

フタル酸エステル中毒マウスの 乳酸脱水素酵素 (LDH) について

佐二木 順子*

I. 緒 言

現在、広汎に使用されているプラスチック製品には、可塑剤としてフタル酸エステル類が添加されている可能性が高い。

ところが、アメリカのボルチモアのある発生学研究室でニワトリの心組織の培養中、ポリ塩化ビニール製輸血セットを取りつけた際、次々と細胞が死んでいったという事実¹⁾をはじめ、コペンハーゲンの病院で肝機能テストを受けた患者の中に人工腎臓を用いて処理された者がいて、新しいポリ塩化ビニール管に取り替えたばかりのものを使用されたが、10~15回この処置をうけると腹痛やほきけを起こした。ところが、古い管に替えると回復したという症例¹⁾が報告された。また、ある種のフタル酸エステルをふ化前の卵黄に投与したところ、ふ化したひよこの中に著しい眼球突出症や角膜欠陥による盲目の個体が発生したという実験例²⁾等、フタル酸エステルに関する様々な研究報告がなされ、現在、本物質の安全性に疑問がもたれ、再検討を迫られている。

著者は、フタル酸エステル類のなかでも神経細胞に発育障害を及ぼし³⁾、比較的毒性が強いと考えられているフタル酸ジ-n-ブチル (DNBP と略称) について動物実験を行ったが、DNBPを大量投与した際、肝臓、肺臓、精巣に肉眼的、病理組織学的に明らかな変化を認めた。^{4) 5)}

そこで、本報では生化学的検討を加えることを目的として上記の変化をひきおこしうる量の DNBP をマウスに投与し、血清ならびに臓器中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性、アイソザイムの変動について実験を行ったので報告する。

II. 実験材料および方法

8週令の雄マウス (農林畜産試験場で1963年以来閉鎖群として生産・維持されたdd-Y系:以後dd-YC系と記す) を用い、5匹は対照群として無投与飼育を行い、

10匹にはフタル酸ジ-n-ブチル (DNBP:和光純薬KK製) の急性毒性を観察するのに適当な量と考えられる200mgを胃ゾンデにて経口投与し、投与後5時間目および17時間目に5匹ずつ心採血を行い、同時に臓器摘出を行った。

血液は、直ちに3,000rpm, 5分間の遠心分離により血清を分離し、LDH 酵素活性測定ならびにアイソザイムの分画を行った。

各臓器 (心, 肺, 肝, 腎) については、測定まで-20℃にて冷凍保存し、使用時1.15%のKCl溶液にて10%のホモジネートを作成し、11,000r.p.m.の冷却遠心を行い、その上清をLDH活性測定、アイソザイム分画に供した。

LDH活性測定は、Hillの変法⁶⁾に従い、LDHアイソザイムは冷却式寒天電気泳動⁶⁾で分画し、デンシトメーター (ヤマト AD-200) にて各分画率を求め、それをLDH活性値に換算してLDH I~V分画値を表示した。

データはすべてt検定に従った。

III. 結 果

DNBP投与後5時間目では衰弱の程度に差こそあれ全例 (10匹) が生存し得た。そこで、そのうち5匹を殺処分し、残り5匹は17時間目まで放置したところ、5匹中3匹は衰弱が著しいにもかかわらず生存していた。以上、生存し得たマウスを剖検した結果、とくに肺の出血性変化が著しかった。

血清ならびに各臓器のLDH活性値は、表1.に示すとおり投与後5時間目には血清に5%の水準で活性の有意上昇がみられた外は変化はなかった。しかしながら投与後17時間目になると血清での本酵素の活性値はさらに上昇し (P<.01), 同時に肺臓 (P<.05) ならびに心臓 (P<.10) で有意上昇がみられた。

次に血清、各臓器中のLDHアイソザイムパターンを図1.に示した。血清では各分画 (LDH I, II, III, V) ともに平均的な増加を示していた。腎臓については対照群に比して5時間目ではIII分画の増加, II分画の減少が、17時間目ではI分画の増加, II, IV分画の減少が明らかな変化であった。心臓については17時間目の全分画 (LDH,

* 千葉県衛生研究所
(1978年2月18日受理)

表1 DBP投与後5時間目, 17時間目におけるマウス血清ならびに臓器中のLDH活性値 (平均値±標準偏差)

臓器	時間	対 照 群	5 時 間 目	17 時 間 目
血 清		886 ± 178	1750 ± 437	2333 ± 379
肝臓 (×10)		20910 ± 2601	23409 ± 2011	23630 ± 1791
腎臓 (×10)		28886 ± 3080	32724 ± 4606	25923 ± 2542
心臓 (×10)		20600 ± 4144	19000 ± 4430	29580 ± 2699
肺臓 (×10)		7050 ± 360	6875 ± 265	8708 ± 1018

・単位は Hll 変位法単位を用いた
 ・** P<.01, * P<.05, ※ P<.10

I, II, III, IV, V) に増加がみられた。一方, 肝臓, 肺臓には著しいパターンの変化はなかった。

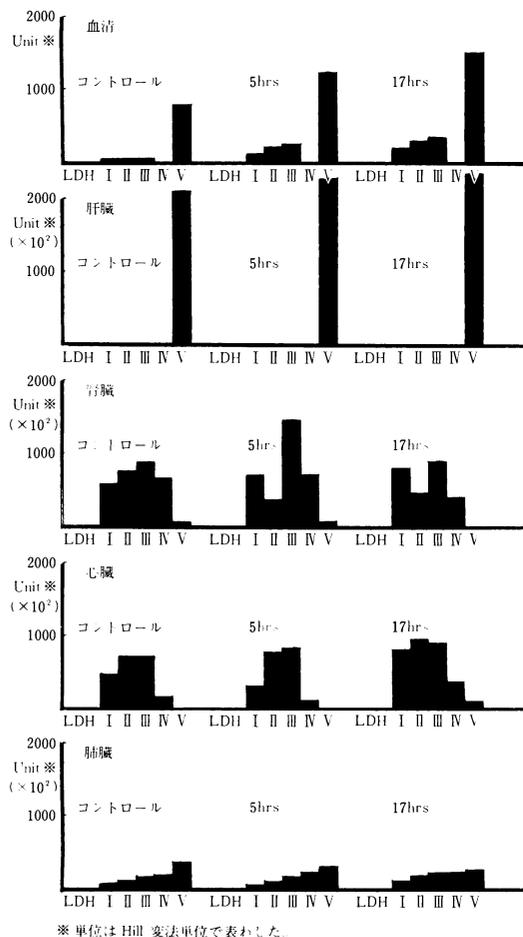


図1 DNBP投与後5時間目, 17時間目におけるマウス血清ならびに臓器中のLDHアイソザイムパターン

IV. 考察ならびに総括

本実験で用いたマウス (dd-YC) は DNBP 200mg投与で投与後5時間目に全例生存可能な状態であった。ところで, 以前著者は, dd-YF系の雄マウス (船橋農場から購入したもの) を用い同処置を施したところ, 10例中3例は5時間以内に斃死し,⁷⁾ その症状は前年報に記載した⁵⁾ ように呼吸促進, 嗜眠等であった。又, 残りの7例についても投与5時間目にはこれら症状が増悪状態にあった。

上記系統間の症状発現時間の差は, 著者が以前に指摘した⁸⁾ DNBPに対する抵抗性の差異によるものと理解できよう。

一般に, 血清中のLDH活性上昇については生体組織中に細胞崩壊, 又は細胞膜の透過性亢進, 酵素の産生が高まるような病変が生じた際, 組織中の酵素が血清中に逸脱するためと考えられている。

この点について, 測定した4臓器に限ってみた場合, 投与後17時間目には血清での有意上昇 (P<.01), と共に心臓 (P<.10), 肺臓 (P<.05) にも有意な上昇傾向がみられた。このことから, 血清中のLDH活性は時間の経過と共に上昇し, それは主に心臓, 肺臓の活性上昇によるものと考えられる。ここで, 通常臓器中のLDH活性値は血清のその100倍以上を示すことを考えあわせると, 投与後5時間目の血清中のLDH活性上昇 (P<.05) も統計的には有意とならない臓器中のわずかな値の変動を反映している可能性がある。

心臓, 肺臓のLDH活性値の上昇は, DNBP中毒をみていく上で面白い現象である。とくに肺臓の障害については前年報で報告し⁵⁾ この原因については, 血球の変性によると考えられる溶血等の現象を *in vitro*,⁹⁾ *in vivo*⁷⁾ で認め, 検討を加えた。さらに, フタル酸エステルの一種であるフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) を含んだ貯血から輸血を受けた患者の肺臓にDEHPが多量蓄積していたという Jaeger らの報告¹⁰⁾ 等を考慮すると, DNBPの大量投与により肺臓にDNBPが多く蓄積され, 肺臓の血管に存在する血球との親和性が高まり, その結果血球の変性ひいては肺臓組織そのものにも悪影響を及ぼす可能性が考えられる。

次に, 血清中のLDHアイソザイムパターンを調べることは, 異常臓器を推定する上で重要な指標となり, 現在, 臨床的には高く評価され, 広汎に用いられている。例えば, ヒトの場合, 肝障害時には肝臓の主分画であるLDHV分画が血清でも増加し, 心筋梗塞時には心臓のLDHアイソザイムパターンが血清に反映する。

このことからすると、DNBP中毒マウスの血清中のLDHアイソザイムの全分画に平均的な増加をみたということから、ある特定の臓器が重点的に障害を受けている可能性はうすいが、なかでも血清のLDH I, II, IIIの増加については主に心臓、肺臓のパターンを反映しているものと考えられる。腎臓の経時的なパターンの変化については不明な点が多いが、腎障害については詳細な病理学的報告もなされており¹¹⁾ さらに検討を加えていかなくてはならない。

以上、マウスによるDNBP急性中毒について、著者の実験を基に考察を加えたが、今後、プラスチック製品から内容物にとけだす微量のDNBPについて長期投与した際、本酵素にどのような変化を与えるか検討する必要がある。

文 献

- 1) 片瀬隆雄：“第二のPCB”フタル酸エステル、食の科学, No.8, 104-111, 1972
- 2) R.K.Bower et al. : Teratogenic effects in the chick embryo caused by esters of phthalic acid, J. Pharmac. Exp. Therap., 171, 314-324, 1970
- 3) 加須屋実：フタル酸ジブチルの神経毒性、医学のあゆみ, 89, 166-167, 1974
- 4) 佐二木順子：フタル酸エステル (Di-n-Butyl phthalate) のマウスにおよぼす生物学的影響、日本公衛誌, 24, 7-12, 1977
- 5) 佐二木順子：フタル酸エステル (Di-n-Butyl phthalate) 経口投与マウスの病理学的観察、千衛研報, 24, 57-63, 1975
- 6) 吉田光孝, 長村洋一：アイソエンザイム分析法、臨床病理, 特集29, 1977
- 7) 佐二木順子：フタル酸エステル (DBP) 投与マウスの血清および臓器中乳酸脱水素酵素 (LDH) について、医学のあゆみ, 104, 463-465, 1978
- 8) 佐二木順子：フタル酸エステルの毒性評価における問題点、医学のあゆみ, 97, 177-178, 1976.
- 9) 佐二木順子：フタル酸エステル (DBP) の溶血現象、医学のあゆみ, 99, 514-515, 1976
- 10) R.J.Jaeger, R.J.Rubin : Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissue. N.Engl. J. Med., 287, 1114-1118, 1972
- 11) 太田秀夫ら：フタル酸エステルの生体におよぼす影響、マウス投与実験による病理組織学的検討、日衛誌, 29, 519-524, 1974

On Lactate Dehydrogenase(LDH) of the Mouse after Administration of Phthalic Acid Ester

Junko SAJIKI

Summary

Lactate dehydrogenase(LDH) activity and LDH isozymes of serum and viscera (liver, heart, kidney and lung) of the dd-Y strain mouse were investigated 5 hours and 17 hours after oral administration of D-n-Butyl phthalate (DNBP).

The results are summarised as follows:

1. LDH activity

A significant increase ($P < .05$) of LDH activity in serum was observed in mice 5 hours after DNBP administration. LDH activity was markedly increased 17 hours after DNBP administration in the serum ($P < .01$), in the heart ($P < .10$) and in the lung ($P < .05$).

2. LDH isozyme patterns

On average, LDH isozyme fractions (I, II, III and V) tended to increase in the serum throughout the period. An increase of all the fractions of LDH isozymes (LDH I, II, III, IV and V) was observed in the heart 17 hours after DNBP administration, while in the kidney there was an increase of LDH I and III fractions, and a decrease of LDH II and IV fractions.