

塩化ベンゼンの生体膜に対する作用

第 II 報

分離正常ラット肝ミトコンドリアにおける 各種濃度による塩化ベンゼンの K^+ 遊出作用

岡山大学医学部公衆衛生教室（指導：緒方正名教授）

森 孝 昭

（昭和56年3月26日受稿）

Key words: 塩化ベンゼン, ミトコンドリア
生体膜, K^+ 遊出

緒 言

塩化ベンゼン類は農薬, 溶剤, 熱媒体および化学薬品の原料¹⁾として用いられている。しかし産業衛生上, 肝, 腎障害, 皮膚粘膜刺激, 中枢抑制, 呼吸器障害があり²⁾, 強い毒性を示すので, 有害性が問題となり許容濃度も低い³⁾。

一方生体系に対する蓄積に関して, 環境庁の昭和54年度化学物質調査⁴⁾の結果では, 公害発生の恐れのある化学的物質の内49種類について調査し, 川底などの環境に蓄積されているのが見出され, その内の塩化ベンゼン類が, 水質, 底質および魚のいずれからも検出されたと報告している。塩化ベンゼン類は, 常温常圧では空気, 水分, 光により作用されず, 長時間煮沸しても分解しない。また, 通常温度では, 水蒸気, アルカリ, 塩酸, 稀硫酸とも反応しない⁵⁾。このように化学的に安定であるので, 難生分解性も予測され, 今後, 更に環境における蓄積が懸念される。

第1報⁶⁾において, 一塩化~四塩化ベンゼンの肝ミトコンドリアの機能障害について, 呼吸調節能(RCI)を用いて検討し, 低濃度において酸化的リン酸化反応を阻害する事を報告した。今回は, その作用機序を検討する目的で, 一塩化~四塩化ベンゼンの各種濃度におけるミトコンドリアの膜障害作用, 特に K^+ 遊出作用につい

て検討したので報告する。

材料および方法

1. 試料

モノクロルベンゼン (Mo CB), O-ジクロルベンゼン (O-DiCB), m-ジクロルベンゼン (m-DiCB), P-ジクロルベンゼン (P-DiCB), 1,2,3-トリクロルベンゼン (1,2,3-TriCB), 1,2,3,4-テトラクロルベンゼン (1,2,3,4-TetCB), 各クロルベンゼンは99%エタノールに溶解し0.05M濃度になるように調製した。

2. ミトコンドリアの分離

ドンリウ系ラット (体重約300g) の肝より Hogeboom-Schneider の変法により分画し実験に供した⁷⁾。

3. K^+ 遊出の測定

0.15M-Choline chloride, 10mM-Tris-HCl buffer (PH 7.5) の反応溶液中にミトコンドリアを懸濁させ, 試薬を添加後, 反応溶液中に遊出してくる K^+ を, カリウム電極 (Beckman社製) を用いて経時的に測定した。反応容量 3.0 ml, 反応温度25℃で行った。

実 験 結 果

1. 異性体間における K^+ 遊出作用の関係

〔図1〕は各種塩化ベンゼン0.28mM濃度

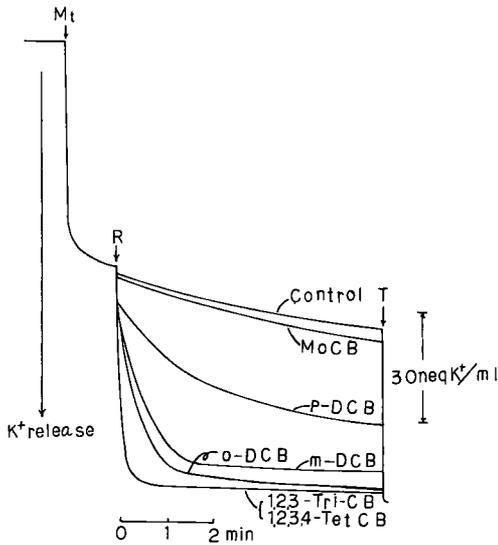


Fig. 1 Release of K^+ from rat liver mitochondria by treatment with chlorinated benzenes (final concentration 0.28mM). Experimental conditions are described in methods

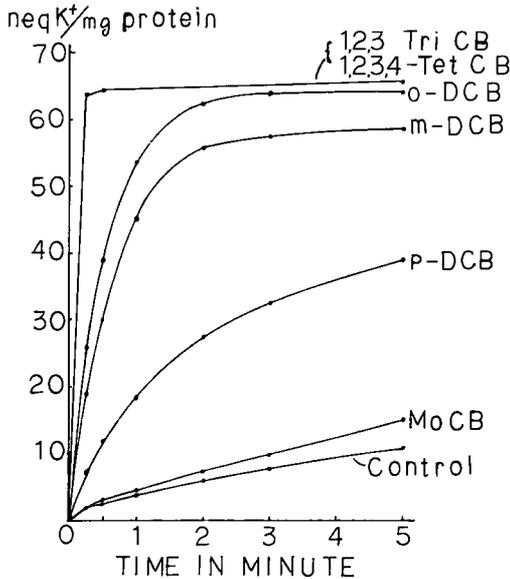


Fig. 2 Relationship between time and K^+ content from mitochondria with chlorinated benzenes (final concentration 0.28mM). Data are calculated from fig. 1

における K^+ 遊出の時間経過の実測図であり、〔図2〕は各種塩化ベンゼン（0.28mM終濃度）添加後の時間と蛋白1mgあたりの K^+ 遊出量に換算したチャートである。二塩化ベンゼンで異性体

間の K^+ 遊出作用を〔図1〕および〔図2〕より計算すると、0.28mM濃度において、0.5分時および5分時での K^+ 遊出量は、O-DiCBでは39 neq K^+ /mg protein, 64 neq K^+ /mg protein, m-DiCBでは30 neq K^+ /mg protein, 59 neq K^+ /mg protein, P-DiCBでは10 neq K^+ /mg protein, 39 neq K^+ /mg proteinであった。すなわち、 K^+ 遊出作用は $0 > m > P$ の順であった。なお蛋白1mgあたりの全 K^+ 量は70 neqであった。

2. 置換基塩素数と K^+ 遊出作用との関係

各塩化ベンゼンの構造上の問題を考慮して、二塩化ベンゼンはO-DiCB, 三塩化ベンゼンは1,2,3-Tri CB, 四塩化ベンゼンは1,2,3,4-Tet CBを用いて測定した。各塩化ベンゼンによるミトコンドリアよりの K^+ 遊出作用を、0.5分時および5分時と比較すると、〔図2〕で明らかのように、塩化ベンゼン0.28mM濃度において、MoCBでは3 neq K^+ /mg protein, 15 neq K^+ /mg protein, O-DiCBでは39 neq K^+ /mg protein, 64 neq K^+ /mg protein, 1,2,3-Tri CB 1,2,3,4-Tet CBでは65 neq K^+ /mg protein, 66 neq K^+ /mg proteinであった。更にO-DiCB, 1,2,3-Tri CB, 1,2,3,4-Tet CBの作用強度を明らかにするために、低濃度の0.085mM濃度での測定を行った。〔図3〕は塩化ベンゼン0.085mM濃度における K^+ 遊出の時間経過の実測図であり、〔図4〕は塩化ベンゼン（0.085mM終濃度）添加後の時間と蛋白1mgあたりの K^+ 遊出量との関係を示す。0.5分時および5分時と比較すると、〔図4〕で明らかのように、O-DiCBでは3 neq K^+ /mg protein, 11 neq K^+ /mg protein, 1,2,3-Tri CBでは11 neq K^+ /mg protein, 57 neq K^+ /mg protein, 1,2,3,4-Tet CBでは21 neq K^+ /mg protein, 59 neq K^+ /mg proteinであった。すなわち、置換基数に関して全体を通して見ると、塩素数が増大するに従い K^+ 遊出作用が増大する傾向にある。

3. 各塩化ベンゼンの濃度と K^+ 遊出作用との関係

〔図5〕は0.5分時における一塩化～四塩化ベンゼンの各種濃度と、 K^+ 遊出量との関係を示す。本図で明らかのように、MoCB, P-DiCB

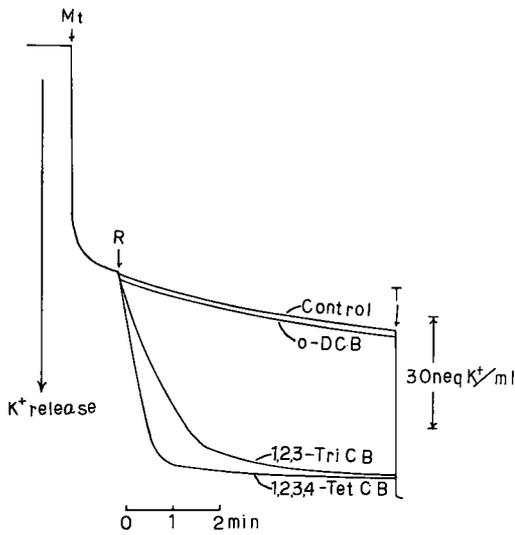


Fig. 3 Release of K^+ from rat liver mitochondria by treatment with chlorinated benzenes [final concentration 0.085 mM]. Experimental condition are described in methods

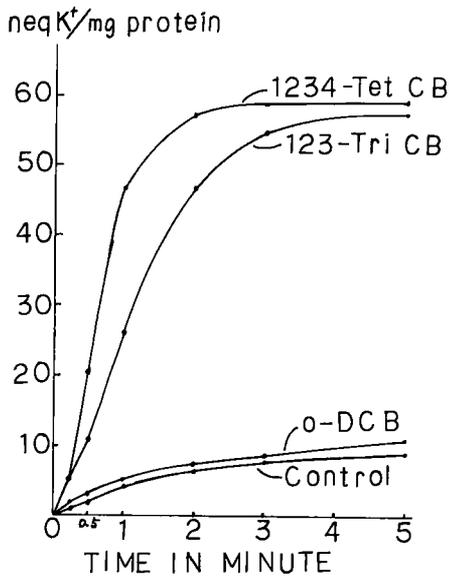


Fig. 4 Relationship between time and K^+ content from mitochondria with chlorinated benzenes [final concentration 0.085 mM]. Data are calculated from fig. 3

では、濃度の増加に対しては、それ程 K^+ 遊出量は増加しないが、*o*-DiCB, *m*-DiCB では 0.2m 濃度から K^+ 遊出が高くなり、1,2,3-Tri CB, 1,2,3,4-Tet CB では急激に K^+ 遊出か高

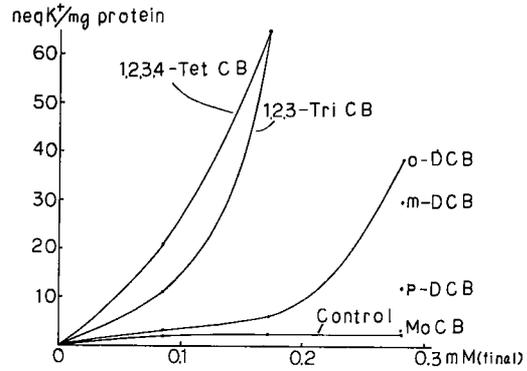


Fig. 5 K^+ content from rat liver mitochondria with chlorinated benzenes of various concentration at 0.5 minutes.

Data are calculated from fig 1 and 3

くなった。

考 察

第1報においては、塩化ベンゼンのミトコンドリアに及ぼす機能障害を、呼吸調節能 (RCI) を用いて、異性体との関係、置換基塩素数との関係、濃度との関係について報告した。その結果、塩化ベンゼンはミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役させた⁶⁾。本報においては、それ等の脱共役作用機序を検討する目的で、膜障害、特に K^+ 遊出作用について検討を行った。無傷のミトコンドリア膜には高濃度の K^+ を維持しており、 K^+ は膜の微小な変化に対しても速かに遊出してくる⁸⁾⁹⁾。異性体間においては、二塩化ベンゼンを例に、0.28mM 濃度で検討すると、第1報では、 $o > m > P$ の順に RCI 値が低下する事を報告したが、 K^+ 遊出作用は $o > m > P$ の順に大きく、したがって膜障害作用の強さもこの順になり、RCI 値低下との関係と一致する。置換基塩素数との関係においては、塩素数が増大するに従い RCI 値は値下したが、 K^+ 遊出作用においても、塩素数が増大するに従い K^+ 遊出量が増大し、膜障害作用が増大する事が認められ、RCI 値低下の傾向と一致する。なお、二塩化ベンゼンで明らかかなように、異性体間において作用強度の差異が認められるので、この件に関しては更に三塩化、四塩化ベンゼンの異

性体についても検討する必要がある。塩化ベンゼンの濃度との関係において、第1報でも、濃度が増加するに従いRCI値が低下し、特に1.2.3-Tri CB, 1.2.3.4-Tet CBでは急激なRCI値の低下の傾向を示す事を報告したが、K⁺遊出においても、塩化ベンゼンの濃度が増加するに従い、K⁺遊出量が増加し、特に1.2.3-Tri CB, 1.2.3.4-Tet CBでは急激な遊出量が認められ、膜障害作用が増大している事を示している。以上の事により、塩素を有するベンゼン化合物は、生体内の標的物質モデルとして、ミトコンドリアに作用する事が明らかであり、ミトコンドリアの機能障害の一因子として膜障害が推測される。

結 論

一塩化～四塩化ベンゼンの各種濃度における、

ミトコンドリア膜に対する作用、特にK⁺遊出作用について調べ、以下の成績を得た。

1. 異性体間において、二塩化ベンゼンの場合、 $0 > m > P$ の順にK⁺遊出作用が増大した。
2. 置換基塩素数が増大するに従い、K⁺遊出作用が増大した。
3. 各塩化ベンゼンとも、濃度が増加するに従い、K⁺遊出作用が増大した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導御校閲を賜った岡山大学医学部緒方正名教授に深甚の謝意を表します。又終始、御鞭撻をいただいた長谷川亨博士に心から感謝いたします。

文 献

1. 藤原元典, 渡辺巖一(編): 総合衛生公衆衛生学, . 南江堂, 東京, pp. 450~452, 1979.
2. Patty, F.A.: Industrial Hygiene and Toxicology. Interscience, New York, Vol II. pp.1333~1362, 1963.
3. 日本産業衛生学会: 許容濃度等の勧告(1977). 産業医学, 19, 160~162, 1977.
4. 環境庁環境保健部保健調査室: 化学物質と環境. 保健調査室レポートNo.6. pp.13~89, 1980.
5. 浅原照三 他(編): 溶剤ハンドブック. 講談社, 東京, pp.292~299, 1979.
6. 森 孝昭: ベンゼン塩素化合物の生体膜に対する作用. 第1報 分離正常ラット肝ミトコンドリアに於ける各化合物の各種濃度の酸化的リン酸化反応に対する影響. 岡山医学会雑誌, 投稿中.
7. Utsumi K: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P³² in mitochondrial pi fraction, *Acta Med. Okayama*, 17, 259~271, 1963.
8. Miyahara M and Utsumi K: Oxidative phosphorylation controlled by potassium in rat liver mitochondria. *Cell Struct Func* 1. 51~59, 1975.
9. 内海耕造, 長谷川亨, 緒方正名: 石油成分の生体エネルギー転換反応に対する作用. 医学と生物, 91, 13~18, 1975.

The effect of chlorinated mono aromatic hydrocarbons on biological membranes. (1. The effect of various concentrations of chlorinated mono aromatic hydrocarbons on the K^+ release of normal isolated rat liver mitochondria)

Takaaki MORI

Department of Public Health, Okayama University

Medical School, Okayama, Japan.

(Director: Prof. M. Ogata)

The effect of mono-, di-, tri- and tetra-chlorinated benzene on K^+ release from rat liver mitochondria was determined. The following results were obtained:

- 1) There were differences between the isomer of dichlorobenzenes on the K^+ release and increase in the K^+ release was in the order of ortho > meta > para dichlorobenzenes.
- 2) K^+ release increased with increase in the number of chlorine.
- 3) K^+ release increased with increase in the concentration of chlorinated benzene.