

ポリ塩化ナフタリン (PCN) 中毒 に関する実験的研究

第 1 報

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

岡山大学医学部公衆衛生 (指導: 緒方正名教授)

大 熊 勝 明

(昭和54年10月25日受稿)

Key words: ポリ塩化ナフタリン
酸化的リン酸化
呼吸活性
K⁺ 遊出

緒 言

ポリ塩化ビフェニール (PCB) は過去において熱媒体、絶縁油、可塑剤等に使用されて来た。我が国では1968年、PCBを含むライスオイル飲用によるカネミ油症事件があり、PCBの毒性¹⁾が急に注目され、次いで外界に於ける生分解が困難²⁾である為、環境中の海泥や、人体に於ける母乳³⁾等の汚染が注目され、PCBの生体作用の研究はその後急速に進んでいる。

一方に於て、現在 PCB 代替品の一つとして、自動車用コンデンサーの絶縁用含浸油等に使用されているポリ塩化ナフタリン (PCN) は PCB 同様に熱的、化学変化に対し安定性を有しており、環境汚染や生体に対する毒性が憂慮されている。PCN の生産使用量は PCB の約1/10程度であるが、その環境汚染については皆川らによって報告⁴⁾されている。然しながら、その生体作用についての研究報告例は数少ない。

Perna, Halowax らの商品名で知られている PCN は、かつて木材防腐等に多量に使用された例があり、産業衛生中毒として、1936年 C.K. Drinker らは3例の肝障害死亡例⁵⁾、同年、L. Schwartz はクロールアクネと黄色肝萎縮の事故例⁶⁾、1939年 L. Greenburg らは3名の事故例⁷⁾に肝障害を認めた。1943年に E. Collier も同じような事故例⁸⁾を、また同年 L. Schwartz らは作業者の痤瘡症の報告⁹⁾をしている。

これら職業性の中毒に関する文献の外、生体作用についてはカロチンのビタミンAへの生体内変換の阻止¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾が認められる。臨床的病変としては皮膚障害と臓器障害があり、前者は血漿中ビタミンAの欠乏等による塩素痤瘡 (クロールアクネ) であり、後者は臓器特異性があり、肝臓に作用し、肝壊死⁵⁾¹¹⁾¹³⁾に至る。

筆者は PCN の毒性作用機序解明の一環として細胞機能にかかわりのある生体膜機能、特にミトコンドリア膜に対する作用を試験管内実験を行って検討したのでその成績を報告する。

材料と方法

試薬: PCN として Halowax 1031, 1000, 1001 及び1013 (Koppers company製) を100% アセトンに溶解し、40~10mM液を作り、呼吸測定を終末濃度が、0.40mM~0.067mM になるように調整した。その平均塩素数と平均分子量等は〔表1〕の通りである。

Table 1. Numbers of chlorine contained in Halowax used

	average numbers of chlorine	wt % Cl	mean molecular weight
Halowax 1031	1.0	22	163
Halowax 1000	1.25	26	171
Halowax 1001	3.5	50	249
Halowax 1013	4.4	56	281

ミトコンドリア分画：Wistar 系ラット(体重約200g)の肝を取り、そのミトコンドリアを Hogeboom-Schneider の変法により分画¹⁴⁾した。

呼吸活性の測定：反応液0.15MKCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5), 2.5mM Potassium Phosphate buffer (pH7.5)中に25℃でミトコンドリアを添加し、30秒後に Na-Succinate (final 5mM)を加え、30秒後に試薬、更に30秒後に Na-ADP (final 0.3mM)を加えて ATP 合成反応を行わせ、それに伴う酸素消費を酸素電極(給水化学研究所製)により経時的に測定し、state 4 の呼吸を測定後、脱共役剤 DNP (final 0.02mM)を加え全酸素消費量を求めた。尚、反応容量3.0mlで行った。呼吸調節能及び ADP/O 比は荻原の方法¹⁵⁾によって算出した。

K⁺ 遊出作用の測定：反応液, 0.15M Choline Chloride, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 中にミトコンドリアを加え、試薬添加 (final 0.4mM) 後反応液中に遊出してくる K⁺ をカリウム電極 (Beckman社製)を用いて経時的に測定した。反応容量3.0 ml, 反応温度25℃で行った。

結 果

1. ミトコンドリアの酸化的リン酸化に対する作用。

市販の PCN の代表例としての Halowax 中測定濃度付近で濃度比較のしやすい Halowax 1001 (平均塩素数3.5)を用いての酸化的リン酸化に伴う呼吸活性への影響を〔図1〕に示した。実験に使用したミトコンドリアでは RCI=5.6, ADP/O比=約2.0であり、無傷で且つ正常である事を確認している。その結果、本図で示される如く、state 4 の呼吸は濃度の増加と共に活性化し典型的脱共役現象を示した。尚、state 3 の呼吸活性の低下の著しい事実より、エネルギー伝達阻害の作用も有している可能性も否

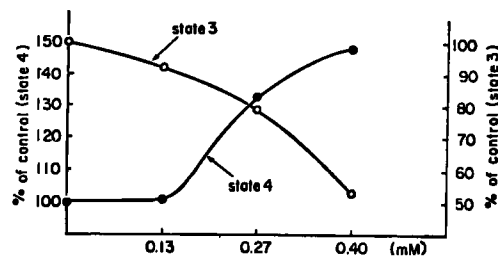


Fig. 1. Concentration dependence of the effect of Halowax 1001 on the respiratory activity of rat liver mitochondria. Experimental conditions are described in methods.

定できない。state 3 の呼吸、state 4 の呼吸の変化は特に濃度0.2~0.3mM付近での変化が著しい。

〔図1〕の成績より算出した呼吸調節能、即ち、RCI (state 3/state 4)の変化及び ADP/O 比の濃度依存性は〔図2〕に示す。〔図1〕及び本図より明

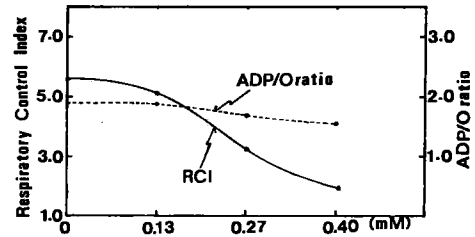


Fig. 2. Concentration dependence of the effect of Halowax 1001 on the respiratory control index and ADP/O ratio of rat liver mitochondria.

Experimental conditions are described in methods.

らかな如く、Halowax 1001 では濃度に依存して RCIが減少する事が認められた。然しながらその際 ADP/O 比の変動は RCI の変動に比較して少なかった。それ故今後この呼吸調節能 RCI を指標に用いて以下の実験を行った。

2. 各種 Halowax の作用強度の比較

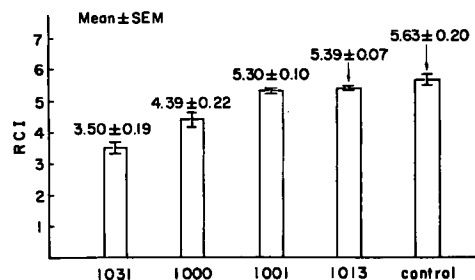


Fig. 3. Comparison of the effect of each Halowax on the respiratory control index of rat liver mitochondria at 0.13mM of various kinds of Halowax.

Experimental conditions are described in methods. SEM: Standard error of means.

〔図3〕は平均塩素数より求めた等モル濃度(終濃度0.13mM)に於ける Halowax 類の作用強度の比較である。RCIの低下は Halowax 1031 (平均塩素数1)が最も強く、次に塩素数1~2の Halowax

1000であり、又 Halowax 1001と Halowax 1013の RCIは低下するが control との差は著明でなかった。

各 Halowax のミトコンドリアの RCI に対する濃度依存性は〔図4〕に示す。塩素を含有する試験

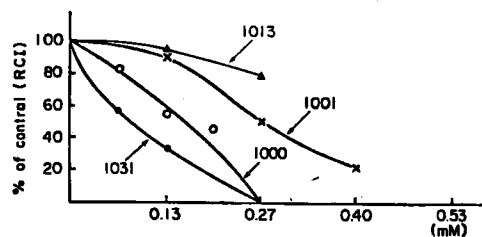


Fig. 4. Comparison of the effect of each Halowax on the respiratory control index at the various concentration.

Experimental conditions are described in methods.

物質の内、RCIへの影響は図から明らかな如く、等モル濃度で比較した場合、用いた実験の濃度では Halowax 1031> Halowax 1000> Halowax 1001> Halowax 1013 の順序に低下した。Halowax 1013の RCI の低下は測定濃度範囲では低い値を示した。この原因の一つとして塩素数の増加と異性体の存在及び水に対する溶解度が非常に小さい為と推定される。

3. K⁺ 遊出作用

ミトコンドリア膜は、膜系が無傷の場合に内部に高い K⁺ 濃度を維持しており、エネルギーを利用した能動輸送による蓄積と僅かづつの K⁺ の漏出とのバランスを保っている。そしてミトコンドリアに於けるエネルギー転換系にも密接な関係を持つと考えられている¹⁶⁾。この K⁺ は膜の微小な変化に対しても速やかに反応して濃度勾配に依存して外部に遊出して行く¹⁶⁾¹⁷⁾。ミトコンドリアの酸化的リン酸化に対する PCN の作用機序の検討の意味で K⁺ 遊出の測定を行った成績は〔図5〕及び〔表2〕に示す。その結果 PCN 類は呼吸調節能への作用とほぼ相関して K⁺ を遊出させる作用のある事が示され、膜障害作用を有する事が認められた。K⁺ 遊出に対する作用強度は Halowax 1031> Halowax 1001≒ Halowax 1000> Halowax 1013であり、RCI 即ち呼吸調節能に対する作用強度と併行しており、塩素数の少ない PCN 程ミトコンドリアの膜障害作用は強い事が認められた。

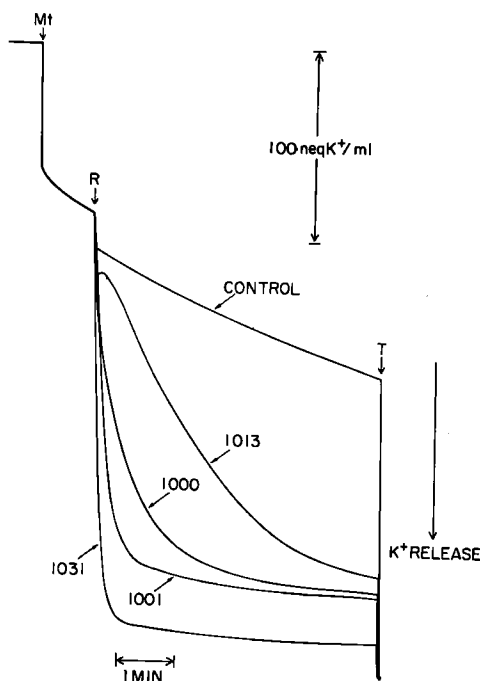


Fig. 5. Release of K⁺ from mitochondria treated with each Halowax. Compositions of a reaction mixture are described in methods.

Table 2. Time course cause of K⁺ release from mitochondria

	Time (min)			
	0	0.5	1	5
	Concentration of K ⁺ , neq/ml			
Control	84	115	125	215
Halowax 1031		620	650	690
Halowax 1000		300	395	560
Halowax 1001		440	505	575
Halowax 1013		150	200	520

考 察

PCN のミトコンドリア膜に対する作用は〔図1〕で見られるように state 4 の呼吸の上昇による脱共役作用と state 3 の呼吸の低下をもたらすエネルギー

一伝達阻害の二つの作用がある。ポリ塩化ビフェニール (PCB) に於ても同様の作用が確認¹⁰⁾されており、PCB に於ける如く環状塩素化合物として同様の作用を有する事が認められた。塩素数と生体膜障害作用との関係は〔図4〕、〔図5〕の結果から明らかなる如く、塩素数が増すにつれてミトコンドリア膜に対する障害作用が低下する事が認められた。然しながら Halowax については RCI に対する作用強度は塩素数と異性体の作用の総和と思われるので一概には論じられない。PCN と PCB との間ではナフタリン核、ビフェニール核の骨核の違いがある事がミトコンドリアの酸化的リン酸化の作用強度の差異に影響している事は否定できない。

結 論

現在 PCB の代用品の一つとして用いられている PCN の生体への作用を調べる目的でポリ塩化ナフ

タリンのミトコンドリア膜に対する作用を Halowax を用いて検討し、以下の成績を得た。

1. ミトコンドリア膜の酸化的リン酸化の作用に対しては state 3 の呼吸を阻害し、state 4 の呼吸を活性化する作用、即ち脱共役作用を有する。
2. Halowax 1001 では添加濃度と RCI の低下との間には平衡関係が認められるが、添加濃度の範囲内では ADP/O 比はやゝ減少の傾向が認められた。
3. PCN はミトコンドリア膜の K⁺ 遊出作用を有しており、Halowax 1031 が最強であった。

謝 辞

本稿を終えるにあたって、御指導、御稿閲賜った恩師緒方正名教授に心から感謝いたします。

文 献

1. Hammond, P.B., Nisbet, I.C.T., Sarofim, A.F., Drury, W.H., Nerson, N. and Rall, D.P.: Polychlorinated Biphenyls-Environmental Impact a Review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ. Res.* 5, 249-362, 1972.
2. Zitko, V. and Choi, P.M.K.: PCB and other industrial halogenated hydrocarbons in the environment. *Fish Res. Board Can. Tech. Rep.* 272, 1-64, 1971.
3. 児玉博和, 太田秀夫: PCB の母子移行に関する研究(1). 日衛誌, 32, 567-573, 1977.
4. 皆川興栄, 滝沢行雄, 戸田芳徳, 北島哲彦: 環境試料中の PCN 分析〔1〕. 公害と対策12, 300-305, 1976.
5. Drinker, C.K., Warren, M.F., and Bennet, G.A.: The problem of possible systemic effects from certain chlorinated hydrocarbons. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 19, 283-311, 1937.
6. Schwartz, L.: Dermatitis from synthetic resins and waxes. *Am. J. Public Health* 26, 586-592, 1936.
7. Greenburg, L., Mayer, M.R., and Smith, A.R.: The systemic effects resulting from exposure to certain chlorinated hydrocarbons. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 21, 29-38, 1939.
8. Collier, E.: Poisoning by chlorinated naphthalenes. *Lanset.* 1, 72-74, 1943.
9. Schwartz, L., and Barlow, F.A.: Chloracne from cutting oils. U. S. *Public Health Rep.* 57, 1747-1752, 1942.
10. Dadrack, R.E., Bieri, J.G., and Cardennas, R.R.: Effects of octachloro naphthalene on vitamin A metabolism in the rat. *J. Nutr.* 57, 287-295, 1955.
11. Brandly, C.A. and Cornelius, C.E.: *Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine*, Acad. Press, New York, Vol. 13, 1969.
12. Huber, W.G., and Link, R.P.: Toxic effects of hexachloronaphthalene on swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 4, 257-262, 1962.
13. Strauss, N.: Hepato-toxic effects following occupational exposure to Halowax (Chlorinated Hydrocarbons). *Rev. Gastroenterol.* 11, 381-387, 1944.
14. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumu-

- lation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama* 17, 258-271, 1963.
15. Hagihara, B.: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 46, 134-142, 1961.
 16. Miyahara, M., and Utsumi, K.: Oxydative phosphorylation controlled by potassium in rat liver mitochondria. *Cell Struct. Funct.* 1, 51-59, 1975.
 17. 内海耕造, 長谷川亨, 緒方正名: 石油成分の生体エネルギー転換反応に対する作用. *医学と生物学* 91, 13-18, 1975.
 18. 緒方正名, 長谷川亨, 荻野泰夫: PCB, PCT, PCN 類の生体膜機能に対する作用, 第52回 日本産業衛生学会講演集, pp. 298-299, 1979.

Experimental study of Polychlorinated naphthalene (PCN) intoxication**1. Effect of PCNs on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria
in a test tube****Katsuaki OHGUMA**

Department of Public Health, Okayama University Medical School of Okayama

(Director : Prof. M. Ogata)

Effect of PCNs on normal isolated mitochondrial membrane was studied and the results obtained were as follows.

- 1) PCNs inhibited the state 3 respiration, and stimulated the state 4 respiration (namely uncoupling action).
- 2) The proportional relationship between a decrease in RCI and an increase in concentration of Halowax 1001 (PCN) was recognized, and a decrease tendency of ADP/O ratio was observed within the range of PCN concentration measured.
- 3) PCNs induced a K^+ release in mitochondria and the release effect was the strongest in Halowax 1031 (PCN).
- 4) Discussion was made that effects of PCNs on the mitochondrial membrane were seemed to be related to their complex characters which are the content of chlorine and their isomers.