

5131e-2

ISSN 0082 — 4771

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

32-2

1981

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



序

時の流れは迅瀨のごとく、科学の進歩は激流のごとく、当衛生研究所の内に流れ来たり、また流れ去ります。

都立の四医学系研究所が、昭和56年度から財団法人化されることになったという厳しい行財政環境のもとで、当衛生研究所も、行政の試験研究機関としての存在意義と実績を問われております。この責任の重大さを充分にわきまえて、試験検査、調査研究、技術研修等、研鑽を続ける覚悟でおります。

さて、本研究所は、昭和45年の技術職員増員から11年、昭和47年の組織機構改革から9年を経過して、いまや技術的にも最も円熟した時かと存じます。

一方、保健所の特別区移管から6年を経過し、23区はそれぞれ衛生検査所や検査センターを新設し、あるいは既存の施設を充実強化するなど、区衛生行政の独自の試験検査を始める時期にもなっております。当研究所といたしましては、これら区衛生検査施設の機能発揮に援助を惜しまないつもりでおりますし、今後23区が名実ともに科学的な自治衛生行政ができるものと期待いたします。同時に都区間、区区間の検査情報提供等についても尽力したいと存じます。

このような現状から、今後における当衛生研究所の任務は、次第に調査研究と研修に重点が移行するとともに、公衆衛生情報の解析提供、検査精度管理へと進展するものと存じます。

特に調査研究に関しては、研究者にとってやりがいのある、また生きがいのある分野であり、この意味において、調査研究の成果を発表する本研究年報の果たす役割は益々重要となってまいります。

本号にも81編の論文が掲載されておりますが、それぞれ著者の自負する新知見を披瀝しております。忌憚のない御指摘、御批判、御鞭撻をいただければ誠に幸いと存じます。

昭和56年12月

東京都立衛生研究所長 野 牛 弘

目 次

報 文

チアベンダゾールのマウスを用いた急性経口毒性試験	林田 志信, 三栗谷久敏, 平賀 興吾.....	1
チアベンダゾールのラットを用いた亜急性毒性試験	三栗谷久敏, 林田 志信, 高橋 博, 井口 重孝, 平賀 興吾.....	5
チアベンダゾールのラットを用いた亜急性毒性試験—病理検索—	藤井 孝, 福森 信隆, 長澤 明道, 三栗谷久敏, 林田 志信, 高橋 博, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 平賀 興吾.....	16
チアベンダゾールと酸化防止剤の相互作用によるサルモネラ菌に対する突然変異誘起性について	藤田 博, 平賀 興吾.....	25
オルトフェニルフェノールナトリウムの品質試験および添加飼料中の定量	溝入 茂, 広門 雅子, 中島 和雄, 中嶋 巖, 遠藤 英美.....	28
オルトフェニルフェノールのラットを用いた亜急性毒性試験	中村 清純, 井口 重孝, 池田 虎雄, 平賀 興吾.....	33
オルトフェニルフェノールによる C57BL/6N マウス被毛の脱色素について	田山 邦昭, 井口 重孝, 平賀 興吾.....	40
経口投与オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) の代謝	大槻 慶子, 樺島順一郎, 中尾 順子.....	51
オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) 投与によるサイクリックヌクレオチドの変動	中川 敦子, 中尾 順子.....	53
経口投与オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) のラット体内酵素への影響	長井二三子, 中尾 順子.....	57
オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のラット尿中酸性フォスファターゼにおよぼす影響	樺島順一郎, 中尾 順子.....	61
ニホンウズラにおけるジブチルヒドロキシトルエンの短期毒性	高橋 省, 平賀 興吾.....	65
2, 4, 6-トリブチルフェノールのイヌにおよぼす影響	高橋 省, 林田 志信, 平賀 興吾.....	67
細胞障害時における脂質過酸化物の形成 (第1報) 四塩化炭素障害に対する BHT の作用	福森 信隆, 平賀 興吾.....	69
クロム鉱さい粉じんのラットによる1カ月間持続吸入実験——吸入後終生飼育ラット呼吸器系の病理学的観察	坂本 義光, 神谷 信行, 池田 虎雄, 平賀 興吾.....	77
クロム鉱さい粉じんのラットによる7日間持続吸入実験 (第2報) 臓器中クロムの分析	神谷 信行, 坂本 義光, 中尾 順子, 平賀 興吾.....	85
アセトアミノフェン投与ラットにおける血液および病理学的検討	多田 幸恵, 藤井 孝, 福森 信隆, 坂本 義光, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 平賀 興吾.....	89

MNNG の突然変異原性, 染色体異常誘発性におよぼすアニリン系薬剤の効果について	佐々木美枝子, 吉田 誠二, 中尾 順子, 平賀 興吾.....	97
Phenobarbital および 3-Methylcholanthrene で誘導した S-9 mix の前変異原物質への 姉妹染色分体交換(SCE)および染色体異常誘発効果の比較検討	縄井寿美子, 吉田 誠二, 中尾 順子, 平賀 興吾.....	103
生物発光法によるラット血中 ATP 量の加令による変化	市川 久次, 小林 博義, 中尾 順子.....	107
Nunc plate を用いた CHO-K1 細胞の染色体標本作製	吉田 誠二, 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾.....	111
F344/Du (Fischer) ラットにおける飼料中化学物質添加濃度と化学物質摂取量の関係について	井口 重孝, 高橋 博, 平賀 興吾.....	115
F344/Du (Fischer) ラットの体重増加曲線について	高橋 博, 井口 重孝, 平賀 興吾.....	121
他 誌 発 表.....		129
学 会 発 表.....		133

CONTENTS

REPORTS

Acute Oral Toxicity of Thiabendazole in Mouse S. Hayashida, H. Mikuriya and K. Hiraga.....	1
Subacute Toxicity of Thiabendazole by Food Administration to Rats H. Mikuriya, S. Hayashida, H. Takahashi, S. Iguchi and K. Hiraga.....	5
Pathological Study on Rats Fed with Thiabendazole for 13 WeeksT. Fujii, N. Fukumori, A. Nagasawa, H. Mikuriya, S. Hayashida, H. Takahashi, N. Yano, K. Yuzawa and K. Hiraga.....	16
Comutagenic Effect of Antioxidants on the Mutagenicity of Thiabendazole in the <i>Salmonella</i> / Microsome Test H. Fujita and K. Hiraga.....	25
Quality and Determination of <i>o</i> -Phenylphenol -Na in Animal Feeds S. Mizoiri, M. Hirokado, K. Nakajima, I. Nakajima and F. Endo.....	28
Subacute Toxicity of <i>o</i> -Phenylphenol by Food Administration to Male Rats K. Nakamura, S. Iguchi, T. Ikeda and K. Hiraga.....	33
Depigmentation Caused by <i>o</i> -Phenylphenol in Hair of C57BL/6N Mice K. Tayama, S. Iguchi and K. Hiraga.....	40
Urinary Metabolites of <i>o</i> -Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) by Oral Administration K. Ohtsuki, J. Kabashima and T. Nakao.....	51
Alteration of Cyclic Nucleotide Levels by Dietary Administration of Sodium ortho Phenylphenate (OPP-Na) in Rat.....A. Nakagawa and T. Nakao.....	53
Effect of <i>o</i> -Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) on Rats Enzymes <i>in vivo</i> F. Nagai and T. Nakao.....	57
Effect of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) on Acid Phosphatase in Rat Urine J. Kabashima and T. Nakao.....	61
Short-Term Toxicity of Butylated Hydroxytoluene in Japanese Quail O. Takahashi and K. Hiraga.....	65
Toxicity of 2,4,6 -Tri- <i>tert</i> -butylphenol in Beagle Dogs O. Takahashi, S. Hayashida and K. Hiraga.....	67
Formation of Lipid Peroxides in Cell Injury (I) Effects of Butylated Hydroxytoluene on Carbon Tetrachloride-induced Intoxication N. Fukumori and K. Hiraga.....	69
Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 1 Month-Pathological Observation of Respiratory System of the Rats kept for Lifespan after the Periods of Exposure Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga.....	77
Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 7 Days (II) Analysis of Chromium in Rat Tissues.....N. Kamiya, Y. Sakamoto, T. Nakao and K. Hiraga.....	85
Hematological and Histopathological Studies of Rats Fed with AcetaminophenY. Tada, T. Fujii, N. Fukumori, Y. Sakamoto, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa and K. Hiraga.....	89

Additional Effect of Phenacetin and its Derivatives on the Mutagenicity and Clastogenicity of MNNG	M. Sasaki, S. Yoshida, T. Nakao and K. Hiraga.....	97
Comparison of Induced Sister Chromatid Exchanges (SCEs) and Chromosome Aberrations by Promutagens Activated with S-9 mix Pretreated with Phenobarbital or 3-Methylcholanthrene	S. Nawai, S. Yoshida, T. Nakao and K. Hiraga	103
Changes with Age of ATP Contents in Rat Blood Measured by Bioluminescent Technique	H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao	107
Chromosome Preparations from CHO-K1 Cells used Nunc Plate	S. Yoshida, M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga.....	111
Relation of Part per Million in Diet to Milligram per Kilogram Body Weight per Day in F344/Du (Fischer) Rat.....	S. Iguchi, H. Takahashi and K. Hiraga.....	115
Growth Curve in F344/Du (Fischer) Rat	H. Takahashi, S. Iguchi and K. Hiraga.....	121
SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS		129
THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS		133

報 文

REPORTS

チアベンダゾールのマウスを用いた急性経口毒性試験

林 田 志 信*, 三栗谷 久 敏*, 平 賀 興 吾*

Acute Oral Toxicity of Thiabendazole in Mouse

SHINOBU HAYASHIDA*, HISATOSHI MIKURIYA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: チアベンダゾール thiabendazole, 駆虫薬 anthelmintic, 食品添加物 food additive, 農薬 pesticide, 防ばい剤 fungicide, マウス Mouse, 急性毒性 acute toxicity

緒 言

チアベンダゾール Thiabendazole (以下 TBZ と略す) は1961年に駆虫薬として開発されたが, 防ばい剤としても用いられている。わが国では1978年に食品添加物に指定され, 柑きつ類およびバナナへの保存料として使用が認められ, 続いて農薬・殺菌剤としても指定された。TBZ の毒性については Robinson ら¹⁾ が報告しているが, 安全性再検討の一環としてマウスを用いて急性毒性試験を行った。本試験では投与担体としてオリーブ油を用い, これに懸濁して投与したが, この際, 担体の容量による50%致死量への影響を併せて観察した。なおラットによる急性毒性試験結果はすでに報告した²⁾。

実験材料および方法

TBZ: Merck Sharp & Dohme International 社 thiabendazole microfine MSD (Lot No. BZA-539, 純度 98.5%以上)を用い, 投与容量が 20ml/kg ないし 10ml/kg となるよう日本薬局方オリーブ油に懸濁し使用した。

実験動物: 日本クレーン飼育の JCL-ICR 系マウスを用い, 雌雄 6 週令で購入し 2 週間飼育後 8 週令で, それぞれ発育良好なものを実験に供した。

飼育条件: 室温 25±1°, 湿度 50~60%, 換気毎時 10 回, 照明は午前 6 時から午後 5 時の飼育室において, プラスチックケージ (大きさ 175×245×125mm) 杉材チップ床敷を使用し, それに 5 匹ずつ収容し, 日本クレーン飼育 CE-2 固型飼料および水道水 (給水ビン) を自由に摂取させた。

投与観察法: 投与前日の午後 5 時より除餌し, 水のみを自由に与え, 午前 9 時 30 分から 10 時 30 分までの間に TBZ を胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与 4 時間後に飼料を与えた。

投与後の一般症状および生死の観察は, 24 時間までは 1 ないし 2 時間毎に, 2 日目以後は朝夕 2 回観察した。

死亡マウスは直ちに剖検, 生存マウスは毎日 9 時 30 分に体重測定をし, 投与後 15 日目にと殺, 剖検した。また 1 週間の死亡率にもとづき, Litchfield-Wilcoxon 法³⁾によって 50%致死量 (LD₅₀) を求めた。

実験 1: オリーブ油容量を 20ml/kg とし, TBZ 750, 1500, 3000 および 6000mg/kg を雌雄マウス各 10 匹に投与した。対照としてオリーブ油 20ml/kg のみ投与と無投与を設けた。

実験 2: オリーブ油容量を 20ml/kg, TBZ 量を実験 1 の結果にもとづき雄マウス 1000, 1300, 1690 および 2200 mg/kg を, 雌マウス 1300, 1690, 2200 および 2860 mg/kg として雌雄各 5 匹に投与した。

実験 3: オリーブ油容量を 10ml/kg とした実験と同一の TBZ 量を雌雄マウス各 10 匹に投与した。

結果と考察

一般症状は実験 1, 2 および 3 を通じて同様であったので一括して述べる。

オリーブ油のみ投与した対照群では, 投与直後より立毛し, うずくまり, 眼の「しょぼつき」がみられた。2~4 時間ごろから少数に軟便ないし下痢が認められ, 飲水を盛んに行った。4 時間後に飼料を与えるとすぐ摂餌をはじめ, 24 時間後には, 一夜絶食により減少した体重もほとんど回復し, その後は発育も順調であった。

TBZ 投与各群では, 投与直後より立毛し, うずくまり, 眼をしょぼつかせ, 中濃度投与以上では, 流涙が認められた。30 分前後より, 頭が重い様な形で頭部を下げたふらふら歩きし, 頭の方から倒れるものが多かった。倒れたままあるいは再び立ち上がり同様の行動を繰返した後, 不動状態となり死に至った。早期死亡例の剖検所見ではほとんど異状はみられず, まだ胃内に薬物が残存していた。18 時間以降の死亡例では, 胃特に幽門部の屈りに 3~4 個の出血点がみられ潰瘍を形成していた。そ

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

表 1. チアベンダゾールをオリーブ油20ml/kg に懸濁して経口投与した JCL-ICR 系マウスの死亡発生時間と死亡数 (実験 1)

性	群 (mg/kg)	動物 数	死亡 数	死 亡 時 間									
				0	10	15	20	24	1	2	3	4(日) (時間)	
雄	Control	5	0(0) ¹⁾										
	Olive Oil	5	0(0)										
	750	10	0(0)										
	1500	10	6(60)		1	1		1			2	1	
	3000	10	10(100)				2	2	3	1		1	1
	6000	10	10(100)		1		2		1	1		5	
雌	Control	5	0(0)										
	Olive Oil	5	0(0)										
	750	10	0(0)										
	1500	10	3(30)				1				2		
	3000	10	9(90)				2	4	2			1	
	6000	10	10(100)				1	2	1	1		2	3

1) 死亡率 (%)

表 2. チアベンダゾールをオリーブ油 20ml/kg に懸濁して経口投与した JCL-ICR 系マウスの死亡発生時間と死亡数 (実験 2)

性	群 (mg/kg)	動物 数	死亡 数	死 亡 時 間								
				0	10	15	20	24	1	2	3	4(日) (時間)
雄	Control ¹⁾	5	0(0) ²⁾									
	1000	5	1(20)									1
	1300	5	4(80)		1					2	1	
	1690	5	3(60)							3		
	2200	5	4(80)							3		1
雌	Control ¹⁾	5	0(0)									
	1300	5	2(40)		1	1						
	1690	5	2(40)				2					
	2200	5	3(60)		1	1	1					
	2860	5	3(60)				2			1		

1) オリーブ油投与

2) 死亡率 (%)

の他には異状を認めなかった。

各実験における死亡発生時間と死亡数、死亡率を表1、2および3に示した。実験1および2では、死亡開始は投与後10時間より、死亡ピークは15～20時間、最終死亡96時間で、雌雄間の死亡時間および死亡数に大差はなかった。実験3では死亡例が少なく明確には言えないが、実験1および2と大差はないが、雄ではやや開始、ピーク、最終死亡時間が遅れているようにみられる。実験2および3の死を免れた動物の体重の推移は図1および2に示す通りで、投与後2～3日まで体重減少を続けた後回復

に向かった。雄では実験2.1000mg/kg 投与群を除き、観察期間中オリーブ油投与対照群の体重まで到達することなく、これを平行的な体重増加(同じ勾配)を示した。雌では、オリーブ油投与対照群の体重増加に近づいた。7日間の死亡率にもとづいて求めた50%致死量(LD₅₀)を表4に示した。オリーブ油投与容量を20ml/kgとした実験1および2でのLD₅₀は雄1500mg/kgおよび1500mg/kg、雌1830mg/kgおよび1900mg/kgでほとんど一致し、雌の方が雄よりやや大きい値を示した。しかし、両実験とも雌雄に共通して適合する用量一致死亡率直線を引

表 3 チアベンダゾールをオリーブ油 10ml/kg に懸濁して経口投与した JCL-ICR系 マウスの死亡発生時間と死亡数(実験3)

性	群 (mg/kg)	動物 数	死 亡 数	死 亡 時 間											(日) (時間)	
				0	10	15	20	24	1	2	3	4	5	6		7
雄	Control ¹⁾	10	0 (0)													
	1000	10	1(10)							1						
	1300	10	3(30)						3							
	1690	10	4(40)					1	1			1				1
	2200	10	1(10)						1							
雌	Control ¹⁾	10	0 (0)													
	1300	10	1(10)				1									
	1690	10	0 (0)													
	2200	10	0 (0)													
	2860	10	3(30)				1	1								

1) オリーブ油を投与

2) 死亡率(%)

表 4. チアベンダゾールをオリーブ油に懸濁して経口投与された JCL-ICR 系マウスの急性毒性

実 験	オリーブ油 容 (ml/kg)	性	週 令	平均 体重(g)	± S D	死 亡 時 間 (時)			勾配函数 (S) ¹⁾	LD ₅₀ (95%信頼限界) ¹⁾ (mg/kg PO)
						開始	ピーク	最終		
1	20	♂	8	33.6 ± 2.2		10	15 ~ 20	72	2.00	1500 (2100~1071)
		♀	8	26.8 ± 1.9		16	16 ~ 20	72	1.46	1830 (2379~1307)
						(♂♀共通)			2.00	1500 (2100~1071)
2	20	♂	8	32.4 ± 1.2		12	20	96	1.59	1500 (2100~1190)
		♀	8	25.8 ± 1.5		12	15 ~ 20	48	1.67	1900 (2622~1377)
						(♂♀共通)			2.17	1400 (2240~ 875)
3	10	♂	8	34.2 ± 1.3		22	24 ~ 48	188	2.80	2800 (4200~1867)
		♀	8	27.0 ± 1.6		10	20	24	2.49	4200 (6510~2710)

投与量: 実験 1. ♂および ♀ 750, 1500, 3000, 6000mg/kg.

実験 2. ♂および ♀ 1000, 1300, 1690, 2200mg/kg.

♀ 1300, 1690, 2200, 2860mg/kg.

動物数: 実験 1. ♂および ♀ ともに各投与につき10匹

実験 2. ♂♀ともに各投与につき5匹

1) Litchfield-Wilcoxon 法による.

検定: 実験 1. ♂および ♀ における雌雄間および実験間の LD₅₀ 値に有意差を認めない. (P>0.05)実験 3. ♂および ♀ における雌雄間および実験 2. 間の LD₅₀ 値に有意差を認める. (P<0.05)

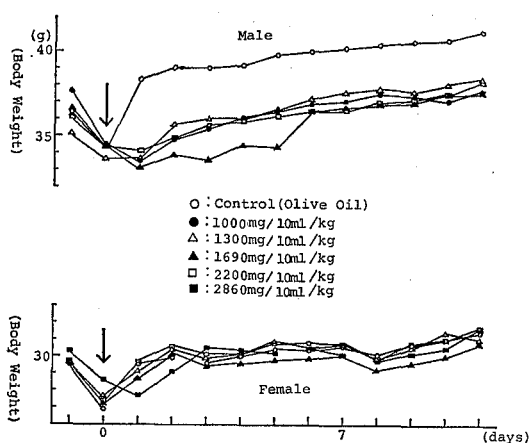
くことが出来, それぞれの LD₅₀ は 1500mg/kg と 1400mg/kg であった. すなわち雌雄間の LD₅₀ 値に差は認められなかった.

オリーブ油投与容量を 10ml/kg とした実験 3 では死亡例が少なかったが, LD₅₀ は雄 2800mg/kg, 雌 4200mg/kg と推定され, 雌雄間に有意差が認められた. また, TBZ 投与量を同一とし, 投与容量を 20ml/kg とした実験 2 の LD₅₀ 値と比較して, 有意に高値であり, 雌雄差

を明確に表わした. すなわち, 投与容量の差により LD₅₀ 値に明らかな差を生じた. この差の発現機作は不詳であるが, 今後 TBZ の毒性研究における投与にあたって考慮されるべきことである.

要 約

チアベンダゾール (TBZ) の JCL-ICR 系マウス雌雄における急性毒性を, オリーブ油懸濁液で投与容量を 20ml/kg と 10ml/kg とに調整経口投与した場合について



第1図 チアベンダゾールの JCL-ICR 系マウスにおける経口急性毒性の体重
↓: 試料投与 (午前 9.30~10.30)

検討した。

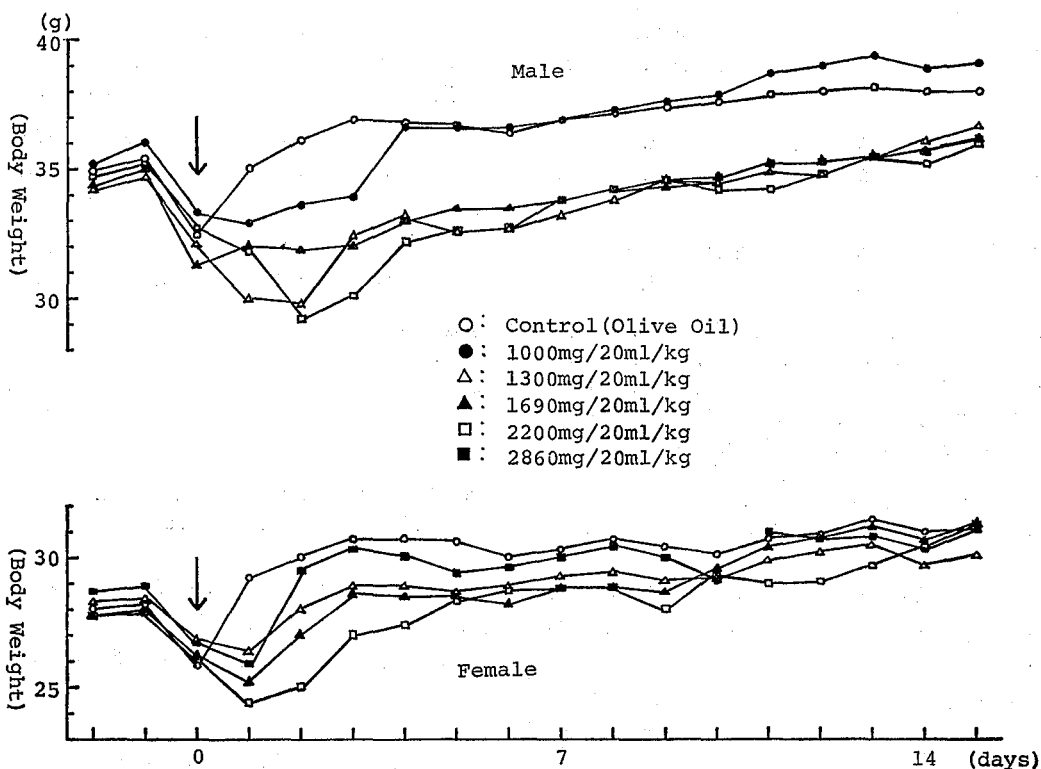
①急性症状は投与容量、雌雄においてはほぼ共通し、うずくまり、立毛、流涙、運動失調、体重低下で、死亡は

投与10時間頃よりはじまり、15~20時間に最も多く、大部分は48時間以内に終結した。死亡を免れた動物の初期の体重低下は、2~3日で回復に向かい、2週間の観察で、雄では、オリーブ油のみ投与の対照動物の体重と、2~4g前後の間隔でT B Z投与群が濃度別に推移し、雌では対照動物のそれに急速に接近した。死亡動物の剖検では胃に出血斑点(潰瘍形成)が散在した以外は顕著な変化はなかった。

②1週間の死亡率にもとづく LD_{50} 値は、20ml/kg 投与で雌雄とも1400mg/kg、10ml/kg投与では雄2800mg/kg、雌4200mg/kgで雌雄間に有意差が認められ、さらに20ml/kg投与との間の差も有意であった。

文 献

- 1) Robinson, H. J., Stoerk, H. C., and Greassle, O. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965
- 2) 三栗谷久敏, 林田志信, 高橋 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 20, 1980
- 3) Litchfield, J. T. Jr., and Wilcoxon, F.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96, 99, 1949



第2図 チアベンダゾールの JCL-ICR 系マウスにおける経口急性毒性の体重
↓: 試料投与

チアベンダゾールのラットを用いた亜急性毒性試験

三栗谷 久 敏*, 林 田 志 信*, 高 橋 博*, 井 口 重 孝*
平 賀 興 吾*

Subacute Toxicity of Thiabendazole by Food Administration to Rats

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

Keywords: チアベンダゾール thiabendazole, カビ防止剤 fungicide, 食品添加物 food additive, ラット rat, 亜急性毒性 subacute toxicity

緒 言

チアベンダゾール thiabendazole (以下 TBZ とする) は1961年に駆虫剤として開発されて以来, カビ防止剤としても使用されている。TBZ の毒性について Robinson¹⁾ は数種の動物を用いた短期および長期試験で顕著な害作用がないとしている。わが国では, 1978年に食品添加物に指定し, 柑きつ類およびバナナへのカビ防止剤として使用を許可した²⁾。しかし, 最近 TBZ に染色体異常を誘発するとの報告³⁾ があり, また当部で行った催奇形性試験でも異常が認められ⁴⁾, TBZ の毒性, 特になん原性の有無についての検討が必要とされるにいたった。

そこで TBZ のがん原性を検索するための前段階として, 同試験に用いると同一系統のラットによる急性経口毒性試験を実施し報告した⁵⁾。本報告はラットを用いた TBZ のがん原性試験における最大投与量を決定する目的で行った TBZ 添加飼料による13週間のラット飼育試験 (亜急性毒性試験) の結果である。

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) を日本クレア飼料粉末飼料 CE-2 (水分7.8, 粗蛋白23.6, 粗脂肪4.4, 粗繊維4.9, 粗灰分6.6, 可溶性無窒素物 52.7%, 344.8 Cal/100g) にそれぞれ0 (対照), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4および0.8%の割合で添加し固型化したものを試験飼料とした。

試験動物: 日本チャールスリバー社生育の F344/Du-Crj ラット雌雄を4週令で購入, 1週間予備飼育後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 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 (縦16.5×横25×奥行40cm) 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て飼育した。試験開始前の飼料には固型飼料 CE-2 を用いた。

試験方法: 投与群のラットには各濃度に TBZ を添加した試験飼料, 対照群のラットには無添加の試験飼料を与え, 各群に雌雄各10匹づつ割り当て, これをランダムに飼育架台に配置した。ラットが5週令になった時点で試験飼料を水道水とともに自由に摂取させ試験を開始した。試験期間は13週間とし, 試験開始1週目を試験0週以下2週目を試験1週, 13週目を試験12週とした。動物の一般状態は毎朝午前9~10時に観察し, 体重は毎週1~2回測定した。飼料摂取量, 飼料コボシ量, 食餌効率および飲水量は試験4週まで毎週, その後は隔週に測定した。また試験終了時には尿検査, 血液学的検査および血清生化学的検査を行った。

検査方法: 飼料摂取量は飼料投与量と3日間摂餌後の飼料残与量およびケージ受け皿への飼料コボシ量を測定し (投与量-残与量-コボシ量)/3により1日の摂取量を求めた。食餌効率は3日間の (体重増加/飼料摂取量) × 100により求めた。また飲水量は給水ビンを用い (投与量 (g) - 3日後の残量 (g))/3 で1日の飲水量 (g) を求めた。尿検査はラット腰部を軽く刺激して排尿させた新鮮尿を用いた。血液学的, 血清生化学的検査に当ってはラットを背位に固定, そけい部を切開後大腿動・静脈を切り, 放出する血液を EDTA-2K 処理試験 (管血液学的検査用) および無処理遠心管 (血清生化学的検査用) とに採用したものをを用いた。

尿検査: Ames 社製試験紙 Labstix, Ictostix, Urobilistix により pH, タンパク, ブドウ糖, 潜血反応, ケトン体, ビリルビンおよびウロビリノーゲンを測定し

* 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

表 1. 体 重 (雄)

試験日数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
0(0) ^{a)}	104.1±3.0 ^{b)} (100.0±0.0) ^{b)}	104.2±4.1 (100.0±0.0)	103.5±3.0 (100.0±0.0)	104.8±3.5 (100.0±0.0)	104.0±3.8 (100.0±0.0)	104.6±1.8 (100.0±0.0)
3	115.1±3.7 (110.0±2.7)	84.1±5.5* (80.3±4.1)*	95.0±3.8* (91.5±2.2)*	110.9±3.8* (105.3±1.9)*	113.4±4.0 (108.6±1.8)	115.0±1.8 (109.4±1.4)
7(1)	132.8±5.9 (127.1±4.0)	89.3±4.6* (85.2±2.2)*	106.0±6.2* (102.0±6.1)*	127.4±5.7 (121.1±2.6)*	128.2±5.4 (122.8±3.1)*	130.8±2.5 (124.5±2.1)
10	143.9±7.3 (137.8±5.8)	94.5±7.7* (90.3±6.2)*	114.5±7.4* (110.2±6.5)*	136.6±6.8* (129.9±3.3)*	138.7±6.7 (132.8±3.4)*	141.4±2.4 (134.8±2.8)
14(2)	159.3±10.1 (152.5±7.9)	98.3±8.7* (93.9±7.3)*	125.5±9.5* (120.8±8.4)*	150.6±8.6 (143.2±4.9)*	151.5±7.3 (145.2±5.4)*	156.5±2.8 (149.1±3.1)
17	170.2±12.6 (162.9±10.2)	99.1±9.6* (94.6±7.6)*	132.7±10.5* (127.9±9.1)*	157.5±12.8* (149.8±10.5)*	159.9±10.2 (153.3±8.4)*	166.5±5.1 (158.7±5.3)
21(3)	182.6±16.4 (174.9±12.7)	100.9±9.8* (96.4±8.1)*	143.7±13.2* (138.4±11.5)*	172.1±11.7 (163.7±7.7)*	170.6±13.0 (163.7±11.6)	175.5±8.5 (167.4±8.2)
24	190.1±18.7 (182.0±15.1)	102.7±10.8* (98.1±8.1)*	149.2±13.6* (143.7±12.0)*	176.8±12.1 (168.2±8.1)*	176.1±16.0 (169.0±14.8)	181.4±10.0 (172.8±10.0)
28(4)	199.9±20.9 (191.3±17.0)	104.8±11.5* (100.1±9.0)*	158.2±15.5* (152.3±13.9)*	186.5±14.1 (177.4±10.1)*	185.5±19.5 (178.1±18.2)	189.0±11.8 (180.4±11.7)
31	207.0±22.9 (198.3±18.7)	107.0±11.6* (102.2±8.7)*	164.4±17.6* (158.4±15.9)*	194.3±14.6 (184.8±11.1)	191.8±22.2 (184.2±20.7)	195.3±12.9 (186.3±12.8)
35(5)	216.5±25.7 (207.2±21.5)	108.2±11.2* (103.2±8.4)*	173.1±18.8* (166.8±17.0)*	203.8±17.1 (193.7±13.3)	199.7±25.6 (191.5±24.2)	202.5±16.0 (193.1±15.6)
42(6)	229.4±26.5 (219.6±21.9)	111.1±11.3* (106.0±8.7)*	185.3±20.9* (178.5±19.1)*	217.5±18.7 (207.0±15.3)	209.9±29.2 (201.4±27.7)	211.8±19.0 (202.1±18.5)
45	235.1±26.7 (225.2±22.1)	113.2±11.4* (108.1±9.0)*	190.6±19.2* (183.8±17.7)*	221.8±20.3 (211.1±17.2)	215.3±29.8 (216.9±32.4)	216.4±18.1 (206.3±18.2)
49(7)	241.6±25.6 (231.4±20.9)	115.0±10.7* (109.9±8.2)*	195.4±20.3* (188.5±18.8)*	227.8±21.2 (216.9±18.1)	221.1±31.1 (212.2±29.8)	220.8±20.9 (210.7±20.5)*
56(8)	252.9±25.4 (242.2±20.3)	117.1±9.4* (111.9±7.0)*	204.1±21.1* (196.7±19.9)*	237.8±21.3 (226.4±18.1)	231.8±34.4 (226.6±32.7)	230.6±23.2 (220.1±22.5)*
59	259.1±23.2 (248.4±18.5)	120.6±9.7* (115.3±7.7)*	209.4±19.0* (201.9±17.8)*	242.7±21.1 (231.1±18.2)*	237.9±33.6 (228.3±32.1)	236.1±22.6* (225.4±21.8)*
63(9)	264.1±23.1 (253.2±18.2)	121.2±9.5* (115.8±7.9)*	212.1±18.8* (204.5±17.6)*	248.5±21.6 (236.6±18.6)	243.9±34.1 (234.3±32.7)	241.5±24.5* (230.5±23.9)*
70(10)	272.1±22.4 (260.9±17.6)	124.2±9.9* (118.8±8.1)*	219.2±18.3* (211.5±17.7)*	255.9±23.2 (243.7±20.1)	251.5±33.0 (241.6±31.9)	248.8±25.2* (237.4±24.7)*
73	276.6±22.1 (265.1±17.4)	125.1±7.7* (119.8±7.0)*	221.8±18.7* (214.1±18.3)*	259.6±22.9 (247.2±20.3)	258.2±35.1 (247.9±33.4)	252.1±25.4* (240.6±24.7)*
77(11)	278.9±21.2 (267.5±17.0)	124.0±7.8* (118.7±7.1)*	224.7±18.3* (216.9±17.8)*	263.3±23.2 (250.8±19.8)	261.5±34.2 (251.0±32.5)	254.5±27.4* (242.9±26.7)*
84(12)	286.9±21.7 (274.9±16.9)	124.6±8.8* (119.3±8.2)*	230.6±17.3* (222.6±16.8)*	271.0±20.3 (258.0±17.7)*	270.3±32.8 (259.5±30.8)	267.3±23.1 (255.4±22.0)* ⁽⁹⁾
87	290.0±21.4 (277.9±16.8)	125.3±8.1* (120.0±7.7)*	231.8±16.5* (223.8±16.3)*	273.7±20.3 (260.5±17.8)*	274.3±32.2 (263.5±30.4)	270.4±22.1 (258.5±21.2)* ⁽⁹⁾
90(13) ^{b)}	292.4±23.0 (280.2±17.9)	126.4±8.5* (121.1±7.8)*	233.9±17.0* (225.8±16.6)*	275.9±18.8 (262.8±16.4)*	276.5±33.5 (265.5±31.6)	273.2±22.0 (261.2±21.2) ⁽⁹⁾

値は一部を除き10例平均±S.D. () 例数 1) g 2) 体重増加率=(体重/試験0日体重)×100 a) 試験週数
b) 試験終了時体重 *対照群と比較して P<0.05

表 2. 体 重 (雌)

試験日数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
0(0) ^{a)}	88.5±3.0 ¹⁾ (100.0±0.0) ²⁾	87.5±2.5 (100.0±0.0)	88.5±1.8 (100.0±0.0)	88.7±3.1 (100.0±0.0)	88.1±2.7 (100.0±0.0)	90.1±3.4 (100.0±0.0)
3	94.9±3.8 (106.5±1.8)	72.4±2.5* (82.2±1.2)*	80.7±2.7* (90.7±1.7)*	90.0±3.2* (101.2±1.5)*	93.3±2.5 (105.4±1.6)	97.2±4.2 (107.4±2.0)
7(1)	106.2±3.6 (119.5±2.2)	72.8±2.2* (82.7±2.1)*	88.4±3.0* (99.4±2.2)*	99.7±3.2* (111.9±2.9)*	103.0±2.9* (116.6±3.1)*	107.3±4.8 (118.6±2.0)
10	112.2±4.4 (126.4±3.0)	72.9±4.9* (82.9±5.7)*	92.4±3.2* (103.9±2.2)*	104.6±3.0* (117.5±3.5)*	108.5±2.9* (122.7±3.8)*	112.6±4.9 (124.7±2.3)
14(2)	119.8±5.0 (134.9±4.2)	74.0±4.0* (84.1±4.0)*	96.7±4.6* (108.9±3.5)*	110.4±4.7* (124.0±4.9)*	115.1±3.9* (130.2±4.8)*	120.8±5.8 (133.6±2.9)
17	124.8±5.6 (140.5±4.4)	72.3±2.5* (82.2±2.6)*	99.6±4.2* (112.0±3.0)*	114.0±5.9* (128.2±6.3)*	119.6±4.8* (135.3±4.9)*	125.0±7.0 (138.0±4.2)
21(3)	130.1±5.4 (146.5±3.9)	70.8±2.5* (80.4±2.0)*	102.7±4.5* (115.4±3.4)*	117.2±6.5* (131.7±7.0)*	122.4±4.5* (138.4±4.3)*	130.0±7.5 (144.0±5.4)
24	132.8±5.0 (149.7±4.9)	69.9±2.8* (79.3±2.9)*	103.5±4.9* (116.5±4.2)*	119.3±6.6* (134.0±7.1)*	125.7±5.6* (142.3±6.0)*	133.1±8.2 (147.3±6.1)
28(4)	137.8±5.1 (155.2±5.8)	69.6±2.9* (78.9±3.1)*	106.3±5.6* (119.6±5.2)*	124.0±8.3* (139.3±8.3)*	130.8±7.3* (148.1±6.3)*	138.1±9.4 (152.7±7.0)
31	139.3±5.1 (156.9±5.8)	68.5±2.8* (77.8±3.2)*	108.9±6.8* (122.5±6.6)*	124.8±7.6* (140.2±7.6)*	132.7±6.9* (150.1±6.5)*	140.0±10.3 (154.6±8.0)
35(5)	143.5±5.1 (161.8±7.0)	67.6±2.4* (76.9±2.5)*	110.8±6.8* (124.7±6.7)*	128.3±9.0* (144.2±8.3)*	137.1±7.4* (155.1±7.0)*	144.9±9.5 (160.3±7.1)
42(6)	147.3±5.5 (166.1±7.2)	65.2±3.0* (74.1±3.2)*	115.4±8.2* (129.9±8.2)*	133.7±9.9* (150.3±9.7)*	142.3±7.8 (161.1±6.8)	150.0±10.9 (166.0±9.4)
45	149.5±5.4 (168.6±6.2)	66.2±3.6* (75.2±3.8)*	117.5±10.6* (132.3±10.9)*	136.1±9.8* (153.0±9.1)*	144.1±7.0* (163.1±6.1)	152.8±11.7 (168.9±10.1)
49(7)	151.8±6.7 (171.3±8.6)	64.6±2.8* (73.4±3.1)*	120.2±10.8* (135.3±10.9)*	138.3±10.3* (155.4±9.6)*	146.6±8.1 (166.0±7.8)	155.4±12.2 (171.9±10.7)
56(8)	156.9±6.8 (177.0±8.1)	64.5±2.8* (73.4±3.3)*	123.8±11.0* (139.4±11.2)*	142.7±10.6* (160.3±9.5)*	150.4±8.3 (170.3±7.3)	159.7±12.8 (176.7±11.3)
59	158.9±6.9 (179.2±8.0)	65.1±3.2* (74.0±3.3)*	126.1±12.3* (141.8±12.5)*	143.7±8.8* (161.6±8.9)*	150.9±7.5* (170.5±5.9)*	161.7±13.1 (179.0±12.0)
63(9)	161.3±7.5 (181.9±8.6)	63.7±2.6* (72.3±2.8)*	127.5±12.2* (143.5±12.4)*	146.0±9.2* (164.1±9.3)*	154.4±6.6* (174.8±5.3)*	163.7±13.8 (181.2±12.2)
70(10)	165.8±8.4 (187.0±9.3)	64.1±3.4* (72.8±3.5)*	130.2±12.0* (146.5±12.3)*	150.3±8.6* (168.9±9.0)*	157.2±8.0* (177.8±6.5)*	167.2±14.1 (185.1±12.6)
73	168.0±8.9 (189.5±9.5)	64.9±3.4* (73.7±3.7)*	132.4±11.6* (149.1±12.5)*	152.0±9.0* (171.0±9.4)*	158.8±8.1* (179.7±6.8)*	169.0±14.2 (187.0±12.9)
77(11)	169.4±9.2 (190.9±9.6)	64.8±2.6* (73.7±2.8)*	132.1±10.3* (148.8±10.9)*	153.8±9.9* (172.8±10.0)*	160.3±7.4* (181.4±6.9)*	170.2±13.1 (188.5±12.4)
84(12)	172.9±10.3 (195.0±10.9)	65.6±4.4* (74.5±4.3)*	136.4±9.7* (153.6±9.8)*	156.2±9.2* (175.7±9.6)*	164.6±9.6 (186.4±8.3)	173.7±14.3 (192.4±13.2)
87	174.0±10.0 (196.1±11.1)	65.8±3.7* (74.7±4.1)*	137.3±8.7* (154.6±9.1)*	156.9±9.4* (176.5±9.5)*	165.3±9.6 (187.2±8.7)	174.7±13.5 (193.6±13.0)
90(13) ^{b)}	175.6±10.5 (198.1±11.2)	65.6±4.2* (74.6±4.6)*	137.1±8.8* (154.3±8.7)*	157.7±9.8* (177.4±10.7)*	166.8±10.4 (188.7±9.7)	176.3±13.9 (195.2±13.2)

値は10例平均±S.D. 1) g 2) 体重増加率=(体重/試験0日体重)×100 a) 試験週数 b) 試験終了時体重
* 対照群と比較して P<0.05

た。

血液学的検査：EDTA-2K 処理血液を用い、Coulter Counter Model S (Coulter Electric 社製) により白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hgb)、ヘマトクリット (Hct)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) について測定した。

血清生化学的検査：日立自動分析装置M-400を用いグルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素活性(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素活性(GPT)、総タンパク量 (TP)、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP) および尿素窒素 (UN) について測定した。

検査結果の推計学的検討に当っては危険率を5%に置いた。

なお、本試験と平行して同一のTBZ添加飼料を用い、同系統雌ラットによる体重回復試験を行った。これはTBZ添加飼料を8週間投与した後普通飼料(CE-2)に切り換え、そのときの体重の変動を観察したものである。(解剖・病理組織学的検索については藤井ら⁶⁾が別に報告する)

試験結果および考察

一般状態：雌雄とも0.8%群、0.4%群に試験1週間より痩せが目立ち始め、試験終了時には0.8%群で特に著明であった。しかし被毛や目の状態、行動などに対照群と比べ著変は認められなかった。死亡は0.05%群雄で試験12週に1例みられたが他の各群には認められなかった。

体重・飼料摂取量・飼料コボシ量・食餌効率：体重を表1(雄)、表2(雌)に示した。対照群と比べ、雄0.8%群、0.4%群、雌0.8%群、0.4%群および0.2%群で試験全期間にわたって有意に小さかった。0.8%群では試験開始とともに雄約20g、雌約15g減少した。雄はその後試験4週間より試験開始時の体重に復し試験終了時までわずかつ増加した。雌ではその後一時回復の兆しがみえたがまた減少し続け、試験7週間から試験終了時まで65g前後の値を示した。したがって試験終了時には図1に示したように対照群の体重増加率を100とすると雄約57%、雌約62%と大幅な増加抑制になった。0.4%群雌雄でも試験開始とともに減少したが0.8%群より程度は軽く、その後緩やかに増加し試験終了時には約20%の増加抑制にとどまった。他の投与群ではほぼ用量-反応関係に伴った増加を示し、試験終了時には対照群に比べいずれも10%以内の増加抑制になった。飼料摂取量を表3に示した。ラット1日当りの摂取量は0.8%群、0.4%群雌雄および0.05%群を除く雌の各投与群において試験全期間に

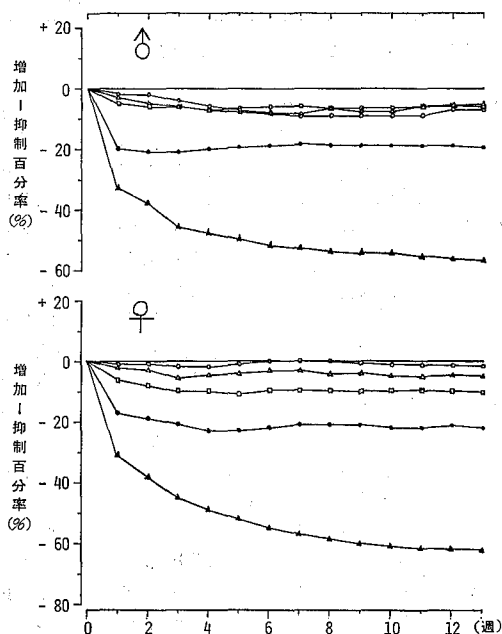


図1. 対照群体重に対する投与群体重増加抑制率

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

0.8%群(▲), 0.4%群(●), 0.2%群(□),
0.1%群(△), 0.05%群(○)

わたって対照群より少なく、他の投与群も減少あるいは減少傾向を呈し、全体的に体重増加に連動するような値を示した。また体重比摂取量は0.8%群雌雄、0.4%群雌で試験3～4週間まで対照群より少なく、以後対照群を上まわる値を示した。0.05%群雄を除く他の投与群では試験全期間にわたって対照群に比べ減少傾向を呈した。飼料コボシ量は表4に示したように各投与群とも試験全期間にわたって対照群と同等かあるいは減少していた。高濃度の薬物添加飼料を用いた試験では開始直後は飼料摂取量の減少に伴ってコボシ量の増加がみられる^{7,8)}。しかし本試験においては試験開始直後から飼料摂取量、コボシ量とも少なかった。これはラットがTBZ添加飼料の摂取前あるいは直後に、極度な忌避を行い以後摂取しようとしなかったためと思われるが、なぜこのように摂取を忌避し続けたのか原因は明らかでない。食餌効率を表5に示した。多少バラツキがあったが、0.4%群、0.2%群、0.1%群および0.05%群雌雄では対照群と大差を認めなかった。0.8%群では雌雄とも試験全期間にわたって対照群に比べ低下していた。特に雌では試験4週まで負の値を示した。

以上、体重は飼料摂取量と関連してみられ、摂餌拒否

表 3. 飼 料 摂 取 量

試験週数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
雄	0 (103.85±6.05) ²⁾	1.13± 0.58* (10.83± 5.52)*	3.07± 0.63* (29.56± 5.59)*	8.24± 0.59* (78.67± 6.30)*	9.74± 0.56* (93.67± 5.30)*	11.32± 0.40* (108.21± 4.69)
	1 (88.88±5.51)	5.77± 0.88* (64.48± 8.56)*	8.81± 1.01* (83.07± 7.98)	10.54± 0.82* (82.59± 3.43)*	10.79± 0.92* (84.02± 4.61)*	12.02± 0.74 (91.86± 5.47)
	2 (77.23±4.40)	5.77± 0.43* (58.89± 5.03)*	8.69± 0.98* (69.17± 5.07)*	10.31± 2.67* (68.61±17.57)	10.93± 1.40* (71.91± 6.42)*	12.44± 0.72 (79.42± 3.94)
	3 (68.05±3.52)	6.39± 0.73* (63.44± 6.34)	9.61± 0.95* (66.89± 3.86)	11.04± 2.39 (64.26±13.57)	11.10± 1.72 (64.71± 5.97)	11.85± 0.90 (67.41± 2.46)
	4 (64.10±4.72)	7.08± 0.95* (67.55± 5.46)	9.97± 2.40* (62.95±13.35)	12.30± 1.42 (65.79± 4.52)	11.82± 2.09 (63.27± 5.19)	12.50± 0.75 (66.12± 2.18)
	6 (54.69±5.48)	6.66± 1.30* (59.76± 9.62)	10.57± 1.59* (57.04± 6.00)	11.94± 1.53 (54.81± 5.10)	11.60± 2.15 (54.99± 4.59)	11.83± 0.96 (55.97± 3.76)
	8 (53.27±3.65)	7.56± 0.64* (64.62± 4.37)*	11.25± 0.99* (55.21± 2.27)	12.58± 1.13 (52.93± 2.48)	11.72± 2.23* (50.38± 5.73)	12.38± 0.85* (53.81± 2.13)
10	13.17±1.05 (48.46±3.10)	7.65± 0.58* (61.81± 5.98)*	11.36± 1.46* (51.71± 4.55)	12.86± 1.19 (50.25± 2.71)	12.64± 2.23 (50.01± 3.67)	12.39± 1.51 (49.78± 3.37)
12	12.91±1.08 (44.95±2.09)	8.41± 1.76* (67.70±15.51)*	11.56± 1.15* (50.19± 4.72)*	13.05± 1.17 (48.16± 3.16)*	12.78± 1.39 (47.34± 2.10)*	12.48± 0.87 (46.78± 2.22)(9)
雌	0 (97.90±5.33)	0.30± 0.18* (3.36± 2.04)*	2.23± 0.53* (25.13± 5.96)*	6.02± 0.78* (67.75± 7.94)*	7.42± 0.58* (84.17± 5.86)*	9.32± 0.59 (103.41± 5.16)*
	1 (90.91±5.44)	4.48± 1.13* (61.61±15.40)*	7.03± 0.58* (79.55± 7.05)*	8.22± 0.51* (82.45± 4.93)*	8.58± 0.74* (83.23± 6.49)*	9.66± 0.89 (89.91± 6.48)
	2 (81.37±4.76)	4.31± 0.49* (58.56± 9.54)*	6.52± 0.19* (67.48± 3.02)*	7.99± 0.48* (72.34± 3.52)*	8.52± 0.80* (73.91± 5.69)*	9.63± 1.16 (79.49± 6.28)
	3 (70.73±4.94)	4.35± 0.58* (61.47± 8.39)*	6.33± 0.60* (61.60± 5.35)*	7.58± 0.56* (64.63± 3.51)*	8.08± 0.90* (65.89± 6.29)	8.93± 1.11 (68.54± 5.66)
	4 (67.15±3.87)	4.68± 0.36* (67.24± 4.98)	7.21± 0.71* (67.75± 5.52)	7.90± 0.69* (63.64± 3.41)*	8.43± 0.68* (64.34± 2.01)	8.99± 1.04 (64.99± 4.94)
	6 (58.66±6.37)	3.83± 1.54* (58.45±22.78)	6.50± 0.99* (56.29± 7.94)	7.64± 0.82* (57.18± 5.70)	8.03± 0.99 (56.47± 7.02)	8.56± 1.18 (56.91± 5.39)
	8 (58.18±5.26)	4.71± 0.38* (73.16± 7.39)*	6.97± 0.73* (56.18± 2.18)	7.89± 0.91* (55.49± 7.20)	7.88± 0.85* (52.45± 5.76)	8.83± 0.96 (55.23± 4.00)
10	9.23±1.23 (55.64±6.77)	4.42± 0.39* (69.12± 7.41)*	7.14± 1.01* (54.72± 5.31)	8.17± 0.52* (54.38± 3.52)	7.94± 1.02* (50.41± 5.44)	8.65± 0.95 (51.77± 4.56)
12	9.34±1.05 (53.95±5.13)	4.49± 0.35* (68.61± 6.07)*	7.19± 0.45* (52.89± 4.53)	8.11± 0.80* (51.89± 4.15)	8.06± 0.85* (48.94± 4.60)*	8.96± 1.13 (51.57± 5.56)

値は一部を除き10例平均± S.D. () 例数 1) g/rat/day 2) g/kg/day * 対照群と比較して P<0.05

による飼料摂取量の減少が体重増加抑制の原因と思われる。このことに関して、本試験と同一の TBZ 添加飼料を用い、同系統雌ラットによる体重回復試験を行った際、普通飼料に切り換えた後0.8%群および0.4%群に急激な体重の上昇(図2)がみられたことから推察できる。しかし0.8%群雌雄で食餌効率が対照群に比べ低下していることは、飼料摂取量の減少のみによる体重増加抑制ではなく TBZ 投与による影響も考慮すべきであろう。

飲水量：表6に示した。各投与群雌雄とも試験全期間を通してラット1日当りの飲水量に対照群と比べ大差は認められなかった。体重比飲水量においては、試験0週を除き0.1%群以上の各投与群雌雄に投与量に伴った増加傾向がみられた。一般に飲水量は飼料摂取量によく並行して増減する傾向があるが、今回の試験での0.8%群、0.4%群は飼料摂取量の少ない割には対照群に比べ飲水量が多いように思われる。これはラットが強い体重増加

表 4. 飼 料 こ ぼ し 量

試験週数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
0	1.8±0.4 ¹⁾	1.2±0.7*	1.7±0.9	1.6±0.5	0.7±0.3*	1.2±0.4*
1	1.7±0.5	1.8±0.9	1.3±0.4*	1.4±0.5	0.8±0.5*	1.1±0.3*
2	1.7±0.7	1.0±0.6*	0.9±0.4*	1.3±0.5	0.9±0.6*	1.1±0.3*
3	1.6±0.8	0.9±0.5*	0.9±0.3*	1.4±0.6	0.6±0.5*	0.8±0.4*
雄 4	1.4±0.7	0.5±0.3*	0.8±0.4*	1.0±0.4	0.4±0.3*	0.8±0.4*
6	1.4±0.6	0.8±0.4*	1.1±0.4	1.3±0.4	0.7±0.5*	0.9±0.4*
8	1.9±0.7	0.8±0.5*	1.5±0.4	1.5±0.7	1.1±0.6*(9)	1.0±0.5*
10	1.5±0.7	0.9±0.8	0.9±0.5*	1.1±0.4	0.8±0.7 (9)	0.9±0.7
12	1.5±0.7	0.5±0.2*	1.0±0.7	1.3±0.5	0.9±0.4*	0.5±0.3*
0	1.2±0.4	0.9±0.8(9)	1.1±0.6	1.7±0.6	0.7±0.2*	0.8±0.4*
1	1.5±0.4	2.5±2.8	1.0±0.7	1.2±0.5	0.5±0.3*	0.9±0.4
2	1.6±0.8	1.5±1.6	0.5±0.3*	0.8±0.4*	0.4±0.3*	0.6±0.2*
3	1.0±0.6	1.4±1.4	0.3±0.2*(9)	0.6±0.4	0.3±0.2*	0.3±0.2*
雌 4	1.0±0.6	0.8±1.0	0.4±0.3*(8)	0.5±0.4*	0.4±0.2*(8)	0.4±0.3*
6	1.1±0.8	1.0±0.9	0.4±0.4*	0.5±0.4	0.6±0.7(9)	0.6±0.4(9)
8	1.0±0.8	0.8±0.6	0.2±0.1*	0.5±0.3(9)	0.4±0.4	0.5±0.2(8)
10	1.0±0.6	0.6±0.4	0.4±0.3*	1.4±2.0	0.6±0.4	0.5±0.3
12	1.0±0.5	0.7±0.6	0.4±0.5*	0.6±0.2*	0.4±0.3*	0.4±0.2*

値は一部を除き10例平均± S.D. () 例数 1) g/rat *対照群と比較して P<0.05

表 5. 食 餌 効 率¹⁾

試験週数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
0	33.7± 7.1	-766.4± 453.4	-99.4±43.7	24.4± 5.9*	32.1± 5.6	30.6± 3.3
1	31.2± 6.5	28.1± 42.4	31.6± 9.3	29.0± 5.5	32.3± 6.6	29.4± 5.7
2	29.1± 4.9	3.8± 15.2	27.1±10.2	0.4±97.8	24.8± 8.6	26.9± 6.2
3	19.7± 5.6	8.5± 11.5*	18.8± 9.1	9.5±27.1	15.4±11.1	16.4± 3.9
雄 4	18.0± 4.4	9.9± 9.8*	20.8±10.0	20.9± 6.5	16.9± 7.7	16.7± 5.2
6	15.2± 4.5	11.4± 12.7	17.5±10.0	11.4± 7.6	15.7± 5.4	13.0± 3.5
8	15.6± 8.1	15.1± 9.5	16.4±10.4	13.0± 5.5	16.9±15.8	15.0± 4.7
10	11.4± 2.8	3.7± 14.1	7.5± 5.3	9.6± 5.4	16.9±12.3	8.8± 5.5
12	7.9± 5.4	3.2± 8.2	2.9±11.2	6.8± 4.6	10.6± 3.9	8.4± 4.3(9)
0	24.5± 5.3	-2428.6±1659.7	-125.1±45.4	6.7± 7.1*	23.4± 6.2	25.3± 5.2
1	20.6± 5.9	-19.5± 96.3	18.6± 7.6	19.8± 3.6	21.3± 4.3	18.1± 7.3
2	17.2± 7.2	-15.4± 23.7	14.8± 5.0	14.7± 6.4	17.1± 9.5	14.5± 6.1
3	9.7± 7.4	-8.0± 16.2	3.6± 7.7	9.1± 2.9	13.2± 5.1	11.5± 4.4
雌 4	5.3± 5.4	-8.3± 11.4	11.5± 6.4*	3.4± 6.0	7.7± 6.7	6.8± 5.9
6	9.0± 8.0	9.0± 31.4	8.0±25.4	10.5± 9.4	-7.3± 4.8	10.4± 7.0
8	6.9± 7.0	4.2± 10.0	10.5± 7.6	3.0±19.3	1.8± 7.6	7.0± 9.5
10	7.2± 4.2	5.9± 9.4	10.3±11.6	6.6± 6.6	6.8± 8.5	6.6± 6.2
12	3.8± 7.7	1.0± 12.2	3.9±10.1	2.5± 7.4	2.6± 7.2	3.4± 8.7

1) 食餌効率=(3日間の体重増加量 g/3日間の摂餌量g)×100 値は一部を除き10例平均±S.D. () 例数

*対照群と比較して P<0.05

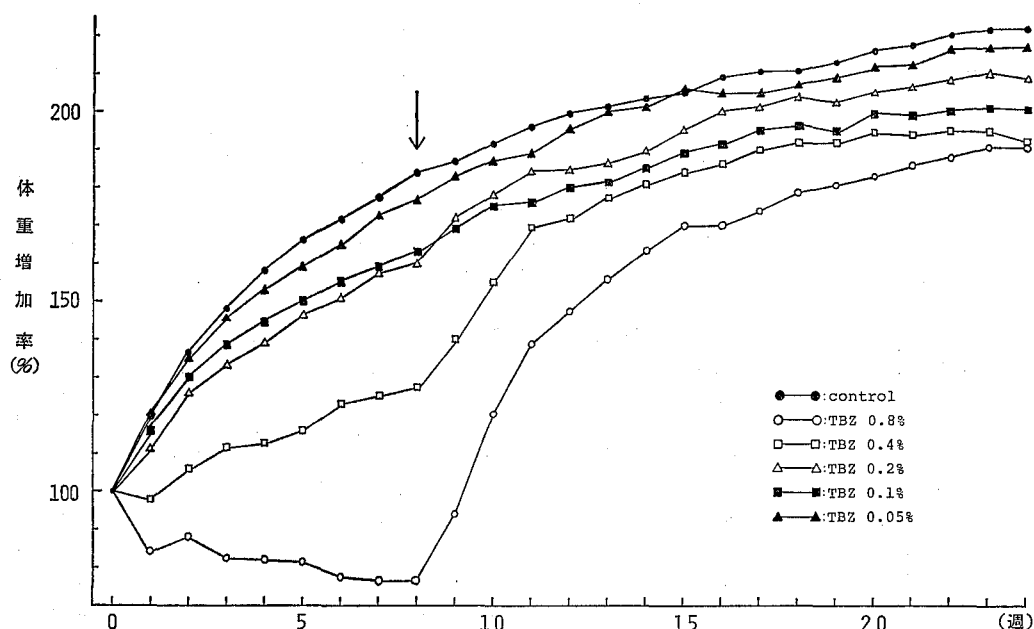


図 2. TBZ 添加飼料投与における体重回復試験 (各群雌 3 匹)
矢印: 普通飼料 (CE—2) に切り換え

抑制を示しながらも外観的にあまり変化がみられなかったことなどから、飼料摂取量の代替として対照群と同程度に飲水したのかもしれない。

TBZ 摂取量: 表 7 に示した。平均 1 日体重 kg 当りの摂取量および 13 週間におけるラット当りの総摂取量は、0.8% 群雌 461mg・4767mg, 雌 464mg・2975mg, 0.4% 群雌 234mg・3570mg, 雌 232mg・2387mg, 0.2% 群雌 125mg・2142mg, 雌 126mg・1407mg, 0.1% 群雌 64mg・1078mg, 雌 64mg・735mg, 0.05% 群雌 34mg・546mg, 雌 34mg・385mg であった。なお TBZ 摂取量は飼料摂取量より求めた。

尿検査: 表 8 に示した。雄では pH の上昇が各投与群に 1 例みられ、また 0.8% 群を除く各投与群にタンパク量の上昇傾向が認められた。その他ブドウ糖、潜血、ケトン体の出現はいずれも認められず、ビリルビン量、ウロビリノーゲン量にも変化がみられなかった。雌では各投与群でタンパク量の上昇傾向がみられ、特に 0.1% 群で顕著であった。また pH も 0.1% 群で多く上昇していた。他に小量のブドウ糖の出現が 0.2% 群、0.1% 群に各 1 例、小量のケトン体の出現が 0.05% 群に 1 例認められた。これらの変化はいずれも TBZ 摂取に関連あると考えられないが、0.1% 群雌における pH の上昇とタンパク量の上昇が注目される。

血液学的検査: 表 9 に示した。WBC は 0.8% 群雌雄において減少した。RBC は 0.8% 群、0.4% 群雌雄で減少がみられ、それに伴って Hgb, Hct も減少し、MCV は逆に増加した。すなわち 0.8% 群、0.4% 群雌雄は貧血状態になっていたと考えられる。また 0.2% 群、0.1% 群雌雄にも同様に軽度の貧血傾向がみられた。このことは藤井ら⁹⁾が本試験の病理組織学的検索において、0.2% 群以上の各投与群雌雄に用量—反応関係をもった脾臓のヘモジリン沈着症を、さらに 0.8% 群、0.4% 群雌雄に骨髓の萎縮を高頻度に認めたことと一致するものと思われる。

血清生化学的検査: 表 10 に示した。比較的用量—反応関係をもってみられた変化は雄における GOT の低下であった。また雄の GPT も用量—反応関係は明らかでないが低下傾向を示した。この GOT, GPT の低下は 0.8% 群、0.4% 群で強くみられた。雌の 0.8% 群では雄とは逆に GOT, GPT は上昇しており、また TP は低下、ALP は上昇していた。以上のような変化から 0.8% 群雌雄あるいは 0.4% 群雌雄での肝臓障害が予測された。藤井ら⁹⁾の報告によると 0.2% 以上の各投与群雌雄に肝細胞の変性または壊死が認められており、特に 0.8% 群、0.4% 群では全例が軽度の変化であった。このことは 0.8% 群あるいは 0.4% 群での変化と一致すると思われる。一

表 6. 飲 水 量

試験週数	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%	
雄	0	13.5±4.9 ¹⁾ (129.7±35.6) ²⁾	8.8±7.3 (84.1±25.2)	12.1±3.3 (116.9±51.6)	14.0±2.4 (133.6±20.8)	15.9±2.0 (153.0±20.5)	14.9±4.1 (142.6±40.2)
	1	16.5±1.6 (124.0±9.3)	14.4±4.2 (160.7±34.0)*	17.4±2.7 (163.9±23.9)*	15.9±2.0 (124.7±12.0)	16.2±1.6 (126.2±9.8)	16.6±1.9 (126.7±16.2)
	2	17.8±1.7 (111.4±7.5)	17.1±4.2 (176.9±60.8)*	16.7±2.6 (132.6±17.1)*	15.7±5.6 (104.4±37.4)	16.5±1.6 (109.1±7.7)	17.5±1.2 (111.5±6.3)
	3	17.1±1.7 (93.8±5.9)	18.1±4.8 (182.7±56.1)*	16.7±2.3 (115.9±12.8)*	16.6±4.3 (96.6±25.1)	16.3±2.0 (95.4±7.4)	17.2±1.3 (97.9±6.2)
	4	18.3±3.5 (91.4±13.6)	17.9±4.9 (171.7±48.5)*	17.5±2.7 (110.1±11.3)*	18.6±2.2 (99.7±9.3)	17.6±2.9 (94.6±9.0)	16.9±1.9 (89.3±9.3)
	6	18.2±3.8 (79.3±12.8)	17.2±4.1 (157.3±33.6)*(9)	17.9±3.0 (96.5±12.5)*	18.6±1.7 (85.7±9.3)	16.9±2.8 (80.7±10.7)	16.8±2.3 (79.7±10.9)
	8	18.8±2.7 (74.6±12.3)	20.4±6.3 (174.5±58.2)*	18.4±2.1 (90.6±9.4)*	18.7±2.0 (79.1±9.8)	17.7±5.7 (76.2±11.0)	18.5±1.8 (80.3±6.8)
	10	18.2±1.6 (67.1±4.9)	20.4±5.4 (165.4±35.2)*	18.8±2.7 (85.8±10.5)*	18.6±2.4 (72.6±8.5)	19.2±3.4 (76.1±7.9)*	17.9±2.4 (72.0±8.3)
	12	18.9±2.3 (69.6±8.0)	19.2±6.1 (154.3±36.4)*	18.0±2.0 (78.1±9.1)*	18.9±2.3 (69.6±8.0)	18.6±2.3 (69.8±4.1)	18.6±2.6 (69.8±9.2)*(9)
雌	0	14.6±2.1 (164.4±23.2)	7.3±2.5* (82.7±28.0)*	12.2±3.6 (137.6±49.0)	13.6±2.6 (152.8±26.5)	13.8±2.7 (155.7±28.3)	14.7±1.1 (163.6±11.5)
	1	15.1±2.1 (142.3±19.7)	13.1±5.0 (180.6±21.1)	16.3±2.1 (184.7±27.1)*	14.6±2.2 (146.0±21.5)	14.9±1.8 (144.1±14.7)	15.4±2.2 (143.4±17.2)
	2	15.6±1.6 (130.4±13.8)	16.2±3.6 (219.9±21.5)*	15.2±1.5 (157.6±17.0)*	13.9±1.8* (126.0±14.8)	14.5±1.2 (125.6±7.8)	15.6±2.0 (129.0±12.9)
	3	15.3±2.5 (117.2±17.4)	15.5±2.7 (218.8±32.9)*	13.4±2.2 (130.6±22.1)	14.3±2.9 (122.3±26.6)	13.6±1.4 (111.1±9.4)	15.1±2.7 (116.1±17.1)
	4	14.5±2.0 (105.0±11.9)	16.2±2.3 (232.8±32.4)*	13.1±2.9 (122.5±23.8)	15.0±5.0 (121.4±48.1)	14.1±2.4 (107.6±13.8)	14.8±2.1 (106.7±11.6)
	6	15.6±4.1 (105.5±26.2)	14.4±2.9 (219.8±38.6)*	13.3±3.8 (114.4±51.7)	14.6±3.8 (109.5±28.9)	14.9±2.5 (104.1±12.7)	13.8±2.5 (92.7±18.5)
	8	16.5±4.1 (105.5±25.0)*(9)	16.0±2.5 (247.9±38.1)*	13.8±2.5 (111.8±18.1)	14.5±1.9 (101.9±11.5)	15.0±2.4 (99.7±13.2)	16.5±3.3 (102.6±14.3)
	10	15.3±1.4 (92.0±6.1)	15.6±2.4 (243.1±36.6)*	15.7±2.8 (120.3±18.9)*	15.7±2.7 (104.4±16.9)*	15.3±1.8 (96.7±7.7)	17.0±3.9 (101.1±15.6)
	12	14.9±1.2 (86.0±5.3)	15.1±3.4 (230.0±58.4)*	15.8±2.4 (116.0±18.2)*	16.1±2.3 (103.0±4.3)*	16.6±2.5 (100.3±11.5)*	16.9±4.9 (96.5±20.5)

値は一部を除き10例平均± S.D. () 例数 1) g/rat/day 2) g/kg/day * 対照群と比較して $P < 0.05$

般に肝臓障害が起こると GOT, GPT 活性は上昇傾向を示すが、今回雄では低下あるいは低下傾向を呈した。雄の GOT, GPT 低下傾向は OPP-Na の亜急性毒性試験でも高濃度群に認められており⁷⁾、ラットの性状によるものか今後肝臓障害の際の血清生化学的試験結果を詳細に検討する必要があると思われる。

以上、TBZ 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1% および 0.05% 添加飼料による雌雄ラット13週間の飼育試験で、0.8

%群、0.4% 群雌雄では多くの観察項目で変化を認め、特に体重は試験全期間にわたって強く抑制され、試験終了時には対照群と比べ 0.8% 群で約 60%、0.4% 群で約 20% の抑制であった。しかしこのほかの 0.2% 群、0.1% 群、0.05% 群では 0.2% 群雌雄に 10% 前後の体重増加抑制がみられた以外数% の抑制にとどまり、他の変化も軽微であった。化学物質のがん原性検査法⁹⁾によると発がん試験における最大投与量は亜急性毒性試験で対照群に

表 7. T B Z 摂 取 量

試験週数	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%	
雄	0	9± 4.6 ¹⁾ (86± 44.3) ²⁾	12± 2.5 (118± 22.1)	16± 1.2 (157± 12.6)	10± 0.6 (93± 5.3)	6± 0.2 (53± 2.4)
	1	46± 7.0 (516± 68.5)	35± 4.1 (332± 31.9)	21± 1.6 (165± 7.1)	11± 0.9 (84± 4.7)	6± 0.4 (45± 2.8)
	2	46± 3.4 (471± 40.3)	35± 3.9 (276± 20.3)	21± 5.3 (137± 35.2)	11± 1.4 (72± 6.4)	6± 0.4 (39± 2.0)
	3	51± 5.8 (508± 50.6)	38± 3.8 (267± 15.4)	22± 4.8 (128± 27.2)	11± 1.7 (64± 5.9)	6± 0.5 (33± 1.2)
	4	57± 7.6 (540± 43.7)	40± 9.6 (252± 53.5)	25± 2.8 (131± 9.0)	12± 1.7 (63± 5.1)	6± 0.4 (32± 1.2)
	6	53± 10.4 (478± 76.9)	42± 6.4 (228± 24.1)	24± 3.1 (109± 10.1)	12± 2.2 (55± 5.8)	6± 0.5 (28± 1.8)
	8	60± 5.1 (517± 35.0)	45± 3.9 (221± 9.1)	25± 2.3 (106± 5.0)	12± 2.2 (50± 5.8)	6± 0.4 (26± 1.0)
	10	61± 4.7 (494± 47.7)	45± 5.8 (207± 18.2)	26± 2.4 (100± 5.4)	13± 2.2 (49± 3.7)	6± 0.7 (24± 1.8)
	12	67± 14.1 (542±123.9)	46± 4.6 (201± 19.0)	26± 2.3 (96± 6.5)	13± 1.4 (47± 2.1)	6± 0.4 (23± 1.3)(9)
	全期間 {	4767 ^{a)} 461 ^{b)}	3570 234	2142 125	1078 64	546 34
雌	0	2± 1.5 (27± 16.3)	9± 2.1 (100± 24.0)	12± 1.6 (135± 15.8)	7± 0.6 (84± 5.9)	5± 0.3 (51± 2.8)
	1	36± 9.0 (493±123.1)	28± 2.3 (318± 28.4)	16± 1.0 (165± 9.8)	9± 0.7 (83± 6.7)	5± 0.4 (44± 3.4)
	2	34± 3.9 (469± 76.3)	26± 0.8 (270± 12.3)	16± 0.9 (144± 7.0)	9± 0.8 (73± 5.8)	5± 0.6 (39± 3.0)
	3	35± 4.6 (492± 67.1)	25± 2.4 (246± 21.4)	15± 1.1 (129± 7.1)	8± 0.9 (65± 6.2)	4± 0.5 (34± 2.7)
	4	37± 2.8 (538± 39.9)	29± 2.9 (271± 22.1)	16± 1.4 (127± 6.9)	8± 0.7 (64± 2.0)	4± 0.5 (32± 2.5)
	6	31± 12.3 (468±182.3)	26± 4.0 (225± 31.9)	15± 1.6 (114± 11.4)	8± 1.0 (56± 6.9)	4± 0.6 (28± 2.8)
	8	38± 3.1 (585± 59.3)	28± 2.9 (225± 8.9)	16± 1.8 (111± 14.4)	8± 0.8 (52± 5.9)	4± 0.5 (27± 1.9)
	10	35± 3.1 (553± 59.2)	29± 4.0 (219± 21.3)	16± 1.0 (108± 7.2)	8± 1.0 (50± 5.4)	4± 0.5 (25± 2.2)
	12	36± 2.8 (549± 48.6)	29± 1.8 (211± 18.1)	16± 1.6 (103± 8.2)	8± 0.9 (48± 4.7)	4± 0.6 (25± 2.9)
	全期間 {	2975 464	2387 232	1407 126	735 64	385 34

値は一部を除き10例平均± S.D. () 例数 1) mg/rat/day 2) mg/kg/day a) ラット当りの総摂取量mg
b) mg/kg/day

比べて10%以内の体重減少があり、中毒による死亡例がなく、且つ強い毒性症状を示さない最大量とされている。すなわち本試験においてはTBZ 0.4%以上は完全な中毒量と考えられ、0.2%以下ではいずれも長期試験に

耐えると予想されることから、TBZ の F344/DuCrjラットを用いたがん原性試験での最大投与量(飼料中濃度)は雌雄とも0.2%が適当であろう。

表 8. 尿 検 査

			0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
雄	pH	5 6 7 8 9	4 ¹⁾ 6	5 4 1	4 5 1	5 4 1	3 6 1	3 5 1
	蛋白質	— 30mg/100ml> 30mg/100ml 100mg/100ml 300mg/100ml	4 2 4	2 2 3 3	2 1 1 6	2 1 1 6	3 1 4 2	2 3 2 2
	ブドウ糖	— 0.1% 0.25% 0.5%	10	10	10	10	10	9
	潜血	— +	10	10	10	10	10	9
	ケトン体	— + ++	10	10	10	10	10	9
	ビリルビン	— 0.2mg/100ml<	10	10	10	10	10	9
	ウロビリノーゲン	0.1~1 E. U. ²⁾ 1 E. U. <	10	10	10	10	10	9
	pH	5 6 7 8 9	5 4 1	3 6 1	3 6 1	3 5 2	1 2 6 1	3 6 1
	蛋白質	— 30mg/100ml> 30mg/100ml 100mg/100ml 300mg/100ml	4 3 3	3 2 3 1 1	1 1 4 4	4 1 5 3	1 2 1 3	3 1 5 1
	ブドウ糖	— 0.1% 0.25% 0.5%	10	10	10	9 1	9 1	10
雌	潜血	— +	10	10	10	10	10	10
	ケトン体	— + ++	10	10	10	10	10	9 1
	ビリルビン	— 0.2mg/100ml<	10	10	10	10	10	10
	ウロビリノーゲン	0.1~1 E. U. 1 E. U. <	10	10	10	10	10	10

1) 例数 2) E. U. = Ehrlich 単位/100ml

表9. 血液学的検査

	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.67 $\pm$ 1.04	5.37 $\pm$ 0.48*	7.30 $\pm$ 0.95	7.00 $\pm$ 0.47	7.35 $\pm$ 1.16	7.10 $\pm$ 0.49(9)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	9.03 $\pm$ 0.45	6.37 $\pm$ 0.34*	7.43 $\pm$ 0.35*	8.67 $\pm$ 0.35	8.64 $\pm$ 0.21*	8.81 $\pm$ 0.44(9)
Hgb (g/dl)	17.40 $\pm$ 0.44	13.79 $\pm$ 0.35*	15.21 $\pm$ 0.53*	16.65 $\pm$ 0.28*	16.86 $\pm$ 0.31*	17.12 $\pm$ 0.41(9)
雄 Hct (%)	44.64 $\pm$ 2.81	34.66 $\pm$ 1.39*	37.97 $\pm$ 1.85*	42.19 $\pm$ 1.74*	42.03 $\pm$ 0.96*	43.19 $\pm$ 2.30(9)
MCV (μ^3)	50.2 $\pm$ 1.40	54.9 $\pm$ 1.66*	51.6 $\pm$ 0.52*	49.0 $\pm$ 0.67*	49.3 $\pm$ 1.06	49.4 $\pm$ 0.73(9)
MCH (μg)	19.45 $\pm$ 0.96	21.75 $\pm$ 0.95*	20.55 $\pm$ 0.62*	19.35 $\pm$ 0.73	19.62 $\pm$ 0.47	19.44 $\pm$ 0.70(9)
MCHC (%)	37.90 $\pm$ 4.59	39.91 $\pm$ 1.15	40.15 $\pm$ 1.37	37.78 $\pm$ 6.27	40.15 $\pm$ 0.65	37.96 $\pm$ 5.13(9)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.35 $\pm$ 1.36	4.33 $\pm$ 0.84*	6.42 $\pm$ 0.91	6.70 $\pm$ 1.67	7.08 $\pm$ 0.94	6.60 $\pm$ 1.07
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.75 $\pm$ 0.48	5.76 $\pm$ 1.33*	6.68 $\pm$ 0.59*	7.45 $\pm$ 0.36	7.65 $\pm$ 0.47	7.37 $\pm$ 0.73
Hgb (g/dl)	16.04 $\pm$ 0.99	11.86 $\pm$ 2.65*	14.05 $\pm$ 1.15*	15.26 $\pm$ 0.85	15.95 $\pm$ 1.05	15.15 $\pm$ 1.41
雌 Hct (%)	39.93 $\pm$ 2.67	31.18 $\pm$ 7.33*	35.30 $\pm$ 3.09*	38.47 $\pm$ 2.06	39.13 $\pm$ 2.84	37.66 $\pm$ 3.68
MCV (μ^3)	52.2 $\pm$ 0.92	54.4 $\pm$ 1.35*	53.7 $\pm$ 0.82*	52.3 $\pm$ 0.67	51.8 $\pm$ 1.23	52.0 $\pm$ 1.25
MCH (μg)	20.77 $\pm$ 0.45	20.76 $\pm$ 0.60	21.06 $\pm$ 0.32	20.53 $\pm$ 0.37	20.90 $\pm$ 0.36	20.70 $\pm$ 0.47
MCHC (%)	40.12 $\pm$ 1.04	38.30 $\pm$ 1.22*	39.92 $\pm$ 1.15	39.70 $\pm$ 1.51	40.84 $\pm$ 1.65	40.19 $\pm$ 0.70

値は一部を除き10例平均 $\pm$ S.D. () 例数 *対照群と比較して $P<0.05$

表10. 血清生化学的検査

	0% (対照)	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
GOT (K.U./mL)	117.10 $\pm$ 7.53	87.50 $\pm$ 8.59*	95.90 $\pm$ 7.89*	102.70 $\pm$ 7.80*	112.50 $\pm$ 10.79	123.67 $\pm$ 8.29(9)
GPT (K.U./mL)	94.10 $\pm$ 12.32	77.60 $\pm$ 13.14*	65.00 $\pm$ 3.83*	71.10 $\pm$ 8.24*	78.70 $\pm$ 11.42*	91.86 $\pm$ 10.75(9)
雄 T.P (g/dl)	70.90 $\pm$ 0.99	68.40 $\pm$ 2.27*	75.00 $\pm$ 2.11*	73.70 $\pm$ 1.57*	70.70 $\pm$ 1.64	71.33 $\pm$ 1.23(9)
ALP (KA-U/dl)	31.10 $\pm$ 2.92	41.10 $\pm$ 5.97*	34.20 $\pm$ 5.16	33.10 $\pm$ 4.70	34.00 $\pm$ 3.77	33.11 $\pm$ 6.03(9)
UN (mg/dl)	21.10 $\pm$ 1.37	21.40 $\pm$ 1.08	19.30 $\pm$ 4.72	18.90 $\pm$ 1.66*	19.50 $\pm$ 1.27*	19.33 $\pm$ 1.80*(9)
GOT (K.U./mL)	116.30 $\pm$ 13.70	146.80 $\pm$ 34.70*	106.50 $\pm$ 8.22	111.20 $\pm$ 13.55	118.50 $\pm$ 16.66	116.90 $\pm$ 14.22
GPT (K.U./mL)	64.20 $\pm$ 18.30	120.80 $\pm$ 44.68*	54.50 $\pm$ 12.82	53.70 $\pm$ 11.81	64.00 $\pm$ 8.18	62.60 $\pm$ 19.08
雌 T.P (g/dl)	65.80 $\pm$ 1.62	55.70 $\pm$ 1.49*	64.40 $\pm$ 1.17*	66.50 $\pm$ 1.65	65.10 $\pm$ 1.79	65.50 $\pm$ 2.27
ALP (KA-U/dl)	24.50 $\pm$ 5.04	44.10 $\pm$ 5.88*	29.90 $\pm$ 5.59*	26.10 $\pm$ 4.61	29.10 $\pm$ 6.35	26.10 $\pm$ 4.68
UN (mg/dl)	17.70 $\pm$ 1.64	25.20 $\pm$ 2.57*	19.50 $\pm$ 1.90*	15.40 $\pm$ 1.65*	17.00 $\pm$ 2.63	17.30 $\pm$ 2.21

値は一部を除き10例平均 $\pm$ S.D. () 例数 *対照群と比較して $P<0.05$

要 旨

チアベンダゾール thiabendazole (TBZ) のラットを用いたがん原性試験に対する最大投与量を決定するために, TBZ 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%および0.05%添加飼料を F344/DuCrj ラット雌雄に13週間投与する亜急性毒性試験を行い, 最大投与量を雌雄とも0.2%と決定した。

文 献

- 1) Robinson, H. J., Stoerk, H. C., and Graessle, O. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965
- 2) 石館守三: 食品添加物公定書解説書, 第4版, B-

625, 1979, 廣川書店

- 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) 小縣昭夫ほか: 東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 5) 三栗谷久敏ほか: 東京衛研年報, 31-2, 20, 1980
- 6) 藤井 孝ほか: 東京衛研年報, 32-2, 16, 1981
- 7) 井口重孝ほか: 東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
- 8) 林田志信ほか: 東京衛研年報, 29-2, 116, 1978
- 9) 小田島成和, 橋本嘉幸: 化学物質と癌の発生, 39, 1978, 学会出版センター

チアベンダゾールのラットを用いた亜急性毒性試験——病理検索——

藤井 孝*, 福森 信隆*, 長澤 明道*, 三栗谷 久敏*
林田 志信*, 高橋 博*, 矢野 範男*, 湯澤 勝廣*
平賀 興吾*

Pathological Study on Rats Fed with Thiabendazole for 13 Weeks

TAKASHI FUJII*, NOBUTAKA FUKUMORI*, AKEMICHI NAGASAWA*,
HISATOSHI MIKURIYA*, SHINOBU HAYASHIDA*, HIROSHI TAKAHASHI*,
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

Thiabendazole (TBZ), a fungicide approved as a food additive for citrus fruits or banana in Japan, was given in pellet diets at dietary levels of 0 (control), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8% respectively to a group of 10 male and 10 female F344 rats for 13 weeks. The body and organ weights of dosed rats, especially the rats fed 0.8% TBZ, were lower than those of the control. However, the weight of urinary bladder of the dosed rats was equal to or slightly higher than that of the control. The dose-related increase of incidence or degree of microscopical changes in some organs or tissues of the rats fed 0.2, 0.4 and 0.8% TBZ was observed. These changes were degeneration of the liver cells, accumulation of the lipofuscin in the kidney, hemosiderosis of the spleen, atrophy of the thymus, decrease of colloid contents in the thyroid, focal increase of number of cell layers in the urinary bladder and atrophy of the bone marrow.

Keywords: thiabendazole, oral toxicity, rat, degeneration of liver cells, hemosiderosis of spleen, decrease of colloid in thyroid

緒 言

チアベンダゾール (以下, TBZ と略す) は駆虫ならびにカビ防止作用をもつことが知られている¹⁻³⁾。我国では1978年に柑橘類およびバナナのみに使用するカビ防止剤として食品添加物に指定された⁴⁾。TBZ は Robinson ら⁵⁾ の報告によれば種々の実験動物を用いた経口急性, 亜急性, 慢性毒性試験で顕著な害作用を示さなかったとしている⁶⁾。しかし, 当部での一連のカビ防止剤の安全性検討のなかで⁸⁻²⁵⁾, TBZ はマウスを用いた催奇形試験で異常が認められ¹⁵⁾, その後も検討を続けている。そこで TBZ の毒性は発癌性の有無を始めとしてさらに検討されるべきと考え, ラットを用いた経口毒性試験を企図した。急性毒性試験の結果は既に報告した²²⁾。本報は TBZ 添加飼料を F344 ラット雌雄に 13 週間摂取させた実験の病理学的検索の結果であり, 体重変動, 血液学的検索などの結果は別報²⁶⁾に示す。

実験材料ならびに方法

検体: TBZ は米国メルク社製 thiabendazole micro-

fine MSD (Lot No. BZA-539) を用いた。

実験動物および飼育環境: 日本チャールス・リバー株式会社より F344/DuCrj ラット雌雄を 4 週令で購入した。

動物は前面と床が網, 他は板のステンレス製個別ケージに収容し, 自動給水 (細菌ろ過器経由) 装置付ベルト式飼育架台で飼育した。飼育室はバリアー区域内にあり室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 50~60%, 換気回数は 1 時間に 10 回, 照明時間は午前 6 時より午後 5 時までの 11 時間に, それぞれ制御してある。

検体投与および投与期間: 日本クレア株式会社製粉末飼料 CE-2 に検体を 0 (対照), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 および 0.8% の濃度に添加した後に固型飼料化した。この固型飼料を動物が 5 週令になった時点から 13 週間にわたって水とともに自由摂取させた。動物は各濃度の添加飼料に雌雄各 10 匹計 120 匹を用いた。

検索方法: 投与終了後, 動物を無麻酔で解剖台に固定し大腿動・静脈を切断, 放血致死せしめた。肉眼的観察

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

を行うとともに脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、卵巣および子宮を摘出し湿重量を測定した。膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後、10%緩衝ホルマリン液0.5mlを注入し膨張させ内尿道口付近で結紮、固定した。膀胱は1週間固定した後、正中線で2分し固定液を流出させ重量を測定した。そのほか眼球、ハーデリアン腺、耳下腺、顎下腺、大舌下腺、甲状腺（上皮小体を含む）、気管、食道、胃、大・小腸、脾臓、精嚢、精巣上体、リンパ節および大腿骨を摘出した。摘出した器官・組織は10%緩衝ホルマリン液で約6時間振盪、液交換を行った後に静置して1週間固定した。固定後の器官・組織は定法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施した。肝臓、腎臓および脾臓はベルリン青染色、Lillie法によるリポフスシン染色も行った。これらの標本を用いて光顕の観察を行った。

なお、器官重量などの測定結果の推計学的検討は危険率を0.1, 1および5%において行った。

結 果

TBZの投与に伴う体重、器官重量の変動および病理学的変化などが投与群ラットに認められた。

器官重量：Table 1 および 2 に各群の投与終了時の体重ならびに器官重量を示した。体重は0.05%群を除き、各投与群とも対照群に比べ小さく、0.2%群雌、0.4および0.8%群雌雄で有意差を生じた。雌雄とも0.05%群を除く各群間で投与量の増加に伴って体重が小さくなる傾向を示した。投与群の器官のうち、対照群に比べ絶対重量が小さく、体重比重量が大きく、ともに有意差を示したのは0.2%群雌の右腎臓、0.4%群雌雄の心臓、肺、右腎臓、雄の脾臓、雌の左副腎、0.8%群雌雄の脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、雄の下垂体、左精巣、雌の副腎であった。絶対重量、体重比重量ともに有意に小さかったのは0.1%群雌の胸腺、0.2%群雌雄の胸腺、雄の脾臓、0.4および0.8%群雌雄の胸腺、雌の下垂体、子宮であった。絶対重量、体重比重量ともに有意に大きかったのは0.05, 0.1および0.2%群雌の膀胱であった。膀胱は0.05%群を除き、各投与群ともほぼ同じか、あるいは大きくなっていた。投与量の増加に伴って絶対重量が小さく、体重比重量が大きくなる傾向を示したのは0.05%群雌雄を除く各群間では雌雄の腎臓、雌の肺、脾臓であった。0.05および0.1%群雌雄を除く各群間では雌雄の心臓、雄の肺、雌の子宮であった。対照群、0.4および0.8%群間では雌雄の脳、副腎、雄の脾臓、下垂体、雌の肝臓であった。投与量の増加に伴って絶対重量、体重比重量ともに小さくなる傾向を示したのは雌雄の胸腺であった。

投与量の増加に伴って対照群、0.4および0.8%群間で絶対重量、体重比重量ともに大きくなる傾向を示したのは雌の膀胱であった。膀胱は体重比重量では雌雄とも全投与群間で同様の傾向が認められた。

肉眼的検索：対照群および投与群とも著明な変化は認められなかった。なお投与開始後12週で死亡した0.05%群雄の1例は肉眼的・組織学的に顕著な変化を示さなかった。

組織学的検索：Table 3 に示す如く、各器官・組織で投与に伴う変化が認められた。肝臓では小葉中心性に好酸性の細胞質と軽度濃縮した核をもつやや小型の肝細胞がみられ、極く少数の細胞が凝固壊死の像を呈していた。また近傍の類洞内皮細胞が顕在化していた。変化は極く軽度なものが0.2%群雄4/10(10例中4例の意、以下同じ)雌8/10, 0.4%群雄1/10, 軽度なものが0.2%群雌雄各1/10, 0.4%群雌9/10, 0.4%群雌および0.8%群雌雄各10/10であった。この変化に加えて中心静脈あるいは小葉間静脈などの周囲の類洞内に細胞質は網状または泡沫状で明るい核を有する貪食細胞が大小の集簇を形成しているのがみられた。貪食細胞の細胞質はヘマトキシリン・エオジン重染色(H・E染色)で薄い黄色に染まり、その中に黄褐色を呈する顆粒が少量認められた(Photo 1)。この顆粒はLillie法では呈色せず、ベルリン青反応陽性であり、ヘモジデリンとした(Photo 2)。変化は極く軽度のものが0.4%群雌2/10, 0.8%群雌6/10, 雌1/10, 軽度なものが0.8%群雄3/10, 雌9/10に認められた。腎臓ではびまん性の変化として主部尿管の上皮細胞質内にH・E染色で黄褐色を呈する顆粒が認められた(Photo 3)。この顆粒はベルリン青反応陽性のものは極く少量であり、多くはLillie法によってリポフスシンとした(Photo 4)。変化は極く軽度なものが0.2%群雄1/10, 雌3/10, 0.4%群雄7/10, 雌8/10, 0.8%群雄3/10, 軽度なものが0.4%群雄1/10, 0.8%群雄7/10, 雌10/10にみられた。脾臓では被膜に皺襞形成がみられ、白脾髄(脾リンパ小節)の減少および縮小が認められた。やや拡張した赤脾髄にはH・E染色で黄褐色、ベルリン青反応陽性のヘモジデリンが大量にみられた(Photo 5, 6)。白脾髄の減少および縮小は極く軽度な変化が0.2%群雌2/10, 0.4%群雄1/10, 雌5/10に、軽度なものが0.4%群雌9/10, 雌2/10, 0.8%群雌9/10, 雌10/10にそれぞれ認められた。ヘモジデリンの沈着は対照群の程度を基準としてそれ以上に著明なものを変化ありとした。変化は極く軽度なものが0.2%群雌雄各1/10, 0.4%群雌雄各2/10, 0.8%群雄1/10, 軽度なものが0.4%群雌雄各8/10, 0.8%群雄8/10, 雌10/10, 中等度

Table 1. Organ Weight in Subchronic Toxicity Test of TBZ (Male)

Group	No. of rats	Body weight (g)	Brain (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Liver (g)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Kidney		Pituitary		Adrenal		Testis		Prostate (mg)	Bladder ^{e)} (mg)
									R	L	R	L	R	L	R	L		
									(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)		
Control	10	294.4 ^{a)}	1914.8 ^{b)}	783.6	871.4	9.68	559.6	176.1	856.3	850.9	7.7	20.8	22.4	1373.8	1419.6	269.6	109.7	
		±23.00	±53.36	±46.21	±63.05	±1.07	±42.77	±12.53	±71.58	±89.56	±1.40	±3.49	±3.99	±74.58	±47.73	±41.02	±16.84	
		657.5 ^{c)}	268.6	298.3	3.30	191.6	60.6	293.0	290.8	2.6	7.0	7.6	471.9	487.6	92.4	37.7		
		±39.61	±13.06	±12.43	±0.15	± 9.55	± 6.70	±13.94	±17.09	±0.41	±0.87	±1.09	±38.85	±33.18	±14.08	± 6.92		
0.05% TBZ	9	273.2	1940.0	780.7	863.8	9.54	541.1	155.1**	831.8	825.7	8.3	19.2	21.3	1291.8	1315.1	281.0	101.1	
		±21.98	±34.81	±38.29	±49.98	±0.80	±30.11	±11.86	±55.68	±58.43	±1.21	±2.07	±1.51	±282.86	±280.63	±66.36	±12.37	
		713.7*	286.5**	316.8**	3.49*	198.5	56.8	304.9	302.6	3.0*	7.0	7.8	471.6	479.6	102.6	37.6		
		±53.17	±11.81	±13.91	±0.13	± 9.05	± 3.73	±12.08	±11.93	±0.33	±0.92	±0.82	±99.44	±94.50	±22.50	± 5.14	(⁸⁾ d)	
0.10% TBZ	10	276.5	1902.6	771.3	864.1	9.79	536.5	154.0**	835.4	854.4	7.4	19.2	21.2	1396.4	1407.2	250.4	109.8	
		±33.49	±56.77	±103.74	±88.04	±1.43	±55.23	±19.44	±95.40	±100.06	±1.60	±3.30	±3.07	±103.92	±102.77	±67.40	±17.51	
		696.0	278.7	313.6*	3.53*	194.7	55.8	302.5	309.3**	2.7	7.0	7.7	508.1*	512.8	89.8	39.7		
		±74.64	±12.21	±17.28	±0.21	±11.27	± 4.60	±11.16	±10.10	±0.56	±1.20	±1.07	±34.07	±43.78	±19.16	± 4.60		
0.20% TBZ	10	275.9	1927.9	778.3	854.0	10.36	497.8**	146.2***	846.6	862.5	8.3	18.8	21.8	1390.4	1446.9	259.4	111.0	
		±18.74	±27.69	±55.36	±67.49	±0.97	±32.25	±18.78	±70.96	±58.06	±1.33	±3.42	±2.26	±72.69	±61.04	±71.98	±14.51	
		701.6*	282.2*	309.7	3.75***	180.7*	53.2*	306.7*	312.7**	3.0	6.8	7.9	505.2*	525.9*	92.9	40.2		
		±48.21	±10.00	±16.54	±0.18	±10.48	± 7.88	±13.57	± 8.87	±0.38	±1.13	±0.49	±29.66	±30.71	±24.48	± 4.37		
0.40% TBZ	10	233.9***	1857.7	709.6**	813.2*	9.87	498.3**	90.4***	780.9*	796.7	7.3	20.0	22.5	1397.8	1434.0	218.2**	107.1	
		±16.98	±67.72	±54.61	±52.57	±0.72	±35.38	± 8.84	±73.94	±66.40	±0.60	±3.15	±3.92	±102.14	±90.22	±26.32	±16.48	
		797.0***	303.5***	348.0***	4.22***	213.1***	38.8***	333.5***	340.5***	3.1**	8.5**	9.6**	598.2***	613.9***	93.3	45.8*		
		±48.09	±13.16	±10.19	±0.13	± 6.46	± 4.60	±16.74	±11.98	±0.28	±1.08	±1.40	±27.91	±23.65	± 9.30	± 6.09		
0.80% TBZ	10	126.4***	1790.6***	477.5***	615.6***	6.54***	378.1***	41.6***	607.2***	614.6***	5.7**	18.1	19.7	1179.4	1214.5*	100.4***	108.2	
		± 8.48	±54.62	±37.27	±81.69	±0.69	±88.75	± 7.85	±53.86	±55.63	±0.89	±2.69	±2.26	±268.28	±237.18	±23.42	±11.87	
		1421.9***	377.8***	487.8***	5.17***	298.1***	32.9***	480.2***	486.2***	4.5***	14.3***	15.6***	929.0***	959.7***	79.7	85.7***		
		±95.71	±16.66	±61.04	±0.36	±60.86	± 5.75	±25.42	±29.47	±0.75	±1.90	±1.44	±191.73	±180.32	±19.82	±14.03	(⁹)	

a) Mean ± SD b) Absolute weight c) Relative weight (g/100g body weight) d) No. of organs e) The value is given after fixation.

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

Table 2. Organ Weight in Subchronic Toxicity Test of TBZ (Female)

Group	No. of rats	Body weight (g)	Brain	Heart	Lung	Liver	Spleen	Thymus	Kidney		Pituitary	Adrenal		Ovary		Uterus	Bladder ^{e)}	
			(mg)	(mg)	(mg)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	R	L	(mg)	R	L	R	L	(mg)	(mg)
										(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
Control	10	175.6 ^{a)} ±10.45	1774.6 ^{b)} ±77.83	539.6 ±38.78	659.9 ±42.20	5.18 ±0.32	400.1 ±32.21	168.4 ±22.30	582.4 ±37.61	581.6 ±34.99	11.1 ±1.46	23.8 ±2.13	25.5 ±2.41	29.2 ±4.37	30.6 ±3.71	460.4 ±95.10	81.0 ±7.98	
		1012.7 ^{c)} ±57.01	307.2 ±10.64	376.5 ±26.55	2.95 ±0.16	228.1 ±17.60	95.9 ±11.52	331.8 ±13.58	331.5 ±15.11	6.3 ±0.88	13.5 ±0.82	14.6 ±1.46	16.6 ±1.74	17.4 ±2.14	262.6 ±55.13	46.7 ^(9) d) ±5.33		
0.05% TBZ	10	176.3 ±13.92	1820.0 ±26.34	535.8 ±44.14	689.0 ±51.43	5.49 ±0.54	402.9 ±25.48	161.1 ±21.05	580.0 ±36.91	570.9 ±37.31	11.6 ±1.75	22.4 ±2.07	25.9 ±1.92	31.6 ±4.84	32.2 ±4.05	434.6 ±82.83	99.6** ±11.29	
		1036.9 ±66.36	304.0 ±13.08	391.5 ±23.42	3.12 ±0.26	229.0 ±13.14	91.4 ±10.11	329.6 ±17.02	324.3 ±13.94	6.6 ⁽⁹⁾ ±1.21	12.7 ⁽⁹⁾ ±1.42	14.6 ⁽⁹⁾ ±1.01	18.0 ±2.96	18.3 ±2.43	248.2 ±53.01	58.6** ⁽⁶⁾ ±7.57		
0.10% TBZ	10	166.8 ±10.39	1805.1 ±40.11	497.7* ±31.90	656.2 ±35.61	5.48 ±0.47	393.5 ±30.70	137.2** ±18.17	544.5* ±18.75	555.6 ±33.67	11.4 ±1.38	22.6 ±2.07	24.1 ±1.52	31.8 ±7.31	30.7 ±7.99	427.4 ±82.06	97.2** ±10.24	
		1085.6* ±64.52	298.5 ±11.27	393.9 ±16.75	3.29** ±0.26	235.8 ±9.32	82.1** ±8.06	327.6 ±23.75	333.7 ±20.34	6.8 ±0.73	13.6 ±1.39	14.5 ±1.31	18.9 ⁽⁹⁾ ±3.93	18.2 ⁽⁹⁾ ±4.22	258.0 ±57.35	58.8** ⁽⁹⁾ ±7.74		
0.20% TBZ	10	157.7*** ±9.76	1777.0 ±77.20	507.0 ±35.80	656.9 ±47.37	5.51 ±0.43	386.3 ±33.93	114.0*** ±11.56	546.1* ±32.63	557.5 ±33.43	10.5 ±1.69	21.1** ±1.69	23.4* ±1.72	29.9 ±4.23	33.6 ±3.60	411.1 ±88.35	102.7* ±20.68	
		1131.0** ±89.73	321.4** ±9.72	416.8** ±21.44	3.49*** ±0.12	244.6* ±8.88	72.4*** ±7.36	346.6* ±15.82	353.7** ±11.98	6.6 ±1.15	13.4 ±1.50	14.9 ±1.51	19.0* ±2.98	21.3** ±2.55	259.5 ±46.56	64.8** ±12.71		
0.40% TBZ	10	137.1*** ±8.83	1761.2 ±39.33	439.6*** ±31.96	594.2** ±45.01	5.07 ±0.51	364.4 ±53.48	91.6*** ±8.23	498.1*** ±48.17	508.1*** ±35.02	7.5*** ±1.17	19.3*** ±2.64	21.7** ±2.18	27.1 ±6.65	26.3* ±4.06	241.7*** ±77.27	88.0 ±5.27	
		1288.5*** ±72.28	320.9* ±17.31	433.4*** ±18.19	3.70*** ±0.27	264.8** ±27.38	67.0*** ±6.75	362.9*** ±19.97	370.6*** ±11.55	5.5 ⁽⁹⁾ ±0.58	14.1 ±1.82	15.8* ±1.10	19.7 ±4.10	19.2 ±2.43	175.0** ±50.10	62.8** ⁽⁶⁾ ±3.96		
0.80% TBZ	10	65.6*** ±4.19	1635.7*** ±23.98	286.9*** ±16.91	456.9*** ±25.41	3.61*** ±0.19	222.7*** ±22.44	28.1*** ±6.22	400.5*** ±35.06	403.5*** ±24.37	3.9*** ±0.88	12.3*** ±2.02	12.6*** ±1.40	11.6*** ±2.69	12.0*** ±1.47	78.0*** ±9.59	96.5 ±19.63	
		2501.5*** ±143.51	437.8*** ±19.15	697.1*** ±21.49	5.52*** ±0.24	339.0*** ±18.81	42.7*** ±8.36	611.8*** ±54.48	616.6*** ±43.30	6.0 ±1.59	18.9*** ±3.14	19.2*** ±1.69	17.5 ±3.26	18.3 ±2.31	119.2*** ±16.02	149.1*** ⁽⁷⁾ ±38.92		

a) Mean ± SD b) Absolute weight c) Relative weight (g/100g body weight) d) No. of organs e) The value is given after fixation.

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

Table 3. Microscopical Findings—Summary of Observations

		Male						Female					
Dietary level of TBZ (%)		0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
No. of rats evaluated ¹⁾		10	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Degeneration and/or necrosis of liver cells	2)												
	-	10	9	10	5	0	0	10	10	10	1	0	0
	±	0	0	0	4	1	0	0	0	0	8	0	0
	+	0	0	0	1	9	10	0	0	0	1	10	10
Aggregation of phagocytes in liver	-	10	9	10	10	10	1	10	10	10	10	8	0
	±	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	2	1
	+	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	9
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Accumulation of lipofuscin in proximal tubules of kidney	-	10	9	10	9	2	0	10	10	10	7	2	0
	±	0	0	0	1	7	3	0	0	0	3	8	0
	+	0	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	10
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemosiderosis of spleen	-	10	9	10	9	0	0	10	10	10	9	0	0
	±	0	0	0	1	2	1	0	0	0	1	2	0
	+	0	0	0	0	8	8	0	0	0	0	8	10
	++	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Decrease of lymphatic nodules of spleen	-	10	9	10	10	0	0	10	10	10	8	3	0
	±	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	5	0
	+	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	2	10
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrophy of thymus	-	10	9	10	10	5	0	10	10	10	10	4	0
	±	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	6	0
	+	0	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	4
	++	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	6
Decrease of colloid in follicles of thyroid	-	10	9	10	9	4	0	10	10	10	9	5	0
	±	0	0	0	1	4	2	0	0	0	1	4	9
	+	0	0	0	0	2	8	0	0	0	0	1	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrophy and congestion in bone marrow	-	10	9	10	10	4	0	10	10	10	10	4	1
	±	0	0	0	0	6	8	0	0	0	0	6	9
	+	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Rats evaluated were those that lived at the termination.

2) - : No change, ± : Very slight changes, + : Slight changes, ++ : Moderate changes.

なものは0.8%群雄1/10にそれぞれ認められた。胸腺では小葉間隙が著明で皮質の幅が狭く、胸腺リンパ球が減少するなどの萎縮像を示した。変化は極く軽度なものが0.4%群雄3/10, 雌6/10, 0.8%群雄1/10, 軽度なものが0.4%群雄2/10, 0.8%群雄7/10, 雌4/10, 中等度なものが0.8%群雄2/10, 雌6/10であった。甲状腺では小胞が小型あるいは不整形を呈し、腔内にはコロイドがほとんど認められなかった(Photo 7)。変化は極く軽度なものが0.2%群雌雄各1/10, 0.4%群雌雄各4/10, 0.8%群雄2/10, 雌9/10に、軽度なものが0.4%群雄2/10, 雌1/10, 0.8%群雄8/10, 雌1/10にそれぞれ認められた。骨髄では骨髄細胞密度の低下、脂肪組織の増加さらにうっ血などが認められた(Photo 8)。変化は極く軽度なものが0.4%群雌雄各6/10, 0.8%群雄8/10, 雌9/10, 軽度なものが0.8%群雄2/10であった。このほか表には記載していないが、膀胱で粘膜上皮細胞がやや大型になり細胞が4~5層になっている極く軽度な増殖性変化が認められた。変化は0.8%群雄1/10, 雌2/10にみられた。以上の如く、各器官・組織での変化はほとんどが極く軽度あるいは軽度なものであったが、雌雄とも対照群, 0.05および0.1%群では著明ではなく, 0.2, 0.4および0.8%群で投与量の増加に伴って変化程度は強く、発現例数も多くなっていた。

総括および考察

TBZ 添加飼料をF344ラットに13週間摂取させたところ、体重および器官重量の変動、組織学的変化などが用量・反応関係をもって認められた。体重では対照群の平均値を100とすると、雄では0.05, 0.1および0.2%群が92.7~93.9, 0.4%群79.4, 0.8%群が42.9となり、雌では0.05, 0.1および0.2%群が89.8~100.3, 0.4%群が78.0, 0.8%群が37.3となる。このように0.05, 0.1および0.2%群雌雄では体重減少が対照群のほぼ10%であるが、0.4%群雌雄では約20%, 0.8%群では約60%と急減している。ラット1匹当りの飼料摂取量は対照群を100とすると0.4%群雌雄はほぼ70~80%, 0.8%群雌雄はほぼ50%程度であった²⁶⁾。今回の体重減少はこの飼料摂取量の減少によるものとも考えられるが、制限給餌実験での体重減少^{27, 28)}と比べ、やや強く現われていたことから飼料摂取量の減少にTBZ投与の影響が加わっていたと考えられる。器官重量で減少がみられたのは雌雄の胸腺、心臓、肺、脾臓、腎臓、脳、副腎および雌の子宮などであった。とくに胸腺では雌雄とも全投与群で絶対・体重比重量が小さくなっていたが他の器官は0.2, 0.4および0.8%群で小さくなっていた。重量減少を示した器官の鏡検では胸腺のリンパ球減少、脾臓のリンパ小節の減少

・縮小、腎臓のリボフスシンの沈着などがみられ、いずれも萎縮像を示したが他の器官では著明に認められなかった。体重減少は0.4および0.8%群で明らかであったが、器官重量減少は0.2%群から明らかとなっている。とくに胸腺では0.05%群から著明になるなど器官重量にはTBZの影響が体重よりも強く現われていたと思われる。膀胱は重量が対照群に比べ減少せず、雌では増加していた。組織検索では0.8%群に1, 2例ではあるが極く軽度の粘膜上皮細胞の増殖性変化が認められており、他の器官・組織がほとんど退行性変化であったのに対し進行性変化を示した。これはTBZの発癌性と関連する変化とも考えられ、膀胱については今後の検索でも慎重を期すべきであろう。組織学的検索では0.4および0.8%群雌雄で骨髄組織の萎縮、脾臓のヘモジデリン沈着など血球産生・破壊に関する組織での異常が認められた。これは0.4および0.8%群雌雄の血液学的検索で貧血が認められた²⁷⁾ことに合致しておりTBZの影響と思われる。肝臓では小葉中心性に肝細胞の変性・壊死、貪食細胞の顕在化がみられた、これはTBZが軽度ながら肝臓に有害作用を及ぼしたと考えられる。0.4および0.8%群雌雄の甲状腺小胞のコロイド消失は、甲状腺の機能低下と直結する程の顕著な変化ではないが、体重増加抑制、雌の子宮重量の減少などは、何らかの影響を与えた結果とも考えられる。

以上の如く、ラットにTBZを投与したところ体重減少のほか、胸腺、甲状腺および骨髄の萎縮、脾臓のヘモジデリン沈着、肝細胞の変性、膀胱粘膜の軽度増殖などが認められた。今後、長期毒性試験においては、肝臓、腎臓のほか、脾臓、リンパ節、骨髄など血球産生・破壊に関与する器官・組織、甲状腺および膀胱などの病理学的変化をとくに注目したいと考えている。

文 献

- 1) Brown, H. D., Matzuk, A. R., Lives, I. R., Peterson, L. H., Harris, S. A., Sarett, L. H., Egerton, J. R., Yakstis, J. J., Campbell, W. C., and Cuckler, A. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1764, 1961
- 2) Cuckler, A. C.: *J. Parasitol.*, 47, 36, 1961
- 3) Allen, P. H., Park, S. E., Ames, E. R., Zeissig, A., and Green, D. F.: *J. Animal Sci.*, 21, 1038, 1962
- 4) Ames, E. R., Cheney, J. M., and Rubin, R.: *Am. J. Vet. Res.*, 24, 295, 1963
- 5) Robinson, H. J., Phares, H. F., and Graessle, O. E.: *J. Invest. Dermatol.*, 42, 479, 1964
- 6) 石館守三監修: 食品添加物公定書・解説書, B-625,

1979, 広川書店

- 7) Robinson, H. J., Stoerk, H. C. and Graessle, O.
E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965
- 8) 小嶋昭江ほか：東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 9) 吉田誠二ほか：東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 10) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報, 29-2, 89, 1978
- 11) 縄井寿美子ほか：東京衛研年報, 29-2, 97, 1978
- 12) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報, 29-2, 99, 1978
- 13) 佐々木美枝子ほか：東京衛研年報, 29-2, 104, 1978
- 14) 佐々木美枝子ほか：東京衛研年報, 29-2, 109, 1978
- 15) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 16) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報, 30-2, 54, 1979
- 17) 田山邦昭ほか：東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
- 18) 米山允子ほか：東京衛研年報, 30-2, 80, 1979
- 19) 佐々木美枝子ほか：東京衛研年報, 30-2, 85, 1979
- 20) 田山邦昭ほか：東京衛研年報, 31-2, 1, 1980
- 21) 小縣昭夫ほか：東京衛研年報, 31-2, 17, 1980
- 22) 三栗谷久敏ほか：東京衛研年報, 31-2, 20, 1980
- 23) 藤田 博ほか：東京衛研年報, 31-2, 26, 1980
- 24) 藤田 博ほか：東京衛研年報, 31-2, 29, 1980
- 25) Hiraga, K., and Fujii, T.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*,
19, 303, 1981
- 26) 三栗谷久敏ほか：東京衛研年報, 32-2, 5, 1981
- 27) Oishi, S., Oishi, H., and Hiraga, K.: *Toxicol.*
Appl. Pharmacol., 47, 15, 1979
- 28) Armand, J. G., and Costello, L. C.: *J. Nutr.*,
105, 208, 1975

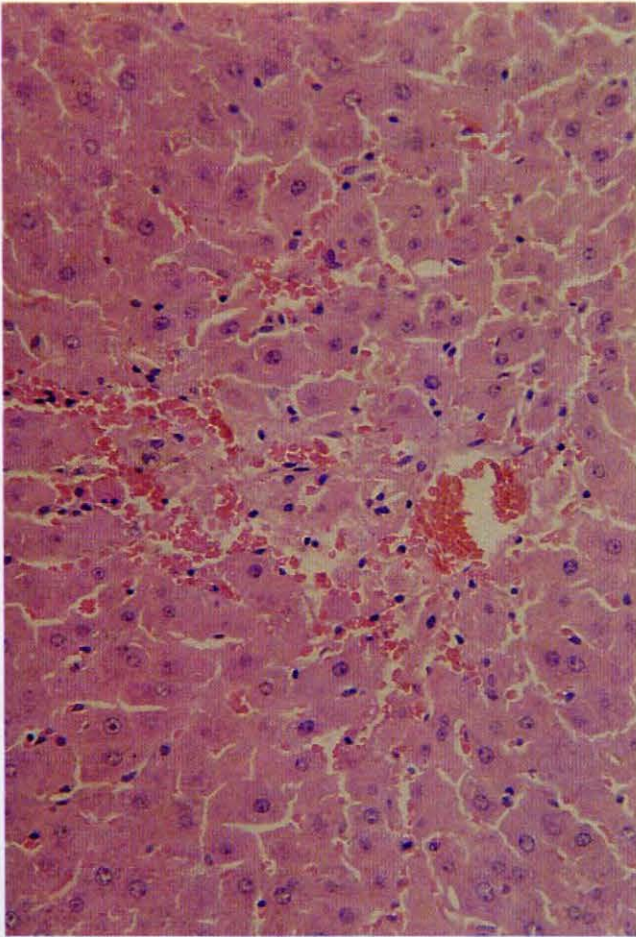
Explanation of Plates

- Photo 1. Degeneration of liver cells and aggregation of phagocytes in liver of male rat fed with 0.8 % TBZ for 13 weeks. H-E $\times 200$
- Photo 2. Cytoplasmic contents or granules of phagocytes in liver of male rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. Prussian blue method for iron $\times 200$
- Photo 3. Accumulation of yellowish brown pigments in proximal tubules of kidney of female rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. H-E $\times 200$
- Photo 4. Lipofuscin in tubules of kidney of female rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. Lillie's method for lipofuscin before the treatment with acetone. $\times 200$
- Photo 5. Brilliant yellow granules of spleen of male rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. H-E $\times 100$
- Photo 6. Hemosiderosis of spleen of male rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. Prussian blue method for iron. $\times 100$
- Photo 7. Decrease of colloid contents in follicles of thyroid of male rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. H-E $\times 200$
- Photo 8. Atrophy and congestion in bone marrow of male rat fed with 0.8% TBZ for 13 weeks. H-E $\times 200$

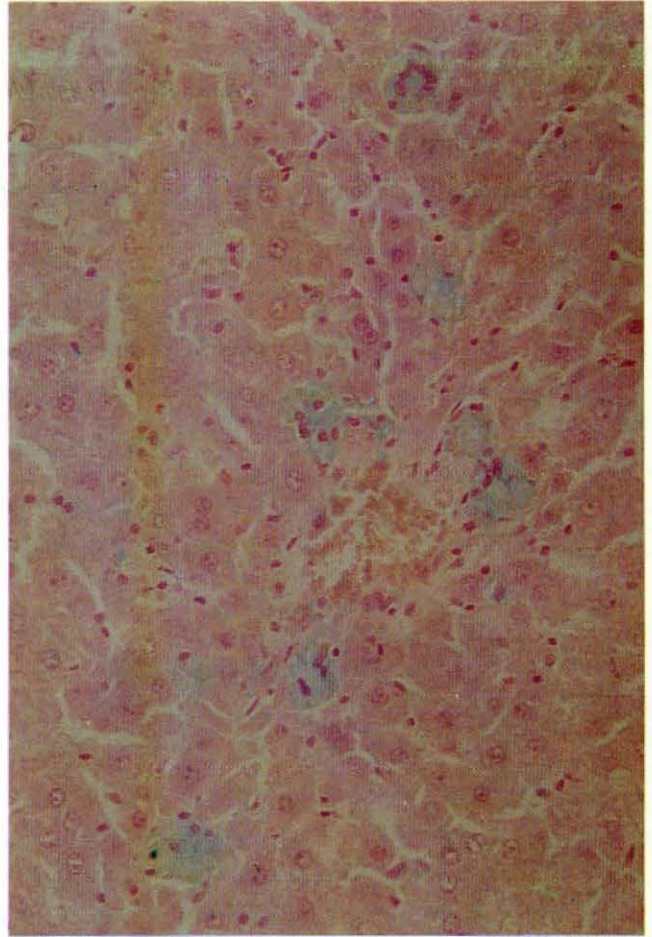
TBZ = Thiabendazole,

H-E = Hematoxylin-eosin stain

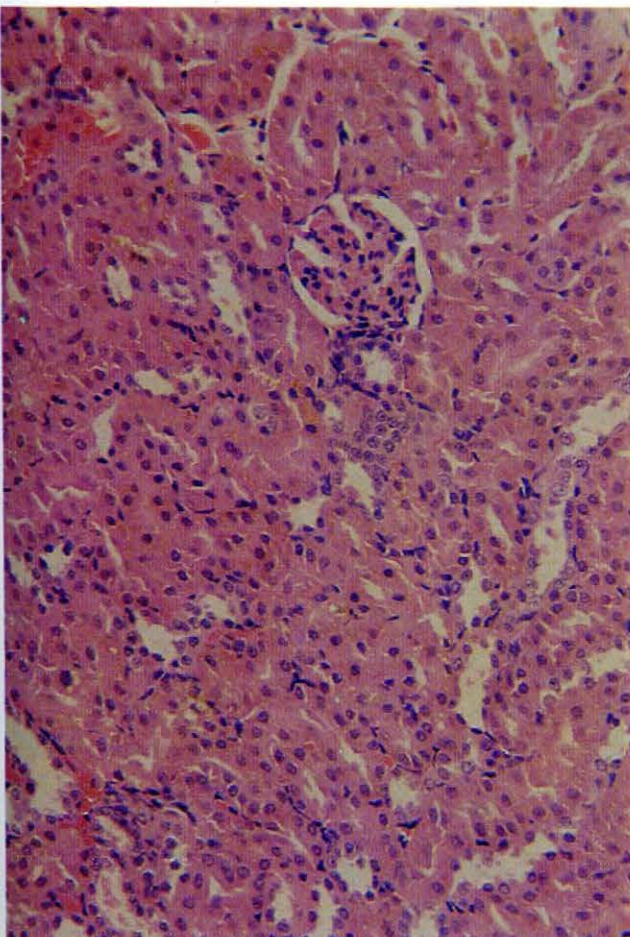
1



2



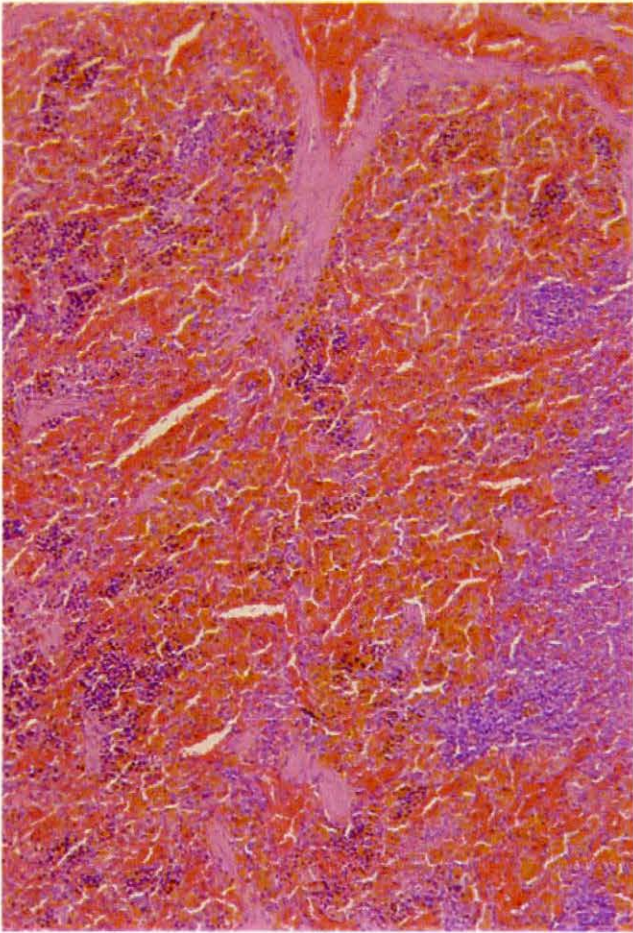
3



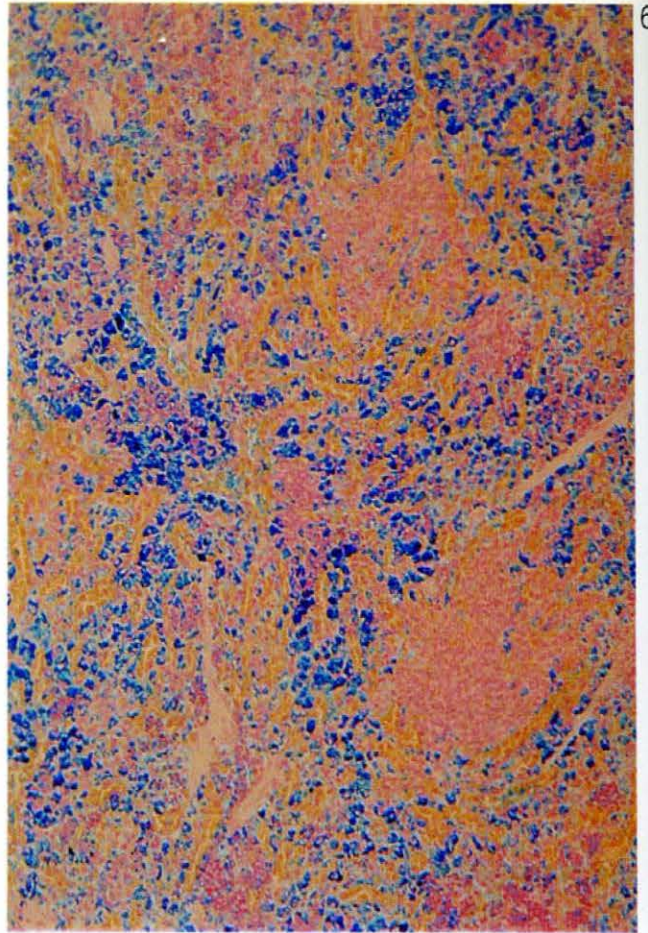
4



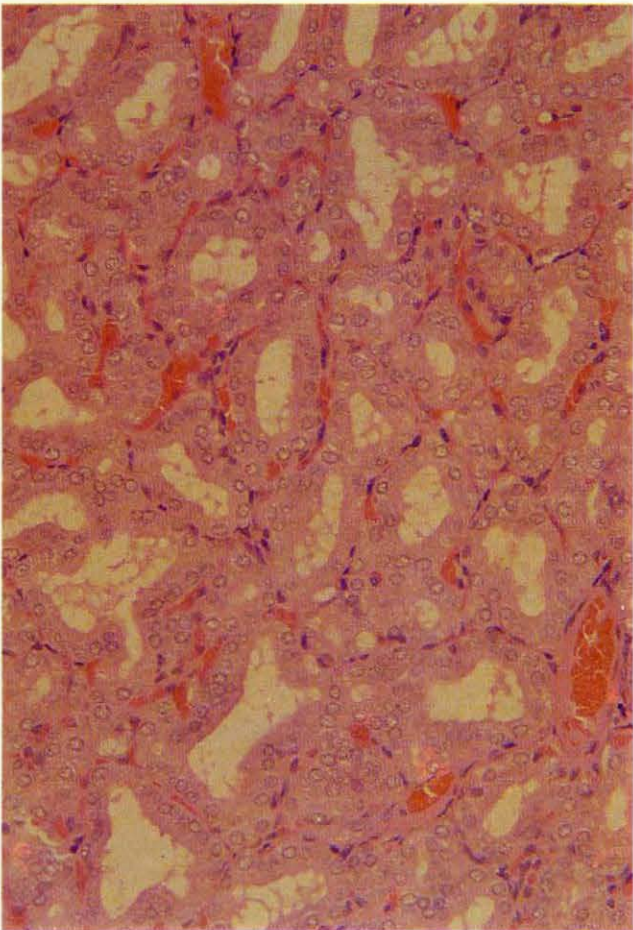
5



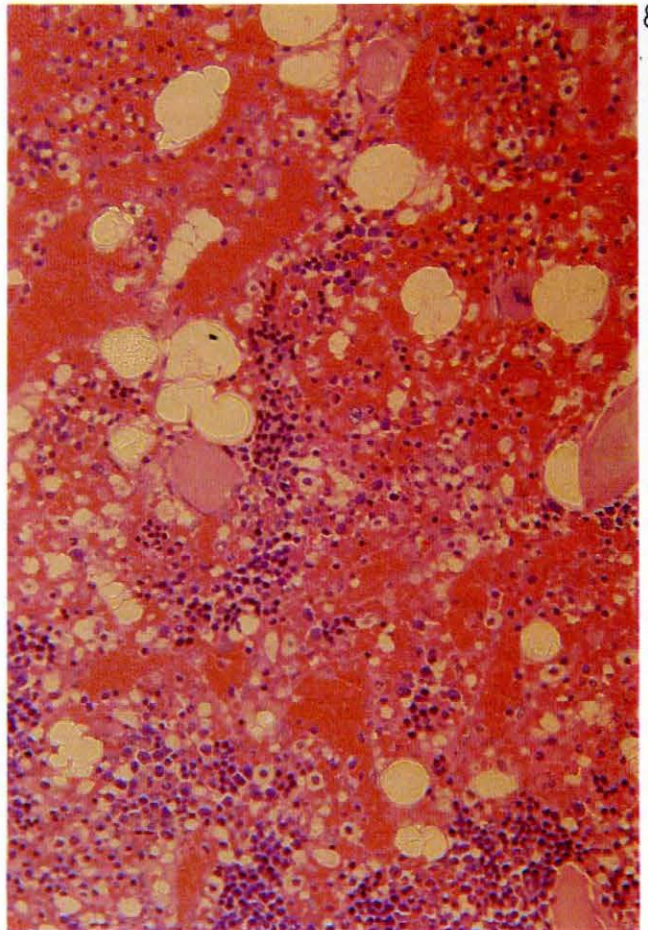
6



7



8



チアベンダゾールと酸化防止剤の相互作用による
サルモネラ菌に対する突然変異誘起性について

藤 田 博*, 平 賀 興 吾*

Comutagenic Effect of Antioxidants on the Mutagenicity
of Thiabendazole in the *Salmonella*/Microsome Test

HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: チアベンダゾール thiabendazole, 酸化防止剤 antioxidants, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, ブチルヒドロキシアニソール butylated hydroxyanisole, α -トコフェロール α -tocopherol, アスコルビン酸 ascorbic acid, 突然変異誘起性 mutagenicity

緒 言

酸化防止剤として用いられるジブチルヒドロキシトルエン (以下 BHT と略す)¹⁻⁵⁾, ブチルヒドロキシアニソール (以下 BHA と略す)²⁻⁷⁾, アスコルビン酸^{1,2,8-11)} および α -トコフェロール^{1,2)} には, 発がん物質による細菌や培養細胞に対する突然変異誘起性や動物に対する発がん性を抑制する効果があることが報告されている. その作用は, 1) 化合物間の直接的反応, 2) 発がん物質の活性化の阻害反応, 3) 不活性化の代謝系の誘導による3つの複雑な過程があると考えられている. 一方, BHT には2-アミノアントラセン等の細菌に対する突然変異誘起性を増加させる場合がある^{12,13)}. またアスコルビン酸がN-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンの突然変異誘起性を増加させるとの報告¹⁴⁻¹⁶⁾もあり, これらの酸化防止剤が突然変異誘起性を変動 (抑制または増加) させる作用については, 一層複雑であることがうかがわれる.

柑きつ類のかび防止剤として用いられているチアベンダゾール (以下 TBZ と略す) はサルモネラ菌に対して単独では突然変異誘起性を示さない¹⁷⁻²⁰⁾. しかし前報²⁰⁾に報告したように TBZ と BHT の混合溶液に弱い突然変異誘起性が確認された. これは BHT の持つ突然変異誘起性変動効果により出現した TBZ の突然変異誘起性であると推察されることから, BHT 同様の変動効果を持つ酸化防止剤の BHA, アスコルビン酸および α -トコフェロールと TBZ との混合溶液の突然変異誘起性について Ames の mutation test 系²¹⁾を用いて検討した. いずれの酸化防止剤を加えた場合にも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), BHA (和光純薬, Lot No. 028-03462), *dl*- α -トコフェロール (和光純薬, Lot No. 027-01792), アスコルビン酸 (和光純薬, Lot No. 012-04802), TBZ (メルク, Lot No. BZA-539), フェノバルビタール (吉田製薬), ジメチルスルホキシド (和光純薬, 以下 DMSO と略す).

Mutation test 菌株は *Salmonella typhimurium* TA98 を用い Ames 法²¹⁾の変法^{22,23)}により行った. 代謝活性化にはフェノバルビタール (0.1%) を飲水として与え, 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から調整した S-9²¹⁾を用い, S-9Mix^{22,23)}中の S-9 の量は 150 μ l/プレートとした.

DMSO に溶かした TBZ (1000 μ g/0.05ml) またはコントロールとして DMSO (0.05ml) と, それぞれ DMSO に溶かした BHT, BHA および α -トコフェロール (2~100 μ g/0.05ml) あるいは蒸留水に溶かしたアスコルビン酸 (0.2~10mg/0.05ml) を小試験管に入れ, S-9Mix 0.5 ml および一夜培養の TA98 菌液 0.1ml を加え, 37℃ で 20 分間の前培養を行った. これに 45℃ に保温した軟寒天²²⁾ 2 ml を加え混合後, 最少寒天培地に重層した. 37℃ 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, 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 4 種類の酸化防止剤の混合溶液の TA98 を用いた mutation test の結果を図 1 に示した. TBZ あるいは酸化防止剤は, それぞれ単独では復帰コロニー数が増加しない¹⁷⁻²⁰⁾ことから, これらの化合物はいずれも単独では突然変異誘起性は陰性であると考えられる. しか

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

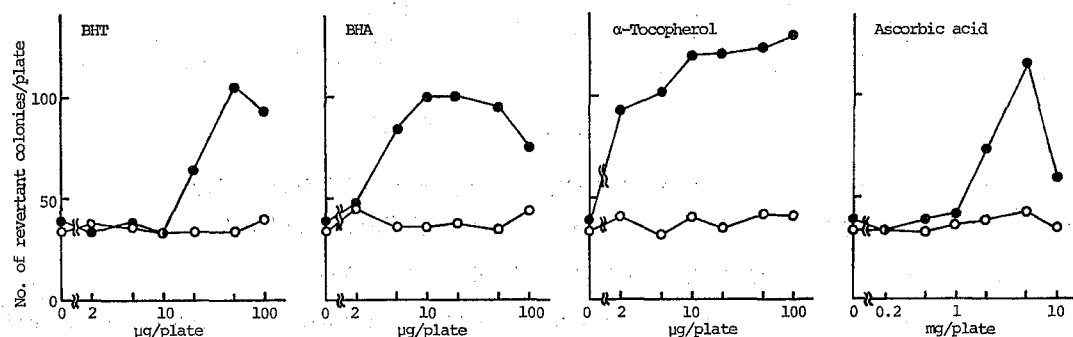


図 1. TBZ と酸化防止剤の混合溶液の TA 98 を用いた mutation test. ●は TBZ (1000μg/プレート) + 酸化防止剤, ○は酸化防止剤のみを示す.

し一定量の TBZ (1000μg/プレート) と BHT, BHA および α-トコフェロール (各 2~100μg/プレート), あるいはアスコルビン酸 (0.2~10mg/プレート) を混合した場合は復帰コロニー数が増加した。DMSO または TBZ のみのコントロールに対して最高 2.5 倍以上の増加を示したことから、混合溶液の突然変異誘起性は弱いものであるが陽性であると考えられる。

BHT は 20μg/プレート (以下/プレートは略す) 以上の濃度で復帰コロニー数が増加したが、50μg で最高となり、100μg ではむしろ増加量は減少した。BHA は 2μg 以上の濃度で増加した。10~50μg ではほぼ同程度の増加を示し、それ以上の濃度では減少傾向が見られた。

α-トコフェロールは 2μg で著しく増加し、100μg まで増加傾向が続いた。なお、100μg 以上の濃度で行った予備実験の結果から 100μg が最高でそれ以上の濃度では増加量は減少することが確認されている。アスコルビン酸は他の 3 化合物に比べて高い濃度を必要とし、1mg 以上の濃度で増加したが 10mg では増加量は急激に減少した。4 化合物に見られたこれらの復帰コロニー数の変化には、酸化防止剤の量に対して用量相関を持って増加し、ある濃度でプラトーに達する (プラトーが明確に示されなかった場合もある) が、その後増加量が減少するという共通性がうかがわれる。しかしこの増加に必要な濃度には化合物間に大きな差が見られ、ほぼ直線的増加濃度における酸化防止剤 nmole 当りの復帰コロニー数を求めて見ると、BHT は 50μg で 0.28, BHA は 10μg で 1.09, α-トコフェロールは 10μg で 3.5 およびアスコルビン酸は 5mg で 0.003 となる。α-トコフェロールが最も高い増加を示し、アスコルビン酸は弱いものであると考えられる。

酸化防止剤が突然変異物質の突然変異誘起性を変動 (抑制または増加) させる効果を持つことは多数報告されている。抑制効果の例としては、*N*-メチル-*N'*-ニト

ロ-*N*-ニトロソグアニジンおよび 1,4-ジニトロ-2-メチルピロールをアスコルビン酸が直接不活化したり⁸⁻¹¹⁾, β-プロピオラクトンと DNA との結合を BHT, BHA, α-トコフェロールおよびアスコルビン酸が阻害すると報告²⁾ されている。またベンツ(a)ピレンおよび 1-アミノアントラセンなどの薬物代謝酵素による活性化を BHT および BHA が阻害するとの報告^{3-6, 24, 25)} もある。一方、増加効果としては、アスコルビン酸が *N*-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンの代謝反応で生じるフリーラジカルの生成に影響を与えると報告¹⁴⁻¹⁶⁾ されており、我々は代謝活性化を必要とする突然変異物質である 2-アミノアントラセンなどの突然変異誘起性を BHT が増加する場合があることを報告して来た^{12, 13)}。これらの酸化防止剤は多様な作用を示すものではあるが、薬物代謝酵素系に作用することによって突然変異誘起性を変動させる効果を示すことは明らかであることから、TBZ と酸化防止剤の混合溶液に見られた弱い突然変異誘起性は TBZ 由来の代謝物質によるものであると考えられる。その物質は明らかではないが、TBZ の基本構造であるベンズイミダゾールとカルベンダジンなどのいくつかの誘導体に代謝活性化を必要としない突然変異誘起性が確認されている^{17, 26, 27)} ことから、それらの物質が生成している可能性が考えられ、酸化防止剤がその生成反応に影響を与えているのではないかと推察される。あるいはアスコルビン酸に見られたようなフリーラジカル生成反応に対する影響の可能性も考慮する必要がある。

ある濃度以上で復帰コロニー数の増加量が減少した。lawn の観察から、これは酸化防止剤によるサルモネラ菌に対する致死効果によるものではないと考えられることから、増加量の減少は酸化防止剤の突然変異誘起性を抑制する作用の現われではないかと推察される。

要 約

チアベンダゾールと酸化防止剤のジブチルヒドロキソトルエン、ブチルヒドロキソアニソール、 α -トコフェロールおよびアスコルビン酸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。いずれの酸化防止剤を加えた場合にも弱い突然変異誘起性が見られた。

文 献

- 1) Shamberger, R. J., Baughman, F. F., and Kalchert, S. L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1461, 1973
- 2) Shamberger, R. J., Corlett, C. L., Beaman, K. D., and Kasten, B. L.: *Mutation Res.*, **66**, 349, 1979
- 3) Calle, L. M., Sullivan, P. D., and Nettleman, M. D.: *B. B. R. C.*, **85**, 351, 1978
- 4) Wattenberg, L. W.: *Cancer Res.*, **35**, 3326, 1975
- 5) McKee, R. H., and Tometsko, A. M.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 473, 1979
- 6) Rahimtula, A. D., Zachariah, P. K., and O'Brien, P. J.: *Biochem. J.*, **164**, 473, 1977
- 7) Speier, J. L., Lam, L. K. T., and Wattenberg, L. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 605, 1978
- 8) Guttenplan, J. B.: *Nature*, **268**, 368, 1977
- 9) Guttenplan, J. B.: *Cancer Res.*, **38**, 2018, 1978
- 10) Galloway, S. M., and Painter, R. B.: *Mutation Res.*, **60**, 321, 1979
- 11) Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, M., and Kada, T.: *B. B. R. C.*, **95**, 835, 1980
- 12) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, **29-2**, 40, 1978
- 13) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, **30-2**, 41, 1979
- 14) Schut, H. A. J., Wirth, P. J., and Thorgeirsson, S. S.: *Mol. Pharmacol.*, **14**, 682, 1978
- 15) Schut, H. A. J., and Thorgeirsson, S. S.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 1405, 1979
- 16) Andrews, L. S., Fysh, J. M., Hinson, J. A., and Gillette, J. R.: *Life Sciences*, **24**, 59, 1979
- 17) Seiler J. P.: *Mutation Res.*, **15**, 273, 1972
- 18) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, **30-2**, 83, 1979
- 19) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, **31-2**, 26, 1980
- 20) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, **31-2**, 29, 1980
- 21) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347, 1975
- 22) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, **28-2**, 53, 1977
- 23) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178, 1975
- 24) Piekarski, L., Sawicki, J., and Kugaczewska, M.: *Neoplasma*, **26**, 139, 1979
- 25) Yang, C. S., Srickhart, F. S., and Woo, G. K.: *Life Sciences*, **15**, 1497, 1975
- 26) Seiler, J. P.: *Mutation Res.*, **17**, 21, 1973
- 27) Seiler, J. P., and Limacher, H.: *Chimia*, **27**, 68, 1973

オルトフェニルフェノールナトリウムの品質試験および添加飼料中の定量

溝 入 茂*, 広 門 雅 子*, 中 島 和 雄*, 中 嶋 巖*
遠 藤 英 美*

Quality and Determination of *o*-Phenylphenol-Na in Animal Feeds

SHIGERU MIZOIRI*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, IWAO NAKAJIMA*
and FUSAYOSHI ENDO*

Quality and changes of *o*-phenylphenol (OPP) and its sodium salt (OPP-Na) in animal feeds were studied using various methods. OPP-Na (Dow Chemicals) fed to rats contained many types of impurities although in small amounts. The concentrations of OPP and OPP-Na in the animal feed hardly changed from the initial levels, while the dialysis with water and the hexane extraction showed low recovery rates. This suggests that OPP and OPP-Na added to the animal feeds exists in two forms, water soluble and water insoluble.

Keywords: *o*-phenylphenol, *o*-phenylphenol-sodium salt, dialysis, impurities

緒 言

オルトフェニルフェノール (以下 OPP と略す) 及びそのナトリウム塩 (以下 OPP-Na と略す) はかんきつ類のかび防止剤として昭和52年に食品添加物に指定されたが, 特殊毒性に関する再検討が引き続きなされ, 昭和55年当所毒性部において混餌経路でラットに対するぼうこう癌の発現が報告された¹⁾. それに基づき, 検討委員会において追加試験計画が策定され, 当科においては次の点の検討を分担することとなった.

1. 発癌実験に用いた飼料中の OPP-Na の定量
2. 投与試験に用いたダウケミカル製 OPP-Na の公定書規格試験と不純物の分析

投与方法として試料を混ぜた飼料を用いる場合, 添加量, 飼料作成時・貯蔵時における化学変化等に伴う試料の減少などに注意する必要がある. 添加量の確認については縄井等²⁾ が水蒸気蒸留法によって行っている. しかし水蒸気蒸留法は酸性条件下100℃で加熱しているため, 飼料と OPP-Na 間に相互作用があった場合, その状態を反映した値となっていないおそれがある. そこで今回飼料中の OPP-Na の定量について, より温和な条件を用いて定量を行い, 結果がまとまったので以下の如く報告する.

実 験

試料 OPP-Na: 当所毒性部において混餌に用いたダウケミカル社製のもの. OPP: 前記OPP-Na を塩酸に

で中和し, 析出物を集めて真空蒸留後, 石油エーテルより再結晶したものを用いた. 定量用のスタンダードは前記 OPP を更にヘキサンによって再結晶し真空昇華して得られたものを用いた. 飼料は当所毒性部より提供をうけたもので, OPP-Na 添加量 2%, 1%, 0.7%, OPP 添加量 2.5%, 1.25%, 0.625%, および 0% のものであった.

試薬 全て東京化成, 関東化学の特級品を用いた. OPP の定量は水蒸気蒸留法では GC, その他の方法では HPLC を用いた. GC: 2%OV-1, 2m, 165℃, キャリアガス窒素25ml/min, 検出器 FID HPLC: Lichrosorb RP-18, 2.5φ×250, 溶離液メタノール: 酢酸: 水=70:25:5, 0.84ml/min, 検出器 UV-254nm.

OPP の定量法はいくつも報告されているが^{3,4)}, 今回は塩基性水溶液の直接注入を目的として上記の HPLC 条件を設定した.

水蒸気蒸留法 系をリン酸酸性にして縄井等の方法によって行った.

透析法 ビスキングCoのセルロースチューブを適当な長さに切り, 一端をしばったあと乳パチで粉碎した飼料 1g 及び水又は水酸化ナトリウム溶液を内液として 10ml 加え, 上端をしばったあと外液として水又は水酸化ナトリウム溶液 90ml を満たした三角フラスコに入れ, 室温で24時間ときどきふりまぜながら放置する. チューブは浸透圧の影響で外液の浸入を受け, 体積が約 15ml にふ

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

くれているので、外液の交換の際新たに加える外液量は85mlとした。放置条件については、24時間放置で充分に平衡に達しており、温度・攪拌による影響はなかった。透析終了後は外液をそのままHPLC用試験溶液とした。

直接抽出法 乳パチで粉碎した飼料1gにメタノール或はヘキサンを100ml加え、24時間ときどきふりまぜながら放置する。抽出溶媒のとりかえはろ過・洗浄後新たに溶媒100mlを加えて続行した。分析にはそのままHPLCに注入した。

水分定量 カールフィッシャー法により行った。

不純物分析 OPP-Na中、定量値と過剰の水酸化ナトリウム分をあわせた残りは不純物であるが、今回はそのうち中性画分について分析を行った。

OPP-Na 220gを塩酸酸性にした上で水を加えて全量を約800mlにするn-ヘキサン(残農用)1l, 0.5l, 0.5lと3回抽出をくり返し、各回毎に0.1N-水酸化ナトリウム0.5lで2回洗浄して酸性物質を除去したあと水0.5lで洗浄する。ヘキサン溶液をあわせ濃縮してGC用試験溶液とする。同定は標準物質のリテンションタイムとマススペクトラムの一致で行った。GC: 3% DEGS3m, 120~220℃, 2℃/min, キャリヤガス窒素17.5ml/min。

結果と考察

ダウケミカル製 OPP-Naの第4版食品添加物公定書各項目の分析値をTable 1に示す。純度試験項目(1)融点(55~58℃)を除いては全て適合していた。これにつ

Table 1. Quality of OPP-Na (Dow Chemicals)

Purity

- (1) melting point: 49-51℃
 - (2) pH: 11.8
 - (3) Arsenic: within limit
 - (4) Heavy metals: within limit
 - (5) NaOH: 0.72%
 - (6) Organic impurities: within limit
- Loss on drying: 25%
Assay: 95.5%

いては、主たる融点降下要因である有機性不純物が公定書試験に基づく比較規準を満たしていることから、おおむね問題がないと判断したが、純度試験中(1)融点と(6)有機性不純物について、試験方法、相互の関連について再検討を加える必要がある。

この有機性不純物のうち中性画分のガスクロマトグラムをFig. 1に示す。番号を付したものは次の通りであり、秤量値より求めた全量は0.028%であった。量的に極めて少ないこともあり、この11の化合物については発癌につながるとはならない。

1. Acetophenone
2. β -Me-Naphthalene
3. α -Me-Naphthalene
4. Biphenyl
5. OPP

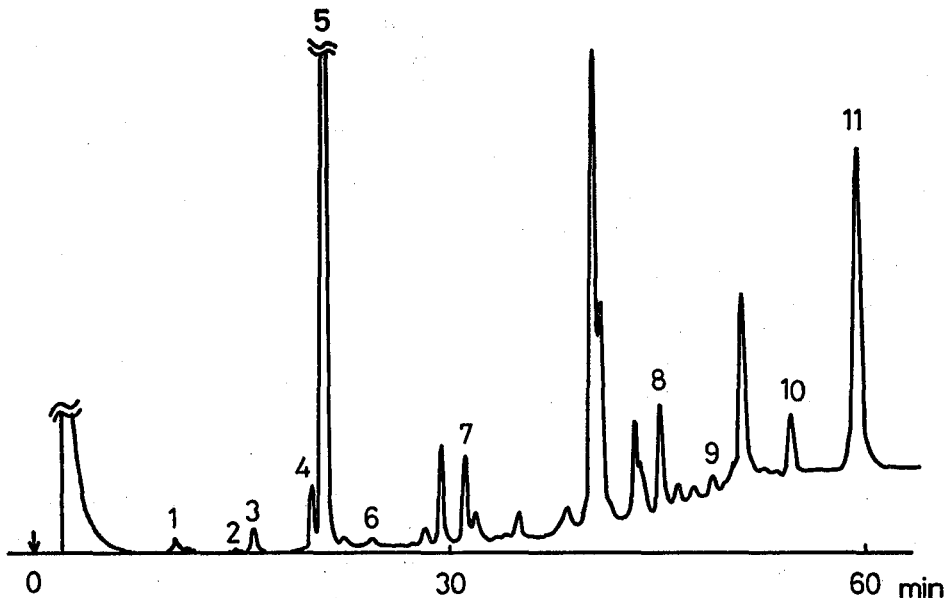


Fig. 1. Gas-Chromatogram of Impurities in OPP-Na(Dow Chemical)

Table 2. Recovery of OPP, OPP-Na in Animal Feeds¹⁾

Samples	Steam Distil ²⁾	Dialysis (1) ³⁾	Dialysis (2) ⁴⁾	Methanol
2% OPP-Na Feeds	100.0%	95.5%	64.4%	96.1%
1% OPP-Na Feeds	95.7	100.0	69.6	90.5
0.7% OPP-Na Feeds	96.0	96.6		97.3
2.5% OPP Feeds		96.3	64.0	94.0
1.25% OPP Feeds		96.0		
0.625% OPP Feeds	97.1	92.0	67.0	93.9

1) Convert the values according to: OPP 100%, OPP-Na 95.5%

2) Recovery of Steam distillation: 90% (Each value was divided by 0.9)

3) Solvent: 0.01N-NaOH

4) Solvent: Water

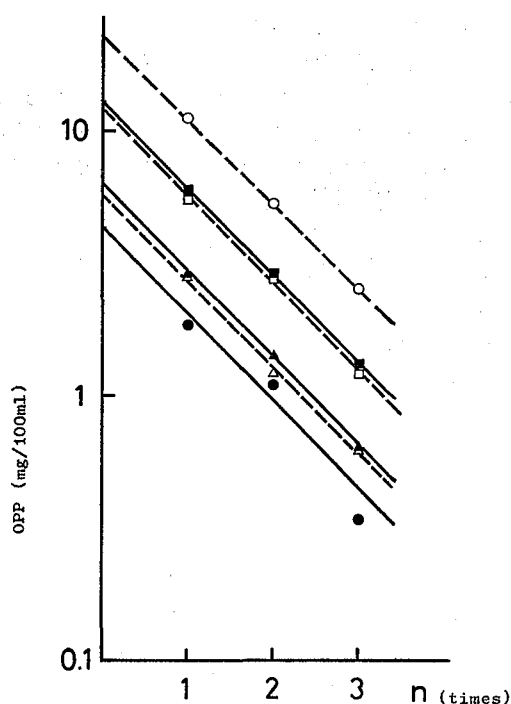


Fig. 2. Concentration of OPP vs times: dialysis with 0.01N-NaOH

○····○ 2.5% OPP ●····● 0.7% OPP-Na
 □····□ 1.25% OPP ■····■ 2.0% OPP-Na
 △····△ 0.625% OPP ▲····▲ 1.0% OPP-Na

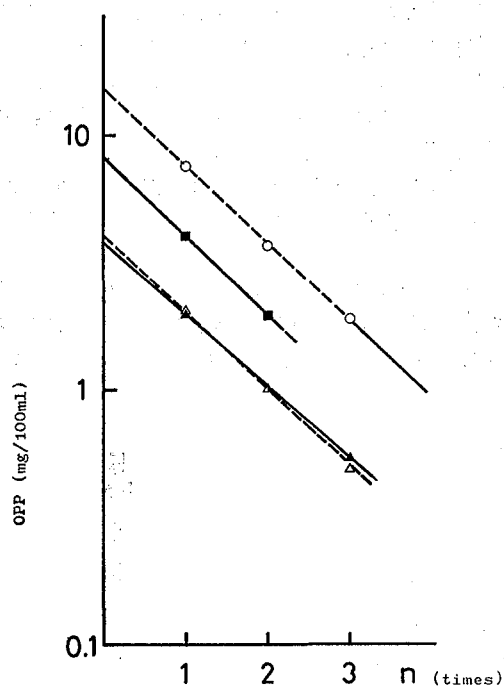


Fig. 3. Concentration of OPP vs times: dialysis with water

○····○ 2.5% OPP ■····■ 2.0% OPP-Na
 △····△ 0.625% OPP ▲····▲ 1.0% OPP-Na

6. Dibenzyl
7. Dibenzofuran
8. Diphenylether
9. Phthalicacid-*n*-Bu-ester
10. Phenyl-[biphenyl-(2)]-ether
11. Xanthone

OPP-Na の公定書試験は OPP-Na の組成として、 $\text{OPP-Na} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ としている。WHO, FAO も 4 水塩としているが構造的な裏付けにもとづくものでないゆえ、本実験に用いた OPP-Na をカールフィッシャー法によって水分定量したところ、27.3% であった。4 水塩中の水分理論値は 27.28% であることから、発癌実験に用いら

Table 3. Recovery of OPP, OPP-Na in Animal Feeds by Extraction with Hexane

Samples	1 day	1 week
2% OPP-Na Feeds		33%
1% OPP-Na Feeds	24%	28
0.7% OPP-Na Feeds		31
1.25% OPP Feeds		34
0.625% OPP Feeds	24	26

れた OPP-Na の結晶水組成は 4 水和物であることがわかった。

飼料中の OPP, OPP-Na の 3 つの異なる測定法による回収率の結果を Table 2 に示す。水蒸気蒸留法はこの中では最も過酷な条件であり、一方水を用いた透析法は最も温和な方法である。

透析法による回収率は次のようにして求めた。透析外液を a ml, 内液を b ml, 透析される OPP 量を M , 飼料中に含まれる OPP と溶液中の OPP との平衡定数を K とした場合、同一試料について外液をとりかえながら抽出をくり返すと n 回目に外液に含まれる OPP の量 P は

$$P = \frac{a}{a+b} \cdot \frac{K}{(K+1)^n} \cdot M \cdots \cdots (1)$$

となり変形すると

$$\log P = -n \log(K+1) + \log \left(\frac{a}{a+b} \cdot K \cdot M \right) \cdots \cdots (2)$$

となって、縦軸に $\log P$, 横軸に n をとれば、傾き $-\log(K+1)$ の直線となる。

一方、溶出される全 OPP 量は

$$\sum_{n=1}^{\infty} P = \frac{a}{a+b} \cdot K \cdot M \cdots \cdots (3)$$

であり、この値は (2) 式の y 切片値より求まる。

0.01N 水酸化ナトリウム及び水を用いた場合の n , $-\log P$ 関係を Fig. 2 及び Fig. 3 に示す。

直接抽出法の場合、メタノールのような抽出力の大きい溶媒では抽出の繰返しで値が急減し、図式解法は困難である。定常状態において抽出される OPP 量を Q , 1 回目に抽出される量を r , 2 回目を s , 平衡定数 K で

$$\frac{r}{Q-r} = \frac{s}{Q-(r+s)} = K \cdots \cdots (4)$$

が成りたち、これより直ちに

$$Q = \frac{r^2}{r-s}, K = \frac{r-s}{s} \cdots \cdots (5)$$

となる。

Table 2 の各数値より明らかなように、水蒸気蒸留法、塩基を用いた透析法、メタノール抽出法については

Table 4. Recovery of OPP in OPP-Na by Extraction with Hexane

Samples		n=1	n=2
OPP-Na(Dow Chemical)	0.7842g	1.2%	0.35%
OPP-Na(syn) ¹⁾	0.3291	0.13	0.04

1) OPP-Na(syn) was synthesized as follows:

In 0.2662g of OPP, 0.5 N-NaOH ($f=1.06$) 5.0ml and water 5.0ml was added, then distilled in vacuo.

いずれも添加された量に対する回収率は高く、飼料中の OPP, OPP-Na の大部分はそのまま何等の作用をうけることなく添加量通り入っていたと解される。しかしながら、最も温和な条件である常温での水による透析結果は他の 3 つの方法に比して著しく低い。一方透析挙動に着目すれば Fig. 2, 3 にみられるように塩基透析、水透析で溶出直線の傾きはおよそ一致している。このことは水透析の場合、透析される量は添加量に対して約 2/3 であるが、透析挙動は塩基によって透析されるものと同一のものであることを意味している。そして残り 1/3 量のは塩基にはとけるが水にはとけないものである。この 1/3 量のことを推定する目的でヘキサンによる飼料の抽出を行った。結果は Table 3 に示す。又、ヘキサンと OPP-Na の溶解実験の結果を Table 4 に示す。Table 3 より明らかなように、OPP, OPP-Na を含む飼料よりヘキサンによって約 30% の OPP が抽出されている。一方 Table 4 に示す如く、OPP-Na 中ヘキサンによって抽出される OPP は極めて少い。OPP 自体のヘキサンに対する溶解度は大きいので、Table 3 で飼料中より抽出されたものは添加されたものが OPP, OPP-Na の別なく OPP であったといえる。即ち水透析の場合、回収率が他の定量法に比して著しく低かったのは混ぜられた OPP, OPP-Na がどちらの場合についても飼料中では 1/3 量が OPP となり、2/3 量が水溶性 OPP (OPP イオン) となっていたからであり、やはりこの場合も飼料中に添加された OPP, OPP-Na は飼料と相互作用することなく存在していたといえる。しかしながら Table 2 で明らかなようにその保たれ方が OPP 飼料系と OPP-Na 飼料系について差がなかったことは OPP, OPP-Na が最終的に飼料の中では同じになったことを意味しており、飼料による OPP のイオン化或は空気中の二酸化炭素による影響を含めて理由を更に検討する必要がある。

ま と め

ダウケミカル製 OPP-Na は多くの不純物を含んではいるが、現在までのところ注意すべき不純物はみられない。

い。飼料中のOPP-Naの定量については、水蒸気蒸留、透析、抽出のいずれについても添加されたOPP-Na量の大部分が確認され、OPP-Naと飼料の間には反応或は結合等の関係は見られなかった。

謝辞 本研究にあたり飼料の提供および助言をいただいた当所毒性部研究員各位に深謝いたします。

文 献

- 1) *Food. Cosmet. Toxicology*, : to be published
- 2) 縄井寿美子, 小縣昭夫, 吉田誠二: 東京衛研年報, 29-2, 97, 1978
- 3) Westöb G., and Andersson A.: *Analyst*, 100, 173, 1975
- 4) Cassidy R. M., and Legay D. S.: *J. Chromatogr. Sci.*, 12, 85, 1974

オルトフェニルフェノールのラットを用いた亜急性毒性試験

中 村 清 純*, 井 口 重 孝*, 池 田 虎 雄*, 平 賀 興 吾*

Subacute Toxicity of *o*-Phenylphenol by Food Administration to Male Rats

KIYOSUMI NAKAMURA*, SHIGETAKA IGUCHI*, TORAO IKEDA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: オルトフェニルフェノール 2-hydroxybiphenyl, 亜急性毒性 subacute toxicity, ラット rat, 食品添加物 food additive, 防ばい剤 fungicide, 膀胱 bladder

ビフェニール (biphenyl: 以下BPと略す) およびその代謝生成物の一つであるオルトフェニルフェノール (化学名 2-hydroxybiphenyl: 以下OPPと略す) とそのナトリウム塩 (sodium 2-phenylphenate: 以下OPP-Naと略す) は、果実や野菜の防ばい剤として欧米で広く用いられてきた。わが国でそれらが食品添加物として指定されたのは比較的新しく、BPは1971年、OPPとOPP-Naについては1977年に柑きつ類への使用が許可された。

当毒性部では、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、OPPおよびOPP-Naについては、既に催奇形性試験、変異原性試験、急性・亜急性毒性試験などが行われてきた¹⁻⁹⁾。とくに、OPP-Naの癌原性試験では、雄ラットに膀胱腫瘍が認められた¹⁰⁾。OPPについても慢性毒性試験および癌原性試験を実施中であるが、ここに雄ラットにおける3ヶ月間の亜急性毒性試験の成績を報告する。

実験材料ならびに方法

検体: OPP は、Dow Chemical Co. の Dowicide 1 (Lot No. MM01040) を使用、日本クレア (株) 製 CE-2 粉末飼料 (粗蛋白23.6%, 粗脂肪4.4%, 粗繊維4.9%, 粗灰分6.6%, 可溶性窒素物52.7%, 水分7.8%) に、OPP をそれぞれ、0%(Control), 0.625%, 1.250% および 2.500% の割合で添加してペレットにしたものを実験飼料とした。

実験動物: 日本チャールス・リバー (株) 生育の近交系 Fischer ラット (F344/DuCrj) 雄を4週令で購入、10日間の予備飼育後発育良好と認めたものを使用した。

飼育条件: 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 50~60%, 換気毎時10回、照明6時から17時までの各条件下に管理された 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 (幅21.5cm, 奥行20cm, 高さ16.5cm) に

ラットを個別に収容、自動給水装置 (細菌ろ過器経由) 付ベルト式飼育架台にケージを配置し、試験開始までは検体無添加の CE-2 固型飼料および水を自由に与え飼育した。

実験方法: 4つの実験飼料投与群は、1群雄10匹を用い、各群ランダムに飼育架台に配置し、5週令より、0%, 0.625%, 1.250% および 2.500% の OPP を含む実験飼料を水とともに自由摂取させた。動物の一般状態は毎日午前9~10時に観察し、体重は毎実験週、飼料摂取量および飲水量は所定の実験週のそれぞれ初めに測定した。13週を経過したところで、生存する39匹を屠殺し、血液学検査、血清生化学検査および主要器官重量測定を行った。

検査方法: 飼料摂取量は、飼料投与量、48時間後の飼料残余量およびケージ受皿への飼料コボシ量を測定し、 $(\text{投与量} - \text{残余量} - \text{コボシ量}) \div 2$ により、1日摂取量を求めた。飲水量は、水ビンを個別に配置して、 $(\text{投与量} - 48\text{時間後の残量}) \div 2$ により、1日飲水量を求めた。

血液学、血液生化学検査にあたっては、ラットを背位に固定、そけい部を切開後、大腿動静脈を切断し、放出される血液を EDTA-2K 処理試験管 (血液学検査用) および無処理遠心管 (血清採取用) とに採取し、放血致死せしめた。

血液学検査: EDTA-2K 処理血液を用い、Coulter Counter Model-S により、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hgb)、ヘマトクリット値 (Hct)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の各項目について測定した。

血清生化学検査: HITACHI Automatic Analyzer M-400を用いて、総蛋白量 (TP)、アルブミン量 (Alb)、グルコース量 (Glu)、尿素窒素量 (UN)、アルカリフォスファターゼ活性 (Alp)、グルタミン酸オキザロ酢酸

* 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. 体 重

実験週数	0%(Control)	0.625%	1.250%	2.500%
0	101.5±3.4 ¹⁾ (100.0±0.0) ²⁾	99.5±5.3 (100.0±0.0)	99.2±4.7 (100.0±0.0)	101.0±4.9 (100.0±0.0)
1	125.8±6.8 (123.5±4.1)	121.4±6.5 (121.6±3.1)	116.3±6.1* (116.9±3.1)*	101.6±7.7* (100.2±4.5)*
2	149.7±12.4 (147.0±9.2)	140.0±8.1 (140.3±6.1)	133.2±7.7* (133.8±5.3)*	118.3±10.5* (116.6±6.1)*
3	171.2±19.1 (168.0±16.1)	157.9±12.8 (158.5±11.9)	147.7±12.8* (148.3±10.0)*	132.5±12.3* (130.6±7.3)*
4	187.3±23.2 (183.8±19.8)	173.9±20.6 (174.5±19.7)	160.6±17.4* (161.3±14.6)*	142.3±14.7* (140.2±10.5)*
5	204.3±25.5 (200.7±21.9)	191.8±27.4 (192.5±26.5)	174.6±23.9* (175.5±20.7)*	151.4±15.5* (149.2±11.7)*
6	218.1±29.3 (214.2±25.5)	206.0±29.8 (206.6±28.8)	186.2±27.6* (187.0±24.1)*	159.1±21.7* (156.9±18.3)*
7	232.2±32.2 (228.2±28.5)	222.5±31.2 (223.1±29.0)	199.1±31.2* (200.0±28.2)*	172.2±25.0* (170.0±22.7)*
8	240.9±35.0 (236.5±31.4)	233.7±30.5 (234.3±28.1)	209.0±33.1 (210.1±30.5)	178.6±26.4* (176.2±24.0)*
9	254.4±35.4 (249.9±31.7)	247.1±28.9 (247.9±26.3)	220.2±35.9* (221.4±33.2)	189.0±26.3* (186.5±23.7)*
10	265.3±33.9 (260.6±30.0)	257.0±27.2 (257.9±24.4)	231.5±36.2* (232.7±32.7)	196.1±31.8* (193.3±28.0)*
11	276.1±30.8 (271.2±26.7)	269.2±26.3 (270.1±23.1)	241.4±35.8* (242.7±32.8)*	211.1±24.1*(g) ^{a)} (207.3±22.4)*
12	285.2±28.8 (280.2±24.5)	277.9±24.0 (278.9±21.0)	250.2±33.9* (251.6±30.3)*	221.9±22.5*(g) ^{a)} (218.0±21.6)*
13	293.8±28.0 (288.9±24.1)	285.0±22.8 (286.1±19.7)	259.0±31.9* (260.7±28.4)*	227.7±18.7*(g) ^{a)} (223.7±17.1)*

(注) 値は特例を除き10例平均±S.D. 1) 絶対重量(g) 2) 体重増加率 = (体重/試験開始日体重) × 100

a) 例数 * Control 群と比較して P<0.05

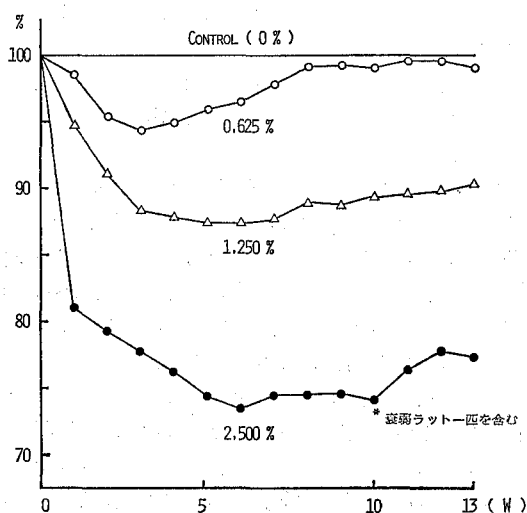


図 1. 体重増加率の比率

$$\frac{\text{実験群体重増加率}}{\text{Control 群体重増加率}} \times 100$$

トランサミナーゼ活性 (GOT) およびグルタミン酸ピルビン酸トランサミナーゼ活性 (GPT) を測定した。

器官重量: 脳, 心, 肺, 肝, 脾, 胸腺, 腎, 下垂体, 副腎, 精巣, 前立腺および膀胱を摘出, 秤量した。

尿検査: 実験 8 週および 12 週に行い, 軽くラット腰部を刺激して滅菌シャーレ上に排尿させた新鮮尿を用い, マイルス・三共社製尿試験紙 (Labstix®) により, pH, 蛋白量, グルコース量, ケトン体および潜血反応を測定した。12 週での排尿ではさらに, 各尿の一部をとって遠沈後, 検鏡した。

実験の結果はすべて, Student's *t*-test により危険率を 5% において推計学的検討を行った。

(解剖・病理組織学所見については別に報告する。)

実験結果

一般状態: 2.5% 投与群 10 匹中 1 例を実験 10 週すぎに瀕死屠殺した以外には, 各投与群とも外見上特に変化を認めなかった。

体重・飼料摂取量・OPP 摂取量・飲水量: 表 1 に体

表 2. 飼料摂取量

実験週数	0%(Control)	0.625%	1.250%	2.500%
1	12.3±1.1 ¹⁾ (97.9±6.2) ²⁾	12.3±0.6 (101.1±6.0)	11.9±1.0 (102.0±7.5)	10.3±0.9*(9) ^{a)} (101.9±10.0)
2	11.7±1.9 (78.0±9.2)	11.0±1.1 (78.4±8.1)	10.4±1.2 (78.2±6.1)	8.9±1.1*(9) ^{a)} (75.2±5.4)
3	12.6±2.2 (73.3±5.3)	11.9±1.7 (74.9±7.0)	10.8±1.8 (73.0±7.7)	9.3±1.7*(9) ^{a)} (69.3±9.4)
5	12.7±2.1 (62.0±6.2)	12.0±2.3 (62.1±5.1)	11.3±2.4 (64.2±5.5)	8.7±2.4*(9) ^{a)} (56.0±11.0)
7	11.9±2.1 (50.8±4.5)	11.8±2.0 (52.7±5.5)	10.8±2.4 (53.5±4.8)	9.0±2.0*(9) ^{a)} (51.2±5.1)
9	12.9±1.7 (50.8±2.2)	12.9±1.5 (52.2±4.3)	11.8±2.3 (53.3±3.7)	10.0±2.2*(9) ^{a)} (52.1±6.6)
13	13.8±1.3 (47.1±2.7)	14.1±0.8 (49.5±2.3)*	12.6±1.8 (48.6±2.1)	12.0±1.4*(8) ^{a)} (52.5±3.0)*

(注) 値は特例を除き10例平均±S.D. 1) g/rat/day 2) g/kg/day

a) 例数 * Control 群と比較して P<0.05

表 3. OPP 摂取量

実験週数	0.625%	1.250%	2.500%
1	76.5±3.7 ¹⁾ (631±37) ²⁾	148.2±12.4 (1275±94)	257.8±21.4 (2548±250)
2	68.5±6.6 (490±51)	130.5±15.2 (978±76)	223.6±27.7 (1880±135)
3	74.1±10.4 (468±44)	135.5±22.4 (922±97)	231.7±43.0 (1734±234)
5	74.8±14.2 (388±32)	141.2±30.2 (802±68)	217.5±60.7 (1402±276)
7	73.5±12.7 (329±34)	134.3±30.4 (668±60)	225.3±51.1 (1280±127)
9	80.5±9.4 (326±27)	147.2±28.5 (666±46)	250.8±54.6 (1303±165)
13	88.0±4.8 (309±14)	157.7±22.8 (608±26)	299.1±35.7 (1312±74)
全期間	7058 ³⁾ 377 ⁴⁾	13042 763	22345 1554

1) mg/rat/day 2) mg/kg/day 3) total dose intake (mg) 4) mg/kg/day

例数は表 2 に同じ

重を、図 1 に Control 群に対する各投与群の体重増加率の比率を、表 2 に飼料摂取量を、表 3 に OPP 摂取量を、表 4 に飲水量を示した。体重は、絶対体重および体重増加率ともに、2.5% 群で全期間、1.25% 群ではほぼ全期間にわたって有意に低かった。0.625% 群では有意差はなかったが体重増加を抑制する傾向を示した。OPP 投与群では、絶対体重と体重増加率が低く、したがって、用量-反応関係がみられた。

飼料摂取量については、その絶対量が 2.5% 群で全期間を通して少なく、各群間に用量-反応関係が認められたが、体重比飼料摂取量には、第13週を例外として各群

間に差はなかった。

飼料摂取量より算出した体重当り OPP 摂取量は、表 3 の () 中に示す通りで、各測定週における 0.625% 群、1.25% 群および 2.5% 群の比は、約 1: 2: 4 となって添加飼料中の OPP 濃度に比例していた。また 13 週間の OPP 総摂取量を算出すると、0.625% 群、1.25% 群および 2.5% 群はそれぞれ、7058mg, 13042mg, 22345mg となり、一日当りの平均摂取量を求めると各群ではそれぞれ、377mg/kg, 763mg/kg, 1554mg/kg であった。

飲水量については、各投与群の体重当り飲水量には用量-反応関係が存在するようにみえる。また経時的にみ

表 4 飲 水 量

実験週数	0%(Control)	0.625%	1.250%	2.500%
1	16.5±1.2 ¹⁾ (131.4±7.0) ²⁾	16.6±1.1 (136.3±6.0)	16.8±1.5 (144.0±10.9)*	16.8±2.3 (9) ^{a)} (164.9±13.3)*
2	16.8±1.5 (112.1±5.0)	16.6±1.4 (118.9±10.9)	15.9±0.9 (119.7±6.2)*	15.4±1.9 (9) ^{a)} (129.7±10.6)*
3	16.8±2.7 (97.8±9.3)	17.0±1.9 (107.7±8.5)*	15.7±1.6 (106.4±8.9)	14.3±3.2 (9) ^{a)} (106.9±18.5)
5	18.2±2.8 (88.7±5.8)	17.5±2.8 (91.3±7.0)	16.5±3.2 (94.3±7.9)	15.3±4.5 (9) ^{a)} (98.6±22.6)
7	18.3±3.2 (78.3±5.4)	17.8±3.4 (79.5±7.9)	16.5±3.5 (82.4±6.7)	17.2±3.6 (9) ^{a)} (98.3±10.1)*
9	18.1±3.4 (70.8±4.8)	18.3±2.8 (74.0±5.9)	17.7±3.1 (80.1±5.0)*	19.4±3.7 (9) ^{a)} (101.7±15.7)*
13	18.4±2.8 (62.5±6.8)	18.9±1.9 (66.4±6.4)	18.3±2.7 (70.6±4.6)*	26.6±3.9*(8) ^{a)} (117.8±18.8)*

値は特例を除き10例平均±S.D.で示した 1) g/rat/day 2) g/kg/day a) 例数

* Control 群と比較して P<0.05

表 5. Organ Weights of Rats Fed by OPP at 13 Week

		0%(Control)	0.625%	1.250%	2.500%
No. of Rats		10	10	10	9
Brain	(mg)	1935±36 ¹⁾ (657±50) ²⁾	1893±53 (662±50)	1894±59 (730±66)*	1860±51*(8) ^{a)} (811±56)*
Heart	(mg)	819±46 (277±17)	814±51 (284±17)	732±70* (280±12)	668±57* (287±7)
Lung	(mg)	838±74 (284±28)	823±70 (287±22)	761±93 (290±14)	718±50* (310±16)*
Liver	(g)	10.36±1.22 (3.49±0.18)	10.82±0.99 (3.76±0.19)*	9.83±1.33 (3.75±0.27)*	10.28±1.27 (4.41±0.24)*
Spleen	(mg)	549±42 (186±12)	544±48 (190±12)	512±49 (196±9)	496±37* (214±15)*
Thymus	(mg)	179.3±21.0 (60.8±7.5)	175.6±25.7 (61.1±6.9)	163.4±23.4 (62.8±8.9)	148.4±23.3* (64.3±11.4)
Kidney	R (mg)	863±75 (292±13)	919±78 (320±14)*	861±103 (329±16)*	885±113 (381±36)*
	L	888±57 (301±13)	948±101 (330±20)*	868±90 (332±11)*	929±112 (400±33)*
Pituitary	G. (mg)	8.0±0.5 (2.7±0.2)	8.2±0.9 (2.9±0.2)	7.6±1.6 (2.9±0.8)	6.7±0.8* (2.9±0.3)
Adrenal	G. R (mg)	19.7±2.0 (6.7±0.7)	20.1±3.1 (7.0±0.9)	19.2±2.6 (7.4±0.8)	18.7±2.5 (8.0±0.6)*
	L	21.7±3.1 (7.4±1.2)	22.2±2.4 (7.7±0.9)	20.2±4.0 (7.7±1.1)	21.7±2.3 (9.4±0.9)*
Testis	R (mg)	1353±34 (460±42)	1368±79 (477±37)	1338±97 (512±29)*	1298±83 (560±21)*
	L	1401±45 (476±41)	1407±95 (490±33)	1376±95 (527±31)*	1348±71 (582±23)*
Prostate	(mg)	277±51 (93±12)	301±60 (105±21)	218±61* (83±18)	214±52*(8) ^{a)} (90±18)
Bladder ^{b)}	(mg)	111.4±24.0 (38.0±8.4)	120.2±13.8 (41.9±5.7)	139.0±19.5* (53.7±10.6)*	128.7±10.0 (55.8±6.7)*
Body Weight	(g)	296±27	287±23	262±29*	232±18*

1) absolute wet weight ± S.D. 2) relative weight (/100g body weight) ± S.D.

a) No. of the organs b) weighed after fixation * P<0.05

表 6. 血 液 学 検 査

	0 % (Control)	0.625%	1.250%	2.500%
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	6.91 $\pm$ 1.89	6.49 $\pm$ 1.93	6.52 $\pm$ 2.09	7.11 $\pm$ 2.07 (9)
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	8.44 $\pm$ 0.33	8.24 $\pm$ 0.29	8.25 $\pm$ 0.42	8.03 $\pm$ 0.32*(9)
Hgb (g/dl)	16.2 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 0.5	16.0 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.6* (9)
Hct (%)	43.6 $\pm$ 2.8	42.6 $\pm$ 2.5	43.4 $\pm$ 3.4	42.6 $\pm$ 2.3 (9)
MCV (μ^3)	51.8 $\pm$ 2.9	51.7 $\pm$ 2.8	52.5 $\pm$ 2.7	53.2 $\pm$ 3.3 (9)
MCH (ng)	19.3 $\pm$ 0.6	19.4 $\pm$ 0.4	19.5 $\pm$ 0.7	19.6 $\pm$ 0.5 (9)
MCHC (%)	37.4 $\pm$ 2.2	37.4 $\pm$ 1.8	37.2 $\pm$ 2.4	36.9 $\pm$ 2.1 (9)

値は特例を除き10例平均 $\pm$ S. D. () 例数 * Control 群と比較して $P < 0.05$

表 7. 血 清 生 化 学 検 査

	0 % (Control)	0.625%	1.250%	2.500%
TP (g/dl)	8.27 $\pm$ 1.43	8.15 $\pm$ 1.63	8.12 $\pm$ 1.52	8.62 $\pm$ 1.59 (9)
Alb (g/dl) ^{a)}	6.35 $\pm$ 1.72	5.86 $\pm$ 0.34	6.81 $\pm$ 2.49	6.13 $\pm$ 0.89 (9)
Glu (mg/dl)	190.6 $\pm$ 44.2	190.0 $\pm$ 52.0	176.1 $\pm$ 14.7	172.4 $\pm$ 28.7 (9)
UN (mg/dl)	22.6 $\pm$ 1.6	22.3 $\pm$ 2.7	23.2 $\pm$ 3.3	24.1 $\pm$ 2.1 (9)
Alp (KA-U/dl)	38.7 $\pm$ 9.7	38.7 $\pm$ 12.5	41.0 $\pm$ 14.3	43.1 $\pm$ 7.4 (9)
GOT (K. U/ml)	141.6 $\pm$ 16.8	139.8 $\pm$ 21.9	135.9 $\pm$ 19.2	146.0 $\pm$ 29.0 (9)
GPT (K. U/ml)	69.9 $\pm$ 27.5	53.6 $\pm$ 8.8	60.0 $\pm$ 23.1	52.2 $\pm$ 9.0 (9)

値は特例を除き10例平均 $\pm$ S. D. () 例数 a) プロムクレゾールグリーン法により測定

ると、0%群、0.625%群および1.25%群では、実験が進むにつれて体重当りの飲水量が一貫して減少するのに対して、2.5%群だけは、第5～7週で最も少なく、その後は増加していた。

器官重量の測定結果を表5に示す。絶対重量については、ホルマリン固定後の膀胱重量に1.25%群、2.5%群、0.625%群の順で増加傾向がみられたが、1.25%群のみにControl群との間に有意差を認めた。他器官の絶対重量には、投与群で増加したものはなく、減少した群でも体重増加(成長)の抑制によるものと考えられる。体重に対する相対重量については、群での体重増加抑制に関連して、2.5%群および1.25%群、胸腺、下垂体および前立腺を除く器官の相対重量が増加していた。0.625%群でも有意に増加していたのは、肝および左右腎であり、肝および腎では用量-反応関係がみられた。

血液学検査結果を表6に示す。2.5%群において、RBCおよびHgbの有意の低下がみられたが、0.625%群および1.25%群ではControl群との間に差はなかった。

血清生化学検査結果を表7に示す。すべての項目について各群間にはとくに差がみられなかった。

尿検査：第12週に行った尿検査において沈査中に精虫の観察された例を除外した結果を表8に示す。2.5%群、1.25%群でpHの低下と蛋白量の減少傾向がみられた

が、グルコースおよびケトン体は排尿した全例で陰性であった。潜血反応については、第8週の検査では、1.25%群で排尿した10匹中1例のみ、第12週では2.5%群同6匹中1例のみが陽性であり、後者の沈査中に多数の赤血球を確認した。しかし、陽性2例とも、他一方の週の尿検査では潜血反応陰性であった。尿沈査所見では、先述した血尿以外には、結晶成分、剥離上皮などに各群間の差はなく、円柱などの病的像も認められなかった。

考 察

日本におけるOPP残留許容量、人体一日摂取許容量はそれぞれ、10ppm以下、0.2mg/kg/dayである¹⁰⁾。今回の雄ラットを用いた試験では、全投与期間を平均した一日摂取量で、この摂取許容量の750～3,000倍のOPPを摂取していた。また田山らのOPP急性経口毒性試験によると、雄ラットのLD₅₀は約2,600mg/kgであった⁹⁾。今回の試験では投与方法を異にするが、第1週の2.5%群の摂取量、2548mg/kgはこの量にはほぼ等しかった。HodgeらによるOPP3ヶ月投与試験でも、OPP3%含有飼料で飼育したラット5匹中の4例が2週間内に死亡し、2%群でもわずかながら発育遅延がみられたと報告されている¹²⁾。今回の試験では、実験初期死亡例はなかったが、2.5%群の体重増加がとくに強く抑制されていた。

OPPの肝への影響については、Hodgeらの投与試験

表 8. 尿 検 査

	蛋白量 (mg/dl)						採尿例数 ^{a)}
	(-)	(±)	30	100	300	>1000	
0 %	0	1	0	9	0	0	10
0.625%	0	0	2	4	1	0	7
1.250%	0	0	2	7	0	0	9
2.500%	0	3	2	1	0	0	6

	pH							採尿例数 ^{a)}
	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	
0 %	0	1	1	4	3	1	0	10
0.625%	0	0	1	4	1	1	0	7
1.250%	0	3	2	4	0	0	0	9
2.500%	0	3	1	1	0	1	0	6

a) 検鏡により Sperm の混入していた例を除外

では、1%および2%群の数例に肝重量の増加がみられ¹²⁾、井口らの OPP-Na 3ヶ月投与試験においても、用量一反応関係をもって肝重量が増加し、4%濃度群では GOT、GPT の低下も認められた⁷⁾。しかしながら、今回の試験では、OPP 投与群での肝の絶対重量は増加せず、GOT、GPT も他の生化学検査項目にも変化がなかった。井口らの OPP-Na 3ヶ月投与試験での OPP-Na 総摂取量⁷⁾を OPP 含有量として換算して今回の試験の OPP 総摂取量と比較すると、0.625% 群および 1.25% 群では約15%減、2.5%群ではほぼ同等量であった。OPP と OPP-Na の肝への影響については、検体の吸収率の差などを含めてその作用をさらに検討する必要がある。

一方、BP および OPP の腎毒性は、かなり以前から指摘されており¹²⁻¹⁴⁾、とくに Booth らによると、1% BP を 60 日間投与したラットでは、多尿と血尿が現われ、腎組織にも可逆的な変化が見られた¹³⁾という。また、井口らの試験⁷⁾および Hodge らの試験¹²⁾では腎絶対重量が増加していた。今回の試験において 2.5% 群の絶対飲水量の増加と、9週以降に体重当り飲水量が増加に転じていることとは、BP による多尿（尿濃縮能の低下）と同質のものとも考えられる。しかし、今回の試験では、腎重量、Alb、UN 等に何らの変化もなく、尿中蛋白量も高濃度 OPP 投与群では低下しており、腎機能障害は比較的軽度と思われる。

膀胱重量が1.25%群で有意に増加し、2.5% 群では有意水準以下の増加であったことは、用量一反応関係にあてはまらないが、Hiraga らの OPP-Na での発癌試験において、OPP-Na 4% 群よりも 2% 群に膀胱腫瘍が多発したこと¹⁰⁾を考え合えると、OPP による膀胱への影響にも濃度段階の逆転がある可能性も考えられる。

RBC および Hgb の低下が 2.5% 群にみられたことは、井口らの OPP-Na での試験結果⁷⁾とも一致している。今回の試験では、潜血尿も 2 例で発見されているが、2 例とも 2 度の検査中 1 回は潜血反応陰性であり、血尿が OPP 投与による機質的なものか偶発的なものか判定できず、そのいずれにしても、尿路系の出血だけでは貧血傾向の説明はできない。飼料摂取量が高濃度投与群で低迷していたことも貧血傾向の一因と考えられるが、それ以外にも、OPP の貧血作用の有無についてさらに検討を加える必要がある。

要 約

オルトフェニルフェノール (OPP) を 0%, 0.625%, 1.25%, 2.5% 含有する飼料を与えて、Fischer 系 (F344/DuCrj) 雄ラット (各群 10 匹) を 13 週にわたって飼育した。この間におけるラット体重 (kg) 当りの OPP 一日平均摂取量は、0.625% 群、1.25% 群、2.5% 群でそれぞれ、377mg, 763mg, 1554mg であった。体重増加を抑制する傾向が 1.25% 群と 2.5% 群で認められ、13 週での体重増加率は、Control 群のそれを 100% としてそれぞれ、88.2%, 77.5% であった。体重当りの飲水量についても、各実験週において用量一反応関係がみられ、特に 2.5% では、7 週を境に体重当り飲水量が減少傾向から増加傾向に転じていた。主要器官重量については、膀胱の固定重量が 1.25% 群で増加していたほかは、肝・腎その他の器官の絶対重量には各群間に差はなかった。血清生化学検査では、すべての項目で差はみられなかった。赤血球数とヘモグロビン量が 2.5% 群で低下していた。尿検査では、2.5% 群に pH の低下と蛋白量の減少傾向がみられ、潜血反応陽性例が、1.25% 群と 2.5% 群中に各一匹みられた。

文 献

- 1) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 2) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 3) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 89, 1978
- 4) 小縣昭夫, 吉田誠一, 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) 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
- 8) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 57, 1979
- 9) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 1, 1980
- 10) Hiraga, K., and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 11) 石館守三監修: 食品添加物公定書解説書, 1979, 広川書店
- 12) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J., Jr., Spencer, H. C., and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 104, 202, 1952
- 13) Booth, A. N., Ambrose, A. M., DeEds, F., and Cox, A. J., Jr.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 560, 1961
- 14) Ambrose, A. M., Booth, A. N., DeEds, F., and Cox, A. J., Jr.: *Food Res.*, 25, 328, 1960

オルトフェニルフェノールによる C57BL/6N マウス被毛の脱色素について

田 山 邦 昭*, 井 口 重 孝*, 平 賀 興 吾*

Depigmentation Caused by *o*-Phenylphenol in Hair of C57BL/6N Mice

KUNIAKI TAYAMA*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

Three groups of C57BL/6N male mice were given *o*-phenylphenol (6.8, 10.2 or 15.3mg/mouse/day) by oral intubation three times a week for 26 weeks. Control group received equivalent volume of olive oil vehicle. Depigmentation of hair was observed in the mice receiving *o*-phenylphenol. Hair color turned from black to gray. There was a dose-related increase in the number of mice showing depigmentation.

Keywords: *o*-phenylphenol, depigmentation, hair, mouse, melanin, inhibition

緒 言

オルトフェニルフェノール(以下 OPP とする)は我国でかんきつ類の防かび剤として使用が許可されている¹⁾。いくつかのフェノール化合物には皮膚を脱色素する作用があることが知られており、職業性暴露または実験等で、人や動物での例が多く報告されている²⁻¹⁰⁾。この脱色素の発生機序は不明な点も多いが、メラニン産生細胞であるメラノサイトの破壊やメラニン生成の生化学的な阻害などが考えられている²⁻⁹⁾。OPP のメラニン生成阻害に関連した報告は非常に少ない。伊藤、西谷ら^{8,9)}はフェニルフェノール製造作業員に白斑黒皮症を観察し、OPP の脱色素作用を患者への貼布および動物実験で確認した。一方 Kahn¹⁰⁾は病院従事職員の皮膚の白斑発生が、フェノール性殺菌消毒薬に起因することをつきとめ、これに含まれる OPP にも弱い脱色素作用があることを確認している。

我々は防かび剤の安全性の検討の一環として、OPP の脱色素作用を確認するために、黒色被毛を持つマウスに強制経口あるいは添加飼料により投与し、この現象を観察したので報告する。

実験材料ならびに方法

1. 実験動物 C57BL/6N 雄マウスを日本チャールス・リバー社より4週令時に購入し、7週令時に発育良好なものを選び実験に供した。

2. 飼育条件 室温 $25\pm 1^{\circ}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気毎時10回、照明午前6時から午後5時の飼育室において、動物入荷後チップ床敷アルミケージ(W225×L325×H110mm)に10匹飼いとした。実験開始1週間前に体重を測定し群

分け後、強制経口投与実験として同様のケージに6匹飼とした群(以下経口投与群とする)および、添加飼料摂取実験として全面ステンレス製金網5室ケージ(W760×L210×H170mm)に1室5匹飼いとした群(以下飼料摂取群とする)に分け、日本クレア製固型飼料 CE-2 および水を自由に与え、実験開始まで予備飼育を行った。

3. 実験方法

1) 強制経口投与実験

検体: OPP は東京化成精製 Lot No. AP01 を用い、日本薬局法オリブ油にて0.2, 0.3, 0.45Mに希釈、褐色ビンに保存し、2週間毎に新しく調製した。なお使用済の検体についてガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーを行った結果、OPP が変化したと思われる物質は含まれていなかった。

投与量および群別: 検体の投与用量は全期間0.2ml/mouse とし、予備実験より投与量を設定した。予備実験では5週令から週3回、13週間 OPP の投与を行ったが、1回の投与量が3.4, 6.8mg では被毛の褪色は観察されず、13.6mg では全例に発生を認めた。また5週令ではマウスが幼弱なために、投与に困難を伴った。そこで本実験では投与量6.8, 10.2, 15.3mg (公比1.5) とし、溶媒対照を設け、7週令から各群12匹のマウスに投与を開始した (Table 1 参照)。

投与方法および投与期間: 0.5ml 注射筒を用い胃・ゾンデにて強制経口投与を週3回行い、投与期間は6ヶ月間とした。なおチップ床敷アルミケージの交換は週2回定期的に行い、固型飼料 CE-2 および水は自由に与えた。

体重測定および被毛の観察: 体重は1ヶ月に1回測定

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Body Weights of C57BL/6N Male Mice Given OPP by Oral Intubation Three Times a Week for 26 Weeks

Dose (mg/mouse/day)	No. of mice		Body weight		
	Initial ¹⁾	Effective ²⁾	0 week ³⁾	13 week	26 week
0 ⁴⁾	12	11	21.0±1.38 ⁵⁾	28.1±2.21	31.1±3.08
6.8	12	10	20.7±1.25	27.6±2.00	31.1±2.49
10.2	12	12	20.3±1.47	27.2±1.92	30.6±3.12
15.3	12	11	20.1±1.49	26.6±1.26	29.3±2.03

1) No. of mice at the beginning of administration.

2) No. of mice except for mice died from faulty intubation or mice showed local depilation due to fighting.

3) values on first day of administration.

4) olive oil vehicle. 5) group mean absolute weights ± S.D. (g).

Table 2. Body Weights of C57BL/6N Male Mice Fed OPP and OPP-Na in Pellet Diet for 26 Weeks and Intakes of OPP or OPP-Na in 26 Weeks

Dietary level (%)	No. of mice		Body weight			Total intake	Mean intake
	Initial ¹⁾	Effective ²⁾	0 week ³⁾	13 week	26 week		
0 ⁴⁾	10	10	20.5±0.89 ⁵⁾	28.2±2.11	32.2±2.93	—	—
OPP	1.25	10	20.6±1.38	27.4±1.78	29.6±2.00*	6.0 ⁶⁾ 231 ⁷⁾	33 ⁸⁾ 1254 ⁹⁾
	2.5	10	20.7±0.70	—	—	—	—
	2.0	10	21.0±0.91	27.3±1.19	29.3±1.75*	9.8 377	53 2039
OPP-Na	4.0	10	20.8±1.18	24.9±1.82*	28.1±1.79*	18.8 811	101 4318

1) No. of mice at the beginning of feeding. 2) No. of mice survived more than 26 weeks.

3) values on first day of feeding. 4) control diet. 5) group mean absolute weights ± S.D. (g).

6) g/mouse. 7) g/kg. 8) mg/mouse/day. 9) mg/kg/day. * P<0.05.

し、被毛および眼球の肉眼的観察は毎回投与時に行った。13および26週目でOPP投与群の被毛に一部褪色が認められたマウスと溶媒対照群のマウスの数例について被毛を抜き、ビオライトで封入し、鏡検した。また一部剃毛した皮膚についても肉眼的および組織学的観察を行った。

2) 添加飼料摂取実験

検体：OPP およびそのナトリウム塩（以下 OPP-Na とする）はダウケミカル社製、それぞれ Lot No. MM 01040, MM01044 を使用、日本クレア製粉末飼料 CE-2 に OPP は 0（対照）、1.25、2.5% に、OPP-Na は 2、4 % の割合に添加し、固型飼料化した。なお添加飼料中の OPP-Na の安定性については縄井ら¹¹⁾が報告している。

投与方法および投与期間：各濃度の添加飼料毎にマウス 10 匹を用い、これを 7 週令時より 6 ケ月間水とともに自由摂取させた。

体重・飼料摂取量の測定および被毛の観察：体重は毎週、飼料摂取量は隔週に 1 回測定した。体重の測定時に外観

の観察を行い、被毛の鏡検も経口投与群と同様に行った。

4. 結果の判定 肉眼的観察による被毛の褪色の程度による分類は、モルモットでの塗布実験の Bleehen ら²⁾の判定基準を参考として以下のように決めた。対照群に近似するものを－、わずかに斑状あるいは帯状に白くみられたものを±、一見して白く斑状あるいは帯状になってみられたものを＋、および全体に白くになってみられたものを++とした。

実験結果

1) 強制経口投与実験

一般症状：投与期間中の死亡例およびファイティングによると思われる皮膚損傷例は有効例から除いた。死亡例は剖検の結果、気管、気管支、肺に液体の貯留および肺のうっ血等がみられたため誤投与とみなした。この誤投与と思われる例以外、投与期間中の死亡例はみとめなかった。

体重および総投与量：0（投与開始日）、13および26週

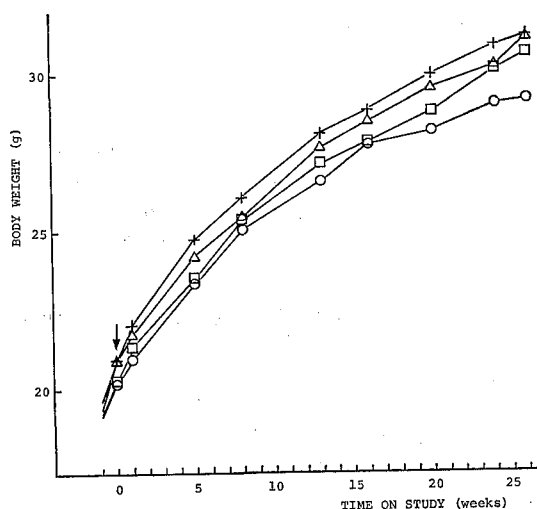


Fig. 1. Changes in Body Weights of C57BL/6N Male Mice Given OPP by Oral Intubation Three Times a Week for 26 Weeks. +: control (olive oil vehicle), Δ : 6.8mg/mouse/day, $\square$: 10.2mg/mouse/day, $\circ$: 15.3mg/mouse/day.

Arrow indicates the day of the beginning of administration. Points represent the mean from 10 to 12 mice.

目での体重を Table 1 に、体重変化を Fig. 1 に示した。体重は OPP 投与群で溶媒対照にくらべ全期間にわたり低かったが、推計学的に有意ではなかった(危険率 5%)。26 週までの総投与量を算定すると 6.8mg 群 0.53g, 10.2mg 群 0.80g, 15.3mg 群 1.19g であり、1kg 当り投与量を概算すると投与開始時、6.8mg 群 329mg, 10.2mg 群 502mg, 15.3mg 群 761mg, 26 週目、6.8mg 群 219mg, 10.2mg 群 333mg, 15.3mg 群 522mg であった。

被毛および眼球の観察: Table 3 に投与後 13 および 26 週目の被毛の褪色を示したマウスの例数、さらにそれらを褪色の発現部位(腹側あるいは背側)と褪色の程度(Grade)により分類した結果を示した。被毛の褪色を示したマウスの例数は 13 週目、6.8mg 群 1/10 (10 例中 1 例の意、以下同様)、10.2mg 群 7/12, 15.3mg 群 9/11 であり、24 週目、6.8mg 群 1/10, 10.2mg 群 12/12, 15.3mg 群 11/11 となり、脱色素作用の発現は投与量に従い増加し、また投与期間にも相関が認められた。褪色の程度による分類では、13 週目、腹側では 6.8mg 群 $\pm$: 1/10, +: 0/10, 10.2mg 群 $\pm$: 4/12, +: 3/12, 15.3mg 群 $\pm$ (Photo 1 に示した): 5/11, + (Photo 2 に示した): 4/11, 背側では 6.8mg 群 $\pm$: 0/10, +: 0/10, 10.2mg 群 $\pm$: 0/12, +: 0/12, 15.3mg 群 $\pm$: 2/11, + (Photo 3, 4 に示した): 3/11, 26 週目、腹側では 6.8mg 群 $\pm$: 1/10, +: 0/10, 10.2mg 群

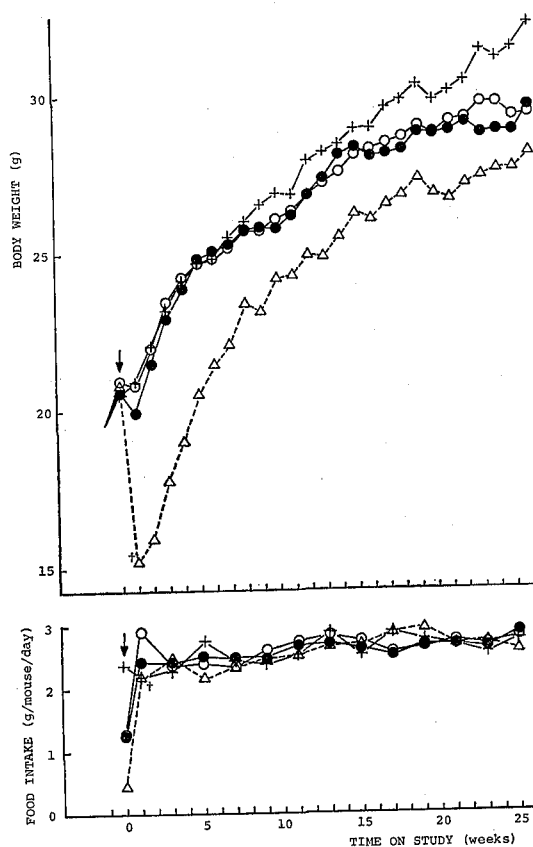


Fig. 2. Changes in Body Weights and Food Intakes of C57BL/6N Male Mice Fed OPP and OPP-Na in Pellet Diet for 26 Weeks. +: control, $\bullet$: 1.25% OPP, $\circ$: 2% OPP-Na, Δ : 4% OPP-Na. Arrow indicates the day of the beginning of feeding. Points represent the mean of 4 or 10 mice. †: Six mice died in 12 days

$\pm$: 7/12, +: 5/12, 15.3mg 群 $\pm$: 3/11, + (Photo 12 に示した): 8/11, 背側では 6.8mg 群 $\pm$: 1/10, +: 0/10, 10.2mg 群 $\pm$: 0/12, +: 1/12, 15.3mg 群 $\pm$: 3/11, + (Photo 13 に示した): 5/11 となり、褪色の程度は投与量および投与期間に従い増加し、背側での発生も多くなった。

被毛の経時的観察において褪色の出現時期は明瞭ではないが、およそ投与開始 5~6 週で、はじめに 15.3mg 群で腹側にわずかに灰白色となる傾向がみられ、9~13 週で背側でも小斑状に被毛の褪色が観察された。10.2, 6.8mg 群は腹側では 9 週頃よりみられ、背側はかなり遅れて、14 週以降より確認された。この被毛の褪色は投与期間に比例して程度が増強される傾向を示し、16 週以降、腹側ではあまり変化せず、背側では被毛の褪色を示した部位の面積は拡大したが、斑状の境界部は不明瞭となった。

Table 3. Effects of OPP and OPP-Na on Pigmentation of Hair in C57BL/6N Male Mice

Dose and Dietary level	No. of mice examined	No. of mice showing depigmentation of hair		No. of mice classified by degree of depigmentation of hair											
		13 week	26 week	13 week				26 week				26 week			
				Ventral				Dorsal				Ventral			
				—	±	+	++	—	±	+	++	—	±	+	++
Oral intubation (mg/mouse/day)															
	0 ¹⁾	11	0	0	11	—	—	—	11	—	—	—	11	—	—
	6.8	10	1	1	9	1	—	—	10	—	—	—	9	1*	—
OPP	10.2	12	7	12	5	4	3	—	12	—	—	—	0	7	5
	15.3	11	9	11	2	5	4	—	6	2*	3*	—	0	3	8
Dietary administration (%)															
	0 ²⁾	10	0	0	10	—	—	—	10	—	—	—	10	—	—
OPP	1.25	10	1	1	9	—	—	1	9	—	—	1*	9	—	—
	2.0	10	0	1	10	—	—	—	10	—	—	—	9	—	—
OPP-Na	4.0	4	0	0	4	—	—	—	4	—	—	—	4	—	—

1) olive oil vehicle. 2) control diet. * No. of mice showing depigmentation both ventral and dorsal hair.
 Visual criteria: (—), abesent; the hair color similar to that of control hair.
 (±), definite but weak; very slight spots or speckles of depigmentation.
 (+), definite but moderate; slight spot or speckles of depigmentation.
 (++) , generalized depigmentation.

褪色を示した被毛の発生部位は、腹側では剣状突起付近から恥骨付近までの間で認められ、背側ではおもに脊柱部、腰部および寛骨部付近で認められた。26週目で、溶媒投与と被毛の褪色した OPP 投与マウスの各 1 例ずつを剃毛して皮膚の肉眼的観察を行った結果、両方の例で、白い皮膚に黒い模様が認められた (Photo 5)。OPP 投与群では、この黒い模様以外の白い部分と、被毛の褪色を示した部位は良く一致していた。この皮膚を組織学的に観察すると、黒い模様の部分では毛根が多数認められた。

13および26週での毛の光顕的観察では、低倍率では溶媒対照群の腹、背側の太い毛と細い毛ともに、黒いメラニンの塊状物質が毛の先端から毛根部に至るまでの間で一様に分布しており、メラニンが消失している毛も標本にみとめられたが、その出現本数は少なかった。これに対し、OPP 投与群の腹、背側の褪色を示した部位の太い毛は、先端から途中までは対照群と同様メラニンが一様に分布しているがそれより毛根部に至るまでが明瞭な境界を持ってメラニンが消失している例が多くみられ一方細い毛は先端付近からメラニンの消失がみられた (Photo 6)。メラニンが消失した部分はその消失が完全なものではなく、部分的にメラニンが認められるものも多く観察された。高倍率では、溶媒対照群の太い毛の楕状部は規則正しい梯子状髄質中にメラニンが認められる (Photo

7) が、OPP 投与群の被毛の褪色を示した部位の太い毛は途中より黒から淡褐色までの細顆粒となり、その後消失してみられなくなった (Photo 8)。

眼球の肉眼的観察では、投与期間中異常は認められなかった。

2) 添加飼料摂取実験

一般症状：死亡は投与後 5 日目から 2 週間以内に OPP 2.5% 群 10/10, OPP-Na 4% 群 6/10 みられた。26 週間生存したマウスでは背側の脱毛が対照群 2/10, OPP 1.25% 群 2/10, OPP-Na 2% 群 4/10 認められ、被毛はやや疎な状態となった。

体重および摂取量：0 (投与開始日), 13 および 26 週目での体重と 26 週間の薬物総摂取量および薬物平均摂取量を Table 2 に、毎週の体重、隔週の飼料摂取量変化を Fig. 2 に示した。体重変化は対照群と比較して OPP-Na 4% 群ではほぼ全期間を通じて有意に小さく、OPP 1.25% 群, OPP-Na 2% 群では 26 週近くで有意に小さくなった (危険率 5%)。OPP および OPP-Na の 26 週間の総摂取量は、OPP 1.25% 群 6.0g, OPP-Na 2% 群 9.8g, OPP-Na 4% 群 18.8g であり、この期間における平均一日 kg 当り摂取量は、OPP 1.25% 群 1,254mg, OPP-Na 2% 群 2,039mg, OPP-Na 4% 群 4,318mg であった。

被毛および眼球の観察：Table 3 に投与後 13 および 26

週目の被毛の褪色したマウスの例数を経口投与群と併せて示した。被毛の褪色したマウスの例数は、13週目 OPP 1.25%群1/10, OPP-Na 2%群0/10, 26週目 OPP 1.25%群1/10, OPP-Na 2%群1/10となった。褪色の程度による分類の例数は腹、背側ともに26週目 OPP 1.25%群1 (Photo 10, 11 に示した): 1/10, OPP-Na 2%群1: 1/10 でありともに全身性の褪色を示した。被毛の経時的観察では、褪色の出現時期は明瞭ではないが、OPP 1.25%群1例は6~7週で背部の一部が光沢を失い、7週頃より背側の一部が斑状の褪色を示し、11~12週で全身が白くなった。OPP-Na 2%群の1例は13~15週より被毛の光沢がなくなり褪色を示した。

13および26週目での OPP と OPP-Na の被毛の褪色した各1例の毛の顕微鏡的観察では、低倍率では太い毛、細い毛共に先端から毛根部まで、対照群に比べ濃さは薄いが一様にメラニンが認められ、高倍率ではメラニン顆粒が非常に疎な状態となってみられた(Photo 9)。また部分的にメラニンが消失しているものもみられた。

眼球の肉眼的観察では、26週目で白色化しているものが OPP 1.25%群1/10, OPP-Na 2%群1/10, OPP-Na 4%群1/4みられた。

総括および考察

C57BL/6N 雄マウスに OPP を強制経口投与(マウス当たり6.8, 10.2, 15.3mg, 週3回)ならびに添加飼料(1.25, 2.5%)によって26週間投与を行った。また、OPP-Na についても添加飼料(2.4%)によって投与を行った。強制経口投与では被毛の褪色したマウスが多く観察され、投与量および投与期間に比例して増加が認められた。被毛の褪色は限局性に斑状あるいは帯状であった。褪色した被毛の顕微鏡的観察ではその多くに毛幹の下部約1/2でメラニン顆粒の消失がみられた。添加飼料による投与では2.5%群で10/10が死亡し、被毛の褪色したマウスは1.25%群で1/10であった。OPP-Na 添加飼料による投与では4%群で6/10が死亡し、生存した4例は被毛の褪色がみられず2%群で1/10認められた。両投与方法において強制経口投与では脱色素作用の発現が多数認められたが、添加飼料による投与では設定した濃度において、最高濃度では死亡例が多数みられ、一段階下の濃度では死亡例はないが、脱色素作用の発現もわずかしこ認めることができなかった。これまでの OPP の脱色素作用は職業性暴露による報告⁸⁻¹⁰⁾であり、OPP が経皮的に吸収された結果作用したと考えられる。経口投与による脱色素作用は伊藤、西谷ら^{8,9)}により C57BL type のマウス5匹を用いそのうち2匹に白毛の発生をみとめているにすぎず、明らかではなかった。今回の実験でマウスの経口

投与により、脱色素作用が用量-反応関係をもって認められ、OPPの脱色素作用が確認された。OPPの脱色素作用に対する報告は少なく、不明な点も多いため、この脱色素作用の発生機序、代謝産物との関連、種差などについて今後検討を加えていきたい。

文 献

- 1) 石館守三監修, 食品添加物公定書・解説書, B-158, 1979
- 2) Bleehen, S.S., Pathak, M.A., Hori, Y., and Fitzpatrick, T.B.: *J. Invest. Dermatol.*, 50, 103, 1968
- 3) Jimbow, K., Obata, H., Pathak, M.A., and Fitzpatrick, T.B.: *J. Invest. Dermatol.*, 62, 436, 1974
- 4) Gellin, G.A., Possick, P.A., and Perone, V.B.: *J. Invest. Dermatol.*, 50, 103, 1968
- 5) 浜田稔夫: 皮膚, 18, 249, 1976
- 6) 清寺 真: 皮膚の生化学, 158, 1966, 金原出版
- 7) Denton, C.R., Lerner, A.B., and Fitzpatrick, T.B.: *J. Invest. Dermatol.*, 18, 119, 1952
- 8) Ito, K., Nishitani, K., and Hara, I.: *Bull. Pharm. Res. Inst.*, 76, 5, 1968
- 9) 西谷宣雄, 原 一郎: 産業医学, 13, 48, 1971
- 10) Kahn, G.: *Arch. Dermatol.*, 102, 177, 1970
- 11) 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

Explanation of Plates

- Photo 1. C57BL/6N mouse showing very slight depigmentation (Grade $\pm$) in ventral aspect by oral intubation of OPP 15.3mg, 3 times a week for 13 weeks
- Photo 2. C57BL/6N mouse showing slight depigmentation (Grade +) in ventral aspect by oral intubation of OPP 15.3mg, 3 times a week for 13 weeks
- Photo 3. C57BL/6N mouse showing slight depigmentation (Grade +) in dorsal aspect by oral intubation of OPP 15.3mg, 3 times a week for 13 weeks.
- Photo 4. Higher magnification of Photo 3.
- Photo 5. Hair-shaved skin of 33-week-old C57BL/6N control mouse.
- Photo 6. Decrease of melanin granule in hair of mouse shown in Photo 3. $\times 40$.
- Photo 7. Guard hair of C57BL/6N control mouse.

×400.

Photo 8. Decrease of melanin granule in guard hair of mouse shown in Photo 3. ×400.

Photo 9. Decrease of melanin granule could be seen in guard hair of one mouse fed 1.25% OPP in pellet diet for 13 weeks. ×400.

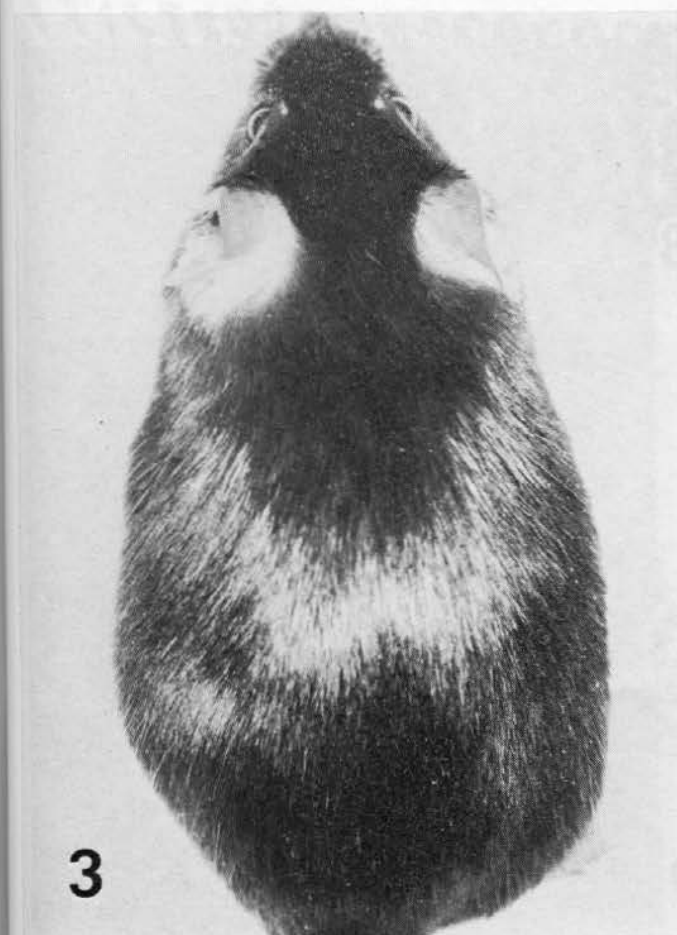
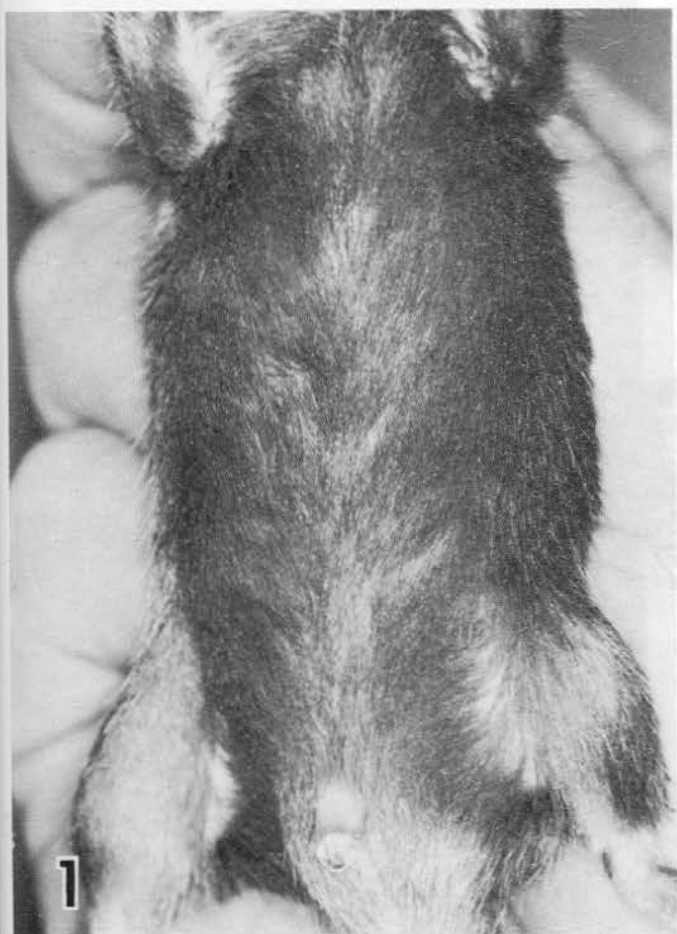
Photo 10. Ventral aspect of C57BL/6N control mouse (upper) and C57BL/6N mouse showing general depigmentation (Grade ++)
by 1.25% OPP in pellet diet for 26 weeks

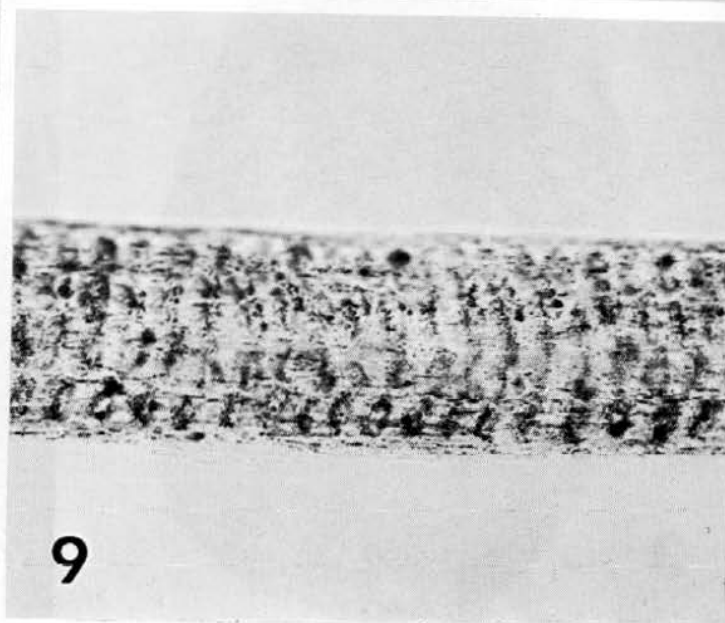
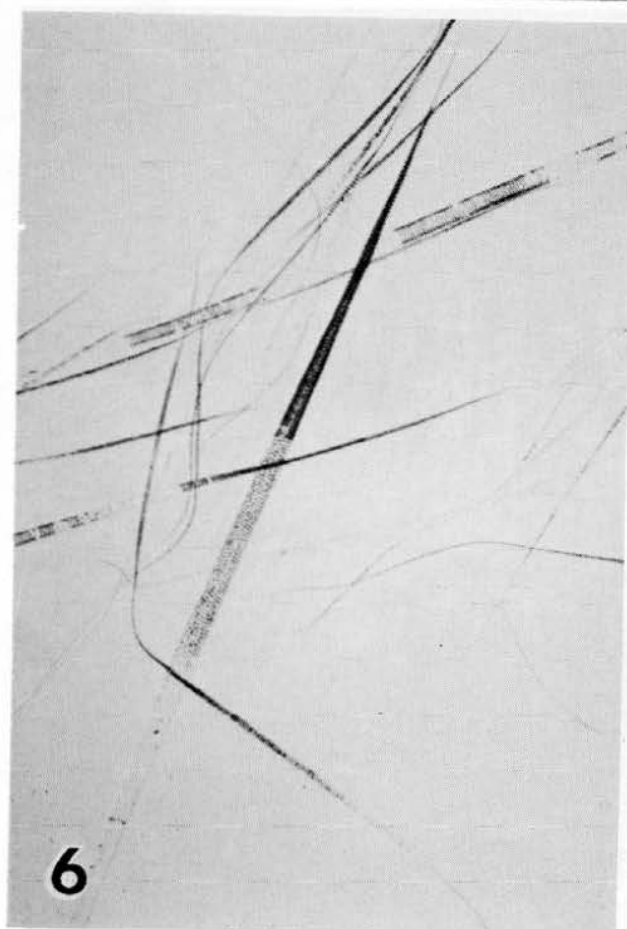
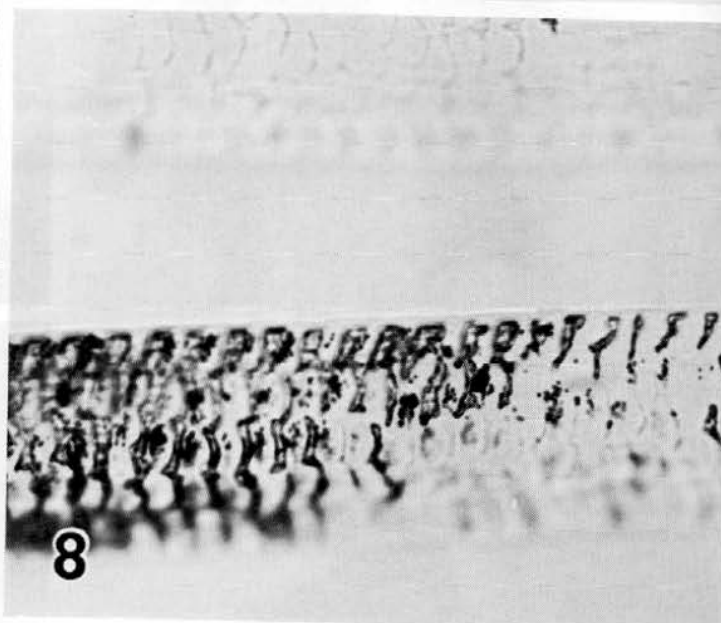
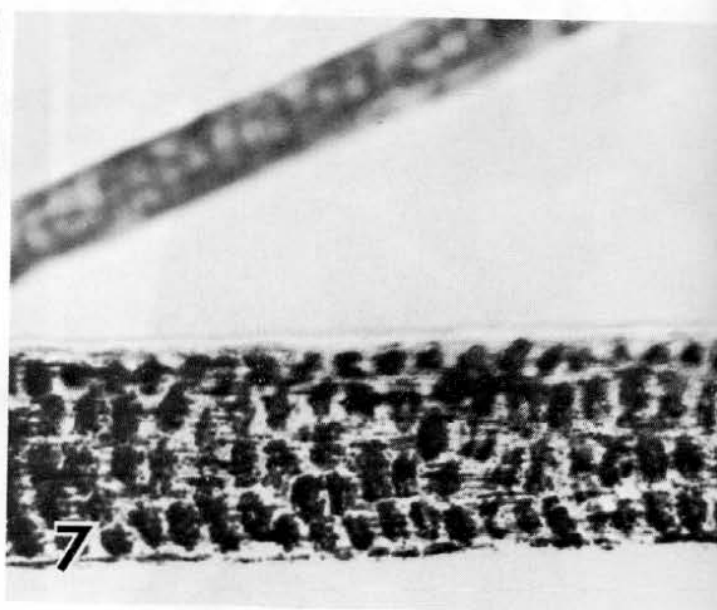
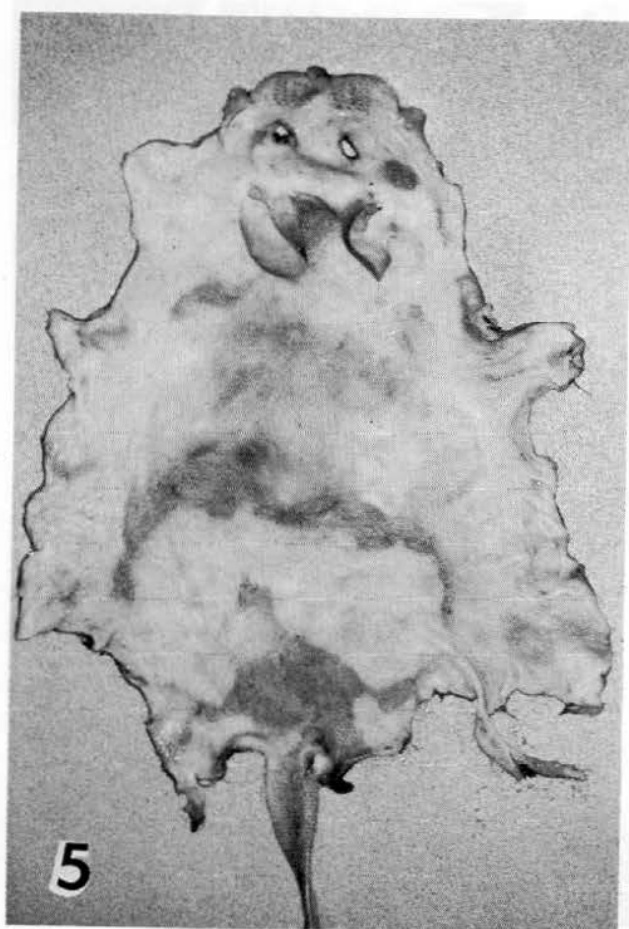
(lower).

Photo 11. Dorsal aspect of mouse given OPP in pellet diet as shown in Photo 10.

Photo 12. Ventral aspect of C57BL/6N control mouse (upper) and C57BL/6N mouse showing slight depigmentation (Grade +) by oral intubation of OPP 15.3mg, 3 times a week for 26 weeks (lower).

Photo 13. Dorsal aspect of mouse given OPP by oral intubation as shown in Photo 12.







12



13

経口投与オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) の代謝

大槻慶子*, 樺島順一郎*, 中尾順子*

Urinary Metabolites of *o*-Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) by Oral Administration

KEIKO OHTSUKI*, JUNICHIRO KABASHIMA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 代謝 metabolism, 高速液体クロマトグラフィー high pressure liquid chromatography

オルトフェニルフェノール (OPP) はジフェニルとともに、防カビ剤として許可され、現在、主として米国産オレンジ・グレープフルーツ等に使用されている。ジフェニルの代謝についての研究は多いが¹⁻⁵⁾、OPP の代謝の報告は少ない。最近、当毒性部において OPP-ナトリウム塩 (OPP-Na) のラットへの長期経口投与により、膀胱ガンの発生を報告した⁶⁾。OPP それ自体は *in-vitro* での変異原性を示さない⁷⁾ので、OPP が体内で発ガン性を示すような代謝をうける可能性を考えて、ガン発生の原因を解明するために比較的大量の経口投与で、ラット体内での代謝・排泄を調査、検討中である⁷⁾。

本報告では、1回強制経口投与による OPP の代謝についてのみ述べる。代謝物は、高速液体クロマトグラフィーによって定量し、また、酵素 (β -グルクロニダーゼ) を作用させ、薄層クロマトグラフィーで抱合体の定性をした。

実験材料および方法

試薬 OPP-Na $\cdot$ 4H₂O (ダウケミカル日本 K.K.)
OPP (関東化学) *p*-キシレノール (関東化学)

動物 ラット: F344/DuCrj 4週令 (体重約55g) を用い、オス、メスそれぞれ3匹に OPP-Na を水に溶かし、300mg/kg、となるように強制経口投与した。また、オス、メスそれぞれ2匹をコントロールとして使用した。

試料 ラット4週令に OPP 300mg/kg 投与後、代謝ケージに入れ、2時間ずつ採取した尿を-80°で保存し、24時間分を合わせて使用した。

酵素標品 β -グルクロニダーゼを精製した⁸⁾。ラットの肝臓1gを0.2M酢酸緩衝液 (pH4.5) で10倍量にしてホモジナイズし、37°で30分間インキュベイトした。3,000 r.p.m. 15分間遠心分離し、その上澄に飽和硫酸アンモニウム溶液を等量、徐々に加え混和した。3,000 r.p.m. 15分間遠心分離し、沈殿に2ml の上記緩衝液に懸濁し、

ビスキングチューブにつめ、再蒸留水で1晩、冷暗所で透析し酵素標品とした。

方法 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析⁹⁾: 尿2ml を水で10ml とした後、水酸化ナトリウム溶液で強塩基性とし、イソオクタン5ml と15分間振とうし、その水層を塩酸で酸性にして酢酸エチル 10ml で抽出、これをイソオクタンに溶解し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。*p*-キシレノールを内部標準として添加、HPLC で分析した。

HPLC の条件 装置: バリアン4100 システム、カラム: Micro pak NH₂-10 内径2.2mm 長さ25cm、溶媒: イソオクタン、イソアミルアルコール、アセトニトリル 25:1:1、流速: 20ml/hr. 検出: 254nm のUV吸収

薄層クロマトグラフィーによる分析: 尿0.5ml をベンゼン0.5ml で抽出、これを sample A とした。尿0.5ml に0.2M酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.5ml、 β -グルクロニダーゼ0.05ml を加え、37°で1時間インキュベイトし、ベンゼン0.5ml で抽出したものを sample B とした。A、B を OPP 標準物質とともに薄層クロマトグラフィーで展開した (図1)。

結果と考察

投与後24時間の尿中 OPP 排泄量は、約26%であった。オスがメスに較べてわずかに多いが、差をみとめる程ではなかった (表1)。2日目 (投与後24時間から48時間) の尿を同様に操作したが、OPP は検出されなかった。投与量の70%以上が吸収されずに糞等により排出していると思われる。

ギブス試薬での OPP の検出はかなり高感度であるが、尿をそのまま抽出したAは、OPP の青色の呈色をしなかった。 β -グルクロニダーゼを作用させたBは、著明に発色し、色も R_f 値も OPP 標準物質と一致した (図1)。ここで使用した β -グルクロニダーゼは、おもにグルク

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町3-24-1

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

表 1. OPP の 24 時間 排泄量*

	体重 (g)	投与量 (mg)	尿量 (ml)	尿中濃度** (mg/ml)	総排泄量 (mg)	排泄量/投与量 (%)
オ ス	56.0	16.8	4.10	1.10	4.51	26.8
メ ス	55.7	16.7	4.06	1.05	4.26	25.2

* 3 匹の平均値

** HPLCによる分析

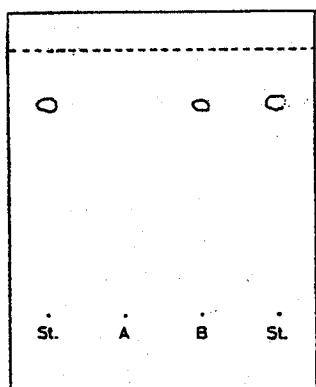


図 1. OPPの薄層クロマトグラフィー

プレート: シリカゲル

展開溶媒: メタノール, ペンゼン 5:95

発色: 0.3%ジブロムキノクロロイミド・

エタノール溶液(ギブス試薬)噴霧

OPPは青色の発色

ロン酸抱合体を加水分解してアグリコンを出す酵素である。

今回の経口投与実験では、性差はなく、その約25%が尿中に排泄され、OPPのほとんどがグルクロン酸抱合体となり、遊離型はなかった。

文 献

- 1) Meyer, T., Aarbakke, J., and Scheline, R.R.: *Acta pharmacol. et Toxicol.*, 39, 412, 1976
- 2) Meyer, T., and Scheline, R.R.: *Acta pharmacol. et Toxicol.*, 39, 419, 1976
- 3) Meyer, T., Larsen, J.C., Hansen, E.V., and Scheline, R.R.: *Acta pharmacol. et Toxicol.*, 39, 433, 1976
- 4) Halpaap, K., Horning, M.G., and Horning, E. C.: *J. Chromato.*, 166, 479, 1978
- 5) Burke, M.D., Benford, D.J., Bridges, J.W., and Parke, D.V.: *Biochem. Soc. Trans. 570th Meeting*, 1370, 1977
- 6) Hiraga, K. et al: *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 7) Nakao, T., Ohtsuki, K., et al: in preparation
- 8) 中尾順子, 中尾 真: 日新医学, 47, 454, 1960

オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) 投与によるサイクリックヌクレオチドの変動

中 川 敦 子*, 中 尾 順 子*

Alteration of Cyclic Nucleotide Levels by Dietary Administration of Sodium ortho Phenylphenate (OPP-Na) in Rat

ATSUKO NAKAGAWA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: オルトフェニルフェノール ortho phenylphenol, サイクリックヌクレオチド cyclic nucleotide, アデニレートシクラーゼ adenylate cyclase, ガン tumor

緒 言

輸入柑橘類の防黴剤として使用されているオルトフェニルフェノール (OPP) は、長期投与によりラットに発ガン作用を示すことが報告¹⁾された。これについて当研究室では現在 OPP による発ガンの機構を解明するため種々検討がなされている。ガン化した培養細胞²⁻⁵⁾,あるいは担ガン動物⁶⁻¹¹⁾でサイクリックヌクレオチドの変動がみられるといういくつかの報告もあることから、私共は OPP を投与したラットの尿中サイクリックヌクレオチドの経時的変動、組織中の量およびアデニレートシクラーゼ (AC) 活性を測定することにより、OPP を投与したラットの発ガン現象とサイクリックヌクレオチドの関係について検討した。

実験方法

動物 4週令 Fisher 系ラット (F344/DuCri) を1週間予備飼育後、雌雄各5匹ずつを1群とし、対照群と2% OPP-Na 投与群に分け約21週間飼育した。採尿¹²⁾は1週間毎にメタボリカで行ない尿は-30℃で保存した。投与終了後ラットは断頭屠殺し、肝臓・腎臓をとり出し-80℃で保存した。

試薬 C-AMP 測定キット, C-GMP 測定キットは Radio Chemical Center のものを使用した。

尿・血漿・臓器中のサイクリックヌクレオチドの測定 尿は 50mM Tris-HCl (pH7.5) 4mM EDTA で75~100 倍に希釈し、血液は 5mM EDTA で血漿を得て測定に供した。肝臓腎臓は 0.25M Sucrose, 10mM Tris-HCl (pH7.4), 4mM EDTA で20%ホモジェネートとし、-80℃で凍結保存した。測定に際し同容量の 4mM EDTA を加え、100℃4分間加熱し3000r.p.m 30分間遠沈して除タンパクした上清を測定に用いた。サイクリック AMP (C-AMP) の測定は C-AMP regulatory

protein に対する competitive binding 法、サイクリック GMP (C-GMP) の測定は C-GMP に特異的な抗血清に対する competitive binding 法に基づき、それぞれの測定キットを用いて行った。

尿中・血清中のクレアチニンの測定 尿は160~180倍に希釈し測定に供した。血清は1/15N H₂SO₄, 1g/dl Na₂WO₄・2H₂O で除タンパクした後 10,000r.p.m 10分間遠沈した上清を測定に用いた。クレアチニンの測定は、Jaffe の反応¹³⁾に従った。

肝臓・腎臓の AC 活性 各組織のホモジェネートを用い、活性の測定は既報¹⁴⁾の方法に従った。タンパク質の測定は Lowry¹⁵⁾法で行った。

実験結果

OPP 投与後38日目からの尿中 C-AMP の変動を図1に、尿中クレアチニンの変動を図2に示した。尿中 C-AMP は OPP 投与群の雄 (図1a), 雌 (図1b)とも対照群に比べて低下し、雄でその傾向が強かった。また尿中クレアチニン量も OPP 投与群の雄 (図2ab)で低く、成長に伴う増加がみられなかった。尿中 C-AMP およびクレアチニンの減少が腎透過性の低下に起因するものか、体内における産生低下に起因するものかを知るため、血中の C-AMP (図3) およびクレアチニン (図4) の測定を行った。血漿中の C-AMP は OPP 投与群の雄で著しい低下を示し、血清中のクレアチニンも OPP 投与群の雄で低下した。以上の結果より、尿中 C-AMP およびクレアチニンの低下は体内における両物質の産生低下を反映したものであることが示唆された。尿中 C-AMP の約半分は腎に、残り半分は腎以外の組織に由来すると言われている。生体内 C-AMP 量に貢献度が高いと思われる肝臓と腎臓の C-AMP を測定した (表1)。OPP 投与群では雌雄いずれも差はないが C-AMP

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

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

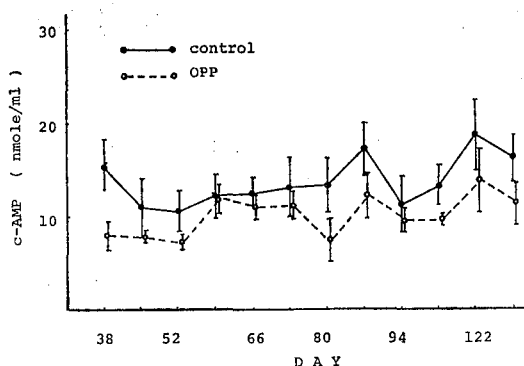


図 1. a 雄の尿中 C-AMP の変動

横軸は OPP 投与開始後の日数を表わす。

66日, 80日, 108日, 136日には尿中 C-GMP を測定した。その結果を C-AMP/C-GMP で表わすと次の通りであった。

	66日	80日	108日	136日
対 照 群	5.26	4.73	6.32	4.95
OPP 投与群	3.84	2.11	4.10	4.25

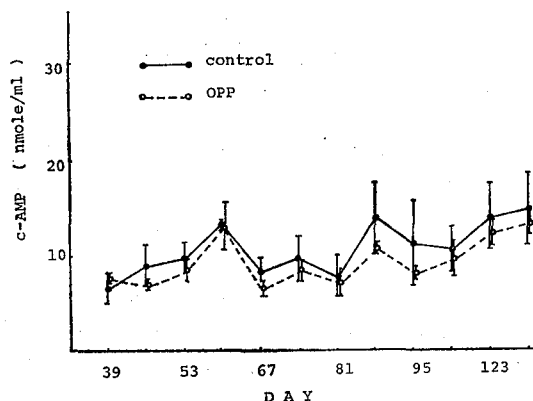


図 1. b 雌の尿中 C-AMP の変動

横軸は OPP 投与開始後の日数を表わす。

量低下の傾向がみられた。一方 C-GMP は C-AMP とならんで近年注目されているサイクリックヌクレオチドである。C-GMP は多くの場合 C-AMP と逆の動向を示す¹⁰⁾ことから、組織中の C-GMP 量を測定した。対照群と OPP 投与群の間に雌雄とも差はないが、OPP 投与群で上昇の傾向がみられた(表2)。また表1と表2より C-AMP/C-GMP 値を求めると、この値は OPP 投与群で雌雄とも低下していた(表3)。生体内 C-AMP レベルは AC による合成に依存することが多いことから、肝臓(図5)と腎臓(図6)における AC 活性と AC の賦活化剤に対する感受性を測定した。OPP 投与群の

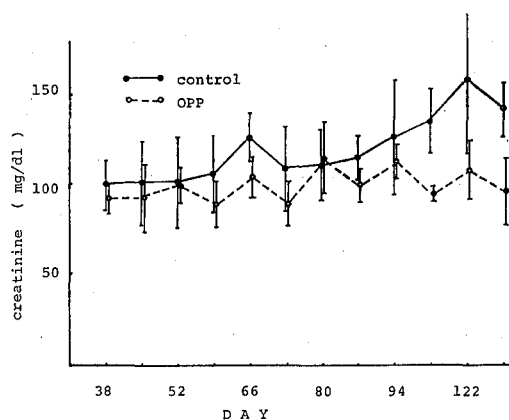


図 2. a 雄の尿中クレアチニン量の変動

横軸は OPP 投与開始後の日数を表わす。

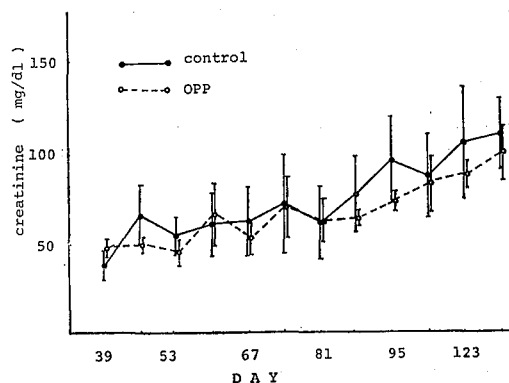


図 2. b 雌の尿中クレアチニンの変動

横軸は、OPP 投与開始後の日数を表わす。

雄では肝臓腎臓いずれも賦活化剤存在下での AC 活性が強く阻害されていた。一方 OPP 投与群の雌では賦活化剤存在下での肝 AC 活性は強く阻害されたが、腎 AC 活性はむしろ上昇していた。この表の AC 活性はタンパク当りの比活性で示してあるが、組織の全活性で表わしても同じ傾向であった。

考 察

培養細胞系におけるガン化と細胞内 C-AMP 量の関係については悪性度の高い細胞系で C-AMP 量が低く⁴⁾、細胞増殖の速いものほど C-AMP 量が低い³⁾という報告がある。またある種の担ガン患者^{8,10,11)}や担ガン動物^{6,7)}では尿中 C-AMP および C-AMP/C-GMP 値が低下することも報告されている。本実験では 2% OPP 投与群雄ラットの尿中・血中・組織中の C-AMP が低下し、尿中・組織中の C-AMP/C-GMP 値が減少していた。また OPP 投与群の雄ラットの解剖所見では膀胱粘膜に

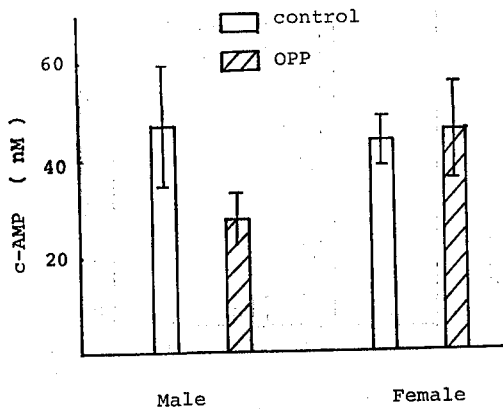


図 3. 血漿中の C-AMP
図中の縦線は標準偏差を表わす。

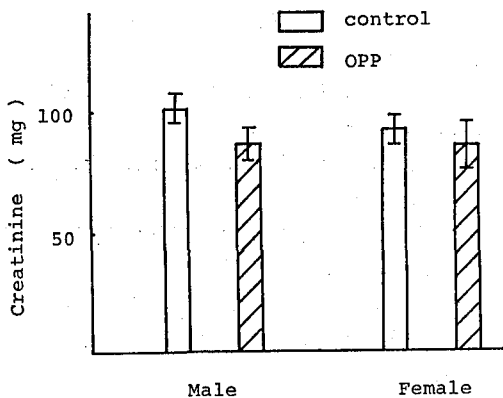


図 4. 血清のクレアチニン量
図中の縦線は標準偏差を表わす。

肥厚がみられガン化の過程にあることが示唆された。OPP を長期投与することによりラットの生体内サイクリックヌクレオチドの動向は、培養ガン細胞や担ガン動物でみられる動向と同じ傾向を示していた。

生体内 C-AMP レベルは AC による合成とホスホジエステラーゼ (PDE) による分解で調節されている。OPP 投与により雌の腎臓を除いた全ての AC 活性は、ホルモンあるいは NaF などの賦活剤の存在下で阻害され、賦活剤に対する感受性が低下していた。AC の basal 活性が阻害されないことから、OPP 投与により、AC が直接阻害されるのではなくホルモンの受容体、あるいは NaF 感受性部位など細胞膜上の変化を通して、AC 活性が抑えられたと思われる。生体の C-AMP レベルを PDE を除いて考えることはできないが、OPP 投与群雄の尿中 C-AMP の減少は組織中の AC 活性の減少を反映したものと思われる。一方 OPP 投与群雌の尿中

表 1. 肝臓と腎臓の C-AMP 量

		肝臓 (pmole/g tissue)	腎臓 (pmole/g tissue)
雄	対 照 群	262±15.1	820±30.6
	OPP 投与群	251±35.6	746±39.1
雌	対 照 群	274±66.6	757±48.9
	OPP 投与群	306±37.2	643±81.0

表 2. 肝臓と腎臓の C-GMP 量

		肝臓 (pmole/g tissue)	腎臓 (pmole/g tissue)
雄	対 照 群	2.96±1.75	11.7±3.17
	OPP 投与群	3.26±1.12	13.8±2.61
雌	対 照 群	5.59±2.04	11.83±2.38
	OPP 投与群	6.91±3.72	11.79±1.30

表 3. 肝臓と腎臓の C-AMP/C-GMP

		肝臓	腎臓
雄	対 照 群	88.5	70.1
	OPP 投与群	76.8	54.1
雌	対 照 群	49.0	64.0
	OPP 投与群	44.3	54.5

C-AMP に変化がみられないのは、腎臓のホルモン依存性 AC 活性の上昇により補充された結果かもしれない。

クレアチニンは筋肉へのエネルギー供給源であるクレアチンリン酸の代謝産物で、尿中血中の 95% 以上が骨格筋に由来する。また尿中排泄量は一定で筋肉の発達の程度と平行していることも知られている。OPP 投与群の雄で体重増加¹²⁾に見合うクレアチニンの増加がみられなかったことについては、筋肉の活動が弱まる等クレアチンリン酸の消費が減少していることも考えられるがこれについては更に今後の検討が必要である。

要 約

1) OPP 投与群の雄ラットにおける尿中 C-AMP およびクレアチニン量は雌に比べて著しく低下した。これは腎透過性の低下というより、両物質の体内における産生の低下であることが示唆された。

2) OPP 投与群ラットの肝臓・腎臓・尿中の C-AMP/C-GMP 値が減少し、培養ガン細胞系や担ガン動物で報告されたものと同じ傾向を示していた。

3) OPP 投与群の雌雄の肝臓および雄の腎臓 AC 活

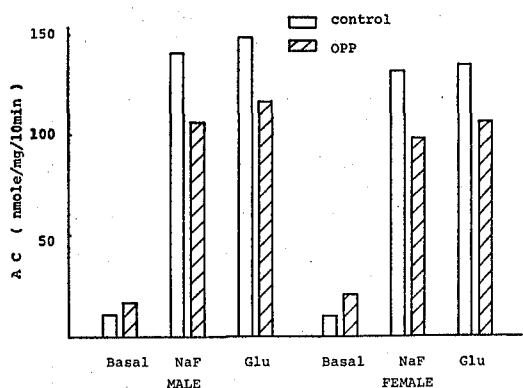


図 5. 肝臓のアデニレートシクラーゼ活性
NaFは10mM, グルカゴンは40 μ g/mlで使用した。

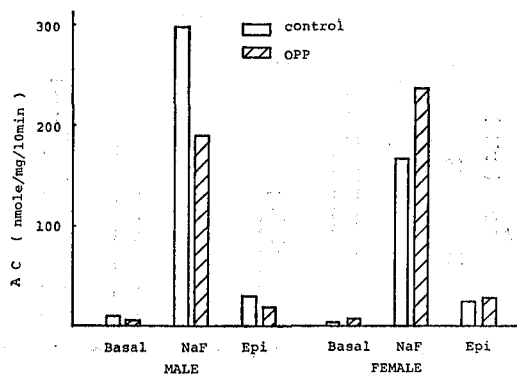


図 6. 腎臓のアデニレートシクラーゼ活性
NaFは10mM, エピネフリンは 10^{-4} Mで使用した。

性はホルモン等の賦活剤に対する感受性が低下した。

謝辞 解剖所見を指導していただいた病理研究科藤井孝主任研究員に感謝いたします。

文 献

- Hiraga, K., and Fujii, T.: *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 303, 1981
- Heidrick, M. L., and Ryan, M. L.: *Cancer Res.*, 31, 1313, 1971
- Otten, J., Johnson, G. S., and Pastan, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1192, 1971
- Sheppard, J. R.: *Nature New Biol.*, 236, 14, 1972
- 西塚泰美, 兼子俊男: *Cyclic AMP*, 335, 1975, 中外医学社
- Hickie, R. A., Walker, C. M., and Croll, G. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 167, 1974
- Wayne E., and Murad, F.: *Cancer Res.*, 36, 1714, 1976
- 丁 宗鉄, 岡田秀親, 早坂健一, 石原和之: *医学のあゆみ*, 109, 618, 1976
- Criss, W. E., and Murad, F.: *Clinical Aspects of Cyclic Nucleotides*, 429, 1977, Spectrum, New York
- Gennari, C., Francini, G., Gall, M., and Lore, F.: *J. Clin. Pathol.*, 31, 735, 1978
- Wood, P. J., and Smith, C. L.: *J. Clin. Pathol.*, 32, 998, 1979
- 樺島順一郎, 大槻慶子, 中尾順子: *東京衛研年報*, 32-2, 61, 1981
- 北村元仕: *実践臨床化学*, 245, 1974, 医歯薬出版
- 中川敦子, 中尾順子: *東京衛研年報*, 29-2, 151, 1978
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, B. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
- Goldberg, N. D., Haddox, M. K., Nicol, S. E., Glass, D. B., Sanford, C. H., Kuehl, F. A. Jr., and Estensen, R.: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 5, 307, 1975

経口投与オルトフェニルフェノール・ナトリウム塩 (OPP-Na) のラット体内酵素への影響

長 井 二三子*, 中 尾 順 子*

Effect of *o*-Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) on Rats Enzymes *in vivo*

FUMIKO NAGAI* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ラット rat, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP)

緒 言

オルトフェニルフェノール (OPP) は食品添加物として使用が許可され、主として米国産の柑橘類の防カビ剤に用いられている。当毒性部では OPP の安全性点検のため、急性^{1,2)} および慢性毒性³⁾、変異原性、催奇性⁴⁾、細胞毒性試験⁵⁾ などをを行い、OPP-ナトリウム塩 (OPP-Na) のラットへの大量長期投与がぼうこうガンを発生させることを報告⁶⁾した。しかし病理組織学的検査では OPP-Na の大量長期投与は尿路系障害以外には顕著な変化は見い出されていない³⁾。そこで著者らは生化学的な手法により OPP-Na 投与によるガン発生機序の解明を中心に検索中である。本報告においては OPP-Na を約4ヶ月間投与したラットの主として尿路系細胞膜酵素に注目し、尿中に出現する γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) の活性および臓器中の γ -GTP, アルカリフォスファターゼ, Na, K-ATPase などについて得られた知見を報告する。

方 法

実験材料 フィッシャー系ラット (F344/DuCrj) 4 週令を日本チャールスリバー社より購入し、1 週間予備飼育後 2% OPP-Na 含有飼料で約 4 ヶ月間飼育した。飼育期間中は一週間毎にメタボリカで採尿し、透析後酵素活性を測定した。飼育および採尿に関する詳細は別に樺島らが報告⁶⁾する。

実験方法 約 4 ヶ月間飼育後断首屠殺し、各種臓器を取り出し、秤量後 -80℃ に保存した。腎臓および肝臓は解氷後各群 5 匹の腎および肝臓を各々一緒にし、4 倍量の 250mM 蔗糖, 4mM Tris, EDTA (pH7.4) を加えて前者はポリトロン、後者はテフロンホモジナイザーを用いて均質化し、-80℃ に保存し、種々の測定を行った。

γ -GTP 活性の測定は和光純薬 γ -グルタミルトランス

ペプチダーゼ測定用試薬 (Code 271-32702) を用い、37℃ でインクベート後、 α -ナフチルアミンの生成をギルフォード 300N 分光光度計をもちい、550nm の波長で測定した⁷⁻¹²⁾。

アルカリフォスファターゼ活性は 50mM p-ニトロフェニルリン酸・2ナトリウム (PNPP), 5mM 塩化マグネシウム, 50mM グリシン・カ性ソーダ緩衝液 (pH 10.0) に酵素液を加え、37℃ でインクベートし、遊離された p-ニトロフェノール (PNP) をギルフォード 300N 分光光度計で 410nm の波長により測定した。

Na, K-ATPase 活性は 1mM ウアバインを用いた以外は従来通りの方法¹³⁾で測定した。

グルタチオンは DTNB とグルタチオンレダクターゼを併用した方法で測定した¹⁵⁾。

たんぱく質の測定は Lowry 法¹⁴⁾に従った。

結 果

尿中 γ -GTP 活性の測定は投与 1 週目から行い、その結果を図 1 および図 2 に示した。雄対照群の活性は図 1 のようにばらつきはみられるが、1, 2, 3 週と徐々に増加しており、その後変動はあるが一定の範囲の値になった。雄の OPP-Na 投与群の尿中 γ -GTP 活性は投与開始後 1 週間の尿ですでに低下しており、その後も 4 ヶ月後まで常に対照群の活性より低い値を示した。雌の対照群の尿中 γ -GTP 活性は雄よりもひくく、また雄にみられたような活性の増加は顕著には見い出せなかった。OPP-Na 投与による γ -GTP 活性の減少は雌ラットにも見い出された (図 2)。

腎臓ホモジネートの各種酵素活性を表 1 に示した。

γ -GTP 活性は表 1 に示した如く、雄、雌ともに OPP-Na 投与が対照に比べて約 20% 低下した。また、腎の γ -GTP 活性は雄、雌ではほぼ同程度の活性を示した。

腎・アルカリフォスファターゼの単位重量当りの活性

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

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

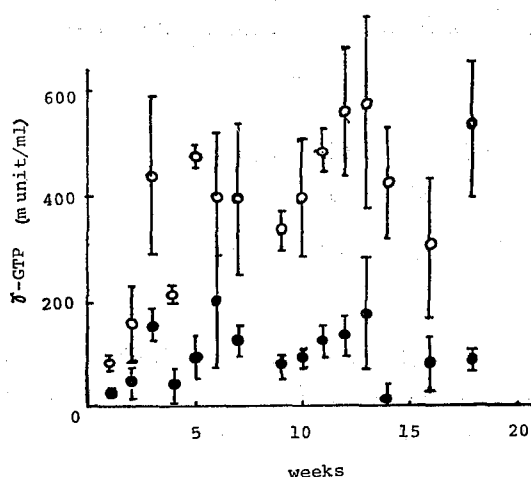


図 1. OPP-Na 投与による雄ラット尿中
 γ -GTP 活性の変動
○: 対照, ●: OPP-Na 投与, 平均値 $\pm$ S D
横軸は投与日数を示す。

は対照, OPP-Na 投与ともに雌が雄より高い値を示したが, OPP-Na 投与によつては約20%減少した。

腎・Na, K-ATPase に関しては性差による違い, OPP-Na 投与による違いともに見い出せなかった。

肝臓ホモジネートの酵素活性およびグルタチオンの含量について表2に示した。

肝・ γ -GTP は OPP-Na 投与により雄, 雌ともに対照の約8倍に上昇した。

グルタチオンの含量は雄, 雌ともに OPP-Na 投与において減少の傾向にあった。

肝・アルカリフォスファターゼについては対照, OPP-

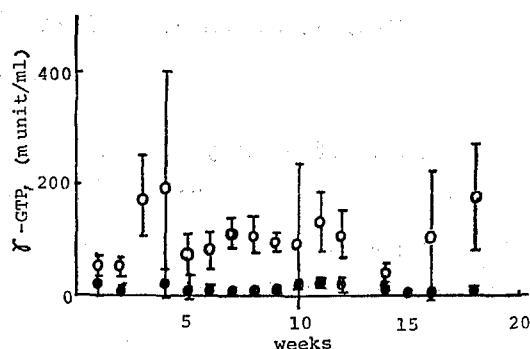


図 2. OPP-Na 投与による雌ラット尿中
 γ -GTP 活性の変動
○: 対照, ●: OPP-Na 投与, 平均値 $\pm$ S D
横軸は投与日数を示す。

Na 投与の間に顕著な差がなかった。

ラット血清 γ -GTP 活性は対照, OPP-Na 投与ともに非常に低く, ここで用いた方法では測定が不可能であった。

考 察

成熟ラット γ -GTP の臓器分布は腎が最も高く, 脾, 脳, 肝にも腎の100分の1程度存在する¹⁶⁾。また個体発生過程で臓器分布は特異な変動を示し, 胎性期においては, 腎, 肝, 脳, 脾での活性に大きな差は見られないが, 成熟にともなつて腎の活性は強くなり, 逆に肝の活性は低くなると言われている¹⁶⁾。 γ -GTP の役割については未だ明らかでないが, Meisterら¹⁷⁾はこの酵素が γ -グルタミルサイクルを形成している酵素系の一部をなしており, 細胞内のグルタチオンの分解と再合成に共役するアミノ酸の細胞内へのトランスポート系としての意義を

表 1. OPP-Na 投与による腎臓酵素活性の変化

	対 照		OPP-Na投与			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
	活性/ グラム	総活性*3	活性/ グラム	総活性*3	活性/ グラム	総活性*3
γ -GTP*1 (unit/min)	79.8	838.0	85.5	568.6	62.0	713.0
アルカリフォス ファターゼ*2 (μ mol/hour)	1,134.0	11,906	1,825.0	12,591	977.0	11,240
Na, K-ATPase*2 (μ mol/hour)	1,487.4	15,617.7	1,592.1	10,985.5	1,524.0	17,52.60
						1,492.0
						9,474.2

* 1. γ -GTPの単位は37℃で基質から1分間に1 μ molの α -ナフチルアミンが遊離される活性度を1単位 (unit) とした。

* 2. アルカリフォスファターゼ, Na, K-ATPaseは37℃1時間で基質から遊離されるパラニトロフェノールあるいは無機リン酸の μ molで示した。

* 3. 各群のラット5匹の総量で示した。

表 2. OPP-Na 投与による肝臓酵素活性およびグルタチオン含量の変動

	対 照				OPP-Na投与			
	♂		♀		♂		♀	
	グラム 当り	総 量* ¹	グラム 当り	総 量* ¹	グラム 当り	総 量* ¹	グラム 当り	総 量* ¹
γ -GTP* ¹ (munit / min)	44.5	2,294.3	61.6	1,848.0	367.2	22,032	497.8	12,545
アルカリフォス ファターゼ* ² (μ mol / hour)	394.7	20,327	382.8	11,484	406.7	24,399	384.3	12,297
グルタチオン* ³ (μ mol)	7.24	372.8	4.84	145.2	3.60	216.0	1.89	60.5

* 1. γ -GTP 活性に関しては表 1 に示したが肝臓の場合はミリユニットで示してある。

* 2. アルカリフォスファターゼについては表 1 に示したとおりである。

* 3. 本表で示したグルタチオン含量は酸化型、還元型を合わせたものである。

* 4. 各群のラット 5 匹の総量で示した。

主張している。腎の γ -GTP は尿細管の上皮細胞に高い密度で分布することが生化学的にも組織化学的にも認められている¹⁸⁻²²⁾。正常ラット尿中の γ -GTP はこの上皮細胞のターン・オーバーに伴い尿細管から直接逸脱してきたものと考えられる。雄ラット尿中の γ -GTP 活性は 6~8 週にかけて上昇傾向にあった。哺乳動物の腎 γ -GTP 活性は成熟とともに上昇と言われている¹⁷⁾ので、この対照実験での尿中の γ -GTP 活性の上昇は腎における活性上昇を示しているものと考えられる。OPP-Na 投与群の尿中 γ -GTP 活性は投与開始後 1 週間ですでに減少しており、その後 4 ケ月目に屠殺するまで減少したままであった。セファローズ Cl-4B による予備実験の結果は活性を有するたんばくがすべてボイドボリウムに溶出されることから細胞の破片または細胞そのものが活性を持ったまま溶出されたものと考えられた。さらに OPP-Na 投与により溶出部位のたんばくは著しく低下した。これは刷子縁での障害が起こったことを示し、このことが活性低下に関連すると考えた。今後投与開始直後からの尿中 γ -GTP 活性を測定し、くわしく検討する予定である。

腎の γ -GTP は単位重量当りの活性においては雄、雌とも同程度の活性を示しており、OPP-Na 投与によっても約 20% 減少していた。対照、OPP-Na 投与とも雄の尿中 γ -GTP 活性が雌より高いのは腎の大きさに伴う総活性の量によるものと考えられる。

アルカリフォスファターゼは細胞膜酵素であるがその生理的意義は未明のままである。しかし臨床的には広く応用されている酵素である。腎アルカリフォスファターゼ活性は対照、OPP-Na 投与とも雌が雄より高くなっ

ていた。このことについては今後検討する。OPP-Na 投与によって単位重量当りのアルカリフォスファターゼ活性は低下した。この酵素は刷子縁部位に存在することが知られており、 γ -GTP の場合と同様尿細管細胞の障害が示唆された。

腎・Na, K-ATP ase 活性は、OPP-Na 投与によって変化しなかった。腎・Na, K-ATP ase は基底膜側に存在すると言われており、この部分の損傷はないものと考えられる。

今後は細胞膜分画などを行い、また組織化学的な検索とも合わせて OPP-Na 投与による障害部位について明らかにする予定である。

肝臓の γ -GTP 活性は腎とは異なり、OPP-Na 投与により約 8 倍の上昇を見た。肝細胞内では γ -GTP は顆粒分画ことにミクロゾーム分画に高い活性分布が認められる。肝実質細胞障害ではこのミクロゾーム分画の活性が有意な上昇をきたすとされている²³⁾。OPP-Na 投与による増加もこのような結果から生じたものであろうか。今後、細胞分画を行って検討する予定である。

肝中のグルタチオンの減少が見られた。グルタチオンは γ -GTP の基質であるが、OPP-Na の解毒に利用されることも考えられるので今後検討する。

肝・アルカリフォスファターゼ活性は OPP-Na 投与による変化は見られなかった。

要 約

1. 尿中の γ -GTP 活性は性差があり雄の活性が雌より有意に高かった。
2. 2%OPP-Na の投与は尿中 γ -GTP 活性を減少させた。

3. 腎の γ -GTP, アルカリフォスファターゼ活性は, OPP-Na 投与により約20%減少したが, Na, K-ATPase の活性は変化しなかった.

4. 肝臓の γ -GTP 活性は2% OPP-Na 投与により約8倍上昇した.

5. 肝グルタチオン含量の減少が見られた.

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) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 1, 1980
- 3) Hiraga, K., et al: *Food cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 4) 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
- 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) 樺島順一郎, 大槻慶子, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 7) Hanes, C. S., Hird, F. J. R., and Isherwood, F. A.: *Biochem. J.*, 51, 25, 1952
- 8) Goldbarg, J. A., Friedman, O. M., Pineda, E. P., Smith, E. E., Chatterji, R., Stein, E. H., and Ruttenburg, A. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 61, 1960
- 9) Orlowski, M., and Szewczuk, A.: *Clin. Chim. Acta*, 7, 755, 1962
- 10) Orlowski, M., and Meister, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 679, 1963
- 11) Orlowski, M., and Szewczuk, A.: *Clin. Chim. Acta*, 6, 430, 1961
- 12) 藤沢 洌, 岡部和彦, 栗原宣夫, 湊 貞正, 玉沖英恒: 肝臓, 11, 436, 1970
- 13) 長井二三子, 厚井麻里, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 143, 1975
- 14) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. Y., Farr A. L., and Randall, B. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
- 15) 松本 博, 国則登代: SHの定量法, 学会出版センター, 92, 1978
- 16) Albert, Z., and Rzuclidlo, Z.: *Acta histochem. Bd.*, 37, S34, 1970
- 17) Meister, A.: *Science*, 180, 33, 1973
- 18) Glenner, G. C., Folk, J. E., and McMillen, P. J.: *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 481, 1962
- 19) Albert, Z., Orlowska, J., Orlowski, M., and Szewczuka, A.: *Acta Histochem.*, 18, 78, 1964
- 20) Kuhlenschmidt, T., and Curthoys, N. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 519, 1975
- 21) Hahn, R., Wendel, A., and Flohe, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 539, 324, 1978
- 22) Horiuchi, S., Inoue, M., and Morino, Y.: *Eur. J. Biochem.*, 87, 429, 1978
- 23) Tanaka, M.: *Acta Path. Jap.*, 24, 651, 1974

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の
ラット尿中酸性フォスファターゼにおよぼす影響

樺 島 順一郎*, 中 尾 順 子*

Effect of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) on Acid Phosphatase in Rat Urine

JUNICHIRO KABASHIMA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: 酸性フォスファターゼ Acid Phosphatase, オルトフェニルフェノールナトリウム Sodium *o*-Phenylphenate, ラット尿 Rat Urine

緒 言

当部で行った毒性試験の結果、オルトフェニルフェノールナトリウム (以下 OPP-Na と略す) は尿路系に強い障害を示し、膀胱腫瘍の発生が報告されている¹⁾。このため腎障害や膀胱腫瘍の発生と尿中酵素の変動との関連を知る目的で、4ヶ月にわたる長期投与実験を行った。ここでは腫瘍発生の機序を解明する手段として、雄に腫瘍発生が強いことから、前立腺に関連の強い酸性フォスファターゼ (以下 AcP と略す) に的をしぼった。

実験材料および実験方法

1. 実験動物 F 344/DuCrj ラット雌雄を、日本チャールスリバー社より4週令時に購入し、1週間予備飼育後、実験に供した。

2. 飼育条件 温度 $25 \pm 1^\circ$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気毎時10回、照明午前6時～午後5時までの飼育室において、ステンレスケージに5匹ずつ収容して、固型飼料 CE-2 (日本クレア製) を与え、自動給水装置付ベルト式飼育架台に配置して、飼育した。

3. 投与方法 雌雄とも、対照群には固型飼料 CE-2 を、投与群には、CE-2 に2% OPP-Na (Dow Chemical 社製) を添加した飼料を自由摂取させ、採尿時には除餌した。水は水道水を自由摂取させ、摂餌量と体重測定を行った。

4. 採尿方法 雌雄とも採尿は週2回行い、ガラス製代謝ケージ「メタボリカ」(杉山元医理器製) に、午前9時から午後3時までの6時間、ラットを一匹ずつ入れ、水のみを与えて採尿を行った。集尿は2時間ごとに行い、尿は氷水中の試験管に保存し、6時間分の尿を個別別にまとめて計量した。週の前半に採取した尿は、氷室中で、ビスキングチューブを用いて、再蒸留水1lに対して1時間の透析を行った後、 -50° で保存した。後半に採取

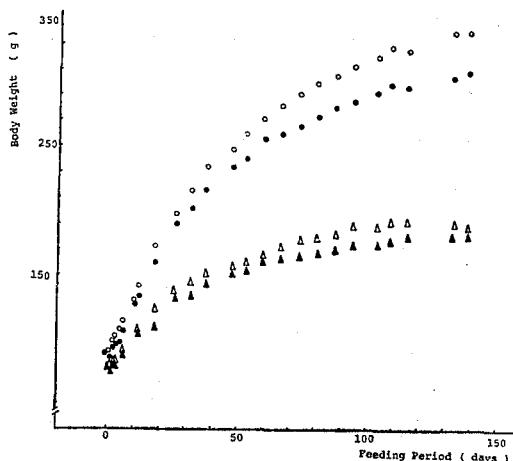


Fig. 1. Curves of Body Weights Gain of Rat
○ control (Male) △ control (Female)
● 2% OPP-Na (Male)
▲ 2% OPP-Na (Female)

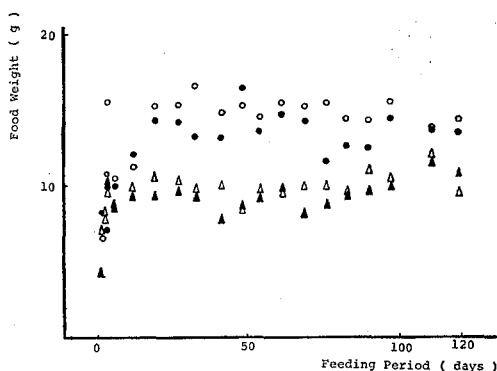


Fig. 2. Curves of Food Intake of Rat
Administrated Orally with OPP-Na
○ control (Male) △ control (Female)
● 2% OPP-Na (Male)
▲ 2% OPP-Na (Female)

* 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. Urinalysis

Sex		Male																							
Days after administration		37		45		51		58		65		72		79		86		93		107		121		135	
Dose %		0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0
pH	5															1									
	6					5 ¹⁾	3	5	3	4		5	4	5	4	4	4	5	3	5	3	5	3	3	
	7					2	2		1	3		2	1		1		1		2		1		2		1
	8									2										1					4
Protein	30mg/dl>					2				5		1													
	30mg/dl					3		5		5	4	2	5		5	1				1		1		1	
	100mg/dl						5		5			3		5		4	2	4	1	4	4	1	4	5	
	300mg/dl																					3			
Glucose	1/10%<					5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5
Ketone-Body	10mg/dl<					5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5
Occult Blood	-	5	4	5	3	5	5	5	5	5	5	2	5	3	5	4	5	2	5	2	5	3	5	2	
	+		1									1		1										2	
	++																	1		2		1			
	+++				1							1				1		2				1		1	
Sex		Female																							
Days after administration		38		46		52		59		66		73		80		87		94		108		122		137	
Dose %		0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0
pH	5															1									
	6	3		4	1	2		4	2	2		3	1	4	1	4	5	5		5	3	1	5	4	
	7	1	2	1	2	3	2	1	3	3	5	2	4	1	4				5	2			1		
	8	1	3		2		3																		1
Protein	30mg/dl>	5	1	5	5	1	4	2	2													1			
	30mg/dl		4			1	2	3	4	5	4	1	4	4	4	3	5	4	5		5	3	3	4	
	100mg/dl						1		1		1	4	1	1	1	1		1		5		1	2	1	
	300mg/dl															1					3				
Glucose	1/10%<	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
Ketone-Body	10mg/dl<	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	
Occult Blood	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	3	
	+																			1		1		1	
	++																								
	+++																								1

1) No. of Rats

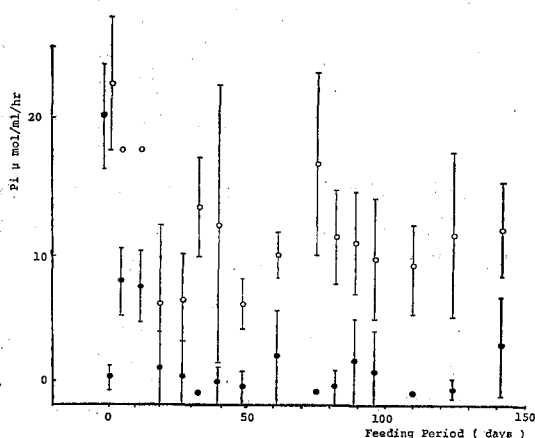


Fig. 3. Effect of OPP-Na on Urinary Acid Phosphatase Activity in Rat (Male)

した尿は、原尿のまま -30° で保存し、化学分析に供した。化学分析については、長井、中川らが報告する^{2,3)}。また37日目以後の尿は、採尿後に尿試験紙での検査を行った。

5. 測定方法

尿試験紙による検査 6時間に採取した尿を、尿試験紙 Labstix (マイルス・三共社製) により、pH, Protein, Ketone-Body, Occult Blood を測定した。

尿中 AcP 活性の測定 フォスファターゼ活性の測定は、通常、フェノールにリン酸を結合させたフェニールリン酸、パラニトロフェニールリン酸などを用いるが、本実験では、投与物質がフェノールを含むため、結果の評価の正確度を欠くために、特にグリセリン酸を基質として用いた。活性は、Fiske-SubbaRow の方法⁴⁾で遊離したリン酸を定量し、尿1ml が1時間に遊離するリン酸量で表わした。

試薬

基質緩衝液	0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.7)	37ml
	0.1M β -グリセリン酸	3.1ml
	0.2M 塩化マグネシウム	5.0ml
	蒸留水	全量 100ml
モリブデン酸アンモニウム・硫酸溶液		
	モリブデン酸アンモニウム	6g
	conc 硫酸	33.4ml
	蒸留水	全量 1.8l
還元試薬	アミノナフトールスルホン酸	6g
	亜硫酸ナトリウム	1.2g
	亜硫酸水素ナトリウム	1.2g
	上記の混合物	0.1g
	蒸留水	全量 5ml

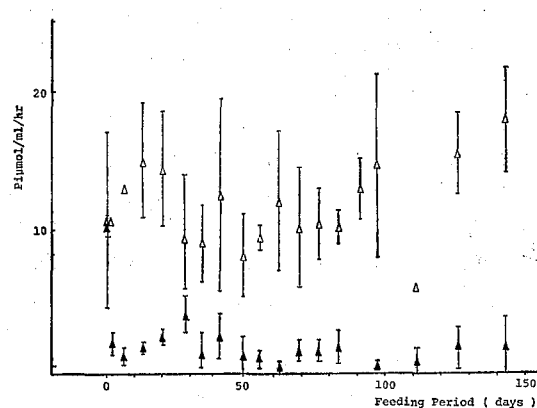


Fig. 4. Effect of OPP-Na on Urinary Acid Phosphatase Activity in Rat (Female)

測定方法 尿は -50° に保存したものを、氷室中で、再び、透析膜を用いて、再蒸留水1lに対して3時間の透析をしたのもを使用した。基質緩衝液0.5mlに透析尿20 μ lを入れ30分間 incubation し、モリブデン酸アンモニウム・硫酸溶液1.5mlを加え、還元試薬50 μ lを加えた後、ただちに 25° の水浴中に15分間入れた後に660nmで吸光度を測定した。

摂餌量の測定 1群当りの飼料投与量と24時間後の飼料残余量およびケージ受皿への飼料コボシ量を測定し、(投与量-残余量-コボシ量)/5を一匹当りの一日摂餌量とした。

実験結果と考察

一般状態 外観的には、雌の投与群で外陰部付近の体毛が茶褐色になったが、他には変化が認められなかった。着色の原因としては、代謝された OPP の誘導体であるフェノール性物質の付着が考えられる。

体重および摂餌量 Fig. 1 に体重を、Fig. 2 に摂餌量を示した。体重は雌雄ともに全実験期間を通じて、投与群では増加の抑制傾向が認められた。雌の投与群では投与67日目以後に、雄では60日目以後に、体重に有意な差が認められた。

尿検査 Table 1 に示したように、pH は投与群の方がアルカリ性に傾き、Protein は雌より雄の方が高く、雄の投与群では投与初期には対照群よりも高い値を示す。Glucose と Ketone-Body は、雌の投与群で投与開始後37日目に1例 Glucose が検出されたものがあったが、他はすべて陰性であった。潜血反応は、対照群ではすべて陰性であったが、投与群では、雄に尿検査を始めた投与開始37日目で陽性が1例あり、反応の出現と消失をく

り返して全体的に陽性の割合が高くなる傾向を示した。雌では投与開始後 108 日目から投与群に潜血反応が見られるものが現われた。

尿中 AcP 活性 Fig. 3 および Fig. 4 に酵素活性の変化を示した。尿量が少ないために、酵素活性が測定できず有意差検定のできないものもあったが、投与開始後直ちに、著明な活性の低下が起こり、対照群との比較では有意な差があるものが多かった。また対照群では、雄が雌に較べて活性の変動が大きかった。今回の実験では、活性の測定は 1 週間ごとに行ったが活性の初期変動を知るために、毎日又は隔日の酵素活性測定を行なう必要がある。また盲検の値が大きく尿量が少ないため、バラツキが大きく、測定法の改良も必要である。

ま と め

OPP-Na の 2% 添加飼料を、F344/DuCrj ラット雌雄に投与し、尿中の AcP 活性と尿試験紙による定性実験

を行ったところ、つぎの結果が得られた。

1. 尿試験紙による検査では、投与群尿は、pH が対照群に較べて高かった。潜血反応は、雄ではすでに 1 カ月で現われるが、雌ではおくれで 3 カ月程度で現われた。
2. 尿中 AcP 活性は、個体差が大きくバラツキはあったが、投与群での活性は直後から低下した。前立腺に特異的な酵素活性については検討中である。

文 献

- 1) Hiraga, K., and Fujii, T. : *Fd and Cosmetic Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 2) 長井二三子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 57, 1981
- 3) 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 53, 1981
- 4) Fiske, C.H., and SubbaRow, Y.H. : *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925

ニホンウズラにおけるジブチルヒドロキシトルエンの短期毒性

高橋 省*, 平賀 興吾*

Short-Term Toxicity of Butylated Hydroxytoluene in Japanese Quail

OSAMU TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

Fifty six-days old male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) were given 1.0% butylated hydroxytoluene (BHT) in the diet for 17 days. The mean BHT intake was 1.1 g/kg/day. At the earlier period of administration, BHT restrained the body weight gains and food intakes, and increased the degree of feather-shedding. BHT slightly increased the weight of liver but not of lung. BHT concentration in adipose tissue was 136 $\mu\text{g/g}$, which was equal to that of chicken and 20-times higher than that of rat. BHT concentration in the liver was 3.31 $\mu\text{g/g}$, which was 1/10 to 1/4 of the concentration of BHT-quinone methide in the liver of rats. These results suggest that there is a metabolic differences of BHT between avians and mammals.

Keywords: butylated hydroxytoluene, toxicity, quail

鳥類の排せつ機構は周知のごとくは乳類と大きく異なるが、一方吸収機構においても異なり、鳥類ではリンパ系の発達が悪く吸収脂質が直接門脈中へ入るといった現象が認められる。これらのことのみから考えてみても鳥類における化学物質の毒性発現はは乳類とは異なることが予想され、事実いくつかの化学物質について毒性の差の報告がある。

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の鳥類に対する毒性の報告はニワトリを実験動物として使用したものがほとんどである¹⁻⁸⁾。

本報告はニホンウズラに及ぼす BHT の影響を検討した結果である。

実験方法

動物は白殻雄ニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) 56日齢 (約50%産卵率を同雌は有する; 東京都畜産試験場浅川分場産) を使用した。ニホンウズラは5連金網ケージで個別飼育した。約1週間馴化後、BHT 含有飼料を与えた。基本飼料は日清印成鶏用配合飼料うずら (日清製粉株式会社, 東京) を使用した。基本飼料の粗たんばく質含量は23.0%以上である。各群は5羽ずつで、対照群は基本飼料を、BHT 投与群は1.0% BHT を含む基本飼料を自由に摂取させ17日間飼育した。

飼育期間中、症状を観察記録するとともに体重および飼料摂取量を測定し、BHT の摂取量は飼料摂取量より計算した。

投与終了後、と殺して血しょうプロトンビン濃度、

肺および肝臓重量を測定、肝臓および頸部脂肪組織中の BHT 濃度を測定した。測定はアセトン-ボウ 硝抽出後、ガスクロマトグラフィーにより行った⁹⁾。

結果および考察

平均体重の推移および平均摂食量の変化を Fig. 1 に示す。対照群の体重は100~120gの範囲内におおむねとどまり、全期間を通じてわずかな傾斜をもって増加した。一方 BHT 投与群では投与1日目の体重減少が急激であり、以後全期間を通じて漸次増加し対照群に近づいた。BHT 投与群における投与初期の体重減少は摂食量の低下にもとづくものと考えられる。6日目以後の摂取量は両群で同一である。BHT 投与群において投与3~6日目に全個体に羽毛の抜けるのが観察された。その後この現象は対照群においても観察された。全期間を通じての平均 BHT 摂取量は1日あたり1.1g/kgであった。

肺および肝臓重量、肝臓および脂肪組織中の BHT 濃度を Table 1 に示す。肺、肝重量には有意差はなかった。なおプロトンビン量は別報に報告した¹⁰⁾。

脂肪組織中の BHT 濃度はラットよりはるかに高く (約20倍と推定)、ニワトリと同程度であった¹¹⁾。肝臓中の BHT 濃度は低く、ラット肝臓中の BHT のキノンメタイド濃度の1/10~1/4倍であった¹⁰⁾。これらの結果は代謝様式の差異にもとづくものと考えられる。

要 約

56日齢の雄ニホンウズラに1.0% BHT を与えた。投与初期において摂食量の低下にともなう体重増加の抑

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

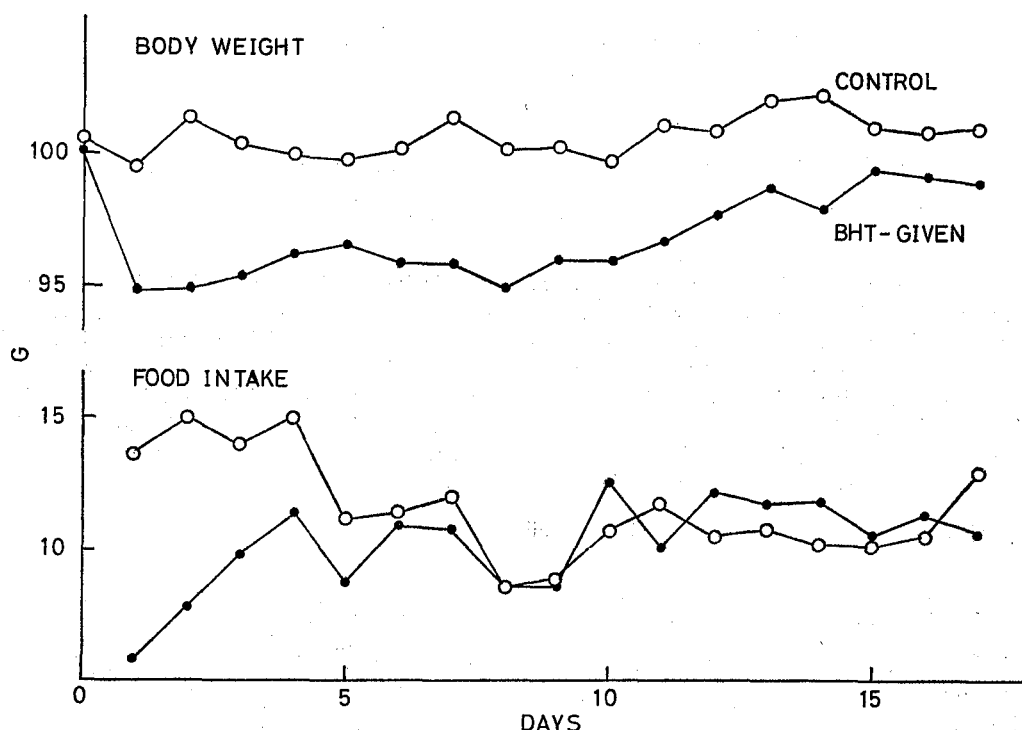


Fig. 1. Effects of Feeding 1.0% BHT on Body Weight Changes and Food Intakes of Male Japanese Quail

Table 1. Weights of Lung and Liver, Hepatic or Adipose Level of BHT of Male Japanese Quail Fed 1.0% BHT for 17 Days (N=5)

	Lungs (g)		Liver (g)		BHT ($\mu\text{g/g}$)		
	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Liver	Adipose	Tissue
Control	1.06 ± 0.10	1.04 ± 0.06	2.00 ± 0.34	1.94 ± 0.24	—	—	—
BHT	1.09 ± 0.07	1.10 ± 0.05	2.34 ± 0.10	2.36 ± 0.04	3.31 ± 0.20	136 ± 27	—

制, 脱羽毛の時期が早まる現象が観察された。肝重量のわずかな増加(有意差なし)も認められた。頸部脂肪組織中の BHT 濃度は $136 \mu\text{g/g}$, 肝臓では $3.31 \mu\text{g/g}$ であった。

文 献

- 1) Van Stratum, D.G.C., and Vos, H. J. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 3, 475, 1965
- 2) Frawley, J. P., Kay, J.M., and Calandra, J.C. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 3, 471, 1965
- 3) Shollenberger, T.E., Parrish, D.B., and Sanford, P.E. : *Poultry Sci.*, 36, 1313, 1957
- 4) March, B.E., Coates, V., and Biely, J. : *Science*, 164, 1398, 1969
- 5) Bunnell, R.H., Matterson, L.D., Singsen, E.P., Potter, L.M., Kozeff, A., and Jungherr, E.L. : *Poultry Sci.*, 34, 1068, 1955
- 6) Telford, I.R., Woodruff, C.S., and Linford, R.H. : *Amer. J. Anat.*, 110, 29, 1962
- 7) Francois, A.C., and Pihet, A. : *Ann. Zootech.*, 9, 195, 1960
- 8) Surak, J.G., Bradley, R.L., Jr., Branen, A.L., Maurer, A.J., and Ribelin, W.E. : *Poultry Sci.*, 56, 747, 1977
- 9) Takahashi, O., and Hiraga, K. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 451, 1979
- 10) Takahashi, O., Hayashida, S., and Hiraga, K. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 18, 229, 1980

2, 4, 6-トリ-*t*-ブチルフェノールのイヌにおよぼす影響

高橋 省*, 林田 志信*, 平賀 興吾*

Toxicity of 2, 4, 6-Tri-*tert*-butylphenol in Beagle Dogs

OSAMU TAKAHASHI*, SHINOBU HAYASHIDA* and KOGO HIRAGA*

Male beagles (10-months old) were fed 2, 4, 6-tri-*tert*-butylphenol (TBP) at a level estimated to cause the ingested amounts to be 49.2, 173 and 454mg/kg/day respectively for 11 days. The behavioural abnormality was observed in the dogs given the highest dose. TBP increased the activities of serum glutamic-oxalacetic or -pyruvic transaminase and alkaline phosphatase. These results suggest that TBP may affect the hepatic parenchymal cells and increase the drug metabolizing enzymes.

Keywords : 2, 4, 6-tri-*tert*-butylphenol, toxicity, dogs

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) はイヌに対してほとんど目立った毒性を示さないことが知られている¹⁻³⁾。われわれは前報⁴⁾においてBHTの構造類似化合物である2, 4, 6-トリ-*t*-ブチルフェノール (TBP) がげっ歯類に対してBHTより強い出血致死効果を有することを報告した。しかし、TBPの他の動物に対する毒性についての報告は少ない。そこでTBPのイヌに対する毒性について調査を行った結果、イヌに対しては出血効果および血液凝固阻害作用をもたないことがわかり、このことについては他誌に発表した⁵⁾。

本報告は、上記、イヌに対するTBPの効果のうち、出血致死効果以外の観察、検査結果を記載するものである。

実験方法

動物は10か月齢の雄ビーグル犬 (日本イー・ディー・エム) を使用した。飼料は1日1回日本クレア製ドッグフード (粗蛋白20.6%, カロリー360cal) を150g与えた。TBP (Aldrich Chemical Co., USA) は少量のスキムミルク、大豆油とともに上記飼料にまぶして与えた。用量はイヌあたり0, 0.37, 1.3, 3.9gである。なお、初めの2日間のみ最高用量は3.9gとしのち3.3gとおとして投与した。期間は11日間である。3.9gはラットにおける出血によるLD₁₀₀に相当する^{6, 7)}。

実験期間中、諸症状を観察し、11日目に血液検査を行った。検査項目はグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (GOT, GPT), アルカリホスファターゼ活性

(ALP), コリンエステラーゼ (CHE), 総蛋白量 (TP), グルコース量 (Glc), 総コレステロール量 (CHO), 尿素窒素 (UN), ナトリウム量 (Na), カリウム量 (K), カルシウム量 (Ca), 白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hgb), ヘマトクリット (Hct) である。

結果および考察

飼料摂取速度が高用量群で遅くなり、下痢が1.3g投与群の2匹、3.3g群の1匹に3~5日にかけて観察された。その場合1.3gの1匹および3.3g群の1匹は血便を伴っていた。最高用量群では2匹とも投与後まもなく、歩行異常 (酩酊状態), 眼瞼下垂, 体温低下の症状を呈した。これは程度を減しながら投与終了時まで続いた。

これらのことから考えてTBPはイヌに対し中枢神経系への作用を有していると考えられる。

血液成分の検査値を表1に示す。GOT, GPT, ALPが用量に相関して上昇した。

GPTはイヌにおけるもっとも感度の高い肝臓毒性の指標酵素であり、GPT, GOTの上昇はTBPに肝細胞実質障害効果の存在の可能性を示唆している⁸⁾。一方、ALPはイヌの場合、胆道系の異常を反映するよりも、肝細胞ミクロゾームの薬物代謝活性の上昇と相関することが多く、TBPの本酵素誘導作用の存在が示唆された^{7, 9)}。

要約

10か月齢の雄ビーグル犬に0.37, 1.3, 3.9~3.3g (初めの2日間のみ3.9g) のTBPを1日1匹あたり11日間与えた。最高用量群で行動異常が観察され、GOT, GPT,

* 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. Effects of Feeding TBP on Blood Components of Male Beagle Dogs^a

TBP (mg/kg)	0		49.2		173		454		
Dog No.	1	2	3	4	5	6	7	8	
GOT	61	55	79	50	75	106	92	119	P<0.05
GPT	27	32	82	25	72	133	76	249	P<0.05
ALP	12	11	28	12	31	27	28	76	P<0.05
CHE	0.29	0.33	0.30	0.28	0.19	0.22	0.32	0.49	
TP	71	75	73	74	69	89	76	65	
Glc	85	86	83	78	82	88	77	83	
CHO	142	202	226	220	210	310	186	102	
UN	15	10	13	10	10	9	27	12	
Na	146	160	156	162	146	150	154	174	
K	5.2	5.6	5.2	5.2	5.0	5.4	5.6	6.4	
Ca	12.8	13.6	10.5	10.2	10.0	12.1	14.5	12.5	
WBC	9.6	8.4	3.0	6.8	7.0	7.1	8.0	9.3	
RBC	6.31	6.09	5.25	6.02	5.88	5.91	5.63	6.39	
Hgb	14.2	14.2	12.6	13.1	13.8	14.5	13.9	14.6	
Hct	39.4	39.2	35.5	37.5	38.3	40.2	39.1	40.4	

GOT: glutamic-oxalacetic transaminase (Karmen U), GPT: glutamic-pyruvic transaminase (Karmen U), ALP: alkaline phosphatase (King-Armstrong U), CHE: choline esterase (4pH), TP: total protein (g/l), Glc: glucose (mg/dl), CHO: cholesterol (mg/dl), UN: urine nitrogen (mg/dl), Na (meq/l), K (meq/l), Ca (mg/dl), WBC: white blood cells (thousands), RBC: red blood cells (millions), Hgb: haemoglobin (g/dl) Hct: haematocrit (%).

ALP の用量に依存した上昇が認められた。

文 献

- 1) Deichmann, W.B., Clemmer, J.J., Rakoczy, R., and Bianchine, J.: *A.M.A. Arch. Industr. Hlth*, 11, 93, 1955
- 2) Karplyuk, I.A.: *Vop. Pitan.*, 19, 67, 1960
- 3) Wilder, O.H.M., Ostby, P.C., and Gregory, B.R.: *J. Agr. Food Chem.*, 8, 504, 1960
- 4) Takahashi, O., and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 811, 1978

- 5) Takahashi, O., Hayashida, S., and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 18, 229, 1980
- 6) Litchfield, M.H., and Gartland, C.J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 117, 1974
- 7) Leeling, J.L., Hartnagel, R.E., Bare, J.J., Fonnseca, E.H., Kraus, P.J., and Kowalski, R.L.: *Toxicology*, 4, 223, 1975
- 8) Keefe, R.T., Newberne, P.M., and Myers, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 15, 135, 1977

細胞障害時における脂質過酸化物の形成 (第1報)
四塩化炭素障害に対する BHT の作用

福 森 信 隆*, 平 賀 興 吾*

Formation of Lipid Peroxides in Cell Injury (I)
Effects of Butylated Hydroxytoluene on Carbon Tetrachloride-induced Intoxication

NOBUTAKA FUKUMORI* and KOGO HIRAGA*

Effects of butylated hydroxytoluene(BHT) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute intoxication were investigated in connection with formation of lipoperoxide and ultrastructural alterations. In the rat liver treated with 50% CCl_4 (1 ml/kg B.W.) dissolved in olive oil, prominent degeneration of hepatocytes such as accumulation of lipid droplets, disappearance of rough surfaced endoplasmic reticulum (RER), anomalous mitochondria and destruction of membrane in increased lysosomes as well as increased lipoperoxide were observed. By the addition of BHT (500 mg/kg B.W.), degeneration generally became moderate, and membrane of RER and mitochondria disappeared. The increase of lipoperoxide was also inhibited slightly. The increase of lipoperoxide induced by CCl_4 was inhibited by BHT in the heart and kidney, but structural changes showed appearance of small lipid droplets. Changes of lipoperoxide in serum was not obvious. Assay of lipoperoxide is important in investigating ultrastructural alterations; however, in some organs it doesn't necessarily follow that the structure should show an identical variations with lipoperoxide.

Keywords : butylated hydroxytoluene, carbon tetrachloride, ultrastructural changes, lipid peroxide, rat

緒 言

食品等に使用されるジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は油脂の変敗を抑制する抗酸化作用があり, *in vitro* で脂質過酸化反応を著しく阻害する¹⁾. 近年, 不飽和脂肪酸の自動酸化により生成される過酸化脂質は生体膜に障害を与え組織の変性を惹起することから退行性変性を伴う各種病変の予測指標として検討されつつある. 著者らはこれまでに種々の条件下で BHT が肝細胞の微細構造に及ぼす影響について検索したところ, 増殖した滑面小胞体 (SER) は BHT の代謝を反映した機能的変化と解し肝細胞の重篤な細胞壊死に至らないことを示唆した²⁻⁶⁾. 一方, 形態的に BHT と同様 SER の機能的増殖をもたらすフェノバルビタール (PB) は四塩化炭素 (CCl_4) の障害を増強するという報告⁷⁾がみられ, 肝障害に対する BHT の作用を検討する必要性が生じた. CCl_4 は肝ミクロソームで遊離基を生成せしめ過酸化脂質を増加させ膜系を破壊し細胞障害に導くことから⁸⁾, 細胞毒性を検索するうえで過酸化脂質の変動を把握する意義は大きい.

これらの観点から, CCl_4 の障害に対する BHT の作用を検討するとともに機能的指標とした過酸化脂質の変動と形態学的変化との関連について比較し論じた.

実験方法

動物は Fischer 系雄性ラット (F344/DuCrj) を室温 $25^\circ \pm 1^\circ$, 湿度 $50\% \pm 5\%$ の環境下で飼育用固型飼料 (日本クレア, CE-2) および水を自由に与え飼育馴化した後 10 週令で実験に供した. 投与前 16 時間絶食させ, 対照群はオリーブ油 (和光純薬) を, CCl_4 群はオリーブ油に溶解した 50% CCl_4 (和光純薬, 特級) を 1ml/kg 体重の割合で腹腔内投与し, BHT・ CCl_4 群は CCl_4 投与 1 時間前にオリーブ油で溶解した 500mg/kg 体重の BHT (和光純薬) を 2ml/kg 体重の割合で経口投与を行いその後 CCl_4 群と同様に CCl_4 を与えた. 投与後, 飼料は自由に摂餌させ 24 時間後屠殺し血液を採取した. 開腹後, 肝臓は 0.9% の生理食塩水で肝門脈から灌流操作を行い脱血した後試料に供した. 摘出臓器は肝臓, 心臓, 腎臓, 肺, 脳とし, 重量測定後一部電子顕微鏡用試料に分割した.

過酸化脂質測定法 各試料は 10% のホモジネートを作

* 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. Effects of BHT on Body Weight and Organ Weight in CCl₄-treated Rats

Group	Body weight (g)	Brain (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Liver (g)	Kidney R (mg)	Kidney L (mg)
Control	246.3 ^{a)}	1805.0 ^{b)}	704.3	761.3	9.76	829.6	828.0
	±14.18	±50.86	±32.13	±58.73	±0.20	±81.26	±83.35
		733.6 ^{c)}	286.0	308.8	3.97	336.4	335.8
		±23.83	±4.06	±6.15	±0.15	±18.01	±20.55
CCl ₄	245.0	1875.0	694.0	807.0	8.79	850.6	854.0
	±16.64	±11.00	±57.16	±49.36	±0.84	±42.66	±44.84
		767.9	283.5	329.8	3.58*	347.5	348.9
		±58.40	±19.08	±18.79	±0.10	±8.70	±13.01
BHT + CCl ₄	228.0	1847.2	664.0	720.5**	8.75*	822.5	836.0
	±12.46	±51.11	±51.72	±16.01	±0.39	±29.03	±26.45
		811.1*	291.1	316.9	3.84**	361.3	367.2
		±26.66	±15.22	±22.61	±0.07	±19.90	±16.94

a) Values expressed as mean ± standard deviation and derived from three or four rats per groups.

b) Absolute weight c) Relative weight (g or mg/100 g body weight)

* P<0.05 as compared to control group

** P<0.05 as compared to CCl₄-treated group

製しる過後、チオバルビツール酸 (TBA) の呈色反応を応用した八木らの方法⁹⁾に従い 0.2ml を採取し 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% 酢酸緩衝液 1.5ml, 0.8% TBA 溶液 1.5ml を加え蒸留水で全量 4ml に調整し、95° 1 時間加熱反応を行い冷却後蒸留水 1ml を加え *n*-ブタノール・ピリジン混液 (15:1) 5ml で抽出し 532 nm で吸光度を測定した。TBA 反応物質として標準液に 1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane (東京化成) を使用し、反応した malondialdehyde (MDA) を Lowry 法¹⁰⁾により測定した蛋白量当りに換算して示した。また、血清中の過酸化脂質量は蛍光法による微量測定を行った¹¹⁾。

電子顕微鏡用試料作製 電顕用試料は摘出臓器のうち過酸化脂質の変動が大きい肝臓、心臓、腎臓に限定し試料を作製した。放血屠殺後、一定部位から細切した試料をパラホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) を用い前固定、オスミウム酸 (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) で後固定を行い、定法に従いエタノールで脱水し、Epon 樹脂に包埋した。包埋した電顕用試料から厚さ約 1μm の切片を得、トルイジン青で染色し光顕的に観察後、超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し日立 HU-12 A 型電子顕微鏡にて検鏡観察した。

実験結果

臓器重量 全体的に著変は認められず BHT・CCl₄ 群の軽度な体重抑制が肝臓を除いた各臓器の相対重量値の増加傾向に反映しているに過ぎなかった。肝臓は CCl₄

群で対照に比べ減少がみられるが、BHT・CCl₄ 群では CCl₄ 群と比較して相対重量値の増加が有意を示した (Table 1)。

過酸化脂質量 Fig. 1 に各臓器は 100mg 蛋白量当り、血清は 1ml 血清当りの過酸化脂質量を TBA 反応の陽性物質で示した。CCl₄ 群で心臓、肝臓、腎臓に有意な増加がみられ、BHT 投与により心臓、腎臓の抑制が認められたが肝臓の抑制は軽度であった。肺は CCl₄ 群で若干上昇し BHT で抑制傾向がみられたがその変動は少なかった。脳は CCl₄ 群、BHT・CCl₄ 群ともほとんど変動が認められなかった。また血清中の過酸化脂質は CCl₄ 群で若干の低下がみられたが BHT の影響は少なく対照に比べ有意な変動を示さなかった。

電子顕微鏡的所見 肝臓ではトルイジン青による光顕的観察で CCl₄ 群の小葉中間帯の肝細胞内に脂肪滴が顕著に増加し核に類似した大きさをもつ大型脂肪滴も散見され、好塩基性顆粒の減少を伴っていた。小葉中心帯の肝細胞は淡染化を呈し空胞形成を認め好塩基性顆粒の減少が著しく、変性の強度な細胞では核の消失を伴った網状構築を示した。BHT・CCl₄ 群では小葉中間帯の脂肪滴の形状は比較的小さく、CCl₄ 群に対し著しい抑制は認められなかった。脂肪滴の散在する細胞の好塩基性顆粒は全体に減少を示した。また脂肪滴の少ない細胞では核、核小体の発達が良好で核周囲の淡染化が認められた。電顕的観察は脂肪滴の沈着がみられた小葉中間帯を主に行った。

CCl₄ 群では粗面小胞体 (RER) の層状配列が不整を

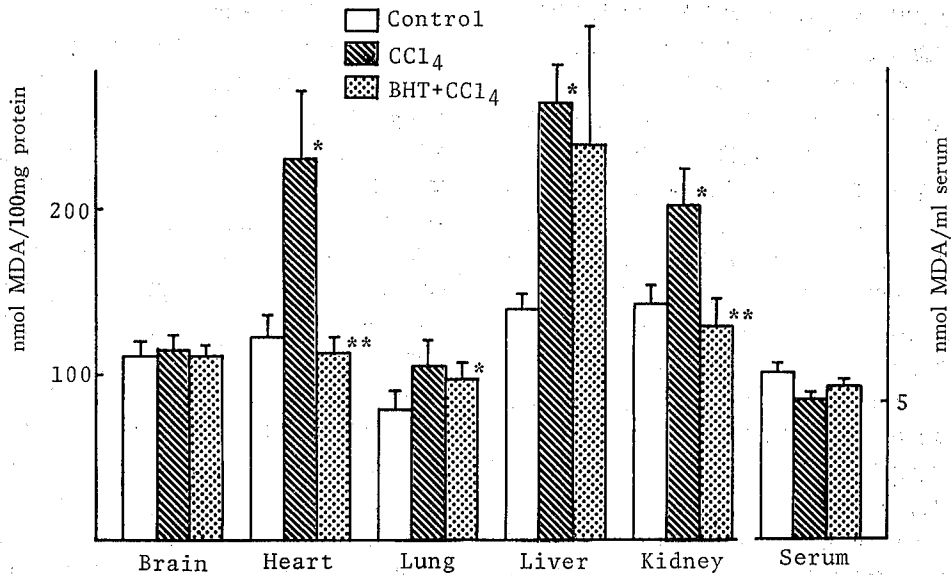


Fig. 1. Effects of BHT on Lipid Peroxides in CCl₄-treated Rats. Bars expressed as mean $\pm$ standard deviation and derived from three or four rats per groups.

* $P < 0.05$ as compared to control group

** $P < 0.05$ as compared to CCl₄-treated group

呈し、ribosome の離脱、消失傾向がみられ、残存する RER は糸粒体の周囲を取り囲む像が多く散見された。Glycogen 顆粒は消失しその部の細胞質では離開がみられ小空胞の形成を伴った。SER の増殖は中等度に認められ伸長、拡張した形状がみられた。糸粒体は長形くびれ像を呈し強度に伸長したものは輪状を呈した。Lysosome は対照群で細胞境界の毛細胆管周囲に確認されるが、CCl₄ の投与により細胞質内に広く散在性に増加し多くは一次 lysosome を呈したが顆粒状の異物を貪食して膜構造が消失したものも認められた (Photo 2)。障害の著しい細胞では核が不規則な輪郭を呈し chromatin の核周囲への凝集、核膜の消失がみられ細胞質が多くの小空胞で占められ、糸粒体の膨化、変形、cristae の消失、糸粒体膜の破壊を認めた。RER、ribosome は消失が顕著で確認できなかった。BHT・CCl₄ 群では細胞質の離開、小空胞の形成がほとんどみられず、核の変形も軽度であった。RER は層状配列の乱れ、膜の消失が認められ脱落した ribosome は curling を呈し残存した。Glycogen 顆粒は全体に減少し glycogen 野で中等度の SER の増殖がみられた。糸粒体は膨化、巨大化を呈するものが多くその部の限界膜の崩壊が認められるが、CCl₄ 群でみられた輪状変形はみられず cristae の異常、基質の電子密度の変化も少なかった。Lysosome は増加するが CCl₄ 群ほど著しくなく、また microbody の増加が明瞭であ

った (Photo 3)。

心臓はトルイジン青の光顕標本で各群間に差異が認められず一様に対照群の所見を呈した。電顕的観察で CCl₄ 群は対照群の糸粒体が円形あるいは楕円形を呈するのに比べ伸長した長形の糸粒体がしばしば観察されたが構造的な異常は認められなかった。また糸粒体間に小脂肪滴を貯留した電子密度の高い顆粒が散見されたが、筋原線維の変化はみられなかった (Photo 5)。BHT・CCl₄ 群では糸粒体の長形化がわずかにみられ、糸粒体に隣接する均質な小脂肪滴が CCl₄ 群同様に出現した (Photo 6)。その他対照群に比べ著しい差異を認めなかった。

腎臓の尿細管について光顕的所見で CCl₄ 群は基底部に及ぶ均一無構造物質が貯留した空胞形成を認める細胞が散在性に分布し、BHT・CCl₄ 群でも CCl₄ 群に比べより少数ではあるが同所見が観察された。また電顕的には CCl₄ 群で brush border の隣接する細胞質に lysosome の増加がみられ、近傍の吸収空胞が拡張し大型の空胞を形成する細胞では糸粒体の膨化、変形を呈した。BHT・CCl₄ 群では細胞質内に比較的大きな脂肪滴の沈着がみられるが lysosome の増加、吸収空胞の拡張とも CCl₄ 群に比べ軽度であった。その他上皮細胞の脱落、基底膜、brush border の著変は認められなかった。

考 察

生体内で形成される遊離基が過酸化脂質を生成せし

め、その生成部位が不飽和脂肪酸を多量に含む生体膜であるために膜構造、透過性の変化が起こり生体膜の障害が発生する。細胞膜あるいは organelles 膜の機能的構造的変化は組織の変性へと移行することから病理学的変化を初期段階で把握するには膜構造の異常をとらえると同時に過酸化脂質の測定が重要と考えられる。近年、過酸化脂質が退行性病変、老化との関連において、特に循環器疾患、肝および腎疾患、急性炎症性疾患、オキシダントによる肺障害¹²⁾、酸素中毒¹³⁾などで増加が認められ臨床的意義が注目され¹⁴⁾、疾病を予測するための一指標として期待されつつある。このような視点から微量定量が可能となった現在、実験動物での過酸化脂質の変動は生体内の異常を察知する有効な指標と考えられる。本報告は過酸化脂質の変動と形態変化との関連を明らかにするため遊離基の生成が知られている CCl_4 で障害を起こし各臓器、血中の過酸化脂質の濃度と微細構造の変化を比較し、あわせて酸化防止剤 BHT の CCl_4 障害に対する作用を調べた。

CCl_4 は肝細胞で脂肪滴の蓄積を起こしその際他の organelles にも顕著な変化を与えた。膜構造に関して RER は不規則な配列をなし著しい消失がみられ、糸粒体の膨化、cristae の消失、糸粒体膜の破壊、また増加した lysosome は一層の限界膜の消失が観察され、これらの形態的所見から明らかに膜の機能障害が疑われる。この状態下で肝臓の過酸化脂質量は、顕著に増加するため CCl_4 による膜障害に過酸化脂質が関与していると考えられる。Recknagel¹⁵⁾ は CCl_4 が肝ミクロソームで遊離基を生じ、脂質過酸化が促進され不飽和脂肪酸を多量に含む膜系に障害を与えるためリポタンパク質の形成を阻害し血中への脂質の放出が抑制され脂肪肝が発生すると報告した。さらに糸粒体の膨化¹⁶⁾、lysosome 膜の破壊による加水分解酵素の放出¹⁷⁾、小胞体の変化¹⁸⁾など過酸化脂質との関与を推測する報告がみられる。今後、膜破壊が容易におこる lysosome の遊出酵素をも測定することが細胞障害の検出に必要と思われる。

BHT は CCl_4 肝障害に対し過酸化脂質を抑制するがその効果は弱かった。形態的には CCl_4 群の脂肪滴沈着に比べわずかに抑制がみられたが、対照群より多量の沈着が認められた。RER の消失、糸粒体の膨化、限界膜の破壊など認めるがいずれも CCl_4 群より軽度であった。このことは形態的に BHT が CCl_4 の障害を抑制する傾向を示し、過酸化脂質の変動とかなり一致していると思われる。BHT 投与の際にみられる SER の増殖の程度は 500mg/kg 体重の高用量にもかかわらずこれまで行った実験²⁻⁶⁾に比べ軽度であった。 CCl_4 が organelles の膜に

損傷を与えるため薬物代謝が低下し SER の増殖が抑制されたと示唆されるが、一方障害の軽度な脂肪滴の蓄積が少ない細胞では核周囲の glycogen 野に多くの SER の増殖がみられた。また PB が CCl_4 の小胞体に作用し肝障害を増強させるという報告⁷⁾から、SER の増殖が同様にみられる PB と BHT では作用に相違がみられ、これらの BHT での変化は過酸化連鎖反応を停止させる抗酸化作用によると考えられる。松永ら⁹⁾は BHT が malondialdehyde の生成段階で過酸化反応を阻害することを認めており、機能的動態が形態的变化と密接に関連すると推察される。

心臓は CCl_4 投与で過酸化脂質の増加がみられ、形態的には糸粒体に隣接して小脂肪滴を含有する顆粒が出現した。この顆粒は正常細胞でも時折散見する lipofuscin と思われ、lipofuscin が過酸化脂質と蛋白との複合体であることから CCl_4 により顆粒が増加したことは心筋細胞で過酸化反応が行われていることを提示している。しかし筋原線維など正常構造を呈していることから、形態的变化が増強されるのは 24 時間以降と思われる。BHT 投与で過酸化脂質量の抑制にもかかわらず糸粒体間に小脂肪滴の出現がみられたことは理解し難く CCl_4 でみられた顆粒が高い電子密度を示すのに対し均質な脂肪滴であったことから lipofuscin と異なり単なる脂肪滴と考えられるが明らかでない。

CCl_4 は腎臓の近位尿細管で空胞形成がみられ糸粒体の膨化、lysosome の増加が観察され過酸化脂質量の増加と関連がみられる。しかし BHT で形態的变化は若干軽減したにすぎず、それに対し過酸化脂質量は対照レベルまで抑制しており形態変化との相違が感じられる。また BHT・ CCl_4 群でみられた細胞質中に沈着する脂肪滴は心臓の BHT・ CCl_4 群にも観察されこれまでの実験²⁻⁶⁾と対比して BHT 単独では脂肪沈着を起こさないことから CCl_4 の作用と思われるが、本来 BHT の持つ抗酸化作用とを考えると逆に考察され沈着した意義は明らかでない。 CCl_4 と BHT の標的臓器に対する侵襲の相違が肝臓と異なる形態変化を与えたと考えられる。

脳、肺の変動は少なく、また血中の変化は CCl_4 でもほとんど認められない。Nakakimura らも CCl_4 で血中の過酸化脂質の増量がみられないことを報告¹⁹⁾しており必ずしも臓器、血中の相関が明らかでない。

CCl_4 肝障害に対し BHT は形態的变化、過酸化脂質の変動とも抑制傾向を示し、過酸化脂質量と構造変化の関連がみられた。一方、心臓、腎臓では BHT の作用に形態的变化と過酸化脂質の変動で差異がみられ、さらに検討を要すると思われる。以前から食品中の油脂の変敗

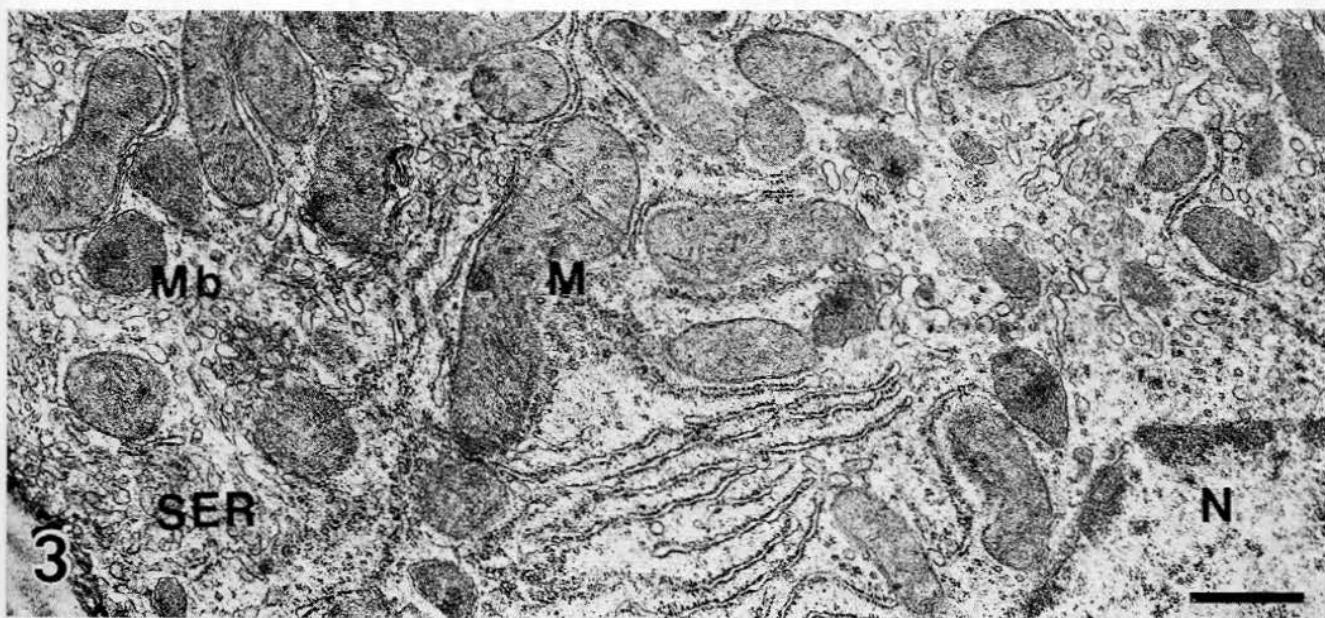
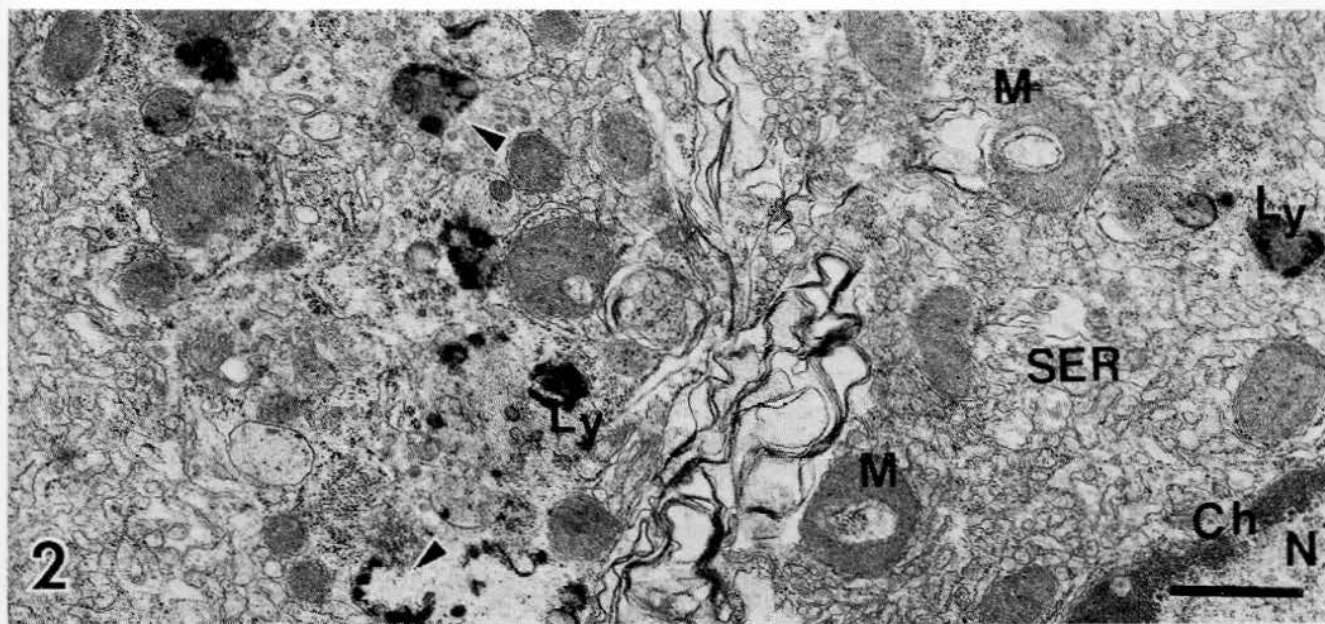
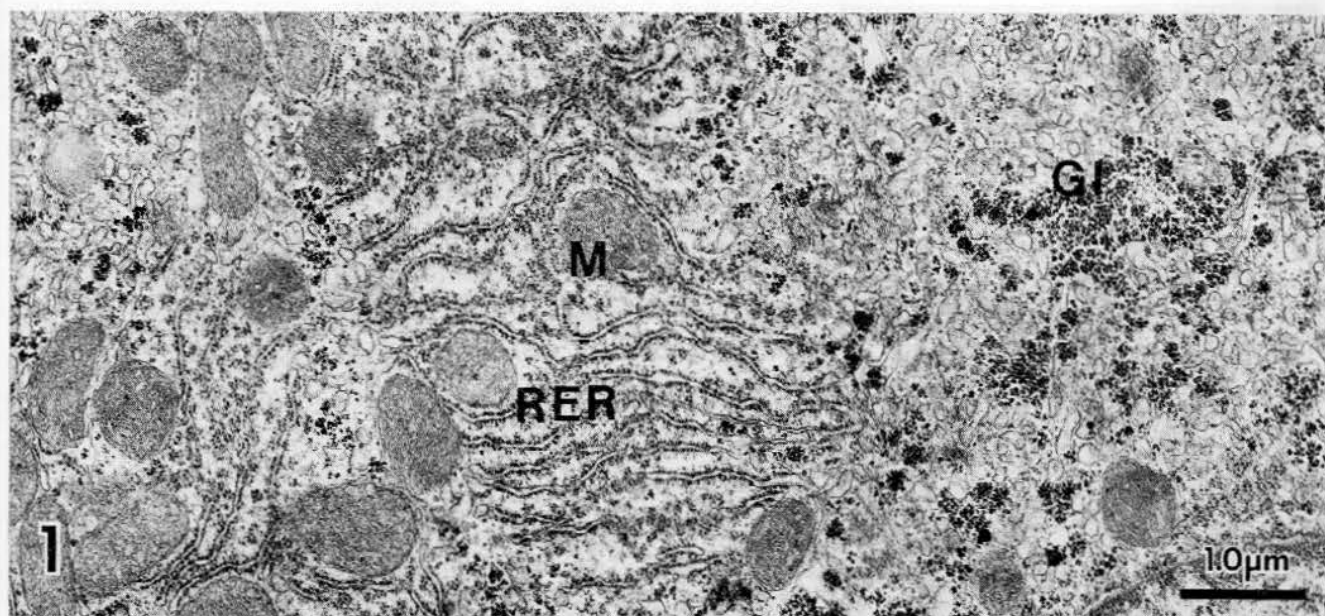
に過酸化脂質の測定がなされてきたが、生体への作用に関する基礎的知見は少なく解明が不十分であり、特に機能と形態に関し今後経時的に変動を把握する必要があると考える。

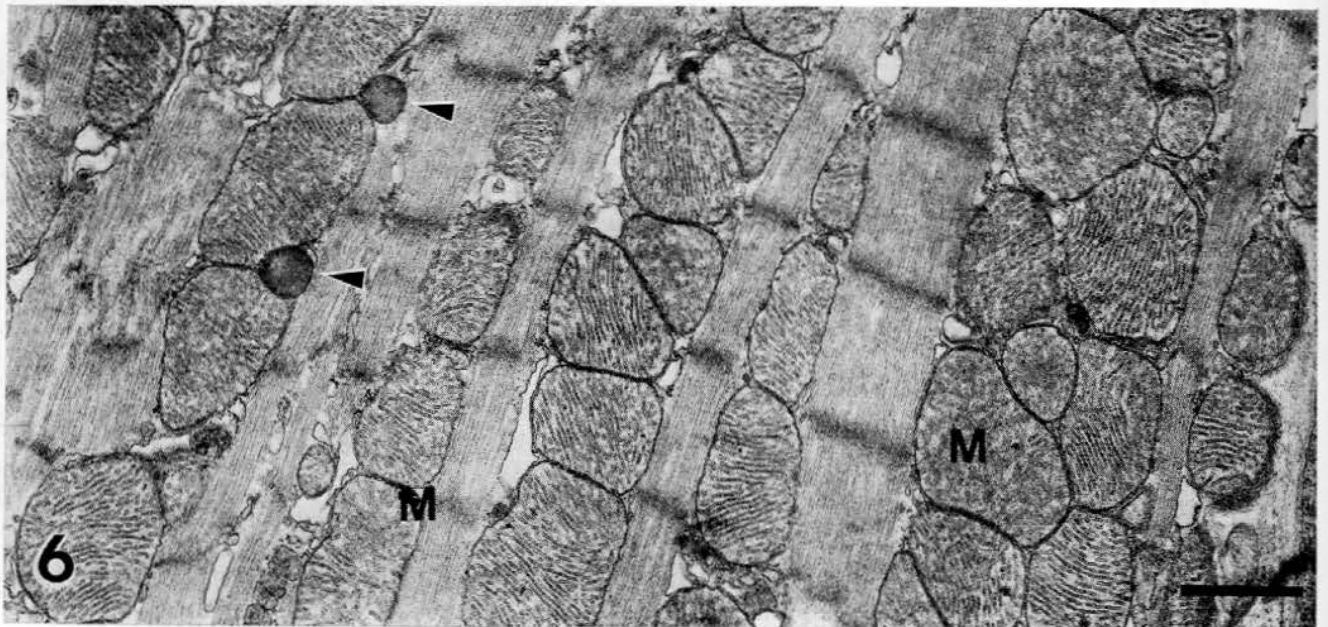
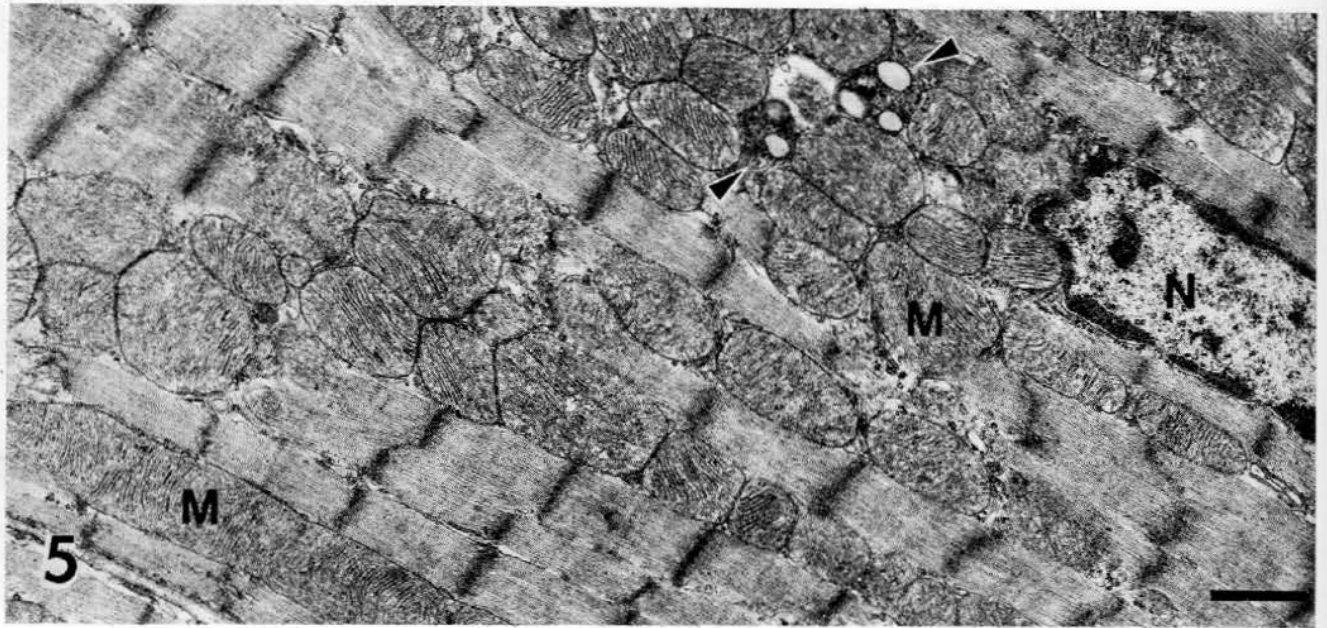
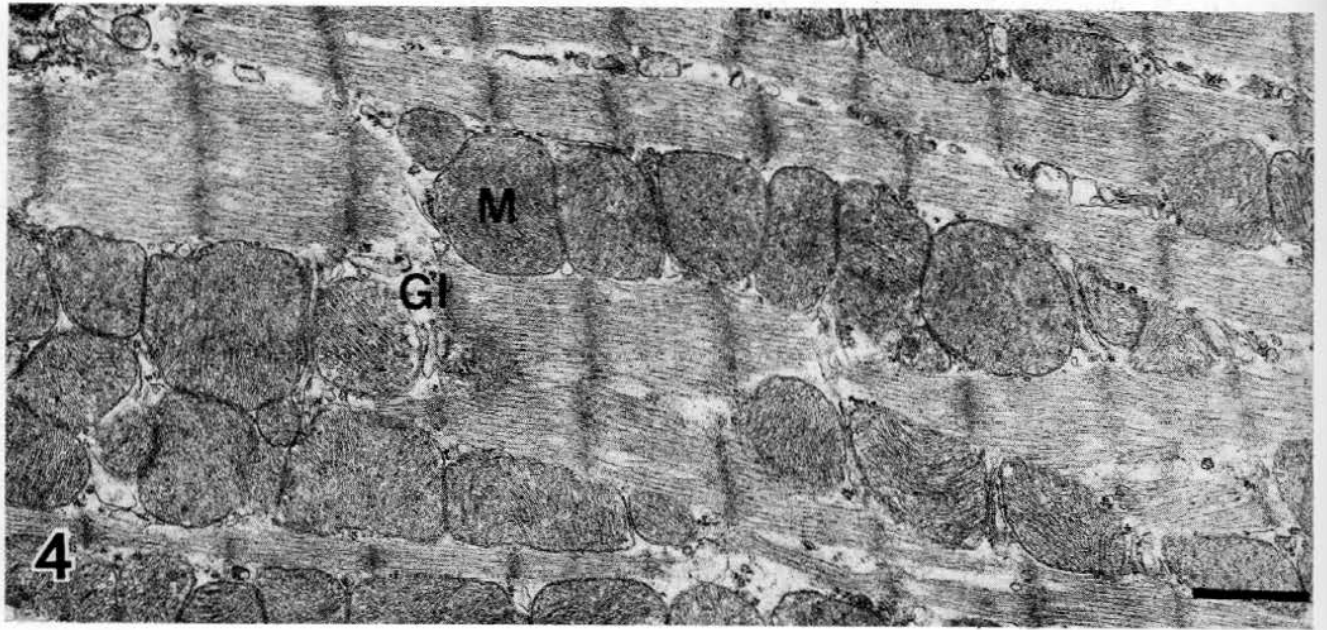
文 献

- 1) 松永和義, 今中雅章, 石田立夫, 小田琢三: 食衛誌, 20, 10, 1979
- 2) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 67, 1976
- 3) 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
- 4) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 24, 1978
- 5) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 31, 1979
- 6) 福森信隆, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 67, 1980
- 7) Reynolds, E.S., Ree, H.J., and Moslen, M.J.: *Lab. Invest.*, 26, 290, 1972
- 8) Cessi, C., Colnmbini, C., and Mameli, L.: *Biochem. J.*, 101, 460, 1966
- 9) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.: *Analyt. Biochem.*, 95, 351, 1979
- 10) Lowry, O.H.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
- 11) Yagi, K.: *Biochem. Med.*, 15, 212, 1976
- 12) Goldstein, B.D., and Balchum, O.J.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126, 356, 1967
- 13) Haugaard, N.: *Physiol. Rev.*, 48, 331, 1968
- 14) 八木國夫他: 臨床病理, 29, 221, 1981
- 15) Recknagel, R.O.: *Pharmacol. Rev.*, 19, 145, 1967
- 16) Hunter, F.E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 238, 828, 1963
- 17) Desai, I.D., Swant, P.L., and Tappel, A.L.: *Biachim, Biophys. Acta.*, 86, 277, 1964
- 18) May, H.E., and McCay, P.B.: *J. Biol. Chem.*, 243, 2288, 1968
- 19) Nakakimura, H., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 2207, 1980

Explanation of Photographs

- Photo 1. A portion of hepatocyte from a control rat. Lamella of rough surfaced endoplasmic reticulum (RER), glycogen particles (GI) and mitochondria (M) are seen. $\times 15000$
- Photo 2. A portion of hepatocyte from a rat treated with CCl_4 . The lack of RER, deformation of mitochondria (M) and aggregates of smooth surfaced endoplasmic reticulum (SER) are observed. Increased lysosomes (Ly) show destruction of membrane frequently (arrow head). Condensation of chromatin (Ch) are seen in the nucleus (N). $\times 15000$
- Photo 3. A portion of hepatocyte from a rat administered with BHT 1 hour before the treatment of CCl_4 . Mitochondria (M) shows swelling and disappearance of membrane. Slight proliferation of SER in the glycogen area is observed and the number of microbodies (Mb) increased. $\times 13000$
- Photo 4. A portion of myocardium from a control rat. There is shown the arrangement of round shaped mitochondria (M) among many myofibril. $\times 14500$
- Photo 5. A portion of myocardium from a rat treated with CCl_4 . Some mitochondria (M) show lengthened form and high density granules (arrow head) are similar to lipofuscin. $\times 11500$
- Photo 6. A portion of myocardium from a rat administered with BHT 1 hour before the treatment of CCl_4 . Small lipid droplets (arrow head) are adjacent to mitochondria (M). $\times 14000$





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—
吸入後終生飼育ラット呼吸器系の病理学的観察

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 1
Month—Pathological Observation of Respiratory System of the Rats kept
for Lifespan after the Periods of Exposure

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

Slc-Wistar rats (5-weeks old) were exposed to chromite ore residue at 20 mg/m³ for 30 days. After the periods of exposure, the animals were transferred to barrier-room and kept under observation until they died or became moribund. In these animals, histological changes by chromite ore residue dust on respiratory system were observed and compared with that of rats exposed to JIS dust No. 11. Mean body weight were lower than control and JIS dust group throughout post-exposure periods, however the trend of its increasing curve were similar to them.

Mean lifespan were also similar to the other two groups.

Histologically, in the chromite ore residue dust group, increase of cell height in tracheal epithelium with increase of glands were observed throughout lifespan after the periods of exposure and focal aggregation of large mononuclear cell and polynuclear giant cell were observed from 92nd week of the post-exposure periods. These changes were not observed in control and JIS dust groups.

Keywords : Chromite ore residue dust, rat, inhalation toxicity, observation for lifespan

緒 言

クロム鉱さい粉じんを1か月間吸入曝露したラットを曝露終了後バリアー動物室に移して飼育をつづけ、鉱さいの生体への影響について終生に亘って観察をおこなった。そのうち曝露終了後1, 3, 6, 12か月目までの結果はすでに報告した¹⁾。鉱さい粉じんを曝露したラットでは、同濃度の関東ローム粉体を曝露したラットに比べ、気管粘膜上皮の細胞高の増加や肺実質の損傷を伴うより強い変化が観察された。これらの変化は鉱さいの可溶性成分による直接的な作用によるものであったが、曝露を中止することにより、肺実質の変化はとくに悪化することなく回復し、また気管粘膜の変化は終了後12か月でも軽減するもののひきつづき認められた。また肺内に吸入された粉じん粒子は終了後12か月を経ても大食細胞に貪食された状態で肺胞内やリンパ組織内に残存していた。本報では終了後12か月目以後終生に亘って飼育したラットについて、肺内に残存する粉じんの挙動や、それらによってひきおこされる組織変化など、終了後の生育過程における鉱さいの影響の有無を観察し得られた結果のうち、

体重の増加推移、死亡経過、呼吸器系における組織変化について述べる。

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、吸入実験は1群20匹として、鉱さい粉じんおよび比較対照として JIS の試験用粉体 11 種 (関東ローム) の 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、粉じん吸入装置²⁾を用いて30日間昼夜連続で行なった。実験に用いたクロム鉱さい粉じんのクロム含量は、総クロム2.8%、水溶性クロム1.2%であった。鉱さい粉じんと JIS 粉体の調整法、化学的性状の詳細、吸入チャンバー内飼育条件については前報³⁾で示したとおりである。またチャンバー内の粉じんの粒度分布は両群とも 4.7 μ 以上15%, 4.7~2.1 μ 50%, 2.1 μ 以下35%であった。

曝露終了後各群2例を屠殺し、残りをバリアー動物室に移し、1ケージに3匹収容して飼育した。曝露終了後12か月目(53週目)に、各群3例を屠殺した他は、残り15匹については死亡または頻死状態になるまで飼育をつづけた。吸入曝露期間およびバリアー内飼育中、クレア

* 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

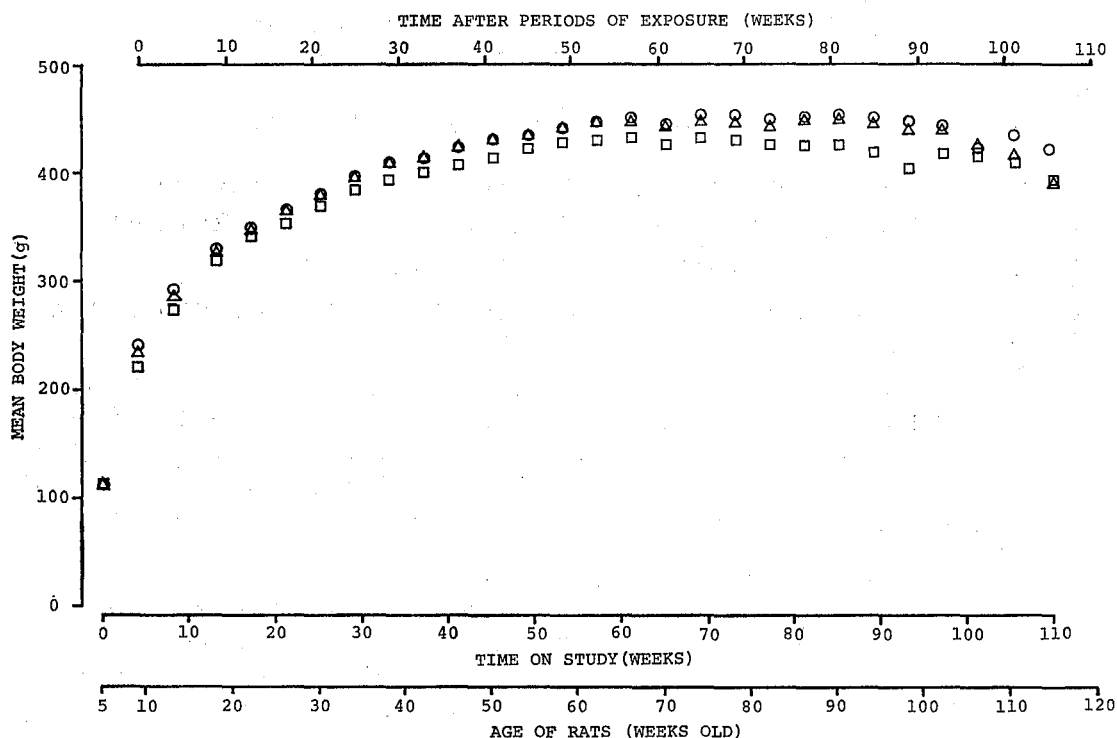


Fig. 1. Growth Curves of Rats kept for Lifespan after the 1 Month-Exposure to Chromite Ore Residue Dust

(○) Control, (△) JIS dust No. 11 : 20 mg/m³, (□) Chromite ore residue dust : 20 mg/m³

製固型飼料 CE-2 と水道水を自由に摂取させた。体重は 85 週目までは 2 週間毎に、以後毎週 1 回測定し、同時にラットの外見、挙動を観察した。

飼育期間中、死後発見例は各群 15 例中、対照群 7 例、JIS 粉体群 5 例、鉍さい群 1 例であり、その他は頻死屠殺例である。頻死屠殺例は、体重の著明な減少、貧血、四肢の麻痺が見られるラットに注目し、これらが、体温の低下や刺激を与えても反応せずに横転する等の症状を示した時点を死の直前の状態と判断して屠殺したものである。屠殺法は大腿部動静脈の切断、放血によった。

すべての動物について剖検し、剖検後諸臓器を摘出、10% 緩衝ホルマリン液で固定し組織標本を作製した。肺は結紮した気管より固定液を 10~12cm 水柱圧で注入、再膨張させて標本を作製した。

結果および考察

1. 体重および一般症状 Fig. 1 に曝露終了後 109 週 (118 週令) までの各群の体重増加曲線を示した。飼育期間を通して、鉍さい群では対照、JIS 群に比べ小さな値を示しているが、増加推移の傾向は同様であった。前報¹⁾

で示したように鉍さい群では 30 日間曝露によって増加が抑制されたために、終了時他の 2 群に比べ小さく、その後もその関係が持続しているが、増加の割合には対照および JIS 群と比べ差がないものと思われる。

一般症状は、とくに鉍さい群のラットで鼻腔および咽喉よりブツブツ、クブクブ、クークー等の音を発生する症状が認められた。この変化は飼育期間中、ほぼ 80 週目までの毎回の観察時に常に半数以上のラットに、また 80 週以後も、毎回の観察時に認められる頻度は徐々に減少するものの、生存するラットの終生に亘って認められた。また、この症状は前報¹⁾で示したように、曝露終了時より認められ、終了後 26 週目までは 1~4 例であったが、その後増加し、53 週目 (12 か月) までに半数以上のラットに認められたものである。飼育期間中以上の症状を示しているラットの動作や外見は、特に頻死状態や外部腫瘍の発生している場合を除き対照、JIS 群と比べ異常はなかった。

2. 死亡経過の推移 Fig. 2 に各群の生存曲線を示した。対照および JIS 群では終了後 123 週目 (132 週令) ま

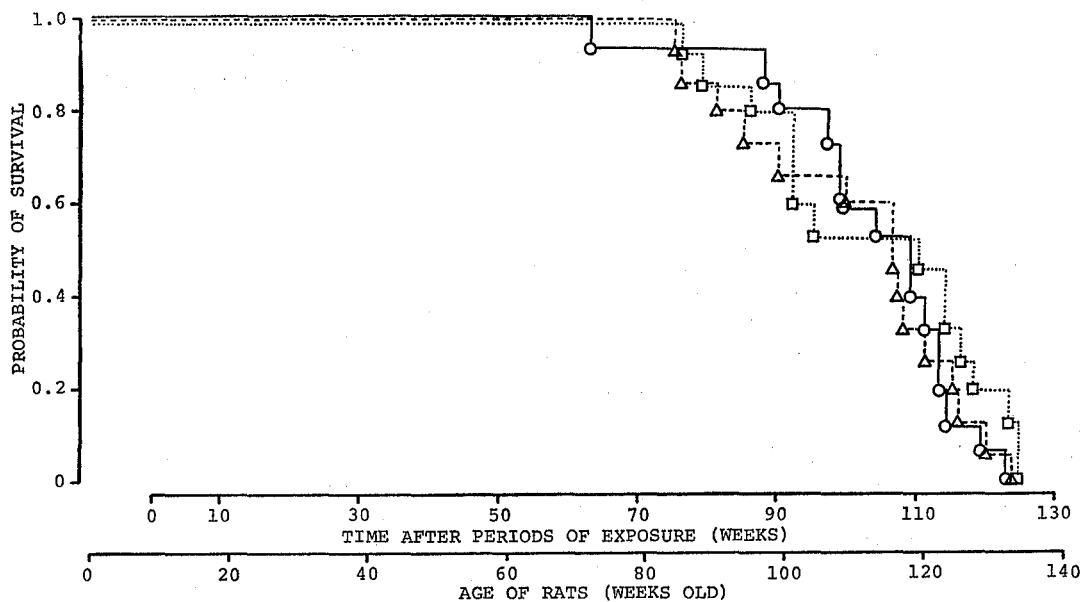


Fig. 2. Survival Curves of Rats kept for Lifespan after the 1 Month-Exposure to Chromite Ore Residue Dust
(O—O) Control, (Δ---Δ) JIS dust No. 11 : 20 mg/m³, (□.....□) Chromite ore residue dust : 20mg/m³

Table 1. Histopathological Findings of Lung

Group	Control			JIS dust			Chromite ore residue dust		
	15			15			15		
Number of rats observed	SL	MO	MA	SL	MO	MA	SL	MO	MA
Grades of changes									
Increasing of cell height in epithelium of trachea	0	1	0	0	0	0	12	1	0
Increasing of number in tracheal glands	1	0	0	3	0	0	4	4	0
Increasing of cell height in epithelium of bronchioles	2	1	0	2	0	0	8	2	0
Focal hemorrhage	3	1	1	2	0	0	3	1	0
Edema	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Calcification of alveolar wall	2	1	0	1	4	0	0	1	0
Aggregation of large mononuclear cell and polynuclear giant cell	0	0	0	0	0	0	4	3	1
Hyperplasia of alveolar cell	1	0	0	1	1	0	1	0	1
Focal pneumonia	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Mononuclear cell leukemic infiltrates	1	1	2	2	1	0	3	1	0
Metastatic carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Grades of changes, SL : Slight, MO : Moderate, MA : Marked

で15匹全例が、鉍さい群では13例が死亡または頻死屠殺された。鉍さい群の生存曲線の傾向は、飼育期間を通して対照、JIS 群と同様であり、死亡経過の推移には特

に変化はみられなかった。また平均寿命は、対照群 112 ± 15週、JIS 群 110 ± 16週、鉍さい群 112 ± 16週であり各群の間に差はなかった。

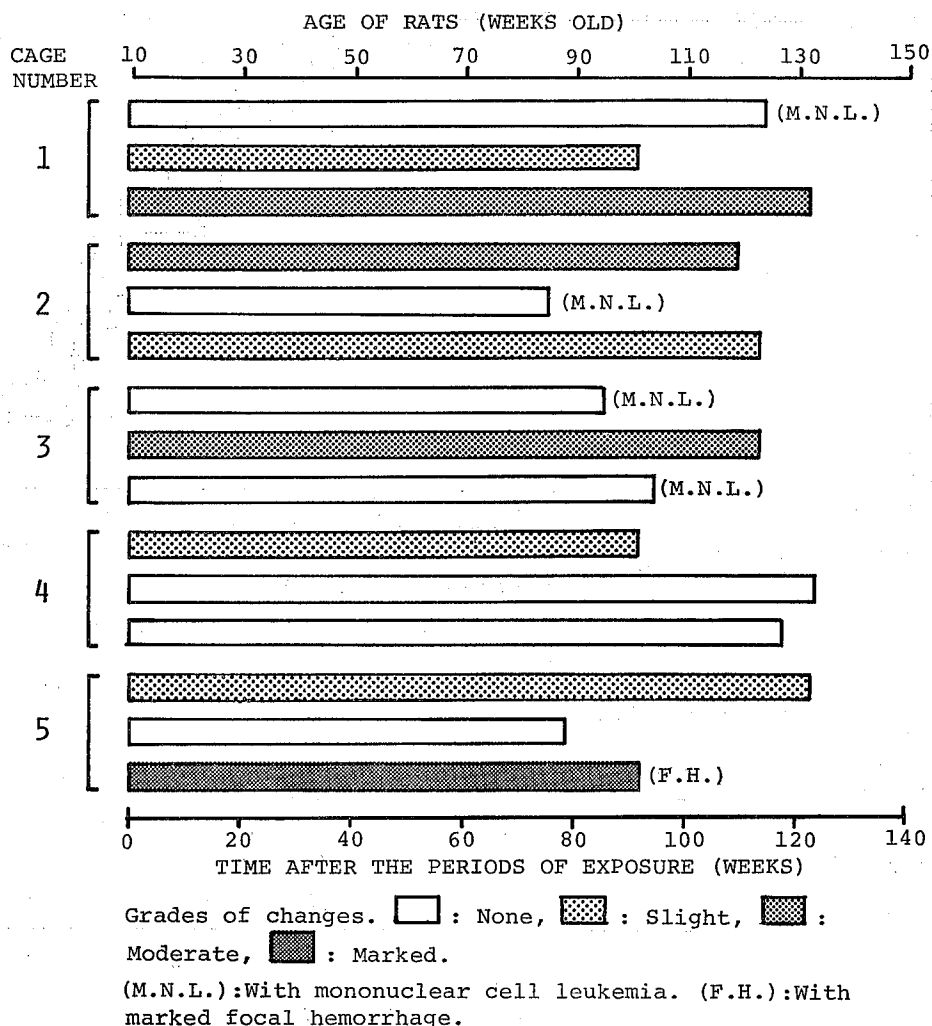


Fig. 3. Grades of Focal Aggregation of Large Mononuclear Cell and Polynuclear Giant Cell in Lung and Survival Time of the Rats kept for Lifespan after the 1 Month-Exposure to Chromite Ore Residue Dust

3. 組織学的観察 各群の呼吸器にみられた組織変化を Table 1 にまとめて示した。そのうち気管粘膜の変化と、大単核細胞や多核巨細胞の集簇は鉾さい群のみに認められた変化であった。

気管における変化は粘膜上皮の細胞高の増加が鉾さい群のほぼ全例で認められ、主に喉頭に近い部位の粘膜上皮にみられた。またその多くが同じ部位に存在する気管腺の増加を伴っていた。これらの変化は軽度なものであったが、肺に出血をみた例では程度が強くなっていた。しかし対照群では、出血をみた例では特に変化はなく、気管粘膜上皮の中等度の細胞高の増加は、甲状腺癌によ

るものであった。肺内各気管支における粘膜上皮の細胞高の増加も、後述する大単核細胞の集簇がみられた鉾さい群で多く、また対照群や JIS 群でも顕著な出血、水腫やその他炎症性変化によく伴ってみられたが、気管粘膜上皮の変化は、以上の肺実質の変化とは必ずしも一致しなかった。気管における変化は前報¹⁾で示したように、曝露終了時より認められ、終了後3～6か月目で程度が強くなり、12か月目(53週目)では軽減するもののひきつづきみられた変化であった。さらに今回の観察結果より、この変化が終生飼育ラットにおいても見られたことは、鉾さい成分の直接的な作用によって生じた変化

が、慢性的な変化として残っているものと考えられ、肺胞領域に比べ、気管の喉頭に近い部分がより粒径の大きい、高濃度の粉じんに曝露されたことを示唆するものと考えた。また前述した呼吸の際にきかれたプツプツ、クークー、クブクブ等の音は、以上の呼吸器症状を反映したものである。

大単核細胞や多核巨細胞の集簇も鉍さい群にのみ認められた変化であった。集簇巣は細気管支末端の気道内や周辺の肺胞内に主に存在していた (Photo 1)。主に集簇巣を形成する大単核細胞は、細胞質が多い円形または多角形の細胞で、細胞質はエオジン好染性のものからヘマトキシリンでやや青色を帯びているものまでみられ、泡沫状であった。また多核巨細胞は、数個から十数個の核が細胞質の辺縁に輪状や馬蹄状に配列していたり、または一部分に密に集まっていて、細胞質はエオジン淡染で泡沫状であった。巨細胞は集簇巣内だけでなく遊離の状態でも存在していた。集簇巣は初期には大単核細胞がまばらに集まっている状態であるが、しだいに巨細胞も出現し、大きさを増し、程度の強い例では結節状をなしていた (Photo 2)。集簇巣の周囲には線維の増生は認められず、内部に粉じんの存在はわずかにみられる場合もあるが、多くはほとんどみられなかった。Fig. 3 にこの変化の程度と、ラットの生存期間を示した。変化は92週令より15例中8例にみられたがその程度と生存期間には特に関係は認められず、この変化が死因となるものではないと考えられた。また各ケージ内での変化の出現および程度は、ケージによって一定の傾向はなく、この変化が感染性のものではないと思われた。図示したように全く変化の見られなかった7例中4例は、いわゆる単核球白血病例であり、肺胞壁に白血病細胞の浸潤を見た例である (Photo 3)。また程度の強い例では、顕著な限局性出血を伴った例であり、この変化の出現や程度が他の病変によって影響されうるものと思われた。

ベリリウムの曝露によって生じる慢性的な病変でも、大核細胞や巨細胞の集簇がおこりさらには肉芽腫の形成が、曝露後数か月ないし数年以後に緩徐に発現することが知られている⁴⁵⁾。しかしこのような変化は、ベリリウムによる病変に特徴的なものではなく、慢性的な炎症反応の一つと考えられている。前報¹⁾で示したように、鉍さい群では、終了時肺胞上皮の剥離、肺胞壁の非薄化、大食細胞等の崩壊残渣と思われるタンパク様物質の肺胞内の蓄積などの変化がみられた。それらの変化は、鉍さいの可溶性成分による直接的な作用と考えられ、曝露を中止することにより、その後とくに悪化することなく軽減し、終了後3か月 (13週間) までには対照と同様で異常

はなくなった。今回観察された終了後80週を経て新たに生じた変化と終了時における変化や鉍さいの作用との関係の有無については推論できなかったが、クロムが大単核細胞の集簇や多核巨細胞の出現を促すという事は知られていない。

粉じん粒子は、終生飼育ラットにおいてもなお肺胞内に残存しており、終了後12か月 (53週) と同様、それらは大食細胞に貪食された状態で肺胞内やリンパ組織中に集まって存在していたが、その周囲にはとくに線維の増生や前述した細胞の集簇巣が特に多くみられるという像は認められなかった (Photo 4)。

以上示した結果のうち、大単核細胞の集簇や多核巨細胞の出現が、終了後12か月では見られず、それ以後生存したラットに発現したことを、細気管支末端部および周辺によく見られること、白血病のような強い病変を伴う場合には全く認められないこと等、この変化のなりたちを考えるうえで興味ある知見と思われ、現在行なっている2年間長期吸入実験の結果において確認し検討を加えたい。

各群に共通して見られた変化のうち肺胞壁の石灰化はJIS群で例数が多く、程度も強かった。鉍さい群では1例に認められた。程度の強い例では、石灰化した肺胞壁の崩壊により、肺胞腔は拡張していた。またこの様な変化を示したラットでは、剖検の際、肺は胸腔を開いても収縮せず、表面はざらざらしていて、やや硬い海綿状であった。その他大動脈はセルロイド様で、大腿骨はもろく折れやすく、副甲状腺もやや大きくなっているのが観察された。肺やその他軟部組織への石灰沈着または石灰転移は、加齢ラットにおいてみられる、いわゆる腎症の顕著な例でおこることが知られている⁴⁶⁾。本実験においてこの変化が、カルシウム含量の少ないJIS群で多くみられ、含量の多い鉍さい群で少なかったことは、体内に取り込まれたカルシウム量の多少が、腎症の発現や、それによる二次的な軟部組織への石灰沈着と、どのように関係するかは、鉍さいの生体への影響の一つとして、興味ある問題であり、今後の課題として、終生飼育ラットについて、腎臓や副甲状腺の組織変化や、肺以外の組織での石灰沈着の状態について検索を行う予定である。

その他、各群に肺胞壁における細胞の非腫瘍性の増生や、限局性の肺炎が認められたが、前述の肺胞壁の石灰沈着と同様いずれも加齢にともなうよくみられる変化であり、特に鉍さい群で顕著にみられた変化ではなかった。腫瘍は、対照群で甲状腺癌の転移性のものが1例認められた他は、鉍さい群における腫瘍の発生はなかった。また各群にほぼ同様な割合で白血病細胞の浸潤がみられ

た。

ま と め

クロム鉱さい粉じんを 20 mg/m³ の濃度で 1 か月間曝露したラットを、曝露終了後バリエー動物室に移し、死亡または頻死状態になるまで飼育を続け、終了後のラットの生育過程におよぼす鉱さいの影響について観察した。得られた結果のうち、体重、死亡経過の推移、呼吸器系の組織変化について示した。体重は対照、JIS 群に比べ、飼育期間を通して小さかったが、増加の割合には差がないようであった。死亡経過の推移も他の群と同様であって特に変化はみられなかった。各群の平均寿命も同様であった。呼吸器系にみられた組織変化はいわゆる加齢に伴なってよく見られる変化が、各群に共通して認められた他、鉱さい群では、気管腺の増加を伴った気管粘膜上皮の細胞高の増加、および細気管支末端部やその周辺での大単核細胞や多核巨細胞の集簇が認められた。気管における変化は曝露時に生じた変化が慢性的に終生に亘って残っているものであり、大単核細胞などの集簇は、曝露終了後 1 年半以上生存したラットに新たに生じた変化であった。以上の変化は、いずれもラットの寿命に影響するものではなかったが、20 mg/m³ で 30 日間曝露によって吸入された鉱さいの影響は曝露を中止することにより取り除かれることなく、終生に亘って残存することを示唆するものと思われる。

(本報告の概要は毒科学会第 8 回昭和 56 年 6 月で発表した)

文 献

- 1) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 43, 1980

- 2) 坂本義光, 調 武久, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 135, 1977
- 3) 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
- 4) Browning, E.: *Toxicity of Industrial Metals*, 2nd Ed., 67, 1969, Butterworths, London
- 5) Anderson, W. A. D.: *Pathology*, 6th Ed., 933, 1971, C. V. Mosby Co, Saint Louis
- 6) 村岡義博, 伊藤真喜子, 前田ユミノ, 林 裕造: *Exp. Anim.* 26, 1, 1977

Explanation of Plates

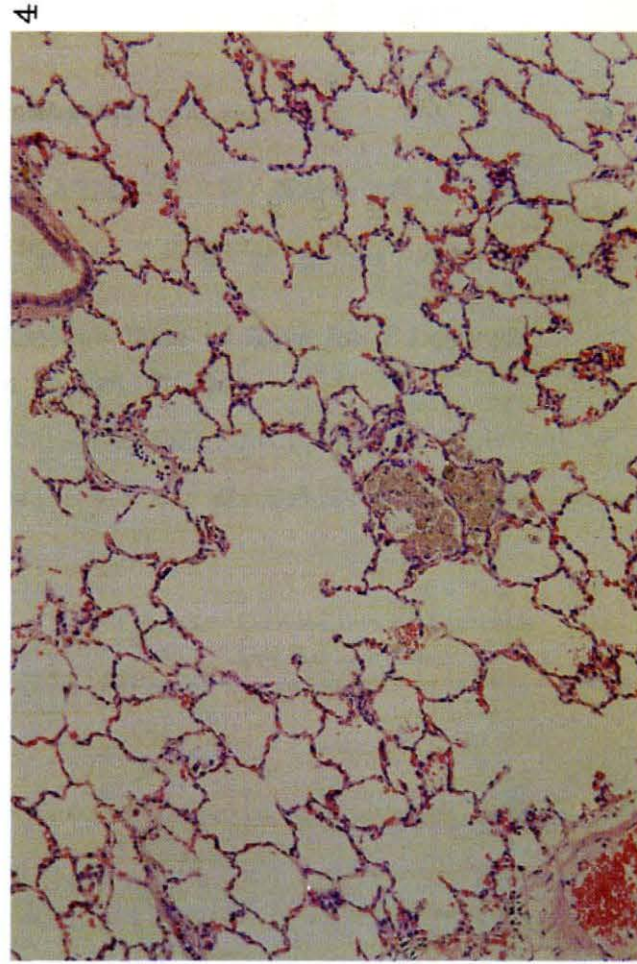
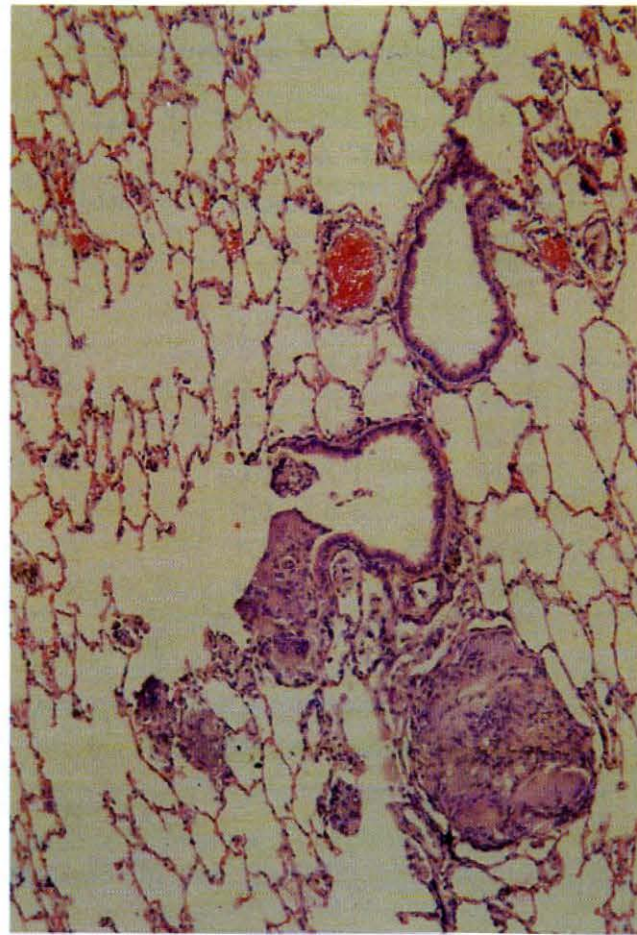
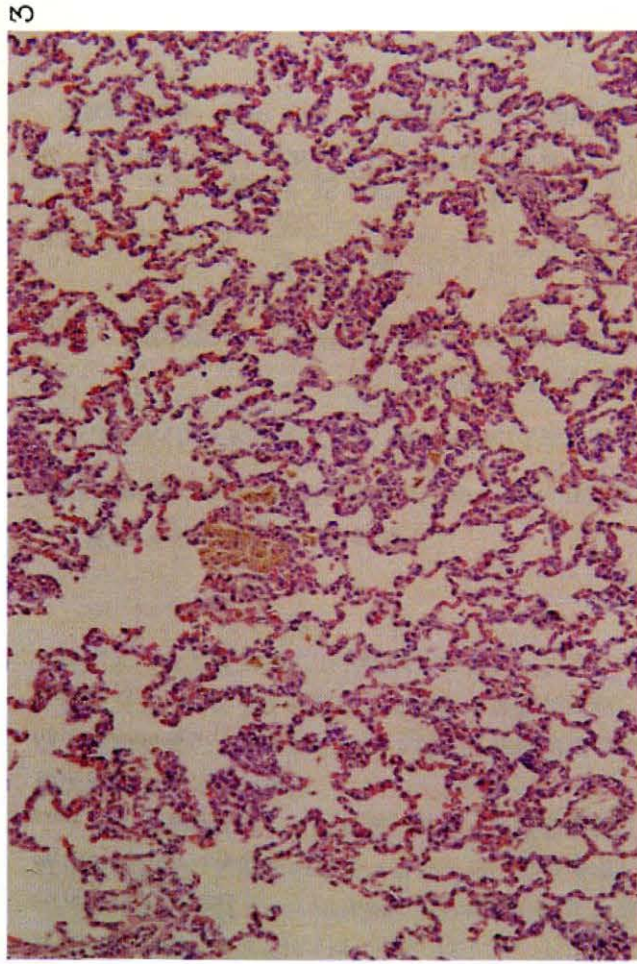
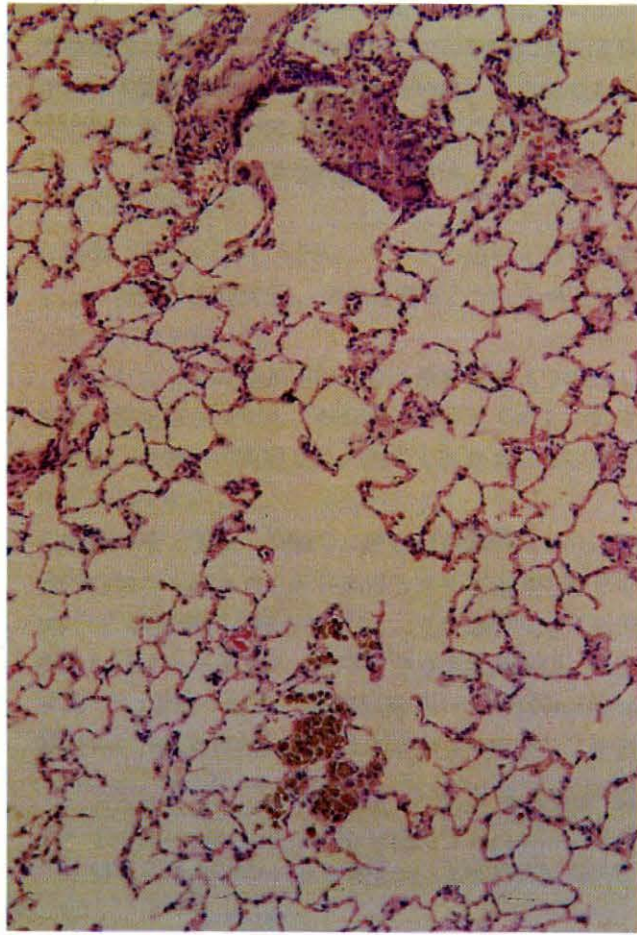
Photomicrographs were prepared from section of lung stained with hematoxylin and eosin.

Photo 1. Aggregation of dust-bearing macrophages in alveoli (left part of field) and aggregation of large mononuclear cell and polynuclear giant cell in respiratory bronchiole (right part of field) in lung of the rats lived for 92 weeks after the periods of exposure (×100)

Photo 2. Nodular aggregation of large mononuclear cell and polynuclear giant cell in lung of the rats lived for 123 weeks after the periods of exposure (×100)

Photo 3. Slight infiltration of mononuclear leukemic cells in lung of the rats lived for 95 weeks after the periods of exposure (×100)

Photo 4. Aggregation of dust-bearing macrophages in alveoli in lung of the rats lived for 118 weeks after the periods of exposure. (×100)



クロム鉱さい粉じんのラットによる7日間持続吸入実験(第2報)臓器中クロムの分析

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 7 Days (II) Analysis of Chromium in Rat Tissues

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, クロム濃度 chromium concentration

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、ラットによる昼夜連続の持続吸入実験を行っている。

クロム化合物については従来からクロム酸塩製造工場従業員に肺ガンの発生率が高いことから、その発ガン性が注目され、各種クロム化合物の粉体について吸入装置を用いた曝露吸入実験が行われている²⁻⁴⁾。しかしこれらの実験は労働環境を反映した間けつ曝露実験であり、また病理学的変化の観察が主で、曝露濃度、期間と臓器中クロム濃度との関係についての報告は少ない⁵⁾。著者らは既に28日間、3か月間の持続吸入実験を行いその結果を報告した⁶⁻⁷⁾。本報ではより短い期間における臓器中クロム濃度の変化を観察するために、7日間の持続吸入実験を行ったので報告する。

実験材料および方法

1. 吸入実験

動物 Sle-wistar (SPF) ラットの雄を4週令で購入し、7日間予備飼育後、順調な発育を示した体重100~120gのものをを用いた。

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 (Alfred Fritsch Co.) で約8時間粉碎、分篩して調整した。粉じんに含まれる主な成分は Table 1 に示した。

投与方法 既報¹⁾の粉じん吸入実験装置により、実験室内空気のみをコントロール群とクロム鉱さい粉じん20 mg/m³ 曝露群の2群を設定し、昼夜連続で7日間持続吸入を行った。吸入チャンパー内の環境条件は、温度25~26°, 湿度50~60%, 換気回数 9RPH (100ml/min), 照明6~18時に調整、飼料は CE-2 (日本クレア), 飲料

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 m	Weight percent (%)
0	>11.0	1.21
1	11.0 — 7.0	2.14
2	7.0 — 4.7	11.08
3	4.7 — 3.3	23.20
4	3.3 — 2.1	26.27
5	2.1 — 1.1	20.08
6	1.1 — 0.65	11.66
7	0.65 — 0.43	2.46
8*	0.43 >	1.20

8* : Filter

水は水道水をそれぞれ自由に摂取させた。吸入チャンパー内の粉じんの粒子径分布は Table 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 3. Analytical Condition for Chromium
by Atomic Absorption Spectrophotometry

Instrument	PERKIN-ELMER AA-4000				
	Graphite Furnace HGA-400				
	Auto Sampler AS-40				
Instrumental Parameters					
Wavelength	357.9nm				
Spectral Bandwidth	0.7nm				
Light Source	Hollow Cathode Lamp				
Lamp Current	10mA				
Background Correction	D ₂ Lamp				
HGA Parameters					
Step	DRY		CHAR	ATOM	CLEAN
Temp.	100	110	1000	2300	2400
Ramp (sec.)	15	15	20	0	1
Hold (sec.)	15	5	25	6	3
Gas Flow(ml/min.)	300	300	300	60	300

曝露開始直前および開始後1日目、3日目、7日目に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、脾臓の各臓器を摘出、秤量後、これら臓器、血液中のクロム濃度を原子吸光法で測定した。

2. クロムの測定

試薬 硝酸は有害金属測定用、過酸化水素水は電子工業用、クロム標準液は原子吸光分析用標準溶液をそれぞれ用いた。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。

操作 摘出臓器および血液は、洗浄済ビーカー⁶⁾に入れ、ホットプレート上約90°で乾燥、放冷後、硝酸2mlを加えて1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。分解が不完全であれば、さらに硝酸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、再蒸留水で一定量として試験溶液とした。別に試薬のみを用いて同様に操作した空試験溶液を調整した。

原子吸光法による測定条件、装置はTable 3に示した。

結果と考察

臓器および血液中の湿重量あたりのクロム濃度の経時的变化をFig. 1に示した。ただし肺は $\mu\text{g/g}$ 、他の臓器、血液は ng/g で示した。また同様の曝露条件で前回行った28日間持続吸入実験の結果⁶⁾を参考値として記した。

すべての臓器、血液でクロム濃度は曝露期間に応じて増加傾向を示した。特に肺は直接曝露を受けるために他

の臓器と比較して非常に高い値を示し、曝露開始前は $0.02\mu\text{g/g}$ であったが、開始後1日目 $8.1\mu\text{g/g}$ 、3日目 $14.3\mu\text{g/g}$ で、7日目には $27.1\mu\text{g/g}$ に達した。腎臓も肺と同様に高い率で増加し、曝露開始前は 6.5ng/g 、開始後1日目 95.3ng/g 、3日目 192.5ng/g 、7日目には 357.1ng/g に達した。これに対して肝臓は曝露開始前で 5.2ng/g 、開始後1日目 28.7ng/g 、3日目 36.4ng/g 、7日目 42.0ng/g とゆるやかな増加を示し、また血液も曝露開始前 3.9ng/g 、開始後1日目 13.8ng/g 、3日目 26.0ng/g 、7日目 40.2ng/g で肝臓と同様の増加傾向がみられた。

一方脾臓は曝露開始前 12.3ng/g 、開始後1日目 42.1ng/g 、3日目 40.3ng/g 、7日目 44.7ng/g と開始後1日目ではやや増加したものの、その後7日目までは大きな変化は示さなかった。コントロール群の測定値は1日目、3日目、7日目のそれぞれで曝露開始前の値と差はなかった。

一般に経気道により摂取された粉じんの肺内への進入は、粒子径によって大きく影響されるが、本実験における粉じんの粒子径分布はTable 2に示したように約35%が肺内まで達したと考えられる²⁾。ただし昼夜連続の全身曝露であるため、体外部や飼育ケージに附着した粉じんがある程度経口摂取された可能性があり、その点を考慮する必要がある。

以上の値を各臓器について28日間持続吸入実験の結果⁶⁾と比較すると、肺、腎臓は28日目でそれぞれ $68.5\mu\text{g/g}$ 、 803.7ng/g となり7日目までと同様に非常に高い増加率を示した。特に肺はつぎに濃度の高い腎臓の約75~85

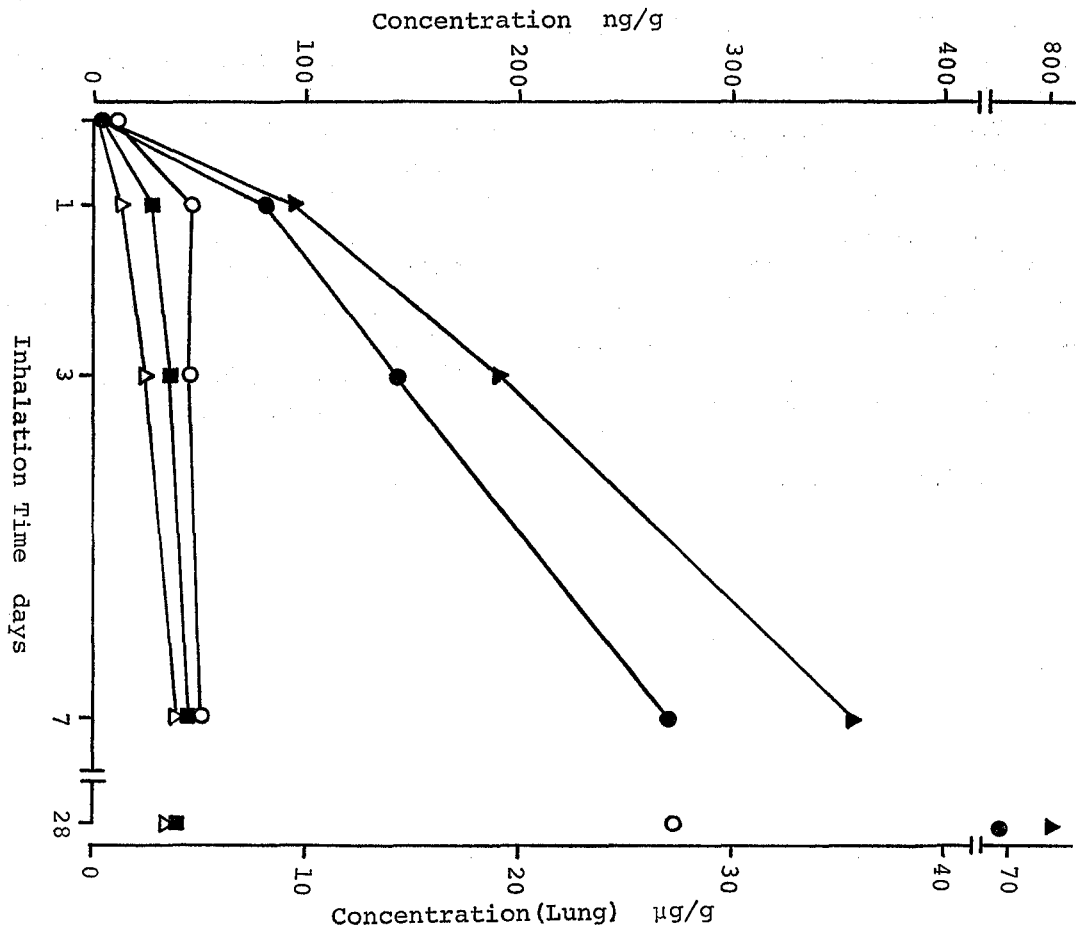


Fig. 1. Chromium Concentration in Lung, Kidney, Liver, Spleen and Blood of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 20 mg/m³ for 7 Days

(●) Lung, (▲) Kidney, (■) Liver, (○) Spleen, (△) Blood

Each points represent the mean of 8 rats except for rats, from 28 days-inhalation experiment, are shown by mean of 10 rats

の高い値を示したが、これは鉍さい中の不溶性のクロム化合物が他の臓器へほとんど移行することなく蓄積されたと考えられる。鉍さい中の不溶性のクロム化合物は主に酸化第二クロム (Cr_2O_3) である⁷⁾が、Morrow らはこの酸化第二クロムの肺における生物学的半減期は200日以上と報告している⁸⁾。またクロムは主に尿へ排泄されることから腎臓中のクロム濃度の増加はその排泄経路として理解されるが、曝露終了後数ヶ月を経ても、腎臓中のクロム濃度は比較的高い値を示す⁹⁾ことより、排泄経路のみでは説明できないように思われる。

脾臓でのクロム濃度の経時的変化は特徴的で曝露開始後1日目ではやや増加したがその後7日目までは変化がな

く、28日目に273.7ng/gと顕著な増加を示した。これは赤血球の破壊による血球成分の残留や網内皮系の作用によると思われ、また3か月持続吸入実験⁶⁾では粉じんの曝露濃度が10mg/m³と本実験の半分であったが、その際の腎臓の濃度とほぼ同じ値を示し(1480ng/g)、脾臓におけるクロムの蓄積性が考えられた。

肝臓、血液は28日目でそれぞれ38.8ng/g、39.5ng/gでともに7日目の値と有意な差はなく、7日目でほぼ一定の値に達した。

ま と め

経気道進入によるクロム鉍さい粉じんの生体におよぼす影響を調べる目的で、粉じん濃度20mg/m³で吸入チ

ンバー内のラットに7日間昼夜連続で曝露し、曝露開始前、開始後1日目、3日目、7日目における臓器、血液中クロムの経時的変化について検討した。

クロム濃度は肺、腎臓で高く、しかも曝露期間に応じて非常に高い増加率で上昇した。特に肺の上昇は著しく、鉍さい中の不溶性のクロム化合物の肺への蓄積のためと思われた。脾臓は曝露開始後1日目にはやや上昇したが、それ以降7日目までは変化がなかった。しかし28日間、3か月間の持続吸入実験の結果^{5,6)}では非常に高い値を示しており脾臓でのクロムの蓄積性が示唆された。肝臓と血液は漸増で、7日目にはほぼ一定値に達した。

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) Baetjer, A. M., Lowry, J. F., Steffee, H., and Budacz, V.: *A.M.A. Arch. Ind. Health*, 20, 124, 1959
- 3) Steffee, C. H., and Baetjer, A. M.: *Arch. Environ. Health*, 11, 66, 1965
- 4) Akatsuka, K., and Lairhall, K. T.: *J. Ind. Hyg.*, 16, 1, 1934
- 5) 宮井 享: 四国医学雑誌, 36, 193, 1980
- 6) 神谷信行, 坂本義光, 伊川三枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 64, 1978
- 7) 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
- 8) Morrow, P. E., Gibb, F. R., Davies, H., and Fisher, M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12, 372, 1968
- 9) 神谷信行: 未発表

アセトアミノフェン投与ラットにおける血液および病理学的検討

多田幸恵*, 藤井孝*, 福森信隆*, 坂本義光*
三栗谷久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*, 長澤明道*
平賀興吾*

Hematological and Histopathological Studies of Rats Fed with Acetaminophen

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

Keywords: アセトアミノフェン Acetaminophen, ラット Rat, リンパ球減少症 Lymphopenia, 血小板減少症 Thrombocytopenia

緒言

アセトアミノフェン(以下AAPとする)はアセトアニリド、フェナセチンの代謝産物で、解熱・鎮痛効果を現わす本態と考えられ、作用が穏やかで副作用の少ない薬物として現在広く使用されている¹⁾。アセトアニリド、フェナセチンでは溶血性貧血、メトヘモグロビン(Met-Hb)血症が発現するとの報告があり、AAPでは軽度のMet-Hb血症、好中球減少症が発現するとの報告がある²⁾。当部において、長期毒性試験のための前段階としてAAPの1, 3, 6, 9, 12日間投与試験を行ったところ、ラットの末梢血中で白血球数(リンパ球)および血小板数の減少が認められた³⁾。この変化に着目し、今回は9, 12日間投与の検索結果とを合わせ考察を加えた。またラットの肉眼的・組織学的検索を行い、造血器系における障害と末梢血での変化との関連性を検討した。さらにAAP 6日間投与のラットについては添加飼料を与えた後普通飼料に切り換え、障害の経過を観察した。

実験材料および方法

試料 日本クレア株式会社製粉末試料(CE-2)にAAPを5%の濃度で添加し、混合した後固型飼料とした。

実験動物・飼育環境 日本チャールス・リバー株式会社生育のF344ラット雄を4週令で購入し、前面および床面が網のステンレス製ケージに対照群は6匹、AAP投与群は5匹ずつ収容し、自動給水装置(細菌ろ過器経由)付ベルト式飼育架台で飼育した。飼育室の条件は、室温25±1℃、湿度50~60%、換気回数毎時10回、照明時間午前6時~午後5時である。

実験方法 表1に示すようにラットを対照群(C: 1

群6匹)、投与群(T: 1群10匹)の各グループに分け、AAPの投与期間(1, 3, 6, 9, 12日間)の相違によりそれぞれ1C・1T~12C・12Tとした。飼料は水と共に自由摂取させた。AAPの6日間投与群については、添加飼料を6日間摂取させた後普通飼料に換え7日間および14日間飼育した。それぞれ6T-7C, 6T-14Cとし、6C-7C, 6C-14Cは各対照群である。

体重・摂餌量: 測定は毎日午前9時~10時に行い、摂餌量はケージ毎に飼料投与量と1日経過後の残余量との差を求め、ラット1匹当りの値で示した。

血液学的検索: 投与期間終了後、ラットを無麻酔下で

Table 1. Experimental Design

Group	No. of rats	Time on study	
		Treated	Untreated
1C	6	0	1
1T	10	1	0
3C	6	0	3
3T	10	3	0
6C	6	0	6
6T	10	6	0
9C	6	0	9
9T	10	9	0
12C	6	0	12
12T	11	12	0
6C-7C	6	0	13
6T-7C	10	6	7
6C-14C	6	0	20
6T-14C	10	6	14

Treated: Feeding with the diet containing 5.0% AAP
Untreated: Feeding with the standard diet

* 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

解剖台に固定し、大腿動静脈を切断し、最初の2〜3滴を捨て、その後の放血液を用いて以下の検索を行った。

赤血球数 (RBC), 白血球数 (WBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Hct), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) はヘパリンナトリウム処理血液を用い Coulter Counter Model S (Coulter Electric 社製) にて測定, メトヘモグロビン量 (Met-Hb) はクエン酸ナトリウム処理血液を用い Evelyn and Malloy 変法⁴⁾により測定, 血小板数 (Pl) は直接流出した血液を硫酸マグネシウム水溶液に浸したガラス棒で採取し, Fonio 法により測定した⁵⁾。また血液塗抹の May-Grünwald 染色標本により血球の形態観察および白血球百分率を算定した。

病理学的検索: 放血, 致死させたラットを解剖し肉眼の観察を行い, 各器官・組織を摘出し10%緩衝ホルマリン液にて固定, 定法に従いパラフィン切片を作製, ヘマ

トキシリン・エオジン重染色標本とし, 光顕的観察を行った。

実験結果

体重・摂餌量 表2に示したように, 対照群は順調な体重増加を示した。投与群では体重の減少がみられ, 投与6日で体重は初期値の65%に低下し, 12T群に1例の死亡がみられた。投与9日で9T群に1例, 12T群に4例の死亡がみられ, 投与12日で12T群の生存ラットは3例となり, 体重は初期値の57%に低下した。6T—7C群および6T—14C群では添加飼料を普通飼料に換えた後顕著な体重増加がみられ, 普通飼料摂取後5日で初期の体重値に回復し, その後も増加を示した。回復期の体重増加率は対照群よりも高い値を示した。摂餌量は投与群で極端な低値を示し, 特に投与後1〜3日は摂食拒否が顕著にみられ, 平均1.1g/Ratであった。対照群の12.1g/Ratと比較すると1/10以下の量である。投与6〜9日で

Table 2. Body Weights and Food Intakes of Rats Treated with AAP

Group	Initial No. of rats	Time on study (Days)									
		0	1	3	6	9	12	13	15	18	20
1C	6	112±8 ^{a)}	115±8 12.5 ^{b)}								
1T	10	112±5 ^{b)}	97±5* 0.7								
3C	6	106±3	109±3*	113±3 12.1 11.5							
3T	10	107±4	94±3* 0.7	83±3* 0.9							
6C	6	108±3	111±4 11.8	116±6 11.3	127±8 12.8						
6T	10	107±2	93±6* 0.7	81±5* 0.3	69±4* 2.6						
9C	6	110±5	116±5 13.3	121±7 11.0	133±7 14.0	149±9 15.8					
9T	10	112±4	97±4* 0.8	85±3* 0.8	72±2* 4.5	70±4*(9) ^{c)} 4.2					
12C	6	109±6	113±7 13.1	116±7 11.6	129±9 13.6	143±9 14.3	159±10 15.8				
12T	11	105±9	91±8* — ^{d)}	80±7* —	69±7*(10) —	67±7*(6) —	64±7*(3) —				
6C—7C	6	108±4	112±5 12.8	118±5 12.3	130±5 13.5	147±4 14.8	163±4 15.8	167±5 16.1			
6T—7C	10	108±3	93±3* 1.1	82±3* 1.2	70±3* 2.8	90±6* 10.4	112±7* 15.6	119±6* 16.6			
6C—14C	6	107±6	111±6 12.3	117±8 12.1	128±9 13.6	142±10 14.0	158±11 15.1	161±11 16.0	168±11 15.1	179±11 14.1	188±12 15.1
6T—14C	10	106±4	91±2* 1.3	80±3* 1.3	67±2* 3.1	90±4* 10.2	112±5* 15.5	119±5* 17.6	132±6* 15.9	145±6* 15.0	162±7* 14.7

a) Body weights (g): Mean ± S.D., b) Food intakes (g/rat/day): Mean ± S.D.

c) No. of rats, d) Not weighing on account of increase of mortality rate

* P<0.05 in comparison with control value

Table 3. Hematological Findings

Group	No. of rats	RBC ($10^9/\text{cmm}$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV ($\text{c}\mu$)	MCH (μg)	MCHC (%)	Met-Hb (%)
1C	6	$7.22 \pm 0.51^{1)}$	16.8 ± 0.7	43.5 ± 2.7	60.6 ± 0.8	23.6 ± 0.7	38.7 ± 0.9	0.51 ± 0.08
1T	10	7.98 ± 0.46	18.4 ± 0.3	48.5 ± 2.5	61.3 ± 0.4	23.3 ± 1.0	36.8 ± 3.6	0.52 ± 0.10
3C	6	7.72 ± 0.22	17.2 ± 0.2	46.5 ± 1.0	60.8 ± 0.7	22.5 ± 0.7	37.0 ± 1.0	0.53 ± 0.11
3T	10	8.75 ± 0.31	$19.9 \pm 0.6^*$	$53.7 \pm 1.9^*$	62.0 ± 1.4	22.9 ± 0.5	37.0 ± 0.7	0.60 ± 0.18
6C	6	8.22 ± 0.41	18.6 ± 0.7	48.9 ± 2.8	60.0 ± 1.6	22.7 ± 0.6	38.0 ± 1.4	0.50 ± 0.08
6T	10	8.24 ± 0.48	18.5 ± 0.5	47.0 ± 2.9	57.1 ± 0.8	22.5 ± 1.1	39.4 ± 2.0	0.48 ± 0.09
9C	6	6.84 ± 0.19	15.0 ± 0.2	39.1 ± 0.6	57.1 ± 0.9	22.0 ± 0.5	38.4 ± 0.6	0.50 ± 0.09
9T	9	$8.24 \pm 0.72^*$	$17.2 \pm 1.4^*$	$46.1 \pm 4.4^*$	56.0 ± 1.1	$21.0 \pm 0.7^*$	37.5 ± 1.2	0.50 ± 0.09
12C	6	6.64 ± 0.22	15.4 ± 0.2	37.9 ± 1.2	57.5 ± 0.5	23.4 ± 0.7	40.6 ± 1.1	0.45 ± 0.07
12T	3	—	—	—	—	—	—	—
6C—7C	6	6.85 ± 0.26	15.4 ± 0.2	39.6 ± 1.3	58.1 ± 0.7	22.7 ± 0.7	38.9 ± 1.0	0.48 ± 0.10
6T—7C	10	6.75 ± 0.29	15.1 ± 0.4	38.8 ± 1.4	58.0 ± 0.4	22.7 ± 0.5	38.9 ± 0.9	0.48 ± 0.10
6C—14C	6	7.40 ± 0.18	16.2 ± 0.3	41.7 ± 0.8	56.8 ± 0.7	22.1 ± 0.3	38.8 ± 0.6	0.53 ± 0.09
6T—14C	10	$6.73 \pm 0.21^*$	$14.8 \pm 0.2^*$	$38.7 \pm 1.0^*$	$58.0 \pm 0.6^*$	22.2 ± 0.4	$38.1 \pm 0.6^*$	0.58 ± 0.09

WBC

		Total ($10^3/\text{cmm}$)	Percentages of				Pl ($10^4/\text{cmm}$)
			Neutro.	Lympho.	Eosino.	Mono.	
1C	6	7.25 ± 1.80	8.3 ± 3.8	90.6 ± 3.9	0.8 ± 0.7	0.1 ± 0.4	—
1T	10	6.26 ± 0.99	$16.6 \pm 3.8^*$	$82.6 \pm 4.0^*$	0.6 ± 0.6	0.2 ± 0.6	—
3C	6	7.87 ± 0.78	6.0 ± 3.6	93.6 ± 3.3	0.3 ± 0.8	0	108.7 ± 25.4
3T	10	8.58 ± 1.48	6.7 ± 3.1	92.6 ± 3.8	0.5 ± 0.8	0.2 ± 0.4	$94.2 \pm 16.2^*$
6C	6	8.23 ± 0.92	5.6 ± 3.2	93.1 ± 3.6	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.8	100.2 ± 38.3
6T	10	$7.00 \pm 1.18^*$	$18.3 \pm 7.9^*$	$81.0 \pm 8.0^*$	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.5	$51.2 \pm 9.6^*$
9C	6	8.33 ± 0.53	7.8 ± 3.9	91.6 ± 3.8	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.4	109.2 ± 22.6
9T	9	$4.89 \pm 1.36^*$	$44.3 \pm 9.9^*$	$54.2 \pm 8.6^*$	0	0.1 ± 0.3	$6.3 \pm 2.7^*$
12C	6	8.42 ± 1.13	8.0 ± 2.7	90.3 ± 3.8	0.3 ± 0.5	1.0 ± 0.8	94.8 ± 29.6
12T	3	—	—	—	—	—	—
6C—7C	6	8.23 ± 0.51	6.6 ± 2.2	93.3 ± 2.2	0	0	120.7 ± 30.5
6T—7C	10	$5.82 \pm 1.13^*$	$29.9 \pm 7.6^*$	$67.8 \pm 7.9^*$	0.9 ± 1.1	1.0 ± 1.0	113.8 ± 55.1
6C—14C	6	7.45 ± 1.11	10.3 ± 5.9	89.0 ± 6.1	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.5	78.0 ± 16.9
6T—14C	10	$5.70 \pm 1.00^*$	$17.5 \pm 5.9^*$	81.2 ± 6.3	0.4 ± 0.5	0.7 ± 0.9	$110.2 \pm 30.6^*$

1) Mean $\pm$ S.D., * $P < 0.05$ in comparison with control value

は若干の増加がみられ 3.7g/Rat であった。6T-7C および 6T-14C 群では添加飼料を普通飼料に換えた後摂餌量の増加がみられ、1～3日は対照群と比較しやや低値を示したが、それ以後は対照群と同様の値を示した。

血液学的検索 表3に示したように、投与群で WBC の減少が顕著にみられ、減少は投与期間に比例して程度を増し、9T群では9C群の60%の値を示した。血液塗抹標本における白血球百分率の算定では、投与群でリンパ球の比率の減少および好中球の比率の増加が認められた。白血球百分率(%) $\times$ WBC で求めた実数値の比較においても投与群でリンパ球の減少および好中球の増加が認められた。RBC, Hb, Hct は6・9T群で軽度の増加がみられたのみで、顕著な変化は認められなかった。Pl は投与群で顕著な減少がみられ6T群は6C群の50%、

9T群は9C群の5%の値を示した。6T-7C 群および 6T-14C 群では WBC, Pl とも急激な回復を示し、WBC は6T-14C群で6C-14C群の70%の値を示した。Plは対照群と同程度に回復していた。また塗抹標本により血球形態を観察したが、異常は認められなかった。Met-Hb の増加および減少はみられなかった。

病理学的検索 肉眼的検索では、対照群に比較し投与群で各器官が著しく小さく、脾臓・胸腺では特に顕著であった。光顕的検索では、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ節・肝臓など造血に関連する器官・組織を中心に観察した。表4に示すように脾臓では6T群で軽度の、9・12T群で中等度の萎縮がみられ、被膜の肥厚および皺襞形成が認められた。また9・12T群で脾小節のリンパ球の減少がみられ皮髄境界が不明瞭となり、3・6・9・12T 群で巨

Table 4. Microscopical Findings

Group No. of rats		1C 6	1T 10	3C 6	3T 10	6C 6	6T 10	9C 6	9T 9	12C 6	12T 3	6C-7C 6	6T-7C 10	6C-14C 6	6T-14C 10
Spleen Atrophy	grade	6	10	6	10	6	8	6	3	6	—	6	7	6	8
	— ¹⁾	—	—	—	—	—	2	—	6	—	3	—	3	—	2
	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Extramedullary hematopoiesis	—	—	1	1	10	2	10	—	9	—	3	—	8	6	1
	+	5	7	5	—	4	—	6	—	6	—	6	2	—	9
	+	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Decrease of megakaryocytes	—	6	10	6	7	6	—	6	1	5	—	6	—	6	8
	+	—	—	—	3	—	10	—	8	1	3	—	10	—	2
	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thymus Atrophy	—	6	10	6	7	6	2	6	—	6	—	6	1	6	9
	+	—	—	—	3	—	8	—	9	—	3	—	3	—	1
	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	—	—
Ecchymosis in medulla	—	5	10	5	10	5	10	5	9	5	3	4	10	5	8
	+	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—	2	—	1	2
	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Necrosis of thymic cells	—	6	10	6	10	6	4	6	—	6	—	6	10	6	10
	+	—	—	—	—	—	6	—	9	—	3	—	—	—	—
	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bone Marrow Decrease of myeloid tissue in femur	—	6	3	4	2	3	—	6	—	5	—	6	—	6	—
	+	—	7	2	5	3	6	—	—	1	—	—	8	—	10
	+	—	—	—	3	—	4	—	9	—	3	—	2	—	—
Congestion	—	6	1	4	—	6	1	6	—	6	—	6	10	6	10
	+	—	9	2	—	—	4	—	5	—	3	—	—	—	—
	+	—	—	—	10	—	5	—	4	—	—	—	—	—	—

1) — : No change, + : Slight changes, ++ : Moderate changes

核球の減少がみられた。対照群の全例および1T群の10例中9例（以下9/10とする）で髄外造血がみられたが、3・6・9・12T群では観察されなかった。髄外造血巣の細胞は赤芽球系細胞が大半を占め骨髄球系の細胞はわずかであった。またヘモジデリンの沈着は対照群、投与群で差がみられなかった。胸腺では3T群で3/10に萎縮がみられ、皮質の中の減少およびリンパ球の減少が認められた。6T群で萎縮はさらに顕著となり皮髄境界が不明瞭となった。また髄質では萎縮によりエオジン淡染の線維が増生している像が観察された。6・9・12T群の皮質および髄質で、リンパ球・細網細胞の壊死が認められた。6T-7C群では個体によりかなりのバラツキがみられ、対照群と同程度、皮質および髄質全体をリンパ球が充たす、12T群でみられたと同様の萎縮を示すなど様々の変化が観察された。6T-14C群では1/10に胸腺全体をリンパ球が充たす変化がみられ、9/10は対照群と同様であった。骨髄では3T群で9/10にうっ血がみられ、7/10に骨髄細胞の減少が認められた。対照群では骨髄細胞が島状に存在したが、投与群ではこの傾向がみられず細胞は個々に離れて存在した。また成熟段階初期の細胞の減少が目立ち、脂肪細胞は輪郭が不明瞭で細胞膜が皺を

形成し、萎縮と思われる変化を示した。6T群で骨髄細胞の減少は顕著となり、髄腔では赤血球に混在して骨髄細胞がわずかに認められた。骨内膜に接した部位では骨髄細胞がかなり認められた。9・12T群でうっ血は軽度となり、骨髄細胞の減少はさらに顕著となり、髄腔では細網基質の不整形な網目構造が目立った。骨髄細胞は骨内膜に接した部位でわずかに認められた。6T-7C群および6T-14C群では6T群でみられた変化（骨髄細胞の減少、脂肪細胞の輪郭不明瞭など）はみられず、対照群と比較し脂肪細胞の増加が認められた。肝臓および副腎では髄外造血はみられなかった。リンパ節は切片上の組織が少なく、観察および比較が困難であった。

考 察

血液学的検索の結果、AAP投与群のラットの末梢血でリンパ球減少、血小板減少、好中球の軽度な増加が認められた。リンパ球減少は脾臓のリンパ小節の萎縮および胸腺の萎縮により発現したものと考えられる。また血小板の減少は脾臓の萎縮および骨髄での骨髄細胞減少により発現したものと考えられる。末梢血で好中球の増加傾向がみられ、貧血がみられなかった点に関しては、骨髄で骨髄細胞の減少がみられたことから、血球が抵抗性を

増し脾臓での血球破壊が抑制されたとの可能性が考えられ、脾臓および末梢血塗抹標本の検索を行った。脾臓でのヘモジデリン沈着は対照群と同様に観察され、また血球形態にも異常はみられず、脾臓での血球破壊は対照群と同様に起っていたものと考えられる。骨髓で血球の産生が低下した場合、末梢血においても貧血および好中球の減少がみられるのが通常であるが、今回の検索では観察されなかった。この機構は明らかではないが、骨髓の骨内膜に接した部位に骨髓細胞が残存し、添加飼料を普通飼料に換えたラットで骨髓組織の回復が短期間にみられた点から、AAP 投与のラットにおいても骨髓は廃絶の状態になく、血球産生の機能を残存させていたものと推測される。

AAP 投与群のラットの末梢血でみられたリンパ球・血小板減少の原因として、1) AAP の作用、2) 摂餌量の低下が考えられる。Starvation の際は骨髓の低形成がみられ、末梢血中の白血球数が減少するとの報告があり⁹⁾、今回投与群での摂餌量が極端に少なく、投与12日で8/10が死亡した事より Starvation の可能性が考えられた。Starvation の際みられる特徴的な所見として肝細胞索の狭小化、胸腺の萎縮、脾臓でのヘモジデリン沈着症、精子形成不全、副腎での脂質沈着などが報告されているが⁷⁾、今回の観察では胸腺の萎縮および精子の欠損がみられ、肝臓、脾臓、副腎などでの変化は観察されなかった。以上の観察結果より、今回の実験におけるラットの死亡、各器官および組織の障害は Starvation の影響だけでなく、AAP 投与による影響が大きく関与しているものと考えられ、とくに骨髓・リンパ組織の萎縮および白血球・血小板の減少は、AAP の影響によるものと考えられる。

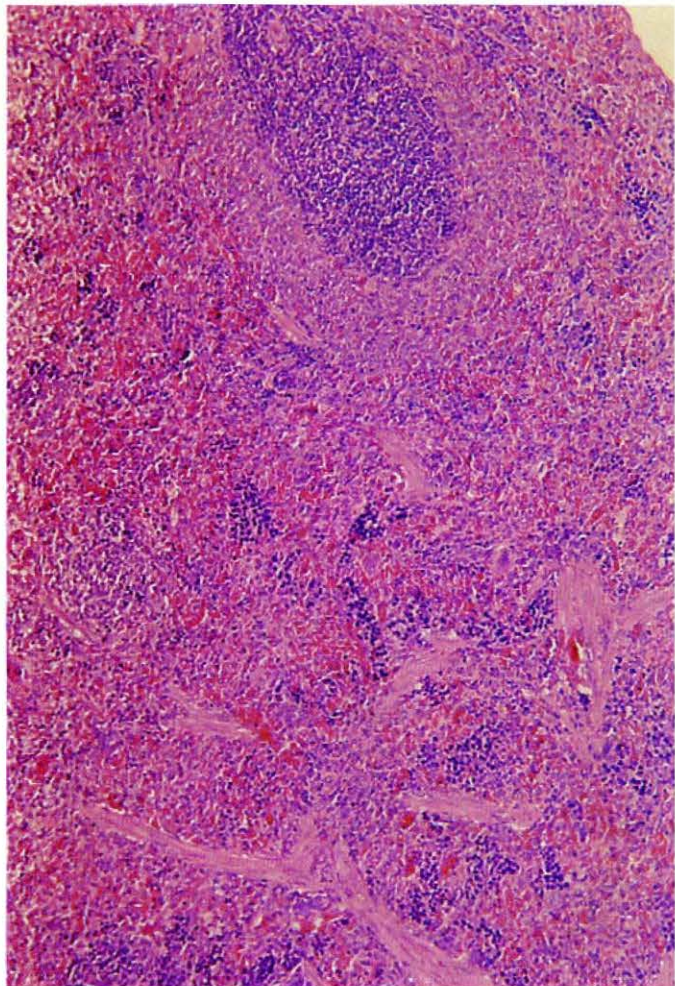
文 献

- 1) Woodbury D. M., and Edward, F.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L. S. and Gilman, A. eds.), 5th Ed., 343, 1975, Macmillan, New York
- 2) Davidson, R. J. L.: *J. clin. Path.*, 24, 537, 1971
- 3) 藤井孝ら: 東京衛研年報, 30-2, 93, 1979
- 4) Hegesh, E., Gruener, N., Cohen, S., Bochkousky, R., and Shuval, H. I.: *Clinica Chimica Acta.*, 30, 679, 1970
- 5) 金井泉, 金井正光編: 臨床検査法提要, 第25版, 64, 1968, 金原出版
- 6) 中川一郎, 二国二郎, 吉川春寿編: 栄養学, 第3版, 455, 1957, 朝倉書店
- 7) Andarson, W. A.: *Pathology*, 6th Ed., 69, 1971, Mosby, Saint Louis

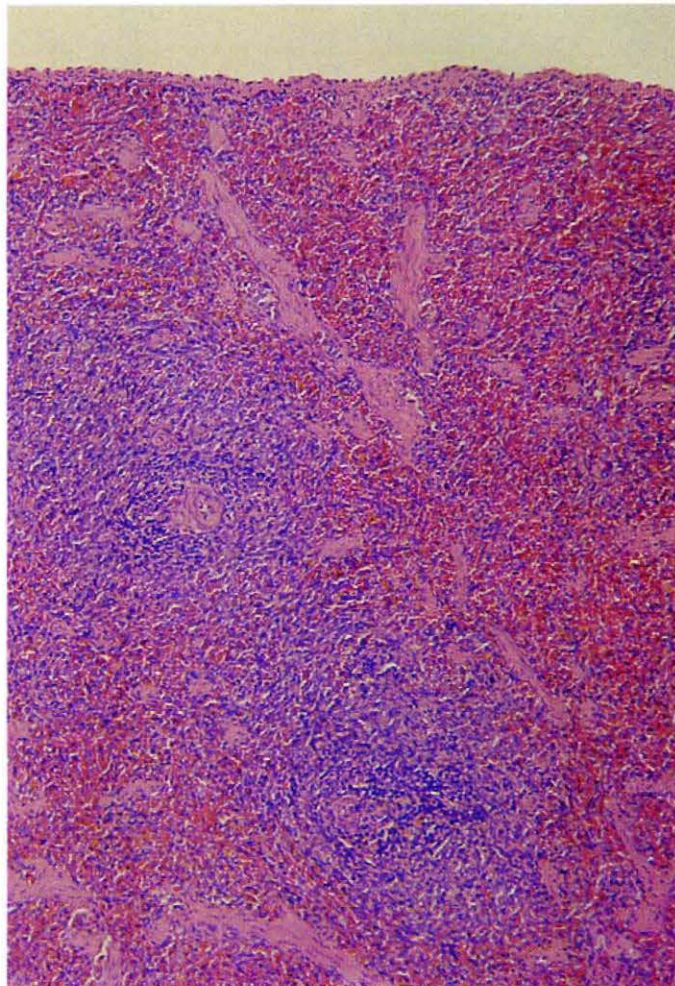
Explanation of Plates

- Photo. 1. Extramedullary hematopoiesis in spleen of rat fed with the standard diet for 12 days. H-E $\times 100$
- Photo. 2. Atrophy of spleen of rat fed with the diet containing 5% AAP for 12 days. H-E $\times 100$
- Photo. 3. Atrophy of thymus of rat fed with the diet containing 5% AAP for 12 days. H-E $\times 100$
- Photo. 4. Decrease of myeloid tissue in femur of rat fed with the diet containing 5% AAP for 12 days. H-E $\times 200$

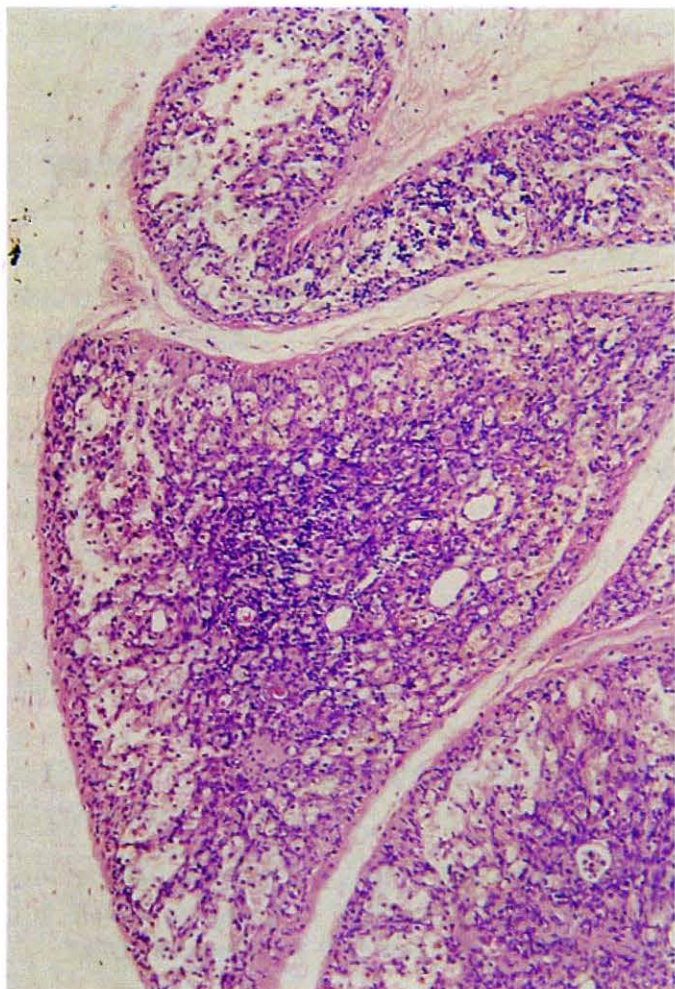
1



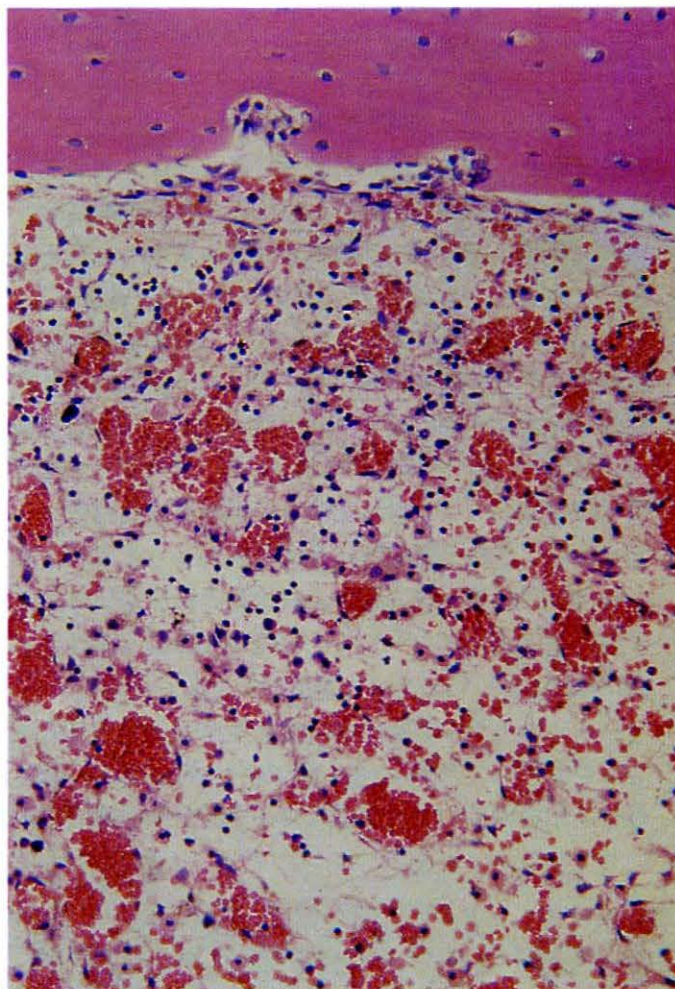
2



3



4



MNNG の突然変異原性, 染色体異常誘発性におよぼすアニリン系薬剤の効果について

佐々木 美枝子*, 吉田 誠二*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Additional Effect of Phenacetin and its Derivatives on the Mutagenicity and Clastogenicity of MNNG

MIEKO SASAKI*, SEIJI YOSHIDA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Phenacetin (acetophenetidine) and its derivatives, acetaminophen and acetanilide, have no or weak mutagenicity and clastogenicity on cultured CHO-K1 cells, except clastogenic action of acetaminophen. Acetaminophen (AAP), however, enhanced the action of potent mutagen, MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). The appearances of Ouabain-resistant cells and chromosome aberrations of MNNG-treated CHO-K1 cells were both increased by the simultaneous treatment of AAP. This effect was not so marked but dose-response relationships were observed at the dosages between 500 to 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of AAP and 0.5 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MNNG. Pre- and post-treatments of AAP were more effective than the simultaneous treatment. The effect of phenacetin was likely to be weaker than that of acetaminophen.

In the screening assay of tumor promoter *in vitro*, an inhibitory effect of AAP on the metabolic cooperation was observed in the mixed culture of chinese hamster cells, V79 wild-type cells and 6-TG resistant mutated cells. The reaction pattern of AAP in this experimental system was very similar to that of TPA (12-*o*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, one of the typical tumor promoters). Although all the mechanism of action of AAP cannot be explained by these experimental results and AAP cannot be decided yet as a mutagenic and/or a carcinogenic promoter, it is possible to say that a part of action of AAP, at least, is dependent upon this inhibitory effect on the metabolic cooperation.

Keywords : Acetaminophen, Mutagenesis, Promoter action, *In vitro* system

緒 言

環境汚染物質・医薬品等の変異原性・発癌性を検討するうえで、培養細胞を用いた *in vitro* スクリーニングテストは、動物実験に比して時間・労力・経費の節約、実験の再現性の容易さなどの点で多くの利点があり、また被験物質の作用機序を考察するためにも有効な実験手段である。我々はチャイニーズハムスター由来の培養細胞を用いて、各種化学物質の変異原性・染色体異常誘発性等について検討してきた¹⁾。この結果、アニリン系鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェン、フェナセチン、アセトアニリドに、強力な変異原性物質である MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) の作用をさらに増強する効果のあることがわかった。この相乗効果の作用機序について種々検討したところ、アセトアミノフェンに、TPA (12-*o*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) と類似するプロモーター効果の存在が *in vitro* の実験系で示唆されたので報告する。

材料および方法

変異原性・染色体異常誘発性の実験には、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% に仔牛血清 (Flow Laboratories 製品) を加えた培養液で培養した。

変異原性検出のためには、10ml 容量のガラス培養瓶 (池本理化, TD₄₀培養瓶) に 5~10 $\times 10^5$ の CHO-K1 細胞を播種し、37℃, 5% CO₂ 細胞培養器中で一夜培養した。16~24 時間後に被験物質を培養液に加え、一定時間静置培養したのち、被験物質を含む培養液を捨てて細胞を洗浄し、再び正常培養液を加えてさらに一日間培養を続けた。その後、細胞を 0.05% トリプシン溶液を用いてガラス面より剥離し遊離細胞浮遊液とした。この浮遊細胞 10⁵~10⁶ を 4ml の培養液を入れた滅菌プラスチックシャーレ (NUNC, N-14001, 60mm $\times$ 15mm) に再播種し、薬剤耐性細胞検出用とした。すなわち、再播種後 2 日目

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

にウアバイン (SIGMA 0-3125, 以下 Oua と略す) を 1mM となるように加え, 14 日目に細胞を固定染色して Oua 耐性細胞のコロニーを数えた. 細胞再播種時に $10^2 \sim 10^3$ の細胞を 4ml の正常培養液を入れたシャーレに播種し, 一週間後に固定染色して生じたコロニー数を数え, 再播種細胞のコロニー形成率とした. コロニーの計数には 1 群 5~10 シャーレを用い, その平均値を求めた. コロニー形成率および突然変異率は次式により求めた.

$$\text{コロニー形成率} = \frac{\text{正常培養液中でのコロニー数}}{\text{再播種細胞数}}$$

$$\text{突然変異率} = \frac{\text{選別培養液中でのコロニー数}}{\text{再播種細胞数} \times \text{コロニー形成率}}$$

染色体異常誘発性については, やはり CHO-K1 細胞を用い, 変異原性検出試験と同様の処理をした細胞の染色体標本作成した. 標本作成は常法によったが^{2,4)}, 培養器具として NUNC マルチディッシュ (NUNC, N-1483) を試用して亜微量試験を行った⁴⁾.

プロモーター効果の検索には, 横浜市立大学医学部組織培養室梅田誠助教授より分与をうけた V79 細胞 (チャイニーズハムスター肺由来株化細胞) の野性株および 6 TG 耐性株 (T2-14) を用い, 培養液としては, MEM (GIBCO, F-11) にアミノ酸, ビルビン酸ナトリウムを強加し, 牛胎児血清 (GIBCO 製品) を 5% に添加したものを用いた. 培養器具としては, NUNC マルチディッシュ (24wells multidish, N-1483) を使用した. *In vitro* でのプロモーター活性の検出は, Yotti⁵⁾, Umeda⁶⁾ の方法に従って行なった. すなわち, ディッシュの各ウェルあたり, 1.3×10^4 の V79 細胞と 50 の V79 (T2-14) 細胞を播種し, 37℃, 5% CO₂ の条件下で一夜培養した. その後, 被検物質および 6 TG (6-Thioguanine, SIGMA A-4882) 5μg/ml を加え, さらに 3 日間培養する. 3 日目に培養液を被検物質を含まない, 5μg/ml 6 TG 添加培養液と交換し, 3 日目ごとに培養液を交換しながら 1 週間培養した. 1 週間目に培養液を捨てて固定染色を行ない, 6 TG 耐性細胞のコロニーを数えた. これと同時にウェルあたり 50 個の V79 (T2-14) 細胞のみを播種したディッシュを設け, プロモーター活性検出系と同様の処理をし, やはり 1 週間目にコロニーを数えて, 被検物質の T2-14 細胞に対する細胞毒性を検討した. 被検物質は通常 1 ディッシュあたり 1 物質とし, 4 ウェルを 1 群として, 5 処置群および 1 溶媒対照群を設けた. 生じたコロニー数は 4 つのウェルの平均値をとった.

被検物質としては, アセトアミノフェン (Acetaminophen, 厚生省がん研究班試料として国立衛試より分与された精製試料, 以下 AAP と略記する), アセトフェネ

チジン (フェナセチン) (Acetophenetidine, 和光 019-00412 APT と略す), アセトアニリド (Acetanilide, 和光 011-00215) を使用し, 全て DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解し, 10μl/ml となるように培養液に加えた. 変異原物質としては MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Aldrich 12,994-1) を, プロモーター物質としては TPA (12-*o*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, SIGMA P-8139) を用い, 陽性対照とした.

結 果

Fig. 1 に MNNG および AAP の変異原性試験の結果を示す. 変異原性物質である MNNG には, 処理量に応じたウアバイン耐性細胞の出現がみられるが (Fig. 1-A) AAP にはこの方法でみる限り突然変異誘発活性はないものと思われた (Fig. 1-B)¹⁾. ところが, 細胞毒性と変異原性が実験条件下で安定している 0.5~1.0μg/ml の MNNG と, 単独では変異原性のみられなかった AAP 30~500μg/ml を細胞に同時に投与すると, MNNG によるウアバイン耐性細胞の出現は, 加えた AAP の量に相関して, MNNG 単独の場合より増加した. MNNG 1μg/ml と, 各濃度の AAP による相乗効果を Fig. 2 に示す. この相乗効果は, AAP 類似の化学構造をもつ APT および AAN にも認められるが, AAP の効果が最も高いように思われた (データは示していない).

AAP による MNNG 活性に対する増強効果は染色体分析を行うとさらに明確になった. MNNG には無論染色体異常誘発能があり, AAP にもこの活性は存在するが³⁾, 両者を同時に作用させた場合の染色体異常の出現頻度は相加的なものではなく, 相乗的なものであると思われた. Fig. 3 にこの結果を示す. 細胞の処理方法は Fig. 2 に示した実験と全く同一であるが, ウアバイン耐性細胞の出現頻度は最も活性の高い 500μg/ml AAP 添加の場合でも 2~3 倍にすぎないが, 異常染色体を有する細胞はそれよりはるかに増加する. 特に, 総異常染色体からギャップを除いた場合, この傾向が顕るしい. また AAP 濃度を一定にして MNNG 濃度を 0.25, 0.5, 1.0 μg/ml と変えた場合には, 異常染色体出現頻度は MNNG 濃度に相関して増加し, この作用が相乗的なものであることが確かめられた (Fig. 4).

AAP のこの活性は MNNG の変異原性に対するプロモーター効果であることが予想されたので, AAP による細胞処理の時期を MNNG 処理の前, および後の様々の期間に行ったところ, 適当な期間に AAP で細胞を処理した場合には, ウアバイン耐性細胞の出現頻度は, AAP・MNNG 同時投与の場合よりもさらに増加する傾向がみられた.

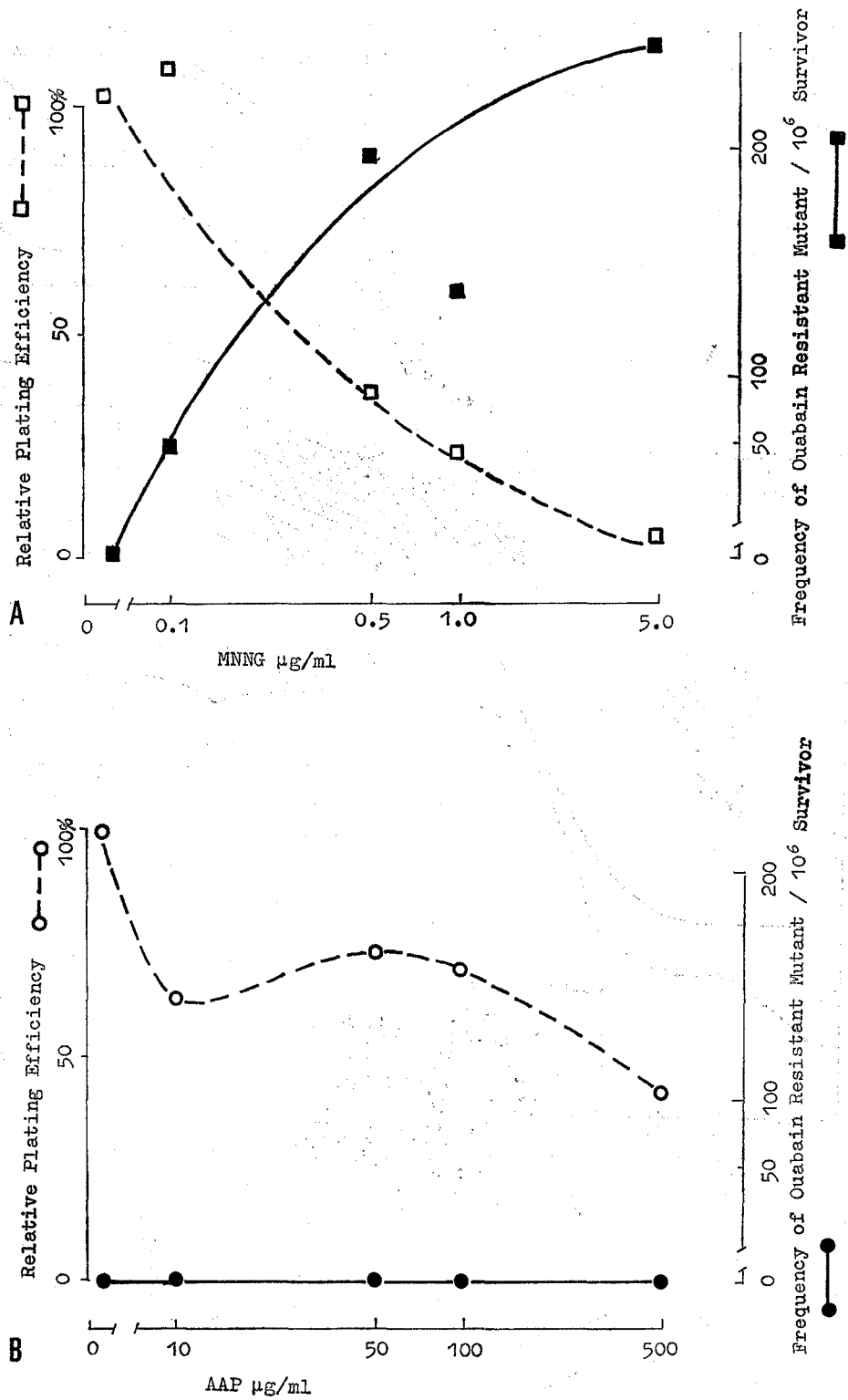


Fig. 1. Mutagenicity of MNNG and AAP

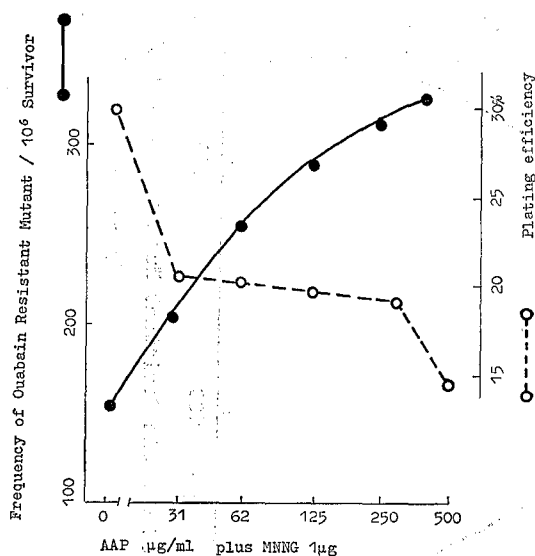


Fig. 2. Additional Effect of MNNG and AAP

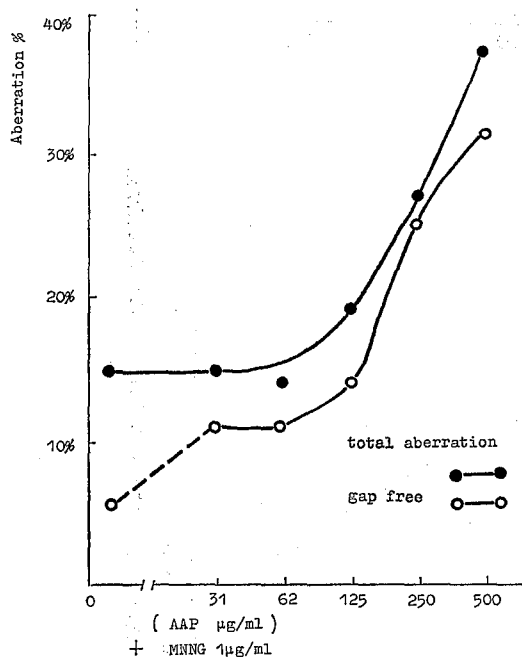


Fig. 3. Chromosome Aberration Induced by MNNG and AAP

また, *in vitro* でプロモーター活性を検出する方法が Trosko 一派により開発されているので⁵⁾, この方法により AAP の活性を検定した. プロモーター物質として知られている TPA と, AAP および APT を同一実験条件で検定したところ, AAP の示す活性パターンが

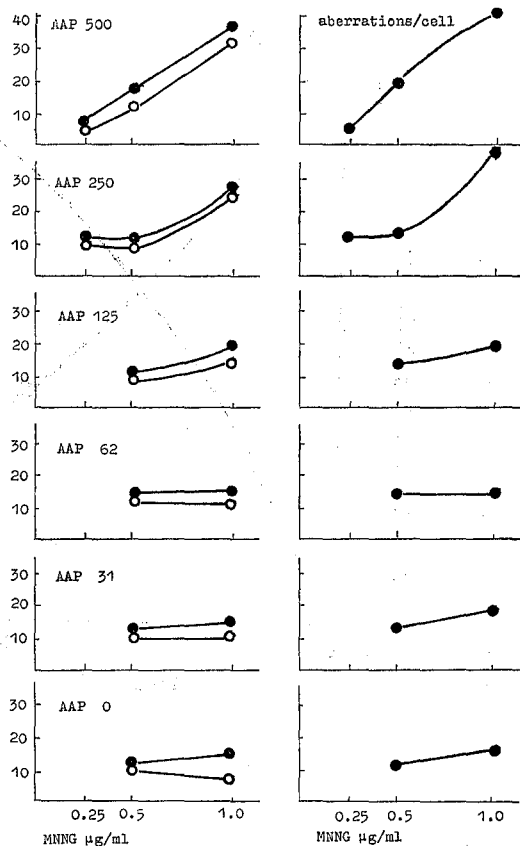


Fig. 4. Chromosome Aberration Induced by MNNG and AAP

TPA に類似していることがわかった (Fig. 5). この結果から, AAP には TPA と同様, 6-TG 耐性細胞の 6-TG^R→6-TG^S への代謝協同 (metabolic cooperation) による回復を阻害するような作用があると思われる.

考 察

前報¹⁾で我々は, AAP には変異原性は認められないが, 変異原物質・MNNG の作用を増強する効果の可能性について述べたが, 今回の実験では AAP と MNNG の相乗効果が明らかになった. CHO-K1 細胞を用いたウアブイン耐性突然変異でみるかぎりでは, AAP に変異原性は認められないが, 染色体異常誘発性は AAP 自身も有しており²⁾, 染色体異常誘発性と変異原性, さらに発癌性との関連を考えてゆこうと, AAP は興味ある物質であると思われる. AAP の作用のメカニズムに関しては, AAP が何らかの障害を生ぜしめた細胞, あるいは染色体が MNNG のような強力な変異原物質に対する感受性を増している可能性 (いわゆる励起状態), あるいは

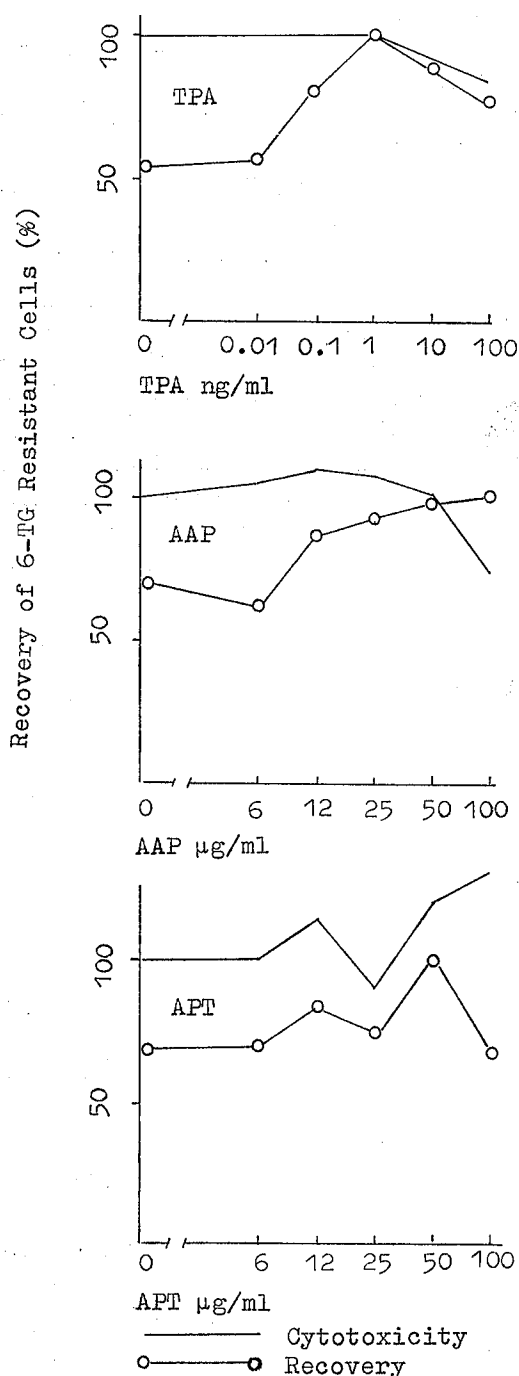


Fig. 5. Effect of TPA, AAP and APT on the Recovery of 6-TG Resistant Cells under the Condition of Metabolic Cooperation

は逆に MNNG によって起こされた変化を AAP がさらに決定的なものに変える可能性, または AAP と MNNG

は相補的なかたちで協同して活性をもつ可能性(MNNG が AAP によってさらに強力な物質に変化する, など)が考えられる. AAP により前処理した細胞の MNNG 感受性がどう変わるか, あるいは MNNG であらかじめ処理した細胞の突然変異は AAP によりさらに増加するか, 等の点を確認するために, MNNG 処理前後の様々な時期に AAP を投与した実験を行ったが, MNNG と AAP は同時投与よりも処理時期をずらした方が変異細胞の出現頻度はより多くなる傾向はみられるが, どの時期に AAP 処理を行った場合に最も有効であるか, 結論は得られていない(未発表). この点に関しては, 目下実験続行中である. また, AAP が MNNG のようなアルキル化剤に対してのみ相乗効果をもつのか, 変異原性物質一般に対してなのか, との点に関しても, 作用機序の異なるいくつかの変異原性物質を用いて確認することが必要であり, 実験計画をたてている.

最後に示したプロモーター活性に関しては, NUNC プレートによるスクリーニングテストの結果であり, さらに詳細な実験を行って確認を急いでいる. しかしながら, 何度か行った実験で常に類似の結果をみており, また, 6-TG^R 細胞と 6-TG^S 細胞の比率を変化させて行った実験においても, TPA のパターンと AAP のパターンが常に似たものであるという事を考慮に入れると, AAP が代謝協同を阻害する物質であることはほぼ確実と思われる. この点を考えると, AAP による MNNG の変異原性・染色体異常誘発活性に対する増強効果の少くとも一部は, TPA 様のプロモーター作用であると思われる. この活性に関しては, Fig. 5 のパターンから考察すると APT (フェナセチン) も弱いながらプロモーター作用をもつことが推察される. フェナセチンに関しては, 動物実験でプロモーター効果を認めた報告⁸⁾もあり, フェナセチンの活性の本体が AAP であろうと考えることはフェナセチンの代謝からみて充分可能性のある問題である. APT や AAN (acetanilide) の作用と AAP の作用との異同についても検討をすすめている.

要 約

チャイニーズハムスター由来培養細胞 CHO-K1 を用い, ウアビン耐性細胞の出現を指標とした *in vitro* 突然変異性検出系において, アセトアミノフェンに強力な変異原性物質である MNNG の作用を増強する効果のあることを認めた. この作用は加えた AAP の量と関連すること, AAP 自体には変異原活性は認められないことから, MNNG に対する相乗効果とみなされる. またこの効果は染色体異常誘発性についても同様にみられ, MNNG と AAP を同時に作用させた細胞では特にギャ

ップ以外の異常の増加が著しかった。

やはりチャイニーズハムスター由来細胞であるV79細胞を用いた実験で、未だスクリーニングの段階ではあるが、AAPにTPAと類似の代謝協同阻害効果が認められた。このことから、AAPの活性の少なくとも一部分は、変異原性プロモーター効果であることが示唆された。

謝辞 本実験にあたりV79野生細胞および6-TG耐性細胞の分与および有益な御助言をいただいた横浜市立大学医学部組織培養室梅田誠助教授に深く感謝いたします。

(本研究の一部は、1980年11月、岡山市で開催された日本環境変異学会第9回研究発表会で発表した。)

文 献

- 1) 佐々木美枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 99, 1980
- 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) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 102, 1980
- 4) 吉田誠二, 佐々木美枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 111, 1981
- 5) Yotti, L. P., Chang, C. C., and Trosko, J. E.: *Science*, 26, 1089, 1979
- 6) Umeda, M., Noda, K., and Ono, T.: *Gann*, 71, 614, 1980
- 7) Chang, C. C., Trosko, J. E., Yotti, L. P., and Schultz, R. A.: *Banbury Report (2) Mammalian Cell Mutagenesis*, 89, 1979, Cold Spring Harbor Laboratory
- 8) Nakanishi, K., Fukushima, S., Shibata, M., Shirai, T., Ogiso, T., and Ito, N.: *Gann*, 69, 395, 1978

Phenobarbital および 3-Methylcholanthrene で誘導した S-9 mix の前変異原物質 への姉妹染色分体交換 (SCE) および染色体異常誘発効果の比較検討

縄 井 寿美子*, 吉 田 誠 二*, 中 尾 順 子*, 平 賀 興 吾*

Comparison of Induced Sister Chromatid Exchanges (SCE_s) and Chromosome Aberrations by Promutagens Activated with S-9 mix Pretreated with Phenobarbital or 3-Methylcholanthrene

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

Keywords: ジメチルニトロソアミン dimethylnitrosamine, シクロホスファミド cychrophosphamide, 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, 3-メチルコランスレン 3-methylcholanthrene, フェノバルビタール phenobarbital

はじめに

先にわれわれは、培養細胞を用いた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、代謝活性化によりはじめて変異原性を現すことが知られている前変異原物質である cychrophosphamide (CP) および dimethylnitrosamine (DMN) を PCB (Aiclor 1254) で誘導した S-9 mix で代謝活性化させ、その誘発姉妹染色分体交換 (SCE) および染色体異常を調べ、代謝活性化の最適条件を検討した¹⁾。この薬物の代謝活性化は S-9 作成の際用いる誘導物質によっても異なることが知られており²⁾、今回われわれは先に得られた条件に基づき、phenobarbital-Na (PB) および 3-methylcholanthrene (MC) で誘導した S-9 mix について CP および DMN への活性化作用を調べ、先の PCB 誘導の場合の結果と合わせ比較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): SIGUMA, 33258 Hoechst: 和光純薬工業, ギムザ液: MERCK, N-Nitrosodimethylamine (DMN): 和光純薬工業, Cychrophosphamide (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% 仔牛血清添加の F12 培養液を用い、角型培養ビンにて密栓培養した。

3. S-9 mix の調整 S-9 は矢作の方法³⁾に基づいた。SD 系雄ラット (5 週令) に、MC は屠殺 24 時間前に 80 mg/kg で 1 回腹腔内投与し、PB は 0.1% 濃度で飲水に混

ぜ、7 日間飲用させた後屠殺した。作成した S-9 は -80° で保存し、S-9 mix は使用時に Natarajan ら⁴⁾の方法に従い調整した。

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。培養ビン当り細胞を約 4.2×10^5 個播種し、48 時間培養した後、培養液を捨て、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、3 時間培養した後、培養液 5ml で洗い、培養ビンをアルミホイルで被って BUdR $0.5 \mu\text{g/ml}$ を加えた培養液 10ml で 27 時間培養した。

5. 標本作成 培養終了 2 時間前にコルセミド $0.1 \mu\text{g/ml}$ を加え、分裂中期細胞を集めた。常法⁵⁾に従い低張、固定操作を行い、標本を作成し、染色体観察には 2% ギムザ液にて、また SCE 観察には先に報告した方法⁶⁾にて染色を行った。

6. 観察 染色体異常検索については 100 個の分裂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 30~50 個の分裂中期細胞を観察し、各々の細胞について SCE 数を記録した。

結 果

MC または PB で誘導した S-9 mix で代謝活性化を図った、CP および DMN の SCE 結果を Table 1 に、染色体異常誘発の結果を Table 2 に示す。PB または MC で誘導した S-9 mix のみで処理した対照は、SCE、染色体異常誘発ともにわれわれが先に得ている無処理での値と殆んど変わらなかった。これに対し CP では、PB および MC で誘導した S-9 mix は CP を活性化してともに SCE および染色体異常を増加させ、特に PB 誘

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

Table 1. Frequency of SCEs per Cell in CHO-K1 Cell Line Treated with Various Concentrations of Cyclophosphamide (CP) or Dimethylnitrosamine (DMN) Activated with S-9 mix Prepared from PB-, MC-Pretreated Rats.

chemicals	S-9	dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (mg/ml) ^a	No. of cells observed	SCEs/cell $\pm$ S. E.
PB		—	100	6.09 $\pm$ 0.26
		1	50	10.86 $\pm$ 0.46
		2.5	30	18.13 $\pm$ 0.93*
		5	50	29.90 $\pm$ 0.84***
		10	50	38.10 $\pm$ 1.36***
		25	10	62.70 $\pm$ 2.73***
CP		—	80	6.00 $\pm$ 0.26
		5	50	5.56 $\pm$ 0.38
		25	50	8.72 $\pm$ 0.47
		50	50	9.26 $\pm$ 0.43
		100	50	10.34 $\pm$ 0.41
		250	30	20.53 $\pm$ 0.78***
MC		500	30	29.00 $\pm$ 0.95***
		1 °	30	32.80 $\pm$ 1.25***
		2.5 °	30	48.25 $\pm$ 2.60***
		5 °	—	—
PB		1 °	50	9.90 $\pm$ 0.56
		2.5 °	30	12.87 $\pm$ 0.79
		5 °	50	22.34 $\pm$ 1.08*
		10 °	30	23.30 $\pm$ 1.23***
		20 °	50	30.04 $\pm$ 1.13***
		30 °	30	24.43 $\pm$ 1.32***
DMN		40 °	—	—
		1 °	50	8.18 $\pm$ 0.42
		2.5 °	30	8.06 $\pm$ 0.57
		5 °	50	10.98 $\pm$ 0.53
		10 °	30	12.00 $\pm$ 0.89
		20 °	50	18.38 $\pm$ 0.95*
MC		30 °	14	7.85 $\pm$ 0.64
		40 °	—	—

* $P < 0.05$

*** $P < 0.005$

導のS-9mixで活性化したCPでは、25 μg でSCEは62.70/cellと観察限界に近く、染色体異常保有細胞も50 μg で92%と高率に発生し、その異常もexchangeが主であった。またMC誘導のものでも2.5mgで48.25/cellとSCEを増加させたが、染色体異常は5mgで20%の誘起に過ぎず、10mgでは細胞毒性が強まって分裂細胞は殆んど得られなかった。PBとMC誘導のS-9mixがCPに対してそれぞれ同程度に活性化する用量を比較すると、SCEの場合にはPB誘導のS-9mixではCP1 μg で10.86/cell、10 μg で38.10/cellであるのに対し、MC誘導では、100 μg で10.34/cell、1mgで32.80/cellと約100倍の差が見られた。また染色体異常についても、異常保有細胞の割合がPB誘導ではCP25 μg で19%、MC誘導では5mgで20%と約200倍の差を示し、PB誘導の方がMC誘導のS-9mixに比べより効果的にCPを活性化した。

一方DMNでもPBおよびMC誘導のS-9mixで、SCE、染色体異常ともに増加させたが、SCEについてはPB誘導においては5mgで22.34/cellと有意な増加が見られ、30mgで最高の30.04/cellを示したが、MC誘導では用量に伴う増加は見られたが、20mgで最高の18.38/cellと、そのSCE誘発性はPB誘導のものに比べ低く、また30mgでは分染されている細胞は減少し、そのSCE頻度は低下していた。染色体異常については、PB、MC誘導のS-9mixともにDMN30mgで異常保有細胞を22%、23%と増加させ、その異常もexchangeおよびbreakの増加が主であった。また40mgではPB、MC誘導とも、分裂細胞は見られなかった。

考 察

先にわれわれはPCB誘導のS-9mixを用いて、CP、DMNのSCEおよび染色体異常誘発を調べ報告した。今回は同条件下でPBおよびMC誘導のS-9mixを用い、同薬物について以上に述べたような結果を得たので、先の結果と合わせて、比較検討を試みた。

CPはFig.1に示したようにSCE、染色体異常とも3種のS-9mixでともに濃度に伴う上昇が見られ、その作用の強さはPB、PCB、MC誘導のS-9mixの順である。SCE頻度を比較すると、PBとMC誘導のS-9mixではその要したCP用量に約100倍の開きがあるが、その誘発濃度が最も高かったMC誘導のS-9mixでもS-9mix無添加のCPのSCEカーブに比べ約1/40の濃度であり、明らかにS-9mixの効果は認められる。一方、染色体異常誘発の見られたCP用量を3種のS-9mixについて比較すると、MC誘導で示された最も高い異常保有率20%はPCB誘導の場合の1,000倍、PB誘導の場合の2,000倍である。また染色体異常の観察される用量は、SCEの観察限界か、もしくは観察不能であった細胞周期の遅れの見られる分染されない細胞の増加する濃度からで、3種のS-9mixともCP濃度に伴う活性化量の増大とともに、SCEの上昇→染色体異常の上昇→細胞致死へと進み、従って細胞致死用量も、CPの最も低濃度からSCEおよび染色体異常を誘発したPB誘導のS-9mixにおいて最も低く、100 μg で分裂細胞は見られなかったのに対し、S-9mix無添加ではこの濃度は20mgと2,000倍の差を示している。CPの代謝活性化は、染色体への作用とともに細胞毒性も強めていると言える。

DMNはFig.2に示したが、3種のS-9mixともにSCEおよび染色体異常の増加が見られた。しかしCPに比べそのSCE、染色体異常誘発頻度は最高でも1/2以下で、そのカーブもゆるやかであり、細胞致死濃度にも大きな差は見られなかった。3種のS-9mixの比較では、

Table 2. Chromosomal Effects of Cychrophosphamide (CP) or Dimethylnitrosamine (DMN) Activated with S-9 mix Prepared from PB-, MC- Pretreated Rats.

chemicals	S-9	dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a (mg/ml)	No. of cells analyzed	aberrant cells (%)	gap		break		ex ³⁾	ot ⁴⁾
					C ₁ ¹⁾	C ₂ ²⁾	C ₁	C ₂		
CP	PB	—	100	1.0			1			
		5°	100	5.0	2		1		1	1
		10°	100	7.0			1	4	2	1
		25°	84	19.0	1		1		10	5
		50°	25	92.0	3		15		27	7
		100	—							
	MC	—	100	1.0	1					
		50°	150	4.0	1	1			1	2
		100°	200	5.5	2		5		2	2
		250°	100	5.0	1		2		1	2
		1	100	3.0			1	2		
DMN	PB	2.5	100	2.0			2			
		5	100	20.0	3		6		12	3
		10	—							
		5	100	4.0	3		1			
		10	100	5.0	2				1	2
	MC	20	94	9.6			1		3	2
		30	100	22.0	5		8	5	10	4
		40	—							
		10	100	3.0	1				1	1
		20	89	2.2	1				1	
		30	100	23.0	6		7		16	3
		40	—							

- 1) Aberrations of chromatid type
- 2) Aberrations of chromosome type
- 3) Exchanges
- 4) Other aberrations

その活性化の強さは PCB, PB, MC の順であると考えられるが, SCE では DMN 20mg でその頻度に PCB と PB で逆転が見られ, また染色体異常誘発も 3 種とも明確な差は認められず, その差の最も大きい SCE における MC 誘導と PCB 誘導の S-9 mix の DMN の用量差も約 10 倍に過ぎず, その活性化に CP との違いが見うけられた。DMN については Matuoka²⁾の無処理を加えた 4 種の S-9 mix で染色体異常誘発を調べた報告があるが, それによると DMN 3mg で PB 誘導が最高の約 60% の異常を示し, 次いで PCB 約 45%, 無処理, MC の順となっておりわれわれの結果と異なるが, 用いた細胞の種類および処理方法など異なっており, このことから前変異原物質をスクリーニングする際の S-9 mix については十分考慮する必要があると思われる。さらに CP で示された S-9 mix の誘導物質の違いによる大きな用量差は, CP 25 μg で 3 種の S-9 mix についてその SCE を比較した場合, PB 誘導 S-9 mix が 60/cell 以上もの SCE を示すのに対し, MC 誘導では殆んど正常値と変化なく, 前変異原物質をスクリーニングする際, 代謝活性化による細胞毒性と関連して, 用いる薬物およびその用量と S-9 mix の種類の関係は大変重要である。PCB で誘導した S-9 mix は, 広範囲に前変異原物質を活性化す

ると言われ変異原のスクリーニングに一般に多用されているが, 今回の CP のように PB 誘導の S-9 mix の方がより効果の見られる物質や, MC 誘導でより顕著に染色体異常を誘発すると言われる styrene monomer の存在²⁾など, *in vitro* の代謝活性化を用いたスクリーニングには, その用いる S-9 mix について, 特にその結果が陰性であったり, 疑問が持たれる場合には PCB 誘導以外のものについても考慮を払う必要がある。

要 旨

前変異原物質として知られている cychrophosphamide (CP) および dimethylnitrosamine (DMN) について, phenobarbital-Na(PB)或は 3-methylcholanthrene(MC)で誘導した S-9 mix を用い, その SCE および染色体異常を調べた。先に得た PCB での結果と合わせ, その活性化作用を SCE および染色体異常誘発について比較検討した。その結果 CP においては PB 誘導, PCB 誘導, MC 誘導の S-9 mix の順にその活性化作用が強く, その活性化を示す CP の用量には特に MC 誘導との間に大きな差が見られた。一方 DMN では, 3 種の S-9 mix は CP に比べその活性化作用は弱く, 活性化を現わす DMN 用量にも 3 種の間で大きな差は見られなかった。

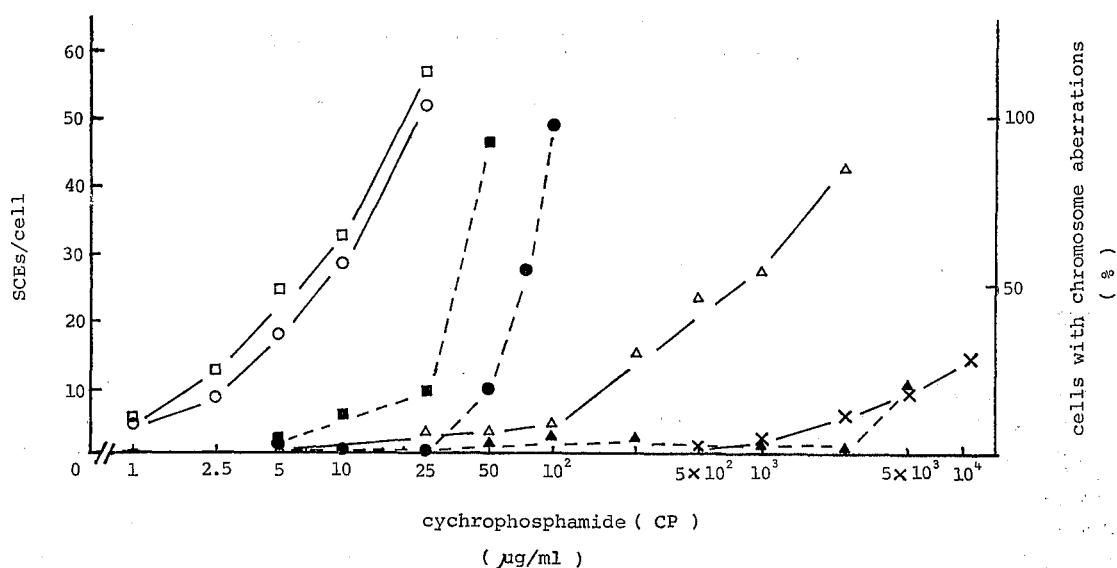


Fig. 1. Difference of SCEs (—) and chromosome aberrations (.....) in CHO-K1 cells treated with various concentrations of cyclophosphamide and S-9 mix prepared from PCB (O, ●)-, PB (□, ■)- or MC (Δ, ▲)- pretreated rats. (x) is without S-9 mix. These figures are subtracted each control's treated S-9 mix only from practical's.

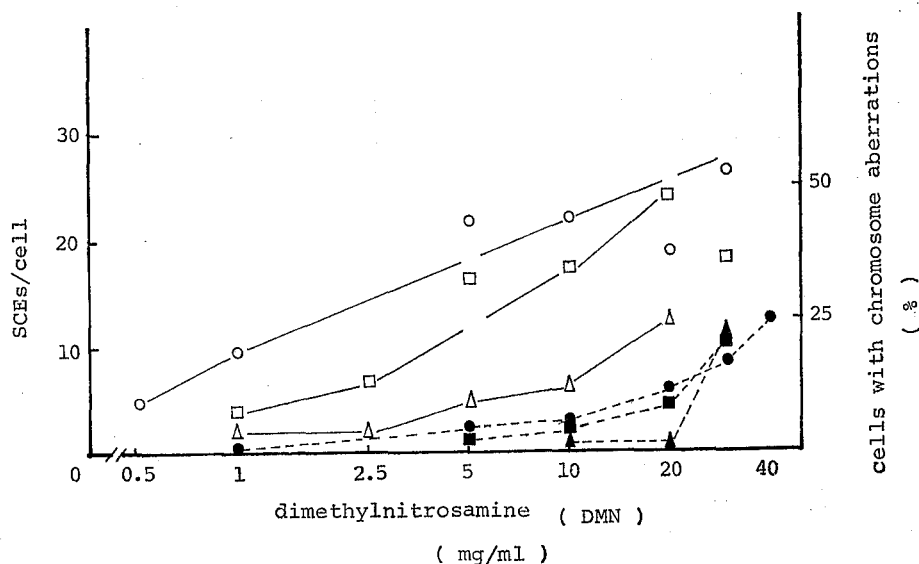


Fig. 2. Difference of SCEs (—) and chromosome aberrations (···) in CHO-K1 cells treated with various concentrations of dimethylnitrosamine and S-9 mix prepared from PCB (O, ●)-, PB (□, ■)- or MC (Δ, ▲)- pretreated rats. These figures are subtracted each control's treated S-9 mix only from practical's.

文 献

- 1) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子: 東京衛研年報, 31-2, 89, 1980
- 2) Matsuoka, A., Hayashi, M., and Ishidate, M.: *Mutation Res.*, 66, 277, 1979
- 3) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, 20, 16, 1975

- 4) Natarajan, A. T., Bates, A. D., and Van Buul, P. P. W.: *Mutation Res.*, 37, 83, 1976
- 5) 吉田誠二, 益淵正典, 縄井寿美子: 東京衛研年報, 26-2, 166, 1975
- 6) 縄井寿美子, 吉田誠二, 益淵正典: 東京衛研年報, 29-2, 167, 1978

生物発光法によるラット血中 ATP 量の加齢による変化

市川 久次*, 小林 博義*, 中尾 順子*

Changes with Age of ATP Contents in Rat Blood Measured by Bioluminescent Technique

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: ラット rat, アデノシン三リン酸 ATP, 血液 blood

毒性の試験, 研究において溶血抵抗 (赤血球膜浸透圧抵抗) に対する影響を検討することは血液毒性のみならず肝臓, 胆道に対する毒性を検索するうえで非常に意義あるものといわれている^{1,2)}. これまで著者ら³⁻⁹⁾は実験小動物 (ラット, マウス) を用いての Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による赤血球膜浸透圧抵抗の測定法の開発ならびに毒性試験への応用を試み, この間に幼若ラットにおいてのみ出現し成長と共に消失する特徴ある高張部瞬時溶血を起す赤血球の存在を見出した. 一方赤血球膜浸透圧抵抗の低下と赤血球中の ATP 量の低下の相関が認められている¹⁰⁾. しかしながら血中 ATP 量の加齢による変化について検討したデータはほとんど見当たらない. そこで今回ラットの出生時より幼若期を経て成熟期までの血中 ATP 量の変化を生物発光法により検討したところ若干の知見を得たので報告する.

実験材料ならびに方法

1. 使用動物: 静岡県実験動物農業協同組合生産の SLC-Wistar 系ラットを日本クレア KK 製の CE-2 飼料にて自家繁殖 (兄妹交配) して得た仔ラットを実験に供した. 実験に供するに当っては出生仔数 7 匹以上, 雌雄 3 匹以上のものを採用し, 母ラット 1 匹につき 10 匹以下の仔ラットを保育するように出生時に選定した. 各週令雌雄 5 匹ずつ実験に供せるようそれぞれ各週令母ラットの数を 1 あるいは 2 匹使用した.

2. 飼育条件: 室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 照明時間 午前 6 時より午後 5 時までに調整された飼育室にて, 生後 4 週令までは母ラットと共にプラスチックケージにカンナクス床敷にて, 餌 (CE-2) は自由に摂取させ, 水は細菌ろ過器経由の水道水を給水びんにより自由に摂取させた. 生後 4 週以後は母ラットより分離し, 雌雄別々にステンレス製網ケージに収容し, 餌 (CE-2) は自由に摂取させ, 自動給水装置 (細菌ろ過器経由) 付ベルト式飼

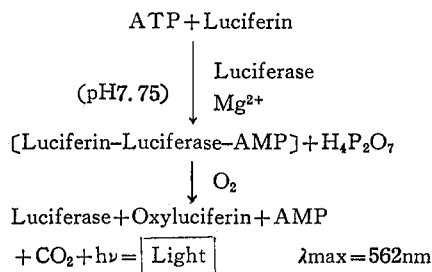
育架台にて飼育した.

3. 体重の測定: ラットの体重測定は採血直前に KN 型動物天秤 (使用範囲 20~100g, 20~800g; 夏目製作所製) を用いて行なった.

4. ラットからの採血ならびに試料血液の調製: ラットからの採血は生後 2 週までは無麻酔下断頭により頸部動静脈より流出する血液を, 生後 3 週以後は無麻酔下背位に固定し, 大腿部を剪毛後切開し, 伏在静脈を露出させ静脈用注射針 (1/4) にて穿刺し噴出する血液をマイクロセレクトピペットならびにシリコン処理したガラス製チップ (10~30 μl 用, Clay Adams 製) を使用して 10 μl 採取し, 冷精製水 990 μl 中に加え激しく混和溶血させ試料血液 (血液 100 倍希釈に相当) とした. なお, ATP 量測定にはさらに 10 倍希釈したもの (血液 1000 倍希釈に相当) を, ヘモグロビン (Hb) 量測定には 100 倍希釈のものを使用した. 調製した試料血液 (血液 100 倍希釈) は -80°C に凍結保存し, 使用時氷水中にて溶解して使用した.

5. 生物発光 (バイオルミネッセンス) 法による ATP 量の測定¹¹⁾

(1) 原理



この反応は上記のように酵素 Luciferase (分子量約 8 万) と Luciferin が ATP と反応して ATP 1 分子当たり 1 ホトンの光を生じる. この生じたホトンをホトダイ

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

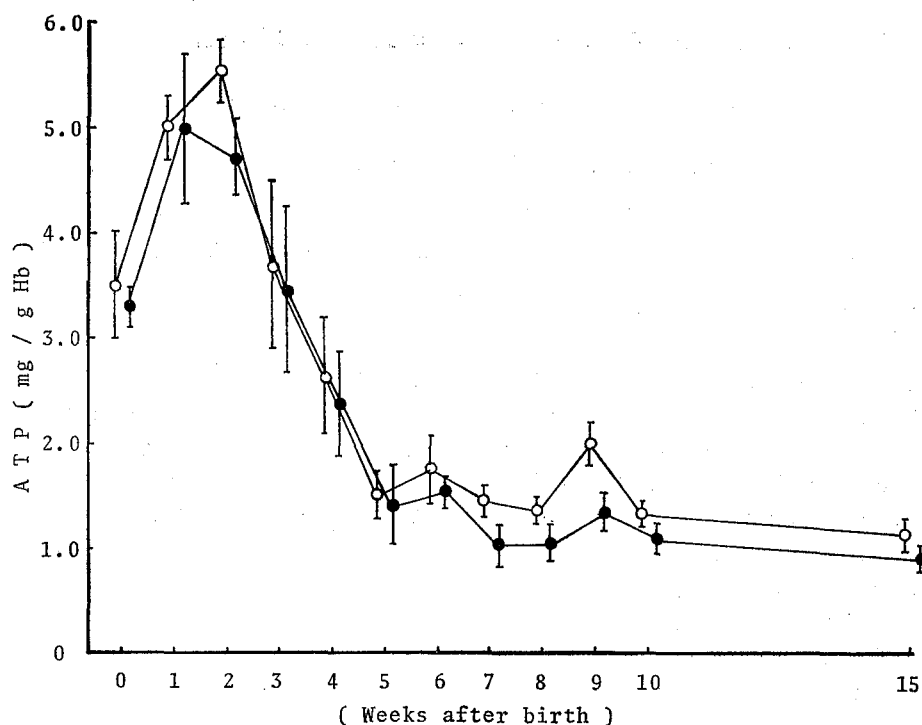


Fig. 1. Changes with Age of ATP Contents in Rats Blood.
○ Male ● Female Vertical bars indicate SD.

オードにより電流に変換し発光強度 (Relative Luminescence Unit=RLU) として読み取る。

(2) 試薬: ATP (Sigma 製, adenosine 5'-triphosphate 2 sodium salt, anhydrous MW. of free acid 507.2), NRS (Lumac 製, ATP 抽出試薬), HEPES 緩衝液 (Lumac 製, MgSO_4 0.1M, NaN_3 0.3%, pH 7.75), Lumit 試薬 (Lumac 製, Luciferin-Luciferase), ヘモキット-N (日本商事製)

(3) ATP 量の測定

	試料血液	NRS	ATP 標準液	H ₂ O	Total
①	10	100	0	140	250
②	10	100	5	135	250
③	10	100	10	130	250

単位: μl , ATP 標準液: $1.0\text{ng}/\mu\text{l}$

上記に示したように①ATP 0ng, ②ATP 5.0ng③ATP 10.0ng を試料血液に添加したものを調製した後, Luciferin-Luciferase (Lumit 試薬) 1 μl に5.0mlのHEPES 緩衝液を加えてゆるく振りながら溶解したもの100 μl を Lumac Celltester 1030内装置にて前記①, ②, ③に分注し, 室温にて反応させ生成するホトンを発光強度として読み取り, ①, ②, ③の発光強度とATP添加量の関係をグラフにプロットし, グラフより標準物質添加法に

Table 1. Changes with Age of ATP and Hemoglobin Contents in Rat Blood

weeks after birth	ATP (mg/dl Blood)		Hb (g/dl Blood)	
	M	F	M	F
0	52.2 $\pm$ 7.46 ^{1), 2)}	49.1 $\pm$ 6.97	14.9 $\pm$ 0.61	14.9 $\pm$ 1.40
1	49.3 $\pm$ 2.75	50.3 $\pm$ 6.72	9.9 $\pm$ 0.30	10.3 $\pm$ 0.38
2	49.6 $\pm$ 4.00	44.0 $\pm$ 2.67	9.1 $\pm$ 0.73	9.4 $\pm$ 0.38
3	42.9 $\pm$ 7.11	41.2 $\pm$ 9.80	11.8 $\pm$ 1.27	12.0 $\pm$ 0.83
4	30.0 $\pm$ 6.15	27.8 $\pm$ 4.60	11.5 $\pm$ 0.46	11.9 $\pm$ 1.50
5	19.4 $\pm$ 1.78	19.1 $\pm$ 2.92	12.8 $\pm$ 0.88	13.3 $\pm$ 1.07
6	25.8 $\pm$ 5.01	22.2 $\pm$ 1.76	14.5 $\pm$ 0.88	14.6 $\pm$ 0.64
7	22.5 $\pm$ 2.53	17.0 $\pm$ 3.41	15.3 $\pm$ 0.44	16.4 $\pm$ 0.46
8	19.7 $\pm$ 2.05	17.1 $\pm$ 2.52	14.3 $\pm$ 0.35	16.0 $\pm$ 0.61
9	27.4 $\pm$ 2.61	20.3 $\pm$ 2.72	13.9 $\pm$ 0.41	15.1 $\pm$ 0.16
10	22.6 $\pm$ 2.37	18.0 $\pm$ 2.73	17.0 $\pm$ 0.29	16.5 $\pm$ 0.67
15	17.5 $\pm$ 2.88	13.9 $\pm$ 1.52	15.2 $\pm$ 0.51	15.1 $\pm$ 0.31

1) mean $\pm$ S.D.

2) No. of rats measured is 5.

よりATP量を求めた。①, ②, ③各々3回ずつ行ないその平均値を使用した。

なお, 測定装置 Lumac Celltester 1030 による測定条件は, 温度: 室温, Function: 10 (積分時間10秒), Sensitivity: MD であった。

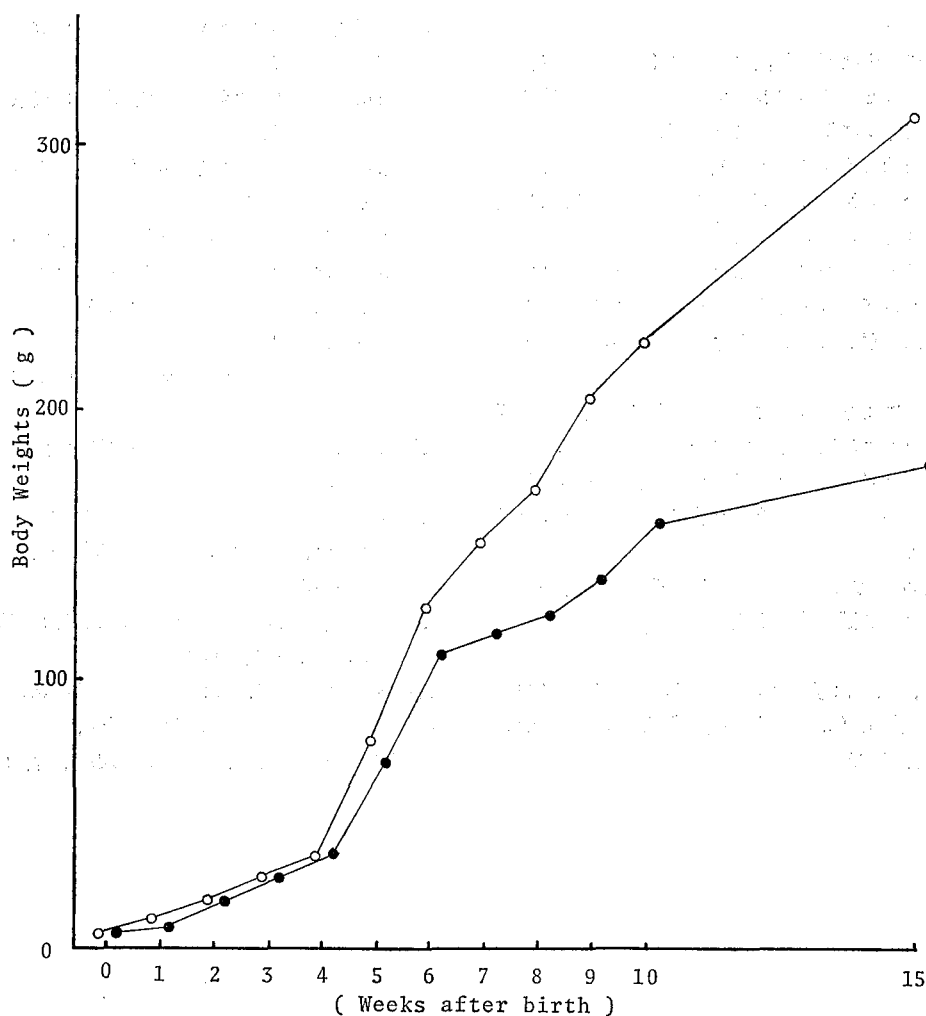


Fig. 2. Body Weights of Rats used
○ Male ● Female

6. ヘモグロビン量の測定：試料血液（100倍希釈） $10\mu\text{l}$ を取りシアンメトヘモグロビン呈色試液（日本商事製） 2.5ml を加え室温にて5分放置した後 Cary 17分光光度計を用いて 420nm にて吸光度を測定し、別に作製した検量線よりヘモグロビン量を求めた。

実験結果ならびに考察

自家繁殖により得たラットを用いて、血中 ATP 量を生物発光法により測定し、加齢によるラット血中 ATP 量の変化を検討した。Fig. 1, Table 1に示した如く、ヘモグロビン g 当りの ATP 量は出生後急激に増加し生後2週においてピークに達した後生後5週まで減少を続け、生後6週以後は加齢と共にわずかに減少していく傾向が認められた。しかし血液 dl 当りの ATP 量は出生

直後が最も高く加齢と共に減少した。また血液 dl 当りのヘモグロビン量は出生直後は成熟期と同等で、出生後2週まで急激に減少し生後2週において最低となり以後徐々に増加し生後2週以後増減はあるが安定した値を示した。これらのことより生後2週におけるヘモグロビン g 当りの ATP 量が高い値を示したのは、生後2週における血液 dl 当りのヘモグロビン量が非常に低い (9.1g/dl blood) ことが大きくかかわっているといえる。Wintrobe^{12,13}はヒトのヘモグロビン量について、生後1日では 19.5g/dl でかなり高く生後1年が最も低く (11.2g/dl) 以後徐々に増加していくことを報告しているが、出生後短期間は体の成長が著しく速く、血液成分の生成が間に合わないでこのような現象が起きるものと考えられ

る。

一方、著者ら⁵⁾はCPC法にて生ずる特徴ある高張部瞬時溶血が生後5～6週において消失し始め、生後6～8週において完全に消失することを報告したが、本研究において得たATP量の急激な減少が終る時期と高張部瞬時溶血が消失し始める時期がほぼ一致するのは興味深い現象であり今後の検討が待たれる。

また、実験に供したラットの体重の変化はFig. 2に示した如くであるが、各週令別々のラットであることを考慮すれば、ほぼ順調な成長をとげていると考えられる。

結 論

生物発光法によりラット血中ATP量の加齢による変化を検討したところ次の結論を得た。

1. ヘモグロビン当りのATP量は出生後増加し、生後2週においてピークに達した後減少し、生後5週以後安定化する。

2. 血液dI当りのATP量は出生直後が最も高く、以後減少し生後5週以後安定化する。

文 献

- 1) Cooper, R. A.: *J. Clin. Invest.*, 48, 1820, 1962
- 2) Mubride, J. R., and Jacob, H. S.: *J. Heamat.*, 18, 383, 1970
- 3) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 203, 1975
- 4) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 27-2, 53, 1976
- 5) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 28-2, 230, 1977
- 6) 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
- 7) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 30-2, 151, 1979
- 8) 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
- 9) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 31-2, 81, 1980
- 10) Cohen, N. S., Ekkolm, J. E., Luther, M. G., and Hanahan, D. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 419, 229, 1976
- 11) Brewer, G. J., and Knudsen, C. A.: *Clin. Chim. Acta*, 14, 836, 1966
- 12) Wintrobe, M. M.: *Clinical Hematology. Lea and Febiger*, Philadelphia, Pa., 4th Edition, 1956
- 13) Wintrobe, M. M.: *J. Clin. Med.*, 17, 899, 1932

Nunc plate を用いた CHO-K1 細胞の染色体標本作製

吉田 誠二*, 佐々木 美枝子*, 中尾 順子*, 平賀 興吾*

Chromosome Preparations from CHO-K1 Cells used Nunc Plate

SEIJI YOSHIDA*, MIEKO SASAKI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

We used semi-microculture plate (NUNC multi dish, N-1483) for the chromosome analysis and cytotoxicity assay of cultured Chinese hamster cells (CHO-K1 cell), and compared the results with those obtained by the usual method.

NUNC multi-dish (N-1483) has 24 separate wells, each well being capable of cultivating 1ml of cell suspension per well. It is possible to conduct experiments for 4, 6 or 24 dosage levels using a single dish.

The results of the experiments using PHQ (phenylhydroquinone, one of metabolites of *ortho*-phenylphenol) are discussed. For chromosome analysis, cells collected from 4 or 6 wells were enough to facilitate a microscopic observation of 150 to 400 mitotic cells. For cytotoxicity screening assay, it was suitable to use 4 wells per dosage level.

Although such problems as regards the solvent concentrations of test chemicals and difficulty of statistic analysis arise in the experiments using these micro- or semimicroapparatus, this multi-dish proved most suitable for the screening assay of toxic substances because of the smaller amount of medium and toxic substances required for conducting more experiments in a shorter period of time and a lesser space.

Keywords: Nunc plate, Chromosome analysis, Cytotoxicity, Phenylhydroquinone, CHO-K1 cell

緒 言

培養細胞を用いての染色体試験は現在広く行なわれており、この培養細胞の持つ多くの利点を利用し先の染色体試験のみならず細胞毒性試験、*in vitro*-mutation assay、及び *in vitro*-promoter assay などの試験も盛んに行なわれている。一方、培養細胞を用いての試験においては培養細胞の種類はもちろんのこと培養器材の選定についても考慮すべき点はいくつかある。その中で、細胞培養の出来るスペース、つまり、incubator の大きさに限度がある場合は頻回に行なう実験に支障を来たすことがあり、培養器材の小型化が望まれる所である。このことは、培養に用いる培養液及び動物血清の使用量についても好影響を及ぼす。これらの事を考慮し培養器材の小型化が可能であれば先の問題点の若干の解決が出来るものと思える。そこで今回、小型培養器材の一つである Nunc plate を用いて染色体標本作製し従来の培養瓶を用いる方法との比較検討を行ない、若干の結果が得られたので報告する。また、Nunc plate を用いて行な

った *orthophenylphenate* の尿中代謝産物である *phenylhydroquinone* の細胞毒性及び染色体試験の結果についても併せて報告する。

材料及び方法

1. **Nunc plate:** Nunc 社製マルチディッシュ、24well (4×6)、培養面積 1.9cm²/well、容量 3.5ml/well、大きさ 88×133mm、ガンマー線滅菌済みの物を使用した。

2. **細胞及び培養:** 細胞は CHO-K1 細胞を用いた。培養液は F12 培養液に仔牛血清 10% 及び抗生物質を添加したものを用いた。細胞をトリプシンによりガラス面より剥離させ適当な細胞浮遊液を作製し細胞数を数え 1.2×10^5 /well/ml の濃度で Nunc plate に分注した。これを 37°C CO₂ incubator に入れ培養を開始した。

3. **染色体標本作製:** 培養の終了する 90 分前に 10μg/ml 濃度のコルセミド溶液を 50μl/well の割合で添加した。コルセミド処理後の細胞に低張処理及び固定を従来の方法¹⁾により施し、Flame-Dry 方法により標本作製した。

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

4. 供試検体：phenylhydroquinone（以下 PHQ と略す）は東京化成工業社製で Lot No. FCRO 3 のものを用いた。

5. Nunc plate (24 well) による PHQ の細胞毒性の検定

(1) PHQ 処理細胞を再培養した場合のコロニー形成率：変異原性試験を行なう場合、供試検体で一定時間処理した細胞を再浮遊したのち、一部を選択耐性を検定するためのディッシュとコロニー形成率を見るためのディッシュに分けて再培養する方法がとられている。この方法に基づいて、PHQ 処理細胞のコロニー形成率を調べた。 8×10^5 個の細胞を 10ml の培養液を入れたガラス培養瓶に一晩培養したのち、PHQ で 24 時間処理した。PHQ は 10mg/ml の濃度に dimethylsulfoxide（以下 dmso と略す）に溶解し、その 100, 75, 50, 25, 10 μ l を培養液に加えた。24 時間後、PHQ 及び dmso を加えた培養液を捨て、細胞を培養液で二度洗浄したのち新しい培養液を入れ、さらに一晩培養した。この後、細胞をトリプシンでガラス面より剥離し、浮遊細胞の状態にして細胞数を計数し、同時に薬剤耐性検出用ディッシュ、コロニー形成率の検出用ディッシュ及び Nunc plate に播種した。コロニー形成率の検出のためには、一週間後に生じたコロニーを染色し計数した。

(2) PHQ の細胞毒性（直接法）：(1) で述べたのは、薬物処理後再播種した細胞のコロニー形成率を調べる方法であるが、次に、細胞を PHQ で処理したのち再播種することなく、直接に細胞毒性を調べた。Nunc plate 6 枚を用い、各 well あたり約 100 個の細胞を播種し、一晩培養したのち、PHQ で処理した。PHQ の濃度は 25, 20, 15, 10, 5, 0 μ g/ml/well の 6 群とし、一群あたり 4well を用いた。処理時間は 2, 6, 8, 24, 48 時間及び 5 日間とし、各一プレートをあてた。各処理時間後、培養液を除いて細胞を洗浄し、新しい培養液を入れてさらに培養した。5 日後、全ての培養液を除いて細胞を固定・染色し、生じたコロニーを計数した。

6. PHQ の染色体試験：dmso に溶解させた種々濃度の検体添加溶液を 10 μ l/well の割合で添加し、3 及び 24 時間処理を行なった。なお、control は dmso のみを先と同容量添加したものとした。染色体標本作製は 3. で記述した方法で行なった。

結果及び考察

Nunc plate と通常用いている培養瓶の染色体作製状況の結果を Table 1 に示す。

Nunc plate の 4well 及び 6well を用いた時の 1ml あたりの分裂中期細胞の数は 38~50 及び 50~67 であり、培養

Table 1. Chromosome preparations from Nunc plate and T. C Bottle

	Medium	Slide	Mitotic cells	Mitotic cell/ml
Nunc plate 4 well	4 ml	2-3	150-200	38-50
Nunc plate 6 well	6 ml	2-3	300-400	50-67
T. C Bot. 1 Bot.	10 ml	5-6	500-1200	50-120

Table 2. Cytotoxicity tests of PHQ on CHO-K1 cells(1)

25 μ g/ml		Treatment of PHQ*1	
		10 μ g/ml	0 μ g/ml
*2	28/ 1 $\times 10^5$	*3 ∞ / 1.2 $\times 10^5$	∞ / 8 $\times 10^4$
	0/ 1 $\times 10^4$	∞ / 1.2 $\times 10^4$	∞ / 8 $\times 10^3$
	0/ 1000	163/ 1220	∞ / 800
	0/ 100	31/ 244	143/ 160
*4	0.028%	13%	89%

*1 Cells were treated with PHQ for 24 hr, and then trypsinized.

The cell suspensions were replated into the multidishes.

*2 The results were shown as;
colony numbers/seeding cell numbers

*3 ∞ : Large numbers of colony, impossible to be counted.

*4 Plating efficiency;
colony numbers/seeding cell numbers $\times 100\%$

瓶の 50~120 に比べ若干少ない結果であった。一般に^{2,3)}染色体試験の観察細胞数は分裂中期の染色体を 1 dose について 100 個と言うのが通常であり、Nunc plate の 4well もしくは 6well を用いれば染色体標本が 2~3 枚作れ、中期細胞が 150~400 個観察出来る。このことは、Nunc plate が染色体試験に充分応用出来るものであることを示唆する結果であった。また、Nunc plate は一枚で 4~6 の dose が設定出来るという利点もある。このことから、Nunc plate は染色体試験のスクリーニングに適しているものと思える。

次に、Nunc plate を用いた PHQ の細胞毒性試験の結果であるが、Table 2 に PHQ 25 及び 10 μ g/ml 処理細胞のコロニー形成率に関する結果を示す。

結果は、再播種した細胞数あたりに生じたコロニー数として示した。PHQ の 100, 75, 50 μ g/ml 処理細胞は 10^5 細胞を播種した場合でもコロニー形成は全く見られなかった。PHQ 無処理の対照ではコロニー形成率は 89% であるのに対し、10 μ g/ml の PHQ で 24 時間処理した細胞では、再播種によるコロニー形成率は 13%、25 μ g/ml

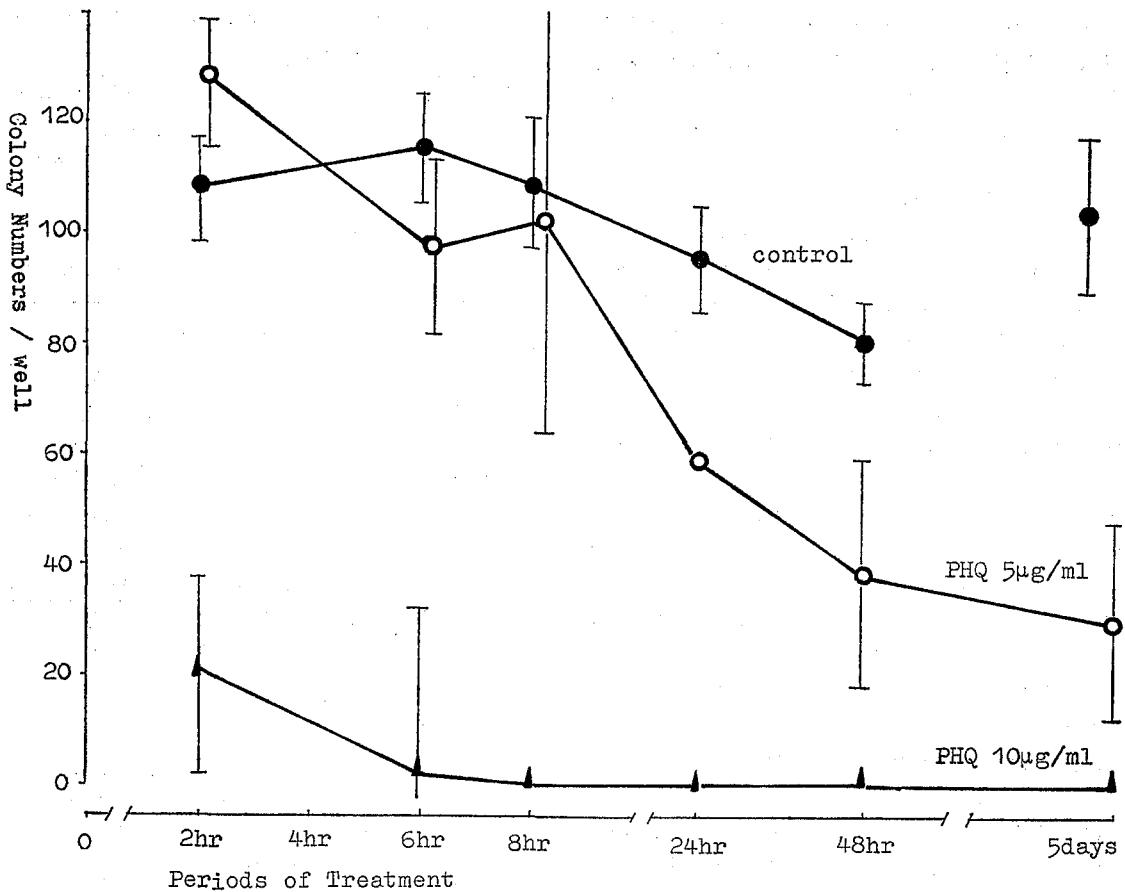


Fig. 1. Cytotoxicity of PHQ (2)

Table 3. Chromosome tests of PHQ on CHO-K1 cells

Duration of treatment (hr.)	Chemical conc. (µg/ml)	No. of observed cells	Total aberrations	gap		berak		Ex.	Ri.	Di.	Pu.	Ot. ^a
				C 1	C 2	C 1	C 2					
3	25	150	10	6	0	3	0	1	0	0	0	0
	5	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	150	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
24	25	84	9	6	1	0	0	0	1	2	0	0
	20	87	9	3	1	1	0	3	1	1	0	0
	12.5	123	11	8	0	2	0	1	0	0	0	1
	10	149	11	2	0	1	0	2	2	3	0	1
	6.25	122	9	1	0	3	0	1	5	3	0	0
	5	100	6	2	1	2	0	2	0	0	0	0
	0	100	4	3	0	0	0	0	0	0	1	0

a Other aberrations : 1 multi-aberrations, 1 erosion

処理では、わずか0.028%であった。なお、これと同時に
行なった変異原性試験で、ここに述べた処理方法では、
PHQにはCHO-K1細胞に対する変異原性は認められな
かった。

次に、Nunc plate の well あたり約100個の細胞を罫

種して行なった細胞毒性（直接法）の結果を Fig. 1 に示
す。5µg, 10µg/ml PHQ 処理で処理量と処理時間に相
関してコロニー形成率の低下が見られた。15, 20, 25µg/
ml の PHQ で処理した細胞は、5日後の固定・染色時
にはコロニーを全く形成しなかった。また、5日間処理

を続けた細胞では、コロニーあたりの細胞数が他の群の細胞数よりも少なく、小さいコロニーが観察された。対照群の細胞にもコロニー形成率の低下が見られたのは、溶媒に用いた dmso を 10 μ l 処理しているの、この効果であろうと思われる。

次に、染色体試験の結果を Table 3 に示す。

PHQ の 25 μ g/ml 3 時間処理で異常細胞数が control に比し有意な増加を示した。その誘発した異常は gap, break であり, exchange も一例見られたが、今回の control の自然誘発異常の頻度が 1.3% (2/150) という値であり我々が現在まで蓄積してきた control の background (3~4%) に比し、かなりの低頻度であった。このことから、25 μ g/ml 処理の異常誘発頻度が 6.7% (10/150) という値にもかかわらず有意な増加を示したものと思える。この 3 時間処理は dose を増やし再検討を行なう。

次に、24 時間処理では 5-25 μ g/ml の間に 6 dose を設定して行なったが、25 及び 20 μ g/ml 処理においては PHQ による細胞増殖阻害が強く観察細胞は 84 及び 87 個という少ない数であった。5-25 μ g/ml 処理のいずれの異常細胞数は、control に比し有意な増加を示していないが、用量に伴う増加が見られた。一方、25, 20 及び 12.5 μ g/ml 処理の誘発する異常が gap を主とするのに対し、10, 6.25 及び 5 μ g/ml 処理では exchange, ring 及び dicentric chromosome という交換型異常が多く観察された。これらの結果を基に今後さらに検討を進めて行きたい。

今回、染色体試験の簡便化ということで小型培養器材の一つである Nunc plate を用いて染色体標本の作製を行なった。作製方法は従来用いている培養瓶と同様の方法、つまり、コルセミドの濃度、低張液として用いた、0.075M KCl 溶液の量などを同じにして行なった所、良好な染色体標本が 2~3 枚作製可能であり分裂中期の細胞も 4 及び 6 well を用いて 150~400 個観察出来た。この結果で従来用いている培養瓶での染色体標本の作製状況に比べて何ら遜色がないことが解った。また、Nunc plate で用いる培養液及び血清の量も培養瓶を用いて行

なう方法に比べ約 1/10 と少なく頻回に行なう細胞毒性試験及び染色体試験においては極めて良好な培養器材であると思える。また、培養瓶に要する培養スペースに比べ約 1 割のスペースで培養が可能であるという点も Nunc plate の利点の一つになっている。

一方、水に難溶もしくは不溶な物質の場合の Nunc plate の適用には若干の検討の余地がある。現在、水に難溶もしくは不溶な物質の場合には dmso を溶媒として用いるが、この dmso の細胞毒性についても考慮すべき点がある。培養細胞の種類により異なるが、一般に、培養液中に dmso ガス 2% 以上の濃度である場合には細胞の増殖に影響を及ぼすとされている¹⁾。つまり、供試検体の細胞毒性が強い場合には溶媒として用いる dmso の量も少量で済むが医薬品及び食品添加物などのように細胞毒性が非常に弱い物質の試験においては高濃度での処理を行なわざるをえない。従って、多量の dmso が培養液に混じってしまう場合がある。また、化学物質の内には、代謝活性化酵素の存在下で初めて変異原性や染色体異常誘発性を示すようになる物質も多く、未知検体の場合には S-9mix 添加の実験を非添加の実験と併せて行う必要があるが、Nunc plate の場合、その培養面積が小さいために、従来の 10ml 容量の培養瓶を用いた実験での S-9mix 処理量をそのまま応用すると、細胞全体を S-9mix 液で覆うことができず、死細胞が増加する等の問題がある。Nunc plate を用いた代謝活性化試験については、さらに検討をすすめている。

文 献

- 1) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 98, 1980
- 2) Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare, 1976
- 3) Ishidate, M. Jr., and Odashima, S.: *Mutation Res.*, 48, 337, 1977
- 4) 吉田誠二: 未発表
- 5) 梅田 誠: 医学のあゆみ, 89, 13, 767, 1974

F344/Du (Fischer) ラットにおける飼料中化学物質添加濃度と 化学物質摂取量の関係について

井 口 重 孝*, 高 橋 博*, 平 賀 興 吾*

Relation of Part per Million in Diet to Milligram per Kilogram Body Weight per Day in F344/Du (Fischer) Rat

SHIGETAKA IGUCHI*, HIROSHI TAKAHASHI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: F344/Du ラット Fischer rat, 飼料摂取 food intake

当部では F344/Du (Fischer) ラットを用いた各種の毒性試験が行われており、著者らも最近同ラットによる2つの長期毒性試験を完遂した。これらの試験より F344/Du ラットの性情に関し多くの情報を得ているが、本報告では飼料に添加した化学物質(試料)の濃度 ppm と化学物質摂取量 mg/kg/day の関係を検討した。この関係を知ることは毒性試験を行う上で極めて有用であり、従来ラットによる長期試験で化学物質の投与量を 1mg/kg. B. W./day とするための飼料中の化学物質の濃度は 20 ppm とされている¹⁾。このことは今回の検討結果においてもほぼ認められたが、ここに詳細を記載し、今後の参考資料としたい。

実験材料ならびに方法

F344/Du (Fischer) ラット: 日本チャールス・リバー飼生育の近交系 F344/DuCrj ラット雌雄を4週齢で購入、1週間の予備飼育後発育良好と認められたものを使用した。

化学物質添加飼料: 基礎飼料は日本クレア(株)の CE-2 固型飼料とし、化学物質は A および B の2種を用いた。化学物質の飼料への添加濃度 ppm は

A: 雄ラット用 0, 9,000 および 4,500

雌ラット用 0, 13,000 および 6,500

B: 雄ラット用 0, 20,000, 7,000 および 2,500

雌ラット用 0, 10,000, 5,000 および 2,500

使用動物数: A 投与各群各50匹, B 投与各群各25匹

飼育条件: 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 50~60%, 換気毎時10回, 照明午前6時から午後5時までの barrier system 飼育室において、前面および床面が網のステンレス製ケージ(縦40×横25×高さ16.5cm)に個別に収容、自動給水装置(細菌ろ過器経由水道水)付ベルト式飼育架台にランダムに配置し化学物質添加飼料投与開始まで基礎飼

料 CE-2 を自由に与えた。添加飼料の投与はラット5週齢時より開始した。なお、5週齢とは出生日を0日とした生後35日から41日までのものをさしている。投与期間は104週(2年)間とし、動物の観察、体重測定、飼料投与、摂餌量測定等は午前9時から11時の間に行った。

A および B 投与ラットの飼育室はそれぞれ独立しており、投与開始日も約1年の相違がある。

飼料摂取量の測定: 飼料投与量、摂餌後の残余量およびケージ受皿への飼料コボン量を測定し、(投与量-残余量-コボン量)/測定日数により1日摂取量(g/rat/day および g/kg. B. W./day)を求めた。測定日(週齢)は表3の通りである。

化学物質摂取量の算定: 飼料摂取量に添加濃度を乗じて求めた。(1)化学物質摂取総量(T)は、今回算定した1日摂取量を次回の測定時まで利用して期間内の総摂取量を算出した。(2)1日平均摂取量(M)は期間内の総摂取量(T)を期間の日数で除した。(3)化学物質1mg/kg/day を摂取(投与)出来る飼料中化学物質添加濃度 ppm (C)は飼料中化学物質濃度 ppm を1日平均摂取量(M)で除した。(4)飼料中化学物質濃度が1ppm のときの化学物質摂取量 mg/kg. B. W./day (D)は1を(C)で除して求めた。

結果と考察

飼料摂取量: 表1(雄)および2(雌)に5週齢時以降4半期毎の飼料摂取量を体重とともに示した。A 投与群とB 投与群(以下A群, B群とする)では全期間を通じてB群の摂取量がやや少いが、加齢に伴う摂取量の変化の傾向は両群間に差は認められず、ラット当りの摂取量は56週齢ごろまで漸増し、以降では殆んど変化なく雄では13~16g/rat/day, 雌では10~13g/rat/day であり、化学物質添加飼料摂取ラットにおいてもB群20,000ppm 投

* 東京都立衛生研究所毒性部 160 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

表 1. 飼 料 摂 取 量 (雄)

ラット 週 齢	A			B			
	0 ¹⁾	90,000	4,500	0	20,000	7,000	2,500
5	11.6±0.9 ²⁾ (125.9±7.3) ³⁾ 92.1±6.3 ⁴⁾	11.1±0.9 (120.9±8.3) 92.4±6.0	10.5±0.9 (113.8±7.2) 92.0±5.9	9.5±0.7 (103.0±6.8) 92.3±5.0	7.9±0.5 (86.3±5.6) 92.0±4.7	10.6±0.8 (113.9±7.8) 93.3±5.2	10.7±0.7 (115.7±6.7) 92.8±4.9
17	14.1±1.1 (48.2±2.8) 292.7±22.5	14.1±1.2 (50.4±3.1) 279.4±19.5	14.1±1.4 (49.6±2.8) 284.4±27.8	12.2±1.5 (48.1±1.9) 254.9±23.7	11.1±2.0 (47.6±3.4) 232.0±32.4	12.9±1.7 (49.8±2.9) 259.8±27.3	12.8±1.2 (49.1±2.1) 260.9±23.3
30	13.8±1.2 (40.3±2.6) 341.5±23.9	13.8±1.1 (41.2±2.1) 333.8±21.9	14.2±1.1 (41.7±1.6) 340.5±25.8	12.9±0.8 (37.7±2.4) 344.0±29.5	11.9±1.3 (38.9±2.0) 308.2±34.4	13.0±1.6 (38.4±1.8) 338.0±42.4	13.2±0.8 (37.7±2.2) 350.0±20.9
43	14.3±1.0 (39.8±2.0) 359.6±28.0	14.1±1.3 (39.5±3.3) 356.4±22.9	14.5±1.1 (40.0±2.1) 362.8±27.3	13.8±1.1 (37.2±2.7) 372.6±36.2	12.8±1.3 (38.6±2.3) 328.3±37.8	14.2±1.0 (38.2±2.2) 365.9±40.0	13.8±0.7 (37.0±1.8) 373.4±25.5
56	15.5±1.1 (41.5±2.2) 375.4±30.3	15.7±0.9 (41.9±2.1) 374.5±28.7	15.7±1.0 (41.0±2.0) 382.4±31.4	14.5±1.2 (36.9±2.5) 394.5±39.2	13.4±1.5 (38.8±2.8) 343.0±36.5	14.6±1.0 (38.0±2.3) 379.7±47.6	14.5±1.0 (37.1±2.3) 391.0±27.8
69	15.9±1.1 (41.3±2.3) 386.2±30.4	15.5±2.3 (40.2±5.7) 382.5±35.2	16.3±1.2 (41.1±2.2) 397.4±29.9	14.0±1.1 (33.1±2.2) 415.2±39.2	13.0±1.2 (35.7±2.3) 350.6±34.2	14.3±1.2 (34.8±2.0) 405.0±34.0	13.9±1.1 (33.6±1.8) 409.0±30.4
82	15.3±1.1 (37.8±1.7) 403.9±33.1	15.1±1.0 (37.5±2.0) 403.5±29.9	15.4±1.5 (36.9±2.6) 417.9±31.0	13.3±1.2 (29.8±2.7) 449.5±40.1	12.0±1.1 (30.9±2.0) 384.6±28.5	13.5±1.3 (31.2±2.5) 431.9±34.2	14.0±1.3 (32.3±2.3) 435.2±33.6
95	15.1±1.3 (36.4±2.3) 415.9±32.3	15.0±1.1 (36.2±2.0) 414.1±25.8	15.1±2.2 (35.3±5.3) 426.3±43.2	15.5±1.6 (33.9±3.0) 456.1±37.8	13.2±1.4 (34.0±3.3) 373.7±54.3	14.7±1.5 (33.5±2.5) 439.7±42.4	14.7±1.1 (32.9±2.6) 448.9±35.6
108	16.6±1.7 (40.9±4.6) 403.0±34.7	16.3±1.1 (41.6±3.3) 388.8±34.3	16.9±1.3 (40.6±3.0) 410.3±42.4	15.0±2.3 (34.4±4.1) 418.3±35.4	12.6±3.2 (33.3±8.1) 378.1±21.6	14.3±2.3 (33.2±5.5) 433.7±34.9	14.9±1.4 (32.9±2.4) 453.5±29.5

値は平均±SD 1) ppm 2) g/rat/day 3) g/kg. B. W./day 4) 体重(g)

表 2. 飼 料 摂 取 量 (雌)

ラット 週 齢	A			B			
	0 ¹⁾	13,000	6,500	0	10,000	5,000	2,500
5	9.1±0.9 ²⁾ (108.9±10.1) ³⁾ 83.3±4.0 ⁴⁾	6.9±0.9 (82.1±11.1) 84.1±3.4	8.7±0.7 (103.8±7.4) 84.1±3.7	8.4±0.6 (107.6±6.7) 78.6±4.0	8.3±0.8 (108.6±10.5) 77.2±4.1	7.8±0.8 (98.3±8.0) 79.3±3.8	9.1±0.7 (118.4±10.0) 77.6±4.4
17	9.3±0.8 (56.1±3.5) 165.7±11.1	8.7±0.9 (57.4±4.0) 151.1±12.8	9.4±0.8 (56.2±3.9) 166.8±12.0	8.7±0.9 (55.9±4.1) 156.7±12.7	8.4±0.7 (56.1±3.3) 151.3±10.0	8.8±1.1 (56.1±3.8) 156.8±15.7	8.5±1.4 (55.2±4.4) 153.5±16.1
30	9.6±0.9 (50.4±3.0) 189.4±12.5	9.3±0.9 (52.8±3.6) 176.1±12.5	9.7±0.7 (51.2±2.8) 190.1±12.0	9.1±0.8 (47.9±3.2) 190.4±17.1	8.7±0.6 (46.9±3.2) 187.3±12.7	9.1±0.6 (47.1±3.4) 194.5±18.5	9.0±0.7 (46.7±2.6) 193.0±16.9
43	10.3±0.8 (50.7±2.9) 202.9±15.1	10.1±0.9 (52.5±4.4) 192.0±14.9	10.3±0.8 (50.9±3.1) 202.8±12.3	9.4±0.9 (45.6±3.4) 208.3±20.0	9.1±0.7 (45.1±2.8) 203.3±14.6	9.8±0.8 (44.4±3.7) 211.1±20.6	9.8±0.8 (45.7±3.6) 208.2±23.6
56	10.9±1.0 (50.4±4.4) 217.2±16.3	11.1±0.9 (53.4±3.4) 207.5±15.7	11.3±0.9 (52.1±4.1) 217.7±17.8	10.8±0.9 (48.9±3.3) 221.5±23.2	10.5±0.7 (49.1±3.3) 214.7±14.0	10.5±0.7 (46.8±3.2) 225.3±20.9	10.6±0.9 (48.4±4.4) 221.8±25.6
69	11.7±0.9 (50.1±4.0) 235.0±20.7	11.2±1.1 (49.9±4.5) 225.2±21.1	11.6±1.1 (49.2±4.8) 235.7±20.6	10.5±1.2 (42.2±4.5) 243.0±30.2	11.0±1.0 (46.1±3.3) 230.4±17.3	10.2±1.0 (40.7±4.0) 244.8±27.3	10.0±1.5 (40.7±5.6) 241.6±30.0
82	11.6±1.5 (45.2±6.1) 257.5±25.0	11.9±1.1 (42.9±4.8) 244.0±23.7	11.7±1.1 (45.2±5.3) 258.8±28.5	10.7±1.2 (38.5±5.7) 277.0±45.3	9.8±1.7 (36.9±8.0) 269.0±32.4	10.2±1.3 (36.6±5.1) 281.7±32.1	10.2±1.8 (38.2±5.9) 268.8±42.2
95	12.0±1.3 (43.3±4.7) 276.9±29.0	11.6±1.6 (45.2±6.3) 258.0±25.8	11.8±1.1 (42.1±5.2) 281.8±28.1	12.5±1.2 (41.4±6.9) 298.8±42.5	12.1±1.1 (42.9±6.5) 285.5±31.1	10.8±2.1 (36.7±6.9) 295.2±39.0	11.4±1.6 (39.7±5.9) 290.2±44.1
108	13.3±1.4 (47.2±5.2) 279.0±37.4	13.1±1.8 (49.9±8.2) 262.6±23.4	13.4±1.4 (47.6±6.1) 283.6±24.9	11.0±2.2 (35.6±8.8) 303.4±34.8	10.1±1.9 (34.0±6.2) 292.9±28.3	10.8±1.6 (35.3±4.8) 307.5±40.2	9.9±1.5 (34.0±6.6) 290.0±42.0

値は平均±SD 1) ppm 2) g/rat/day 3) g/kg. B. W./day 4) 体重(g)

表 3. ラット各週齢時における添加化学物質摂取量

ラット 週 齢	雄					雌				
	A		B			A		B		
	9, 000 ¹⁾	4, 500	20, 000	7, 000	2, 500	13, 000	6, 500	10, 000	5, 000	2, 500
5	1088 ²⁾	512	1726	797	288	1069	675	1086	491	295
6	1067	471	1990	713	253	1412	683	1042	524	268
7	943	420				1208	586			
8	805	361	1480	542	195	1151	519	781	388	202
9	700	313				942	460			
10	649	295	1239	455	160	880	434	714	343	179
11	608	283				882	428			
12	552	258				787	400			
13	520	246				776	391			
14	510	237	953	349	122	801	387	561	280	137
15	486	233				754	380			
16	466	226				730	361			
17	454	223				747	365			
18	427	208	944	324	115	703	340	562	277	140
19										
20	420	206				715	340			
21	402	202				664	339			
22	393	196	871	295	107	706	347	514	254	125
24	388	195				689	340			
26	388	191	822	283	100	682	347	505	254	127
28	380	192				678	335			
30	371	188	778	269	94	687	333	469	235	116
32	379	189				693	330			
34	378	186	802	276	96	681	331	484	237	117
36	375	179				678	332			
38			756	258	90			465	225	113
40	355	180				682	330			
42			773	267	92			451	221	111
44	370	184				667	328			
46			747	257	93			474	232	113
48	375	187				704	347			
50			769	260	90			486	230	118
52	378	188				709	345			
54			776	266	92			491	234	120
56	377	184				694	339			
58			788	263	94			518	244	126
60	377	184				684	341			
62			766	263	91			496	238	116
64	381	184				670	315			
66			715	243	83			461	203	101
68	369	185				649	319			
70			737	256	88			491	210	111
72	354	174				632	307			
74			758	244	83			447	207	100
76	348	169				616	304			
78			644	227	78			408	193	94
80	338	166				639	293			
82			619	218	80			369	183	95
84	324	156				576	283			
86			529	221	76			400	185	90
88	319	157				574	279			
90			631	211	74			381	183	91
92	326	156				588	273			
94			680	234	81			428	183	98
98			634	214	75			361	189	92
101	348	176				612	305			
102			623	229	77			386	179	94
104	358	177				630	308			
106			666	232	81			339	176	84
108	374	183				649	309			

1) ppm 2) mg/kg. B. W. /day

表 4. 各試験区間内における添加化学物質総摂取量

ラット週齢 (試験区間)	ppm	雄						雌					
		A			B			A			B		
		9,000	4,500	20,000	7,000	2,500	Mean	13,000	6,500	10,000	5,000	2,500	Mean
5 8	T	27321	12348	50302	19355	6923		33873	17241	27657	13489	7231	
	M	975.8	441.0	1796.5	691.3	247.3		1209.8	615.8	987.8	481.8	258.3	
	C	9.2	10.2	11.1	10.1	10.1	10.1	10.7	10.6	9.7	10.4	10.1	10.3
	D	0.109	0.098	0.090	0.099	0.099	0.099	0.093	0.094	0.103	0.096	0.099	0.097
9 17	T	34615	16198	71736	26306	9261		51093	25242	41167	20160	10208	
	M	549.4	257.1	1138.7	417.6	147.0		811.0	400.7	653.4	320.0	162.0	
	C	16.4	17.5	17.6	16.8	17.0	17.1	16.0	16.2	15.3	15.6	15.4	15.7
	D	0.061	0.057	0.057	0.060	0.059	0.059	0.062	0.062	0.065	0.064	0.065	0.064
18 30	T	36015	17920	79282	27139	9674		62874	31010	47551	23625	11788	
	M	395.8	196.9	871.2	298.2	106.3		690.9	340.8	522.5	259.6	129.5	
	C	22.7	22.9	23.0	23.5	23.5	23.1	18.8	19.1	19.1	19.3	19.3	19.1
	D	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.053	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052
31 43	T	33635	16618	70784	24339	8470		62125	30121	42735	20965	10430	
	M	369.6	182.6	777.8	267.5	93.1		682.7	331.0	469.6	230.4	114.6	
	C	24.4	24.6	25.7	26.2	26.9	25.6	19.0	19.6	21.3	21.7	21.8	20.7
	D	0.041	0.041	0.039	0.038	0.037	0.039	0.053	0.051	0.047	0.046	0.046	0.049
44 56	T	34083	16940	69566	23800	8344		63098	30933	43505	20944	10542	
	M	374.5	186.2	764.5	261.5	91.7		693.4	339.9	478.1	230.2	115.8	
	C	24.0	24.2	26.2	26.8	27.3	25.7	18.7	19.1	20.9	21.7	21.6	20.4
	D	0.042	0.041	0.038	0.037	0.037	0.039	0.053	0.052	0.048	0.046	0.046	0.049
57 69	T	34307	16758	68964	23404	8248		61572	29953	44737	20818	10444	
	M	377.0	184.2	757.8	257.2	90.6		676.6	329.2	491.6	228.8	114.8	
	C	23.9	24.4	26.4	27.2	27.6	25.9	19.2	19.7	20.3	21.9	21.8	20.6
	D	0.042	0.041	0.038	0.037	0.036	0.039	0.052	0.051	0.049	0.046	0.046	0.049
70 82	T	31920	15680	64225	21882	7532		57449	27727	40271	18361	9205	
	M	350.8	172.3	705.8	240.5	82.8		631.3	304.7	442.5	201.8	101.2	
	C	25.7	26.1	28.3	29.1	30.2	27.9	20.6	21.3	22.5	24.8	24.7	22.8
	D	0.039	0.038	0.035	0.034	0.033	0.036	0.049	0.047	0.044	0.040	0.040	0.044
83 95	T	29498	14294	54999	19950	7014		53137	25431	35609	16709	8435	
	M	324.2	157.1	604.4	219.2	77.1		583.9	279.5	391.3	183.6	92.7	
	C	27.8	28.6	33.1	31.9	32.4	30.8	22.3	23.3	25.5	27.2	27.0	25.1
	D	0.036	0.035	0.030	0.031	0.031	0.033	0.045	0.043	0.039	0.037	0.037	0.040
96 108	T	31360	15393	58702	20552	7091		55615	26747	34027	16562	8344	
	M	344.6	169.2	645.1	225.8	77.9		611.2	293.9	373.9	182.0	91.7	
	C	26.1	26.6	31.0	31.0	32.1	29.4	21.3	22.1	26.7	27.5	27.3	25.0
	D	0.038	0.038	0.032	0.032	0.031	0.034	0.047	0.045	0.037	0.036	0.037	0.040

T=Total mg/kg. B. W. M=mg/kg. B. W./Day C=1 mg/kg. B. W./Day equals in ppm of diet
D=1 ppm in food equals in mg/kg. B. W./Day

与ラットでやや低値を示したのを除き、いずれも同様同値であった。mg/kg. B. W./day 値は5週齢から17週齢にかけて激減し、以降漸減した。

各週齢時の化学物質摂取量 (mg/kg. B. W./day): 表3に各週齢時の化学物質摂取量を示した。摂取量は初期に急速に、その後82~92週齢まで漸減した。以後は増減の動揺がみられた。

化学物質総摂取量: 表4に化学物質添加飼料投与開始の5週齢から4週間、9週齢から9週間、18週齢以降13週間(3ヵ月)毎の、その期間内における化学物質総摂取量(T)、1日平均摂取量(M)、化学物質1 mg/kg. B. W./day 摂取(投与)に相当する飼料中化学物質添加濃度ppm(C)および化学物質1 ppm添加飼料による化学

物質摂取量 mg/kg. B. W./day (D)を示した。

表5に化学物質添加飼料投与開始の5週齢時から4週間(1ヵ月)、13週間(3ヵ月)、26週間(6ヵ月)、39週間(9ヵ月)、52週間(1年)、65週間(1年3ヵ月)、78週間(1年6ヵ月)、91週間(1年9ヵ月)および104週間(2年)における表3と同様なT、M、CおよびDとA群とB群の成績を平均したCおよびDを示した。

各期間内の各群間のCおよびD値はよく一致しており表5におけるその平均値は、4週間雄C=10.1、D=0.099、雌C=10.3、D=0.097で雌雄間にほとんど差は認められないが、13週間雄C=14.1、D=0.071、雌C=13.5、D=0.074、26週間雄C=17.5、D=0.057、雌C=15.8、D=0.063、52週間雄C=20.8、D=0.048、

表 5. 化学物質添加飼料投与開始からの化学物質総摂取量

		雄					雌						
ラット週齢 (試験期間)	ppm	A		B			Mean	A		B			Mean
		9, 000	4, 500	20, 000	7, 000	2, 500		13, 000	6, 500	10, 000	5, 000	2, 500	
5 8	T	27321	12348	50302	19355	6923		33873	17241	27675	13489	7231	
	M	975.8	441.0	1796.5	691.3	247.3		1209.8	615.8	987.8	481.8	258.3	
	C	9.2	10.2	11.1	10.1	10.1	10.1	10.7	10.6	9.7	10.4	10.1	10.3
	D	0.109	0.098	0.090	0.099	0.099	0.099	0.093	0.094	0.103	0.096	0.099	0.097
5 17	T	61936	28546	122038	45661	16184		84966	42483	68824	33649	17493	
	M	680.6	313.7	1341.1	501.8	177.9		933.7	466.8	756.3	369.8	192.2	
	C	13.2	14.4	14.9	14.0	14.1	14.1	13.9	13.9	13.2	13.5	13.0	13.5
	D	0.076	0.069	0.067	0.071	0.071	0.071	0.072	0.072	0.076	0.074	0.077	0.074
5 30	T	97951	46466	201320	72800	25858		147840	73493	116375	57274	29281	
	M	538.2	255.3	1106.2	400.8	142.1		812.3	403.8	639.4	314.9	160.9	
	C	16.7	17.6	18.0	17.5	17.6	17.5	16.0	16.1	15.6	15.9	15.5	15.8
	D	0.060	0.057	0.056	0.057	0.057	0.057	0.063	0.062	0.064	0.063	0.065	0.063
5 43	T	131586	63084	272104	97139	24328		209965	103614	159110	78239	39711	
	M	482.0	231.1	996.7	355.8	125.7		769.1	379.5	582.8	286.6	145.5	
	C	18.7	19.5	20.7	19.8	19.9	19.7	16.9	17.1	17.2	17.4	17.4	17.2
	D	0.053	0.051	0.048	0.051	0.050	0.051	0.059	0.058	0.058	0.057	0.058	0.058
5 56	T	165669	80024	341670	120939	42672		273063	134547	202615	99183	50253	
	M	455.1	219.8	938.7	332.3	117.2		750.1	369.3	556.5	272.5	138.1	
	C	19.8	20.5	21.3	21.1	21.3	20.8	17.3	17.6	18.0	18.3	18.1	17.9
	D	0.051	0.048	0.047	0.047	0.047	0.048	0.058	0.057	0.056	0.055	0.055	0.056
5 69	T	199976	96782	410634	144343	50820		334635	164500	247352	120001	60697	
	M	439.5	212.7	902.5	317.2	111.7		735.5	361.5	543.6	263.7	133.4	
	C	20.5	21.2	22.2	22.0	22.4	21.7	17.7	18.0	18.3	18.9	18.7	18.3
	D	0.049	0.047	0.045	0.045	0.045	0.046	0.056	0.056	0.055	0.053	0.053	0.055
5 82	T	231896	112462	474859	166225	58352		392084	192227	287623	138362	69902	
	M	424.7	206.0	869.7	304.4	106.9		718.1	352.1	526.8	253.4	128.0	
	C	21.2	21.8	23.0	23.0	23.4	22.5	18.1	18.5	19.0	19.7	19.5	18.9
	D	0.047	0.046	0.043	0.043	0.043	0.044	0.055	0.054	0.053	0.051	0.051	0.053
5 95	T	261394	126756	529858	186175	65366		445221	217658	323232	155071	78337	
	M	410.4	199.0	831.8	292.3	102.6		698.9	341.7	507.4	243.4	123.0	
	C	21.9	22.6	24.0	23.9	24.4	23.4	18.6	19.0	19.7	20.5	20.3	19.6
	D	0.046	0.045	0.042	0.042	0.041	0.043	0.054	0.053	0.051	0.049	0.049	0.051
5 108	T	292754	142149	588560	206727	72457		500836	244405	357259	171633	86681	
	M	402.1	195.3	808.5	284.0	99.5		688.0	335.7	490.7	235.8	119.1	
	C	22.4	23.5	24.7	24.6	25.1	24.1	18.9	19.4	20.4	21.2	21.0	20.2
	D	0.045	0.043	0.040	0.041	0.040	0.042	0.053	0.052	0.049	0.047	0.048	0.050

T=Total mg/kg. B. W. M=mg/kg. B. W./Day C=1 mg/kg B. W./Day equals in ppm of diet
D=1 ppm in food equals in mg/kg. B. W./Day

雌 C=17.9, D=0.056, 78週間雄 C=22.5, D=0.044,
雌 C=18.9, D=0.053, 104週間雄 C=24.1, D=0.042,
雌 C=20.2, D=0.050であり雌雄間に差が生じた。

まえがきで述べたようにラットを用いた長期毒性試験で化学物質(検体)を飼料に添加して投与する(摂取せしめる)場合、試験期間中の平均化学物質摂取量 1 mg/kg/day は化学物質 20ppm 添加飼料の摂取に相当するといわれている。これは両者の関係の概略を示したものであり、ラットの系統、雌雄、試験期間の長短等により変動することは当然である。今回 F344/Du ラットで得た成績はこれを示している。

今後当部で F344/Du ラットを用いて行う長・短毒性

試験においては、ここで得た成績にもとづいて化学物質添加濃度の設定あるいは摂取量の推定を行うべきものと考ええる。

まとめ

F344/Du (Fischer) ラットにおける飼料中化学物質添加濃度 ppm と化学物質摂取量 mg/kg. B. W./day の関係を 2 つの長期毒性試験の成績により検討した。

F344/Du ラット 5 週齢より試験(化学物質添加飼料投与)開始の場合、各試験期間内の化学物質平均摂取量 1 mg/kg/day を得るに必要な飼料中化学物質添加濃度 ppm は、

試 験 期 間	雄	雌
4 週間 (1 月)	10	10
13 " (3 ")	14	14
26 " (6 ")	18	16
52 " (12 ")	21	18
78 " (18 ")	23	19
104 " (24 ")	24	20

と算定された。

文 献

- 1) Food and Drug Administration: Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, 1959, the Association of Food and Drug officials of U. S. A.

F344/Du (Fischer) ラットの体重増加曲線について

高橋 博*, 井口重孝*, 平賀興吾*

Growth Curve in F344/Du (Fischer) Rat

HIROSHI TAKAHASHI*, SHIGETAKA IGUCHI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: F344/Du ラット Fischer rat, 体重 body weight, 体重増加曲線 growth curve

当部ではこれまでラットの成長過程における体重増加曲線に吟味を加え, 規則性ある変動を見出し, その詳細を報告して来た¹⁻⁶⁾.

今回は, 近交系 F344/Du (Fischer) ラットにおける体重増加曲線の性状を当部で行われた3つの短期および長期飼育試験で得た成績により検討した. 短期試験の成績では飼料摂取量および飲水量との関係も吟味した.

動物および観察方法

F344/Du (Fischer) ラット: 日本チャールス・リバー(株) F344/DuCrj を4週齢で購入.

飼育条件: 室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$, 換気毎時10回, 照明午前6時から午後5時までの barrier system 飼育室で前面および床面が網のステンレス製ケージ(縦40, 横25, 高さ16.5cm)に個別に収容, ベルト式飼育架台に

表 1. F344/Du ラットを用いた3つ(A・BおよびC)の13週間飼育試験の対照群の体重

週齢/群	雄			雌		
	A	B	C	A	B	C
5	96.2 $\pm$ 3.0 ¹⁾ (100.0 $\pm$ 0 ²⁾)	86.3 $\pm$ 2.2 (100.0 $\pm$ 0)	104.1 $\pm$ 2.9 (100.0 $\pm$ 0)	82.9 $\pm$ 2.4 (100.0 $\pm$ 0)	78.9 $\pm$ 2.1 (100.0 $\pm$ 0)	88.5 $\pm$ 2.9 (100.0 $\pm$ 0)
6	123.8 $\pm$ 5.8 (128.3 $\pm$ 4.4)	112.9 $\pm$ 6.0 (130.3 $\pm$ 5.3)	132.8 $\pm$ 5.9 (127.1 $\pm$ 3.9)	99.3 $\pm$ 3.9 (119.7 $\pm$ 3.4)	98.7 $\pm$ 5.1 (124.6 $\pm$ 4.6)	106.2 $\pm$ 3.5 (119.5 $\pm$ 2.2)
7	150.8 $\pm$ 12.5 (156.6 $\pm$ 10.7)	130.6 $\pm$ 6.7 (150.8 $\pm$ 5.8)	159.3 $\pm$ 10.0 (152.5 $\pm$ 7.8)	113.5 $\pm$ 3.3 (136.9 $\pm$ 4.5)	113.2 $\pm$ 4.4 (143.0 $\pm$ 4.2)	119.8 $\pm$ 5.0 (134.9 $\pm$ 4.2)
8	176.9 $\pm$ 18.1 (183.4 $\pm$ 16.1)	148.4 $\pm$ 10.9 (171.5 $\pm$ 11.1)	182.6 $\pm$ 16.3 (174.9 $\pm$ 12.7)	125.7 $\pm$ 3.9 (151.2 $\pm$ 4.1)	123.8 $\pm$ 3.8 (156.6 $\pm$ 4.5)	130.1 $\pm$ 5.3 (146.5 $\pm$ 3.8)
9	196.0 $\pm$ 27.1 (203.4 $\pm$ 25.1)	163.7 $\pm$ 19.0 (189.3 $\pm$ 20.1)	199.9 $\pm$ 20.8 (191.3 $\pm$ 16.9)	131.9 $\pm$ 5.0 (159.1 $\pm$ 5.0)	132.4 $\pm$ 4.8 (167.4 $\pm$ 6.1)	137.8 $\pm$ 5.0 (155.2 $\pm$ 5.8)
10	211.8 $\pm$ 28.3 (219.5 $\pm$ 29.8)	175.3 $\pm$ 26.5 (202.4 $\pm$ 28.8)	216.5 $\pm$ 25.7 (207.2 $\pm$ 21.4)	138.6 $\pm$ 6.0 (165.8 $\pm$ 6.4)	136.3 $\pm$ 5.1 (172.4 $\pm$ 8.2)	143.5 $\pm$ 5.0 (161.8 $\pm$ 7.0)
11	221.4 $\pm$ 28.3 (229.9 $\pm$ 33.8)	190.7 $\pm$ 32.8 (220.3 $\pm$ 35.9)	229.4 $\pm$ 26.4 (219.6 $\pm$ 21.9)	142.2 $\pm$ 7.4 (171.5 $\pm$ 7.9)	140.6 $\pm$ 6.5 (177.7 $\pm$ 9.2)	147.3 $\pm$ 5.4 (166.1 $\pm$ 7.1)
12	236.1 $\pm$ 32.8 (244.9 $\pm$ 31.9)	199.5 $\pm$ 36.0 (230.3 $\pm$ 35.9)	241.6 $\pm$ 25.6 (231.4 $\pm$ 20.8)	146.5 $\pm$ 8.0 (176.2 $\pm$ 8.1)	143.4 $\pm$ 8.7 (181.4 $\pm$ 12.4)	151.8 $\pm$ 6.6 (171.3 $\pm$ 8.5)
13	246.3 $\pm$ 31.1 (255.7 $\pm$ 29.5)	213.7 $\pm$ 37.5 (246.8 $\pm$ 40.9)	252.9 $\pm$ 25.4 (242.2 $\pm$ 20.2)	150.0 $\pm$ 8.1 (180.9 $\pm$ 7.6)	148.6 $\pm$ 8.6 (187.9 $\pm$ 11.6)	156.9 $\pm$ 6.7 (177.0 $\pm$ 8.0)
14	257.9 $\pm$ 29.2 (267.9 $\pm$ 28.4)	224.0 $\pm$ 36.0 (258.7 $\pm$ 38.7)	264.1 $\pm$ 23.1 (253.2 $\pm$ 18.1)	154.4 $\pm$ 9.4 (186.2 $\pm$ 9.6)	150.9 $\pm$ 9.4 (191.1 $\pm$ 13.2)	161.3 $\pm$ 7.5 (181.9 $\pm$ 8.5)
15	267.2 $\pm$ 27.9 (277.6 $\pm$ 26.9)	232.9 $\pm$ 36.0 (269.0 $\pm$ 38.9)	272.1 $\pm$ 22.3 (260.9 $\pm$ 17.5)	155.9 $\pm$ 9.3 (188.0 $\pm$ 9.7)	153.3 $\pm$ 10.1 (193.9 $\pm$ 14.4)	165.8 $\pm$ 8.4 (187.0 $\pm$ 9.2)
16	273.9 $\pm$ 25.9 (284.6 $\pm$ 24.4)	248.5 $\pm$ 34.8 (287.1 $\pm$ 38.0)	278.9 $\pm$ 21.2 (267.5 $\pm$ 17.0)	160.5 $\pm$ 10.4 (193.5 $\pm$ 10.8)	159.6 $\pm$ 8.7 (202.0 $\pm$ 12.5)	169.4 $\pm$ 9.1 (190.9 $\pm$ 9.5)
17	282.5 $\pm$ 24.7 (293.5 $\pm$ 23.1)	259.0 $\pm$ 31.3 (299.4 $\pm$ 34.0)	286.9 $\pm$ 21.6 (274.9 $\pm$ 16.9)	164.9 $\pm$ 7.9 (198.9 $\pm$ 8.6)	164.8 $\pm$ 7.3 (208.5 $\pm$ 11.0)	172.9 $\pm$ 10.2 (195.0 $\pm$ 10.9)

値は10例平均 $\pm$ SD 1) 絶対重量(g) 2) 体重増加率=(体重/5週齢時体重) $\times$ 100

* 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. F 344/Du ラットを用いた3つ (A・BおよびC) の13週間飼育試験の対照群の飼料摂取量および飲水量

週齡／群	雄			雌			
	A	B	C	A	B	C	
飼料 摂 取 量	6	11.8± 1.3 ¹⁾ (95.5± 7.4) ²⁾	11.0± 1.0 (90.7± 6.2)	11.8± 1.0 (88.8± 5.5)	8.8± 0.8 (88.6± 9.0)	10.4± 0.4 (98.1± 3.0)	9.6± 0.6 (90.9± 5.4)
	8	13.8± 2.6 (77.7± 8.5)	10.4± 2.0 (66.2± 7.4)	12.4± 1.4 (68.0± 3.5)	9.5± 0.7 (76.1± 3.7)	9.4± 0.9 (72.7± 7.6)	9.2± 0.7 (70.7± 4.9)
	10	12.8± 2.6 (60.6± 6.7)	10.7± 3.3 (57.7± 8.8)	12.8± 2.0 (64.1± 4.7)	8.8± 1.0 (63.8± 5.6)	7.9± 1.0 (57.3± 5.5)	9.2± 0.6 (67.1± 3.8)
	12	13.7± 1.9 (58.2± 3.9)	11.0± 2.6 (53.2± 4.7)	12.6± 2.1 (54.6± 5.4)	9.3± 0.5 (63.6± 1.4)	7.7± 1.1 (53.5± 5.3)	8.6± 1.1 (58.6± 6.3)
	14	14.2± 1.5 (55.1± 2.0)	12.3± 2.0 (53.9± 4.7)	13.1± 1.0 (48.4± 3.1)	9.5± 0.7 (61.6± 3.5)	8.4± 1.1 (55.1± 4.9)	9.2± 1.2 (55.6± 6.7)
	16	14.5± 1.2 (53.1± 2.6)	12.8± 1.3 (50.5± 2.9)	12.9± 1.0 (44.9± 2.0)	9.9± 0.5 (62.1± 4.3)	9.1± 0.7 (55.8± 3.5)	9.3± 1.0 (53.9± 5.1)
飲 水 量	6	16.2± 1.9 ¹⁾ (131.1±10.3) ²⁾	15.5± 0.8 (128.1± 6.3)	16.5± 1.6 (124.0± 9.3)	13.4± 4.7 (135.8±35.1)	15.1± 0.9 (142.2± 7.4)	15.1± 2.2 (142.3±19.7)
	8	18.0± 3.2 (101.4±10.6)	14.9± 1.8 (95.7± 9.7)	17.1± 1.7 (93.8± 5.9)	15.3± 1.6 (122.0±13.4)	13.8± 1.2 (107.1± 8.3)	15.3± 2.5 (117.2±17.4)
	10	18.8± 4.0 (88.3±11.2)	13.8± 3.1 (75.0± 5.9)	18.3± 3.5 (91.4±13.6)	15.6± 1.6 (113.4±12.5)	11.3± 1.8 (81.3±12.5)	14.5± 2.0 (105.0±11.9)
	12	19.5± 3.4 (82.4± 7.8)	14.2± 3.3 (69.0± 6.8)	18.2± 3.8 (79.3±12.8)	17.1± 1.7 (117.4±11.7)	11.3± 2.2 (78.1±12.0)	15.6± 4.1 (105.5±26.2)
	14	20.5± 3.7 (79.3± 9.9)	16.6± 3.0 (71.3± 7.7)	18.2± 1.6 (67.1± 4.9)	15.9± 2.7 (103.0±14.7)	12.6± 2.4 (82.0±11.8)	15.3± 1.4 (92.0± 6.1)
	16	20.6± 2.2 (75.3± 4.8)	17.1± 2.4 (67.5± 9.0)	18.9± 2.3 (69.6± 8.0)	16.3± 1.6 (102.1±12.2)	13.6± 1.3 (83.5± 7.3)	14.9± 1.2 (86.0± 5.3)

値は10例平均±SD 1) g/rat/day 2) g/kg/day

配置, 日本クレア(株) CE-2 固型飼料および細菌ろ過器經由水道水(自動)を自由に与え, 発育良好なものを5週齢より観察した。なお, 5週齢とは出生日を0日として35日から41日までのものをいう。

観察方法: 短期飼育群——雌雄各10匹について5週齢より17週齢(13週間)まで毎週1回午前10時に体重を測定した。飼料摂取量および飲水量は隔週に測定した。飼料摂取量(摂餌量)は投与飼料重量, 摂餌後の残余飼料量および測定期間中のケージ下の受皿にコボした飼料量を測定し(投与量-残余量-コボン量)/測定日数より1日摂餌量を算定した。飲水量は(投与量-残余量)/測定日数により1日飲水量を求めた。

観察群数はA, BおよびCの3群で, いずれも出生月日が異なり, 飼育室も別であった。

長期飼育群——観察群数はD, EおよびFの3群で, DとFは同一出生月日で同一飼育室での飼育である。DとEは雌雄各50匹, Fは雌雄25匹であり, DおよびF群においては5週齢より108週齢まで毎週1回午前10時に体重を測定し, E群では5週齢より22週齢まで隔週, それ以後は4週毎に体重を測定した。

結果と考察

短期飼育群: 表1に体重と5週齢体重を100とした体重増加率の推移を, 表2に飼料摂取量および飲水量のg/rat/dayとg/kg/dayの推移を, 図1に雄, 図2に雌の体重増加率, 飼料摂取量g/kg/dayおよび飲水量g/kg/dayを示した。

体重は, 5週齢時の雄A96.2±3.0g, B86.3±2.2g, C104.1±2.9gで, Cの平均体重が最も大きく次いでA, Bの順で, BとCの差は約18gであった。雌の5週齢時体重はA82.9±2.4g, B78.9±2.1g, C88.5±2.9gで平均体重の大きさの順位は雄の場合と同様でC>A>BでBとCの差は約9.5gであった。この大きさの順位は最後まで維持され, 13週後の17週齢時の平均体重は雄A282.5±24.7g, B259.0±31.3g, C286.9±21.6gでBとCの差は約28gになった。雌A164.9±7.9g, B164.8±7.3g, C172.9±10.2gでほとんど並行的な体重増加曲線を示した。これを5週齢時体重を100とした体重増加率でみると, 雄Bの7週齢から15週齢までを例外として雌雄ともその値は絶対重量の場合と全く逆の推移を示した(表1, 図1, 2), この関係はすでに前報²⁾で指摘しており, 5

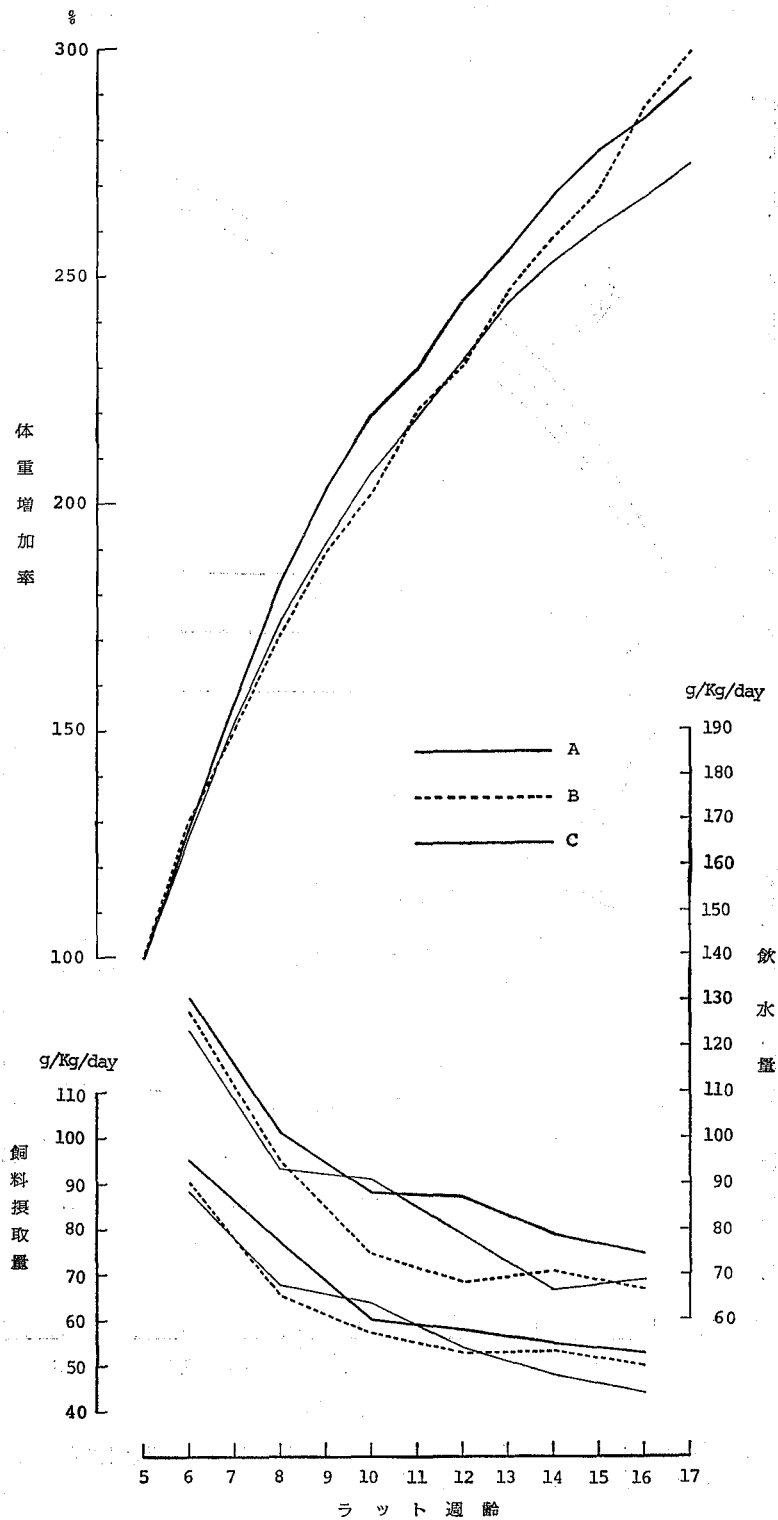


図 1. F 344/Du ラット雄を用いた 3 つ (A・B および C) の 13 週間飼育試験の対照群の体重増加率・飼料摂取量および飲水量

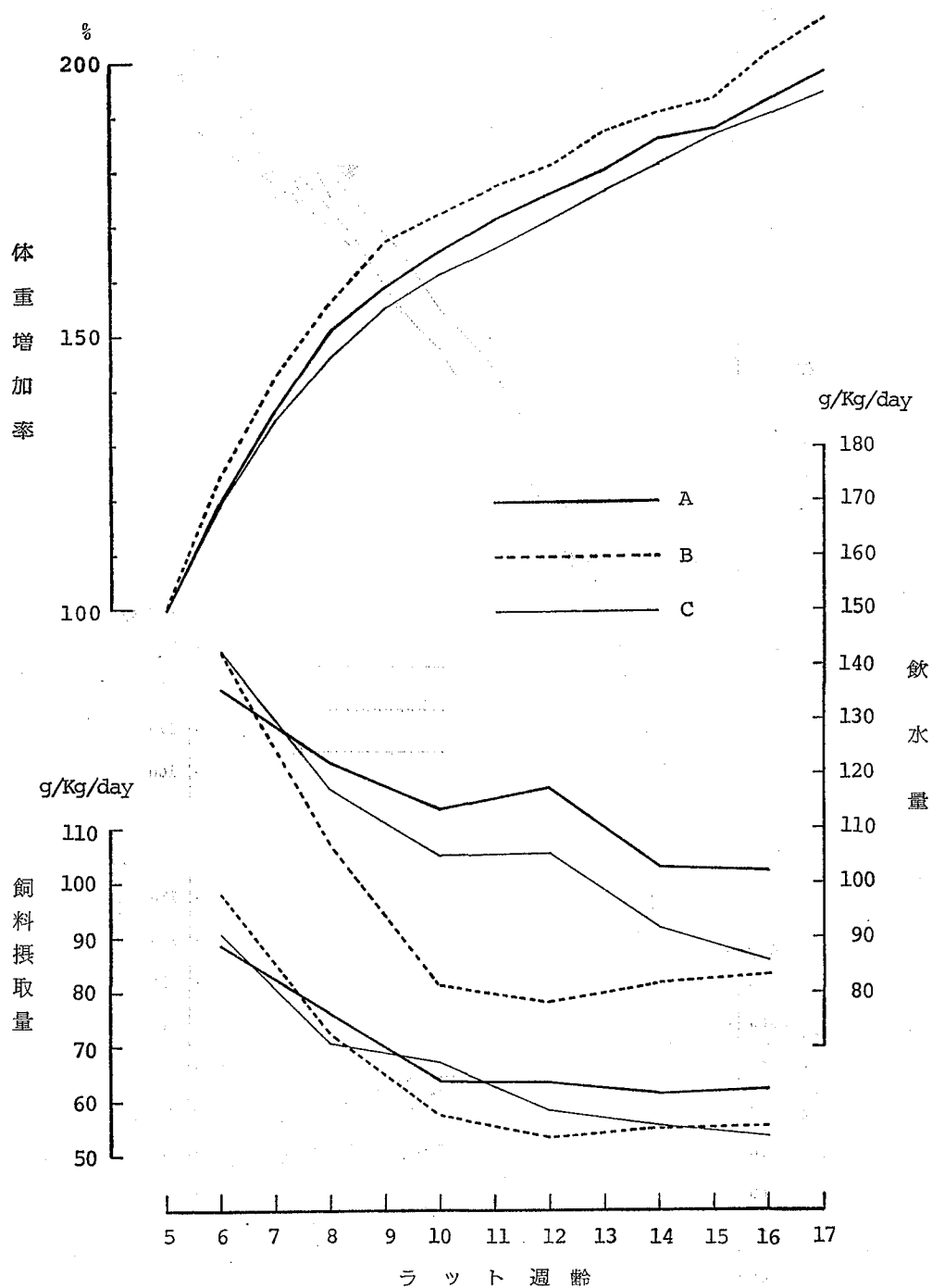


図 2. F 344/Du ラット雌を用いた 3 つ (A・B および C) の 13 週間飼育試験の対照群の体重増加率・飼料摂取量および飲水量

表 3. F 344/Du ラットを用いた3つ (D・EおよびF) の長期飼育試験の
対照群の体重

週齢/群	雄			雌		
	D	E	F	D	E	F
5	92.1±6.3 ¹⁾ (100.0±0 ²⁾)	97.4±4.5 (100.0±0 ²⁾)	92.3±4.9 (100.0±0 ²⁾)	83.3±3.9 (100.0±0 ²⁾)	80.5±3.6 (100.0±0 ²⁾)	78.6±3.9 (100.0±0 ²⁾)
17	292.7±22.5 (317.6±21.3)	283.5±30.3 (291.4±30.7)	279.8±27.9 (303.4±33.8)	165.7±11.0 (198.9±12.0)	172.5±12.7 (214.2±13.9)	167.2±12.8 (212.5±15.8)
30	341.5±23.8 (370.8±23.8)	332.5±42.1 (341.9±43.4)	344.0±29.4 (372.8±33.3)	189.4±12.4 (227.4±13.9)	195.7±15.1 (243.1±17.5)	190.4±17.0 (242.0±20.5)
43	364.6±28.1 (395.9±27.9)	360.3±45.0 (370.4±47.1)	371.6±36.0 (402.8±40.8)	204.6±13.9 (245.8±16.1)	211.3±14.9 (262.5±16.8)	207.3±19.9 (263.4±24.1)
56	375.4±30.2 (407.5±28.8)	378.2±48.3 (388.6±49.9)	396.4±39.8 (428.1±44.8)	217.2±16.2 (260.8±16.8)	225.2±16.2 (279.8±19.1)	224.9±24.6 (285.9±30.6)
69	389.2±30.7 (422.7±31.4)	403.8±52.3 (415.0±54.2)	419.8±39.1 (453.6±45.7)	237.6±20.4 (285.3±22.3)	258.8±22.8 (321.5±26.6)	248.3±31.2 (315.6±38.1)
82	409.0±32.5 (444.2±32.7)	424.7±51.4 (436.4±54.9)	449.5±40.0 (484.1±46.2)	259.0±27.6 (310.9±30.9)	285.3±28.1 (354.3±33.4)	277.0±45.3 (351.5±54.0)
95	415.2±32.4 (451.4±33.8)	434.5±44.0 (448.8±48.3)	453.8±37.1 (488.9±44.7)	274.5±27.6 (329.2±30.5)	298.6±28.4 (370.4±32.0)	303.7±36.6 (384.7±44.7)
108	400.7±35.5 (436.2±38.8)	413.5±37.5 (427.1±40.8)	432.7±50.4 (468.7±60.1)	279.5±32.0 (335.1±36.6)	298.9±42.4 (369.9±51.1)	305.7±35.7 (385.1±51.0)

D50例
値は E50例 平均±SD 1) 絶対重量(g) 2) 体重増加率=(体重/5週齢体重)×100
F25例

週齢時の体重の大小はその後の体重増加を規定している
ようである。

飼料摂取量は6週齢時雄A11.8±1.3g, B11.0±1.0g, C11.8±1.0g, 雌A8.8±0.8g, B10.4±0.4g, C9.6±0.6g, 16週齢時雄A14.5±1.2g, B12.8±1.3g, C12.9±1.0g, 雌A9.9±0.5g, B9.1±0.7g, C9.3±1.0gであり、途中の推移と併せみると体重の小さいB群雄はA, Cに比べて摂取量が少ないようである。これを体重 kg 当りの摂取量に換算してもBはAおよびCと比べて低値を示しており、Bにおいて食餌効率のよいことがわかる。雄では週齢増加とともに摂取量の増大傾向がみられるが、雌では増大傾向は認められないようである。

飲水量は6週齢時雄A16.2±1.9g, B15.5±0.8g, C16.5±1.6g, 雌A13.4±4.7g, B15.1±0.9g, C15.1±2.2g, 16週齢時雄A20.6±2.2g, B17.1±2.4g, C18.9±2.3g, 雌16.3±1.6g, B13.6±1.3g, C14.9±1.2gで飼料摂取量とよく連動しており、雄では観察期間中漸増が認められたが雌では増加がみられなかった。

長期飼育群：表3に各群雌雄の平均体重 g/rat および5週齢時体重を100とした平均体重増加率%を、図3に体重増加曲線を示した。

5週齢時体重は、雄D92.1±6.3g, E97.4±4.5g, F92.3±4.9g, 雌D83.3±3.9g, E80.5±3.6g, F78.6±3.9gであり、25週齢前後までほとんど同じ体重増加の推

移を示したが、その後3者間の平均体重の差は大きくなった。このことは短期飼育群の項で、5週齢時体重がその後の体重増加を規定するようだと述べたことに反し、体重が最高に達した95週齢時には雄D451.4±33.8g, E448.8±48.3g, F453.8±37.1g, 雌D274.5±27.6g, E298.6±28.4g, F303.7±36.6gとなり、5週齢時の大小とは関連しない体重を示した。これは短期飼育群は各々10匹のラットで体重の分布幅が小さく、長期飼育群は各50匹ないし25匹で体重の分布幅が広く、偏りもあったためと考えられる。しかし体重増加曲線を大きくみると3者の推移は大体同じで雄では15週齢ごろまでやや直線的に(270g前後)、その後35週齢前後にかけて抛物線をえがきながら360g前後に達し、その後60週齢前後にかけてゆるやかに増加して390g前後に至り、その後は90~95週齢の最高体重を得るまで、今までより急な勾配で増加した(430g前後)、その後は漸減傾向を示した。雌では15週齢前後までやや直線的に増加し(160g前後)、その後50週齢前後までゆるやかな増加を示し(210g前後)、その後雄の場合と同様に90~95週齢にかけて増加勾配を増して最高体重(290g前後)に達した。以降の観察期間中は体重の増減は少なかった。発育曲線の勾配がゆるやかになった後再び急になることは極めて興味深く、今後も観察を続けたい。

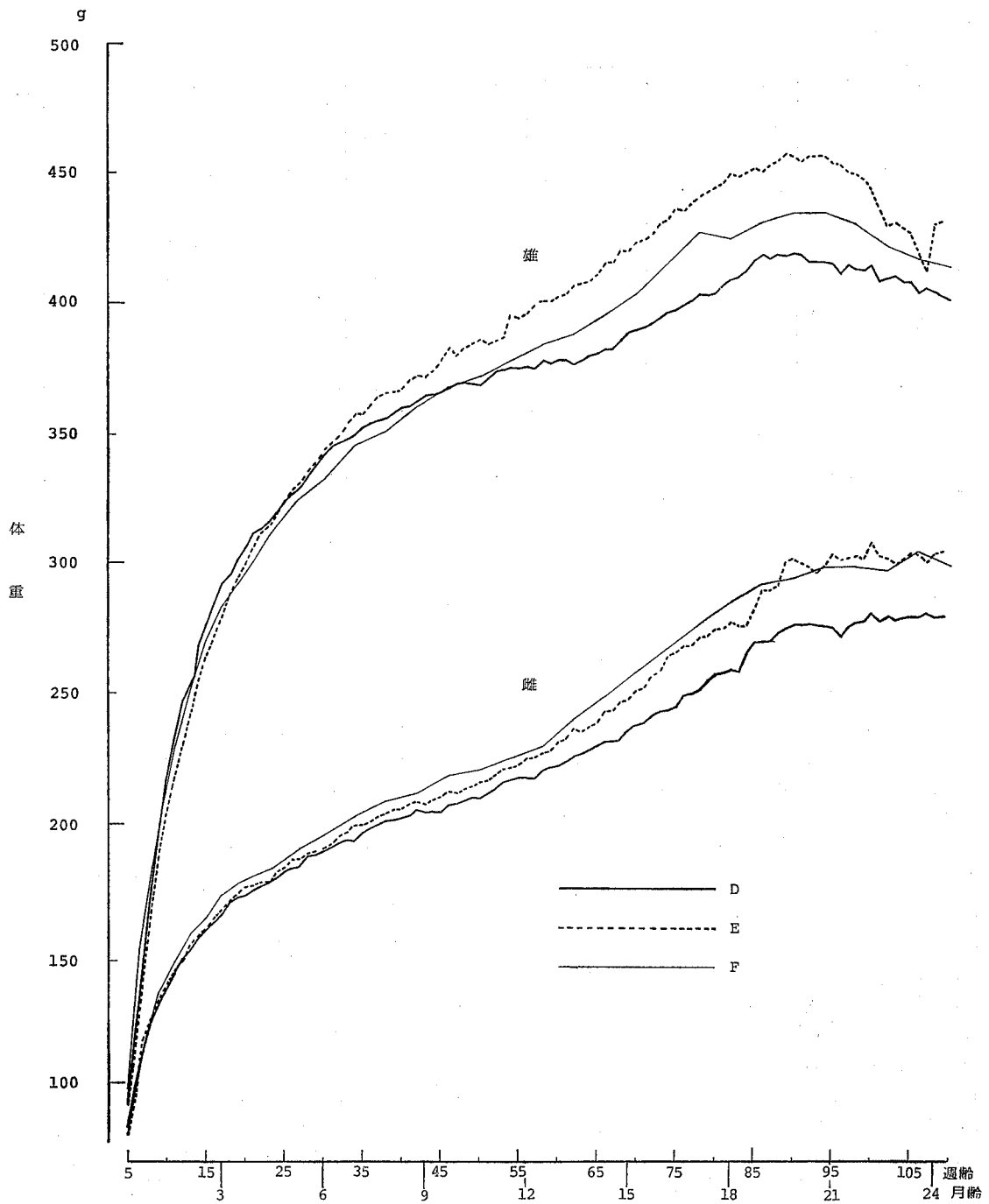


図 3. F 344/Du ラットを用いた 3 つ (D・E および F) の 104 週間飼育試験の体重

ま と め

F344/Du (Fischer) ラットの体重増加の推移と摂餌量および飲水量について、当部で行なわれた短期および長期飼育試験の対照動物の成績により検討した。

1. 5週齢時体重は雄85~105g, 雌78~88g, 17週齢時雄260~290g, 雌165~175g, 56週齢時雄375~395g, 雌215~225g, 95週齢時(最高体重到達時)雄430g前後, 雌290g前後であった。

2. 体重増加曲線において雄では60週齢前後より, 雌では50週齢前後より90~95週齢にかけて, ゆるやかであった体重増加勾配が急となり最高体重に到達することを見出した。

3. 摂餌量は5週齢雄12g, 雌9.5g, 13週齢雄14g, 雌9.5g/日で, 雄は週齢とともに増加したが, 雌ではほとんど変化しなかった。

4. 飲水量は5週齢雄16g, 雌15g, 13週齢雄20g, 雌15g/日であり, 摂餌量とよく連動した。

文 献

- 1) 平賀興吾, 藤井 孝, 中川好男, 福森信隆, 坂本義光: 東京衛研年報, 26-2, 181, 1975
- 2) 林田志信, 井口重孝, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 186, 1975
- 3) 福森信隆, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 191, 1976
- 4) 林田志信, 井口重孝, 池田虎雄: 東京衛研年報, 27-2, 198, 1976
- 5) 林田志信, 高橋 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 236, 1977
- 6) 林田志信, 高橋 博, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 1978

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1980. 7—1981. 6)

Species Differences in the Haemorrhagic Response to Butylated Hydroxytoluene

O. Takahashi, S. Hayashida and K. Hiraga: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 18(3), 229, 1980

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を飼料中より Sprague-Dawley, Wistar, Donryu, Fischer 系のラット, ICR, ddY, DBA/c, C3H/He, BALB/cAn, C57 BL/6N マウス, New Zealand White-Sat ウサギ, ビーグル犬およびニホンウズラに投与, あるいは Hartley 系モルモット, ゴールデンハムスターに腹腔投与した. 1.2% BHT を与えたすべての系統のラットは出血致死が生じた. ddY マウスで精巣上体へのおよび皮下出血が観察された. モルモットで脳出血が観察された. 2,6-ジブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノン はラット肝のみに検出された.

Excretion of Dietary Butylated Hydroxytoluene

O. Takahashi and K. Hiraga: *Toxicol. Lett.*, 6 (4/5), 287, 1980

1.00% ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 含有飼料を10日間にわたりラットに与え, 尿, 糞中のフェノール量を定量した. 10日間の BHT 累積摂取量はラットあたり約5.0mmolであった. 10日間の尿および糞中へのフェノール累積排泄量はラットあたり3.65mmolであり摂取量の73%にあたった. そのうち約48%が尿中へ, 25%が糞中への排泄である. 摂取量あたり尿, 糞で約30あるいは11%が非抱合型のフェノールであった. 代謝産物主成分は3,5-ジブチル-4-ヒドロキ安息香酸であった.

Toxicity of Tri-*n*-butyl Phosphate, with Special Reference to Organ Weights, Serum Components and Cholinesterase Activity in Male Rats

Hisae Oishi, Shinshi Oishi and Kogo Hiraga: *Toxicol. Lett.*, 6 (2), 81, 1980

リン酸トリ-*n*-ブチルを飼料に0.5%または1%の割合で混合し, 雄性ラットに自由摂取させて, 飼料摂取量, 飲水量, 体重, 臓器重量, 血清生化学値および臓器中コリンエステラーゼ活性を測定した. 投与群の体重は対照群より有意に軽かった. 投与群の血液凝固時間は有意に延長した. 血清コリンエステラーゼ活性には差がなかったが, 脳コリンエステラーゼ活性は有意に増加した. また, *in vitro* 系でのコリンエステラーゼ活性に与える TBP の影響についても検討し, *in vivo* との比較において議論した.

Effects of Phthalic Acid Monoesters on Mouse Testes

S. Oishi and K. Hiraga: *Toxicol. Lett.*, 6 (4/5), 239, 1980

フタル酸エステル類のうちジ-2-エチルヘキシル, ジブチル, ジイソブチルフタレートはラットの精巣に対して萎縮作用を有しており, またこれらの主要代謝中間体であるモノエステルについても同様な作用のあることを前報で報告した. しかしマウスではフタル酸ジエステルのこのような精巣萎縮作用は見出せなかった. そこでこれらのモノエステルを合成し, 飼料中に2%濃度で添加してマウスに1週間摂取させた後, 精巣萎縮作用, 精巣中テストステロン及び亜鉛濃度について検索した結果, 精巣萎縮作用は生ぜず, ジエステルの場合と同様な結果が得られた.

Effects of Four Bisphenolic Antioxidants on Prothrombin Levels of Rat Plasma

O. Takahashi and K. Hiraga: *Toxicol. Lett.*, 7(6), 405, 1981

雄 Sprague-Dawley 系ラットに2,2'-メチレンビス(4-エチル-6-*t*-ブチルフェノール), 2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール), 4,4'-ブチリデンビス(3-メチル-6-*t*-ブチルフェノール) あるいは4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*t*-ブチルフェノール)を飼料100gあたり1.135mmol添加し与えた. 1週間後のプロトロンビン時間および部分トロンボプラスチン時間の指数値が, 2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール)投与ラットで対照の32, 37%まで低下した.

Effects of Four Bisphenolic Antioxidants on Lipid Contents of Rat Liver

O. Takahashi and K. Hiraga: *Toxicol. Lett.*, 8 (1/2), 77, 1981

投与方法は前報 (*Toxicol. Lett.*, 7, 405, 1981) と同一. 4,4'-ブチリデンビス(3-メチル-6-*t*-ブチルフェノール)は脂肪肝をひきおこし, 肝臓トリグリセリド, ジグリセリドおよびコンステリルエステル濃度を7.1, 5.8, 6.1倍に上昇させた. 血漿トリグリセリド, 総コレステロール, 遊離脂肪酸は明らかな減少を示した. 従ってこの脂肪肝はおもに肝臓からの脂質排泄異常にもとづくものと推察される. 他のビスフェノール類もなんらかの肝脂質の変化をもたらした.

Induction of Hepatic Microsomal Monooxygenases in Female Rats Given Various Substituted Phenols

and Hydroquinones

S. Kawano, N. Nakao and K. Hiraga: *Japan. J. Pharmacol.*, 31 (3), 459, 1981

種々の置換基を有するフェノール類およびヒドロキノン類の肝薬物代謝酵素の誘導能について、Wistar-JCL系雌ラットを用いて比較検討した。その結果、2, 4, 6-tert-butylphenol および 4-tert-butyl-2, 6-diisopropylphenol は、典型的誘導物質、phenobarbital (PB) と構造上は著しく異なっているにもかかわらず、スペクトルの性質、触媒活性、電気泳動の性質からみて、典型的なPB型の誘導作用を示すことが明らかにされた。しかしながら、構造上は非常によく似ている 2, 6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) の場合には、電気泳動の性質において、上記2物質との間に若干の差異が示された。

Species and Strain Differences in the Butylated Hydroxytoluene (BHT)-Producing Induction of Hepatic Drug Oxidation Enzymes

S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga: *Japan. J. Pharmacol.*, 30 (6), 861, 1980

0.5% BHT 添加飼料 6 日間給与による肝薬物代謝酵素系の変化について Wistar-JCL 系雌雄ラット、C57BL/6N 系および DBA/2N 系の雄マウスを用いて検討を行った。雌雄ラットおよび C57BL/6N 系マウスでは、肝重量および肝ミクロソーム・タンパク含量の顕著な増大がもたらされた。チトクローム P-450 含量および酵素活性の上昇はさらに顕著で、100g 体重当たりで、それぞれ 2.5 倍および 3 倍以上の上昇を示した。BHT で誘導されたチトクローム P-450 は、種々の点でフェノバルビタール (PB) 誘導のものと差を認めなかった。すなわち、1) 広い基質特異性を有する、2) CO 結合差スペクトル・ピーク波長の短波長側への移行を示さない、3) エチルイソシアニド差スペクトル・ピーク比の上昇を示さない、4) P-ニトロアニソール・デメチラーゼ活性の α -ナフトフラボンによる阻害を認めない、5) SDS ゲル電気泳動による分子量 5.0 万および 5.4 万のポリペプチド・バンドの著しい増大を示す。しかしながら、BHT による分子量 4.6 万のポリペプチドの誘導は、PB 誘導によるものよりずっと顕著で、また、この誘導は、マウスにおいては認められなかった。これに比して、3-メチルコランスレン非感受性の DBA/2N マウスでは、肝重量の増大もチトクローム P-450 の誘導も認められなかった。にもかかわらず、この系統のマウスでは、著しく高い死亡率が観察された。

LIGAND-DEPENDENT REACTIVITY OF (Na⁺+K⁺)-ATPase WITH SHOWDOMYCIN

Shigeko Hara, Yukichi Hara, Toshiko Nakao and Makoto Nakao: *Biochemica et Biophysica Acta*, 644, 53, 1981

Showdomycin inhibited pig brain (Na⁺+K⁺)-ATPase with pseudo first-order kinetics. The rate of inhibition by showdomycin was found to depend in the presence of 16 combinations of four ligands, i. e., Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and ATP, and was found to depend on the ligands added. Combinations of ligands were divided into five groups in terms of the magnitude of the rate constant; in the order of decreasing rate constants these were: (1) Na⁺+Mg²⁺+ATP, (2) Mg²⁺, Mg²⁺+K⁺, K⁺ and none, (3) Na⁺+Mg²⁺, Na⁺, K⁺+Na⁺ and Na⁺+K⁺+Mg²⁺, (4) Mg²⁺+K⁺+ATP, K⁺+ATP and Mg²⁺+ATP, (5) K⁺+Na⁺+ATP, Na⁺+K⁺+Mg²⁺+ATP and ATP. The highest rate was obtained in the presence of Na⁺, Mg²⁺ and ATP. The apparent concentrations of Na⁺, Mg²⁺ and ATP for half-maximum stimulation of inhibition ($K_{0.5}$) were 3mM, 0.13mM and 4 μ M, respectively. The rate was unchanged upon further increase in Na⁺ concentration from 140 to 1000mM. The rate of inhibition could be explained on the basis of the enzyme forms present, including E₁, E₂, ES, E₁-P and E₂-P, i. e., E₂ has higher reactivity with showdomycin than E₁, while E₂-P has almost the same reactivity as E₁-P. We conclude that the reaction of (Na⁺+K⁺)-ATPase proceeds via at least four kind of enzyme form (E₁, E₂, E₁-nucleotide and EP), which all have different conformations.

Biological Fate of Butylated Hydroxytoluene (BHT): Binding of BHT Metabolites to Cysteine in Vitro

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: *Biochem. Pharmacol.*, 30 (8), 887, 1981

BHT とタンパクの結合様式を推定するため、*in Vitro* の実験で検討した。ミクロゾームと NADPH₂ 存在下、¹⁴C-BHT とシステインあるいは BHT と ¹⁴C-システインを反応させた。その結果、薄層クロマトグラフィにおいて各々の反応液から同一の R_f 値を示す化合物が得られ、BHT の代謝物がシステインと結合することを確認した。つぎに ¹⁴C-システインと既知の BHT 代謝物をエタノール酢酸緩衝液中で反応させたところ、BHT-

alcohol quinone と quinone methideを加えた溶液から、
各々同一の Rf 値（上の実験で得られた結合体の Rf 値と

も一致）の化合物が得られ、この2つの代謝中間体がタ
ンパクのチオール基に結合することが示唆された。

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1980. 7—1981. 6)

中川敦子, 中尾順子: アデニレートシクラーゼにおよぼすバナデートの影響

第53回日本生化学会大会 (1980.10)

中尾順子, 中尾 真: Na, K-ATPase の Na^+ 型及び K^+ 型のみかけの分子量の相異

第53回日本生化学会大会 (1980.10)

佐々木美枝子, 吉田誠二, 平賀興吾: MNNG の変異原性・染色体異常誘発性におよぼすフェナセチンの効果
日本環境変異原学会 (EMS Japan) 第9回研究発表会 (1980.11)

大石真之, 平賀興吾: フタル酸モノ及びジエステルのマウス精巢に与える影響

第54回日本薬理学会総会 (1981. 3)

高橋 省, 平賀興吾: Butylated hydroxytoluene (BHT) の出血致死効果

第54回日本薬理学会総会 (1981. 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) とシステインの結合

日本薬学会第101年会 (1981. 4)

川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾: ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) による肺障害致死作用とマウスの系統
第8回日本毒科学会 (1981. 6)

坂本義光, 神谷信行, 平賀興吾: クロム鉱さい粉じんのラットによる1か月間吸入後の終生飼育実験

第8回毒科学会 (1981. 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)

中 田 和 男

寺 山 武

藪 内 清

原 田 裕 文

吉 原 武 俊

村 上 一

石 川 隆 章

西 垣 進

中 尾 順 子

昭和56年12月1日 発行

規格表 第2類

印刷番号 (56) 745

刊行物番号 (H) 24

東京都立衛生研究所研究年報第32-2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)