

N, N-di(2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline の毒性に関する研究

II. 毒性に対する副腎の関与について

宮尾 陟・三浦徳明*・石黒 茂

(昭和51年8月30日 受理)

Studies on the Toxicity of N, N-di(2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline

II. On a Role of the Adrenal on the Toxicity of the Drug

Noboru MIYAO, Noriaki MIURA* and Shigeru ISHIGURO

(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

前報¹⁷⁾で著者らは、N, N-di(2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline (通称 Torpedo, 以下 Torpedo と略記) が、マウス雄のみにきわめて著しい毒性を示し、マウス雌およびラットの雄、雌にはほとんど毒性を示さないという、非常に興味ある特異な性質を有することを明らかにし、マウス精巣の著明な病変から、マウス精巣がなんらかの形で毒性に関与することを示唆した。マウスの精巣に対する毒性も、精巣に及ぼす直接効果と下垂体-副腎系を介する効果が考えられる。後者の点では、その後、戴²⁴⁾が Leydig 細胞に及ぼす影響の観点から、マウス雄の 20, 60 ppm 群について、下垂体を組織学的に検索し、下垂体の細胞の変化ならびに数を調べているが、 α , β , γ 細胞ともに特に異常を認めていない。

いずれにしても、マウスの精巣にのみ毒性を示し、ラットの精巣には全く毒性を示さないということは不思議であり、ラットでもより大量の場合は、精巣に対して毒性を示すようになるか、また薬物代謝との関連から経口投与以外でも毒性の傾向が同じであるかなどの問題、さらには毒性と副腎との関連などを検討し、いささか知見を得たので報告する。

材料ならびに方法

試験薬物: Torpedo は acetone, benzene には極めてよく溶けるが、水には溶けにくいので、水を用いてガラスホモジナイザーで一様な懸濁液とし、必要量を腹腔内注射した。

供試動物: マウスは ICR-JCL 系、ラットは Wistar 系で、いずれも 5 週齢以上のものを用いた。なおマウスは実験の目的に応じて、次のような前処置を

行った。

1) 去勢: nebutal 麻酔後、常法どおり実施した。

2) 副腎摘出: nebutal 麻酔下、腹位に固定して常法どおり両側副腎を同時に摘出した後、後処置を十分施し、日本クレア固型飼料 CE-2 と生理食塩水で飼育した。

3) ホルモン投与: testosterone propionate を、まず acetone に溶解し、40~45°C の恒温槽で acetone をとばしながらゴマ油に溶解し、0.025 mg/20 g (体重) または 0.05 mg/20 g を連日 2 週間皮下注射した。estradiol benzoate は蒸留水で希釈し、0.05 mg/20 g または 0.1 mg/20 g を連日 1 週間筋肉内注射した。hydrocortisone acetate は 1 mg/20 g を腹腔内注射した。

肝トリプトファンピロラーゼ (以下 TP) 活性: Knox & Mehler¹⁴⁾ に準じて測定した。

なおその他の方法の詳細は、それぞれ実験成績のところで記述する。

実験成績

(1) Torpedo の腹腔内投与がマウスに及ぼす影響

前報¹⁷⁾では、薬物は混飼によって与えられたので、非経口投与の場合も同じ結果が得られるかどうかを検討したもので、Torpedo 腹腔内投与後の死亡状況は Table 1 のとおりである。マウス 1 回の投与量は、前報¹⁷⁾の飼料中の薬物含有量を基に算定すると、5, 20, 60, 180, 540 ppm 群の 1 日の摂取量は、それぞれ約 0.5, 2, 8, 32, 128 mg/kg であったので、これを 1 回の投与量とした。

腹腔内投与の場合も、投与量が多くなると雄マウス

* 長崎県中央家畜保健衛生所

Table 1. Number of mice*1 died in each week after the intraperitoneal injection of Torpedo.

Sex*5 Group	Number of animals	Torpedo (mg/kg)	1*2			2		3	4	5	7	8	9	Sum of dead animals	Mortality (%)
			5*3	6	7	8	9	10	15	25	29	44	50		
M	I	10	0*4										0	0	
	II	10	0.5										0	0	
	III	10	2										0	0	
	IV	10	8						1				1	10	
	V	10	32		1	1	2		1	1	1	1	9	90	
	VI	10	128	2	3	2	1	1	1				10	100	
F	I	10	0*4										0	0	
	II	10	0.5										0	0	
	III	10	2										0	0	
	IV	10	8										0	0	
	V	10	32										0	0	
	VI	10	128									1	1	10	

*1 Age: 6 weeks old.

*2 Weeks after the administration.

*3 Days when animals died after the administration of Torpedo.

*4 Saline was administered.

*5 M: Male, F: Female.

の死亡率は高くなり、V、VI群のそれは90、100%を示したが、雌マウスはほとんど死亡せず、経口投与の場合と同様の所見であった。VI群で投与後8週目に1匹死亡しているが、これは後述の体重増加率からみても、薬物の高濃度による一般的障害と思われる。ただ経口投与の場合には、低濃度群の雄が15~25%死亡しているのに¹⁷⁾、今回はそれに相当するII、III、IV群で、ほとんど死亡例がみられなかった。雄のV、VI群の死亡マウスは、死亡前日位から元気、食欲がなくなり、目やに、立毛等が観察され、また肛門部に黄褐色の下痢様便が付着していた。経口投与でみられた精巣萎縮は、肉眼観察では1週以内に死亡したマウスでは認められず、2週以後に死亡したものでは認められた。その病変も経口投与の場合と同様、精細管の萎縮、間質の減少、精細胞の壊死、減少、消失、無精子等が観察され、死亡日が早い(1週以内)ものでは軽微で、遅いものでは重度であった。精巣以外の所見では、肝のウツ血、肺の充出血が主なものであった。ほとんど死亡しなかった雄のII~IV群では、4週頃までは臨床的变化は全く認められなかったが、5週以後では対照群と比較して、体毛につやがなくなるなどの変化がみられた。

投与後の雄の体重変化は Fig. 1 のとおりで、対照(I群)の順調な増加に比べて、II~IV群では投与後20日位まで対照群と同様な増加を示したが、それ以後は減少を始め、投与中止(50日目)後の10日間でも、III、IV群はやや増加しているが、投与量の少ないII群ではむしろ減少している。V、VI群では投与後の

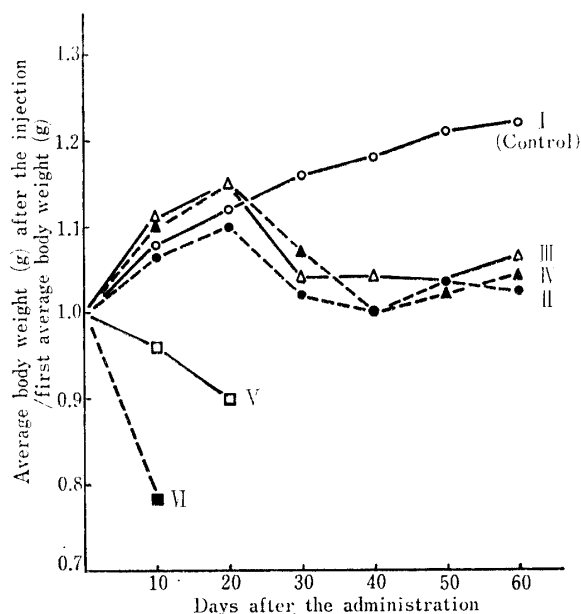


Fig. 1. The change of average body weight in male mice after the intraperitoneal injection of Torpedo.

初期から急速に減少して死亡した。雌ではII~V群では臨床的にも何ら変化もみられず死亡するものもなかったが、40日頃よりやや体重増加率の減少がみられ(Fig. 2)、投与中止後(50日以後)ではまた増加を示している。VI群は投与初期に変化は認められなかったが、中期以後は体毛につやがなくなり、また20日以後は体重も減少を示し、高濃度では雌にも一般的影響を及ぼすことを示している。

(2) 大量の Torpedo 投与がラットに及ぼす影響

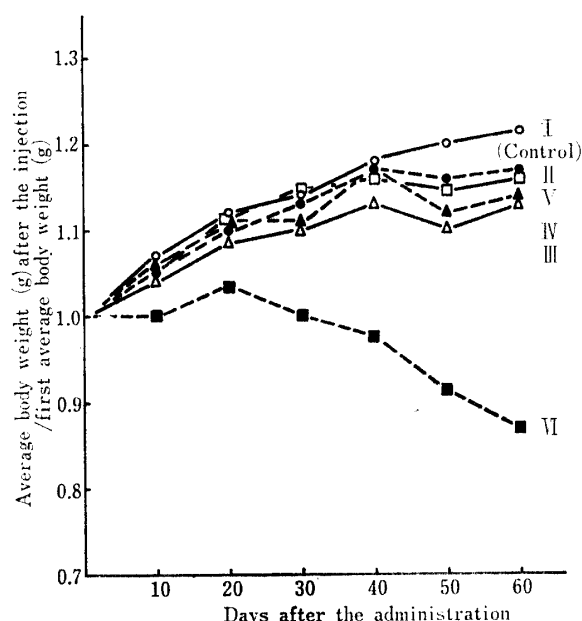


Fig. 2. The change of average body weight in female mice after the intraperitoneal injection of Torpedo.

経口投与の場合、ラットでは 1620 ppm 群 (毎日 80 ~90 mg/kg 摂取に相当する) でも変化がみられなかった¹⁷⁾、より大量ではマウスと同様な傾向を生じることがどうかを検討した。Table 2 に示すように、80

~90 mg/kg の 3 倍以上である 250, 500, 1,000 mg/kg の 3 群について調べたが、40 匹中雄 8, 雌 7 匹の似たような死亡数であった。剖検の結果死亡ラットでは、すべて腸管癒着が認められたので、それらの死亡原因は Torpedo が難水溶性のため、本実験で用いたような高濃度の場合、相当稠密な懸濁液であり、一種の異物として作用したこと、またそのための太い注射針の使用によって、その刺激から腹膜炎を併発し、その上腸管癒着のため消化障害がおり、衰弱、死亡したものと考えられる。組織学的検索では精巣に何らの異常も認められなかった。

(3) マウスの繁殖に及ぼす影響

腹腔内に 128, 64, 32, 0 (対照として生理食塩水) mg/kg の Torpedo を雄マウスに投与した 3 日後から、1 週間雄 1 匹に対して雌 3 匹を同じケージ内に収容して交配せしめた。雄、雌とも一度繁殖に供し、異常の認められなかったものを用いた。またケージ内の雄はいずれも観察した限りでは交尾欲を示していた。生れた仔の数は Table 3 のとおりで、0 mg/kg (対照) 雄の 41 匹に対して、32 mg/kg 投与雄からは 22 匹、64 mg/kg の雄からは 20 匹、128 mg/kg の雄からは 3 匹で、Torpedo が雄の精巣に作用し、繁殖能力に悪影響を及ぼすことは明らかである。

Table 2. Number of rats*1 died before the 40th day after the intraperitoneal injection of large quantity of Torpedo.

Sex*3	Group	Number of animals	Torpedo (mg/kg)	Days after the administration												Sum of dead animals	Mortality (%)	
				3	4	5	7	8	11	14	18	25	27	29	40			
M	I	5	0*2			1											1	20
	II	5	250	1							1						2	40
	III	5	500		1		1		1								3	60
	IV	5	1000					1						1			2	40
F	I	5	0*2														0	0
	II	5	250			1											1	20
	III	5	500			1			1					1			3	60
	IV	5	1000			1					1	1					3	60

*1 Age: 5 weeks old. Body weight: 85~120g

*2 Saline was administered.

*3 M: Male, F: Female.

Table 3. Fertility in male mice administered various quantities of Torpedo.

Male	Torpedo administered (mg/kg)											
	128			64			32			0		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
No. of female												
Number of young	3	0	0	10	0	10	13	0	9	15	14	12
Male	2			5		4	5		6	10	9	5
Female	1			5		6	8		3	5	5	7

(4) Torpedo 投与後のマウス精巣抽出物がマウスに及ぼす影響

Torpedo 負荷マウスの精巣そのものが、マウスに及ぼす影響をみるため、8週齢マウス20匹に Torpedo 128 mg/kg を3日間連日腹腔内投与し、4日目に精巣をとりだして20匹分プールしたものを一般毒物抽出法⁷⁾に準じ、25%タングステン酸ナトリウムでホモジナイズし、50%硫酸水素ナトリウムを加えて加熱し、濾過、除タンパクの後エーテルで抽出し、エーテル層と水層に分離した。以後の操作は常法を省略し、エーテルをとばした後の残渣に水を加えてよく攪拌し、水層は減圧濃縮してともに適量にした。これらの液を5週齢の雌雄マウス10匹ずつに0.25 ml ずつ2週間連日腹腔内投与したが、雄、雌ともに全く死亡せず、臨床観察でも全く変状を認めなかった。

(5) 去勢ならびに異性ホルモン投与が Torpedo の毒性に及ぼす影響

5-1. testosterone 投与実験

Table 4 に示すように、まず雌に testosterone を投与した場合 (I群)、去勢雄 (II群)、去勢雌 (III群) の場合を正常雄 (IV群) と比較した。II, III, IV群にゴマ油を投与したのは、testosterone をゴマ油に溶かしたので、その影響を考慮したためである。testosterone 液は体重 20 g 当り 0.1 ml (testosterone 0.05 mg を含有) を連日2週間皮下注射した。ゴマ油も同様にし、去勢群では手術後5日目から投与した。翌日から各群とも Torpedo 64 mg/kg を隔日腹腔内投与した。Table 1 の結果 (投与20日までに32 mg/kg で50%, 128 mg/kg で100%の死亡率) からみて、20日位までにIV群の大部分は死亡すると予想したが、約50%しか死亡しなかったので、20日以降は倍量の128 mg/kg を50日目まで投与した。しかしその後の死亡状況もそれほど急激にはならなかった。これは64 mg/kg で Torpedo に対する耐性が

ある程度確立したためかもしれない。また50日間を通してのIV群の死亡率は、Table 1 のV群 (32 mg/kg 投与) と大体同じで、Torpedo の影響が少ないようであったが、これは Torpedo 投与開始週齢の相違 (6週齢と9週齢) や、ゴマ油投与による生体の感受性の変化などによることが考えられる。去勢雄のII群で死亡率が極端に減少すること、testosterone 投与雌 (I群) で毒性に少々影響がみられる点は、興味あるところである。

Table 4 の結果を補足する目的で、去勢雄、雌に testosterone (0.025 mg/20 g) を投与する実験を追加した。Torpedo 投与前のいろいろな処置は Table 4 の場合と同様で、Torpedo は128 mg/kg を隔日に20日間腹腔内投与した。死亡状況は Table 5 のとおりで、対照としてゴマ油投与群 (I群) を設けたのは、Table 4 で Torpedo の毒性が減弱するような所見がみられるためである。今回 (7週齢マウス) の場合、大部分1週内に死亡したことからみて、Table 4 のIV群での初期の死亡率の低下や死亡までの日数遅延は、ゴマ油による生体の感受性の変化によるものではなく、マウスの週齢の相違による感受性の差異によるものと思われる。去勢雌に testosterone を投与した群 (II群) は、投与しない群 (Table 4 のIII群) に比べて、毒性が増加する傾向を示している。去勢雄に testosterone を投与した群 (III群) は、投与しない群 (Table 4 のII群) が20匹中1匹のみ、Torpedo 投与後14日目に死亡したのに比べて、8日目までに5匹中3匹も死亡し、明らかに毒性の増加が認められた。

5-2. estradiol 投与実験

Table 6 に示すように、I群は雌に estradiol (0.05 mg/20 g)、II群は去勢雄に estradiol (0.05 mg/20 g)、III, IV群 (対照) は雄、雌に生理食塩水を投与した。II群は術後5日目から estradiol 投与を開始

Table 4. Effect of testosterone treatment and castration on the toxicity of Torpedo to mice.

Group	Sex*1	Number of animals	Treatment	Number of dead animals												Sum of dead animals	Mortality (%)											
				7*2	8	9	10	11	13	14	18	19	25	34	35			40	45	50								
I	F	20	(Testosterone Sesame oil												1	1											2	10
II	CM	20	Sesame oil										1														1	5
III	CF	20	Sesame oil																								1	5
IV	M	20	Sesame oil	2	2	2	1	1	1					1	1	2	1	1	1	1	1						17	85

*1 F: Female, CM: Castrated male, CF: Castrated female, M: Male.

*2 Days after the administration of Torpedo.

The details of the method are described in the text.

Table 5. Effect of testosterone treatment after the castration on the toxicity of Torpedo to mice.

Group	Sex*1	Number of animals	Treatment	Number of dead animals					Sum of dead animals	
				4*2	5	7	8	11		20
I	M	5	Sesame oil	1	3		1			5
II	CF	5	(Testosterone Sesame oil				1	1		2
III	CM	5	(Testosterone Sesame oil		1	1	1			3

*1 M: Male, CF: Castrated female, CM: Castrated male

*2 Days after the administration of Torpedo.

The details of the method are described in the text.

Table 6. Effect of estradiol treatment on the toxicity of Torpedo to mice.

Group	Sex*1	Number of animals	Treatment	Number of dead animals					Sum of dead animals	
				4*2	5	6	7	8		14
I	M	10	Estradiol			7	3			10
II	CM	10	Estradiol		1			1		2
III	M	10	Saline	4	5	1				10
IV	F	10	Saline							0

*1 M: Male, CM: Castrated male, F: Female.

*2 Days after the administration of Torpedo.

The details of the method are described in the text.

し、連日1週間筋注した。翌日から Torpedo (128mg/kg) を隔日腹腔内投与した。雄に estradiol を投与した I 群は対照 (III 群) と同様に元気がなくなり、立毛、目やに、下痢様便の付着等がみられ、Torpedo 投与7日目までに全例死亡したが、III 群が5日目までにすべて死亡するのに対して、やや死亡がおくれており、死亡遅延に estradiol がある程度関与しているかもしれない。去勢雄に estradiol を投与した II 群は立毛などみられても、下痢様便はみられず、投与後8日までに2例死亡するにすぎなかった。対照雌 (IV 群) はやはり死亡しなかった。

(6) Torpedo の毒性に及ぼす副腎摘出の影響

Table 7 に示すように、I 群は副腎摘出 (以下副摘と略す) 雄に Torpedo を投与する群、II 群は副摘後の死亡状況を比較観察するための雄で Torpedo を投与しない群、III 群は I 群と同様な雌の群、IV 群は II 群と同様な雌の群、V、VI 群は副摘しない雄、雌の対照群で Torpedo を投与する群、VII 群は雄に副摘後 cortisone と Torpedo を投与する群、VIII 群は同様な雌の群とした。マウスはすべて7週齢のもので、Torpedo は副摘翌日から 128mg/kg を連日2週間 (VII、VIII 群は手術後5日目から投与)、cortisone は 1mg/20g を手術翌日から連日投与した。副摘動物は摘出

後生理食塩水を与えても、7~10日までに死亡するといわれるが、本実験の II、IV 群では観察期間の2週間以内に、雄4匹、雌5匹が死亡するのみであった。この原因として副摘の不完全または副々腎の存在¹⁶⁾ (マウスでは40%程度存在するといわれる) が考えられる。しかし、雄では Torpedo 投与後の体重の低下が相当あって、副摘による体重低下との関係がはっきりしない (Fig. 3) が、Torpedo の影響が大して及ばない雌では、Torpedo 投与のみの VI 群に比べて、副摘の III、IV 群が著しい体重減少を示しており (Fig. 3)、後述のように副摘マウスで TP の活性の増加がみられないことより、副摘の効果はあったものと思われる。

いずれにしろ I~IV 群の死亡マウスは V 群のように下痢様便、立毛等はみられずに死亡しており、Torpedo そのものによる毒性が減弱していることを思わせる。副摘後 cortisone 処置をした雌 (VII 群) の死亡率は、cortisone 処置をしない副摘雌 (III 群) に比べて明らかに減少した。1匹死亡しているが、これは Torpedo によるものとは思われなかった。雄 (VII 群) は V 群のように下痢様便等がみられて死亡し、cortisone 処置をしない副摘雄 (I 群) と異なる所見であった。

Table 7. Effect of adrenalectomy on the toxicity of Torpedo to mice.

Group	Sex* ¹	Number of animals	Treatment	Number of dead animals											Sum of dead animals	Mortality (%)
				3* ²	4	5	6	7	8	9	10	12	14			
I	M	10	(Adrenalectomy Torpedo)	3				3	2		1				9	90
II	M	10	(Adrenalectomy Torpedo)	1		1					2				4	40
III	F	10	(Adrenalectomy Torpedo)	1		1		1		3	1				7	70
IV	F	10	(Adrenalectomy Torpedo)	1	1	1		1			1				5	50
V	M	10	(Torpedo)	2	1	3	3						1		10	100
VI	F	10	(Torpedo)												0	0
VII	M	6	(Adrenalectomy Cortisone Torpedo)	2	3										5	83.3
VIII	F	6	(Adrenalectomy Cortisone Torpedo)	1											1	16.7

*1 M: Male, F: Female.

*2 Days after the administration of Torpedo.

The details of the method are described in the text.

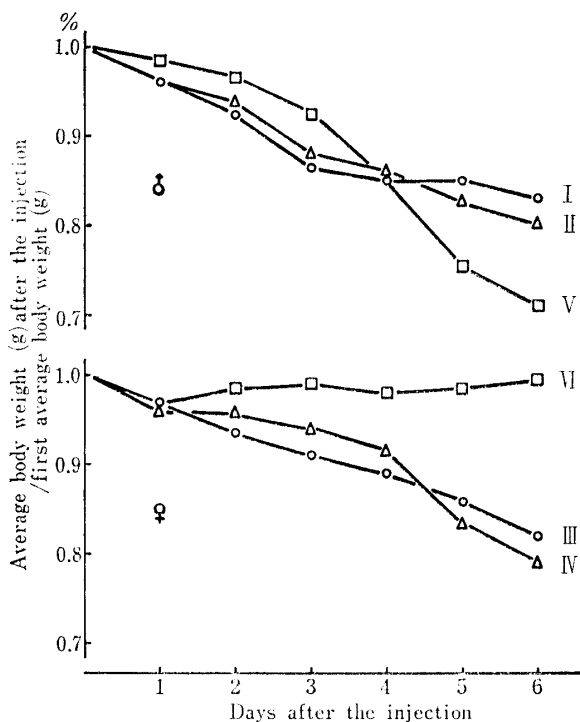


Fig. 3. The decrease of the body weight in adrenalectomized male and female mice after the injection of Torpedo.

I, III Adrenalectomized, Torpedo-treated
 II, IV Adrenalectomized
 V, VI Torpedo-treated

(7) Torpedo がマウス肝 TP 活性に及ぼす影響

7-1. 正常ならびに生理食塩水投与マウスの TP 活性

マウス肝 TP についての研究はきわめて少なく、

ネズミの種類によって活性値が非常に異なるという報告⁶⁾ もみられるので、一応正常値を知る目的で雄 15 匹、雌 16 匹について肝 TP 活性値を測定した結果、雄 1.892 ± 0.334 、雌 $1.461 \pm 0.304 \mu\text{M}$ キヌレン/時間/g 肝という平均値が得られ、性差が認められた ($P < 0.05$).

次に TP 活性は高張 NaCl で誘導されるという事実¹²⁾ もあり、本研究で生理食塩水を投与するものを対照とした場合もあるので、TP 誘導の有無を検討した結果、雄、雌ともに正常マウスとほとんど同じであり、有意差は認められなかった。

7-2. Torpedo 1 回投与後の TP 活性

Fig. 4 に種々量の Torpedo 1 回腹腔内注射 6 時間後の TP 活性を示した。8 mg/kg 投与群の TP 活性は、雄、雌ともに対照群の約 2.3 倍の増加を示し、また雌の活性は雄の 76% であった。32 mg/kg 投与群では雄 2.9 倍、雌 2.8 倍の増加で、雌は雄の 73% であった。明らかに雄、雌とも Torpedo 投与量の増加につれて、TP 活性は段階的に増加するが、雄では 64 mg/kg と 128 mg/kg の場合はほぼ同じであった。

7-3. (1) の実験における残存マウスの Torpedo 投与後の TP 活性

Table 1 に示した II 群 (0.5 mg/kg)、III 群 (2 mg/kg)、IV 群 (8 mg/kg)、V 群 (32 mg/kg)、VI 群 (128 mg/kg) の投与中止後 10 日以降残存したマウスについて、TP 活性を 128 mg/kg の Torpedo 1 回腹腔内投与 6 時間後に測定した結果を Fig. 5 に示した。例数は各群雌雄 5 匹ずつである。雌では対照と比

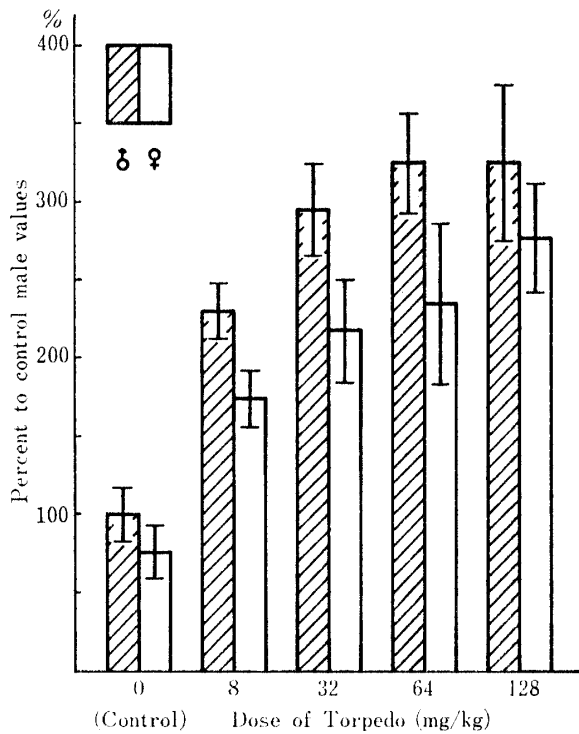


Fig. 4. Effect of a single injection of Torpedo on the activity of mouse liver tryptophan pyrrolase.

Tryptophan pyrrolase activity was measured 6 hrs after a single intraperitoneal injection of Torpedo. Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent. Each column represents the mean value of five animals and vertical lines indicate the standard error.

較して、TP 活性の増加はⅡ～Ⅴ群までは1.1～1.2倍程度であったが、Ⅵ群だけがとくに2.6倍の活性増加を示した。雄ではⅤ、Ⅵ群が死亡のため例数がたらず、測定できなかったが、Ⅱ、Ⅲ群で1.3および1.4倍とわずかに増加し、Ⅳ群で2.2倍の増加を示した。

7-4. Torpedo による TP 誘導の経時的変動

128 mg/kg の Torpedo を正常マウスに1回腹腔内投与後 1.5, 3, 6, 12, 24時間における TP 活性は Fig. 6 のとおりである。雄、雌とも6時間後が最高で、それぞれ3.3, 3.6倍の増加を示し、12時間後に正常レベルにもどっている。この間雄の方が常に雌より20～30%高い活性を示した。

7-5. Torpedo による TP 誘導に及ぼす去勢ならびに testosterone 投与の影響

Fig. 7 は去勢後4日および2週のマウス、ならびに去勢後2週間にわたって連続して testosterone (0.025 mg/20g) を投与したマウスに、Torpedo (128 mg/kg) を1回腹腔内投与6時間後の TP 活性を、

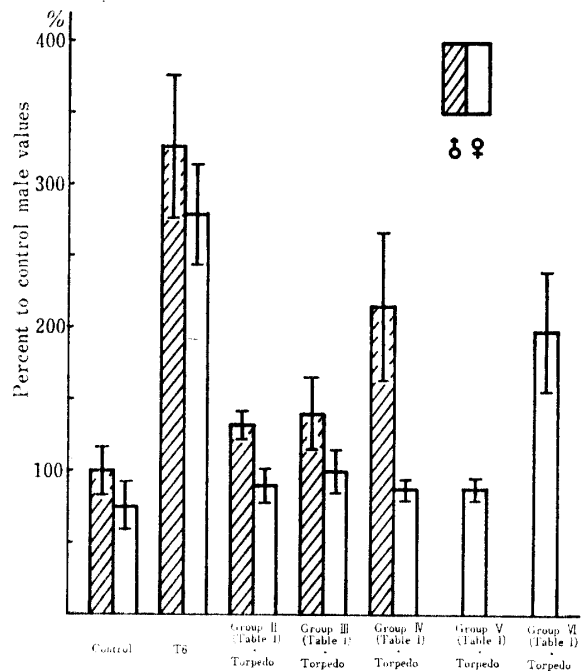


Fig. 5. Tryptophan pyrrolase activity 6 hrs after a single injection of Torpedo (123 mg/kg) into mice survived in the experiment (1).

T6 represents tryptophan pyrrolase activity 6 hrs after a single injection of Torpedo (128 mg/kg) into intact mice. Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent. The details of the method are described in the text.

正常マウスおよび正常マウスに Torpedo のみを投与したものと比較したものである。Torpedo による TP 活性の増加は正常マウスの方が去勢マウスより高く、去勢雄の活性は雄の85%、去勢雌の活性は雌の62%であった。去勢4日後では、Torpedo 投与後の TP 活性にまだ雌雄差がみられ、去勢雄の方が去勢雌より高かったが、去勢2週間後では両者の TP 活性に差がなくなり、誘導活性も正常雄より極端に低く、1.4倍位であった。去勢後2週間連日 testosterone 処置マウスの TP 活性は去勢雄、雌とも大体同じであり、しかも正常雄の誘導活性に近い値を示した。

7-6. Torpedo による TP 誘導に及ぼす副腎摘出の影響

Torpedo による TP 活性の増加が有機リン剤²⁷⁾やある種のトランキライザー⁴⁾などと同じく、最終的に副腎からの glucocorticoid の分泌促進に基づく可能性が推測されるので、副摘マウスを用いて TP 活性を測定した結果は Fig. 8 のとおりである。Torpedo 投与正常マウスが6時間後に3.3倍の活性を示し

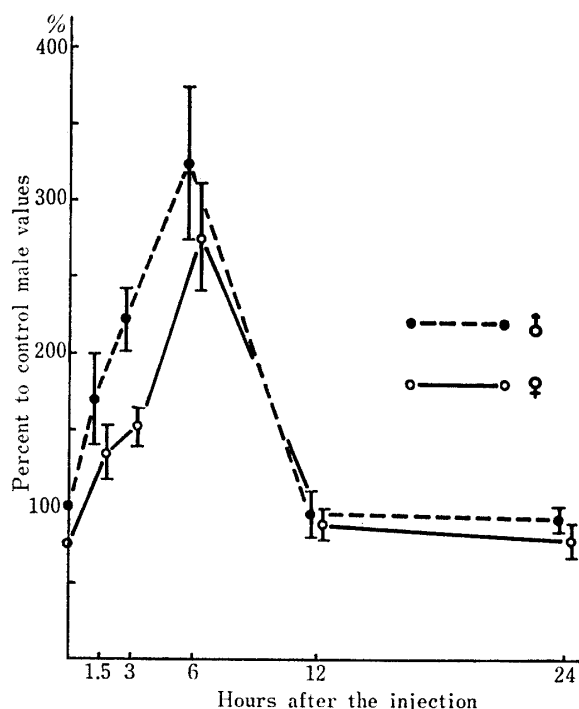


Fig. 6. Effect of a single dose of Torpedo (128 mg/kg) on mouse liver tryptophan pyrrolase as a function of time.

Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent. Vertical bars represent the standard error at each point.

たのに、副摘マウスでは、対照（正常）マウスとほとんど差がなかった。

7-7. Torpedo の連続投与による TP 活性の変動

128 mg/kg の Torpedo の連続投与で、雄マウスが1週内に大部分死亡しているのに、投与後3日前後の生体の状態の一端を知る目的で、3日連続 Torpedo (128 mg/kg) を投与し、最終投与6時間後に TP 活性を測定した。Fig. 9 に示すように、雄では1回投与後3.3倍に増加したのに対して、3日連続投与では3.1倍の増加を示し、それほど差はなかった。雌では1回投与後3.6倍に増加し、3回連続では2.9倍の増加で、約22%低下した。また1回投与では雌の活性は雄の85%であったが、3回投与では69%で、約16%の低下を示した。

考 察

先の Torpedo の経口投与による毒性試験において¹⁷⁾ マウスでは雄のみに著しい毒性を示し、雌にはまったく毒性を示さないこと、またラットでは観察した1620 ppm 濃度まで、雄、雌ともにまったく毒性を示

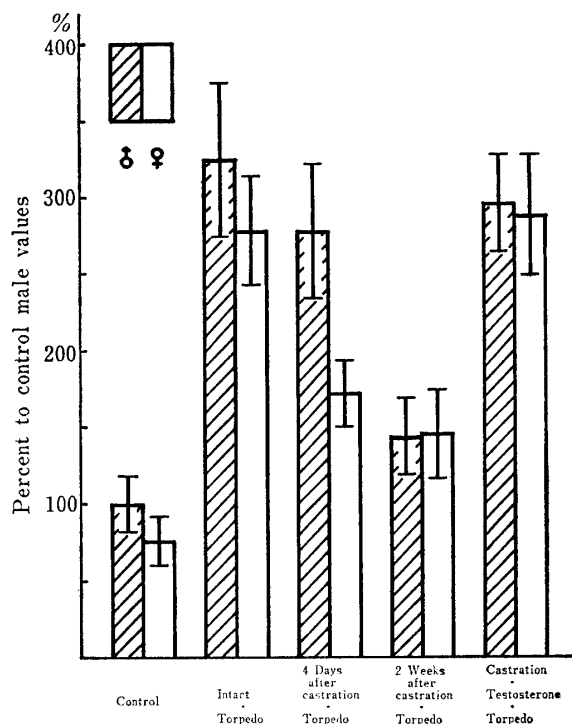


Fig. 7. Effect of castration and testosterone treatment on mouse liver tryptophan pyrrolase activity 6 hrs after the intraperitoneal injection of Torpedo (128 mg/kg).

Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent. The details of the method are described in the text.

さないという興味ある結果が得られている。

緒論に述べたような理由で、著者らは Torpedo の毒性の本態について、いささか追求することにしたが、前報¹⁷⁾ のような固形飼料を調製することは多額の費用を要するので、Torpedo の腹腔内投与によって観察することにし、まずマウスにおいて腹腔内投与も経口投与も毒性傾向が同じかどうかを比較検討した。経口投与の場合、雄の投与後1週内の死亡率は180 ppm 群 (32 mg/kg を1日に摂取)、540 ppm 群 (128 mg/kg を1日に摂取) で各々、0%、35%であったが¹⁷⁾、腹腔内投与の場合は隔日投与なのにⅤ群 (32 mg/kg)、Ⅵ群 (128 mg/kg) で、20%、70%であった。また2週以内の死亡率は経口投与では32 mg/kg 群が10%、128 mg/kg 群が80%であったが¹⁷⁾、腹腔内投与では32 mg/kg 群が50%、128 mg/kg 群が100%であった (Table 1)。雌はほとんど死亡しなかった。このように Torpedo がマウス雄のみに影響を与えることは、腹腔内投与の場合も経口投与の場合と同様であって、しかも腹腔内投与の方がより大き

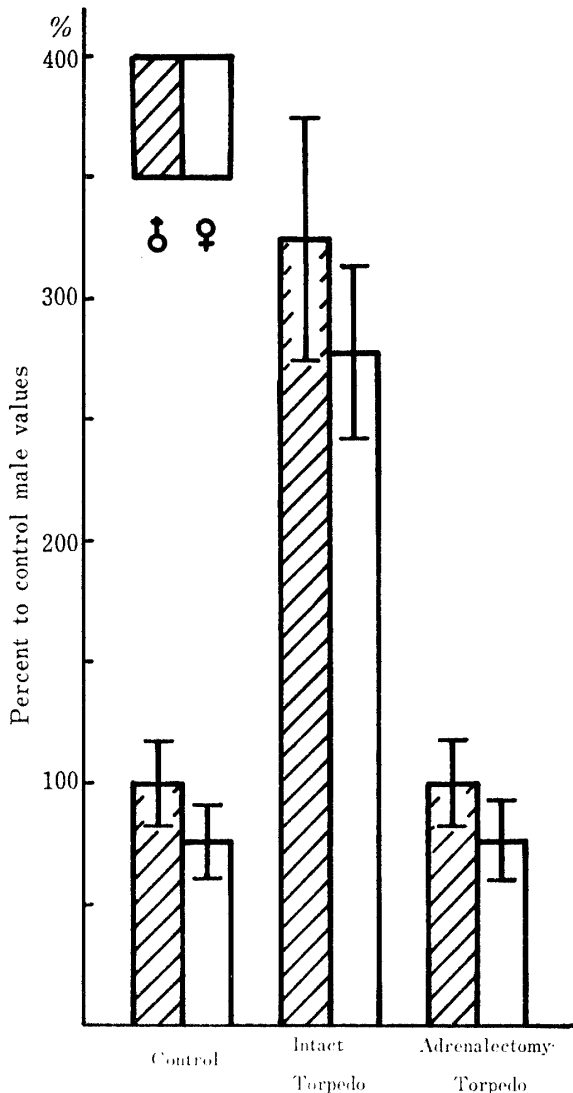


Fig. 8. Effect of adrenalectomy on mouse liver tryptophan pyrrolase activity 6 hrs after the intraperitoneal injection of Torpedo (128 mg/kg).

Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent.

く影響を与えるといえる。

腹腔内投与の場合、注射針と薬物の機械的刺激が問題となるが、対照雄、雌、Torpedo 投与雌の死亡率が0%であることから、それほど影響を与えるとは考えられない。経口投与では小腸で吸収後、門脈を経て一旦肝に入った後体循環に入るが、腹腔内投与の場合は直接体循環に入るわけであるから、胃腸内での消化その他の作用や、肝における代謝作用をうけておらず、また経口投与では Torpedo の吸収が腹腔内投与より低いことが考えられるので、後者の方が毒性が大きいのは妥当であろう。なお Torpedo が肝の代謝に

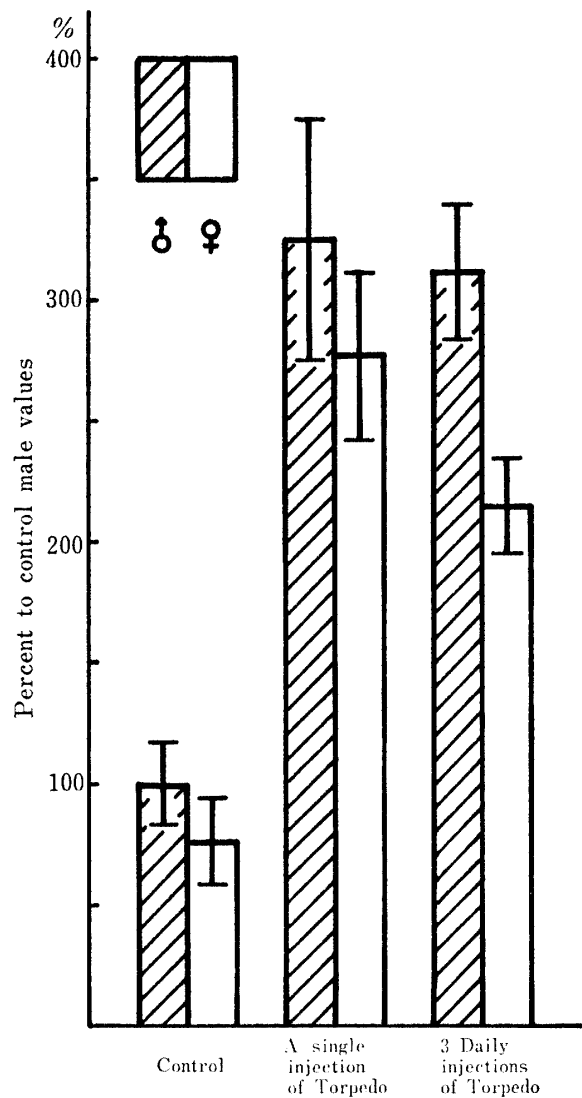


Fig. 9. Effect of a single and three daily injections of Torpedo (128 mg/kg) on mouse liver tryptophan pyrrolase activity.

Tryptophan pyrrolase activity was measured 6 hrs after the last injection of Torpedo. Tryptophan pyrrolase activity obtained from the control male mouse was represented as 100 percent.

よって、どの程度毒性が弱まる（または強まる）かについては、薬物代謝酵素阻害剤である SKF-525A を用いる実験を計画したが、本薬物の入手が困難で実施できなかった。

マウス雄における精巣の著しい病変からみて、Torpedo は一応精巣毒と考えられるが、その毒性がマウスに限られ、ラットの精巣にはまったく影響を及ぼさないことは不思議であり、経口投与で観察した 1620 ppm (80~90 mg/kg を1日摂取) より、さらに大量である 250, 500, 1,000 mg/kg を隔日腹腔内投与す

る実験を行った。この場合の死亡状況は雌雄大体同様な傾向であり (Table 2), またⅣ群雄の死亡2例の病理組織所見においても、とくに Torpedo によると思われる所見は得られなかった。従ってこのような高濃度でも、ラットではマウスにおけるように精巣にのみ特異的に作用するという性質は認められない。

以上の結果からみて、Torpedo はマウス雄のみ、しかもその精巣に致死的影響を及ぼす精巣毒であって、その毒性が一般的にいうマウスの性差によるものとは考えにくい。雌雄のラットの間で, barbiturates, strychnine, nicotine, picrotoxin など、ある種の薬物に対する反応性が異なることは古くから知られている。その原因として以前は、これら薬物に対する中枢神経系の感受性が異なるためと考えられていたが、その後肝ミクロゾームの薬物代謝酵素の性差が、その主な原因であるとみられるようになってきた。すなわちある種の薬物代謝酵素は男性ホルモンのタンパク同化作用に依存することが認められている^{2,8,10)}。さらに興味あることに、肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素活性の性差はラットだけに認められ、マウスその他の動物、ヒトでは認められていない⁹⁾。なお phenobarbital をはじめ多くの薬物が薬物代謝酵素活性を誘導することが知られているが、この場合の活性増加はラット以外の多くの動物でも認められており、活性増加の発現時間も相当違って、タンパク同化ホルモン依存とは異なるようである。

いずれにしろ、Torpedo に対する性による反応性の相違はマウスのみにもみられ、ラットではみられないこと、しかもその影響が雄のみであること、経口投与(ある程度代謝後と考えられる)でも、腹腔内投与(主に直接と考えられる)でもその反応性の傾向は同一であること、および精巣に対する著しい病変などからみて、Torpedo に対する反応性の性による差異は、タンパク同化ホルモン依存性の薬物代謝酵素活性の性差などによるものではなく、Torpedo の毒性は精巣にその主作用を有するものと考えられる。何故に Torpedo がマウスの精巣のみに作用し、ラット精巣に作用しないかは不明であるが、タンパク同化依存性の薬物代謝酵素活性の性差が、ラットのみにもみられるかということも、現在のところまったく不明であって、これらは今後の研究課題といえよう。

Torpedo を投与した雄マウスと正常雌マウスとを交配させると、雌マウスの繁殖能力の低下は明らかで、32 mg/kg と 64 mg/kg 投与のものでは仔の数にそれほど差はなく、対照のもの約半分であったが、

128 mg/kg 投与のものでは対照の 1/10 以下であった (Table 3)。128 mg/kg 隔日投与で雄は4日以降死亡しており (Table 1)、繁殖実験では 128 mg/kg の1回投与が3日目から繁殖に影響を及ぼしているので、Torpedo の精巣への影響は投与後2~3日以内に現われるものと考えられる。

次に Torpedo が精細胞の壊死・消失など、精巣に悪影響を与えた後、精巣にとどまるか、または精巣から有害物質がでて、生体に致死作用を及ぼすかどうかをみるため、精巣抽出物を雌雄マウスに投与したが、まったく変化が認められなかった。従って Torpedo が精巣に蓄積することは考えられず、また変化した精巣から有害物質が出ることも考えられない。

Torpedo の雄マウスに対する毒性は去勢すると著明に減退し、それに testosterone を投与すると、ある程度また毒性が増大することが認められた (Table 4, 5)。また去勢雌に testosterone を投与すると去勢雄ほどではないが、Torpedo の毒性がやや増大するようにみえた。しかし去勢雌には大して毒性を示さないといえよう。さらに雄に estradiol を投与しても Torpedo の毒性には変化なく、去勢雄に testosterone 投与の場合と estradiol 投与の場合とを比較すると、Torpedo の毒性は前者の方が強い (Table 5, 6)。これらの事実は、マウスにおける Torpedo の毒性発現に卵巣の有無は関係なく、精巣の存在が大きく関与し、二次的に男性ホルモンがその毒性に関与することを示唆し、また estradiol は testosterone とは逆に、むしろ Torpedo の毒性を弱めるように作用すると考えられる。testosterone の存在が Torpedo の毒性に重要性を持っているとすると、その代謝酵素活性がタンパク同化ホルモン依存性であって、その代謝産物が雄に有害に作用するという事も考えられる。ラットでは有機リン剤の paration などその事実が認められている。しかし前述のように腹腔内投与が経口投与よりも毒性が強くと現われると思われること、マウス雌にはほとんど毒性を示さないこと、現在のところマウスでは肝ミクロゾームの薬物代謝酵素活性に性差が認められていないことなどから、Torpedo の代謝産物が有害的に作用することは一応否定せざるをえないが、Torpedo による TP の誘導もみられるので、この点はなお詳細な研究が必要であろう。

副摘マウスにおける実験では、対照の副摘雌雄マウスが術後10日までに約半数しか死亡していないので、副摘が完全であったかどうか、また副々腎の存在などの問題が残るが、前述のように一応副摘効果はあった

ものと考えられる。例数が少ないのでそれほど明白なことはいえないが、Table 7 の死亡数、対照マウス (V 群) の体重の減少状態、臨床所見からみて、副摘によって Torpedo の毒性はある程度減弱するものと思われる。副摘後 cortisone 処置した場合は、Torpedo の毒性は雄では再び増大し、雌では減弱するようである。(Table 7)。一方体重の減少、臨床所見からみた I, II 群の比較では、Torpedo は副摘そのものにとくに影響を与えることはないようである。いずれにしても Torpedo による TP 活性の誘導、副摘によるその阻害などを考え合せると、Torpedo の精巣に及ぼす毒性には副腎 (または下垂体-副腎系) が関与するものと思われる。

一般に薬物代謝酵素の場合、副摘による影響、摘出後の副腎皮質ホルモン投与によるその回復はきわめてはっきりしており、たとえば雄ラットでは副摘により肝ミクロゾームの hexobarbital の水酸化などが著しく低下し、cortisone や prednisolone の投与で回復することが認められており⁹⁾、Kato & Gillette¹¹⁾ も hexobarbital や aminopyrine 代謝酵素活性が、雄ラットで副摘後著しく低下することを認めている。本研究では副摘の影響がそれほど明確でないので、より多数例について詳細な研究が必要であろう。

TP は glucocorticoid によるホルモン誘導ならびに tryptophan による基質誘導を示す典型的な酵素であるが、その他有機リン剤の EPN²²⁾、insuline²³⁾、isocarboxazid²⁰⁾、triamterene⁵⁾、histidine^{12, 13, 15)}、histamine¹²⁾、epinephrine¹²⁾、ACTH^{12, 13)}、ethylalcohol²¹⁾、大麻抽出物¹⁹⁾ など多くの物質により誘導することが認められている。そしてこれらの薬物による TP 誘導は副摘ラットでは認められなくなることが多く、その大部分はストレスアとしての働きにより、下垂体-副腎系の賦活によって副腎からの glucocorticoid の分泌促進によることが明らかにされている。

マウスにおける TP 活性の正常値は雄の方が雌よりも高く、Torpedo による誘導は雌雄ともに認められ、投与 6 時間後で両者大体同じく 3 倍前後の誘導値を示し、また Torpedo の投与量の増加につれて誘導値も増加の傾向を示した (Fig. 4, 5)。誘導値は投与 6 時間前後が最高で、12 時間後には正常値にもどっている (Fig. 6)。また Torpedo による TP 誘導能と毒性との関係をみると、雄は TP 活性が対照雄の 3 倍の増加をきたす 32 mg/kg から死亡しはじめ、雌は対照雄の 2.8 倍の増加をきたす 128 mg/kg で、臨床所

見、体重増加率などの点で毒性が観察されており、Torpedo の毒性が死亡として現われるのは、酵素的にみた場合 TP 誘導活性が対照雄の 3 倍位の増加をきたす Torpedo 量からと考えられる。

雄マウスの TP 活性が雌マウスより高いことは、ラットにおける TP³⁾、薬物代謝酵素の場合^{1, 10, 12, 19)}と同様である。ところが去勢するとこの傾向は大分変わり、去勢 4 日後では Torpedo の TP 誘導能は去勢しないものに比べて低下してくるが、まだ雄の方が高く、2 週後では誘導能はさらに低下して正常値に近くなり、かつ去勢雄、雌の TP 活性はまったく同じになってくる (Fig. 7)。去勢 4 日後にはまだタンパク同化作用のある testosterone の影響が残っているのであろう。また去勢後 testosterone 処置をすると、誘導能は去勢しない場合の誘導能に近くなり、しかも去勢雄、雌の活性値の差もない。このことは testosterone が TP 活性を促進するものであり、Torpedo による TP 活性の増大が、一部タンパク同化ホルモン依存性であることを示唆し、前述の testosterone による Torpedo の毒性の増加と何らかの関係があるように思える。

副摘により Torpedo の TP 活性誘導は完全に阻止された (Fig. 8)。従って Torpedo による TP 活性の増加も、他の多くの薬物の場合と同様にストレス性 glucocorticoid の分泌促進によるものであろう。

Torpedo の連続投与後の TP 活性が 1 回投与後の TP 活性より低く、また雄より雌の方がより低下している (Fig. 9) のは、ストレスの連続による反応性の低下のためと考えられる。さらに (1) の実験の残存マウスの TP 誘導活性で、雄では投与量が多い群ほど高くなる傾向を示し、雌では 32 mg/kg 群まで対照と変わらず毒性が臨床所見、体重の変化でみられた 128 mg/kg 群で著明な増加がみられた。しかしこのときの誘導値は正常マウスに 1 回投与したものに比べて、高くても約 50% であった (Fig. 5)。このように TP 活性は毒性が強いものほど高いことが示唆され、雌雄の性差は Torpedo の連続投与による反応性の低下の違いが関与すると思われる。

本研究では Torpedo はマウス雄の生殖機能に影響を与えることが明らかにされたが、雄の生殖機能に毒性を示す有機物質として、(1) 抗代謝剤、(2) 抗精子形成剤、(3) gonadotrophin レベルに作用する非ステロイド、(4) 抗 androgen、(5) Leydig 細胞あるいは下垂体に作用する精巣毒が知られている²⁵⁾。(1) に属する ethionine の毒性は去勢により著明に増強

され、*testosterone* により減少するといわれているが、*Torpedo* の毒性はこれとまったく逆であることは興味あるところである。戴の下垂体の成績²⁴⁾ および今回の結果からみて、*Torpedo* は少なくとも (3)、(5) に属する精巣毒とは思われない、いずれにしても *Torpedo* はマウス精巣に主作用を有し、その作用に副腎が関与するようであるが、精巣毒としてどのタイプに属するものであるかは、マウス精巣にのみ作用し、ラットでは毒性を示さない点とともに、さらに詳細な研究を要するものと考えられる。

要 約

前報¹⁷⁾ で認められた *N, N*-di(2-chloroethyl)-4-methyl-2,6-dinitroaniline のマウス雄のみに対する著しい毒性について、その毒性に果す副腎の役割を知る目的で、さらに詳細な実験を行い、次の結果をえた。

1. 腹腔内投与された *Torpedo* は経口投与の場合と同じく、マウス雌にはほとんど毒性を示さず、マウス雄に対しては特異的に、精巣、精細管の萎縮、間質の減少、精子形成の減少(無精子)、精細胞の壊死、消失をひきおこした。また他の薬物と同じく、経口投与より腹腔内投与の方が、毒性が強く現れた。

2. ラットでは相当量を投与しても、マウスにおけるような雌雄による性差は認められなかった。

3. *Torpedo* 投与雄マウスの繁殖能力は著明に低下した。

4. *Torpedo* 投与雄マウスの精巣抽出物は、マウス雌、雌に何ら影響を及ぼさなかった。

5. 雄マウスに対する *Torpedo* の毒性は去勢により減弱し、去勢後 *testosterone* 処置により再び増強した。

6. 雄マウスに *estradiol* を投与した場合の *Torpedo* の毒性は、大した変化を示さなかった。

7. 副腎摘出により、雄マウスに対する *Torpedo* の毒性は減弱する傾向を示した。

8. *Torpedo* はマウスの TP 活性を増加せしめ、投与量が多くなるにつれ、TP 活性も増加した。

9. *Torpedo* による TP 活性の増加は投与後6時間が最高で、12時間後には正常レベルにもどった。

10. 去勢により *Torpedo* による TP 活性の増加は低下し、去勢後4日と2週後では、後者の方が著明に低下した。また去勢後 *testosterone* を投与すると、*Torpedo* による TP 誘導は回復した。

11. 副腎摘出により、*Torpedo* による TP の誘導

活性は完全に阻止された。

12. *Torpedo* 1回投与後と連続投与後の TP 活性の増加は後者の方が低く、このとき雄より雌の方がより低下した。

以上 *Torpedo* の毒性はマウスの精巣に主作用を有し、その作用に副腎が関与すること、またラットにみられる薬物代謝酵素の場合とは同一視できないが、タンパク同化ホルモン (*testosterone*) が生体の感受性の因子として働くことが示唆される。

終りに本研究の病理組織学的所見については、本学家畜病理学教室河野猪三郎教授をはじめ、同教室各位の御指導・御協力を賜ったので深く感謝いたします。

文 献

- 1) Axelrod, J.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **117**, 322-329 (1958)
- 2) Booth, J. and Gillette, J. R.: *ibid.*, **137**, 374-379 (1962)
- 3) Civen, M. and Knox, W. E.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1787-1790 (1959)
- 4) Dube, D. K., Dutta, H. N., Pal, B. and Ghosh, J. J.: *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2249-2251 (1972)
- 5) Duncan, J. E. and Ghosh, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 404-408 (1969)
- 6) Green, A. R.: *Brit. J. Pharmacol.*, **53**, 287-292 (1975)
- 7) 浜田 照・黒岩幸雄・藤川福二郎・平井邦夫・内藤多喜夫: 最新裁判化学, 37-43, 南江堂, 東京 (1972)
- 8) Kato, R., Chiesara, E. and Vassanelli, P.: *Jap. J. Pharmacol.*, **12**, 26-33 (1962)
- 9) 加藤隆一: 薬の代謝と薬効, 187-229, 中外医学社, 東京 (1968)
- 10) Kato, R., Chiesara, E. and Frontino, G.: *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 221-230 (1962)
- 11) Kato, R. and Gillette, J. R.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **150**, 285-291 (1965)
- 12) Knox, W. E.: *Brit. J. Exp. Path.*, **32**, 462-469 (1951)
- 13) ——— and Auerbach, V. H.: *J. Biol. Chem.*, **214**, 307-313 (1955)
- 14) ——— and Mehler, A. H.: *ibid.*, **187**, 419-430 (1950)
- 15) ——— and ———: *Science*, **113**, 237-238 (1951)
- 16) 能谷 朗: 熊原雄一編, 医化学実験講座. 内分泌 II, 40-41, 中山書店, 東京 (1972)
- 17) 宮尾 陟・石黒 茂・河野猪三郎・安田宣秘: 鹿大農学術報告, **26**, 75-93 (1976)
- 18) Poddar, M. K. and Ghosh, J. J.: *Biochem.*

- Pharmacol.*, **21**, 3301-3303 (1971)
- 19) Quinn, G. P., Axelrod, J. and Brodie, B. B.: *ibid.*, **1**, 152 (1958)
- 20) Satoh, T.: *Enzyme*, **12**, 124-128 (1971)
- 21) Sardesai, V. M. and Provido, H. S.: *Life Science*, **II, Part III**, 1023-1028 (1972)
- 22) 佐藤哲夫・吉田祚一: 日薬理誌, **66**, 387-393 (1970)
- 23) Schor, J. M. and Frieden, E.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 612-618 (1958)
- 24) 戴 黔章: 未発表
- 25) 高橋日出彦: くすりの毒性, 307-312, 南江堂 (1973)

Summary

In the previous paper¹⁷⁾ we reported that N, N-di(2-chloroethyl)-4-methyl-2,6-dinitroaniline showed a striking toxicity to the male mouse alone, and showed little influence on female mouse as it did in case of male and female rats. It is a main aim of the present work to investigate whether adrenal plays a part in this singular toxicity of the drug.

1. The toxicity of this drug was hardly observed in the female mouse to which it was injected intraperitoneally, as in case of the female to which it was administered orally. In male mouse, it caused the following symptoms: an atrophy of testis and seminiferous tubules, testis interstitial cell proliferation, necrosis and disappearance of seminiferous epithelium, and spermacrasia. The drug, as in case of many other drugs, caused more significant toxicity in case of an intraperitoneal injection than in an oral administration.

2. Even when a very high dose of the drug was administered, such a sex difference on the toxicity as observed in the mouse was not found in the rat.

3. The fertility significantly lowered in the male mouse administered the drug.

4. The testis-extract from the male mouse administered the drug had no influence on both male and female mice.

5. The toxicity of the drug to male mouse was diminished by the execution of the castration and even after castration it was reinforced by being treated with testosterone.

6. The drug toxicity to the male mouse was hardly varied by the pre-treatment with estradiol.

7. The adrenalectomy developed a tendency to diminish the drug toxicity to male mouse.

8. The injection of this drug increased mouse liver tryptophan pyrrolase activity, and the augmentation of activity was proportional to the increase in the drug dose.

9. The maximum rise of tryptophan pyrrolase activity by the drug was observed 6 hrs after the administration and returned to normal after 12 hrs.

10. The rise of tryptophan pyrrolase activity by the drug was suppressed by castrating the mouse. This suppression was made more remarkable after 2 weeks than after 4 days, of the castration, and was restored by being treated with testosterone after the castration.

11. The induction of tryptophan pyrrolase by the drug was completely inhibited through the adrenalectomy of the mouse.

12. The induction of the enzyme was less after the successive injections of the drug than it was a single one, and this lowering of activity was more significant in the female than in the male.

From these results, it is suggested that the drug has a principal toxicity on the testis of mouse and the adrenal plays an important part in its action.