±15.2)

1) g/rat/day　2) g/kg/day　* 対照と比較してP <0.05

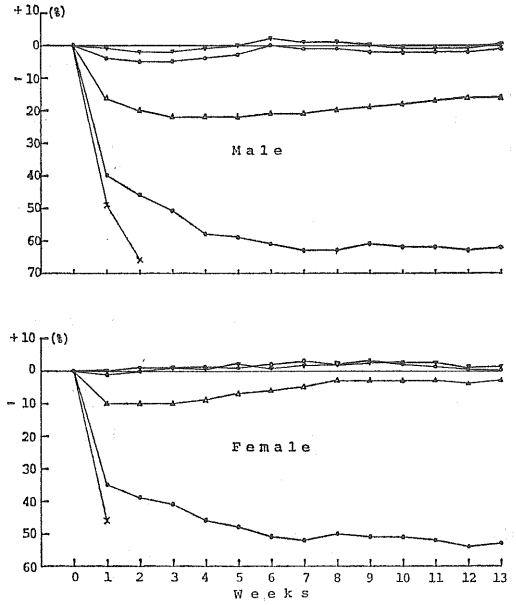


図1. 対照群体重に対する試験群体重増加(抑制)率

$$\left(1-\frac{\text{試験群の体重増加率}}{\text{対照群の体重増加率}}\right)\times 100$$

×—× 5％群，●—● 2.5％群，△—△ 1.25％群
○—○ 0.625％群，▲—▲ 0.3125％群

16日2，17日3，18日1例，雌7日5，8日2，12日1，14日1，16日1例が死亡した．すなわち試験開始後6日目より18日目までに全例死亡し，雄は16・17日目に，雌では7日目に50％が集中していた．目が黒くみえるものが多く，死亡時に血尿を伴っているものがあった．

2.5％群においても飼料のコボシはやや多く，痩せもやや目立った．5％群にみられた他の症状はあまり顕著ではなかった．雄は全例生存したが，雌は試験61，70，86日目に各1例計3例が死亡した．

1.25％群，0.625％群，0.3125％群では対照群と差を認めなかった．

飼料摂取量　表1に示すように5％群は1回だけ，しかもラット数が死亡により雄6匹，雌1匹だけの値であるが，対照群の約1/3の摂餌量であった．2.5％群では対照群の約1/2の摂餌量であるが体重比摂取量は8週頃より対照群に優る値を示した．1.25％群雄は対照群にやや下廻る摂餌量であったが体重比摂餌量は優っていた．雌での摂餌量は対照群と同等か，やや優り体重比摂餌量は大であった．0.625％群，0.3125％群では対照群と差を示さなかった．

表 4.　体　　重（雄10例平均±ＳＤ）

実験週＼群	0％(対照)	5.0 ％	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
0 a)	83.6±2.2	83.5±2.4	83.0±2.5	83.3±1.3	83.0±2.1	83.0±2.1
1	96.2±3.0[1] (100.0±0)[2]	96.3±2.8 (100.0±0)	95.7±2.8 (100.0±0)	95.9±1.4 (100.0±0)	95.0±3.3 (100.0±0)	95.2±3.1 (100.0±0)
2	123.8±5.8 (128.3±4.4)	63.8±4.7 (65.8±4.6)*(8)	73.9±3.7 (76.6±3.1)*	103.5±3.8 (107.6±3.5)*	117.0±4.4 (122.6±1.9)*	121.4±2.6 (127.0±2.3)
3	150.8±12.5 (156.6±10.7)	51.3±6.6 (52.8±5.8)*(6)	80.2±4.6 (83.8±4.9)*	120.2±6.4 (125.3±6.3)*	140.9±5.4 (148.3±4.3)	146.1±10.0 (153.4±8.0)
4	176.9±18.1 (183.4±16.1)		86.6±4.5 (90.0±4.9)*	137.5±10.3 (142.8±10.1)*	165.1±7.5 (173.3±7.3)	171.4±14.7 (179.5±12.6)
5	196.0±27.1 (203.4±25.1)		81.4±5.9 (85.0±5.3)*	151.2±16.0 (157.6±16.1)*	184.9±10.3 (194.6±9.9)	192.0±18.0 (201.6±17.0)
6	211.8±28.3 (219.5±29.8)		86.1±5.1 (89.3±4.1)*	164.6±19.1 (171.2±19.8)*	203.0±13.2 (213.3±12.3)	210.2±20.2 (220.4±20.7)
7	221.4±28.3 (229.9±33.8)		86.5±5.0 (89.3±3.8)*	173.8±20.8 (181.2±21.5)*	218.9±15.4 (230.4±14.7)	224.3±22.3 (235.7±23.0)
8	236.1±32.8 (244.9±31.9)		88.3±6.2 (91.6±5.3)*	185.7±20.2 (193.1±20.8)*	230.3±17.7 (241.9±16.5)	236.0±23.9 (247.6±25.3)
9	246.3±31.1 (255.7±29.5)		90.5±8.2 (94.5±7.4)*	196.3±20.6 (204.6±21.3)*	240.8±18.0 (253.4±16.1)	246.4±23.5 (258.9±24.5)
10	257.9±29.2 (267.9±28.4)		98.7±9.8 (103.1±9.3)*	208.8±21.1 (217.6±21.0)*	250.0±17.6 (263.1±15.9)	256.3±21.7 (269.4±23.4)
11	267.2±27.9 (277.6±26.9)		100.9±9.5 (105.3±8.6)*	217.8±21.5 (227.0±21.3)*	258.8±16.6 (272.4±14.6)	260.1±21.9 (275.5±21.8)
12	273.9±25.9 (284.6±24.4)		103.0±10.6 (107.5±9.5)*	225.7±19.1 (235.3±19.0)*	265.5±14.2 (279.4±11.4)	268.4±20.3 (281.5±22.2)
13	282.5±24.7 (293.5±23.1)		103.6±10.8 (108.1±10.0)*	235.0±19.9 (245.0±20.0)	273.5±13.7 (287.9±11.4)	275.2±19.5 (288.7±22.4)
14b)	288.6±24.9 (299.9±23.9)		108.4±11.0 (113.2±10.1)*	242.7±18.9 (253.0±18.6)	282.7±14.3 (297.5±11.3)	284.2±20.3 (298.8±23.5)

1) g 2) 体重/実験第1週体重×100＝体重増加率 * 対照と比較してP〈0.05 a)実験開始3日前体重 b)実験終了時体重

表 5.　体　　重（雌10例平均±ＳＤ）

実験週＼群	0％(対照)	5.0 ％	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
0 a)	74.1±2.5	73.8±2.6	74.0±3.7	74.1±1.9	74.0±2.7	74.0±1.7
1	82.9±2.4[1] (100.0±0)[2]	81.8±2.3 (100.0±0)	81.9± (100.0±0)	83.2±2.7 (100.0±0)	82.5±2.2 (100.0±0)	82.5±2.1 (100.0±0)
2	99.3±3.9 (119.7±3.4)	52.6±2.9 (65.0±5.2)*(3)	63.8±4.5 (77.7±5.3)*	89.9±2.2 (107.6±2.3)*	98.3±4.3 (118.8±4.8)	99.3±6.0 (119.8±4.0)
3	113.5±3.3 (136.9±4.5)		68.5±6.1 (83.6±5.9)*	102.6±4.5 (123.3±5.7)*	112.5±5.1 (136.4±6.5)	113.9±3.1 (138.1±3.9)
4	125.7±3.9 (151.2±4.1)		72.3±5.4 (87.8±4.8)*	113.7±7.9 (136.2±9.5)*	126.2±5.0 (152.5±5.1)	125.8±3.6 (152.1±4.5)
5	131.9±5.0 (159.1±5.0)		70.7±8.4 (86.4±10.2)*	121.3±9.7 (145.8±12.1)*	132.7±5.9 (160.8±5.4)	132.5±4.7 (160.6±6.1)
6	138.6±6.0 (165.8±6.4)		70.5±7.3 (85.5±7.2)*	128.6±10.6 (154.0±12.4)*	139.2±6.1 (168.2±6.1)	139.5±5.7 (168.6±6.2)
7	142.2±7.4 (171.5±7.9)		68.5±7.3 (83.5±6.2)*	134.5±11.2 (161.7±14.0)	144.3±5.8 (174.9±5.4)	143.4±6.7 (173.8±7.6)
8	146.5±8.0 (176.2±8.1)		70.8±8.6 (85.7±7.6)*	139.8±10.5 (167.6±14.5)	149.8±6.4 (181.2±6.2)	148.6±6.5 (179.5±6.9)
9	150.0±8.1 (180.9±7.6)		73.1±9.1 (89.1±8.8)*	145.4±9.6 (174.8±11.4)	152.4±6.3 (184.7±7.0)	152.6±7.1 (184.9±7.2)
10	154.4±9.4 (186.2±9.6)		74.8±9.5 (91.5±10.2)*(9)	149.8±7.4 (180.1±8.8)	157.4±6.3 (190.8±6.6)	157.6±6.7 (191.0±7.3)
11	155.9±9.3 (188.0±9.7)		74.8±6.0 (92.2±6.6)*(8)	151.2±9.1 (181.8±11.8)	158.6±6.4 (192.2±6.3)	158.9±7.0 (192.6±7.6)
12	160.5±10.4 (193.5±10.8)		75.8±8.1 (93.3±8.3)*(8)	156.0±8.7 (187.6±10.6)	162.4±6.8 (196.8±5.9)	163.3±7.9 (197.9±8.1)
13	164.9±7.9 (198.9±8.6)		74.7±13.4 (91.8±14.8)*(8)	158.7±10.2 (190.8±12.3)	165.0±6.7 (200.0±6.5)	166.1±6.5 (201.3±6.9)
14b)	170.7±7.8 (205.9±7.2)		79.7±7.3 (97.4±8.2)*(7)	165.9±9.1 (199.5±11.2)	170.3±6.7 (206.4±6.8)	172.1±8.3 (208.5±8.1)

1) g 2) 体重/実験第1週体重×100＝体重増加率 * 対照と比較してP〈0.05 a)実験開始3日前体重 b)実験終了時体重

表 6. 食 餌 効 率 （7日間の体重増加量g／7日間の摂餌量g）×100

	実験週＼群	0％(対照)	5.0 ％	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
♂	2	32.1±6.6[1]	−63.0±36.9(6)[2]	14.5±3.9	23.0±5.4	30.0±4.6	31.8±5.1
	4	18.3±9.4		−18.6±25.7	14.8±5.5	20.2±3.6	21.5±4.9
	6	9.3±16.3		−0.1±11.5	10.9±2.7	16.6±2.8	15.0±3.4
	8	11.3±6.7		0.6±24.2	11.9±4.2	11.0±2.3	11.1±3.3
	10	9.5±2.9		3.5±13.5	9.9±5.5	8.9±3.4	4.0±8.5
	12	8.5±3.5		−0.8±14.0	9.9±4.6	8.1±2.3	6.9±4.9
♀	2	22.8±4.2	−43.2 (1)	12.7±5.6	19.8±5.0	21.8±3.4	22.7±4.3
	4	9.1±2.1		−11.6±33.2	10.8±6.0	9.1±3.7	9.3±3.3
	6	6.5±2.5		−7.5±8.9	9.1±3.3	7.9±3.3	6.2±4.1
	8	5.4±4.3		5.8±6.1	8.5±4.2	3.9±4.2	6.0±2.1
	10	2.1±2.8		−0.7±17.9	1.7±4.2	1.7±2.4	1.9±4.0
	12	6.2±5.4		−20.1±62.3	3.7±3.1	3.6±2.5	5.5±5.9

1) 10例の平均±SD　2) 例数

表 7. 血 液 学 的 検 査

	＼群	0％(対照)	2.50％	1.25％	0.625％	0.3125％
♂	WBC (×10³/mm³)	5.85±0.68[1]	13.77±4.39*	6.22±1.17	6.11±0.66	6.60±0.35*
	RBC (×10⁶/mm³)	8.489±0.241	4.844±0.707*	8.046±0.311*	8.498±0.289	8.566±0.258
	HGB (g/dl)	16.4±0.61	11.9±2.21*	16.3±0.47	16.6±0.55	16.5±0.57
	HCT (%)	44.2±1.09(10)[2]	35.4±4.24*(10)	44.6±1.81(10)	44.6±1.94(10)	45.1±2.48(9)
	MCV (μ³)	53.5±0.97	73.9±4.97*	56.6±0.84*	53.7±0.95	54.0±1.87
	MCH (μμg)	19.7±0.62	24.8±1.69*	20.6±0.64*	19.8±0.34	19.5±0.71
	MCHC (%)	37.0±1.15	33.7±3.82*	36.3±1.18	37.1±0.76	36.4±2.41
♀	WBC (×10³/mm³)	5.35±0.42	11.37±5.86*	5.37±0.94	5.45±0.98	5.42±1.02
	RBC (×10⁶/mm³)	8.118±0.330	4.094±1.345*	7.813±0.306*	8.028±0.309	8.189±0.233
	HGB (g/dl)	17.0±1.20	9.6±3.23*	16.8±0.63	16.5±0.70	16.7±0.42
	HCT (%)	44.4±2.64(10)	28.4±9.30*(7)	44.1±2.24(10)	44.4±1.97(10)	45.0±2.23(10)
	MCV (μ³)	56.0±2.31	69.5±2.87*	57.7±1.49	56.6±1.57	56.1±2.07
	MCH (μμg)	21.2±1.53	24.1±1.40*	21.8±0.82	20.8±0.26	20.7±0.52
	MCHC (%)	38.0±2.31	34.6±2.50*	38.1±1.93	37.1±1.34	37.0±1.79

1) 平均±SD　2) 例数　* 対照と比較してP＜0.05

表 8. 血清生化学的検査（雄）

群	0％(対照)	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
GOT (KU)	111.5±20.4[1)](10)[2)]	210.2±85.2*(8)	82.8±25.4*(8)	72.8±9.5*(9)	104.0±33.6(10)
GPT (KU)	46.7±7.4(10)	149.3±79.2*(8)	39.1±8.8(8)	32.6±2.7*(9)	43.0±9.3(10)
LDH (WU)	713.2±176.2(10)	599.7±188.0(8)	674.3±270.2(8)	557.1±127.4*(9)	632.5±293.7(10)
ALP (KAU)	30.9±2.9(10)	32.9±10.1(8)	29.1±3.0(8)	29.3±4.2(9)	28.5±2.56(10)
TTT (SHU)	0.76±0.53(10)	0.33±0.15(3)	0.47±0.30(8)	0.58±0.25(9)	0.64±0.38(9)
ChE (△pH)	0.12±0.03(10)	0.10±0.04(8)	0.11±0.04(8)	0.11±0.03(9)	0.12±0.02(10)
総ビリルビン(mg/dl)	0.38±0.10(10)	0.26±0.06(3)	0.40±0.14(8)	0.34±0.10(9)	0.35±0.10(9)
総コレステロール (mg/dl)	59.5±4.8(10)	83.0±38.2(3)	58.6±6.6(8)	65.2±4.0*(9)	58.7±3.3(9)
トリグリセライド (mg/dl)	145.6±18.4(10)	48.3±1.5*(3)	90.3±21.3*(8)	127.0±18.9*(9)	131.1±22.2(9)
β-リポ蛋白(mg/dl)	145.9±16.2(10)	80.6±20.6*(3)	116.5±20.1*(8)	130.5±29.9(9)	135.0±31.1(9)
総蛋白 (g/dl)	6.92±0.23(10)	5.56±0.72(3)	7.00±0.31(8)	7.33±0.20*(9)	6.91±0.22(9)
A/G	1.44±0.17(10)	1.63±0.06(3)	1.48±0.14(8)	1.50±0.19(9)	1.48±0.15(9)
尿素窒素 (mg/dl)	22.2±1.8(10)	16.6±1.5*(3)	22.8±2.3(8)	21.4±1.2(9)	22.2±1.4(9)
クレアチニン(mg/dl)	0.47±0.16(10)	0.13±0.15(3)	0.52±0.13(8)	0.47±0.14(9)	0.45±0.27(9)
尿 酸 (mg/dl)	1.69±0.58(10)	2.30±0.92(3)	2.22±0.44*(8)	1.81±0.57(9)	1.65±0.92(9)
ナトリウム (mEq/l)	140.3±2.9(10)	141.0±2.0(3)	141.0±1.9(8)	140.5±2.9(9)	141.5±1.42(9)
カリウム (mEq/l)	5.86±0.47(10)	6.20±0.62(3)	5.92±0.59(8)	5.98±0.45(9)	5.72±0.67(9)
クロール (mEq/l)	104.0±3.3(10)	106.3±1.2(3)	104.0±1.6(8)	101.5±0.9*(9)	101.3±1.5*(9)

1) 平均±SD 2) 検査例数 * 対照と比較してP <0.05

表 9. 血清生化学的検査（雌）

群	0％(対照)	2.5 ％	1.25％	0.625％	0.3125％
GOT (KU)	104.1±17.4[1)](10)[2)]	388.7±257.0*(7)	76.2±16.4*(9)	86.1±21.9(9)	103.3±31.1(10)
GPT (KU)	45.2±7.6(10)	219.0±119.7*(7)	36.0±5.5*(9)	39.0±5.4(9)	45.5±16.6(10)
LDH (WU)	717.8±209.7(10)	727.8±272.0(7)	486.4±162.6*(9)	589.0±235.5(9)	707.8±406.7(10)
ALP (KAU)	28.3±2.4(10)	31.5±6.7(7)	25.4±3.8(9)	23.4±3.7(9)	26.8±4.1(10)
TTT (SHU)	0.30±0.17(8)	0.7±— (1)	0.30±0.29(9)	0.28±0.21(6)	0.33±0.19(9)
ChE (△PH)	0.79±0.12(10)	0.13±0.03*(7)	0.60±0.10*(9)	0.78±0.10(9)	0.79±0.11(10)
総ビリルビン(mg/dl)	0.26±0.05(8)	0.20±— (1)	0.22±0.01(5)	0.25±0.08(6)	0.24±0.11(9)
総コレステロール (mg/dl)	64.2±5.7(8)	58.0±— (1)	70.0±8.0(5)	70.1±9.2(6)	66.4±7.0(9)
トリグリセライド (mg/dl)	57.5±6.8(8)	82.0±— (1)	56.2±10.1(5)	59.3±10.4(6)	58.3±11.0(9)
β-リポ蛋白(mg/dl)	47.0±8.8(8)	111.0±— (1)	49.8±18.1(5)	55.6±32.9(6)	49.1±17.0(9)
総蛋白 (g/dl)	6.18±0.28(8)	5.00±— (1)	6.44±0.46(5)	6.26±0.50(6)	6.26±0.45(9)
A/G	1.65±0.14(8)	1.80±— (1)	1.58±0.19(6)	1.56±0.18(6)	1.64±0.10(9)
尿素窒素 (mg/dl)	21.1±2.0(8)	27.0±— (1)	20.6±5.8(5)	19.1±1.8(6)	20.3±2.5(9)
クレアチニン(mg/dl)	0.27±0.07(8)	0.0±— (1)	0.28±0.22(5)	0.33±0.08(6)	0.23±0.13(9)
尿 酸 (mg/dl)	2.30±0.42(8)	3.50±— (1)	2.18±0.27(5)	2.16±0.19(6)	2.21±0.43(9)
ナトリウム (mEq/l)	142.6±2.3(8)	147.0±— (1)	144.6±1.8(5)	141.1±2.3(6)	141.5±2.5(9)
カリウム (mEq/l)	5.67±0.39(8)	6.10±— (1)	5.64±0.57(5)	6.21±0.84(6)	6.01±0.93(9)
クロール (mEq/l)	105.7±2.5(8)	108.0±— (1)	107.0±2.5(4)	106.0±2.3(5)	104.1±2.0(7)

1) 平均±SD 2) 検査例数 * 対照と比較して P <0.05

表 10. 器 官 重 量（雄）

器官＼群	0％(対照) (10)[a]	2.5％ (10)	1.25％ (10)	0.625％ (10)	0.3125％ (10)
脳	1878.4±134.9[1] (653.7±58.9)[2]	1635.5±24.9* (1520.3±134.7)*	1833.6±42.1 (758.6±56.7)*	1888.1±39.1 (668.8±32.9)	1882.5±42.3 (665.0±48.9)
心臓	769.0±56.5 (266.3±10.7)	390.3±60.9* (358.9±36.5)*	681.7±50.1* (280.8±12.1)*	766.4±47.7 (270.4±8.5)	731.6±55.3 (257.0±14.0)
肺	875.9±41.3 (304.4±20.1)	480.5±32.1* (444.5±26.7)*	763.9±45.9* (314.9±9.9)	847.3±52.7 (299.2±12.7)	831.8±40.9* (292.9±15.1)
肝臓	9.826±0.831 (3.404±0.147)	5.333±0.691* (4.921±0.519)*	9.343±0.925 (3.841±0.157)*	10.790±0.497* (3.816±0.140)*	9.906±0.893 (3.479±0.161)
腎臓（左）	862.1±87.1 (298.2±13.3)	601.5±72.5* (556.5±67.1)*	812.4±64.5 (334.5±13.1)*	911.4±44.1 (322.1±12.1)*	857.0±48.5 (301.5±9.1)
腎臓（右）	845.0±70.3 (292.6±9.9)	575.1±65.1* (532.6±62.7)*	787.7±43.7* (324.8±11.7)*	909.2±55.9 (321.3±15.9)*	845.8±61.3 (297.3±11.7)
脾臓	555.8±43.5 (192.4±8.7)	399.5±100.9* (365.7±74.1)*	413.9±45.7* (170.0±8.0)*	521.7±28.9* (184.2±7.7)*	546.8±37.1 (192.4±11.3)
下垂体	8.32±1.19 (2.82±0.27)	5.63±1.15* (5.21±1.19)*	7.36±1.23 (2.99±0.53)	7.99±0.83 (2.78±0.30)	7.64±0.90 (2.65±0.33)
副腎（左）	20.5±2.8 (7.1±0.9)	11.9±2.1* (11.0±2.1)*	16.9±3.5* (6.9±1.5)	20.3±2.3 (7.2±0.6)	18.8±2.4 (6.5±0.7)
副腎（右）	19.7±1.8 (6.8±0.5)	10.9±3.1* (10.1±2.9)*	15.5±2.4* (6.3±0.8)*	17.5±1.6* (6.1±0.6)*	17.2±1.7* (6.0±0.6)*
胸腺	181.1±18.8 (62.8±4.5)	22.9±9.1* (21.1±8.1)*	150.9±27.7* (62.1±9.8)	180.8±19.1 (64.2±8.6)	180.6±28.8 (63.3±8.7)
精巣（左）	1399±62 (487±39)	236±26* (218±16)*	1199±62* (495±36)	1388±84 (491±16)	1365±40 (482±33)
精巣（右）	1379±71 (480±44)	225±15* (208±21)*	1151±69* (476±38)	1269±214 (450±78)	1331±61 (469±23)
前立線	300±44 (103±14)	38±12* (35±8)*	237±44* (97±15)	278±45 (99±16)	294±76 (103±23)

a）例数　1）mg/rat（肝臓 g/rat）　2）mg/100g 体重（肝臓 g/100g 体重）
* 対照と比較して $P<0.05$

AAP 摂取量　表2に示す通りである．平均1日体重kg当り摂取量は2.5％群雄 1,709mg，雌 1,732mg，1.25％群雄944mg，雌942mg，0.625％群雄435mg，雌443mg 0.3125％群雄206mg，雌217mgとなった．

飲水量　表3に示す通りで，摂餌量と大体比例した飲水量となっていた．

体重　表4（雄），5（雌）に示す通りである．5％群は試験開始とともに激減し3週以内に全例死亡．2.5％群は第1週に雌雄とも約30g減少，以降やや回復したが，雌では試験開始時体重までに復することなく途中3例の死亡がみられた．雄は第10週頃より試験開始時体重に復し試験終了時までわずかに増加し，死亡例はなかった．1.25％群は体重増加がやや鈍であり図1に示すように雄では対照群の体重増加率と比較し約20％の抑制がみられた．雌ははじめ10％前後の抑制であったが次第に回復に近づき最終的には3％の抑制にとどまった．0.625％群は雄で1週から5週にかけてやや増加抑制がみられたが以降は雌と同様に対照群と変らない体重増加を示した．0.3125％群は雌雄とも対照群と変らない体重増加であった．

食餌効率　摂餌量と体重増加量より求めた食餌効率を表6に示した．多少バラツキがあったが1.25％群，0.625％，0.3125％群では対照群の食餌効率と大差を認められなかった．5％，2.5％群では負の値を示す場合が多かった．

血液学的検査成績　表7に示すように2.5％群雌雄で

表 11. 器官重量(雌)

器官＼群	0%(対照) (10)[a]	2.5% (7)	1.25% (10)	0.625% (10)	0.3125% (10)
脳	1778.9±42.9[1] (1042.8±35.2)[2]	1525.4±40.7* (1923.4±134.1)*	1770.2±22.9 (1069.3±56.5)	1767.3±29.9 (1038.5±39.3)	1777.1±20.5 (1033.9±41.1)
心臓	514.1±17.1 (301.1±13.7)	356.1±108.7* (445.5±120.3)*	491.9±36.3 (296.2±20.1)	518.1±32.5 (303.8±12.9)	512.5±38.7 (297.3±16.5)
肺	650.9±27.7 (381.2±14.5)	403.7±33.5* (507.4±35.3)*	612.2±47.5* (368.5±16.1)	624.2±34.9 (366.1±12.9)*	641.0±40.9 (372.3±24.7)
肝臓	4.997±0.275 (2.923±0.091)	3.975±0.597* (5.034±0.941)*	5.762±0.525* (3.468±0.205)*	5.686±0.347* (3.333±0.115)*	5.324±0.413* (3.086±0.117)*
腎臓(左)	524.0±24.1 (306.8±11.1)	484.8±45.3* (610.7±63.7)*	540.6±27.5 (325.7±12.9)*	557.1±31.3* (326.6±15.3)*	554.1±30.3* (321.7±15.3)*
腎臓(右)	509.2±24.9 (297.9±7.1)	467.5±35.5* (589.7±62.7)*	536.3±22.5* (323.3±11.1)*	543.7±22.3* (318.8±11.7)*	533.8±25.1* (310.0±12.5)*
脾臓	390.9±47.9 (228.9±27.9)	335.4±53.5* (421.7±68.7)*	330.4±20.1* (198.6±5.9)*	362.6±15.7 (212.5±5.3)	375.1±22.7 (217.7±10.3)
下垂体	11.0±1.4 (6.44±0.79)	4.25±1.27* (5.30±1.57)	11.1±1.5 (6.67±0.79)	11.2±2.0 (6.56±1.13)	11.8±1.5 (6.80±0.65)
副腎(左)	24.7±4.3 (14.4±2.4)	12.3±3.2* (15.4±4.1)	21.0±2.9* (12.6±1.5)	24.2±2.5 (14.1±1.8)	23.6±2.2 (13.7±1.2)
副腎(右)	23.0±2.1 (13.4±1.4)	11.9±3.5* (14.8±4.5)*	19.3±2.1* (11.5±1.0)*	21.8±2.4 (12.7±1.3)	20.3±3.5* (11.7±1.9)*
胸腺	160.2±20.4 (93.7±9.4)	29.5±17.9* (35.7±17.4)*	156.9±6.9 (94.6±5.0)	163.6±17.1 (96.0±9.6)	169.3±13.4 (98.6±9.7)
卵巣(左)	26.3±4.1 (15.3±1.9)	9.9±2.7* (12.4±3.4)*	24.6±5.1 (14.8±3.2)	29.7±4.0 (17.4±2.3)*	28.0±3.8 (16.2±2.5)
卵巣(右)	28.3±5.0 (16.5±2.5)	9.2±3.1* (11.4±3.6)*	26.5±4.6 (15.9±3.0)	27.8±4.2 (16.2±2.3)	30.1±3.0 (17.5±1.9)
子宮	463±88 (271±51)	83±35* (103±12)*	395±106 (238±61)	432±82 (253±46)	437±98 (255±61)

a) 例数　　1) mg/rat (肝臓 g/rat)　　2) mg/100g 体重 (肝臓 g/100g 体重)
* 対照と比較して $P<0.05$

は WBC の増加と顕著な貧血が認められた. 1.25% 群雌雄では RBC が軽度であるが有意な減少として認められた. 0.625%群, 0.3125%群雌雄では有意な変動を示すものはなかった.

血清生化学的検査成績　血清量の不足あるいは溶血等により検査例数に不揃いを来たしたが, その結果を表8(雄), 表9(雌)に示した. 2.5%群雄では GOT, GPT 活性の上昇, トリグリセライド, β-リポ蛋白量の低下が認められた. 雌でも GOT, GPT 活性の上昇が認められたほか, ChE 活性の低下がみられた. トリグリセライド, β-リポ蛋白に関しては例数1のため評価出来なかった. 1.25%群では逆に GOT, GPT 活性低下が雌雄でみられ, 雌では更に LDH 活性, ChE 活性の低下がみられた. 雄では 2.5% 群より程度は小さいが同様にトリグリセライド, β-リポ蛋白量の減少を認めた. また, 尿酸の有意な増加がみられた. 0.625% 群雌では有意な変動は認められなかったが, GOT と GPT 活性は低下の傾向であった. 雄では1.25%群と同様なGOT, GPT 活性の低下と LDH 活性の低下, トリグリセライド, β-リポ蛋白の 1.25%より軽度な減少とクロールの減少が認められた. 0.3125%群では雄のクロールが軽度の減少と認められた以外対照群と差はみられなかった.

器官重量　表10 (雄), 表11 (雌) に示すように2.5% 群雌雄ではいずれも器官重量も有意に小さく, 体重比重量は脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 下垂体, 副腎で

有意に大きく，胸腺，精巣，前立腺ないし卵巣，子宮において有意に小さかった．この3器官は萎縮と考えられる．1.25%群でも程度は小であるが脾臓と副腎を除き2.5%群と同様な傾向の変動を示した．脾臓と副腎は2.5%群胸腺などの変動と同一傾向の有意な値であった．0.625%群では肝臓と腎臓が絶体，比重量ともに有意に大きく，肥大と判断した．脾臓が縮少ないし縮少傾向であった．0.3125%群雄ではほとんど変動をみなくなったが，雌では肝臓および腎臓重量が0.625%群よりやや程度は低いが有意に大きかった．以上，肝臓と腎臓では用量に伴った重量の増加がみられ雌では0.3125%群でもその有意性が認められた．

考　察

癌原性検索法指針[5]によると発癌試験における最大投与量は亜急性毒性試験で対照群に比し10%以内の体重増加抑制に留まり，中毒による死亡例が無く，且つ強い毒性症状を示さない最大量とするとされている．本試験でAAP 5%添加飼料摂取ラット（5%群ラット）は雌雄とも摂餌不良，急激な痩せ，亢奮，眼の色が黒くみえる，血尿を伴って6日から18日までの間に全例死亡した．AAPではメトヘモグロビンの形成されることはまれとされているが，眼の色が黒くみえたのはメトヘモグロビン形成によるのではないかと推察される．また，AAPで，血小板減少症がみられるといわれており，血尿の原因と関連して血小板を検査する必要があろう．2.5%群ラットでは摂餌や不良で試験開始時を下回る体重を維持し雌では62日から87日までの間に3例死亡した．雄では試験後半より体重の回復傾向がみられ試験開始時にやや優るようになり，全例生存した．血液学的検査で白血球数の増加と著明な貧血がみられ，血清生化学的検査ではGOT，GPT活性の上昇等があり器官重量はいずれも異常値を示した．

0.125%群ラットでは摂餌量が雄においてやや少く，体重比摂餌量は多く，体重は対照群ラットに比し全期間約20%の抑制がみられた．雌では体重比摂餌量のみが多く，体重は初期に約10%の抑制であったが次第に回復し，試験終了時は約3%の抑制に留まった．血液学的には雌雄とも極く軽度の赤血球数の減少がみられたが，血清生化学的には注目すべき変動はなかった．0.625%，0.3125%群ラットでは0.625%群雄ラットにおいて初期に5%程度の体重増加抑制が認められた以外には肝臓および腎臓の用量—反応関係をもった軽度の重量増加が注目された．以上AAP2.5%以上は完全な中毒量と考えられたが，1.25%以下では雄の体重以外著明な変化とは認められないので，体重10%以内の抑制での最大投与量として雌では1.3%，雄では1.25%と0.625%の中間量（対数）の0.9%を考えた．

要　旨

Acetaminophen（AAP）のラットを用いた癌原性試験における最大投与量を決定するため，AAP 5，2.5，1.25，0.625および0.3125%添加飼料を近交系Fischerラット雌雄に13週間投与する亜急性毒性試験を行い，最大投与量を雄0.9%，雌1.3%と決めた．

（本研究は厚生省がん研究助成金による補助を受けた）

文　献

1) Goodman, L. S. and A. Gilman : *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 343, 1975, Macmillan Publishing Co., Inc., New York
2) Meyler, L. and A. Herxheimer : *Side* Effects of Drugs, 7, 158, 1972, Excepta Medica, Amsterdam
3) 河内　卓：遺伝変異原性を主とする発癌物質スクリーニング，厚生省がん研究助成金による研究報告集(下)，744，1976
4) 井坂英彦，吉井紘興：第36回日本癌学会総会記事 18，1977
5) 小田嶋成和：化学物質の癌原性検索法指針（厚生省がん研究助成金による），1976
6) 藤井　孝，阿部幸恵，湯澤勝廣，三栗谷久敏，矢野範男，長澤明道，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，125，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 125-136, 1978

アセトアミノフェン添加飼料を13週間摂取させたラットの病理学的検索

藤井　孝*, 阿部幸恵*, 湯澤勝廣*, 三栗谷久敏*
矢野範男*, 長澤明道*, 平賀興吾*

Pathological Study on Rats Fed with Acetaminophen for 13 Weeks

TAKASHI FUJII*, YUKIE ABE*, KATSUHIRO YUZAWA*, HISATOSHI MIKURIYA*,
NORIO YANO*, AKEMICHI NAGASAWA* and KOGO HIRAGA*

Oral toxicity of acetaminophen (AAP) which is used as analgesic and antipyretic agent have been tested for dietary administration on both sexes of Fischer rats. The test material was mixed with standard food in a concentration of 0.00 (control), 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 and 5.0%, and the rats fed *ad libitum* for 13 weeks to the both groups of 10 male and 10 female rats respectively. Rats fed a diet containing 5.0 or 2.5% of AAP were died during the period from 6 to 87 days after administration (mortality : 5.0% male 10/10, female 10/10; 2.5% female 3/10). Macroscopic and microscopic observations of these rats died in the course of studying were petechia in various tissues, hepatic necrosis, renal tubular necrosis, atrophy of submaxillary gl and hypertrophy of parotid gl. In the case of rats sacrificed at termination, showed the symptome of anemia, hepatic necrosis and atrophy of submaxillary gl, and positive dose-response relations were found among groups fed with AAP. It is concluded that under the condition of this study, AAP had toxic effects for the blood, liver, kidney and salivary gl in both sexes of Fischer rats.

緒　言

Acetaminophen (AAP) は解熱・鎮痛剤として用いられている薬物であるが[1,2]，急激な大量投与によってヒトに致命的な肝障害および腎障害を惹起することが知られており[3-8]，ラットの急性毒性試験でも同様変化を生ずると報告されている[9,10]．このような急性障害の報告以外に比較的長期の実験として Boyd ら[11] は CBL Wistar ラット雄に AAP 懸濁液を100日間投与し肝細胞壊死，腎炎などが投与に関連した変化として観察されたと報告している．

しかし，AAP の癌原性の有無についての検討は現在まで行なわれておらず，これ迄のところ Yamamoto ら[12] および Weisburger ら[13] によって癌原性を有する化学物質との併用実験が行なわれ，AAP はその発癌作用を抑制する効果があると報告されているのみである．そこで AAP の癌原性の有無について検討すべくラットに2年以上にわたって AAP 添加飼料を摂取させる実験を計画した．今回は長期実験に先立って行なった AAP 添加飼料をラットに13週間摂取させた実験の病理学的検索結果の報告である．

実験材料ならびに方法

試料：Acetaminophen (APP) およびその添加飼料は国立衛生試験所より供与された．

実験動物および飼育環境：日本チャールス・リバー株式会社において barrier-system で生育された Fischer ラット雌雄を4週令で購入した．動物は室温25±1℃，湿度50～60%，換気回数を1時間に10回，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と床が網，他は板のステンレス製個別ケージに収容し，自動給水（細菌ろ過器経由）装置付ベルト式飼育架台で飼育した．飼料（日本クレア株式会社製固型飼料 CE-2）と水は自由に摂取させた．

試験方法：AAP 投与期間は13週間とし，投与はAAPを飼料に添加して動物に自由に摂取させる方法とした．添加飼料中の AAP 濃度は0.00(対照)，0.3125，0.625，1.25，2.5および5.0%の6段階を設定した．動物は各濃度の添加飼料に雌雄10匹づつを割り当て合計120匹を用いた．投与は5週令になった時点で飼料を添加飼料に切り替えて開始した．

病理学的検索方法：投与終了時，大腿動・静脈を離断，放血屠殺し解剖した．肉眼的観察後，脳，下垂体，胸腺，心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，卵巣および子宮を摘出し重量を測定した．そのほか脊髄，耳下腺，顎下腺，大舌下腺，甲状腺（上皮小体を

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

含む），気管，食道，膵臓，胃，大・小腸，膀胱，大腿骨，冬眠腺，リンパ節などを摘出した．摘出した器官・組織は10%緩衝ホルマリン液で約6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．固定後の器官・組織は定法に従ってパラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン重染色を施こした．このほか必要に応じてPAS染色，アザン・マロリー染色，ビリルビン染色（Hall法），チモーゲン顆粒染色（Lovnoy法），ヘモジデリン染色（ベルリン青法），ギムザ染色（Taylor法）を行ない病理組織学的検索に供した．また解剖時の大腿動・静脈からの血液で塗沫標本（May-Grünwald–Giemsa染色）を作製し，血液細胞の光顕的観察を行なった．投与途中死亡例についても血液を除き投与終了時と同様の検索を行なった．

試験結果

投与期間途中死亡例の検索

死亡率：5%群雌雄100%（10/10：10例中10例の意，以下同様），2.5%群雌30%(3/10)であり，そのほかの各群では死亡が認められなかった．死亡までに摂取したAAP量は5%群雄2.66mg/kg/day(6例平均)，雌2.94 mg/kg/day（1例）であった．死亡は5%群雄では6～18日（投与開始日を第1日として算出した日数，以下同様），雌では7～16日，2.5%群では62～87日にみられた．5%群雄では6～15日に40%(4/10)，16，17日に50%(5/10)が死亡，雌では6日まで0%(0/10)，7日に50%(5/10)が死亡と雄は16，17日，雌は7日に集中していた．

解剖所見：Table 1に示すような変化が認められた．**脳，胃，肺，冬眠腺，骨格筋**(浅部)，**卵巣**などに出血がみられ，**膀胱**内にも血尿が貯留していた．**耳下腺**の腫大および**顎下腺**の縮小がみられ，間質に出血を認める例もあった．**舌**では舌尖から舌体にかけての粘膜に潰瘍がみられた．**胸腺**は全例で縮小がみられ痕跡程度になっていたり，点状出血を伴う例も認められた．**精巣**では縮小し被膜に皺襞を生じ弾力性の無くなっている例がみられた．

組織所見：Table 2に示すような変化が認められた．**脳**では実質の横断面に2～5個の小出血巣が散在しているのが5%群雄5/10，雌3/10，2.5%群雌1/3にみられた（Photo 1）．出血は5%群雄では16日以後に5例，雌は8日以前に2例，2.5%群雌は87日に1例認められた．**胃**では腺胃および非腺胃粘膜固有層の充血が散在し，表在上皮細胞間隙からの出血が観察された．胃の出血は5%群雄5/10，雌7/10でみられ，このうち雄2例，雌6例に小腸粘膜の小出血巣も認められた．また胃の出血は雄では15日以後に5例，雌では7日以前に5例みられた．このほかに**冬眠腺**，関節近傍や浅部の**骨格筋**，**肺**，**耳下腺**，**顎下腺**周囲の結合組織，**膀胱粘膜**などに微小～小出血巣の散在が認められた．上述の各器官・組織での出血は明らかな血管の障害像を伴わないものであり出血巣の周囲組織には充血はみられるが壊死および反応性変化などは著明ではなかった．**脾臓**では被膜の皺襞形成がみられるとともに赤血球，リンパ球が減少し，リンパ小節が不明瞭になっているのが認められた．変化は5%群雄9/10，雌6/10，2.5%群雌3/3でみられ投与期間に伴う変化程度の強弱は認められなかった．**リンパ節**（主に肝門部）では胞体内に鉄反応陽性の黄褐色顆粒を少量含んだ食細胞が軽度に増加，リンパ球はやや減少しているのがみられた（Photo 2）．食細胞の増加は5%群雄4/10，雌1/10，2.5%群雌3/3にみられた．**胸腺**は肉眼的所見で全例に縮小がみられたが，組織所見では胸腺リンパ球が中等度以上に減少して細網基質が著明になり皮髄境界は全く不明瞭になっていた．**舌**では舌尖から舌体にかけての粘膜上皮の壊死・剥離，筋壊死および充血などがみられ，変化が広範で深部に及んでいる例も認められた（Photo 3）．粘膜下織，筋層などの壊死巣のうちにはグラム陽性の桿菌あるいは球菌が集族している部分もみられた．変化は5%群雄7/10，雌3/10にみられ，この例数は雄では15日以後，雌では13日以後の全例にあたり投与期間に比例して変化も強くなっていた．**耳下腺**では腺房上皮細胞の肥大がびまん性にみられ細胞質はやや明調・均質で弱好塩基性を呈し小型のzymogen顆粒が散在していた．核の多くはヘマトキシリンで軽度に濃染していたが核数の増加，分裂像は著明に認められなかった．細胞内顆粒の減少，細胞変性および炎症細胞の浸潤などはみられなかった（Photo 4）．肥大は両側性に起っており5%群雄4/10，雌2/10にみられ，この例数は雄では15日以後，雌では14日以後の全例にあたる．**顎下腺**では両側性に腺房上皮細胞の萎縮がびまん性にみられた．分泌管上皮細胞内の顆粒は減少あるいは消失し小葉間導管上皮細胞は変性・扁平化しており管腔には剥離細胞，多形核白血球が塊状に存在していた（Photo 5）．変化は全例にみられ投与期間に比例して強くなる傾向を示した．また5%群雄5/10に腺房上皮の壊死，腺房の消失，結合組織の軽度増生などが限局性に認められた．**肝臓**では小葉中心性に肝細胞の融解壊死がみられ，壊死細胞が帯状に並んで各小葉をつないでいる例もみられた（Photo 6）．壊死は5%群雄9/10，雌10/10，2.5%群雌3/3にみられ出血を伴っていたのが5%群雄5例，雌8例，2.5%群雌3例であった．雄では軽～中等度の変化がやや広範囲に

Table 1. Macroscopic Pathology—Summary of Observations

	Male						Female						
Concentration (%)	0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50	5.00	0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50		5.00
T or D*	T	T	T	T	T	D	T	T	T	T	T	D	D
No. of rats	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	3	10
SKELETAL MUSCLE													
Hemorrhage	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	2	2
HIBERNATING GL.													
Hemorrhage	–	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–	–	7
PAROTID GL.													
Enlargement	–	–	–	–	3	4	–	–	–	–	1	–	1
SUBMAXILLARY GL.													
Small	–	–	–	–	8	6	–	–	–	–	5	–	2
TONGUE													
Ulcer	–	–	–	–	–	7	–	–	–	–	–	–	3
STOMACH													
Echymoses	–	–	–	–	–	8	–	–	–	–	–	–	9
LIVER													
Irregular surface	–	–	–	–	8	2	–	–	–	–	6	3	1
Yellowish brown	–	–	–	–	9	2	–	–	–	–	6	3	–
BRAIN													
Hemorrhage	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	1	3
THYMUS													
Small/flaccid	–	–	–	2	9	10	–	–	–	–	5	3	7
SPLEEN													
Small	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4
Discolouration	–	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	3
LYMPH NODES													
Enlargement	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	2	–
Congestion	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	3
LUNG													
Congestion/echymoses	–	–	–	–	–	8	–	–	–	–	–	1	10
BLADDER													
Hemorrhagic fluid	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	5
TESTES													
Small/flaccid	–	–	–	–	6	5							
OVARY													
Hemorrhage							–	–	–	–	–	–	4
UTERUS													
Small							–	–	–	–	4	–	–

* T : Rats sacrificed at termination. D : Rats dying during the study.

Table 2. Microscopic Pathology—Summary of Observation

		Male						Female						
Concentration (%)		0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50	5.00	0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50		5.00
T or D*		T	T	T	T	T	D	T	T	T	T	T	D	D
No. of rats		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	3	10
HIBERNATING GL.														
Hemorrhage	NO**	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	7	3	5
	SL	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	–	4
	MO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
BRAIN														
Hemorrhage	NO	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	7	2	7
	SL	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	1	3
SPLEEN														
Decrease of erythrocytes	NO	10	10	10	10	–	1	10	10	10	10	–	–	6
	SL	–	–	–	–	10	5	–	–	–	–	7	1	3
	MO	–	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	2	1
Decrease of lymphocytes	NO	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10	7	2	4
	SL	–	–	–	–	–	8	–	–	–	–	–	1	6
	MO	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–
LYMPH NODES														
Increase of phagocytes	NO	10	10	10	10	6	6	10	10	10	10	–	–	9
	SL	–	–	–	–	2	4	–	–	–	–	1	–	1
	MO	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	6	3	–
Decrease of lymphocytes	NO	10	10	10	10	6	7	10	10	10	10	1	–	6
	SL	–	–	–	–	4	3	–	–	–	–	4	3	4
	MO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–
Hyperemia	NO	10	10	10	10	9	4	10	10	10	10	6	–	6
	SL	–	–	–	–	1	6	–	–	–	–	1	3	4
	MO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
THYMUS														
Decrease of thymic lymphocytes	NO	10	10	10	10	1	–	10	10	10	10	1	2	–
	SL	–	–	–	–	9	–	–	–	–	–	5	1	2
	MO	–	–	–	–	–	10	–	–	–	–	1	–	8
Hyperemia	NO	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	7	3	3
	SL	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	4
	MO	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	3
LUNG														
Hemorrhage	NO	10	10	10	10	10	6	10	10	10	10	7	3	6
	MO	–	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	4
Hyperemia	NO	10	10	10	10	9	4	10	10	10	10	7	3	1
	SL	–	–	–	–	1	2	–	–	–	–	–	–	8
	MO	–	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	1
TONGUE														
Ulcer	NO	10	10	10	10	10	3	10	10	10	10	7	3	7
	SL	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	3
	MO	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–
	SE	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–
PAROTID GL.														
Hypertrophy of acinar cells	NO	10	10	10	9	3	6	10	10	10	10	4	3	8
	SL	–	–	–	1	7	1	–	–	–	–	3	–	1
	SE	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	1
Hemorrhage in stroma	NO	10	10	10	10	10	6	10	10	10	10	6	2	8
	SL	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	1	1	1
	MO	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	1

	**													
M. SUBLINGUAL GL.														
Hypertrophy of serous cells	NO	10	10	10	10	7	8	10	10	10	10	5	2	9
	SL	–	–	–	–	3	2	–	–	–	–	2	1	1
SUBMAXILLARY GL.														
Atrophy of acinar cells(diffuse)	NO	10	10	10	10	–	–	10	10	10	10	–	–	–
	SL	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	8
	MO	–	–	–	–	10	7	–	–	–	–	7	3	2
Atrophy of acinar cells (focal)	NO	10	10	10	6	10	10	10	10	10	7	7	3	10
	SL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–
	MO	–	–	–	4	–	–	–	–	–	2	–	–	–
Necrosis of acinar cells/proliferation of interstitial connective tissues	NO	10	10	10	6	–	5	10	10	10	9	–	–	10
	SL	–	–	–	3	–	5	–	–	–	1	–	–	–
	MO	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	3	–	–
	SE	–	–	–	–	10	–	–	–	–	–	4	3	–
LIVER														
Centrilobular necrosis	NO	10	10	10	10	–	1	10	10	10	10	–	–	–
	SL	–	–	–	–	4	6	–	–	–	–	1	–	4
	MO	–	–	–	–	4	3	–	–	–	–	3	2	2
	SE	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	3	1	4
Contrilobular degeneration	NO	10	10	10	1	10	9	10	10	10	9	7	3	10
	SL	–	–	–	5	–	1	–	–	–	1	–	–	–
	MO	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Proliferation of interstitial connective tissues	NO	10	10	10	10	4	10	10	10	10	10	–	–	10
	SL	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	2	2	–
	MO	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	5	1	–
STOMACH														
Hemorrhage in mucousa	NO	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	7	3	3
	SL	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	6
	MO	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	1
Hyperemia	NO	10	10	10	10	6	2	10	10	10	10	7	3	1
	SL	–	–	–	–	4	8	–	–	–	–	–	–	9
INTESTINE														
Hemorrhage	NO	10	10	10	10	10	8	10	10	10	10	7	3	4
	SL	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	6
KIDNEY														
Necrosis of epithelium in distal tubules	NO	10	10	10	10	10	–	10	10	10	10	7	–	–
	SL	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	2	6
	MO	–	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	1	3
	SE	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	1
Yellow granules in epithelium of proximal tubules	NO	10	10	10	5	–	4	10	10	10	4	–	2	8
	SL	–	–	–	5	–	–	–	–	–	6	–	–	–
	MO	–	–	–	–	4	6	–	–	–	–	1	1	2
	SE	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–	6	–	–
TESTES or OVARY														
Atrophy	NO	10	10	10	10	–	3	10	10	10	10	2	3	10
	SL	–	–	–	–	7	1	–	–	–	–	3	–	–
	MO	–	–	–	–	3	6	–	–	–	–	2	–	–
UTERUS														
Atrophy	NO							10	10	10	10	3	3	10
	SL							–	–	–	–	3	–	–
	MO							–	–	–	–	1	–	–

* T : Rats sacrificed at termination. D : Rats dying during the study.

** NO : No change. SL : Slight changes. MO : Moderate changes. SE : Severe changes.

Table 3. Haematology

Male					
Concentration (%)	0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50
No. of rats examined	10	10	10	10	10
Total erythrocyte count (10^6/mm^3)	8.489±0.2401[1]	8.566±0.257	8.498±0.289	8.046±0.311*	4.844±0.707*
Erythroblast count[2]					
Basophilic erythroblast	0	0	0	0	2(1)[3]
Polychromatophilic erythroblast	0	0	0	0	24.7±33.7(10)
Orthochromatic erythroblast	1(1)	0	1, 2(2)	1, 2(2)	55.5±91.0(10)
Total leukocyte count (10^3/mm^3)	5.85±0.68	6.60±0.54*	6.11±0.65	6.22±1.16	13.77±4.39*
Differential count of leukocyte (%)					
Neutrophils	13.0±5.7	9.2±3.1	9.5±3.3	11.7±3.1	17.8±8.8
Lymphocytes	85.8±5.9	89.8±3.3	89.1±3.1	86.6±3.1	80.4±9.4
Monocytes	0.2±0.4	0.5±0.5	0.4±0.5	0.5±0.7	1.2±0.7
Eosinophils	0.6±0.6	0.4±0.5	0.7±0.6	0.5±0.7	0.4±0.6
Other cells[4]	0.4±0.5	0.1±0.3	0.3±0.4	0.2±0.4	0.1±0.3
Female					
Concentration (%)	0.00	0.3125	0.625	1.25	2.50
No. of rats examined	10	10	10	10	7
Total erythrocyte count (10^6/mm^3)	8.118±0.329	8.189±0.233	8.028±0.308	7.813±0.305*	4.092±1.344*
Erythroblast count					
Basophilic erythroblast	0	0	0	0	0
Polychromatophilic erythroblast	0	0	0	0	17.7±10.4(6)
Orthochromatic erythroblast	1(1)	0	1(1)	0	53.7±41.1(7)
Total leukocyte count (10^3/mm^3)	5.35±0.41	5.42±1.01	5.45±0.98	5.37±0.93	11.37±5.85*
Differential count of leukocyte (%)					
Neutrophils	10.6±3.0	9.7±4.3	10.9±4.1	8.7±4.9	16.5±7.9*
Lymphocytes	88.9±3.3	89.7±4.6	88.2±4.7	90.1±4.7	81.8±8.4*
Monocytes	0.2±0.4	0.1±0.3	0.4±0.5	0.4±0.6	0.4±0.5
Eosinophils	0.3±0.6	0.5±0.7	0.5±0.7	1.4±1.7	1.1±1.7

cf. Level of significance : * $P<0.05$ in comparison with control value.
1) Mean ± SD, SD=Standard deviation. 2) Count of erythroblasts per 100 leukocytes, indivisual values or Mean ± SD. 3) No. of rats found erythroblast in peripheral blood. 4) This include smudge cells and unidentifiable cells.

みられるのに対し雌では限局性の出血を伴う顕著な壊死巣を形成する傾向がみられた．**腎臓**ではびまん性に遠位尿細管上皮細胞が核濃縮，細胞質の融解を起こして壊死していた．管内には濃縮した核と染色性を示さず腫大して境界が全く不明瞭な細胞質をもった上皮がみられ，壁から剥離した細胞も多数認められた (Photo 7)．変化は全例にみられ，投与期間と変化程度の強弱に関連は認められなかった．近位尿細管上皮細胞内に鉄反応陽性の黄褐色顆粒が中等量存在しているのがみられた．変化は5%群雄6/10，雌2/10，2.5%群雌1/3にみられ，これは5%群雄では16日以後，雌では14日以後の全例にあたり，2.5%群雌では87日の例であった．**精巣**では被膜に皺襞形成がみられ，精細管壁は不整形となり管腔内に精子がみられず精細胞も減少しているのが7/10に認められた．この例数は15日以後の全例にあたり，変化は投与期間に比例して顕著になっていた．

投与終了時生存例の検索

血液検査：Table 3 に示すような変化が認められた．2.5および1.25%群雌雄の赤血球数は対照群に比べ有意に減少していた[14]．2.5% 群雌雄では対照群に比べヘモ

グロビン量およびヘマトクリット値は有意に減少しており平均赤血球容積は増加，平均赤血球ヘモグロビン濃度は減少していた[14]．また1.25%群雌雄でも極く軽度ながら同様の変化を示した[14]．血液塗沫標本の検鏡で2.5%群雌雄の全例に赤血球の大小不同，多染性赤血球，菲薄赤血球，破砕赤血球などがみられ，さらに多くの赤芽球が混在していた（Photo 8）．各群の間には赤血球および白血球数に差がみられるが一応の目安として白血球100個当りの赤芽球数を示した．これによれば雄10/10，雌6/7に多染性赤芽球，雌雄の全例に正染性赤芽球が出現していた．これらから2.5% 群雌雄は顕著な低色素貧血であり，1.25%群雌雄も軽度ながら同様の傾向を示したと考えられる[15]．白血球数は2.5% 群雌雄で対照群に比べ顕著に増加していた．白血球の分類では2.5% 群雌雄とも好中球の増加およびリンパ球の減少が対照群に比べ有意に認められた[14]．また，0.3125および0.625%群雌雄の血液検査では対照群と異なる所見はみられなかった．

解剖所見：Table 1 に示すような変化が認められた．2.5%群雌雄では**耳下腺**の腫大，**顎下腺**の縮小，**肝臓**の黄褐色で表面の粗糙化，**胸腺**の縮小，**リンパ節**の腫大，**精巣**の縮小，**子宮**の縮小などが観察された．1.25%群雄では**胸腺**の縮小が2/10にみられたが，その他の各群では認むべき変化がなかった．

組織所見：Table 2 に示すような変化が認められた．**脾臓**では軽度な赤血球の減少が2.5% 群雌雄の全例にみられた．**リンパ節**（主に肝門部）では胞体内に鉄反応陽性の黄褐色顆粒を中等量以上に含んだ食細胞が多数集簇しているのが2.5%群雄4/10，雌7/7にみられた．変化は死亡例よりも顕著な例がみられ雄2例，雌6例は中等度の変化を示した．またリンパ球の減少が2.5%群雄4/10，雌6/7にみられた．**胸腺**では胸腺リンパ球の減少が2.5%群雄9/10，雌6/7にみられたが死亡例に比べ変化は軽度であった．**耳下腺**では腺房上皮細胞の肥大が軽度ながらびまん性にみられ，2.5%群雄7/10，雌3/7，1.25%群雄1/10であった．腺房上皮細胞質内の顆粒は軽度に増加しており細胞の肥大は分泌物の貯留によるものであった．**顎下腺**では腺房上皮細胞の萎縮・壊死，分泌管・小葉間導管上皮細胞の変性および間質結合組織の増生などがみられた．変化は2.5% 群雌雄の全例でびまん性に，死亡例での変化よりも強く起っていた．1.25%群雄4/10雌3/10に限局性の腺房萎縮が，同群雄4/10，雌1/10に腺房上皮の壊死および間質結合織の増生が限局性にそれぞれ認められた．**肝臓**では小葉中心性の肝細胞壊死が2.5%群雌雄の全例にみられ死亡例と同等あるいはそれ以上に顕著であった．さらに雄6/10，雌7/7に限局性瘢痕化・偽小葉形成およびクッパー細胞の鉄反応陽性顆粒の貪食像などが認められた．また小葉中心部の肝細胞に細胞質の好エオジン性の増加，PAS 陽性物質の消失，核の膨化・融解傾向がみられるのが1.25%群雄9/10，雌1/10で認められた．**胃**では粘膜固有層の軽度な充血が2.5%群雄4/10にみられた．**腎臓**では死亡例でみられた遠位尿細管上皮細胞のびまん性壊死は認められず極く一部の上皮の核濃縮が2.5%群3/10にみられるのみであった．また2.5%群雌雄では軽度に好塩基性を示す細胞質と明調な核をもつ再生上皮と思われる細胞が密在し，基底膜は肥厚している尿細管が散在性に認められる例が多かった．近位尿細管上皮細胞内に鉄反応陽性の顆粒が中等量存在しているのが2.5%群雌雄の全例，1.25%群雄5/10，雌6/10にみられた．このうち変化が大部分の腎単位で認められたのは2.5%群雌雄の各6/10であった．**精巣**では2.5% 群の全例に萎縮がみられたが死亡例よりは軽度なものが多かった．**卵巣**の萎縮が2.5%群5/7に，**子宮**の萎縮が2.5%群4/7にみられた．卵巣，子宮ともに変性は認められず子宮では機能層，筋層の構成細胞が密在しているが細胞質が少量のために核のみ顕著にみられ各層とも菲薄化していた．以上の変化は0.625および0.3125%群雌雄では認められなかった．

総括および考察

Acetaminophen（AAP）を0.00（対照），0.3125，0.625，1.25，2.5および5.0%の濃度で飼料に添加してFischer ラット雌雄に13週間投与した．投与開始後6～18日で5.0%群雌雄は100%（各10/10），2.5%群は62～87日の間に30%(3/10)が死亡したが他の各群での死亡は認められなかった．死亡例および生存例の解剖または組織所見からAAP 投与に関連した変化と考えられる主なものは，出血，肝細胞壊死，腎尿細管上皮細胞壊死，顎下腺の変性萎縮であった．

出血は5.0および2.5%の死亡例でみられ生存例では明らかでなかった．出血はいずれも微小～小出血であり，周囲組織の変化，障害像を呈する血管もみられないなど細静脈，毛細血管からの漏出性出血と考えられる．また投与期間の比較的長かった死亡例では主に肝門部のリンパ節にヘモジデリンを貪食した細胞が多くみられたが，これは肝臓内での出血およびそのほかの部位での出血を反映しているものと思われる．これらのことから死亡例では多くの器官・組織で微小～小出血が反復あるいは連続的に起っていた可能性があり，これによる失血が死亡原因の1つではないかと思われる．生存例では血液検査で2.5%群雌雄が顕著な低色素性貧血を呈し，1.25%群

雌雄も軽度ながら同様傾向を示したこと，2.5%群雌雄で好中球の増加がみられたこと，組織検索で2.5%群雌雄のリンパ節中のヘモジデリン貪食細胞が死亡例よりもさらに増加してみられたことなどから2.5%群雌雄は慢性失血性貧血の状態にあったと推定される[15]．このように死亡例，生存例でみられた出血および貧血の症状からAAPは出血性素因を形成する作用があるのではないかと考えられる．AAPは大量投与でヒトに血小板減少症を惹起させるとされており[2]，ラットにおいてもこれが出血性素因となったとも思われるが今回はこの点について検索しておらず今後の課題としたい．

肝臓の小葉中心性肝細胞壊死は死亡・生存例の5.0および2.5%群雌雄合計で39/40に発現しており，壊死に至る過程と思われる小葉中心性の肝細胞変性が1.25%群雄9/10，雌1/10に認められた．このように肝細胞の変性・壊死は用量・反応関係を示す変化でありAAP投与に関連した変化と考えられる．また肝細胞の変化では壊死は5.0および2.5%群とも雄よりも雌に強い変化を示す例が多くみられた．変性は雌雄とも0.3125および0.625%群でみられないが1.25%群では雌に比べ雄に出現例数が多く変化程度も強いものがみられた．このことからAAP濃度の差異によって肝細胞の反応態度に雌雄差が生じていたと考えられる．このほか5%群で雌が雄よりも早期に多数死亡し，消化管粘膜の出血も多くみられ，2.5%群では雌のみが死亡したことなども雌雄差の表現と思われる

唾液腺では耳下腺が肥大，顎下腺が萎縮という互いに反対方向の変化を示した．耳下腺の肥大は発現総数は比較的少ないが変化程度を考慮に入れると用量・反応関係を示しているように思われた．しかし5%群でみると肥大は投与開始後2週間未満ではみられず発現には一定の濃度と投与期間を要すると思われた．さらに雄では2週間以後の3/7には肥大が認められず必ずしも投与期間に比例した発現となっていない．ラット耳下腺の肥大は8～67%の減食によって起るとの報告があり[16,17]，5.0および2.5%群雌雄の1日平均摂取量は対照群に比べ5%群雄70.5%，雌62.5%，2.5%群雄62.8～48.6%，雌(生存例) 53.0～42.0%の減食になっていた[14]．

これは5.0および2.5%群はその体重減少を考慮しても明らかに減食状態にあったことを示している．これらのことから耳下腺の肥大は現時点でAAPによる直接的影響か否かは断定できないと考える．顎下腺の萎縮は5.0および2.5%群の全例にみられ，軽度な変化は1.25%群にも散見されておりAAP投与と関連ある変化と考えられる．萎縮の顕著な例では腺房上皮の壊死を起しており一定濃度以上でAAPの投与を続けると不可逆的変化を招来すると思われる．ラット顎下腺の萎縮はDibenamine投与で交感神経刺激の減少によって耳下腺の萎縮とともに起ると報告があり[17]，顎下腺と耳下腺は神経刺激によって同一方向の変化を示すと考えられる．このことからAAPは神経刺激以外の作用機序で唾液腺に影響を与え顎下および耳下腺に反対方向の変化をもたらしたか，顎下腺の萎縮・変性を惹起し次いで耳下腺が代償性に肥大したかなどが考えられるが，この点については今後さらに検討を加える必要があると思われる．

舌の潰瘍は投与開始13日以後の5%群雌雄全例に発症し投与期間に比例して変化が強くなっていたことからAAP投与に関連した変化と考えられる．また食道，胃および腸などの消化管粘膜に明らかな潰瘍が認められず舌にのみ発現したのはAAPの出血性素因形成に続く微小出血さらに局所的貧血によって粘膜固有層・下織などが各種の刺激に反応し易い状態になっており，そこに舌では細菌感染が加わったために潰瘍が起ったと推定される．

腎臓の遠位尿細管上皮細胞の壊死は死亡例にのみ認められたが生存例の2.5%群でも壊死の後続変化と思われる尿細管上皮の再生像がみられ，5.0および2.5%群で一連の変化を示したと考えられる．このことから変化はAAP投与に関連したものと思われる．AAPは大量投与によってヒトおよび動物に尿細管上皮細胞壊死を起すことが知られており[3-10]今回の結果もこれらと一致していた．近位尿細管上皮細胞内のヘモジデリン沈着は投与期間に比例して発現したため死亡例より生存例に頻発したが用量・反応関係を示して出現しておりAAP投与に関連した変化と考えられる．この変化は老令，衰弱または大きな壊死性・出血性腫瘍をもったラットなどでもみられる変化であり[18]，5.0および2.5%群では出血，貧血のほか顕著な体重減少，生殖器官の萎縮など衰弱を示しており，これらが腎臓に反映したとも思われる．

このようにAAP投与に関連した変化は血液，肝臓，唾液腺，腎臓などに認められた．しかしこれらの変化は0.625および0.3125%群雌雄ではみられず，0.625%群ラットの1日のAAP平均摂取量が体重kgあたり雄で434mg，雌で443mgであった[14]ので今回の病理学的検索の結果からはこの値が最大無作用量と推定される．また5%群での死亡集中時期が雌雄で異なり，雌に早くみられたこと，2.5%群での死亡は雌のみであったこと，肝細胞の変性・壊死が雄では雌よりも低濃度で多発するが最高濃度での変化は雄より雌に強くみられたことなどからAAP投与時の用量・反応関係の表現に雌雄で差異を生

じていたと考えられる.

以上, Acetaminophen の大量によって雌雄ラットに出血, 肝細胞壊死, 顎下腺萎縮および腎臓尿細管上皮細胞壊死の生ずることを明らかにした.

(本実験は厚生省がん研究助成金の補助を受けた)

文　献

1) 日本公定書協会：第八改正日本薬局方第二部解説書, 14, 1971, 広川書店
2) Woodbury, D.M. and F. Edward : *The Pharmacological Basis of Therapeotics* (Goodman, L.S. and A. Gilman eds.) 343, Macmillan Publishing, New York
3) Davidson, D.G.D., G.M. Williams, Heisburger : *Cancer Res.*, 33, 454, 1973
4) Krikler, D.M. : *Brit. med. J.*, 2, 615, 1967
5) Maclean, D., T.J. Peters, R.A.G. Brown, M. Margaret, G. F. Braines, and P. G. C. Robertson : *Lancet*, 2, 849, 1968
6) Boyer, T.D. and L.R. Steven : *S. Am. Med. Assn.*, 218, 440, 1971
7) Abel, J.A. : *Clin. Pharmac. Ther.*, 12, 583, 1971
8) Clark, R., R.P.H. Thompson, V. Borirakchanyavat, B. Widdop, A.R. Davidson, R. Govlding, and R. Williams : *Lancet*, 1, 66, 1973
9) Boyd, E.M. and G.M. Bereczky : *Brit. J. Pharmacol.*, 26, 606, 1966
10) Mitchell, J.R., D.J. Jollow, W.Z. Potter, D.C. Davis, J.R. Gillette and B.B. Brodie : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 185, 1973
11) Boyd, E.M. and S.E Hogan : *Canada. J. Physiol. Pharmacol.*, 46, 239, 1968
12) Yamamoto, R.S., G.M. Williams, H.L. Richardson, E.K. Weisburger, and J.H. Weisburger : *Cancer Res.*, 33, 454, 1973
13) Weisburger, J.H., E.K. Weisburger, R.M. Madison, M.L. Wenk, and D.S. Klein : *J. Natl. Cancer Inst.*, 51(1), 235, 1973
14) 林田志信ほか：東京衛研年報, 29-2, 116, 1978
15) 長谷川弥人, 日野志郎編：臨床血液学, 369, 1966
16) Sreebny, L.M. and D.A. Jhonson : *Am. J. Physiol.*, 215, 455, 1968
17) Buchener, A. and L.M. Sreebny : *J. Nutr.*, 100, 655, 1970
18) Handelman, C.S. and H. Wells : *Am. J. Anat.*, 112, 65, 1963
19) Snell, K.C. : *Pathology of Laboratory Rats and Mice* (Cotchin, E. and F.S.C. Roe eds.) 112, Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, 1967

Explanation of Plate

Photo 1. Hemorrhage in brain of rat fed with 2.5 % AAP for 87 days. H-E om×100

Photo 2. Increasing of phagocytes filled with hemosiderin droplets in lymph node of female rat fed with 2.5% AAP for 13 weeks. H-E om×100

Photo 3. Ulcer in tongue of male rat fed with 5.0 % AAP for 18 days. H-E om×40

Photo 4. Hypertrophy of acinar cells in parotid gl. of male rat fed with 5.0% AAP for 17 days. H-E om×100

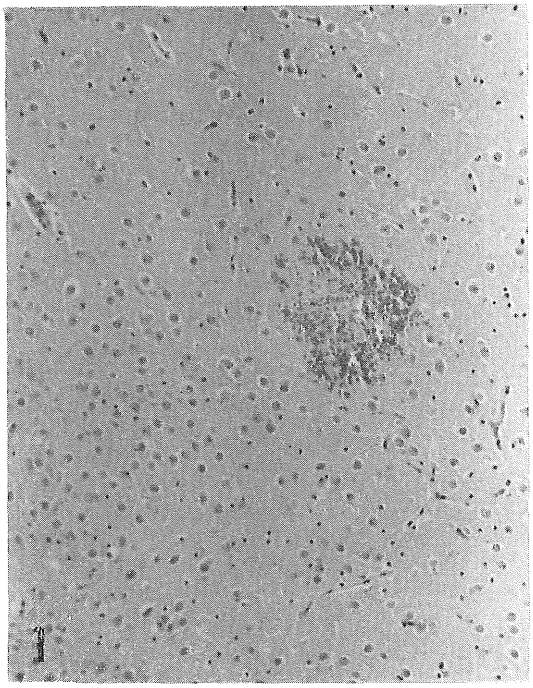
Photo 5. Degenerative atrophy of acinar cells in submaxillary gl. of male rat fed with 2.5 % AAP for 13 weeks. H-E om×100

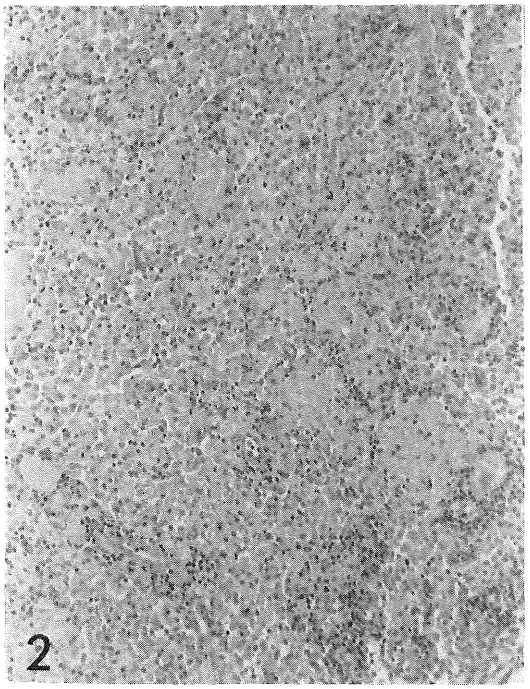
Photo 6. Centrilobular necrosis of hepatcytes in liver of male rat fed with 5.0% AAP for 17 days. H-E om×100

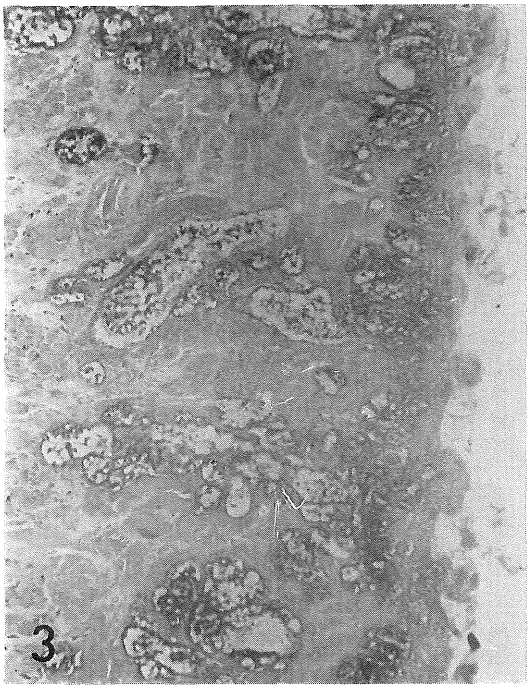
Photo 7. Renal tubular necrosis of distal tubules in kidney of male rat fed with 5.0%AAP for 16 days. H-E om×200

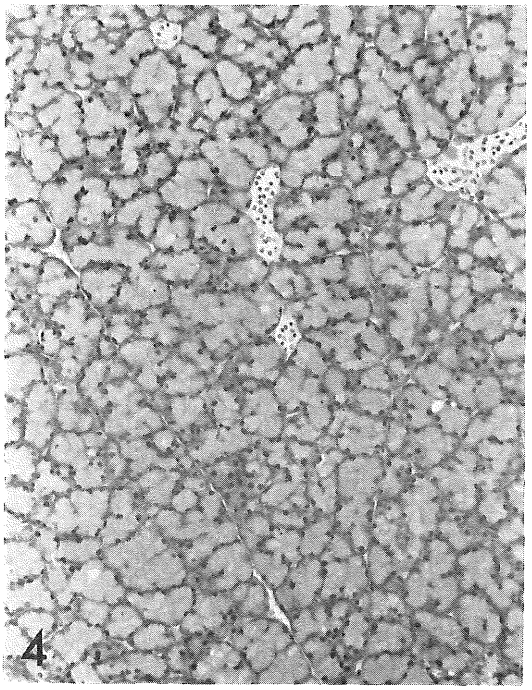
Photo 8. Poikilocytosis, anisocytosis and erythroblastosis in peripheral blood of male rat fed with 2.5% AAP for 13 weeks. May-Grünwald-Giemsa stain om×1,000

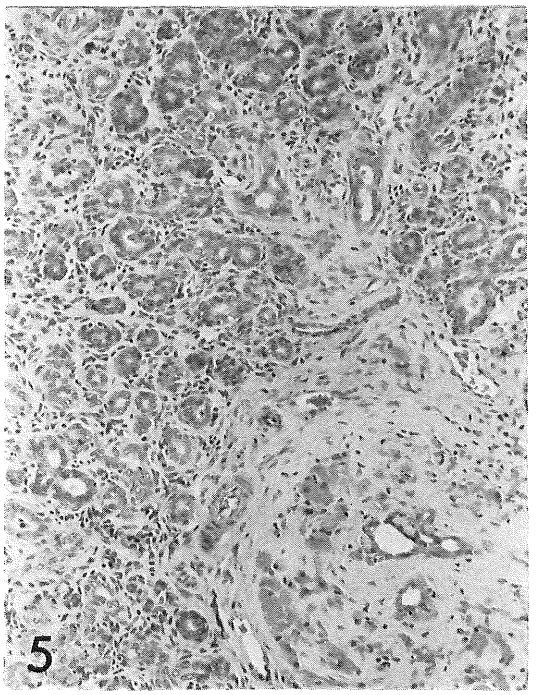
AAP=acetaminophen, H-E=hematxylin-eosin stain, om=original magnification

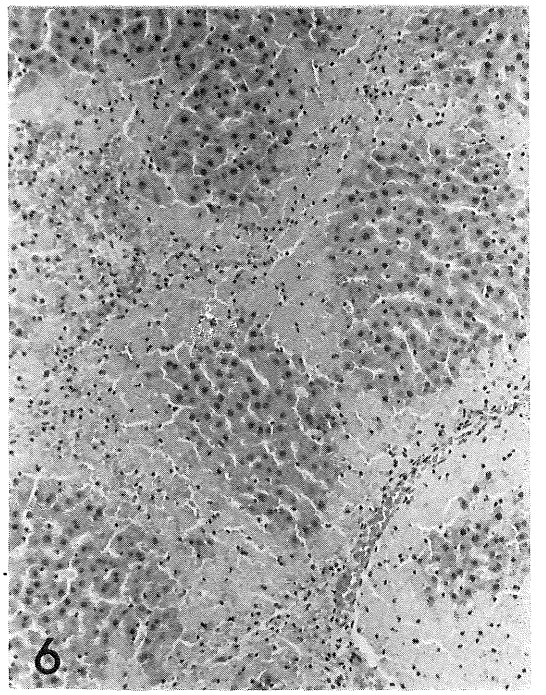

1

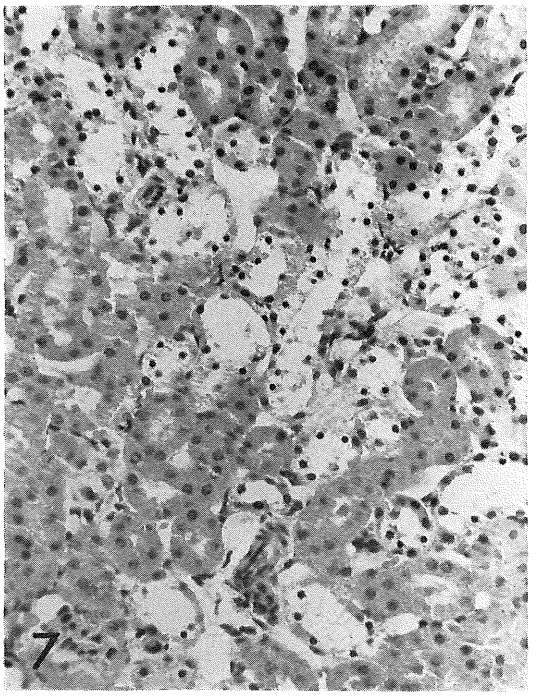

2

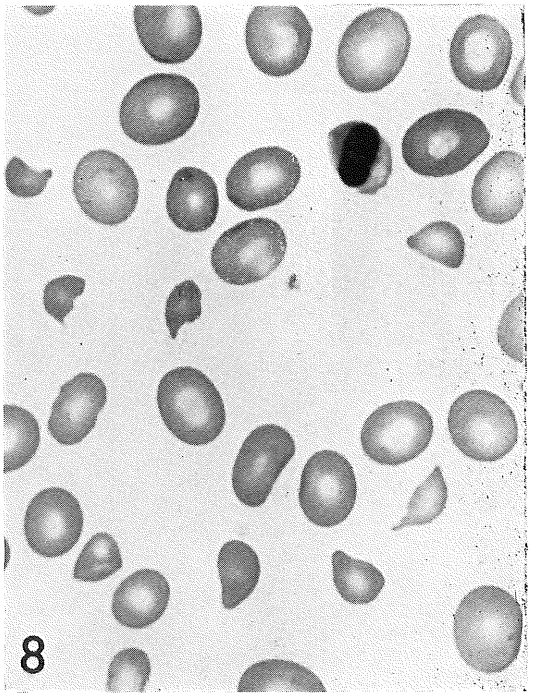

3


4


5


6


7


8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 137-141, 1978

ポリ塩化ジベンゾフランとポリ塩化ビフェニルの比較毒性

大石眞之*, 森田昌敏*, 大石向江*, 平賀興吾*

Comparative Toxicity of Polychlorinated Dibenzofurans and Biphenyls in Rats

SHINSHI OISHI*, MASATOSHI MORITA**, HISAE OISHI* and KOGO HIRAGA*

ポリ塩化ビフェニル（PCB）は，1929年以来大量に生産消費され，その結果環境中に排出されたPCBが，その化学的生物学的安定性のために徐々に環境および人類をも含めた生物体内に蓄積されてきた．しかしJensen[1]やWidmark[2]により有機塩素系農薬の分析に対する妨害物質としてその存在が報告されるまでは，PCBによる汚染はほとんど無視されていたが，彼らの報告以後PCBによる環境汚染や生態系への影響の報告は指数函数的に増加した[3]．特にわが国においては1968年に西日本に発生したいわゆるカネミライスオイル中毒事件（カネミ油症）により多数のPCB中毒患者を出すという悲劇により，PCBの毒性研究が広く行われるようになった[4]．

カネミ油症の原因物質は米ヌカ油製造工程中で混入したPCB（カネクロール400）であると同定されたが，その後の動物実験ではライスオイル中のKC400はもとのKC400より毒性の高いことが認められ[5]，PCB単独ではなく微量不純物質も関与しているのではないかと考えられた．そしてカネクロールを含む多くのPCB製品から不純物質としてポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）が発見され[6-9]，さらにライスオイル中からもPCDFが検出された[10]．又PCBの加熱によってもPCDFの生成することが証明され[11]油症のある面はPCDFが関与しているのではないかと考えられた．PCDFは，非常に毒性が高いとされているテトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン（TCDD）と構造が酷似していることから，その毒性は高いことが考えられるが，PCDFの毒性に関する報告はほとんどなく，カネミ油症にPCDFがどの程度関与しているのかは，まったく不明である．そこでPCBとPCDFの毒性の比較を行い，その解明を試みた．

実験材料および方法

実験に使用したPCDFの合成法およびガスクロマトグラムは既に報告した[12]．PCBとしてはKC500を用いた．

SD系雄ラット（日本クレア）を4週令で購入し，アルミ製代謝ケージ中で1匹づつ飼育した．1週間環境馴化後，PCDF 1ppm，PCDF 10ppmあるいはPCB 100 ppmを添加したクレアラット用粉末飼料(CE-2)を4週間にわたり摂取させた．その間体重および飼料摂取量は毎日，又水分摂取量，尿量，糞量は週1回測定を行った．4週間後に断頭により屠殺，採血後臓器重量を測定した．血液学的測定は，Coulter Counter Model Sにより行った．血清トリグリセリドの測定はアセチルアセトン法[13]，無機リンはFiske-Sabbarow法[14]，Na，Kは炎光光度法，コルチコステロン量は螢光光度法[15]で行った．その他の血清生化学的測定は日立自動分析装置M 400で行った．肝臓成分の測定は，蛋白量はLowry法[16]，グリコーゲン量はアンスロン法[17,18]，核酸はSchmidt-Thannhauser-Schneider法[19]により分画後，デオキシリボ核酸(DNA)はBurton法[20]，リボ核酸(RNA)はオルシノール法[21]により測定した．肝脂質の測定はFolch法[22]で抽出し薄層クロマトグラフィで分画後トリグリセリドはFletcher法[13]，リン脂質はAllen-中村変法[23]，遊離脂肪酸はDucomb法[24]，コレステロールはZak-Henly法[25]で測定した．

統計学的検定はStudentのt検定を行い5％以下を有意とした．

結　果

PCDF 10ppm摂取群では投与開始3週間目より塩素痤瘡と思われる皮疹が耳介部に認められた．その組織切片像は，毛包の過角化と嚢胞状拡張がみられた．

体重，飼料摂取量，飲水量，尿量の変化を表1に示した．体重はPCDF 10ppm群で非常に抑制を受け，1ppm群，PCB 100ppm群も有意に抑制された．PCDF10ppm群では飼料摂取量，飲水量も減少がみられた．飼料摂取

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

量より計算した薬物摂取量は，PCDF10ppm で0.96mg/kg/day，1 ppm で0.097mg，PCB 100ppm で10.2mg であった．

臓器重量は表2に示した．PCB 群では脳の絶対重量，相対重量とも対照群より高く，又肝と脾の相対重量の増加もみられた．一方 PCDF 10ppm 群では胸腺，副生殖器で絶対重量および相対重量の減少がみられ，相対重量では 1 ppm，10ppm ともに脳，心，肺，副腎，脾，肝，精巣で増加がみられた．組織標本の観察結果から胸腺皮質の完全な消失が認められた．

血液学的検索結果を表3に示す．PCDF 群で赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット値の減少がみられ血液塗沫標本の観察より溶血性貧血像がみられた．

血清生化学的検査値を表4に示す．コレステロール量の増加，トリグリセリド量の減少，コリンエステラーゼ活性の上昇，ロイシンアミノペプチダーゼ活性の低下が PCB，PCDF 群ともにみられた．PCDF 群ではさらに尿素窒素の減少と GPT 活性の低下がみられた．

肝成分の分析値を表5に示す．DNA，RNA，蛋白量に差はみられないが，グリコーゲン含量の減少と総脂質の増加がみられた．これらの上昇は主にリン脂質とコレステロール量の上昇によるものであり，トリグリセリドと遊離脂肪酸に変化はみられなかった．

考　察

PCDF 10ppm 群で塩素痤瘡様皮疹がみられたが，西住によれば，ウサギ耳への塗布実験では PCB と PCDF に痤瘡誘発性効果に大きな差はないとされている[26]が，ラットに経口的に投与した場合は PCDF の方が強い誘発性をもっていると考えられる．

PCB や TCDD による体重減少に関しては数多くの報告があるが[27-33]，今回みられた PCDF 群の体重減少は，飼料摂取量の低下が原因の一つと考えられる．しかし胸腺重量の減少とその組織像が TCDD 投与動物の場合[33-38]と一致しており，又 TCDD 投与マウスの免疫能低下が報告されている[39]ことより PCDF でも免疫能低下の生じていることが考えられる．McConell らは TCDD 投与サルの死亡原因として餓飢状態による栄養障害によって生じた消耗による死ではないかと考えているが，ラットの場合制限食の実験データ[41]より考えるとむしろ胸腺摘出動物やヌードマウス（先天性胸腺欠損マウス）にみられるいわゆる Wasting disease による死であり，今回みられた体重減少はその前段階と考えられる．

表 1.　PCB，PCDF 投与ラットの体重，飼料摂取量，飲水量，尿量

	測定日	対照群	PCB 100ppm	PCDF 1 ppm	PCDF 10ppm
体　重（g）	1	124±2.7	123±3.0	121±3.2	117±3.5
	7	174±4.0	171±4.6	163±5.3	148±3.4*
	14	229±5.0	220±6.9	207±7.2*	179±3.9*
	21	284±5.9	272±6.8	250±9.4*	208±5.9*
	27	326±7.5	306±7.2	279±15*	229±4.9*
飼料摂取量（g/日）	1	17.7±0.82	16.4±0.58	14.1±0.92*	13.4±0.77*
	7	20.5±0.54	19.2±0.68	16.5±0.54*	13.3±1.3*
	14	23.0±0.84	22.1±0.88	19.1±1.7	17.3±0.96*
	21	26.1±0.86	25.3±0.42	22.5±1.6	17.3±0.78*
	27	25.3±1.7	26.8±0.79	20.8±1.3	17.1±0.50*
飲水量（ml/日）	1	27.0±1.4	24.1±0.71	22.6±1.2	24.9±1.1
	7	29.0±0.75	29.3±1.4	27.8±1.0	25.1±1.9
	14	29.6±2.5	33.0±1.5	30.1±3.3	28.0±1.6
	21	38.6±2.1	36.7±1.1	35.4±2.2	28.4±2.2*
	27	42.1±1.5	40.9±2.6	39.3±2.8	35.6±2.0*
尿　量（ml/日）	1	3.03±0.50	3.34±0.55	4.20±0.70	4.84±0.73*
	7	3.59±0.57	4.23±0.70	4.56±0.63	4.15±1.0
	14	8.71±1.1	9.40±0.79	7.44±0.91	5.03±0.69*
	21	10.4±0.70	11.1±1.1	10.5±0.64	9.68±1.3
	27	11.4±0.83	13.5±1.7	14.5±2.5	9.60±1.4

* $P < 0.05$，M±SE

表 2. PCB, PCDF投与ラットの臓器重量

	対照群	PCB 100ppm	PCDF 1 ppm	PCDF 10ppm
脳 (g)	1.79±0.034	1.89±0.023*	1.83±0.078	1.77±0.026
(g/100g)	0.55±0.018	0.62±0.050*	0.67±0.050*	0.77±0.017*
胸腺 (g)	0.75±0.033	0.74±0.048	0.43±0.030*	0.15±0.018*
(g/100g)	0.23±0.011	0.24±0.014	0.16±0.008*	0.07±0.009*
心 (g)	1.05±0.021	1.01±0.033	1.02±0.056	0.82±0.030
(g/100g)	0.32±0.007	0.33±0.007	0.37±0.008*	0.36±0.008*
肺 (g)	1.33±0.052	1.31±0.039	1.34±0.059	1.31±0.041*
(g/100g)	0.41±0.014	0.43±0.010	0.49±0.021*	0.57±0.020*
副腎 (mg)	53.1±1.8	45.3±4.1	49.0±3.9	51.4±3.6
(mg/100g)	16.5±0.43	15.5±1.4	18.8±0.86*	22.4±1.4*
脾 (g)	0.76±0.035	0.79±0.029	0.78±0.054	0.67±0.032
(g/100g)	0.23±0.008	0.26±0.006*	0.28±0.010*	0.29±0.018*
肝 (g)	15.9±0.77	18.1±0.93	17.7±0.86	15.0±0.56
(g/100g)	4.83±0.11	5.75±0.15*	5.69±0.18*	6.42±0.27*
腎 (g) 右	1.33±0.028	1.28±0.045	1.19±0.063	0.98±0.033*
(g/100g) 右	0.41±0.010	0.42±0.003	0.43±0.012	0.43±0.010
精巣 (g)	2.98±0.066	3.00±0.071	2.99±0.090	2.79±0.097
(g/100g)	0.92±0.032	0.98±0.019	1.09±0.044*	1.22±0.031*
精嚢 (g)	0.65±0.037	0.55±0.050	0.52±0.073	0.35±0.042*
(g/100g)	0.20±0.011	0.18±0.014	0.18±0.022	0.15±0.017*
前立腺 (g)	0.32±0.024	0.30±0.035	0.28±0.039	0.16±0.015*
(g/100g)	0.10±0.007	0.10±0.009	0.10±0.010	0.07±0.006*

P＜0.05, M±SE

表 3. PCB, PCDF 投与ラットの血液学的検査値

	対照群	PCB 100ppm	PCDF 1 ppm	PCDF 10ppm
白血球 ($\times 10^3/mm^3$)	8.36±0.64	7.67±0.53	8.26±0.67	7.70±0.74
赤血球 ($\times 10^6/mm^3$)	6.23±0.081	6.22±0.17	5.99±0.11	5.15±0.096*
ヘモグロビン (g/dl)	13.2±0.15	13.4±0.26	12.5±0.22*	10.6±0.24*
ヘマトクリット (%)	36.2±0.15	35.6±0.79	33.3±0.60*	28.2±0.35*

* P＜0.05, M±SE

PCB 群, PCDF 群とも肝の相対重量の増加が認められるが, 肝重量の増加については PCB および TCDD 投与で既に数多く報告されている[30,33,34,42-46]. 肝の絶対重量の有意な増加は認められなかったが, これは体重の減少によることが考えられる. すなわち肝重量は飼料摂取を制限した場合, 体重よりもより重量減少の程度が大きく, 相対重量は小さくなる[41]. それゆえ体重減少がみられ相対重量が増加した場合は, 薬物投与の影響と考えられる.

血清コレステロール値およびトリグリセリド値の増加と肝脂質含量の増加が PCB 投与動物で報告されているが[43,45], 今回の実験では血清トリグリセリド値の減少がみられた. 血清トリグリセリド値の減少は小松らによっても報告されている[47]が, これは投与群で飼料摂取が少なかった影響と考えられる. すなわち飼料摂取量が低下した場合, コレステロール値はあまり影響を受けないが, トリグリセリドはすみやかに減少する[41]. 肝脂質のうちリン脂質の増加が著しいが, 西住らの報告によれば肝の電顕像でミエリン様像が多数観察されていること[48]と関連ずけて考えられる.

PCDF 投与ラットで尿にポルフィリンの排泄のみられることが報告されている[49]. これは今回の PCDF 群

表 4. PCB, PCDF 投与ラットの血清生化学的検査値

	対照群	PCB 100ppm	PCDF 1 ppm	PCDF 10ppm
蛋白 (g/dl)	5.77±0.052	6.05±0.089*	5.66±0.076	5.47±0.011
グルコース (mg/dl)	161±2.9	149±2.9*	158±2.7	153±2.4
尿素窒素 (mg/dl)	24.4±0.79	22.5±1.25	21.5±0.75*	21.5±0.54*
コレステロール (mg/dl)	60.4±2.3	78.2±4.2*	92.8±12*	89.4±2.8*
無機リン (mg/dl)	10.7±0.30	10.7±0.46	12.6±0.73	9.65±0.36
トリグリセリド (mg/dl)	283±14	139±10*	160±18*	100±8.3*
コルチコステロン (μg/dl)	63±8.4	65±11	97±32	173±51*
GOT (KU)	110±2.6	112±4.0	114±4.1	138±5.5*
GPT (KU)	33.1±0.81	30.4±1.2	24.6±1.3*	25.6±1.2*
Al-P (KA-U)	53.1±4.4	51.3±4.9	53.1±5.8	57.6±4.7
ChE (△PH)	0.06±0.006	0.10±0.011*	0.12±0.011*	0.14±0.015*
LAP (I.U)	38.7±0.76	30.1±1.7*	32.5±2.5*	26.7±1.2*
Na (meq)	131±1.8	130±2.6	142±5.2	133±2.8
K (meq)	7.5±0.25	7.2±0.13	8.0±0.26	7.5±0.21

P<0.05, M±SE

表 5. PCB, PCDF 投与ラットの肝成分

	対照群	PCB 100ppm	PCDF 10ppm	PCDF 1 ppm
蛋白 (mg/g)	230±12	280±14	270±14	260±13
DNA (mg/g)	1.8±0.11	2.2±0.14	1.9±0.13	1.6±0.07
RNA (mg/g)	7.2±0.63	8.5±0.36	8.3±0.47	7.2±0.05
グリコーゲン (mg/g)	70±2.9	57±5.7*	41±3.3*	57±3.2*
総脂質 (mg/g)	32±2.1	54±3.1*	60±6.3*	57±4.0*
トリグリセリド (mg/g)	5.4±0.37	6.1±0.95	7.1±1.2	63±0.48
リン脂質 (mg/g)	19±1.7	40±2.9*	42±5.7*	41±3.9*
遊離脂肪酸 (mg/g)	5.7±0.52	5.4±0.36	6.1±0.65	6.7±2.8
コレステロール (遊離) (mg/g)	1.8±0.04	2.3±0.08	3.8±0.27*	2.4±0.10*
(エステル型) (mg/g)	0.7±0.03	0.6±0.06	1.0±0.16	0.6±0.08

P<0.05, M±SE

でみられた赤血球数，ヘマトクリット値，ヘモグロビン量の減少が溶血性貧血によるものであることの一つの傍証となろう．

カネミ油症の主要な原因物質はライスオイルに混入したPCBであることはほぼ確実と思われるが，PCDFもその毒性の強さを考えるとある程度関与していると考えるのが妥当と思われる．

要旨

PCDF 1 ppm, 10ppm あるいは PCB100ppm 添加飼料を4週間摂取させた後，臓器重量，血液学的検査，血清生化学的検査，組織学的検査，肝成分分析を行った．その結果 PCDF 10ppm 群で耳介部に塩素痤瘡様皮疹を生じ，胸腺重量の減少と胸腺皮質の消失がみられた．さらに赤血球数，血色素量の減少もみられた．PCB, PCDF 群とも肝脂質の増加と血清コレステロールの増加が認められ，脂質代謝の異常が示唆された．これらよりカネミ油症は PCB ばかりでなく，PCDF も関与しているものと考えた．

文献

1) Jensen, S.: *New Sci.* 32, 612, 1966
2) Widmark, G: *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* 50, 1069, 1967
3) Norton, N: *Environ. Res.* 5, 249, 1972.
4) Higuchi, K.: *PCB Poisoning and Pollution,*

3, 1976, Kodansha Ltd., Tokyo and Academic Press, New York
5) 池田良雄：食衛誌, 13, 359, 1972
6) Vos, J. G., J. H. Komen, VAN DER Maas, Ten Noever de Braun, and R. H. de Vos : *Fd. Cosmet. Toxicol.* 8, 563, 1970
7) Bowes, G.W., B.R. Simoneit, A.L. Burlingame, B. W. de Lappe, and R. W. Risebrough : *Environ. Health Perspect.*, 5, 191, 1973
8) Bowes, G. W., M. J. Mulvihill, M. R. Decamp, and A. S. Kende : *J. Agr. Fd. Chem.*, 23, 1222, 1975
9) Roach, J. A. G. and I. H. Pomerantz : *Bull. Environ. Contam. Toxcol.*, 12, 338, 1974
10) Nagayama, J., M. Kuratsune, and Y. Masuda: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 9, 1976
11) 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, 28-1, 260, 1977
12) Morita, M. and S. Oishi : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18, 61, 1977
13) Fletcher, M. J. : *Clin. Chim. Acta* 22, 393, 1968
14) Fiske, C. F. and Y. Sabbarow : *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925
15) Guillemin, R., G. W. Clayton, H. S. Lipscomb, and J. D. Smith : *J. Lab. Clin. Med.*, 53, 830, 1959
16) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
17) Hodge, A. W. and B. J. Wilson : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 481, 1970
18) Carrol, N. V. R. E. Longley, and J. H. Roe : *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957
19) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, 164, 747, 1946
20) Burton, K. : *Biochem. J.* 62, 315, 1956
21) Mejbaum, W. : *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117, 1939
22) Folch J., M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957
23) 中村道徳：農化誌, 24, 1, 1950
24) Ducombe, W. G. : *Biochem. J.*, 88, 17, 1963
25) Henly, A. A. : *Analyst*, 82, 286, 1957
26) 西住昌裕，倉恒匡徳，増田義人：福岡医誌, 66, 600, 1975
27) Bruckner, J. V., K. L. Khanna, and H. H. Cornish, H. H. : *Toxicol. Appl. Pharmal.*, 28, 189, 1974
28) 永井諄爾，古川ミチヨ，八戸義明，樋口かをる：福岡医誌, 62, 42, 1971
29) Vos, J. G. and E. Notenboom-Ram : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 563, 1972
30) Kociba, R. J., P. A. Keeler, C. N. Park., and P. J. Gehring : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35, 553, 1976
31) Greig, J. B., G. Jones, W. H. Butler, and J. M. Barnes : *Fd. Cosmet. Toxicol.* 11, 585, 1973
32) Harris, M. W., J. A. Moore, J. G. Vos, and B. N. Gupta : *Environ. Health Perspect.*, 5, 101, 1973
33) Vos, J. G., J. A. Moore, and J. G. Zinkle : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29. 229, 1974
34) Allen, J. R., J. P. Van Miller, and D. H. Norback : *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13, 501, 1975
35) Buu-Hoi, N. P., C. Pharm-Huu, G. Sesque, M. C. Azum-Gelade, and G. Saint-Ruf. : *Natur Wissenschaften*, 4, 174, 1972
36) Gupta, B. N., J. G. Vos, J. A. Moore, J. G. Zinkle, and B. C. Bullock : *Environ. Health. Perspect.* 5, 125, 1973
37) Faith, R. E. and J. A. Moore : *J. Toxicol. Environ. Health*, 3, 451, 1977
38) McKinney, J. D., K. Chae, B. N. Gupta, J. A. Moore, and J. A. Goldstein : *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 65, 1976
39) Vos, J. G., K. G. Kreeftenberg, H.W.B. Engel, A. Minderhoud and L. M. Jansen: *Toxicology*, 9, 75, 1978
40) McConnell, E. E., J. A. Moore, and D. W. Dalgard : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 175, 1978
41) Oishi, S., H. Oishi, and K. Hiraga : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press
42) Sanders, O.T., R.L. Zepp, and R.L. Kirkpatric: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 394, 1974
43) Litterst, C. L., T. M. Farber, A. M. Baker, and E. J. Van Loon : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 112, 1972
44) Hansell, M. M. and D. J. Ecobichon : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 418, 1974
45) Itokawa, Y., N. Yagi, H. Kaito, K. Kawahara, and K. Fujiwara : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 131, 1976
46) Goldstein, J. A., P. Hickman, V. W. Burse, and H. Bergman : *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32, 461, 1975
47) 小松富美子，田中潔：福岡医誌, 62, 35, 1971
48) Nishizumi, M. : *Arch. Environ. Health.*, 21, 620, 1970
49) Oishi, S. and K. Hiraga : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 16, 47, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 142-146, 1978

短期間少量のポリ塩化ビフェニールおよびジベンゾフランを投与したラットにおける毒性

川野澄江*, 林田志信*, 井口重孝*, 平賀興吾*

Toxicity of Small Amounts of Polychlorinated Biphenyls and Dibenzofurans in Rats Following Short-Term Exposure

SUMIE KAWANO*, SHINOBU HAYASHIDA*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

緒　言

欧米では，1966年にはすでにポリ塩化ビフェニール(PCB)が環境中に流出して生物を広く汚染していることが問題にされていた．しかしながらわが国では，1970年になってようやく環境汚染の研究が始められたのが実情で，その間に国内のPCB生産量は倍増し，汚染が急速に深刻化し，世界最悪の汚染を見るに至った[1]．1972年にはPCBの生産は中止され，使用も規制されるに至ったが，その化学的安定性から，長期にわたった汚染の続行が推定され，その人体への影響が憂慮される[2]．

そこで，今回われわれは，少量のPCBをラットに数回投与したのち長期にわたって症状を観察し，PCBの残留効果について検討を行った．また，PCBを含む種々の有機塩素系化合物の不純物として知られるポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の影響についても同時に検討を行った．

実験材料および方法

Ⅰ　試薬　使用したPCB標品は，鐘淵化学製カネクロール(KC)-500，PCDF標品は，和光純薬工業製一級試薬（Lot No. 16-839—四塩化物12.0%，五塩化物88.0%の混合物）である．その他の試薬に関しては，既報[3,4]に記載したとおりである．

Ⅱ　実験動物および投与方法　生後5週令のWistar-JCL系雄ラットを使用し，1ケージ4匹飼いとし，室温25°，湿度50%，照明時間7—17時の一般飼育室で飼育を行った．飼料は，日本クレア製固型飼料CE-2で自由に摂食させた．

PCBおよびPCDFは，オリーブ油に溶解し，体重kg当りそれぞれ10mg，100μgを1日1回，3日間連続して腹腔内に投与したのち，通常の条件下で飼育を続け，1，6，13，28日後に殺し，器官重量の測定，血液学的検査，血清生化学的検査，肝薬物代謝酵素の活性の測定を行った．対照動物には，オリーブ油のみを投与した．なお，一群の動物数は，4匹とした．

Ⅲ　検査方法

1. 血液学的検査：断頭後，ヘパリン塗布試験管に採血を行い，Coulter Counter Model-S (Coulter Electric Inc.) を用いて，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)の測定を行った．

2. 血清生化学的検査：自動分析装置（日立M-400）を用いて以下の9成分について測定を行った：総タンパク量，グルコース量，尿素窒素量，総コレステロール量(CHO)，アルブミン量，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT），グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ，アルカリフォスファタゼ（ALP），コリンエステラーゼ（ChE）．

3. 肝薬物代謝酵素活性の測定：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，過去の年報[3,4]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4mM，ニコチン酸アミド5mM，$MgCl_2$ 5mM，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 0.14mM，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4mMまたはアニリン0.5mM）からなり，37°で10分間反応させたのち，反応生成物，*p*-ニトロフェノール，ホルムアルデヒドまたは*p*-アミノフェノールを定量した．

実験結果

Ⅰ　体重および器官重量の変化

試験期間の体重変化を Fig. 1 に示したが，PCBおよびPCDFの投与は，体重には顕著な変化を及ぼさなかった．

器官重量のうち，有意の変化を示した肝臓，胸腺，肺の重量変化を Fig. 2 に示した．肝重量は，PCBの投

* 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

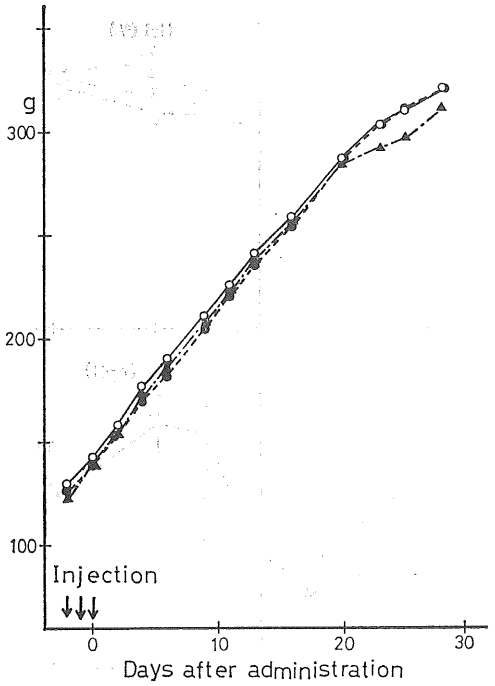


Fig. 1. Average Cumulative Body Weight Gain of Rats Following Three Daily Injections of PCBs or PCDFs.
Rats were given three daily ip injections of PCBs or PCDFs at doses of 10mg or 100μg/kg of body weight, respectively, on day −2, −1 and 0. Each group contained four rats.
○ control, ▲ PCBs, ● PCDFs.

与では有意の変化を示さなかったが，PCDFの投与では6日後に26%の増加を示し，その後も28日まで有意の増加を示した．対照動物の胸腺重量は，13日をピークとしてその後は減少し始める．PCB の投与ではこれとほぼ同様の推移がみられた．PCDF の投与では，6日後に減少し，その後も増加がみられず，6日後，13日後には顕著な胸腺萎縮が起きていると考えられる．肺重量は，PCB 投与では変化がなかったが，PCDF の投与では初期に有意の増加を示した．

その他の器官（心臓，脾臓，腎臓，睾丸，前立腺，副腎）の重量には，両化合物の投与による変化は認められなかった．

Ⅱ 血液学的検査値

Fig. 3 の上段に白血球数，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリットの変化を示した．

PCB の投与では，13日後の赤血球数とヘマトクリットに有意の増加が認められた．

PCDF の投与では，有意差が認められたのは6日後の白血球数の増加のみであるが，6日後から13日後にかけて赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリットに減少の傾向がうかがえる．

Ⅲ 血清生化学的検査値

Fig. 3の下段に検査項目のうち有意の変化のみられたコレステロール，GPT，アルカリフォスファターゼ，コリンエステラーゼの変化を図示した．コレステロール値は，両化合物投与後13日目まで増加の傾向を示した．

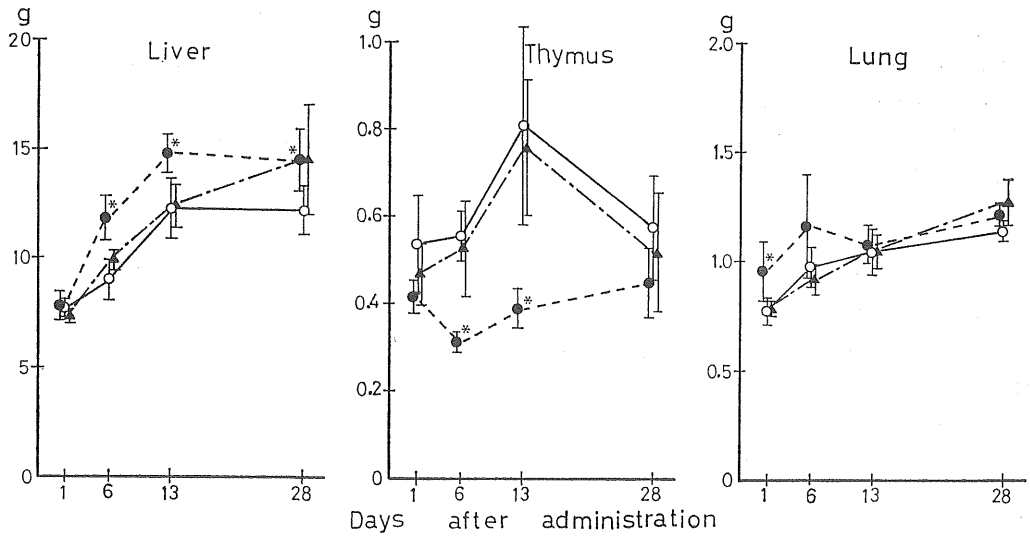


Fig. 2. Organ Weight Changes of Rats Following Three Daily Injections of PCBs or PCDFs.
○ control, ▲ PCBs, ● PCDFs.
The vertical line at each point represents the mean ± SD of four experiments, and an asterisk indicates values significantly different from control ($P<0.05$).

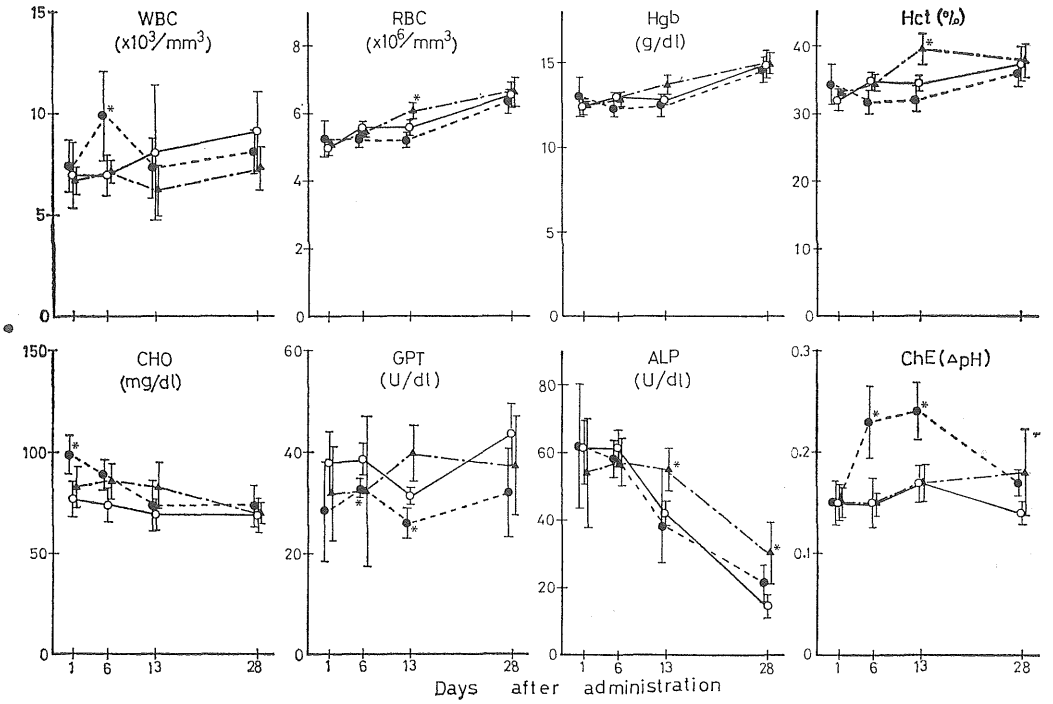


Fig. 3. Hematological and Serum Biochemical Parameters of Rats Following Three Daily Injections of PCBs or PCDFs.
○ control, ▲ PCBs, ● PCDFs.

GPT にはばらつきが著しいが，PCDF 投与後6日と13日の値は，対照に比べ有意の減少を示した．対照のアルカリフォスファターゼには，6日目以後に顕著な減少が認められるが，PCB の投与では減少が遅れるためか，13日後，28日後の値は，対照に比べて有意の高い値を示した．PCDF の投与では対照と差がなかった．コリンエステラーゼには，PCDF 投与後6日目以後に有意の上昇が認められたが，PCB の投与では有意の変化は認められなかった．

Ⅳ 肝薬物代謝系への影響

Fig. 4 に肝ミクロソームのチトクローム量および薬物代謝酵素の活性の変化を示した．両化合物投与後13日目に肝臓タンパク質含量は有意の減少を，ミクロソーム・タンパク質含量は有意の増加を示したが，その他の時点では，両成分には対照と比べ有意の変化は認められなかった．

一方，チトクローム P-450含量は，両化合物投与後速やかに上昇し，6日後には PCB 投与では対照の1.34倍に，PCDF 投与では2.16倍に上昇した．その後13日目まで高い値が続いたが，28日目には対照と同程度にまで減少した．チトクローム b_5 含量も両化合物の投与により著明に上昇し，13日後には PCB 投与では対照の1.82倍に，PCDF 投与では2.44倍に上昇した．その後減少しはじめたが，28日目に至っても，まだ対照よりかなり高い値を示した．

また，薬物代謝酵素の活性は，PCB 投与では1日後から13日後まで，*p*-ニトロアニソール，アニリン，アミノピリンのいずれの基質の場合にも顕著に上昇した．活性はその後減少し始め，前二者の活性は，28日後には対照レベルにまで下がったが，アミノピリン・デメチラーゼの活性は，ひき続き有意の上昇を示したままであった．一方，PCDF の投与では，*p*-ニトロアニソール，デメチラーゼ，アニリン・ヒドロキシラーゼの活性は，13日後まで顕著な上昇を示したが，28日後には対照レベルにまで減少した．アミノピリン・デメチラーゼ活性は，6日後までは上昇せず，13日後にわずかの上昇を示した．

考　　察

今回われわれは，総投与量 30mg という少量の PCB 投与の影響を1ケ月間にわたって観察した．この程度の

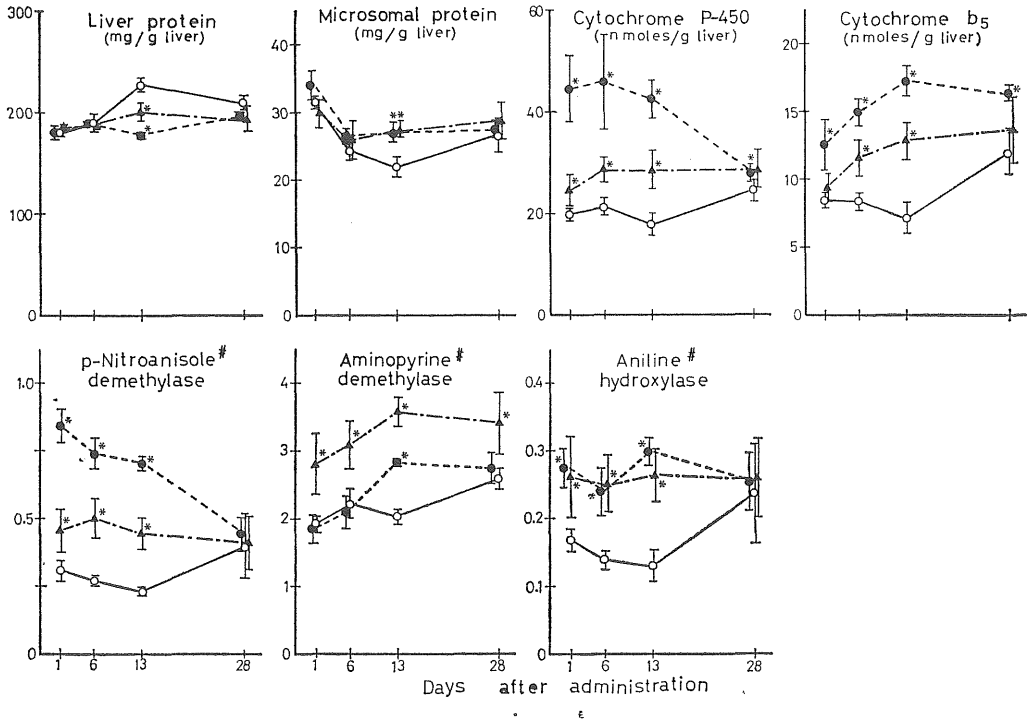


Fig. 4. Hepatic Microsomal Drug-Metabolizing Enzyme Activities of Rats Following Three Daily Injections of PCBs or PCDFs.
○ control, ▲ PCBs, ● PCDFs.
Enzyme activities are expressed as n moles of formed metabolites per g of liver per 10 min.

投与量では肝臓他の器官重量は顕著な変化を示さなかったが，肝ミクロソームのチトクローム P-450 含量，b_5 含量，および薬物代謝酵素の活性には顕著な上昇が認められた．しかも，この効果は，投与後2週間たっても衰えず，4週間後にようやくほぼ対照レベルに復帰した．このように，少量の PCB の投与で肝薬物代謝系が長期に上昇を続けていることから，ステロイドホルモンの代謝を通じて，動物の生殖機能や体内代謝全般が長期にわたって影響を受けている可能性が考えられる．

また，血液成分および血清成分への影響は，初期には認められないが，2～4週間経過してから，赤血球数，ヘマトクリット，血清アルカリフォスファターゼ値に上昇が認められた．このように PCB の影響には，ある期間を経てはじめて出現するものもあり，注目される．

PCDF の効果は，総投与量 300μg でも PCB よりはるかに強力である．肝ミクロソーム酵素系への影響は，100倍量の PCB よりはるかに強力であるばかりでなく，基質特異性においても PCB 投与の場合とは異なり，以前に報告したように両者は肝薬物代謝酵素の誘導様式が異なるようである[4,5]．また，胸腺の萎縮と血清コリンエステラーゼ値の上昇は，このような少量の投与においても認められうるきわだった特徴のようである．

要　約

Wistar-JCL 系雄ラットに少量のポリ塩化ビフェニール（PCB，10mg/体重kg）およびポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF，100μg/体重kg）を3日間腹腔内投与し，その影響を1ヶ月にわたって観察した．PCB は器官重量には有意の変化を及ぼさなかったが，肝薬物代謝系の活性には長期にわたった著しい上昇をもたらした．また，投与後2週目の赤血球数，ヘマトクリット値の上昇と，投与後2—4週の血清アルカリフォスファターゼ値の上昇が注目される．

PCDF は，総投与量 300μg という少量の投与においても著明な肝肥大，胸腺萎縮，肝薬物代謝系の活性の上昇，血清コリンエステラーゼ値の上昇をもたらした．また，その影響は PCB 同様長く持続し，投与後4週間を

経過しても完全には対照レベルに復帰しなかった.

文　献

1) 磯野直秀, 藤原邦達：科学, 42, 312, 1972
2) 磯野直秀：科学, 42, 448, 1972
3) 川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾：東京衛研年報, 27-2, 179, 1976
4) 川野澄江, 平賀興吾：東京衛研年報, 28-2, 175, 1977
5) Kawano, S. and K. Hiraga : *Japan. J. Pharmacol.*, 28, 305, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 147-150, 1978

ショードマイシンの Na, K-ATPase 阻害機構（第2報）
阻害に対する ATP の作用

原　しげ子*, 中尾順子*

Inhibition of Na, K-ATPase by Showdomycin (II)
Effects of ATP on the Inhibition

SHIGEKO HARA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

有機，無機水銀化合物を始めとした種々の環境汚染物質の毒性には，細胞膜機能障害が関与していることが多い．種々の膜酵素に対する阻害作用もその一因である[1,2]．膜酵素の中で特に Na, K-ATPase は，Na^+ と K^+ の能動輸送の本体であり，細胞の生命維持に関する重要な酵素である[3-5]．私共は，水銀化合物の Na, K-ATPase 阻害機構を調べてきたが[6]，さらに詳細に知るために，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，イオンあるいは ATP の Na, K-ATPase に対する作用が調べられてきた[7-11]．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（以下SMと略す）が脳 Na, K-ATPase を不可逆に阻害し，疑似一次反応（pseudo first order kinetics）に従う[12]こと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．前報で一部報告したが，今回は各種 ATP 誘導体を用い，ATP の作用についてさらに詳しい検討を加えた．

方　法

試薬　adenylyl imidodiphosphate（以下 AMP-PNP と略す），α, β-methylene adenosine 5′-diphosphate（以下 AMP-CP と略す），β, γ-methylene adenosine 5′-triphosphate（以下 AMP-PCP と略す）はシグマ社製をトリス塩にして使用した．その他は前報[13]に従った．

ブタ脳 Na, K-ATPase は中尾らの方法[14]に従いNaI処理標品を用いた．Na, K-ATPase 活性の測定は前報[13]に従った．

阻害の初速度の求め方　50mMトリス－塩酸(pH7.5), 0.01mM EDTA に NaCl, KCl, $MgCl_2$, 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 を添加して全量500μlとし反応を開始した．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，1 mM 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．阻害の初速度は前報[13]に従って求めた．

結　果

Na^+ (140mM), K^+ (14mM), Mg^{2+}(5mM) の各種組み合せ（8通り）をつくり，それぞれの条件で SM の Na, K-ATPase に対する阻害速度を求めた（Fig. 1 白柱）．これらのイオンの影響は，塩化コリンでイオン強度を等しくしても結果には変わりがなかった．各種リガンド組み合せに0.1mM ATPを添加したところ，Na+Mgの系を除いたすべての系で阻害速度は減少した(Fig. 1斜線)．これに対し，Na+Mg の組み合せでは，ATP 添加により，阻害速度が3倍近く増加した．

この ATP の阻害減少作用と阻害増加作用を，ATP 以外のヌクレオチドやリン酸化合物を用いて検討した．Table 1 に示したように，ADP, CTP, ITP, GTP, UTP, PNPP は ATP と同様に，リガンド無添加の場合に SM の阻害速度(k)を減少させ，一方 Na+Mg の場合はkを増加させた．ATP及びADP誘導体であるAMP-PNP, AMP-PCP, AMP-CP は，リガンド無添加の場合に，ATP と同様に阻害速度を減少させた．しかしながら，Na+Mg の系でも阻害が減少し，kは小さくなった．また，AMP, PNP, Pi 添加では，阻害速度に大きな変化がみられなかった（Table 1）．

次に阻害促進作用に対する Mg^{2+}, Na^+, ATP 各々の $K_{0.5}$（半阻害促進濃度）を求めた(Table 2)．Mg の $K_{0.5}$ は Fig. 2 で，また Na の $K_{0.5}$ は Fig. 3 より Lineweaver

* 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

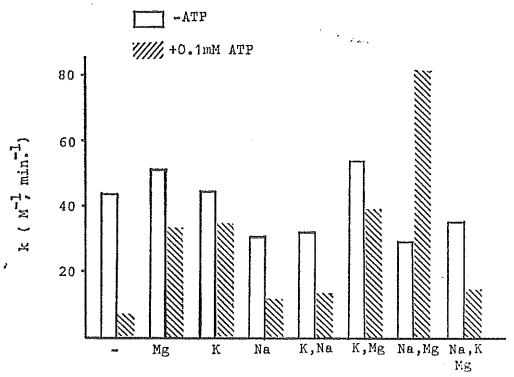


Fig. 1. 種々のリガンドの阻害速度に対する影響
50mM トリス－塩酸(pH7.5), 0.01m M EDTA にそれぞれ 140mM NaCl, 14mM KCl, 5mM $MgCl_2$を添加した. SMの濃度は2mMを用いた.

Table 1. ヌクレオチドおよびリン酸化合物の阻害速度に対する影響

	阻害速度定数 (k : M^{-1}, $min.^{-1}$)	
リガンド(1mM)	—	NaCl+$MgCl_2$
—	62	33
ATP	14	112
ADP	19	82
CTP	36	104
ITP	51	108
GTP	37	96
UTP	46	72
PNPP	45	79
AMP-PNP	16	23
AMP-PCP	16	16
AMP-CP	20	23
AMP	62	27
PNP	61	36
Pi	68	30

PNP : *p*-nitrophenol
PNPP : *p*-nitrophenylphosphate

-Burk plot から求めた. ATP の $K_{0.5}$ は, 予備加温中に酵素標品中に存在していると思われる Na-ATPase, Mg-ATPase により ATP が分解されることも考えられるので, NaCl と $MgCl_2$ の濃度をそれぞれ 14mM, 1 mM に下げて求めた (Fig. 4). ATP が 10μM で, すでに最大速度に達した. さらに, ADP と PNPP の阻害促進作用の $K_{0.5}$ を求めた. 140mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ 存在下で ADP の $K_{0.5}$ を, また 140mM NaCl 5 mM $MgCl_2$ 存在下で PNPP の $K_{0.5}$ を求め Table 2 に示した. ATP の阻害保護作用の $K_{0.5}$ は, Fig. 5 の

Table 2. 種々のリガンドの半阻害促進濃度 ($K_{0.5}$)

リガンド	$K_{0.5}$
Mg^{2+}	0.13 mM
Na^{+}	3.1 mM
ATP	< 10 μM
ADP	830 μM
PNPP	50 μM

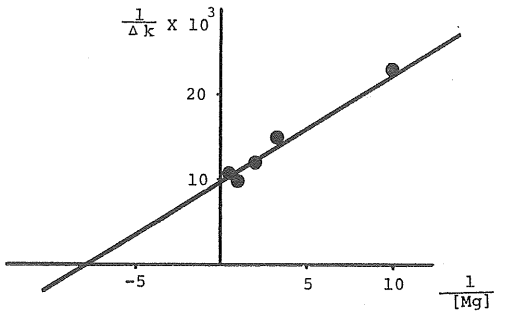


Fig. 2. 阻害促進作用に対する Mg の $K_{0.5}$
140 mM NaCl, 1mM ATP 存在下で求めた. 縦軸は阻害速度 (k) の増加分の逆数, 横軸は $MgCl_2$ 濃度の逆数を示す.

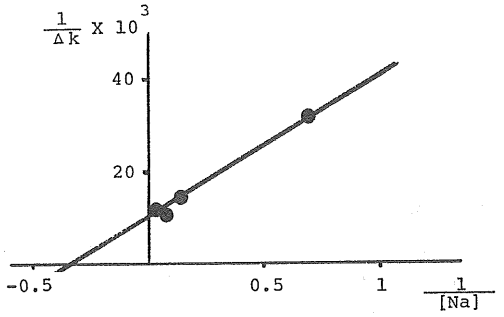


Fig. 3. 阻害促進作用に対する Na の $K_{0.5}$
5mM $MgCl_2$, 1 mM ATP 存在下で求めた. 縦軸は阻害速度 (k) の増加分の逆数, 横軸は NaCl 濃度の逆数を示す.

Lineweaver-Burk polt から求め, 1.5μM であった.

以上の結果を Teble 2 にまとめて表わした.

考　察

Na+Mg 存在下で, ATP が SM の阻害を著しく増加させた(Fig. 1). この結果は, ^{14}C-NEM の酵素への結合がこのリガンド条件で最大になるという Titus ら[15]の報告とは一致したが, 阻害の程度を指標にした Skou[7], Banerjee ら[10], Schoot ら[11]の結果とは異なった. これは酵素標品によるちがい, NEM を用いると ATP の作

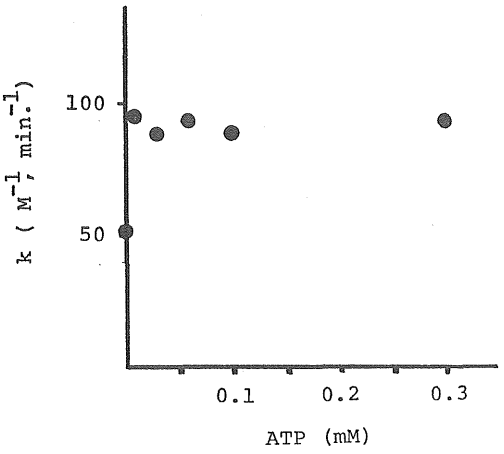


Fig. 4. ATPの阻害促進作用
14mM NaCl, 1mM $MgCl_2$ 存在下で，種々のATP濃度における阻害速度（k）．縦軸上の点は，ATP無添加の時の阻害速度を示す．

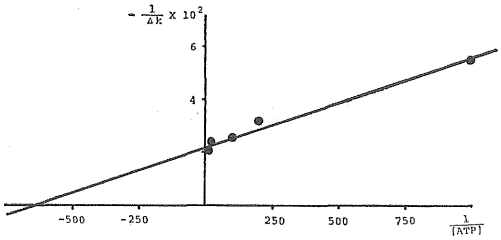


Fig. 5. 阻害保護作用に対するATPの$K_{0.5}$
リガンド無添加（50mMトリス－塩酸（pH7.5），0.01mM EDTA）の条件で求めた．縦軸は阻害速度（k）の減少分の逆数，横軸はATP濃度の逆数を示す．

用が観察しにくいことに加えて，観測の指標が異なることすなわち，彼らは阻害の到達度を指標にしているのに対し，私共は阻害速度を指標にしていることによると思われる．

ATP添加による阻害増加が，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明らかでない．しかし，Titus ら[15]の実験から，おそらく反応するSH基の個数が増加していると考えられる．

ATPはK, Na, Mgなどのリガンド条件で異なる作用を示し，Na+Mg組み合せでは阻害促進作用を，それ以外の組み合せでは阻害保護作用を示した．1mMの濃度を用いた時の保護作用の強さは，ATP, ADP, CTP, GTP, PNPP, UTP, ITPの順であった（Table 1）．もし同濃度のリン酸化合物を用いた時の保護作用の強さが，酵素に対する親和性をあらわしているとすると，この保護作用の強さの順位は，Hegyvary ら[16]により報告されたATP bindingのDissociation constantの順位とよく一致している．一方，阻害促進作用は，ATPやADPのリン酸基を修飾した誘導体ではみられない．同濃度（1mM）を用いた時，UTP以外のヌクレオシド－3リン酸はATPと同程度に阻害を促進し，ADPはそれらに比べて弱い．このことから，阻害促進にはリン酸基部分の構造が関与していることが推定される．

これらのことから，ATPの阻害保護作用と阻害促進作用は別の作用であり，リガンド条件により現われ方が異なる．

阻害保護作用のATPの$K_{0.5}$はFig. 5より1.5μMであった．一方，阻害促進作用のATPの$K_{0.5}$は，予備加温中にATPの分解が考えられるので，正確に求めるのは難しい．Fig. 4より，ATP濃度10μMで最大速度に達していた．いずれの作用もATPの$K_{0.5}$はμMの桁でかなり小さく，E-P形式の際のATPのKm[17]または，ATP bindingの際のATPのKd[16,18]に近く，非常に特異的な作用であることがわかる．

K-PNPPaseの基質であるPNPPの，阻害促進作用に対する$K_{0.5}$は50μMであり，ADPの$K_{0.5}$は830μMであった．また，阻害促進作用のNaの$K_{0.5}$は2.5～3mMで，ATP水解反応でKをOに外挿した時のNaに対する$K_{0.5}$の値[19]に近い．Mgの$K_{0.5}$は0.1mM付近であった．

これらの$K_{0.5}$の値から，酵素+Na+Mg+ATPの組み合せで生じるSMに対し親和性の高い酵素の状態は，酵素反応の一中間体と同じconformationであると考えられる．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ないが，SMの阻害促進を引き起こすATP siteは，基質としてのATP結合部位である可能性が強い．

要　約

1) SMによるNa, K-ATPaseの阻害速度を指標にして，Na, K-ATPaseに対するATPの作用を調べた．

2) 種々の組み合せのリガンド（Na, K, Mg）存在下で，ATPを添加するとNa+Mg以外の系ではATPの保護作用がみられた．この保護作用はリガンド無添加の条件で一番大きく，この際のATPの$K_{0.5}$は1.5μMであった．

3) これに対し，Na+Mgの組み合せでは，ATP添加により阻害速度が3倍以上増加した．阻害促進作用に対するMg, Naの$K_{0.5}$はそれぞれ0.13mM, 3mMであり，一方ATPは10μMで最大速度に達した．

4) 阻害保護作用と阻害促進作用は，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．一方，ATP や ADP 誘導体（AMP-PNP, AMP-PCP, AMP-CP）は，阻害保護作用を持つにもかかわらず，阻害促進作用を示さなかった．

5) 以上のことから，ATP の阻害保護作用と阻害促進作用とは別の作用であり，ATP に対し異なる効果を示す2種類の site の存在が示唆された．

文　献

1) 矢ヶ崎しげ子，原　論吉，中尾順子：東京衛研年報，26-2, 148, 1975
2) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 161, 1976
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) Whittam, R. and K. P. Wheeler : *Ann. Rev. Physiol.*, 32, 21, 1970
6) 矢ヶ崎しげ子，原　論吉，中尾順子：東京衛研年報，25, 691, 1974
7) Skou, J. C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 234, 1974
8) Banerjee, S. P., S. M. E. Wong, V. K. Khama, and A. K. Sen : *Mol. Pharmacol.*, 8, 8, 1972
9) Robinson, J. D. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 139, 164, 1970
10) Banerjee, S. P., S. M. E. Wong, and A. K. Sen : *Mol. Pharmacol.*, 8, 18, 1972
11) 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
12) Tobin, T. and T. Akera : *Biochim. Biophys. Acta*, 389, 126, 1975
13) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，28-2, 196, 1977
14) Nakao, T., Y. Tachima, K. Nagano, and M. Nakao : *J. Biochem.*, 73, 609, 1973
15) Hart, W. M. Jr and E. O. Titus : *J. Biol. Chem.*, 248, 1365, 1973
16) Hegyvary, C. and R. L. Post : *J. Biol. Chem.*, 246, 5234, 1971
17) Post, R. L., A. K. Sen, and A. S. Rosenthal : *J. Biol. Chem.*, 240, 1437, 1965
18) Norby, J. G. and J. Jensen : *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 104, 1971
19) 原　論吉：お茶の水医学雑誌，23, 25, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 151-154, 1978

アデニレートシクラーゼにおよぼすバナジウムの影響

中川敦子，中尾順子

Effects of Vanadate on Adenylate Cyclase of Rat Brain

ATSUKO NAKAGAWA* and TOSHIKO NAKAO*

緒　言

バナジウムは工業的に重要な金属で冶金業では鋼鉄の成分として，化学工業では酸化触媒として広く利用されている．現在では利用される絶対量が少なく，かつ製品中では安定な化合物として存在するため，環境汚染の問題は生じていない．しかし局地的汚染であるスクラップ鉄処理場付近のフュームへの暴露および鉱さい，廃触媒等バナジウム残留物の処理は今後問題となる可能性はある．

一方バナジウムの生体に対する作用は，ヒヨコ[1]およびラット[2]の必須微量金属であることからヒトにおいても重要な金属と推測されている．毒性の観点からはバナジウムの大量投与による急性の呼吸器系症状のほか，*in vivo* におけるシステイン含量の低下[3-5]，コレステロール合成[6]，CoA[7]および CoQ[8] 合成の低下等種々酵素系に対する阻害が観察されている．また *in vitro* においてはアルカリホスファターゼ[9]，酸性ホスファターゼ[10]およびNa, K-ATPase[11]の強力な阻害剤である．これらりん酸水解酵素に対するバナジウムの阻害機構は，水溶液中における HPO_4^{2-} と $H_2VO_4^-$ の構造が類似していることから，バナジウムがりん酸の結合部位に結合するためと説明されている．アデニレートシクラーゼ（AC）はホルモン作用を細胞内に伝えるメッセンジャーの役割をもつ c-AMP の合成酵素で，Na, K-ATPase と同じく ATP を基質とし細胞膜に存在する．筋肉から抽出，精製した ATP には低濃度のバナジウムが常に含まれているのでバナジウムの生体内作用は ATP に関連する酵素系を介し生理的作用を発現しているかも知れないと考え，ACに対するバナジウムの影響を観察した．

実験方法

酵素の調製　ラットの脳を9容の 0.25M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH7.5) でホモゲナイズ後，4,500r. p. m. 10分間遠沈 (sorvall ss-34 ロータ) する．沈澱を同条件で2回洗い，同緩衝液にけん濁して酵素源として使用した．タンパク濃度は9～12mg/m*l* として −80℃で保存した．活性はこの条件で3カ月間変化しなかった．ラットの骨格筋，心筋，腎臓の酵素はそれぞれ Severson, D. L. 等[12]，Drummond, G. I. 等[13]，Marx, S. J. 等[14]の方法に従って調製した．ルブロール可溶化酵素は脳の酵素を 100mM Sucrose, 50mM Glycylglycine buffer (pH 7.5), 3 mM DTT, 1％ルブロールPX存在下で溶かしてホモゲナイズ後，0℃で30分間放置する．この時のタンパク濃度は 5.8mg/m*l* である．これを 27,000 ×g 30分間遠沈して上清を可溶化酵素として使用した．

ACの測定法　Salomon, Y. 等[15]の方法を改変して行った．反応溶液は 20mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM $MgCl_2$, 2.6mM [α-^{32}P] ATP (40—50cpm/pmole), 1 mM c-AMP, 10mM テオフィリンとし，酵素タンパク100～150μg を加えて全量を 100μl にする．オルトバナジン酸ソーダ (Na_3VO_4) との反応は，20mM Tris-HCl (pH 7.5) の存在下で酵素と Na_3VO_4 を 0℃ 5分間 preincubate 後，Tris-HCl 以外の反応液を加え37℃ 5分間反応を行ない，反応停止液(40mM, APT 1.4mM c-AMP) 100μl を加えて反応を停止する．回収率を調べるため [^{14}C] c-AMP (20,000cpm, 10μl) を加え，93℃ 5分間加熱後水 0.8m*l* を加えて 2,000r. p. m. 10分間遠沈する．上清を Dowex 50W-X4 およびアルミナカラムにかけて c-AMP を分離溶出する．溶出液は Bray Medium 12m*l* を入れたバイアル瓶に直接受け液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-230) で放射能を測定する．なおルブロール可溶化酵素の活性測定は，酵素の失活を防ぐため 1 mg/m*l* BSA および 1 mM DTT を反応液に添加した．Na, K-ATPase 活性の測定は中尾等の方法[16]に従った．タンパク質の測定は Lowry 法[17]に従い，Na_3VO_4 の濃度は原子吸光分光光度計 (Perkin Elmer 403) を用いて測定した．

試薬　[α-^{32}P] ATP, [adenine-u-^{14}C] c-AMP はラジオケミカルセンター，ATP, c-AMP, DTT, dl-

* 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

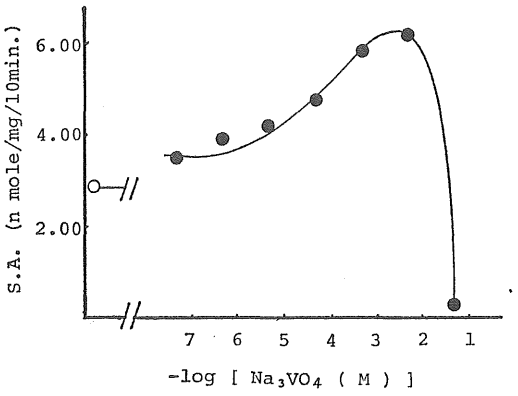


図 1. バナジウムによるアデニレートシクラーゼの活性化
○—○：Na_3VO_4 無添時の活性
●—●：Na_3VO_4 添加時の活性

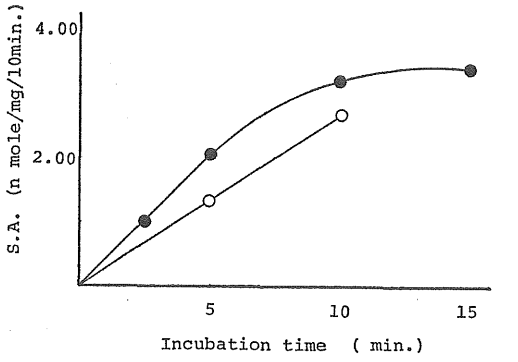


図 2. アデニレートシクラーゼ反応の時間経過
○—○：Na_3VO_4 無添加時の反応
●—●：1.14×10^{-3}M Na_3VO_4 添加時の反応

表 1. アデニレートシクラーゼに対する Na_3VO_4 活性化反応の可逆性

Preincubation 時の Na_3VO_4 濃度	assay 時の Na_3VO_4 濃度	比活性
1.14×10^{-3}M	8.32×10^{-7}M	1.33
1.14×10^{-3}M	1.14×10^{-3}M	2.46
0	0	1.13
0	1.14×10^{-3}M	2.32

酵素を1.14×10^{-3}M Na_3VO_4 および 16mM Tris-HCl (pH7.5)存在下で0℃ 7分間 preincubate 後，10mM Tris-HCl (pH7.5)で37倍に希釈する．5,000 r.p.m. で15分間遠沈し，沈澱を同容の10mM Tris-HCl (pH7.5) で洗う．得られた沈澱を10mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁したものを Na_3VO_4 で preincubate した酵素として使用した．

イソプロテレノールおよびエピネフリンはシグマ社，ルブロール PX は半井化学薬品，Na_3VO_4 は和光純薬，Dowex 50W-X4 (200—400メッシュ) はダウケミカル社，中性アルミナは Tochtergesellshaft der ICN Pharmaceuticals のものを使用した．ルブロールPXは不純物を除くためあらかじめ陰イオンおよび陽イオン樹脂を通して精製し，−30℃で保存したものを使用した．

結果および考察

ラット脳のACは図1に示すように4.56×10^{-8}Mから4.56×10^{-3}Mの Na_3VO_4 で活性化され，最高活性は4.56×10^{-3}M で得られた．この値は対照活性の約2倍で10 mM NaF による活性化値に近い値である．Na_3VO_4 によるACの活性化反応には0℃ 5～10分間の preincubation が必要で，Na_3VO_4 存在下でのAC反応は酵素タンパク 150μg で37℃ 5分間までは直線であった (図2)．NaF による活性化が mM オーダでみられ不可逆反応[18]であるのに対し，Na_3VO_4 による反応は4.56×10^{-8}Mの低濃度から観察され可逆的であった (表1)．種々の報告によれば生体組織内のバナジウム濃度は10^{-8}Mから10^{-6}M[11,19] である．またアルカリホスファターゼ[9]，酸性ホスファターゼ[10]，Na, K-ATPase[11] に対するバナジウムの半阻害濃度はそれぞれ2.2×10^{-6}M，2.7×10^{-7}M，3×10^{-6}M で生体濃度に近い．以上のことからバナジウムは生体でACおよびりん酸水解酵素系に対する調節因子の作用をもつことも考えられる．ラットの腎臓，骨格筋および心筋のACも脳の酵素と同様に Na_3VO_4 により活性化された．

ACは細胞膜酵素で膜の内側に触媒部位をもち，ATPから c-AMP を生成する．この反応は NaF により促進される．またACは膜に存在するホルモン受容体に結合した各種ホルモンによっても活性が促進される．Na_3VO_4 によるACの活性化が膜のどの部位で生ずるかを知るため既知の活性化剤との関係を観察した．Na_3VO_4 の活性はエピネフリン (図3) およびイソプロテレノール (図4) に付加的で，NaF (図5) に対しては影響がみられなかった．ACは非イオン界面活性剤であるルブロールPXで可溶化するとホルモンによる活性化反応は完全に消失する．しかし NaF による活性化は程度の差はあるが残存する．本実験で得られた可溶化酵素は Na_3VO_4 により活性化され，その値は NaF による活性化値に近かった (図6)．以上の結果から Na_3VO_4 によるACの活性化は受容体側からの間接的な作用ではなく，膜の内側から酵素反応に作用するものと考えられる．細胞膜酵素に対するバナジウムの作用部位に関しては，最近 Cantley 等[20] により赤血球の Na, K-ATPase

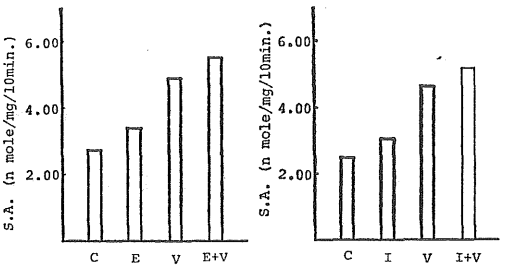


図 3.(左) アデニレートシクラーゼ活性におよぼすエピネフリンとバナジウムの影響
C：コントロール　E：10^{-4}Mエピネフリン添加
V：4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 添加
E＋V：10^{-4}Mエピネフリンおよび4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 添加

図 4.(右) アデニレートシクラーゼ活性におよぼすイソプロテレノールとバナジウムの影響
C：コントロール　I：10^{-4}Mイソプロテレノール添加
V：4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 添加
I＋V：10^{-4}イソプロテレノールおよび 4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 添加

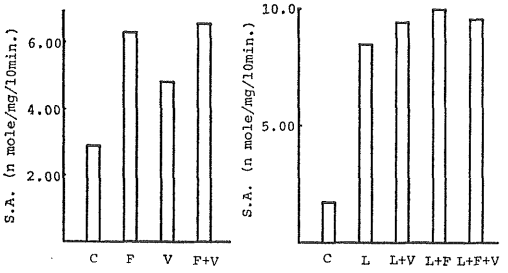


図 5.(左) アデニレートシクラーゼ活性におよぼす NaF とバナジウムの影響
C：コントロール　F：10mM NaF
V：4.56×10^{-4}M Na_3VO_4
F＋V：10mM NaF および4.56×10^{-4}MNa_3VO_4添加

図 6.(右) ルブロールで可溶化したアデニレートシクラーゼ活性におよぼす NaF とバナジウムの影響
C：コントロール　L：ルブロール可溶化酵素
L＋V：ルブロール可溶化酵素に4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 を添加
L＋F：ルブロール可溶化酵素に10mM NaF を添加
L＋F＋V：ルブロール可溶化酵素に4.56×10^{-4}M Na_3VO_4 および10mM NaF を添加

が Na_3VO_4 により細胞の内側から阻害されることが報告されている.

Na_3VO_4 のＡＣ活性化作用は NaF による活性化と見かけ上類似していた. しかしバナジウムとフッ素のイオン的性質のちがい（Vは陽イオン, Fは陰イオン), 酵素反応に対する可逆性のちがい（Vは可逆的, Fは不可逆的), および酵素の活性化に要する最低濃度のちがい（Vは10^{-8}Mのオーダ, Fは10^{-3}M のオーダ）から両活性化剤の反応機構は全く異なると考えられる. またバナジウムは他のホスファターゼ活性を調節し同時に生的理にＡＣをコントロールしていることも予想されるが, これについては実験中である.

要　約

ラット脳のＡＣは 4.56×10^{-8}M 以上の Na_3VO_4 で活性化され, 最高活性は4.56×10^{-3}M で得られた. その値は対照活性の約２倍で, 10mM NaF 添加時の活性（対照活性の２～2.5倍）に近かった. しかし Na_3VO_4 による活性化は NaF と異なり可逆的で, 活性化に要する最低濃度は NaF が10^{-3}M であるのに比べて非常に低かった. バナジウムによるＡＣの活性化はカテコールアミンに付加的で, NaF による活性化には影響がなかった. またルブロールで可溶化したＡＣは Na_3VO_4 により NaF と同程度に活性化された. 以上の結果よりバナジウムはＡＣに対して NaF に類似の作用ではあるが低濃度で触媒部位側, すなわち細胞膜の内側から作用し, かつ可逆的であることから生理的な作用をもつ可能性が示唆された.

文　献

1) Hopkins, L. L., JR., and H. E. Mohr : *Newer Trace Elements in Nutrition*, 195, 1971, Marcel Dekker, New York
2) Schwarz, K. and D. B. Milne : *Science*, 174, 426, 1971
3) Mountain, J. T., F. R. Stockell, JR. and H. E. Stokinger : *A. M. A. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 8, 406, 1953
4) Mountain, J. T., F. R. Stockell, JR. and H. E. Stokinger : *A. M. A. Arch. Ind. Health*, 12, 494, 1955
5) Bergel, F., R. C. Bray and K. R. Harrap : *Nature*, 181, 1654, 1958
6) Curran, G. L. : *J. Biol. Chem.*, 210, 765, 1954
7) Mascitelli-Coriadoli, E. and C. Citterio : *Nature*, 183, 1527, 1959
8) Ajyar, A. S. and A. Sreenivassan : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107, 914, 1961
9) Lopes, V., T. Stevens and R. N. Lindquist : *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 31, 1976
10) Van Etten, R. L., P. P. Waymack, and D. M. Rehkop : *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 6782, 1974

11) Cantley, L. C. JR., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene and G. Guidotti : *J. Biol. Chem.*, 252, 7421, 1977
12) Severson D. L., G. I. Drummond and P. V. Sulakhe : *J. Biol. Chem.*, 247, 2949, 1972
13) Drummond, G. I. and L. Duncan : *J. Biol. Chem.*, 46, 4166, 1971
14) Marx, S. J., S. A. Fedak, and G. D. Aurback : *J. Biol. Chem.*, 247, 6913, 1972
15) Salomon, Y., C. Londos and M. Rodbell : *Anal. Biochem.*, 58, 541, 1974
16) Nakao, T., K. Nagano, K. Adachi and M. Nakao : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 444, 1963
17) Lowry, O. H., N. Y. Rosenbrough, A. L. Farr and B. J. Randoll : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
18) Perkins, J. P. and M. M. Moore : *J. Biol. Chem.*, 246, 62, 1971
19) 木村正己，小野　哲，和田　攻：環境汚染物質の生体への影響(2) クロム・バナジウム，191，1977 東京化学同人
20) Cantley, L. C. JR., M. D. Resh and G. Guidotti : *Nature*, 272, 552, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 155-157, 1978

赤血球の老化と細胞膜脂質成分の変化

長井二三子*, 中尾順子*, 中尾 真**

Changes in Lipids of Stored Human Erythrocyte Membrane

FUMIKO NAGAI*, TOSHIKO NAKAO* and MAKOTO NAKAO**

緒 言

哺乳動物の成熟赤血球は非常に単純な構造で，細胞膜に囲まれた内側に細胞内小器官を全く含まず，代謝系も単純である．したがって完成した赤血球は約120日間の寿命を終えるまで老化の過程を進行するのみと言ってもよく，老化のモデルとしては最も良い材料であり，毒性の問題も老化を無視することはできないと考える．

保存血は抗凝固剤としてクエン酸，エネルギー源としてグルコースを加えたACD液とともに4℃で保存されている[1]．保存中に赤血球内のATP濃度は低下し，4週間で約半分，8週間では1/10から1/20になる．ATPレベルの低下とともに保存中の顕著な変化としては形が円盤状から金平糖をへて平滑球になること，輸血後寿命が短縮されること，浸透圧溶血抵抗が減少することなどがある[2-6]．血液にアデニン，イノシンを加えて4℃で保存するとATPレベルは8週間後も正常の範囲であり，輸血後寿命は新鮮血に近く，円盤状の型が大部分をしめ，浸透圧溶血抵抗の低下もおさえられることが知られている[7-10]．

赤血球中のただ一つの構造物である細胞膜は基本構造となる脂質二重層の中に何十種ものタンパクがモザイクのように埋めこまれている．膜脂質は主成分のリン脂質，コレステロールのほか，糖脂質，トリグリセリド，遊離脂肪酸からなっている．最近，細胞膜構造とATPレベルとの関係についての研究が蓄積されつつあり，1)スペクトリンのATPによるリン酸化と赤血球の形の変化との関係や[11,12]，2)ATPレベルが低い赤血球あるいはその赤血球からつくられた膜小胞のリピッドがフォスフォリパーゼの作用を受けやすい[13,14]，3)ATPレベルが低い赤血球からリピッド含量が高く，スペクトリンを含まない小胞が遊離してくる[15]などの報告がある．

著者らは赤血球の老化と脂質成分の変化との関係を調べる目的で，血液をACD液のみで保存したものとアデニン，イノシンを加えたACD液で保存したものを用いて，両者のATPレベルと赤血球膜のリン脂質，コレステロール量を測定した．これらの関係について得られた知見を報告する．

実 験

材料 ACD保存液は水100m*l*にクエン酸ソーダ2.2g，クエン酸0.8g，ブドウ糖2.2gを含む．アデニンとイノシンはメルク製のものを使用した．

日赤血液センターより供与された採血1日以内のPacked Cellを使用した．ここで使用したPacked Cellとは，採取した血液を保存血としたものを遠心分離し，血漿部分を一部取り除いたものでヘマトクリット値は60～75%であった．

方法 血液の保存法0.9% NaCl 200m*l*とACD保存液30m*l*を合わせた液にアデニン4mM，イノシン40mMになるように溶解し，ミリポアフィルターでろ過して無菌的にしたあと，無菌操作でPacked Cell 10m*l*に対して2m*l*を加えた．対照群は0.9% NaCl 200m*l*とACD保存液30m*l*を合わせたものをアデニン，イノシン添加群と同様の方法でPacked Cellに加えた．おのおののヘマトクリット値は50～55%程度であった．調製した血液は4℃冷蔵庫に保存した．

赤血球膜の調製 一定の期間保存した血液をそれぞれ3,000rpm 15分間遠心し，血漿および赤血球層上部にある血小板や白血球をアスピレーターをつないだ先曲がりピペットで除去した．赤血球を約5倍量の0.9% NaClに再浮遊させ再遠心した．この操作を3回繰り返した．50～60%ヘマトクリット値になるように0.9% NaClに浮遊させた赤血球に約15倍（セルボリゥム）の2.5mM Tris HCl pH8.2を一度に加え低張溶血をし時々かきまぜながら30分間放置し，Sorvall SS34のローターで20,000 rpm 20分間遠心した．ペレットを2.5mM Tris HCl pH8.2に懸だくし，再遠心した．これを3回繰り返しペレット底部の赤い部分は捨てた．洗滌がおわったペレットは2.5mM Tris HCl pH8.2に懸だくし，赤血球膜標

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京医科歯科大学医学部生化学

品とした[16]．以上の操作はすべて4℃で行った．

リピッドの抽出　Dodgeら[17]の方法に準じ以下のように行った．赤血球膜標品1 m*l* に対して5 m*l* の BHT の入ったメタノール（メタノール100m*l* に BHT 5 mg を含むもの）を加えてときどき攪拌しながら30分間おいたあと5 m*l* のクロロホルムを加えた．再度攪拌しながら30分間おいたあと3,000rpm 10分間遠心し，上澄液を分液ロートに移した．残渣について2回この操作を繰り返した．ただし，メタノールおよびクロロホルムで処理する時間は10分間にした．分液ロートに集めた抽出液にクロロホルム16.5m*l* と 0.05M KCl 7.3m*l* を加えよく振とうしたのち冷暗所に一晩おいた．翌日室温にもどし上層と下層の分離を完全にさせて下層を集めロータリーエバポレーターで40℃減圧蒸発乾固し，クロロホルムに溶かし，−80℃に保存した．

フォスフォリピッドの定量　Bartlett 法[18,19]に準じて加水分解および呈色を行い，JASCO UVIDEC 60分光光度計をもちいて 830nm で定量した．

コレステロールの定量　赤血球膜標品およびリピッド抽出液のコレステロールは Zak, Henly の変法[20]または Zlatkis ら[21]の方法に準じて呈色し富士光電 Hg, ADS 比色計で測定した．

タンパク質の定量　*Lowry* 法[22]に準じた．

結　果

赤血球膜リン脂質およびコレステロールは保存日数に

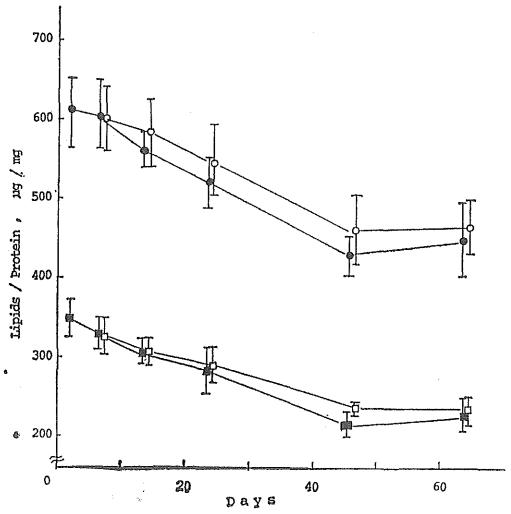


図 1.　血液の保存日数による細胞膜リン脂質およびコレステロールの変動
アデニン，イノシン添加リン脂質を○，コレステロールを□，Control のリン脂質を●，コレステロールを■で示した．
5個の試料の平均値±標準偏差

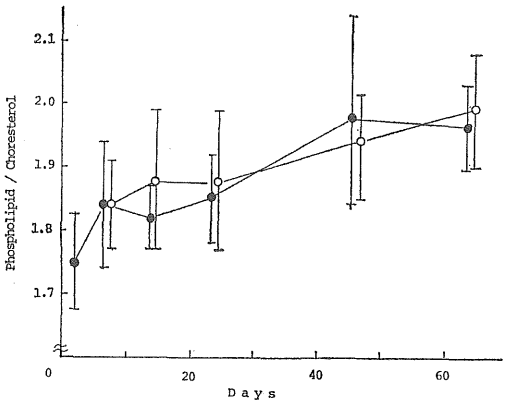


図 2.　血液の保存日数による細胞膜のリン脂質とコレステロールの存在比の変動
アデニン，イノシン添加○，Control●
5個の試料の平均値±標準偏差

したがって減少した（図1）．リン脂質は採血後1週間までは大きな変化を示さず，その後6週間まで徐々に減少した．コレステロールはリン脂質よりも減少率が高かった．このことは図2に示したように赤血球膜のリン脂質とコレステロールの存在比として表わすと，その比が1.75から2.0へと変化しており，明らかである．

細胞内 ATP レベルは添加したアデニン，イノシンの濃度が 0.67mM，6.7mM と従来の方法にくらべて低かったため，6～8週間後には約0.3～0.4μ moles/m*l* Cell と低下した．ATP レベルとリピッドの関係であるが，リン脂質含量はアデニン，イノシン添加群が対照よりやや高い傾向にあり，ATP 濃度との関係が示唆された．コレステロールは6週間目ではアデニン，イノシン添加群がコントロールに比べてやや高くなった．ATP レベルとリピッドの関連性については，今回の実験ではアデニン，イノシン添加による ATP レベルの上昇が不充分だったので，今後さらに完全な条件下で ATP レベルの高い標品を得て検討する予定である．

考　察

保存血の細胞内 ATP 含量はアデニン，イノシンを加えて保存することによって8週間後も正常に近い値を示すことが知られている[7-10]．その形，浸透圧溶血抵抗値，輸血後寿命も新鮮血に近い[7-10]．さらに8週間を経過した ACD 保存血もアデニン，イノシンを加えて37℃インクベートするとほぼ正常に近い ATP レベルにもどる．このとき形，および輸血後寿命は改善されるが，浸透圧溶血抵抗値は改善されない[2-6,23]．赤血球の老化にはいくつかの段階があるが，ATP により可逆的に回復するものとしないものにわけることができる．

著者らは赤血球膜構造と老化による変化の解明を目的に，ATP レベルとリピッド組成の関係について検討を加えることを試みた．保存血の赤血球膜リピッドは保存日数にしたがって減少すること，膜のリン脂質とコレステロールの存在比は変化しないことなどが報告されている[24,25]．また中尾ら[8]はアデニン，イノシンを添加したACD 保存血の血清コレステロールがコントロールに比べて低く，むしろ新鮮血に近いと間接的に膜リピッドとATP の関係を述べている．また最近血液を37℃で12時間以上グルコースを加えない条件下でインクベートするとスペクトリンを含まず，リピッドが無傷の赤血球に比べて約2倍ある小胞が遊離してくるとの報告があり[15]，赤血球の老化との関連性から興味が持たれる．

著者らの結果でも4℃で保存すると6週間までは赤血球膜のリン脂質，コレステロールともに減少した．しかし，コレステロールの減少率がリン脂質より高く，図2に示したように，リン脂質／コレステロール（存在比）が上昇している．これについては今後くわしく調べる予定である．

細胞内のATP 量との関連であるが，リン脂質の減少はATP レベルと関係していることを示唆している．コレステロールもややその傾向にあった．今後アデニン，イノシンの濃度を4 mM，40mM程度にして細胞内ATP レベルを8週間まで正常に近い状態に保ったものを用いて，リン脂質，コレステロールおよびリン脂質／コレステロール（存在比）について再度検討をする予定である．またリン脂質組成についても，細胞内ATP 濃度と比較して検討する予定である．

要　約

赤血球の保存日数と赤血球内ATP レベルと膜を形成するフォスフォリピッド，コレステロールの変化を経時的に調べた．ATP 濃度はアデニンとイノシンを添加することによって調整した．8週間の保存期間における観察で次のような結果をえた．

1) 赤血球のリン脂質およびコレステロールは保存日数にしたがい6週間まで徐々に減少した．

2) コレステロールの減少率はリン脂質の減少率より大きかった．

3) リン脂質およびコレステロールの減少は，赤血球のATP レベルに関連していることが示唆された．ATP レベルを高めて影響をくわしく検討する予定である．

文　献

1) Rapoport, S.: *J. Clin. Invest.*, 591, 616, 1974
2) Nakao, M., T. Nakao, M. Tachibana, H. Yoshikawa, and H. Abe: *Biochim. Biophys. Acta*: 32, 564, 1959
3) Nakao, M., T. Nakao, M. Tachibana, and H. Yoshikawa: *J. Biochem.*, 47 661, 1960
4) Nakao, M., T. Motegi, T. Nakao, S. Yamazoe, and H. Yoshikawa: *Nature*, 191, 283, 1961
5) Nakao, M., T. Nakao, and S. Yamazoe: *Nature*, 187, 954, 1960
6) Nakao, M., T. Nakao, S. Yamazoe, and H. Yoshikawa: *J. Biochem.*, 49, 487, 1961
7) Nakao, M., T. Ozaki, K. Nagano, and T. Nakao: *Pro. XI Congress of Inter. Soc. Blood Transfusion*, 746, 1966
8) Nakao, M.,T. Nakao, H. Yoshikawa, T. Wada, H. Takaku, and K. Nakao: *Pro. 8th Congr. Int. Soc. Blood Transfusion Tokyo 1960*, 455, 1962
9) Nakao, M., T. Nakao, Y. Arimatzu, and H. Yoshikawa: *Pro. Japan Acad.*, 36, 43, 1960
10) Wada, T., H. Tanaka, K. Nakao, M. Nakao, and Y. Yoshihama: *Pro. Japan Acad.*, 36, 619, 1960
11) Sheetz, M. P. and S. J. Singer: *J. Cell Biology*, 73, 638, 1977
12) Birchmeier, W. and S. J. Singer: *J. Cell Biology*, 73, 647, 1977
13) Gazitt, Y., I. Ohad, and A. Loyter: *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 72, 1359, 1976
14) Shukla, S. D., M. M. Billah, R. Colemman, J. B. Finean, and R. H. Michell: *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 48, 1978
15) Lutz, H. U., S.-C. Liu, and J. Palek: *J. Cell Biology*, 73, 548, 1977
16) 太田英彦：蛋白質核酸酵素 別冊 生体膜実験法，64，1974
17) Dodge, J. T. and G. B. Philips: *J. Lipid Research*, 8, 667, 1967
18) Bartlett, G. R.: *J. Biol. Chem.*, 234, 466, 1959
19) 下条　貞：生体膜実験技術，129，1967，南江堂
20) 北村元仕：臨床化学分析Ⅲ，72，1966，東京化学同人
21) Zlatkis, A. B., B. Zak, and A. J. Boyle: *J. Lab. Clin. Med.*, 41, 486, 1953
22) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
23) Nakao, K., T. Wada, T. Kamiyama, M. Nakao, and K. Nagano: *Nature*, 194, 877, 1962
24) Haradin, A. R., R. I. Weed, and F. Read: *Transfusion*, 9, 229, 1969
25) Winterbourn, C. C. and R.D. Batt: *Biochim. Biophys. Act*, 202, 1, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 158-160, 1978

ラット尿中の蛋白質（第2報）
γ-GTP, LDH, ALP を示標とした腎障害と尿中酵素との関連

中尾順子*, 道源正子*, 樺島順一郎*

Proteins in Rat Urine(II)
Relationship of Kidney Function and Excretion of γ-GTP, LDH, and ALP in Rat Urine

TOSHIKO NAKAO*, MASAKO DOGEN* and JUNICHIRO KABASHIMA*

緒　言

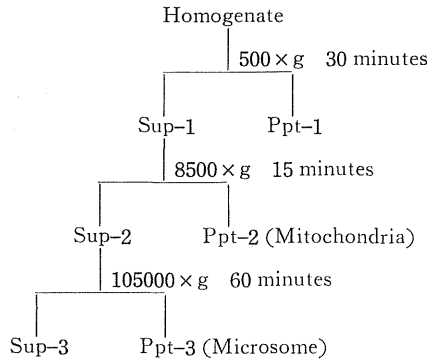
カドミウム，クロムなど重金属は腎障害の著しい毒物である．クロムの急性中毒では腎機能障害が死因であるといわれている．またカドミウムは細尿管障害の結果，タンパクの喪失が起るといわれている．ラットやマウスなど小動物では腎毒性の検出法は病理標本のみが可能であった．代謝ケージを用いてラット尿中に飼料中のタンパクの混入がなく，ラットでも尿検査により病状の推定が可能なことを，ラット尿中のタンパクの分析を行ない昨年報告した．

本報告はカドミウム，クロムを皮下投与によりラットに与え，尿中に排出されるタンパク，酵素，乳酸脱水素酵素（以下 LDH と略す），アルカリホスファターゼ(以下 ALP と略す)，γ-グルタミルトランスペプチダーゼ[1]（以下 γ-GTP と略す）の活性の変動を追跡し，人間における症状と障害部位と酵素との関係を比較し，あわせて考察し，作用部位の考察を行なった．

実験方法および材料

ラット JCL-SD 系4週令，体重65—75g の雄，5匹を1群とし，メタボリカ中で1週間予備飼育の後，$CdCl_2$ 1.5mg/kgを皮下に連日投与し，$Na_2Cr_2O_7$は 5 mg/kg を1回皮下に投与した．体重の変化を記録し，尿を毎日採集した後，タンパクと酵素活性を測定した．投与後11日目と31日目に動物を屠殺し，血中の酵素活性を測定した．また肝，腎を10倍容の 0.25M Sucrose でホモゲナイズして，表1の方法で分画し，ホモヂネート，核，ミトコンドリア，ミクロソームおよび上清の各分画についてそれぞれ酵素活性を測定して，臓器中の酵素の変動をしらべた．

Table 1. Cell Fractionation



酵素活性の測定法：尿，血清，各臓器分画の20—25μlについて，LDH は Wacker の方法を用いたキット(ヤトロン製）で測定し，単位は Wróblewski 単位/ml で示した．ALP は kind-king 変法を用い，単位はking-Armstrong 単位/dl で示した．γ-GTP は Orlowski 法を改良したキット（ヤトロン製）で測定し，単位はミリ単位 /ml で示した．

結果および考察

尿中酵素の変動は図1—a，b，cに示した．タテ軸は活性の強さを示し，ヨコ軸は投与後の日数を示した．a は LDH，b は ALP，c は γ-GTP，を示した．また血清中の臨床化学検査の結果は表2のようであった．肝と腎の各分画の酵素活性は表3と表4に示した．

カドミウムとクロムの投与では尿中酵素の排泄は対照実験を中心にして，カドミウムでは低下を示し，クロムでは上昇を示した．血清中の LDH はクロムおよびカドミウム投与で，投与後11日目では約16%上昇している．しかし尿中に排泄された LDH はクロムでは血清同様に，最高21%上昇し，カドミウムでは血清の上昇にもかかわらず低下を示した．

尿中 γ-GTP は LDH によく似た経過を示し，クロ

* 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

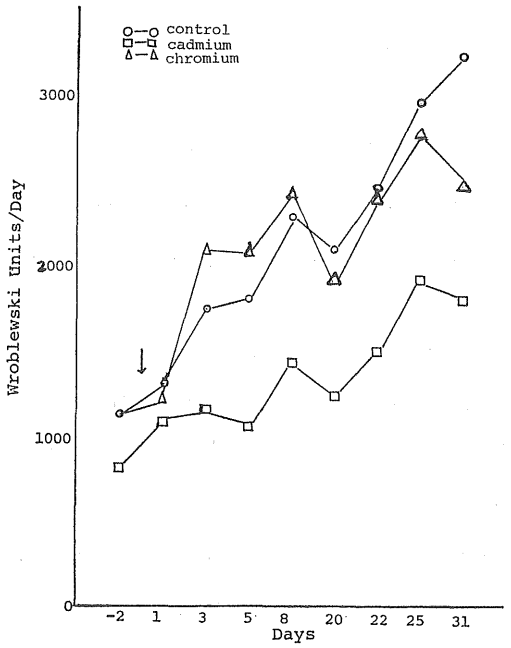


Fig. 1-a. LDH in Rat Urine

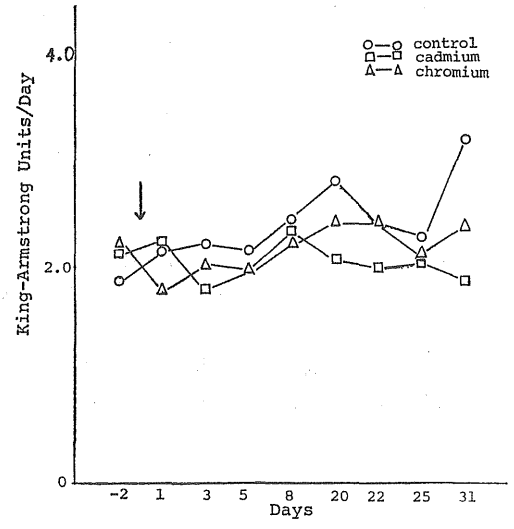


Fig. 1-b. ALP in Rat Urine

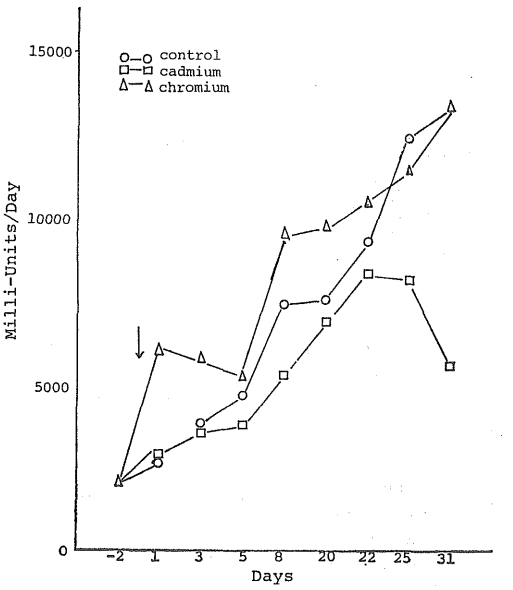


Fig. 1-c. γ-GTP in Rat Urine

ムで上昇し，カドミウムで低下を示した．ただし血清中では，γ-GTP 活性はほとんど認められず，従ってカドミウム，クロムによる活性上昇もなかった．

腎の各分画の酵素活性は LDH，ALP，γ-GTP ともにクロム，カドミウムによってみるべき変化がなかった．

肝の各分画における酵素活性の変動はミクロソームで ALP はカドミウム投与により対照の2倍以上に上昇してクロム投与では変化がみられなかった．γ-GTP はカドミウム投与により約10%減少し，クロム投与により投与後11日目で約23%，31日目で約50%減少しているのがみられた．γ-GTP は腎に非常に高く，本酵素はアミノ酸の透過に関係している[1]といわれ，細尿管の微絨毛中に活性が高いといわれている[1]．肝の γ-GTP 活性は低く，ラットでは人間の場合とは異なり[2]，血清中にはほとんど検出されなかった．人間では肝胆道疾患で上昇するが，病気の快復に密接に関連するとの報告がある[3]．しかしラットでは肝の γ-GTP は低く，血清中にも認

Table 2. Biochemical Values in Serum of Rats

		GOT K. U/ml	GPT K. U/ml	GLU mg/dl	UN mg/dl	CHO mg/dl	TP g/dl	ALP KA. U/dl	CHE ΔpH	LDH W. U/ml
11 Days	control	162.4±19.24	34.8±3.03	150.4±5.02	19.9±1.55	65.6±9.94	5.8±0.30	68.6±13.66	0.166±0.038	1274±251.80
	chromium	172.4±22.28	34.6±2.88	145.2±9.88	18.2±2.79	65.4±3.50	5.7±0.18	49.2±8.70	0.174±0.030	1541±204.28
	cadmium	178.6±16.47	34.6±4.82	131.4±4.27	17.9±1.08	43.4±18.55	4.8±0.80	43.0±9.43	0.120±0.031	1500±318.37
31 Days	control	191.2±22.21	41.8±4.08	121.0±1.00	21.2±1.75	62.6±10.78	6.2±0.28	45.6±10.57	0.146±0.046	2643±502.82
	chromium	203.2±22.76	44.8±2.16	113.0±11.91	22.5±1.54	64.6±7.02	6.3±0.15	55.2±19.67	0.154±0.027	2363±454.70
	cadmium	207.6±20.36	44.6±5.31	116.8±5.58	16.7±1.03	50.6±5.12	6.1±0.25	28.4±7.50	0.144±0.013	2010±465.88

Table 3. Enzyme Activities of LDH, ALP, γ-GTP in Microsomal Fraction of Rat Liver

Enzymes \ Days	CONTROL		CHROMIUM		CADMIUM	
	11	31	11	31	11	31
LDH Wróblewski-U. /gtissue	30024±5952	26273±2678	23337±2192	22993±7436	21067±5201	24895±709
ALP KA. U/gtissue	0.17±0.06	0.10±0.03	0.19±0.02	0.10±0.02	0.42±0.17	0.21±0.04
γ-GTP Milli-U. /gtissue	186.7±58.1	167.6±43.3	145.2±38.1	84.6±19.4	163.1±84.4	157.8±41.0

Table 4. Enzyme Activities of LDH, ALP, γ-GTP in Microsomal Fraction of Rat Kidney

Enzymes \ Days	CONTROL		CHROMIUM		CADMIUM	
	11	31	11	31	11	31
LDH Wróblewski-U./gtissue	4794±564	2459±279	5067±414	2300±422	4630±1151	3046±171
ALP KA. U/gtissue	54.1±14.5	27.3±2.4	56.7±9.6	28.4±7.7	59.9±13.6	30.1±6.8
γ-GTP Milli-U./gtissue	546226±78750	352551±48678	597467±58655	346825±39960	524270±77520	360056±33156

められなかった.

尿中の酵素活性の変動は，腎障害を示していると考えることができる．人間における慢性腎炎では尿中排出の低下を示し，ネフローゼでは上昇を示した[4]．動物実験でγ-GTPに関する報告は全くないところから単純に推定すると，カドミウム投与では慢性腎炎型であり，クロム投与では細尿管障害が主たる障害ではないかと考えられる．LDH活性はγ-GTPと相関を示した．尿中LDHは人間の場合は腎障害との関連は明らかでない．しかし分子量の大きいLDHの尿中での低下が糸球体ろ過の障害であるか細尿管の吸収促進であるかは結論できないが，γ-GTPとの関連により糸球体の障害を示しているのかもしれないが，結論は今後の研究にまたねばならない．

本実験ではカドミウムとクロムの投与方法が異なるので，正確な対比をするのは無理かと考えられるが，カドミウム投与での電顕像からほとんど障害が認められなかったことから考えても，本法は非常に鋭敏に早期の腎障害を検出し得る方法と考える．またこの障害が一時的なものであるのか否かを知るためには更に研究をすすめている．

文　献

1) Thiele, K.G. : *klin. Wschr.* 51, 339, 1973
2) Tate, S. and A. Meister : *J. of Biol. Chem.* 249, 7593, 1974
3) 山内雅博ら：臨床病理 25-9, 744, 1977
4) 長裕子ら：臨床病理 25-9, 921, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 161-165, 1978

マウス包皮腺の微細構造と去勢後の変化

三栗谷 久 敏*, 福 森 信 隆*, 平 賀 興 吾*

Electron Microscopic Observations of Preputial Gland on Non-treated and Castrated Mice

HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

緒　　言

包皮腺は脂腺の一種で複合胞状型の全分泌腺[1]に属し，げっ歯類で良く発達している．

マウスではその分泌機能は旺盛で，Ozawa[2]の報告によると腺細胞中に多量の脂肪滴，良く発達した同心円状の滑面小胞体（SER），大きな顆粒を持つ糸粒体などが特徴的な形態として観察されている．また包皮腺の分泌機能は性ホルモンの影響を受けている[3,4]と言われているが，これまで去勢に関しての報告はみない．

そこで今回著者らは，マウスの去勢を行い包皮腺の微細構造を観察したので報告する．

実験材料および実験方法

動物は ICR 系雄性マウス（体重36～39g）10匹を用い，5匹を無処置とし，残り5匹は睾丸摘出の去勢を行った．これらの動物は日本クレア製 CE-2 固型飼料で3週間飼育後断頭と殺し，速やかに包皮腺を摘出，重量測定を行い電顕試料とした．

電顕試料は約1 mm^3 に細切し，3％パラホルムアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.3）で4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（0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.3）で1.5時間後固定を行った．以下定法に従いエタノール脱水，QY-1を通して Epon 812-Araldite M 混合樹脂に包埋した．包埋した電顕試料の厚さ約1 μ 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ニルおよびクエン酸鉛で二重染色を施し，HU-12A 型電顕にて腺細胞を中心に観察した．なお，無処置マウス包皮腺の微細構造を正常構造とした．

観 察 結 果

無処置動物（正常構造）：マウス包皮腺は基底膜に囲まれた腺房，腺房間に存在する結合組織，分泌物の排出導管で構成されており，腺房内の腺細胞はその中心に向う程分化が進み，分化程度に応じて特徴的な形態が観察された．

腺房辺縁の腺細胞は未分化で脂肪滴を含まないが，豊富なリボゾーム，粗面小胞体（PER）がみられた．しかし SER はほとんど認められなかった．糸粒体は桿状形が多く，基質内に1～数個の電子密度が高い大きな顆粒を持つのが特徴的であった．核は楕円形で大きく，また細胞境界にはデスモゾームが散見された（図1）．

腺房中間部の腺細胞は分化しつつある細胞で数層の細胞から成り，腺房の中心に近い細胞程脂肪滴が多く存在していた．またこの部の腺細胞では SER と思われる層状構造が同心円状を成しきわめて良く発達しており，多くはその中心に脂肪滴を入れていた（図2，3）．RER は細管状に少量認められた．ゴルヂ体は SER と類似しており，区別が困難であった．リボゾームは豊富に存在し，その多くはポリゾームとして認められた．糸粒体は桿状形および円形が多く，腺房辺縁部の腺細胞と同様基質内に1～数個の電子密度が高い大きな顆粒を認めた（図4）．また単位膜に囲まれ，内部に電子密度が中等度の粒状物質を有するミクロボディ様小体が散見された（図3，4）．

腺房中心部の腺細胞は完全に分化した細胞で多量の脂肪滴で占められ，細胞質は少なくその電子密度は高くなっていた．核は圧迫され縮少しており，他の細胞小器官はその微細構造が不明瞭であった（図5）．

去勢動物：肉眼的に包皮腺は大きさが縮少してみられ，重量測定の平均値を比較すると無処置では絶体重量95.5mg，体重10g当りの重量24.9mgであり，去勢動物では絶体重量46.1mg，体重10g当りの重量12.2mgを示し，去勢動物の包皮腺重量は著明に減少していた．

腺房辺縁部の腺細胞では正常構造と比較し著変は認められなかった（図6）．

腺房中間部の腺細胞では正常構造と比較し脂肪滴および同心円状の SER の数が減少傾向を呈し，同時に脂肪

* 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

滴を中心に入れた SER の層も減少している感があった．また細管状の RER が一部認められた．他の細胞小器官は正常構造とほぼ同様の形態を呈した（図6）．

腺房中心部の腺細胞で細胞質の電子密度が増していた．脂肪滴は腺房中間部の腺細胞に比較し増加していた．また同心円状の SER が認められ，多くは脂肪滴をその中心に入れていた．糸粒体は膜構造が不明瞭であったが，糸粒体内顆粒は明確に認められた．リボゾームは豊富に認められた．核は辺縁がやや不整で萎縮の感があったが比較的大きく，核小体も発達していた．ゴルヂ体は認められなかった（図7）．

考　察

今回正常腺細胞中に多くの脂肪滴と良く発達した同心円状の SER が観察された．SER の発達は包皮腺腺細胞以外では脂腺細胞，精巣の間細胞，卵巣の黄体細胞および副腎皮質細胞のようなステロイド産生細胞でもみられる[5]．

Ozawa[2] はマウスにテストステロンを投与し，その結果包皮腺腺細胞に SER の高度な発達を観察し，また諸橋[5] はラットにエストロゲンを投与し，脂腺細胞で脂肪滴の減少と SER の発達不良を観察している．今回の観察で去勢したマウス包皮腺腺細胞は正常構造と比較し，脂肪滴がかなり減少しており，SER の発達も中程度であった．包皮腺重量の減少は，この脂肪滴の減少が原因の一つと思われる．また腺房中心部の腺細胞でも正常構造にみられる様には分化しておらず，SER や糸粒体などの細胞小器官が散見された．これらのことから包皮腺は性ホルモンに依存性があり，性ホルモンは SER に影響を与え，その脂肪滴生成に関与していると思われる．

分化しつつある腺細胞で Ozawa[2] はゴルヂ体の存在を報告しているが，今回の観察では SER との区別が困難であった．形態的に良く発達したゴルヂ体は槽が伸長し層状構造を呈するため，SER の構造と類似して観察されたものと思われる．一方，包皮腺と同様の分泌機序を持つ脂腺では機能が亢進している時，一般の脂肪滴の分泌機序と異なりゴルヂ体を介さないで直接 SER から分泌される[5] といわれることからゴルヂ体の発達が良好でなく，そのために明確に観察されなかったとも考えられるが明らかでない．

マウス包皮腺腺細胞の糸粒体内顆粒は大きく，電子密度が高く特徴的な形態を示した．時には糸粒体基質内に4～5個認められた．これは発達した SER と同様種々のステロイド産生細胞でもみられるが[4]，それらの糸粒体内顆粒より一般に大きく明瞭である．この顆粒は去勢したマウスの包皮腺腺細胞にも存在し，大きさや数は正常構造に比較して差が認められないことから，性ホルモンによる影響を受けないものと考えられる．またこの顆粒について，一般の糸粒体内にみられる顆粒の様に2価の陽イオン[6] の吸着と関係があるのではなくて，脂肪性のものではないか[3] と言う意見もあるが，さらに今後の検討が必要と思われる．

以上，包皮腺の分泌機能は性ホルモンに依存性があると考えられ，今後去勢後の動物に性ホルモンを投与し，その変化を観察するなどさらに検討を加えたい．またマウス包皮腺にみられた糸粒体内顆粒についても，生化学など多方面からの検索が必要と考えられる．

結　語

マウス包皮腺の正常および去勢後の微細構造を観察した．その結果正常腺細胞では多量の脂肪滴，良く発達した同心円状の SER，特徴的な糸粒体内顆粒などがみられ，去勢後の腺細胞では脂肪滴や SER の減少，分化程度の遅れなどを呈したが，正常腺細胞と微細構造的に本質的な相違は認められなかった．

文　献

1) 黒住一昌：日本臨床電子顕微鏡学会誌，7(1)，1，1974
2) Ozawa, H.: *Acta Anat. Nippon*, 42, 181, 1967
3) 永野俊雄：電子顕微鏡による細胞組織図譜，3，114，1967，医学書院，東京
4) 黒住一昌：電子顕微鏡による細胞組織図譜，5，228，1968，医学書院，東京
5) 諸橋正昭：日本臨床電子顕微鏡学会誌，7 (2)，125，1974
6) Peachey, D. L.: *J. Cell. Biol.*, 20, 95, 1964

附図の説明

図1. 腺房辺縁部の未分化腺細胞（UDC）がみられる．核(N)はだ円形で大きく，糸粒体(M)は特徴的な顆粒を持っている．また小量の粗面小胞体がみられる．BM：基底膜

図2. 分化しつつある腺細胞に多くみられる同心円状の滑面小胞体（SER）を示す．M：糸粒体

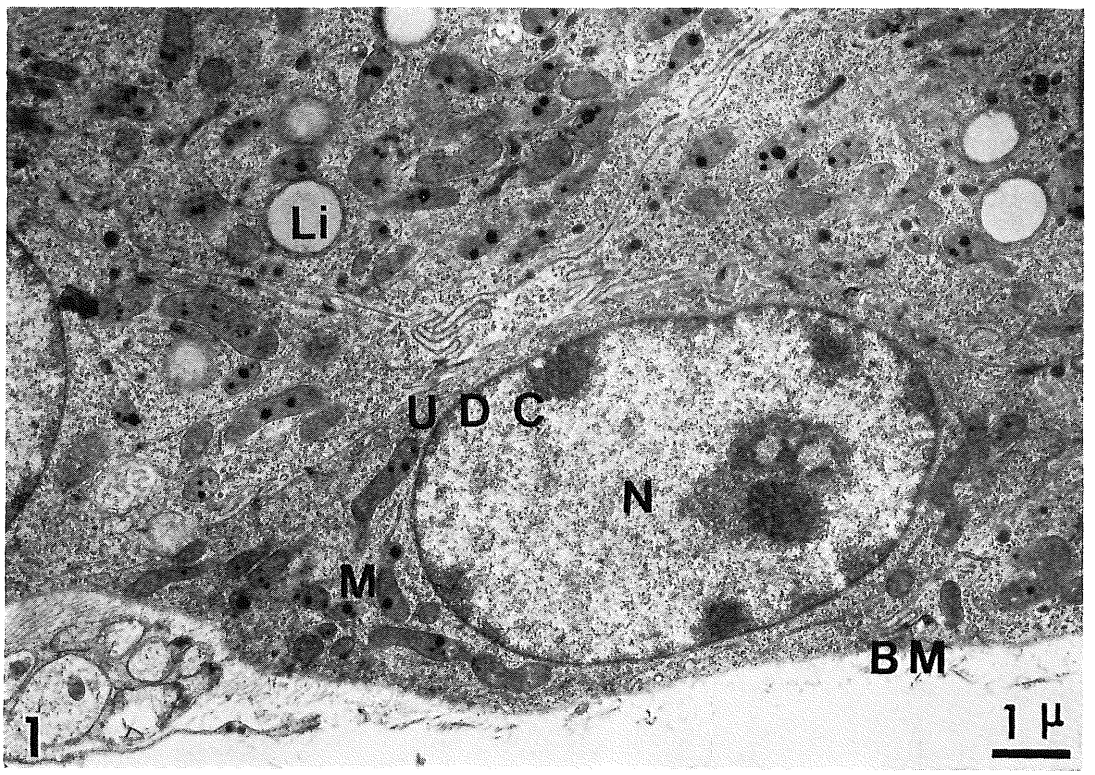
図3. 分化しつつある腺細胞に多くみられる脂肪滴(Li)を中心に入れた滑面小胞体（SER）を示す．また隣接してミクロボディ様小体(DB)がみられる．

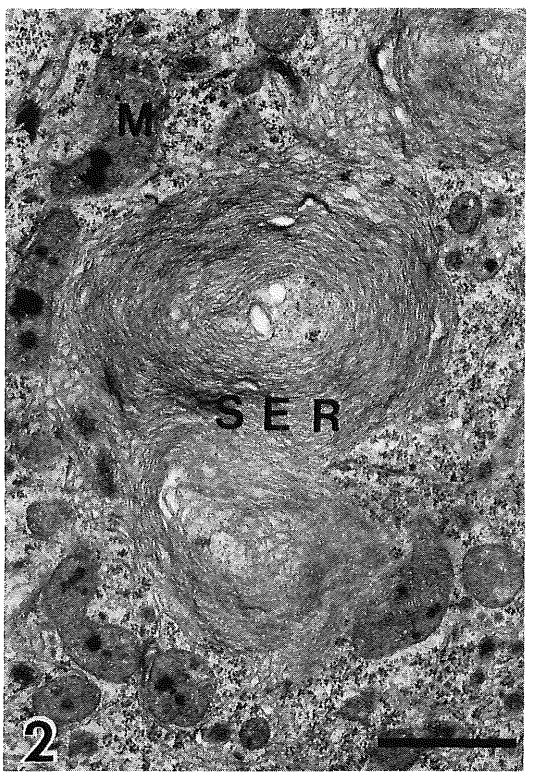
図4. 特徴的な糸粒体内顆粒(MG)を示す．M：糸粒体　N：核　DB：ミクロボディ様小体

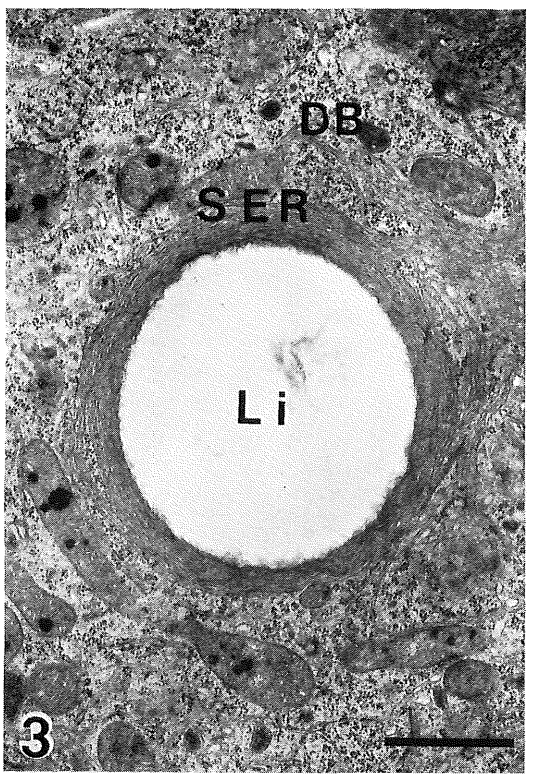
図5. 腺房中心部の腺細胞を示す．細胞質は多量の脂肪滴（Li）で占められ，核(N)は圧迫されている．また他の細胞小器官は認められない．

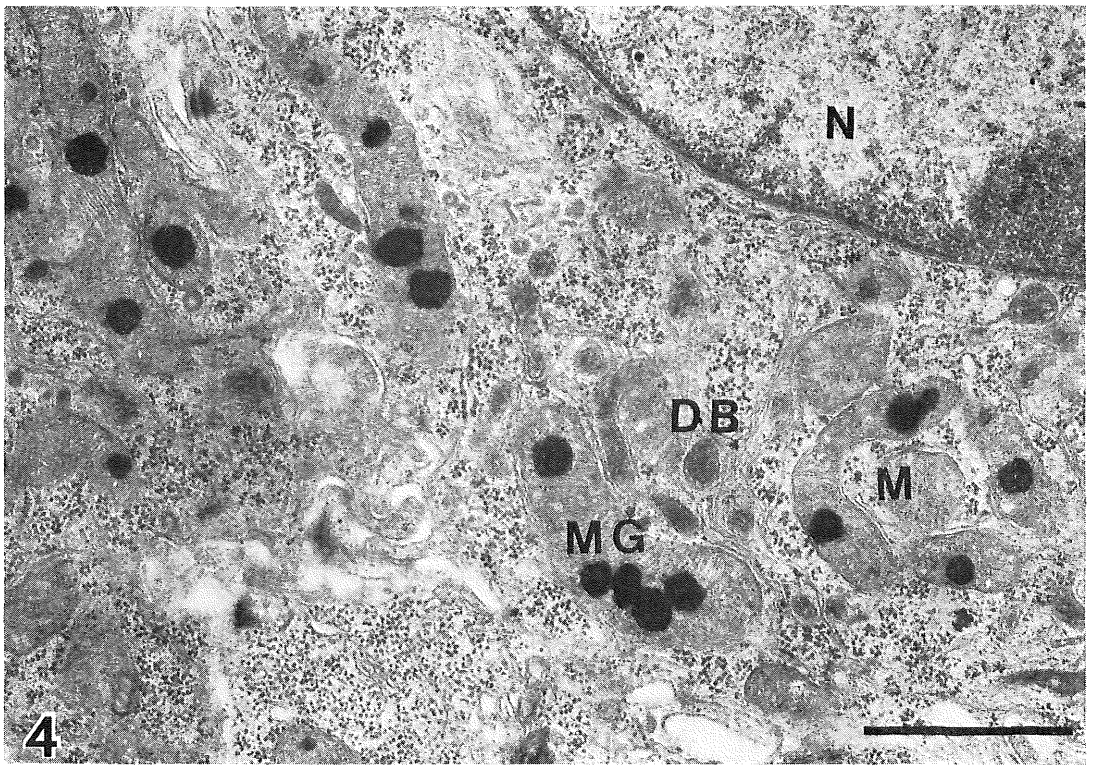
図6. 去勢後の腺細胞を示す．腺房中間部の腺細胞は脂肪滴(Li)，滑面小胞体(SER)とも減少している．UDC：未分化腺細胞　N：核　BM：基底膜　M：糸粒体

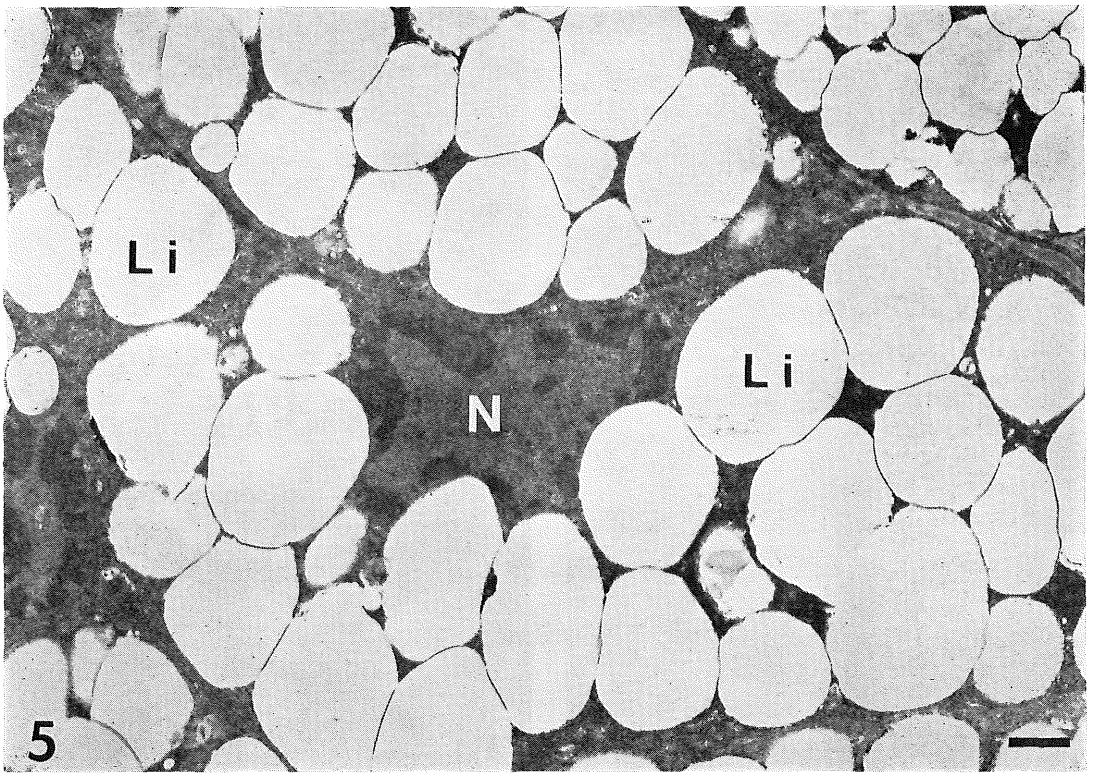
図7. 去勢後の腺細胞で，腺房中心部の腺細胞を示す．細胞質は電子密度を増し，多く脂肪滴（Li）で占められているが，細胞小器官は存在しており，滑面小胞体(SER)や糸粒体内顆粒（MG）などが認められる．N：核

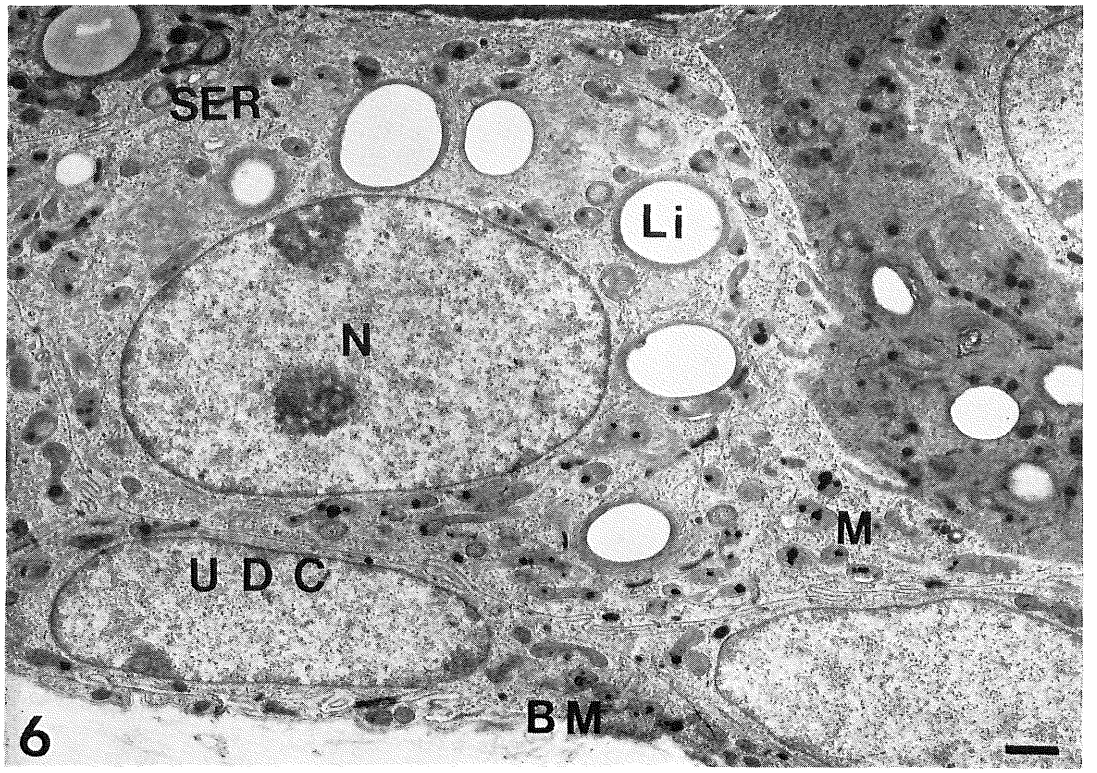

Li
U D C
N
M
BM
1μ
1

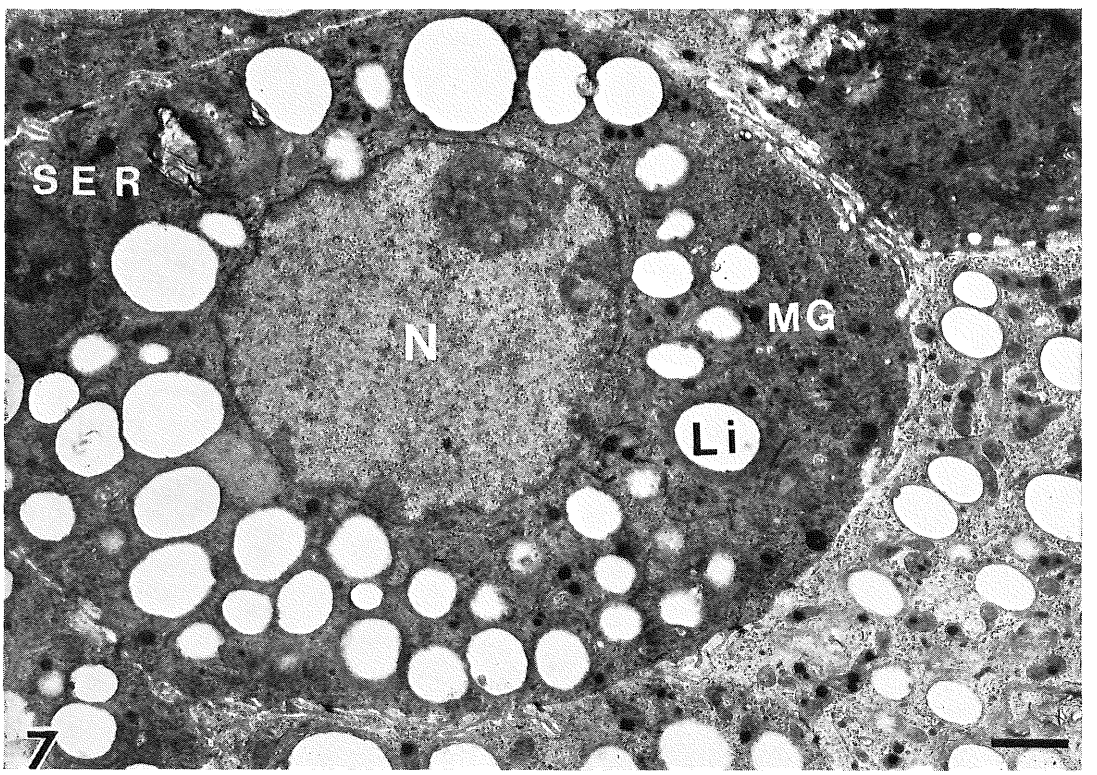

M
S E R
2


DB
S E R
Li
3


N
DB
M
MG
4


Li
Li
N
5


SER
Li
N
M
UDC
BM
6


SER
N
MG
Li
7

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-2, 167-171, 1978

姉妹染色分体交換（SCE）による変異原物質の検索（第1報）
SCE検索にあたっての基礎的研究

縄井寿美子*, 吉田誠二*, 益渕正典*, 中尾順子*
平賀興吾*

Examination of Mutagens by Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) (I)
Fundamental Experiments of Examination on SCE by Mutagens, in vitro

SUMIKO NAWAI*, SEIJI YOSHIDA*, MASANORI MASUBUCHI*,
TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

はじめに

これまで我々は，染色体の gap，break，などの形態的変異として現われる染色体異常誘起を検索する細胞遺伝学的方法を用いて，物質の突然変異原性の有無の検討を行って来た[1,2]が，これにはいくつかの問題点が考えられた．その1つは染色体異常は種々な要因により起こるので，観察されたこれらの形態的異常が真にDNAの変化を伴うものであるかどうかを判断することが困難であること，さらに染色体分析には高度の熟練と多くの労力を要すること，また gap と break の判断の基準が明確でなく統一されていないこと，有意な異常の出現のためにはかなり高濃度の薬剤を用いる必要のあることなどである．

最近，姉妹染色分体交換（Sister Chromatid Exchanges, SCEs）についての研究が細胞遺伝学をはじめとして各方面で盛んに用いられるようになり，突然変異原物質の検索にも極めて有用であることが指摘[3]されている．SCEsは，5-bromo-2′-deoxyuridine (BUdR) を含む培地中で2細胞周期の間細胞を培養し，固定，螢光染色，紫外線照射の後ギムザ液で染色すると，各々の染色体の染色分体が一方は濃く他方は淡く染め分けられて現われる(Fig. 4)ことにより，突然変異原性，染色体異常誘起性，あるいは発癌性物質が起こした染色体の組換えを容易に検出できるものである．

このようなSCEs誘起に基づく変異原物質の検定は，染色体異常による検出法のいくつかの問題点を解決しているように思われる．すなわちSCEsはDNAの変化に起因すると考えられており，その集計方法は簡単で，単に交換の生じた切断部位を数えればよく，特に熟練を必要としないこと，またSCEsは染色体異常を生じる濃度よりかなり低い濃度でも誘起される鋭敏なものであること[4]などであるからである．以上の点を考えて，我々はこれまで行って来た染色体異常誘発試験に加えて，SCEsによる検索を細胞レベルでの変異原性の検定法として用いることとし，そのための基礎的な知見を得るために実験した．

SCEsはBUdRの濃度[5-7]，用いる細胞の種類，培地に添加される血清の種類や量[8]などによってもその値に違いが生ずるといわれており，我々はまず，BUdRの添加時間を決めるために必要なCHO-Kl細胞の細胞周期をオートラジオグラフィーにより測ることから始め，この結果に基づいて，さらに使用するBUdRの濃度を決めるため，種々の濃度のBUdRを添加して，本細胞に染色体異常を誘起せず，またSCEsも本細胞の"自然に生じた"SCEsと考えられる一定の低い値に留まる濃度を求める実験を行った．これらの結果よりSCEs検索の本細胞における条件を定め，突然変異誘起物質としてよく知られているMitomycin C (MMC), Methylmethanesulfonate (MMS), Ethylmethanesulfonate (EMS) についてSCEs誘起の実験を行って，その用量—効果関係の有無を調べ，変異原物質検定法としての本法の有効性を検討したので報告する．

材料および方法

細胞および培養：チャイニーズハムスター卵巣由来CHO-Kl株，10%仔牛血清添加F-12培地を用い，角型培養ビンあるいはラブテックフラスケットにて密栓培養した．

試薬：仔牛血清（極東製薬工業），F-12培地（日本製薬），^{3}H チミジン(The Radioactive centre 25Ci/mM)，チミジン（和光純薬工業），ミクロオートラジオグラフィー用乳剤（NR-M_2，小西六写真工業），現像液（コニドールX，小西六写真工業），ギムザ液（MERCK），

* 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

BUdR (SIGMA) 溶液：蒸留水に溶かして各々Table 1の最終濃度とした，buffer：0.06M Na_2HPO_4 51%に0.06M KH_2PO_4 を49%の割合に混ぜ，pH 6.8とした，33258 Hoechst (和光純薬工業)，MMC (協和発酵工業)，MMS (EASTMAN KODAK)，EMS (EASTMAN KODAK)

オートラジオグラフィー

ラブステックフラスケットで細胞を48時間密栓培養したのち，1μCi/ml の^{3}Hチミジンを添加した培地で15分間培養し標識した．この後直ちに100倍量のチミジンを加えた培地で洗い，正常培地で3回洗浄したのち培養した．標識後種々な時間培養した細胞をカルノア液（メタノール3：酢酸1）で固定，デッピング法により乳剤処理を施し，5℃で1週間露光し，現像の後2%ギムザ液にて染色した．

染色体標本の作製

細胞を培養ビンに播種し，48時間密栓培養したのち，培養ビンをアルミホイルで被って完全に遮光し，0.1ml BUdR 溶液を 9.9ml の培地中の細胞に添加し，そのまま26.5時間培養した．固定の1.5時間前に中期の細胞を集めるために 0.1μg/ml のコルセミドを添加した．ここまでの操作は，BUdR を添加した細胞がS期に可視光線に触れると多くの SCEs を引き起こす[7,9,10]ところから，暗くして行った．常法により細胞を集め，低張液(0.075M KCl 溶液)を加え37℃で15分処理，カルノア液で2時間以上固定したのち火焔乾燥法により標本を作製した．標本は染色体異常観察用のものはそのまま2%ギムザ液で染色し，SCEs 観察用のものは以下の操作を行った．まず buffer に 1μg/ml に 33258 Hoechst を加えた液で約10分間染色し，buffer で洗ったのち標本上にさらに buffer をマウントしてカバーグラスで被い，約10分間紫外線を照射した．この間標本が乾かないよう時々 buffer を加注した．こののち標本を蒸留水で軽く洗い，風乾してから2%ギムザ液で染色した．

変異原物質での処理

3種の試薬については添加直前に培地にて溶かし，Table 2 に示した最終濃度になるよう調整した．細胞を実験の48時間前に播種しておき，BUdR を最終濃度 0.5 μg/ml となるように細胞に添加し，この時，同時に検査試薬を加え，27時間培養した．染色体標本作製法と同様な操作で SCEs 検索標本を作製し，それぞれ50細胞観察してその平均および標準誤差(S. E)を求め，t 検定にかけた．

結　果

細胞周期の測定：標識，染色した標本について，各点中期の細胞をそれぞれ100個観察し，標識されている細胞の割合を求めて Fig. 2 を作製，細胞周期を調べた．すなわち細胞の分裂周期(Generation time)は，^{3}H チミ

Table 1. Frequencies of SCEs and Chromosomal Aberrations in Cells with BUdR Concentrations for 26.5h. before Fixation

BUdR dose (μg/ml)	No. of cells observed	observation of SCEs SCEs/cell (± S. E)	observation of chromosomal aberrations total aberrations	total breaks chromatid type	total breaks chromosom type	total gaps chromatid type	total gaps chromosom type	total inter-exchanges	total other aberrations
Control	200		4	0	0	3	0	0	1
0.25	50	5.10±0.28							
	200		2	0	0	2	0	0	0
0.50	50	5.04±0.33							
	200		1	0	0	0	0	0	1
1.0	50	6.52±0.35							
	200		4	0	0	2	0	0	2
2.5	50	6.88±0.48							
	200		12	2	0	4	0	5	1
5.0	50	7.08±0.34							
	200		9	1	2	3	0	3	0
10.0	50	7.62±0.46							
	200		44	8	2	16	0	17	1
20.0	50	10.02±0.44							
	200		74	11	1	43	2	13	4
40.0	50	13.10±0.58							
	200		104	17	1	69	4	11	2

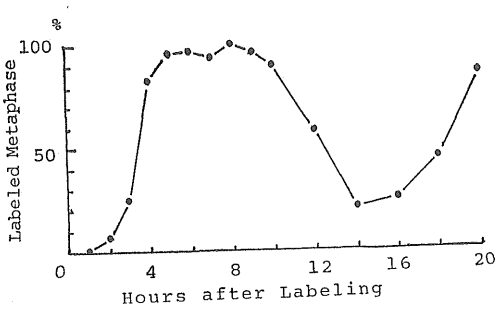


Fig. 1. Percentage of labeled metaphases at different hours after a pulse labeling with ^3H thymidine. CHO-Kl cells were incubated in ^3H thymidine for a 15min period ending at zero time. Values for generation time, G_1, S, and G_2 period were determined from this graph, as 15, 3.7, 8.8, and 2.5 hours.

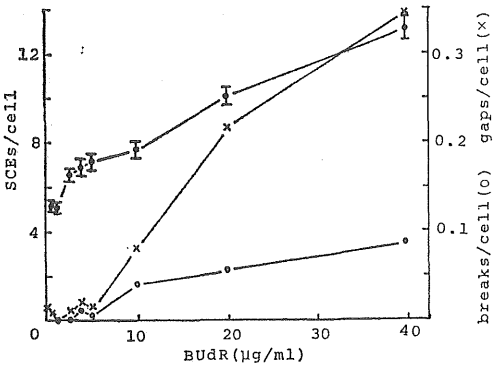


Fig. 2. Frequencies of SCEs (•), chromatid breaks (○) and chromatid gaps (×) in CHO-Kl cells treated with BUdR at various concentrations for 26.5 hours before fixation. By this consequence, BUdR dose for its labeling method was determined at 0.5μg/ml.

ジン添加時からラベルされた中期細胞のパーセントカーブの最も下降する点までの間か，もしくは2相の上昇カーブの50%値の間として示される．従って本細胞ではおよそ15時間である．DNA 合成期(S期)はカーブの50%値の間でおよそ8.8時間，分裂期（M期）の一部を含む間期（G_2 期）は標識時から上昇カーブの50%値までで，およそ2.5時間，従ってM期とDNA 合成準備期（G_1期）は15－（8.8+2.5）=3.7で3.7時間となる．

以上の結果より SCEs 検索に要する BUdR の添加時間は，2回のS期を通すという条件から26.5～27時間が適当である．

BUdR 濃度の決定：Table 1 に示した種々の濃度の BUdR を添加し，染色体標本作製法により作製した標本について，染色体異常は200個のよく拡がった中期細胞を観察し，各々の細胞について gap，break などの異常を数えた．また SCEs についてはよく拡がり分染された中期の染色体50細胞を観察し，1細胞ごとの SCEs の数を記録し，細胞あたりの平均および S.E を求めた．

結果を Table 1 および Fig. 2 に示す．SCEs については，BUdR 濃度 0.25μg/ml および 0.5μg/ml では1細胞あたり5.10，5.04とほぼ等しい低い値を示すが，1μgから40μg までは徐々に増加した．一方染色体異常は SCEs に比べてその数は非常に少なく，最大濃度の40μg でも1細胞あたりでは0.085の染色分体型break，および0.345の gap を示したに過ぎなかった．またその増加は gap，break とも BUdR 濃度 10μg ではじめて示された．この他の異常としては染色体間交換（inter-exchange）が 10μg で増加をみせたが，それ以上では反対にやや減少の傾向を示した．なお二動原染色体（dicentric chromosome）および環状染色体（ring chromosome）が Table 1 に示した他の異常として若干出現した．

以上の結果より，BUdR 濃度は break，gap ともにみられず，SCEs も低い 0.5μg/ml を用いることとした．

変異原物質の SCEs への効果：結果を Table 2 および Fig. 3 に示す．観察した細胞は Fig. 4 に示したごとく，染色分体の明暗がはっきりと分染されていた．対照は細胞あたりの平均値が5.03と，BUdR の基礎実験値とほとんど変らなかった．MMC，MMS，EMS とも

Table 2. Frequencies of SCEs in Cells Treated with MMC, MMS, EMS at Various Concentrations for 27h. before Fixation

Substance	dose (mol/ml)	No. of cells observed	SCEs/cell (±S.E)	p<0.001
Control	—	100	5.03±0.20	
MMC	10^{-9}	50	5.66±0.36	−
	5×10^{-9}	50	6.30±0.36	+
	10^{-8}	50	9.58±0.47	+
	5×10^{-8}	50	12.04±0.50	+
	10^{-7}	50	31.42±0.92	+
	5×10^{-7}	50	42.22±1.04	+
MMS	5×10^{-7}	50	4.98±0.29	−
	10^{-6}	50	6.66±0.39	+
	5×10^{-6}	50	7.34±0.35	+
	10^{-5}	50	18.74±0.64	+
	5×10^{-5}	50	29.24±0.87	+
EMS	10^{-5}	50	6.54±0.42	+
	5×10^{-5}	50	6.92±0.32	+
	10^{-4}	50	7.82±0.37	+
	5×10^{-4}	50	14.82±0.50	+
	10^{-3}	34	22.32±1.10	+

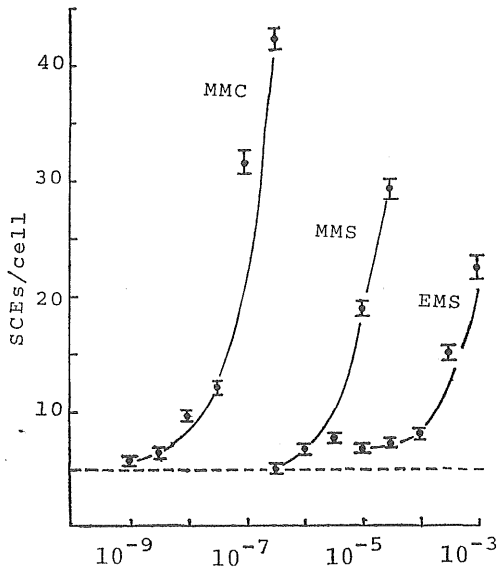


Fig. 3. SCEs induced by chemical mutagens, MMC, MMS, EMS at various concentrations in CHO-Kl cell. Dose response curves of induced SCEs were showed obviously on this figure. The break line is control level.

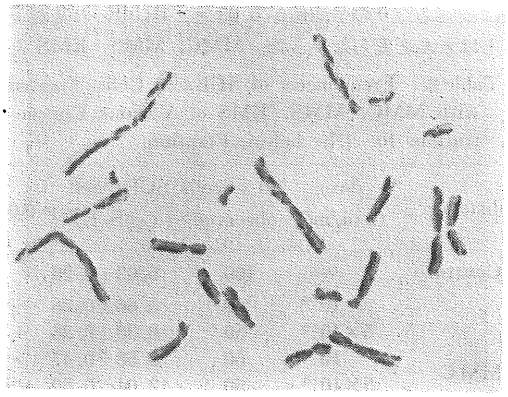


Fig. 4. SCEs in CHO-K1 cell treated with 5×10^{-7} M MMC. 45 SCEs were observed in metaphase chromosomes as bright or dark parts.

に濃度の増加とともに SCEs の数も増し，MMCは 1×10^{-9}M/m*l* では5.66と対照にほぼ近い値を示し，最も高濃度の 5×10^{-7}M では42.22とその約8倍にも達した．MMS では 5×10^{-7}M で4.98と対照よりむしろ低い値を示したが，5×10^{-5}M ではこれも約6倍ほどの上昇をみせた．EMS は 1×10^{-5}M でも6.54とすでに対照より高い値を示し，1×10^{-3}M で22.32まで上昇した．しかしこの濃度では観察に耐え得るきれいな中期像が少なく，観察できたのは34細胞であった．t検定の結果ではMMC 1×10^{-9}M および MMS 5×10^{-7} を除いてすべて対照との間に $p<0.001$ という高い有意性を示した．すなわち対照と有意な差のある濃度は，MMC; 5×10^{-9}M, MMS; 1×10^{-6}M, EMS; 1×10^{-5}M/m*l* であった．

考　察

オートラジオグラフィーによる細胞周期の測定により，細胞周期は15時間，S期8.8時間，一部のM期および G_2 期2.5時間，G_1 期およびM期3.7時間であり，BUdR 添加時間を26.5～27時間と定めることができた．使用したラブテックフラスケットは従来のカバーグラスを用いた方法[11]にくらべ便利な方法であった．

BUdR の濃度決定の実験では，SCEs については0.25 μg および0.5μg において細胞あたり約5個という低い値を示したが，1μg より40μg まで徐々に増加し全体として用量—効果関係を示していると思われた．一方 break および gap についてはその上昇が認められるのは10μg からであり，これは SCEs の増加のみられる濃度の約10倍であった．この結果より BUdR 濃度は 0.5μg/m*l* を用いることとした．なおこの濃度での SCEs の数は，Kato[5] の Don 株での実験の値2～3に比べいく分高かった．

MMC，MMS，EMS の3種の変異原を用いた実験では，そのすべてが用量—効果関係を示した．中でも MMC は最も作用が強く，5×10^{-9}M から有意な増加が認められた．また対照も BUdR の濃度決定の実験値とほとんど変らず，本法での高い再現性が期待できる．しかし SCEs の数の増加とともに，交換の生じた部位も微小なものが多く見られるようになって，特に40/cell を越す SCEs を有する細胞については判定に困難をきたすものが生じ，また S.E も増加して細胞間の SCEs の数にバラツキが大きくなるのが認められた．t検定の結果をみると，MMC の 1×10^{-9}M および MMS の 5×10^{-7}M の2つを除いてすべて対照との間に $p<0.001$ という高い有意性を示したことからも，本法はかなり微小な増加でもよく反応する鋭敏な方法であると考えられ，変異原性の疑われる物質の検定にも十分用いられうると考えられた．

SCEs の生ずる機構については，現在微生物の複製後修復 (post replication repair) にあたる障害を修復する機構によるとする説が示され，そのメカニズムも次第に明らかになりつつある．このように DNA 障害の修復の結果として生ずる SCEs は，突然変異原性を示す物質のほとんどが癌原物質でもある事実が明らかにされた現

在，SCEs 誘起性のある物質を変異原物質としてスクリーニングすることは十分意義のあるものと考えられる．Perry と Evans[3]は14種類の発癌性のある突然変異原物質を用いて SCEs を調べ，この方法がこれらを検索するスクリーニングとして有効であることを示した．今回の我々の実験においても，強力なアルキル化剤である MMC, MMS, EMS ともに用量の増加に伴う SCEs の上昇をみることができ，従来の染色体異常誘起の実験に加えて変異原物質検索の一助となりうることが明らかとなった．

謝辞 本研究を行うにあたり，特にアイソトープ操作について御指導，御援助を頂きました当研究所毒性部金西信次氏に感謝の意を表します．

文　献

1) 益渕正典，縄井寿美子，吉田誠二，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，149，1977
2) 益渕正典，縄井寿美子，平賀興吾，広門雅子：東京衛研年報，28-2，159，1977
3) Perry, P. and H. J. Evans : *Nature* 258, 121, 1975
4) Kato, H. and H. Shimada : *Mutation* Res, 28, 459, 1975
5) Kato, H. : *Nature* 251, 70, 1974
6) Latt, S. A : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 71, 3162, 1974
7) Wolff, S. and P. Perry : *Chromosoma*, 48, 341, 1974
8) Kato, H. : personal communication
9) Kato, H. : *Nature*, 252, 739, 1974
10) Ikushima, T. and S. Wolff : *Exp. Cell. Res*, 87, 15, 1974
11) Prescott, D. M. and M. A. Bender : *Exptl. Cell. Res*, 29, 430, 1963

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 172-174, 1978

ラットの成長過程における体重の変動について(第3報)
体重増加率

林田志信*, 高橋 博*, 井口重孝*, 平賀興吾*

Changes of Body Weight in Growing Rat (III)
Growth Rate

SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

緒　言

著者らはこれまでラットの成長過程における体重増加曲線に吟味を加え，規則性ある変動を見出し，その詳細を報告してきた[1-3]．今回はラットの体重増加の態度を増加率の観点より検索した．

観察方法

動物は barrier system 下に生育された日本チャールスリバー社の近交系 Fischer ラット雌雄を用いた．4週令で購入，barrier system 飼育室で，前面および床面が網のステンレス製ケージ（縦40cm，横25cm，高さ16.5 cm）に個別に収容，ベルト式飼育架台に配置，日本クレア製 CE-2 飼料および細菌ろ過器経由水道水を自由に与えた．飼育環境条件は，室温25±1℃，湿度50±5%，換気毎時10回，照明午前6時から午後5時とした．

雌雄ラットをそれぞれ体重別に大中小の3群にわけ，各群を15～14匹とし，5週令より28週令時まで毎週金曜日午前10時に体重を測定した．

表 1.　雄ラットの体重

週令＼群 匹数	小 15	中 15	大 15
5	84± 2.2	91± 1.9	99± 2.4
6	111± 4.2	120± 3.2	131± 5.0
7	135± 7.6	148± 6.2	161± 9.6
8	161±10.5	177± 9.7	189±14.6
9	182±14.5	199±11.9	212±19.3
10	201±16.2	219±13.3	230±21.0
11	219±15.2	235±14.2	246±23.4
12	231±15.8	247±13.6	260±23.6
13	241±15.5	256±14.1	270±22.4
14	253±17.1	267±15.1	283±22.5
15	263±17.7	275±17.2	289±23.0
16	270±17.3	283±17.8	299±23.3
17	279±19.1	290±19.5	306±22.5
18	280±19.4	293±19.1	309±23.5
19	286±16.9	299±19.8	316±22.8
20	292±18.4	303±20.6	321±23.9
21	297±18.5	307±20.8	326±23.3
22	299±18.7	310±20.8	329±22.3
23	302±17.7	313±21.4	332±22.3
24	306±18.8	318±20.8	337±21.9
25	309±18.5	321±22.1	340±22.4
26	312±17.8	324±23.4	343±23.9
27	314±18.9	327±23.5	344±24.2
28	319±18.9	332±22.9	350±24.2

表 2.　雌ラットの体重

週令＼群 匹数	小 15	中 15	大 14
5	78± 1.7	83± 1.0	87± 1.9
6	94± 3.6	99± 3.9	104± 2.7
7	108± 4.5	113± 4.3	119± 3.4
8	118± 5.1	123± 5.9	130± 4.3
9	125± 6.0	130± 7.0	137± 5.5
10	131± 8.2	136± 9.4	144± 6.9
11	137± 8.5	142±10.8	150± 7.6
12	140± 8.7	147±10.2	155± 8.1
13	146± 6.7	149±11.9	160± 7.5
14	150± 6.7	153±12.2	164± 7.4
15	153± 7.0	157±13.1	167± 7.4
16	157± 6.8	161±12.1	171± 7.6
17	160± 7.3	164±12.8	174± 7.8
18	163± 8.1	168±12.7	177± 7.9
19	165± 7.3	171±12.6	179± 7.9
20	166± 8.6	173±12.6	180± 8.0
21	168± 8.6	175±12.7	182± 8.1
22	169± 7.3	176±12.1	184± 8.0
23	171± 8.0	177±12.5	184± 7.4
24	174± 8.9	179±13.0	186± 8.2
25	176± 9.3	181±13.0	189± 8.5
26	177± 8.9	182±12.2	190± 9.9
27	177± 8.6	184±13.6	191± 9.9
28	180± 8.9	188±13.1	195±10.8

* 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 3. 雄ラットの5週令時体重を100とした体重増加率

週令＼群 匹数	小 15	中 15	大 15
5	100	100	100
6	131± 3.5	130± 2.6	130± 3.6
7	158± 6.9	161± 6.2	161± 8.5
8	188± 9.9	192±10.1	189±13.2
9	214±13.5	216±12.7	211±17.7
10	237±14.8	239±15.1	230±20.1
11	257±13.0	256±16.0	246±22.5
12	272±13.4	268±15.0	260±22.8
13	283±12.8	279±16.1	270±21.4
14	298±14.4	291±17.5	283±21.1
15	308±12.1	300±20.0	289±21.5
16	318±14.4	308±20.5	299±21.7
17	328±16.6	316±22.2	306±20.7
18	329±18.3	319±22.0	309±20.2
19	337±14.5	326±22.9	316±21.1
20	344±16.6	330±24.0	321±22.7
21	350±16.9	335±24.2	326±22.5
22	350±17.3	338±24.1	329±21.5
23	355±16.4	341±24.9	332±21.4
24	360±17.4	346±24.0	337±20.6
25	364±17.3	350±25.5	340±22.2
26	367±15.8	353±27.6	343±23.1
27	370±17.0	356±27.2	344±23.5
28	375±17.4	362±26.9	350±23.4

表 4. 雌ラットの5週令時体重を100とした体重増加率

週令＼群 匹数	小 15	中 15	大 14
5	100	100	100
6	119± 2.7	118± 4.9	118± 2.7
7	136± 4.5	134± 5.3	135± 3.9
8	150± 6.2	147± 7.4	147± 4.8
9	158± 7.3	155± 9.3	155± 6.3
10	166± 9.8	162±11.8	163± 7.7
11	173±10.7	169±13.3	171± 8.6
12	180± 9.7	175±12.4	176± 9.1
13	185± 8.4	178±14.9	181± 8.4
14	191± 8.4	183±15.2	186± 8.4
15	195± 8.6	187±16.6	189± 8.3
16	199± 9.0	192±15.5	194± 9.1
17	203± 9.4	196±16.3	198± 8.9
18	207±10.2	201±16.2	201± 8.5
19	209± 9.6	204±15.7	204± 9.0
20	210±10.2	206±15.7	205± 8.4
21	213±10.8	209±15.6	207± 9.3
22	215± 9.1	210±15.0	208± 8.9
23	217± 9.4	212±15.6	209± 8.2
24	221±10.1	213±16.3	211± 9.4
25	224±10.3	216±16.4	213± 8.6
26	224±11.4	218±15.3	216±10.9
27	225±10.5	220±17.1	216±10.3
28	228±11.2	224±16.6	221±11.0

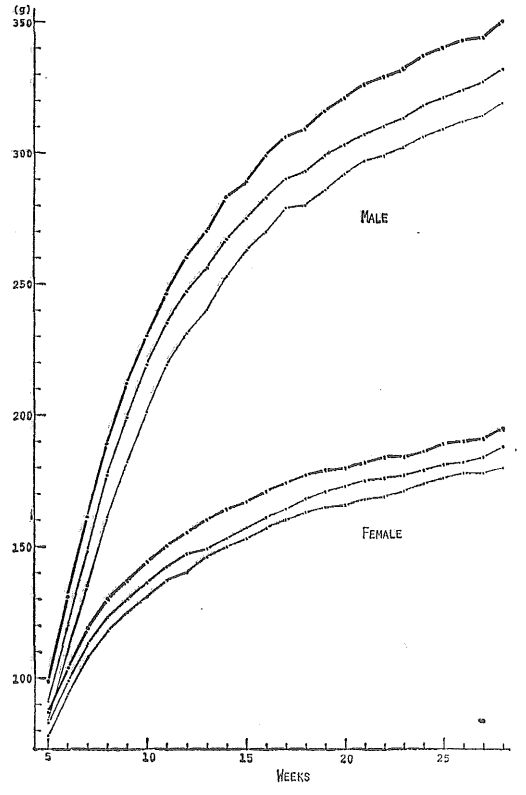


図 1. 体 重 増 加 曲 線

●▬▬●：大群, ●——●：中群, ●——●：小群

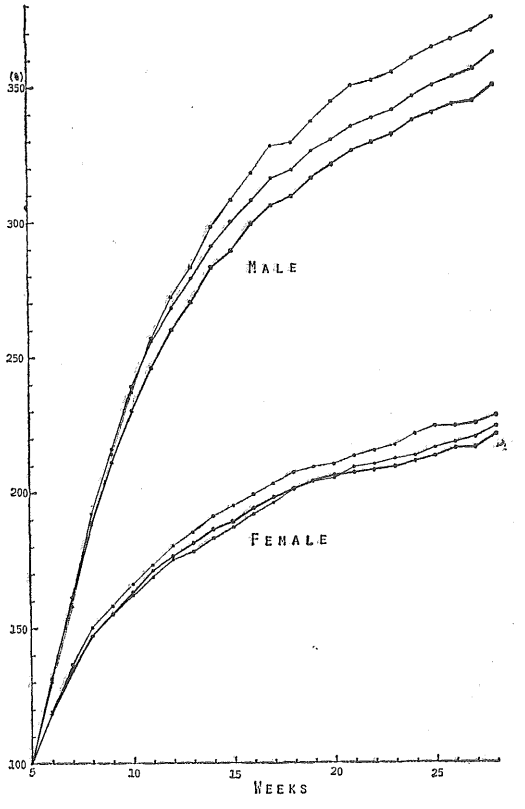


図 2. 体 重 増 加 率

●▬▬●：大群, ●——●：中群, ●——●：小群

表 5. 体重増加曲線の変曲点の体重を100とした体重増加率

週令	♂ 小	♂ 中	♂ 大	♀ 小	♀ 中	♀ 大
5	100	100	100	100	100	100
6	131	130	130	119	118	118
7	158	161	161	136	134	135
8	188	192	189	150	147	147
9	214–100	216–100	211–100	158–100	155–100	155–100
10	110	110	108	105	105	105
11	120	118	116	110	109	109
12	127	123	123	112	113	113
13	132–100	129–100	128–100	117–100	115–100	117–100
14	105	104	105	103	103	103
15	109	107	107	105	105	104
16	112	111	111	108	108	107
17	116–100	113–100	113–100	110–100	110–100	109–100
18	101	101	101	102	102	102
19	103	103	103	103	104	103
20	105	104	105	104	105	103
21	106	106	107	105	107	105
22	107	107	108	106	107	106
23	108	108	109	107	108	106
24	110	110	110	109	109	107
25	111	111	111	110	110	109
26	112	112	112	111	111	109
27	113	113	113	112	112	110
28	114	114	114	113	115	112

観察結果と考察

表1，2および図1に雌雄各群の平均体重の推移を示した．5週令時体重±SDは雄小群84±2.2，中群91±1.9，大群99±2.4，雌小群78±1.7，中群83±1.0，大群87±1.9であり，28週令時体重は雄小群319±18.9，中群332±22.9，大群350±24.2，雌小群180±8.9，中群188±13.1，大群195±10.8であり，週令とともに群間の平均体重の差は拡大した．体重増加曲線には9，13．17週令時付近に変曲点[1]があるようである．

表3，4および図2は5週令時の体重を100とし体重増加率を計算したものである．雌雄の大，中，小群ともにその体重増加率曲線は9週令時までほとんど一致した．

以降は次第に差が拡大し，小群が高値を，大群が低値を示した．そこで，体重増加曲線の変曲点における体重（平均）を100として増加率を求めてみた．結果は表5の通りで，雌雄各大，中，小群の増加率は5週令時より9週令時までと同様ほとんど一致した．

以上，本観察内において5週令時の体重の大小は体重増加を規制し，5週令時に重いものは体増加量が大きく，軽いものは小さいが，その体重増加率は発育の各段階においては同一であるといえる．以上の観察は体重測定実験において汎用される体重増加率の有用性に根拠を与えたものと思う．

文　献

1) 林田志信，井口重孝，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，26-2，186，1975
2) 林田志信，井口重孝，池田虎雄：東京衛研年報，27-2，198，1976
3) 林田志信，高橋　博，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，236，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 175-179, 1978

ラットの血液および血清成分の統計学的分析

大石向江*, 大石眞之*, 平賀興吾*

Statistical Analyses of Blood and Serum Components in the Rat

HISAE OISHI*, SHINSI OISHI* and KOGO HIRAGA*

緒　言

毒性学の分野においては動物に薬物や化学物質を投与して種々の検査を行ない検査結果の解釈に統計学的方法を用いなければならないことが多い．毒性学で通常の統計学的方法を用いる場合，標本数が多いときには中心極限定理により正規分布を平均に対して適用できるため正規性の仮定についてはあまり論じなくてもすむことから比較的等閑視されるが，標本数の大きくない場合にはすぐ正規性からのゆがみがあらわれる[1]．そこで母集団の分布型を知っておくことが適切な統計処理を行なう上に第一に必要となってくる．

健康なヒトから得られた血液および血清中成分値は，ある一定の規則的な分布を示すことが知られており，それには報告者によって多少の差はあるものの正規分布型を示すものとして総タンパク質量，グルコース量，コレステロール量，コリンエステラーゼ活性，乳酸脱水素酵素活性などが，また対数正規分布型を示すものとして尿素窒素量，トリグリセライド量，グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性，アルカリ性ホスファターゼ活性などがあげられる[2-6]．しかし，実験動物の血液，血清成分の統計学的な分布様式はほとんど知られていない．そこでここではまずラットの血液および血清成分値が試験物質に曝露していない状態でいかなる分布型を示すものかを知るため以下の実験を行ないいくつかの知見を得たので報告する．

実験材料および実験方法

1. 実験動物　生後4週令の JCL-Wistar 系雄・雌性ラットを日本クレアより購入した．

2. 飼育方法　動物は一般動物飼育室（室温25±1°，湿度50—60%，照明12時間）内でステンレスケージに5匹ずつ入れて飼育した．7週間飼育した後，断頭・採血し以下の実験に供した．

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）の測定を Coulter Counter Model-S（Coulter Electrics 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(Glu—Glucose-Oxidase 変法)，尿素窒素量（UN—Urease-Indophenol 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．

c．測定結果は頻度分布を正規確率紙および対数正規確率紙に記録し，5%点での χ^2 検定を行なった．

結　果

各測定値の平均，標準偏差，変動係数，例数を表1に示す．これらの値は過去に行なわれ報告されている数値とほぼ同一であった．

雄性ラットの WBC の結果を図1に，また雌性ラットの WBC の結果を図2に示す．雄性ラットの WBC は対数正規分布を，一方雌性ラットの RBC は正規分布を示した．χ^2 検定の結果はいずれも図中に記す．RBC の結果を図3に，Hgb の結果を図4に，Hct の結果を図5に，また MCV の結果を図6に示す．これらはいずれも正規分布をした．

TP の結果を図7に，Glu の結果を図8に示す．TP，Glu は雄・雌性とも対数正規分布を示した．UN の結果を図9に示す．UNは両性とも正規分布を示した．

GOT の結果を図10に，また GPT の結果を図11に示す．これらはいずれも正規分布であった．Al-P の結果を図12に示す．Al-P は対数正規分布であった．ChE の結果は図13に示すが，これは雄・雌性とも正規分布であった．

* 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. ラット血液・血清成分の測定値

		平均	標準偏差	変動係数 (%)	例数
WBC	雄	9.4	3.8	40.4	95
($\times 10^3$/mm^3)	雌	5.6	1.3	23.2	89
RBC	雄	8.76	0.509	5.81	91
($\times 10^6$/mm^3)	雌	7.20	0.324	4.50	89
Hgb	雄	17.8	0.708	3.98	94
(g/dl)	雌	15.2	0.630	4.14	89
Hct	雄	48.1	2.98	6.20	94
(%)	雌	41.1	1.71	4.16	89
MCV	雄	56.4	1.65	2.93	95
(μ^3)	雌	58.3	1.22	2.09	89
TP	雄	8.9	1.3	14.6	102
(g/dl)	雌	9.1	1.0	11.0	98
Glu	雄	137.7	17.19	12.48	102
(mg/dl)	雌	135.0	19.46	14.41	101
UN	雄	20.6	2.44	11.8	100
(mg/dl)	雌	20.3	1.96	9.66	99
GOT	雄	123.8	15.53	12.54	99
(K. unit)	雌	123.9	14.05	11.34	101
GPT	雄	35.2	6.09	17.3	100
(K. unit)	雌	28.7	4.18	14.6	99
Al-P	雄	35.9	14.8	41.2	102
(K. A. unit)	雌	26.0	7.81	30.0	100
ChE	雄	0.334	0.124	37.1	101
(ΔpH)	雌	0.853	0.146	17.1	101

表 2. ラット血液・血清成分の分布型

正規分布		対数正規分布	
WBC	(雌)	WBC	(雄)
RBC	(雄・雌)	TP	(雄・雌)
Hgb	(雄・雌)	Glu	(雄・雌)
Hct	(雄・雌)	Al-P	(雄・雌)
MCV	(雄・雌)		
UN	(雄・雌)		
GOT	(雄・雌)		
GPT	(雄・雌)		
ChE	(雄・雌)		

以上の結果を表2にまとめた.

考　察

ラットの血液・血清成分の値は今回測定した項目についてはいずれも正規分布か対数正規分布をすることがわかった. ヒトでは正規分布に近い型を示す項目には肥満度, 血圧, 比肺活量, コレステロール量, 赤血球数などがあり, また GOT, GPT, 尿素窒素量, 白血球数は対数正規分布をすることが知られている[7-10]. 赤血球数については今回の結果ではヒトと同様な分布をすることがわかった. GOT, GPT 尿素窒素量, 白血球数は正規分布型を示し, ヒトの分布型とは異なっている. このことは血液血清成分の同一項目であってもパターンに種差のあることが考えられる. 今回の測定での白血球数において, 雄性と雌性でその分布型に相違がみられたが, その理由は性差であるかどうか現在不明であり, より例数を多くして検討を行なう必要があると考えられる. ヒトでは性差のみられるものとして, 20～39才の血清コレステロール値（男：正規分布, 女：対数正規分布）が知られている[11].

分布型によらない検定（たとえば Wilcoxon の順位検定など）以外の通常の統計的な検定（たとえば Student の t 検定など）は正規分布型について行なわれるものであり, その他の分布型をとる場合は正規化してから統計処理を行なうべきである. 特に毒性試験においては一群の動物数は数匹ないし数十匹を用いるのが限度である. その血液・血清成分等検査値が正規分布型をとらない場合（たとえば総タンパク質量, グルコース量, アルカリ性ホスファターゼ活性）は正規化してから処理する必要がある.

まとめ

雄・雌性ラットを用いてその血液および血清成分を測定し, それらがいかなる分布型を示すか統計学的考察を行なった.

文　献

1) 三上　操：統計的推測, 251, 1969, 筑摩書房, 東京
2) 北村元仕：日本臨床, 31, 1223, 1973
3) Caputo, M. J.: *Am. J. Med. Tech.* 38, 1, 1972
4) Wootton, I. D. P. and E. G. King: *Lancet*, March, 7, 470, 1953
5) 武田裕他：テクニコン国際シンポジウム, 東京, 115, 1974
6) Martin, H. F., B. J. Gudzinowcz and H. Fanger: Normal Values in Clinical Chemistry, Marcel Dekker Inc., New York, 1975
7) 北村元仕：日本臨床, 29（増刊号）, 6, 1971
8) 北村元仕：日本臨床, 34（秋季増刊号）, 3, 1976
9) 藤井元信, 三好　保, 中田久世：公衆衛生, 41, 585, 1977
10) 岩塚　徹, 山本達郎, 水野嘉子, 岡本　登：現代医学, 25, 303, 1978
11) 若林正雄, 細見　弘, 森　英樹, 田崎武信：日本臨床, 34（秋季増刊号）, 1976

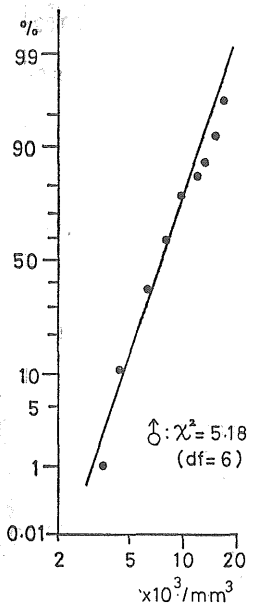


図 1. WBC（雄性）

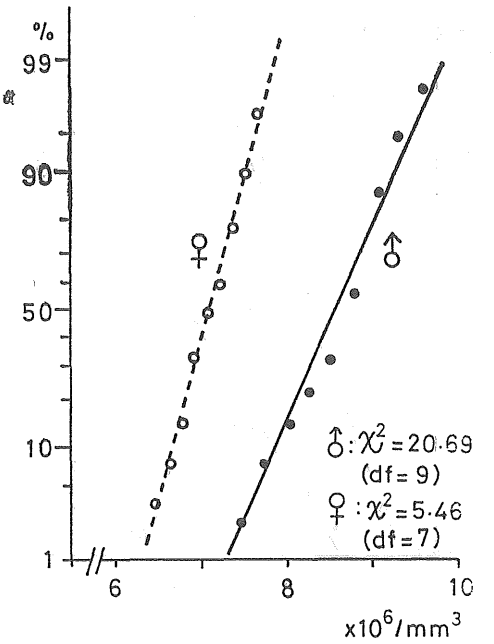


図 3. RBC

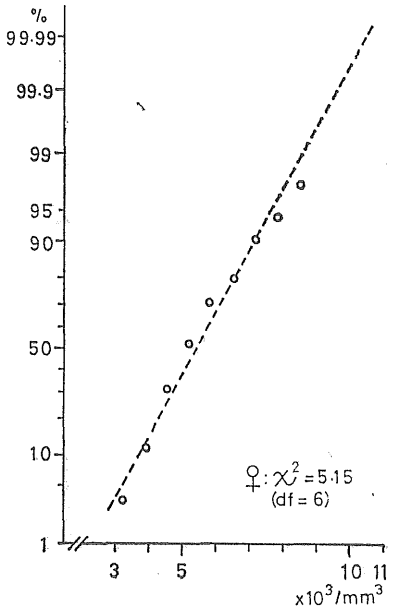


図 2. WBC（雌性）

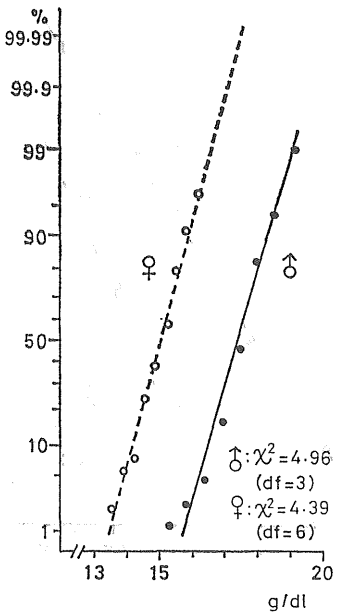


図 4. Hgb

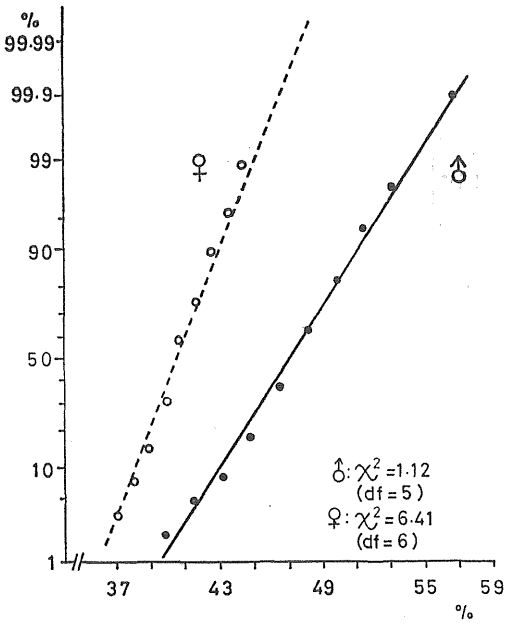


図 5. Hct

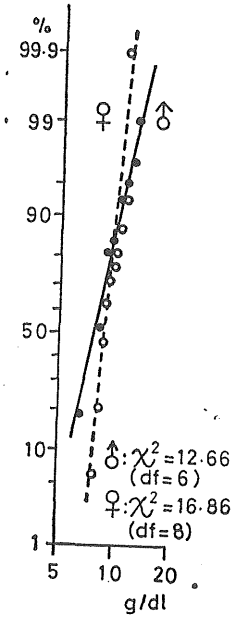


図 7. TP

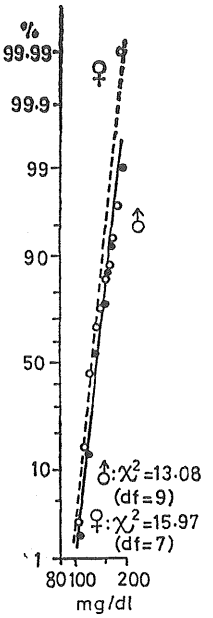


図 8. Glu

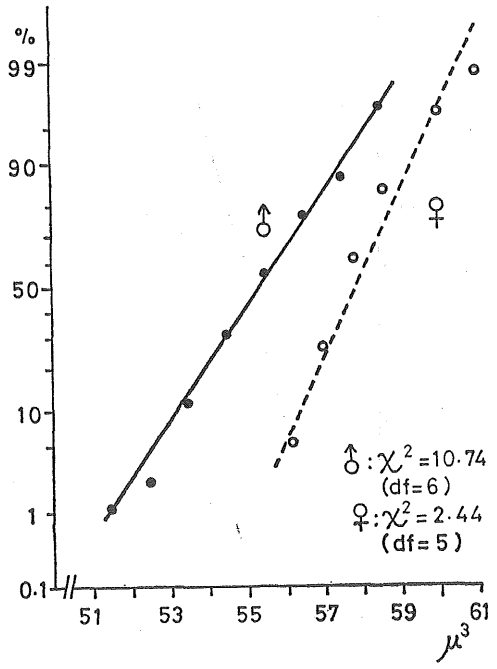


図 6. MCV

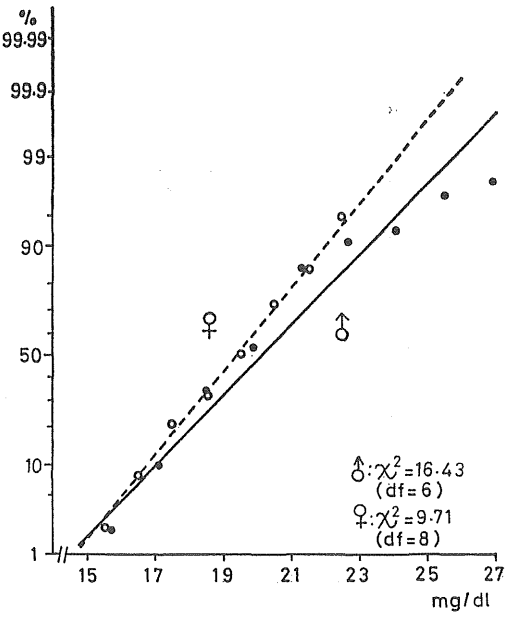


図 9. UN

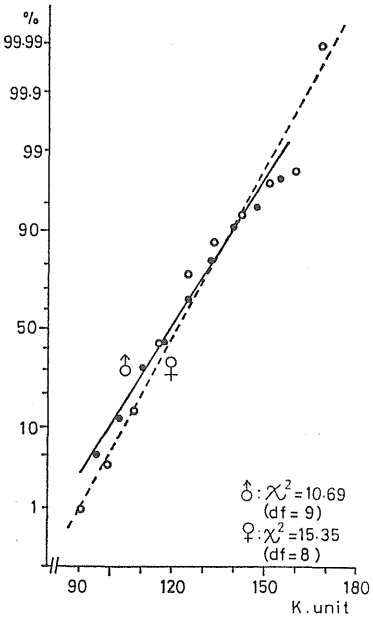


図 10. GOT

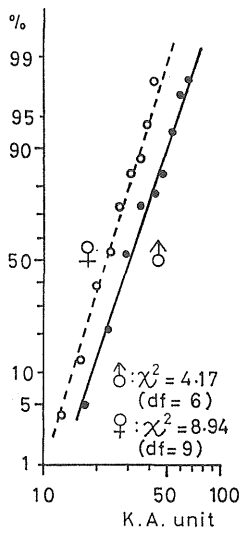


図 12. Al-P

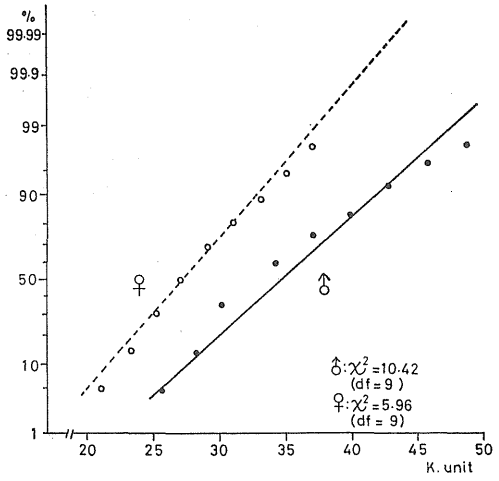


図 11. GPT

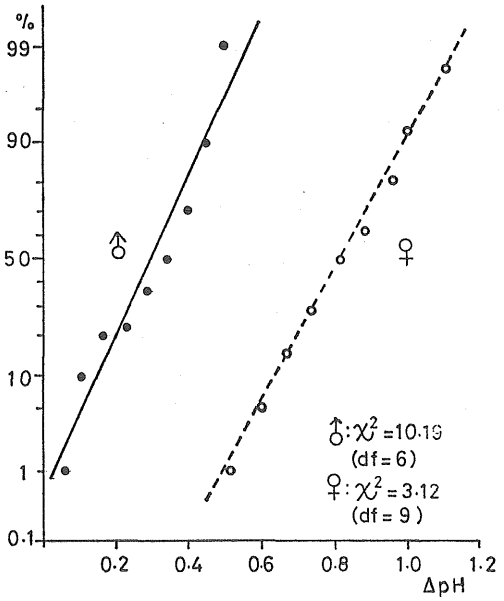


図13. ChE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-2, 180-187, 1978

ラットにおける死後変化の経時的観察　1. 肉眼的検索

阿部幸恵*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*, 長澤明道*
藤井　孝*, 平賀興吾*

Macroscopical Observations of Postmortem Changes on Rats in Course of Time

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

緒　言

毒性試験では長期・短期を問わず試験途中での死亡動物の検索が重要であり，動物が死亡した場合速やかに解剖し組織固定を行うことが望ましいとされている．しかし休日および夜間などの死亡例では発見が遅れることが多く，死後変化の発現により肉眼的・組織学的検索が不可能になる場合が多くみられる．また比較的死後経過時間が短い場合でも，死後変化と投与薬物による障害とを区別することが困難な場合も多い．そこで一定条件下での死後変化を観察し，死亡例検索時の参考にしたいと考えた．今回，ラットの死後変化の推移を観察するため，死体硬直・体温低下の測定，体表・体内の肉眼的観察，血液細胞を含む器官・組織の光顕的観察などを経時的に行った[1]．本報では肉眼的観察結果を中心に報告し，次報で光顕的観察結果を報告する．

実験方法

実験動物および飼育環境

バリヤーシステム下に生育された Slc：Wistar ラット雄を静岡実験動物研究所より5週令で購入し，室温25±1°，湿度50±5％の環境下で飼育用固型飼料（日本クレア・CE—2）を与え5週間予備飼育した．試験前日に下痢，眼球の白濁など異常がみられなかった個体を選出し実験に用いた．

実験方法および外表部の検索

デシケータ内でラットにクロロホルムを7～10分間吸入させ死亡させた．死亡は心拍動の停止により判断し，この時点を死亡時刻とした．死後0，1，3，6，12，24，48時間にラットを6匹づつ解剖し，時間経過に伴う死後変化を肉眼的に検索した．解剖までの時間ラットをステンレス製の平らなケージ床面の網に伏臥位に載せ，飼育棚に並べ，室温25±1°，湿度50±5％の実験室に放置した．なおこれは動物飼育環境と同一条件である．死後24，48時間に解剖したラット12匹については以下の検索および外表部の観察を合わせて行った．

体重：死後0，3，6，9，12，18，24，30，48時間に1g感度の天秤にて体重測定を行った．

体温：死後0.5，1，1.5，2，2.5，3，4，5，6，7，8，9，12，18，24，30，48時間に0.1°感度の水銀温度計にて直腸温を測定した．また同時刻の室温と湿度をアスマン式通風乾湿球温度計にて測定した．

死体硬直および寛解：体温測定時および死後10，11時間に下顎，頸，肘，足首，躯幹，尾の硬直を観察した．これら6ケ所は予備実験で硬直の判定が容易であった個所である．躯幹の硬直はラットの腹の部分を手で持った際の体の折れ曲る角度（腹面の示す角度）で測定し，0～30°を－，31°～150°を＋，151°～180°を卄とした．尾の硬化はラットを水平な台上に置き，尾の部分の台を取り除いた時に下る尾の傾斜で測定し，$y=-ax^2$ の放物線を利用し，$x=0$ から $y=-1/2\,x^2$ を－，それ以上 $y=-1/25\,x^2$ までを＋，それ以上 $y=0$ までを卄とした．

内部器官・組織の検索

死後0，1，3，6，12，24，48時間に解剖したラットについては解剖時に肉眼的検索を行い，器官・組織を摘出した．摘出した器官・組織のうち，肝臓，脾臓，腎臓，心臓，肺，脳，精巣についてはそれぞれの重量を測定し，解剖前に測定した体重から体重 100g あたりの器官重量（体重比重量）を求めた．器官・組織は摘出後，緩衝ホルマリン中に固定し，通常のパラフィン切片作製法により組織標本を作製した．また解剖時に外頸静脈を切断し，血液塗抹標本を作製した．

結果および考察

体重および体温の測定結果を表1，図1に，死体硬直を表2に，外表部の観察で顕著な変化がみられた眼球の観察結果を表3に示した．また器官重量，体重比重量

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

表 1. 死後時間経過に伴う，直腸温および体重の変動

時間[1]	室温 (°)	湿度 (%)	直腸温 (°)	体重 (g)
0[2]	25.4	58	33.7±0.7[4]	248.1±23.2[4]
0.5	25.4	57	30.7±0.4	—
1	25.2	58	28.5±0.4	—
1.5	25.2	58	27.9±0.3	—
2	25.4	57	27.2±0.1	—
2.5	25.4	57	26.6±0.3	—
3	25.4	57	26.3±0.1	249.5±22.9
4	25.6	56	25.8±0.1	—
5	25.8	54	25.8±0.1	—
6	25.2	58	25.6±0.1	247.4±23.3
7	25.4	57	25.4±0.1	—
8	26.6	52	25.7±0.1	—
9	26.4	53	25.9±0.1	246.8±23.4
12	26.6	53	26.1±0.2	247.9±23.2
18	25.9	53	25.3±0.1	246.6±23.2
24	25.6	57	24.9±0.1	246.0±23.3
30*	25.8	56	25.6±0.0	246.6±25.6
48*	24.8	53	24.7±0.1	244.8±25.1

1) 死後経過時間　　2) 0-24時間：動物数12
30*および48*時間：動物数 6　　4) 平均値±標準誤差

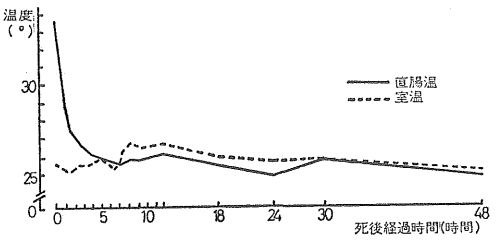


図 1. 死後時間経過に伴う直腸温の変動

を表 4 に，内部器官・組織の観察結果を表 5 に示した．

体重

死後時間経過に伴い徐々に減少する傾向がみられた．

体温

死後 0 時間から 3 時間で急速な直腸温の低下がみられ，死後 5 時間で室温とほぼ同温に低下した．以後室温と同様の変動を示したが室温より弱干低値を示した．

死体硬直および寛解

死後 0 時間では死体硬直がみられなかった(写真 1)．硬直の発現には部位により差がみられ，死後 30 分で下顎，頸，肘，躯幹に軽度の硬直がみられ，足首，尾ではやや遅れて硬直がみられた．硬直は 2 時間ないし 2.5 時間で最高に達し（写真 2），この状態は下顎で 9 時間，

表 2.　死後時間経過に伴う死体硬直および寛解

死後経過時間	下顎			頸			肘			足首			躯幹			尾		
	−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++
0[1]	12[2]	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−
0.5	11	1	−	10	2	−	11	1	−	12	−	−	10	2	−	12	−	−
1	−	12	−	1	11	−	3	9	−	3	9	−	−	12	−	7	5	−
1.5	−	1	11	−	9	3	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	8	4
2	−	−	12	−	1	11	−	3	9	−	4	8	−	−	12	−	1	11
2.5	−	−	12	−	−	12	−	2	10	−	1	11	−	−	12	−	−	12
3	−	−	12	−	1	11	−	1	11	−	−	12	−	−	12	−	−	12
4	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	12	−	−	12
5	−	−	12	−	1	11	−	3	9	−	2	10	−	−	12	−	1	11
6	−	−	12	−	2	10	−	5	7	−	3	9	−	1	11	−	1	11
7	−	−	12	−	2	10	−	7	5	−	5	7	−	3	9	−	1	11
8	−	−	12	−	5	7	−	11	1	−	9	3	−	8	4	−	1	11
9	−	−	12	−	7	5	1	10	1	−	9	3	−	8	4	−	2	10
10	−	−	12	1	9	2	1	11	−	−	11	1	−	10	2	−	5	7
11	−	−	12	3	8	1	2	10	−	−	12	−	−	12	−	−	9	3
12	−	1	11	8	4	−	11	1	−	−	12	−	−	12	−	1	11	−
18	1	1	10	11	1	−	12	−	−	4	8	−	−	12	−	2	10	−
24	5	7	−	12	−	−	12	−	−	11	1	−	−	12	−	10	2	−
30*	5	1	−	6	−	−	6	−	−	5	1	−	−	6	−	6	−	−
48*	6	−	−	6	−	−	6	−	−	6	−	−	−	6	−	6	−	−

1) 0-24時間：動物数12，30*および48*時間：動物数 6　　2) 動物数

表 3. 死後時間経過に伴う眼球の白濁

時間[1]	右眼球				左眼球			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
0[2]	12[3]	−	−	−	11	1	−	−
0.5	11	1	−	−	9	3	−	−
1	11	1	−	−	9	3	−	−
1.5	11	1	−	−	9	1	1	1
2	12	−	−	−	9	1	1	1
2.5	9	3	−	−	8	−	2	2
3	9	3	−	−	8	−	2	2
4	3	5	4	−	5	2	3	2
5	2	3	4	3	−	5	3	4
6	1	2	1	8	−	−	4	8
7	2	−	1	9	1	−	−	11
8	4	1	−	7	4	1	−	7
9	4	5	−	3	5	4	−	3
10	8	3	−	1	6	5	−	1
11	8	4	−	−	7	4	−	1
12	9	3	−	−	9	2	−	1
18	10	2	−	−	12	−	−	−
24	12	−	−	−	12	−	−	−
30*	6	−	−	−	6	−	−	−
48*	6	−	−	−	6	−	−	−

1) 死後経過時間　2) 0-24時間：動物数12
30*および48*時間：動物数6　3) 動物数

尾で6時間，頸，肘，足首，躯幹で約3時間持続し，その後寛解が開始された．硬直の発現に比較し寛解の開始には各個体，部位によりかなりの差がみられ，硬直が最も長時間持続した下顎では死後11時間後に寛解が開始された．死後24時間で死体硬直の寛解はさらに進み（写真3），死後30時間あるいは48時間でほぼ寛解したが，足首では踵側によく曲がり，甲側に曲がり難いなど死後0時間のラットと比較し関節の動きに多少の制約がみられた．また表3で躯幹の硬直が48時間後も＋を示しているが，これは硬直が持続したわけではなく，腹腔内にガスが貯留し体の折れ曲がる角度が大であったためである．

外表部の観察（眼球の変化）

死後0時間の眼球は一様に透明で少量の涙液がみられたのみであった（写真4）．死後10ないし30分間で眼瞼がやや閉じ半眼状となり多量の涙液の流出がみられた．死後2時間でほとんどのラットに赤色涙液がみられ（写真5），血液の混入が疑われたが，塗抹，ギムザ染色標本で血球は認められなかった．この赤色物質はハーダー氏腺より分泌されるポルフィリンであると考えられた[2]．死後1ないし2時間で眼球に淡い白濁がみられ白

表 4. 死後時間経過に伴う器官重量の変動

死後経過時間	体重	器官重量								
		肝臓	脾臓	腎臓(右)	腎臓(左)	心臓	肺	脳	精巣(右)	精巣(左)
0（時間）	252.0[1] ±16.1	11603.3[2] ±1523.8 4597.5[3] ±447.6	528.8 ±41.9 209.9 ±11.2	923.6 ±48.2 367.0 ±15.5	931.5 ±71.4 369.4 ±10.5	726.5 ±51.2 288.2 ± 5.1	917.8 ±67.7 368.4 ±46.0	1867.5 ±22.4 743.6 ±49.4	1391.5 ±97.4 552.4 ±23.6	1423.1 ±106.8 565.0 ±29.9
1	250.8 ±15.7	12291.6 ±675.0 4903.7 ±136.2	527.8 ±17.4 210.8 ± 9.4	970.5 ±37.2 387.5 ±14.2	975.6 ±93.3 388.6 ±20.4	758.6 ±37.9 303.0 ±16.4	1033.5 ±141.2 414.9 ±76.2	1856.8 ±58.5 741.6 ±28.2	1380.6 ±87.2 550.6 ±17.6	1433.1 ±95.5 571.6 ±25.9
3	254.6 ±19.4	13431.6 ±1047.9 5270.0 ±140.7	513.1 ±31.0 201.6 ± 7.5	1012.8 ±77.9 397.4 ±10.8	992.1 ±60.8 389.6 ±11.3	776.0 ±68.4 304.5 ±15.4	1374.8 ±177.4 538.6 ±48.4	1868.6 ±56.7 734.9 ±27.3	1374.8 ±49.7 540.7 ±22.6	1391.3 ±42.0 547.4 ±25.1
6	252.1 ±15.3	12983.3 ±814.5 5148.6 ±79.6	538.0 ±45.9 213.3 ±11.6	966.0 ±62.8 383.1 ±11.0	979.8 ±64.6 388.6 ±11.6	775.5 ±37.8 307.8 ±11.8	1737.6 ±199.3 689.5 ±68.1	1838.1 ±41.4 730.5 ±32.3	1352.0 ±58.8 536.9 ±20.4	1387.5 ±55.6 551.6 ±34.3
12	247.6 ±20.8	11691.6 ±1074.0 4720.1 ±158.4	514.6 ±49.7 207.9 ±12.5	956.6 ±95.0 386.2 ±17.5	954.3 ±56.0 386.4 ±21.5	748.8 ±44.2 303.0 ±11.6	1510.1 ±345.3 609.0 ±119.6	1838.6 ±81.6 744.8 ±36.5	1383.0 ±45.2 543.2 ±46.0	1360.3 ±32.6 552.5 ±48.4
24	247.3 ±23.2	11389.1 ±1304.0 4600.3 ±208.9	459.6 ±56.3 185.5 ± 8.5	865.1 ±126.4 348.6 ±25.1	886.1 ±121.0 357.4 ±24.9	745.5 ±57.8 302.2 ±16.4	1250.8 ±153.8 505.4 ±33.3	1855.0 ±82.1 753.6 ±48.7	1192.3 ±64.7 483.9 ±26.2	1217.6 ±66.8 494.4 ±31.5
48	244.8 ±25.1	9109.5 ±1763.2 3693.7 ±361.3	383.8 ±58.1 157.2 ±22.7	702.6 ±90.4 288.5 ±38.5	766.8 ±81.2 313.7 ±20.2	746.3 ±75.6 305.6 ±22.9	1420.1 ±300.1 583.7 ±128.6	1764.3 ±126.1 725.3 ±75.2	1036.6 ±118.8 424.6 ±41.8	1012.1 ±124.8 416.0 ±60.2

1) 平均値(g)±標準誤差　2) 絶対重量(平均値mg)±標準誤差　3) 重量(平均値mg)/体重100g±標準誤差

濁は徐々に濃さを増した（写真5）．死後4ないし5時間で眼球全体にみられた白濁の中心部に透明な部分が現われ，その後透明域は徐々に広がり白濁は眼球周辺にドーナツ状に押しやられ，死後9時間でほぼ消失しわずかに混濁がみられる程度となった．この白濁は12例中11例にみられたが，左右の眼球間，個体間で出現開始までの時間にかなりの差がみられた．白濁した眼球を解剖時に切開した結果，水晶体の前眼房側に白色のゼラチン様物質が付着しているのが観察された．この白濁はラット屠殺時のクロロホルムに起因するとの疑いから，屠殺法を変え，炭酸ガスによる窒息死，大腿部血管切断による脱血死のラットについて追試したが，クロロホルム屠殺でのラット同様白濁が観察された．白濁の出現に並行して死後5時間頃より眼球表面に乾燥がみられ，9時間で上眼瞼および下眼瞼に沿って眼球に弧状の溝がみられた．また眼球表面は硬さを増し，内眼瞼および眼球強膜に著明な血管走行が認められた．死後24時間で眼球は完全に乾燥し，落ちくぼみ，角膜表面に多数の微細なしわが観察された（写真6）．

器官重量および体重比重量

それぞれの器官の重量と体重比重量は同様の増減傾向を示したので以下に一括して述べる．

肝臓，脾臓，腎臓では死後1ないし3時間までに軽度の増加がみられ，3時間以降12時間までは重量変化がほとんどみられず，死後12時間以降に減少がみられた．心臓，脳では顕著な重量変化はみられなかった．精巣では死後0時間から12時間まで重量変化がほとんどみられず，12時間以降減少がみられた．肺では重量変化が顕著にみられ死後0時間に平均917.8mgであった肺が死後6時間に平均1,737.6mgとなりほぼ2倍近くの増加がみられた．死後6時間を境に減少がみられ，死後24時間以降に再び増加が認められた．

内部器官・組織の観察結果

検索は死後0時間に解剖したラットでの観察結果を対照として行った．

皮下組織　解剖時に皮下の細血管をメスの背で軽くしごき血液がもとに戻るか否かにより皮下血管内の血液の凝固を検索したところ，死後6時間までは血液に流動性がみられ，死後12時間以降は流動性がみられなかった．皮下血管内の血液はおよそ死後12時間で凝固したものと考えられる．

死後3時間で6例中2例の鼠径部皮下に直径15mm前後の淡い黒色斑がみられ，それ以後も同様の黒色斑が6例中2例ないし4例にみられた．この黒色斑は左側に多く，皮下脂肪組織の中に細かい樹枝状に黒色インクを流したようであり，時間の経過に伴い黒色が濃さを増した（写真7）．前記の黒色斑とは別に死後6時間で6例中4例の腹部皮下に淡緑色，淡黒色の着色がみられた．死後12時間で6例中5例に，死後24時間以降で6例全例に同様の着色がみられ，色は次第に濃さを増し暗赤色，暗緑色，赤褐色を呈した．またこの着色は腹筋にも認められた．

表 5.　内部器官・組織の観察結果

肉眼的観察所見	死後経過時間(時間)					
	1	3	6	12	24	48
皮下組織・鼠径部の黒色斑	−	2[1)]	2	3	2	4
着色(緑色,黒色,赤褐色)	−	1	4	5	6	6
皮下血管内の血液凝固	−	−	1	6	5	6
外頸静脈内の血液透明感有	−	−	−	−	1	4
腹筋・着色（黒色，赤褐色）	−	−	−	1	6	6
腐敗臭顕著	−	−	−	6	6	6
腹水貯留（血性）	−	1	1	6	2	2
肝臓・帯灰赤色の虎斑模様	2	−	1	4	6	−
脾臓・尾部黒色	1	5	6	6	6	6
腎臓・軟化	−	−	−	2	4	5
脳・軟化	−	2	2	6	6	5
胸腺・赤色斑	−	1	4	1	1	−
胃・前胃—皺襞の消失	−	−	2	1	3	6
腺胃—皺襞の消失	−	2	2	2	5	6
前胃—透明感の増加	1	1	3	3	2	3
ガス貯留	−	−	1	3	5	5
腸管・小腸—ガス貯留	−	1	1	5	6	4
盲腸—ガス貯留	3	5	5	6	6	4
大腸—ガス貯留	−	3	3	5	3	5
腸管壁軟化および透明感の増加	−	−	−	4	6	6
盲腸—血管走行不明瞭	−	2	3	1	2	−
脂肪組織・透明感の増加	−	−	2	2	3	3

1) 動物数

腐敗臭　死後12時間で開腹時にわずかな腐敗臭があり，死後24時間以降は腐敗臭が顕著であった．

腹水　死後3および6時間でそれぞれ6例中1例に，12時間で6例全例に，24および48時間で6例中2例に腹水の貯留が認められた．いずれも少量で赤色を呈し，塗抹，ギムザ染色標本で赤血球が認められた．

肝臓，脾臓，腎臓　死後3時間で肝臓辺縁部が帯状に黒く着色する変化がみられ，この変化は時間の経過に伴い広い幅で観察された．死後24時間で肝臓は黒色調を増し黒赤色となり，血液の抜けたような灰色調を帯びた部分がまだら状にみられ全体として虎斑模様を呈した（写真8）．また顕著な軟化が認められた．死後48時間で肝臓

は全体に暗赤色調が抜け帯灰橙色となり，硬さを増し，指で押すとくぼみが戻らず，24時間までの肝臓と比較しかなりの萎縮がみられた．

脾臓，腎臓でも時間の経過に伴い肝臓でみられたと同様の辺縁部の黒色の変化および軟化が観察された．肝臓の場合と異なり，死後48時間の脾臓，腎臓ではこれらの変化がさらに顕著となり，腎臓では被膜を剥離した際に血液様の粘度の高い液体が被膜に付着し腎臓の形態が保たれなかった．

脳　死後3および6時間でそれぞれ6例中2例に，12時間以降6例全例に脳の軟化がみられた．死後48時間で軟化は特に顕著にみられ，脳摘出の際嗅脳の部分は摘出が不可能であった．

胃　死後0時間の胃では皺襞が明瞭にみられたが（写真9），死後3時間で6例中2例の腺胃に皺襞の消失がみられ，死後6時間で6例中2例の前胃および腺胃に同様の変化が観察された．皺襞の消失により胃は偏平な膜のようになり，死後0時間の胃と比較し大きさが増した．死後24および48時間で皺襞の消失がほとんどのラットにみられ，前胃および腺胃は壁が薄くなり前胃では透明感が増した．また前胃ではヒダ状縁から食道側に向けて粘膜が容易に剥離された（写真10）．

腸管　死後0時間の盲腸では血管走行が明瞭にみられ，腹腔内脂肪は不透明な乳白色を呈した（写真11）．死後3時間で6例中1ないし3例の十二指腸，空腸，回腸，結腸に少量のガスの貯留がみられ，12時間以降はさらに貯留が明らかとなった．盲腸では死後3時間から6例中5例にガスの貯留がみられ，腸管の他の部分と比較し顕著に認められた．また時間の経過に伴い盲腸の血管走行が不明瞭となり，死後24時間以降は走行が観察されなかった（写真12）．死後0時間の腸管は淡褐色，帯緑灰色を呈し，死後12時間で褐色，緑褐色を呈した．死後24時間以降腸管はさらに黒色調を増し死後48時間で黒褐色，黒緑色を呈した．また死後12時間以降腸管壁の軟化がみられ，弾力性が失なわれ，透明感の増加がみられた（写真12）．腸管においても胃と同様粘膜面の観察を行ったが，胃でみられたような顕著な変化は認められなかった．

精巣　時間の経過に伴い精巣表面の血管走行が不明瞭となり，死後48時間で血管走行が観察されなかった．また24時間までは精巣は乳白色を呈し，被膜を通して精細管が観察されたが，死後48時間では赤白色を呈し精細管が観察されなかった．

陰嚢　死後6時間以降で陰嚢壁の血管走行が顕著にみられ，陰嚢は全体として暗赤色ないし紫赤色を呈した．死後24時間以降，陰嚢腔にわずかな赤色液の貯留がみられ，塗抹，ギムザ染色標本で赤血球が認められた．

脂肪組織　死後6時間で6例中2例の腹腔内脂肪が部分的に透明感を増し，ごく微細な油滴状を呈した．この変化は時間の経過に伴い程度を増し，特に肝臓，腎臓，回腸などに接している部分の脂肪では顕著にみられ，淡黄色，淡赤色などの着色も観察された（写真12）．

皮下脂肪では腹腔内脂肪でみられたような油滴状変化が観察されず，脂肪は時間の経過に伴い淡白色から桃白色に変化した．死後24時間以降は解剖の際皮膚の剥離が困難になり，皮下脂肪が乾燥したような印象を受けた．

以上のように様々な死後変化が肉眼的に観察された．今回の結果と，従来の毒性試験で行った死亡例での観察結果とを比較すると，毒性試験途中死亡例では腐敗臭，器官・組織の軟化などが短時間であらわれる例が多く認められた．このことは今回の実験では健康と思われるラットを無処置のまま死亡させたのに対し，毒性試験では薬物投与などの処置あるいは老衰により，ラットを死に至らせたという死亡に至るまでの過程の相違が反映されたものと考えられる．このように今回の観察結果を直ちに毒性試験での，死後変化と薬物投与による変化との鑑別，死亡時刻の推定などに短絡させることはできないが，組織検索の結果と併せて死亡例検索の際の参考にしたいと考えている．

ま と め

経時的な死後変化を観察するため，ラットをクロロホルムにより死亡させ25±1°の実験室に放置し，肉眼的検索を行った．

死後時間経過に伴い様々な死後変化が観察されたが，個体間の差なくどのラットにもみられた変化として次のような点があげられる．

死後1時間：軽度の死体硬直の発現

死後2時間：死体硬直最強，眼球の白濁*，赤色涙液の流出*

死後3時間：盲腸に少量のガス貯留，肝臓・脾臓・腎臓などの器官の腹側下部が黒色に変化

死後6時間：体温が室温に低下，眼球表面の乾燥*，腹部皮下に淡緑色の着色，胃の皺襞消失

死後12時間：皮下毛細血管内血液の凝固，脳の軟化，腸管内のガス貯留顕著

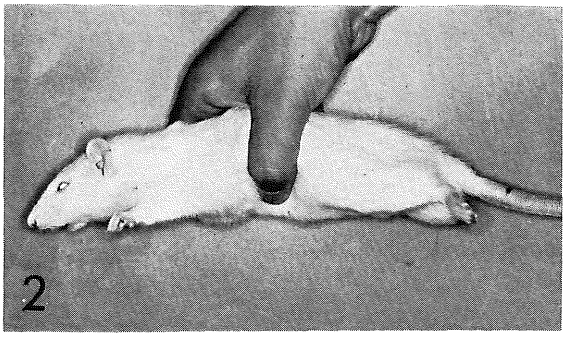
死後24時間：開腹時の腐敗臭顕著，各器官の軟化顕著，腹筋に暗赤色および暗緑色の着色，少量の血性腹水貯留，陰嚢内腔に淡赤色液貯留*

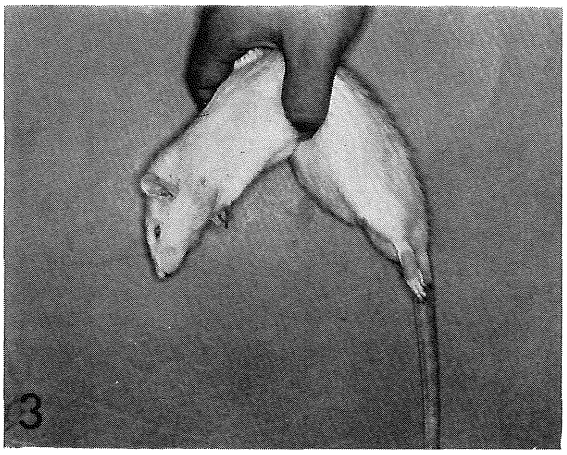
死後30時間：死体硬直ほぼ寛解

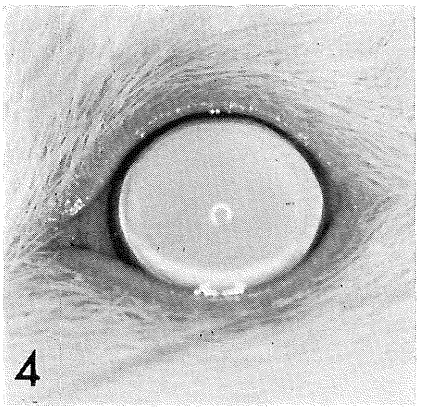
（右肩に＊印を記した変化は，出現開始に各個体で差がみられたものである．）

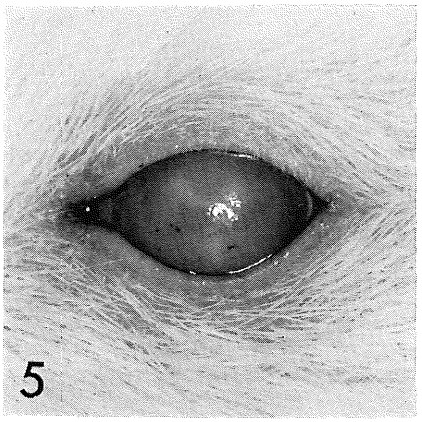
文　献

1) 錫谷　徹：法医診断学，41，1972，南江堂
2) Innes J. R. M. and M. F. Stanton: *Amer J. Path.* 38, 455, 1961









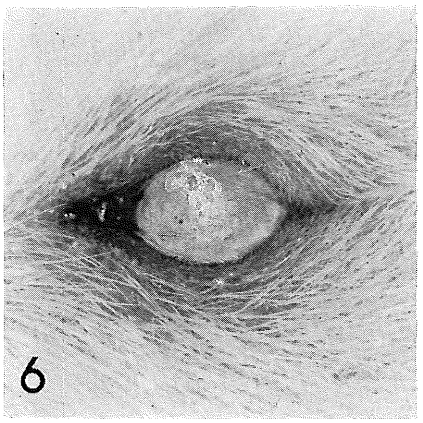
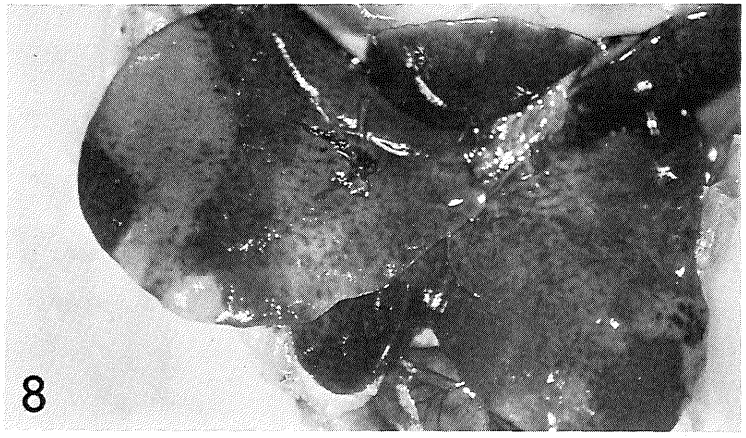
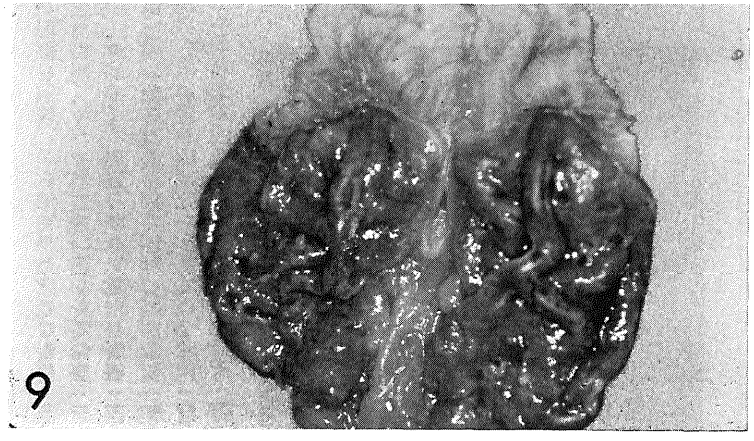


写真 1. 死後 0 時間：死体硬直はみられず，腹部を持ち上げると完全に折れ曲る．（死体硬直－）
写真 2. 死後 3 時間：死体硬直が顕著で，腹部を持ち上げると，頸，躯幹，尾が一直線を呈する（死体硬直＋）
写真 3. 死後24時間：死体硬直の寛解が進み腹部を持ち上げると，くの字状を呈する．（死体硬直＋）
写真 4. 死後 0 時間：眼球は透明で少量の涙液がみられる．
写真 5. 死後 6 時間：眼瞼がやや閉じ半眼状となり，眼球は白濁し，少量の赤色涙液がみられる．
写真 6. 死後24時間：眼球の白濁はほぼ消失し，表面に微細なしわがみられ，乾燥している．





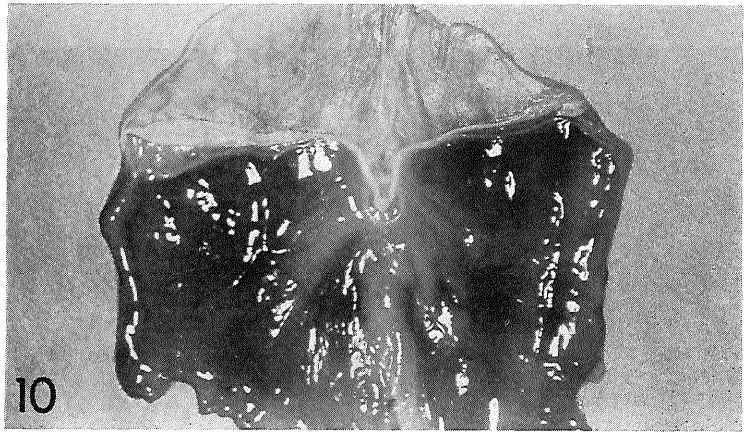


写真 7.　死後12時間：左鼠径部皮下に黒色斑がみられる．

写真 8.　死後24時間：肝臓は部分的に灰赤色となり虎斑模様を呈する．

写真 9.　死後 0 時間：前胃および腺胃で皺襞が明瞭にみられる．

写真10.　死後24時間：前胃および腺胃で皺襞が消失し，前胃ヒダ状縁の部分で粘膜の剥離がみられる．

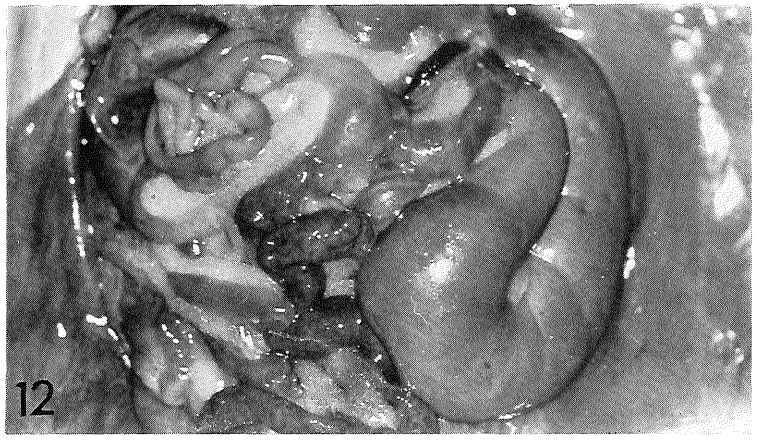


写真 11.　死後 0 時間：盲腸で血管走行が明瞭にみられ，腹腔内脂肪は不透明な乳白色を呈する．

写真 12.　死後24時間：盲腸で血管走行がみられず，腹腔内脂肪は透明感を増し微細な油滴状を呈する．また腸管で透明感の増加および軟化がみられる．

他　誌　発　表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1977.8—1978.7)

Influence of Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) to Serum Protein Components in Rats

S. Oishi : Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18(6), 773, 1977

ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) 投与ラットの血清蛋白を電気泳動的に分離，定量した．その結果特に γ_1-グロブリン，β-グロブリンに変化がみられた．これらの結果を PCDF の肝障害作用や免疫能との関連について議論した．

Comparative Toxicity of Polychlorinated Biphenyl and Dibenzofurans in the Rats

S. Oishi, M. Morita, and H. Fukuda : Toxicol. Appl. Pharmacol., 43(1), 13, 1978

ポリ塩化ビフェニル (PCB) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) を飼料に添加してラットに4週間摂取させた．その結果，耳介部に塩素痤瘡様皮疹が PCDF 10ppm 群に生じた．また胸腺重量の減少，溶血性貧血がPCDF 群にみられ血清生化学的検査値にも変化がみられた．これらの結果を構造の類似した 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンと比較し，また PCB 中毒（カネミ油症）との関連において議論した．

Is a Mixture of Polychlorinated Dibenzofurans an Inducer of Hepatic Porphyria ?

S. Oishi and K. Hiraga : Fd. Cosmet. Toxicol., 16(1), 47, 1978

肝ポルフィリン症の誘発性をポリ塩化ビフェニル (PCB) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) 投与ラットで比較した．その結果 PCB は δ-アミノレブリン酸合成酵素の著しい活性上昇と肝ポルフィリン量の増加が認められた．しかし PCDF は肝ポルフィリン症の誘発能は非常に弱かった．

Polychlorinated Dibenzofurans—Potent Inducers of Rat Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes

S. Kawano and K. Hiraga : Jap. J. Pharmacol., 28(2) 305, 1978

The effects of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), toxic contaminants of commercial polychlorinated biphenyl preparations (PCBs), on the induction of hepatic drug-metabolizing enzymes were studied in the rat. PCDFs were about a thousand times more potent than PCBs (Kanechlor 500) as inducers of cytochrome P-450. Rats given 10 μg/kg of PCDFs intraperitoneally for 3 days showed significantly increased hepatic cytochrome P-450 levels. At the highest dose tested, 1000μg/kg, a two-fold increase of cytochrome P-450 and a three-fold increase of *p*-nitroanisole demethylase activity were observed. PCDFs and 3-methylcholanthrene had quite similar effects on microsomal drug-metabolizing enzymes. Both drugs increased *p*-nitroanisole demethylase activity strikingly and aniline hydroxylase activity moderately, but produced little change in aminopyrine demethylase activity. α-Naphthoflavone, which is known to be a specific inhibitor of aryl hydrocarbon hydroxylase induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, inhibited at low concentrations *p*-nitroanisole demethylase activity of rats previously treated with both drugs. Further, both drugs increased the 455 nm to 430 nm peak ratios of ethyl isocyanide difference spectra. Following three daily doses of PCDFs (100 μg/kg), cytochrome P-450 level and *p*-nitroanisole demethylase activity remained elevated for over 15 days, with a decrease to control after 30 days. Such indicates the slow excretion of PCDFs.

Dose-Response Study of Hemorrhagic Death by Dietary Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Male Rats

O. Takahashi and K. Hiraga : *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 43(2), 399, 1978

Sprague-Dawley 系の雄ラットに 0.58, 0.69, 0.83, 1.00, 1.20あるいは1.44%のジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を含む24%カゼイン食を40日間自由摂取させた．死亡率は用量に依存しており，死亡は BHT を526 mg/kg/日以上与えた場合に起こった．LD 50 (40日) は 760 (669—864) mg/kg/ 日であった．死亡動物には，胸腔，腹腔，外部出血などの大量出血が観察された．さらに，BHT を与えたすべての群の生存動物にも，精巣上体，精巣，膵臓などの器官に出血が観察された．しかし，この出血は対照群には見られなかった．プロトロンビン指数は BHT を与えた全生存動物で低下した．低下の程度は BHT の1日摂取量に依存していた．これらの観察は，BHT あるいはその代謝中間体がラットにおいて出血をひき起こすことを示唆している．

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT) : Subcellular Distribution of BHT in Rat Liver

Y. Nakagawa, M. Ikawa and K. Hiraga : Chem. Pharm. Bull., 26(2), 374, 1978

Biological fate of ^{14}C-labeled butylated hydroxytoluene (^{14}C-BHT) in rat liver was investigated. After a single oral dose of ^{14}C-BHT, the radioactivity was reached a maximum concentration in the liver after 6 hr and in the serum after 6–12 hr.

A bulk of radioactivity was found in the supernatant fraction, although the amount of radioactivity and specific radioactivity increased in the microsomal fraction with time. The radioactivity which was incorporated into the microsomal fraction was mainly located in the smooth ER 3–6 hr after the administration. These results suggest that the radioactivity, which was incorporated into the supernatant fraction, migrated to the microsomal fraction.

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1977.8—1978.7)

益淵正典，縄井寿美子，平賀興吾，広門雅子：**サッカリン不純物の染色体異常誘発性**
日本環境変異原研究会第6回研究発表会（1977. 9）

吉田誠二，益淵正典，平賀興吾：**人工甘味料の CHO-kl 細胞における染色体異常誘発性**
日本環境変異原研究会第6回研究発表会（1977. 9）

益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**EMS，MMC の JCL-ICR マウスにおける優性致死（DL）評価**
日本環境変異原研究会第6回研究発表会（1977. 9）

益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**優性致死試験法の検討（1） 長期投与条件下における優性致死作用**
日本環境変異原研究会第6回研究発表会（1977. 9）

吉田誠二，益淵正典，高橋昭夫，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**ICR 系マウスにおける etylmethanesulfonate（EMS）単一投与後の優性致死作用**
日本遺伝学会第49回大会（1977. 9）

高橋昭夫，益淵正典，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**ICR 系マウスにおける mitomycin C（MMC）の優性致死作用**
日本遺伝学会第49回大会（1977. 9）

益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：**ICR 系マウスにおける EMS，MMC 精子形成期間連続投与後の優性致死誘発性**
日本遺伝学会第49回大会（1977. 9）

伊川三枝子，米山允子，平賀興吾：**種々の界面活性剤における亜急性毒性試験 肝，腎酵素への影響**
日本公衆衛生学会第36回（1977. 10）

高橋省，林田志信，平賀興吾：**2, 4, 6-Tri-*tert*-butylphenol の出血致死効果と種差**
第57回日本薬理学会関東部会（1977. 10）

高橋省，平賀興吾：**BHT による出血致死効果（第10報）現在までの要約と今後の問題点**
第51回日本薬理学会総会（1978, 3）

大石眞之，平賀興吾：**PCB および PCDF の比較毒性（第4報）**
第51回日本薬理学会総会（1978. 3）

中川好男，伊川三枝子，平賀興吾：**ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の肝細胞内運命**
日本薬学会第98年会（1978. 4）

大石眞之，平賀興吾：**PCB および PCDF の比較毒性（第5報）**
第48回日本衛生学会総会（1978. 4）

川野澄江，平賀興吾：**ラット肝薬物代謝酵素に及ぼす食餌タンパク質欠乏の影響**
昭和53年度日本農芸化学会（1978. 4）

市川久次，小林博義，中尾順子，平賀興吾，中川茂男：**幼若ラット赤血球内に存在する電気泳動的に特異な蛋白**
第40回日本血液学会総会（1978. 4）

坂本義光，神谷信行，平賀興吾：**クロム鉱さい粉じんのラットによる1月間持続吸入実験**
第5回毒作用研究会（1978. 5）

福森信隆，平賀興吾：**BHT と ethanol のラット肝におよぼす相互作用**
日本薬理学会第58回関東部会（1978. 6）

福森信隆，三栗谷久敏，平賀興吾：**BHT によるラットエタノール脂肪肝の微細構造変化**
日本電子顕微鏡学会第34回学術講演会（1978. 6）

原しげ子，原論吉，中尾順子，中尾真：**ブタ脳 Na，K-ATPase に対する Showdomycin 阻害**
第50回日本生化学大会（1977. 10）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

三　村　秀　一　（委員長）
高　橋　保　二
坂　井　千　三
原　田　裕　文
村　上　　一
直　井　家寿太
石　川　隆　章
平　賀　興　吾
中　尾　順　子

昭和53年12月11日　発行

規格表　第 2 類
印刷番号（53）786
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報 第29－2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）