

環境汚染物質(炭化水素)の生態系への影響

第 2 報

ラット肝ミトコンドリアのエネルギー転換系に 対するハロゲン化炭化水素の作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

荻 野 泰 夫

(昭和57年7月19日受稿)

Key words: ハロゲン化ベンゼン,
ミトコンドリア,
酸化的磷酸化

緒 言

ハロゲン化炭化水素は医薬, 農薬, 殺菌剤, 溶剤, 難燃剤, 麻醉剤, くん蒸剤及びその他各種化学物質の中間体原料¹⁾として工業的に広く使用されている。そのうち, モノクロルベンゼンの生産量は最も多く, 世界では年間48万トン/1974年, わが国では2万7千トン/1977年にも及んでいる²⁾。ヘキサクロルベンゼン(HCB), ポリ塩化ナフタレン(PCN), ポリ塩化ビフェニール(PCB)等はその使用が禁止され, これらに代って高分子芳香族ブrom化ベンゼンが難燃剤として広く使用される傾向にある。しかし, 近年, アメリカ合衆国ミシガン州における家畜飼料のポリブrom化ビフェニール(PBB)による偶発的な汚染の影響が報告され³⁾注目を集めた。体内に取り込まれたPBBは肝臓や脂肪組織に濃縮され, ラットに投与した場合, その組織に蓄積される量はPCBよりも高レベル⁴⁾であると言われている。その毒性については, PCBの構造と類似し, PCBより難溶性で, 蓄積性が高い点から, 更に大であると考えられる。また, Harris⁴⁾らはPBB投与ラットの体重増加率の低下や脂肪の増加による肝重量の増加, 肝グルコース量の減少などを報告している。

一方, 近年, プールや水道水中のトリハロメタン (THM) が社会問題となり, 水道水中の

THM濃度の暫定基準値が設定された。その毒性についてはマウス⁶⁾, ラット⁷⁾に対するLD50を同じハロゲン置換数とモル数とで比較すると塩素より臭素の方が強く, 肝臓の損傷が顕著に現われている。又, 筆者等の実験⁸⁻¹⁰⁾でも脂肪族, 芳香族共に魚への蓄積性は塩素より臭素が高く, 食物連鎖による蓄積が示唆された。

こうした事例に着目し, 各種ハロゲン化炭化水素(表1)の肝毒性を明らかにする目的でラット肝ミトコンドリア(Mt)のエネルギー転換反応及びK⁺区画性に対する作用を調べた結果, 興味ある事実が明らかになったので, こゝに報告する。

材 料 と 方 法

ミトコンドリアの分画: Wistar系ラット(体重200g)の肝MtをHogeboom-Schneider¹¹⁾の変法¹²⁾により分画し実験に供した。

Mt呼吸活性の測定: 0.15 MKCl, 10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5), 2.5 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)を含む反応液(25°C)中にMtを添加し, 30秒後にコハク酸ナトリウム(終末5 mM)を加えた後, 各々30秒毎に被検物質, Na-ADP(終末0.3 mM)を加えてATP合成反応を行わせ, それに伴う酸素消費速度を酸素電極(給水化学研究所製)で経時的に測定した。State 4の呼吸を測定後, 脱共役剤DNP

Table 1. List of halogenated hydrocarbons used

Compound	Molecular formula	Density	Boiling point	Octanol / Water *
Bromoform	CHBr_3	2.70	149~150	400
Boron carbide	CBr_4	2.51	2350	2000
Fluoro benzene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{F}$	1.03	84.7	214
Chloro benzene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1.11	131~132	873
Bromo benzene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$	1.50	156.2	1028
Iodo benzene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{I}$	1.83	188~189	2120
o-Dibromo benzene	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}_2$	1.99	224	6760
p-Dibromo benzene	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}_2$	1.95	218~219	6760
m-Dibromo benzene	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}_2$	1.96	219.5	6760
1,2,3-Tribromo benzene	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Br}_3$	—	275	51300

* Application of gas chromatography for the measurement of partition coefficient

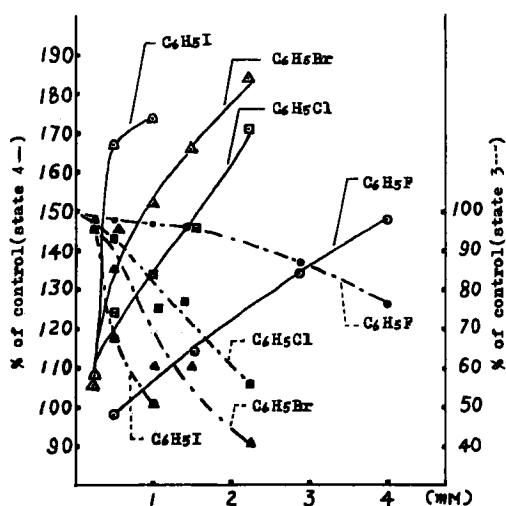


Fig. 1. Concentration dependence of the effect of monohalogenated benzenes on the respiratory activity of rat liver mitochondria. Experimental conditions are described in methods

(終末0.02 mM)を加え全酸素消費量を求めた。なお、反応液量3.0mlで行った。呼吸調節能(RCI)

及び酸化能 (ADP/O 比) は荻原の方法¹³⁾によって算出した。

K⁺ 区画性の測定: 0.15M塩化コリン, 10 mM トリシュー塩酸緩衝液 (PH 7.5) 中に Mt を加え、被検物質 (終末0.4 mM) 添加後、反応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。反応液量 3.0 ml, 反応温度25°Cで行った。

試薬: 各被検物質は個々にエタノールに溶解し0.1M溶液を調製した。これを適宜希釈して、呼吸測定の終末濃度が0.067~0.40 mM になるように添加した。

結 果

1. 各種モノハロゲンベンゼンに対する作用

1) 呼吸活性に対する作用

図1に Mt の呼吸活性に対する各種モノハロゲンベンゼンの作用を示す。図から明らかなようにいずれの被検物質についても、State 4呼吸の活性化、State 3呼吸の抑制が見られる。また、その作用強度は $\text{C}_6\text{H}_5\text{I} > \text{C}_6\text{H}_5\text{Br} > \text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$

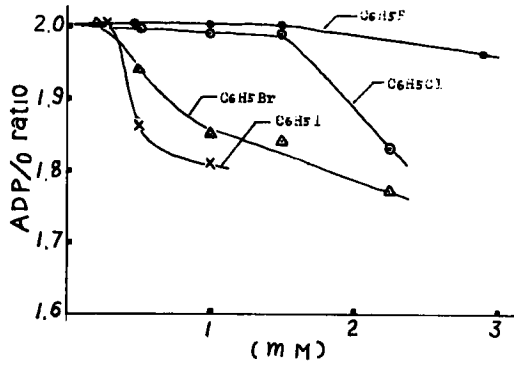


Fig. 2. Concentration dependence of the effect of monohalogenated benzenes on the ADP/O ratio of rat liver mitochondria.

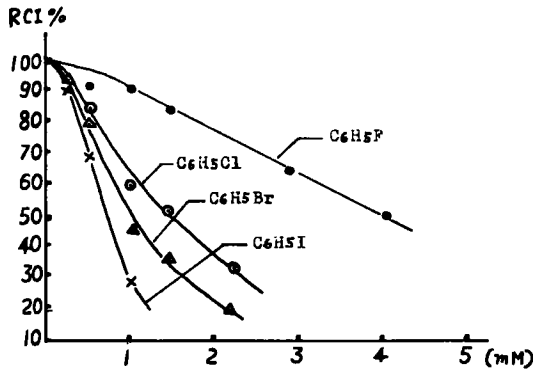


Fig. 3. Concentration dependence of the effect of monohalogenated benzenes (fluorobenzene, chlorobenzene, bromobenzene, and iodobenzene) on the respiratory control of rat liver mitochondria. RCI; (state 3/state 4).

$\text{Cl} > \text{C}_6\text{H}_5\text{F}$ の順であった。上記 4 種のモノハロゲンベンゼンについて、それぞれの作用強度を更に詳しく観察するために ADP/O 比及び RCI に対する作用を比較した。その結果、図 2 の如く ADP/O 比は $\text{C}_6\text{H}_5\text{I} > \text{C}_6\text{H}_5\text{Br} > \text{C}_6\text{H}_5\text{Cl} > \text{C}_6\text{H}_5\text{F}$ の順に低下し、また、図 3 の如く RCI についても同様であった。

2) K^+ 区画性に対する作用

以上の結果から、各種モノハロゲンベンゼンによる Mt 膜機能の低下が明らかであるが、更に、Mt 膜が持つ重要な機能の一つと考えられる K^+ の区画性に対する検討を行った。その結果、図 4 に示すように、モノハロゲンベンゼン

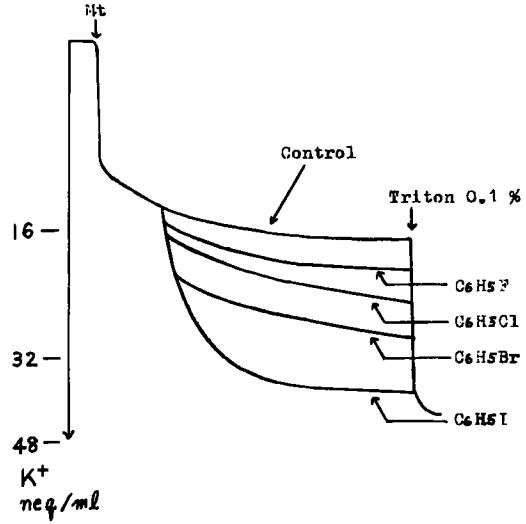


Fig. 4. Potassium release from rat liver mitochondria treated with monohalogenated benzene (1 mM).

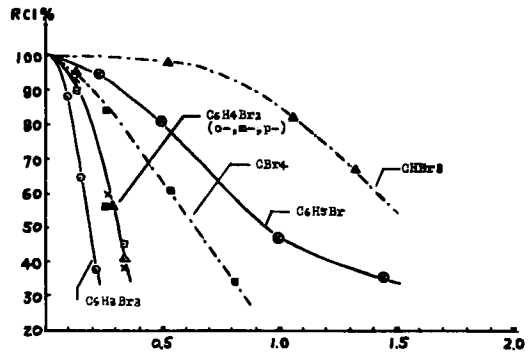


Fig. 5. Concentration dependence of the effect of halogenated benzenes (bromoform, boron carbide, bromobenzene, o- m- p-dibromobenzene, 1, 2, 3-tribromobenzene) on the respiratory control of rat liver mitochondria.

による Mt 内の K^+ 遊出作用は ADP/O 比及び RCI に対する作用とほぼ相関することが明らかになった。

2. 各種ブロム化炭化水素に対する作用

1) 呼吸活性に対する作用

二種の脂肪族ブロム化炭化水素と三種の芳香族ブロム化炭化水素について、RCI に対する作用強度の比較を行った。その結果、各被検物質とも 0.1~1.6 mM の濃度範囲で、RCI は図 5

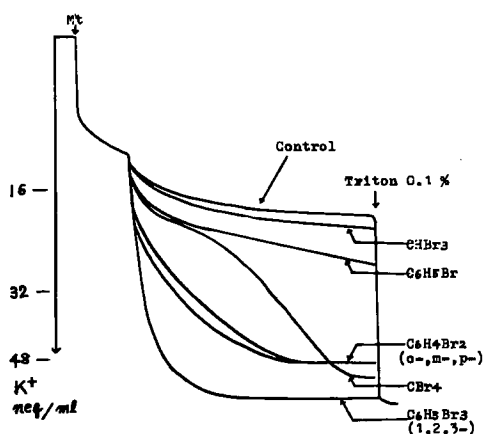


Fig. 6. Potassium release from rat liver mitochondria treated with aliphatic and aromatic brominated hydrocarbons (0.25mM).

の如く濃度依存して低下し、その作用強度は $C_6H_3Br_3 > C_6H_4Br_2 > CBr_4 > C_6H_5Br > CHBr_3$ の順であった。なお、この RCI の低下はモノハロゲンベンゼンの場合と同様、State 3 の低下傾向と State 4 の増加によるものであった。

2) K^+ 区画性に対する作用

図6は、上記5物質のMt膜の K^+ 区画性に対する作用を調べた結果である。図から明らかなように CBr_4 の場合のみや、異ったパターンを示したが、相互間の K^+ 遊出作用強度は RCI に対する作用とほぼ相関していた。

考 察

ミトコンドリアの電子伝達やそれに共役したエネルギー伝達を阻害する物質の阻害様式は①電子伝達阻害②脱共役③リン酸化阻害の三つに大別することができる。しかし、これらの区別が不明確な物質も少なくない。本実験で用いたハロゲン化炭化水素のMtに対する作用は State 4 呼吸の上昇と ADP/O 比の低下から脱共役作用が考えられる。一方、State 3 呼吸の抑制からエネルギー伝達阻害作用も考えられ、ここに示した実験結果のみで上記の作用様式を決定することは困難である。PCB, PCN^{14,15)}においても同様な作用が観察されており、酸化的リン酸化能に対する同様な阻害機構が示唆される。本実験に用いたすべての化合物はMtの K^+ 区

画性を乱し、外部に K^+ を遊出させる作用を持つことが認められ、物質区画性の面からもこれらの物質によるMt障害が示された。正常なMt内に大量に存在する K^+ は能動的に一定レベルに保たれており、 H^+ と共にMtのエネルギー状態によって変化することが明らかにされている^{16,17)}。例えば、共役阻害剤¹⁸⁾、重金属¹⁷⁾のように解離するイオンによってMtのエネルギー状態を低下させることにより、Mt内の K^+ は外部に放出される。しかし、本実験のために用いたハロゲン化ベンゼンの極性の順序は $I > Br > Cl > F$ の順で、①ハロゲン基自体の差異②極性の差異 (Octanol/Water 比は C_6H_5I , C_6H_5Br , C_6H_5Cl , C_6H_5F で 2120, 1028, 873, 214) 極性に伴う水に対する溶解度の差異で、ハロゲン化ベンゼンについてMtへの阻害作用の強さの差異に影響していると考えられる。

結 論

環境汚染物質の生体への作用を調べる目的でハロゲン化炭化水素のラット肝ミトコンドリア膜に対する作用を検討し、以下の成績を得た。

1. モノハロゲン化ベンゼンは State 3 の低下と State 4 の上昇とにより、RCI, ADP/O 比共に低下させる。
2. 上記の作用強度を比較すると $C_6H_5I > C_6H_5Br > C_6H_5Cl > C_6H_5F$ の順に強く、しかも、 K^+ 遊出作用と平行する。
3. ブロム化炭化水素はモノハロゲンベンゼンと同様に RCI と ADP/O 比を低下させ、その作用強度は $C_6H_3Br_3 > C_6H_4Br_2 > CBr_4 > C_6H_5Br > CHBr_3$ の順に強く、 K^+ 遊出作用と平行する。

謝 辞

本稿を終えるにあたって、御指導、御稿閲賜った恩師緒方正名教授に心から感謝いたします。

1. 化学工業日報社編, 6877の化学薬品, pp.151—160, 1976, 東京.
2. 環境庁保健調査室編, 化学物質と環境, 東京, pp.81—89, 1980.
3. Carter, L.J.: Michigan's PBB incident; Chemical mixup leads to disaster. *Science* 192, 240—243, 1976.
4. Harris, S.J., Cecil, H.C. and Bitman, J.: Effects of feeding a polybrominated biphenyl flame retardant (fire-Master BP-6) to male rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 692—696, 1978.
5. Kimbrough, R.D., Linder, R.E., Burse, V.W., Jennings, R.W. and Ga, C.: Adenofibrosis in the rat liver; with persistence of polychlorinated biphenyls in adipose tissue. *Arch. Environ. Health* 27, 390—395, 1973.
6. 富田基郎: トリハロメタンの毒性, 用水と廃水, 23, 907—914, 1981.
7. 大森義仁, 戸部満寿夫, 石館基, 谷村頭雄, 中沢泰夫: 環境保全研究報告成果集, I—29, 1980.
8. 緒方正名, 荻野泰夫: 塩素系有機溶剤類の魚体への移行, 日本公衛誌, 24, 695—699, 1977.
9. 荻野泰夫: 臭素系有機溶剤類の魚体への移行, 岡山医学会誌, 90, 1451—1456, 1978.
10. 荻野泰夫, 谷本浩一, 石田立夫, 緒方正名: ハロゲン系炭化水素及び芳香族炭化水素の魚体への移行, 第38回日本公衆衛生学会講演集, p.785, 1979.
11. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Palade, G.H.: Gytochemical studies of mammalian tissues.
1. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* 172, 619—635, 1948.
12. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama* 17, 258—271, 1963.
13. Hagihara, B.: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys Acta* 46, 134—142, 1961.
14. 緒方正名, 長谷川亨, 荻野泰夫: PCB, PCT, PCN 類の生体膜機能に対する作用, 第52回日本産業衛生学会講演集, pp.298—299, 1979.
15. Ogata, M., Hasegawa, T., Takahara, K., Ohguma, K., Ogino, Y., Mori, T., Watanabe, S. and Meguro, T.: Oxidative phosphorylation of liver mitochondria from polychlorinated naphthalene administered rats, *Industrial Health* 19, 235—240, 1981.
16. Settlemire, C.T., Hunter, G.R. and Brierley, G.P.: Ion transport in heart mitochondria XIII. The effect of ethylenediaminetetraacetate on monovalent ion uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 487—499, 1968.
17. Miyahara, M., Utsumi, K.: Oxydative phosphorylation controlled by potassium in rat liver mitochondria. *Cell struc. Func.* 1, 51—59, 1975.
18. Stanbury, S.W. and Madge, G.H.: Potassium metabolism of mitochondria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82, 675—681, 1953.

**Studies on the biological toxicity of several hydrocarbon
pollutants of the environment**

**Report 2. The effect of halogenated hydrocarbons on oxidative
phosphorylation and potassium compartmentalization
of rat liver mitochondria.**

Yasuo OGINO

Department of Public Health, Okayama University Medical School of Okayama

(Director: Prof. M. Ogata)

In order to investigate the influence of various environmental pollutants on living organisms, the effects of halogenated hydrocarbons on the mitochondrial membrane were examined. The results obtained were as follows:

1) Monohalogenated benzenes decrease state 3 respiration and increase state 4 respiration, resulting in a decrease in both respiratory control (RCI) and the ADP/O ratio.

2) The above activity is in the decreasing order of iodobenzene, bromobenzene, chlorobenzene and fluorobenzene. This order of activity is parallel to that of potassium releasing activity.

3) Similarly to the effect of monohalogenated benzenes, brominated hydrocarbons also decrease both RCI and the ADP/O ratio. The activity is in the decreasing order of tribromobenzene, dibromobenzene, boron carbide, monobromobenzene and bromoform, which parallels the potassium releasing activity.