アニリン誘導体の細胞毒性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 原田, 明久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8179

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第1号　233－247（1990）

アニリン誘導体の細胞毒性

金沢大学医学部衛生学講座（主任：橋本和夫教授）
原　田　明　久

（平成2年1月29日受付）

アニリン誘導体は広く化学工業の生産工程で取り扱われている有機化学物質であり，近年，ポリウレタン・合成ゴムなどの原料としてますます生産量が増加しつつある．本研究では，これら化学物質の毒性予測法開発の一環として動物実験法にかわる試験管内における毒性試験代替法を試みた．アニリン誘導体24種類について，Balb/3T3 培養細胞への log ED_{50} と log ATP_{50} は有意な正の相関を示した．Log $(1/ED_{50})+\rho\sigma$（ρ：回帰係数，σ：電子的置換基定数）は，n-オクタノール－水分配係数 log P との関連性で3種類に分類でき，各々 log P の2次関数として表された．アニリン誘導体とヒトヘモグロビンとの反応では，24物質中11物質にメトヘモグロビン形成と2物質にヘモグロビンの変性がみられた．Balb/3T3 細胞と初代培養肝細胞との共存培養 (co-culture) では，アニリン誘導体の ED_{50} がさらに小さくなり，アニリン誘導体が代謝を受けてより毒性の強い物質に変化する可能性が示唆された．アニリン誘導体と核酸塩基との結合性は認められなかった．

Key words aniline derivatives, Balb/3T3, cytotoxicity, methemoglobin, QSAR

アニリン誘導体は，染料，プラスチック，溶剤，殺虫剤，発色色素として広く化学工業の生産工程で取り扱われている[1]．これらアニリン誘導体の健康障害性については，一部皮膚障害性[2]やメトヘモグロビン血症をおこすことが知られており[3]，変異原性の報告もある[4]．しかし，その他多くのアニリン誘導体の健康障害性については，なお十分な知見が得られていない．また，アニリン誘導体の毒性機序については，不明な点が多く残されている．

本研究は，障害性未知のアニリン誘導体の毒性予測法開発と毒性機序の解明を目的として，動物実験に代わる試験管内における毒性試験代替法を試みた．このために，まず皮膚機能や障害性研究その他に広く利用される Balb/3T3, Clone A31（線維芽細胞）を用いて，これに及ぼすアニリン誘導体自体の致死効果，および，エネルギー産生系への作用と，一般に化学物質の生物活性を決める上で重要と考えられている疎水性との相関を調べた．この結果，アニリン誘導体の毒性は，電子的効果を考慮することにより疎水性と高い相関を示すことが明かとなり，その毒性を疎水性との関連で考察した．このことは，また，生体が曝露を受けたときに皮膚吸収性が高いことを示している．そこでアニリン誘導体が体内に吸収されたのちに血中に入り，血液と反応をおこす可能性を考えて，アニリン誘導体とヒトヘモグロビンとの試験管内での反応を調べた．また，血液との反応のみならず，血中のアニリン誘導体が肝臓へ運ばれ，そこで何らかの代謝を受ける可能性も十分に考えられることから，アニリン誘導体の代謝産物の作用を知るために，上記 Balb/3T3 細胞とラットの初代培養肝細胞との共存培養における，アニリン誘導体の致死作用を調べた．更に一部のアニリン誘導体について，変異原性について検討するため

Abbreviations: ACD, acid citrate dextrose; ATP, adenosine triphosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, dimethylsulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetracetic acid; metHb, methemoglobin; oxyHb, oxyhemoglobin; PBS, phosphate buffer saline; QSAR, quantitative structure-activity relationship

に，核酸塩基との反応性を調べた．

材料および方法

I．試薬及び器具

アニリン誘導体として，アニリン，ニトロアニリン (o-, m-, p-)，フェニレンジアミン (o-, m-, p-)，トルイジン (o-, m-, p-)，アニシジン (o-, m-, p-)，クロロアニリン (o-, m-, p-)，アミノフェノール (o-, m-, p-)，アミノ安息香酸 (o-, m-, p-), p-エチルアニリンおよび p-プロピルアニリン (図1) を東京化成工業 (東京) より入手した．これらの試験物質は，水に溶けにくいものも多いため，ジメチルスルホオキシド (dimethyl-sulfoxide, DMSO) (和光純薬，大阪) を溶媒として用いた．Adenosine triphosphate (ATP) 測定のために ATP 抽出試薬と ATP HEPES 緩衝液 (ともに Turner designs, USA) を用いた．化学発光の測定にはルミカウンター・1000 (日音医理科器械，東京) を用いた．培養には，35mm ディッシュ (Falcon 社， USA) を使用し，共存培養にはトランスウェル (Costar社, USA) を用いた．

II．培養細胞

Balb/3T3, Clone A31 (線維芽細胞) を American Type Culture Collecton (USA) より入手した．初代培養肝細胞の調整は，既に報告されている方法[5,6]に基づき行った．第1段階の灌流には，ハンクス液からカルシウムイオン (Ca^{2+}) を除き，エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) (和光純薬) を加えた前灌流用緩衝液を用い，第2段階にコラーゲナーゼ (和光純薬) を加えたコラーゲナーゼ溶液を用いた．また，細胞洗浄用に冷蔵保存したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (Gibco 社， USA) に10%仔牛血清 (Gibco 社) を入れた血清培地を使用した．

III．培　地

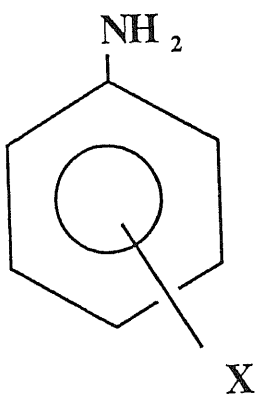
Balb/3T3 細胞の培養には，DMEM 溶液に上記10%仔牛血清を入れて血清培地としたものを使用した．初代培養肝細胞は，摘出直後より，上記血清培地にデキサメサゾン (Sigma 社， USA) 10^{-8}M，インシュリン (Sigma 社) 2×10^{-9}M とペニシリン－ストレプトマイシン溶液 (Gibco 社) 5万単位/500ml を加えて使用した．

IV．ヒトヘモグロビン溶液の調整

ヒトヘモグロビンは，日本赤十字センター金沢支部より得たヒト ACD (acid citrate dextrose) 保存血 (採血後3日) を用いて，Tomoda ら[7]の方法により調整した．最終ヘム濃度は 3mM とした．

V．試験物質の培養細胞への曝露

継代維持している Balb/3T3 細胞を，細胞密度が 1×10^4cells/cm^{2}となるよう 35mm ディッシュにまき，37°C，10% CO_2下にて培養した．試験物質は 100% DMSO 溶液に溶解したのち，血清培地にて1000分の1に希釈し，できるだけ DMSO 濃度を薄くして細胞への毒性が少ないようにした．そして pH を正確に7.5に合わせたのち，0.20μm メンブレンフィルター



X：
1. H
2. o -NO 2
3. m-NO 2
4. p -NO 2
5. o -NH 2
6. m-NH 2
7. p -NH 2
8. o -CH 3
9. m-CH 3
10. p -CH 3
11. o -OCH 3
12. m-OCH 3
13. p -OCH 3
14. o -Cl
15. m-Cl
16. p -Cl
17. o -OH
18. m-OH
19. p -OH
20. o -COOH
21. m-COOH
22. p -COOH
23. p -C 2 H 5
24. p -C 3 H 7

Fig. 1. Chemical structures of aniline derivatives examined in this study. Depending on substitution, 24 derivatives are present and they are widely used as industrial chemicals.

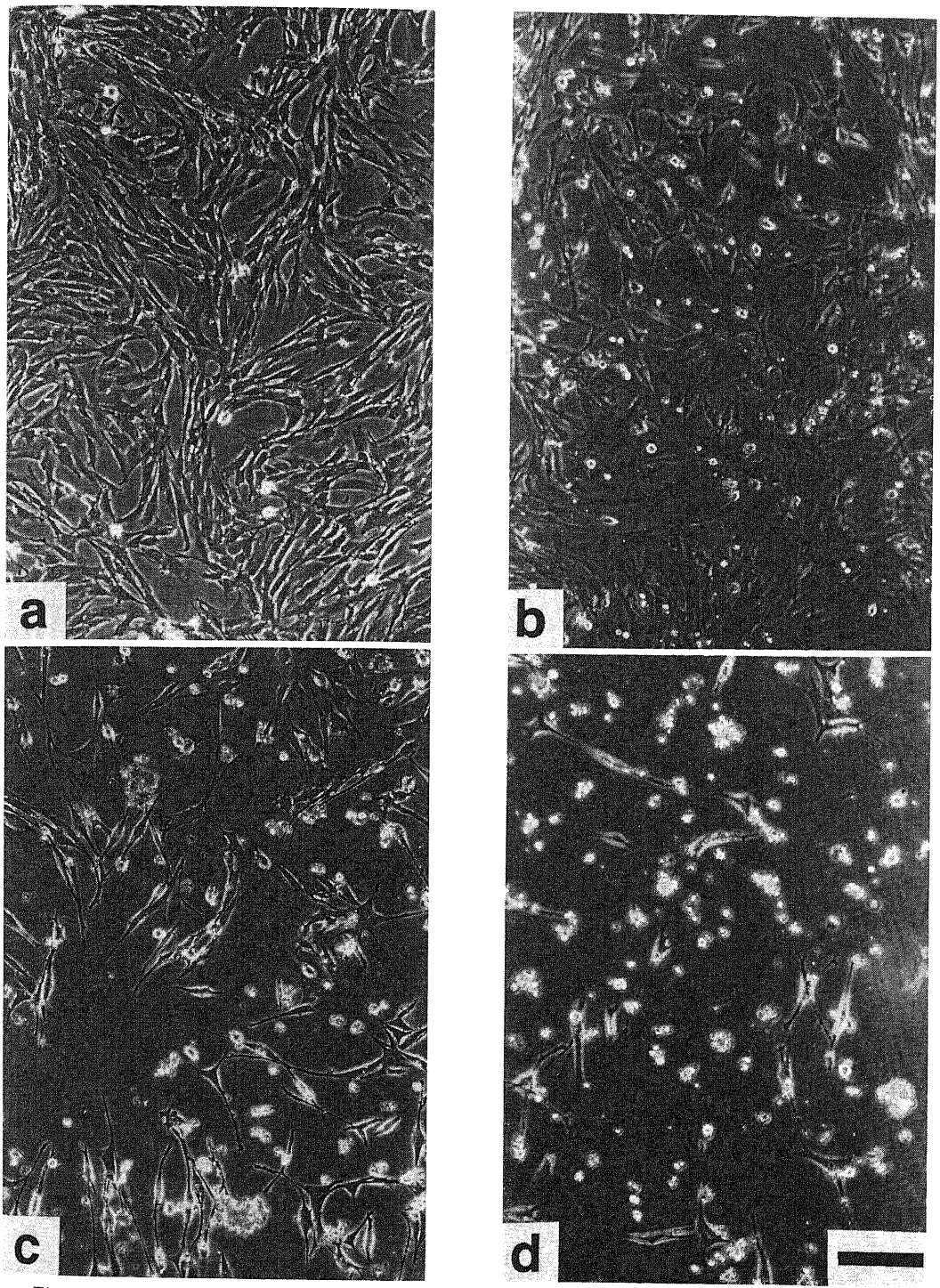


Fig. 2. Effects of aniline derivatives on Balb/3T3 cells in culture at 72 hours after exposure to (a) control (0.1%DMSO), (b) aniline 10mM, (c) o-nitroaniline 1mM, or (d) o-phenylenediamine 0.5mM. The number of cells exposed to o-nitroaniline and o-phenylenediamine was much decreased than those of aniline even though their concentration was much lower than aniline. Scale bar, 10 μm.

にてろ過滅菌し，設定した5濃度に希釈した．希釈には，pH7.5のろ過滅菌した0.1% DMSO を含む血清培地を使った．細胞播種15時間後，ディッシュ内の培地を減圧吸引し，かわりに試験物質を溶かした血清培地を各濃度毎に2ディッシュ，各々 2ml ずつ入れ，37 °C，10% CO_2下にてさらに培養を続けた．なお，コントロールとしては，0.1% DMSO のみを含む血清培地を用いた (図2).

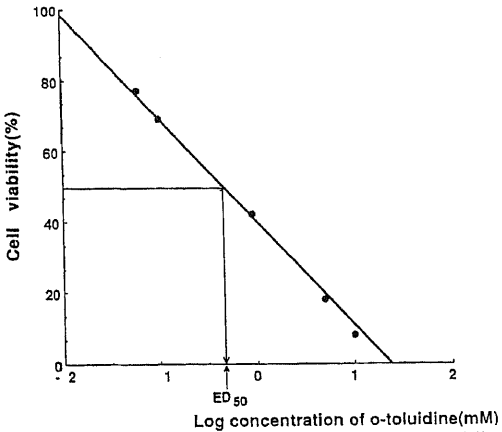


Fig. 3. Dose-response relationship of o-toluidine. ED_{50} was determined after a Probit transformation of cell viability of Balb/3T3 cells. ED_{50} values of other aniline derivatives were determined in the same manner.

VI. 試験物質の50%致死量 (ED_{50})

細胞を試験物質に曝露してから72時間後に，細胞を phosphate buffer saline (PBS) (1mM EDTA，0.2% グルコース) にて2回洗い，0.05%トリプシン (Sigma 社) 0.5ml を入れ細胞をはく離し，EDTA 及びグルコース共に含まない PBS ［以下 PBS (−) とする］を1.5ml を加えて 2ml とし，うち 1ml を取り出して0.2%メチレンブルー溶液 1ml と混ぜ，トーマ氏血球計算盤 (日本臨床器械，東京) にて1ディッシュ2回，染色されていない細胞数を数え，その値をその濃度における細胞生存数とした．コントロールの細胞数を100%として各濃度における細胞生存率 (%) をプロビット変換し，その値が5.0となる濃度をその試験物質の50%致死量 (ED_{50}) とした (図3)．上記の測定を同一物質について少なくとも2回以上繰り返しおこなった．

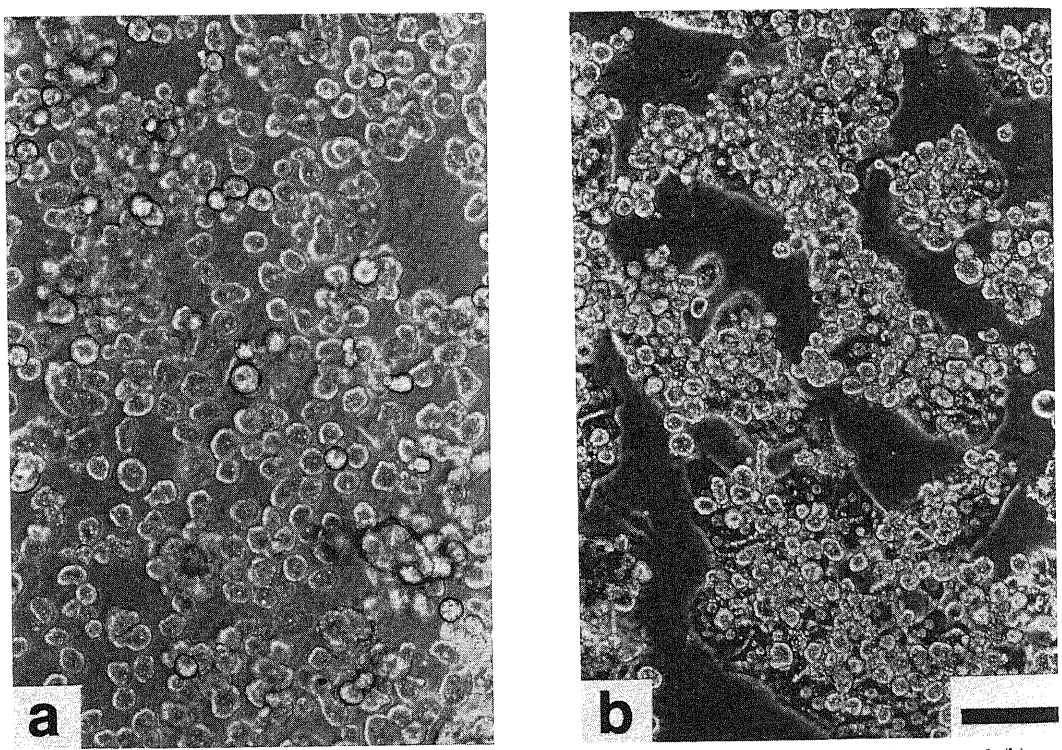


Fig. 4. Phase contrast microscopic appearance of primary rat liver cells at (a) 4 hours and (b) 72 hours in culture. Primary rat liver cells attached to the dish surface in several hours after inoculation and were not changed greatly even at 72 hours. Scale bar, 10 μm.

Ⅶ. ATP の抽出，定量と ATP_{50}

Ⅵ. で残った細胞浮遊液 1ml を，PBS (−) にてさらに 1×10^4 cells/ml になるように希釈し，その 1ml を ATP 抽出試薬 (1ml) と ATP HEPES 緩衝液 (1ml) の入った試験管に加え，正確に 1 分間，回転振盪器にて激しく振盪して ATP 抽出をおこなった．この ATP 抽出液から ATP 量を測定した．ATP の定量には，ルシフェリン−ルシフェラーゼ反応[8] を用いた．ルシフェリンはルシフェラーゼ，Mg^{++}，O_2，ATP の存在下で次の反応により化学発光を生じる．

$$\text{ルシフェリン}+\text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{ルシフェラーゼ}} \text{ルシフェリン}-\text{AMP}+\text{P}-\text{Pi}$$

$$\text{ルシフェリン}-\text{AMP}+O_2 \xrightarrow{\text{ルシフェラーゼ}} \text{オキシルシフェリン}+\text{AMP}+CO_2+\text{光}$$

この発光量は ATP の量に依存するため，発光量を測定することで ATP の量を算出した[8]．この ATP 量から，ATP が対照群と比較して50%に阻害される濃度を ATP_{50}とした．この際にもコントロールと比較した各濃度における ATP 産生率 (%) をプロビット変換して求めた．

Ⅷ. 試験物質とヒトヘモグロビンとの反応条件と分析

22種の試験物質とヒトヘモグロビンとの反応を調べるため，ヒトヘモグロビン溶液 (最終ヘム濃度 3mM) に試験物質 (最終濃度 10mM, 1%DMSO 中) を加え，37°C恒温槽にて 5 時間振盪させた．得られたヒトヘモグロビン溶液は，Tomoda らの方法[9] で等電点電気泳動 (LKB PAG プレート，pH 3.5〜9.5) を行い，それを二波長 TLC スキャナー CS-930 (島津製作所，京都) でゲルスキャンニング (630nm) して，オキシヘモグロビン，部分酸化型ヘモグロビン 2 種およびメトヘモグロビン形成量を求め，これら 4 種のヘモグロビン

Table 1. Structure, ED_{50}, log P, σ, and HB of aniline derivatives

	Compound	Structure	ED_{50}[a](mM)	Log P[b]	σ[c]	HB1[d]	HB2[e]
1	Aniline	$NH_2C_6H_5$	1.858	0.90	0.	0	0
2	o-Nitroaniline	$NH_2C_6H_4NO_2$	0.520	1.80	0.78	1	0
3	m-Nitroaniline	$NH_2C_6H_4NO_2$	0.361	1.37	0.71	1	0
4	p-Nitroaniline	$NH_2C_6H_4NO_2$	0.322	1.39	0.78	1	0
5	o-Phenylenediamine	$NH_2C_6H_4NH_2$	0.014	0.15	−0.66	0	1
6	m-Phenylenediamine	$NH_2C_6H_4NH_2$	0.121	−0.42	−0.16	0	1
7	p-Phenylenediamine	$NH_2C_6H_4NH_2$	0.021	−0.3	−0.66	0	1
8	o-Toluidine	$NH_2C_6H_4CH_3$	0.149	1.32	−0.17	0	0
9	m-Toluidine	$NH_2C_6H_4CH_3$	0.189	1.40	−0.07	0	0
10	P-Toluidine	$NH_2C_6H_4CH_3$	0.201	1.39	−0.17	0	0
11	o-Anisidine	$NH_2C_6H_4OCH_3$	0.074	1.18	−0.27	1	0
12	m-Anisidine	$NH_2C_6H_4OCH_3$	0.301	0.93	0.12	1	0
13	p-Anisidine	$NH_2C_6H_4OCH_3$	0.028	1.18	−0.27	1	0
14	o-Chloroaniline	$NH_2C_6H_4Cl$	0.208	1.92	0.23	0	0
15	m-Chloroaniline	$NH_2C_6H_4Cl$	0.388	1.88	0.27	0	0
16	p-Chloroaniline	$NH_2C_6H_4Cl$	0.128	1.83	0.23	0	0
17	o-Aminophenol	$NH_2C_6H_4OH$	0.015	0.62	−0.37	0	1
18	m-Aminophenol	$NH_2C_6H_4OH$	0.084	0.17	0.12	0	1
19	p-Aminophenol	$NH_2C_6H_4OH$	0.020	−0.17	−0.37	0	1
20	o-Aminobenzoic acid	$NH_2C_6H_4COOH$	3.883	1.21	0.45	0	1
21	m-Aminobenzoic acid	$NH_2C_6H_4COOH$	16.631	0.27	0.37	0	1
22	p-Aminobenzoic acid	$NH_2C_6H_4COOH$	17.491	0.83	0.45	0	1
23	p-Ethylaniline	$NH_2C_6H_4C_2H_5$	0.230	1.96	−0.15	0	0
24	p-Propylaniline	$NH_2C_6H_4C_3H_7$	0.347	2.49	−0.13	0	0

[a] ED_{50} was determined by Probit transformation of cell viability. [b] P represents n-octanol-water partition coefficient. [c] σ represents a Hammet constant. [d, e] HB represents hydrogen bonding of activesite. HB1 and HB2 represent hydogen acceptor and amphiprotic substituents, respectively.

中のメトヘモグロビンの割合を求めた．

IX．初代培養肝細胞による共存培養

初代培養肝細胞（図4）は，Balb/3T3 細胞と同時に培養した．I．で求めたトランスウェル（Costar 社）の上段に初代培養肝細胞を 1×10^5 cells/cm^2 播種し，下段に Balb/3T3 細胞をV．と同様，1×10^4 cells/cm^2 播種した．上段に培地を 1.6ml，下段には 2.4ml で全体で 4ml の培地を入れた．試験物質は，上段の容器内にのみ入れるため，V．と同様の濃度になるよう調整し，細胞への添加直前に，すでにある培地を減圧吸引し，PBS（−）にてよく洗い，培地内に残っているホルモンの影響を除いたのち，初代培養肝細胞に作用させた．その72時間後に Balb/3T3 細胞の表面を PBS（1mM EDTA，0.2%グルコース）にて2回洗い，0.05%トリプシン 0.5ml を加え細胞をはく離し，0.2%メチレンブルー溶液を 0.5ml 加えてよく混ぜ，その生細胞数をトーマ氏血球計算盤にて1ディッシュ2回数え，VI．と同様に50%致死量CO ED_{50} を求めた．

X．試験物質と核酸塩基との試験管内での反応

アニリン，o-トルイジン，p-フェニレンジアミン，o- と p-アミノフェノールと核酸塩基との試験管内での反応をしらべた．核酸塩基は，2mM の 2'-デオキシアデノシン，2'-デオキシシチジンおよびチミジンの燐酸緩衝溶液（0.2M, pH 7.0）を用いた．これと，0.1% DMSO に溶解した 1mM の試験物質を37°Cで，Solomon ら[10]の方法に準じて，3週間反応させた．反応後の溶液 2 μl を薄層クロマト（シリカゲル70プレート）（和光純薬）にスポットし，イソプロパノール/水（2.3/1）にて常温で展開した．数時間後，Buchanan[11]の方法に準じて0.5%システインの硫酸溶液（3N）を噴霧したのち，85°C，10分間加熱した．上記3種の核酸塩基溶液と0.1% DMSO 溶液とを同様に反応させた試料を対照とした．

XI．構造−活性相関（quantitative structure-activity relationship, QSAR）

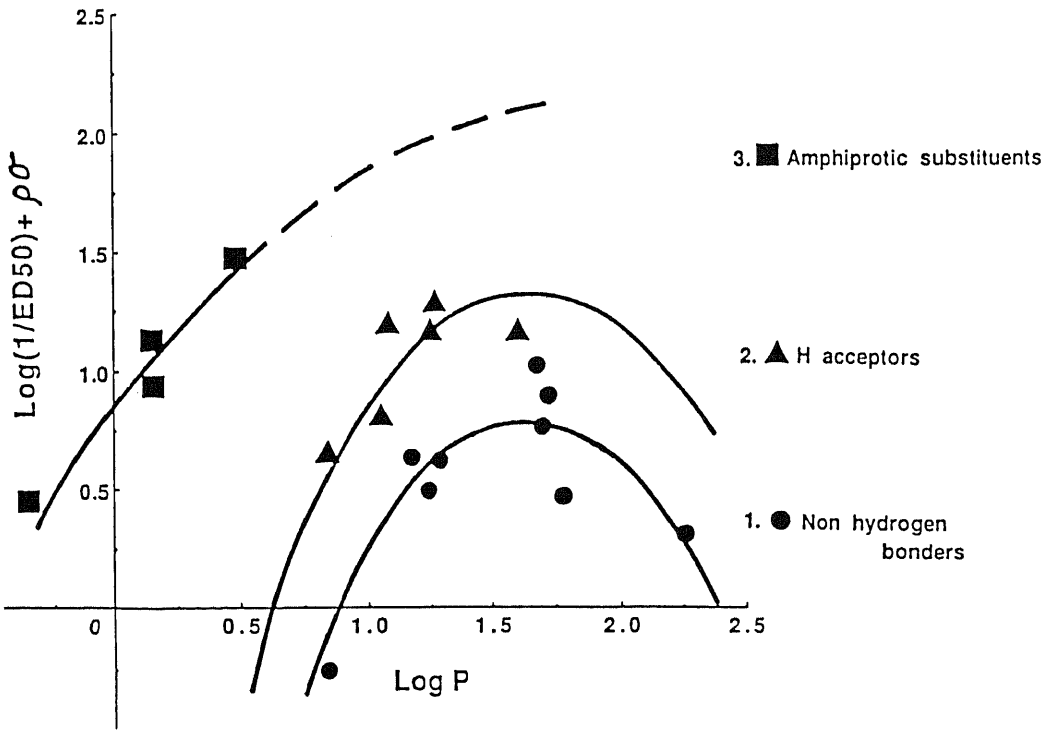


Fig. 5. Relationships between $\log(1/ED_{50})+\rho\sigma$ and log P. Aniline derivatives showed parabolic relationships between the cytotoxicity and log P. The toxicity increased further when the compounds had hydrogen acceptable (▲) or amphiprotic substituents (■) than those having nonhydrogen bonders (●). A broken line represents the necessity of further refinement by adding the number of amphiprotic substituents which have greater log P value than those examined in this study.

疎水性を示す n-オクタノール－水分配係数 log P は，m-, p-フェニレンジアミン以外は Hansch らの「THE LOGP DATA BASE」[12] を用いた．m-, p-フェニレンジアミンについては，Fujita の報告[13] に従った．電子的効果を示す電子的置換基定数 σ の値は，Hansch らの報告[14]に従った．HB はダミー変数とし，HB1 は水素受容性のものに 1 を与え，HB2 は両性 (水素受容性かつ水素供与性) のものに 1 を与え，いずれも残りを 0 とした．ED_{50} と log P，σ，の解析は，Hansch らの方法[15] に従い，PASAR 重回帰分析プログラムを用いて FACOM M360R コンピューターにておこなった．

XII．統計学的検定法

ED_{50} と ATP_{50} の相関は Pearson の積率相関係数を用いた．

ED_{50} と CO ED_{50} の平均値の差の検定は，Student's t-検定を用いた．ともに $p<0.05$ を有意とした．

Table 2. Effect of anilion derivatives on ATP (adenosine triphosphate) content of Balb/3T3 cells

	Compoud	ATP_{50}[a](mM)
1	Aniline	1.898
2	o-Nitroaniline	0.378
3	m-Nitroaniline	0.271
4	p-Nitroaniline	0.280
5	o-Phenylenediamine	0.030
6	m-Phenylenediamine	0.370
7	p-Phenylenediamine	0.035
8	o-Toluidine	0.576
9	m-Toluidine	0.608
10	p-Toluidine	0.228
11	o-Anisidine	0.670
12	m-Anisidine	0.383
13	p-Anisidine	0.016
14	o-Chloroaniline	0.706
15	m-Chloroaniline	0.601
16	p-Chloroaniline	0.097
17	o-Aminophenol	0.037
18	m-Aminophenol	0.240
19	p-Aminophenol	0.026
20	o-Aminobenzoic acid	5.614
21	p-Aminobenzoic acid	11.110
22	p-Aminobenzoic acid	10.370
23	p-Ethylaniline	—[b]
24	p-Propylaniline	—[c]

[a] ATP_{50} was determined by Probit transformation of extracted ATP contents. [b, c] Not determined.

成　　績

I．アニリン誘導体の構造と細胞致死作用 (ED_{50}) との相関

本研究に用いたアニリン誘導体の化学構造，ED_{50} と化学構造より示される分配係数 (log P)，電子的置換基定数 (σ) とダミー変数 (HB) を表 1 に示す．アニリン誘導体の合成のもととなるアニリンの細胞毒性はアミノ安息香酸 (o-, m-, p-) を除いた他のすべての誘導体よりも弱い．特に，フェニレンジアミン (o-, p-)，アニシジン (o-, p-) やアミノフェノール (o-, m-, p-) はその毒性がアニリンと比較して約20倍から130倍の強さであった．また，置換基の位置が異なることで，同じ誘導体でも生物活性に大きな差が生じている．

本実験で用いたアニリン誘導体についておこなった構造－活性相関分析のうち，有意な相関の得られた 3 種類の重回帰式を以下に示し，各式の活性値 log $(1/ED_{50})+\rho\sigma$ (ρ は回帰係数) と分配係数 log P との関係を図 5 に示した．これらはいずれも放物線に適合すると考えられた．

1．化合物…1，8，9，10，14，15，16，23，24

$$\log(1/ED_{50}) = -1.194(\log P)^2 + 4.342\log P - 0.697\sigma - 3.12$$

(n=9, r=0.891, s=0.20, F=6.42)

2．化合物…1，2，3，4，8，9，10，11，12，13，14，15，16，23，24

$$\log(1/ED_{50}) = -1.152(\log P)^2 + 4.133\log P - 1.10\sigma + 0.608\,HB1 - 2.89$$

(n=15, r=0.892, s=0.22, F=9.71)

3．化合物…1，2，3，4，5，6，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，23，24

$$\log(1/ED_{50}) = -0.328(\log P)^2 + 1.301\log P - 0.804\sigma + 0.486\,HB1 + 1.550\,HB2 - 0.622$$

(n=19, r=0.887, s=0.27, F=9.64)

ここで，化合物は表 1 の番号で示した．また，n は分析に用いたアニリン誘導体の数，r は相関係数，s は標準偏差を示す．3 式はいずれも有意 ($p<0.01$) であった．

II．アニリン誘導体の培養細胞におけるエネルギー産生系の阻害 (ATP_{50}) と ED_{50} との関係

アニリン誘導体の培養細胞の ATP 産生に与える影響 (ATP_{50}) を表 2 に示した．ATP_{50} は 0.026mM から 11.11mM までの広い範囲にわたった．log ED_{50} と log ATP_{50} との関係を図 6 に示した．両者の相関式は

$$\log ATP_{50} = 0.728 \log ED_{50} + 0.0992 \quad (r = 0.830)$$

で有意の正の相関関係を示した ($p<0.01$). この結果，いずれのアニリン誘導体においても ED_{50} に比較して，ATP_{50} が特に小さくなっているものはなく，アニリン誘導体がエネルギー産生系を阻害しているとは考えられない．

Ⅲ．試験物質とヒトヘモグロビンとの反応

試験物質とヒトヘモグロビンとの反応で得られた等電点電気泳動パターンを図7に示す．この泳動パターンから，ヘモグロビンはアニリン誘導体によって酸化され $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ や $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ のような半分酸化型ヘモグロビンや，さらに完全酸化型ヘモグロビン $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2$ であるメトヘモグロビンに変化することがわかった．p-ニトロアニリン，o-, m-, p-フェニレンジアミン，o-, m-, p-，クロロアニリン，o-アミノフェノール，o-, m-, p-アミノ安息香酸は強いメトヘモグロビン形成能を示した．また，p-フェニレンジアミンとヘモグロビンの反応では，ヘモグロビンの各バンド間に不鮮明な泳動部分 (テーリング) が出現し，p-アミノフェノールにおいては完全に泳動像が乱れた．このことより，この両者においては，ヘモグロビンの変性が示唆された．

なお，各アニリン誘導体のメトヘモグロビン形成の割合を表3に示す．

Ⅳ．初代培養肝細胞との共存培養系におけるアニリン誘導体の細胞毒性

共存培養によるアニリン誘導体の CO ED_{50} を表4に示した．図8には，ED_{50} と比較した ED_{50}/CO ED_{50} を示した．o-, m-ニトロアニリン，o-, m-トルイジン，p-アニシジン，o-, m-クロロアニリンと m-アミノフェノールの ED_{50} と CO ED_{50} は有意の差はなかった．o- と p-アミノフェノールの CO ED_{50} は ED_{50} より有意に大きくなった．残りの誘導体は CO ED_{50} が ED_{50} より有意に小さくなり毒性が強くなったことを示した．また，o-, m-アミノフェノールについて培養濃度と細胞抑制率との関係を図9に示した．量－反応関係が放物線となり，ある濃度を頂点としてその左右で抑制率の増加がみられるという特徴があった．

Ⅴ．試験物質の核酸塩基との反応性

アニリン，o-トルイジン，p-フェニレンジアミン，

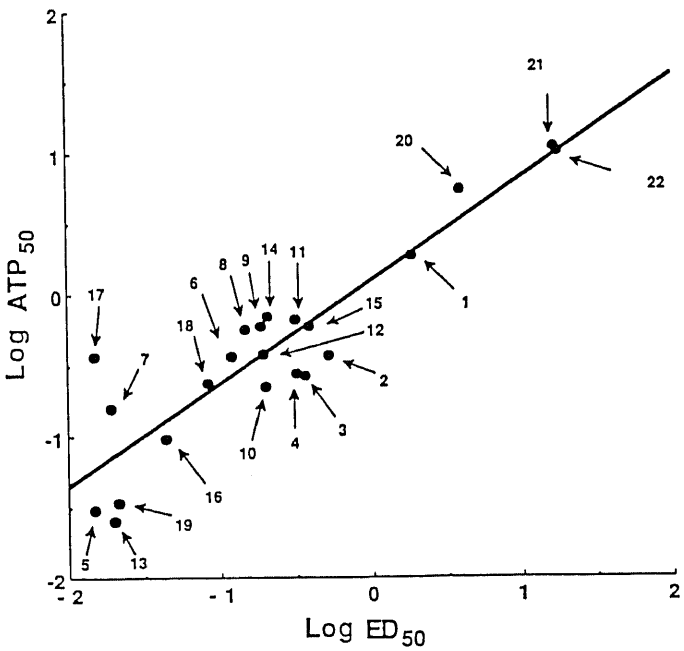


Fig. 6. Relationship between log ATP_{50} and log ED_{50}. Log ATP_{50} and log ED_{50} have a good correlationship, suggesting that the decrease of ATP content is not the direct result of the inhibitory effects of the test compounds on energy metabolism but is probably due to the effect of cell viability. Numbers in figure indicate the compound in Table 2.

o-, p-アミノフェノールは，3種の核酸塩基，2'－デオキシアデノシン，2'－デオキシシチジンおよびチミジンとのいずれの塩基に対する反応物も検出されなかった．

考　　察

アニリンおよびその誘導体は，各種の色素や工業および医薬品生産の出発物質として，古くから化学工業界で広く用いられている．近年は，有機合成原料として，とくにポリウレタン・合成ゴム・殺虫剤・防カビ剤・酸化防止剤などへの利用も拡大しつつある[1]．一方これら誘導体は，生産工程における原料の取り扱いに際して，吸入，皮膚接触，経口摂取の結果強い毒性を生じることが知られている．また，時には一般家庭で用いられる製品の誤用によって，とくに小児などの中毒を引きおこすことも知られている[16]．

本研究はこれらアニリン誘導体24種について，その毒性を試験管内において検討した．これら誘導体は，化学構造上，アニリンに置換基が1つ付いたものであるが，その置換基の化学的性質により生物活性としての毒性 (ED_{50}) が大きく異なる．生物活性は主として，疎水性をもって説明されることはよく知られている

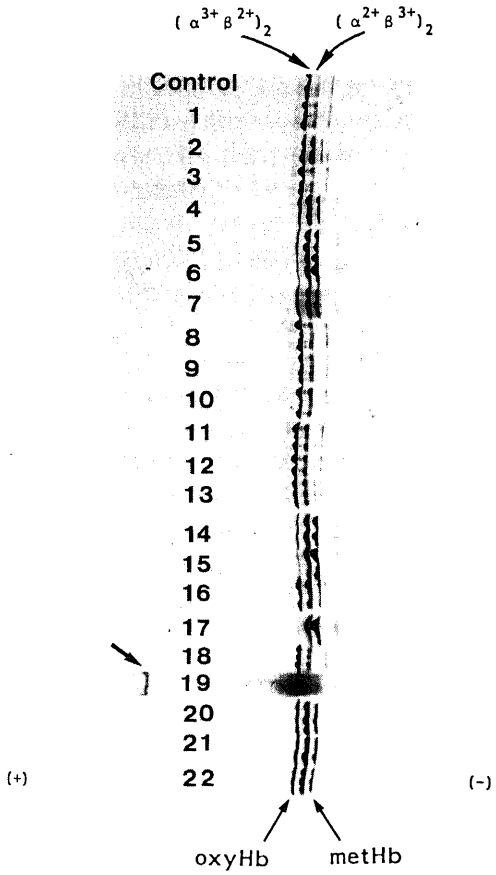


Fig. 7. Isoelectric-focusing patterns on PAG plate (pH 3.5～9.5) of human hemoglobin solutions which were incubated with aniline derivatives. Numbers in figure indicate the compound in Table 3. Remarkable methemoglobin formation was observed in p-nitroaniline, o-, m-, p-phenylenediamine, o-, m-, p-chloroaniline, o-aminophenol, o-, m-, and p-aminobenzoic acid. Evident tailing of hemoglobin between the major bands was observed in p-phenylenediamine and p-aminophenol, suggesting denaturation of the protein. Abnormal spot (arrow) was also observed.

Table 3. Oxidation of human hemoglobin by aniline derivatives

	Compound	Methemoglobin[a] (%)
1	Aniline	0
2	o-Nitroaniline	5.90
3	m-Nitroaniline	0
4	p-Nitroaniline	18.76
5	o-Phenylenediamine	28.06
6	m-Phenylenediamine	43.83
7	p-Phenylenediamine	—[b]
8	o-Toluidine	4.35
9	m-Toluidine	6.11
10	p-Toluidine	3.97
11	o-Anisidine	4.10
12	m-Anisidine	3.53
13	p-Anisidine	3.62
14	o-chloroaniline	35.27
15	m-Chloroaniline	11.48
16	p-Chloroaniline	11.04
17	o-Aminophenol	45.20
18	m-Aminophenol	0
19	p-Aminophenol	—[c]
20	o-Aminobenzoic acid	24.93
21	m-Aminobenzoic acid	21.66
22	p-Aminobenzoic acid	16.19
23	p-Ethylaniline	—[d]
24	p-Propylaniline	—[e]

[a] The isoelectric-focusing patterns were analysed by gel-scanning at 630 nm and the methemoglobin contents (%) were estimated from each of the components (oxyhemoglobin, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ and methemoglobin). [b,c] The methemoglobin contents were not estimated because of denaturation of hemoglobin itself. [d,e] Not determined.

が[17]，著者は，とくにこれらアニリン誘導体の疎水性と電子的効果に注目した．すなわち，Hansch らが，化学構造の生体作用に関するモデルから，活性を分配係数の他に電子的効果および立体的効果などで説明している[15]ように，疎水性を n-オクタノール－水分配係数 log P，電子的効果を σ，分子内結合度をあらわすダミー変数として HB を用いて検討した．その結果，生物活性としての $\log(1/ED_{50})+\rho\sigma$ は，log P との関連性で 3 種類に分類でき，各々 log P の 2 次関数（放物線）として説明された（図 5）．すなわち，アニリン誘導体が適当な疎水性を有する場合は，作用部位への輸送量または作用部位での生体成分との疎水性相互作用の効果が増大し，毒性発現に関与すると考えられる．とくに，重回帰式 1 は，置換基がメチル基（$-CH_3$），エチル基（$-C_2H_5$），プロピル基（$-C_3H_7$）と塩素（$-Cl$）であり，これらは水素結合を形成しない置換基群の集まりである．重回帰式 2 は重回帰式 1 に，ニトロ基（$-NO_2$）とメトキシ基（$-OCH_3$）の置換基をもつアニリン誘導体が加わっている．この両者の置換基は水素結合を形成する置換基群のため，HB の係数が正の係数となって，水素結合を形成しない重回帰式 1 よりさらに生物活性が強くなっていると考えられる[18]．特にニトロ基においては，電子求引性の性質を持つため $-NO_2$ の O の部分に電子のプールができ，それが生体成分中に多くある H^+ の部分と反応して水素結合を形成するのではないかと考えられる．また，重回帰式 3 はアミノ基（$-NH_2$）と水酸基（$-OH$）を置換基として持つものがさらに加わったものである．これらは電子求引性，供与性両方の性質を持ち，その点，ニトロ基（$-NO_2$）やメトキシ基（$-OCH_3$）などの水素受容基よりも生体成分と水素結合し得る可能性が高い．それは，HB1 より HB2 の係数が大きいことより考えられ，そのため毒性がさらに強くなっていると思われる．しかし，これに関しては加えられたサンプル数も少ないため，さらに置換基の種類をふやして詳細に検討する必要がある．

Table 4. Effect of aniline derivatitves on viability of Balb/3T3 cells co-cultured with primary rat liver cells

	Compound	$CO\,ED_{50}$
1	Aniline	0.345*
2	o-Nitroaniline	0.455
3	m-Nitroaniline	0.192
4	p-Nitroaniline	0.038*
5	o-Phenylenediamine	0.008*
6	m-Phenylenediamine	0.020*
7	p-Phenylenediamine	0.009*
8	o-Toluidine	0.200
9	m-Toluidine	0.134
10	p-Toluidine	0.051*
11	o-Anisidine	0.053*
12	m-Anisidine	0.037*
13	p-Anisidine	0.019
14	o-Chloroaniline	0.094
15	m.Chloroaniline	0.124
16	p-Chloroaniline	0.026*
17	o-Aminophenol	0.040*
18	m-Aminophenol	0.038
19	p-Aminophenol	0.054*
20	o-Aminobenzoic acid	0.150*
21	m-Aminobenzoic acid	2.150*
22	p-Aminobenzoic acid	0.390*
23	p-Ethylaniline	—[b]
24	p-Propylaniline	—[c]

[a] $CO\,ED_{50}$ was determined by Probit transformation of Balb/3T3 cell viability. [b, c] Not determined. *$p<0.05$ vs. ED_{50} by Student's t-test.

Ahlers ら[19]は，イースト菌を用いて，試験管内でのフェノールやアニリン誘導体を含む57種の化学物質について，その毒性を分配係数 log P のみより検討しているが，本実験において水素結合の有無も毒性の強さに大きく関与していることが明らかとなった．

細胞レベルの毒性発現の機序としては，酵素の逸脱，呼吸鎖の抑制，DNA 合成の阻害そして細胞増殖の抑制なども考えられている[20]が，水素結合がエネルギー産生系に影響する可能性が考えられたので，この系の障害として ATP_{50} を検討した．この結果，ATP_{50} と ED_{50} との間には，高い相関関係を示した（図 6）．Kemp ら[21][22]もすでに他の化学物質について同様の結果を報告している．しかし，どの誘導体についても ED_{50} に比較して ATP_{50} が特に小さくなっているものはなく，水素結合をおこさないもの，おこすもの，いずれのアニリン誘導体もエネルギー産生系の障害を特におこすものではないと考えられた．

アニリン誘導体が，構造－活性相関の分析により分配係数 log P との高い相関が明らかになったことから，生体がアニリン誘導体の曝露を経皮的または経気道的に受けたとき，すみやかに体内に吸収されることが考えられる．このとき第 1 の標的臓器は，アニリン誘導体と直接接触した皮膚や粘膜の部位となるが，第 2 の標的臓器として血液との反応が考えられる．アニリン誘導体によりメトヘモグロビン血症がおこることはよく知られており，このメトヘモグロビン量を指標

として，生物学的モニタリングを試みようとする報告は多い[23)~25)]．本研究においても，アニリン誘導体のメトヘモグロビン形成量を算出した（表3）．しかし，Nagasawa ら[26)27)]は，o-アミノフェノールがチトクローム c により代謝を受け，他の物質に変化することを報告しており，また，Tomoda ら[28)]もヒトヘモグロビンと o-アミノフェノールとの直接的な反応により，o-アミノフェノールがヘモグロビンによる代謝を受け，2－アミノフェノキサジン－3－オンになることを報告している．このことからアニリン誘導体のヒトヘモグロビンとの反応は，酸化還元反応だけでなく，ヘモグロビンによるアニリン誘導体の代謝産物の作用も考慮しなければならない．この代謝産物は，等電点電気泳動にて，ヘモグロビンのバンド出現位置よりも離れたところに異常なスポットをもつことでその存在を知ることができる（図7）．また，p-フェニレンジアミンや p-アミノフェノールによるヘモグロビンの泳動像の乱れは，アニリン誘導体のヘムタンパクへの強い変性作用を示している．これらのことから，アニリン誘導体とヒトヘモグロビンとの反応を泳動像をもって検討することで，単にメトヘモグロビン形成を知るのみでなく，ヘモグロビンによるアニリン誘導体の代謝作用とアニリン誘導体のヘモグロビンの変性作用という重要な知見が得られることが示唆された．なお，本研究で用いたアニリン誘導体22種についての等電点電気泳動によるメトヘモグロビンの形成を示した報告は現在までなく，新しい知見となった．

以上，血液を，体内に入ったアニリン誘導体の第2の標的臓器と考えたが，血中に入ったアニリン誘導体がさらに肝臓での代謝を受けたのちの生体作用を，試験管内でしらべるため初代培養肝細胞との共存培養法を検討した．初代培養肝細胞を用いた共存培養は，動物実験に対する動物愛護の立場からの批判や，強毒性物質を直接動物に投与して実験する場合に，実験関係者にかかる危険性が大きいなどといった理由で，試験管内における実験法としてますます重要になってきている．初代培養肝細胞は，薬物代謝酵素の低下は多少あるものの種々の誘導剤にて活性化することができ，1週間程度の実験では試験管外の肝臓と同じレベルの薬物代謝活性を持つ[29)]と言われている．

肝臓における化合物の同化異化作用は，化合物の解毒のみならず場合によっては逆に毒性を強めることも

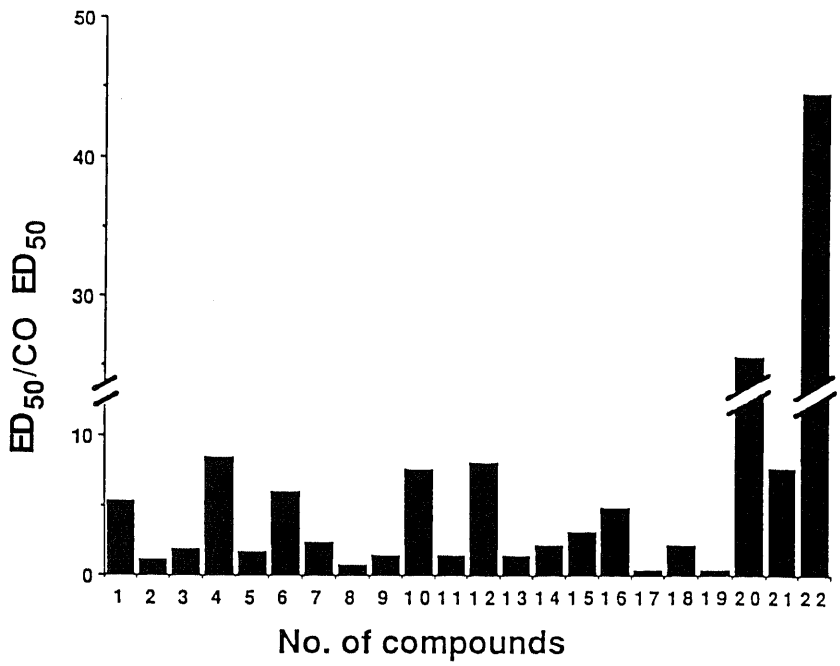


Fig. 8. Ratio of ED_{50} to CO ED_{50}. CO ED_{50} was determined after a Probit transformation of cell viability of Balb/3T3 cells co-cultured with primary rat liver cells. CO ED_{50} are lower than ED_{50} in most of the test compounds, suggesting that most of aniline derivatives were bioactivated by liver cells. Numbers in figure indicate the compound in Table 4.

あり[30]，その化合物の変異原性，発癌性の機作とも密接な関係のあることが知られている[4)31)]．特に，芳香族アミンの代謝活性については，他の発癌性物質に先立って渡辺[32]，Miller[33]によりこれまで多くの研究がなされてる．それによると，アミン類は肝や他の組織の P-450 によって芳香族環の水酸化を受けアミノフェノールになり活性化され，これがさらに N-水酸化を受けヒドロキシアミン水酸基ができてより活性化される[32]．本実験において，アニリンが初代培養肝細胞との共存培養によってより活性化されたが，他の誘導体においても同様の知見が得られた．一方，図9の o-と m-アミノフェノールにおいては，主な代謝産物が硫酸エステルである[34]ことから考えて，ある濃度以上では肝細胞は解毒の方向に働いていると考えられた．しかし，今回の成績では濃度が極めて低い場合には，代謝抱合の速度が遅くなり，アミノフェノールそれ自体の毒性により，直接的に細胞毒性を示したものと考えられる．この点については，今後更に検討を要する．以上の結果，初代培養肝細胞を用いる研究法は，アニリン誘導体の代謝活性化または解毒の模様を知る1つの手がかりとなり，試験管外の実験系に近づける重要な手段と思われた．

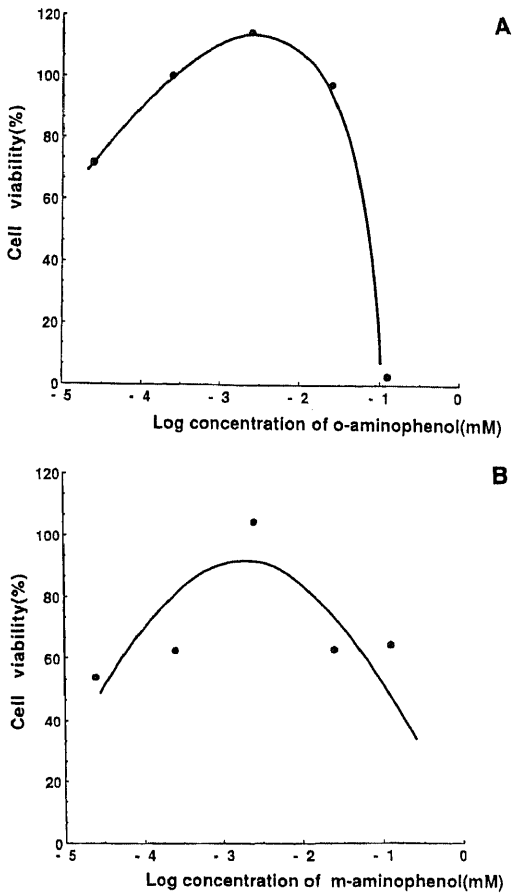


Fig. 9. Dose-response relationship of (A) o- and (B) m-aminophenol in viablity of Balb/3T3 cells co-cultured with primary rat liver cells. These two aniline derivatives showed parabolic relationships between the cytotoxicity and concentration of the compounds.

アニリン誘導体の発癌性に関しては多くの報告[4)35)]があるが，いまだに成績の一致をみない[31]．化学物質の発癌性を検討するとき，化学物質が蛋白質と核酸に対してアルキル化反応をおこすことが知られている[36]．親化合物のアニリンについては，発癌性は否定されて[4]，蛋白質の －SH 基への作用がないことも報告されている[37]が，トルイジンについては，発癌性の報告がある[38]．本実験において3種の核酸塩基との反応をアニリンも含めて5物質に限って調べたが，その結果，いずれも核酸との結合性はみられず発癌性との関連性は確認できなかった．

以上，アニリン誘導体を用いて動物実験の代替法について検討をおこなったが，構造－活性相関による分析をおこなうことで，毒性発現性に関するある程度の予想の道が開かれた．また，初代培養肝細胞を用いる共存培養法によって試験管外の方法にかえて，試験管内で毒性の代謝活性，および解毒化についての知見を得た．今後は培養，諸条件を検討してさらに試験管外に近い実験系を確立することが大切と考える．

結　　論

有機合成化学として近年用途の拡大しつつあるアニリン誘導体 (aniline derivatives) の細胞毒性をしらべ，動物実験代替法としての有用性を検討して，以下の成績を得た．

1．アニリン誘導体の親化合物，アニリンの細胞毒性は，アミノ安息香酸 (o-, m-, p-) を除いた他のアニリン誘導体よりも弱い．特に，フェニレンジアミン (o-, p-)，アニシジン (o-, m-) とアミノフェノール (o-, m-, p-) はその毒性が親化合物であるアニリンの約20倍から130倍であった．また，置換基の位置が異なることで，同じ誘導体でも生物活性が大きく異なった．アニリン誘導体の50%細胞致死量 (ED_{50}) と分配係数 log P との関係は $\log(1/ED_{50})+\rho\sigma$ (ρ：回帰係数，σ：電子的置換基定数) が，log P の2次式で表され，各々のアニリン誘導体が持つ化学反応性の特徴により3つの有意な重回帰式が導かれた．

2．アニリン誘導体の培養細胞におけるエネルギー産生系への障害 (log ATP_{50}) と log ED_{50} とは高い相関関係を示した．

3．p-ニトロアニリン，o-, m-, p- フェニレンジアミン，o-, m-, p- クロロアニリン，o-アミノフェノール，o-, m-, p- アミノ安息香酸は試験管内で強いメトヘモグロビン形成能を示した．p-フェニレンジアミンとp-アミノフェノールは，ヘモグロビンの変性をおこした．

4．アニリン，p-ニトロアニリン，o-, m-, p-フェニレンジアミン，p-トルイジン，o-, m-アニシジン，p-クロロアニリン，o-, m-, p-アミノ安息香酸の共存培養系における50%細胞致死量 (CO ED_{50}) は ED_{50} と比較して有意に小さくなり，初代培養肝細胞との共存培養によってこれらは細胞毒性が増加した．

5．アニリン，o-トルイジン，p-フェニレンジアミン，o-, p- アミノフェノールと核酸塩基との試験管内での結合性はみられなかった．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，終始御指導と御校閲を頂きました恩師橋本和夫教授に深謝いたします．さらに，御指導，御助言を頂きました金沢大学医学部第一生化学教室友田燁夫助教授ならびに，京都大学農学部農芸化学藤田稔夫教授に厚く御礼申し上げます．研究をおこなうにあたり御協力頂きました金沢大学医療短期大学3年鮎川知子と松本三穂，本教室の出村千恵子，鈴木貴子諸氏ならびに，有益な御助言を頂きました本教室の諸先生方に深く感謝いたします．

なお，本論文の要旨の一部は，The 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (1989年，ホノルル) において発表した．

文　　献

1) **Manahan, S. E.:** Toxicological Chemistry, 1st ed., p211-230, Lewis Publishers, Inc., Michigan, 1989.

2) **政本幸三，高瀬吉雄:** 皮膚に対する化学物質の作用．信州医誌，**35,** 185-193 (1987).

3) **Bunn, H. F., Forget, B. G. & Ranney, H. G.:** Human Hemoglobin, 1st ed., p336-350, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1977.

4) **Wilmer, J. L., Kligerman, A. D. & Erexson, G. L.:** Sister chromatid exchange induction and cell cycle inhibition by aniline and its metabolites in human fibroblasts. Environ. Mutagen., **3,** 627-638 (1981).

5) **Berry, M. N. & Friend, D. S.:** High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell. Biol., **43,** 506-520 (1969).

6) **Long, R. M. & Moore, L.:** Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: Comparative studies in vivo and in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol., **92,** 295-306 (1988).

7) **Tomoda, A., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.:** Characterization of intermediate hemoglobin produced during methemoglobin reduction by ascorbic acid. J. Biol. Chem., **253,** 7415-7419 (1978).

8) **Kiyotani, K., Kanamoto, Y. & Matsuo, Y.:** Firefly luciferase assay for adenosine triphosphate in cultured cell. Hiroshima J. Med. Sci., **33,** 279-285 (1984).

9) **Tomoda, A., Matsukawa, S., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.:** Effect of inositol hexaphosphate on hemoglobin oxidation by nitrile and ferricyanide. Biochem. Biophys. Res. Commun., **74,** 1469-1474 (1977).

10) **Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F. & Segal, A.:** Direct alkylation of 2'-deoxy-nucleoside and DNA following in vitro reaction with acrylamide. Cancer Res., **45,** 3465-3470 (1985).

11) **Buchanan, J. G.:** Detection of deoxyribonucleosides on paper chromatograms. Nature, **168,** 1091 (1951).

12) **Hansch, C. & Leo, A.:** Substituent Constant for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, 1st ed., p1-339 Wiley Interscience, New York, 1979.

13) **Fujita, T.:** Analysis and prediction of partition coefficients of meta- and para- disubstituted benzenes in terms of substituent effects. J. Pharm. Sci., **72,** 285-289 (1983).

14) **Hansch, C., Leo, A., Unger, S. H., Kim, K. H., Nikaitani, D. & Lein, E. J.:** "Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations. J. Med. Chem., **16,** 1207-1216 (1973).

15) **Hansch, C. & Fujita, T.:** $\rho - \sigma - \pi -$ Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. J. Am. Chem. Soc., **86,** 1616-1626 (1969).

16) **Arena, J. M.:** Poisoning, 2nd ed., p156-157, Charles C Thomas Publisher, Illinois, 1970.

17) **Hansch, C.:** Quantitative structure-activity relationships in drug design. In E. J. Ariens (ed.),

Drug Design, 1st ed., p271-342, Academic Press, New York, 1971.

18) **Fujita, T., Nishioka, T. & Nakajima, M.:** Hydrogen-bonding parameter and its significance in quantitative structure-activity studies. J. Med. Chem., **20,** 1071-1081 (1977).

19) **Ahlers, J., Benzing, M., Gies, A., Pauli, W. & Rosick, E.:** Yeast as an unicellular model system in ecotoxicology and xenobiochemistry. Chemosphere, **17,** 1603-1615 (1988).

20) **Fry, J. R. & Bridges, J. W.:** A novel mixed hepatocyte-fibroblast culture system and its use as a test for metabolism mediated cytotoxicety. Biochem. Pharmacol., **26,** 969-973 (1976).

21) **Kemp, R. B., Cross, D. M. & Meredith, R. W. J.:** Adenosine triphosphate as an indicator of cellular toxicity in vitro. Fd. Chem. Toxic., **24,** 465-466 (1986).

22) **Kemp, R. B., Cross, D. M. & Meredith, R. W. J.:** Comparison of cell death and adenosine triphosphate content as indicator of acute toxicity in vitro. Xenobiotica, **18,** 633-639 (1988).

23) **Pereira, M. A. & Chang, L. W.:** Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. Chem. Biol. Interact., **33,** 301-305 (1981).

24) **Albrecht, W. & Neumann, H. -G.:** Biomonitoring of aniline and nitrobenzene. Hemoglobin binding in rats and analysis of adducts. Arch. Toxicol., **57,** 1-5 (1985).

25) **Birner, G. & Neumann, H. -G.:** Biomonitoring of aromatic amines II: Hemoglobin binding of some monocyclic aromatic amines. Arch. Toxicol., **62,** 110-115 (1988).

26) **Nagasawa, H. T. & Gutmann, H. R.:** The oxidation of o-aminophenols by cytochrome C and cytochrome oxidase. I. Enzymatic oxidations and binding of oxidation products to bovine serum albumin. J. Biol. Chem., **234,** 1593-1599 (1959).

27) **Nagasawa, H. T., Gutmann, H. R. & Morgan, M. A.:** The oxidation of o-aminophenols by cytochrome C and cytochrome oxidase. II. Synthesis and identification of oxidation products. J. Biol. Chem., **234,** 1600-1604 (1959).

28) **Tomoda, A., Yamaguchi, J., Kojima, H., Amemiya, H. & Yoneyama, Y.:** Mechanism of o-aminophenol metabolism in human erythrocytes. FEBS. Letts., **196,** 44-48 (1986).

29) **市原 明:** 肝細胞(ラット). 機能細胞の分類と培養(三井洋司, 高木良三郎, 市原 明, 関口守正, 松村外志張 編), 第1版, 175-191頁, 丸善株式会社, 東京, 1987.

30) **Ericson, A. C. & Walum, E.:** Cytotoxicity of cyclophosphamide and acrylamide in glioma and neuroblastoma cell lines cocultured with liver cells. Toxicol. Lett., **20,** 251-256 (1984).

31) **Yoshimi, N., Sugie, S., Iwata, H., Niwa, K., Mori, H., Hashida, C. & Shimizu, H.:** The genotoxicity of a variety of aniline derivatives in a DNA repair test with primary cultured rat hepatocytes. Mutat. Res., **206,** 183-191 (1988).

32) **渡部 烈:** 発癌生. 毒性学(吉村英敏編), 第5版, 242-319頁, 講談社, 東京, 1984.

33) **Miller, J. A.:** Carcinogenesis by chemicals: An overview-G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res., **26,** 2239-2247 (1970).

34) **Evelo, C. T. A., Versteegh, J. F. M. & Blaauboer, B. J.:** Kinetics of the formation and secretion of the aniline metabolite 4-aminophenol and its conjugates by isolated rat hepatocytes. Xenobiotica, **14,** 409-416 (1984).

35) **Rosenkranz, H. S., Klopman, G., Chankong, V., Pet-Edwards, J. & Haimes, Y. Y.:** Prediction of environmental carcinogens: a strategy for the mid 1980s. Environ. Mutagen., **6,** 231-258 (1984).

36) **Holbook, D. J. Jr.:** Chemical carcinogenesis. In Hodgson E. and Guthrie F. E. (eds.) Introduction to Biochemical Toxicology, 1st ed., p310-329, Elsevier, New York, Oxford, 1980.

37) **De Bruin, A.:** Biochemical Toxicology of Environmental Agents, 1st ed., p912, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1976.

38) **Gleenblatt, M., Mirvish, S. & So, B. T.:** Nitrosamine studies: induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrile and secondary amines in Swiss mice. J. Natl. Cancer Inst., **46,** 1029-1034 (1971).

Cytotoxicity of Aniline Derivatives Akihisa Harada, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 233～247·(1990)

Key words aniline derivatives, Balb/3T3, cytotoxicity, methemoglobin, QSAR

Abstract

Aniline derivatives are widely used as industrial chemicals and their production is increasing year by year. In the present study, a useful in-vitro screening method was examined for testing the toxicity of aniline and its derivatives as an alternative to in-vivo tests using whole animals. In the 24 aniline derivatives examined, log ED_{50} (a 50% inhibition dose for viability) and log ATP_{50} (a 50% inhibition for ATP content) to Balb/3T3 cells have a good correlationship. The aniline derivatives showed three statistically significant parabolic relationships between log $(1/ED_{50})+\rho\sigma$ (ρ : a regression coefficient, σ : a Hamment constant) and log P (n-octanol-water partition coefficient). Isoelectric fousing patterns of human hemoglobin solutions incubated with aniline derivatives, showed not only methemoglobin formation in most compounds, but also denaturation of hemoglobin in two compounds. The aniline derivatives showed significant liver metabolism-mediated changes in cytotoxicity, when these compounds were tested using the co-cultivation system with primary rat liver cells. No direct interaction of nucleosides was observed following in-vtro reaction with the aniline derivatives.