

白アリ防除剤に関する実験的研究

第 1 編

有機リン系薬剤およびクロロナフタリン系薬剤の 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)

酒 井 律 江

(平成 2 年 5 月 31 日受稿)

Key words: 有機リン系薬剤, クロロナフタリン系薬剤, ミトコンドリア,
酸化的リン酸化

緒 言

白アリ防除剤として、有機塩素系殺虫剤であるクロルデンが約25年間にわたって広く用いられてきた。クロルデンは難分解性で、環境中に長期間残留し、魚介類への蓄積¹⁾や白アリ防除処理家屋の大気および土壌の汚染²⁾³⁾が数多く報告されている。またヒトでは母乳への移行⁴⁾、その他、暴露後に作業者の運動失調、痙攣等が観察されている⁵⁾。したがってヒトの健康や生活環境の保全等に悪影響をおよぼす恐れがあると、1986年9月、クロルデンは「化学物質の審査および製造等の規則に関する法律」により、特定化学物質に指定され、国内でのその製造、使用、輸入が禁止となった⁶⁾。

そのためクロルデンに替わる薬剤として、より環境汚染および人体に対する影響の少ないとされている有機リン系薬剤⁷⁾であるクロルピリホス (0, 0-diethyl 0-(3, 5, 6, -trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate), ピリグフェンチオン (4, 5-dihydro-3-oxo-2-phenyl-6-pyridazinyl diethyl phosphothioate), ホキシム (0, 0-diethyl 0-(α -cyanobenzylideneamino) phosphorothioate) およびクロロナフタリン系薬剤である α -クロロナフタリン, β -クロロナフタリンの使用が増加して来た。その中

でも有機リン系薬剤が多用されるようになった。有機リン系薬剤はクロルデンに比べて残留性が少ないことが特性とされている⁷⁾。しかし、有機リン系薬剤であるクロルピリホスについては、農業用の使用濃度に比較して白アリ防除剤としての散布濃度は約2.5~75倍と著しく高い⁸⁾。それ故に、白アリ防除作業従事者にとって中毒事故発生の危険がより多くなると考えられる。そこで、作業従事者の健康管理や環境汚染等の公衆衛生的見地からも、これらの薬剤の毒性についてより詳細に情報を得る必要があると思われる。

一方、クロルデンの生体膜に対する作用については、すでに単離ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化における、エネルギー伝達障害、および ATPase 活性における酵素系の障害について、報告されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。そこで、今回これら有機リン系およびクロロナフタリン系薬剤の生体膜に対する作用について検索するため、単離ラット肝ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化および ATPase 活性に及ぼす影響に関して比較検討し、その阻害様式をも併せて考察した。

実験材料と実験方法

1. ラット肝ミトコンドリア (Mt) の分離調製
体重約200 gのドンリュウ系ラットを断頭後、

直ちに肝臓を摘出し、Hogeboon-Schneider¹²⁾の変法¹³⁾により、肝 Mt を分離調製した。なお Mt 蛋白の定量は Biuret 法¹⁴⁾により測定した。

2. 呼吸活性の測定

0.15 M KCl, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) より成る反応液に MT (5.0~8.8 mg protein/ml) を懸濁し、25°C で攪拌しながら呼吸基質 (5 mM コハク酸ナトリウム), 各薬剤, 0.3 mM アデノシンニリン酸ナトリウム (Na-ADP) および 2, 4-ジニトロフェノール (DNP) を順次添加し、反応液中の溶存酸素濃度の変化をガルバニー電極 (給水化学) を用いて経時的に測定した。

各 State の酸素消費速度, および呼吸調節能 (RCI) は萩原の方法で算出した¹⁵⁾。

3. ATPase 活性の測定

0.2 M ショ糖液, 20 mM KCl, 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 3 mM MgCl₂ より成る反応液に Mt (2.5~4.4 mg protein/ml) を懸濁し、50 mM Na-ATP を加えて全量 2 ml とし、25°C, 15 分間反応させた。その後水冷過塩素酸で反応を停止させ、遠心除蛋白後、上清液中の無機リン (Pi) を高橋の方法¹⁶⁾で測定した。

4. 試 薬 類

本実験に使用した試薬類は以下の通りであった。

クロルピリホス標準品およびピリダフェンチオン標準品は和光純薬工業(株)より、ホキシムはナノゲン社より、そして α -クロロナフタリンおよび β -クロロナフタリンは東京化成工業(株)より購入した。

Fig. 1 に本実験に使用した、白アリ防除剤としての有機リン系薬剤およびクロロナフタリン系薬剤の構造式を示す。

これらのものはすべてエタノールに溶解して実験に供した。

その他の試薬類はすべて試薬特級のものを使用した。

実 験 結 果

1. 肝 Mt の呼吸活性に対する作用

3 種類の有機リン系薬剤および、2 種類のクロロナフタリン系薬剤について、単離ラット肝

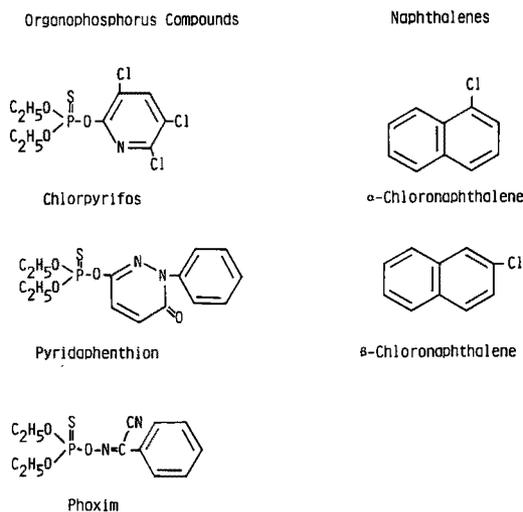


Fig. 1 Chemical structure of pesticides

Mt の呼吸活性 (State 3 および State 4) に対する作用を比較検討した。

1) 有機リン系薬剤

有機リン系薬剤の呼吸活性に対する作用を Fig. 2 に示す。図に示すようにクロルピリホス、ピリダフェンチオンおよびホキシムの全てに State 3 呼吸活性の抑制が認められた。各々の薬剤の State 3 呼吸活性の対照に対する 75% 阻害濃度は、クロルピリホスでは約 45 μ M, ピリダフェンチオンでは約 300 μ M およびホキシムでは約 70 μ M であった。

State 4 呼吸活性については、クロルピリホスおよびピリダフェンチオンは濃度依存的にその活性を促進した。しかしホキシムは State 4 呼吸活性に対してはほとんど作用を示さなかった。State 4 呼吸活性の対照に対する 150% 促進濃度は、クロルピリホスでは約 65 μ M であり、ピリダフェンチオンにおいては約 200 μ M であった。

2) クロロナフタリン系薬剤

クロロナフタリン系薬剤の呼吸活性に対する作用を Fig. 3 に示す。図に見られるように α -および β -クロロナフタリンの両者とも、State 3 呼吸活性を抑制したが、その抑制の度合は僅かであった。

しかし、両薬剤は State 4 呼吸活性を濃度依

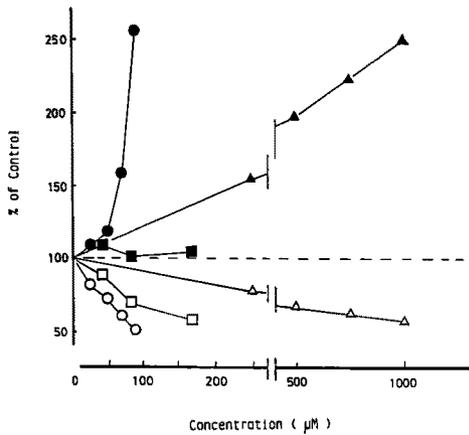


Fig. 2 Effect of organophosphates on mitochondrial respiratory activity
 State 3 : ○—○, Chlorpyrifos △—△, Pyridaphenthion □—□, Phoxim
 State 4 : ●—●, Chlorpyrifos ▲—▲, Pyridaphenthion ■—■, Phoxim

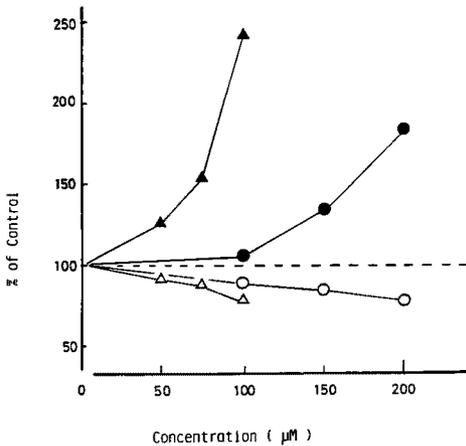


Fig. 3 Effect of chloronaphthalenes on mitochondrial respiratory activity
 State 3 : ○—○, α-Chloronaphthalene △—△, β-Chloronaphthalene
 State 4 : ●—●, α-Chloronaphthalene ▲—▲, β-Chloronaphthalene

的に促進した。State 4呼吸活性の対照に対する150%促進濃度は、α-クロロナフタリンでは約170 µMであり、β-クロロナフタリンにおいては約75 µMであった。

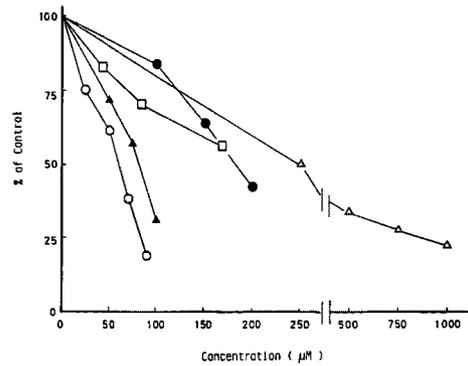


Fig. 4 Effect of pesticides on mitochondrial activity (RCI)
 ○—○, Chlorpyrifos △—△, Pyridaphenthion □—□, Phoxim
 ●—●, α-Chloronaphthalene ▲—▲, β-Chloronaphthalene

以上の結果より State 3呼吸活性の抑制の度合は、クロルピリホス > ホキシム > β-クロロナフタリン > α-クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順であった。

State 4呼吸活性の促進はクロルピリホス > β-クロロナフタリン > α-クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順で強かった。しかし、ホキシムは State 4呼吸活性に対してほとんど作用を示さなかった。

3) 有機リン系薬剤およびクロロナフタリン系薬剤による呼吸調節能(State 3 / State 4, Respiratory Control Index : RCI) に与える影響

RCIに対する有機リン系薬剤およびクロロナフタリン系薬剤の作用を Fig. 4 に示す。図に見られるように、全ての薬剤において RCI の低下が見られた。その低下の度合は、クロルピリホス > β-クロロナフタリン > ホキシム > α-クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順であった。

2. 肝 Mt の ATPase 活性に対する作用

1) 有機リン系薬剤

有機リン系薬剤による ATPase 活性に対する作用を Fig. 5 に示す。

クロルピリホス、ホキシムおよびピリダフェンチオンの全ての薬剤は潜在性 ATPase (latent ATPase) 活性を濃度依存的に促進したが、ピリ

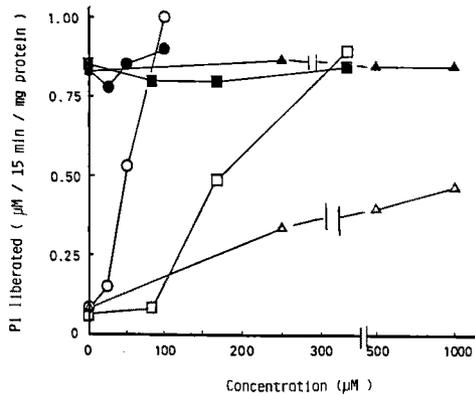


Fig. 5 Effect of organophosphates on mitochondrial ATPase activity
 - DNP : ○—○, Chlorpyrifos △—△, Pyridaphenthion □—□, Phoxim
 + DNP : ●—●, Chlorpyrifos ▲—▲, Pyridaphenthion ■—■, Phoxim

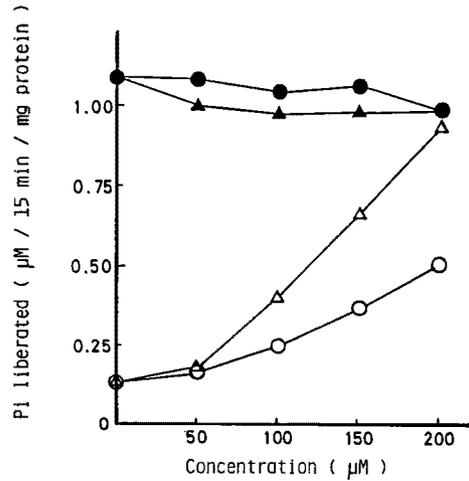


Fig. 6 Effect of chloronaphthalenes on mitochondrial ATPase activity
 - DNP : ○—○, α-Chloronaphthalene △—△, β-Chloronaphthalene
 + DNP : ●—●, α-Chloronaphthalene ▲—▲, β-Chloronaphthalene

ダフェンチオンはその作用が最も弱かった。DNPで活性化したATPase (DNP stimulated ATPase) 活性に対しては、いずれの薬剤もほとんど作用をおよぼさなかった。

2) クロナフタリン系薬剤

クロナフタリン系薬剤によるATPase活性に対する作用を Fig. 6 に示す。

α- および β-クロナフタリンは共に濃度に依存して、latent ATPase 活性を促進したが、DNP stimulated ATPase 活性に対しては、ほとんど影響が認められなかった。

考 察

ミトコンドリアには細胞の生命維持に重要な器官があり、種々の反応を行っている。そのひとつにミトコンドリアの呼吸鎖で生じたエネルギーを利用して、ADP と Pi から ATP を生成する酸化的リン酸化反応がある¹⁷⁾¹⁸⁾。この反応はエネルギーの生成に大切な役割を果たし、その機能障害は生体に大きな影響をおよぼすと考えられる。Chance と williams は酸素電極を用いて、無傷のミトコンドリアの生理的状態(State)を観察している¹⁹⁾。State 3 は呼吸基質, Pi, ADP

および酸素が十分にあり、酸化的リン酸化反応が最もスムーズに進行し、呼吸速度が極めて速く、ATP が合成されている状態であり、それに続く State 4 は ADP が全てリン酸化されて、呼吸速度はゆるやかとなり、呼吸鎖の電子伝達系とリン酸化系が平衡となる制御呼吸状態をいう。

ミトコンドリアのインタクトネスの指標は、一般に呼吸調節能 (RCI : Respiratory Control Index : State 3 / State 4) が使用されている。この値を無傷のミトコンドリアのそれと比較することにより、ミトコンドリアのインタクトネスの状態を推測することができる¹⁷⁾。

また、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する阻害作用は電子伝達阻害、エネルギー伝達阻害および脱共役の三つの様式に大別されている¹⁷⁾¹⁸⁾。すなわち、ミトコンドリアの呼吸鎖の電子の流れを阻害するものが、電子伝達阻害であり、その阻害剤は呼吸鎖におけるそれぞれの Site を阻害する。また ATP へのエネルギー伝達反応を阻害するものが、エネルギー伝達阻害であり、State 3 呼吸のみを阻害するという。そしてミトコンドリアの電子伝達系とエネ

ルギー伝達系の共役を切断し、ATPの形成を阻止し、State 4呼吸を促進するものが、脱共役であるといわれている。

また、無傷のミトコンドリアには潜在性ATPase活性はほとんどないが、これはミトコンドリアの機械的損傷や脱共役剤等によって活性化されるといわれている。そしてDNPで活性化されたATPaseはオリゴマイシンなどのエネルギー伝達阻害剤で抑制されるという¹⁷⁾¹⁸⁾。

今回実験した有機リン系薬剤はミトコンドリアの呼吸機能に対して、それぞれ異なった作用を示した。すなわちクロルピリホスは強くState 3呼吸を抑制し、State 4呼吸を促進した。その結果RCIは濃度に依存して低下し、このことには、State 3およびState 4の相方が関与した。そしてlatent ATPase活性を促進した。これらのことから脱共役作用が推測され、またState 3呼吸活性の強い抑制とDNP stimulated ATPase活性には影響のないことから、電子伝達阻害もうかがわれた。ピリダフェンチオンでは弱いState 3呼吸活性の抑制とState 4呼吸活性の促進が見られ、RCIの低下作用も最も弱かった。またlatent ATPase活性の僅かな活性化が認められたのみであった。ホキシムにおいてはState 3呼吸活性の抑制が認められたが、State 4呼吸活性には影響がなかった。このことからホキシムによるRCIの低下は、State 3呼吸活性の抑制によるものと考えられる。またlatent ATPase活性を促進し、DNP stimulated ATPase活性には影響のないことから、ミトコンドリアの阻害様式として、電子伝達阻害が考えられ、またlatent ATPase活性の作用から、ミトコンドリアの呼吸鎖における作用の他にミトコンドリア膜自体への損傷が推察された。

以上のことから、今回検討した有機リン系薬剤においては、クロルピリホスがミトコンドリア呼吸機能に対して最も阻害作用が強く、次いでホキシムが、ピリダフェンチオンはその作用は弱く、それぞれの薬剤によるミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対しては、異なった作用様式をもつことが示唆された。

クロロナフタリン系薬剤である α -および β -クロロナフタリンはいずれもState 3呼吸活性を

僅かに抑制し、State 4呼吸活性を濃度依存的に促進した。その結果RCIは低下したが、このRCIの低下には、State 4呼吸活性の促進作用が多く関与していることが認められた。また、DNP stimulated ATPase活性には影響を与えないが、latent ATPase活性を濃度依存的に促進した。これらのことから α -および β -クロロナフタリンのミトコンドリア呼吸機能に対する阻害様式は脱共役的であることが、強く示唆された。そしてState 3およびState 4呼吸活性、ならびにlatent ATPase活性ともにクロルピリホスが最も影響を多く与えた。

インタクトネスの指標として用いられているRCI値で、今回検討した薬剤を比較すると、クロルピリホス > β -クロロナフタリン > ホキシム > α -クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順であった。クロルピリホスが最も強く、ピリダフェンチオンが最も弱かった。

いずれにしても、クロルデンに替わる白アリ防除剤はミトコンドリア膜に対して、それぞれの阻害様式で作用をおよぼした。特にクロルピリホスはその膜作用が強力であった。白アリ防除作業者の作業環境等を考え併せると、特に、定期的な健康診断はもとより、暴露に対する防御をより一層注意する必要があると考える。さらに今後も、これらの薬剤の生体への有害作用について種々の検討が望まれる。

結 論

今日、クロルデンに替わり使用されている有機リン系およびクロロナフタリン系白アリ防除剤に関し、単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸活性およびATPase活性に対する作用を調べた結果、以下の成績を得た。

1. Mt 呼吸活性に対して

クロルピリホスは強くState 3呼吸活性を抑制し、State 4呼吸活性を促進した。その結果RCIを低下した。

ピリダフェンチオンはState 3呼吸活性には殆ど影響をおよぼさず、State 4呼吸活性を僅かに促進させた。

ホキシムはState 4呼吸活性には影響を与えなかったが、State 3呼吸活性を抑制した。

α -および β -クロロナフタリンはともに, State 3呼吸活性に対しては作用は弱く, State 4呼吸を促進させ, その作用は β -クロロナフタリンの方が強かった.

RCI低下の度合いは, クロルピリホス > β -クロロナフタリン > ホキシム > α -クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順であった.

2. ATPase 活性に対して

検討した全ての薬剤は latent ATPase 活性を促進させ, その作用強度はクロルピリホス >

ホキシム > β -クロロナフタリン > α -クロロナフタリン > ピリダフェンチオンの順であった.

DNP stimulated ATPase 活性に対しては, いずれの薬剤も影響を与えなかった.

本稿を終えるに当たり, 御懇篤なる御指導と御校閲をいただいた岡山大学医学部緒方正名教授に心から深謝いたします. また, 終始御協力いただきました岡山大学医学部公衆衛生学教室の諸先生に感謝いたします.

文 献

- 1) Yamagisi T, Miyazaki T, Kaneko S and Horii S: Residues of chlordanes in fish and selfish from Kanto Area and it vicinity. *J Food Hyg Soc Jpn* (1981) **22**, 270—270.
- 2) 野口信行: 白蟻防除処理家屋におけるクロルデン残留量と作業者の血液検査成績について. *岡山医誌* (1985) **97**, 315—326.
- 3) 野口信行: クロルデン暴露ラットの生体内運命について. *岡山医誌* (1985) **97**, 327—339.
- 4) Miyazaki T, Akiyama K, Kaneko S, Horii S and Yamagisi T: Chlordane residues in milk. *Bull Environ Contam Toxicol* (1980) **25**, 518—523.
- 5) Aldrich FD and Holmes JH: Acute chlordane intoxication in child. *Arch Environ Health* (1969) **19**, 129—132.
- 6) 井上嘉幸: シロアリ防除剤のはなし [1]. しろあり (1986) pp. 8—16.
- 7) 岩崎一郎: 人体残留: 農薬中毒, 平木 深, 上田喜一編, 南江堂, 東京 (1978) pp. 87—99.
- 8) 須永匡彦, 吉田宗弘, 上田照子, 高坂祐夫, 原 一郎: シロアリ防除作業におけるクロルピリホスの曝露と尿中アルキルリン酸濃度との関係. *産業医* (1989) **31**, 142—149.
- 9) 野口信行: 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. *岡山医誌* (1985) **97**, 341—349.
- 10) 森 孝昭: テクニカルクロルデン投与ラットの肝, 血清成分の変化および散布作業従事者の血清検査. *岡山医誌* (1986) **98**, 809—818.
- 11) Ogata M, Izushi F, Eto K, Sakai R, Inoue B and Noguchi N: Effect of chlordane on hepatic mitochondrial respiration. *Toxicol Lett* (1989) **48**, 67—74.
- 12) Hogeboom GH, Schneider WC and Pallade GC: Cytochemical studies of mammalian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J Biol Chem* (1948) **172**, 619—635.
- 13) Utsumi K: Relation between mitochondria swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of 32pP in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med Okayama* (1963) **17**, 258—271.
- 14) Gornall AG, Bardawill CJ and David MM: Determination of serum proteins by the biuret reaction. *J Biol Chem* (1949) **177**, 751—766.
- 15) Hagihara B: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* (1961) **46**, 134—142.
- 16) 高橋泰幸: 組織中無機燐真値と 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* (1955) **26**, 690—698.

- 17) 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕造: ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応; ミトコンドリア, 南江堂, 東京 (1971) pp. 152—205.
- 18) 中沢 透, 浅見行一: 酸化的リン酸化. ミトコンドリア, 東京大学出版会, 東京 (1979) pp. 38—64.
- 19) Chance B and Williams G R: A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation; Nature (1955) **176**, 250—254.

Toxicity of organic phosphates and chloronaphthalenes

Part 1. The effect on mitochondrial oxidative phosphorylation in the rat liver

Ritsue SAKAI

Department of Public Health,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M. Ogata)

The effect of organic phosphates and chloronaphthalenes, which are used in new pesticides on mitochondrial oxidative phosphorylation in the rat liver was examined.

Chlorpyrifos and phoxim decreased State 3 respiration in a dose-dependent manner, but pyridaphenthion, α - and β -chloronaphthalene had only a slight effect. Degree of their effect in the order of chlorpyrifos > phoxim > β -chloronaphthalene > α -chloronaphthalene > pyridaphenthion. Chlorpyrifos, pyridaphenthion, α - and β -chloronaphthalene affected on the State 4 respiration, but phoxim did not. Consequently, they lowered the respiratory control index and the effect being in the order of chlorpyrifos > β -chloronaphthalene > phoxim > α -chloronaphthalene > pyridaphenthion.

All the compounds tested stimulated latent ATPase activities, but DNP - stimulated ATPase activities were not affected by these compounds. Their effect on latent ATPase activities were in the descending order of chlorpyrifos > phoxim, β -chloronaphthalene > α -chloronaphthalene > pyridaphenthion.

These findings suggest that chlorpyrifos, pyridaphenthion, phoxim, α -chloronaphthalene and β -chloronaphthalene impede mitochondrial oxidative phosphorylation.