ラット肝臓の脂質と薬物代謝におよぼす ジブチルヒドロキシトルエンの影響

(昭和 47 年 10 月 2 日受理)

有 吉 敏 彦^{*1} 高 畠 英 伍^{*1,*2}

Effect of Dibutylhydroxytoluene on the Lipid and Drug Metabolism of Rat Liver

Toshihiko ARIYOSHI and Eigo TAKABATAKE

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki)

Effect of short term administration of dibutylhydroxytoluene (BHT) on lipids and drug metabolizing enzyme system of liver in female rats were investigated.

1) BHT administration caused liver enlargement and the increase of cholesterol in microsomes and mitochondria, and that of phospholipid in microsomes, but no change in serum cholesterol, liver glycogen and triglyceride contents.

2) BHT administration did not change the percentage composition of phospholipids. However, BHT administration increased the percentage of stearic acid in mitochondria phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl choline fractions, while it decreased that of unsaturated fatty acid such as arachidonic acid.

3) The activity of aminopyrine demethylase, the contents of cytochrome P-450 and b_5 , and the spectral difference of aniline binding increased significantly by the BHT administration.

(Received October 2, 1972)

緒 言

脂溶性の高い化合物は、肝臓ミクロゾームに局在する薬物代謝酵素で、水にとけやすい極性の高い化合物に変化され排泄される。この酵素の機能はミクロゾームの脂質と密接なつながりをもつことが最近種々の面から論ぜられている¹⁻⁶⁾。またこの酵素の活性は生理的要因や、種々の化合物の投与で容易に変動することもよく知られている^{7,8)}。現代の生活においては種々の医薬品、食品添加物、香粧品等を、量は少なくともたえず摂取する機会が多い。このことは病気の治療あるいは予防のために服用される医薬品の薬効、毒性に薬物代謝を介して重要な変化を与える可能性を示唆している。

食品添加物として多くの食品の酸化防止剤として使用されているジブチルヒドロキシトルエン (BHT と略記する) も脂溶性が高く、薬物代謝酵素を誘導することが

知られているが、今回著者らは脂質代謝への影響と関連づけてその効果を検討した。

実験方法

1. 動物: 実験前1週間あらかじめクレア固形飼料と水で飼育し、発育順調なことを確かめた体重 85 ± 10 g Wistar 系雌性ラットを1群12匹ずつ使用した。

2. 試料ならびに投与方法: BHT は $200 \text{ mg}/5 \text{ ml}/\text{kg}$ になるように 0.2% トラガントゴム溶液に懸濁させ、5日間経口的に投与した。対照としては 0.2% トラガントゴム溶液を同量投与した。

3. 試薬: nicotinamide-adenine dinucleotide (reduced form, NADH), nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP), glucose 6-phosphate (G 6 P), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G 6 PDH) はベーリンガー社製のものを使用した。

4. 肝臓組織成分ならびに薬物代謝酵素活性の測定法: BHT を5日間経口投与し、最後の投与から24時間

*1 長崎大学薬学部: 長崎市文教町 1-14

*2 現住所、国立公衆衛生院: 東京都港区白金台4-6-1

Chart 1. Preparation of microsomes and mitochondria

後に断頭して屠殺し、肝臓の一部をただちにグリコーゲン⁹⁾ およびトリグリセリド¹⁰⁾ 分析の試料とし、残部は3倍量の0.25 M ショ糖溶液(0.001 M EDTA 含有)とともにテフロンホモジナイザーでホモジナイズし、Chart 1で示すような方法でミトコンドリア(Mt と略記する)およびミクロゾーム(Mc と略記する)を調製した。

Mt, Mc の総脂質はクロロホルム: メタノール(2:1, v/v)で抽出し、Folch 法¹¹⁾に従って精製した。リン脂質はケイ酸カラムクロマトグラフィー¹²⁾および薄層クロマトグラフィー¹³⁾で分離精製し、各分画のリン¹⁴⁾を測定した。また各分画の構成脂肪酸は Stoffel らの方法¹⁵⁾でメチル化し、5% DEGS-1% H_3PO_4 (Chromosorb-W, 60~80 mesh)を用い島津 GC-1C 装置で分析した。

酵素活性の測定にあたってはさきの分離法で調製したMcを、pH 7.4 KCl-tris 緩衝液でけん濁し、Lowryらの方法¹⁶⁾でタンパク量を測定し、4.5 mg/mlになるように調製し酵素液とした。薬物の代謝能はアミノピリン(AM と略記する)の脱メチル化¹⁷⁾とアニリン(AN と略記する)の水酸化¹⁸⁾について、37°, 10分間空気相中で incubate して測定した。incubation mixture の組成は、酵素液 1 ml, G 6 P 5 mM (最終濃度, 以下同様), NADP 0.5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, G 6 PDH 1.75 units, tris-HCl 緩衝液(pH 7.4) 50 mM, 基質は AM 2 mM, AN 1 mM で全量 3 ml とした。チトクローム P-450, b_5 含量は大村らの方法¹⁹⁾、基質と P-450 の結合差スペクトルは Schenkman らの方法²⁰⁾に従い島津マルチパーパス自己分光光度計を用いて測定した。

実験結果

1. ラットの体重、肝臓重量、肝臓グリコーゲン、Mc タンパク量におよぼす BHT の効果: BHT の5日間連続投与期間中体重の増加は対照と差がない。しかし肝臓重量は増加し、体重 100 g 当りの肝臓重量は対照の113%であった。

また Mc タンパク量は 肝臓 1 g 当りでも、体重 100 g 当りでも増加したが、肝臓グリコーゲン量は差がなかった (Table 1)。

2. 脂質におよぼす BHT の効果: Table 1 に示すように BHT 処置は肝臓トリグリセリド、血清コレステロール量には影響を与えない。しかし Mc, Mt のコレステロールを増加させ、また Mc のリン脂質量も増加させた。しかし Mc の総リン脂質の増加はあっても、Table 2 に示すように構成リン脂質の比率は変えない。Mt リン脂質においてもその構成比率は変えない。

リン脂質のホスファチジルコリン(PC と略記する)画分の脂肪酸は、Mc ではパルミチン酸の割合が減少し、Mt ではステアリン酸の割合が増加し、またパルミチン酸も増加の傾向があるが、不飽和脂肪酸のアラキドン酸の割合が減少する。一方ホスファチジルエタノールアミン(PE と略記する)画分でも同様な傾向が観察されたが、とくに Mt での不飽和脂肪酸の割合の減少が著しい (Table 3)。

3. 薬物代謝酵素、チトクローム P-450, b_5 含量および基質結合差スペクトルにおよぼす BHT の効果: AM 脱メチル酵素および AN 水酸化酵素の活性は、Mc タンパク当りでそれぞれ43%, 10%の増加、チトクローム

Table 1. Effect of Dibutylhydroxytoluene on Body Weight, Liver Weight, Glycogen, Microsomal Protein, and Lipids in Female Rats

		Control	BHT
Number of rat		12	12
Body weight	1st day (g)	93 ± 2	94 ± 2
	6th day (g)	115 ± 2	113 ± 2
Liver weight	(g)	5.71 ± 0.13	6.31 ± 0.16
	(g/100 g b. w.)	4.97 ± 0.09	5.60 ± 0.10**
Microsomal protein (mg/g liver)		13.0 ± 0.36	15.3 ± 0.22**
	(mg/100 g b. w.)	64.7 ± 2.24	87.0 ± 1.49**
Glycogen	(mg/g liver)	59.8 ± 2.44	55.2 ± 2.24
Triglyceride	(mg/g liver)	4.60 ± 0.30	4.61 ± 0.32
Cholesterol serum (mg/100 ml)		81.4 ± 5.19	86.4 ± 3.48
	microsome (μg/g liver)	193.4 ± 12.69	248.4 ± 18.00*
	mitochondria (μg/g liver)	237.0 ± 26.70	343.3 ± 41.78*
Phospholipid phosphorus (μg/g liver)			
	microsome	244.1 ± 4.61	276.5 ± 9.54*
	mitochondria	178.9 ± 6.16	185.1 ± 9.03

Note: Rats were given single daily oral administration of 200 mg/kg of BHT for 5 days and sacrificed 24 hours after the last administration. All values are mean ± standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 2. Effect of Dibutylhydroxytoluene on Composition of Hepatic Phospholipids

Fraction	Control		BHT	
	phosphorus μg/g liver	%	phosphorus μg/g liver	%
Microsome				
Phosphatidyl ethanolamine	59.2 ± 4.35	24.3	66.5 ± 2.95	24.0
Sphingomyelin	9.1 ± 1.06	3.7	11.4 ± 0.35	4.1
Phosphatidyl choline	164.5 ± 8.90	67.4	189.2 ± 11.35	68.2
Phosphatidyl inositol	11.3 ± 0.52	4.6	10.3 ± 2.05	3.7
Mitochondria				
Phosphatidyl ethanolamine	46.7 ± 3.05	26.1	48.0 ± 5.35	26.0
Sphingomyelin	16.6 ± 1.58	9.3	21.6 ± 2.70	11.6
Phosphatidyl choline	97.2 ± 0.85	54.3	100.0 ± 1.60	54.0
Phosphatidyl inositol	18.4 ± 2.27	10.3	15.5 ± 1.35	8.4

Note: All values are mean ± standard error.

P-450, b_5 含量は27%, 17%の増加であるが, 肝臓 1g 当り, 100 g 体重当りでは BHT の処置は, 酵素活性, チトクローム含量を著しく増加させた。一方基質結合差スペクトルでは AN は増加するが, ヘキサバルビタールでは変化がない (Table 4).

考 察

BHT のヒト 1 日摂取許容量 (条件付) は 0.5~2.0 mg/kg とされているので, 安全率を考慮して 100 倍量

の 200 mg/kg をラット投与量とした。BHT の肝臓重量や薬物代謝に対する影響についてはすでに, Gilbert ら²¹⁾, 高仲ら²²⁾, Botham ら²³⁾ の報告があるが, 脂溶性の高い BHT の脂質に対する詳しい報告は少ない。Gilbert²¹⁾ によると雌ラットに BHT 500 mg/kg/日 の連続投与で, 2 日後体脂肪中に BHT が 265 ppm 蓄積する。投与を続けると 100 ppm に低下するが, 脂肪構成成分に対する影響については報告していない。著者らは 200 mg/

Table 3. Effect of Dibutylhydroxytoluene on Fatty Acid Composition of Hepatic Phospholipids

(A) Phosphatidyl ethanolamine

Fatty acids	Microsome		Mitochondria	
	Control	BHT	Control	BHT
16:0	20.0±0.63	18.1±1.69	22.7±0.82	24.3±0.45
16:1	0.6±0.10	0.6±0.09	0.7±0.14	0.6±0.12
18:0	32.6±1.01	32.8±1.07	37.6±1.59	46.2±0.52**
18:1	7.5±0.12	6.7±0.19	13.0±0.66	13.3±0.24
18:2	8.1±0.32	6.7±0.47*	5.6±0.26	4.2±0.38
20:4	20.6±0.99	23.1±2.16	14.2±1.48	7.8±0.20**
()***	1.1±0.30	1.1±0.27	1.8±0.40	1.8±0.17
22:6	9.4±0.68	10.8±0.27	4.7±1.19	1.6±0.36*
unsaturated fatty acids	47.4±1.70	49.1±2.71	39.7±2.33	29.5±0.45**

(B) Phosphatidyl choline

Fatty acids	Microsome		Mitochondria	
	Control	BHT	Control	BHT
14:0	0.2±0.05	0.2±0.06	0.3±0.06	0.2±0.04
16:0	20.0±0.65	17.8±0.26*	22.8±1.70	25.4±0.67
16:1	0.8±0.08	0.7±0.10	0.5±0.18	1.0±0.14
18:0	27.7±0.23	27.5±1.51	30.8±0.67	37.4±0.93**
18:1	8.5±0.19	8.9±0.29	11.1±0.90	13.2±0.73
18:2	12.9±0.34	13.3±0.58	11.7±0.27	10.6±1.02
20:4	22.6±0.85	23.6±0.66	16.1±2.42	8.2±0.61*
()***	1.2±0.10	1.6±0.12	2.0±0.35	1.8±0.25
22:6	6.0±0.23	6.4±0.40	4.6±1.00	2.2±0.36
unsaturated fatty acids	52.1±0.86	54.5±0.75	46.1±2.65	37.0±1.57*

Note: All values are mean ± standard error, and expressed as percentage of total fatty acids detected. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** unidentified.

kg/日, 5日間の投与で肝臓トリグリセリド, 血清コレステロール含量には変化を認めなかったが, Mc, Mt コレステロールは増加を示し, Mc リン脂質, Mc タンパク含量の増加とともに肝臓重量の増加を認めた. Gilbert²¹⁾の実験と今回の実験では, 投与量は異なるが肝臓重量増加の程度はほぼ一致している. 一方 Mc リン脂質の増加は総体的なリン脂質の増加であって, その構成比は変わっていない. これは代表的な酵素誘導剤のフェノバルビタール処置とよく似た結果で, エタノールやエチオニン処置後のように PE 画分のみが増加し, Mc リン脂質の構成比が変わること⁶⁾ではなく, BHT 処置でリン脂質の合成促進²⁴⁾か, 分解抑制²⁵⁾の総合的な現われと考えられる. 構成脂肪酸は Mc では PE, PC とも差がないが, Mt では総体的に不飽和脂肪酸の減少が著しい. このことと BHT の酸化防止の効果との間に関係が

あるか否かさらに検討する必要がある.

Gilbert ら²¹⁾の実験では薬物代謝酵素活性の増加は 24 時間で始まり, 3 日後最高に達しさらに投与を続けても活性は変化しないが, 肝臓重量の増加は 75 mg/kg 以上の投与で認められている. 高仲ら²²⁾は低用量 (50 mg/kg) の BHT 投与で, 肝臓重量の増加はなくとも薬物代謝酵素活性の増加を認めているなど, 必ずしも肝臓重量と薬物代謝酵素活性の間には相関関係があるとはいえない. 今回の実験では肝臓重量は対照より 13% 増加を示したが, Mc 電子伝達系成分の一つであり異物酸化の中心的役割を演ずる P-450 含量は Mc タンパク mg 当りで 27% 増加し, 肝臓 g 当りでは約 50%, 体重 100 g 当りでは約 70% の増加となっている. 一方薬物代謝酵素の活性は Mc タンパク当りで AM 脱メチル酵素活性は増加したが, AN 水酸化酵素活性は有意差を認めなかつ

Table 4. Effect of Dibutylhydroxytoluene (BHT) on the Cytochrome and Drug Metabolizing Enzyme Activities

		Control	BHT
Cytochrome P-450	(absorbance/mg protein)	0.062±0.002	0.079± 0.003**
	(absorbance/g liver)	0.797±0.014	1.205± 0.041**
	(absorbance/100 g b. w.)	3.969±0.142	6.790± 0.218**
b ₅	(absorbance/mg protein)	0.090±0.002	0.106± 0.003**
	(absorbance/g liver)	1.166±0.036	1.617± 0.059**
	(absorbance/100 g b. w.)	5.806±0.241	9.101± 0.242**
Enzyme activity			
Aminopyrine	(mμ moles/mg protein/min)	3.92 ±0.35	5.62 ± 0.34**
	activity/P-450		
Demethylase	(mμ moles/absorbance/min)	6.39 ±0.61	7.20 ± 0.58
	(mμ moles/g liver/min)	50.18 ±5.48	85.87 ± 4.38**
	(mμ moles/100 g b. w./min)	256.31 ±30.60	486.41 ±33.87**
Aniline	(mμ moles/mg protein/min)	0.56 ±0.01	0.62 ± 0.04
	activity/P-450		
Hydroxylase	(mμ moles/absorbance/min)	0.91 ±0.05	0.79 ± 0.07
	(mμ moles/g liver/min)	7.27 ±0.49	9.40 ± 0.61*
	(mμ moles/100 g b. w./min)	36.18 ±2.61	53.39 ± 4.70*
Spectral change			
Aniline	(absorbance/mg protein)	0.018±0.0004	0.022±0.0008*
	spectral change/P-450	0.291±0.012	0.274±0.013
	(absorbance/g liver)	0.233±0.011	0.329±0.009**
	(absorbance/100 g b. w.)	1.158±0.062	1.859±0.070**
Hexobarbital	(absorbance/mg protein)	0.008±0.001	0.009±0.001
	spectral change/P-450	0.132±0.011	0.107±0.010
	(absorbance/g liver)	0.105±0.008	0.130±0.015
	(absorbance/100 g b. w.)	0.527±0.048	0.734±0.080

Note: Condition the same as described in Table 1. All values are mean ± standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

た。これを P-450 当りで換算すると AM 脱メチル酵素活性は変化なく、AN 水酸化酵素活性は有意差はないがむしろ低下している。しかし肝臓 g 当り、さらに 100 g 体重当りに換算すると、いずれも BHT 投与群で対照群より高く、その割合は P-450 量の増加とほぼ平行している。P-450 と基質結合差スペクトルにおいてもほぼ同様な関係が認められた。Lane ら²⁶⁾は BHT 処置後電子顕微鏡による観察で、Mc の滑面小胞体の増殖を認め、また Botham ら²⁸⁾はこの滑面小胞体の増殖と AM 脱メチル酵素活性との間に密接な関係を認めている。著者らの今回の実験においては、酵素活性や結合差スペクトルの変化は、P-450 含量の増加に基づくと考えられる。

最近 BHT の 0.04~0.2 g/kg の投与で、マウスの肺に組織学的に著しい影響を与えることが報告された²⁷⁾。肺組織はとくに脂質に富む組織であるので興味ある報告

と考える。食品添加物は少量ずつ毎日連続して摂取されるから、脂溶性の高い化合物の場合はいかに低用量といえども、生体に何らかの影響がある場合は十分注意する必要があると思われる。

要 約

BHT 200 mg/kg/日、5日間 Wistar 系雌性ラットに経口投与し、脂質および薬物代謝酵素系に対する影響を検討しつぎの結果をえた。1) BHT 処置は肝臓重量、Mc, Mt のコレステロール含量および Mc リン脂質量を増加させたが、血清コレステロール、肝臓グリコーゲン、肝臓トリグリセリド量には影響がなかった。2) Mc リン脂質量は増加させたが、その構成リン脂質の比率は変えなかった。しかし Mt 中の不飽和脂肪酸の割合を減少させた。3) AM 脱メチル活性、チトクローム P-450, b₅ 含量ならびに AN との結合差スペクトルを有意

に増加させた。

終りに臨み実験の一部を担当された猿渡咲子嬢に感謝致します。

本研究の概要は昭和47年4月の日本薬学会第92年会で発表した。

文 献

- 1) Lu, A. Y. H., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* **243**, 1331 (1968).
- 2) Strobel, H. W., Lu, A. Y. H., Heidema, J., Coon, M. J.: *ibid.* **245**, 4851 (1970).
- 3) Shoeman, D. W., Chaplin, M. D., Mannering, G. J.: *Mol. Pharmacol.* **5**, 412 (1969).
- 4) Chaplin, M. D., Mannering, G. J.: *ibid.* **6**, 631 (1970).
- 5) Leibman, K. C., Estabrook, R. W.: *ibid.* **7**, 26 (1971).
- 6) 有吉敏彦, 高島英伍: “第3回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム” 塚元久雄編, p. 261 (1972), 南山堂.
- 7) Conney, A. H.: *Pharmacol. Rev.* **19**, 317 (1967).
- 8) Parke, D. V.: “The Biochemistry of Foreign Compounds”, p. 99 (1968), Pergamon Press.
- 9) Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., Muntwyler, E.: *Arch. Biochem. Biophys.* **25**, 191 (1950).
- 10) Butler, W. M. Jr., Maling, H. M., Horning, M. G., Brodie, B. B.: *J. Lipid Res.* **2**, 95 (1961).
- 11) Folch, J. F., Lee, M., Sloane-Stanley, G. H.: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
- 12) Hanahan, D. J., Dittmer, J. G., Warashina, E. A.: *J. Biol. Chem.* **228**, 685 (1957).
- 13) Skipski, V. P., Peterson, R. F., Barclay, M.: *Biochem. J.* **90**, 374 (1964).
- 14) Fiske, C. H., Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).
- 15) Stoffel, W., Chu, F., Ahrens, E. H.: *Anal. Chem.* **31**, 307 (1959).
- 16) Lowry, O. H., Reserough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 17) Nash, T.: *Biochem. J.* **55**, 416 (1953).
- 18) Imai, Y., Sato, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 80 (1966).
- 19) Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
- 20) Schenkman, J. H., Remmer, H., Estabrook, R. W.: *Mol. Pharmacol.* **3**, 113 (1967).
- 21) Gilbert, D., Golberg, L.: *Food Cosmet. Toxicol.* **3**, 417 (1965), *ibid.* **5**, 481 (1967).
- 22) 高仲 正, 加藤隆一, 大森義仁: *食衛誌*. **10**, 260 (1969).
- 23) Botham, C. M., Conning, D. M., Hayes, Jo, Litchfield, M. H., Mcelligott, T. F.: *Food Cosmet. Toxicol.* **8**, 1 (1970).
- 24) Orrenius, S.: *J. Cell Biol.* **26**, 725 (1965).
- 25) Holtzman, J. L., Gillette, J. R.: *J. Biol. Chem.* **243**, 3020 (1968).
- 26) Lane, B. P., Lieber, C. S.: *Lab. Invest.* **16**, 342 (1967).
- 27) Marino, A. A., Mitchell, J. T.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **140**, 122 (1972).