マウスにおけるメチル t -ブチルエーテルの 肝脂質過酸化反応への影響

加藤 貴彦^{*1}, 嵐谷 奎一^{*1}, 菊池 亮^{*1},
吉川 正博^{*1}, 児玉 泰^{*2}

^{*1}産業医科大学医療技術短期大学, ^{*2}産業医科大学医学部衛生学教室

Effects of Methyl tertiary-Butyl Ether on Hepatic Lipid Peroxidation in Mice

Takahiko KATOH^{*1}, Keiichi ARASHIDANI^{*1}, Makoto KIKUCHI^{*1},
Masahiro YOSHIKAWA^{*1} and Yasushi KODAMA^{*2}

^{*1}*School of Nursing and Medical Technology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu*

^{*2}*Department of Environmental Health, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu*

Abstract The effect of one-shot or repeated treatment with methyl tertiary-butyl ether (MTBE) on lipid peroxidation and cytochrome P-450 in mouse liver was examined. One-shot treatment at the 500mg/kg dose level caused a transient decrease in leukocyte number after 24h. An increased level of lipid peroxide was observed in the liver homogenates 24h after one-shot treatment and four weeks of repeated 200mg/kg treatment.

The hepatic cytochrome P-450 content increased after one and four weeks of repeated treatment (50, 200mg/kg). On the other hand, the treatment did not affect glutathione content and glutathione-S-transferase activity. These results indicate that MTBE treatment caused lipid peroxidation in the liver homogenate and induction of hepatic microsomal cytochrome P-450 content.

Key words: Methyl tertiary-butyl ether (メチル t -ブチルエーテル), Lipid peroxide (過酸化脂質), Cytochrome P-450 (シトクロームP-450), Leukocyte (白血球), Glutathione (グルタチオン)

緒 言

メチル t -ブチルエーテル (methyl tertiary-butyl ether, 以下MTBE)は、刺激臭を有する揮発性無色透明液体で、ガソリンのオクタン価向上剤、ならびにラッカー混合溶剤の混和改良剤として使用されている有機溶剤である。特に、近年、その優れたガソリンのオクタン価向上性に注目され、MTBE含有ハイオクガソリンの需要が伸びてきている。この様な状況下で、石油会社各社は

MTBE製造工場の新設に着手しており、今後その生産量の上昇が見込まれ、MTBE関連従事者はもちろん一般住民も曝露される機会が増加すると考えられる。一方、MTBEは、臨床分野においてdirect instillation法による優れた胆石溶解剤として、1985年頃よりアメリカを中心に使用されている^{1,2)}。適応例では、胆嚢壁に障害がなければ血中への移行は少なく、軽度のアルカリフォスファターゼ上昇以外に副作用は少ないといわれている²⁾。しかし、少数ではあるが腎不全の報告例³⁾もあり、また

Reprint requests to : Takahiko Katoh, School of Nursing and Medical Technology, University of Occupational and Environmental Health, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan

血中へ移行した場合は、そのエーテルの性質上、脂溶性が極めて高く、容易に血液脳関門を通過し⁴⁾、急性影響として麻酔作用²⁾などの中枢神経系への影響のほか、腹腔内漏出による出血、壊死などの組織障害をおこす可能性も示唆されている。しかし、MTBEの生体影響についてはこれまで実験報告が少なく、その毒性の発生機序、解毒代謝機構についても十分に解明されていない。そこで我々は、MTBEの生体影響を究明する目的で、マウスを用いてMTBEの投与実験を行い、近年種々の薬物の毒性、発癌性の機序として注目され、また脂質膜障害の指標となる過酸化脂質の生成に対する影響を検索した。分子状酸素の脂質への付加反応である脂質過酸化反応は、生成された過酸化脂質それ自体の毒性と、脂質過酸化反応の結果として膜機能障害とが問題とされる。そこで、酸化反応に対する防御システムとしてのグルタチオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼへの影響やミクロゾーム膜内在性酵素のシトクロームP-450への影響についても検索した。また同時に末梢血液への影響についても検討した。

実験材料および方法

本実験では、投与群、対照群とも6～9週齢のddY系雄性マウスを用いた。購入後、3日間ケージで順化させた後に、実験を開始した。MTBEは、東京化成工業から、チオバルビツール酸(TBA)、グルタチオン(還元型)は、和光純薬工業から、グルタチオン測定時の α -フタルアルデヒドはシグマ化学工業から購入した。その他の試薬もすべて化学分析用を用い、和光純薬工業から購入した。

MTBE投与量の設定は、LD₅₀値⁵⁾: 830mg/kg (95%信頼区間: 784-878mg/kg)を算出し、この結果にもとづいて投与量を決定した。1回投与実験(対照群10匹、投与各群10匹)では、コーンオイルに溶解しMTBEを50、200及び500mg/kgの用量でマウス腹腔内に投与し、24時間後、48時間後に測定に供した。連続投与実験(対照群5匹、投与各群5匹)では、50及び200mg/kgのMTBE

を1日1回、週5回、1週間、4週間の各期間マウス腹腔内に投与し、投与後24時間後にエーテル麻酔下に解剖した。対照群は、コーンオイルを投与群と同様のスケジュールで投与した。飼料(日本クレアCE-2)および飲料水は両群とも自由に摂取させた。

血液は腋窩動脈から採血し、血液学的検査に用いた。ヘモグロビン濃度は、シアノメトヘモグロビン法を原理としたネスコートヘモリキット-N試薬(日本商事)に血液を混合し比色定量し、ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット法により計測した。白血球数は、3%氷酢酸希釈液ユノベット(Becton, Dickinson and Company)で希釈後、また血小板数は、1%シュウ酸アンモニウム希釈液ユノベットで希釈後、それぞれBurker-Turk計算板にて計測した。

肝臓は、氷冷生理食塩水にて灌流後に摘出し、その一部をホモジナイズ後、常法により、可溶性分画とミクロゾーム分画を得た⁶⁾。肝ホモジネートについて、過酸化脂質量を測定した。過酸化脂質の測定には、チオバルビタル酸(TBA)反応陽性物質をマロンジアルデヒド(malondialdehyde, MDA)換算量で表現するOhkawaら⁷⁾の方法を用いた。可溶性分画では、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性(基質: CDNB)⁸⁾、及び還元型グルタチオン量⁹⁾を、ミクロゾーム分画では、シトクロームP-450¹⁰⁾量を測定した。蛋白質の定量は、Bradfordの方法¹¹⁾に従って行った。標準蛋白質として、BSAを用いた。有意差検定は一元配置の分散分析を行い、Bonferroni法に基づき、対照群と投与群との多重比較を行った。

結 果

1. 一回投与実験

1) 血液学的検査

白血球数は、500mg/kg投与後24時間で、対照群に比べ29%の有意な減少が観察された(Table 1)。しかし、投与後48時間では対照群との間に有意差は認められなかつ

Table 1 Hematological findings at 24h after MTBE treatment in the one-shot experiment

Dose (mg/kg, B.W.)	Hb (g/dl)	Ht (%)	WBC ($\times 10^9/\mu\text{l}$)	Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)
0	12.1 $\pm$ 2.5	43.5 $\pm$ 3.3	5.5 $\pm$ 0.9	88.3 $\pm$ 8.0
50	14.1 $\pm$ 0.7	46.6 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 1.8	75.9 $\pm$ 11.7
200	14.0 $\pm$ 1.7	43.8 $\pm$ 1.4	5.8 $\pm$ 1.5	112.4 $\pm$ 21.2
500	13.6 $\pm$ 1.0	42.7 $\pm$ 1.9	3.9 $\pm$ 0.7*	106.5 $\pm$ 25.0

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=10)

Significantly different from control: *P<0.05

Table 2 Hematological findings at 48h after MTBE treatment in the one-shot experiment

Dose (mg/kg, B. W.)	Hb (g/dl)	Ht (%)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)
0	15.0 $\pm$ 1.2	44.0 $\pm$ 2.4	5.2 $\pm$ 0.9	78.3 $\pm$ 4.6
50	14.5 $\pm$ 1.9	46.0 $\pm$ 3.1	5.1 $\pm$ 1.6	78.2 $\pm$ 4.8
200	15.3 $\pm$ 0.8	43.6 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 0.7	84.5 $\pm$ 8.8
500	14.5 $\pm$ 0.6	42.2 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 1.2	76.4 $\pm$ 10.1

Results are expressed as mean $\pm$ S. D. (n=10)

た(Table 2)。一方、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び血小板数の測定値は投与後24時間、48時間のいずれの投与量においても、投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

2) 肝臓への影響

肝臓の臓器重量に関しては、投与24時間後では50mg/kg, 200mg/kg, 500mg/kg 投与群及び対照群で、それぞれ平均1.95g, 1.95g, 2.06g, 2.08gであり、また投与48時間後では50mg/kg, 200mg/kg, 500mg/kg 投与群及び対照群ではそれぞれ平均2.10g, 1.98g, 2.06g, 2.16gで、いずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

肝ホモジネートにおいて、過酸化脂質量は投与後24時間で増加傾向を示し、50mg/kg, 500mg/kg 投与群ではそれぞれ65%, 50%の有意な増加を認めた(Fig. 1)。しかし、投与後48時間では500mg/kg 投与群でのみ増加傾向が認められたが有意ではなかった(Fig. 1)。一方、

ミクロゾーム分画のシトクロームP-450量(Fig. 1)、可溶性分画のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性や解毒に重要な還元型グルタチオン量については、投与群と対照群との間に有意差は認められなかった(Table 3)。

2. 連続投与実験

1) 血液学的検査

ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、血小板数は、1週間、4週間のいずれの期間においても、対照群との間に有意な差は認められなかった(データ未掲載)。

2) 肝臓への影響

肝臓の臓器重量に関しては、1週間の50mg/kg, 200mg/kg 投与群及び対照群ではそれぞれ平均2.32g, 1.99g, 2.25gであり、また4週間の50mg/kg, 200mg/kg 投与群及び対照群ではそれぞれ平均2.08g, 2.17g, 2.22gで、いずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

肝ホモジネートにおいての過酸化脂質量は、4週間投

Fig. 1 Effects of one-shot treatment with MTBE on the lipid peroxide (TBA) and cytochrome P-450 in mouse liver

Points represent mean $\pm$ S. D. (n=10).

Significantly different from control; *P<0.05

□: 50mg/kg, ▨: 200mg/kg, ■: 500mg/kg

Mean TBA level (nmol malondialdehyde (MDA)/100mg protein) in the control mice was 120.7 at 24h and 98.5 at 48h after treatment.

Mean cytochrome P-450 level (nmol/mg protein) in the control mice was 0.66 at 24h and 0.57 at 48h after treatment.

Table 3 Effects of one-shot treatment with MTBE on the glutathione content and glutathione-S-transferase activity in mouse liver

Dose (mg/kg, B.W.)	Reduced glutathione (μ mole/g liver)		Glutathione-S-transferase (nmole product/min/mg protein)	
	24 hours after treatment	48 hours after treatment	24 hours after treatment	48 hours after treatment
0	4.5 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.4	1080 $\pm$ 72.6	1066 $\pm$ 85.7
50	4.2 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.3	1145 $\pm$ 86.9	1072 $\pm$ 66.9
200	4.6 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.4	1046 $\pm$ 89.7	1105 $\pm$ 47.8
500	4.5 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.3	1158 $\pm$ 96.8	1088 $\pm$ 55.1

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=10)

Fig. 2 Effects of repeated treatment with MTBE on the lipid peroxide (TBA) and cytochrome P-450 in mouse liver

Points represent mean $\pm$ S.D. (n=5).

Significantly different from control; *P<0.05

□: 50mg/kg, ▨: 200mg/kg

Mean TBA level (nmol MDA/100mg protein) in the control mice was 95.6 for 1W treatment and 89.7 for 4W treatment.

Mean cytochrome P-450 level (nmol/mg protein) in the control mice was 0.49 for 1W treatment and 0.45 for 4W treatment.

与群で増加傾向を示し、200mg/kg 投与群で85%の有意な増加を認めた(Fig. 2)。また、肝ミクロゾーム分画中のシトクロームP-450量は50mg/kg, 200mg/kgを1週間投与した群で80%, 110%, 4週間投与群で35%, 70%の有意な増加を認めた(Fig. 2)。しかし、肝可溶性分画の還元型グルタチオン量、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性については対照群との間に有意差は認められなかった(Table 4)。

考 察

これまで検索した限り、MTBEは胆石溶解剤として適用した症例において、白血球数の減少は報告されていない。しかし、今回、我々はマウスを用いた500mg/kgの

一回投与実験において、24時間後に一過性の白血球数減少を認めた。白血球数減少の機序としては、①産生の低下、②寿命の短縮、③血管内分布の変化などの可能性が一般的に挙げられている。本実験では、投与後48時間では、対照群との差が認められないこと(Table 2)、連続投与実験でも差が認められないことから、白血球の血管内の分布の変化によるみかけ上の白血球数減少と考えられる。

近年、脂質過酸化反応が、環境中の化学物質や種々の薬物の毒性、あるいは発癌性の原因の一つとして生体に様々な影響を及ぼすことが明らかとなってきた。脂質過酸化亢進の原因として、例えば、四塩化炭素においては体内代謝中間体としてのトリクロロラジカルがイニ

Table 4 Effects of repeated treatment with MTBE on the glutathione content and glutathione-S-transferase activity in mouse liver

Dose (mg/kg, B.W.)	Reduced glutathione (μ mole/g liver)		Glutathione-S-transferase (nmole product/min/mg protein)	
	1 Week repeated treatment	4 Weeks repeated treatment	1 Week repeated treatment	4 Weeks repeated treatment
0	4.3 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.5	1038 $\pm$ 86.0	1066 $\pm$ 45.6
50	4.2 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.4	1060 $\pm$ 82.6	1156 $\pm$ 75.7
200	4.5 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.4	1131 $\pm$ 62.1	1083 $\pm$ 94.3

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=10)

シエーターとして働いていると報告されている¹²⁾。他方、DDTでは、シトクロームP-450やNADPHシトクローム還元酵素の合成促進による酵素的過酸化反応の活性化に基づいていると説明されたり¹³⁾、あるいはグルタチオン及びグルタチオンペルオキシダーゼによって構成される酸化還元サイクルの酸化的ストレスに対する防御システムの破綻が原因である¹⁴⁾と報告されたりと多様である。本実験でのMTBEによる脂質過酸化反応の亢進は、シトクロームP-450量の増加と連動していないこと、酸化的ストレスの防御機序を有するグルタチオン、またグルタチオンペルオキシダーゼ様活性をもつグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性の変化も認められないことから、DDTとは異なった要因によると推測されるが、現時点ではその詳細は不明である。

MTBEを投与した場合、その投与量の90%以上は呼吸中に排泄され、残りの10%はエーテル結合がきれ、中間産物としてtertiary (*t*)-ブタノールとメタノールが産生されるといわれている¹⁵⁾。*t*-ブタノールは、エタノール、メタノールと比較しアルコール脱水素酵素によって代謝されにくくシトクロームP-450によって代謝されると考えられている¹⁶⁾。これまで、MTBEのシトクロームP-450に対する影響については、Savolainenら⁴⁾がラットを用い、300ppm、15週間吸入曝露実験で、腎シトクロームP-450は約25%増加し、肝シトクロームP-450は変化が認められなかったと報告している。また、Bradyら¹⁷⁾もラットを用いたMTBE (i.p.) 5ml/kg一回投与実験では肝シトクロームP-450に変化は認められなかったと報告している。ただし、彼らは、Immunoblotを用いたシトクロームP-450のアイソザイム分析により、P-450 2B1の増加を認めている。本実験では我々は連続投与実験においてアイソザイムの詳細は不明だが、肝シトクロームP-450量の増加を認めた。MTBEは、メタノールと*t*-ブタノールに代謝されると考えられているが¹⁷⁾、先に述べたように*t*-ブタノールはアルコール脱水素酵素で代謝

されにくいこと¹⁶⁾から、シトクロームP-450の増加は*t*-ブタノールの代謝のために誘導されたと推測される。

以上、MTBEによる生体影響を解毒の中心である肝を用いて検索した。脂質過酸化反応の亢進及びシトクロームP-450の誘導はMTBEの毒性発生の機序、代謝を解明するうえで興味ある知見と思われる。

結 語

MTBE (Methyl tertiary-butyl ether)の生体影響、特に血液、肝臓への影響を検索する目的で、マウスを用い投与実験を行い、血液学的検査、肝薬物代謝酵素、グルタチオン、そして脂質過酸化反応に関して次の結果を得た。

- 1) 500mg/kg一回投与後24時間後に、白血球数の減少を認めた。
- 2) 肝ホモジネートにおける過酸化脂質の増加が一回投与実験の24時間後と、200mg/kg 4週間連続投与群で認められた。
- 3) 肝ミクロゾームのシトクロームP-450量の増加が、1週間、4週間の連続投与実験において、50mg/kg、200mg/kgのいずれの投与群においても認められた。
- 4) 一回投与実験、連続投与実験のいずれにおいても肝可溶性分画の還元型グルタチオン量、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性に変化は認められなかった。

稿を終わるにあたり、実験に協力していただいた産業医科大学医療技術短期大学 秋野健一、岡崎智恵子、岩本直子、田中和美、長野順子、藤本真弓、和田明子、堀内正巳各氏に感謝致します。

文 献

- 1) Allen, M.J., Borody, T.J., Bugliosi, T.F., May, G.R., LaRusso, N.F. and Thistle, J.L.: Rapid dissolution of gallstones by methyl tert-butyl ether,

- N. Engl. J. Med., **312**, 217-220 (1985).
- 2) Allen, M.J., Borody, T.J., Bugliosi, T.F., May, G.R., LaRusso, N.F. and Thistle, J.L.: Cholelitholysis using methyl tertiary butyl ether, *Gastroenterology*, **88**, 122-125 (1985).
- 3) Ponchon, T., Baroud, J., Pujol, B., Valette, P.J. and Perrot, D.: Renal failure during dissolution of gallstones by methyl-tert-butyl ether, *Lancet*, **2**, 276-277 (1988).
- 4) Savolainen, H., Pfaffli, P. and Elovaara, E.: Biochemical effects of methyl tertiary-butyl ether in extended vapour exposure of rats, *Arch. Toxicol.*, **57**, 285-288 (1985).
- 5) 嵐谷奎一, 加藤貴彦, 吉川正博, 菊池亮, 川本俊弘, 児玉泰: マウスにおける Methyl tertiary-butyl ether の腹腔内投与による LD₅₀ と臓器重量変化, *産業医学*, **35**, 404-405 (1993).
- 6) Kato, R., Takanaka, A. and Takayanagi, M.: Substrate-induced spectral change of liver microsomes in phenobarbital and methylcholanthrene-treated male and female rats, *J. Biochem.*, **68**, 395-413 (1970).
- 7) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979).
- 8) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jacoby, W.B.: Glutathione S-transferases, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7310-7319 (1974).
- 9) Hissin, P.J. and Hilf, R.: A fluorometric methods for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.*, **74**, 214-226 (1976).
- 10) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964).
- 11) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 12) Butler, T.C.: Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **134**, 311-319 (1961).
- 13) 内山 充: 農薬における有機ハロゲンの毒性, 変異原と毒性, **4**, 47 (1981).
- 14) 糸川嘉則, 蒲原一隆: PCB中毒と過酸化機構, 文部省環境科学研究報告 B124, 92 (1981).
- 15) Bugliosi, T.F., Borody, T.J., Allen, M.J., Rach, G.J., LaRusso, N.F. and Thistle, J.L.: Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in expired air and methanol in blood do not reach potentially harmful levels after gallbladder and duodenal instillation of therapeutic doses of MTBE in dogs, *Gastroenterology*, **86**, 1313 (1984).
- 16) Cederbaum, A.I. and Cohen, G.: Oxidative demethylation of t-butyl alcohol by rat liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 730-736 (1980).
- 17) Brady, J.F., Xiao, F., Ning, S.M. and Yang, C.S.: Metabolism of methyl tertiary-butyl ether by rat hepatic microsomes, *Arch. Toxicol.*, **64**, 157-160 (1990).

(受付 1993年3月5日 受理 1993年7月22日)