トリクロロエチレンとイソプロピルアルコールの 肝内代謝における相互作用 —ラット灌流肝臓における実験—

王 廣増^{*1,*2}, 高野 健人^{*1}, 富田 和久^{*1},
仲田 和代^{*1}, 中村 桂子^{*1}

^{*1}東京医科歯科大学医学部公衆衛生学教室

^{*2}現在 中華人民共和国・河北省唐山市華北煤炭医学院予防医学系毒理学教研室

Interaction of Trichloroethylene and Isopropyl Alcohol in the Perfused Rat Liver

WANG Guang-zeng, Takehito TAKANO, Kazuhisa TOMITA,
Kazuyo NAKATA and Keiko NAKAMURA

*Department of Public Health and Environmental Science,
School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo*

Abstract The interaction of trichloroethylene (TCEL) and isopropyl alcohol (IPA) was studied in the perfused rat liver. Experiments consisted of four parts; TCEL administration with or without IPA, chloral hydrate (CH) administration with or without IPA, IPA administration with or without CH, IPA administration with or without trichloroethanol (TCE). The chemicals were administered into the perfusate of Krebs-Henseleit buffer saturated with 95%O₂/5%CO₂ in a non-recirculating circuit. Concentrations of the following three metabolites in the effluent were continuously measured by gas chromatograph and chemical methods: TCE and trichloroacetate (TCA) (metabolites of TCEL and CH), and acetone (a metabolite of IPA). Fluorescence from intracellular reduced pyridine nucleotides (NADH, NADPH) was monitored by surface fluorometry. The results showed that IPA changed the TCA/TCE ratio in the TCEL metabolism because of an increase in NADH production, and IPA oxidation was suppressed by CH because of an inhibitory effect of TCE on alcohol dehydrogenase. It was concluded that IPA and TCEL, both ubiquitous agents, interacted with each other in their metabolic pathways in the perfused rat liver, suggesting a new feature of a combined effect of these chemicals when they coexist.

Key words : Trichloroethylene (トリクロロエチレン), Isopropyl alcohol (イソプロピルアルコール), Chloral hydrate (抱水クロラル), Perfused rat liver (ラット灌流肝臓), Redox state (酸化還元状態)

緒 言

トリクロロエチレン (trichloroethylene, TCEL) は広

く使用されている有機塩素系化合物であり、また環境汚染物質としても検出されている有機溶剤である¹⁾。TCELの毒性に関する知識の普及に伴い、その使用は注意深く

Reprint requests to : Prof. Takehito Takano, Department of Public Health and Environmental Science, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

行われる傾向²⁾にあるが、なおTCELに関するより多くの衛生学的情報が必要であると思われる。特に、用量反応関係や中毒症状などに関する毒性情報だけでなく、代謝のメカニズムを明らかにする研究は、労働者や住民の健康を総合的に配慮するうえで重要な基礎資料になるものと考えられる。

一方、イソプロピルアルコール(isopropyl alcohol, IPA)も頻用されている化学物質である³⁾。

我々は、TCELとIPAという二種類の有機溶剤の複合影響に興味を持ち、この二種類の化学物質のそれぞれの代謝に及ぼす相互作用に着目し、ラットの灌流肝臓を実験モデルとして、ひとつの実験所見の事実を得ることを目的として本研究を行った。

TCELの体内代謝は、多くの研究報告によって明らかにされている^{4~7)}。体内に吸収されたTCELは主に肝臓においてチトクロームP₄₅₀系(P₄₅₀)により、中間代謝産物の抱水クロラル(chloral hydrate, CH)に代謝される⁴⁾。このCHは、さらに、生体内変換をうけ、トリクロロ酢酸(trichloroacetic acid, TCA)、あるいは、トリクロロエタノール(trichloroethanol, TCE)に代謝される⁵⁾。すなわち、抱水クロラル脱水素酵素によりTCAに酸化される代謝経路と、アルコール脱水素酵素(ADH)によってTCEに還元される代謝経路の2種類の経路の存在が知られている^{4, 6)}。

CHがTCEに代謝される場合にはNADHが必要とされ、CHがTCAに代謝される場合にはNADが必要とされる。したがって、TCEとTCAの産生比(TCE/TCA比)は細胞内酸化還元状態、特にNAD/NADH比によって変化することが報告されている⁸⁾。

一方、IPAも従来より肝臓においてADHによってアセトンに代謝されることが知られている^{9, 10)}。また、IPAがADHによってアセトンに酸化される場合はNADが必要とされ、NADHが産生される。そこで、TCEL代謝とIPA代謝の相互影響を観察するためには、細胞内のNAD/NADHの変動をモニターすることが不可欠である。

この目的に合致した実験系として、我々はラット灌流肝臓を調整し、臓器蛍光分析装置を用いて、NAD/NADHの酸化還元状態の変化をモニターし、さらに、TCELおよびIPAのそれぞれの代謝産物の産生率を測定し、代謝動態変化の把握を行った。

その結果、TCELとIPAはそれぞれの代謝の過程で細胞内NAD/NADHレベルを変化させ、相互に影響を及ぼし合うことの一端が判明したので以下に報告する。

方 法

1. ラット灌流肝臓の調整

実験動物は、Wistar系ラット(雄、体重200-300g、日本クレア)を用いた。飼育は24℃、午前6時点燈、午後6時消燈の12時間の明暗サイクルで行い、飼料(CE-2、日本クレア)と水の摂取は自由とした。20頭を一群5頭とし4群にわけた。TCEL投与実験に用いたラットはTCELを代謝するP₄₅₀を誘導するため、フェノバルビタール(連続4日間、70mg/kg体重、腹腔内投与)投与の前処理を行った。

ラット肝臓の灌流方法は既報¹¹⁾に準じて行った。すなわち、ペントバルビタール(50mg/kg体重、腹腔内投与)により麻酔し、開腹後、カニューレを門脈に挿入し、肝臓が膨潤しないように注意して灌流を行った。流出液は下大静脈から導いた。

灌流液は、血液成分を含まないKrebs-Henseleit bufferを用い、95%O₂-5%CO₂で飽和した。基質として、また細胞内酸化還元電位を生理的な状態に定常的に保つため、1.0 mM乳酸と0.1 mMピルビン酸を使用した。灌流温度は31℃、灌流量は30 ml/分とした。

酸素消費量は、灌流液を大静脈より外気と隔絶して導き、電極法により測定した酸素分圧の変化値と流量値から算出した。

流出液は2分毎に採取した。

使用した試薬類は以下の市販品(特級)を用いた。TCELおよびIPAは関東化学より、CH、TCEおよびTCAはナカライテスクより購入した。

2. 臓器蛍光分析

灌流肝臓における還元型ビリジンスクレオチド(PN)の蛍光変化の経時的測定はすでに本誌で報告した臓器蛍光分析法¹²⁾を用いて行った。光源として、超高圧水銀燈を用い、フィルターと石英ファイバーにより366 nmの励起光を臓器表面に照射し、還元型PNから発せられる蛍光を、同じく石英ファイバーとフィルターにより選択して、光電子増倍管に導いた。同時に、720 nmの近赤外光を用いて光の反射条件を監視し補正した。

3. 代謝産物の測定

TCEとTCAの測定は、ガスクロマトグラフ(島津GC-7A, ECD)を用い、HumbertとFernandezの方法¹³⁾により測定した。IPAの代謝産物アセトンの測定は、自記分光光度計(日立100-50)を用いて、サリチルアルデヒド定量法¹⁴⁾によって測定した。

4. 実験条件

実験は次の四条件について行った。i) 灌流液中最終濃度0.1 mMのTCELを24分間負荷し、途中8分間10 mMのIPAを同時負荷。ii) 灌流液中最終濃度0.1 mMのCHを24分間負荷し、途中8分間10 mMのIPAを同時負荷。iii) 灌流液中最終濃度10 mMのIPAを24分間負荷し、途中8分間1.0 mMのCHを同時負荷。iv) 灌流液中最終濃度10 mMのIPAを24分間負荷し、途中8分間を0.1 mMのTCEを同時負荷。

5. 推計学的検討

平均値の差の検定は、t-testにより行い、有意水準は5%とした。

結 果

1. TCEL代謝に及ぼすIPAの影響

灌流肝臓に0.1mM TCELを負荷した後、10 mM IPAを同時に負荷したときの酸素消費量、還元型PNレベルの変化率、TCA、TCEの産生率の経時的变化を図1に典型例として示した。また、TCEL単独負荷時、TCELとIPA同時負荷時、同時負荷終了後のTCEL単独負荷時の各プレートー時におけるPN変化率、TCA産生率およびTCE生産率を表1に示した。

TCEL単独負荷により、還元型PN量は減少し、投与3分後にはほぼ一定の値に達した。また、灌流排出液中にTCEおよびTCAが認められ、TCA/TCE産生比はほぼ8:1であった。TCELとIPA同時負荷開始後、図1にみられるように急速に還元型PN量は増加した。また、TCE産生率もTCEL単独負荷時と比較して3.2倍まで有意に増加した。一方、TCA産生率はIPA負荷によりTCEL単独負荷時の55%まで有意に減少した。IPA負荷中止後、還元型PN量は再び減少し、IPA負荷前のレベルに戻った。

Fig. 1 Typical changes in oxygen consumption, reduced pyridine nucleotides (PN), and production rates of trichloroethanol (TCE) and trichloroacetic acid (TCA) following administration of trichloroethylene (TCEL) with or without isopropyl alcohol (IPA) in the perfused rat liver

The redox level of PN is measured as percent reduction. In the present experiment, 100% reduction was defined as the level reached when inducing complete anoxia, and 0% reduction was defined as the stable level maintained in Krebs-Henseleit buffer with an adequate oxygen supply.

Table 1 Effect of isopropyl alcohol (IPA) on levels of reduced pyridine nucleotides (PN), production rates of trichloroethanol (TCE) and trichloroacetic acid (TCA) in the perfused rat liver during trichloroethylene (TCEL) administration

	0.1mM TCEL		
	Without IPA ^a	With 10mM IPA	Without IPA ^b
Change in reduced PN level (%)	-19.3±1.4	-7.5±0.8 ^c	-21.0±0.5
TCE production rate (nmol/g liver/min)	0.95±0.16	3.10±0.64 ^c	1.68±0.27
TCA production rate (nmol/g liver/min)	7.63±0.75	4.24±1.01 ^c	8.06±1.23

All values are means±SE. n=5.

^a Values when 0.1mM TCEL was administered alone before IPA administration.

^b Values when 0.1mM TCEL was administered alone after IPA administration.

^c represents a statistically significant difference caused by IPA administration.

た。また、TCEおよびTCA産生率も還元型PNと同様、IPA負荷中止後にはIPA負荷前のレベルに戻った。

2. CH代謝に及ぼすIPAの影響

TCELの中間代謝産物であるCHの代謝に及ぼすIPAの影響について、同じく代謝産物のTCEおよびTCAの産生率の変化を図2に示した。CHを負荷した場合の還元型PN量の減少($-8.72 \pm 0.57\%$, $n=5$), また、IPA投与時の還元型PN量の増加($2.71 \pm 1.39\%$, $n=5$)が認め

Fig. 2 Changes in trichloroethanol (TCE) and trichloroacetic acid (TCA) production rates following administration of chloral hydrate (CH) with or without isopropyl alcohol (IPA) in the perfused rat liver. A significant difference from the value for CH alone is shown.

Fig. 3 Changes in the reduced pyridine nucleotide (PN) level and acetone production rate following administration of isopropyl alcohol (IPA) with or without chloral hydrate (CH) in the perfused rat liver. A significant difference from the value for IPA alone is shown.

られた。

図2にみられるように、CH単独負荷の場合、TCE、TCA産生率はそれぞれ、 33.8 ± 4.1 nmol/g liver/min, 54.7 ± 6.7 nmol/g liver/minであり、TCA産生がTCE産生を上回っていた。

IPAを同時に負荷した場合、TCE産生率はCH単独負荷時の産生率と比べて2.1倍の有意な増加が認められた(図2)。一方、TCA産生率は、IPA同時負荷時には、CH単独負荷時の産生率の68%であり、有意に減少した。IPA同時負荷により、CHの主たる代謝産物はTCAからTCEへと変化した。TCEとTCA産生率の合計産生率はCH単独負荷時のそれと比べて有意差を認めなかった。

3. IPA代謝に及ぼすCHの影響

灌流肝臓に10mM IPAを負荷した時ならびに10mM IPAと0.1mM CHを同時負荷した時の還元型PN変化率、アセトン産生率を図3に示した。IPAがアセトンに代謝される過程において、アセトン産生率はCHの同時負荷により有意に抑制されることが認められた。

4. IPA代謝におよぼすTCEの影響

灌流肝臓に10mM IPAを負荷した時ならびに10mM IPAと0.1mM TCEを同時負荷したときのアセトン産生率を図4に示した。その結果、TCEの同時負荷によりアセトン産生率の有意な抑制(76%)が認められた。

考 察

ラット灌流肝臓に対してTCELとIPAの同時負荷をおこなった結果、TCELは肝臓において代謝され、TCAと

Fig. 4 Changes in the acetone production rate following administration of isopropyl alcohol (IPA) with or without trichloroethanol (TCE) in the perfused rat liver. A significant difference from the value for IPA alone is shown.

TCEの産生をもたらし、IPAが共存することにより、TCAの産生は減少し、TCEの産生が増加することが示された。

また、臓器蛍光分析法による肝細胞内還元型PNレベルの観察により、TCEL投与が還元型PNレベルを低下させ、IPA投与は還元型PNレベルを上昇させることが示された。

TCEL投与により還元型PNの減少は、TCELからP₄₅₀によりCHに変化する際に消費されるNADPHと、CHからTCEに変化する際に消費されるNADHの両方の減少分を含むものと考えられた。TCELの中間代謝産物であるCHとIPAの同時負荷によって、肝細胞内還元型PNレベルは、TCELとIPAの同時負荷における結果と同様の方向への変化を示した。しかし、この場合の還元型PNの変化は、P₄₅₀によるNADPH消費を含まない変化と考えられ、CHからTCEへの代謝によるNADHの消費、CHからTCAへの代謝によるNADHの産生の加減の結果を示しているものと考えられた。

Bucherら¹⁵⁾は、ラット灌流肝臓において、灌流液中の乳酸とピルビン酸の濃度を変化させ、本実験で用いたものと同様の臓器蛍光分析法により、還元型PNの蛍光量変化が肝細胞内の酸化還元状態(redox state)を示しており、それが、乳酸/ピルビン酸比10:1において、生体内における生理的な酸化還元状態と同様のレベルにあることを報告している。また、Kawamotoら⁸⁾は、灌流肝臓において、比較的低濃度(0.1 mM)のCH投与下では、代謝産物はTCAの比率が高く、TCEの比率が低いことを報告している。しかしながら、高濃度のCH(1.0 mM)投与によっては、代謝産物はTCEの比率が高くなり、TCAの産生率を上回ることを同時に観察している。

これらのことを勘案すると、TCA/TCE比は、細胞内のNADH/NADの変化によって影響を受けやすく、容易に変化するものと考えられた。すなわち、IPAの投与は、ADHによるアセトンへの酸化過程によって細胞内にNADHを増加させ、NADHの存在下において進行するCHからTCEへの反応を促進し、NADHを産生するCHからTCAへの反応を抑制したのと考えられた(図5B)。

しかしながら、TCAとTCEの合計産生率はIPA共存下においても影響を受けなかった。これは、Kawamotoら⁸⁾によって行われた灌流液中の乳酸濃度を変化させて得られた細胞内酸化還元状態の変化に応じたTCA/TCE比の変化に関する観察濃度と相応する結果と考えられた。

また、本実験条件下では、IPAの代謝はCHの共存下に

Fig. 5 Changes in the pool size of NADH and metabolic pathways of trichloroethylene (TCEL) and isopropyl alcohol (IPA) in the rat liver cell

A: TCEL is metabolized to CH by the cytochrome P₄₅₀ system, and then metabolized to TCA and TCE. The production rate of TCA is greater than that of TCE due to the intracellular NAD/NADH ratio.

B: The production rate of TCE is increased compared to TCA by the coexistence of the isopropyl alcohol (IPA), where NADH is produced by the oxidation of isopropyl alcohol. The change in size of the NADH pool is considered to cause conversion of the ratio of TCEL metabolites.

において抑制される事実が得られた。Sellersら¹⁶⁾は、CHが飲酒による酪酐状態を強めるという現象に注目し、CHがエタノールからアセトアルデヒドの代謝を抑制することを報告している。さらに、Sellersらは、CHのエタノール酸化抑制機構が、CHの代謝産物であるTCEによるADH代謝阻害作用によるものであることを報告している。IPAが、同じくADHにより酸化され、アセトンに変換されることを考えるならば、本実験結果におけるCHのIPA代謝抑制機構も、主として、TCEによるADH阻害作用によるものと思われた。しかしながら、本実験結果からは、その断定をすることができない。

以上より、IPAがTCEL代謝に影響を与え、また、TCELの中間代謝産物のCHがなんらかの機構によって、IPA代謝に影響を与えることが示唆された。

結 語

ラットの灌流肝臓を実験モデルとして、TCELとIPAの代謝における相互作用を検討した。その結果、IPAは細胞内NADHレベルを高めることにより、TCELの代謝産物比(TCA/TCE比)を変化させ、またTCELはIPAのアセトンへの代謝を抑制することが判明した。

本研究は文部省科学研究費(課題番号05454224)の補助を受けた。

文 献

- 1) Sittig, M.: Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals, pp. 672-675, Noys Publications, Park Ridge, New Jersey (1981).
- 2) World Health Organization: Environmental Health Criteria 50. Trichloroethylene, World Health Organization, Geneve (1985).
- 3) Sittig, M.: Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals, pp. 397-399, Noys Publications, Park Ridge, New Jersey (1981).
- 4) Waters, E.M., Gerstner, H.B. and Huff, J.E.: Trichloroethylene. I. An overview, J. Toxicol. Environ. Health, **2**, 671-707 (1977).
- 5) Ikeda, M., Miyake, Y., Ogata, M. and Ohmori, S.: Metabolism of trichloroethylene, Biochem. Pharmacol., **29**, 2983-2992 (1980).
- 6) Shultz, J. and Weiner, H.: Alteration of the enzymology of chloral hydrate reduction in the presence of ethanol, Biochem. Pharmacol., **28**, 3379-3384 (1979).
- 7) Kimbrough, R.D., Mitchell, F.L. and Houk, V.N.: Trichloroethylene: an update, J. Toxicol. Environ. Health, **15**, 369-383 (1985).
- 8) Kawamoto, T., Hobara, T., Kobayashi, H., Iwamoto, S., Sakai, T., Takano, T. and Miyazaki, Y.: The metabolite ratio as a function of chloral hydrate dose and intracellular redox state in the perfused rat liver, Pharmacol. Toxicol., **60**, 325-329 (1987).
- 9) Abshagen, U. and Rietbrock, N.: Zum mechanismus der 2-propanoloxydation. Interferenzversuche mit niederen aliphatischen alkoholen in vivo und an der isoliert perfundierten rattenleber, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., **265**, 411-424 (1970).
- 10) Nordmann, R., Ribiere, C., Rouach, H., Beauge, F., Giudicelli, Y. and Nordmann, J.: Metabolic pathways involved in the oxidation of isopropanol into acetone by the intact rat, Life Sci., **13**, 919-932 (1973).
- 11) Takano, T., Miyazaki, Y. and Motohashi, Y.: Interaction of trichloroethane isomers with cytochrome P-450 in the perfused rat liver, Fundam. Appl. Toxicol., **5**, 353-360 (1985).
- 12) 高野健人, 宮崎良文, 本橋 豊: ラット灌流肝臓をもちいた環境中化学物質による細胞内代謝動態変化の観察方法—灌流肝臓における呼吸鎖チトクローム類, チトクロームP₄₅₀, カタラーゼの可視域スペクトル変化, および還元型ビリジンスクレオチドの蛍光変化の経時的同時測定, 日衛誌, **38**, 649-656 (1983).
- 13) Humbert, B.E. and Fernandez, J.G.: Simultaneous determination of trichloroacetic acid and trichloroethanol by gas chromatography, Int. Arch. Occup. Environ. Health, **36**, 235-241 (1976).
- 14) 日本薬学会: 衛生試験法・注解, pp. 1097-1098, 金原出版, 東京(1980).
- 15) Bucher, T., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. and Sies, H.: State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate/pyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver, Eur. J. Biochem., **27**, 301-317 (1972).
- 16) Sellers, E.M., Lang, M., Koch-Weser, J., LeBlanc, E. and Kalant, H.: Interaction of chloral hydrate and ethanol in man. I. Metabolism, Clin. Pharmacol. Ther., **13**, 37-49 (1972).

(受付 1993年7月13日 受理 1993年9月27日)