学会賞受賞論文

(奨励賞)

DBCP の毒性に関する代謝的研究

加藤 保 博

(財)残留農薬研究所化学部

Physiological and Biochemical Metabolic Study Related to
DBCP-induced Hepatic Necrosis in Rats

Yasuhiro KATO

Division of Chemistry, Institute of Environmental Toxicology,
Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187, Japan

The physiological and biochemical metabolic fate of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) was studied in relation to the mammalian toxicity of the chemical. On oral administration of ^{14}C -DBCP to male rats at 20 to 400 mg/kg which was the lethal dose causing death in 24 hr with a severe necrotic lesion in the liver and kidney (inner cortex), the ^{14}C at all dose levels maldistributed in these target organs (and the target organ site). Radioactive material covalently bound to proteins was the predominant radioactive component in these target organs and dose-dependently increased with a concomitant severe depression of hepatic glutathione (GSH). Formation of ^{14}C -urea which implies a *de novo* synthesis of ^{14}C -labeled proteins and nucleic acids via the C_1 -pool was not detected. Alkylating potential of DBCP was evidenced by *in vitro* binding experiments in which ^{14}C -incorporation into the liver-9,000 g supernatant and microsomal (*ms*) proteins required an oxidative metabolic transformation of DBCP by *ms*-cyt P_{450} enzyme system, but this was not dependent on the protein synthesis. Low molecular-weight SH compounds such as GSH prevented the alkylation of the macromolecules; however, no prooxidant action indicating involvement of a DBCP-free radical was detected. A low concentration of 1,1,1-trichloro-propane-2,3-oxide, an inhibitor of *ms*-epoxide hydrolase, stimulated the alkylation of the macromolecules. Thus, DBCP was concluded to be oxidatively converted into a reactive epoxide(s) and covalently bound with the nucleophilic sites of the cellular macromolecules *in vitro* and *in vivo*. Investigations on the toxicological and metabolic alterations after pretreatment (*ip*) of rats with phenobarbital, SKF-525A, and GSH demonstrated that the severity of the necrotic lesion in the centrilobular hepatocytes induced by 400 mg/kg of DBCP was closely dependent on the alkylation of the hepatic macromolecules.

はじめに

殺線虫用土壌燻蒸剤として 1955 年から最近まで長期にわたって世界的に広く用いられてきた 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) の製造工場労働者の間から、精子形成障害による不妊化が検出されたとの D. Whorton らの報告 (1977)¹⁾ は多くの毒性関連研究者の注目を集め、今日までにその毒作用として急性肝細胞壊死、

細胞壊死を含む腎障害^{2,3)}, 異常形態精子の産生と精子数減少を伴う精子形成障害²⁻⁴⁾, 胃扁平上皮癌, 乳腺癌^{5,6)}, 肺癌⁷⁾ をラットを含む各種実験動物で誘発することが知られている。また, DBCP には遺伝毒性もあり, バクテリア DNA に作用して (*E. coli* pol A_1^-)⁸⁾ 塩基交換型の突然変異を起こす⁹⁻¹⁰⁾ とともにヒト精子¹¹⁾, ラット精原細胞ならびに骨髓細胞¹²⁾ で染色体異常 (*in vivo*) を誘起し, さらにラットに対して優性致死作用を有する^{13,14)}

など顕著な毒性が明らかにされてきた。筆者らは安全性評価の一環として行なわれる哺乳動物を用いての農薬の代謝研究では薬物代謝動態の毒性学的な意味を明らかにすることが重要と考え、本研究では作用とより直接的な結びつきが得られると思われる標的臓器中での薬物の存在形態解明に重点を置いて、DBCP のラットにおける代謝動態の特性と毒性発現との関連を生理生化学的に明らかにすることを目的とした。以下はその概要である。

¹⁴C-DBCP の雄ラットにおける一般動態^{15,16)}

Wistar 系成熟雄ラットに LD₅₀ 値^{2,8)} の約 1/15 に相当する 20 mg/kg の ¹⁴C-DBCP を 1 回経口投与し、尿、糞、呼吸中への排泄、体内分布と組織保持性、胆汁排泄などを調査した。

1. 体外排泄と胆汁排泄

14 日間投与量の 51, 21, 18% がそれぞれ尿、糞、呼吸中に排泄された。呼吸中からは微量 (0.03%/48 時間) の未変化物も検出されたが、大部分 (>89%) は 3 位 ¹⁴C の脱炭酸による ¹⁴CO₂ であった。尿中には 8 種類以上の放射性代謝物が含まれるが有機溶媒転溶可能な成分、または XAD-2 樹脂に吸着されうる成分は 10% 以下でしかなく、尿中 ¹⁴C の約 70% を占める主成分はセファデックス G-10 によるゲルクロマトグラフィーと *tlc* の結果から、グルタチオン (GSH) よりも分子量の大きな複数 (4 種) の抱合体と考えられた。糞中への排泄は活発な胆汁排泄に起因するものであり、投与 24 時

間後までの実測値 (22.7%) と排泄速度定数から求めた胆汁中への総排泄量 (39%) はいずれも糞排泄量の 1.6 から 1.8 倍に相当し、DBCP の吸収率が 100% に近いこと、DBCP が肝臓で代謝抱合化され、一部は腸肝循環していることを示していた。GSH をアルキル化し、GSH 抱合体を形成する薬剤では抱合体生成量に対応して肝 GSH 量が低下することが知られているが¹⁷⁾、DBCP 投与ラットでも肝 GSH は投与 6 時間後には対照区の約 80% に低下しており、胆汁排泄物と尿中から検出された抱合体は GSH 関連抱合体であろうと推定された。

2. 体内分布と組織保持性

大部分の臓器、組織における放射性成分の濃度とその半減期は血漿中のそれらを上回っており、全 ¹⁴C で見た場合、実質組織への高い分布性と貯留性が認められた。最も高い ¹⁴C 分布の認められる臓器は急性毒性主標的臓器である肝臓で、体内総残存量 (消化管内残存量を除く) の 35 (6 時間後) ~ 45% (48 時間後) が分布した。腎臓はこれに次ぐ臓器で、腎臓薬物代謝酵素系 (cyt. P₄₅₀) の局在部位であり^{18,19)}、また DBCP による臓器内主障害部位となる皮髄境界部への ¹⁴C 局在が全身オートラジオグラフィーから判明し、標的臓器中の薬物代謝と臓器内放射性残存量、毒性発現との関連が注目された。

組織残留物と高分子結合 (アルキル化)

1. 蛋白など細胞内高分子成分への ¹⁴C 取込み *in vivo*^{15,16)}

全 ¹⁴C の主要分布臓器である肝臓、腎臓と、長い ¹⁴C 半減期を示す脂肪組織、赤血球、精巣、ならびに血漿中の放射性残留物を、1) 未変化物、2) 各種有機溶媒 (70% メタノール、アセトン、酢酸エチル) で抽出可能な未変化物を含む可溶性成分、ならびに、3) 残渣成分に分け、組織残留物中に占めるそれらの割合と減衰性をまず調査した。Fig. 2 はその結果であり、脂肪組織中の放射性成分ならびに脂質成分がほぼ定量的に抽出される条件下で肝臓、腎臓、精巣、赤血球などでは可溶性成分と比較してより長い半減期を有する放射性残渣成分が組織残留物の主体を占めており、その生成は投与 6 時間以内に最大となることが判明した。一方、これらの臓器組織中で未変化物の占める割合は DBCP のラットにおける主貯留臓器と判定された脂肪組織と初期 (投与 6 時間後) の赤血球を除けば、投与 6 時間後においても 0.4 (精巣) ~ 0.08% (血漿) のごく低レベルであり、またその減衰性は肝臓で最も高く (6 時間後: 0.034 ppm, 24 時間後: 0.001 ppm)、¹⁴C-DBCP が肝臓を中心とする組織で放

Fig. 1 Sephadex G-10 gel filtration of hydrophilic components of rat urine.

Urine collected for 48 hr from rats orally treated with 20 mg/kg of ¹⁴C-DBCP was passed through an XAD-2 resin column. Aqueous eluate was concentrated by lyophilization and charged onto the Sephadex G-10 column (2.6 cm id. × 45 cm). Elution solvent and flow rate: 0.5 ml/min of water.

Fig. 2 Formation of "bound ^{14}C " unextractable with organic solvents after a single oral dosing of ^{14}C -DBCP (20 mg/kg).

Upper: "non-bound" components per tissue total ^{14}C .

Lower: content of the "bound ^{14}C " (—) and the "non-bound ^{14}C " (---).

⊗: Adipose tissue, ⊙: Blood cells, ●: Kidney, ◐: Liver, ○: Plasma, ⊕: Testes.

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 4 rats.

放射性残渣にまで急速に代謝されることを示唆していた。この有機溶媒不溶性残渣の実体に関する分析は投与 24 時間後の赤血球、肝臓、ならびに腎臓を用いて行なわれた。赤血球放射活性の 59% はヘモグロビン分画に分布しており、さらにその 68% はトリクロロ酢酸 (TCA) 不溶かつ、メタノール、アセトン、ジクロロメタンなどの有機溶媒還流抽出不能なグロビン分画から回収され、放射性ヘモグロビン蛋白の生成が明らかであった。肝臓ならびに腎臓中の残留物については臓器中の残存血液を除去したそれら臓器ホモジネートのセファデックス G-10, G-50 によるゲル濾過とプロテアーゼ処理による影響を調査した。その結果、これら臓器中の放射性成分の約 60% はプロテアーゼによる加水分解を受けて mol wt 数百以下にまで低分子量化されうる mol wt 数万以上の蛋白であることが明らかとなった。またこのプロテアーゼ処理に伴う蛋白からの ^{14}C の消失が、化学結合以外以外の力で蛋白鎖中に巻き込まれたり吸着されていた低分子放射性成分の蛋白加水分解に伴う脱離によるもので

なく、蛋白の一次構造が放射化されていたことに帰因していることはプロテアーゼ加水分解物中の ^{14}C がジニトロフェニル化後のみ酸性下でエーテル転溶可能となることから確認された。蛋白以外的高分子量成分に関しては肝 DNA を調査したが、単離 DNA (OD 260 nm: OD 230 nm: OD 280 nm=1.000: 0.502: 0.498) から回収された ^{14}C は有意ではあったが低レベルでしかなかった (肝臓 ^{14}C の 0.03%)。しかし、フェノール法を基本とした DNA 単離の過程で 2 回のプロナーゼ処理を 1 回とし、また RNase 処理を省いて得た粗 DNA 標品 (OD 260 nm: OD 230 nm: OD 280 nm=1.000: 0.672: 0.554) からは 1.4% の ^{14}C が回収され、クロマチンのレベルでは比較的高い ^{14}C 取込みの起きている可能性が示唆された。

以上記したように 3- ^{14}C -DBCP のラットにおける代謝動態の最大の特徴は肝臓、腎臓など毒性標的臓器中で蛋白を主体とする細胞内高分子成分への ^{14}C 取込みが認められることである。この高分子量成分放射化の機構に

Table 1 TCA-insoluble radioactive macromolecular residues in the liver and kidney.

Fraction	Radioactivity recovered (% of 3,000 g supernatant)	
	Liver	Kidney
3,000 g supernatant	100	100
Sephadex G-10 BDF ^{a)} ...(A)	79.8	82.0
Sephadex G-50 BDF ^{a)}	62.1	60.3
TCA- and organic solvents-insoluble residues of A...(B)	59.9	50.8
Sephadex G-10 BDF ^{a)} of protease hydrolysate prepared from B ^{b)}	<2	<2

Blood-removed tissues collected 24 hr after dosing (20 mg/kg of ¹⁴C-DBCP) were homogenized and centrifuged at 3,000 g for 10 min.

^{a)} Blue dextran fraction through Sephadex G-10 or G-50 columns.

^{b)} TCA- and organic-solvents insoluble residue prepared from Sephadex G-10 BDF was digested by protease and again gel-filtrated through Sephadex G-10 column.

Values are mean of 3 experiments.

ついては、1) DBCP の3位 ¹⁴C が C₁ プールを経て蛋白などに再合成された、2) DBCP から活性化代謝物が生成され、これが既存蛋白などに不可逆的に共有結合(アルキル化)した、との二つの可能性が考えられたが、アルキル化能を有する薬剤に共通して見られる肝 GSH レベルの低下があり、また C₁ プールを経た場合に生成される放射性尿素²⁰⁾が DBCP の場合検出されない(投薬量、200 mg/kg の 0.2% 以下、Fig. 3) ことから後者の機構、すなわち活性化代謝物によるアルキル化の可能性

Fig. 3 Tlc autoradiograms of urinary excreta. Sample: methanol extracts from the lyophilized 0-24 hr urine of rats dosed with 200 mg/kg of ¹⁴C-DBCP.

Tlc plates: precoated silica gel 60F₂₅₄ (0.2 mm gel thick, E. Merck).

Solvent systems: A) butanol-ethanol-acetic acid-water (8:2:1:3, v/v), B) isopropanol-chloroform-methanol-water (10:10:5:2, v/v).

が高いと推定された。

2. *in vitro* 試験系による蛋白など高分子成分アルキル化と活性化代謝物の検索^{16,21)}

in vivo 実験で推定された DBCP の高分子アルキル化能を検討し、活性化代謝物を決定するためラット肝 9,000 g 上清分画とマイクロゾーム (*ms*) を用いて *in vitro* 蛋白結合実験を行なった。

TCA ならびに有機溶媒不溶ラット肝 9,000 g 上清蛋白への ¹⁴C 取込みは mixed function oxidase (*mfo*) による代謝活性化を要求し、NADPH で促進され、sesamex によって抑制されたが、ラット肝 peptidyl transferase 阻害剤である十分量の puromycin の影響を受けないことから明らかに蛋白合成に対する依存性はなく、*in vitro* における蛋白への ¹⁴C 取込みが既存成分への活性化代謝物の結合、すなわちアルキル化に起因していることが判明した。*ms* による実験ではこの結論を再確認するとともに、GSH、システイン (Cys)、ジエチルジチオカルバミン酸 (DEDTC) など低分子量 SH 化合物の高分子結合抑制効果と *ms*-epoxide hydase 阻害剤である 1,1,1-trichloropropane-2,3-oxide (10 μM) による促進効果が検出され、高分子成分アルキル化能を有する活性化代謝物として epoxide(s) の生成が判明した。なお、DEDTC の抑制効果から示唆される ¹⁴C-フリーラジカルの関与については DBCP 活性化代謝物が生成され、高分子成分のアルキル化が起こる NADPH 添加肝 9,000 g 上清系と肝ホモジネートの二つの試験系で DBCP と CCl₄ の脂質過酸化能を TBA 法によって比較したが CCl₄ とは対照的に DBCP からは何ら有意のプロオキシダント効果も検出されなかった。このため、肝 *ms*-cyt. P₄₅₀ による酸化的代謝によって生成される蛋白アルキル化能を有する活性化代謝物としてフリーラジカルが関与している可能性は低く、*in vitro* における活性化代謝物の主体は epihalohydrin などと推定される epoxide(s) であり、*in vivo* における高分子量成分への ¹⁴C 取込みも *in vitro* と同様、epoxide(s) によるアルキル化が主因であると考えられた。また、組織内の主要な低分子量 SH 化合物である GSH の抑制効果は epoxide(s) と非酵素的に結合することによってもたらされたものと考えられることから、高分子成分アルキル化サイトは蛋白の SH 基など親核性残基と推定された。

高分子アルキル化と急性肝細胞壊死²²⁾

1. 薬量相関

蛋白など高分子成分アルキル化の毒性的意義、とくに肝臓、腎臓での細胞壊死につながる急性毒性との関連を

← Photo. 1 The liver and kidney 18 hr after oral treatment of male rats with 400 mg/kg of DBCP.

Liver: Swelling with hemorrhage and white spots in the hepatic lobules, Kidney: White spots in the inner cortex.

Photo. 2 ^{14}C -Distribution 6 hr after oral treatment of male rats with 200 mg/kg of ^{14}C -DBCP.

Photo. 3 Effects of pretreatments of rats with phenobarbital (PB), SKF-525A, and glutathione (GSH) on 400 mg/kg of DBCP-induced necrotic lesion in the centrilobular hepatocytes.

Centrilobular acidophilic degeneration in the hepatocytes with single cell necrosis induced by DBCP (control) was enhanced by PB (massive necrosis with hemorrhage) and weakened by SKF-525A and GSH pretreatments. Animals were killed 9 hr after the DBCP dosing and sections of liver were stained with hematoxylin and eosin. ($\times 100$) 1: Control, 2: SKF-525A, 3: PB, 4: GSH.

Table 2 Irreversible covalent binding of ^{14}C -DBCP with microsomal proteins *in vitro*.

Incubation mixture		Bound radiocarbon (nmol bound/60 min/3 mg protein)	
Basic system		0.498±0.053	100%
— native microsome (boiled)		0.012±0.009**	2%
— NADPH generating system		0.016±0.010**	3%
— oxygen (under nitrogen)		0.275±0.031**	55%
+SKF 525A	0.1 mM	0.168±0.024**	34%
	1.0 mM	0.028±0.011**	6%
+puromycin	0.1 mM	0.514±0.058	
	1.0 mM	0.453±0.034	
+ glutathione		0.126±0.016**	25%
+ cysteine		0.188±0.021**	38%
+ trichloropropene oxide			
	0.01 mM	0.617±0.042**	124%
	0.1 mM	0.482±0.063	
	1.0 mM	0.360±0.027**	72%
+ DEDTC		0.151±0.055**	30%

The basic system (1 ml) contained rat liver microsomes (3 mg protein/ml); Tris-HCl buffer, pH 7.4 (100 mM) ^{14}C -DBCP (0.24 μmol); NADPH-generating system. Reaction was started by the addition of substrate in 20 μl ethanol and incubated under air for 60 min with shaking at 37°C.

Values are mean $\pm$ S.D. ($n=6\sim 12$), ** $p<0.01$.

Table 3 Failure of DBCP to exhibit a pro-oxidant effect *in vitro*.

Incubation mixture		MDA ^{a)} ($\mu\text{mole}/\text{eq. gram fresh liver}$)	
		30 min ^{b)}	60 min ^{b)}
Without NADPH		0.014±0.009	0.036±0.013
Basal mixture		0.022±0.008	0.043±0.019
+DBCP	0.2 μl	0.028±0.008	0.044±0.017
	1 μl	0.026±0.009	0.049±0.013
	5 μl	0.029±0.007	0.046±0.014
	10 μl	0.026±0.008	0.042±0.010
+CCl ₄	0.2 μl	0.22±0.02	—
	1 μl	0.31±0.03	0.61±0.17
	5 μl	0.45±0.04	0.84±0.17
	10 μl	0.50±0.08	1.21±0.21

^{a)} Malonic dialdehyde, ^{b)} Incubation time.

Incubation was carried out aerobically at 37°C in 1.15% KCl buffered with 0.2 M phosphate (pH 7.4), supplemented with 10 mM NADPH and rat liver 9,000 g supernatant enzymes from 5 adult male rats (25 mg liver equivalent per a tube). Total volume was 4 ml. MDA was determined by a TBA method. Values are means of 6 experiments ($\pm$ S.D.).

検討するため、20 mg/kg から LD₅₀ 値の約 1.3 倍、400 mg/kg までの経口薬量下での体内分布、標的臓器中の放射性残留物構成、肝 GSH レベルなどの変動をまず調査した。

全身オートラジオグラフィー（投与 6 時間後）による分析では 20 mg/kg と 200 mg/kg の両薬量下における ^{14}C の体内分布パターンは同一であり、肝臓と腎皮髄境界部に高い ^{14}C 分布が見られた。臓器中の ^{14}C 量は薬量

増加に伴って増大するとともに、低薬量時（20 mg/kg）6 時間以内であった peak time も 200 mg/kg 以上の薬量下では 6 時間以降に移った。しかし放射性成分の存在様式とその比率には基本的な変化は見られず、高薬量時（>200 mg/kg）投与 6 時間後の肝臓ならびに腎臓中で組織 ^{14}C 量の 60~70% を占める主成分は低薬量時と同様に高分子結合物であり、その絶対量は投与 6 時間以降の時点で最大となった。肝臓における高分子結合 ^{14}C の薬

Fig. 4 Dose-dependent correlation among hepatic macromolecular binding, DBCP content, and glutathione (GSH) depression 6 hr after oral dosage.

●: Macromolecular binding (microgram equivalents of ¹⁴C-DBCP bound per gram of fresh liver), ○: GSH expressed as percentage of control group, ○: DBCP.

Each point represents mean $\pm$ S.D. of 4 animals.

量に依存した増加はこれに対応した肝 GSH 量の顕著な減少を伴っており、200 mg/kg 以下の薬量では肝 GSH の低下は 24 時間後にはほぼ回復するのに対し、400 mg/kg 薬量下では対照群の約 40% (9 時間後) に低下したまま回復することなく、肝臓と腎臓に顕著な病変 (Photo. 1, 肝臓の腫大化、出血、胞膜面の粗糲化、小葉ごとに白色斑; 腎臓の腫大化と皮髄境界部にリング状の白色斑) を生じて投与 12 時間から 24 時間後の間に動物は死亡した。これらの結果は既述した GSH の役割を支持するものであり、標的臓器中の GSH 貯蔵量または生成能が活性代謝物の不活性化に対応しうるレベル以下にまで低下した場合、高分子アルキル化は急激に高まり、肝臓、腎臓に障害を惹き起こし個体死に至ることを示唆していた。

2. 高分子アルキル化と細胞壊死

高分子アルキル化と個体死、細胞壊死に至る病理変化、組織 GSH レベルとの関連をさらに明確なものとするため、400 mg/kg 薬量化における致死効果 (24 時間内の死亡率)、標的臓器中の GSH レベルと高分子結合量、ならびに病変強度に対して、*in vitro* 実験から *in vivo* で肝臓中の高分子結合量を変動させることが予測されたフェノバルビタール (PB), SKF-525A, GSH の前処理 (または同時処理) の影響を DBCP 投与 9 時間後の

時点で比較検討した。

前処理しない DBCP のみの対照区では投与 9 時間後には流涙が見られるほか貧血状態となり、かなりの衰弱が認められた。また肝臓、腎臓中の GSH レベルも無投与群の約 40% にまで低下するが、死に至るには投与後 12 から 24 時間を要した。PB 前処理は ¹⁴C の体外排泄を高めたが、同時に DBCP による肝臓、腎臓 GSH 低下作用と致死効果を顕著に促進して全個体とも投与 9 時間 10 分後には死亡した。これに対し、SKF-525A ならびに GSH 処理群の個体には対照群で認められた顕著な衰弱、貧血、流涙も見られず、また組織中の GSH レベルの低下も抑制されて LD₅₀ 値以下の 200 mg/kg 投与時に匹敵するレベルを維持して全個体とも 24 時間以上生存するなど顕著な軽減効果が明瞭に認められた。

標的臓器中の放射性残留物については肝臓可溶性成分量はいずれの前処理によっても有意の変動 ($p < 0.05$) を示さなかったが、高分子結合量は PB 処理により 1.3 倍に、SKF-525A または GSH 処理によっておのおの対照区の 77, 73% にと有意に増減した。腎臓では PB 処理により高分子結合量は対照区の 1.7 倍に増加したが、可溶性成分量には有意の変動は認められなかった。一方、SKF-525A ならびに GSH 処理群においては高分子結合量はいずれも対照区の 70~80% に、可溶性成分量は約 1.8 倍にそれぞれ増減した。

組織病理学的検索による 400 mg/kg DBCP 投与 9 時間後の変化は、腎臓 (近位尿細管上皮細胞の顆粒状変性と硝子滴変性) に比べて肝臓で著しく、単一細胞~巣状壊死を伴う小葉中心性の肝細胞好酸性変性が認められた。PB 処理群では障害は顕著に亢進され、肝臓に個体死の原因とされた出血を伴う重度の小葉中心性細胞壊死が見られるようになったほか、腎近位尿細管上皮細胞にも壊死を示す核濃縮が散在的に認められるようになった。一方 SKF-525A 処理群と GSH 処理群の病理変化は肝臓では細胞壊死出現頻度が低下したほか、病変部位も限局化されて軽減効果が認められた。腎臓では GSH 処理群で病変部位が若干限局化される傾向にあったが、しかし両処理群とも対照区との差は不明瞭であった。

以上のように急性肝細胞壊死による DBCP の致死効果ならびに細胞壊死または細胞壊死に至る病変強度には肝 *ms*-cyt. P₄₅₀ 活性と肝 GSH レベルの相方に依存して生成されることが確認された高分子結合 ¹⁴C 量に対する依存性があり、肝 *ms*-cyt. P₄₅₀ で生成された DBCP の活性化代謝物である epoxide(s) によって細胞機能維持に重要な役割を果たしている蛋白など高分子成分の親核性残基がアルキル化されることが DBCP による小葉

Table 4 Effects of metabolic modifiers and glutathione pretreatments on the DBCP-induced mortality, macromolecular binding, glutathione content, and some other indices in male rat target organs 9 hr after a single oral dosing of ^{14}C -DBCP (400 mg/kg).

Index	Control (DBCP only)	Pretreated with		
		Phenobarbital	SKF-525A	Glutathione
No. of deaths	0/4 [4/4] ^{a)}	2/4 [4/4] ^{a)}	0/4 [0/4] ^{a)}	0/4 [0/4] ^{a)}
No. of moribund rats	0/4	2/4	0/4 [0/4] ^{a)}	0/4 [0/4] ^{a)}
No. of rats in debility	4/4	0/4	0/4 [0/4] ^{a)}	0/4 [0/4] ^{a)}
No. of rats with anemia	4/4	4/4	0/4	0/4
No. of rats in lacrimation	4/4	4/4	0/4	0/4
Liver wt./bw. (%)	4.15±0.17	6.42±0.79** (155)	4.64±0.41	3.95±0.22
Kidney wt./bw. (%)	0.45±0.02	0.55±0.07** (123)	0.46±0.03	0.45±0.03
Testes wt./bw. (%)	0.84±0.07	0.98±0.19	0.83±0.05	0.89±0.04
Glutathione (mm)				
in the liver	3.42±0.56	2.35±0.48** (69)	4.50±0.74** (132)	4.65±0.24** (136)
in the kidney	3.08±0.43	2.15±0.45** (70)	3.97±0.41** (129)	3.94±0.23** (128)
ppm equivalent of ^{14}C -DBCP				
Liver t - ^{14}C	179.7±21.8	209.4±34.1** (117)	146.6±24.3	166.3±34.0
bound ^{14}C	92.7±11.2	122.4±17.5** (132)	71.2±4.3** (77)	67.5±10.8** (73)
Kidney t - ^{14}C	122.7±21.1	162.9±32.0	147.7±14.6	154.3±5.6* (126)
bound ^{14}C	65.4±5.5	110.4±7.0** (169)	45.4±12.4** (69)	50.6±2.8** (77)
Testes t - ^{14}C	15.8±3.4	16.1±4.2	16.8±2.1	14.1±1.0
bound ^{14}C	7.4±3.3	8.9±3.5	5.9±1.7	5.2±0.5
% of dose				
Radiocarbon excreted in the urine	7.83	10.56 (134)	3.13 (40)	10.98 (140)

Pretreatments; Phenobarbital: 80 mg/kg/day (i.p.) for 3 days, SKF-525A: 80 mg/kg (i.p.), 30 min before DBCP administration, Glutathione: 75 g/kg (i.p.) 4 times (5 min before and 30, 90, and 180 min after DBCP-dosing).

t - ^{14}C : total radiocarbon level, Bound ^{14}C : covalently bound radiocarbon with macromolecules.

^{a)} Observation at 24 hr after DBCP-administration.

() : % ratio of control value.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Each value represents mean ($\pm$ S.D.) of 4 animals.

中心性肝細胞壊死の原因の一つになっていると考えられた。細胞壊死に至る腎近位尿管部での病変については、投与9時間後での対照区病変が比較的軽度であったことに一部起因する可能性はあるが、PB処理群で病変の亢進に対応した高分子アルキル化が認められたものの、病変強度と高分子アルキル化レベルとは必ずしも対応しておらず、今後の課題として残された。

おわりに

以上、本研究ではDBCPのラットにおける体内動態の最大の特徴である標的臓器中での“Bound ^{14}C ”形成の解明に重点をおいて急性毒性との関連について検討を進め、これが肝細胞壊死に結びつくことを明らかにしたが、この結論をさらに確固としたものにするには、本研

究の中では明らかになしえなかった臓器中可溶性成分組成との関連も含めてさらに生化学的なレベルで研究を進めてゆくことが必要であろう。なお、本研究の中では直接扱わなかった遺伝毒性との関連については、精子染色体異常と優性致死発現には核DNAのアルキル化は直接的な関連を持っておらず、精子核蛋白であるプロタミンのCys残基アルキル化が直接的な原因となるとの興味ある結論がSegaら²³⁾によるethylmethane sulfonateのマウスにおける優性致死発現機序に関する研究から出されており、本研究の中で精巣高分子量成分への ^{14}C 取込みが見いだされるとともに、蛋白アルキル化サイトの一つとしてCysが推定されたことはDBCPの精子染色体分異異常と優性致死発現機序解明にも本研究は足掛りを与えるものとなったといえよう。

なお、本研究の発表とほぼ同時期の 1979 年末に刊行された Jones らの尿中代謝物に関する報告²⁴⁾では、ラット尿中から epihalohydrin, α -halohydrin, glycidol を経て生成されたと考えられる S-(2,3-dihydroxypropyl)-N-acetylcysteine と 1,3-(bis-N-acetylcysteinyl)propane-2-ol が検出、同定されており、epihalohydrin と想定される epoxide(s) が活性化代謝物として生成され、これが蛋白等をアルキル化するという本研究の結論を支持、補完するものとなった。なお、同報告は同時に DBCP による腎障害 (利尿作用, 50 mg/kg *ip.*) の原因として DBCP から生成されるシュウ酸 (カルシウム) の腎臓への沈着を示唆しているが、筆者らの調査では 400 mg/kg (*po*) までのシュウ酸で DBCP (400 mg/kg) 投与 24 時間後の (死亡) 個体腎皮髄境界部に認められる細胞壊死によるリング状白色斑は見られず、DBCP による腎近位尿管上皮細胞壊死がシュウ酸に起因するとする考えには疑問が残る。また、肝障害に関して *ms*-酵素に対する影響を検討した Moody らの報告 (1980)²⁵⁾では DBCP は肝 *ms*-cyt P₄₅₀ に対して I 型の基質結合スペクトルを示し、PB 前処理によって急性致死率が上昇するが、脂質過酸化能は検出されないことを明らかにして、DBCP の肝毒性は *mfo* による代謝活性化に依存するが CCl₄ とは別な型であるとの考えを示し、本研究の結論を支持するものとなった。

末筆ながら本研究の機会をいただき、ご指導を賜った残留農薬研究所後藤真康化学部長、俣野修身同副部長、ならびに本研究遂行にあたって終始ご鞭撻を賜った同研究所白須泰彦毒性部長に深甚なる感謝の意をささげる次第である。また、常に良き共同研究者として本研究を支えていただいた同研究所化学部 RI 代謝研究グループの佐藤清、牧伸一両氏、そして多忙にもかかわらず本研究のため病理鏡検を引き受け、また病理変化に関して有益なるご助言、ご教示をいただいた原田孝則*、三森国男、平野雅裕氏をはじめとする同研究所毒性部第 1 研究室の方々に深く感謝するとともに敬意を表し、栄誉をわかち合いたい。

引用文献

- 1) D. Whorton, R. M. Krauss, S. Marshall & T. H. Milby: *Lancet* **11**, 1259 (1977)
- 2) T. R. Torkelson, S. E. Sadek, V. K. Rowe, J. K. Kodama, H. H. Anderson, G. S. Loquram & C. H. Hine: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **3**, 545 (1961)
- 3) E. V. Faidysh, N. N. Rahnnatullaev & V. A. Vaechvskii: *Med. Zh. Uzbek.* **1**, 64 (1970)
- 4) Ya. B. Reznik & G. K. Spichan: *Gig. Sanit.* **6**, 101 (1975)
- 5) W. A. Olson, R. J. Herbermann, E. K. Weisburger, J. M. Ward & J. H. Weisburger: *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1993 (1973)
- 6) M. B. Powers, R. W. Voelker, N. P. Page, E. K. Weisburger & H. F. Kranzbill: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **33**, 122 (1975)
- 7) G. Reznik, S. F. Stinson & J. M. Ward: *Cancer Lett.* **10**, 339 (1980)
- 8) H. S. Rozenkranz: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **14**, 8 (1975)
- 9) R. W. Biles, T. H. Conner, N. M. Trieff & M. S. Legator: *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**, 301 (1978)
- 10) S. J. Stolzenburg & C. H. Hine: *J. Toxicol. Environ. Health* **5**, 1149 (1979)
- 11) R. W. Kapp, D. J. Piccians & C. B. Jacobson: *Mutat. Res.* **64**, 47 (1979)
- 12) R. W. Kapp, D. J. Picciano & C. B. Jacobson: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **48**, A-46 (1979)
- 13) K. S. Rao, F. J. Murray, A. A. Crawford, J. A. John, W. J. Potts, B. A. Schwetz, J. D. Berek & C. M. Parker: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **48**, A-137 (1979)
- 14) S. Teramoto, R. Saito, H. Aoyama & Y. Shirasu: *Mutat. Res.* **77**, 71 (1980)
- 15) Y. Kato, K. Sato, S. Maki, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **4**, 195 (1979)
- 16) Y. Kato, K. Sato, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **5**, 45 (1980)
- 17) C. F. Chasseaud: "Glutathione," ed. by I. M. Arias & W. B. Jakoby, Ravan Press, New York, p. 80, 1976
- 18) K. Ichihara, S. Kusunose & M. Kusunose: *Biochem. Biophys. Acta* **176**, 704 (1969)
- 19) J. R. Michell, R. J. McMurtry, C. N. Statham & S. D. Nelson: *Am. J. Med.* **62**, 518 (1977)
- 20) J. R. Gillette & L. R. Pohl: *J. Toxicol. Environ. Health* **2**, 849 (1977)
- 21) Y. Kato, O. Matano & S. Goto: *Toxicol. Lett.* **3**, 299 (1979)
- 22) Y. Kato, K. Sato, T. Harada, S. Maki, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **5**, 81 (1980)
- 23) G. A. Sega & J. G. Owens: *Mutat. Res.* **52**, 87 (1978)
- 24) A. R. Jones, G. Fakhouri & P. Gadiel: *Experientia* **35**, 1432 (1979)
- 25) D. E. Moody, B. Head & E. A. Smuckler: *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **3**, 177 (1980)

* 現在: 残留農薬研究所水海道研究所毒性部第 1 研究室主任