Cyclochlorotine-肝障害を修飾する因子(2)

—分子内塩素原子の影響—

寺尾 清^{*1}, 諸岡 信久^{*2}, 伊藤恵美子^{*1}, 辰野 高司^{*2}

K. TERAO^{*1}, N. MOROOKA^{*2}, E. ITO^{*1}, T. TATSUNO^{*2}: Some factors influencing on cyclochlorotine-liver injury (2) —The effects of chlorine atoms in cyclochlorotine molecule on murine hepatocytes—

Summary

The effects of dechlorinated dyclochlorotine (deCl-CC) on murine liver cells were compared with those of Cyclochlorotine (CC). The deCl-CC were prepared by treating CC with 25% ammonia water-methanol (1:5). Compared with the morphological changes induced by CC in hepatocytes such as vacuole-formation, a marked reduction in cytotoxicity was observed in the rat as well as mouse hepatocytes treated with deCl-CC in *in vivo* and *in vitro* systems.

Penicillium islandicum の産生する二次代謝産物である cyclochlorotine (CC) は環状のオリゴペプチドで、分子内に2原子の塩素原子が存在している。CCの大量投与によって、ラットあるいはマウス肝細胞に発生する非脂肪性の空胞は、分子内に存在する塩素原子と非常に関係が深いことが予測される。今回、われわれはCCから塩素を除いた dechlorinated cyclochlorotine を合成し、この物質のラットならびにマウス肝細胞に対する生物活性を、CCのそれと比較検討した。

Dechlorinated CC (deCl-CC): CCをメタノールに溶解し、最終濃度が5%になるよう市販アンモニア水を加え密栓後、40°Cに一夜放置した。反応混液は減圧濃縮し、白色の残渣を得た。これをメタノールに溶解し濾過後、減圧濃縮し残渣を得た。これを含むメタノールから1回、クロロホルム-メタノール(1:1)

から1回それぞれ再結晶した。この結晶は焰色反応(一)で薄層クロマト〔シリカゲル:クロロホルム-メタノール(1:1)〕で単一スポットを示し、その R_f 値はCCより0.2程度下っていた。このスポットはUV 254 nmに吸収を示しニンヒドリン呈色は(一)であったことから、生成物は脱塩素化したCCと考えられた。

in vivo 実験: CCおよびdeCl-CCを生理食塩液に溶解後、雄ICRマウス(平均体重30g)あるいは雄Wistarラット(平均体重200g)の腹腔内に体重1kg当り3mg注射し、1時間後に屠殺し、肝を固定し光顕ならびに電顕標本を作成し観察した。3mg/kgのCCを投与した動物の肝は従来の報告¹⁻³⁾と同様、肝細胞に著しい空胞変性がみられた(Fig. 1)。肝小葉の末梢のみならず中心部に至るまで大小の空胞が肝細胞中に充満している。deCl-CC投与動物はこれに反し、マウスでは殆んど空胞変性は認められず、門脈周辺部の肝細胞に少量の小脂肪滴が散在するだけであった。ラットはより感受性が高く、門脈周辺帯(Rapaportのzone 1)に一致して数 μ の比較的大きい空胞変性がみられた(Fig. 2)。

in vitro 実験: 雄Wistar系ラット(体重150g)

^{*1} 千葉大学生物活性研究所(〒280 千葉市亥鼻1-8-1)

(Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University (1-8- Inohana, Chiba 280)

^{*2} 理化学研究所(〒351 和光市広沢 2-1)

The Institute of Physiol and Chemical Research (Hirosawa, Wako-shi Saitama 351)

Fig. 1. Photomicrograph of a rat liver 1 hr after the ip injection of cyclochlorotene (CC).

A marked vacuolation is observed in the almost all of the hepatocytes in the liver lobule. P: A tributary of portal vein. HE×160

Fig. 2. Photomicrograph of a rat liver 1 hr after the ip injection of deCl-CC.

Hepatocytes with vacuolation (arrow) are limited in a zone 1 (Rapaort). P: A tributary of portal vein. HE×320

を麻醉後門脈よりコラゲナーゼ灌流を行い肝細胞を単離しワイマウス培地に浮遊させた。肝細胞 $10^6/\text{ml}$ 中に CC あるいは deCl-CC を $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、 $5\sim 60$ 分処理した。処理後 1% グルタルアルデヒドで固定し細胞膜の bubbling の出現を鏡検し、正常細胞と bubbling 細胞の比率を測定した (Fig. 3)

CC 処理群の肝細胞は 10 分以内に、正常の肝細胞が 25% 以下となり、60 分処理では全ての肝細胞に

bubbling がみられる。これに反し deCl-CC では $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では対照との間に有意差はなく $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では、最初の10分間には有意差はないが、30分処理で約 $1/4$ 、60 分で約 40% 肝細胞に bubbling が生じ $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の CC に近くなる。

以上のように deCl-CC は CC に比し明らかに生物活性は低下する。即ち、CC 分子内の塩素が作用基として非常に大きな役割を担っているが、これ以外の

Fig. 3. The effects of CC and deCl-CC on isolated rat free hepatocytes *in vitro*

構造もまた無視し得ないことを示唆している。

イオノフォアとしての働きについては目下検討中である。

引用文献

- 1) Saito, M.: Acta Pathol Jap **9**, 785 (1959).
- 2) Hara, M.: Tokyo Igaku Zasshi, **72** 136 (1964).
- 3) Terao, K., Ito, E., Tatsuno, T.: Arch Toxicol. (1984) in press.