

Google translation/AEIC trial

The Journal of Toxicological Sciences Vol. 44(2019) No. 8 August

Letter

[Effective dispersal of titanium dioxide nanoparticles for toxicity testing](#)

Kenichi Kobayashi, Hisayo Kubota, Rieko Hojo, Muneyuki Miyagawa

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 515-521

Original	Google translation
<p>Currently, protocols for the dispersal of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles are not standardized and often yield non-uniform particles and/or insufficient dispersal in liquid medium. Our study aimed to improve dispersal so that TiO₂ nanoparticles are of uniform size, making nanotoxicity testing more reliable. Various combinations of vehicles, sonication durations, and sonication volumes were assessed for optimizing preparations of TiO₂ nanoparticles. We tested each of five vehicles: ultrapure water (UPW), 0.2% disodium hydrogen phosphate (DSP), Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), 0.9% saline (S), or S containing 0.05% Tween 80 (ST). We also assessed two sonication durations and three sonication volumes. Each suspension underwent ultrasonication and centrifugation; the supernatants were then analyzed. Particle size was measured by dynamic light scattering. P25 nanoparticles (~100 nm; the type of TiO₂ nanoparticles used in our study) in UPW and 0.2% DSP were effectively</p>	<p>現在、二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子の分散プロトコルは標準化されておらず、しばしば不均一な粒子や液体媒体への不十分な分散をもたらします。私たちの研究は、TiO₂ ナノ粒子が均一なサイズになるように分散を改善し、ナノ毒性試験の信頼性を高めることを目的としました。TiO₂ ナノ粒子の調製を最適化するために、車両、超音波処理時間、および超音波処理体積のさまざまな組み合わせが評価されました。5つの車両のそれぞれをテストしました：超純水 (UPW)、0.2%リン酸水素二ナトリウム (DSP)、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、0.9%生理食塩水 (S)、または0.05%Tween 80を含むS (ST)。また、2つの超音波処理時間と3つの超音波処理ボリュームを評価しました。各懸濁液は超音波処理と遠心分離を受けました。その後、上清を分析しました。粒子サイズは、動的光散乱によって測定されました。UPW および0.2%DSPのP25ナノ粒子 (~100 nm、我々の研究で使用されたTiO₂ ナノ粒子のタイプ) は効果的に分散されました。ただし、PBS、S、またはSTには含まれていません。超音波処理の関連する継続時間と体積を0.2%DSPで調べました。各バイアルの30分間の超音波処理時間と10 mLの容</p>

Google translation/AEIC trial

<p>dispersed; however, those in PBS, S, or ST were not. Relevant duration time and volume for sonication were examined with 0.2% DSP. A sonication time of 30 min and volume of 10 mL for each vial were determined to be optimal sonication conditions as determined with our dispersal assay. Under these optimal conditions, P25 nanoparticles sonicated/centrifuged in UPW or 0.2% DSP remained dispersed and exhibited long-term stability (90 days). We thus have developed a reliable procedure for preparing TiO₂ nanoparticles in liquid-phase dispersions for toxicity testing.</p>	<p>量が、分散アッセイで決定された最適な超音波処理条件であると決定されました。これらの最適な条件下で、超音波または 0.2% DSP で超音波処理/遠心分離された P25 ナノ粒子は分散したままで、長期安定性を示しました (90 日間)。このように、毒性試験のために液相分散液で TiO₂ ナノ粒子を調製するための信頼できる手順を開発しました。</p>
--	--

Original Article

[Stephanthraniline A suppresses proliferation of HCT116 human colon cancer cells through induction of caspase-dependent apoptosis, dysregulation of mitochondrial function, cell cycle arrest and regulation of Akt/p38 signaling pathways](#)

Lu Wang, Li Yao, Xiaoyu Li, Juan Chen, Chenghua Lou, Yiqi Wang

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 523-533

Original	Google translation
<p>Stephanthraniline A (STA) is a C₂₁ steroidal aglycone isolated from the stem of <i>Stephanotis mucronata</i> (Blanco) Merr. that exerts growth inhibition in human colon cancer cells. However, the intracellular molecular mechanisms whereby this occurs have not been well characterized. In this study, we found that STA significantly inhibits the growth of HCT116 colon cancer cells in a time- and concentration-dependent manner.</p>	<p>Stephanthraniline A (STA) は、<i>Stephanotis mucronata</i> (Blanco) Merr の茎から分離された C₂₁ ステロイドアグリコンです。それは、ヒト結腸癌細胞で成長阻害を発揮します。しかし、これが起こる細胞内分子メカニズムは十分に特徴付けられていません。この研究では、STA が HCT116 結腸癌細胞の成長を時間と濃度に依存して著しく阻害することを発見しました。細胞増殖に対する STA の阻害効果は、アポトーシスの誘導に関連していた。活性化されたカスパーゼ-</p>

Google translation/AEIC trial

<p>The inhibitory effect of STA on cell growth was related to the induction of apoptosis. Activated caspase-3, caspase-8 and caspase-9, along with a decreased Bcl-2/Bcl-x ratio and loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta \psi_m$), were observed in response to STA treatment. Furthermore, treatment of HCT116 cells with STA resulted in G0/G1 phase cell cycle arrest accompanied by decreased mRNA levels of cyclin-dependent kinase 4 (<i>CDK4</i>), <i>p21</i> and <i>c-myc</i>. Additionally, the inhibition of Akt signaling and activation of p38 signaling were observed after treatment with STA in HCT116 cells. These findings indicate that STA inhibits HCT116 cell growth by promoting apoptosis, the dysregulation of mitochondrial function, and cell cycle arrest.</p>	<p>3、カスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 は、Bcl-2 / Bcl-x 比の減少およびミトコンドリア膜電位の喪失 ($\Delta \psi_m$) とともに、STA 処理に応答して観察されました。さらに、HCT116 細胞を STA で処理すると、サイクリン依存性キナーゼ 4 (CDK4)、p21 および c-myc の mRNA レベルの低下を伴う G0 / G1 期の細胞周期停止が起こりました。さらに、HCT116 細胞での STA 処理後に、Akt シグナル伝達の阻害と p38 シグナル伝達の活性化が観察されました。これらの発見は、STA がアポトーシス、ミトコンドリア機能の調節不全、および細胞周期停止を促進することにより HCT116 細胞の成長を阻害することを示しています。</p>
--	--

Letter

[Disulfiram facilitates ataxin-3 nuclear translocation and potentiates the cytotoxicity in a cell model of SCA3](#)

Zijian Wang

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 535-542

Original	Google translation
<p>Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is caused by the expansion of a glutamine-encoding CAG repeat in the <i>ATXN3</i> gene encoding the protein ataxin-3. The nuclear presence of polyglutamine-expanded ataxin-3 is of critical</p>	<p>脊髄小脳性運動失調 3 型 (SCA3) は、タンパク質アタキシン-3 をコードする <i>ATXN3</i> 遺伝子のグルタミンをコードする CAG リピートの拡大によって引き起こされます。ポリグルタミン拡張アタキシン-3 の核内存在は、SCA3 の病因にとって非常に重要で</p>

Google translation/AEIC trial

importance for the pathogenesis of SCA3. Disulfiram, an FDA-approved drug for alcoholism, has also garnered attention in cancer treatment. However, it has shown toxicity in the nervous system. Bearing this in mind, we treated cells expressing ataxin-3 with disulfiram to measure several pathogenic cascades of SCA3, including aggregate formation, soluble ataxin-3 expression and nuclear localization of ataxin-3 and the cytotoxicity, which assess the direct effect of disulfiram on SCA3 cell models. To our knowledge, this is direct evidence that disulfiram elevated the nuclear localization of polyglutamine-expanded ataxin-3 and enhanced the cytotoxicity in a cell model of SCA3. Furthermore, disulfiram did not affect the aggregate formation of polyglutamine-expanded ataxin-3 at least at a single dose. Our findings repurpose disulfiram as a modulator of ataxin-3 nuclear transport that aggravates the pathology of SCA3, which is a new target for disulfiram. This study also represents an important example of determining novel side effects in pre-existing drugs. This study suggests that caution may be warranted when this compound is used to treat alcohol abuse or cancer in patients carrying a SCA3-causing mutation.

す。アルコール依存症の FDA 承認薬であるジスルフィラムも、がん治療で注目を集めています。しかし、それは神経系に毒性を示しています。これを念頭に置いて、アタキシン-3 を発現する細胞をジスルフィラムで処理し、凝集体形成、可溶性アタキシン-3 発現、アタキシン-3 の核局在化、およびジスルフィラムの直接効果を評価する細胞毒性など、SCA3 のいくつかの病原性カスケードを測定しました SCA3 セルモデル。私たちの知る限り、これはジスルフィラムがポリグルタミン拡張アタキシン-3 の核局在化を高め、SCA3 の細胞モデルにおける細胞毒性を増強したという直接的な証拠です。さらに、ジスルフィラムは、少なくとも単回投与でポリグルタミン拡張アタキシン-3 の凝集体形成に影響しませんでした。我々の発見は、ジスルフィラムの新しい標的である SCA3 の病状を悪化させるアタキシン-3 核輸送のモジュレーターとしてジスルフィラムを再利用しています。この研究は、既存の薬物の新規副作用を決定する重要な例でもあります。この研究は、この化合物が SCA3 を引き起こす変異を有する患者のアルコール乱用または癌の治療に使用される場合、注意が必要であることを示唆しています。

Original Article

[Human plasma and liver concentrations of styrene estimated by combining a simple](#)

Google translation/AEIC trial

[physiologically based pharmacokinetic model with rodent data](#)

Tomonori Miura, Shotaro Uehara, Mayuko Nakazato, Takashi Kusama, Akiko

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 543-548

Original	Google translation
<p>Long-term exposure to certain volatile organic compounds is a significant public health concern. A variety of food containers and drinking cups prepared from polystyrene or polystyrene-related plastics could contain styrene monomer. In the current study, the concentrations of styrene in plasma and liver were surveyed and determined after oral doses of 25 mg/kg to rats and 200 mg/kg to control and humanized-liver mice. Plasma concentrations of styrene in rats were still detected 2 hr after 10–25 mg/kg oral doses. In contrast, after an order of magnitude higher oral dose of styrene (200 mg/kg) to mice, styrene in mouse plasma was rapidly cleared within 15 min to the limit-of-detection level. However, unmetabolized styrene was detected in mouse liver 24 hr after oral treatment. A simple physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model capable of estimating blood and liver concentrations of styrene was established for rats. A human PBPK model was then set up for styrene by using the same intrinsic hepatic clearances in rats and humans and by applying allometric scaling to rat parameters obtained from the plasma</p>	<p>特定の揮発性有機化合物への長期暴露は、公衆衛生上の重大な懸念事項です。ポリスチレンまたはポリスチレン関連プラスチックから調製されたさまざまな食品容器および飲用カップには、スチレンモノマーが含まれている可能性があります。現在の研究では、ラットに 25 mg / kg、対照およびヒト化肝臓マウスに 200 mg / kg を経口投与した後、血漿および肝臓中のスチレン濃度を調査し、決定しました。ラットの血漿中スチレン濃度は、10~25 mg / kg の経口投与の 2 時間後にも検出されました。対照的に、マウスへのスチレンの経口投与 (200 mg / kg) の桁の大きさの後、マウス血漿中のスチレンは検出限界レベルまで 15 分以内に急速に除去されました。ただし、経口代謝の 24 時間後にマウス肝臓に未代謝のスチレンが検出されました。ラットの血液および肝臓のスチレン濃度を推定できる、単純な生理学的薬物動態 (PBPK) モデルが確立されました。次に、ラットとヒトで同じ内因性肝クリアランスを使用し、ラットのスチレンの血漿濃度から得られたラットパラメータにアロメトリックスケールリングを適用することにより、スチレンのヒト PBPK モデルを設定しました。(線量から用量への) 逆線量測定分析により、1000 を超えるヒト血液サンプルの米国バイオモニタリングデータで報告されたスチレン濃度の 95 パーセンタイル値 (0.132 ng / mL)</p>

Google translation/AEIC trial

concentrations of styrene in rats. By reverse dosimetry analysis (from concentrations to doses), we found that the 95th percentile values of styrene concentrations (0.132 ng/mL) reported in United States biomonitoring data of more than 1000 human blood samples may imply exposure to repeated oral doses of styrene of 2.89 µg/kg/day. These results suggest that styrene biomonitoring data in human blood samples imply exposures roughly similar to or lower than the established tolerable daily intake level of 7.7 µg/kg/day.	は、2.89 µg/kg/日。これらの結果は、ヒトの血液サンプル中のスチレンバイオモニタリングデータが、確立された許容可能な毎日の摂取レベルである7.7 µg/kg/dayとほぼ同じかそれより低い暴露を意味することを示唆しています。
---	--

Original Article

[Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats](#)

Yo Shinoda, Satoshi Tatsumi, Eiko Yoshida, Tsutomu Takahashi, Komyo Et

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 549-558

Original	Google translation
Methylmercury (MeHg) exposure is known to induce neurodegeneration in both the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS). Molecular mechanisms of MeHg-induced neurotoxicity have been well investigated in the CNS, however, it remains unclear in the PNS. In the present study, comprehensive gene expression analysis was performed by analyzing MeHg-exposed adult rat dorsal root ganglion (DRG) by DNA microarray. Methylmercuric chloride (6.7 mg/kg/day) was administered to nine-week-old male	メチル水銀 (MeHg) 暴露は、中枢神経系 (CNS) と末梢神経系 (PNS) の両方で神経変性を誘発することが知られています。MeHg 誘発神経毒性の分子メカニズムは、CNS でよく研究されていますが、PNS では不明のままです。本研究では、MeHg に暴露した成体ラット後根神経節 (DRG) を DNA マイクロアレイで分析することにより、包括的な遺伝子発現分析を実施しました。塩化メチル水銀 (6.7 mg/kg/日) を 9 週齢の雄 Wistar ラットに 5 日間投与し、その後 2 日間投与しなかった。このサイクルは 1 回繰り返されました。MeHg 暴露の開始後 7 または 14 日目にラットを麻酔し、

Google translation/AEIC trial

<p>Wistar rats for five days, followed by two days without administration; this cycle was repeated once. Rats were anesthetized at 7 or 14 days after commencement of MeHg exposure, and their DRGs were removed and homogenized to make total RNA samples. DNA microarray data from Day 7 samples identified 100 out of 18,513 detected genes as annotated genes with more than two-fold upregulated or downregulated expression compared with controls. Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses suggested strong involvement of immune activation and inflammation pathways in rat DRG exposed to MeHg, and some genes overlapped with previously reported genes affected by MeHg exposure in the cerebellum. The present results suggest that MeHg-induced neurotoxicity is associated with immune activation and inflammatory responses in rat DRG.</p>	<p>DRG を取り出してホモジナイズし、トータル RNA サンプルを作成しました。7 日目のサンプルからの DNA マイクロアレイデータは、対照と比較して発現が 2 倍以上アップレギュレートまたはダウンレギュレートされた注釈付き遺伝子として 18,513 個の検出遺伝子のうち 100 個を特定した。注釈、可視化、統合発見のためのデータベース (DAVID) および遺伝子とゲノムの京都百科事典 (KEGG) 経路分析は、MeHg にさらされたラット DRG の免疫活性化と炎症経路の強い関与を示唆し、一部の遺伝子は以前に報告された遺伝子と重複しました小脳における MeHg 暴露。現在の結果は、MeDR 誘発神経毒性がラット DRG の免疫活性化と炎症反応に関連していることを示唆しています。</p>
--	--

Letter

[LC-MS analyses of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine-adducts of glutathione, cysteine, *N*-acetylcysteine, and albumin in a plasma sample: A case study from a patient with a rare acetaminophen-induced acute swelling rash](#)

Masashi Ozawa, Takashi Kubo, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 559-563

Original	Google translation
----------	--------------------

Google translation/AEIC trial

Acetaminophen (Paracetamol, APAP) has been widely used for many decades as an analgesic and antipyretic agent but APAP overdose often causes acute adverse reactions, particularly liver damage. The metabolically oxidized form of APAP, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), is chemically reactive and binds covalently to proteins. Therefore, NAPQI is believed to be the key metabolite that causes hepatotoxicity, especially under conditions of glutathione depletion. Other APAP-induced adverse reactions, such as skin damage, are rare and remain poorly studied. Here, we report a case study of a male patient who presented with an acute swelling skin rash (without hepatotoxicity) caused by therapeutic doses of APAP. Plasma samples were collected at 17 hr after dosing (during the manifestation of symptoms) and at one month (after recovery) and were subjected to LC-MS analysis of NAPQI-adducts. A significant concentration of NAPQI-cysteine adduct (33 pmol/mL) was found together with low concentrations of NAPQI-*N*-acetylcysteine adduct (2.0 pmol/mL) and NAPQI-glutathione adduct (0.13 pmol/mL). However, the NAPQI-albumin adduct was below the detection limit (below 0.001% modification on albumin) despite a previous report of high concentrations of NAPQI-albumin adduct following acute liver injury.

アセトアミノフェン（パラセタモール、APAP）は、鎮痛剤および解熱剤として何十年も広く使用されてきましたが、APAP の過剰摂取は、しばしば急性の副作用、特に肝障害を引き起こします。APAP の代謝酸化型である *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニン（NAPQI）は化学的に反応性があり、タンパク質に共有結合します。したがって、NAPQI は、特にグルタチオン枯渇の条件下で肝毒性を引き起こす重要な代謝物であると考えられています。皮膚損傷などの他の APAP 誘発性副作用はまれであり、研究が不十分なままです。ここでは、APAP の治療用量によって引き起こされる急性腫脹性皮膚発疹（肝毒性なし）を呈した男性患者の事例研究を報告します。血漿サンプルを投与後 17 時間（症状の発現中）および 1 ヶ月（回復後）に収集し、NAPQI 付加体の LC-MS 分析にかけました。低濃度の NAPQI-*N*-アセチルシステイン付加物 (2.0 pmol / mL) および NAPQI-グルタチオン付加物 (0.13 pmol / mL) とともに、かなりの濃度の NAPQI-システイン付加物 (33 pmol / mL) が見つかりました。ただし、NAPQI アルブミン付加物は、急性肝障害後の高濃度の NAPQI アルブミン付加物の以前の報告にもかかわらず、検出限界以下（アルブミンの 0.001%未満の修正）でした。したがって、観察された APAP 誘発性の皮膚損傷は、APAP 誘発性肝障害とは異なる原因があった可能性があります。

Google translation/AEIC trial

Therefore, the observed APAP-induced skin damage may have had a different cause from APAP-induced liver injury.	
---	--

Original Article

[Immunohistochemical expression of autophagosome markers LC3 and p62 in preneoplastic liver foci in high fat diet-fed rats](#)

Sosuke Masuda, Sayaka Mizukami, Ayumi Eguchi, Ryo Ichikawa, Misato Nak

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(8): 565-574

Original	Google translation
Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by excessive deposition of droplets in hepatocytes. Patients with NAFLD can be at risk for nonalcoholic steatohepatitis, which can lead to hepatocellular carcinoma. Autophagy is a cellular pathway that is crucial for survival and homeostasis, and which protects against pathophysiological changes like obesity and cancer. We determined the expression of autophagy markers in preneoplastic hepatic lesions and the effects of an autophagy repressor chloroquine (CQ) or inducer amiodarone (AM) in a steatosis-related hepatocarcinogenesis model. Male F344 rats were fed a control diet or high fat diet (HFD), and subjected to initiation and promotion steps with N-nitrosodiethylamine injection at week 0 and a partial hepatectomy at week 3. Several HFD-fed rats were administered 0.1% CQ and 0.5% AM in their drinking water during week 2 and 8. CQ and AM	非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、肝細胞における過剰な液滴の沈着を特徴としています。NAFLD の患者は、肝細胞癌につながる非アルコール性脂肪性肝炎のリスクがある可能性があります。オートファジーは、生存と恒常性にとって重要な細胞経路であり、肥満や癌などの病態生理学的変化から保護します。我々は、前癌性肝病変におけるオートファジーマーカーの発現とオートファジーリプレッサークロロキン (CQ) または脂肪変性関連肝発癌モデルにおける誘導因子アミオダロン (AM) の効果を決定しました。オスの F344 ラットに対照食または高脂肪食 (HFD) を与え、0 週目に N-ニトロソジエチルアミンを注射し、3 週目に部分肝切除を行う開始および促進ステップを実施しました。2 週目と 8 週目で飲料水中の AM が 0.5%。CQ と AM は、HFD による肥満を改善しませんでした。AM は CQ ではなく、肝臓のグルタチオン S-トランスフェラーゼ胎盤型陽性前腫瘍性肝巣の数を有意に減少させた。オートファゴソームマーカー LC3 と LC3 結合タンパク質 p62 は、前腫瘍病巣で不均一に発現しま

Google translation/AEIC trial

did not improve HFD-induced obesity. AM, but not CQ, significantly decreased the number of glutathione S-transferase placental form-positive preneoplastic liver foci in the liver. Autophagosome markers LC3 and the LC3-binding protein p62 were heterogeneously expressed in the preneoplastic foci. CQ might inhibit autophagy by significantly increased p62/LC3 ratio, while AM might have a potential of inducing autophagy by showing an increased gene expression of the autophagy regulator, *Atg5*. These results suggest that preneoplastic lesions express autophagosome markers and that AM might decrease steatosis-related early hepatocarcinogenesis by potentially inducing autophagy in HFD-fed rats, while inhibition of autophagy by CQ did not alter the hepatocarcinogenesis. However, an immunohistochemical trial revealed a technical limitation in detecting autophagosome markers because there were variations in each preneoplastic lesion.

した。CQはp62/LC3比の大幅な増加によりオートファジーを阻害する可能性があります。AMはオートファジー制御因子*Atg5*の遺伝子発現の増加を示すことによりオートファジーを誘発する可能性があります。これらの結果は、前腫瘍性病変がオートファゴソームマーカーを発現し、AMがHFD投与ラットでオートファジーを潜在的に誘導することにより、脂肪変性に関連する早期肝発癌を減少させる可能性があることを示唆しているが、CQによる自食作用の阻害は肝発癌を変化させなかった。ただし、免疫組織化学的試験では、各前腫瘍病変にばらつきがあるため、オートファゴソームマーカーの検出に技術的な限界があることが明らかになりました。