個体毒性の検証に基づく *in vitro* 簡易毒性評価系の確立

市 川 和 洋* 鄭 然 孫* 内 海 英 雄*

In Vitro Bioassay System Closely Related to Whole Body Toxicity

Kazuhiro ICHIKAWA*, Youn-Son CHUNG* and Hideo UTSUMI*

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-82 Japan

Abstract

For *in vitro* bioassay system to evaluate water environment, it may be important to correlate *in vitro* data closely to whole body toxicity. In order to establish the evaluation system for *in vitro* bioassay, we focused on oxidative stress and investigated toxicities of organic halogenated compound using both *in vitro* micronucleus test and *in vivo* hepatic injuries test.

Micronuclei formation of HeLa cells was induced by chlorophenols and the induction was enhanced with addition of S9mix. The enhancement was inhibited by scavengers of hydrogen peroxide, hydroxyl radical or superoxide radical, indicating that micronuclei formation of HeLa cells was induced by oxidative stress which was caused with metabolites of chlorophenols.

Oral treatment of 2,4,6-trichlorophenol or carbon tetrachloride increased the amount of serum GOT. *In vivo* free radical reactions which were estimated with *in vivo* ESR technique were also enhanced specifically in upper abdomen, indicating that metabolites of these compounds caused liver injuries through oxidative stress.

The present study demonstrated the evaluation system of *in vitro* and *in vivo* bioassays concerning oxidative stress caused with organic halogens. *In vitro* bioassay system will be more valuable and reliable, comparing *in vitro* data with *in vivo* one using indices of same mechanism of toxicity.

Key words: *in vitro* micronucleus test, electron spin resonance, whole body toxicity, organic halogenated compound

1. はじめに

我々を取りまく環境水は微量かつ多種の物質により汚染され続けているが、その膨大な物質種の中で毒性評価がなされているものはごく一部に過ぎない¹⁻³⁾。また、これら微量汚染物質の環境中での変化体生成、およびその毒性についてはほとんど知見が得られていない。

これらの微量環境汚染物質による毒性を総合的に評価するためにバイオアッセイ、特に簡易毒性評価法の利用が考えられている⁴⁾。簡易毒性評価手法は、簡便性・定量性等の利点⁵⁻⁷⁾を持つが、得られる毒性値と個体での毒性発現との間に必ずしも相関が見られないことが問題視されている。例えば、Table 1 に示すようにベンゼン類のラット急性毒性値とコロニー形成阻害試験の結果との間に相関は見られない。また極端な例であるが、強い神経毒性物質である有機リン系農薬 DDVP は、初代培養肝細胞を用いたアルブミン合成阻害試験では弱い毒性しか検

出されなかった⁸⁾。これは、DDVP はアセチルコリンエステラーゼを阻害する神経毒性物質であり⁹⁾、用いた簡易評価系は肝細胞のアルブミン合成能を指標としていることに依ると考えられる。すなわち、物質毎に標的臓器や毒性発現機序は異なることから、簡易毒性評価手法の毒性学的意義を明示するためには、Fig. 1 に示すように簡易毒性評価系に用いる細胞の由来と毒性指標はできる限り一致させ、毒性発現機序に着目した簡易毒性評価系を作成した上で、同一機序による個体毒性との相関性を検証するシステムを構築することが必須である。

ところで、近年環境汚染物質の毒性発現の主要原因として活性酸素・フリーラジカルが注目を浴びている¹⁰⁾。例えば、タバコ煙成分¹¹⁾、パラコート¹²⁾等の農薬類、紫外線¹³⁾等による健康障害はフリーラジカル反応が関与し生体に酸化ストレスを惹起することによるものと報告されている。この酸化ストレスを生物個体で無侵襲的に評価する方法として、我々はマウスやラットなどの齧歯類を材料

* 九州大学薬学部薬品物理化学教室 〒812-82 福岡市東区馬出 3-1-1

Table 1 *In vivo* and *in vitro* toxicities of chemical compounds

	Rat oral LD ₅₀ (mg · kg ⁻¹)	IC ₅₀ (mM) ^{a)}	IC ₅₀ (ppm) ^{b)}
Benzene	930.0	2.47	
Chlorobenzene	2290.0	2.47	
o-Dichlorobenzene	500	1.33	
p-Dichlorobenzene	500	1.01	
Ethylbenzene	3500.0	0.98	
Toluene	5000.0	2.53	
1,3-dichloropropane	250-500		
Tetrachloroethylene	8850		
Carbon tetrachloride	5630-9770		
Pentachlorophenol	210	0.07	
Chlornitrofen	10800		1.1
Chlorothalonil	>10000		10.2
Chlorpyrifos	135-163		1.1
DDVP	56-80		761.1
Simazine	>5000		3.0
Benthiocarb	130		9.1

a) IC₅₀ values from colony formation inhibition test using L-929 cell line.

b) IC₅₀ values from albumin secretion inhibition test using primary cultured rat hepatocytes

Fig. 1 Strategy of this study

とした生体計測電子スピン共鳴分析法 (ESR) を開発してきた。この方法は体外からニトロキシドラジカルをプローブとして投与し、生体内での部位毎でのラジカル減衰速度を求めることで、種々の酸化ストレスにより惹起される生体内フリーラジカル反応を評価するもので、種々のモデル動物で酸化ストレスの病態への関与を検討してきた¹³⁻¹⁶⁾。

そこで本研究では、毒性発現機序として酸化ストレスに着目し、*in vitro* 簡易毒性評価系としては哺乳動物培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験を検討すると共にマウス個体での肝障害性、マウス生体内フリーラジカル反応惹起性を検証した。モデル物質には肝炎誘発物質であり毒性発現にフリーラジカル反応の関与が知られている四塩化炭素^{17,18)}とクロロフェノール類¹⁹⁾を用いた。

2. 実験方法

2.1 *in vitro* 小核試験

小核試験は Matsuoka らの方法²⁰⁾により行った。細胞はヒト子宮頸部がん由来樹立株 HeLa を用いた。2,4,6-trichlorophenol (TCP), 2,6-dichlorophenol (DCP) は DMSO に、チオ尿素はエタノールに、マンニトール、カタラーゼ、グルタチオン、スーパーオキシドデスムターゼ (SOD) は水に溶かした。前培養した HeLa 細胞に、TCP, DCP を最終濃度 1 mM になるように添加し、37°C、5 %CO₂条件下で 1 時間培養した。培地交換後さらに 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で小核形成数を計測した。抗酸化剤は最終濃度 100mM (チオ尿素、マンニトール、グルタチオン) あるいは 20unit · ml⁻¹ (カタラーゼ、SOD) で TCP, DCP と同時に加えた。

2.2 *in vivo* 肝障害試験

四塩化炭素には ddY 系、TCP の実験には CD-1 系雌性マウス (5 ~ 6 週齢) を用いた。四塩化炭素 (2.0ml · kgb.w.⁻¹) は 1 %CMC-Na 溶液に溶かし、0.5ml を経口投与した。TCP は DMSO に溶かし、更に DMSO 最終濃度が 0.5% になるように生理食塩水で希釈し、0.5ml を経口投与した。抗酸化剤として、Trolox (ビタミン E 誘導体) ないしマンニトール 2 μmol · kgb.w.⁻¹ を含む生理食塩水 0.5ml を有機ハロゲン化合物投与 30 分前に経口投与した。各対照群には用いた溶媒のみを経口投与した。

処理一定時間後に市販のキットを用いて血清 GOT を測定し肝障害の程度を判定した²¹⁾。生体内フリーラジカル反応惹起性は、常磁性スピンプローブ (3-Carbamoyl PROXYL: 1.2 μmol · kgb.w.⁻¹) をマウス尾静脈投与したのち生体計測 ESR を用いて測定し¹⁵⁾、その減衰速度定数を得た。

3. 結果および考察

3.1 *in vitro* 小核試験

本実験では、細胞外で S 9 mix により代謝活性化を行い、生成する活性種による小核形成について検討した。TCP, DCP による小核形成は S 9 mix 添加により増大した (Fig. 2)。この増大は用いたすべての抗酸化剤により有意に抑制された。チオ尿素はヒドロキシルラジカル、カタラーゼは過酸化水素、SOD はスーパーオキシドラジカルを不均化する。グルタチオンはグルタチオンペルオキシダーゼ存在下で過酸化水素を消去する。従って、S 9

mix 添加により TCP, DCP の代謝過程でヒドロキシルラジカル、過酸化水素、スーパーオキシドラジカルが生成し、これらの活性酸素が小核形成の増大に関与していること、および本試験方法が環境汚染物質により惹起される酸化ストレスの程度を評価する上で有効であることが示唆された。

3.2 動物個体毒性試験

四塩化炭素投与により血清 GOT 量は有意に増加し、肝障害が惹起されていることが示された (Fig. 3)。この血清 GOT 量の上昇は抗酸化剤 Trolox の前投与により抑制された。一方、生体内フリーラジカル反応惹起性に関してはマウス上腹部におけるスピンプローブの消失速度が対照群に比べて有意に上昇し、この亢進は Trolox の前投与により対照群レベルまで抑制された (Fig. 3)。また、胸部および下腹部でのスピンプローブの消失速度は四塩化炭素を投与してもほとんど変わらないことから、スピンプローブの消失の亢進は酸化ストレスによるものでラジカル反応惹起が肝を含む上腹部に局限していることが示された。また、vitamin E 投与は四塩化炭素による肝の脂質過酸化を抑制することで肝障害を軽減することが報告されている²²⁾。従って、四塩化炭素の肝代謝物により生体内フリーラジカル反応が惹起され肝障害が生じたこと、および本 *in vivo* 測定系が動物個体での環境汚染物質による酸化ストレスの評価に有用であることが示された。

in vitro 小核試験に用いた TCP においても四塩化炭素と同様の結果が得られた。すなわち、TCP 投与群での血清 GOT 量と上腹部でのスピンプローブの消失速度

Table 2 Effect of antioxidants on micronuclei formation by chlorophenols

	TCP	2,6-DCP
in the absence of S9 mix	1.8±2.4	0.3±1.6
in the presence of S9 mix	10.3±2.2	5.5±0.3
+TU	0.6±2.2**	-1.4±1.3**
+GSH	1.1±2.0**	0.9±0.4**
+SOD	1.0±0.5**	3.1±2.7*
+CAT	0.3±2.5**	2.1±1.2**

Values of micronuclei test are expressed as net numbers by subtracting MN numbers of negative control from total ones of the samples. (*: p<0.05, **: p<0.01)

TU: thiourea, GSH: glutathione, CAT: catalase, SOD: superoxide dismutase, TCP: 2,4,6-trichlorophenol, 2,6-DCP: 2,6-dichlorophenol

Table 3 Carbon tetrachloride induced liver injuries and free radical reactions

	spin clearance rate (min. ⁻¹)			serum GOT (IU · ml ⁻¹)
	breast	upper abdomen	lower abdomen	
Control	0.101±0.013	0.120±0.010	0.110±0.008	51.1±13.1
Treated	0.093±0.016	0.155±0.012 *	0.124±0.014	72.3±8.1 *
+Trolox		0.128±0.008		45.1±7.4

Spin clearance rates and serum GOT were measured 30 min. and 6 hours after carbon tetrachloride administration, respectively.

(n ≥ 4, *: p<0.05)

Table 4 2,4,6-Trichlorophenol induced liver injuries and free radical reactions in upper abdomen

	spin clearance rate (min. ⁻¹)			serum GOT (IU · ml ⁻¹)
	0.5 hr	1.0 hr	3.0 hr	
Control	0.201±0.013	0.195±0.009	0.214±0.018	41.5±10.1
Treated	0.260±0.014 *	0.243±0.014 *	0.171±0.030 *	82.0±6.4
+mannitol	0.200±0.003	0.195±0.014		78.0±7.4

Serum GOT were measured 6 hours after 2,4,6-trichlorophenol administration.

(n ≥ 3, *: p<0.05)

は、対照群に比べ有意に上昇した (Fig. 4)。この消失速度の亢進は下腹部・胸部では見られず、投与30分～1時間にのみ観測され・OH スカベンジャーであるマンニトールの同時投与で抑制された。一方、*in vitro* 実験で、ここで用いたスピンプローブが Fenton 反応等で発生させた・OH によりその常磁性を失うことが知られている^{23,24)}。従って、TCP の初期肝代謝時に・OH が生成し、消失速度が亢進している可能性が示された。血清 GOT 量はマンニトールの投与では抑制されなかったことから、TCP による肝障害が・OH 以外の経路により惹起されている可能性も示唆される。・OH の関与を更に詳細に示すためには、今後チオ尿素等の他の・OH スカベンジャーを併用することが必要であろう。

また、肝障害とフリーラジカル反応の亢進のいずれが原因ないしは結果であるかに関しては、マンニトールをはじめ抗酸化剤の投与時期を変え、肝障害とフリーラジカル反応の変化を経時的に測定する必要がある。これらのことにより、*in vivo* 評価系の有効性が一層明らかとなり、結果として *in vitro* 小核試験の検証に大いに有効となるであろう。

4. ま と め

本研究では酸化ストレスに着目し、有機ハロゲン化合物の簡易毒性評価法として哺乳動物培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験と共に、マウス個体での肝障害性評価からの検証方法の確立を図った。

その結果、*in vitro* 小核試験が酸化ストレスの簡易評価系として有効であり、TCP の代謝過程で活性酸素種が生成し、小核形成上昇に関与していることを示した。また、四塩化炭素あるいは TCP 投与によりフリーラジカル反応が亢進し、肝障害が惹起されることを示した。

本系は *in vitro* 簡易毒性評価法での結果を個体毒性の面から検証することが可能で、*in vitro* 簡易毒性評価系の毒性学的裏付けを行う上で有用であろう。また、抗酸化酵素遺伝子導入細胞、遺伝子組替マウスを用いることで詳細な知見が得られると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費重点領域研究 (人間地球系)、基盤研究 (B) および一般研究 (B)、(財)とうきゅう環境浄化財団、(財)昭和シェル石油環境研究助成財団の助成によって行われた。

(原稿受付 1997年 6月 5日)

(原稿受理 1997年 8月 4日)

引 用 文 献

- 1) US EPA (1975) US environmental and protection agency report on suspect carcinogens in water supply, June 17.
- 2) Dunlop, W.J., Shew, D.C., Scalf, M.R., Cosby, R.L. and Robertson, M.J. (1976) Identification and analysis of organic pollutions in water, In "Annual Arbor Science (Ed. by Keith, L. H.)", Ann Arbor, MI, Ch. 27 p453.
- 3) Paasivirta, J., et al., (1985) Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment, *Chemosphere*, 14, 469-491.
- 4) 内海英雄 (1996) 水環境の安全性評価のためのバイオアッセイの今後, 水環境学会誌, 19, 758-763.
- 5) 内海英雄, 濱田昭, 大野泰男 (1992) 細胞毒性試験による有害化学物質汚染の評価, 水環境学会誌, 15, 655-661.
- 6) Utsumi, H., Kiyoshige, K., Shimbara, S. and Hamada, A. (1994) Comparative studies on cytotoxicity of micropollutants in water. -Principle of cytotoxicity matrix-. *Environ. Toxicol. Water Quality*, 9, 333-339.
- 7) 市川和洋, 内海英雄 (1995) 培養細胞を用いた水質評価法, *ファルマシア*, 31, 284-286.
- 8) Ichikawa, K., Sakai, Y., Sakoda, A. and Suzuki, M. (1996) Long-term cytotoxicities of various pesticides evaluated by albumin secretion of primary cultured rat hepatocytes, *Bio-technol. Tech.*, 10(2), 99-102.
- 9) Kobayashi, H., Yuyama, A., Imajo, S. and Matsusaka, N. (1980) Effects of acute and chronic administration of DDVP (dichlorvos) on distribution of brain acetylcholine in rats, *J. Toxicol. Sci.*, 5, 311-9.
- 10) Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985) Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York.
- 11) Pryor, W.A., Hales, B.J., Premovic, P.I. and Church, D.F. (1983) The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications, *Science*, 220, 425-427.
- 12) Hassan, H.M. (1984) Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat, *Methods in Enzymology*, 105, 523-32.
- 13) 松本謙一郎, 河合彩世, Colin F. Chignell, 内海英雄 (1996) アンスラリン塗布マウス皮膚への UVA 照射時のラジカル発生部位の解析, 磁気共鳴と医学, 7, 102-105.
- 14) 内海英雄 (1995) 生体計測用 ESR を用いた生体内ラジカルの挙動解析, 環境変異原研究, 16, 317-326.
- 15) Utsumi, H. and Takeshita, K. (1995) *In vivo* ESR measurement of free radical reactions in living animals using nitroxyl probes, In Bioradicals Detected by ESR Spectroscopy (Ed. by Ohya-Nishiguchi, H., and Packer, L.) Birkhauser Verlag Basel, Switzerland.
- 16) Utsumi, H., Ichikawa, K. and Takeshita, K. (1995) *In vivo* ESR measurements of free radical reactions in living mice, *Toxicology Letters*, 82/83, 561-565.
- 17) Sipes, G., Krishna, G. and Gillette J.R. (1977) Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of cytochrome p-450, *Life Sciences*, 20, 1541-1548.
- 18) Poli, G., Poli-Chiono, M., Slater, T.F., Dianzani, M.U. and Gravela, E. (1978) Effects of carbon tetrachloride on isolated rat liver cells: Stimulation of lipid peroxidation and inhibitory action of free-radical scavengers, *Biochem. Soc. Trans.*, 6, 589-591.
- 19) Juhl, H., Blum, K. and Witte, I. (1989) The *in vitro* metabolites of 2,4,6-trichlorophenol and their DNA strand breaking properties, *Chem. Biol. Interactions*, 69, 333-344.
- 20) Matsuoka, A., Yamazaki, Y., Suzuki, T., Hayashi, M. and Sofuni, T. (1993) Evaluation of the micronucleus test using a Chinese Hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test, *Mut. Res.*, 272, 223-236.
- 21) Henry, R.J., Chiamori, N., Golub, O.J. and Berkman, S. (1960) Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase, *Am. J. Clin. Path.*, 34, 381-398.
- 22) Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K. and Kaneda, T. (1990) Phospholipid hydroperoxide accumulation in liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride and its inhibition by dietary α -tocopherol, *J. Biochem.*, 107, 689-711.
- 23) Asmus, K.D., Nigam, S. and Willson, R.L. (1976) Kinetics of nitroxyl radical reactions A pulse-radiolysis conductivity study, *Int. J. Radiat. Biol.*, 29, 211-219.
- 24) Nigam, S., Asmus, K.D. and Willson, R.L. (1976) Electron transfer and addition reactions of free nitroxyl radicals with radiation induced radicals, *Physical Org. Chem.*, 85, 211-219.