

ニトロソアミンのミトコンドリア膜に対する作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

石井邦彦

（昭和53年8月31日受稿）

緒言

過去において、染料、有機薬品その他の合成原料として、ジフェニルアミンが作業現場で広く使用されており、ジフェニルニトロソアミン（DPNA）の生成の可能性があることから、DPNA中毒の問題が危惧されてきた。

1970年代前半から、特に食品分野においてニトロソアミンの存在と生成の確認に関する多くの研究が行われてきたが^{1)~3)}。最近、環境大気および室内空気中からも、多い場合は ppb レベルに達するニトロソアミンを検出したことが報告され^{4)~6)}。注目されている。そして、これらニトロソアミン類は、発ガン物質としてのみならず、肝障害性中毒物質として、その量は極めて微量であっても、長期暴露により強い人体影響を示す物質である。

ニトロソアミン類の前駆体である各種2級アミンおよび亜硝酸塩は、生活環境中に広く存在し、これらからニトロソアミンを生成する傾向は、特に各種産業現場でよく使用されている弱塩基性アミンに顕著である⁷⁾。そして、その生成速度は、アミンの濃度と亜硝酸塩の濃度の2乗との積で表わされる⁸⁾。すなわち、亜硝酸塩またはNO₂濃度が増大すれば、ニトロソアミンの生成し易さは、著しく増大することが示唆される。また、空气中、室温、自然光下において、NO、NO₂とジメチルアミン（DMNA）の生成を確認した報告⁹⁾も見られ、大気中でも2級アミンと窒素酸化物により容易にニトロソアミンが生成することが裏付けられた。

最近の大気中における窒素酸化物濃度は、増大の傾向を示しているが¹⁰⁾。これによって、ニトロソアミン類がより生成され易い状況となったことが懸念される。このような背景から、ニトロソアミン類の中毒作用機序の解明は、重要な問題と思われる。

著者は、強い慢性中毒作用を解明する手振りの1つを

得る目的で、in vitroにおいて、ニトロソアミンのミトコンドリア膜に対する障害作用を検討し、2~3の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

肝ミトコンドリアの分画

体重 200g 前後のドンリウ系ラットから肝臓を摘出し、Hogeboom Schneider の変法¹¹⁾でミトコンドリアを分画し、分画後、0℃で、0.25M sucrose, 3mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) に懸濁したものを実験に供した。

試薬溶液の調製

N-Nitrosodimethylamine (DMNA), N-Nitroso-diethylamine (DENA) は、和光純薬製試薬特級、N-Nitrosodibutylamine (DBNA) は東京化成製、N-Nitrosodiphenylamine (DPNA) は和光純薬製をそれぞれ用い、和光純薬製試薬特級エチアルコールに溶解し、0.05M~1M の範囲の必要な濃度の溶液を調製し、試薬溶液とした。

酸化的リン酸化反応の測定

反応液 (0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer-pH 7.5) 3.5ml 中に、リン酸 2mM、ミトコンドリア、呼吸基質 Na-succinate 4mM を添加し、続いて反応液中のニトロソアミンの最終濃度が 0.05, 0.075, 0.1, 0.17mM 等々となるよう試薬溶液を添加し、さらにリン酸化基質 ADP 0.26mM を添加して、反応温度 25℃における反応液中の溶存酸素消費量をガルバニーアンモニウム電極（給水化学製）を用いて、経時的に測定した。

呼吸調節能 (R. C. I.) や ADP/O 比の計算は、Chance, Williams らの方法¹⁰⁾で行なった。

K⁺遊出の測定

反応液 (0.25M 砂糖, 10mM Tris-HCl buffer-pH 7.5) 3ml にミトコンドリアを添加し、続いて反応液中のニトロソアミンが、1mM、等々、必要濃度となるよう試薬溶液を加えて、反応温度 25℃において、反応液中に遊出してくる内部 K⁺ をカリウム電極

(Beckman社) を用いて経時的に測定した。

実験結果

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対するニトロソアミン類の作用
ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対するニトロソアミン類の作用を検討するため、反応液中の試薬最終濃度を0.17mMとし、肝ミトコンドリアの呼吸活性に対する各種ニトロソアミン類の作用を検討した結果をFig. 1に示す。なお、対照は、試薬の溶剤に使用するエチルアルコールを、反応液中の最終濃度が約0.86%となるよう添加したもので、ミトコンドリアは、正常な呼吸調節能 (State 3/State 4: 5.0) を示した。Fig. 1から明らかな如く、ニトロソアミンを添加したものは、いずれも対照に対し、State 4呼吸を上昇させ、ADP/O比を低下させる脱共役作用を有することが認められた。この場合、R. C. I. の方が、ADP/O比よりも脱共役現象に対する感度が高いため認められた。それ故 R. C. I. を指標として、次の検討を行なった。

この脱共役作用を比較するため、添加した試薬の種類ごとに呼吸調節能を求める、Table 1の結果を得た。この結果から、ニトロソアミンは低濃度域(0.2 mM~1 mM)において、肝ミトコンドリアの呼吸調節能に対し、若干の機能障害を示し、その障害作用は、DMNA=DENA<DBNA<DPNAの順に大きくなつた。この順位は、これら化合物の水溶性に反比例する。すなわち、化合物の脂溶性とよく一致することが示唆された。

Table 1. Effects of Nitrosamines on the oxidative phosphorylation of mitochondria.

Compound	Respiratory Control Index
Control	5.00
DMNA	4.95
DENA	4.68
DBNA	3.65
DPNA	3.59

また、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対するニトロソアミン類の脱共役作用と、添加試薬の濃度との関係につき検討を行ない、Fig. 2の結果を得た。この結果から、DPNAおよびDBNAは、上記脱共役作用が、濃度増加とともに著しく増大するのに

対し、DMNAおよびDENAは、測定した濃度範囲内(0~15mM溶液)では、脱共役作用は始んど認められなかった。また、DPNA、DBNAの脱共役作用は、0.1mMから0.2mMの濃度範囲で急激に増大することが認められた。

ミトコンドリアに対するニトロソアミンのK⁺遊出作用

ニトロソアミン中DPNA、DBNAは、ミトコンドリアのエネルギー転換系に対し、脱共役作用を示すことが認められ、ミトコンドリア膜に対する傷害作用を有することが示唆された。この傷害作用機序を検討するため、ミトコンドリア膜のK⁺区画性に対する作用を比較検討し、Fig. 3の結果を得た。

この結果から、K⁺遊出はDPNAの添加によって最も強く、DBNAを添加した場合も若干認められたが、DMNA、DENA添加の場合においては、1mM濃度では殆んど認められなかった。K⁺遊出強度の順位は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する脱共役作用の順位と良く一致している。

K⁺遊出作用の濃度依存性をDPNAおよびDBNAについて検討を行ない、Fig. 3-(B), Fig. 3-(C)の結果を得た。この結果から、DPNAでは0.5mM以上、またDBNAでは約2mM以上の濃度においてK⁺遊出が強く誘起されることが認められた。

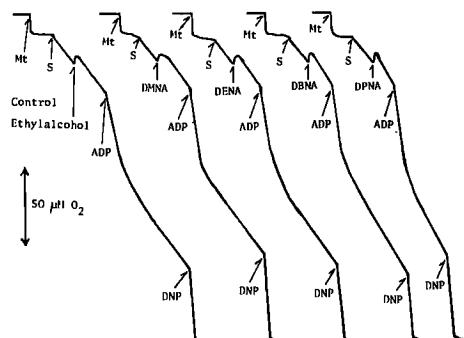


Fig. 1 The effects of nitrosamines on the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria.

Experimental conditions were described in method, except that the concentration of nitrosamines was 0.17 mM and that of ethyl alcohol as control was 0.86 percent.

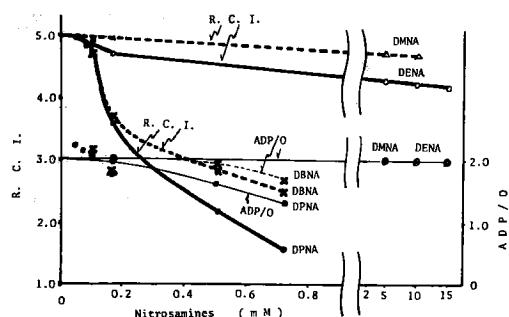


Fig. 2 The effects of nitrosamines on the respiratory control and ADP/O ratio of rat liver mitochondria.

Experimental conditions were as same as in Fig. 1 except that various concentrations of nitrosamines were added. Respiratory control index (RCI) and ADP/O ratio were calculated by the method of Chance and Williams¹⁰⁾

考 察

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する脱共役作用は、DMNA=DENA<DBNA<DPNA の順に大きくなっている。この順位は、これら化合物の脂溶性とよく一致していることが明らかとなつたが、このことから、ニトロソアミンの作用部位としては、ミトコンドリア膜の脂質にアルキル基またはフェニル基が作用し、ニトロソ基を外に向いていることが推定される。長谷川らは、ベンゾチオフェンのベンゼン環が膜に作用していることを指摘している¹¹⁾が、上記の推定とよく符合する。

ニトロソアミン類のうち、DPNA, DBNA は特に生体膜に親和性が強く、ミトコンドリア膜の障害、K⁺イオン透過性の増大、脱共役現象、呼吸調節能の低下等一連の膜の生物作用に障害をもたらす。ベンゼン、トルエン等の作用発現濃度が数 mM であるのに対し、DPNA, DBNA は 0.2 mM の低濃度でミトコンドリアの呼吸調節能に対する作用を発現する。このことから、ニトロソアミンの生体に対する傷害作用が強いことが示唆され、ニトロソアミンは、生体膜に対して障害作用があることが、新たに認められた。

結 論

ニトロソアミン類の生体作用を解明するため、生体膜に対する作用、特にミトコンドリアのエネルギー

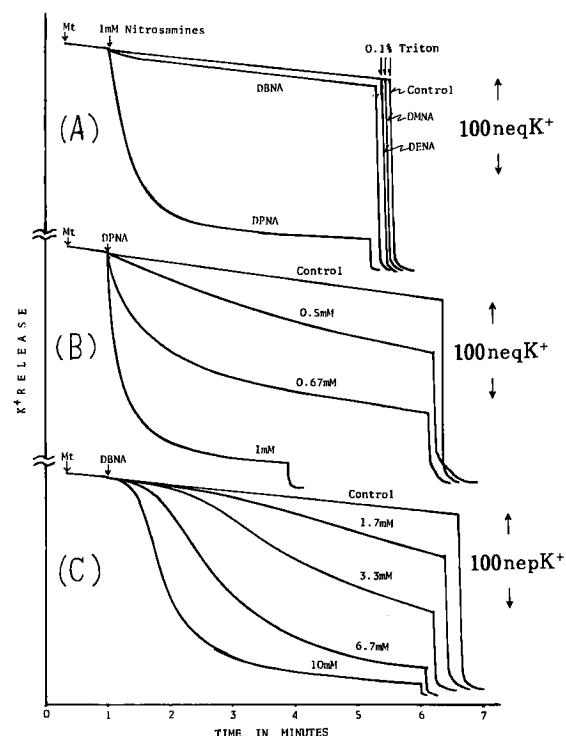


Fig. 3 Release of K⁺ from mitochondria by treatment with nitrosamines. Experimental conditions were described in method, except that the concentration of nitrosamines was 1 mM in (A) and (B) various concentrations of DPNA and (C) various concentrations of DBNA.

一転換反応および K⁺選択性に対するニトロソアミン類の作用を検討し、以下の結果を得た。

- 1) DPNA, DBNA は、低濃度域（約 0.2 mM 液）において、肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化機能を阻害した。
- 2) DPNA, DBNA は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する脱共役作用が、濃度増加とともに著しく増大するのにに対し、DMNA, DENA は、測定濃度範囲内（0 ~ 15 mM 液）では、脱共役作用は殆ど認められなかった。そして、DPNA, DBNA の脱共役作用は、0.1 mM から 0.2 mM の濃度範囲で急激に増大することが認められた。

- 3) ミトコンドリア内からの K⁺遊出は、DPNA, DBNA の添加によって観察された。特に DPNA の添加による K⁺遊出は強かった。しかし、1 mM の濃度の DMNA, DENA では、K⁺遊出は観察されなかった。

4) ニトロソアミンによるミトコンドリア内からの K^+ 遊出強度の順位は、呼吸調節能の阻害度の順位と良い一致を示した。

5) 以上の成績を総括すると、ニトロソアミンはミトコンドリア膜機能を障害し、その障害作用はニトロソアミンの化学構造によって変り、DPNA, DBNA, DENA, DMNAの順に作用が強いことが認めら

られ、発ガン性や肝硬変の作用のほか、生体膜機能に障害作用を示すことが示唆された。

謝 詞

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御高闘を賜った、緒方正名教授に深謝いたします。また終始変わぬ御援助、御協力を戴いた長谷川亨氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 河端俊治, 中村昌道, 石橋亨, 赤築秀憲, 浜野美代子, 松居正己: 食品中のN-ニトロソアミンに関する研究, 食衛誌, **13**, 240, 1971.
- 2) 山田隆: 食品中のニトロソアミンの分析法, 食品衛生研究, **24**, 875-886, 1974.
- 3) D. H. Fine, D. P. Rounbehler and P. E. Oettinger: A rapid method for the determination of sub-part per billion amounts of N-nitroso compounds in foodstuffs, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 383-389, 1971.
- 4) D. H. Fine, D. P. Rounbehler, N. M. Belber and S. S. Epstein: N-nitroso compounds: Detection in ambient air, *Science*, **192**, 1328-1330, 1976.
- 5) D. H. Fine, D. P. Rounbehler, E. Sawiki, K. Krost and G. A. DeMarrais: N-nitroso compounds in the ambient community air of Baltimore, Maryland, *Anal. Letters*, **9**, 595-604, 1976.
- 6) 山手昇, 井上哲男, 松村年郎, 坂田衛, 松居正巳: 空気中のN-ニトロソ化合物の測定, 第18回大気汚染研究全国協議会大会講演要旨集, p. 362, 1977.
- 7) 相原敬次, 篠崎光夫, 金子幹宏, 和田裕, ニトロソアミンの大気中での生成に関する基礎的検討, 第18回大気汚染研究全国協議会大会講演要旨集, p. 316, 1977.
- 8) 環境庁大気規制課, 昭和52年版日本の大気汚染状況, 1977.
- 9) Utsumi, K.: Reaction between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction, *Acta Med. Okayama*, **17**, 259-271, 1963.
- 10) Chance, B. and Williams, G. R.: *Advan. Enzymol.*, **17**, 65, 1956.
- 11) 長谷川亨, 緒方正名: ベンゾチオフェン, ジベンゾチフェンのミトコンドリア膜に対する作用, 岡山医学雑誌, **90**, 167-177, 1978.

Effects of nitrosamines on the mitochondrial membrane**Kunihiko ISHII**

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Masana Ogata)

In order to clarify the biological toxicities of nitrosamines, the effects of nitrosamines on the biological membrane, especially on the energy transfer reaction and on the K^+ compartmentation of mitochondria were examined.

The results obtained were as follows;

- 1) DPNA and DBNA uncoupled the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria at the low concentration (about 0.2 mM solution).
- 2) Uncoupling activities of DPNA and DBNA to the mitochondrial oxidative phosphorylation were increased in accordance with the increase in concentration and showed a remarkable increase within the concentration range from 0.1 mM to 0.2 mM solution.
- 3) The release of K^+ from mitochondria was induced by treatment with DPNA or DBNA, especially was accelerated by DPNA. However, it could not be induced by treatment of 1mM DMNA or DENA.
- 4) The order of K^+ -release intensity induced by nitrosamines was corresponding to that of uncoupling activities of nitrosamines.
- 5) In conclusion, it was recognized that the functions of mitochondrial membrane were damaged by nitrosamines and their injurious effects were influenced by their chemical structures in the order of DPNA, DBNA, DENA and DMNA. This suggests that nitrosamines may have injurious effects on the function of the biological membrane, as well as their already recognized effects of carcinogenecity or liver injury (liver cirrhosis).