短 報

オルトリジン (3,3'-ジメチルベンジジン)
の尿中代謝物とその変異原性Urinary Metabolites of *o*-Tolidine (3,3'-dimethylbenzidine) and Mutagenicity
of the Metabolites

膀胱がんの起因物質として知られているベンジジン (BZ) は、現在労働安全衛生法によって製造使用が禁止されている。しかしこれと化学構造が類似した物質のなかには動物実験で腫瘍形成作用のみられるものが少なくない¹⁾。

著者^{2,3)}はさきに BZ それ自身の変異原性はそれほど強くないにもかかわらず、それをラットに経口投与した尿のエーテル抽出物がきわめて強い変異原活性を示すこと、またこの現象が主として BZ の N アセチル代謝物に起因していると考えられることをみいだしているが、特化則第1類物質であるオルトリジン (*o*-tolidine, or 3,3'-dimethylbenzidine, 以下 DMBZ と略) についても同様の検討を試みたのでその成績を報告する。

実験材料および実験方法

検体: DMBZ は和光純薬特級試薬を使用した。BZ, DMBZ の誘導体である N-acetylbenzidine (N-AcBZ), N, N'-diacetylbenzidine (N, N'-AcBZ), 3,3'-dimethyl-N-acetylbenzidine (N-AcDMBZ), 3,3'-dimethyl-N, N'-diacetylbenzidine (N, N'-AcDMBZ) は著者らの研究室において合成されたものを使用した。

動物: 生後ほぼ12週、体重約300gのSprague-Dawley雄ラット (試験群, 対照群各4匹) を使用した。

尿試料の作成: DMBZ をアラビヤゴムに懸濁させ、ラット1匹につき50mg/kgの割合で経口投与し、絶食させたとえ24時間中に得られた尿を採取、pHを7に修正し、エーテル抽出を行なって得られた抽出物を全4匹について集め試験試料とした。同時に化学物質の投与を行なわないラットから同様に得られた尿抽出物を、対照試料として実験に供した。

変異原性試験: DMBZ, N-AcBZ, N, N'-AcBZ, N-AcDMBZ, N, N'-AcDMBZ および前記エーテル抽出物はいずれもこれを dimethyl sulfoxide に溶解し、*Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100, PCB 誘導による S9mix を用い、プレインキュベーション法による Ames test を試みた⁴⁾。

尿抽出物の分析: 前記尿抽出物の一部をエタノールに

Fig. 1. Gas chromatogram of urine extract of a rat treated with DMBZ.

A: DMBZ, B: N-AcDMBZ, C: N, N'-AcDMBZ
Gas chromatograph: Hewlett-Packard 5840 A equipped with flame ionization detector and nitrogen-phosphorous detector; Column: 3 feet $\times$ 2 mm i.d. glass column arranged for on-column injection and packed with OV-17 on 80/100 mesh Chromosorb W (AW-DMCS); Oven temperature: 150 $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C, at 6 $^{\circ}$ C/min; Carrier: Nitrogen at 18 ml/min

溶解させ、ガスクロマトグラフィーによる分析を行なった。

実験結果および考察

DMBZ, および DMBZ 投与ラット尿抽出物それ自身を試料として実施した Ames test の結果を Table 1 に示した。表示のごとく DMBZ の変異原性は TA 98+S9 の場合にみられるが、尿抽出物は TA 98, TA 100 の両株に対し、direct mutagen としての作用もあること、しかし S9mix の存在下でより強い変異原活性を示すことが知られた。

Fig. 1 に GC 分析による DMBZ のクロマトグラムを示した。尿抽出物のなかに DMBZ のほか、DMBZ の代謝物として N-AcDMBZ, N, N'-AcDMBZ の検出できることが証明された。

Table 2 は N-AcDMBZ, N, N'-AcDMBZ の変異原性を、N-AcBZ, N, N'-AcBZ と対比して示したものである。N-AcDMBZ, N, N'-AcDMBZ はいずれも変異原性を示すが、その強さには N-AcDMBZ > N, N'-AcDMBZ の関係が認められる。

BZ の代謝経路として Morton⁵⁾ は BZ $\rightarrow$ N-AcBZ $\rightarrow$ N, N'-AcBZ $\rightarrow$ N-hydroxy-N, N'-diacetylbenzidine $\rightarrow$ nucleic acid binding の変化を想定しているが、DMBZ に関してはまったくこのような知見が得られていない。

Table 1. Mutagenicity of *o*-tolidine and urine extracts of rats treated with *o*-tolidine.

Test Sample	Dose (μ g/plate)	His ⁺ revertants per plate ^a			
		TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 -S9	TA100 +S9
<i>o</i> -Tolidine	0	22	26	145	157
	50	20	128	156	187
	100	17	187	149	192
	200	19	246	146	214
UE-Control ^b	200	24	25	132	136
UE-DMBZ ^c	50	269	524	202	216
	100	442	1,149	276	290
	200	262	1,482	332	552

a: Average of two separate experiments.

b: Urine extract obtained from a rat to which no chemical was given.

c: Urine extract obtained from a rat to which *o*-tolidine (DMBZ) was given.Table 2. Mutagenicity of urinary metabolites of *o*-tolidine in comparison with that of benzidine metabolites.

Test Sample	Dose (μ g/plate)	His ⁺ revertants per plate ^a			
		TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 -S9	TA100 +S9
3,3'-Dimethyl-N-acetylbenzidine (N-AcDMBZ)	10	26	740	138	330
	50	19	1,206	147	696
	200	29	3,372	153	1,180
3,3'-Dimethyl-N,N'-diacetylbenzidine (N,N'-AcDMBZ)	10	22	150	138	133
	50	19	401	141	209
	200	35	510	142	212
N-Acetylbenzidine (N-AcBZ)	10	20	814	142	272
	50	18	2,463	127	870
	200	29	3,982	143	1,456
N,N'-Diacetylbenzidine (N,N'-AcBZ)	10	20	541	134	255
	50	18	1,771	128	898
	200	21	3,200	144	1,226
Control ^b	-	25	29	137	145

a: Average of two separate experiments.

b: Average of control data for each chemical.

しかし実験結果から DMBZ についても代謝経路として、N-acetylation→N,N'-diacetylation の変化のあることが推定される。またNアセチル体代謝物の変異原性が S9mix の存在下で示されていることは、BZ 代謝物の場合と同様、肝ミクロゾーム中の mixed-function oxidase によるN水酸化の過程をへて変異原活性が示されるものと考えられる^{2,3)}。

尿抽出物が S9mix の有無にかかわらず変異原性を示すことは、N-AcDMBZ, N,N'-AcDMBZ 以外に変異原活性を示す物質がこのなかに含まれていることを示すものであるが、いずれにせよ尿中に強い変異原活性物質が認められること、また代謝物を GC 分析によって検出することは、DMBZ の代謝や発がん性について示唆に

とむ知見をあたえるだけでなく、DMBZ 取扱者の健康管理にとっても裨益するところが少なくないと考えられる。

BZ 類似物質取扱い時の管理として、作業環境管理、作業管理が重要であることは論をまたないが、これをチェックする手段として有機溶剤暴露の指標として利用される機会の多い尿中代謝物の測定が、同じ意味において考慮されてしかるべきであろう。

しかし尿試料が細胞診に用いられることはあっても、このような目的のために供せられる機会はこれまでほとんどなかったといってよい。DMBZ の N アセチル体を尿中代謝物として同定しえたことは、その測定を通じて作業者の暴露状態を知り、健康管理に役立たせうる端緒が示されたものとみなすことができよう。

文 献

- 1) Haley, T. J.: Benzidine revisited: A review of the literature and problems associated with the use of benzidine and its congeners, Clin. Toxicol., 8: 13-42, 1975.
- 2) 田中健一: ベンジジン系色素投与ラット尿の変異原性について, 産業医学, 22: 194-203, 1980.
- 3) Tanaka, K., Marui, S. and Mii, T.: Mutagenicity of extracts of urine from rats treated with aromatic amines, Mutat., Res., 79: 173-176, 1980.
- 4) 矢作多貴江: 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, 20: 1178-1189, 1975.
- 5) Morton, K.C., King, C. M. and Baetcke, K. P.: Metabolism of benzidine to N-hydroxy-N,N'-diacetylbenzidine and subsequent nucleic acid binding and mutagenicity, Cancer Res., 39: 3107-3113, 1979.

田中健一

東レ滋賀病院

Ken-ichi TANAKA

Toray Shiga Hospital, 7-35, Sonoyama 2-chome, Otsu, 520 Japan

昭和55年7月21日受付

通信先: 田中あて, Reprint requests to K. Tanaka