

岡山医学会雑誌

第94巻11,12合併号 (第1056,1057号)

昭和57年12月30日発行

塩化ベンゼンの生体膜に対する作用

第 III 報

生体内投与における 0-ジクロルベンゼンの ラット肝に対する作用

岡山大学医学部公衆衛生教定 (指導: 緒方正名教授)

森 孝 昭

(昭和57年6月1日受稿)

Key words : 0-ジクロルベンゼン, トリグリセライド,
脂質過酸化, ATP,
酸化的リン酸化

緒 言

クロルベンゼン類は農薬, 溶剤, 化学薬品の原料, 熱媒体¹⁾として多く用いられている。また, これ等の化合物は化学的に安定²⁾なものも多く, 難生分解が予想され環境中への蓄積が懸念される。筆者は第I報³⁾および第II等⁴⁾において, 試験管内におけるラット肝ミトコンドリアに対する作用について検討し報告した。これ等クロルベンゼン類の中で, 我が国の工業生産量⁵⁾の多いものの一つとして, 0-ジクロルベンゼンがある。このものは, 溶解性, 浸透性に富み, 蒸発速度がおそいので, ラッカーおよびワニスに添加したり, 金属, 皮革, 自動車, 航空機工業において脱脂剤として, またワックス, 樹脂の溶剤として用いられている。その他に冷却剤, 殺虫剤, 防腐剤, くん蒸剤, 染料および

医薬品の中間体として用いられている²⁾。この化合物は皮膚, 粘膜に対する刺激作用が強く, また, 吸入により, 中枢神経抑制作用, 呼吸困難等を生じせしめる¹⁾。したがって許容濃度も低く定められている⁶⁾。0-ジクロルベンゼンをラットに投与し, 投与した後のラット肝, 特に肝ミトコンドリアに対する影響について検討した。

実験方法

1. 生体内投与

生後9週, 195~215gのドンリウ系ラット雌6匹を一群とし, 0-ジクロルベンゼン(0-DCB)を経口投与した。投与方法は, 0-DCBをアラビアゴムで乳化し, 2.7mg/ml液に調製し飲料水として投与した。なおアラビアゴムの濃度は2.5%である。投与期間は60日及び120日とし, 他に

対照群としてそれぞれ数匹を実験に供した。対照群には2.5%アラビアゴム液を飲料水として与えた。飼育は空調のもと20~25°Cで行った。

2. ミトコンドリアの分離

Hogeboom, Schneider 変法⁷⁾によりラット肝より分画した。

3. 肝トリグリセライド値の測定

摘出した肝をホモジネートし、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、P-クロロフェノール発色法^{8,9)}で測定した。反応温度は37°C。JCA-VS-100・クリナライザー(日本電子)を用いて、肝1g中のトリグリセライドを測定した。

4. 肝 ATP 量の測定

渡辺ら¹⁰⁾の方法に準じて Luciferin Luciferase 法で測定した。すなわち、断頭後、肝小片を摘出し、冷生食液で洗い、重量を測定後5mlの煮沸蒸留水に投入、30秒間加熱し ATP ase 活性を失活させた。ATP aseによるATP分解の条件を一定にするために、断頭後煮沸水に投入するまでの時間を正確に2分間とした。煮沸後更に5mlの蒸留水を加えて、テフロンホモゲナイザーでホモネートし、水溶液中で10分間加熱して、ATPの抽出を行った。この抽出液を氷冷した後、適量の蒸留水で稀釈し、Luciferin Luciferase (Sigma Co)を加えて発生する蛍光を Luminesencer reader (Aloka)を用いて測定し、肝1g中のATP量を定量した。

5. TBA 値の測定

内山ら¹¹⁾の方法に準じて測定した。摘出した肝を冷1.15% KCl液で洗滌後、同液で10%ホモジネート液とし、その0.5mlに1%リン酸溶液3ml、0.6% TBA 試薬1mlを加えて45分間水浴中で煮沸する。冷後n-ブタノール4mlを加えて激しく振り、遠沈後n-ブタノール層を535nm及び520nmで吸光度を測定し、その差をTBA値とした。

6. 酸化的リン酸化反応

0.15 M-KCl 10mM-Tris HCl-Buffer (PH 7.5) Na-Pi-Buffer 2.5mMの反応液3.5ml中に、ミトコンドリア(Mt)を懸濁させ、呼吸基質としてNa-Succinate 5mM、リン酸化基質としてNa-ADP 0.3mMを加えて、反応温度25°Cにて経時的に反応液中の溶存酸素量を、ガルバニ

ー酸素電極を用いて測定した。呼吸調節能 (state 3/state 4) は萩原¹²⁾の方法で算出した。

結 果

1. 生育状態

a. 餌、水の摂取量について

〔表1〕は60日及び120日における投与群と対

表1. 0-DCB 経口投与による水、餌の摂取量及び肝重量の変化

		水摂取量	餌摂取量	肝重量
60日	対照群	142±4.7	52.5±8.5	24.73±2.09
	投与群	111±8.9 (78)	51.4±7.4 (98)	26.35±0.91 (107)
120日	対照群	138±8.9	49.2±7.3	25.57±0.28
	投与群	98±6.0 (71)	48.9±8.8 (99)	26.62±1.60 (104)

水摂取量: ml/日/kg 体重

餌摂取量: g/日/kg 体重

肝重量: g/kg 体重

(): 対照群に対する比率

照群の餌、水の摂取量(1kg体重/日)期間平均)及び、肝重量(g/kg体重)の比較である。餌の摂取量においては、各投与群とそれぞれの対照群との比較において、ほとんど差は認められなかった。60日と120日との比較においては、60日はラットの成長期であるためか、120日より摂取量がやや多かった。しかし120日の途中の60日までを60日のものと比較すると差は認めなかった(データ略)。水については、0-DCBを混入しているためか、対照群に比べて投与群は摂取量が少なかった。60日と120日の比較においては、餌の場合と同様に60日の場合がやや多かった。しかし120日の途中の60日まで60日のものと比較すると差は認めなかった。

b. 体重変化

〔図1〕は投与群と対照群との体重の変化を示したものである。週令は同じであるが、投与開始時のラットの体重にやや差が認められたので、便宜上、投与開始時の比率で示した。この図で明らかのように、体重の変化においてさほどの差は認められなかった。

2. 摘出肝の処見

色調においては投与群と対照群との間にはほ

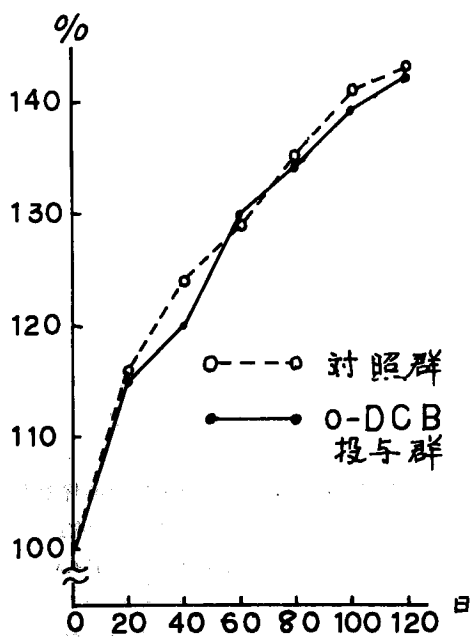


図1. 0-DCB 投与群及び対照群の体重変化

ほとんど差が認められなかった。検鏡下においては、組織的なものには差は認めなかったが、投与群において好中球の増加の傾向が認められた。

3. 摘出肝重量

〔表1〕で示されるように、肝重量は対照群に比べて、わずかながら増加の傾向を示したが有意差は無かった。

4. 肝トリグリセライド値

〔表2〕は60日,120日における、投与群と対

表2. 0-DCB 経口投与によるラット肝への作用

		TG	ATP	TBA
60日	対照群	21.7±4.6	0.610±0.089	0.093±0.024
	投与群	25.9±6.1 (119)	※1 0.395±0.062 (64)	0.093±0.012
120日	対照群	21.3±5.5	0.667±0.097	0.100±0.018
	投与群	27.2±6.6 (128)	※2 0.399±0.056 (60)	0.094±0.016

TG : mg/g 肝
 ATP : mg/g 肝
 TBA : 吸光度535nm-520nm
 () : 対照群に対する比率
 ※1 : t-Test P<0.05
 ※2 : t-Test P<0.01

表3. 0-DCB 各種濃度におけるラット肝 Mt への作用 (in vitro)

0-DCBmM 濃度	state 3	state 4	RCI
0	95.5	16.1	5.9
0.214	94.6	22.0	4.3
0.357	84.9	26.5	3.2
0.500	76.2	33.7	2.3

State 3 :
 State 4 : natoms O₂/min/mg protein

表4. 0-DCB 経口投与によるラット肝 Mt への作用

		State 3	state 4	RCI
60日	対照群	104.0±0.1	15.2±1.4	6.8±0.9
	投与群	82.5±21.6 (79.3)	18.4±3.9 (121.0)	†5.0±0.3 (73.5)
120日	対照群	104.9±3.2	17.7±3.5	6.0±1.2
	投与群	※79.1±12.4 (75.4)	23.0±6.2 (129.5)	※3.6±0.9 (60.0)

State 3 :
 State 4 : natoms O₂/min/mg protein

() : 対照群に対する比率
 ※ : t-Test P<0.05
 † : Welch test P<0.05

照群の肝1g中のトリグリセライド, ATPの量およびTBA値を示している。〔表2〕で明らかかなように、0-DCB投与群にトリグリセライド値が増加し、投与期間の長い程増加の傾向が認められたが、統計的有意差は無かった。

5. 肝ATP量

〔表2〕で明らかかなように、0-DCBの投与により、肝ATP量はそれぞれの対照群に対して、t検定において有意に低下した。60日投与群はP<0.05であり、120日投与群においてはP<0.01であった。

6. TBA値

〔表2〕で示されるように、o-DCB投与群と対照群との間には差は認められなかった。60日投与と120日投与との間にも差は認められなかった。

7. 酸化的リン酸化反応

a. 試験管内実験

〔表3〕は試験管内において分離正常ラット肝Mtに各種濃度のo-DCBを作用させた時の、Mtのstate3呼吸, state4呼吸およびRCI

値を示している。この表で明らかなように、state 3呼吸活性の抑制と state 4呼吸活性の増大により RCI 値が低下した。

b. o-DCB 生体内投与

〔表4〕は o-DCB 生体内投与におせる肝 Mt の State 3呼吸, State 4呼吸および RCI 値を示している。o-DCB 投与により state 3呼吸の活性は抑制され, state 4呼吸の活性が増大し, したがって RCI 値は低下した。この事は試験管内実験の結果と類似している。

c. 投与日数との関係

〔表4〕で明らかなように、日数が長くなれば state 3呼吸活性の抑制, state 4呼吸活性が増大し, したがって RCI 値が低下した。便宜上, 60日における投与群の RCI の平均値と, 対照群のそれとの差異を Welch 検定で比較すると統計的に有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。120日における投与群の State 3および RCI の平均値と, 対照群のそれとの t 検定において, 統計的に有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。

以上の事により, o-DCB の投与群において, 肝重量の増加, 肝 ATP 量の減少, トリグリセライド値の増加, State 3呼吸活性の抑制, State 4呼吸活性の増大, RCI 値の低下の成績が得られた。

総括ならびに考察

o-DCB 投与のラット肝の解剖所見においては, 対照群に比較してわずかな重量増加の傾向が認められる他は, 大きな変化は認められなかった。しかし, Mt の機能, 特に呼吸調節能において, 変化が大きく見られた。この事から o-DCB の作用部位の一つとして Mt が考えられる。この事は試験管内実験の結果と生体内投与の結果が相関している事からも推測される。肝 ATP 量は低下の傾向にあるが, これは Mt の機能が抑制され, ATP の合成が阻害されていると推測される。肝トリグリセライドについては, 増大の傾向を示すが, ばらつきが多いので現段階では統計的確認は得られない。TBA 反応においては, 対照群と o-DCB 投与群との間に, また, 投与期間においても差が認められなかった。したがって, 脂質過酸化への影響は少ないものと推測

されるが, 異なる条件による TBA 反応等について更に検討する必要がある。

結 論

ラットに o-DCB を60日および120日間経口投与し, 対照群との比較検討および投与日数との関係を検討し, 次のような成績を得た。

1. o-DCB 投与群の肝臓は, 対照群のそれと比較して, わずかながらの重量増加の傾向が認められた。
2. 肝トリグリセライド値は対照群のそれに比較してやや高く, また, 投与日数が長い程高い傾向を示した。
3. 肝 ATP 量について, o-DCB 投与群の平均値は, 対照群のそれと比較して, 統計的に有意 (60日の場合 $P < 0.05$, 120日の場合 $P < 0.01$) に低下した。
4. TBA 値は, o-DCB 投与群と対照群との比較, および投与日数との関係において, 特に差異は認められなかった。
5. 酸化的リン酸化反応においては, state 3呼吸を抑制し, state 4呼吸活性を増大させ, したがって RCI 値を低下させた。投与日数が長い程この傾向が強くなった。60日投与群では RCI 値が Welch 検定において, 120日投与群では state 3および RCI 値が t 検定において, 統計的に有意 ($P < 0.05$) に低下した。state 3呼吸の抑制, state 4呼吸の増大は試験管内実験の成績とほぼ同じ傾向を示した。

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。また, 終始御指導を賜った長谷川 亨博士ならびに組織検鏡に御助言を戴いた岡山赤十字病院検査部長国友忠義博士に心から感謝いたします。

文 献

1. Clayton, G.D.: *Patty's Industrial Hygiene and toxicology*. Interscience, New York, Vol IIB, pp.3603—3645, 1982.
2. 浅原照三, 他(編): 溶剤ハンドブック. 講談社, 東京, pp.292—299, 1979.
3. 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, **92**, 1085—1089, 1980.
4. 森 孝昭: 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. 岡山医学会雑誌, **93**, 537—541, 1981.
5. 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, 13—89, 1980.
6. 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.
7. Utsumi, K: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama* **17**, 259—271, 1963.
8. 仁科甫啓: 中性脂肪. 臨床検査, **22**, 1304—1313, 1978.
9. 福井 巖, 他: トリグリモライド. 日本臨床, **31**, 117—1973.
10. Ogata, M. and Watanabe, S.: Rapid determination of microquantity of ATP with Luciferin-Luciferase reaction and liquid scintillation counter. 医学と生物, **74**, 36—42, 1967.
11. Uchiyama, M. and Mihara, M.: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271—278, 1978.
12. Hagihara, B: Techniques of the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim, Biophys. Acta* **46**, 134—142, 1961.

**Effect of chlorinated monoaromatic hydrocarbons on biological
membranes (3. Effect of o-dichlorobenzene on rat liver.)**

Takaaki MORI

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama Japan

(Director: Prof. M. Ogata)

o-Dichlorobenzene (o-DCB) was emulsified in a 2.5% gum arabic solution and given orally to rats for 60 and 120 days. The effects of o-DCB on rats were compared with control rats given water containing the same percent of gum arabic.

The following results were obtained:

- 1. The livers of rats administered o-DCB were slightly heavier than those of control rats.**
- 2. Triglyceride levels of rats administered o-DCB were higher than those of control rats. The level of triglyceride in rats administered o-DCB tended to increase according to the duration of o-DCB administration.**
- 3. The level of ATP in the liver of rats administered o-DCB was significantly lower than that in the liver of control rats.**
- 4. The respiratory control of liver mitochondria of rats administered o-DCB decreased in state3 respiration, and increased in state4 respiration.**

The respiratory control index of the liver mitochondria decreased after o-DCB was given orally to rats, and it was observed that the longer the period administration was, the lower the respiratory control index was.