

## 特別研究報告

## 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 (第二次) (平成9年度～平成11年度)

世話人 病理部 広瀬 雅雄

医薬品をはじめとする各種化学物質のヒトに対する安全性確認のために、従来より実験動物を用いた試験法が実施されているが、種々の面で見直しが必要とされている。たとえば、多数の動物を用い、長期間にわたる実験が要求されることに由来する多大な労力と経費の問題、化学物質の代謝などにおけるヒトと実験動物との間の種差の問題、化学物質の曝露を直接的に示す付加体などを検知する鋭敏な指標がまだ実用化されていない問題、動物愛護の問題などが挙げられる。ところで、近年の分子生物学、細胞培養技術、バイオ技術などの進歩は、従来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評価を、細胞レベルまたは分子レベルで判定できる可能性を示唆する。本研究班は、化学物質による生体内の分子変化や微量反応などの測定法を確立し、従来の試験法との比較においてその毒性学的な有意性を明らかにし、新規の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を目的とした。

第一次研究期間(平成6年度～8年度)においては、*in vitro*ないしは*in vivo*の試験系を用いて、分子、細胞および組織レベルでの種々の指標の有用性について検討し、基礎研究段階としていくつかの指標が安全性評価に応用可能であることを明らかにした。第二次研究期間(平成9年度～11年度)では、新しい指標のさらなる探索を含め、各指標が迅速かつ鋭敏な評価手段として有意かどうかをさらに検討した。毒性部では、正常ラットの肝臓、腎臓、脾臓および肝細胞分画中の微量元素(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、各臓器および肝細胞各分画における微量元素の存在パターンの特徴を明らかにした。療品部では、医用材料として使用されるあるいは不純物として混在する可能性のある各種金属イオンは細胞間連絡、神経発生分化および

軟骨分化を阻害し、特に細胞間連絡の最小有効阻害濃度が生物影響評価において有用な毒性指標となる可能性を明らかにした。生物薬品部では、四塩化炭素を投与したラットの肝臓をRT-PCR法を用いて検索し、インヒビン $\beta$ B、 $\beta$ C、 $\beta$ EmRNAが肝障害の指標として有用であることを明らかにした。機能生化学部では、化学物質のもつアレルギー促進活性をマスト細胞を用いて*in vitro*で評価する場合、マスト細胞への情報伝達系への影響を含めて考えることが重要であること、刺激後30分以内に放出されるヒスタミンや $\beta$ -hexosaminidaseばかりでなく、転写促進活性を伴い刺激後3時間以上たつて放出されるサイトカイン類も有用なマーカーであることを明らかにした。薬理部では、ヒトにおけるジフェニールの代謝に関して、CYP450発現系を用いることで、ヒト肝ミクロソームの関与を推測可能であることを明らかにした。病理部では、環境中の発がん物質である2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b]-pyridine (PhIP)をラットに投与して、免疫組織化学的および電子顕微鏡的に検索した結果、強力な発がん物質である4-hydroxyaminoquinoline (4HAQO)と同様に、DNA付加体形成、核小体分離および細胞増殖が標的臓器において連続的に発現することを明らかにした。大阪支所生物試験部では、butyl benzyl phthalate (BBP)およびtributyltin chloride (TBTCI)について検討し、偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に対する影響を調べることにより胚致死作用を検出することが可能であることを明らかにした。

以上、各担当部が行った研究の概要について説明したが、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。本研究班は化学物質の安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標を確立することを目的として発足し、そのイニシエーションの任務をおおよそ果たしたものであると思われるが、さらにそれをプロモートする研究を進める

必要がある。

### 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]

第一次報告<sup>1)</sup>に継続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、今回はCRJ-F344ラットの26ヶ月までの肝臓、腎臓、脾臓および7ヶ月までの肝細胞分画中の必須元素の分析結果を報告する。

#### [方法]

- 飼育方法：実験動物は室温 $24 \pm 5\%$ 、照明12時間のバリア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。
- 検体および測定元素：肝臓、腎臓、脾臓、肝細胞分画および参考資料として胃内容物、市販飼料中のカルシウム (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元素を測定した。
- 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 As社製ICAP-61試料分解容器；三愛科学製電気レンジ用試料分析容器

電子レンジ；日立製MR-M26

4. 分析法：肝臓、腎臓、脾臓は摘出後、凍結乾燥した。肝細胞分画は組織1gに0.25M ショ糖3mlを加え、テフロン軸ガラスホモジナイザーでホモジナイズした。そのホモジネートを冷却遠心し、核分画、ミトコンドリア分画、マイクロソーム分画および細胞質分画の4分画に分けた。胃内容物は1および2週齢ラットの胃を摘出し冷凍乾燥後、乾燥乳を取り出した。飼料は市販の飼料4種類とした。乾燥臓器、肝細胞分画、乾燥乳、飼料を電子レンジを用いて硝酸・過塩素酸で湿式分解<sup>2)</sup>し、その分解溶液中のCa, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn濃度をICPで測定した。

#### 5. 結果：

肝臓、腎臓、脾臓中の必須元素の月齢変動と元素分布 (1ヶ月齢～26ヶ月齢) をFig 1, 2, 3, 4に示した。

肝臓について：Ca, Mn, およびZn濃度は月齢、性差による大きな変化はなく一定の値を示していた。CuおよびMg濃度は18ヶ月齢までは雌が高い値を示したが、その後は逆に雄が高い値を示した。月齢による変化は認められなかった。Fe濃度は月齢に伴って増加し、常に雌が高い値を示していた。

腎臓について：Ca, Cu, FeおよびZn濃度はいずれも雌が高い値を示していた。Fe, Cuについては月齢に伴って増加した。Mg, Mnは雌雄、月齢による変化は認められなかった。

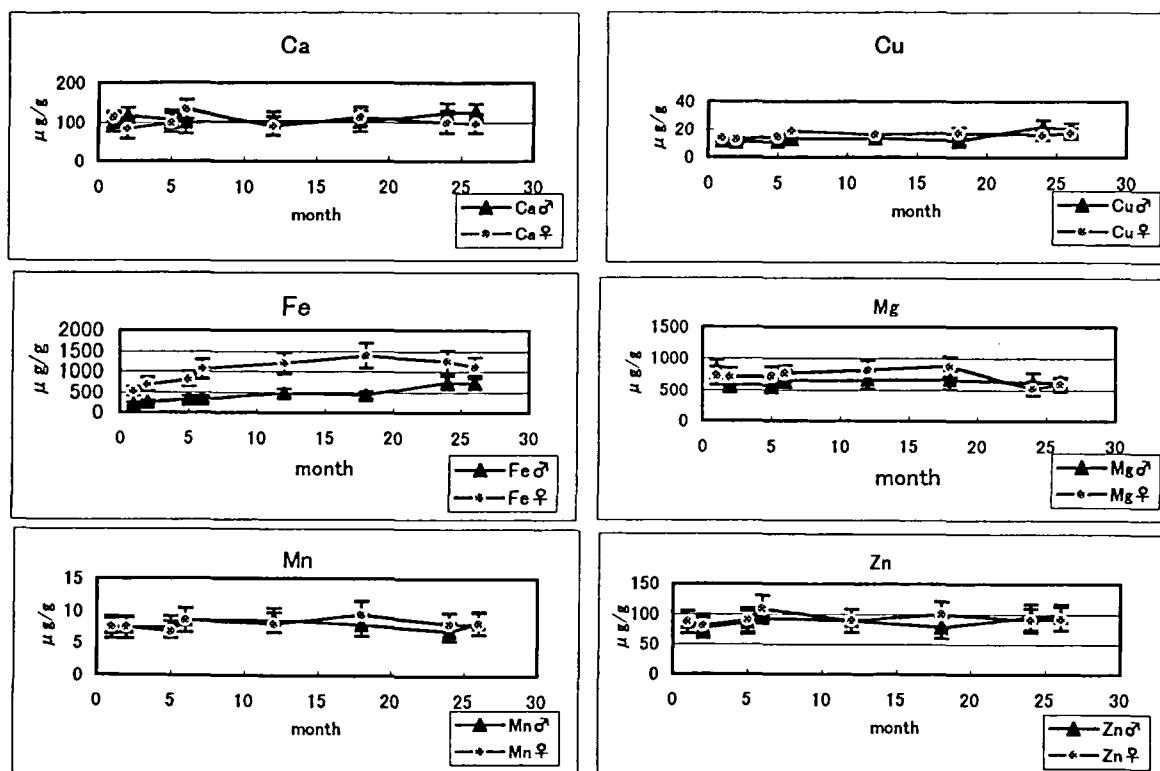


Fig. 1 Changes in Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn concentration in the liver of CRJ-F344 rat along with aging

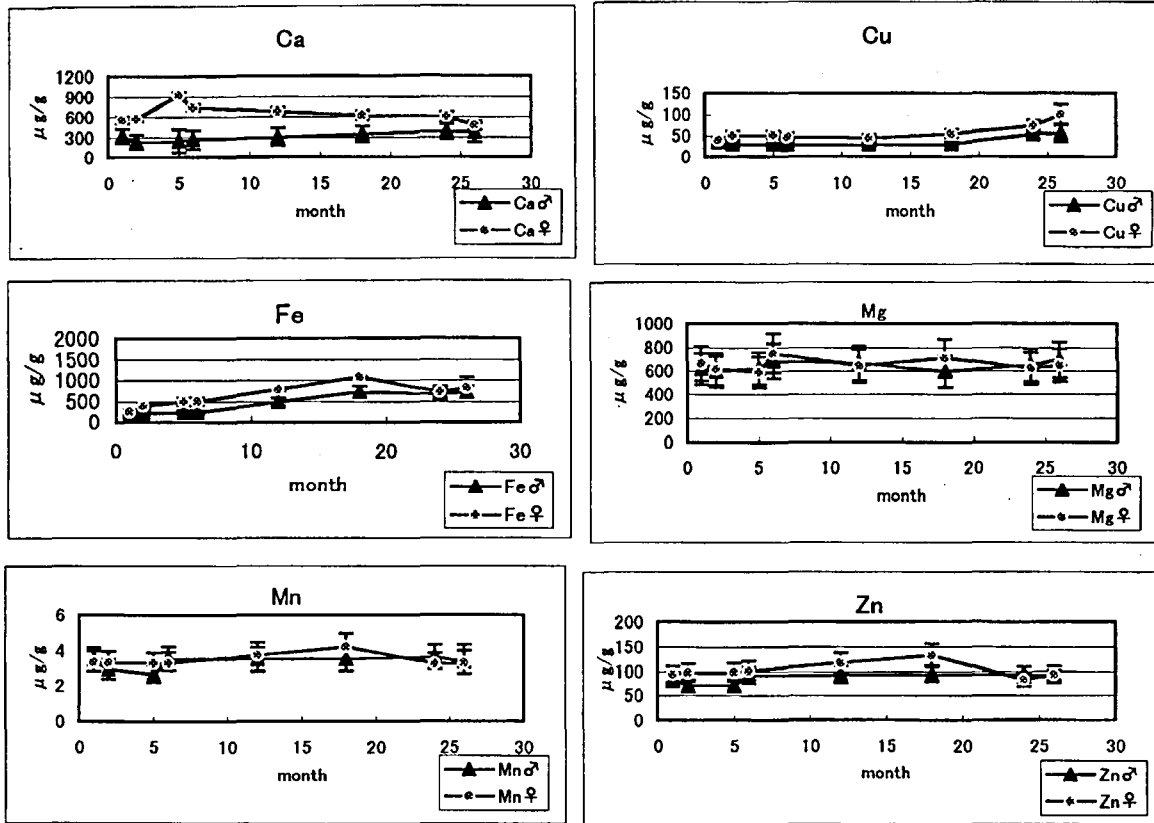


Fig. 2 Changes in Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn concentration in the kidney of CRJ-F344 rat along with aging

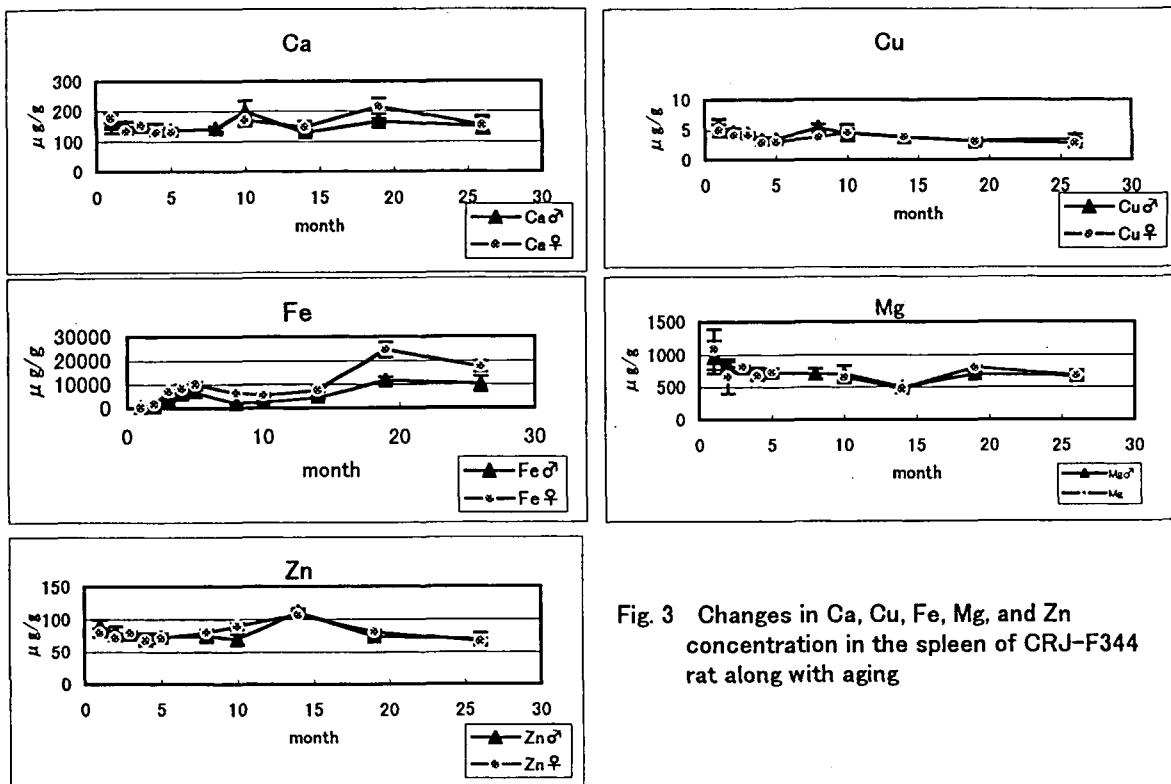


Fig. 3 Changes in Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn concentration in the spleen of CRJ-F344 rat along with aging

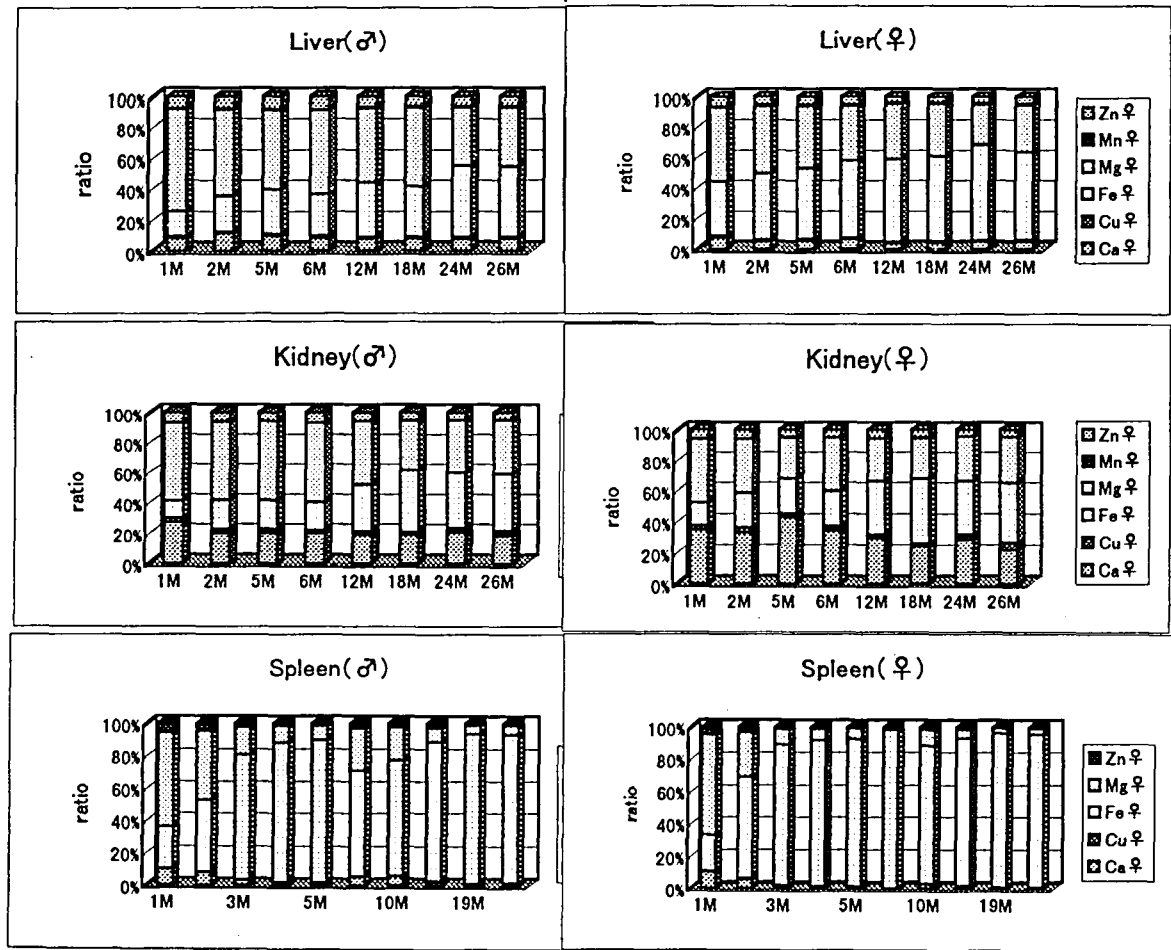


Fig. 4 Changes in 6 or 5 essential metals ratio from male and female rats liver, kidney and spleen

Table 1 Concentration of 6 essential metals in each cellular fraction from male and female rats liver

1ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	97	13.3	158	530	6.35	59.1
	ミトコンド	165	24.7	233	567	6.3	62.2
	可溶性分画	5.3	6.57	83	144	1.24	58
	ミクロゾーム	91.7	8.7	591	827	2.9	66.1
female	核・未破碎	107	11.2	179	542	6.59	55.2
	ミトコンド	163	20.8	285	571	6.3	59
	可溶性分画	5.92	5.47	86	134	1.19	53.7
	ミクロゾーム	87.5	7.78	802	823	2.9	64.4
2ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	98	9.1	121	458	6.57	45.7
	ミトコンド	119	12.2	199	563	7.14	62.9
	可溶性分画	4.39	8.28	81	174	1.45	65.8
	ミクロゾーム	81.1	6.8	492	745	2.9	61.6
female	核・未破碎	95	8.3	273	484	5.49	55.1
	ミトコンド	135	12.4	396	542	6.46	63.5
	可溶性分画	5.46	8.7	156	155	1	71.0
	ミクロゾーム	81.2	7.56	1652	859	2.28	71.0
3ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	111	10	150	520	7.89	56.1
	ミトコンド	119	12.2	190	563	7.14	62.9
	可溶性分画	4.39	8.28	81	174	1.45	65.8
	ミクロゾーム	81.1	6.8	492	745	2.9	61.6
female	核・未破碎	89	9.6	380	527	5.33	58.7
	ミトコンド	135	12.4	532	542	6.46	63.5
	可溶性分画	5.46	8.7	156	155	1	71.0
	ミクロゾーム	81.2	7.56	1652	859	2.28	71.0
4ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	67	10.1	145	455	5.28	47.7
	ミトコンド	117	10.4	190	542	7.07	56.5
	可溶性分画	3.86	8.69	75	162	1.12	60.4
	ミクロゾーム	77.71	5.44	600	697	2.99	65.6
female	核・未破碎	94	9	359	501	7.07	61.1
	ミトコンド	127	15.2	678	615	6.89	61.1
	可溶性分画	5.49	11.2	249	183	1.27	66.8
	ミクロゾーム	84.84	8.49	2499	901	2.7	72.8
5ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	103	8.2	170	538	7.65	52.3
	ミトコンド	137	9.9	197	572	8.51	49.6
	可溶性分画	4.1	7.89	83	177	1.5	57
	ミクロゾーム	73.3	4.88	620	645	3.01	54.6
female	核・未破碎	85	9.9	546	541	6.22	54.6
	ミトコンド	123	13.5	793	647	7.27	58.4
	可溶性分画	4.87	9.95	194	169	1.2	61.6
	ミクロゾーム	79.6	6.58	3588	860	2.3	67.2
6ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	109	9.04	175	542	9.18	54.5
	ミトコンド	128	11.7	179	571	9.04	57.7
	可溶性分画	4.17	9.14	85.0	181	1.59	64.5
	ミクロゾーム	79	5.33	689	740	3.34	61.8
female	核・未破碎	88	10.8	545	534	7.16	55.6
	ミトコンド	112	14.2	889	587	7.21	60.3
	可溶性分画	5.02	10.5	204	154	1.19	60.6
	ミクロゾーム	79	6.97	3512	853	2.72	69.1
7ヶ月齢		Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
male	核・未破碎	112	7.98	185	489	7.66	51.2
	ミトコンド	122	10.8	278	546	7.09	58.9
	可溶性分画	3.49	8.28	88.0	172	1.39	59.6
	ミクロゾーム	82	5.05	1050	737	2.7	64.4
female	核・未破碎	93	9.1	527	503	6.89	48.6
	ミトコンド	108	12.4	1044	565	6.22	57.6
	可溶性分画	3.56	8.5	228.0	152	1.11	53.9
	ミクロゾーム	72	6.09	3055	832	2.5	64.5

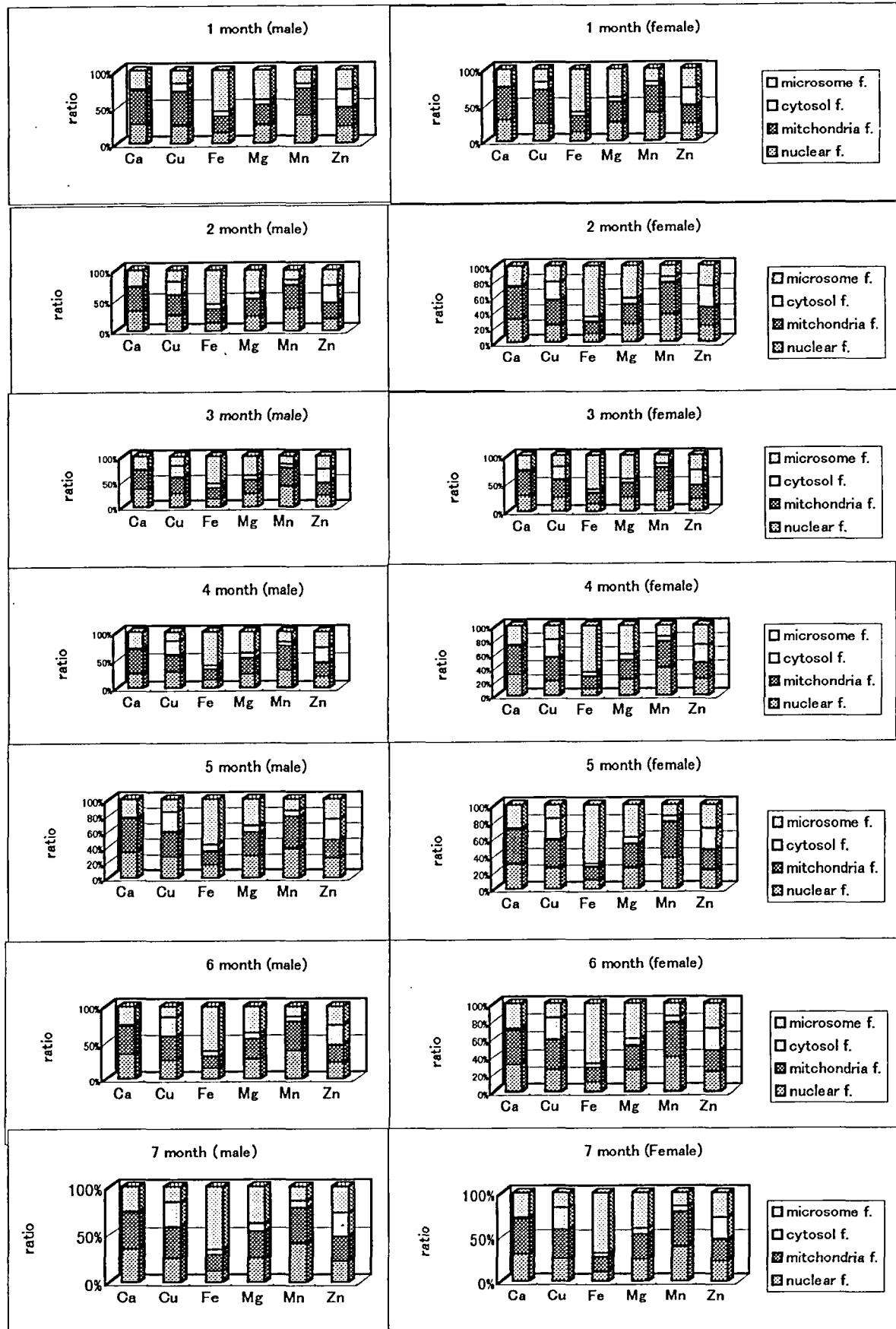


Fig. 5 Ratio of essential metals in each cellular fraction from male and femal rats liver

Table 2 1週齢, 2週齢雌雄ラットの胃内容物 (milk)中の必須元素濃度

1 week♂	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	9072	13.6	50.0	1919	517	0.40	703	7173	2458	53.2
SD	476	1.16	11.9	145	29	0.07	90	170	108	6.37

2 week♂	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	10741	12.3	33.0	1683	493	0.68	499	8009	2863	58
SD	481	0.42	2.2	142	38	0.24	75	201	70	5.56

1 week♀	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	8739	15.1	52.7	2475	638	0.36	836	7164	2342	52.7
SD	426	1.10	0.96	340	26	0.06	120	216	59	3.51

2 week♀	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	10420	11.8	24.8	2214	577	0.47	753	7460	2761	44.9
SD	946	1.37	3.27	532	87	0.17	116	609	160	4.03

Table 3 市販飼料中の必須元素濃度

船橋 マウス・ラット飼育用

F-2	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	5522	9.0	164	7227	1911	87.8	1507	6382	2270	42.9
SD	439	0.88	22	191	48	27.4	85	329	70	1.11

オリエンタル チャールスリバーフォーミュラー

CRF	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	10935	10.3	138	9220	2429	71.4	2897	8150	2648	69
SD	253	0.75	10	178	54	10.1	104	334	39	5.31

クレア マウス・ラット・ハムスター特殊繁殖用

OA2	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	16095	5.20	285	6565	1732	63.1	2654	10928	2827	45.1
SD	667	0.18	6	81	19	7.5	31	309	131	0.75

クレア マウス・ラット飼育繁殖用

	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	10013	6.9	286	10198	2885	79.7	2439	10064	2667	47.2
SD	358	0.27	6	150	22	7.0	60	219	38	1.59

オリエンタル マウス・ラット・ハムスター飼育用

CE2	Ca ppm	Cu ppm	Fe ppm	K ppm	Mg ppm	Mn ppm	Na ppm	P ppm	S ppm	Zn ppm
average	10648	8.1	106	9558	2492	48.6	2461	9030	2676	54.0
SD	668	0.12	4	145	54	0.5	106	397	17	1.78

脾臓について：Fe濃度は雌が高い値を示し月齢に伴って増加した。Ca, Cu, MgおよびZn濃度には性差および月齢変動は見られなかった。Mnは肝臓、腎臓と比較して低濃度であったため本条件下では検出濃度以下であった。臓器内元素分布 (Fig. 4) で比較すると肝臓にはMg, Fe, 腎臓にはMg, Fe, Ca, 脾臓にはMg, Feが多く、月齢によって変化が認められた。肝細胞分画中の元素濃度 (1ヶ月

齢～7ヶ月齢) をTable 1, 元素濃度分布比をFig. 5に示した。

Ca, Cu, Mn濃度の高い分画はミトコンドリア>核・未破壊細胞>ミクロゾーム>可溶性分画

Fe, Mg, Zn濃度の高い分画はミクロゾーム>ミトコンドリア>核・未破壊細胞>可溶性分画であった。

乾燥ミルクおよび飼料中の元素濃度をTable 2, 3に示し

た。

#### 参考文献

- 1) 特別研究報告(第一次) 国立医薬品食品衛生研究所報告, 116, 119~218 (1998)
- 2) Kojima, I., Uchida T. and Iida, C.: Press urized microwave digestion of biological samples for metal determination. Analytical Sciences, 4, 211~214 (1988)

#### 細胞間連絡阻害活性の重要性

療品部 土屋利江, 中村晃忠

#### 「目的」

ギャップ結合蛋白コネキシンは、ヒトや動物細胞に幅広く存在し、細胞と細胞間の情報伝達に重要な機能を示す膜蛋白である。ギャップ結合構成蛋白分子であるコネキシンの突然変異によって生じた疾患が明らかになり、その重要性が認識されている。正常組織のほとんどすべての細胞間に、ギャップ結合が存在する。ギャップ結合は、直径1.2nmであり、分子量1000以下の物質が通過しうること、また、荷電や、化学的組成の違いによる通過性において、それほど選択性はないと考えられている。しかし、最近、コネキシン分子の種類により、通過する分子量の大きさ等に選択性がみられること、コネキシン分子の細胞内での合成、分解の一連の動的回転と、細胞の生理学的状態との関係が、シグナル伝達分子を中心においた研究の進展により、次第に理解が深まりつつある。更に、コネキシン分子の立体構造と機能変化との関係や、コネキシンのN末、C末側の構造および膜貫通ドメインと機能変化との関係も、細胞工学的手法等により、急ピッチに解析が進み分子的理解が深まりつつある。いずれにしても、ギャップ結合連絡は、細胞のホメオスタシスを維持する上で重要な細胞間装置である。

本特別研究第一次で、医用材料に添加される各種添加剤を中心に、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、12 well plateを用いた迅速かつ鋭敏な試験方法を確立した。そこで、本研究第二次では、医用材料に使用あるいは、不純物として混在する可能性のある各種金属イオンが、細胞間連絡を阻害する可能性およびその最小有効阻害濃度を明らかにした。さらに、われわれの方法で得られた最小有効阻害濃度が、生物影響評価において、有用な毒性指標として使用可能であるのかを明らかにするために、神経発生分化阻害強度との関係を中心に検討した結果について報告する。また、各金属塩の骨格系の催奇形性発現を予測するために、軟骨分化に及ぼす影響についても併せて評価した。

#### 「方法」

試験化合物：硝酸カドニウム、オルトバナジン酸ナトリウム、塩化亜鉛、硝酸鉛、塩化チタンおよび硫酸銅を入手し、試験に用いた。

細胞株：V79細胞の野生株(HGPRT+)およびその変異株であるTG1細胞(HGPRT-)は、国立医薬品食品衛生研究所・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。

代謝協同阻害試験：前回報告した方法で試験を行った<sup>1)</sup>。

神経分化阻害試験<sup>2)</sup>：胎齢13日のラット胎児の将来中脳になる領域を切り出し、トリプシン処理を行い、得られた細胞を $5 \times 10^6$ /mlに調製後、24wellには、20 $\mu$ l、96wellには、5 $\mu$ lをスポット状に播種する。細胞を接着させるために、炭酸ガス培養装置内に、1時間程度静置する。培地を24wellには、0.5ml、96wellには、0.2mlを加えて高密度培養を行う。培養1日目に、各種金属塩を種々の濃度で含む培地溶液を加えて、更に6日間培養する。培養開始から7日目に、細胞増殖の程度をニュートラルレッド法で、細胞分化の程度は、ヘマトキシリン染色し、濃染された神経細胞巣の数を顕微鏡下で数えて評価する。コントロールの細胞増殖および細胞分化の平均値を100%とした時、その50%を阻害する試験金属塩の濃度(IC50( $\mu$ g/ml))により、金属塩の増殖阻害強度および分化阻害強度を示した。

#### 「結果および考察」

6種の金属塩について試験した結果、代謝協同阻害活性を認めた。最小有効阻害濃度の低い順に示すと、硝酸カドニウム(0.25 $\mu$ g/ml) < 硫酸銅(0.75 $\mu$ g/ml) < オルトバナジン酸ナトリウム(1.0 $\mu$ g/ml) < 塩化亜鉛(10 $\mu$ g/ml) < 硝酸鉛(19 $\mu$ g/ml) < 塩化チタン(50 $\mu$ g/ml)となり、この順に、代謝協同阻害作用が強いことが明らかになった。

一方、胎児の中脳由来の初代細胞を用いて、神経分化阻害能について試験した結果、いずれの金属塩も神経分化を阻害する活性が認められた。細胞増殖阻害強度を、IC50で示すと、硝酸カドニウム(2.6 $\mu$ g/ml) < オルトバナジン酸ナトリウム(3.0 $\mu$ g/ml) < 硫酸銅(16 $\mu$ g/ml) < 塩化亜鉛=硝酸鉛(20 $\mu$ g/ml) < 塩化チタン(100 $\mu$ g/ml)であった。神経分化強度阻害と細胞増殖阻害強度との関係は、ほぼ強さの順序は同じであり、両者の間で相関性を認めた。しかし、細胞増殖阻害は、神経分化阻害に比べて阻害能が弱かった。IC50値で比較すると、硝酸カドニウムでは、約9倍、硫酸銅およびオルトバナジン酸ナトリウムで約3倍高濃度で、細胞増殖阻害のIC50値を示した。従って、これらの3種の金属塩では、親や胎児全体での毒性が出ない濃度で特異的に神経毒性作用を示す可能性があることが示唆された。



代謝協同阻害との関係について調べた結果、神経分化阻害と良い相関性を示した。硫酸銅以外の4種の金属塩では、代謝協同阻害の最小有効阻害濃度と神経分化阻害のIC50値は、ほぼ同じ濃度域であった。

代謝協同阻害はチャイニーズハムスターの肺由来の細胞を用いた結果である。一方、神経分化はラット胎児の中脳領域の組織由来の細胞である。このように、臓器も種も異なる2種の細胞で試験したにもかかわらず、神経分化阻害と代謝協同阻害とが良い相関性を示したのは、おそらく同じ分子種のコネキシンが両細胞系で働いていることが要因であると考えられる。

ラット脳の神経細胞は、コネキシン43が、ギャップ結合を担っている。一方、V79細胞のコネキシンをウェスタンブロット法で解析した結果、コネキシン43が機能していることを確認している。コネキシンはすでに13種以上の分子が同定されているが、いずれも、N末とC末側が細胞質内に存在し、膜を4回貫通する構造を有している。C末側のアミノ酸配列はコネキシンの分子種により異なり、C末側の配列が組織特異性を示すと考えられている。従って、細胞が異なっても、同じコネキシン43を有している細胞であることから、金属塩による阻害効果も同じアミノ酸配列の分子との相互作用の結果、誘発されたと考えると、同じ濃度域での阻害効果も理解できる。しかし、これらの金属塩がどのように、ギャップ結合を阻害するのか、コネキシンの分子変化や磷酸化修飾の可能性等を更に詳細に検討する必要がある。

試験した金属塩の神経毒性および催奇形性作用について調査した結果、硝酸鉛および硝酸カドミウムは、神経毒性を示し、水頭症を発生する。オルトバナジン酸ナトリウムおよび塩化亜鉛は骨系の奇形を誘発する。硫酸銅はハムスターで、心血管系の欠損が報告されている。オルトバナジン酸ナトリウムについては、胎児の軟骨分化を神経分化の5分の1の濃度で阻害することから、*in vivo*では、より低濃度で阻害される骨形成阻害が催奇形性作用として発現しやすいものと考えられる。同じく塩化亜鉛についても、骨系の奇形や遅延が報告されているが、この場合にも、神経阻害のIC50値の3分の1の濃度で、軟骨分化を阻害した結果を得ている。神経毒性が報告されている硝酸鉛や硝酸カドミウムでは、軟骨分化阻害のIC50値は神経分化阻害のIC50値の3倍高い値を示し、神経組織への催奇形性作用が発現しやすい結果を支持するものであった。硫酸銅は、*in vivo*での心血管系の欠陥や炎症による浮腫が報告されている。硫酸銅をV79代謝協同阻害、神経分化、軟骨分化3種の系で試験した結果、最も低い濃度で硫酸銅が阻害した系は代謝協同阻害試験であった。コネキシン43ノックアウトマウスは、出生直後に死に至ることが報告されている。死因は、心臓に直結した血管の破裂によるものであった。心臓および血管はコネキシン43が存在する器官であり、

この分子がノックアウトされたマウスでは、循環器系の欠陥(血管破裂)を生じると考えられる。すなわち、硫酸銅は、神経分化や軟骨分化への影響に比べて、V79代謝協同阻害で検出可能なコネキシン43からなるギャップ結合機能を強く阻害する作用があるため、コネキシン43の機能が不可欠な心血管系の欠損ハムスターを発生したものと推察した。

塩化チタンについては、酸化されやすいため、添加後、一部は酸化物になっている。催奇形性に関する文献では、Titanocene dichlorideについて、骨化の遅延が報告されている。*in vitro*結果も軟骨の分化阻害の方が、神経分化に比べて阻害されやすい傾向を示す結果を得ている<sup>3)</sup>。

以上、6種の金属塩での結果であるが、3種の*in vitro*系での結果から、それぞれの金属塩の*in vivo*での催奇形性発現<sup>4)</sup>の違いを考察することができた。今後は、更に、試験化合物の数を増やして、この考察に基づいた催奇形性発現予測がどの程度正しいのか検証する必要がある。

文献(発表論文を含む)

- 1) Tsuchiya T. and Nakamura A.: Effect of different implant materials on inhibition of gap-junctional intercellular communication as an index of tumor promotion. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 74 Surgical implants and other foreign bodies. pp. 290-294 (1999)
- 2) Tsuchiya T., Oguri I., Nakajima-Yamakoshi Y. and Miyata N.: Novel harmful effects of [60] fullerene on mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. FEBS Letters 393, 139-14 (1996)
- 3) Tsuchiya T., Nakamura A., Ohshima Y. et al.: Chondrogenic cellular responses to titanium and zirconium alloys *in vitro*. Tissue Engineering, 4, 197-204 (1998)
- 4) 土屋利江, 安全性評価 発癌性・変異原性・催奇形性: 金属系バイオマテリアルの基礎と応用(筏 義人, 立石哲也, 角田芳衛 編) アイピーシー, 印刷中

肝臓に対する安全性評価のためのRT-PCRを用いた迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究

生物薬品部 小林 哲, 新見伸吾, 早川堯夫

「目的」

毒物などにより障害を受けた肝臓は自己修復作用により、通常速やかに元の組織に修復再生される。また、さらに障害が進むと修復再生が起こらなくなり、以降障害は急速に進行する。このような過程にはさまざまな増殖因子、サイトカインなどが関与しており、その発現調節により巧妙に調節されている。そこで本研究所においては肝障害において発現が調節される可能性のある因子に着目して、肝障害モデルラットにおけるmRNAの変動を調べ毒性指標と

しての有用性を評価することとした。今回特に着目したのはフォリスタチンとアクチビンAであり、それぞれ肝細胞の増殖を促進そして抑制することが知られている。アクチビンAはインヒビン $\beta$ A鎖のホモダイマーであり、インヒビン $\beta$ 鎖にはそれ以外に $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ Eの存在が知られている。これらインヒビン $\beta$ 鎖から構成されているタンパクの肝臓における役割については不明であるが、mRNAの発現は知られている。そこで、これらインヒビン $\beta$ 鎖mRNAについても検討を行った。なお、肝障害は四塩化炭素投与により惹起し、各因子のmRNAレベルは感度及び迅速性において有用性が広く認められているRT-PCR法を用いて測定を行った。

#### 実験方法

##### RNAの調製

雄性ウイスターラット(200-220g)を1群3匹とし四塩化炭素、オリーブ油の等量混合液を2.0ml/kg腹腔内投与し、1, 3, 6, 12, 24, 48及び72時間後、肝臓から市販のキットを用いてトータルRNAを調製した。

##### cDNAの合成

一本鎖cDNAはランダムヘキサマーをプライマーとしてトータルRNAから市販のキットを用いて合成した。

##### PCR反応

cDNAを90℃, 5分処理後、プライマー及びTaq DNA polymeraseを含むPCR反応液を添加し、PCR反応(変性: 95℃, 30秒, アニール: 55℃, 30秒, 伸長反応: 72℃, 60秒)を20-30サイクル行った。なお、用いるプライマーは報告されている各遺伝子に特異的な配列を参考に作成した。

##### PCR産物の定量

PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、サイバングリーンで染色し、蛍光イメージアナライザーで定量した。各バンドの蛍光強度は同様にして求めた常在性遺伝子であるグイセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素PCR産物の蛍光強度で補正し、無処置のラット肝臓における補正值と比較した。

##### 結果および考察

フォリスタチンmRNAは四塩化炭素投与3時間後から上昇し始め、6時間から12時間後コントロールの4倍以上に達し、以降徐々に減少した。一方、インヒビン $\beta$ AmRNAは投与1時間後に減少しはじめ、6時間後にはコントロールの約4分の1に達した。以降12時間後には若干回復がみられ、48時間までほぼ一定であった。これらの結果はホリスタチンおよびインヒビン $\beta$ AmRNAが肝障害の指標として有用であることを示しているとともに、フォリスタチンとアクチビンAの発現がそれぞれ肝障害に伴う肝細胞増殖の促進及びその後の停止を促すよう調節されていることを

示唆している。

インヒビン $\beta$ BmRNAは投与1時間後から上昇し、3時間から24時間までコントロールの約4倍のレベルを維持して、以降徐々に減少した。インヒビン $\beta$ CmRNAは投与12時間から24時間においてコントロールの半分以下に低下し、以降徐々に回復した。また、 $\beta$ EmRNAは投与3時間後にコントロールの約3倍に達し、6時間以降にはコントロールレベルまで低下した。これらの結果はインヒビン $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ EmRNAが肝障害の指標として有用であることを示しているとともに、これらインヒビン $\beta$ 鎖をサブユニットとするタンパクが肝障害において何らかの役割を果たしていることを示唆している。

#### 化学物質によるアレルギー促進活性の評価法の検討

機能生化学部 手島玲子・斉藤嘉朗・池淵秀治・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促進活性をin vitroで評価するための手法の開発を行っている。第一次ではラットがん化好塩基球細胞(RBL-2H3)を用いて、化学物質のマスト細胞の情報伝達系への作用を知る方法がアレルギー促進活性を知るうえで有用であることを示してきた。第二次では、RBL-2H2細胞に加えて、BMMC(マウス骨髄由来肥満細胞)並びにCBMC(人臍帯血由来肥満細胞)を用いて、化学物質による細胞からの脱顆粒反応、細胞内カルシウム濃度上昇、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 及びIL-4)並びにケモカインMCP-1の産生について検討を加え、アレルギー指標としての有用性について検討を行った。

##### [方法]

(1) 脱顆粒反応の測定: 24ウェルのマイクロタイタープレートに、10% FCSを含むDMEMに $1 \times 10^5$  cell/mlの濃度に浮遊したRBL-2H3細胞または、IL-3存在下で1か月以上分化させたBMMC, SCF(80ng/ml)及びIL-6(50ng/ml)存在下で2か月以上分化させたCBMCを1mlずつ加え、37℃で16時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養し、小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase阻害剤DTBHQ(2, 5-di-(t-butyl)-1, 4-hydroquinone), DTAHQ(2, 5-di-(t-amyl)-1, 4-hydroquinone)及びCPA(cyclopiazonic acid)等の刺激剤で、細胞の刺激を行い、刺激後35分後に脱顆粒によって細胞から放出される $\beta$ -hexosaminidaseの量を、酵素基質を用いる比色法にて定量した。(2) 細胞内カルシウム濃度変化: Ca<sup>2+</sup>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<sub>335</sub>/F<sub>362</sub>)でモニターした。(3) サイトカインの産生: 10% FCSを含むDMEMに $1 \times 10^5$  cell/mlの濃

度に浮遊したRBL-2H3細胞, BMMC, CBMCを1mlずつ加え, 37℃で16時間, CO<sub>2</sub>インキュベータ中で培養後, 各種薬剤による刺激を行い, 刺激後, 3-9時間の細胞培養上清中に放出されてくるTNF- $\alpha$ , IL-4, MCP-1の量をサンドイッチELISA法にて測定を行った。

#### [結果]

(1) 脱顆粒反応は, 用いた小胞体Ca<sup>2+</sup>ATPase阻害剤と, protein kinase C活性化剤であるフォルボルエステル(TPA)存在下で相乗的に引き起こされた<sup>1)</sup>。(2) 3種の細胞共, これらCa<sup>2+</sup>ATPase阻害剤で, 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は用量依存的に上昇した。(3) サイトカイン産生に関しては, TNF- $\alpha$ 産生は, TPA共存下で刺激後3時間で引き起こされたが, MCP-1, IL-4産生は, TPA非存在下でも引き起こされ, それぞれ6時間, 9時間にピークがあった。また, actinomycin Dで阻害されることよりCa<sup>2+</sup>依存性の転写活性促進経路によることが示された。さらに, 免疫抑制剤FK-506またはcyclosporin Aで抑制されることより転写活性化因子NF- $\kappa$ Bの活性化の関与が考えられた。さらに, MCP-1産生において, Map kinaseであるp38MAP kinaseの関与を示唆するデータが得られた<sup>2-4)</sup>。

#### [考察]

(1) 培養マスト細胞から遊離される種々のメディエータ並びに合成誘導されるサイトカイン類には, TPAの共存を必要とする場合と, 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇のみで十分な場合があることが示された。マスト細胞への情報伝達系への影響を含めて考えることが, 化学物質の持つアレルギー促進活性をマスト細胞を用いて*in vitro*で評価する場合重要であることが示された。

(2) マスト細胞から遊離されるメディエータとして, 刺激後30分以内に放出されるヒスタミンや $\beta$ -hexosaminidaseばかりでなく, 転写促進活性を刺激後3時間以上たって放出されるサイトカイン類も, マスト細胞の活性化, さらにアレルギー促進活性を考えるうえで, 有用なマーカーであることが示唆された。

#### 発表論文

- 1) Teshima R., Onose J., Ikebuchi H., and Sawada J.: Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors and PKC activation synergistically stimulate TNF- $\alpha$  production in RBL-2H3 cells. *Inflamm. Res.* 47, 328-333, 1998
- 2) Onose J., Teshima R., and Sawada J.: Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor induce IL-4 and MCP-1 production in RBL-2H3 cells. *Immunol. Lett.* 64, 17-22, 1998
- 3) Teshima R., Onose J., Okunuki H. and Sawada J.: Effect of Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 Map kinase activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 34-43, 2000

- 4) Teshima R., Onose J., Okunuki H. and Sawada J.: The effect of Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors on the stimulation of mast cells. *Recent Research Developments in Immunology* (in press)

#### 化学物質の代謝的活性の種差を予測する方法の確立

薬理部 紅林秀雄, 大野泰雄

#### 【緒言】

ヒトおよび各種動物肝組織を用いて代謝的活性化の種差を予測する方法を確立させる目的で, モデル化合物としてジフェニル(DP)を選び, その代謝を*in vitro*および*in vivo*の系で検討した。DPはオルトフェニルフェノール(OPP)とともに輸入柑橘類の防ばい剤として使用されている添加物であり, OPPより毒性は低いものの長期発ガン実験により雌性BDF1マウスで肝臓ガンが報告されている。F344系ラットではなく, 雌性BDF1マウスで肝臓ガンが発生した原因を代謝的活性化の面から検討するとともに, ヒトミクロソーム等を用いることで人における代謝および毒性を考察することとした。

#### 【実験材料および方法】

Diphenyl (DP) とそのモノ水酸化体3種類, 4-hydroxybiphenyl, 2-hydroxybiphenylおよび3-hydroxybiphenyl, またジ水酸化体の4種類, 4,4'-dihydroxybiphenyl, 2,2'-dihydroxybiphenyl, 2,3-dihydroxybiphenyl, および2,5-dihydroxybiphenylは市販品を購入した。

ミクロソームは雌雄未処理のBDF1マウスおよびF344系ラットの肝臓から常法により調製した。ヒト肝ミクロソームは米国IIAM社より購入した。ミクロソームとのインキュベーション溶液は0.1M磷酸緩衝液(pH=7.4), 10mM MgCl<sub>2</sub>, NADPH 5mM総量0.1mlで, 基質のDPおよび3種類のモノ水酸化体3種類は0.5mMで通常37℃30分インキュベートし, HPLCで分析した。これらへの代謝活性は代謝物の生成量より, CYP450またはタンパク量(mg)当たりで算出した。

{液体クロマトグラフ(HPLC)での定性および定量}

HPLCは, LC-10AD型ポンプに, 検出器SPD-M10AVP, SIL-10AオートサンプラーおよびCTO-10AC型カラムオーブンを連結したのを用い, 必要に応じ前処理ガードカラム(Guard Cartridge Capcell MF Ph-1)を組合せて用いた。カラムは2種類の逆相系ODS系カラム, 流速1ml/min, 検出波長260nmで測定した。移動相の設定はアセトニトリル, 水(0.5%酢酸を含む)1:9から20分間でアセトニトリル, 水(0.5%酢酸を含む)80:20の直線的グラジエント, 30分後まで同一条件で測定した。なお3-hydroxybiphenylのHPLC上での保持時間R<sub>t</sub>はパラ水酸化体4-hydroxybiphenylのR<sub>t</sub>に非常に近接していたため圧倒的に多いパラ水酸化体

に合算した。

[尿および糞への排泄実験および代謝物グルクロノイドないし硫酸抱合体を定性および定量]

尿および糞への排泄実験は、雌雄のBDF1マウスおよびF344系ラット、一群5匹としてDP400mg/kg/10mlコーン油を投与し、代謝ケージで尿および糞を投与後24時間および48時間まで採取した。糞中代謝物は2日分の糞をソクスレー抽出器で3時間アセトン抽出し、尿は濾過後、HPLCで分析した。

抱合体代謝物グルクロノイドないし硫酸抱合体の標準物質としては、BDF1マウスないしF344系ラットにDPのモノ水酸化体3種類、または4種類のジ水酸化体を100mg/kg/10mlコーン油の割合で経口投与し、その24時間尿を採取し、その一部を $\beta$ -glucuronidase 0.2units/ml、またはarylsulfatase 60 units/mlおよび10 mM sacharolactoneで数時間インキュベート後HPLC上でフリー体を定量することで、酵素処理前のクロマト上で消失したピークをその化合物のグルクロノイドないし硫酸抱合体として定性および定量することとした。なお、市販品のなかった3,4'-dihydroxybiphenylおよび3,4-dihydroxybiphenylおよび3,4,4'-trihydroxybiphenylは近似する類似体で概算した。

今回、3-hydroxybiphenylのグルクロノイド抱合体は、HPLC上での保持時間Rtがパラ水酸化体4-hydroxybiphenylのグルクロノイド抱合体に近く、パラ水酸化体の量と比較しても少ないことからパラ水酸化体に合算した。また、オルト水酸化体2-hydroxybiphenylの抱合体はHPLC上での保持時間Rtが他の水酸化体の抱合体に重なり、パラ水酸化体の

量と比較しても少ないことから除外した。

### 【結果】

[尿および糞中排泄]

400mg/kgで経口投与されたDPの糞中代謝物はほとんどフリーの代謝物であり、抱合体は検出できなかった。その糞中排泄の割合はマウスおよびラットでいずれも低く、2日間で、雄性ラットでは3%、雌性ラットで2%であり、雄性マウス2%であり、雌マウスで1%程度であった。経口投与されたDPの糞中排泄の割合は低く、DPの主排泄経路は尿中排泄であり、DPはほとんど吸収されたと考えられる。

その2日間の尿中代謝物の割合を比較した (Table 1)。2日目の尿中代謝物の和を100%として、1日目と2日目の和で比較すると、雄性ラットでは1日目56%、2日目44%であり、雌性ラットでは1日目64%、2日目36%であった。雄性マウスでは1日目82%、2日目18%であり、雌性マウスでは1日目74%、2日目26%であった。ラットでは2日目の尿中排泄の割合はまだ高く、体内残留の可能性も残された。マウスでは1日目の尿中排泄の割合が高く、マウスでの排泄がラットより速いことが予測された。

この2日間の尿中代謝物の中では、ラットおよびマウスで共に、パラ水酸化体4-hydroxybiphenylの抱合体の割合がおおよそ半分ぐらいと一番多く、雌雄マウスではそのグルクロノイドの割合が硫酸抱合体より多い。ラットではそのグルクロノイドが少なく硫酸抱合体の割合が多く、雄性ラットで特に顕著であった。また、3,4-dihydroxybiphenylの場合で

Table 1. Urinary metabolites of diphenyl in BDF1 mouse and F344 rat in two days.

		Day	3,4,4'-S	2,5-S	3,4'-S	4,4'-S	4,4'-G	3,4-S	3,4-G	3-S	4-S	4-G	sum(mol)	
rat	male	1	9.01	13.41	4.38	48.9	22.01	17.3	6.0	5.82	129.6	3.4	259.83	56.0
		2	9.72	25.74	7.5	29.9	41.09	31.3	1.6	5.03	42.6	9.8	204.28	44.0
		sum(mol)	18.73	39.15	11.88	78.8	63.1	48.6	7.6	10.85	172.2	13.2	464.11	
		%	4.0	8.4	2.6	17.0	13.6	10.5	1.6	2.3	37.1	2.8		100.0
rat	female	1	5.3	4.4	1.6	19.4	9.6	8.2	22.1	16.17	31.33	27.19	145.29	63.7
		2	3.8	5.8	3.0	9.7	8.4	6.3	17.4	0.5	18.4	9.48	82.78	36.3
		sum(mol)	9.1	10.2	4.6	29.1	18.0	14.5	39.5	16.67	49.73	36.67	228.07	
		%	4.0	4.5	2.0	12.8	7.9	6.4	17.3	7.3	21.8	16.1		100.0
mouse	male	1	2.64	4.16	0.6	3.19	2.7	7.81	1.71	1.54	5.16	30.67	60.18	82.3
		2	1.34	3.05	0.24	1.66	2.3	1.22	0.25	0.11	1.11	1.68	12.96	17.7
		sum(mol)	3.98	7.21	0.84	4.85	5.0	9.03	1.96	1.65	6.27	32.35	73.14	
		%	5.4	9.9	1.1	6.6	6.8	12.3	2.7	2.3	8.6	44.2		100.0
mouse	female	1	1.1	7.1	0.6	3.6	1.3	5.1	1.9	0.95	7.63	20.6	49.88	73.6
		2	1.5	3.9	2.44	1.26	3.6	0.85	0.65	0.11	2.1	1.5	17.91	26.4
		sum(mol)	2.6	11.0	3.04	4.86	4.9	5.95	2.55	1.06	9.73	22.1	67.79	
		%	3.8	16.2	4.5	7.2	7.2	8.8	3.8	1.6	14.4	32.6		100.0

2,5--2,5-dihydroxydiphenyl  
3,4--3,4-dihydroxydiphenyl  
3,4'--3,4'-dihydroxydiphenyl  
4,4'--4,4'-dihydroxydiphenyl

3,4,4'--3,4,4'-trihydroxydiphenyl  
3--3-hydroxydiphenyl  
4--4-hydroxydiphenyl

S: sulfate  
G: glucuronide

も同様に雄性ラットでその硫酸抱合体の割合が多く、雌性ラットではそのグルクロニドの割合が多かった。但し、マウスでは雌雄ともに3, 4-dihydroxybiphenylは硫酸抱合体の割合が高かった。

2番目に多かった代謝物はジ水酸化体の4, 4'-dihydroxybiphenylであり、そのグルクロニドとその硫酸抱合体の和としての割合はラットでマウスより高く、ラットの雄性でより多く排泄された。

また、パラハイドロキノン体でもある2, 5-dihydroxybiphenylの硫酸抱合体が検出され、ラットで雌が雄より高いが、ラットよりマウスが高く、マウスでは雌が雄より高いのが特徴であった。

[ミクロソームを用いた代謝実験]

雌雄のBDF1マウスの肝ミクロソームはNADPH存在下で、DPからそのモノ水酸化体であるオルト水酸化体、パラ水酸化体と、更に水酸化されたジ水酸化体の4, 4'-dihydroxybiphenyl, 3, 4-dihydroxybiphenyl, 2, 5-dihydroxybiphenyl等の生成が見られた (Table 2 & 3)。これらへの代謝活性は全体的に雌が雄より高い傾向が見られ、2, 5-dihydroxybiphenylへの代謝活性は雌マウスが雄より有意に高いことが推定された。

一方、雌雄のF344ラットの肝ミクロソームでもNADPH存在下で、DPからそのモノ水酸化体のパラ水酸化体とオルト水酸化体、更にジ水酸化体4, 4'-dihydroxybiphenylの生成がみられたが、2, 5-dihydroxybiphenylはラットでは検出されなかった (Table 2 & 3)。

更に、すでにモノ水酸化された一次代謝物のパラ、メタおよびオルト水酸化体を基質として、マウスまたはラットの肝ミクロソームとインキュベートし、ジ水酸化体等の代謝生成物を検討した (Table 2 & 3)。

パラ水酸化体からはジ水酸化体4, 4'-dihydroxybiphenylが生成し、この代謝活性は、マウスでは雌雄で同程度、ラットでは雄が高い傾向であった。

オルト水酸化体からジ水酸化体2, 5-dihydroxybiphenylが生成している。この代謝活性はマウスでは雌、ラットでは雄が高い傾向にあった。

メタ酸化体からもジ水酸化体2, 5-dihydroxybiphenylが生成している。この代謝活性も同様に、マウスでは雌、ラットでは雄が高い傾向であった。

ヒト肝ミクロソームでもNADPH存在下で、DPからそのモノ水酸化体のパラ水酸化体とオルト水酸化体、更にジ水酸化体4, 4'-dihydroxybiphenylの生成がみられ、それらの比率はラット、マウスと大差なかった (Table 2 & 3)。一方、

Table 2. Metabolic velocities(/P450/min) of diphenyl and 2-, 3-, or 4-hydroxydiphenyl with microsomal fractions of F344 rats and BDF1 mice

		body weight (g)	liver weight (g)	P450 nmol/mg protein	substrate of Diphenyl /P450/min				4-OH /P450/min	3-OH /P450/min	2-OH /P450/min
					4,4'-diol	4(3)-OH	2,5-diols	2-OH	4,4'-diol	2,5-diols	2,5-diols
Rat	male	191.25.6	7.740.56	1.240.31	0.130.06	0.300.16	ND.	0.140.04	0.220.13	1.010.83	2.261.63
	female	134.63.8	4.320.28	0.910.41	0.030.01	0.390.11	ND.	0.180.03	0.170.04	0.790.66	0.990.19
Mouse	male	26.951.29	1.230.11	1.180.27	0.150.06	0.810.46	0.110.05	0.260.13	0.250.10	0.670.34	1.540.27
	female	19.371.31	0.770.08	0.780.19	0.210.13	1.150.96	0.240.14	0.430.26	0.320.21	1.811.33	3.892.02
Human	Pooled (2female + 2male)			0.462	0.390.27	0.810.23	ND.	0.190.08	0.480.08	0.290.06	1.350.60

Table 3. Metabolic velocities(nmol/mg protein/min) of diphenyl and 2-, 3-, or 4-hydroxydiphenyl with microsomal fractions of F344 rats and BDF1 mice

		body weight (g)	liver weight (g)	P450 nmol/mg protein	nmol/mg protein/min						
					substrate of Diphenyl				4-OH	3-OH	2-OH
					4,4'-diol	4(3)-OH	2,5-diols	2-OH	4,4'-diol	2,5-diols	2,5-diols
Rat	male	191.25.6	7.740.56	1.240.31	0.170.10	0.370.24	ND.	0.180.07	0.260.13	0.920.77	1.870.96
	female	134.63.8	4.320.28	0.910.41	0.020.01	0.290.09	ND.	0.140.04	0.130.02	0.630.44	0.900.41
Mouse	male	26.951.29	1.230.11	1.180.27	0.180.10	0.880.38	0.130.07	0.300.17	0.280.11	0.740.33	1.780.33
	female	19.371.31	0.770.08	0.780.19	0.150.07	0.760.52	0.170.07	0.310.15	0.220.10	1.381.05	2.800.94
Human	Pooled (2female + 2male)			0.462	0.170.13	0.370.11	ND.	0.090.04	0.220.04	0.140.03	0.620.27

2, 5-dihydroxybiphenylはラットと同様検出されなかった。また、各モノ水酸化体を基質としたときは、マウス、ラットと同様に更に水酸化された2, 5-dihydroxybiphenylおよび4, 4'-dihydroxybiphenylの生成がみられた。

### 【考察】

経口投与されたDPの糞中排泄の割合はマウスおよびラットで低く、主排泄経路は尿中排泄であり、経口投与されたDPはほとんど吸収され、まず水酸化反応を受け、次に抱合化されて尿中に排泄されたことになる。DPの代謝排泄の律速は最初の水酸化反応と二次代謝の抱合化反応等が考えられる。

尿中排泄のほとんどは水溶性のグルクロニドまたは硫酸抱合体の代謝物で、全体的にマウスではグルクロニドの抱合体が多く、ラットではグルクロニドより硫酸抱合体が多く排泄される傾向がみられた (Table 1)。マウスおよびラットで比較すると、ラットでの膀胱結石の原因がパラ水酸化体の硫酸抱合体であったという報告と一致している。

尿中代謝物のグルクロニド抱合体および硫酸抱合体は化学的に安定な水溶性化合物と考えられる。抱合化されていないフリーのモノ水酸化体はDPより水溶性は少し増加するがフェノール性の水酸基のもつ酸性物質であり、ジ水酸化体の水溶性は更に増加しフェノール性の水酸基も増加する。そのため、これら水酸化体の毒性はDPよりも増加すると考えられる。その中でも2, 5-dihydroxybiphenylのようなヒドロキノン体はキノンに酸化され易く、酸素を還元して $H_2O_2$ などの活性酸素を生成する。またキノンは生体中のフラビン酵素などによりヒドロキノンに還元されやすく、酸化と還元をくりかえすことになり、この酸化還元サイクルにより生成する活性酸素が蓄積することになる。活性酸素はDNAを切断することや発ガンのプロモーター等も知られている。また一般にキノンは不安定な親電子化合物で電子供与性物質とマイケル付加反応で共有結合を生成しやすい性質があり、生体に損傷を生ずることとなる。

DPの肝ミクロソームでの代謝活性を比較した場合、ヒト肝ミクロソームでもマウス、ラットと同様にNADPH存在下で、パラ水酸化体とオルト水酸化体、更にジ水酸化体4, 4'-dihydroxybiphenylの生成がみられた。一方、マウスで認められた2, 5-dihydroxybiphenylはラットと同様に検出されなかった (Table 2 & 3)。

一方、各モノ水酸化体であるオルト、パラ及びメタ水酸化体を基質としたときは、いずれも更に水酸化された2, 5-dihydroxybiphenylおよび4, 4'-dihydroxybiphenylの生成がみられた。なかでは雌マウス及び雄ラットでオルト及びメタ水酸化体から2, 5-dihydroxybiphenylへの代謝活性が高いことが示された。

そこでラットの肝ミクロソームではDPのモノ水酸化反

応はパラ水酸化が中心で、オルト水酸化体およびメタ水酸化体の生成は少ないと考えられる。一方、BDF1マウスの肝ミクロソームではDPのモノ水酸化反応はパラ水酸化のみならずオルト水酸化反応され、これが更に水酸化され2, 5-dihydroxybiphenylを生成する。後者の代謝活性がBDF1マウス雌で雄マウスより有意に高いことが毒性発現の原因の一つであると推定された。また今回使用したヒトミクロソームはどちらかというともウスよりラットに似た代謝活性を様していたが、ヒトの薬物代謝では個体差が大きいと言われており、もう少し例数を増やすことが要求される。また市販され出しているヒトCYP450発現系を用いることでこの代謝における寄与および毒性との関連性が考察可能と思われる。

今回はパラヒドロキノン体の酸化還元サイクルにより生成する活性酸素に注目したが、一般的には、これのみならず、オルト位のキノン-ヒドロキノン体の酸化還元サイクルにより活性酸素が生成する可能性もあり、フリーの代謝物による活性酸素の生成する可能性は高い。フリーの代謝物の生成する肝臓に発ガン性がみられたことと関連する。フリーの代謝物が過剰であったり遺伝的欠損でグルクロニドまたは硫酸抱合体への代謝能力が不足することがあると毒性作用を受けると考えられる。

今回の動物の種差及び性差の代謝実験の結果*in vivo*及び*in vitro*で比較的に一致していた。まず、経口投与されたDPの糞中排泄の割合はマウスおよびラットでいずれも低く、主排泄経路は糞中ではなく尿中であった。この1日目の尿中排泄の割合がマウスでラットより高く、マウスで代謝排泄が速いことが予測され、これは、肝ミクロソームでのDP代謝活性でマウスがラットより高い傾向にあったことと一致した。また、その動物の肝ミクロソームによるDPの代謝物の種類およびその生成速度はよく相関しているように思われた。これら*in vitro*および*in vivo*での代謝物の検討から、ラットでのDPの代謝反応はパラ水酸化が中心で、BDF1マウスではDPのパラ水酸化のみならずオルト水酸化が起こり、続いて活性酸素につながる活性代謝物と考えられる2, 5-dihydroxybiphenylが生成することが判明した。この毒性につながる代謝経路への代謝活性速度がBDF1マウス雌で雄マウスより有意に高いことが判明し、毒性発現の原因の一つであると推定された。

但し、今回の代謝実験は*in vitro*では未処理の動物の肝ミクロソームを、また*in vivo*でも未処理の動物の単回投与であった。発ガン実験ではDPを連続投与しており連続投与した場合のDPの生体に与える影響、例えばDPの薬物代謝系に与える誘導効果やその結果としてのDPの代謝物への影響等も考えられる。また、今回ジ水酸化やトリ水酸化体の標準化合物が手に入らないものもあり、尿中代謝物もすべてを同定されたわけではなく、標準化合物があるものでその抱合体を推定して定量した。これらいくつかの改善が

なされることでより正確な代謝が判明するものと思われる。

【結論】

DPの主排泄経路の尿中排泄はマウスでラットより速いことが予測されたが、肝ミクロソームでのDP代謝活性もマウスがラットより高い傾向にあったことと一致した。ラットでのDPの代謝はパラ水酸化が中心で、BDF1マウスではDPのパラ水酸化のみならずオルト水酸化が起こり、続いて毒性につながる2, 5-dihydroxybiphenylが生成した。肝ミクロソームのオルト水酸化体から2, 5-dihydroxybiphenylの生成する代謝活性は雌マウスで高いことが肝発ガンの原因の一つと考えられる。一般に薬物代謝では種差、性差、個体差が言われており、代謝酵素のCYP450の発現量でDPの代謝活性や代謝物の変化が考えられる。ヒトにおけるDP代謝でもCYP450発現系を用いることでヒト肝ミクロソームを用いた代謝への関与を考察可能と思われる。

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, 広瀬雅雄

【目的】

我々はすでに強力な遺伝毒性発癌物質である4-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO)をラットに単回投与し、経時的に2~48時間の短期間における病理学的毒性指標について検討した結果、4HAQO投与2時間後から標的細胞である膵腺房、小腸上皮、肺上皮および副腎皮質細胞にDNA付加体の形成がみられ<sup>1)</sup>、ほぼ同時にこれら標的細胞に超微形態学的に核小体分離が誘発されることを明らかにし、遺伝毒性発癌物質などにより誘発される核小体分離はDNA傷害さらに発癌性の指標となることが示唆された<sup>2)</sup>。また、化学物質の発癌性と細胞増殖活性との相関性が高いことから、PCNA免疫組織化学を用いて細胞増殖活性を検索した結果、主標的細胞である膵腺房細胞に対照群と比較して有意な増殖活性の上昇が認められた。このように、化学物質の毒性、特に発癌性評価の迅速かつ鋭敏な病理学的毒性指標としては免疫組織化学的手法によるDNA付加体形成や細胞増殖活性の検索および超微形態学的観察などが有用な検索法となると思われる。2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP)は魚肉類の加熱調理過程で生じる遺伝毒性発癌物質で、前立腺、大腸、膵および乳腺などにDNA付加体を形成し、発癌性を示すことが報告されている<sup>3~5)</sup>。今回PhIPを用い、前回の実験と同様に経時的に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、PCNA免疫組織化学により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、PhIPをコーン油に混合し、300mg/kg B. W.の割合で単回強制経口投与し、経時的に4, 6, 24, 48, 72時間後に各5匹ずつエーテル麻酔下で屠殺・剖検した。臓器はPhIPの発癌の標的細胞である前立腺および大腸、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、同様に屠殺・剖検した。各臓器は10%中性緩衝ホルマリン溶液あるいはブアン溶液で固定後、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、超微形態学的に観察した。

I ブアン溶液で固定した前立腺、大腸および肝については免疫組織化学的にPhIP-DNA付加体に対する抗体を用いてDNA付加体を染色し、各上皮細胞の陽性率を算出し、さらに超微形態学的に各細胞の核小体分離を観察し、その出現率を経時的に比較・検討した。

II 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した前立腺、大腸および肝について、抗PCNA抗体を用いて、免疫組織化学的に各上皮細胞の陽性率を経時的に検索した。

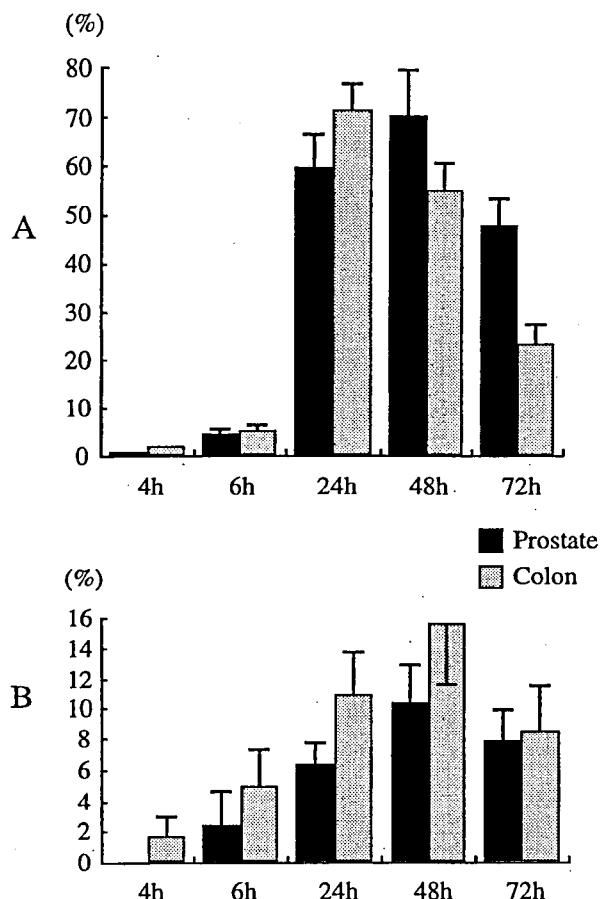


Fig. 1 Summary of sequential changes of PhIP-DNA adduct formation (A) and nucleolar segregation (B) in the rat ventral prostate with PhIP. Data represent mean ± standard deviation.

## 【結果】

## I PhIPによるDNA付加体形成と核小体分離

Fig. 1に各臓器のDNA付加体陽性細胞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付加体陽性細胞は、前立腺上皮細胞ではPhIP投与48時間後で、大腸上皮細胞では24時間後で平均約70%以上の最高値を示した。一方、肝では陽性細胞はほとんど認められなかった。超微形態学的観察では、前立腺上皮および大腸上皮細胞に核小体分離が観察され、投与48時間後で最も出現率が高く、いずれも10%以上であったが、肝細胞ではほとんど認められなかった。細胞質内にはリボゾムの減少以外には特徴的な変化は認められなかった。

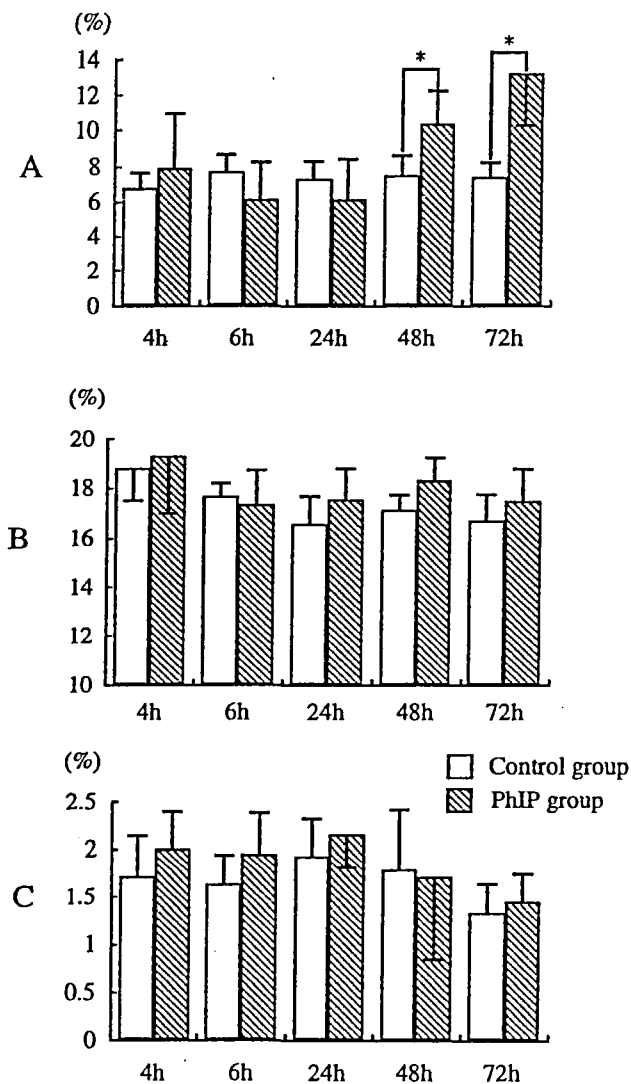


Fig. 2 PCNA labeling index in the rat ventral prostate (A), colon (B) and liver (C) treated with PhIP or vehicle alone. Significantly different at \* $p < 0.05$  as compared with the control group. Data represent mean  $\pm$  standard deviation.

## II PhIPによる細胞増殖活性について

免疫組織化学的染色によるPCNA陽性細胞標識率の結果をFig. 2に各臓器毎に示した。PhIP投与群の前立腺上皮細胞においてPCNA陽性細胞の陽性率は対照群と比較して、投与24時間後までは差がみられなかったが、48時間後以降は有意に高く、投与72時間後で最も高く発現した。投与群の大腸上皮細胞の投与24時間後以降では、対照群と比較していずれも高い傾向を示したが有意差は認められなかった。正常な大腸上皮細胞は生理学的に細胞増殖活性は高いことから、PCNAによる細胞増殖活性の差は検出しにくいものと思われた。PhIPの非標的細胞である投与群の肝細胞は対照群と比べて細胞増殖活性はほとんど差がなかった。

## 【考察】

前立腺上皮および大腸上皮細胞ではDNA付加体形成および核小体分離のピークは24から48時間後にみられ、その後漸次減少した。また、細胞増殖活性については大腸上皮細胞では高い傾向がみられたが、前立腺上皮細胞においてのみ投与48時間以降有意に高く発現し、最高値を示したのは72時間後であった。PhIP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。また細胞増殖活性は腫瘍形成において高くなることが知られていることから、早期に発癌作用が始まることが示唆された。今回の結果から、PhIP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し後に細胞増殖活性の上昇を示すものと考えられた。今回用いたPhIPは強力な発癌物質である4HAQOと同様に標的細胞の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。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ことから、PhIP投与による標的細胞への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、細胞増殖活性が亢進され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環境化学物質のPhIPは4HAQOと同様に標的細胞のDNAと付加体を形成し、その形態的表現としての核小体分離を誘発する。続いて、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) 今沢孝喜・西川秋佳・高橋道人: 迅速かつ鋭敏な病理学的毒性指標に関する検討, 衛研報告, 特別研究報告, 116, 213-215 (1998)
- 2) 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)
- 3) Takahashi, S., Tamano, S., Hirose, M., Kimoto, N., Ikeda, Y., Sakakibara, M., Tada, M., Kadlubar F. F., Ito, N., Shirai, T.: Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP): detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution. *Cancer Res.*, 58, 4307-4313 (1998)
- 4) Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S., Sugimura, T.: A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine. *Carcinogenesis*, 12, 1503-1506 (1991)
- 5) Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., Ito, N.: The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.*, 57, 195-198 (1997)

## 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

Keywords: developmental toxicity, early embryonic loss, decidual cell response, butyl benzyl phthalate, tributyltin

### [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

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) 及び船底や漁網の汚染防止剤として使われてきた tributyltin chloride (TBTCI) 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 TBTCI のラットにおける発生毒性について検討した。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を明らかにした<sup>1-8)</sup>。更に、BBP 及び TBTCI 共にラットの妊娠初期に投与したときには著しい生殖障害、すなわち早期の胚致死、を惹起することを明らかにした<sup>5-8)</sup>。第二次研究期間においては、BBP 及び TBTCI の偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応に及ぼす影響について調べ、肺致死作用の検出系としての有用性について検討する。

### [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 ± 1℃, 湿度 55 ± 5%, 12-h 明/暗時に調整した動物室で飼育した。毎日の陰垢検査により 4 日の性周期を少なくとも 2 回示した雌ラットを実験に使用した。妊娠及び偽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 TBTCI (純度 98%, アルドリッチケミカル) はオリーブ油に溶解し、5ml/kg を経口投与した。投与日及び投与量はそれぞれの実験結果の項に記載した。

#### 3. 妊娠ラット

成熟処女ラットを雄ラットと一夜同居した後、翌朝陰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。妊娠ラットは妊娠 20 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。

#### 4. 偽妊娠ラット

成熟処女ラットを精管結紮した雄ラットと一夜同居した後、翌朝陰垢を認めたものを偽妊娠とし、この日を偽妊娠 0 日とした。偽妊娠 4 日に偽妊娠ラットをエーテル麻酔下で回復し、子宮の腔側から先端を曲げた細い針金を挿入して、子宮内膜の反子宮間膜側を卵管端まで創傷することによって脱落膜反応を惹起した。偽妊娠 9 日の子宮重量を測定して脱落膜反応の指標とした。

#### 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の妊娠ラットにおける胚致死作用と偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に対する影響

ラットの妊娠0-8日に250, 500, 750または1000mg/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。着床の認められなかった雌ラット(不妊雌ラット)が250及び500mg/kg投与群で10匹中1匹, 750mg/kg投与群で11匹中4匹, 1000mg/kg投与群で12匹中5匹認められ, 1000mg/kg投与群では妊娠率が対照群に比べて有意に低かった。750及び1000mg/kg投与群における着床数は有意に減少し, 1000mg/kg投与群における着床前胚死亡率は有意に上昇した。着床の認められた妊娠成立ラットについては, 黄体数及び吸収胚数にBBP投与群と対照群との間の差はみられなかったが, 1000mg/kg投与群における着床数及び生存胎児数は有意に減少した。1000mg/kg投与群における着床前胚死亡率, 750及び1000mg/kg投与群における着床後胚死亡率は対照群に比べて有意に高かった。500mg/kg以上の投与群における生存胎児の体重は有意に低かった。

ラットの偽妊娠0-8日に250, 500, 750または1000mg/kgのBBPを経口投与し, 偽妊娠9日の子宮重量を測定して脱落膜反応の指標とした。750及び1000mg/kg投与群において対照群に比べて有意に低い卵巣重量が認められた。BBP投与群における黄体数は対照群と同様であった。偽妊娠9日の子宮重量は750及び1000mg/kg投与群において対照群に比べて有意に低かった。偽妊娠ラット血清中プロゲステロンレベルには500mg/kg以上のBBP投与で低下の傾向がみられた。

これらの結果から, BBPをラットの妊娠初期に投与したとき胚致死作用が750mg/kg以上の投与量で認められ, 偽妊娠ラットにBBPを投与したときにも750mg/kg以上で子宮重量の低下が観察された。すなわち, 妊娠初期に投与されたBBPは子宮における脱落膜腫形成の低下を引き起こし, その結果, 胚致死を惹起することが示唆された<sup>9)</sup>。

##### 2. TBTCIの偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に対する影響

第一次研究期間において, ラットの妊娠0-3日または妊娠4-7日に8.1, 16.3, 32.5または65.1mg/kgのTBTCIを経口投与し, 妊娠20日に開腹して生殖障害作用について調べた。その結果, 妊娠0-3日の16.3mg/kg以上の投与量で有意に高い着床後胚死亡率が有意に上昇し, 妊娠4-7日の投与で16.3mg/kg以上の投与量で有意に高い着床後胚死亡率が認められた。第二次研究期間においては, 同投与量のTBTCIを偽妊娠ラットに投与して脱落膜反応に及ぼす影響について検討した。すなわち, ラットの偽妊娠0-3

日に4.1, 8.1, 16.3または32.5mg/kg, 妊娠4-7日に8.1, 16.3, 32.5または65.1mg/kgのTBTCIを経口投与し, 偽妊娠9日の子宮重量を測定して脱落膜反応の指標とした。偽妊娠0-3日の16.3mg/kg以上のTBTCI投与で対照群に比べて有意に低い子宮重量及び偽妊娠ラット血清中プロゲステロンレベルが認められた。また, 偽妊娠4-7日のTBTCI投与でも16.3mg/kg以上の投与で対照群に比べて有意に低い子宮重量及び偽妊娠ラット血清中プロゲステロンレベルが認められた。しかし, いずれの投与期間においても黄体数及び卵巣重量にはTBTCI投与の影響は観察されなかった。

これらの結果から, 妊娠0-3日及び妊娠4-7日にTBTCIを投与したときそれぞれ着床前及び着床後胚死亡率が有意に上昇する投与量のTBTCIを偽妊娠ラットの偽妊娠0-3日または偽妊娠4-7日に投与したとき子宮重量の低下が認められた。すなわち, 妊娠初期に投与されたTBTCIは子宮における脱落膜腫形成の低下を引き起こし, その結果, 早期の胚死亡を惹起することが示唆された<sup>10)</sup>。

#### [まとめ]

BBP及びTBTCIは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り, 妊娠初期に投与したときには著しい胚致死作用を示すことが明らかになった。また, 胚致死作用を発現するのと同量のBBPまたはTBTCIを偽妊娠ラットに投与したときには, 子宮の脱落膜反応を抑制することが明らかになった。これらのことから, BBP及びTBTCIによる胚致死作用は脱落膜反応抑制に起因することが示唆された。受精卵の着床及び胚のその後の生存にとって必要不可欠な子宮の脱落膜反応を抑制する化合物は妊娠早期の胚致死作用を示す可能性があり, 偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に対する影響を調べることににより胚致死作用を検出することが可能であることが本実験により示された。

#### 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima : Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats. J. Appl. Toxicol., 19, 375-365 (1999)

- 5) M. Ema, R. Kurosaka, H. Amano and Y. Ogawa : Embryoletality of butyl benzyl phthalate during early pregnancy in rats. *Reprod. Toxicol.*, 8, 231-236 (1994)
- 6) Harazono, M. Ema and Y. Ogawa : Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicol. Lett.*, 89, 185-190 (1996)
- 7) 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)
- 8) A. Harazono, M. Ema and K. Kawashima : Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-Induced pregnancy failure in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 224-230 (1998)
- 9) M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima : Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudo-pregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 12, 127-132 (1998)
- 10) Harazono, M. Ema and K. Kawashima : Antifertility effect of tributyltin chloride administered during pre-implantation period in rats : effect on decidual cell response. *J. Toxicol. Sci.*, 23, 231 (1998)