

## フタル酸エステル投与によるマウス肝臓リン脂質および グリコーゲン量の変動

柳田 晃良・榎本 則行・中川 浩毅

(食糧管理化学教室)

昭和 53 年 10 月 12 日 受理

### Effects of Phthalate Esters on the Concentration of Hepatic Phospholipids and Glycogen in Mice

Teruyoshi YANAGITA, Noriyuki ENOMOTO and Hiroki NAKAGAWA

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received October 12, 1978

#### Summary

The effects of two phthalate esters on weight gain, liver weight and the concentration of hepatic lipids and glycogen in female and male mice were studied.

Feeding stock diets containing DEHP at the levels of 0.5% and 1.0% to female and male mice for 12 days resulted in an enlargement of liver, a significant increase in the concentration of hepatic phospholipids and a significant decrease in the concentration of hepatic glycogen. There was no significant difference in weight gain.

In female mice fed stock diets containing DBP at the levels of 0.5% and 1.0% for 12 days, there were no significant differences in weight gain and liver weight compared with those of the control mice. However, weight gain decreased in male mice fed a diet containing DBP at a level of 1.0%. Both in female and male mice, feeding of DBP at a level of 1.0% resulted in an increase in the concentration of hepatic phospholipids and a decrease in the concentration of hepatic glycogen. The fatty acid profile of hepatic phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in female mice after feeding of DBP differed from that of the controls. In particular, the percentage of docosahexaenoic acid increased significantly at the expense of linoleic acid.

The alterations of the concentration of hepatic phospholipids and liver weight in male mice fed a 20% casein diet (control diet) after feeding a 20% casein diet containing DEHP at a level of 1.0% for 7 days were also examined. The accumulation of hepatic phospholipids and the increase in the liver weight were detected at the days 1, 3 and 6. However, the magnitude of the increase in these parameters was inclined to decrease at the days 3 and 6.

#### 緒 言

塩化ビニル系合成樹脂の可塑剤として広く使用されているフタル酸エステル類は、プラスチック製品から容易に溶出するため、現在、環境および生体汚染物質の一つとして注目を集めている。これまで、動物やヒトの組織<sup>1,2)</sup> 食品<sup>3)</sup> あるいは河川水等<sup>4)</sup> の汚染が報告されている。

我々は、フタル酸エステルの生体に及ぼす影響を検討するなかで、代表的なフタル酸エステルである di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を食餌とともに摂取したラットにおいて、肝臓肥大と肝臓—血漿系の脂質代謝の著しい変動を認めた。<sup>5)</sup> とくに、肝臓リン脂質の顕著な増加と質

的変動は特徴的であった。リン脂質は細胞膜構造物の基本成分であり、ミトコンドリアおよびミクロゾームの膜機能は、一部リン脂質により調節をうけている。<sup>6)</sup> ミクロゾーム膜に存在する薬物代謝酵素の活性発現におけるリン脂質の役割もよく知られている。<sup>7)</sup> それ故、フタル酸エステル投与による肝臓リン脂質代謝の変動は、膜機能に著しい影響を及ぼすものと考えられる。事実、フタル酸エステルを投与したラットから単離されたミトコンドリアの swelling pattern は無処理ラットのそれと著しく異なる。<sup>8)</sup>

本研究では、フタル酸エステルの生体に及ぼす影響に関する基礎的知見を得るため、代表的なフタル酸エステル、di-n-butyl phthalate (DBP) および DEHP を食餌とともに雌、雄マウスに与えた時の肝臓脂質成分およびグリコーゲン量に及ぼす影響を調べた。

## 実験方法

### I. 動物実験

dd' 系マウスを 22—24°C 室温中で飼育した。基本飼料としては、固形飼料 (NM, オリエンタル酵母工業) を粉末にしたものを用いた。

実験 1 : 雄および雌マウスそれぞれ 18 頭を 3 群に分け、1 群 6 頭とした。対照群には基本飼料を与え、他の 2 群には基本飼料に DEHP 0.5% あるいは 1.0% を添加した飼料を与えた。

実験 2 : 雌マウスを 3 群 (各群 6 頭) に分け、基本飼料、あるいは基本飼料に DBP 0.5% または 1.0% を添加した飼料を与えた。雄マウスは 2 群 (各群 6 頭) に分け、基本飼料あるいは基本飼料に DBP 1.0% を添加した飼料を与えた。

実験 1 および 2 ともに、12 日間自由摂食させたのち、断首放血し、肝臓を摘出して分析に供した。

実験 3 : 雄マウス 40 頭を 2 群に分け、1 群には 20% カゼイン食 (対照飼料) を自由摂食させ、他の群には 20% カゼイン食に DEHP 1.0% を添加した飼料を 7 日間自由摂食させたのち、対照食に切り換え、0, 1, 3 および 6 日目に断首放血後、肝臓を摘出し分析に供した。カゼイン食の飼料組成は前報<sup>9)</sup> に準じた。DEHP および DBP (東京化成製) の純度は、前報<sup>9)</sup> に従い、電子捕獲器付きのガスクロマトグラフィーで検定した。いずれも 1 つのピークしか検出されなかった。

### II. 分析方法

肝臓脂質は Folch ら<sup>9)</sup> の方法に従い抽出純化した。リン脂質およびトリグリセリド量は前報<sup>10)</sup> に従い測定した。グリコーゲン量は Seifer らの方法<sup>11)</sup> で定量した。肝臓フォスファチジルコリンおよびフォスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成は、薄層クロマトグラフィーで分画後、メチル化しガスクロマトグラフィー (日本電子, JGC, 20K) で分析した。詳細は前報<sup>12)</sup> に記した。

## 結 果

体重増加、肝臓重量、肝臓脂質および肝臓グリコーゲン量に及ぼす影響

実験 1 : 結果は Table 1 に示した。DEHP 0.5% あるいは 1.0% を添加した飼料を与えた雌および雄マウスの体重増加量は、対照区に比べ、わずかに低下したが、有意な差は認められなかった。肝臓重量は DEHP 投与により著しく増加した。肝臓リン脂質量は DEHP 投与により顕著に増

Table 1. Effects of DEHP on weight gain, liver weight, liver lipids and liver glycogen in mice<sup>a)</sup>

Groups <sup>b)</sup>	Initial body wt. (g)	Weight gain (g/12 days)	Liver weight (g/100 g body wt)	Liver		
				Phospho-lipids	Triglyceride	Glycogen
				(mg/g liver)		
Female						
Control	15.7±0.2	7.7±0.7	6.0±0.2	32.4±0.9	9.0±1.4	48±2
DEHP 0.5%	16.1±0.3	5.6±0.6	8.5±0.4*	38.8±1.5*	9.5±0.8	19±1*
DEHP 1.0%	16.0±0.2	5.8±0.8	10.1±0.7*	41.6±0.6*	10.2±0.7	12±2*
Male						
Control	17.5±0.5	1.7±0.2	5.6±0.2	32.0±0.5	—	66±1
DEHP 0.5%	17.5±0.3	1.0±0.1	8.1±0.4*	37.4±1.2**	—	35±4*
DEHP 1.0%	17.5±0.3	-1.0±0.2	9.3±0.3*	40.1±0.8*	—	23±2*

a) Values are the means ± SE of six mice.

b) Mice were fed a stock diet with or without (control) addition of DEHP at a level of 0.5% or 1.0% *ad libitum* for 12 days.

\*,\*\* Difference from the control is significant at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

加し、増加の割合は摂取した DEHP レベルが高いほど著しかった。肝臓トリグリセリド量に著しい影響はなかった。一方、肝臓グリコーゲン量は DEHP 投与により有意に減少した。

実験 2：Table 2 に示したように、DBP を摂取した雌マウスの体重増加量および肝臓重量に著しい変動はなかった。しかしながら肝臓リン脂質量は顕著に増加し、グリコーゲン量は著しく減少した。雄マウスでは、DBP 投与により体重増加量の低下が認められたが、肝臓重量に著しい差異はなかった。DBP 投与による肝臓リン脂質の著しい増加と肝臓グリコーゲン量の減少が認められた。

 Table 2. Effects of DBP on weight gain, liver weight, liver lipids and liver glycogen in mice<sup>a)</sup>

Groups <sup>b)</sup>	Initial body wt. (g)	Weight gain (g/12 days)	Liver weight (g/100 g body wt)	Liver		
				Phospho-lipids	Triglyceride	Glycogen
				(mg/g liver)		
Female						
Control	16.7±0.4	2.0±0.4	5.8±0.2	32.4±0.9	5.6±0.5	43±5
DBP 0.5%	16.3±0.6	4.0±1.3	6.1±0.2	35.7±0.7	7.5±0.7	31±5
DBP 1.0%	16.9±0.6	2.7±0.6	7.2±0.2	37.5±0.4*	7.1±0.6	34±2
Male						
Control	14.6±0.4	7.8±0.9	5.9±0.1	32.9±0.6	10.3±1.4	49±6
DBP 1.0%	14.8±0.6	1.1±1.9*	6.5±0.4	38.0±0.7**	6.5±1.3	28±4*

a) Values are the means ± SE of six mice.

b) Mice were fed a stock diet with or without (control) addition of DBP at a level of 0.5% or 1.0% *ad libitum* for 12 days.

\*,\*\* Difference from the control is significant at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

雌マウスに DBP を添加した飼料を与えた時の肝臓フォスファチジルコリンとフォスファチジルエタノールアミンの構成脂肪酸の変化を Table 3 に示した。フォスファチジルコリンでは、DBP 0.5%区で、ドコサヘキサエン酸の割合の増加とパルミチン酸の割合の低下が認められた。

Table 3. Effects of DBP on the fatty acid composition of hepatic phospholipids in female mice<sup>a)</sup>

Groups <sup>b)</sup>	Fatty acids (%)							
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	22:6
Phosphatidylcholine								
Control	29.6±2.1	2.0±0.3	17.6±1.4	9.5±1.6	26.3±2.4	2.0±0.2	10.2±1.9	9.2±0.9
DBP 0.5%	20.9±1.4*	2.8±0.5	15.1±1.5	12.0±1.3	21.3±1.3	1.4±0.3	10.9±0.4	12.7±1.7*
DBP 1.0%	21.3±1.3*	2.5±0.1	14.2±1.6	14.1±1.0*	18.3±0.8*	1.4±0.3	13.2±0.7	12.9±0.7*
Phosphatidylethanolamine								
Control	17.1±2.1	2.3±0.3	17.9±1.1	9.6±1.6	13.3±1.6	2.1±0.7	15.3±1.8	22.4±2.0
DBP 0.5%	18.4±2.9	1.2±0.2*	16.7±0.7	9.0±1.6	9.2±1.0**	3.4±1.4	17.4±1.6	25.8±3.1
DBP 1.0%	17.7±1.5	1.4±0.1*	14.8±0.9	10.6±0.8	7.1±0.7*	1.9±0.3	18.3±0.5*	29.0±1.7*

a) Values are the means  $\pm$  SE of six mice.

b) See Table 2.

\*,\*\* Difference from the control is significant at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

DBP 1.0% 区ではオレイン酸およびドコサヘキサエン酸の割合の増加とパルミチン酸およびリノール酸の割合の低下が認められた。フォスファチジルエタノールアミンでは、DBP 0.5%区で、リノール酸およびパルミトオレイン酸の割合が低下した。DBP 1.0%区では、アラキドン酸およびドコサヘキサエン酸の割合が増加し、リノール酸およびパルミトオレイン酸の割合が低下した。

実験3: あらかじめ DEHP 1.0% を含む 20% カゼイン食を7日間摂食させたのち、20% カゼイン食 (対照飼料) を与えた雄マウスの肝臓重量および肝臓リン脂質量の経時的変動を Fig. 1 に示した。DEHP 投与による肝臓重量の増加は、対照飼料に切り換えて1日、3日あるいは6日経過したのちにも認められた。しかし、3日および6日目での増加の割合は、1日目のそれに比べて著しく低値を示した。DEHP投与により増加した肝臓リン脂質量は、対照飼料に切り換え1日、3日および6日経過したのちも、対照区のそれに比べ高い値を示した。しかし、0日目の

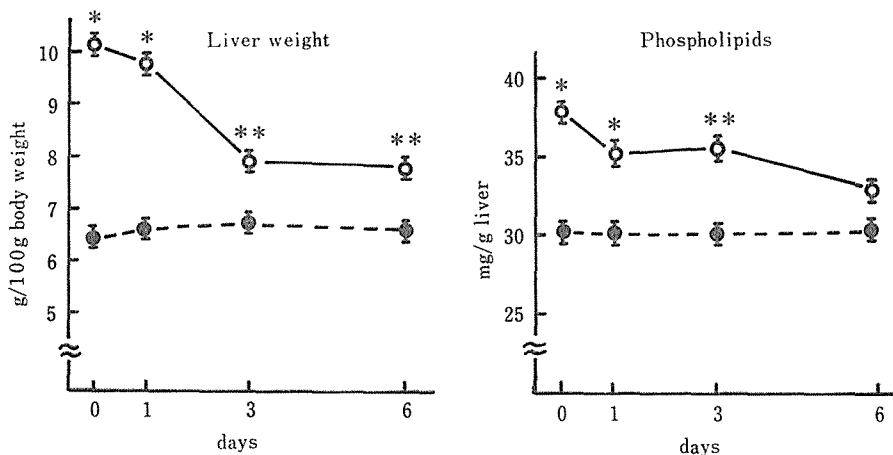


Fig. 1. Changes in liver weight and the concentration of hepatic phospholipids in male mice.  $\odot$ ; control mice,  $\circ$ ; treated mice. Values are the means  $\pm$  SE of five mice. Mice were fed a 20% casein diet with or without (control) addition of DEHP at a level of 1.0% for 7 days and then fed a 20% casein diet for 1, 3 or 6 days.

\*,\*\* Difference from the control is significant at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

リン脂質量に比べ、1日および3日目ではいくらか減少していた。6日目では、対照区のリン脂質量との間に有意な差は認められなくなった。

## 考 察

フタル酸エステル類の代表的な化合物、DEHP および DBP を0.5%あるいは1.0%レベルで食餌と共に雌および雄マウスに投与すると、肝臓リン脂質の顕著な増加—phospholipidosis—と肝臓グリコーゲンの減少が認められた。これらの結果は、ラットを用いた同条件での実験結果<sup>5,13)</sup>とほぼ一致していた。

DEHP を投与した雌および雄マウスでは肝臓肥大を伴っていた。一方、DBP 投与では、肝臓重量の有意な増加は認められなかった。薬物に対する生体の応答は、動物の種差、性差、年齢あるいは栄養条件により変動することが知られている。<sup>14,15)</sup> 本実験で用いたこれらの化合物の生体への影響に、動物の性差の著しい影響はないものと考えられる。

DBP の急性毒性は DEHP のそれに比べ、5～10倍程度高いことが報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら、DEHP を投与したマウスの肝臓リン脂質の増加量および肝臓肥大の程度は、DBP を投与したマウスのそれらに比べて顕著であり、フタル酸エステルの側鎖、アルキル基の炭素数が多い程、すなわち親油性が高い化合物ほど肝臓に及ぼす影響は著しいものと考えられる。

先に、DEHP 投与によるラット肝臓—血漿系の脂質成分の変動を調べ、肝臓リン脂質量の増加は、ミトコンドリアでの増加に起因し、チトクローム p-450 を中心とする薬物代謝酵素が局在するミクロソームでのそれは、ミトコンドリアに比べて高くないことを報告した。<sup>9)</sup> いずれの画分においても、フォスファチジルエタノールアミンの顕著な増加と、フォスファチジルコリンの増加が認められた。リン脂質成分の百分率比では、フォスファチジルエタノールアミンの顕著な増加とフォスファチジルコリンの低下が認められ、したがってフォスファチジルエタノールアミン/フォスファチジルコリン比は高値を示す。ミクロソーム膜での薬物代謝酵素の活性発現には、フォスファチジルコリンの存在が要求される。<sup>7)</sup> フタル酸エステルによるミクロゾームリン脂質組成の変動は、膜の疎水性環境を変化させ、薬物代謝酵素活性に著しい影響を及ぼすものと考えられる。

DBP 投与は、肝臓リン脂質の構成脂肪酸にも著しい変動を及ぼした (Table 3)。とくに、ドコサヘキサエン酸の割合の増加とリノール酸の割合の低下が特徴的である。

フタル酸エステルによる肝臓リン脂質増加のメカニズムとして 1) リン脂質の合成高進、2) リン脂質分解の抑制、3) 肝臓から血漿への搬出の低下、4) 他組織から肝臓への流入の増加、あるいはこれらの組合せが考えられる。リン脂質合成の高進の関与については、相反した報告<sup>17,18)</sup>があり、現在まで明らかでない。リン脂質分解の抑制の関与に関して、我々は、DEHP 投与ラットで、肝臓ミトコンドリアおよびミクロゾームのリン脂質は増加しているにもかかわらず、リゾフォスファチジルコリン量は減少すること、あるいは肝臓ミトコンドリアの swelling 速度が著しく遅くなることから、リン脂質の代謝分解は抑制されている可能性を指摘した。<sup>8)</sup> また、DEHP 投与により血漿リン脂質量は低下の傾向を示すことから、肝臓から血漿へのリン脂質の搬出低下の可能性も示唆される。しかし、これらの寄与の程度は、今後の研究をまたねばならない。

フタル酸エステルの代謝は比較的早いものと考えられているが、<sup>19)</sup> DEHP 投与したのち普通食に切り換えても、肝臓リン脂質に対する影響は6日目でも認められた (Fig. 1)。しかしながら、その程度は経時的に低下する傾向を示した。摂取された DEHP はリパーゼにより、mono-(2-ethylhexyl) phthalate に加水分解される。尿中では、アルキル部分の *w* あるいは *w*-1 酸化物に

由来する種々の代謝産物が見いだされている。<sup>20)</sup> DEHP 構成成分である ethylhexanol あるいはフタル酸塩を投与しても、ラット肝臓脂質代謝に著しい影響を及ぼさない。<sup>21)</sup> フタル酸エステル投与による肝臓脂質成分の変動を惹起させる原因物質は、まだ明らかでない。

フタル酸エステルは、これら肝臓成分の変動のみならず、細胞の形態学的変化をも引き起こす。Yanagita ら<sup>8)</sup> は、DEHP を投与したラット肝臓の電子顕微鏡観察から、空胞をもつコンデンスしたミトコンドリアとミエリン様の細胞内封入体の出現を認めている。Lake ら<sup>22)</sup> はマイクロボディ数が増加することを認めている。

今後、フタル酸エステルの広範な汚染状況の把握とともに、生体に及ぼす影響に関するさらなる追究が必要であろう。

## 要 約

フタル酸エステルが雌雄マウスの体重増加量、肝臓重量、肝臓脂質および肝臓グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した。

DEHP 0.5%あるいは1.0%を含む飼料を12日間摂取した雌または雄マウスでは、肝臓肥大、肝臓リン脂質量の顕著な増加および肝臓グリコーゲン量の著しい減少が認められた。増体重量には著しい差異はなかった。

DBP 0.5%あるいは1.0%を含む飼料を12日間摂取した雌マウスでは、体重増加量と肝臓重量に著しい変化はなかった。DBP 1.0%を含む飼料を摂取した雄マウスの体重増加量は低下した。DBP 1.0%を含む飼料を摂取した雌、雄マウスとも、肝臓リン脂質量の顕著な増加とグリコーゲン量の減少が認められた。DBP を摂取した雌マウスの肝臓フォスファチジルコリンおよびフォスファチジルエタノールアミンの構成脂肪酸は、対照マウスのそれと著しく異なっていた。ドコサヘキサエン酸の割合の増加とリノール酸の割合の低下が特徴的である。

DEHP 1.0%を含む20%カゼイン食を7日間摂取させたのち、20%カゼイン食(対照飼料)を与えた雄マウスの、肝臓リン脂質量と肝臓重量の変動を調べた。肝臓リン脂質の蓄積および肝臓重量の増加は1、3および6日目でも認められた。しかし、これらのパラメーターの増加の割合は、3および6日目では低下する傾向を示した。

## 文 献

- 1) Jeager, R. J. and R. J. Rubin, (1970). *Lancet*, **2**, 151.
- 2) Nazir, D. J., A. P. Alcaraz, B. A. Biel, M. Beroza and P. P. Nair (1971). *Biochemistry*, **10**, 372.
- 3) Artman, N. R., W. R. Michael and C. J. Alexander (1967). *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **44**, 372.
- 4) Fishbein, L. and P. W. Albro (1972). *J. Chromat.*, **70**, 365.
- 5) Yanagita, T., K. Kobayashi and N. Enomoto (1978). *Biochem. Pharmac.*, **27**, 2283.
- 6) Hoffman, J. F., J. H. Schulman and N. Eden (1963). *Federation Proc.*, **18**, 70.
- 7) Strobel, H. W., A. Y. H. Lu, J. Heidema and M. J. Coon (1970). *J. Biol. Chem.*, **245**, 4851.
- 8) Yanagita, T., S. Kuzuhara, N. Enomoto and T. Shimada (1978). *Fifth International Congress of Food Science and Technology*. p. 291, September. *Biochem. Pharmac. Submitted in press.*
- 9) Folch, J., M. Lee and G. H. Sloane-Stanley (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
- 10) Yanagita, T. and M. Sugano (1976). *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1751.
- 11) Seifer, S., S. Seymour, B. Behton, R. E. Boldt and C. A. Elevejem (1957). *J. Nutr.*, **54**, 155.
- 12) Yanagita, T. and M. Sugano (1975). *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 63.
- 13) 柳田晃良, 小林勝紀, 榎本則行 (1977). 日農化西日本大会講演集, 8.
- 14) Conney, A. H. (1967). *Pharmacol. Rev.*, **19**, 317.

- 15) 柳田晃良, 葛原祥二, 小林勝紀, 榎本則行 (1978). 日本栄養食糧学会講演要旨集, 660.
- 16) 柳田晃良, 葛原祥二, 榎本則行 (1978). 日農化学会講演要旨集, 442.
- 17) Bell, F. P. and D. J. Nair (1976). *Lipids*, **11**, 216.
- 18) Sakurai, T., S. Miyazawa and T. Hashimoto (1978). *J. Biochem.*, **83**, 313.
- 19) Tanaka, A., T. Adachi, T. Takahashi and T. Yamaha (1975). *Toxicology*, **4**, 253
- 20) Daniel, J. W. and H. Bratt. (1974). *Toxicology*, **2**, 51.
- 21) 柳田晃良, 葛原祥二, 榎本則行 (1979). 医学のあゆみ, **108**, 224.