原 著

摂食量が有機溶剤の代謝と毒性に及ぼす影響

小 山 裕*, 佐 藤 章 夫**

EFFECTS OF ONE-DAY FOOD RESTRICTION ON THE
METABOLISM AND TOXICITY OF ORGANIC
SOLVENTS IN RATS

Yutaka KOYAMA* and Akio SATO**

Studies were made with male Wistar rats on the effects of 50% food restriction on the metabolism of eight organic solvents (chloroform, carbon tetrachloride, 1,2-dichloroethane, 1,1-dichloroethylene, trichloroethylene, benzene, toluene and styrene) and on the hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride inhalation at 400 ppm for 4 h. The activities of liver drug-metabolizing enzymes for these solvents were enhanced almost equally without exception by one-day food restriction, although the restriction produced no significant increase in the microsomal protein and cytochrome P-450 contents. Carbon tetrachloride hepatotoxicity was enhanced by the food restriction, as evidenced by a marked increase of serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activities in the food-restricted rats. Histological findings of the liver also supported this finding. Thus, food restriction enhances metabolism of organic solvents in the liver, and can modify toxicity of some chemicals such as carbon tetrachloride, which need metabolic activation to become cytotoxic.

Key words: animal experiment; nutrition; food restriction; liver drug-metabolism; cytochrome P-450; organic solvent; carbon tetrachloride (CCl₄); hepatotoxicity

I. 緒 言

労働者を含め、我々の日常生活の中で絶食を経験することはまれである。しかし、食事量の制限となると、たびたび経験するところであろう。わが国に限らず、先進諸国においては、美容・健康上の理由からのカロリー摂取の制限がひろく行われており、そのいきすぎが問題となる。開発途上国では、慢性的な低栄養状態が社会問題化している。

最近、化学物質の毒性発現との関連において、薬物代謝酵素 (microsomal drug-metabolizing enzymes; mixed-function oxidase; microsomal hydroxylase;

microsomal mono-oxygenase) の役割が注目されている。この酵素は、外来の化学物質を解毒したり、あるいは逆に活性化することにより、化学物質の毒性発現に大きな役割を演じている。したがって、この酵素の活性に影響を与える因子は、化学物質の毒性を左右するといってもよい。例えば、絶食は肝薬物代謝酵素の活性を亢進させ、四塩化炭素をはじめとする塩素系有機溶剤の肝毒性を著しく増強¹⁻⁹⁾させる。絶食というような、急激な変化でなくとも、4週間にわたる摂食量の制限 (自由摂取の45%) によって肝のアニリン水酸化酵素等の活性が亢進¹⁰⁾する。これまでのところ、絶食の影響を述べた論文が数多くみられるのに比べ、制限食での有機溶剤の代謝と毒性に関する論文はほとんどない。今回我々は、ラットにおいて、1日のみの給餌制限が、溶剤の代謝および毒性にどのような影響を及ぼすか検討した。代謝については、8種類の揮発性炭化水素 (chloroform, carbon tetrachloride, 1,2-dichloroethane, 1,1-dichloroethylene, trichloroethylene, benzene, toluene, styrene) の *in vitro* での代謝速度を測定した。毒性については、

* 信州大学医学部衛生学教室

** 山梨医科大学第1保健学教室
昭和60年7月29日受付

* Department of Hygiene, Shinshu University
School of Medicine

** Department of Environmental Health, Medical
University of Yamanashi

Received for publication, July 29, 1985

Table 1. Composition of the basal diet.

Components	Content
Casein	3.47 g
Oil	
olive oil	2.16 g
corn oil	0.63 g
Sucrose	9.72 g
L-Cystine	41 mg
DL-Methionine	25 mg
Ethyl linoleate	212 mg
Vitamin mixture	407 mg
DL- α -Tocopherol	2 mg
Mineral mixture	813 mg
Carrhagheenan	212 mg

The value shows an amount of each nutrient taken by a rat per day. An appropriate amount of water was added to the mixture of these components, which was then mixed thoroughly, to make a liquid diet of 80 ml (80 kcal).

四塩化炭素をモデル物質として、肝障害の程度をみた。

II. 方 法

実験には Wistar 系雄性ラット（静岡実験動物：10 週齢，250 g）を用いた。ラットは、温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル 12 時間（明期、午前 6 時～午後 6 時；暗期午後 6 時～午前 6 時）の動物室で飼育した。食餌条件を一定にするために、餌は一定時刻（午後 5 時）に与えた。摂食量をコントロールするために液体飼料を用い、1 日の摂取カロリーを 80 kcal (80 ml) とした。80 ml（基準量）の液体飼料は Table 1 に示す組成からなり、ラットの成長に十分な量の栄養を含有¹¹⁾する。

基準量の液体飼料で 3 週間馴化飼育したのち 1 日のみ、餌の量を、基準量 (80 kcal)、半分量 (40 kcal)、0 (0 kcal, すなわち絶食) の 3 段階に変えて実験に供した。半分量群には 40 ml の水を別に与え、絶食群には水のみ 80 ml を与えた。

各群のラットを、翌日の午前 11 時に断頭・放血によって屠殺し、肝を取り出し、1.15% KCl-phosphate buffer にて肝ホモジネートをつくった。肝薬物代謝酵素の活性は、Sato & Nakajima の方法¹²⁾により測定した。すなわち、肝ホモジネートの $10,000 \times g$ 上清を酵素源として、気-液平衡による基質減少法を用いて 8 種類の炭化水素の代謝速度を測定した。同時に肝ミクロゾーム蛋白を Lowry らの方法¹³⁾で、チトクローム P-450 を

Omura & Sato の方法¹⁴⁾で測定した。

餌の摂取量が肝毒性の発現におよぼす影響をみるために、モデル物質として、代謝活性化と肝障害の関連が既知の四塩化炭素を用いた。すなわち、給餌制限により肝において四塩化炭素の代謝が亢進すればその活性代謝物による肝毒性が増強することが予測される。各群のラットを、午前 9 時より午後 1 時まで、4 時間、400 ppm の四塩化炭素に暴露し、招来された肝障害を観察した。用いた暴露チェンバーの容積は約 360 l で、ここにラット 6～9 匹を入れ、給気量毎分 11～12 l にて暴露を行った。濃度のコントロールは、給気量の調節により行った¹⁵⁾。暴露チェンバー内の四塩化炭素濃度はガスクロマトグラフ（日立 163 型）により 20 分ごとに測定した。

肝障害の指標として、血清中のグルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナーゼ（以下、GOT）とグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ（以下、GPT）の活性を測定した。血液は暴露前と暴露終了 20 時間後（翌日の午前 9 時）にラット尾静脈より採取した。活性は、市販のキットを用い、NADH の減少を分光学的に測ることによりもとめた (Boehringer Mannheim, UV-test, opt; 自記分光光度計、日立 EPS-3 T 型)。また同時に光顕的に組織像を観察した。

III. 結 果

1. 摂食量が肝薬物代謝酵素の活性に及ぼす影響

摂食量（A 群：基準量 80 kcal, B 群：半分量 40 kcal, C 群：絶食 0 kcal）による体重、肝重量、ミクロゾーム蛋白量、チトクローム P-450 量の違いを Table 2 に示した。摂食量の減少にともない、体重の減少、肝重量の減少、体重に対する肝重量の比率の低下がみられた。A 群を 1 として B 群と C 群をみると、体重で 0.97 と 0.94、肝で 0.85 と 0.67、肝/体重比では 0.85 と 0.72 であった。ミクロゾーム蛋白およびチトクローム P-450 については、共に有意な差は認められなかった。

8 種類の炭化水素の代謝速度を、Fig. 1 に示した。摂食量による代謝速度の変化をみると、溶剤によって程度に違いはあるが、8 種類とも、“80 kcal < 40 kcal < 0 kcal”というパターンを示した。すなわち、摂食量の減少にともない 8 種類すべてで代謝速度が増大した。このことから、給餌制限による活性亢進は、すくなくとも揮発性炭化水素にたいしては、基質非特異的であることがうかがわれた。

2. 摂食量が四塩化炭素の肝毒性発現に及ぼす影響

ラットに暴露した四塩化炭素の 4 時間平均濃度は、402 ppm であった。摂食量と四塩化炭素の肝毒性との関

Table 2. Effects of food restriction on body weight, liver weight, liver microsomal protein and cytochrome P-450 contents.

Parameters	Food intake (kcal)		
	80	40	0
Body weight (g)	329.6±8.8	318.4±9.2 ^a	309.7±8.2 ^b
Liver weight (g)	12.8±0.8	10.9±0.3 ^b	8.6±0.4 ^b
Liver/body (g/g%)	3.9±0.2	3.3±0.1 ^b	2.8±0.1 ^b
Microsomal protein (mg/g liver)	21.1±0.9	22.5±1.5	23.1±1.8
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.69±0.05	0.76±0.12	0.75±0.14

The values represent the mean±SD for seven rats.

a : Significantly different from normal group, $p < 0.05$, b : $p < 0.01$.

Fig.1. Metabolism of eight organic solvents in the rat liver following one-day food restriction. Each point represents the mean±SD for four to seven rats.

係を Fig.2 に示した。摂食量の減少にともない、GOT と GPT の活性値がともに指数関数的に増加し、肝障害の増強が示唆された。暴露前後の値を比較してみると、A 群では GPT でわずかながら有意の増加を認めたが、GOT には増加が認められなかった。B 群においては GOT が 6 倍、GPT で 16 倍の上昇を認めた。C 群にいたっては、GOT、GPT がおおよそ、65 倍、49 倍にまで増大した。組織学的な所見においても、C 群では中心静脈周辺に広範囲の壊死像が、また、B 群では、

脂肪化と若干の細胞壊死が認められた。しかし、A 群では脂肪化のみで壊死像は認められず、3 群の間に明確な差がみられた。すなわち、肝障害の程度は四塩化炭素の代謝速度と同様に、“80 kcal<40 kcal<0 kcal” という関係が認められた。

以上のように、摂食量の減少は肝の薬物代謝酵素の活性亢進を引き起こした。四塩化炭素のように活性代謝物が毒性を発現する化学物質においては、この活性亢進によって毒性が増強された。

Fig.2. Serum GOT and GPT levels 20 hr after a 400 ppm×4 hr carbon tetrachloride exposure. 0=fast; 40=one-half of the normal food intake; 80=normal food intake; Control=before inhalation. Each point represents the mean±SD for seven rats.

IV. 考 察

薬物代謝酵素は解毒酵素であると同時に、発癌物質をはじめとする多くの有害化学物質の活性化酵素でもある（多くの化学発癌物質は、生体内で薬物代謝酵素の作用を受けて活性化され、初めて発癌性を発揮する¹⁶⁾。したがって、摂食量の減少による薬物代謝酵素の活性化によって、多くの有害化学物質の毒性が影響を受けることが予想される。

絶食による四塩化炭素の肝毒性増強については多くの報告¹⁻⁹⁾がある。絶食というような急激な変化は、日常的に経験されることではないが、3食のうち1食を抜くとか、平生の半分くらいしか取らないということは、たびたび我々の経験するところである。1日のみの食事の制限ということになれば、ほとんどの人が経験しているところであろう。食事制限による薬物代謝酵素活性への影響について述べた論文^{10,17)}はいくつかある。

肝の薬物代謝酵素活性に関して、Prasad ら¹⁷⁾は、家兎において、50%の摂食制限の実験を行っている。それによると、5か月間の制限において、肝ミクロゾームのグルクロニールトランスフェラーゼの活性およびチトクローム P-450 が増加した。Sachan¹⁰⁾は、雄性ラットで28日間、45%制限食の実験を行っている。その結果では、自由摂食させた群に比し、実験群で、体重が35%、肝重量が55%、肝/体重比が31%の減少をしめている。肝薬物代謝酵素に関しても、*in vitro*において、アニリン水酸化酵素、P-クロロメチルアニリン-N-脱メチル酵素、およびP-ニトロ安息香酸還元酵素などの肝ミクロゾーム薬物代謝酵素の活性亢進、それに付随する細胞質中の NADPH 生成酵素の活性亢進ならび

に、チトクローム P-450 量とミクロゾーム蛋白量の増加を報告している。*in vivo*においても、ヘキサバルビタールの代謝速度の増大をのべている。我々の実験は、1日のみの制限であるので40 kcalの群で、体重、肝重量、肝/体重比は、おのおの、3、15、15%にとどまっており、P-450 量とミクロゾーム蛋白量の上昇が認められなかったことを除いて、我々の結果は Sachan の報告と一致している。長期の給餌制限が、1日の制限の延長線上にあると考えてよいかどうか今後検討を要するところであろう。

今回、毒性に及ぼす影響を明らかにするために、比較的高濃度（400 ppm）の暴露実験を行った。一般の作業現場でこのような濃度の四塩化炭素の暴露は考えられない。しかし、1日のみの50%の制限食で、1回の吸入暴露によって細胞壊死を伴う激しい肝障害を招来した。当然のことながら、ラットでの結果を直接人間にあてはめることはできない。しかし、食事量の減少は日常よく経験することだけに、摂食量が制限された状態においては、有害化学物質に対する感受性が人間においても変化する可能性がある。特に有害化学物質の暴露をうける機会の多い労働者では、食事の摂取について十分な注意を払う必要があろう。

摂食量の問題に限らず、これまで報告されている、アルコール飲用による化学物質の毒性に対する影響¹⁸⁻²¹⁾や、糖質の摂取量による毒性への影響^{11,21)}など食物の摂取と化学物質の毒性との関係は、我々にとって身近な問題だけに、今後とも十分検討していくことが必要であろう。

稿を終えるにあたり、ご校閲の労をいただいた信州大学医学

部衛生学教室の村山忍三教授,ならびに実験にご協力いただいた同教室奥山周作助手と三治豊氏に深謝いたします。

本論文の要旨は第56回日本産業衛生学会において発表した。なお,本研究の一部は昭和58年度文部省科学研究費(奨励研究(A)課題番号58770394)の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Krishnan N, Stenger R. Effects of starvation on the hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1966; 49: 239-246.
- 2) Jaeger RJ, Conolly RB, Murphy SD. Short-term inhalation toxicity of halogenated hydrocarbons: effects on fasting rats. *Arch Environ Health* 1975; 30: 26-30.
- 3) Daves N, Whipple C. The influence of fasting and various diets on the liver injury effected by chloroform anesthesia. *Arch Int Med* 1919; 23: 616-633.
- 4) Goldschmidt S, Vars HM, Ravdin I. The influence of the foodstuffs upon the susceptibility of the liver to injury by chloroform, and the probable mechanism of their action. *J Clin Invest* 1939; 18: 277-289.
- 5) Jaeger RJ, Conolly RB, Murphy SD. Effect of 18 HR fast ANF glutathione depletion on 1,1-dichloroethylene-induced hepatotoxicity and lethality in rats. *Exp Mol Pathol* 1974; 20: 187-198.
- 6) Mackenna MJ, Zempel JA, Kmadrid EO, Gehring PJ. The pharmacokinetics of (¹⁴C) vinylidene chloride in rats following inhalation exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 45: 599-610.
- 7) Diaz Gomez MI, de Cartro CR, de Ferreyra EC et al. Mechanistic studies on carbon tetrachloride hepatotoxicity in fasted and fed rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 32: 101-108.
- 8) Nakajima T, Sato A. Enhanced activity of liver drug-metabolizing enzymes for aromatic and chlorinated hydrocarbons following food deprivation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 50: 549-556.
- 9) Mclean AEM, Mclean EK. The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(*p*-chlorophenyl)-ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem J* 1966; 100: 564-571.
- 10) Sachan DS. Modulation of drug metabolism by food restriction in male rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 104: 984-989.
- 11) Nakajima T, Koyama Y, Sato A. Dietary modification of metabolism and toxicity of chemical substances, with special reference to carbohydrate. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 1005-1011.
- 12) Sato A, Nakajima T. A vial-equilibration method to evaluate the drug-metabolizing enzyme activity for volatile hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 47: 41-46.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 14) Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370-2378.
- 15) Sato A, Nakajima T, Fujiwara Y, Murayama N. A pharmacokinetic model to study the excretion of trichloroethylene and its metabolites after an inhalation exposure. *Br J Ind Med* 1977; 34: 56-63.
- 16) Miller JA. Carcinogenesis by chemicals—an overview. *Cancer Res* 1970; 30: 559-576.
- 17) Prasad KVS, Nair KM, Sivakumar B, Rao BSN. Effect of food restriction (undernutrition) on plasma sex hormone binding globulin (SHBG) capacity, liver drug metabolizing enzymes and uterine cytosol progesterone receptor. *Contraception* 1981; 23: 563-576.
- 18) Strubelt O, Obermeier F, Siegers CP. The influence of ethanol pretreatment on the effects of nine hepatotoxic agents. *Acta Pharmacol Toxicol* 1978; 43: 211-218.
- 19) Sato A, Nakajima T, Koyama Y. Effects of chronic ethanol consumption on hepatic metabolism of aromatic and chlorinated hydrocarbons in rats. *Br J Ind Med* 1980; 37: 382-386.
- 20) Sato A, Nakajima T, Koyama Y. Dose-related effects of a single dose of ethanol on the metabolism in rat liver of some aromatic and chlorinated hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 60: 8-15.
- 21) Sato A, Nakajima T, Koyama Y. Interaction between ethanol and carbohydrate on the metabolism in rat liver of aromatic and chlorinated hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 68: 242-249.

著者への通信先: 小山 裕, 〒390 松本市旭3丁目1-1 信州大学医学部衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1, Asahi, Matsumoto, Nagano, 390 Japan (Y. Koyama)