

Tkco ⑨

+131e

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

31-2

1980

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



Tko(1)

CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

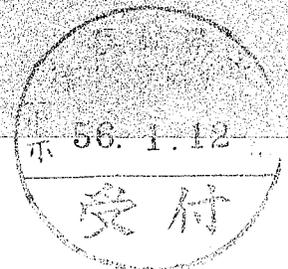
研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

31-2

1980

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



序

80年代という新しい年代に入り、私達をとりまく社会情勢は大きく変化しております。過去20年にわたる高度成長による科学の発展は、ややもすると人間社会に対し思いもよらぬ影響を与えております。健康を障害する要因は多様化、複雑化の様相を呈し、環境衛生、食品衛生、それに大気汚染関連問題等毎日に増しております。このため当研究所としてもその内容の質的な変化が要求され、これに充分対応出来る機能を整備し近代的研究設備を十二分に活用し、各分野の試験検査と各種の調査研究を行うと共に、都民の健康保持について今日の問題ばかりでなく10年先、さらに将来の問題を考えながら研究に取り組んでおります。

さてここに昭和54年度の当研究所の研究成果を研究年報第31号として集録刊行することが出来ました。ここに掲載された各課題は、当所研究員の苦勞の結晶であります。特に試験検査にかかわる研究成果、あるいは行政指導に関連のある調査研究が多いと思います。各地方衛生研究所、また都区の試験検査、行政指導にも活用願えれば幸いと存じます。

昭和 55 年 12 月

東京都立衛生研究所長 野 牛 弘

目次

報 文

| | | |
|--|--|----|
| オルトフェニルフェノールのラットにおける急性経口毒性試験 | 田山 邦昭, 井口 重孝, 平賀 興吾..... | 1 |
| 優性致死試験法の開発 1. 長期投与優性致死試験 | 平賀 興吾, 小縣 昭夫, 吉田 誠二, 安藤 弘, 久保 喜一, 益淵 正典..... | 7 |
| オルトフェニルフェノールナトリウムのラットにおける長期投与優性致死試験 | 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 平賀 興吾..... | 17 |
| チアベンダゾールのラットを用いた急性経口毒性試験 | 三栗谷久敏, 林田 志信, 高橋 博, 平賀 興吾..... | 20 |
| チアベンダゾール (TBZ) 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..... | 26 |
| 4種のかび防止剤の組み合わせによる突然変異誘起性 | 藤田 博, 平賀 興吾..... | 29 |
| クロム鉱さい粉じんのラットによる3か月間持続吸入実験 (第1報) 体重, 器官重量, 組織学的変化につ いて..... | 坂本 義光, 神谷 信行, 池田 虎雄, 平賀 興吾..... | 33 |
| クロム鉱さい粉じんのラットによる1か月間持続吸入実験 特に吸入後の回復について | 坂本 義光, 神谷 信行, 池田 虎雄, 平賀 興吾..... | 43 |
| クロム鉱さい粉じんのラットによる3か月間持続吸入実験 (第2報) クロムの体内分布 | 神谷 信行, 坂本 義光, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 51 |
| アデニレートシクラーゼにおよぼすパナデートの影響 | 中川 敦子, 中尾 順子..... | 54 |
| ラット尿中蛋白質 (第4報) カドミウム投与ラットの尿中遊離アミノ酸の分析 | 樺島順一郎, 中尾 順子..... | 57 |
| ポリ塩化ビフェニール (PCB) の肝薬物代謝酵素誘導作用に関する若干の考察 | 川野 澄江, 平賀 興吾..... | 61 |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の高脂肪食, 無脂肪食投与肝に対する影響 | 福森 信隆, 平賀 興吾..... | 67 |
| 肝グルタチオンに対するジブチルヒドロキシトルエンの影響 | 中川 好男, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 77 |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 摂取ラットの出血に対するエストロゲンの効果 | 鈴木 英子, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 79 |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の幼若マウス赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響 | 市川 久次, 小林 博義, 中尾 順子..... | 81 |
| 血液の保存期間延長に関する研究 | 長井二三子, 中尾 順子, 中尾 真..... | 85 |

| | | |
|--|--|-----|
| 培養細胞を用いた変異原物質スクリーニングのための代謝活性化法の検討 既知変異原物質による染色体異常及び姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発への代謝活性化の影響 | 縄井寿美子, 吉田 誠二, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 89 |
| ジブチルヒドロキソトルエン (BHT) 投与ラットの肝9,000×g上清 (S-9) 分画による突然変異物質の 代謝活性化について..... | 小嶋 昭江, 藤田 博, 平賀 興吾..... | 96 |
| 培養細胞による変異原スクリーニングテスト | 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 99 |
| アセトアミノフェンおよびその関連物質の細胞遺伝学的研究 | 吉田 誠二, 縄井寿美子, 平賀 興吾..... | 102 |
| LAS によるマウス抗体産生の抑制について | 佐々木美枝子, 中尾 順子..... | 109 |
| リン酸トリメチルホスホールの雄性ラットにおよぼす影響 | 大石 向江, 大石 真之, 平賀 興吾..... | 115 |
| 低温下におけるラット死後変化の経時的観察 | 多田 幸恵, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 藤井 孝, 平賀 興吾..... | 118 |
| 経胎盤法・新生仔投与方法によるマウス発癌試験 (予備的考察) | 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾..... | 127 |
| 他 誌 発 表..... | | 131 |
| 学 会 発 表..... | | 133 |

CONTENTS

REPORTS

| | |
|---|----|
| Acute Oral Toxicity of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) in Rats K. Tayama, S. Iguchi and K. Hiraga..... | 1 |
| Improvement of the Methods in Dominant Lethal Test I. Dominant Lethal Test with Long Term Administration K. Hiraga, A. Ogata, S. Yoshida, H. Ando, Y. Kubo and M. Masubuchi..... | 7 |
| Dominant Lethal Tests of Long Term Administration with Sodium <i>o</i> -Phenylphenol (OPP-Na) in RatsA. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga..... | 17 |
| Acute Oral Toxicity Test of Thiabendazole in RatsH. Mikuriya, S. Hayashida, H. Takahashi and K. Hiraga..... | 20 |
| Effect of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of Thiabendazole in the Salmonella/Microsome Test H. Fujita and K. Hiraga..... | 26 |
| Mutagenicity of Paired Fungicide Mixtures in the Salmonella/Microsome Test H. Fujita and K. Hiraga..... | 29 |
| Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 3 Months (I) Body Weight, Organ Weight and Histological Changes Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga..... | 33 |
| Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats-Recovery after 1 Month Exposure Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga..... | 43 |
| Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 3 Months (II) Distribution of Chromium in the Rat N. Kamiya, Y. Sakamoto, T. Nakao and K. Hiraga..... | 51 |
| Effects of Vanadate on Adenylate Cyclase in Rat Brain A. Nakagawa and T. Nakao..... | 54 |
| Protein in Rat Urine (IV) Analysis of Free Amino Acid in the Urine of Rat Treated Subcutaneously with Cadmium Chloride J. Kabashima and T. Nakao | 57 |
| Some Considerations in the Induction of Hepatic Drug Oxidation Enzymes Produced by Polychlorinated Biphenyls (PCB) S. Kawano and K. Hiraga | 61 |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Rat Liver Cells by Feeding with Diets Differed Fat Content N. Fukumori and K. Hiraga | 67 |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Levels of Liver Glutathione Y. Nakagawa, T. Nakao and K. Hiraga..... | 77 |
| Effects of Estrogen on Hemorrhage Induced by Butylated Hydroxytoluene (BHT) in RatsH. Suzuki, T. Nakao and K. Hiraga..... | 79 |

| | |
|--|------------|
| Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Osmotic Fragilities of Erythrocytes in Infant MiceH. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao..... | 81 |
| Studies on Prolongation of Preservative Period of Blood F. Nagai, T. Nakao and M. Nakao..... | 85 |
| Examination of Methods by Metabolize Activation with S-9 Mix for Screening of Mutagens on CHO-K1 Cell Line Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) and Chromosome Aberration by Metabolized MutagensS. Nawai, S. Yoshida, T. Nakao and K. Hiraga..... | 89 |
| Mutagenic Activation of Mutagenic Chemicals by Liver 9,000×g Supernatant Fractions from Butylated Hydroxytoluene(BHT)-treated Rats A. Kojima, H. Fujita and K. Hiraga..... | 96 |
| <i>In vitro</i> Screening Test of Mutagens on Cultured Cells M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga..... | 99 |
| Cytogenetic Studies of Acetaminophen and Its Related Compounds S. Yoshida, S. Nawai and K. Hiraga..... | 102 |
| Immunosuppressive Effect of LAS-treated Antigen on MiceM. Sasaki and T. Nakao..... | 109 |
| Toxicity of Tri- <i>n</i> -butyl Phosphate in Male RatsH. Oishi, S. Oishi and K. Hiraga..... | 115 |
| Observations of Postmortem Changes in Course of Time on Rats kept in Low Temperature Y. Tada, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, T. Fujii and K. Hiraga..... | 118 |
| Carcinogen Bioassay in Mice—Preliminary Experiments on Transplacental and Neonatal Treatments of Test Substance M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga..... | 127 |
| SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS..... | 131 |
| THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS..... | 133 |

報 文

REPORTS

オルトフェニルフェノールのラットにおける急性経口毒性試験

田山 邦昭*, 井口 重孝*, 平賀 興吾*

Acute Oral Toxicity of *o*-Phenylphenol (OPP) in Rats

KUNIAKI TAYAMA*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

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

緒 言

かんきつ類の防ばい剤として使用されている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)の毒性評価の一環として、前報¹⁾において、OPP-Na のラットにおける急性経口毒性について報告した。今回、OPP について急性経口毒性を同一系統のラットを用いて検討したので報告する。

本実験では使用動物数を各群5匹用いて行った。この50%致死量(LD₅₀)の信頼性について検討するため、動物数を3倍にして再実験を行い、使用動物数が各群15匹と5匹の場合でのLD₅₀値の相違について考察した。

実験材料ならびに方法

I. 検体および実験動物

検体 : OPP はダウケミカル社製の Dowicide 1 (Lot No. MM 04196-A) を用い、投与容量がすべて10ml/kg 体重となるように、約60°に加温したオリーブ油に溶解調製し、室温にもどして使用した。

実験動物 : Fisher 系ラット (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。ラットは投与前日午前5時より除餌(飲水は自由)しておいた。

飼育条件 : 室温25±1°, 湿度55±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、ステンレスケージ(前面、床網; 40×25×16.5cm)に5匹ずつ収容、日本クレア製 CE-2 固型飼料および細菌ろ過器經由水道水を自由に摂取させた。

II. 実験方法

実験 1. 動物の群分け : ラットは投与一週間前に体重を層別化し、各濃度群(以下群とする)へ無作為にわり当てた。このとき各群の平均体重の差が、雌雄ともに2gの範囲となり、標準偏差も各群ほぼ近い値となった。一週間後、一夜絶食後投与日の全体の平均体重は雄144±

12g, 雌103±5gであった。

投与量・匹数 : 予備試験により適当と思われる最小および最大濃度を設定し、その間を5段階とし、さらに溶媒対照を設けた。投与匹数は各群5匹とした(Table 1)。

投与方法 : 体重測定後午前10時から10時30分までの間に検体を胃ゾンデにて強制経口投与した。5400 mg/kg 投与群は結晶が析出したため加温溶解して行った。投与3時間後より餌を与えた。

観察・検査 : 生死の観察は投与後24時間までは30分毎に、以降48時間まで2時間毎に、3日以降は朝夕2回行った。死亡ラットは直ちに剖検を行い、生存ラットは15日目に断頭屠殺し、血液学的・血清生化学的検査および剖検を行った。剖検時、全身器官組織を肉眼的観察後、直ちに10%緩衝ホルマリン固定、死亡例の一部については常法に従いH-E染色を施し、組織学的検索を行った。

実験 2. 実験1は各群5匹の動物数でLD₅₀値を算出した。このLD₅₀値の検討として、同一週令の雄ラットを用い、動物数を15匹にして実験を行った。動物の群分け、投与方法は実験1と同様で、投与量は3800~1400 mg/kg 間を5段階とした(Table 5)。そして各群15匹を用いた1つの実験を5匹用いたそれぞれ独立した3つの実験A, B, Cグループに分け、それぞれのLD₅₀値の相違を合わせて検討した。グループA, B, Cの選定は無作為に行った。一夜絶食後投与日の全体の平均体重は163±10gであった。

LD₅₀値は実験1, 2ともに14日間の死亡率から Litchfield-Wilcoxon 法²⁾で算出した。算出にあたって、最小2乗法 (probit 法コンピューター・プログラム) で求めた回帰式を Litchfield-Wilcoxon 法の対数確率紙上に適用した直線を利用した。

実験結果

実験 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.

Table 1. Mortality Data of Rats Administered Orally with OPP
Range-Finding Test

| Sex | Dose mg/kg | Initial body weight ¹⁾ | Mortality ratio | (No. of deaths) (No. dosed) | Time of death after dosing (hrs) |
|--------|------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Male | 250 | 153±9 | | 0/4 | — |
| | 1000 | 152±9 | | 0/4 | — |
| | 4000 | 151±6 | | 4/4 | <24 |
| Female | 250 | 104±4 | | 0/4 | — |
| | 1000 | 103±5 | | 0/4 | — |
| | 4000 | 102±6 | | 3/4 | <26 |

Full Scale Test

| Sex | Dose mg/kg | Initial body weight ¹⁾ | Mortality ratio | (No. of deaths) (No. dosed) | Time of death after dosing (hrs) |
|--------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Male | 0 ²⁾ | 145±12 | | 0/5 | — |
| | 1000 | 145±14 | | 0/5 | — |
| | 1400 | 143±13 | | 0/5 | — |
| | 2000 | 145±12 | | 2/5 | 14—34 |
| | 2700 | 142±14 | | 1/5 | 31.5 |
| | 3800 | 145±11 | | 5/5 | 2.5—17.5 |
| Female | 0 ²⁾ | 100±5 | | 0/5 | — |
| | 1400 | 103±4 | | 0/5 | — |
| | 2000 | 104±4 | | 2/5 | 29—30.5 |
| | 2700 | 103±3 | | 2/5 | 19—26.5 |
| | 3800 | 107±7 | | 4/5 | 20—70 |
| | 5400 | 102±6 | | 4/5 | 2—35 |

1) overnight fasted rats, mean±S.D. (g)

2) vehicle alone (10 ml/kg b.w.)

Rats of similar body weight, selected 7 days before dosing, are identified and assigned randomly to the various groups.

Table 2. LD₅₀ of Rats Administered Orally with OPP¹⁾

| | Male | Female |
|---------------------------|-----------|-----------|
| LD ₅₀ (mg/kg) | 2600 | 2850 |
| Confidence limit (p=0.05) | 1991—3395 | 1946—4173 |
| Slope function | 1.36 | 1.70 |
| Confidence limit (p=0.05) | 1.06—1.73 | 1.05—2.75 |

1) LD₅₀ was calculated by the Litchfield-Wilcoxon method.

初期体重, 死亡数および LD₅₀ 値 予備実験および本実験の投与日の体重, 死亡数, 死亡時期と LD₅₀ 値を Table 1, 2 に示した. 投与前日までの平均体重, 標準偏差は, 雌雄の各群でよく揃っていたが, 絶食後投与日の体重は雌でやや不揃いとなった. 死亡時期は雌雄ともに投与後 2~35 時間以内であり, 雌 1 例が 70 時間で死亡した. 死亡の多発時期は例数が少ないためはっきりしない

が, ほぼ時間内で分散していた. LD₅₀ 値は雄 2600mg/kg, 雌 2850mg/kg となり, 性差は認められなかった(危険率 5%).

一般症状 自発運動の低下および流涙は雌雄ともほぼ共通で, 投与直後より数時間にわたってみられ, とくに高濃度群で顕著であった. この自発運動の低下の認められたラットは外部刺激(音・痛覚)に対して鈍であった

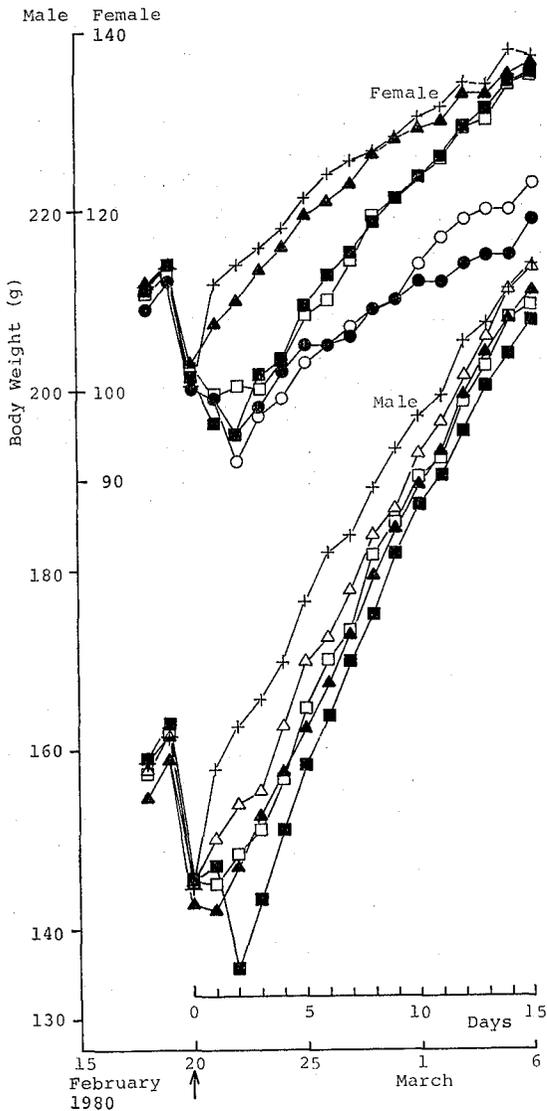


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights of Survival Rats Administered Orally with OPP: 0 (control: +), 1000 (Δ), 1400 (\blacktriangle), 2000 (\square), 2700 (\blacksquare), 3800 (\circ), or 5400 (\bullet) mg/kg b.w. Arrow indicates the day of single-dose administration. Values are the means of 1-5 rats.

が、正向反射の消失はみられず、ケージの隅で背を丸めうずくまるものも認められた。さらに重篤なものでは歩行困難となり、静止状態で腹臥姿勢をとり、呼吸数の低下がみられ死亡した。その他投与濃度にあまり関連が認められなかったものとして、立毛、異常音(クックック)の発声あるいは口、鼻周囲に淡褐色や赤褐色(赤褐色液は潜血+)、陰門周囲に淡褐色の汚れ、また肛門部

に糞塊等の付着が一部認められた。投与2日後では数例で自発運動が強度に低下していた。3日後以降上記の異常音、外見上の汚れ等はみられなくなり回復がみられた。糞便性状は軟便や下痢様便等も中・高濃度群にやや多く散見されたが、一過性で3日後以降ほとんど認められなかった。

体重変化 投与後14日間生存したラットの濃度別の体重変化を Fig. 1 に示した。各群ともに、対照群雌雄と、1000mg/kg 投与群雄、1400mg/kg 投与群雌を除き、1~2日まで下降し、その後上昇へ向った。期間中は対照群に雌雄とも近づく傾向をみせた。

剖検所見 雌雄差、投与濃度に関連した所見はあまりみられず、死亡例では、副腎はほとんどすべての例で腫大し、赤味を帯びていた。胃は前胃部では菲薄化し、腺胃部では皺襞が消失し、扁平となり、一部では直径1mm以下の点状出血が確認された。また胃内に少量ガスの貯留が認められた例もあった。胃内容物は摂取した餌と油の混合した粘性褐色物中に、OPPの結晶と思われる白色の塊が認められた。小腸は外見上、十二指腸側が褐色、盲腸側とくに回腸が暗緑色を呈し、この暗緑色域は血液が混ざっている様な黒褐色および黒紫色のペースト様物が詰っていた。盲腸はやや拡張したものも一部みられた。その他肝臓が黒色調を増し、腎では皮髄境界部、乳頭部が赤くなっていた。

屠殺例では雌雄ともほとんど変化はみられなかった。

顕微鏡所見 死亡例について無作為に取り出した雌雄各群一例について鏡検した結果、ほぼ共通に認められた変化は、腎臓では乳頭部の巢状壊死および集合管腔の拡張、上皮細胞の壊死が認められ、尿細管は部分的に上皮細胞の脱落および核の消失がみられた。またエオジン濃染の均一無構造の物質が尿管腔に多く認められ、これよりもやや淡染のものが集合管腔に認められた。肝臓では、小葉中心帯の肝細胞に粗大な空泡が認められ、また散在性に肝細胞の萎縮がみられた。副腎では網状層細胞の腫大が著しく、網状層から束状層の部分にかけて、一部出血が認められた。胃および腸管では粘膜上皮の脱落が顕著に認められた。

血液学的・血清生化学的検査 投与後15日目の屠殺例について行った結果を Table 3, 4 に示した。高濃度群は雌雄ともバラツキが大となったが、ほぼ対照群と近い値を示した。

実験 2.

使用動物数と LD₅₀ 値 実験1で使用動物数を各群5匹としたが、雄で死亡率が0, 100%を除き、対数確率紙上2点しか得られなかった。この条件で Litchfield-Wilco-

Table 3. Hematological Examination of Rats at 15 Days after Single Oral Administration of OPP

| Sex | Dose mg/kg | No. of rats sampled ¹⁾ | WBC $\times 10^8/\text{mm}^3$ | RBC $\times 10^6/\text{mm}^3$ | Hgb g/dl | Hct % | MCV μ^3 | MCH $\mu\mu\text{g}$ | MCHC % |
|--------|------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| Male | 0 | 5 | 8.13 \pm 1.13 ²⁾ | 8.14 \pm 0.24 | 16.4 \pm 0.38 | 45.1 \pm 1.51 | 55.8 \pm 0.45 | 20.2 \pm 0.49 | 36.3 \pm 1.01 |
| | 1000 | 5 | 10.0 \pm 2.96 | 7.66 \pm 0.42 | 15.4 \pm 0.84 | 42.6 \pm 2.37 | 55.8 \pm 0.45 | 20.2 \pm 0.54 | 36.2 \pm 1.03 |
| | 1400 | 5 | 8.60 \pm 1.10 | 7.35 \pm 0.49 | 15.4 \pm 1.16 | 41.3 \pm 3.46 | 56.2 \pm 1.09 | 21.0 \pm 0.29 | 37.3 \pm 0.47 |
| | 2000 | 3 | 11.2 \pm 2.26 | 7.68 \pm 0.17 | 15.9 \pm 0.06 | 43.6 \pm 0.35 | 56.7 \pm 1.15 | 20.7 \pm 0.46 | 36.3 \pm 0.12 |
| | 2700 | 4 | 9.85 \pm 3.35 | 7.51 \pm 0.96 | 15.9 \pm 2.17 | 43.8 \pm 7.67 | 58.0 \pm 3.37 | 21.2 \pm 0.53 | 36.5 \pm 1.55 |
| | 3800 | 0 | — | — | — | — | — | — | — |
| Female | 0 | 4 | 6.80 \pm 0.72 | 8.16 \pm 0.39 | 16.9 \pm 0.54 | 46.3 \pm 1.82 | 56.8 \pm 1.89 | 20.5 \pm 0.85 | 36.4 \pm 0.50 |
| | 1400 | 4 | 6.25 \pm 0.83 | 7.84 \pm 0.66 | 16.3 \pm 1.29 | 44.6 \pm 3.47 | 56.8 \pm 0.50 | 20.7 \pm 0.29 | 36.5 \pm 0.21 |
| | 2000 | 3 | 5.60 \pm 0.40 | 7.08 \pm 0.77 | 14.5 \pm 1.73 | 40.5 \pm 3.80 | 57.3 \pm 0.58 | 20.6 \pm 0.38 | 35.8 \pm 1.15 |
| | 2700 | 3 | 7.06 \pm 0.90 | 7.47 \pm 0.33 | 15.4 \pm 0.83 | 43.2 \pm 1.80 | 57.3 \pm 1.15 | 20.3 \pm 0.71 | 35.6 \pm 0.66 |
| | 3800 | 1 | 9.1 | 8.41 | 17.1 | 45.6 | 55.0 | 20.3 | 37.3 |
| | 5400 | 1 | 6.2 | 7.08 | 14.0 | 38.9 | 55.0 | 19.8 | 35.9 |

1) The rats survived during the period of examination.

2) mean \pm S.D.

Table 4. Serum Biochemical Examination of Rats at 15 Days after Single Oral Administration of OPP

| Sex | Dose mg/kg | No. of rats sampled ¹⁾ | TP g/dl | GLU mg/dl | UN mg/dl | GPT K-U/ml | ALP KA-U/dl | CHO mg/dl | ChE ΔpH |
|--------|------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| Male | 0 | 5 | 6.42 \pm 0.13 ²⁾ | 134 \pm 4.8 | 18.8 \pm 0.8 | 42.4 \pm 3.7 | 49.4 \pm 2.0 | 52.4 \pm 0.9 | 0.148 \pm 0.02 |
| | 1000 | 5 | 6.60 \pm 0.21 | 141 \pm 4.9 | 18.8 \pm 2.4 | 43.0 \pm 3.4 | 47.2 \pm 7.6 | 55.6 \pm 2.9 | 0.174 \pm 0.02 |
| | 1400 | 5 | 6.76 \pm 0.36 | 158 \pm 21 | 20.4 \pm 2.1 | 41.8 \pm 7.2 | 51.4 \pm 5.1 | 55.6 \pm 6.1 | 0.182 \pm 0.02 |
| | 2000 | 3 | 6.60 \pm 0.10 | 146 \pm 15 | 19.6 \pm 1.2 | 42.6 \pm 3.2 | 51.3 \pm 3.2 | 56.0 \pm 5.3 | 0.150 \pm 0.02 |
| | 2700 | 4 | 6.65 \pm 0.06 | 138 \pm 21 | 19.2 \pm 2.1 | 39.0 \pm 2.2 | 51.0 \pm 4.0 | 56.0 \pm 3.3 | 0.180 \pm 0.03 |
| | 3800 | 0 | — | — | — | — | — | — | — |
| Female | 0 | 5 | 5.40 \pm 1.04 | 131 \pm 18 | 21.8 \pm 3.8 | 41.6 \pm 2.6 | 37.6 \pm 2.9 | 63.5 \pm 13 | 0.512 \pm 0.06 |
| | 1400 | 5 | 4.98 \pm 1.41 | 127 \pm 12 | 19.8 \pm 2.4 | 49.6 \pm 11 | 32.6 \pm 2.3 | 55.2 \pm 19 | 0.578 \pm 0.11 |
| | 2000 | 3 | 6.53 \pm 0.51 | 127 \pm 5.0 | 19.3 \pm 5.5 | 48.0 \pm 13 | 35.3 \pm 4.9 | 69.3 \pm 14 | 0.540 \pm 0.15 |
| | 2700 | 3 | 5.76 \pm 0.92 | 127 \pm 6.7 | 19.7 \pm 6.7 | 41.7 \pm 12 | 34.7 \pm 4.1 | 66.7 \pm 17 | 0.517 \pm 0.12 |
| | 3800 | 1 | 6.6 | 154 | 18 | 44 | 40 | 76 | 0.52 |
| | 5400 | 1 | 6.5 | 133 | 24 | 43 | 50 | 36 | 0.36 |

1) The rats survived during the period of examination.

2) mean \pm S.D.

xon 法より LD₅₀ 値を算出した。この値がどれくらい信頼できるかの検討として、各群15匹を用い、これを3つに分け、5匹用いたそれぞれ独立した実験A, B, Cと考えた場合と15匹用いた1つの実験T(=A+B+C)と考えた場合とで比較をした。その結果を Table 5 に示す。A, B, Cそれぞれ LD₅₀ 値 2800, 2700, 2240mg/kg, slope function 1.85, 1.43, 1.75 となり、Tは LD₅₀ 値 2550mg/kg, slope function 1.65 となり、それらの95%信頼限界は15匹用いたTよりも5匹用いたA, B, Cの方が広がった。

考 察

OPP の Fisher 系ラットにおける急性経口毒性について検討した結果、LD₅₀ 値は雄 2600mg/kg, 雌 2850 mg/kg であり、前報¹⁾ の OPP-Na で明らかに性差が認められたのに対し、OPPでは認められなかった。OPP-Na の場合、雄で 1000mg/kg 前後であり、約 2.6倍高い値を示した。また週令、系統、飼育条件等に差があるにもかかわらず、Hodge らの報告²⁾ の成熟雄ラットでの 2700mg/kg と近い値であった。

一般症状は OPP-Na における腹部膨満や体重の特異

Table 5. Mortality and LD₅₀ for Each Groups of Male Rats Administered Orally with OPP

| | Groups ²⁾ | | | |
|--|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| | A | B | C | T |
| Dose (mg/kg) | | | | |
| 1400 | 0/5 ¹⁾ | 0/5 | 1/5 | 1/15 |
| 1800 | 2/5 | 0/5 | 2/5 | 4/15 |
| 2300 | 2/5 | 2/5 | 2/5 | 6/15 |
| 3000 | 3/5 | 5/5 | 4/5 | 12/15 |
| 3800 | 3/5 | 3/5 | 4/5 | 10/15 |
| LD ₅₀ (mg/kg) ¹⁾ | 2800 | 2700 | 2240 | 2550 |
| Confidence limit (p=0.05) | 1915—4094 | 2087—3493 | 1641—3057 | 2133—3048 |
| Slope function | 1.85 | 1.43 | 1.75 | 1.65 |
| Confidence limit (p=0.05) | 0.88—3.88 | 0.99—2.08 | 1.00—3.05 | 1.24—2.18 |

- 1) LD₅₀ was calculated by the Litchfield-Wilcoxon method.
- 2) Group T was divided into group A, B and C.
- 3) Mortality ratio (No. of deaths/No. dosed)

な変動はみられず、流涙、自発運動の低下等がみられ、死亡例では Hodge らの報告と同様に呼吸数の低下が確認された。体重変動は投与後 1～2 日目まで下降し、その後上昇へ向った。死亡時期は 2～35 時間以内にそのほとんどが死亡し、1 例のみが 70 時間で死亡した。Hodge らの報告で 48 時間以内にほとんど死亡し、1 例が 6 日目で死亡としているのとはほぼ同様の結果であり、OPP-Na の 1 週間以上経っても死亡がみられたのと対象的であった。

解剖・組織所見として死亡例で副腎の腫大（これは OPP-Na でもみられた）、胃腸管粘膜の剥離、腎乳頭の巣状壊死、肝細胞の空胞化が認められた。なお OPP-Na の胃に対する顕著な出血等は今回の OPP では認められず、馬淵ら⁴⁾のparaオキソ安息香酸ブチルのナトリウム塩の胃に対する出血等から考えて強アルカリの作用と考えられた。

以上 OPP と OPP-Na ではかなり違った急性毒性であることが示された。

今回、OPP の急性経口毒性試験で、使用動物数を各群 15 匹用いた実験 T (= A + B + C) とこれらを 3 つに分け、5 匹用いたそれぞれ独立した実験と考えた場合での LD₅₀ 値について比較を行った結果、T は LD₅₀ 値 2550mg/kg, slope function 1.65 で、A, B, C はそれぞれ LD₅₀ 値 2800, 2700, 2240mg/kg, slope function 1.85, 1.43, 1.75 となり、5 匹という少ない動物数を用いた場合では、95%信頼限界は広くなったが、LD₅₀ 値, slope function は 15 匹用いた値とかなり近い値となった。Table 5 の LD₅₀ 値の算出は、最小 2 乗法で求めた回帰式を Litchfield-Wilcoxon 法へ適用したものである

が、Litchfield-Wilcoxon 法の対数確率紙上で、A, B, C のそれぞれの用量—反応関係の結果へ T の回帰式を適用したところ χ^2 検定へ適合した。これより A, B, C はそれぞれ T と同じ用量—反応直線を持つことができ、T と同じ LD₅₀ 値 2550mg/kg, slope function 1.65 であると言える。逆への適用つまり T の結果へそれぞれ A, B, C の回帰式を適用したところ B だけが χ^2 検定で不適合となった。

実験 1 の結果と実験 2 の T との比較では、slope function が 1.36 および 1.65 とやや異なる値であったが、LD₅₀ 値は 2600mg/kg および 2550mg/kg と近い値となった。これについても上記と同様の検定に適合し、実験 1 の雄も LD₅₀ 値 2550mg/kg, slope function 1.65 であると言える。逆の適用では同様の検定に不適合となった。実験 1 の雄と実験 2 の B では用量—反応関係がやや不良であり、このような場合に、最小 2 乗法を適用した用量—反応直線では他のグループに比べて少し異なった直線を示し、slope function はやや異なったが、LD₅₀ 値は対数確率紙上の中心部の値であり、slope function が χ^2 検定を満たす範囲で変動しても、それ程影響を受けずかなり良い値が得られると思われる。

以上より、急性毒性試験で各群 5 匹の動物数を用いた場合、all or none の反応であるためバラツキはやむをえず、slope function が異なることがある点や、95%信頼限界が広くなることを除けば、15 匹用いた場合と LD₅₀ 値に大差ないと思われる。

まとめ

① オルトフェニルフェノール (OPP) の急性経口毒性を Fisher 系ラット雌雄 (8 週令、一夜絶食) を用い、

14日間、観察した。

②投与に伴い自発運動の低下、流涙がみられた。死亡は2～35時間以内に起こり、副腎の腫大、腎乳頭部の壊死、肝細胞の空胞化が認められた。

③50%致死量(14日)は雄2,600mg/kg, 雌2,850mg/kgであった。

④使用動物数とLD₅₀値の関係についての考察を加えた。

文 献

1) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30

-2, 57, 1979

2) Litchfield, J. T. Jr., and Wilcoxon, F.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949

3) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J. Jr., Spencer, H. C., and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 104, 202, 1952

4) 馬淵依子, 川野澄江, 藤田 博, 水尾昭江, 樺島順一郎, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 103, 1975

優性致死試験法の開発 1. 長期投与優性致死試験

平賀 興 吾*, 小 縣 昭 夫*, 吉 田 誠 二*, 安 藤 弘*
久 保 喜 一*, 益 淵 正 典**

Improvement of the Methods in Dominant Lethal Test I. Dominant Lethal Test with Long Term Administration

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

Keywords: 優性致死試験 dominant lethal test, 長期投与 long term administration, エチルメタンサルホネート ethylmethanesulphonate, マイトマイシンC mitomycin C, マウス mouse

優性致死現象とは、雌雄のどちらかに由来する配偶子(卵あるいは精子)のゲノムに変化が起ったため受精卵が途中で発生を停止し死に致ることをいうが、遺伝的障害評価の際の簡便な一指標として、最近では環境中の突然変異原物質を検出するのに頻繁に用いられる傾向にある。

普通、マウスを用いた優性致死試験では、雄に1回(急性)あるいは5~7回(亜急性)被検物質を投与後、精子形成に要する6週の間、毎週末処置未経産の雌と交配を続け、妊娠中期に胎児調査が行われている。しかし、安全性の有無を評価する際に対象となってくる化学物質のほとんどは微量かつ長期的に摂取されるものが多く、体内での代謝や蓄積性も含めて、その作用は急性試験の結果からは推し測れぬものがある。優性致死試験においても長期投与による作用の調べられることが望まれるが、これまでに試験法の開発を目的として行われた例はほとんどなく、その是非を検討するにもほとんど資料のない現状である。

著者らは以上の観点から、長期投与による優性致死試験の必要性を感じ、いくつかの化学物質についてそれを試みてきた^{1,2)}。今回さらにその有効性を検討するため、既知突然変異原物質であり、優性致死試験においても陽性対照物質としてよく用いられる ethylmethanesulphonate (以下EMSと略す)と mitomycin C (以下MMCと略す)について、長期(4, 6, 8週)間投与後の優性致死現象を調べたので報告する。またその結果を、通常行われている1回投与後のそれと^{3,4)}比較しつつ、ルーチンワークとして行う際の有用性についても論じたい。

材料および方法

1. 実験動物と飼育条件 雌雄ともJCL/ICRマウス(日本クレア株式会社)を用い、4週令で購入後8週令まで予備飼育し、発育良好なものを選び実験に供した。さらに雄に関しては、先天的致死因子の保有の有無を検討するため、すべてを投与開始前に無処置未経産の雌と予備交配し、正常な妊娠・胎児所見を示したもののみを使用した。選択後の使用動物数を表1に示す。飼育は温

表 1. 投与群, 投与量および使用動物数

| 物質 | 群 | 投与量 (mg/kg) | 投与開始 ^a 時の雄数 | 交配時期と雌数 | | |
|---------|---|----------------|---------------------------|----------------|----|----|
| | | | | 4週 | 6週 | 8週 |
| EMS | D | 203.4 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | E | 156.5 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | F | 120.3 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | G | 92.6 | 10 | — ^b | 20 | 20 |
| | H | 71.2 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | I | 54.7 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| MMC | J | 42.1 | 10 | — ^b | 20 | 20 |
| | D | 1.75 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | E | 1.35 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | F | 1.04 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | G | 0.80 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | H | 0.62 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| Control | I | 0.48 | 10 | — ^b | 20 | 20 |
| | J | 0.37 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| | | 0 | 10 | 10 | 20 | 20 |

a; あらかじめ予備交配し自然保有致死因子を持つものは抜いた。

b; 4週目の交配群からは抜いた。

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

** 広島大学理学部

度 $25 \pm 1^\circ$ ，湿度 $55 \pm 5\%$ ，照明8～17時，換気毎時10回の飼育室にて行った。雄は全期間プラスチックケージにて1匹飼い，雌は交配前日までアルミケージにて10匹飼い，交配後はプラスチックケージにて2匹飼いとす。雌雄とも全期間を通じ，固型飼料 CE-2（日本クレア株式会社）と水道水を自由に与えた。

2. 試料 ethylmethanesulphonate (EMS) は Eastman Kodak Co. 製，Lot No. B4B を，mitomycin C (MMC) は生化学工業株式会社製，Lot No. M1070 を用いた。これらは毎回使用直前に滅菌蒸留水にて希釈して用いた。

3. 試料投与量の決定 あらかじめ予備実験を行い，最小作用量が EMS で $90 \text{ mg/kg}^{\text{a}}$ ，MMC では $1.75 \sim 2.28 \text{ mg/kg}^{\text{a}}$ であることを得た。この値を参考にそれぞれ1.3の公比で7の投与量群を設けた。表1に投与群，投与量および使用動物数を示す。以下本論文では煩雑さを避けるため，それぞれの物質の投与量を数値ではなく，表1中の群の記号で示すこととする。また群の記号の付し方は我々の先の報告⁴⁾に準じた。

4. 投与方法 毎日連続投与が望まれるが，頻回投与によるマウスへの影響が大きいと思われたため，EMS，MMCとも4日毎に1回腹腔内投与した。両物質とも投与容量が体重100g当り1mlとなるよう希釈調整して行っ

た。

5. 交配方法 投与開始日から4，6，8週目に交配した。交配は雄1匹に対し10週令の無処置未経産の雌2匹を4日間同居させて行った。毎朝陰栓の有無を確認し，陰栓の認められたものを妊娠成立とみなし，その日を妊娠0日とし，別ケージにて雄と分離飼育した。

6. 胎児および排卵数調査 投与開始後4，6，8週に交配した妊娠12～13日の母獣を屠殺開腹し，卵巢および子宮を摘出，卵巢については黄体数を調べ排卵数とし，子宮については着床数，生存胎児数，早・後期死胚数を調べた。

7. 精巣，精巣上体の重量および組織学的所見 8週間の投与・交配後，各群1～5匹の雄についてその精巣重量を測定した。また測定後ただちに精巣および精巣上体を固定し，常法により組織標本を作製観察した。

結果

1. 死亡例 (図1a) EMS: D群では4日目に1匹の死亡がみられた。さらに8日目に1匹，12日目に3匹，16日目に3匹，28日目に1匹が死亡し，全投与期間を通じ生き残ったものは1匹であった。E群では36日目に1匹，44日目に1匹，G群で44日目に1匹が死亡した。F，H，I，J群では死亡はみられず，投与量に対する作用関係は顕著であった。MMC: D群で投与48日目，52

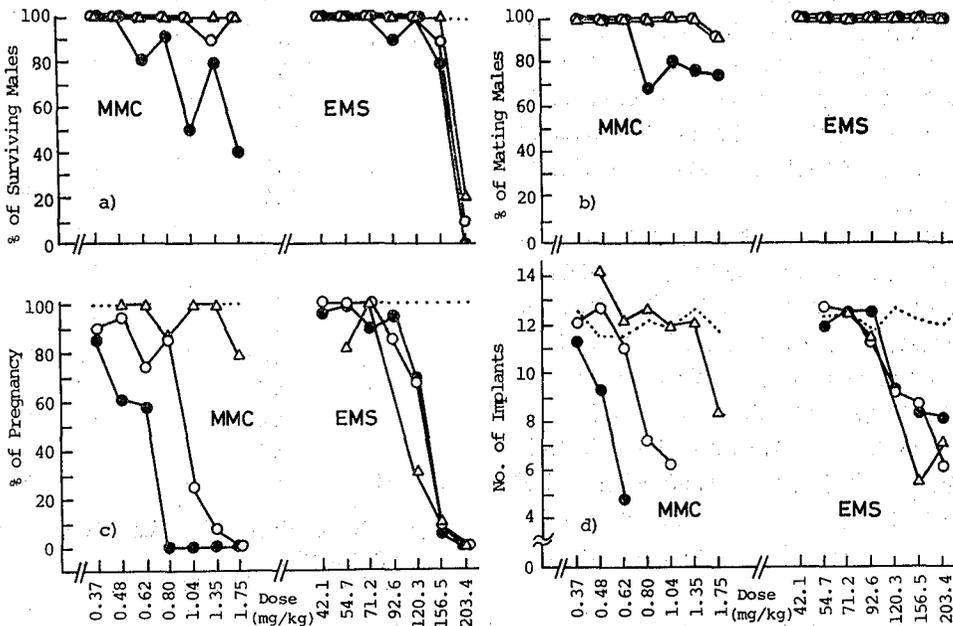


図1. EMS, MMC 腹腔内長期投与における投与量および投与期間と，a) 生存率，b) 交尾率，c) 妊娠率，d) 1母獣当りの平均着床数の関係。 Δ — Δ 4週間， \bigcirc — \bigcirc 6週間， \bullet — \bullet 8週間投与後の結果および……陰性対照の結果を示す。

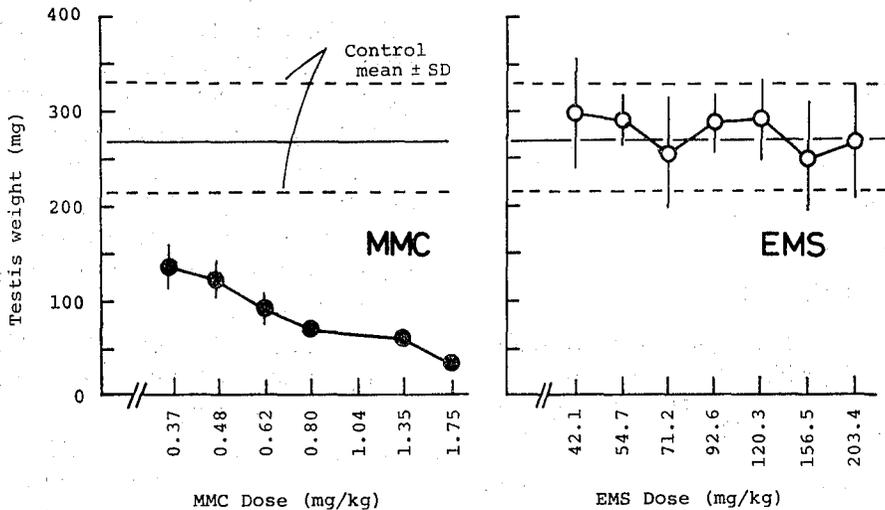


図 2. EMS, MMC 8週間腹腔内投与後の精巣重量と投与量の関係

日目に各1匹, E群では32日目, 52日目に各1匹, F群では48日目に3匹, H群では48日目に1匹が死亡した。G, I, J群においては死亡はみられなかった。MMC投与により死亡した動物のほとんどは腹水が認められた。EMSでは投与開始後早い時期に, またMMCでは比較的時間が経過してから死亡する傾向がみられた。

2. 交尾率(図1b) 交配に使用した雄数当りの交尾した雄数で換算した値を求めた。一般にJCL/ICRマウスにおける交尾率は75~100%であるが^{3,4)}, 今回用いた雄1匹に対し雌2匹の4日間同居法ではControl群が100%の交尾率を示しており, 本方法により交尾はほぼ完全に成立するものと判断される。EMS: すべての群において生存した雄はすべて交尾可能であった。先にも述べたようにD群では多数が死亡したにもかかわらず, 生存した1匹は交尾能力を維持していた。MMC: 4, 6週時のD群に, また8週時のD~G群に顕著な低下がみられた。8週間投与により死亡例が多数認められたことから(図1a)交尾能力にも影響のおよんでいることが考えられる。雌に関する交尾率は付表1に示した。

3. 妊娠率(図1c) 交尾した雄数当りの妊娠させた雄数で換算した値を求めた。これまで我々が得ているJCL/ICRマウスにおける妊娠率は90%以上であるが^{3,4)}, 今回のControl群の値は4~8週時とも100%であった。EMS: 4~8週時のD~F群で顕著な低下をみたが, 投与期間の長短による差はなかった。これらの群は交尾は正常に行っており(図1b), 明らかに何らかの欠陥を持つ精子が放出されていることを示唆している。MMC: EMSと同様低下は特に顕著であった。またそれ

は, 投与期間が長くなればなるほど著しく, 8週時ではD~G群まで0%であった。雌に関する妊娠率は付表1に示した。

4. 着床数(図1d) 妊娠した雌1匹当りの平均着床数を求めた。これまで我々が得ているJCL/ICRマウスでの平均着床数は, $11.75 \pm 2.79 \sim 13.41 \pm 1.59$ であり³⁻⁵⁾ 今回用いた動物のControl群では $11.80 \pm 1.62 \sim 12.75 \pm 2.79$ でよく一致していた。EMS: 4~8週時ともD~F群で有意な減少をみたが投与期間の長短による顕著な差異は認められなかった。MMC: 投与期間が長くなればなるほど着床数は減少し, 特に8週時ではI群でも有意な低下が認められた。

5. 精巣重量(図2)とその組織所見(図3) EMS, MMC 8週間投与後の精巣重量を測定した。その結果, EMS投与群についてはControl群とほぼ同じであったが, MMC群ではdose-responseをとまなり顕著な重量の減少がみられた。特に最高投与量群であるD群では精巣が米粒大に萎縮していた。精巣重量測定後ただちに精巣および精巣上体を固定し, 組織標本作製した。観察の結果, EMS群では精巣および精巣上体ともほぼControl群と同様の所見を得たが(図3C, D), MMC群では, D~G群で精細管内にはわずかな精原細胞と支持細胞が認められたのみで, 精母細胞, 精細胞, 精子はまったく観察されなかった(図3E)。また頭部, 体部, 尾部の精巣上体管中においても精子は認められなかった(図3F)。すでに精原細胞において強度のcell killingが起こり, 精子形成が行われないものと思われる。またH~J群は精原細胞から精子に致る細胞は観察されるが, そ

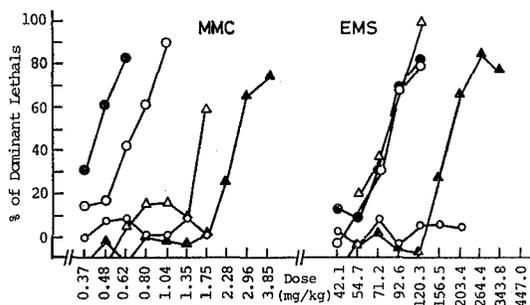


図4. EMS, MMC 腹腔内長期投与における投与量および投与期間と優性致死誘発率の関係。△—△ 4週間、○—○ 6週間、●—● 8週間。○—○ 予備(無処置時)交配、▲—▲ 1回投与実験の結果を示す。

の数は Control 群に比べて少ない。これは 8 週間投与後 D~G 群で交尾は行いが(図1b)、妊娠雌が得られない(図1c)現象、および H~J 群で妊娠率が低下する(図1c)現象の原因と考えられる。

6. 優性致死誘発率(図4) Röhrbornの公式⁶⁾に従い優性致死誘発率を求めた。なお比較のために、予備交配時に求めた無処置時の値を小白丸印で、また通常の試験法(腹腔内1回投与)において EMS, MMC の最も顕著に優性致死現象の現われる時期に調べた値を黒三角印で図中に付記した。両物質とも、その dose-response curve は投与期間の長短にかかわらず非常に似通った形状を呈し、その作用は同一機序によるものと思われる。**EMS:** 最も高い値を示した E 群は 1 回投与試験ではまったく作用は認められない。F, G 群も同様であり、1 回投与後の値に比べ低投与量群でも顕著な優性致死誘発率の上昇がみられる。しかし本物質は 4 週以上投与期間を延長しても値は変化せず、薬物あるいは障害の蓄積性はないものと思われる。**MMC:** EMS と同様に 1 回投与試験ではまったく作用の認められない低投与量群でも顕著な優性致死誘発率の上昇をみた。また本物質は EMS とは異なり、投与期間が長くなればなるほどさらに低投与量でも高い値を示すようになった。

考 察

1. 長期投与による優性致死試験の感度 図4に示されたごとく、両物質の dose-response curve は投与期間の長短にかかわらずそれぞれ似通った形状を呈し、その作用は同一機序によることがうかがえ、長期間投与することによる弊害はないものと思われる。一方、感度の上昇は顕著に認められ、1 回投与ではまったく作用の認められない低投与量でもその作用を検出できることが明らかである。

Hastings ら⁷⁾は、triethylenemelamin (TEM) を飼料に混じ、10日間と45日間摂取させたマウスについて早期死胚の出現率を比較し、長期間投与することにより検出感度が高められることを示した。これは投与方法としても検体添加飼料による経口投与が可能であることを示している。Šrám はさらに微量の EMS(10mg) を 20回(日)連続投与しその後の優性致死の検出を試みているが結果は陽性であった⁸⁾。先の筆者らのデータからも明らかのように、この 10mg 投与量は 1 回投与ではまったく検出不可能な量である³⁾。

長期投与による方法は、微量でも長期間投与することにより優性致死現象を検出することができる、非常に有効な方法だと考えられる。

2. 投与量 今回の実験では、連続投与における総投与量が 1 回投与におけるそれを大幅に上回っている。これは比較のため先に報告した 1 回投与実験における投与量^{3,4)}を連続投与における 1 回の量としたためであるが、もしも投与量を同一とし、それを分割した場合はどうであろうか。先ほど述べた EMS の 200mg 1 回投与と 10 mg 20回(日)投与実験³⁾では、投与完了後 8 週間におたり交配を続けそれぞれ最も高い優性致死誘発率を示す時期で比較すると、分割投与した場合は 1 回投与に比べその値は明らかに低いが、交配しつづけた期間の優性致死誘発率の和はほぼ同一であった。物質によっては用量と作用反応間に threshold のあることが考えられ、あらゆる実験においてこの投与量の決定は問題となるであろう。さらに多くの物質で検討されることが望まれる。

現在著者らは、繁殖実験として考える範囲での数段階の高用量を投与して、まず被検物質に優性致死性があるか否かを判断し、もし疑いがあればさらに低投与量の数群を設け、用量作用反応関係が存在するか否かを調べる方法をとりようとしている。一般に実験動物は個体により感受性に差があるため結果はばらつきやすいが、使用動物数を増やすことおよび日常我々が接触しているよりもさらに高濃度の物質を投与することが可能であり、それにより感度は多少にぶくとも大きな効果が得られることが期待されるからである。しかしその反面、急性試験にも共通することではあるが、日常の実際量と実験投与量との差、および多量投与するために調べようとする反応以外の要因で生じる疑優性致死現象、たとえば今回、MMC の高投与群にみられた生殖細胞での cell killing などには十分な注意が払われねばならない。

3. ルーチンとして行う場合の問題

ここで理想的なものとは感度の高いことはもとより、

①技術的に簡単で、②時間および③材料や設備などに費用のかからぬ方法であろう。長期投与による試験法は以下にふれるごとく、このいずれの条件をも満たしてくれるものであった。①に関してはかねて優性致死試験法の長所として論ぜられるところである。②、③に関しては、図4で示唆されたごとく、EMSやMMCのように精子形成過程の異なる時期に作用する物質であっても6~8週間投与すれば同時に優性致死現象を示すようになることから、投与後最低一回の交配によりその影響を検討することができる。このことは非常に大きな長所であり、投与後毎週交配を続ける従来の方法に比べ、使用する雄数は変わらないが交配回数とそれに必要な雌数は1/6~1/8となり、また交配と解剖に要する労力、時間や費用は大幅に縮小される。これまで優性致死試験は簡便ではあるが手間や実施コストが高くつく^{9,10)}と言われてきたことを十分に補うものである。

また、慢性毒性試験などで飼育されている動物を使用したり、それと同一ロットの動物で並行して実験を開始すれば、遺伝毒性以外の毒性試験結果も参考にでき、総合的な安全性の評価を下すことが可能である^{1,2)}。

(本研究は日本環境変異原学会第6回研究発表会1977年9月大阪、日本遺伝学会第49回大会1977年9月札幌で発表した)

文 献

- 1) 益淵正典, 高橋昭夫, 高橋 省, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 100, 1977
- 2) 小縣昭夫, 縄井寿美子, 吉田誠二, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾, 益淵正典: 東京衛研年報, 29-2, 99, 1978
- 3) 吉田誠二, 益淵正典, 高橋昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 192, 1977
- 4) 高橋昭夫, 益淵正典, 吉田誠二, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 187, 1977
- 5) 益淵正典, 高橋昭夫, 高橋 省, 吉田誠二, 安藤弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 154, 1977
- 6) Röhrborn, G.: *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970, Spring-Verlag, Berlin
- 7) Hastings, S. E., K. W. Huffman, and M. A. Galls: *Mutation Res.*, 40, 371, 1976
- 8) Šrám, R. J.: *Mutation Res.*, 41, 25, 1976
- 9) Committee 17, *Science*, 187, 503, 1975
- 10) 岩原繁雄: 遺伝毒性とその試験, 講談社サイエンスフィック, 東京, 1977

付表 1. 生殖生物学的所見

| 実験群 | | | 使用動物数 | | | | 交尾確認数 | | 交尾率(%) | | 妊娠動物数 | | 妊娠率(%) | |
|--------|----------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|-------|-----|----------------|----------------|-------------------|----------------|------------------------|----------------|
| 物 質 | 群と 投与量 (mg/kg) | 交 配 週 | ♂ | | | ♀ ^④ | ⑤ | ⑥ | ♂ ^⑦ | ♀ ^⑧ | ♂ ^⑨ | ♀ ^⑩ | ♂ ^⑪ | ♀ ^⑫ |
| | | | 投 ^① 与 | 死 ^② 亡 | 交 ^③ 配 | 交 配 | ♂ | ♀ | 交 尾/ 交配 | 交 尾/ 交配 | 妊 せ せ 娠た | 妊 し 娠た | 妊 せ せ 娠た さ | 妊 し 娠た |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| EMS | D | 4 | 10 | 8 | 2 | 2 | 2 | 2 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 * | 0 * |
| | | 6 | 10 | 9 | 1 | 2 | 1 | 1 | 100 | 50.0 | 0 | 0 | 0 | 0 * |
| | 203.4 | 8 | 10 | 10 | 0 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | E | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 1 | 1 | 10.0 | 10.0*** |
| | | 6 | 10 | 1 | 9 | 18 | 9 | 15 | 88.8 | 83.3 | 1 | 1 | 11.1*** | 6.7*** |
| | 156.5 | 8 | 10 | 2 | 8 | 16 | 8 | 16 | 100 | 100 | 1 | 1 | 12.5*** | 6.3*** |
| | F | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 3 | 3 | 30.0** | 30.0** |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 18 | 100 | 90.0 | 7 | 12 | 70.0 | 66.7* |
| | 120.3 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 9 | 14 | 90.0 | 70.0* |
| | G | 4 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 10 | 16 | 100 | 84.2 |
| | 92.6 | 8 | 10 | 1 | 9 | 18 | 9 | 18 | 100 | 100 | 9 | 17 | 100 | 94.4 |
| H | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 20 | 100 | 100 | |
| 71.2 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 9 | 17 | 90.0 | 89.5 | |
| I | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 8 | 8 | 80.0 | 80.0 | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 20 | 100 | 100 | |
| 54.7 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 10 | 19 | 100 | 100 | |
| J | 4 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 20 | 100 | 100 | |
| 42.1 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 10 | 18 | 100 | 94.7 | |
| MMC | D | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 9 | 9 | 90.0 | 90.0 | 7 | 7 | 77.8 | 77.8 |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 12 | 100 | 60.0** | 0 | 0 | 0 *** | 0 *** |
| | 1.75 | 8 | 10 | 6 | 4 | 8 | 3 | 3 | 75.0 | 37.5*** | 0 | 0 | 0 ** | 0 *** |
| | E | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 |
| | | 6 | 10 | 1 | 9 | 18 | 9 | 14 | 100 | 77.7 | 1 | 1 | 11.1*** | 7.1*** |
| | 1.35 | 8 | 10 | 2 | 8 | 16 | 6 | 7 | 75.0 | 43.8*** | 0 | 0 | 0 *** | 0 *** |
| | F | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 17 | 100 | 85.0 | 4 | 4 | 40.0* | 23.5*** |
| | 1.04 | 8 | 10 | 5 | 5 | 10 | 4 | 5 | 80.0 | 50.0** | 0 | 0 | 0 ** | 0 *** |
| | G | 4 | 10 | 0 | 8 | 8 | 8 | 8 | 100 | 100 | 7 | 7 | 87.5 | 87.5 |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 8 | 16 | 80.0 | 84.2 |
| | 0.80 | 8 | 10 | 1 | 9 | 18 | 6 | 10 | 66.7 | 55.6** | 0 | 0 | 0 *** | 0 |
| H | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 19 | 100 | 95.0 | 9 | 14 | 90.0 | 73.7* | |
| 0.62 | 8 | 10 | 2 | 8 | 16 | 8 | 14 | 100 | 87.5 | 5 | 8 | 62.5 | 57.1** | |
| I | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 17 | 100 | 85.0 | 10 | 16 | 100 | 94.1 | |
| 0.48 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 8 | 12 | 80.0 | 60.0** | |
| J | 4 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 18 | 100 | 90.0 | |
| 0.37 | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 17 | 100 | 85.0 | |
| Cont | Cont | 4 | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 10 | 10 | 100 | 100 |
| | | 6 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 95.0 | 10 | 20 | 100 | 100 |
| | | 8 | 10 | 0 | 10 | 20 | 10 | 20 | 100 | 100 | 10 | 20 | 100 | 100 |

① 投与した匹数, ② 投与期間中に死亡した匹数, ③ ①-②=③, ④ ③に同居させた雌の合計匹数, ⑤ 同居させた雌2匹に産栓が確認されない時は除く, ⑥ 産栓を確認した雌の合計匹数, ⑦ ⑤/③, ⑧ ⑥/④, ⑨ 同居させた雌2匹のうち1匹でも妊娠を認めたものに対する雄数, ⑩ 開腹時, 着床痕・胚胎児の認められた雌数, ⑪ ⑨/⑤, ⑫ ⑩/⑥. (統計) χ^2 検定 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ a 交配群よりはばいた.

付表 2. 排卵数および胎児に関する所見 (その1)

| 実験群 | | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | | | | | | | |
|-------------|---------------------------------------|----------------|-------------|-------|--------------|-----------|--------------|-----------|------------|----|-----------|----|-----------|----|--------------|
| 物質 | 量 (mg/kg) | 交配週 | 排 卵 数 | 着 床 数 | 未 着 床 数 | 生 存 胎 児 数 | 早 期 死 胚 数 | 後 期 死 胚 数 | 総 死 胚 数 | | | | | | |
| EMS | D 203.4 | 4 ^a | — | — | — | — | — | — | — | | | | | | |
| | | 6 ^a | — | — | — | — | — | — | — | | | | | | |
| | | 8 ^b | — | — | — | — | — | — | — | | | | | | |
| E 156.5 | 4 6 8 | 11 | 7 | 4 | 6 | 1 | 0 | 1 | | | | | | | |
| | | 14 | 6 | 8 | 5 | 1 | 0 | 1 | | | | | | | |
| | | 11 | 8 | 3 | 0 | 7 | 1 | 8 | *** | | | | | | |
| F 120.3 | 4 6 8 | 32 | 10.67±4.16 | 16 | 5.33±3.06*** | 16 | 5.33±1.16** | 2 | 0.67±1.16 | 13 | 4.33±2.89 | 1 | 0.33±0.67 | 14 | 4.66±2.30*** |
| | | 156 | 13.00±2.04 | 104 | 8.67±3.58** | 52 | 4.33±3.85** | 45 | 3.75±2.83 | 53 | 4.42±1.73 | 6 | 0.50±0.80 | 59 | 4.92±2.15*** |
| | | 165 | 11.79±1.72* | 116 | 8.29±2.79*** | 49 | 3.50±2.85*** | 43 | 3.07±6.99 | 71 | 5.07±2.20 | 2 | 0.14±0.36 | 73 | 5.21±2.29*** |
| G 92.6 | 4 ^b 6 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 200 | 12.50±2.25 | 146 | 9.13±3.22** | 54 | 3.38±2.55** | 70 | 4.38±3.07 | 63 | 3.94±2.21 | 13 | 0.81±0.91 | 76 | 4.75±2.21*** |
| | | 203 | 11.94±2.11 | 156 | 9.18±3.40** | 47 | 2.76±2.31** | 66 | 3.88±2.32 | 83 | 4.88±2.29 | 7 | 0.41±0.62 | 90 | 5.29±2.26*** |
| H 71.2 | 4 6 8 | 127 | 12.70±1.49 | 114 | 11.40±1.96 | 13 | 1.30±1.42 | 70 | 7.00±3.56 | 42 | 4.20±2.49 | 2 | 0.20±0.42 | 44 | 4.40±2.27*** |
| | | 260 | 13.00±1.41 | 224 | 11.20±3.00 | 36 | 1.80±2.57 | 154 | 7.70±3.33 | 58 | 2.90±2.22 | 12 | 0.60±0.88 | 70 | 3.50±2.33*** |
| | | 237 | 13.94±2.33 | 211 | 12.41±1.46 | 26 | 1.53±2.90 | 155 | 9.12±2.64 | 49 | 2.88±2.03 | 7 | 0.41±0.62 | 56 | 3.29±1.99*** |
| I 54.7 | 4 6 8 | 118 | 14.75±1.67 | 100 | 12.50±1.77 | 18 | 2.25±2.19 | 89 | 11.13±1.81 | 11 | 1.38±0.92 | 0 | | 11 | 1.38±0.92 |
| | | 267 | 13.35±1.69 | 253 | 12.65±1.73 | 14 | 0.70±1.13 | 229 | 11.45±2.06 | 18 | 0.90±1.12 | 6 | 0.30±0.47 | 24 | 1.20±1.15 |
| | | 265 | 13.95±1.93 | 235 | 12.37±1.64 | 30 | 1.58±1.92 | 205 | 10.79±1.72 | 22 | 1.16±0.83 | 8 | 0.42±0.77 | 30 | 1.58±1.17 |
| J 42.1 | 4 ^b 6 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 287 | 12.75±1.62 | 255 | 12.75±1.62 | 32 | 1.60±2.48 | 228 | 11.40±1.47 | 20 | 1.00±1.17 | 7 | 0.35±0.75 | 27 | 1.35±1.23 |
| | | 246 | 13.67±2.57 | 213 | 11.83±3.15 | 33 | 1.83±1.82 | 193 | 10.72±3.23 | 15 | 0.83±0.79 | 5 | 0.28±0.46 | 20 | 1.11±0.96 |
| MMC 1.75 | D 6 ^a 8 ^a | 77 | 11.00±4.55 | 58 | 8.29±4.23* | 19 | 2.71±2.22 | 42 | 6.00±2.89 | 15 | 2.14±1.35 | 1 | 0.14±0.38 | 16 | 2.29±1.60*** |
| | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

付表 2. 排卵数および胎児に関する所見 (その2)

| 実験群 | | | ① | | ② | | ③ | | ④ | | ⑤ | | ⑥ | | ⑦ | | | | |
|------|----------------|----------------|-------------|-------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|---|---|
| 物質 | 量 (mg/kg) | 交配週 | 排 卵 数 | 着 床 数 | 未 着 床 数 | 生 存 胎 児 数 | 早 期 死 胚 数 | 後 期 死 胚 数 | 総 死 胚 数 | 生 存 胎 児 数 | 早 期 死 胚 数 | 後 期 死 胚 数 | 総 死 胚 数 | 生 存 胎 児 数 | 早 期 死 胚 数 | 後 期 死 胚 数 | 総 死 胚 数 | | |
| MMC | E | 4 | 141 | 14.10±2.38 | 120 | 12.00±3.40 | 21 | 2.10±1.97 | 101 | 10.10±3.76 | 16 | 1.60±1.51 | 3 | 0.30±0.48 | 19 | 1.90±1.60* | | | |
| | | 6 | 16 | — | 15 | — | 1 | — | 12 | — | 3 | — | 0 | — | 3 | — | — | — | |
| | 1.35 | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | F | 4 | 141 | 14.10±4.31 | 119 | 11.90±0.99 | 22 | 2.20±4.08 | 94 | 9.40±1.58 | 22 | 2.20±1.23 | 3 | 0.30±0.48 | 25 | 2.50±1.18** | | | |
| | | 6 | 52 | 13.00±1.63 | 25 | 6.25±5.74** | 27 | 6.75±4.57*** | 22 | 5.50±5.45 | 2 | 0.50±0.58 | 1 | 0.25±0.50 | 3 | 0.75±0.50 | | | |
| | 1.04 | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | G | 4 | 99 | 14.14±0.69 | 88 | 12.57±1.40 | 11 | 1.57±1.81 | 75 | 10.71±1.98 | 12 | 1.71±1.11 | 1 | 0.14±0.38 | 13 | 1.86±0.07 | | | |
| | | 6 | 190 | 11.88±2.39 | 114 | 7.13±4.60*** | 76 | 4.75±3.80*** | 89 | 5.56±3.76 | 23 | 1.44±1.50 | 2 | 0.13±0.34 | 25 | 1.56±1.59*** | | | |
| | 0.80 | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 8 ^a | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| H | 4 | 133 | 13.30±2.87 | 121 | 12.10±2.85 | 12 | 1.20±1.23 | 106 | 10.60±3.41 | 10 | 1.00±0.33 | 5 | 0.50±0.97 | 15 | 1.50±1.43 | | | | |
| | 6 | 184 | 13.14±2.54 | 155 | 11.07±3.17 | 29 | 2.07±1.73 | 129 | 9.21±3.14 | 17 | 1.21±0.97 | 9 | 0.64±0.84 | 26 | 1.86±1.17* | | | | |
| 0.62 | 8 | 95 | 11.88±2.42 | 38 | 4.75±4.17*** | 57 | 7.13±3.18*** | 28 | 3.50±3.93 | 5 | 0.63±0.74 | 5 | 0.63±0.92 | 10 | 1.25±1.28** | | | | |
| | 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| I | 4 | 145 | 14.50±1.84 | 142 | 14.20±1.62** | 3 | 0.30±0.68 | 126 | 12.60±2.12 | 11 | 1.10±1.10 | 5 | 0.50±0.70 | 16 | 1.60±0.97 | | | | |
| | 6 | 221 | 13.81±1.17 | 202 | 12.63±1.75 | 19 | 1.19±1.22 | 175 | 10.94±2.35 | 21 | 1.31±1.40 | 6 | 0.38±0.62 | 27 | 1.69±1.40 | | | | |
| 0.48 | 8 | 151 | 12.58±1.83 | 111 | 9.25±4.07** | 40 | 3.33±3.77** | 93 | 7.75±3.49 | 13 | 1.08±1.00 | 5 | 0.42±0.79 | 18 | 1.50±1.17* | | | | |
| | 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| J | 4 ^b | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 6 | 245 | 13.61±1.75 | 216 | 12.00±2.85 | 29 | 1.61±2.38 | 189 | 10.50±3.42 | 19 | 1.06±1.51 | 8 | 0.44±0.62 | 27 | 1.50±1.54 | | | | |
| 0.37 | 8 | 230 | 13.53±2.12 | 192 | 11.29±2.26 | 38 | 2.24±2.82* | 165 | 2.24±2.82 | 19 | 1.12±0.93 | 8 | 0.47±0.62 | 27 | 1.59±1.00 | | | | |
| | 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| Cont | Cont | 4 | 130 | 13.00±2.11 | 118 | 11.80±1.62 | 12 | 1.20±1.14 | 110 | 11.00±2.00 | 4 | 0.40±0.97 | 4 | 0.40±0.84 | 8 | 0.80±1.31 | | | |
| | | 6 | 262 | 13.10±1.83 | 240 | 12.00±1.95 | 22 | 1.10±1.94 | 220 | 11.00±2.41 | 11 | 0.55±1.23 | 9 | 0.45±0.60 | 20 | 1.00±1.45 | | | |
| | | 8 | 271 | 13.55±2.72 | 255 | 12.75±2.79 | 16 | 0.80±1.32 | 233 | 11.65±3.23 | 14 | 0.70±0.98 | 8 | 0.40±0.68 | 22 | 1.10±1.33 | | | |

①～⑦ 総数および平均±S.D., ① 黄体数より推定, ⑤ 肉眼的に脱落膜腫のみ認められたもの, ⑥ 肉眼的に少しでも胚塊の認められたもの
a; 妊娠腫が得られなかった, b; 交配群よりはぶいた
(統計) ①, ② t検定, ③-⑦ χ^2 検定 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

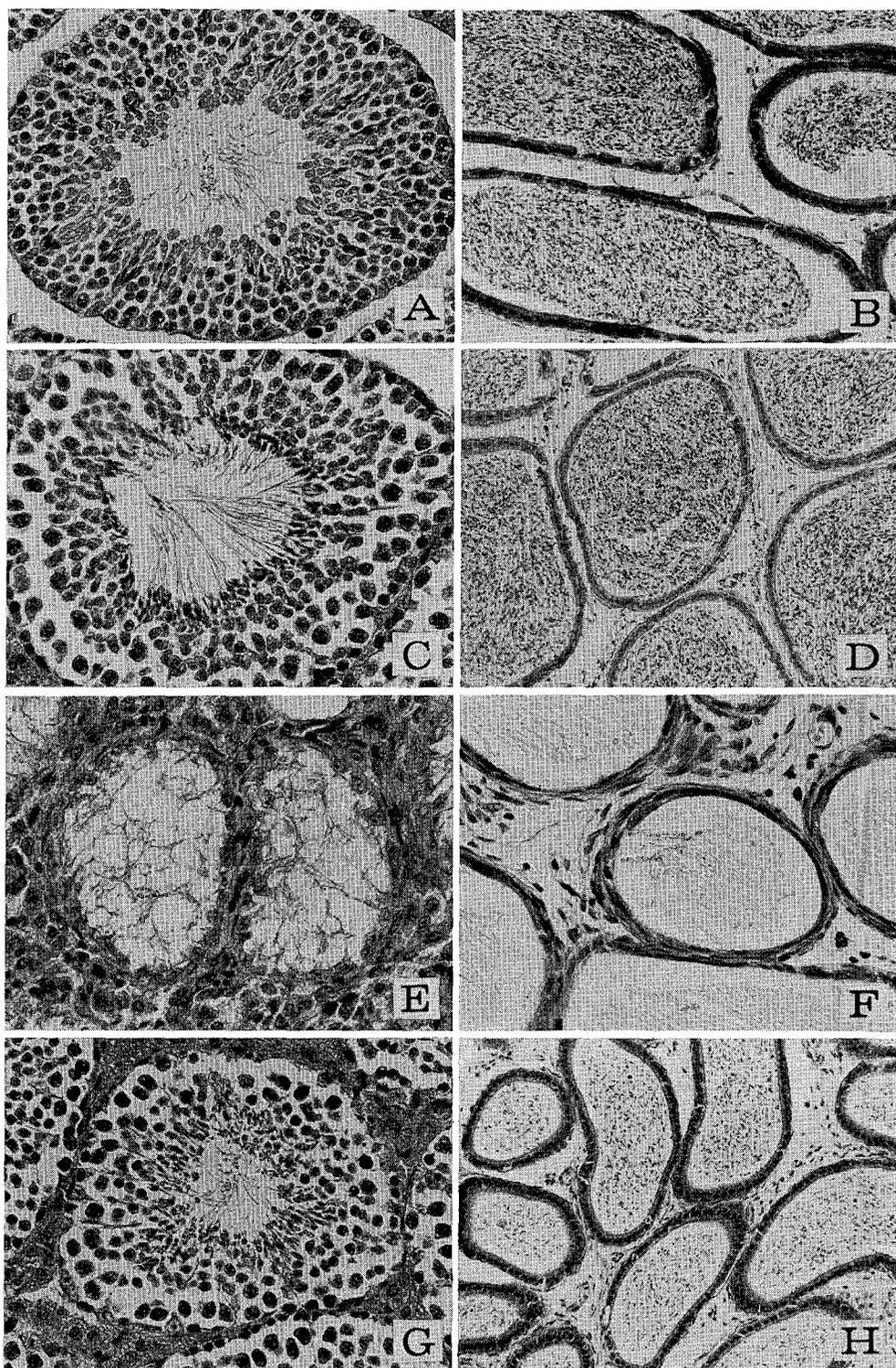


図 3. EMS, MMC 8 週間腹腔内投与後の精巣および精巣上体の組織所見. A, B : control 群, C, D : EMS 42.1~203.4 mg/kg 投与群, E, F : MMC 0.80~1.75mg/kg 投与群, G, H : MMC 0.37~0.62mg/kg 投与群, A, C, E, G は精細管, B, D, F, H は精巣上体管を示す.

オルトフェニルフェノールナトリウムのラットにおける長期投与優性致死試験

小 縣 昭 夫*, 安 藤 弘*, 久 保 喜 一*, 平 賀 興 吾*

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

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, 優性致死試験 dominant lethal test, ラット rat

当部では以前より防ばい剤の安全性についての点検作業を進めており、オルトフェニルフェノールおよびその塩については既に催奇形性試験や変異原性試験 (Ames test, 染色体試験, SCE test, マウス優性致死試験) での成績を多数報告しており、いずれも陰性の結果を得ている¹⁻⁹⁾。本報告はオルトフェニルフェノールナトリウムのラットを用いて行なった当部で開発した長期投与優性致死試験成績である。

試験材料ならびに方法

1. 試料 オルトフェニルフェノールナトリウム (以下 OPP-Na と略す) は Dow Chemical 社製の Dawicide A Lot No. MMO 1044 を使用した。

2. 実験動物 雌雄とも (株) 日本チャールスリバー社生育の近交系 Fischer ラット (F344/DuCrj) を用いた。雄は 4 週令で購入, 1 週間予備飼育後, また雌は雄購入時より 8 週後に 4 週令で購入, 4 週間予備飼育後, 実験に供した。

3. 飼育条件 温度 25±1°, 湿度 55±5%, 換気毎時 10 回, 照明午前 6 時~午後 5 時までの barrier system 飼育室において, 前面および床面が網のステンレス製ケージに個別に収容, 自動給水装置 (細菌ろ過器経由) 付ベルト式飼育架台に配置した。

4. 実験群の設定 表 1 に示した添加量群, 雌雄動物数を用いた。添加量群はすでに報告したマウスでの優性致死試験と同一濃度とし, 4%, 2%, 1%, 0% (対照) の計 4 群を用いた。

5. OPP-Na 添加飼料と投与方法 OPP-Na は日本クレア (株) CE-2 固型飼料に添加使用した。雌雄とも飼料, 水道水を自由摂取させたが, 雄には 5 週令時より添加飼料を, 雌には全期間を通じ無添加飼料を与えた。なお, OPP-Na 添加飼料の安定性については当部の縄井

Table 1. Experimental Design

| Concentration of OPP-Na in diet (%) | Number of male rats administered OPP-Na diet | Number of male rats utilized for mating | Number of female rats utilized for mating |
|-------------------------------------|--|---|---|
| 4.0 | 20 | 20 | 20 |
| 2.0 | 20 | 20 | 20 |
| 1.0 | 20 | 20 | 20 |
| 0 (Cont.) | 25 | 25 | 25 |

⁹⁾らが報告している。

6. 体重および飼料摂取量 添加飼料を摂取させた雄ラットの体重・飼料摂取量に関しては, 同一生年月日のラットを用い, 同一濃度の飼料を摂取させ, 同時にスタートした当部での 13 週間亜急性毒性試験成績¹⁰⁾を考慮に入れた。その報告中雄ラットの体重は 4% 群で全期間を通じ有意な増加抑制がみられた 2% 群も実験 3 週まで有意な増加抑制がみられたが以降対照群と同等となった。飼料摂取絶対量は 4% 群が全期間にわたって少なく, その他の群も体重増加変動に関連するような値を示している。

7. 交配方法 雌雄 1:1 のラットを 4 日間同居させた。毎朝精子存在の有無を確認し, 精子の存在を確認したものを妊娠成立とみなし, その日を妊娠 0 日とした。

8. 胎児調査 優性致死誘発性を判定するため, 妊娠 13 日の母獣をエーテル麻酔下に屠殺開腹し, 卵巢と子宮を摘出, 卵巢については黄体数を, 子宮については着床数, 生存胎児数, 早・後期死胚数を調べ常法¹¹⁻¹²⁾に従い処理した。

結 果

結果を表 2 に示した。

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 2. Effects of OPP-Na with Dams and Fetuses

| Concentration of OPP-Na in diet (%) | Number of female rats successful for mating (%) | Number of pregnant rats (%) | Number of corpora lutea Mean±SD | Number of implants Mean±SD | Number of pre-implants loss Mean±SD | Number of live fetuses Mean±SD | Number of early fetal death Mean±SD | Number of late fetal death Mean±SD |
|-------------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 4.0 | 9 (45.0) | 9 (100) | 98 10.9±1.1 | 92 10.2±1.1 | 6 0.7±0.7 | 82 9.1±1.6 | 3 0.3±0.7 | 7 0.8±0.8* |
| 2.0 | 11 (55.0) | 8 (72.7) | 87 10.9±1.5 | 82 10.3±0.9 | 5 0.6±1.1 | 77 9.6±1.3 | 2 0.3±0.7 | 3 0.4±0.5 |
| 1.0 | 10 (50.0) | 8 (80.0) | 83 10.4±1.4 | 65 8.1±2.0 | 18 2.3±2.4 | 60 7.5±2.1 | 3 0.4±0.7 | 2 0.3±0.5 |
| 0(Cont.) | 17 (68.0) | 16 (94.1) | 167 10.4±2.0 | 153 9.6±3.0 | 15 0.9±1.4 | 143 8.9±3.0 | 7 0.4±0.7 | 3 0.2±0.4 |

* P<0.05

添加飼料を投与した雄ラットのいずれの群においても投与期間中死亡した動物はみられなかった。

1. 生殖生物学的所見

(1) 交尾率 OPP-Na 添加飼料投与群のいずれも対照群に比べ、交尾雌数の低値がみられるが、推計学的に有意ではなかった。

(2) 妊娠率 交尾を確認した雌で開腹時に着床の認められた雌の割合は4%群100%、2%群72.7%、1%群80%、対照群94.1%であった。2%群がやや低値を示したが、対照群と比べ推計学的に有意ではなかった。

2. 排卵数および胎児に係わる所見

表2に示すとおり、4%群の後期死胚数が対照群に比し、有意に増であったが、排卵数を推測させる黄体数、着床数、生存胎児数、早期死胚数では投与群間に有意なまた用量相関の変動はみられなかった。

総括と考察

防ばい剤オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na)の優性致死誘発性をラットを用いて検討した。実験はOPP-Na 添加飼料を3か月間雄ラットに摂取させた後、無処置未経産の雌と交配、妊娠13日に開腹、黄体数および胎児観察を行なった。

OPP-Na 添加飼料投与期間中死亡した動物はなかった。しかし井口ら¹⁰⁾の報告によると高濃度群(4%)では有意な体重増加抑制と摂餌量の低下が認められており、マウスを用いた優性致死試験⁹⁾のそれとよく一致している。またOPP-Naの1日平均摂取量は4%群(2487mg/kg/day)、2%群(1384mg)、1%群(706mg)と報告している。

生殖生物学的所見ではOPP-Na 添加飼料摂取群の交尾雌数が対照群に比べ少ないようであるが有意差は認められなかった。また妊娠率に有意な、用量相関のうかがえる変動はみられなかった。

排卵数(黄体数)および胎児に係わる所見では4%群の後期死胚数に対照群と比べ有意な増加を認めた。しかし他の観察項目に有意なまた用量相関のうかがえる変動はみられず、優性致死誘発性評価の重要な指標となる早期死胚数でも有意なまた用量相関のうかがえる増加はみられなかった。4%群で有意であった後期死胚数の増加に関し、早・後期死胚を合わせた総死胚数では推計学的に有意を示さなかった。ちなみにRöhrbornの方式¹³⁾に従って優性致死誘発率を求めると4%群(4.0)、2%群(-1)、1%群(1)となり、本試験でのOPP-Naのラットに対する優性致死誘発性はなかったものと思われる。

今回の試験では1回の交配で十分な妊娠(交尾した)動物を得ることができなかった為、数回くり返し交配したが、十分な数を得ることができなかった。またOPP-Na 添加飼料投与群での交尾率が推計学的に有意ではなかったが低値を示している。マウスではOPP-Na 添加飼料投与群でもほとんどの雄が交尾をしており、この差はラットとマウスでのOPP-Naに対する感受性差(動物種差)に起因するのかもしれない。

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) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 44, 1979
 - 8) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 51, 1979
 - 9) 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
 - 10) 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
 - 11) 田島弥太郎, 吉田俊秀, 賀田恒夫編: 化学物質の突然変異性検出法, 81, 1973, 講談社サイエンティフィック
 - 12) 高野喜一, 菊池康基, 飯島貞二, 土川 清: 薬物の特殊毒性-1, 胎児毒性と遺伝毒性, 128, 1975, 南江堂
 - 13) Röhrborn, G. : *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, Chapt. 4, 148, 1970, Spring-Verlag, Berlin

チアベンダゾールのラットを用いた急性経口毒性試験

三栗谷 久 敏*, 林 田 志 信*, 高 橋 博*, 平 賀 興 吾*

Acute Oral Toxicity Test of Thiabendazole in Rats

HISATOSHI MIKURIYA*, SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI*
and KOGO HIRAGA*

Keywords: チアベンダゾール thiabendazole, 防ばい剤 fungicide, ラット rat, 急性毒性 acute toxicity

緒 言

チアベンダゾール thiabendazole (以下 TBZとする) は駆虫剤あるいは防ばい剤として用いられている。わが国では、その安全性を評価して1978年に食品添加物に指定し、柑きつ類およびバナナへの防ばい剤として使用を認めた。TBZの毒性に関してはRobinsonら¹⁾が報告しており、顕著な毒作用のないことを示唆している。しかし、最近当部で行った催奇形性試験での催奇形作用の疑い²⁾、石館の報告した染色体異常試験における高頻度の4倍体の出現³⁾などTBZの毒性、特にがん原性について再吟味する必要性が生じた。

そこでがん原性試験を行うにあたって、その前段階として、同試験に用いると同一系統のラットにより、同一飼育環境での急性経口毒性試験を行った。

TBZの急性経口毒性についてRobinsonら¹⁾は、ラットのLD₅₀値を3.1g/kg (TBZ 2% CMC 溶液懸濁液投与)としている。

今回、TBZは水に難溶のためオリーブ油およびアラビアゴム溶液の2種類の懸濁剤を用い懸濁液として投与した(試験1)。その結果、TBZアラビアゴム溶液懸濁液投与の雌は用量に伴う致死率の逆転が著しかった。そのためこれに関して確認試験を行うとともに、急性毒性試験に用いられる動物数を少数にした場合の用量一致致死率関係とLD₅₀値についても併せて検討した(試験2)。

試験材料および方法

検体: 米国メルク社製 thiabendazole microfine MSD (Lot No. BZA-539) を日本薬局方オリーブ油または日本薬局方アラビアゴムの0.5% 溶液に懸濁させたもの。投与容量はすべて10ml/kg B. W. とした。

試験動物: チャールスリバー社生育の近交系 Fischer ラット (F344/DuCrj) を用い、試験1では雌雄を4週令で購入し4週間飼育後、また試験2では雌を5週令で購入し3週間飼育後それぞれ発育良好なものを試験に

供した。

飼育条件: 室温 25±1°, 湿度 50~60%, 換気毎時10回, 照明午前6時から午後5時に制御した飼育室において、前面および床が網のステンレスケージ (縦16.5×横25×奥行40cm) に5匹づつ収容し、日本クレア(株)CE-2 固型飼料および細菌ろ過装置経由の水道水を自由に摂取させた。

試験方法: 動物は投与前日の午後5時より除餌し、水のみを与え、投与日の午前9時30分より10時30分までの間に検体を胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与後4時間目より飼料を与えた。

試験1 8週令の雌雄ラットにTBZオリーブ油懸濁液およびTBZ 0.5% アラビアゴム溶液懸濁液を投与した。投与量はTable 1に示したように、オリーブ油懸濁液使用、614mg/kg から1800mg/kgの間を公比1.25で、0.5% アラビアゴム 溶液懸濁液使用、1300mg/kg から4827mg/kgの間を公比1.3でそれぞれ6用量設けた。また対照としてオリーブ油または0.5% アラビアゴム溶液を投与した。投与匹数は各用量雌雄とも5匹とした。なお投与量は文献値および予備試験の結果を参考にして決定した。

投与後の一般症状および生死の観察は24時間まで1~2時間毎に、2日以降は朝夕の2回行った。死亡ラットは直ちに剖検し、生存ラットについては毎日午前9時30分に体重測定し投与後15日目にと殺、剖検した。また1週間の死亡率に基づきLitchfield-Wilcoxon法⁴⁾により50%致死量(LD₅₀)を求めた。

試験2 TBZ 0.5% アラビアゴム溶液懸濁液の660, 820, 1050, 1300および1600mg/kg B. W. を各5匹に投与した。この投与グループを3グループ作りそれぞれA, B, Cとした。

生死の観察は検体投与後午後5時まで連続的、2日以降は朝夕の2回行った。観察期間は2週間とし、この間

* 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. The Time-Course of Number of Dead Rats after Administration of Thiabendazole (TBZ)

| Vehicle & Sex | Dose (mg/kg) | No. of rats | No. of dead rats | Dead time | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-----------|---|-----------------|----|----|----|---|---|---|--------|---|--|
| | | | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 24 | 1 | 2 | 3 | (days) | | |
| Olive oil | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 1875 | 5 | 5 (100) ³⁾ | | | 2 ⁴⁾ | 1 | | 1 | | | | | | |
| | 1500 | 5 | 3 (60) | | | 1 | 2 | | | | | | | | |
| | 1200 | 5 | 5 (100) | | | 1 | 1 | 1 | | | | | 1 | 1 | |
| | 960 | 5 | 2 (40) | | | 1 | 1 | | | | | | | | |
| | 768 | 5 | 2 (40) | | | | | 1 | 1 | | | | | | |
| | 614 | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |
| | vehicle ¹⁾ | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |
| Female | 1875 | 5 | 4 (80) | | | | | 2 | 1 | | | | | 1 | |
| | 1500 | 5 | 2 (40) | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| | 1200 | 5 | 2 (40) | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | | |
| | 960 | 5 | 4 (80) | | | 1 | | 2 | | | | | 1 | | |
| | 768 | 5 | 1 (20) | | | | 1 | | | | | | | | |
| | 614 | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |
| | vehicle ¹⁾ | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |
| 0.5% Gum arabic solution | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 4827 | 5 | 5 (100) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | |
| | 3713 | 5 | 5 (100) | | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | | | | |
| | 2856 | 5 | 4 (80) | | 3 | | 1 | | | | | | | | |
| | 2197 | 5 | 4 (80) | | 2 | | 1 | 1 | | | | | | | |
| | 1690 | 5 | 5 (100) | | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | |
| | 1300 | 5 | 3 (60) | | 1 | | 1 | | 1 | | | | | | |
| | vehicle ²⁾ | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |
| Female | 4827 | 5 | 5 (100) | | 2 | 2 | 1 | | | | | | | | |
| | 3713 | 5 | 5 (100) | | 2 | 1 | | 2 | | | | | | | |
| | 2856 | 5 | 5 (100) | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | |
| | 2197 | 5 | 5 (100) | | 1 | | 1 | 2 | | 1 | | | | | |
| | 1690 | 5 | 1 (20) | | | | 1 | | | | | | | | |
| | 1300 | 5 | 2 (40) | | | | 1 | | 1 | | | | | | |
| | vehicle ²⁾ | 5 | 0 (0) | | | | | | | | | | | | |

1) olive oil 10 ml/kg

3) Mortality (%)

2) 0.5% Gum arabic solution 10 ml/kg

4) No. of dead rats

のA, B, C各グループの死亡数に基づき Table 3 に示した組み合わせで、1用量に用いた動物数を5匹、10匹および15匹とした場合について死亡率を求め Litchfield-Wilcoxon 法⁴⁾により50%致死量 (LD₅₀) を求めた。

試験結果

試験1

Control (vehicle): オリーブ油投与ラット, 0.5% アラビアゴム溶液投与ラットとも投与直後にうずくまり、一部に流涙が見られたが回復は早く、4時間後飼料を与えると同時に摂食し始めた。また投与前一夜絶食による体重の減少もオリーブ油投与の雄を除き24時間後にはほぼ回復し、その後順調な発育を示した。オリーブ油投与の雄も48時間後には絶食前の体重に回復し、その後順調に発育して試験終了時には0.5% アラビアゴム溶液

投与ラットの雄と同様の体重を示した (Fig. 1, 2)。

投与群: オリーブ油懸濁液使用および0.5% アラビアゴム溶液懸濁液使用とも観察された症状は共通していた。主な症状は投与直後よりうずまり、閉眼、流涙を認めるものが多く、次いで一部に洗顔様動作、ふらふらと歩く、背をまるめてはねるような動作をする、背をまるめ前両足で頭を抱え込むような動作をするものなどがみられた。続いて自発運動が低下し伏臥または横臥の姿勢をとり死に至った。この時一部に伏臥または横臥の状態から仰臥状態になり四肢を激しく震わせて死亡するもの、またケージ内を激しく暴れ回りその後仰臥状態になり四肢を震わせて死亡するものも見られた。その際死亡ラットの口の周囲に泡状の物質が、また鼻には血液様の液体が付着していた。死亡ラットの剖検で、胃は全体的

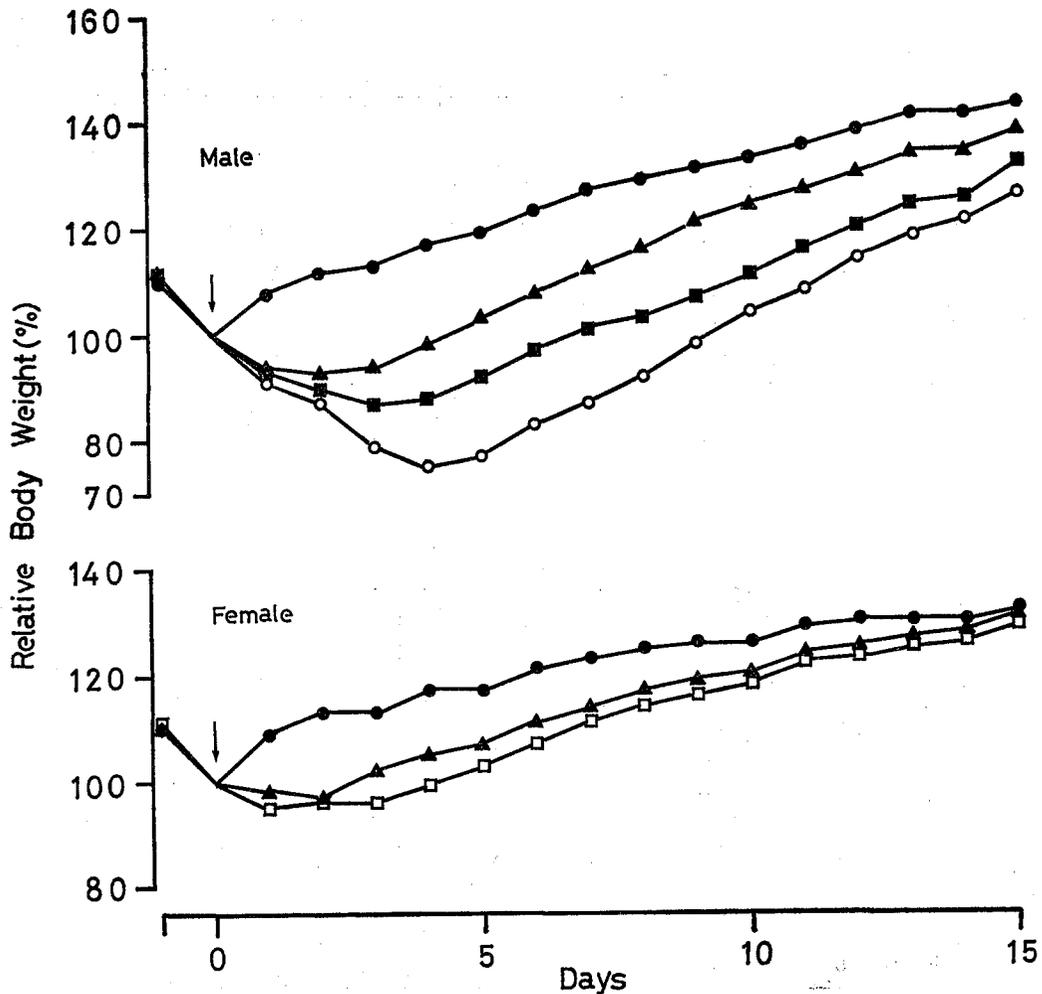


Fig. 1. Relative Body Weight Changes of Rats Survived after Administration of Thiabendazole (TBZ)
 Vehicle : 0.5% Gum arabic solution
 Arrow : Administration of TBZ
 Control(●), 1300 mg/kg(▲), 1690 mg/kg(□), 2197 mg/kg(○), 2856 mg/kg(■)

に膨張して透明感があり、ガスとともに黄白色の物質(大部分は検体と思われる)が貯留していた。また黄白色の物質は盲腸付近まで認められた。他主要器官に著変は認められなかった。

死亡発生時間と死亡数を Table 1 に示した。死亡の初発は 6 時間目、最終は 53 時間目であったが大多数は 24 時間以内に死亡した。特に 0.5% アラビアゴム溶液懸濁液使用では死亡開始とほぼ同時にピークがおとずれ、ほとんどは 15 時間以内に死亡した。また 0.5% アラビアゴム溶液懸濁液使用はオリーブ油懸濁液使用より死亡率が高かった。両懸濁剤使用とも雌雄間の死亡時間に大差はな

かった。

死を免れた動物は 2~4 日まで体重減少を続けたが、それ以降順調な回復を示した。しかし、大多数はその体重増加曲線の勾配が Control のそれと平行的であり、したがって投与後の体重減少が大きかったものは 15 日間の観察終了時においても Control と同等の体重までに回復しなかった (Fig. 1, 2)。観察終了時に行った生存ラットの剖検では主要器官に特記すべき変化が認められなかった。

用量一致死率曲線の slope function (Litchfield-Wilcoxon 法) および LD_{50} 値とその 95% 信頼限界値を Table 2

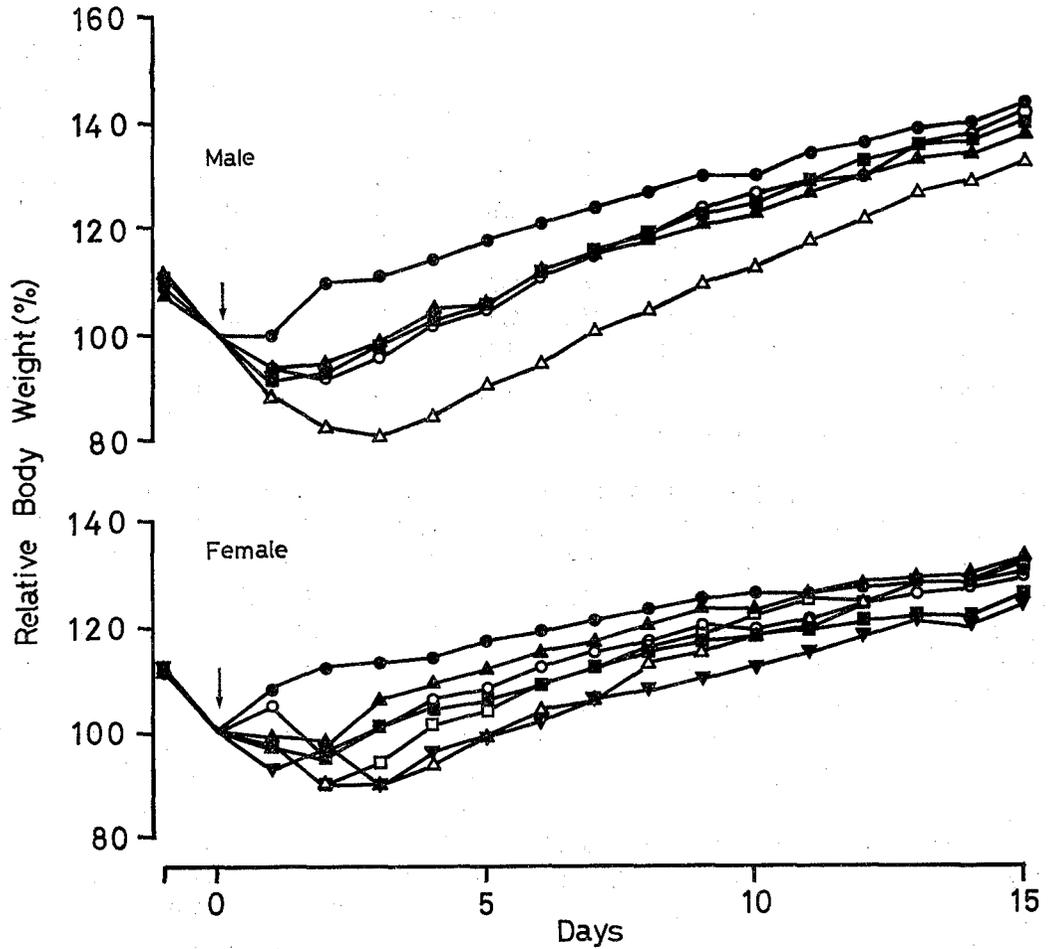


Fig. 2. Relative Body Weight Changes of Rats Survived after Administration of Thiabendazole (TBZ)
 Vehicle: Olive oil
 Arrow: Administration of TBZ
 Control (●), 614 mg/kg (▲), 768 mg/kg (■), 960 mg/kg (○), 1200 mg/kg (□), 1500 mg/kg (△), 1875 mg/kg (▼)

Table 2. Acute Oral Toxicity Test of Thiabendazole (TBZ) in Fischer 344 Rats

| Vehicle | Week-Old | Sex | Initial body weight ^{a)} (g) | Dead time (hr) | | | Slope function | LD ₅₀ (mg/kg) | Confidence limits ^{b)} (mg/kg) |
|--------------------------|----------|--------|---------------------------------------|----------------|-------|-----|----------------|--------------------------|---|
| | | | | Onset | Peak | End | | | |
| Olive oil | 8 | Male | 151±8.5 | 9 | 12 | 49 | 1.50 | 1075 | 836—1383 |
| | | Female | 112±5.1 | 9 | 15 | 53 | 1.62 | 1180 | 902—1544 |
| 0.5% Gum arabic solution | 8 | Male | 152±7.8 | 6 | 9, 14 | 21 | 1.55 | 1325 | 905—1940 |
| | | Female | 112±5.4 | 9 | 9—15 | 21 | 1.50 | 1750 | 1310—2340 |

a) Mean±S.D. Initial body weight was determined shortly before administration of TBZ.

b) P=0.05

Table 3. Acute Oral Toxicity Test of Thiabendazole (TBZ) in Fischer 344 Female Rats
—Relation of Dose-Mortality and Number of Rats—

| Group | Mortality | | | | | Slope function | LD ₅₀ (mg/kg) | Confidence limits at P=0.05 (mg/kg) |
|---------|-------------------|------|------|------|-------|----------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | Dose (mg/kg) | | | | | | | |
| | 660 | 820 | 1050 | 1300 | 1600 | | | |
| [A] | 0/5 ¹⁾ | 2/5 | 1/5 | 3/5 | 4/5 | 1.42 | 1175 | 946~1459 |
| [B] | 0/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 | 3/5 | 1.47 | 1250 | 950~1644 |
| [C] | 1/5 | 0/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 | 1.44 | 1170 | 931~1469 |
| [A+B] | 0/10 | 4/10 | 2/10 | 4/10 | 7/10 | 1.46 | 1200 | 1017~1416 |
| [A+C] | 1/10 | 2/10 | 4/10 | 6/10 | 7/10 | 1.43 | 1150 | 984~1344 |
| [B+C] | 1/10 | 2/10 | 4/10 | 4/10 | 6/10 | 1.49 | 1320 | 1079~1614 |
| [A+B+C] | 1/15 | 4/15 | 5/15 | 7/15 | 10/15 | 1.47 | 1200 | 1045~1377 |

1) No. of dead rats/No. of treated rats

に示した。Slope function は両懸濁剤使用とも1.55付近であった。また LD₅₀ 値はオリーブ油懸濁液使用, 雄1075mg/kg, 同雌1180mg/kg, 0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用, 雄1325mg/kg, 同雌1750mg/kg で雌雄とも0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用の方がオリーブ油懸濁液使用より大きく, 特に雌は用量一致死亡率の関係が逆転していたためオリーブ油懸濁液使用雌の値と大差を示した。しかし, LD₅₀ 値の両懸濁剤間での差および各懸濁剤での性差は推計学上有意でなかった。

試験2

A, B, C各グループとそれらの組み合わせによる死亡動物数, slope function(Litchfield-Wilcoxon法)および LD₅₀ 値とその95%信頼限界値を Table 3 に示した。用量一致死亡率の関係は1用量につき5匹のA, B, C各グループより, 各グループを組み合わせると1用量につき10匹, 15匹と数を増すにしたがって良好となった。しかし, slope function および LD₅₀ 値はいずれも同様の値をとり, 1.45付近, 1200mg/kg 付近であった。また1用量につきA, B, Cを組み合わせると15匹とした場合の用量一致死亡率曲線に, A, B, C各グループと10匹に組み合わせた場合との用量一致死亡率関係を適合させてみたところ, いずれも推計学的に適合可能であり, slope function 1.47, LD₅₀ 値1200mg/kg, 95%信頼限界値, 15匹とした場合1045~1377mg/kg, 10匹とした場合1014~1421mg/kg, 5匹の場合945~1523mg/kgであった。

考 察

チアベンダゾール (TBZ) のラットにおける急性毒性について検討した。LD₅₀ 値は Table 2 に示したように0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用の方がオリーブ油懸濁液使用より雌雄とも高い傾向を示した。しかし, いずれも投与後の主症状や死の様子が類似していたこと,

slope function が1.55付近であり LD₅₀ 値には推計学的に有意差がなかったことなどから両懸濁剤使用ともその致死作用に本質的な差はないと考えられる。また0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用の雌で用量一致死亡率の関係が逆転し, LD₅₀ 値が1750mg/kg と高い結果になったのは, 用量の設定が全体的に高かったためと思われる。このことは試験2で LD₅₀ 値が1200mg/kg 付近, slope function が1.45付近であったことから推察できると考えられる。さらに両懸濁剤使用ともその雌雄間の slope function, LD₅₀ 値には推計学的に有意差がないこと, 発症時間や症状, 死亡時間に大差がなかったことなどからその致死作用に性差はないと考えられる。

Robinsonら¹⁾はTBZの急性経口毒性試験においてラット(Holzman S.D. ラット)のLD₅₀ 値は3.1g/kgであり, その主症状は衰弱, 体重低下, 運動失調および昏睡状態であったと報告している。今回の試験で主症状は昏睡状態を除き類似していたが, LD₅₀ 値はRobinsonらの約1/2の値であった。このことは使用動物の系統, 実験条件および飼育条件等の相違によるためではないかと考えられる。

Toccoら⁵⁾は¹⁴CでラベルしたTBZのラットを用いた投与実験で, 投与されたTBZの80~90%は48時間以内に排泄されるとしている。今回死を免れた動物は症状の回復も早く, その後の体重増加もcontrol とほぼ同様であったことから, Toccoらが示唆しているようにラットにおけるTBZの代謝, 排泄は比較的迅速に行われるものと思われる。

従来げっ歯類における急性毒性試験では1用量に雌雄各10匹程度の動物を用いるのが一般的であった。しかし最近がん原性試験等の前段階の試験として急性毒性試験が行われる場合は, 1用量に雌雄各5匹が用いられてい

る。そこで試験2では試験1における0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用雌の用量一致死率関係の確認と併せて、同一条件下において1用量につき5匹の場合と10および15匹とした場合の用量一致死率関係やLD₅₀値等について検討した。結果としていずれの場合もLD₅₀値やslope functionはほぼ同様の値を示したが、用量一致死率関係は5匹のグループが良好でなかった。しかし、15匹とした場合の用量一致死率曲線と5匹ないし10匹とした場合との用量一致死率関係は推計学的に適合した。すなわち、使用動物数が少なければ用量に伴う致死率に逆転などが生ずるのは確率的にも当然であり、1用量5匹の使用でも用量一致死率の関係、LD₅₀値を十分推定できると考えられる。

まとめ

①チアベンダゾール(TBZ)のF344(Fischer)ラット雌雄における急性毒性を、オリーブ油および0.5%アラビアゴム溶液を用いた懸濁液として経口投与し検討した。主な症状は両懸濁液使用雌雄とも共通しており、うずくまり、閉眼、流涙、自発運動の低下、四肢の震え等であった。LD₅₀値は、オリーブ油懸濁液使用、雄1075mg/kg、同雌1180mg/kg、0.5%アラビアゴム溶液懸濁

液使用、雄1325mg/kg、同雌1750mg/kgであり、推計学的に性差、懸濁液による差は認められなかった。

②0.5%アラビアゴム溶液懸濁液使用雌の用量一致死率関係とLD₅₀値についての確認と併せて、1用量に用いる動物数を5、10および15匹とした場合の用量一致死率関係およびLD₅₀値について検討した。1用量に用いる動物数が多い程用量一致死率関係は良好であった。しかし、slope functionやLD₅₀値に大差はなく、それぞれ1.45付近、1200mg/kg付近であった。

文 献

- 1) Robinson, H. J., Stoerk, H. C., and Graessle, O. E. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965
- 2) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報，29-2，112，1978
- 3) 石館 基：培養細胞の染色体異常を指標とする癌原性物質のスクリーニング，厚生省がん研究助成金による研究報告集(下)，750，1976
- 4) Litchfield, J. T. Jr., and Wilcoxon, F. : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949
- 5) Tocco, D. J., Rosenblum, C., Martin, C. M., and Robinson, H. J. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 9, 31, 1966

チアベンダゾール (TBZ) の突然変異誘起性に対する
ジブチルヒドロキソトルエン (BHT) の影響

藤田 博*, 平賀 興吾*

Effect of Butylated Hydroxytoluene on the Mutagenicity of
Thiabendazole in the Salmonella/Microsome Test

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: ジブチルヒドロキソトルエン butylated hydroxytoluene, チアベンダゾール thiabendazole, 突然変異誘起性 mutagenicity

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ソトルエン (以下 BHT と略す) は単独では突然変異誘起性は示さないが^{1,2)}, 他の化合物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³⁻⁶⁾.

2-アミノアントラセン等の突然変異物質の突然変異誘起性に対する BHT の効果を代謝活性化を導入した Ames の mutation test 系⁷⁾を用いて検討したところ, 突然変異誘起性が BHT 量によって増加する場合と減少する場合が見られた. 特に, フェノバルビタール (以下 PB と略す) で薬物代謝酵素を誘導したラット肝臓ホモジネートの 9,000×g 遠心の上清分画 (以下 S-9 と略す) を代謝活性化に用いた場合に増加の効果が著しく, その効果は S-9 量により著しく変動することなどから, BHT が薬物代謝酵素に作用している可能性が示唆された^{8,9)}.

これまでは既知の突然変異物質に対する BHT の作用を検討して来たが, 単独では突然変異誘起性を示さないが BHT を加えると突然変異誘起性を示す化合物の検索を Ames の mutation test 系を用いて試みた. その結果, かび防止剤であるチアベンダゾール (以下 TBZ と略す) と BHT の混合溶液に弱い突然変異誘起性が見られたので報告する.

実験材料と方法

試料 BHT (和光純薬, Lot No. KIK-5562), TBZ (メルク, Lot No. BZA-539), PB (吉田製薬), アロクロール 1254 (以下 PCB と略す, 三菱モンサント化成), ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す, 和光純薬)

Mutation test 菌株は *Salmonella typhimurium* TA98 を用い, Ames 法⁷⁾の変法^{1,10)}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を誘導した Wistar 系ラット雄の肝臓ホモジネートの 9,000×g の10分間遠心の上清分画 (S-9) を用いた.

DMSO に溶かした TBZ (1000, 500, 100 μ g/0.05ml) および BHT (100, 50, 10, 5, 1 μ g/0.05ml) を小試験管に入れ, S-9Mix¹⁰⁾ 0.5ml および一夜培養の TA98 菌液 0.1ml を加え, 37°C で20分間の前培養を行った. これに 45°C に保温した軟寒天¹¹⁾2ml を加え混合後, 最少寒天培地¹⁾に播種し, 37°C で48時間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを計数した. なお, S-9Mix 中の S-9 量は PB, PCB 誘導 S-9 共に 50 μ l/プレートとした. ただし, S-9 量を変えた実験では S-9 量は 0, 25, 50, 100 および 150 μ l/プレートの 5 段階とした.

すべての測定値はプレート 3 枚の平均値で示した.

結果と考察

TBZ と BHT の混合溶液の mutation test の結果を表 1 に示した. TBZ 1000, 500, 100 μ g/プレートに対し

表 1. TBZ と BHT の混合溶液の *S. typhimurium* TA 98 を用いた mutation test

| TBZ (μ g/ プレート) | S ⁹⁾ | BHT (μ g/プレート) | | | | | |
|----------------------------|-----------------|---------------------|----|----|----|----|----|
| | | 100 | 50 | 10 | 5 | 1 | 0 |
| 1000 | PB | 54 ²⁾ | 53 | 95 | 58 | 42 | 43 |
| | PCB | 28 | 30 | 44 | 48 | 48 | 35 |
| 500 | PB | 53 | 62 | 86 | 45 | 49 | 45 |
| | PCB | 35 | 42 | 50 | 59 | 58 | 45 |
| 100 | PB | 49 | 57 | 45 | 49 | 42 | 39 |
| | PCB | 38 | 47 | 53 | 42 | 46 | 38 |
| 0 | PB | 36 | 50 | 48 | 48 | 43 | 42 |
| | PCB | 44 | 45 | 41 | 43 | 43 | 40 |

1) 50 μ l/プレート, 2) 復帰コロニー数/プレート

* 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

て BHT 100, 50, 10, 5, 1 μ g/プレートとした。PCB 誘導 S-9 を用いて代謝活性化した場合は、復帰コロニー数に変化は見られなかった。PB 誘導 S-9 を用いた場合は、TBZ 1000 μ g または 500 μ g に BHT 10 μ g を混合した組み合わせで復帰コロニーが増加し、BHT 無添加のコントロールに対して約 2 倍であった。TBZ および BHT は、Ames の mutation test 系において単独では突然変異誘起性が検出されないことから、この増加は TBZ と BHT による相互作用の結果と考えられる。

PB 誘導 S-9 を用いて代謝活性化した場合に復帰コロニー数の増加が見られたことから、S-9Mix 中の S-9 量による影響を調べた(図 1)。TBZ は 1000 μ g, 500 μ g/プレートに対して BHT は 30 μ g/プレートとし、S-9 量は 0~150 μ l/プレートとした。BHT を加えない場合 S-9 量を変えても復帰コロニー数は変化しないが、30 μ g の BHT を加えることにより S-9 量の増加に伴って復帰コロニー数は増加した。TBZ 1000 μ g では S-9 量 150 μ l まで直線的に増加し、S-9 量 150 μ l の時復帰コロニー数はコントロールの 3 倍以上の増加であった。また TBZ 500 μ g では S-9 量 100 μ l が最大となり S-9 量 150 μ l では少し減少した。

TBZ と BHT の混合溶液の突然変異誘起性に見られた相互作用の機構については明らかではないが、復帰コロニーの増加は、1) BHT 量に最適濃度があること、2) PB 誘導 S-9 を用いた代謝活性化が必要であること、3) S-9Mix 中の S-9 量によって変化し、S-9 量が多いほうが効果があることがわかった。これらの条件は、前報^{8,9)}に報告した 2-アミノアントラセン等の突然変異物質の突然変異誘起性を BHT が増加させる場合に一致する。従って、TBZ と BHT の相互作用においても、BHT と S-9 中の薬物代謝酵素の活性との関連が大きな要因となっていると推察される。すなわち、TBZ 由来の代謝物質に突然変異誘起性を有する物質が存在し、この物質の生成に BHT が影響している可能性が考えられる。

TBZ 1000 μ g, S-9 量 150 μ l の時、88 個の復帰コロニーの増加が見られた(図 1)。Ames 系¹⁰⁾の突然変異誘起性を表わすための計算によると、0.018 復帰コロニー/ μ mole TBZ となる。Ames 系は、この値が 0.01 を越える化合物は突然変異物質であるとしている。従って、TBZ と BHT の混合溶液は突然変異誘起性をもつと考えられるが、河内¹²⁾の突然変異誘起性の強さによる分類に従うならば非常に弱い突然変異誘起性である。

Nagao¹³⁾ は Ames の mutation test 系において突然変異誘起性を示さないオルトトルイジンおよびイエロー

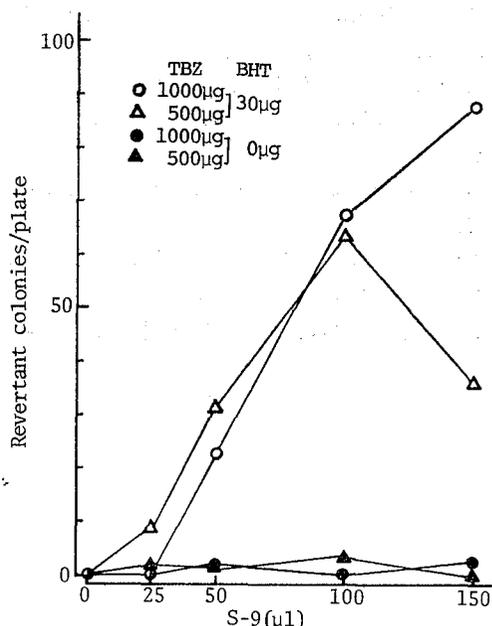


図 1. TBZ と BHT の混合溶液の *S. typhimurium* TA98 を用いた mutation test における S-9 量の影響

同一 S-9 量のコントロール (TBZ 0 μ g) の復帰コロニー数 (28~44) を引いた値を示す。

OB にノルハルマンを加えることにより突然変異誘起性が現われることを報告している。これは薬物代謝酵素にノルハルマンが作用し、オルトトルイジンおよびイエロー OB から突然変異誘起性をもつ代謝物質が生成すると考え、ノルハルマンが comutagen であるとしている。BHT にも類似した comutagen の作用があると推察される。

要 約

チアベンダゾール (TBZ) とジブチルヒドロキソトルエン (BHT) の混合溶液の突然変異誘起性を Ames の mutation test 系を用いて検討した。フェノバルビタール誘導ラット肝臓ホモジネートを用いて代謝活性化した場合、TBZ 1000 μ g, BHT 30 μ g で復帰コロニー数が 3 倍に増加した。これは 0.018 復帰コロニー/ μ mole となり、非常に弱い突然変異誘起性陽性と判断した。

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., and Weisburger, E.K. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 11, 199, 1973
- 5) Praino, 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) Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E. : *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
- 8) 藤田 博, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 29-2, 40, 1978
- 9) 藤田 博, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 30-2, 41, 1979
- 10) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, 20, 1178, 1975
- 11) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Aems, B.N. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 5135, 1975
- 12) 河内 卓 : 蛋白質核酸酵素, 23, 422, 1978
- 13) Nagao, M., Yahagi, T., and Sugimura, T. : *B. R. C.*, 83, 373, 1978

4種のかび防止剤の組み合わせによる突然変異誘起性

藤田 博*, 平賀 興吾*

Mutagenicity of Paired Fungicide Mixtures in the Salmonella/Microsome Test

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

Keywords : かび防止剤 fungicides, チアベンダゾール thiabendazol, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ジフェニール diphenyl, パラヒドロキシ安息香酸ブチル *p*-hydroxybutylbenzoate, 突然変異誘起性 mutagenicity

緒 言

柑きつ類のかび防止剤として使用されているチアベンダゾール (以下 TBZ と略す), オルトフェニルフェノール (以下 OPP と略す), ジフェニール (以下 DP と略す) およびパラヒドロキシ安息香酸ブチル (以下 PHBB と略す) の安全性については当部においても種々の面からの検討がされて来た¹⁻⁴⁾。

突然変異誘起性に関する報告としては, Ames⁵⁾ の mutation test 系を用いた TBZ, DP および PHBB の陰性の報告^{6,7)}がある。しかし, OPP については陰性の報告^{6,7)}が多いなかで花田⁸⁾による陽性の報告も見られる。

多くの化合物の突然変異誘起性の検索が広く進められてくるに従い, 突然変異誘起性は持たないが, 他の化合物の突然変異誘起性を変動させるノルハルマン^{9,10)} やジブチルヒドロキシトルエン^{11,12)} (以下 BHT と略す) のような化合物が見い出され, 相互作用が起る場合が示されて来た。

そこで, 我々は4種のかび防止剤が2種以上併用されている現状も考慮し, 2種ずつ組み合わせた混合溶液の突然変異誘起性を Ames の mutation test 系を用いて検討したので報告する。

実験材料と方法

試料 TBZ (メルク, Lot No. BZA-539), OPP (東京化成 Lot No. FB-101), DP (東京化成 Lot No. A101) および PHBB (和光純薬 Lot No. KIO-2284) をジメチルスルホキシド (和光純薬 Lot No. B-775378) に溶かした。陽性コントロールとしてフリルフラマイド (AF-2, 上野製薬), ベンツ (a) ピレン (BP, 和光純薬) および2-アセチルアミノフルオレン (AAF, 和光純薬) を用いた。薬物代謝酵素の誘導剤としてはフェノバルビ

タール (以下 PB と略す, 吉田製薬) またはアロクロール 1254 (以下 PCB と略す, 三菱モンサント化成) を用いた。

Mutation test 菌株は *Salmonella typhimurium* TA98 を用い Ames 法⁵⁾の変法¹³⁾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を誘導した Wistar 系ラット雄の肝臓ホモジネートを 9000×g で10分間遠心した上清分画 (以下 S-9 と略す) を用いた。

4種のかび防止剤を2種ずつ組み合わせ6種類の実験を行った (表1)。各実験は2化合物ともそれぞれ1000, 100, 10, 1 および 0 μ g/プレート の5濃度段階とし, すべての濃度の組み合わせは25種類とした。

混合試料溶液 0.1ml に代謝活性化する場合には0.5ml の S-9Mix^{13,14)} を, しらない場合には 0.5ml のリン酸緩衝液 (pH7.4) を加え, さらに一夜培養の TA98 菌液 0.1ml を加え, 37°C で20分間の前培養を行った。これに45°C に保温した軟寒天¹⁴⁾ 2ml を加え混合後, 最少寒天培地¹⁴⁾ に播種した。37°C で48時間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを計数した。なお, S-9Mix 中の S-9 量は PB, PCB 誘導 S-9 共に 50 μ l/プレートとした。ただし, S-9 量を変える実験では, S-9 量は 0, 25, 50, 100 および 150 μ l/プレートとした。

すべての測定値はプレート3枚の平均値で示した。

結果と考察

TBZ, OPP, DP および PHBB の4種のかび防止剤を2種ずつ組み合わせた6種類の mutation test の結果を表1に示した。TBZ-DP, TBZ-PHBB, OPP-DP, OPP-PHBB および DP-PHBB の5種類の組み合わせでは代謝活性化の有無にかかわらず復帰コロニー数に変化は見られず, 突然変異誘起性は検出されなかった。TBZ-OPP の組み合わせでは, 代謝活性化しない場合と

* 東京都立衛生研究所毒生部 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. かび防止剤を2種ずつ組み合わせた混合溶液の TA 98 を用いた mutation test³⁾

| 1-1 TBZ-OPP | | | | | | | 1-2 TBZ-DP | | | | | | | 1-3 TBZ-PHBB | | | | | | |
|--------------------|------------------|--------------------|-----|----|----|----|------------|-----|------|-----|----|----|----|--------------|-----|------|-----|----|----|----|
| TBZ | S9 ¹⁾ | OPP | | | | | TBZ | S9 | DP | | | | | TBZ | S9 | PHBB | | | | |
| | | 1000 ²⁾ | 100 | 10 | 1 | 0 | | | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 | | | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 |
| 1000 ²⁾ | PCB | 0 | 49 | 52 | 52 | 48 | 1000 | PCB | 24 | 55 | 57 | 56 | 51 | 1000 | PCB | 0 | 47 | 63 | 46 | 50 |
| | PB | 0 | 64 | 80 | 39 | 35 | | PB | 9 | 32 | 38 | 33 | 30 | | PB | 0 | 29 | 33 | 29 | 28 |
| | — | 0 | 28 | 28 | 27 | 26 | | — | 13 | 20 | 28 | 23 | 27 | | — | 0 | 18 | 33 | 28 | 29 |
| 100 | PCB | 0 | 51 | 54 | 56 | 50 | 100 | PCB | 33 | 54 | 47 | 40 | 57 | 100 | PCB | 0 | 55 | 52 | 48 | 57 |
| | PB | 0 | 48 | 60 | 45 | 39 | | PB | 15 | 36 | 42 | 42 | 50 | | PB | 0 | 34 | 34 | 34 | 38 |
| | — | 0 | 32 | 39 | 35 | 34 | | — | 16 | 25 | 26 | 36 | 33 | | — | 0 | 25 | 26 | 28 | 36 |
| 10 | PCB | 0 | 63 | 60 | 48 | 52 | 10 | PCB | 32 | 63 | 59 | 62 | 61 | 10 | PCB | 0 | 55 | 52 | 57 | 55 |
| | PB | 0 | 37 | 36 | 41 | 48 | | PB | 16 | 37 | 44 | 34 | 43 | | PB | 0 | 37 | 30 | 35 | 30 |
| | — | 0 | 32 | 28 | 32 | 29 | | — | 25 | 31 | 29 | 35 | 38 | | — | 0 | 30 | 33 | 26 | 31 |
| 1 | PCB | 0 | 62 | 55 | 56 | 58 | 1 | PCB | 34 | 66 | 60 | 55 | 57 | 1 | PCB | 0 | 48 | 63 | 55 | 52 |
| | PB | 0 | 36 | 47 | 46 | 46 | | PB | 24 | 33 | 44 | 42 | 40 | | PB | 0 | 40 | 37 | 37 | 40 |
| | — | 0 | 29 | 39 | 36 | 27 | | — | 26 | 26 | 36 | 35 | 28 | | — | 0 | 24 | 28 | 29 | 27 |
| 0 | PCB | 0 | 59 | 57 | 57 | 47 | 0 | PCB | 35 | 57 | 64 | 58 | 55 | 0 | PCB | 0 | 59 | 50 | 51 | 53 |
| | PB | 0 | 39 | 38 | 44 | 49 | | PB | 23 | 37 | 40 | 51 | 43 | | PB | 0 | 41 | 38 | 35 | 37 |
| | — | 0 | 32 | 26 | 40 | 27 | | — | 20 | 32 | 30 | 29 | 28 | | — | 0 | 38 | 27 | 29 | 39 |

| 1-4 OPP-DP | | | | | | | 1-5 OPP-PHBB | | | | | | | 1-6 DP-PHBB | | | | | | |
|------------|-----|------|-----|----|----|----|--------------|-----|------|-----|----|----|----|-------------|-----|------|-----|----|----|----|
| OPP | S9 | DP | | | | | OPP | S9 | PHBB | | | | | DP | S9 | PHBB | | | | |
| | | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 | | | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 | | | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 |
| 1000 | PCB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1000 | PCB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1000 | PCB | 0 | 19 | 29 | 28 | 32 |
| | PB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | PB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | PB | 0 | 17 | 12 | 11 | 17 |
| | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | — | 0 | 0 | 2 | 8 | 18 |
| 100 | PCB | 16 | 51 | 54 | 53 | 55 | 100 | PCB | 0 | 49 | 53 | 59 | 53 | 100 | PCB | 0 | 50 | 54 | 56 | 54 |
| | PB | 19 | 37 | 38 | 43 | 46 | | PB | 0 | 39 | 38 | 47 | 33 | | PB | 0 | 32 | 33 | 33 | 32 |
| | — | 2 | 17 | 22 | 27 | 24 | | — | 0 | 21 | 34 | 29 | 31 | | — | 0 | 17 | 25 | 21 | 22 |
| 10 | PCB | 21 | 53 | 57 | 49 | 47 | 10 | PCB | 0 | 54 | 55 | 45 | 52 | 10 | PCB | 0 | 53 | 51 | 59 | 54 |
| | PB | 14 | 42 | 36 | 48 | 45 | | PB | 0 | 32 | 42 | 42 | 44 | | PB | 0 | 41 | 30 | 44 | 37 |
| | — | 11 | 22 | 26 | 29 | 27 | | — | 0 | 25 | 29 | 31 | 30 | | — | 0 | 24 | 28 | 29 | 29 |
| 1 | PCB | 23 | 52 | 50 | 52 | 49 | 1 | PCB | 0 | 49 | 47 | 49 | 48 | 1 | PCB | 0 | 52 | 51 | 51 | 50 |
| | PB | 14 | 35 | 42 | 42 | 40 | | PB | 0 | 39 | 38 | 42 | 30 | | PB | 0 | 35 | 37 | 38 | 36 |
| | — | 12 | 21 | 29 | 33 | 29 | | — | 0 | 27 | 38 | 33 | 29 | | — | 0 | 30 | 35 | 30 | 29 |
| 0 | PCB | 27 | 54 | 49 | 46 | 45 | 0 | PCB | 0 | 44 | 46 | 50 | 55 | 0 | PCB | 0 | 52 | 49 | 50 | 52 |
| | PB | 20 | 34 | 45 | 38 | 37 | | PB | 0 | 40 | 37 | 39 | 34 | | PB | 0 | 39 | 43 | 40 | 44 |
| | — | 9 | 22 | 24 | 28 | 31 | | — | 0 | 32 | 30 | 27 | 32 | | — | 0 | 30 | 28 | 28 | 30 |

1) 50 μ l/プレート, 2) μ g/プレート, 3) 陽性コントロール: PCB-S9=BP (10 μ g) 365—615, PB-S9=AAF (10 μ g) 4100—5100, S9=AF-2 (0.05 μ g) 309—657

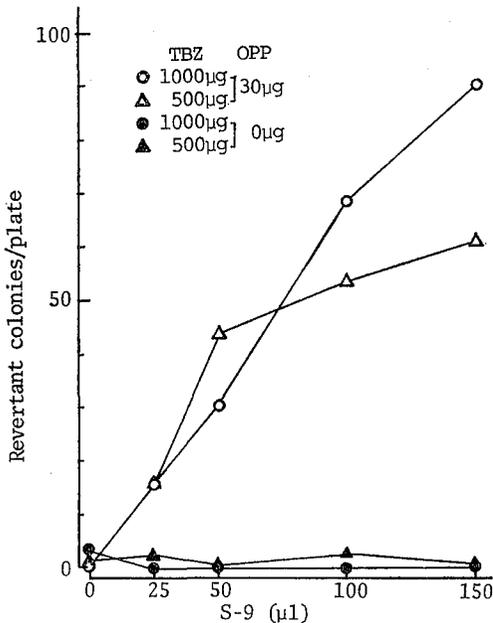


図 1. TBZ と OPP の混合溶液の *S. typhimurium* TA98 を用いた mutation test における S-9 量の影響

同一 S-9 量のコントロール (TBZ 0 μg) の復帰コロニー数 (27~40) を引いた値を示す。

PCB 誘導 S-9 を用いて代謝活性化した場合には復帰コロニー数はほとんど変化しなかった。PB 誘導 S-9 を用いた場合には TBZ 1000 μg, OPP 10 μg/プレートの時、TBZ または OPP 単独のコントロールに対して復帰コロニー数は約 2 倍の増加が見られた (表 1-1)。

このように、PB 誘導 S-9 を用いて代謝活性化した場合に TBZ-OPP の組み合わせで復帰コロニー数に増加が見られたので、代謝活性化に用いた S-9 Mix 中の S-9 量による影響を調べた (図 1)。TBZ は 1000 μg/プレートに対し OPP は 30 μg/プレートとし、S-9 量は 0~150 μl/プレートとした。S-9 量の増加に伴って復帰コロニー数は増加し、S-9 量 150 μl, TBZ 1000 μg では TBZ 無添加の値に対して約 3 倍の増加であった。

以上のように、TBZ あるいは OPP は単独では突然変異誘起性を示さないが、両者を混合し PB 誘導 S-9 による代謝活性化を行うことにより復帰コロニー数が増加した。従って、この増加は、TBZ と OPP の相互作用の結果であると考えられる。ただし、その機構は明らかではない。

TBZ 1000 μg, OPP 30 μg/プレート、S-9 量 150 μl/プレートの時、91 個の復帰コロニー数の増加 (図 1) が見ら

れたことから、Ames ら¹⁵⁾ の突然変異誘起性を表わすための計算によると、0.014 復帰コロニー/μmole となる。Ames らは、この値が 0.01 を越える化合物は突然変異物質であるとしている。従って、TBZ-OPP の混合溶液は突然変異誘起性を持つと考えられるが、河内¹⁶⁾ の突然変異誘起性の強さによる分類に従うならば非常に弱いものであると考えられる。

TBZ-OPP の混合溶液が突然変異誘起性を示すためには PB 誘導 S-9 による代謝活性化が必要である。従って、代謝物質の存在が予想されるが、その物質が TBZ 由来か、OPP 由来かそれとも両者によるのかは明らかではない。しかし、TBZ と BHT の混合溶液が突然変異誘起性を示す¹⁷⁾ こと、そして BHT が突然変異物質の突然変異誘起性を変動させる作用を有する^{11, 12)} ことを考慮すると TBZ 由来の代謝物質の可能性が考えられ、OPP は BHT 同様の変動させる作用を持つのではないかと考えられる。今後、この点について検討する予定である。

要 約

4 種のかび防止剤を 2 種ずつ組み合わせさせた混合溶液の突然変異誘起性を Ames の mutation test 系を用いて検討した。フェノバルビタール誘導ラットの肝臓ホモジネートを用いて代謝活性化した場合に、チアベンダゾール 1000 μg, オルトフェニルフェノール 30 μg で復帰コロニーが約 3 倍に増加した。これは 0.014 復帰コロニー/μmole となり非常に弱い突然変異誘起性陽性と判断した。この組み合わせ以外はすべて陰性であった。

文 献

- 1) 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
- 2) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一: 東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 3) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 48, 1979
- 4) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 55, 1979
- 5) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
- 6) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 83, 1979
- 7) 河内 卓: 遺伝変異原物質を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発, 厚生省がん研究助成金による研究報告, 1975・1976
- 8) 花田信次郎: 栄養と食糧, 29-1, 66, 1976
- 9) Nagao, M., Yahagi, T., and Kawachi, T.: *Proc. Japan Acad.*, 53, 95, 1977
- 10) Nagao, M., Yahagi, T., and Sugimura, T.:

B. B. R. C., 83, 373, 1978

- 11) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 40, 1978
12) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 41, 1979
13) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, 20, 1178, 1975
14) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28

-2, 53, 1977

- 15) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 5135, 1975
16) 河内 卓: 蛋白質核酸酵素, 23, 422, 1978
17) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 26, 1980

クロム鉱さい粉じんのラットによる3か月間持続吸入実験 (第1報)
 体重, 器官重量, 組織学的変化について

坂本 義光*, 神谷 信行*, 池田 虎雄*, 平賀 興吾*

Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 3 Months (I)
 Body Weight, Organ Weight and Histological Changes

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

Keywords: クロム鉱さい粉じん chromite ore residue dust, ラット rat, 吸入毒性 inhalation toxicity

緒 言

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体におよぼす影響を観察する目的で, 粉じん吸入実験装置¹⁾を用いた昼夜連続の吸入曝露実験を行なっている。すでにラットによる7日間および1か月間の吸入実験を行ない, 結果については前報で報告した^{2,3)}。実験では鉱さいの影響を呼吸器系だけでなく, ラットの生育状態, 血液血清成分, 肺以外の諸臓器についても観察を行ない, 同時に諸臓器中のクロム含量を分析し, 経気道摂取によるクロムの体内分布についても検索を行なった⁴⁾。前実験において鉱さいの生体への影響は, 鉱さいの可溶性成分による肺組織への直接的な作用が主で, 他の諸臓器への影響は認められなかった。本報では, さらに吸入曝露を継続した場合の肺の組織変化の経過ならびに他の諸臓器への影響の有無を観察し, 今後行なう予定の低濃度長期吸入実験の濃度設定の参考にする目的で行なった3か月間の昼夜連続吸入実験の結果を報告する。実験は, 実験室内空気のみを通したチャンバー内飼育の対照群の他に, 肺の粉じんに対する反応を比較する目的で, エアロゾルとした時に鉱さい粉じんと同様の粒度分布を示す関東ローム粉体の吸入曝露群を比較対照群として設定して行なった。

実験材料および方法

動物 Slc-Wistar 系雄ラット, 4週令を購入し11日間予備飼育した後, 実験に用いた。吸入実験開始時の体重は110~135gであった。

粉体 クロム鉱さい粉じんは, 鉱さい塊を前報³⁾で述べた方法により粉碎, 分篩し調製した。比較対照として用いた関東ローム粉体は日本粉体工業協会より JIS Z8901 試験用粉体11種を入手し, 使用した。両粉体とも吸入実験に用いる前に100℃で一昼夜乾燥した。

Table 1. Metal Concentration of Dust

| Chromite ore residue | | JIS Dust No. 11 | |
|----------------------|-----------|-----------------|-------|
| | (%) | | (%) |
| Ca | 21.2 | Si | 16-19 |
| Fe | 6.1 | Fe | 12-16 |
| Cr | 2.8(1.2)* | Al | 14-17 |
| Si | 2.4 | Mg | 2-4 |
| Al | 1.8 | Ca | 0-2 |
| Na | 0.4 | Ti | 0-2 |
| Ni | 0.3 | Cr | ND |
| Mn Ti Zn Sr | <0.1 | | |

(*) : Water soluble Cr

各粉体の比重は鉱さい2.79, 関東ローム2.97であり, 原粉体の平均粒径は各々3.3および1.79μであった。

粉体の化学的性状について Table 1 に粉体中に含まれる金属の濃度を示した。鉱さいについては原子吸光分析⁴⁾により, また関東ロームについては日本粉体工業協会の分析値によった。鉱さい中のクロム量は2.8%, 水可溶性クロムは1.2%であった。また Table 2 に成分の化学的組成および Table 1 の値より換算した濃度を示した。クロム鉱さいについては, 含まれる主な金属についてのみ, X線回折分析による結果を示した。また関東ロームについては Table 1 と同様である。鉱さいでは Ca の化合物が主な成分であり, 関東ロームは Si, Al, Fe の化合物が主な成分であった。なお鉱さい中 Cr⁶⁺ については検出できなかった。X線回折分析は島津X線回折装置 XD-3A により, 同社に依頼して行なった。粉体の生理食塩水に対する溶解性は前報²⁾ に記したとおりである。

吸入実験 実験は1群16匹として, 比較対照の関東ローム粉体 10mg/m³ (JIS Dust 群), クロム鉱さい粉じん

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 2. Chemical Composition of Dust

| Chromite ore residue dust | |
|--------------------------------|-------|
| Formula** | % |
| CaCO ₃ CaO] | 51.7 |
| Fe ₂ O ₃ | 8.7 |
| SiO ₂ | 5.1 |
| Al ₂ O ₃ | 3.4 |
| Cr ₂ O ₃ | 2.4 |
| JIS Dust No. 11 | |
| Formula | % |
| SiO ₂ | 30-40 |
| Al ₂ O ₃ | 26-32 |
| Fe ₂ O ₃ | 17-32 |
| MgO | 3-7 |
| TiO ₂ | 0-4 |
| CaO | 0-3 |

* : X-Ray diffraction analysis

Table 3. Particle Size Distributions of Aerosol in Inhalation Chamber

| Sampler Stage | Diameter μ | Weight percent | | |
|---------------|----------------|----------------|-------|----------|
| | | Cr-L | Cr-H | JIS Dust |
| 0 | >11.0 | 1.08 | 1.10 | 1.18 |
| 1 | 11.0-7.0 | 1.66 | 1.52 | 1.52 |
| 2 | 7.0-4.7 | 3.71 | 7.47 | 5.31 |
| 3 | 4.7-3.3 | 13.39 | 20.65 | 19.83 |
| 4 | 3.3-2.1 | 30.40 | 33.62 | 37.29 |
| 5 | 2.1-1.1 | 36.46 | 25.29 | 26.66 |
| 6 | 1.1-0.65 | 12.71 | 9.01 | 6.88 |
| 7 | 0.65-0.43 | 0.49 | 1.14 | 1.00 |
| 8* | 0.43> | 0.10 | 0.02 | 0.33 |

8* : Filter

10mg/m³ (Cr-H 群) および 1mg/m³ (Cr-L 群) の粉じん曝露群と実験室内空気のみを対照群の 4 群を設定し 91 日間昼夜連続で行なった。なお実験に使用した吸入実験装置の詳細は前報にゆずる³⁾。実験期間中、動物は吸入チャンパー内に 2 個のケージに等分して収容し、クレア製固型飼料 CE-2 およびチャンパー内給水ノズルより水道水を自由に摂取させた。チャンパー内飼育条件は換気回数 10~11 回/時で、温度 25~26℃、湿度 50~60% であった。照明時間は吸入実験室と同様午前 6 時~午後 6 時とした。またチャンパー内粉じん濃度の変動幅は各群とも設定濃度 $\pm 10\%$ 以内であり、粒度分布は Table 3 に示したように各群とも 4.7 μ 以下が 90%、2.0 μ 以下は、鉍さい 1 mg/m³ 曝露群では約 50%、鉍さいおよび関東ローム粉体 10mg/m³ 曝露群では約 35% の割合であった。

検査 動物は曝露後 91 日目に大腿部動脈を切断、放出する血液を採取し、放血屠殺した。各群 16 例中 10 例について器官重量秤量、血液、血清生化学的検査および臓器中クロム含量の測定を行ない、残り 6 例について病理組織学的検査を行なった。このうちクロム含量分析については神谷ら³⁾の報告にゆずる。

1) 一般症状の観察および体重の測定。実験期間中毎日、吸入チャンパーのガラス窓より観察し、また週一度の体重測定時には、呼吸の際の鼻および咽喉よりの異常音の有無に注意した。体重は毎週の各群の値を 16 例の平均値 \pm S. D.、および吸入開始時の体重にもとづいた増加率 (%) で表わした。

2) 血液学的検査。上述した方法で採取した血液につ

いて Coulter Counter Model-s を用いて、WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC を測定した。

3) 血清生化学的検査。定法により調製した血清について自動分析装置 (HITACHI M-400) により、TP, Alb, Cho, Glu, UN, GPT, GOT, Alp, ChE を測定した。

4) 剖検。肉眼的観察。

5) 臓器重量の測定。脳、心臓、肺(左右)、肝臓、脾臓、腎臓(左右)、胸腺、精巣(左右)、前立腺、下垂体、甲状腺、副腎(左右)を測定した。各器官について絶対重量と解剖時の体重にもとづいて体重比重量を求め各群 10 例の平均値 \pm S. D. で表わした。さらに肺については 110℃ で恒量になるまで乾熱し、乾燥重量及び水分含量を測定した。

6) 病理組織学的検査。重量秤量臓器の他に、気管、縦隔部リンパ節、食道、胃、小腸、大腸、唾液腺、すい臓、鼻腔を摘出し、10% 緩衝ホルマリンで固定した。肺は結紮した気管より固定液を約 10cm 水柱の圧で注入し、再膨張させた後固定した。固定後定法に従って組織標本を作製し、HE 染色の他に、PAS 反応、鍍銀染色を行なった。

結 果

1. 一般症状 吸入曝露期間中、各粉じん曝露群の動物の挙動、外見には、特に異常は見られなかった。

2. 体重 吸入開始日より毎週の体重および増加率の値を Table 4 に示し、各群の増加曲線を Fig. 1 に示した。表に示したように、鉍さい 10mg/m³ 曝露群では、曝露 10 週目より対照に比べ有意に小さかったが、増加率では差がなかった。しかし各群の増加曲線をみると、Fig. 1 に示したように、鉍さい曝露群では曝露後 4 週目より増

Table 4. Weekly Body Weights and Body Weight Gains During Exposure to Dust for 3 Months

| Group | No. of rats | Experimental duration after the start of exposure (weeks) | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------------|---|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|---------|----------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Control | (16) | 122±7 ^{a)} | 153±9 | 183±11 | 210±11 | 233±12 | 250±14 | 265±14 | 280±14 | 293±15 | 302±15 | 313±15 | 321±17 | 328±20 | 335±20 |
| | | | 125±3 ^{b)} | 149±5 | 172±7 | 190±8 | 204±10 | 216±12 | 229±13 | 239±14 | 247±14 | 256±16 | 262±18 | 268±20 | 274±20 |
| JIS Dust | (16) | 121±5 | 152±7 | 181±7 | 208±8 | 232±8 | 251±9 | 265±10 | 280±12 | 292±12 | 302±12 | 314±12 | 322±13 | 332±14 | 339±14 |
| | | | 125±3 | 148±6 | 171±6 | 191±7 | 206±8 | 218±9 | 231±10 | 240±11 | 248±11 | 259±11 | 265±12 | 273±13 | 279±13 |
| Cr-L | (16) | 121±6 | 152±9 | 180±12 | 205±11 | 228±12 | 244±14 | 258±15 | 273±15 | 283±16 | 294±16 | 303±16 | 308±16 | 318±17 | 324±18 |
| | | | 125±3 | 149±5 | 169±4 | 189±6 | 201±6 | 213±7 | 225±7 | 233±7 | 242±8 | 250±9 | 254±9 | 262±9 | 267±10 |
| Cr-H | (16) | 120±5 | 152±8 | 182±8 | 210±9 | 232±11 | 245±13 | 261±14 | 274±15 | 283±17 | 291±18 | 297±20* | 302±20** | 310±20* | 314±21** |
| | | | 125±5 | 151±7 | 174±9 | 192±11 | 203±14 | 216±16 | 227±17 | 235±19 | 242±20 | 247±23 | 250±24 | 257±25 | 261±26 |

a) Absolute weight (g), mean±S. D., b) Body weight gain(%): (Each week's weight/weight at the start of exposure)×100. Statistical significance, * p<0.05, ** p<0.01 (vs Control)

加傾向が小さく、8週目以後10mg/m³曝露群ではさらにその傾きが小さいという推移を示しており、鉍さい曝露群では、対照、関東ローム曝露群 (JIS Dust 群) に比べ、増加の割合が濃度に比例して抑制される傾向がみられた。

3. 血清生化学的検査 各群の結果をTable 5に示したが、いずれも問題となる変化はなかった。また血液学的検査結果は、測定装置故障のため得られなかった。

4. 剖検所見 関東ローム、鉍さい高濃度群の縦隔リンパ節が対照に比べやや大きかった他は、特に著変は認められなかった。

5. 器官重量 結果をまとめてTable 6に示した。表に示したように著明な変化を示したのは肺で各粉じん曝露群とも対照に比べ絶対重量、体重比重量が有意に大きく、また鉍さい高濃度群では、関東ローム群に比べ有意に大きかった。各群とも左右の肺で同様な傾向であった。肺(左葉)の湿重量、乾燥重量、水分含量をTable 7に示した。各群とも湿重量の増加に比例して乾燥重量、水分含量も対照に比べ増加しているが、水分含量を湿重量に対する割合で見ると鉍さい低濃度群では対照と差がなく、鉍さい10mg/m³関東ローム群では、小さな値を示した。

肺以外の臓器では鉍さい曝露群で肝重量が絶対重量、体重比ともに小さく、その程度は濃度に比例しているようであった。また鉍さい10mg/m³群では心臓、腎臓の絶対重量が小さかったが体重比では差がなかった。

6. 組織学的観察 粉じん曝露群に認められた変化は、肺の組織変化が主であって他の諸臓器には対照と比べ特に変化は認められなかった。本報では変化のみならず、気管について得られた結果についてのみ述べる。またこれらの変化について各群での有無および程度をTable 8にまとめて示した。

関東ローム粉体曝露群 (JIS Dust 群). 食べた粉じん粒子で胞体内を満たした大食細胞が肺胞内に多く散在しており、大食細胞の一部は、数個が集合して肺胞内に存在していた。肺胞壁では、肺胞上皮の軽〜中程度の腫大がみられ、細胞の増生と合せ肥厚した肺胞壁も散見され、大食細胞が多く存在する部位やその周辺の肺胞では特にその程度は強くみられた。肺胞内には大食細胞の他に、大食細胞の崩壊により、放出された粉じん粒子の存在もみられた。崩壊している大食細胞は、形を保っているものに比べ少なかった (photo 1). 肺内の各気管支には特に著変はなかった。

鉍さい10mg/m³曝露群 (Cr-H 群). 肺胞腔内に粉じんを貪食した大食細胞が散在してみられるが、その数は

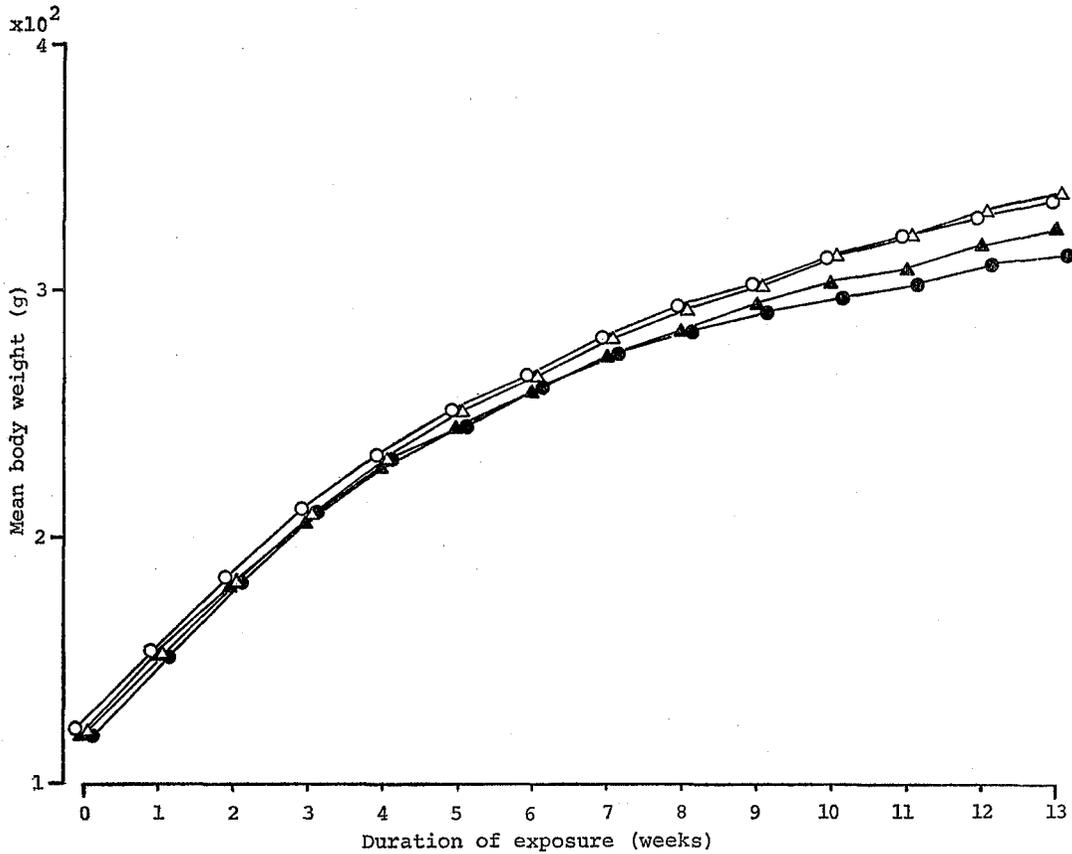


Fig. 1. Growth Curves of Rats during Exposure

Each point represents the mean of 16 rats.

○—○ Control, △—△ JIS dust No. 11 10 mg/m³, ▲—▲ Chromite ore residue dust 1 mg/m³, ●—● Chromite ore residue dust 10 mg/m³

Table 5. Results of Blood Biochemical Examination

| Group | No. of rats | TP g/dl | Alb g/dl | Cho mg/dl | Glu mg/dl | UN mg/dl | GPT K-U/ml | GOT K-U/ml | Alp K. A-U/dl | ChE ΔpH |
|----------|-------------|---------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|---------------|---------------|------------------|------------|
| Control | (10) | 7.58 ± 0.20 ^{a)} | 4.37 ± 0.25 | 105 ± 2.0 | 210 ± 45 | 45.6 ± 6.1 | 50.2 ± 11.4 | 104 ± 16 | 43.1 ± 6.8 | 123 ± 3.7 |
| JIS Dust | (10) | 7.65 ± 0.10 | 4.43 ± 0.18 | 104 ± 1.5 | 195 ± 39 | 43.9 ± 4.1 | 48.8 ± 11.4 | 110 ± 11 | 42.4 ± 7.9 | 124 ± 5.8 |
| Cr-L | (10) | 7.51 ± 0.15 | 4.34 ± 0.23 | 105 ± 4.0 | 215 ± 37 | 42.1 ± 3.3 | 45.9 ± 7.2 | 101 ± 16 | 43.0 ± 6.8 | 126 ± 1.3 |
| Cr-H | (10) | 7.34 ± 0.23 | 4.27 ± 0.19 | 101 ± 2.6 | 199 ± 43 | 42.8 ± 3.3 | 47.7 ± 6.1 | 101 ± 11 | 40.3 ± 5.0 | 125 ± 4.8 |

a) : mean ± S. D., Control : Air of inhalation room, JIS Dust : JIS Dust No. 11 10 mg/m³, Cr-L : Chromite ore residue dust 1 mg/m³, Cr-H : Chromite ore residue dust 10 mg/m³

関東ローム群に比べはるかに少なく、崩壊または腫大し崩壊過程にあるものが多かった。また胞体内の粉じん粒子もはるかに少ないが、粉じん粒子と思われる微細顆粒の他に黄褐色のやや粗大な顆粒も同時に認められた。肺

胞内に存在する大食細胞は遊離の状態のもの少数個が集合して存在しているのがみられた。肺胞内には、大食細胞の存在の他に、微細顆粒状から均質、硝子様でエオジン淡染、PAS陽性のタンパク様物質の存在がみられ、

Table 6. Organ Weights of Rats Exposed to JIS Dust No.11 10 mg/m³, Chromite Ore Residue Dust 1 mg/m³ and 10 mg/m³

| Group | No. of rats | Brain mg | Heart mg | Lung (R) mg | Lung (L) mg | Liver g | Spleen mg | Kidney (R) mg | Kidney (L) mg |
|----------|-------------|-------------------------|-----------|-------------|-------------|---------------|-----------|---------------|---------------|
| Control | (10) | 1925 ± 45 ^{a)} | 905 ± 47 | 698 ± 34 | 370 ± 24 | 11.05 ± 0.69 | 615 ± 30 | 951 ± 51 | 926 ± 61 |
| | | 583 ± 36 ^{b)} | 274 ± 16 | 211 ± 12 | 112 ± 7 | 3.34 ± 0.19 | 186 ± 9 | 288 ± 19 | 280 ± 21 |
| JIS Dust | (10) | 1933 ± 49 | 921 ± 50 | 1008 ± 72** | 556 ± 47** | 10.72 ± 0.67 | 626 ± 39 | 929 ± 49 | 922 ± 48 |
| | | 584 ± 28 | 277 ± 8 | 303 ± 11** | 167 ± 8** | 3.23 ± 0.10 | 189 ± 8 | 280 ± 7 | 278 ± 14 |
| Cr-L | (10) | 1927 ± 60 | 867 ± 70 | 734 ± 36* | 407 ± 25** | 10.09 ± 0.89* | 610 ± 72 | 906 ± 68 | 895 ± 81 |
| | | 601 ± 28 | 270 ± 14 | 229 ± 10** | 126 ± 6** | 3.14 ± 0.12* | 189 ± 12 | 282 ± 15 | 278 ± 18 |
| Cr-H | (10) | 1920 ± 38 | 835 ± 85* | 1105 ± 85** | 614 ± 44** | 9.49 ± 0.87** | 583 ± 43 | 883 ± 70* | 915 ± 71 |
| | | 617 ± 32 | 267 ± 15 | 354 ± 16** | 197 ± 9** | 3.04 ± 0.12** | 187 ± 13 | 283 ± 11 | 293 ± 15 |

| Group | No. of rats | Thymus mg | Testis(R) mg | Testis(L) mg | Prostate gl. mg | Hypophysis mg | Thyroid gl. mg | Adrenal gl. (R) mg | Adrenal gl. (L) mg |
|----------|-------------|-----------|--------------|--------------|-----------------|---------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Control | (10) | 204 ± 19 | 1502 ± 96 | 1558 ± 118 | 293 ± 82 | 8.74 ± 1.10 | 12.12 ± 1.26 | 17.27 ± 1.42 | 19.63 ± 1.61 |
| | | 61 ± 4 | 454 ± 29 | 471 ± 38 | 88 ± 23 | 2.64 ± 0.32 | 3.67 ± 0.55 | 5.22 ± 0.36 | 5.95 ± 0.54 |
| JIS Dust | (10) | 193 ± 24 | 1491 ± 47 | 1531 ± 70 | 270 ± 39 | 8.49 ± 1.31 | 11.97 ± 3.15 | 18.16 ± 1.69 | 18.91 ± 1.36 |
| | | 58 ± 5 | 450 ± 24 | 462 ± 26 | 81 ± 14 | 2.56 ± 0.36 | 3.63 ± 0.92 | 5.48 ± 0.50 | 5.74 ± 0.51 |
| Cr-L | (10) | 207 ± 39 | 1489 ± 119 | 1535 ± 113 | 306 ± 85 | 8.24 ± 1.17 | 10.85 ± 2.03 | 16.60 ± 2.16 | 18.32 ± 2.02 |
| | | 64 ± 9 | 464 ± 26 | 478 ± 26 | 95 ± 28 | 2.58 ± 0.38 | 3.40 ± 0.68 | 5.21 ± 0.82 | 5.75 ± 0.85 |
| Cr-H | (10) | 191 ± 22 | 1531 ± 84 | 1561 ± 86 | 284 ± 67 | 8.25 ± 1.29 | 11.03 ± 2.44 | 17.28 ± 2.34 | 19.01 ± 1.78 |
| | | 61 ± 8 | 492 ± 28 | 501 ± 14 | 91 ± 21 | 2.65 ± 0.43 | 3.53 ± 0.75 | 5.55 ± 0.75 | 6.11 ± 0.64 |

a) Absolute weight, mean ± S. D. b) mg(g)/100g Body weight, mean ± S. D.
 Statistical significance: * p < 0.05, ** p < 0.01, Control vs JIS Dust, Cr-L, Cr-H
 ' p < 0.05, '' p < 0.01 JIS Dust vs Cr-H

Table 7. Lung (left lobe) Wet, Dry Weight and Water Content of Rats Exposed to JIS Dust No. 11 and Chromite Ore Residue Dust for 91 Days

| Group | Wet weight mg | Dry weight mg | Water content | |
|----------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| | | | mg | % |
| Control | 370 ± 24 | 81 ± 4 | 290 ± 21 | 78.2 ± 0.7 |
| JIS Dust | 556 ± 47* | 135 ± 14* | 421 ± 40* | 75.6 ± 2.1* |
| Cr-L | 407 ± 25* | 88 ± 5* | 320 ± 21* | 78.5 ± 0.7 |
| Cr-H | 615 ± 45* | 145 ± 11* | 469 ± 35* | 76.4 ± 0.6* |

JIS Dust: JIS Dust No. 11 10 mg/m³
 Cr-L, Cr-H: Chromite ore residue dust 1 mg/m³, 10 mg/m³
 *: p < 0.05, vs Control. ' : p < 0.05, vs JIS Dust

粉じん粒子や大食細胞や壁成分の崩壊残渣の混在も認められた。またこの物質が存在する部位は全葉にわたって散在していた。肺胞壁は肺胞上皮が軽〜中程度に腫大しており、関東ローマ曝露群に比べ程度は弱かった (photo

2)。この変化は、大食細胞の存在する肺胞で主にみられ、タンパク様物質の存在する部位の肺胞では、対照と同様なものの他、細胞成分が少なく菲薄になった肺胞壁が散見された(photo 3)。鉱さい10mg/m³曝露群では、この他気管の喉頭に近い部位で軽度な気管粘膜上皮の細胞高の増加が認められたが、肺内の各気管支には著変はみられなかった。

鉱さい1mg/m³曝露群。粉じんを貪食した大食細胞は、肺胞内に、主に集合した状態で存在し、遊離のものは少なかった。また軽度な腫大を示している大食細胞もみられるが崩壊したものは見られず、また肺胞腔内には、高濃度群でみられたタンパク様物質の存在もなかった。肺胞壁の変化は、大食細胞の存在する部位で、肺胞上皮が軽度な腫大を示した他は、対照と差がなかった (photo 4)。

粉じん粒子の存在。肺内に吸入された粉じん粒子は、肺食細胞に貪食された状態で肺胞内に存在する他、肺内リンパ組織や縦隔部リンパ節にも蓄積が認められ、小集簇を形成していた。これらはいずれも食細胞に貪食された状態で存在していた。また量的には、関東ローマ

Table 8. Results of Histological Observation of Lung from the Rats Exposed to JIS Dust No. 11 and Chromite Ore Residue Dust for 3 Months

| Changes | Control | JIS Dust | Cr-L | Cr-H |
|--------------------------------------|---------|----------|------|------|
| Alveolar cell | | | | |
| Enlargement | — | ++ | ± | + |
| Proliferation | — | + | — | ± |
| Desquamation | — | + | — | + |
| Alveolar macrophage | | | | |
| Increase of number | — | +++ | + | ++ |
| Amount of phagocytosed dust particle | — | +++ | + | ++ |
| Enlargement | — | + | + | ++ |
| Disintegration | — | + | — | +++ |
| Small aggregation in alveoli | — | + | + | + |
| Presence of debris in alveoli | — | + | — | +++ |
| Trachea | | | | |
| Increase of epithelial cell height | — | — | — | + |

: Control : Air of inhalation room, JIS Dust : JIS Dust No. 11 10 mg/m³

Cr-L : Chromite ore residue dust 1 mg/m³, Cr-H : Chromite ore residue dust 10 mg/m³

: Grade of changes in table is presented with mean of 6 rats

: Symbols, — no reaction, ± very slight reaction, + slight reaction, ++ moderate reaction, +++ — +++ Marked reaction

群で各部位に多く、不溶性粉じん量に比例した蓄積量を示した。各曝露群のこれらの組織では、粉じんの存在以外の組織変化はみられなかった。

考 察

クロム鉱さいを 10mg/m³ の濃度で3か月間昼夜連続曝露すると、肺以外の臓器のうち、腎臓、脾臓、肝臓にクロムの蓄積が多かった⁴⁾。しかし組織学的観察結果から、経気道摂取されたクロムやその他の鉱さい成分は、呼吸器以外の諸器官には影響は認められず、鉱さい曝露群における体重の増加抑制傾向も、鉱さいによる呼吸器への作用の二次的な影響によるものと思われる。肺の組織変化は、前実験²⁾ですでにみられた変化が、曝露量、曝露期間にともなって程度が強くなったもので、特に性質を異にする変化はみられなかった。肺組織変化のうち、肺胞細胞の腫大、増殖は、肺内の粉じん量が多い関東ロータム群でやや強かった。これは粉じんや粉じんを貪食した肺食細胞の存在する部位に顕著であり、肺胞から異物を取り除く、肺クリアランス機能の亢進した部位に一致し、生理的反応の一つであると考えられ、また肺胞細胞の増殖は、これらが格子線維やコラーゲン線維の増生を伴わないかぎり可逆的であるとされている^{5,6)}。本実験では線維の増生はみられなかった。鉱さい曝露群では肺胞内へのタンパク様物質の蓄積が特徴的な変化として認められた。Grossら^{7,8)}は大量の石英粉体や金属アルミニ

ウムの吸入曝露により同様な変化を観察している。この変化は粉じんのもつ細胞毒性により、大食細胞の破壊を伴った大食細胞による肺クリアランス機構の障害と考えられ^{5,7)}、肺内に粉じんが大量に残存する関東ロータム群で程度が弱く、鉱さい曝露群で顕著にみられることは、この変化が粉じん量によるものではなく粉じんの性質によるものであり、気管粘膜上皮の変化とともに、鉱さい成分の強い細胞毒性を示すものである。鉱さい 1mg/m³ 曝露群では、前実験²⁾と同様、肺胞領域での変化は肺胞細胞の軽度な腫大以外には、著変はみられなかった。大食細胞は肺胞内に集合し、小集簇を形成して存在したが、低濃度でのこのような状態の大食細胞の存在は粉じんの長期間、昼夜連続という曝露条件に加え、大食細胞が肺クリアランス過程に関与する能力を妨げるという鉱さい成分の作用も考えられる。また肺重量が対照に比べ大きいことや、さらに肺に含まれるクロム量の分析結果⁴⁾から、曝露終了時のクロム量の曝露量に対する割合は、むしろ低濃度群で大きい事などから、鉱さいの肺実質への影響は全くないとはいえず、その曝露量に比例していると思われる。

以上の結果から、1mg/m³ を最高濃度とした低濃度長期吸入実験を計画し、低濃度でのクロム鉱さい粉じんの生体への影響について現在実験観察中である。

ま と め

クロム鉱さい粉じんを $10\text{mg}/\text{m}^3$ 、および $1\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、3か月間ラットに吸入曝露し、鉱さい粉じんの経気道摂取による生体への影響を観察した。実験では粉じんに対する肺の反応を比較する目的で鉱さい $10\text{mg}/\text{m}^3$ 曝露群と同濃度の関東ローム粉体曝露群を設定した。

鉱さい曝露群では実験後半より濃度に比例し、体重の増加抑制傾向を示した。肺重量は各曝露群で対照に比べ大きくその程度は鉱さい $10\text{mg}/\text{m}^3$ 、関東ローム、鉱さい $1\text{mg}/\text{m}^3$ の順であった。肺以外の臓器では、鉱さい曝露群で、肝重量が濃度に比例し小さく、鉱さい $10\text{mg}/\text{m}^3$ 曝露群で心臓、腎臓が小さかったが、いずれも体重の増加抑制に伴った変化であった。

肺の組織変化は、鉱さい $10\text{mg}/\text{m}^3$ では、大食細胞の崩壊が顕著であり、肺胞内へのタンパク様物質の蓄積が多く鉱さい成分による肺クリアランスの障害が示唆された。肺胞壁では関東ロームに比べて軽度な肺胞細胞の腫大の他、壁成分の剥離もみられた。この他気管で粘膜上皮の細胞高の増加が認められ、鉱さい $10\text{mg}/\text{m}^3$ では呼吸器系への影響が関東ローム群に比べ大きかった。鉱さい $1\text{mg}/\text{m}^3$ では大食細胞の崩壊はみられず主に肺胞内に小集簇を形成して存在し、その周辺の肺胞壁で肺胞細胞の軽度な腫大がみられた他は特に著変はなかった。その他鉱さい曝露群では関東ローム曝露群と同様、肺内の各気管支、粉じんが蓄積している肺内リンパ組織および縦隔部リンパ節、また肺以外の諸臓器には特に変化はみられなかった。

(本研究の概要は毒作用研究会第6回昭和54年6月で発表した。)

文 献

- 1) 坂本義光, 調 武久, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 135, 1977
- 2) 坂本義光, 神谷信行, 伊川三枝子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 67, 1978

- 3) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 142, 1977
- 4) 神谷信行, 坂本義光, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 51, 1980
- 5) Gross, P.: *Arch. Environ. Health*, 14, 883, 1967
- 6) Hatch, T. F., and Gross, P.: *Pulmonary Deposition and Retention of Inhaled Aerosols*, 87, 1964, Academic Press, New York
- 7) Gross, P., and de Terville, T. P.: *Arch. Path.* 86, 255, 1968
- 8) Gross, P., Halrley, R. A., and de Terville, T. P.: *Arch. Environ. Health* 26, 227, 1973

Explanation of Plates

Photomicrographs were prepared from section stained with hematoxylin and eosin

Photo 1. Lung of rat exposed to JIS Dust No. 11.

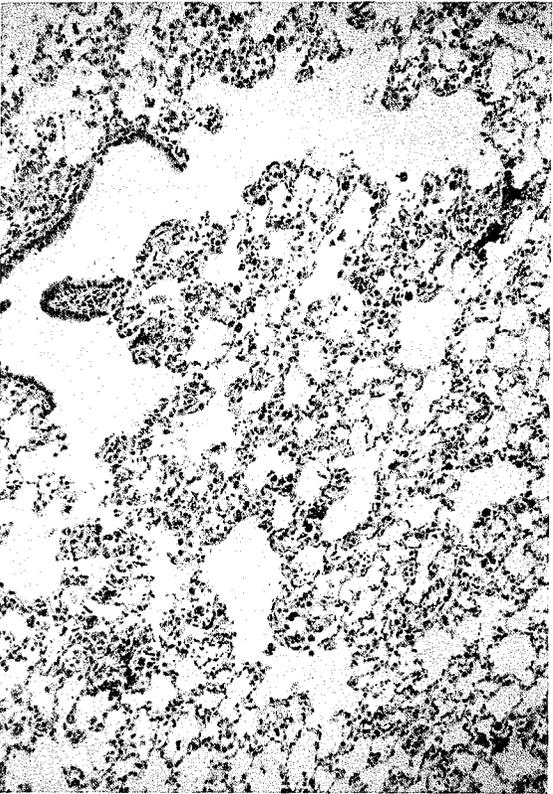
Macrophages filled with dust particles are observed in alveoli. Alveolar wall are thickened by increase in number and size. ($\times 100$)

Photo 2. Lung of rat exposed to Chromite ore residue dust $10\text{mg}/\text{m}^3$.

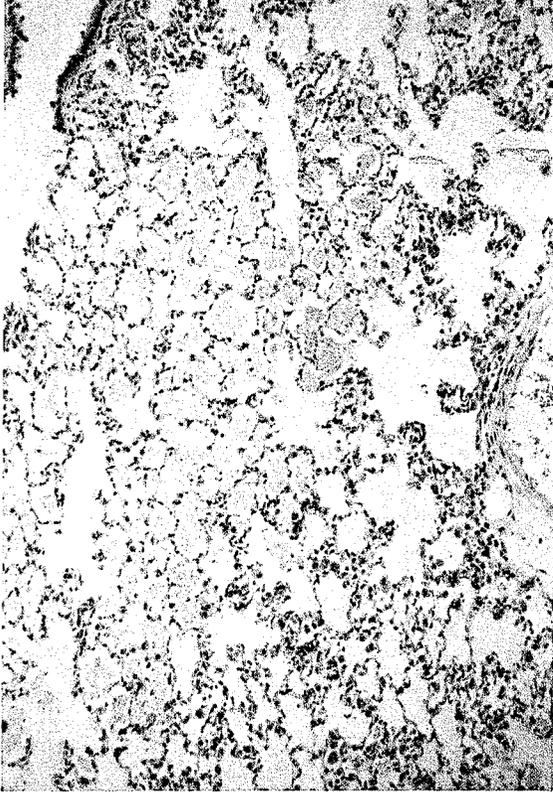
Air spaces in half parts of the fields are filled with proteinaceous materials. In other region have no materials in alveoli, alveolar wall are thickened. Macrophages are observed in this region. ($\times 100$)

Photo 3. Higher magnification of photo 2. Proteinaceous materials have fine granular or more dense homogeneous appearance and contained dust particles. Alveolar wall are normal or thin and less cellularity. ($\times 200$)

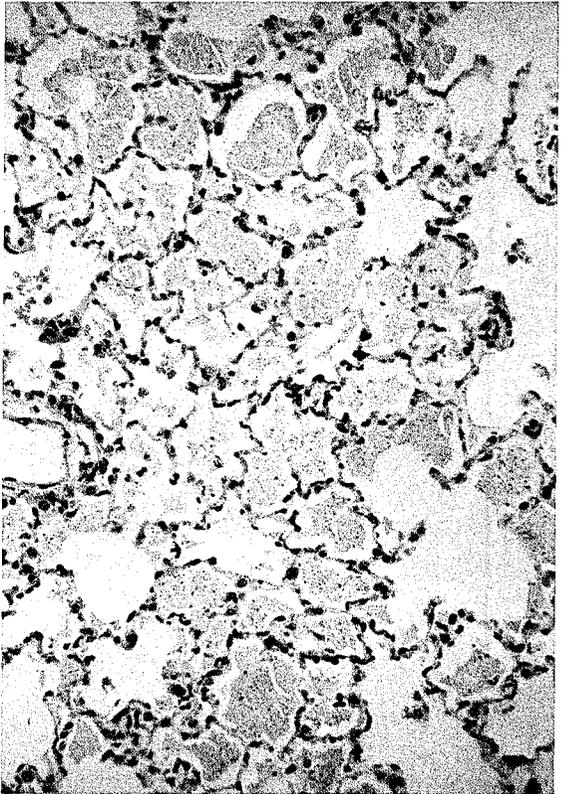
Photo 4. Lung of rat exposed to Chromite ore residue dust $1\text{mg}/\text{m}^3$. Macrophages collected in alveoli are observed. Alveolar wall around collection of cells are slightly thickened. ($\times 100$)



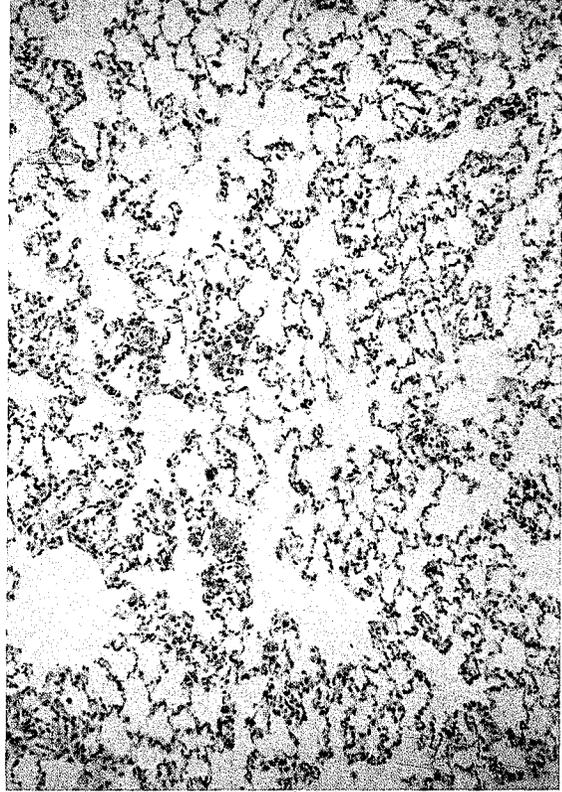
1



2



3



4

クロム鉱さい粉じんのラットによる1か月間持続吸入実験 特に吸入後の回復について

坂本 義光*, 神谷 信行*, 池田 虎雄*, 平賀 興吾*

Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats—Recovery after 1 Month Exposure

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

Keywords: クロム鉱さい粉じん Chromite ore residue dust, ラット rat, 吸入毒性 inhalation toxicity, 回復 recovery

緒 言

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体におよぼす影響を観察する目的で粉じん吸入実験装置¹⁾を用いたラットによる全身曝露実験を行なっている。すでに1週間、1および3か月間の昼夜連続吸入実験を行ない結果は前報²⁻⁴⁾で報告した。以上の実験から得られた結果では、比較対照として用いた関東ローム粉体を同濃度で曝露したラットに比べ、体重の増加抑制傾向⁴⁾、肺重量の増加に加えて、肺実質の損傷を伴うより強い肺の組織変化が認められた。しかしいずれの実験においても、肺以外の諸臓器には鉱さいによると思われる変化は認められなかった。本報では鉱さい粉じんを20mg/m³の濃度で1か月間吸入曝露したラットについて、曝露中止後の肺の組織変化の経過および肺内に吸入された粉じん粒子の挙動を中心に曝露後のラットの生育過程における影響の有無について、同条件で関東ローム粉体を吸入曝露したラットと比較観察した結果を報告する。なお本報では曝露終了後12か月目までの結果を示した。

実験材料および方法

動物はSlc-Wistar 系雄ラット、5週令を用い、実験は鉱さい粉じん(Cr群)および比較対照としての関東ローム粉体(JIS試験粉体11種: JIS Dust群)の各20mg/m³曝露群と実験室内空気のみを対照群の3群を設定し、粉じん吸入実験装置¹⁾により30日間昼夜連続で行なった。実験に用いた動物数は曝露終了後1, 3, 6か月間飼育観察のために各群24匹、また終了後終生飼育観察のために各群20匹として2回に分けて吸入実験を行なった。

クロム鉱さい粉じんおよび関東ローム粉体の調製法および化学的性状は前報⁴⁾に示したとおりである。鉱さい中の総クロム量は2.8%, 水溶性クロムは1.2%であった。吸入期間中の吸入チャンバー内飼育条件は換気回数9

~10回/時で温度25~26℃湿度50~60%であった。またチャンバー内のエアロゾル粒度分布は両粉じん曝露群とも4.7μ以上15%, 4.7~2.1μ 50%, 2.1μ以下35%であった¹⁾。

曝露終了後動物はバリエー動物室へ移し、飼育した。吸入曝露およびバリエー内飼育期間中、日本クレア製固型飼料CE-2、水道水を自由に摂取させた。体重は曝露開始および終了時の他、終了時より2週間毎に測定し、同時にラットの外見、挙動を観察した。

動物は、各群24例で吸入曝露を行なったラットについて、曝露終了時および終了後1, 3, 6か月目(各4, 13, 26週間目)に各6例を、また各群20例で吸入曝露したラットについて終了時2例、終了後12か月目(53週間目)に各群3例を大腿部動脈の切断により放血屠殺した。解剖後肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出、秤量し、気管、縦隔部リンパ節および鼻腔とともに10%緩衝ホルマリンで固定後、定法により標本作製しHE染色を行ない組織学的観察を行なった。肺は結紮した気管より固定液を10cm水柱の圧で注入し、再膨張させ固定した。

結 果

1. 一般症状 鉱さいを曝露したラットでは呼吸の際に鼻腔または咽喉より、ブツブツ、クブクブ、クウクウ、等の音を発するラットが認められた。この変化を示したラットは曝露終了時より終了後6か月目までは、曝露後終生飼育ラット18例中1~4例であり、6か月前後より12か月目までに半数以上のラットに認められたが、対照、関東ローム群には全く認められなかった。

2. 体重 Fig. 1に曝露後終生飼育ラットの12か月目(53週間目)までの体重増加曲線を示した。鉱さい曝露群では、増加が抑制され終了時対照および関東ローム群に比べ小さな値を示した。曝露終了後も各週の値は、飼

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

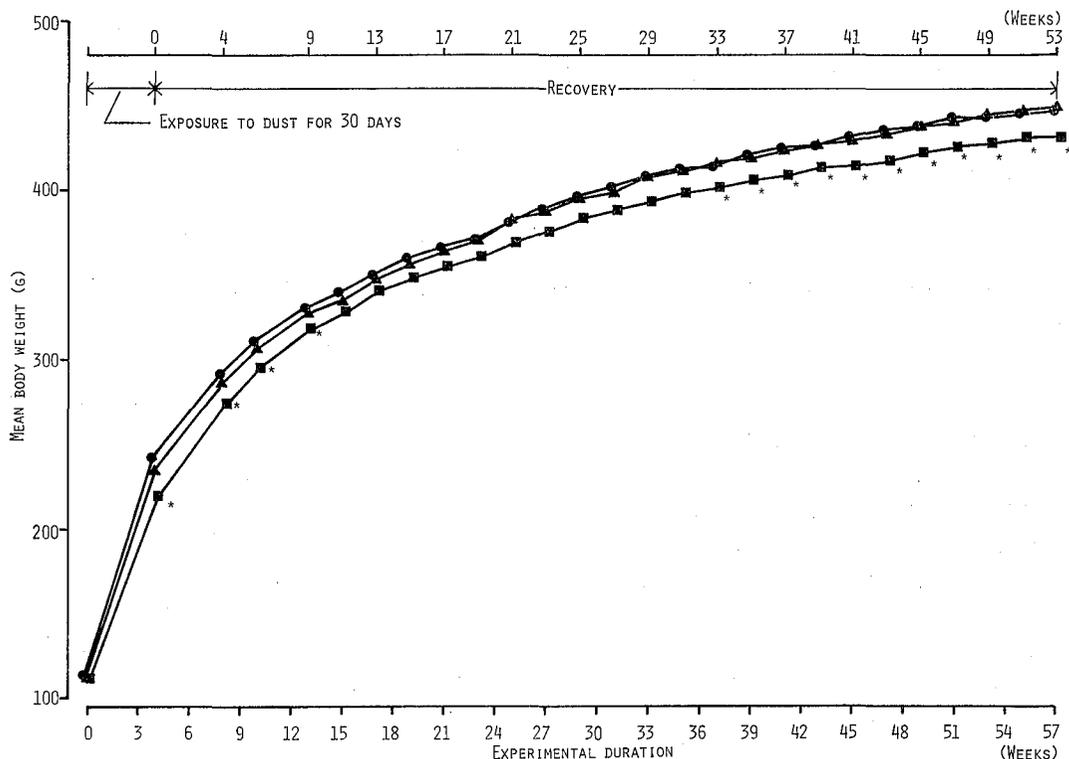


Fig. 1. Growth Curves of Rats in Duration of Exposure and Recovery

●—● Control, ▲—▲ JIS Dust No. 11 20 mg/m³, ■—■ Chromite ore residue dust 20 mg/m³.
Each points represent means \pm S. D. of 15 rats

育期間を通して他の群に比べ小さいが、増加曲線の変動推移は他の群と平行であり、終了後の増加の割合は他の群と同様であった。

3. 器官重量 曝露終了時および終了後1, 3, 6か月目の各群6例のラットの器官重量をTable 1にまとめて示した。肺重量の他には、特に意味のある変化を示した器官はなかった。肺重量は鉦さい、関東ローム群ともに曝露終了時より3か月目までは対照と比べ有意に大きかったが、6か月目では差はみられなかった。また肺絶対重量および体重比重量の回復期間における変動推移をFig. 2に示した。関東ローム群では、その変動推移は対照群とほぼ平行であり、重量の大きいなりに、体重の増加に伴い肺重量の増加する割合は徐々に減少するという性質を対照群同様示していたが、鉦さい曝露群では各期間での増加の割合の変動が大きく他の群とやや性質を異にしているようであった。

4. 組織学的観察 関東ロームおよび鉦さい曝露群ともに呼吸器系以外の器官組織には特に変化は認められず、以下肺の組織変化および、鉦さい曝露群でみられた

気管粘膜の変化についてのみ結果を示した。

関東ローム曝露群、曝露終了時、大量の粉じんを食食した大食細胞が肺胞内に散在してみられ、肺胞壁は軽～中等度の肺胞細胞の腫大がみられ、大食細胞の存在する肺胞やその周辺では特に顕著であった。肺胞内には大食細胞の他に大食細胞の崩壊残渣と思われる粉じん粒子を混在した微細顆粒状のエオジン淡染物質の存在がわずかではあるが認められた(Photo 1)。曝露終了後1か月目では、大食細胞は肺胞内またはその周辺に集合する傾向を示し、3か月以後肺胞内に小集簇を形成し遊離の状態のものは少なくなった(Photo 2)。集簇の大きさは、それらが存在する肺胞のひとつの大きさであるが、12か月目では集簇の存在する肺胞同士が融合したような大きいものもみられた(Photo 3)。肺胞壁の変化は1か月以後肺胞細胞の腫大は軽減し、大食細胞の集合している部位の肺胞壁を除いて対照と差がなかった。集簇の周囲では肺胞細胞の腫大や軽度な増殖がみられ、特に6か月以後より顕著であった。気管、肺内の各気管支には曝露終了時より変化はみられなかった。

Table 1. Organ Weight of Rats killed at the Termination of Exposure and 1, 3, 6 Months after Cessation of Exposure

| Examination | Group | Number of rats | Lung | Liver | Kidney | | Spleen | Body weight |
|------------------------|------------------------------|-------------------|--|-------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|
| | | | mg | g | right mg | left mg | mg | g |
| Exposure (30 days) | Control | 6 | 872±78 ^{a)} 395±25 ^{b)} | 8.74±0.42 3.97±0.11 | 748±27 339±8 | 770±30 349±11 | 450±10 204±6 | 220±8 |
| | JIS Dust No. 11 | 6 | 1133±53* 494±22* | 9.22±0.16* 4.03±0.09 | 785±28* 343±18 | 787±16 344±13 | 460±20 200±7 | 229±7 |
| | Chromite ore residue dust | 6 | 1234±106* 598±62* | 8.00±0.98 3.85±0.20 | 733±58 354±15 | 733±40 354±19 | 436±64 210±14 | 207±15 |
| Recovery (1 month) | Control | 6 | 1047±50 388±29 | 10.03±0.68 3.71±0.10 | 822±40 304±13 | 845±39 313±7 | 572±47 211±12 | 270±13 |
| | JIS Dust No. 11 | 6 | 1251±82* 459±46* | 10.22±0.65 3.77±0.12 | 846±19 313±12 | 857±20 317±17 | 557±33 206±14 | 270±10 |
| | Chromite ore residue dust | 6 | 1263±55* 492±14* | 9.61±0.61 3.74±0.09 | 807±49 314±9 | 847±48 330±8 | 525±36 204±7 | 256±13 |
| Recovery (3 months) | Control | 6 | 1198±51 351±11 | 11.94±0.58 3.50±0.05 | 964±33 283±6 | 989±21 290±8 | 611±52 179±10 | 340±13 |
| | JIS Dust No. 11 | 6 | 1330±106* 395±28* | 11.54±0.41 3.43±0.12 | 958±55 285±12 | 954±48 284±11 | 632±27 188±9 | 336±13 |
| | Chromite ore residue dust | 6 | 1420±129* 435±36* | 11.29±1.14 3.45±0.09 | 992±63 303±9 | 967±90 295±13 | 604±58 185±11 | 327±27 |
| Recovery (6 months) | Control | 6 | 1230±157 317±34 | 12.44±0.74 3.24±0.10 | 1057±100 275±17 | 1082±68 281±9 | 646±27 168±5 | 383±14 |
| | JIS Dust No. 11 | 6 | 1362±111 344±26 | 12.84±0.68 3.25±0.09 | 1029±77 260±10 | 1079±63 272±9 | 674±25 170±7 | 395±17 |
| | Chromite ore residue dust | 6 | 1229±122 326±27 | 11.64±0.87 3.09±0.09 | 1014±72 269±8 | 1017±55 270±10 | 631±37 167±6 | 376±19 |

a) : Absolute weight, b) : Relative weight (mg or g/100 g Body weight)

Statistical significance : * p<0.05 (vs Control), p<0.05 (vs JIS Dust No. 11)

鉍さい曝露群。曝露終了時粉じんを食した大食細胞が肺胞内に散在しているが、その数は関東ローム群に比べはるかに少なく、むしろ崩壊または腫大し崩壊過程にあるものが多かった。肺胞内や気道内には、主に大食細胞の崩壊残渣と思われる粉じんを混在したエオジン淡染物質の存在がみられ、関東ローム群に比べ広い部位の肺胞に多かった (Photo 4)。肺胞壁は関東ローム群に比べ軽度な肺胞細胞の腫大みられたが、崩壊残渣の存在する部位では、肺胞細胞の剥離した細胞成分の少ない肺胞壁も散見された (Photo 5)。曝露終了後1か月目では、大食細胞は、肺胞内に遊離または数個集合した状態で存在し、崩壊またはその過程にあるものはほとんど見られず、大きさは関東ローム群と変わらず、細胞境界の明瞭なものが存在していた。大食細胞の挙動は3か月以後関東ローム群と同様、肺胞内に集簇巣を形成して存在し、12か月目では形は大きくなり、数は減っていた。肺胞壁の変化は1か月目では、肺胞細胞の腫大した肺胞壁が散見されるが3か月以後、大食細胞の存在する部位を除いて対照と差がなかった。集簇巣周囲の肺胞壁の変化は関東

ローム群と比べ程度は弱かった (Photo 6, 7)。肺胞内の崩壊残渣の存在は曝露終了後1か月目以後ほとんど見られず、また肺胞細胞の剥離も同様であった。その他鉍さい曝露群では気管粘膜上皮が細胞高の増加により円柱上皮様に変化していた。この変化は曝露終了時より認められたが、その程度は3~6か月目で強く固有層では白血球の浸潤や気管腺の増生を示すものも多かったが、12か月目では、軽減していた。以上の変化は喉頭に近い部位で顕著であった (Photo 8)。また肺内の各気管支には曝露終了時より著変はみられなかった。

粉じん粒子の存在。両曝露群とも吸入された粉じん粒子は、大食細胞に食された状態で曝露終了後12か月を経過しても肺胞内に存在する他、肺内リンパ組織および縦隔リンパ節にも蓄積がみられた。これらの組織内でも食細胞に食された状態で存在し曝露終了時より回復期間に伴い増加していた。また量的には不溶性粉じんである関東ローム群で多かった。両群とも粉じんの存在以外、これらの部位での組織変化はみられなかった。

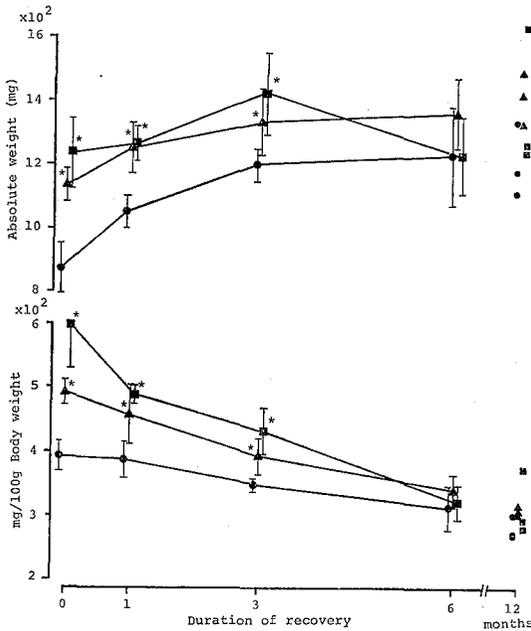


Fig. 2. Lung Weight Changes during Recovery (●) Control, (▲) JIS Dust No. 11 20 mg/m³ (■) Chromite ore residue dust 20 mg/m³ Each point represents the mean \pm S.D. of 6 rats except for rats at 12 months of recovery which are shown by each value of 3 rats

考 察

クロム鉱さい粉じん 20mg/m³, 30日間昼夜連続の吸入曝露によりラットに認められた変化は、体重の増加抑制、肺重量の増加、肺および気管の組織変化であった。いずれも既に行なった実験²⁻⁴⁾において観察されたものである。体重の増加抑制は、鉱さいによって呼吸器以外の諸器官には影響をおよぼさないことから鉱さい成分による主に肺の障害による影響と考えられ、曝露を中止することにより肺の回復に伴って同時に回復するものと思われる。肺重量は一般的に種々の物質の吸入によって増加するが、短期吸入実験では主に肺胞細胞の腫大、増生など肺実質の増加を反映したものである。肺胞壁の変化は、本実験でも曝露終了後12か月目でも粉じんを貪食した大食細胞の存在するかぎり認められたが、曝露終了後肺内より粉じんが徐々に排出されるのに伴い肺胞壁の変化も回復すると思われる。関東ローム群での回復期間における肺重量の変動推移はこのことをよく反映しているものと思われる。鉱さい曝露群では、肺組織変化は肺胞細胞の腫大に加え、肺胞内への崩壊残渣の蓄積、肺胞壁の損傷などがみられ、これらの回復経過が重量の変動推移にも反映し、関東ローム群のそれとは異なったものにし

ていると思われる。

曝露終了後肺内に残存する粉じん粒子は、鉱さい群では、回復期間において粉じんを貪食した大食細胞が腫大や崩壊を示さないことから、鉱さいの可溶性成分は急速に除去され、不溶性で直接的な作用のない粉じんが残存していると思われる。それらの粉じんの挙動は関東ローム粉体と同様であった。肺内には曝露終了後12か月を経ても大食細胞に貪食された状態の粉じんの存在がみられたが、一般に線毛上皮のある気道上での粉じんの排除は比較的早い時間内で行なわれるが、肺胞領域での排出は遅く、月単位の時間を要するとされ、またこの時期で大食細胞の線毛上皮への移動やリンパ系への取り込みがおくとされている⁵⁾。肺内に吸入された粉じんの挙動についてはHeppleston^{6,7)}の報告に詳しく、鉄鉱石、石炭、シリカの粉じんを用い曝露終了後の挙動について観察した結果、曝露後ラットの生存期間に伴い、粉じん粒子は呼吸細気管周囲の肺胞内に多く集簇していた。本実験で得られた結果でも、特に集簇巢の部位については述べなかったが、Hepplestonの観察結果と同様であると思われる。さらにシリカでは集簇巢の周囲に線維化が生じるのに対し、鉄鉱石、石炭では線維化はおきないとしている⁷⁾、長時間肺内に存在する粉じんが、その部位でどのような変化をひきおこすかという点については、粉じんの性質に大きくかかわっているが、現在継続中である曝露後終生飼育ラットによって観察を続ける予定である。

鉱さい曝露群では気管粘膜の変化が曝露の時より回復期間を通して認められた。この変化は関東ローム曝露群ではみられないことから粉じんの物理的作用ではなく、鉱さい成分による直接作用と思われるが、終了後3~6か月目にその程度が強くなる事については、呼吸器系の障害という点から興味ある結果と思われるが、今回はその理由については推測できなかった。

ま と め

クロム鉱さい粉じんを 20mg/m³ の濃度で1か月間吸入曝露したラットにおける、曝露中止後の鉱さいの影響の有無および経過について、肺の組織変化を中心とした観察を行なった。体重は吸入曝露により増加が抑制されたが、曝露終了後、回復期間を通して、その増加推移には対照と比べ差がなかった。肺重量は終了時より3か月目まで対照に比べ大きく、6か月目では差がなかった。肺の組織変化は大食細胞の崩壊、肺胞内の崩壊残渣の存在、肺胞壁成分の剥離の他、関東ローム群と共通した肺胞細胞の腫大が曝露終了時みられたが、いずれも曝露を中止することにより悪化することなく、軽減した。肺内に残存する粉じんは、回復期間の経過に伴い、大食細

胞に貪食された状態で肺胞内に集簇巣を形成した。この変化は関東ローム群のラットでも同様の経過を示した。鉍さい曝露群では気管粘膜上皮が円柱上皮様に変化し、固有層への白血球の浸潤、気管腺の増生を伴っていたが、曝露終了時より終了後3~6か月目で顕著であり、12か月目では軽減した。呼吸器系以外の諸器官には、曝露終了時より回復期間を通して、鉍さいの影響によると思われる変化はなかった。

(本報告の概要は毒作用研究会第7回昭和55年6月で発表した)

文 献

- 1) 坂本義光, 調 武久, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 135, 1977
- 2) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 142, 1977
- 3) 坂本義光, 神谷信行, 伊川三枝子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 67, 1978
- 4) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 33, 1980
- 5) 河合清之訳: 新毒性学の基礎と応用, 211, 1975, ソフトサイエンス社
- 6) Heppleston, A. G.: *Amer. J. Path.*, 42, 119, 1963
- 7) Heppleston, A. G.: *Arch. Environ. Health*, 7, 54, 1963

Explanation of plates

Photomicrographs were prepared from section stained with hematoxylin and eosin.

Photo 1-3. Lung from the rats exposed to JIS Dust No. 11 20mg/m³ for 1 month.

Photo 1. Lung at the termination of exposure. Macrophages filled with dust particles are observed in air spaces. Alveolar wall are

slightly thickened in alveoli have macrophages. (×100)

Photo 2. Lung at 3 months after the termination of exposure. Macrophages are collected in alveoli. (×100)

Photo 3. Lung at 12 months after the termination of exposure. Aggregates of dust-bearing macrophages, surrounded by thickened alveolar wall, are situated in relation to respiratory bronchiole. (×100).

Photo 4-7. Lung of the rats exposed to chromite ore residue dust 20 mg/m³ for 1 month.

Photo 4. Lung at the termination of exposure. Cell debris are observed in air spaces. (×100)

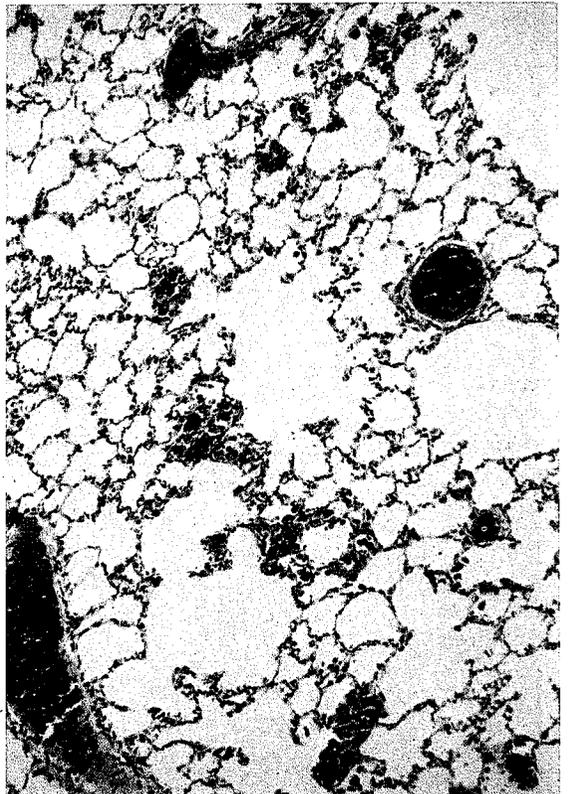
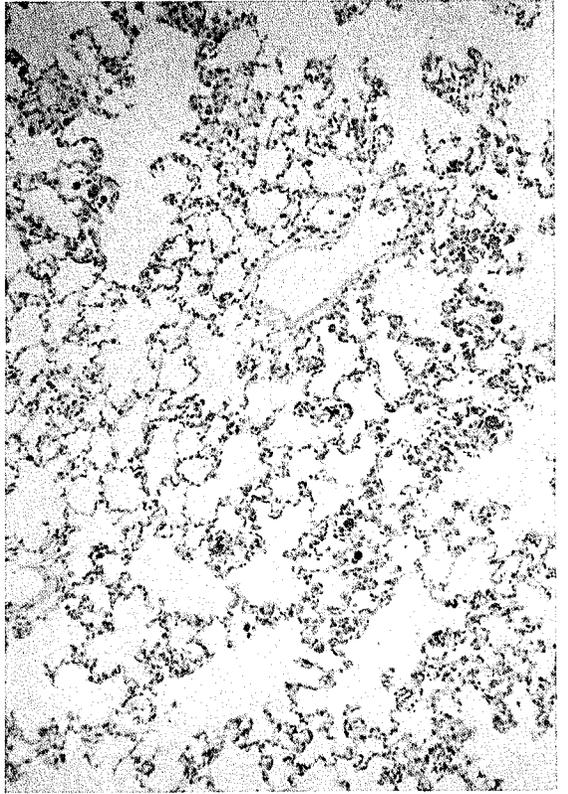
Photo 5. Higher magnification of photo 4. Debris in alveoli contain dust particles. Number of dust-bearing macrophages are less than lung of photo 1 and enlarged macrophage is observed in air space. Alveolar wall with less cellularity are observed in this region. (×200)

Photo 6. Lung at 3 months after the termination of exposure. Dust-bearing macrophages are collected in alveoli. (×100)

Photo 7. Lung at 12 months after the termination of exposure. Number of aggregates of macrophages are decreased, but in size are increased. (×100)

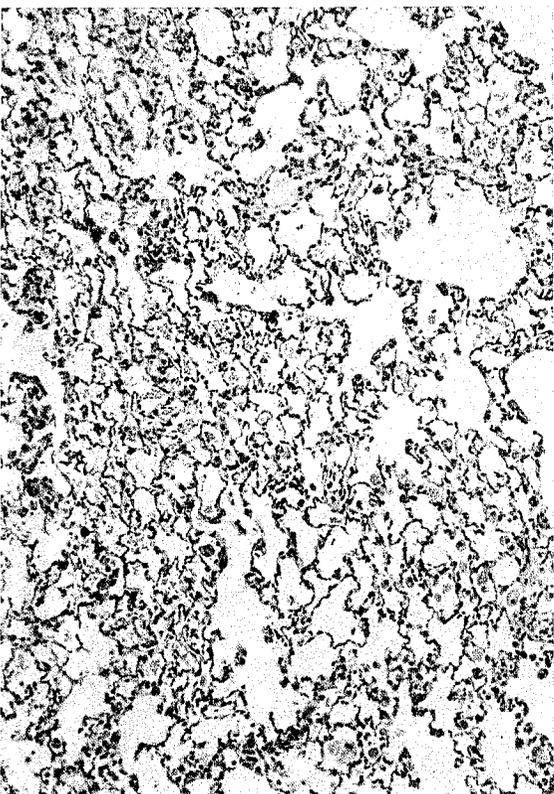
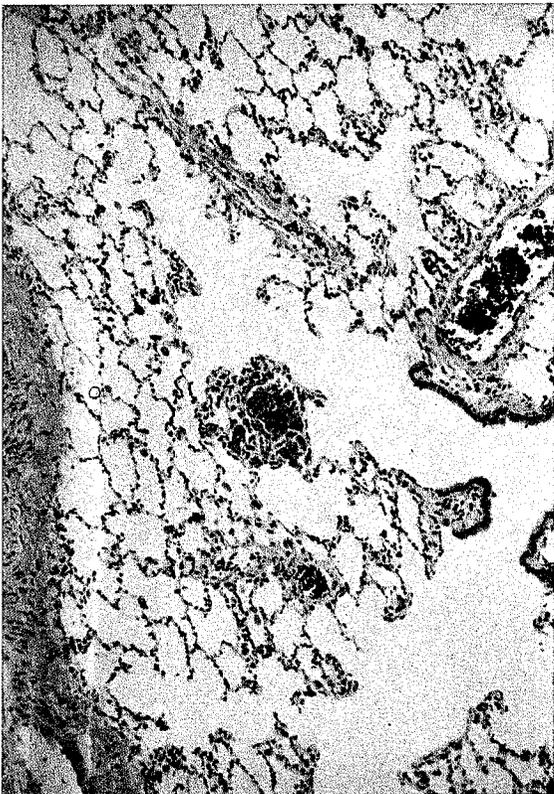
Photo 8. Trachea from rat killed at 6 months after the termination of exposure. Increase of cell height in epithelium are observed. (×400)

1



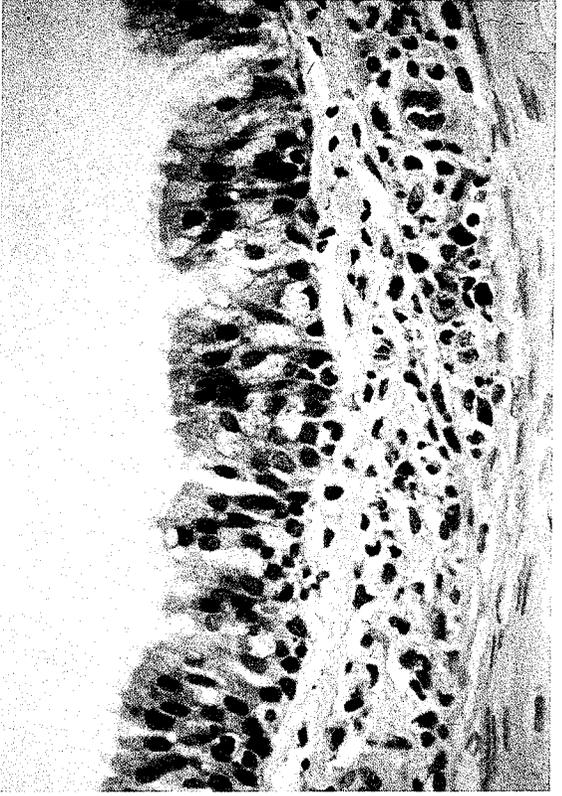
2

3

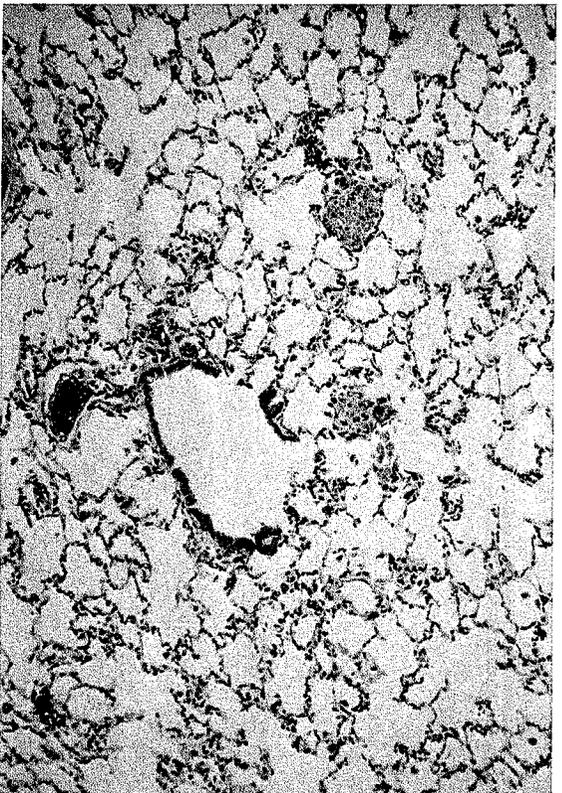


4

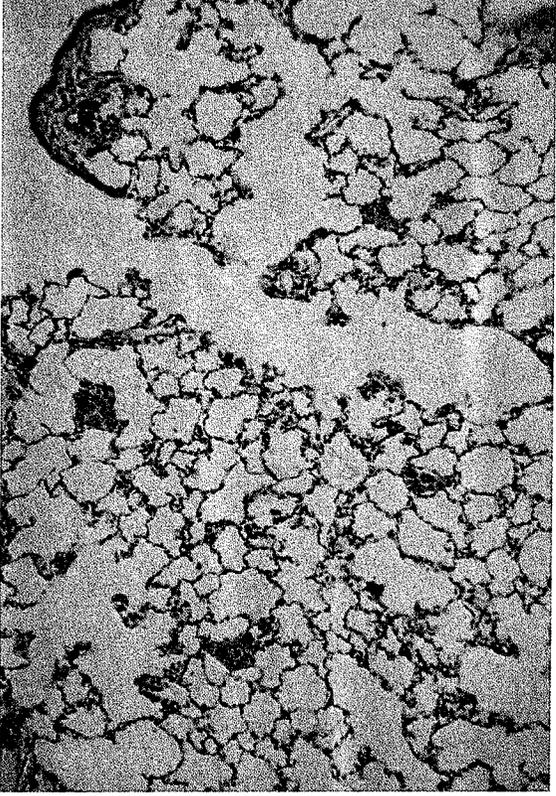
8



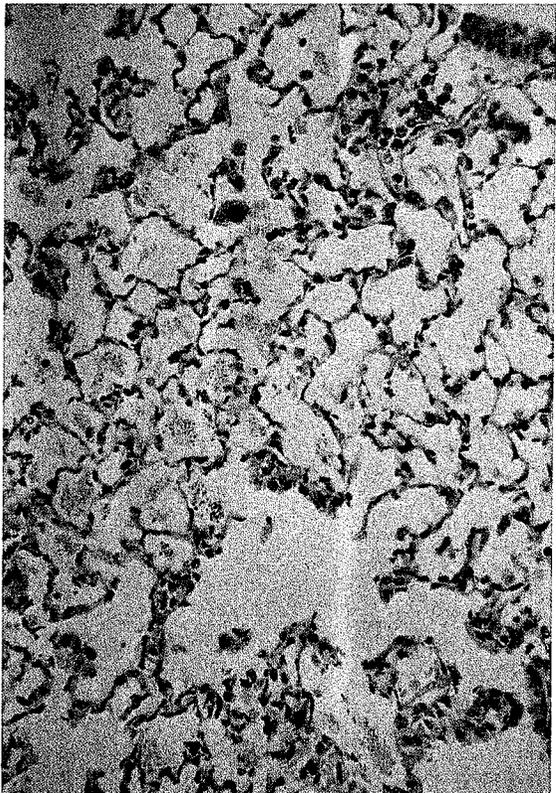
7



6



5



クロム鉱さい粉じんのラットによる3か月間持続吸入実験(第2報)クロムの体内分布

神谷 信行*, 坂本 義光*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 3 Months (II)

Distribution of Chromium in the Rat

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

Keywords: クロム鉱さい粉じん Chromite ore residue dust, ラット rat, 吸入毒性 Inhalation toxicity, 分布 distribution

緒 言

粉じんとして経気道により摂取されるクロム鉱さいの生体におよぼす影響を観察するために、当部では粉じん吸入実験装置¹⁾を製作し、ラットによる持続(昼夜連続)吸入実験を行っている。既に粉じん濃度 1.5mg/m³, 21mg/m³ で28日間の持続吸入実験を行い、その結果は前報²⁾で述べたように、臓器中のクロムは、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳の順で高く、血液では血餅に高く、血清は21mg/m³ 曝露群でわずかに高い値を示した。本報では、より長い曝露期間における変化を観察するため、3か月間にわたって持続吸入した際の、クロムの臓器、血液における分布と、クロム鉱さい中に含まれるカルシウム、アルミニウム、ニッケル、マンガン、亜鉛の肺での濃度について報告する。

吸入実験方法

動物 Slc-wistar系(SPF)ラットの雄を4週令で購入し、11日間予備飼育後、順調な発育を示したもので、体重110~135gのものを使用した。

粉じん クロム鉱さい粉じんは投棄地区より採取した鉱さい塊をボールミル(Alfrad Fritsch Co.)で約8時間粉さいして調整した。粉じんに含まれる主な重金属成分についてはTable 1に、粉じんの粒径分布はTable 2に示した。

動物実験 既報¹⁾の粉じん吸入実験装置により、吸入チャンバー内の粉じん濃度は、1.0mg/m³(低濃度曝露群)、10mg/m³(高濃度曝露群)に設定、コントロール群は供給空気のみとし、3か月(91日)間持続吸入を行った。環境条件は、温度25~26°、湿度50~60%、換気回数10~11回/時(110l/min)、照明時間6~18時に調整、飼料はCE-2(日本クレア)を、飲料水は水道水を自由に摂取させた。

Table 1. Composition of Chromite Ore Residue Dust

| | (%) |
|----|-----------|
| Ca | 21.2 |
| Fe | 6.1 |
| Cr | 2.8(1.2)* |
| Si | 2.4 |
| Al | 1.8 |
| Na | 0.4 |
| Ni | 0.3 |
| Mn | 0.08 |
| Ti | 0.04 |
| Zn | 0.03 |
| Sr | 0.005 |

(*)*: Water soluble Cr Atomic Absorption Spectrophotometry

Table 2. Particle Size Distribution in Inhalation Chamber

| Sampler Stage | Diameter μ | Weight percent | |
|---------------|----------------|----------------|---------|
| | | Cr-Low | Cr-High |
| 0 | >11.0 | 1.08 | 1.10 |
| 1 | 11.0-7.0 | 1.66 | 1.52 |
| 2 | 7.0-4.7 | 3.71 | 7.47 |
| 3 | 4.7-3.3 | 13.39 | 20.65 |
| 4 | 3.3-2.1 | 30.40 | 33.62 |
| 5 | 2.1-1.1 | 36.46 | 25.29 |
| 6 | 1.1-0.65 | 12.71 | 9.01 |
| 7 | 0.65-0.43 | 0.49 | 1.14 |
| 8* | 0.43> | 0.10 | 0.02 |

8*: Filter

* 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 3. Distribution of Chromium in the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 1.0 mg/m³ and 10 mg/m³ for 3 months

| | Control | 1.0 mg/m ³ (0.220 mg)* | 10 mg/m ³ (2.03 mg)* |
|--------|---------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Lung | 0.018±0.008 (0.019) | 22.5±4.1 (25.7) | 125.7±11.9 (216.1) |
| Liver | 3.4±1.0 (37.6) | 16.6±3.5 (167.5) | 90.6±18.1 (859.8) |
| Kidney | 13.2±2.4 (24.8) | 155.5±25.1 (280.1) | 1477±252 (2655) |
| Spleen | 11.8±1.8 (6.8) | 110.0±14.4 (67.1) | 1480±154 (862.8) |
| Brain | 3.0±2.8 (5.8) | 4.2±2.5 (8.1) | 9.3±5.2 (17.9) |
| Clot | 7.3±1.2 | 15.6±3.9 | 83.5±7.1 |
| Serum | 3.2±4.2 | 2.9±4.8 | 26.3±7.5 |

mean±SD unit: ng/g [lung µg/g] wet base
(): ng/whole tissue [lung µg/whole tissue]

(*)*: total inhalation value(Cr)

曝露期間終了後、動物の体重を測定し、大腿部動静脈を切開、採血し、屠殺後、肺、腎臓、肝臓、脾臓、脳の各臓器を摘出、秤量、血液は定法により血餅と血清に分離後、これらのクロムを原子吸光法で測定した。また肺については、カルシウム、アルミニウム、ニッケル、マンガン、亜鉛をプラズマジェット発光法で測定した。

定量方法

試薬 硝酸は有害金属測定用を、過酸化水素水は電子工業用を用いた。クロム、カルシウム、アルミニウム、ニッケル、マンガン、亜鉛の各標準液は原子吸光分析用標準溶液をその都度希釈して用いた。水は石英二段蒸留装置(藤原製作所)で再蒸留したものを用いた。

装置 原子吸光分光光度計は Nippon Jarrell-Ash・AA-8500 (フレームレスアトマイザー・FLA-100) を、プラズマジェット発光分光分析装置は SMI・SPECTR-ASPAN-III を使用した。

操作 摘出臓器および血餅は洗浄済のビーカー²⁾に入れ、ホットプレート上約100°で乾燥、放冷後、硝酸2mlを加えて一日放置した後、ホットプレート上で徐々に加熱、溶解させ、放冷後、過酸化水素水1mlを加え、突沸を防ぐためにゆっくり温度を上げて加熱を続けた。完全に溶解しなかった臓器は、硝酸1ml、過酸化水素水0.5mlを追加し、淡黄色透明の液となるまでこの操作をくりかえした。分解終了後、放冷し、再蒸留水で正確に10mlにメスアップして試験溶液とした。別に同様に操作した空試験溶液を調整した。血清は再蒸留水で正確に3倍に希釈して試験溶液とした。

測定条件(原子吸光法) 波長・357.9nm, ランプ電流・10mA, DRY・20A・15秒・STEP, ASH・70A・20秒・STEP, ATOMIZE・270A・7秒・FLASH, アルゴンガス流量・2l/min, バックグラウンド補正・チタ

Table 4. Metal Concentration in Lung of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 1.0 mg/m³ and 10 mg/m³ for 3 Months

| | Control | 1.0 mg/m ³ | 10 mg/m ³ |
|----|------------|-----------------------|----------------------|
| Al | 7.4±0.9 | 47.5±4.5 | 214.6±21.6 |
| Ca | 83.5±6.5 | 119.7±12.3 | 357.0±20.2 |
| Cr | 0.02±0.008 | 22.5±4.1 | 125.7±11.9 |
| Mn | ND | ND | 1.63±0.2 |
| Ni | 0.21±0.1 | 0.14±0.1 | 1.37±0.2 |
| Zn | 15.1±2.0 | 16.3±0.9 | 15.8±0.7 |

mean±SD unit: µg/g wet base

ン(364.3nm・20mA), 試料注入量・20µl

測定条件(プラズマジェット発光法)・波長・Ca-393.3nm Al-396.1nm Ni-341.4nm Mn-257.6nm Zn-213.8nm, プラズマ電流・14A, アルゴンガス流量・5l/min, 試料導入量・3ml/min

結果と考察

クロム量を臓器、血餅は湿重量あたり、血清は容量あたりの値で示し、()内には各臓器中の総クロム量をそれぞれ示した(Table 3)。鉍さい粉じん曝露群はコントロール群に比較しておおむね高い測定値がみられ、高濃度曝露群と低濃度曝露群との間にも、差が認められた。臓器では、肺、腎臓、脾臓に高く、次いで肝臓で、脳が最も低かった。肺は直接曝露を受けるため他の臓器に比べて非常に高い値で、高濃度曝露群で125.7µg/g、低濃度曝露群で22.5µg/gに達した。腎臓は1477ng/g、155.5ng/g、脾臓は1480ng/g、110.0ng/gで、肝臓はこれら臓器より比較的少なく90.6ng/g、16.6ng/gで、以上4つの臓器は血球濃度以上であった。脳および血清では、

高濃度曝露群でのみ高い値を示し、低濃度曝露群はコントロール群と差がなかった。

このように各臓器へのクロムの分布は、肺、腎臓、脾臓、肝臓の順で高い値を示したが、これはクロム(6価)の経気道投与実験の結果^{3,4)}やクロム 鉱さい水浸出液による経皮吸収実験の結果^{5,6)}と一致しており、また先に報告²⁾した1か月間持続吸入実験と同様の体内分布を示した。

各臓器について1か月間持続吸入実験の結果と比較すると、高濃度曝露群の脾臓を除いて3か月では、1か月のほぼ1.5倍~2倍になっているが、高濃度曝露群の脾臓では、5.4倍にもなり他の臓器とは異なる挙動を示した。これは脾臓における赤血球の破壊による血球成分の残留や、網内皮系の食作用による蓄積のためと考えられる。脳、血餅、血清は、低濃度曝露群では差が認められなかったが、高濃度曝露群では、ほぼ1.3倍になった。

また肺での総クロム量は、1か月、3か月ともに試算による総クロム吸入量の約10%で、期間による差はなかった。

肺における各金属について、クロムと同様に湿重量あたりの値で示した (Table 4)。コントロール群と比較して、カルシウム、アルミニウムは低濃度曝露群、高濃度曝露群とも高い値を示し、マンガン、ニッケルは高濃度曝露群でのみ高い値を示したが、亜鉛は変化が認められなかった。Table 1 にみられるように鉱さい中のカルシウム量は、21.2%でクロムの7.6倍、アルミニウムの12倍存在するにもかかわらず、各群の肺における濃度(コントロール群の値を差し引いた値)を比較すると、低濃度曝露群では、カルシウムはクロムの1.6倍、アルミニウムの0.9倍、高濃度曝露群ではクロムの2.2倍、アルミニウムの1.3倍にとどまった。またこれらの元素をコントロール群と低濃度曝露群、高濃度曝露群とを比較する

と、カルシウムは低濃度曝露群でコントロール群の1.4倍、高濃度曝露群はコントロール群の4.3倍、クロムはそれぞれ1125倍、6285倍、アルミニウムはそれぞれ6.4倍、29倍となり、これらの金属の肺における挙動が大きく異なることが示唆された。

まとめ

クロム 鉱さい粉じんを、1.0mg/m³、10mg/m³の濃度で吸入チャンバー内のラットに3か月間昼夜連続で曝露し、経気道進入によるクロム 鉱さい粉じんの生体におよぼす影響を調べる目的で、クロムの体内分布および粉じんに含まれる主な金属の肺における濃度について検討した。

臓器では肺、腎臓、脾臓に高く、次いで肝臓で、脳が最も低かった。

血液では血餅に高く、血清は高濃度曝露群でのみわずかに高い値を示した。これら臓器、血液の結果は1か月持続吸入実験²⁾と同様の体内分布を示した。

肺における金属では、カルシウム、アルミニウムが高く、マンガン、ニッケルは高濃度曝露群でのみ高い値を示し、亜鉛は差がなかった。

文 献

- 1) 坂本義光, 調 武久, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 135, 1977
- 2) 神谷信行, 坂本義光, 伊川三枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 64, 1978
- 3) Baetjer, A. M., Damron, C., and Budacz, V.: *A. M. A. Archives of Industrial Health*, 20, 54, 1959
- 4) 宮井 享: 四国医学雑誌, 36, 193, 1980
- 5) 福森信隆, 樺島順一郎, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 129, 1977
- 6) 長井二三子, 金西信次, 原しげ子, 樺島順一郎, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 56, 1976

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, コレラトキシン cholera toxin

緒 言

バナジウムはヒヨコ¹⁾ やラット²⁾ の必須微量元素であることから、ヒトにとっても重要な金属であると推測されている。*in vitro* において5価バナデート(V⁵⁺)は、生体内濃度に近い低濃度で種々組織のアデニレートシクラーゼ (AC) を賦活化する^{3,4)}一方、Na, K-ATPase⁵⁾および各種りん酸水解酵素を阻害^{6,7)}する。さらに赤血球膜の陽イオン輸送を細胞の内側から阻害することも報告され、V⁵⁺ は生体の調節に関与している可能性が示唆されている。私共は V⁵⁺ の AC 賦活化機構について報告^{4,8)}してきたが、今回は AC 活性調節の一因子である GTP 結合タンパクにおよぼす V⁵⁺ の影響について検討した。

実験方法

膜酵素標品の調製および AC 活性の測定は前報³⁾に従った。

コレラトキシン (CT) の前処理 AC 反応に先だち 0.67mg/ml CT に 133mM dithiothreitol (DTT) を加え、30℃ 40分間インキュベートしてCTを活性化して使用した。CT 存在下での AC 活性測定は、反応液に 5 mM NAD, 20mM DTT, 10⁻⁴M GTP および100μg/ml CT を添加して行った。

試薬 V⁵⁺には和光純薬 KK の NH₄VO₃を使用した。ATP はシグマ社の Grade I を使い、GTP, DTT はシグマ社、CT はシュバルツマンおよびシグマ社、NAD はオリエンタル酵母 KK のものを使用した。

実験結果および考察

CT は鳥類赤血球膜¹⁰⁻¹²⁾、リンパ球膜¹³⁾、脂肪細胞膜¹⁴⁾など種々の動物細胞 AC を賦活化する。CT によるラット脳細胞膜の AC を賦活化する条件を検討し、その結果を図1に示した。CT のみの添加では賦活化作用はほとんどみられなかった。十分な賦活化作用を示すには他の組織と同じく GTP および NAD の添加が必要で、ラット脳細胞膜 AC のCT による賦活化にもADP-ribosylation 反応が関与していることがわかった。また V⁵⁺ は

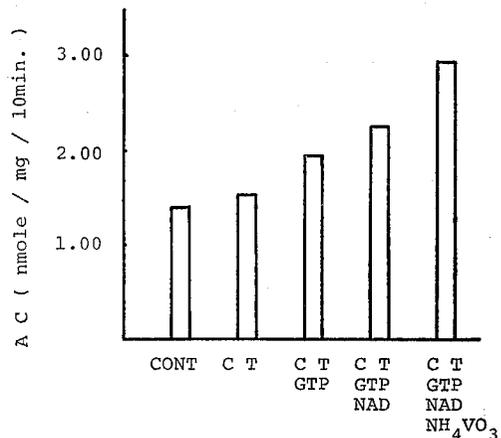


図1. ラット脳ACのCTによる賦活化

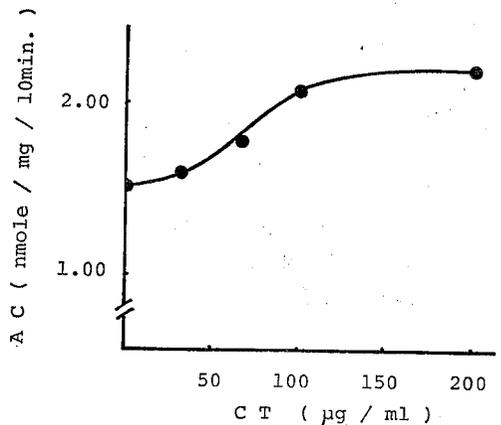


図2. ラット脳ACのCTによる賦活化曲線

CT に付加的に作用した。図2にCT による AC の賦活化曲線を示した。CT を添加した活性は、前処理した CT を酵素に加え30℃ 5分間インキュベートした後、ATP³²を加えて反応を開始して行った。鳥類赤血球膜 AC^{10,12)} やリンパ球膜 AC¹³⁾ に比べて作用は弱い³⁾、ラ

* 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

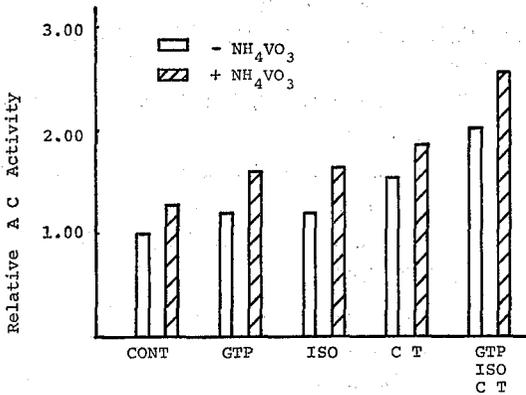


図 3. GTP 結合タンパクに關与するリガンド存在下での V⁵⁺ による AC の賦活化

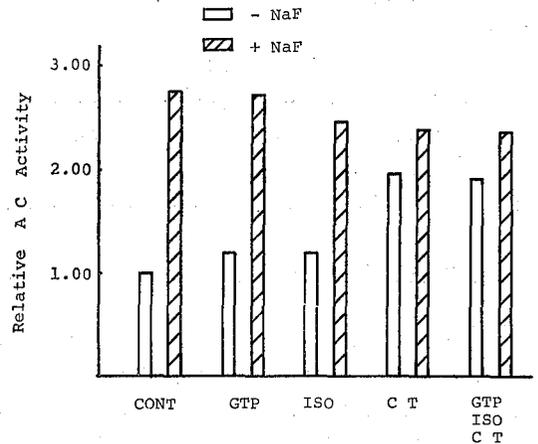


図 4. GTP 結合タンパクに關与するリガンド存在下での NaF による AC の賦活化

表 1. V⁵⁺ および NaF 依存性 AC のリガンドによる影響

| Activator | Ligand | | | | |
|---------------------------------|--------|-----|-----------|----|------------------|
| | - | GTP | イソプロテレノール | CT | GTP イソプロテレノール CT |
| NH ₄ VO ₃ | 100 | 122 | 137 | 70 | 100 |
| NaF | 100 | 73 | 61 | 13 | 14 |

ラット脳 AC でも CT による賦活化作用は認められた。この条件下では 100 μg/ml 以上の CT で十分な AC 賦活化作用がみられ、以下の実験では全て 100 μg/ml 濃度の CT を使用した。AC 活性の調節には種々の機構が推測されているが、AC に付随し細胞膜の内側に存在する GTP 結合タンパクも重要な因子の一つである。CT は GTP 結合タンパクに結合した GTP 水解酵素の阻害^{10,13)}、および GTP 結合タンパクへの ADP-ribosylation の促進^{12,15,16)}を通して AC を賦活化することが明らかにされている。V⁵⁺ による AC 賦活化反応が GTP 結合タンパクを介した反応かどうかを知るため、GTP 結合タンパクに關与する種々のリガンドと V⁵⁺ の関係を調べ図 3 に示した。V⁵⁺ 依存性 AC 活性はいずれのリガンドが存在しても変わらず、V⁵⁺ が存在しない時の活性の 119~137% が得られた。一方 NaF は細胞の内側から作用し、可溶性 AC でも賦活化作用を示すなど AC に対し V⁵⁺ とよく似た反応を示す既知の AC 賦活化剤である。NaF の GTP 結合タンパクにおよぼす影響を検討し図 4 に示した。NaF 依存性 AC 活性は種々リガンドの存在下で阻害され、NaF の作用は GTP 結合タンパクに關与していることが示唆された。NaF と V⁵⁺ の作用を比較するため、図 3 および図 4 よりリガンドを加えない時の V⁵⁺ 依存性 AC および NaF 依存性 AC 活性を 100 として、種々リガンド存在下での V⁵⁺ および NaF 依存性活性を相対値で表わし表 1 に示した。NaF 依存性 AC 活性は GTP、イソプロテレノール存在下で各々 73, 61% に、CT 存在下では 13~14% に低下し V⁵⁺ の作用とは異っていた。

AC 賦活化機構の一つに GTP 結合タンパクを介した系が考えられている。NaF は従来触媒部位に直接作用し AC を賦活化すると考えられていた。しかし、最近

Downs 等¹⁷⁾により NaF は GTPase 活性は阻害しないが、GTP 結合タンパクに作用して AC を賦活化することが報告され、本実験でも NaF は GTP 結合タンパクを介した系で AC を賦活化している可能性が示唆された。V⁵⁺ による AC 賦活化機構が GTP 結合タンパクを介する可能性については、V⁵⁺ の賦活化作用が GTP 結合タンパクに關与するいずれのリガンドが存在しても変わらないことから、GTP 結合タンパクを介さない機構であると推測される。しかし V⁵⁺ は Na, K-ATPase はじめ各種りん酸水解酵素の強力な阻害剤であることから、GTP 結合タンパクに特異的な GTPase を阻害して AC を賦活化している可能性も否定できない。これについては現在検討中である。

要 約

1. ラット脳の膜標品 AC は、ADP-ribosylation が行われる条件下で、CT により賦活化された。
2. NaF 依存性 AC 活性は GTP 結合タンパクに關与するリガンドの存在下で阻害され、NaF による AC 賦活化には GTP 結合タンパクが關与することが示唆された。
3. V⁵⁺ 依存性 AC 活性は GTP 結合タンパクに關与

するリガンドの存在下で影響を受けず、NaFとは異っていた。

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) 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 29-2, 151, 1978
- 4) Schwabe, U., Puchstein, C., Hannemann, H., and Söchtig, E. : *Nature*, 277, 143, 1979
- 5) Cantley, L. C., Jr., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., and Guidotti, G. : *J. Biol. Chem.*, 252, 7421, 1977
- 6) Lopes, V., Stevens, T., and Lindquist, R. N. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 31, 1976
- 7) Van Etten, R. L., Waymach, P. P., and Rehkop, D. M. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 6782, 1974
- 8) Cantley, L. C., Jr., Resh, M., and Guidotti, G. : *Nature*, 272, 552, 1978
- 9) 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 30-2, 136, 1979
- 10) Selinger, Z., and Cassel, D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3307, 1977
- 11) Lad, P. M., Nielson, T. B., and Rodbell, M. : *J. Biol. Chem.*, 255, 988, 1980
- 12) Enomoto, K., and Gill, D. M. : *J. Biol. Chem.*, 255, 1252, 1980
- 13) Johnson, G. L., and Bourne, H. R. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 792, 1977
- 14) Cooper, D. M. F., Schlegel, W., Lin, M. C. and Rodbell, M. : *J. Biol. Chem.*, 254, 8927, 1979
- 15) Vaughan, M., and Moss, J. : *J. Biol. Chem.*, 252, 2455, 1977
- 16) Gill, D. M., and Meren, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3050, 1978
- 17) Downs, R. W., Jr., Spiegel, A. M., Singer, M., Reen, S., and Aurbach, G. D. : *J. Biol. Chem.*, 255, 949, 1980

ラット尿中蛋白質 (第4報) カドミウム投与ラットの尿中遊離アミノ酸の分析

樺島 順一郎*, 中尾 順子*

Protein in Rat Urine (IV) Analysis of Free Amino Acid in the Urine of Rat Treated Subcutaneously with Cadmium Chloride

JUNICHIRO KABASHIMA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: 塩化カドミウム CdCl_2 , アミノ酸 Amino Acid, ラット尿 Rat Urine

我々は、これまでにラットにカドミウムやクロムなどの重金属を投与し、尿中の蛋白質、酵素活性の変動と腎障害との関連について検討してきた¹⁻³⁾。一方、人の慢性カドミウム中毒とアミノ酸についての報告も多く⁴⁻⁷⁾、尿中アミノ酸個々についての報告もされている⁸⁻⁹⁾。今回、ラットに約2カ月間カドミウム (塩化カドミウム, CdCl_2 水溶液) を連続投与し、その尿中遊離アミノ酸排泄におよぼす影響についての検討を試み、ここに途中経過であるが投与開始後34日までの経過につき報告する。

実験材料および方法

実験材料および方法は、前報に従って採集した尿を、 -50° に凍結保存したものを分析時に解凍し、尿 0.5ml に2規定の水酸化リチウムを 50 μl 加え、pH12~13位にして約5~10分放置してアンモニアを除いた後、0.2規定塩酸を 1.5ml 加え、pH2以下にしたものをアミノ酸分析用試料とした。分析機は、日立高速アミノ酸分析計 835-50型を用い、各々のアミノ酸量を測定した。分析操作は、その生体液分析法 (835型高速アミノ酸分析計取扱説明書) によった。また使用動物数は、カドミウム投与群、対照群ともに5匹で、統計処理を行った。

結果および考察

Table 1 にカドミウム投与ラットならびに対照ラットの1日当りの尿中遊離アミノ酸排泄量の分析結果を示した。正常人では、尿中に排泄された総アミノ酸量に対して、最も大きな割合を示すのは、Gly, Tau であるが、ラットは、カドミウム投与群、対照群ともに Gly, Tau の割合が大であった。しかし、17日目では、投与群の排泄量は、対照群に対してやや減少した。またイタイタイ病患者の尿では、Gly は正常人と差がないが、Tau は減少することが知られている¹⁰⁾。一方、カドミウム投与群と対照群のアミノ酸を比較すると、Gly, α -AAA, Met, β -AIBA, Lys, 1-MeHis, His, 3-MeHis, Hypro,

Pro は投与開始後26日目から増加の傾向が認められる。しかしながら Gly, Lys, 1-MeHis, 3-MeHis では、26日目からすでに有意な増加が認められたが、 α -AAA, Hypro では、ややおくれて31日目から有意な増加が認められた。 α -ABA では対照群では検出限界以下であったが、カドミウム投与群では明らかに排出が認められた。Met, β -AIBA では、増加傾向に有意差が認められなかった。人間の場合、His, Cysthio, 3-MeHis, β -AIBA などは、正常人で血中アミノ酸濃度が上昇するだけで尿中への排泄が増大し腎の再吸収がほとんど行われ¹¹⁾。これらのアミノ酸は、イタイタイ病患者の場合でも尿中への排泄が増加しないことが知られている⁹⁾。しかし今回の、ラットへのカドミウム投与実験では、Cysthio の増加は認められなかったが、他の His, 3-MeHis, β -AIBA などの尿中への排泄は増大した。このことは、カドミウム投与群のラットの腎での病変は、人のイタイタイ病における慢性的な病変とは異なるが、腎機能上の障害の詳細については、今後の研究にまたねばならない。これらについては、今後未分析の35日目以後の尿の分析や、投与方法の変更などによって明らかにしたい。腎でのアミノ酸の再吸収に関しては、5つの輸送系があるとされている¹²⁻¹⁴⁾。カドミウム投与ラットの尿中排泄アミノ酸の増加は、一つのアミノ酸輸送系のアミノ酸の排泄の増加ではなく、全輸送系の一部のアミノ酸の排泄の増加である。これらのことから、排泄アミノ酸の増加の理由としては、5つの輸送系が全体的に、軽い病変を起こしている可能性が考えられる。また前報で報告したように、メタロチオネインの量は11日目と31日目ではほとんど同じであるが、31日目にはカドミウムの排泄量は、約10倍位に増加している。アミノ酸分析の結果では、12, 17, 21日目に Ala の量が減少し、21, 34日目に β -Ala の量が有意に低下していた。これらのアミノ酸以外では

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Free Amino Acids Contents in the Urine of Male Rats

| | | 5 days | | 12 days | | 17 days | |
|--------------------|-------------------|----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|
| P-Ser | Control | 118.4±41.73 | (5) | 210.7±32.73 | (5) | 146.2±63.51 | (5) |
| | CdCl ₂ | 104.6±50.80 | (5) | 174.7±16.97 | (5) | 122.4±26.88*** | (5) |
| Tau | Control | 2324.4±1837.56 | (5) | 6474.3±1627.60 | (5) | 9853.6±3487.91 | (5) |
| | CdCl ₂ | 2611.5±1757.28 | (5) | 5366.7±1435.6 | (5) | 4599.1±1788.87* | (5) |
| Asp | Control | 82.6±75.25 | (4) | 51.9±22.3 | (5) | 19.7±12.07 | (4) |
| | CdCl ₂ | 39.4±33.01 | (5) | 31.2±17.09 | (5) | 4.3±4.50 | (3) |
| Thr | Control | 10.0±4.44 | (5) | 2.3±5.19 | (1) | 29.4±15.72 | (5) |
| | CdCl ₂ | 21.3±36.70 | (4) | 2.8±4.00 | (2) | 1.6±3.49* | (1) |
| Ser | Control | 1.0±2.32 | (1) | 38.0±31.16 | (5) | 7.6±10.46 | (2) |
| | CdCl ₂ | 16.5±29.79 | (2) | 6.3±4.37 | (4) | 2.0±4.38 | (1) |
| Glu | Control | 192.5±45.78 | (5) | 130.5±33.33 | (5) | 153.4±86.91 | (5) |
| | CdCl ₂ | 135.1±44.83 | (5) | 83.6±52.90 | (4) | 171.7±141.69 | (5) |
| α-AAA | Control | 2.1±4.74 | (1) | 12.3±7.50 | (4) | 9.4±11.50 | (3) |
| | CdCl ₂ | 1.9±4.23 | (1) | 7.1±11.60 | (2) | 3.3±7.42 | (1) |
| Gly | Control | 6429.1±2141.3 | (5) | 7774.3±2004.44 | (5) | 8462.8±4759.17 | (5) |
| | CdCl ₂ | 5015.3±1276.7 | (5) | 5218.5±1060.10* | (5) | 5155.1±639.15 | (5) |
| Ala | Control | 748.4±404.73 | (5) | 504.3±149.71 | (5) | 527.6±239.58 | (5) |
| | CdCl ₂ | 395.4±211.47 | (5) | 254.6±58.52** | (5) | 196.2±59.86* | (5) |
| Cit | Control | ND | | 40.6±21.10 | (5) | 34.4±27.65 | (4) |
| | CdCl ₂ | 20.5±23.67 | (5) | 28.1±11.69 | (5) | 19.9±16.08 | (4) |
| α-ABA | Control | ND | | ND | | ND | |
| | CdCl ₂ | 1.2±2.63 | (1) | ND | | ND | |
| Val | Control | 10.4±6.83 | (4) | 40.5±20.33 | (5) | 24.5±25.22 | (3) |
| | CdCl ₂ | 5.2±11.54 | (1) | 46.3±25.25 | (5) | 6.6±14.76 | (1) |
| Met | Control | 4.5±5.25 | (3) | 17.8±10.99 | (5) | 17.7±10.52 | (4) |
| | CdCl ₂ | 10.7±8.79 | (3) | 7.7±3.29 | (3) | 10.7±5.03 | (5) |
| Cystthio | Control | 12.2±4.31 | (5) | 25.3±8.05 | (5) | 23.7±8.82 | (5) |
| | CdCl ₂ | 15.4±6.50 | (5) | 16.7±8.87 | (5) | 8.4±8.86* | (3) |
| Ileu | Control | 18.8±12.54 | (4) | 26.1±15.05 | (4) | 30.4±8.87 | (5) |
| | CdCl ₂ | 22.8±3.93 | (5) | 25.6±6.28 | (5) | 19.6±12.57 | (4) |
| Leu | Control | 9.6±5.92 | (5) | 8.1±7.81 | (3) | 7.8±7.56 | (3) |
| | CdCl ₂ | 5.3±6.11 | (3) | 9.7±1.30 | (5) | 8.9±5.36 | (4) |
| Tyr | Control | 38.3±23.0 | (5) | 48.2±68.81 | (2) | 80.2±33.50 | (5) |
| | CdCl ₂ | 42.7±32.3 | (5) | 54.5±33.63 | (4) | 45.6±35.81 | (4) |
| Phe | Control | 42.9±10.93 | (5) | 46.5±28.56 | (5) | 75.3±14.23 | (5) |
| | CdCl ₂ | 88.6±12.91 | (5) | 70.4±18.89 | (5) | 70.0±7.61 | (5) |
| β-Ala | Control | 223.6±85.06 | (5) | 240.2±72.78 | (5) | 348.4±151.20 | (5) |
| | CdCl ₂ | 196.5±68.26 | (5) | 131.2±67.63* | (5) | 191.0±98.81 | (5) |
| β-AIBA | Control | 50.3±383.76 | (5) | 58.7±25.01 | (5) | 79.0±30.33 | (5) |
| | CdCl ₂ | 46.5±26.44 | (5) | 27.4±25.21 | (3) | 53.2±20.29 | (5) |
| γ-ABA | Control | 43.8±11.88 | (5) | 41.3±8.48 | (5) | 45.2±18.14 | (5) |
| | CdCl ₂ | 45.5±25.92 | (5) | 33.0±8.75 | (5) | 34.8±19.61 | (5) |
| Orn | Control | 17.4±3.59 | (5) | 19.6±5.82 | (5) | 27.7±11.48 | (5) |
| | CdCl ₂ | 17.3±11.69 | (5) | 12.9±4.52 | (5) | 13.8±4.77* | (5) |
| Lys | Control | 12.9±3.58 | (5) | 20.2±5.92 | (5) | 20.0±8.61 | (5) |
| | CdCl ₂ | 19.1±20.77 | (5) | 26.5±9.02 | (5) | 10.6±7.31 | (5) |
| 1-MeHis | Control | 16.2±5.95 | (5) | 10.8±12.10 | (3) | 17.1±13.23 | (4) |
| | CdCl ₂ | 6.2±9.27* | (2) | 6.9±6.74 | (3) | 14.8±11.45 | (4) |
| His | Control | 13.7±4.71 | (5) | 24.5±8.06 | (5) | 23.6±9.76 | (5) |
| | CdCl ₂ | 13.8±8.95 | (5) | 19.3±6.86 | (5) | 22.0±7.08 | (5) |
| 3-MeHis | Control | 52.9±16.80 | (5) | 57.0±16.04 | (5) | 50.4±25.27 | (5) |
| | CdCl ₂ | 38.1±29.24 | (5) | 37.1±15.10 | (5) | 51.7±25.78 | (5) |
| Arg | Control | 6.1±4.61 | (4) | 42.5±15.86 | (5) | 34.3±18.75 | (5) |
| | CdCl ₂ | 19.3±16.89 | (5) | 26.6±12.40 | (5) | 25.2±12.19 | (5) |
| Hypro | Control | 216.9±84.10 | (5) | 190.6±85.11 | (5) | 187.2±132.46 | (4) |
| | CdCl ₂ | 73.0±47.38* | (4) | 105.4±38.33 | (5) | 91.7±18.05 | (5) |
| AspNH ₂ | Control | 28.7±20.91 | (4) | 81.4±40.68 | (5) | 59.4±8.44 | (5) |
| | CdCl ₂ | ND | | 51.7±13.82 | (5) | 37.4±35.19 | (3) |
| Pro | Control | 42.0±12.66 | (5) | 77.9±22.98 | (5) | 41.6±24.66 | (4) |
| | CdCl ₂ | 22.3±22.97 | (3) | 48.9±24.30 | (5) | 44.1±9.67 | (5) |

Each value is expressed as n moles of amino acid/day/rat(mean±SD for 5 rats).

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001; Significantly different from control

Saline (control) and CdCl₂ (1.5mg/Kg. B. W.) was injected once a day

Treated Subcutaneously with Cadmium Chloride

| 21 days | | 26 days | | 31 days | | 34 days | |
|--------------------|--|--------------------|--|--------------------|--|---------------------|--|
| 338.7±82.42 (5) | | 257.3±76.00 (5) | | 269.7±117.43 (5) | | 190.8±79.53 (5) | |
| 244.7±53.48 (5) | | 153.0±33.32* (5) | | 252.4±63.68 (5) | | 236.9±62.43 (5) | |
| 9754.1±1750.20 (5) | | 8452.8±2213.03 (5) | | 8460.7±2140.55 (5) | | 10738.5±2894.32 (5) | |
| 6764.2±3741.09 (5) | | 5907.7±1429.07 (5) | | 6260.3±2600.29 (5) | | 9500.3±4383.21 (5) | |
| 14.60±13.47 (3) | | 44.4±30.75 (5) | | 2.1±4.70 (1) | | 96.2±11.22 (5) | |
| 15.4±9.87 (4) | | 45.5±27.00 (4) | | 15.9±22.70 (3) | | 24.6±22.19*** (3) | |
| 13.1±3.88 (5) | | 8.1±7.92 (3) | | 16.7±18.22 (3) | | 16.1±15.70 (3) | |
| ND | | 8.1±8.30 (3) | | 111.6±98.00 (5) | | ND | |
| 275.0±87.61 (5) | | 2.9±6.49 (1) | | 9.4±9.11 (3) | | 11.5±10.73 (3) | |
| 18.6±25.23 (4) | | 4.4±6.13 (2) | | 46.0±23.16* (4) | | 3.7±5.47 (2) | |
| 181.1±130.87 (5) | | 249.4±122.23 (5) | | 202.5±138.48 (5) | | 335.2±52.29 (5) | |
| 174.1±61.89 (5) | | 346.2±180.71** (5) | | 439.8±154.74* (5) | | 239.2±216.19* (5) | |
| 14.9±11.90 (4) | | ND | | 24.0±5.28 (1) | | ND | |
| 28.0±36.43 (3) | | 11.6±11.88 (3) | | 51.6±33.36*** (5) | | 100.1±65.45 (5) | |
| 4148.9±2216.83 (5) | | 7226.1±2322.63 (5) | | 5112.7±2448.50 (5) | | 9017.4±1105.29 (5) | |
| 4198.8±2134.70 (5) | | 4609.4±1657.11 (5) | | 3834.8±1495.31 (5) | | 7551.2±1544.99 (5) | |
| 1157.0±267.80 (5) | | 1295.8±317.72 (5) | | 1276.2±904.23 (5) | | 874.8±264.95 (5) | |
| 639.4±157.12* (5) | | 820.9±371.05 (5) | | 1282.0±656.61 (5) | | 1064.4±437.89* (5) | |
| 13.3±7.97 (4) | | ND | | ND | | ND | |
| 28.5±24.37 (5) | | ND | | 46.4±63.67 (2) | | ND | |
| ND | | ND | | ND | | ND | |
| 5.0±6.85 (2) | | ND | | 4.2±5.89 (2) | | 2.5±5.59 (1) | |
| 39.2±37.87 (3) | | ND | | ND | | 55.7±52.04 (3) | |
| 45.8±26.82 (5) | | 13.1±29.34 (1) | | 15.1±33.85 (1) | | 9.3±20.71 (1) | |
| 7.1±9.77 (2) | | 12.4±53.68 (4) | | ND | | 12.7±11.65 (3) | |
| 8.9±12.57 (3) | | 23.1±6.89* (5) | | 20.2±18.93 (3) | | 28.3±17.36 (4) | |
| 19.9±12.98 (4) | | 29.0±7.35 (5) | | 29.1±14.14 (5) | | 36.6±11.68 (5) | |
| 18.5±6.12 (5) | | 19.1±7.73 (5) | | 27.6±8.91 (5) | | 44.1±14.23 (5) | |
| 37.4±16.66 (5) | | 35.7±10.64 (5) | | 21.7±13.23 (5) | | 29.6±7.28 (5) | |
| 28.6±6.05 (5) | | 24.5±5.42 (5) | | 20.4±7.10 (5) | | 32.8±9.05 (5) | |
| 2.0±4.56 (1) | | 3.7±5.03 (2) | | 18.2±28.92 (3) | | 8.2±9.36 (3) | |
| 9.2±10.12 (3) | | 7.0±6.86 (3) | | 17.5±5.98 (5) | | 25.9±9.00* (5) | |
| 8.4±18.69 (1) | | 17.0±23.40 (2) | | 1.0±2.15 (1) | | 35.2±34.21 (3) | |
| 27.7±45.70 (2) | | 17.7±11.02 (3) | | 33.4±13.53*** (5) | | 8.5±11.83 (3) | |
| 61.4±16.58 (5) | | 53.5±31.20 (4) | | 108.3±35.46 (5) | | 94.6±27.73 (5) | |
| 70.8±24.94 (5) | | 65.5±15.23 (5) | | 104.4±31.96 (5) | | 121.8±77.70 (4) | |
| 330.7±53.19 (5) | | 225.7±70.04 (5) | | 195.9±75.6 (5) | | 235.2±63.70 (5) | |
| 233.9±76.42* (5) | | 176.3±78.67 (5) | | 180.4±80.81 (5) | | 256.2±68.20 (5) | |
| 35.3±21.26 (4) | | 49.2±12.44 (5) | | 28.8±27.79 (3) | | 21.5±21.65 (3) | |
| 37.5±20.79 (5) | | 82.7±29.09 (5) | | 79.0±18.31 (5) | | 193.0±40.19*** (5) | |
| 37.3±9.81 (5) | | 35.0±10.55 (5) | | 26.6±12.89 (5) | | 43.3±8.00 (5) | |
| 41.4±23.97 (5) | | 33.5±6.01 (5) | | 26.3±13.54 (5) | | 53.1±22.30 (5) | |
| 12.1±10.87 (4) | | 16.1±8.20 (5) | | 2.6±5.77 (1) | | 27.5±10.10 (5) | |
| 16.4±14.97 (4) | | 8.8±9.19 (3) | | 2.8±6.26 (1) | | 19.2±12.02 (4) | |
| 41.4±26.94 (4) | | 12.2±8.14 (4) | | 19.5±21.89 (5) | | 21.9±9.35 (5) | |
| 24.3±20.63 (5) | | 34.0±11.88*** (5) | | 57.5±20.10* (5) | | 123.2±67.24* (5) | |
| 10.2±16.12 (2) | | 12.6±12.12 (3) | | 9.8±13.84 (2) | | 37.1±11.96 (5) | |
| 5.1±6.93 (2) | | 34.1±9.71* (5) | | 60.2±24.70*** (5) | | 167.8±54.24*** (5) | |
| 18.1±10.55 (5) | | 8.3±7.81 (3) | | 9.6±9.34 (3) | | 20.1±2.90 (5) | |
| 19.0±9.07 (5) | | 21.5±16.35 (4) | | 68.2±56.03 (5) | | 273.9±266.96 (5) | |
| 28.5±7.55 (5) | | 21.3±13.16 (4) | | 12.7±7.86 (4) | | 49.3±17.19 (5) | |
| 29.2±22.57 (5) | | 60.8±23.61* (5) | | 72.3±17.42*** (5) | | 203.5±34.74*** (5) | |
| 12.4±14.64 (4) | | 14.8±15.90 (3) | | 27.8±19.18 (4) | | 52.5±35.57 (5) | |
| 20.0±17.86 (4) | | 18.0±4.60 (5) | | 47.0±36.50 (5) | | 27.0±30.13 (3) | |
| 249.6±107.55 (5) | | 165.7±78.80 (5) | | 140.0±112.93 (4) | | 122.9±83.15 (4) | |
| 165.1±45.29 (5) | | 181.3±56.84 (5) | | 159.6±38.79 (5) | | 345.6±130.21* (5) | |
| 30.2±38.43 (4) | | 62.3±57.89 (3) | | 91.5±52.11 (4) | | 134.6±26.28 (5) | |
| 67.7±46.85 (4) | | 86.0±29.44 (5) | | 130.2±53.34 (5) | | 132.0±123.85 (3) | |
| 104.7±19.03 (5) | | ND | | 47.1±48.65 (3) | | ND | |
| 80.0±17.43 (5) | | 60.3±35.57 (4) | | 67.3±46.06 (4) | | 79.1±89.72 (3) | |

ND : No detected in all of 5 rats

Figures in parenthesis indicate no. of rats detected

P-Ser が17, 26日目, Tau, Orn が17日目に有意に低下を示し, α -AAA が31日目, Leu が34日目に有意に増加を示していた。以上, 投与開始後34日目までの途中断続的な分析の結果からは, 結論を出せるまでのデータは得られなかった。

注) 最後にアミノ酸分析に際して, 分離が非常に悪い Cys, Hylys など, 対照群, 投与群ともに検出限界以下のものが多いアミノ酸は除外して検討した。検討の対象としたアミノ酸は以下に記載するとおりである。P-Ser (Phosphoserine), Tau (Taurine), Asp (Aspartic acid), Thr (Threonine), Ser (Serine), Glu (Glutamic acid), α -AAA (α -Amino-adipic acid), Gly (Glycine), Ala (Alanine), Cit (Citrulline), α -ABA (α -Amino butylic acid), Val (Valine), Met (Methionine), Cysthio (Cystathionine), Ileu (Iso leucine), Leu (Leucine), Tyr (Tyrosine), Phe (Phenylalanine), β -Ala (β -Alanine), β -AIBA (β -Amino-iso-butylic acid) γ -ABA (γ -Amino-n-butylic acid), Orn (Ornithine), Lys (Lysine), 1-MeHis (1-Methylhistidine), His (Histidine), 3-MeHis (3-Methylhistidine), Arg (Arginine), Hypro (Hydroxyproline), AspNH₂ (Asparagine), Pro (Proline)

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) 中尾順子, 道源正子, 樺島順一郎, 藤井秀美: 東京衛研年報, 30-2, 129, 1979
- 4) Clarkson, T. W., and Kench, J. E.: *Biochem. J.*, 62, 361, 1956
- 5) Kazantzis, G., Flynn, F. V., Spowage, J. S., and Trott, D. G.: *Quart. J. med.*, 32, 165, 1963
- 6) 豊島滋, 星野忠夫, 土屋健三郎: 環境庁調査委託事業報告書, 65, 日本公衆衛生協会, 1973
- 7) 星野忠夫, 土屋健三郎: 環境公害防止等調査研究委託費による報告書, 163, 日本公衆衛生協会, 1973
- 8) 福島匡昭, 坂元倫子, 小林悦子: 日衛誌, 29, 498, 1974
- 9) 能川浩二, 本多隆文, 小林悦子, 石崎有信: 日衛誌, 34, 723, 1980
- 10) 西野治身, 城石和子, 渡辺正男: 環境保健レポート, 184, 1978
- 11) Efron, M. L.: *New Eng. J. Med.*, 272, 1058, 1965
- 12) Milne, M. D.: *Brit. Med. J.*, 1, 327, 1964
- 13) Milne, M. D.: In 3rd Ed. "*Biochemical Disorders in Human Disease*" (Editor: Thompson, R. H. S., and Wootton, I. D. P.), 553, 1970, Academic Press, New York
- 14) 荒川雅雄, 吉田稔男: 内科, 33, 1316, 1974

ポリ塩化ビフェニール (PCB) の肝薬物代謝酵素誘導作用に関する若干の考察

川野 澄江*, 平賀 興吾*

Some Considerations in the Induction of Hepatic Drug Oxidation Enzymes Produced by Polychlorinated Biphenyls (PCB)

SUMIE KAWANO* and KOGO HIRAGA*

Keywords: ポリ塩化ビフェニール (PCB) polychlorinated biphenyls (PCB), 薬物代謝酵素 drug oxidation enzymes, チトクローム P-450 cytochrome P-450, ラット rat, 肝臓 liver

市販ポリ塩化ビフェニール (PCB) 製品は、肝薬物代謝酵素の強力な誘導物質としてよく知られているが、この酵素に数種のアイソザイムが存在する事実が明らかにされて以来^{1,2)}、PCB 異性体とアイソザイム誘導との関連についての詳細な検討が行われつつある^{3,4)}。そこで今回われわれは、1) PCB の各種異性体がどのアイソザイムを誘導しているのか、2) 動物体内で生じた PCB の代謝物によって誘導作用が修飾されているか、3) 市販 PCB 混合物中に存在するポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) 等の不純物の寄与はどの程度か、以上の諸点について若干の検討を行った。

実験材料および方法

1) 試薬 市販ポリ塩化ビフェニール (PCB) 混合物: Kanechlor 200, 300, 400, 500, 600 は、和光純薬工業株式会社から、PCB 異性体: 2, 5, 2', 5'-, 3, 4, 3', 4'-, 2, 4, 2', 4'-, 2, 3, 2', 3'-, 2, 3, 4, 5-テトラクロロビフェニール (TCB), 2, 3, 4, 2', 5'-, 2, 4, 5, 2', 5'-ペンタクロロビフェニール (PCB), 2, 3, 4, 2', 3', 4'-, 2, 4, 6, 2', 4', 6'-ヘキサクロロビフェニール (HCB) は、Analabs Inc. から購入し、特に記載のない限りそのまま使用した。その他の試薬は、既報^{5,6)}のとおりである。

2) 動物および投与方法 Wistar-JCL系雄ラット(4~6週令)を使用した。各検体は、オリーブ油に溶解して腹腔内に投与し、投与後5日目に屠殺した。

3) 肝ミクロソーム分画の調製法、酵素活性、差スペクトルの測定法 既報のとおりである⁵⁻⁷⁾。

4) PCB の精製法 ヘキサンに溶解した KC-400, 100mg を 20g の酸化アルミニウムを充てんした内径 10 mm のカラム上に添加し、5% ジクロロメタン-ヘキサン溶液 200ml, 次いで 20% ジクロロメタン-ヘキサン溶液 250 ml で溶出し、それぞれを PCB 分画, PCDF 分画とし

た。各分画は、KD 式濃縮装置、次いで温浴上で溶媒を完全に除去したのち、オリーブ油に溶解して動物に投与した。3, 4, 3', 4'-TCB 20mg も同様な方法で精製し、PCDF を除去した。

実験結果

1) 塩素含量の異なる Kanechlor 標品の肝薬物代謝酵素誘導作用の比較 (Table 1)

低用量 (0.171mmoles/kg) の KC-600 の投与では、KC-400, KC-500 の投与に比べてはるかに強い誘導が認められた (チトクローム P-450 含量は、対照の 2.7 倍に上昇)。しかしながら、エチルイソシアニド差スペクトルの 455nm/430nm ピーク比 (以下、EIC 比と略す) の上昇はわずかであり、*p*-ニトロアニソール・デメチラーゼ (NADM) 活性、アミノピリン・デメチラーゼ (APDM) 活性の上昇は、それぞれ対照の 3.5 倍、2.5 倍といずれの場合も顕著であった。以上の事実から、低用量の KC-600 による誘導は、PB 型に近いとみられる。

高用量 (1.71mmoles/kg) の KC-400, 500, 600 の投与でチトクローム P-450 含量は 2.5 倍前後に上昇し、EIC 比も 1.0 前後に上昇した。しかしながら酵素活性の変化をみると、NADM 活性が 3 倍以上に上昇するのに対して、APDM 活性の上昇は 40~50% にすぎなかった。以上の結果から、高用量では、PB 型の酵素と同時に MC 型の酵素も強く誘導されていると推測されるが、KC-600, KC-500 投与の EIC 比の有意差を考慮すると、KC-600 による MC 型の誘導は、KC-500 のそれに比べて弱いと考えられる。低塩素含量の KC-200, KC-300 による誘導は小さかった。

2) 酸化アルミニウムカラムで分別された KC-400 分画の肝薬物代謝酵素の誘導能

市販 PCB 混合物は、MC 型の薬物代謝酵素の強力な

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Induction of Hepatic Drug Oxidation Enzymes in Male Rats Given Various Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Kanechlors, KC) Different in Chlorine Content

| Compound | No. of animals | Body weight (B. W., g) | Liver weight (g/100g B. W.) | Microsomal protein (mg/100g B. W.) | Cytochrome P-450 (nmoles/mg microsomal protein) | Ethyliso-cyanide difference spectrum (455/430 nm ratio) | Drug oxidation activity ^{a)} | |
|--|----------------|------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|---------------------------------------|-------------------------|
| | | | | | | | <i>p</i> -Nitroanisole demethylase | Aminopyrine demethylase |
| Experiment 1 (0.171 mmoles/kg body weight) | | | | | | | | |
| None | 4 | 133±10 | 4.78±0.39 | 100.1±12.4 | 0.79±0.02 | 0.31±0.04 | 13.2±1.2 | 68.5±14.7 |
| KC-400 | 4 | 126±8 | 5.02±0.38 | 126.0±9.4 | 1.27±0.08*** | 0.54±0.02*** | 32.8±3.7*** | 96.6±15.0* |
| KC-500 | 4 | 129±6 | 5.19±0.56 | 130.7±32.7 | 1.32±0.38* | 0.48±0.12* | 31.5±6.0*** | 102.0±14.3* |
| KC-600 | 4 | 129±8 | 5.37±0.51 | 144.7±5.1*** | 2.11±0.10*** | 0.54±0.05*** | 46.0±5.5*** | 171.0±32.2** |
| Experiment 2 (1.71 mmoles/kg body weight) | | | | | | | | |
| None | 3 | 159±7 | 5.02±0.08 | 120.8±11.8 | 0.59±0.22 | 0.33±0.10 | 11.0±5.6 | 66.2±28.6 |
| KC-200 | 3 | 161±2 | 6.21±0.09*** | 180.0±37.9 | 0.86±0.10 | 0.43±0.12 | 34.2±5.4** | 88.8±17.6 |
| KC-300 | 3 | 158±12 | 6.36±0.64** | 183.8±36.7* | 1.19±0.02* | 0.62±0.08* | 41.6±1.6*** | 105.6±11.0 |
| Experiment 3 (1.71 mmoles/kg body weight) | | | | | | | | |
| None | 3 | 180±8 | 4.20±0.27 | 89.4±7.9 | 0.88±0.07 | 0.39±0.02 | 12.4±0.9 | 62.8±2.1 |
| KC-400 | 3 | 187±3 | 5.69±0.74* | 179.9±14.1** | 2.04±0.23** | 1.15±0.23** | 46.3±6.8** | 87.2±1.2*** |
| KC-500 | 3 | 181±3 | 6.05±0.46** | 254.9±15.9*** | 2.40±0.32** | 1.29±0.19** ^{b)} | 43.6±6.1*** | 88.8±10.8* |
| KC-600 | 3 | 180±1 | 5.49±0.22** | 255.0±28.9*** | 2.20±0.25*** | 0.89±0.10** ^{b)} | 36.5±3.3** | 96.6±12.7* |

Four to six week-old Wistar-JCL male rats were given *ip* various commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Kanechlors) at a higher (1.71 mmoles/kg) or a lower (0.171 mmoles/kg) doses and killed five days later.

Each value represents mean±SD.

Significantly different from olive oil alone injected control rats: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

a) nmoles of formed metabolite/mg microsomal protein/10 min. b) Significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Comparison of the Inducibility of Drug Oxidation Enzymes between a Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixture (Kanechlor 400) and Its Fractions Derived from Aluminium Oxide Column Chromatography

| | Control (olive oil) | KC-400 (250 mg/kg B. W.) | PCB fraction | PCDF fraction |
|---|------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
| No. of animals | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Body weight (B. W., g) | 141±9 | 143±5 | 141±3 | 143±9 |
| Liver weight (g/100g B. W.) | 4.66±0.28 | 7.09±0.23*** | 6.76±0.40** | 4.93±0.13 |
| Microsomal protein content (mg/100 g B. W.) | 109.5±9.3 | 219.0±39.6** | 205.1±26.4** | 114.8±9.9 |
| Cytochrome P-450 content (nmoles/mg microsomal protein) | 0.70±0.15 | 2.00±0.26*** | 1.96±0.08*** | 0.85±0.02*** |
| Ethylisocyanide difference spectrum (455 nm/430 nm peak height ratio) | 0.28±0.01 | 0.87±0.12*** | 0.92±0.12*** | 0.27±0.01 |
| Drug oxidation activity (nmoles of formed metabolite/mg microsomal protein/10min) | | | | |
| <i>p</i> -Nitroanisole demethylase | 13.4±1.0 | 44.5±4.4*** | 42.0±1.6*** | 13.1±1.0 |
| Aminopyrine demethylase | 81.6±6.5 | 116.6±12.8* | 119.7±9.6** | 81.8±5.2 |

Two fractions of Kanechlor 400 (KC-400) separated by aluminium oxide column chromatography, *i.e.* polychlorinated biphenyl (PCB) and dibenzofuran (PCDF) fractions, were dissolved in olive oil at a concentration corresponding to that of the original KC-400, and injected *ip* to male rats.

Each value represents mean±SD.

Significantly different from control, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

誘導物質である PCDF を種々の濃度で含有している⁹⁾。そこで、PCDF 含量が最も高いと考えられる KC-400 を酸化アルミニウムカラムで分画し、PCB 分画、PCDF 分画の誘導能をもとの KC-400 の誘導能と比較した (Table 2)。PCB 分画は、KC-400 と全く変らない強力な誘導作用を示した。また、PCDF 分画の投与でチトクローム P-450 含量にはわずかながら上昇が認められたが、EIC 比には上昇が認められなかったことから、この誘導は、PCDF によると考えるよりも、PCB 分画に回収されずに残った高塩素含量の PCB によっていると考えた方が妥当であろう。

3) PCB 異性体の誘導能の比較

5 種のテトラクロロビフェニール (TCB), 各 2 種のペンタクロロビフェニール (PCB), ヘキサクロロビフェニール (HCB) の肝薬物代謝酵素の誘導能を比較した (Table 3)。チトクローム P-450 含量に有意の増加を示したのは、3, 4, 3', 4'-TCB, 2, 4, 2', 4'-TCB, 2, 3, 4, 2', 3', 4'-HCB, 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB の 4 異性体であるが、EIC 比の上昇を示したのは、3, 4, 3', 4'-TCB のみである。また、酵素活性の変化をみると、3, 4, 3', 4'-TCB では、NADM 活性は約 2 倍に上昇するのに対して、APDM 活性は逆に減少の傾向を示した。他の 3 種の異性体では

両酵素活性とも有意の上昇を示した。3, 4, 3', 4'-TCB の特異的誘導能が、PCDF 等の不純物に起因している可能性も考えられるため、酸化アルミニウムカラムで精製した標品について同様な実験を行ったところ、全く同じ結果が得られた (Experiment 2)。従って、3, 4, 3', 4'-TCB 標品の MC 型の誘導能は、この物質に固有の性質と言える。他の 3 種の異性体は、PB 型の誘導物質と考えられる。

4) PCB による肝薬物代謝酵素の誘導に及ぼす前投与フェノバルビタール (PB) の影響

Ryan らにより、市販 PCB 混合物によって PB 型、MC 型の両酵素が誘導されていることが明らかにされた⁹⁾。また、Poland らにより、PCB の異性体のうち MC 型の誘導を示すものは、3, 4, 3', 4'-TCB, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB 等数種に限られており、ビフェニールの 2 個のベンゼン環の平面的配置に関連があることが指摘された⁹⁾。しかしながら、PCB 混合物中に占めるこれらの異性体の存在割合は小さく¹⁰⁾、Table 3 で示した 3, 4, 3', 4'-TCB の誘導能から判断した限りでは、PCB 混合物の有する強力な MC 型の誘導作用を、これらの異性体の存在のみによって説明することは困難である。Table 3 および Poland ら⁹⁾、Goldstein ら⁹⁾ の実験結果を考慮す

Table 3. Induction of Rat Hepatic Drug Oxidation Enzymes Produced by Various Polychlorinated Biphenyl Isomers

| Compound | No. of animals | Body weight (B. W., g) | Liver weight (g/100g B. W.) | Microsomal protein (mg/100g B. W.) | Cytochrome P-450 (nmoles/mg microsomal protein) | Ethylisocyanide difference spectrum (455/430nm ratio) | Drug oxidation activity ^{a)} | |
|--------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|---|---|---------------------------------------|-------------------------|
| | | | | | | | p-Nitroanisole demethylase | Aminopyrine demethylase |
| Experiment 1 | | | | | | | | |
| None (olive oil) | 3 | 133±2 | 4.88±0.20 | 81.7±11.7 | 0.87±0.08 | 0.32±0.05 | 15.9±0.7 | 82.1±8.6 |
| 2, 5, 2', 5'-TCB | 3 | 139±7 | 5.46±0.30* | 97.4±5.0 | 0.88±0.09 | 0.34±0.05 | 16.8±0.9 | 93.7±10.3 |
| 3, 4, 3', 4'-TCB | 4 | 137±8 | 6.29±0.76* | 111.6±20.5 | 1.56±0.31* | 0.91±0.26* | 29.3±4.3** | 77.8±8.6 |
| 2, 4, 2', 4'-TCB | 4 | 144±11 | 5.12±0.36 | 93.9±8.0 | 1.21±0.12* | 0.36±0.04 | 28.3±3.9** | 114.9±11.0** |
| 2, 3, 2', 3'-TCB | 4 | 142±9 | 4.73±0.21 | 87.2±8.7 | 0.90±0.06 | 0.31±0.01 | 17.7±1.5 | 104.4±7.8* |
| 2, 3, 4, 5-TCB | 4 | 134±3 | 4.33±0.23* | 83.6±5.2 | 0.96±0.05 | 0.36±0.04 | 25.2±8.1 | 69.3±4.2* |
| Experiment 2 | | | | | | | | |
| None (olive oil) | 4 | 133±4 | 5.05±0.22 | 95.7±10.6 | 0.81±0.03 | 0.32±0.11 | 15.1±1.2 | 81.9±9.7 |
| 3, 4, 3', 4'-TCB ^{b)} | 4 | 122±9 | 6.12±0.54* | 137.0±10.0** | 1.46±0.25*** | 1.09±0.38** | 32.6±7.4** | 71.8±14.2 |
| 2, 3, 4, 2', 5'-PCB | 2 | 131±1 | 5.29±0.35 | 112.3±27.4 | 0.81±0.08 | 0.37±0.03 | 16.6±2.3 | 82.9±4.6 |
| 2, 4, 5, 2', 5'-PCB | 1 | 127 | 5.27 | 96.7 | 1.04 | 0.34 | 23.7 | 133.3 |
| 2, 3, 4, 2', 3', 4'-HCB | 2 | 137±7 | 5.39±0.18 | 112.4±8.8 | 1.10±0.09** | 0.28±0.01 | 23.6±0.6** | 133.8±19.4** |
| 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB | 3 | 144±5* | 5.11±0.27 | 101.7±17.9 | 0.97±0.05** | 0.28±0.03 | 21.9±4.9* | 123.8±24.1* |

Four week-old Wistar-JCL male rats were given various tetra-(TCB), penta-(PCB) or hexa-chlorobiphenyl (HCB) isomers at a dose of 50mg/kg of body weight and killed 5 days later.

Each value represents mean±SD.

Significantly different from olive oil alone given control rats : * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

a) nmoles of formed metabolite/mg of microsomal protein/10min. b) 3, 4, 3', 4'-TCB purified by aluminium oxide column chromatography was given to rats.

ると、塩素数の比較的多い多数の PCB 異性体は、PB 型の誘導作用を示す。それゆえ、誘導された PB 型酵素によって生じた PCB の代謝物が、MC 型の誘導を引き起している可能性も考えられる。そこで、PCB 投与の 3 日前から PB を飲水中に添加して与えたときの、3, 4, 3', 4'-TCB (5mg/kg), KC-200 および KC-300 (500mg/kg) の誘導能の変化を調べた。結果は、Table 4 に示すごとく、PB 単独で与えたときの誘導能とほとんど差がなかった。

考 察

PCB による薬物代謝酵素の誘導の問題は、この酵素に数種のアイソザイムが存在すること、PCB に塩素数と塩素基の位置の異なる多数の異性体が存在することによって二重に複雑化されている。Alvares ら¹¹⁾は、Aroclor 1254 による誘導が PB 型と MC 型の混合型であると報告している。その後 Ryan ら⁹⁾は、Ouchterlony 二重拡散分析法を用いて、Aroclor 処理ラットで、PB 型酵素、MC 型酵素がともに誘導されていることを免疫学的に明らかにしている。一方、Poland ら⁸⁾は、PB 型

酵素、MC 型酵素の誘導が、PCB の異なる異性体によって別々に引起されていることを示し、従来知られている MC 型の誘導物質 (多環式炭化水素、ハロゲン化芳香族化合物) がすべて平面構造をとっていることから、MC 型の誘導を行う PCB 異性体 (3, 4, 3', 4'-TCB, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB) も同様な平面構造を有していると推定した。また、ビフェニール・ブリッジに隣接した位置に塩素基が置換している異性体は、平面構造をとりえないため、MC 型の誘導も起しえないと考えた。しかしながら、このような平面構造をとりうる異性体は 5 種 (ほかに 3, 4, 3'-TCB, 3, 4, 4'-TCB, 3, 4, 5, 3', 4'-PCB) に限られ、市販 PCB 混合物中の存在量がきわめて低く¹⁰⁾、誘導能が特別強力ではないこと (十分な酵素誘導には 50mg/kg 以上の投与が必要) を考えあわせると、PCB の MC 型の誘導作用をこれだけで説明することは困難であると思う。

最近、Dannan ら¹²⁾は、2, 4, 5, 3', 4', 5'-ヘキサプロモビフェニールで、Robertson ら¹³⁾は、2, 4, 5, 3', 4'-ペンタプロモビフェニールで、PB 型、MC 型の両酵素が誘

Table 4. Effect of Previously Administered Phenobarbital (PB) on the Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Producing Induction of Rat Hepatic Drug Oxidation Enzymes

| Drug | PB | No. of animals | Body weight (B. W., g) | Liver weight (g/100g B. W.) | Microsomal protein content (mg/100g B. W.) | Cytochrome P-450 content (nmoles/mg microsomal protein) | Ethylisocyanide difference spectrum (455/430nm ratio) |
|------------------|----|----------------|------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|
| None | - | 3 | 172±4 | 5.13±0.50 | 96.2±16.1 | 0.87±0.04 | 0.27±0.01 |
| None | + | 2 | 160±1* | 6.52±0.40* | 203.1±7.8** | 2.18±0.28*** | 0.43±0.02** |
| 3, 4, 3', 4'-TCB | - | 3 | 165±7 ^{a)} | 4.89±0.48 | 80.0±7.0 | 0.96±0.07 | 0.32±0.02 ^{b)} |
| 3, 4, 3', 4'-TCB | + | 3 | 148±4* | 6.16±0.19* | 180.5±6.9*** ^{a)} | 2.28±0.25** | 0.44±0.08 |
| KC-300 | - | 2 | 179±15 | 5.92 | 140.7 | 1.14±0.00 | 0.34±0.00 ^{b)} |
| KC-300 | + | 3 | 161±2 | 7.90±0.36 ^{a)} | 270.5±24.0 ^{a)} | 2.21±0.45* | 0.59±0.04*** ^{a)} |
| KC-200 | + | 2 | 166±0 ^{a)} | 7.69±0.17 ^{a)} | 240.8±36.3 | 2.17±0.13 | 0.59±0.09 |

Five week-old Wistar-JCL male rats were given a single *ip* injection of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB, 5mg/kg), Kanechlor (KC)-300 (500mg/kg) or KC-200 (500mg/kg) and killed five days later. A part of animals were given PB in drinking water (0.1%) from three days prior to PCB injection till the end of experiment, a period of 8 days.

Each value represents mean±SD.

Significantly different from each PB-nongiven group, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

a) Significantly different from PB alone given rats ($p < 0.05$). b) Significantly different from PCB and PB-nongiven rats ($p < 0.05$).

導されることを報告している。また、Parkinsonら¹⁴⁾は、2, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-ヘブタクロロビフェニールがMC型の誘導を示すことを報告している。それゆえ、PCBでは、MC型の誘導がベンゼン環の平面的配置に必ずしも関係していないように思われる。Dannanら¹²⁾、Robertsonら¹³⁾のプロモビフェニールに関する報告は、単一の化合物がMC型とPB型の両酵素を誘導することを示した最初の例であり、誘導機構との関連で興味もたれる。

最近 Forgueら¹⁵⁾は、*in vitro*の酵素系による2, 5, 2', 5'-TCBのarene oxideの生成を確認している。それゆえ、環境汚染物質、PCBの発がん性を検討する上で、個々の異性体の生体内における代謝機構を酵素誘導との関連において解明することが、ますます重要になってきていると言える。

要 約

種々の塩素含量の市販PCB混合物、Kanechlor(KC)のラット肝薬物代謝酵素誘導作用を比較したところ、低用量(0.171mmoles/kg)のKC-600でフェノバルビタール(PB)型に近い誘導が、高用量(1.71mmoles/kg)のKC-400, 500, 600でPB型と同時に3-メチルコランスレン(MC)型の強い誘導が示された。このMC型の誘導は、ポリ塩化ジベンゾフラン等の不純物の存在によるものではなかった。9種のPCB異性体の誘導能を比較したところ、3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニール(TCB)はMC型の誘導を示したが、これ単独でKCの

MC型の誘導作用を説明しうるほど強力ではなかった。他の3種の異性体はPB型の誘導作用を示した。PBを前投与したラットのKC-200, 300, TCBの誘導能を調べたが、PB投与による誘導能の強化は認められなかった。

謝辞 本研究の遂行にあたって御助言をいただいた環境保健部、秋山和幸主任、中川順一主事に感謝の意を表します。

文 献

- Haugen, D. A., van der Hoeven, T. A., and Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 3567, 1975
- Ryan, D. E., Thomas, P. E., Korzeniowski, D., and Levin, W.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1365, 1979
- Poland, A., and Glover, E.: *Mol. Pharmacol.*, **13**, 924, 1977
- Goldstein, J. A., McKinney, J. D., Lucier, G. W., Hickman, P., Bergman, H., and Moore, J. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **36**, 81, 1976
- 川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, **27-2**, 179, 1976
- 川野澄江, 平賀興吾: 東京衛研年報, **28-2**, 175, 1977
- 川野澄江, 広瀬久美子, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, **30-2**, 116, 1979
- 中川順一, 森田昌敏, 秋山和幸, 桶口育子, 三村秀

- 一：東京衛研年報, 27-1, 316, 1976
- 9) Ryan, D. E., Thomas, P. E., and Levin, W. :
Mol. Pharmacol., 13, 521, 1977
- 10) 中村彰夫, 樫本隆：食衛誌, 18, 1, 1977
- 11) Alvares, A. P., Bickers, D. R., and Kappas, A. :
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1321, 1973
- 12) Dannan, G. A., Moore, R. W., Besaw, L. C., and
Aust, S. D. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
85, 450, 1978
- 13) Robertson, L. W., Parkinson, A., and Safe, A. :
Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 175, 1980
- 14) Parkinson, A., Cockerline, R., and Safe, S. :
Biochem. Pharmacol., 29, 263, 1980
- 15) Forgue, S. T., Preston, B. D., Hargraves, W. A.,
Reich, I. L., and Allen, J. R. : *Biochem. Biophys.
Res. Commun.*, 91, 475, 1979

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の高脂肪食, 無脂肪食投与肝に対する影響

福森信隆*, 平賀興吾*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Rat Liver Cells by Feeding with Diets Differed Fat Content

NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

Effects of butylated hydroxytoluene(BHT) as antioxidant on hepatocytes in male Wistar rats fed diets with different fat contents for a week were investigated electron microscopically and biochemically. Six %, 30% and 0% linol salad oil were added to standard, high-fat and fat-free diets, respectively. In the standard diet containing 1% BHT, decrease of glycogen particles and remarkable proliferation of vesicular SER shifted from the end of RER were observed. Deformed mitochondria were surrounded by RER. The changes by feeding with high-fat diet alone were seen as numerous lipid droplets extending from midlobular to peripheral lobular region, increase of microbodies, developed Golgi apparatus and multiple glycogen particles. The addition of 1% BHT produced abundant glycogen particles, but not many of lipid droplets. Moreover, TG and PL values in the serum were inhibited biochemically. The forms of proliferated SER showed filamentous and tubulous shapes. The changes caused by fat-free diet were disappearance of glycogen particles and swelling of mitochondria. When added 1% BHT, the changes were not found concerning other organelles and TG, PL values in the serum except slight proliferation of vesicular SER, and depletion of glycogen particles. The changes in standard and high-fat diets when compared to fat-free diet were remarkable. Those results suggest that diets with different fat contents modify the changes induced by BHT.

Keywords : butylated hydroxytoluene, rat hepatocyte, ultrastructural changes, high-fat diet, fat-free diet

緒言

抗酸化剤として食品等に使用されるジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は主に肝臓で代謝され, 用量の増加に伴い肝重量の増加¹⁾が認められている. その際, 電子顕微鏡的観察で滑面小胞体 (SER) の増殖²⁾がみられ肝細胞における代謝の反映と解されているが, 同時に糸粒体の異型, 層状配列を乱した粗面小胞体 (RER) の減少, glycogen 顆粒の減少など他の細胞小器官に与える影響も少なくない. これらの細胞内小器官の変動に着目し著者らはこれまでに BHT の投与時間, 投与量の相違による肝細胞内微細構造の変化および肝臓の代謝に影響を与える他の化学物質との併用による相互作用について検討してきたが, いずれも BHT による肝細胞の変化は重度な細胞障害を惹起せしめない³⁻⁶⁾. さらに Botham らによると SER の増殖は BHT の代謝にもとづく生理反応であり BHT の投与中止により増殖した SER が速やかに減少し正常に復すると報告²⁾しているが, 一方著者らは顕著な SER の増殖がみられた細胞で RER の消失,

糸粒体の崩壊, 核萎縮などを認め細胞機能の低下を示唆したが必ずしも肝細胞の広範囲に及ぶものではない⁶⁾.

今回, BHT と他因子との相互作用を検討する一環として, BHT が脂溶性物質であり, また種々の脂肪肝に抑制的に作用する可能性が強いことから脂肪含量を異にした摂餌条件下で肝細胞に対する BHT の作用を比較検討した.

実験方法

動物は馴化した7週令の JCL : Wistar 系雄性 rat を用い, 室温 $25 \pm 1^\circ$, 湿度 $50 \pm 5\%$ の環境下で飼育し, Table 1 に示す割合で混合した粉末飼料 (オリエンタル酵母工業) を与え, それぞれ標準食, 高脂肪食, 無脂肪食とした. 実験前, 1 晩絶食後 BHT 投与群では各群に 1% の割合で BHT (和光純薬) を混和させた飼料を与え 6 群に分けて水とともに自由に摂取させた. 投与期間は 1 週間とし次の諸検査を実施した.

体重 絶食後および屠殺時に測定した.

肝重量 断頭屠殺後開腹し, 速やかに肝臓を摘出し重

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Composition of Diets

| | Standard diet | High-fat diet | Fat-free diet(%) |
|------------------|---------------|---------------|------------------|
| Linol salad oil | 6 | 30 | 0 |
| Milk casein | 25 | 25 | 25 |
| Corn starch | 38 | 14 | 44 |
| α -Starch | 10 | 10 | 10 |
| Cellulose powder | 8 | 8 | 8 |
| Minerals | 6 | 6 | 6 |
| Granule sugar | 5 | 5 | 5 |
| Vitamins | 2 | 2 | 2 |

量を測定した。

血清生化学的検査 断頭放血時の血液から血清を分離して、総蛋白量 (TP) : Biuret 法, グルコース量 (Glu) : グルコースオキシターゼ法, トランスアミナーゼ活性 (GOT および GPT) : Reitman-Frankel 変法, アルカリフォスファターゼ活性 (ALP) : Kind-King 変法, 尿素窒素 (UN) : Urease-Indophenol 法, 総コレステロール量 (Cho) : Lieberman-Burchard 法, 中性脂肪 (TG) : 酵素法, リン脂質 (PL) : オキシターゼ法を日立 M-400 自動分析装置にて測定した。

電子顕微鏡用試料作製 放血屠殺後, 1群3匹から肝方形葉左下端部を摘出し, 細切後冷3%パラホルムアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4)にて前固定を行い, 緩衝液中で洗浄後1%オスミウム酸(0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4)で後固定を1.5時間行った。定法に従いエタノールで脱水し, Epon 樹脂に包埋した。包埋した電顕試料の厚さ約1 μ mの切片をトルイジン青で染色し光顕的に観察後, 肝小葉中間帯の超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し, 日立 HU-12A 型電

子顕微鏡にて検鏡した。

実験結果

体重 各群の初期および投与後の体重, 成長率を Table 2 に示した。標準食に比べ高脂肪食で増加を示したが無脂肪食では減少傾向がみられた。BHT を添加した飼料では標準食, 高脂肪食の体重増加が抑制されているのに対し無脂肪食では抑制がみられずほぼ維持状態を保った。BHT 添加の影響は無脂肪食に比べ高脂肪食で著しかった。なお高脂肪食, BHT 添加高脂肪食では他の群に比べ若干の摂餌量の減少がみられた。

肝重量 絶対値は無脂肪食で標準食に比べ減少がみられ, BHT 添加により高脂肪食で増加を抑制する傾向が認められた。一方, 相対的肝重量値で比較すると無脂肪食で有意な減少を認めたが高脂肪食の減少は著しくなかった。BHT 添加で標準食, 無脂肪食の増加がみられたが, 高脂肪食ではその影響が少なかった (Table 2)。

血清生化学的検査 Table 3 に各群の検査値を示した。TP は脂肪含量の差異による変化がほとんどみられず, BHT の添加により高脂肪食で低下を認めた。Glu は全般的に BHT 添加群で低下がみられ, 標準食, 高脂肪食で BHT 無添加群の値を抑制した。GOT は BHT 添加の影響がほとんどみられず, 高脂肪食で他の群より若干の値の上昇が認められた。GPT は無脂肪食での低下が認められるほか BHT 添加により全体的に低下を示した。ALP は標準食と比べ高脂肪食で著しい増加が, 無脂肪食で低下が認められ, BHT 添加で高脂肪食による上昇を抑制した。Cho, TG, PL は高脂肪食で上昇を認め BHT の添加により TG, PL の抑制がみられた。

電子顕微鏡的所見 標準食では通常の固型飼料 (日本クレア, CE-2) 摂餌動物に比べ若干の glycogen 顆粒が少なく存在するものの他の organelles はほぼ正常像を示

Table 2. Effects of BHT on Body Weight and Liver Weight in Rats Fed with Diets Differed Fat Content

| Diets groups | No. of rats | Body weight | | | Liver weight | |
|-----------------|-------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|
| | | Initial (g) | Final (g) | Growth rate (%) | Absolute (g) | Relative (g/100g) |
| Standard | 5 | 247.8 \pm 9.20 ^{a)} | 271.8 \pm 13.25 | 109.6 \pm 2.22 | 11.89 \pm 1.11 | 4.37 \pm 0.23 |
| High-fat | 5 | 242.0 \pm 10.77 | 306.0 \pm 9.67 | 126.5 \pm 1.64* | 12.73 \pm 0.68 | 4.16 \pm 0.15 |
| Fat-free | 5 | 248.2 \pm 9.39 | 256.4 \pm 12.32 | 103.3 \pm 2.82* | 9.51 \pm 1.11 | 3.70 \pm 0.26* |
| 1% BHT standard | 5 | 234.6 \pm 10.99 | 202.0 \pm 12.59 | 86.1 \pm 5.28** | 10.30 \pm 1.12 | 5.09 \pm 0.36** |
| 1% BHT high-fat | 6 | 234.1 \pm 12.35 | 205.8 \pm 11.95 | 87.9 \pm 2.43** | 9.22 \pm 1.10 | 4.47 \pm 0.34* |
| 1% BHT fat-free | 5 | 240.4 \pm 7.79 | 246.4 \pm 6.87 | 102.5 \pm 2.62* | 9.92 \pm 0.45 | 4.03 \pm 0.13* [†] |

a) Values are the means \pm SD for five or six animals and those marked with asterisks differ significantly (Student's *t* test) from the standard diets in non-BHT treatment or BHT treatment groups (* P<0.05) and from non-BHT treatment in each diets groups differed fat content (** P<0.05).

Table 3. Effects of BHT on Serum Biochemical Changes in Rats Fed with Diets Differed Fat Content

| Diets groups | No. of rats | TP g/dl | Glu mg/dl | GOT K-U/ml | GPT K-U/ml | ALP K·A-U/dl | UN mg/dl | Cho mg/dl | TG mg/dl | PL mg/dl |
|----------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|-------------|--------------|------------|--------------|---------------|---------------|
| Standard | 5 | 6.1±0.50 ^{a)} | 123.8±13.68 | 102.4±3.20 | 36.2±5.26 | 49.8±23.72 | 21.8±4.60 | 70.4±10.33 | 159.6±40.65 | 143.6±26.88 |
| High-fat | 5 | 6.4±0.24 | 138.6± 9.58 | 109.0±2.64* | 34.2±4.38 | 91.2±26.11* | 23.4±6.80 | 92.8± 7.79* | 227.4±16.87* | 180.4±18.62* |
| Fat-free | 5 | 6.2±0.28 | 107.2± 4.76 | 104.4±3.45 | 26.0±2.34* | 16.4± 2.40* | 16.4±5.12 | 88.2±10.89* | 179.2±26.80 | 161.2±14.73 |
| 1%BHT standard | 5 | 6.0±0.34 | 97.0± 4.30** | 100.0±3.60 | 25.0±3.08** | 37.0±13.22 | 24.4±6.22 | 89.4± 9.37** | 152.4±25.82 | 141.6±18.02 |
| 1%BHT high-fat | 6 | 5.8±0.14** | 101.1± 5.26** | 105.8±3.06* | 29.1±4.11 | 59.0±16.85** | 19.8±5.11 | 93.3±11.27 | 151.1±21.77** | 145.6±12.16** |
| 1%BHT fat-free | 5 | 6.5±0.08* | 98.8± 8.55 | 103.6±2.79 | 22.6±2.19** | 16.4± 2.88* | 15.6±4.09* | 90.4± 9.18 | 196.4±30.85* | 145.2±12.93 |

a) Values are the means±SD for five or six animals and those marked with asterisks differ significantly (Student's *t* test) from the standard diets in non-BHT treatment or BHT treatment groups (* P<0.05) and from non-BHT treatment in each diets groups differed fat content (** P<0.05).

した。BHT 添加標準食は glyco-gen 野で glyco-gen 顆粒の減少あるいは消失に伴って SER の顕著な増殖が観察され、その形態は主に vesicle 状を呈し大きく拡張した SER が散見する細胞もみられた。SER の増殖部では ribosome の離脱、curling を伴った RER の消失傾向が認められ末端部では SER に移行する像が多く認められた。残存する RER は糸粒体の周囲に集まり不整な層状配列を呈し、RER に取り囲まれた糸粒体は多く長型化がみられ糸粒体膜の消失、一部 cristae の崩壊を認めた。Golgi 装置の発達は比較的良好でその周囲に microbody の軽度な増加が認められた。Disse 腔にみられる脂肪滴は標準食に比べて著しい増加を示した。また、脂肪食では glyco-gen 顆粒が胞体内の広範囲で密に存在し増加した小脂肪滴の周囲に分布した。小脂肪滴の大きさは種々を呈したが比較的糸粒体の大きさに類似したものが多くみられた。これらの変化は無脂肪食では認められず、標準食に比べて著しい増加を示した。また、microbody は全体的に増加傾向がみられその多くは core を持つ一般的な形状であったが、core の存在しない比較的小型の microbody の増加も認められた。糸粒体はほぼ正常に近かったが軽度な膨化を生じた糸粒体では基質に暗調物質の蓄積がみられた。RER は一部消失をみる

が層状配列の分散は少なく、SER も正常像を示した。Golgi 装置の発達は良好で数層の集合体を形成し末端の囊部に very low density lipoprotein (VLDL) の貯留を認めるものがみられた。BHT 添加高脂肪食では高脂肪食と同程度に glyco-gen 顆粒が多く残存したが、小脂肪滴の増加は認められなかった。Glyco-gen 野で vesicle 状を呈する SER の軽度な増加がみられたが BHT 添加標準食に比較して少なかった。一方、伸長して filament 状を呈し末端が断裂した特徴的な様態を示す SER が glyco-gen 野で多く認められた。これらの伸長した SER は層状構築が不整に乱れ消失傾向を伴う RER と明瞭な識別が困難であり、また比較的長径で発達した Golgi 装置との同定も明らかでなかった。Golgi 装置と明確に断定されるものでは末端囊部の VLDL 顆粒は高脂肪食摂取に比べ少なかった。糸粒体は長型、膨化などみられ RER で囲まれる像が多かった。Microbody は増加を認めるが高脂肪食に比べ軽度であった。Disse 腔の脂肪滴は高脂肪食、BHT 添加高脂肪食とも量的増加がみられ、BHT 添加により変動を認めなかった。なおトルイジン青色を施した光顕的観察で高脂肪食は肝小葉中間帯からゾリソソ帯部にわたり大小の脂肪滴の増加が細胞内に散見されたが、BHT の添加により脂肪滴の蓄積が抑制され標準食と同程度の散在を示した。

無脂肪食では細胞質内の glycogen 顆粒が減少し、極めて散在性に認めるに過ぎない。糸粒体は膨化したものが多く、その基質は明調化し cristae の発達が悪く糸粒体膜の崩壊、消失を認めた。SER, RER, Golgi 装置では顕著な変化がみられなかった。BHT 添加無脂肪食の変化は glycogen 顆粒が減少してほとんど認められず、その間に SER の増殖がみられた。SER の増殖の程度は BHT 添加標準食に比べ軽度であり、SER の拡張とみられる小空胞の形成を認める細胞もみられた。RER は糸粒体の取り囲み、層状配列の乱れが軽度に認められるが消失は少なく比較的正常像を呈した。糸粒体は長型、くびれ像など異型を認めるが cristae の変化は少なかった。また microbody は若干増加傾向を示したが、Golgi 装置の発達は認められなかった。Disse 腔の脂肪滴は無脂肪食、BHT 添加無脂肪食ともほとんどみられなかった。

考 察

脂溶性の BHT は異なる脂肪含量の摂餌により溶解性、消化管での吸収性、生体内での反応性に差異が生じると想定されるため肝細胞内の形態学的変化を主に把握する目的で実験を行った。脂質は腸管内で β -モノグリセリドと遊離脂肪酸に分解され胆汁酸の作用でミセルを形成して小腸粘膜細胞内に取り込まれるが、その時飼料中の脂質分が多いと活発な脂質路の移動により、BHT の吸収が増加すると考えられる。また肝臓は脂溶性物質を代謝し極性化を行って体内に摂取された異物質の解毒機構を持つとともに多くの栄養素の重要な代謝の場である。そのため飼料中の脂肪含量の相違により肝臓への影響が指摘され、低蛋白食⁷⁾、高脂肪食⁸⁾等の食餌性因子が重要な要因となる。

標準食に BHT を添加した微細構造の変化はこれまでの報告と大差がみられず肝重量の増加も認められた⁹⁻¹¹⁾。Glycogen 顆粒は減少しているものの若干の残存がみられ、その部で vesicle 状の SER が増殖していた。増殖した SER の形態は一般に投与量、投与期間の増加に伴って vesicle 状から tubule 状に漸次移行することから、また glycogen 顆粒の残存が認められることから BHT による障害が強く出現しているとは思われず、これらの変化は代謝過程における解毒機構の亢進像と考えられる。血清 Glu 値は BHT 添加で有意に減少し肝細胞内の glycogen 顆粒の挙動と比較的一致することから、SER の増殖の程度を把握するための指標になると思われる。RER 末端部での移行の亢進は SER を増殖させ、また RER の正常な層状構築を乱し、ribosome の脱落、RER の消失を惹起せしめるが、血清 TP の減少はみら

れなかった。RER の消失にもかかわらず血清 TP 値の変動がみられなかったことは細胞質内に離脱した free の ribosome が存在するためと思われ、BHT の投与中止により速やかに SER の減少、RER の再構築が行われるものと考えられる。

高脂肪・低蛋白食で脂肪肝の出現することが知られているが、その原因として脂質の負荷と低蛋白による lipoprotein 形成の低下によると述べている¹²⁾。高脂肪食のみの条件で行った本実験においても中等度ではあるが肝細胞内に脂肪滴の増加がみられ、これは主に脂質の負荷によると考えられる。森らは脂肪肝の発生機序が肝細胞内で合成された中性脂肪を lipoprotein として排泄するに要する蛋白の量的減少に起因している¹³⁾と述べ、すなわち食餌中の脂質の負荷などによる遊離脂肪酸の流入過剰によって蛋白が不足する時、あるいは RER での蛋白合成の障害による絶対的な不足を論じている¹⁴⁾。高脂肪食で RER は一部の消失を認めたが正常に近い層状構築を保持しているため蛋白合成系への障害は少ないと思われる。このことは microbody の増加、VLDL を貯留し良好に発達した Golgi 装置からも lipoprotein の合成が増大していると思われ、細胞機能の亢進がうかがわれる。また軽度な糸粒体の膨化は機能亢進の表現といわれているが、基質に蓄積のみられた暗調物質の意義は明らかでない。脂質代謝に関与する microbody の増加は先の報告¹⁵⁾でもみられ、比較的小型の形状は Novikoff らのいう microperoxisomes と考えられる¹⁶⁾。一般的には中心部に core が存在するが core の持たない microbody の増加は catalase, urate oxidase などの酵素的変化に何んらかの関わりがあると思われる¹⁷⁾が明らかでない。Nagao らは絶食後高脂肪食を与えた rat で微細構造の変化を観察し、投与後12時間目から脂肪滴の増加がみられ、同時に Golgi 装置、SER の発達は報告しており¹⁸⁾、脂肪滴の蓄積は比較的早い時期に起こるものと思われる。血清生化学的検査値は標準食に比べて Cho, TG, PL が有意に増加し血液中の脂肪成分と肝細胞内の変化とに相関が認められる。このことは血液中の遊離脂肪酸の濃度と肝臓で排泄される VLDL の増加が平衡的で lipoprotein が放出しきれなくなると脂肪滴が蓄積すると考えられ、高脂肪食の Disse 腔に散見された小脂肪滴との関与が示唆される。

BHT 添加高脂肪食での著明な変化は、密在した glycogen 顆粒の間に散在する伸長した tubule 状あるいは filament 状 SER の増殖が特徴的に観察された。SER の増殖は標準食に比べ量的に軽度であり、vesicle 状の SER は少なく、伸長を呈するため ribosome を脱落した

RER あるいは Golgi 装置と類似しているが、層状構築を認めず、離脱した ribosome の curling がみられないことなどから他の organelles と識別される。このように伸長した SER は BHT の高濃度⁵⁾、長期投与⁶⁾の際に観察されたが多くは tubule 状であり相互に networks を形成しているため今回みられた伸長とは若干形状が異なっている。これらの変化は通常 BHT により glycogen 顆粒が消失しその分野に SER が著しく増殖するのに対して、BHT 添加高脂肪食では glycogen 顆粒が多く密在している点が相違しており、BHT の薬物代謝と高脂肪食による脂質代謝との相互影響によると推察されるが明らかでない。一方、高脂肪食で散見された胞体内脂肪滴の増加はみられず標準食と同程度であり、血清 TG、PL の高脂肪食での上昇値を BHT が抑制していることと関連がみられる。しかし、Disse 腔の小脂肪滴は残存したままであり、この小脂肪滴は胞体内から排泄されたものではなく、食餌性に起因する脂質と考えられる。BHT はエタノール⁵⁾やオロチン酸¹⁰⁾ 脂肪肝を阻止することが知られているがその機序は未だ明解でない。長型化、膨化した糸粒体を取り囲む RER および発達した Golgi 装置は機能亢進像とみられ、細胞損傷に導くとは思われない。相対的肝重量は BHT により若干の増加をみるが有意でなく、標準食に比べ減少している。このことは必ずしも高脂肪食が BHT の作用を助長するとは限らないことを意味しているが、肝重量の増加は SER の増殖と密接に関係するため BHT 添加標準食に比べ SER の増殖が軽度であることを反映している。血清 Glu は BHT 添加で高脂肪食に比べ減少しているが、電顕的観察で細胞内に glycogen 顆粒が残存していることとの関係は明らかでない。血清 GOT、ALP は高脂肪食、BHT 添加高脂肪食とも他の群より高値を示すが GPT の有意な上昇は認められないため肝障害によるのではなく、ALP の上昇は rat で小腸由来の ALP が多いことから小腸依存性の ALP と思われ食餌中の脂肪量の変化により吸収機構に影響を与えたためと考えられる。

無脂肪食の糸粒体は膨化、変型を呈したが、これはエネルギー産生を高めるための適応像と思われる。しかしエネルギー供給源である glycogen 顆粒の減少のため機能的に負担が加わったと思われ、cristae の発達が悪く顕著なものでは糸粒体膜の崩壊を生じたと考える。血清 Glu は無脂肪食で低下をみるが有意でなく、glycogen 顆粒の消失に比べ変動は少ない。Wilson らは脂肪酸欠乏 mouse で糸粒体の膨化、中央部 matrix の発達を報告し、この変化は糸粒体の酸化的リン酸化に影響を及ぼすかわち ATP の欠乏によると示唆した¹⁴⁾。

BHT 添加無脂肪食で glycogen 顆粒は無脂肪食と同様に消失し、また SER の増殖は標準食に比べ軽度で一部拡張を呈した。標準食で BHT の作用は glycogen 顆粒の消失を伴いつつ SER の増殖が進行するが、BHT 添加無脂肪食での glycogen 顆粒の消失は SER の増殖程度が軽度であること、すでに無脂肪食で glycogen 顆粒が消失していることから BHT の作用とは考え難い。BHT 添加で SER の増殖が軽度である理由として、通常 glycogen 顆粒が SER の膜新生のためのエネルギー源として利用されるが無脂肪食では glycogen 量が少ないため SER の膜新生が充分に出来なかったこと、さらに脂溶性の性状を持つ BHT が無脂肪食では腸管の吸収が悪かったため BHT の体内摂取量が少なかったことなどが考察される。血清 ALP 値が無脂肪食、BHT 添加無脂肪食ともに低下しているのは、食餌中の脂質量の違いが腸管由来の ALP に関与していると思われ興味深い。RER、糸粒体、Golgi 装置の変化はともに著しくないことから細胞の機能亢進はみられないと思われる。また相対的肝重量の増加は脂肪を含む他の群に比べ低値を示した。

体重に関して高脂肪食で摂餌量の減少がみられたにもかかわらず標準食、無脂肪食に比べ増加が大きかったことは脂質の栄養価の高いことを証明している。また BHT 添加により高脂肪食、標準食で体重増加の抑制がみられ、無脂肪食で BHT 添加の有無による影響が少なかったことは食餌中の脂肪含量の相違が BHT の作用に影響を与えていると示唆される。

本実験は脂溶性の抗酸化剤 BHT が飼料中の脂肪含量の差異により、BHT の吸収あるいは生体内作用を考慮に入れ肝細胞での微細構造の変化を比較検索した。摂餌期間が1週間と比較的短期間であるが全ての群で形態学的、臨床生化学的観点から重度な肝障害の惹起はみられなかった。食餌の脂肪組成の相違は、BHT による SER の増殖様式、glycogen 顆粒の変動、RER の消失、糸粒体の変型などに異なる変化を与え、形態的には高脂肪食で細胞機能の亢進、無脂肪食で機能低下の像を呈し、また高脂肪食に出現した脂肪滴の増加を BHT が抑制した。総括的見地から比較すると、高脂肪食、標準食に比べ無脂肪食では BHT の影響が軽度であることから、BHT の作用発現に飼料中の異なる脂肪組成の関与が示唆される。

(本研究の一部は日本電子顕微鏡学会第35回学術講演会 1979年5月で発表した。)

文 献

- 1) Feuer, G., Gaunt, I. F., Golberg, L., and Fairwea-

- ther, F. A. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 3, 457, 1965
- 2) Botham, C. M., Conning, D. M., Hayes, J., Litchfield, M. H., and Mcelligott, T. F. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 8, 1, 1970
 - 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) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 30-2, 31, 1979
 - 7) Svoboda, D., and Higgins, J. : *Amer. J. Path.*, 45, 3531, 1964
 - 8) Nagao, Y., Suzuki, T., Yasuda, H., and Takaki, F. : *Jikei Med. J.*, 8, 119, 1961
 - 9) Satoh, T. : *J. Clin. Electron Microscope*, 7, 161, 1974
 - 10) Mori, M., Yokoyama, M., and Onoe, T. : *Japan. J. Clin. Electron Microscopy*, 6, 21, 1973
 - 11) Ishii, H., Fukumori, N., Horie, S., and Suga, T. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 617, 1, 1980
 - 12) Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Ouintana, N., and Davis, C. : *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 540, 1973
 - 13) 高橋 省, 中尾順子, 平賀興吾 : 東京衛研年報, 29-2, 22, 1978
 - 14) Wilson, J. W., and Leduc, E. H. : *J. Cell. Biol.*, 16, 281, 1963

Explanation of Figures

- Fig. 1. A portion of hepatocyte from the rat fed with the standard diet. There are mitochondria (M), lamella of rough surfaced endoplasmic reticulum (RER) and glycogen particles (Gl). $\times 17000$.
- Fig. 2. A portion of hepatocyte from the rat fed with the standard diet containing 1% BHT for a week. Extreme proliferation of vesicular smooth

endoplasmic reticulum (SER) in the glycogen area and sinuous cisterna of RER surrounding mitochondria (M) are seen. $\times 17000$.

- Fig. 3. A portion of hepatocyte from the rat fed with the high-fat diet. Several lipid droplets (L) are seen in the cytoplasm. Glycogen particles (Gl) are present abundantly. Alterations of RER, SER and mitochondria (M) are not seen severely. $\times 14000$.

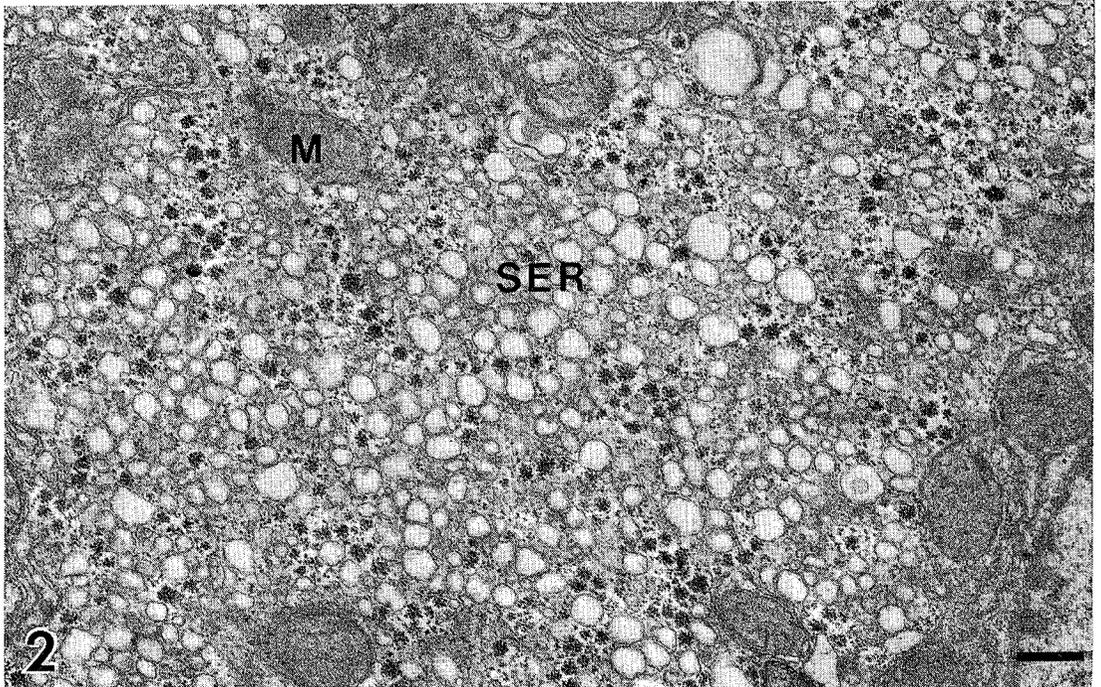
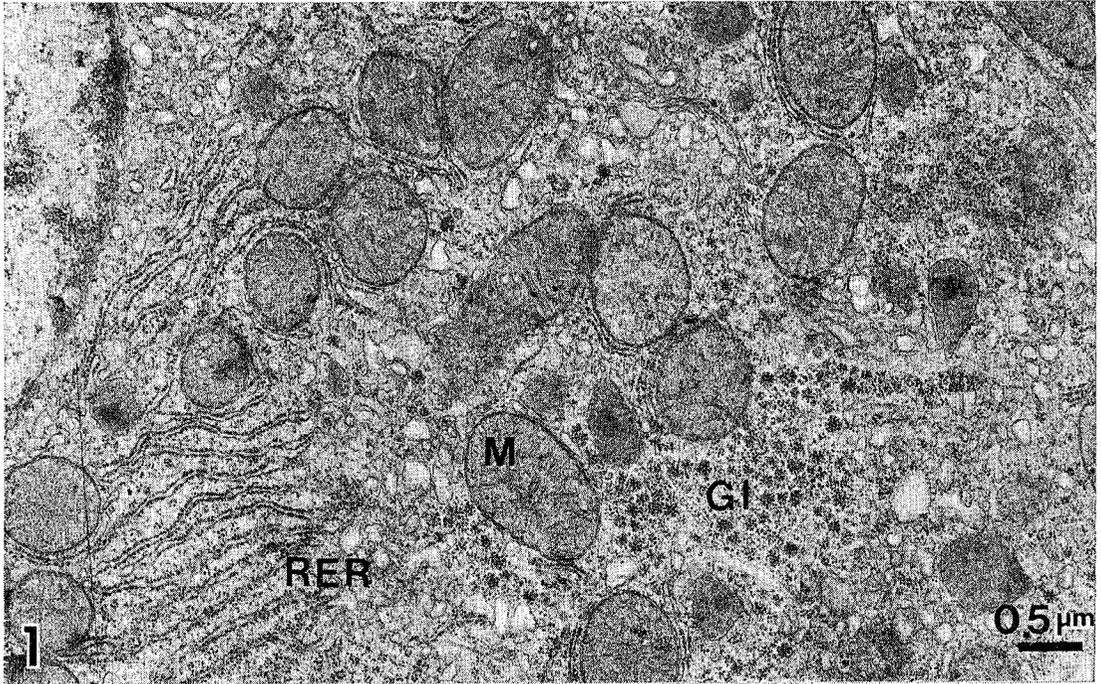
- Fig. 4. A portion of hepatocyte from the rat fed with the high-fat diet. Many microbodies (Mb) are observed in the glycogen area. Most microbodies contain nucleoid core(n), but the anucleoid microbodies are also seen frequently (arrows). $\times 16000$.

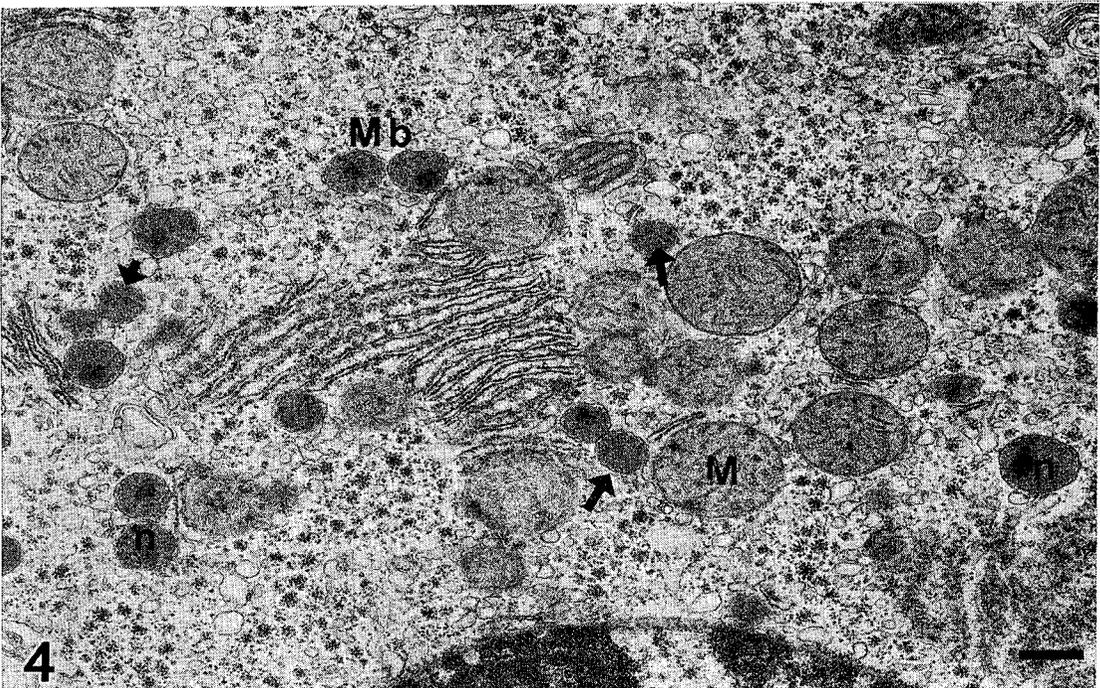
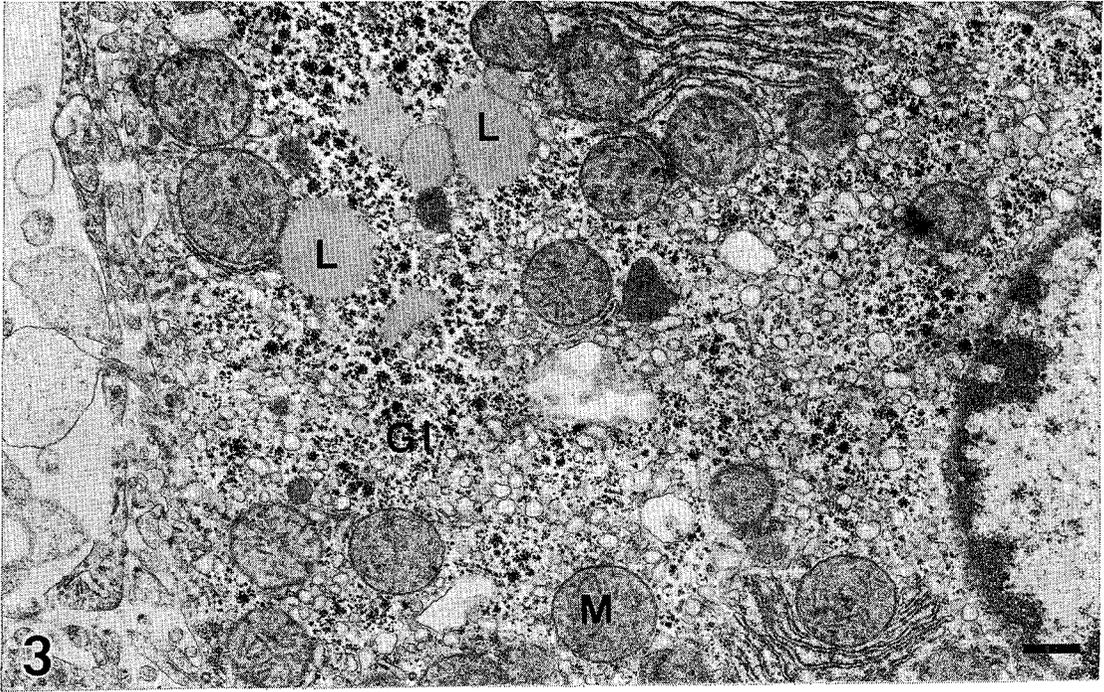
- Fig. 5. A portion of hepatocyte from the rat fed with the high-fat diet containing 1% BHT for a week. Slight proliferation of SER in the glycogen area is observed, and several SER are filamentous and tubulous shapes. $\times 21000$.

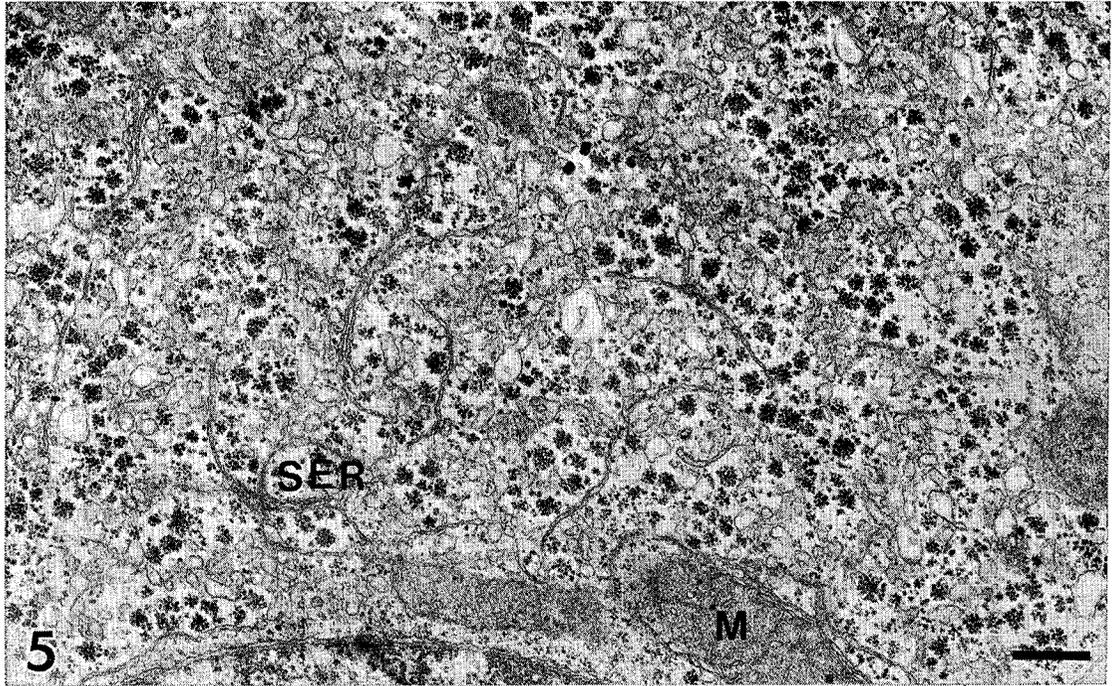
- Fig. 6. A portion of hepatocyte from the rat fed with the high-fat diet containing 1% BHT for a week. Accumulation of lipid droplets is not seen in the glycogen area. There are much glycogen particles (arrows) among proliferation of dilated SER. Lengthened mitochondria (M) was surrounded by RER. $\times 18000$.

- Fig. 7. A portion of hepatocyte from the rat fed with the fat-free diet. The lack of glycogen particles and swelling of mitochondria (M) are seen. The changes of other organelles are slight. $\times 15000$.

- Fig. 8. A portion of hepatocyte from the rat fed with the fat-free diet containing 1% BHT for a week. There is glycogen depletion. Slight proliferation of SER and lengthened deformation of mitochondria (M) are showed. $\times 16000$.







オールを混合した。使用したラットの数は各群5匹であり、すべてのラットは一匹がいとし2週間実験飼料を自由摂取させた。

4. 実験方法

血漿プロトロンビン量 前報³⁾に従い測定した。

結果および考察

1.5% BHT 投与群では飼料摂取開始後13日目に5匹中3匹のラットが出血死した。生き残った2匹のラットはプロトロンビン量が著しく減少し、出血死寸前であると思われた。ところが1.5%BHT+エストロゲン投与群では実験期間中死亡したラットはなくプロトロンビン量も1.5%BHT 投与群に比べ比較的多かった。0.5%BHT 投与群では死亡例はなかったがすべてのラットにおいてプロトロンビン量は著しく減少していた。0.5%+エストロゲン投与群でのプロトロンビン量はそのような著しい減少は観察されなかった。BHT を投与しない群でもエストロゲン投与によりプロトロンビン量の増大はみら

れた。したがって、以上の結果からエストロゲン投与によりBHT 誘発のビタミンK欠乏、プロトロンビン量の減少および出血を阻止しうることが示唆された。そこでBHT 摂取雌ラットのビタミンK欠乏症の抵抗性の原因としてエストロゲンの濃度の高いことが考えられる。一方、Jollyら⁴⁾はエストロゲンの作用の一つにビタミンKの腸管からの吸収を増加させることを報告している。そこで現在、ビタミンKの吸収に対するBHT の影響について検討中である。

文 献

- 1) 米山允子ら：東京衛研年報，24，450，1973
- 2) Metta, V. C., and Johnson, B. C. : *J. Nutr.*, 72, 455, 1960
- 3) Suzuki, H., Nakao, T., and Hiraga, K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 261, 1979
- 4) Jolly, D. W., Carolyn, C., and Thomas, E. N, Jr. : *Amer. J. Physiol.*, 232, H12, 1977

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の幼若マウス赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響

市川久次*, 小林博義*, 中尾順子*

Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Osmotic Fragilities of Erythrocytes in Infant Mice

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: CPC, 赤血球膜 erythrocytes membrane, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, 仔マウス infant mice

著者らは、これまで CPC (coil planet centrifuge) 法による赤血球膜浸透圧抵抗 (溶血抵抗) の測定について、毒性試験・研究への応用を企図し、基礎的、応用的検討を行ってきた¹⁻⁶⁾。今回、応用的研究の一環として、予備的ではあるがジブチルヒドロキシトルエン (以下 BHT と略す) を経母乳投与により新生~幼若マウス (仔マウス) に投与し、その赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響を検討したので報告する。なお、体重増加、肝臓重量におよぼす影響についても付加的に言及した。

実験材料ならびに方法

1. 使用動物: 日本クレア生産の ICR マウスを日本クレア製の CE-2 飼料にて自家繁殖 (兄妹交配) して得た母仔を実験に供した。実験に供するに当っては、出生仔数 9 匹以上、雌雄 4 匹以上、母マウス 1 匹につき 9 あるいは 10 匹の仔マウスを保持するよう出生時に選んだ。
2. 試料: BHT は和光純薬製 (Lot No. KIK5562) 結晶性粉末, mp. 69.5°C のものを使用した。
3. 投与方法ならびに期間: 試料 (BHT) をそれぞれ 0, 0.08, 0.25, 0.50, 1.0% の割合で日本クレア製粉末飼料 (CE-2) に混合し、固型飼料として経母乳的に仔マウスに投与した。投与期間は、7, 14 日群に分けた。
4. 飼育条件: 室温 25±1°C, 湿度 55±5%, 照明時間 午前 6 時より午後 5 時に調整された飼育室にて、母マウス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。
5. 検査項目ならびに方法

i) 赤血球膜浸透圧抵抗: 仔マウスを断頭し、流出してくる血液をヘパリン処理したヘマトクリット管に採取し、市川ら⁷⁾の方法に準じ、170-30mOsM の濃度勾配をもつ食塩液の CPC コイルを使用して行った。

ii) 体重: 実験開始後 0, 7, 14 日目は雌雄個体別に、

2, 4, 6, 8, 10, 12 日目は雌雄区別なく測定し、出生日の平均体重を 100% として成長率で示した。

iii) 肝臓重量: 断頭採血後すみやかに肝臓を摘出し、重量を秤量、体重比重量として表わした。

実験結果ならびに考察

BHT を経母乳により仔マウス (7, 14 日間) に投与し、その赤血球膜浸透圧抵抗におよぼす影響について検討した。Table 1 に示した如く、7 日間投与の全雄群と雌の 0.50, 1.0% 投与群において、溶血終了値 (HEP) が対照群に比して有意に上昇したのが認められた。これは溶血最大抵抗値が上昇したことであり、溶血抵抗の減少を意味すると考えられる。また、溶血開始値にはほとんど差が認められず、溶血幅が投与群全体において減少する傾向が認められたことから、BHT はマウスの乳児期の初期に経母乳投与した場合、赤血球膜の浸透圧抵抗を弱くする作用があることが示唆された。これまでの成熟ラットに BHT を投与して検討した結果では、むしろ溶血抵抗を増加すると報告されている^{2,7)}。今回の実験は投与経路が経母乳であり、また動物の種類も仔マウスである。この相反する結果を考察するに、仔マウスが摂取したものが BHT そのものというよりも、代謝乳汁分泌物と考えた方が妥当であり、成熟ラットに経口的に投与した場合と異なった結果を得たのは、種差もそうではあるが、経母乳投与ということも理由の一つとして考えられる。したがって、BHT 投与の母乳中の存在状態については、今後の検討課題であると考えられる。

一方、Fig. 1, Table 2 に実験期間中の体重推移ならびに実験終了時の体重増加率、肝臓重量の体重比重量を示した (体重の実験開始時における絶対重量を意図的にそろえることが不可能であるので、体重増加については成長率、肝臓重量は体重比重量で示した)。BHT 1.0% 投与

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Osmotic Fragilities of Erythrocytes in the Infant Mice Administered with BHT through the Mother Mice

| Days | Sex | Dose | HSP ¹⁾ | | HEP ²⁾ | HW ³⁾ |
|------|-----|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 7 | M | Control | 115±3.0 ⁴⁾ | (5) ⁵⁾ | 74±1.1 | 42±2.4 |
| | | BHT 0.08% | 118±2.3 | (6) | 79±1.9*** | 39±2.0* |
| | | BHT 0.25% | 115±2.6 | (6) | 76±1.0** | 38±3.2 |
| | | BHT 0.50% | 119±1.1 | (5) | 80±3.0** | 38±2.5* |
| | | BHT 1.00% | 117±2.2 | (4) | 79±0.6** | 39±1.7 |
| | F | Control | 115±3.0 | (5) | 74±1.6 | 41±1.4 |
| | | BHT 0.08% | 115±1.9 | (4) | 74±2.1 | 41±1.3 |
| | | BHT 0.25% | 112±3.7 | (4) | 76±1.5 | 36±3.6 |
| | | BHT 0.50% | 117±3.5 | (5) | 78±2.4* | 39±2.5 |
| | | BHT 1.00% | 120±2.2* | (5) | 77±0.4* | 43±2.3 |
| 14 | M | Control | 112±1.5 | (6) | 77±2.2 | 35±2.7 |
| | | BHT 0.08% | 108±3.6 | (5) | 79±2.8 | 29±3.0* |
| | | BHT 0.25% | 108±2.5* | (6) | 77±2.0 | 30±2.7* |
| | | BHT 0.50% | 112±1.9 | (5) | 79±3.2 | 33±1.7 |
| | | BHT 1.00% | 112±1.5 | (5) | 77±1.5 | 34±0.8 |
| | F | Control | 110±3.3 | (4) | 77±0.5 | 35±3.7 |
| | | BHT 0.08% | 109±1.9 | (5) | 79±1.7* | 30±0.7 |
| | | BHT 0.25% | 109±1.5 | (4) | 78±1.5 | 31±2.4 |
| | | BHT 0.50% | 105±5.5 | (5) | 77±1.5 | 27±4.6 |
| | | BHT 1.00% | 107±1.3 | (4) | 77±1.3 | 29±2.2 |

1) Start point of hemolysis

2) End point of hemolysis

3) Width of hemolysis

4) mOsM, mean±S.D.

5) No. of infant mice

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

Table 2. Effects of BHT on Body Weights Gain and Liver Weights in Infant Mice.

| Sex | Dose | 7 days | | 14 days | | |
|-----|-----------|----------------------------|-----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | | Body Weights ¹⁾ | Liver Weights ²⁾ | Body Weights | Liver Weights | |
| M | Control | 279±7.1 ³⁾ | (5) ⁴⁾ | 3036±291.2 | 355±41.8 (5) ⁴⁾ | 4160±363.8 |
| | BHT 0.08% | 269±13.5 | (6) | 2931±161.3 | 471±26.7 (5) | 3458±71.1** |
| | BHT 0.25% | 251±30.0 | (6) | 2905±259.8 | 400±18.4 (6) | 3446±181.4** |
| | BHT 0.50% | 263±21.1 | (5) | 2757±187.2 | 419±34.4 (5) | 3365±183.0** |
| | BHT 1.00% | 170±8.7*** | (4) | 2776±109.1 | 343±33.6 (5) | |
| F | Control | 290±31.1 | (5) | 3339±192.2 | 365±35.8 (5) | 4074±516.4 |
| | BHT 0.08% | 278±9.9 | (4) | 2995±379.1 | 497±28.5 (5) | 3592±73.5* |
| | BHT 0.25% | 250±10.0* | (4) | 3109±230.8 | 415±24.9*** (4) | 3301±154.7* |
| | BHT 0.50% | 278±25.1 | (5) | 2987±128.3* | 438±22.3 (5) | 3539±110.7* |
| | BHT 1.00% | 168±23.9*** | (5) | 2913±228.6* | 323±57.8** (4) | |

1) Growth rates (%)

2) mg/100 g. Body weights

3) mean±S.D.

4) No. of infant mice

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

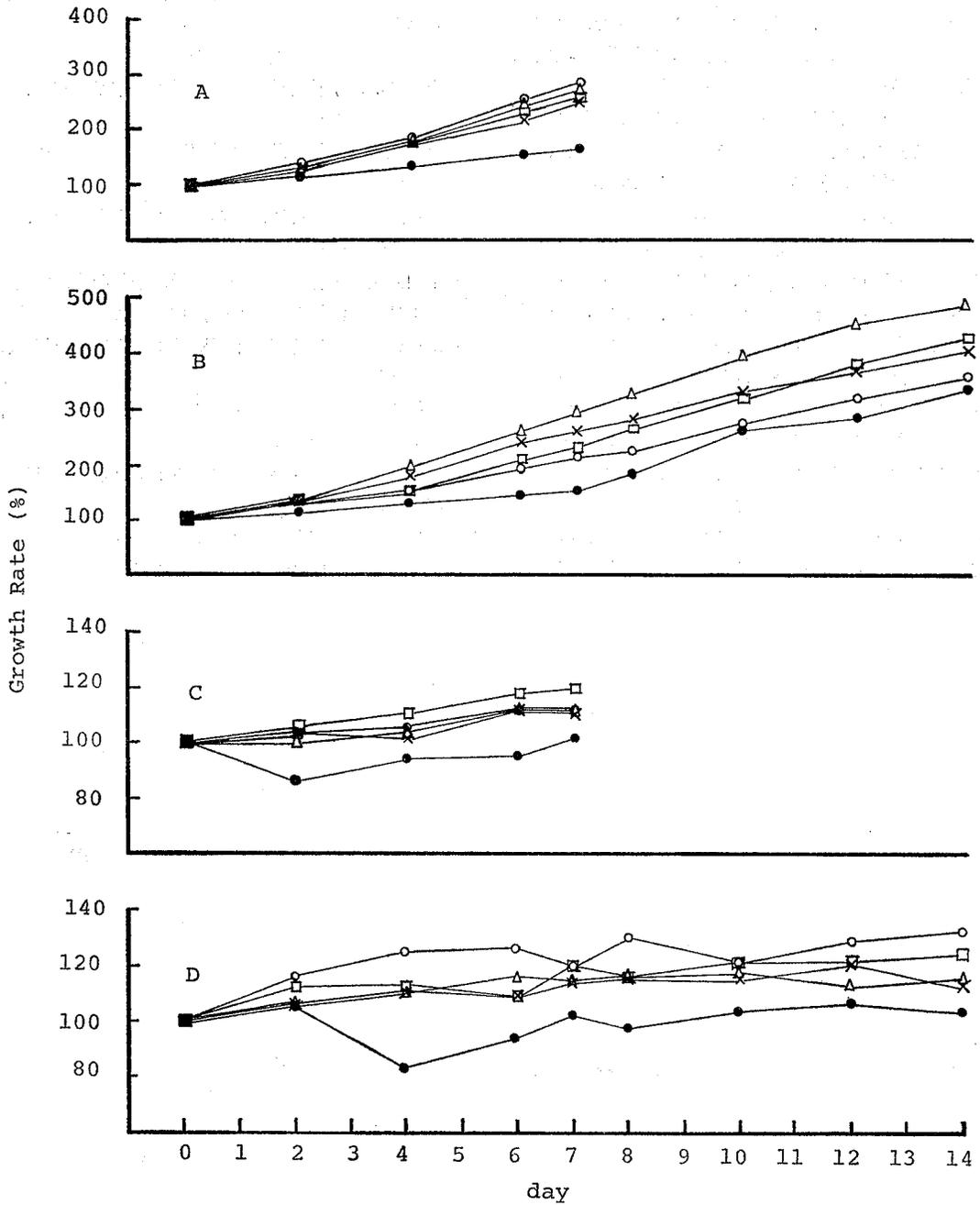


Fig. 1. Changes of Body Weights of Infant and Mother Mice
 ○ Control △ BHT 0.08% × BHT 0.25% □ BHT 0.50% ● BHT 1.00%
 A 7 days infant mice
 B 14 days infant mice
 C 7 days mother mice
 D 14 days mother mice

群, とくに7日間投与において体重増加の抑制が著しく(雌雄ともに), また, 肝臓の体重比重量も投与群は全体的に減少ないし減少傾向が認められ, 赤血球膜浸透圧抵抗の変化とを合せ考えると相関性が推定される。

これまで多くの研究者によりBHTのラットに対する肝重量増加作用は報告され, 広く知られている。また, 小林もBHTを経母乳投与により仔ラットに投与し, 仔ラットの肝臓重量の増加を報告している⁹⁾。しかし, 本実験の結果は, 仔マウスに対してはむしろ肝臓重量増加を抑制し, 赤血球膜浸透圧抵抗に対しては溶血抵抗を減少させる作用があることを示唆している。このようにBHTを経母乳により仔マウスに投与した場合, ラットとは異なった作用を示す結果を得たが, 今後①種差, ②母乳中の存在状態, ③赤血球膜浸透圧抵抗と血清中コレステロール量⁹⁾等について考慮しつつ, 今回は動物数が少なかったので今後詳細なる検討を企図してみたい。

結 論

BHTを経母乳により仔マウスに投与し, その赤血球膜浸透圧抵抗に対する影響を検討したところ, 投与開始

初期において溶血終了値が上昇し, 溶血幅が減少する傾向を認めた。

文 献

- 1) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 203, 1975
- 2) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 27-2, 53, 1976
- 3) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 28-2, 230, 1977
- 4) 市川久次, 小林博義, 中尾順子, 平賀興吾, 中川茂男: 日本血液学会誌, 41-2, 102, 1978
- 5) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 30-2, 151, 1972
- 6) 市川久次, 小林博義, 中尾順子, 中川茂男: 日本血液学会誌, 43-2, 295, 1980
- 7) 長井二三子, 鈴木英子, 中尾順子: 東京衛研年報, 27-2, 137, 1976
- 8) 小林博義: 東京衛研年報, 30-2, 5, 1980
- 9) 北島和彦: 山口医学, 23, 67, 1974

血液の保存期間延長に関する研究

長井 二三子*, 中尾 順子*, 中尾 真**

Studies on Prolongation of Preservative Period of Blood

FUMIKO NAGAI*, TOSHIKO NAKAO* and MAKOTO NAKAO**

Keywords: 保存血 preservative blood, アデニン adenine, イノシン inosine, ATP, 2,3-DPG, 浸透圧溶血抵抗 osmotic fragility, 平均赤血球容積 MCV

緒 言

血液の保存には一般には凝固阻止作用と緩衝作用をかねたクエン酸, クエン酸ソーダおよびエネルギー源としてブドウ糖を含んだ ACD 液または上記の添加物のほかにリン酸塩を含んだ CPD 液が用いられている。保存血の有効期間は 4℃ 保存で 21 日間と決められているが, この期間を過ぎると輸血後の寿命が 70% に減少してしまうからであり¹⁻³⁾, 赤血球の ATP レベルの減少^{1,4)}, 解糖速度の低下^{1,5)}, 浸透圧溶血抵抗の減弱^{1,6)}なども生じる。

血液の保存期間延長に関する研究としては Gabrio⁷⁻⁹⁾等のイノシン等のヌクレオシドを添加して保存する方法があげられるが, この方法は ATP レベルの維持にはある程度の効果を示したが, 最終目的とする輸血後寿命の改善にはいたらなかったことがのちに多くの人の追試¹⁰⁻¹⁶⁾によって証明されている。次に中尾らは ACD 血にアデニンとイノシンを同時に添加して保存することによって比較的簡単に保存期間を数週間延長できることを報告した^{6,15-18)}。すなわち 8 週間保存後も ATP 量, 浸透圧溶血抵抗が正常に保たれていること, 解糖活性が ACD 血より盛んであること, 輸血後寿命が十分長いことなどである。その後輸血後の代謝産物尿酸の出現をおさえるために少量のアデニンを添加する報告¹⁹⁾もされた。その後一時血液の凍結および解凍技術などの進歩により超低温保存により赤血球の代謝を完全に停止して保存する方法が開発されたことなどからアデニン, イノシンを添加して数週間保存期間を延長する方法の実用化については発展していないが, アデニン添加法はスウェーデン, 西独, 米国で国家的に検定を通り広く実用化されている。しかしこの方法は原理的には中尾らの言う趣意にそわず, 実験的にもアデニン, イノシン同時添加ほどの効果はなかった。また, 凍結血液は低温保存のため特別な設備を要

し, コストが高くなることなどもあり, 最近にいたって比較的簡単に保存期間を数週間延長できるアデニン, イノシンを添加する保存法の実用化を考えた。実用化に際しては添加物およびその代謝産物の尿酸の毒性が問題になるので保存後に赤血球を洗浄してこれらのものを除去しなければならない。そのためには洗浄操作に耐えられるように膜を強化する必要があった。膜を強化しかつ代謝や物理的生物的の活性に変化を生ぜしめない方法を探し, 等浸透圧下で赤血球の内と外のコロイド浸透圧を近づけることによって溶血をおさえることを目的として膜難透過物質の蔗糖を利用した。前報²⁰⁾において予備実験ではあるが血液に蔗糖を加えて保存すると赤血球の代謝その他の性状にはあまり影響を与えずに MCV が小さくなり, それに伴って膜が強化されること, また, アデニン, イノシンに加えて蔗糖を添加した血液では MCV, 浸透圧溶血抵抗の変化とともに 100 日間保存後も ATP レベルが正常の範囲にあること, 2,3-DPG 含量が相当量残存していることなどについて報告した。しかしこの保存液は CaCl₂ を含むため僅かながらフィブリンの析出が認められ, また Tris-HCl の大量使用については問題がある。そこでこれらの物質を除き, 実際に輸血用血液の保存に相当であると考えられる組成の混合液を作製して血液を保存し, 予備実験と同様なことについて検討を加えた。本報ではその結果を報告する。またウサギ血液の自家輸血による輸血後寿命の測定についても試みたが別の機会に報告する予定である。

方 法

血液は日赤血液センターより供与された赤血球濃厚液 (PC)²¹⁾を用いた。赤血球数, ヘモグロビン量, MCV, ATP, 2,3-DPG の測定は前報²⁰⁾に示した通りに行った。次に血液の保存法を示す。2mM クエン酸, 10mM

* 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

表 1. 赤血球濃厚液 (PC) および S-CPD, AIS-CPD, AS-CPD 保存血の MCV の変動

| 保存日数 保存法 | 10日 | 17日 | 33日 | 53日 | 78日 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | μ^3 | μ^3 | μ^3 | μ^3 | μ^3 |
| PC | 93 | 92.5 | 93 | 93 | — |
| S-CPD | 87 | 86 | 85 | 86 | 82.5 |
| AIS-CPD | 86 | 81 | 81 | 82 | 79 |
| AS-CPD | 87 | 86.5 | 83.5 | 84.5 | 79 |

PC: 赤血球濃厚液, S-CPD, AIS-CPD, AS-CPD の添加液は次のとおりである。S-CPD: 2mM クエン酸, 10mM クエン酸ソーダ, 4mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 15mM ブドウ糖, 250mM 蔗糖, AIS-CPD: S-CPD + 8mM アデニン + 40mM イノシン, AS-CPD: S-CPD + 0.6mM アデニン。

クエン酸ソーダ, 4mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 15mM ブドウ糖, 250mM 蔗糖液を作り S-CPD 液とした。この液に 8mM アデニン, 40mM イノシンを加えた液を AIS-CPD 液, 0.6mM アデニンを加えた液を AS-CPD 液とした。各々の液を滅菌後無菌操作で血液 10ml に対して 7.7ml 加え, 4℃無菌的に保存した。保存中は一定期間毎に浸透圧溶血抵抗, ATP 量, 2,3-DPG 量, 赤血球数, MCV, ヘモグロビン量を測定した。

結果ならびに考察

中尾らのアデニン, イノシンを添加する赤血球の保存法を実用化するには保存赤血球が洗浄に耐えられるように赤血球膜を強化する必要があると考え, 等浸透圧の蔗糖液を用いた。今回の実験では輸血用血液として実用化が可能であると考えられる保存液を使って血液の保存を試みた。クエン酸, クエン酸ソーダ, ブドウ糖, それに最近使われるようになったリン酸塩を混合した保存液 (CPD 保存液)²²⁾ を基礎とし, これにアデニン, イノシン, 蔗糖を添加して保存した。表 1 は保存日数と MCV の関係を示したものである。AIS-CPD 保存血の MCV は S-CPD および AS-CPD に比べて早い時期に小さくなる傾向にあった。最近 CPD 保存液に少量のアデニンを加える方法が用いられるようになったが, 蔗糖と共にアデニンを加えた保存を試みた。この AS-CPD の MCV は S-CPD と AIS-CPD の中間の値であった。保存日数と浸透圧溶血抵抗の変化の関係を図 1 に示した。PC の浸透圧溶血抵抗は保存中徐々に減弱するのに対して蔗糖添加保存血は徐々に増強された。また AIS-CPD は一番増強されており, 次に AS-CPD, S-CPD の順であった。図 2 は ATP 量, 図 3 は 2,3-DPG 量の変動を示したものである。AIS-CPD の ATP 量は測

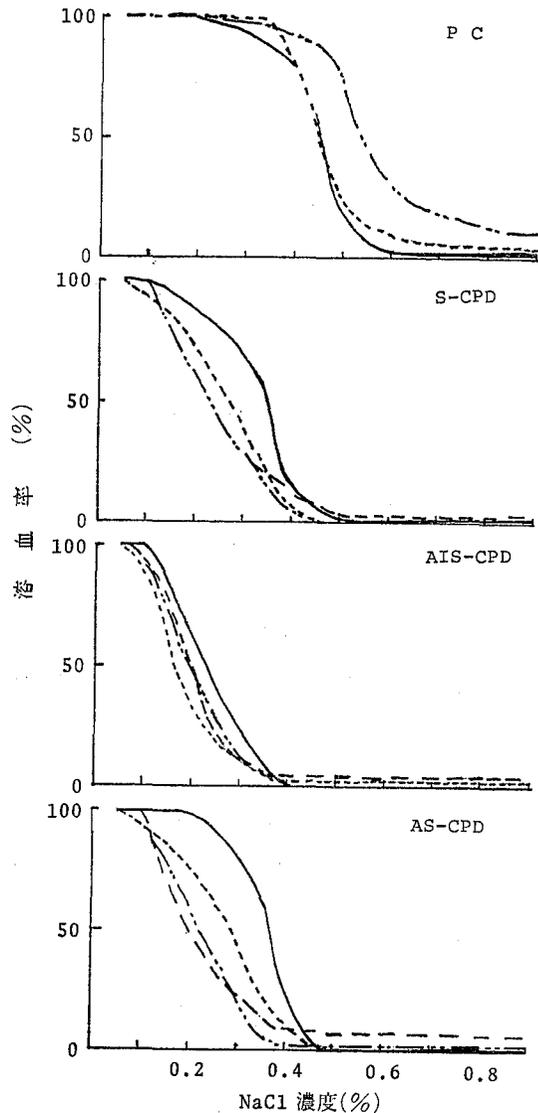


図 1. 4℃保存によるヒト赤血球浸透圧溶血抵抗の変動

— : 15日間保存, : 26日間保存, —•—•— : 45日間保存, — — — : 81日間保存

保存液および保存方法については『方法』に示した。

定を試みた60日の間, 新鮮血のレベルを保っており, 予備実験の結果と合わせるとさらに相当日数の間, 新鮮血のレベルを保つことが示唆された。AS-CPD の ATP 量は PC や S-CPD より高レベルであったが, AIS-CPD のように新鮮血の値を保つというようなことはなかった。2,3-DPG については AIS-CPD は S-CPD, PC に比べてかなり多く残っていたが, AS-CPD は S-

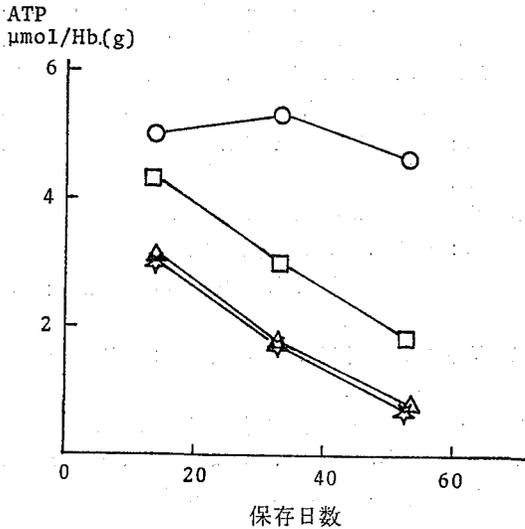


図 2. 4℃保存によるヒト血中 ATP 含量の変動
 ☆: 赤血球濃厚液(PC), △: S-CPD, ○: AIS-CPD, □: AS-CPD 保存液および保存方法については『方法』に示した。

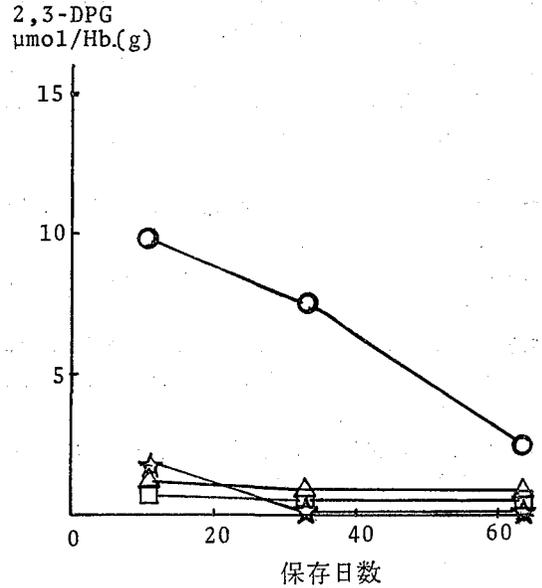


図 3. 4℃保存による血中 2,3-DPG 含量の変動
 ☆: 赤血球濃厚液(PC), △: S-CPD, ○: AIS-CPD, □: AS-CPD. 保存液および保存方法については『方法』に示した。

CPD, PC と同じように60日保存後にはほとんど消失していた。蔗糖の効果をまとめると赤血球の容積が小さくなること、浸透圧溶血抵抗が増強されること、これらの効果には時間がかかることなどがあげられる。しかし、ATP量、糖代謝、形態などにはほとんど影響しなかった。蔗糖に加えてアデニン、イノシンを添加して血液を保存することによって ATP 量、2,3-DPG 量が長期間保持されたのはアデニン、イノシンの添加によって赤血球内の代謝が ATP 拡大再生産の方向に働いたことと細胞外の蔗糖の影響で細胞膜が強化され溶血しにくくなったこと、細胞内の容積が小さくなって赤血球内の物質の濃度が上昇したことなどにより代謝に好影響をおよぼしたためであろう。蔗糖とともにアデニンのみを加えた保存は ATP 量に関してはやや効果を示したが、2,3-DPG 量に関しては全く効果がなく、酸素解離能²⁹⁾の維持ということについては疑問がある。いずれにしろアデニン、イノシン、蔗糖添加のようなめざましい結果は得られなかった。

要 約

① アデニン、イノシン、蔗糖を添加する血液の保存法は
 ① 保存中の MCV を小さくし、それに伴って赤血球膜を強化し、洗浄に耐えられる赤血球にした。

② ATP 含量は 8 週間以上の保存後も新鮮血のレベルを保持しており、2,3-DPG 含量も対照に比べると有意に高かった。

またここでは示さなかったが、ウサギの自家輸血による輸血後寿命の結果も合わせて考えると、この方法は輸血用血液の保存期間延長法として実用化が有望である。

文 献

- 1) Rapoport, S.: *J. Clin. Invest.*, 26, 591, 1947
- 2) Ross, J. F., Finch, C. A., Peacock, W. C., and Sammons, M. E.: *J. Clin. Invest.*, 26, 687, 1947
- 3) Strumia, M. M., Blake, A. D. Jr. and MacGraw, J. Jr.: *J. Clin. Invest.*, 26, 678, 1947
- 4) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M., and Yoshikawa, H.: *J. Biochem.* 48, 472, 1960
- 5) Rapoport, S.: *J. Clin. Invest.*, 26, 616, 1947
- 6) Nakao, M., Nakao, T., Arimatsu Y., and Yoshikawa, H.: *Pro. Japan. Acad.*, 36, 43, 1960
- 7) Gabrio, B. W., Donohue, D. M., and Finch, C. A.: *J. Clin. Invest.*, 34, 1509, 1955
- 8) Gabrio, B. W., Donohue, D. M., Hunnekens, F. M., and Finch, C. A.: *J. Clin. Invest.*, 35, 562, 1956
- 9) Gabrio, B. W., Donohue, D. M., Hunnekens, F. M., and Finch, C. A.: *J. Clin. Invest.*, 35, 657, 1956
- 10) Prankard, T. A.: *Brit. J. Haemat.*, 1, 406, 1955

- 11) Kashket, S., Rubinstein, D., and Denstedt, O. F. : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 827, 1957
- 12) Lange, R. D., Grosby, W. H., Donohue, D. M., Finch, C. A., Gibson, J. G. II, MacManus, T. J., and Strumia, M. M. : *J. Clin. Invest.*, **37**, 1485, 1958
- 13) Strumia, M. M., Eusebi, A. J., and Strumia, P. V. : *J. Lab. Clin. Med.*, **71**, 138, 1968
- 14) 橋 正道, 中尾 真, 吉川春寿 : 生化学, **31**, 679, 1959
- 15) Wada, T., Takaku, F., Nakao, K., Nakao, M., Nakao, T., and Yoshikawa, H. : *Pro. Japan Acad.*, **36**, 618, 1960
- 16) 中尾喜久, 和田武久, 神山照秋, 中尾 真 : 日本内科学会誌, **51**, 19, 1962
- 17) Nakao, M., Nakao, T., Yoshikawa, H., Wada, T., Takaku, H., and Nakao, K. : *Pro. 8th Congr. Int. Soc. Blood Transf.*, 455, 1962
- 18) Nakao, M., Ozaki, T., Nagano, K., and Nakao, T. : *Pro. XI Congr. Int. Soc. Blood Transf.* 746, 1966
- 19) Simon, E. R., Chapman, P. G., and Finch, C. A. : *J. Clin. Invest.* **41**, 351, 1962
- 20) 長井二三子, 中尾順子, 中尾 真 : 東京衛研年報, **30-2**, 140, 1979
- 21) 長井二三子, 中尾順子, 中尾 真 : 東京衛研年報, **29-2**, 155, 1978
- 22) 安田純一 : 血液製剤, 近代出版, 61, 1979
- 23) Benesch, R., Benesch, R. E., and Yu, C. I. : *Pro. Nat. Acad. Sci.*, **59**, 526, 1967

培養細胞を用いた変異原物質スクリーニングのための代謝活性化法の検討
既知変異原物質による染色体異常及び姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発への代謝活性化の影響

縄井 寿美子*, 吉田 誠二*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Examination of Methods by Metabolize Activation with S-9 Mix for Screening of
Mutagens on CHO-K1 Cell Line Induced Sister Chromatid Exchange (SCE) and
Chromosome Aberration by Metabolized Mutagens

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

Keywords: ジメチルニトロソアミン dimethylnitrosoamine, シクロホスファミド cyclophosphamide CHO-K1 細胞 CHO-K1 cell line, 姉妹染色分体交換 sister chromatid exchange, 染色体異常 chromosome aberration, S-9 mix

はじめに

環境中の発癌性, 変異原性物質のうちには, Benzo(a)-pyrene や dimethylnitrosoamine (DMN) 等のように, 体内で代謝活性化を受けて初めてその作用を現わす物質があることが知られている。細胞レベルでの *in vitro* の変異原物質検索のための短期スクリーニングにおいては, 近年酵素誘導したラット肝ミクロゾームフラクション (S-9mix) を薬物と同時に作用させて代謝活性化を図る方法が行われ, 従来 *in vivo* 試験によらなければ検出できなかったような物質の変異原性をも簡単に検出できるようになった。培養細胞での染色体異常および SCE 誘発の検索にも代謝活性化法は用いられているが, それらは S-9 mix および薬物の細胞への処理方法において, 浮遊させた細胞に処理させる方法^{1,2)}と, 付着した細胞にそのまま処理させる方法³⁻⁶⁾との2つに大別でき, また処理時間についてもそれぞれ異っている。そこでわれわれは, チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を用い, 代謝活性化により強力な変異原性を示す DMN および cyclophosphamide (CP) を指標として, これまでわれわれが行って来た SCE および染色体異常誘発による変異原物質のスクリーニングに代謝活性化法を導入すべく, その基礎実験として, S-9 mix および薬物の細胞への処理方法, 処理時間を検討することとした。

材料および方法

1. 試薬 F12培養液: 日水製薬, 仔牛血清: 極東製薬工業, 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BUdR): SIGMA, 33258 Hoechst: 和光純薬工業, ギムザ液: MERCK, N-Nitrosodimethylamine (DMN): 和光純薬工業,

cyclophosphamide (CP): ICN pharmaceuticals, Inc

2. 細胞および培養 チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 株を 10% 仔牛血清添加 F12 培養液を用い, 角型培養ビンにて密栓培養した。

3. S-9mix の調整 S-9 は矢作⁷⁾の方法に基づいた SD 系雄ラット (5~6 週令) に PCB (Aroclor 1254) 100mg/kg で 1 回腹腔内投与し, 酵素誘導した肝ホモジネートの S-9 フラクションを, ドライアイスアセトンで急速凍結させ, -80° で保存したものをを用いた。S-9 mix は Natarajan らの方法¹⁾に従い調整した。

4. 薬物調整および処理 DMN および CP は培養液に溶解して用いた。薬物処理は, DMN については細胞浮遊液に作用させる方法 (浮遊細胞処理法) と, 培養ビンに付着した細胞に直接処理する方法 (直接処理法) との2つを試み, また処理時間についても検討した。CP には DMN での実験の結果決定した処理方法, 処理時間を用いた。

1) 浮遊細胞処理法 石館^{8,9)} および Matsuoka²⁾ 等の方法に基づき行った。細胞播種後 48 時間培養し, 培養ビンに付着増殖した細胞を 0.25% トリプシン液で剥し, 2×10^7 /ml の細胞浮遊液 0.2ml, 薬物溶液 0.2ml, S-9 mix あるいは培養液 1ml の割にスピッツ管に加え, 37° の温浴槽に約 35° に傾けていれ, 軽く振盪しながらそれぞれ 30分, 60分, 180分間代謝活性化を行った。後, 5ml の培養液を加え, 遠沈し上清を捨てて, 先に培養液 10ml を加えアルミホイルで被っておいた培養ビンに播き, BUdR 0.5 μ g/ml を添加して 27 時間培養した。

2) 直接処理法 細胞を播種し 48 時間培養した後, 培

* 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

養液を捨て、薬物を溶かした培養液 5ml および S-9 mix または培養液 0.25ml を加え、それぞれ 30分、60分、120分、180分間培養し、培養液 3ml で洗い、培養ビンをアルミホイルで被って、BUdR 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培養液 10 ml で 27時間培養した。

5. 標本作成 培養終了 2 時間前に 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルセミドを加え、中期細胞を集めた。常法に従い、低張、固定操作を行い、火焰乾燥法で標本を作った。染色は染色体異常観察には 2% ギムザ液を用い、また SCE 観察には先に報告した方法¹⁰⁾で分染を行った。

6. 観察 染色体異常検索については 100 個の中期細胞を目安とし、異常保有細胞数および異常の種類を調べた。SCE については 30 の中期細胞を観察し、各々の細胞について SCE 数を記録した。

結 果

DMN を用いて行った浮遊細胞処理法による SCE 試験の結果を Table 1 に、染色体異常誘発試験の結果を Table 2 に示す。いずれにおいても処理時間 180 分は細胞の状態が悪く、観察が十分にできなかったため除外した。結果を SCE について見ると、S-9 mix を加えないものでは、30分、60分ともに DMN のどの用量でも対照との差は認められなかったのに対し、S-9 mix を加えたものでは、DMN 10mg で 30分処理が 6.87、60分処理が 7.80 と対照よりやや高い値を示し、それぞれ 20, 40, 80 mg と用量の増加とともに SCE の増加が認められた。しかし最高用量の 80mg では、30分、60分ともに分染されていない細胞がほとんどで、観察できたのは 9 および 4 細胞だけであり、また 5% 以下の危険率で対照との間に有意差を示したのは、この 80mg 群のみであった。処理時間については、30分より 60分の方がどの用量でも幾分高い SCE 値を示した。染色体異常誘発試験については、S-9 mix を加えていないものでは高用量でも染色体異常保有細胞の増加は見られなかったが、S-9 mix 添加のものでは、60分処理で対照の 4% (すべて gap) に対し、異常保有細胞は 20, 40, 80mg でそれぞれ 6, 11, 13.7% と増加の傾向を示し、break も 40mg で 2%, 80mg で 7% とやや増加した。しかし 30分処理では 40, 80mg で break が若干出現しているものの、異常保有細胞および break に用量-作用関係は見られなかった。

次に直接法により得られた SCE と染色体異常誘発試験の結果を Table 3 および Table 4 に示す。S-9 mix 無添加群はどの処理時間でもいずれも対照との間に有意な差は見られなかった。ただ 120分 30mg で 8.7 とやや高い値を示した。また 60分、120分の 40mg では、細胞毒性による分裂周期の遅れのため、分染像が得られなかった。

Table 1. Frequency of SCEs per Cell in CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Suspension Treatment with Various Concentrations of DMN and with or without S-9 Mix after Different Exposure Term.

| treatment term (min.) | dose (mg/ml) | No. of cells observed | SCEs/cell \pm S. E. |
|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| 30-S ¹⁾ | 80 | 9 | 18.33 \pm 2.81** |
| | 40 | 30 | 11.78 \pm 1.18 |
| | 20 | 30 | 10.93 \pm 0.78 |
| | 10 | 30 | 6.87 \pm 0.59 |
| | 1 | 30 | 5.43 \pm 0.49 |
| | — | 30 | 4.60 \pm 0.22 |
| 60-S | 80 | 4 | 20.00 \pm 0.82** |
| | 40 | 30 | 13.27 \pm 0.81 |
| | 20 | 30 | 10.97 \pm 0.68 |
| | 10 | 30 | 7.80 \pm 0.63 |
| | 1 | 30 | 5.20 \pm 0.40 |
| | — | 30 | 4.63 \pm 0.42 |
| 30 | 80 | 30 | 5.10 \pm 0.43 |
| | 40 | 30 | 5.00 \pm 0.41 |
| | 20 | 30 | 5.80 \pm 0.49 |
| | 10 | 30 | 4.97 \pm 0.40 |
| | — | 30 | 4.60 \pm 0.44 |
| 60 | 80 | 30 | 5.80 \pm 0.37 |
| | 40 | 30 | 5.00 \pm 0.39 |
| | 20 | 30 | 5.26 \pm 0.37 |
| | 10 | 30 | 5.80 \pm 0.48 |
| | — | 30 | 5.90 \pm 0.41 |

** Significantly different from control ($p < 0.01$)

1) Addition of S-9 mix

S-9 mix 添加群では、各処理時間の S-9 mix のみの対照に 4.8~7.3 とややばらつきが見られた。DMN は S-9 mix 添加で SCE の大きな増加を示し、それぞれの処理時間群とも 5% 以下の危険率で対照との間に有意差を示しているが、その用量は 30分では 30mg 以上から、60分では 20mg 以上から、120分および 180分では 5mg 以上からで、120分、180分は 5mg ですでに 1% 以下の危険率という高い有意性を示した。なお 120分、180分の 40mg では、分染像が得られなかった。染色体異常誘発試験の結果は Table 4 に示したが、30分、60分、120分は S-9 mix 添加群についてのみ、180分では S-9 mix 添加、無添加両方について調べた。30分、60分、120分では、120分 40mg で異常保有細胞出現率 31% と高かったが、30分、60分では

Table 2. Chromosome Effects of DMN on CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Suspension Treatment with or without S-9 Mix after Different Exposure Term.

| treatment term (min.) | dose (mg/ml) | No. of cells analysed | aberrant cells (%) | gap | | break | | ex. ³⁾ | ot. ⁴⁾ |
|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | | |
| 30-S ⁵⁾ | 80 | 90 | 7.8 | 3 | | 2 | | 1 | 1 |
| | 40 | 100 | 8.0 | 4 | | 3 | | | 1 |
| | 20 | 50 | 6.0 | 2 | | 1 | | | |
| | 10 | 50 | 6.0 | 3 | | 1 | | | |
| | — | 50 | 10.0 | 5 | | | | | |
| 60-S | 80 | 95 | 13.7 | 7 | 1 | 7 | | | 1 |
| | 40 | 100 | 11.0 | 7 | | 2 | 1 | | 1 |
| | 20 | 100 | 6.0 | 4 | 1 | | | | 1 |
| | 10 | 71 | 1.4 | 1 | | | | | |
| | — | 50 | 4.0 | 2 | | | | | |
| 30 | 80 | 70 | 1.4 | 1 | | | | | |
| | 40 | 100 | 4.0 | 3 | | | | | |
| | 20 | 70 | 0 | | | | | | |
| | — | 88 | 0 | | | | | | |
| 60 | 80 | 80 | 2.5 | 2 | | | | | |
| | 40 | 93 | 3.2 | | 1 | 1 | | | |
| | 20 | 74 | 4.1 | | 1 | | | | |
| | — | 82 | 1.2 | 1 | | | | | |

- 1) Aberration of chromatid type
- 2) Aberration of chromosome type
- 3) Exchange
- 4) Other aberration
- 5) Addition of S-9 mix

最高40mgでも6%, 7%という値で, この120分処理群を含めていずれの群でも明確な用量-作用関係は認められなかった. これに比べ180分処理では, 異常保有細胞数は40mgで30%という高い値を示し, また用量に伴う増加が認められ, breakについても対照で0, 5, 10mgでそれぞれ1であるのに対し, 30mgで12, 40mgで19とやはり用量に伴い急激な増加を見せた. また40mgではexchangeも9出現している.

次に以上述べたDMNでの代謝活性化の結果から, 最も適当と思われた直接処理, 180分の代謝活性化で行ったCPの実験結果をSCEについてはTable 5に, 染色体異常誘発についてはTable 6に示す. SCEについてはDMNと異り, S-9 mix 無添加群においてもわずかつつではあるが用量に伴う増加が認められ, 10mgではSCE 18.7と, 1%以下の危険率で対照4.5との間に有意差が認められたが, 20mgでは分裂像は得られなかった. S-9 mix を加えたものでは細胞への毒作用が強まって, 50 μ g では分裂像は見られず, 観察できた最大用量は実に

SCE57を記録した25 μ gで, CPのみの場合の用量の400分の1であった. また7用量間すべてに濃度によるSCEの増加が明確に現われ, 5 μ g以上から3用量で1%以下の危険率を持って対照との間に高い有意差を示した. 一方染色体異常誘発については, SCEの結果と異り, S-9mix無処理群では異常保有細胞は10, 5mgとも増加は全く見られなかったが, S-9mix 処理により, 50, 75 μ gで22%, 57%と高い増加を示した. 異常の種類についてもbreakが15%, 32%と高頻度で出現し, またexchangeも6%, 23%と高い値であった. 100 μ gでは観察できたのは3細胞のみであったが, そのいずれも異常保有細胞であった.

考 察

S-9 mix を用いた代謝活性化法のSCEおよび染色体異常誘発試験への導入は, Natarajan¹⁾およびMatsuoka²⁾, 石館^{3,4)}が浮遊細胞処理法で, またStetkaとWolff^{5,6)}およびその他の人々^{5,6)}が付着した細胞に直接処理する方法で試み, 処理時間はそれぞれ異っているが, いずれも良い結果を報告している. しかし浮遊細胞処理による

Table 3. Frequency of SCEs per Cell in CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Seat Treatment with Various Concentrations of DMN, and with or without S-9 Mix after Different Exposure Term.

| treatment term (min.) | dose (mg/ml) | No. of cells observed | SCEs \pm S. E. |
|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------------|
| 30-S ¹⁾ | 40 | 30 | 20.36 \pm 1.10* |
| | 30 | 30 | 20.13 \pm 0.98* |
| | 20 | 30 | 19.57 \pm 1.36 |
| | 10 | 30 | 17.80 \pm 1.00 |
| | 5 | 30 | 14.03 \pm 0.91 |
| | 1 | 30 | 10.20 \pm 0.55 |
| — | — | 30 | 6.40 \pm 0.51 |
| 60-S | 40 | 30 | 28.40 \pm 1.48** |
| | 30 | 30 | 29.83 \pm 1.37** |
| | 20 | 30 | 34.30 \pm 2.09* |
| | 10 | 30 | 21.00 \pm 1.54 |
| | 5 | 30 | 23.60 \pm 1.66 |
| | 1 | 30 | 9.20 \pm 0.69 |
| — | — | 30 | 5.53 \pm 0.45 |
| 120-S | 40 | — | — |
| | 30 | 30 | 30.20 \pm 1.87** |
| | 20 | 30 | 27.17 \pm 1.69* |
| | 10 | 30 | 24.90 \pm 1.43* |
| | 5 | 30 | 31.13 \pm 1.57** |
| | 1 | 30 | 21.43 \pm 1.32 |
| — | — | 30 | 7.30 \pm 0.53 |
| 180-S | 40 | — | — |
| | 30 | 30 | 31.13 \pm 1.29** |
| | 20 | 30 | 23.37 \pm 1.33* |
| | 10 | 30 | 26.77 \pm 1.72* |
| | 5 | 30 | 26.57 \pm 1.34** |
| | 1 | 30 | 14.23 \pm 1.22 |
| — | — | 30 | 9.53 \pm 0.59 |
| 30 | 40 | 30 | 6.33 \pm 0.36 |
| | 30 | 30 | 6.13 \pm 0.61 |
| | 20 | 30 | 6.77 \pm 0.49 |
| 60 | 40 | — | — |
| | 30 | 30 | 7.13 \pm 0.58 |
| | 20 | 30 | 5.53 \pm 0.46 |
| 120 | 40 | — | — |
| | 30 | 30 | 8.70 \pm 0.66 |
| | 20 | 30 | 7.03 \pm 0.51 |
| 180 | 40 | 30 | 5.20 \pm 0.40 |
| | 30 | 30 | 5.13 \pm 0.36 |
| | 20 | 30 | 5.40 \pm 0.44 |
| | — | — | 30 |

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

1) Addition of S-9 mix

180分の代謝活性化は、Matsuoka, 石館が推奨しているにもかかわらず、われわれのDMNを指標とした実験では分析不能であった。これは用いた細胞種、処理後の培養方法などの違いによるものかとも考えられる。30分、60分処理についても染色体異常誘発では、60分処理の高用量でやや増加したものの30分では特に差は見られず (Table 2)、また SCE では30分、60分ともに用量-作用関係が見られたが、有意差の見られたのは最高用量 80mg の1点のみであり、SCE 値も18, 20とそれ程高くはなかった (Table 1)のに対し、直接処理法の場合には、染色体異常誘発については、180分処理が他の30分、60分、120分処理に比べ異常細胞出現率も高く (Table 4)、Fig. 1に示したように明確な用量-作用関係を示した。SCE について見ると、30分処理はその増加のカーブもなだらかで SCE の最高値も余り高くはないが、60分、120分、180分は、1~5mg の間で急激な増加が見られ、特に120分、180分では SCE 40 以上を示す飽和と思われるような高い SCE を有する細胞の出現も認められた (Table 3)。また処理時間に比例して、より低用量から対照との間で有意差を示す傾向が見られ、これらのことを先の染色体異常での結果と考え合わせると、処理方法では直接処理、処理時間では180分を用いるのが適当であると考えた。

この条件で次に行った CP の結果も、Fig. 2に示したように SCE、染色体異常誘発の両試験とも、代謝活性化により急激な上昇カーブが認められ、強い用量-作用関係を示して満足できるものであった。また CP は S-9 mix 無添加の場合にも、SCE に関してはゆるやかではあるが用量に伴う増加が認められ、CHO 細胞での Perry¹¹⁾、Stetka³⁾らの結果と一致した。これは DMN が肝細胞によってのみ活性化されるのに対し、CHO 細胞自身がわずかながら CP を活性化できることを示すものと思われる。しかしわれわれの実験では、S-9 mix の有無により用量に約 2,000 倍の大きな開きが見られた。またわれわれの結果は、CP の SCE 誘発を調べた Stetka と Wolff³⁾の報告に比べても、S-9 mix 処理を行った場合には用量で約10倍感度が高いが、これは彼らの行った処理時間が20分と短いためかとも考えられる。DMN も CP も代謝活性化により DNA をアルキル化して変異原となるが、われわれの実験ではその強さは、染色体異常誘発では約100倍の用量差、SCE 誘発では約1000倍の用量差で CP の方が強く、また染色体異常および SCE 誘発数でも、CP の方がかなり上まわっていた。DMN に比べ CP は強力な変異原であるといえる。

ところで、薬物の用量に関して SCE と染色体異常誘発とを比べてみると、CP では染色体異常の増加がみら

Table 4. Chromosomal Effects of DMN on CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Seat Treatment with or without S-9 Mix after Different Exposure Term.

| treatment term (min.) | dose (mg/ml) | No. of cells analysed | aberrant cells (%) | gap | | break | | ex. ³⁾ | ot. ⁴⁾ |
|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | | |
| 30-S ⁵⁾ | 40 | 100 | 6.0 | 1 | | 3 | | 1 | 1 |
| | 30 | 100 | 5.0 | | | 2 | | 1 | 2 |
| | 20 | 100 | 2.0 | | | 1 | | | |
| | — | 59 | 1.7 | 1 | | | | | |
| 60-S | 40 | 100 | 7.0 | 4 | | 1 | | 1 | 1 |
| | 30 | 100 | 3.0 | | | 2 | | 1 | |
| | 20 | 100 | 6.0 | 1 | | 1 | | 3 | 1 |
| | 10 | 100 | 6.0 | 2 | | 1 | | 1 | 2 |
| | — | 50 | 2.0 | | | 1 | | | |
| 120-S | 40 | 29 | 31.0 | 4 | | 3 | | 4 | |
| | 30 | 100 | 6.0 | | | 2 | | 4 | 6 |
| | 20 | 39 | 10.3 | 3 | | 1 | | | |
| | 10 | 111 | 8.1 | 3 | | 1 | | 4 | 1 |
| | — | 100 | 4.0 | 2 | | 2 | | | |
| 180-S | 40 | 100 | 30.0 | 8 | | 19 | | 9 | 1 |
| | 30 | 100 | 22.0 | 13 | | 12 | | | |
| | 20 | 100 | 17.0 | 11 | 5 | | | | 1 |
| | 10 | 100 | 11.0 | 8 | | 1 | | 1 | |
| | 5 | 96 | 10.4 | 8 | 1 | 1 | | | |
| | 1 | 75 | 5.3 | 3 | | | | 1 | |
| | — | 100 | 5.0 | 4 | 1 | | | | |
| 180 | 40 | 80 | 2.5 | 2 | | | | | |
| | 30 | 100 | 4.0 | 4 | | | | | |
| | 20 | 100 | 3.0 | 3 | | | | | |
| | — | 100 | 3.0 | 3 | | | | | |

- 1) Aberration of chromatid type
- 2) Aberration of chromosome type
- 3) Exchange
- 4) Other aberration
- 5) Addition of S-9 mix

れるより約10分の1の用量で SCE の有意な上昇が見られ、また DMN では交換型の異常の誘発に着目すると、SCE はこの約8分の1の用量である。SCE に関するこれまでの報告¹²⁾でも、SCE 試験は染色体異常誘発試験より薬物の低い濃度で検出できるといわれ、このことは SCE 検索の利点の1つとされているが、今回の直接法による180分の代謝活性化試験でも、結果は良く符合した。またこの方法は浮遊細胞処理法に比べて簡便で、時間も短縮できるので、この点もスクリーニングとして用いる場合には大きな利点となると考えられる。しかし代

謝活性化に要する時間と活性化の程度¹³⁾、および活性化された物質の保持時間は薬物により異なり、たとえば2-AAFでは、SCE に関して、代謝活性化時間30分では全く増加は見られないが、2.5時間で2倍、5時間で3倍と、処理時間の長さに応じて増加することが報告⁴⁾されており、彼らはその中で、陰性の結果を得たものについては処理時間をさらに延ばして再検査することが必要であると述べている。この代謝活性化時間の問題の他にも、S-9 を作成する際の誘導物質および用いる動物の種類も、薬物および用いる細胞の種類によりその代謝活性

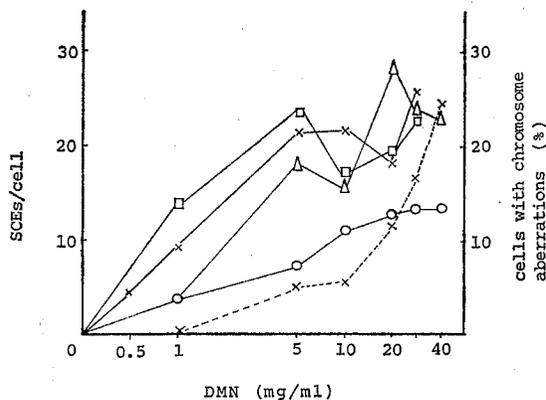


Fig. 1. Increase of SCEs and chromosomal aberrations in CHO-K1 cells treated with S-9 mix and various concentrations of DMN for different term, 30(O), 60(Δ), 120(□), 180(x) min. Expression time is 27hr. These figures are subtracted each control's from practical's. Break line is percent of cells with chromosomal aberrations.

化に大きな影響を及ぼす要因となり得ることが考えられ、代謝活性化法を用いたスクリーニングの際には十分注意すべき要素である。われわれは今回の実験から、*in vitro*での染色体異常誘発および SCE 試験に、代謝活性化法として180分間の代謝活性化時間による直接処理を導入することを決めたが、陰性の結果を得たものにつ

Table 5. Frequency of SCEs per Cell in CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Seat Treatment with Various Concentrations of CP and with or without S-9 mix for 180 Min.

| treatment term (min.) | dose (μg/ml) ^o (mg/ml) | No. of cells observed | SCEs/cell ± S. E. |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------|
| | 50° | — | |
| | 25° | 30 | 56.97 ± 1.61** |
| | 10° | 30 | 33.50 ± 1.38** |
| | 5° | 30 | 23.17 ± 1.08** |
| 180-S ¹⁾ | 2.5° | 30 | 13.73 ± 0.81 |
| | 1.0° | 30 | 9.37 ± 0.63 |
| | 0.5° | 30 | 7.03 ± 0.48 |
| | 0.25° | 30 | 6.20 ± 0.45 |
| | — | 30 | 5.57 ± 0.48 |
| | 20 | — | |
| | 10 | 30 | 18.73 ± 0.87** |
| | 5 | 30 | 12.80 ± 0.69 |
| 180 | 2.5 | 30 | 10.10 ± 0.63 |
| | 1.0 | 30 | 6.60 ± 0.53 |
| | 0.5 | 30 | 5.50 ± 0.45 |
| | — | 30 | 4.53 ± 0.45 |

** Significantly different from control (p < 0.01)

1) Addition of S-9 mix

Table 6. Chromosome Effects of CP on CHO-K1 Cell Line by Method of Cell Seat Treatment with or without S-9 Mix for 180 Min.

| treatment term (min.) | dose (μg/ml)* (mg/ml) | No. of cells analysed | aberrant cells (%) | gap | | break | | ex. ³⁾ | ot. ⁴⁾ |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | | |
| | 100* | 3 | 100.0 | 2 | | | | | 1 |
| | 75* | 63 | 57.1 | 4 | | 20 | | 15 | 14 |
| | 50* | 100 | 22.0 | 4 | 1 | 15 | | 6 | 2 |
| 180-S ⁵⁾ | 25* | 100 | 3.0 | 1 | 1 | 2 | | 1 | |
| | 10* | 85 | 2.4 | 2 | | | | | |
| | 5* | 95 | 4.2 | 4 | | | | | |
| | — | 100 | 3.0 | 1 | 1 | 2 | | | |
| | 10 | 100 | 1.0 | 1 | 1 | | | | |
| 180 | 5 | 100 | 4.0 | 4 | 3 | 1 | | | |
| | — | 72 | 2.8 | 2 | 2 | | | | |

1) Aberration of chromatid type

2) Aberration of chromosome type

3) Exchange

4) Other aberration

5) Addition of S-9 mix

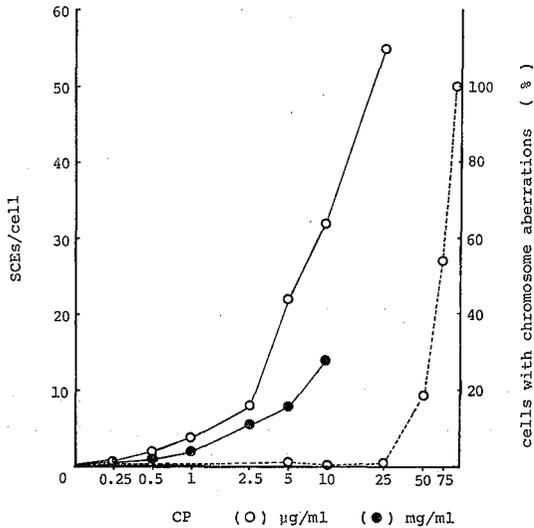


Fig. 2. Increase of SCEs and chromosomal aberrations in CHO-K1 cells treated with various concentrations of CP, and with (○) or without (●) S-9 mix for 180min. Break line is percent of cells with chromosomal aberrations. These figures are subtracted each control's from practical's.

いては、以上述べたようなことをふまえて、さらに実験を重ねる必要があると思われる。

要 旨

培養細胞を用いた *in vitro* での発癌性および変異原性物質のスクリーニングにおいて、S-9 mix を用いて薬物の代謝活性化を図ることは、薬物の変異原性を考える上でより正確な知見をもたらすものである。われわれは、これまで行って来た CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* での SCE および染色体異常誘発物質の検索のスクリーニングに、S-9 mix による代謝活性化法を導入すべく、代

謝活性化により強い変異原性を示す発癌物質、DMN を指標として、細胞への薬物および S-9 mix の処理方法、処理時間を検討した結果、培養ビンに附着した細胞に直接 S-9 mix および薬物を 180 分間作用させる方法が最も適当であると結論した。このことは、この条件で行った代謝活性化により同様に強い変異原性を示すことが知られている CP の実験で、顕著な染色体異常および SCE の誘発が、強い用量-作用関係を伴って現われたことから確かめられた。

文 献

- 1) Natarajon, A. T., Tates, A. D., and Van Buul, P. P. W. : *Mutation Res.*, 37, 83, 1976
- 2) Matsuoka, A., Hayashi, M., and Ishidate, M. : *Mutatron Res.*, 66, 277, 1979
- 3) Stetka, D. G., and Wolff, S. : *Mutation Res.*, 41, 343, 1976
- 4) Stetka, D. G., and Wolff, S. : *Mutation Res.*, 58, 103, 1978
- 5) Weinstein, D., Katy, M. L., and Kazmar, S. : *Mutation Res.*, 46, 297, 1977
- 6) DE Raat, W. K. : *Mutation Res.*, 66, 253, 1979
- 7) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, 20, 16, 1975
- 8) 石館 基 : 変異原と毒性, 4, 64, 1978
- 9) 石館 基 : 組織培養, 5, 115, 1979
- 10) 縄井寿美子, 吉田誠二, 益淵正典 : 東京衛研年報, 29-2, 167, 1978
- 11) Perry, P., and Evans, H. J. : *Nature*, 258, 121, 1975
- 12) Kato, H., and Shimada, H. : *Mutation Res.*, 28, 459, 1975
- 13) White, A. D., and Heskete, L. C. : *Mutation Res.*, 69, 283, 1980

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 投与ラットの肝 9,000×g 上清 (S-9)
分画による突然変異物質の代謝活性化について

小嶋昭江*, 藤田博*, 平賀興吾*

Mutagenic Activation of Mutagenic Chemicals by Liver 9,000×g Supernatant Fractions
from Butylated Hydroxytoluene (BHT)-treated Rats

AKIE KOJIMA*, HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: 突然変異性 mutagenicity, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene

緒言

肝臓の肥大および薬物代謝酵素の誘導を起すフェノールビタール (PB) や、ポリ塩化ビフェニール (PCB) を投与したラットの肝ホモジネート 9,000×g 上清 (S-9) 分画が、投与しないラットの S-9 に比べて、*in vitro* における突然変異物質の突然変異性を増強することを Ames¹⁾ が報告して以来、この方法は突然変異性の検出試験に広く用いられている。

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) はラットに組織障害を伴わない PB 型の肝重量の増加^{2,3)}、および aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 などの薬物代謝酵素を誘導する^{4,5)}ことが知られている。また、BHT, ブチルヒドロキシアニソール, エトキシキンなどの酸化防止剤が発がん物質による発がんを抑制するという報告もある⁶⁻⁸⁾。一方、BHT の *in vitro* における作用として、突然変異物質の突然変異性を減少^{9,10)}、あるいは増加¹¹⁾させるという報告がある。

これらのことから、われわれは突然変異試験の S-9 を調製する動物に投与する薬物代謝酵素誘導剤として、BHT を使用する可能性を検討するために、BHT を投与したラットの S-9 を調製し、この S-9 を用いて 2-アセチルアミノフルオレン、2-アミノアントラセン、ベンツ (a)ピレン、ジメチルニトロサミンの突然変異性を試験し、PB あるいは PCB を投与したラットの S-9 を用いた場合の突然変異性と比較した。

実験材料および方法

1. 試薬

BHT (ジブチルヒドロキシトルエン, 和光純薬), AAF (2-アセチルアミノフルオレン, 和光純薬), AA (2-アミノアントラセン, 和光純薬), B(a)P (ベンツ (a)ピレン, 和光純薬), DMN (ジメチルニトロサミン,

和光純薬), PB (フェノールビタール, 吉田製薬), PCB (アロクロール 1254, 三菱モンサント化成), シクロヘキセンオキサイド (Aldrich Chemical Co.), DMSO (ジメチルスルホキシド, 和光純薬)

2. 動物および投与方法

JCL-SD 系雄ラットを 4 週令で購入し、1 週間、予備飼育後実験に供した。飼料は日本クレア製固型飼料 CE-2 を与えた。

BHT はコーンオイル溶液として、400mg, 800mg/kg B. W. を 2 日間隔で 2 回経口投与し、投与後 2 日目に屠殺して肝臓を摘出した。PB は 0.1% 水溶液を屠殺前の 7 日間飲水の代りに投与し、PCB はコーンオイル溶液として、500mg/kg B. W. を腹腔内に投与し、投与後 5 日目に肝臓を摘出した。なお、対照として無処理群とコーンオイル投与群をもうけた。

3. S-9 分画および S-9 Mix の調製

矢作の方法¹²⁾に従って行った。

4. 突然変異性試験

AAF, AA, B(a)P は DMSO に溶解し、*Salmonella typhimurium* TA98 株を用いて Ames の方法^{1,13)}に 20 分間の前培養を加えた変法¹²⁾で突然変異性を試験した。DMN は滅菌生理食塩水に溶解し、TA100 株を用いて同様の方法で試験を行った。結果は各々プレート 3 枚の平均値で示した。

5. シクロヘキセンオキサイドの添加

epoxide hydratase の阻害剤であるシクロヘキセンオキサイドは DMSO に溶解し、その 0.05ml を B(a)P の試験系に加えた。この実験のプレート当りの S-9 量は 150 μ l とした。

結果および考察

Table 1 に各投与群の屠殺時の体重および肝重量を示

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Body and Liver Weights of Rats Treated with BHT, PB and PCB

| Treatment | No. of rats | Body weight (g) | Liver weight | |
|--------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|
| | | | g | g/100g B. W. |
| BHT (400 mg) | 2 | 185 | 12.4 | 6.7 |
| BHT (800 mg) | 2 | 167 | 11.5 | 6.9 |
| PB | 7 | 178 | 11.9 | 6.7 |
| PCB | 4 | 174 | 13.3 | 7.6 |
| Corn oil | 2 | 182 | 9.8 | 5.4 |
| Control | 2 | 181 | 8.6 | 4.8 |

した。体重 100g 当りの肝重量は無処理群の 4.8g, コーンオイル投与群の 5.4g に比較して, BHT 400mg/kg B. W. 投与群 (BHT 400mg 群) は 6.7g, BHT 800mg/kg B. W. 投与群 (BHT 800mg 群) は 6.9g と増加傾向を示した。この値は PCB 投与群の 7.6g よりは低いが, PB 投与群 (6.7g) とほぼ同じであった。

Fig. 1 に各 S-9 Mix 中の S-9 の量を変えて行った 4 種類の突然変異物質の突然変異試験の結果を示した。AAF の場合, 無処理群の S-9 に比較して, コーンオイルおよび PCB 投与群の S-9 による突然変異性は低く, PB 投与 S-9 による突然変異性はいずれの S-9 量においても非常に高かった。BHT 400mg 群の S-9 による突然変異性は無処理群の場合よりやや低く, BHT 800mg 群による突然変異性は無処理群および BHT 400mg 群の場合より高かった。

AA の突然変異性はコーンオイル, BHT 400mg 群お

よび無処理群の S-9 を使用した時に高く, PCB 投与群の S-9 を使用した場合にはいずれの S-9 量においても非常に低かった。PB 群の S-9 による突然変異性は S-9 の量が増えるに従って減少し, BHT 800mg 群の S-9 による突然変異性も PB の場合よりは高いが S-9 の増加に伴って減少傾向を示した。

B(a)P の場合は PCB 投与群の S-9 による突然変異性が S-9 150 μ l で高く, PB 群の S-9 の場合は全体に低かった。BHT 両群の S-9 による突然変異性はいずれの S-9 量においても, コーンオイルおよび無処理群の場合より低かった。

DMN の突然変異性は PB および PCB 投与群の S-9 を使用した場合にコーンオイルおよび無処理群の S-9 を使用した場合より高かった。BHT 両群の S-9 による突然変異性は両対照群の S-9 と比較してほとんど差は認められなかった。

BHT 投与群の S-9 は 4 種の突然変異物質に対して PB 投与群の S-9 とほぼ同じ型の突然変異性を示したが, AAF と DMN に対しては PB 投与群の S-9 より低い突然変異性を示した。また, PCB 投与群の S-9 を使用した場合に高かった B(a)P に対する突然変異性も BHT 投与群の S-9 を使用した場合低かった。これらの結果から, 従来の薬物代謝酵素誘導剤の代りに突然変異試験に BHT を投与したラットの S-9 を用いる著しい利点は見い出されなかった。

BHT, プチルヒドロキシアニソールおよびエトキシキンなどの酸化防止剤が肝ミクロソームの epoxide hydra-

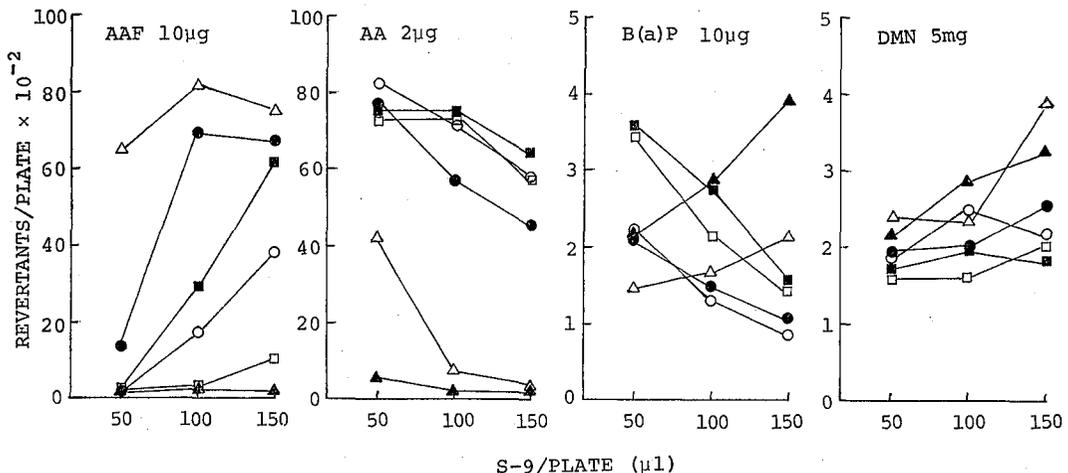


Fig. 1. Mutagenic Activation of AAF, AA, B(a)P and DMN by the S-9 Fractions from BHT 400 mg (O)-, BHT 800mg (●)-, PB (Δ)-, PCB (▲)- and Corn Oil (□)-treated Rats and Untreated (■) Rats.

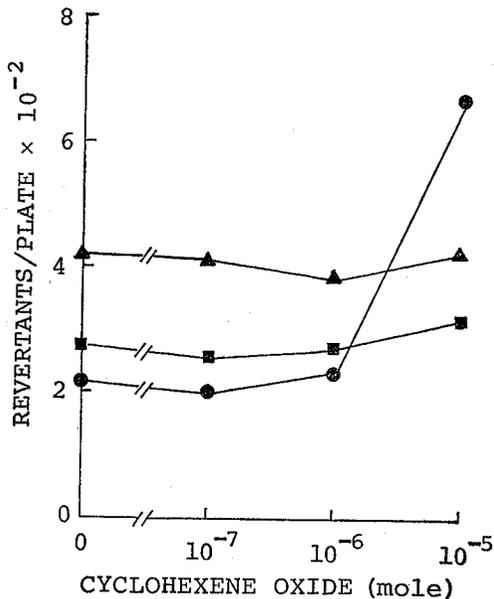


Fig. 2. Effect of Cyclohexene Oxide on the B(a)P Mutagenicity Mediated by the S-9 Fractions from BHT 800 mg (●)- and PCB (▲)-treated Rats and Untreated (■) Rats.

tase を誘導するという報告がある^{14,15}). epoxide hydratase はエポキシドを加水分解する酵素で, B(a)P hydroxylase とともに B(a)P の代謝に関与する¹⁶)といわれている. 精製したこの酵素を加えることにより B(a)P の突然変異性は減少する¹⁷). そこで B(a)P の突然変異試験系に epoxide hydratase の阻害剤であるシクロヘキセンオキシドを加える実験を行った (Fig. 2). シクロヘキセンオキシドを 10^{-5} mole 加えた場合, 無処理および PCB 投与群の S-9 による B(a)P の突然変異性はほとんど変化がなかったが, BHT 800mg 投与群の S-9 による突然変異性は 3 倍に増加した. この結果により BHT 投与群の S-9 による B(a)P の突然変異性の低下は BHT 投与により epoxide hydratase が誘導されたためと考えられる. シクロヘキセンオキシドを添加した BHT 投与ラットの S-9 を代謝活性化に用いれば, B(a)P の突然変異性は PCB 投与 S-9 を用いた場合より高い値が得られる.

要 旨

ジブチルヒドロキシルエノン (BHT) 400mg, 800mg/kg B. W. を投与した SD 系ラットの肝ホモジネート 9,000×g 上清 (S-9) 分画を用いて, 2-アセチルアミノ

フルオレン, 2-アミノアントラセン, ベンツ(a)ピレン, ジメチルニトロサミンの *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 株に対する突然変異性を調べた. 現在使用されているフェノバルビタールあるいはポリ塩化ビフェニールを使用した場合と比較して, 高い突然変異性は得られなかった.

文 献

- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2281, 1973
- Deichman, W. B., Clemmer, J. J., Rokoczy, R., and Bianchine, J.: *Archs. ind. Hyg.*, **11**, 93, 1955
- Brown, W. D., Johnson, A. R., and O'Halloran, M. W.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **37**, 533, 1959
- Gilbert, D., and Golberg, L.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 417, 1965
- 有吉敏彦, 高島英伍: 食衛誌, **14**, 75, 1973
- Speier, J. L., Lam, L. K. T., and Wattenberg, L. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 605, 1978
- Wattenberg, L. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 1005, 1975
- Weisburger, E. K., Evarts, R. P., and Wenk, M. L.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **15**, 139, 1977
- Rahimutula, A. D., Zachariah, R. K., and O'Brien, P. J.: *Biochem. J.*, **164**, 473, 1977
- Calle, L. M., Sullivan, P. D., Nettleman, M. D., Ocasio, I. J., Blazyk, J., and Jollick, J.: *B. B. R. C.*, **85**, 351, 1978
- 藤田博, 平賀興吾: 東京衛研年報, **29-2**, 40, 1978
- 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178, 1975
- Ames, B. N., McCann, J. C., and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347, 1975
- Kahl, R., and Netter, K. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 473, 1977
- Cha, Y. N., and Martz, F.: *Fed. Proc.*, **37**, 596, 1978
- Jerina, D. M., and Daly, J. W.: *Science*, **185**, 573, 1974
- Oesch, F., Bentley, P., and Glatt, H. R.: *Int. J. Cancer*, **18**, 448, 1976

培養細胞による変異原スクリーニングテスト

佐々木 美枝子*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

In vitro Screening Test of Mutagens on Cultured Cells

MIEKO SASAKI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Screening of mutagenic substances, more rapid and at lower cost, is one of the important problems in toxicological research. The assay of mutagenicity using cultured mammalian cells has been recognized of its usefulness recently and many more data are being presented on many substances.

Mutagenicity of acetaminophen (one of potent antipyretic and analgesic substance, abbreviated as AAP) and methylnitrosoguanidine (potent mutagen, abbreviated as MNNG) was assayed *in vitro* by the method using cultured chinese hamster cell; CHO-K1 cell. The mutated cells were selected by culturing in ouabain-containing medium, in which only ouabain-resistant mutant cells were able to grow. AAP was not estimated as a mutagenic substance from this experimental method. However, there remains a possibility that AAP can enhance the mutagenic potentiality of MNNG. Whether this phenomenon can be certified experimentally, and how it will be affected in the other test systems, microsome- or cell-mediated mutagenic assay are now under investigation.

Keywords : Mutagenicity, Acetaminophen, CHO-K1 cell

緒 言

環境汚染物質・医薬品等の変異原性・発癌性の有無の検討は、これらの物質の毒性試験のなかでもかなり重要な位置を占めている。この問題に関する最終的な結論は実験動物を用いた変異原性試験・発癌性試験によって得られており、現時点では動物実験に代りうる方法は開発されていない。しかしながら近年これら環境汚染物質の加速度的な増加がみられるのに対し、動物実験を行うためには、時間・労力・費用などの点で大きな制限があるために、短時間・低労力・低費用で結論の得られる各種スクリーニング法が開発されている。培養細胞を用いた変異原性試験も、毒性物質のスクリーニング法として近年さかんに用いられるようになった方法の一つである¹⁾。これは試験管内で培養細胞に被検物質を処理し、この処理により生じてくる突然変異細胞を選択培養液により分離し、その出現頻度を指標として変異原性を検索する方法である。

当研究部では変異原性物質の検出のために、微生物による変異原性試験および培養細胞の染色体異常の検索が *in vitro* の方法として現在用いられているが、さらに培養細胞による変異原性試験を合わせて行うために予備実験をすすめてきた。未だ各種検体をスクリーニングする

ための統一されたテストシステムの確立には到っていないが、鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェンの変異原性検索を目的としていくつかの実験を行なったのでその結果を報告する。

材料および方法

細胞は当研究部において継代維持されている CHO-K1 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来株化細胞) を用いた。細胞は、Ham F-12 培養液 (ニッスイ製品) に 10% に仔牛胎児血清 (GIBCO 製品, 以下 FCS と略す) を加えた培養液で培養した。

変異原性検出のためには、培養瓶のガラス表面に生育した細胞を 0.25% トリプシン溶液によって剥離し、ピペッティングにより浮遊細胞の状態にして、約 10^5 の細胞を 4 ml の培養液を入れた滅菌プラスチックシャーレ (FALCON-3002, 60mm×15mm) に播種し、37°C, 5% CO₂ に調整した細胞培養器中で一夜培養した。16~24 時間後に被検物質を培養液に加え、2 時間静置培養したのち、培養液を捨てて細胞を洗浄し、再び正常培養液を入れて 2 日間培養した。その後、再び細胞をトリプシンによって剥離し、 10^5 ~ 10^6 細胞を選択培養液を入れたプラスチックシャーレに再播種し、14 日間培養したのち、生じた薬剤耐性コロニーをメイグリュンワルド染色液で固

* 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

定染色しコロニー数を調べた。同時に100個の細胞を正常培養液を入れたシャーレに播種し、7日後にコロニーを数え、細胞生存率(コロニー形成率)を求めた。コロニーの計数には1群5~10シャーレを用い、その平均値を出した。コロニー形成率および突然変異率は次式により求めた。

$$\text{コロニー形成率} = \frac{\text{正常培養液中でのコロニー数}}{\text{最初にまいた細胞数}}$$

$$\text{突然変異率} = \frac{\text{選択培養液中でのコロニー数}}{\text{最初にまいた細胞数}}$$

$$+ \text{コロニー形成率}$$

被検物質としてはアセトアミノフェン(厚生省がん研研究班試料として国立衛試より分与された精製試料。AAPと略記する)、陽性コントロールとしてメチルニトロトロソグアニジン(Aldrich12994-1, MNNGと略す)を用いた。また選択培養液としては、ウアバイン(SIG-MA0-3125, Ouaと略す)を1mM濃度に添加した培養液を用いた^{2,3)}。

結 果

AAPおよびMNNGの各濃度で2時間処理したCHO-K1細胞におけるコロニー形成率およびOua耐性変異細胞出現頻度をTable 1に示す。変異原物質として知られるMNNGで処理した場合には、5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度でOua耐性細胞が出現した。Oua耐性細胞の自然発現率は $5 \times 10^{-8}/\text{cell/generation}$ とされているので⁴⁾、表に示した変異細胞は明らかにMNNG処理によって生じたものである。MNNG 5 $\mu\text{g/ml}$ で処理した細胞の突然変異率が最も高いが、この濃度では細胞毒性のために細胞の生存率が非常に低下するので、陽性コントロールとしてのMNNG濃度は0.5~1 $\mu\text{g/ml}$ が最適と思われた。AAPでは、500, 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ AAPで処理した細胞のいずれにもOua耐性細胞は生じなかった。したがってこの処理方法で判断するかぎり、AAPにはCHO-K1細胞に対する変異原性はないものと思われた。またAAPとMNNGとで同時に処理した場合にも、MNNG単独処理の場合と変異細胞出現に大差は認められなかった。しかしながら、AAPをMNNGと同時に加えた場合、コロニーの大きさなどの点で何らかの相乗効果があるようにも思われたので、MNNG濃度を1 $\mu\text{g/ml}$ と一定にして、AAPで前処理した細胞のMNNG感受性とAAP・MNNG同時処理細胞の感受性を検討した。

100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ のAAPを加えた培養液で4時間細胞を培養したのち細胞を洗浄し、新たに加えた培養液にMNNG 1 $\mu\text{g/ml}$ を加え、細胞生存率と変異細胞出

Table 1. Colony Efficiency and Appearance of Ouabain-resistant Cells of AAP and/or MNNG Treated CHO-K1 Cell

| Treatment*1 | Colony Efficiency*2 | Oua. resist. cells/10 ⁵ |
|--------------------------|---------------------|------------------------------------|
| AAP 500 $\mu\text{g/ml}$ | 41.2% | 0 |
| 100 | 68.7 | 0 |
| 50 | 72.6 | 0 |
| 10 | 62.6 | 0 |
| 0 | 100.0 | 0 |
| MNNG 5 $\mu\text{g/ml}$ | 1.7 | 149.4 |
| 1 | 23.0 | 13.1 |
| 0.5 | 35.8 | 19.7 |
| 0.1 | 109.2 | 0.5 |
| 0 | 100.0 | 0 |
| AAP 50+MNNG 0.5 | 33.0 | 12.8 |
| AAP 10+MNNG 0.1 | 79.1 | 3.1 |

*1 Cells were treated by test chemicals for 2 hr.

*2 Colony efficiency of untreated control was regarded as 100.0%, and those of treated groups were shown as relative percentages.

現頻度をみた。同時にAAP単独処理、AAP・MNNG同時処理、MNNG単独処理の場合を比較した(Table 2)。この実験でも、AAP単独ではOua耐性細胞の出現はみられなかったが、AAPで前もって処理した細胞では、AAP 100 $\mu\text{g/ml}$ で前処理した場合にMNNGによるOua耐性細胞の出現頻度が特に高かった。また前処理しない細胞にAAPとMNNGを同時に投与した場合にも、AAP 100 $\mu\text{g/ml}$ +MNNG 1 $\mu\text{g/ml}$ で高い変異細胞出現がみられた。この点を確かめるために、直径100 mmの大型シャーレを用い、Oua(+)培養液に播種する細胞数をシャーレあたり 2×10^6 に増して再実験を試みたが(Table 2, Exp. 2) Oua耐性細胞の出現頻度は相対的にはExp. 1よりも減少し、変異細胞コロニー数にもはっきりした差は認められなかった。従ってこの実験からはAAPにMNNGによる変異細胞の発現を促進する効果があるか否か、実験的検証は得られなかった。

考 察

AAPの変異原性について、吉田らは同じくCHO-K1細胞を用いて染色体異常誘発性について検索し、AAPで処理した細胞に染色体異常が増加することを報告している⁵⁾。しかしながら、Oua耐性細胞の出現を指標とするかぎりにおいては、AAPにはCHO-K1細胞に対する変異原性は認められなかった。また、AAPで前処理した細胞、あるいはAAPとMNNGで同時処理した

Table 2. Effect of AAP-Pretreatment on Mutagenicity of MNNG

| Pretreatment*1 | Treatment*2 | Colony Efficiency | Oua. resist. cells/10 ⁵ |
|----------------|-------------------------|-------------------|------------------------------------|
| Exp. 1 | | | |
| AAP 100 µg/ml | MNNG 1 µg/ml | 19.2% | 11.8 |
| 50 | 1 | 24.4 | 4.4 |
| 0 | 1 | 35.3 | 7.2 |
| 100 | — | 85.3 | 0 |
| 50 | — | 93.1 | 0 |
| 0 | — | 99.3 | 0 |
| — | MNNG 1 µg+AAP 100 µg/ml | 23.5 | 15.3 |
| — | MNNG 1 µg+AAP 50 µg/ml | 31.1 | 6.4 |
| — | AAP 100 µg/ml | 89.3 | 0 |
| — | AAP 50 | 94.0 | 0 |
| Exp. 2 | | | Oua. resist. cells/dish*3 |
| AAP 100 µg/ml | MNNG 1 µg/ml | NT | 9.33/1.85×10 ⁶ |
| 50 | 1 | NT | 7.00/1.80×10 ⁶ |
| 10 | 1 | NT | 13.75/1.88×10 ⁶ |
| 0 | 1 | NT | 11.67/1.79×10 ⁶ |
| 0 | 0 | 88.3% | 0/2.99×10 ⁶ |
| — | MNNG 1 µg+AAP 100 µg/ml | NT | 10.33/2.05×10 ⁶ |

*1 Cells were pretreated by AAP for 4hr, just before MNNG treatment.

*2 Cells were treated by test chemical(s) for 2hr.

*3 Mean values from 3 dishes of Oua(+) culture.

細胞では、MNNG の変異原性が増強される傾向がみられるが、実験的な確証をもつにはいたっていない。この点に関しては統計処理が可能なデータを得るよう検討をすすめている。

今回の実験では細胞を直接被検物質で処理する方法を用い(直接法)、薬物代謝酵素を含む肝ミクロゾーム分画と被検物質とで細胞を処理する方法(ミクロゾーム経由突然変異試験)や、フィーダー細胞を用いて代謝活性化を行わせる方法(細胞経由試験)は行っていないが、直接法では変異原性が認められない物質でも代謝活性化酵素の存在する実験条件では変異原性が発現される可能性がある。AAP についても、これらの方法を併用してさらに詳しくその変異原性の有無を検討すべく、目下実験をすすめている段階である。

要 約

チャイニーズハムスター由来の培養細胞である CHO-K1 細胞を用いて変異原性試験を行なった。強力な変異原であることが知られている MNNG, および鎮痛解熱剤

AAP を被検物質とし、ウアバイン耐性細胞の出現頻度を指標としてこれらの物質の変異原性を調べた。MNNG には 0.5~1µg/ml の濃度で十分な変異原性が認められたが、AAP には、この方法では、CHO-K1 細胞に対する変異原性は認められなかった。しかしながら AAP には MNNG の活性を増強させる効果があるかもしれないことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 黒田行昭: 組織培養, 5 (5), 137, 1979
- 2) Arlett, C. F., Turnbull, D., et al: *Mutation Res.*, 33, 261, 1975
- 3) Trosko, J. E., Chang, C. C., Yotti, L. P., and Chu, E. H. Y: *Cancer Res.*, 37, 188, 1977
- 4) Cole, J., Arlett, C. F., and Green, M. H. L.: *Mutation Res.*, 41, 377, 1976
- 5) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 102, 1980

アセトアミノフェンおよびその関連物質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 Acetaminophen and Its Related Compounds

SEIJI YOSHIDA*, SUMIKO NAWAI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: アセトアミノフェン Acetaminophen, フェナセチン Phenacetin, アセトアニリド Acetanilide, *in vitro* and *in vivo*, 染色体分析 Chromosome Analysis

緒 言

アニリン誘導体の解熱・鎮痛薬 Acetaminophen (以下 AAP と略す) の変異原性については厚生省が特別研究班¹⁾により種々の試験系で行なわれており, その中で *in vitro* および *in vivo* 染色体試験の結果のみが陽性と報告されているが, より詳細な検討を同属の Phenacetin (以下 APT と略す) と Acetanilide (以下 AAL と略す) についても併せて行なった.

材料および方法

1. 薬物: Acetaminophen (以下 AAP と略す) は日本薬局方のもを用いた. Phenacetin (以下 APT と略す), 和光純薬製の Lot No. Alk 0969を用いた. Acetanilide (以下 AAL と略す), 和光純薬製の Lot No. WAG 0620-2 を用いた.

2. 細胞および培養: 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 培養液に仔牛血清10%および抗生物質として penicillin (100 μ /ml) と streptomycin (100 μ g/ml) を加えたものを用いた.

3. *in vitro* 試験 (1): 細胞を播種, 培養2日目に薬物を Dimethylsulfoxide (以下 DMSO と略す) に溶解し培養液に添加した. このようにして作製した各濃度の薬物添加培養液で6および24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²⁾に準じた. なお, 陽性対照には既知 Clastgen として知られている 4-Nitroquinoline-N-Oxide (以下 4NQO と略す) を用いた.

4. *in vitro* 試験 (2): 特に Sister Chromatid Exchange (以下 SCE と略す) の誘発の有無について.

細胞播種後2日目に薬物添加培養液を添加し, 培養瓶をアルミホイルで被い, 5-Bromodeoxyuridine (以下

BudR と略す) を 0.5 μ g/ml の割合で添加し27時間培養した. 標本の作製および染色と結果の判定は縄井らの前報³⁾に準じた. 先の *in vitro* 試験 (1) 同様に 4NQO を陽性対照として用いた.

5. *in vitro* 試験 (3): 特に代謝活性化について.

代謝活性化には PCB により薬物代謝酵素系を誘導した SD 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 (以下 S9 と略す) を用いた. また, S9mix (NADP-産生系と肝ホモジネートの S9を合わせたもの) の調整は Natarajan ら⁴⁾の方法に従った.

細胞播種後2日目に検体添加培養液と先のようにして調整した S9mix とを同時に添加し培養を行なった. 3時間後に先の混和液をすて, 培養液で細胞面を1回洗浄し培養瓶をアルミホイルで被い, BudR 添加培養液を添加し27時間培養を行なった. なお, この実験には代謝活性化を受けることにより染色体異常および SCE 誘発が見られる Dimethylnitrosamine (以下 DMN と略す) を陽性対照物質として用いた. この DMN の代謝活性化による染色体異常および SCE の誘発の詳細は別に報告⁵⁾する. 染色体および SCE 標本の作製と結果の判定は前報^{2), 3)}に準じた.

6. *in vivo* 試験 (1): 日本チャールスリバー株式会社育生の ICR マウス 雄を5週令で購入し, 8週令の時点で以下の実験に供した.

各薬物を DMSO で溶解し各種濃度の薬物溶液を作製した. 投与容量は全て10ml/kg とし腹腔内注射および胃ゾンデにより経口投与を行なった. なお, 対照は DMSO を同容量腹腔内注射および経口投与した. 投与後6, 24ないし48時間目に各群4匹の動物を放血により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.

* 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. Chromosome Effects of AAP, APT, AAL and 4NQO on CHO-K1 Cells

| Duration of Treatments (hr.) | Chemicals | Treatment Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ex. ³⁾ | Di. ⁴⁾ |
|------------------------------|-----------|--|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|-------|----|-------------------|-------------------|
| | | | | | C1 ¹⁾ | C2 ²⁾ | C1 | C2 | | |
| 6 | AAP | 100 | 62 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 70 | 100 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 50 | 106 | 8 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | 10 | 110 | 6 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | APT | 100 | 138 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 50 | 167 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 10 | 135 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 100 | 7 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | AAL | 50 | 108 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | 10 | 100 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 0 | 121 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 100 | 24 ⁶⁾ | 10 | 5 | 4 | 0 | 3 | 1 |
| 24 | AAP | 70 | 104 | 18 ⁶⁾ | 4 | 3 | 7 | 1 | 1 | 1 |
| | | 50 | 100 | 5 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| | | 25 | 100 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 88 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | APT | 50 | 103 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 10 | 139 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 100 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 50 | 116 | 6 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | AAL | 10 | 130 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 0.5 | 100 | 29 ⁶⁾ | 4 | 0 | 15 | 0 | 31 | 0 |
| | | 0.25 | 100 | 16 ⁶⁾ | 4 | 0 | 5 | 0 | 13 | 0 |
| | | 0.10 | 100 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 |
| 4NQO | 0 | 166 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

1) Chromatid Type 2) Chromosome Type 3) Exchange

4) Dicentric 5) Ring 6) p Significantly Higher than 0.05

7. *in vivo* 試験 (2): 日本チャールスリバー株式会社育生の ICR マウス雄と当部で繁殖を行なったチャイニーズハムスター雄を用いた。マウスは4週令で購入, 5週令の時点で以下の実験に供した。なお, 飼育は両 *in vivo* 実験とも温度 $25 \pm 1^\circ$, 湿度55%, 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。また, 飼料は日本クレア株式会社製固型飼料 CE-2 を水とともに自由に与えた。

AAP を日本クレア株式会社製飼料 CE-2 に種々の割合で添加し自由摂取させた。1, 6ないし7週目に各群4~5匹の動物を放血により屠殺後, 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 (1)

染色体分析の結果を Table 1 に示す。6時間処理群では AAP, APT, AAL のいずれも染色体の構造および数的異常は無処理コントロールに比し有意な増加を認

めなかった。しかし, 24時間処理において AAP の100および70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で Gap, Break, Exchange の構造異常が有意な増加を示し, さらに無処理ではほとんど出現しない Dicentric Chromosome や Ring Chromosome なども見られた。50および25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で Gap や Break が見られているが, いずれも有意な増加とはなっていない。また, 数的異常は100, 70, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理のいずれも有意な増加を示していないことから, AAP は本実験条件下では切断型と交換型異常を含む染色体の構造異常を誘発することが認められた。一方, APT と AAL は, いずれの処理量においても染色体の構造および数的異常の有意な増加を示していないことから本実験条件下では染色体異常誘発性は無いものと思える。なお, 陽性対照として用いた 4NQO は切断型および交換型異常を高頻度で誘発した。

2) *in vitro* 試験 (2)

結果を Table 2 に示す。AAP の400, 300, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理のいずれも染色体の分染像がほとんど見られず, SCE

Table 2. Frequency of SCEs in CHO-K1 Treated with AAP, APT, AAL and 4NQO

| Chemicals | Treatment Dose ($\mu\text{g/ml}$) | No. of Cells Analysed | SCE \pm SE |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| AAP | 200 | ND | |
| | 150 | 50 | 9.00 \pm 0.59 |
| | 100 | 50 | 7.22 \pm 0.44 |
| | 75 | 50 | 4.90 \pm 0.34 |
| | 50 | 50 | 5.34 \pm 0.38 |
| | 25 | 50 | 5.02 \pm 0.33 |
| | 10 | 50 | 4.98 \pm 0.34 |
| APT | 400 | 50 | 4.86 \pm 0.30 |
| | 200 | 50 | 5.06 \pm 0.33 |
| | 100 | 50 | 5.24 \pm 0.32 |
| | 75 | 50 | 4.34 \pm 0.29 |
| | 50 | 50 | 4.54 \pm 0.28 |
| | 25 | 50 | 4.56 \pm 0.33 |
| AAL | 400 | 50 | 5.30 \pm 0.31 |
| | 200 | 50 | 4.86 \pm 0.31 |
| | 100 | 50 | 4.78 \pm 0.32 |
| | 75 | 50 | 4.32 \pm 0.28 |
| | 50 | 50 | 4.58 \pm 0.29 |
| | 25 | 50 | 4.74 \pm 0.32 |
| 4NQO | 0.5 | ND | |
| | 0.25 | 30 | 36.30 \pm 1.67 ¹⁾ |
| | 0.10 | 30 | 32.23 \pm 2.70 ¹⁾ |
| | 0.05 | 30 | 19.53 \pm 1.86 |
| | 0.01 | 30 | 8.37 \pm 0.51 |
| | 0 | 50 | 4.44 \pm 0.35 |

1) p Significantly Higher than 0.05

の分析は不可能であった。この AAP に比し APT および AAL の両者は最高濃度である400 $\mu\text{g/ml}$ 処理においてもよく分染されていた。このことは、AAP は強い分裂阻害作用を有するものと思える。

AAP の150~25 $\mu\text{g/ml}$ 処理の SCE 誘発頻度は無処理コントロールに比しいずれも有意な増加を認めていないが、100および150 $\mu\text{g/ml}$ 処理の SCE 誘発頻度は7.22, 9.00とやや高い値で APT と AAL が全く増加の傾向を示さなかったのに対し弱いながら用量一相関があるようにも考えられる。また、陽性対照として用いた4NQO は用量一相関のある増加を示しており強い SCE 誘発性を示した。この4NQO の結果は Popescu ら⁶⁾の報告とよく一致していた。

3) *in vitro* 試験 (3)

染色体分析の結果を Table 3 に示す。AAP の1600~200 $\mu\text{g/ml}$ のいずれの処理量においても代謝活性化の有無にかかわらず染色体の構造および数異常の有意な増加は認められなかった。また、APT と AAL も AAP

Table 4. Frequency of SCEs in CHO-K1 Treated with AAP, APT, AAL and DMN

| Chemicals | Treatment Dose ($\mu\text{g/ml}$) | No. of Cells Analysed | SCE \pm SE | |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------|
| AAP | + ¹⁾ 1600 | 50 | 5.96 \pm 0.42 | |
| | - ²⁾ 1600 | 50 | 5.10 \pm 0.32 | |
| | + 800 | 50 | 5.24 \pm 0.32 | |
| | - 800 | 50 | 7.06 \pm 1.14 | |
| | + 400 | 50 | 7.68 \pm 0.70 | |
| | - 400 | 50 | 7.40 \pm 1.04 | |
| | + 200 | 50 | 7.16 \pm 0.34 | |
| | - 200 | 50 | 5.64 \pm 0.34 | |
| | + 100 | 50 | 6.72 \pm 0.37 | |
| | - 100 | 50 | 4.56 \pm 0.29 | |
| | + 50 | 50 | 6.00 \pm 0.35 | |
| | - 50 | 50 | 4.84 \pm 0.33 | |
| | + 1600 | ND | | |
| | - 1600 | ND | | |
| APT | + 1200 | 50 | 5.58 \pm 0.38 | |
| | - 1200 | 50 | 5.14 \pm 0.31 | |
| | + 800 | 50 | 6.48 \pm 0.37 | |
| | - 800 | 50 | 5.42 \pm 0.32 | |
| | + 400 | 50 | 6.26 \pm 0.37 | |
| | - 400 | 50 | 4.88 \pm 0.34 | |
| | + 200 | 47 | 4.94 \pm 0.36 | |
| | - 200 | 50 | 5.22 \pm 0.30 | |
| | + 100 | 50 | 5.04 \pm 0.32 | |
| | - 100 | 50 | 4.16 \pm 0.24 | |
| | + 50 | 50 | 6.26 \pm 0.40 | |
| | - 50 | 50 | 5.62 \pm 0.32 | |
| | + 1600 | 50 | 5.50 \pm 0.36 | |
| | - 1600 | 50 | 5.08 \pm 0.36 | |
| AAL | + 800 | 50 | 6.62 \pm 0.35 | |
| | - 800 | 50 | 5.10 \pm 0.30 | |
| | + 400 | 50 | 5.44 \pm 0.33 | |
| | - 400 | 50 | 5.68 \pm 0.37 | |
| | + 200 | 50 | 5.38 \pm 0.37 | |
| | - 200 | 50 | 5.12 \pm 0.31 | |
| | + 100 | 50 | 6.40 \pm 0.30 | |
| | - 100 | 50 | 4.58 \pm 0.29 | |
| | + 50 | 50 | 5.38 \pm 0.28 | |
| | - 50 | 50 | 4.66 \pm 0.27 | |
| | + 20000 | 30 | 30.57 \pm 1.47 ²⁾ | |
| | + 5000 | 30 | 24.10 \pm 1.68 ²⁾ | |
| | DMN | + 1000 | 30 | 12.90 \pm 0.96 |
| | | + 500 | 30 | 5.57 \pm 0.48 |
| + 0 | | 50 | 5.74 \pm 0.32 | |
| - 0 | | 50 | 5.08 \pm 0.34 | |

1) S9 presence 2) S9 absence

と同様の結果であり染色体異常誘発は見られなかった。一方、代謝活性化試験の陽性対照に用いた DMN は S9 mix 存在下において強い染色体異常を誘発した。次に、SCE 誘発試験の結果を Table 4 に示す。AAP, APT

Table 3. Chromosome Effects of AAP, APT, AAL and DMN on CHO-K1 Cells after Short Term Exposures with and without Metabolic Activations

| Chemicals | Treatment Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ex ¹⁾ | Di ²⁾ | Ma ³⁾ | Pu ⁴⁾ | Ot ⁵⁾ |
|-----------|--|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | | C1 | C2 | C1 | C2 | | | | | |
| AAP | + ⁶⁾ 1600 | 87 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | - ⁷⁾ 1600 | 82 | 6 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | + 1200 | 92 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 1200 | 90 | 5 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | + 800 | 100 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 800 | 47 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 400 | 100 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 400 | 100 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 200 | 100 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 200 | 100 | 4 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| APT | + 1600 | 150 | 7 | 4 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | - 1600 | 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 1200 | 99 | 5 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | - 1200 | 92 | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 800 | 108 | 6 | 2 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 800 | 92 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 400 | 100 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 400 | 100 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 200 | 100 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 200 | 100 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AAL | + 1600 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 1600 | 93 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 1200 | ND | | | | | | | | | | |
| | - 1200 | 93 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + 800 | 100 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DMN | + 40000 | 50 | 29 ⁸⁾ | 7 | 0 | 11 | 0 | 6 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| | + 20000 | 100 | 18 ⁸⁾ | 8 | 0 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DMSO | + 0 | 100 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 0 | 95 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| None | + 0 | 100 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - 0 | 72 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

1) Exchange 2) Dicentric 3) Cell with Multiple Aberrations 4) Pulverization 5) Others
6) S9 Presence 7) S9 Absence 8) p Significantly Higher than 0.05

および AAL のいずれも代謝活性化の有無にかかわらず SCE の誘発は見られなかった。

4) *in vivo* 試験 (1)

AAP の結果を Table 5 に示す。経口投与群の 6 時間処理のいずれにおいても染色体異常保有細胞の有意な増加は見られなかったのに対し腹腔内投与の 600mg/kg 処理において異常細胞の有意な増加が認められた。また、1200mg/kg も有意な差とはなっていないが増加の傾向が見られた。24 時間処理においても同様の結果であり、腹腔内投与の 600 および 300mg/kg のいずれも異常細胞の有意な増加が見られた。また、経口投与群も用量一相関

がうかがわれる増加を示していた。腹腔内投与群の誘発する異常は 48 時間処理においても見られ 600mg/kg 処理で異常細胞の有意な増加が認められた。一方、経口投与群の 1200 および 600mg/kg 処理のいずれも異常細胞の有意な増加は見られなかった。次に、APT の結果を Table 6 に示す。腹腔内投与群の 6 時間処理で 1200 および 600mg/kg の用量で異常細胞の有意な増加が見られた。同様に 24 および 48 時間においても有意な増加を示した。一方、経口投与群の 6、24 および 48 時間処理のいずれも有意な増加は見られなかった。次に、AAL の結果を Table 7 に示す。経口投与および腹腔内投与群の 6 ないし 24 時間処

Table 5. Chromosome Effects of AAP on CD-1 Mice

| Duration of Treatment (hr.) | Route of Administered | Treatment Dose (mg/kg) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ri. ¹⁾ | Ot. ²⁾ |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|-------------------|-------------------|
| | | | | | C1 | C2 | C1 | C2 | | |
| 6 | PO | 1800 | 200 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 104 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 200 | 6 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | | 600 | 101 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 300 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | PO | 1800 | 200 | 11 ³⁾ | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 150 | 9 ³⁾ | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | 600 | 151 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | ND | | | | | | | |
| | | 600 | 100 | 8 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | PO | 1800 | ND | | | | | | | |
| | | 1200 | 237 | 8 | 2 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| | | 600 | 151 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 600 | 292 | 12 ³⁾ | 9 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| | | 300 | 183 | 6 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | PO | 0 | 100 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | ip | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

1) Ring 2) Others 3) p Significantly Higher than 0.05

Table 6. Chromosome Effects of APT on CD-1 Mice

| Duration of Treatment (hr.) | Route of Administered | Treatment Dose (mg/kg) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ri. | Ot. |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|-----|-----|
| | | | | | C1 | C2 | C1 | C2 | | |
| 6 | PO | 1800 | 200 | 5 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 183 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 152 | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | 600 | 180 | 9 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 300 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | PO | 1800 | 200 | 6 | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 100 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 200 | 10 ¹⁾ | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| | | 600 | 200 | 16 ¹⁾ | 7 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | | 300 | 124 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | PO | 1800 | 180 | 5 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 200 | 12 ¹⁾ | 1 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 150 | 11 ¹⁾ | 2 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | | 600 | 200 | 14 ¹⁾ | 0 | 0 | 13 | 0 | 1 | 0 |
| | | 300 | 200 | 10 ¹⁾ | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | PO | 0 | 100 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ip | | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

1) p Significantly Higher than 0.05

理のいずれにおいても異常細胞の有意な増加は認められなかった。しかし、腹腔内投与群の48時間処理において、有意な増加とはなっていないが、用量-相関のうか

がわれる増加を示した。

5) *in vivo* 試験 (2)

結果を Table 8 に示す。1週間摂取群のみマウスとチ

Table 7. Chromosome Effects of AAL on CD-1 Mice

| Duration of Treatment (hr.) | Route of Administered | Treatment Dose (mg/kg) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ri. | Ot. |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|-----|-----|
| | | | | | C1 | C2 | C1 | C2 | | |
| 6 | PO | 1800 | 200 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | | 1200 | 200 | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 600 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 200 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | 600 | 200 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 300 | 200 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | PO | 1800 | 200 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1200 | 150 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | 600 | 200 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | ip | 1200 | 200 | 9 | 4 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | | 600 | 200 | 7 | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 |
| | | 300 | 200 | 5 | 3 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| PO | 0 | 200 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| ip | 0 | 150 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Table 8. Chromosome Effects of AAP on Mice and Chinese Hamster

| Duration of Treatment (W) | Animals | Treatment Dose (%) | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | Gap | | Break | | Ot. |
|---------------------------|---------|--------------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|-----|
| | | | | | C1 | C2 | C1 | C2 | |
| 1 | Mo. | 2.5 | ND | | | | | | |
| | Ch. | 2.5 | ND | | | | | | |
| | Mo. | 1.3 | 193 | 16 | 4 | 0 | 12 | 0 | 0 |
| | Ch. | 1.3 | 150 | 10 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | Mo. | 0.90 | 166 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ch. | 0.90 | 150 | 6 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Mo. | 0.65 | 150 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| | Ch. | 0.65 | 74 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mo. | 0 | 100 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Ch. | 0 | 100 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Mo. | 2.5 | 150 | 13 ¹⁾ | 7 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | Mo. | 1.25 | 121 | 5 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | Mo. | 0.62 | 100 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Mo. | 0 | 100 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Mo. | 2.5 | 150 | 11 ¹⁾ | 4 | 0 | 7 | 0 | 0 |
| | Mo. | 1.25 | 150 | 10 ¹⁾ | 3 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| | Mo. | 0.62 | 150 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mo. | 0 | 100 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

1) p Significantly Higher than 0.05

チャイニーズハムスターを用い、2および7週間摂取群はマウスだけを用いた。1.3%群のマウスおよびチャイニーズハムスターに有意ではないが異常細胞がコントロールに比し増加を示した。染色体異常誘発については2種の差は見られないが、誘発された異常細胞は、マウスではGapおよびBreakを示し、チャイニーズハムスターはGapのみであった。また、2週間摂取の2.5%および7

週間摂取の2.5%ないし1.25%で異常細胞の有意な増加が見られた。

AAP, APT および AAL の *in vitro* における染色体異常誘発の有無は石館ら¹⁾の報告によると AAP のみが陽性となっており、APT は偽陽性、AAL は陰性の結果を示しており、我々の結果とよく一致していた。近年、培養細胞に S9 を導入²⁾、*in vitro* 代謝活性化試

験として盛んに用いられている。この方法を用いることによりDMNのように代謝活性化されることにより強い染色体異常誘発を示す物質の検出が可能となった。松岡ら⁹⁾は、この代謝活性化試験を用いて先のAPTを試験し、Gap, Break, Translocationなどの異常を含む構造異常を誘発することを報告している。従来、薬物を直接培養細胞に処理し、その染色体異常を検出(いわゆる直接試験)するのみであったが、今回、この代謝活性化試験を現在用いているCHO-K1細胞で検討を行ない十分に使用可能であることを確認した⁵⁾。このことにより、APTの代謝活性化試験を行なったが、先述の松岡らが報告する所の染色体異常誘発は見られなかった。このことについては今後さらに検討を続けたい。一方、*in vivo*の結果でAAPの染色体異常誘発性が見られ、この結果は杉山ら¹⁾の報告とよく一致していた。また、AAP添加飼料摂取動物の染色体分析の結果で陽性を示していることに對し、経口1回投与では染色体異常が見られなかった。このことは、AAPの暴露量によるものと考えられた。また、APTについても異常細胞の誘発頻度が用量一相関の見られる増加を示していることから、APTの染色体異常誘発性が認められた。一方、AALは*in vitro*および*in vivo*試験のいずれにおいても異常細胞の増加を認めていない。このことにより、AALの染色体異常誘発は無いものと考えられた。

ま と め

Acetaminophen (AAP), Phenacetin (APT), Acetanilide (AAL)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。

1. *in vitro*試験(CHO-K1細胞を用いた直接試験) AAPのみが陽性であり、APTとAALは陰性であった。

2. *in vitro* SCE (Sister Chromatid Exchange) 誘発試験

AAP, APT, AALのいずれも陰性であった。

3. *in vitro* 代謝活性化試験

AAP, APT, AALのいずれも染色体異常およびSCE誘発は陰性であった。

4. *in vivo* 試験(マウスを用いた経口および腹腔内1回投与試験)

AAPおよびAPTの陽性を認めた。AALは陰性であった。

5. *in vivo* 試験(AAP添加飼料によるマウスおよびチャイニーズハムスターの染色体試験)

AAPの陽性を認めた。

文 献

- 1) Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare, 1976
- 2) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 48, 1979
- 3) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 51, 1979
- 4) Natarajan, A. P., Tates, A. D., and Vogel, N. D.: *Mutation Res.*, 37, 83, 1976
- 5) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 89, 1980
- 6) Popescu, N. C., Turnbull, D., and Dipaolo, J. A.: *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 59, No. 1, July 1977
- 7) Ishidate, M. Jr., and Odashima, S.: *Mutation Res.*, 48, 337, 1977
- 8) Weinstein, D. Katz, L. M., and Kazmer, S.: *Mutation Res.*, 46, 297, 1977
- 9) Matsuoka, A., Hayashi, M., and Ishidate, M. Jr.: *Mutation Res.*, 66, 277, 1979

LAS によるマウス抗体産生の抑制について

佐々木 美枝子*, 中尾 順子*

Immunosuppressive Effect of LAS-treated Antigen on Mice

MIEKO SASAKI* and TOSHIKO NAKAO*

The effect of LAS (linear alkylbenzene sulfonate) on antibody production was examined with mice immunized with SRBC (sheep red blood cell). Animals, which were treated with LAS one day before or after SRBC injection, did not show any difference in antibody production, that was assayed by the titration of serum immunoglobulin or by counting of the hemolytic plaque forming cells (PFC) of the spleen, from the control animals immunized with SRBC alone. On the other hand, animals that were simultaneously administered with SRBC and LAS showed marked decrease in both humoral anti-SRBC antibody titer and PFC production. Serum IgG level of mice injected with SRBC-LAS did not show any response even at the secondary and tertiary antibody responses, while in such mice, IgG production was enhanced after stimulation with SRBC alone.

LAS, as a surfactant, causes hemolysis of the erythrocyte. But antibody production of animals immunized with SRBC hemolyzed with distilled water was not suppressed as greatly as LAS-treated SRBC. It is suggested that LAS modifies antigenicity of SRBC, probably some surface marker will be digested partially by LAS, but it may be that the immunological memory for IgG production remains intact.

Keywords : LAS, Mice immunized with SRBC, Suppression of IgG production

緒 言

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸塩 (Linear Alkylbenzene Sulfonate, 以下LAS と略す) の毒性については当研究部においてこれまで種々の実験がなされ、低濃度の LAS にはほとんど毒性はないとの結論が得られている¹⁻³⁾。我々は LAS 毒性試験の一環としてその免疫反応に対する影響について調べた。実験系としては、マウスに対するヒツジ赤血球 (sheep red blood cell, 以下SRBC と略す) 免疫系を用いた。LAS を抗原投与前後に投与した場合には抗 SRBC 抗体の産生には何ら変化はみられず、抗原と同時に投与した場合のみ抗体産生の抑制がおこなることが予備実験により判明したので、SRBC と LAS を同時投与した場合の抗 SRBC 抗体産生の経時的变化を中心に実験を行なった。この結果、LAS による抗体産生の抑制は抗原である SRBC の抗原性が LAS によって修飾されるためであろうとの結論が得られた。またこの実験系でみられた抗体産生の抑制は免疫動物の免疫記憶能には影響しないことが推察された。この現象の作用機作についてはさらに検討が必要であるが、抗体産生機序の解明や SRBC の抗原性の検索

のための有効な実験系となりうるかも知れない。

材料および方法

実験動物としては自家繁殖した ICR マウス、8週令および16~20週令の雌を用いた。

予備実験として、LAS を抗原と同時にあるいは抗原投与前後に投与した場合の抗体産生を比較した。抗原としては PBS (リン酸緩衝生理食塩水) に10%に懸濁した SRBC (日生研製) を用いた。この10% SRBC 0.1 ml を腹腔内注射してマウスを免疫し、さらに1週間後に追加免疫を行った。LAS (花王アトラス KK, Lot No. 141) は0.4%溶液とし、その0.1ml を抗原と同時に、あるいは抗原投与前の1日前、1日後に腹腔内注射した。LAS に対するコントロールとしては PBS を用い、対照動物には LAS の代りに PBS 0.1ml を注射した。この実験には16~20週令のマウスを用い、1群4匹とした。初回免疫後4日目に半数のマウスを屠殺して血清抗体価と脾臓の抗体産生細胞数を調べ、14日目に全てのマウスを屠殺して血清抗体価のみを調べた。

抗原 SRBC と LAS を同時投与した場合についてさらに詳しく検討した。8週令の ICR マウス35匹を用い

* 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. Schedule for Immunization

| Code | 1st Ag (0 wk) | 2nd Ag (1 wk) | 3rd Ag (5 wk) | 4th Ag (7 wk) |
|------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| AA | SRBC-LAS | SRBC-LAS | SRBC-LAS | SRBC |
| AC | SRBC-LAS | SRBC | SRBC | SRBC |
| BB | SRBC-DDW | SRBC-DDW | SRBC-DDW | SRBC |
| BC | SRBC-DDW | SRBC | SRBC | SRBC |
| CA | SRBC | SRBC-LAS | SRBC-LAS | SRBC |
| CB | SRBC | SRBC-DDW | SRBC-DDW | SRBC |
| CC | SRBC | SRBC | SRBC | SRBC |

1群5匹づつ7群に分け、Table 1に示した免疫スケジュールに従って免疫を行った。抗原としては10%SRBCと0.4% LAS (抗原A), SRBCと再蒸留水 (抗原B), SRBCとPBS (抗原C)を各々等量混合し4℃に1夜静置したのちよく攪拌し、その0.2mlをマウスに腹腔内注射した。初回免疫後1週, 5週, 7週目に追加免疫を行った。採血は初回免疫後1, 2, 3, 5, 7, 8週目に行なった。1~7週目まではマウスの尾を鋭利なカミソリで軽く傷つけることにより部分採血をした。血液はヘマトクリット管(ガラス毛细管)にとり、採血後ただちにヘマトクリット遠心器により遠心し、血清部分のみを管内に封じ、抗体価判定まで4℃に保存した。8週目は心臓穿刺により全採血を行なった。

血清抗体価はヒツジ赤血球凝集反応をマイクロタイトレーション法により行なって判定した。マイクロプレート上で0.025mlの血清をダイリューターを用いて2倍段階希釈し、10%SRBC 0.025mlを各ホールに加え、攪拌したのち室温に数時間静置し、赤血球の凝集の有無を判定した。判定は-, 土, +, 卍, 卍の5段階に記載し、卍以上の凝集価を示した希釈倍率をもってその血清の抗体価とした。2メルカプトエタノール(2MEと略す)耐性抗体価の判定には、血清を0.1Mの2MEを含む希釈液で段階希釈し、室温に30分静置したのち10%SRBC 0.02mlを加え、同様に判定した。

脾臓の抗体産生数はカニングム法による直接ブランク数によって算定した。

結 果

SRBC免疫とLAS投与の経時的関係を見るために行なった予備実験の結果をTable 2およびFig. 1に示す。Fig. 1は各群のマウス血清中の抗SRBC抗体価の変化を、Table 2は脾臓の抗体産生細胞数を示したものである。動物数が各群4匹と少ないために個体間のばらつきが大きい。この実験によりSRBCとLASを同時に投与した場合のみ抗体産生の抑制がみられることが判明した。LASをSRBC投与の1日前、あるいは1日

Table 2. Direct PFC of Spleens from Mice Immunized with SRBC, and Effect of LAS-treatment

| | PFC/spleen | PFC/10 ⁶ cells |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| SRBC+LAS | 43.8-180×10 ² | 7.8-12.5×10 |
| SRBC | 39.6-270×10 ² | 2.6-15.3×10 ² |
| LAS | 1 - 9×10 ² | 0.3- 1.4×10 |
| PBS | 2.5-4.5×10 ² | 0.6- 0.7×10 |
| SRBC--LAS | 33.6-64.2×10 ² | 4.2- 4.5×10 ² |

SRBC+LAS: Mice were injected with SRBC and LAS together.

SRBC--LAS: Mice were injected with LAS, a day after SRBC.

後に投与した場合の抗体産生はSRBCのみを投与したコントロールと同様であった。LAS単独ではPBSと同様バックグラウンドの抗体産生を促進、あるいは抑制する効果はないものと思われた。

界面活性剤であるLASによってもたらされるSRBCの溶血がこの抗体産生抑制の原因であると予想されたので、LASによる溶血と、蒸留水による溶血とを比較した。Fig. 2~3にこの実験の結果を示す。この結果からLASによる抗体産生抑制には次のような傾向が認められた。1) LAS処理SRBCで免疫したマウスではコントロール群(C群)および蒸留水によりSRBCを溶血させた群(B群)に比べて血中抗体価が低下する。特に2ME抵抗性抗体(IgG)の産生抑制が著しい。2) IgG産生の抑制は、第2次、第3次抗原刺激によって抗体産生が促進された時点でもみられる(AA-2W, 7W)。したがってこの抗体はほとんどがIgMであり、IgM産生はあまり抑制されていないことがわかる。3) このような動物をSRBCのみで追加免疫すると、それまで産生が抑えられていたIgG産生は他の群と大差なく促進される。4) 蒸留水により溶血させたSRBCで動物を免疫した場合には、抗体産生は溶血させないSRBCで免疫

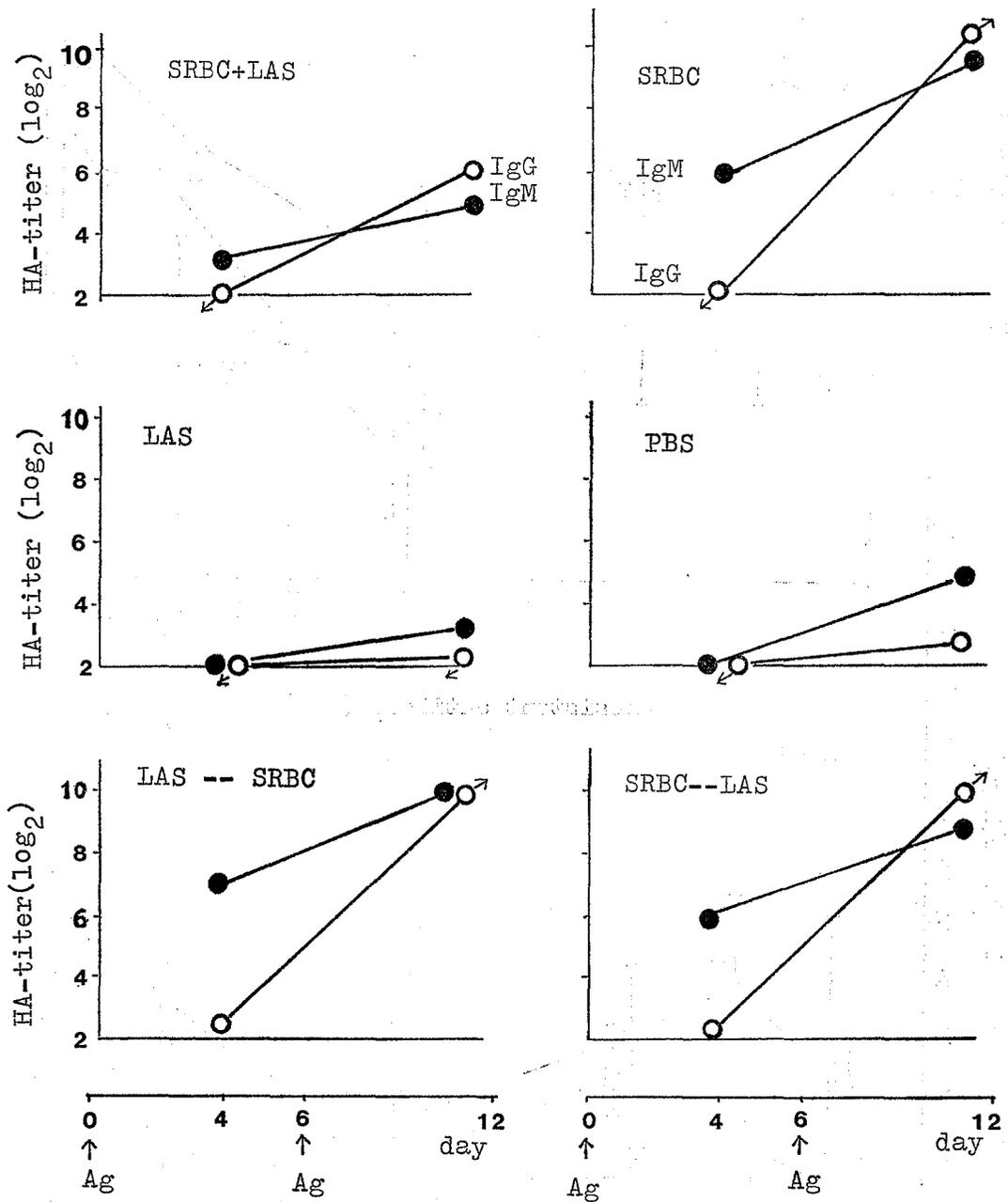


Fig. 1. Anti-body Production on Mice Immunized with SRBC
 SRBC+LAS : Mice were immunized with SRBC and LAS together.
 SRBC--LAS : LAS injection 1 day after SRBC.
 LAS--SRBC : LAS injection 1 day before SRBC.

した場合とあまり変わらない。

考 察

これらの実験成績から考えて、抗原 SRBC の LAS 処

理による IgG 産生の抑制は、LAS によってヒツジ赤血球の抗原構造が化学的に変化させられるためであることが推察される。蒸留水により溶血させた抗原（これは基

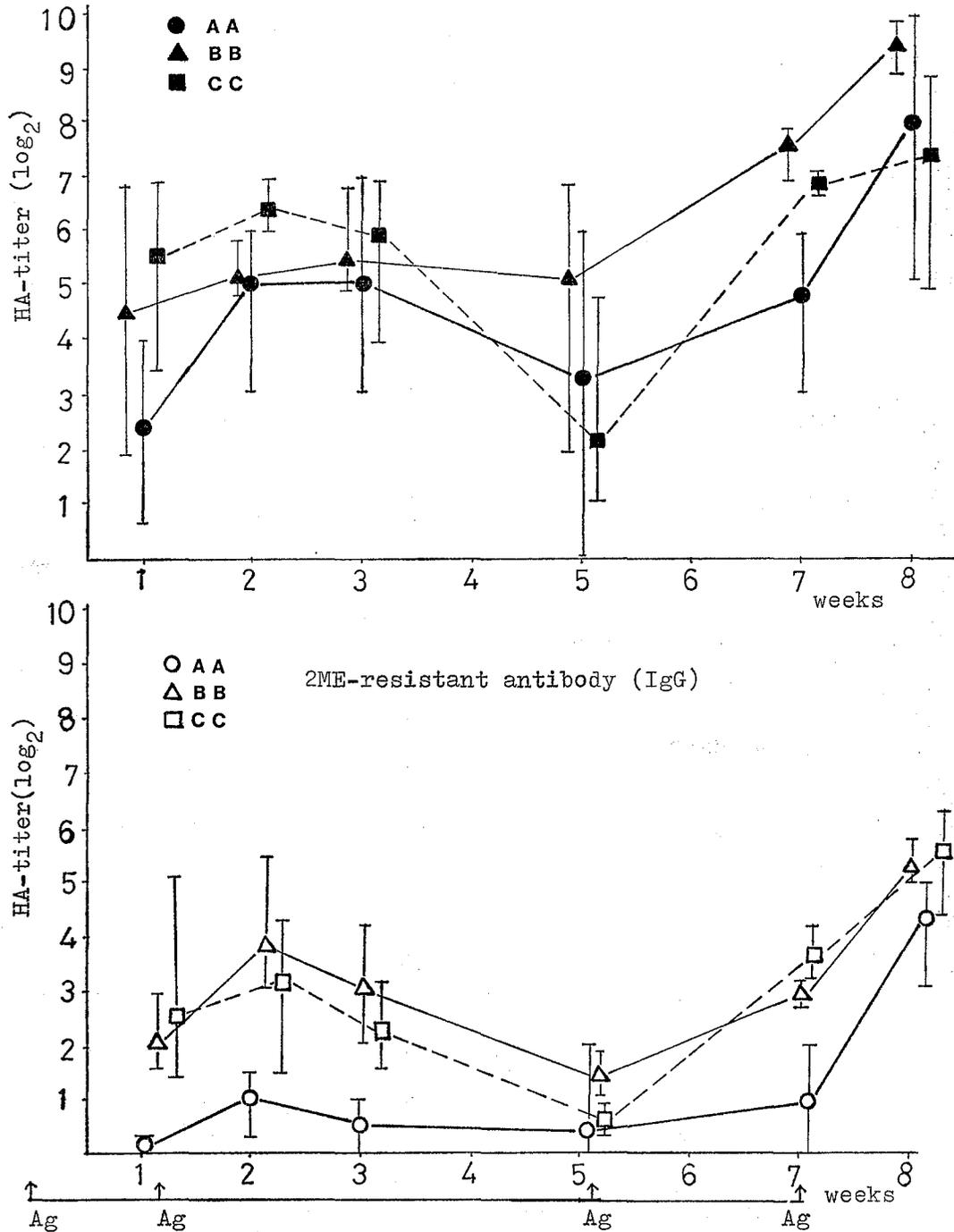


Fig. 2. Antibody Production on Mice Immunized with SRBC, LAS-treated SRBC and DDW-treated SRBC

本的には Forssman 抗原とみなしてよく、ほぼ完全な抗原性を有していると思われる) と異なり、LAS 処理によって赤血球の膜構造はかなりの変化をうけるものと思

われる。しかしながら、このような IgG 産生の抑制されている動物を無処理の抗原で刺激すると IgG 産生は対照群とほとんど変わりなく促進されることから、IgG 産生細

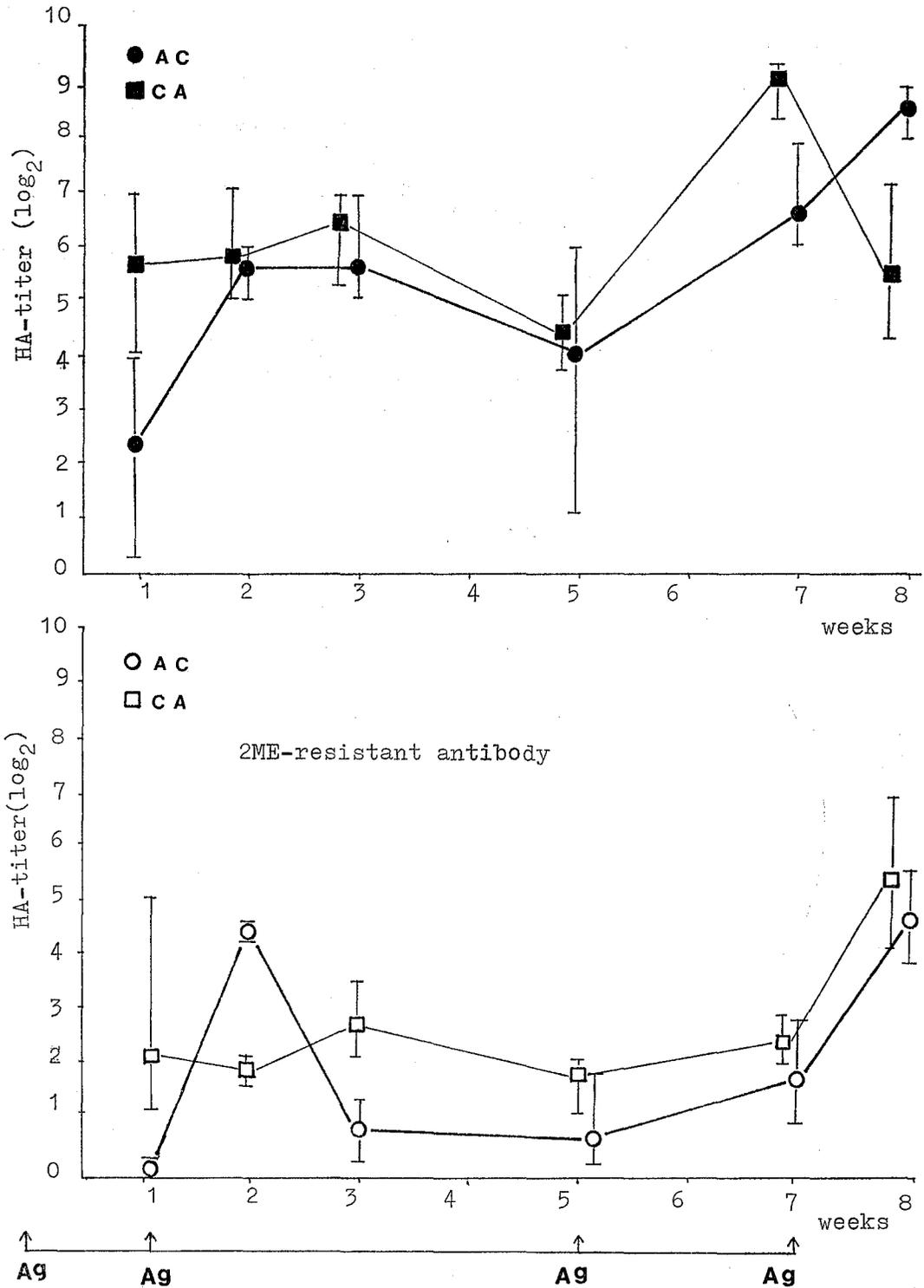


Fig. 3. Antibody Production on Mice Immunized with SRBC and SRBC-LAS

胞あるいは免疫記憶細胞はすでに準備されていることが予想される。抗体産生は一般に免疫初期には IgM 産生が主で、抗原刺激が持続すると IgG 産生が主流になることが知られているが、IgM 産生から IgG 産生に切り換えられる機構のどの部分かが、LAS 処理 SRBC による免疫では抑制されるのではないだろうか。

界面活性剤によって赤血球の膜抗原がどのような変化をうけるか、化学的な検索は未だ行っていない。今後、LAS 以外の界面活性剤についても検討する予定である。

また今回の実験結果から判断するかぎりにおいては、この現象は抗原の変化に起因するものであり、LAS 投与は動物の免疫能あるいは抗体産生細胞の機能に直接影響はしないものと考えられるが、この点に関しても今後さらに検討をすすめてゆきたい。

要 約

LAS のマウス抗体産生におよぼす影響について調べ

た。LAS を抗原である SRBC と同時にマウスに腹腔内注射すると、血中抗体価および脾臓の抗体産生細胞数が顕著に減少した。血中免疫グロブリンの IgG は第二次、第三次抗原刺激を行ってもほとんど増加しなかった。蒸留水により溶血させた SRBC ではこのような現象はみられないので、この抗 SRBC 抗体の抑制は LAS による SRBC の抗原性の変化に起因するものと思われる。

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) 高橋昭夫, 佐藤 薫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 67, 1975
- 3) 米山允子, 馬淵依子, 伊川三枝子, 小林博義, 市川久次: 東京衛研年報, 27-2, 105, 1976

リン酸トリ-*n*-ブチルの雄性ラットにおよぼす影響

大石 向江*, 大石 真之*, 平賀 興吾*

Toxicity of Tri-*n*-butyl Phosphate in Male Rats

HISAE OISHI*, SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: リン酸トリ-*n*-ブチル tri-*n*-butyl phosphate, 雄性ラット male rats, 毒性 toxicity, 血液凝固時間 blood coagulation time

緒 言

リン酸トリエステル類は難燃剤, ガソリン添加剤およびプラスチックの可塑剤などとして広く使用されている。Meijers および Van der Leer¹⁾は1974年に Waal川の Brakel の地点でリン酸ブチルが検出されたことを報告し, Grob²⁾も環境からのリン酸トリエステルの検出を報告している。また, わが国においても1977年に日本近海に棲息する魚類の組織中からリン酸トリエステルの発見された例が環境庁から報告されている³⁾。このように, リン酸トリエステルは環境中に徐々に蓄積, 増加しつつあり, 近い将来に環境汚染物質の一群になることが懸念される。

今回リン酸トリエステルの一つであるリン酸トリブチルのラットに対する毒性を検査し, 以下の知見を得たので報告する。

実験材料ならびに実験方法

1. **実験動物** 実験には生後4週令の JCL: Wistar系 SPF 雄性ラット (日本クレア) を使用した。ラットは環境馴化のため一週間予備飼育した後, 以下の実験に用いた。動物は一般動物飼育室 (室温 22~25°, 湿度 55~60%, 照明11時間) にて個別に飼育した。

2. **試料** 実験には和光純薬工業株式会社製リン酸トリ-*n*-ブチル (Lot No. PKG7991, 以下 TBP と略す) を使用した。

3. **投与方法および期間** TBP をラット飼育用粉末飼料 (クレア CE-2) に 0% (対照群), 0.5%, または 1% の割合で添加し, 10週間自由摂取させた。飲水も自由に行なわせた。

4. 検索方法

a. 体重, 飼料摂取量, 飲水量を毎日測定し, 症状観察を行なった。

b. 10週間経過後, ラットを断頭, 採血し, 血液凝固

時間の測定⁴⁾と解剖による肉眼的観察, ならびに脳, 肝臓および腎臓の重量測定を行なった。

c. 血清生化学的検査 総タンパク質量 (TP と略す—Biuret 法), グルコース量 (Glu—Glucose-Oxidase 法), 尿素窒素量 (UN—Urease-Indophenol 法), コレステロール量 (Cho—Liebermann-Burchard 法), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性 (GOT—Reitman-Frankel 法), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (GPT—Reitman-Frankel 法), アル

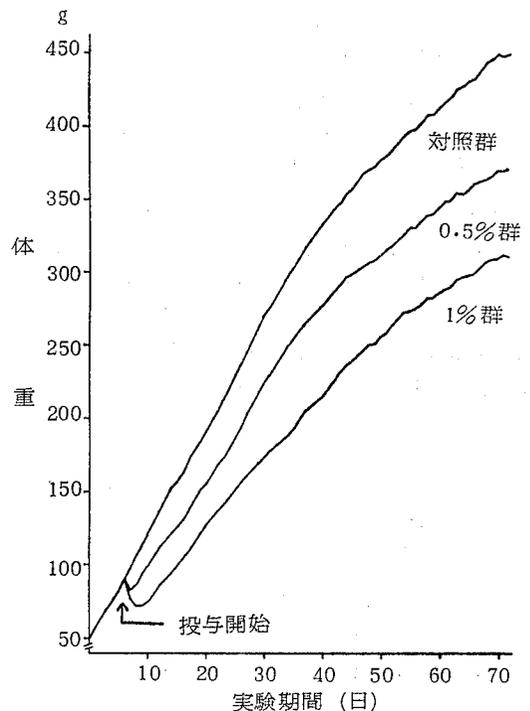


図 1. リン酸トリ-*n*-ブチルを投与された雄性ラットの体重の変化

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

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

表 1. 雄性ラットの体重および臓器重量におよぼすリン酸トリ-*n*-ブチルの影響¹⁾

| | 対 照 群 | 0.5 % 群 | 1 % 群 |
|------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 体 重 | | | |
| 初期値 | 91.1±5.7 | 89.7±8.3 | 90.6±7.0 |
| 最終値 | 446.5±37.2 | 368.8±22.8*** | 309.4±28.8*** |
| 臓器重量 | | | |
| 脳 | 2.1±0.1 (0.46±0.04) | 2.0±0.1* (0.53±0.03)*** | 1.9±0.1** (0.61±0.07)*** |
| 肝 臓 | 17.4±1.7 (3.90±0.20) | 19.0±2.2 (5.13±0.34)*** | 18.9±2.6 (6.07±0.36)*** |
| 腎 臓 | 3.1±0.3 (0.70±0.03) | 2.8±0.3* (0.77±0.04)*** | 2.6±0.2*** (0.85±0.06)*** |

イ 値は平均±標準偏差 (g) を示す。動物数は、対照群は10匹、0.5%および1%群は11匹である。

カッコ内は体重比重量 (g/100g体重) を示す。星印は対照群との統計学的有意差を示す。

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

表 2. 雄性ラットの血液成分および血液凝固時間におよぼすリン酸トリ-*n*-ブチルの影響¹⁾

| | 対 照 群 | 0.5 % 群 | 1 % 群 |
|------------------|-----------|------------|---------------|
| 総タンパク質量 (g/dl) | 7.1±0.4 | 7.5±0.6 | 8.2±0.7*** |
| グルコース量 (mg/dl) | 136.2±7.8 | 126.8±7.8* | 115.7±11.2*** |
| 尿素窒素量 (mg/dl) | 11.2±1.3 | 13.6±1.7** | 14.7±2.1*** |
| コレステロール量 (mg/dl) | 86.8±10.7 | 92.0±11.0 | 105.5±16.2** |
| ナトリウム量 (mEq/l) | 139±3 | 137±5 | 138±2 |
| カリウム量 (mEq/l) | 7.6±0.7 | 7.3±0.5 | 8.1±0.5 |
| カルシウム量 (mg/dl) | 14.8±5.4 | 17.8±7.5 | 14.7±2.4 |
| 血液凝固時間 (秒) | 102±20 | 151±40** | 210±50*** |

イ 値は平均±標準偏差を示す。動物数は、対照群は10匹、0.5%および1%群は11匹である。

星印は対照群との統計学的有意差を示す。

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

カリ性ホスファターゼ活性 (Al-P—Kind—King 法) の測定は自動分析装置 (HITACHI M-400 Automatic Analyzer) で行なった。コリンエステラーゼ活性 (ChE) は Garry—Routh 法⁵⁾ により測定した。血清ナトリウム量 (Na) とカリウム量 (K) は蛍光光度計により、またカルシウム量 (Ca) は Connerty および Briggs の方法⁶⁾ で測定した。

d. 脳および肝臓は Potter—Elvehjem 型のホモジナイザーにより 0.2M トリス—塩酸緩衝液 (pH7.4) 中でホモジナイズした。ホモジネートは 3,000 回転で 10 分間冷却遠心し上清をコリンエステラーゼ活性測定に用いた。測定は血清 ChE 活性測定と同様に行なった。

e. 体重および臓器重量は、正規化のため立方根をとり、TP, Glu, UN, GOT, GPT, Al-P, Na および K は正規化のために対数変換を行なった⁷⁾。結果はすべて Student's *t*-test により推計学的検討を行なった。

結果ならびに考察

体重の変化を図 1 に示す。体重(初期値および最終値)ならびに臓器重量の結果を表 1 に示す。投与群の最終体重は対照群に比較して有意に減少していた。投与群の飼料摂取量は実験期間中、対照群より有意に少なかった。平均飼料摂取量は対照群、0.5%群、1%群についてそれぞれ 22.9, 19.5 および 17.4g/日/ラットであった。飲水量は有意差がなかった。1%群の脳と腎臓の絶対重量は対照群に比べて有意に軽かった。脳の相対重量の増加は飼料摂取量が減少したために体重増加が抑制された結果と考えられる⁸⁾。

血清成分および血液凝固時間の結果を表 2 に示す。TP と Cho は 1%投与群において、また UN は TBP 投与両群とも対照群より有意に上昇していた。これらから腎臓傷害の生じたことが考えられる。血液凝固時間は TBP 投与の両群において対照群より有意に延長していた。こ

表 3. 雄性ラットの血清酵素活性におよぼすリン酸トリ-*n*-ブチルの影響¹⁾

| | 対照群 | 0.5%群 | 1%群 |
|--------------------|----------|-----------|-----------|
| GOT ^{a)} | 135±22 | 107±15** | 104±11*** |
| GPT ^{b)} | 37.6±7.4 | 30.6±4.0* | 30.6±3.9* |
| Al-P ^{c)} | 24.4±7.7 | 17.6±4.8* | 18.9±5.5 |

イ 値は平均±標準偏差を示す。動物数は、対照群は10匹、0.5%および1%群は11匹である。

星印は対照群との統計学的有意差を示す。

*:P<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001

ロ グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性 (Karmen 単位)

ハ グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (Karmen 単位)

ニ アルカリ性ホスファターゼ活性 (King-Armstrong 単位)

のことから TBP は血液凝固系に直接に作用するかまたは肝臓傷害を介して間接的に凝固系に影響を与えることが示唆される。

血清酵素活性の結果を表 3 に示す。TBP 投与両群の GOT および GPT 活性、かつ 0.5% 投与群の Al-P 活性が対照群より有意に低下していた。

血清、脳および肝臓の ChE 活性の結果を表 4 に示す。脳の ChE 活性は 0.5%、1% 群とも対照群より有意に上昇していた。肝臓と血清の ChE 活性は有意差がなかった。TBP は有機リン化合物であることから ChE 活性が阻害されることが考えられたが、今回の実験ではラットの ChE 活性は TBP によっては阻害されなかった。しかし Sabine および Hayes⁹⁾ は TBP はヒトの赤血球および血漿 ChE 活性を阻害すると報告している。著者らも *in vitro* の実験でヒトの血清 ChE 活性が TBP により阻害されることを確認したが、牛血清 ChE、ラット血清および肝臓の ChE 活性は *in vitro* では阻害されなかった (大石, 未発表データ)。以上のことから、TBP の ChE 阻害作用には種差が考えられる。脳の ChE 活性が上昇した理由は現在のところ不明である。

要 旨

リン酸トリ-*n*-ブチルを飼料に添加して雄性ラットに

表 4. 雄性ラットのコリンエステラーゼ活性におよぼすリン酸トリ-*n*-ブチルの影響¹⁾

| | 対照群 | 0.5%群 | 1%群 |
|------------------|---------|------------|-----------|
| 血清 ^{a)} | 1.5±0.5 | 1.9±0.7 | 1.7±0.6 |
| 脳 ^{b)} | 8.2±1.7 | 11.7±3.2** | 10.3±2.5* |
| 肝臓 ^{c)} | 4.5±1.9 | 5.3±2.4 | 3.9±2.4 |

イ 値は平均±標準偏差を示す。動物数は、対照群は10匹、0.5%および1%群は11匹である。

星印は対照群との統計学的有意差を示す。

*:P<0.05, **:P<0.01

ロ μMSH/分/ml 血清

ハ ×10⁻²μMSH/分/mg タンパク質

ニ ×10⁻¹μMSH/分/mg タンパク質

自由摂取させた。コリンエステラーゼ活性は阻害されず、血液凝固時間が延長した。

謝辞 血液凝固時間測定に御協力いただいた高橋省氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Meijers, A. P., and van Der Leer, R. C.: *Water Res.*, 10, 597, 1976
- 2) Grob, K.: *J. Chromatogr.*, 90, 303, 1974
- 3) 環境庁環境保健調査部保健調査室編: 化学性物質と環境 (昭和53年版) 94, 1978
- 4) 松岡松三: 出血性素因と血栓症, 1969, 金原出版, 東京
- 5) Garry, P. J., and Routh, J. I.: *Clin. Chem.*, 11, 91, 1965
- 6) Connerty, H. V., and Briggs, A. R.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 290, 1966
- 7) 大石向江, 大石真之, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 175, 1978
- 8) Oishi, S., Oishi, H., and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 15, 1979
- 9) Sabine, J. C., and Hayes, F. N.: *Arch. Ind. Occup. Med.*, 6, 174, 1952

低温下におけるラット死後変化の経時的観察

多田幸恵*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*, 長澤明道*
藤井孝*, 平賀興吾*

Observations of Postmortem Changes in Course of Time on Rats kept in
Low Temperature

YUKIE TADA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA*,
TAKASHI FUJII* and KOGO HIRAGA*

Keywords: 死後変化 Postmortem Changes, ラット Rat, 低温 Low Temperature

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は肉眼的・光顕的観察を困難にする事が多い。前回私達は、当部動物飼育施設に死亡ラットが放置された場合の条件を設定し、死後変化を解剖・組織学的に検索し、その結果を報告した^{1,2)}。死後変化は様々な外的条件によりその進行速度が左右され、特に温度による影響が大きいようであり、進行を遅らせるためにはすみやかに冷所に保存することが望ましい。当部でも死亡動物を発見した際は解剖までの間冷所保存することとしているが、今回低温下における死後変化をラットを用いて実験的に観察した。

実験方法

実験動物および飼育環境 日本チャールスリバー育生の F344 ラット雄を4週令で購入し、室温25±1°, 湿度50±5%の環境下で飼育用固型飼料(日本クレア・CE-2)を与え4週間予備飼育した。試験前日に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 一群6匹5群、計30匹のラットをデンケータ内でエーテル麻酔により致死させ、各ラットごと32×38cmのビニール袋に入れ密封し、ステンレス製ケージ床面の網に伏臥位に載せ1.0~5.5°の冷蔵庫内に放置した。冷蔵庫は試験途中に死亡個体が発見した際解剖までの間保存するのに利用しており、前面がガラス張りのステンレス製である。5群のうち1群6匹については、死亡前15分、死亡時、死後30分、1時間、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12、15、18、21、24、42、48時間に(以下死後時間をhとする)体重、体温(直腸温)、冷蔵庫内の温度・湿度の測定を行い、合わせて外表部、死体硬直の観察を行った。観察法、使用器具は前回¹⁾と同様であ

表1. 死後時間経過に伴う、直腸温および体重の変動

| 時間 ¹⁾ | 庫内温度 (°) | 湿度 (%) | 直腸温 (°) | 体重 (g) |
|------------------|-------------|-----------|------------------------|-------------------------|
| - 0.25 | | | 36.3±0.3 ²⁾ | 197.1±3.8 ²⁾ |
| 0 | 3.5 | 51 | 34.8±0.7 | 197.0±3.9 |
| 0.25 | 5.0 | 65 | 28.8±2.1 | 196.6±4.5 |
| 0.5 | 4.0 | 51 | 26.2±0.8 | 197.8±4.5 |
| 0.75 | 2.5 | 54 | 23.5±1.0 | 198.1±4.0 |
| 1 | 4.0 | 51 | 21.6±0.4 | 198.1±4.7 |
| 1.5 | 5.0 | 55 | 18.0±0.4 | 198.5±3.4 |
| 2 | 3.0 | 60 | 15.4±0.7 | 198.1±3.8 |
| 2.5 | 4.0 | 65 | 15.7±0.8 | 198.6±4.3 |
| 3 | 3.0 | 49 | 14.8±0.6 | 197.8±3.6 |
| 4 | 3.5 | 49 | 11.8±0.5 | 198.6±3.0 |
| 5 | 5.0 | 68 | 10.7±0.6 | 198.3±4.3 |
| 6 | 3.5 | 51 | 9.3±0.2 | 198.1±4.0 |
| 8 | 1.8 | — | 8.5±0.2 | 198.0±4.1 |
| 10 | 3.0 | 60 | 6.7±0.2 | 197.6±3.8 |
| 12 | 2.5 | 55 | 8.3±0.1 | 198.5±2.8 |
| 15 | 2.5 | — | 5.6±0.4 | 197.8±3.1 |
| 18 | 4.0 | 67 | 5.4±0.2 | 198.1±3.8 |
| 21 | 1.5 | — | 5.5±0.2 | 197.8±3.9 |
| 24 | 1.0 | — | 5.1±0.1 | 198.1±4.2 |
| 42 | 4.5 | 67 | 5.9±0.1 | 197.5±4.2 |
| 48 | 5.5 | 68 | 6.4±0.1 | 197.6±3.8 |

1) 死後経過時間 2) 平均値±標準偏差

るが、死体硬直については観察部位を躯幹、前肢、後肢の3カ所に限定した。他の4群については6、12、24、48hにそれぞれ1群ずつ解剖し肉眼的検索を行った後器官・組織を摘出した。器官・組織は緩衝ホルマリン中に

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

表 2. 死後時間経過に伴う死体硬直および寛解

| 時間 ¹⁾ | 軀 幹 | | | | 前 肢 | | | | 後 肢 | | | |
|------------------|-----------------|---|----|-----|-----|---|----|-----|-----|---|----|-----|
| | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ |
| 0.25 | 6 ²⁾ | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.25 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.5 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.75 | 5 | 1 | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 1 | 5 | 1 | — | — | 5 | 1 | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 1.5 | 1 | 4 | 1 | — | — | 5 | 1 | — | — | 5 | 1 | — |
| 2 | — | 3 | 3 | — | — | 4 | 2 | — | — | 3 | 3 | — |
| 2.5 | — | 1 | 5 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — |
| 3 | — | — | — | 6 | — | — | 2 | 4 | — | — | — | 6 |
| 4 | — | — | — | 6 | — | — | 2 | 4 | — | — | — | 6 |
| 5 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 8 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 10 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 12 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 15 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 18 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 21 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 24 | — | — | — | 6 | — | — | 2 | 4 | — | — | — | 6 |
| 42 | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — |
| 48 | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | — | 6 | — |

1) 死後経過時間 2) 動物数/総動物数 6

表 3. 死後時間経過に伴う眼球の白濁

| 時間 ¹⁾ | 右 眼 球 | | | | 左 眼 球 | | | |
|------------------|-----------------|---|----|-----|-------|---|----|-----|
| | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ |
| 0.25 | 6 ²⁾ | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.25 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.5 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 0.75 | 3 | 3 | — | — | 2 | 4 | — | — |
| 1 | 2 | 4 | — | — | 2 | 4 | — | — |
| 1.5 | 2 | 4 | — | — | 1 | 4 | 1 | — |
| 2 | — | 5 | 1 | — | 1 | 4 | 1 | — |
| 2.5 | — | 1 | 5 | — | — | 1 | 5 | — |
| 3 | — | — | 1 | 5 | — | — | 1 | 5 |
| 4 | — | — | 1 | 5 | — | — | — | 6 |
| 5 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 |
| 8 | — | — | 3 | 3 | — | — | 3 | 3 |
| 10 | — | 2 | 4 | — | — | 1 | 5 | — |
| 12 | — | 5 | 1 | — | — | 5 | 1 | — |
| 15 | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — |
| 18 | 1 | 5 | — | — | 1 | 5 | — | — |
| 21 | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — |
| 24 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 42 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 48 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |

1) 死後経過時間 2) 動物数/総動物数 6

固定し、通常のパラフィン切片作製法により組織標本を作製し、光顕的に観察した。

実験結果

体重 表1に示したように、死後経過時間とは無関係にはば一定の値を示した。

体温 表1に示したように、0 hから3 hの間で急速な低下がみられ、以後徐々に低下し42 hで庫内温度と近似温に低下した。

死体硬直および寛解

前回¹⁾の動物飼育室と同条件に放置(以下室温放置とする)したラットと比較し、硬直の発現に遅れがみられた。硬直は1 hで始まり3 hで最高に達し、その後長時間持続し42 hで寛解の開始が観察された。

外表部の観察

前回の実験で変化のみられた眼球の観察を中心に行った。両眼球ともに死後45分で白濁の出現がみられ、3 hで白濁が顕著となった。8 hで白濁の中心部に透明な部分が現われ白濁は徐々に淡くなり24 hで消失した。白濁以外の変化として室温放置でみられた涙液の流出および

赤色涙液の流出は低温放置のラットでは少数にみられたのみであった。眼以外の変化として6 h以降に鼻周囲に淡赤色液の付着が観察された。

内部器官・組織の観察

皮下組織 皮下血管内の血液凝固を前回の方法¹⁾により検索したところ、24 hまで血液の流動性がみられ、48 hで流動性がみられなかった。室温放置のラットでみられた鼠径部の黒色斑は、低温放置の場合48 hまでの観察ではみられなかった。黒色斑とは別に、24 h以降の腹部皮下に淡緑色、淡黒色の着色がみられた。着色は時間経過と共に濃さを増し、暗緑色、赤褐色を呈した。また腹筋にも同様の着色が観察された。

腹水 室温放置では12 hで全例に腹水の貯留がみられたが、低温放置では48 hまでの観察で認められなかった。

腐敗臭 室温放置では24 hで腐敗臭顕著となったが、低温放置では48 hまでで認められなかった。

腹腔内脂肪 脂肪組織は不透明な乳白色を呈し、透明感および軟化はみられなかった。

脾臓 48 hで辺縁が黒色に変化し、並行して軟化がみ

表 4. 内部器官・組織の観察結果

| 肉 眼 的 観 察 所 見 | 死 後 経 過 時 間 (時 間) | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------|---|----|-----|----|---|------|-----|---|---|----|-----|
| | 6 | | 12 | | 24 | | 48 h | | | | | |
| | - | + | - | + | - | + | - | + | | | | |
| 鼻周囲淡赤色液付着 | 2 ¹⁾ | 4 | 1 | 5 | 2 | 4 | 1 | 5 | | | | |
| 皮下組織・鼠径部の黒色斑 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 6 | — | | | | |
| 着色(緑色, 黒色, 赤褐色) | 6 | — | 5 | 1 | 4 | 2 | 1 | 5 | | | | |
| 皮下血管内の血液凝固 | 6 | — | 6 | — | 5 | 1 | 1 | 5 | | | | |
| 腹筋・着色(黒色, 赤褐色) | 6 | — | 3 | 3 | 5 | 1 | 4 | 2 | | | | |
| 脂肪組織・透明感 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 6 | — | | | | |
| 腐敗臭顯著 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 6 | — | | | | |
| 胸水貯留 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 6 | — | | | | |
| 腹水貯留 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 6 | — | | | | |
| 胃・前胃一皺襞の消失 | 4 | 2 | 6 | — | 6 | — | 5 | 1 | | | | |
| 腺胃一皺襞の消失 | 6 | — | 6 | — | 6 | — | 5 | 1 | | | | |
| 前胃一透明感 | 5 | 1 | 6 | — | 6 | — | 4 | 2 | | | | |
| | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ |
| 脾臓・尾部黒色 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 辺縁軟化 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 鮮紅色 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 肺臓・暗赤色斑 | 6 | — | — | — | 3 | 3 | — | — | 1 | 5 | — | — |
| 肝臓・帯灰赤色の虎斑模様 | 1 | 4 | 1 | — | — | 3 | 3 | — | 2 | 3 | 1 | — |
| 辺縁黒色 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 軟化 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 1 | 5 | — | — |
| 腸管・胃一ガス貯留 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 十二指腸一ガス貯留 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 空腸, 回腸一ガス貯留 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 盲腸一ガス貯留 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 結腸, 直腸一ガス貯留 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 胃一血液の滲み | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 十二指腸一血液の滲み | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 4 | 1 | 1 | — |
| 空腸, 回腸一血液の滲み | 5 | 1 | — | — | — | 4 | 2 | — | — | 4 | 2 | — |
| 盲腸一血液の滲み | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 3 | 3 | — | — |
| 結腸, 直腸一血液の滲み | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |
| 腸管膜・血液の滲み | 5 | 1 | — | — | 2 | 4 | — | — | — | 2 | 3 | 1 |
| 腎臓・軟化 | 6 | — | — | — | 4 | 2 | — | — | 3 | 3 | — | — |
| 緑褐色 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 4 | 2 | — | — |
| 精巣・軟化 | 6 | — | — | — | 2 | 3 | 1 | — | 3 | 2 | 1 | — |
| 血管走行不明瞭化 | 6 | — | — | — | 2 | 3 | 1 | — | 2 | 2 | 2 | — |
| 精囊・着色(赤褐色) | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — |
| 脳・軟化 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 3 | 3 | — | — |
| 血管走行不明瞭化 | 6 | — | — | — | 6 | — | — | — | 5 | 1 | — | — |

1) 動物数/総動物数 6

られた。また6例中3例で全体の色調が淡くなり鮮紅色を呈する変化がみられた。

肺 時間経過に伴い暗赤色斑が多くみられた。

肝臓 時間経過に伴い黒色調を増し黒赤色となり、斑状に血液の抜けたような灰色調を帯びた部分がみられた。24h以降では肝臓の辺縁部が黒色に変化していた。

表 5-1. 光顯的觀察結果

| 光顯的觀察所見 | 死後経過時間 | | | |
|-----------------|--------|----|----|-----|
| | 6 | 12 | 24 | 48h |
| 脾 臓 | | | | |
| 皮質および髓質に小円形の空隙 | + | + | ++ | + |
| リンパ球核濃縮 | - | + | + | ++ |
| リンパ節 | | | | |
| 皮質および髓質に小円形の空隙 | - | + | + | + |
| リンパ球核濃縮 | - | - | - | + |
| 胸 腺 | | | | |
| 組織構築崩壊 | - | - | + | + |
| 髓質に広汎性出血 | + | + | + | + |
| リンパ球核濃縮 | - | - | + | + |
| 心 臓 | | | | |
| 筋細胞核萎縮 | - | - | - | + |
| 肺 | | | | |
| 肺胞毛細血管内に血球 | - | + | + | + |
| 気管粘膜上皮萎縮 | - | - | - | + |
| 肺胞腔内にエオジン淡染の残渣 | + | + | + | ++ |
| 肺胞上皮核濃縮 | - | - | - | + |
| 肺胞上皮剥離 | - | + | + | + |
| 肺胞壁菲薄化 | - | - | + | + |
| 顎下腺 | | | | |
| 分泌管および導管萎縮 | + | + | ++ | ++ |
| 分泌管および導管崩壊 | - | - | - | + |
| 分泌管上皮核萎縮 | - | - | - | + |
| 舌下腺 | | | | |
| 分泌管および導管萎縮 | - | - | + | + |
| 腺房細胞核濃縮 | - | - | - | + |
| 耳下腺 | | | | |
| 分泌管および導管萎縮 | + | + | ++ | ++ |
| 腺房細胞萎縮 | - | - | - | + |
| 腺房細胞核濃縮 | - | - | - | + |
| 肝 臓 | | | | |
| 類洞の拡張および類洞内に血球 | + | + | + | + |
| 染色性低下および組織の無構造化 | - | - | - | + |
| 肝細胞核萎縮 | - | - | + | ++ |
| 類洞内皮細胞核濃縮 | - | - | + | ++ |
| 膵 臓 | | | | |
| 染色性低下および組織の無構造化 | + | + | + | + |
| 腺房細胞萎縮 | + | + | + | + |
| 腺房細胞核濃縮 | - | - | + | + |
| 膵島細胞崩壊 | - | - | - | + |

胃 6 hで6例中2例の前胃に皺襞の消失がみられ、48 hで6例中1例の前胃および腺胃に同様の変化が観察された。また48 hでは前胃に透明感がみられた。

腸管 室温放置で3 hより観察された腸管内のガスの

表 5-2. 光顯的觀察結果

| 光顯的觀察所見 | 死後経過時間 | | | |
|-----------------|--------|----|----|-----|
| | 6 | 12 | 24 | 48h |
| 胃 (前胃) | | | | |
| 粘膜上皮基底層細胞の核濃縮 | + | + | ++ | ++ |
| 粘膜上皮中間層細胞の核濃縮 | + | + | + | ++ |
| 粘膜固有層結合組織細胞の核濃縮 | - | - | + | ++ |
| 胃 (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 | - | - | - | + |
| 空・回腸 | | | | |
| 絨毛粘膜上皮剥離 | + | + | + | + |
| 腸腺脱落 | - | - | + | ++ |
| 染色性低下および組織の無構造化 | - | - | + | + |
| 盲 腸 | | | | |
| 粘膜の表在上皮剥離 | - | - | + | + |
| 腸腺脱落 | - | + | ++ | ++ |
| 染色性低下および組織の無構造化 | - | - | + | ++ |
| 結 腸 | | | | |
| 粘膜の表在上皮剥離 | - | - | - | + |
| 染色性低下および組織の無構造化 | - | - | - | + |
| 腎 臓 | | | | |
| 皮髓境界部に赤血球集簇 | - | + | ++ | ++ |
| 尿細管上皮の脱落 (腎迷路) | + | ++ | ++ | ++ |
| 遠位尿細管上皮の腫脹 | + | + | + | + |
| 尿細管上皮核濃縮 (皮質部) | + | + | + | ++ |
| (皮髓境界部) | - | + | + | ++ |
| (髓質) | + | + | ++ | ++ |
| 精 巢 | | | | |
| 精細胞の局所性消失 | - | - | + | + |
| 間質細胞核濃縮 | - | + | + | ++ |
| 下垂体 | | | | |
| 前葉細胞崩壊 | - | - | + | + |
| 後葉細胞核濃縮 | - | - | - | + |
| 副 腎 | | | | |
| 細胞の萎縮および核濃縮 | - | + | + | ++ |
| 細胞の局所性消失 | - | - | + | + |
| 脳 | | | | |
| 血管腔拡張 | - | - | + | ++ |
| 神経膠細胞核萎縮 | - | + | + | + |

貯留が、低温放置では48 hまでの観察でみられなかった。盲腸の血管走行が24 hで不明瞭となり、48 hで再び明瞭となった。また腸管の血管に沿った血液の滲みが24 hでみられ、空・回腸ではこの変化が顕著にみられた。48 hのラット全例で腸管壁の軟化がみられ、腸管は弾力性を

失い透明感を増した。

腸管膜 腸管でみられたと同様の血液の滲みが6 hより観察され、24および48 hでは全例にみられた。

腎臓 12 h以降で軟化が観察され、24および48 hで軟化に加え色調が淡くなり緑褐色を呈する変化が観察された。

精巣 24 h以降で精巣表面の血管走行の不明瞭化および軟化がみられた。

陰囊 6 h以降で陰嚢壁の血管走行が顕著にみられ、陰嚢全体として暗赤色ないし紫赤色を呈した。

脳 24および48 hで6例中3例に軟化がみられた。また血管走行の不明瞭化が数例に観察された。

組織の光顕的観察

脾臓・リンパ節・胸腺 12 hでリンパ球の核濃縮が軽度にもみられ、核のクロマチン網工が不明瞭となった。48 hでリンパ球の核濃縮は程度を増したが、濃縮を示さないリンパ球および骨髄系細胞も多数みられ、48 hの標本においてもリンパ球と骨髄系細胞との識別が可能であった。また染色性の低下はほとんどみられなかった。以上の血球の変化と並行して、脾臓、リンパ節では12 h以降で赤脾腫および白脾腫に小円形の空隙がみられ、その部分にエオジン淡染の物質が存在するという変化が散在して認められた。胸腺では6 h以降で髄質に広汎な浸潤性の出血が認められた。

心臓・骨格筋 顕著な変化がみられず、染色性の低下もほとんどみられなかった。

肺 12 h以降で肺胞上皮の剥離がみられ、肺胞腔内にエオジン淡染の無構造物質が認められた。24 h以降で気管支粘膜上皮の萎縮がみられ、気管支粘膜が固有層より遊離していた。

口腔腺 顎下腺・耳下腺では腺房に比較し導管・分泌管で顕著な変化がみられ、6 h以降で分泌管の萎縮、24 h以降で分泌管の崩壊が観察された。48 hで耳下腺腺房細胞の萎縮がみられ、細胞は好塩基性を増し腺房間に空隙を生じていた。舌下腺では腺房と導管の変化が並行してみられ、48 hで導管の萎縮および腺房細胞の核濃縮が軽度に認められた。

肝臓 6 hで類洞の拡張がみられ、拡張した類洞には多数の赤血球が存在した。この変化は中心静脈付近で顕著にみられたが、時間の経過と共に赤血球が小葉中間部に集簇する傾向がみられた。24 hで肝細胞核の萎縮がみられ、萎縮した核の周囲の細胞質には空隙がみられた。この変化と並行して肝細胞の細胞質に空隙が認められた。室温放置では24 h以降で、肝細胞の核が消失し組織が崩壊し無構造となり、ヘマトキシリンおよびエオジン

に染色されない、いわゆる融解壊死の像が全例にみられたが、低温放置では48 hで2例にみられたのみであった。

脾臓 6 hで腺房細胞の崩壊および染色性の低下が限局性にみられた。室温放置ではこの染色性の低下が時間の経過と共に程度を増したが、低温放置では48 hにおいても6 h同様軽度にもみられたのみであった。48 hで脾島の境界が不明瞭となり一部の脾島細胞は崩壊し核の消失がみられた。

胃(前胃) 前胃粘膜と食道とはほぼ同様の変化を示し、6 hで基底層および中間層細胞の核濃縮がみられ時間の経過と共に程度を増した。24 h以降で粘膜固有層の結合組織細胞の核濃縮が軽度にもみられた。

胃(腺胃) 6 hで粘膜表在上皮の剥離が軽度にもみられ、時間の経過と共に程度を増した。24 h以降で胃腺細胞の萎縮および核濃縮がみられ、主細胞は好塩基性を増した。壁細胞は個々に解離し腫脹および核の消失が認められた。

腸管 空・回・結腸：12 hで粘膜の表在上皮の剥離および腸腺の脱落が軽度にもみられ、24 h以降で組織の染色性低下が限局性に認められた。盲腸：12 h以降で腸腺の脱落がみられ、この変化が顕著な部位では筋層と粘膜固有層のみが残存していた。また24 h以降で組織の染色性低下がみられた。

腎臓 6 hで腎迷路にあたる主部尿管上皮の細胞質が顆粒状となり、エオジン染色性が低下し核が濃縮する変化がみられた。この変化は尿管の崩壊へと移行し、時間の経過と共に腎迷路では尿管の崩壊像が多数観察された。この変化と並行して、皮質部の遠位尿管上皮が腫脹し細胞質が脱落、核が消失する変化が散在して認められた。髄質では集合管および乳頭管上皮の核濃縮が24 h以降で顕著に認められた。

精巣 24 h以降で精細胞の局所性消失が軽度にもみられ、精細管の細胞集団の中にエオジン淡染の無構造物質を満した小空隙が認められた。12 h以降で間質細胞の核濃縮が軽度にもみられたが室温放置でみられた解離および細胞の消失はみられなかった。

脳 12 hで神経膠細胞の核濃縮がみられ、核の周囲の細胞質に空隙を生じていた。また24 hで血管腔の拡張がみられた。

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、個体間の差なくみられた変化をまとめると次のようである。

死後45分：眼球の白濁出現

死後1時間：死体硬直の発現

死後6時間：胸腺髓質に広汎性出血，顎下腺・耳下腺で分泌管萎縮，腺胃粘膜の表在上皮剥離，脾臓で限局性に染色性低下，腎臓で尿細管の散在性崩壊

死後12時間：盲腸で腺組織の脱落，肺胞上皮の剥離

死後24時間：腹部皮下の着色，肝臓・脾臓で辺縁部が黒色に変化

死後48時間：皮下血管内の血液凝固，脾臓・肝臓・腎臓・脳・腸管の軟化，死体硬直の寛解開始

以上のように低温下放置のラットでは死後6時間で軽度に発現した変化が，その後も軽度ないし中等度の変化で継続する傾向がみられ，時間の経過と共に著変した室温放置での死後変化とは大いに異なっていた。

今回観察された変化と前回の室温放置での死後変化とを比較すると，室温放置のラットでみられ，低温放置のラットではみられなかった変化として次のようなものが掲げられる。腐敗臭，腹水の貯留，腸管内ガス貯留，組織構築の崩壊，組織の広汎な染色性低下。これらの変化はいずれも室温放置のラットで死後12時間以降にみられた変化であり，自家融解から腐敗へと進行する死後変化の行程³⁻⁴⁾が，低温下に保存されることにより，死後48時間では腐敗に至る前の状態に保たれたものと考えられる。これは室温放置で大部分の組織にヘマトキシリン染色性の杆菌が観察されたのに対し，低温放置では腸管でしかみられなかった点，また解剖時に腐敗臭，腸管内ガス貯留が観察されなかった点からも推測できる。このように死亡個体を低温下に保存することは不可欠であると思われる。ただし腐敗に至る前の個体，すなわち組織の広汎な染色性低下，組織の無構造化がみられず軽度の死後変化のみが観察される個体の検鏡においては，ラット固有の病変と死後変化との識別が困難であると思われ，その際，腎迷路における主部尿細管の変性および顎下腺の分泌管変性などは，死後経過時間に相応して出現するため判断の一助となることと思われる。

今回の観察から，死亡動物はなるべくすみやかに低温保存すべきであると考えられるが動物実験においては発見までの間死亡個体が室温放置されるのが実情である。今後の検討課題として，死亡個体を一定時間室温放置した後低温下に保存し，その際の死後変化を経時的に観察することが重要であると思われる。

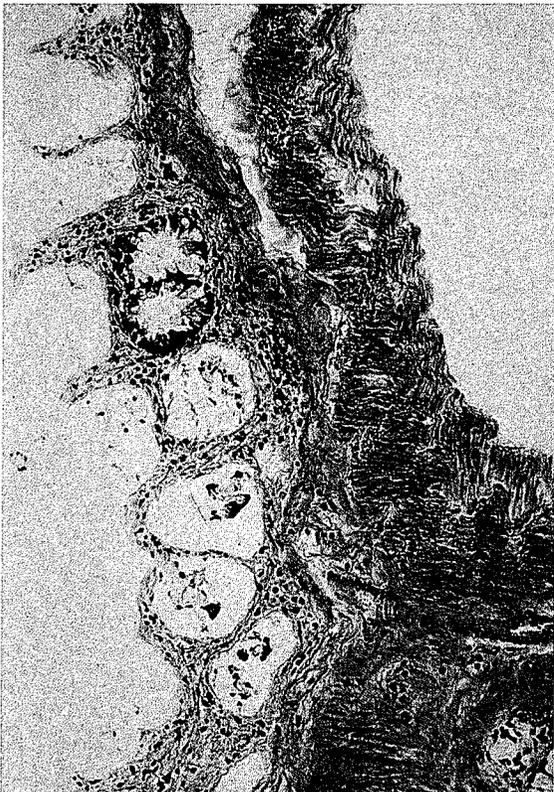
文 献

- 1) 阿部幸恵ら：東京衛研年報，29-2，180，1978
- 2) 多田幸恵ら：東京衛研年報，30-2，160，1979
- 3) 錫谷 徹：法医診断学，41，1972，南江堂
- 4) Chandra, Jagdish, and Sabharwal, K. : *J. Indian Med. Ass.*, 51 (7), 336, 1968

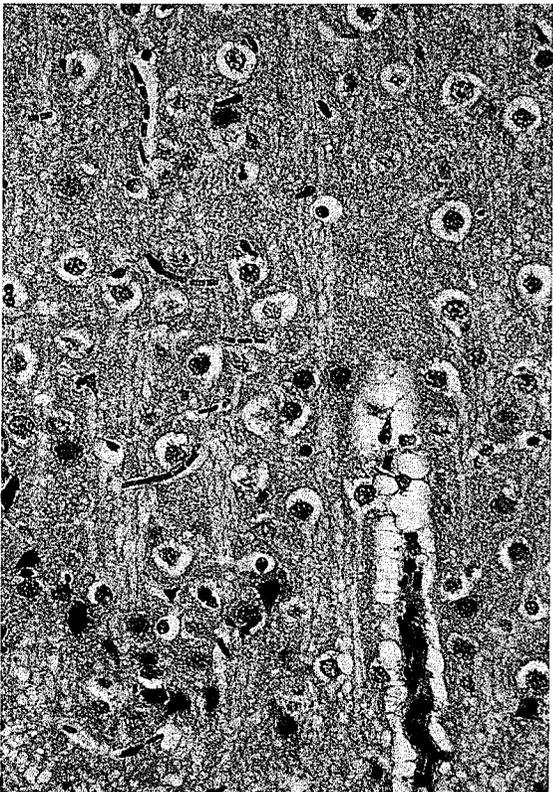
写真説明

- 写真1. 死後48時間：腹部皮下に着色がみられ，内部器官は帯黒色を呈する。
- 写真2-8. :ヘマトキシリン・エオジン重染色標本
- 写真2. 脾臓（死後24時間，×200）：リンパ球の核濃縮が軽度のみみられ，赤脾髄および白脾髄に円形の小空隙がみられる。
- 写真3. 顎下腺（死後24時間，×100）：分泌管の萎縮および崩壊がみられる。
- 写真4. 肝臓（死後24時間，×200）：類洞の拡張および肝細胞の空胞化がみられる。
- 写真5. 胃（死後24時間，×100）：腺細胞の萎縮および粘膜表在上皮の剥離がみられる。
- 写真6. 盲腸（死後24時間，×100）：腸腺の脱落がみられ粘膜固有層と筋層のみが残存する。
- 写真7. 腎臓（死後24時間，×100）：腎迷路の主部尿細管で尿細管上皮の脱落および核の消失がみられる。
- 写真8. 脳（死後24時間，×200）：神経膠細胞の核萎縮および核の周囲の細胞質に空隙がみられる。

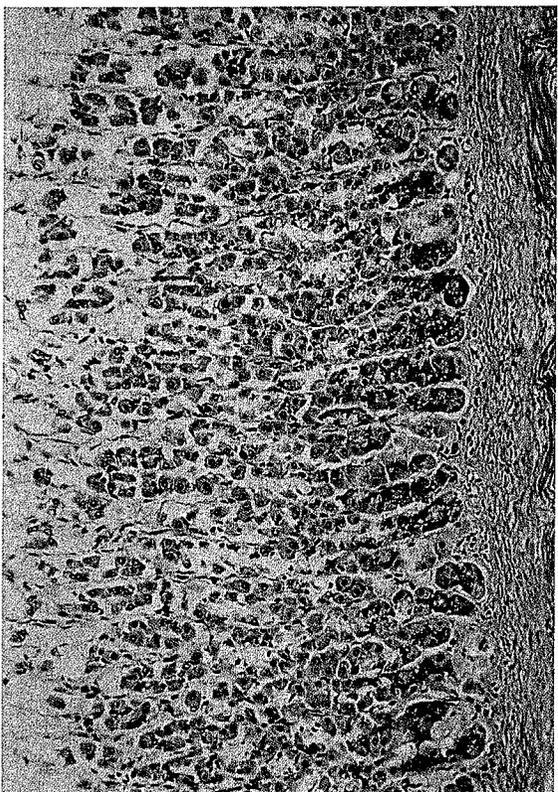
6



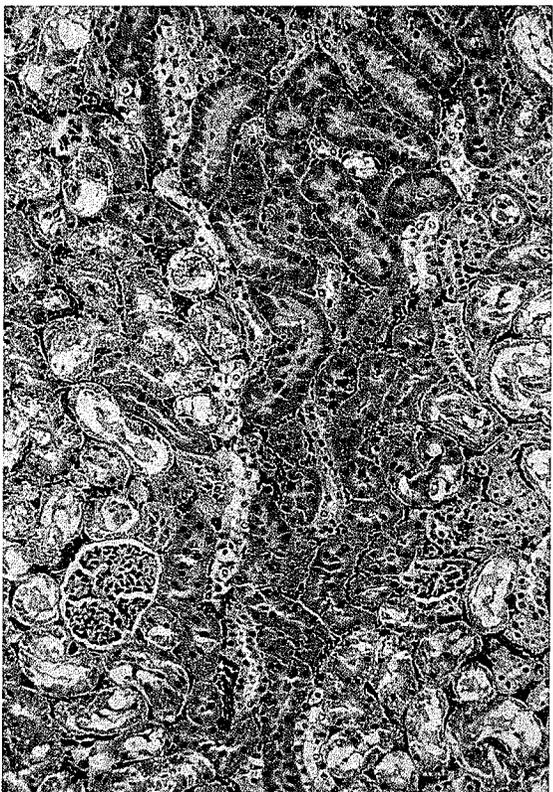
8



5



7



経胎盤法・新生仔投与方法によるマウス発癌試験（予備的考察）

佐々木 美枝子*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Carcinogen Bioassay in Mice—Preliminary Experiments on Transplacental and Neonatal Treatments of Test Substance

MIEKO SASAKI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Keywords: 発癌性 Carcinogenicity, ICR マウス ICR mice, 経胎盤発癌 Transplacental Carcinogenicity, 新生仔投与方法 Treatment on Neonatal Mice, チアベンダゾール Thiabendazole

緒 言

化学物質の発癌性の検索は毒性研究のきわめて重要な部門の一つである。最近、発癌性と突然変異誘起性、染色体異常誘起性との関連性がしだいに明らかになり、微生物や培養細胞を用いた *in vitro* の系で発癌性のスクリーニングがさかんに行われるようになった。しかし現在でも、最終的には動物を用いて発癌性の有無をテストすることが必要であるとされている。

動物を用いる実験方法として、成熟動物を使う試験の他に、経胎盤法と新生仔法とが知られている。前者は妊娠中の母体に化学物質を投与してその子孫動物における腫瘍発生の有無をみるものであり、後者は化学物質を出生直後の新生仔期の動物に投与しその腫瘍発生をみるものである。化学物質を妊娠動物に与えた場合、その物質あるいはその代謝物が胎盤を通過して胎仔に作用し、生後腫瘍を発生させることは経胎盤発癌として知られている。妊娠時期の母体がある種の化学物質にさらされた場合に、その子供に特異的な腫瘍が発生する例は臨床医学的にもいくつかの症例がある。また妊娠のどの時期に化学物質にさらされるかによって、妊娠中期では奇形の発生が、妊娠後期では腫瘍発生がみられる例も動物実験において知られている¹⁻³⁾。新生仔投与発癌試験は、出生直後、24時間以内に動物に被検物質を投与する方法である。一般に新生仔期の動物は発癌物質に対する感受性が高い。これは、新生仔期は各組織器官が急速に増大する時期であること、また内分泌器官や免疫機能が未発達であることにも起因していると思われる⁴⁾。このような点から考えて、経胎盤発癌試験や新生仔投与発癌試験は、奇形の発生や小児がんの問題などと密接な関係がある。

当研究部では、化学物質の慢性毒性試験の一環として成熟動物に対する発癌性について検索し、また妊娠動物

に化学物質を投与することにより催奇形性の検討がなされているが、これらの実験成績に合わせて、経胎盤・新生仔投与発癌試験を行うべく準備をすすめている。今回防カビ剤であるチアベンダゾールを被検物質として、これらの方法による発癌試験のための予備実験を行ったので、その結果について報告する。

材料および方法

実験動物としては当部動物飼育室において自家繁殖させた8~12週令のICRマウス、雌58匹、雄18匹を用いた。雌マウスは発情周期を観察して18匹、18匹、24匹の3群に分け、1群づつ3回に分けて交配させた。雌マウスと雄マウスを1:1あるいは3:1に同居させ毎朝雌マウスの陰栓の有無を観察した。陰栓の認められたものを妊娠マウスとみなし、妊娠0日とした。妊娠マウスは雄と分離してプラスチックケージに個別飼いとす。42匹の妊娠マウスのうち、経胎盤発癌試験に35匹を、新生仔投与発癌試験に7匹を用いた。新生仔マウスは出産後24時間以内に体重を測定し、そのまま母マウスに哺乳させた。出生後30日目に仔マウスを母マウスと分離し、体重を測定したのち雌雄に分けて、大型のアルミケージに移して飼育を続けた。ケージあたりの匹数は5~10匹とした。動物は全実験期間中、温度25±1°、湿度55±5%、照明午前9時~午後5時、換気毎時10回の動物飼育室で飼育し、日本クレア製固型飼料CE-2および水道水を自由摂取させた。

被検物質として用いたチアベンダゾール(Thiabendazole, 東京化成 TCI-E.P. Lot. AL01, 以下TBZと略記する)は、経胎盤投与の場合にはオリーブ油に懸濁させ胃ゾンデによって妊娠マウスに強制経口投与を行った。投与量は小豚らの行った催奇形性実験の量を参考にしたが、詳細は結果の項に記す。また、新生仔投与の

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

表 1. 妊娠後期 TBZ 投与の出産におよぼす効果 (1)

(実験 1)

| No. | TBZ (mg/kg)*1 | | 新生仔数 (出産数) | 新生仔死亡 | | 新生仔平均体重*2 |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------|--------|-----------|
| | | | | 24hr 以内 | 2wk 以内 | |
| 1 | 1500 | 出 産 (SS-19)*3 | 9 | 0 | 0 | 1.57g |
| 2 | " | 流 産 (SS-18) | — | — | — | — |
| 3 | " | 出 産 (SS-20) | 9 | 1 | 1 | 1.68 |
| 4 | " | 流 産 (SS-18) | — | — | — | — |
| 5 | " | 出 産 (SS-21) | 6 | 6 | — | — |
| 6 | " | 母体死亡 (SS-17) | — | — | — | — |
| 7 | 750 | 母体死亡 (SS-17) | — | — | — | — |
| 8 | " | 出 産 (SS-20) | 11 | 0 | 1 | 1.90 |
| 9 | " | 母体死亡 (SS-17) | — | — | — | — |
| 10 | " | 出 産 (SS-20) | 8 | 0 | 0 | 1.90 |
| 11 | " | 流 産 (SS-17) | — | — | — | — |
| 12 | " | 出 産 (SS-21) | 8 | 5 | 0 | NT*4 |
| 13 | 0 (オリーブ油) | 出 産 (SS-19) | 12 | 0 | 0 | 1.63 |
| 14 | " | " (SS-19) | 13 | 0 | 0 | 1.63 |
| 15 | " | " (SS-20) | 11 | 0 | 0 | NT |
| 16 | " | " (SS-20) | 7 | 0 | 1 | NT |
| 17 | " | " (SS-20) | 11 | 0 | 0 | NT |
| 18 | " | " (SS-18) | 14 | 0 | 0 | 1.71 |

*1 妊娠16日目のマウスに1500mg/10ml Olive oil/kg, 750mg/kg の TBZ および 10ml Olive oil/kg を強制経口投与した。

*2 新生仔体重は出生後24時間以内に測定した。

*3 () 内は妊娠日数を示す。

*4 測定せず。

場合には、TBZ 50mg を 1ml の DMSO (Dimethyl sulfoxide) に溶解し、この原液を 3 倍段階希釈して原液の 1/3, 1/9, 1/27 濃度の溶液を作成した。各濃度の溶液および溶媒として用いた DMSO の各 0.01ml を生後 24 時間以内の新生仔マウスの背部皮下に注射した。

結 果

経胎盤発癌試験：実験 1 として、18 匹の妊娠マウスを 6 匹ずつの 3 群に分け、妊娠 16 日目にオリーブ油に懸濁した TBZ およびオリーブ油のみを胃ゾンデにより強制経口投与した。投与量は 1500mg TBZ/10ml olive oil/kg, 750mg TBZ/10ml olive oil および 10ml olive oil/kg である。この投与方法は催奇形性試験において用いられている方法であるが、妊娠 16 日目のマウスでは投与容量はマウスあたり 0.5ml に達した。この方法で TBZ を投与したマウスの出産への影響、新生仔の生死、および新生仔の出生後 24 時間以内の平均体重を表 1 に示した。TBZ 1500mg/kg 投与群では、1 匹が翌日死亡、2 匹が妊娠 18 日目に流産、1 匹では出産の遅延がみられた上に新生仔は出産後死亡し、生仔が得られたのは 2 匹の母マウス

からのみであった。TBZ 750mg/kg 投与群でも母体死亡 2, 流産 1, 出産後新生仔の 5/8 が死亡したものと、妊娠マウスに対する急性毒性が認められた。オリーブ油のみの投与では母体死亡、流産はなく、出生した新生仔の死亡もほとんど認められなかった (表 1)。

実験 1 の投与方法では経口投与容量がマウスにとって多量すぎ、そのための影響も考えられたので、つぎに投与容量をマウスあたり 0.1ml に限定し、マウスあたり 25mg, 12.5mg の TBZ を妊娠 16, 17, 18 日目に 3 日間連続投与する方法を試みた (TBZ 濃度は 250mg/ml olive oil および 125mg/ml olive oil)。TBZ 投与量は体重あたりの量に換算すると 500~600mg および 250~350mg/kg/day となる (実験 2)。

各投与量につき 1 群 6 匹の妊娠マウスにこの投与方法で TBZ 連続投与を行ったところ、母体死亡、流産は全くみられなかった。出産新生仔数は母マウスあたり 7~12 匹、総数 108 匹で、このうち 12.5mg TBZ 投与群の 2 匹の仔マウスが離乳期に死亡した以外に仔マウスの死亡もみられなかった。

表 2. 妊娠後期 TBZ 投与の出産におよぼす効果 (2)

(実験 2)

| No. | TBZ 量*1 | 生存数/出産仔数*2 | 離乳前死亡*3 | TBZmg/kg/日*4 |
|-----|--------------|------------|---------|--------------|
| 21 | 25mg/mouse | 10/10 | 0 | 595~470 mg |
| 22 | " | (非妊) | — | — |
| 23 | " | 11/11 | 0 | 560~475 |
| 24 | " | 7/7 | 0 | 555~480 |
| 25 | " | 9/9 | 0 | 640~540 |
| 26 | " | 9/9 | 0 | 560~480 |
| 27 | 12.5mg/mouse | 11/11 | 0 | 295~250 |
| 28 | " | 10/10 | 0 | 300~260 |
| 29 | " | 8/8 | 0 | 330~292 |
| 30 | " | 10/10 | 1 | 335~318 |
| 31 | " | 11/11 | 0 | 320~290 |
| 32 | " | 12/12 | 1 | 325~272 |

(実験 3)

| No. | TBZ 量*5 | 生存数/出産仔数*2 | 離乳前死亡*3 | TBZmg/kg*4 |
|-----|------------|------------|---------|------------|
| 41 | 50mg/mouse | 7/7 | 0 | 1300 mg |
| 42 | " | 10/10 | 0 | 1100 |
| 43 | " | 10/12 | 0 | 1100 |
| 44 | " | 12/12 | 0 | 1300 |
| 45 | " | 11/11 | 0 | 1200 |

*1 TBZ25mg または 12.5mg/0.1ml オリーブ油/マウスを妊娠 16, 17 および 18 日目に 3 日連続経口投与した。

*2 生後 24 時間以内の生存新生仔数/出産仔数

*3 生後 3 週間以内の死亡

*4 体重あたりの TBZ 投与量

*5 TBZ 50mg/0.2ml オリーブ油/マウスを妊娠 17 日目に投与。

表 3. 新生仔期 TBZ 投与結果

| TBZ 量*1 | 生存仔数/新生仔数*2 | 離乳前死亡 | TBZ/kg*3 |
|---------------|-------------|-------|----------|
| 1:1 (50mg/ml) | 12/13 | 0 | 300mg |
| 1:3 | 9/12 | 1 | 100 |
| 1:9 | 11/11 | 0 | 30 |
| 1:27 | 14/14 | 0 | 10 |
| 0 (DMSO) | 13/13 | 1 | 0 |

*1 50mg/ml 溶液およびその 1/3, 1/9, 1/27 濃度の希釈液を DMSO を溶媒として作成した。出生後 24 時間以内の新生仔マウスの背部皮下に各濃度溶液の 0.01ml を注射した。

*2 注射後 24 時間以後の生存仔数/投与新生仔数。

*3 新生仔体重 1.5g と仮定した場合の TBZ 投与量/kg 体重。

実験 1 では 750mg/kg の TBZ の単回投与で半数の母マウスの死亡または流産がみられている。投与容量を減らした場合にも同じ現象がみられるかどうかを検討するため、実験 2 と同じく 250mg TBZ/ml olive oil 懸濁液をつくり、その 0.2ml を妊娠 17 日目の 5 匹のマウスに単回投与した (50mg TBZ/マウス)。この投与量を体重あたりの量に換算すると 1100~1300mg/kg に相当した (実験 3)。この場合にも母マウスの死亡および流産は全くみら

れず、全例が正常に出産した。出産仔数は母マウスあたり 7~12 匹、総数 52 匹で、このうち同一の母マウスから生れた 2 匹の新生仔 (このマウスの出産仔数は 12) が出生後 24 時間以内に死亡したが、他の 50 匹は離乳時まで正常に生育した。

実験 2, 実験 3 の成績から考えて、これらの投与方法で妊娠マウスに対する TBZ の最大耐量を求めることはできず、さらに方法の検討が必要と思われた。

新生仔投与発癌試験 新生仔投与方法での TBZ の最大耐量を決定するために、50mg/ml の TBZ 溶液およびその 1/3, 1/9, 1/27 希釈溶液を作成し、その 0.01ml を出生後 24 時間以内の新生仔マウスの背部皮下に注射した。この投与量は、新生仔マウスの体重を 1.5g と仮定した場合、各々 300, 100, 30, 10mg/kg に相当する。コントロールとして TBZ を溶解させるために用いた溶媒である DMSO 0.01ml を同様に注射した。この結果、TBZ 1/1 溶液 (50mg/ml) の 0.01ml を注射した 13 匹の新生仔に 1 匹、その 1/3 希釈液を注射した 12 匹に 3 匹の 24 時間以内の死亡がみられた。1/3, 1/27 希釈液および DMSO の注射によっては 1 群 11~14 匹のマウスに死亡は全くみられなかった。TBZ または DMSO の皮下注射によって注射部位は発赤し、さらに壊死をおこすものもあったが、発毛の時期にはしだいに回復し、離乳期以後には注射局所には何ら所見は認められなかった。

考 察

当研究部の小縣らは、TBZ を妊娠中期の ICR マウスに経口投与するとその胎児に奇形が発生することを観察している(私信)。経胎盤投与試験においては小縣らの投与方法を参考にして投与量を決めたが、妊娠後期にはマウスの体重がいちぢるしく増加するために投与容量が多量になる。この点を考慮して経口投与の容量を減らした実験では TBZ の急性毒性は顕著に低下した。実験 1 では TBZ 濃度は 150, 75mg/ml であり、実験 2 および 3 では 250, 125mg/ml としたが、この懸濁液の濃度および経口投与容量が毒性に大きく影響することが考えられる。高濃度の懸濁液を少量投与した場合には投与物質

の吸収が不完全なのかも知れず、また多量の経口投与では母体に対する物理的・生理的効果が加味されるかも知れない。投与容量、TBZ 濃度の問題や、懸濁液とする際の溶媒の問題等、さらに検討をすすめている。

新生仔投与試験に関しては、この投与量では新生仔マウスに対する最大耐量を決定できなかったもので、投与量を増やして LD を決め、発癌試験における投与量を決定する必要があり、この点に関しても実験を計画中である。

胎仔期あるいは新生仔期に TBZ の投与をうけたこれらのマウスはすでに 7~8 カ月間飼育観察中である。この間、死亡例、屠殺例について剖検所見、血清の生化学的検査および骨髓細胞の染色体分析などの検索を行っている。これらのマウスには、雄マウスにアミロイドーシスと思われる皮膚炎および膀胱の結石、雌マウスに胸腺肥大および白血病が多発する傾向がみられるが、対照群との比較検討が未だ不十分のため結論を出すにいたっていない。これらの各種検索および組織学的所見を検討しこの予備実験から得られた成績を参考にして、TBZ の経胎盤発癌試験、新生仔投与発癌試験の本実験を行うべく、準備をすすめている。

参考文献

- 1) Larsen, C.D.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 8, 63, 1947
- 2) Aaron, H.H., Schneerson, S.J., et al: *J. Am. Med. Assoc.*, 159, 848, 1955
- 3) Nomura, T., and Okamoto, E.: *Gann*, 63, 731, 1972
- 4) Toth, B.: *Cancer Res.*, 28, 727, 1968

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1979.7—1980.6)

Concentrations

S. Oishi and K. Hiraga: *Toxicology*, 15 (3), 197, 1980

フタル酸エステル類のラットにおける主要代謝物であるフタル酸モノエステルの精巢萎縮作用をウイスター系雄ラットを用いて実験した。使用したモノエステルは、モノブチル(MBP), モノイソブチル(MIBP), モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) およびモノオクチル (MOP) であり, これらは無水フタル酸と当該アルコールより合成し, 2%濃度でラット飼料に添加して1週間摂取させた。MBP, MIBP および MEHP は精巢萎縮作用を示したが, MOP は萎縮を生じなかった。精巢萎縮群の精巢中テストステロンは上昇し, 亜鉛濃度は減少していた。これらの結果はジエステルの結果と一致しており, フタル酸エステルの精巢萎縮作用はジエステルそのものより, その代謝物であるモノエステルによるものと考えられた。

Biological fate of butylated hydroxytoluene (BHT)-Binding of BHT to nucleic acid *in vivo*

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: *Biochem. Pharmacol.*, 29 (9), 1304, 1980

^{14}C で標識した BHT をラットに経口投与した後, 肝のタンパクおよび核酸と結合した放射能について検討した。タンパク分画の全放射能は投与6時間後に最高になり, 以後減少した。一方, 核酸分画の放射能は経時的に増加し, 1週間後においても一定の値を維持した。特に RNA 中の比放射能は経時的な増加を示し, 1週間後では DNA の18倍, タンパクの35倍であった。さらにこれらの高分子と結合した放射能はフェノバルビタール前処置ラットにおいていずれも増加(RNA で170%, DNA で153%, タンパクで154%)した。

Effect of pretreatment with butylated hydroxytoluene (BHT) on binding of ^{14}C -BHT to lung microsomes

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: *J. Pharm. Dyn.*, 3 (6), 314, 1980

肺マイクロソームと ^{14}C -BHT の結合について, BHT 前処置による影響を *in vitro* で調べた。BHT を前処置したラットにおいて, ミクロソーム高分子と結合した放射能は顕著に減少した。この減少はチトクロム P-450 量と BHT oxidase 活性の減少を伴い, さらにこれらの3成分の挙動は BHT 投与量に依存した。一方, フェノバルビタールを前処置したラットではこのような変化はみられなかった。

Effect of Dietary Protein Deficiency on Rat Hepatic Drug-Metabolizing Enzyme System

Sumie Kawano and Kogo Hiraga: *Japan. J. Pharmacol.*, 30, 75, 1980

We have examined the effect of dietary protein deficiency on rat hepatic drug-metabolizing enzyme system for a period of two months. Cytochrome P-450 and b_5 contents in liver microsomes, which were plotted on semilogarithmic paper as a function of the time of deficiency, showed biphasical reductions during protein deficiency: rapid decreases in the first 3 weeks were followed by more gradual decreases. However, the three enzymatic activities examined, i.e. aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase and p-nitroanisole demethylase, were not reduced at a uniform rate. In the earlier phase, activities of the former two enzymes were reduced more rapidly than that of the last phase. This biphasical and non-uniform reduction of enzymatic activities suggests the existence of two or more cytochrome P-450 subspecies in non-depleted male rats. Intraperitoneal administration of well-known environmental pollutants, polychlorinated dibenzofurans and biphenyls (100 μg and 100mg/kg, respectively) to the depleted rats resulted in a marked induction of drug-metabolizing enzymes. However, as the deficiency became more severe (2 months), the induction declined to a considerable degree, especially in the case of polychlorinated biphenyl administration.

学 会 发 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1979.7—1980.6)

神谷信行, 坂本義光, 中尾順子, 平賀興吾: クロム鉍
さい粉じんのラットによる1および3ヶ月間持続吸入実
験 (クロムの体内分布について)

日本薬学会第99年会 (1979. 8)

中川教子, 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52回日本生化学会大会 (1979. 10)

中尾順子, 中尾 真: Na, K. ATPase の高速液クロ
ムによる分画とサブユニット構造

第52回日本生化学会大会 (1979. 10)

中尾 真, 道源正子, 中尾順子, 長井二三子, 田端介
富: 赤血球膜の強化法とその機序

第52回日本生化学会大会 (1979. 10)

原しげ子, 原 諭吉, 中尾順子, 中尾 真: Na, K.
ATPase の Showdomycin 阻害

第52回日本生化学会大会 (1979. 10)

神谷信行, 坂本義光, 中尾順子, 平賀興吾: クロム鉍
さい粉じんのラットによる7日間持続吸入実験 (クロム
の体内挙動)

日本薬学会第100年会 (1980. 4)

市川久次, 小林博義, 中尾順子, 中川茂男: 幼若ラッ
トにおいて出現した CPC 高張部瞬時溶血についての検
討

第42回日本血液学会総会 (1980. 4)

中尾順子, 長井二三子, 中尾 真: 蔗糖添加新保存液
AIS-CPD の保存効果

第28回日本輸血学会 (1980. 6)

大石真之, 平賀興吾: フタル酸エステル類の精巢萎縮
作用

第53回日本薬理学会総会 (1980. 3)

中川好男, 平賀興吾, 須賀哲弥: ジブチルヒドロキシ
トルエン (BHT) と肝高分子の結合

日本薬学会第100年会 (1980. 4)

高橋 省, 平賀興吾: Butylated hydroxytoluene の
出血致死効果: 肝臓ミクロソーム内でのフィロキノンエ
ポキシド依存プロテインカルボキシル化反応に対する
2,6-di-tert-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadieno-
ne の阻害作用

第62回日本薬理学会関東部会 (1980. 6)

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

木 村 康 夫 (委員長)

五味 淵 弘 平

寺 山 武

藪 内 清

下 平 彰 男

原 田 裕 文

村 上 一

西 垣 進

石 川 隆 章

中 尾 順 子

昭和55年12月1日 発行

規格表 第 2 類
印刷番号 (55) 814
刊行物番号 (H) 24

東京都立衛生研究所研究年報第31-2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

〒131 東京都墨田区向島3-33-5
電 話 03 (625) 7481 (代)