殺菌剤 Oxine-Copper の少量投与によりマウス肝臓に誘導された *in Vivo* での毒性、
過酸化脂質の濃度低下及び Glutathione, Ascorbic Acid, 銅の濃度上昇

北條康司,* 橋本育子, 宮本陽子, 川添禎浩, 水谷民雄

京都府立大学人間環境学部食保健学科食品安全性学研究室

In Vivo Toxicity, Lipid Peroxide Lowering, and Glutathione, Ascorbic Acid and Copper
Elevation Induced in Mouse Liver by Low Dose of Oxine-Copper, a Fungicide

Yasuji HOJO,* Ikuko HASHIMOTO, Yoko MIYAMOTO, Sadahiro KAWAZOE, and Tamio MIZUTANI

Department of Food Sciences and Nutritional Health, Kyoto Prefectural University,
Shimogamo, Kyoto 606-8522, Japan

(Received September 1, 1999; Accepted December 3, 1999)

While oxine-copper (OxCu) is generally used as an agricultural fungicide and induces a harmful effect on ecosystems, little information is available regarding a toxic effect of OxCu on mammals. In this article, we examined *in vivo* induction of toxicity and change of levels of glutathione and ascorbic acid, major biological antioxidants, lipid peroxide and copper (Cu) in liver and kidney 4 h and 24 h after intraperitoneal administration of OxCu at a low dose (0.05 mmol/kg) to mice. Increased hepatic ascorbic acid and Cu levels were found at 4 h after the treatment. In addition, body weight change was lowered and serum glutamic pyruvic transaminase activity was elevated significantly compared to control at 24 h after the treatment, suggesting induction of systemic and hepatic toxicity respectively. These were accompanied by lowered lipid peroxide level and enhanced glutathione, ascorbic acid and Cu levels in the mouse liver. On the other hand, OxCu induced no elevation in serum urea nitrogen concentration 4 h and 24 h after the treatment, suggesting no induction of nephrotoxicity, accompanied by no change in renal lipid peroxide, glutathione, ascorbic acid and Cu levels. These results suggest that hepatic Cu elevation may induce hepatotoxicity and no renal Cu elevation may lead to no induction of nephrotoxicity after the treatment with OxCu.

Key words—oxine-copper; hepatotoxicity; serum glutamic pyruvic transaminase; glutathione; ascorbic acid; lipid peroxide

緒 言

Oxine-copper (OxCu) は殺菌剤として使用されている農薬であり、1995 年の国内生産量は 266 トンにのぼっている。¹⁾ 近年、そのゴルフ場での散布が水質を汚染し、近くの養魚場で魚の大量斃死を引き起こしたことが報告されている。²⁾ OxCu は、2 価銅と 8-hydroxyquinoline が 1 : 2 で結合したキレート化合物であり、野菜や果物への使用頻度も高く、残留性も比較的大きいと言われている。^{3,4)} マスに対する 48 時間半数致死濃度が 0.2—0.3 ppm であり、C 群に分類されるほど魚毒性が高い⁴⁾ ことで注目されているが、他方、哺乳動物に対する急性毒性は低く、マウスに対する半数致死経口投与量は 9000 mg/kg (25.6 mmol/kg)⁴⁾ である。しかし、OxCu の哺乳動物に対する安全性、毒性の研究は、ほとんどされていないのが現状である。

本研究では、OxCu の半数致死投与量の 500 分の 1 に相当する低い投与量の急性腹腔内投与によるマウス肝臓腎臓毒性誘導と、生体内の主要な抗酸化物

質である glutathione (GSH) 及び ascorbic acid, 過酸化脂質、銅の濃度変化について、*in vivo* で検討した結果を報告する。

実 験 の 部

実験動物 体重 29—31 g の ddY 系雄性マウス (船橋農場, 千葉) を使用した。餌 (マウス・ラット用固形飼料 F-2, 船橋農場) 及び水 (イオン交換樹脂と蒸留により精製した水) を、自由摂取させ、日照サイクル 12 時間、温度 23±1℃、湿度 50±10% で飼育した。1 週間の予備飼育後、実験に用いた。統計学的解析を目的とした実験に使用した動物数は、各群共、5 匹であった。

動物実験 Fanning and Jonassen の方法⁵⁾ に従って合成した OxCu を 0.5% methy cellulose 水溶液に溶かし、マウス 1 kg 当たり 0.05 mmol (溶液量 10 ml) を、マウス腹腔内に単回投与した。コントロールとして、0.5% methy cellulose 水溶液を同様に投与した。屠殺 5 分前に、sodium pentobarbital 注射液 (大日本製薬) の腹腔内投与 (100 mg/kg) に

より麻酔し、心臓からの採血により屠殺し、肝臓及び腎臓を摘出した。

血清 Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT) 活性測定 血液を、室温で1時間静置後、遠心分離 (3000 rpm, 30 分) し、得られた上清をさらに遠心分離 (1500 rpm, 10 分) し、その上清を血清試料とした。SGPT 活性は、トランスアミナーゼ測定用試薬 (イアトロザイム TA-LQ, ヤトロン) を用いて測定された。

血清尿素窒素 (SUN) 濃度測定 SUN 濃度を、血清尿素窒素測定試薬 (尿素窒素 B テストワコー, 和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した。

過酸化脂質濃度測定 肝臓及び腎臓中の過酸化脂質濃度を、TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 値として測定し、nmol MDA/g 組織重量の単位で表した。⁶⁾ ここで、MDA は malondialdehyde を表す。

非タンパク性 SH(NPSH) 濃度測定 肝臓及び腎臓中の NPSH 濃度を、Ellman 試薬を用いた方法⁷⁾ で測定した。

Ascorbic Acid 濃度測定 肝臓及び腎臓中の還元型 ascorbic acid 濃度を、folin phenol 試薬を用いた方法で測定した。⁸⁾

銅濃度測定 肝臓及び腎臓中の銅含有量をフレイム原子吸光度法⁹⁾ により測定した。

統計学的解析 実験成績を、平均値±標準偏差として表した。2群の平均値の間の有意差検定には、Student's unpaired *t*-test を用いた。危険率5%以下 ($p < 0.05$) を有意とした。

結果と考察

OxCu の半数致死投与量の 500 分の 1 に相当する低い投与量 (0.05 mmol/kg) によるマウス肝臓腎臓毒性誘導について、投与後 4 時間及び 24 時間で検討した結果を Table 1 に示す。各毒性指標のデータの上段はコントロール群の値、下段は OxCu 群の値を表す。

OxCu 投与群の体重変化率 (投与直前の体重に対する屠殺直前の体重の比率) は、投与 4 時間後では、コントロール群とくらべ変化は見られなかったが、投与 24 時間後では、有意に減少した。さらに、コントロール群の体重変化率は投与後 4 時間とくらべ 24 時間では低下しなかったのにくらべ、OxCu 群では 24 時間後に有意な低下が見られた。これらのことから、OxCu 投与 24 時間後に全身的毒性誘導が推定された。

肝臓毒性の指標とされる相対的肝臓重量及び SGPT 活性¹⁰⁾ の内、相対的肝臓重量は OxCu 投与後 4 時間及び 24 時間で、コントロールと有意差が見られなかったが、SGPT 活性は OxCu 投与後 24 時間では、コントロール群より有意に増加し、また、投与後 4 時間とくらべても有意な上昇が見られた。こ

れらのことから、OxCu 投与 24 時間後に肝臓毒性誘導が推定された。しかし、SGPT 活性値はそれほど高くなく、相対的肝臓重量にも変化が見られなかったことから、比較的軽い毒性と考えられる。酸化的損傷の尺度である過酸化脂質の肝臓中濃度は、OxCu 投与後 24 時間でコントロール群より有意に低下し、酸化的損傷の抑制を示唆した。NPSH として測定された GSH の肝臓中濃度は、OxCu 投与後 4 時間でコントロール群より増加する傾向が見られ、投与後 24 時間では有意に増加した。また、4 時間後より 24 時間後に有意な上昇が見られた。この上昇は、OxCu 投与による毒性誘導に対して防御的に増加したものと推定され、過酸化脂質の肝臓中濃度の低下と対応している。毒性を示さない濃度の trimethyltin 又は triethyltin の存在下で脳のグリア細胞を培養した場合、細胞中の GSH 濃度及び GSH-S-transferase 活性の増加が認められ、これは防御的な変化と考えられている。¹¹⁾ 肝臓中 ascorbic acid 濃度も GSH と類似して、OxCu 投与による有意な増加が見られた。肝臓中銅濃度は、OxCu 投与後 4 時間及び 24 時間で、コントロールより有意差に増加した。以上のように、0.05 mmol/kg の OxCu 投与 4 時間後に肝臓中 ascorbic acid 及び銅濃度がコントロールより有意に増加し、さらに、24 時間後に全身的毒性及び肝臓毒性の誘導が示唆され、肝臓中の過酸化脂質濃度の低下、GSH, ascorbic acid, 銅の濃度増加を伴った。

腎臓毒性の指標とされる相対的腎臓重量及び SUN 濃度¹²⁾ は、共に、OxCu 投与 4 時間後及び 24 時間後に有意な変化を受けなかった。また、過酸化脂質、GSH, ascorbic acid, 銅の腎臓中濃度にも OxCu 投与の影響が見られなかった。このように、OxCu 投与により腎臓での毒性誘導及び関連指標の変化が起こらなかったのは、腎臓中銅濃度が増加しなかったことによると推定される。同じ理由で、OxCu 投与により肝臓で毒性が誘導されたのは、肝臓中銅濃度の増加によると考えられる。

しかし、毒性発現の見られない投与 4 時間後に、既に肝臓中の銅及び ascorbic acid の濃度が増加し、その後の時間経過により毒性が誘導されることから考えると、毒性誘導には銅と ascorbic acid の両方が関与する可能性がある。この点で、GSH は OxCu 投与後 4 時間で濃度上昇が見られなかったのも、毒性への関与が少ないかもしれない。Ascorbic acid や GSH は抗酸化作用を示すが、一方、銅イオン共存下で自動酸化を受け、活性酸素を発生して細胞に酸化的損傷を与え得ることが指摘されている。^{13, 14)} したがって、OxCu 投与後 4 時間での肝臓における ascorbic acid 及び銅の濃度上昇により、これらの間の相互作用が組織を酸化し毒性を誘導する要因となる可能性がある。しかし、OxCu に関して、銅と 8-hydroxyquinoline とは強くキレート結合してい

Table 1. Toxicity Data in Mice at 4 h and 24 h after Intraperitoneal Administration of 0.05 mmol Oxine-Copper/kg

Toxicity item	4 h	24 h
Body weight change (%)	97.3 ± 0.4 97.7 ± 0.6	100.1 ± 1.1 ^{b)} 93.1 ± 1.5 ^{a, b)}
Liver weight (% of body weight)	4.91 ± 0.24 5.04 ± 0.42	5.40 ± 0.35 ^{b)} 5.20 ± 0.80
SGPT (Karmen unit/ml)	25.3 ± 11.5 22.8 ± 3.2	15.9 ± 1.7 40.1 ± 13.8 ^{a, b)}
TBARS (nmol MDA/g liver)	193.2 ± 67.4 227.4 ± 62.7	209.4 ± 26.1 156.1 ± 11.5 ^{a)}
NPSH (μmol/g liver)	7.43 ± 0.16 8.33 ± 1.65	9.06 ± 0.87 ^{b)} 10.41 ± 0.67 ^{a, b)}
Ascorbic acid (μmol/g liver)	7.28 ± 0.12 8.49 ± 0.34 ^{a)}	7.01 ± 0.97 8.52 ± 0.51 ^{a)}
Cu (μmol/g liver)	0.16 ± 0.05 0.29 ± 0.08 ^{a)}	0.15 ± 0.04 0.26 ± 0.05 ^{a)}
Kidney weight (% of body weight)	1.26 ± 0.14 1.24 ± 0.26	1.23 ± 0.05 1.17 ± 0.07
SUN (mg %)	23.6 ± 2.6 22.3 ± 5.3	23.4 ± 4.0 20.7 ± 5.3
TBARS (nmol MDA/g kidney)	277.7 ± 81.4 269.3 ± 35.2	329.6 ± 71.1 323.9 ± 31.0 ^{b)}
NPSH (μmol/g kidney)	5.53 ± 0.61 7.19 ± 0.82 ^{a)}	6.61 ± 0.12 ^{b)} 6.63 ± 0.18
Ascorbic acid (μmol/g kidney)	7.34 ± 0.83 8.88 ± 1.56	6.48 ± 0.55 7.09 ± 0.70 ^{b)}
Cu (μmol/g kidney)	0.13 ± 0.06 0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.07 0.14 ± 0.05

Body weight change (%) = percentage of body weight immediately before sacrificing to body weight immediately before administration. SGPT = serum glutamic pyruvic transaminase. TBARS = thiobarbituric acid reactive substances. MDA = malondialdehyde. NPSH = nonprotein sulfhydryl. SUN = serum urea nitrogen. Values are means ± S.D. of 5 mice. Upper row, control data; lower row, oxine-copper data. a) Significantly different from control data ($p < 0.05$). b) Significantly different from 4 h data ($p < 0.05$).

る¹⁵⁾ので、銅イオンの遊離が困難であり、また、通常平面四辺形の配位構造をとる銅の配位座（配位数4）のすべては2分子の8-hydroxyquinolineの窒素原子と酸素原子とによって満たされているのでOxCu中の銅への他原子の結合や反応も困難であり、要するにOxCu中の銅は反応不活性であるから、OxCuのままでは生体に影響を与えにくいと考えられる。2価銅：8-hydroxyquinoline=1：1の化合物は、1：2の化合物すなわちOxCuとくらべて、amino acyl *t*-RNA synthetase を著しく阻害し、2価銅又は8-hydroxyquinolineの単独では阻害効果がないことが報告されている。¹⁶⁾したがって、OxCu中の銅が反応できるのは代謝変換を受けて、OxCu中の8-hydroxyquinolineの1分子が離れて銅の配位座に他原子が結合し得る場合と、さらにもう1分子の8-hydroxyquinolineが離れて銅が遊離イオンになった場合に限られ、代謝変換は時間を要する。したがって、過酸化脂質の増加が見られなかったことも考慮すると、OxCu中の銅とascorbic acidとの反応が肝

臓組織に酸化的損傷を与える可能性は低いと推定される。OxCuによる肝臓毒性誘導において銅とascorbic acidが関与する他のメカニズムを研究する必要がある。

単離肝細胞を用いた研究において銅塩への曝露は細胞死、過酸化脂質濃度増加、GSH濃度減少をもたらしたが、一方、Wilson病の治療薬であるキレート剤penicillamine共存下では、細胞死は抑制されたにもかかわらず、過酸化脂質増加、GSH減少の状態は変化しなかったことから、銅による細胞損傷に過酸化脂質及びGSHの変化が直接関与する可能性は否定された。¹⁷⁾これは、過酸化脂質が銅による細胞損傷と関連しないという点で、本研究と類似している。本研究におけるOxCuの肝臓毒性へのGSHの関与については明らかではないが、過酸化脂質濃度の上昇抑制すなわち組織の酸化的損傷の抑制には、抗酸化物質GSH, ascorbic acidの濃度増加が寄与するかもしれない。

2価銅以外のOxCuの成分である8-hydroxy-

quinoline が OxCu の毒性誘導に果たす役割については、今後の研究が必要である。人の単離白血球を 2 価銅イオンに曝露した培養実験¹⁸⁾において、8-hydroxyquinoline 共存下でのみ細胞損傷が認められ、8-hydroxyquinoline が銅イオンと結合することにより銅イオンの細胞内への輸送を助けることが示された。銅イオンのままでは細胞膜を通過しにくい、8-hydroxyquinoline と 1:2 で結合することにより（すなわち OxCu になり）電荷はゼロになり、細胞膜を通過しやすくなるからである。本研究においても同様の役割を 8-hydroxyquinoline が果たしている可能性が考えられる。前述のように OxCu 中の銅と 8-hydroxyquinoline とは強く結合している¹⁵⁾ので、8-hydroxyquinoline が遊離状態で作用する可能性は低いと思われる。

OxCu の哺乳動物に対する毒性については、ヒツジへの皮下注射による血清中 ceruloplasmin 活性の上昇¹⁹⁾及びヒト精子に対する殺傷作用²⁰⁾が報告されているにすぎない。哺乳動物に対する無機銅化合物投与の毒性症状として、血清中 glutamic oxalacetic transaminase, lactic dehydrogenase, SGPT の活性上昇及び GSH 濃度低下がすでに報告されている。²¹⁾ また、銅の肝臓毒性の一般的特徴として、肝臓中銅濃度の上昇及び血清中 ceruloplasmin 濃度の低下も知られている。²²⁾ この血清中 ceruloplasmin 濃度低下は、 OxCu 投与によるヒツジの血清中 ceruloplasmin 活性上昇¹⁹⁾と対照的である。これらの興味深い違いに関して今後の研究が必要である。

以上のように、少ない量 (0.05 mmol/kg) の OxCu のマウス腹腔内投与により、肝臓では毒性誘導が示唆され、過酸化脂質濃度の減少及び GSH, ascorbic acid, 銅の濃度増加を伴ったが、腎臓では毒性誘導は起こらず、過酸化脂質, GSH, ascorbic acid, 銅の濃度変化も見られなかった。

REFERENCES

- 1) "Noyakuyoran —1996—," ed. by Plant Protection Division, Agricultural Production Bureau, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Japan Plant Protection Association, Tokyo, 1996, p. 67.
- 2) Ogawa H., Katsura E., Kanetoshi A., Kojima H., Kanashima H., Abstracts of papers, the 111th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 1991, No. 4, p. 165.
- 3) "Analytical Methods for Pesticide Residues: Addendum," ed. by Goto S., Kato S., Soft Scientific Publications, Tokyo, 1987, pp. 131–132.
- 4) "Pesticide Data Book. Third Edition: 1997," ed. by Uesugi Y., Ueji M., Koshioka M., Soft Scientific Publications, Tokyo, 1997, pp. 305–306.
- 5) Fanning J. C., Jonassen H. B., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **25**, 29–35 (1963).
- 6) Masugi F., Nakamura T., *Vitamins (Japan)*, **51**, 21–29 (1977).
- 7) Sedlak J., Lindsay R. H., *Anal. Biochem.*, **25**, 192–205 (1968).
- 8) Jagota S. K., Dani H. M., *Anal. Biochem.*, **127**, 178–182 (1982).
- 9) Puchyr R. F., Shapiro R., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 868–870 (1986).
- 10) Moslen M. T., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 403–416.
- 11) Cookson M. R., Slamon N. D., Pentreath V. W., *Arch. Toxicol.*, **72**, 197–202 (1998).
- 12) Goldstein R. S., Schnellmann R. G., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 417–442.
- 13) Halliwell B., Gutteridge J. M., "Methods in Enzymology," Vol. 186, Part B, ed. by Packer L., Glazer A. N., Academic Press, San Diego, U.S.A., 1990, pp. 1–85.
- 14) Kurata T., "Antioxidants. Free Radicals and Biological Defense," ed. by Niki E., Shimasaki H., Mino M., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1994, pp. 79–86.
- 15) "Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Part B. Organic Ligands," ed. by Perrin D. D., Pergamon Press Ltd., Oxford, England, 1979, pp. 650–651.
- 16) Rohde W., Cordell B., Webster R., Levinson W., *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 102–111 (1977).
- 17) Stacey N. H., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 211–220 (1981).
- 18) Crutchley D. J., Que B. G., *Circulation*, **92**, 238–243 (1995).
- 19) Mahmoud O. M., Ford E. J., *J. Comp. Pathol.*, **93**, 551–558 (1983).
- 20) Franchi F., Santoro S., Crescenzi F., Santoro C., Ivaldi M., *Minerva Ginecol.*, **31**, 483–486 (1979).
- 21) Todd J. R., Thompson R. H., *Br. Vet. J.*, **121**, 90–96 (1965).
- 22) Goering P. L., Klaassen C. D., "Comprehensive Toxicology," Vol. 9, ed. by McCuskey R. S., Earnest D. L., Elsevier Science Ltd., Oxford, 1997, pp. 389–406.