フタル酸ジ-*n*-ブチルのマウス体内分布と代謝ならびに核酸、蛋白質との相互作用¹⁾

岡田昌二, 為政 脩

静岡薬科大学²⁾Distribution and Metabolism of Di-(*n*-butyl)-phthalate in Mice and Its Interaction with Nucleic Acids and Proteins¹⁾

SHOJI OKADA and OSAMU TAMEMASA

Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received February 20, 1978)

¹⁴C-labeled dibutyl phthalate (DBP), one of the most widely utilized plasticizers, when administered orally to mice at a dose of 0.94 μ Ci/25 μ g/mouse, was rapidly metabolized and excreted. The total radioactivity remaining 8 hr after the administration in 10 kinds of the organs or tissues examined was not more than 1% of the administered activity. One hour after the administration, the highest radioactivity per organ and per wet weight of tissue was detected in the liver (2.25% of the administered) and the kidney (100 dpm/mg wet tissue), respectively. In these two organs, ¹⁴C-DBP was metabolized to ¹⁴C-mono-butyl phthalate (MBP) and ¹⁴C-phthalic acid, and the former was the major metabolite. Although DBP and MBP interacted with DNA *in vitro*, no radioactivity was recovered from the DNA of ¹⁴C-DBP-treated cells of mouse liver, possibly because ¹⁴C-DBP and its metabolites were hardly transported into the nuclei.

Keywords—phthalic acid esters; di-(*n*-butyl)-phthalate, distribution and metabolism of; mono-(*n*-butyl)-phthalate; phthalic acid; interaction with DNA, RNA and proteins

プラスチック可塑剤として繁用されているフタル酸エステル類 (PAE) は哺乳動物に対する急性毒性が低く,^{3,4)} かつ速かに排泄される⁴⁾ ために安全な物質と考えられてきたが, プラスチック製品の広範囲にわたる利用に伴って人体内に摂取される量も増加しており, 長期にわたる体内摂取による遺伝的影響, 発癌の可能性あるいは胎児催奇型性等について問題が提起されてきている。⁴⁻⁶⁾

PAE の生体内代謝に関しては, PAE の中でもっとも使用量の多い di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) についてこれまで多く研究されており,^{4,6-8)} 体内で mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) 等に変化して速かに排泄されるとされている。一方, DEHP に次いで使用量の多い di-(*n*-butyl)-phthalate (DBP) については同様な推定がなされているものの, 報告は少ない。⁹⁾

本研究では, この DBP の ¹⁴C-標識体についてマウスに経口投与した場合の体内分布と代謝を明らかにすると

1) 一部は日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月。

2) Location: 2-2-1 Oshika, Shizuoka, 422, Japan.

3) F.A. Patty, "Industrial Hygiene and Toxicology," Vol. II, Interscience Publishers, New York, 1967, pp. 1904-1906.

4) J. Autian, "Environmental Health Perspectives," No. 4, ed. by U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1973, pp. 3-26; L. Fishbein, P.W. Albro, *J. Chromatogr.*, **70**, 365 (1972).

5) H.J. Hugos, *FDA By-Lines*, **3**, 81 (1972).

6) R.K. Bower, S. Haberman, P.D. Minton, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **171**, 314 (1970); A.R. Singh, W.H. Laurence, J. Autian, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 51 (1972); Y. Yagi, K. Tutikawa, N. Shimoi, *Teratology*, **14**, 259 (1976).

7) P.W. Albro, R. Thomas, L. Fishbein, *J. Chromatogr.*, **76**, 321 (1973); P.W. Albro, R.O. Thomas, *Biochem. Biophys. Acta*, **306**, 380 (1973).

8) J.W. Daniel, H. Bratt, *Toxicology*, **2**, 51 (1974); D.T. Williams, B.J. Blanchfield, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 371 (1974); A. Tanaka, T. Adachi, T. Takahashi, T. Yamaha, *Toxicology*, **4**, 253 (1975).

9) D.T. Williams, B.J. Blanchfield, *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 854 (1975).

ともに、遺伝的影響、発癌性、催奇型性等に関与すると考えられるデオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA) および蛋白質との相互作用を検討した。その結果、DBP あるいはその代謝産物は速かに排泄されるが、投与 1 時間後に一時的に ^{14}C -放射活性が他の臓器に比較して多く検出された肝および腎において、DBP は mono-(*n*-butyl)-phthalate (MBP) およびフタル酸 (PA) に代謝されていることを見出した。一方、DBP, MBP, PA のうち、DBP および MBP は *in vitro* で DNA と相互作用を示したが、マウス肝の細胞レベルでは DNA との結合は認められなかった。

実験の部

Di-(*n*-butyl)-phthalate-7- ^{14}C (^{14}C -DBP) の合成 無水フタル酸-7- ^{14}C (New England Nuclear 製品, (10.5 mCi/mmol) 240 μCi (3.39 mg) に *n*-BuOH 5 ml および カートルエンズルホン酸 5 mg を加え、 110° , 8 時間還流後反応液を 0.4 M K_2CO_3 10 ml で 2 回、ついで H_2O 10 ml で 1 回洗浄し、*n*-BuOH を減圧留去した。得られた反応生成物を 5%-hydrated Florisil (Floridin Co., 100—200 メッシュ) のカラム (8×375 mm, あらかじめ *n*-hexane 100 ml で洗浄) にのせ、*n*-hexane 50 ml にひきつづき 15% ether-*n*-hexane 100 ml で溶出した。

Fig. 1. Chromatographic Separation of ^{14}C -DBP

Column: 5% hydrated Florisil, 100—200 mesh, 8×375 mm.
Fraction: 5 ml.
 ^{14}C -DBP was obtained from the shaded portion.

溶出液を 5 ml ずつ分取し、それぞれの放射活性をトルエンシンチレーター溶液¹⁰⁾を用いて液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-602) で測定した。その結果、生成 ^{14}C -DBP は鋭い 1 ピークとなって現れたので (Fig. 1). 該当フラクション (No. 17—20) を集め、フード内で溶媒を自然蒸発させて ^{14}C -DBP を得た。 ^{14}C -DBP の確認は薄層クロマトグラフィー (TLC) およびラジオガスクロマトグラフィー (Aloka, RGC-212) によって行い、それぞれ非放射性既知試料の場所に 1 スポットあるいは 1 ピークを得た。放射化学的収量 215 μCi (収率 89.6%), 化学的収量 5.7 mg (収率 89.5%), 比放射能 10.5 mCi/mmol.

Mono-(*n*-butyl)-phthalate-7- ^{14}C (^{14}C -MBP) の調製 ^{14}C -標識無水フタル酸と *n*-BuOH との反応によって得る常法は微量の合成には不适当なので、 ^{14}C -DBP の部分加水分解によって調製した。すなわち、 ^{14}C -DBP 5 μCi (0.13 mg) に 1 N NaOH 100 ml を加え、 37° , 1 時間振とうし、1 N HCl で pH 3 にした後反応生成物を ether 100 ml で 4 回抽出した。ether 層を Na_2SO_4 で脱水後減圧濃縮し、濃縮液をシリカゲル薄層 (Merck, Kieselguhr F-254, 20×20 cm) に線状にスポットして benzene-dioxane-AcOH (90:25:4) で 4° , 2 時間展開した。この TLC 上の ^{14}C -MBP スポット ($R_f=0.56$) をオートラジオグラフィーで検出し、これをかきとって ether で抽出し、減圧乾燥して ^{14}C -MBP を得た。放射化学的収量 1.06 μCi (収率 21.2%)。

Phthalic acid-7- ^{14}C (^{14}C -PA) の調製 無水フタル酸-7- ^{14}C に H_2O を加えて ^{14}C -PA 水溶液とした。

^{14}C -DBP のマウスへの投与と体内分布の測定 ^{14}C -DBP を 0.5% カルボキシメチルセルロース (Merck) に 100 $\mu\text{g/ml}$ (3.76 $\mu\text{Ci/ml}$) の濃度に懸濁させ、あらかじめ 24 時間絶食させた ddY 系マウス (♂, 25 ± 1 g) に 0.25 ml (0.94 $\mu\text{Ci}/25 \mu\text{g}/\text{mouse}$) ずつ胃ゾンデを用いて投与した。投与後 1, 2, 4, 8, 24 時間目にそれぞれのマウスを殺して肝、腎、脾、肺、横隔膜、睪丸、脳、脂肪体および血液¹¹⁾ をとり出した。各組織 50 mg に Soluene 350 (Packard Instrument Co.) 1 ml を加え、 50° に加温して組織を溶解させ、さらに AcOH で中和した後、トルエンシンチレーター溶液 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-602) で放射活性を測定した。

肝および腎組織からの ^{14}C -DBP 代謝物の抽出と同定 凍結乾燥した肝または腎組織の一定量に少量の ether を加え、テフロンホモジナイザー中で磨砕した後、加えた ether とともに Soxhlet 抽出器 (東洋汙紙 No. 84 円筒汙紙を使用) に移して Chart 1 に示す抽出操作を行った。

10) 2,5-Diphenyloxazole (DPO) 4 g および 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene (POPOP) 0.1 g を toluene 1 l に溶解したもの。

11) 血液は眼窩静脈より採取し、直ちに血液凝固阻止剤 (シュウ酸アンモニウム 1.2 g およびシュウ酸カリウム 0.8 g を水 100 ml に溶解) を血液 9 容に対して 1 容加え、その 50 mg を液体シンチレーション用バイアル中に秤取し、 H_2O_2 水 2—3 滴を加えて加温脱色後さらに加温して H_2O_2 を除いた。

Chart 1. Extraction and Separation of ^{14}C -DBP and Its Metabolites

代謝物の同定は、シリカゲル薄層 (Merck, Kieselguhr F-254) で benzene-dioxane-AcOH (90:25:4), 95% EtOH-25% アンモニア水 (100:16) または *n*-BuOH-AcOH- H_2O (4:1:2) を用いて二次元 TLC を行い、オートラジオグラフィーによって放射性スポットの位置を確認し、標準試料と比較して行った。さらに、この放射性スポットをかきとって代謝物を抽出し、これに非放射性標準試料を加えて再結晶を行い、再結晶の前後における比放射能が変化しないことを確かめて同定を確実にした。

代謝物の β -グルクロニダーゼおよびアリルスルファターゼ処理 ether 不溶物中のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体を処理するために、ether 抽出残渣約 100 mg に β -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼ混合物 (カタツムリ, Boehringer Mannheim GmbH, β -グルクロニダーゼ活性 5.2 U/ml, アリルスルファターゼ活性 2.6 U/ml) を 0.2 ml 加え、20 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)-0.001 M EDTA¹²⁾ 中で 37°, 1 時間振うとし、遊離した代謝物を ether および H_2O で抽出した。

DNA, RNA および蛋白質との結合の測定 DNA (コウシン 胸腺, Sigma, Type I, "highly polymerized"), RNA (ラット肝から熱フェノール・SDS¹³⁾ 法で抽出¹³⁾), アルブミン (人血清, Nutritional Biochem. Corp.) およびヒストン (本研究室五島廉輔氏より分与された Ehrlich 腹水癌細胞からの標本) の存在による DBP あるいはその代謝物の水溶性の変化を測定することによって結合度を推定した。¹⁴⁾ すなわち、内径約 3 mm, 長さ約 120 mm (内容量約 0.85 cm^3) のよく洗浄した肉厚ガラス管の一端をやや引きのばして封じ、この中に ^{14}C -DBP, ^{14}C -MBP あるいは ^{14}C -PA の ether 溶液一定量をマイクロピペットで入れ、37° に加温して ether を完全に除いた後、DNA 等の溶液 (0.01 M NaCl-0.01 M Tris¹²⁾-HCl, pH 7.4) 0.1 ml を加えて封管し、37° で 20 時間横位置で振とうした。これを 3000 rpm, 5 分間遠心して ^{14}C -DBP 等の不溶分を細くなっている側の底部に集め、上部を開管して上清 0.05 ml をとり、セロソルブシンチレーター溶液¹⁵⁾ を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。この放射活性値を 0.01 M NaCl-0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) のみを加えた対照実験における値と比較して ^{14}C -DBP 等の溶解度の増加分を算出した。

マウス肝細胞からの DNA の抽出 ^{14}C -DBP を与えたマウス (ddY, ♂, 25±1 g) 肝細胞からの DNA の抽出は、まず核を分離し、¹⁶⁾ この分離核から DNA を抽出する方法¹⁷⁾ によった。すなわち、 Ca^{2+} を含まない Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (Ca^{2+} -free KRP)¹⁸⁾ で灌流、洗浄後ステンレスふるい (60 メッシュ) を通した肝

12) EDTA—ethylenediamine tetraacetic acid, SDS—sodium dodecylsulfate, Tris—tris-(hydroxymethyl)-aminomethane.

13) C.M. Mauritzen, Y.C. Choi, H. Busch, "Methods in Cancer Research," Vol. 6, ed. by H. Busch, Academic Press, New York, 1971, pp. 253—282; S. Okada, H. Busch, *Cancer Res.*, 32 1737 (1972).

14) E. Boyland, B. Green, *Brit. J. Cancer*, 16, 507 (1962); *Idem*, *Biochem. J.*, 87, 14p (1963); E. Boyland, *Brit. Med. Bull.*, 20, 121 (1964).

15) DPO 5 g, POPOP 0.5 g および naphthalene 80 g を methylcellosolve 428 ml, dioxane 428 ml および toluene 140 ml に溶解したもの。

16) 村松正実, "生化学実験講座, 2 巻, 核酸の化学 I," 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1975, pp. 76—77.

17) J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 280. (1961); 村松正実, "生化学実験講座, 2 巻, 核酸の化学 I," 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1975, pp. 78—80.

18) 0.122 M NaCl-0.013 M KCl-0.65 mM MgSO_4 -0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.2.

組織の Ca^{2+} -free KRP 浮游液 (2 g/5 ml) に ^{14}C -DBP 1 μCi を加えて 37° , 1 時間振とうし, Ca^{2+} -free KRP で十分洗浄して得た肝組織から下記のように DNA を抽出した。

まず, この肝組織に 2 倍量の 2 M sucrose-3.3 mM CaCl_2 を加えてテフロンホモジナイザーで処理し, ガーゼろ過して得た細胞に 2 M sucrose-3.3 mM CaCl_2 30 ml を加え, 4° で $6000\times g$, 1 時間遠心して核ペレットを得た。次いでこの核ペレットを 0.15 M NaCl-0.015 M クエン酸緩衝液 (pH 8.5) (SSC) 少量に懸濁させ, 0.1 M EDTA-2% SDS-SSC 6 ml を加えて 60° , 5 分間振とうし, さらに 2 M NaClO_4 6 ml および CHCl_3 -isoamyl-alcohol (25:1) 12 ml を加えて $7000\times g$, 5 分間遠心して得た水層に 2 倍量の EtOH を加えて DNA を沈殿させた。この DNA の SSC 溶液をリボヌクレアーゼ A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および T_1 (20 U/ml) で処理して混在 RNA を除き, さらに CHCl_3 -isoamyl alcohol による抽出をくり返して精製 DNA を得た。この DNA 中の ^{14}C -DBP 由来の放射活性は, 試料に Soluene 350 を加えて加温溶解後セロソルブシンチレーター溶液を加えて液体シンチレーター・シンカウンターで測定した。

結 果

^{14}C -DBP に由来する放射活性のマウス体内分布

^{14}C -DBP の経口投与 (0.94 $\mu\text{Ci}/25 \mu\text{g}$ DBP/mouse) による ^{14}C -放射活性のマウス体内分布とその時間経過に

Fig. 2. ^{14}C -Distribution in the Organs and Tissues of ^{14}C -DBP-Administered Mice

^{14}C -DBP, emulsified in 0.5% carboxymethylcellulose solution, was orally administered to mice (ddY, δ , 25 ± 1 g, 3 mice/group) at a dose of 0.94 $\mu\text{Ci}/25 \mu\text{g}$ /mouse. The radioactivity distributed in the organs or tissues, i.e., liver, kidney, spleen, pancreas, lung, brain, testicle, diaphragm, epididymal adipose and blood, was determined in a liquid scintillation spectrometer with an aid of Soluene 350. The data shown are mean values obtained with 3 samples. Because of very low radioactivity in spleen, pancreas, brain, testicle and diaphragm, these data are not shown.

(A): expressed as percentage of ^{14}C -radioactivity administered/organ or tissue.

(B): expressed as ^{14}C dpm/mg wet tissue.

×... total radioactivity distributed in 10 kinds of organs or tissues tested. ○— liver, ●— kidney, △— blood, ▲— lung, ■— epididymal adipose.

る変化を Fig. 2. に示す。Fig. 2(A) にみられるように, 投与 1 時間後に肝, 腎, 血液, 肺, 脂肪体, 脾, 膵, 睪丸, 横隔膜および脳中に残存した ^{14}C -放射活性の合計値は投与量の 5.7% に過ぎず, しかもその後の時間経過とともに急激に減少して, 投与 8 時間後には 0.9% となった。この放射活性を各臓器, 組織について比較すると肝にもっとも高く, 腎, 血液がこれに次いだ。又, 脾, 膵, 睪丸, 横隔膜および脳中の分布はきわめて少なく, ほとんど検出できなかった。

一方, 各臓器, 組織の単位湿重量当りの放射活性は, Fig. 2 (B) に示すように腎にもっとも高く, 脂肪体, 血液および肝がこれに次いだ。なお, 脾, 膵, 睪丸, 横隔膜および脳中の比放射活性はいずれも図示困難な程度に低かった。

肝および腎組織中の DBP 代謝生成物

臓器全体の放射活性あるいは単位湿重量当りの比放射活性がもっとも高かった肝および腎組織 (Fig. 2) について, 投与 1 時間後における ^{14}C -DBP からの代謝生成物をしらべた。

Table I に示すように, 両組織とも ^{14}C -放射活性の 56—59% は直接 ether で抽出可能な形で存在していた (Fraction [I])。さらに, 二次元 TLC によって分離した後, 各スポットの放射活性を測定した結果, Table II に示すように, Fraction [I] の放射活性の大部分は ^{14}C -MBP によるものであった。このことはこの画分に非放射性 MBP を加えて再結晶したとき, 再結晶の前後で比放射能がほとんど変化しないことから確かめられた (Table III)。

Ether 抽出残渣については, 肝, 腎とも β -グルクロニダーゼおよびアシルスルファターゼ処理後の水溶性画分にもっとも高い放射活性が認められた。この放射活性のほとんどは透析によって外液に検出され (Table I), TLC (Table II) および再結晶法 (Table III) によって大部分が ^{14}C -PA によるものであることが示された。

以上の結果から, 経口投与時に DBP は速かに代謝され,

TABLE I. ^{14}C -Radioactivity Fractionated from Liver and Kidney of ^{14}C -DBP-Administered Mice^{a)}

Fraction	% radioactivity of organ	
	Liver	Kidney
Extracted with ether		
[I] extract	58.7	56.8
[II] residue	34.1	36.1
Fraction[II], digested with β -glucuronidase and arylsulfatase		
[IIA] ether extract	1.6	9.6
[IIB] H_2O -extract	29.0	25.7
[IIC] residue	6.4	0.9
Fraction[IIB], dialyzed		
[IIBd] dialyzable	27.1	23.9
[IIBn] non-dialyzable	1.0	0.7

a) Mice (ddY, δ , 25 ± 1 g) were orally given with ^{14}C -DBP at a dose of $0.94 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{g}/\text{mouse}$ and maintained for 1 hr.

TABLE II. Contents of ^{14}C -Labeled DBP, MBP and PA in the Fractions Obtained from Liver and Kidney of ^{14}C -DBP-Administered Mice

Fraction ^{a)}	Solvent system for 2 dimension TLC ^{b)}		% radioactivity of organ					
	1 st	2 nd	Liver			Kidney		
			DBP	MBP	PA	DBP	MBP	PA
[I] ^{c)}	A	B	1.8	50.0	2.6	1.9	50.4	2.0
[IIA]	A	B	0.0	0.3	1.1	0.1	7.9	0.8
[IIBd] ^{c)}	A	C	0.2	0.1	25.4	0.6	0.6	22.3
Total			2.0	50.4	29.1	2.6	58.9	25.1

a) The same fraction as shown in Table I.

b) Plate: Merck Kieselguhr F-254 solvent: A—95% EtOH-NH₄OH (100: 16), B—benzene-dioxane-AcOH (90: 25: 4), C—*n*-BuOH-AcOH-H₂O (4: 1: 2).

c) MBP and/or PA contents in the fraction[I] and [IIBd] were also determined by the recrystallization method (Table III).

TABLE III. Contents of MBP or PA in the Ether-Soluble and Water-Soluble Fractions Determined by the Recrystallization Method

Fraction ^{a)}	Tissue	Recryst. with ^{b)}	Specific radioactivity (dpm/mg)		Content of MBP or PA [$\frac{(B)}{(A)} \times 100(\%)$]
			Before recryst. (A)	After recryst. (B)	
[I]	Liver	MBP	9592	9423	MBP 98.2
	Kidney	MBP	12370	12050	MBP 97.4
[IIBd]	Liver	MBP	6007	230	MBP 3.8
		PA	8763	7832	PA 89.4
	Kidney	MBP	4050	233	MBP 5.8
		PA	6492	6266	PA 96.5

a) The same fraction as shown in Table I and II.

b) Solvent for the recrystallization: MBP—*n*-hexane-benzene (3: 1), PA—H₂O.

TABLE IV. Solubility of DBP, MBP and PA in Bio-Macromolecule Solution

Solution ^{a)}	Solubility at 37° (mg/100 ml) ^{b)}		
	DBP	MBP	PA
Control	1.3±0.1	306±15	6863±142
DNA	5.2±0.8 ^{c)}	415±26 ^{c)}	7081±160
RNA	1.1±0.1	376±9 ^{c)}	6873±173
Albumin	2.9±0.3 ^{c)}	289±24	6909±114
Histone	2.8±0.3 ^{c)}	287±25	7164±243

a) In 0.01 M NaCl-0.01 M Tris-HCl, pH 7.4.

b) Mean±S.E. (n=3).

c) Significant ($p<0.01$).

投与 1 時間後には肝および腎には DBP 自身はほとんど存在せず、50—60% が MBP に、25—30% が PA に変化していることが明らかになった (Table II).

DBP, MBP および PA の核酸ならびに蛋白質との相互作用

Fig. 2 および Table I—III に示したように、マウスに経口投与された DBP は速かに MBP と PA とに代謝されるとともに排泄されるが、一方では多量に与えた場合の胎児催奇型性あるいは変異原性も指摘されており、^{4,6)} 従ってたとえ少量であっても核酸あるいは蛋白質と結合した場合に問題がおり得ると考えられる。そこでこれら生体高分子と DBP, MBP および PA との結合をまず *in vitro* での溶解度法¹⁴⁾ によって測定した。すなわち、¹⁴C-標識 DBP, MBP または PA の中性水溶液 (0.01 M NaCl-0.01 M Tris-HCl, pH 7.4) における溶解度がコウシ胸腺 DNA, ラット肝 RNA, 人血清アルブミンあるいは Ehrlich 腹水癌細胞ヒストンの存在 (3 mg/ml) で増大するかどうかをしらべた。

その結果、Table IV に示すように、DNA は DBP および MBP の水に対する溶解度を明らかに増加させた。とくに MBP の溶解度は対照実験 (306±15 mg/100 ml) に比べて約 100 mg/100 ml の増加を示し (415±26 mg/100 ml), DNA との間にながりの相互作用をおこすことが推定された。MBP は DBP と異なり、RNA 溶液中でも明らかな溶解度の増大 (約 70 mg/100 ml) がみられ、RNA との間にも相互作用が存在することが推測された。一方 DBP はアルブミンおよびヒストンの存在で溶解度がやや増大したが、MBP ではこのような現象はみられなかった。また、PA に関してはいずれの場合も明らかな溶解度変化はみられなかった。なお、予備実験において、pH 6.5—8.0 の間での DBP, MBP および PA の水に対する溶解度の有意義はみられなかったため、上記の溶解度変化は明らかに DNA 等の存在によるものである。

DBP および MBP が *in vitro* で DNA と相互作用を示すことから、次に細胞レベルでの DNA との結合をしらべた。マウス肝細胞 2 g (湿重量) に ¹⁴C-DBP 1 μ Ci を加えて 5 ml の Ca²⁺-free KRP 中で 37°, 1 時間振とうしたものから DNA を抽出し、その放射活性を対照実験 (¹⁴C-DBP を加えずに肝細胞を同様に保温振とうした後 ¹⁴C-DBP 1 μ Ci を加え、直ちに氷冷洗浄して DNA を抽出) の値と比較した。その結果、DNA 中には放射活性は全く認められなかった。

考 察

PAE の中でもっとも多用されている DEHP は、ラットへの経口投与時にまず酢リパーゼによる加水分解を受けて mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) となり、さらに ω 酸化および ω -1 酸化を受けて PA にまで分解され、いずれも速かに排泄されることが知られている。⁷⁾ 本研究において DBP のマウスへの経口投与 1 時間後にすでに肝および腎から DBP に代って MBP と PA が多量に検出された (Table II, III) ことは、DBP についても DEHP と同様な代謝経路が存在することを示唆している。両組織において、MBP および PA として得られた放射活性値は組織内全放射活性の 50—60% (MBP) および 25—30% (PA) に相当し、両者の合計は 80—84% に達した (Table II)。実験操作上の多少の損失によって回収率は 100% に満たないと予想されるので、MBP と PA 以外の安定な代謝生成物はほとんど存在しないものと考えられる。

MBP の大部分は遊離の状態が存在するが、腎組織中では一部、すなわち組織内全放射活性の 7.9% に相当す

る部分が β -グルクロニダーゼ・アリスルファターゼ処理によってはじめて ether 可溶性になることから (Table II), この分はグルクロン酸もしくは硫酸抱合体として存在していたと考えられる。一方, 肝ではこのような MBP の抱合体がほとんど検出されず (Table II), したがって肝で生成した抱合体が直ちに排泄されるものと考えられる。

DBP および MBP は DNA の存在で水溶性が増加し (Table IV), DNA との相互作用が *in vitro* ではおこると推定されたが, ^{14}C -DBP を与えたマウス肝細胞から抽出した DNA には放射活性が検出されなかった。この場合, DBP の少なくとも一部は細胞内で MBP に変化していると考えられ,¹⁹⁾ *in vitro* で DNA との相互作用は DBP よりも MBP の方が大きい (Table IV) にもかかわらず, *in vivo* で結合がみられなかったことについて次の二つの説明が可能である。すなわち, 第一は *in vitro* でみられた相互作用は, DBP, MBP および DNA の化学構造から考えて, 共有結合, イオン結合等の強い結合によるものではなく, おそらく “stacking” による弱いのもであり, したがって細胞内で DNA と相互作用をしても抽出時に遊離する場合である。第二は DBP あるいは MBP が膜系などの脂質に対して親和性が高いために核内の DNA にまで到達し得ない場合である。この二つの可能性のいずれが高いかを本実験から明確にすることは困難であるが, DEHP の場合はウシ心筋においてミトコンドリアに局在すると報告されており,²⁰⁾ DBP についても第二の可能性の方が高いものと推測される。一方, DBP および DEHP は 1 mm 以下の低濃度でラット肝ミトコンドリアの呼吸阻害をおこすことが知られており,²¹⁾ したがって以上の結果から, DBP は DNA の変化あるいはその遺伝情報発現における変化をおこすよりは, むしろ呼吸阻害などミトコンドリアにおける障害をおこす可能性の方が高いものと考えられる。

謝辞 Ehrlich 腹水癌細胞ヒストンを分与下さった本研究室 五島廉輔氏ならびに実験の一部に協力いただいた本研究室 手塚雅勝, 藤田佳子, 加藤久長, 加藤葉子の諸氏に感謝する。

- 19) 予備実験において, polychlorobiphenyl (PCB) 処理後に得たマウス肝細胞 9000×g 上清に NADPH 産生系を加えた “S-9Mix” 中で ^{14}C -DBP を 37°, 1 時間インキュベートすると大部分が ^{14}C -MBP に変化していた。
- 20) D.J. Nair, A.P. Alcaraz, B.A. Bierl, M. Beroza, P.P. Nair, *Biochemistry*, **10**, 4228 (1971); D.J. Nair, M. Beroza, P.P. Nair, “Environmental Health Perspectives,” No. 3, ed. by U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1973, pp. 141–148.
- 21) T. Ohyama, *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**, 153 (1976); T. Takahashi, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 19 (1977).