DL-乳酸の急性摂取マウスにおける肝臓毒性誘導

北條康司,* 松井佳代, 渡利裕美子, 川添禎浩, 水谷民雄
京都府立大学人間環境学部 食保健学科食品安全性学研究室

Hepatotoxicity Induction in Mice after Acute DL-Lactic Acid Intake

Yasuji HOJO,* Kayo MATSUI, Yumiko WATARI, Sadahiro KAWAZOE, and Tamio MIZUTANI
Department of Food Sciences and Nutritional Health, Kyoto Prefectural University,
Shimogamo, Kyoto 606-8522, Japan

(Received August 23, 1999; Accepted December 3, 1999)

DL-Lactic acid and its salts are added to food as acidulants, pH control agents, leavening agents, nutrient supplements and seasonings. However, the basic data concerning the safety and toxicity of these compounds are insufficient. In this article, we examined induction of hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice after acute intake of DL-lactic acid. Body weight change, serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) activity, serum urea nitrogen (SUN) concentration, liver and kidney weights, and renal lipid peroxide level could not be affected significantly in mice at 4 h after intraperitoneal administration of DL-lactic acid at 1.2 mmol/kg, indicating no induction of toxicity in the liver and kidney. In contrast, at 20 h after the treatment, SGPT activity, liver weight and lipid peroxide level were enhanced significantly, suggesting induction of hepatotoxicity. However, SUN concentration, kidney weight and lipid peroxide level could not be affected significantly at 20 h after the treatment, indicating no induction of nephrotoxicity.

Key words—DL-lactic acid; hepatotoxicity; SGPT; liver weight; liver TBARS; mouse

緒 言

乳酸及び乳酸塩は、食品添加物として酸味料、pH調整剤、膨張剤、栄養強化剤、調味料などに使用され、^{1,2)} 熱傷や腎臓障害の治療にも用いられてきた。³⁾ Cisplatinを含有する乳酸 microsphere (CDDP-MS) がガン治療に使用されている。⁴⁾ しかし、これら乳酸及び乳酸塩の安全性・毒性に関する研究は十分ではない。薬物代謝による血液中の乳酸蓄積から生ずる acidosis (いわゆる lactic acidosis) が知られており、^{5,6)} また、乳酸が背髄症 (myelopathy)・脊髄壊死をひきおこし、⁷⁾ 血栓症、⁸⁾ 脳症 (encephalopathy) や panic 反応、さらに、致死性の神経性心臓拍動異常⁹⁾ をもたらすことが報告されている。培養神経細胞への毒性も知られている。⁹⁾ 本研究では、まだ知られていない肝臓腎臓への急性影響について、DL-乳酸のマウス腹腔内投与により検討したので報告する。

実 験 の 部

実験動物 体重 29—31 g の ddY 系雄性マウス (船橋農場, 千葉) を使用した。餌 (マウス・ラット用固形飼料 F-2, 船橋農場) 及び水 (イオン交換樹脂と蒸留により精製した水) を自由摂取させ、日照サイクル 12 時間、温度 23±1℃、湿度 50±10% で飼育した。1 週間の予備飼育後、実験に用いた。統計学

的解析を目的とした実験に使用した動物数は、各群共、6 匹であった。

動物実験 DL-乳酸は、ナカライテスク (京都) 製特級品を使用した。本試薬の成分測定値は、メーカーによると、D 体:L 体=1:1 (ラセミ体)、総乳酸 90.8%、重金属 5 ppm 以下 (鉛として)、シアン 2 ppm 以下、アセトアルデヒド基準以下などである。本試薬は、発酵法によって製造されており、化学的製造法で使用する有害なアセトアルデヒドやシアンなどは原料として使用されてないため、これらは夾雑物としては含まれないと推定される。DL-乳酸を 0.25 M acetate buffer (pH 7.0) に溶かし、マウス 1 kg 当たり 1.2 mmol (溶液量 10 ml) をマウス腹腔内に投与した。コントロールとして acetate buffer を同様にして投与した。屠殺 5 分前に sodium pentobarbital 注射液 (大日本製薬) の腹腔内投与 (100 mg/kg) により麻酔し、心臓からの採血により屠殺し、肝臓及び腎臓を摘出した。

血清 Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT) 活性測定 血液を、室温で 30 分間静置後、遠心分離 (3000 rpm, 30 分) し、得られた上清をさらに遠心分離 (1500 rpm, 10 分) し、その上清を血清試料とした。SGPT 活性を、血清 GPT 測定試薬 (GPT-UV テストワコー, 和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した。

血清尿素窒素 (SUN) 濃度測定 SUN 濃度を血

清尿素窒素測定試薬（尿素窒素 B テストワコー，和光純薬工業，大阪）を用いて測定した。

還元型 Glutathione (GSH) 濃度測定 肝臓及び腎臓中の GSH 濃度を *o*-phthalaldehyde を用いた蛍光法で測定した。¹⁰⁾

過酸化脂質濃度測定 肝臓及び腎臓中の過酸化脂質濃度を，TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 値として測定し，nmol MDA/g 組織重量の単位で表した。¹¹⁾ ここで MDA は malondialdehyde を表す。

統計学的解析 実験成績は，平均値±標準偏差として表された。DL-乳酸投与群とコントロール群の平均値の間の有意差検定には Student's unpaired *t*-test を用いた。危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意とした。

結果と考察

DL-乳酸による *in vivo* 肝臓腎臓毒性誘導の可能性を検討した。マウスへの経口投与による LD₅₀ 値は 54.1 mmol/kg¹²⁾ であるが，本研究では，これの 2.2% に相当する低い投与量 (1.2 mmol/kg) の DL-乳酸をマウス腹腔内に投与した。

Table 1 は，投与 4 時間後の毒性関連データを示す。コントロール群とくらべ，全身毒性の指標である体重変化率（投与直前の体重に対する屠殺直前の体重の比率），肝臓毒性の指標とされる相対的肝臓重量及び SGPT 活性，¹³⁾ 腎臓毒性の指標とされる相対的腎臓重量及び SUN 濃度¹⁴⁾ は有意に変化せず，毒性の発現は見られなかった。酸化的障害の指標である GSH 及び過酸化脂質の臓器中濃度の内，肝臓過酸化脂質濃度のみが増加し，肝臓での酸化的変化の可能性を示唆する。GSH と過酸化脂質の臓器中濃度変化のこのような違いの原因として，酸化的攻撃に対する脂質の感受性が GSH より高かった可能性も考えられるが，今後の研究課題である。

Table 2 は，投与 20 時間後の毒性関連データを示す。コントロール群とくらべ，体重変化率や腎臓毒

性関係の指標には有意な変化が見られなかったが，SGPT 活性，肝臓での相対的臓器重量，過酸化脂質濃度は，いずれも有意に上昇したことから肝臓毒性の誘導が示唆された。投与 4 時間後に現われた過酸化脂質濃度増加すなわち酸化的損傷が時間経過と共に進行した結果として 20 時間後に肝臓毒性が誘導されたと推定される。また，体重変化率の低下が見られないので，全身毒性は誘導されていないことが示唆される。

熱傷や腎臓障害に対する DL-乳酸溶液の体内注入による治療において生ずる脳症，panic 反応，神経性心臓拍動異常は L-乳酸では起こらず D-乳酸によって起こることが報告されている。³⁾ また，既に，世界保健機関 (WHO) は，DL-乳酸及びその塩の食品への使用に関連して，L-乳酸及びその塩は食品に使用されているが，DL-乳酸も D-乳酸も生後 3 カ月未満の乳児用食品に使用すべきでないと述べている。¹⁵⁾ L-乳酸と異なり，D-乳酸は，生体中に本来存在しない異物であるから，毒性発現の可能性を否定できない。これらのことから，本研究で示された DL-乳酸による肝臓障害において，D-乳酸の関与の可能性も考えられる。

以上の結果，DL-乳酸が *in vivo* で肝臓毒性を誘導する可能性が初めて見い出された。本研究で使った乳酸の品質が実験結果に影響を与えている可能性は不明である。ただし，乳酸に関する日本の食品添加物規格¹⁾ では L-乳酸と D-乳酸の含有比率は定められていないが光学異性を示す名称が付けられていないことから常識的にはラセミ混合物と考えられる。純度は 40% 以上と定められているが，乳酸以外の成分についての規格は定められていない。したがって，我々の使用した DL-乳酸の品質は，ラセミ混合物という点で食品添加物規格と同じであり，乳酸純度はむしろ我々の方がはるかに高い (90.8%)。乳酸以外の含有成分の毒性への関与については不明であるが，それを知るためには，今後，これらの成分の解明が必要である。今後，種々の実験条件（異

Table 1. Toxicity Data in Mice at 4 h after Intraperitoneal Administration of 1.2 mmol DL-Lactic Acid/kg

Toxicity item	Control	DL-Lactic acid
Body weight change (%) ^{a)}	99.1 ± 2.0	100.4 ± 1.2
Liver weight (% of body weight)	4.36 ± 0.58	4.23 ± 0.42
Kidney weight (% of body weight)	1.28 ± 0.09	1.27 ± 0.15
SGPT (Karmen unit/ml)	23.0 ± 5.8	25.6 ± 9.1
SUN (mg %)	28.6 ± 4.3	25.2 ± 7.2
GSH (μmol/g liver)	1.86 ± 0.19	1.82 ± 0.15
GSH (μmol/g kidney)	0.23 ± 0.07	0.28 ± 0.04
TBARS (nmol MDA/g liver)	194.9 ± 41.8	466.6 ± 101.0 ^{b)}
TBARS (nmol MDA/g kidney)	151.7 ± 46.2	152.5 ± 32.8

Values are means ± S.D. of 6 mice. a) Percentage of body weight immediately before sacrificing to body weight immediately before administration. b) Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table 2. Toxicity Data in Mice at 20 h after Intraperitoneal Administration of 1.2 mmol DL-Lactic Acid/kg

Toxicity item	Control	DL-Lactic acid
Body weight change (%) ^{a)}	98.8 ± 1.6	98.2 ± 0.8
Liver weight (% of body weight)	4.22 ± 0.51	4.94 ± 0.20 ^{b)}
Kidney weight (% of body weight)	1.25 ± 0.11	1.26 ± 0.14
SGPT (Karmen unit/ml)	24.1 ± 10.6	75.4 ± 15.1 ^{b)}
SUN (mg %)	24.4 ± 5.9	18.5 ± 11.1
GSH (μmol/g liver)	1.91 ± 0.25	2.66 ± 0.92
GSH (μmol/g kidney)	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.05
TBARS (nmol MDA/g liver)	188.9 ± 44.5	392.2 ± 87.5 ^{b)}
TBARS (nmol MDA/g kidney)	110.7 ± 17.1	116.9 ± 28.6

Values are means ± S.D. of 6 mice. a) Percentage of body weight immediately before sacrificing to body weight immediately before administration. b) Significantly different from control ($p < 0.05$).

なるメーカーの乳酸，曝露量，曝露時間，曝露経路など）の下で毒性誘導を詳細に検討し，L-乳酸及びD-乳酸の関与も含め，反応メカニズムについても解明する必要がある。

REFERENCES

- 1) "Commentary of the Japanese Standards for Food Additives. Fifth Edition," supervised by Ishidate M., Tanimura A., Hirokawa Publishing Co., Tokyo, 1987.
- 2) Food Hygienic Society of Japan, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **40**, J112-J167 (1999).
- 3) Chan L., Slater J., Hasbargen J., Herndon D. N., Veech R. L., Wolf S., *Integr. Physiol. Behav. Sci.*, **29**, 383-394 (1994).
- 4) Hagiwara A., Takahashi T., Sasabe T., Ito M., Lee M., Sakakura C., Shobayashi S., Muranishi S., Tashima S., *Anticancer Drugs*, **3**, 237-244 (1992).
- 5) Bennett W. M., "Comprehensive Toxicology," Vol. 7, ed. by Goldstein R. S., Elsevier Science Ltd., Oxford, 1997, pp. 1-19.
- 6) Siemes H., Nau H., Schultze K., Wittfoht W., Drews E., Penzien J., Seidel U., *Epilepsia*, **34**, 332-346 (1993).
- 7) Balentine J. D., Greene W. B., *Acta Neuropathol.*, **73**, 233-239 (1987).
- 8) Ramos K. S., Chacon E., Acosta D., Jr., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 487-527.
- 9) Brewer G. J., *Neurobiol. Aging*, **19**, 561-568 (1998).
- 10) Hissin P. J., Hilf R., *Anal. Biochem.*, **74**, 214-226 (1976).
- 11) Masugi F., Nakamura T., *Vitamins (Japan)*, **51**, 21-29 (1977).
- 12) "WHO Food Additives Series. No. 5," World Health Organization, Geneva, 1974.
- 13) Moslen M. T., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 403-416.
- 14) Goldstein R. S., Schnellmann R. G., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 417-442.
- 15) "WHO Technical Report Series. No. 557," World Health Organization, Geneva, 1974.