フタル酸エステルの細胞毒性

Cytotoxicity of Phthalate Esters

札幌医科大学公衆衛生学教室

加 須 屋 実

Minoru KASUYA

Department of Public Health, Sapporo Medical College, Sapporo

Dimethyl phthalate, diethyl phthalate, and di-*n*-butyl phthalate were added to fibroblast cultures from newborn rat cerebellar tissue.

1. Dimethyl phthalate in a concentration of 30.5×10^{-4} M had no visible effect on the growth of fibroblasts.
2. Diethyl phthalate inhibited the growth of fibroblasts at about 2.6×10^{-4} M; in a concentration of 25.5×10^{-4} M it markedly inhibited growth and caused atrophy of the cells.
3. Di-*n*-butyl phthalate inhibited the growth of fibroblasts at about 3.9×10^{-4} M; at 11.7×10^{-4} M it caused marked inhibition of growth and degenerative changes such as granulation, vacuole formation, and oval change of the cells.

These results indicate that phthalate ester with larger molecular weight and lower water-solubility has a higher toxicity.

最近急激に発展した合成高分子工業は、多種類かつ大量のプラスチック製品を生活環境に送りこんだが、それらに含まれる可塑剤や安定剤の衛生性については必ずしも完全に研究された上のことではない。なかでも可塑剤のうちとくに大量に用いられているフタル酸エステルについては、環境汚染を示す報告が次々に出されており¹⁻⁴⁾、フタル酸エステルによると考えられる人体障害も報告されている⁵⁾が、その毒性についてはいまだ未知の点が多い。

フタル酸エステルは親油性の物質であることからして脂質に富んだ組織、たとえば神経組織等に作用しうると考えられるが、神経系に対するフタル酸エステルの毒性については数少ない報告があるのみである⁶⁻⁸⁾。著者はいくつかのフタル酸エステルの培養小脳に対する毒性を検討したが^{9,10)}、di-*n*-butyl phthalateの方がdiethyl phthalateよりも毒性の強いことを見出した。さらに、培養小脳の神経線維の伸長を指標としていちばん構造の簡単な3つのフタル酸エステルの毒性の強さを比較し、di-*n*-butyl phthalateがいちばん毒性が強くdiethyl phthalateがこれに次ぎ、dimethyl phthalateがいちばん弱いことを明らかにした¹¹⁾。この結果は現在まで

にLD₅₀などにみられている関係¹²⁾とはまったく逆であり、この相異が細胞の感受性の差による可能性もあるので、小脳培養に際してみられ、神経細胞とは発生学的に起源を異にするFibroblastに着目してこの3つのフタル酸エステルの毒性を比較した。

方 法

ラット小脳の培養は以前に報告した¹²⁾と同じ方法で行なった。フタル酸エステルは工業用品ではなく、試薬として市販されている純品(特級または1級品)(東京化成工業または関東化学製)をそのまま精製することなく用いた。実験に供したフタル酸エステル(ならびにその略語)とその溶解性等についてはTable 1に示す。フタル酸エステルは直接仔牛血清中に混入し(1μl/ml血清)、サーモミキサーによって数分間混和した。DMP, DEPはまったく透明に溶解した。DNBPを添加した血清は少しく混濁したが、沈澱等は認められず、均等に懸濁した。培養液調整にあたっては、これらフタル酸エステルを添加した血清と正常血清とを混合して希望のフタル酸エステル濃度を得た。培養は4日間CO₂培養器中で行ない(36.5℃)位相差顕微鏡により効果を判定した。

Table 1. Phthalate esters tested.

Phthalate esters	Molecular weight	Water solubility (g/100ml water)	LD ₅₀ ^b (g/Kg) (Intraperitoneally)
Dimethyl phthalate (DMP)	194.19	0.43 ^a	1.58
Diethyl phthalate (DEP)	222.23	0.1 ^b	2.83
Di- <i>n</i> -butyl phthalate (DNBP)	278.34	0.04 ^a	4.00

^aFrom Merck Index.^bFrom Ref. 7.

細胞の発育程度の判定は2つの方法を用いた。すなわち第1は Fibroblast の発育の阻害状態と細胞の変性像の有無を考慮して4段階に評価したものである (Table 2)。発育度Ⅳは正常発育を示すものであり、Fibroblast は紡錘形をなし互いに密集してシート状に発育している移植片である。Ⅲは発育が抑制されている (Fibroblast のシート状発育がきわめて少ないか、または認められず散在して存在するもの) が、変性像 (萎縮像、円形化、顆粒形成、空胞化等) は認められないもの。Ⅱは発育が抑制されておりかつ変性像を伴う移植片。Ⅰはまったく発育の認められないものである。第2は Fibroblast のシート状発育の有無のみに着目し、その発育程度、ならびに変性像の有無はまったく考慮に入れずに判定したもの (Fig. 2) であり、(シート状発育を示した移植片の数/培養に供した移植片の数)×10であらわした。

結 果

DMP の Fibroblast に対する発育抑制作用は非常に弱かった。Fig. 1, A は $6.1 \times 10^{-4}M$ DMP の存在下において Fibroblast がシート状に発育している像を示したものであるが、この培養像は対照におけるそれとほとんど変りがない。Fibroblast は、DMP が $30.5 \times 10^{-4}M$ というかなりな高濃度においても、一部に分散した発育像がみられたとはいえ比較的よく発育し、対照との間に有意差は認められなかった。

DEP は Fibroblast の発育をかなり障害し、 $2.6 \times 10^{-4}M$ 附近からその影響が認められる。この発育抑制は、シート状発育がごく小面積認められるのみか、あるいはまったく認められず、散在して存在するという形で現われたが、しばしばその紡錘形は保たれながらも非常に萎縮した像を示した (Fig. 1, B)。DEP の場合、この萎縮像の明らかなものを変性的変化とみなして判定した。

DNBP は $3.9 \times 10^{-4}M$ 附近から Fibroblast の発育を抑制しはじめ、 $11.7 \times 10^{-4}M$ においては非常に強い毒性

を発揮した。しかも Fig. 1, C にもみられるように Fibroblast に対して強い変性をもたらしている。この変性像は DEP にみられたような萎縮像ではなく、細胞の破壊を意味すると思われる紡錘形の消失と円形化、細胞輪郭の不明瞭化、細胞内の顆

Fig. 1 The effects of DMP, DEP, and DNBP on fibroblasts from newborn rat cerebellum in tissue culture. (4 days in vitro). Phase contrast microscope, 10×10.

A. DMP: $6.1 \times 10^{-4}M$.

B. DEP: $25.5 \times 10^{-4}M$.

C. DNBP: $19.5 \times 10^{-4}M$.

Table 2. The effects of phthalate esters on fibroblasts from newborn rat cerebellum in tissue culture

		Phthalate esters ($\times 10^{-4}$ M)														
		DMP					DEP					DNBP				
Degree of outgrowth	IV	8	9	9	7	7	10	4	5	2		10	8	2		
	III	2	1	1	3	3	6		3	4	3		2	4		
	II								1	2	4			3	9	8
	I								1	2	3			1	1	2
	U Values ^a	45 ^b 45 ^b 45 ^b 45 ^b					20 25 10 0					40 ^b 10 0 0				

^a The Mann-Whitney U test. Critical value of U for a one-tailed test at $\alpha=0.05$ is 27.

^b No significantly different from control.

The degree of the outgrowth of each explants was indicated as follows: Outgrowth, IV; depressed outgrowth without degenerative changes, III; depressed outgrowth with degenerative changes, II; and no outgrowth, I.

Numerals in the Table show the number of explants of cerebellum.

Fig. 2 Toxic effects of DMP, DEP, and DNBP on fibroblasts from newborn rat cerebellum in tissue culture.

○: DMP. ◐: DEP. ●: DNBP.

The degree of outgrowth: (explants showed a sheet like development of fibroblasts/explants served for culture) $\times 10$.

粒ならびに空胞形成などである。

Table 2に、これら DMP, DEP, DNBP の Fibroblast に対する作用をまとめて示した。これらフタル酸エステル毒性の強さを比較すると、変性をひき起す程

度からみて DNBP がいちばん強く、ついで DEP, DMP となる。さらに、Fibroblast がシート状発育を示すかどうかを指標としてこれらの毒性を比較したものが Fig. 2 である。ここにみられるように、Fibroblast は DMP 存在下ではいずれの濃度においても大部分シート状発育を示しているが、DEP が 15.3 ならびに 25.5×10^{-4} M ではかなり阻害されている。DNBP においては、 19.5×10^{-4} M においてシート状発育はまったく認められない。これらのことから、これら 3 つのフタル酸エステルの Fibroblast に対する毒性は、

DNBP > DEP > DMP

であると結論づけることができよう。

考 察

Nematollahi ら¹⁰⁾は、フタル酸エステルのアルキル基が C_1 から C_{12} までの毒性を検討し、 C_1 から C_8 までのものが Chick embryo cell ならびに L-cell (Mouse fibroblast cell) の培養細胞に対し毒性を示したことから、低分子量のものほど毒性が強いと結論しているが、 C_1 から C_8 の中での毒性の順位については不明である。Calley ら⁷⁾は主としてマウスに腹腔内投与して得た LD_{50} の値から (Table 1 参照) 同じ結論、すなわち分子量が小さいほど、さらには水に対する溶解性が大きいほど毒性が強いと結論している。彼らはまた Chick embryo cell と Mouse fibroblast の培養細胞に対する毒性をも調べているが、これによると Chick embryo cell に対しては毒性が認められず、DMP と DEP が Mouse

fibroblast に毒性を示し dibutyl phthalate は示さなかったとしている。ここでも一応上記の関係が成立している。さらに、培養小脳における神経線維の伸長に対する作用の場合この関係は逆になっていることを見出した¹¹⁾が、今回報告したように Fibroblast においても彼らとは逆の結果を得た。Calley らは、細胞系はほとんどまったく水の環境によって成立している、として彼らの結果を説明している。しかし、多くの細胞成分は疎水結合によってもまた構成されていることを見のがせない。生体内に溶解、吸収され、各臓器まで移動する段階においては水溶性が大きな比重をもつと考えられる。だが、直接生体成分、たとえば蛋白質、あるいは膜成分（とくに脂質）と作用して中毒作用が発現する場面では化合物の疎水的性質が大きな意味をもってくることがありえよう。本報告の実験では、フタル酸エステルは直接細胞に作用する条件になっているので、それらの疎水性が前面に出てきたものと思われる。なお、彼らの組織培養の実験は、同じ組織培養とはいっても条件はむしろ経腹膜投与のそれに似ていると考える。なぜなら、細胞の単層培養にフタル酸エステルを作用させる場合に、50mg/ml のフタル酸エステルを 0.05ml 含ませた多孔性のパッドを培養基の上においているため、これらエステルが細胞に到達するためにはまず培養液に溶解する必要があるだろうからである。

フタル酸エステルが神経組織に対して毒性を発揮しうることが示されたわけだが、その作用機序についてはいまだ明確ではない。しかし、非水溶性のものほど高い毒性を示したことから、細胞成分との疎水結合が示唆されよう。Di-2-ethylhexyl phthalate が牛心筋の重ミトコンドリアの脂質中に特に大量検出された¹⁴⁾という報告などから考えると、膜成分との相互作用が大きな役割を占めているのかもしれない。しかし、今回の報告は、最も構造の簡単なフタル酸エステルについてのみ調べたものであり、より複雑な構造をもった他のフタル酸エステルについても同じことがあてはまるかどうかは今後の課題である。

結 論

ラット小脳の組織培養片から遊出する Fibroblast に対するフタル酸エステルの作用を検討した。DMP は Fibroblast の生長に著明な影響を与えなかった。DEP はこれらの発育を抑制し、かつ細胞の萎縮をもたらした。DNBP は Fibroblast の発育を強く抑制し、かつ細胞内の顆粒、空胞形成、細胞の円形化等の強い変性像をもた

らした。これらの結果ならびに Fibroblast のシート状発育の有無を指標として行なった毒性の比較から、DNBP, DEP, DMP の毒性の強さは分子量の大きさと平行し、非水溶性であるほど強い活性をもつと結論された。

本研究の一部は昭和47年度文部省科学研究費（特定研究、人間生存と自然環境）の援助によっておこなった。

文 献

- 1) 片瀬隆雄：医療用精製水とフタル酸エステル，医学のあゆみ，83，471-472 (1972)。
- 2) Mayer, F. L. Jun., Stalling, D. L., and Johnson, J. L.: Phthalate esters as environmental contaminants, *Nature*, 238, 411-413 (1972)。
- 3) Morris, R. J.: Phthalic acid in the deep sea jellyfish *Atolla*, *Nature*, 227, 1264 (1970)。
- 4) Ogner, G. and Schnitzer, M.: Humic substances: Fulvic acid-dialkyl phthalate complexes and their role in pollution, *Science*, 170, 317-318 (1970)。
- 5) Neergaard, J., Nielsen, B., Faurby, V. Christensen, D. H., and Nielsen, O. F.: Plasticizers in P.V.C. and the occurrence of hepatitis in a haemodialysis unit, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 5, 141-145 (1971)。
- 6) Mallette, F. S., and Von Haam, E.: Studies on the toxicity and skin effects of compounds used in the rubber and plastics industries, II. Plasticizers, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg. & Occupat. Med.* 6, 231-236 (1952)。
- 7) Calley, D., Autian, J., and Guess, W. L.: Toxicology of a series of phthalate esters, *J. Pharm. Sci.* 55, 158-162 (1966)。
- 8) Bower, R. K., Haberman, S. and Minton, P. D.: Teratogenic effects in the chick embryo caused by esters of phthalic acid, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 171, 314-324 (1970)。
- 9) 加須屋実：フタル酸ジブチルの神経毒性，投稿中
- 10) 加須屋実：フタル酸ジエチルの培養神経組織に対する作用，産業医学，印刷中
- 11) Kasuya, M.: Toxicity of phthalate esters to nervous tissue in culture, 投稿中
- 12) 加須屋実，岡田 晃：塩化カドミウムの培養小脳に対する影響，医学のあゆみ，79，173-174 (1971)。

- 13) Nematollahi, J., Guess, W. L., and Autian, J.: Plasticizers in medical application I, Analysis and toxicity evaluation of dialkyl benzenedicarboxylates, J. Pharm. Sci. 56, 1446-1453 (1967).
- 14) Nazir, D. J., Alcaraz, A. P., Bierl, B. A., Beroza, M., and Nair. P. P.: Isolation, identification, and specific localization of di-2-ethylhexyl phthalate in bovine heart muscle mitochondria, Biochemistry, 10, 4228-4232 (1971).

(受付1973年4月2日)