食餌中のメチオニンがクロロベンゼン投与によって 生じたラット肝グルタチオンおよび過酸化 脂質レベルの変化に与える影響

吉田 宗弘, 原 一郎

関西医科大学公衆衛生学教室

Effect of Dietary Methionine on Chlorobenzene-Induced Variation in Hepatic Glutathione and Lipid Peroxide Levels in Rats

Munehiro YOSHIDA and Ichiro HARA

Department of Public Health, Kansai Medical University, Moriguchi 570

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 38, 279~283 (1985)

Effects of dietary methionine on hepatic glutathione synthesis and lipid peroxidation in rats injected with chlorobenzene were investigated. After being fed for 4 weeks on a 10% casein-based diet (basal diet) or the basal diet supplemented with 0.3% DL-methionine, rats were intraperitoneally injected with chlorobenzene at a level of 0, 0.2, 0.5, or 2.0 mmol/kg body weight. In the rats fed the basal diet, a mortality of four-sixths was brought within 48 hours by the 2.0 mmol/kg of chlorobenzene, and TBA value, an index of lipid peroxidation, was significantly increased by the 0.5 mmol/kg of chlorobenzene. Supplementation with methionine to the basal diet made all the rats survive, and caused a lowered TBA value and a significant increase of liver wet weight in the rats injected with the 0.5 or 2.0 mmol/kg of chlorobenzene. While a significantly higher hepatic glutathione synthesis activity was observed, hepatic total glutathione level was significantly lower in the rats fed the basal diet. Chlorobenzene-induced increases in the glutathione level and its synthesis activity were observed 48 hours after the injection in the rats fed the methionine-supplemented diet but not in the rats fed the basal diet. These results indicate that chlorobenzene exposure may cause a critical impairment due to lipid peroxidation in rats fed a diet marginal in sulfur-containing amino acids.

(Received October 18, 1984)

クロロベンゼンは化学工場において有機溶剤、合成原料として広く用いられており、慢性、あるいは突発的な急性中毒の生じる危険性を有する化学物質である。動物体内に侵入したクロロベンゼンは肝で代謝を受け、尿中へはメルカプツール酸、もしくはクロロカテコールまたはクロロフェノールの硫酸、またはグルクロン酸抱合体として排泄される¹⁾。ラットを用いた実験では、腹腔内投与したクロロベンゼンの約 20% が肝グルタチオンと酵素的に抱合したのちメルカプツール酸として尿中に出現することが報告されている²⁾。一般にクロロベンゼンをはじめとする親電子性の化合物を動物に投与すると、メルカプツール酸形成の過程で肝グルタチオンが消費され一時的に激減することが知られている^{3)~5)}。われわれは先に、クロロベンゼンを投与したラットでは肝グルタチオンの一時的な枯渇に対応して肝グルタチオン合成活

性と肝グルタチオンレダクターゼ活性が有意に上昇すること、および、この枯渇の影響が肝システイン代謝にまで及んでいることを明らかにした⁶⁾⁷⁾。ところで、肝グルタチオン量は食餌条件、とくに、含硫アミノ酸の摂取状況によって大きく変動することが知られているが⁸⁾⁹⁾、このことは食餌条件がクロロベンゼンによる代謝応答に影響を与えることを意味している。本研究は、クロロベンゼンのような化学物質の取扱い従事者がとくにどのような栄養素摂取に留意しなければならないかを判断するための基礎的知見を得る目的で、食餌中のメチオニン含量がクロロベンゼンによる代謝応答とその毒性をどのように修飾するかを検討したものである。

実験方法

体重 50~60 g の Wistar 系雄ラットを 2 群に分け、1 群にはミルクカゼイン (10%) をタンパク質源とした基本飼料を、もう 1 群には基本飼料に 0.3% の DL-メ

チオニンを添加した飼料を与え、自由摂取法にて飼育した。基本飼料の組成を以下に示す(%)：ミルクカゼイン, 10；馬鈴薯デンプン, 58；ショ糖, 15；大豆油, 8；塩混合（オリエンタル配合 [(mg/g diet) : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.736; KH_2PO_4 , 15.432; NaH_2PO_4 , 5.61; NaCl , 2.796; Ca-lactate , 21.054; Fe-citrate , 1.908; MgSO_4 , 4.302; ZnCO_3 , 0.066; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$, 0.072; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.018; KI , 0.006] に $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ を 0.131 mg/g diet, Na_2SeO_3 を 0.00022 mg/g diet, 添加したもの), 6；ビタミン混合（オリエンタル配合 [(mg/kg diet) : thiamin·HCl, 12; riboflavin, 40; pyridoxine·HCl, 8; cyanocobalamin, 0.005; ascorbic acid, 300; biotin, 0.2; folic acid, 2; calcium pantothenate, 50; *p*-aminobenzoic acid, 50; niacin, 60; inositol, 60; choline chloride, 2,000; retinyl acetate, 1.72; cholecalciferol, 0.025; α -tocopheryl acetate, 50; menadione, 52; cellulose, 7,312]), 1；セルロース粉末, 2。全飼育期間中、飲料水としては水道水を与え、また、飼育室は恒温 (22~24°C)、恒湿 (60%) に保ち、12 時間ごとの明暗周期 (8~20 時点灯) とした。飼育開始 4 週間後に、0, 0.2, 0.5, または 2.0 mmol/kg body weight のクロロベンゼンをオリーブ油に溶解して腹腔内投与した。投与 48 時間後にすべてのラットを屠殺した直ちに肝臓を摘出した。

摘出した肝臓は秤量の後、約 1 g を切り取り 4 倍量の 10% トリクロロ酢酸 (TCA) とともにホモジナイズし、 $6,000 \times g$, 15 分間遠心して得られる上清をグルタチオンおよびシステインの定量に用いた。一方、これとは別に肝臓約 1 g を切り取り、9 倍量の生理食塩水とともにホモジナイズし、得られた 10% ホモジネートをチオバルビツール酸 (TBA) 試験に用いた。また、この 10% ホモジネートを $105,000 \times g$, 60 分間遠心して得られる可溶性タンパク質画分をグルタチオン合成活性の測定に

供した。

肝 TCA 可溶性画分中のグルタチオンは Tietze による酵素法¹⁰⁾で定量し、総グルタチオン量として示した。システインは Gaitonde による酸ニンヒドリン法¹¹⁾で求めた。肝グルタチオン合成活性は前報⁵⁾と同様、10% ホモジネートの可溶性タンパク質画分を L-システイン、L-グルタミン酸、グリシン、および ATP 生成系とともにインキュベートし、生成したグルタチオンを酵素的に定量することにより求める方法で測定した。また TBA 試験は Uchiyama and Mihara の方法¹²⁾で実施し、マロンジアルデヒドに換算した値でその結果を示した。タンパク質量は Lowry 法の Miller による改良法¹³⁾で求めた。

得られたデータの統計処理は要因配置の分散分析を用いて実施した¹⁴⁾。

結果および考察

実験飼料で 4 週間飼育したラットの体重は、基本飼料飼育群が 169 ± 4 g、メチオニン補足飼料飼育群が 198 ± 3 g (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=24$) であり、明らかにメチオニンの補足効果が認められた。Table 1 は、クロロベンゼン腹腔内投与 48 時間後のラットの肝湿重量を体重 100 g あたりに換算してまとめたものである。なお、基本飼料飼育群のうち 2.0 mmol/kg body weight のクロロベンゼンを投与したラット 6 匹中 4 匹が投与 48 時間以内に死亡し、生き残った 2 匹にも、血液の凝固、溶血、肝臓のうっ血、などの明らかな異常がみいだされた。腹腔内投与した場合のクロロベンゼンの LD_{50} は約 5 mmol/kg body weight と報告されており¹⁵⁾、基本飼料群において 2.0 mmol/kg の投与で 6 匹中 4 匹が死亡したことは、10% カゼイン食という食餌条件によってクロロベンゼンの LD_{50} が明らかに小さな値に変化したことを示している。クロロベンゼン投与による肝湿重量の

Table 1. Effect of chlorobenzene injection on liver wet weight in rats fed experimental diets.^A

Chlorobenzene injected (mmol/kg body weight)	Liver wet weight ^B (g/100 g body weight)		
	Basal	+Methionine	<i>p</i> ^C
0	4.27 ± 0.04^a	4.55 ± 0.15^a	NS
0.2	4.10 ± 0.25^a	4.69 ± 0.09^a	NS
0.5	4.41 ± 0.14^a	5.27 ± 0.19^b	<0.05
2.0	5.50 ^D	5.53 ± 0.22^b	

^A After being fed on a 10% casein-based diet with or without methionine-supplement, rats were intraperitoneally injected with chlorobenzene. Livers were excised 48 hours after the injection.

^B Each value represents mean $\pm$ SEM for 6 animals unless otherwise noted; means in the same column not sharing a common small letter differ significantly ($p < 0.05$).

^C Significant difference between "Basal" and "+Methionine"; NS, not significant ($p > 0.1$).

^D Mean for 2 survived animals; data for these animals were excluded at the statistical treatment.

Table 2. Effect of chlorobenzene injection on hepatic lipid peroxidation in rats fed experimental diets.^A

Chlorobenzene injected (mmol/kg body weight)	TBA value ^B					
	(nmol/g liver)			(nmol/liver/100 g body weight)		
	Basal	+Methionine	<i>p</i> ^C	Basal	+Methionine	<i>p</i> ^C
0	182±17 ^a	165±17 ^a	NS	776± 66 ^a	755± 97 ^a	NS
0.2	192± 9 ^a	210±13 ^a	NS	783± 52 ^a	987± 79 ^{a,b}	NS
0.5	371±32 ^b	215±25 ^a	<0.05	1,630±135 ^b	1,119± 89 ^b	<0.05
2.0	699 ^D	223±17 ^a		4,721 ^D	1,254±119 ^b	

^A Experimental conditions were described in Table 1.

^B TBA value was obtained by the method of Uchiyama and Mihara,¹²⁾ and was expressed as malondialdehyde equivalent. Each value represents mean±SEM for 6 animals unless otherwise noted; means in the same column not sharing a common small letter differ significantly (*p*<0.05).

^C Significant difference between "Basal" and "+Methionine"; NS, not significant (*p*>0.1).

^D Mean for 2 survived animals; data for these animals were excluded at the statistical treatment.

増加（肝の肥大）は、基本飼料群では著しい毒性の発現した 2.0 mmol/kg の投与ではじめて生じているのに対し、メチオニン補足飼料群では 0.5 mmol/kg のクロロベンゼン投与ですでに認められた。前報において、クロロベンゼン投与による肝の肥大はタンパク質量と DNA 量の増加を伴った肝実質細胞の増加であることを報告したが⁹⁾、メチオニン補足群にのみ明らかな肝肥大が生じた事実は、基本飼料（10% カゼイン）の制限アミノ酸であるメチオニンの補足によって肝臓のアミノ酸プールの質的改善が進んだために、クロロベンゼン代謝物による肝細胞組織の損傷に対応した細胞合成の亢進が可能となったことを反映しているのかもしれない。

Table 2 は、肝臓に蓄積した TBA 陽性物質をマロナルデヒドに換算し、体重 100 g あたりの総量と肝臓 g あたりの濃度でまとめたものである。過酸化脂質量を反映する TBA 陽性物質量は総量では、両群ともにクロロベンゼン投与で有意の増加が認められた。しかし、その程度はメチオニン補足飼料群のほうが明らかに低かった。肝 TBA 陽性物質生成に対する食餌中メチオニン補足の抑制効果は、TBA 値を肝湿重量あたりで比較した場合により明瞭であった。すなわち、基本飼料群では 0.5 mmol/kg body weight のクロロベンゼン投与で TBA 陽性物質濃度が約 2 倍に上昇したのに対し、メチオニン補足飼料群では 2.0 mmol/kg の投与でも有意の上昇は認められなかった。食餌中へのメチオニン補足は、過酸化脂質の生成を抑制するとともに、損傷を受けた細胞の比率を細胞合成の亢進によって小さくするという点で、クロロベンゼンの毒性を軽減したと思われる。

Table 3 はクロロベンゼン投与 48 時間後の肝臓の総グルタチオン濃度とグルタチオン合成活性を示したもの

である。なお、同じ期間、固型飼料（オリエンタル酵母社、MF）で飼育したラット肝のグルタチオン濃度は $6.64 \pm 0.51 \mu\text{mol/g}$ （平均値±標準誤差、*n*=4）であり、メチオニン補足飼料群の値はこれを若干上まわるものであった。基本飼料群のグルタチオン濃度は、メチオニン補足飼料群の半分以下であり、10% カゼイン食が含硫アミノ酸不足であることを明白に示している。われわれは先に、クロロベンゼンを腹腔内投与したラットでは、肝グルタチオンの一時的な減少に対応して肝グルタチオン合成活性が上昇し、投与 24 および 48 時間後には、肝グルタチオン濃度は投与前よりも有意に高い値を示すこと、さらにこの濃度上昇がクロロベンゼン投与量に依存することを報告した^{6,7)}。しかし、肝グルタチオン濃度の低い基本飼料群について得られた結果は、これらとは明らかに異なり、肝グルタチオン濃度に関する代謝応答はみかけ上まったく認められないというものであった。一方、クロロベンゼンを投与しないラットの肝グルタチオン合成活性はグルタチオン濃度の低かった基本飼料群においてメチオニン補足飼料群を上まわる値が認められた。このことはグルタチオン濃度がグルタチオン合成の律速酵素である γ -グルタミルシステインシンターゼの生成量を調節している¹⁰⁾ことの現われであろう。クロロベンゼン投与はメチオニン補足飼料群においてのみ肝グルタチオン合成活性を上昇させており、肝グルタチオン濃度の増加をよく反映した結果となった。基本飼料群において合成活性が高いにもかかわらず、グルタチオン濃度が低レベルであるという結果は、10% カゼイン食という含硫アミノ酸の少ない食餌を摂取したために肝のシステインプールが縮小し、グルタチオン合成系よりのシステイン要求を充足させることができなかったことを示

Table 3. Effect of chlorobenzene injection on glutathione level and its synthesis activity in rat liver.^A

Chlorobenzene injection (mmol/kg body weight)	Total glutathione content ^B (μ mol/g liver)			Glutathione synthesis activity ^B (nmol glutathione/min/mg soluble protein)		
	Basal	+Methionine	<i>p</i> ^C	Basal	+Methionine	<i>p</i> ^C
0	2.68 $\pm$ 0.52 ^a	7.89 $\pm$ 0.53 ^a	<0.01	1.08 $\pm$ 0.09 ^a	0.68 $\pm$ 0.04 ^a	<0.05
0.2	2.96 $\pm$ 0.33 ^a	8.36 $\pm$ 0.77 ^a	<0.01	0.96 $\pm$ 0.17 ^a	0.88 $\pm$ 0.09 ^{a,b}	NS
0.5	2.91 $\pm$ 0.21 ^a	11.90 $\pm$ 1.08 ^b	<0.001	1.33 $\pm$ 0.40 ^a	1.16 $\pm$ 0.31 ^b	NS
2.0	3.51 ^D	15.53 $\pm$ 0.25 ^c		0.90 ^D	1.08 $\pm$ 0.09 ^b	

A-D Same as in Table 1.

している。事実、肝のシステイン濃度は、基本飼料群が $0.05 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$ 、メチオニン補足飼料群が $0.13 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$ (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=6$) であった。

急性クロロベンゼン中毒の主たる症状は、中枢神経系の抑制・麻痺、肝・腎臓の壊死・変性であることが知られている¹⁾。本実験において死に至ったラットには、外見上神経系に障害の生じた徴候は認められず、解剖所見からもその死因は肝臓の壊死によるものであると判断された。プロモベンゼンを用いた研究から、芳香族モノハロゲン化合物の中で細胞毒性を示す化合物の主体は、P-450を中心とした mixed function oxygenase によって生じるエポキシド化合物であることが判明している¹⁷⁾。基本飼料で飼育したラットにおいては、肝グルタチオンおよびシステイン濃度の低下の結果、クロロベンゼンエポキシドが円滑に処理されずにタンパク質や核酸等に結合したり細胞膜に損傷を与えたりしたために、細胞機能の著しい低下ひいては細胞の壊死が生じたと考えられる。過酸化脂質の蓄積は処理しきれなかったエポキシドが細胞の膜脂質に作用した結果を反映したものと思われる。

ところで、種々の化学物質の毒性は食餌条件、とくに、食餌中のタンパク質含量によって修飾を受けるといわれている^{18)~20)}。低タンパク質の条件下では薬物代謝酵素活性のレベルの低下が知られており¹⁹⁾、メチオニンの補足効果は、10% カゼイン食に第一制限アミノ酸を加えたことによって投与したクロロベンゼンを処理するのに十分な薬物代謝酵素活性が得られたことを表わしているのかもしれない。しかし、クロロベンゼンにおいてはその中間代謝物であるエポキシドに強い細胞毒性が認められており¹⁷⁾、また、ラットではクロロベンゼンの主たる最終代謝産物がメルカプツール酸であることから²⁾、エポキシドと反応するのに十分な量の肝グルタチオンの存在もまた必要であると判断される。絶食、あるいは低タンパク質といった食餌条件下では肝グルタチオン濃度が低下しており²¹⁾²²⁾、メチオニン補足効果の理由として、タンパク質栄養価の改善に加えて、Reed and

Beatty がその総説²³⁾の中で指摘しているように、肝グルタチオン濃度の上昇をあげることも可能であると思われる。

今回、ラットで得られた結果をそのままヒトにあてはめることには無理もあるだろうが、クロロベンゼンのような親電子性の化合物の取扱いに従事する作業者はタンパク質、とくに、含硫アミノ酸の摂取に留意しなければならないであろう。

要 約

クロロベンゼンの毒性とクロロベンゼンによって惹起される代謝応答が、食餌中のメチオニン含量の変化によってどのように修飾されるかを検討した。

ラットを2群に分け、10% カゼイン飼料 (基本飼料) および 0.3% の DL-メチオニンを補足した 10% カゼイン飼料で4週間飼育した後、0, 0.2, 0.5, または 2.0 mmol/kg body weight のクロロベンゼンを腹腔内投与した。

基本飼料群ラットにおいては、0.5 mmol/kg のクロロベンゼン投与によって肝 TBA 値が有意に上昇し、2.0 mmol/kg の投与では6匹中4匹が投与後48時間以内に死亡した。飼料へのメチオニン補足は、肝 TBA 値の上昇を軽減し、全ラットを生存させるとともに、0.5 mmol/kg 以上の投与の場合に肝湿重量の有意な増大を生じさせた。また基本飼料群では、メチオニン補足飼料群に比して肝グルタチオン合成活性が有意に高いにもかかわらず、低い肝グルタチオン濃度しか認められず、クロロベンゼン投与48時間後のグルタチオン濃度にも変化がなかった。しかし、メチオニン補足飼料群においては、肝グルタチオン合成はクロロベンゼン投与によって亢進し、肝グルタチオン合成活性とグルタチオン濃度の上昇が生じた。

以上の結果より、10% カゼイン食という含硫アミノ酸の少ない食餌条件下においては、肝グルタチオン合成系よりのシステイン要求が充足されていないために、クロロベンゼンのような肝グルタチオンを消費する化合物を

負荷した場合に、過酸化脂質生成にもとづく重大な障害の発生する可能性がある」と判断された。

なお、本研究は文部省科学研究費 (No. 59770409) によって行なわれたことを申し述べておく。

文 献

- 1) Deichman, W.B. : Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3rd Rev. Ed. (Clayton, G.D. and Clayton, F.E., eds.), 3604 (1981), Wiley-Interscience Publication (New York)
- 2) Ogata, M. and Shimada, Y. : *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **53**, 51 (1983)
- 3) Boyland, E. and Chasseand, L.F. : *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 1526 (1970)
- 4) Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 211 (1973)
- 5) Kluwe, W.M., Greenwell, A. and Harrington, F. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **220**, 399 (1981)
- 6) Yoshida, M. and Hara, I. : *Ind. Health*, **22**, 11 (1984)
- 7) Yoshida, M. and Hara, I. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 69 (1985)
- 8) Seligson, F.H. and Rotruck, J.T. : *J. Nutr.*, **113**, 98 (1983)
- 9) Iwami, K., Nakamura, A., Higuchi, M. and Iwai, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2555 (1983)
- 10) Tietze, F. : *Anal. Biochem.*, **27**, 502 (1969)
- 11) Gaitonde, M.K. : *Biochem. J.*, **104**, 627 (1967)
- 12) Uchiyama, M. and Mihara, M. : *Anal. Biochem.*, **86**, 271 (1978)
- 13) Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, **31**, 964 (1959)
- 14) Snedecor, C.W. and Cochran, W.G. : *Statistical Methods*, 6th Ed., Chapter 12 (1967), Iowa State University Press (Ames)
- 15) Kocsis, J.J., Harkaway, S. and Snyder, R. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **243**, 104 (1975)
- 16) Richman, P.G. and Meister, A. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422 (1975)
- 17) Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N. and Gillette, J.R. : *Pharmacology*, **11**, 151 (1974)
- 18) Shakman, R.A. : *Arch. Environ. Health*, **28**, 105 (1974)
- 19) Campbell, T.C. and Hayes, J.R. : *Pharmacol. Rev.*, **26**, 171 (1974)
- 20) 糸川嘉則 : 中毒学と栄養学 (鈴木継美, 井村伸正, 鈴木庄亮編), 228 (1978), 篠原出版 (東京)
- 21) Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A. and Sakamoto, Y. : *J. Biochem.*, **75**, 93 (1974)
- 22) 東 胤昭 : 栄養と食糧, **33**, 203 (1980)
- 23) Reed, D.J. and Beatty, P.W. : *Rev. Biochem. Toxicol.*, **2**, 213 (1980)

(昭和 59 年 10 月 18 日受理)