

u31e-2

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

30-2

1979

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



## 序

東京都の財政危機と、新知事の誕生により都行政の体質変換が行われているなかで、当研究所は、世俗を離れて、日々試験検査、調査研究に明け暮れております。

本日、ここに昭和53年度の研究成果を第30号として刊行することが出来ましたので、御批判御指導をお願いする次第です。

地方衛生研究所は、全国に68ヶ所あり、それぞれの地方において、試験検査・調査研究、技術研修および衛生情報解析に、それぞれの特長を生かして活躍しております。そして、それぞれ研究報告を出版しておりますが、それらの報告には、研究所間の共通な課題が数多く認められます。これらの課題報告を総合的に判断すると、全国的な規模で結論が得られるものと考え、努めて、他研究所の調査研究報告を読ませていただいております。

これからは、地方衛生研究所を結ぶ研究協力により、国レベルの大きな働きが出来るものと考えます。

昭和50年より始まった23区への衛生行政の移管も順調に進行しつつありますが、これにともない簡易な試験検査は23区で行われるようになり、当研究所の試験検査数は減少しております。一方質的に見ると高度の検査は増加の傾向にあります。これは当然のことで、物事がわかってくれば、疑問も生ずるのであって、疑問を解くため衛生研究所に依頼検査となってくるものと思われまふ。当研究所ではこれらの疑問に即答出来るように、更に研鑽に努めるつもりでおります。今後調査研究成果の提供、技術情報の提供、研修等に力をそそぎたいと存じます。

この研究年報は当研究所研究員の一年間の苦勞の結晶でありますので、都区における試験検査にも、また行政指導にも御活用願えれば幸と存じます。

擧筆するにあたり、本書の編集委員ならびに関係諸氏の献身的な御奉仕を深く感謝いたします。

昭和54年12月

東京都立衛生研究所長 野 牛 弘

# 目 次

## 報 文

|                                                                                      |                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| マウスに対するジブチルヒドロキシトルエンの短期毒性<br>.....高橋 省, 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 多田 幸恵, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 1                                  |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の幼若ラットに対する影響 (第1報)<br>.....                                      | 小林 博義..... 5                       |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 投与ラットにおける回復実験 (第2報)<br>.....                                     | 市川 久次, 小林 博義, 中尾 順子, 平賀 興吾..... 12 |
| ジブチルヒドロキシトルエンの出血致死効果と老齢ラット<br>.....                                                  | 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) の DT-diaphorase 活性に対する影響について (第2報)<br>.....                      | 鈴木 英子, 中尾 順子, 平賀 興吾..... 25        |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の生体内運命 (第3報)<br>BHT と肺ミクロゾームの <i>in vitro</i> における結合<br>.....    | 中川 好男, 中尾 順子, 平賀 興吾..... 28        |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 長期投与にみられたラット肝の微細構造変化<br>.....                                    | 福森 信隆, 三栗谷久敏, 平賀 興吾..... 31        |
| 2-アミノアントラセン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<br>.....                              | 藤田 博, 平賀 興吾..... 41                |
| オルトフェニルフェノールナトリウムの細胞遺伝学的研究<br>.....                                                  | 吉田 誠二, 縄井寿美子, 平賀 興吾..... 44        |
| チアベンダゾールの細胞遺伝学的研究<br>.....                                                           | 吉田 誠二, 縄井寿美子, 平賀 興吾..... 48        |
| 姉妹染色分体交換 (SCE) による変異原物質の検索 (第2報) 防ばい剤2種の SCE 誘発性<br>.....                            | 縄井寿美子, 吉田 誠二, 中尾 順子, 平賀 興吾..... 51 |
| オルトフェニルフェノールナトリウムのマウスを用いた急性毒性試験<br>.....                                             | 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 平賀 興吾..... 54  |
| オルトフェニルフェノールナトリウムのラットを用いた経口急性毒性試験<br>.....                                           | 田山 邦昭, 井口 重孝, 平賀 興吾..... 57        |
| オルトフェニルフェノールナトリウムのラットを用いた亜急性毒性試験<br>.....                                            | 井口 重孝, 田山 邦昭, 平賀 興吾..... 67        |
| チアベンダゾール (TBZ) の亜急性毒性について<br>.....                                                   | 米山 允子, 伊川三枝子, 平賀 興吾..... 80        |
| オルトフェニルフェノール抗原化の試み<br>.....                                                          | 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾..... 85       |

|                                                                 |                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| アセトアミノフェンのラットを用いた経口急性毒性                                         | 林田 志信, 高橋 博, 平賀 興吾                                              | 90  |
| アセトアミノフェンのラットを用いた1, 3および6日間経口毒性試験                               | 藤井 孝, 福森 信隆, 多田 幸恵, 坂本 義光, 三栗谷久敏,<br>湯澤 勝廣, 矢野 範男, 長澤 明道, 平賀 興吾 | 93  |
| ラット顎下腺の微細構造におよぼすアセトアミノフェンの影響                                    | 三栗谷久敏, 福森 信隆, 平賀 興吾                                             | 105 |
| ポリ塩化ジベンゾフランおよびジベンゾジオキシンの胎児および乳児への移行                             | 大石 真之, 平賀 興吾                                                    | 113 |
| 市販有機塩素剤に関する毒性学的研究                                               | 川野 澄江, 広瀬久美子, 井口 重孝, 平賀 興吾                                      | 116 |
| ラットおよびマウスの肝9,000×g上清分画による2-アセチルアミノフルオレンの代謝活性化におよぼす薬物代謝酵素誘導剤の影響  | 小嶋 昭江, 平賀 興吾                                                    | 124 |
| ラット尿中の蛋白質(第3報) カドミウムによる腎障害と尿中蛋白質                                | 中尾 順子, 道源 正子, 樺島順一郎, 藤井 芳美                                      | 128 |
| Showdomycin の Na, K-ATPase 阻害機構(第3報) リン酸化中間体形成と阻害速度との関係         | 原 しげ子, 原 諭吉, 中尾 順子                                              | 133 |
| アデニレートシクラーゼにおよぼすバナデートの影響                                        | 中川 敦子, 中尾 順子                                                    | 136 |
| 保存血の寿命延長に関する研究                                                  | 長井二三子, 中尾 順子, 中尾 真                                              | 140 |
| 蛍光抗体法によるラット小腸アルカリフォスファターゼの検出                                    | 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾                                            | 143 |
| Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による周生期ラットの赤血球膜浸透圧抵抗について           | 市川 久次, 小林 博義, 中尾 順子                                             | 151 |
| ラット器官重量(第2報) 肺重量について                                            | 坂本 義光, 平賀 興吾                                                    | 155 |
| ラットにおける死後変化の経時的観察 2. 光顕的検索                                      | 多田 幸恵, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 藤井 孝, 平賀 興吾                         | 160 |
| 液体シンチレーション測定法によるRI研究室内 <sup>3</sup> H, <sup>14</sup> Cの測定管理について | 金西 信次, 藤田 博, 野牛 弘                                               | 173 |
| 他誌発表                                                            |                                                                 | 177 |
| 学会発表                                                            |                                                                 | 179 |



# CONTENTS

## REPORTS

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Short-Term Toxicity of Butylated Hydroxytoluene in Mice<br>..... O. Takahashi, A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, Y. Tada, T. Nakao and K. Hiraga.....                                             | 1  |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Infant and Young Rats (I)<br>..... H. Kobayashi.....                                                                                           | 5  |
| Effects of Discontinuation on Administration with Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats (II)<br>..... H. Ichikawa, H. Kobayashi, T. Nakao and K. Hiraga.....                               | 12 |
| Hemorrhages in Aged Rats Caused by Dietary Butylated Hydroxytoluene<br>.....O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                                       | 22 |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on DT-diaphorase Activity (II)<br>..... H. Suzuki, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                                    | 25 |
| Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (III) Binding <i>in Vitro</i> of BHT to Lung Microsomes<br>.....Y. Nakagawa, T. Nakao and K. Hiraga.....                                        | 28 |
| A Case of Ultrastructural Alterations in Rat Hepatocytes after Long-Term Administration<br>of Butylated Hydroxytoluene (BHT)<br>..... N. Fukumori, H. Mikuriya and K. Hiraga.....           | 31 |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of 2-Aminoanthracene in the<br>Salmonella/microsome Test<br>..... H. Fujita and K. Hiraga.....                                      | 41 |
| Cytogenetic Studies of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate<br>..... S. Yoshida, S. Nawai and K. Hiraga.....                                                                                      | 44 |
| Cytogenetic Studies of Thiabendazole<br>..... S. Yoshida, S. Nawai and K. Hiraga.....                                                                                                       | 48 |
| Examination of Mutagens by Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) (II)<br>Test of Two Fungicides by Induced SCE, <i>in vitro</i><br>.....S. Nawai, S. Yoshida, T. Nakao and K. Hiraga..... | 51 |
| Acute Oral Toxicity Tests of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) in Mice<br>..... A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga.....                                                         | 54 |
| Acute Oral Toxicity of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) in Rats<br>.....K. Tayama, S. Iguchi and K. Hiraga.....                                                                      | 57 |
| Subacute Toxicity of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate by Food Administration to Rats<br>.....S. Iguchi, K. Tayama and K. Hiraga.....                                                          | 67 |
| Subacute Toxicity of Thiabendazole<br>..... M. Yoneyama, M. Ikawa and K. Hiraga.....                                                                                                        | 80 |
| Haptenization of <i>o</i> -Phenylphenol<br>..... M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                                                                     | 85 |

|                                                                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Acute Oral Toxicity of Acetaminophen in Rats<br>..... S. Hayashida, H. Takahashi and K. Hiraga.....                                                                                                 | 90         |
| Toxicological Studies on Rats Fed with Acetaminophen for 1, 3 or 6 Days<br>..... T. Fujii, N. Fukumori, Y. Tada, Y. Sakamoto, H. Mikuriya,<br>K. Yuzawa, N. Yano, A. Nagasawa and K. Hiraga.....    | 93         |
| Ultrastructural Changes of Submandibular Gland in Rat Administered Acetaminophen in Diet<br>..... H. Mikuriya, N. Fukumori and K. Hiraga.....                                                       | 105        |
| Transfer of Polychlorinated Dibenzofuran and Dibenzodioxin to the Fetuses and Sucklings of Mice<br>..... S. Oishi and K. Hiraga.....                                                                | 113        |
| Toxicological Studies of Polychlorinated Aromatic Compounds in Female Rats<br>..... S. Kawano, K. Hirose, S. Iguchi and K. Hiraga.....                                                              | 116        |
| Effects of Drug-Metabolizing Enzyme Inducers on the Mutagenic Activation of<br>2-Acetylaminofluorene by the Rat and Mouse Liver 9,000×g Supernatant Fractions<br>..... A. Kojima and K. Hiraga..... | 124        |
| Proteins in Rat Urine (III) Nephrotoxicity by Cadmium Administration and Proteins in that Urine<br>..... T. Nakao, M. Dogen, J. Kabashima and Y. Fujii.....                                         | 128        |
| Inhibition of Na, K-ATPase by Showdomycin (III) Relation of EP-formation with the Inhibition Rate<br>..... S. Hara, Y. Hara and T. Nakao.....                                                       | 133        |
| Effects of Vanadate on Adenylate Cyclase in Rat Brain<br>..... A. Nakagawa and T. Nakao.....                                                                                                        | 136        |
| Studies on Prolongation of Viability of Stored Blood<br>..... F. Nagai, T. Nakao and M. Nakao.....                                                                                                  | 140        |
| Detection of the Intestinal Alkalinephosphatase of Rat by the Fluorescent Antibody Techniques<br>..... M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                       | 143        |
| Osmotic Fragilities of Perinatal Rats Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge(CPC)Method<br>..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao.....                                            | 151        |
| Organ Weight of Rats (II) Liver Weight<br>..... Y. Sakamoto and K. Hiraga.....                                                                                                                      | 155        |
| Microscopical Observations of Postmortem Changes on Rats in Course of Time<br>..... Y. Tada, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, T. Fujii and K. Hiraga.....                                           | 160        |
| Control and Measurement of $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ by Liquid Scintillation Counter<br>..... N. Kananishi, H. Fujita and H. Yagyu.....                                                        | 173        |
| <b>SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS.....</b>                                                                                                                                               | <b>177</b> |
| <b>THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS .....</b>                                                                                                                                   | <b>179</b> |

# 報 文

REPORTS

## Short-Term Toxicity of Butylated Hydroxytoluene in Mice

OSAMU TAKAHASHI\*, AKIO OGATA\*, HIROSHI ANDO\*, YOSHIKAZU KUBO\*,  
YUKIE TADA\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords** : toxicity, butylated hydroxytoluene, mice

Butylated hydroxytoluene (BHT) is a hindered phenolic antioxidant widely used as a food preservative or rubber and petroleum stabilizer. Many toxicological studies were summarized by several authors<sup>1-4)</sup>. The short-term toxicity of BHT was mostly studied using the rat as an experimental animal and the major effect of BHT was the induction of hepatic hypertrophy accompanied with the increase in hepatic microsomal enzymes in rats. On the other hand, it was reported that the lung damage caused by intraperitoneally or orally injected BHT was a toxicity to mice<sup>5-7)</sup>. We reported the hemorrhagic death by dietary BHT in rats<sup>8)</sup>, and found the species difference in the hemorrhagic effect of BHT. These findings suggest that the safety evaluation of BHT should be specified depending upon the toxicological data using more animal species.

The present report describes the general signs of intoxication caused by BHT in male and female mice.

### Materials and Methods

Male and female ICR mice (CLEA Japan Inc.), 4 weeks old, were fed a laboratory ration (CLEA CE-2) in plastic cages for 2 weeks and then divided into groups, housed individually in a stainless wire cage and fed the BHT-containing experimental diet for 3 weeks. The 24.00% casein-purified diet was used as a basal<sup>9)</sup>, and given to each mouse in a form of a kneaded dough with some water. The concentration of BHT (from Tokyo Kasei Kogyo) was 1.20% which was nearly equal to the hemorrhagic LC<sub>50</sub>(40days) in rats. In order to compare with the effect on rats and mice, Sprague-Dawley rats (CLEA) were used. The feeding procedures were similar to those to mice. All experiments were done in a controlled room at 25±1°C and 50±5% humidity.

Body weights, food intakes and the outward signs of intoxication were recorded during the experimental period. BHT intakes were calculated from food intakes. Animals were killed by a blow on the head. Then, blood was collected and some organs were removed and weighed. Whole blood coagulation times were measured by the method of Sahli and Fonio described by Matsuoka<sup>9)</sup>. Hematological counts were made by the Coulter Counter Model S (Coulter Electronics Inc., Hialeah, Florida).

### Results and Discussion

The changes in body weight and food intake are shown in Fig. 1. The stress after alterations in cages and food quality might have caused depression of body weights at early period in male and female mice. Body weight and food intake of mice fed BHT were lower than controls in male, but were equal or higher than controls in female. The changes in body weight and food intake of Sprague-Dawley rats are shown in Fig. 2. Although the lag of adaptation in mice was longer than in rats, effects of BHT on body weights were lesser in mice than rats. BHT intakes calculated from food intakes were about 1.9g/kg in male and about 2.5g/kg in female mice.

The following signs were noted with mice fed BHT for 3 weeks. A mild diarrhea on Day 1-5, hair roughening on Day 6-9 and some stimulated behavior on and after Day 9 in male mice, and a diarrhea in some female mice, whose stools were yellowish.

\* 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

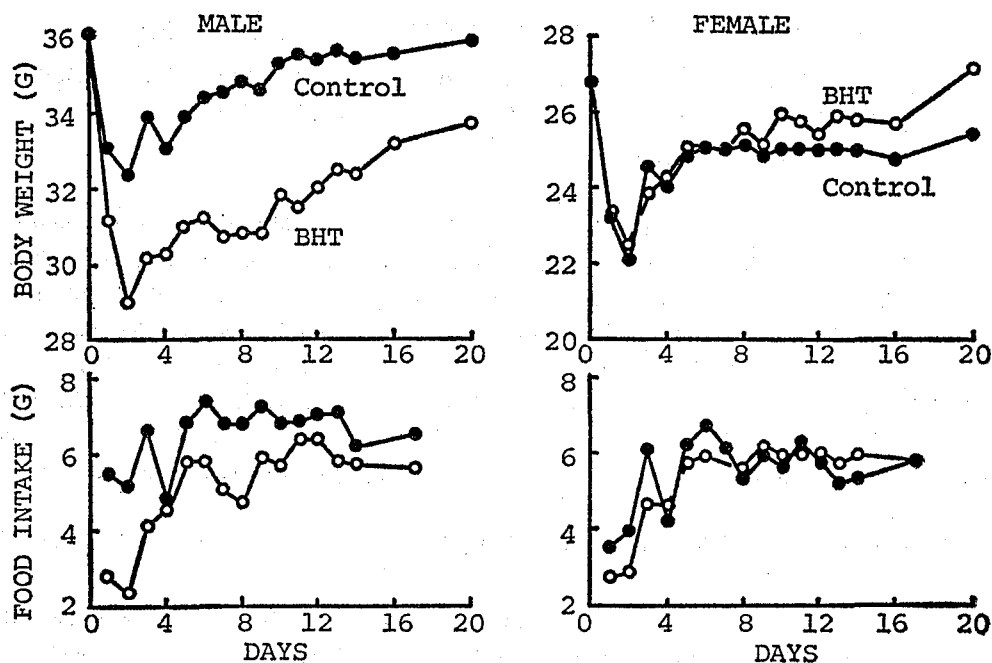


Fig. 1. Effects of BHT on Mean Body Weight and Food Intake in ICR Mice  
Each point represents the mean of 5 animals in control or 10 animals in BHT-given group.

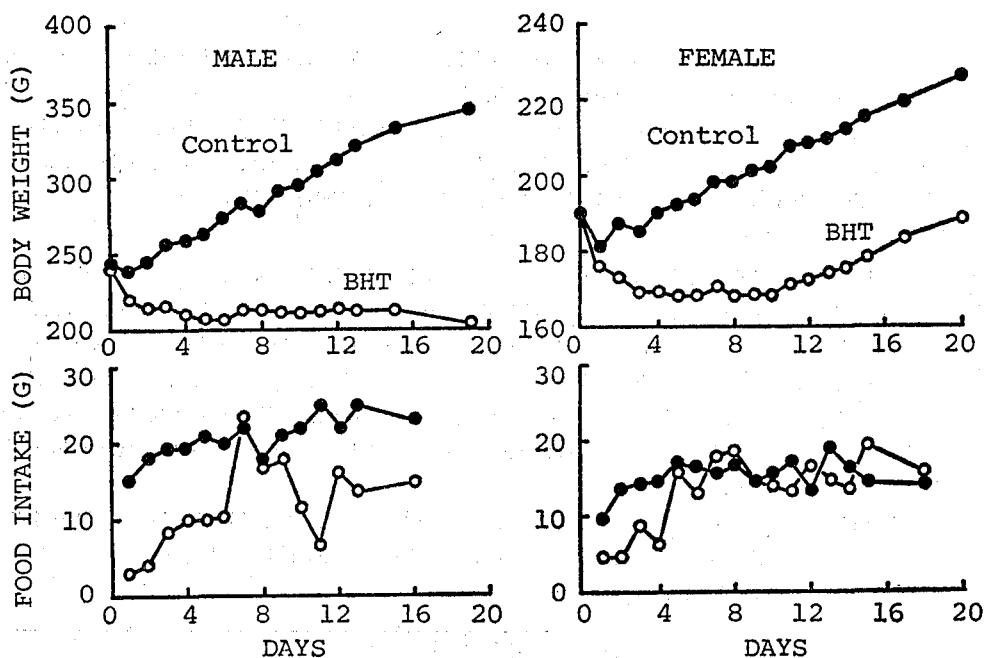


Fig. 2. Effects of BHT on Mean Body Weight and Food Intake in Sprague-Dawley Rats  
Each point represents the mean of 5 animals in control or 10 animals in BHT-given group.

Gross findings in autopsy are shown in Table 1. Organ weights and hematological values are shown in Table 2 and 3. The enlargement of liver or caecum was markedly caused by dietary BHT in mice, and these effects were similar to those in rats. The lungs were enlarged in male mice, which suggested that dietary BHT may also cause the enlargement of lungs in mice as well as intraperitoneally or orally BHT<sup>5-7</sup>. However, in rats, the enlargement of lungs was not caused even by intraperitoneally injected BHT (Table 4). The interesting data in this study were the enlargement of pancreas, thickening of duodenum and greenish coloring of liver, which suggested the possibility of the functional acceleration in the digestive process in female mice. The histological

observations of those livers gave no abnormal figures, but we had already found the deep-green coloring of liver by feeding of BHT in combination with linear alkylbenzene sulfonate for 9 months in male mice<sup>10</sup>. It appeared that BHT also influenced the reticulo-endothelial system, which contained the enlargement of spleen and thymus and the increase in white blood cells in female mice. Whole blood

Table 1. Gross Findings in Autopsy

|        | Groups  | No. of animals | Observations            |    |
|--------|---------|----------------|-------------------------|----|
| MALE   | Control | 5              | —                       |    |
|        | BHT     | 10             | Enlargement of caecum   | 10 |
|        |         |                | Enlargement of lungs    | 7  |
|        |         |                | Enlargement of heart    | 2  |
| FEMALE | Control | 5              | Enlargement of lungs    | 2  |
|        | BHT     | 10             | Enlargement of caecum   | 10 |
|        |         |                | Thickening of duodenum  | 10 |
|        |         |                | Enlargement of pancreas | 2  |
|        |         |                | Greenish liver          | 2  |
|        |         |                | Enlargement of spleen   | 4  |
|        |         |                | Enlargement of thymus   | 6  |

Table 2. Effects of BHT on Organ Weights in Mice

| Organs      | Absolute weight (mg) |       |        |        | Relative weight (mg/100g body weight) |         |        |         |
|-------------|----------------------|-------|--------|--------|---------------------------------------|---------|--------|---------|
|             | MALE                 |       | FEMALE |        | MALE                                  |         | FEMALE |         |
|             | Cont.                | BHT   | Cont.  | BHT    | Cont.                                 | BHT     | Cont.  | BHT     |
| Brain       | 497                  | 486   | 519    | 501    | 1414                                  | 1432    | 2059   | 1857*   |
| Thymus      | 59.0                 | 41.7  | 55.3   | 70.9   | 162                                   | 123     | 217    | 258     |
| Lungs       | 202                  | 264   | 280    | 265    | 563                                   | 788*    | 1106   | 977     |
| Heart       | 146                  | 132   | 117    | 112    | 408                                   | 393     | 462    | 415     |
| Spleen      | 75.7                 | 92.9  | 71.8   | 86.2*  | 212                                   | 276     | 282    | 321     |
| Adrenal (R) | 1.75                 | 1.79  | 3.41   | 3.37   | 4.90                                  | 5.33    | 13.5   | 12.4    |
|             | (L)                  | 1.70  | 1.88   | 3.73   | 4.78                                  | 5.63    | 14.8   | 13.7    |
| Liver       | 1871                 | 2231* | 1288   | 1978** | 5229                                  | 6611*** | 5060   | 7263*** |
| Kidney (R)  | 280                  | 260   | 171    | 167    | 791                                   | 768     | 674    | 615*    |
|             | (L)                  | 270   | 242    | 167    | 761                                   | 715     | 662    | 595*    |
| Testis (R)  | 125                  | 140   |        |        | 353                                   | 418     |        |         |
|             | (L)                  | 123   | 130    |        | 345                                   | 388     |        |         |
| Ovary (R)   |                      |       | 5.26   | 5.28   |                                       |         | 20.7   | 19.5    |
|             | (L)                  |       | 5.39   | 4.89   |                                       |         | 20.9   | 17.9    |
| Uterus      |                      |       | 105    | 81.0   |                                       |         | 416    | 302     |

Each value represents the means of 5 in control or 10 animals in BHT-given group, and those marked with asterisks differ significantly (Student's *t*-test) from the appropriate control values:

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Table 3. Effects of BHT on Hematological Values in Mice

|                                         | MALE  |      | FEMALE |       |
|-----------------------------------------|-------|------|--------|-------|
|                                         | Cont. | BHT  | Cont.  | BHT   |
| White blood cells( $10^3/\text{mm}^3$ ) | 3.36  | 3.36 | 2.24   | 3.76* |
| Red blood cells ( $10^6/\text{mm}^3$ )  | 8.70  | 8.52 | 8.16   | 8.08  |
| Hemoglobin (g/100mL)                    | 16.1  | 15.2 | 15.4   | 14.9  |
| Hematocrit (%)                          | 43.2  | 41.4 | 42.2   | 42.1  |
| Mean corpuscular volume( $\mu^3$ )      | 98.0  | 96.2 | 102    | 102   |
| Whole blood coagulation time (min)      | 4.67  | 5.57 | 7.27   | 5.68  |

Each value represents the means of 5 in control or 10 animals in BHT-group, and those marked with asterisks differ significantly (Student's *t*-test) from the control values: \* $P < 0.05$ .

Table 4. Effect of Intraperitoneally Injected BHT on Lung Weight in Sprague-Dawley Rats

|             |                                                 | Cont. | BHT<br>( $\times 3$ days)<br>380mg 760mg |       |
|-------------|-------------------------------------------------|-------|------------------------------------------|-------|
| Lung weight | Absolute (g)                                    | 1.52  | 1.71                                     | 1.26  |
|             | Relative ( $\text{g}/100\text{g body weight}$ ) | 0.725 | 0.875                                    | 0.647 |

Each value represents the means of 5 rats, whose weights of livers were significantly increased by both doses of BHT versus control.

coagulation time was not prolonged.

These results suggest that the toxicity of BHT in mice is largely different from those in rats and effects on body weight or hemostasis may be slighter than in rats but effects on some other functions appear to be much stronger than in rats.

### References

- 1) Hathway, D. E.: *Advan. Fd Res.*, 15, 1, 1966
- 2) Brannen, A. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59, 1970
- 3) Daniel, J. W.: *Proc. Inter. Congr. Fd Sci. Technol.*, 3rd ed. 793, 1970, Washington, D. C.
- 4) FAO/WHO: *WHO Fd Add. Ser.*, No. 5, 1974
- 5) Marino, A. A. and Mitchell, J. T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140, 122, 1972
- 6) Witschi, H. and Saheb, W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147, 690, 1974
- 7) Witschi, H. and Lock, S.: *Toxicology*, 9, 137, 1978
- 8) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 399, 1978
- 9) Matsuoka, M.: Hemorrhagic Diathesis and Thrombosis (in Japanese), 1969, Kinbara Press, Tokyo
- 10) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Tokyo Eiken Nempo*, 27-2, 86, 1976

### マウスに対するジブチルヒドロキシトルエンの短期毒性

高橋 省\*, 小縣 昭夫\*, 安藤 弘\*, 久保 喜一\*  
多田 幸恵\*, 中尾 順子\*, 平賀 興吾\*

酸化防止剤のジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 24% カゼイン基本食に 1.20% になるように混ぜ、雌雄マウスに 3 週間与えた。BHT 投与群は、雄マウスで、体重増加の抑制、盲腸肥大、肺肥大、肝臓肥大、雌マウス

で、盲腸肥大、十二指腸肥厚、脾臓肥大、緑色肝、肝臓肥大、脾臓肥大、胸腺肥大、白血球の上昇を示し、それらは、ラットに対する BHT の影響とは異ったものを多く含んでいた。なお、出血傾向は認められなかった。



## ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の幼若ラットに対する影響 (第1報)

小林 博 義\*

### Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Infant and Young Rats (I)

HIROYOSHI KOBAYASHI\*

**Keywords** : ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, 幼若ラット infant and young rat, 毒性 toxicity

#### 緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の毒性研究において離乳後のラットを用いた検討は数多くなされているが, 幼小時の検討はほとんどない<sup>1-7)</sup>. そこでラットを用い BHT 添加飼料を出生直後より与え, 経母乳摂取による14日令までの BHT の影響を体重, 器官重量, 血液, 血清生化学成分の変化により観察した.

#### 実験材料ならびに方法

**試料** BHT (3,5 di tert butyl 4 hydroxytoluene) は和光純薬製 (Lot No KIK 5562) 白色結晶粉末で mp 69.5° のものを使用した. 0% (対照), 0.08%, 0.25%, 0.50% の割合で日本クレア 飼料粉末飼料 (CE-2) に添加後固型乾燥し実験飼料とした.

**動物** 自家繁殖し, 日本クレア 飼料 CE-2 飼料にて飼育した Wistar-SLC 系由来ラットを兄妹交配して得た母とその仔を用いた. 動物は, 室温  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 照明時間午前6時より午後5時を条件とした飼育室にて, 生後14日目まで母ラットとともに, プラスチックケージにカンナグズ床敷にて飼育した.

**実験方法** BHT 添加飼料を出生日より投与を開始, 毎日体重を雌雄の区別なく測定, 症状観察, 飼料摂取量の測定を行なった. 実験10日および14日目にそれぞれ母仔の血液学的, 血清生化学的検査と器官重量の測定を行なった.

**血液学的ならびに血清生化学的検査法** 断頭屠殺時に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), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を Coulter Counter-Model-S により測定した. 血清総蛋白 (TP), グルコース (GLU), 尿素窒素 (SUN), 総コレステロール量 (CHO), トランスアミラーゼ活性 (GPT, GOT), アルカリホスファターゼ活

性 (ALP) を自動分析装置 (日立 M-400) によって測定した.

**器官重量** 断頭放血後速やかに, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓を摘出秤量した.

**飼料摂取量** 飼料量を毎日秤量し前日との差を摂取量として母体重 100g 当り飼料摂取量をもって各群を比較した.

#### 実験結果

**一般状態と剖検所見** 飼料摂取量 (飼料消費) で, 0.08%, 0.25%, 0.50% BHT 各投与群とも2日目まで少ない傾向がみられたが以後は対照群との差はみられなかった.

0.25%, 0.50% 投与群の母は対照群にくらべ保育に専念しにくい様子が, 哺乳姿勢や子供の手入れなどにぎこちなさとして散見された. また仔を食殺あるいは仔を分散して哺育する現象が一部の母にみられたがこの現象は前述の保育がぎこちない母に多くみられた.

仔の一般状態は用量による著差はなく, 被毛の生え始め, 開眼時期, 歩行開始, 身繕いなどに差はみられなかった. 仔の解剖時に腹腔出血を一部 (10日飼育0.08%群雄1匹, 0.25%群雄1匹, 14日飼育0.25%群雄1匹) にみとめた. この腹腔出血ラットは無出血の同一投与群ラットにくらべ脾臓重量の増加している傾向がみられた.

また BHT 投与群で用量と関係なく, 5~8日頃両眼下縁と鼻根をはさんで左右にくまどり様皮下暗赤色の帯を示すものが散見された.

剖検時 BHT 摂取群は肝臓の辺縁が丸く表面が粗になっているものが多数を占めた.

**体重増加率** BHT 0.08%, 0.25%, 0.50% 各投与群母仔とも対照群に近い増加率を示した.

**血液学的検査** 0.08%, 0.25%, 0.50% 各投与群母仔とも2~3の差はみられるが用量との関係ある変化はみられなかった.

\* 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

Table 1. Hematology

| Day                   | Sex | Group | No. of Rat | WBC<br>× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | RBC<br>× 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> | Hgb<br>g/dl | Hct<br>%  | MCV<br>μ <sup>3</sup> | MCH<br>μg | MCHC<br>% |        |
|-----------------------|-----|-------|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|--------|
| Infant and Young Rats | 10  | M     | Control    | 18                                        | 14.9±3.0                                  | 3.2±0.4     | 9.2±1.3   | 24± 7.4               | 82±1.2    | 29±2.3    | 36±8.8 |
|                       |     |       | 0.08%      | 26                                        | 16.4±3.0                                  | 3.7±0.2*    | 10.2±0.7  | 29± 2.7               | 81±1.8    | 27±1.2    | 34±1.2 |
|                       |     |       | 0.25%      | 24                                        | 13.9±7.9                                  | 3.5±0.3     | 9.7±1.0   | 28± 2.7               | 80±3.1    | 28±2.1    | 34±2.3 |
|                       |     |       | 0.50%      | 28                                        | 12.3±4.1*                                 | 3.6±0.4     | 10.4±1.0  | 30± 3.2*              | 83±3.4    | 29±2.2    | 35±2.2 |
|                       |     | F     | Control    | 18                                        | 15.1±3.1                                  | 3.1±0.5     | 9.3±0.8   | 26± 4.4               | 83±1.4    | 31±7.7    | 37±8.9 |
|                       |     |       | 0.08%      | 19                                        | 14.4±2.1                                  | 3.7±0.2**   | 10.2±0.9  | 30± 2.4**             | 82±1.6    | 27±0.7    | 33±0.9 |
|                       |     |       | 0.25%      | 21                                        | 13.1±5.5                                  | 3.4±0.1     | 9.6±0.7   | 28± 1.7               | 80±2.9    | 27±1.8    | 34±1.9 |
|                       |     |       | 0.50%      | 19                                        | 11.9±2.9*                                 | 3.6±0.4**   | 10.2±1.4  | 31± 1.8**             | 83±3.6    | 28±1.3    | 34±1.0 |
|                       | 14  | M     | Control    | 15                                        | 9.8±7.3                                   | 5.1±3.5     | 11.7±8.1  | 20±10.0               | 67±7.1    | 24±1.7    | 34±2.8 |
|                       |     |       | 0.08%      | 33                                        | 8.7±3.1                                   | 3.6±0.5     | 8.8±1.3   | 25± 4.1               | 70±2.5    | 25±1.0    | 34±1.1 |
|                       |     |       | 0.25%      | 24                                        | 5.5±2.3*                                  | 3.8±0.5     | 9.1±1.5   | 26± 4.2*              | 69±3.1    | 24±1.3    | 34±0.9 |
|                       |     |       | 0.50%      | 21                                        | 9.2±7.3                                   | 3.8±0.3     | 9.5±1.5   | 26± 3.1*              | 69±3.2    | 25±3.2    | 36±3.2 |
|                       |     | F     | Control    | 16                                        | 7.7±3.8                                   | 4.6±3.1     | 9.0±1.2   | 14± 9.6               | 70±6.7    | 24±1.9    | 35±1.7 |
|                       |     |       | 0.08%      | 19                                        | 8.9±3.4                                   | 3.9±0.2     | 9.6±0.8   | 26± 4.6               | 70±2.5    | 24±1.1    | 34±0.9 |
|                       |     |       | 0.25%      | 20                                        | 5.6±1.3                                   | 4.0±0.5     | 10.0±0.9  | 28± 3.8               | 69±2.1    | 24±1.2    | 34±1.3 |
|                       |     |       | 0.50%      | 19                                        | 11.0±10.1                                 | 3.9±0.3     | 10.2±1.9  | 26± 2.1               | 69±1.6    | 26±3.9    | 36±3.2 |
| Mother Rats           | 10  | F     | Control    | 4                                         | 4.7±1.9                                   | 4.7±1.5     | 10.3±3.2  | 29± 8.4               | 62±6.6    | 22±3.2    | 35±1.4 |
|                       |     |       | 0.08%      | 5                                         | 5.8±1.3                                   | 6.3±0.6     | 13.2±1.5  | 37± 3.6               | 59±1.7    | 21±0.2    | 35±1.2 |
|                       |     |       | 0.25%      | 5                                         | 6.5±1.5                                   | 6.2±0.8     | 13.9±1.2* | 37± 2.8               | 60±4.9    | 22±3.7    | 36±1.0 |
|                       |     |       | 0.50%      | 3                                         | 7.8±1.1                                   | 6.7±0.8     | 14.0±0.6* | 38± 2.8               | 58±2.8    | 21±1.7    | 36±1.4 |
|                       | 14  | F     | Control    | 3                                         | 8.7±4.6                                   | 4.9±3.7     | 11.2±7.7  | 41± 0.8               | 77±0.7    | 24±1.9    | 34±0.2 |
|                       |     |       | 0.08%      | 5                                         | 4.5±1.4                                   | 6.6±0.5     | 13.9±1.0  | 38± 3.3*              | 58±1.7**  | 21±0.5*   | 35±1.6 |
|                       |     |       | 0.25%      | 4                                         | 6.4±4.7                                   | 6.2±0.2     | 13.1±0.8  | 36± 3.3*              | 59±2.6**  | 21±0.6*   | 35±0.4 |
|                       |     |       | 0.50%      | 3                                         | 4.4±1.7                                   | 6.7±0.2     | 13.7±0.4  | 38± 1.4*              | 57±1.5**  | 20±0.6*   | 36±0.2 |

Mean $\pm$ S.D.    \* P<0.05    \*\*P<0.01

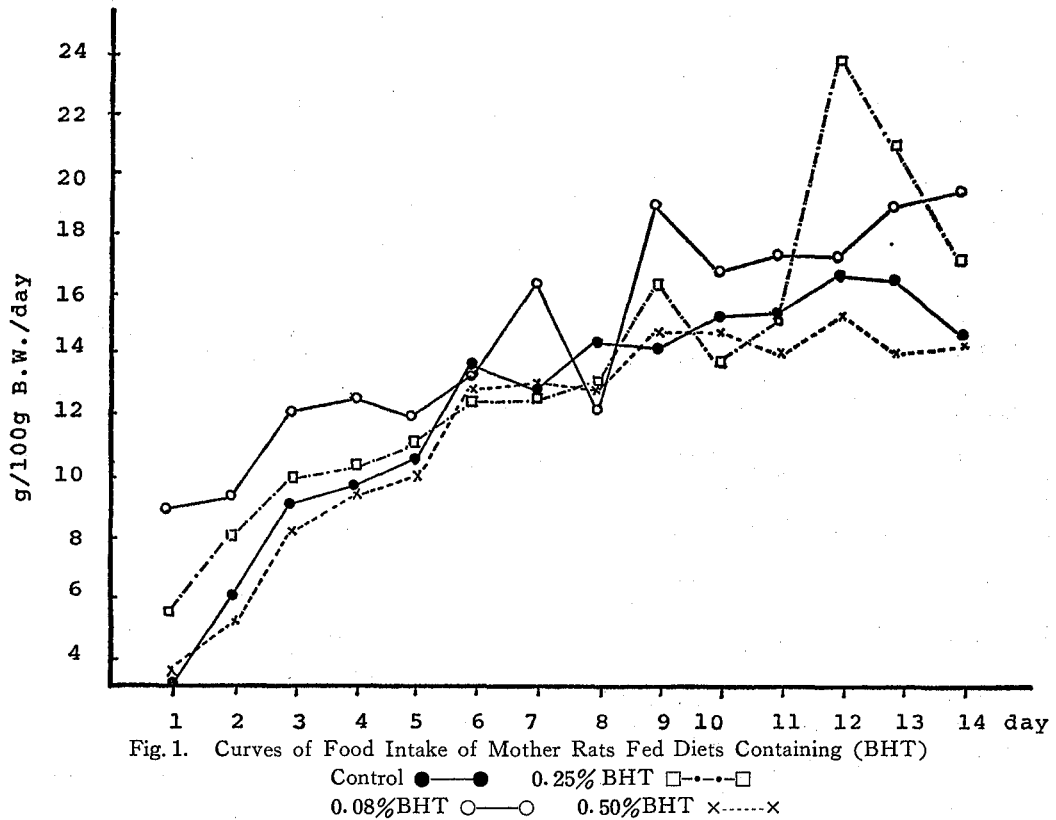


Table 2. Biochemical Tests

| Day         | Sex | Group   | No. of Rat | TP<br>g/dl | GLU<br>mg/dl | SUN<br>mg/dl | GPT<br>K-U/ml | ALP<br>KA-U/dl | CHO<br>mg/dl |
|-------------|-----|---------|------------|------------|--------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| 14          | M   | Control | 15         |            | 175±40.8     | 164±201.4    | 40±31.5       | 35±16.3        | 218±113.3    |
|             |     | 0.08%   | 33         |            | 170±56.5     | 101±124.7    | 25±10.0*      | 29±11.9        | 239±64.5     |
|             |     | 0.25%   | 24         |            | 156±38.6     | 128±201.7    | 22±7.5*       | 31±9.4         | 196±89.3     |
|             |     | 0.50%   | 21         |            | 138±37.9*    | 85±107.5     | 18±15.5*      | 27±6.2         | 177±87.4     |
|             | F   | Control | 16         |            | 178±18.8     | 163±176.9    | 31±9.5        | 33±8.3         | 218±67.6     |
|             |     | 0.08%   | 19         |            | 168±28.2     | 38±13.1      | 35±3.1        | 29±6.5         | 212±91.2     |
|             |     | 0.25%   | 20         |            | 160±54.3     | 201±175.6    | 24±9.6*       | 28±10.0        | 254±151.1    |
|             |     | 0.50%   | 19         |            | 133±37.2*    | 131±138.5    | 16±10.5*      | 33±9.0*        | 189±75.6*    |
| Mother Rats | 10  | Control | 4          | 85±45.1    | 159±29.6     | 108±119.2    | 76±11.8       | 84±17.7        | 159±8.3      |
|             |     | 0.08%   | 5          | 113±28.2   | 197±34.6     | 167±121.1    | 84±4.3        | 90±14.0        | 172±4.9      |
|             |     | 0.25%   | 5          | 90±29.3    | 158±8.6      | 67±71.4      | 104±40.5      | 80±18.4        | 156±6.1      |
|             | 14  | Control | 3          | 33±8.5     | 142±11.2     | 185±112.9    | 100±24.4      | 62±17.2        | 141±5.2      |
|             |     | 0.08%   | 5          | 87±58.8    | 197±5.6      | 106±151.8    | 125±37.5      | 106±33.0       | 170±11.6     |
|             |     | 0.25%   | 4          | 16±3.5     | 137±8.2      | 249±76.8     | 89±13.9       | 57±4.3         | 137±0.9      |
|             |     | 0.50%   | 3          | 12±6.6     | 118±20.3     | 88±63.5      | 67±17.0       | 51±7.8         | 142±10.7     |

Mean±S.D \* P&lt;0.05

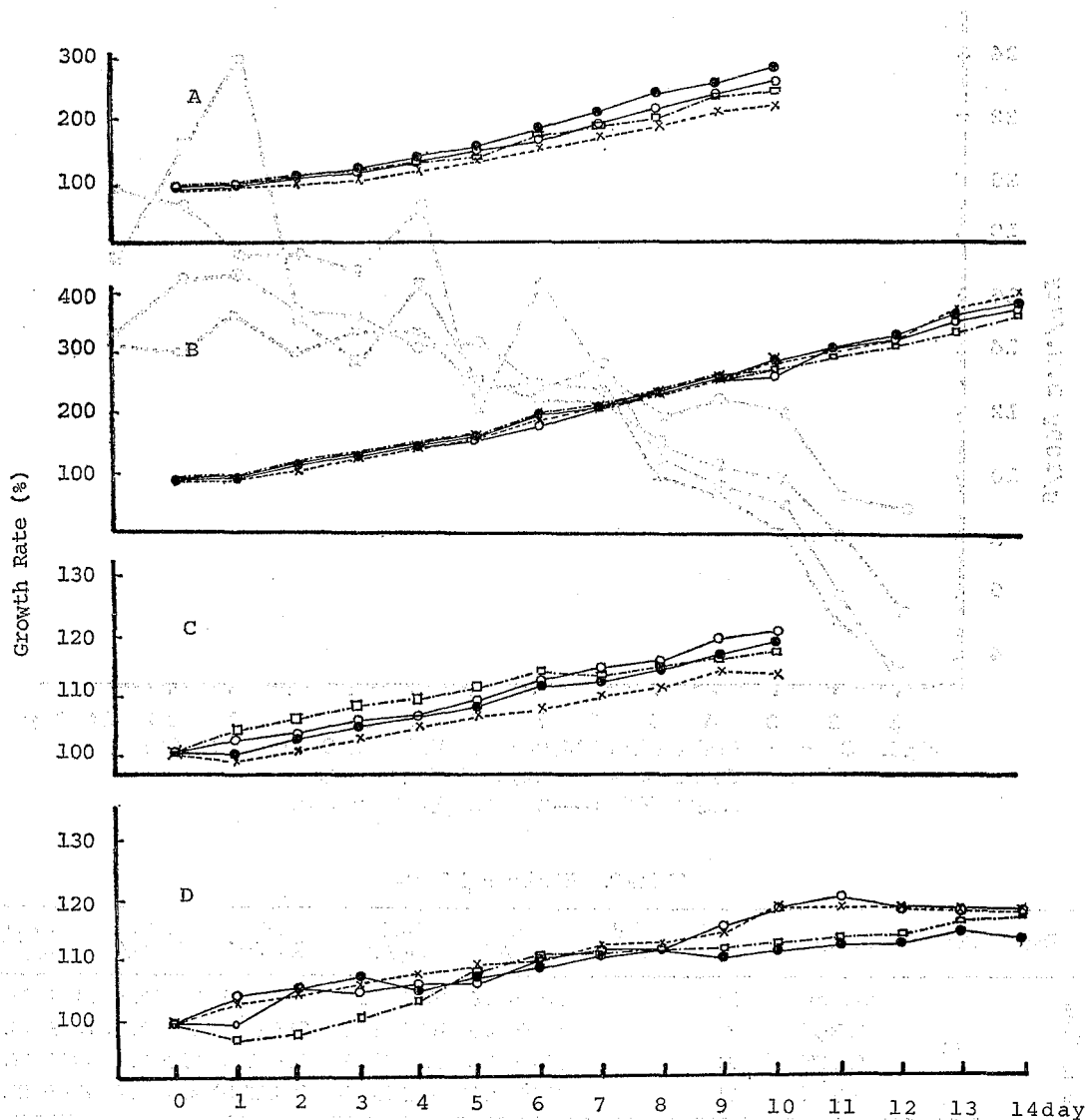


Fig. 2. Changes of Body Weight in Rats

A. 10 Day Infant and Young Rats.

B. 14 Day Infant and Young Rats.

C. 10 Day Mother Rats.

D. 14 Day Mother Rats.

●—● Control ○—○ 0.08% BHT

□—□ 0.25% BHT ×—× 0.50% BHT

血清生化学検査 母群では BHT 0.08%, 0.25%, 0.50% 各群に著変はみられなかった。BHT 投与各仔群で 14 日目 グルコース (GLU), トランスアミラーゼ活性 (GPT), アルカリホスファターゼ (ALP) の低下傾向が用量に比例してみられた。

器官重量 BHT 0.08%, 0.25%, 0.50% 母群で胸腺が 10, 14 日に用量に比例した増重量が, 肝臓では増重量傾向がうかがわれた。その他には著変はみられなかった。

BHT 0.08%, 0.25%, 0.50% 仔群では脾臓の減量が

Table 3. Organ Weights of Infant and Young Rats Fed Diets Containing (BHT)

| Day | Sex | Group   | No. of Rat        | Thymus<br>mg<br>mg/100g | Heart<br>mg<br>mg/100g | Liver<br>mg<br>mg/100g | Kidney (L)<br>mg<br>mg/100g | Spleen<br>mg<br>mg/100g |
|-----|-----|---------|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 10  | M   | Control | 18                | 42± 8.3                 | 96± 11.3               | 450± 65.4              | 92±12.7                     | 79± 13.1                |
|     |     |         | (4) <sup>a)</sup> | 265±43.0                | 618± 79.4              | 2859± 231.3            | 590±63.3                    | 494± 86.1               |
|     |     | 0.08%   | 26                | 42± 9.5                 | 87± 11.9               | 419± 53.7              | 84± 9.5                     | 58± 14.4                |
|     |     |         | (5)               | 291±54.2                | 598± 64.0              | 2885± 237.1            | 583±33.0                    | 395± 71.2*              |
|     |     | 0.25%   | 24                | 58± 9.3                 | 79± 12.2               | 364± 61.8              | 75± 8.4                     | 49± 12.5                |
|     |     |         | (5)               | 295±53.6                | 611± 55.6              | 2834± 242.3            | 585±46.2                    | 380± 64.6*              |
|     |     | 0.50%   | 28                | 31± 8.1                 | 74± 7.6                | 368± 63.0              | 74± 8.9                     | 45± 12.3                |
|     |     |         | (3)               | 248±73.2                | 516±207.5              | 2862± 281.9            | 583±54.4                    | 355± 86.9*              |
|     | F   | Control | 18                | 43± 6.5                 | 90± 11.2               | 424± 47.5              | 86± 8.9                     | 67± 8.4                 |
|     |     |         | (4)               | 293±43.2                | 603± 68.8              | 2832± 42.9             | 578±46.2                    | 448± 41.3               |
|     |     | 0.08%   | 19                | 42±11.7                 | 79± 11.7               | 394± 60.5              | 79±10.2                     | 50± 13.4                |
|     |     |         | (5)               | 314±54.2                | 606± 63.2              | 2983± 228.9            | 603±34.3                    | 375± 60.4*              |
|     |     | 0.25%   | 21                | 38± 8.4                 | 76± 12.2               | 355± 38.8              | 75± 7.0                     | 46± 11.3                |
|     |     |         | (3)               | 300±59.4                | 587± 81.1              | 2747± 199.2            | 525±49.3                    | 353± 71.6*              |
|     |     | 0.50%   | 19                | 35± 8.3                 | 77± 11.0               | 403± 83.1              | 76± 8.0                     | 46± 14.4                |
|     |     |         | (3)               | 282±86.2                | 602± 78.3              | 3158± 848.0            | 596±65.2                    | 363±118.1*              |
| 14  | M   | Control | 15                | 55±21.7                 | 121± 25.6              | 681± 144.6             | 120±22.5                    | 83± 33.4                |
|     |     |         | (3)               | 268±73.6                | 610±100.7              | 3398± 572.9            | 603±77.4                    | 415±154.4               |
|     |     | 0.08%   | 33                | 61±28.1                 | 109± 22.4              | 643± 36.1              | 113±27.8                    | 67± 18.5                |
|     |     |         | (5)               | 305±80.3                | 565± 75.9              | 3313± 360.4            | 577±50.4                    | 345± 50.2*              |
|     |     | 0.25%   | 24                | 58±13.1                 | 106± 17.2              | 651± 85.0              | 110±18.7                    | 58± 12.1                |
|     |     |         | (4)               | 301±49.6                | 561± 61.2              | 3481± 544.1            | 582±47.0                    | 309± 38.9*              |
|     |     | 0.50%   | 21                | 68±17.2                 | 121± 25.0              | 701± 120.7             | 122±17.7                    | 80± 23.5                |
|     |     |         | (3)               | 327±62.1                | 582± 88.1              | 2659±1323.1            | 590±58.0                    | 381± 91.7               |
|     | F   | Control | 16                | 69±25.9                 | 114± 19.8              | 690± 84.5              | 122±15.0                    | 72± 20.0                |
|     |     |         | (3)               | 348±99.4                | 579± 72.0              | 3532± 588.9            | 626±14.5                    | 364± 94.3               |
|     |     | 0.08%   | 19                | 72±26.2                 | 104± 20.4              | 608± 110.0             | 114±23.5                    | 66± 18.8                |
|     |     |         | (5)               | 370±69.7                | 543± 65.1              | 3158± 113.9            | 594±44.4                    | 341± 64.1               |
|     |     | 0.25%   | 24                | 52±17.3                 | 96± 14.8               | 580± 81.9              | 103±16.2                    | 52± 12.3                |
|     |     |         | (4)               | 300±77.4                | 188± 67.2              | 3377± 434.7            | 598±46.5                    | 305± 50.1*              |
|     |     | 0.50%   | 19                | 71±30.3                 | 103± 18.2              | 629± 125.3             | 114±21.6                    | 66± 21.0                |
|     |     |         | (3)               | 391±148.0               | 572± 88.2              | 3461± 278.1            | 628±57.4                    | 369±107.5               |

Mean±S.D. \* P&lt;0.05 a). Mother Rats

Table 4. Organ Weights of Mother Rats Fed Diets Containing (BHT)

| Day | Sex | Group   | No. of Rat | Thymus<br>mg<br>mg/100g | Heart<br>mg<br>mg/100g | Liver<br>g<br>g/100g | Kidney (L)<br>mg<br>mg/100g | Ovary<br>mg<br>mg/100g | Uterus<br>mg<br>mg/100g |
|-----|-----|---------|------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|
| 10  | F   | Control | 4          | 105± 9.5                | 745± 50.3              | 11.1± 0.7            | 806± 49.1                   | 37± 3.5                | 352± 42.3               |
|     |     |         |            | 43± 5.2                 | 308± 26.9              | 4.6± 0.1             | 333± 23.1                   | 15± 1.0                | 145± 20.9               |
|     |     | 0.08%   | 5          | 94± 46.2                | 684± 51.9              | 11.3± 1.3            | 764± 60.9                   | 40± 8.8                | 289± 54.5               |
|     |     |         |            | 42± 19.2                | 306± 16.2              | 5.0± 0.4             | 342± 14.2                   | 17± 3.0                | 129± 18.8               |
|     |     | 0.25%   | 5          | 120± 45.7               | 666± 67.4              | 10.6± 1.1            | 727± 28.4                   | 44± 12.2               | 284± 52.5               |
|     |     |         |            | 57± 25.2                | 308± 22.1              | 4.9± 0.3             | 388± 25.4                   | 20± 5.3                | 131± 22.0               |
|     |     | 0.50%   | 3          | 145± 0.7**              | 667± 46.2              | 11.1± 0.8            | 711± 5.7                    | 47± 1.7                | 275± 39.5               |
|     |     |         |            | 70± 2.7**               | 322± 17.2              | 5.4± 0.5*            | 344± 10.7                   | 22± 0.9*               | 133± 29.2               |
| 14  | F   | Control | 3          | 79± 37.8                | 752± 76.7              | 10.2± 1.7            | 830± 53.5                   | 32± 7.5                | 274± 31.0               |
|     |     |         |            | 31± 12.6                | 314± 30.6              | 4.2± 0.2             | 346± 18.2                   | 13± 1.6                | 114± 2.3                |
|     |     | 0.08%   | 5          | 105± 13.0               | 698± 58.9              | 11.8± 1.1            | 757± 55.0                   | 35± 10.2               | 250± 42.0               |
|     |     |         |            | 48± 9.3                 | 317± 14.1              | 5.3± 0.3*            | 344± 12.5                   | 16± 3.9                | 112± 11.1               |
|     |     | 0.25%   | 4          | 111± 34.9               | 752± 40.7              | 12.7± 1.4            | 822± 55.6                   | 43± 7.8                | 279± 42.4               |
|     |     |         |            | 47± 13.5                | 322± 17.0              | 5.4± 0.3*            | 352± 21.9                   | 18± 3.4                | 119± 19.7               |
|     |     | 0.50%   | 3          | 121± 41.5               | 742± 98.5              | 12.0± 1.9            | 748± 77.3                   | 42± 5.5                | 301± 44.8               |
|     |     |         |            | 53± 17.9                | 325± 18.9              | 5.2± 0.2*            | 328± 13.9                   | 18± 2.8                | 131± 2.9                |

Mean±S.D. \* P&lt;0.05 \*\* P&lt;0.01

用量に比例してみられた他には著変はみられない。

### 考 察

BHT の幼若ラットへの影響研究の一環として経母乳投与による乳児期ラットの変化を観察した。母に与える BHT 添加飼料濃度は、当部の非妊娠ラットにおける研究から、肝肥大はみられるがその他は顕著な影響を与えず長期飼育に耐えうる耐量である 0.50% 添加を最高濃度とし、以下 0.25% およびほとんど影響がないと考える 0.08% を使用した。

母親摂飼料は (コボシを含めて) 各 BHT 摂取各群において 2 日頃までやや少なかったが、以後は対照とかわりなく、0.08% 群はむしろ多かった。したがって BHT 添加飼料摂取による母体への栄養的な影響は少なかったと考えられる。

実際母体の体重増加も BHT 摂取各群と対照との間には差はなかった。しかし症状的には BHT 0.25%, 0.50% 群の一部に授乳行動でやや異常を示すものがあり、また仔を食殺するものもみられた。

仔の発育は良好で、被毛の発生、開眼時期その他も

BHT 摂取各群と対照群の間で差はみられなかった。ただ解剖時において用量関連はないが、BHT 摂取群のごく少数に腹腔内出血がみられた。このことが成熟ラットに多量の BHT を連続投与した時にみられる出血と同機作<sup>6)</sup>によるものか、今後対照群での発生の有無を確認したうえで明らかにしていく必要があるものと考え。また用量とは関係なく BHT 摂取の仔の少数に両眼下縁皮下に暗赤色の帯をみとめた。これも BHT との関連はもとより皮下出血によるものかどうかは現在不明であるが腹腔出血とともに今後検討すべきことと考える。

血液学的、血清生化学的検査で用量と関連してみられた変化は仔のグルコース (GLU)、トランスアミラーゼ活性 (GPT)、およびアルカリホスファターゼ (ALP) 活性低下傾向であった。

器官重量で仔の肝臓は用量と関連は明らかでないが対照にくらべやや重く、表面やや粗、辺縁やや鈍であった (母は仔よりやや重度)。このことから BHT の成熟ラットにおけると同様<sup>2-7)</sup>な肝臓への影響がうかがわれた。

脾重量は母ではほとんど変化がなかったが、仔では用量にともない減少した。母では胸腺重量が用量にともない増加がみられたが仔ではほとんど変化がなかった。これらの母と仔における相違の原因については不明であるが成熟ラット（あるいは授乳母体）と幼若ラットにおける機能の相違<sup>8,9)</sup> が示唆されたものと興味深い。

謝辞 本研究にあたり御協力下さった市川久次氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 小林博義：東京衛研年報 28-2, 239, 1977
- 2) 市川久次, 小林博義, 中川好男 ら：東京衛研年報, 28-2, 1, 1977
- 3) 伊川三枝子, 中川好男：東京衛研年報, 27-2, 10, 1976
- 4) 馬淵依子, 伊川三枝子：東京衛研年報, 27-2, 20, 1976
- 5) 小林博義, 市川久次, 米山允子ら：東京衛研年報, 27-2, 17, 1976
- 6) 鈴木英子, 高橋 省, 中尾順子ら：東京衛研年報, 27-2, 82, 1976
- 7) 平賀興吾, 林田志信, 中川久次ら：東京衛研年報, 22, 231, 1970
- 8) 吉岡 一：周産期医学：6-1, 9, 1977
- 9) 木戸内 清, 大西鐘寿：小児医学, 10, 4, 25, 1977

## ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 投与ラットにおける回復実験 (第2報)

市川久次\*, 小林博義\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

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

HISATSUGU ICHIKAWA\*, HIROYOSHI KOBAYASHI\*, TOSHIKO NAKAO\*  
and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene (BHT), ラット rat, 投与中止 discontinuation of administration

著者らは前報<sup>1)</sup>において、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 1.5%というかなり高濃度を飼料に混入し、摂取させ途中で対照と同じ飼料に切換え、その後の影響を検討し、肝臓重量の増加、血清中の尿素窒素量についての影響に関して報告した。今回は BHT の濃度をさらに低くし、体重の増加に影響をおよぼさない用量を考慮して検討し若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料ならびに方法

1. 使用動物: 静岡県実験動物農業協同組合生産の SLC-Wistar (SPF) 系ラット雌雄を用いた。生後4週令で購入し、4日間予備飼育後、体重増加、一般状態に異状のないものを実験に供した。実験開始時 (平均体重 75g) ステンレス網ケージに入れ実験に供した。

2. 試料: BHT は和光純薬 K K 製 (Lot No. KIK 5562) 結晶性白色粉末で mp. 62.5° のものを使用した。

3. 投与方法ならびに投与期間: 試料 (BHT) は、0.5, 1.0%の割合で日本クレア K K 製粉末飼料 (CE-2, 粗蛋白 24.0%, 粗脂肪 3.5%, 粗繊維 4.5%, 粗灰分 6.0%, 可溶性無窒素物 56.0%, カルシウム 1g/100g, リン 1g/100g, カリウム 9.63g/100g) に混合し、固型飼料に形成し<sup>2)</sup>、対照群には日本クレア K K 製粉末飼料 CE-2 を固型飼料に形成したものを自由に摂取させた。水は細菌ろ過器を通した水道水を自由に摂取させた。投与期間ならびに動物数は Fig. 1, Table 1 に示した。

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

#### 5. 測定ならびに測定方法:

1) 体重の測定 体重は実験初期の14日間と BHT 含有飼料を対照飼料に切換えてから14日間は毎日、他は週2回 (Fig. 2 中では週ごとに図示) 測定し、適時、一般症状の観察、給餌を行った。

2) 血球成分の測定、白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (HGB), ヘマトクリット値 (Hct), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の7項目について、市川<sup>3)</sup>らの方法に従って測定した。

3) 血清成分ならびに血清酵素活性の測定 総蛋白量 (TP), グルコース量 (GLU), 尿素窒素量 (UN), トランスアミナーゼ活性 (GOT ならびに GPT), アルカリフォスファターゼ活性 (ALP), 総コレステロール量 (CHO), コリンエステラーゼ活性 (ChE), Na<sup>+</sup>量, K<sup>+</sup>量について、市川<sup>3)</sup>らの方法に従って行った。

#### 4) 剖検 肉眼的所見観察

5) 臓器重量の測定 胸腺, 肺, 肝臓, 腎臓 (左, 右), 脾臓, 心臓, 睪丸 (左, 右), 卵巣, 子宮を摘出し附着する血液, 脂肪等を除去し, メトラ製デジタル電子天秤 (PE-162, HE-20) にて秤量した。

測定値はすべて推計学的処理を行った。

#### 実験結果

1. 体重, 一般症状の推移 体重増加については, Table 2, Fig. 2, 3 に示した如く, BHT 0.5% 投与群は雌雄とも全実験期を通して対照群とはほぼ同等度の体重の増加を示した (推計学的に有意なる抑制を示した時期があったが, 体重のバラツキが減少したために起った一時的なものであった)。BHT 1.0% 投与群では, 雄群において投与開始直後, 体重は減少し, 2日後最小値を示したが3日目には実験開始時の体重のレベルにもどり, その後徐々に増加したが, 全実験期間 (16週間) にわたって体重の増加は緩慢で実験終了時 (16週後) の体重は対照群に比し有意に低かった ( $P < 0.05$ )。雌群においては, 雄群においてみられた実験開始直後の体重の減少はみられなかったが, 全実験期間にわたって, 体重増加

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



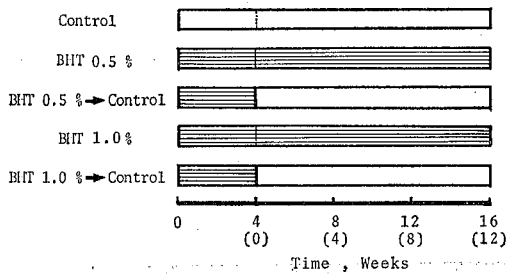
Table 1. Summary of Animal Groupings and Dosage of BHT

| Doses <sup>1)</sup><br>Weeks | 0               |   | 0.5 |   | 1.0 |   |
|------------------------------|-----------------|---|-----|---|-----|---|
|                              | M               | F | M   | F | M   | F |
| 4 (0) <sup>2)</sup>          | 7 <sup>3)</sup> | 7 | 7   | 7 | 7   | 7 |
| 5 (1)                        | 8               | 8 | 8   | 8 | 8   | 8 |
| 8 (4)                        | 8               | 8 | 8   | 8 | 8   | 8 |
| 16 (12)                      | 6               | 6 | 8   | 8 | 8   | 8 |

1) BHT %

2) Weeks from changed BHT to control

3) No. of rats

Fig. 1. Treatment Schedules and Group Labelling  
( ) Weeks from change BHT to Control

は対照群に比し抑制され、実験終了時(16週後)においても対照群に比し有意に低かった ( $P < 0.001$ )。実験開始後4週目に BHT 0.5%, 1.0% の飼料を対照飼料に切換えて飼育した群においては、BHT 0.5% 摂取群は飼料切換えによってもほとんど対照群、BHT 0.5% 摂取群との間に差は認められず、BHT 1.0% 摂取群では、

飼料切換により、体重は急速に増加し実験終了時(飼料切換え後12週目)には雌群、雄群とも対照群とほぼ同じまでに成長した。

一般症状は、投与群において軟便あるいは下痢便がまれにみられたがすぐに回復し、BHT 投与によるものとはいえなかった。一方、BHT 1.0% 投与群では、雌雄両群において削痺、下腹部の被毛が赤褐色に汚染されたが、対照飼料に切換えた群では、体重の急速なる増加とともに下腹部被毛の汚染も軽減された。

2. 血球成分 血球成分の測定結果は Table 3 に示した如くであるが、全実験期間を通して、いずれの項目においても、BHT 投与、対照飼料への切換えにより著明な変化を示したものはなかったが、雌雄両群の白血球数において、BHT 投与群は対照群に比し減少の傾向が全実験期間を通してみられた。また雌群のヘモグロビン量においても同様な傾向がみられた。

3. 血清成分ならびに血清酵素活性 血清成分ならびに血清酵素活性の測定結果は、Table 5, 6 に示した如くであるが、雌雄両群ともに全実験期間を通して、BHT 投与、対照飼料への切換えにより変化がみられたのは血清コレステロール量において BHT 0.5%, 1.0% 投与の4週、5週、8週飼育群において、対照群に比し有意なる増加傾向が認められ、16週飼育群においても同様に増加傾向が認められたが、対照飼料に切換えた群においては、それぞれ減少し切換えて1週後に対照群との間に有意なる差はなく、以後も同様に対照群との間に差はなかった。BHT 投与により増加した血清コレステロール量は投与中止により早期に対照レベルに回復するのを認めた。また、雌雄の GPT 活性において全実験期間

Table 2. Body Weights Gain of Rats

| S<br>E<br>X | Weeks   | No.<br>of<br>rats | Control                     | BHT0.5%       | BHT0.5%→Control | BHT1.0%          | BHT1.0%→Control  |
|-------------|---------|-------------------|-----------------------------|---------------|-----------------|------------------|------------------|
| M           | 4 (0)   | 7                 | 210.2 ± 15.40 <sup>1)</sup> | 203.8 ± 19.78 |                 | 172.2 ± 20.17**  |                  |
|             | 5 (1)   | 8                 | 241.8 ± 10.97               | 236.0 ± 14.46 | 234.6 ± 16.61   | 208.7 ± 12.24*** | 216.6 ± 9.41***  |
|             | 8 (4)   | 8                 | 296.1 ± 13.18               | 282.0 ± 7.89* | 284.6 ± 17.02   | 252.7 ± 14.25*** | 270.2 ± 10.08*** |
|             | 16 (12) | 8                 | 345.3 ± 20.94(6)            | 345.1 ± 17.58 | 344.1 ± 12.78   | 312.8 ± 21.74*   | 343.5 ± 17.24    |
| F           | 4 (0)   | 7                 | 142.1 ± 7.26                | 140.8 ± 16.02 |                 | 130.2 ± 12.48*   |                  |
|             | 5 (1)   | 8                 | 160.3 ± 5.42                | 153.7 ± 8.71  | 157.1 ± 11.09   | 147.3 ± 9.94**   | 147.5 ± 12.81*   |
|             | 8 (4)   | 8                 | 179.3 ± 6.69                | 171.7 ± 9.16  | 174.8 ± 6.91    | 166.1 ± 9.43**   | 170.5 ± 9.65     |
|             | 16 (12) | 8                 | 203.5 ± 5.16(6)             | 194.8 ± 10.94 | 196.6 ± 13.00   | 188.8 ± 9.71**   | 201.1 ± 12.26    |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean ± SD (g)

\*  $p < 0.5$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

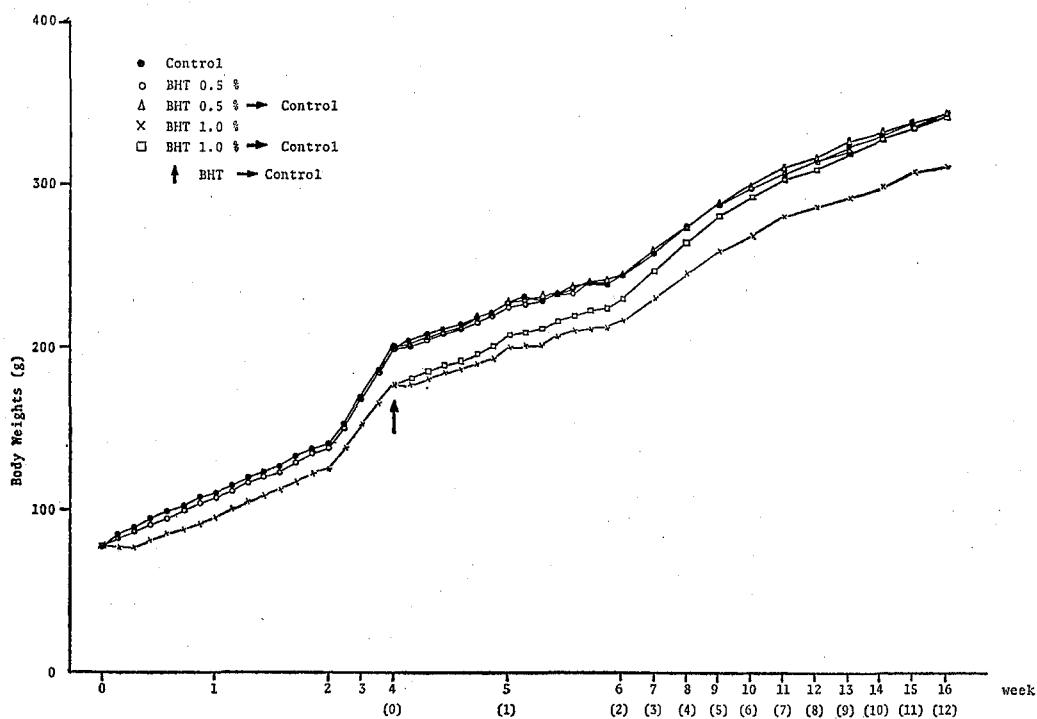


Fig. 2. Curves of Body Weights Gain of Rats (Male) ( ) Weeks from change BHT to Control

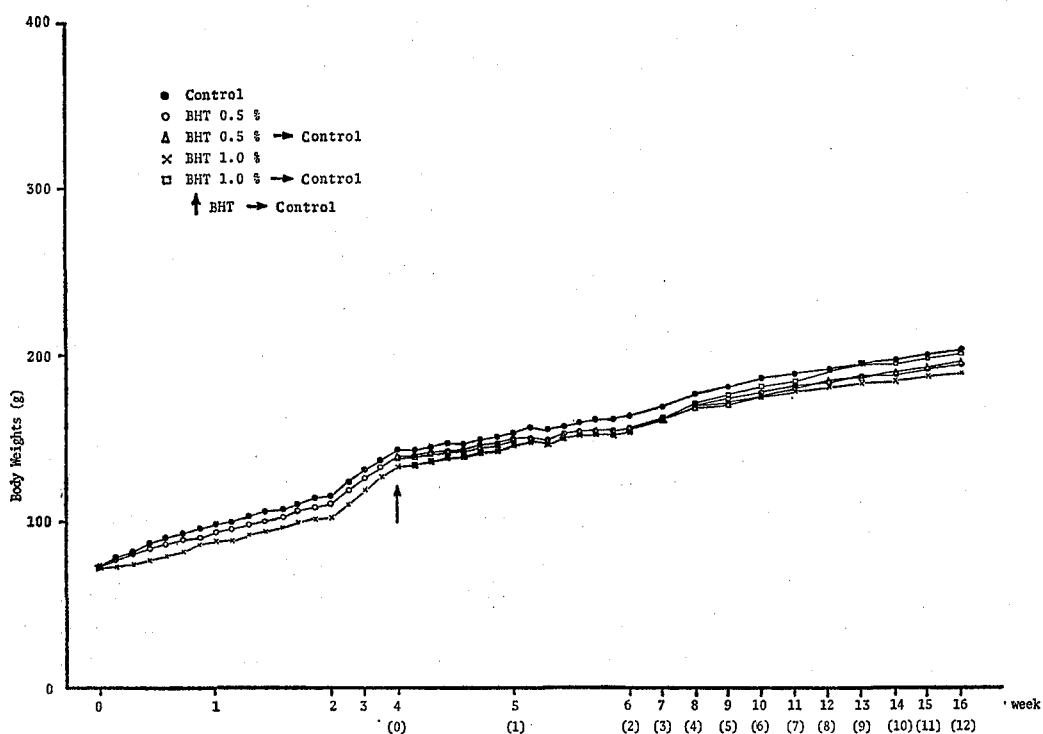


Fig. 3. Curves of Body Weights Gain of Rats (Female) ( ) Weeks from change BHT to Control

Table 3. Blood Components of Male Rats

| Weeks      | Doses                         | No. of rats | WBC<br>$\times 10^3/\text{mm}^3$            | RBC<br>$\times 10^6/\text{mm}^3$ | HGB<br>g/dl                                 | Hct<br>%                                      | MCV<br>$\mu^3$              | MCH<br>$\mu\text{g}$          | MCHC<br>%                      |
|------------|-------------------------------|-------------|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 4<br>(0)   | Control                       | 7           | 7.0 $\pm$ 1.84 <sup>1)</sup>                | 7.52 $\pm$ 0.336                 | 16.5 $\pm$ 0.68                             | 42.5 $\pm$ 1.22                               | 57 $\pm$ 1.0                | 22.0 $\pm$ 0.58               | 38.9 $\pm$ 0.87                |
|            | BHT0.5%                       | 7           | 5.1 $\pm$ 1.77                              | 7.02 $\pm$ 0.224 <sup>**</sup>   | 15.6 $\pm$ 0.44 <sup>*</sup>                | 38.3 $\pm$ 1.27 <sup>***</sup>                | 55 $\pm$ 0.7 <sup>*</sup>   | 22.5 $\pm$ 0.75               | 40.7 $\pm$ 1.44 <sup>*</sup>   |
|            | BHT1.0%                       | 7           | 4.0 $\pm$ 0.79 <sup>(6)</sup> <sup>**</sup> | 7.19 $\pm$ 0.483 <sup>(6)</sup>  | 15.4 $\pm$ 0.81 <sup>(6)</sup> <sup>*</sup> | 38.6 $\pm$ 2.19 <sup>(6)</sup> <sup>***</sup> | 54 $\pm$ 0.7 <sup>***</sup> | 21.8 $\pm$ 0.44               | 40.1 $\pm$ 0.68 <sup>*</sup>   |
| 5<br>(1)   | Control                       | 8           | 7.6 $\pm$ 1.22                              | 8.32 $\pm$ 0.787                 | 18.4 $\pm$ 0.71                             | 45.2 $\pm$ 5.54                               | 55 $\pm$ 0.0                | 22.2 $\pm$ 1.79               | 40.8 $\pm$ 3.18                |
|            | BHT0.5%                       | 8           | 7.2 $\pm$ 1.61                              | 8.11 $\pm$ 0.466                 | 17.8 $\pm$ 1.13                             | 42.7 $\pm$ 2.51                               | 53 $\pm$ 0.7                | 22.2 $\pm$ 1.18               | 41.7 $\pm$ 2.45                |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.3 $\pm$ 1.50                              | 8.45 $\pm$ 0.498                 | 18.0 $\pm$ 0.63                             | 44.7 $\pm$ 2.92                               | 54 $\pm$ 0.4                | 21.6 $\pm$ 0.89               | 40.2 $\pm$ 1.87                |
|            | BHT1.0%                       | 8           | 5.6 $\pm$ 0.44 <sup>(7)</sup> <sup>**</sup> | 7.91 $\pm$ 0.270                 | 17.3 $\pm$ 0.45 <sup>**</sup>               | 41.6 $\pm$ 1.62                               | 53 $\pm$ 0.5                | 22.2 $\pm$ 0.51               | 41.1 $\pm$ 1.39                |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.3 $\pm$ 0.93 <sup>***</sup>               | 8.24 $\pm$ 0.305                 | 17.3 $\pm$ 0.75 <sup>*</sup>                | 43.0 $\pm$ 1.75                               | 53 $\pm$ 0.7                | 21.3 $\pm$ 0.77               | 40.0 $\pm$ 1.22                |
| 8<br>(4)   | Control                       | 8           | 7.4 $\pm$ 1.21                              | 7.03 $\pm$ 0.318                 | 15.6 $\pm$ 1.24                             | 36.9 $\pm$ 1.55                               | 53 $\pm$ 0.9                | 22.5 $\pm$ 2.15               | 42.2 $\pm$ 3.86                |
|            | BHT0.5%                       | 8           | 6.7 $\pm$ 0.74                              | 7.03 $\pm$ 0.418                 | 15.8 $\pm$ 0.50                             | 36.1 $\pm$ 2.72                               | 52 $\pm$ 1.1                | 22.9 $\pm$ 1.05               | 44.0 $\pm$ 2.86                |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.0 $\pm$ 0.83 <sup>*</sup>                 | 7.29 $\pm$ 0.405 <sup>*</sup>    | 15.7 $\pm$ 0.48                             | 37.5 $\pm$ 2.06                               | 52 $\pm$ 0.5 <sup>*</sup>   | 21.9 $\pm$ 0.87               | 42.1 $\pm$ 1.85                |
|            | BHT1.0%                       | 7           | 5.9 $\pm$ 0.38 <sup>*</sup>                 | 6.79 $\pm$ 0.399 <sup>*</sup>    | 14.9 $\pm$ 0.39                             | 35.2 $\pm$ 1.64                               | 53 $\pm$ 1.7                | 22.8 $\pm$ 1.29               | 42.3 $\pm$ 1.47                |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 7           | 6.1 $\pm$ 1.11                              | 7.27 $\pm$ 0.341 <sup>**</sup>   | 15.6 $\pm$ 0.53                             | 37.4 $\pm$ 1.64 <sup>*</sup>                  | 52 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup>   | 21.7 $\pm$ 0.50               | 41.7 $\pm$ 1.14                |
| 16<br>(12) | Control                       | 6           | 6.4 $\pm$ 0.86                              | 6.54 $\pm$ 0.561                 | 15.4 $\pm$ 0.61                             | 35.2 $\pm$ 2.45                               | 52 $\pm$ 1.3                | 22.5 $\pm$ 1.19               | 43.7 $\pm$ 2.59                |
|            | BHT0.5%                       | 6           | 6.2 $\pm$ 0.96                              | 7.02 $\pm$ 0.586                 | 14.9 $\pm$ 0.32                             | 34.4 $\pm$ 2.77                               | 51 $\pm$ 1.0                | 22.2 $\pm$ 1.72               | 43.5 $\pm$ 3.87                |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.4 $\pm$ 0.62 <sup>*</sup>                 | 7.29 $\pm$ 0.420                 | 15.2 $\pm$ 0.46                             | 36.7 $\pm$ 2.19                               | 51 $\pm$ 0.5 <sup>*</sup>   | 21.1 $\pm$ 0.86 <sup>*</sup>  | 41.2 $\pm$ 1.79 <sup>*</sup>   |
|            | BHT1.0%                       | 8           | 5.3 $\pm$ 1.18                              | 7.55 $\pm$ 0.875                 | 15.3 $\pm$ 1.20                             | 38.8 $\pm$ 3.83                               | 52 $\pm$ 1.8                | 20.7 $\pm$ 2.16               | 39.6 $\pm$ 3.15 <sup>*</sup>   |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.6 $\pm$ 1.46                              | 7.77 $\pm$ 0.578                 | 15.5 $\pm$ 0.58                             | 39.7 $\pm$ 2.28 <sup>*</sup>                  | 52 $\pm$ 1.6                | 20.2 $\pm$ 1.29 <sup>**</sup> | 38.9 $\pm$ 1.57 <sup>***</sup> |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean $\pm$ SD

\* p&lt;0.05 \*\* p&lt;0.01 \*\*\* p&lt;0.001

を通して、投与、対照飼料へ切換えた群において対照群に比し、低下ないし低下傾向がみられた。その他の項目においては、一定の傾向を示すものはなかった。

4. 臓器重量 各臓器の絶対重量ならびに体重比重量(体重 100g 当りの重量)は、Table 7, 8 に示した如くである。全実験期間を通して、雌雄両群とも BHT 投与、対照飼料への切換えにより、一定の変化を示したのは肝臓で、BHT 0.5% 投与群は体重増加においては対照群との間に差はなかったが、肝臓の絶対重量ならびに体重比重量ともに有意なる増加を示した ( $P<0.001$ )。BHT 1.0% 投与群においても同様に増加を示し、用量反応関係があった ( $P<0.001$ )。実験開始(BHT 投与開始) 4 週後飼料を対照飼料に切換えた群における肝臓重量は、切換え後 1 週目においては、雌雄両群ともに

BHT 投与群より減少はしていたが、対照群に比し有意なる差をもって重かった。その後徐々に減少し、対照飼料に切換え後 12 週目(実験終了時)において、雌群では絶対重量、体重比重量ともに、雄群では絶対重量が対照群との間に差がなくなるまで減少し、回復が認められたが、雄群の体重比重量は回復しなかった。また、著明ではなかったが雌雄両群の脾臓の重量において、BHT 投与群は対照群に比し、減少ないし減少傾向がみられた。その他の臓器については、一定の変化がみられなかった。

5. 剖検所見 BHT 1.0% 投与を対照飼料に切換えた後 1 週飼育群において、卵巣水腫 1 例がみられた。

#### 考 察

医薬品、食品添加物、環境汚染物質等において、これ

Table 4. Blood Components of Female Rats

| Weeks      | Doses                         | No. of rats | WBC<br>$\times 10^3/\text{mm}^3$ | RBC<br>$\times 10^6/\text{mm}^3$ | HGB<br>g/dl        | Hct<br>%            | MCV<br>$\mu^3$  | MCH<br>$\mu\text{g}$ | MCHC<br>%          |
|------------|-------------------------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|----------------------|--------------------|
| 4<br>(0)   | Control                       | 7           | 4.9 $\pm$ 1.43 <sup>1)</sup>     | 7.45 $\pm$ 0.387                 | 17.1 $\pm$ 0.78    | 40.4 $\pm$ 2.23     | 55 $\pm$ 0.7    | 23.3 $\pm$ 0.65      | 42.4 $\pm$ 1.08    |
|            | BHT0.5%                       | 7           | 4.8 $\pm$ 1.04                   | 7.19 $\pm$ 0.354                 | 16.5 $\pm$ 0.67    | 38.8 $\pm$ 1.76     | 55 $\pm$ 1.0    | 23.6 $\pm$ 0.52      | 42.6 $\pm$ 0.71    |
|            | BHT1.0%                       | 7           | 5.6 $\pm$ 1.36                   | 7.26 $\pm$ 0.300                 | 15.9 $\pm$ 0.91*   | 38.7 $\pm$ 1.61     | 54 $\pm$ 1.3    | 22.3 $\pm$ 1.27      | 41.3 $\pm$ 1.69    |
| 5<br>(1)   | Control                       | 8           | 6.8 $\pm$ 1.71                   | 6.77 $\pm$ 1.133                 | 16.9 $\pm$ 2.01    | 36.7 $\pm$ 5.77     | 55 $\pm$ 1.0    | 25.5 $\pm$ 1.96      | 46.4 $\pm$ 1.24    |
|            | BHT0.5%                       | 8           | 5.5 $\pm$ 0.87                   | 6.94 $\pm$ 1.204                 | 16.2 $\pm$ 1.29    | 35.7 $\pm$ 5.87     | 54 $\pm$ 1.1*   | 24.0 $\pm$ 2.54      | 45.3 $\pm$ 1.76    |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.5 $\pm$ 1.21                   | 6.96 $\pm$ 0.820                 | 16.8 $\pm$ 1.72    | 38.2 $\pm$ 5.69     | 56 $\pm$ 3.1    | 24.4 $\pm$ 0.77      | 44.1 $\pm$ 2.70    |
|            | BHT1.0%                       | 8           | 4.9 $\pm$ 1.12*                  | 6.97 $\pm$ 1.158                 | 16.1 $\pm$ 1.21    | 36.6 $\pm$ 5.87     | 53 $\pm$ 1.5*   | 23.7 $\pm$ 2.85      | 44.8 $\pm$ 5.57    |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.7 $\pm$ 1.32                   | 7.46 $\pm$ 1.427                 | 16.5 $\pm$ 1.21    | 38.2 $\pm$ 6.66     | 52 $\pm$ 0.9*** | 22.9 $\pm$ 2.85      | 43.8 $\pm$ 4.83    |
| 8<br>(4)   | Control                       | 8           | 7.5 $\pm$ 0.80                   | 6.31 $\pm$ 0.419                 | 15.9 $\pm$ 0.35    | 34.5 $\pm$ 2.64     | 55 $\pm$ 0.9    | 25.5 $\pm$ 1.31      | 46.3 $\pm$ 3.08    |
|            | BHT0.5%                       | 8           | 6.1 $\pm$ 0.97**                 | 5.83 $\pm$ 0.362*                | 14.9 $\pm$ 0.45*** | 31.3 $\pm$ 1.76(7)* | 54 $\pm$ 0.9(7) | 26.0 $\pm$ 1.45(7)   | 48.1 $\pm$ 2.38(7) |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.4 $\pm$ 0.66*                  | 6.29 $\pm$ 0.513                 | 15.5 $\pm$ 0.56    | 33.4 $\pm$ 2.82     | 53 $\pm$ 1.1**  | 24.9 $\pm$ 1.99      | 46.7 $\pm$ 4.12    |
|            | BHT1.0%                       | 8           | 5.6 $\pm$ 0.78***                | 6.59 $\pm$ 0.192                 | 15.0 $\pm$ 0.50*** | 34.6 $\pm$ 1.11     | 53 $\pm$ 0.7*** | 23.0 $\pm$ 0.63***   | 43.3 $\pm$ 1.06*   |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 5.9 $\pm$ 1.17*                  | 6.73 $\pm$ 0.378                 | 15.9 $\pm$ 0.58    | 35.7 $\pm$ 2.21     | 53 $\pm$ 1.1*   | 23.8 $\pm$ 0.97*     | 44.5 $\pm$ 0.72    |
| 16<br>(12) | Control                       | 6           | 5.3 $\pm$ 1.19                   | 7.15 $\pm$ 0.457                 | 15.3 $\pm$ 0.79    | 38.1 $\pm$ 2.31     | 54 $\pm$ 1.0    | 21.7 $\pm$ 0.64      | 40.2 $\pm$ 1.43    |
|            | BHT0.5%                       | 8           | 4.4 $\pm$ 0.82                   | 6.95 $\pm$ 0.664                 | 15.0 $\pm$ 1.01    | 37.2 $\pm$ 4.30     | 54 $\pm$ 1.9    | 22.1 $\pm$ 1.38      | 40.9 $\pm$ 1.86    |
|            | BHT0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 4.5 $\pm$ 0.62                   | 7.04 $\pm$ 0.332                 | 14.9 $\pm$ 0.44    | 37.5 $\pm$ 1.61     | 54 $\pm$ 1.4    | 21.3 $\pm$ 0.79      | 39.5 $\pm$ 1.03    |
|            | BHT1.0%                       | 8           | 4.3 $\pm$ 1.17                   | 7.11 $\pm$ 0.231                 | 14.6 $\pm$ 0.42    | 36.6 $\pm$ 1.24     | 52 $\pm$ 1.0**  | 20.9 $\pm$ 0.91      | 40.0 $\pm$ 1.47    |
|            | BHT1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 4.6 $\pm$ 0.85                   | 6.98 $\pm$ 0.446                 | 15.4 $\pm$ 0.40    | 36.9 $\pm$ 2.63     | 54 $\pm$ 1.1    | 22.3 $\pm$ 0.83      | 41.5 $\pm$ 1.84    |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean  $\pm$  SD

\* p&lt;0.05 \*\* p&lt;0.01 \*\*\* p&lt;0.001

らの摂取中止後の推移は、これらの安全性（毒性）を評価するうえにおいて、非常に意義あるものと考えられる。前報<sup>1)</sup>において著者らは、BHT 1.5%というかなり高濃度を使用したか、今回は、濃度を低くして BHT 投与を途中で中止し、その後の影響について、ラットを用いて経時的に検討した。

体重の増加については、Table 2, Fig. 2, 3 に示した如く、BHT 0.5%投与群においては全実験期間を通して、雌雄両群ともに対照群との間に差は認められなかった（推計学的には有意なる抑制がみられた時期があったが、各個体間のバラツキが小さくなったために現れた現象ですぐに回復した）。このことにより、BHT は0.5%までならラットにおいて、体重に影響を与えないといつて良いではないかと考えられる。一方、BHT 1.0%を

投与した雌雄においてはかなりの相異が認められ、性差があった。即ち、実験開始直後（BHT 投与開始直後）の体重の減少は雄群においてのみ認められ、雌群では認められなかった。また、全体的にみても、雌群は体重そのものが雄群に比し小さいということもあるが、推計学的有意差（対照群との間に）こそ認められるが、雌群は雄群に比べ体重増加の抑制は少なく、体重への影響は雄の方がより多くの影響を受けたものと考えられる。一方、実験開始後（BHT 投与開始後）4週目に対照飼料に切換えて、その後の推移を検討した群においては、雌雄両群とも飼料切換え後体重は急速に増加し、実験終了時（飼料切換え後12週）には、対照群との間に差が認められないまでに回復した。しかし、回復の速さには雌雄に差があり、雌群は飼料切換え後4週目では対照群との

Table 5. Biochemical Tests in Male Rats

| Weeks      | Doses            | No. of rats | TP<br>g/dl            | Cho<br>mg/dl          | GLU<br>mg/dl           | UN<br>mg/dl           | ALP<br>u/dl          | GOT<br>u/ml             | GPT<br>u/ml           | ChE<br>△pH                | Na <sup>+</sup><br>mEq/l | K <sup>+</sup><br>mEq/l |
|------------|------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 4<br>(0)   | Control          | 7           | 6.3±0.41              | 60±3.1                | 140±9.8                | 27±2.1                | 62±6.6               | 124±12.2                | 33±4.2                | 0.17±0.014                | 136±1.1                  | 7.9±0.56                |
|            | BHT 0.5%         | 7           | 6.9±0.32              | 63±3.2                | 143±9.2                | 29±1.9 <sup>*</sup>   | 55±7.6               | 100±9.8 <sup>**</sup>   | 25±2.4 <sup>**</sup>  | 0.26±0.020                | 135±2.2                  | 8.0±0.68                |
|            | BHT 1.0%         | 7           | 6.9±0.30              | 68±6.5 <sup>**</sup>  | 141±4.7                | 29±2.1                | 57±11.7              | 107±8.3 <sup>**</sup>   | 22±13.1               | 0.26±0.051                | 135±2.1                  | 3.2±0.34                |
| 5<br>(1)   | Control          | 8           | 6.5±0.17              | 56±2.2                | 134±6.7                | 26±1.8                | 59±13.1              | 143±9.1(7)              | 41±6.1                | 0.15±0.020                | 139±2.3                  | 6.8±0.21                |
|            | BHT 0.5%         | 8           | 7.4±0.30 <sup>*</sup> | 64±5.3 <sup>**</sup>  | 126±6.7 <sup>*</sup>   | 28±0.9 <sup>**</sup>  | 61±2.8               | 123±12.7 <sup>**</sup>  | 27±4.9 <sup>***</sup> | 0.24±0.032                | 138±2.9                  | 7.2±0.46                |
|            | BHT 0.5%→Control | 8           | 6.8±0.26              | 53±4.2                | 134±8.2                | 27±1.5                | 55±3.6               | 124±10.6 <sup>**</sup>  | 34±5.2 <sup>*</sup>   | 0.19±0.029                | 138±2.3                  | 7.2±0.25 <sup>*</sup>   |
|            | BHT 1.0%         | 8           | 7.3±0.20 <sup>*</sup> | 70±4.5 <sup>***</sup> | 127±7.3 <sup>*</sup>   | 29±1.3 <sup>**</sup>  | 67±5.7               | 104±17.7 <sup>***</sup> | 26±3.3 <sup>***</sup> | 0.25±0.011                | 137±2.4                  | 7.5±0.31 <sup>***</sup> |
|            | BHT 1.0%→Control | 8           | 6.7±0.32              | 53±6.1 <sup>**</sup>  | 138±7.7                | 26±1.9                | 50±3.0               | 114±11.6 <sup>***</sup> | 29±4.8 <sup>***</sup> | 0.18±0.016                | 138±1.8                  | 7.2±0.39 <sup>*</sup>   |
| 8<br>(4)   | Control          | 8           | 6.8±0.29              | 61±3.3                | 130±3.4                | 26±1.1                | 51±5.2               | 129±10.3                | 34±5.2                | 0.14±0.023                | 143±1.1                  | 7.0±0.32                |
|            | BHT 0.5%         | 7           | 7.3±0.43              | 62±5.6                | 126±3.1 <sup>*</sup>   | 28±2.8                | 43±7.4 <sup>*</sup>  | 121±11.9                | 27±3.8 <sup>*</sup>   | 0.21±0.058 <sup>*</sup>   | 144±2.6                  | 7.5±0.44 <sup>*</sup>   |
|            | BHT 0.5%→Control | 8           | 6.9±0.31              | 55±5.5 <sup>*</sup>   | 133±6.0                | 26±1.6                | 45±5.6 <sup>*</sup>  | 120±8.8                 | 31±6.3                | 0.16±0.023                | 144±2.1                  | 7.1±0.33                |
|            | BHT 1.0%         | 8           | 7.8±0.23 <sup>*</sup> | 60±5.8                | 133±6.2                | 28±1.4 <sup>*</sup>   | 41±5.2 <sup>**</sup> | 93±13.5 <sup>***</sup>  | 21±2.2 <sup>***</sup> | 0.25±0.024 <sup>***</sup> | 142±2.6                  | 7.7±0.38 <sup>**</sup>  |
|            | BHT 1.0%→Control | 8           | 6.7±0.17              | 54±3.0 <sup>***</sup> | 140±4.6 <sup>***</sup> | 23±1.6 <sup>***</sup> | 43±2.2 <sup>**</sup> | 114±17.6                | 34±7.4                | 0.14±0.034                | 140±1.8 <sup>**</sup>    | 7.4±0.30 <sup>*</sup>   |
| 16<br>(12) | Control          | 6           | 7.2±2.71              | 57±23.1               | 121±7.1                | 21±0.8                | 33±9.8               | 55±4.9                  | 55±8.3(4)             | 0.32±0.081                | 139±1.9                  | 7.2±0.52                |
|            | BHT 0.5%         | 8           | 7.5±5.07              | 55±4.1                | 120±4.8                | 21±1.3                | 34±1.9               | 51±4.7                  | 51±14.1               | 0.38±0.021                | 140±1.0                  | 7.3±0.46                |
|            | BHT 0.5%→Control | 8           | 7.1±4.16              | 52±4.8                | 121±2.3                | 21±1.2                | 33±2.2               | 51±4.6                  | 48±10.6               |                           | 140±1.8                  | 7.1±0.32                |
|            | BHT 1.0%         | 8           | 7.9±4.59              | 61±5.4                | 123±9.9                | 22±1.3                | 35±3.5               | 50±3.5                  | 43±10.6               | 0.38±0.026                | 139±2.1                  | 7.9±0.90                |
|            | BHT 1.0%→Control | 8           | 7.3±3.37              | 57±4.3                | 131±7.1 <sup>*</sup>   | 19±0.8 <sup>**</sup>  | 34±4.8               | 49±5.7                  | 50±24.3               | 0.38±0.049                | 140±1.8                  | 7.8±0.52                |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean±SD

\*p&lt;0.05 \*\*p&lt;0.01 \*\*\*p&lt;0.001

Table 6. Biochemical Tests in Female Rats

| Weeks | Doses                          | No. of rats | TP<br>g/dl                  | Cho<br>mg/dl                 | GLU<br>mg/dl               | UN<br>mg/dl                 | ALP<br>u/dl                 | GOT<br>u/ml                   | GPT<br>u/ml                   | ChE<br>$\Delta$ pH              | Na <sup>+</sup><br>mEq/l     | K <sup>+</sup><br>mEq/l       |
|-------|--------------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| (0)   | Control                        | 7           | 6.2 $\pm$ 0.11 <sup>D</sup> | 70 $\pm$ 5.3                 | 133 $\pm$ 2.9              | 23 $\pm$ 1.6                | 41 $\pm$ 11.3               | 121 $\pm$ 12.1                | 23 $\pm$ 3.8                  | 0.57 $\pm$ 0.068                | 136 $\pm$ 0.9                | 6.1 $\pm$ 0.25                |
|       | BHT 0.5%                       | 7           | 6.5 $\pm$ 0.21              | 85 $\pm$ 7.5 <sup>***</sup>  | 132 $\pm$ 4.0              | 23 $\pm$ 1.7                | 46 $\pm$ 7.5                | 102 $\pm$ 23.0                | 23 $\pm$ 5.4                  | 0.46 $\pm$ 0.100 <sup>*</sup>   | 144 $\pm$ 3.6 <sup>***</sup> | 6.6 $\pm$ 0.49 <sup>*</sup>   |
|       | BHT 1.0%                       | 7           | 6.2 $\pm$ 0.24              | 100 $\pm$ 7.2 <sup>***</sup> | 129 $\pm$ 5.7              | 25 $\pm$ 3.3                | 51 $\pm$ 2.7                | 106 $\pm$ 10.0 <sup>*</sup>   | 25 $\pm$ 3.5                  | 0.32 $\pm$ 0.069 <sup>***</sup> | 145 $\pm$ 2.4 <sup>***</sup> | 6.8 $\pm$ 0.31 <sup>***</sup> |
| (1)   | Control                        | 8           | 6.3 $\pm$ 0.26              | 74 $\pm$ 6.2                 | 137 $\pm$ 8.5              | 25 $\pm$ 2.0                | 41 $\pm$ 14.3               | 129 $\pm$ 9.7                 | 31 $\pm$ 2.3                  | 0.60 $\pm$ 0.114                | 137 $\pm$ 2.3                | 6.5 $\pm$ 0.29                |
|       | BHT 0.5%                       | 8           | 6.6 $\pm$ 0.20              | 86 $\pm$ 3.7 <sup>***</sup>  | 130 $\pm$ 5.9              | 26 $\pm$ 3.4                | 42 $\pm$ 11.6               | 109 $\pm$ 24.6                | 25 $\pm$ 4.6 <sup>**</sup>    | 0.56 $\pm$ 0.065                | 136 $\pm$ 1.5                | 6.6 $\pm$ 0.40                |
|       | BHT 0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.2 $\pm$ 0.24              | 73 $\pm$ 6.1                 | 133 $\pm$ 5.9              | 24 $\pm$ 2.8                | 36 $\pm$ 5.4                | 129 $\pm$ 12.2                | 31 $\pm$ 7.5                  | 0.60 $\pm$ 0.054                | 137 $\pm$ 1.6                | 6.4 $\pm$ 0.39                |
|       | BHT 1.0%                       | 8           | 6.7 $\pm$ 0.23              | 96 $\pm$ 5.1 <sup>***</sup>  | 129 $\pm$ 6.9              | 26 $\pm$ 2.0                | 33 $\pm$ 13.1               | 106 $\pm$ 10.5 <sup>***</sup> | 25 $\pm$ 3.2 <sup>**</sup>    | 0.45 $\pm$ 0.087 <sup>*</sup>   | 136 $\pm$ 1.8                | 6.8 $\pm$ 0.36 <sup>*</sup>   |
|       | BHT 1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.1 $\pm$ 0.11              | 70 $\pm$ 6.3                 | 141 $\pm$ 6.8              | 22 $\pm$ 2.1 <sup>*</sup>   | 37 $\pm$ 8.8                | 118 $\pm$ 19.2                | 27 $\pm$ 4.7                  | 0.44 $\pm$ 0.052 <sup>**</sup>  | 137 $\pm$ 1.8                | 6.3 $\pm$ 0.12                |
| (4)   | Control                        | 8           | 6.5 $\pm$ 1.18              | 74 $\pm$ 6.3                 | 136 $\pm$ 9.9              | 24 $\pm$ 1.5                | 41 $\pm$ 4.5                | 137 $\pm$ 6.9                 | 34 $\pm$ 5.1                  | 0.75 $\pm$ 0.063                | 141 $\pm$ 1.7                | 6.7 $\pm$ 0.33                |
|       | BHT 0.5%                       | 8           | 6.7 $\pm$ 0.91              | 86 $\pm$ 5.6 <sup>**</sup>   | 127 $\pm$ 4.5 <sup>*</sup> | 25 $\pm$ 2.0                | 34 $\pm$ 4.4 <sup>**</sup>  | 113 $\pm$ 7.0 <sup>***</sup>  | 21 $\pm$ 5.2 <sup>***</sup>   | 0.61 $\pm$ 0.131                | 141 $\pm$ 1.7                | 6.5 $\pm$ 0.18                |
|       | BHT 0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.6 $\pm$ 0.19              | 75 $\pm$ 3.0                 | 131 $\pm$ 5.1              | 23 $\pm$ 1.7                | 35 $\pm$ 3.8 <sup>*</sup>   | 120 $\pm$ 7.8 <sup>***</sup>  | 28 $\pm$ 2.7 <sup>*</sup>     | 0.77 $\pm$ 0.060                | 140 $\pm$ 1.1                | 6.5 $\pm$ 0.25                |
|       | BHT 1.0%                       | 8           | 7.3 $\pm$ 0.34              | 97 $\pm$ 12.3 <sup>***</sup> | 130 $\pm$ 5.2              | 27 $\pm$ 2.2 <sup>**</sup>  | 34 $\pm$ 3.6 <sup>**</sup>  | 103 $\pm$ 6.8 <sup>***</sup>  | 20 $\pm$ 5.7 <sup>***</sup>   | 0.51 $\pm$ 0.061 <sup>**</sup>  | 139 $\pm$ 1.8 <sup>**</sup>  | 6.8 $\pm$ 0.27                |
|       | BHT 1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 6.5 $\pm$ 0.20              | 73 $\pm$ 4.5                 | 146 $\pm$ 8.8              | 21 $\pm$ 1.7 <sup>**</sup>  | 31 $\pm$ 2.8 <sup>***</sup> | 115 $\pm$ 22.3 <sup>*</sup>   | 27 $\pm$ 4.6 <sup>*</sup>     | 0.72 $\pm$ 0.073                | 141 $\pm$ 1.7                | 6.7 $\pm$ 0.46                |
| (12)  | Control                        | 8           | 7.2 $\pm$ 2.31              | 70 $\pm$ 17.6                | 118 $\pm$ 10.3             | 19 $\pm$ 1.2                | 35 $\pm$ 3.1                | 52 $\pm$ 2.9                  | 54 $\pm$ 7.0(5)               | 0.76 $\pm$ 0.329                | 139 $\pm$ 1.6                | 6.9 $\pm$ 0.57                |
|       | BHT 0.5%                       | 8           | 7.4 $\pm$ 3.32              | 90 $\pm$ 17.5 <sup>*</sup>   | 117 $\pm$ 6.0              | 18 $\pm$ 3.3                | 31 $\pm$ 4.3                | 52 $\pm$ 1.7                  | 39 $\pm$ 9.6 <sup>*</sup>     | 0.88 $\pm$ 0.067                | 139 $\pm$ 1.4                | 7.0 $\pm$ 0.32                |
|       | BHT 0.5% $\rightarrow$ Control | 8           | 7.2 $\pm$ 2.07              | 74 $\pm$ 14.8                | 117 $\pm$ 6.1              | 18 $\pm$ 2.0                | 26 $\pm$ 4.4 <sup>**</sup>  | 52 $\pm$ 2.8                  | 44 $\pm$ 4.6 <sup>*</sup>     | 0.92 $\pm$ 0.168                | 138 $\pm$ 1.9                | 6.6 $\pm$ 0.42                |
|       | BHT 1.0%                       | 8           | 7.7 $\pm$ 2.81              | 98 $\pm$ 21.5                | 121 $\pm$ 10.3             | 22 $\pm$ 1.4 <sup>**</sup>  | 24 $\pm$ 6.4 <sup>*</sup>   | 50 $\pm$ 4.0                  | 35 $\pm$ 10.1 <sup>**</sup>   | 0.82 $\pm$ 0.151                | 139 $\pm$ 0.9                | 6.7 $\pm$ 0.29                |
|       | BHT 1.0% $\rightarrow$ Control | 8           | 7.3 $\pm$ 2.61              | 78 $\pm$ 12.2                | 131 $\pm$ 6.7 <sup>*</sup> | 17 $\pm$ 0.6 <sup>***</sup> | 29 $\pm$ 6.0 <sup>*</sup>   | 50 $\pm$ 2.8                  | 38 $\pm$ 8.8(7) <sup>**</sup> | 0.89 $\pm$ 0.151                | 139 $\pm$ 2.6                | 7.2 $\pm$ 0.48                |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean $\pm$ SD\* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01 \*\*\* $p$ <0.001

Table 7. Organ Weights of Male Rats

| Weeks      | Doses           | No. of rats | Thymus<br>mg/100g      | Lung<br>mg/100g         | Liver<br>g/100g            | Kidney(L)<br>mg/100g     | Kidney(R)<br>mg/100g   | Spleen<br>mg/100g       | Heart<br>mg/100g        | Test. (L)<br>mg/100g | Test. (R)<br>mg/100g |
|------------|-----------------|-------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| 4<br>(0)   | Control         | 7           | 467±139.7 <sup>D</sup> | 960±91.9                | 9.10±0.765                 | 831±72.1                 | 838±67.6               | 502±31.7                | 658±60.1                | 1112±107.5           | 1108±113.1           |
|            |                 | 7           | 220±53.9               | 458±48.1                | 4.33±0.198                 | 395±17.1                 | 399±19.3               | 239±13.3                | 312±10.9                | 534±40.2             | 527±39.4             |
|            | BHT0.5%         | 7           | 351±53.0               | 920±90.1                | 12.03±1.466 <sup>***</sup> | 882±105.7 <sup>***</sup> | 854±85.0 <sup>*</sup>  | 448±56.3 <sup>*</sup>   | 648±49.8                | 1159±85.5            | 1108±75.0            |
|            |                 | 7           | 172±22.6               | 453±45.4                | 5.89±0.195 <sup>***</sup>  | 432±16.7 <sup>***</sup>  | 419±11.3 <sup>*</sup>  | 220±26.2                | 319±15.8                | 570±27.6             | 546±38.9             |
|            | BHT1.0%         | 7           | 290±32.3 <sup>**</sup> | 709±87.5 <sup>***</sup> | 11.28±1.200 <sup>***</sup> | 764±89.2 <sup>***</sup>  | 789±79.6 <sup>**</sup> | 382±54.5 <sup>***</sup> | 560±56.5 <sup>**</sup>  | 1001±221.0           | 952±204.5            |
|            |                 | 7           | 169±21.5 <sup>*</sup>  | 413±45.6                | 6.58±0.634 <sup>***</sup>  | 444±39.6 <sup>**</sup>   | 460±42.5 <sup>**</sup> | 222±22.4                | 326±28.9                | 579±100.8            | 551±96.8             |
|            |                 |             |                        |                         |                            |                          |                        |                         |                         |                      |                      |
|            |                 |             |                        |                         |                            |                          |                        |                         |                         |                      |                      |
|            |                 |             |                        |                         |                            |                          |                        |                         |                         |                      |                      |
|            |                 |             |                        |                         |                            |                          |                        |                         |                         |                      |                      |
| 5<br>(1)   | Control         | 8           | 388±37.9               | 775±50.5                | 9.99±0.490                 | 962±109.9                | 968±76.4               | 510±28.5                | 694±37.9                | 1293±74.1            | 1246±79.3            |
|            |                 | 8           | 140±17.3               | 320±15.9                | 4.13±0.080                 | 397±36.9                 | 400±26.7               | 211±11.3                | 287±11.4                | 535±30.0             | 515±31.7             |
|            | BHT0.5%         | 8           | 323±21.9               | 777±82.3                | 13.26±0.892 <sup>***</sup> | 927±74.9                 | 937±78.5               | 538±69.2                | 667±92.8                | 1305±50.1            | 1248±35.4            |
|            |                 | 8           | 137±11.1               | 329±28.3                | 5.62±0.173 <sup>***</sup>  | 392±14.0                 | 397±20.5               | 228±23.3                | 283±37.3                | 554±27.3             | 530±25.5             |
|            | BHT0.5%→Control | 8           | 375±48.1               | 754±65.2                | 10.96±1.125 <sup>***</sup> | 902±88.2                 | 880±78.0 <sup>*</sup>  | 515±49.8                | 699±35.9                | 1248±53.1            | 1217±64.5            |
|            |                 | 8           | 159±16.0 <sup>*</sup>  | 321±20.1                | 4.66±0.238 <sup>***</sup>  | 384±16.5                 | 375±16.3 <sup>*</sup>  | 219±9.4                 | 298±11.8                | 533±24.8             | 520±33.7             |
|            | BHT1.0%         | 8           | 292±47.0 <sup>*</sup>  | 710±66.3 <sup>*</sup>   | 13.37±1.001 <sup>***</sup> | 846±75.3 <sup>*</sup>    | 824±75.9 <sup>**</sup> | 430±27.0 <sup>***</sup> | 430±37.6 <sup>***</sup> | 1244±28.2            | 1196±92.9            |
|            |                 | 8           | 140±24.0               | 341±43.1                | 6.40±0.151 <sup>***</sup>  | 406±41.7                 | 396±42.7               | 206±17.3                | 294±23.7                | 597±44.8             | 574±54.5             |
|            | BHT1.0%→Control | 8           | 350±50.4 <sup>*</sup>  | 729±62.4                | 10.77±0.851 <sup>***</sup> | 849±51.7                 | 839±38.6               | 496±35.2                | 650±45.7                | 1230±67.8            | 1185±61.3            |
|            |                 | 8           | 161±19.5               | 336±15.9                | 4.97±0.289 <sup>***</sup>  | 392±18.7                 | 387±16.1               | 229±10.7                | 300±11.8                | 568±33.1             | 547±33.5             |
| 8<br>(4)   | Control         | 8           | 328±55.4               | 993±137.2               | 11.24±0.682                | 1074±52.7                | 1055±54.8              | 602±24.5                | 784±44.6                | 1414±49.9            | 1344±45.7            |
|            |                 | 8           | 110±16.1               | 335±38.2                | 3.80±0.133                 | 362±11.4                 | 356±14.4               | 203±9.6                 | 264±6.7                 | 478±24.9             | 454±19.0             |
|            | BHT0.5%         | 8           | 283±38.9               | 894±98.4                | 14.10±0.994 <sup>***</sup> | 1096±91.9                | 1096±83.8              | 555±25.6 <sup>**</sup>  | 759±30.0                | 1427±35.0            | 1389±40.0            |
|            |                 | 8           | 100±11.7               | 317±35.0                | 4.99±0.228 <sup>***</sup>  | 388±28.4                 | 388±28.0               | 196±4.8                 | 269±7.9                 | 506±18.5             | 493±22.3             |
|            | BHT0.5%→Control | 8           | 299±27.8               | 914±114.3               | 10.76±1.056                | 966±91.3                 | 964±74.3               | 573±48.6                | 754±54.7                | 1392±57.8            | 1352±45.8            |
|            |                 | 8           | 105±6.6                | 320±30.1                | 3.77±0.156 <sup>*</sup>    | 339±18.5                 | 338±11.6               | 201±9.3                 | 265±9.4                 | 490±29.1             | 476±26.2             |
|            | BHT1.0%         | 8           | 281±46.9               | 899±166.7               | 13.65±0.925 <sup>***</sup> | 942±60.9                 | 929±59.8               | 487±31.4                | 713±43.2                | 1402±36.2            | 1350±35.0            |
|            |                 | 8           | 111±18.7               | 356±66.9                | 5.40±0.222 <sup>***</sup>  | 372±11.7                 | 367±15.5               | 193±7.0                 | 282±9.4                 | 555±23.3             | 535±30.0             |
|            | BHT1.0%→Control | 8           | 291±22.5               | 969±87.6                | 10.55±0.425 <sup>*</sup>   | 939±64.2                 | 921±42.9               | 549±17.0                | 728±31.9                | 1382±55.9            | 1354±66.1            |
|            |                 | 8           | 107±6.4                | 358±28.0                | 3.91±0.101                 | 347±14.1                 | 341±7.0                | 203±3.1                 | 269±7.1                 | 512±24.6             | 501±28.2             |
| 16<br>(12) | Control         | 6           | 203±21.6               | 953±110.2               | 10.67±0.809                | 1121±75.3                | 1089±70.9              | 685±123.3               | 798±55.5                | 1414±71.5            | 1368±49.9            |
|            |                 | 6           | 58±6.3                 | 275±16.5                | 3.09±0.097 <sup>***</sup>  | 324±13.7                 | 315±12.0               | 199±40.0                | 231±11.6                | 410±28.7             | 396±19.0             |
|            | BHT0.5%         | 8           | 183±23.4               | 1007±64.8               | 15.34±0.879 <sup>***</sup> | 1226±75.4                | 1186±74.5              | 645±24.7                | 849±60.1                | 1452±89.9            | 1417±59.5            |
|            |                 | 8           | 53±7.9                 | 291±9.7                 | 4.45±0.107 <sup>***</sup>  | 355±18.1                 | 344±21.2               | 187±8.7                 | 245±7.1                 | 421±16.6             | 411±15.6             |
|            | BHT0.5%→Control | 8           | 165±38.6               | 1036±57.0               | 11.33±0.523                | 1126±73.7                | 1121±89.1              | 662±55.5                | 836±33.1                | 1450±70.2            | 1379±91.9            |
|            |                 | 8           | 47±10.4                | 301±16.6                | 3.29±0.051 <sup>***</sup>  | 327±23.2                 | 325±22.5               | 192±14.6                | 243±6.6                 | 421±22.3             | 401±29.6             |
|            | BHT1.0%         | 8           | 159±43.6               | 1042±144.2              | 16.16±1.328 <sup>***</sup> | 1120±85.5                | 1086±116.9             | 575±38.8                | 814±75.2                | 1498±65.6            | 1486±40.3            |
|            |                 | 8           | 50±12.8                | 332±34.0                | 5.17±0.228 <sup>***</sup>  | 358±17.3                 | 346±18.6               | 184±11.3                | 260±18.0                | 480±30.9             | 476±27.9             |
|            | BHT1.0%→Control | 8           | 203±53.5               | 1113±91.1               | 11.29±0.653 <sup>*</sup>   | 1064±63.4                | 1066±55.0              | 663±32.2                | 858±78.9                | 1449±43.5            | 1447±76.7            |
|            |                 | 8           | 58±14.2                | 324±18.4                | 3.29±0.113 <sup>***</sup>  | 309±13.4                 | 310±17.4               | 193±5.0                 | 249±13.8                | 422±20.7             | 422±35.7             |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean ± SD

\* p&lt;0.05 \*\* p&lt;0.01 \*\*\*p&lt;0.001

Table 8. Organ Weights of Female Rats

| W<br>s<br>e<br>e<br>k<br>s | Doses           | No.<br>of<br>rats | Thymus<br>mg<br>mg/100g | Lung<br>mg<br>mg/100g | Liver<br>g<br>g/100g | Kidney(L)<br>mg<br>mg/100g | Kidney(R)<br>mg<br>mg/100g | Spleen<br>mg<br>mg/100g | Heart<br>mg<br>mg/100g | Ovary<br>mg<br>mg/100g | Uterus<br>mg<br>mg/100g |
|----------------------------|-----------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| (0)                        | Control         | 7                 | 276±64.6 <sup>1)</sup>  | 698±61.1              | 5.33±0.292           | 574±37.1                   | 589±34.5                   | 345±36.9                | 446±22.9               | 44±11.8                | 301±79.9                |
|                            |                 | 7                 | 194±46.4                | 491±59.1              | 3.73±0.090           | 402±30.4                   | 412±22.4                   | 242±29.2                | 312±12.0               | 31±7.7                 | 213±63.5                |
|                            | BHT0.5%         | 7                 | 322±66.3                | 691±59.1              | 7.31±0.771           | 581±39.8                   | 589±41.4                   | 337±44.0                | 471±44.2               | 41±10.8                | 237±78.1                |
|                            |                 | 7                 | 227±22.3                | 492±36.4              | 5.21±0.397           | 415±36.8                   | 420±26.8                   | 241±36.4                | 335±12.8               | 29±5.0                 | 166±43.9                |
|                            | BHT1.0%         | 7                 | 295±37.5                | 669±98.9              | 8.37±0.821           | 534±31.5                   | 541±38.7                   | 306±30.0                | 436±51.2               | 33±12.3                | 227±121.5               |
|                            |                 | 7                 | 227±24.1                | 512±28.1              | 6.43±0.246           | 412±24.3                   | 416±24.4                   | 235±18.8                | 334±14.3               | 25±9.0                 | 173±91.2                |
|                            |                 |                   |                         |                       |                      |                            |                            |                         |                        |                        |                         |
|                            |                 |                   |                         |                       |                      |                            |                            |                         |                        |                        |                         |
| (1)                        | Control         | 8                 | 348±54.0                | 659±58.5              | 5.82±0.223           | 587±36.8                   | 590±27.8                   | 359±20.1                | 488±54.2               | 50±7.0                 | 347±54.5                |
|                            |                 | 8                 | 217±32.9                | 411±39.3              | 3.63±0.146           | 366±22.1                   | 368±16.7                   | 224±7.0                 | 303±27.2               | 31±4.0                 | 216±34.6                |
|                            | BHT0.5%         | 8                 | 299±32.0                | 643±96.4              | 7.91±0.744           | 600±68.4                   | 583±47.3                   | 359±35.4                | 476±43.4               | 44±12.2                | 263±104.5               |
|                            |                 | 8                 | 194±19.5                | 417±45.3              | 5.14±0.272           | 389±34.2                   | 379±25.8                   | 233±12.7                | 309±20.6               | 28±6.9                 | 171±69.4                |
|                            | BHT0.5%→Control | 8                 | 295±36.6                | 705±137.1             | 6.69±0.742           | 587±37.3                   | 585±27.8                   | 367±22.9                | 494±47.1               | 48±9.5                 | 276±65.6                |
|                            |                 | 8                 | 188±23.4                | 447±62.4              | 4.26±0.325           | 372±17.7(7)                | 373±18.8                   | 234±15.0                | 314±20.2               | 31±6.7                 | 175±40.9                |
|                            | BHT1.0%         | 8                 | 283±42.0                | 612±66.4              | 8.76±0.827           | 567±44.6                   | 559±51.3                   | 357±35.8                | 461±30.2               | 39±11.2                | 189±77.5                |
|                            |                 | 8                 | 191±20.8                | 415±30.0              | 5.94±0.225           | 385±19.1                   | 379±22.0                   | 242±20.0                | 313±9.6                | 26±6.8                 | 128±52.4                |
| (4)                        | BHT1.0%→Control | 8                 | 307±81.7                | 651±61.1              | 6.41±0.670           | 580±52.1                   | 592±64.2                   | 350±33.0                | 501±43.8               | 44±8.1                 | 217±96.8                |
|                            |                 | 8                 | 206±42.3                | 442±34.7              | 4.34±0.156           | 393±19.8                   | 401±21.4                   | 237±14.9                | 340±11.7               | 30±5.8                 | 143±53.6                |
|                            |                 |                   |                         |                       |                      |                            |                            |                         |                        |                        |                         |
|                            | Control         | 8                 | 260±18.0                | 724±94.7              | 5.92±0.212           | 603±36.2                   | 589±41.4                   | 396±15.0                | 518±16.7               | 42±10.9                | 375±55.2                |
|                            |                 | 8                 | 145±7.2                 | 403±50.3              | 3.30±0.113           | 336±18.4                   | 328±19.4                   | 221±8.9                 | 289±16.7               | 23±6.4                 | 209±30.1                |
|                            | BHT0.5%         | 8                 | 248±26.1                | 712±58.2              | 7.69±0.564           | 630±41.9                   | 633±34.1                   | 389±39.8                | 508±38.3               | 53±4.3                 | 298±36.6                |
|                            |                 | 8                 | 144±12.1                | 414±30.3              | 4.47±0.157           | 366±13.2                   | 369±12.7                   | 226±16.4                | 295±13.6               | 31±2.4                 | 173±15.1                |
|                            | BHT0.5%→Control | 8                 | 275±44.7                | 692±100.7             | 6.07±0.384           | 555±31.8                   | 563±26.4                   | 400±33.5                | 493±22.8               | 49±13.5                | 349±74.4                |
| (12)                       |                 | 8                 | 157±26.1                | 395±53.4              | 3.47±0.155           | 317±18.6                   | 322±14.9                   | 228±15.7                | 282±11.1               | 28±7.8                 | 199±37.5                |
|                            | BHT1.0%         | 8                 | 256±42.7                | 762±98.5              | 9.02±0.795           | 576±43.2                   | 576±32.7                   | 357±19.6                | 499±46.6               | 51±19.2                | 262±80.6                |
|                            |                 | 8                 | 154±23.2                | 459±58.1              | 5.43±0.273           | 347±18.4                   | 347±10.5                   | 215±8.6                 | 300±13.1               | 30±11.0                | 157±48.1                |
|                            | BHT1.0%→Control | 8                 | 235±19.4                | 683±89.1              | 5.91±0.526           | 563±30.3                   | 560±36.5                   | 355±47.0                | 503±43.5               | 52±7.9                 | 322±75.8                |
|                            |                 | 8                 | 138±10.9                | 399±34.7              | 3.46±0.140           | 330±9.4                    | 328±8.7                    | 208±27.7                | 295±13.3               | 31±4.9                 | 188±43.1                |
|                            |                 |                   |                         |                       |                      |                            |                            |                         |                        |                        |                         |
|                            | Control         | 6                 | 188±28.5                | 858±56.6              | 6.23±0.291           | 673±17.0                   | 665±20.2                   | 437±21.1                | 537±21.2               | 47±5.7                 | 446±63.2                |
|                            |                 | 6                 | 92±13.6                 | 421±20.3              | 3.06±0.107           | 330±14.5                   | 327±7.3                    | 214±7.8                 | 264±7.0                | 23±2.7                 | 219±33.3                |
| 16                         | BHT0.5%         | 8                 | 167±17.1                | 857±120.5             | 7.46±0.417           | 647±64.6                   | 636±33.5                   | 399±27.1                | 505±29.7               | 44±4.2                 | 330±52.3                |
|                            |                 | 8                 | 86±8.0                  | 441±68.9              | 3.83±0.099           | 331±17.9                   | 327±17.0                   | 204±11.6                | 259±5.7                | 22±1.9                 | 170±32.3                |
|                            | BHT0.5%→Control | 8                 | 187±15.3                | 848±38.1              | 5.91±0.555           | 570±58.6                   | 564±53.3                   | 408±44.6                | 519±44.9               | 44±7.4                 | 427±55.9                |
|                            |                 | 8                 | 95±8.1                  | 432±30.9              | 3.00±0.113           | 289±13.8                   | 286±17.9                   | 207±12.9                | 264±9.4                | 22±3.7                 | 219±35.0                |
|                            | BHT1.0%         | 8                 | 176±19.8                | 794±132.7             | 8.72±0.441           | 574±48.3                   | 599±44.3                   | 395±23.9                | 522±33.2               | 45±6.2                 | 349±80.9                |
|                            |                 | 8                 | 93±8.2                  | 420±65.2              | 4.62±0.148           | 304±25.5                   | 317±19.2                   | 209±8.8                 | 276±12.3               | 23±3.1                 | 184±38.3                |
|                            | BHT1.0%→Control | 8                 | 189±40.1                | 850±87.9              | 6.04±0.445           | 608±46.6                   | 597±43.2                   | 413±11.9                | 541±50.0               | 49±9.8                 | 455±63.4                |
|                            |                 | 8                 | 94±19.2                 | 423±41.8              | 3.00±0.127           | 302±15.6                   | 296±11.5                   | 206±10.2                | 268±13.5               | 24±4.4                 | 226±31.3                |

( ) Weeks from change BHT to control

1) mean ± SD

\* p&lt;0.05 \*\* p&lt;0.01 \*\*\* p&lt;0.001



差が認められないまでに回復し、雌群の方が回復が速かった。

血球成分については、Table 3, 4 に示した。全般的に著明な変化はなかったが、BHT 投与群の雌雄において白血球数 (WBC) において、全実験期間にわたって減少傾向が、BHT 投与群雌においてヘモグロビン量の減少傾向がみられたが、これらはこれまでの研究においてしばしば明らかにされている<sup>4)</sup>。

血清成分ならびに血清酵素活性については、Table 5, 6 に示した如くである。前報<sup>1)</sup>において著者らは血清尿素窒素量について、飼料の切換えによる効果はなく、不可逆であったと報告したが、今回の実験においては、逆に対照群に比し投与群では低下を示すものがあり、前報において血清尿素窒素量の増加については、今回使用した濃度ではみられなかった。一方、注目すべきは血清コレステロール量で、全実験期間を通して雌雄両群において、BHT 投与群は対照群に比し増加ないし増加傾向がみられ、この増加は、対照飼料への切換えにより早期に対照群レベルに減少した。これまで、多くの研究者たちにより BHT の血清コレステロール増加は指摘されているが、この作用は可逆的で、その回復は速やかであることが明らかとなった。

臓器重量については、BHT の代表的作用の一つとして肝臓重量増加作用<sup>5)</sup>が報告されているが、前報<sup>1)</sup>においても報告したが BHT 投与群では、雌雄両群ともに肝臓重量において、絶対重量、体重比重量とも著明な増加を示し、BHT 投与開始 4 週後に飼料を対照飼料に切換えた群では、徐々に増加抑制が生じ、飼料切換え 12 週後 (実験終了時) において、雌群の絶対重量、体重比重量、雄の絶対重量は対照群のレベルにまで回復した。雄の体重比重量は実験終了時においても対照群との間に差がみられたが、これはバラツキが少ないために出た結果

であって本質的に対照群との間に差があるとは考えにくい。一方、肝臓に対する BHT の作用については、重量増加についてのみならず、血清コレステロール量についても可逆性があり、BHT の作用は、体重、臓器機能のレベルにおいて 1.0% までは可逆的であると推察できる。しかし、安全性という見地から考察を加えれば、細胞レベルにおける作用についても考慮せねばならず、酵素に対する作用、膜に対する作用について詳細なる検討を行い、その上でさらに検討すべきであると考えらる。

### 結 論

BHT 投与を途中で中止し、その後の影響を検討する目的で、BHT 0.5%, 1.0% 含有飼料を 4 週間ラットに投与した後対照飼料に切換え、その後の影響を経時的に検討し次の結論を得た。

1. ラット雌雄において、体重増加に影響をおよぼさない BHT 濃度は 0.5% であった。
2. BHT 1.0% 投与の場合、体重増加の抑制において、性差があり、そのうける影響は雄の方が雌よりも大であった。
3. 血清コレステロール量、肝臓重量は雌雄両群において、BHT 投与により増加し、対照飼料への切換えにより、対照レベルにもどった。

### 文 献

- 1) 市川久次, 小林博義, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 33, 1977
- 2) 池田虎雄, 水尾昭江, 久保喜一, 林田志信, 小林博義, 平賀興吾: 東京衛研年報, 25, 525, 1974
- 3) 市川久次, 小林博義, 中川好男, 長井二三子, 清水麻里, 池田虎雄, 矢野範男, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 1, 1977
- 4) Gilbert, D. and Golberg, L.: *Fd., Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965

## ジブチルヒドロキシトルエンの出血致死効果と老齢ラット

高橋 省\*, 中尾 順子\*, 平賀 興 吾\*

### Hemorrhages in Aged Rats Caused by Dietary Butylated Hydroxytoluene

OSAMU TAKAHASHI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

Butylated hydroxytoluene (BHT) was administered in the purified diet to groups of four male or female Sprague-Dawley rats, 1.5-years old, at a concentration of 1.20% for 25 days. BHT caused two male rats to hemorrhage and decreased the prothrombin index of two male rats to the abnormal levels.

**Keywords** : hemorrhage, prothrombin, butylated hydroxytoluene, aged rats

食品添加物として使用が許可されているジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の高用量を与えたラットは出血して死亡し、血漿プロトロンビン時間はいちじるしく延長する。この効果は BHT の用量に依存しており、薬理学的に特異性の高いものである<sup>1,2)</sup>。

BHT による出血致死現象の外延を規定するために、次の二つの考え方に立って、羅列的実験を行ってきた。

1) 実験動物を一定にして、出血致死数、出血個体数、プロトロンビン指数の三つを生物学的レベルの異なった現象的結果の示標としたとき、ある一定の現象的結果をもたらすための、BHT 関連化合物の化学的特徴は何か。

2) 上記 1) の系において、投与物質を一定にしたとき、ある一定の現象的結果をもたらす動物の性質は何か。

その結果、1) の観点からは、BHT 以外に置換フェノール類の 2, 4, 6-トリ-*t*-ブチルフェノール、2, 6-ジイソプロピル-4-*t*-ブチルフェノール、2, 6-ジ-*t*-ブチルフェノールが出血致死効果をもつことを見出した<sup>3,4)</sup>。これは、すでに知られているタマリンあるいはインダンジオン系の経口抗凝血剤、あるいは、テトラクロル-4-ビリジノール、2-クロル-3-フィチルナフトキノロンなど以外の抗ビタミン K 作用をもつ化学物質群の存在性を示唆すると考えられる<sup>5)</sup>。2) の観点からは、種差、系統差、性差の存在を知った<sup>6,7)</sup>。

本報告は 2) の観点からの羅列の一つであり、BHT の出血致死効果と動物の年齢との関係を知るための予備的実験観察の結果であって、1.5 年齢の雌雄ラットに対する BHT の出血効果の有無をとり扱っている。

### 実験方法

動物は Sprague-Dawley 系のラット (日本クレア) を 4 週齢で購入し、コンベンショナルな飼育室で 1.5 年間固型飼料 (CLEA CE-2) と水を与えたのち用いた。ラットは 1 匹飼いと し、24.00% カゼイン食を基本飼料として、1.20% の BHT (東京化成) を与えた<sup>1,5)</sup>。

投与期間中は、出血を中心に一般症状を観察し、体重、飼料摂取量を測定した。その他の方法は前報どおりである<sup>1)</sup>。

### 結果および考察

体重、飼料および BHT の摂取量、実験終了時の肝臓重量を表 1 に示す。BHT の摂取量は、6 週齢の雄ラットでの出血による LD<sub>50(40日)</sub> の 15.5% (雄)、37.9% (雌) であった<sup>1)</sup>。

雌雄とも、投与開始後 11 日目より下痢、赤尿が認められ、雄で、12、13 日目に 1/4 の動物に鼻出血、16 日目に 2/4 に足からの出血が観察された。25 日間の投与で死亡動物はなく、生存動物の内臓器官への出血も観察されなかったが、雌雄ともに BHT 投与群で盲腸肥大が認められた。なお、雄で対照群に 1 匹肝臓癌および脾臓癌が、雌で対照群に 1 匹、BHT 群に 1 匹それぞれ乳癌が、対照群に 3 匹、BHT 群に 2 匹、腹部皮下の浮腫が観察された。

プロトロンビン指数は、雌雄とも、対照群と投与群の間に有意差はなかったが、雄 2 匹は異常値を示した (表 2)。

老齢ラットは、新しい環境条件への適応が悪く、飼料を精製飼料に切り換えたさいの順化に時間がかかる。とくに BHT を含む飼料に対しては摂取拒否を示すため、BHT の摂取量が低下した。しかしながら、BHT による出血およびプロトロンビン指数の低下は基本的には存

\* 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. Mean Body Weights and Food Intake of Rats Fed Diets Containing 1.20% BHT for 25 Days

| Group         | Number<br>of<br>rats | Body weight<br>(g) |       | Body-weight<br>gain<br>(%) | Mean<br>food intake<br>(g/rat/day) | Mean<br>BHT intake<br>(mg/kg/day) |
|---------------|----------------------|--------------------|-------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
|               |                      | Initial            | Final |                            |                                    |                                   |
| <b>Male</b>   |                      |                    |       |                            |                                    |                                   |
| Control       | 2                    | 686                | 690   | 0.6                        | 19.2                               | —                                 |
| BHT           | 4                    | 659                | 517   | -22                        | 5.9                                | 118                               |
| <b>Female</b> |                      |                    |       |                            |                                    |                                   |
| Control       | 3                    | 442                | 422   | -4.5                       | 17.5                               | —                                 |
| BHT           | 4                    | 431                | 325   | -25                        | 9.6                                | 288                               |

Table 2. Hemorrhagic Signs, Prothrombin Index and Relative Liver Weights of Rats Fed Diets Containing 1.20% BHT for 25 Days

| Group         | Hemorrhage              | Prothrombin<br>index<br>(%) | Mean | Relative<br>liver weight<br>(g/100g body weight) | Mean   |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------------------------|--------|
| <b>Male</b>   |                         |                             |      |                                                  |        |
| Control       |                         |                             |      |                                                  |        |
| 1             |                         | 120                         | 103  | 3.31                                             | 3.26   |
| 2             |                         | 86                          |      | 3.21                                             |        |
| BHT           |                         |                             |      |                                                  |        |
| 1             | From callosity of foot  | 35                          | 71   | 4.53                                             | 4.05*  |
| 2             |                         | 90                          |      | 3.99                                             |        |
| 3             |                         | 120                         |      | 3.69                                             |        |
| 4             | From foot and epistaxis | 40                          |      | 3.97                                             |        |
| <b>Female</b> |                         |                             |      |                                                  |        |
| Control       |                         |                             |      |                                                  |        |
| 1             |                         | 105                         | 104  | 3.71                                             | 3.62   |
| 2             |                         | 79                          |      | 3.19                                             |        |
| 3             |                         | 127                         |      | 3.97                                             |        |
| BHT           |                         |                             |      |                                                  |        |
| 1             |                         | 105                         | 110  | 4.72                                             | 4.94** |
| 2             |                         | 105                         |      | 4.94                                             |        |
| 3             |                         | 121                         |      | 5.47                                             |        |
| 4             |                         | 110                         |      | 4.62                                             |        |

\* Significantly different from control,  $P < 0.05$  (Student's *t*-test).\*\* $P < 0.01$ .

在するし、性差も認められる<sup>9)</sup>。

高用量の BHT を大量に投与した場合、急性的な出血致死のものは目立った出血効果が観察されなくなるが、上記の結果は、これが、ラットの老齢化にともなう BHT の代謝あるいは止血機構の変化に基づいた現象ではなく、むしろ BHT の長期連続投与に反応して起った適応

現象であることを示している<sup>9)</sup>。

BHT の新しい代謝物 2, 6-ジ-*n*-ブチル-4-メチレン-2, 5-シクロヘキサジエノンがラットの肝臓中より同定され、その反応性や肝臓内濃度の種差から考えて、BHT による出血効果を理解する上で、重要な物質であろうと予想される<sup>9,10)</sup>。この物質の肝臓内濃度の変化もあわせ、

BHT の出血致死効果と動物の年齢との関係について検討する必要がある。

### 要 約

1.5年齢の Sprague-Dawley 系雌雄ラットに、24.00% のカゼイン食を基本飼料とし1.20% BHT を与えた。雄において出血が認められるとともに、その半数において、プロトロンビン指数の異常な低下が認められた。

### 文 献

- 1) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 399, 1978
- 2) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 16, 475, 1978
- 3) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 811, 1978
- 4) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicology Lett.*, in press
- 5) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *J. Nutr.*, 109, 453, 1979
- 6) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Japan. J. Pharmacol.*, 28, 127P, 1978
- 7) Takahashi, O., Hayashida, S., and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, in press
- 8) 高橋 省, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 86, 1976
- 9) 高橋 省, 平賀興吾: 第52回日本薬理学会総会要旨, 184, 1979
- 10) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, in press

## 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 (第2報)

鈴木英子\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

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

HIDEKO SUZUKI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, DT-diaphorase, ビタミンK vitamin K

#### 緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を雄ラットに摂取させた場合、出血傾向を示すことはすでに報告した<sup>1)</sup>。さらにその出血のメカニズムについても種々の検討を行い報告した<sup>1,2)</sup>。前報<sup>3)</sup>では、BHT 摂取雄ラットにおいて肝臓の DT-diaphorase 活性が上昇することを報告した。今回、雄ラットにビタミンK欠乏飼料を与えた場合の肝臓中の DT-diaphorase 活性の変化、ならびにプロトロンビン時間への影響を測定した。一方、雄ラットに比べ出血傾向の弱い雌ラットの肝臓中の DT-diaphorase 活性も測定し、この酵素活性の変動と出血との関連性を検討した。

#### 実験材料および方法

1. 実験動物: JCL: SD 系ラット雌雄を生後4週令で購入、室温 $25 \pm 1^\circ$ 、湿度55-60%、照明を午前6時より午後6時までで行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, ビタミンK<sub>3</sub>: 和光純薬, Lot No. WAE 4275

3. 投与方法: ビタミンK欠乏飼料は Mameesh らの方法<sup>4)</sup>に従い作製し、予備飼育後、ステンレス金網ケージに一匹ずつ収容したラットに10日間自由摂取させた。ビタミンK添加飼料は、ビタミンK欠乏飼料に、ビタミンK<sub>3</sub> 10.4mg/100gの割に加え、同様に一匹飼いにしたラットに10日間自由摂取させた。BHT は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粉末飼料より製造した。

#### 4. 実験方法

血漿プロトロンビン時間 血漿採取法およびプロトロンビン時間測定法は前報に記載した方法<sup>3)</sup>に従った。

肝ミクロソーム分画の調製 採血直後、断頭により屠殺し、開腹し、肝臓を摘出した。以後の方法は Ernster らの方法<sup>5)</sup>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、10,000gで10分間遠沈した上清をBeckman Model L 3-50型超遠心機を用いて105,000gで60分間遠沈した。生じたペレットは測定前に0.25M Sucroseにけん濁させた。ミクロソーム沈澱後の上清も酵素活性の測定に供した。

DT-diaphorase 活性の測定および蛋白質定量法 前報<sup>3)</sup>に従って測定した。

#### 結果および考察

ビタミンK欠乏飼料摂取雄ラットではビタミンK添加飼料摂取雄ラットに比べ、プロトロンビン時間が著しく延長し、肝臓の DT-diaphorase 活性は2倍以上上昇した。(Table 1) ミクロソーム、上清共に上昇した。この酵素活性が上清部分で高いことはすでに報告されている<sup>6)</sup>が今回、ミクロソーム部分での活性測定も行った。

また、Table 2に示すように1.5% BHTを7日間摂取させた雌ラットの肝臓中の DT-diaphorase 活性は雄ラットの場合と同様に上昇し、肝ミクロソーム分画に約1.5倍、上清に2~5倍の上昇がみられた。一方、プロトロンビン時間の延長はすでに報告した<sup>1)</sup>ように雄ラットに比べ弱かった。以上の結果は主として次の2つの可能性が考えられる。①DT-diaphorase 活性とプロトロンビン時間延長との間に関連性はない。②BHT 摂取雄ラットにおいては、まず肝臓中の DT-diaphorase 活性が上昇し、ついでプロトロンビン時間の延長をきたし、出血がおこる。又ビタミンK欠乏飼料摂取雄ラットにおいても同様に DT-diaphorase 活性が上昇し、プロトロンビン時間の延長をきたし、出血がおこる。ところが、BHT 摂取雌ラットでは、肝臓の DT-diaphorase 活性は上昇するが、ビタミンK様因子が存在し、プロトロン

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Liver DT-diaphorase Activities of Rats fed with Vitamin K Free Diet

| Diet              | DT-diaphorase* |             | Prothrombin time (sec) |
|-------------------|----------------|-------------|------------------------|
|                   | Microsome      | Supernatant |                        |
| Without vitamin K | 343            | 1372        | > 300                  |
|                   | 250            | 516         | 60                     |
|                   | 335            | 1036        | > 300                  |
|                   | 201            | 740         | 100                    |
|                   | 272            | 1043        | 183                    |
|                   | 322            | 1007        | > 300                  |
| Mean :            | 287±23         | 953±120     | —                      |
| With vitamin K    | 202            | 303         | 13                     |
|                   | 190            | 440         | 15                     |
|                   | 256            | 412         | 13                     |
|                   | 198            | 375         | 28                     |
|                   | 259            | 448         | 16                     |
|                   | 158            | 509         | 15                     |
| Mean :            | 211±16         | 415±29      | 17±2                   |

\*nanomoles DCPIP reduced/min/mg protein

ビン時間の延長, ならびに出血に対して抵抗性をもっていると推察される。

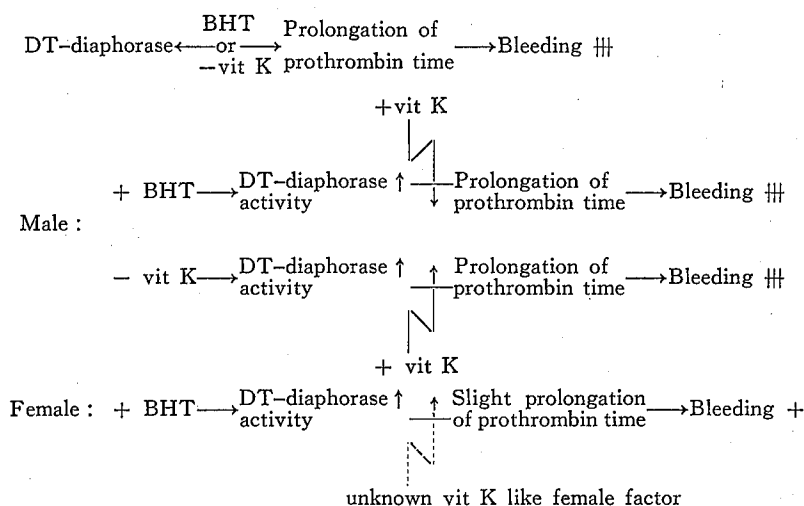
①, 又は②の可能性を証明するためには, さらに雌ラットにビタミンK 欠乏飼料を摂取させた場合の DT-diaphorase 活性の変動を測定する等, 種々の検討を加え

Table 2. Liver DT-diaphorase Activities of Rats treated with BHT

|        |         | DT-diaphorase* |             | Prothrombin |
|--------|---------|----------------|-------------|-------------|
|        |         | Microsome      | Supernatant | time (sec)  |
| Male   | Control | 367            | 848         | 20          |
|        |         | 343            | 530         | 25          |
|        |         | 379            | 612         | 18          |
|        |         | 213            | 736         | 19          |
|        | Mean :  | 325±38         | 682±70      | 20±2        |
|        | BHT     | 536            | 2926        | 65          |
|        |         | 521            | 2381        | 60          |
|        |         | 624            | 2428        | 46          |
|        |         | 497            | 1805        | 45          |
|        | Mean :  | 545±28         | 2385±229    | 54±5        |
| Female | Control | 381            | 1042        | 23          |
|        |         | 375            | 1193        | 18          |
|        |         | 320            | 546         | 15          |
|        |         | 334            | 575         | 22          |
|        | Mean :  | 353±15         | 839±164     | 20±2        |
|        | BHT     | 468            | 2563        | 25          |
|        |         | 650            | 2143        | 25          |
|        |         | 607            | 1593        | 43          |
|        |         | 674            | 1888        | 15          |
|        | Mean :  | 600±46         | 2047±206    | 27±6        |

\*nanomoles DCPIP reduced/min/mg protein

\*nanomoles DCPIP reduced/min/mg protein



る必要がある。最近, Siegfried ら<sup>7)</sup> によりプロトロンビンの合成能が雄ラットに比べ雌ラットで高いという報告があり, ワルファリンに対する性差を説明している。

この点に関しても検討したい。

#### 要 旨

I ビタミンK 欠乏飼料摂取あるいは BHT 摂取による

雄ラットの出血に DT-diaphorase 活性の上昇

Ⅱ 雄ラットにおける、ビタミンK欠乏飼料あるいはBHT摂取によるプロトロンビン時間の著しい延長と出血に関連して DT-diaphorase 活性の上昇のあることを見出した。既報の雌ラットにおけるBHT摂取抵抗性(わずかなプロトロンビン時間の延長と出血傾向)を検討した結果 DT-diaphorase 活性上昇以外の過程で抵抗性を支配する未知の性因子の存在することが示唆された。

#### 文 献

- 1) 鈴木英子ら：東京衛研年報，26-2，49，1975
- 2) 鈴木英子ら：東京衛研年報，27-2，82，1976
- 3) 鈴木英子ら：東京衛研年報，29-2，35，1978
- 4) Mameesh, M. S. and Johnson, B. C.: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101, 467, 1959
- 5) Ernster, L., Siekeritz, P. and Palade, G. E.: *J. Cell. Biol.*, 15, 541, 1962
- 6) Ernster, L., Danielson, L., and Ljunggren, M.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 58, 171, 1962
- 7) Siegfried, C. M., Knauer, G. R., and Matschiner, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 486, 1979

## ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の生体内運命 (第3報)

### BHT と肺ミクロゾームの *in vitro* における結合

中川 好男\*, 中尾 順子\*, 平賀 興吾\*

## Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (III)

### Binding *in vitro* of BHT to Lung Microsomes

YOSHIO NAKAGAWA\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** 抗酸化剤 antioxidant, butylated hydroxytoluene, 共有結合 covalent binding, ラット肺 rat lung, ミクロゾーム高分子 microsomal macromolecules

医薬品、食品添加物および環境汚染物質等の安全性あるいは毒性を検討する場合、それらの化合物の生体での代謝やその結果生じた代謝物と生体成分との関係を明らかにする必要がある。しばしば代謝された中間体が生体成分に結合し、生理機能を書し毒性を発現することが知られている<sup>1)</sup>。

さて、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は加工食品や石油製品等の抗酸化剤として使用されている。BHT の毒性については既に多くの報告<sup>2,3)</sup> があるが、細胞内での代謝運命についての報告は極めて少ない。そこで著者らはこれまでラット肝細胞内での BHT の挙動について *in vivo* と *in vitro* で検討してきた<sup>4-6)</sup>。その結果から、(1)経口的に入った BHT は主に肝で代謝され、代謝物のある物が肝および他器官細胞の高分子物質 (タンパク質や核酸) と共有結合する、(2)この高分子と結合した代謝物は長期間各器官に滞留し BHT の生体からの排泄を抑制する一因となる、(3)この代謝物の生成はミクロゾーム存在下、O<sub>2</sub> と NADPH が必要であり、肝ミクロゾームが最も高い代謝活性をもち次いで肺ミクロゾームが肝の40%の活性をもっている、ということが明らかになった。そこで今回この肺ミクロゾームの代謝活性に注目し *in vitro* での代謝について検討した。

#### 実験材料および方法

**材料** 3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (toluene methyl-<sup>14</sup>C) (以下 <sup>14</sup>C-BHT) は New England Corp 製を用いた。比放射能は 2.2μCi/mg であった。非放射性 BHT は和光純薬、NADP と glucose 6-phosphate は Sigma Chemicals, glucose 6-phosphate dehydrogenase は Boehringer Mannheim GmbH, SKF-525A は Smith, Kline and French Lab., phenobarbital (PB) は藤永製薬、その他の試薬は市販の最高級を使用した。

**動物および前処置** 雄のウイスター系ラット (SPF), 体重170—190gを一群5匹として用いた。非放射性BHT はオリーブ油に溶かし 50mg/kg と 500mg/kg の用量で1日1回, 3日間経口投与した。PBは水に溶かし 80mg/kg の用量で1日1回5日間腹腔内注射した。各動物は最終投与24時間後に実験に用いた。対照群はオリーブ油または生理食塩水を同一期間投与した。

**ミクロゾームの調製およびミクロゾーム高分子と <sup>14</sup>C-BHT の結合** 肺は0.9% 塩化ナトリウムで還流し、一群5匹分を合併してミクロゾームを調製した。その方法および<sup>14</sup>C-BHT とミクロゾーム高分子との結合については前報<sup>8)</sup> に記載した。

**その他の方法** 放射能は Beckman シンチレーション カウンター (LS-355) で計測し、外部線源法で計測値を補正した。シンチレーション組成はトルエントライトン系<sup>9)</sup> を用いた。タンパク量は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry らの方法<sup>10)</sup> で、P-450 量は Omura-Sato の方法<sup>11)</sup> で測定した。

#### 結果および考察

**肺ミクロゾームと BHT の結合** Table 1 は肺ミクロゾーム高分子と <sup>14</sup>C-BHT の結合について種々の条件の影響を示した。ミクロゾームの monooxygenase 系の阻害剤である CO と SKF-525A はミクロゾーム高分子と <sup>14</sup>C-BHT の結合を93—96%抑制した。インキュベーション組成から NADPH の生成を除いたり、ミクロゾーム自体をあらかじめ10分間煮沸するとの結合を98%以上抑制した。またこの結合は窒素気相下で反応させると約80%抑制された。一方システインと還元型グルタチオンはこの結合を顕著に抑制させた。これらの条件における抑制の程度は、肝ミクロゾームの場合<sup>8)</sup> に比べ窒素気相下で約10%小さかった他はいずれも同様の値を示し

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



Table 1. Effect of Various Incubation Conditions on Binding *in Vitro* of  $^{14}\text{C}$ -BHT to Macromolecules from Lung Microsomes

| Incubation condition                             | Amount bound <sup>a)</sup><br>(dpm/mg protein/10 min) | Inhibition (%) |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|
| Complete                                         | 975±30                                                | -              |
| Microsomes boiled <sup>b)</sup>                  | 18±3                                                  | 98.2           |
| -NADPH                                           | 17±2                                                  | 98.3           |
| -O <sub>2</sub> (100% N <sub>2</sub> atmosphere) | 210±4                                                 | 78.5           |
| +Carbon monoxide (90% CO, 10% O <sub>2</sub> )   | 68±4                                                  | 93.0           |
| +Cysteine (1.0 mM)                               | 180±5                                                 | 81.5           |
| +Glutathione (1.0 mM)                            | 83±6                                                  | 91.5           |
| +SKF-525A (1.0 mM)                               | 41±4                                                  | 95.8           |

a) Values are expressed as means ± S.D. of three determinations.

b) Boiling of microsomes proceeded for 10 min.

た. これらの結果から肺ミクロゾーム高分子と $^{14}\text{C}$ -BHTの結合にはシトクロムP-450と連結した monooxygenase系が必須であり, BHTの代謝活性化が行なわれた後に代謝物が高分子と結合することが示唆された. またチオール化合物であるシステインとグルタチオンは生体に取り込まれた異物の代謝活性体と結合することにより毒性発現を抑制させることが知られている<sup>12)</sup>. ミクロゾームにより代謝された $^{14}\text{C}$ -BHT代謝物の一部もこの両化合物と結合し, その結果高分子との結合が顕著に抑えられたものと思われる.

#### BHTおよびPB前処置ラットの肺ミクロゾームと $^{14}\text{C}$ -BHTの結合

肺ミクロゾームの $^{14}\text{C}$ -BHT結合能は肝の約40%を示し, 他の器官のミクロゾームに比べ著しく高い<sup>3)</sup>. そこでBHTまたはPBをラットに処置した後, 肺ミクロゾームの高分子と $^{14}\text{C}$ -BHTの結合を検討した. その結果はTable 2と3に示した. BHTの高投与群で体

Table 2. Effects of Pretreatment with BHT on Lung Weight, Microsomal Protein, and Amount of Metabolite(s) of  $^{14}\text{C}$ -BHT bound to Microsomal Macromolecules in Rats

| Treatment       | Body wt. <sup>a)</sup><br>(g)     | Lung wt. <sup>a)</sup><br>(g/100g) | Microsomal protein <sup>d)</sup><br>(mg/g tissue) | Amount bound <sup>b)</sup><br>(dpm/mg protein/5 min) |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Control         | 193.4±7.7                         | 0.446±0.045                        | 11.15                                             | 543±15                                               |
| BHT (50 mg/kg)  | 201.4±11.8<br>(104) <sup>c)</sup> | 0.448±0.037<br>(101)               | 11.15<br>(100)                                    | 342±2<br>(63)                                        |
| BHT (500 mg/kg) | 173.6±9.9<br>(90)                 | 0.464±0.011<br>(104)               | 9.93<br>(89)                                      | 97±15<br>(18)                                        |

a) Each value represents the means ± S.D. of five rats.

b) Values are expressed as means ± S.D. of three determinations.

c) Values in parenthesis represent percentage of controls.

d) Values are expressed as means of three determinations.

Table 3. Effects of Pretreatment with Phenobarbital on Lung Weight, Microsomal Protein, and Amount of Metabolite(s) of  $^{14}\text{C}$ -BHT bound to Microsomal Macromolecules in Rats

| Treatment    | Body wt. <sup>a)</sup><br>(g)    | Lung wt. <sup>a)</sup><br>(g/100g) | Microsomal protein <sup>d)</sup><br>(mg/g tissue) | Amount bound <sup>b)</sup><br>(dpm/mg protein/5 min) |
|--------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Control      | 192.0±5.6                        | 0.454±0.040                        | 10.28                                             | 508±19                                               |
| PB(80 mg/kg) | 193.0±9.9<br>(101) <sup>c)</sup> | 0.454±0.090<br>(100)               | 9.02<br>(88)                                      | 492±3<br>(97)                                        |

a) means ± S.D. of five rats

b) means ± S.D. of three determinations

c) percentage of control

d) means of three determinations

重と肺ミクロゾームタンパク量が約10%減少したが、肺重量には影響がみられなかった。ミクロゾーム高分子と結合した $^{14}\text{C}$ -BHT量は投与量の増加に伴ない顕著に減少した。Tableには示していないが肺ミクロゾームのP-450量も減少した。一方PB処置ではミクロゾームタンパク量の若干の減少以外、体重、肺重量、P-450量、 $^{14}\text{C}$ -BHTの結合量に影響が認められなかった。以上の結果からBHTとPBは肺ミクロゾームの薬物代謝活性に対して肝の場合と異なった影響を与えた。すなわち肝ミクロゾームの場合、高分子とBHTの結合はミクロゾームの薬物代謝酵素をPBまたはBHTで誘導することにより顕著に増加し、その結合量はBHT oxidase活性の増加と並行した<sup>9)</sup>。しかし肺ミクロゾームの場合、BHT前処置は高分子と $^{14}\text{C}$ -BHTの結合を抑制し、さらにP-450量を減少させたことから、薬物代謝活性を阻害させることが示唆された。一方PB前処置により肺ミクロゾームP-450量および $^{14}\text{C}$ -BHTの結合量に変化が認められなかったことから、PBは肺ミクロゾームの薬物代謝系には肝の場合ほど強く作用しないと思われる。今回BHT前処置により、肺ミクロゾームの薬物代謝活性に減少がみられたが、この原因がBHTの直接的な作用か、あるいは肝を介して生じた代謝物に由来するのかは今後検討したい。

#### 要 旨

肺ミクロゾームの高分子と $^{14}\text{C}$ -BHTの結合を *in vitro* で検討した。この結合はミクロゾーム存在下、 $\text{O}_2$ とNADPHが必要でありCO、SKF-525A、ミクロゾームの煮沸で93%以上阻害された。BHTを前処置した

ラットのミクロゾーム高分子と $^{14}\text{C}$ -BHTの結合は、前処置した投与量の増加に伴ない著しく抑制された。PBの前処置ではこの結合に影響が認められなかった。

#### 文 献

- 1) Gillette, J. R., Mitchell, J. R., and Brodie, B. B.: *Ann. Rev. Pharmacol.*, 14, 271, 1974
- 2) Branen, A. J.: *J. Am. Oil Chem.*, 52, 59, 1975
- 3) Hathway, D. E.: *Adv. Food Res.*, 15, 1, 1966
- 4) 中川好男, 伊川三枝子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 5, 1976
- 5) 中川好男, 伊川三枝子, 福森信隆, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 37, 1977
- 6) Nakagawa, Y., Ikawa, M., and Hiraga, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 374, 1978
- 7) Nakagawa, Y., Hiraga, K., and Suga, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 442, 1979
- 8) Nakagawa, Y., Hiraga, K., and Suga, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 480, 1979
- 9) Patterson, M. S. and Green, R. C.: *Anal. Chem.*, 37, 854, 1965
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
- 11) Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964
- 12) Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., and Brodie, B. B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 203, 1973

## ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 長期投与にみられたラット肝の微細構造変化

福 森 信 隆\*, 三栗谷 久 敏\*, 平 賀 興 吾\*

### A Case of Ultrastructural Alterations in Rat Hepatocytes after Long-Term Administration of Butylated Hydroxytoluene (BHT)

NOBUTAKA FUKUMORI\*, HISATOSHI MIKURIYA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** 微細構造 ultrastructure, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, ラット rat, 肝細胞 hepatocyte, 長期毒性 long term toxicity

#### 緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は抗酸化剤, 安定化剤として工業製品, 食品等の酸化を防止する目的で使用されている。肝臓に対して肝重量の増加<sup>1)</sup>が滑面小胞体 (SER) の増殖に伴って認められ, このことは BHT が肝臓で代謝される過程の細胞における適応反応であると解される。著者らはこれまで BHT の短期投与による肝細胞の微細構造の変化を電子顕微鏡を用いて観察し, SER の増殖を主とした糸粒体の異型, 粗面小胞体 (RER) の減少など報告<sup>2-5)</sup>したが必ずしも細胞に重度な損傷を与えていない。

今回, BHT の長期投与を行った動物を肝微細構造の変化の一症例として報告するとともにこれまで行った短期投与の肝細胞の変化と比較した。

#### 実験方法

動物は 0.07% の BHT を添加した固型飼料で飼育され, 長期飼育を目的とした Slc: Wistar 系雄性ラットで実験途中に瀕死の状態を呈したため病理解剖が行われた一症例 (No. LT-255) であり, BHT の摂取期間は 86 週間であった。

飼育は室温  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 照明時間午前 6 時から午後 5 時, 換気回数毎時 10 回に制御された barrier 飼育室にて飼育され, 水を自由に摂取させた。

電子顕微鏡用試料は動物を放血屠殺後, 肝方形葉左下端部から摘出し, 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, 緩衝液で洗浄後細切し, 1% オスミウム酸 (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) を用い 1.5 時間の後固定を行った。エタノール脱水後, 定法に従って Epon 樹脂に包埋した。はじめに厚さ約  $1 \mu\text{m}$  の切片をトリジン青で染色し光顕的に観察を行い, その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。

#### 観察結果

トリジン青染色の光顕的観察で肝小葉中間帯の細胞は, 核周囲が明調化し好塩基性顆粒の細胞膜側への偏在傾向を持つ細胞がみられたが, 必ずしも均一な変化を示しているのではなく各細胞間で差異を認めた。核を確認した細胞のみについて核周囲の染色状態, 好塩基性顆粒の分布変動を基準に 800 個の細胞を分類すると, 核周囲の明調化, 好塩基性顆粒の移動がみられずあるいは極めて軽度な細胞約 69%, 核周囲の中等度な明調化がみられ好塩基性顆粒が若干偏在している細胞約 24%, 核周囲が顕著に明調化し, 好塩基性顆粒が細胞膜側に偏在した細胞約 7% であった。これらの変化に関して, 電顕的観察で核周囲の明調化は glycogen 野での SER の増殖にほぼ対応することから, 0.07% BHT 摂取では肝臓の細胞全域に著しく SER の増殖を与えていなかった。以下, SER の増殖の程度に従って肝細胞の変化を検索した。

SER の増殖が正常像に近似し比較的軽度な細胞では, 糸粒体の多くは円形あるいは長円形を示し異型像を認めなかった。RER は層状構築を保持し細胞質全体に広く分布し, 一部に ribosome の解離が認められたがその数は少なかった。他の細胞小器官の変化はともに顕著でなかった (Fig. 1, 2)。

SER の増殖が中等度の細胞では, SER の形態は vesicle 状を呈し RER から移行した連接像が頻繁にみられた。多くの RER の層状配列は残存したが, 一部消失傾向に伴い ribosome を脱落し curling 状を呈した。糸粒体は膨化し, 基質が明調となり cristae の消失が散見された。Microbody は増加傾向を示す細胞と増加のみみられない細胞があり細胞間で差異を認めた。核は比較的良好な発

\* 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

違がみられた。

SERの増殖が顕著な細胞では、核周囲に増殖した vesicle 状の SER が密に細胞質の約半分以上を占め互いに隣接し集団化していた(Fig. 3)。これらの細胞のトリジン青染色を施した光顕的所見で SER の増殖部は明調化を呈し細胞内顆粒の細胞膜側への偏在あるいは減少傾向を認めた。SER の形状は中等度の増殖部に比較して多くは vesicle 状を呈するが若干 tubule 状を示した SER も散見された。RER は層状配列が乱れ ribosome を離脱して消失傾向を多く認めた。残存している RER は糸粒体の周囲を取り囲み (Fig. 5)、あるいは末端が膨化して SER への移行像を呈した (Fig. 4)。この部の糸粒体は膨化して cristae の崩壊、基質の淡明化を呈し、不明瞭な膜構造を認めた (Fig. 6, 7)。また長形の著しい糸粒体は、中央部がくびれて RER の接近した像を多く認めた (Fig. 5, 8)。特に SER の増殖が著しい部で周囲を SER で取り囲まれた糸粒体は伸長して馬蹄型に変形し、中心に ribosome 様の顆粒を封入していた (Fig. 3, 6, 7)。Microbody は全体的に軽度増加し (Fig. 9) Golgi 装置の発達もやや良好であるのに対して、lysosome の変化は顕著でなかった。核は不整形な輪郭を呈し、核膜に chromatin の凝集を認めるものが多かったが、核小体の発達は良好であった。一部の細胞では核膜が消失し核濃縮と思われる像が観察された (Fig. 10)。その他細胞質に myelin 形成が散見される細胞を認めたが比較的少数であった。また糸粒体の膨化が著しい細胞は膨化に伴い基質が淡明を呈し cristae の消失を認め空泡化がみられた (Fig. 11)。この部の核は萎縮し不整な核膜を認めた。

Glycogen 顆粒は SER の増殖の有無にかかわらず変動がなく、少数を認めるに過ぎなかった。

### 考 察

肝臓は糖質、脂質、蛋白質、ホルモンの代謝および胆汁の排泄などの機能的役割をつかさどる重要な臓器であり、また生体内に取り込まれた化学物質の解毒を行っている。特に BHT などの脂溶性物質を排泄するために極性化反応を行い、その解毒機能の反映は生化学的には薬物代謝酵素の誘導であり<sup>9)</sup>、形態的には SER の増殖およびこれに付随する細胞小器官の亢進像で示される。生体に吸収された化学物質は肝細胞で代謝の過程を経て排泄されるが、細胞の解毒機能の限界を越えた時細胞の疲労・変性に移行する。さらに BHT などの脂溶性物質は生体内の脂肪組織に蓄積することが予測されることから<sup>1)</sup>、摂取期間の長短が細胞の損傷の程度に影響を与えたと考えられる。今回検索を行った動物は86週間の長期間におよび0.07%の BHT を含む飼料を摂取させたラットで摘出

時に瀕死に近い状態を呈していたが十分に検索が可能である試料のため BHT の長期投与後における肝細胞の変化を把握する目的で電顕的観察を行った。

BHT の主要な変化である SER は細胞により増殖の差異がみられ光顕的観察からもすべての細胞で著しい増殖を認めず、小葉中間帯の約7%の細胞で顕著な増殖が確認されるに過ぎなかった。このことは BHT の摂取量が比較的少量であるため解毒機能に必要な肝細胞が少数で充足されると推察される。高用量を用いた短期投与<sup>2)</sup>では小葉中間帯のほぼ全域に肝細胞の腫大、SER の著しい増殖がみられたのに比較し、少数であることは機能的に見合った適応変化の反映と考えられる。

薬物代謝の亢進に伴う形態変化は先に述べた SER の増殖を主とするが、この変化は SER に局在する通常の薬物代謝酵素の量では処理できないため SER を増加させるので、BHT に特異的な変化ではなくフェノバルビタール<sup>7)</sup>、ポリ塩化ビフェニル<sup>8)</sup>など他の物質でも共通して誘発される。SER の増殖時にはエネルギーが必要となり、そのために glycogen が供給され、糸粒体が cristae の配列を乱さずに長型腫大して機能亢進像を呈する。また RER の糸粒体の取り巻きも糸粒体でのエネルギーの収受を容易ならしめるための像であると思われる。SER の増生は RER の末端部が膨化し ribosome を離脱した移行像として観察される。この移行像は SER の増殖の顕著な細胞に比べ、中等度の細胞に多くみられた。これらの細胞の核、核小体は良好に発達して肥大傾向を呈し細胞の機能亢進像を示している。一方、Lane は核の肥大とともに核分裂の増加を報告<sup>9)</sup>しているが、今回の観察では核分裂の増加はみられなかった。先に行った短期投与で初期に限って核分裂の増加が認められたことから<sup>2)</sup>、長期間の摂取は BHT に対する細胞の適応と動物の加齢などが影響して分裂像を惹起せしめなかったと思われる。

SER の増殖の顕著な細胞は SER が細胞質に密集して分布し vesicle 状あるいは tubule 状を示した。一般的に SER の形状は増殖時の初期に vesicle 状を示し、漸次 tubule 状に移行することから、今回みられた変化はその推移過程と思われる。増殖した SER で周囲を取り囲まれた RER は層状構築が乱れ ribosome を脱落しあるいは消失傾向がみられたことから、機能低下を意味すると考えられる。また糸粒体は cristae の崩壊、基質の淡明化が起こり、核もこの部の多くで不整な chromatin を凝集した形態を呈し比較的核濃縮が多くみられたことから、細胞機能の限界を越えた表現像であろうと推察され、その後変性に陥ると考えられる。糸粒体が伸長して

馬蹄型を呈し中心に ribosome 様顆粒を封入した所見が多く観察されたが、すべて顕著な SER の増殖部であり糸粒体の機能を維持するための変化と思われるが、その意義は明らかでない。

細胞個々のこれらの変化は SER の増殖の程度により細胞機能の亢進あるいは低下像とに分別されるが肝組織全体として把握すると大部分の細胞では軽度あるいは中等度の SER の増殖を認め機能亢進を示唆するのに対し、機能の低下を示す顕著な SER の増殖した細胞は少数を認めるに過ぎない。このことは正常あるいは機能亢進した細胞が低下した細胞の機能を代償的に充足しているため肝機能の低下に至らないと考えられる。BHT の短期投与<sup>5)</sup> で一部に著しい細胞変化がみられたにもかかわらず、血清 GOT, GPT の変動が少ないことから理解される。

短期投与<sup>3,4)</sup> で認められた secondary lysosome の増加は SER の増殖した細胞でもみられなかった。このことは細胞内に蓄積した異物を急激に排出する必要のないことを示唆していると思われる。また一方では myelin 像を認める細胞があり、0.32% BHT を12ヶ月長期摂取させた際<sup>2)</sup> にみられた myelin 像と同様に過度のSERの増殖による変性に伴う膜の増生と思われる。なおSERの増殖が顕著な部では glycogen 顆粒の減少を伴うが、今回軽度な増殖部で glycogen 顆粒の明瞭な確認が困難であった理由として、動物が瀕死の状態に近かったための栄養障害が考えられるが、先の長期投与<sup>2)</sup> の肝細胞でも glycogen 顆粒がほとんど認められなかったことから BHT の長期摂取の影響も考慮される。さらに絶食の栄養障害で小胞体の増殖を惹起するという報告<sup>10)</sup> がみられるが、細胞小器官に著変をみないで細胞全体の萎縮を認めることから、今回観察された変化は減食の影響より BHT の関与が大きいと推察される。

以上のことから、比較的低用量の BHT を長期間摂取させた時でも予想に反して少数ではあるが SER の顕著に増殖した細胞が認められ、SER の過度の増殖は機能

的限界を越えると細胞の機能低下像、変性に移行し悪影響をおよぼすが、限界を越えない機能の亢進した細胞が代償的に解毒を含めた肝機能を保持すると思われるので肝臓全体を把握した時、適応変化の域を脱し得ないと推測される。

## 結 語

0.07% BHT 添加飼料を86週間摂取させたラットで肝微細構造の変化を観察した。肝小葉中間帯で約7%のSERの顕著な増殖がみられたが、多くの細胞では中等度以下のSERの増殖であった。SERの増殖は糸粒体の腫大、核の良好な発達とともに機能亢進像を示すが、顕著なSERの増殖部ではRERの消失、糸粒体の崩壊、核萎縮など細胞機能の低下像を認めた。SERの過度の増殖は薬物代謝の機能の限界を越えた機能低下と示唆されるが、比較的少数に限られることから他の細胞が代償的に肝臓機能を補充すると考えられる。

## 文 献

- 1) Gilbert, D. and Golberg, L.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 417, 1965
- 2) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 22, 1975
- 3) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 67, 1976
- 4) 福森信隆, 高橋 省, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 61, 1977
- 5) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 24, 1978
- 6) 佐藤 了: 薬物代謝, 1, 1973, 講談社
- 7) Burger, P. C. and Herdson, P. B.: *Amer. J. Path.*, 48, 793, 1966
- 8) Watari, N.: *J. Clin. Electron. Microsc.*, 8, 165, 1975
- 9) Lane, B. P. and Lieber, C. S.: *Lab. Invest.*, 16, 342, 1967
- 10) 市川 厚: 細胞, 3, 1, 1971

### Explanation of figures

Fig. 1 and 2 are hepatocytes of rat showing slight proliferation of smooth surfaced endoplasmic reticulum (SER) after 86-week administration of 0.07% butylated hydroxytoluene (BHT). There are not anomalous mitochondria (M) and scattered-lamella of rough surfaced endoplasmic reticulum (RER). But warp of nuclear membrane (Nm) are observed.

Fig. 3 to 11 are hepatocytes of rat showing extreme proliferation of SER after 86-week administration of 0.07% BHT.

Fig. 3. Abundant SER in hepatocyte and well-developed nucleolus (NL) are prominent.

Fig. 4. Continuity between vesicular SER and the end of RER are seen frequently (arrows).

Fig. 5. Sinuous cisterna of RER surrounding mitochondria (M) in the area of marked

proliferation of SER are seen.

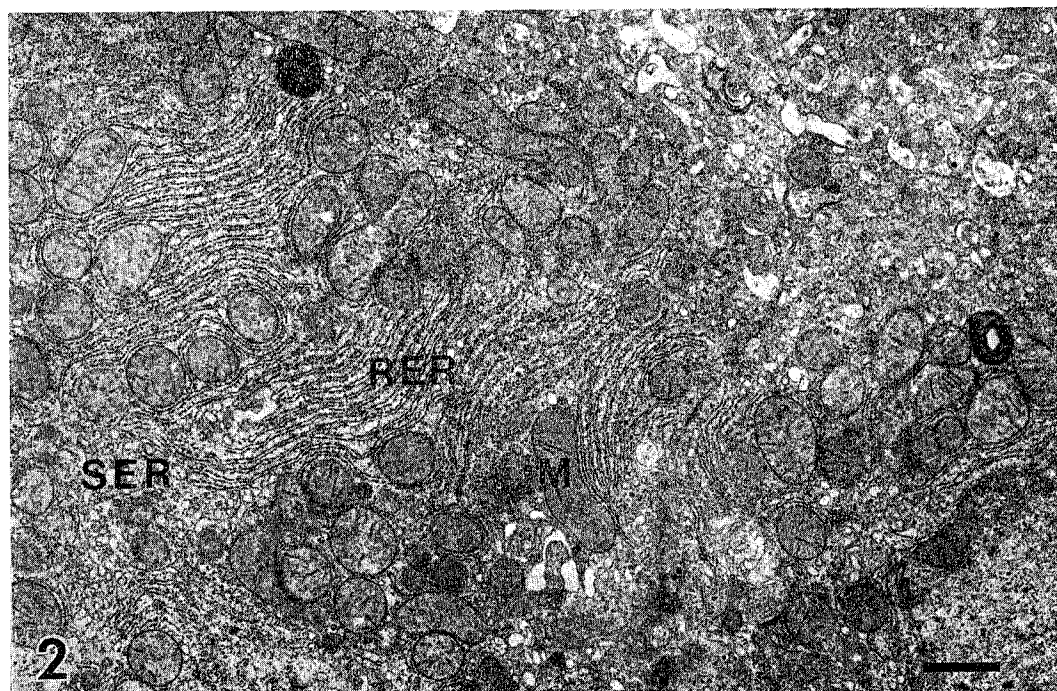
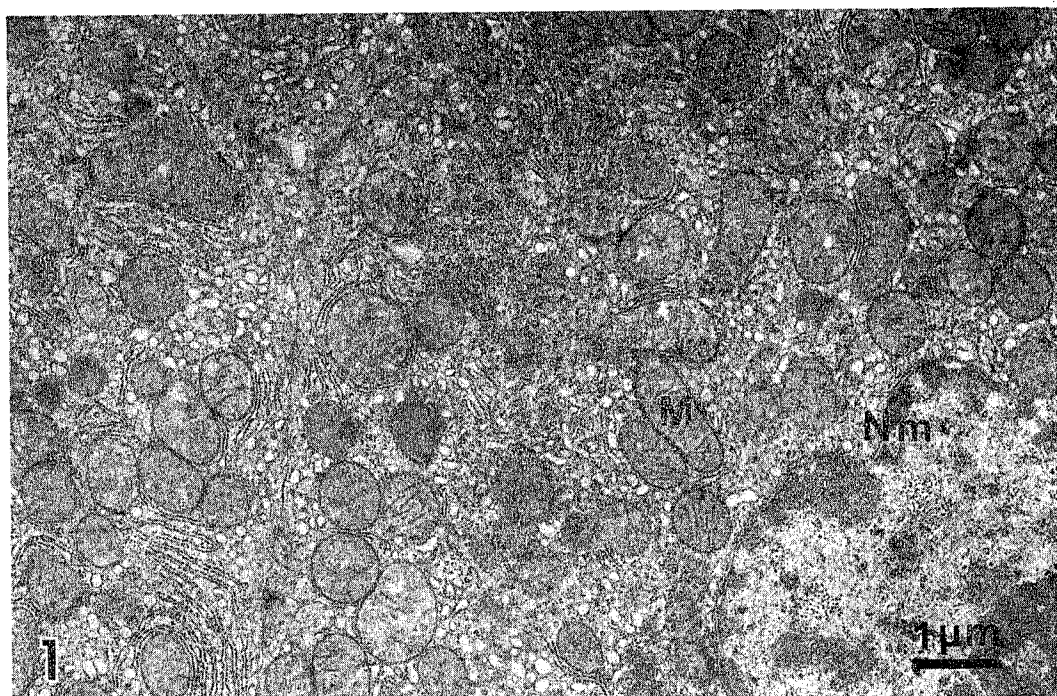
Fig. 6,7. Alterations of mitochondria are showed swelling (a), disintegration of cristae (b) and horseshoe-shaped stretch containing inclusion (c).

Fig. 8. Lengthened deformation of mitochondria (M) and myelin figure (arrow) are observed.

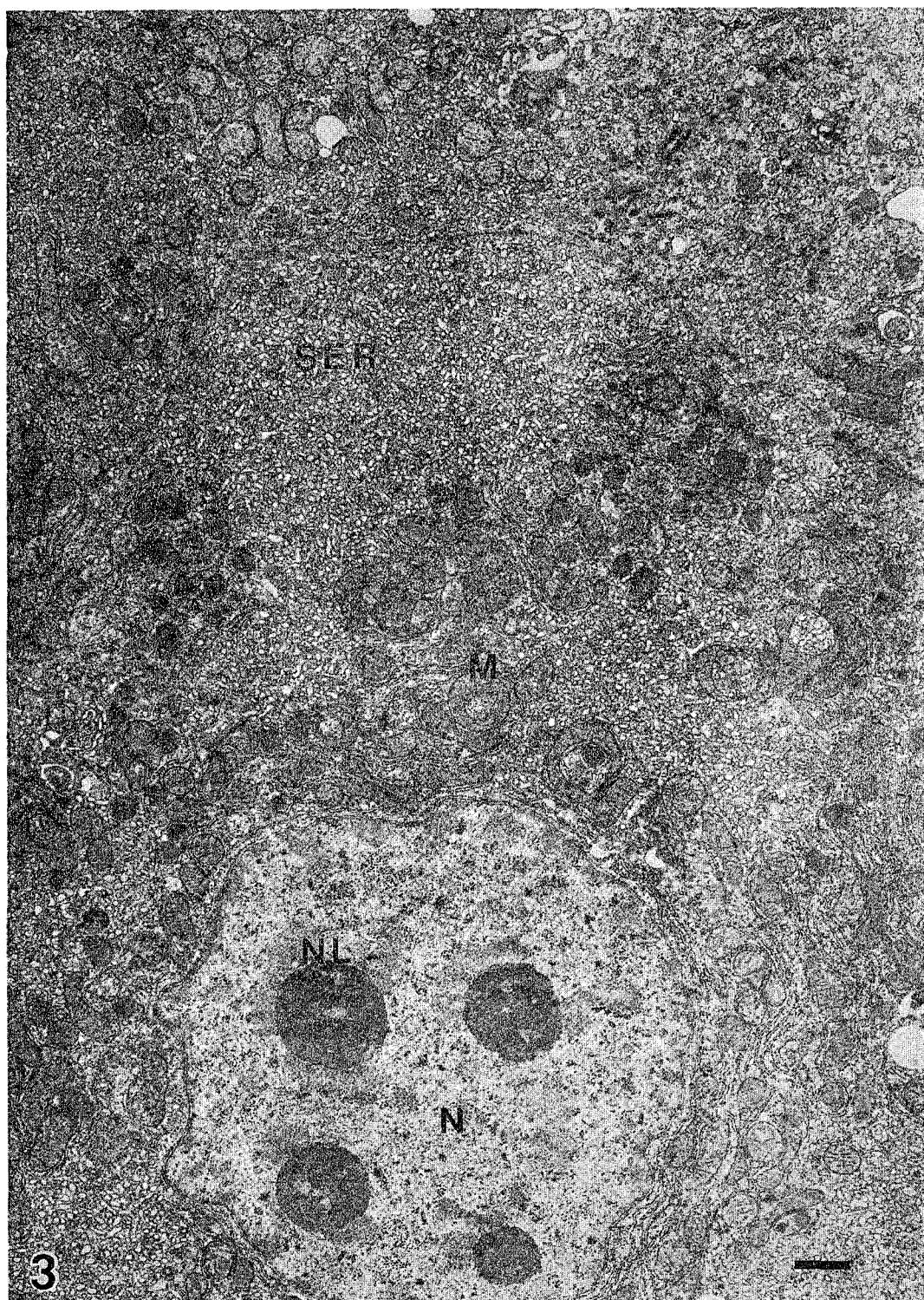
Fig. 9. There are mere glycogen particles (arrows) among proliferation of SER and slight increase of microbodies (Mb).

Fig. 10. Some ribosomes are detached from the surfaces of scattered RER. Irregularly-shaped nucleus (N) seems to be atrophy.

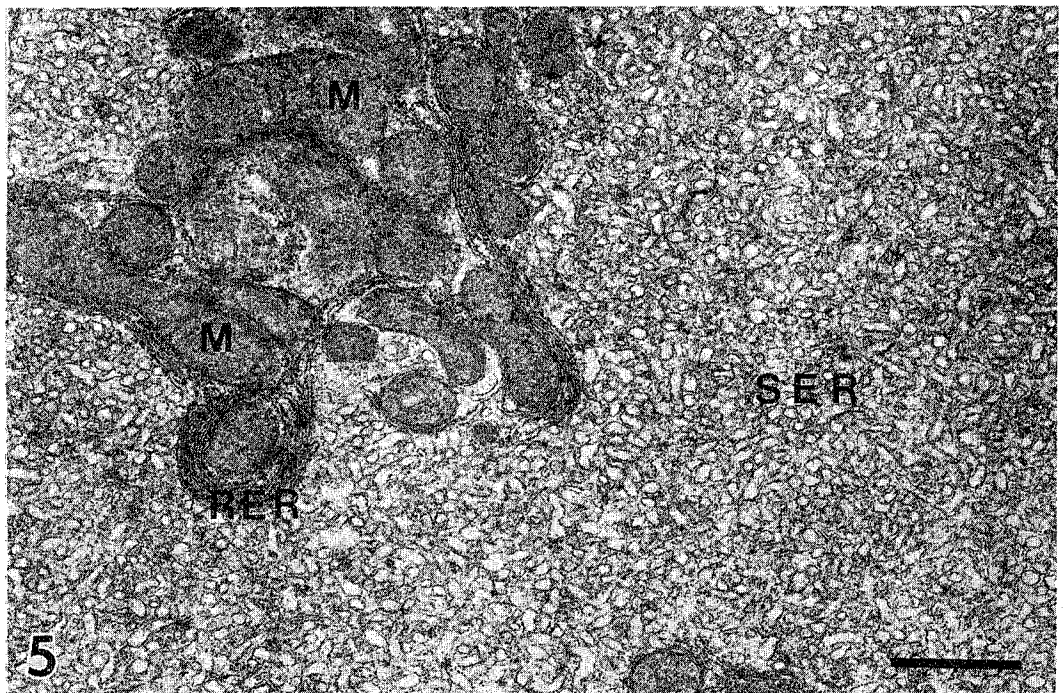
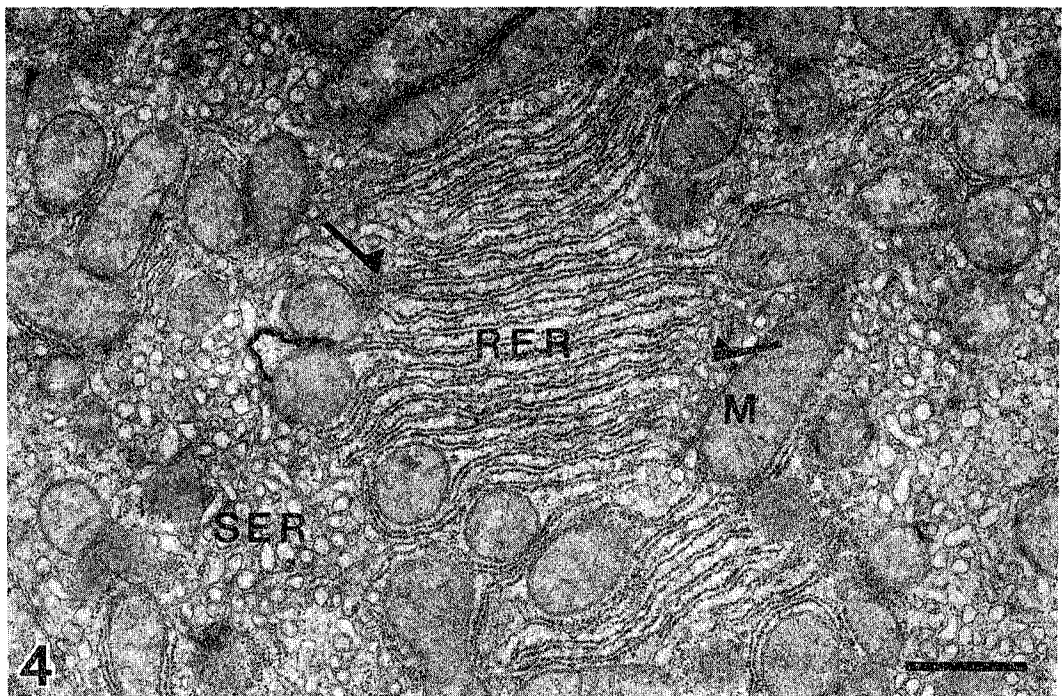
Fig. 11. Anomalous destruction and swelling of mitochondria (M) accompanying disappearance of cristae are seen.

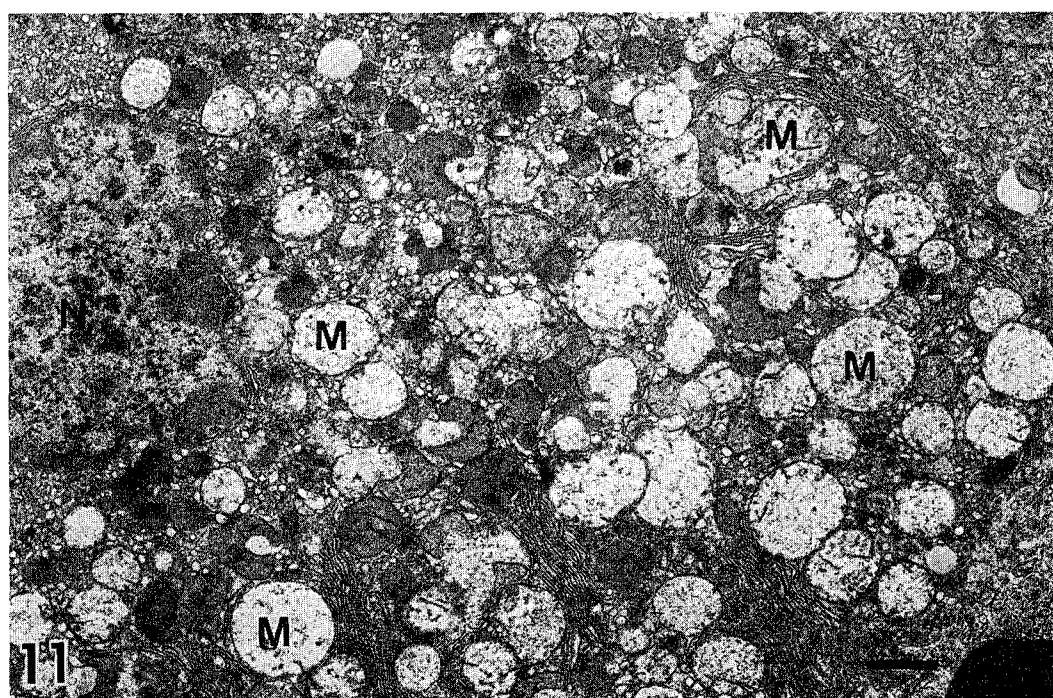
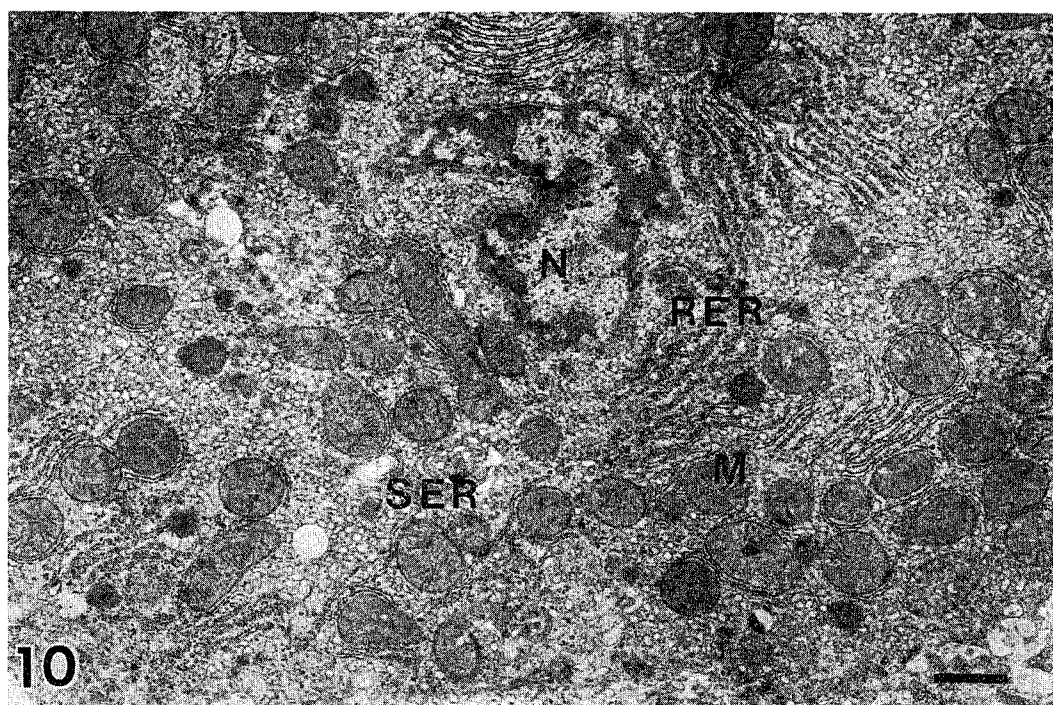












## 2-アミノアントラセンの突然変異誘起性に対するジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の影響

藤田 博\*, 平賀 興 吾\*

### Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of 2-Aminoanthracene in the Salmonella/Microsome Test

HIROSHI FUJITA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** 2-アミノアントラセン 2-aminoanthracene, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, 突然変異誘起性 mutagenicity, 代謝活性化 metabolic activation

#### 緒 言

食品に添加される酸化防止剤であるジブチルヒドロキシトルエン (以下 BHT と略す) は単独では突然変異誘起性を示さないが<sup>1,2)</sup>, 他の化学物質の突然変異誘起性あるいは発がん性を変動させる効果がある<sup>3-6)</sup>. 我々は前報<sup>7)</sup>において Ames の mutation test 系を用いて 2-アセチルアミノフルオレン, ベンゾ (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<sub>1</sub> の突然変異誘起性に対する BHT の効果を検討した. その結果, 同時に添加した BHT の量によりこれらの化学物質の突然変異誘起性が増加または減少し, 最も大きな増加を示す BHT 量は 10~50 $\mu$ g/プレートであることを報告した.

代謝活性化を行った mutation test において BHT がいくつかの化学物質の突然変異誘起性を減少させると報告<sup>8-10)</sup>されており, その効果は薬物代謝酵素による化学物質の活性化を BHT が阻害する結果であるとされている. しかし, 前報で示したような突然変異誘起性を増加させる効果の機構は明らかではない. 今回, 我々は 2-アミノアントラセンの突然変異誘起性に対する BHT の効果について誘導試薬の異なる 2 種類の S9<sup>11)</sup> を用いて S9 量および前培養による変化を検討したので報告する.

#### 実験材料および実験方法

**試薬** 2-アミノアントラセン (以下 2-AA と略す, 和光純薬), 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), ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬)

**mutation test** 菌株は *Salmonella typhimurium* TA 98 を用い Ames 法<sup>12)</sup>の変法<sup>1,12)</sup>により行った. 代謝活性化には PB または PCB により薬物代謝酵素系を誘導した Wistar 系ラット雄の肝臓ホモジネートの 9,000 $\times$ g, 10分間遠心の上清分画 (S9) を用いた. 菌液 0.1ml に DMSO に溶かした 2-AA (1 $\mu$ g/0.05ml), BHT (5-

100 $\mu$ g/0.05ml) および S9-mix<sup>1,12)</sup> を加え 37 $^{\circ}$ で20分間前培養後, 最少寒天培地<sup>13)</sup>に軟寒天<sup>14)</sup>を用いて播種し, 37 $^{\circ}$ , 48時間培養後, 復帰コロニー数を計数した.

2-AA の S9 による代謝に対する BHT の増加効果の時間変化を見るために, 2-AA および S9-mix のみで 37 $^{\circ}$ , 0~120分間の前培養を行い, これに DMSO に溶かした BHT (10または 50 $\mu$ g) および菌液を加え, ただちに最少寒天培地に軟寒天を用いて播種し, 37 $^{\circ}$ , 48時間培養後, 復帰コロニー数を計数した.

全ての測定値は 3 枚のプレートを用い平均値で示した.

#### 結 果

2-AA の突然変異誘起性に対する BHT の効果を図 1 に示す. 図 1A は PB 誘導 S9 を用いた場合で, S9 量が 10 $\mu$ l では 2-AA の突然変異誘起性は BHT の添加により減少した. BHT 無添加のとき S9 量の増加は突然変異誘起性を減少させるが, BHT を添加することにより著しい増加が見られ, S9 量 50 $\mu$ l で BHT 量 10 $\mu$ g で約 4 倍, S9 量 150 $\mu$ l では BHT 量 50 $\mu$ g で約 15 倍の増加を示した. しかし, 添加する BHT 量をさらに増すと増加効果は減少した. PCB 誘導 S9 の場合 (図 1B), PB 誘導 S9 とは異なり S9 量 10 $\mu$ l では BHT 量 10 $\mu$ g で約 2 倍の増加が見られたが, S9 量 50 $\mu$ l, 150 $\mu$ l ではほとんど増加は見られなかった.

これらの現象が 2-AA の代謝に対する BHT の作用によると考えられることから, BHT の効果の時間変化を調べた. 上記実験より増加効果が見られる S9 量と BHT 量の条件を選択し, S9-mix と 2-AA のみの前培養を行った後に菌液および BHT を添加し, 前培養の時間変化による復帰コロニー数の変化を図 2 に示す. PB 誘導 S9 の場合, 図 2A に示すように S9 量 50 $\mu$ l, BHT 無添加のとき前培養時間が長くなるに従い復帰コロニー数は減

\* 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

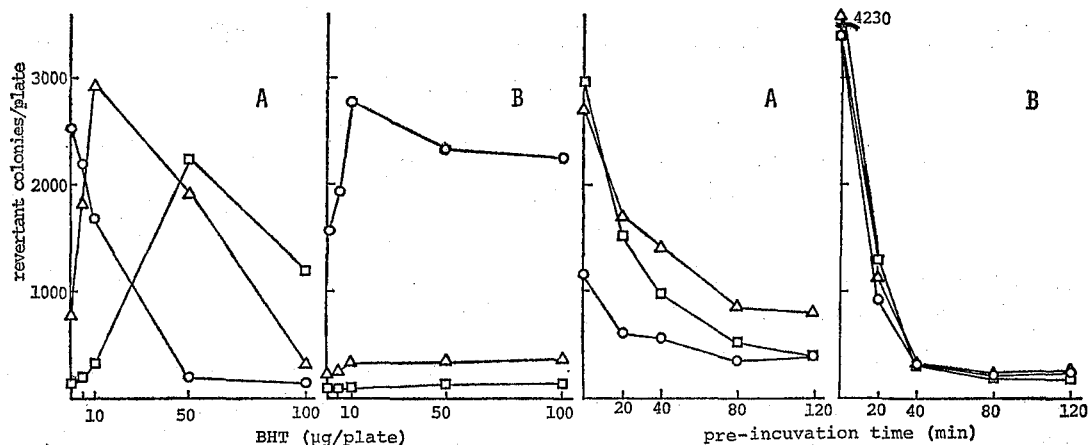


図1. 2-AAの突然変異誘起性に対するBHTの効果。AはPB誘導S9, BはPCB誘導S9によって代謝活性化した。○はS9量10µl, △は50µl, □は150µlを示す。

図2. 2-AAの突然変異誘起性の前培養時間による変化に対するBHTの効果。AはPB誘導S9 (S9量50µl), BはPCB誘導S9 (S9量10µl)によって代謝活性化した。○はBHT無添加, △は10µg, □は50µgを示す。

少し, 120 分間では前培養をしないときの約 30%であった。前培養がないときに BHT を 10µg または 50µg 添加すると突然変異誘起性の増加が見られ, 前培養時間の経過とともに低下し, BHT 50µg では BHT 無添加とほぼ同じ値まで減少した。PCB誘導 S9 の場合(図2B), S9 量 10µl で BHT 無添加のとき前培養により復帰コロニー数は急激な減少を示した。BHT を 10µg または 50µg 添加すると, 50µg の前培養のないときのみわずかの増加を示したが, BHT 無添加とほぼ同じ復帰コロニー数の変化を示した。

### 考 察

BHT は 2-AA の突然変異誘起性を変動させる効果を示す。誘導試薬の異なる 2 種類の S9 を用い S9 量を変えた場合, 最も大きな増加を示す S9 量と BHT 量の関係は PB 誘導 S9 で S9 50µl-BHT 10µg, S9 150µl-BHT 50µg であり, PCB 誘導 S9 では S9 10µl-BHT 10µg であった。また S9 10µl のとき PB 誘導 S9 では減少効果のみが見られたが, PCB 誘導 S9 ではわずかに増加が見られた。このように BHT の効果は PB, PCB 誘導 S9 によって異なり, PB 誘導 S9 で増加または減少の変動が大きいことが明らかとなった。両 S9 による BHT の効果の違いは前培養時間を変えた実験でも見られ, PB 誘導 S9 では前培養時間を長くしても増加効果が見られるのに対し, PCB 誘導 S9 では増加効果がほとんど見られなかった。従って BHT の突然変異誘起性を増加または減少させる効果は代謝活性化に用いた S9

中の薬物代謝酵素の組成およびその活性によって変化すると考えられ, S9 量と BHT 量の比率を変えることにより突然変異誘起性が大きく変動することから S9 の酵素反応と BHT 量に微妙なバランスが存在していると考えられる。

突然変異誘起性の減少効果は Rahimtula<sup>9)</sup>, Yang<sup>9)</sup> および Calle<sup>10)</sup> によって S9 中の薬物代謝酵素による化学物質の活性化を BHT が阻害する結果であると報告されている。増加効果の機構は明らかではなく, S9 中の薬物代謝酵素には不活性化反応<sup>13)</sup>もあることから, 増加効果は BHT による不活性化反応の阻害である可能性が考えられる。

Shamberger<sup>14)</sup> は β-プロピオラクトンとマロンアルデヒドの突然変異誘起性を S9 非存在下で BHT が抑制すると報告し, BHT の突然変異の減少効果は DNA に対する作用であると述べている。また Daugherty<sup>15)</sup> は BHT が修復あるいは複製 DNA 合成を阻害することを報告している。従って mutation test 系においても BHT が薬物代謝酵素系以外の反応に対し作用している可能性が考えられ, 増加および減少効果はともにそれらの反応を含めた総合的結果であることを考慮し, 様々な方向からの検討が必要であると思われる。

Nagao ら<sup>16,17)</sup> はノルハーマンがベンゾ(a)ピレンの突然変異誘起性を増加または減少させる二面効果を持つことを報告し, 不活性化と活性化のバランスに対しノルハーマンが作用しており, 増加効果は疎水性代謝物質が

ら親水性代謝物質への代謝の阻害によるものであると述べている。ノルハーマンに見られる効果とBHTの効果には高い類似性が推察される。

酸化防止剤にはブチルヒドロキシアニソール、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール等があり、これらの化学物質にも他の化学物質の突然変異誘起性や発がん性を変動させる効果があると報告<sup>8,9,16,18,19)</sup>されていることからBHTとの比較検討の必要があると思われる。

### 要 旨

誘導試薬の異なる2種類のS9を用いてAmesのmutation test系における2-アミノアントラセンの突然変異誘起性に対するBHTの効果を検討した。

PB誘導S9の場合、BHTにより突然変異誘起性は増加または減少し、S9量を変えることにより著しく変動した。PCB誘導S9の場合はいずれのS9量でもわずかの増加のみ示し、BHTの効果がS9の種類によって異なることがわかった。

### 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) 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 Kamra, O. P.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 25, 67, 1974
- 4) Ulland, B. M., Weisburger, J. H., Yamamoto, R. S., and Weisburger, E. K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 11, 199, 1973
- 5) Peraino, C., Fry, R. J. M., Staffeldt, E., and Christopher, J. P.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 15, 93, 1977
- 6) Wattenberg, L. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 60, 11, 1978
- 7) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 40, 1978
- 8) Rahimtula, A. D., Zachariah, P. K., and O'Brien, P. J.: *Biochem. J.*, 164, 473, 1977
- 9) Yang, C. S., Strickhart, F. S., and Woo, G. K.: *Life Sciences*, 15, 1497, 1975
- 10) Calle, L. M., Sullivan, P. D., and Nettleman, M. D.: *B. B. R. C.*, 85, 351, 1978
- 11) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
- 12) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, 20, 1178, 1975
- 13) DeFlora, S.: *Nature*, 271, 455, 1978
- 14) Shamberger, R. J., Corlett, C. L., Beaman, K. D., and Kasten, B. L.: *Mutation Res.*, 66, 349, 1979
- 15) Daugherty, J. P., Davis, S., and Yielding, K. L.: *B. B. R. C.*, 80, 963, 1978
- 16) Nagao, M., Yahagi, T., and Sugimura, T.: *B. B. R. C.*, 83, 373, 1978
- 17) Fujino, T., Fujiki, H., Nagao, M., and Yahagi, T.: *Mutation Res.*, 58, 151, 1978
- 18) Cameron, E., Pauling, L., and Leibovitz, B.: *Cancer Res.*, 39, 663, 1979
- 19) Schut, H. A. J., Wirth, P. J., and Thorgeirsson, S. S.: *Mol. Pharmacol.*, 14, 682, 1978

## オルトフェニルフェノールナトリウムの細胞遺伝学的研究

吉田 誠二\*, 縄井 寿美子\*, 平賀 興吾\*

### Cytogenetic Studies of Sodium o-Phenylphenate

SEIJI YOSHIDA\*, SUMIKO NAWAI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** OPP-Na, マウス・ラット・CHO-K1 Mouse・Rat・CHO-K1, 染色体分析 Chromosome Analysis

#### 緒 言

かんきつ類の防ばい剤オルトフェニルフェノールの染色体試験結果については先に報告<sup>1)</sup>したが、今回は、そのナトリウム塩 (Sodium o-phenylphenate, OPP-Na) の *in vitro* および *in vivo* における染色体試験結果を報告する。OPP-Na は、その製法により品質が、さまざまであるといわれ各社製品を見ると白色、淡黄色、桃色、黒等種々の着色が見られた。そこで、入手出来た6種の製品について試験を行なった。

#### 試験材料および方法

1. 検体: OPP-Na として東京化成社製市販品, Lot No. FB102, 桃色 (以下 ONT と略す), 東京化成社製市販品を一度遊離酸に戻して精製したもの, 白色 (以下 ONP と略す), 三光化学製, 桃色 (以下 ONS と略す), Dow chemical Co. 製淡黄色のもの (以下 OND と略す), Dow chemical Co. 製 Dowicide A, 白色フレック状のもの (以下 ONW と略す), 黒色フレック状のもの (以下 ONB と略す), とに分けたものの6種を用いた。

2. 培養細胞の増殖に及ぼす影響: 培養細胞は、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1細胞を用いた。培養液はF12培養液 (Gibco 社製) に牛牛血清10%および抗生物質として penicillin と streptomycin を加えたものを用いた。培養3日目の細胞を Trypsin (Diffco 社製) によりガラス面より剥離し、 $4 \times 10^5/\text{ml}$  濃度の細胞浮遊液を作製した。次に、検体を培養液で溶解した各濃度の検体添加培養液をチェンバースライド (Lab-Tek社製) の各 well に 0.2ml ずつ分注し、これに細胞浮遊液 0.2ml 加えよく混和後  $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$  ふらん器にて培養を開始した。なお、対照は、培養液のみとした。24時間後、各チェンバースライドの混和液をすて、リン酸緩衝生理食塩水で1回細胞面を洗い、ホルマリン溶液で固定し、HE染色を施し Panel 法<sup>2)</sup>に従って増殖阻害を調べた。

3. 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体試験: 培養3

日目に各濃度の検体添加培養液に移して6, 24および48時間処理後常法により染色体標本を作製した。染色体分析を分裂中期のよく拡がった細胞について行ない、異常細胞の分類および結果の判定は前報<sup>1)</sup>に準じた。

4. マウスを用いた *in vivo* 染色体試験: JCL-ICR系マウスの雄を用いた。日本クレア(株)より6週令で購入、一週間の予備飼育したのち実験に供した。

飼育は温度  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 照明午前8時~午後5時, 換気毎時10回の飼育室にて行ない、日本クレア(株)製の固型飼料 CE-2 と水道水を自由に与えた。検体を蒸留水で溶解した各濃度溶液を投与容量 10ml/kg に調整して胃ゾンデにより経口投与した。なお、対照は無処理とした。6, 24ないし48時間後各投与群より5匹の動物を無麻酔下断頭により屠殺、常法により骨髓細胞を採取し、染色体標本を作製した。染色体分析を分裂中期のよく拡がった細胞について行ない異常細胞の分類および結果の判定は *in vitro* 試験と同様にした。

5. ラットを用いた *in vitro* 染色体試験: 当部で購入した Dow chemical Co. 製 OPP-Na (Dowicide A) の亜急性毒性試験の一部として行なった。動物は、barrier system 下に生育された近交系 Fischer ラットを日本チャールスリバー(株)より4週令で購入、室温  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度 50~60%, 照明午前6時~午後5時, 換気毎時10回の当部 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ケージに個別に収容し、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。飼料は、日本クレア(株)製 CE-2 を用い、水とともに自由に与えた。動物が5週令の時点で飼料を OPP-Na 添加飼料 (4, 2, 1, 0%) に切り替え、13週間飼育後動物を無麻酔下断頭により屠殺、常法により骨髓細胞を採取し染色体標本を作製した。染色体分析、異常細胞の分類および結果の判定は上記 *in vivo* 試験と同様とした。

#### 結果と考察

1) OPP-Na の培養細胞の増殖に及ぼす影響

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



Table 1. Growth Inhibition of OPP-Na

| Dose<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | ONT            | ONP | ONS | OND | ONW | ONB |
|------------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 200                          | 4 <sup>a</sup> | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   |
| 100                          | 4              | 4   | 4   | 4   | 4   | 2   |
| 50                           | 3              | 2   | 4   | 2   | 0   | 0   |
| 25                           | 1              | 0   | 2   | 1   | 0   | 0   |
| 12.5                         | 0              | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 6.2                          | 0              | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3.1                          | 0              | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 0                            | 0              | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

a Grade of Growth Inhibition was Scored 4, 3, 2, 1, 0—According to the Method of Umeda<sup>2)</sup> et al.

ONT: Tokyo Kasei Kogyo

ONP: Purified ONT

ONS: Sanko Kagaku Kogyo

OND: Dow Chemical Co., Light Yellow

ONW: Dow Chemical Co., White

ONB: Dow Chemical Co., Black

Table 2. Frequency of Chromosome Aberrations with ONT on CHO-K1 Cells

| Duration of Treatment (hrs.) | Chemical Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of Cells Analyzed | Total Aberrations | Gap             |                 |                 | Break |    |                 |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|
|                              |                                     |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | Ot <sup>c</sup> | C1    | C2 | Ot <sup>c</sup> |
| 6                            | 100                                 | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 50                                  | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0                                   | 200                   | 7                 | 7               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
| 24                           | 100                                 | 600                   | 27 <sup>d</sup>   | 27              | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 50                                  | 600                   | 28 <sup>d</sup>   | 25              | 0               | 3               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 25                                  | 400                   | 10                | 10              | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 5                                   | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
| 48                           | 0                                   | 550                   | 6                 | 6               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 50                                  | 200                   | 14 <sup>d</sup>   | 14              | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 25                                  | 200                   | 9                 | 8               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 5                                   | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0                                   | 400                   | 12                | 10              | 0               | 2               | 0     | 0  | 0               |

a: Chromatid type, b: Chromosome type, c: Others, d: p Significantly Higher than 0.05

増殖阻害度の結果を Table 1 に示すように、今回用いた検体の中では ONS が最も強い増殖阻害を示し、以下 ONT, OND, ONP, ONW, ONB の順であった。

## 2) 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体試験

ONT の結果を Table 2 に示す。

100 $\mu\text{g/ml}$  および 50 $\mu\text{g/ml}$  6時間処理のいずれにおいても染色体の構造および数的異常に関しては対照に比べ何ら差は見られなかった。しかし、100 $\mu\text{g/ml}$  および 50 $\mu\text{g/ml}$  24時間処理において染色体の構造異常を保有

Table 3. Frequency of Chromosome Aberrations with OPP-Na on CHO-K1 Cells

| Duration of Treatment (hrs.) | Chemicals | Chemical Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of Cells Analyzed | Total Aberrations | Gap             |                 |                 | Break |    |                 |
|------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|
|                              |           |                                     |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | Ot <sup>c</sup> | C1    | C2 | Ot <sup>c</sup> |
| 6                            | ONP       | 100                                 | 200                   | 4                 | 3               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONS       | 100                                 | 200                   | 5                 | 3               | 0               | 2               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | OND       | 100                                 | 200                   | 5                 | 4               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONW       | 100                                 | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 4                 | 3               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONB       | 100                                 | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 2                 | 1               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           |                                     |                       |                   |                 |                 |                 |       |    |                 |
|                              |           | 0                                   | 200                   | 4                 | 3               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
| 24                           | ONP       | 100                                 | 200                   | 6                 | 5               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONS       | 50                                  | 186                   | 13 <sup>d</sup>   | 10              | 0               | 3               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 8                 | 8               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 12.5                                | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | OND       | 100                                 | 200                   | 9                 | 8               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONW       | 100                                 | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONB       | 100                                 | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 50                                  | 200                   | 4                 | 3               | 0               | 2               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0         | 400                                 | 10                    | 10                | 0               | 0               | 0               | 0     | 0  |                 |
| 48                           | ONP       | 50                                  | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 12.5                                | 186                   | 8                 | 8               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONS       | 25                                  | 200                   | 9                 | 9               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 12.5                                | 186                   | 9                 | 9               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 12.5                                | 186                   | 9                 | 9               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | OND       | 50                                  | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONW       | 50                                  | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | ONB       | 50                                  | 200                   | 4                 | 4               | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              |           | 25                                  | 200                   | 4                 | 3               | 0               | 1               | 0     | 0  | 0               |
| 0                            |           | 400                                 | 9                     | 9                 | 0               | 0               | 0               | 0     | 0  |                 |

a: Chromatid type, b: Chromosome type, c: Others, d: p Significantly Higher than 0.05

する細胞が対照に比べ有意な増加を示した。また、50 $\mu\text{g/ml}$  48時間処理でも異常細胞が有意な増加を示した。しかし、数的異常に関しては24および48時間処理のいずれにおいても認められなかった。

次に ONP, ONS, OND, ONW, ONB の結果を Table 3 に示す。

6時間処理では ONP, ONS, OND, ONW, ONB のいずれにおいても染色体の構造および数的異常に関しては対照に比べ何ら差は見られなかった。しかし、24時間処理において ONS 50 $\mu\text{g/ml}$  で染色体の構造異常を保有する細胞が対照に比べ有意な増加を示した。しかし、数的異常に関しては一例も見られなかった。一方、ONP, OND, ONW, ONB については、いずれも染色体の構造および数的異常を保有する細胞は、対照に比べ何らの差も認められなかった。また、48時間処理のいずれにおいても染色体の構造および数的異常に関しては、対照に比べ何ら差を認めなかった。

## 3) マウスを用いた *in vivo* 染色体試験

Table 4. Frequency of Chromosome Aberrations with OPP-Na on Mice

| Duration of Treatment (hrs.) | Chemicals | Chemical Conc. (mg/kg) | No. of Cells Analyzed | Total Aberrations | Gap             |                 | Break |                   |
|------------------------------|-----------|------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|-------------------|
|                              |           |                        |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | C1    | C2 O <sup>c</sup> |
| 6                            | ONT       | 1200                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 300                    | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 0                      | 200                   | 0                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
| 24                           | ONT       | 1200                   | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 300                    | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0                 |
|                              |           | 0                      | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              | ONP       | 1200                   | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              | ONS       | 1200                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              | OND       | 1200                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                              | ONW       | 1200                   | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
| 48                           | ONB       | 1200                   | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 300                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 0                      | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              | ONT       | 1200                   | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 600                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 300                    | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                              |           | 0                      | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |

a: Chromatid Type, b: Chromosome Type, c: Others

Table 5. Chromosome Studies of Rats Following 13 weeks Treatment with OPP-Na

| Chemical Conc. (%) | No. of Cells Analyzed | Total Aberrations | Gap             |                 | Break |                   |
|--------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|-------------------|
|                    |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | C1    | C2 O <sup>c</sup> |
| 4.0                | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0                 |
| Total              | 200                   | 2                 | 1               | 0               | 1     | 0                 |
| 2.0                | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
| Total              | 200                   | 3                 | 3               | 0               | 0     | 0                 |
| 1.0                | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
| Total              | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0                 |
| Cont.              | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 1                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
|                    | 50                    | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0                 |
| Total              | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0                 |

a: Chromatid type, b: Chromosome type, c: Others

2) の結果より ONT については6, 24および48時間処理を設けて行なった。他の ONS, ONP, OND, ONW, ONB については24時間処理のみとした。その結果を Table 4 に示す。

ONT の6, 24および48時間処理ならびに ONS, ONP, OND, ONW, ONB の24時間処理のいずれにおいても染色体の構造および数的異常は、対照と比べ何ら差を認めなかった。

4) ラットを用いた Dowicide A の *in vivo* 染色体試験 結果を Table 5 に示す。

4%, 2%, 1%投与群のいずれにおいても染色体の構造および数的異常に関しては、対照に比べ何ら差を認めなかった。

以上, *in vitro* 系で ONT と ONS に染色体異常細胞の有意な増加が見られたが, ONT の精製品である ONP は染色体に全く影響を示さず, また, *in vivo* 系においても全く影響を示していないことから ONT の染色体異常誘発は, 不純物に起因するものと思える。

ONT について当部の小嶋ら<sup>3)</sup> は微生物を用いた mutation test を行ない陰性の結果を得ている。また, 当部の縄井ら<sup>4)</sup> は姉妹染色分体交換 (SCEs) の誘発の有無を CHO-K1 細胞を用いて調べ陰性の結果を報告した。さらに, *in vivo* 系の試験として当部の小縣ら<sup>5)</sup> は ONT 添加飼料による長期投与優性致死試験を行ない ONT に優性致死誘発性が無いことを述べている。優性致死現象は染色体異常によるものと考えられており, 我々の *in vivo* 染色体試験の陰性の結果とよく一致しており ONT の変異原性は無いものと判断した。また, ONS についても *in vitro* 染色体試験で 50 $\mu$ g/ml の24時間処理において gap を主とする異常細胞が対照に比べ有意な増加を示したが, 用量に伴う増加は認められていないので, 染色体異常誘発性は無いものと判断した。他の OND, ONW, ONB については, *in vitro* および *in vivo* の両系のいずれにおいても染色体には全く影響を示さなかった。

### 要 旨

6種のオルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) について培養細胞の増殖に及ぼす影響, 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体試験, マウスを用いた *in vivo* 染色体試験を行なった。また1検体についてラットを用いた長期投与染色体試験を行なった。

培養細胞の増殖に及ぼす影響には可成りの変動が見られ, *in vitro* 染色体試験において2検体に軽度の染色体異常を認めた。その他では染色体の構造および数的異常を認めなかった。すなわち, 精製した検体において染色体異常は陰性であったことから2検体による陽性結果は, OPP-Na 以外の不純物によるものと考えた。

謝辞 精製検体の分与ならびに有益な御助言を頂いた当所食品添加物研究科遠藤英美科長に深謝いたします。



文 献

- 1) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 2) 梅田 誠, 川崎一也, 斉藤 守 : 日臨, 30, 942, 1972
- 3) 小嶋昭江, 藤田 博 : 未発表
- 4) 縄井寿美子, 吉田誠二, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 30-2, 51, 1979
- 5) 小縣昭夫, 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾 : 第7回日本環境変異原学会講演抄録集, 1978

## チアベンダゾールの細胞遺伝学的研究

吉田 誠二\*, 縄井 寿美子\*, 平賀 興吾\*

### Cytogenetic Studies of Thiabendazole

SEIJI YOSHIDA\*, SUMIKO NAWAI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** TBZ, マウス・ラット・CHO-K1 Mouse・Rat・CHO-K1, 染色体分析 Chromosome Analysis

#### 緒 言

チアベンダゾール (thiabendazole) は, benzimidazol 系化合物の一種であり<sup>1)</sup>, 以前より欧米で柑きつ類の防ばい剤や駆虫薬として用いられており最近我が国でも柑きつ類の食品添加物およびバナナの保存料として認められた。

チアベンダゾールの変異原性に関して寺本ら<sup>2)</sup>は微生物を用いた mutation test, *in vitro* および *in vivo* 染色体試験ならびに優性致死試験を行ない, いずれの試験においても陰性の結果を報告している。また, 厚生省のがん研究助成金による河内班の報告もある<sup>3)</sup>。しかし, その中で石館は CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体試験の48時間処理において高頻度の4倍体細胞の出現を認めている。

一方, 当部の小縣ら<sup>4)</sup>は, 妊娠マウスの臨界期にチアベンダゾール大量を投与して奇形の増加することを観察している。今回, 防ばい剤の安全性再点検の一環としてチアベンダゾールの染色体異常誘発性の有無を *in vitro* および *in vivo* の両系を用いて調べた。特に *in vivo* 試験では, 小縣らの行なった催奇形試験に準じた大量投与を行なった。

#### 試験材料および方法

1. 検体: チアベンダゾール (以下 TBZ と略す), 東京化成社製, Lot No. A101

2. *in vitro* 試験: チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を用いた。培養液は, F12培養液(Gibco 社製)に仔牛血清 10% および抗生物質として penicillin 100u/ml, streptomycin 100μg/ml を加え, NaHCO<sub>3</sub> で pH 7.2~7.4 に調整して用いた。細胞を播種, 培養2日目に検体をジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す) に溶解し, 培養液に添加した。この際 DMSO 濃度は, 最終的に 0.5% となるようにした。このようにして作製した各濃度の検体添加培養液で 6, 24ないし 48

時間細胞を処理後, 常法により染色体標本を作製, ギムザ染色を行ない, 分裂中期のよく拡がった細胞について染色体分析を行なった。異常細胞の分類および結果の判定は前報<sup>5)</sup>に準じた。

3. マウスを用いた *in vivo* 試験: JCL-ICR 系マウスの雌を用いた。8週令で購入, 一週間の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8時~午後5時, 換気毎時10回の飼育室にて行なった。なお, 飼料は, 日本クレア(株)製固型飼料 CE-2 を水とともに自由に与えた。

検体をオリーブ油で溶解し, 最高濃度 2,400mg/kg より 1,158mg/kg までの間, 公比 1.2 で5段階を作製した。投与容量は全て 10ml/kg とし胃ゾンデにより経口投与を行なった。なお, 対照は無処理とした。投与後 6, 24および48時間目に各群5匹の動物を屠殺後, 常法により骨髓細胞を採取し染色体標本を作製した。異常細胞の分類および結果の判定は *in vitro* 試験と同様に行なった。

4. ラットを用いた *in vivo* 試験: 4週令の slc-wistar 系ラット雌雄を購入, 一週間の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6時~午後5時, 換気毎時10回の飼育室にて行なった。なお, 飼料は, 日本クレア(株)製固型飼料 CE-2 を水とともに自由に与えた。

検体を日本クレア(株)製飼料 CE-2 にそれぞれ 0.50%, 0.25% の割合に添加し自由摂取させた。1週および6週目に各群5匹の動物を屠殺後, 常法により骨髓細胞を採取し染色体標本を作製した。異常細胞の分類および結果の判定は *in vitro* 試験と同様に行なった。

#### 結果と考察

##### 1) *in vitro* 試験

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Frequency of Chromosome Aberrations in CHO-K1 Cells Induced by Treatment of Thiabendazole (TBZ)

| Duration of Treatment (hrs.) | Treatment Dose ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap             |                 | Break |    |                 |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|
|                              |                                     |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | C1    | C2 | Ot <sup>c</sup> |
| 6                            | 100                                 | —                     | —                 | —               | —               | —     | —  | —               |
|                              | 50                                  | 200                   | 4                 | 4               | 4               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 25                                  | 200                   | 3                 | 3               | 3               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0                                   | 200                   | 7                 | 7               | 7               | 0     | 0  | 0               |
| 24                           | 50                                  | 108                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 25                                  | —                     | —                 | —               | —               | —     | —  | —               |
|                              | 5                                   | 136                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0                                   | 150                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0  | 0               |
| 48                           | 50                                  | —                     | —                 | —               | —               | —     | —  | —               |
|                              | 25                                  | 182                   | 3                 | 3               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 5                                   | 150                   | 3                 | 3               | 0               | 0     | 0  | 0               |
|                              | 0                                   | 200                   | 5                 | 5               | 0               | 0     | 0  | 0               |

a Chromatid type b Chromosome type c Others

検体処理濃度は、予備試験で得た細胞が分裂し得る最大量 100 $\mu\text{g/ml}$  と、その1/2もしくは1/10量としたが、100 $\mu\text{g/ml}$  の6時間処理および 50 $\mu\text{g/ml}$  の48時間処理

については検体による細胞増殖阻害が強く、染色体分析に必要な分裂細胞が得られなかった。

一方、25 $\mu\text{g/ml}$  の24時間処理については細胞の状態不良により染色体分析は行えなかった。

結果は Table 1 に示すように、6時間処理において gap を伴う異常細胞が観察されたが対照に比べ出現数は、むしろ少なかった。また、24および48時間処理においても6時間処理の結果と同様で染色体の構造異常を伴う細胞の増加は全く見られなかった。

先述のように石館は、CHL 細胞で4倍体細胞の高頻度の出現を報告しているが、本実験では4倍体細胞を含む染色体の数的異常は全く見られなかった。

## 2) マウスを用いた *in vivo* 試験

結果は Table 2 に示す通りで 2,400, 2,000, 1,667, 1,389, 1,158 mg/kg 投与の各6, 24および48時間処理のいずれにおいても構造異常を伴う細胞の増加は見られなかった。また、染色体の数的異常も認められなかった。

## 3) ラットを用いた *in vivo* 試験

Table 2. Frequency of Chromosome Aberrations on Mice Induced by Treatment of Thiabendazole (TBZ)

| Duration of Treatment (hr.) | Treatment Dose (mg/kg) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap             |                 | Break |    | Ex <sup>c</sup> | Fr <sup>d</sup> | Ot <sup>e</sup> |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|-----------------|-----------------|
|                             |                        |                       |                   | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | C1    | C2 |                 |                 |                 |
| 6                           | 2400                   | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 2000                   | 150                   | 2                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               | 1               | 1               |
|                             | 1667                   | 150                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1389                   | 150                   | 4                 | 2               | 0               | 2     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1158                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 0                      | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
| 24                          | 2400                   | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 2000                   | 200                   | 2                 | 0               | 0               | 2     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1667                   | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1389                   | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1158                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 0                      | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
| 48                          | 2400                   | 200                   | 1                 | 1               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 2000                   | 200                   | 2                 | 2               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1667                   | 200                   | 0                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1389                   | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 1     | 0  | 0               | 0               | 0               |
|                             | 1158                   | N.D                   | —                 | —               | —               | —     | —  | —               | —               | —               |
|                             | 0                      | 200                   | 1                 | 0               | 0               | 0     | 0  | 0               | 0               | 0               |

a Chromatid type b Chromosome type c Exchange d Fragment  
e Others aberrations

Table 3. Frequency of Chromosome Aberrations on Rats Induced by Thiabendazole (TBZ)

| Duration<br>of Treat-<br>ment(W) | Sex | Treatment<br>Dose<br>(%) | No. of<br>Cells<br>Analysed | Total<br>Aberra-<br>tions | Gap             |                 | Break |    | Exc <sup>c</sup> | Fr <sup>d</sup> | Di <sup>e</sup> | Ri <sup>f</sup> | Ot <sup>g</sup> |
|----------------------------------|-----|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-------|----|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                  |     |                          |                             |                           | C1 <sup>a</sup> | C2 <sup>b</sup> | C1    | C2 |                  |                 |                 |                 |                 |
| 1                                | M   | 0.50                     | 200                         | 6                         | 2               | 0               | 3     | 0  | 0                | 0               | 1               | 0               | 0               |
|                                  | M   | 0.25                     | 172                         | 5                         | 1               | 0               | 3     | 0  | 0                | 0               | 1               | 0               | 0               |
|                                  | M   | 0                        | 223                         | 2                         | 1               | 0               | 1     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                                  | F   | 0.50                     | 200                         | 2                         | 0               | 0               | 0     | 0  | 0                | 1               | 0               | 0               | 1               |
|                                  | F   | 0.25                     | 250                         | 5                         | 1               | 0               | 2     | 0  | 0                | 2               | 0               | 0               | 0               |
|                                  | F   | 0                        | 250                         | 2                         | 1               | 0               | 0     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 1               |
| 6                                | M   | 0.50                     | 202                         | 3                         | 1               | 0               | 0     | 0  | 0                | 1               | 0               | 0               | 1               |
|                                  | M   | 0.25                     | 156                         | 0                         | 0               | 0               | 0     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                                  | M   | 0                        | 180                         | 0                         | 0               | 0               | 0     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                                  | F   | 0.50                     | 250                         | 6                         | 1               | 0               | 1     | 0  | 1                | 0               | 0               | 3               | 0               |
|                                  | F   | 0.25                     | 250                         | 5                         | 3               | 0               | 2     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                                  | F   | 0                        | 250                         | 2                         | 1               | 0               | 0     | 0  | 0                | 0               | 0               | 0               | 1               |

a Chromatid type b Chromosome type c Exchange d Fragment  
e Dicentric f Ring g Others aberrations

結果は Table 3 に示すように 0.50% および 0.25% 検体添加飼料摂取 1 週 および 6 週の各雌雄ラットにおいて、いずれも染色体の構造および数的異常の増加を認めなかった。

以上、本実験条件下において、TBZ の染色体異常誘発性はないと考えられる。

#### 要 旨

チアベンダゾール (TBZ) の染色体異常誘発性の有無を *in vitro* および *in vivo* の両系を用いて調べた。

*in vitro* 系として CHO-K1 細胞, *in vivo* 系は、マウスおよびラットを用いた。両系とも TBZ に起因する

と考えられる染色体の構造および数的異常は、本条件下において陰性と判定した。

#### 文 献

- 1) Seiler, J. P.: *Mutation Res.*, 32, 151, 1975
- 2) 寺本昭二, 白須泰彦, 森谷正明, 手塚英夫: 第 5 回毒作用研究会発表抄録集, 1978
- 3) Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare, 1976
- 4) 小縣昭夫, 平賀興吾: 未発表
- 5) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978

姉妹染色分体交換 (SCE) による変異原物質の検索 (第2報) 防ばい剤2種の SCE 誘発性

縄井 寿美子\*, 吉田 誠二\*, 中尾 順子\*, 平賀 興吾\*

Examination of Mutagens by Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) (II)

Test of Two Fungicides by Induced SCE, *in vitro*

SUMIKO NAWAI\*, SEIJI YOSHIDA\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, チアベンダゾル thiabendazole, CHO-K1 細胞 CHO-K1 cell line, 姉妹染色分体交換 sister chromatid exchange

姉妹染色分体交換 (Sister Chromatid Exchanges, SCEs) は, DNA 障害により誘発されると言われ, 発癌および突然変異原物質の多くにおいて, 用量に伴う増加が認められている<sup>1)</sup>. この SCEs は, Latt<sup>2)</sup> により開発された BUdR (5-Bromodeoxyuridine) ラベル法にギムザ染色を組み合わせた FPG (Fluorescence plus Giemza) 染色法により簡単に検索でき, 感度も鋭敏であることなどから, 変異原物質のスクリーニングとして有効であると示唆されている<sup>3)</sup> ことは先の報告<sup>4)</sup> でも述べた. 我々もチャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を用いて, 既知の変異原物質3種について先に行った基礎実験で, 良い結果を得ている. そこで今回我々は, 柑橘類の防ばい剤として用いられているオルトフェニルフェノール (OPP) とそのナトリウム塩 (OPP-Na), および柑橘類, バナナに用いられているチアベンダゾル (TBZ) について SCE 誘発試験を試み, その変異原性を検討することとした.

OPP は花田<sup>5)</sup> によって微生物で細胞の突然変異を誘起する因子であるとして陽性の結果が示されているのに対し, 白須ら<sup>6)</sup> の微生物を用いた試験, ラットを用いた細胞遺伝学的試験, 優性致死試験, および CHO-K1 細胞を用いての一連の防ばい剤についての吉田ら<sup>7)</sup> の細胞遺伝学的試験ですべて陰性の結果を得ており, またそのナトリウム塩についても, 石館<sup>8)</sup>, 吉田ら<sup>9)</sup> が細胞遺伝学的試験で, 小縣らが優性致死<sup>10)</sup> および催奇形性試験<sup>11)</sup> で陰性の結果を報告している. 一方 TBZ は我国では昨年初めて使用が許可されたが, 石館<sup>8)</sup> はチャイニーズハムスター肺由来の CHL 細胞を用いた細胞遺伝学的試験において, 45 $\mu$ g/ml, 48時間処理で74%の4倍体出現率を認め陽性の結果を得ているのに対し, 先の吉田ら<sup>7)</sup> の試験では, 細胞その他実験条件の違いによるものと思わ

れるが, 25 $\mu$ g/ml, 48時間処理および 50 $\mu$ g/ml, 24時間処理で陰性を報告している. また小縣ら<sup>12)</sup> はマウスの催奇形性試験で陽性の成績を示している. このように OPP およびそのナトリウム塩, TBZ については, その安全性になお検討の余地があると考えられる所から, 我々はそれら防ばい剤の SCEs 誘発を, その安全性についての総合的な検討の一助とすべく調べたので報告する.

材料および方法

1. 試薬 *o*-phenylphenol (OPP): 東京化成工業, *o*-phenylphenol sodium (OPP-Na): 東京化成工業 (T): DOW Chemical (D): 三光化学 (S), Thiabendazole (TBZ): 東京化成工業, Mitomycin C (MMC): 協和発酵工業, Sucrose: 和光純薬工業, 5-Bromodeoxyuridine (BUdR): SIGMA, 33258 Hoechst: 和光純薬工業, Dimethylsulfomide (DMSO): 和光純薬工業

2. 細胞および培養 CHO-K1 細胞を, 仔牛血清 10% 添加の F12 培養液で密栓培養した. 細胞周期は 15 時間, 染色体数は 19~21 本で, そのほとんどが 20 本である.

3. 薬物調整および処理 細胞播種後48時間目に培養液を換え, 培養ビンをアルミホイルで被って完全に遮光した後, BUdR 0.5 $\mu$ g/ml を加え, 同時に被検物質を添加して27時間密栓培養した. OPP は DMSO に溶解, OPP-Na および MMC は蒸留水に溶解, TBZ はエタノールに溶解して各々 Table 1 に示した最終濃度となるよう培地に 0.01ml/ml 施添加した. sucrose は培地に直接溶解して加えた.

4. 標本作成および染色 標本作成 1.5 時間前にコルセミドを 0.1 $\mu$ g/ml 加えた. 標本作成および染色は, 我々が先に行った方法に準じた.

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

## 結 果

試験は5回に分けて行った。各々の試験毎に対照を設け、対照には薬物処理群と同様に溶媒のみを添加した。また陽性対照として、先の我々の実験で良い用量-作用関係を示した MMC を用い、さらに OPP, OPP-Na, TBZ の結果から、日常多用されている 蔗糖 (sucrose) の試験を追加し、結果の判定に役立てた。観察は各々50細胞について行い、細胞あたりの SCEs を求め、対照との間で有意差検定にかけた。

結果を Table 1 に示す。OPP の 50 $\mu$ g, OPP-Na (T) 75 $\mu$ g, TBZ 45 $\mu$ g, sucrose 75mg は、薬物の細胞への影響が強く、分裂細胞が得られないか、或は得られても細胞周期の遅れのために姉妹染色分体の分染が為さ

Table 1. Frequency of SCEs in CHO-K1 Cell Line Treated with OPP, OPP-Na and TBZ at Various Concentrations for 27hr before Fixation

| chemicals | dose ( $\mu$ g/ml) | No. of cells observed | SCEs/cell $\pm$ S. E. |
|-----------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| OPP       | 50                 | —                     | —                     |
|           | 25                 | 50                    | 5.04 $\pm$ 0.30       |
|           | 12.5               | 50                    | 5.76 $\pm$ 0.30       |
|           | 5                  | 50                    | 4.56 $\pm$ 0.30       |
|           | —                  | 50                    | 4.68 $\pm$ 0.26       |
| OPP-Na(T) | 75                 | —                     | —                     |
|           | 50                 | 50                    | 5.94 $\pm$ 0.36       |
|           | 25                 | 50                    | 6.16 $\pm$ 0.34       |
|           | 12.5               | 50                    | 5.16 $\pm$ 0.31       |
| OPP-Na(D) | 50                 | 50                    | 6.04 $\pm$ 0.27       |
|           | 25                 | 50                    | 5.84 $\pm$ 0.30       |
|           | 12.5               | 50                    | 5.46 $\pm$ 0.31       |
|           | —                  | 50                    | 5.54 $\pm$ 0.31       |
| OPP-Na(S) | 50                 | 50                    | 6.16 $\pm$ 0.30       |
|           | 25                 | 50                    | 6.00 $\pm$ 0.35       |
|           | 10                 | 50                    | 6.08 $\pm$ 0.35       |
|           | 5                  | 50                    | 5.08 $\pm$ 0.37       |
|           | 1                  | 50                    | 5.22 $\pm$ 0.37       |
|           | —                  | 50                    | 4.70 $\pm$ 0.33       |
| MMC       | 0.025              | 50                    | 36.40 $\pm$ 1.12b     |
|           | 0.0125             | 50                    | 26.14 $\pm$ 0.81b     |
|           | 0.005              | 50                    | 11.76 $\pm$ 0.33      |
| TBZ       | 45                 | —                     | —                     |
|           | 35                 | 50                    | 5.76 $\pm$ 0.38       |
|           | 25                 | 50                    | 5.10 $\pm$ 0.26       |
|           | 15                 | 50                    | 5.46 $\pm$ 0.29       |
|           | 5                  | 50                    | 4.96 $\pm$ 0.34       |
|           | —                  | 50                    | 4.88 $\pm$ 0.28       |
| sucrose   | 75a                | —                     | —                     |
|           | 50a                | 50                    | 7.02 $\pm$ 0.31       |
|           | 25a                | 50                    | 6.40 $\pm$ 0.35       |
|           | 10a                | 50                    | 5.36 $\pm$ 0.35       |
|           | 5a                 | 50                    | 5.38 $\pm$ 0.36       |
|           | —                  | 50                    | 5.18 $\pm$ 0.30       |

a. mg/ml

b. significantly different from control ( $p < 0.001$ )

れず、観察が不可能であったものである。OPP については、観察できた最高用量の 25 $\mu$ g および 12.5 $\mu$ g で対照よりやや高い SCEs が見られたが、用量-作用関係は認められなかった。また OPP のナトリウム塩に関しては、入手もとにより薬物の肉眼的な差異、純度、pH などの違いが見られたので、(T), (D), (S) 3社のものについてそれぞれ試みた。(T), (D)については、最高用量である 50 $\mu$ g および 25 $\mu$ g において SCE 頻度は対照より高かったが、(T)では用量-作用関係が見られず、また(D)でもその増加は誤差範囲であると考えられた。(S)については 25 $\mu$ g 以下さらに群を設けたが、5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g ではほとんど対照と変わらない頻度であり、50 $\mu$ g, 25 $\mu$ g についても(T) (D)と同様、有意な増加は見られなかった。一方、陽性対照として用いた MMC は、用量-作用関係を示し、対照 4.7 に対し、0.025 $\mu$ g および 0.0125 $\mu$ g では各々36, 26という高い SCEs の上昇が見られ、 $P < 0.001$  で対照との間に高い有意性を示した。一方 TBZ については、45 $\mu$ g 48時間処理の培養細胞で4倍体が高頻度で出現するという、先に述べた石館<sup>9)</sup>の報告があるが、我々の27時間処理の試験ではそのような増加は見られず、また SCEs についても、各処理群とも対照より幾分高い値を示したが、誤差範囲であると考えられ、用量-作用関係も見られなかった。ところで今回 SCEs 誘発性を調べた OPP および TBZ は、陽性対照として用いた MMC などのアルキル化剤や他の一般の発癌物質に比べ、細胞への強い毒性、顕著な変異原性は見られず、従って試験では必然的に姉妹染色分体の分染可能な最大用量での処理を行うこととなった。我々は今回誤差範囲ではあるが、各々の高濃度処理群にいずれも対照より幾分高い値を認めたので、高濃度処理と SCEs を考える上で、さらに日常頻用されている蔗糖を実験に加えた。用いた蔗糖の 50mg/ml の最高用量は、OPP-Na の 1,000 倍濃度であったが、SCEs の観察は可能であった。そして SCEs 頻度は、50mg, 25mg で 7.02, 6.40 とやはり対照よりやや高い値を示した。

## 考 察

SCE に関しては、Evans<sup>10)</sup> が、これまで為された X 線、UV などの物理的要因、また薬物などの化学的要因の種々な材料における研究の結果を総合して、SCE とは何かということを考察しており、その機構の解明が待たれる所である。そして1978年6月に開かれた SCE の有用性に関する日米合同会議についての Wolff<sup>11)</sup> の報告には、SCE が DNA の障害に起因することは疑いなく、その感受性の高さ、簡便さなどからも、哺乳動物レベルで薬物の DNA への作用をはかる一つの有効な指標

となり得るが、薬物のスクリーニングにおいては、今後 SCEs 誘発性の強さの基準を決め、SCEs 陰性である薬物に関してさらにデータを集める必要があると述べられている。今回の我々の試験においても、SCEs 誘発性を試験した薬物が強い変異原性の予想されないものだけに、結果の判定にあたっては、SCEs 誘発性が陰性であると確証された薬物の対照を設定することがどうしても必要であると考えられた。しかしそのような薬物のデータはまだ少く、我々はとりあえず蔗糖を対照として用いて SCEs 誘発試験を試みた。この蔗糖については先に吉田ら<sup>15)</sup>が、CHO-K1 細胞を用いて 40mg/ml, 24 時間処理で染色体異常誘発性は見られないとの報告をしている。結果は最高用量の 50mg, 25mg では、7.02, 6.40 と有意差は無いが無処理対照 5.18 よりやや高い値を示した。しかし 10 および 5mg では用量—作用関係も見られず、無処理対照とほとんど変わらない値であった。この結果からも、TBZ, OPP および OPP-Na の高濃度処理に見られた対照より幾分高い値は、薬物の SCEs 誘発性に関しては特に問題はないものと考えられた。

ところで最近、化学物質等については、発癌性ということと同時にその遺伝的安全性が問題とされるようになり、種々の材料および方法を用いて突然変異原性の検討を行うべきであるとの見知から、SCEs 誘発はその機構は明らかではないが、DNA へ作用する薬物をスクリーニングする手段の一つとして意義あることと思われた。しかし BUDr ラベル法の開発により SCEs が注目されるようになってからまだ日が浅く、種々な薬物についての SCEs 誘発性に関する資料の蓄積もまだ十分ではない。今回我々はその変異原性の疑われる防ばい剤 2 種について SCEs 誘発試験を試み、それらが用量—作用関係も、SCEs の有意な上昇も示さなかったことから、この実験条件下では OPP およびそのナトリウム塩、TBZ には SCEs 誘発性は見られないと判定したが、このような DNA への作用の余り強くないと予想される薬物のスクリーニングの為に、Wolff が述べているように SCEs 陰性の薬物についての資料の蓄積の必要を特に感じた。今回用いた蔗糖はかなりな高濃度であり、対照として十分に満足できるものではなかったかもしれない。我々も今後 SCEs 陰性の薬物について調べていき、SCEs によるスクリーニングをより確実なものとしていく必要が

あると思われる。

### 要 旨

我々はチャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を用い、その遺伝的安全性に疑問が持たれた果実の防ばい剤 2 種、オルトフェニルフェノールとそのナトリウム塩、およびチアベンダゾルについて、SCEs 誘発性を調べることににより DNA への作用を検討した。結果は陽性対照として用いた Mitomycin C が用量—作用関係を持って高い SCEs 誘発性を示したのに対し、これら 2 種の防ばい剤では SCEs 分染可能な最高処理量でも、いずれも対照に比べ有意な増加は見られず、また用量—作用関係も認められなかった。

### 文 献

- 1) Perry, P. and Evans, H. J.: *Nature*, 258, 121, 1975
- 2) Latt, S. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 43, 122, 1973
- 3) Perry, P. and Wolff, S.: *Nature*, 251, 156, 1974
- 4) 縄井寿美子, 吉田誠二, 益淵正典: 東京衛研年報, 29-2, 167, 1978
- 5) 花岡信次郎: 栄養と食糧, 29-1, 66, 1976
- 6) 白須泰彦, 森谷正明, 加藤貴美江: 日本環境変異原学会第 5 回研究発表会, 1976
- 7) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 8) 石舘 基: 昭和 51 年度厚生省がん研究助成金による研究報告集(下), 750, 1976
- 9) 吉田誠二, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 44, 1979
- 10) 小縣昭夫, 吉田誠二, 安藤 弘: 日本環境変異原学会第 7 回研究発表会, 1978
- 11) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一: 東京衛研年報, 29-2, 89, 1978
- 12) 小縣昭夫: Personal communication
- 13) Evans, E. J.: *Chromosomes Today*, 6, 315, 1977
- 14) Wolff, S.: *Mutation Res.*, 64, 53, 1979
- 15) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 162, 1977

## オルトフェニルフェノールナトリウムのマウスを用いた急性毒性試験

小 縣 昭 夫\*, 安 藤 弘\*, 久 保 喜 一\*, 平 賀 興 吾\*

### Acute Oral Toxicity Tests of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) in Mice

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

**Keywords:** 防ばい剤 fungicide, オルトフェニルフェノール・ナトリウム sodium *o*-phenylphenate, 急性経口毒性 acute oral toxicity, マウス mouse

当部では防ばい剤の安全性に関する研究を進めているが、その一環として現在まだ報告のないオルトフェニルフェノール・ナトリウム（以下 OPP-Na と略す）の急性毒性をマウスを用いて検討した。この際 OPP-Na はその製法により品質は様々であるため 2 社の製品を用い比較した。

#### 試験材料ならびに方法

1. 実験動物 CD-1 (ICR) マウス雌雄を日本チャールスリバー(株)より 4 週令時に購入, 8 週令時に発育良好なものを選び試験に供した。

2. 飼育条件 温度 $25 \pm 1^\circ$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 照明午前 8 時～午後 5 時, 換気毎時 10 回の飼育室にて日本クレア製固型飼料 CE-2 および水道水を自由に与え, 試験開始時までアルミケージに 10 匹飼い, 検体投与前日に体重測定後群分けをしプラスチックケージにて 1 匹飼いとした。

3. 試料 オルトフェニルフェノール・ナトリウムは東京化成(株)製 Lot No. AL01 (以下 T-OPP-Na と略す) とダウケミカル社製品 (以下 D-OPP-Na と略す) を用い, 蒸留水にて溶解, 投与容量がすべて 10ml/kg となるように調整し実験に供した。

4. 投与量および投与方法 投与前日の午後 4 時に除餌, 水のみを与え翌日 (投与日) 午前 10 時に体重測定後経口投与を行なった。試料投与量は予備実験として雄マウスで行なった 2 回に及ぶ up and down 法<sup>1)</sup>での結果を参考にし, 雄マウスに T-OPP-Na を 2600mg/kg (A 群), 2364mg (B 群), 2149mg (C 群), 1953mg (D 群), 1776mg (E 群), 1614mg (F 群), 1468mg (G 群) 公比 1.1 と蒸留水 (H 群) 10ml/kg 投与とした。雌マウスでの T-OPP-Na 量は雄マウスでの結果を参考に公比 1.2 で A 群 1792mg, B 群 1493mg, C 群 1244mg, D 群 1037mg, E 群 864mg, F 群 720mg,

G 群 600mg, H 群 0mg/kg (蒸留水 10ml/kg) 投与とした。D-OPP-Na 量は雌雄マウス共に T-OPP-Na の雌マウスの投与量と同量とした。T-OPP-Na では各投与量に 19—21 匹の動物を, D-OPP-Na では 14—15 匹 (対照群のみ 10 匹) を用いた。症状ないし死亡の観察は投与 24 時まで 1 時間毎に, 以降は 1 週間毎日午前 9 時と午後 4 時の 2 回行ない, 各死亡動物は直ちに剖検した。投与 24, 48, 72 時間および 1 週間における死亡率にもとづき Bliss の probit 法<sup>2)</sup> (コンピューター) により用量反応回帰式および LD<sub>50</sub> 値とその 95% 信頼限界を求めた。

#### 試験結果

##### 1. T-OPP-Na

###### (1) 雄マウス

投与後 1 週間までの経時的な死亡数 (累積値) を表 1 上段に示した。検体投与後 1 時より死亡がみられ, 大半は 24 時間以内に致死した。A 群 (2600mg/kg) では全例, 最小用量の G 群 (1468mg/kg) でも 14/19 (73.7%) と高い死亡率を示した。主な症状は, 投与終了直後より A (2600mg) ~ F (1614mg) 群の動物はうずくまり, H (蒸留水) 群を除く各群で吃逆様の異常発声音が聞かれた。この異常音発声動物数は時間の経過と共に減じた。また角膜が白色変化している動物を投与量に関係なく数例認めた。この変化は死亡動物に限らず生き残っている動物にも認められたが, その中には時間経過と共に消失するものもあった。死亡動物は四肢を伸ばした腹臥の状態であり, 剖検の結果はいずれも胃底部 (腺胃) から十二指腸にかけての出血を認めた。他の主要臓器に特記する変化は認めなかった。LD<sub>50</sub> 値等は表 2 上段に示す通りで, 1 週間値は勾配 6.6, LD<sub>50</sub> 1018 (1319~67) mg/kg であった。

###### (2) 雌マウス

雄マウスでの結果から投与量をさげ最大投与量 1792

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



Table 1. Acute Oral Toxicity Test of OPP-Na (Tokyo kasei Co.) in Mice

|        | Dose<br>mg/kg | Number<br>of Mice | Mean<br>B. W. | accumulated No. and (%) of dead mice |          |          |          |          |
|--------|---------------|-------------------|---------------|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
|        |               |                   |               | 12hrs                                | 24hrs    | 48hrs    | 72hrs    | 1week    |
| Male   | A 2600        | 20                | 31.5          | 15(75.0)                             | 20 (100) | 20 (100) | 22 (100) | 20 (100) |
|        | B 2364        | 20                | 31.3          | 9(45.0)                              | 18(90.0) | 19(95.0) | 19(95.0) | 19(95.0) |
|        | C 2149        | 20                | 31.4          | 10(50.0)                             | 18(90.0) | 20 (100) | 20 (100) | 20 (100) |
|        | D 1953        | 21                | 30.9          | 9(42.9)                              | 15(71.4) | 20(95.2) | 21 (100) | 21 (100) |
|        | E 1776        | 20                | 31.1          | 6(30.0)                              | 14(70.0) | 19(95.0) | 19(95.0) | 20 (100) |
|        | F 1614        | 20                | 31.1          | 3(15.0)                              | 12(60.0) | 17(85.0) | 17(85.0) | 17(85.0) |
|        | G 1468        | 19                | 31.4          | 4(21.1)                              | 14(73.7) | 15(78.9) | 16(84.2) | 16(84.2) |
|        | H 0           | 20                | 31.5          | 0                                    | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Female | A 1792        | 20                | 23.7          | 14(70.0)                             | 20 (100) | 20 (100) | 20 (100) | 20 (100) |
|        | B 1493        | 20                | 23.6          | 6(30.0)                              | 15(76.0) | 20 (100) | 20 (100) | 20 (100) |
|        | C 1244        | 20                | 23.4          | 3(15.0)                              | 11(55.0) | 18(90.0) | 19(95.0) | 20 (100) |
|        | D 1037        | 20                | 23.5          | 0                                    | 8(40.0)  | 17(85.0) | 17(85.0) | 18(90.0) |
|        | E 864         | 20                | 23.5          | 1( 5.0)                              | 2(10.0)  | 12(60.0) | 17(85.0) | 18(90.0) |
|        | F 720         | 20                | 23.3          | 0                                    | 0        | 8(40.0)  | 11(55.0) | 14(70.0) |
|        | G 600         | 20                | 23.5          | 0                                    | 1( 5.0)  | 1 (5.0)  | 3(15.0)  | 4(20.0)  |
|        | H 0           | 20                | 23.4          | 0                                    | 0        | 0        | 0        | 0        |

Table 2. Acute Oral Toxicity Test of OPP-Na in Mice

|                          | Time after administration of T-OPP-Na |             |             |            |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|------------|
|                          | 24hrs                                 | 48hrs       | 72hrs       | 1week      |
| Male LD <sub>50</sub>    | 1322                                  | 1258        | 1103        | 1018(a)    |
| Confidence limits of 95% | 1508<br>889                           | 1450<br>782 | 1356<br>323 | 1319<br>67 |
| Female LD <sub>50</sub>  | 1165                                  | 816         | 728         | 683(b)     |
| Confidence limits of 95% | 1264<br>1080                          | 878<br>750  | 789<br>655  | 736<br>613 |

(a) Regression line of Y on X:  $Y=6.6X-14.9$ (b) " "  $Y=9.9X-23.2$ 

Y.....Probit, X.....log Dose

mg/kg とし公比 1.2 で 7 群を設けた。表 1 下段に死亡数と死亡率を示した。高用量群では雄マウスでみられたように投与後 24 時間以内に大半が死亡したが、用量低下とともに死亡発生のピークが 48・72 時へと移り、F (720 mg) 群でも 72 時間で 11/20 (55%)、1 週間で 14/20 (70%) が死亡した。主な症状は雄マウス同様うずくまり、吃逆様の異常発声音、角膜の白色変化が認められた。また死亡状態、剖検結果も雄と同様であった。表 2 下段に LD<sub>50</sub> 値等を示した、1 週間値は勾配 9.9, LD<sub>50</sub> 683 (736~613) mg/kg で雄より勾配大きく LD<sub>50</sub> 値は低かったが推計学的に有意差は認められなかった。

## 2. D-OPP-Na

Table 3. Acute Oral Toxicity Test of OPP-Na (Dow Chemical Co.) in Mice

|        | Dose<br>mg/kg | Number<br>of Mice | Mean<br>B. W. | accumulated No. and (%) of dead mice |          |          |          |          |
|--------|---------------|-------------------|---------------|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
|        |               |                   |               | 12hrs                                | 24hrs    | 48hrs    | 72hrs    | 1week    |
| Male   | A 1792        | 15                | 32.5          | 9(60.0)                              | 13(86.7) | 14(93.3) | 14(93.3) | 14(93.3) |
|        | B 1492        | 14                | 32.4          | 6(42.9)                              | 12(85.7) | 13(92.9) | 14 (100) | 14 (100) |
|        | C 1244        | 15                | 32.5          | 2(13.3)                              | 7(46.7)  | 11(73.3) | 13(86.7) | 13(86.7) |
|        | D 1037        | 15                | 32.2          | 2(13.3)                              | 7(46.7)  | 12(80.0) | 12(80.0) | 13(86.7) |
|        | E 864         | 15                | 32.4          | 1( 6.7)                              | 2(13.3)  | 5(33.3)  | 5(33.3)  | 5(33.3)  |
|        | F 720         | 15                | 32.4          | 0                                    | 0        | 1( 6.7)  | 3(20.0)  | 4(26.7)  |
|        | G 600         | 15                | 32.2          | 0                                    | 1( 6.7)  | 1( 6.7)  | 2(13.3)  | 3(20.0)  |
|        | H 0           | 10                | 33.1          | 0                                    | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Female | A 1792        | 15                | 25.4          | 13(86.7)                             | 14(93.3) | 15 (100) | 15 (100) | 15 (100) |
|        | B 1493        | 15                | 25.3          | 3(20.0)                              | 11(73.3) | 13(86.7) | 13(86.7) | 15 (100) |
|        | C 1244        | 15                | 25.5          | 2(13.3)                              | 11(73.3) | 14(93.3) | 14(93.3) | 14(93.3) |
|        | D 1037        | 15                | 25.5          | 0                                    | 5(33.3)  | 9(60.0)  | 9(60.0)  | 9(60.0)  |
|        | E 864         | 15                | 25.2          | 0                                    | 2(13.3)  | 7(46.7)  | 7(46.7)  | 7(46.7)  |
|        | F 720         | 15                | 25.3          | 1( 6.7)                              | 2(13.3)  | 3(20.0)  | 3(20.0)  | 5(33.3)  |
|        | G 600         | 15                | 25.1          | 0                                    | 0        | 2(13.3)  | 5(33.3)  | 5(33.3)  |
|        | H 0           | 10                | 25.8          | 0                                    | 0        | 0        | 0        | 0        |

Table 4. Acute Oral Toxicity Test of OPP-Na in Mice

|                          | Time after administration of D-OPP-Na |             |            |            |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------|------------|------------|
|                          | 24hrs                                 | 48hrs       | 72hrs      | 1week      |
| Male LD <sub>50</sub>    | 1138                                  | 974         | 896        | 857(a)     |
| Confidence limits of 95% | 1249<br>1042                          | 1071<br>880 | 987<br>805 | 950<br>759 |
| Female LD <sub>50</sub>  | 1112                                  | 904         | 854        | 812(b)     |
| Confidence limits of 95% | 1224<br>1013                          | 998<br>810  | 958<br>742 | 903<br>710 |

(a) Regression line of Y on X:  $Y = 6.7X - 14.5$ (b) " " :  $Y = 6.4X - 13.5$ 

Y.....Probit, X.....log Dose

雌雄マウスとも雌での T-OPP-Na 量と同量を投与し同時に試験を行なった。経時的な死亡数（累積値）、死亡率を表 3 に示した。死亡発生の推移は雌雄マウスともほとんど同様であり、T-OPP-Na 雌よりやや死亡率は低かった。主な症状は T-OPP-Na の場合と大体同様であるが、角膜の白色化は雌雄ともに認められなかった。表 4 に LD<sub>50</sub> 値等を示した。雌雄はほとんど同値を示し、1 週間値は雄勾配 6.7, LD<sub>50</sub> 857 (950~759) mg/kg, 雌勾配 6.4, LD<sub>50</sub> 812 (903~710) mg/kg であった。

### 考 察

オルトフェニルフェノール・ナトリウム (OPP-Na) のマウスにおける急性毒性について検討した。防ばい剤 OPP-Na は製法により品質は様々で、本試験に用いた T-OPP-Na は桃色、D-OPP-Na は淡黄色をしており、実際両製品の純度試験<sup>3)</sup>で、融点 50.5~56.5°と 49~52°、液性 12.38と 11.50、乾燥減量 12.2%と 25%、定量 97.1%と 95.1%の成績が報告されている。この 2 製品のマウス経口 LD<sub>50</sub>、用量致死率曲線の勾配は 1 週間値で T-OPP-Na 雄 1018mg/kg, 6.6, 雌 683mg/kg, 9.9, D-OPP-Na 雄 857mg/kg, 6.7, 雌 812mg/kg 6.4 であった。両製品によるこれらの値の差は実験時の T-OPP-Na において用量の設定に不適切な点のあったこと、実験日の相違等によるものであり、死亡発生の推移、用量反応曲線の勾配も略一致しており本質的には致死作用に差は

ないと考える。一方当部田山<sup>4)</sup>がラットを用い行なった OPP-Na の急性毒性試験で性差を認めている。本試験でも T-OPP-Na の場合、一見性差がみられるが、同時並行して行なったものでなく、用量設定も違うこと、推計学的にも有意でないこと、また D-OPP-Na の場合には全く性差を示さなかったことよりマウスに関しては性差がないものと考えられる。当部田山らによると同時期におけるラット雄の経口 LD<sub>50</sub> は 1000mg 前後としておりマウスと変わらない値を示している。

一般症状では投与直後よりうずくまり、吃逆様異常発声音を認めた以外あまり多くの症状を示さず、死亡したものは四肢を伸張し腹臥位姿勢で、剖検では胃底部（腺胃）から十二指腸にかけての出血であった。多くは OPP-Na の高 pH と刺激性による症状と思われ、フェノールとしての中樞作用を思わせる症状はみられなかった。また T-OPP-Na と D-OPP-Na の差を示したのは T-OPP-Na 投与の場合に用量と関係なく角膜の白色変化するものがみられたが D-OPP-Na 投与の場合は全く認められなかった。角膜の白色変化の原因として最初 OPP-Na がフェノール類似の性質によると考えていたが要因は他に求める必要があろう。

以上マウスにおける経口急性毒性上からは T-OPP-Na と D-OPP-Na を略同一に扱ってよいように思われるが、品質の向上が望まれる。

### 要 旨

マウスを用い 2 社製品のオルトフェニルフェノール・ナトリウム (T-OPP-Na, D-OPP-Na) の急性毒性を行ない、一般症状、死亡数を経時的に観察、LD<sub>50</sub> 値を求めた。

### 文 献

- 1) 伴義雄 他：医薬品研究法, 98, 1968, 朝倉書店
- 2) 佐久間昭：生物検定法, 251, 1964, 東京大学出版会
- 3) 当所食品添加物研究資料
- 4) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾：東京衛研年報, 30-2, 57, 1979

## オルトフェニルフェノールナトリウムのラットを用いた経口急性毒性試験

田山 邦昭\*, 井口 重孝\*, 平賀 興吾\*

### Acute Oral Toxicity of Sodium o-Phenylphenate (OPP-Na) in Rats

KUNIAKI TAYAMA\*, SHIGETAKA IGUCHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノールナトリウム o-phenylphenol sodium salt, 急性毒性 acute toxicity, ラット rat, 防ばい剤 fungicide

#### 緒 言

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 とする)は防ばい剤として、現在世界各国において果実、果菜に使用されている。我国でも最近食品添加物として、かんきつ類に限り使用が許可された。OPP-Na については、動物実験等で毒性学的検討を加えた報告はみられない。そこで当部では、OPP-Na の安全性を各面より検討しているが、その一環として雌雄ラットによる経口急性毒性試験を行った。

はじめの実験の雌ラットにおいて用量-反応関係が成り立たなかったためこれを実験 1 とし、再度実験を行いこれを実験 2 とした。実験 1 および 2 はともに同様の成績を示したので本報告では実験 1 を中心に述べる。

#### 実験材料及び方法

**試料** オルトフェニルフェノールナトリウム (sodium o-phenylphenate tetrahydrate) は Dow Chemical 社製の Dovicide A (Lot No. MM01044-5436) を使用した。

**実験動物:** Fischer 系ラット (Charles River inbred F344/DuCrj) 雌雄を日本チャールスリバー社より 4 週令時に購入、4 週間飼育後 (8 週令時) のものを実験に供した。

**飼育条件:** 室温  $25 \pm 1^\circ$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、照明午前 6 時～午後 5 時、換気毎時 10 回の飼育室で、5 匹ずつステンレス製ケージ (前面・床網: 縦  $40 \times$  横  $25 \times$  高さ  $16.5\text{cm}$ ) に収容、日本クレア製固形飼料 CE-2 と水道水 (細菌ろ過装置経由) を自由に摂取させた。

**投与方法並びに観察:** 投与量、投与匹数は Table 1 に示した。試料の投与容量はすべて  $10\text{ml/kg}$  となるように精製水で溶解調整し、胃ゾンデにて強制経口投与した。投与溶液の pH は  $12.3 \sim 12.9$  であったが、対照には

精製水を同容量与えた。投与前日午後 5 時より除餌 (飲水は自由) し、午前 10 時より投与を開始した。投与後 3 時間目より餌を与えた。

ラットは、投与 1 週間前に体重を層別化し、各群へ無作為的にわり当てた。投与前日朝の体重の平均値  $\pm$  標準偏差は、実験 1 : 雄  $171 \pm 10.0\text{g}$ 、雌  $125 \pm 5.2\text{g}$ 、実験 2 : 雄  $153 \pm 9.0\text{g}$ 、雌  $119 \pm 5.5\text{g}$  であり、絶食後投与開始直前では、実験 1 : 雄  $155 \pm 9.0\text{g}$ 、雌  $113 \pm 4.7\text{g}$ 、実験 2 : 雄  $138 \pm 8.3\text{g}$ 、雌  $107 \pm 5.0\text{g}$  であった。

投与後一般症状の観察ならびに体重の測定を 30 日間にわたって行い、死亡例については剖検し、胃の内容物の pH (東洋濾紙社製 pH 試験紙による) も測定可能なものについて行った。また投与後 3 日間受け皿を設け、便の状態も観察した。LD<sub>50</sub> は Bliss の Probit 法<sup>1)</sup> で算出した。

#### 実験結果

**一般症状:** 投与直後は全般的に咳嗽、洗顔様動作、流涙が認められ、その後鎮静状態になり、外部刺激に対しても反応が鈍くなった。また、鼻や口腔、肛門周囲に赤褐色液が一部のラットにみられた。投与後 24 時間目では、生存ラットは依然として自発運動の低下が続き、一部に呼吸に伴って異常音 (クークー、クシュ) を継続的に発声するものを認めた。48 時間以降は一部のラットを除きかなり元気回復がみられた。

**投与後の時間経過と死亡数**は Table 1 に示した。死亡は雌雄とも 7 時間目から始まり、その大半が雄 24 時間、雌 48 時間以内に死亡した (実験 2 では死亡時期が全般的に早期に起り、雌雄とも 2 時間目から始まり、雄 12 時間、雌 48 時間以内にその大半が死亡した)。その後は 19 日までに散発的に死亡した。この死亡頻発期の死亡直前の症状は、静止状態で腹臥姿勢をとり、閉眼し、呼吸数の低下が認められた。

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Time Course of Numbers of Dead Rats after Administration of OPP-Na

| Experimental<br>No. | Sex    | Initial<br>Body<br>Weight <sup>1)</sup> | Dose<br>mg/kg | No. of<br>Rats | Days |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | Total | Mort-<br>ality<br>(%) |
|---------------------|--------|-----------------------------------------|---------------|----------------|------|----|----|----|-----|-----|----|-----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|-------|-----------------------|
|                     |        |                                         |               |                | 0    | 6  | 12 | 24 | 1   | 2   | 3  | 4   | 5  | 6 | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 18 |       |                       |
| Exp. 1              | Male   | 155±9                                   | 1460          | 10             |      | 2  | 7  | 1  |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 10 | 100   |                       |
|                     |        |                                         | 1330          | 10             |      | 1  | 2  | 2  |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 5  | 50    |                       |
|                     |        |                                         | 1210          | 20             |      | 1  | 9  | 1  |     | 1*  |    |     |    |   |    |    |    |    | 1* |    | 13 | 65    |                       |
|                     |        |                                         | 1100          | 10             |      | 1  | 2  |    | 1   |     |    | 1°  |    |   | 1* |    |    |    |    |    | 6  | 60    |                       |
|                     |        |                                         | 1000          | 10             |      | 1  | 1  |    | 1   |     |    | 1*  |    |   |    |    |    |    |    |    | 4  | 40    |                       |
|                     |        |                                         | control       | 10             |      |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 0     | 0                     |
|                     | Female | 133±5                                   | 1040          | 10             |      |    | 3  | 2  | 1   |     | 1  |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 7  | 70    |                       |
|                     |        |                                         | 860           | 18             |      |    | 1  | 1  |     | 1*  |    |     | 1* |   | 1* | 1* |    |    |    |    | 6  | 33    |                       |
|                     |        |                                         | 720           | 10             |      | 1  | 1  |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 2  | 20    |                       |
|                     |        |                                         | 600           | 10             |      |    | 1  | 1  |     |     |    | 2** | 1* |   |    |    | 1* |    |    |    | 6  | 60    |                       |
|                     |        |                                         | 500           | 10             |      |    | 1  | 3* |     |     |    | 1*  |    |   |    |    |    |    |    |    | 5  | 50    |                       |
|                     |        |                                         | control       | 10             |      |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 0     | 0                     |
| Exp. 2              | Male   | 138±8                                   | 1450          | 10             |      | 3  | 5  |    | 1   |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 9  | 90    |                       |
|                     |        |                                         | 1260          | 10             |      | 2  | 7  |    | 1°  |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 10 | 100   |                       |
|                     |        |                                         | 1096          | 10             |      |    | 5  |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    | 5  | 50    |                       |
|                     |        |                                         | 953           | 10             |      |    |    | 1  | 1   |     |    |     |    |   |    |    |    |    | 1* |    | 3  | 30    |                       |
|                     |        |                                         | 829           | 10             |      |    |    |    |     |     |    | 1*  |    |   |    |    |    |    |    |    | 1  | 10    |                       |
|                     |        |                                         | control       | 10             |      |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 0     | 0                     |
|                     | Female | 107±5                                   | 1200          | 10             |      | 2  | 3  | 3  | 2   |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 10    | 100                   |
|                     |        |                                         | 1000          | 10             |      |    |    | 5  | 1°  |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 6     | 60                    |
|                     |        |                                         | 830           | 10             |      |    |    |    | 1   |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 1     | 10                    |
|                     |        |                                         | 694           | 10             |      | 1° |    |    | 2°° |     | 1° |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 4     | 40                    |
|                     |        |                                         | 578           | 10             |      |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 0     | 0                     |
|                     |        |                                         | 482           | 10             |      |    |    | 1  | 1°  | 2** |    |     |    |   |    |    |    |    |    |    |    | 4     | 40                    |
| control             | 10     |                                         |               |                |      |    |    |    |     |     |    |     |    |   |    |    |    |    |    | 0  | 0  |       |                       |

1) overnight fasted B.W., Mean ± S.D. (g)

\* These rats showed abdominal distention after administration of OPP-Na. At autopsy, they showed marked dilatation in gastrointestinal tract by gas.

° These rats didn't show abdominal distention after administration of OPP-Na. At autopsy, they showed dilatation in gastrointestinal tract by gas.

排便は投与濃度と関連性がみられ、投与後12時間目は低濃度群だけ認められ、24時間目では中濃度群にも認められた。中には形状不整の黒褐色便あるいは赤褐色液状物が散見された。48時間以降は各濃度群とも排便が多く観察された。

投与後24時間以降に、外見上腹部がゴム球の様に張ったラットが観察された。一見肥満しているようだが、体重は非常に小さかった。この腹部膨満ラットは低濃度群で、しかも雌に多く認められた（このときすでに高濃度群の多くは死亡している）。投与後24時間目から72時間

頃までがその発生時期で、その後膨満状態のまま19日以内に散発的に死亡したもの（Table 1 \* 印）と投与後10日以降、膨満が消失し生存したものとに分かれた。72時間以降散発的に死亡したラットのほとんどは、この腹部膨満が観察されたものであった。腹部膨満ラットの死亡直前の症状は、静止状態で閉眼し、チアノーゼを呈し、さらに肛門部に糞塊等が認められた。

剖検所見：どの投与群でも、胃腸管内の出血性の変化が著明であった。すなわち投与後比較的初期（12時間目まで）に死亡した全ラットの胃は、赤褐色液（pH 8~9）

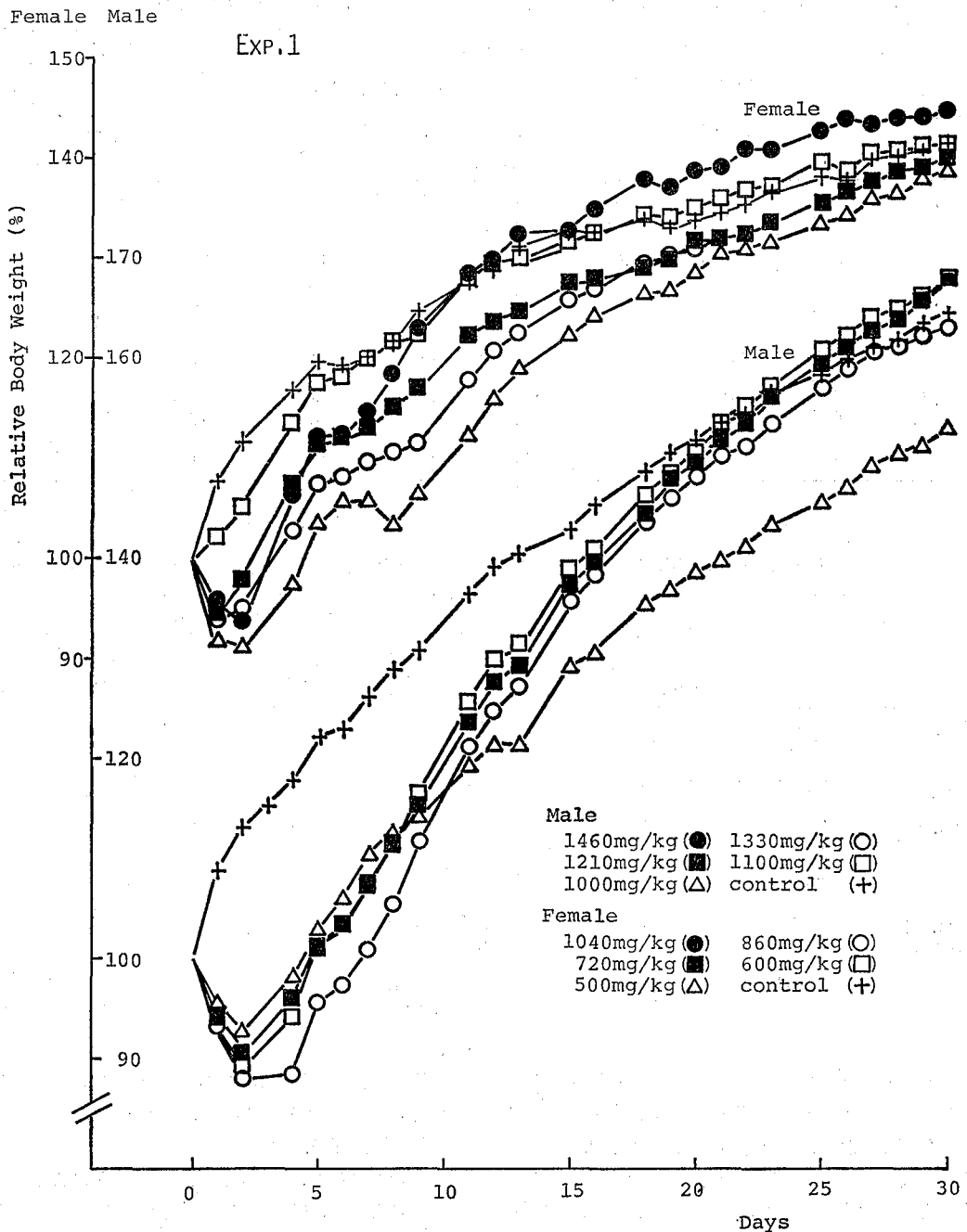


Fig. 1. Relative Body Weight Changes of Survival Rats Administered with OPP-Na as Compared with Initial Body Weight —Mean Values

が多量に貯留し、そのため前胃部は拡張し菲薄化していた。また潰瘍も数例認められたが、表在粘膜の剥離と菲薄化のため、死亡時期の経過とともに陥入部が確認でき

なかった。腺胃部では、血餅と思われる暗赤色のタール様物が全体に付着していた (Fig. 3)。また腸管内は少し赤味を帯びていた〔実験2では実験1に比べ、死亡が5

Table 2. Numbers of Rats Classified by Patterns of Body Weight Changes

| Experimental No.  | Sex    | No. of Rats Examined | Nonsurvivor |                          |    |    | Survivor |                          |    |
|-------------------|--------|----------------------|-------------|--------------------------|----|----|----------|--------------------------|----|
|                   |        |                      | Total       | Patterns of B. W. Change |    |    | Total    | Patterns of B. W. Change |    |
|                   |        |                      |             | Death within 24 hrs.     | \  | \\ |          | V                        | W  |
| Exp. 1            | Male   | 60                   | 38          | 27                       | 8  | 3  | 22       | 21                       | 1  |
|                   | Female | 58                   | 26          | 8                        | 10 | 8  | 32       | 28                       | 4  |
|                   | Total  | 118                  | 64          | 35                       | 18 | 11 | 54       | 49                       | 5  |
| Exp. 2            | Male   | 50                   | 28          | 23                       | 4  | 1  | 22       | 21                       | 1  |
|                   | Female | 60                   | 25          | 15                       | 10 | 0  | 35       | 30                       | 5  |
|                   | Total  | 110                  | 53          | 38                       | 14 | 1  | 57       | 51                       | 6  |
| Exp. 1+<br>Exp. 2 | Male   | 110                  | 66          | 50                       | 12 | 4  | 44       | 42                       | 2  |
|                   | Female | 118                  | 51          | 23                       | 20 | 8  | 67       | 58                       | 9  |
|                   | Total  | 228                  | 117         | 73                       | 32 | 12 | 111      | 100                      | 11 |

Table 3. Numbers of Rats with Abdominal Distention Classified by Patterns of Body Weight Changes

| Experimental No.  | Sex    | No. of Rats with Abdominal Distention | Patterns of B. W. Change |   |    |          |   |   |
|-------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|---|----|----------|---|---|
|                   |        |                                       | Nonsurvivor              |   |    | Survivor |   |   |
|                   |        |                                       | Total                    | \ | \\ | Total    | V | W |
| Exp. 1            | Male   | 5                                     | 4                        | 1 | 3  | 1        | 0 | 1 |
|                   | Female | 11                                    | 10                       | 2 | 8  | 1        | 0 | 1 |
|                   | Total  | 16                                    | 14                       | 3 | 11 | 2        | 0 | 2 |
| Exp. 2            | Male   | 3                                     | 2                        | 1 | 1  | 1        | 0 | 1 |
|                   | Female | 6                                     | 2                        | 2 | 0  | 4        | 0 | 4 |
|                   | Total  | 9                                     | 4                        | 3 | 1  | 5        | 0 | 5 |
| Exp. 1+<br>Exp. 2 | Male   | 8                                     | 6                        | 2 | 4  | 2        | 0 | 2 |
|                   | Female | 17                                    | 12                       | 4 | 8  | 5        | 0 | 5 |
|                   | Total  | 25                                    | 18                       | 6 | 12 | 7        | 0 | 7 |

時間早く起り、初発死亡例の胃内容物は、懸濁状の灰白色あるいは黄土色 (pH 9~11) を呈し、腸管ではほとんど変化がみられなかった点が異なっていた]。

死亡が多発した時期 (12~24時間) での胃内容物は、黒褐色あるいは赤褐色 (pH 8) を呈し、腺胃部のタール様付着も部分的となり、表面が溶かされているような糜爛が観察された。また腸管内も赤褐色液状物がみられ、腸管が赤味を帯びていた。

腹部膨満が観察されその後散発的 (24時間~19日) に死亡した全例は、胃および腸管全域にガスが充満し、容積膨大とともに壁が菲薄化し透視可能で、内容物もほとんど認められなかった (Fig. 4, 5)。

腹部膨満が観察されず (24時間~5日) に死亡した例でも、胃腸管内にガスの貯留を認めたものもあった (Table 1。印)。

(なおここで、ガスの貯留は死後変化によっても現れる<sup>2)</sup> ことから、剖検時に胃腸管内にガスを認めても、生存中腹部膨満を認めたものだけを腹部膨満ラットとした。)

他の臓器では、膀胱内に投与後24時間以内の死亡例のすべてに灰色あるいは黒褐色物を認めた。また胸腺の点状出血、肺の斑状出血、そして腎臓の皮髄境界部、副腎、卵巣、浅頸部リンパ節が赤くなったものが認められたが、投与量・死亡時期の相違による関連性はなかった。

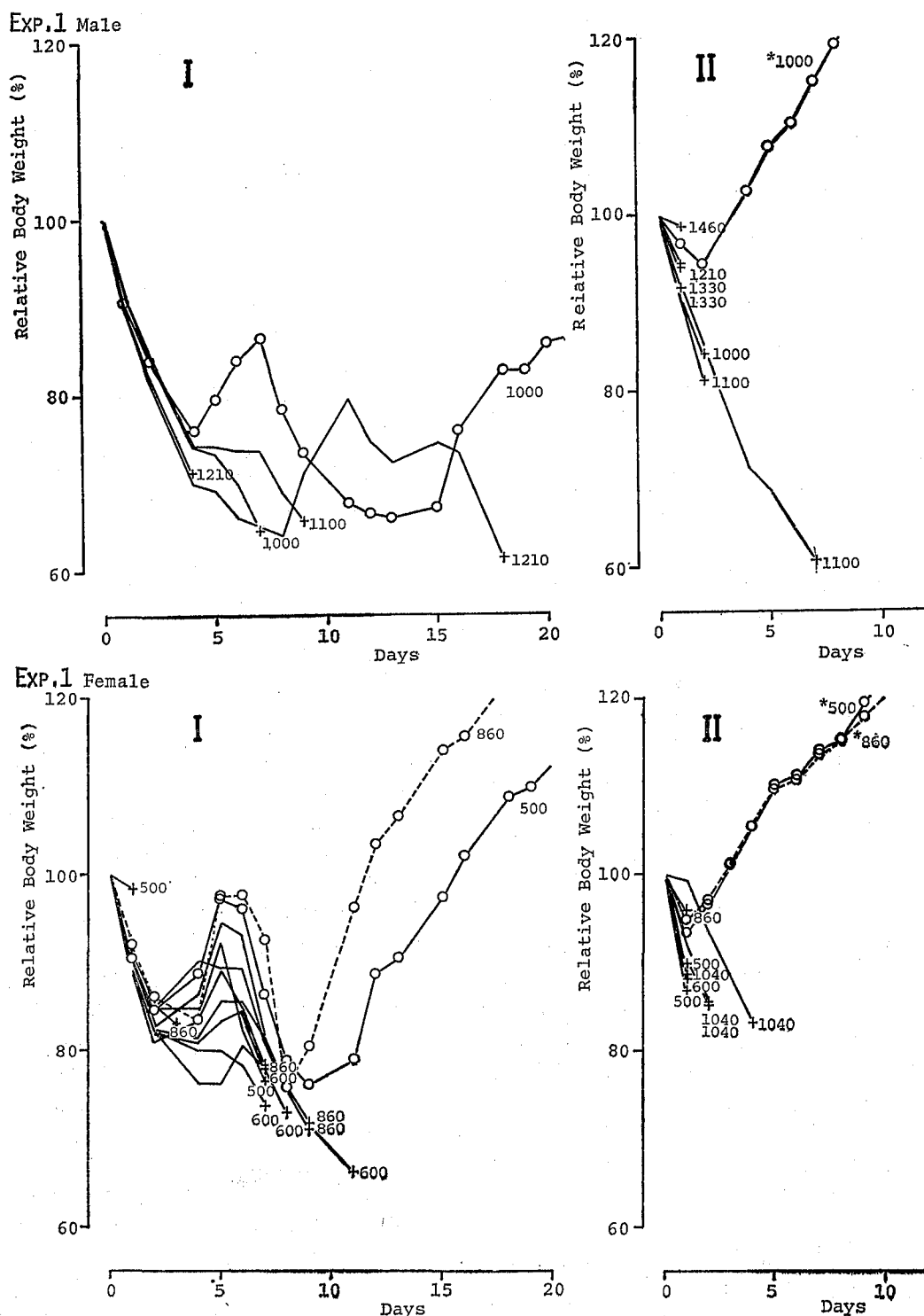


Fig. 2. Relative Body Weight Changes of Rats Administered with OPP-Na  
 — Individual Values (\* Mean Values)  
 I Rats with Abdominal Distention II Rats without Abdominal Distention  
 —+— Nonsurvivors —o— Survivors

Table 4. Lethal Dose of OPP-Na in Rats Calculated by Probit Method

|        |                            | 12hrs.                            | 24hrs.                                | 48hrs.                  | 72hrs.                  | 1 wk.                   | 2 wks.                  |
|--------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Exp. 1 | Male                       |                                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|        | LD <sub>50</sub> mg/kg     | —                                 | 1251 <sup>1)</sup>                    | 1197                    | 1183                    | 1157                    | 1096                    |
|        | Confidence Limit<br>P=0.05 | —<br>( <i>g</i> >1) <sup>2)</sup> | 1139—1458                             | 1108—1286               | 1070—1284               | 1015—1254               | 576—1214                |
|        | Regression Line            | —                                 | Y=9.38X<br>-24.1 <sup>3)</sup>        | Y=12.9X<br>-34.6        | Y=11.0X<br>-28.9        | Y=10.4X<br>-26.9        | Y=7.58X<br>-18.0        |
|        | Female                     |                                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|        | LD <sub>50</sub> mg/kg     | —                                 | —                                     | —                       | —                       | —                       | —                       |
| Exp. 2 | Male                       |                                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|        | LD <sub>50</sub> mg/kg     | 1154                              | 1136                                  | 1103                    | 1085                    | 1065                    | 1049                    |
|        | Confidence Limit<br>P=0.05 | 1068—1244                         | 1046—1233                             | 1012—1197               | 1006—1166               | 977—1155                | 957—1141                |
|        | Regression Line            | Y=15.3X<br>-41.9                  | Y=13.7X<br>-36.7                      | Y=13.2X<br>-35.2        | Y=16.0X<br>-43.7        | Y=13.4X<br>-35.4        | Y=12.6X<br>-33.1        |
|        | Female                     |                                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|        | LD <sub>50</sub> mg/kg     | —                                 | ( $\chi_0^2 > \chi^2$ ) <sup>4)</sup> | ( $\chi_0^2 > \chi^2$ ) | ( $\chi_0^2 > \chi^2$ ) | ( $\chi_0^2 > \chi^2$ ) | ( $\chi_0^2 > \chi^2$ ) |
|        | Confidence Limit<br>P=0.05 | —<br>( <i>g</i> >1)               | —                                     | —                       | —                       | —                       | —                       |
|        | Regression Line            | —                                 | —                                     | —                       | —                       | —                       | —                       |

1) Expressed as mg of Sodium *o*-Phenylphenate tetrahydrate (Dowicide A)2) *g*: *g*-criterion 3) Y: probit X: log-dose 4) heterogeneity

**体重の推移**: 投与直前の体重を100とした生存ラットの平均増加率をFig. 1に示した。対照群雌雄および1,000 mg/kg 群雄を除き各濃度群とも1~2日目まで下降し、その後上昇に向った。ただし500mg/kg 群雌では、8日前後に一時体重減少がみられた。そこで個別に増加率を検討したところ、その変動には大きく分けて2つの型式、すなわち体重減少後直線的に回復を示すV型と、最初はV型と同じであるが6~8日頃にかけて再び体重が減少しその後直線的に回復を示すW型があることが判明した。このことを各濃度群についても調べた結果、W型が実験1で5例、実験2で6例あった。また24時間以降死亡したラットの個々についても増加率の変動を検討したところ、比較的初期に死亡する直下降型と、初めは直下降型と同じ経過をたどりその後一時上昇し、再び死に至るまで下降する裏返しN型(以下これを逆N型と呼ぶ)の2型式があることが判明した。逆N型は実験1で11例、実験2で1例認められた(Fig. 2, Table 2)。

**体重推移と腹部膨満発生**: 体重増加率変動型式と腹部膨満の発生との間に関連性があるようにみえたので、膨満の発生したもの、しないもので体重増加率曲線について検討してみた(Fig. 2)。その結果、腹部膨満生存ラ

ットはW型、死亡ラットは大半が逆N型であった。これらの型式別匹数をTable 3に示した。すなわち、腹部膨満が観察され生き残ったラットはすべてW型を示し、逆N型で死亡したラットはすべてが腹部膨満が観察されたとと言える。

**LD<sub>50</sub> 値**: ほとんどすべての死亡が2週間以内に起っている(Table 1参照)ことから、2週間までのLD<sub>50</sub>を Bliss の Probit 法で算出し、その95%信頼限界、回帰式も併せてTable 4に示した。雌では2週間目のLD<sub>50</sub>が、2回の実験でそれぞれ1,096mg/kg, 1,049mg/kgとなった。雌では用量-反応関係が認められず、LD<sub>50</sub>は求められなかった。また雄では回帰式の勾配が、時間の経過とともに小さくなる傾向を示し、信頼限界も広がった。なお投与したOPP-Na (Dowicide A)は水分子を含んでおり、それを4H<sub>2</sub>Oと仮定し、これを除いたLD<sub>50</sub>は雄で685mg/kg (95%信頼限界363-759), 656mg/kg (598-713)となる。

#### 考 察

OPP-Na のラットを用いた2回にわたる経口急性毒性試験の結果、LD<sub>50</sub>は雄で1,096mg/kg と1,049mg/kgであったが、雌ではいずれも用量-反応関係が得られず



算出できなかった。この実験に平行して当部小縣ら<sup>3)</sup>が行ったマウスでの  $LD_{50}$  (経口 1 週間値) は、雄 857mg/kg, 雌 812mg/kg で、性差なく雌においてもきれいな用量-反応関係を得ている。一方 Hodge ら<sup>4)</sup>は OPP の成熟雄ラットでの  $LD_{50}$  (経口) を、2,700mg/kg としているが、症状についての詳細は述べておらず、雌についての報告はない。

雌で用量-反応関係が得られなかったことに関連あると考えられる現象として、死亡が12時間目から2日目までをピークとするものと、7日目から11日目までをピークとして発現するものとの二峰性が認められた。このうち第2ピーク時の死亡ラットは低濃度群に多く、また雌で顕著であった。すなわちこの死亡発現には、薬物の1次作用と、その結果による2次的な作用あるいは別の因子による遅発作用が存在するように思われる。第2ピーク時に死亡したラットと、腹部膨満ラットとがよく一致していたことから、この遅発作用は胃腸管麻痺である可能性も考えられる。2回目の実験では、二峰性が明瞭でなかったが、これは遅発作用が1次作用に近接したためと推定した。いずれにしても2回の実験で再現性が得られたことは、この遅発作用が低濃度でも働き、雌と雄では感受性が異なるためと考えられる。

腹部膨満ラットの体重増加変動において、死亡例では初期に下降状態のまま死亡する直下降型と、直下降型と同じ経過をとりその後一時上昇し再び死に至るまで下降する逆N型の2つの変動型式があり、生存例ではすべてが逆N型と同じ経過をとりその後直線的に上昇するW型の変動を示すことが判明した。腹部膨満が初めの下降状

態の時点で観察されたことから、直下降型では1次作用が強く出たため比較的初期に死亡したことが考えられ、逆N型、W型では一時回復はしたが、その後何らかの遅発作用により生死を分けたと言える。体重の変動から見れば、第2番目の下降時期である5日目頃が遅発作用の発現と一致しているように思われる。

#### ま と め

①オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の経口急性毒性を Fischer 系ラット雌雄 (8 週令, 1 夜絶食) を用い、30 日間にわたり、2 回観察した。

②症状は咳嗽、洗顔様動作、流涙、鎮静様状態、閉眼、異常呼吸音、その他特異なものとして一部に腹部膨満が2日以降に出現し、死亡は大多数が12-24時間をピークに48時間以内に起り胃腸粘膜の出血を伴っていた。

③50%致死量 (14日) は雄で1,096mg/kg, 1,049mg/kg, 雌ではいずれも用量-反応関係が得られなかった。

④雌ラットにおける用量-反応関係の不成立についての考察を加えた。

#### 文 献

- 1) Bliss, C. I.: *Quart. J. Pharm. and Pharmacol.*, 11, 192, 1938
- 2) 阿部幸恵, 矢野範男, 湯澤勝廣, 長澤明道, 藤井孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 180, 1978
- 3) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 54, 1979
- 4) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J. Jr., Spencer, H. C., and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 99, 202, 1952

**Explanation of Figures**

Fig. 3. Stomach of a rat administered with OPP-Na for 7 hours, showing hemorrhage in glandular stomach and ulcer in thinned forestomach.

Fig. 4. Marked distention of abdomen of a rat

administered with OPP-Na.

Fig. 5. Marked dilatation in gastrointestinal tract of the rat shown in Fig. 4 by gaseouse distention.

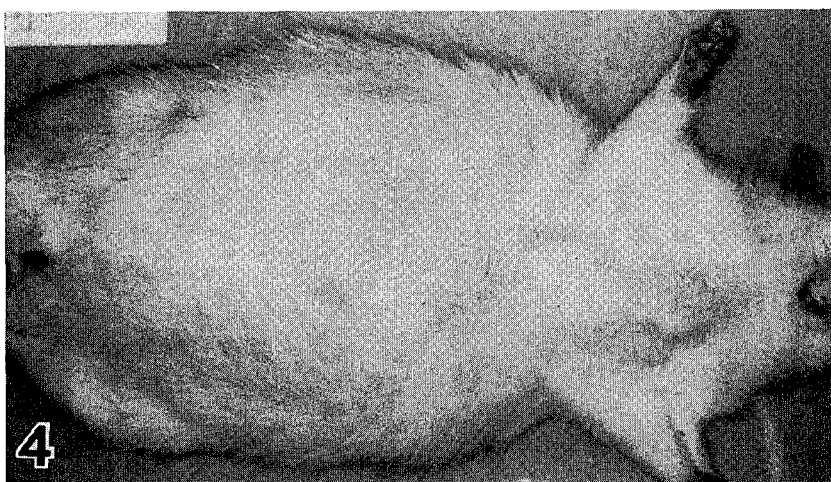
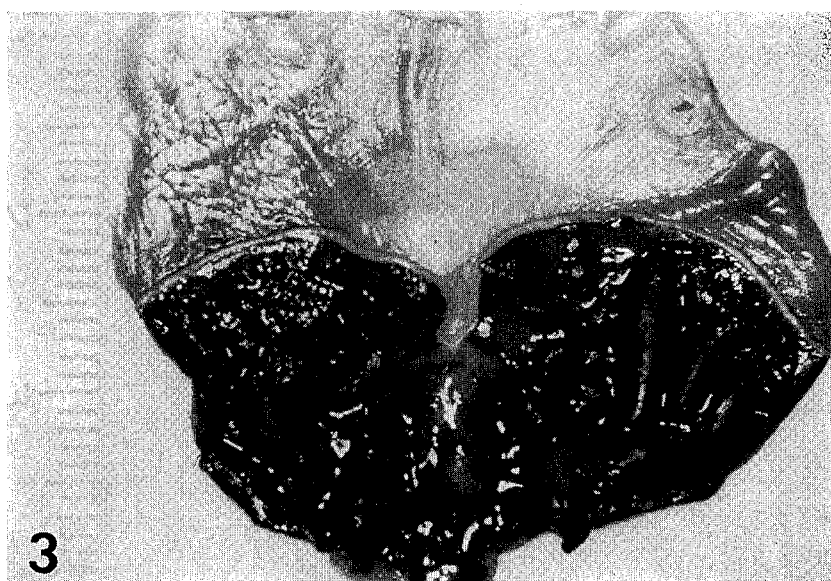


表 1. 体 重 (雄)

| 実験日数 | 0%(対照)                                              | 4.000%                       | 2.000%                     | 1.000%                     | 0.500%                     | 0.250%                     | 0.125%                     |
|------|-----------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| -3   | 72.3±1.1<br>(82.3±0.9)                              | 72.6±2.2<br>(83.8±1.8)       | 72.9±1.3<br>(83.8±0.9)     | 72.9±1.1<br>(84.2±1.1)     | 72.3±1.1<br>(83.8±1.3)     | 72.5±1.1<br>(83.9±1.7)     | 73.5±1.5<br>(83.5±1.9)     |
| 0    | 86.3±2.2 <sup>b)</sup><br>(100.0±0.0) <sup>b)</sup> | 86.2±3.5<br>(100.0±0.0)      | 86.4±2.1<br>(100.0±0.0)    | 86.1±1.9<br>(100.0±0.0)    | 85.8±2.5<br>(100.0±0.0)    | 85.8±2.0<br>(100.0±0.0)    | 87.7±2.2<br>(100.0±0.0)    |
| 4    | 101.1±3.3<br>(116.7±2.5)                            | 81.0±5.6*<br>(93.5±4.4)*     | 94.9±3.8*<br>(109.3±3.1)*  | 99.6±3.1<br>(115.1±2.2)    | 99.5±3.4<br>(115.4±2.4)    | 99.7±3.6<br>(115.8±2.3)    | 102.1±2.9<br>(115.8±1.8)   |
| 7    | 112.9±6.0<br>(130.3±5.3)                            | 88.3±6.4*<br>(102.0±4.8)*    | 108.2±5.1<br>(124.7±4.4)*  | 109.3±6.0<br>(126.3±4.9)   | 109.8±6.1<br>(127.7±6.0)   | 109.8±6.7<br>(127.4±5.7)   | 112.5±5.4<br>(127.7±6.2)   |
| 11   | 121.6±6.0<br>(140.4±5.8)                            | 96.7±7.7*<br>(111.5±6.3)*    | 116.9±4.7<br>(134.7±3.3)*  | 120.6±6.4<br>(139.5±6.4)   | 119.2±7.5<br>(138.4±6.3)   | 119.3±5.3<br>(138.6±3.8)   | 123.9±4.3<br>(140.9±4.1)   |
| 14   | 130.6±6.7<br>(150.8±5.8)                            | 103.8±6.5*<br>(119.9±5.6)*   | 124.1±5.8*<br>(143.2±4.8)* | 128.3±6.5<br>(148.5±7.3)   | 127.5±9.5<br>(148.0±8.1)   | 128.8±5.3<br>(149.7±3.9)   | 133.9±7.6<br>(152.1±6.9)   |
| 21   | 148.4±10.9<br>(171.5±11.1)                          | 119.2±10.5*<br>(137.8±10.0)* | 141.1±7.7<br>(162.8±7.4)*  | 145.6±9.2<br>(168.8±11.5)  | 144.7±15.4<br>(168.0±14.8) | 144.8±8.5<br>(168.2±7.4)   | 150.7±11.9<br>(171.3±11.7) |
| 25   | 156.5±14.7<br>(180.7±15.4)                          | 126.2±14.2*<br>(145.8±14.7)* | 149.8±7.5<br>(172.9±8.1)   | 154.3±11.5<br>(178.9±15.1) | 151.6±21.2<br>(175.9±21.3) | 152.3±10.7<br>(177.0±9.6)  | 159.3±14.8<br>(181.1±14.7) |
| 28   | 163.7±19.0<br>(189.3±20.1)                          | 130.6±15.4*<br>(150.9±15.6)* | 156.3±9.9<br>(180.4±10.5)  | 159.2±14.7<br>(184.8±19.1) | 158.4±20.7<br>(183.9±20.7) | 160.1±12.3<br>(186.0±11.2) | 167.9±15.1<br>(190.8±15.0) |
| 35   | 175.3±26.5<br>(202.4±28.8)                          | 143.5±23.5*<br>(165.7±24.1)* | 171.8±14.9<br>(198.5±17.2) | 173.2±17.8<br>(200.8±23.2) | 167.7±29.9<br>(194.5±30.8) | 175.0±20.9<br>(203.2±21.4) | 183.2±19.6<br>(208.1±20.4) |
| 39   | 182.9±31.1<br>(211.4±34.0)                          | 151.4±28.8*<br>(174.6±29.8)* | 180.8±17.7<br>(209.0±20.2) | 181.7±20.1<br>(210.9±26.0) | 177.8±33.2<br>(206.3±35.1) | 186.5±26.1<br>(216.5±27.3) | 193.0±21.8<br>(219.5±23.2) |
| 42   | 190.7±32.8<br>(220.3±35.9)                          | 157.3±32.6*<br>(181.3±33.7)* | 189.5±19.4<br>(218.9±22.3) | 188.2±21.7<br>(218.4±28.1) | 183.1±35.5<br>(212.3±37.8) | 194.3±27.3<br>(225.6±28.4) | 199.9±23.8<br>(227.4±25.9) |
| 49   | 199.5±36.0<br>(230.3±35.9)                          | 165.1±39.5*<br>(190.2±41.7)* | 203.8±24.9<br>(235.4±29.1) | 199.2±26.2<br>(231.3±33.5) | 190.2±41.7<br>(220.8±45.3) | 205.0±32.2<br>(238.1±33.9) | 212.8±26.2<br>(242.3±28.9) |
| 53   | 205.4±37.5<br>(237.1±39.1)                          | 172.3±45.7<br>(198.4±48.6)   | 210.5±26.6<br>(243.2±30.9) | 205.7±27.4<br>(239.1±35.1) | 197.4±41.9<br>(229.4±45.7) | 212.7±36.2<br>(247.0±39.1) | 220.0±26.1<br>(250.4±29.2) |
| 56   | 213.7±37.5<br>(246.8±40.9)                          | 177.1±47.4<br>(204.0±50.3)*  | 216.7±27.0<br>(250.4±31.5) | 213.0±26.2<br>(247.3±33.8) | 202.9±42.6<br>(235.8±46.6) | 219.4±38.3<br>(254.7±41.6) | 227.2±28.4<br>(258.7±31.9) |
| 63   | 224.0±36.0<br>(258.7±38.7)                          | 185.8±51.6<br>(214.0±55.1)*  | 227.3±29.3<br>(262.6±34.0) | 224.4±28.2<br>(260.7±36.1) | 212.9±46.7<br>(247.3±51.8) | 229.8±42.6<br>(266.9±46.8) | 237.5±27.6<br>(270.5±31.4) |
| 67   | 232.9±36.0<br>(269.0±38.9)                          | 192.8±52.5<br>(222.1±56.1)*  | 234.6±28.3<br>(271.1±32.8) | 231.6±29.0<br>(269.2±37.2) | 220.3±47.7<br>(255.8±53.1) | 237.3±45.9<br>(275.5±50.7) | 245.5±29.9<br>(279.6±34.2) |
| 77   | 248.5±34.8<br>(287.1±38.0)                          | 205.4±58.2<br>(236.6±63.1)*  | 251.1±29.0<br>(290.3±33.7) | 245.7±26.6<br>(285.6±34.8) | 235.9±50.0<br>(274.3±56.0) | 250.4±48.6<br>(291.0±53.7) | 257.2±29.3<br>(292.9±33.7) |
| 81   | 254.5±32.5<br>(294.3±35.1)                          | 210.7±58.9*<br>(242.8±64.0)* | 252.4±29.2<br>(291.4±31.7) | 252.6±24.9<br>(293.4±33.0) | 241.1±48.7<br>(280.3±54.5) | 256.4±49.3<br>(297.8±54.7) | 264.2±29.5<br>(301.1±33.9) |
| 84   | 259.0±31.3<br>(299.4±34.0)                          | 216.4±60.1<br>(249.5±65.5)*  | 257.6±28.6<br>(297.7±31.3) | 256.8±24.2<br>(298.2±31.9) | 245.9±48.7<br>(285.7±54.2) | 261.2±49.1<br>(303.3±54.3) | 268.2±29.1<br>(305.5±33.4) |
| 88   | 261.7±31.2<br>(302.7±33.8)                          | 217.7±59.6*<br>(251.2±65.0)* | 261.0±26.5<br>(301.7±29.3) | 259.7±22.6<br>(301.7±30.2) | 249.8±46.6<br>(290.3±51.6) | 264.3±49.3<br>(306.9±54.5) | 271.2±28.5<br>(308.9±32.7) |

(注) 値は10例平均±SD 1) 絶対重量(g) 2) 体重増加率=(体重/実験0日体重)×100 a) 実験週数

\* 対照群と比較してP&lt;0.05

表 2. 体 重 (雌)

| 実験日数                   | 0%(対照)                                              | 4.000%                       | 2.000%                       | 1.000%                     | 0.500%                       | 0.250%                     | 0.125%                     |
|------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| -3                     | 68.5±1.4<br>(86.4±1.5)                              | 68.3±1.7<br>(85.5±1.0)       | 67.9±1.7<br>(87.4±1.3)       | 68.4±0.9<br>(86.1±1.3)     | 67.9±2.2<br>(86.1±1.8)       | 68.2±1.2<br>(87.5±1.9)     | 68.4±1.5<br>(85.6±2.3)     |
| 0<br>(0) <sup>a)</sup> | 78.9±2.1 <sup>1)</sup><br>(100.0±0.0) <sup>2)</sup> | 79.6±2.5<br>(100.0±0.0)      | 77.5±2.9<br>(100.0±0.0)      | 79.2±1.3<br>(100.0±0.0)    | 78.3±2.6<br>(100.0±0.0)      | 77.7±2.1<br>(100.0±0.0)    | 79.4±1.7<br>(100.0±0.0)    |
| 4                      | 90.3±2.6<br>(113.9±2.6)                             | 73.6±5.8*<br>(92.0±5.9)*     | 82.8±9.9*<br>(106.1±10.4)*   | 90.7±2.1<br>(113.9±1.9)    | 89.3±3.1<br>(113.7±2.2)      | 89.0±3.3<br>(114.1±2.7)    | 89.9±3.6<br>(112.7±2.9)    |
| 7<br>(1)               | 98.7±5.1<br>(124.6±4.6)                             | 81.9±4.3*<br>(102.5±4.4)*    | 91.3±6.9*<br>(117.2±6.1)*    | 97.8±3.8<br>(122.9±4.4)    | 94.4±3.6*<br>(120.1±3.0)*    | 95.7±5.8<br>(122.6±5.2)    | 98.0±3.5<br>(122.8±3.0)    |
| 11                     | 106.7±4.5<br>(134.8±4.3)                            | 89.1±5.5*<br>(111.5±5.1)*    | 98.5±6.6*<br>(126.5±4.5)*    | 106.8±3.1<br>(134.3±2.8)   | 103.8±3.5<br>(132.2±2.9)     | 105.6±4.6<br>(135.5±3.7)   | 106.6±4.6<br>(133.7±3.7)   |
| 14<br>(2)              | 113.2±4.4<br>(143.0±4.2)                            | 93.6±5.9*<br>(117.2±6.0)*    | 103.7±6.5*<br>(133.3±3.7)*   | 112.7±4.0<br>(141.7±4.3)   | 109.5±4.0<br>(139.4±3.5)*    | 111.6±5.5<br>(143.1±4.5)   | 112.4±5.2<br>(141.0±4.0)   |
| 21<br>(3)              | 123.8±3.8<br>(156.6±4.5)                            | 104.4±9.5*<br>(130.5±9.7)*   | 112.5±7.4*<br>(144.5±6.0)*   | 123.0±5.5<br>(154.7±5.8)   | 118.4±4.9*<br>(150.8±5.3)*   | 121.8±6.5<br>(156.3±5.5)   | 123.7±6.3<br>(155.2±6.5)   |
| 25                     | 129.2±4.2<br>(163.2±5.9)                            | 109.0±10.5*<br>(136.3±10.8)* | 116.5±8.2*<br>(149.8±6.8)*   | 127.1±6.8<br>(160.0±7.3)   | 121.9±4.6*<br>(155.3±5.6)*   | 126.8±7.6<br>(162.6±6.9)   | 128.6±7.8<br>(161.5±8.1)   |
| 28<br>(4)              | 132.4±4.8<br>(167.4±6.1)                            | 110.4±11.5*<br>(138.1±11.5)* | 118.2±8.7*<br>(152.1±7.6)*   | 128.1±11.4<br>(161.2±13.3) | 123.1±4.6*<br>(156.9±4.8)*   | 129.4±8.0<br>(165.9±7.1)   | 131.0±7.8<br>(164.6±7.9)   |
| 35<br>(5)              | 136.3±5.1<br>(172.4±8.2)                            | 112.6±13.2*<br>(140.8±13.9)* | 120.1±11.1*<br>(154.5±11.8)* | 133.2±9.7<br>(167.8±11.4)  | 127.0±6.6*<br>(161.8±8.3)*   | 132.6±9.7<br>(170.1±9.2)   | 139.2±10.8<br>(174.7±12.1) |
| 39                     | 138.7±6.1<br>(175.5±8.7)                            | 115.4±14.0*<br>(144.4±14.8)* | 121.7±12.1*<br>(156.5±13.5)* | 136.2±11.3<br>(171.5±13.5) | 128.6±7.4*<br>(163.8±9.2)*   | 134.2±11.3<br>(172.1±11.1) | 142.2±12.4<br>(178.4±14.4) |
| 42<br>(6)              | 140.6±6.5<br>(177.7±9.2)                            | 117.7±15.2*<br>(147.2±16.1)* | 123.8±12.8*<br>(159.2±14.4)* | 138.4±14.3<br>(174.2±17.4) | 131.2±7.0*<br>(167.2±9.3)*   | 137.0±11.8<br>(175.7±11.9) | 145.0±11.7<br>(182.0±13.4) |
| 49<br>(7)              | 143.4±8.7<br>(181.4±12.4)                           | 118.1±16.0*<br>(147.5±17.3)* | 123.7±14.4*<br>(159.1±17.3)* | 142.3±14.7<br>(179.2±18.1) | 130.7±11.2*<br>(166.7±14.3)* | 137.6±13.1<br>(176.5±13.3) | 149.2±14.8<br>(187.2±17.8) |
| 53                     | 144.0±8.6<br>(182.2±11.7)                           | 117.9±16.0*<br>(147.4±6.9)*  | 124.3±15.5*<br>(159.9±18.6)* | 143.7±14.5<br>(180.8±17.7) | 130.9±12.6*<br>(166.8±16.0)* | 138.2±13.2<br>(177.5±13.6) | 151.3±15.0<br>(190.2±18.2) |
| 56<br>(8)              | 148.6±8.6<br>(187.9±11.6)                           | 121.3±17.3*<br>(151.7±18.6)* | 126.7±16.7*<br>(162.8±19.8)* | 146.8±15.3<br>(184.9±18.7) | 134.2±13.1*<br>(170.9±16.9)* | 142.8±13.6<br>(183.2±13.9) | 154.2±15.5<br>(193.5±18.4) |
| 63<br>(9)              | 150.9±9.4<br>(191.1±13.2)                           | 122.3±17.9*<br>(152.9±19.4)* | 127.6±19.7*<br>(164.1±23.5)* | 149.6±16.3<br>(188.4±20.1) | 133.5±15.3*<br>(170.3±19.6)* | 144.1±14.5<br>(185.0±15.7) | 156.8±17.9<br>(196.8±21.8) |
| 67<br>(10)             | 153.3±10.1<br>(193.9±14.4)                          | 124.4±19.0*<br>(155.4±20.8)* | 129.3±20.2*<br>(166.3±24.6)* | 152.2±16.4<br>(191.7±20.1) | 136.1±16.1*<br>(173.4±20.8)* | 146.9±15.5<br>(188.4±16.6) | 159.0±17.3<br>(199.7±20.8) |
| 77<br>(11)             | 159.6±8.7<br>(202.0±12.5)                           | 129.5±20.2*<br>(161.9±22.4)* | 132.5±21.0*<br>(170.6±25.6)* | 155.6±17.6<br>(196.0±21.6) | 140.3±16.5*<br>(178.8±21.5)* | 152.1±15.1<br>(195.2±16.2) | 163.2±17.1<br>(205.0±20.2) |
| 81                     | 163.3±7.3<br>(206.5±11.0)                           | 133.5±20.1*<br>(167.1±22.5)* | 134.9±21.6*<br>(173.5±26.4)* | 158.2±18.4<br>(199.2±22.6) | 143.9±16.0*<br>(183.4±21.2)* | 153.8±15.0<br>(197.3±15.7) | 166.4±16.6<br>(209.1±19.4) |
| 84<br>(12)             | 164.8±7.3<br>(208.5±11.0)                           | 134.9±21.2*<br>(168.7±23.6)* | 137.5±20.4*<br>(176.9±24.7)* | 159.4±18.3<br>(200.5±22.3) | 145.7±14.1*<br>(185.9±18.5)* | 155.9±14.7<br>(199.9±15.2) | 167.9±17.0<br>(211.0±20.0) |
| 88                     | 166.5±7.1<br>(210.8±10.4)                           | 136.2±20.9*<br>(170.4±23.8)* | 138.6±19.6*<br>(178.4±24.2)* | 161.2±18.2<br>(202.8±22.0) | 147.2±14.9*<br>(187.6±19.5)* | 156.6±14.2<br>(201.0±14.7) | 168.6±16.4<br>(211.8±19.4) |

(注) 値は10例平均±SD 1) 絶対重量 2) 体重増加率=(体重/実験0日体重)×100 a) 実験週数

\* 対照群と比較してP&lt;0.05

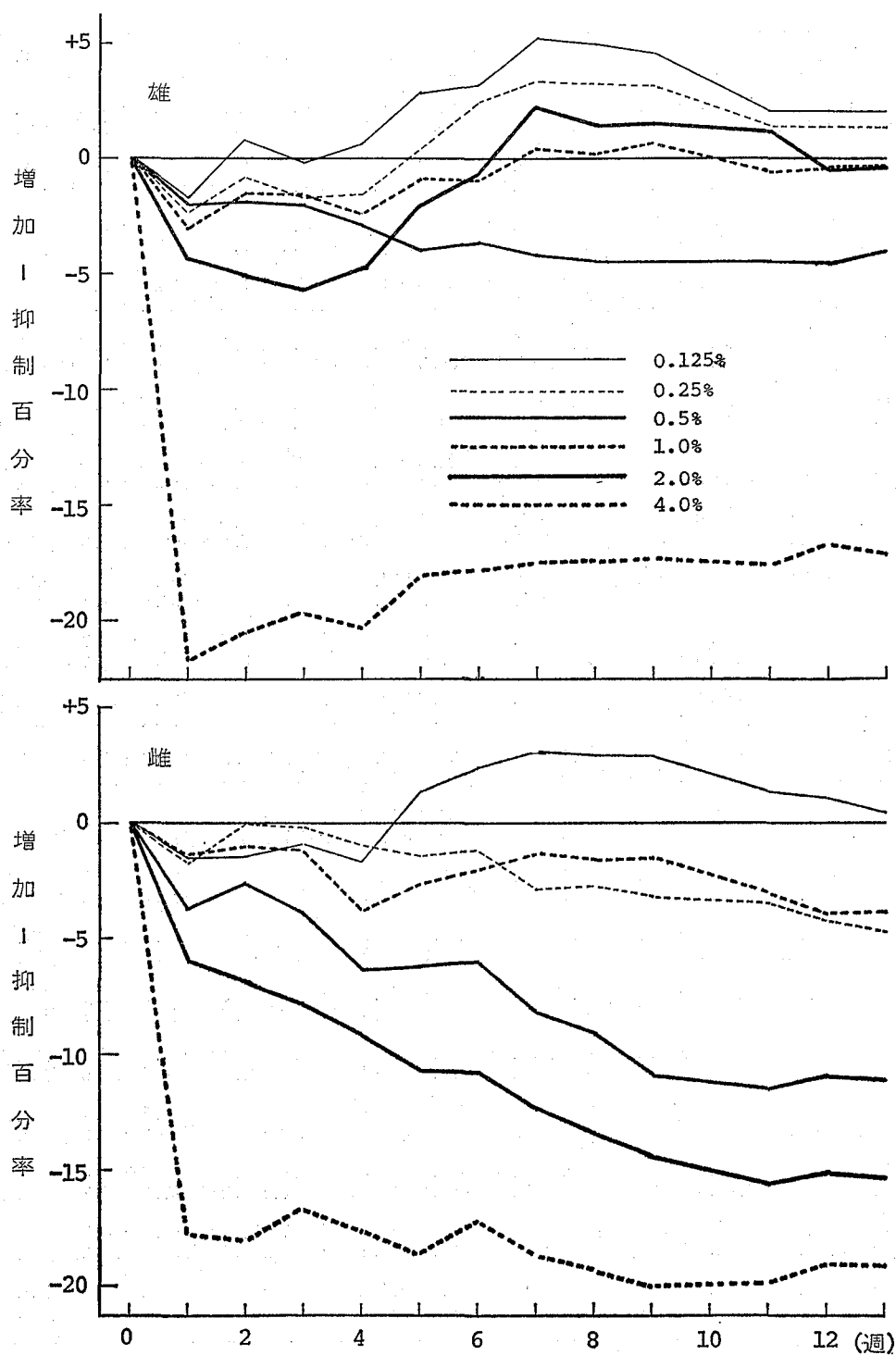


図 1. 対照群に対する各実験群体重増加（抑制）率の比率

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

(GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ活性(GPT), アルカリホスファターゼ活性(ALP), 総タンパク量(TP), アルブミン量(ALB), アルブミン・グロブリン係数(A/G), 尿素窒素(UN), グルコース量(GLU), 総コレステロール量(CHO)を測定し, Beckman

社製KLiNa炎光度計を用いて, ナトリウム量( $\text{Na}^+$ ,  $\text{mEq/l}$ ), カリウム量( $\text{K}^+$ ,  $\text{mEq/l}$ )を測定した.

器官重量: 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 下垂体, 副腎, 胸腺, 精巣, 前立腺, 卵巣, 子宮を摘出, 秤量した.

表 3. 飼料摂取量

| 実験週数 | 0%(対照)                                              | 4.0%                     | 2.0%                     | 1.0%                    | 0.5%                    | 0.25%                  | 0.125%                  |
|------|-----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0    | 8.7±1.0 <sup>1)</sup><br>(101.6±11.2) <sup>2)</sup> | 3.3±1.2*<br>(38.6±14.0)* | 7.5±0.6*<br>(86.6±6.5)*  | 8.5±0.7<br>(99.3±7.4)   | 9.2±0.7<br>(108.1±6.6)  | 8.6±0.8<br>(101.0±7.9) | 8.2±0.4<br>(94.4±3.6)   |
| 1    | 11.0±1.0<br>(90.7±6.2)                              | 9.1±0.7*<br>(95.1±6.8)   | 10.7±1.0<br>(91.8±7.4)   | 11.1±0.9<br>(92.2±8.0)  | 11.1±0.9<br>(93.6±5.3)  | 11.3±0.5<br>(95.0±5.5) | 11.5±0.9<br>(92.6±5.3)  |
| 3    | 10.4±2.0<br>(66.2±7.4)                              | 8.8±1.3*<br>(70.0±6.0)   | 10.3±1.0<br>(68.6±4.6)   | 10.6±1.2<br>(68.5±4.2)  | 9.8±1.9<br>(64.9±6.6)   | 10.5±1.1<br>(68.9±5.7) | 10.5±1.3<br>(66.3±6.7)  |
| 5    | 10.7±3.3<br>(57.7±8.8)                              | 9.3±2.5<br>(61.2±6.0)    | 11.1±2.0<br>(61.1±7.1)   | 10.6±2.2<br>(57.9±6.9)  | 9.5±3.4<br>(53.1±12.5)  | 11.2±2.3<br>(59.7±5.4) | 11.5±1.8<br>(59.7±6.0)  |
| 7    | 11.0±2.6<br>(53.2±4.7)                              | 9.5±3.4<br>(53.9±6.9)    | 12.0±2.4<br>(56.7±5.4)   | 11.5±2.0<br>(55.9±4.4)  | 10.5±2.6<br>(53.1±5.8)  | 11.5±3.1<br>(53.1±7.4) | 11.8±2.3<br>(53.3±6.1)  |
| 11   | 12.8±1.3<br>(50.5±2.9)                              | 11.4±3.2<br>(53.9±3.6)*  | 12.7±2.6<br>(50.1±7.0)   | 12.5±1.2<br>(49.7±3.1)  | 12.4±2.7<br>(51.4±3.8)  | 12.6±2.6<br>(49.3±2.3) | 12.7±1.2<br>(48.4±2.2)  |
| 0    | 8.0±0.5<br>(101.5±6.7)                              | 2.7±1.1*<br>(34.6±14.6)* | 5.7±1.8*<br>(73.4±23.7)* | 7.2±0.4*<br>(91.6±5.6)* | 7.9±0.5<br>(100.8±6.7)  | 7.7±0.9<br>(99.2±11.3) | 7.1±0.4*<br>(89.5±5.7)* |
| 1    | 10.4±0.4<br>(98.1±3.0)                              | 8.5±0.7*<br>(95.4±5.3)   | 9.6±0.8*<br>(98.2±10.7)  | 9.9±0.5*<br>(92.8±3.6)* | 9.7±0.4*<br>(93.5±3.3)* | 10.0±0.9<br>(95.0±6.6) | 10.1±0.6<br>(94.7±5.2)  |
| 3    | 9.4±0.9<br>(72.7±7.6)                               | 7.7±1.5*<br>(70.9±8.8)   | 7.9±1.2*<br>(68.0±9.7)   | 8.4±2.1<br>(65.8±15.9)  | 8.3±0.6*<br>(68.3±4.3)  | 8.7±0.8<br>(69.1±5.0)  | 9.1±1.6<br>(70.8±11.4)  |
| 5    | 7.9±1.0<br>(57.3±5.5)                               | 6.6±1.8<br>(56.9±9.9)    | 6.8±1.5<br>(55.4±8.5)    | 7.9±2.2<br>(57.2±13.8)  | 7.1±1.2<br>(54.9±7.7)   | 7.7±1.2<br>(57.8±6.3)  | 8.4±2.1<br>(58.7±12.7)  |
| 7    | 7.7±1.1<br>(53.5±5.3)                               | 6.1±1.4*<br>(51.2±5.5)   | 6.4±1.7<br>(51.1±8.3)    | 7.9±1.5<br>(54.9±5.9)   | 6.7±1.5<br>(51.3±7.3)   | 7.4±1.2<br>(53.9±5.6)  | 8.7±1.7<br>(57.1±6.8)   |
| 11   | 9.1±0.7<br>(55.8±3.5)                               | 7.4±1.7*<br>(55.2±5.0)   | 7.4±1.6*<br>(54.9±5.5)   | 8.6±1.4<br>(54.4±3.9)   | 7.8±1.2<br>(54.4±5.7)   | 8.2±1.1<br>(53.6±5.1)  | 9.2±1.0<br>(55.4±2.1)   |

値は10例平均±SD 1) g/rat/day 2) g/kg/day \* 対照群と比較して $P<0.05$

表 4. 餌こぼし量

| 実験週数 | 0%(対照)                | 4.0%      | 2.0%                   | 1.0%                  | 0.5%                   | 0.25%    | 0.125%                |
|------|-----------------------|-----------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------|-----------------------|
| 0    | 4.2±1.7               | 14.3±6.3* | 6.6±2.4*               | 5.5±1.5               | 4.0±0.5                | 4.3±0.3  | 4.8±0.7               |
| 1    | 3.2±0.9               | 2.9±0.7   | 2.3±1.2                | 3.5±1.3               | 2.2±0.7*               | 2.7±0.5  | 2.8±0.4               |
| 3    | 2.8±0.9               | 2.1±0.5   | 2.2±0.8                | 3.0±0.8 <sup>a)</sup> | 2.1±0.5                | 2.4±0.5  | 3.1±0.7               |
| 5    | 2.4±1.3               | 2.0±1.2   | 2.2±0.9                | 2.6±0.8               | 2.2±1.1                | 2.5±0.7  | 3.1±1.0 <sup>a)</sup> |
| 7    | 2.5±1.0               | 2.9±1.7   | 2.5±1.2                | 2.9±1.3               | 2.2±1.1                | 2.3±1.0  | 3.2±1.2               |
| 11   | 3.0±0.8               | 4.7±2.4*  | 3.1±1.7                | 3.2±1.2               | 2.7±1.1                | 3.2±1.4  | 3.2±0.6               |
| 0    | 4.7±1.4               | 18.2±7.3* | 8.3±2.1* <sup>a)</sup> | 6.0±1.8               | 3.4±0.6*               | 4.5±1.3  | 4.3±1.0               |
| 1    | 2.9±0.6               | 3.2±1.7   | 3.3±0.8                | 3.3±0.6               | 2.0±0.6*               | 2.7±0.7  | 3.2±1.2               |
| 3    | 2.9±0.7               | 1.9±0.7*  | 1.7±0.3*               | 2.8±1.0 <sup>a)</sup> | 1.6±0.5* <sup>a)</sup> | 2.0±0.6* | 2.8±1.4 <sup>a)</sup> |
| 5    | 1.6±0.3 <sup>a)</sup> | 1.5±0.6   | 1.2±0.4                | 2.2±0.8 <sup>a)</sup> | 1.5±0.7                | 1.8±0.9  | 2.3±0.8*              |
| 7    | 1.6±0.5               | 1.3±0.5   | 1.1±0.5*               | 2.0±0.9               | 1.2±0.6                | 1.4±0.5  | 1.9±0.7               |
| 11   | 2.0±0.7               | 1.7±0.8   | 1.5±0.4                | 1.8±0.6               | 1.6±0.6                | 1.5±0.4  | 2.1±0.7               |

値は特別を除き10例平均±SD g/rat a) 例数 \* 対照群と比較して $P<0.05$

表 5. 食 餌 効 率<sup>1)</sup>

| 実験週数 |    | 0%(対照)                     | 4.0%        | 2.0%                       | 1.0%                       | 0.5%                      | 0.25%     | 0.125%                     |
|------|----|----------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|----------------------------|
| 雄    | 0  | 42.1± 3.3                  | -49.7±41.4* | 28.2± 8.2*                 | 39.5± 5.6                  | 36.9± 4.8*                | 39.9± 4.3 | 43.3± 4.1                  |
|      | 1  | 27.0± 7.9                  | 25.8± 8.9   | 22.0± 5.3                  | 22.7± 8.0                  | 24.5± 5.4                 | 27.9± 5.8 | 28.5± 9.0                  |
|      | 3  | 21.2±12.4                  | 16.7± 8.1   | 20.6± 9.0                  | 20.2± 7.3(9) <sup>a)</sup> | 23.6±13.9                 | 24.4±15.2 | 26.3±21.4                  |
|      | 5  | 24.5± 7.0                  | 18.8±12.4   | 25.7± 7.2                  | 20.0± 5.8                  | 17.4± 6.9*                | 23.2± 7.3 | 23.0± 5.0(9) <sup>a)</sup> |
|      | 7  | 25.7±12.5                  | 16.8± 6.2   | 17.5± 8.8                  | 22.0±10.7                  | 16.4± 7.8                 | 18.1±11.5 | 19.6± 6.7                  |
|      | 11 | 12.0± 6.1                  | 16.2± 6.5   | 15.3±10.2                  | 11.1± 7.5                  | 13.0± 7.9                 | 13.3± 5.9 | 10.5± 5.7                  |
| 雌    | 0  | 35.5± 6.2                  | -66.0±61.2* | 30.8± 5.0(9) <sup>a)</sup> | 39.6± 5.1                  | 34.7± 3.7                 | 36.8± 7.1 | 36.8± 8.3                  |
|      | 1  | 20.7± 3.3                  | 17.5± 5.6   | 17.9± 5.2                  | 19.7± 4.9                  | 19.5± 4.2                 | 19.6± 4.5 | 19.0± 3.4                  |
|      | 3  | 11.4± 4.7                  | 5.4±10.3    | 6.6± 4.6*                  | 11.0± 6.4(9) <sup>a)</sup> | 8.2± 5.8(9) <sup>a)</sup> | 9.7± 4.6  | 12.1± 3.1(9) <sup>a)</sup> |
|      | 5  | 11.1± 5.4(8) <sup>a)</sup> | 11.3±10.8   | 10.1± 8.9                  | 12.6± 7.6(9) <sup>a)</sup> | 12.5± 6.2                 | 12.0± 8.8 | 12.0± 6.7                  |
|      | 7  | 19.9±11.8                  | 17.4±10.0   | 11.5± 9.8                  | 12.8± 6.5                  | 16.0± 9.8                 | 20.0±10.8 | 11.3± 8.7                  |
|      | 11 | 5.3± 7.6                   | 5.5± 7.0    | 13.0±11.5                  | 4.7± 5.3                   | 8.9±12.6                  | 8.3±13.4  | 5.2± 7.2                   |

1) 食餌効率 = (3日間の体重増加量g / 3日間の摂餌量g) × 100 値は特例を除き10例平均 ± S D

a) 例数 \* 対照群と比較して P &lt; 0.05

表 6. O P P-Na 摂 取 量

| 実験週数  | 4.0%                                      | 2.0%                                                  | 1.0%                      | 0.5%                     | 0.25%                 | 0.125%                |                       |
|-------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 雄     | 0                                         | 133± 49.1 <sup>1)</sup><br>(1547±563.3) <sup>2)</sup> | 150± 13.5<br>(1734±130.9) | 85± 7.0<br>(993± 74.0)   | 46± 3.9<br>(540±33.3) | 21± 2.1<br>(252±19.8) | 10± 0.5<br>(117± 4.7) |
|       | 1                                         | 367± 28.3<br>(3806±274.5)                             | 215± 20.4<br>(1838±148.3) | 111± 9.1<br>(922± 80.1)  | 55± 4.7<br>(468±26.9) | 28± 1.2<br>(237±13.9) | 14± 1.2<br>(115± 6.5) |
|       | 3                                         | 354± 52.6<br>(2804±240.7)                             | 206± 20.1<br>(1373± 93.1) | 106± 12.1<br>(686± 42.2) | 49± 9.6<br>(324±33.1) | 26± 2.9<br>(172±14.4) | 13± 1.6<br>(82± 8.4)  |
|       | 5                                         | 375±102.7<br>(2449±243.5)                             | 222± 40.9<br>(1227±146.9) | 106± 22.2<br>(579± 69.5) | 47±17.4<br>(265±63.0) | 28± 5.8<br>(148±13.7) | 14± 2.2<br>(74± 7.7)  |
|       | 7                                         | 380±137.7<br>(2159±278.4)                             | 241± 48.7<br>(1135±108.2) | 115± 20.5<br>(559± 44.2) | 52±13.4<br>(265±28.9) | 28± 7.7<br>(132±18.5) | 14± 2.9<br>(66± 7.8)  |
|       | 11                                        | 456±130.3<br>(2160±147.0)                             | 255± 52.5<br>(1002±140.8) | 125± 12.7<br>(497± 31.4) | 62±13.6<br>(257±19.0) | 31± 6.5<br>(123± 5.7) | 15± 1.6<br>(60± 2.7)  |
| 全期間 { | 33299 <sup>a)</sup><br>2487 <sup>b)</sup> | 20370<br>1384                                         | 10087<br>706              | 4760<br>353              | 2513<br>177           | 1246<br>85            |                       |
| 雌     | 0                                         | 110± 46.2<br>(1389±587.6)                             | 114± 37.2<br>(1470±475.3) | 72± 4.1<br>(916± 56.8)   | 39± 2.3<br>(504±33.5) | 19± 2.3<br>(247±28.3) | 8± 0.5<br>(111± 7.0)  |
|       | 1                                         | 340± 28.2<br>(3819±213.0)                             | 193± 17.8<br>(1966±214.2) | 99± 5.4<br>(929± 36.7)   | 48± 2.3<br>(468±16.5) | 25± 2.3<br>(237±16.7) | 12± 0.8<br>(118± 6.5) |
|       | 3                                         | 311± 61.5<br>(2840±354.9)                             | 158± 24.6<br>(1362±194.5) | 84± 21.8<br>(658±159.3)  | 41± 3.4<br>(341±21.6) | 21± 2.0<br>(170±15.0) | 11± 2.0<br>(88±14.4)  |
|       | 5                                         | 266± 73.1<br>(2280±397.5)                             | 136± 30.1<br>(1109±170.2) | 79± 22.1<br>(572±38.2)   | 35± 6.4<br>(274±38.7) | 19± 3.0<br>(144±16.0) | 10± 2.6<br>(72±15.9)  |
|       | 7                                         | 244± 56.0<br>(2051±223.4)                             | 129± 34.9<br>(1022±167.4) | 79± 15.0<br>(549± 59.7)  | 33± 7.7<br>(256±37.0) | 18± 3.1<br>(134±14.1) | 10± 2.1<br>(70± 8.7)  |
|       | 11                                        | 297± 68.2<br>(2209±203.6)                             | 149± 33.8<br>(1100±111.0) | 86± 14.1<br>(544± 39.7)  | 39± 6.2<br>(271±28.5) | 20± 2.8<br>(133±13.0) | 11± 1.2<br>(68± 2.5)  |
| 全期間 { | 24598<br>2431                             | 13314<br>1338                                         | 7588<br>694               | 3479<br>352              | 1827<br>177           | 952<br>87             |                       |

1) mg/rat/day 2) mg/kg/day a) ラット当り総摂餌量mg b) mg/kg/day



表 7. 飲 水 量

| 実験週数 | 0%(対照)                                                 | 4.0%                       | 2.0%                       | 1.0%                      | 0.5%                     | 0.25%                    | 0.125%                    |
|------|--------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 雄    | 0 16.0±1.0 <sup>1)</sup><br>(186.1±11.4) <sup>2)</sup> | 9.4±3.5*<br>(109.6±40.1)*  | 15.9±0.6<br>(184.6±5.9)    | 16.4±1.2<br>(191.1±12.5)  | 15.8±1.1<br>(184.2±11.7) | 15.5±1.3<br>(180.6±12.8) | 16.0±0.8<br>(182.8±10.0)  |
|      | 1 15.5±0.8<br>(128.1±6.3)                              | 16.9±1.9<br>(174.8±16.4)*  | 17.3±1.7*<br>(148.0±12.2)* | 16.3±1.5<br>(135.9±11.6)  | 15.4±1.3<br>(129.3±6.7)  | 15.1±1.4<br>(126.7±12.5) | 15.7±1.7<br>(127.2±12.4)  |
|      | 3 14.9±1.8<br>(95.7±9.7)                               | 16.6±2.8<br>(131.7±14.7)*  | 17.0±1.8*<br>(113.4±8.6)*  | 16.4±1.9<br>(106.0±5.4)*  | 15.1±2.2<br>(100.1±10.3) | 14.1±1.2<br>(92.5±5.5)   | 15.1±2.4<br>(94.5±10.8)   |
|      | 5 13.8±3.1<br>(75.0±5.9)                               | 16.4±3.9<br>(108.1±6.8)*   | 18.2±3.8*<br>(100.2±13.6)* | 15.9±3.0<br>(86.9±8.7)*   | 14.2±3.2<br>(79.6±7.1)   | 14.6±3.2<br>(77.7±8.3)   | 15.5±2.2<br>(80.1±6.3)    |
|      | 7 14.2±3.3<br>(69.0±6.8)                               | 16.8±6.0<br>(95.4±11.5)*   | 18.5±4.7*<br>(86.7±13.5)*  | 16.6±2.7<br>(80.7±5.7)*   | 14.2±3.5<br>(71.6±6.8)   | 15.4±4.2<br>(71.3±9.7)   | 16.9±3.1<br>(76.9±13.8)   |
|      | 11 17.1±2.4<br>(67.5±9.0)                              | 21.5±6.7<br>(101.3±12.3)*  | 21.2±3.6*<br>(83.6±6.3)*   | 18.2±2.5<br>(72.1±5.1)    | 16.2±3.7<br>(66.8±5.6)   | 16.9±4.1<br>(65.1±5.6)   | 17.9±2.4<br>(68.1±7.0)    |
| 雌    | 0 14.4±2.0<br>(182.1±22.5)                             | 10.0±2.3*<br>(126.5±27.6)* | 11.3±5.6<br>(144.6±71.6)   | 15.3±2.8<br>(193.3±36.2)  | 13.1±4.6<br>(169.0±59.9) | 11.1±5.9<br>(143.5±75.3) | 14.2±0.8<br>(179.5±9.9)   |
|      | 1 15.1±0.9<br>(142.2±7.4)                              | 15.9±1.4<br>(179.1±8.8)*   | 15.6±1.1<br>(159.4±11.9)*  | 15.9±1.6<br>(148.8±11.9)  | 14.8±1.5<br>(143.2±13.2) | 14.5±2.0<br>(136.8±14.9) | 14.7±1.5<br>(138.4±12.2)  |
|      | 3 13.8±1.2<br>(107.1±8.3)                              | 14.5±2.2<br>(132.6±12.8)*  | 14.2±2.7<br>(122.2±21.7)*  | 13.9±5.0<br>(108.4±38.2)  | 12.8±2.6<br>(104.8±19.1) | 12.9±1.8<br>(101.7±12.7) | 14.6±2.7<br>(113.7±17.8)  |
|      | 5 11.3±1.8<br>(81.3±10.2)                              | 13.0±2.3<br>(112.8±8.6)*   | 12.8±3.5<br>(105.1±26.4)*  | 13.0±4.7<br>(93.8±32.8)   | 11.3±2.2<br>(87.4±13.6)  | 11.5±2.8<br>(85.2±15.0)  | 13.4±2.4*<br>(93.7±10.9)* |
|      | 7 11.3±2.2<br>(78.1±12.0)                              | 12.0±2.7<br>(101.1±10.9)*  | 11.3±3.3<br>(89.8±16.1)    | 13.8±2.8*<br>(95.4±12.5)* | 10.1±2.9<br>(76.3±15.2)  | 10.8±2.5<br>(77.7±12.9)  | 12.8±2.6<br>(84.2±11.3)   |
|      | 11 13.6±1.3<br>(83.5±7.3)                              | 14.3±3.1<br>(106.9±8.8)*   | 12.8±3.4<br>(93.7±12.9)*   | 15.4±3.3<br>(96.9±15.0)*  | 12.5±3.2<br>(86.0±14.1)  | 13.1±2.8<br>(84.8±15.0)  | 13.9±1.8<br>(83.6±5.5)    |

値は10例平均±SDで示した 1) g/rat/day 2) g/kg/day \* 対照群と比較してP<0.05

結果の推計学的検討に当っては危険率を5%に置いた。

(解剖・病理組織学的所見については別に報告する)

#### 実験結果と考察

一般状態：外観的には特に変化を認めなかったが、表4に示すように飼料のコボンが初期において4%群雌雄に多く、この時期における摂餌行動の異常が考えられる。

体重・摂餌量・摂餌効率・飲水量：表1・2に雄および雌の体重を、図1に対照群に対する各実験群の体重増加率の比率を、表3に摂餌量、表4に餌コボン量、表5に摂餌効率、表6にOPP-Na摂取量、表7に飲水量を示した。

体重は、対照群と比較して、雄4%群、雌4%、2%および0.5%群において全期間を通じ有意に小さく、雄2%群は実験3週まで有意に小であったが以降同等となった。0.5%群は推計学的に有意ではないが増加抑制の傾向を示し、雌雄とも0.5%群は用量-反応の関係よりはずれた。この他の実験群では差を認めなかった。

飼料摂取絶対量は、4%群雌雄および2%群雌において全期間にわたって少く、その他の群も体重増加変動に

関連するような値を示し、体重比摂取量は、高濃度群では実験0週において用量に伴った減少をみたが以後では対照群との間に大差を示さなかった。食餌効率は、4%群雌雄、2%群雌においてやや小であったほかは対照群と比較して大きい変動はなかった。

以上、0.5%群雌雄とも体重増加において用量-反応関係よりはずれたことについて、検体添加飼料は同一日に同一Lotの検体、同一Lotの飼料原料(0%飼料も同一)を用いて製造したものであり、0.5%飼料のみに体重増加抑制あるいは摂餌量を低下される因子の混入は考えられないことから、全くの偶然のように思われる。

高濃度群では摂餌効率がやや低下することより、OPP-Na摂取による体重低下(増加抑制)にはOPP-Naの味、刺激性等による摂餌量の減少(摂餌拒否)によるだけでなく、薬理的作用も考えられる。

なお、摂餌量より求めたOPP-Na摂取量は表6に示す通りで、平均一日体重kg当り摂取量および13週間における一日体重kg当り平均摂取量(実験期間中の総摂取量)は4%群雌 2487mg (33299mg)、雌 2431mg (24598mg)、2%群雌1384mg (20370mg)、雌1338mg

表 8. 器 官 重 量 (雄)

| 器官    | 0 % (対照)                                                 | 4.0%                                      | 2.0%                          | 1.0%                                    | 0.5%                                     | 0.25%                        | 0.125%                      |
|-------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 脳     | 1875.7±40.3 <sup>1)</sup><br>(724.7±80.50) <sup>2)</sup> | 1806.3±70.1*<br>(920.4±384.9)             | 1875.8±32.5<br>(725.6±81.5)   | 1849.2±48.7<br>(716.5±66.7)             | 1872.1±63.7<br>(771.7±140.5)             | 1864.0±62.7<br>(731.0±158.7) | 1903.4±48.5<br>(708.7±79.5) |
| 心 臓   | 741.0±71.1<br>(283.5±10.5)                               | 644.5±151.9<br>(301.6±32.1)               | 713.5±57.1<br>(274.0±16.7)    | 740.9±61.5<br>(285.0±12.3)              | 720.2±132.9<br>(288.1±14.9)              | 744.6±137.1<br>(281.5±8.3)   | 750.5±68.7<br>(276.9±10.9)  |
| 肺     | 802.0±53.1<br>(307.9±19.3)                               | 717.3±140.9<br>(341.1± 52.7)              | 746.8±95.3<br>(287.4±38.7)    | 798.0±63.7<br>(307.9±22.7)              | 759.4±87.9<br>(308.0±31.5)               | 792.6±99.5<br>(304.6±34.5)   | 803.2±59.9<br>(297.0±18.5)  |
| 肝 臓   | 9.41±1.305<br>(3.59±0.203)                               | 10.22±3.325<br>(4.59±0.497)*              | 11.07±1.569*<br>(4.22±0.255)* | 9.52±1.151<br>(3.65±0.205)              | 8.77±1.961<br>(3.48±0.233)               | 9.69±2.193<br>(3.63±0.253)   | 9.61±1.309<br>(3.52±0.187)  |
| 腎臓(左) | 806.6±92.5<br>(308.1±12.5)                               | 874.3±229.9<br>(405.2±32.3)*              | 912.3±80.7*<br>(349.8±13.7)*  | 835.9±65.5<br>(321.9±5.5)*              | 792.9±132.9<br>(318.3±11.0)              | 836.6±120.3<br>(319.1±21.3)  | 840.2±64.3<br>(310.7±16.7)  |
| 腎臓(右) | 793.6±81.5<br>(303.6±12.9)                               | 861.3±231.3<br>(400.5±42.9)*              | 893.2±76.5*<br>(342.6±12.1)*  | 837.4±46.5<br>(323.0±14.9)*             | 791.8±133.5<br>(317.9±16.3)*             | 824.4±141.7<br>(312.9±13.5)  | 834.1±59.9<br>(308.3±16.9)  |
| 脾 臓   | 507.9±30.5<br>(195.2±17.3)                               | 451.0±103.1<br>(210.3±17.3)               | 513.4±37.1<br>(197.1±12.5)    | 497.7±30.9<br>(192.3±18.7)              | 483.2±64.5<br>(195.4±17.9)               | 505.5±76.1<br>(193.5±22.7)   | 520.9±50.5<br>(192.0±11.5)  |
| 下垂体   | 7.1±0.81<br>(2.6±0.29)                                   | 7.3±1.41(8) <sup>a)</sup><br>(3.1±0.45)*  | 7.5±0.97<br>(2.8±0.37)        | 6.9±1.31(9) <sup>a)</sup><br>(2.5±0.45) | 7.0±1.27<br>(2.8±0.55)                   | 6.9±1.33<br>(2.6±0.29)       | 6.8±1.13<br>(2.4±0.29)      |
| 副腎(左) | 19.2±3.00<br>(7.3±1.05)                                  | 19.1±4.67(9) <sup>a)</sup><br>(9.2±1.91)* | 19.5±2.89<br>(7.4±1.21)       | 19.3±2.41<br>(7.4±0.65)                 | 19.2±3.81<br>(7.7±1.03)                  | 17.9±4.31<br>(6.7±1.15)      | 18.8±1.75<br>(6.9±0.97)     |
| 副腎(右) | 18.5±2.57<br>(7.0±0.59)                                  | 17.0±3.61(9) <sup>a)</sup><br>(8.4±2.63)  | 17.5±2.03<br>(6.7±0.65)       | 18.1±1.87<br>(6.9±0.60)                 | 16.8±3.09(9) <sup>a)</sup><br>(6.7±0.73) | 17.2±3.61<br>(6.4±0.57)*     | 18.2±1.81<br>(6.7±0.81)     |
| 胸 腺   | 165.3±28.41<br>(63.7±12.25)                              | 136.1±41.27<br>(62.0±15.83)               | 165.3±19.15<br>(63.6±7.65)    | 176.3±21.23<br>(68.2±9.89)              | 170.3±24.63<br>(69.1±9.03)               | 166.9±25.91<br>(64.1±9.23)   | 169.6±22.31<br>(62.5±5.85)  |
| 精巣(左) | 1385.9±73.5<br>(533.3±41.1)                              | 1260.6±269.7<br>(592.7±63.1)*             | 1398.1±60.3<br>(539.3±47.1)   | 1316.3±86.9<br>(508.6±38.5)             | 1187.9±362.1<br>(493.7±159.3)            | 1331.9±141.5<br>(513.3±61.5) | 1393.6±70.1<br>(517.4±48.3) |
| 精巣(右) | 1351.0±88.7<br>(519.3±37.3)                              | 1199.0±234.7<br>(569.8±85.5)              | 1335.8±59.3<br>(515.0±41.9)   | 1299.5±87.7<br>(501.6±31.7)             | 1311.9±166.5<br>(532.4±55.5)             | 1294.9±150.1<br>(498.0±53.9) | 1338.1±74.3<br>(497.0±49.1) |
| 前立腺   | 230.2±68.1<br>(86.7±22.4)                                | 165.7±80.7<br>(70.6±28.1)                 | 252.2±73.5<br>(95.6±23.3)     | 239.0±50.2<br>(91.2±14.0)               | 190.5±60.1<br>(74.5±12.0)                | 218.9±81.1<br>(80.5±21.6)    | 238.2±67.1<br>(86.8±19.6)   |

値は特例を除き10例平均±S D

a) 例数

1) mg/rat (肝臓 g/rat)

2) mg/100g B. W. (肝臓 g/100g B. W.)

\* 対照群と比較してP&lt;0.05

表 9. 器 官 重 量 (雌)

| 器官    | 0 % (对照)                                                 | 4.0%                                     | 2.0%                                     | 1.0%                                      | 0.5%                                    | 0.25%                        | 0.125%                       |
|-------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 脳     | 1782.5±34.1 <sup>1)</sup><br>(1071.7±48.1) <sup>2)</sup> | 1698.4±68.9*<br>(1271.6±192.1)*          | 1721.7±61.3*<br>(1259.5±143.7)*          | 1769.7±41.3<br>(1111.0±137.5)             | 1739.0±44.1*<br>(1190.8±110.7)*         | 1753.8±43.3<br>(1126.2±85.9) | 1781.4±36.5<br>(1064.1±93.7) |
| 心 臓   | 508.7±23.9<br>(305.1±10.1)                               | 431.0±69.1*<br>(316.2±14.3)              | 431.9±59.5*<br>(311.5±8.3)               | 496.9±52.7<br>(308.1±7.3)                 | 458.2±52.1*<br>(310.7±15.9)             | 489.8±43.5<br>(312.8±18.3)   | 518.6±40.9<br>(307.8±9.7)    |
| 肺     | 643.9±58.3<br>(386.4±34.5)                               | 553.0±68.5*<br>(408.1±27.5)              | 553.9±64.7*<br>(400.8±21.3)              | 631.3±54.1<br>(393.2±27.1)                | 598.5±62.9<br>(406.2±13.9)              | 616.4±61.5<br>(393.5±21.3)   | 656.4±38.1<br>(390.6±24.5)   |
| 肝 臓   | 5.08±0.341<br>(3.05±0.137)                               | 5.57±1.181<br>(4.05±0.291)*              | 4.71±0.845<br>(3.38±0.261)*              | 5.20±0.743<br>(3.21±0.145)*               | 4.69±0.677<br>(3.17±0.233)              | 4.90±0.677<br>(3.11±0.223)   | 5.31±0.617<br>(3.15±0.181)   |
| 腎臓(左) | 558.0±26.0<br>(335.0±12.7)                               | 541.4±59.3<br>(400.4±28.9)*              | 526.2±53.7<br>(381.3±20.3)*              | 561.4±43.7<br>(349.5±19.7)                | 526.7±51.1<br>(357.9±21.9)*             | 531.5±41.5<br>(339.5±12.5)   | 572.3±34.1<br>(340.7±21.9)   |
| 腎臓(右) | 558.0±28.7<br>(334.8±16.3)                               | 538.2±64.1<br>(397.3±26.7)*              | 521.4±51.5<br>(378.2±26.5)*              | 562.0±43.3<br>(350.1±23.3)                | 519.3±42.7*<br>(353.4±17.1)*            | 540.3±43.1<br>(345.4±20.1)   | 565.5±43.3<br>(335.8±13.1)   |
| 脾 臓   | 362.3±22.5<br>(217.1±10.9)                               | 317.0±45.5*<br>(232.7±10.5)*             | 319.2±45.1*<br>(230.3±16.3)*             | 358.1±40.9<br>(221.8±9.5)                 | 340.2±41.7<br>(230.6±15.7)*             | 347.3±25.1<br>(221.8±7.5)    | 388.0±39.9<br>(230.4±20.5)   |
| 下 垂 体 | 9.3±1.45<br>(5.5±0.77)                                   | 6.9±2.05*(9) <sup>a)</sup><br>(4.9±0.87) | 7.2±2.13*(9) <sup>a)</sup><br>(5.0±0.95) | 10.2±2.15<br>(6.2±0.80)*                  | 8.7±2.09(9) <sup>a)</sup><br>(5.7±0.89) | 9.1±2.27<br>(5.7±1.09)       | 11.2±2.19*<br>(6.5±0.79)*    |
| 副腎(左) | 23.9±3.57<br>(14.2±1.61)                                 | 17.8±4.05*<br>(13.0±1.71)                | 16.4±4.35*<br>(11.6±1.73)*               | 22.1±4.01<br>(13.6±1.55)                  | 18.9±4.37*<br>(12.7±2.19)               | 22.0±3.15<br>(14.0±1.19)     | 24.2±4.27<br>(14.2±1.83)     |
| 副腎(右) | 21.3±2.73<br>(12.7±1.21)                                 | 15.9±2.37*<br>(11.7±1.39)                | 15.0±3.91*<br>(10.6±1.47)*               | 20.0±3.31<br>(12.3±0.99)                  | 17.9±3.93*<br>(11.9±1.71)               | 19.7±3.27<br>(12.5±1.35)     | 22.3±2.69<br>(13.2±1.23)     |
| 胸 腺   | 155.2±15.27<br>(93.3±10.21)                              | 142.9±16.23<br>(106.1±13.51)*            | 148.0±13.05<br>(107.9±12.37)*            | 154.9±15.79<br>(96.3±5.55)                | 149.8±16.79<br>(102.4±12.77)            | 158.4±7.35<br>(101.6±7.65)*  | 166.0±11.13<br>(98.9±7.73)   |
| 卵巣(左) | 27.5±5.31<br>(16.4±2.69)                                 | 20.0±5.05*<br>(14.4±1.99)                | 19.4±5.93*<br>(13.7±2.77)*               | 26.0±4.05(9) <sup>a)</sup><br>(15.6±2.41) | 21.5±7.45*<br>(14.3±3.95)               | 23.4±5.81<br>(14.7±2.99)     | 28.3±5.09<br>(16.6±1.97)     |
| 卵巣(右) | 26.3±3.77<br>(15.7±2.13)                                 | 21.3±6.63*<br>(15.3±3.31)                | 21.1±7.51<br>(14.9±3.87)                 | 26.6±5.39<br>(16.4±2.93)                  | 20.7±5.91*<br>(13.8±2.97)               | 22.4±4.81<br>(14.2±2.61)     | 27.0±2.93<br>(16.0±1.53)     |
| 子 宮   | 399.6±97.8<br>(238.5±50.2)                               | 231.4±120.0*<br>(162.5±60.1)*            | 259.6±149.7*<br>(179.2±85.6)             | 384.0±135.3*<br>(231.5±71.6)              | 290.6±137.3*<br>(191.0±77.7)            | 328.7±99.0<br>(207.7±50.2)   | 427.6±115.4<br>(251.9±59.4)  |

値は特例を除き10例平均±SD

a) 例数

1) mg/rat (肝臓 g/rat)

2) mg/100g B. W. (肝臓 g/100g B. W.)

\* 対照群と比較してP&lt;0.05

表 10. 血 液 学 的 検 査

|                                  | 0%(対照)          | 4.0%             | 2.0%             | 1.0%             | 0.5%             | 0.25%           | 0.125%          |
|----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| WBC( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) | 7.06 $\pm$ 1.04 | 7.09 $\pm$ 0.85  | 7.29 $\pm$ 0.75  | 7.10 $\pm$ 0.96  | 6.56 $\pm$ 0.71  | 6.97 $\pm$ 0.57 | 6.46 $\pm$ 0.77 |
| RBC( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 8.57 $\pm$ 0.35 | 8.14 $\pm$ 0.12* | 8.46 $\pm$ 0.27  | 8.55 $\pm$ 0.34  | 8.66 $\pm$ 0.39  | 8.76 $\pm$ 0.36 | 8.64 $\pm$ 0.32 |
| Hgb(g/dl)                        | 16.5 $\pm$ 0.35 | 15.5 $\pm$ 0.24* | 16.1 $\pm$ 0.42  | 16.4 $\pm$ 0.41  | 16.4 $\pm$ 0.53  | 16.5 $\pm$ 0.41 | 16.3 $\pm$ 0.33 |
| 雄 Hct(%)                         | 44.3 $\pm$ 1.18 | 42.0 $\pm$ 0.65* | 43.7 $\pm$ 1.24  | 44.5 $\pm$ 1.50  | 45.0 $\pm$ 1.94  | 44.8 $\pm$ 1.53 | 44.4 $\pm$ 1.26 |
| MCV( $\mu^3$ )                   | 52.7 $\pm$ 1.05 | 52.6 $\pm$ 1.27  | 52.6 $\pm$ 0.97  | 52.8 $\pm$ 0.79  | 52.8 $\pm$ 0.91  | 52.1 $\pm$ 1.10 | 52.1 $\pm$ 1.10 |
| MCH( $\mu\text{g}$ )             | 19.5 $\pm$ 0.59 | 19.3 $\pm$ 0.44  | 19.3 $\pm$ 0.47  | 19.4 $\pm$ 0.54  | 19.3 $\pm$ 0.43  | 19.2 $\pm$ 0.47 | 19.2 $\pm$ 0.63 |
| MCHC(%)                          | 37.1 $\pm$ 0.74 | 36.8 $\pm$ 0.38  | 36.8 $\pm$ 0.50  | 36.7 $\pm$ 0.74  | 36.5 $\pm$ 0.70  | 36.8 $\pm$ 0.57 | 36.7 $\pm$ 0.80 |
| WBC( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) | 7.36 $\pm$ 1.07 | 7.35 $\pm$ 0.86  | 6.37 $\pm$ 0.99* | 6.48 $\pm$ 0.48* | 7.08 $\pm$ 0.97  | 6.95 $\pm$ 0.96 | 8.11 $\pm$ 2.49 |
| RBC( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 8.23 $\pm$ 0.16 | 8.15 $\pm$ 0.15  | 8.07 $\pm$ 0.16* | 8.12 $\pm$ 0.21  | 8.12 $\pm$ 0.17  | 8.26 $\pm$ 0.30 | 8.23 $\pm$ 0.25 |
| Hgb(g/dl)                        | 16.5 $\pm$ 0.28 | 15.8 $\pm$ 0.38* | 15.7 $\pm$ 0.34* | 16.1 $\pm$ 0.51* | 16.1 $\pm$ 0.34* | 16.4 $\pm$ 0.59 | 16.4 $\pm$ 0.38 |
| 雌 Hct(%)                         | 44.7 $\pm$ 1.14 | 43.2 $\pm$ 0.97* | 42.5 $\pm$ 0.83* | 43.4 $\pm$ 1.61* | 43.4 $\pm$ 1.22* | 44.1 $\pm$ 1.59 | 44.2 $\pm$ 1.05 |
| MCV( $\mu^3$ )                   | 55.2 $\pm$ 1.13 | 53.7 $\pm$ 0.67* | 53.3 $\pm$ 0.67* | 54.3 $\pm$ 0.67* | 54.1 $\pm$ 0.73* | 54.4 $\pm$ 1.17 | 54.4 $\pm$ 0.85 |
| MCH( $\mu\text{g}$ )             | 20.4 $\pm$ 0.24 | 19.6 $\pm$ 0.40* | 19.7 $\pm$ 0.38* | 20.2 $\pm$ 0.19  | 20.1 $\pm$ 0.27* | 20.1 $\pm$ 0.36 | 20.2 $\pm$ 0.25 |
| MCHC(%)                          | 36.9 $\pm$ 0.82 | 36.5 $\pm$ 0.70  | 36.9 $\pm$ 0.70  | 37.1 $\pm$ 0.48  | 37.0 $\pm$ 0.52  | 37.1 $\pm$ 0.35 | 37.1 $\pm$ 0.42 |

値は10例平均 $\pm$ SD \* 対照群と比較して $P < 0.05$

(13314mg), 1%群雄 706mg (10087mg), 雌 694mg (7588mg), 0.5%群雄 353mg (4760mg), 雌 352mg (3479mg), 0.25%群雄 177mg (2513mg), 雌 177mg (1827mg), 0.125%群雄 85mg (1246mg), 雌 87mg (952mg) であった。

飲水量は雌雄とも高濃度群において用量に伴った増加および増加傾向がみられた。一般に飲水量は摂餌食によく並行して増減するが、ここでは全く逆の現象であり、今後検討を要するが、要因として飼料中 OPP-Na の刺激性また、 $\text{Na}^+$  に換算して非常に大きな摂取量であること等が考えられる<sup>9)</sup>。

器官重量：表8に雄，表9に雌の器官重量を示した。高濃度群雌雄特に雄の肝臓および腎臓（左，右）において用量一反応の関係をもって重量増加が認められた。これは Hodge ら (1952)<sup>9)</sup> がオルトフェニルフェノールについてラットを用いて行った3か月飼育試験の成績と一致するものとみられる。その他，対照と比較して推計学的に有意な変化が特に雄4%群，雌4%，2%および0.5%群に多かったが，そのほとんどは絶体重量と体重比重量より考察して体重増加抑制に伴う各器官の特性による変化，一部は用量一反応関係からみて偶発的变化と考えられた。しかし，これらの変化の意味は慢性毒性試験のなかで確かめたい。

血液学的検査成績：結果を表10に示す。雄においては4%群の赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリットのわずかな低下 ( $P < 0.05$ ) がみられたのみであった。雌

では白血球数が2%および1%群において低下していたが，僅少であり，用量一反応関係も認められないことから特に意味あるとは考えられなかった。赤血球では0.5%以上の高濃度群において赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット，平均赤血球容積，平均赤血球ヘモグロビン量が用量一反応の関係は明らかでないがわずかな低下ないし低下傾向が特に雌でみられた。すなわち貧血発生傾向がうかがえた。

血清生化学的検査成績：結果を表11に示す。用量一反応関係を示す明らかな変化は雄高濃度群における GOT および GPT 活性低下，雌の GPT 活性低下，その他高濃度群で用量一反応関連は明らかでないが雌雄共通にみられた変化は総タンパク量，アルブミン量，コレステロール量の増加，グルコース量の低下であった。肝臓重量増加と併せ考え，OPP-Na の肝臓作用の検討が必要である。

尿検査成績：結果を表12に示す。雌雄ともにやや用量関連をもってみられた変化は pH の上昇とタンパク量の低下であった。その他のグルコース，ケトン体，潜血の出現はいずれも認められず，ビリルビン量，ウロビリニン量には変化が認められなかった。pH の上昇は検体の物性によるものと考えられる。タンパク量低下の理由是不明であるが，本実験で観察された発育抑制，尿 pH，血清総タンパク量およびアルブミン量の増加，腎重量増加等との関連の有無に興味がある。

以上，OPP-Na 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 および

表 11. 血 清 生 化 学 的 検 査

|                         | 0% (対照)     | 4.0%            | 2.0%           | 1.0%         | 0.5%         | 0.25%        | 0.125%       |
|-------------------------|-------------|-----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| GOT(K. U/ml)            | 126.3±11.07 | 91.6±15.38*(9)  | 100.0±12.68*   | 102.6± 8.39* | 115.2±16.25  | 115.1±23.34  | 121.7±16.26  |
| GPT(K. U/ml)            | 65.5±13.39  | 39.7± 6.07*(9)  | 45.4± 9.25*    | 47.9± 7.01*  | 54.1± 9.29*  | 64.8±16.73   | 66.4±12.15   |
| ALP(KA-U/dl)            | 38.3± 4.05  | 36.0± 5.65(9)   | 37.5± 4.24     | 34.7± 3.02*  | 35.9± 2.33   | 36.2± 3.08   | 35.7± 3.62   |
| TP(g/dl)                | 7.0± 0.17   | 7.4± 0.43*(9)   | 7.4± 0.34*     | 6.9± 0.28    | 6.9± 0.34    | 6.9± 0.28    | 7.0± 0.23    |
| ALB(g/dl) <sup>a)</sup> | 5.2± 0.14   | 5.5± 0.36*(9)   | 5.5± 0.26*     | 5.2± 0.20    | 5.2± 0.22    | 5.1± 0.24    | 5.2± 0.17    |
| 雄 A/G                   | 2.8± 0.16   | 2.8± 0.25(9)    | 2.9± 0.25      | 3.0± 0.13*   | 3.0± 0.13*   | 2.8± 0.21    | 2.8± 0.20    |
| UN(mg/dl)               | 20.1± 0.87  | 19.6± 1.32(9)   | 20.3± 1.70     | 19.3± 1.63   | 19.3± 0.94   | 19.9± 2.07   | 19.4± 1.43   |
| GLU(mg/dl)              | 200.9±18.22 | 174.8±28.71*(9) | 193.7±22.03    | 196.6±25.00  | 184.5±14.41* | 201.2±36.41  | 183.2±14.10* |
| CHO(mg/dl)              | 64.7± 6.97  | 80.4± 7.12*(9)  | 67.2± 4.73     | 55.8± 4.54*  | 61.0± 5.53   | 62.3± 5.85   | 64.0± 4.11   |
| Na(mEq/l)               | 136.0± 2.40 | 136.7± 3.59(9)  | 136.9± 2.02    | 137.9± 6.06  | 136.5± 3.10  | 136.1± 2.13  | 137.3± 1.88  |
| K(mEq/l)                | 6.9± 0.53   | 6.6± 0.37(9)    | 6.9± 0.48      | 6.8± 0.49    | 6.7± 0.51    | 6.5± 0.58    | 6.9± 0.40    |
| GOT(K. U/ml)            | 99.5±17.72  | 100.0±14.02     | 110.5±19.91    | 106.2± 9.02  | 110.4±20.67  | 108.1±23.61  | 98.6±58.93   |
| GPT(K. U/ml)            | 46.3± 6.25  | 36.2± 6.57*     | 40.2± 5.53*    | 44.0± 5.29   | 40.9± 9.91   | 47.7± 7.46   | 43.1± 7.08   |
| ALP(KA-U/dl)            | 32.9± 4.93  | 32.6± 3.80      | 30.2± 5.77     | 31.0± 3.68   | 34.1± 7.01   | 32.3± 4.71   | 30.0± 4.39   |
| TP(g/dl)                | 6.4± 0.17   | 6.9± 0.51*      | 6.4± 0.38      | 6.7± 0.33*   | 6.4± 0.31    | 6.4± 0.29    | 6.6± 0.28    |
| ALB(g/dl) <sup>a)</sup> | 4.9± 0.11   | 5.2± 0.35*      | 4.9± 0.26      | 5.2± 0.23*   | 4.9± 0.26    | 4.9± 0.19    | 5.0± 0.20    |
| 雌 A/G                   | 3.2± 0.21   | 3.1± 0.21       | 3.2± 0.22      | 3.3± 0.18    | 3.3± 0.15    | 3.2± 0.20    | 3.1± 0.16    |
| UN(mg/dl)               | 16.3± 1.63  | 18.2± 2.04*     | 17.7± 2.35     | 17.0± 1.49   | 16.2± 2.09   | 16.8± 1.81   | 16.4± 1.71   |
| GLU(mg/dl)              | 178.1±12.56 | 151.7±10.76*    | 158.7±13.15*   | 168.2± 8.90  | 169.6±20.47  | 161.5±10.58* | 173.7±15.80  |
| CHO(mg/dl)              | 80.7± 6.12  | 90.0± 7.11*     | 82.0± 5.94     | 78.0± 8.43   | 75.5± 8.94   | 78.6± 4.67   | 80.8± 9.94   |
| Na(mEq/l)               | 133.3± 2.49 | 136.1± 1.79*    | 135.1± 2.58(8) | 135.4± 1.35* | 135.5± 2.95  | 135.9± 1.37* | 135.2± 2.61  |
| K(mEq/l)                | 6.3± 1.35   | 6.1± 0.44       | 6.2± 0.29(8)   | 6.1± 0.39    | 5.9± 0.44    | 6.1± 0.37    | 5.8± 0.29    |

値は特例を除き10例平均±SD ( ) 例数 \* 対照群と比較してP<0.05 a) グロムクレゾールグリーン法により測定

表 12. 尿 検 査

|        |              | 0%(cont.)                | 4.0%            | 2.0% | 1.0% | 0.5% | 0.25% | 0.125% |
|--------|--------------|--------------------------|-----------------|------|------|------|-------|--------|
| Male   | pH           | 5                        |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 6                        | 3 <sup>1)</sup> | 1    | 3    | 2    | 2     | 3      |
|        |              | 7                        | 7               | 7    | 6    | 4    | 5     | 6      |
|        |              | 8                        |                 | 2    | 4    | 3    | 3     | 2      |
|        | Protein      | -                        |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 30mg/dl>                 |                 | 1    |      |      |       |        |
|        |              | 30mg/dl                  | 4               | 8    | 7    | 4    | 5     | 6      |
|        |              | 100mg/dl                 | 6               | 1    | 3    | 6    | 5     | 4      |
|        |              | 300mg/dl                 |                 |      |      |      |       | 6      |
|        | Glucose      | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 0.25g/dl                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | Keton Body   | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 10mg/dl<                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | Occult Blood | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 5 <sup>2)</sup>          |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 10                       |                 |      |      |      |       |        |
| Female | Bilirubin    | 0.2mg/dl>                | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 0.2mg/dl<                |                 |      |      |      |       |        |
|        | Urobilin     | 0.1~1E. U. <sup>3)</sup> | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 1E. U. <                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | pH           | 5                        |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 6                        | 8               | 2    | 2    | 6    | 5     | 5      |
|        |              | 7                        | 2               | 3    | 3    | 3    | 2     | 4      |
|        |              | 8                        |                 | 5    | 5    | 1    | 3     | 1      |
|        | Protein      | -                        |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 30mg/dl>                 | 1               | 5    | 1    | 3    | 3     | 1      |
|        |              | 30mg/dl                  | 8               | 5    | 9    | 7    | 7     | 7      |
|        |              | 100mg/dl                 | 1               |      |      |      | 2     | 1      |
|        |              | 300mg/dl                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | Glucose      | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 0.25g/dl                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | Keton Body   | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 10mg/dl<                 |                 |      |      |      |       |        |
|        | Occult Blood | -                        | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 5 <sup>2)</sup>          |                 |      |      |      |       |        |
|        |              | 10                       |                 |      |      |      |       |        |
|        | Bilirubin    | 0.2mg/dl>                | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 0.2mg/dl<                |                 |      |      |      |       |        |
|        | Urobilin     | 0.1~1E. U. <sup>3)</sup> | 10              | 10   | 10   | 10   | 10    | 10     |
|        |              | 1E. U. <                 |                 |      |      |      |       |        |

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

4.0% 添加飼料による雌雄ラット 3 か月の飼育実験で、4.0% 群雌雄では多くの観察項目で変化を認め特に体重増加は全期間を通して強く抑制され、対照群に対して約 17% の抑制であった。また雌 2.0% 群は最終的に約 15% の体重増加抑制がみられた。しかしこのほかの 0.125% および 0.25% 群雌雄では殆んど変化はみられず、雄 2.0%、1.0% および 0.5% 群、雌 1.0% および 0.5% 群では緒変化は軽微であり、いずれも長期の試験に耐えると予想された。すなわち OPP-Na の Fischer ラットを用いた慢性毒性試験およびがん原性試験での最高投与量（飼料中濃度）は雄 2.0%、雌 1.0% が適当であろう。

#### 総 括

1. 食品添加物、防ばい剤オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 および 4.0% 添加飼料による Fischer ラット雌雄の 13 週間にわたる飼育実験を行った。

2. この間における OPP-Na 1 日体重 kg 当り平均摂取量は 4.0% 群雄 2,487mg, 雌 2,431mg, 2.0% 群雄 1,384mg, 雌 1,338mg, 1.0% 群雄 706mg, 雌 694mg, 0.5% 群雄 353mg, 雌 352mg, 0.25% 群雄 177mg, 雌 177mg, 0.125% 群雄 85mg, 雌 87mg であった。

3. 各種観察項目において 0.25% 群および 0.125% 群等の低濃度群では全く変化が認めず、高濃度群では

i) 体重増加抑制が認められ、対照群に対し 4.0% 群雌雄では約 17%、2.0% 群雌雄約 15% の抑制率であった。

ii) 摂餌量および摂餌効率はやや低下し、飲水量は増加した。

iii) 肝臓および腎臓重量が用量に伴って増加した。

iv) 血清トランスアミラーゼ特に GPT 活性が用量に伴って低下し、総タンパク量、アルブミンの増加傾向がみられた。

v) 貧血傾向が特に雌でみられた。

vi) 尿の pH の増大傾向とタンパクの減少傾向を示した。

4. 以上の成績を総合して慢性毒性試験およびがん原性試験における最高投与量（飼料添加濃度）を雄 2.0%、雌 1.0% と決めた。

#### 文 献

- 1) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 2) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 3) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 89, 1978
- 4) 小縣昭夫, 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 99, 1978
- 5) 佐々木美枝子, 縄井寿美子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 104, 1978
- 6) 佐々木美枝子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 109, 1978
- 7) 縄井寿美子, 小縣昭夫, 吉田誠二, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 97, 1978
- 8) 遠藤英美: 談話
- 9) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J. Jr, Spencer, H. C., and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 104, 202, 1952

## チアベンダゾール (TBZ) の亜急性毒性について

米山 允子\*, 伊川 三枝子\*, 平賀 興 吾\*

### Subacute Toxicity of Thiabendazole

MASAKO YONEYAMA\*, MIEKO IKAWA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール thiabendazole, 肝臓・腎臓酵素への影響 effect of liver and kidney enzyme, ラット rat

#### 緒 言

Thiabendazole (2-(4-Thiazolyl) benzimidazole) は 1961年に駆虫剤として開発されて以来, 防カビ剤としても使用されている。日本では1978年にかんきつ類の防カビ剤として許可された。Thiabendazole の毒性については Robinson<sup>1)</sup> らが報告しているが, 顕著な毒作用のないことを示唆している。我々はラットを用いて肝臓・腎臓の酵素を中心に Thiabendazole の生体に及ぼす影響を経時的に検討したので報告する。

#### 実験材料及び方法

(試料) Thiabendazole は, 東京化成 K・K 製 Lot No AN03 を使用した。

(実験動物) Wistar JCL 系ラット 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。

(投与方法, 期間) Thiabendazole を日本クレア製飼料 CE-2 に 0.25%, 0.5% になるように混和しラットに自由摂取させた。動物は室温 25±1℃, 湿度 50~60%, 照明時間 6—18 時の飼育条件下で 1 週間及び 6 週間飼育した。飼育期間中, 毎週体重, 飼料及び試料, 摂取量, 飲水量を測定し症状観察を行った。実験終了時, 次の項目について検討した。断頭採血後, 血液学的, 血清生化学的検査, 肝・腎の重量測定及び酵素学的検査を行った。血液学的検査: 断頭時放出する血液をヘパリン塗布試験管に採取後, Coulter Counter Model S を用いて次の項目を測定した。①白血球数 (WBC) ②赤血球数 (RBC) ③ヘモグロビン量 (Hgb) ④ヘマトクリット (Hct) ⑤平均赤血球容積 (MCV) ⑥平均赤血球ヘモグロビン量 (MCHC)。血清生化学的検査: 採血後 3000 rpm, 10 分遠心分離後, 血清を採取し, 日立自動分析装置 M400 を用いて次の項目について測定した。①グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素 (GOT, Reitman-

Frankel 変法) ②グルタミン酸ビルビン酸アミノ基転移酵素 (GPT, Reitman-Frankel 変法) ③グルコース量 (GLU, グルコースオキシダーゼ法) ④尿素窒素法 (UN, ウレアーゼインドフェノール法) ⑤総コレステロール量 (CHO, Lieberman-Burchard 法) ⑥アルカリフォスファターゼ (ALP, Kind-King 変法) ⑦コリンエステラーゼ (CHE,  $\Delta$ PH 法), 肝臓の測定酵素<sup>2)</sup>: グルコース-6-フォスファターゼ (G6Pase), 乳酸脱水素酵素 (LDH), GPT, GOT, Total Acidphosphatase (T.ACP) 腎臓の測定酵素: G6Pase, Mg-ATPase, Na, K-ATPase, T.ACP, Alp, イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH), マレイン酸脱水素酵素 (MDH), グルコース脱水素酵素 (GIDH), LDH。蛋白質の定量は Lowry<sup>3)</sup> らの方法に従った。

#### 結 果

①一般症状 体重増加は Table 1 に示すように 0.5% で雌雄とも有意な減少を示し, 個体当りの 1 日の飼料摂取量は雌雄とも対照に比べ 0.5% で減少している。0.5% 群の雄は飼料摂取後, 3 日目で頭頸部脱毛症状を示した。

②血液学的検査 Table 2 に示すように 6 週目 0.5% 投与群雄雌の RBC に有意な減少がみられた。

③血清生化学的検査 Table 3 に示した。CHE は 0.5% 投与群で雌雄の 1 週目に有意な上昇を示し, 雌の 6 週目では 0.25%, 0.5% 投与群に有意な上昇を示している。CHO は雌雄の 1.6 週目とも濃度に比例して有意な上昇を示している。TP は雌雄の 1.6 週目とも濃度に比例して有意な上昇を示しているか, 上昇の傾向を示している。

④臓器重量 肝, 腎の臓器重量を Table 4 に示した。肝臓は 1.6 週目とも体重比重量に有意な増加を示し, 腎臓では 6 週目の雄に有意な増加を示している。

\* 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



Table 1. Body Weight Gain, Food, Water and Sample Consumption of Rats on Administration of TBZ

| Sex    | %       | No. of Rats | Initial Body wt (g)     |           | Final Body wt (g) |            | Body wt Gain (%) |            | Food (g/rat/day) |      | Water (g/rat/day) |      | Sample (g/kg/B. W/day) |       |
|--------|---------|-------------|-------------------------|-----------|-------------------|------------|------------------|------------|------------------|------|-------------------|------|------------------------|-------|
|        |         |             | 1 <sup>1)</sup>         | 6         | 1                 | 6          | 1                | 6          | 1                | 6    | 1                 | 6    | 1                      | 6     |
| Male   | Control | 5           | 107.4±4.4 <sup>2)</sup> | 104.6±1.9 | 133.4±4.6         | 254.4±19.2 | 124.2±9.1        | 242.8±19.7 | 15.6             | 15.1 | 15.0              | 20.8 |                        |       |
|        | 0.25    | 5           | 105.8±3.5               | 104.4±2.7 | 132.2±1.6         | 232.6±17.2 | 124.8±3.9        | 222.6±20.5 | 14.9             | 13.8 | 19.0              | 20.1 | 0.280                  | 0.146 |
|        | 0.50    | 5           | 107.0±4.7               | 104.2±2.1 | 100.0±5.4         | 162.8±12.5 | 93.0±2.0         | 156.0±13.3 | 10.2             | 11.0 | 20.5              | 20.1 | 0.510                  | 0.314 |
| Female | Control | 5           | 107.4±2.8               | 106.0±4.0 | 117.6±2.7         | 158.0±7.9  | 114.2±4.7        | 148.0±6.0  | 8.1              | 14.4 | 19.4              | 22.6 |                        |       |
|        | 0.25    | 5           | 103.8±3.5               | 103.4±4.1 | 111.6±1.1         | 150.2±5.6  | 113.0±8.5        | 144.8±3.8  | 10.0             | 18.6 | 19.9              | 27.8 | 0.225                  | 0.306 |
|        | 0.50    | 5           | 98.4±3.2                | 97.4±3.2  | 93.8±13.8         | 111.6±4.5  | 94.8±3.5         | 114.2±3.1  | 5.5              | 12.9 | 14.4              | 24.4 | 0.290                  | 0.576 |

1) Week 2) Values are the mean ± S.D. \*P<0.1 \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01

Table 2. Blood Components of Rats on Administration of TBZ

| Sex    | %       | No. of Rats | WBC (×10 <sup>9</sup> ) |           | RBC (×10 <sup>6</sup> ) |           | HGB (mg)   |            | HCT (%)    |            | MCV (μ <sup>3</sup> ) |            | MCH (μg)   |            | MCHC (%)   |            |
|--------|---------|-------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|        |         |             | 1 <sup>1)</sup>         | 6         | 1                       | 6         | 1          | 6          | 1          | 6          | 1                     | 6          | 1          | 6          | 1          | 6          |
| Male   | Control | 5           | 6.82±2.24 <sup>2)</sup> | 6.74±1.28 | 8.10±2.23               | 8.25±0.63 | 16.82±4.62 | 15.14±0.48 | 54.82±2.49 | 40.18±1.15 | 59.20±2.04            | 52.40±0.54 | 18.74±5.68 | 19.38±0.55 | 32.76±6.57 | 37.34±0.74 |
|        | 0.25    | 5           | 5.80±1.46               | 7.25±0.65 | 8.25±2.01               | 7.61±0.67 | 16.62±3.86 | 14.55±1.24 | 61.40±3.04 | 38.80±3.45 | 57.60±0.89            | 52.00±0.70 | 16.36±6.08 | 19.30±0.77 | 30.34±8.54 | 37.33±1.28 |
|        | 0.50    | 5           | 6.85±0.44               | 6.30±1.27 | 7.66±0.63               | 7.20±0.14 | 16.30±1.67 | 15.05±0.64 | 45.31±2.30 | 40.25±1.12 | 58.50±0.57            | 56.50±0.57 | 21.48±0.45 | 20.85±0.37 | 37.47±0.57 | 37.18±0.71 |
| Female | Control | 5           | 7.20±0.00               | 7.74±2.38 | 6.94±1.68               | 7.80±0.15 | 12.03±2.44 | 15.36±0.28 | 35.73±8.34 | 43.03±1.07 | 60.20±0.83            | 55.25±1.89 | 18.90±2.11 | 19.90±0.18 | 34.18±1.61 | 35.75±1.22 |
|        | 0.25    | 5           | 7.10±0.08               | 7.62±0.58 | 6.78±0.47               | 7.42±0.31 | 14.34±0.64 | 14.96±0.82 | 41.50±3.41 | 40.46±1.71 | 61.80±2.95            | 54.60±1.34 | 21.16±1.47 | 19.52±0.13 | 33.92±6.19 | 36.96±2.16 |
|        | 0.50    | 5           | 7.40±0.58               | 5.70±1.56 | 7.86±1.58               | 7.20±0.27 | 14.92±2.06 | 15.26±0.29 | 41.70±5.74 | 41.02±2.04 | 60.63±0.82            | 59.00±1.24 | 19.28±1.97 | 20.08±0.63 | 34.45±0.81 | 37.22±1.98 |

1) Week 2) Values are the mean ± S.D. \*P<0.1 \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01

Table 3 Biochemical Values in Serum of Rats on Administration of TBZ

| Sex    | %       | ChE ( $\Delta$ pH)              |                   | Glu (mg/dl)     |                 | UN (mg/dl)     |                | GOT (K. U/ml)    |                  | GPT (K. U/ml)   |                 | CHO (mg/dl)     |                 | T. P (g/dl)   |                | A L P           |                |
|--------|---------|---------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
|        |         | 1 <sup>1)</sup>                 | 6                 | 1               | 6               | 1              | 6              | 1                | 6                | 1               | 6               | 1               | 6               | 1             | 6              | 1               | 6              |
| Male   | Control | 0.163 $\pm$ 0.001 <sup>2)</sup> | 0.168 $\pm$ 0.000 | 139.4 $\pm$ 3.2 | 126.4 $\pm$ 7.4 | 23.4 $\pm$ 2.0 | 24.2 $\pm$ 1.6 | 154.0 $\pm$ 20.2 | 160.8 $\pm$ 15.3 | 35.6 $\pm$ 6.0  | 34.0 $\pm$ 5.7  | 119.8 $\pm$ 3.9 | 107.0 $\pm$ 2.7 | 6.0 $\pm$ 0.2 | 6.9 $\pm$ 0.1  | 63.6 $\pm$ 10.4 | 50.2 $\pm$ 4.3 |
|        | 0.25    | 0.163 $\pm$ 0.002               | 0.167 $\pm$ 0.001 | 140.8 $\pm$ 2.4 | 121.4 $\pm$ 7.5 | 22.2 $\pm$ 1.0 | 21.6 $\pm$ 1.3 | 150.0 $\pm$ 11.1 | 167.6 $\pm$ 12.1 | 38.2 $\pm$ 6.8  | 35.6 $\pm$ 3.1  | 127.8 $\pm$ 5.4 | 114.8 $\pm$ 2.8 | 6.5 $\pm$ 0.3 | 7.3 $\pm$ 0.1  | 76.6 $\pm$ 5.7  | 56.0 $\pm$ 4.3 |
|        | 0.50    | **                              | **                | **              | **              | 24.3 $\pm$ 2.5 | 24.2 $\pm$ 1.6 | 177.4 $\pm$ 22.8 | 167.8 $\pm$ 9.5  | 42.4 $\pm$ 13.2 | 43.2 $\pm$ 7.1  | 131.8 $\pm$ 2.8 | 134.8 $\pm$ 9.7 | 6.7 $\pm$ 0.2 | 7.6 $\pm$ 0.2  | 76.2 $\pm$ 11.1 | 68.8 $\pm$ 8.8 |
| Female | Control | 0.153 $\pm$ 0.003               | 0.117 $\pm$ 0.005 | 133.8 $\pm$ 4.6 | 130.0 $\pm$ 6.9 | 26.3 $\pm$ 2.0 | 25.0 $\pm$ 3.3 | 170.2 $\pm$ 11.5 | 167.4 $\pm$ 6.5  | 33.0 $\pm$ 4.2  | 36.0 $\pm$ 3.8  | 128.0 $\pm$ 2.2 | 118.4 $\pm$ 4.8 | 6.5 $\pm$ 0.1 | 6.9 $\pm$ 0.1  | 72.8 $\pm$ 4.3  | 47.6 $\pm$ 2.9 |
|        | 0.25    | 0.159 $\pm$ 0.008               | 0.131 $\pm$ 0.006 | 133.6 $\pm$ 5.4 | 130.4 $\pm$ 4.9 | 23.7 $\pm$ 2.3 | 23.2 $\pm$ 2.2 | 175.4 $\pm$ 18.8 | 165.6 $\pm$ 17.9 | 39.8 $\pm$ 6.2  | 39.0 $\pm$ 11.8 | 153.0 $\pm$ 7.1 | 137.0 $\pm$ 4.9 | 6.7 $\pm$ 0.1 | 7.1 $\pm$ 0.08 | 79.8 $\pm$ 6.4  | 51.0 $\pm$ 5.6 |
|        | 0.50    | **                              | **                | **              | **              | 25.0 $\pm$ 1.7 | 26.7 $\pm$ 1.2 | 164.4 $\pm$ 33.0 | 181.0 $\pm$ 10.3 | 36.8 $\pm$ 8.1  | 53.2 $\pm$ 9.9  | 149.6 $\pm$ 8.9 | 158.8 $\pm$ 5.6 | 6.7 $\pm$ 0.3 | 7.4 $\pm$ 0.3  | 63.4 $\pm$ 8.5  | 56.0 $\pm$ 4.7 |

1) Week 2) Values are the mean  $\pm$  S.D. \*P<0.1 \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01

Table 4. Organ Weight of Liver and Kidney on Administration of TBZ

| Sex    | %       | No. of Rats | Liver                         |                 |                 |                 | Kidney          |                 |                 |                 |
|--------|---------|-------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|        |         |             | 1 <sup>1)</sup>               |                 | 6               |                 | 1               |                 | 6               |                 |
|        |         |             | g                             | g/100gBW        | g               | g/100gBW        | g               | g/100gBW        | g               | g/100gBW        |
| Male   | Control | 5           | 6.04 $\pm$ 0.50 <sup>2)</sup> | 4.52 $\pm$ 0.23 | 9.61 $\pm$ 0.73 | 3.91 $\pm$ 0.31 | 1.19 $\pm$ 0.04 | 0.89 $\pm$ 0.01 | 1.10 $\pm$ 0.08 | 0.70 $\pm$ 0.02 |
|        | 0.25    | 5           | **                            | 6.98 $\pm$ 0.46 | 5.28 $\pm$ 0.40 | 9.98 $\pm$ 0.79 | 4.28 $\pm$ 0.05 | 1.18 $\pm$ 0.04 | 0.89 $\pm$ 0.03 | 1.12 $\pm$ 0.01 |
|        | 0.50    | 5           | ***                           | 5.54 $\pm$ 0.55 | 5.53 $\pm$ 0.29 | 7.89 $\pm$ 0.83 | 4.83 $\pm$ 0.25 | 0.91 $\pm$ 0.05 | 0.91 $\pm$ 0.01 | 0.98 $\pm$ 0.03 |
| Female | Control | 5           | 5.10 $\pm$ 0.09               | 4.33 $\pm$ 0.08 | 5.40 $\pm$ 0.29 | 3.41 $\pm$ 0.07 | 1.08 $\pm$ 0.06 | 0.87 $\pm$ 0.02 | 1.78 $\pm$ 0.11 | 0.70 $\pm$ 0.01 |
|        | 0.25    | 5           | *                             | 5.56 $\pm$ 0.34 | 4.98 $\pm$ 0.34 | 5.75 $\pm$ 0.22 | 3.83 $\pm$ 0.15 | 1.04 $\pm$ 0.08 | 0.89 $\pm$ 0.01 | 1.71 $\pm$ 0.13 |
|        | 0.50    | 5           | ***                           | 4.28 $\pm$ 0.46 | 4.62 $\pm$ 0.66 | 4.73 $\pm$ 0.19 | 4.24 $\pm$ 0.14 | 0.85 $\pm$ 0.04 | 0.91 $\pm$ 0.03 | 1.30 $\pm$ 0.13 |

1) Week 2) Values are the mean  $\pm$  S.D. \*P<0.1 \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01

Table 5. Liver Enzyme Activities of Rats on Administration of TBZ

| Sex    | %       | G6Pase                     |                          | T. ACP                  |           | LDH                     |             | GPT                      |                          | GDT                      |                           |
|--------|---------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|        |         | $\mu\text{moles Pi/mg/hr}$ |                          | $\mu\text{moles/mg/hr}$ |           | $\Delta\text{E/mg/min}$ |             | KU/mg                    |                          | KU/mg                    |                           |
|        |         | 1 <sup>1)</sup>            | 6                        | 1                       | 6         | 1                       | 6           | 1                        | 6                        | 1                        | 6                         |
| Male   | Control | 3.92±0.23 <sup>2)</sup>    | 4.29±0.27                | 3.0±0.06                | 2.74±0.37 | 1.080±0.120             | 1.320±0.162 | 88.0±22.2                | 158.0±8.7                | 121.8±12.0               | 202.4±11.9                |
|        | 0.25    | 3.50±0.51                  | 4.38±0.27                | 2.96±0.41               | 2.72±0.49 | 1.092±0.205             | 1.176±0.156 | 88.8±13.2                | 141.4±13.3 <sup>**</sup> | 103.4±23.4               | 177.2±12.9 <sup>***</sup> |
|        | 0.50    | 2.90±0.14 <sup>***</sup>   | 3.97±0.23 <sup>***</sup> | 2.79±0.31               | 2.42±0.23 | 0.792±0.107             | 1.092±0.565 | 125.4±15.4 <sup>**</sup> | 161.4±50.4               | 130.0±26.2               | 159.8±59.5                |
| Female | Control | 2.76±0.24                  | 2.70±0.36                | 3.96±0.28               | 2.46±0.22 | 0.672±0.065             | 0.708±0.098 | 110.2±12.1               | 134.4±11.4               | 126.8±14.3               | 136.4±12.2                |
|        | 0.25    | 2.78±0.28                  | 3.46±0.18                | 4.10±0.25               | 2.56±0.15 | 0.720±0.060             | 0.612±0.078 | 108.6±8.5                | 131.5±14.5               | 117.6±13.7               | 135.8±15.5                |
|        | 0.50    | 2.66±0.40                  | 2.47±0.18                | 4.26±0.19               | 2.64±0.19 | 0.636±0.032             | 0.492±0.050 | 115.0±31.9               | 125.5±13.0               | 101.8±17.4 <sup>**</sup> | 108.8±9.8 <sup>***</sup>  |

1) Week 2) Values are mean±SD \*P&lt;0.1 \*\*P&lt;0.05 \*\*\*P&lt;0.01

Table 6. Kidney Enzyme Activities of Rats on Administration of TBZ

| Sex    | %       | G6Pase                   |                         | Mg-ATP                   |                           | Na,K-ATP                 |                          | T. ACP                   |                           | AIP                      |                           | ICDH                    |                          | MDH                     |                        | GIDH                     |                          | LDH                      |                        |
|--------|---------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
|        |         | $\mu\text{moles/mg/hr}$  |                         | $\mu\text{moles/mg/hr}$  |                           | $\mu\text{moles/mg/hr}$  |                          | $\mu\text{moles/mg/hr}$  |                           | $\mu\text{moles/mg/hr}$  |                           | $\Delta\text{E/mg/min}$ |                          | $\Delta\text{E/mg/min}$ |                        | $\Delta\text{E/mg/min}$  |                          | $\Delta\text{E/mg/min}$  |                        |
|        |         | 1 <sup>1)</sup>          | 6                       | 1                        | 6                         | 1                        | 6                        | 1                        | 6                         | 1                        | 6                         | 1                       | 6                        | 1                       | 6                      | 1                        | 6                        | 1                        | 6                      |
| Male   | Control | 4.76±0.15 <sup>2)</sup>  | 3.61±0.27               | 12.89±1.04               | 12.17±1.50                | 6.88±0.84                | 6.48±0.76                | 4.27±0.29                | 5.82±0.58                 | 10.89±0.92               | 14.00±1.53                | 0.56±0.04               | 0.65±0.10                | 1.88±0.12               | 2.22±0.22              | 0.15±0.01                | 0.19±0.01                | 2.76±0.06                | 3.81±0.37              |
|        | 0.25    | 4.57±0.17                | 3.63±0.19               | 11.56±0.71 <sup>**</sup> | 11.04±1.60                | 5.49±0.93 <sup>**</sup>  | 7.55±1.87                | 4.58±0.25                | 6.58±0.85                 | 11.69±1.33               | 14.18±1.04                | 0.53±0.00               | 0.66±0.03                | 1.88±0.10               | 2.23±0.18              | 0.14±0.02                | 0.17±0.01 <sup>**</sup>  | 2.97±0.18 <sup>**</sup>  | 3.99±0.23              |
|        | 0.50    | 4.64±0.22 <sup>***</sup> | 3.13±0.13 <sup>**</sup> | 11.31±0.52 <sup>**</sup> | 10.48±0.90                | 5.63±0.88 <sup>**</sup>  | 6.91±1.83                | 5.38±0.22 <sup>***</sup> | 7.02±0.67 <sup>**</sup>   | 11.87±0.50 <sup>*</sup>  | 15.26±1.42                | 0.54±0.07               | 0.59±0.03                | 1.78±0.11               | 2.22±0.20              | 0.13±0.01 <sup>**</sup>  | 0.17±0.01 <sup>**</sup>  | 3.01±0.14 <sup>***</sup> | 4.09±0.27 <sup>*</sup> |
| Female | Control | 4.25±0.49                | 3.50±0.36               | 10.62±1.64               | 15.11±0.55                | 6.31±1.07                | 7.20±0.28                | 3.53±0.25                | 8.60±1.19                 | 10.66±1.35               | 12.78±0.90                | 0.47±0.05               | 0.51±0.05                | 1.72±0.15               | 1.72±0.06              | 0.13±0.03                | 0.17±0.01 <sup>**</sup>  | 3.74±0.19                | 4.15±0.23              |
|        | 0.25    | 3.27±0.69                | 3.24±0.23               | 9.04±2.15                | 13.76±0.56 <sup>***</sup> | 4.31±0.94 <sup>**</sup>  | 7.13±0.18                | 3.59±0.33                | 9.21±1.33                 | 10.61±0.99               | 12.57±1.57                | 0.41±0.03 <sup>*</sup>  | 0.21±0.03                | 2.14±0.50               | 1.80±0.08              | 0.12±0.02                | 0.15±0.01 <sup>**</sup>  | 4.80±0.90                | 4.32±0.37              |
|        | 0.50    | 3.47±0.68 <sup>*</sup>   | 3.06±0.22 <sup>*</sup>  | 8.41±1.87 <sup>*</sup>   | 13.36±1.28 <sup>***</sup> | 3.55±1.18 <sup>***</sup> | 5.19±0.56 <sup>***</sup> | 4.23±0.23 <sup>***</sup> | 11.44±0.54 <sup>***</sup> | 7.72±0.37 <sup>***</sup> | 12.45±0.55 <sup>***</sup> | 0.39±0.03 <sup>*</sup>  | 0.43±0.06 <sup>***</sup> | 1.74±0.24               | 1.63±0.06 <sup>*</sup> | 0.10±0.01 <sup>***</sup> | 0.14±0.01 <sup>***</sup> | 4.42±0.30                | 3.95±0.25              |

1) Week 2) Values are the mean ± S.D. \*P&lt;0.1 \*\*P&lt;0.05 \*\*\*P&lt;0.01

⑤肝臓の酵素学的検査 得られた結果はホモジネイトの蛋白量当たりとし Table 5 に示した。G6Pase が雄の1.6週目の0.5%に有意な低下を示し、GOT が1.6週目の各濃度に有意な低下あるいは傾向を示し、LDH は雌雄1.6週目で低下の傾向を示す他は顕著な差を認めなかった。

⑥腎臓の酵素学的検査 Table 6 に示した。G6Pase, Mg-ATP, Na, K-ATP, ICDH, GDH の雌雄に1.6週目とも0.25%, 0.5%投与群で有意な減少あるいは減少の傾向がみられ T. ACP では有意な上昇, LDH の雄のみに有意な上昇がみられた。

#### 考 察

Thiabendazole 0.25%, 0.5%を含む飼料をラットに自由摂取させ、肝臓、腎臓の酵素学的検査を中心に亜急性試験を行った。0.5%群における雌雄の体重の減少は飼料摂取量の低下と推測される。Seiler<sup>4)</sup>はTBZが体重増加に関して雌より雄に感受性の高いことを述べているが、その傾向はみられなかった。しかし赤血球数の減少は同様の結果が得られキレート作用を持つTBZとの関係を更に検討する必要がある。血清中の酵素はCHE, GPT, GOT, CHO, TP に有意な上昇と上昇の傾向を示し、Gluには逆に低下を示していることから肝臓機能の異常が推測される。肝疾患判断の指標とされているGPTは雄の1.6週目の0.5%に有意な上昇あるいは上昇の傾向を示し、同様に血清中のGPTも上昇の傾向を示し肝臓組織障害によるGPTの血中への流出が予測された。G6Pase, LDHは糖代謝系に関与する酵素である。その酵素活性は雌雄いずれも低下の傾向を示しTBZの糖代謝系への影響が示唆された。腎測定酵素に関しては、TCA サイクル系の最初の脱水素酵素であるICDHおよび最後の脱水素酵素であるMDHに低下の傾向が認められ、又アミノ酸代謝とTCA サイクル系を結ぶGDHの有意な低下が認められた。これらのことから

ミトコンドリアにとむ腎皮質部分の障害が推測される。また、G6Paseも投与群において低下していることから糖新生能が減少していることも考えられるが糖新生の律速酵素であるphosphoenolpyruvate carboxykinase活性を測定しさらに詳しく検討する必要がある。Dubach<sup>5)</sup>らは、ラットにaminonucleosideを注入しnephroticratを作成し、腎内酵素を測定している。軽度の腎組織障害時期に活性変化はほとんどないが、障害度が進行するにしたがってTCA サイクル系(ICDH, MDH)の酵素活性は低下し anaerobic, glycolytic enzymes (Hexokinase, LDH)は逆に上昇したと報告している。今回の実験においても同様の傾向が認められた。髄質外部に多く存在しているNa, K-ATPaseは低下の傾向を示していることから遠位部の基底膜の損傷及びそれに伴う輸送機能の低下が推測されるが、さらに詳細な検討を要する。ACPは糸球体で最も活性が強くライソゾーム中に存在し、このマーカーとしての意義をもっていることから測定したが、0.5%投与群において雌雄に有意の上昇を認めた。この上昇がライソゾーム膜が破壊してホモジネイト上清中に蓄積したものかライソゾーム中での合成率がたかまったことによるかは更に検討を要する。

#### 文 献

- 1) Harry J. Robinson, Herbert C. Stoerk, and Otto E. Graessle : *Toxi. and Apply Pharm.*, 7, 53-63, 1965
- 2) 馬淵依子ら：東京衛研年報, 27-2, 20, 1976
- 3) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : *J. Bio. Chem.*, 193, 265, 1951
- 4) Seiler, J. P. : *Mutation Research.*, 32, 151-168, 1965
- 5) Dubach, U. C. and Recant, L. : *J. Clin. Invest.*, 39, 1364, 1960

## オルトフェニルフェノール抗原化の試み

佐々木美枝子\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

### Haptenization of *o*-Phenylphenol

MIEKO SASAKI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

Haptenization of *o*-phenylphenol was studied for investigation of its reaginic action. OPP was reacted *in vitro* with a carrier protein, BSA or KLH, by the method of making protein-nitrophenol complex. Mice were immunized with this OPP-protein complex, and anti-OPP antibodies were assayed *in vitro* by the precipitation reaction using glass capillary tubes and haemoagglutination test of antiserum-sensitized SRBC, and *in vivo* by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test on the rat skin. Some hetero-antigens which had different carrier proteins from the immunized hapten-carrier complex were used as assayed antigens.

Anti-OPP IgG was detected by *in vitro* assay and very low level of anti-OPP IgE was assayed by PCA-test in a part of experiments. Since the titer of anti-OPP IgE was very low, it may be a nonspecific reaction of the rat skin against mouse serum. Details of reaction of protein and OPP or stability of its complex is under investigation, and methods of immunization and assay system will be studied in further experiments.

**Keywords:** *o*-phenylphenate, hapten-carrier system, passive cutaneous anaphylaxis

## 緒 言

毒性部では種々の食品添加物、医薬品等についてその慢性、急性、特殊毒性の検定を行っているが、これらの物質には比較的小分子のものが多く、我々はこれらの物質の免疫反応におよぼす影響について調べることにより毒性研究の一助にしたいと考え、オルトフェニルフェノール（以下 OPP と略す）を検体として、その免疫反応に対する作用<sup>1)</sup> および細胞毒性<sup>2)</sup> について報告した。しかしながら、食品や医薬品として摂取される物質にはその直接作用のほかに、生体中の蛋白質などの高分子物質と結合して間接的な、生体を介した作用のあることも当然考えられる。一方、OPP に皮膚や粘膜に対する刺激性があることは古くは Hodge らも報告し<sup>3)</sup>、我々も検体としてこの物質を扱って経験していることである。そこで、OPP にアレルギー反応を誘発する能力があるかどうかを検討してみることとした。アレルギー反応の発生機序には血中抗体が関与するものと細胞性抗体によるものとが考えられるが、まず OPP に血中レアギン産生誘発能があるか否かを確かめるため、ニトロ化合物であるトリニトロフェノールやジニトロフェノールをモデルとしたハプテン・キャリアー免疫系において、OPP をニトロフェノール様のハプテン化すること

を試みた。未だ予備実験の段階であり、実験結果も不十分ではあるが一連の結果が得られたので報告する。

## 材料および方法

1) ハプテン・キャリアー結合物の作成法：キャリアー蛋白としては、ウシガンマグロブリン(Bovine Gamma Globulin Fr. 2, Nutritional Biochemical Corporation, Control No. 5997; BGG と略す)、ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumine, Fr. 5, MILES, Code No. 81-003-2, Lot. 298; BSA と略す) およびキーホールリンペットヘモシアニン(Keyhole Limpet Hemocyanin CALBIOCHEM. Lot. 730136; KLH と略す)を用いた。ハプテンとしては、ジニトロフェノール(2, 4-Dinitrofluorobenzene, 東京化成, TCI-GR D835, lot. FCMO 1; DNP と略す)、トリニトロフェノール(Sodium 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonate, 東京化成, TCI-GR T497, lot. AJO 2; TNP と略す) およびオルトフェニルフェノール(Orthophenylphenol sodium salt, 東京化成, TCI-CP. P. 202, Lot. ALO 1; OPP)を用いた。

キャリアー蛋白とハプテンとの結合法は恒らの方法<sup>4)</sup>に従った。BSA 200mg, BGG, KLH 各 100mg を 10 mL の生理食塩水に溶解し、炭酸ナトリウムを加えて溶液の pH を 9~10 に調整した。これに DNP, TNP,

\* 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

OPP 各 100mg を加え、室温で18時間、遮光してゆっくり攪拌して蛋白とハプテンを結合させた。この後、未反応のハプテンを除くために、pH 7.5 のリン酸緩衝液を用いて氷室で3日間透析した。透析後の反応液は、280nm の吸光度により蛋白量を測定し、氷室に保存した。

2) 免疫方法：免疫動物としては、BALB/c AnNcrj, C3H/He Ncrj (日本チャールズリバー) および ICR マウス (兄妹交配により自家繁殖) 8~16週令、雌を用いた。免疫方法は浜岡の方法<sup>5)</sup> に従い、初回免疫として1~100 $\mu$ g の抗原液とアジュバントとして Alum (水酸化アルミニウムゲル)<sup>6)</sup> とを等量混合して 0.2~0.5ml をマウス腹腔内に投与し、3週後に追加免疫として同量の抗原液のみを腹腔内注射した。動物は一定数(3~5匹)を一週間ごとにエーテル麻酔下で心臓穿刺により採血屠殺し、得られた血清は-50℃に保存した。

3) 抗体価の検定：抗体価の検定には *in vitro* ではガラス毛细管による沈降反応および感作血球による赤血球凝集反応を用いた。*In vivo* での IgE の検出法としてはラットを用いた受身皮膚アナフィラキシー反応 (passive cutaneous anaphylaxis; PCA と略す) を行った。この反応はハプテン特異的 IgE 抗体の検出法としてきわめて感度の高いものである。被検ラットは、日本チャールズリバーの Fisher F344/Ducrj, 雌、2~4ヶ月令を用いた。ラットはネンブタール麻酔下で背部を剃毛し、マジックインキで約 3cm 間隔で印をつけ、免疫マウス血清を段階希釈して 0.05ml を皮内注射した。4~24時間後に、抗原液 (1mg/ml) と 1% エバンスブルー溶液を等量混合したものを 0.3ml 尾静脈より投与した。陽性反応では皮内注射部位にエバンスブルーによる青色斑が生ずるが、30分~1時間後にこの青色斑の大きさを皮膚外面または剥離した皮膚の内面から測定し、直径 5mm 以上を陽性とした。

#### 結果および考察

予備実験として、ハプテン・キャリアー免疫によりマウスに IgE 抗体産生を促すことが知られている DNP, TNP をハプテン抗原として、C3H/He, BALB/c マウスを免疫した。免疫抗原としては、BGG-DNP, BGG-TNP を用い、各 1, 10, 100 $\mu$ g を Alum (水酸化アルミニウムゲル) とともにマウスに腹腔内投与した。抗体検出用の抗原としては BSA-DNP, BSA-TNP を用い、*in vitro* での沈降反応、*in vivo* ではラット皮膚を利用した PCA テストを行った。この結果 10~100 $\mu$ g/mouse の抗原を Alum (2~5mg/mouse) とともに腹腔内投与し、3週間後に同量の抗原のみで追加免疫を行

うと、4~5週間後に抗ハプテン、抗キャリアー抗体価がともに上昇することが確かめられた。動物は BALB/c の方が反応性が良いように思われたので、以下の実験では BALB/c および自家繁殖した ICR マウスを用いた。

ついで、前述したような反応条件で、KLH および BSA と OPP を反応させた。蛋白と結合させるために加えた OPP の量は 20, 10, 5, 1mg/ml とし、ニトロフェノールの場合と同様に遮光反応後リン酸緩衝液で反応液を透析し、蛋白量を測定後、氷室に遮光保存した。免疫には、BSA-OPP, KLH-OPP 各 10 $\mu$ g/mouse を Alum とともにマウスに腹腔内注射し、3週間後に同量の抗原のみをやはり腹腔内に投与した。初回免疫後1週間ごとに5回、3匹ずつのマウスから採血し、血清はブールして-50℃に保存した。この血清の抗ハプテン、抗キャリアー抗体価の検定を、*in vitro* での沈降反応およびラット皮膚による PCA テストにより行った。抗原は免疫に用いた BSA-OPP, KLH-OPP 各 1mg/ml を用いた。沈降反応の場合には原血清を希釈せずに検定抗原と反応させ、室温に一晩静置した。結果の判定は沈降反応の程度により肉眼的な定性判定を行った。反応後ただちに抗原と抗体の境界面に沈降環を生ずるものを $\pm$ 、数時間以内に沈降環を生ずるものを $\pm$ 、一晩静置後沈降環あるいは管底に沈降物を認めるものを $+$ とし、全く沈降物を生じないものを反応-とした。ラットを用いた PCA テストの結果は、陽性反応を示した抗血清の最大希釈倍率で表わした。2倍希釈血清でも反応の生じないものは-と記載した。結果を Table 1 に示す。沈降反応においては、Exp. 1, 2 および 7 の 5 週目血清に抗ハプテン (抗 OPP) 抗体が認められる。BSA-OPP 免疫群においてホモの抗原に対する沈降反応が KLH-OPP 免疫群より弱いのは、BSA は KLH に比してマウスに対する抗原性が弱いと思われる。どちらの免疫群においても、免疫反応は追加免疫後の 4, 5 週目に顕著になっている。PCA テストでは、Exp. 1 および 5 の 5 週目血清で OPP に対する反応が陽性となった。しかしながら沈降反応において抗体が認められる他の実験群では、5 週目血清の PCA テスト結果は全て陰性であった。Exp. 1 および 5 にみられる反応も PCA としてはきわめて弱いもので、この結果からは抗 OPP-IgE の産生は確認できない。

高力価の抗血清を得る目的で免疫方法を検討し、追加免疫を初回免疫後20日目と40日目の2回行った。動物は ICR マウスを用い、初回免疫には抗原と Alum、追加免疫には抗原のみを腹腔内注射した。抗原量は前回と同様 10 $\mu$ g/mouse であるが、今回は KLH に OPP と

Table 1. Titration of Antisera by Precipitating Reaction and PCA Test

| Exp. No. | Immunized Ag* <sup>1</sup><br>(OPP dose)* <sup>2</sup> | Strain<br>of<br>mice | Weeks<br>after<br>1-st imm. | Assayed Ag* <sup>3</sup> |                   |                    |                   |
|----------|--------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|          |                                                        |                      |                             | BSA-OPP                  |                   | KLH-OPP            |                   |
|          |                                                        |                      |                             | Prc.* <sup>4</sup>       | PCA* <sup>5</sup> | Prc.* <sup>4</sup> | PCA* <sup>5</sup> |
| 1        | BSA-OPP<br>(20mg)                                      | ICR                  | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | +                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | +                        |                   | +                  | NT                |
|          |                                                        |                      | 4                           | +                        |                   | ++                 | 1:8               |
|          |                                                        |                      | 5                           | +                        |                   | +++                | 1:4               |
| 2        | BSA-OPP<br>(10mg)                                      | BALB/c               | 1 wk                        | +                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | +                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | +                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | ++                       |                   | +                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | ++                       |                   | +                  | —                 |
| 3        | BSA-OPP<br>(5mg)                                       | BALB/c               | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | +                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | +                        |                   | —                  | —                 |
| 4        | BSA-OPP<br>(1mg)                                       | BALB/c               | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | +                        |                   | +                  | —                 |
| 5        | KLH-OPP<br>(20mg)                                      | ICR                  | 1 wk                        | —                        | 1: 4              | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        | 1: 2              | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | +                        | 1: 2              | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | —                        | —                 | ++                 | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | —                        | 1:64              | +++                | —                 |
| 6        | KLH-OPP<br>(10mg)                                      | BALB/c               | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | —                        |                   | +                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | —                        |                   | ++                 | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | —                        | 1: 2              | +++                | —                 |
| 7        | KLH-OPP<br>(5mg)                                       | BALB/c               | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | —                        |                   | ++                 | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | —                        |                   | +++                | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | ++                       | —                 | +++                | —                 |
| 8        | KLH-OPP<br>(1mg)                                       | BALB/c               | 1 wk                        | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 2                           | —                        |                   | +                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 3                           | —                        |                   | —                  | —                 |
|          |                                                        |                      | 4                           | —                        |                   | ++                 | —                 |
|          |                                                        |                      | 5                           | +                        | —                 | +++                | —                 |

\*1 Mice were immunized with 10 $\mu$ g/mouse of Ag + Alum and boosted with same dose of Ag after 3 weeks.

\*2 Added OPP (mg/ml) at preparing the complex of protein and OPP.

\*3 Antisera were assayed with homo- and hetero-Ag.

\*4 Precipitation reaction using glass capillary tubes.  
(1mg/ml of Ag: undiluted serum)

\*5 Passive cutaneous anaphylaxis test on rat skin. Diluted antisera were injected i. d. and hetero-Ag (300 $\mu$ g/rat) were challenged i. v. with 0.5% Evans Blue, 18 hr after skin injections.

TNP を二重に反応させた抗原 (KLH-OPP-TNP) と KLH-OPP を比較した。採血は初回免疫後6週目まで1週間ごとに6回行った。この免疫で得られた抗血清を用いて行った PCA テストの結果を Table 2 に示す。検定抗原としては KLH-OPP, BSA-OPP, BGG-TNP, BSA-TNP を用いた。KLH-OPP に対する反応は5,

6週目血清では 1: 64 および 1: 128 とかなり高くなっているが、BSA-OPP では PCA はおこらない。従って KLH-OPP によって検出された抗体は抗 KLH-IgE であり、抗 OPP-IgE は検出されなかった。Exp. 9 において BGG-TNP, BSA-TNP に対する PCA は5, 6週目に認められるので、免疫に使用した ICR マウス

Table 2. Titration of Antisera by PCA Test

| Exp. No. | Immunized Ag* <sup>1</sup> | Weeks* <sup>2</sup> | Assayed Ag* <sup>3</sup> |         |         |         |
|----------|----------------------------|---------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
|          |                            |                     | KLH-OPP                  | BSA-OPP | BGG-TNP | BSA-TNP |
| 9        | KLH-OPP-TNP                | 1 wk                | —                        |         | —       |         |
|          |                            | 2                   | 1:16                     |         | 1:2     |         |
|          |                            | 3                   | 1:16                     |         | 1:16    |         |
|          |                            | 4                   | 1:16                     |         | 1:16    |         |
|          |                            | 5                   | 1:64                     | —       | 1:8     | 1:128   |
|          |                            | 6                   | 1:64                     | —       | 1:128   | 1:128   |
| 10       | KLH-OPP                    | 5 wk                | 1:64                     | —       |         | —       |
|          |                            | 6                   | 1:128                    | —       |         | —       |

\*<sup>1</sup> Mice were immunized with 10 $\mu$ g/mouse of Ag + Alum ip. injection and 20 & 40 days after the 1-st immunization same dose of Ag was injected ip. as booster.

\*<sup>2</sup> Week (s) after the 1-st immunization.

\*<sup>3</sup> Passive cutaneous anaphylaxis test on rat skin was done. Diluted antisera were injected id. and each assayed Ag was challenged iv. with 0.5% Evans Blue, 18 hr after skin injection.

Table 3. Titration of Antisera by Haemoagglutination Test Using Sensitized Sheep Red Blood Cells\*<sup>1</sup>

| Immunized Ag* <sup>2</sup> | Weeks* <sup>3</sup> | Assayed Ag  | Dilution of antisera |     |     |      |      |      |       |
|----------------------------|---------------------|-------------|----------------------|-----|-----|------|------|------|-------|
|                            |                     |             | 1:2                  | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| KLH-OPP                    | 5 wk                | KLH         | +++                  | ++  | +   | +    | —    | —    | —     |
|                            |                     | BSA         | —                    | —   | —   | —    | —    | —    | —     |
|                            |                     | KLH-OPP-TNP | +++                  | +++ | +++ | +    | —    | —    | —     |
|                            |                     | KLH-OPP     | ++                   | ++  | +   | —    | —    | —    | —     |
|                            |                     | BSA-OPP     | —                    | —   | —   | —    | —    | —    | —     |
|                            | 6 wk                | KLH         | +++                  | +++ | +++ | ++   | +    | —    | —     |
|                            |                     | BSA         | —                    | —   | —   | —    | —    | —    | —     |
|                            |                     | KLH-OPP-TNP | +++                  | +++ | +++ | +    | —    | —    | —     |
|                            |                     | KLH-OPP     | +++                  | ++  | ++  | +    | —    | —    | —     |
|                            |                     | BSA-OPP     | —                    | —   | —   | —    | —    | —    | —     |

\*<sup>1</sup> Sheep red blood cells (SRBC) were reacted *in vitro* 1:10 diluted antiserum at 37° C for 30 min and 4° C for 18 hr, then SRBC were washed with phosphate buffer saline containing 0.5% normal rabbit serum. The SRBC were resuspended into gelatin veronal buffer and this SRBC were used as the sensitized erythrocyte. The test was done by microtitration method. 0.025ml of 2-fold diluted antisera and 0.025ml of each assayed Ag (1mg/ml) were reacted on the microplates and 0.025 ml of 2 $\times$ 10<sup>8</sup> sensitized erythrocytes were added into each well. The plates were stirring and then standing at 37°C for 1 hr. and haemoagglutination reaction was observed.

\*<sup>2</sup> Mice were immunized Ag + Alum and boosted twice with only Ag.

\*<sup>3</sup> Weeks after 1-st immunization.

のハプテン・キャリアー免疫に対する反応性には問題はないと思われる。KLH-OPP-TNP 免疫においても、KLH-OPP 免疫においても、抗キャリアー抗体は両者ともに認められるが抗ハプテン抗体は TNP に対してのみ認められた。

つぎに *in vitro* での抗体価検出の感度をあげるために赤血球凝集反応を試みた。感作血球としてはヒツジ赤血球 (SRBC) に Exp. 10 (Table 2) の 5 週目血清を用させたものを用いた。予備実験として 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml の

SRBC に 1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 に希釈した血清を 37°C で 30 分間作用させ、4°C に一晩置いたものを感作血球として反応を行ったところ、1/5 および 1/10 希釈血清で SRBC を感作するのが最適と思われたので、本実験では 1/10 希釈血清によって感作した SRBC を感作血球として用いた。方法は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) に浮遊した 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml SRBC に同量の 1/10 希釈血清を加え、37°C で 30 分間、ついで 4°C で 18 時間、時々おだやかに攪拌して反応させたのち、0.5% に正常



ウサギ血清を含むPBSで血球を洗浄した。これは抗血清で被覆されなかった SRBC 表面をウサギ血清で覆うために行った。洗浄後の感作血球は凝集反応希釈液として用いるゼラチンベロナール緩衝液に再浮遊し、 $2 \times 10^8/\text{ml}$  に調整した。赤血球凝集反応はマイクロタイタープレートを用いて行った。検定抗原としては、KLH, BSA, KLH-OPP-TNP, KLH-OPP, BSA-OPP 各  $1\text{mg}/\text{ml}$  を用いた。検定すべき抗血清  $0.025\text{ml}$  (Exp. 10 に示した 5, 6 週血清) をダイリューターで 2 倍段階希釈し、ついで検定抗原 ( $1\text{mg}/\text{ml}$ )  $0.025\text{ml}$ , 感作血球 ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ )  $0.025\text{ml}$  をドロップで加えた。マイクロタイター用ミキサーで十分に攪拌したのち、 $37^\circ\text{C}$  一時間静置した。判定は一般の赤血球凝集反応の規準に従った。結果を Table 3 に示す。Table 2 の結果と同様、抗 OPP 抗体は認められず (Table 3, BSA-OPP に対する反応は全て-)、抗キャリアー抗体 (抗 KLH 抗体) のみが認められた。

以上の実験結果から総合的に判断すると、抗 OPP-IgE 抗体 (レアギン抗体) はこの方法では産生されないものと思われる。Table 1 で示した抗 OPP-PCA も、きわめて低力価の反応であるため、マウス血清そのものによる非特異的な反応である可能性を否定できない。ただし、沈降反応で認められた抗 OPP 抗体 (Table 1, Exp. 1 および 5) は、抗 OPP-IgG の産生を示唆しているかも知れない。この点を確かめるために、沈降反応よりは感度がすぐれているとされている感作血球による凝集反応を行ったが、結果としてはやはり抗 OPP 抗体を検出することはできなかった。しかしながら、この実験では、ニトロフェノールと全く同様の方法で OPP を蛋白と反応させる方法を取り、OPP と蛋白との結合性や結合物の安定性については検討していない。この点に関しては、吸光度測定等により方法を検討中であるが、未だ結論は得られていない。また、抗体価の測定においても、実験条件をさらに検討する必要があると思われる。これらの点を明らかにしたうえで、OPP のニトロ化など、抗原性を高めるための条件を設定するよう、準備をすすめている。小分子物質の抗原化はホルモンやビタミン等の生体由来小分子物質、過敏症が問題となる種々の薬剤、などに多くの報告が見られるが<sup>7)</sup>、高分子

の免疫に比べればその数は非常に少ない。しかしながら生体内の高分子と結合する可能性のある小分子物質が抗原性をもってアレルギー反応をはじめとする様々な活性を発揮することは十分考えられることであり、今後、種々の実験条件を設定して、この問題を追求してゆくつもりである。

## 結 論

ハプテン・キャリアー免疫系のハプテンとして広く用いられているニトロベンゼンをモデルとして、オルトフェニルフェノールのハプテン化を試みた。キャリアー蛋白としては BSA, KLH, BGG を使い、これらと OPP を *in vitro* で結合させたものを抗原としてマウスを免疫した。抗 OPP 抗体の検出には免疫した抗原とは異なる蛋白をキャリアーとした OPP-蛋白結合物を用い、ラット皮膚を用いた PCA で IgE 抗体を検出し、*in vitro* での沈降反応および感作血球凝集反応によって IgG 抗体の検出を試みた。この結果、BSA-OPP, KLH-OPP を抗原とした場合の一部に、抗 OPP IgG, 抗 OPP IgE を検出できた。しかしながら抗体力価はきわめて低く、非特異反応である可能性も否定できない。OPP と蛋白質との結合性や結合物の安定性、免疫方法や検出方法などに関して実験方法をさらに検討中である。

## 参考文献

- 1) 佐々木美枝子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 109, 1978
- 2) 佐々木美枝子, 縄井寿美子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 104, 1978
- 3) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J. Jr., Spencer, H. C., and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 99, 202, 1952
- 4) 幅 誠二, 浜岡利之: 免疫実験操作法, 抗原Ⅶの 2, 865, 1974, 日本免疫学会編
- 5) 浜岡利之: 免疫実験操作法, 抗体Ⅸの 1, 827, 1974, 日本免疫学会編
- 6) Levine, B. B. and Vaz, N. M.: *Int. Arch. Allergy*, 39, 156, 1970
- 7) Butler, V. P. and Beiser, S. M.: *Advances in Immunology*, 17, 255, 1973, Academic Press, New York & London

## アセトアミノフェンのラットを用いた経口急性毒性

林 田 志 信\*, 高 橋 博\*, 平 賀 興 吾\*

### Acute Oral Toxicity of Acetaminophen in Rats

SHINOBU HAYASHIDA\*, HIROSHI TAKAHASHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** アセトアミノフェン acetaminophen, 解熱・鎮痛薬 analgesic-antipyretics, ラット rat, 急性毒性 acute toxicity

解熱・鎮痛薬アセトアミノフェン acetaminophen (以下 AAP とする) が治療に導入されて以来 70 数年を経ているが、最近このものに変異原性が認められ、さらに同属の phenacetin に癌原性がラットで確認され<sup>2)</sup>、AAP の癌原性が示唆された。

よって AAP の癌原性を検索することとし、まず、ラットによる急性毒性実験をおこなった。

AAP の経口急性毒性については Boyd ら (1966)<sup>3)</sup> の報告があり雄ラットで  $LD_{50}$  は  $3.71 \pm 0.83$  g/kg (AAP トラガカントゴム溶液懸濁液投与) としている。

しかし、所期の目的であった癌原性試験に用いると同一系統同一飼育環境のラット雌雄で概略の  $LD_{50}$  (AAP オリーブ油懸濁液投与) を求めたところ強い雌雄差を示し、雌は雄の 2 倍の値であった。そこで、これを確認するため再実験するとともに AAP をアラビアゴム液に懸濁して投与する実験と併せ行い、懸濁剤による  $LD_{50}$  値の相違も観察した。

#### 試料材料および方法

**検体:** 日本薬局方アセトアミノフェン (AAP) をオリーブ油 (日本薬局方) またはアラビアゴム (日本薬局方) の 0.5% 溶液に懸濁させたもの。投与容量はすべて 10 ml/kg B.W. とした。

**実験動物:** チャールスリバー社生育の近交系 Fischer ラット (F344/DuCrj) 雌雄を 4 週令で購入し、室温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、換気毎時 10 回、照明午前 6 時から午後 5 時の飼育室において前面、床網のステンレスケージ (40×25×16.5 cm) に 5 匹ずつ収容、日本クレア (株) CE-2 固型飼料および細菌ろ過器経由水道水自由摂取の条件にて飼育、発育の良好な動物を実験に供した。

**実験方法:** 動物は投与前日午後 5 時より除餌し、水のみを与え、午前 9 時より 12 時までの間に検体を胃ゾンデにより強制経口投与した。投与 3 時間後より飼料を与え、投与前と同様 1 ケージに 5 匹を入れた。

**実験 1:** オリーブ油中懸濁検体と 13 週令ラットにより、0 (オリーブ油)、1.1 g (11%)、1.5 g (15%)、2.2 g (22%) および 3.0 g (30%)/kg B.W. を雌雄各 5 匹に投与した。

**実験 2:** オリーブ油中懸濁検体と 6 週令ラットにより、0 (無処置)、0 (オリーブ油)、1.6 g、2.1 g、2.8 g、および 3.6 g/kg B.W. を雌雄各 10 匹のラットに投与した。

**実験 3:** 0.2% アラビアゴム液中懸濁検体と 6 週令ラットを用い、0 (無投与)、0 (0.5% アラビアゴム液)、1.1 g、1.7 g、2.6 g、4.0 g および 6.0 g/kg B.W. を各 10 匹の雄ラットに、0 (無投与)、0 (0.5% アラビアゴム液)、2.8 g、3.6 g、4.7 g、6.1 g、8.0 g/kg B.W. を各 10 匹の雌ラットに投与した。

**症状:** 生死の観察は検体投与後午後 5 時までは連続的に、以降 24 時間まで 2 時間毎に、2 日以降は朝夕 2 回行った。死亡ラットは直ちに剖検し、実験 1、2 の生存ラットについては体重 3 週間、毎日午前 9 時 30 分に測定した。また、1 週間の死亡率にもとづき Litchfield-Wilcoxon 法<sup>4)</sup>により 50% 死亡量 ( $LD_{50}$ ) を求めた。

#### 結果および考察

**Control** 各実験の無投与 control 群では、投与前の一夜絶食による体重減少も 24 時間後には大体回復し順調な発育を示した。Vehicle control のオリーブ油投与ラットでは 2~4 時間頃少数に軟便ないしは、下痢がみられ、多数に水の多飲がみられた。0.5% アラビアゴム液投与ラットでも下痢を示すものがあった。しかし、両 Vehicle control とも 24 時間後には絶食により減少した体重もほとんど回復し、以降無投与 Control 群と大体同様の発育を示した (図 1, 2, 3, 4)。

**投与群** 各実験で観察した症候は、共通していたが、オリーブ油懸濁液を使用した実験 (1) および (2) では動物の年令の低い実験 (2) の方が発症時間、死亡時間がやや早い

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

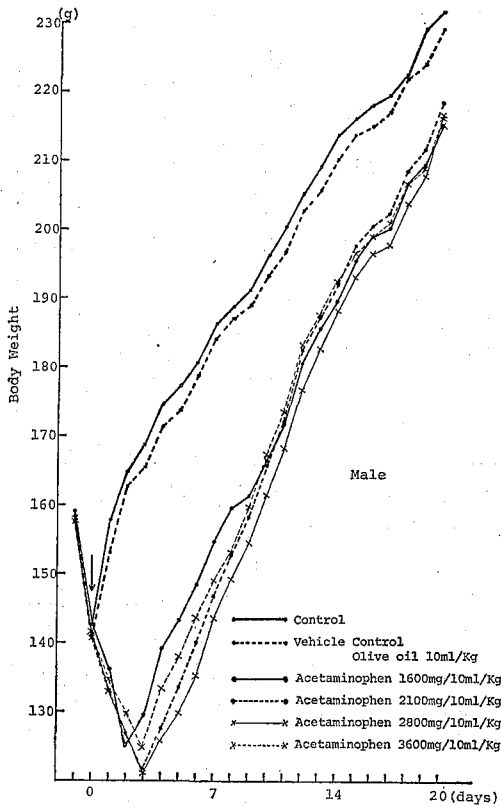


図1. アセトアミノフェンのラットにおける経口急性毒性——体重

試料：オリーブ油懸濁液，動物：Fischer 系ラット雄，↓：試料投与（午前9時30分から午前11時），投与前一夜絶食

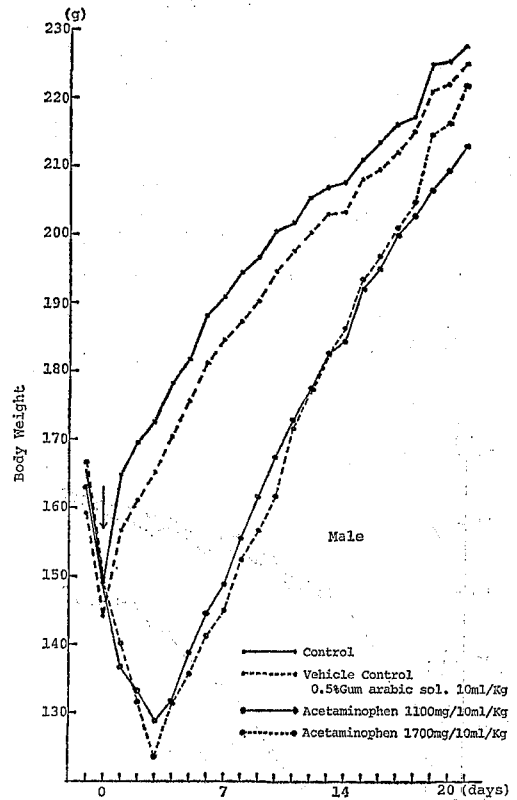


図3. アセトアミノフェンのラットにおける経口急性毒性——体重

試料：0.5%アラビアゴム液懸濁液，動物：Fischer 系ラット雄，↓：試料投与（午前9時30分から午前11時），投与前一夜絶食

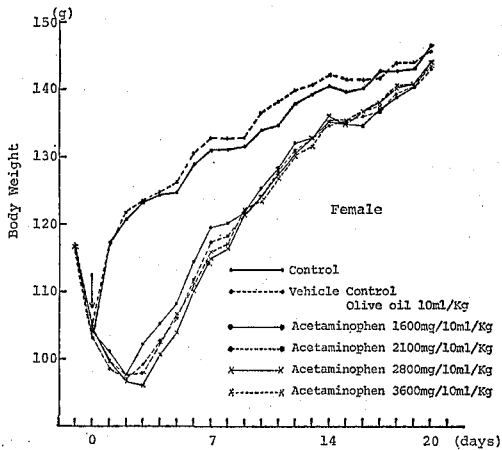


図2. アセトアミノフェンのラットにおける経口急性毒性——体重

試料：オリーブ油懸濁液，動物：Fischer 系ラット雌，↓：試料投与（午前9時30分から午前11時），投与前一夜絶食

ようであったが，致死率には大差なかった。オリーブ油懸濁液使用と0.5%アラビアゴム液懸濁液使用とでは後者での発症時間が早く，その程度も強く，死亡時間も早く，致死率も高かった。いずれの実験においても雌雄間の発症時間，症状，死亡時間に大差はなかったが，致死率は雌より雄の方が高かった。

主な症状は投与直後よりうずくまり閉眼のもの多く，次いで一部に立毛，つま先で歩く，網につかまって立つ，水のみを激しい動作をする，自身の前趾を咬む，他を攻撃する等興奮様の行動を示すものがあり，続いて鼻閉，呼吸困難を示し，眼色は黒ずみ（透明感があり），鼻あるいは肛門からの出血，ときに血尿等がみられた。最後に横臥，正向反射消失して死に致った。死亡ラットの剖検では肺，胸腺に赤斑があり，胃特に噴門部に潰瘍と出血，腸内にも血液の存在が認められた。肝臓では表

表 1. アセトアミノフェンの Fischer ラットにおける経口急性毒性

| 実験 | Vehicle          | ラット |   |               | 死亡時間(時) |       |     | 致死曲線<br>勾配函数 | LD <sub>50</sub><br>g/kg | 95%信頼限界<br>g/kg |
|----|------------------|-----|---|---------------|---------|-------|-----|--------------|--------------------------|-----------------|
|    |                  | 週令  | 性 | 体重±S.D<br>(g) | 開始      | ピーク   | 最終  |              |                          |                 |
| 1  | オリーブ油            | 13  | ♂ | 268±8.2       | 24      | 44—72 | 160 | 1.58         | 2.2                      | 1.8—2.8         |
|    |                  |     | ♀ | 161±6.5       | 20      | 20    | 20  | 2.50         | 4.8                      | 2.8—8.5         |
| 2  |                  | 6   | ♂ | 158±12.6      | 19      | 21—34 | 68  | 4.90         | 2.4                      | 1.2—4.8         |
|    |                  |     | ♀ | 117±4.8       | 17      | 22    | 30  | 1.69         | 5.6                      | 3.5—8.8         |
| 3  | 0.5% アラ<br>ビアゴム液 | 6   | ♂ | 166±3.5       | 4       | 16—24 | 24  | 1.54         | 1.7                      | 1.3—2.1         |
|    |                  |     | ♀ | 117±2.6       | 4       | 16—24 | 24  | 1.78         | 2.9                      | 2.1—3.8         |

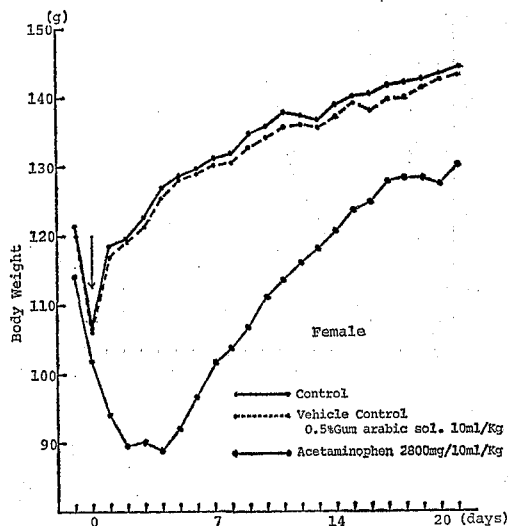


図 4. アセトアミノフェンのラットにおける経口急性毒性——体重

試料：0.5%アラビアゴム液懸濁液，動物：Fischer 系ラット雌，↓：試料投与(午前9時30分から午前11時)，投与前一夜絶食

面が粗となっていた。

死亡の発生時間(開始，ピーク，最終)を表1に示した。最高160時であったが，大多数は24時以内に死亡した。

死をまぬがれた動物は2～4日まで体重減少を続けたが以降急速に回復に向い，その体重増加曲線の勾配はControlのそれより急であった。しかし3週間の観察期間中にControlと同等の体重までに回復するには至らなかった(図1, 2, 3, 4)。

用量一致致死率曲線の slope function (Litchfield-Wilcoxon 法) および LD<sub>50</sub> 値とその95%信頼限界値を表1

に示した。実験1の雌，実験2の雄においては用量一致致死率関係不良で slope function が大きくそれぞれ2.50, 4.90となったが，その他は雌雄とも1.60前後であった。LD<sub>50</sub> はいずれも性差を示し，オリーブ油を用いた実験1, 2では動物の週令による差は認められず，雄2.2g, 2.4g/kg 雌4.8g, 5.6g/kg であった。0.5%アラビアゴム液を用いた実験3では雄1.7g, 雌2.9g/kg であった。すなわち実験2と3とのLD<sub>50</sub> 値には明らかな差が認められた。

### ま と め

- ① アセトアミノフェン(AAP)のFischer系ラット雌雄における急性毒性を，AAPのオリーブ油と0.5%アラビアゴム液とによる懸濁液を経口投与して検討した。
- ② LD<sub>50</sub> 値は，オリーブ油懸濁液使用，13週令ラット雄2.2g/kg，同雌4.8g/kg，6週令ラット雄2.4g/kg 同雌5.6g/kg，0.5%アラビアゴム液懸濁液使用，6週令ラット雄1.7g/kg，同雌2.9g/kg であった。
- ③ 以上より，AAPのラットにおける経口LD<sub>50</sub> 値の性差と懸濁剤による差を認めた。

### 文 献

- 1) 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
- 2) Isaka, H., Yoshii, H., Otsuji, A., Koike, M., Nagai, Y., Koura, M., Sugiyasu, K., and Kanabayashi, T.: *Gann*, 70, 29, 1979
- 3) Boyd, E.M. and Bereczky, G.M.: *Brit. J. Pharmacol.*, 26, 606, 1966
- 4) Litchfield, J. T. Jr. and Wilcoxon, F.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949

## アセトアミノフェンのラットを用いた1, 3および6日間経口毒性試験

藤井 孝\*, 福森 信隆\*, 多田 幸恵\*, 坂本 義光\*, 三栗谷 久敏\*  
湯澤 勝廣\*, 矢野 範男\*, 長澤 明道\*, 平賀 興吾\*

## Toxicological Studies on Rats Fed with Acetaminophen for 1, 3 or 6 Days

TAKASHI FUJII\*, NOBUTAKA FUKUMORI\*, YUKIE TADA\*,  
YOSHIMITSU SAKAMOTO\*, HISATOSHI MIKURIYA\*, KATSUHIRO YUZAWA\*,  
NORIO YANO\*, AKEMICHI NAGASAWA\* and KOGO HIRAGA\*

A bioassay of the toxicity of acetaminophen (AAP), an analgesic and antipyretic agent, was conducted using male Fischer rats. The test material was administered in the diet concentrations of 0.0% (control) and 5.0% to two groups each consisting of 30 rats respectively. During days 1, 3 and 6 days, 10 rats of each group were sacrificed for hematological and pathological examinations.

In the rats fed with AAP, food intake was markedly lower than that of the control and a decrease of body and organ weights was observed throughout the treatment period. In the dosed rats, thrombocytopenia occurred at 3 and 6 days, and centrilobular hepatocyte necrosis was observed from 1 to 6 days.

It is concluded that under the conditions of this bioassay, AAP had toxic effects for the blood and liver of male Fischer rats.

**Keywords** : acetaminophen, oral toxicity, rat, thrombocytopenia, hepatic necrosis

### 緒 言

アセトアミノフェン (以下, AAP と略す) は解熱・鎮痛剤として用いられている薬物であり<sup>1,2)</sup>, その毒性に関する報告も少なくない<sup>3-11)</sup>. 著者らは AAP の発癌作用を検討する目的でラットを用いての長期試験を企画し, その前段階として AAP 添加飼料を Fischer ラット雌雄に13週間摂取させる試験を実施した. その結果, 5%添加飼料摂取ラットは摂取開始後6~18日間で全例死亡し, 出血, 肝細胞壊死, 腎臓尿細管上皮細胞壊死, 顎下腺萎縮などが認められた<sup>12,13)</sup>. 今回は AAP による出血の原因の検索ならびに肝細胞壊死, 顎下腺萎縮などの組織変化を経時的に観察する目的で5%AAP 添加飼料を雄性ラットに1, 3および6日間摂取させ結果を得たので報告する. なお, 顎下腺は電顕的観察を行っており別報<sup>14)</sup>にて報告する.

### 実験材料ならびに方法

**試料** : AAP は5%の濃度で飼料に添加した. 飼料は日本クレア 株式会社製粉末飼料 CE-2 を用い, これに AAP を混合した後固型飼料化した. 対照には AAP を添加しない粉末飼料 CE-2 を固型飼料化したものを用いた.

**実験動物および飼育環境** : 日本チャールス・リバー株式

会社生育の Fischer ラット雄を4週令で購入した. 動物は天井, 床および前面が網, 他は板のステンレス製ケージに5匹 (AAP 投与群) または6匹 (対照群) ずつ収容し自動給水装置 (細菌ろ過器経由) 付ベルト式飼育架台で飼育した. 飼育室は室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度50~60%, 換気回数1時間に10回, 照明は午前6時から午後5時までで制御されている.

**試料投与および投与期間** : Table 1 に示す如く AAP 投与期間は1, 3および6日間とし各期間毎に投与群は10匹, 対照群は6匹ずつを充て, それぞれ1 T, 1 C, 3 T, 3 C, 6 Tおよび6 Cとした. 動物を1週間予備飼育後 (5週令の後半), 投与群の飼料を添加飼料に切り替え, 水と共に自由摂取させ投与を開始した.

**検索方法** : 一般状態観察, 体重・摂餌量測定は毎日午前9時から10時に行なった. 摂餌量はケージ毎に飼料投与量と1日間経過後の残余量との差で求めラット1匹当りの値で表わした. 動物は投与期間終了後, 無麻酔下で解剖台に固定し大腿動・静脈を離断, 放血致死させた. **血液学的検査**はこの放出血液を用いてFonio法<sup>15)</sup>による血小板数 (Pl) 測定, 塗抹標本作製 (May-Grünwald-Giemsa 染色後に白血球の分画を行なった.), およびクエン酸ナトリウム処理血液でメトヘモグロビン量 (Met-Hb) の測

\* 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. Dosage Schedule for Toxicological Study of Acetaminophen (AAP)

| Group | No. of rats | Concentration of AAP in feed (%) | Treatment period (days) |
|-------|-------------|----------------------------------|-------------------------|
| 1 C   | 6           | 0                                | 1                       |
| 1 T   | 10          | 5.0                              | 1                       |
| 3 C   | 6           | 0                                | 3                       |
| 3 T   | 10          | 5.0                              | 3                       |
| 6 C   | 6           | 0                                | 6                       |
| 6 T   | 10          | 5.0                              | 6                       |

定<sup>10)</sup>を行なった。またヘパリンナトリウム処理血液を用い 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 (Hb), ヘマトクリット値 (Hct), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球容積 (MCV) および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を測定した。病理学的検査では肉眼的観察を行なうとともに脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 顎下腺, 腎臓, 脾臓および精巣を摘出し重量を測定した。そのほか下垂体, 眼球, ハーデリアン腺, 耳下腺, 大舌下腺, 甲状腺 (上皮小体を含む), 気管,

肺, 食道, 胃, 大・小腸, 脾臓, 副腎, 膀胱, 前立腺, 精囊, 精巣上体, リンパ節および大腿骨を摘出した。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た。肝臓, 腎臓, 顎下腺, 耳下腺および大舌下腺はPAS染色ならびにアザン・マロリー染色を, 唾液腺はムチカルミン染色も行なった。これらの標本を用いて光顕的観察を行なった。

なお, 体重, 血液学的検査および器官重量などの測定結果の推計学的検討は危険率を5%において行なった。

### 結 果

一般状態観察, 体重および摂餌量測定: 投与群は投与1日 (投与開始後1日間経過した時点, 以下同様) で軽度の立毛がみられ, 2日では被毛が粗剛になる, 爪先立ちで歩く, 外界刺激に対する反応が鋭敏になるなどの症状が現われ削瘦が目立ち始めた。5, 6日では全身の立毛が顕著で自発運動が低下し背を丸めて蹲まることが多くなり, 尾は尾骨が浮き出て凸凹になっていた。投与期間中の死亡例は認められなかった。Table 2 に示す如く投与群の体重は1日で開始時に比べ13~15%減少し, それ

Table 2. Body Weights and Food Intake - Group Mean Values

| Group <sup>1)</sup> | No. of rats | Days on study                |                                      |                        |                        |                        |                        |                        |
|---------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                     |             | 0 <sup>2)</sup>              | 1                                    | 2                      | 3                      | 4                      | 5                      | 6                      |
| 1 C                 | 6           | 112±8 <sup>3)</sup><br>100±0 | 115±8<br>103±1 <sup>4)</sup><br>12.5 |                        |                        |                        |                        |                        |
| 1 T                 | 10          | 112±5<br>100±0               | 97±5*<br>85±2*<br>0.7                |                        |                        |                        |                        |                        |
| 3 C                 | 6           | 106±3<br>100±0               | 109±3<br>103±1<br>12.1               | 109±3<br>103±1<br>11.1 | 113±3<br>106±1<br>11.5 |                        |                        |                        |
| 3 T                 | 10          | 107±4<br>100±0               | 94±3*<br>87±1*<br>0.7                | 87±3*<br>81±1*<br>0.4  | 83±3*<br>77±1*<br>0.9  |                        |                        |                        |
| 6 C                 | 6           | 108±3<br>100±0               | 111±4<br>102±1<br>11.8               | 112±5<br>104±1<br>8.8  | 116±6<br>107±2<br>11.3 | 118±7<br>109±2<br>12.1 | 121±8<br>111±3<br>12.0 | 127±8<br>117±4<br>12.8 |
| 6 T                 | 10          | 107±2<br>100±0               | 93±6*<br>86±2*<br>0.7                | 86±5*<br>80±1*<br>0.3  | 81±5*<br>76±1*<br>0.3  | 76±5*<br>71±2*<br>1.9  | 73±4*<br>68±2*<br>2.0  | 69±4*<br>64±1*<br>2.6  |

1) C: Control, T: 5.0% AAP; 1, 3 and 6: Treated for 1, 3 and 6 days respectively.

2) Body weights at the beginning of feeding.

3) Group mean absolute weights ± S. D. (g), S. D. = standard deviation.

4) Group mean increasing ratio ± S. D. (%), increasing ratio = (daily weight/initial weight) × 100 (%).

5) Food intake; g/rat/day.

cf. Level of significance: \*p<0.05 in comparison with control value.

Table 3. Hematology

| Group | No. of rats | RBC                     | Hb         | Hct                  | MCV       | MCH       | MCHC     | Pl                   | Met-Hb    |
|-------|-------------|-------------------------|------------|----------------------|-----------|-----------|----------|----------------------|-----------|
|       |             | 10 <sup>6</sup> /cmm    | g/dl       | %                    | cμ        | μg        | %        | 10 <sup>4</sup> /cmm | %         |
| 1 C   | 6           | 7.72±0.51 <sup>2)</sup> | 16.8±0.7   | 43.5±2.7             | 60.6±0.8  | 23.6±0.7  | 38.7±0.9 | —                    | 0.51±0.08 |
| 1 T   | 10          | 7.98±0.46               | 18.4±0.3   | 48.5±2.5             | 61.3±0.4  | 23.3±1.0  | 36.8±3.6 | —                    | 0.52±0.10 |
| 3 C   | 6           | 7.72±0.22               | 17.2±0.2   | 46.5±1.0             | 60.8±0.7  | 22.5±0.7  | 37.0±1.0 | 108.7±25.4           | 0.53±0.11 |
| 3 T   | 10          | 8.75±0.31               | 19.9±0.6*  | 53.7±1.9*            | 62.0±1.4  | 22.9±0.5  | 37.0±0.7 | 94.2±16.2*           | 0.60±0.18 |
| 6 C   | 6           | 8.22±0.41               | 18.6±0.7   | 48.9±2.8             | 60.0±1.6  | 22.7±0.6  | 38.0±1.4 | 100.2±38.3           | 0.50±0.08 |
| 6 T   | 10          | 8.24±0.48               | 18.5±0.5   | 47.0±2.9             | 57.1±0.8  | 22.5±1.1  | 39.4±2.0 | 51.1±9.6*            | 0.48±0.09 |
|       |             | Total                   | WBC        | 10 <sup>3</sup> /cmm |           |           |          |                      |           |
|       |             |                         | Neutro.    | Lympho.              | Eosino.   | Mono.     |          |                      |           |
| 1 C   | 6           | 7.25±1.80               | 0.59±0.29  | 6.58±1.78            | 0.05±0.04 | 0.01±0.04 |          |                      |           |
| 1 T   | 10          | 6.26±0.99               | 1.02±0.19* | 5.19±1.03            | 0.03±0.01 | 0.01±0.03 |          |                      |           |
| 3 C   | 6           | 7.87±0.78               | 0.46±0.26  | 7.37±0.87            | 0.02±0.05 | 0         |          |                      |           |
| 3 T   | 10          | 8.58±1.48               | 0.58±0.33  | 7.93±1.37            | 0.04±0.07 | 0.01±0.03 |          |                      |           |
| 6 C   | 6           | 8.23±0.92               | 0.47±0.30  | 7.65±0.74            | 0.03±0.04 | 0.04±0.08 |          |                      |           |
| 6 T   | 10          | 7.00±1.18*              | 1.25±0.48* | 5.74±1.33*           | 0.01±0.02 | 0.02±0.03 |          |                      |           |

1) C: Control, T: 5.0% AAP; 1, 3 and 6: Treated for 1, 3 and 6 days respectively.

2) mean ± S.D. S.D. = Standard deviation, \*p<0.05 in comparison with control value.

それぞれの対照群との間に有意差を生じた。3 Tおよび6 Tとも体重減少は投与終了時まで続き、6 Tの終了時の体重は開始時よりも35%減少していた。投与群の平均摂餌量は概算で1 Tが対照の5%, 3 Tが5%(3~7%), 6 Tが10%(2~20%)であり、6 Tでは1~3日が3%(2~5%), 4~6日が17%(15~20%)であった。AAPの平均摂餌量は1 Tが35mg/rat/day, 360mg/kg/day, 3 Tが33mg/rat/day, 380mg/kg/day, 6 Tが65mg/rat/dayであり、6 Tでは1~3日が21mg/rat/day, 735mg/kg/day, 4~6日が108mg/rat/day, 1,501mg/kg/dayであった。

血液学的検査: Table 3に示す如く1 Tおよび3 Tはそれぞれの対照に比べHbおよびHctが増加しており、3 Tでは有意差を生じた。3 TではRBCおよびMCVが対照に比べて増加しているがこれはHbならびにHctの増加に関連したものでMCHおよびMCHCには著明な差異は認められなかった。1 Tでも軽度ながら同様の傾向がみられた。6 Tでは6 CとRBCはほぼ同数でHbに差はみられず、HctおよびMCVは1 Tならびに3 Tとは異なり僅かながら減少を示していた。Plは3 Tおよび6 Tとも対照に比べ有意に少なく、6 Tの減少は3 Tよりも顕著であった。なお1 Cおよび1 Tは検査途中で誤りが認められたため結果を削除した。Met-Hbは投与各群とも対照との間に顕著な差異は認められなかった。WBCは1 Tおよび6 Tが対照に比べ減少し、6 Tでは有意差を生じた。3 Tは軽度な増加が認められ

た。白血球の分画では1 Tおよび6 Tで対照に比べ好中球が有意に増加し、6 Tではリンパ球が有意に減少していた。

器官重量: Table 4に示す如く1 Tでは1 Cに比べ肝臓、顎下腺、腎臓および脾臓が小さくなっていた。体重比重量では脳、心臓および腎臓が大きく、肝臓が小さくなっておりいずれも有意差を示した。3 Tでは3 Cに比べ精巣を除く全秤量器官が有意に小さくなっていた。体重比重量では胸腺および肝臓が小さく、他の器官は大きくなっており心臓を除いていずれも有意差を示した。6 Tでは6 Cに比べ全秤量器官が有意に小さくなっており、とくに胸腺は顕著であった。体重比重量は脳、顎下腺および腎臓が大きく、胸腺、肝臓および脾臓が小さく、いずれも有意差を示した。

肉眼的観察: 1 Tでは対照に比べ肝臓がやや小さくなっており、顎下腺は小さく軟かくなっていた。3 Tでは1 Tでの変化が軽度に強まり胸腺は小さく軟かくなっていた。6 Tでは全例に顕著な消瘦がみられ、3 Tで認められた各変化はさらに強まっていた。顎下腺は小さく軟かく軽度には水腫様変化を呈していた。心臓、胸腺、脾臓および精巣も小さくなっており胸腺の縮小はとくに顕著であった。また6 Tの肝臓は帯赤褐色を呈しそこに黄褐色の点が散在している例が多く認められた。

組織学的観察: Table 5に示すような変化が観察された。顎下腺では1 Tで腺房細胞の軽度萎縮および腺房の小型化が7/10(10例中7例の意、以下同様)に、小葉内

Table 4. Organ Weight - Group Mean Values

| No. of Group | Body weight (g) | Brain (g)               | Thymus (mg) | Heart (mg) | Liver (g)  | Submaxillary (mg) |         | Kidney (mg) |         | Spleen (mg) |          | Testis (mg) |   |
|--------------|-----------------|-------------------------|-------------|------------|------------|-------------------|---------|-------------|---------|-------------|----------|-------------|---|
|              |                 |                         |             |            |            | R                 | L       | R           | L       | R           | L        | R           | L |
| 1 C          | 6               | 1.68±0.27               | 297±37      | 467±45     | 5.18±0.40  | 101±9             | 104±9   | 496±36      | 509±39  | 346±45      | 570±119  | 580±116     |   |
|              |                 | 1.45±0.85 <sup>3)</sup> | 258±38      | 403±21     | 4.48±0.10  | 87±4              | 90±6    | 428±15      | 439±14  | 298±25      | 489±78   | 498±76      |   |
| 1 T          | 10              | 1.68±0.60               | 259±43      | 458±32     | 3.65±0.25* | 87±5*             | 85±8*   | 446±28*     | 456±31* | 294±28*     | 521±60   | 543±61      |   |
|              |                 | 1.73±0.42*              | 266±36      | 473±29*    | 3.76±0.22* | 90±4              | 87±7    | 460±15*     | 470±16* | 303±19      | 539±69   | 561±68      |   |
| 3 C          | 6               | 1.68±0.54               | 302±18      | 468±38     | 4.80±0.15  | 95±6              | 93±4    | 494±12      | 486±28  | 314±6       | 394±103  | 410±97      |   |
|              |                 | 1.49±0.46               | 267±19      | 414±32     | 4.25±0.11  | 84±5              | 82±6    | 437±10      | 430±20  | 278±4       | 348±89   | 362±84      |   |
| 3 T          | 10              | 1.63±0.27*              | 165±22*     | 369±35*    | 3.07±0.22* | 85±13*            | 81±7*   | 390±20*     | 387±20* | 253±29*     | 460±109  | 485±113     |   |
|              |                 | 1.97±0.56*              | 198±23*     | 443±35     | 3.69±0.23* | 103±15*           | 98±8*   | 470±13*     | 466±14* | 305±35*     | 553±126* | 583±131*    |   |
| 6 C          | 6               | 1.71±0.22               | 293±36      | 511±64     | 5.59±0.72  | 111±9             | 114±4   | 525±67      | 544±66  | 345±38      | 591±213  | 621±212     |   |
|              |                 | 1.35±0.83               | 230±16      | 402±41     | 4.38±0.27  | 87±5              | 90±4    | 412±27      | 427±25  | 271±54      | 460±153  | 484±152     |   |
| 6 T          | 10              | 1.64±0.26*              | 49±5*       | 281±15*    | 2.59±0.22* | 80±9*             | 87±7*   | 363±25*     | 368±23* | 131±22*     | 303±172* | 315±170*    |   |
|              |                 | 2.36±0.12*              | 70±5*       | 404±10     | 3.74±0.29* | 116±14*           | 119±11* | 523±19*     | 531±26* | 188±24*     | 428±216  | 445±213     |   |

1) C: Control, T: 5.0% AAP; 1, 3 and 6: Treated for 1, 3 and 6 days respectively.

2) Group mean absolute weights ± S.D., S.D. = Standard deviation.

3) Group mean relative weights ± S.D., Relative weights = weights/100g body weight.  
cf. Level of significance: \*p<0.05 in comparison with control value.

導管上皮細胞の軽度な核濃縮が1/10に認められた。3 Tで腺房細胞の萎縮が9/10に、萎縮した細胞の細胞質中の好塩基性物質の軽度な減少が3/10に、小葉内導管上皮細胞の軽度な核濃縮が4/10に、小葉間導管上皮細胞の軽度な扁平化および局所性壊死・脱落が2/10に、間質の軽度な水腫様変化ならびに好酸球を主体とする白血球浸潤が1/10に認められた。6 Tでは1 Tおよび3 Tと同様の変化は全例にみられ、中等度以上の変化例が多くなっており、間質の水腫および細胞浸潤は8/10に認められた。さらに1 Tおよび3 Tでは認められなかった小葉内導管上皮細胞の局所性壊死が3/10に、小葉間導管腔内に白血球および導管上皮細胞などの変性・壊死残渣を包含する像が7/10に観察された (Photo 1)。対照にはこれらの変化は認められなかった (Photo 2)。肝臓では投与群の全例に小葉中心帯の肝細胞が細胞質の好塩基性物質を消失しエオジン淡染均質となり細胞境界が不明瞭になるなどの変化がみられた。小葉中心性肝細胞壊死はこの変化が進行した像で軽度なものが1 Tに5/10, 3 Tに4/10, 6 Tに6/10認められた (Photo 3)。3 Tおよび6 Tではそれぞれ3/10に中等度の変化が広範囲に起っていた (Photo 5, 7)。対照にはこれらの変化は認められなかった (Photo 4, 6, 8)。脾臓では小葉間導管およびランゲルハンス島周辺部を除く部位の腺房の小型化が3 Tの全例, 6 Tの7/10にみられた。腺房の小型化は腺房細胞がZymogen 顆粒の減少により縮小したためで変性は認められなかった。対照には変化がみられなかった。胸腺では3 Tで皮質の幅が狭くなり胸腺リンパ球が軽度に減少しているのが全例に認められた。6 Tでは軽度な変化が1/10で残る9/10は細胞網質の著明化および皮髄境界の顕著な不明瞭化を呈する中等度の萎縮であった (Photo 9)。対照には萎縮は認められなかった (Photo 10)。脾臓では3 Tで被膜に皺襞を形成し赤・白脾臓とも縮小し全体的に軽度な萎縮を示す例が3/10にみられた。6 Tでは白脾臓に比べ赤脾臓の縮小がやや顕著であり全体として中等度の変化を示したのが7/10, 軽度な変化は3/10であった。髄外造血は1 C, 1 Tおよび3 Cでは全例に6 Cでは2/6にみられたが3 Tおよび6 Tでは全例に認められなかった。精巣では6 Tで被膜および精細管壁の皺襞形成が軽度にみられ、精細管腔に精子が観察されない例が4/10に認められた。皺襞形成が中等度で間質が水腫様に拡張し、精細管腔に精子がみられず精細胞密度も低下しているのが3/10に認められた。骨髄では3 Tで軽度な骨髄細胞密度の低下ならびに脂肪組織の増加が5/10にみられた (Photo 11, 12)。6 Tでは3 Tと同程度の変化が2/10に、より顕著な変化が8/10にみられた。骨髄細胞密



Table 5. Microscopical Findings - Summary of Observations

| Treatment period (day)                              |      | 1   |     | 3   |     | 6   |     |
|-----------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Group*                                              |      | 1 C | 1 T | 3 C | 3 T | 6 C | 6 T |
| No. of rats                                         |      | 6   | 10  | 6   | 10  | 6   | 10  |
| <b>SUBMAXILLARY GL.</b>                             |      |     |     |     |     |     |     |
| Atrophy of acinar cells                             | NO** | 6   | 3   | 6   | 1   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | 7   | -   | 9   | -   | 4   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 6   |
| Decrease in cytoplasmic basophilia of acinar cells  | NO   | 6   | 10  | 6   | 7   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 3   | -   | 5   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 5   |
| Degeneration in lining cells of intralobular ducts  | NO   | 6   | 10  | 6   | 10  | 6   | 7   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | -   | -   | 3   |
| Pyknosis in lining cells of intralobular ducts      | NO   | 6   | 9   | 6   | 6   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | 1   | -   | 4   | -   | 8   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 2   |
| Squamization in lining cells of interlobular ducts  | NO   | 6   | 10  | 6   | 8   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 2   | -   | 6   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 4   |
| Debris within interlobular ducts                    | NO   | 6   | 10  | 6   | 10  | 6   | 3   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | -   | -   | 4   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 3   |
| Cell infiltration in interstitium                   | NO   | 6   | 10  | 6   | 9   | 6   | 2   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 1   | -   | 7   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 1   |
| <b>LIVER</b>                                        |      |     |     |     |     |     |     |
| Centrilobular degeneration                          | NO   | 6   | -   | 6   | -   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | 3   | -   | 3   | -   | 3   |
|                                                     | MO   | -   | 7   | -   | 7   | -   | 7   |
| Centrilobular necrosis                              | NO   | 6   | 5   | 6   | 3   | 6   | 1   |
|                                                     | SL   | -   | 5   | -   | 4   | -   | 6   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | 3   | -   | 3   |
| <b>PANCREAS</b>                                     |      |     |     |     |     |     |     |
| Decrease of zymogen granules                        | NO   | 6   | 10  | 6   | -   | 6   | 3   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 10  | -   | 7   |
| <b>THYMUS</b>                                       |      |     |     |     |     |     |     |
| Atrophy                                             | NO   | 6   | 10  | 6   | -   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 10  | -   | 1   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 9   |
| <b>SPLEEN</b>                                       |      |     |     |     |     |     |     |
| Atrophy                                             | NO   | 6   | 10  | 6   | 7   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 3   | -   | 3   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 7   |
| Extramedullary hematopoiesis                        | NO   | -   | -   | -   | 10  | 4   | 10  |
|                                                     | SL   | 6   | 10  | 6   | -   | 2   | -   |
| <b>TESTIS</b>                                       |      |     |     |     |     |     |     |
| Atrophy                                             | NO   | 6   | 10  | 6   | 10  | 6   | 3   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | -   | -   | 4   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 3   |
| <b>BONE MARROW</b>                                  |      |     |     |     |     |     |     |
| Decrease of myeloid tissue                          | NO   | 6   | 10  | 6   | 5   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 5   | -   | 2   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 8   |
| <b>BONE (FEMUR)</b>                                 |      |     |     |     |     |     |     |
| Inhibition in proliferation of epiphyseal cartilage | NO   | 6   | 10  | 6   | 4   | 6   | -   |
|                                                     | SL   | -   | -   | -   | 6   | -   | 8   |
|                                                     | MO   | -   | -   | -   | -   | -   | 2   |

\* C: Control, T: 5.0% AAP; and 6: Treated for 1, 3 and 6 days

\*\* NO: No change, SL: Slight changes, MO: Moderate changes.

度の低下は赤芽球系、顆粒球系を問わず巨核球も含めて起っており残存している細胞の多くはどの系統も成熟段階の進んだものであった。少数みられる未成熟な細胞には好塩基性の低下および軽度の萎縮が認められた (Photo 13, 14)。大腿骨では骨端軟骨層の軽度な非薄化および軟骨細胞の萎縮が3 Tで6/10に、6 Tで8/10に、中等度の変化が6 Tの2/10にみられた (Photo 15, 16)。非薄化は増殖、成熟および肥大軟骨層の各層で層数 (細胞数) の減少および軟骨細胞の萎縮が起ったためで骨梁形成部でも細い不規則な骨梁が形成されていた。

### 総括および考察

AAP を5%の濃度で飼料に添加して Fisher ラット雄に1, 3および6日間摂取させた。この結果、前回の試験<sup>12)</sup>で2.5および5% AAP 添加飼料摂取ラットにみられた飼料摂取忌避が今回はさらに顕現化し、1日当りの平均摂餌量は前回は対照の約20%であったのに対し今回は約10%であった。このためラットは投与期間中 semistarvation の状態におかれていたと考えられる。semistarvation あるいは starvation によって生体に起る変化は実験条件によっても異なるが、体重減少、器官・組織重量減少、循環障害、貧血などである<sup>17-23)</sup>。

Oishi ら<sup>22)</sup>によれば Wistar ラット雄を用い5週令から対照の摂餌量の約23%に給餌制限し、7日目に開始時に比べ約22%の体重減少をみたとしている。Armand ら<sup>23)</sup>は Wistar ラット雄 (体重260~300 g) を用い対照の摂餌量の約25%に給餌制限し、7日目に開始時に比べ約26%の体重減少がみられたと報告している。これらに対し前回の試験では2.5% AAP 添加飼料摂取ラットは対照の約48%の摂餌量で7日目に開始時に比べ33%の体重減少がみられた<sup>12)</sup>。つまり制限給餌の実験よりも多量に飼料摂取させたが体重減少はより顕著に現われる結果となっている。このことから化学物質などを添加した飼料の摂取忌避による摂餌量減少は動物を低栄養状態におくと同時に量の多少に拘らず摂取した化学物質などの作用の発現も併せて考慮する必要があることは明らかである。

今回の試験では体重は投与1日の減少が投与各群とも顕著であった。これは摂餌量の著減によるもので投与群ラットはAAPを僅かながら摂取すると同時に試験開始直後から急性的な semistarvation の状態におかれていたと思われる。血液検査では1 Tと3 TにRBCおよびMCVの増加がみられ、このため3 Tでは3 Cに比べHctが有意に増加していた。このことは前回の13週間2.5% AAP 添加飼料摂取ラットでRBC, Hb, およびHctが減少していたこと<sup>12)</sup>、Oishi ら<sup>22)</sup>が制限給餌4週間でRBC減少をみたことなどと異なる。しかしArmand

ら<sup>23)</sup>は制限給餌7日目でHctの増加を観察しており、6 TではHctが減少傾向を示したことなどから semistarvation の初期には一過性にHctの増加が起るのではないかと考えられる。3 Tおよび6 Tでみられた血小板数減少は3 Tよりも6 Tで顕著になっていた。血小板数減少は止血効果障害を招き出血を惹起する可能性は大であり、これが前回の出血の要因になっていたと思われる。血小板の生成母地である骨髄の組織学的観察では、とくに6 Tで著明な萎縮がみられ飢餓骨髄 starvation marrow と称される像を呈していた。血小板数減少はこの骨髄組織萎縮のために巨核球減少あるいは巨核球から血小板への分裂生成過程に抑制が生じたためと推察される。しかし骨髄では巨核球だけではなく赤芽球系・顆粒球系細胞の減少も起っていたにも拘らず貧血は認められず血小板数減少の原因を飢餓骨髄像だけに求めるのは早計と思われる。さらにヒトではAAPの大量摂取により血小板減少症を惹起するとの報告もあり<sup>2)</sup>、血小板数減少は現時点では semistarvation よりはAAPの影響によるものと考えられる。器官重量は脳および顎下腺が各投与群ともほぼ同じ値を示しており、このため投与期間が長くなるにつれて体重比重量は増加していた。組織学的観察で脳は萎縮が明らかではなかった。顎下腺は実質細胞である腺房上皮の萎縮は顕著であるが間質には水腫様変化が起り水分が増加したため絶対重量の減少は1 T, 3 Tおよび6 Tで著明な差となって現われなかったと思われる。顎下腺の萎縮は前回は2.5および5% AAP 添加飼料摂取ラットに耳下腺の肥大とともにみられた変化で、今回は耳下腺に変化が認められず顎下腺の萎縮が先行することを示した。また前回は萎縮がAAP投与に関連する変化としたが今回の結果からは semistarvation の関与も考えられ、この点に関してはさらに検討が必要と思われる。胸腺および脾臓は投与期間が長くなるにつれて絶対および体重比重量とも顕著に減少した。組織学的に胸腺は偶発性退縮であり脾臓の萎縮とともに原因がAAPまたは semistarvation のいずれとも判断し難い。肝臓は絶対重量は著明に減少したが体重比重量は投与各群ではほぼ同じ値を示しており体重減少に見合う減少となっている。これは体重減少が給餌制限の場合よりも顕著であったために肝臓重量は著明な減少を示したにも拘らず体重減少と平行した形になったものと思われる。組織学的観察では肝臓は小葉中心性壊死が1 Tで5/10に軽度ながら認められ3 T, 6 Tと投与期間に比例して顕著になり発生例数も増加した。肝細胞壊死は前回も認められた変化で semistarvation によって起るという報告はないが、AAPの大量摂取によってヒトに発症すると

の報告は多くみられる<sup>3,5-10</sup>)ことから AAP の影響による変化ではないかと考えられる。腎臓は 1 T, 3 T 次いで 6 T と徐々に絶対重量が減少し, 体重比重量は増加したが組織学的に著変はみられなかった。前回は腎臓で尿管上皮細胞壊死を観察したが今回は認められず肝臓の変化に後発することを示した。精巣は 6 T で絶対重量が顕著に減少し組織学的にも萎縮が認められた。これは 3 T および 6 T でみられた骨髓組織萎縮および大腿骨骨端軟骨における成長抑制とともに全身の栄養状態低下を表現したものと思われる。

以上の如く現時点では血小板数減少および肝細胞壊死は AAP の作用が強く現われた変化でヒトならびにラットに共通して起る障害であると考えられる。しかしそのほかの変化は強い semistarvation の影響を否定できず, 低栄養状態下の動物に対する AAP の作用であったとも推定できる。今後は semistarvation の影響を除去するため AAP を飼料添加以外の方法でラットに連続投与し, その際生ずる変化を今回の結果と比較検討したいと考えている。

#### 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 Edward, F.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L. S. and Gilman, A. eds.), 343, Macmillan Publishing, New York
- 3) Davidson, D. G. D. and Eastham, W. N.: *Brit. med. J.*, 2, 497, 1966
- 4) Boyd, E. M. and Bereczky, G. M.: *Brit. J. Pharmacol.*, 26, 606, 1966
- 5) Krikler, D. M.: *Brit. med. J.*, 2, 615, 1967
- 6) Maclean, D., Peters, T. J., Brown, R. A. G., McCathie, M., Baines, G. F., and Robertson, P. G. C.: *Lancet*, 2, 849, 1968
- 7) Boyd, E. M. and Hogan, S. E.: *Canada. J. Physiol. Pharmacol.*, 46, 239, 1968
- 8) Boyer, T. D. and Rouff, S. L.: *J. Am. Med. Assn.*, 218, 440, 1971
- 9) Abel, J. A.: *Clin. Pharmac. Ther.*, 12, 583, 1971
- 10) Clark, R., Thompson, R. P. H., Borirakchanyavat, V., Widdop, B., Davidson, A. R., Goulding, R., and Williams, R.: *Lancet*, 1, 66, 1973
- 11) Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., and Brodie, B. B.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 187, 211, 1973
- 12) 林田志信ほか：東京衛研年報, 29-2, 116, 1978
- 13) 藤井 孝ほか：東京衛研年報, 29-2, 125, 1978
- 14) 三栗谷久敏ほか：東京衛研年報, 30-2, 105, 1979
- 15) 金井 泉, 金井正光編：臨床検査法提要, 第25版, 64, 1968, 金原出版
- 16) Hegesh, E., Gruener, N., Cohen, S., Bochkovsky, R., and Shuval, H. I.: *Clin. Chim. Acta.*, 30, 679, 1970
- 17) 吉村寿人：日本医師会雑誌, 21(5), 19, 1947
- 18) 瀧澤延次郎ほか：日本病理学会誌 (地方会号), 39, 28, 1950
- 19) 中川一郎, 二国二郎, 吉川春寿 編：栄養学, 朝倉書店, 3 版, 昭和32年1月
- 20) 吉川春寿監修：栄養学, 朝倉書店, 2 版, 昭和51年6月
- 21) Schärer, K.: *Toxicology*, 7, 45, 1977
- 22) Oishi, S., Oishi, H., and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 15, 1979
- 23) Armand, J. G. and Costello, L. C.: *J. Nutr.*, 105, 208, 1975

#### Explanation of Plates

- Photo 1. Atrophy of submaxillary gland of rat fed with 5 % AAP for 6 days. H-E ×200
- Photo 2. Submaxillary gland of rat fed with basic diet for 6 days. H-E ×200
- Photo 3. Centrilobular necrosis in liver of rat fed with 5% AAP for 1 day. H-E ×100
- Photo 4. Liver of rat fed with basic diet for 1 day. H-E ×100
- Photo 5. Centrilobular necrosis in liver of rat fed with 5% AAP for 3 days. H-E ×100
- Photo 6. Liver of rat fed with basic diet for 3 days. H-E ×100
- Photo 7. Centrilobular necrosis in liver of rat fed with 5% AAP for 6 days. H-E ×100
- Photo 8. Liver of rat fed with basic diet for 6 days. H-E ×100
- Photo 9. Atrophy of thymus of rat fed with 5% AAP for 6 days. H-E ×100
- Photo 10. Thymus of rat fed with basic diet for 6 days. H-E ×100
- Photo 11. Decrease of myeloid tissue in femur of rat fed with 5% AAP for 3 days. H-E ×200

Photo 12. Myeloid tissue in femur of rat fed with basic diet for 3 days. H-E  $\times 200$

Photo 13. Decrease of myeloid tissue in femur of rat fed with 5% AAP for 6 days. H-E  $\times 200$

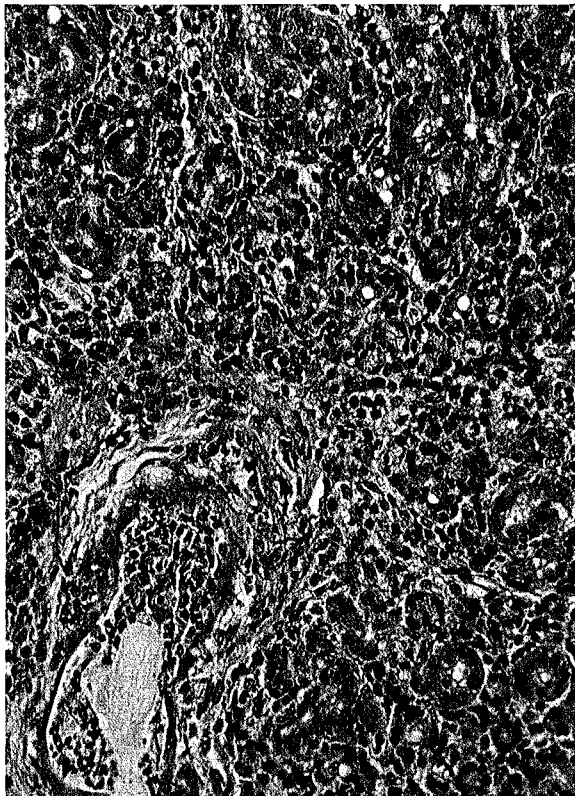
Photo 14. Myeloid tissue in femur of rat fed with basic diet for 6 days. H-E  $\times 200$

Photo 15. Thinning of epiphyseal plate in femur of rat fed with 5% AAP for 6 days. H-E  $\times 200$

Photo 16. Epiphyseal plate in femur of rat fed with basic diet for 6 days. H-E  $\times 200$

AAP=acetaminophen, H-E=hematoxylin-eosin stain.

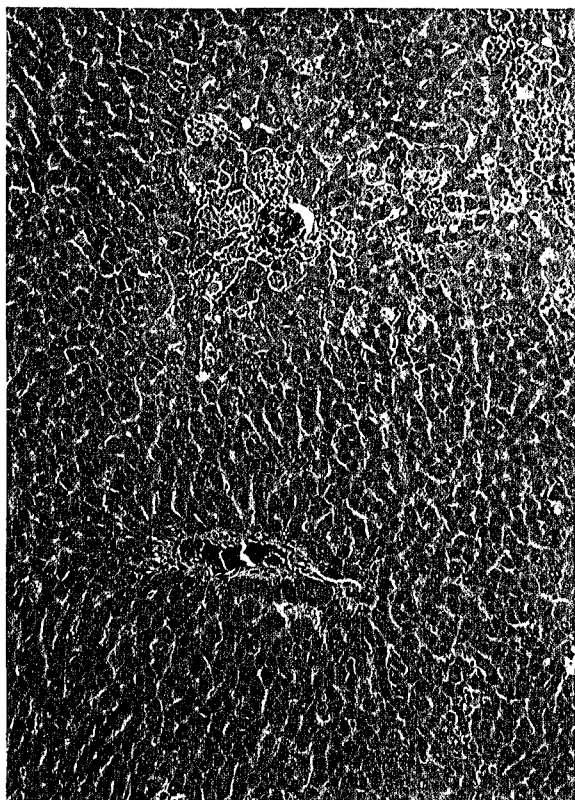
1



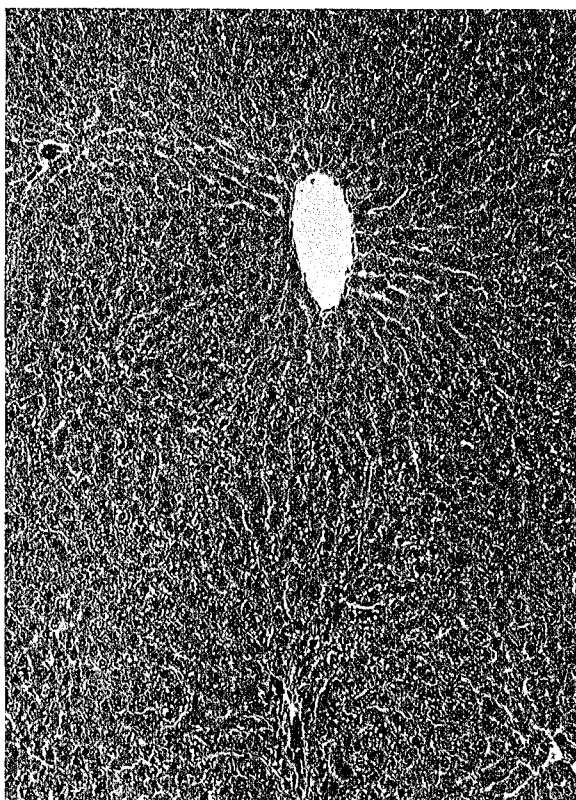
2



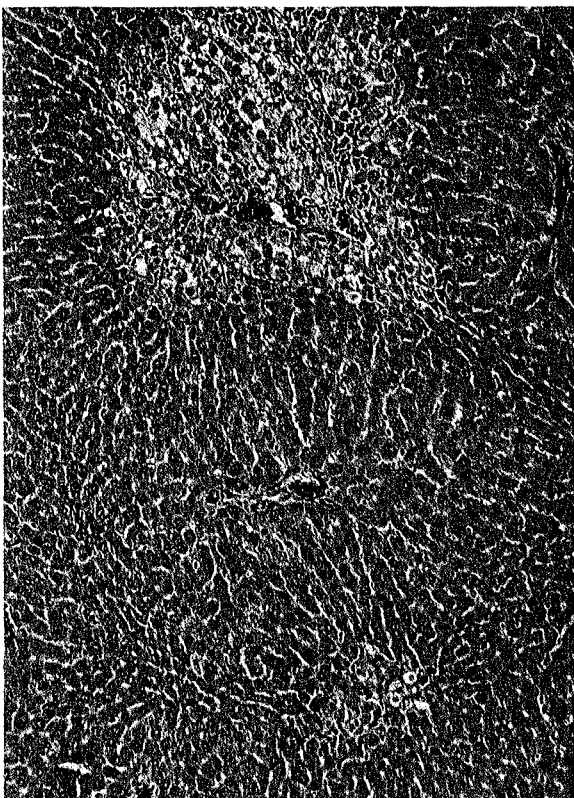
3



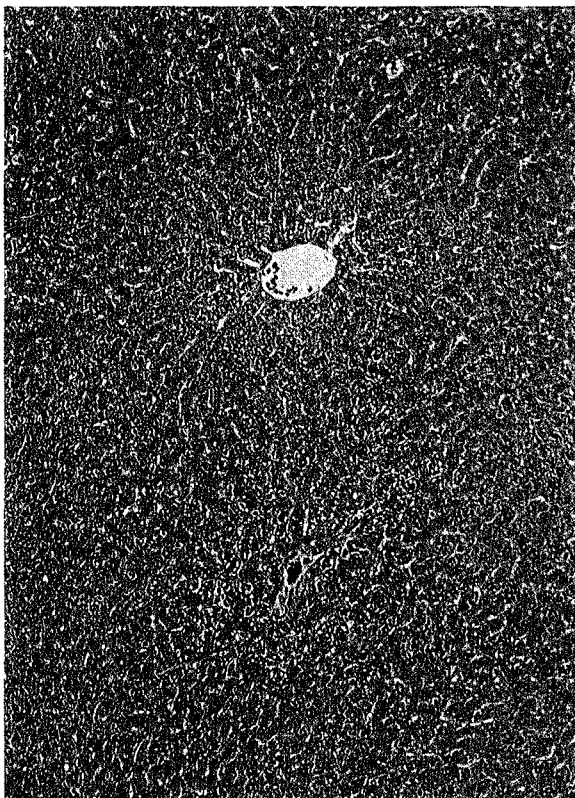
4



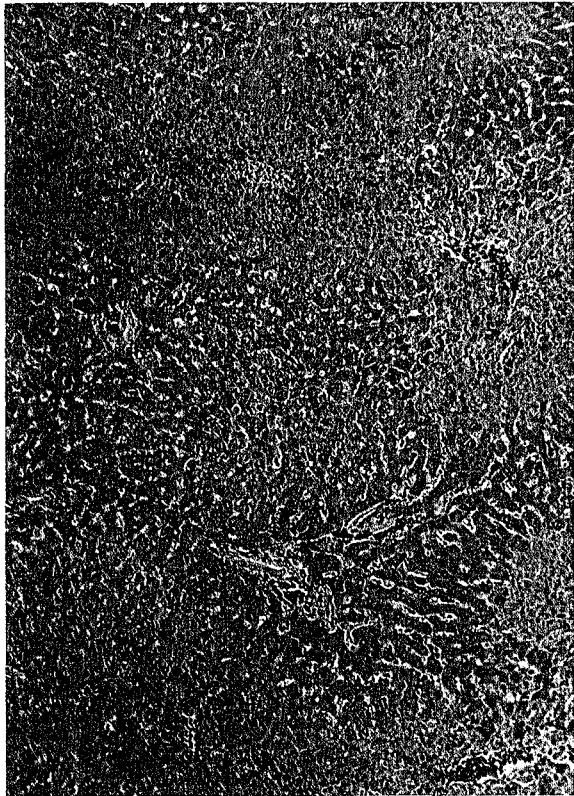
5



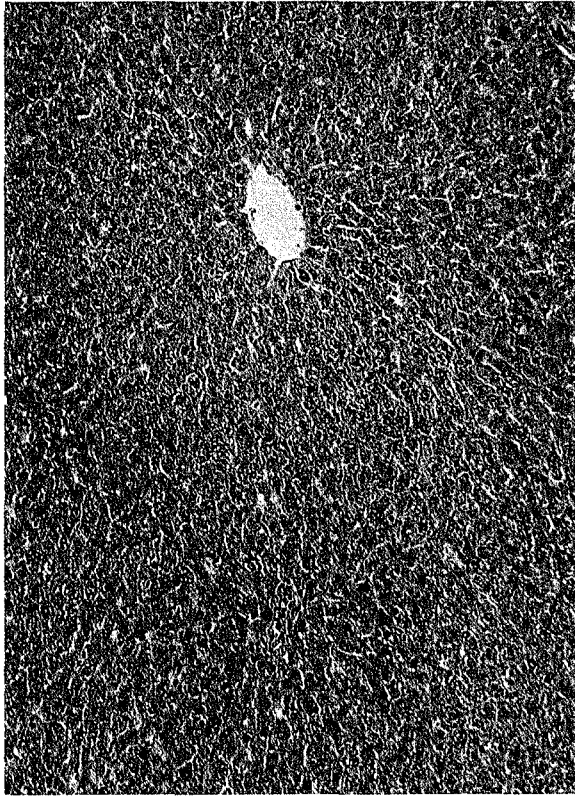
6



7

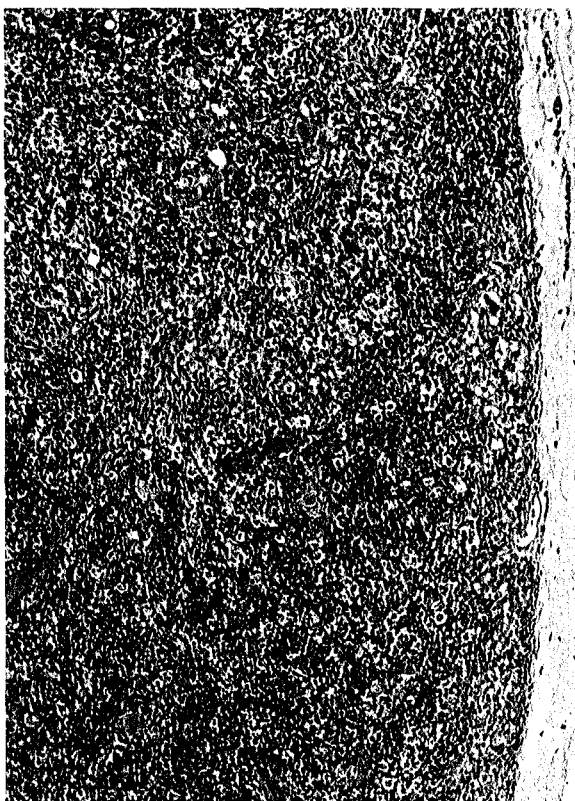


8





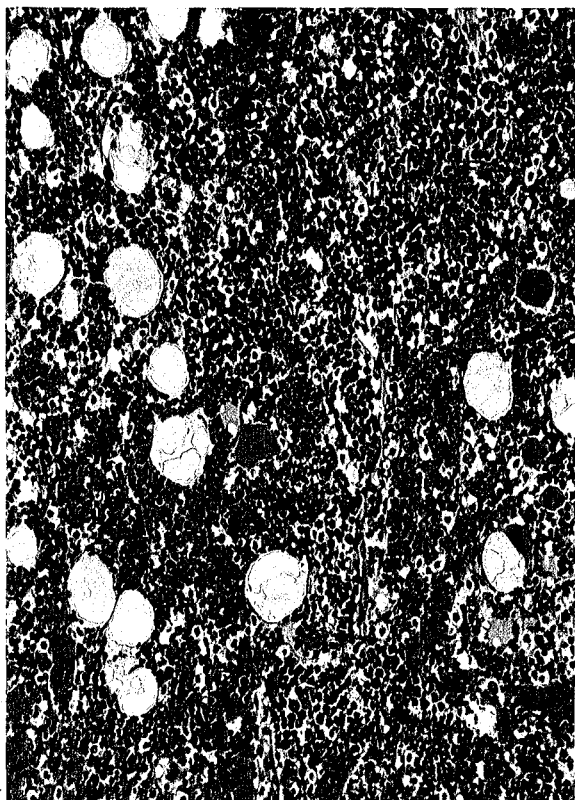
9



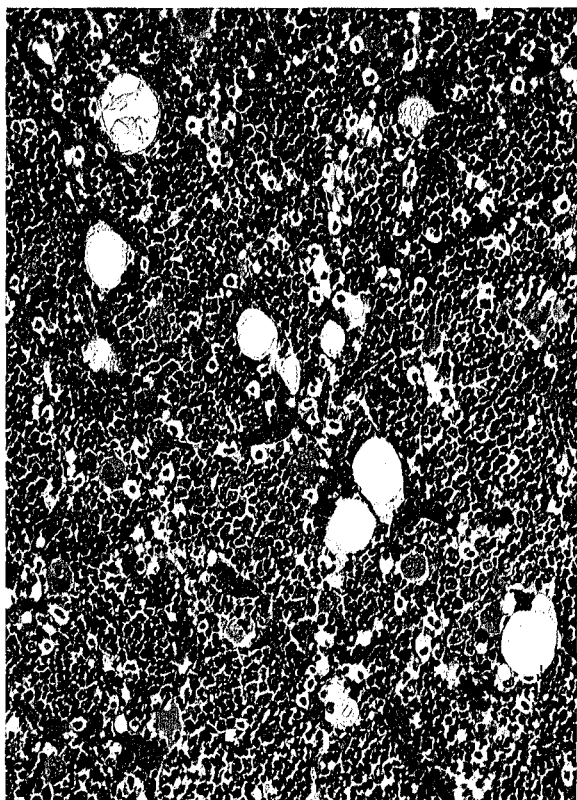
10



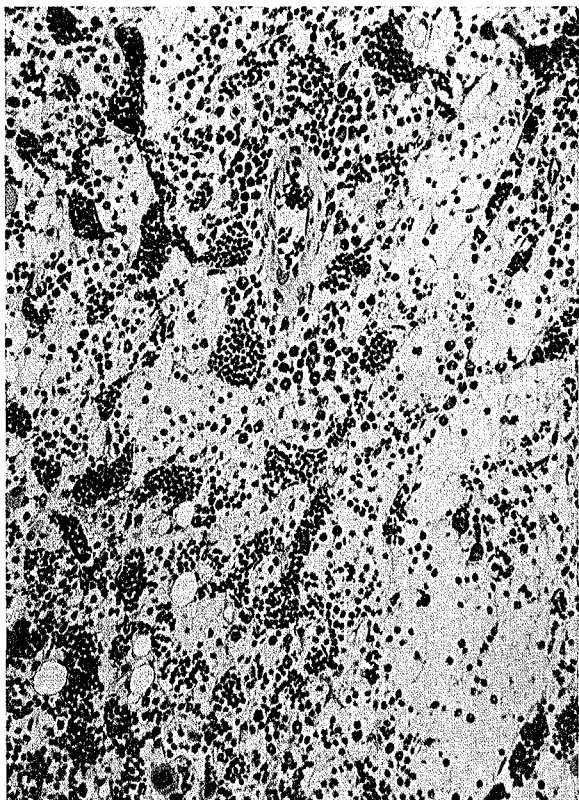
11



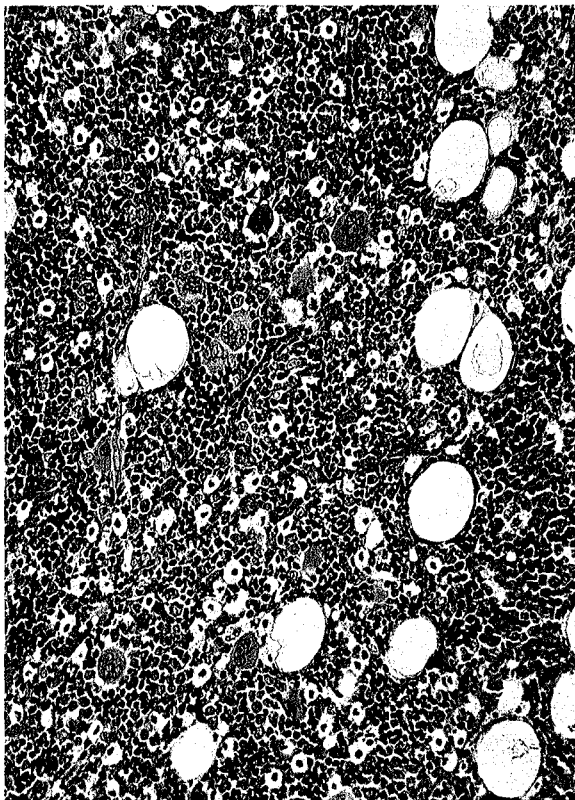
12



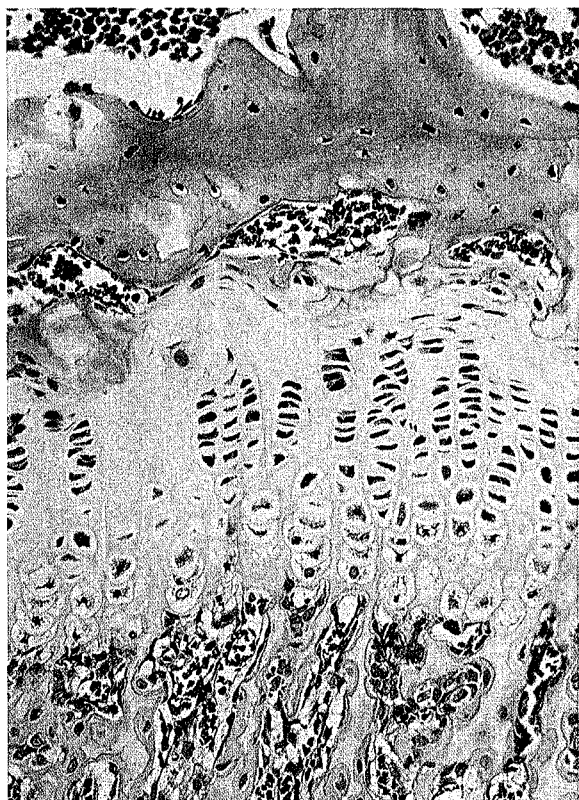
13



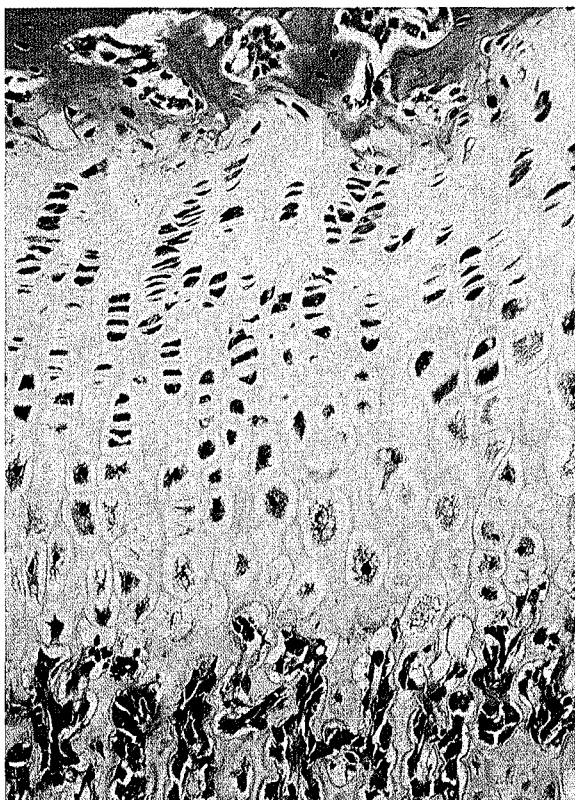
14



15



16





## ラット顎下腺の微細構造におよぼすアセトアミノフェンの影響

三栗谷 久 敏\*, 福 森 信 隆\*, 平 賀 興 吾\*

### Ultrastructural Changes of Submandibular Gland in Rat Administered Acetaminophen in Diet

HISATOSHI MIKURIYA\*, NOBUTAKA FUKUMORI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** アセトアミノフェン acetaminophen, ラット rat, 顎下腺 submandibular gland, ultrastructure

#### 緒 言

Acetaminophen (AAP) は解熱・鎮痛剤として用いられている。先に当部では AAP 添加飼料をラットに13週間摂取させた実験を行い、2週間以内で死亡したラットに、出血、肝細胞壊死、顎下腺の萎縮などが認められた<sup>1)</sup>。そこで今回藤井らは AAP 添加飼料摂取時の、ラットにおよぼす初期経時変化を調べる 目的で、血液学的、組織学的に検索を行った<sup>2)</sup>。

本報はこの実験において肝、腎、顎下腺など光学顕微鏡(光顕)的に変化のみられた器官<sup>2)</sup>のうち、顎下腺について電子顕微鏡(電顕)的に微細構造の変化を観察したものである。

#### 実験方法

詳細は別報<sup>2)</sup>に記載されているのでここでは要旨および電顕用試料の作製について記した。

実験動物は日本チャールス・リバー社生育の Fischer 雄性ラットを用いた。投与期間は5% AAP 添加飼料投与群、対照群(日本クレア, CE-2)とも1, 3および6日間とし、その間飼料、水を自由に摂取させた。

電顕用試料作製: 放血屠殺後、右側顎下腺の一部(大舌下腺より遠位の辺縁部)を摘出し、細切後3%パラホルムアルデヒド(0.1M リン酸緩衝液, pH7.3)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<sub>4</sub> 液(0.1M リン酸緩衝液, pH7.3)で1.5時間後固定した。以下定法に従いエタノール脱水、置換剤を通して Epon-Araldite M 混合樹脂に包埋した。包埋した試料の厚さ約 1 μm 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 型電顕にて観察した。

#### 観察結果および考察

1日目: 終末部では一部の腺細胞に粗面小胞体(RE

R) 腔の拡張、糸粒体基質の軽度の凝集などがみられた以外、著変が認められなかった。

線条部の細胞では基底部の basal infolding の拡張によると思われる淡明化がみられた以外、著変が認められなかった。

排出導管部では一部に幅が狭く、若干の空胞を含む暗調細胞が認められた(図1)。この細胞は壊死に移行するものと思われるが Tamarin ら<sup>3)</sup>が言う正常の排出導管細胞に存在する dark columnar cell とも考えられ明らからなかった。

3日目: 終末部では RER の層状配列の乱れや腔の拡張あるいは vesicle 状 RER (図2) などが一部の腺細胞にみられた以外、著変が認められなかった。

線条部細胞は基底部の細胞質が淡明化あるいは空胞化しているのが散見された。これは1日目の線条部細胞にみられたのと同様 basal infolding の拡張によるものと思われる。他は細胞によって糸粒体に軽度な swelling がみられた以外、著変が認められなかった。

排出導管部の細胞では電子密度の高い、扁平状で、複雑な切れ込みを呈する核が散見された(図3)。また一部に導管を構成する細胞の丈が著しく低くなっているのが認められた。この細胞は扁平状の核を有し、糸粒体や RER は貧弱で散在的であった。desmosome は良好に観察された。ある細胞では細胞質が部分的に空胞状となり、その中に暗調の糸粒体、膜様構造物、vesicle 状 RER などが散在していた。このような変化がみられた導管の管腔には、細胞成分を含む残渣が存在していたが、細胞成分の由来は明らかでなかった。

6日目: 終末部では核濃縮の感がある腺細胞が散見された。これらの細胞は核がやや不規則な形に縮小しており、核質は電子密度が高くほぼ均一であった。細胞質は分泌顆粒が比較的多く存在し、これらの間にやや暗調な

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakuninchō 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

糸粒体や RER が散在していた。特に RER は tubule 状のものが少量しかみられず、顕著な消失傾向を呈していた。また Golgi 装置は対照群に比べ発達が悪く、確認できない細胞もあった (図4)。これらの変化は光顕所見<sup>1)</sup> による腺房の萎縮および好塩基性物質の減少と関連があると思われる。

線条部細胞では基底部の細胞質の淡明化、空胞化が3日目よりやや程度を増し散見された。これらの大半は basal infolding の拡張によるものと思われるが、中に basal infolding がほとんどみられず、細胞質全体が淡明化している細胞も観察された。この細胞では核質の電子密度がやや低く、糸粒体は暗調なものが多かった。Golgi 装置は不明瞭であった。また隣接する細胞が壊死しているのが観察された (図5)。この細胞基底部の淡明化、空胞化は1, 3日目、そして軽度には対照群にもみられており、ある程度生理的な現象<sup>2)</sup> と思われる。一般的に basal infolding は再吸収による水分、塩類代謝の盛んな細胞に多くみられるところから、basal infolding が消失傾向を示す細胞では再吸収機能<sup>4,5)</sup> に影響があると思われる。また一部の管腔に細胞成分を含む残渣や好中球と思われる血液細胞がみられた。このような管腔周囲の細胞は丈がやや低く、basal infolding の発達もやや悪かった。また対照群にみられる小分泌顆粒はほとんど認められず、Golgi 装置の発達も悪く、細胞機能の低下が示唆された。これらの細胞の中には壊死に陥ったと思われる細胞も散見され、管腔残渣のうち細胞成分はこのような細胞の脱落によるものと思われる。

排出導管細胞の多くは著しい扁平状を呈して観察された。これらの細胞は細胞質が暗調で、扁平状の核を有し、swelling 状。細胞によっては暗調の糸粒体が密に存在していた。RER, Golgi 装置はほとんど認められず、細胞境界もやや不明瞭であった (図6)。管腔は細胞成分を含む残渣や好中球と思われる血液細胞、そして分泌物と考えられる無構造な物質で占められているのが多くみられた。残渣のうち細胞成分の多くは、管腔周囲の細胞に壊死細胞や脱落寸前の細胞 (図7) が散見されるところから、これら壊死・脱落細胞に由来すると思われる。白血球については、何に由来するのか明らかでなかった。

また軽度な扁平がみられた細胞では、細胞質内に限界膜で囲まれ、中に変性したと思われる細胞内小器官を含む電子密度の高い小体が認められた (図8)。この小体は cytolysome<sup>6)</sup> と思われ、この小体の出現は細胞にとって不用あるいは異物化した細胞質成分を排除する自己防御反応の一つではないかと考えられる。

以上の観察より、5% AAP 添加飼料摂取によるラット顎下腺の変化は1, 3日目で軽度ながら局所的に、6日目ではほぼびまん性に、それも線条部や排出導管部など導管系を中心に起こると思われる。

しかしながら、これらの変化を AAP の作用と言う観点からみたととき、顎下腺が生理的に影響を受けやすく複雑な機能を営んでいることや年令差によって構造的に差異<sup>7,8)</sup> がみられることなどの点も考慮に入れる必要があり、またさらに今回ラットが減食状態<sup>1)</sup> にあったことから、飢餓時における細胞への影響についても合わせてより詳細な検討が必要と思われる。

### ま と め

5% AAP 添加飼料1,3および6日間摂取によるラット顎下腺の微細構造変化を電顕的に観察した。その結果、1日目はほとんど著変が認められなかった。3日目は排出導管部の一部に丈の低い細胞がみられ、管腔には残渣や白血球が認められた。6日目では終末部に核濃縮や RER の消失傾向を示す腺細胞が散見された。線条部は淡明化した細胞や、丈が低く basal infolding の発達の悪い細胞がみられた。排出導管部は細胞の扁平が顕著で、壊死細胞や脱落寸前の細胞が散見された。管腔には残渣や白血球が多く存在していた。また cytolysome とと思われる小体を有する細胞もみられた。

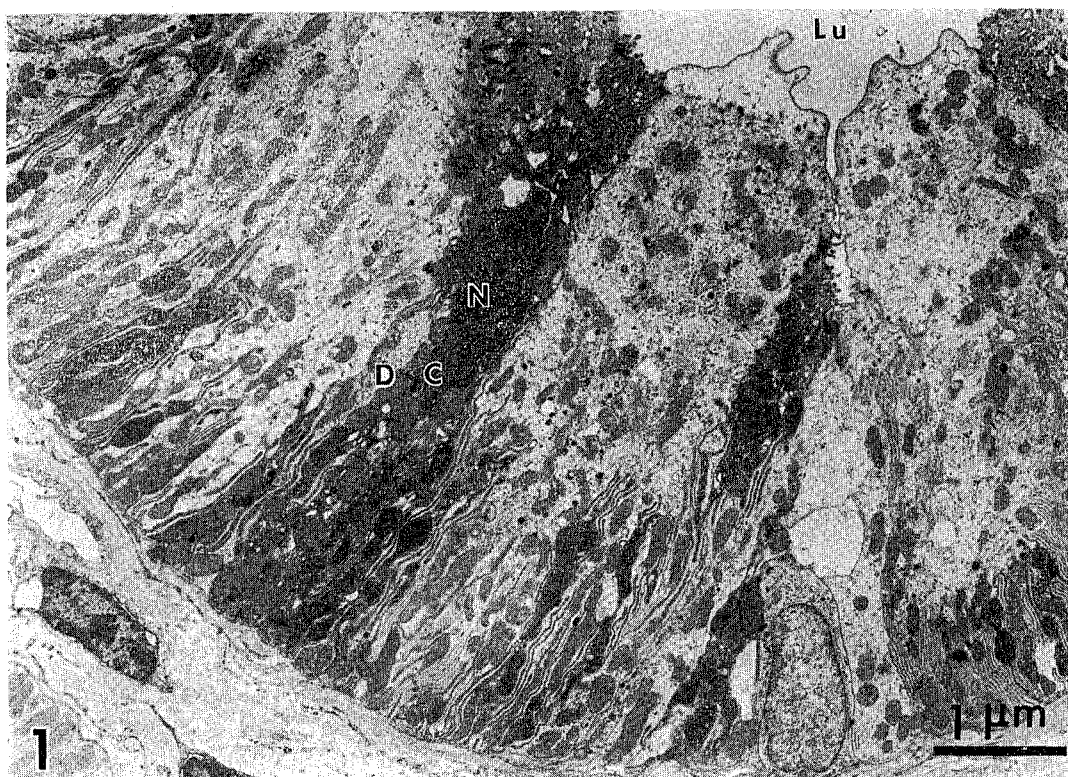
### 文 献

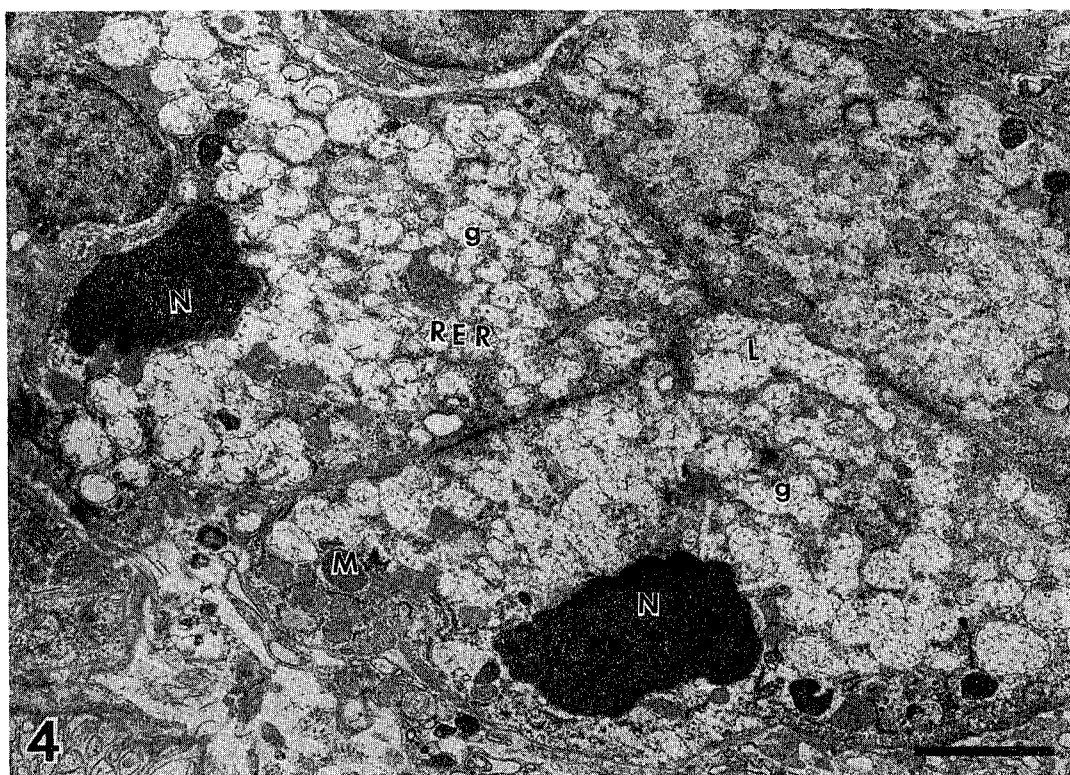
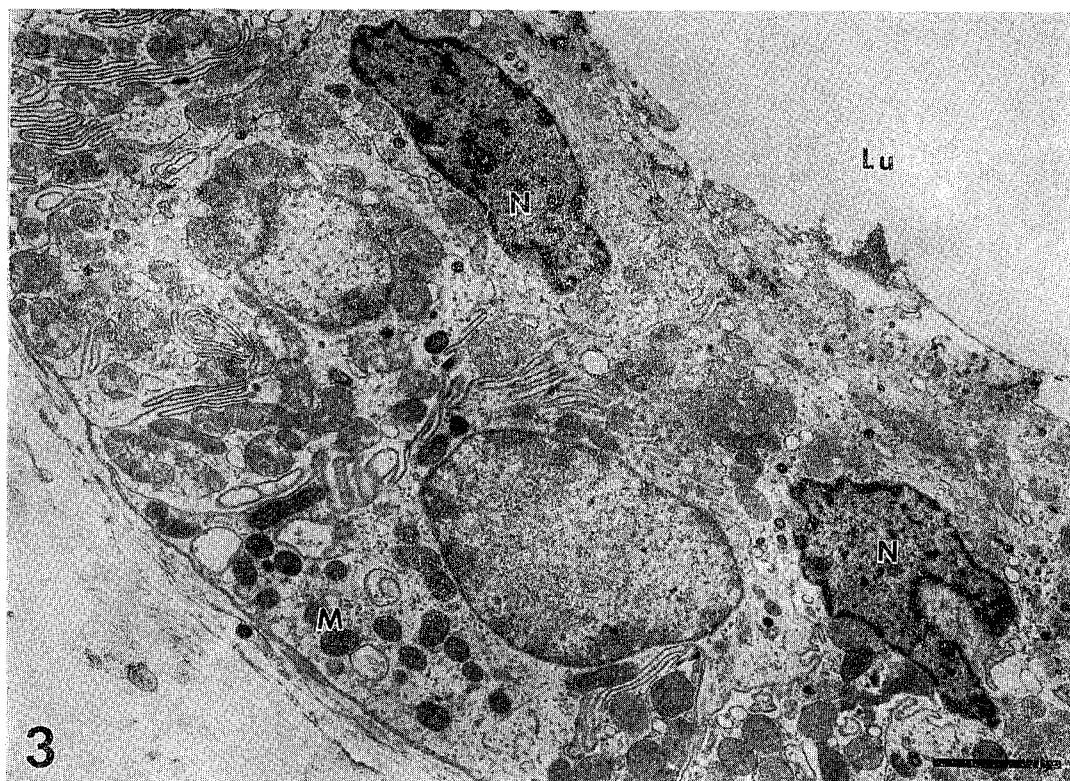
- 1) 藤井 孝ほか：東京衛研年報，29-2，125，1978。
- 2) 藤井 孝ほか：東京衛研年報，30-2，93，1979。
- 3) Tamarin, A. and Sreebny, L. M.: *J. Morph.*, 117, 295, 1965。
- 4) 藤江君夫：新組織学，第2版，397，1970，医学書院，東京。
- 5) 市川 厚：動物細胞学 I，65，1977，朝倉書店，東京。
- 6) 倉橋和啓：細胞，2(4)，14，1970。
- 7) 曲直部康之：大阪市大医誌，9，887，1960。
- 8) 立花民子：歯科学報，71，252，1971。

### 附图の説明

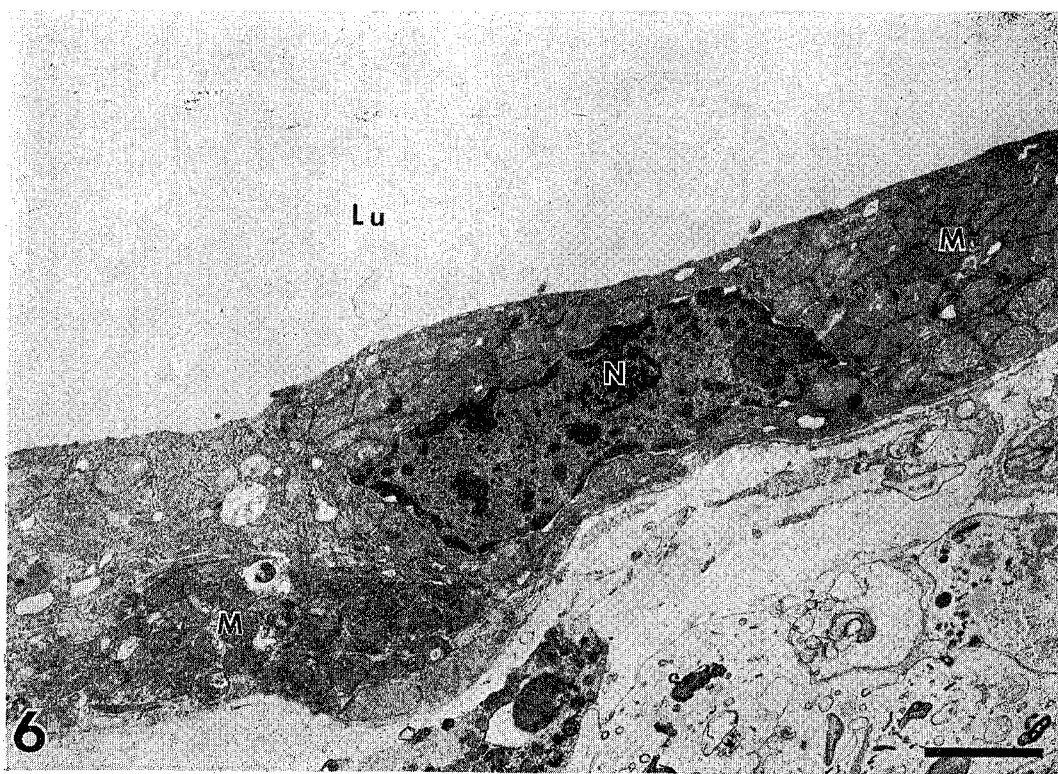
- 図1. 摂取1日目の排出導管細胞を示す。幅が狭く若干の空胞を含む暗調細胞 (DC) がみられる。Lu: 管腔，N: 核。
- 図2. 摂取3日目の終末部腺細胞を示す。Vesicle 状の RER, Golgi 装置 (GO) などがみられる。No: 核小体，g: 分泌顆粒。
- 図3. 摂取3日目の排出導管細胞を示す。電子密度が高く、扁平状で、複雑な切れ込みを呈する核 (N) がみられる。暗調な糸粒体 (M) も存在する。

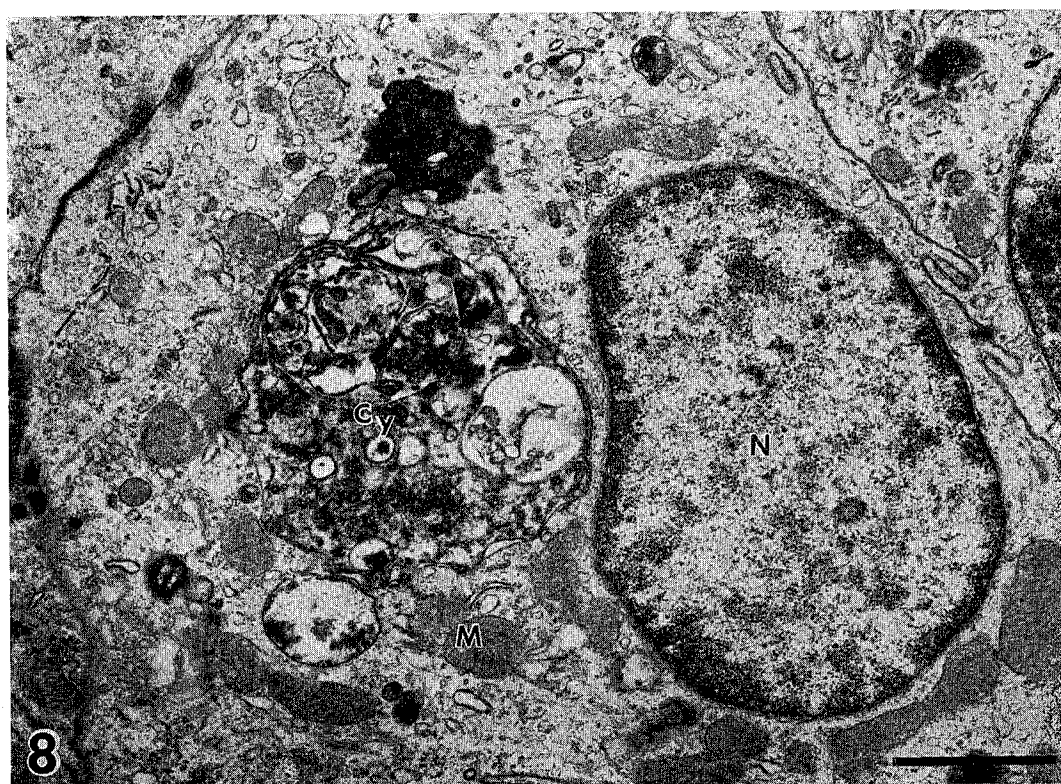
- 図4. 摂取6日目の終末部腺細胞を示す。核は濃縮の感があり、RERは tubule 状ものが少量で、消失傾向を呈する。L: 腺腔
- 図5. 摂取6日目の線条部細胞を示す。Basal infolding が消失し、細胞質全体が淡明化している細胞がみられる。また隣接している細胞が壊死状態である (NC)。
- 図6. 摂取6日目の排出導管細胞を示す。細胞が著しい扁平状を呈している。細胞質には糸粒体 (M) が密に存在している。
- 図7. 摂取6日目の排出導管細胞を示す。脱落細胞 (FC) がみられる。管腔には細胞成分などの残渣が存在している。
- 図8. 摂取6日目の排出導管細胞を示す。Cytolysome (Cy) 核小体が認められる。











## ポリ塩化ジベンゾフランおよびジベンゾジオキシンの胎児および乳児への移行

大石 眞之\*, 平賀 興吾\*

### Transfer of Polychlorinated Dibenzofuran and Dibenzodioxin to the Fetuses and Sucklings of Mice

SHINSHI OISHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** ポリ塩化ジベンゾフラン polychlorinated dibenzofuran, ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, 胎盤通過 placental transfer, 乳腺通過 mammary transfer

ポリ塩化ジベンゾフラン (CDF) およびジベンゾ-*p*-ジオキシン (CDD) は、塩化フェノール工業製品の微量不純物質として知られている<sup>1-3)</sup>。CDD の異性体の1つである 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) は、もっとも毒性が強いとされており、その半数致死量はモルモットでは 1μg/kg 以下と報告されている<sup>7)</sup>。TCDD はさらに実験動物に対して塩素痤瘡 (Chloracne) を生じ<sup>8)</sup>、催奇形性があり<sup>9-11)</sup>、胎児に対する毒性を有し<sup>12-14)</sup>、免疫抑制作用をもつとされている<sup>15, 16)</sup>。

人に対する TCDD の影響としては、研究室や工場内での誤操作などによって塩素痤瘡が生じたことが報告されている<sup>17, 18)</sup>。特に 1976 年 6 月 10 日にイタリア北部 Milano 北郊の町 Seveso の Icmesa 工場より流出したトリクロロフェノール中に相当量の CDD が含まれていたため、地域住民の強制退去、立入禁止等の処置がとられたが、住民 (特に子供) に多数の塩素痤瘡患者を出したほか、種々の疾患を生じる結果となった。この事件の臨床医学的、疫学的な報告<sup>19-21)</sup> や社会学的な考察<sup>22)</sup> については、既にいくつかの報告がなされているが、CDD には蓄積性や遅延毒性があるためいまだ十分な報告となっていない。特にこの事故後数カ月して出生した子供達に奇形の比率がやや高い傾向を認めたことは、カトリック教というイタリアの宗教的背景とからんで大きな社会問題となっている。

現在研究されている CDD は TCDD が主であるが環境中には TCDD 以外の CDD も排出されていると考えられるのでこれらの CDD や CDF についても充分研究する必要がある。CDF 混合物の毒性<sup>23, 24)</sup>、免疫抑制作用<sup>25)</sup> については既に報告したので、今回は胎児、乳児への移行性について報告する。

#### 実験材料と方法

使用した CDF および CDD は和光純薬より購入した。CDF は 4 塩化物と 5 塩化物の混合物であり、CDD は 7 塩化物と 8 塩化物の混合物であった<sup>26)</sup>。

実験には日本クレアより購入した ICR:JCL マウスを使用した。マウスはプラスチックケージに個別飼育し、飼料 (CE-2) および水は自由に摂取させた。

CDF および CDD の胎盤通過の実験には、妊娠 18 日目のマウス 3 匹に 50μg/マウスの CDF あるいは CDD を経口ゾンデで投与し、投与 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺し、直ちに胎児を取り出し、胎児はエーテルで屠殺後分析まで -20° で保存した。

CDF および CDD の乳児への移行実験には出産 1 日後の母獣 3 匹に 50μg/マウスの CDF あるいは CDD を経口ゾンデで投与し、投与 24 時間後に母獣は頸椎脱臼により、乳児はエーテルで屠殺後、分析まで -20° で保存した。

分析には、母獣は各 3 匹、乳児は 3 母獣より 1 腹当たり各 2 匹を選び計 6 匹、また胎児は 1 腹中の 2 胎児を 1 組として 1 母獣当たり 2 組とし、3 母獣分計 6 組を用いた。母獣の肝、脂肪組織、胎児および乳児はハサミで細切後、無水硫酸ナトリウム約 2g を含む *n*-ヘキサン-アセトン (95:5, v/v) 20ml 中で、ポリトロンホモジナイザーを用いて破砕抽出し、*n*-ヘキサン層を 2% 食塩水、ついで濃硫酸で洗滌し、窒素気流下で濃縮し、フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製した<sup>26)</sup>。溶出した CDF、CDD 画分を窒素気流下で濃縮し、ガスクロマトグラフィーで分析定量を行った。ガスクロマトグラフィーの条件はほぼ既報<sup>27)</sup> に準じたが、CDD に関してはカラム温度 270°、検出器温度 300° 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



## 結果と考察

母獣の肝および脂肪組織、胎児、乳児より抽出した CDF, CDD のガスクロマトグラムは肝の CDD を除いて、ほぼ投与した CDF, CDD と同一のパターンを示した。肝より抽出した CDD は投与 CDD と比べてヘプタクロロ-*p*-ジオキシンのピークが非常に小さくなっているのが認められた。他の CDF 混合物を投与したマウス肝より抽出した CDF のガスクロマトグラムも投与 CDF や他の臓器より抽出した CDF のパターンと異なることが報告されている<sup>27)</sup>。これらのことは、CDF や CDD は主に肝で代謝され、その代謝速度は塩素の数と置換位置により異なっていることを示唆している。

Table 1. Mean Concentrations of the CDF and CDD in the Liver, Adipose Tissue and Fetus of Dams Administered the CDF or CDD

|                | CDF (ppm) | CDD (ppm) |
|----------------|-----------|-----------|
| Mother         |           |           |
| Liver          | 2.6       | 2.4       |
| Adipose Tissue | 3.4       | 5.1       |
| Fetus          |           |           |
| Whole Body     | 0.049     | 0.024     |

Values are the mean for 3 dams or 6 units (2 fetuses made up 1 unit).

Table 2. Mean Concentrations of the CDF and CDD in the Liver, Adipose Tissue and Suckling of Dams Administered the CDF or CDD

|                | CDF (ppm) | CDD (ppm) |
|----------------|-----------|-----------|
| Mother         |           |           |
| Liver          | 3.4       | 3.0       |
| Adipose Tissue | 3.3       | 3.5       |
| Suckling       |           |           |
| Whole Body     | 0.75      | 0.070     |

Values are the mean for 3 mothers or 6 sucklings.

CDF および CDD の肝、脂肪組織、胎児、乳児中の残留濃度を Table 1 と 2 に示した。母獣の CDF, CDD 濃度は妊娠マウスと授乳中のマウスでほとんど差はみられなかった。PCB では授乳中のマウスは妊娠マウスに比し非常に低濃度であると報告されている<sup>28)</sup>。

胎児中の CDF 濃度は CDD 濃度より高値を示したが、母獣の濃度に大きな差はみられなかった。乳児ではこの

傾向はより明瞭で CDF は CDD 濃度の10倍以上であった。CDF は胎盤および乳腺を CDD よりも通過しやすいと考えられる。

乳児中の CDF, CDD 濃度は胎児中のそれよりも高かった。PCB でも同様な傾向がみられ、乳児の濃度は胎児の 100 倍以上と報告されている<sup>29)</sup>。これらのことは塩素化芳香族炭化水素化合物は、胎盤より乳腺の方がより通過しやすいことを示唆している。

## 要 旨

CDF および CDD の胎盤通過性、乳腺通過性の検討を行ったところ、胎児、乳児とも CDF の方が残留濃度が高かった。このことは CDD よりも CDF の方が胎盤および乳腺を通過しやすいことを示唆している。

## 文 献

- 1) Bowes, G. W., Simoneit, B. R., Burlingame, A. L., De Lappe, B. W., and Risebrough, R. W.: *Environ. Health Perspect.*, 5, 191, 1973
- 2) Bowes, G. W., Mulvihill, M. J., DeCamp, M. R., and Kende, A. S.: *J. Agr. Food Chem.*, 23, 1222, 1975
- 3) Buser, H.-R.: *J. Chromatogr.*, 107, 295, 1975
- 4) Nilsson, C.-A.: *J. Chromatogr.*, 89, 325, 1974
- 5) Roach, J. A. G. and Pomerantz, I. H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 338, 1974
- 6) Vos, J. G., Komen, J. H., Van der Maas, H. L., Ten Nover de Braun, M. C., and de Vos, R. H.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 8, 625, 1970
- 7) Harris, M. W., Moore, J. A., Vos, J. G., and Gupta, B. N.: *Environ. Health Perspect.*, 5, 101, 1973
- 8) Jirasek, L. J., Kanensky, J., Kubek, K., Pazderova, J., and Luka, E.: *Czech. Dermatol.*, 49, 145, 1974
- 9) Coutney, K. D. and Moore, J. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 396, 1971
- 10) Moore, J. A., Gupta, B. N., Zinkl, J. G., and Vos, J. G.: *Environ. Health Perspect.*, 5, 81, 1973
- 11) Neubert, D., Zens, P., Rothenwaller, A., and Merker, H. J.: *Environ. Health Perspect.*, 5, 67, 1973
- 12) Collins, T. F. X., Williams, C. H., and Gray, G. C.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6, 559, 1971
- 13) Emerson, J. L., Thompson, D. J., Stebing, R. J., Gerbig, C. G., and Robison, V. B.: *Food*

- Cosmet. Toxicol.*, 9, 395, 1971
- 14) Sparschu, G. L., Dunn, F. L., and Rowe, V. K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 317, 1970
- 15) Vos, J. G., Moore, J. A., and Zinkl : *Environ. Health Perspect.*, 5, 149, 1973
- 16) Vos, J. G., Kreefenberg, J. G., Engel, H. W. B., Minderhoud, A., and van Noorle Jansen, L. M. : *Toxicology*, 9, 75, 1978
- 17) May, G. : *Brit. J. Indust. Med.*, 30, 276, 1973
- 18) Oliver, R. M. : *Brit. J. Indust. Med.*, 32, 49, 1975
- 19) Gianotti, F. : *Ann. Dermatol. Venereol.*, 104, 825, 1977
- 20) Sanchioni, L., Cefis, F., and Gropp, A. : *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 108, 1617, 1978
- 21) Reggiani, G. : *Arch. Toxicol.*, 40, 161, 1978
- 22) Fuller, J. G. : 死の夏 (野間宏監訳) アンヴェル社
- 23) Oishi, S., Morita, M., and Fukuda, H. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 13, 1978
- 24) Oishi, S. and Hiraga, K. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 16, 47, 1978
- 25) Oishi, S. and Hiraga, K. : *J. Environ. Health Sci.*, in press
- 26) Firestone, D. : *J. Agr. Food Chem.*, 25, 1274, 1977
- 27) Morita, M. and Oishi, S. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18, 61, 1977
- 28) Takagi, Y., Otake, T., Kataoka, M., Murata, Y., Aburada, S., Akasaka, S., Hashimoto, K., Uda, H., and Kitaura, T. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 38, 549, 1976
- 29) Masuda, Y., Kagawa, R., Tokudome, S., and Kuratsune, M. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 16, 33, 1978

## 市販有機塩素剤に関する毒性学的研究

川野 澄江\*, 広瀬 久美子\*, 井口 重孝\*, 平賀 興吾\*

### Toxicological Studies of Polychlorinated Aromatic Compounds in Female Rats

SUMIE KAWANO\*, KUMIKO HIROSE\*, SHIGETAKA IGUCHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** 毒性試験 toxicological studies, 市販有機塩素系化合物 commercial polychlorinated organic compounds, ペンタクロロフェノール pentachlorophenol, ペンタクロロニトロベンゼン pentachloronitrobenzene, 肝薬物代謝酵素の誘導 induction of hepatic drug-metabolizing enzymes, 血清生化学的試験 serum biochemical studies, 有毒不純物 toxic contaminants

ペンタクロロフェノール (PCP) は、除草剤、殺虫剤、木材防腐剤等の用途で使用されており、その生産量は、わが国では年間約 100 トンと言われる。その工業的製法は、フェノールの塩素化もしくはヘキサクロロベンゼンの水解によっているため、製造工程で大量のポリクロロフェノキシフェノール (PCPP), ポリクロロジフェニールエーテル (PCDPE), ポリクロロジベンゾジオキシン (PCDD), ポリクロロジベンゾフラン (PCDF) 等々が生成し、最終産物中にも残留する<sup>1,2)</sup>。PCDD, PCDF は、催奇形性、アクネ発症性のきわめて強い猛毒性化合物として知られている<sup>3)</sup>。これらの化合物には、塩素数と塩素基の位置の異なる多数の異性体が存在し、それらを相互に分離、定量することはきわめて困難であり、しかも異性体によって毒性の強さが著しく異なっている<sup>4,5)</sup>。最も毒性が強いとされている 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾジオキシン (TCDD) のモルモットにおける LD<sub>50</sub> 値は、0.6 µg/kg ときわめて小さい<sup>6)</sup>。他の有機塩素系化合物の毒性について検討する際にも、PCDD 等の猛毒性化合物の存在に対して、たとえ微量の存在ではあっても、十分な配慮がなされるべきであろう。

今回われわれは、実際に市販されている有機塩素剤、PCP, テトラクロロフェノール (TCP), トリクロロフェノール (TriCP), テトラクロロナフタレン (TCN), ペンタクロロニトロベンゼン (PCNB) の毒性に関して、雌性ラットを用いて検討を行った。一般毒性試験項目 (体重および器官重量の測定、血清生化学的試験) のほかに、PCDD, PCDF の最も鋭敏な生物学的指標とみなされている肝薬物代謝酵素の誘導作用<sup>7)</sup> を特に測定し、市販有機塩素剤中に存在する不純物の生物影響に言及し

た。

#### 実験材料および方法

1. 試薬 試験に供したペンタクロロフェノールは、高純度とみられる Aldrich Chemical Co. 製純度99%試薬 (PCP-AG), Eastman Chemical Co. 製純度98%試薬 (PCP-E) の2種、低純度とみられる Aldrich Chemical Co. 製工業用規格品、純度86% (PCP-AT), 東京化成工業株式会社製純度95%試薬 (PCP-T), 関東化学株式会社製 (PCP-K) の3種、合計5種である。テトラクロロフェノールは、Aldrich Chemical Co. 製 2,3,4,5-テトラクロロフェノール、純度98% (TCP-AI), 2,3,5,6-テトラクロロフェノール (TCP-AII), 関東化学株式会社製 2,3,4,6-テトラクロロフェノール (TCP-K) の3種を供した。そのほか、Aldrich Chemical Co. 製工業用規格 2,3,5-トリクロロフェノール (TriCP), 1,2,3,4-テトラクロロナフタレン (TCN), 関東化学株式会社製ペンタクロロニトロベンゼン (PCNB) の3種を試験に供した。

その他の分析用試薬に関しては、既報に示した<sup>7,8)</sup>。

2. 実験動物および投与方法 生後5週令 (体重100~120g) の Wistar-JCL 系雌性ラットを使用した。室温 25±1°, 湿度 50±5%, 照明時間 7—17時の一般飼育室で飼育を行った。ステンレス製金網ケージを使用し、各ケージ 4~5 匹とした。全飼育期間にわたって体重の測定を行い、飼料摂取量の測定を数回行った。

飼料原末 (日本クレア CE-2) に上記11検体 (PCP-AG, PCP-E, PCP-T, PCP-K, PCP-AT, TCP-AI, TCP-AII, TCP-K, TriCP, TCN, PCNB) を各0.2%の割合で添加して試験飼料とした。各群 4~5 匹のラットに上記試験飼料を3週間自由に摂取させた。

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

3. 肝ミクロソーム分画の調製法および酵素活性、差スペクトルの測定法。既報に示してある<sup>7,8)</sup>。酵素活性の測定は、今回は、*o*-ニトロアニソール・デメチラーゼ (NADM) とアミノピリン・デメチラーゼ (APDM) についてのみ実施した。反応溶液の組成は、NADP 0.8 mM, グルコース-6-リン酸 4mM, ニコチンアミド 5mM, 塩化マグネシウム 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 0.1mM, ミクロソーム分画 (反応溶液 1ml 中に肝臓 50mg に相当するミクロソーム分画を含む) および基質 (*o*-ニトロアニソール 1.2mM, アミノピリン 4mM) とからなり、全容量は 1.25ml とした。反応時間は 10分とした。

4. 血清生化学検査 断頭による採血後、遠心分離して得た血清について、日立自動分析装置 M-400 を用いて、以下の諸項目の血清生化学的検査を実施した。総タンパク量 (TP), グルコース量 (GLU), 尿素窒素量 (UN), グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素 (GPT), アルカリホスファターゼ (ALP), 総コレステロール量 (CHO), コリンエステラーゼ (ChE), グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素 (GOT)。詳細は

既報に示した<sup>9)</sup>。

### 結果と考察

Wistar-JCL 系雌性ラットに、規格、純度の異なる 11 種の市販有機塩素剤 (ペンタクロロフェノール 5 種, テトラクロロフェノール 3 種, トリクロロフェノール, テトラクロロナフタレン, ペンタクロロニトロベンゼン各 1 種) をそれぞれ 0.2% の割合で添加した粉末飼料を 3 週間給与し、その毒性について検討した。実験は 2 回に分けて行い、実験 1 では、PCP-E, PCP-T, PCP-K, TCP-AI, TCP-K を、実験 2 では、PCP-AG, PCP-AT, TCP-AII, TriCP, TCN, PCNB を投与した。

#### 1. 体重および飼料摂取量

試験期間の体重変化を Fig. 1 に示した。PCP 投与では、全群とも、投与開始後の数日間、著しい体重減少を示した。なかでも、PCP-E 投与群の減少は、顕著であった。体重の減少は約 1 週間続き、その後は増加を示したが、その程度はわずかであった。

TCP-K 投与群では、投与開始後の数日間に著しい体重減少が示された。その後 6 日目頃から急激な増加が認められたが、初期の成長の遅れを取戻すことはできなかった。TCP-AI, TCP-AII, TriCP, TCN 投与群の

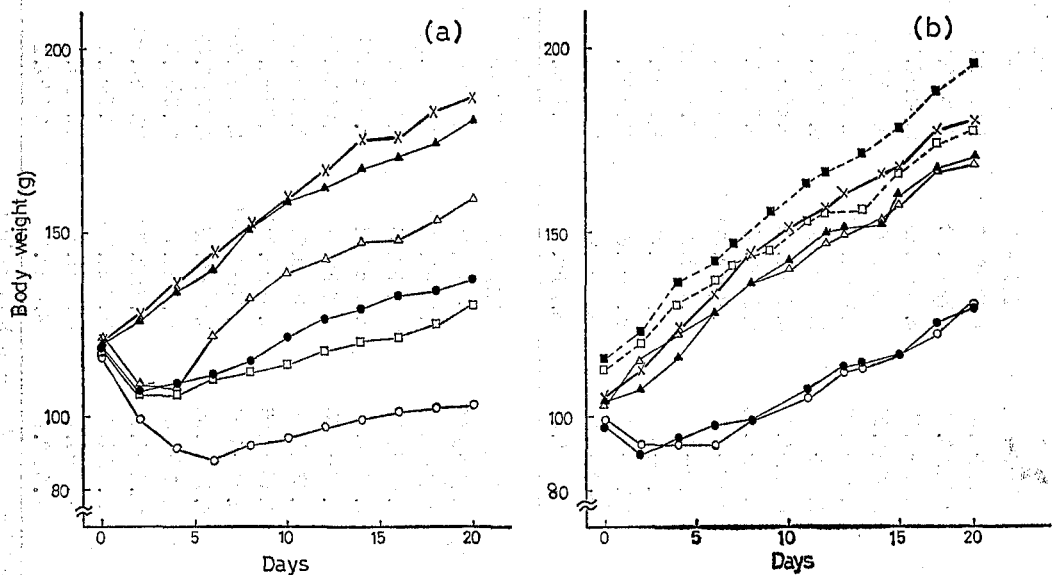


Fig. 1. Body Weight Changes of Female Rats on Oral Administration of Chlorinated Aromatics

(a) Experiment 1.

× Control, ○ PCP-E, ● PCP-T, □ PCP-K, △ TCP-K, ▲ TCP-AI.

(b) Experiment 2.

× Control, ○ PCP-AG, ● PCP-AT, ▲ TCP-AII, △ TriCP, □ TCN, ■ PCNB.

Table 1. Organ Weight in Female Rats on Oral Administration of Chlorinated Phenols and Aromatics

|              | Experiment 1. |              |              |             |              |              |
|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
|              | Control       | PCP-E        | PCP-T        | PCP-K       | TCP-AI       | TCP-K        |
| Brain#       | 1.00±0.04     | 1.69±0.15*** | 1.28±0.09*** | 1.38±0.02** | 1.07±0.08    | 1.13±0.03*** |
| Liver#       | 4.34±0.03     | 4.72±0.29    | 6.34±0.08*** | 6.21±0.09** | 4.28±0.02    | 4.63±0.03    |
| Lung#        | 0.57±0.05     | 0.71±0.15    | 0.58±0.13    | 0.65±0.12   | 0.54±0.06    | 0.57±0.06    |
| Heart#       | 0.35±0.02     | 0.35±0.07    | 0.37±0.03    | 0.36±0.03   | 0.34±0.02    | 0.35±0.10    |
| Thymus#      | 0.27±0.02     | 0.10±0.06*** | 0.19±0.05*   | 0.26±0.03   | 0.23±0.04    | 0.27±0.02    |
| Spleen#      | 0.29±0.02     | 0.29±0.08    | 0.31±0.03    | 0.32±0.03   | 0.30±0.03    | 0.33±0.05    |
| Kidney(R)#   | 0.41±0.02     | 0.55±0.10*   | 0.52±0.03*** | 0.50±0.04** | 0.47±0.02*** | 0.43±0.06    |
| Kidney(L)#   | 0.41±0.02     | 0.53±0.09*   | 0.51±0.04*** | 0.48±0.03** | 0.46±0.03**  | 0.49±0.05**  |
| Uterus#      | 0.17±0.02     | 0.10±0.02*** | 0.19±0.04    | 0.17±0.08   | 0.20±0.05    | 0.21±0.04    |
| Ovary(R)##   | 19.2±2.0      | 12.1±7.7     | 16.1±2.2*    | 17.5±4.8    | 19.5±3.0     | 17.7±2.0     |
| Ovary(L)##   | 22.0±3.7      | 14.6±5.2*    | 15.9±4.4*    | 16.9±4.9    | 20.4±3.0     | 15.0±2.6**   |
| Adrenal(R)## | 17.1±1.2      | 16.1±1.6     | 18.3±1.5     | 17.4±2.4    | 15.9±1.1     | 16.2±1.3     |
| Adrenal(L)## | 16.7±2.8      | 16.4±1.9     | 18.0±1.3     | 18.5±2.2    | 16.8±1.3     | 16.0±1.6     |
| Hypophysis## | 5.8±0.4       | 5.2±0.9      | 5.1±0.6      | 5.8±0.7     | 5.6±0.5      | 4.0±2.3      |

|              | Experiment 2. |              |              |            |            |           |             |
|--------------|---------------|--------------|--------------|------------|------------|-----------|-------------|
|              | Control       | PCP-AG       | PCP-AT       | TCP-AII    | TriCP      | TCN       | PCNB        |
| Brain#       | 1.00±0.06     | 1.36±0.11*** | 1.40±0.08*** | 1.07±0.04  | 1.11±0.07* | 1.07±0.07 | 0.97±0.02   |
| Liver#       | 4.35±0.06     | 6.17±0.28*** | 7.53±0.21*** | 4.42±0.20  | 4.23±0.22  | 4.30±0.35 | 5.75±0.45** |
| Lung#        | 0.59±0.12     | 0.57±0.03    | 0.62±0.06    | 0.55±0.08  | 0.56±0.06  | 0.54±0.07 | 0.51±0.03   |
| Heart#       | 0.34±0.02     | 0.37±0.02    | 0.37±0.02    | 0.36±0.01  | 0.34±0.01  | 0.34±0.01 | 0.34±0.03   |
| Thymus#      | 0.28±0.03     | 0.25±0.09    | 0.21±0.01*** | 0.25±0.03  | 0.24±0.01* | 0.25±0.03 | 0.24±0.01*  |
| Spleen#      | 0.25±0.04     | 0.31±0.02*   | 0.33±0.03*   | 0.30±0.03  | 0.27±0.04  | 0.27±0.01 | 0.30±0.03   |
| Kidney(R)#   | 0.46±0.05     | 0.54±0.04*   | 0.55±0.02*   | 0.50±0.02  | 0.45±0.03  | 0.45±0.02 | 0.47±0.04   |
| Kidney(L)#   | 0.44±0.04     | 0.54±0.03**  | 0.52±0.03*   | 0.49±0.01* | 0.44±0.03  | 0.45±0.02 | 0.47±0.03   |
| Uterus#      | 0.19±0.05     | 0.11±0.06    | 0.17±0.05    | 0.22±0.06  | 0.23±0.04  | 0.24±0.03 | 0.20±0.07   |
| Ovary(R)##   | 19.7±1.8      | 14.1±4.4*    | 15.5±3.5     | 19.7±2.2   | 19.6±2.4   | 21.8±4.0  | 19.6±3.1    |
| Ovary(L)##   | 24.1±2.7      | 11.5±3.7***  | 15.4±3.7**   | 18.5±3.4*  | 19.7±1.7*  | 20.6±2.4  | 20.4±3.1    |
| Adrenal(R)## | 16.5±2.3      | 14.7±0.7     | 15.7±1.3     | 12.6±7.2   | 17.1±2.6   | 16.9±1.7  | 16.4±1.1    |
| Adrenal(L)## | 16.5±1.7      | 15.3±1.9     | 15.9±1.1     | 12.9±7.3   | 17.1±2.8   | 17.5±0.4  | 16.9±1.7    |
| Hypophysis## | 4.6±0.8       | 4.4±0.6      | 3.4±2.1      | 5.4±0.2    | 6.0±0.7*   | 5.5±0.7   | 5.8±0.5*    |

# g/100 g body weight; ## mg/100 g of body weight.

Values are the mean±SD for 4 or 5 rats. Significantly different from control \* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01, \*\*\* P&lt;0.001.

Table 2. Effects of Chlorinated Phenols and Other Aromatics on Hepatic Microsomal Hemoproteins and Drug-Metabolizing Enzyme Activities

|                        | Experiment 1. |              |              |              |             |              |
|------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
|                        | Control       | PCP-E        | PCP-T        | PCP-K        | TCP-AI      | TCP-K        |
| Microsomal#            | 22.0±2.6      | 26.9±3.0*    | 29.6±1.2**   | 29.8±1.2***  | 20.9±2.3    | 23.5±4.4     |
| Protein                | (100)         | (122)        | (135)        | (136)        | (95)        | (107)        |
| Cytochrome##           | 0.54±0.07     | 0.97±0.17*** | 1.23±0.10*** | 1.24±0.16*** | 0.64±0.10*  | 0.67±0.05    |
| P-450                  | (100)         | (180)        | (228)        | (230)        | (119)       | (124)        |
| Cytochrome##           | 0.27±0.02     | 0.50±0.09*** | 0.59±0.09*** | 0.53±0.09*** | 0.36±0.01** | 0.37±0.05*** |
| b <sub>5</sub>         | (100)         | (185)        | (219)        | (196)        | (133)       | (137)        |
| p-Nitroanisole†        | 6.9±0.7       | 21.9±3.3***  | 25.1±4.2***  | 22.6±1.5***  | 11.1±1.9**  | 10.6±1.5**   |
| demethyrene            | (100)         | (322)        | (369)        | (332)        | (163)       | (159)        |
| Aminopyrine†           | 17.1±2.2      | 38.9±5.8***  | 26.2±3.7***  | 23.1±3.1**   | 25.3±3.5**  | 21.8±1.9**   |
| demethylase            | (100)         | (228)        | (153)        | (135)        | (148)       | (128)        |
| Ethylisocyanide†       | 0.58±0.09     | 0.43±0.03**  | 1.16±0.08*** | 1.08±0.17*** | 0.51±0.03   | 0.49±0.05    |
| difference<br>spectrum | (100)         | (74)         | (200)        | (186)        | (88)        | (85)         |

|                        | Experiment 2. |              |              |           |           |           |              |
|------------------------|---------------|--------------|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
|                        | Control       | PCP-AG       | PCP-AT       | TCP-AII   | TriCP     | TCN       | PCNB         |
| Microsomal#            | 19.1±2.6      | 31.2±2.4***  | 30.7±1.7***  | 23.9±2.8* | 20.6±3.0  | 23.3±3.1  | 23.8±4.5     |
| Protein                | (100)         | (163)        | (161)        | (125)     | (108)     | (122)     | (125)        |
| Cytochrome##           | 0.61±0.05     | 0.81±0.09**  | 1.26±0.05*** | 0.73±0.07 | 0.65±0.06 | 0.67±0.05 | 1.15±0.03*** |
| P-450                  | (100)         | (133)        | (207)        | (120)     | (107)     | (110)     | (189)        |
| Cytochrome##           | 0.31±0.04     | 0.56±0.06*** | 0.53±0.04*** | 0.35±0.02 | 0.34±0.07 | 0.37±0.04 | 0.51±0.04*** |
| b <sub>5</sub>         | (100)         | (181)        | (171)        | (113)     | (110)     | (119)     | (165)        |
| p-Nitroanisole†        | 7.1±2.2       | 12.4±3.2*    | 21.5±1.9***  | 9.8±5.6   | 9.0±1.9   | 10.0±0.5* | 26.3±3.5***  |
| demethylase            | (100)         | (175)        | (303)        | (138)     | (127)     | (141)     | (370)        |
| Aminopyrine†           | 32.5±9.1      | 39.4±10.7    | 41.0±1.5     | 39.7±5.6  | 36.0±10.0 | 40.1±3.5  | 78.0±6.9***  |
| demethylase            | (100)         | (121)        | (126)        | (122)     | (111)     | (123)     | (240)        |
| Ethylisocyanide†       | 0.54±0.03     | 0.54±0.05    | 1.18±0.06*** | 0.52±0.07 | 0.55±0.05 | 0.53±0.05 | 0.59±0.09    |
| difference<br>spectrum | (100)         | (100)        | (219)        | (96)      | (102)     | (98)      | (109)        |

Each value represents the mean $\pm$ SD from four or five rats. Significantly different from control \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

# mg of microsomal protein/g of liver; ## nmoles/mg of microsomal protein; † nmoles of formed metabolite/mg of microsomal protein/10 min;

‡ 455nm/430nm peak ratio. Numbers in parentheses are per cent of control.

Table 3. Serum Biochemical Values in Female Rats on Oral Administration of Chlorinated Phenols and Other Chlorinated Aromatics

| Experiment 1. |           |             |               |               |            |             |
|---------------|-----------|-------------|---------------|---------------|------------|-------------|
|               | Control   | PCP-E       | PCP-T         | PCP-K         | TCP-AI     | TCP-K       |
| TP (g/dl)     | 6.4±0.1   | 5.4±0.1***  | 6.4±0.2       | 6.4±0.3       | 5.9±0.3*   | 6.2±0.1*    |
| GLU (mg/dl)   | 171±4     | 148±24      | 151±7***      | 147±7***      | 166±12     | 177±8       |
| UN (mg/dl)    | 19.6±2.0  | 30.0±6.2**  | 19.4±2.5      | 19.3±4.7      | 21.7±1.2   | 21.8±4.1    |
| GPT (KU/dl)   | 26.8±1.3  | 47.8±9.0*** | 80.0±19.1***  | 84.2±20.5***  | 28.8±1.5   | 39.9±3.6*** |
| ALP (KA-U/dl) | 31.6±9.3  | 58.0±27.9   | 47.4±13.1     | 48.4±6.9**    | 50.0±14.4* | 38.8±7.2    |
| CHO (mg/dl)   | 80.0±4.6  | 61.2±6.4*** | 157.2±13.5*** | 150.2±19.0*** | 69.9±3.9** | 88.4±9.7    |
| ChE (4pH)     | 0.39±0.10 | 0.24±0.05*  | 0.34±0.05     | 0.39±0.09     | 0.41±0.07  | 0.37±0.07   |
| GOT (KU/dl)   | 106±10    | 119±25      | 145±23**      | 150±21**      | 123±11*    | 125±3**     |

| Experiment 2. |           |             |               |           |            |           |             |
|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------|------------|-----------|-------------|
|               | Control   | PCP-AG      | PCP-AT        | TCP-AII   | TriCP      | TCN       | PCNB        |
| TP (g/dl)     | 6.4±0.4   | 5.9±0.2*    | 6.4±0.3       | 6.7±0.3   | 6.7±0.6    | 6.2±0.2   | 6.7±0.2     |
| GLU (mg/dl)   | 169±7     | 162±17      | 146±5***      | 165±12    | 177±15     | 169±8     | 167±16      |
| UN (mg/dl)    | 25.3±3.8  | 24.4±4.7    | 22.3±3.8      | 22.4±3.9  | 22.4±2.4   | 21.6±1.6  | 21.5±2.3    |
| GPT (KU/dl)   | 36.5±5.8  | 68.0±6.2*** | 84.2±22.2**   | 34.0±4.2  | 35.8±4.0   | 33.0±4.3  | 17.8±2.8**  |
| ALP (KA-U/dl) | 37.8±12.4 | 49.8±12.5   | 42.8±10.4     | 48.4±12.7 | 81.8±32.6* | 38.8±18.4 | 25.5±3.8    |
| CHO (mg/dl)   | 85.3±5.8  | 97.2±8.1*   | 192.0±23.7*** | 79.0±13.1 | 86.8±6.8   | 94.6±5.6* | 105.8±11.4* |
| ChE (4pH)     | 0.38±0.06 | 0.27±0.05*  | 0.31±0.07     | 0.45±0.08 | 0.49±0.12  | 0.47±0.07 | 0.55±0.09*  |
| GOT (KU/dl)   | 129±12    | 137±13      | 158±9**       | 119±13    | 131±14     | 128±3     | 122±13      |

Values are the mean±SD for 4 or 5 rats. Significantly different from control \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

体重増加は、わずかながら対照群を下まわった。PCNB 投与群の体重増加は、対照群に匹敵した。

PCP 投与の全期間および TCP-K 投与の初期に認められる著しい成長抑制の主な原因は、飼料摂取量の著しい低下にあると思われる。TCP-K 投与後6日目頃から体重の急激な増加が認められたが、その時の飼料摂取量は、対照群を上まわるほどであった。

## 2. 剖検所見および器官重量

屠殺後の剖検によって認められた著明な変化は、以下のとおりである。PCP 投与では、全群に肝臓、腎臓の暗褐色化、胸腺の著しい萎縮が示された。TCN 投与では、前胃が半透明の硬い薄膜状に変化した。PCNB 投与では、肝臓の肥大化が著しく、黄色を呈していた。

Table 1 に体重 100g 当りの器官重量を示した。PCP、PCNB 投与の肝臓、PCP、TCP 投与の腎臓に有意の増加が認められた。PCP 投与の脳重量の有意の増加、卵巣、子宮重量の有意の減少は、摂取量の低下に起因した成長の遅れによっているものと思われる。その他の器官重量には、有意の変化は認められなかった。

## 3. 肝薬物代謝酵素の誘導作用

薬物代謝酵素の誘導物質は、2つのグループに大別され、それぞれフェノバルビタール (PB)、3-メチルコランソレン (3-MC) によって代表される<sup>10,11)</sup>。薬物代謝酵素 (チトクローム P-450) は、基質特異性が非常に小さいのが特徴であるが、3-MC 誘導酵素の基質特異性は、PB 誘導酵素のものよりは、かなり限定されている。PB は、今回われわれが測定した NADM、APDM の両酵素活性を上昇させるのに対して、3-MC は、NADM のみを上昇させる<sup>9)</sup>。また、本酵素は、エチルイソシアニドと結合して特徴的な差スペクトルを生ずるが、3-MC 誘導酵素の差スペクトルは著しく変化し、455nm/430nm ピーク比は増大する。PB 誘導酵素では、このような変化は起らない<sup>11)</sup>。

PCDD、PCDF は、きわめて強力な 3-MC 型の誘導物質である<sup>4,9)</sup>。ちなみに、最も強力だと言われる 2, 3, 7, 8-TCDD の誘導能は、3-MC の数万倍と言われる<sup>12)</sup>。それゆえ、この 3-MC 型の酵素誘導作用は、種々の有機塩素剤の PCDD、PCDF 汚染の有効な生物学的指標にちやうどなると考えた。

Table 2 に各種有機塩素剤を投与した雌ラットの肝ミクロソーム・タンパク含量、チトクローム P-450 含量、 $b_5$  含量、NADM 活性、APDM 活性、エチルイソシアニド差スペクトルの 455nm/430nm ピーク比を示した。肝ミクロソーム・タンパク含量は、PCP 投与の全群で著しく上昇したが、他の有機塩素剤の投与による変化

は、顕著でなかった。チトクローム P-450 含量は、すべての投与群において有意の上昇もしくは上昇の傾向を示したが、PCP-T、PCP-K、PCP-AT、PCNB 投与群の上昇が特に顕著であった。チトクローム  $b_5$  含量の変化は、P-450 含量の変化によく類似していた。

PCP-E、PCP-T、PCP-K、PCP-AT、PCNB 投与群の NADM 活性は、それぞれ対照の 3.2, 3.7, 3.3, 3.0, 3.7倍と著しく上昇した。これに対して、TCP-AI、TCP-K、TCP-AII、TriCP、TCN 投与群の上昇は、それぞれ対照の 1.6, 1.6, 1.4, 1.3, 1.4 倍とわずかであった。5種の PCP 製品中 PCP-AG のみは、対照の 1.8 倍と、わずかな上昇を示すにすぎなかった。一方、APDM 活性の上昇は、PCP-E、PCNB 投与群では、対照の 2.3, 2.4 倍と顕著であったが、他の投与群の上昇は、ごくわずかであった。

PCP-T、PCP-K、PCP-AT 投与群では、エチルイソシアニド差スペクトルの 455nm/430nm ピーク比が約 2 倍に上昇したが、その他の投与群では、上昇は認められなかった。

以上の結果から考えると、純度の低い PCP-T、PCP-K、PCP-AT による誘導は 3-MC 型に近く、高純度とみられる PCP-E、PCP-AG による誘導は、むしろ PB 型に近いと思われる。それゆえ、市販 PCP 製品の示す 3-MC 型の誘導作用は、製品中に含まれている不純物に帰因していることが示唆された。また、PCNB が強い PB 型の誘導物質であることが示された。

## 4. 血清生化学的検査

結果を Table 3 に示した。顕著な変化が認められたのは、CHO 値と GPT 値である。純度の低い PCP 製品、PCP-T、PCP-K、PCP-AT を投与した群の血清 CHO 値は、それぞれ対照の 2.0, 1.9, 2.3 倍に上昇した。純度の高い PCP 製品、PCP-AG、PCP-E の投与では、わずかな上昇もしくは逆に減少が認められた。他の投与群の変化はわずかであった。

血清 GPT 値は、全 PCP 投与群で著しい上昇を示したが、低純度の PCP-T、PCP-K、PCP-AT による上昇は、特に顕著であった。そのほか、TCP-K 投与群では有意の上昇が、PCNB 投与群では有意の減少が認められた。

PCP 投与で血清 TP 値および GLU 値に減少の傾向がみられたが、摂取量の低下と関連があるのかもしれない。

## 5. 生化学的検査諸因子間の相互の関連

以上に述べてきた肝薬物代謝酵素および血清生化学的検査値の相互の関連を明らかにするため、特に変動の大



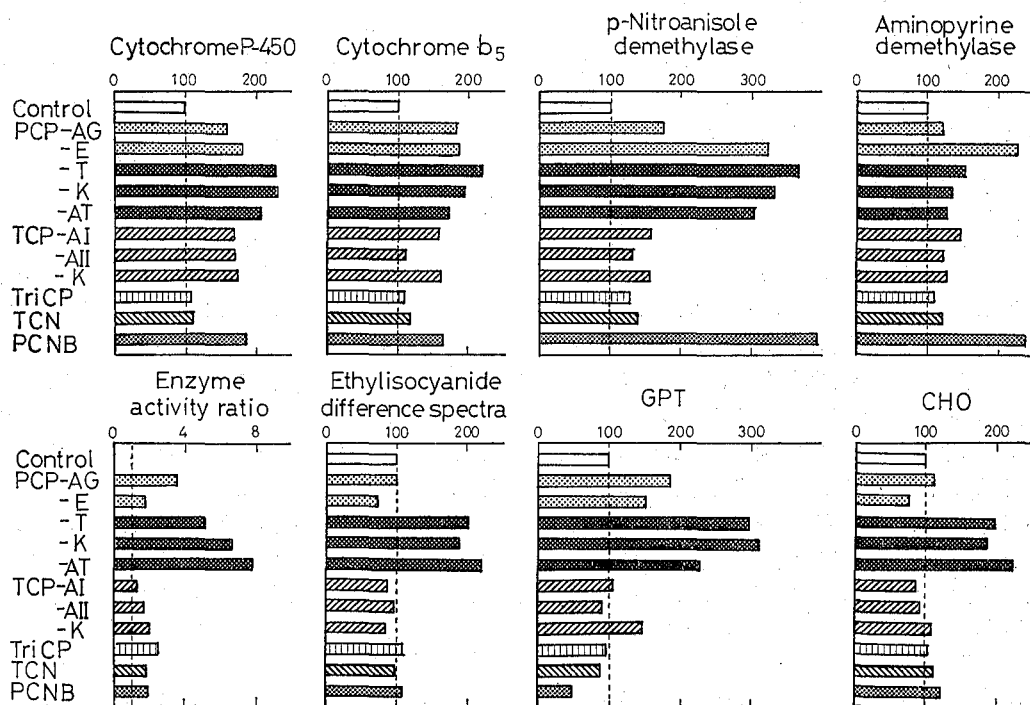


Fig. 2. Relationship between Various Biochemical Parameters Markedly Changed by the Administration of Polychlorinated Aromatics  
 Except Enzyme activity ratio, values are expressed as % of control.  
 Enzyme activity ratio means % increase of p-nitroanisole demethylase activity divided by that of aminopyrine demethylase activity.

きい成分を選んで図示した (Fig. 2)。

チトクローム P-450 含量,  $b_5$  含量は, TriCP, TCN を除いた全投与群で著しく上昇している。NADM 活性は PCP, PCNB 投与の全群で著しい上昇を示すのに対して, APDM 活性は, PCP-E 投与群, PCNB 投与群でのみ著明な上昇を示す。両酵素活性の上昇率の比 (NADM 活性の上昇率/APDM 活性の上昇率) は, 誘導酵素のタイプの違いを表わすと考え, Fig. 2 に図示してみた。純度の低い PCP を投与した群では, 特にこの比の上昇が大きい。エチルイソシアニド差スペクトルの 455nm/430nm ピーク比の上昇もこの 3 群に特徴的である。

一方, 血清生化学的試験項目のうち CHO 値の上昇は, 上記の酵素活性比およびエチルイソシアニド差スペクトルのピーク比の上昇とよく一致している。また, GTP 値の上昇も特にこの 3 群で著しいようである。

#### 総 括

市販有機塩素剤を 0.2% の割合で飼料中に添加して雌

性ラットに給与し, その毒性について検討した。試験に供した有機塩素剤は, ペンタクロロフェノール (PCP) 5 製品, テトラクロロフェノール (TCP) 3 製品, トリクロロフェノール (TriCP), テトラクロロナフタレン (TCN), ペンタクロロニトロベンゼン (PCNB) 各 1 製品の計 11 製品である。PCP は, 著しい成長抑制と肝, 腎臓の肥大化が示すように強い毒性を有していた。しかしながら, 肝薬物代謝酵素の誘導作用には製品間に著しい差が認められ, 低純度とみられる 3 製品は, 顕著な 3-メチルコランスレン (3-MC) 型の誘導 (酵素の基質特異性の変化, エチルイソシアニド差スペクトルの変化) を示すのに対して, 高純度とみられる 2 製品は, むしろフェノバルビタール (PB) 型に近い, あまり強くない誘導を示した。今回結果を示さなかったが, われわれは, 低純度の製品が大量のポリクロロフェノキシフェノール, -ジフェニールエーテル, -ジベンゾジオキシン (PCDD) を含有していることをすでに確認しており, 3-MC 型の酵素誘導は, これらの不純物 (おそらくは

PCDD であろう) に起因していると思われる。低純度の PCP は、血清コレステロール値および GPT 値に顕著な上昇をもたらした。これら 2 因子も PCDD 汚染の有力な生物学的指標になりうると考える。

その他の有機塩素剤, TCP, TriCP, TCN, PCNB の投与は、成長、器官重量、血清生化学的試験値、肝薬物代謝酵素にある程度の変化をもたらしたが、3-MC 型とみられる酵素誘導は認められず、著しい PCDD 汚染はないものと思われる。これらの製品による顕著な変化を以下に列記する。① 2, 3, 4, 6-TCP による比較的強い成長抑制, ② TCN による前胃の変性, ③ PCNB による著しい肝肥大, P B 型の肝薬物代謝酵素の誘導および血清 GPT 値の低下。

#### 文 献

- 1) Nilsson, C.-A.: *J. Chromatogr.*, 89, 325, 1974
- 2) Buser, H.-R.: *J. Chromatogr.*, 107, 297, 1975
- 3) Matthiaschk: *Dioxin. Toxicological and Chemical Aspects*, 123, 1978, SP Medical & Scientific Books, New York - London
- 4) Poland, A. and Glover, E.: *Mol. Pharmacol.*, 9, 736, 1973
- 5) Poland, A. and Glover, E.: *J. Biol. Chem.*, 251, 4936, 1976
- 6) Schwetz, B. A.: *Environ. Health Perspect.*, 5, 87, 1973
- 7) 川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 179, 1976
- 8) Kawano, S. and Hiraga, K.: *Jap. J. Pharmacol.*, 28, 305, 1978
- 9) 川野澄江, 林田志信, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 142, 1978
- 10) Conney, A. H.: *Pharmacol. Rev.*, 19, 317, 1976
- 11) Mannering, G. J.: *Metabolism*, 20, 228, 1971
- 12) Poland, A. and Glover, E.: *Mol. Pharmacol.*, 10, 349, 1974

## ラットおよびマウスの肝 9,000×g 上清分画による2-アセチルアミノフルオレンの代謝活性化 におよぼす薬物代謝酵素誘導剤の影響

小 嶋 昭 江\*, 平 賀 興 吾\*

### Effects of Drug-Metabolizing Enzyme Inducers on the Mutagenic Activation of 2-Acetylaminofluorene by the Rat and Mouse Liver 9,000×g Supernatant Fractions

AKIE KOJIMA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords** : 突然変異性 mutagenicity, 2-アセチルアミノフルオレン 2-acetylaminofluorene, 3-メチルコランスレン 3-methylcholanthrene, フェノバルビタール phenobarbital, ポリ塩化ビフェニール polychlorinated biphenyl, ラット rat, マウス mouse

#### 緒 言

発ガン物質であるベンツ(a)ピレン, アフラトキシン B<sub>1</sub>, 2-アセチルアミノフルオレン (AAF) などの突然変異性は, 代謝活性化されることによって初めて検出される。ゆえにバクテリアを用いる突然変異性試験には, 哺乳類の肝ミクロソーム分画(S 9分画)による代謝活性化が取り入れられている。現在, このS 9は研究者が個々に調製して突然変異性試験に用いている。しかし, ミクロソーム分画の酵素活性は, 動物種, 系統, 性差, 週令, 誘導剤などによって変ってくる。従って, スクリーニングにより適したS 9を得るためには, このような条件についてもっと検討がなされなければならない。今回, われわれは酵素誘導剤の影響について検討するために, フェノバルビタール (PB), 3-メチルコランスレン(MC), ポリ塩化ビフェニール (PCB) で処理したラットおよびマウスの肝ホモジネート 9,000×g (S 9) 分画を用いて, *Salmonella typhimurium* TA98 に対する AAF の突然変異性を比較する実験を行った。マウスは, MC によって酵素誘導がおこる C57BL/6N 系および誘導がおこらない DBA/2N の2種類の系統を使用した。

#### 実験材料および方法

##### 1. 実験動物

動物は, Wistar-JCL 系ラット, C57BL/6N Crj 系および DBA/2N Crj 系マウスそれぞれ5週令の雄を使用した。ラットはステンレス製金あみケージで, マウスは床敷を入れたアルミ製ケージで飼育し, それぞれ, 水および普通固型飼料 (日本クレア製, CE-2) を自由に摂取させた。

##### 2. 薬物代謝酵素の誘導

PB, MC, PCB による薬物代謝酵素の誘導を行った。ラットについてはPBとMCを同時に投与する実験も併行して行った。

①PB投与: 飲水にPB (吉田製薬製) を0.1% 添加し, 一週間投与後, 断頭屠殺し肝臓を摘出した。

②MC投与: MC (Fluka, AG, SG 製) のコーンオイル溶液 (ラット 10mg/ml, マウス 5mg/ml) を体重 1kg あたり 20mg の割合で4日間, 腹腔内に連続投与し, 翌日肝臓を摘出した。

③PCB 投与: PCB (三菱モンサント製, Aroclor 1254) のコーンオイル溶液 (200mg/ml) を体重 1kg あたり 500mg の割合で腹腔内に一回投与し, 5日後肝臓を摘出した。

3. 肝ホモジネートの S9 分画, S9-Mix の調製  
矢作<sup>1)</sup>の方法に従って調製した。

##### 4. 突然変異性試験

*Salmonella typhimurium* TA98<sup>2)</sup> を用いて Ames ら<sup>2,3)</sup>の方法にプレインキュベーションを加えた矢作<sup>1)</sup>の方法に従って行った。プレインキュベーションは20分間とした。AAF はジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬製) に溶解した。実験結果はプレート3枚の平均復帰コロニー数で示した。S 9分画を添加した場合のTA98の自然復帰コロニー数はプレートあたり平均35であった。

#### 結 果

薬物代謝酵素を誘導したラットの肝のS 9分画を用い, 0.5ml のS9-Mix 中のS 9分画含有量を変えて AAF (10μg/プレート) の突然変異性を比較した結果を Fig. 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

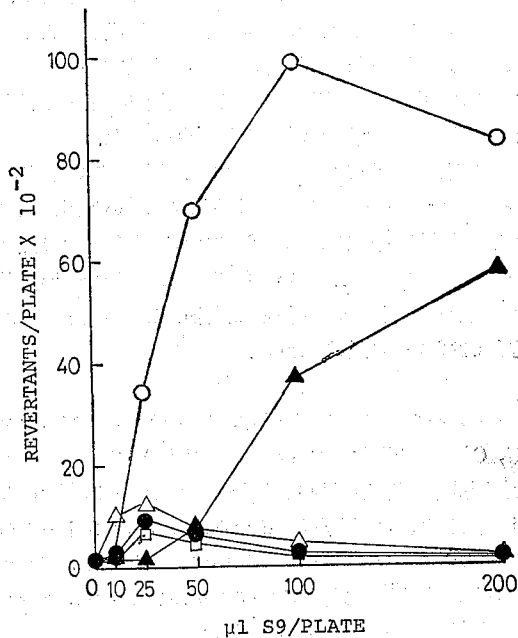


Fig. 1. Mutagenic Response of *S. Typhimurium* TA98 to AAF Using MC-Induced(●), PB-Induced(○), PCB-Induced(△), MC+PB-Induced(□) and Uninduced(▲) Rat Liver S9 Fractions.

に示した。無処理ラットの S9 による AAF の突然変異性は 25 μl/プレートまではほとんど認められず、50 μl/プレート以上では S9 の増加に従って 200 μl/プレートまで活性は上昇した。PB 投与ラットによる AAF の突然変異性は 25 μl/プレートで著しい上昇を示し、50 μl/プレートでは無処理ラットの S9 の場合に比べ15倍の活性を示した。以後 100 μl/プレートまで活性は上昇し、200 μl/プレートではやや低下した。一方、MC および PCB 投与ラットの S9 による活性は 25 μl/プレートでは無処理ラットの S9 の場合に比較してやや高かったが、以後 S9 の増加に従って低下し、100 μl/プレート以上の濃度ではほとんど認められなかった。また、PB、MC 同時投与ラットの S9 による AAF の突然変異活性は MC 単独投与ラットの S9 の場合と同様非常に低かった。

Fig. 2に2種の系統のマウスについての結果を示した。無処理の C57BL および DBA マウスの S9 による AAF の突然変異性は、ラットの場合とよく似ていたが、低濃度においてはマウスの S9 による活性の方がやや高いように思われた。PB 投与の両系のマウスの S9 による活性は、無処理の S9 の場合に比較して 25 μl/プレートで 8~10倍、50 μl/プレートで 2~3 倍と著しい上昇を示

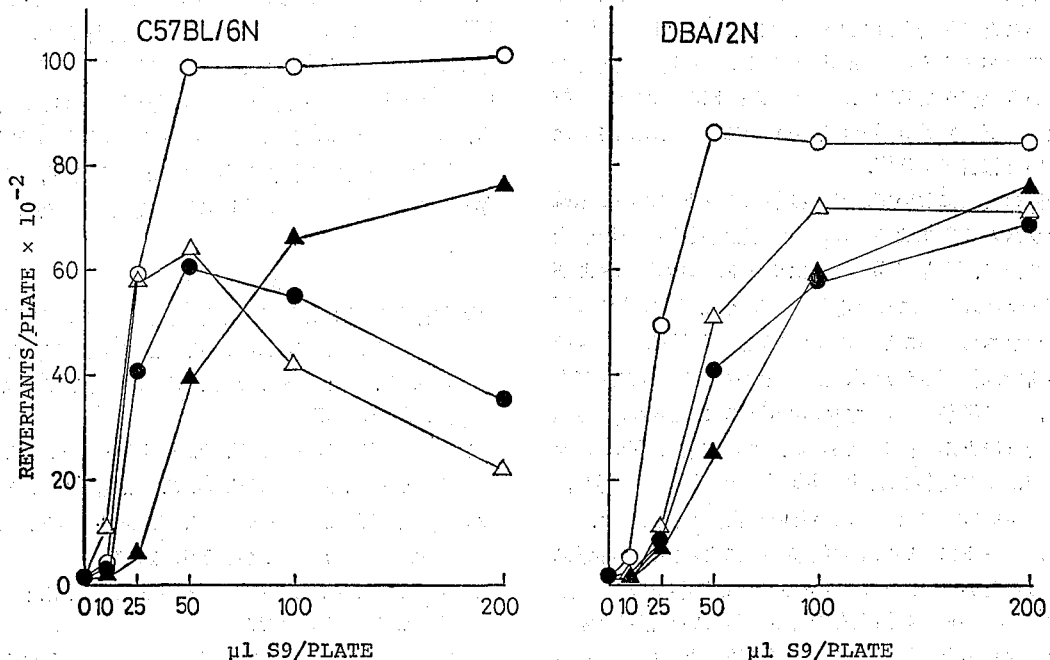


Fig. 2. Mutagenic Response of *S. Typhimurium* TA98 to AAF Using MC-Induced(●), PB-Induced(○), PCB-Induced(△) and Uninduced(▲) Mouse Liver S9 Fractions.

した。一方、MCおよびPCB投与は2系統のS9による活性に異なる影響を与えた。MCおよびPCB投与C57BLマウスのS9による活性は、低濃度(10, 25 $\mu$ l/プレート)において無処理マウスに比較して7~8倍上昇した。しかし、50 $\mu$ l/プレートでは上昇はにぶり、100 $\mu$ l/プレート以上ではS9の増加に従って低下した。これに対し、MC投与DBAマウスのS9による活性は無処理の場合と比較してほとんど変化は見られなかった。またPCB投与DBAマウスのS9の活性は無処理およびMC投与マウスの場合に比べてやや高かった。

### 考 察

薬物代謝酵素は多くの酵素から成っているが、酵素誘導剤であるPBとMCでは誘導される酵素に違いがあるといわれている。PCBはPB型とMC型の両方の酵素を誘導するという報告がある<sup>4)</sup>。

AAFの代謝経路はかなり詳しく研究されており、発ガン剤、突然変異剤への代謝活性化の第一段階はN-hydroxylationだと考えられている<sup>5)</sup>。N-hydroxylationはArylhydrocarbon (Benzo [a] pyrene) hydroxylase (AHH)と密接な関係にあり<sup>6)</sup>、この酵素はMCによって誘導される。C57BLマウスにおけるMC投与はAHHおよびN-hydroxylationの活性を上昇させ<sup>7)</sup>、また、そのミクロソーム分画によるAAFの突然変異性を上昇させるが<sup>8)</sup>、DBAマウスにおいてはこのような上昇は起らないことが報告されている。また、ラットにおけるMC投与がAAFのN-hydroxylationの活性を上昇させるという報告がある<sup>9,10)</sup>。一方、ラットにおけるPB投与はAAFのN-hydroxylationをほとんど増加させないという報告がある<sup>11)</sup>。

今回の実験において、PB投与はラットおよび2系統のマウスのS9によるAAFの突然変異性を著しく上昇させたが、MC、PCB投与はラット、C57BLおよびDBAマウス各々に異なる影響を与えた。MC投与C57BLマウスのS9によるAAFの突然変異性はS9濃度の高い所では抑制されたが、無処理マウスの場合に比べ上昇し、MC投与DBAマウスのS9による活性は無処理の場合とほとんど同じであった。この結果はC57BLマウスではMC投与によりN-hydroxylationが上昇し、DBAマウスでは上昇しないという報告と合致した。しかし、ラットにおいてMC投与S9による活性が非常に低かったという結果は、ラットのMC投与がAAFのN-hydroxylationの活性を上昇させるという報告と矛盾した。マウスとは異なるこの結果の原因として、MC投与によって、①マウスの場合とは異なる酵素が誘導されている；②生じたN-OH AAFが無毒化される；③N-OH

AAFあるいはそれ以降の代謝物がマスキングされる、などが考えられる。また、PB、MC同時投与およびPB、MC両型の酵素誘導を行うPCB投与ラットのS9によるAAFの突然変異性がMC単独投与ラットの場合と同じく低かったという結果は興味深かった。

突然変異性試験の代謝活性化には、PBあるいはPCBで処理したラットのS9がよく使用されているが、MCおよびPCB投与ラットのS9によるAAFの突然変異性が非常に低かったという結果から、突然変異性試験の成績を一種類のS9を使った結果のみで判定するのは危険ではないかと考えられる。

### 要 旨

フェノバルビタール (PB)、3-メチルコランスレン (MC)、ポリ塩化ビフェニール (PCB) の3種類の薬物代謝酵素誘導剤を投与したWistar系ラット、C57BL/6N系およびDBA/2N系マウスの肝ホモジネートの9,000 $\times$ g分画 (S9分画) を用いて、*Salmonella typhimurium* TA98に対する2-アセチルアミノフルオレン (AAF) の突然変異性を比較した。

無処理動物のS9によるAAFの突然変異性については動物間、系統間に大きな差は見られなかった。PB投与はラットおよびマウスの両系のS9によるAAFの突然変異活性を著しく上昇させたが、MC、PCB投与はラットおよび2系統のマウスに異なる影響を与えた。C57BL系ではAAFの突然変異性を上昇させ、DBA系では上昇させなかった。この結果からAAFのN-hydroxylationと突然変異性の関係が確認された。一方、ラットについては、MCによるAAFのN-hydroxylationの増加の報告があるのにもかかわらず、MC投与ラットのS9によるAAFの突然変異性は非常に低かった。

### 文 献

- 1) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178，1975
- 2) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 2281, 1973
- 3) Ames, B. N., Lee, F. D., and Durston, W. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 789, 1978
- 4) Ryan, D. E., Thomas, P. E., and Levin, W.: *Mol. Pharmacol.*, 13, 521, 1977
- 5) Schut, H. A. J. and Thorgeirsson, S. S.: *Fed. Proc.*, 39, 999, 1977
- 6) Thorgeirsson, S. S., Felton, J. S., and Nebert, D. W.: *Mol. Pharmacol.*, 11, 159, 1975
- 7) Nebert, D. W., Robinson, J. R., Niw, A.,

- Kumak, K., and Poland, A. P. : *J. Cell Physiol.*, 85, 393, 1975
- 8) Felton, J. S. and Nebert, D. W. : *Fed. Proc.*, 33, 596, 1974
- 9) Thorgeirsson, S. S., Jollow, D. J., Sasame, H. A., Green, I., and Mitchell, J. R. : *Mol. Pharmacol.*, 9, 398, 1973
- 10) Schut, H. A. and Thorgeirsson, S. S. : *Cancer Res.*, 38, 2501, 1978
- 11) Malejka-Giganti, D., McIver, R. C., Glasebrook, A. L., and Gutmann, H. R. : *Biochem. Pharmacol.*, 27, 61, 1978

ラット尿中の蛋白質 (第3報) カドミウムによる腎障害と尿中蛋白質

中尾 順子\*, 道源 正子\*\*, 樺島 順一郎\*, 藤井 芳美\*

Proteins in Rat Urine (III) Nephrotoxicity by Cadmium Administration and Proteins in that Urine

TOSHIKO NAKAO\*, MASAKO DOGEN\*\*, JUNICHIRO KABASHIMA\* and YOSHIMI FUJII\*

**Keywords**: 塩化カドミウム  $\text{CdCl}_2$ , 乳酸脱水素酵素 LDH, アルカリフォスファターゼ ALP, ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ  $\gamma$ -GTP

緒 言

小動物腎障害の早期診断の手段として, 尿中の蛋白質および酵素活性の変動を調べてきている<sup>1,2)</sup>.

重金属による腎障害と尿中酵素の関連を調べた報告は多いが<sup>3)</sup> 必ずしもその障害を明らかにしているわけではない. また極端な濃度の場合は特異的な現象か否かも明

らかではない. 一般に食品添加物や環境汚染による物質の場合は低濃度で徐々に進行するものと考えられる.

比較的低濃度の塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2$ ) 1.5mg/kg をラットに皮下注射によって与え, 尿中に出現するアルカリフォスファターゼ(ALP), 乳酸脱水素酵素(LDH),  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) の活性を

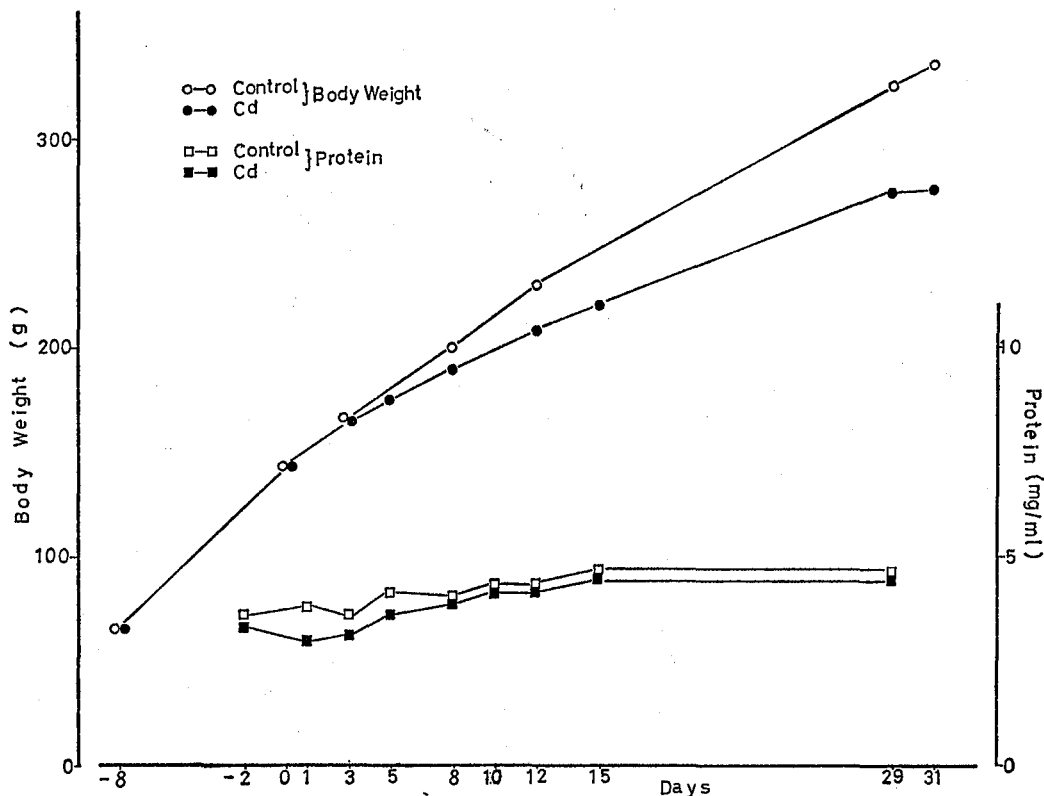


Fig. 1. Weight Gain of Animals and Total Urinary Protein excreted as a Function of Days of Exposure

\* 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

\*\*東京医科大学医学部第一生化学

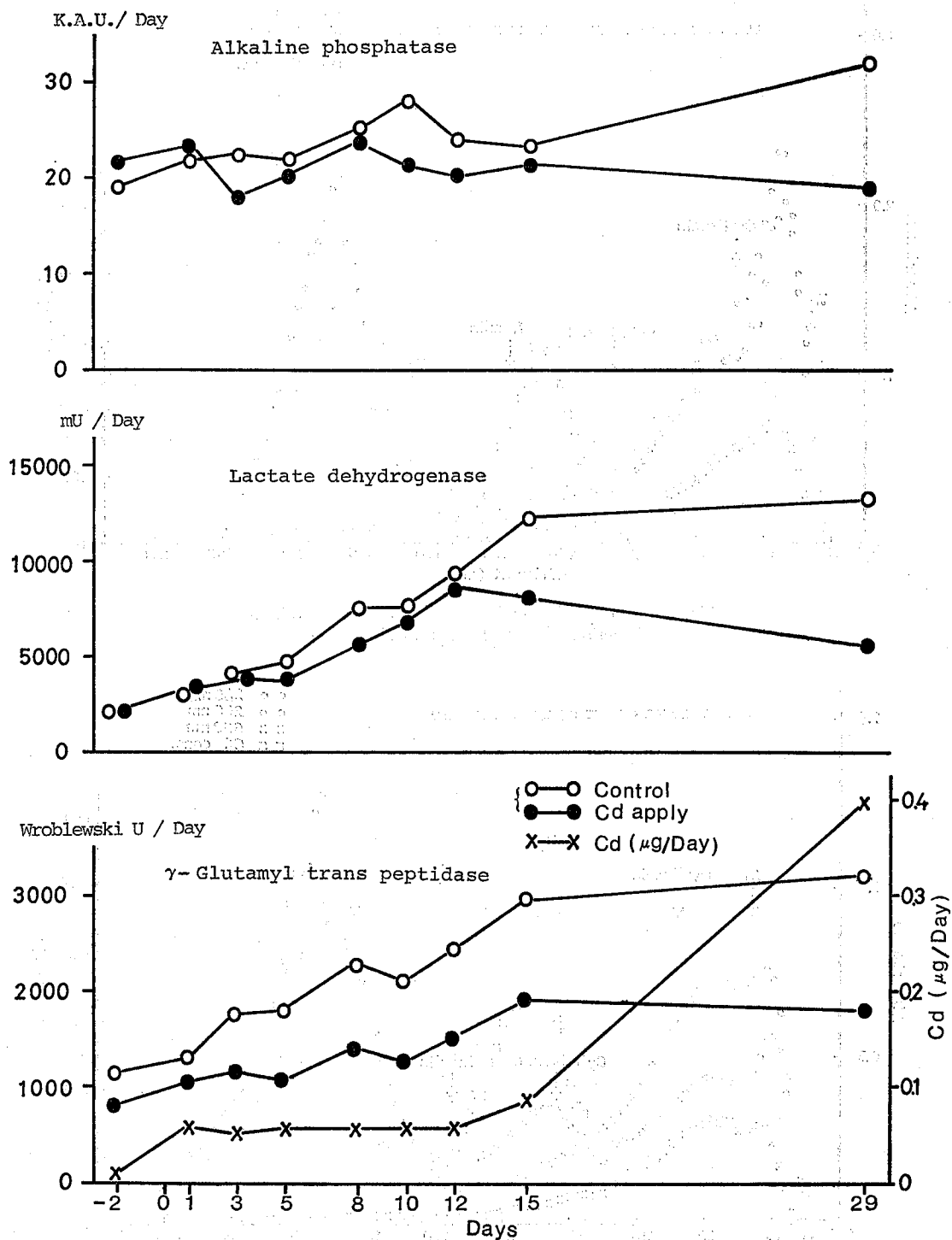


Fig. 2. Enzyme Activity Levels and Amounts of Cadmium in Urine as a Function of Days after Onset of the Experiment



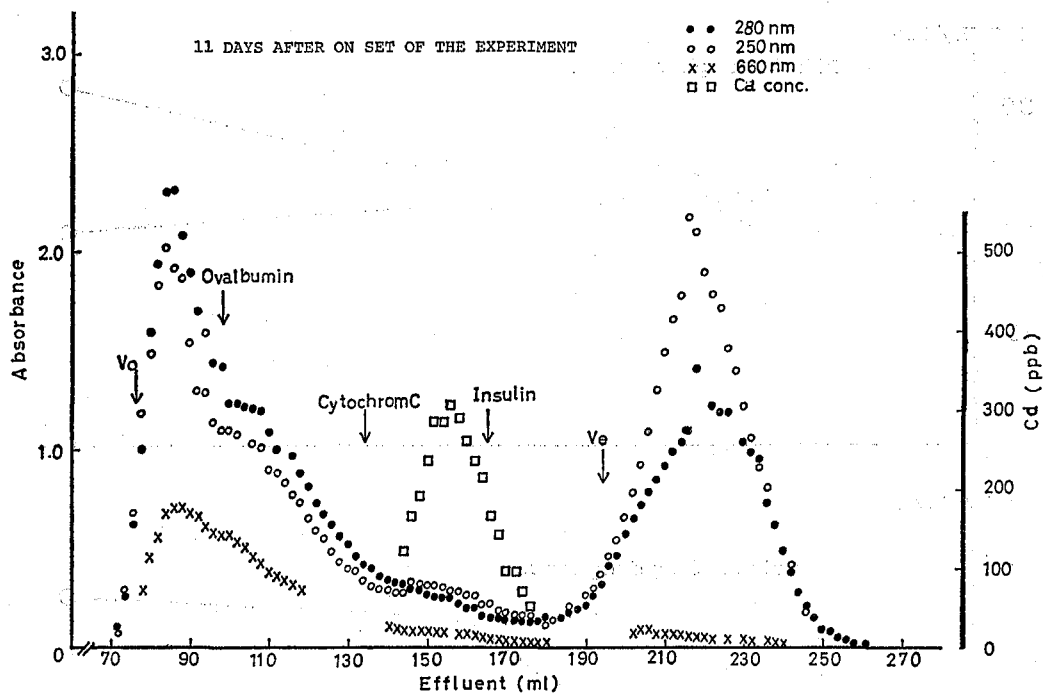


Fig. 3. Metallothionein Formation in Kidney Soluble Fraction after 11 Days Exposure

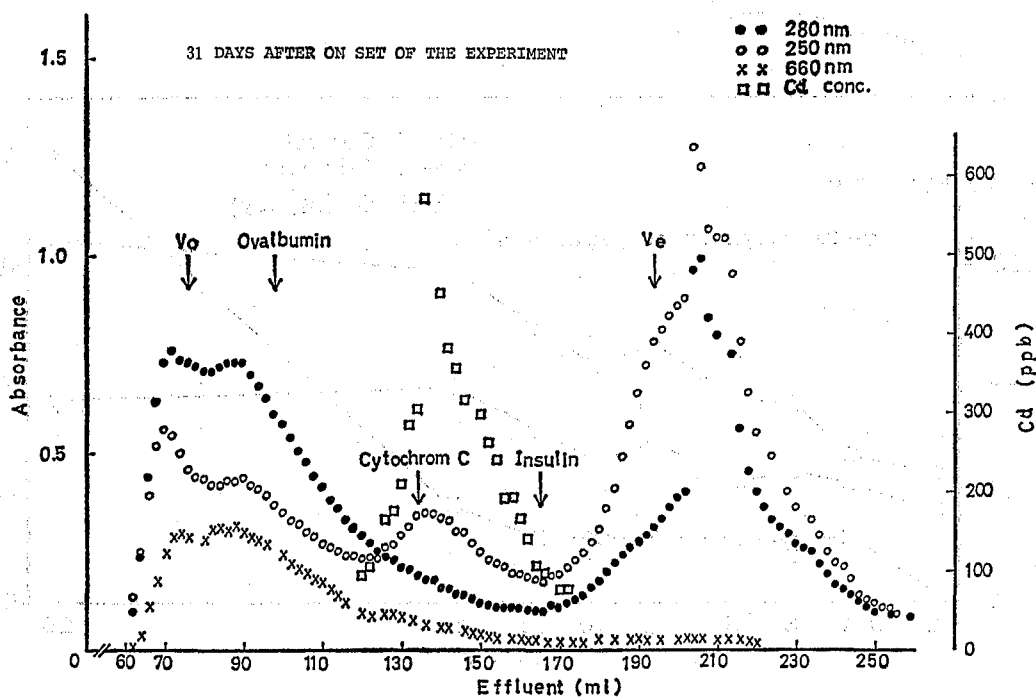


Fig. 4. Metallothionein Formation in Kidney Soluble Fraction after 31 Days Exposure

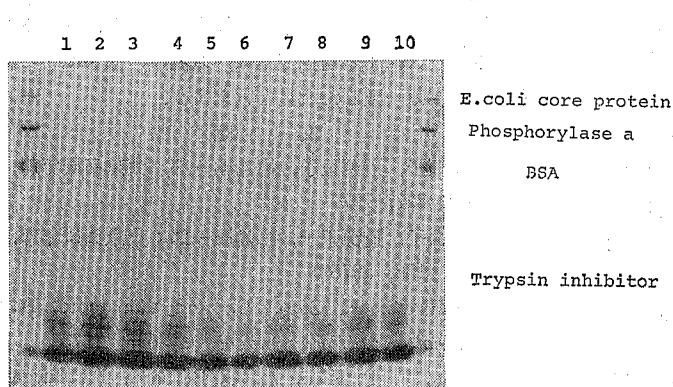


Fig5

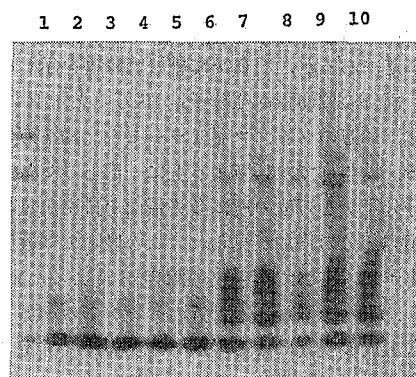


Fig6

#### SDS-PAGE pattern of rat urine

Fig. 5. Protein pattern in urine as a function of 30 days after onset of the experiment. 1-5 (control), 6-10 (Cadmium treated)

Fig. 6. Protein pattern in urine as a function of 48 days after onset of the experiment. 1-5 (control), 6-10 (Cadmium treated)  
Molecular weight proteins showed both side of the pattern:  
from top to bottom: E. coli core protein (150K) Phosphorylase a (100K)  
BSA (68K) and Trypsin inhibitor (22K)

調べ一部は既に報告した。

$\gamma$ -GTP に関する報告は近年増加しつつあり、水銀による上昇<sup>4)</sup>や低濃度カドミウムによる低下の報告もある<sup>5)</sup>。

尿中に証明される酵素はネフロン個有のものと血清中から濾出されたものとに分けて考えると  $\gamma$ -GTP はネフロン個有のものであり、ALP や LDH は血清中にも存在し、その由来は明らかでない。従って  $\gamma$ -GTP は腎障害の指標としての意義は大であると考えられる<sup>6)</sup>。

激しい障害がおこる様な条件では殆んどの場合、尿中酵素の上昇をみるが、当研究部の目的としている、弱いが慢性的な障害では何が起こるか、という目でこれら酵素活性の低下について考察してみる。

#### 実験方法及び材料

実験材料及び方法は前報<sup>2)</sup>に従った。

尿中蛋白は Lowry 法で測定し、カドミウムはフ列ムレスアトマイザー付原子吸光分光光度計 (ジャーレルアッシュ社製) で測定した。

酵素活性は前報<sup>2)</sup>に従った。メタロチオネインはラット腎ホモジネイト 105000×g 上清 (ベックマンの分離用超速心機 40A ローター 40,000回転 1時間) を Sephadex G75 (2.5×7.5cm) で分離し、タンパクは 280nm、及び Lowry 法で測定し、卵アルブミン、チトクロム C、インシュリンを分子量のマーカとして用いた。排除限

界 (Vo) はブルーデキストランを用いた。

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli<sup>7)</sup> 法で分離し、クマジーブリリアントブルー R250 で染色した。

#### 結果および考察

CdCl<sub>2</sub> 1.5mg/kg の皮下注射により、体重の低下及び尿中蛋白量は図 1 に示す様に推移した。体重は 31 日目では Control 群の約 80% を示し、尿中蛋白量は投与群の方がやや低目であった。

酵素活性は 3 種の酵素共に Cd 投与群は低下を示し、31 日目では統計的に有意の低下を示した ( $P < 0.01$ ) 図 2。カドミウムは 15 日から排泄の増加を示し、31 日目では第 1 日目の約 10 倍に増加した。

腎ホモジネイト 105000×g 上清部分のメタロチオネインの合成を投与後 11 日目と 31 日目について測定した。図 3 は 11 日目、図 4 は 31 日目の結果をプロットしたものである。腎組織 1.5g の上清全部を 5ml ずつの fraction に分け、測定したものである。11 日目と 31 日目のメタロチオネインの量は殆んど同じで、250nm 当りのカドミウムの比も同様であった。

尿中蛋白について SDS ポリアクリルアミド電気泳動の結果を図 5 図 6 に示した。図 5 は 30 日目の尿のパターンで 1~5 が Control 群、6~10 が Cd 投与群である。ここまでは尿中蛋白の量も組織も殆んど変わりがな

い。図6は投与後48日目の尿で、実験群が異なる為感受性に差はあるが、明らかに細尿管障害を示している。

両側の標準蛋白は分子量16万の大腸菌コアプロテイン、10万のフォスホリラーゼA、約7万のBSAである。投与群では10万より上に一部とBSA部分と最小部分分子量1万位の所に多く蛋白の排出が見られる。BSA相当部分の増加が見られ、この段階では近位尿管の障害が起きていて再吸収の障害がおこった事が認められる。又、分子量10万付近のペプチドの増加もあり、尿管上皮の脱落による増加ではないかと推定される。この様に尿蛋白の増加があっても特に著しい酵素活性の増加はなかった。

以上の結果から腎障害が如何なる形でおこっているかを推定すると、腎障害の初期症状は尿中蛋白量の増加や酵素量の増加ではなくむしろ減少するところに特徴がある。そしてこの変化はFowler<sup>9)</sup>らの報告にある様な腎微血管の肥厚と内腔の縮少がCadmium投与ラットで数週間の間に観察されるという形態学的な所見に見合うBiochemicalな所見ではないかと考えられる。人間にお

ける慢性腎炎の場合の尿中 $\gamma$ -GTPの低下と、ラットでのカドミウムによる初期変化は、血流量の低下による結果と考えれば一致した所見と言えよう。

#### 文 献

- 1) 中尾順子, 道源正子, 樺島順一郎: 東京衛研年報, 28-2, 227, 1977
- 2) 中尾順子, 道源正子, 樺島順一郎: 東京衛研年報, 29-2, 158, 1978
- 3) Nomiyama, K., Sato, C., and Yamamoto, A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24, 625, 1973
- 4) Braun, J. P., Rico, A. G., Bernard, P., Burgat-Sacaze, V., Eghbali, B., and Godfrain, J. C.: *Toxicol.*, 11, 73, 1978
- 5) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 1970
- 6) King, L. C., Clark, V., and GJFaeder, E.: *Bull. Environ. Contam. & Toxicol.*, 16, 572, 1976
- 7) Fowler, B. A., Jones, H. S., Brown, H. W., and Haseman, J. K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 34, 233, 1975

## Showdomycin の Na,K-ATPase 阻害機構 (第3報)

### リン酸化中間体形成と阻害速度との関係

原 しげ子\*, 原 諭 吉\*\*, 中 尾 順 子\*

## Inhibition of Na,K-ATPase by Showdomycin (III)

### Relation of EP-formation with the Inhibition Rate

SHIGEKO HARA\*, YUKICHI HARA\*\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords** : Na, K-ATPase, showdomycin, リン酸化中間体 phosphorylated intermediates

### 緒 言

重金属化合物の毒性には、細胞膜機能障害が関与していることが多い。種々の膜酵素が重金属によって阻害されることがその一因であると考えられる<sup>1,2)</sup>。膜酵素の中で特に Na, K-ATPase は、 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の能動輸送の本体であり、細胞の生命維持に關与する重要な酵素である<sup>3-5)</sup>。

Na, K-ATPase は ATP の加水分解反応中に二種類のリン酸化中間体 ( $\text{E}_1\sim\text{P}$ ,  $\text{E}_2\sim\text{P}$ ) を經由することが知られており、それに伴って酵素蛋白質の構造の変化が生じ、その変化がイオンの輸送と関係が深いことが予想されている (Fig. 1)<sup>6-8)</sup>。私共は前報<sup>9,10)</sup>で、マレイミド誘導体抗生物質 Showdomycin (以下 SM と略す) がブタ脳 Na, K-ATPase を疑似一次反応に従って阻害し、リガンド ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP) の16通りの組み合わせのうちで  $\text{Na}+\text{Mg}+\text{ATP}$  存在下における阻害速度定数 ( $k$ ) が非常に大きな値をとることを報告した。このリガンド条件は、酵素がリン酸化される条件と同一である<sup>11-13)</sup>。そこで今回は SM 阻害とリン酸化中間体との関係について検討した。その結果、リン酸化中間体が SM に対し高い親和性を持つことが示唆された。

### 方 法

**試薬** deoxy-ATP (以下 d-ATP 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<sup>9,10)</sup>に従った。ブタ脳 Na, K-ATPase は中尾らの方法<sup>14)</sup>に従い NaI 処理標品を用いた。

**阻害の初速度の求め方** 50mM トリス-塩酸 (pH7.5), 0.01mM EDTA に NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ , ATP を種々の組み合わせで添加した反応液に、約 100 $\mu\text{g}$  のブタ脳 Na, K-ATPase の標品を加え 37° で 2~3 分子備加温した。

これに、37° で加温した SM を終濃度 2mM 添加して全量 500 $\mu\text{l}$  とし、反応を開始した。一定時間おきに反応液から 20 $\mu\text{l}$  を取り、37° に加温した 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol を含む Na, K-ATPase 活性測定液に加え活性を測定した。阻害の初速度は前報<sup>9)</sup>に従い求めた。

### 結 果

$\text{Na}^+$  (140mM),  $\text{K}^+$  (14mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (5mM), ATP (0.1mM) の各種組み合わせ 16 通りについて SM の阻害速度定数 ( $k$ ) を求めたところ、 $\text{Na}+\text{Mg}+\text{ATP}$  のリガンド条件で非常に大きな  $k$  値を示した (Table 1)。このリガンド条件は酵素がリン酸化される条件と同じであることから、リン酸化型酵素が SM に対し高い親和性を持つことが予想された。そこで、SM 阻害とリン酸化中間体との関係について検討した。

この組み合わせで、 $k$  値を増加させるに必要な  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , ATP の  $K_{0.5}$  (半阻害促進濃度) を求めた。 $\text{Mg}^{2+}$  と  $\text{Na}^+$  の  $K_{0.5}$  は前報<sup>10)</sup>で報告したが、それぞれ 0.13 mM, 3mM であった。ATP の  $K_{0.5}$  は非常に低濃度のため正確に求めるのは困難であった。この理由は、阻害反応の間に Na-ATPase によって ATP が消費されるためと考えられる。そこで、NaCl と  $\text{MgCl}_2$  の濃度をそれぞれ 14mM, 1mM に下げ、さらにできるだけ短時間で阻害速度を求めた。その結果、ATP の  $K_{0.5}$  は Fig. 2 から 4 $\mu\text{M}$  であった。この ATP の阻害促進作用は、他のヌクレオチドを用いても得られた (Fig. 2)。ATP の  $K_{0.5}$  は一番小さく、次に ATP 以外のトリリン酸-ヌクレオチドの  $K_{0.5}$  が 70~100 $\mu\text{M}$  であった。ADP の最大阻害速度は ATP にほぼ等しいが、 $K_{0.5}$  は 280 $\mu\text{M}$  であった。また、ATP および ADP 誘導体である d-ATP, d-ADP は ATP の代りをするが、

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京医科歯科大学医学部生化学教室

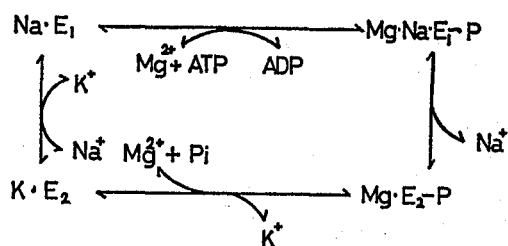


Fig. 1. Na, K-ATPase の反応仮説<sup>6-8)</sup>  
Eは酵素を示す

Table 1. 種々のリガンド存在下における阻害速度

| リガンド条件    | k ( $M^{-1}, \text{min}^{-1}$ )<br>— | +0.1mM ATP |
|-----------|--------------------------------------|------------|
| —         | 50                                   | 6          |
| Mg        | 59                                   | 33         |
| K         | 50                                   | 34         |
| Na        | 36                                   | 11         |
| K, Na     | 35                                   | 13         |
| K, Mg     | 55                                   | 39         |
| Na, Mg    | 37                                   | 110        |
| Na, K, Mg | 35                                   | 15         |

50mM トリス-塩酸 (pH7.5), 0.01mM EDTAにそれぞれ140mM NaCl, 14mM KCl, 5mM  $MgCl_2$  および0.1mM ATP を添加した. SMの濃度は2mMを用いた.

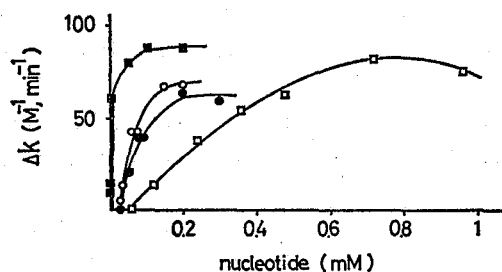


Fig. 2. ヌクレオチドの阻害促進作用

横軸はヌクレオチド濃度, 縦軸はヌクレオチド無添加 (Na+Mg) の場合のkとの差( $\Delta k$ )を示す. ATP, ADPの作用は14mM NaCl, 1mM  $MgCl_2$  存在下で, CTP, ITPは140mM NaCl, 3mM  $MgCl_2$  存在下で求めた.

■—ATP, ○—CTP, ●—ITP, □—ADP

AMP-PNP, AMP-PCP, AMP-CPはこの作用を持たなかった. これらの結果, リン酸化型酵素がSMで非常に阻害されやすいことが示唆された.

そこで, k 値に対する高濃度 NaCl の影響を調べた.

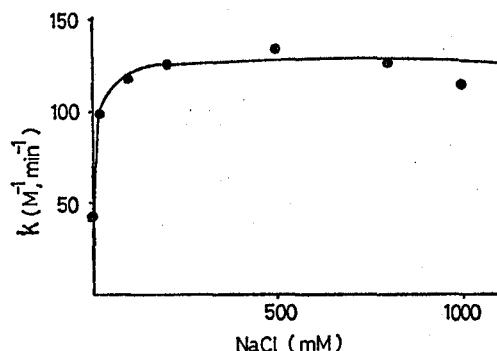


Fig. 3. NaCl 濃度の影響

1mM ATP, 3mM  $MgCl_2$  存在下でNaCl濃度を変え阻害速度 (k) を求めた.

Table 2. リン酸化酵素に対する阻害速度

| リガンド条件                             | k ( $M^{-1}, \text{min}^{-1}$ ) | $\Delta k$ | (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|------------|-----|
| —                                  | 63                              | —          | —   |
| 3mM $MgCl_2$ , 3mM Pi              | 92                              | 29         | 60  |
| 140mM NaCl, 3mM $MgCl_2$ , 1mM ATP | 109                             | 46         | 100 |

Fig. 3 から, NaCl の濃度を上げて k 値にほとんど変化がみられなかった.

次に,  $Mg+Pi$  存在下でk値を求め,  $Na+Mg+ATP$  の組み合わせの場合と比較した (Table 2). リガンド無添加の条件との差 ( $\Delta k$ ) から,  $Mg+Pi$  で得られるk値は,  $Na+Mg+ATP$  のk値の約60%であった.

### 考 察

Na, K-ATPase は,  $Na+Mg+ATP$  存在下で, SMに非常に阻害されやすい. このSMに非常に親和性の高い酵素の状態は, リン酸化型酵素であろうと推定し検討した. その結果次に述べる理由から, SMに親和性の高い conformation はリン酸化酵素であると結論した. 1)  $Na+Mg+ATP$  のリガンド組成は, 酵素がリン酸化される条件と同一である. 2) 阻害促進作用に対する ATP の  $K_{0.5}$  は  $4.5 \mu M$  で ATP に特異性が高い (Fig. 2), また E-P 形成の際の ATP の  $K_m^{15)}$  または, ATP binding の際の ATP の  $K_d^{16,17)}$  に近い. 3) リン酸化酵素を形成しない ATP 類同体 (AMP-PNP, AMP-PCP) ではこの作用が得られない. 4) 阻害促進作用の  $Na^+$  の  $K_{0.5}$  は 3mM で, 酵素のリン酸化を促進する  $Na^+$  の  $K_m$  (6.4mM) と近い値である<sup>18)</sup>.

Na, K-ATPase の反応中間体として, 二種類のリン

酸化酵素 ( $E_1\sim P$ ,  $E_2\sim P$ ) の存在が考えられている。140mM NaCl 存在下では、おそらく大部分が  $E_2\sim P$  型のリン酸化酵素であると思われる。高濃度 NaCl (400 mM) は、 $E_1\sim P$  から  $E_2\sim P$  への転換を阻害し、それに伴い  $E_1\sim P$  が増加することが知られている<sup>19)</sup>。そこで高 NaCl 濃度の影響を調べたが、 $k$  値は一定であった (Fig. 3)。このことから、 $E_1\sim P$  型と  $E_2\sim P$  型はほぼ等しい  $k$  値で阻害されることが示唆された。

リン酸化酵素 ( $E_2\sim P$ ) は、Fig. 1 の反応を逆向きに回転させることにより、 $Mg^{2+}$  の存在下で  $P_i$  からリン酸化して得ることが可能である<sup>9,20,21)</sup>。そこで、 $Mg+P_i$  存在下での  $k$  値を求めたところ  $90M^{-1}, min^{-1}$  であった。この  $k$  値は、 $Na+Mg+ATP$  存在下と比べると小さいが、他のリガンド組成で得られる  $k$  値 (Table 1) よりはかなり大きい。谷口ら<sup>20)</sup>は、この条件下で逆反応により形成される  $E_2\sim P$  量は正反応の60%であると報告している。このことを考え合わせると、 $Mg+P_i$  存在下で形成されるリン酸化中間体は  $Na+Mg+ATP$  の場合とほぼ近い  $k$  値で阻害されるのかもしれない。これらの逆反応の結果からも、リン酸化酵素が SM に親和性が高いことが支持された。

#### 要 約

1)  $Na, K$ -ATPase に対する SM の阻害は疑似一次反応に従い、阻害速度定数 ( $k$ ) はリガンド ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $ATP$ ) 条件で異なった。

2)  $Na+Mg+ATP$  の組み合わせで、 $k$  値は大きな値を示した。 $k$  値を増加させるに必要な  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $ATP$  の  $K_{0.5}$  はそれぞれ 3mM, 0.13mM,  $4.5\mu M$  であった。

3) この組み合わせで、 $Na^+$  を  $E_1\sim P$  から  $E_2\sim P$  への転換を阻害する濃度にまで増加しても  $k$  値は変わらなかった。

4)  $ATP$  類同体の AMP-PCP, AMP-PNP は  $ATP$  のこの作用の代りをしないが、ITP, CTP, d-ATP は代りをした。

5)  $Mg+P_i$  存在下でも、上記の組み合わせに近い  $k$  の値が得られた。

6) これらの結果、リン酸化型酵素が SM に対し高い親和性を持つこと、さらに  $E_1\sim P$  と  $E_2\sim P$  は同程度の親和性を持つことが示唆された。

#### 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), 1, 257, 1970, Wiley-Interscience, London
- 4) Skou, J. C.: *Bioenergetics*, 4, 1, 1973
- 5) Whittam, R. and Wheeler, K. P.: *Ann. Rev. Physiol.*, 32, 21, 1970
- 6) Post, R. L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B., and Sen, A. K.: *J. Gen. Physiol.*, 54, 3065, 1969
- 7) Fahn, S., Koval, G. J., and Albers, R. W.: *J. Biol. Chem.*, 243, 1993, 1968
- 8) Albers, R. W., Koval, G. J., and Siegel, G. J.: *Mol. Pharmacol.*, 4, 324, 1968
- 9) 原しげ子, 中尾順子: 東京衛研年報, 28-2, 196, 1977
- 10) 原しげ子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 147, 1978
- 11) Schwartz, A., Lindenmayer, G. E., and Allen, J. C.: *Current Topics in Membranes and Transport* (ed. F. Bonner, A. Kleinzeller), 3, 1, 1972, Academic Press, New York
- 12) Hokin, L. E. and Dahl, J. L.: *Metabolic Pathways* (ed. L. Hokin), 4, 269, 1972, Academic Press, New York
- 13) Tonomura, Y.: *Muscle Proteins, Muscle Contraction & Cation Transport*, 1972, University of Tokyo Press, Tokyo
- 14) Nakao, T., Tachima, Y., Nagano, K., and Nakao, M.: *J. Biochem.*, 73, 609, 1973
- 15) Post, R. L., Sen, A. K., and Rosenthal, A. S.: *J. Biol. Chem.*, 240, 1437, 1965
- 16) Norby, J. G. and Jensen, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 104, 1971
- 17) Hegyvary, C. and Post, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 246, 5234, 1971
- 18) March, S. and Post, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 252, 633, 1977
- 19) Kuriki, Y. and Racker, E.: *Biochemistry*, 15, 4951, 1976
- 20) Taniguchi, K. and Post, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 250, 3010, 1975
- 21) Lindenmayer, G. E., Laughter, A. H., and Schwartz, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 187, 1968

## アデニレートシクラーゼにおよぼすバナデートの影響

中川 敦子\*, 中尾 順子\*

### Effects of Vanadate on Adenylate Cyclase in Rat Brain

ATSUKO NAKAGAWA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** アデニレートシクラーゼ adenylate cyclase, バナデート vanadate

#### 緒 言

バナジウムはヒヨコ<sup>1)</sup> やラット<sup>2)</sup> の必須微量元素であることから、ヒトにおいても重要な金属であると推測される。5価のバナジウム化合物は *in vitro* における各種リン酸水解酵素の強力な阻害剤<sup>3-5)</sup> として知られているが、最近オルトバナジン酸ソーダ ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) が Na, K-ATPase<sup>6)</sup> および赤血球の陽イオン輸送<sup>6)</sup> の阻害剤であり、細胞の内側から生体の調節に関与している可能性が示唆されている<sup>6,7)</sup>。

私共は Na, K-ATPase と同じく細胞膜酵素で、ATP を基質にするアデニレートシクラーゼ (AC) が、生体内濃度に近いバナデートで可逆的に活性化されることを既に報告<sup>8)</sup> した。バナデートの AC 活性化作用は Schwabe 等<sup>9)</sup> によっても報告されている。今回は前報に続き AC に対するバナデートの作用機構について更に詳しい検討を加え、あわせて AC 可溶化剤としてのニッコール (octa-ethyleneglycol dodecyl ether) を既知の可溶化剤であるルブロール-PX と比較した。

#### 実験方法

**酵素の調製** 膜酵素標品の調製は前報<sup>8)</sup> に従った。可溶化酵素の調製はタンパク濃度 5mg/ml, 100mM Sucrose, 5mM Glycylglycine buffer (pH7.5), 3mM DTT 存在下で、ルブロール-PX またはニッコールを加えてホモゲナイズし、0℃ 20分間放置後 105,000×g 60分間遠沈した。その上清を可溶化酵素として使用した。

**AC の測定** 1.05mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP を基質とし、生成物である c-AM<sup>32</sup>P を Dowex 50W-X4 およびアルミナカラムで分離溶出した後、溶出液の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。その他は前報<sup>8)</sup> に従った。

**試薬** GTP はシグマ社、五酸化バナジウムは和光純薬、ニッコール (octa-ethyleneglycol dodecyl ether) は日光ケミカル社のものを使用した。Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> は予め

HCl で中和後、V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> は NaOH 存在下で溶かし HCl で中和後反応液に加えて使用した。その他は前報<sup>8)</sup> に従った。

#### 実験結果および考察

5価バナジウム化合物による膜標品 AC の活性化を図 1 に示した。最高活性を示すバナジウムの濃度は Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, とほぼ同じでそれぞれ  $4.2 \times 10^{-5}\text{M}$  および  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  であった。予め塩酸で中和した Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> は未中和 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を直接反応液に加え、反応液中の buffer で中和した場合に比べ活性化曲線が低濃度側に移行した。これは未中和 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> が反応開始前までに完全に中和されていないか、あるいは塩酸による中和でバナジウムの酸化還元状態に変化が生じたためかと考えられる。りん酸水解酵素の阻害剤としてのバナデートはりん酸結合部位に結合するが、図 1 に示すように AC 活性にりん酸は関与せず AC の活性化作用におけるバナデートはりん酸の作用とは異っていた。図 2 に AC の既知活性化剤である GTP を添加した結果を示した。最高活性値を示す濃度の GTP にバナデートを加えると付加的な活性化反応を示し (図 3), NaF にバナデートを添加した場合<sup>9)</sup> とは異っていた。1%ルブロール-PX で可溶化した AC に対する Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF および GTP の関係を図 4 に示した。ルブロール-PX 可溶化 AC ではカテコールアミンの作用は消失するが、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF および GTP の作用は残存した。NaF<sup>10,11)</sup> および GTP<sup>12,13)</sup> は細胞膜の内側から AC を活性化すると考えられている。またバナジウムは陰イオン輸送系で容易に細胞膜を通過し、細胞の内側から Na, K-ATPase を阻害すると報告<sup>6,7)</sup> されている。バナデートによる AC の活性化も NaF や GTP と同じく細胞膜の内側から作用しているのかもしれない。ルブロール可溶化 AC における Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> の活性化作用は NaF には付加的で GTP には付加的でなく膜標品 AC とは異っていた。Neer の報告<sup>14)</sup> によれば

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

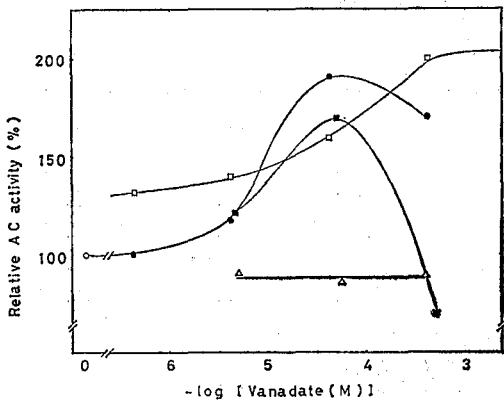


図 1. バナデートによるACの活性化曲線  
バナジウムまたはりん酸無添加時の活性を 100  
とした相対活性で表わした。  
●—● 中和した  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , □—□ 未中和の  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  
■—■  $\text{V}_2\text{O}_5$ , △—△  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

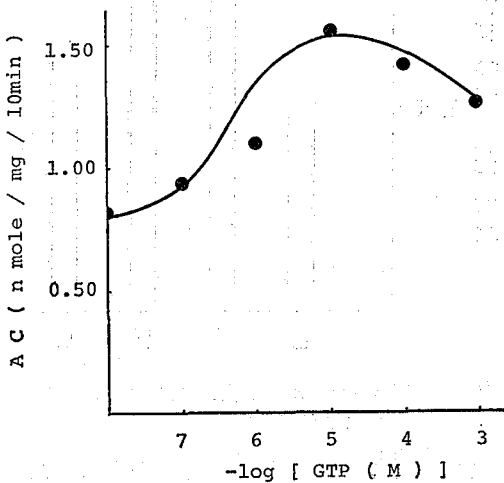


図 2. GTP による AC の活性化曲線

ルブロール可溶性ACには Sepharose 6B で分離できる  
少なくとも 2 種の AC が存在し、それらは Gpp(NH)p  
あるいは NaF による活性化速度に大きな差がみられ  
る。可溶性ACが単一のものとすれば、ルブロール  
可溶性ACにおけるバナデート活性化作用についても  
簡単に説明することはできない。ルブロール可溶性AC  
は失活しやすく不安定である。可溶性ACにおけるバナ  
デート作用を詳しく知るにはより安定な可溶性ACが必  
要なことから、ルブロールと同じく非イオン性界面活性  
剤であるニコールを用いてAC活性に対する作用、可  
溶性能および保存中の影響をルブロール-PX と比較し

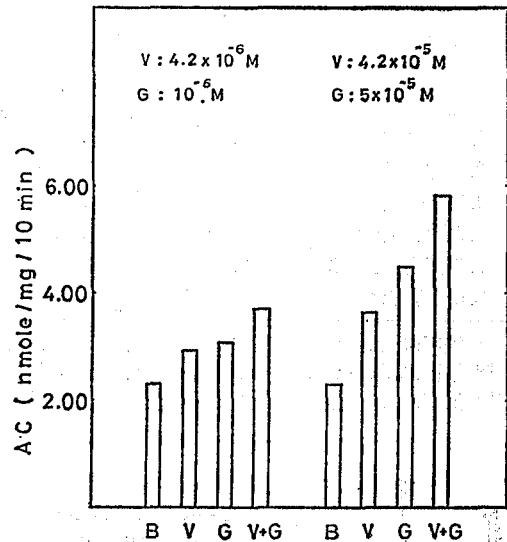


図 3. AC 活性におよぼすバナデートと GTP の影響

図の左半分は最大活性を示すより低い濃度の  
 $\text{Na}_3\text{VO}_4$  および GTP を添加した時の AC 活性  
化を示した。

図の右半分は最大活性を示す濃度の  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  お  
よび GTP による活性化を示した。B は活性化  
剤を加えない時の活性、V は  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を加えた  
時の活性、G は GTP を加えた時の活性を示す。

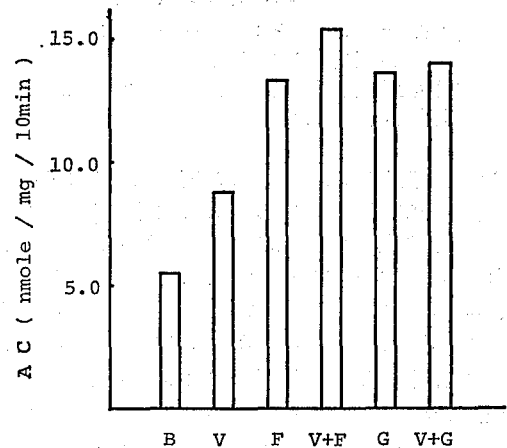


図 4. ルブロール-PX 可溶性 AC における  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  
NaF および GTP の影響

B は活性化剤を加えない時の活性、V は  $4.2 \times 10^{-5}\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , F は  $10^{-2}\text{M}$  NaF, G は  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  GTP を加えた時の活性を示す。

た。図 5 に示すようにニコールによる AC の活性化  
曲線はルブロール-PX と同じで、0.3% 以上の濃度  
で 2.5 倍の活性化作用がみられた。次にニコールによる



表 1. ニッコールとルブロール-PXによるAC可溶性能の比較

| 膜標品AC      | 比 活 性   |         | タンパク収量 |       | 全 活 性 |       |
|------------|---------|---------|--------|-------|-------|-------|
|            | ニッコール   | ルブロール   | ニッコール  | ルブロール | ニッコール | ルブロール |
| 膜標品AC      | 1.00    | 1.00    | 1.00   | 1.00  | 1.00  | 1.00  |
| 0.03%可溶化AC | 0.801*  | 0.444** | 0.129  | 0.166 | 0.103 | 0.073 |
| 0.1%可溶化AC  | 1.78*   | 1.39**  | 0.226  | 0.203 | 0.402 | 0.282 |
| 0.3%可溶化AC  | 4.89*** | 3.92*** | 0.390  | 0.347 | 1.91  | 1.36  |
| 1.0%可溶化AC  | 5.81*** | 5.00*** | 0.471  | 0.461 | 2.74  | 2.31  |
| 2.5%可溶化AC  | 5.94*** | 5.11*** | 0.488  | 0.525 | 2.90  | 2.68  |

\* 抽出に用いた膜標品ACは5.11mg, ACの比活性は1.42nmole/mg/10min

\*\* 抽出に用いた膜標品ACは4.88mg, ACの比活性は0.402nmole/mg/10min

\*\*\* 抽出に用いた膜標品ACは3.80mg, ACの比活性は0.768nmole/mg/10min

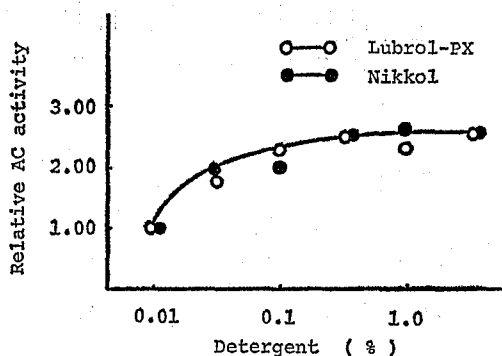


図 5. ニッコールとルブロール-PXによる膜標品ACの活性化曲線  
界面活性剤無添加時の活性を1.00とした相対活性で表わした。

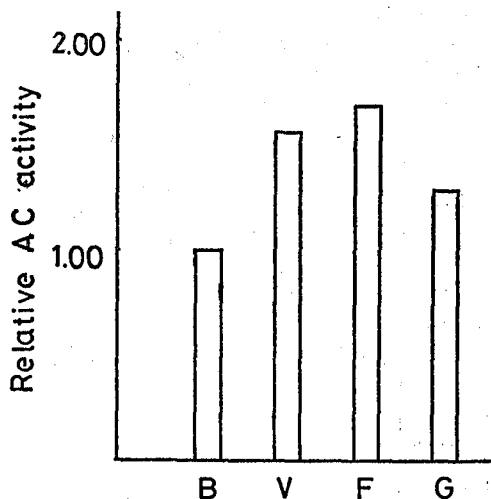


図 6. 1%ニッコール可溶化ACにおける $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaF およびGTPの影響

活性化剤を加えない時の活性値を1.00とした相対活性で表わした。Bは活性化剤を加えない時の活性, Vは $4.2 \times 10^{-5}\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Fは $10^{-2}\text{M}$  NaF, Gは $5 \times 10^{-5}\text{M}$  GTPを加えた時の活性を示す。

表 2. ニッコール可溶化ACとルブロール-PX可溶化ACの保存中の活性の変化

| 保存日数(日)          | 0   | 1  | 3  | 5  | 20 | 24 |
|------------------|-----|----|----|----|----|----|
| ニッコール可溶化ACの活性(%) | 100 | 83 | 79 | 75 | 69 | 67 |
| ルブロール可溶化ACの活性(%) | 100 | 47 | 44 | —  | —  | —  |

ACの可溶性能をルブロール-PXと比較し表1に示した。この表は全て膜標品ACを1とした相対値で表わしたが、両可溶化剤とも1%以上の濃度でよいAC標品が得られ、活性およびタンパクの収率もほぼ同程度であった。ニッコール可溶化ACにおける $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaFおよびGTPの作用を図6に示した。ルブロール-PX可溶化ACと同様にこれら活性化剤による活性化作用がみられた。ルブロール-PXとニッコール可溶化ACを $-80^\circ\text{C}$ で保存した時の活性の変化を比較し表2に示した。ニッコール可溶化ACはルブロール-PX可溶化ACより活性がよく保持された。以上の結果よりニッコールはルブロール-PXと同程度の可溶性能をもち既知活性化剤に対する作用も同じであるが、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した時の失活が少なくルブロール-PXよりすぐれた可溶化剤であることがわかった。

#### 要 約

1. 5価バナジウムはACを活性化し最大活性値を示す

バナデート濃度はおよそ  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  であった。

2. バナデートによる膜標品ACの活性化はGTPに付加的で、NaFには付加的でなかった。

3. バナデートによる1%ルブロール可溶化ACの活性化はGTPに付加的でなく、NaFには付加的であった。

4. 可溶化剤としてのニコールをルブロール-PXと比較検討した。ACの可溶化能、活性化の程度には差がないが-80℃で保存した時の活性の保持はニコールの方がすぐれ、ニコールはルブロール-PXに比べ有効な可溶化剤であった。

#### 文 献

- 1) Hopkins, L. L., Jr. and Mohr, H. E.: *Newer Trace Elements in Nutrition*, 195, 1971, Marcel Dekker, New York
- 2) Schwarz, K. and Milne, D. B.: *Science*, 174, 426, 1971
- 3) Lopes, V., Stevens, T., and Lindquist, R. N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 31, 1976
- 4) VanEtten, R. L., Waymach, P. P., and Rehkop, D. M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 6782, 1974
- 5) Cantley, L. C., Jr., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., and Guidotti, G.: *J. Biol. Chem.*, 252, 7421, 1977
- 6) Cantley, L. C., Jr., Resh, M., and Guidotti, G.: *Nature*, 272, 552, 1978
- 7) Cantley, L. C., Jr. and Aisen, P.: *J. Biol. Chem.*, 254, 1781, 1979
- 8) 中川敦子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 151, 1978
- 9) Schwabe, U., Puchstein, C., Hannemann, H., and Söchtig, E.: *Nature*, 277, 143, 1979
- 10) Rodbell, M., Birnbaumer, L., and Pohl, S. L.: *J. Biol. Chem.*, 245, 718, 1970
- 11) Perkins, J. P. and Moore, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 246, 62, 1971
- 12) Hanoune, J., Lacombe, M., and Pecker, F.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4569, 1975
- 13) Stolc, V.: *J. Biol. Chem.*, 252, 1901, 1977
- 14) Neer, E. V.: *J. Biol. Chem.*, 251, 5831, 1976

## 保存血の寿命延長に関する研究

長井 二三子\*, 中尾 順子\*, 中尾 真\*\*

### Studies on Prolongation of Viability of Stored Blood

FUMIKO NAGAI\*, TOSHIKO NAKAO\* and MAKOTO NAKAO\*\*

**Keywords:** 保存血 stored blood, アデニン adenine, イノシン inosine, ATP, 2,3-DPG, 浸透圧溶血抵抗 osmotic fragility, MCV

#### 緒 言

輸血用保存血の不足が叫ばれている。その解決の方法は保存期間の延長のみであると考えられる。従って新しい保存液の開発が望まれている。

輸血に用いる ACD 保存血<sup>1)</sup>の保存期間は4℃の保存状態で21日間と決められている。それはこの期間で輸血後寿命が70%になるからである。中尾らは ACD 保存血にアデニンとイノシンを加えて保存すると、8週間後の血液の ATP レベルおよび浸透圧溶血抵抗値が正常の範囲に保たれていること、解糖速度が ACD 保存血に比べて速いこと、赤血球の形が円盤状であること、輸血後寿命が充分長いことなどを報告している<sup>2-10)</sup>。またアデニン、イノシンによる赤血球の若返りについても報告している<sup>2-6,11)</sup>。8週間保存した通常の ACD 血にアデニン、イノシンを添加して37℃、3時間インクベートすると ATP レベルが正常の範囲に戻る、形が平滑球から円盤状に戻る、輸血後寿命もアデニン、イノシンを加えて保存したものと同じく新鮮血に近くなることなどである。

今回、著者らは中尾らの方法を改変することによってさらに長期間安定に血液を保存できる可能性を見出した。保存血にアデニン、イノシンおよび Sucrose,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Tris HCl pH 7.4 混液を加えて保存すると約100日間保存後も ATP レベルが正常の範囲にあり、形も円盤状をしていた。解糖系酵素活性を示すとされている 2,3-diphospho glycerate (2,3-DPG と略す) は ACD 保存血では30日間でほぼ消失したのに対し、この保存法では100日後も相当量残っていた。さらに赤血球の浸透圧溶血抵抗、平均赤血球容積 (MCV と略す) などに興味ある知見が得られた。

#### 実験材料および方法

血液は ACD 保存血をヘマトクリット60~75%に調製

した Packed Cell<sup>12)</sup> を日赤血液センターから供与された。

1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.25M Sucrose, 10mM Tris HCl pH7.4 の溶液を調製した。この混液にアデニン 8mM, イノシン 40mM を加えた液を A I 液、加えない液をコントロール液とし、それぞれの液をオートクレーブで滅菌した。この A I 液およびコントロール液と Packed Cell をそれぞれ無菌的に1対1に混合し4℃で保存した。A I 液添加血液を A I, コントロール添加血液をコントロールと略す。

一定期間保存のあと、ATP, 2,3-DPG, 浸透圧溶血抵抗、および Model S コールターカウンターにより赤血球数、ヘモグロビン量、MCV を測定した。

ATP は島津 C-RIA データー処理装置をつないだバリアン System 4100 高速液体クロマトグラフィーにより分離定量した。カラムは Micropak  $\text{NH}_2$  あるいは Micropak AX10 を使用した。Micropak  $\text{NH}_2$  を使用したときは 0.4M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 30% MeOH の溶媒を用い 40ml/hr の流量、2,300~2,800psi の圧で測定した。Micropak AX10 のときは 0.75M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  の溶媒を用い、120ml/hr の流量、1,600~1,800psi の圧で行った。

2,3-DPG はベーリンガー・マンハイム製の 2,3-DPG 測定用キットを使用して測定した。

浸透圧溶血抵抗は Dacie<sup>13)</sup> の方法に従って行った。

#### 結 果

新鮮血の ATP レベルは約 3~4/ $\mu\text{mol}/\text{Hb}(\text{g})$  である。図1に示したように、A I の ATP レベルは90日すぎまでは新鮮血の上限のレベルの値を保っていた。図には示さなかったが、採血10日を経たのち、アデニン、イノシンを加えて保存した血液は、添加後数日で新鮮血の ATP レベルに達し、その後約100日間はそのレベルを保った。

2,3-DPG の測定結果は図2に示した。コントロール

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京医科歯科大学医学部第一生化学

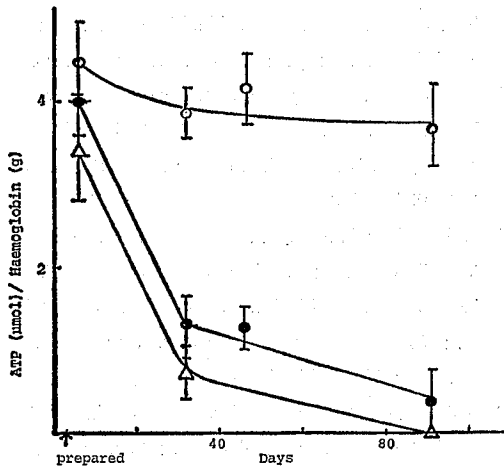


図1. 保存中の血液のATPレベルの変動  
 △ Packed Cell, ● Control, ○ AI  
 実験例3例の平均値±標準偏差

は約2週間で約1/2になり30日ではほぼ消失した。  
 この溶液で保存した血液の0.9%等張液中での溶血率

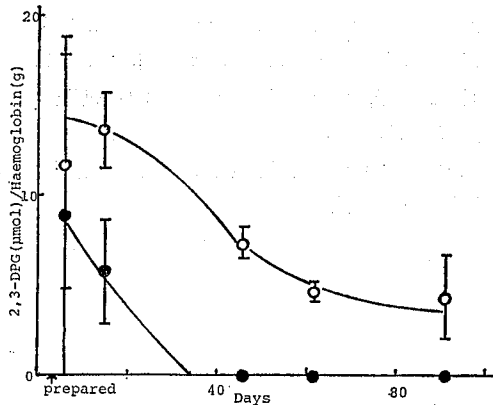


図2. 保存中の血液の2,3-DPG量の変動  
 ● Control, ○ AI  
 実験例3例の平均値±標準偏差

を表1に示した。0.9%等張液中での溶血率はACD保存血の Packed Cell が保存期間45日ですでに9.6%になっているのに対し、同じ時期のコントロール、およびAIの溶血率は2~3%であった。約100日保存後の等張液中での溶血率はコントロール、AIともに約11%であり、同じ時期の Packed Cell は35.4%であった。

50%浸透圧溶血抵抗値を図3に示した。図に見られるように保存日数に従って徐々に抵抗が増し、採血後50日でコントロールで0.2%, AI添加例で0.18%の塩濃度まで達し、保存期間100日まではこの値を保っていた。

MCVは図3に示したように保存後50日まで徐々に減少し、一定の値になった。

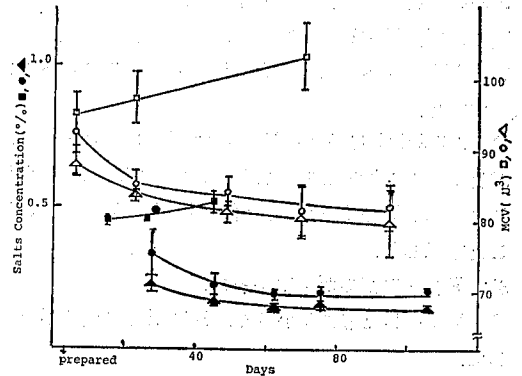


図3. 保存中の赤血球のMCVおよび50%浸透圧溶血抵抗値  
 □ Packed Cell, ● Control, Δ AI  
 実験例3例の平均値±標準偏差

### 考 察

以上示した結果はアデニン、イノシン添加による保存期間延長実用化のための実験の一部である。

AIのATPレベルは100日間保存後も正常に近い値を保った。また解糖系の酵素活性の指標になるといわれる2,3-DPGもコントロールに比較してかなり多くの量が保たれていた。この結果は100日保存後も赤血球のメタボリズムは活発に営まれていることを示した。1mM

表1. 等張液中の溶血率

| 保存日数<br>保存法 | 15日           | 23~26日       | 45~46日       | 94~106日       |
|-------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| Packed Cell | 2.17±0.32 (%) | 3.17±1.0 (%) | 9.6±1.98 (%) | 35.4±3.60 (%) |
| Control     | —             | 2.55±0.45    | 2.40±1.08    | 11.60±2.85    |
| AI          | —             | 3.09±1.39    | 2.73±1.27    | 11.03±4.97    |

実験例3例の平均値±標準偏差

CaCl<sub>2</sub>, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25M Sucrose, 10mM Tris HCl PH7.4 混液を加えて血液を保存すると、浸透圧溶血抵抗が増すこと、等張液中での溶血率が低くなること、MCV が小さくなることなどの結果を示したが、この溶液を用いて保存すると赤血球膜が浸透圧に対して抵抗するようになり、その結果アデニン、イノシンの保存効果がさらに上昇したものと考えられる。

本実験は in Vitro における保存期間延長の基礎的実験であり、保存液個々の輸血による毒性の検討は今後の研究に待たねばならない。輸血への実用化については現在研究中である。

### 要 約

Sucrose を加えた新しい保存液の開発を試み、基礎的段階でほぼ満足する結果を得た。

- 1) ATP レベルは保存 100 日後も新鮮血のレベルを保っていた。
- 2) 2,3-DPG は徐々に減少したがコントロールでは 30 日ですでに消失してしまうのに対して、90 日後も新鮮血の約 1/3 の値を示し、解糖が活発に営まれていることを示した。
- 3) 保存中の溶血が少なかった。
- 4) MCV が正常より小さく、浸透圧溶血抵抗が上昇した。

### 文 献

- 1) Rapoport, S. : *J. Clin. Invest.*, 591, 616, 1974
- 2) Nakao, M., Nakao, T., Tachibana, M., Yoshikawa, H., and Abe, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, 32,

564, 1959

- 3) Nakao, M., Nakao, T., Tachibana, M., and Yoshikawa, H. : *J. Biochem.*, 47, 661, 1960
- 4) Nakao, M., Motegi, T., Yamazoe, S., and Yoshikawa, H. : *Nature*, 191, 283, 1961
- 5) Nakao, M., Nakao, T., and Yamazoe, S. : *Nature*, 187, 954, 1960
- 6) Nakao, M., Nakao, T., Yamazoe, S., and Yoshikawa, H. : *J. Biochem.*, 49, 487, 1961
- 7) Nakao, M., Ozaki, T., Nagano, K., and Nakao, T. : *Pro. XI Congr. of Inter. Soc. Blood Transfusion*, 746, 1966
- 8) Nakao, M., Nakao, T., Yoshikawa, H., Wada, T., Takaku, H., and Nakao, K. : *Pro. 8th Congr. Inter. Soc. Blood Transfusion Tokyo* 1960, 455, 1962
- 9) Nakao, M., Nakao, T., Arimatzu, Y., and Yoshikawa, H. : *Pro. Japan Acad.*, 36, 43, 1960
- 10) Wada, T., Tanaka, H., Nakao, K., Nakao, M., and Yoshikawa, Y. : *Pro. Japan Acad.*, 36, 619, 1960
- 11) Nakao, K., Wada, T., Kamiyama, T., Nakao, M., and Nagano, K. : *Nature*, 194, 877, 1962
- 12) 長井二三子, 中尾順子, 中尾 真 : 東京衛研年報, 29-2, 155, 1978
- 13) 三輪史朗 : 臨床検査技術全書, 3, 血液検査学, 296, 1972, 医学書院

## 蛍光抗体法によるラット小腸アルカリフォスファターゼの検出

佐々木美枝子\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

### Detection of the Intestinal Alkalinephosphatase of Rat by the Fluorescent Antibody Techniques

MIEKO SASAKI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

Anti-rat intestinal alkalinephosphatase antiserum was prepared by the immunization on rabbit with this enzyme. Titer of the antiserum was assayed *in vitro* by the precipitation reaction using glass capillary tubes and by the agar gel plate Ouchterlony method. The precipitation titer of this antiserum was  $\times 16$  and  $\times 32$  of its IgG fraction, but antigen-antibody complex (the mixture of rat alkaline phosphatase and antiserum IgG) reacted very well to the anti-rabbit IgG goat serum, assayed by the Ouchterlony method.

Rat intestinal alkalinephosphatase could be detected by the indirect immunofluorescent technique, using this anti-rat rabbit antiserum as the primary antibody and FITC-labeled anti-rabbit IgG goat serum as the secondary antibody. This primary serum was regarded roughly as a histospecific antibody to the rat intestinal enzyme. The distinct conclusion concerning about the histospecificity of this antiserum would be brought by further experiments.

**Keywords :** immunofluorescent technique, intestinal alkalinephosphatase, histospecificity

#### 緒 言

アルカリフォスファターゼ (以下AL-Pと略す) は、リン酸モノエステル結合を水解する非特異的な酵素のうちアルカリ性でより強い酵素活性を発現するものをいう。この酵素は、細菌、動物細胞、臓器等にかなり一般的に存在するが、その生理学的意義はまだ確認されていない。ヒトおよび動物臓器中では、AL-Pは小腸、胎盤、乳腺に多量に存在し、また腎、骨、肺、肝、脾臓および白血球にも酵素活性が認められる。これら臓器のAL-Pはたがいにアイソザイムであり、主としてヒトにおいて、小腸、胎盤、腎、肝等のAL-Pは電気泳動的に分離されることが知られている。

当研究部、米山らは、界面活性剤である直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)を投与したラットにおいて、血清アルカリフォスファターゼが増加すること、およびこの酵素が小腸由来のものであることを推察し、LAS投与ラット小腸よりアルカリフォスファターゼを分離精製してその性質を生化学的に調べている<sup>1,2)</sup>。また樺島らは、仔牛小腸由来のアルカリフォスファターゼでウサギを免疫して得られた抗血清を用いて、

酵素反応によって仔牛小腸AL-Pとラット小腸AL-Pとの間に交叉性のないことを確認している<sup>3)</sup>。

以下にのべる実験は、ラット小腸由来のAL-Pに対する抗血清を用いて、ラット小腸に局在するAL-Pを組織特異的に検出することができかどうかを、蛍光抗体間接法を用いて検討したものである。

#### 材料および方法

1) 抗ラット小腸アルカリフォスファターゼ抗血清(一次免疫血清)の作製: 抗原として用いたラット小腸由来アルカリフォスファターゼ(以下RAL-Pと略す)はLAS長期投与ラット小腸より分離精製されたもので、当研究部米山らの分与をうけた<sup>2)</sup>。試料(蛋白量0.818 mg/ml)はミリポアフィルターでろ過滅菌後、100 $\mu$ g/mlに調製し、各1 mlずつをアンプルに封入し、使用まで氷室に保存した。ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼ(BAL-Pと略す)はBoehringer Mannheim社製のものを購入し(Kontrol-Nr. 7245836)、0.15M NaClに対して一晚透析後、やはり100 $\mu$ g/mlとし、ろ過滅菌してアンプルに封入、氷室に保存した。

免疫動物としてはウサギ(NZW-Sat種、雌、SPF)

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

を用いた。ウサギは体重約2kgのものを購入し、当部の実験動物飼育舎において標準飼料により1.5ヶ月間飼育後、免疫をはじめた。免疫方法は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のAL-P溶液1mlを等量のプロイントコンプリートアジュバントに懸濁したものを10日間隔で2回皮下接種し、以後10～15日ごとに、追加免疫として100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗原液のみ1mlを耳静脈より静脈注射した。免疫動物は経時的に耳静脈より試験採血を行ない、ガラス毛细管による沈降反応および寒天平板によるOuchterlony法により抗体価を測定した。抗体価が安定した時点で全採血により動物を屠殺し、得られた血清を50%飽和硫酸で3回、33%飽和硫酸で2回塩析後、リン酸緩衝液で透析し、IgG分画とした。

2) 蛍光抗体法による組織アルカリフォスファターゼの染色：小腸アルカリフォスファターゼの増加することが知られている0.4%LASを1ヶ月間投与したラット(SLC-Wistar系ラット、LASは飲料水中に投入し自由摂取)<sup>2,5)</sup>および無投与の対照ラットの、小腸、腎、脾、肝、胸腺、心臓の凍結切片標本およびパラフィン包埋標本を作成し、蛍光染色を行なった。蛍光抗体染色は、前述した一次免疫血清で組織切片を処理したのち、さらに蛍光色素をラベルした二次血清を作用させて組織中の抗原を染色する蛍光抗体間接法によった<sup>4)</sup>。二次血清としては、FITC\*ラベル抗ウサギIgGヤギ血清(MILES社製、Code no. 65-173)を用いた。方法を簡単に述べると、各組織の切片標本に適当な濃度に希釈した一次血清(抗RAL-PウサギIgG)を滴下し、37℃で30分間(または4℃で一晩)作用させたのち、標本を生理食塩水で十分洗浄し、未反応の一次血清を除いた。ついで二次血清(FITCラベル抗ウサギIgG血清)を37℃で20～45分間作用させ、再び十分に洗浄し、蛍光顕微鏡で検鏡した。各切片標本は、蛍光染色と同時に組織化学的なアルカリフォスファターゼ染色(カルシウム・コバルト法)も併せて行ない、比較検討した。

\*FITC: fluorescein isothiocyanate

### 結果および考察

1) 免疫血清の抗体価：免疫動物から経時的に採血し、ガラス毛细管による沈降反応および寒天平板を用いたOuchterlony法により抗体価を測定した。前述した免疫方法によって得られる抗血清の抗体価は沈降反応で測定した場合には非常に低く、アジュバントに懸濁した抗原を2回投与し、さらに10日目ごとに抗原を静脈内投与して追加免疫しても抗体力価は $\times 16$ 以上にはならなかった。また免疫動物から大量採血して得た抗血清のIgG分画でも沈降反応の抗体価は依然として $\times 32$ と低力価であ

表1. RAL-P, BAL-P, FITC-抗ウサギIgG血清と抗RAL-P, 抗BAL-Pとの沈降反応(毛细管法)

| 抗 体          | 抗 原    | 沈降反応 |
|--------------|--------|------|
| 抗RAL-P       | RAL-P  | +    |
|              | BAL-P  | —    |
| FITC-抗ウサギIgG | 抗RAL-P | ++   |
| 抗BAL-P       | RAL-P  | —    |
|              | BAL-P  | +    |
| FITC-抗ウサギIgG | 抗BAL-P | ++   |

(注) ガラス毛细管に抗体と抗原が界面を接するように注入し、垂直に立てて室温に放置した。判定は抗原と抗体の境界面に生ずる沈降環および一夜放置後の管底の沈降物によった。

—：全く沈降反応を示さないもの

＋：一夜放置後に沈降物が管底に認められるもの

++：数時間以内に境界面に沈降環が生じ、一夜放置後には多量の沈降物を認めるもの

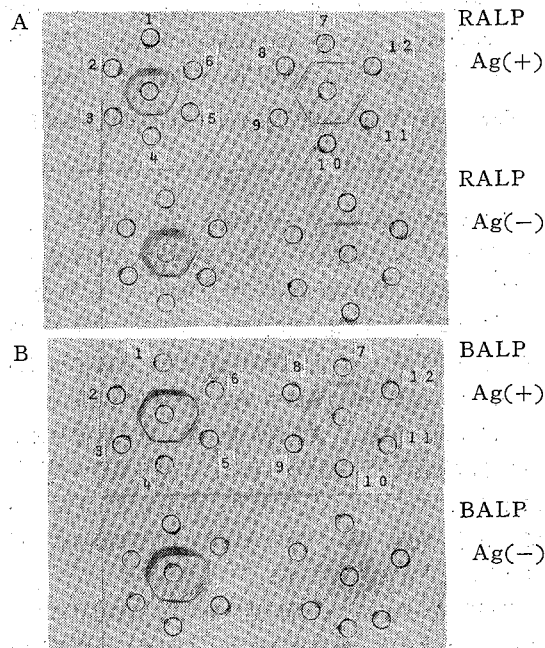


図1. 抗AL-P抗血清とFITC-抗ウサギIgG抗血清の反応

(注) 図Aは抗RAL-P抗血清を用いたOuchterlonyの結果を示す。抗血清は2倍段階希釈して辺縁ウェルに入れ中心ウェルには抗ウサギIgGを入れた。図の1～12の数字は血清の希釈倍率を示す。

Ag(+)は、抗血清と抗原(RAL-P)をあらかじめ反応させてからウェルに入れたもの、Ag(-)は抗血清のみを入れたもので、Ag(+)の方が反応性がすぐれている。

図Bは同じことを抗BAL-Pを用いて調べたものである。

り、毛細管法による反応の場合、抗原と抗体の接触面に肉眼的な沈降環は認め難く、判定は沈降管を一晚放置後の管底の沈降物によってのみ行ない得た。

また、IgG 分画血清を用いて、抗 RAL-P 血清と抗 BAL-P 血清との交叉性を *in vitro* で調べたところ、両者には全く交叉性は認められなかった。すなわち、抗 RAL-P IgG と BAL-P、抗 BAL-P と RAL-P とは全く反応せず、ホモの抗原と抗血清の間にのみ沈降反応が認められた (表 1)。樺島らは酵素反応によってラット小腸 AL-P と仔牛小腸 AL-P とは交叉性のないことを証明しているが<sup>9)</sup>、両者は免疫学的にも抗原性を異にするものと思われる。

つぎに FITC をラベルした抗ウサギ IgG (二次血清) と各抗血清との反応性を Ouchterlony 法により調べたところ、抗原抗体結合物と FITC-抗ウサギ IgG との反応性がきわめて良好であることが示された。すなわち、抗 RAL-P IgG と抗 BAL-P を各々 2 倍段階希釈し、中央のウェルに FITC-抗ウサギ IgG を入れて Ouchterlony を行なうと (図 1, Ag-) FITC-抗ウサギ IgG の力価は  $\times 500$ 、 $\times 250$  であるのに対し、辺縁ウェルにそれぞれホモの抗原 (RAL-P および BAL-P) を抗血清と共に入れたもの (図 1, Ag+) では抗体価は  $\times 4000$  以上となった。この現象の原因については詳しく検討はしていないが、おそらく、抗原抗体結合物にさらに抗ウサギ IgG 血清が結合することによって安定した沈降物が生じるためであろうと思われる。抗 RAL-P、抗 BAL-P の沈降抗体価が低かった原因は、抗原が比較的小分子であったためと、沈降物を十分に形成するだけの抗体が存在しなかったためであろう。

2) 蛍光抗体法による組織アルカリフォスファターゼの染色：前述したように、FITC ラベル抗血清の力価は抗原抗体結合物が存在する場合にきわめて高い値をとることが示され、作成した抗 RAL-P IgG は蛍光抗体染色の一次血清として有効であると思われた。そこでこの抗 RAL-P IgG を一次血清とし、FITC ラベル抗ウサギ IgG を二次血清として、ラットの各組織の凍結切片標本について、一次血清濃度を  $\times 16$  から  $\times 2000$  まで 2 倍段階希釈し染色性を検討した。二次血清は  $\times 200$  とした。

この結果、小腸の組織標本では実験群 (0.4% LAS 1 ヶ月投与群)、対照群 (非投与群) とともに、一次血清  $\times 2000$  で非常に強い蛍光が認められた (写真 1, 2)。小腸組織では蛍光は微細絨毛、基底膜、腸管腔に認められた。対照群と実験群との差は認められず、正常ラット小腸絨毛細胞にもきわめて AL-P が多量に存在することが示された。一次血清をさらに  $\times 4000$ 、 $\times 8000$ 、 $\times 16000$

と希釈して染色を行なったが、 $\times 4000$  ではやはり実験群、対照群ともに蛍光が認められ、これ以上の希釈では両者ともに蛍光は認められなくなった。実験群のラットでは血清 AL-P の酵素活性は対照群の 1.3~1.5 倍に増していることが報告されているが<sup>9)</sup>、蛍光抗体法ではこの差を数字で示すことはできなかった。

腎臓では、実験群に近位尿細管に局在する蛍光が認められた。糸球体、遠位尿細管には蛍光は全く認められず、またこの近位尿細管の蛍光は対照群の腎には全くみられなかった (写真 3, 4)。LAS 投与ラットの組織学的検索を行なった当研究部藤井らは腎組織における所見として、近位尿細管の狭窄と上皮細胞の腫脹を観察しており<sup>9)</sup>、また、小腸粘膜、尿細管壁、細胆管壁の細胞壁に共通抗原性のある蛋白を証明している Butterworth らの報告<sup>10)</sup> もあるので、LAS 投与群にのみ観察されるこの現象がどのような原因によるものかは未確認である。可能性としては、小腸由来の AL-P が何らかの腎障害の結果として腎尿細管に沈着したものか、あるいは小腸由来 AL-P と腎由来 AL-P に共通抗原性があることが考えられる。しかし対照群においては腎組織は抗小腸 AL-P 抗血清とは全く反応していないことから、使用した抗血清は一応、小腸組織に特異的に反応するものと考えてよいと思われる。但し、小腸由来 AL-P と腎由来 AL-P との交叉性の確認のためには、腎由来 AL-P に対する抗血清を作成して交叉性を直接検討するなどの方法でさらに実験をすすめるなければならない。

実験群と対照群との差は脾臓組織の一部にも認められた。すなわち、脾臓細胞の一部に実験群のみに蛍光がみられた。対照群の脾は蛍光抗体により全く染色されなかった。脾臓組織の染色性については今後さらに詳しく検討をすすめる予定である。なお、肺、肝、胸腺には実験群、対照群ともに蛍光は認められなかった (写真 5-7)。

同じく組織凍結切片標本を用いて、組織化学的なアルカリフォスファターゼ染色を試みた。その結果、小腸では実験群、対照群ともに強陽性、腎ではともに弱陽性~疑陽性であった。肺・肝・脾・胸腺では反応は陰性であった。蛍光染色、AL-P 染色の結果を表 2 にまとめた。

同一の組織の一部をパラフィン包埋して切片を作成し、一次血清  $\times 800$ 、二次血清  $\times 200$  で蛍光抗体染色を行なった。凍結切片の場合より感度はおちる傾向はあるが、小腸組織の蛍光は凍結切片のものと同様に認められた。これは組織 AL-P がパラフィン包埋の条件でも安定であることを示している。

アルカリフォスファターゼは臨床検査面での存在意義がきわめて大であり、この方面での知見は枚挙にいとま



表2. 蛍光抗体法および組織アルカリフォスファターゼ染色によるラット組織AL-Pの検出

|    |   | 蛍光抗体法*1 |       | AL-P染色*2 |       |
|----|---|---------|-------|----------|-------|
|    |   | 実験群*3   | 対照群*4 | 実験群*3    | 対照群*4 |
| 小腸 | 腸 | +++     | +++   | +++      | +++   |
| 腎臓 | 臓 | ++      | —     | ±        | +     |
| 肺臓 | 臓 | —       | —     | —        | —     |
| 肝臓 | 臓 | —       | —     | —        | —     |
| 脾臓 | 臓 | +(一部)   | —     | —        | —     |
| 胸腺 | 腺 | —       | —     | —        | —     |

\*1 蛍光抗体法は、ウサギを免疫して得た抗RAL-P血清を一次血清とし、FITCラベル抗ウサギIgGヤギ血清を二次血清とした蛍光抗体間接法による。

\*2 AL-P染色はカルシウム・コバルト法によった。

\*3 0.4% LASを含有した飲料水を1ヶ月間自由摂取させたラットの組織を用いた。

\*4 LAS非投与対照ラットの組織を用いた。

がないほどであるが、基礎医学的な面では、その存在は生化学的には古くから知られているものの作用機作の生理学的な意味づけは未知のまま残されている。この非特異的な広範囲に存在する酵素は、小腸粘膜、胎盤、腎近位尿管上皮、肝胆細管、毛細血管内皮細胞など、物質輸送に関連した細胞の細胞膜にその活性が認められるために細胞膜の能動輸送、特にCaの吸収との関係が注目されている。また、癌患者の血清中に非常に高値のアルカリフォスファターゼ活性が認められることは臨床医学的によく知られていることであるが、この血清AL-Pと組織由来AL-Pとの関係についても最近知見が増加している<sup>7-10)</sup>。

毒性学の分野でも、界面活性剤をはじめ種々の物質によって血清および組織AL-Pが変動することはしばしば観察されているが、病理組織学的所見と生化学的变化を結んで理解するために、蛍光抗体法は有効な手段である。今後の研究の方向としては、各臓器由来のAL-Pの免疫学的な相異を明らかにし、さらに他種の動物や細胞のAL-Pの種特異性や近似性についても追求してアルカリフォスファターゼの本質を見究めると同時に、担癌動物や毒物投与時の動物におけるこの酵素の存在意義を明らかにしてゆく必要があると思われる。

#### 要 約

ラット小腸由来のアルカリフォスファターゼを抗原としてウサギを免疫して抗血清を得た。この抗血清は沈降抗体価は低かったが、これに抗原を反応させさらに抗ウサギIgG血清を作用させると、in vitro できわめて高力価であることが示された。この抗血清のIgG分画を一次

血清とし、FITCラベル抗ウサギIgGヤギ血清を二次血清として、蛍光抗体間接法によりラット小腸AL-Pの蛍光染色を行なった。さらに検討の余地は残されているが、この抗血清は、同時に行なった組織AL-Pの酵素化学染色の結果と併せて考えると、ラット小腸AL-Pに対する組織特異的な抗体とみなすことができる。他臓器由来AL-Pおよび他動物由来AL-Pとの交叉性についてはさらに検討中である。

謝 辞：本実験を行なうにあたり、蛍光抗体標本の判定に関して御指導、御助言をいただいた東京大学医科学研究所病理学研究部青山先生、倉田先生および切片標本作成に多大な御協力をして下さった同研究部小林伊代さんに心より感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) 米山允子, 伊川三枝子, 中尾順子: 東京衛研年報, 25, 655, 1974
- 2) 米山允子, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 62, 1975
- 3) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 27-2, 176, 1976
- 4) Kawamura Akiyoshi, Jr. (Ed.): *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, 2nd Ed., 86, 1977, University of Tokyo Press, Tokyo
- 5) 藤井 孝, 坂本義光, 阿部幸恵, 三栗谷久敏, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 85, 1977
- 6) Butterworth, P. J., Moss, D. W., Pitkanen, E., and Pringle, A.: *Clin. Chim. Acta.*, 11, 220, 1965
- 7) Schlamowitz, M. and Bodansky, O.: *J. Biol. Chem.*, 234, 1433, 1959
- 8) Fishmann, W. H., Inglis, N. R., Stolbach, L. L., and Krant, M. J.: *Cancer Res.*, 28, 150, 1968
- 9) Fishman, W. H., Inglis, N. R., Green, S., et al.: *Nature*, 219, 697, 1968
- 10) Kawasaki, H., Takeuchi, M., and Kimoto, E.: *Gann*, 65, 473, 1974

#### 写 真 説 明

写真1. 抗AL-P血清による小腸アルカリフォスファターゼの蛍光染色(一次血清 ×2000, 二次血清 ×200, 検鏡倍率 ×200)。

写真は実験群(LAS投与群)ラットの小腸であるが、小腸の蛍光は実験群と対照群に全く差は認められなかった。

写真2. 同上。小腸アルカリフォスファターゼの強拡大(倍率 ×400)。写真は対照群の組織である。

写真3. 実験群の腎にみられた抗AL-Pによる蛍光。

近位尿細管壁のみに蛍光が認められ、糸球体および遠位尿細管では蛍光はみられない。

(一次血清  $\times 500$ , 二次血清  $\times 200$ , 倍率  $\times 400$ )

写真4. 対照群の腎を写真3と同じ条件で染色したもの。蛍光は全く認められない。

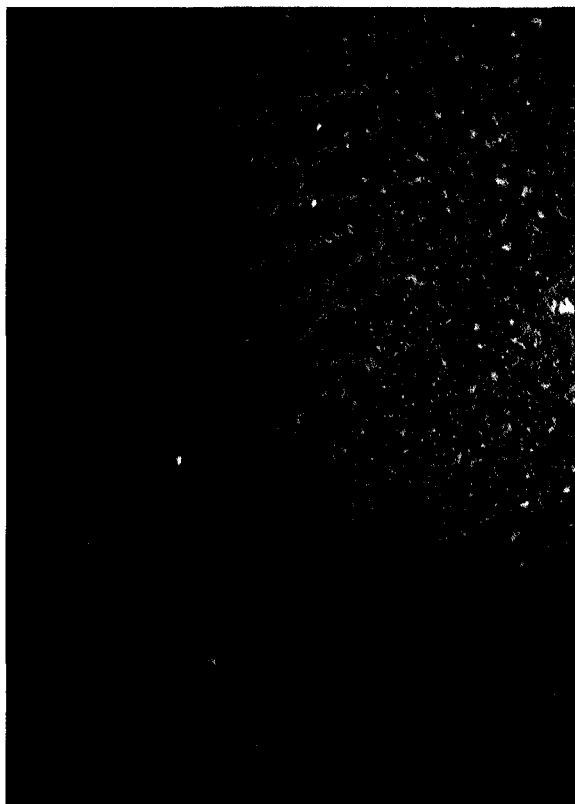
写真5. 実験群の肝臓。実験群・対照群ともに肝臓は抗小腸AL-P血清では染色されない。

(一次血清  $\times 16$ , 二次血清  $\times 200$ , 倍率  $\times 400$ )

写真6. 対照群の肺臓 (一次血清  $\times 2000$ , 二次血清  $\times$

200, 倍率  $\times 400$ )。肺にも実験群・対照群ともに抗AL-Pによる蛍光はみられなかったが、一次血清の倍率が低い場合には両群ともに非特異蛍光が認められた。

写真7. 実験群の脾臓のろ胞周辺に認められた蛍光 (一次血清  $\times 16$ , 二次血清  $\times 200$ , 検鏡倍率  $\times 400$ )。対照群の脾には蛍光はみられなかったが、実験群においても脾臓の一部だけに蛍光がみられたのみであった。



1



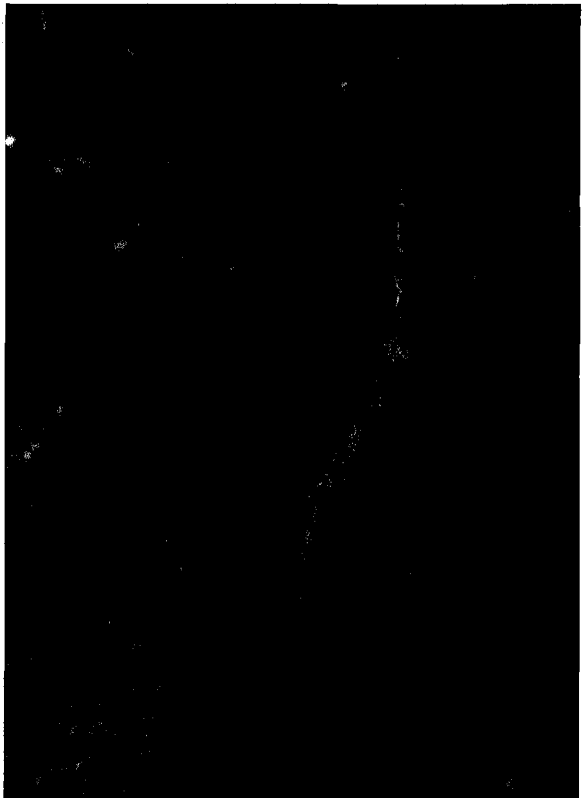
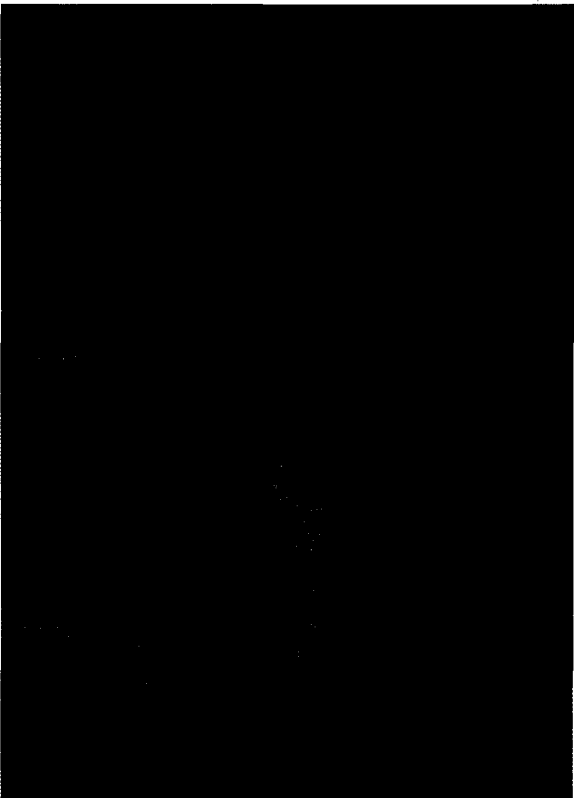
2



3



4



## Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による周生期ラットの赤血球膜浸透圧抵抗について

市川久次\*, 小林博義\*, 中尾順子\*

### Osmotic Fragilities of Perinatal Rats Red Blood Cells Measured by Coil Planet Centrifuge (CPC) Method

HISATSUGU ICHIKAWA\*, HIROYOSHI KOBAYASHI\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords** : CPC, 赤血球膜 red blood cells membrane, 周生期ラット perinatal rats

著者らは、これまでCPC (Coil Planet Centrifuge) 法を用いて、小動物 (マウス, ラット) の赤血球膜浸透圧抵抗 (溶血抵抗) について検討し、測定法を確立するとともに毒性試験への応用の基礎的研究を行い、幼若ラット (生後1~3週) において特徴ある高張部瞬時溶血 (仮称) が起こり、その程度 (時期, 濃度) において個体差はあるが、成熟と共に消失することを見出し報告した<sup>1,2)</sup>。今回著者らは、周生期ラットにおける赤血球膜浸透圧抵抗について検討し、若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料ならびに方法

1. 使用動物: 静岡県実験動物農業協同組合生産のSLC-Wistar系 (SPF) 妊娠ラット (胎令8日目 (妊娠8日目) 胎令はプラグ発見時を0日とした) を購入し、1匹ずつ個別のプラスチック製透明ケージにて飼育し (室温 $25 \pm 1^\circ$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 日本クレアKK製固型飼料CE-2を自由摂取, 水は細菌ろ過器を通した水道水を自由摂取), 胎児は胎令18, 19, 20, 21日目の妊娠ラットを無麻酔下背位に固定開腹し, 胎児を胎盤と共に取り出し, 出産直後の新生児 (胎令22日目) は9時, 12時, 17時に観察し, 前日17時~当日12時までに出産したものを実験に供した。なお加えて, 胎仔数10~12匹, 雌雄とも5匹以上のものを使用した。

2. 採取方法: 胎児については, 胎盤をつけたままの状態, 新生児はそのまま断頭し, 流出してくる血液を市川<sup>3)</sup>らの方法に準じ, ヘパリン処理したヘマトクリット管に採取した。

3. 連続濃度勾配食塩液のCPCコイルへの注入, 採取した血液のCPC法による赤血球膜浸透圧抵抗の測定方法は市川<sup>3)</sup>らの方法を用いた。

#### 実験結果

Fig. 1~Fig. 3に示した如く雌雄とも胎児の成熟と共

に, 溶血幅が減少し, CPCコイルの高張部 (図中コイル左側端部) において, 高張側液として170mOsM (0.546%) NaCl液を用いた場合に胎仔の成熟につれて, その程度においてかなりの個体差があるが減少していく特徴ある高張部瞬時溶血が認められたが, 血液と等張である280m OsM (0.9%) NaCl液を高張側液に用いた場合には, 胎令18~21日の胎児ならびに新生児 (胎令22日目) のいずれにおいても, 高張部瞬時溶血は認められなかった。

#### 考 察

著者らは、これまでCPC法による赤血球膜浸透圧抵抗の測定について、毒性試験への応用を目的とし、小動物 (マウス, ラット) を対象とした場合の実験法を確立し<sup>1,2)</sup>、基礎実験として加令と溶血抵抗の関係について検討を加えてきたが、今回周生期ラットについて検討したところ、雌雄とも成熟と共に溶血幅の減少が認められたが、この現象はこれまで報告した加令と赤血球膜の成熟との関連において考えられる変化である。一方、注目すべきは、高張部瞬時溶血 (仮称) に関してである。著者らは、これまでの研究において、幼若ラット (生後1~3週において強くでる) において高張側液に170 or 280 m OsM の NaCl 液を用いた時、いずれの場合においても雌雄ともに特徴ある高張部瞬時溶血が起こることを見出したが、周生期ラットでは、Fig. 1~Fig. 3に示した如く雌雄とも、その程度において個体差があるが、170m OsM (0.546%) NaCl 液を高張側液として用いた場合のみ高張部瞬時溶血が起こるのが認められたが、280m OsM (0.9%) NaCl 液 (血液と等張) を高張側液として用いた場合には高張部瞬時溶血は出現しなかった。このことから、これまでに報告した幼若ラットにおいて見い出された高張部瞬時溶血<sup>1,2)</sup>と周生期ラットにおいて見い出された高張部瞬時溶血は、(1)周生期ラット

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

においては、170m OsMのときは出現し、個体差があるが成熟と共に減少していくが、280m OsMのときは出現しない。②幼若ラットにおいては、170m OsM, 280m OsMの双方において出現し、成熟と共に個体差が多少あるが消失していく①、②の理由により生理的現象として、本質的に異なったものと考えられる。このことについては、肝臓、脾臓（胎児期においては、肝臓、脾臓において造血がなされているといわれている<sup>4)</sup>）、骨髓等の造血に関与する臓器の機能の成熟あるいは造血に関与する生理活性物質等との関連を考慮し検討を加えて行きたい。

### 結 論

周生期ラットを用いて、CPC法により赤血球膜浸透圧抵抗について検討したところ次の結論を得た。

① 溶血幅における変化は、幼若～成熟ラットにおい

てと同じく成熟と共に減少し、その延長上にあることを認めた。

② 高張部瞬時溶血においては、幼若ラットとは異なり、高張部の浸透圧（170m OsMでは出現し、280m OsMでは出現しない）により差があった。

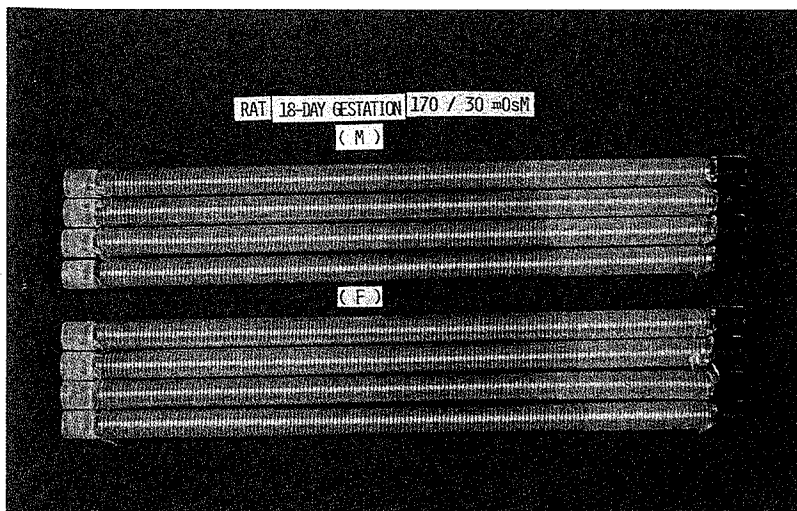
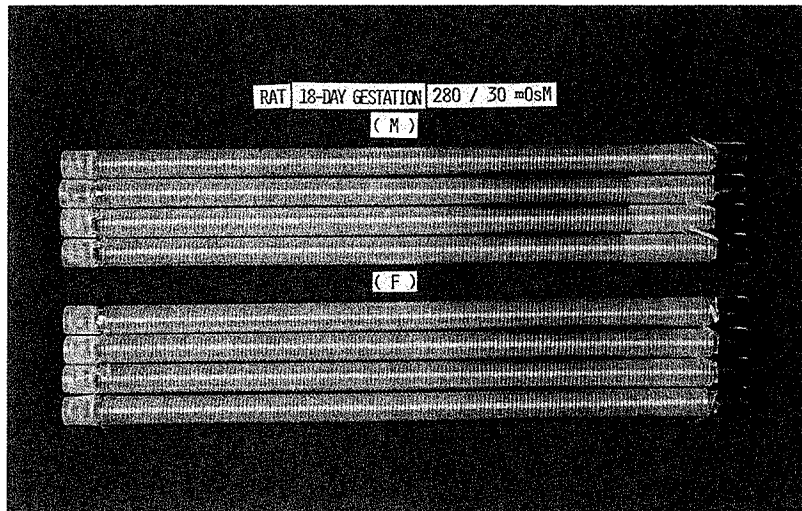
### 文 献

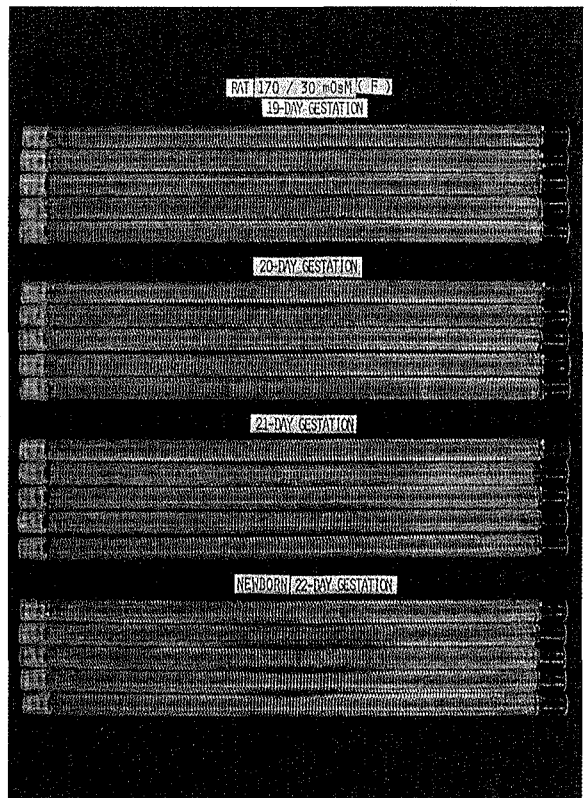
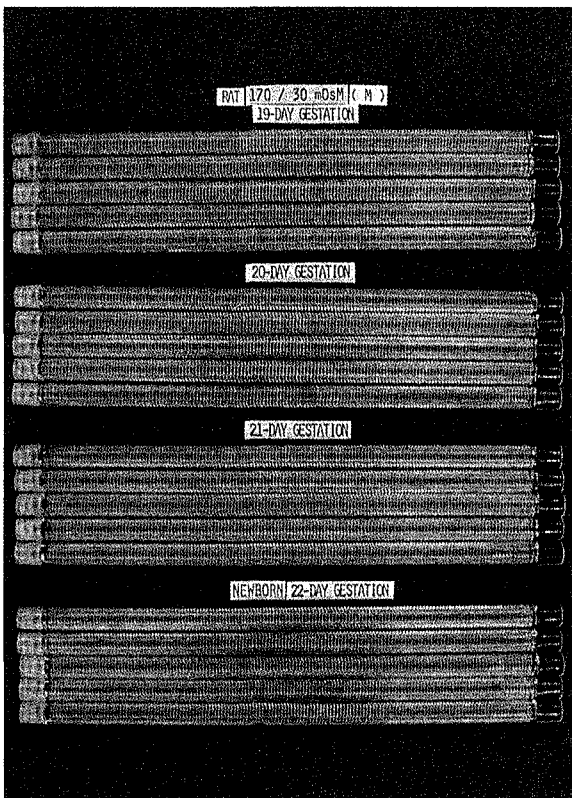
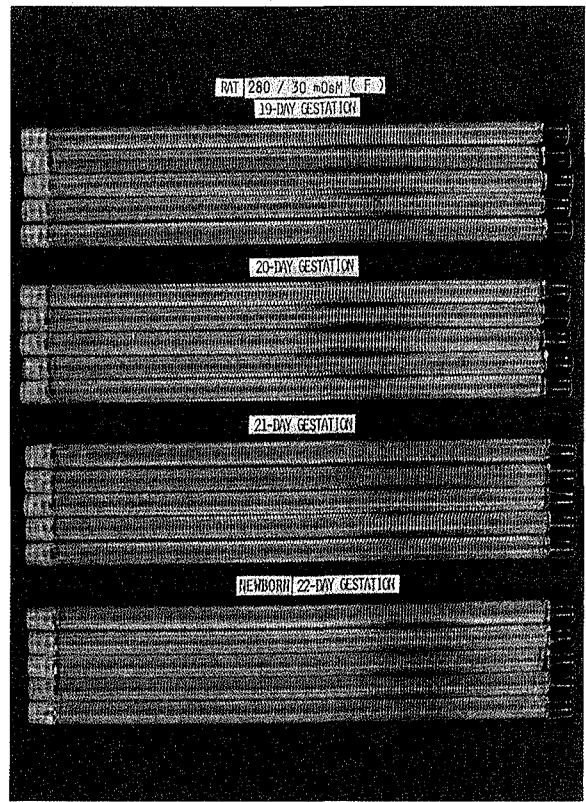
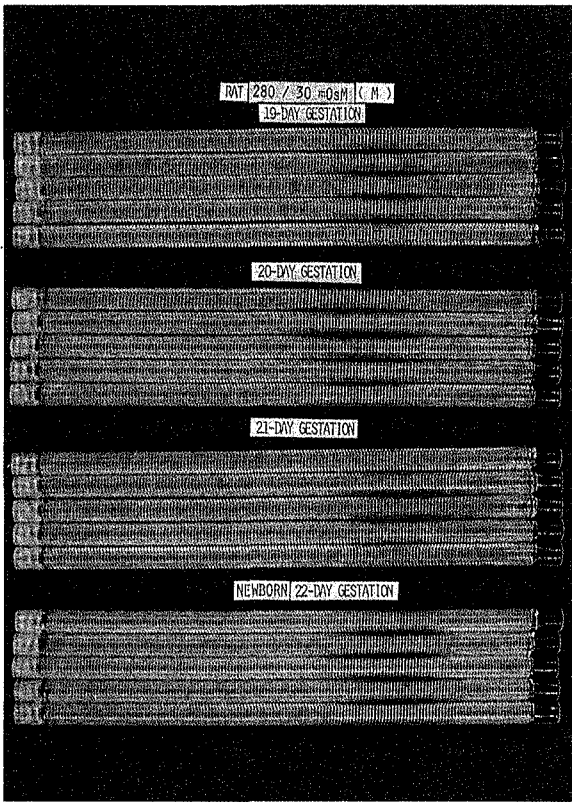
- 1) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 28-2, 230, 1977
- 2) 市川久次, 小林博義, 中尾順子, 平賀興吾, 中川茂男: 日本血液学会雑誌, 41, 102, 1978
- 3) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 203, 1975
- 4) Winobe, M.M.: *Clinical Hematology*, P. 32, Lea and Febiger, Philadelphia, 1961

Fig. 1. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 18-Day Gestation by CPC Method  
from the left to the right: 170 or 280-30 mOsM NaCl  
(M): male, (F): female

Fig. 2. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 19-21-Day Gestation and Newborn (22-Day Gestation) by CPC Method  
from the left to the right: 280-30 mOsM NaCl  
(M): male, (F): female

Fig. 3. Osmotic Fragility of Rat Red Blood Cells at 19-21-Day Gestation and Newborn (22-Day Gestation) by CPC Method  
from the left to the right: 170-30 mOsM NaCl  
(M): male, (F): female







## ラット器官重量 (第2報)\* 肝重量について

坂本 義光\*\*, 平賀 興吾\*\*

### Organ Weight of Rats (II)\* Liver Weight

YOSHIMITSU SAKAMOTO\*\* and KOGO HIRAGA\*\*

**Keywords:** ラット rat, 体重 body weight, 器官重量 organ weight, 肝重量 liver weight

#### 緒 言

動物の生理的または病理的变化による器官重量の増減には、各々の器官の形態的および機能的性質が反映されるものと考えられる。著者らはその点に着目し、従来からラット器官重量の成長に伴う増加推移、薬物負荷の際の変動のしかたについて観察を行なっている。既に生後5～9週のラットで、各器官の増加推移には体重によく伴うものと、個有の推移を示すものがあることを報告した<sup>1)</sup>。今回ひきつづき、より若令からより高令のラットの器官重量の成長に伴う増加推移を観察する目的で、生後3～35週の102例のラットを総合し、その器官重量について検索を行なった。本報ではそのうち肝重量について得られた結果を報告し、さらに正常ラットの増加推移にみられた性質をより明確に把握するために、正常ラットにおける各個体の肝重量と体重との関係と、肝体重比重量の低下を示した実験例での関係とを比較、検討した。

#### 実験材料および方法

##### 1. 成長に伴う肝重量の増加推移の観察

ラットは昭和51年から53年の間に著者らが吸入実験、およびその他の実験で対照群として用いた22～248日令までのSlc-Wistar系雄、102例を集合したものである。各実験の際の例数は5～20例であった。また実験および飼育の時期は一定でない。ラットは、そのほとんどが、室内空気のみを通した吸入実験用チャンバー内で飼育したもので、その飼育条件については既報<sup>2)</sup>に記載した通りである。すべてのラットについて日本クレア製固型飼料(CE-2)、水道水を自由に摂取させた。実験終了後、動物は体重を測定し、大腿部動静脈の切断により脱血死させ、解剖後ただちに器官重量を測定した。屠殺方法はすべてのラットで同一である。

##### 2. 実験例: クロム鉛さい粉じん吸入実験

実験は5週令 Slc-Wistar 系雄ラットを用い、1群20匹

とし、室内空気のみを対照群と、鉛さい粉じん1mg/m<sup>3</sup>(Cr-L群)、10mg/m<sup>3</sup>(Cr-H群)曝露群を設定し、90日間昼夜連続で行なった。吸入実験の詳細は既報<sup>2)</sup>に記載した通りである。実験終了後の動物の処理は前述した方法と同じである。またこれらの動物については、常法に従い、血清生化学的検査、病理組織学的観察を行なった。

#### 実験 結果

##### 1. 成長に伴う肝重量の増加推移

実験に用いたラットの体重および肝重量の日令に伴う増加曲線をFig. 1, 2に示した。図中の値は各群の平均値

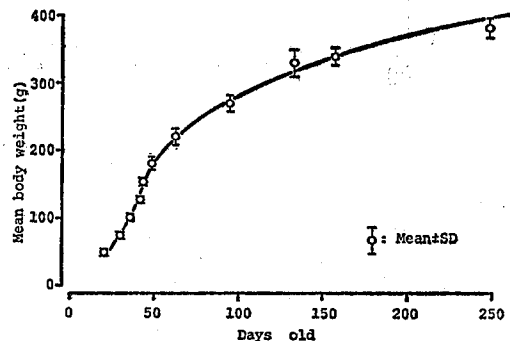


Fig. 1. Increasing Curve of Body Weight

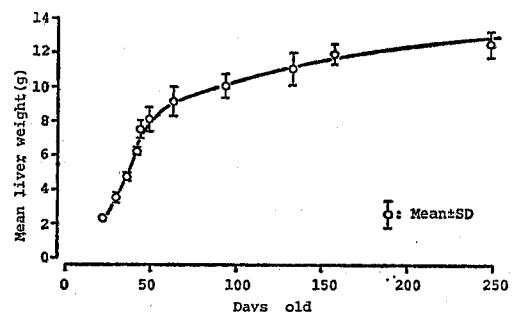


Fig. 2. Increasing Curve of Liver Weight

\* 毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究(東京衛研年報, 25, 577, 1974)を本論文の第1報とする。

\*\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\*\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

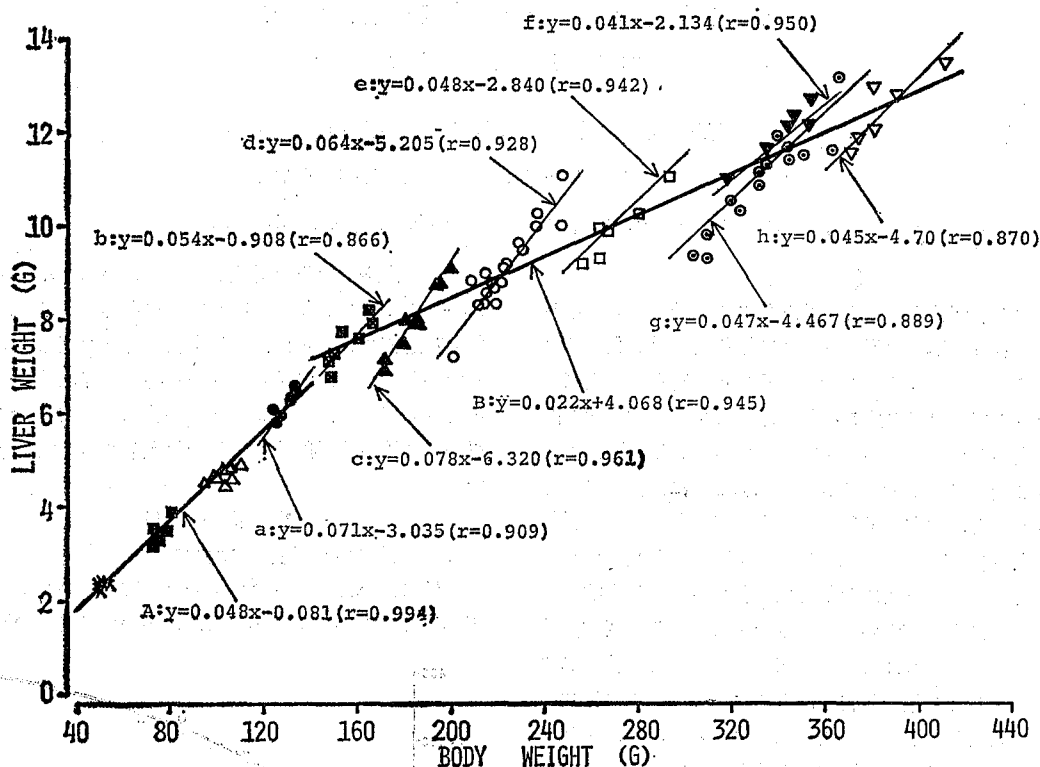


Fig. 3. Scatter Diagram of Body Weights and Liver Weights

± S. D. で示した。体重は、ほぼ50日令、180 g 近辺まで急な割合で増加し、その後増加の割合は低下するものの、250 日令までは、加齢に伴い、直線的な増加傾向を示している。肝重量の増加推移は、体重のそれと同様な傾向線をえがいていて、その変曲点も体重と一致しているが、50日令以降の増加の割合は、体重に比べ小さくなっている。

各個体の肝重量と体重についての関係をFig. 3 に示した。各個体の肝重量を体重に伴う一連の増加推移としてみると体重140g (40~50日令) を境として大きく2つの推移にわけられ、各々回帰直線A, Bで表わされるような直線的関係を示している。また各実験群つまり同一週令内での各個体の肝重量をみると、その分布は、体重120g 以下では、一点に集合して回帰直線A上に存在しているが、体重の増加に伴いバラツキが大きくなっている。この場合、各個体の肝重量は図に示すように、各々の体重と直線関係をもって分布し、各々回帰直線a~hによって表わされている。それらの傾斜は全個体を成長に伴う平均的な増加推移としてとらえた回帰直線A, Bに比べ大きく、特に140g以上の動物で顕著にみられた。また各

々の直線の傾きは、体重140g以下での増加推移を表わす直線Aの傾きに近い値を示していた。各週令間で肝重量と体重との関係を比較すると、ある週令のラットのうち最も大きい体重が、より高週令の最も小さいラットの体重とほぼ等しい場合が観察される。その場合、肝重量は、より若い週令に属するラットでより大きい値を示していた。

## 2. 実験例：クロム鉱さい粉じん吸入実験

各群の1週間毎に測定した体重増加曲線をFig. 4 に示した。曝露群では実験後半より対照に比べ、増加が抑制される傾向がみられ、その程度は曝露濃度に比例していた。肝重量は Table 1 に示すように、曝露群 (Cr-L, Cr-H群) で、絶対重量、体重比ともに対照群に比べ有意に小さく、その程度は濃度に比例していた。各実験群の個体別の肝重量と体重の関係をFig. 5 に示した。各群とも肝重量の体重に対する分布は、各回帰直線A, B, Cで示されるように、直線関係にあり、肝重量は体重に伴っていた。各曝露群での肝重量の体重に対する分布は、対照に比べ左下方に多く分布する傾向を示し、その回帰直線B, Cの傾きは、濃度に伴い徐々に左下りの傾

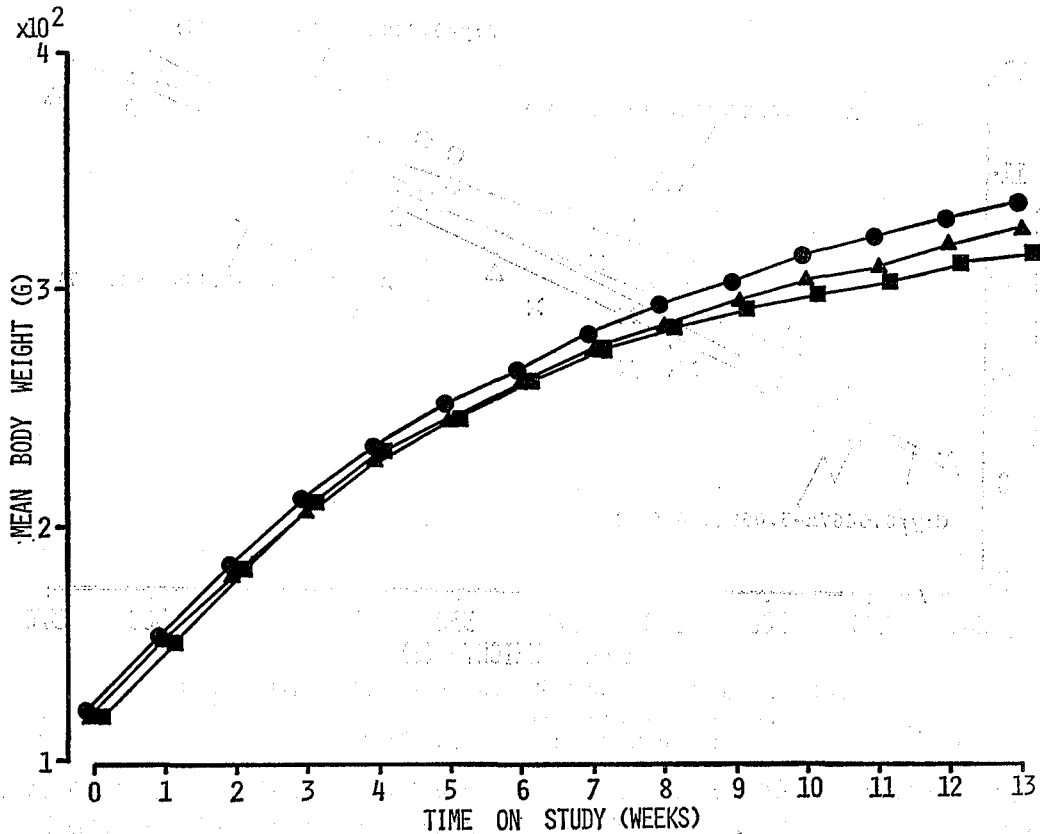


Fig. 4. Growth Curve for Rats in Inhalation Experiment

●-●:Control, ▲-▲:Cr-L, ■-■:Cr-H

Table 1. Body Weight, Liver Absolute and Relative Weight of Rats in Inhalation Experiment

| Group   | No. of rats | Body weight<br>g | Liver weight  |                             |
|---------|-------------|------------------|---------------|-----------------------------|
|         |             |                  | Absolute<br>g | Relative <sup>a)</sup><br>g |
| Control | 10          | 330±17           | 11.05±0.69    | 3.34±0.19                   |
| Cr-L    | 10          | 321±22           | 10.09±0.89*   | 3.14±0.12*                  |
| Cr-H    | 10          | 311±17*          | 9.49±0.87**   | 3.04±0.12**                 |

Values in table are presented as mean±SD.

a), g/100g Body weight. Statistical significance,

\* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01

斜を増していた。

全体をこみにして求めた肝重量と体重の関係は、図中回帰直線Dで表わされるが、その傾きは、Fig. 3で示した回帰直線Aの傾きと同様であった。

なお血清生化学的検査および肝臓の病理組織学的観察

の結果には、特に変化は認められなかった。

### 考 察

肝臓はその成長に伴う重量増加の推移が、体重との間に直線関係を示すが、50日令近辺を境にして、増加の急な期間と緩やかな期間にわけられた。田所<sup>9)</sup>らはWistar系ラットの種々の器官について、その成長に伴う重量増加推移には、性差のあらわれる時期や器官によっては、増加の割合が大きく変化する時期が観察され、それらが生後45～60日令近辺でみられ、またその時期はラットの生殖機能の発現から性成熟にいたる期間に相当するとしている。肝臓の増加推移には性差がみられないが<sup>1,9)</sup>、今回観察した40～50日令での増加推移の変化も、ラットの成長に伴って発現する生理的变化のあらわれと考えられる。

50日令以降の肝重量の増加推移では同一週令の各個体の体重に対する肝重量の分布は、成長に伴った肝重量の平均的な増加推移に対して平行ではなく、右上りの傾きをもつ直線的分布を示す性質があった。体重および器官

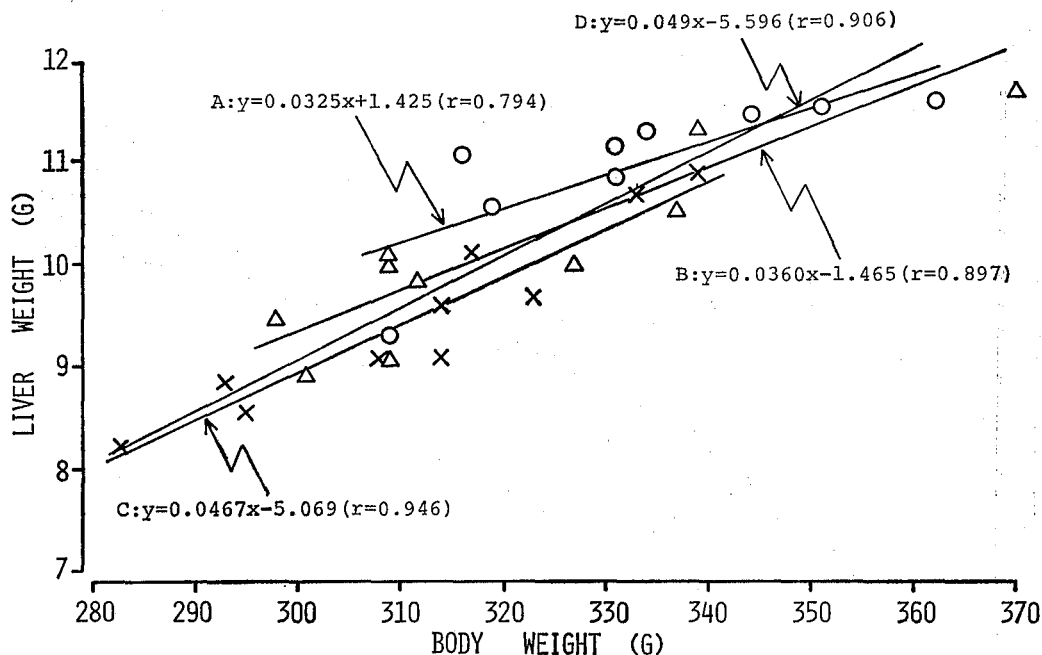


Fig. 5. Scatter Diagram of Body Weights and Liver Weights of Rats in Inhalation Experiment  
A(O):Control, B( $\Delta$ ):Cr-L, C( $\times$ ):Cr-H

重量はラットの成長に伴い個体差も大きくなる。つまり同一週令のラットで、何らかの原因によって、その成長の度合の大きい個体と小さい個体が生じ、それに伴い器官重量の個体差も大きくなると考えられる。肝臓では正常ラットにおける結果から、成長の度合の小さい個体の肝重量の増加の割合は、体重のそれに比べより小さく、また成長の度合の大きい個体では体重に比べより大きいという性質があるように思われる。しかしこの性質は、同一週令のラットでは、各個体の肝重量が体重に比例しているために確認できないが、実験例で示したように、肝の体重比重量の低下の際には、同一週令のラット間に成長の程度に差が生じたために、以上の性質が検出されたものと思われる。また肝臓の体重比重量の低下は、制限食摂取実験<sup>4,5)</sup>において、体重の増加抑制または減少に伴って、器官重量が減少するが、その内、特に変化の著しい肝臓で特徴的にみられる変化である。このような場合の肝の体重比の低下という変化も、本来正常ラットに具わっている肝重量の性質の顕著なあらわれと考えられる。逆に肝重量が増加した場合の変動のしかたについて、著者らの行った、食品添加物である Butylated Hydroxytoluene (BHT) 添加飼料摂取実験の結果を参考にとすると、この場合、各個体の肝重量と体重との関係は、対照群、BHT 摂取群とも直線関係にあり、肝重

量が増加した場合でも肝重量が体重に伴うという性質は保たれていた。また BHT 摂取群の回帰直線の傾きは対照群に比べ大きく、肝重量の増加は体重の大きい個体でより大きいという性質を示していた。この事は、肝臓が薬物によって反応性に大きくなる場合においても肝重量の変動のしかたには、正常ラットにみられる性質が反映していると思われる。いずれにしろ肝重量の変動の背景には、その個体の成長の程度が大きく影響しているものと思われる。また種々の条件下で肝重量が変化した場合、各個体の肝重量と体重との関係において、正常ラットにみられる性質が保たれている場合には、肝の重量変化は、肝の障害的变化を示すものではないと考えられる。

#### ま と め

生後22~248日の Wistar 系雄ラット、102例の体重および肝重量から、ラットの成長に伴う肝重量の増加推移を観察し、正常ラットの肝重量の変動のしかたには、成長の程度 of 大きい個体の肝重量は体重の増加した割合以上に大きく、また成長の程度 of 小さい個体では、その割合は体重に比べより小さいという性質があることが推測された。この正常ラットにおける性質は、体重の増加抑制に伴い体重比の低下した肝臓と体重との関係を観察することにより、より明確に検出されたと考えた。

## 文 献

- 1) 坂本義光, 三栗谷久敏, 矢野範男, 吉田誠二, 平賀興吾: 東京衛研年報, 25, 577, 1974
- 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) 田所作太郎, 栗原嘉雄, 栗原憲雄, 小川治克, 宮下景司: 北関東医学, 12, 250, 1962
- 4) Schärer, K.: *Toxicology*, 7, 45, 1977
- 5) Oishi, S., Oishi, H., and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 15, 1979
- 6) 坂本義光, 中川好男, 藤井 孝, 福森信隆, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 16, 1975

## ラットにおける死後変化の経時的観察 2. 光顕的検索

多田幸恵\*, 矢野範男\*, 湯澤勝廣\*, 長澤明道\*

藤井孝\*, 平賀興吾\*

### Microscopical Observations of Postmortem Changes on Rats in Course of Time

YUKIE TADA\*, NORIO YANO\*, KATSUHIRO YUZAWA\*, AKEMICHI NAGASAWA\*,  
TAKASHI FUJII\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** 死後変化 postmortem changes, ラット rat, 光顕的観察 microscopical findings

#### 緒言

毒性試験では試験途中での死亡動物の検索が重要であるが、死亡例検索の場合、死後変化の発現により肉眼的・光顕的变化が多様化し、被験物質の影響をみるのに困難を生ずることが多い<sup>1)</sup>。このため当部動物施設の飼育条件下におけるラットの死後変化を観察し、変化の概要を把握し、今後の死亡例検索の参考にしたいと考えた。前回、クロロホルム麻酔下でラットを致死させ、死体硬直・体重および体温の測定、体表・体内の肉眼的観察を行い死後経過時間とその変化について結果を報告した<sup>2)</sup>。今回は、前回の検索時に摘出した器官・組織を光顕的に観察した。

#### 実験方法

##### 実験動物および飼育環境

バリヤースシステム下に生育された Slc:Wistar ラット雄を静岡実験動物農業協同組合より5週令で購入し、室温 $25\pm 1^\circ$ 、湿度 $50\pm 5\%$ の環境下で固型飼料CE-2(日本クレア株式会社)を与え5週間飼育した。異常がみられなかった個体を選出し実験に用いた。

##### 実験方法および光顕的検索

ラットをデシケータ内でクロロホルム麻酔により致死させ、心拍動の停止時点を死亡時刻とした。解剖までの間、死亡ラットはステンレス製ケージ床面の網に伏臥位に載せ、飼育棚に並べ、室温 $25\pm 1^\circ$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 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0, 1, 3, 6, 12, 24, 48時間にラットを6匹ずつ解剖し、肉眼的検索を行った後、器官・組織を摘出した。(以下死後0時間を0h、死後1時間を1h、のごとく0~48hと略す。)摘出した器官・組織は脾臓、リンパ節、胸腺、右大腿骨(骨髓)、骨格筋(右大腿部)、心臓、肺、舌、顎下腺、舌下腺、耳下腺、肝臓、脾臓、食道、

胃、空腸、回腸、盲腸、結腸、腎臓、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、下垂体、副腎、甲状腺、脳で、10%緩衝ホルマリンで固定、定法に従いパラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン重染色標本とした。これらの標本を光顕的に観察した。

#### 実験結果

観察結果は表1-1~表1-3に示すとおりであり、以下各器官毎に詳述する。結果中“崩壊”および“染色性低下”という表現を用いたが、崩壊とは組織が破砕し崩れている状態をいい、染色性低下とは組織の好塩基性・好酸性低下により核および原形質などがヘマトキシリン・エオジンに染色されない状態をいった。

##### 脾臓・リンパ節・胸腺・骨髓

これら4器官では血球の変化を中心に観察した。0および1hで、小リンパ球はクロマチン網工が粗大顆粒状の輪郭明瞭な円型核を有し、核の中央に核小体が著明にみられた。3hで小リンパ球の核のクロマチン網工にわずかな凝集がみられ、6hで大部分のリンパ球に軽度の核濃縮がみられた。一部のリンパ球核は辺縁が凹凸で不整形を呈し中リンパ球核は輪郭不明瞭となり好塩基性が低下していた。12hで小リンパ球の核濃縮が顕著にみられ、核小体が不明瞭になり、細胞質は好酸性を増し、赤芽球によく似た像を呈していた。24hで小・中リンパ球核の好塩基性低下がみられ、一部のリンパ球核は染色性が低下していた。赤血球は存在部位により好酸性低下までの時間かなりの差がみられ、密に赤血球が存在する部位では12hで好酸性低下がみられた。骨髓では6hで顆粒球系、赤芽球系、骨髓巨核球系の細胞の核濃縮および核の空胞化がみられ、24hで核濃縮が顕著に認められた。

既述の血球の変化と並行して、脾では6hで脾小節境

\* 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 1-1. 光顕的検索結果

| 光顕的観察所見         | 死後経過時間(時間) |   |    |    |    |    |    |
|-----------------|------------|---|----|----|----|----|----|
|                 | 0          | 1 | 3  | 6  | 12 | 24 | 48 |
| <b>脾 臓</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 脾小節境界不明瞭        | 1)         | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 赤脾髄に黄褐色顆粒       | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| リンパ球核濃縮         | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| リンパ球核の輪郭不明瞭     | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| リンパ球核の好塩基性低下    | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| 赤血球好酸性低下        | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| <b>リンパ節</b>     |            |   |    |    |    |    |    |
| リンパ母胞境界不明瞭      | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| リンパ球核濃縮         | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| リンパ球核の輪郭不明瞭     | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| リンパ球核の好塩基性低下    | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| 赤血球好酸性低下        | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| <b>胸 腺</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 皮髄境界不明瞭         | -          | - | -  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 組織構築崩壊          | -          | - | -  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 髄質に広汎性出血        | -          | - | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| リンパ球核濃縮         | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| リンパ球核の輪郭不明瞭     | -          | - | -  | +  | ++ | ++ | ++ |
| リンパ球核の好塩基性低下    | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| 赤血球好酸性低下        | -          | - | -  | -  | -  | ++ | ++ |
| <b>心 臓</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 筋細胞好酸性低下        | -          | - | -  | -  | -  | +  | +  |
| 筋細胞核萎縮および好塩基性低下 | -          | - | -  | +  | +  | +  | ++ |
| 血管壁筋細胞解離        | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| <b>肺</b>        |            |   |    |    |    |    |    |
| 肺胞毛細血管に血球       | -          | - | +  | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 気管粘膜崩壊          | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 肺胞腔内にエオジン染色の残渣  | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 肺胞上皮核濃縮         | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| 肺胞壁非薄化          | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| <b>顎下腺</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 分泌管および導管崩壊      | -          | - | +  | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 分泌管上皮核萎縮        | -          | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 腺房細胞核濃縮         | -          | - | -  | -  | -  | -  | +  |
| <b>舌下腺</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 分泌管および導管崩壊      | -          | - | +  | +  | +  | ++ | ++ |
| 腺房細胞萎縮          | -          | - | -  | -  | -  | -  | +  |
| 腺房細胞核の好塩基性低下    | -          | - | -  | -  | -  | +  | +  |

1) - : 変化なし, + : 軽度な変化, ++ : 中等度な変化, +++ : 顕著な変化

表 1-2. 光顕的検索結果

| 光顕的観察所見         | 死後経過時間(時間) |   |    |    |    |    |    |
|-----------------|------------|---|----|----|----|----|----|
|                 | 0          | 1 | 3  | 6  | 12 | 24 | 48 |
| <b>耳下腺</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 分泌管および導管崩壊      | 1)         | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 腺房細胞に小空胞        | -          | + | +  | +  | +  | -  | -  |
| 腺房細胞核の好塩基性低下    | -          | - | -  | -  | -  | +  | ++ |
| <b>肝 臓</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 類洞の拡張 (小葉中心部)   | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| (小葉周辺部)         | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 組織辺縁部の染色性低下     | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| グリソン嚢に黄褐色顆粒     | -          | - | -  | -  | -  | -  | ++ |
| 肝細胞核萎縮          | -          | - | -  | -  | -  | ++ | ++ |
| 類洞内皮細胞核濃縮       | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 胆管細胞核濃縮         | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| <b>脾 臓</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 腺房細胞に小空胞        | -          | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 腺房および脾島の染色性低下   | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 腺房細胞萎縮          | -          | - | +  | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 腺房細胞核濃縮         | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 脾島細胞崩壊          | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 脾島細胞核濃縮         | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| <b>食 道</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 粘膜上皮基底層細胞の核濃縮   | -          | - | -  | +  | +  | +  | ++ |
| 粘膜上皮中間層細胞の核消失   | -          | - | -  | -  | +  | +  | ++ |
| 粘膜上皮角化層剥離       | -          | - | -  | -  | +  | +  | +  |
| 粘膜固有層結合組織細胞の核濃縮 | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 筋層の筋線維束萎縮       | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| <b>胃</b>        |            |   |    |    |    |    |    |
| 前・腺胃境界部粘膜剥離     | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| 腺胃粘膜の表在上皮剥離     | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 腺細胞の解離          | -          | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 胃腺主細胞萎縮および核濃縮   | -          | - | -  | +  | +  | ++ | ++ |
| 胃腺壁細胞核消失        | -          | - | -  | -  | +  | ++ | ++ |
| <b>空・回腸</b>     |            |   |    |    |    |    |    |
| 絨毛崩壊            | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 絨毛粘膜上皮剥離        | -          | - | +  | +  | +  | +  | ++ |
| 組織の染色性低下        | -          | - | +  | +  | +  | ++ | ++ |
| 腸腺脱落            | -          | - | +  | +  | +  | +  | +  |
| <b>盲 腸</b>      |            |   |    |    |    |    |    |
| 粘膜上皮剥離          | -          | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 組織の染色性低下        | -          | - | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 腸腺脱落            | -          | - | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

1) - : 変化なし, + : 軽度な変化, ++ : 中等度な変化, +++ : 顕著な変化

表 1—3. 光顕の検索結果

| 光顕の観察所見          | 死後経過時間(時間)     |   |   |   |    |    |    |
|------------------|----------------|---|---|---|----|----|----|
|                  | 0              | 1 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| <b>結 腸</b>       |                |   |   |   |    |    |    |
| 粘膜の表在上皮剥離        | — <sup>D</sup> | — | — | + | +  | +  | +  |
| 組織の染色性低下         | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| <b>腎 臓</b>       |                |   |   |   |    |    |    |
| 皮髄境界部に赤血球集簇      | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| 尿管散在性崩壊          | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| 髓質部尿管萎縮          | —              | — | — | + | +  | +  | +  |
| 組織の染色性低下         | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 尿管上皮脱落(皮質部)      | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| (皮髄境界部)          | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| 尿管上皮核濃縮(皮質部)     | —              | — | + | + | +  | +  | +  |
| (皮髄境界部)          | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| (髓質部)            | —              | — | + | + | +  | +  | +  |
| <b>精 巢</b>       |                |   |   |   |    |    |    |
| 精細胞剥離            | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 精細胞の局所性消失        | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 精細管固有膜の菲薄化       | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 間質細胞の解離          | —              | — | + | + | +  | +  | +  |
| 間質細胞崩壊           | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| <b>下垂体</b>       |                |   |   |   |    |    |    |
| 前葉細胞萎縮           | —              | — | — | + | +  | +  | +  |
| 前葉細胞崩壊           | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 中間部細胞崩壊          | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 後葉細胞核濃縮          | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| <b>副 腎</b>       |                |   |   |   |    |    |    |
| 球状層細胞萎縮および核濃縮    | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 束状層細胞萎縮および核濃縮    | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 網状層細胞萎縮および核消失    | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| 髓質細胞萎縮           | —              | + | + | + | +  | +  | +  |
| <b>甲状腺・上皮小体</b>  |                |   |   |   |    |    |    |
| 小胞上皮剥離           | —              | — | + | + | +  | +  | —  |
| 小胞上皮崩壊           | —              | — | — | + | +  | +  | +  |
| 上皮小体の腺房萎縮        | —              | — | — | — | —  | +  | +  |
| <b>脳</b>         |                |   |   |   |    |    |    |
| 血管腔拡張            | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 大脳錐体細胞萎縮および好酸性増加 | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 大脳・小脳の神経膠細胞核濃縮   | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 小脳髄質の神経線維粗糲化     | —              | — | — | — | +  | +  | +  |
| 小脳髄質に空隙          | —              | — | — | — | —  | +  | +  |

1) —: 変化なし, +: 軽度な変化, ++: 中等度な変化, +++: 顕著な変化

界の不明瞭化がみられ, 24h で赤脾髄に黄褐色の顆粒がみられた。胸腺では 3h で髄質に浸潤性出血が軽度のみられ, 6h では髄質広汎に出血がみられた。前回の肉眼的検索の際, 6h で胸腺に赤色斑が観察されたが, これは髄質におけるこの出血であると推定される。

#### 心臓・骨格筋

6h で筋細胞の核萎縮がみられ, 24h で筋細胞の顕著な核萎縮および染色性低下, 核周囲の細胞質に空隙がみられた。また血管壁筋細胞の萎縮および核濃縮が認められた。心筋細胞は 24・48h でも軽～中等度の好酸性を示していた。骨格筋および腸管粘膜下の筋組織も心筋とほぼ同様の変化を示した。

#### 肺

1h で気管支粘膜上皮の変性および剥離がみられ, 3h で肺胞を囲む毛細血管に多数の赤血球がみられた。また肺胞壁が菲薄となり一部で肺胞境界が不明瞭となっていた。6h で肺胞壁の菲薄化が顕著にみられ, 肺胞腔にエオジン染色の細胞残渣が認められた。24h で気管支粘膜の皺襞構造崩壊, 肺胞細胞で核濃縮および核質の一部消失が見られた。

#### 口腔腔

顎下腺: 1h で分泌管の萎縮および分泌管上皮細胞核のクロマチン凝集がみられ, 3h で分泌管および導管の上皮細胞脱落, 管腔内に細胞残渣が多くみられた。12h で分泌管の崩壊が顕著にみられ, 管構造は判然とせず, 管と周囲組織との境界が不明瞭となっていた。腺房変化は軽度で, 24h で腺細胞の核萎縮が見られた程度であった。

耳下腺: 顎下腺とほぼ同様の変化を示し, 腺房と比較し導管・中間部で顕著な変化がみられた。顎下腺で見られなかった変化として 1h で耳下腺に輪郭明瞭な腺房大の空胞, 腺房細胞に輪郭不明瞭な小空胞が観察された。

舌下腺: 3h で導管の崩壊がみられ, 24h で腺房細胞に小空胞および核消失がみられ腺房境界が不明瞭となっていた。舌下腺では分泌管・導管に比較し腺房の変化が顕著であった。

#### 肝臓

1h で肝細胞索の幅が狭く, いわゆる痩せた状態となり類洞が拡張し, 洞内に多数赤血球がみられた。6h で類洞内皮細胞の核および小胆管細胞の核に濃縮がみられた。12h で組織辺縁部の肝細胞の好酸性低下, 核および好塩基顆粒の好塩基性低下がみられた。24h で類洞内の赤血球の好酸性低下がみられた。また肝細胞核の萎縮および好塩基性低下がみられ, 核周囲の細胞質に空隙が認められた。48h で組織の染色性低下が顕著にみられ, 小



胆管の核は互いに癒着し好塩基性の不整形な塊状を呈した。またグリソン嚢には黄褐色顆粒が認められた。

#### 脾臓

1h で一部の腺房に、輪郭不明瞭な小空胞をもつ腺房細胞がみられ、3h ではほとんどの腺房に同様の変化が認められた。また辺縁部で腺房細胞の萎縮および核濃縮がみられ、細胞質は好塩基性を増していた。腺房細胞は相互に解離し個々の細胞が孤立したようになり、腺房構造が不明瞭になっていた。脾島細胞では全体に核濃縮がみられ、島周辺部の細胞は崩壊しているものが多かった。6h で限局性に染色性の低下および腺房細胞の崩壊が認められた。24h で腺房細胞の崩壊および染色性の低下が組織全体にみられ、島細胞も崩壊し染色性が低下していた。

#### 食道

6h で粘膜上皮基底層細胞の核濃縮、12h で基底層細胞の核濃縮が顕著にみられ、中間層細胞で核消失がみられた。角化層では好酸性低下および剥離がみられた。24h で濃縮した核周囲細胞質に空隙がみられ、粘膜上皮および固有層の結合織に好酸性低下がみられた。また筋層で筋線維束萎縮、線維束間の空隙が認められた。

#### 胃

前胃粘膜上皮は食道とほぼ同様の変化を示した。以下腺胃での変化を示した。1h で粘膜上皮の細胞境界が明瞭となり、3h で粘膜上皮の剥離がみられた。6h で胃腺頸部の腺細胞（主に壁細胞）の剥離、胃腺主部の壁細胞核の好塩基性低下および主細胞の核濃縮が認められた。12h で胃腺主部および副部の腺細胞萎縮がみられ、前・腺胃境界部で前胃粘膜の剥離が認められた。24h で粘膜上皮および胃腺の顕著な脱落がみられ、筋層と粘膜固有層のみが残存していた。また組織の染色性低下が顕著であった。

#### 腸管

空・回腸：3h で局所性に絨毛構造が崩壊し、絨毛を形成している粘膜上皮と固有層が管腔中に脱落していた。また一部で絨毛の表在上皮および腸腺の顕著な脱落がみられ、粘膜固有層および筋層のみが残存していた。6h で組織のやや広汎に染色性低下がみられ、12h で絨毛の崩壊および染色性の低下が広汎にわたり顕著に認められた。

盲腸・結腸：空・回腸とほぼ同様の変化を示し、その中で盲腸の変化は最も顕著であった。盲腸では1h で粘膜上皮および腸腺の脱落がみられ、12h で組織の染色性低下がみられた。結腸では粘膜の崩壊が観察されず、組織の染色性低下も空・回腸に比較し軽度であった。

#### 腎臓

皮質内側部から髓質にかけて広汎に見られた赤血球が1h で皮髓境界部に集簇していた。皮髓境界部では尿管上皮細胞の核濃縮がみられた。3h で皮質外側の尿管に散在性の崩壊がみられ、核は濃縮し、細胞質は細顆粒状となり好酸性が低下していた。また皮質部の尿管で軽度な核濃縮、皮髓境界部の尿管で顕著な核濃縮が認められた。6h で髓質内帯特に腎乳頭部で集合管が萎縮し、細胞質の好酸性増加、核濃縮がみられた。尿管上皮細胞の変化は近位よりも遠位に顕著であった。24h で皮質に被膜方向を底とするくさび状に染色性低下が認められた。この部分は腎迷路にあたっており、これを除く髓放線の尿管ではかなり染色性が保たれていた。48h で尿管および糸球体の崩壊、染色性低下が顕著にみられたが、皮質内側の主部の直尿管では構築および染色性がかなり保たれていた。組織の染色性低下および組織構造の崩壊は、皮質外側部で他の部位よりも顕著に認められた。

#### 精巣

0h では数個の集団をなしていた間質細胞が、3h で個々に解離しており、12h で間質細胞の崩壊および核濃縮がみられた。また基底膜に接していた精細胞が膜から遊離し、固有膜の菲薄化が認められた。24h で精細胞の消失がみられ、精細胞の精細胞集団の中に小空隙が生じていた。48h で組織の染色性低下が顕著にみられたが、精子の好塩基性はかなり保たれていた。

#### 精囊

1h で精囊上皮の剥離がみられ、腔内に剥離細胞が多数みられた。6h で精囊上皮の剥離が顕著にみられ、粘膜の皺襞構造が崩壊し、筋層および固有層のみが残存していた。24h で一部に残存していた粘膜上皮の好塩基性および好酸性が増加し、細胞はヘマトキシリン・エオジン共染の残渣のようであった。

#### 精巣上体

組織の崩壊は軽度で、48h で上皮細胞の核の空胞化および濃縮がみられた程度であった。染色性の低下は顕著に認められた。

#### 副腎

1h で髓質細胞の萎縮および核濃縮がみられ、12h で皮質網状層の細胞の核濃縮が認められた。24h で皮質球状層の細胞の萎縮および核濃縮がみられ、網状層で細胞崩壊が認められた。48h で髓質の細胞核の消失がみられ、細胞はエオジン淡染の残渣のようであった。

#### 甲状腺・上皮小体

3h で小胞上皮細胞の核濃縮および剥離が軽度のみら

れ、6hで上皮細胞の剥離が顕著にみられた。一部で小胞上皮が崩壊し小腔内にエオジン淡染の残渣が認められた。また間質には赤血球が多数認められた。24hで小胞の崩壊が顕著にみられ、小胞を取り囲む結合組織が残存し網目状を呈していた。上皮小体は他の内分泌器官と比較し変化が軽度で、24hで腺細胞に萎縮が見られた程度であった。

#### 下垂体

6hで前葉細胞の萎縮および核濃縮がみられ、24hで前葉に加え、中間部の細胞の萎縮および染色性低下が認められた。

#### 脳

6hで大脳および小脳の神経膠細胞の核濃縮がみられ、大脳錐体細胞の萎縮および好酸性増加が認められた。24hで膠細胞の核濃縮および好酸性低下が顕著にみられ、小脳に空隙が認められた。

肉眼的検索で軟化がみられた腸管・腎臓・脳などを光顕で観察した結果、組織の好酸性低下、核の顕著な濃縮、細胞質の細顆粒状化、空隙の出現など共通の変化が認められた。これらの器官・組織では組織学的検索が困難であった。

#### 総括および考察

死後経過時間により多様な変化が観察されたが、明らかな変化としては次のようにまとめられる。

**死後1時間：**肝臓の拡張、脾臓腺細胞に小空胞出現、腺胃粘膜上皮剥離、盲腸粘膜上皮および腸腺脱着、腎臓皮髄境界部に赤血球集簇、精囊上皮剥離

**死後3時間：**肺胞毛細血管に赤血球集簇、肺胞壁菲薄化、顎下腺分泌管萎縮、脾臓腺房細胞に小空胞出現、腸絨毛崩壊、腎臓皮質部で尿管の散在性崩壊、甲状腺小胞上皮剥離

**死後6時間：**リンパ球・上皮細胞・結合組織細胞の核変性、胸腺髄質に広汎性出血、脾臓で限局性に染色性低下、腸管で限局性に染色性低下、腎臓髄質内帯で集合管萎縮

**死後12時間：**肺の気管支粘膜崩壊、前胃粘膜剥離、精巢間質細胞崩壊、甲状腺小胞上皮崩壊

**死後24時間：**各器官で上皮組織、血球、結合組織の染色性低下

**死後48時間：**組織の染色性低下および組織構築の崩壊顕著、但し、心臓および筋組織では48時間後も染色性・組織構築がかなり保たれていた。

以上のように、死後6時間で上皮細胞・血球などの核に変性がみられ、死後24時間で上皮細胞・血球・結合組織の核および細胞質の染色性低下が認められたが、筋組

織は死後48時間でも中等度に染色性を保っていた。このように、死後変化は各系統器官ごとの相異により発現するのではなく、それらを構成する細胞・組織ごとに、異なった形や時間で現われてくるものと考えられる。しかし脾臓、腸管では死後変化が短時間で顕著に現われ、精巢、外涙腺では死後48時間でも組織構築の崩壊が軽度であるなどの器官特異性が認められたことも事実である。

今回の光顕的観察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、試験途中死亡例では薬物投与、疾病、栄養状態の悪化、老化などにより器官・組織が障害を受けている場合が多く、組織の融解が短時間で現われる例が多く認められた。特に非上皮性組織の腫瘍を有した個体では、他の組織で死後変化が顕著な場合も多く、疾患の種類によっても死後変化はかなり異なると考えられる。これらの点を考慮した上で、今回の光顕的検索結果および前回の肉眼的検索結果を、試験途中死亡例検索の際の参考とし、死後変化と薬物投与による変化、死後変化と老化・疾病などによる変化との鑑別に役立てたいと考えた。

#### ま と め

ラットの経時的な死後変化を観察するため、クロロホルムにより致死させ $25 \pm 1^\circ$ の実験室に放置し、死後0, 1, 3, 6, 12, 24, 48時間の器官・組織について光顕的検索を行った。死後変化が顕著に発現するのは死後6および24時間で、死後6時間でそれぞれの器官の上皮細胞・血球の核変性がみられ、細胞の同定が困難となった。死後24時間でそれぞれの器官の上皮組織、血球、結合組織の染色性低下および組織崩壊が認められ、組織構造検索が困難となった。

#### 文 献

- 1) 錫谷徹：法医診断学，41，1972，南江堂
- 2) 阿部幸恵，矢野範男，湯沢勝広，長沢明道，藤井孝，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，180，1978
- 3) Luna L. G.: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd Ed., 8, 1968, McGraw-Hill Book Company, New York

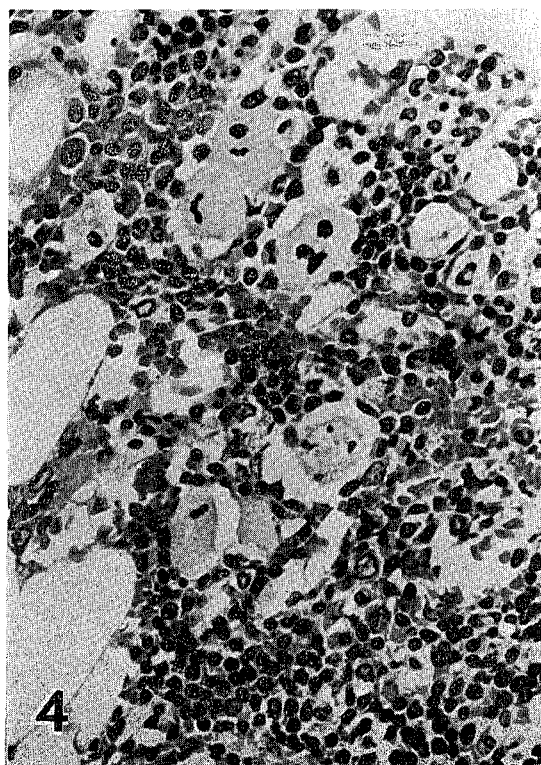
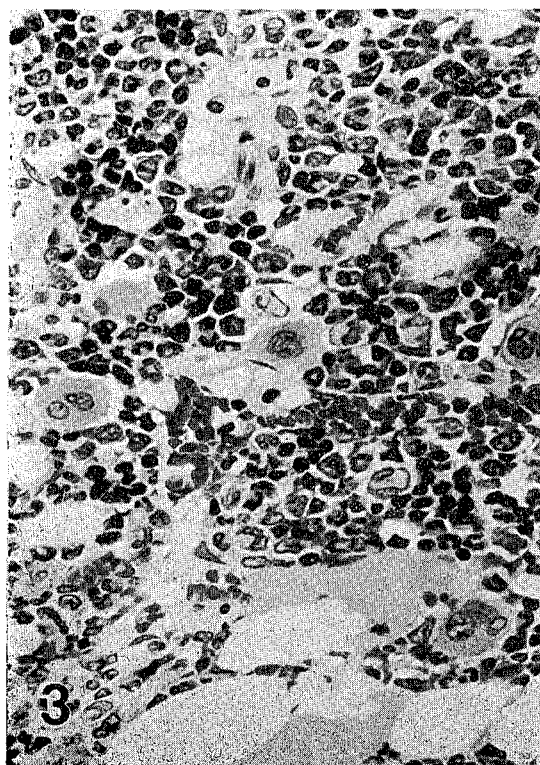
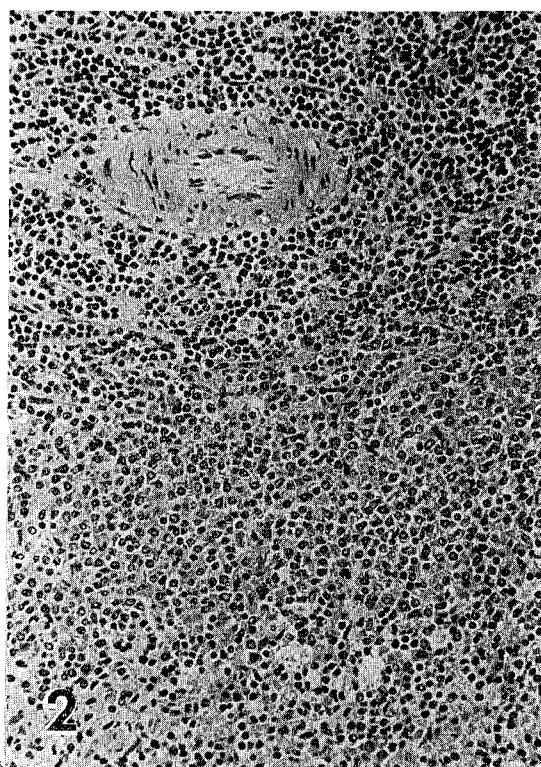
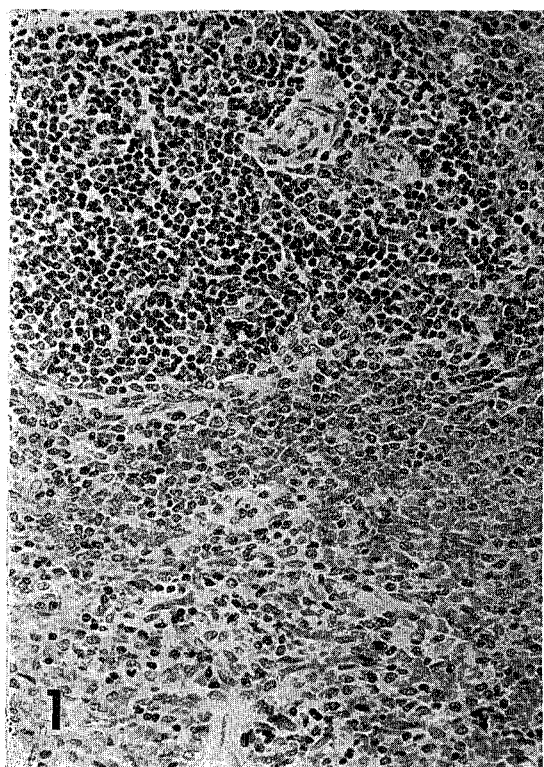
#### 写真説明

写真1-24.：ヘマトキシリン・エオジン重染色標本

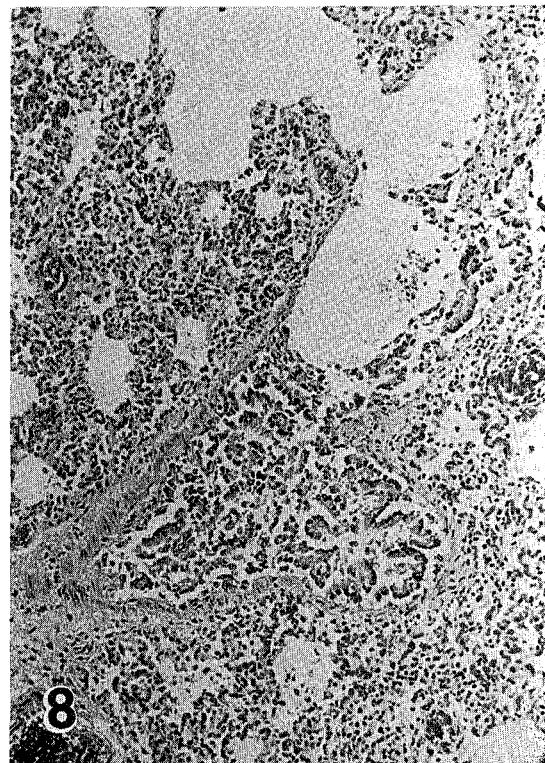
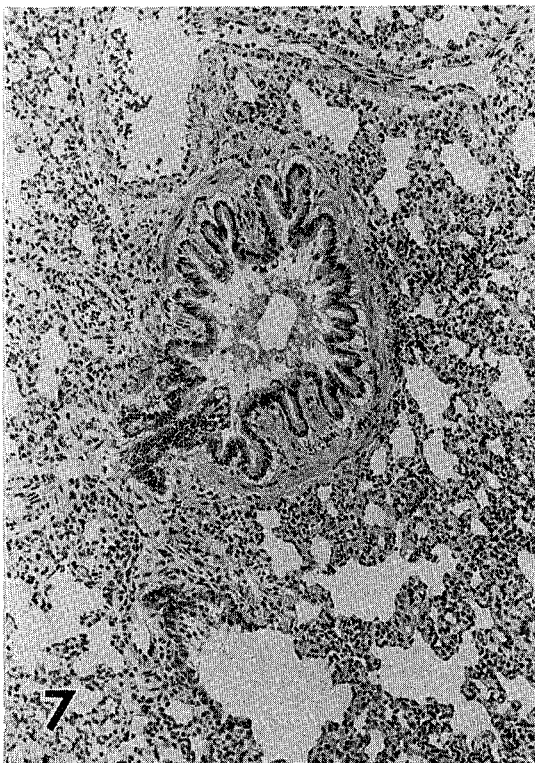
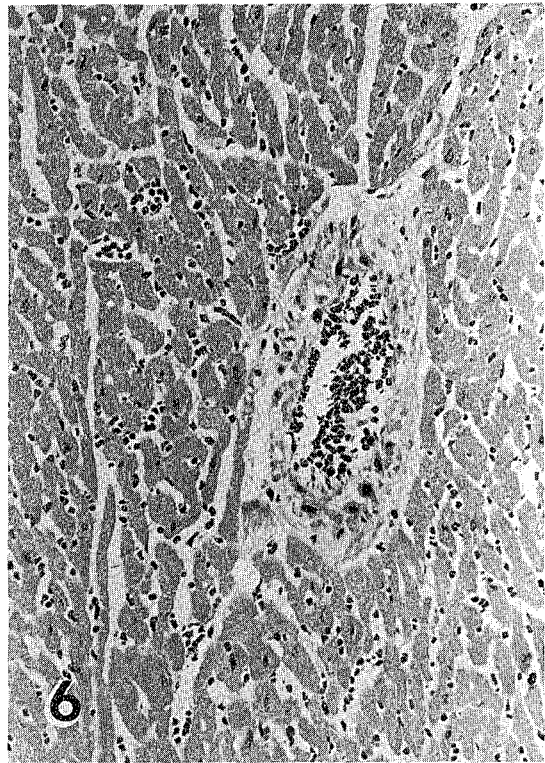
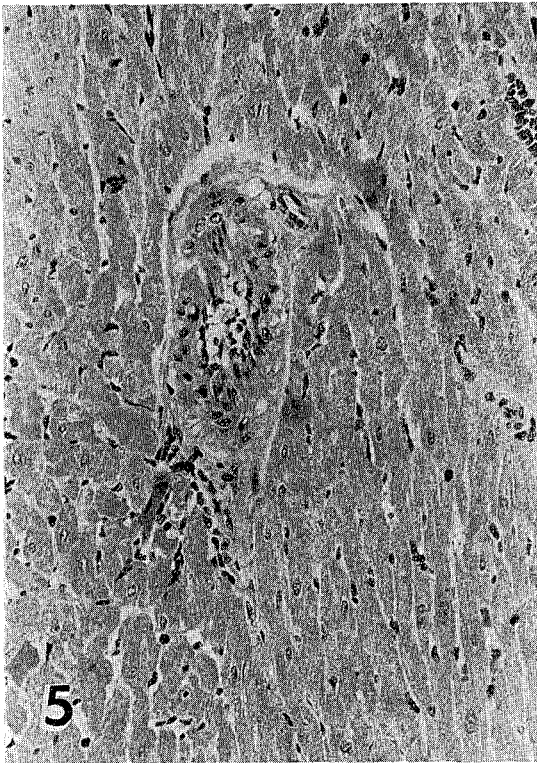
写真1. 脾臓（死後0時間 ×200）

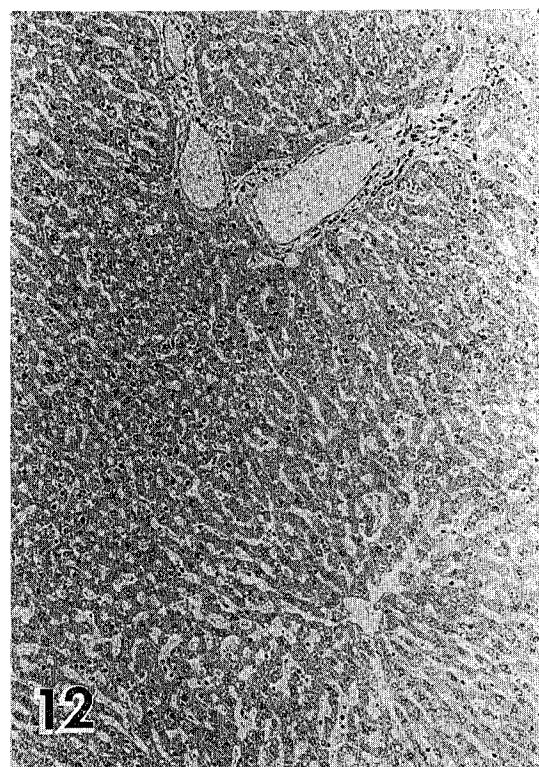
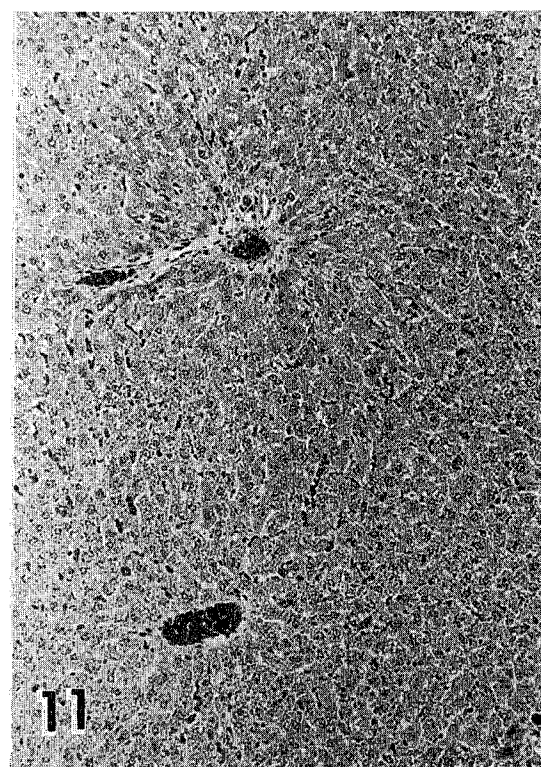
写真2. 脾臓（死後12時間 ×200）：脾小節の境界が不明瞭となり、リンパ球の核に濃縮および空胞がみられる。

- 写真 3. 骨髓 (死後 0 時間  $\times 400$ )
- 写真 4. 骨髓 (死後 12 時間  $\times 400$ ): 顆粒球系・赤芽球系・巨核球系細胞の核に濃縮および空胞がみられ, 細胞質がエオジン濃染している.
- 写真 5. 心臓 (死後 0 時間  $\times 200$ )
- 写真 6. 心臓 (死後 24 時間  $\times 200$ ): 心筋線維束の萎縮および筋細胞の核濃縮, 血管壁筋細胞の萎縮および核濃縮がみられる.
- 写真 7. 肺 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 8. 肺 (死後 24 時間  $\times 100$ ): 気管支粘膜の崩壊, 肺胞壁の菲薄化, 気管支および肺胞腔内にエオジン淡染の残渣がみられる.
- 写真 9. 顎下腺 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 10. 顎下腺 (死後 12 時間  $\times 100$ ): 分泌管および導管の崩壊がみられ, 管腔内にエオジン淡染の残渣がみられる.
- 写真 11. 肝臓 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 12. 肝臓 (死後 24 時間  $\times 100$ ): 肝細胞の萎縮, 類洞の拡張, 肝細胞の核濃縮がみられる. 類洞および小葉間静脈内の赤血球の好酸性が低下し, エオジン淡染の残渣のようにみえる.
- 写真 13. 胃 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 14. 胃 (死後 12 時間  $\times 100$ ): 腺細胞の萎縮および核濃縮, 粘膜表在面上皮の剥離がみられる.
- 写真 15. 空腸 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 16. 空腸 (死後 12 時間  $\times 100$ ): 絨毛の崩壊, 粘膜上皮の核濃縮がみられ, 写真左部の組織は染色性が低下している.
- 写真 17. 腎臓 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 18. 腎臓 (死後 24 時間  $\times 100$ ): 糸球体および尿管上皮の核濃縮がみられ, 細胞質は顆粒状を呈する. 写真右部の組織は染色性が低下している.
- 写真 19. 精巣 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 20. 精巣 (死後 24 時間  $\times 100$ ): 精細管の萎縮, 精細管固有膜の菲薄化, 間質細胞の崩壊がみられる. 写真中央部の精細管では精細胞が巢上に消失し細胞集団の中に空隙を生じている.
- 写真 21. 副腎 (死後 0 時間  $\times 200$ )
- 写真 22. 副腎 (死後 24 時間  $\times 200$ ): 球状層細胞の萎縮および核濃縮, 束状層細胞の萎縮および核のクロマチン凝集がみられる.
- 写真 23. 脳 (死後 0 時間  $\times 100$ )
- 写真 24. 脳 (死後 24 時間  $\times 100$ ): 神経細胞の萎縮および核濃縮, 血管腔の拡張がみられる.

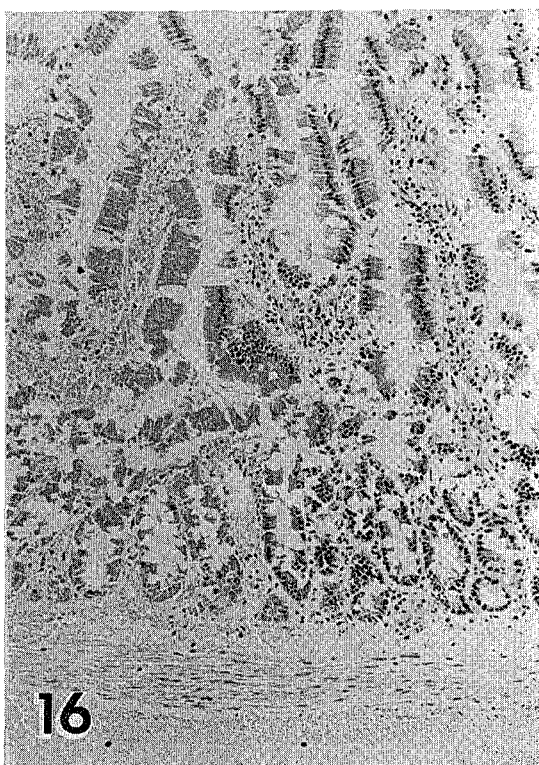
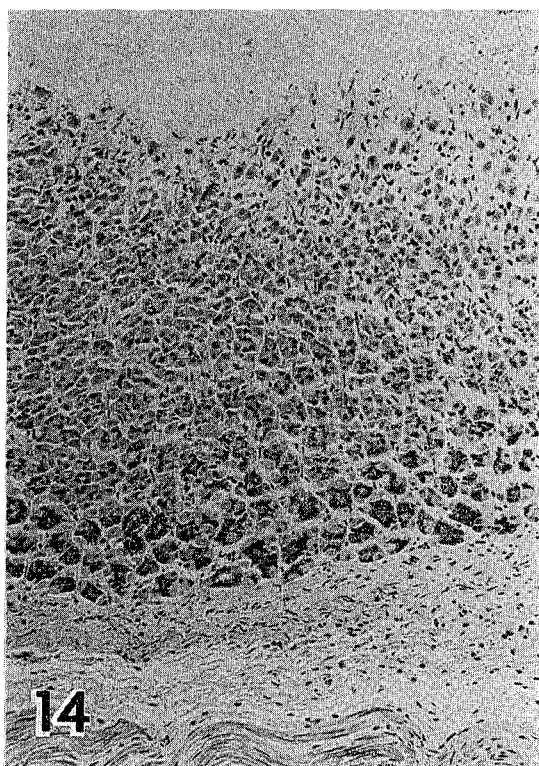
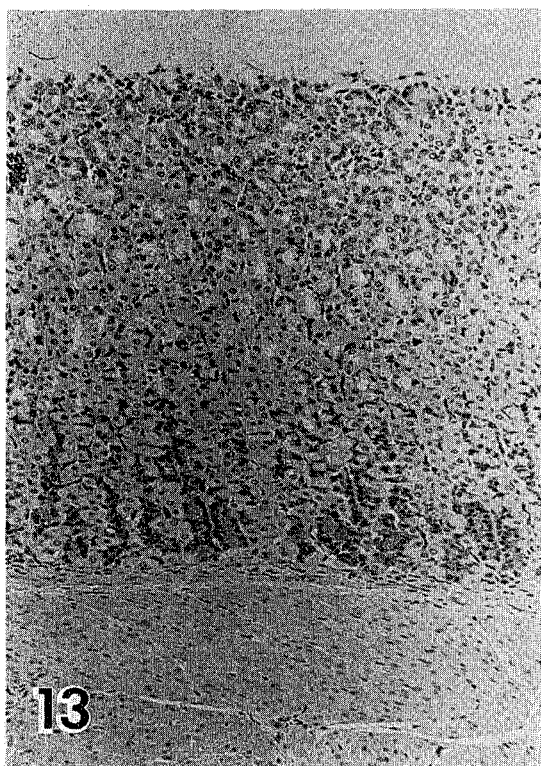


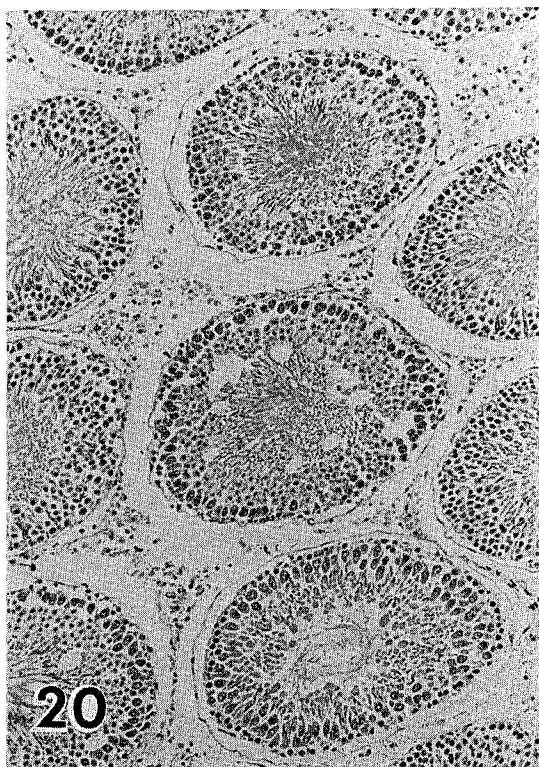
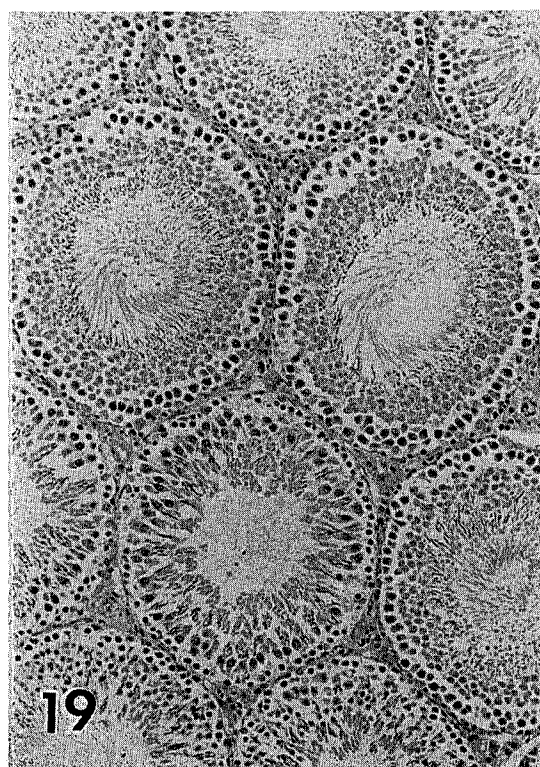
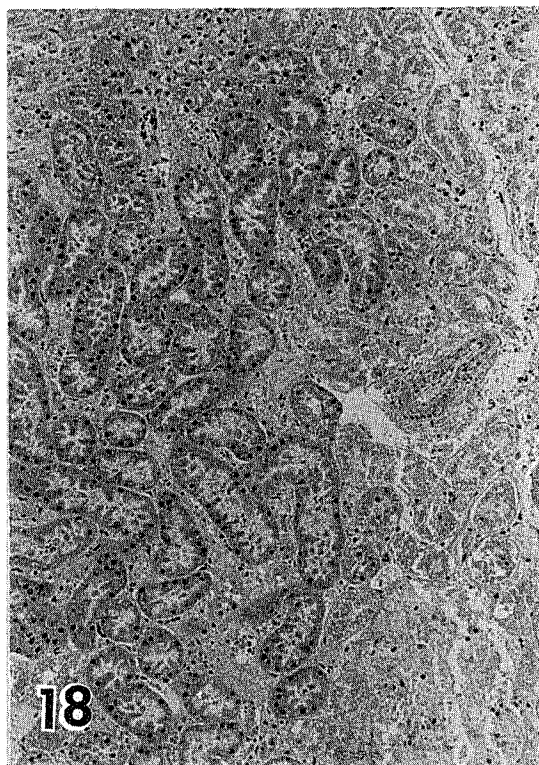
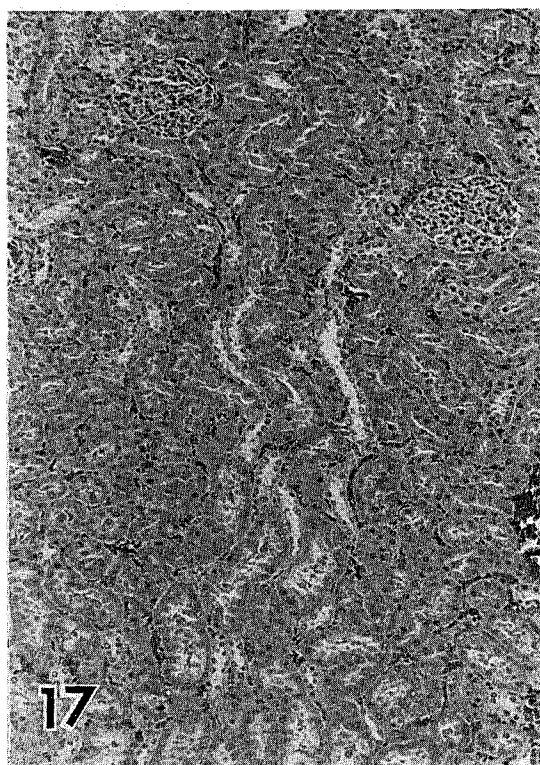




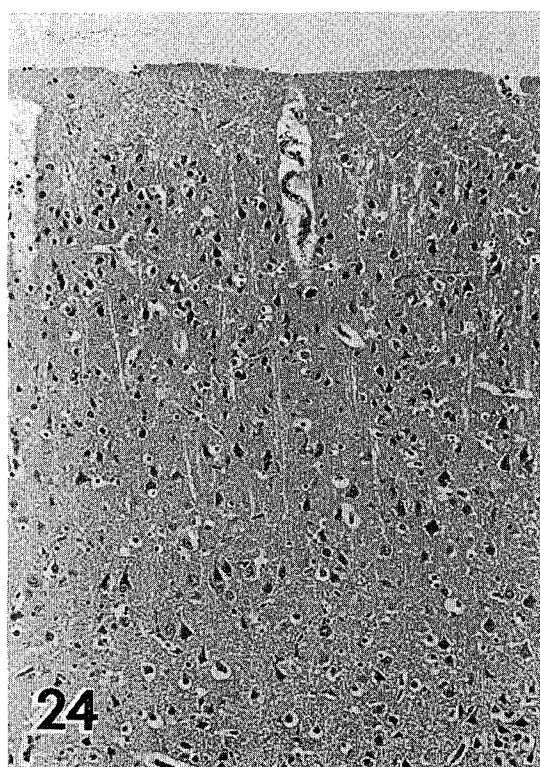
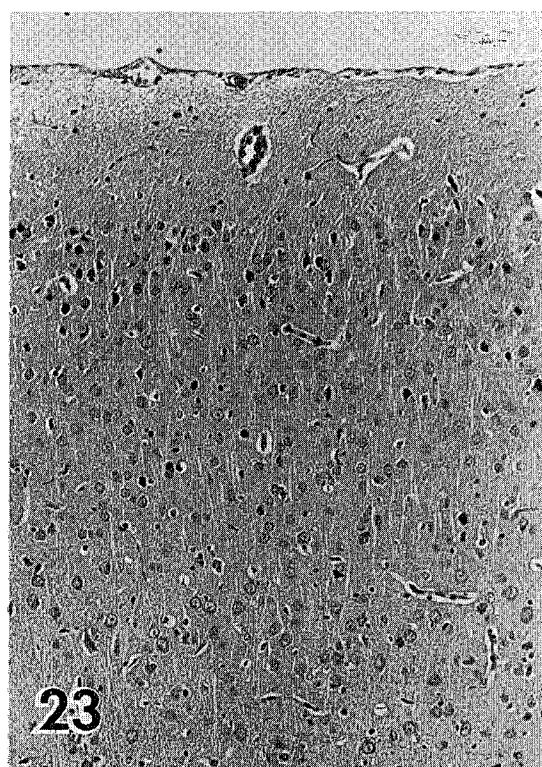
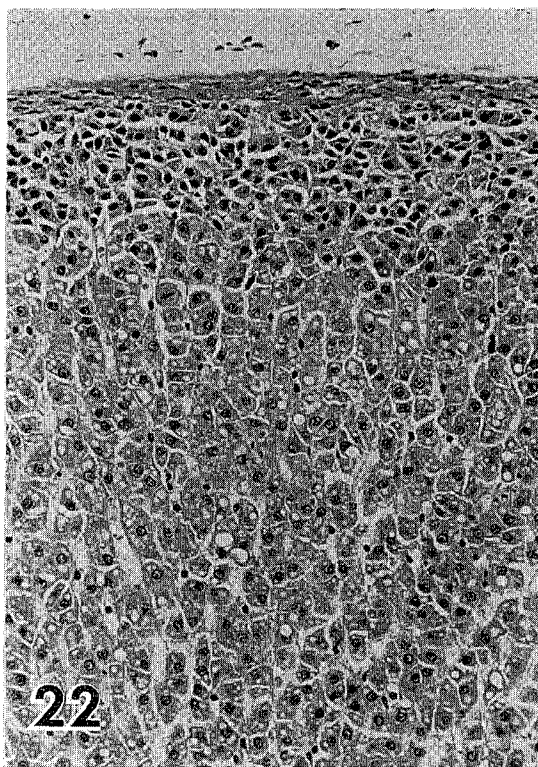
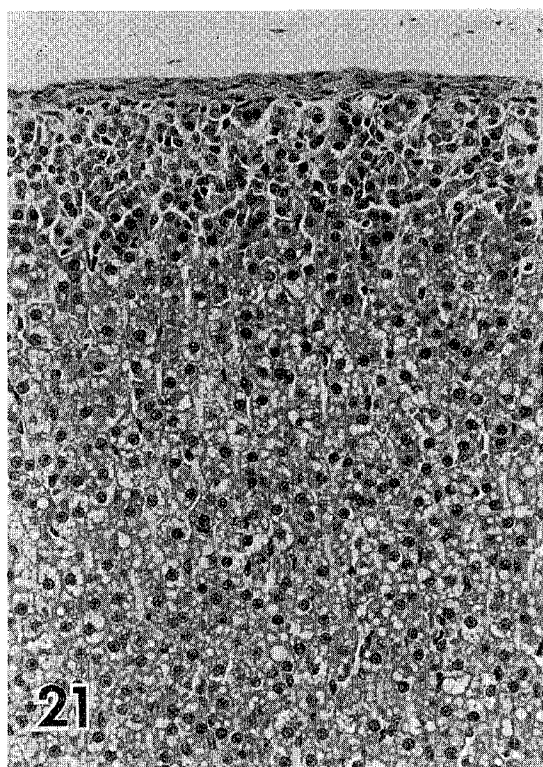












## 液体シンチレーション測定法による RI 研究室内 $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ の測定管理について

金西 信次\*, 藤田 博\*, 野牛 弘\*

### Control and Measurement of $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ by Liquid Scintillation Counter

NOBUJI KANANISHI\*, HIROSHI FUJITA\* and HIROSHI YAGYU\*

**Keywords:** 液体シンチレーションカウンタ liquid scintillation counter,  $^3\text{H}$  と  $^{14}\text{C}$   $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$ , ミニバイアル mini-vial

$^3\text{H}$ および $^{14}\text{C}$ は弱い $\beta$ 線放出核種であり, その測定には液体シンチレーションカウンタ (以下液シンと略す) による測定が最も有効な測定法であると考えられ, これらの核種の放射線管理にも, この測定法が極めて有用であるとされている. 当所には $^3\text{H}$ 線源を使用したECD ガスクロマトグラフィーが多数あり, またRI研究室では $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ の使用が他の核種に比較して極めて多く, 我々は第一に液シンを用いたこれらの測定管理法を確立することを目的として以下の実験をおこなった.

一方, 液体シンチレーターの廃棄はその処理が困難であることから, RI廃棄業者の引取りがおこなわれず, 所内での保管を余儀なくされ, 廃棄保管量は年々増大している. それ故現在使用している標準バイアル瓶による測定 (液体シンチレーター容量15~20 ml) をミニバイアル瓶 (約5 ml) に転換し, 液体シンチレーターを4分の1ないし3分の1に減らすことをも目的とした.

今回我々はミニバイアルを用いた液体シンチレーション測定法のため, 外部標準線源法によるクエンチング補正曲線, シンチレーター量による計数値の変化等を調べた. 更に現在これらの液シンによる測定データーの処理に多くの労力を必要とするところから, 当所にあるオリベッティ電子計算機, ならびにHITAC 10 IIを用いたデーター処理についてプログラムを作製し, 省力化をはかったので報告する. なおミニバイアルによる測定法ならびにそのデーター処理方法は当所における $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ 標準化合物を用いた実験研究にもそのまま使用することができる.

#### 実験方法

測定器: Beckman LS-230 および LS-355 液体シンチレーションカウンタを使用. 外部標準線源として共に $^{137}\text{Cs}$ を装備. LS-230はGain: 306で, LS-355はGain: 296, AQC: 460で測定.

電子計算機: オリベッティ P652, HITAC 10 II

試薬: 液体シンチレーターは Aquasol II (NEN), クエンチャーはニトロメタン (和光純薬特級) を使用.  $^3\text{H}$ 水標準液 (7.72  $\mu\text{Ci}$ , Sep. 22. '72, Beckman),  $^{14}\text{C}$ トルエン標準液 (0.2  $\mu\text{Ci}$ , Mar. 13. '78, NES)

クエンチング標準液の作製: 正確に希釈した $^3\text{H}$ 水標準液あるいは $^{14}\text{C}$ トルエン標準液0.5 mlと, 0~0.4%ニトロメタンを含んだ液体シンチレーターを加えて合計量を5 mlとしミニバイアルに封入したものをクエンチング標準液とした.

測定試料の作製: シンチレーター容量に関する測定試料は,  $^3\text{H}$ 量を一定とし, 水分含量を10%にし, 合計シンチレーター量を5~7 mlにした. 水分含量に関する測定試料は $^3\text{H}$ 量を一定にし, 水分含量を2~40%とし, 合計量を5 mlとした.

#### 結果と考察

##### $^3\text{H}$ の計数

$^3\text{H}$ のクエンチング標準液数値を液シンのH-3チャンネルで測定し, 測定値cpmとこの標準液に入っている絶対量とから計数効率を求め, 同時に測定された外部標準線源比 (以下E. S. Rと略す) とから図1 A, Bを作製した. 図1 Aは測定器としてLS-355を用いた場合で, E. S. Rを $x$ , 計数効率を $y$ とすると, 最小自乗法で求めた曲線は

$$y = -0.0411 + 0.869x$$

で表わされる. 図1 BはLS-230を用いた場合で

$$y = -0.159 + 1.06x$$

で表わされる. 測定試料中の $^3\text{H}$ 量は測定値を計数効率で除したもので

$$^3\text{H dpm} = \frac{\text{cpm}}{y}$$

で表わされる. 液シンより出力されるE. S. Rとcpmを計算機に入力することによりdpmを計算するプログラムを上記式を用いて作製した.

\* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

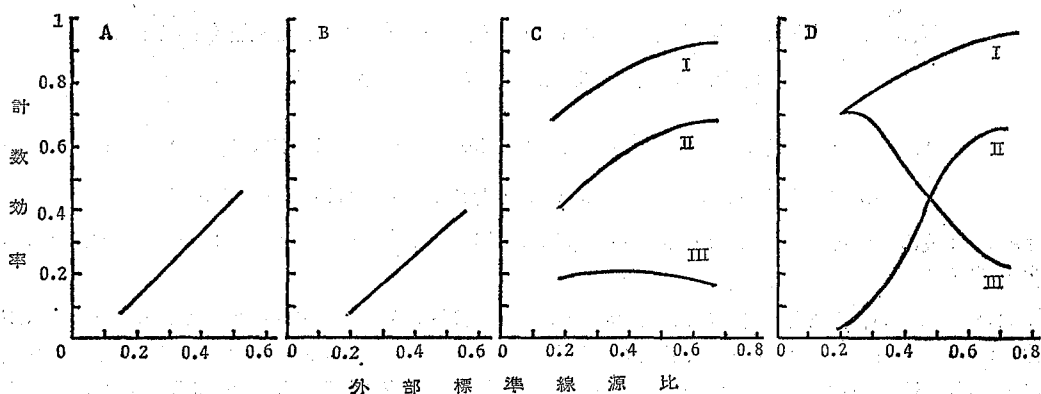


図1. クエンチングカーブ A: LS-355,  $^3\text{H}$ , B: LS-230,  $^3\text{H}$ , C: LS-355,  $^{14}\text{C}$ , D: LS-230,  $^{14}\text{C}$

### $^{14}\text{C}$ の計数

$^{14}\text{C}$  のクエンチング標準液数種を液シンの H-3, Small C-14, Full C-14 の三種のチャンネルで測定し、測定値 cpm と絶対量の比から計数効率を求めて、E. S. R とから図 1 C, D を作製した。曲線 (I) は Full C-14 のチャンネルで測定した曲線である。図 1 C は LS-355 により測定した場合で

$$y_{(I)} = 0.482 + 1.34x - 1.04x^2$$

で表わされる。図 1 D は LS-230 により測定した場合で、曲線 (I) は

$$y_{(I)} = 0.582 + 0.994x - 0.604x^2$$

で表わされる。 $^3\text{H}$  の場合と同様にそれぞれの式を

$$^{14}\text{C dpm} = \frac{\text{cpm}}{y_{(I)}}$$

に代入した式のプログラムを作製し、E. S. R と cpm を計算機に入力することによって dpm を算出することができる。

### $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ の二重標識の計数

図 1 C と D の曲線 (II), (III) は  $^{14}\text{C}$  のクエンチング標準液を Small C-14, H-3 チャンネルにより測定したもので、LS-355 では図 1 C より

$$y_{(III)} = 0.206 - 0.0157x - 0.0637x^2$$

$$y_{(II)} = 0.159 + 1.44x - 0.948x^2$$

LS-230 では図 1 D より

$$y_{(III)} = 0.531 + 2.19x - 7.99x^2 + 6.98x^3 - 1.32x^4$$

$$y_{(II)} = 0.0004 - 0.682x + 3.47x^2 + 2.21x^3 - 5.41x^4$$

で表わされる。但し LS-230 ではディスクリミネーターレベル 290~460 を Small C-14 とした。これらの計数効率  $y$  と計数値 cpm を用いてスピルオーバー法により二重標識した  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  の量をそれぞれ算出するプログラムを作製した。

### HITAC 10 II によるデーター処理

液シンの測定データーは試料番号、測定方式の番号或いは T=測定時間、A=測定値 (標準誤差)、B=測定値 (標準誤差)、C=測定値 (標準誤差)、X 或いは S=E. S. R 値の順でテラタイプにより打出される。それと同時に紙テープにも穿孔することができる。この紙テープを HITAC 10 II によってデーター処理すれば、計算機へ一つ一つのデーターを入力することがないので、計算時における読み取りや入力の手間をなくすることがで

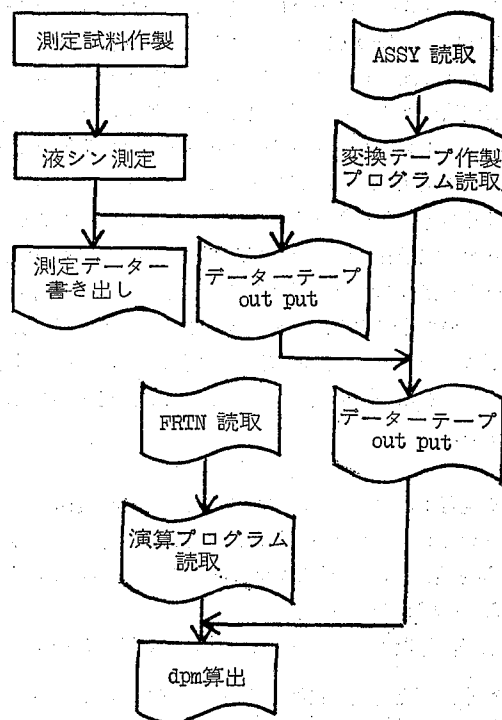


図2. HITAC 10 II による測定データー処理

きと考え、図2に示す方法で処理した。液シンによるデーターテープはそのままでは計算処理することが困難なので、ASSEMBLERにより試料番号、3つのチャンネルの測定データー、E.S.Rのみを取出し別の紙テープに穿孔する。この縮小変換したデーターテープをFORTRANでプログラムした計算方式で処理するという方法をおこなった。

#### シンチレーター量による計数値の変動

ミニバイアルの使用は標準バイアルにくらべシンチレーター量のわずかの違いが計数値を変動させる要因となる。図3は各バイアル中の $^3\text{H}$ 量を一定とし、合計シンチレーター量を変えて測定したもので、E.S.R(白丸)はシンチレーター量の増加にともなって減少する。このE.S.Rを用いて校正した計数値(dpm黒丸)は5~6mlで同じ値を示し、7ml以上では減少した。このことからシンチレーター量を合計5~6mlとすることが至適であると考えられる。

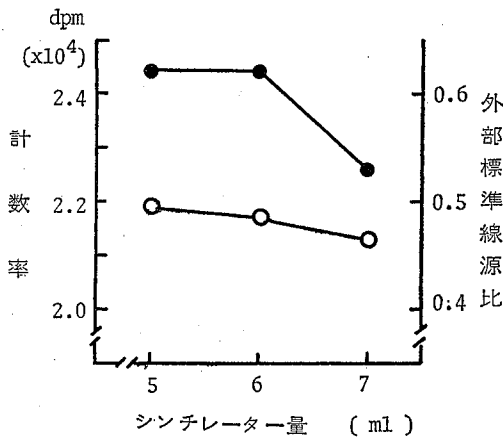


図3. シンチレーター量による計数値の変動

#### 水分含量による計数値の変動

Aquasol IIは乳化シンチレーターとして多量の水分を含有させることができるとされており、我々の測定試料も多量の水分を含むことが多いので、ミニバイアルを用いたときの水分含量による計数値の変動を調べた。図4は一定の $^3\text{H}$ 量における測定結果で、E.S.R(白丸)は水分量の増加に反して減少するが、このE.S.Rを用いて校正した計数値dpm黒丸はわずかに減少するだけであった。なおこのAquasol IIはほぼ13~18%の間で二層に分離して測定不能であるとされている。

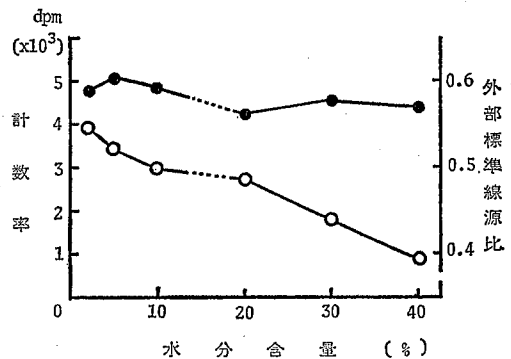


図4. シンチレーター水分含量によるE.S.Rと計数値

#### $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ 空气中濃度および表面汚染の測定管理

当所 $^3\text{H}$ 線源ECDガスクロマトグラフィーの使用ならびにR I研究室内での $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ 標識化合物の使用がなされている。空气中 $^3\text{H}$ は空气中水分あるいは燃焼管を通した $^3\text{H}$ 水分をドライアイス・アルコールで捕集し、 $^{14}\text{C}$ は $\text{CO}_2$ としてモノエタノールアミンで捕集し、液シンで測定する。同時に捕集空気容量、採集空気温度、湿度を測定する。又表面汚染はスメア法により採取した試料を液シンで測定。これらのデーターを計算処理するプログラムを作成した。最終的に空気 $1\text{cm}^3$ 当りの $\mu\text{Ci}$ 数、表面汚染濃度は $1\text{cm}^2$ 当りの $\mu\text{Ci}$ 数を算出する。

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1978.8—1979.6)

### Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT); Binding *in Vitro* of BHT to Liver Microsomes

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (2), 480, 1979

$^{14}\text{C}$  で標識した BHT と肝ミクロゾームの結合を *in vitro* で検討した。ミクロゾーム高分子と  $^{14}\text{C}$ -BHT の結合は、インキュベーション時間およびミクロゾームのタンパク濃度に比例してそれぞれ直線的に増加した。この結合は酸素と NADPH が必要であり、一酸化炭素と SKF-525A で阻害された。以上のことからこの結合にはシトクロム P-450 と連結したモノオキシゲナーゼ系が関与していることが明らかになった。さらにこの結合はミクロゾームのモノオキシゲナーゼ系の促進剤（フェノバルビタールと BHT）で前処置することにより著しく高まった。これらの促進剤の効果から、高い BHT オキシダーゼ活性を持ったシトクロム P-450 が肝ミクロゾームにおける BHT の代謝活性化に大きく関与していることが示唆された。一方、他の器官におけるミクロゾームの結合能は、脳、腎、脾においてともに著しく小さかったが、肺では肝ミクロゾームの約40%であった。

### Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT); Binding *in Vivo* of BHT to Macromolecules of Rat Liver

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (2), 442, 1979

$^{14}\text{C}$  で標識した BHT をラットに経口投与した後、肝および他器官における高分子物質と放射性化合物の結合について検討した。肝の全放射能および高分子と結合した放射能はいずれも6—12時間後に最高になった。結合した放射能の減少速度は全放射能のそれに比べ小さかった。それゆえに結合率（全放射能に対する結合した放射能の%）は経時的に増加した。結合した放射能はすべての細胞内分画に認められ、特にミクロゾーム分画で高かった。フェノバルビタールで前処置したラットにおいて、ミクロゾーム分画の高分子と結合した放射能は対照群に比べ高かった。この高分子と結合した放射能は他の器官でも認められ、肺と腎では経時的に増加した。

### The Relationship between Hemorrhage Induced by Butylated Hydroxytoluene and Its Antioxidant Properties or Structural Characteristics

O. Takahashi and K. Hiraga: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46 (3), 811, 1978

Sprague-Dawley 系の雄ラットに5つの酸化防止剤と6つの置換フェノールを与えた。飼料中の濃度はジブチルヒドロキソトルエン(BHT)の出血による LC50 (40日) に等しい。3週間の投与で、3つの酸化防止剤（ブチルヒドロキシアニソール、イオノックス330、N, N'-ジフェニル-p-フェニレンジアミン）は出血をひきおこさず、2,5-ジ-*tert*-ブチルヒドロキシノン は BHT と異なった出血致死をひきおこした。エトキシキンのみが BHT 投与時と類似の出血をひきおこした。2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールと2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノールは、出血致死をひきおこした。2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノールは出血をひきおこしたが、3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド、3,5-ジ-*tert*-ブチルヒドロキシ安息香酸、および2,4,6-トリメチルフェノールは出血を生じさせなかった。これらの観察は BHT による出血が、むしろ酸化防止効果よりも構造的特徴にもとづいて生じる可能性を示唆するものである。

### Effects of Low Levels of Butylated Hydroxytoluene on the Prothrombin Index of Male Rats

O. Takahashi and K. Hiraga: *Food Cosmet. Toxicol.*, 16 (5), 475, 1978

ジブチルヒドロキソトルエン (BHT) を一群5匹の雄ラットに 0.0085, 0.017, 0.033, 0.065, 0.13, 0.25, 0.50% の濃度で飼料中に混ぜ1あるいは4週間投与した。1週目で、0.017%以上の BHT レベルを与えたラットでプロトロンビン指数の有意な低下がみられたが、4週目では0.50%のみが明らかな低下を示したにすぎない。

### Preventive Effects of Phylloquinone on Hemorrhagic Death Induced by Butylated Hydroxytoluene in Male Rats

O. Takahashi and K. Hiraga: *J. Nutr.*, 109 (3), 453, 1979

ジブチルヒドロキソトルエン (BHT) の出血致死効果に対するビタミンKの効果を決定了。Sprague-Dawley 系雄ラットに BHT と2つのフェノール型酸化防止剤（2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールと2,5-ジ-*tert*-ブチルヒドロキシノン）を24%カゼイン食に混ぜ与えた。フェノール類の濃度は BHT の LD<sub>50</sub>(40日) にほぼ等しい。1.20% の BHT によってひきおこされた出血致死、出血、プロトロンビン指数の低下は同時に加えたフィロキノン (0.68  $\mu\text{mole/kg/day}$ ) により阻止された。フィロキノンは、また、関連フェノール型酸化防止剤による効果も阻

止した。1.2%のBHTを3日間与えつづけたラットの大腿静脈に注射された10 nmolesのフィロキノンプロトンビン濃度を28%から正常の100%まで18から24時間以内に回復させた。フィロキノンオキシドもBHTによる低プロトンビン血症を阻止した。これらの結果はBHTによる出血致死効果が直接あるいは間接的なビタミンK欠乏によっておこされることを示し、その機構はワルファリンによるものとは異なるらしいことを示している。

#### Effect of Phthalic Acid Esters on Gonadal Function in Male Rats

S. Oishi and K. Hiraga: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 21 (1), 65, 1979

フタル酸エステル、特にジ-2-エチルヘキシルフタレート (DEHP) をラットに5日間腹腔内に投与した際の睪丸静脈血中テストステロン濃度の変化について検討を行った。この結果 DEHP はテストステロン濃度の低下

を生じさせた。

#### The Effect of Food Restriction for 4 Weeks on Common Toxicity Parameters in Male Rats

S. Oishi, H. Oishi and K. Hiraga: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47 (1), 15, 1979

毒性試験では、飼料中に添加された被検物質のため、しばしば飼料摂取量の低下がみられる。この飼料摂取量の低下は、それ自体で種々の生理的変化を生じるため、投与物質によりひきおこされた変化と区別することが毒性試験においては特に重要である。そこで低摂取量（制限食）下の生理的変化について、主に毒性試験で用いられるパラメーターについて検討を加えた。雄ラットに1日あたり5g, 10g, 15gの飼料を4週間摂取させた。対照群には飼料を自由に摂取させた。その結果、主要臓器重量の増減、白血球数の減少、血清酵素活性の変化等が認められた。

# 学 会 发 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1978.8—1979.6)



中尾順子, 道源正子:  $\gamma$ -GTP, LDH および ALP を示標とした腎障と尿中酵素との関係

第37回日本公衆衛生学会総会 (1978. 10)

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: オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のマウスにおける長期投与優性致死試験

日本環境変異原学会第7回大会 (1978. 10)

中川敦子, 中尾順子: アデニレートシクラーゼにおよぼすバナジウムの影響

第51回日本生化学会大会 (1978. 11)

大石真之, 平賀興吾: ポリ塩化ビフェニル (PCB) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) の比較毒性 (6)

第59回日本薬理学会関東部会 (1978. 11)

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3月間持続吸入実験

第6回毒素作用研究会 (1979. 6)

高橋 省, 平賀興吾: Butylated hydroxytoluene (BHT) の出血致死効果に対するビタミン K<sub>1</sub> の抑制効果

第59回日本薬理学会関東部会 (1978. 11)

高橋 省, 平賀興吾: ラット肝臓における butylated hydroxytoluene (BHT) の代謝物の1つ 2,6-di-*t*-butyl-4-methylene-2, 5-cyclohexadienone について

第52回日本薬理学会総会 (1979. 3)

高橋 省, 平賀興吾: Butylated hydroxytoluene (BHT) による出血致死効果の種差・系統差・性差と 2,6-di-*t*-butyl-4-methylene-2, 5-cyclohexadienone の肝臓内濃度との関係

第60回日本薬理学会関東部会 (1979. 6)

福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: BHT による高脂肪食, 無脂肪食投与ラット肝の微細構造変化

日本電子顕微鏡学会第35回学術講演会 (1979. 5)

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

三 村 秀 一 (委員長)

山 下 孝

寺 山 武

藪 内 清

下 平 彰 男

原 田 裕 文

村 上 一

直 井 家壽太

石 川 隆 章

中 尾 順 子

昭和54年12月 1 日 発行

規格表 第 2 類

印刷番号 (54) 793

刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第30-2号

編 集 行 : 東京都立衛生研究所

〒160 東京都新宿区百人町3-24-1

電 話 03 (363) 3231 (代)

印刷所 : 大東印刷工業株式会社

〒130 東京都墨田区向島3-33-5

電 話 03 (625) 7481 (代)