

安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究（第一次）

（平成6年度～平成8年度）

世話人 高橋道人

医薬品をはじめとする各種化学物質の生体に対する安全性の確認のために、従来より実験動物を用いた試験法が施行されているが、次のような面で見直しが必要とされている。第一には、多数の動物を用い、長期間にわたる実験が要求され、従ってかかる経費も莫大なものとなる。第二に、ヒトと実験動物との間には化学物質の代謝などにおいて差異がみられることが多く、しばしば実験成績のヒトへの外挿が難しい。第三に、従来の毒性指標の殆どは発現した毒性現象を感知するもの（反応指標）であり、化学物質の曝露を直接的に示す生体指標（曝露指標）は実用化されていない。第四は、動物愛護の問題である。一方、近年の分子生物学、細胞培養技術及びバイオ技術の進歩は、これまでの実験動物による個体レベルおよび臓器レベルでの安全性を、いろいろな指標を導入することによって分子レベルないしは細胞レベルで判定できる可能性を示唆している。本研究の目的は、化学物質による生体内の分子変化や微量反応或いは生理変動の測定方法を確立し、従来の試験法との比較検討によりその毒性学的な有意性を明らかにし、毒性指標として採用することにより、化学物質に対する安全性評価の高度化をめざすことにある。

第一次研究期間においては、*in vitro* ないし *in vivo* の試験系を用い、分子、細胞および組織レベルでの種々の毒性指標の有用性について検討した。毒性部では、正常ラットの血清や肝臓、腎臓などの諸臓器における微量金属元素（Ca, Cu, Fe, Mg, Mn および Zn）をプラズマ発光分光分析装置（ICP）を用いて測定し、臓器、週齢および性による存在比の特徴があることを明らかにした。療品部では、医用材料の添加剤について、V79 代謝協同阻害試験法を用いて細胞間連絡阻害作用を検索し、いくつかの紫外線吸収剤および色素に阻害活性のあることを確認した。生物薬品部では、四塩化炭素およびフタル酸エステルを投与したラット肝について HPLC-RT-PCR 法を用いて検索し、HGF および β -アクチンの変動が mRNA レベルで測定可能であることを明らかにした。機能生化学部では、アレルギー促進活性の評価法として培養ラットがん化好塩基球細胞を用い、いくつかの小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤が種々のメディエーター遊離を促進することを確認した。薬理部では、代謝的活性化の種差を簡便に予測する方法について

検討し、代謝量と生体高分子への共有結合量との関係は化学物質ごとに異なることを明らかにした。病理部では、4HAQO を投与したラットの諸臓器について免疫組織化学的ならびに電子顕微鏡的に検索し、DNA 付加体形成、微細な核小体変化、p53 蛋白発現、アポトーシスおよび細胞増殖が標的臓器において連続的に起こることを明らかにした。大阪支所生物試験部では、ラット脱落膜反応を用いた発生毒性検出法について検討し、妊娠ラットへの化学物質の投与時期により発生毒性に感受性と発現様式が異なることを明らかにした。

以上、各担当部が行った試験研究の概要について述べたが、その具体的な内容については以下に記す各々の報告書を参照されたい。

なお、本研究プロジェクトは第二次研究期間として平成9年度から3年間の予定で既に継続中である。次の3年間において、細胞間連絡阻害活性やアレルギー原性などの *in vitro* 試験系毒性指標の簡易迅速評価法を確立し、生体高分子付加体などの実験動物における化学物質の曝露指標の検出感度や特異性をさらに検討するとともに、組織内微量金属元素の変動、成長因子の発現、細胞増殖活性、細胞死、代謝活性および脱落膜反応などの生体反応指標の迅速かつ鋭敏な評価手段としての総合的な有意性を確認することにより、実用化に向けて更に研究を推し進める予定である。

毒性指標としての生体内金属元素の変動

毒性部 鈴木幸子・小川幸男・金子豊蔵・井上 達

[目的]

近年、老化、心疾患、脳血管系疾患、肝胆系疾患など内因性疾患と微量金属の機能に深い関係があることが明らかにされ、生体内微量金属への関心が高まっている。こうしたことは、分析機器ならびに技術の発展に伴い、多元素を同時に短時間で測定が可能となったことと深い関連がある。その結果、生体内には多種多様な元素が様々な濃度で存在して生命機能の維持に重要な役割を担っていることが明らかになっている。現在までは化学物質等の投与による生体への影響を病理組織学的検査と共に、血清生化学検査が生体への影響を調べる判断基準となっているが、血清のみな

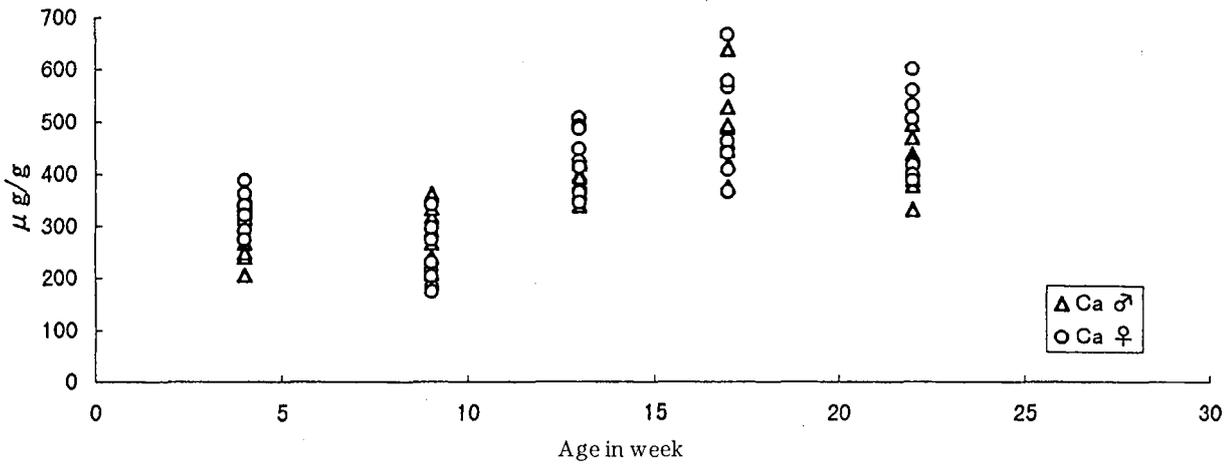


Fig. 1 Changes in Calcium concentrations in the Lung of Slc-Wistar rats along with aging.

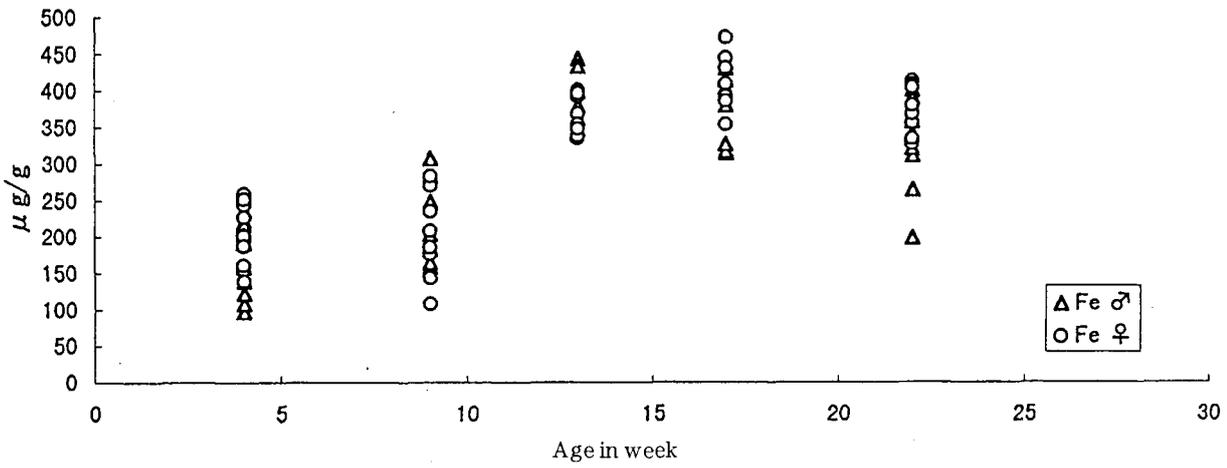


Fig. 2 Changes in Iron concentrations in the Lung of Slc-Wistar rats along with aging.

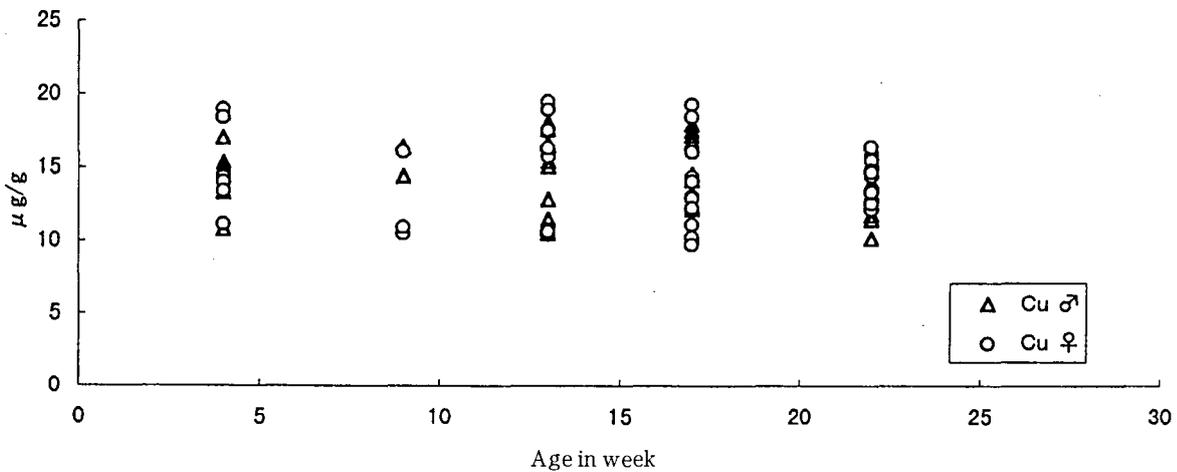


Fig. 3 Changes in Copper concentrations in the Liver of Slc-Wistar rats along with aging.

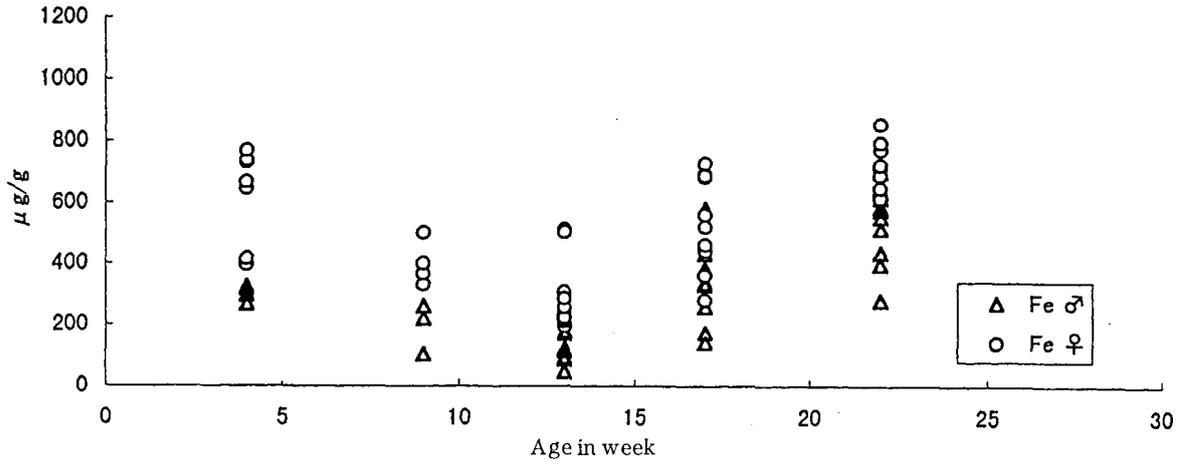


Fig. 4 Changes in Iron concentrations in the Liver of Slc-Wistar rats along with aging.

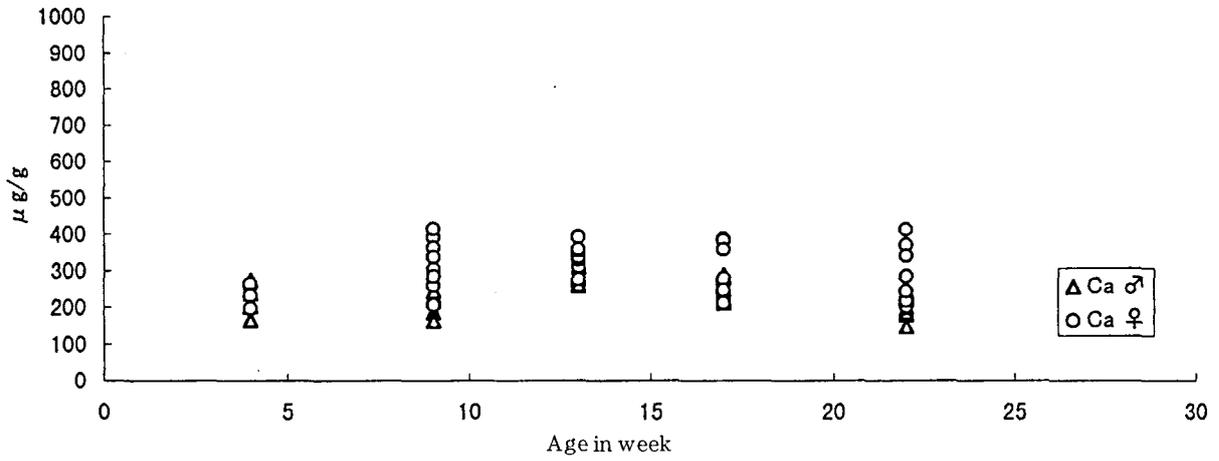


Fig. 5 Changes in Calcium concentrations in the Kidney of Slc-Wistar rats along with aging.

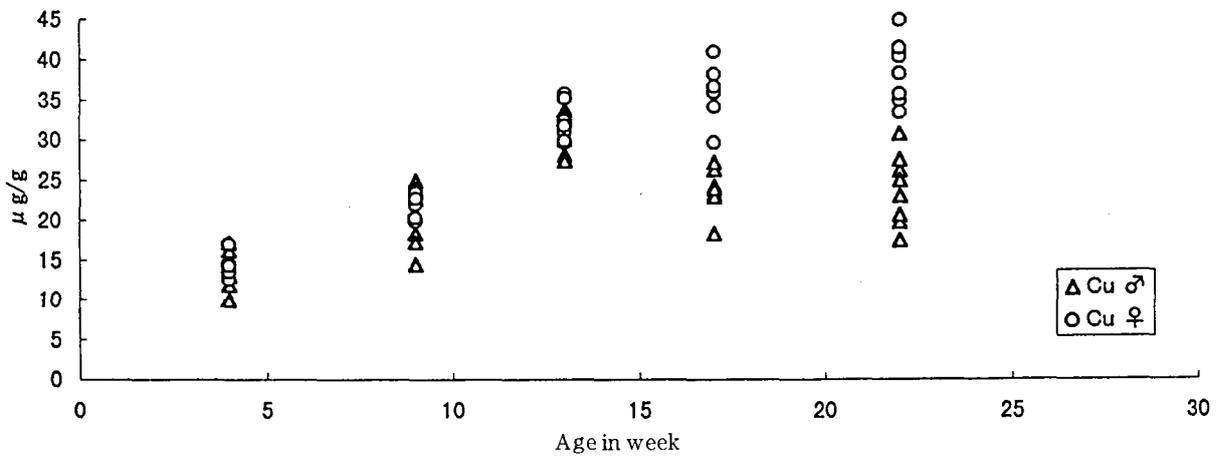


Fig. 6 Changes in Copper concentrations in the Kidney of Slc-Wistar rats along with aging.

らず臓器中の必須元素を測定する事によって、安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標となるものと思われる。

本研究の第一次では基礎実験として、実験動物の生体内必須元素濃度の正常値を把握する目的で、実験に供しない健康と考えられるラット3系統 (Slc Wistar, JCL-Sprague-Dawley, CRJ-F344) の血清、および臓器中の必須元素濃度測定結果を集積している (Table 1)。今回は4, 9, 13, 17, 22, 26週齢のSlc-Wistar系雌雄ラットの臓器および血清中の必須元素濃度の分析結果を報告する。

[方法]

1. 飼育条件

実験動物は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明12時間のバリアーシステムの動物室で飼育し、ラット飼育用固形飼料 (船橋農場製 F2) と水道水を自由に摂取させた。

2. 臓器および元素

臓器は肺、肝臓、腎臓、脾臓の4臓器および血清、元素はカルシウム (Ca)、銅 (Cu)、鉄 (Fe)、マグネシウム (Mg)、マンガン (Mn) および亜鉛 (Zn) の6元素について報告する。

3. 装置

真空凍結乾燥器: FTS system 社製 DURA-DRY

誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP): 真空多元素同時分析型 Thermo-Jarrel Ash 社製 ICAP-61

試料分解容器: 三愛科学製電子レンジ用試料分解容器

電子レンジ: 日立製 MR-M26

4. 分析法

摘出臓器は凍結乾燥後、電子レンジを用いて硝酸・過塩素酸で湿式分解¹⁾した。分解溶液中のCa, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn濃度をプラズマ発光分析装置 (ICP) で測定した²⁾。その結果を動物実験におけるデータ処理法³⁾の一部変更したプログラムを作成して系統、週齢、性差、臓器別に分類、蓄積した。

5. 結果

各元素の臓器中濃度の結果のうち変化の認められた元素について Fig. 1~9 に示した。各元素の測定値について週齢変化および性差を臓器別で比較検討した。

週齢に伴って変化の認められた元素は肺のカルシウム濃度が増加傾向、腎臓の銅濃度が増加、肺、肝臓、腎臓および脾臓の鉄濃度の増加が認められた。

性差の変化が認められた元素は腎臓のカルシウム濃度が4週齢では差は認められなかったが、それ以降、雌の値が雄の1.2~1.5倍であった。血清の鉄濃度は雌の値が雄の値の1.2倍~2.0倍の高い値を示した。肝臓、腎臓および脾臓の鉄濃度について、4週齢の脾臓では性差は認められなかったが、その後は雌の値が高かった。マグネシウム、マンガン、亜鉛については週齢、性差による明らかな変化は認められなかった。

以上の結果を Table 2 に纏めた。

Table 2 Summarized changes in metal concentration with aging between both sexes.

	Ca		Cu		Fe	
	aging	sexes	aging	sexes	aging	sexes
Lung	↑				↑	
Liver					↑	♀ > ♂
Kidney		♀ > ♂	↑		↑	♀ > ♂
Spleen					↑	♀ > ♂
Serum						♀ > ♂

文 献

- 1) 鈴木幸子・小川幸男・鎌田栄一・金子豊蔵・黒川雄二: 必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第一報), 衛生試験所報告, **108**, 132-135 (1990)
- 2) 鈴木幸子・小川幸男・広瀬明彦・金子豊蔵・黒川雄二: 必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第二報), 衛生試験所報告, **109**, 115-118 (1991)
- 3) 鈴木幸子・斎藤 実・中路幸男・戸部満寿夫: 動物実験におけるデータ処理法について, 衛生試験所報告, **100**, 204-211 (1982)

細胞間連絡阻害活性の重要性

療 品 部 土屋利江・出川宏規・中村晃忠

[目的]

細胞の重要な生理機能を担うギャップ結合の細胞間連絡阻害活性を指標として、医用材料に添加される各種添加剤を中心に検討し、細胞間連絡阻害活性の安全性評価上での有用性を検討し、迅速かつ鋭敏な試験方法を確立する事を目的とする。

各種添加剤の細胞間連絡阻害作用を迅速に評価するために、12 well plate を用いた方法を検討した。その結果、我々の代謝協同試験法の感度は、TPA について文献値と比較した結果、高い傾向が認められた。また、従来、陰性結果であった過酸化水素についても阻害活性を検出する事ができた。

医用材料に添加される色素や紫外線吸収剤について検討した結果を中心に報告する。

[方法]

試験化合物: ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤7種、および、ベンゾフェノン系紫外線吸収剤2種を使用した。色素としては、アゾフェニル化合物2種、および、アンスラキノン系色素4種を入手し、試験に用いた。

細胞株: V79細胞の野生株 (HGPR+) のおよびその変異株であるTG1細胞 (HGPR-) は、国立衛研・細胞バンクより入手し、5% FCS-改変MEM培地を用いて培養した。

試験方法：代謝協同阻害試験は 12 well plate の各 well に V79 細胞を 8×10^4 個, TG1 細胞を 100 個播種し, 細胞毒性試験は, TG1 細胞を各 well に 100 個まいて, 各々 5 時間静置した。培地を捨て, 種々の濃度の紫外線吸収剤を含む培地を 2 ml 加え, 6-thioguanine を最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ に調製して加えた。7 日間培養後, 細胞を固定しギムザ染色を行い, 形成されたコロニー数を数えた。コントロール(培地のみ)の well)でのコロニー数に比較して, 試験化合物でのコロニー数が統計的に有意に増加した時を代謝協同阻害活性陽性と判定した。細胞毒性は, コントロールの well に形成されたコロニーの平均値を 100% として, 試験物質でのコロニー形成率により細胞毒性を評価した。

2 段階 transformation assay は Balb/3T3 細胞を用いて, 角永らの方法に従って行った。6 週間培養した後に固定し, ギムザ溶液で染色後, 形成された transformed foci の数により, 発癌イニシエーションおよび発癌プロモーション活性を評価した。

[結果および考察]

1. 色素について

色素はコンタクトレンズや人工血管等の医療器具に使用されている。2 種のアンスラキノン系色素について V79 代謝協同阻害試験を行った結果, Quinizarin は阻害活性陰性であった。Purple 201 は $7.5 \mu\text{g/ml}$ から阻害活性を検出した。アゾフェノール系色素である Sudan 1 やアンスラキノン系色素である Purple 201 は, 既知発癌プロモーターであるリトコール酸に比べて, より低濃度で細胞間連絡阻害作用を示すことが明らかになった。一方, Quinizarin や Red 225 は本試験法では陰性であった。色素の代謝物が発癌プロモーション作用を示す可能性もあるので, 実際に色素を材料に添加する場合には, 代謝的活性化の可能性についても慎重に検討する必要がある。

強力な発癌プロモーターである TPA は, Sudan 1 の約 10 万分の 1 の濃度で阻害した。このように阻害濃度には, 100 万倍程度の大きな違いがあることが明らかになった。

2. 紫外線吸収剤について

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 7 種について試験した結果, 5 種の吸収剤で代謝協同阻害が認められた。また, それらの最小阻害濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ 以下を示し, 既知発癌プロモーターであるリトコール酸に比べて, 低濃度で阻害活性を示す事が明らかになった。阻害活性を示さなかったベンゾトリアゾール系吸収剤 2 種は阻害活性を示した化合物に比べ, 分子量が大きい傾向が認められた。更に, 阻害活性陰性の化合物は, ベンゾトリアゾールに結合しているヒドロキシフェニル基が, アルキル基以外の側鎖で置換されていた。阻害作用を示した 5 種のうち, 塩素で置換されていない 4 種について $20 \mu\text{M}$ 濃度での recovery ratio (コロニー増加率: 試験群でのコロニー形成率/コントロール

でのコロニー形成率)を計算し, 比較した。その結果, メチル基よりも tertiary のオクチル基, また, アルキル基の 1 置換型よりもフェノール環のオルトおよびパラ位に 2 置換されている方が, 活性強度が高い傾向が認められた。ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤である HBPBT の代謝協同阻害活性に及ぼす光増強作用について検討した結果, UVA を照射しても活性強度の増加は認められなかった。

次に, HBPBT について 2 段階 transformation assay を行った。細胞播種後 1 日目から 72 時間この化合物を添加して培養しても transformed foci の数は増加しなかったが, 細胞を低濃度の 3-MCA で弱くイニシエートした後, 培養 7 日目から HBPBT で処理すると明らかに transformed foci の数が増加し, 陽性対照 (3-MCA + TPA) 群の transformed foci の数とほぼ同程度であった。従って, HBPBT には発癌イニシエーション作用を認めなかったが, 発癌プロモーション作用が明らかになった。代謝協同阻害作用を示した濃度域で有意な transformed foci の増加を認めたことから, その機構には gap 結合細胞間連絡阻害作用が関与していることが推定された。一方, ベンゾフェノン系吸収剤について試験した結果, 1 種はベンゾトリアゾール系の場合よりも, より高濃度で阻害活性を示し, 残りの 1 種は阻害活性陰性であった。

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 1 種についてギャップ結合阻害機構を明らかにするために, ギャップ結合構成蛋白であるコネキシンの変化を抗体を用いて解析した。

抗コネキシン抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した結果, コネキシンに相当するバンドは化合物濃度が増加するにつれゲルシフトする傾向がみられた。更に, 抗燐酸化抗体を用いた免疫沈降法で解析した結果, コネキシンは複数のアミノ酸残基の燐酸化レベルが上昇している事が明らかになった。従って, プロテインキナーゼによるコネキシンの燐酸化修飾により, コネキシンの局在性や安定性等に異常を生じその結果, 細胞間連絡機能が阻害されたものと考えられる。

以上の結果より, 近年頻繁に使用されているいくつかの色素や紫外線吸収剤が, 発癌プロモーション作用を示す可能性が示された。色素については代謝的活性化によって, 阻害作用が更に増強される可能性があることに注意する必要がある。紫外線吸収剤は今後ますます使用頻度が増加し, 種々の製品内に添加され, また, 繰り返し使用される可能性がある化合物である。紫外線の防御効果のみでなく, 生物学的安全性を考慮して, 慎重に選択する必要があるものとする。

発表論文

- 1) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Nakamura, A.: Studies on the tumor-promoting activities of additives in bio-

- materials: Inhibition of Metabolic cooperation by additives such as pigments and phenolic antioxidants. *J. Long-Term Effects of Medical Implants*, **5**, 243-252 (1995)
- 2) Tsuchiya, T., Takahara, A., Cooper, S.L., Nakaoka, R., Degawa, H., Nakamura, A.: A new hypothesis: Inhibitory potentials of the gap-junctional intercellular communication play an important role in the tumorigenesis induced by biomaterials. *Proceedings of the fifteenth southern biomedical engineering conference*, 331-332 (1996)
- 3) 土屋利江: 高分子材料の *in vitro* 発癌プロモーション活性, 高分子論文集特集号, **6**, 314-322 (1998)

RT-PCR産物定量法のHPLCを用いた改良及びHPLC-RT-PCRを用いたフタル酸エステルの毒性指標検索に関する基礎的検討

生物薬品部 小林 哲・新見伸吾・福岡正道・早川堯夫

[目的]

文明の発展に伴い環境における化学物質の種類が急速に増加し、その多くは環境汚染物質として大きな社会的問題となっている。たとえば最近問題となっている環境ホルモンはその典型的な例である。今後どのようにして環境汚染物質から人間を守るかは重要な問題であるが、ある化学物質が毒性を及ぼすかどうかについて、あらかじめ毒性発現の要因となる特異的な生体指標の変化がわかれば、その変化を調べることでより毒性あるいは安全性を評価することが可能となり有用と考えられる。しかしながら現状ではその指標となる有用な生体内における変化は充分解明されていない。本研究においてはこれらの変化を精度よく検出できる測定系を構築するとともに、その測定系を用いて有用な生体内指標を検索することを目的としている。

このような研究においては生体内指標の検索における候補の選択のみならず、どのような測定系で有用な指標を検索するかが問題となる。変動因子がタンパク質の場合、その検出原理としてはタンパクの変化を検出する方法とそれを規定するm-RNAの変化を検出する方法の二種類が考えられる。タンパクの検出には抗体を用いた免疫化学的方法と、タンパクによっては固有の酵素反応を利用する方法がある。抗体を用いる場合の問題点はその調製並びに測定法の確立が容易ではないことであり、多数の候補のなかから有用な指標を検索することは困難である。また、指標となりうるタンパクは酵素とは限らないため酵素反応を測定して検出する方法の適用は限られている。そこで近年注目を浴びているのはRT-PCR法を用いた測定系で、広く生化学及び分子生物学における研究の分野で生体反応の調

節機構の解明に幅広く用いられている。本法の有用な点は遺伝子構造が解明されていればある塩基対に相補的なプライマーを用いてそのmRNAを検出できる点にある。実際この方法が診断用医薬品に応用されて各種ウイルスの感染の有無の判定に用いられている。しかしながら本法を生体内指標の検索に用いる場合、現状ではその定量性及び精度に問題があり、場合によっては指標となる生体内変化を正確に検出できない可能性もあるが、その原因について十分な解明は行われていない。我々はその原因の一つが現行のゲル電気泳動法を用いた測定法にある可能性を考え、それに代わりうる方法としてHPLC法に着目し、その有用性についてゲル電気泳動法と比較検討を行った。

一方、生体内指標を検索する際、どのような指標を候補として選択すべきかが問題となる。一般に生体は、ある化合物等により疾患が引き起こされる場合、その恒常性を維持するためにその疾患を治癒する方向に働き、その際様々な成長因子、サイトカイン等の変動が起きることが予想される。一方、疾患時には標的臓器を構成する細胞において細胞骨格を含む様々な主要構成成分に異常が起きることも予想される。そこでこのような観点から、現在環境ホルモンとして生体に異常を及ぼすことで注目されているフタル酸エステルについて、その毒性を評価しうる有用な生体内指標に関して、RT-PCRを用いて基礎的検討を行った。

[方法]

1. 測定用試料の調製

動物は200-220gの雄性ウイスターラットを用いた。四塩化炭素は1.0ml/kgとなるように腹腔内投与して、10時間後に肝臓を摘出した。フタル酸ジブチルは8.6mmol/kgとなるように強制経口投与して、6時間後に肝臓を摘出するとともに、末梢血をヘパリン採血した。肝臓はChomczynskiらの方法¹⁾に従い、10倍量のソリューションD(4Mチオシアン酸グアニジウム, 2.5mMクエン酸ナトリウム pH7.0, 0.5% N-ラウロイルサルコシン, 0.1M 2-メルカプトエタノール)でホモジナイズし、血液は10倍量のソリューションDと混合して、使用するまで-70℃で保存した。

市販キットを用い、上記処理をした肝臓及び血液から総RNAを抽出した。RNA濃度は260nmにおける吸光度より定量した。mRNAと総RNAは最終濃度がそれぞれ2µg/mlおよび0.1mg/mlになるようにDEPC処理水で希釈した。20ngのmRNAまたは3.2µgの総RNAから、5'-pd(N)₆と市販キットを用いて一本鎖cDNAを合成した。RNAとcDNAは-70℃で保存した。

2. PCR反応

PCR溶液(10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% (w/v)ゼラチン, 2.5mM dNTP, 20pMプライマー, 0.03U/ml Taq DNA polymerase) 100µlに15µlのcDNAを添加し、94℃で4分間DNAの変性を

行った後、20~30サイクルの反応（1サイクル：変性94℃ 60秒，再会合55℃ 90秒，DNAポリメラーゼ反応72℃ 180秒）を行った。HGF センスプライマーとして（5'-GGG TTT GGC CAT GAA TTT GA-3'）アンチセンスプライマーとして（5'-ACC TCT GTA GCT TTC ACC GT-3'）を用いた²⁾。β-アクチンのセンスプライマーとして（5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3'）アンチセンスプライマーとして（5'-GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG-3'）を用いた^{3,4)}。これらプライマーは製造委託したものを購入し，最終濃度を0.1 mM となるよう希釈し，分注後凍結保存した。

3. 電気泳動

標準 DNA (Amplisize DNA size standard, 10 ng/band/μl; Bio-Rad Lab., Hercules, CA) または PCR 反応産物10 μl を2%アガロースゲル (TAE pH 8.1, 3 μg/ml エチジウムプロマイド) にアプライし，TAE 中で，16.7 V/cm で45分間泳動した。EDAS システム (コダック) でゲルを撮影後，コダックデジタルサイエンスの1次元電気泳動解析ソフトウェアを用いて定量解析し，ゲルイメージ解析により，DNA の量は蛍光の正味強度として表示した。

4. HPLC

TSK-gel DNA-NPR カラム (東洋ソーダ) に標準 DNA または PCR 反応産物を10 μl 注入した。移動相は A 液 (20 mM Tris-HCl, pH 9.0) と B 液 (20 mM Tris-HCl, pH 9.0, および 1 M NaCl) を使い，開始時に A/B の比率を50/50 とし，20分には25/75になるよう直線勾配のグラジエントを形成させ，その後20分から38分までは50/50でカラムの再平衡化というプログラムで DNA の溶出を行った。流速は0.25 mL/min とし，DNA 量は280 nm におけるピーク面積として表示した。

【結果】

図1は電気泳動法を用いた DNA 標準品の検量線を作成した結果を示している。測定値と濃度において直線関係がみられたものの，相関係数は若干低く検量線は原点からはずれていた。図2は同様に HPLC 法を用いた DNA 標準品の検量線を示している。測定値と濃度においてはほぼ原点を通る直線関係が得られ，相関係数は電気泳動法に比べ高かった。表1は DNA 標準品の両測定法における測定値の再現性を調べた結果を示している。50 ng と100 ng において HPLC 法の方が優っていた。図3はアクチン及び HGF を例にとり，RT-PCR の増幅曲線を HPLC による定量に基づいて作成した結果を示している。両者とも20から30サイクルで良好な増加が確認された。図4は四塩化炭素投与肝疾患モデルラットにおける肝臓の HGFmRNA 上昇^{5,6)}を HPLC-RT-PCR により測定した結果を示している。本法においても HGFmRNA 上昇が確認され，その再現性も良好であった。なお同疾患モデルラットにおいてアクチ

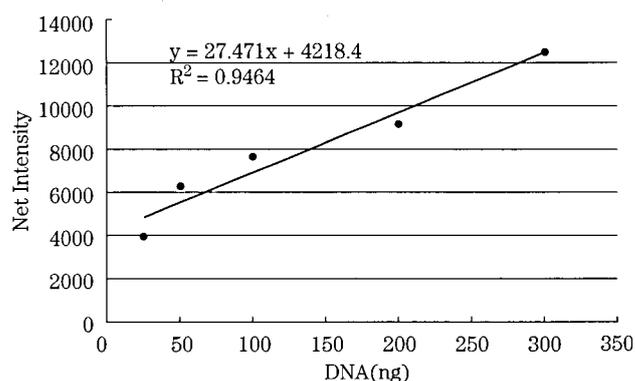


Fig. 1 Standard curve for determination of DNA amount using electrophoresis method.

MW markers of DNA were used in this experiment as described in Materials and Methods. Experimental conditions are described in Materials and Methods.

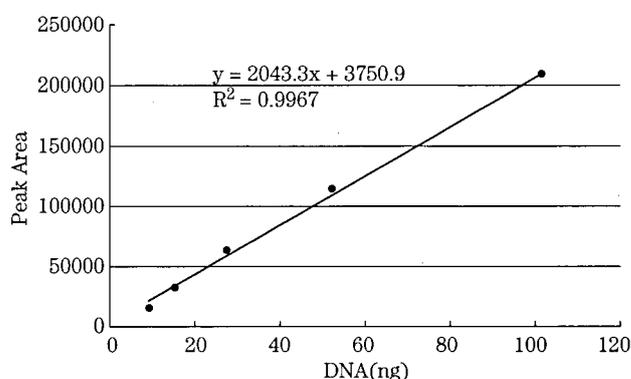


Fig. 2 Standard curve for determination of DNA amount using HPLC method.

MW markers of DNA were used in this experiment as described in Materials and Methods. Experimental conditions are described in Materials and Methods.

Table 1. Comparison of the reproducibility of DNA amount estimates by HPLC and electrophoresis

Method	DNA (ng)	CV (%)
HPLC	50	7
	100	8
Electrophoresis	50	16
	100	27

MW markers of DNA were used in the experiments as described in Materials and Methods. Experimental conditions are described in Materials and Methods. Data are means ± SD of three experiments.

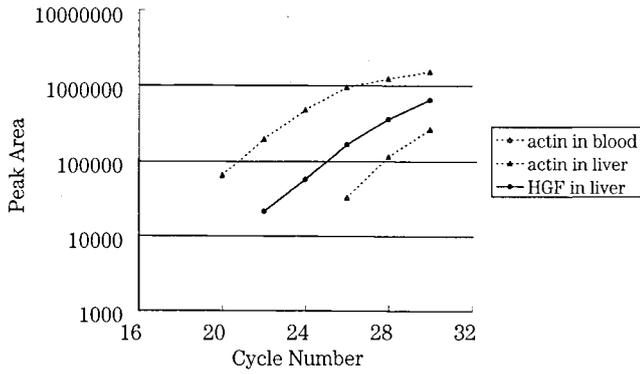


Fig. 3 PCR amplification curves of β -actin and HGF measured by HPLC method.

Experimental conditions are described in Materials and Methods.

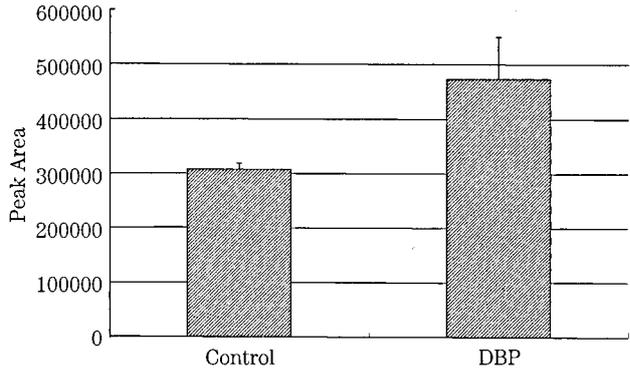


Fig. 6 Effect of DBP on the level of β -actin mRNA in rat blood.

Experimental conditions are described in Materials and Methods. Data are means \pm SD of three rats.

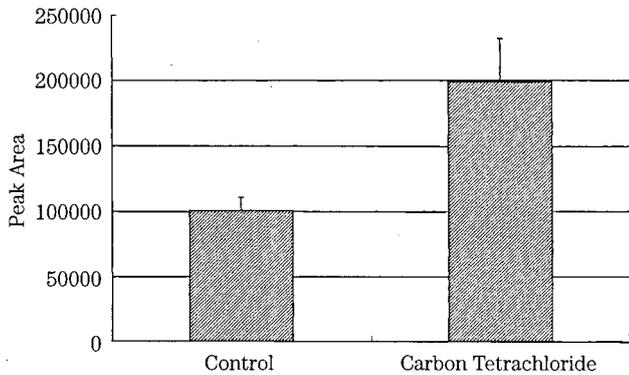


Fig. 4 Detection of the increase of HGF mRNA in rat liver induced by carbon tetrachloride using HPLC-RT-PCR.

Experimental conditions are described in Materials and Methods. Data are means \pm SD of three rats.

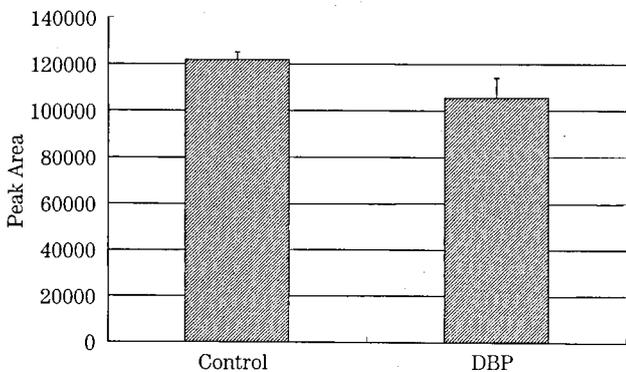


Fig. 5 Effect of DBP on the level of HGF mRNA in rat liver.

Experimental conditions are described in Materials and Methods. Data are means \pm SD of three rats.

ン mRNA の変化はみられなかった。

次に環境ホルモンであるフタル酸ジブチルエステル (DBP) の肝臓における HGF mRNA に及ぼす作用について HPLC-RT-PCR を用いて検討を行なった結果を図 5 に示している。DBP は先の四塩化炭素の場合と異なり HGF mRNA にほとんど影響を与えなかった。図 6 は DBP が血液中の β -アクトチン mRNA に及ぼす作用について HPLC-RT-PCR を用いて調べた結果を示している。DBP 投与により β -アクトチン mRNA が未処理に比べ約 50% 上昇することが判明した。

[考察]

本研究においては安全性評価に有用な生体内指標を精度よく検出できる測定系の構築、並びにその測定系を用いた生体内指標の検索に関する基礎的検討を行うことを目的としている。

RT-PCR 産物の測定系に関する基礎的検討として電気泳動法及び HPLC 法で標準 DNA の検量線を作成し比較したところ、HPLC のほうがより低濃度から高濃度に至るまで直線性関係が得られ、その相関係数も高い値が得られた。また再現性についても二つの濃度で比較したところ、HPLC のほうがより低い CV 値が得られた。これらの結果は HPLC 法のほうが電気泳動法に比べてより幅広い濃度範囲において定量的にかつ精度よく DNA を測定できることを示しており、RT-PCR 産物の定量においても同様な有用性を示すことが示唆された。さらに肝臓や血中のアクトチン mRNA 及び HGF mRNA を例にとり RT-PCR のサイクル依存性を HPLC で測定した結果、両サンプルにおいて 20 から 30 サイクルで増幅産物の良好なサイクル依存性がみられ、HPLC は至適な増幅回数の検討に有用であることが示された。さらに四塩化炭素投与肝疾患モデルラットにおける肝臓の HGF mRNA 上昇を HPLC-RT-PCR により測定した結果、HGF mRNA 上昇が確認され、その再

現性も良好であったことから、HPLC法がRT-PCRによる特定のmRNAの変化を調べるために有用であることが示された。

次にHPLC-RT-PCRを用いて化学物質の毒性を評価する生体内指標の検索に関する基礎的検討を行った。本研究においてその対象として選んだものは、環境汚染物質の一つであり、最近環境ホルモンとして注目を浴びているDBPである。DBPは肝毒性を示すことから、先の四塩化炭素と同様に肝臓におけるHGFmRNAの上昇を引き起こすかどうか検討を行ったところ、HGFmRNAの変化はほとんどみられなかった。この違いの原因については明らかではないが、DBPと四塩化炭素による肝障害発生機序が異なっていることによるのかもしれない。一方血液においてはDBPにより β -アクチンmRNAの上昇がみられた。この原因として、DBPが白血球に作用し細胞骨格の異常を伴う毒性作用を引き起こしている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: *Anal. Biochem.*, **162**, 156-169 (1987)
- 2) Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S., Nakamura, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3200-3204 (1990)
- 3) van - Hille B., Lohri, A., Reuter, J., Herrmann, R.: *Clin. Chem.*, **41**, 1087-93 (1995)
- 4) Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D.: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1759-1771 (1983)
- 5) Kinoshita, T., Tashiro, K. and Nakamura, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1229-34 (1989)
- 6) Maher, J. J.: *J. Clin. Invest.*, **91**, 2244-52 (1993)

化学物質のアレルギー原性並びにアレルギー促進活性の簡易迅速評価法の検討

機能生化学部 手島玲子・澤田純一

[目的]

本研究課題においては、化学物質の持つアレルギー原性及びアレルギー促進活性の検討のための簡易評価法並びに*in vitro*評価系の確立をめざしている。第一次においては、アレルギー促進活性を*in vitro*で評価するための方法として、培養ラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞を用い、細胞の情報伝達系に作用する化学物質が、細胞からのメディエータ遊離にいかに関与するかを調べた。

[方法]

細胞としては、ラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞、化学物質としては、3種の小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤を用いた。小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤としては、抗酸化剤でもあるDTBHQ(2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone)、

発がんプロモータの1つであるThapsigargin(TG)、並びにかび毒であるCyclopiazonic acid(CPA)を用いた。細胞内カルシウム濃度変化は、 Ca^{2+} 蛍光指示薬であるFura-2-AMを用い、2波長励起による蛍光強度比(F_{335}/F_{362})でモニターした。細胞から放出されるメディエータとしては、刺激後30分以内に放出されるものとして、脱顆粒によって放出されるヒスタミンまたは β -hexosaminidase, SRS(slow reacting substance)として知られるロイコトリエン, LTC_4 の測定を行い、刺激後3時間以上たつて放出されるものとして、炎症性サイトカインの1つであるTNF- α の測定を行った。

[結果]

1. 小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤の細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇への効果の検討: TG, CPA, DTBHQ 3種の小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤は、1980年代の後半から、筋小胞体並びに小胞体 Ca^{2+} -ATPase(SERCA)阻害作用を有することの見い出されてきた物質であるが、アレルギー担当細胞への効果は、ほとんど調べられていなかった。RBL-2H3細胞においては、抗原刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇が、ヒスタミン遊離に必須であるので、これら3種の小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇へ及ぼす効果について検討した。TG, CPA, DTBHQは、どれも $[Ca^{2+}]_i$ を用量依存的に上昇させた。ED₅₀は、それぞれ1.6 nM, 1.4 μ M, 2.9 μ Mであった(図1)。

2. RBL-2H3細胞からのメディエータ遊離への小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤の効果: これら3種の阻害剤は、細胞からの脱顆粒(β -hexosaminidase遊離, ヒスタミン遊

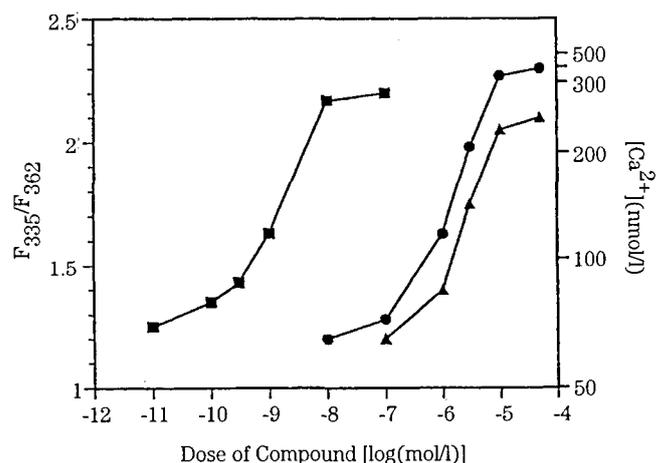


Fig. 1 Dose responses for the increase in $[Ca^{2+}]_i$ of RBL-2H3 cells induced by TG (squares), CPA (circles), and DTBHQ (triangles). The fluorescence ratios (F_{335}/F_{362}) at 100s after the addition of the drugs are plotted against the drug concentration. The fluorescence ratio without the drugs was approximately 1.2. Similar results were obtained in four or five different experiments.

離)を, protein kinase C (PKC) 活性化剤である TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 存在下で著しく上昇させた。これらの阻害剤による TPA 共存下における脱顆粒反応は, 用量依存的で, それぞれの ED_{50} は, 8.6 nM, 3.6 μ M, 4.1 μ M であり, $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇とよい相関がみられた。DTBHQ に関して, $[Ca^{2+}]_i$ と β -hexosaminidase 遊離の関係をプロットしてみると, 図2のようになり, $[Ca^{2+}]_i$ で, 100 nM 以上で, 有意な脱顆粒反応のみられることが判明した。また, TG, CPA は単独で, 用量依存的な LTC_4 産生を促した。その ED_{50} は, 11 nM, 11 μ M であり, これも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とよい相関があり, こちらは, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみで, PKC 活性化を必要としない反応であった。一方, 即時型アレルギーの late phase reaction に関与する炎症性サイトカイン TNF- α の産生に関しては, TG 20 nM, CPA 3 μ M, DTBHQ 10 μ M でピークに達し, $[Ca^{2+}]_i$ が最高に達する濃度とほぼ一致した。また, この TNF- α 産生は, 脱顆粒反応と同様, TPA 共存下で相乗的な増強効果がみられた。これら阻害剤による TNF- α 産生は, actinomycin D の処理により, 抑制されることより, 転写レベルでの活性化を伴っていることが判明した。以上, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が, 即時型アレルギーの late phase reaction に関与するメディエータの放出にも関与することが示唆された。

[考察]

$[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇を促す物質をアレルギー担当細胞である RBL-2H3 細胞に作用させたところ, 種々のメディエー

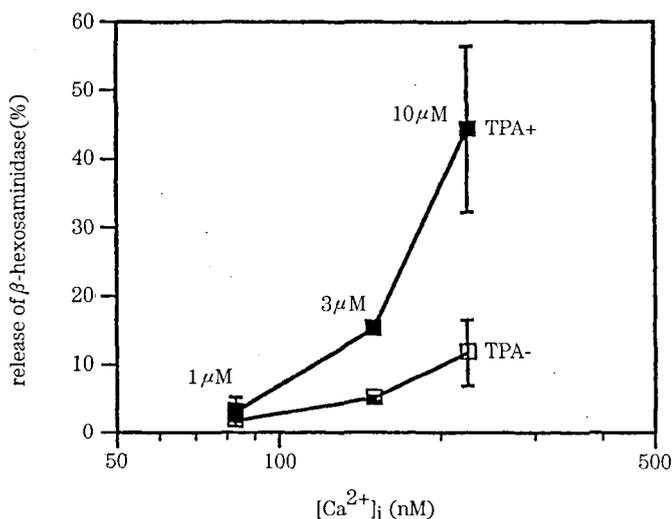


Fig. 2 Relationship between $[Ca^{2+}]_i$ and release of β -hexosaminidase induced by various concentrations of DTBHQ. Antioxidant concentrations used are shown near the symbols. The total (released and residual amounts of β -hexosaminidase) were taken as 100%. Each bar represents the mean \pm SD for the data from 2 or 3 experiments done in duplicate.

タ遊離が促進されることが判明した。メディエータ遊離には, TPA の存在が必要な場合と必要でない場合が存在し, 各々 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみで十分な場合と, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び PKC の活性化を必要とする場合の両者の存在を意味する。いずれにしても, $[Ca^{2+}]_i$ がひきがねとなるものと思われ, 化学物質のアレルギー促進活性を考えるうえで, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を調べる方法が有用な方法の一つであることが示された。

発表論文

- 1) Kitajima, S., Momma, J., Tsuda, M., Kurokawa, Y., Teshima, R. and Sawada, J.: *Inflamm. Res.*, **44**, 335-339 (1995)
- 2) Akasaka, R., Teshima, R., Kitajima, S., Momma, J., Inoue, T., Kurokawa, Y., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1513-1519 (1996)
- 3) Akasaka, R., Teshima, R., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: *Inflamm. Res.*, **45**, 583-587 (1996)
- 4) Teshima, R., Onose, J., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: *Inflamm. Res.*, **47**, 318-333 (1998)

化学物質の代謝的活性化の種差を簡便に予測する方法の確立

薬理部 紅林秀雄

[目的]

化学物質の中には生体内で代謝的活性化を受け生体蛋白・核酸等の高分子に共有結合することで毒性発現の原因になるものがある。また, この化学物質の毒性発現やその代謝にはしばしば動物種差のみられることがある。

1,4-ジクロロベンゼン(1,4-DICB)は, NTP(1987)による2年間の発がん実験で雄性ラットの腎臓と雌雄マウスの肝臓に発がん性を有することが報告された¹⁾。また, ラットでの急性肝毒性は, 1,4-DICB より1,2-ジクロロベンゼン(1,2-DICB)が強く現れることが報告されている²⁾。この肝毒性の位置異性による違い, 性差およびラットではなくマウスで肝に発がん性を有するという種差の問題がある。

Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) の場合は, 16週間の毒性試験における毒性症状はマウスよりラットに強く, また雄性より雌性ラットに強く発現し, ラットでは肝および腎重量増加, 脳の海馬の壊死と錐体ニューロンの減少が報告されている³⁾。長期毒性試験では雌雄ラットの腎臓と雄性マウスの肝臓に発がん性が報告されている⁴⁾。

様々な毒性発現の種差の違いの検討課題の一つとして, 代謝的活性化を担う酵素チトクロム P450(P450)の分子種の違いが考えられる。多くの化学物質の多種の代謝反応は単一分子種の P450 により行われるのではなく, 低い基質特異性をもつ多種の P450 により触媒される。この代謝反応では水溶性の増加した代謝物を生成し, 解毒の方向にあ

ると考えるのが一般的ではあるが、場合によっては活性中間体や活性代謝物を生成することもある。この時、代謝反応性の異なる P450 の分子種と毒性発現との関連性が生ずることになる。

今回、代謝的活性化の種差を簡便に予測する方法を確立させる目的で、上記のジクロロベンゼンおよび TCEP をモデル化合物とし、その代謝速度ならびに代謝的活性化によると考えられる高分子との共有結合量の関連性を *in vitro* の系で検討し、その毒性発現と動物種差との関係を考察した。

【方法】

雄性 F344 ラット及び B6C3F1 マウスの未処理または誘導剤の phenobarbital, 3-methylchranthrene, dexamethasone または acetone 等で処理した動物の肝臓から常法により調製したミクロソームを使用した。リン酸緩衝液 (pH = 7.4) (MgCl₂ を含む) に NADPH, 炭素-14 標識したジクロロベンゼンの基質を加え 37°C でインキュベートした。有機溶媒で反応を停止し、ODS 逆相系カラムを用いた HPLC で代謝物を分離し、放射性検出器で定量した。沈澱したタンパク質はメタノール, エタノール, 酢酸エチル, エーテルで洗浄後, 1 N の水酸化ナトリウムで溶解し, 液体シンチレーターで測定し, タンパク高分子への共有結合量を計測した。P450 含量は Omura and Sato の法, タンパク濃度は BCA キットを使用した。

¹⁴C-TCEP の場合も同様にラットの肝上清またはミクロソーム画分と還元型グルタチオン (GSH) または NADPH 存在下でインキュベートした後, HPLC を用いて代謝物を分離し, その代謝物の割合から代謝速度を測定した。また上記と同様, タンパク高分子との共有結合量を計測した。

【結果及び考察】

1,2-DICB 及び 1,4-DICB のラット肝ミクロソームでの代謝を検討した結果, 1,2-DICB と 1,4-DICB ともに NADPH 存在下の肝ミクロソームにより代謝され, 急性肝毒性が強く現れると報告されている 1,2-DICB が代謝されやすく, また多種の代謝物を生成することが判明した。そこで, 代謝されやすい 1,2-DICB の代謝を, 各種誘導剤で処理したラットのミクロソームを用いて比較検討したところ, その代謝速度は phenobarbital または acetone で処理したラットの肝ミクロソームではコントロールラットの 3~4 倍の速度であった (Fig. 1)。Phenobarbital または acetone でラット肝細胞に誘導される P450 分子種で代謝されることが予測された。

また, この 1,2-DICB および 1,4-DICB はラット肝ミクロソームで代謝される際, その一部はタンパク高分子に共有結合するが, この共有結合量は代謝量の 1/10 程度であること, またこの共有結合は肝毒性の強い 1,2-DICB が高い値を示すことが確認された (Fig. 2)。一方, 1,4-DICB のタ

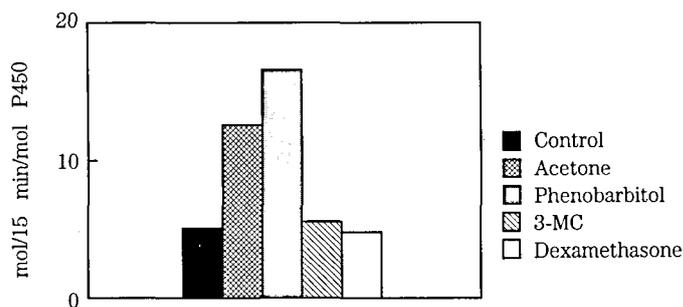


Fig. 1. Metabolic rate of 1,2-Dichlorobenzene by rat liver microsomes

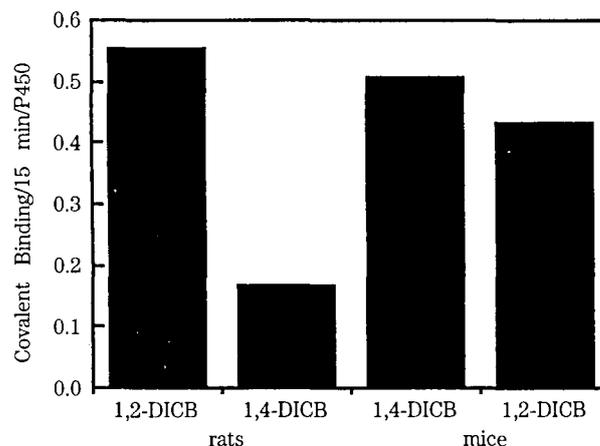


Fig. 2. Covalent Binding of Dichlorobenzenes by rat and mice liver microsomes

ンパク高分子への共有結合量は肝発がん性の認められたマウスの肝ミクロソームでラットより高い値を示すことが判明した。

更に, これらの共有結合は GSH で強く阻害されることが判明した (Fig. 3, Fig. 4)。また, この共有結合はキノンを還元する作用のある還元型アスコルビン酸で阻害され, 1,2-DICB より 1,4-DICB の場合に強く阻害されることが確認された。

ハロゲン化ベンゼン類は代謝的活性化を受け, 不安定なエポキシドを生成し, これがさらにハロゲン化フェノール, ハロゲン化ヒドロキノンやそのキノン体等に代謝されると考えられている。上記共有結合の阻害実験からその活性代謝物は, 1,2-DICB の場合はエポキシド, 1,4-DICB の場合はそのキノン体であることが予測された。

一方, ラット肝ミクロソームにおける TCEP の代謝速度の場合も, NADPH 非存在下では低く, NADPH 存在下で高い値を示した。その代謝速度は雄性未処理ラットで 1.25 ± 0.32 nmol/mg protein/min であり, phenobarbital 処理でその 4 倍, clofibrate 処理で 2.3 倍, dexamethasone 処理で 1.6 倍, acetone 処理で 1.3 倍, 3-methylchranthrene

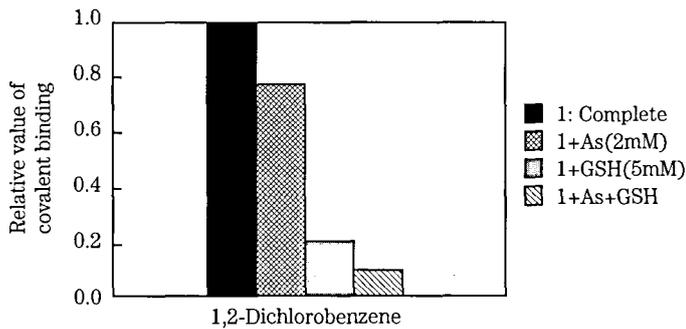


Fig. 3. Effects of ascorbate and glutathione on covalent binding of 1,2-dichlorobenzene to rat liver microsomes

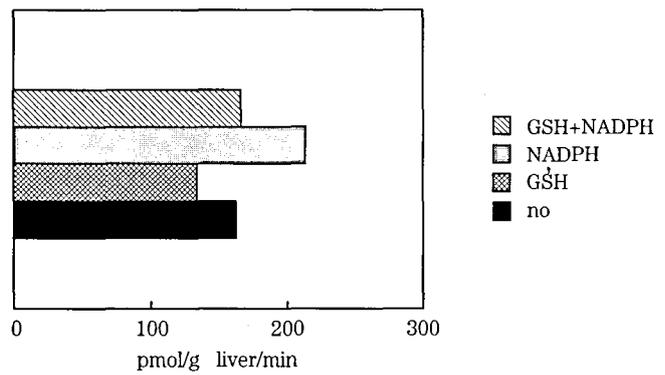


Fig. 5. Covalent binding of TCEP to microsomal protein of rat liver

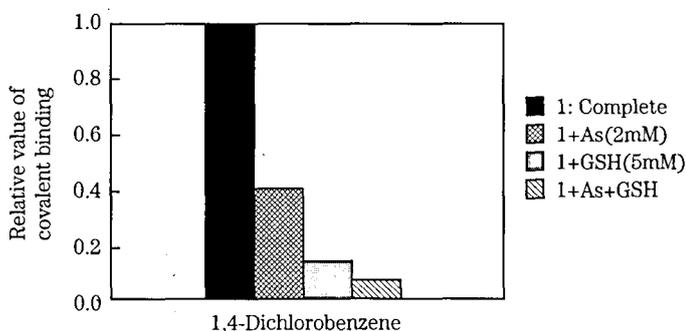


Fig. 4. Effects of ascorbate and glutathione on covalent binding of 1,4-dichlorobenzene to rat liver microsomes

処理で0.5倍の順であった。この代謝速度 nmol/mg protein/min を nmol/g liver/min および mol/mol P450/min で表現した場合の相関係数はそれぞれ $r^2 = 0.941, 0.948, 0.833$ であり、良い相関性を示し、P450 当りの代謝活性での比較は適切であることが確認された。

一方、TCEP は NADPH 存在下並びに非存在下で肝上清またはミクロソームのタンパク高分子と共有結合すること、この共有結合量は代謝量の 1/100 程度であること及びこの共有結合の一部は GSH で阻害されることが判明した (Fig. 5)。しかし、この共有結合は NADPH 非存在下で高分子と共有結合すること、共有結合量の GSH で阻害される割合は小さいこと、また誘導ミクロソームを用いたときの代謝速度と共有結合量との相関性は低いこと等が判明している。

TCEP のようなハロゲン化合物は親電子反応で有機化合物と共有結合しやすい性質があること、また TCEP から代謝されて生成し、TCEP の活性代謝物と考えられているアルデヒドのカルボン酸への代謝され易さやアルデヒド本体の反応性の強弱を考慮すると TCEP での共有結合量の GSH による阻害率の小さいことは予測される。

TCEP のラットにおける毒性症状で脳の海馬の壊死と

錐体ニューロンの減少が報告されているか^{5,6)}、その後の TCEP のラットにおける薬物動態試験では、脳の海馬等への特異的分布や蓄積性は報告されていない^{5,6)}。動物実験における毒性発現の部位と薬物動態試験での特異的臓器分布や蓄積性ないしは共有結合性は必ずしも一致している訳ではなく、その現象や原因を持続的に検討していく必要がある。

今回、ジクロロベンゼンの場合にはそのミクロソームでの代謝量とタンパク高分子との共有結合の関連性が強いこと、一方、TCEP は GSH 存在下及び非存在下で共有結合を生成し、ミクロソームでの代謝速度と共有結合量の関連性も低いことが判明した。即ち、化学物質によってその代謝量と生体高分子への共有結合量の関係は異なることが明らかになった。しかし、それぞれの化学物質の代謝と高分子への共有結合の原因やその関連性を追究していくことで種差と毒性発現機序の解明の一助になると考えられた。

文 献

- 1) NTP TR319 pp.198 (1987)
- 2) Stine, E. R. Gunawardhana, L. and Sipes, I. G.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **109**, 472-481 (1991)
- 3) Matthews, H. B., Dixon, D., Herr, D. W. and Tilson, H.: *Toxicol. Ind. Health*, **6**, 1-15 (1990)
- 4) Matthews, H. B., Eustis, S. L. and Haseman, J.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **20**, 477-485 (1993)
- 5) Herr, D. W., Sanders, J. M., and Matthews, H. B.: *Drug Metab. Disp.*, **19**, 436-442 (1991)
- 6) Yoshida, K., Ninomiya, S., Esumi, Y., Kurebayashi, H., Minegishi, K., Ohno, Y. and Takahashi, A.: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **43**, p-9 (1997)

迅速かつ鋭敏な病理学的毒性指標に関する検討

病理部 今沢孝喜・西川秋佳・高橋道人

【目的】

化学物質などの毒性を動物を用いて評価する場合、長期間を要する。例えば、強力な発癌物質として知られている4-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO) は、ラット尾静脈内への単回投与では選択的に膵の腺房細胞腫瘍、好酸性病変および好塩基性結節性病変が高率に誘発される¹⁾。しかし、4HAQOによりこれら病変が誘発されるには処置してから一年以上必要とする。一般的に化学発癌物質の癌化の機構はDNAに化学的に共有結合することにより発癌物質-DNA付加体を形成するといわれており、4HAQOの場合は生体内でO-アルシル化を受けアデニンおよびグアニンと結合し、複数のDNA付加体を形成することが知られている²⁾。林らはラット尾静脈内に4HAQO(10 mg/kg)の単回投与で早期に超微形態学的変化として、末梢神経細胞に核小体分離が誘発されることを報告した³⁾。この誘発された細胞の核小体分離は核小体の構成成分である顆粒部と線維部の分離を特徴とする超微構造変化で、アフラトキシンB1、アドリアマイシンなど、多数報告されている^{4,5)}。上記に示した物質はいずれもDNA付加体を形成する発癌物質である。そこで、DNA付加体形成と核小体分離との関係を検索するために以下の実験を行なった。また、DNA傷害が誘発されると癌抑制遺伝子であるp53が誘導され、apoptosisが促進されることから、4HAQOの標的細胞である膵腺房細胞において免疫組織化学的にp53蛋白の発現とapoptosis細胞の出現を経時的に観察・比較し、さらに腫瘍発生と細胞増殖活性との相関性が高いことから、経時的に膵腺房細胞の細胞増殖活性についても検討した。

【方法】

動物は6週齢雄SDラットを用い、4HAQO(20 mg/kg)を尾静脈内に単回投与し、経時的に2~72時間後に各4匹ずつ屠殺・剖検した。臓器は4HAQOの発癌の標的細胞である膵を中心に肺、副腎および小腸さらに非標的細胞である肝を摘出した。対照群には溶媒のみを投与し、屠殺・剖検した。各臓器は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法に従いH&E染色を施した。また、一部を2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、電顕的に観察した。

I 各臓器を免疫組織化学的に4HAQO-DNA付加体に対する抗体を用いてDNA付加体を検出し、その陽性率と超微形態学的に膵腺房細胞、肺上皮細胞、副腎皮質細胞、小腸粘膜上皮細胞および肝細胞の核小体分離の出現率を観察し、経時的に比較・検討した。

II 4HAQOの主標的細胞である膵腺房細胞と非標的細胞である肝細胞について、抗p53抗体を用いて、免疫組織

化学的にp53蛋白の発現率とTUNEL法によるapoptosis細胞の出現率を経時的に検索した。

III 4HAQOによる膵腺房細胞の細胞増殖活性について、抗PCNA抗体を用いて、免疫組織化学的にその陽性率を経時的に検索した。

【結果と考察】

I 4HAQOによるDNA付加体形成と核小体分離

結果をFig. 1に各臓器のDNA付加体形成および核小体分離の出現率を経時的に示した。ただし、肝細胞も同様に検索を行ったがこのような変化は認められなかったためこのグラフから除外した。DNA付加体形成は、特に膵腺房細胞では4HAQO投与4時間後で平均約77%と最も高い陽性率を示し、他の標的細胞では最高30%前後であった。肝細胞はほぼ陰性であった。超微形態学的な観察では、標的細胞には核小体分離が観察され、膵腺房細胞では投与6時間後で47%と最も出現率が高く、他の標的細胞では10%前後であったが、肝細胞ではほとんど認められなかった。また、いずれの細胞も核小体以外の細胞質内にはリボゾー

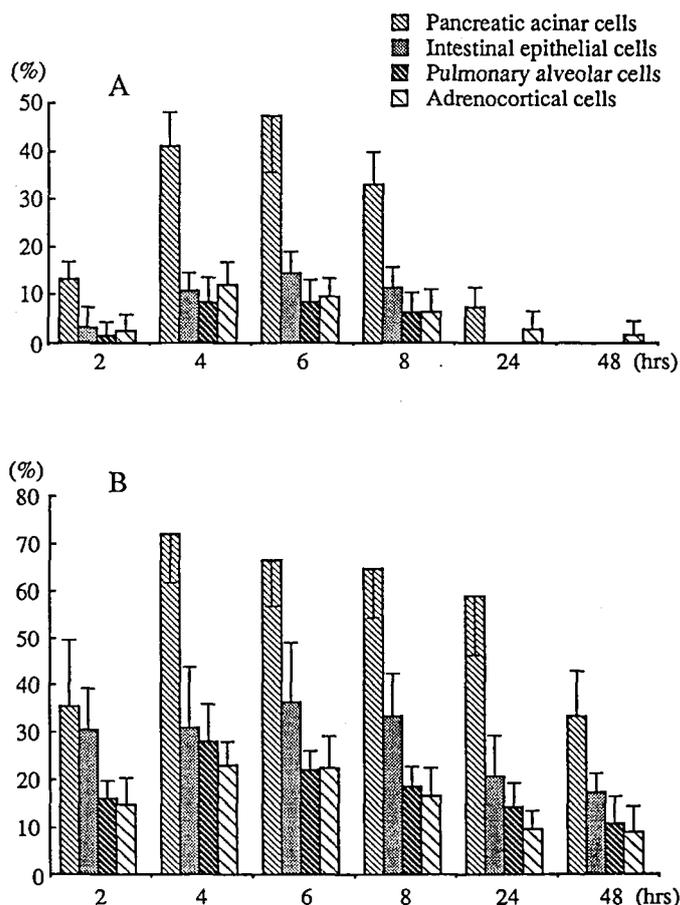


Fig. 1. Summary of sequential changes in nucleolar segregation (A) and 4HAQO-DNA adduct formation (B) for the exocrine pancreas, intestine, lung and adrenocortex of rats treated with 4HAQO
Data represent mean ± standard deviation

ムの減少している以外には特徴的な変化は認められなかった。膵腺房細胞にみられたDNA付加体形成の陽性率および核小体分離の出現率は他の標的細胞よりも全体に高く維持されていた。しかし、いずれの細胞もDNA付加体形成および核小体分離のピークは4から6時間後にみられ、その後漸次減少した。4HAQOにより発癌の標的細胞に誘発されたDNA付加体形成および核小体分離は短時間に回復がみられ、非標的の肝細胞ではほとんど認めることができなかったことから、核小体分離とDNA付加体形成あるいは発癌との関係が考えられる。以上より、DNA付加体形成と核小体分離の標的性は一致しており、4HAQOは標的細胞のDNAと付加体を形成した後に、核小体の超微構造変化を発現するものと考えられる。現在、genotoxicな発癌物質は標的細胞のDNAと結合することによってその細胞をイニシエートすると考えられており、発癌物質により誘発される核小体分離は核小体におけるrRNA合成阻害の形態的表現と考えられ、その機序としてDNAのtemplateとしての機能障害があげられる。今回の結果から、4HAQOは標的細胞のDNAと付加体を形成し、核小体の超微構造変化を引き起こすものと思われた⁹⁾。化学物質により誘発される核小体分離はDNA傷害の指標となることが示唆された。

II 4HAQOによるp53蛋白の発現とapoptosisの誘発

4HAQO投与動物の膵腺房細胞にp53蛋白の陽性細胞およびapoptosis細胞の出現が観察された。また、apoptosis細胞は同一膵組織の電顕的観察により確認された。p53蛋白の発現およびapoptosisの出現率の推移はほぼ同様の経過をたどり、ともに投与24時間後で最も強く観察され、その後p53蛋白は急激に減少したが、apoptosisは遅延して減少した(Fig. 2)。一方、投与群の肝細胞および対照群の膵腺房細胞ではp53蛋白およびapoptosis細胞はほとんど観察されなかった。4HAQOの投与により、発癌の主たる

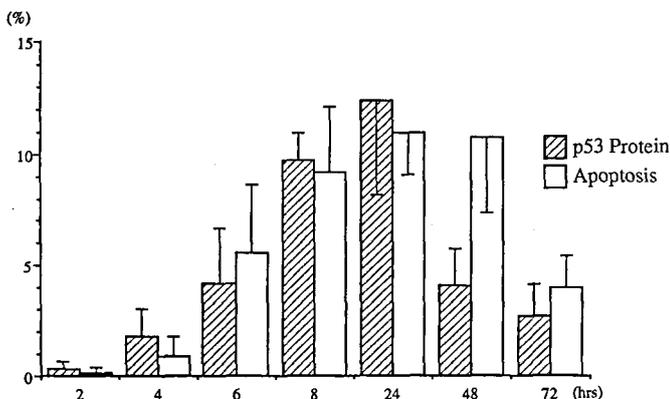


Fig. 2 Summary of sequential changes in p53 protein expression and apoptosis for the exocrine pancreas of rats treated with 4HAQO

Data represent mean \pm standard deviation

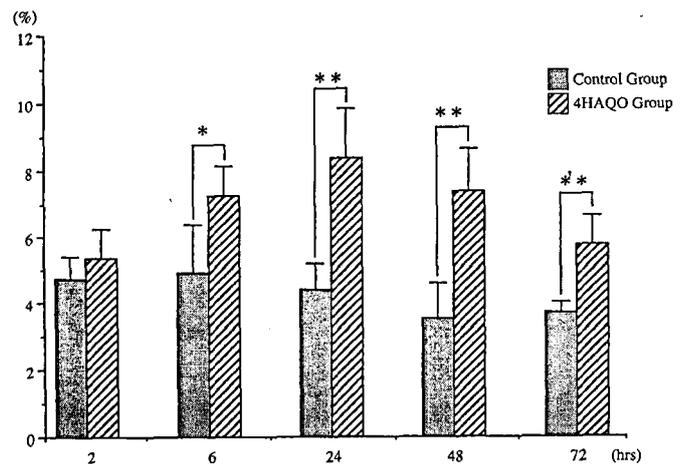


Fig. 3. PCNA contents in pancreatic acinar cells of rats treated with 4HAQO and control rats

Significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control group

Data represent mean \pm standard deviation

標的細胞である膵腺房細胞にp53蛋白の発現亢進がみられ、同時にapoptosisも誘発されることが明らかとなった。4HAQOは膵腺房細胞に対し投与4時間後で最も高頻度にDNA付加体形成を示すことから、p53蛋白はDNA損傷を受けた後に発現され、またapoptosisの誘導と深い関与が示唆された。

III 4HAQOによる細胞増殖活性について

4HAQO投与群のPCNA陽性細胞の陽性率は対照群と比較して、投与2時間後では差がみられなかったが、6時間後以降は有意に高く、陽性率は投与24時間後で最も高く発現した。投与群の肝細胞では細胞増殖活性はみられなかった。4HAQOの投与により、発癌の主たる標的細胞である膵腺房細胞に細胞増殖活性の亢進がみることが明らかとなった。

[まとめ]

本実験で用いた、毒性および発癌性が明らかにされている化学物質の4HAQOは標的細胞のDNAと付加体を形成し、その形態的表現として核小体分離を誘発する。続いて、癌抑制遺伝子であるp53が誘導され、apoptosisを促進するようになり、同時に細胞増殖活性が亢進されることが明らかとなった。このように化学物質の毒性あるいは発癌作用のメカニズムは上記のように連動して早期に現れることが判明し、細胞や組織レベルで化学物質の毒性あるいは発癌性を予測することが可能である。これらの研究は他の化学物質についても応用できるものと思われる。

文献 (発表論文を含む)

- 1) Imazawa, T., Furukawa, F., Shibutani, M., Mitsumori, K., Sato, M., Hayashi, Y. and Takahashi, M.: Correlation between nucleolar organizer regions and cell proliferation in pancreatic acinar cell proliferative lesions in rats. *Pancreas*, **9**, 219-224 (1994)
- 2) Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M. H.: Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxiaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction of 4-acetoxiaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res.*, **45**, 520-525 (1985)
- 3) Hayashi, Y., Hasegawa, T. and Toyoshima, K.: Nucleolar alterations of alveolar epithelial cells in rats following administration of 4-hydroxiaminoquinoline 1-oxide. *Experimentia*, **27**, 925-926 (1971)
- 4) Svoboda, D., Racela, A. and Higginson, J.: Variations in ultrastructural nuclear changes in hepatocarcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 651-657 (1967)
- 5) Hayashi, Y., Imazawa, T., Kokubo, T., Kurokawa, Y. and Takahashi, M.: Nucleolar alterations of myocardial cells and glomerular epithelial cells in rats after a single administration of adriamycin. *Toxicol. Lett.*, **20**, 105-110 (1984)
- 6) Imazawa, T., Nishikawa, A., Tada, M., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Nucleolar segregation as an early marker for DNA damage; an experimental study in rats treated with 4-hydroxiaminoquinoline 1-oxide. *Virchows Archiv*, **426**, 295-300 (1995)

ラット脱落膜反応を用いた発生毒性に関する組織器官レベルでの検出システムの開発

大阪支所生物試験部 江馬 眞・原園 景
宮脇英美子・川島邦夫

[目的]

胎児の器官形成期や周産期における化学物質の暴露によって胎児奇形や生後の児に行動異常が誘発されることはよく知られており、これらの研究もよく行われている。しかしながら、妊娠初期における化学物質の暴露による受精卵の着床阻害や早期の胚致死についてはあまり注意が払われていない。

不妊交尾によって得られる偽妊娠動物は、通常の妊娠状態と同様な生理状態を示し、妊娠初期における化学物質の母体に対する影響を胚に対する影響と分離して検索するのに好都合である。子宮内膜に受精卵が着床する際の刺激によって惹起される脱落膜反応とその後に形成される脱落膜組織は受精卵の着床及び胚の発育にとって必要不可欠である。妊娠初期における化学物質の有害作用は、偽妊娠動物における脱落膜反応に対する影響を調べることにより検出が可能であると考えられる。

本研究においては、可塑剤として使われている butyl benzyl phthalate (BBP) 及び船底や漁網の防汚剤として使われてきた tributyltin chloride (TBTCl) を用いて、偽妊娠ラットにおける脱落膜反応を用いた胚致死作用検出法の毒性指標としての有用性について検討する。

第一次研究期間においては、BBP 及び TBTCl のラットにおける発生毒性について検討した。

[方法]

1. 動物

Wistar ラットを用いた。動物は飼料 (F-1, 船橋農場) と水道水を自由に与え、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12-h 明/暗時に調整した動物室で飼育した。成熟処女ラットを雄ラットと一夜同居した後、翌朝膈垢内に精子を認めたものを妊娠とし、この日を妊娠0日とした。妊娠ラットは実験終了まで個別ケージにて飼育した。

2. 投与

BBP (純度98.2%, 和光純薬) 及び TBTCl (純度98%, アルドリッチケミカル) はオリーブ油に溶解し、5 ml/kg を経口投与した。投与量はそれぞれの実験結果の項に記載した。

3. 観察

妊娠ラットは妊娠20日 (一部のラットでは妊娠7, 9または11日) に開腹し、黄体数, 着床数, 生存胎児数, 吸収・死亡胎児数などを記録した。生存胎児は雌雄の判別後、体重を測定し、外表異常の有無を調べた。約1/3の生存胎児はブアン液に固定した後、内臓異常を検索した。残りの約2/3の生存胎児についてはアルコールに固定した後、骨染色し、骨格異常の検索を行った。

4. 統計処理

一腹毎の値を単位とした。分散分析及び Dunnett の多重比較, Kruskal-Wallis test 及び Mann-Whitney test または Fisher's exact test によって統計処理を行った。

[結果及び考察]

1. BBP の発生毒性

ラットの妊娠7~9日, 10~12日または13~15日に750, 1000または1250 mg/kg の BBP を経口投与し、妊娠20日にラットを開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。妊娠7~9日, 妊娠10~12日または妊娠13~15日のいずれの投与日においても750 mg/kg 以上の BBP 投与により着床後胚死亡率の有意の上昇が認められた。妊娠7~9日及び13~15日の750 mg/kg 以上の投与により奇形胎児の発現率が有意に上昇した。妊娠7~9日の投与後には脊椎骨の欠損や癒合及び肋骨の癒合, 妊娠13~15日の投与後には口蓋裂及び胸骨分節の癒合などの奇形が多く観察された。しかしながら、妊娠10~12日投与のいずれの群にも奇形を有する胎児の発現率の上昇は認められなかった。これらの結果から、BBP をラット胎児の器官形成期に投与したときには

胚致死作用及び催奇形性を示し、BBPの発生毒性発現には投与時期特異性があることが明らかになった¹⁾。

着床後の胚致死作用について詳しく検討するために、2%

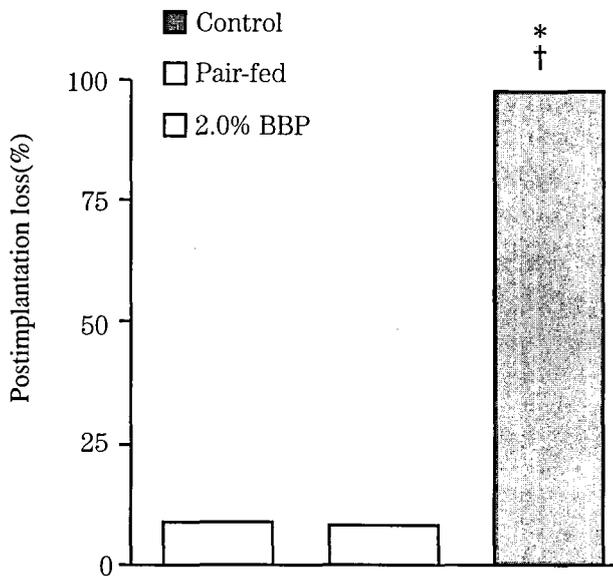


Fig. 1. Postimplantation embryonic loss on day 11 of pregnancy in rats given BBP on days 0-11 of pregnancy. * Significantly different from the control group, $p < 0.05$. † Significantly different from the pair-fed group, $p < 0.05$.

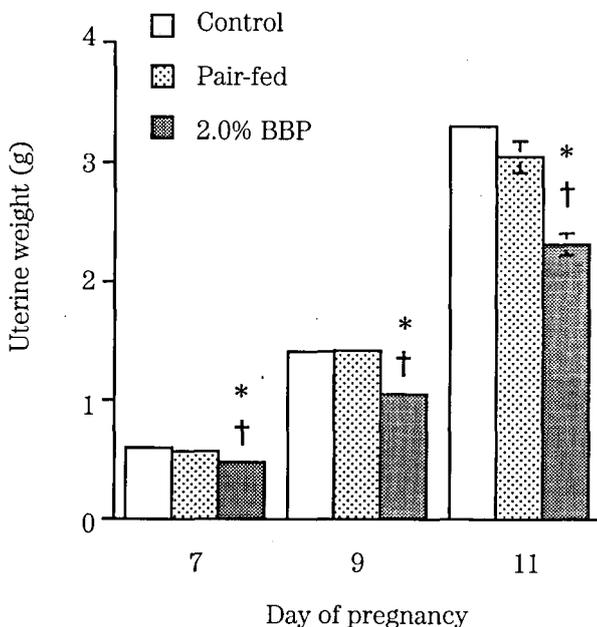


Fig. 2. Uterine weight on day 7, 9, or 11 of pregnancy in rats given BBP on day 0 through the day of sacrifice. * Significantly different from the control group, $p < 0.05$. † Significantly different from the pair-fed group, $p < 0.05$.

のBBPを含む飼料をラットの妊娠0日から与え、妊娠7、9または11日にラットを開腹して胚に対する影響を調べた。2% BBP群における着床後胚死亡率は著しく上昇し、対照群及びPair-fed群に比べて有意に高くなった (Fig. 1)。2% BBP群の子宮重量は妊娠7、9及び11日のいずれにおいても対照群及びPair-fed群に比べて有意に低くなった (Fig. 2)。これらの結果から、妊娠初期に投与したBBPは著しい胚致死作用を示すことが明らかになった。更に、BBP投与により子宮重量が低下することから、BBPは子宮の脱落膜組織の形成を阻害することが示唆され、これがBBPの胚致死作用の要因の一つであると考えられた²⁾。

2. TBTCIの発生毒性

ラットの妊娠7~9日、10~12日または13~15日に25、50または100 mg/kgのTBTCIを経口投与し、妊娠20日にラットを開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。妊娠7~9日の25及び50 mg/kg投与群、妊娠10~12日の100 mg/kg投与群において着床後胚死亡率の有意の上昇が認められた。妊娠10~12日の100 mg/kg投与群、妊娠13~15日の25、50及び100 mg/kg投与群において奇形胎児の発現率が有意に上昇した。口蓋裂が最も多く観察された。これらの結果から、TBTCIは胚致死作用及び催奇形性を示すことが明らかになった³⁾。

TBTCIの催奇形性について更に詳細に検討するために、100 mg/kgをラットの妊娠7~9日間の1日に、200 mg/kgを妊娠7~15日間の1日に経口投与し、妊娠20日に開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。妊娠7~11日間の1日にTBTCIを投与したとき、着床後の胚致死作用が有意に上昇した。口蓋裂を有する胎児の頻度は妊娠8、11、12、13または14日にTBTCIを投与したときに有意に上昇し、妊娠13日の投与後に最も高くなった。これらの結果から、TBTCIの催奇形性は胎児の器官形成期の間の1日に投与することにより、3日間の投与に比べてより明確になり、TBTCIの催奇形性は妊娠8日及び妊娠11-14日の二相性の感受期を示すことが明らかになった⁴⁾。

TBTCIの胚致死作用について詳しく検討するために、8.1、12.2または16.3 mg/kgのTBTCIをラットの妊娠0~7日に経口投与し、妊娠20日に開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。妊娠率はTBTCI投与により低下し、12.2及び16.3 mg/kg投与群では対照群に比べて有意に低くなった。着床前胚死亡率は12.2及び16.3 mg/kg投与群において有意に高かった (Fig. 3)。しかしながら、着床の認められたラットにおいては黄体数、着床数、着床前及び着床後胚死亡率にTBTCI投与群と対照群との間に差はみられなかった。これらの結果から、妊娠初期のTBTCI投与により、着床阻害(着床前胚致死)が惹起されることが明らかになった⁵⁾。

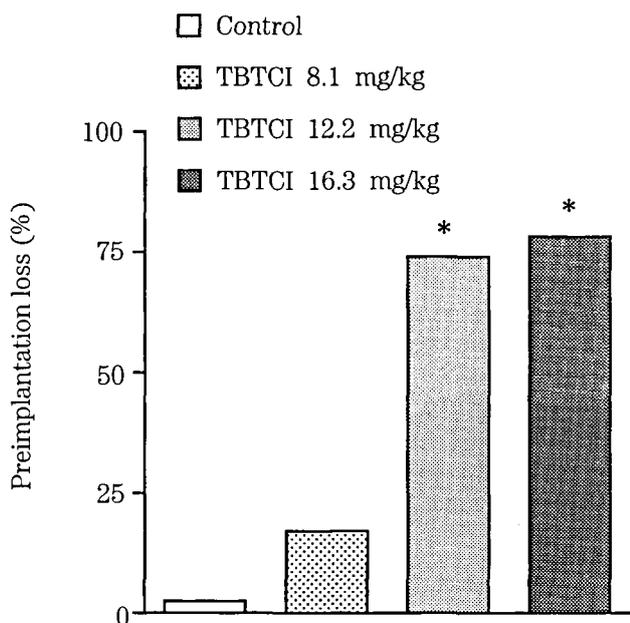


Fig. 3. Preimplantation embryonic loss in rats given TBTCI on days 0-7 of pregnancy.
* Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

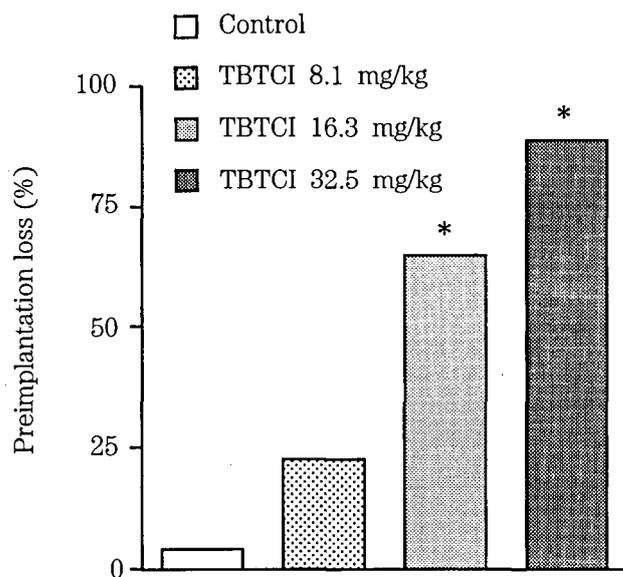


Fig. 4. Preimplantation embryonic loss in rats given TBTCI on days 0-3 of pregnancy.
* Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

TBTCIの生殖障害作用について更に検討するために、8.1, 16.3, 32.5または65.1 mg/kgのTBTCIをラットの妊娠0~3日または妊娠4~7日に経口投与し、妊娠20日に開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。妊娠0~3日にTBTCIを投与したとき、16.3 mg/kg以上の投与量で着床前胚死亡率が有意に上昇した (Fig. 4) が、いずれの投与群における着床後胚死亡率共対照群との間に差はみられなかった。妊娠4~7日の投与では、65.1 mg/kg投与群において有意に高い着床前胚死亡率が認められ (Fig. 5)、また16.3 mg/kg以上の投与量で有意に高い着床後胚死亡率が観察された (Fig. 6)。これらの結果から、TBTCIによる生殖障害作用は投与時期によってその強さと発現様式が異なることが明らかになった⁶⁾。

以上に示したように、BBP及びTBTCI共に妊娠ラットに投与したとき、投与時期によって発生毒性の感受性と発現様式が異なることが明らかになった。更に、妊娠初期に投与したときには著しい生殖障害を示すことが明らかになった。第二次研究期間においては、BBP及びTBTCIの偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に及ぼす影響について検討し、胚致死作用の検出系としての有用性について検討する。

発表論文

- 1) M. Ema, R. Kurosaka, H. Amano and Y. Ogawa: Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 223-228 (1995)

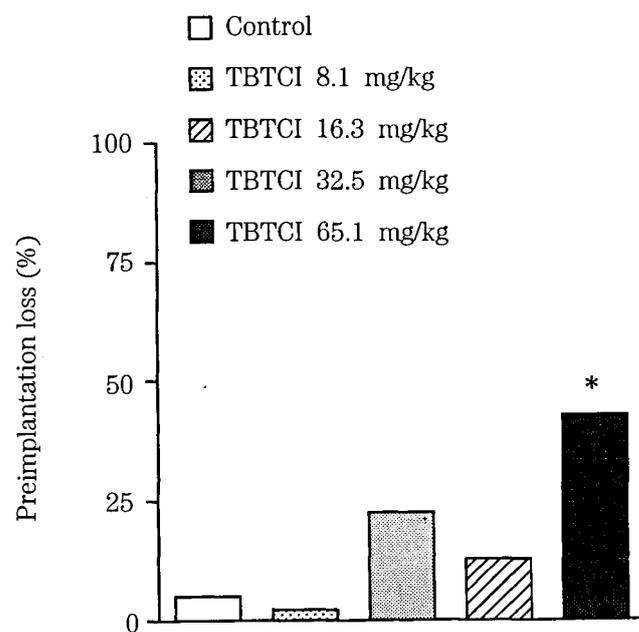


Fig. 5. Preimplantation embryonic loss in rats given TBTCI on days 4-7 of pregnancy.
* Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

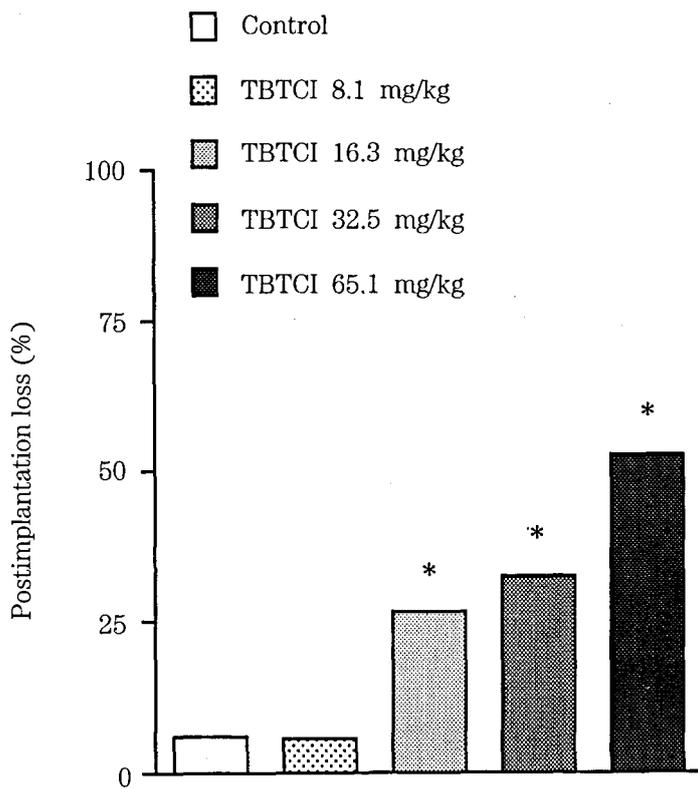


Fig. 6. Postimplantation embryonic loss in rats given TBTCI on days 4-7 of pregnancy.

* Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

- 2) M. Ema, R. Kurosaka, H. Aamno and Y. Ogawa: Embryo lethality of butyl benzyl phthalate during early pregnancy in rats. *Reprod. Toxicol.*, **8**, 231-236 (1994)
- 3) M. Ema, R. Kurosaka, H. Amano and Y. Ogawa: Further evaluation of the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. *Toxicology*, **96**, 195-201 (1995)
- 4) M. Ema, A. Harazono, E. Miyawaki and Y. Ogawa: Effect of the day of administration on the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33**, 90-96 (1997)
- 5) A. Harazono, M. Ema and Y. Ogawa: Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicol. Lett.*, **89**, 185-190 (1996)
- 6) A. Harazono, M. Ema and Y. Ogawa: Evaluation of early embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats: phase- and dose-dependent antifertility effects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 94-99 (1998)