

# 岡山医学会雑誌

第90巻3, 4, 合併号 (1000, 1001)

昭和53年4月30日発行

## 亜硝酸イオンと硝酸イオンのミトコンドリア膜 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)

井上 堅太郎

(昭和52年11月8日受稿)

### 緒 言

二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) などの窒素酸化物は, 大気中に存在して呼吸により吸入され, それ自身でも呼吸器に有害に作用するし, 亜硫酸ガス (SO<sub>2</sub>), 浮遊粒子状物質等の大気汚染物質と共に複合汚染により相加的相乗的に人体に影響を及ぼすことが推定されている。また光化学オキシダント等の二次汚染物質の生成に重要な化合物でもあることなど, 大気汚染物質として近年注目されている。

窒素酸化物は産業活動や自動車等の発生源における燃料の燃焼にもなって発生するため, 大規模工業立地地域や大都市等において大気汚染をひきおこすこととなった。発生源である工場の燃焼施設や自動車からは主として酸化窒素 (NO) が排出されるが大気中で O<sub>2</sub> 等と反応して二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) に変化するため, 環境大気中では両者が汚染物質として検出されている。

窒素酸化物のうち, 生体に対する影響についての研究報告は NO<sub>2</sub> に関するものが多く発表されている。

動物実験では, 肺気腫をおこし死亡率を増大させること<sup>1), 2)</sup> 窒素酸化物は, 同様に主要な大気汚染物質である亜硫酸ガスに比べ水に溶けにくく従って肺の末端上皮細胞に到達しやすく<sup>3)</sup> 従って呼吸機能へ

強い影響を及ぼすこと<sup>4)</sup> 呼吸器細胞の変化や気管支上皮細胞の増殖をおこすこと<sup>5), 6)</sup> インフルエンザウィルスに対する感染抵抗性の低下<sup>7), 8), 9)</sup> インフルエンザウィルスに感染させた場合に末梢気管支に腺腫様異型像が出現すること<sup>10)</sup> メトヘモグロビンを増加させること<sup>11)</sup> 等が知られている。

人に対する二酸化窒素の影響については, 産業曝露に係る症状に関し多種多様の例がみられる<sup>12)</sup> 疫学的な調査結果は米国と日本で報告されているが<sup>13), 14), 15)</sup> 現段階では WHO の報告によれば疫学的に二酸化窒素と人の健康影響の関係を決定的に対応づけることは困難であるとされている<sup>16)</sup> しかしこの点に関しては今後研究の余地が残されているものと考えられる。

生化学的な研究は, 肺などの還元型グルタチオン量の変化<sup>6), 17)</sup> リン脂質生成に対する影響<sup>18), 19)</sup> 脂質過酸化反応などの例があり, いずれも生体膜に対する二酸化窒素の影響を認めている。

大気中の二酸化窒素は水に吸収された場合は, ほぼ等モルの亜硝酸イオンと硝酸イオンになるとされており<sup>21)</sup> 筆者は主として亜硝酸ソーダを使用して亜硝酸イオンがミトコンドリアの呼吸活性に与える影響を調査し, いくつかの知見を得たので報告する。

## 調査方法

## 1 ミトコンドリアの分離

体重 200g 前後のドンリュウ系ダイコクネズミの肝よりミトコンドリアを分離して実験に供した。ミトコンドリアの分離は、0.25M sucrose, 3mM tris-HCl (PH 7.4), 0.1mM EDTA 中でHogeboom, Shneider の変法<sup>22)</sup>で分離し、0.25M sucrose, 3mM tris-HCl (PH 7.4) で洗浄したものを使用した。

## 2 酸化的リン酸化反応

反応液として、3.5ml の 0.15MKCl, 10mM ほう酸緩衝液 (PH 7.4) を用い、反応温度25℃で反応した。呼吸基質としてはコハク酸ソーダ 5mM を、またリン酸化基質として ADP 0.3mM を添加し、溶液中の溶存酸素の経時変化を酸素電極を用いて測定記録し、亜硝酸ソーダ等の添加による影響を調べた。

実験は前述のように、二酸化窒素が水に吸収された場合に亜硝酸イオンと硝酸イオンになるとされて

いるため、<sup>21)</sup>亜硝酸ソーダと硝酸ソーダによる影響の差を調査した後、酸化的リン酸化反応の亜硝酸ソーダ添加による影響を調べた。

また、亜硝酸イオンのミトコンドリア膜への影響の機構を解明する目的で、反応液を10mM tris-KCl 緩衝液 (PH 7.4) を使用して比較を行った。

## 結果

## ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する亜硝酸イオンと硝酸イオンの作用の差

図1にみられるように、硝酸イオンの添加による影響は極く僅少で呼吸調節能 (R.C.I.) はコントロール 3.8 から 3.7 に低下したのみであるが、亜硝酸イオンを添加した場合の影響は強く発現し呼吸調節能 (R.C.I.) は 3.0 に低下した。

また亜硝酸イオンに同量の硝酸イオンを加えた場合も硝酸イオンの影響は少なく、呼吸調節能は 3.0 から 2.8 に低下したのみであった。

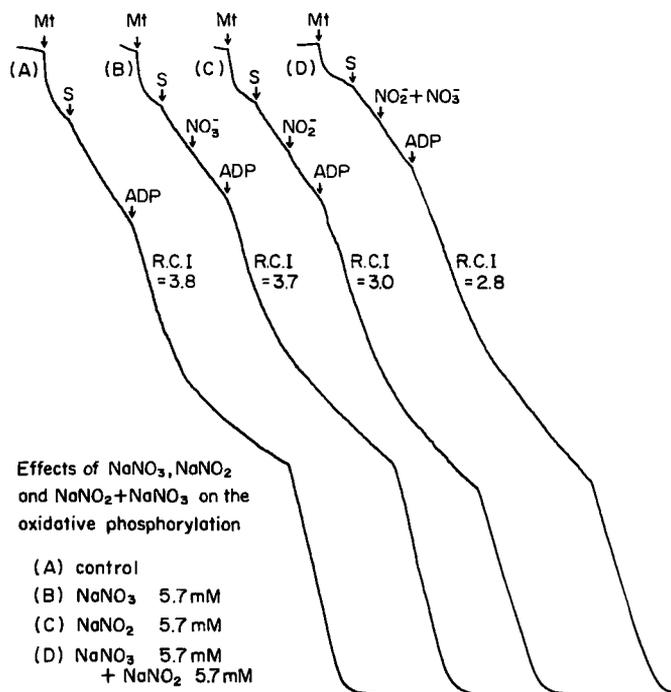


Fig. 1 Effects of NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> and NaNO<sub>2</sub>+NaNO<sub>3</sub> on the oxidative phosphorylation

- (A) control
- (B) NaNO<sub>3</sub> 5.7mM
- (C) NaNO<sub>2</sub> 5.7mM
- (D) NaNO<sub>3</sub> 5.7mM + NaNO<sub>2</sub> 5.7mM

亜硝酸イオンの作用

State 4 の呼吸活性の変化は、図2にみられるように亜硝酸ソーダの濃度が0-5 mM に上昇するに

Fig. 2 Effect of NaNO<sub>2</sub> on the relative activity of State 4 and the ratio of respiratory-release

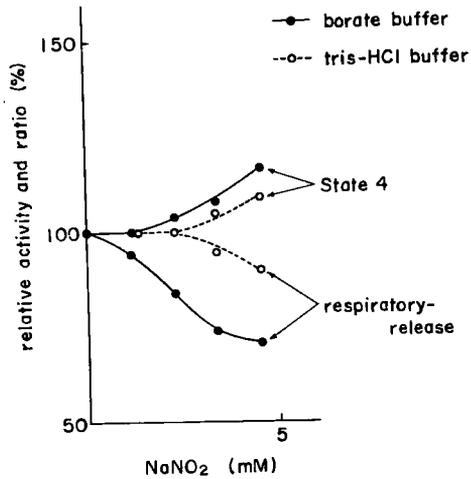
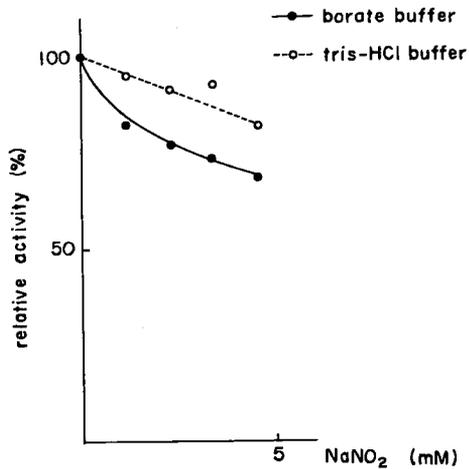


Fig. 3 Effect of NaNO<sub>2</sub> on the relative activity of State 3



従って、呼吸活性が上昇している。また、図2の(脱共役時呼吸速度) / (State4 の速度) については亜硝酸ソーダの濃度が0-5 mM に上昇するに従って比率の低下が認められた。

State 3 及び呼吸調節能 (R.C.I) に対する作用は、図3、図4のように、State 3 の呼吸活性は亜硝酸ソーダの濃度が0-5 mM に上昇するに従ってコントロールの約70%程度に低下し、呼吸調節能については約50%程度に低下することが認められた。

なお本研究は tris-hydroxymethyl-aminomethane が NH<sub>2</sub> 基を有することを考慮してホウ酸緩衝液を反応液としたが tris-HCl 緩衝液を用いた場合にも類似の作用が認められた。

Fig. 4 Effect of NaNO<sub>2</sub> on the respiratory control index

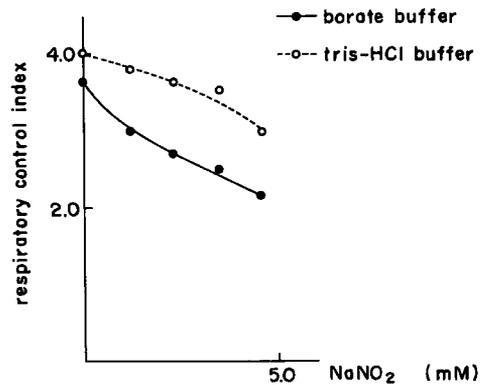


Fig. 5 Respiratory control index on the condition of borate or tris-HCl buffer

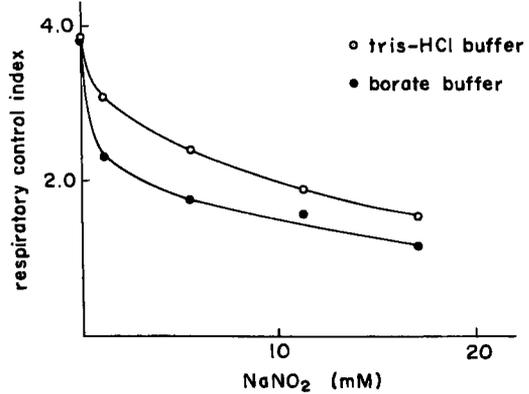


Fig. 6 Relative activity of state 3 on the condition of borate or tris-HCl buffer

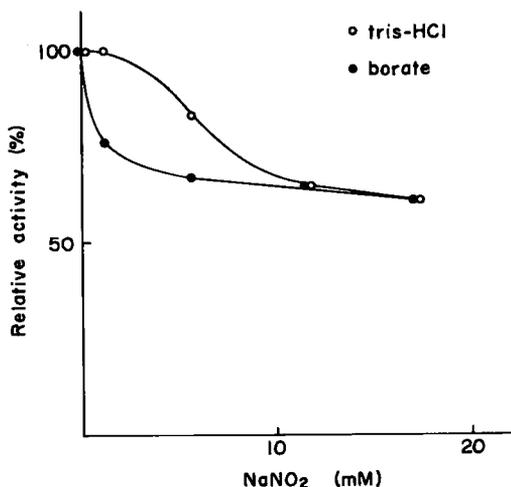
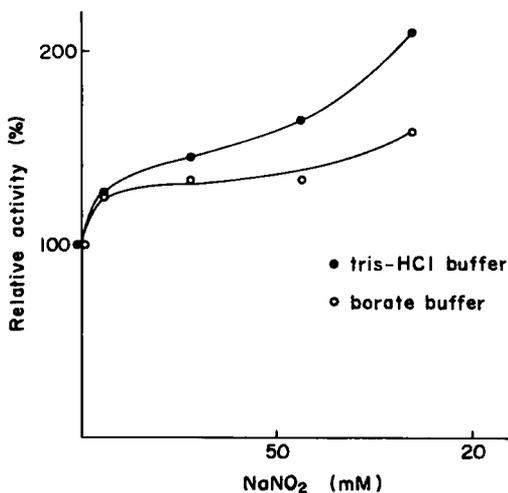


Fig. 7 Relative activity of state 4 on the condition of borate or tris-HCl buffer



#### 反応液の相違による亜硝酸イオンの作用の差

同一のミトコンドリアによるホウ酸緩衝液とtris-HCl緩衝液を反応液とした場合の亜硝酸イオンの作用の差は図5, 図6, 図7のとおり得られた。図5のように呼吸調節能に関しては, 図4と同様に亜硝酸ソーダ濃度に依存して低下するが, ホウ酸緩衝液

を使用した場合の方が呼吸調節能の低下が著しい。また State 4 の呼吸活性は図6のように亜硝酸ソーダの濃度が0-20mM程度の範囲では, 濃度の高いほど両緩衝液の差が大きく, State 3 の呼吸活性は図7のように亜硝酸ソーダの濃度が0-5 mMの範囲では両緩衝液の差が大きく, 10-20mMの付近での差がほとんど認められなかった。

#### 考 察

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応においてみられる呼吸調節能は, ミトコンドリア膜の微細な変化に対応して変化することが知られている。硝酸イオンに比べて亜硝酸イオンを添加した場合の呼吸調節能への影響は, 亜硝酸イオンの場合の方が強く現れ, 今回の実験濃度, 5 mM程度では亜硝酸イオンの作用に注目すべきであると思われる。

亜硝酸ソーダ0-20mMの添加により呼吸調節能が低下したことから, 亜硝酸ソーダの添加により, ミトコンドリア膜は何らかの傷害を受けて変化したと考えられる。この傷害の結果は図2にみられるように亜硝酸ソーダがミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して脱共役作用を有するものと考えられる。この結果は長谷川等による亜硝酸イオンがミトコンドリアの潜在ATPase活性を活性化させるという内容とも一致している。

図5-7のようにホウ酸緩衝液に比べtris-HCl緩衝液が亜硝酸ソーダのミトコンドリアに対する作用を緩和するように作用しているものと考えられ, このことは $\alpha$ -アミノ酸のアミノ酸Nの定量<sup>24)</sup>に利用される,  $\alpha$ -アミノ酸の亜硝酸による脱アミノ化反応のように, tris-HCl緩衝液中のtris-hydroxy-methyl-aminomethaneのアミノ基に亜硝酸イオンが何らかの作用を及ぼしたものと推定される。ホウ酸緩衝液ではこのような作用がなく呼吸調節能等に差が生じたと推定される。このことは亜硝酸ソーダがミトコンドリアの生体膜のアミノ基に作用を及ぼしていることを示唆しているものと思われる。またこの作用は亜硝酸ソーダ0-5 mMではState 3の呼吸活性に影響を与え, さらに10-20mMではState 4の呼吸活性の上昇, 即ち脱共役作用の発現に関与しているものと推定される。

二酸化窒素の生化学的影響に関しては, マウスの肺, 肝臓組織の還元グルタチオンの減少<sup>61,7)</sup>、ラットの肺脂質における脂質過酸化反応<sup>20)</sup>など, 二酸化窒素の酸化作用を説明するような研究例があるが, 本研

究では亜硝酸イオンがミトコンドリア膜へ作用し細胞に傷害を与えることが明らかとなり、この事は生体膜の作用に対して新しい知見を加えたものと考えられる。

### 結 論

二酸化窒素の生体作用に関連して、亜硝酸ソーダと硝酸ソーダのラット肝ミトコンドリアに対する作用を調査して以下の結果を得た。

1 ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して、亜硝酸ソーダは硝酸ソーダに比べて5 mM 程度の濃度では影響が強く発現する。

2 亜硝酸ソーダは、1-10mM の濃度において State 4 の呼吸活性を上昇させる。このことは亜硝酸ソーダが脱共役作用を有しているためと考えられ

る。

3 ミトコンドリアの呼吸調節能は1-10mM の濃度において低下することが認められた。

4 二酸化窒素がアミノ基に影響を与えることが知られていることから、酸化的リン酸化反応の反応液をホウ酸緩衝液、tris-HCl 緩衝液について比較した結果、tris-HCl 緩衝液の場合に亜硝酸ソーダの作用が弱くなる傾向が認められた。このことから亜硝酸ソーダがミトコンドリア生体膜のアミノ基へ作用する可能性が推定された。

本研究にあたりご指導いただいた岡山大学医学部公衆衛生学教室緒方正名教授、ご協力いただいた同教室長谷川亨氏に深謝いたします。

### 参 考 文 献

- 1) La Towsky, L. W. Mc Quiddy E.L., Toljman J.P. : J. Ind. Hyg. Toxicol., 23, 129-133, 1941
- 2) Hine, C. H., Meyers, F. H., Wright, R. W. : Pulmonary changes in animal exposed to nitrogen dioxide, effects of acute exposures, Toxicol. Appl. Pharmacol., 16, 201-213, 1970
- 3) 横山栄二 : O<sub>3</sub> の肺機能に及ぼす影響, 光化学反応による大気汚染に関する学術講演会講演集, 123-143 日本公衆衛生協会 (東京) 1972
- 4) 横山栄二 : SO<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub> 及び O<sub>3</sub> の換気能に及ぼす影響の比較, 産業医学, 11, 563-568, 1969
- 5) Freeman, G., Stephens, R. J., Crane, S. C., Furiori, N. J. : Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide, Arch. Environ. Health, 17, 181, 1968
- 6) 中島泰知, 楠本繁子, 陳震東, 岡本一也 : 二酸化窒素長期連続暴露のマウス肺の還元型グルタチオン量におよぼす影響と病理組織学的変化, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 労働衛生編, No.7, 35-41, 1969
- 7) 服部正次, 建石竜平, 中島泰知 : 低濃度 NO<sub>2</sub>, CO ガス暴露によるマウスの気管支肺胞系の形態学的変化について, 日本胸部疾患学会雑誌, 10, 16, 1972
- 8) Buckley, R. D., Loosli, C. G. : Effects of nitrogen dioxide inhalation on germfree mouse lung, Arch. Environ. Health, 18, 588, 1969
- 9) Freeman, G., Crane, S. C., Stephens, R. T., Furiori, N. J. : The subacute nitrogen dioxide induced lesion on the rat lung, *ibid*, 18, 605, 1969
- 10) 伊藤耕三 : NO<sub>2</sub> ガス暴露マウスのインフルエンザウィルス感染に及ぼす影響, 日本衛生学雑誌, 26, 304, 1971
- 11) Mc Quiddy, E. L. : J. Ind. Hyg. Toxicology, 23, 200-215, 1941
- 12) 窒素酸化物等に係る環境基準専門委員会, 窒素酸化物等に係る測定法検討委員会 : 窒素酸化物等の環境基準に関する資料 (昭和47年6月), 25-26, 1972
- 13) Shy, C. M., Creason, J. P., Pearlman, M. D., Mc Clain, K. E., Benson, F. B., Young, M. M. : The Chattanooga School children study : Effects of community exposure to nitrogen dioxide I, Journal of Air Pollut. Control Association, 20, 539-545, 1970
- 14) Shy, C. M., Creason, J. P., Pearlman, M. D., Mc Clain, K. E., Benson, F. B., Young, M. M.

- : The Chattanooga School children Study: Effects of community exposure to nitrogen dioxide II, *ibid*, 20, 582-588, 1970
- 15) 環境庁環境保健部: 複合大気汚染健康影響調査, 1977
  - 16) 環境庁大気保全局企画課: WHO 窒素酸化物に関する環境保健クライテリア (草案) (第7章の仮訳), 1977
  - 17) 中島泰知, 楠本繁子: NO<sub>2</sub> 短期連続暴露のマウス肺還元型グルタチオン量におよぼす影響, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 労働衛生編, No.6, 17, 1968
  - 18) 瀬戸勝男, 川上正澄, 杉田暉道, 宍戸昌夫, 山路瑞子, 津田恒之: 肺のリン脂質の生成に対するオゾンおよび二酸化窒素吸入の影響, 医学と生物学, 86, 317-320, 1973
  - 19) 瀬戸勝男, 川上正澄, 竹島三知子, 昆真紀子, 杉田暉道, 宍戸昌夫: 肺のリン脂質の生成に対するオゾンおよび二酸化窒素の短時間曝露の影響, *ibid*, 87, 57-60, 1973
  - 20) Grey, E. L., Goldberg, S. B., Patton, F. M.: Toxicity of the oxides of nitrogen, *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 10, 423-425, 1954
  - 21) 大気汚染研究全国協議会, 第二小委員会編: 大気汚染ハンドブック, 測定編, 152-167, コロナ社, 東京 1971
  - 22) Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P<sup>32</sup> in mitochondrial Pi fraction, *Acta Med. Okayama*, 17, 259-271, 1963
  - 24) 長谷川亨, 緒方正名: ミトコンドリアのATPase 活性に関する亜硝酸ソーダの作用について, 本誌, 投稿中
  - 25) 藤井暢三: 生化学実験法, 定量編, 191-196, 南山堂, 東京, 1964

**Effects of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) and sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ )  
on the mitochondrial membrane**

by

**Kentaro INOUE**

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Masana Ogata)

Effects of  $\text{NaNO}_2$  and  $\text{NaNO}_3$  on the oxidative phosphorylation of mitochondria were studied, and following results were obtained.

- 1) The effect of  $\text{NaNO}_2$  on the oxidative phosphorylation is higher than  $\text{NaNO}_3$ .
- 2) Relative activity of State 4 is activated by  $\text{NaNO}_2$  (1–10mM) added to reaction mixture.
- 3) The respiratory control index of mitochondria is decreased by  $\text{NaNO}_2$ .
- 4) The effect of  $\text{NO}_2^-$  on oxidative phosphorylation in the borate buffer as reaction mixture is higher than that in the tris-HCL buffer. It is suggested that  $\text{NO}_2^-$  has a probability of the reaction on  $-\text{NH}_2$  site of mitochondria.