

クロルデンのラット肝ミトコンドリアの 呼吸活性に対する作用

岡山大学医学部公衆衛生学講座 (指導: 緒方正名教授)

出 石 文 男

(平成2年9月4日受稿)

Key words : Chlordane, Mitochondria, Oxidative phosphorylation,
Electron transport system

緒 言

クロルデンは有機塩素系殺虫剤であり、我が国では白蟻駆除剤として広く使用されてきた¹⁾。その使用量は年々増加の一途をたどってきたが、1986年9月には化学物質審査規制法により使用禁止になった。白蟻防除処理家屋におけるクロルデン濃度の調査結果によれば、移住空間のみならず、噴霧作業者の血液中にもクロルデンが検出されている^{2,3)}。また、河川、湾の泥質、魚類への蓄積の報告^{4,5,6,7)}があり授乳婦の母乳へのクロルデンの移行も報告されている^{8,9)}。一方、ラットを用いた暴露実験によりクロルデンの成分およびそれらの代謝物が長期にわたり脂肪組織、肝臓等に蓄積することが明らかにされている¹⁰⁾。クロルデンの動物実験による毒性については、ラットにおける中枢神経系の刺激、胃潰瘍、肝肥大等の発現¹¹⁾、マウスにおける胎児数の減少と発育低下¹²⁾、肝癌の多発など多くの報告がある¹³⁾。芳香族ハロゲン化合物として塩化ベンゼンの肝毒性についてはいくつか報告されている^{14,15)}。著者等はクロルデンの *in vitro* の毒性実験によるラット肝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の報告¹⁶⁾を行ってきた。今回、更にクロルデンの肝毒性についてラット肝ミトコンドリア (Mt) を用いて各呼吸基質での呼吸活性に及ぼす影響、特に電子伝達系に与える影響について検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 肝ミトコンドリア (Mt) の分離

体重約200gのドンリユウ系ラット(雄)より Hogeboom, Schneider 法¹⁷⁾の内海による変法¹⁸⁾により肝 Mt を分離し、0.25M sucrose, 4 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) に懸濁し実験に供した。Mt 蛋白の定量は、牛血清アルブミンを標準とし Biuret 法¹⁹⁾により測定した。

2. ミトコンドリア呼吸活性の測定

0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 10mM phosphate buffer (pH7.4) より成る反応液に Mt (2.4mg of protein/ml) を懸濁し、25°C で攪拌しながら呼吸基質 5 mM succinate (suc), 5 mM β -hydroxybutylate (β -HB) または 5 mM ascorbate+0.1mM N, N, N', N' tetramethyl phenylene-diamine (TMPD), chlordane, 0.3 mM ADP を順次添加して全量を3.5ml とし、溶存酸素濃度の変化をガルバニー型酸素電極(給水化学)を用いて、連続的に記録測定した²⁰⁾。

3. 呼吸開放時のクロルデンの影響の測定

0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 10mM phosphate buffer (pH7.4) より成る反応液に Mt (1.6mg of protein/ml), 呼吸基質として 5 mM suc, 5 mM β -HB または 5 mM asc+TMPD をつぎに 0.02mM DNP を加えて呼吸を開放し、各 chlordane を添加して溶存酸素の変化を測定した。

4. 超音波処理亜ミトコンドリア粒子の調整

Mt 懸濁液を氷冷しながら、2分間 Sonifire (Bronson)により超音波処理し未粉碎の沈澱を除き30000rpmで10分間遠心後、実験に供した。NADH-cytochrome C reductaseは反応液0.15 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.4), 0.02mM cytochrome C 中で heptachlor 添加後3分間 incubation し、0.1mM NADH を基質として550nm での cytochrome C の還元を日立ダブルビーム分光光度計を用いて測定した。NADH-DCIP reductase は、dichloroindophenol (DCIP) の還元を600nmで測定した。

5. 試 薬

trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor は和光純薬の製品を用い、ethanol に溶解して実験に供した。ADP, NADH, cytochrome C (type III) は Sigma 社の製品を、他の試薬はすべて特級品を用いた。

結 果

1. 呼吸基質別のクロルデン主成分の影響

Table 1は5 mM β -hydroxybutylate, 5 mM succinate あるいは5 mM ascorbate + TMPD をそれぞれ呼吸基質に用いた時、50 μ M

trans-chlordane, cis-chlordane 及び heptachlor を添加した際の呼吸への影響を示したものである。数値は control に対する%である。Table 1から明らかなように、呼吸基質が ascorbate の場合は state 3呼吸, state 4呼吸に影響を与えなかった。 β -hydroxybutylate の場合は state 3呼吸をやや抑制したが state 4呼吸においては変化がみられなかった。succinate を呼吸基質とした場合は、state 3呼吸, state 4呼吸の両者を抑制した。特に state 3呼吸の抑制がより強く見られた。各 chlordane 間の作用の比較では trans-chlordane が cis-chlordane と heptachlor に比べ強かった。

2. 呼吸開放時における各呼吸基質とクロルデン主成分との関係。

呼吸基質として β -hydroxybutylate, succinate, ascorbate を用い、DNP で呼吸を開放し1分毎に trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor をそれぞれ50 μ M 添加して溶存酸素の消費速度を測定した。Table 2はそれらの値を control に対する%として各 chlordane 間でまとめたものである。この表から明らかなように、ascorbate を呼吸基質に用いた場合には、各 chlordane ともこの濃度では溶存酸素消費の抑制作用は認められなかった。 β -hydrox-

Table 1 Effect of chlordane-components on mitochondrial respiration

experiment	β -hydroxybutylate		succinate		ascorbate	
	state 3	state 4	state 3	state 4	state 3	state 4
trans-chlordane	80	108	37	72	100	100
cis-chlordane	89	100	45	70	100	100
heptachlor	95	100	47	70	100	100

Values are expressed as percents of control

Table 2 Effect of chlordane-components on DNP-released respiration

substrate	trans-chlordane		cis-chlordane		heptachlor	
	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M
β -hydroxybutylate	100	94	100	98	100	98
succinate	45	33	46	41	45	42
ascorbate	100	100	100	100	100	100

Values are expressed as percents of control

ybutylate を呼吸基質に用いた場合には、各 chlordane ともわずかな抑制傾向がみられた。

Succinate を呼吸基質に用いた場合は、濃度依存的に各 chlordane とも強く抑制し、その作用強度は酸化的リン酸化反応阻害と同じように trans-chlordane が cis-chlordane と heptachlor に比べ強くあらわれた。

3. Fig. 1 は heptachlor の電子伝達系への作用を NADH を基質に用いて亜 Mt 粒子での cytochrome C, DCIP の還元への影響を調べたものである。本図に示されるように 100 μM 濃度 heptachlor では NADH による cytochrome C, DCIP の還元作用をわずかに抑制する傾向が見られた。

考 察

生体内でエネルギー転換作用を行う 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。Mt の酸化的リン酸化反応に対する阻害様式は電子伝達阻害、脱共役およびエネルギー転換阻害に大別されるが、その区分は必ずしも容易でない。本実験に用いた trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor の Mt におよぼす影響について succinate を呼吸基質にした場合、比較的低濃度で state 3 呼吸および state 4 呼吸を抑制させるが、特に state 3 呼吸の低下が著しかった。緒方らの分類²¹⁾によれば、chlordane は電子伝達阻害のグループに分類される。このことは、trans-chlordane の低濃度では抑制された state 3 呼吸が DNP で解放されるが、500 μM で抑制された呼吸は DNP で解放されず呼吸阻害作用があることから推測される¹⁶⁾。trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor 間での作用強度はすでに報告されているが¹⁶⁾、これら実験結果からも同じ傾向が観察された。

酸化的リン酸化反応での呼吸基質の違いによる chlordane 主成分の作用の差について succinate, β -hydroxybutylate, ascorbate を用いて検討した結果、succinate の場合に抑制が著しかった。 β -hydroxybutylate の場合は state 3 呼吸を僅かに抑制し state 4 呼吸には影響がみられなかった。さらに、ascorbate の場合には state 3 呼吸, state 4 呼吸どちらにも影響がみ

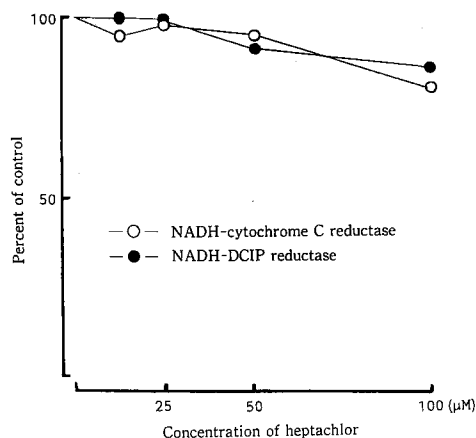


Fig. 1 Effect of heptachlor on the reduction of cytochrome C and dichloroindophenol added to NADH of submitochondrial particles

られなかった。DNP で呼吸解放された Mt の chlordane による抑制は、呼吸基質 succinate の場合が著しいが呼吸基質 β -hydroxybutylate でも抑制が観察される。これらの結果より、この実験に使用した chlordane は site 特異的な電子伝達阻害剤ロテノン、アンチマイシン A, KCN のような作用ではないと考えられる。更に、100 μM heptachlor は亜ミトコンドリア粒子での NADH による cytochrome C, DCIP 還元作用を僅かに抑制することから β -hydroxybutylate での抑制と一致する。以上の結果から chlordane は Mt の呼吸鎖の site II を強く抑制するが site I にも影響をあたえることが推測される。

結 論

Chlordane の主成分である trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor についてラット肝ミトコンドリアに対する影響を調べ以下の成績を得た。

1. 酸化的リン酸化反応への影響：trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor は succinate を呼吸基質にした場合には、state 3 呼吸と state 4 呼吸を抑制した。また、これらの chlordane 化合物は、 β -hydroxybutylate を呼吸基質にしたばあいでは、わずかに state 3 呼

吸を抑制したが、ascorbate のばあいでは state 3 呼吸, state 4 呼吸の抑制が認められなかった。これらの chlordane 化合物間では, trans-chlordane が cis-chlordane, heptachlor に比べ強い抑制作用を示す傾向がみられた。

2. DNP 解放呼吸への影響: trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor は succinate での解放呼吸を強く抑制した。これらの chlordane 化合物は, β -hydroxybutylate の呼吸をわずかに抑制したが, ascorbate の呼吸では抑制は認められなかった。これらの chlordane 化

合物間では, trans-chlordane が cis-chlordane, heptachlor に比べ強い抑制作用を示す傾向がみられた。

3. 亜ミトコンドリア粒子への影響: heptachlor は NADH による cytochrome C, DCIP の還元をわずかに抑制する傾向がみられた。

本稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った岡山大学医学部緒方正名教授に深甚の謝意を表します。

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, 環境庁環境保健部保健調査室 (1983) pp 8—71.
- 2) 野口信行: 白蟻防除処理剤クロルデンの公衆衛生学的研究 (第1報). 白蟻防除処理家屋のクロルデン残留と作業者の血液検査成績について. 岡山医誌 (1985) **97**, 315—326.
- 3) Saito I, Kawamura N, Uno K, Hisanaga N, Takeuchi Y, Ono Y, Iwata M, Gotoh M, Okutani H, Matsumoto I, Fukaya Y, Yoshitomi S and Ohno Y: Relationship between chlordane and its metabolites in blood of pest control operators and spraying conditions. *Int Arch Occup Environ Health* (1986) **58**, 91—97.
- 4) 宮崎奉之, 山下達典, 松本昌雄: 海水, 河川水及び魚介類中の残留クロルデン類の成分パターン. *食衛誌* (1986) **27**, 49—58.
- 5) Oloffs PC, Albright LJ and Sgeto SY: Persistence of residues in water and sediment of a freshwater lake after surface application of technical chlordane. *J Environ Sci Health* (1978) **B13**, 47—58.
- 6) 宮崎奉之, 秋山和幸, 金子誠二, 堀井昭三, 山岸達典, 村上 一: 魚介類中のクロルデンとその近縁化合物の分離同定と定量法. *東京衛研年報* (1980) **31**, 161—165.
- 7) Eugene EK: Correlation of bioconcentration factors of chemicals in aquatic and terrestrial organisms with their physical properties. *Environ Sci Technol* (1980) **14**, 553—556.
- 8) Mjyazaki T, Akiyama K, Kaneko S, Horii S and Yamagishi T: Chlordane residues in human milk. *Bull Environ Contam Toxicol* (1980) **25**, 518—523.
- 9) Tojo Y, Wariishi M, Suzuki Y and Nishiyama K: Quantitation of chlordane residues in mothers' milk. *Arch Environ Contam Toxicol* (1986) **15**, 327—332.
- 10) 野口信行: 白蟻防除処理剤クロルデンの公衆衛生学的研究 (第2報). 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.
- 11) Boyd EM and Taylor FI: The acute oral toxicity of chlordane in albino rats fed for 28 days from weaning on a protein deficient diet. *Ind Med Surg* (1969) **38**, 434—441.
- 12) Deichman WB and Peplinger ML: Effect of combinations of pesticide on reproduction of mice. Abstract of Papers for the fifth Annual Meeting of the Society of Toxicology. Williamsburg, Virginia, March 14—16, 1966. *Toxicol Appl Pharmacol* (1966) **8**, 337—338.
- 13) Epstein SS: Carcinogenicity of heptachlor and chlordane. *Sci Total Environ* (1976) **6**, 103—154.
- 14) 森 孝昭: 塩化ベンゼンの生体膜に対する作用. 第III報. 生体内投与における 0-ジクロルベンゼンのラッ

- ト肝に対する作用. 岡山医誌 (1982) **94**, 967—972.
- 15) 池上幸江, 土橋文江, 大野光宣, 西出英一: ラット肝臓及び血清脂質成分に対する芳香族塩素化合物の影響と化学構造の関係. 食衛誌 (1987) **28**, 436—444.
 - 16) 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.
 - 17) Hogeboom GH, Schneider WC and Pallade GC: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J Biol Chem* (1948) **172**, 619—635.
 - 18) Utsumi K: Relation between mitochondria swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med Okayama* (1963) **17**, 258—271.
 - 19) Gornall AG, Bardawill CJ and David MM: Determination of serum proteins by the biuret reaction. *J Biol Chem* (1949) **177**, 751—766.
 - 20) Hagihara B: Technique for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* (1961) **46**, 134—142.
 - 21) Ogata M, Mori T, Izushi F, Etoh K, Sakai R, Meguro T and Inoue B: Classification of potentially toxic chemicals based on their effects on mitochondrial respiration. *Physiol Chem Phys Med NMR* (1983) **15**, 229—232.

Effect of chlordane on rat liver mitochondrial respiration**Fumio IZUSHI**

**Department of Public Health,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. M. Ogata)**

In attempting to clarify the toxicity of chlordane, its effects on respiratory activities in hepatic mitochondria and on electron transport in sonicated submitochondrial particles were examined.

State 3 and 4 respiration, and DNP-released respiration were inhibited by chlordane compounds, with the ranked degree of inhibition was in descending order being, trans-chlordane, cis-chlordane, and heptachlor. The inhibitory effects of chlordane were more remarkable in the presence of succinate as a respiratory substrate than in the presence of β -hydroxybutylate or ascorbate. Heptachlor also decreased cytochrome C reduction by NADH-cytochrome C reductase. The results suggest that chlordane does not seem to be a specific inhibitor such as cyanide, rotenone, or antimycin A.