

トリクロロエチレンの代謝と肝毒性に対する アルコールとフェノバルビタール投与の差異について

那須 (中島) 民江, 沖野知範, 村山忍三, 那須裕*
釘本 完*

Differences following ethanol and phenobarbital administration
in the metabolism and hepatotoxicity of trichloroethylene

Tamie Nasu-Nakajima, Tomonori Okino, Ninzo Murayama,
Yutaka Nasu* and Mamoru Kugimoto*

アルコールとフェノバルビタール (P B) が *in vivo* のトリクロロエチレン (T R I) の代謝と肝毒性に与える影響を5段階のT R I暴露濃度 (500, 1000, 2000, 4000, 8000 ppm) において検討した。未処理とアルコール投与ラットの血中T R Iの減衰曲線は2000 ppm を境にパターンが変わった。しかしP B投与ラットにおける血中T R Iの減衰曲線はいかなる暴露濃度においても同様のパターンであった。アルコールとP Bはいずれの暴露濃度においても血中からのT R Iの消失を速めた。この傾向は2000 ppm 以下の暴露においてはアルコールの方がP Bより強かった。アルコールとP Bは尿中への総三塩化物 (T T C) の排泄速度を亢進させた。この亢進作用は2000 ppm 以下ではアルコールの方がP Bより強く, 4000 ppm 以上ではP Bの方が強かった。アルコールとP BはT R I暴露後のトリクロロ酢酸 (T C A) の排泄量を増大させ, この傾向はいずれの暴露濃度においてもアルコールの方が強かった。しかしT T Cに対するT C Aの排泄割合を増大させたのはアルコールのみであった。

アルコールとP BはT R I暴露に起因した血清G P Tの上昇を強めた。この程度は2000 ppm 以下のT R I暴露後はアルコールの方が, 4000 ppm 以上の暴露後はP Bの方が強かった。T R I暴露後のT T Cの排泄速度 (すなわちT R Iの代謝速度) と血清G P T値はよい関連性を示した (2時間暴露実験では $r=0.870$, 8時間暴露実験では $r=0.934$)。

トリクロロエタノール (T C E) 投与実験において, アルコールはT C EからT C Aの代謝を亢進させるが, P Bはこの代謝経路には影響を及ぼさなかった。

結局アルコールとP BはともにT R Iの代謝を亢進させ, 肝毒性を増強させるが, この作用形式はT R Iの暴露濃度によって異なる。すなわちアルコールの作用は低濃度領域から出現し, 高濃度領域に達すると飽和してしまうが, P Bによる作用は暴露濃度上昇に伴ない増強していく。

はじめに

労働環境で使用される化学物質はしばしば種々の経路を経て一般生活環境中にも存在することがある。その良い例は揮発性を有する炭化水素類 (有機溶剤) である。Trichloroethylene (T R I) は産業職場において最も良く使用されている有機溶剤の一つである。しかし近年T R Iによる生活環境 (都市大気, 地下水, 土壌) の汚染状況が明らかとなり, 産業活動に伴いT R Iの暴露を受けている労働者は勿論のこと, 公衆全般へのT R Iの慢性影響が懸念されている。

T R Iは肝ミクロソームに局在するチトクロームP-450の触媒作用により抱水クロラルに代謝され, さらにアルコール脱水素酵素 (A D H) とアルデヒド脱水素酵素 (A L D H) によりそれぞれトリクロロエタノール (T C E) とトリクロロ酢酸 (T C A) に代謝される。生成したT C Eの一部は再び抱水クロラルを経てT C Aに代謝される¹⁾。

はT R Iそのものでなく, T R Iの代謝物であることが知られている¹⁾。すなわちT R I代謝を左右する因子はT R Iの肝毒性にも影響を与えることが予想される。一方, T R Iの発癌性に関してはマウスを用いた実験で報告されているが, ラットを用いた実験では発癌性は認められないという²⁾。この発癌性に関する種差はラットとマウスの間に認められるT R Iの代謝能力の差に起因すること

信州大学医学部衛生学
*信州大学医学部公衆衛生学
Department of Hygiene, Shinshu University School
of Medicine.

が報告されている。このようにTRIの生体内代謝はその毒性と深いかわり合いを持っている。

アルコール^{3~5)}やフェノバルビタール(PB)^{6~9)}はTRIの代謝速度を亢進させ、肝毒性を増強させることは既に報告されている。しかしこれらの実験のほとんどは単一の濃度で行われており、アルコールやPBによるTRI代謝と毒性修飾の量一反応関係を検討した報告は少ない¹⁰⁾。TRIをはじめとする多くのハロゲン化炭化水素の代謝は飽和するといわれている。このような観点から最近これらの化学物質の毒性を評価する際には、量一反応関係を考慮した動力学的側面から検討する必要性が強調されている¹¹⁾。

そこでこの論文ではラットにおけるTRIの代謝速度と肝毒性に与えるアルコールとPBの影響を暴露濃度(500, 1000, 2000, 4000, 8000)と暴露時間(2, 8時間)を変えて検討した。

方 法

1. 実験動物

動物はWistar系雄性ラットを使用した。ラットは明暗サイクルの備わった恒温室(20±2℃)で飼育した。ラットには市販の固型飼料(日本クレアCE-2)と水を自由に与えた。ラットが8週齢に達したところで2群に分け、それぞれに液体飼料の基準食とアルコール食を与えた。基準食は既報¹²⁾の成分割合を若干変更した。すなわち、シュクロース12.0g, カゼインナトリウム2.93g, レーシスチン41mg, DL-メチオニン25mg, オイル2.0g(オリーブ1.54g, コーン0.46g), リノール酸エチル212mg, ビタミンミックス407mg, DL- α -トコフェロール2mg, ミネラルミックス813mg, カラゲナン212mgを80mlの水に溶かしたものを基準食とした。基準食のシュクロースを4.0gに減らし、2.0gのアルコールと、基準食と等カロリーにするために2.02gのオイル(オリーブ1.56g, コーン0.46g)を添加した餌をアルコール食とした。添加したオイルはTRIの代謝速度には影響を与えないことは既に確認されている⁵⁾。ラットにこれらの液体食を80mlずつ、毎日午後4時に与えた。約3週間これらの餌で馴化飼育を行ったところで、基準食群はさらに2群に分け、一方をControl(Untreated)群とした。他方には80mg/kgのPBをTRI暴露前、あるいは屠殺前4日間腹腔内投与し、PB群とした。

2. In vitroのTRI代謝実験

Control, アルコールおよびPB投与ラット肝におけるTRIの代謝速度をSato and Nakajimaの方法¹³⁾

を若干変更して測定した¹⁴⁾。ミクロソーム蛋白はLowryらの方法で¹⁵⁾チトクロームP-450はOmura and Satoの方法¹⁶⁾でそれぞれ測定した。

3. In vivoのTRI代謝実験

Control, アルコールおよびPB投与ラットに500, 1000, 2000, 4000および8000ppmのTRIを2時間(10-12am), 既報の暴露装置¹⁷⁾で暴露した。暴露終了後血中TRI濃度をsyringe-平衡法¹⁸⁾で経時的に測定した。暴露開始から24時間(翌日の10時まで)尿を経時的に採取し、Tanaka and Ikedaの方法で¹⁹⁾総三塩化物(TTC)とTCAを測定した。TRI暴露後はラットに水のみ与えた。暴露終了22時間後(翌日の朝10時)ラットを屠殺して解剖し、肝のTRI代謝速度を前述の方法で測定した。

4. TRI肝毒性実験

Control, アルコールおよびPB投与ラットに500, 1000, 2000, 4000および8000ppmのTRIを2(10-12am)ないし8(8am-16pm)時間暴露した。それぞれの暴露終了22時間後(2時間暴露の場合は10am, 8時間暴露の場合は14pm)血清GPT(SGPT)値をベーリンガー・マンハイム社のキット(Rate法)で測定した。SGPT値は25℃における値(IU/ℓ)に換算した。

5. TRIおよびTCE単一投与実験

Control, アルコールおよびPB投与ラットに2.24mmol/kgのTRIとTCE(TCE源として鳥居製薬より供与されたmonosodium trichloroethyl phosphateを使用した)をそれぞれ腹腔内投与(10am)した。投与後尿中TTCとTCAをTanaka and Ikedaの方法で¹⁹⁾測定した。

1. In vitroにおけるTRIの代謝速度

従来の報告に一致してアルコールとPBはいずれもミクロソーム蛋白とチトクロームP-450の含有量を増大させ、その程度はPBの方が大きかった²⁰⁾。アルコールはTRIの代謝を著しく亢進させた(約6倍)。PBもTRI代謝を亢進させるが、その程度はアルコールよりも小さかった(Table 1)。

2. In vivoにおけるTRI代謝

Fig. 1は500-8000ppmのTRIを2時間暴露後のTRIの血中濃度の推移を示す。暴露終了から2時間に

Table 1. Effects of ethanol and phenobarbital administration on the drug-metabolizing enzymes

	Control	Ethanol	P B
Body weight (g)	262.8 ± 5.0	241.6 ± 9.1*	263.2 ± 12.7
Liver weight (g)	10.6 ± 0.4	8.6 ± 0.7*	13.6 ± 0.8*
Liver/body (%)	4.03 ± 0.11	3.55 ± 0.20*	5.17 ± 0.06*
Microsomal protein (mg/g)	20.0 ± 1.4	24.3 ± 2.0*	29.7 ± 0.9*
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.68 ± 0.14	0.96 ± 0.04*	1.37 ± 0.09*
Metabolic rate of trichloroethylene (nmol/g/min)	13.0 ± 1.3	75.2 ± 1.7*	34.4 ± 1.7*

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

おけるTRIの消失速度でみると、全群においてTRIの暴露濃度が上昇するにつれて遅延する傾向が認められた。Controlとアルコール投与ラットの血中からのTRI減少曲線は4000 ppm以上の高濃度のTRI暴露後はパターンが変わった。すなわちTRIは指数関数的な減少から非指数関数的な減少パターンへ移行した。ところがPB投与ラットの血中TRIの減少曲線はいずれの暴露濃度においても同様なパターン（指数関数的な減少）であった。

500 ppmのTRI暴露においてアルコールとPBは明らかに血中からのTRIの消失を速め、その程度はアルコールの方が大きかった。この現象はTRIの暴露濃度の上昇に伴い顕著となり、2000 ppmのTRI暴露後3群の間の血中TRI消失速度の差は最も大きくなった。ところが4000 ppmと8000 ppm暴露においては、暴露終了2時間における消失速度でみるとアルコール投与ラットよりPB投与ラットの方が速かった。

Fig. 2 はTRI暴露中および暴露後尿中に排泄されたTTCを累積したものである。アルコールとPB投与ラットは暴露中と暴露終了8時間までに排泄されるTTC量が多いことが明かであった。この程度は先のTRI血中濃度の消失と一致して2000 ppm暴露まではアルコール投与ラットの方が大きく、この暴露濃度において3群の差が最も顕著であった。4000 ppm暴露後はアルコールとPBの間にTTCの排泄速度の差は認められないが、8000 ppm暴露においてはPB投与ラットの方がアルコール投与ラットより明らかに速かった。

Fig. 3 は500~8000 ppmのTRI開始から6時間に排泄されたTTC量（単位時間当りの排泄量）をそれぞれの暴露濃度に対してプロットしたものである。Control

ラットのTTCの排泄速度は500 ppm暴露でほぼ最大に達していた。アルコール投与ラットのTTC排泄速度は1000~2000 ppm暴露後最大となり（Controlの約5倍）、8000 ppm暴露後は逆に低下した。一方PB投与ラットのTTC排泄速度は1000~2000 ppm暴露後一旦ピークに達し（Controlの約4倍）、2000 ppmを越えると再び上昇した。すなわち2000 ppm以下のTRI暴露においてはアルコール投与ラットの方がPB投与ラットよりもTTCの排泄速度は大きく、4000 ppm以上のTRI暴露においてはPB投与ラットの方がアルコール投与ラットよりTTCの排泄速度は大きかった。以上の結果より次の結論が得られた。アルコールとPBはin vitroのみならずin vivoのTRI代謝も亢進させるが、その程度はTRIの暴露濃度によって異なる。2000 ppm以下のTRI暴露においてはアルコールの方が、4000 ppm以上のTRI暴露においてはPBの方がTRI代謝の亢進作用は強い。

Table 2 は500~8000 ppmのTRI暴露開始から24時間に尿中に排泄されたTCA量を示す。ControlラットのTCA排泄量は4000 ppmのTRI暴露までは暴露濃度に関係なく、8000 ppmの暴露においてのみ増大する傾向が認められた。これらのラットのTCA排泄量をTTCに対する割合でみるとTRIの暴露濃度が上昇すると逆に減少した。PBは1000 ppm以上のTRI暴露においてTCAの排泄量を増大させたが、TTCに対する割合にはほとんど影響を与えなかった。Controlラットと同様PBラットのTCAの排泄割合は暴露濃度の上昇に伴ない減少する傾向であった。アルコールはいずれの暴露濃度においてもTCAの排泄量のみならずTTCに対する排泄割合も増大させた。しかし、このTCAの

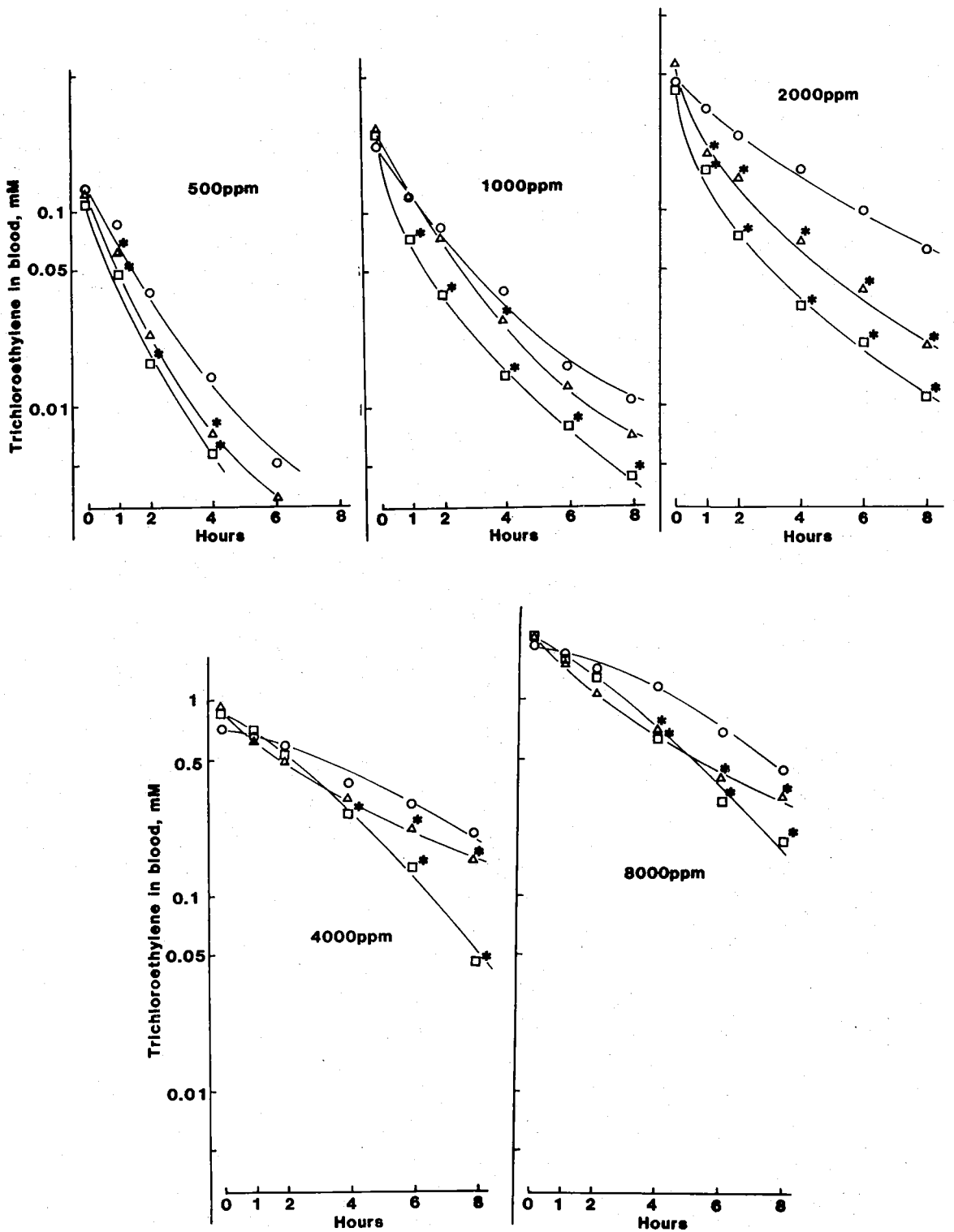


Fig. 1. Decay curves of TRI in blood after a 2-hour inhalation exposure to TRI.
 (O) Control; (Δ) PB; (\square) Ethanol

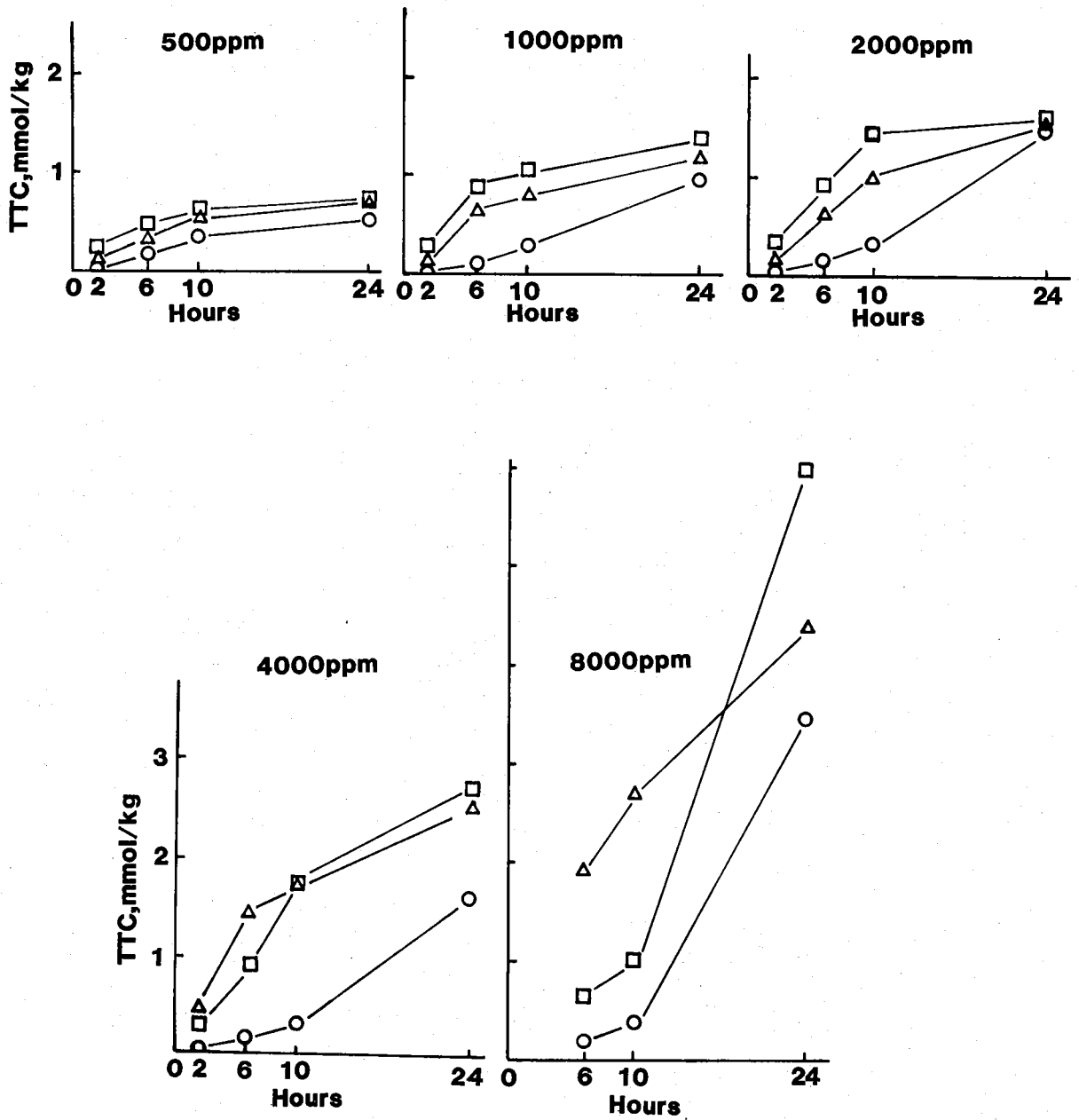


Fig. 2. Cumulative amount of TTC excreted in urine during and after a 2-hour inhalation exposure to TRI. See the legend in Fig. 1.

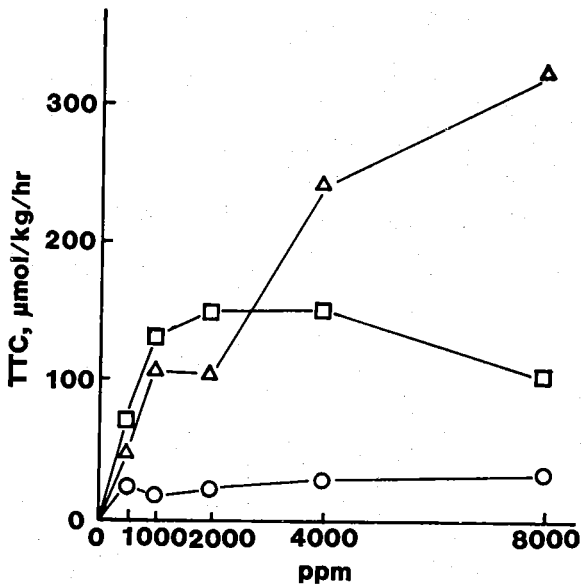


Fig. 3. Excretion rate of TTC in urine for the first six hours after start of a 2-hour inhalation exposure to TRI. See the legend in Fig. 1.

Table 2. TCA in urine after exposure to TRI

Conc. (ppm)	Treatment	TCA (µmol/kg)	TCA/TTC (%)
500	Control	16.6 ± 4.2	2.9 ± 0.8
	PB	16.1 ± 6.3	2.4 ± 1.1
	Ethanol	26.9 ± 2.8 ^{ab}	4.2 ± 0.3 ^{ab}
1000	Control	15.0 ± 2.5	1.6 ± 0.3
	PB	24.3 ± 5.6 ^a	2.0 ± 0.4 ^{ab}
	Ethanol	43.6 ± 6.0 ^{ab}	3.4 ± 0.4 ^{ab}
2000	Control	15.7 ± 3.4	1.1 ± 0.3
	PB	24.8 ± 2.9 ^a	1.6 ± 0.2
	Ethanol	46.7 ± 9.7 ^{ab}	3.2 ± 1.0 ^{ab}
4000	Control	23.2 ± 9.2	1.4 ± 0.5
	PB	48.7 ± 10.4 ^a	1.9 ± 0.5
	Ethanol	88.6 ± 25.1 ^{ab}	3.3 ± 0.4 ^{ab}
8000	Control	34.8 ± 10.8	1.1 ± 0.2
	PB	61.1 ± 7.6 ^a	1.4 ± 0.2
	Ethanol	107.9 ± 31.1 ^{ab}	1.9 ± 0.5 ^a

^aSignificantly different ($p < 0.05$) from control

^bSignificantly different ($p < 0.05$) from PB

排泄割合は Control や PB ラットと同様、暴露濃度の上昇に伴ない減少する傾向を示した。

500~8000 ppm の TRI を 2 時間暴露終了 22 時間後、すべてのラットを屠殺、解剖して肝における *in vitro* の TRI 代謝速度を測定した (Table 3)。Control

Table 3. Metabolic rate of TRI *in vitro* 22hrs after exposure to TRI

Conc. (ppm)	nmol/g liver/min		
	Control	PB	Ethanol
0	29.5 ± 5.7	53.4 ± 5.4	31.6 ± 4.1
500	26.2 ± 4.9	48.4 ± 3.2	31.3 ± 13.6
1000	46.7 ± 10.8 [*]	53.7 ± 7.1	56.0 ± 8.6 [*]
2000	51.3 ± 6.0 [*]	55.3 ± 11.1 [*]	55.4 ± 8.6 [*]
4000	54.1 ± 4.2 [*]	41.4 ± 4.2 [*]	42.6 ± 10.5 [*]
8000	63.1 ± 16.0 [*]	34.6 ± 6.3	55.3 ± 12.5 [*]

* Significantly different ($p < 0.05$) from non-exposed rats.

ラットの非暴露群の TRI 代謝が Table 1 に示された代謝速度より亢進しているのは、TRI 暴露実験当日はすべてのラットを絶食させたためであろう。絶食が TRI 代謝を亢進させることは既に確認されている²⁾。すでに報告した事実に一致してアルコール投与ラットの非暴露群の TRI 代謝速度は、解剖前日アルコール投与を中止して絶食させたために、アルコールの作用は消失し、絶食の影響のみ出現していた。一方 PB 投与ラットの非暴露群の TRI 代謝速度は PB に絶食の作用が相加され、Table 1 に示された速度より約 2 倍亢進していた。

Conuroil とアルコール投与ラット肝における TRI 代謝速度は 1000 ppm 以上の TRI 暴露後明らかに亢進した。しかし PB 投与ラット肝における TRI 代謝速度は TRI 暴露後亢進せず、4000 ppm 以上の TRI 暴露においては逆に低下していた。

3. TRI 肝毒性実験

Control; アルコールおよび PB 投与ラットに 500~8000 ppm の TRI を 2 あるいは 8 時間暴露し、TRI の肝毒性 (SGPT 値) に与える暴露濃度と暴露時間の影響を検討した。2 時間暴露実験において、いずれのラットにおいても 2000 ppm の暴露濃度までは SGPT 値の上昇は認められなかった。Control ラットの SGPT 値は 4000 と 8000 ppm 暴露後若干上昇した。しかしこれらのラット肝は光顕的に点状あるいは巣状壊死、細胞浸潤がごくわずかに認められる程度で、肝障害は極めて軽

度と思われた。アルコールとPBは明らかにTRIに起因したSGPT値の上昇を強めるが、その作用形式はそれぞれ異なった。アルコール投与ラットのSGPT値は4000ppmと8000ppmの暴露の間に差は認められないが、PB投与ラットのSGPT値は4000ppmより8000ppm

暴露後の方が大きかった。すなわち同一暴露時間で比較するとアルコール投与ラットのTRIによる肝障害は飽和するが、PB投与ラットの肝障害は暴露濃度に比例して増大するようであった (Table 4)。

TRI 8時間暴露実験において、Control とPB投

Table 4. SGPT level 22hrs after exposure to TRI(IU/l)

Conc. (ppm)	× time (hr)	Control	PB	Ethanol
0	× 0	27.8 ± 2.3	30.7 ± 6.1	33.7 ± 3.1
500	× 2	31.1 ± 4.5	40.9 ± 6.4	48.6 ± 16.1
1000	× 2	37.7 ± 10.7	42.9 ± 8.2	39.1 ± 6.7
2000	× 2	31.7 ± 5.6	43.1 ± 12.4	42.9 ± 17.1
4000	× 2	44.0 ± 7.1 ^a	773 ± 251 ^a	338 ± 76 ^{ab}
8000	× 2	57.1 ± 14.7 ^a	1790 ± 1220 ^a	229 ± 97 ^{ab}
500	× 8	42.2 ± 9.6 ^a	58.7 ± 20.9 ^a	120 ± 37 ^{ab}
1000	× 8	38.6 ± 4.1 ^a	135 ± 37 ^a	232 ± 104 ^a
2000	× 8	50.7 ± 7.1 ^a	281 ± 58 ^a	1780 ± 1220 ^{ab}

^a Significantly different ($p < 0.05$) from non-exposed rats.

^b Significantly different ($p < 0.05$) from PB-treated rats.

与ラットのSGPT値は500ppm暴露後推計学的には有意に上昇した。しかし光顕的にはほとんど変化は認められなかった。2000ppm暴露後ControlラットのSGPT値は若干上昇し、その程度は光顕的にも総暴露量が等しい8000ppm×2時間の暴露後と類似していた。アルコールとPBはTRIに起因したSGPT値の上昇を増大させ、その程度は常にアルコールの方が大きかった。とくにアルコールが500ppmのTRI暴露後明らかにSGPT値を上昇させることは興味深い。以上の結果を総合して考えると以下の結論が下されよう。(1) Control (未処理)ラットにおけるTRIの肝毒性は暴露濃度を上昇させても、暴露時間を延長させても極めて軽度であろう。(2) アルコールとPBはTRIの肝毒性を増幅させ、その程度は2000ppm以下の暴露ではアルコールの方が、4000ppm以上の暴露においてはPBの方が強いであろう。(3) PB投与ラットのSGPT値はTRIの暴露濃度の上昇に伴ない増大し、同一の総暴露量(濃度×時間)で比較すると、暴露時間を延長させるよりも暴露濃度を高くする方がSGPT値の上昇は著しい(8000ppm×2時間 VS 2000ppm×8時間; 4000ppm×2時間 VS 1000ppm×8時間)。(4) アルコール投与ラットにおけるSGPT値は4000ppmの2時間暴露においてはほぼピークに達し、それ以上暴露濃度を上げて有意に上昇しなかった。その結果、総暴露量で比較すると暴露時間を延長させる方(2000ppm×8時間)が暴露濃度を上昇

させる(8000ppm×2時間)よりもSGPT値の上昇は著しい。

4. TRIの代謝経路に対するアルコールとPBの影響

Fig. 4-1は2.24 mmol/kgのTRIを腹腔内投与後、尿中に排泄されたTTCとTCAを累積したものである。アルコールとPBは投与方法に関係なくTTCの排泄を亢進させることが明らかであった。先の暴露実験と一致してアルコールはTCAの排泄を増大させるが、PBはほとんど影響を与えなかった。

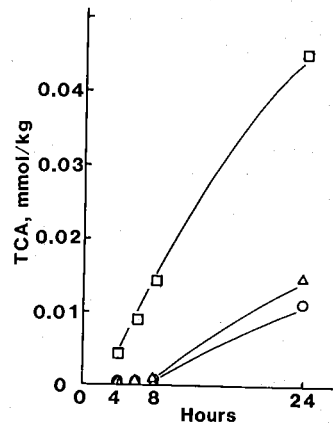


Fig. 4-1 Cumulative amount of TCA in urine after TRI (2.24mmol/kg,i.p) administration to rats. See the legend in Fig. 1.

Fig 4-2 はTCEP投与後尿中に排泄されたTCAの累積を示している。PBはTCAの排泄量には全く影響を与えなかったが、アルコールは明らかにTCAの排泄を増大させた。したがってアルコールはTRI→TCEのみならずTCE→TCAの代謝も亢進させるといえる。しかしPBが影響を与えるのはTRI→TCEの代謝経路のみと思われる。

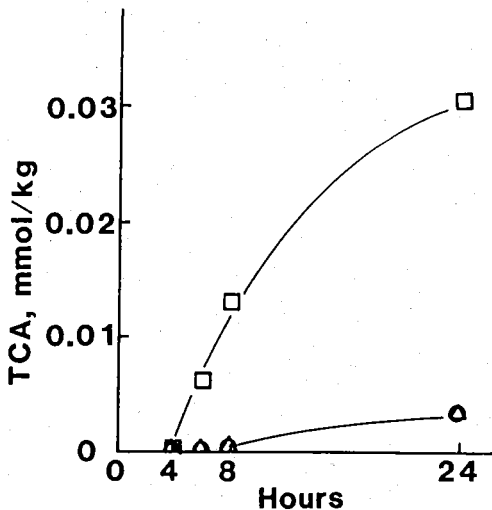
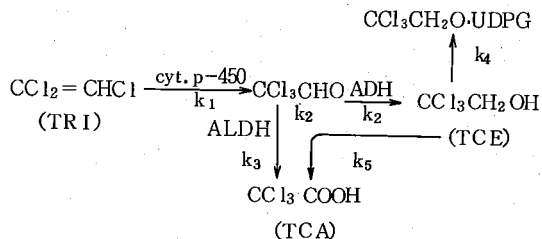


Fig. 4-2 Cumulative amount of TCA in urine after monosodium trichloroethyl phosphate(2.24mmol/kg, i. p) administration to rats. See the legend in Fig. 1.

考 察

TRIの代謝経路を下記に示す¹⁾。TRIはまずチトクロームP-450の触媒作用により抱水クロラールに代謝される^{6, 7, 9, 22, 23}。抱水クロラールはADHおよびALDHの作用により速やかにそれぞれTCEとTCAに代謝される。TCEのほとんどはグルクロン酸抱合をうけてウロクロラール酸として尿中へ排泄されるが、その一部は再びTCAに代謝される^{1, 8}。アルコール^{3-5, 20}とPB^{6, 7, 9, 20}はチトクロームP-450を誘導し、 k_1 の反応速度を増大させる。 k_3 は極めてminorな経路でTTCの排泄量には大きな影響を与えない(Table 2参照, すなわちTTC≒TCEと考えるとさしつかえない)。一般にADHの活性はアルコールの慢性投与やPBの前投与の影響はうけないといわれている²⁴。一方反応速度的に k_1 は k_4 より遅く²⁵⁻²⁷、エネルギーを要するためTRI代謝の律速段階であるとみなされている^{7, 25}。アルコールとPBはTRIの血中からの消失を



速め (Fig. 1), 尿中へのTTCの排泄を速めた (Fig. 2)。従ってこれらの現象は主にアルコールとPBによるチトクロームP-450の誘導に起因するものと思われる。

Control ラットのTTC排泄速度は500~1000ppmですでに最大値に達しているようである (Fig. 3)。血中TRI濃度 (恐らく肝のTRI濃度にほぼ等しい) が0.2 mM付近でControlラット肝におけるTRI代謝速度は最大となり、血中TRI濃度 (暴露濃度) がこれ以上上昇してもTRI代謝速度はほとんど変わらなかった。おそらくこの濃度付近でControlラットのTRI代謝能力は飽和しているのであろう。事実Stott²⁹らやProut²⁹らもラットにおいてはTRI代謝は飽和することを認めている。一方Andersen³⁰らはGas Uptake Methodを用いた実験で、ラットのTRI代謝の K_m は463ppmであることを報告している。この結果はラットにおけるTRI代謝速度は1000ppm付近で最大となることを意味しており、筆者らの結果と矛盾しない。今Control (未処理)ラットのTTCの最大排泄速度を40 $\mu\text{mol/kg/hr}$ とする (Fig. 3) と、これらのラットにおけるTRI暴露開始から24時間に排泄されるTTCの最大値は暴露濃度に関係なく960 $\mu\text{mol/kg/24hrs}$ と算出される。ところが2000ppm以上のTRI暴露においてControlラットのTTCの総排泄量はこの値を越えている (Fig. 2)。これは暴露当日絶食させたことと、TRIによりチトクロームP-450の誘導 (TRI代謝速度の亢進) に起因すると思われる。事実Table 1と3を比較すれば、ControlラットのTRI代謝はTRI暴露前に比べて、絶食とTRIの作用が加わり4倍も亢進している。2000ppm以上のTRI暴露ではこれらの作用が相加され、あたかも暴露濃度の上昇に伴ないTTCの排泄が増大しているようにみえるのであろう。

In vitroの代謝実験から (Table 1) はアルコールの方がPBよりTRI代謝の亢進作用は強い印象をうける。しかしin vivoにおいてアルコールとPBのTRI代謝亢進作用の程度はTRIの暴露濃度に依存していた。アルコールによるTRI代謝の亢進作用は2000ppmのTRI暴露後最大 (TTCの排泄速度は160 $\mu\text{mol/kg/hr}$) となり、8000ppm暴露においては逆にその作用は

低下 (TTCの排泄速度は $100 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{hr}$) した。

4000 ppm 以上の TRI 暴露においては、アルコール投与ラットの TRI 代謝は血中 TRI 濃度が 2000 ppm 暴露と同程度に減少すると (すなわち暴露終了 4~8 時間後) 急激に活発に行なわれるようである。このために TTC の排泄曲線は放物線ではなく S 状曲線を描くのであろう (Fig. 1, 2)。アルコールで誘導されるチトクローム P-450 は血中 TRI 濃度が 0.5 mM 付近でその触媒作用は最大となり、TRI 濃度が 0.5 mM を越えるとその作用は抑制される様である。この原因に関しては今のところ不明である。このようなアルコール投与ラットにおける最大 TRI 代謝速度の遅延現象は TRI 暴露による麻酔作用からもうかがえた、PB 投与ラットには TRI 暴露後 30~60 分麻酔作用が認められたが、アルコール投与ラットにおいては、TRI 暴露直後麻酔から醒め、暴露 4~8 時間後再び麻酔作用が認められた。TRI による麻酔作用は主として代謝物 (抱水クロラール、TCE) に起因するといわれているから、アルコール投与ラットにおいては TRI 暴露終了から 4~8 時間後にその代謝が活発に行なわれた証拠と思われる。

PB 投与ラットにおける TRI 代謝速度の亢進作用はアルコール投与ラットとは異った様相を示した。これらのラ後ピークに達し、その後再び暴露濃度の上昇に伴ない増大した。この結果 2000 ppm 以下の TRI 暴露ではアルコールの方が、4000 ppm 以下の TRI 暴露では PB の方が TRI 代謝速度の亢進作用は強いことが推測された。PB 投与ラット肝における TRI の代謝速度は TRI の血中濃度が 2 mM (8000 ppm 暴露) に達しても飽和しないようである。したがって、*in vivo* における動力学的側面からみる限り、アルコールと PB はそれぞれ TRI 代謝に対して異ったチトクローム P-450 を誘導していると思われる。アルコールで誘導される P-450 は低濃度の TRI に対して活発な触媒作用を示すが、PB で誘導される P-450 は低濃度の TRI に対する触媒作用はアルコールより弱く、TRI の濃度の上昇に伴ないその効力を発揮するようである。最近筆者ら¹⁴⁾ はアルコールはベンゼン代謝に対して K_m の低い (0.01, 0.07 mM) P-450 を、PB は K_m の高い (4.5 mM) P-450 を誘導することを報告した。同様の現象が TRI 代謝に関してもいえるのかもしれない。

TRI 暴露実験においてアルコールと PB は TCE のみならず TCA の排泄量も増大させた。しかし TTC に対する TCA の排泄割合でみると、影響を与えるのはアルコールのみであった。一方 TCE 投与実験において、アルコールは TCE から TCA の代謝を亢進させるが、PB はこの代謝には何ら影響を与えなかった (Fig. 4

-2)。したがって TRI 暴露後みられた PB 投与ラットの TCA 排泄量の増大は PB により TRI → 抱水クロラールの代謝の亢進に起因するであろう。アルコール投与ラットにおける TAC の排泄量の増大はアルコールによる TRI → 抱水クロラールと TCE → 抱水クロラールの両者の代謝亢進に起因すると思われる。

TRI の肝毒性発現のメカニズムに関してはいろいろの説がある。例えばエポキシド説^{31,32)}、代謝物と P-450 との複合体形成^{8,9)} などである。いずれにしても TRI 代謝の最初のステップ (k_1 、すなわちチトクローム P-450 の活性) が律速であるという点では一致している。本研究でも k_1 の反応速度を増大させる因子 (アルコールと PB) は TRI の肝毒性を増大させることからこの仮説が再確認できた。アルコール³³⁾ や PB³⁴⁻³⁵⁾ が TRI の肝毒性を強めることは既に報告されている。しかしこれらの多くは単一の TRI 濃度を用いた実験から得られており、両者の肝毒性増強作用に対する暴露濃度や暴露時間の影響に関してはほとんど検討がなされていない。血清 GPT 値からみる限りアルコールと PB による肝毒性増強作用は暴露濃度により異っていた。アルコール投与ラットにおける血清 GPT 値は 2000 ppm までは暴露時間を長くする (8 時間) と暴露濃度の上昇に伴ない上昇した。しかし 4000 ppm 以上の TRI 暴露 (2 時間) 後は血清 GPT 値はほとんど上昇せず、量-反応関係がみられなくなった。したがってこのような濃度のところで行った結果を総暴露量で比較すると (8000 ppm × 2 時間 VS 2000 ppm × 8 時間) 暴露濃度を上昇させるよりも暴露時間を延長させた場合の方が血清 GPT の上昇は大きいという結果であった (Table 4)。ところが PB 投与ラットの血清 GPT 値は TRI の暴露濃度を上昇させればさせる程上昇し、量-反応関係が認められた。PB 投与ラットの S GPT 値を総暴露量で比較すると常に暴露濃度 (例えば 8000 ppm × 2 時間, 4000 ppm × 2 時間) を上昇させる方が暴露時間を延長させる (2000 ppm × 8 時間, 1000 ppm × 8 時間) より P T 値の上昇は大きかった。TRI の代謝速度と同様に、同一暴露時間でみるとアルコール投与ラットの血清 GPT 値は飽和するが、PB 投与ラットの GPT 値は検討した濃度下では飽和しないようである。ここで Fig. 3 に示された TTC の排泄速度と Table 4 に示された血清 GPT 値が良く対応していることに気付く。実際 TTC の排泄速度と血清 GPT 値の相関係数は 2 時間暴露実験後は $r = 0.870$ 、8 時間暴露実験後は $r = 0.934$ であった。このように TTC の排泄速度は TRI の肝毒性と深いかわり合いを持っているようである。(Fig. 5-1, 5-2)。

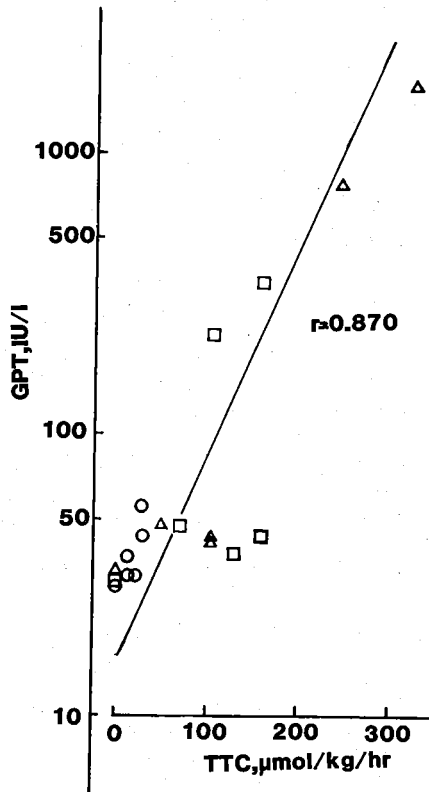


Fig. 5-1 Correlation between excretion rate of TTC and SGPT level after a 2-hour inhalation exposure to TRI. See the legend in Fig. 1.

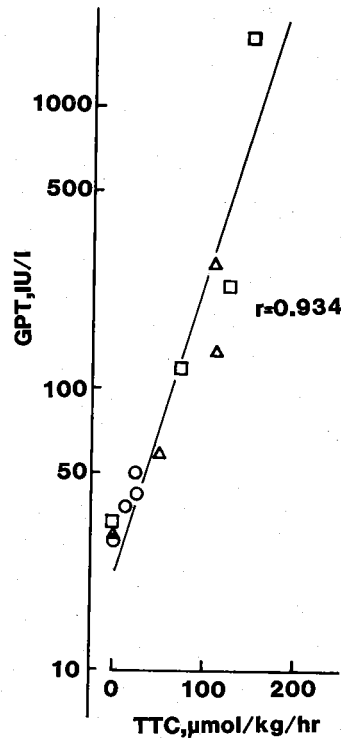


Fig. 5-2 Correlation between excretion rate of TTC and SGPT level after a 8-hour inhalation exposure to TRI. See the legend in Fig. 1.

TRIの肝毒性はその代謝物量(24時間に排泄された総TTC量)や暴露時のチトクロームP-450のレベルと対応するといわれている³⁵⁾。本実験においてこのような相関性は必ずしも認められなかった。例えば8000 ppmのTRI暴露後血清GPT値はPB ≫ アルコール ≫ Controlであるが、総TTC量はアルコール > PB ≧ Controlであった。PB投与ラットにおけるTRI代謝は暴露開始から6時間ぐらいの間はFig. 3'に示されるように亢進していたが、肝毒性が早くから出現(暴露直後すでにGPT値は2倍に、暴露終了4時間後には4倍上昇していた)したため、それ以後のTRI代謝は逆に低下したと思われる。ところがControlとアルコール投与ラットGPT値の上昇はPBに比べると軽度で、しかも暴露終了4時間後にはGPTの上昇は全く認められなかった(未発表データ)。一方暴露終了翌日の肝ミクロソームにおけるTRIの代謝速度はPB投与ラットにおいてはTRI非暴露群に比べて約50%低下していた

が、Controlとアルコール投与ラットにおいては逆に約2倍亢進していた。PB投与ラットの肝はTRIにより障害をうけてTRI代謝能力が半減していたが、アルコールやControlラットの肝はTRIによる酵素誘導作用が加算され、TRIの代謝能力は非常に高まっていたものと思われる。このように暴露開始から長時間(例えば24時間)に排泄される代謝物量には肝障害、絶食、TRIによる酵素誘導作用など種々の因子の影響が含まれるので、この量が各群のTRI代謝能力を反映するか否か疑問である。前述のように血清GPTの値は各々のTTCの排泄速度と極めてよく対応していた。すなわちTRIの代謝速度がTRIの肝毒性発現に大きな影響を与えるものと思われる。

アルコールは低濃度におけるTRIの肝毒性を強めた。一般に産業職場あるいは生活環境に存在するTRIの濃度は低いからTRIの肝毒性を考える際低濃度ではTRIの肝毒性を修飾しないPB投与はあまり重要ではない。

本研究からアルコール（飲酒）はTRI暴露者の肝障害を誘発する可能性があり、アルコールが低濃度TRIの慢性暴露に対してどのような作用をもたらすか興味を持たれる。

文 献

1. Waters, E. M., Gerstner, H. B. and Huff, J. E. (1977) : Trichloroethylene I. An overview, *J. Toxicol. Environ. Health* 2, 671-707
2. National Cancer Institute (1976) : Carcinogenesis Bioassay of trichloroethylene. C. A. S. No. 79-02-6, D. H. E. W. Publ. No. (NIH) 76-802
3. Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y. (1980) : Effects of chronic ethanol consumption on hepatic metabolism of aromatic and chlorinated hydrocarbons in rats, *Br. J. Ind. Med.* 37, 382-386
4. Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y. (1981) : Dose-related effects of a single dose of ethanol on the metabolism in rat liver of some aromatic and chlorinated hydrocarbons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 60, 8-15
5. Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y. (1983) : Interaction between ethanol and carbohydrate on the metabolism in rat liver of aromatic and chlorinated hydrocarbons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 68, 242-249
6. Costa, A. K., Katz, D. and Ivantich, K. M. (1980) : Trichloroethylene: Its interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 in vitro, *Pharmacology*, 29, 433-439
7. Ikeda, M., Miyake, Y., Ogata, M. and Ohmori, S. (1980) : Metabolism of trichloroethylene, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2983-2992
8. Miller, R. E. and Guengerich, F. P. (1982) : Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450: evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide, *Biochemistry*, 21, 1090-1097
9. Miller, R. E. and Guengerich, F. P. (1983) : Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes and reconstituted enzyme systems containing cytochrome P-450, *Cancer Res.*, 43, 1145-1152
10. Buben, J. A. and O'Flaherty, E. J. (1985) : Delineation of the role of metabolism in the hepatotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene; A dose-effect study, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 105-122
11. Andersen, M. E. (1981) : Saturable metabolism and its relationship to toxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 9, 105-149
12. Nakajima, T., Koyama, Y. and Sato, A. (1982) : Dietary modification of metabolism and toxicity of chemical substances—with special reference to carbohydrate, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1005-1011
13. Sato, A. and Nakajima, T. (1979) : A vial-equilibration method evaluate the drug-metabolizing enzyme activity for volatile hydrocarbons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 41-46
14. Nakajima, T., Okino, T. and Sato, A. (in press) : Kinetic study on benzene metabolism in rat liver—possible presence of three forms of benzene-metabolizing enzymes in the liver, *Biochem. Pharmacol.*,
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., A. L., and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
16. Omura, T. and Sato, A. (1964) : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378
17. Sato, A., Nakajima, T., Fujiwara, Y. and Murayama, N. (1975) : Kinetic studies on sex difference in susceptibility to chronic benzene intoxication—with special reference to body fat content, *Br. J. Ind. Med.*, 32, 321-328
18. Sato, A., Nakajima, T. and Fujiwara, Y. (1975) : Determination of benzene and toluene in blood by means of a syringe-equilibration method using a small amount of blood, *Br. J. Ind. Med.*, 32, 210-214
19. Tanaka, S. and Ikeda, M. (1968) : A method for determination of trichloroethanol and trichloroacetic acid in urine, *Br. J. Ind. Med.*, 25, 214-219

20. Sato, A. and Nakajima, T. (1985) : Enhanced metabolism of volatile hydrocarbons in rat liver following food deprivation, restricted carbohydrate intake, and administration of ethanol, phenobarbital, polychlorinated biphenyl and 3-methylcholanthrene: A comparative study, *Xenobiotica*, 15, 67-75
21. Nakajima, T. and Sato, A. (1979) : Enhanced activity of liver drug-metabolizing enzymes for aromatic and chlorinated hydrocarbons following food deprivation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 549-556
22. Byington, K. H. and Leibman, K. C. (1965) : Metabolism of trichloroethylene in liver microsomes. II Identification of the reaction product as chloral hydrate, *Mol. Pharmacol.*, 1, 247-254
23. Vehleke, H., Tabarelli-Poplowski, S., Bonse, G. and Henschler, D. (1977) : Spectral evidence for 2, 2, 3-trichloro-oxirane formation during microsomal trichloroethylene oxidation, *Arch. Toxicol.* 37, 95-105
24. 石井裕正, 岡崎勲, 松崎松平監訳 : アルコールと臓器障害—病態生理と治療— (1982), 医歯薬出版株式会社, 1-44
25. Nomiyama, K. and Nomiyama, H. (1979) : Pathway and rate of metabolism of trichloroethylene in rats and rabbits, *Ind. Health*, 17, 29-37
26. Briemer, D., Ketelaars, H. C. and von Rossum, I. M. (1974) : Gas chromatographic determination of chloral hydrate, trichloroethanol and trichloroacetic acid in blood and in urine employing headspace analysis, *J. Chromatogr.*, 88, 55-63
27. Cole, W. J., Mitchell, R. G. and Salomonson, R. F. (1975) : Isolation, characterization and quantitation of trichloroethylene in man using electron capture gas chromatography and mass fragmentography, *J. Pharmacol.*, 27, 167
28. Stott, W. T., Quast, J. F. and Watanabe, P. G. (1985) : The pharmacokinetics and macromolecular interactions of trichloroethylene in mice and rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 137-151
29. Prout, M. S., Provam, W. M. and Green, T. (1985) : Species differences in response to trichloroethylene. I Pharmacokinetics in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 79, 389-400
30. Andersen, M. E. Gargas, M. L., Tones, R. A. and Jenkins, L. J. (1980) : Determination of the kinetic constants for metabolism of inhaled toxicants in vivo using gas uptake measurements, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54, 100-116
31. Powell, J. F. (1945) : Trichloroethylene; absorption, elimination and metabolism, *Br. J. Ind. Med.*, 2, 142-145
32. Yllner, S. (1961) : Urinary metabolites of ¹⁴C-tetrachloroethylene in mice, *Nature, Lond.*, 191, 820
33. Cornish, H. H. and Adefuin, J. (1966) : Ethanol potentiation of halogenated aliphatic solvent toxicity, *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.* 27, 57-61
34. Carlson, G. P. (1974) : Enhancement of the hepatotoxicity of trichloroethylene by inducers of drug metabolism, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 7, 637-640
35. Moslen, M. T., Reynolds, E. S. and Szabo, S. (1977) : Enhancement of the metabolism and hepatotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene, *Biochem. pharmacol.*, 26, 369-375