

白蟻防除処理剤クロルデンの公衆衛生学的研究

第 3 報

クロルデンのラット肝ミトコンドリアの 酸化的リン酸化に対する作用について

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

野 口 信 行

（昭和60年2月28日受稿）

Key words : クロルデン

ミトコンドリア

酸化的リン酸化

緒 言

クロルデン(工業製品)は、米国で開発された有機塩素系殺虫剤^{1),2)}でBHC, DDTなど農薬として使用された有機塩素系殺虫剤と異なり、わが国では、そのほとんどが白蟻防除処理剤として使われており、その使用量は年々著しく増加している¹⁾。従って、防除処理家屋居住者及び防除作業者のクロルデン被曝による健康障害が懸念されている。

著者は、先に、白蟻防除処理家屋におけるクロルデン濃度の測定と防除作業者の血液検査等を実施し、居住空間において長期間クロルデンが検出されること、また、防除作業者の血中からもクロルデンが検出され、CPK値上昇の傾向がみられること等を明らかにした³⁾。更に、クロルデンの生体内運命についても検討した結果、低濃度、短時間暴露であるにもかかわらず各組織からクロルデン成分及び代謝産物としてのOxychlorane, Heptachlorepoxydeが検出され、なかでも特に、trans-Nonachlorが脂肪組織、肝臓等に長期に蓄積されることを明らかにした⁴⁾。

ラットを用いたクロルデンの投与実験では中枢神経系の刺激、胃潰瘍、肝肥大の発現等があり⁵⁾、甲状腺癌の発生が確認されている⁶⁾。さらにマウスを用いた実験では、18ヵ月間クロルデンを投与した場合、肝癌の多発がみられ⁷⁾、

胎仔の発育低下が観察されている⁸⁾。また、種々の動物実験において肝臓障害を伴う慢性毒性が報告され⁹⁾、人の場合には、けいれん、共調性の失調がみられることなどの報告がある¹⁰⁾。

このような観点からクロルデンの毒性に関し、特に肝毒性発現機構を明らかにする目的でラット肝ミトコンドリア(Mt)の酸化的リン酸化反応に対する作用について検討した。その結果、興味ある事実が明らかになったのでここに報告する。

実験材料と方法

1. 肝ミトコンドリア(Mt)の分離調製

体重約200gのドンリュウ系ラットを断頭屠殺し、0.25Mショ糖液を用いてHogeboom-Schneider¹¹⁾の変法¹²⁾により肝Mtを分離調製した。Mt蛋白の定量は、牛血清アルブミンを標準としBiuret法¹³⁾により測定した。

2. Mt呼吸活性の測定

分離した肝Mtの呼吸活性は、ガルバニ電極(給水化学研究所)を用いて測定した。即ち、0.15M KCl, 10mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4), 5mM MgCl₂, 10mM リン酸緩衝液(pH7.4)より成る反応液2.5mlMt中に試料を懸濁し、25°Cで攪拌しながら呼吸基質(5mMコハク酸ナトリウム, 5mMβヒドロキシ酪酸(β-OH)または、5mMアスコルビン酸+0.1mM N, N,

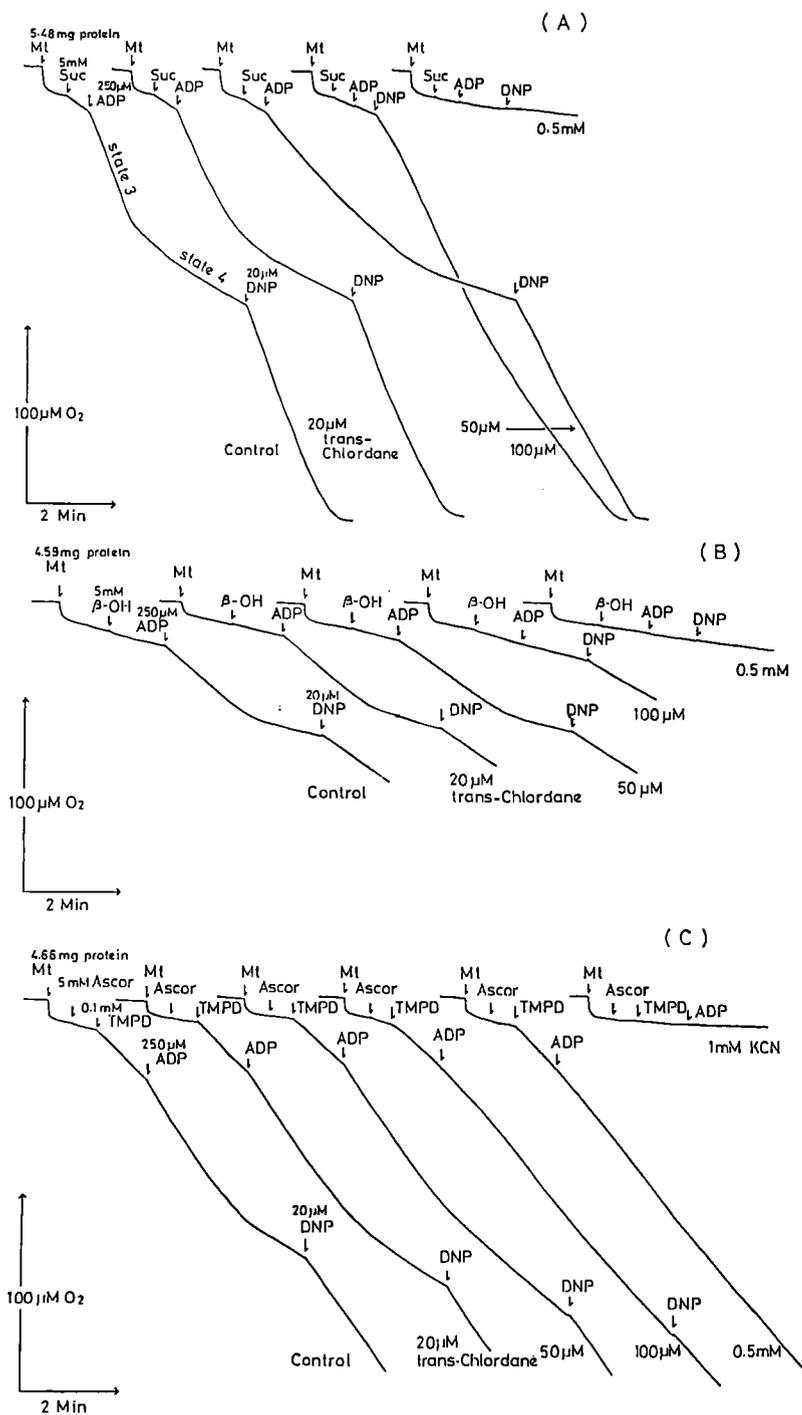


Fig. 1 Effect of chlordane on the respiratory activity of rat liver mitochondria
 (A) 5 mM succinate
 (B) 5 mM β -hydroxybutyrate
 (C) 5 mM ascorbate + 0.1 mM TMPD

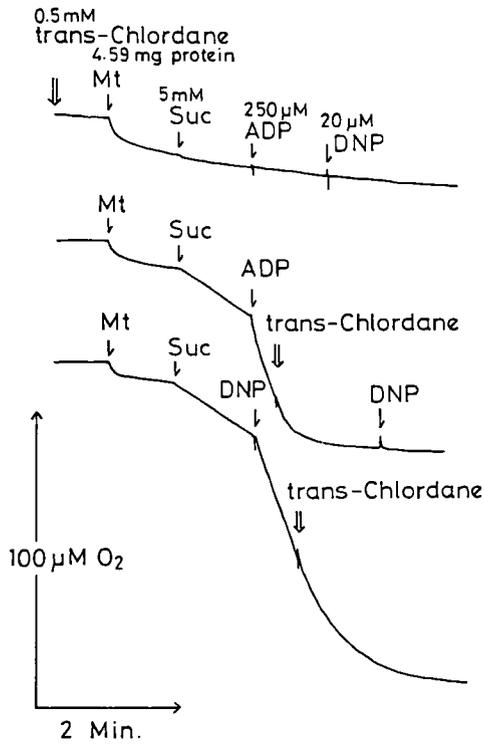


Fig. 2 Inhibition of respiration by trans-chlordane

N' , N' -テトラメチル- p -フェニレンジアミン (TMPD), $250\mu\text{M}$ Na-ADP 及び $2,4$ -ジニトロ (DNP) を添加し、各種クロルデン成分存在下で溶存酸素濃度の変化を連続的に記録測定した。

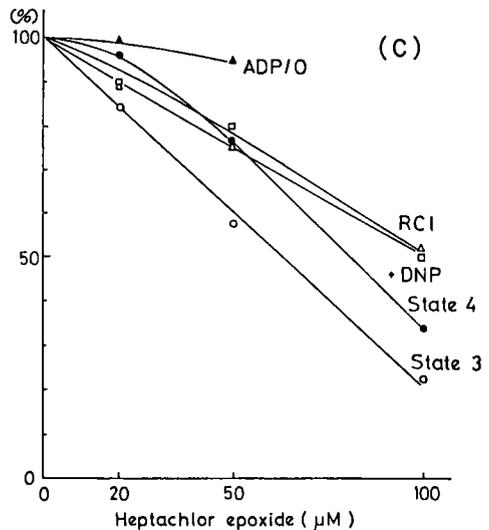
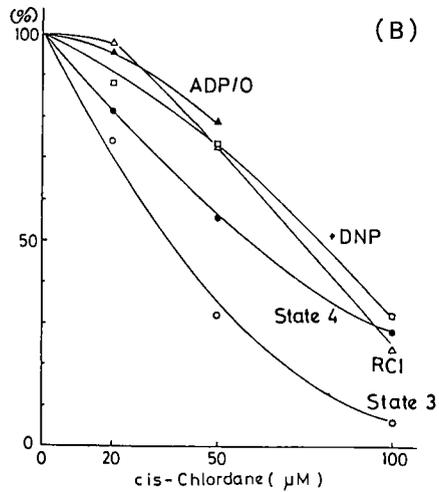
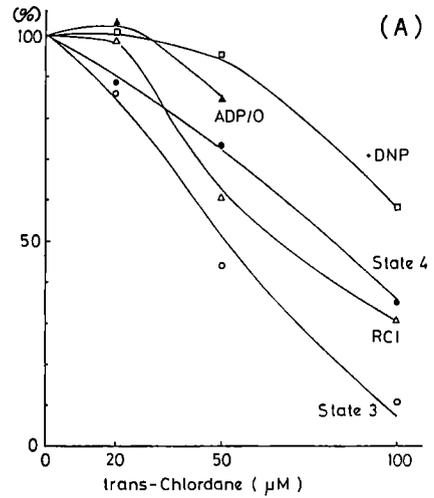
得られた結果より各 State の酸素消費速度、呼吸調節能 (RCI) 及び酸化的リン酸化能 (ADP/O 比) を算出した。

3. ATPase 活性の測定

0.2M Sucrose, 20mM KCl, 5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 及び 3mM MgCl_2 より成る反応液に Mt を懸濁して全量を 2ml とし、 3mM Na-ATP を加えて 25°C , 15 分間インキュベートした。終末濃度 8% の水冷トリクロル酢酸 (TCA) を添加して反応を停止し、遠心除蛋白後、上清液中の無機リン (Pi) を高橋の方法¹⁴⁾で測定した。

4. 試薬類

クロルデン (工業製品) の成分 trans-Chlordane, cis-Chlordane, Heptachlor 及び代謝産物の一つ



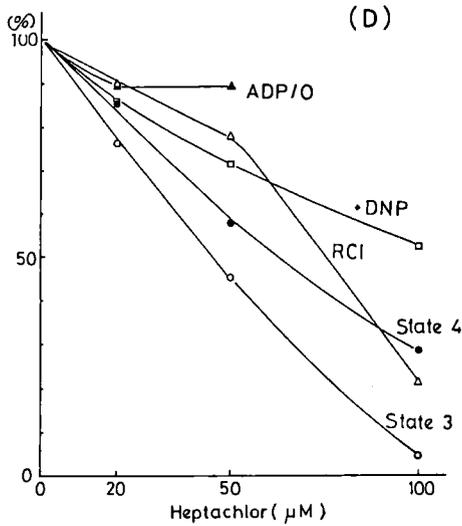


Fig. 3 Effect of chlordane on the mitochondrial respiration, RCI and ADP : O ratio

Heptachlorepoxyde は、和光純薬工業 KK. の製品を用い、各々エタノールに溶解して実験に供した。

また、Na-ADP 及び Na-ATP はベーリンガー・マンハイム山之内 KK の製品を、オリゴマ

イシンはシグマ社製のものを用いた。他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

結 果

1. 肝 Mt の酸化的リン酸化反応に対する作用

Fig. 1 は 5 mM コハク酸(A), 5 mM β-OH (B) あるいは 5 mM アスコルビン酸 + TMPD (C) をそれぞれ呼吸基質にしたときの Mt の呼吸様式と種々の濃度の trans-Chlordane をあらかじめ反応液中に添加した際の呼吸活性の変化

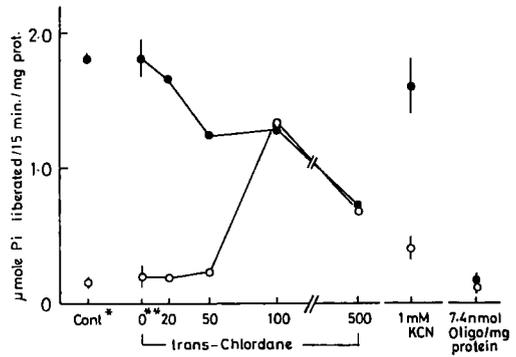


Fig. 5 Effect of trans-chlordane on the latent ATPase activity of rat liver mitochondria
* Non-treated
** Solvent control (1% ethanol)
○ : -DNP, ○ : +DNP (5 × 10⁻⁵ M)

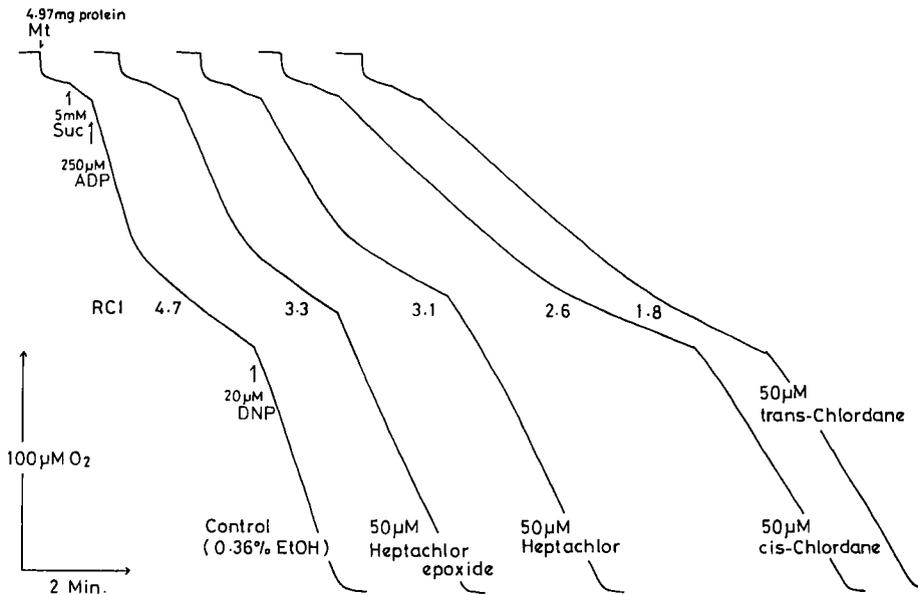


Fig. 4 Effect of chlordane on the respiratory activity of rat liver mitochondria

Table I Effect of chlordane on the latent ATPase activity of rat liver mitochondria

Additions (μM)	-DNP		+DNP ($5 \times 10^{-5} \text{M}$)	
	Pi liberated (μ moles/15 min/mg protein)	%	Pi liberated (μ moles/15 min/mg protein)	%
trans-Chlordane	0	0.28	1.83	100
	20	0.23	1.81	98.9
	50	0.23	1.34	73.2
	100	1.53	1.39	76.0
	500	0.44	0.47	25.7
cis-Chlordane	0	0.16	1.65	100
	20	0.11	1.75	106.1
	50	0.13	1.79	108.5
	100	0.67	1.43	86.7
	500	1.03	0.92	55.8
Heptachlor	0	0.16	1.65	100
	20	0.13	1.62	98.2
	50	0.11	1.56	94.5
	100	0.50	1.32	80.0
	500	0.73	1.11	67.3
Heptachlor epoxide	0	0.28	1.83	100
	20	0.23	1.85	101.1
	50	0.22	1.83	100.0
	100	0.25	2.10	114.3
	500	0.27	1.87	102.2

を示す。

Fig. 1 (A)に示すごとく、コハク酸を呼吸基質に用いた場合、終末濃度 $50 \mu\text{M}$ ($22\text{--}25 \text{ n mol/mg protein}$)ではState 3及びState 4の呼吸の明らかな抑制が見られた。100 μM ではState 3呼吸はほぼ完全に抑制されるが、DNPの添加で解放され、さらに高濃度(0.5mM)ではすべての呼吸が抑制された。

呼吸基質に $\beta\text{-OH}$ を用いた場合にほぼ同様である(Fig. 1 (B))。

しかし、呼吸基質にアスコルビン酸+TMPDを用いた場合には、高濃度の被検物質存在下において、なお基質レベルの呼吸が維持され、KCN存在下では完全に呼吸阻害が見られた(Fig. 1 (C))。

Fig. 2は、高濃度(0.5mM)trans-Chlordaneが各Stateの呼吸を抑制することを示す。

Fig. 3 (A), はtrans-Chlordane存在下のMtにおける呼吸(State 3, State 4及びDNPによる解放呼吸), RCI及びADP/O比の濃度依

存性を示す。図から明らかなように、これらのうち、State 3呼吸の抑制が最も強く、その50%阻害度は、およそ $50 \mu\text{M}$ であった。

trans-Chlordaneの他、cis-Chlordane, Heptachlorないしは、Heptachlorepoideについても、ほぼ同様であった。

Fig. 4は、クロルデン成分及び代謝産物についてそれぞれ終濃度 $50 \mu\text{M}$ 存在下における呼吸活性の変化を比較したものである。その結果、RCI値の低下の度合は、trans-Chlordane>cis-Chlordane>Heptachlor>Heptachlorepoideの順であった。

2. 肝Mtの潜在性ATPase活性に対する作用

Fig. 5にtrans-Chlordane存在下に於ける肝MtのATPase活性の変化を示す。即ちtrans-Chlordaneは Mg^{2+} 依存性ATPase (Mg^{2+} -ATPase)活性を促進し、その度合は終末濃度 $100 \mu\text{M}$ ($81 \text{ nmol/mg protein}$)で最高値(溶媒対象の7.2倍)を示し、さらに高濃度(0.5mM)では、活性の促進効果は顕著に低下した。一方、

DNP 活性化 ATP ase (DNP-ATP ase) 活性に対しては、濃度依存的な抑制効果を示し、終末濃度 0.5 mM の阻害率は 60.2% であった。cis-Chlordane 及び Heptachlor の場合は、濃度依的に Mg^{2+} -ATP ase 活性を促進し、DNP-ATP ase 活性を抑制した。しかし、Heptachlorepoide は、上記二者とは異なり、 Mg^{2+} -ATP ase 活性の促進も DNP-ATP ase 活性の抑制も見られなかった (Table 1)。

考 察

生体内でエネルギー転換作用を担う Mt については、多くの化学物質による阻害が知られている。即ち、各種環境汚染物質の Mt に対する in vivo ならびに in vitro の作用に関して数多くの報告があり、重金属^{15), 16)}をはじめ PCN¹⁷⁾、フタル酸エステル¹⁶⁾、ブロム化合物¹⁹⁾など、各種化学物質の毒性検定にもこうした手法が取り入れられつつある。

Mt の酸化的リン酸化に対する阻害様式は電子伝達阻害、脱共役及びエネルギー転移阻害の三つに大別されるが、その区分は必ずしも容易でなく、緒方ら²⁰⁾のような方法も考案されている。

本実験に用いたクロルデン成分及び代謝産物の Mt に対する影響については、trans-Chlordane, cis-Chlordane 及び Heptachlor が比較的濃度 ($\leq 100 \mu M$) で State 3 及び State 4 の呼吸を抑制し、RCI 及び ADP/O 比を低下させるが、特に 3 呼吸の低下が鋭敏であり、抑制された State 3 呼吸が DNP で解放されるところから、化学説におけるこれらのエネルギー転移阻害作用が示唆される。しかし、高濃度では、trans-Chlordane にみられるような電子伝達阻害作用がある。

呼吸基質の種類による作用の違いについては、アスコルビン酸 + TMPD 系では高濃度のクロルデン類による電子伝達阻害が観察されず、これらの作用点に関して Site 特異性が考えられる。即ち、これらの結果は、cyt. c \rightarrow O₂ 間の電子伝達経路 (Site 3) のクロルデンに対する感受性が他の部位よりも低いことを示唆する。

次に、酸化的リン酸化反応の部分反応としての ATP ase 活性については、無傷の Mt は活性を示さないが、機械的損傷や脱共役剤によりリ

ン酸反応の逆反応が促進されて、著しい活性の上昇を示すようになる。また DNP で促進される ATP 活性は、オリゴマイシンなどのエネルギー転移阻害剤で抑制されることが知られている。こうしたことから、Mt の ATP ase 活性に対する作用の上から、クロルデンの呼吸活性に対する阻害様式をよりの確に把握することが可能であると考えた。

実験結果から明らかのように、Heptachlorepoide を除くクロルデン成分はいずれも Mg^{2+} -ATP ase 活性の著明な促進効果をもち、その作用は先の酸素消費速度の上から得た阻害様式と異なる脱共役剤としての特徴を示す。

この原因の一つに、これら薬剤の酸化的リン酸化反応に対する作用についての多様性が考えられるが、この点については詳細な検討が必要である。更に、クロルデンの主たる代謝産物である Oxychlordane が得られなかったため、本実験では用いなかったが、この点に関する検討も必要である。

いずれにせよ、本研究の結果はクロルデンが DDT やリンデンと比べかなりの低濃度で Chinese Hamster Cells に対して障害作用を示すという Tsushimoto ら²¹⁾の結果と併せてクロルデンによる毒性発現の機構を考える上で一つの示唆を与えるものであろう。

結 論

白蟻防除処理剤クロルデンの毒性に関し、ラット肝 Mt の酸化的リン酸化反応に対する作用を調べた結果、以下の成績を得た。

1. クロルデン成分及び代謝産物存在下で Mt の呼吸、RCI 及び ADP/O 比の低下が起こり、その度合は、trans-Chlordane > cis-Chlordane > Heptachlor > Heptachlor epoxide の順であった。
2. 各種呼吸活性指標のうち、State 3 の呼吸が最も鋭敏に阻害され、クロルデンのエネルギー転移阻害作用が示唆された。しかし高濃度では、全ての呼吸が抑制され、電子伝達阻害が示された。
3. 呼吸活性の低下は呼吸基質の種類によって異なり、作用部位の Site 特異性が示された。
4. trans-Chlordane, cis-Chlordane 及び Hep-

tachlor は Mg^{2+} -ATP ase 活性を促進し, DNP-ATP ase 活性を抑制した.

5. Heptachlor の代謝産物 Heptachlorepoide は Heptachlor よりも Mt に対する阻害作用が弱い.

謝 辞

本稿を終えるに当たって, 御指導, 御校閲を賜わった恩師, 緒方正名教授に心から感謝します. また, 実験に際し御指導, 御協力いただいた岡山県環境保健センター井上豊治博士に謝辞を申し上げます.

文 献

1. 環境庁環境保健部保健調査室編, 化学物質と環境. 東京, pp. 8—71, 1983.
2. ペルシコールパシフィックリミテッド編, クロルデンハンドブック, シロアリキクイムシの防除の手引. pp. 1, 1979.
3. 野口信行: 白蟻防除処理家屋のクロルデン残留量と作業者の血液検査成績について. 岡山医学会誌, 投稿中.
4. 野口信行: クロルデン暴露ラットの生体内運命について. 岡山医学会誌, 投稿中.
5. Boyd, E.M. and Taylor, F.I.: The acute oral toxicology of chlordane in albino rats fed for 28 days from weaning on a protein; deficient diet. *Ind. Med.* **38**, 434, 1969.
6. National Cancer Institute: *Bioassay of Chlordane for Possible Carcinogenicity Technical Report*, Series No. 8, pp. 77—808, 1977.
7. Epstein, S.S.: Carcinogenicity of heptachlor and chlordane. *Sci. Total Environ.* **6**, 103, 1976.
8. Deichman, W.B. and Pepling, M.L.: Effect of combinations of pesticide on reproduction of mice, (abstract 11). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 337, 1966.
9. 環境庁環境保健部保健調査室編, 化学物質と環境. 東京, pp. 23, 1984.
10. Aldrich, F.D. and Horlner, J.H.: Acute chlordane intoxication in child. *Arch. Environ. Health* **19**, 129—132, 1969.
11. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Palade, G.H.: Cytochemical studies of mammalia tissues. 1. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* **172**, 619—635, 1984.
12. Utsumi, K.: Relation between mitochondria swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P in mitochondrial Pi fraction. *Acta. Med. Okayama*, **17**, 258—271, 1963.
13. Gormal, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751—766, 1948.
14. 高橋泰常: 組織中無機磷真値と Creatine 燐酸の定量法及び豚精子の Phosphoamidase, Creatine Phosphokinase 作用について. 生化学, **26**, 690, 1955.
15. 長谷川享: 各種重金属イオンのミトコンドリアに対する作用. 岡山医学会誌, **89**, 1487—1494, 1977.
16. 長谷川享, 野上祐作, 緒方正名: カドミウムとルテニウムレッドの相互作用, 特にミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して. 岡山医学会誌, **89**, 1501—1505, 1977.
17. 大熊勝明: PCN の正常ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化に対する作用. 岡山医学会誌, **91**, 1455—1460, 1979.
18. Inouye, B., Ogino, Y., Ishida, T., Ogata, M. and Utsumi, K.: Effect of phthalate esters on mitochondrial oxidative phosphorylation in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43**, 189—198, 1978.
19. Inouye, B., Katayama, Y., Ishida, T., Ogata, M. and utsumi, K.: Effect of aromatic bromine

- compounds on the function of biological membranes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **48**, 467—477, 1979.
20. Ogata, M., Mori, T., Izushi, F., Etoh, K., Sakai, R., Meguro, T. and Inouye, B.: Classification of potentially toxic chemicals based on their effects on mitochondrial respiration. *Phys. Chem. Physics Med. NMR.* **15**, 229—232, 1983.
21. Tsushima, G., Chang, C.C., Trosko, J.E. and Matsumura, F.: Cytotoxic, mutagenic and cell-cell communication inhibitory properties of DDT, Lindane and Chlordane on Chinese Hamster Cells in vitro. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 721—730, 1983.

Epidemiological Studies of Chlordane for Termite Prevention

Part 3. Effect of chlordane on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria

Nobuyuki NOGUCHI

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. M. Ogata)

In order to clarify the cytotoxicity of chlordane (industrial product as insecticide), the effect on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria was studied.

The respiration rate, RCI and ADP/O ratio were inhibited by chlordane related compounds, and the degree of inhibition was in the descending order of trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor and heptachlor epoxide. Of the indexes indicating various respiratory activities, state 3 respiration was the most sensitively inhibited by these compounds, suggesting their energy transfer inhibition. However, electron transport was also inhibited by high concentrations of chlordane constituents. The inhibitory effect of the chlordane constituents on respiratory activity varied depending on the species of respiratory substrate, suggesting site specificity of these compounds. Trans-chlordane, cis-chlordane and heptachlor stimulated Mg^{2+} ATPase activity and inhibited DNP-stimulated ATPase activity. Heptachlorepoide, a metabolic product of heptachlor, has less effect on mitochondria than heptachlor.