有機塩素系化合物投与によるマウス肝臓 DNA の損傷について

(平成4年5月28日受理)

梅垣敬三* 池上幸江* 市川富夫*

Hepatic DNA Damage in Mice Given Organochlorine Chemicals

Keizo UMEGAKI, Sachie Ikegami and Tomio ICHIKAWA

(The National Institute of Health and Nutrition: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan)

The effects of organochlorine chemicals, mainly pesticides, on DNA single-strand breaks (DNA SSB) and the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in DNA were examined in mouse liver. Male mice were treated with organochlorine chemicals *per os* for 5 days, and killed 4 hrs after the last administration. The daily dose of each chemical was about one-fifth of the reported LD₅₀. The chemicals examined were endrin, dieldrin, γ -BHC, chlorpyrifos, heptachlor, pentachloronitrobenzene, *pp'*-DDT, pentachlorophenol, chlordane, 2,4-D, mirex, pentachlorobenzene, hexachlorobenzene, chlorobenzilate, methoxychlor and trichloroethylene. The administrations of dieldrin, heptachlor, chlordane, mirex, pentachlorobenzene, hexachlorobenzene, chlorobenzilate, and trichloroethylene significantly increased relative liver weight. The 8-OHdG level in hepatic DNA of vehicle-treated mice was 1.2 per 10⁵ dG and comparable values were found in all groups treated with the chemicals. Hepatic DNA SSBs in mice treated with trichloroethylene and pentachlorophenol were significantly enhanced, but the effect was slight.

(Received May 28, 1992)

Key words: 有機塩素系化合物 organochlorine chemicals; DNA 損傷 (マウス肝臓) DNA damage in mouse liver; DNA 鎖切断 DNA strand breaks; 8-ヒドロキシデオキシグアノシン 8-hydroxydeoxyguanosine

緒 論

農薬、産業廃棄物質として環境中に存在する有機塩素系化学物質は、難分解性で脂溶性の化合物が多く、脂肪に溶けて生体に留まるため、その影響も長期間持続する。それらの化合物の発ガン性、変異原性、遺伝毒性の有無を明らかにすることは極めて重要な問題である。

有機塩素系農薬の大部分は、Ames 試験において変異原性を認めないと報告されている¹⁾。しかし、有機塩素系農薬の発ガン性をマウスやラットを用いた *in vivo* の系において検討した実験においては、それらが肝細胞ガンの発生を増加させると報告されている^{2), 3)}。それらの有機塩素系化学物質の *in vivo* における DNA 損傷作用の有無については十分明らかにされていない。

最近、ペルオキシゾーム増殖作用を持つ抗脂質血漿剤、除草剤、プラスチック可塑剤など、変異原性はないが発ガン性を有する化学物質が、生体内において活性酸素を生成して DNA の酸化的損傷を惹起することが明らかにされた⁴⁾。その DNA の酸化的損傷がそれらの化合物の発ガン性に関連すると考えられている。DNA の酸化的損傷の指標としては、DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 量の増加が注目されている。有機塩素系化合物においても同様に、生体内において活性酸素を生成して DNA の酸化的損傷を惹起する可能性があると考えられる。

著者らは、本実験において 16 種類の農薬を中心とした有機塩素系化学物質を雄マウスに投与し、その肝臓 DNA 損傷作用についての検討を行った。DNA の損傷作用は、DNA 鎖切断の測定、DNA の酸化的損傷の指標と

* 国立健康・栄養研究所: 〒162 東京都新宿区戸山 1-23-1

Treatment Protocol					
Day	0	1	2	3	4 (4h)
	↑	↑	↑	↑	↓ Sacrificed
Chemicals	Dose/day (mg/kg BW)	Dose×5 (mg/kg BW)	% of LD ₅₀	LD ₅₀ (mg/kg BW)	
Endrin	2.4	12	67	18	
Dieldrin	9.2	46	100	46	
γ-BHC	17	85	97	88	
Heptachlor	11.1	56	56	100	
Chlorpyrifos	17	85	83	102	
pp'-DDT	17	85	75	113	
Pentachlorophenol	31.8	159	76	210	
Chlordane (trans)	74.2	371	111	335	
2, 4-D	71	355	95	375	
Mirex	86.8	434	59	740	
Pentachlorobenzene	170	850	77	1100	
Pentachloronitrobenzene	175.1	876	53-73	1200-1650	
Hexachlorobenzene	170	850	85	1000	
Chlorobenzilate	170	850	18-117	1729-4850	
Methoxychlor	170	850	12-17	5000-7000	
Trichloroethylene	171.7	858.5	117	4.92 (ml)	

Scheme 1. Experimental protocol

Mice were administered various organochlorine chemicals dissolved in soybean oil and sacrificed 4hrs after the last administration. Control mice were received an equivalent vehicle.

なる DNA 中の 8-OHdG 量の測定により評価した。化合物の投与条件は、文献より得た LD₅₀ の 1/5 量を 1 日 1 回、5 日連続投与とした。ちなみに、今回検討した農薬は、マウスやラットにおいて肝腫瘍を発生させ、Ames 試験における変異原性は陰性であることが報告されている¹⁾。

実験方法

1. 試薬

3,5-ジアミノ安息香酸、ペンタクロロフェノール、ペンタクロロニトロベンゼンはアルドリッチ、クロロベンジレート、メトキシクロル、ミレックスはガスクロ工業(株)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、ヘキサクロロベンゼンとペンタクロロベンゼンは東京化成工業(株)製、トリクロロエチレンは和光純薬工業(株)製の特級試薬、クロルデン、エンドリン、ディルドリン、リンデン(γ-BHC)、ヘプタクロル、クロルピリフォス、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(pp'-DDT)は和光純薬工業(株)製のガスクロ用標準試薬を用いた。

2. 実験動物

ICR 系雄マウス 6 週齢(日本クレア(株))を 23±2° の条件において 1 週間予備飼育した後、1 群 5~6 匹とし、群間に体重差がないように分けた。この時の体重の平均±標準偏差は 33±2 g であった。マウスにはだいた油に溶かした有機塩素系化合物を Scheme 1 に示したように 1 日 1 回、5 日連続経口投与した。その投与容量はマウス体重 30 g に対して 0.2 ml とし 1 回の投与量は文献値の LD₅₀ の 1/5 に近い量に設定した。ただし、エンドリン、ヘプタクロル、ミレックスは予備的な実験においてその投与量では最終投与前に一部死亡するマウスがいたため投与量を低くした。マウスは最終投与 4 時間後に頸椎脱臼法で屠殺し、体重と肝臓重量を測定した。飼育期間中、マウスには飼料(CE-2、日本クレア(株))と飲料水を自由に摂取させた。

3. アルカリ unwinding 法による DNA 損傷の測定

マウスから肝臓を摘出後直ちに既報の方法⁵⁾により DNA 損傷を測定した。この測定法の原理は、2 本鎖

Fig. 1. Effect of organochlorine chemical administration on body weight
Mice were treated as shown in Scheme 1. Each column and horizontal bar indicate mean and SE for 5~6 mice.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

Fig. 2. Effect of organochlorine chemical administration on liver weight
Mice were treated as shown in Scheme 1. Liver weight was expressed as % of body weight. Each column and horizontal bar indicate mean and SE for 5~6 mice.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

DNA がアルカリ溶液中において 1 本鎖になるとき、そのなりやすさが DNA 鎖に損傷があるほど速いことを利用したものである。DNA 損傷度 (% unwound DNA) は、2 時間のアルカリ処理をした時の総 DNA 中の 1 本鎖 DNA の百分率を示し、DNA 損傷がおきているほど

その値は高くなる。ポジティブコントロールとして DNA 損傷作用の強い *N*-ニトロソジメチルアミンを 20 mg/kg 体重、1 回腹腔内投与し、その 4 時間後の肝臓 DNA 損傷を本法により測定したとき、%DNA 損傷度は、約 45% になった。

Fig. 3. Effect of organochlorine chemical administration on hepatic DNA strand breaks
Mice were treated as shown in scheme 1. DNA strand breaks were measured by alkaline unwinding method. Each column and horizontal bar indicate mean and SE for 5~6 mice.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

Fig. 4. Effect of organochlorine chemical administration on level of 8-OHdG in hepatic DNA
Mice were treated as shown in scheme 1. DNA was extracted from liver and digested to deoxynucleosides. Contents of 8-OHdG and dG were measured by ECD-HPLC method. Each column and horizontal bar indicate mean and SE for 5~6 mice.

4. 8-OHdG 含量の測定

-80°において保存しておいた肝臓から Gupta らの方法⁸⁾により総 DNA を抽出した。抽出した DNA は Kasai らの方法⁷⁾に従ってヌクレアーゼ P1 とアルカリホスファターゼにより切断後、等量のクロロホルムと振とう混和した。これを 12,000 rpm, 5 分間遠心して上清を分取し、測定用試料とした。デオキシグアノシン (dG) と 8-OHdG は UV 検出器 (日立 L-4200, 測定波長 280 nm) と電気化学検出器 (医理科 Σ875, 加電圧 600 mV) を付けた高速液体クロマトグラフィー (日立 L-6000) により分析した。カラムには医理科 RP18T, 移動相には 10% メタノール含有 50 mM リン酸緩衝液 pH 5.5 を用いた。DNA 中の 8-OHdG 含量は 10^5 個の dG 当たりで計算した。

6. その他

結果は平均と標準誤差で示し、有意差検定は Aspin と Welch の検定により行った。

結果及び考察

化学物質による DNA 損傷作用は、投与した化合物そのものによる場合とその代謝物による場合が考えられる。後者の場合においては、化合物の代謝速度により DNA 損傷の惹起される時期が変わると考えられる。本実験では、有機塩素系化合物を 1 日 1 回連続 5 日経口投与し、最終投与 4 時間後の肝臓 DNA 損傷を測定した。投与量はそれぞれの化合物の LD₅₀ の約 1/5 量に設定した。この条件は、投与量も高く、代謝を受けにくい化合物の場合においても、ある程度はその代謝物が生成する状態と考えられる。また、経口投与 4 時間後は、投与した化合物並びにその代謝物の肝臓中の濃度が高くなっている状態と考えられる。従って、今回行った実験条件が最適の条件か否かは明らかではないが、この条件設定により、少なくとも DNA 損傷作用の強い化合物においては、その作用を検出することが可能であると考えた。

解剖時の体重、肝臓重量を Fig. 1 と 2 に示した。無処置群に比べて、体重はエンドリン、ミレックス投与群で低く、肝臓重量はディルドリン、ヘプタクロル、クロルデン、ミレックス、ペンタクロロベンゼン、ヘキサクロロベンゼン、クロロベンジレート、トリクロロエチレンを投与した群において高かった。

化合物投与による肝臓 DNA の鎖切断と酸化的損傷を測定し、その結果を Fig. 3, 4 に示した。DNA 鎖切断を示す %DNA 損傷度は、無処置群に対してヘプタクロル、ミレックス、ペンタクロロベンゼンを投与した群において高い傾向が認められ、ペンタクロロフェノールとトリクロロエチレンを投与した群においては、わずかではあるが有意な増加が認められた。一方、DNA の酸化的損傷を示す DNA 中の 8-OHdG 量は、無処置群に対して、いずれの化合物投与においても有意に増加しなかった。無処置群における 8-OHdG 量は、 10^5 個の dG 当たり約

1.2 個であり、他の報告とも良く一致していた⁷⁾。

トリクロロエチレンは、マウスやラットを用いた *in vivo* の実験において肝臓 DNA 鎖切断を惹起すること、その作用はフェノバルビタールの前処置やトリクロロエチレンの連続投与により代謝を亢進させた条件において増加すること、さらに、代謝物であるトリクロロ酢酸やジクロロ酢酸には DNA 損傷作用のあることが報告されている^{8), 9)}。また、ペンタクロロフェノールの代謝物であるテトラクロロヒドロキノンには、培養細胞の実験系において DNA 鎖切断作用のあることが報告されている¹⁰⁾。本実験で得られた結果はこれらの報告と一致している。

トリクロロエチレンの代謝物であるトリクロロ酢酸やジクロロ酢酸はマウスやラットにおいて肝臓ペルオキシゾームを増加させ、過酸化脂質レベルも高めることが報告されている^{11), 12)}。これらの報告は、トリクロロエチレン投与により DNA の酸化的損傷が惹起されること、その酸化的損傷が、DNA 鎖切断作用に関連する可能性を示唆する。しかし、本実験条件においては、肝臓 DNA 中の 8-OHdG 量の有意な増加を検出できなかった。この原因として、DNA が酸化損傷を受けていたとしても修復されている可能性が考えられる。8-OHdG の修復酵素は大腸菌や哺乳動物細胞にも検出されている^{13), 14)}。また、今回測定した DNA は肝臓の総 DNA であり、ほとんどが核 DNA である。核 DNA は、その損傷が修復されやすく、DNA 中の 8-OHdG レベルも低いことが知られている¹⁵⁾。

今回検討した有機塩素系農薬のほとんどは、有意な DNA 鎖切断作用と DNA 中の 8-OHdG 量の増加を惹起しなかった。この結果は、検討した有機塩素系化合物の *in vivo* における DNA 損傷作用が、弱いことを示唆していると考えられる。農薬の変異原性を細菌を用いて検討し、有機塩素系農薬についてはその変異原性が認められなかったという報告¹⁾は、本実験結果とよく対応している。

ま と め

農薬を中心とした 16 種類の有機塩素系化合物の DNA 損傷作用を雄マウス肝臓を用いた *in vivo* 実験において検討した。DNA 損傷は、DNA 鎖切断の測定、DNA 中の 8-OHdG 量の測定により行った。用いた化合物はエンドリン、ディルドリン、 γ -BHC、ヘプタクロル、クロルピリフォス、*pp'*-DDT、ペンタクロロフェノール、クロルデン、2,4-D、ミレックス、ペンタクロロベンゼン、ペンタクロロニトロベンゼン、ヘキサクロロベンゼン、クロロベンジレート、メトキシクロル、トリクロロエチレンであり、投与条件は LD₅₀ (文献値) の 1/5 量を 1 日 1 回、5 日連続経口投与とした。その結果、化合物投与による 8-OHdG 量の増加は、いずれの化合物においても認められなかった。一方、DNA 鎖切断は、弱い

ながらもトリクロロエチレンとペンタクロロフェノール投与において検出できた。

本研究は環境庁国立機関公害防止等試験研究費により行ったものであり、関係各位に感謝致します。

文 献

- 1) 白須泰彦: トキシコロジーフォーラム **9**, 2~11 (1986).
- 2) IARC; IARC Monographs **30** (1983).
- 3) 厚生省公衆衛生局栄養課監訳: “がん予防と食生活” p. 276~311 (1982), 日本栄養食品協会.
- 4) Floyd, R. A.: Carcinogene. **11**, 1,447~1,450 (1990).
- 5) 梅垣敬三, 池上幸江, 溝淵佐保, 市川富夫: 食衛誌. **32**, 553~558 (1991).
- 6) Gupta, R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6,943~6,947 (1984).
- 7) Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H.: Carcinogene. **7**, 1,849~1,851 (1986).
- 8) Walles, S. A. S.: Toxicol. Lett. **31**, 31~35 (1986).
- 9) Nelson, M. A., Bull, R. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **94**, 45~54 (1988).
- 10) Ehrlich, W.: Mutat. Res. **244**, 299~302 (1990).
- 11) Larson, J. L., Bull, R. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **115**, 268~277 (1992).
- 12) DeAngelo, A. B., Daniel, F. B., McMillan, L., Wernsing, P., Savage, R. E., Jr.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **115**, 268~277 (1992).
- 13) Chung, M. H., Kasai, H., Jones, D. S., Inoue, N., Ishikawa, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S.: Mutat. Res. **254**, 1~12 (1991).
- 14) Yamamoto, F., Kasai, H., Bessho, T., Chung, M. H., Inoue, H., Ohtsuka, E., Hori, T., Nishimura, S.: Jpn. J. Cancer Res. **83**, 351~357 (1992).
- 15) Richter, C., Park, J., Ames, B. N.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 6,465~6,467 (1988).