

# 有機及び無機マンガ中毒に関する研究

## 第 1 報

### 分離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 MMT 及び $MnCl_2$ の作用比較

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名）

森 田 啓 次 郎

（昭和56年2月16日受稿）

**Key words:** メチルシクロペンタジェニルマンガ、  
塩化マンガ、ミトコンドリア、  
酸化的リン酸化、 $K^+$ 遊出

#### 結 言

無機マンガ（以下Mn）の健康影響については、Mn 製鋼所など労働環境における Mn 粉じんあるいは Mn ヒュームによる慢性のパーキンソニズム様の神経症状を主とする中毒症<sup>1,2)</sup>、一般生活環境においては Mn 産業周辺における Mn 粉じんの長期低濃度曝露によって肺炎罹患率の増加の可能性についての問題などがある<sup>3, 4,5)</sup>。

これら Mn の健康影響については、Mn の化合物形態、量及び曝露のタイプ<sup>6,7,8,9)</sup> などにより質的な相違が見られる。また Mn は生体に対し必須金属<sup>10)</sup>であるが量が大になると毒性を発現し、そのため量-反応関係を容易に把握することは困難である。

一方、有機化合物として、Mn のカルボニル化合物である methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) は、自動車のアンチノック剤である四エチル鉛の代替品として、また燃料油の燃焼促進剤などとして米国で開発製造されている。金属カルボニル、例えばニッケルカルボニルは非常に毒性が強く、しかも発がん性<sup>11)</sup>があることが認められている。MMT の人体影響は、四エチル鉛に類似した、主として中枢神経系に作用し、その症状は Mn 中毒時

のパーキンソニズムに類似している。我国では現在のところ燃料油の消煙剤、燃焼促進剤として試用段階で、その年間使用量は少量にすぎない。しかし今後、広範に使用されれば、作業場の助燃剤としてと添加作業の際、MMT 取り扱者の健康問題とあわせて、MMT の燃焼により生成する Mn 酸化物<sup>12)</sup>がひきおこす大気汚染は環境衛生上の問題として検討が必要と思われる。

MMT は動物実験で生体内で比較的速やかに無機化が行なわれ、臓器中では肝臓に高濃度に蓄積<sup>13,14)</sup>する。また脳にも移行<sup>15)</sup>し代謝活性が認められている。Mn は肝臓細胞においてはライソゾームやミトオンドリア (Mt) に多く分布<sup>16,17)</sup>し、しかも Mt に取り込まれた Mn は残留性を示す。これらのことから Mn の生体内代謝に関して肝臓は重要な役割を果していると考えられる。

以上の観点から、Mn の毒作用機序について生体膜障害作用を中心とした基礎的な知見を得るために、ラット肝 Mt のエネルギー転換反応（酸化的リン酸化反応）を指標として試験管内実験を、無機 Mn 化合物である  $MnCl_2$  について行うと共に、特に毒性の強い有機 Mn 化合物の一つである MMT について検討したので、その結果について報告する。

## 材 料 と 方 法

## 1. ミトコンドリア分画

ドンリユー系ラット (体重約250 g) の肝臓を摘出し、Hogeboom-schneider<sup>18)</sup> の変法<sup>19)</sup> により分画し、氷冷した0.25M Sucrose, 4 mM Tris-HCl buffer (PH 7.5) 中で懸濁し実験に使用した。

## 2. 試薬

Methylclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT:  $\text{CH}_3\text{C}_5\text{H}_4\text{Mn}(\text{CO})_3$ ) は Alfa Products 製を Dimethylsulfoxide に溶解し、0.1M 溶液を調製。また無機 Mn 溶液は和光純薬製の塩化マンガン ( $\text{MnCl}_2$ ) を水溶解し、0.1 M 溶液を調製した。

呼吸測定時にそれぞれ10mM~100mM の範囲で段階的に希釈した溶液をつくり使用した。

## 3. 呼吸活性の測定

反応液0.15M  $\text{KCl}_2$ , 10mM Tris-HCl buffer (PH 7.5) 2.5mM, Potassium Phosphate buffer (PH 7.5) 中に25°Cでミトコンドリア (2.3mg 蛋白/ml) を添加し、呼吸基質として Na-Succinate 5 mM, リン酸基質として Na-ADP (0.3mM) を加えて ATP 合成反応を行なわせ、これに伴う酸素消費とガルバニー酸素電極 (給水化学) を用いて経時的に測定し、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。反応容量は 3.0 mlであった。

呼吸調節能、及び ADP/O 比、は荻原<sup>20)</sup>の方法によって算出した。

4.  $\text{K}^+$  遊出作用の測定

反応液0.15M Choline chloride, 10mM Tris HCl buffer (PH 7.5) 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  $\text{K}^+$  をカリウム電極 (Beckman 社製) を用いて経時的に測定した。反応溶液 3.0ml 反応温度25°Cで行った。

## 結 果

## 1. ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する作用。

有機 Mn 化合物である MMT と無機 Mn 化合物の  $\text{MnCl}_2$  についてラット肝 Mt に対する呼吸パターンを図-1 に示す。尚、実験に使用した Mt は  $\text{RCI}=4.5\sim 5.0$ , ADP/O 比は平均2.0 でありインタクトなものであることを確認している。MMT,  $\text{MnCl}_2$  の低濃度 (0.025mM) と高濃度 (0.05mM) についての作用を測定した結果である。 $\text{MnCl}_2$  と比較して MMT 存在下では呼吸は著しく活性化し、明らかに  $\text{MnCl}_2$  とは異ったパターンを示す。

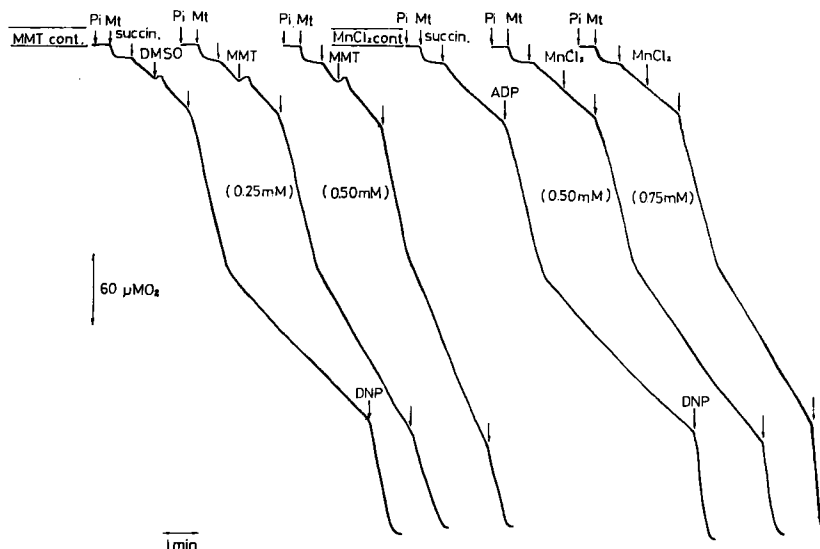


Fig. 1 Effect of MMT and  $\text{MnCl}_2$  on the respiratory process of rat liver mitochondria

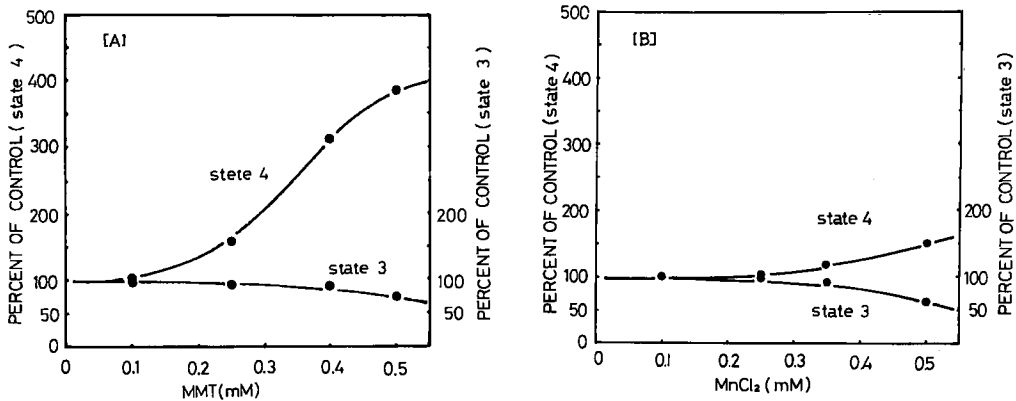


Fig. 2 Concentration dependence of the effect of MMT and  $MnCl_2$  on the respiratory activity of rat-liver mitochondria [A] MMT. [B]  $MnCl_2$

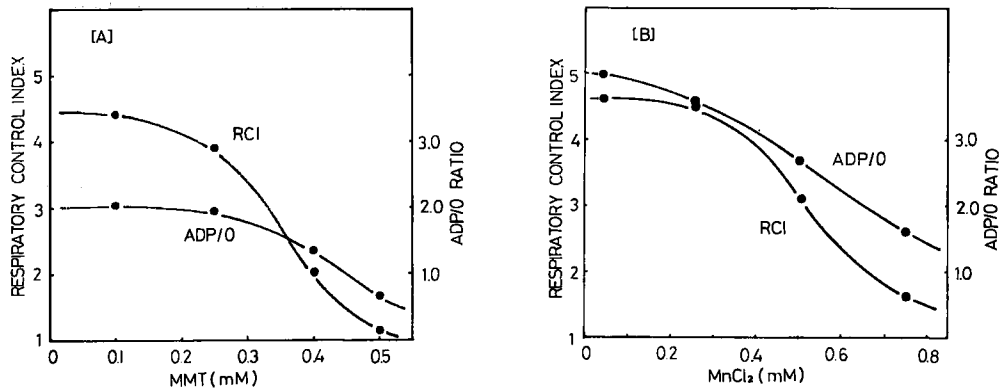


Fig. 3 Concentration dependence of the effect MMT and  $MnCl_2$  on the respiratory control index and ADP/O ratio river mitochondria [A] MMT. [B]  $MnCl_2$

図-2には MMT [A] と  $MnCl_2$  [B] の State 3 と State 4 に対する作用の比較を示した。

MMT は State 4 の呼吸活性が 0.2mM 附近より急速に促進され脱共役現象が認められる、しかし、State 3 の呼吸活性に対する影響は比較的少ない。同一濃度範囲での  $MnCl_2$  [B] は State 4, State 3 いずれも呼吸活性の著しい変化は示さなかった。これらの結果より MMT と  $MnCl_2$  とでは、この濃度範囲では、MMT の方が作用が著しく認められ、 $MnCl_2$  には作用が MMT より弱いことが認められたと同時に両者は Mt に対し脱共役作用を示す事が認められた。

図-1 の実験結果より算出した RCI と ADP/O 比の濃度依存性を図-3 に示す。図から明ら

かなように MMT [A] は 0.2~0.4mM の附近で著しい RCI の低下が認められ、しかし ADP/O 比の減少は RCI より少なかった。 $MnCl_2$  [B] については、MMT と同一濃度範囲において、RCI, ADP/O 比のいずれも著しい低下は示さず、MMT の約 2 倍濃度で MMT と同レベルの膜傷害作用を発現した。

MMT,  $MnCl_2$  いずれも RCI, ADP/O 比の低下の傾向を示したことは、典型的な脱共役現象(作用)を有するものと言える。

図-4 には MMT と  $MnCl_2$  の Mt に対する RCI の作用の比較を示した。

## 2. $K^+$ の透過性に対する作用

上記の実験より MMT,  $MnCl_2$  いずれも Mt の酸化的リン酸化反応に対し脱共役作用を示

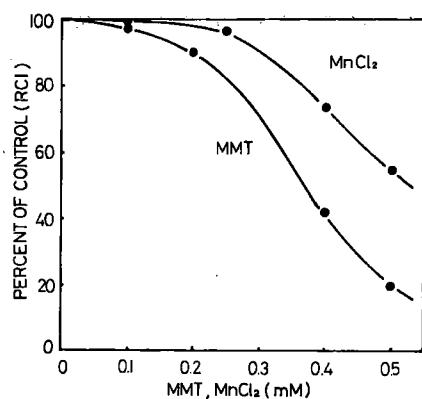


Fig. 4 Comparison of the effect of MMT and  $MnCl_2$  on the respiratory control index at the various concentration

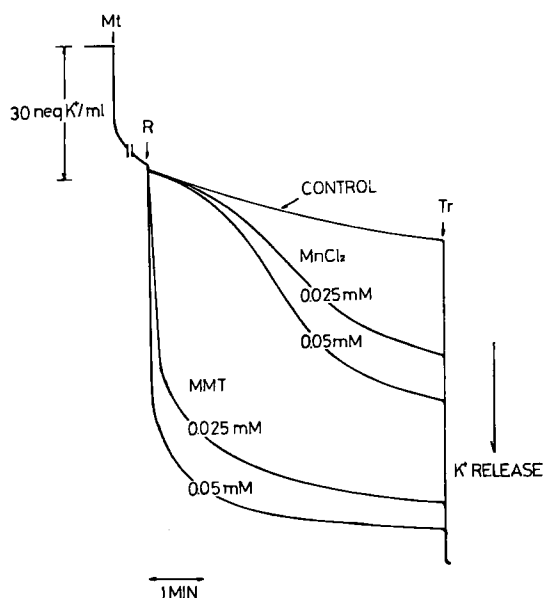


Fig. 5 Release of  $K^+$  from mitochondria treated with MMT and  $MnCl_2$  compositions of a reaction mixture are described in method

したがこれらの物質の脱共役作用の機序を検討する意味で膜障害作用を検討した。Mt 膜は膜系が十分生理機能を保持している場合には高い  $K^+$  濃度を維持しており、エネルギー依存性の能動輸送による蓄積と少量づつの  $K^+$  の排出とのバランスを保っている。そして Mt にお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<sup>21)</sup>。この  $K^+$  は膜の生理機能状態の

変化に対して鋭敏に反応し、濃度勾配に依存した透過性を示すようになる<sup>22)</sup>。

図-5に MMT と  $MnCl_2$  の Mt 膜の  $K^+$  透過性に対する測定結果を示す。いずれの場合も添加濃度に依存してミトコンドリア内部より  $K^+$  の遊出促進が誘起され、Mt 膜の  $K^+$  区画性の損傷が示唆された。また  $K^+$  透過性に対する作用強度は MMT が  $MnCl_2$  より数倍強いことが認められた。

## 考 察

Mt の酸化的リン酸反応に対する各種阻害物質の作用様式は電子伝達阻害、エネルギー伝達阻害及び共役阻害(脱共役作用)に大別される。

MMT の場合 State 4 だけが 0.2mM 以上で特異的に促進されるが、他の State の呼吸阻害は見られないことから、その作用は脱共役的といえる。 $MnCl_2$  の場合、むしろ  $Mn^{2+}$  の微量は酸化的リン酸化反応の共役に必要であることが知られており<sup>23)</sup>。今回の実験では 0.3mM 以上の高濃度域において State 4 の呼吸活性が幾分増大し、MMT と同様に脱共役現象を示した。

これらの点を更に明確にするために、Mt の潜在性 ATPase 活性に対する作用について検討した結果、MMT は ATPase 活性を促進することを認めた。

Mitchell の化学浸透説<sup>24,25)</sup>によれば、酸化的リン酸化の脱共役剤は、膜電導度の増加によって Mt 以外に形成された  $H^+$  勾配及び膜電位差を減少させるように作用する。これらのうちで膜電位は主として膜内外の  $K^+$  勾配に依存するといわれている<sup>23)</sup>。したがって MMT による Mt 膜の  $K^+$  透過性の増大、RCI 及び ADP/O 比の低下は、いずれも Mt の酸化的リン酸化反応に対する MMT の脱共役作用を示す。 $MnCl_2$  も同様の作用を示すが、MMT に比べてはるかに弱い、この両者の作用の違いは、多くの脱共役作用阻害物質が脂溶性を有し、Mt の膜脂質に溶け込み、 $H^+$  や他のイオン透過性が高くなることと認められており<sup>26,27)</sup>、MMT が高い脂溶性(n-オクタノールに対し100%溶解)を示すことが無機 Mn 化合物の  $MnCl_2$  と比べて作用強度に著しい差異を与える一つの要因と考えられる。

## 結 論

四エチル鉛の代換品としてまた、燃料油の燃焼促進剤として開発製造されているMMTの毒作用機序について基礎的な知見を得るためにラット肝 Mt の酸化的リン酸化反応を指標として試験管内実験を行いその作用強度について無機 Mn 化合物の  $MnCl_2$  と比較検討し、以下の結果を得た。

- 1) Mt 膜の酸化的リン酸化反応に対して、MMT は特に State 4 の呼吸を著しく活性化し、脱共役現象を示した。 $MnCl_2$  も同様の作用が認められたが MMT に比較し、その作用強度は弱かった。
- 2)  $K^+$  の透過性に対しては MMT,  $MnCl_2$  い

ずれも添加濃度に依存して  $K^+$  の遊出促進が誘起され、Mt 膜の  $K^+$  区画性の損傷が認められた。作用強度は MMT が  $MnCl_2$  より数倍強い。

3) MMT と  $MnCl_2$  の脱共役作用強度の著しい違いは、MMT が高い脂溶性を有することが、一つの要因と考えられる。

## 謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲をいただきました恩師緒方正名教授に心より謝意を表します。また本実験を行うに当り御協力をいただきました長谷川亨先生に厚く感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第54回日本産業衛生学会(1981)に於て発表した。

## 文 献

1. 後藤 稔, 池田正之, 原一郎編. : 産業中毒便覧. 医歯薬出版pp. 429-437, 1977.
2. Patty, F.A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 2, Interscience Publishers, N.Y., pp.1079-1089, 1962.
3. 鈴木幸夫: マンガによる環境汚染について. 産業医学. 12, 529-533, 1970.
4. Robert, Z.M., Richard E., James D.F. and Donald E.G.: Potentiating effects of manganese dioxide on experimental respiratory infections. *Environ. Res.* 11, 386-391, 1976.
5. Pancheri, G.: Industrial atmospheric pollution in Italy. *Problems of Control of Air Pollution* (ed. F.S. Mallatte) Rheinhold publishing Co., N.Y., pp. 252-263, 1955.
6. 毛利高二: マンガン粉じん吸入に関する実験的研究. 四国医誌, 28, 2, 118-129, 1973.
7. 森田啓次郎, 石田立夫, 緒方正名: 各種環境汚染物質の生体への作用機構に関する研究, マウスに吸入されたマンガンヒュームの運命, 岡山県環境保健センター年報, 2, 108-212, 1978.
8. 鈴木幸夫, 西山敬太郎, 鈴木泰夫他: フェロマンガ工場作業者の血液及尿中マンガン量に関する研究. 四国医誌, 29, 425-432, 1974.
9. 藤井信男: 二酸化マンガ粉じんの肺吸収に関する実験的研究. 第2報マウスにおける吸入実験. 四国医誌, 34, 6, 291-299, 1978.
10. Scrutton, M.C., M.F. Utter, and Mildvan, A. S.: Pyruvate carboxylase. VI. The presence of tightly bound manganese. *J. Biol. Chem.* 241, 3480-3487, 1966.
11. Sunderman, F.W., Jr.: The current status of nickel carcinogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 3, 156-180, 1973.
12. Exon, G.H. and Koller, L.D.: Effects of feeding manganese antiknock gasoline additive exhaust residues ( $Mn_3O_4$ ) in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 370-373, 1975.
13. 大西和男: Methyl cyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) の急性毒性に関する実験的研究. 四国医誌, 34, 3-4, 183-193, 1978.
14. Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.A. and Miller, S.T.: Primordial homeostasis in a mammal as shown by the control of manganese. *Nature* 201, 828-829, 1964.

15. Moore, W., Hall, L., Crocker, W., Adams, J. and Stara, J.F.,: Metabolic aspects of metylocyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in rats. *Environ. Res.* 8, 171-177, 1974.
16. 鈴木平光, 山本昭子, 和田 攻ら: マンガンの生体内代謝に関する研究. マンガンの肝内および胆汁中移行におけるライソゾームの役割. *日衛誌*, 35, 200, 1980.
17. Maynard, L.S., and Cotzias G.C.: The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat. *J. Biol. Chem.* 214, 489-495, 1955.
18. Hogeboom G.H. et al.,: 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.* 172, 619, 1948.
19. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of  $P^{32}$  in mitochondrial piifraction. *Acta Med. Okayama.* 17, 258-271, 1963.
20. Hagihira, B.,: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Acta* 46, 1341-142, 1961.
21. Miyahara, M., and Utsumi, K.: Oxidative phosphorylation controlled by potassium in rat liver mitochondria. *Cell Struct. Funct.* 1, 51-59, 1975.
22. 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.
23. Lindberg, O. and L. Ernster.: Manganese, a co-factor of oxidative phosphorylation. *Nature* 173, 1038-1039, 1954.
24. Mitchell, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148, 1961.
25. Mitchell, P. and J. Moyle.: Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 105, 1147-1162, 1967.
26. 寺田 弘, 村岡三郎: アンカップラー. *蛋白質 核酸 酵素*. 18, 911-929, 1973.
27. Packer, L. and Utsumi, K.: The relation of respiration-dependent proton transfer to mitochondrial structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 386-403, 1969.

**Experimental Study on Inorganic manganese and  
Organic manganese(MMT) intoxication**

**1**

**Comparison between the effects of MMT and MnCl<sub>2</sub> on  
oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria**

**Keijiro MORITA**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School of Okayama**

**(Director: Prof. M.Ogata)**

Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl(MMT) has been developed and used increasingly as a replacement for tetraethyl lead which has been widely used as an anti-knock agent of gasoline, or as a fuel oil combustion improver.

We, therefore, investigated the effect of MMT on oxidative phosphorylation and K release of mitochondria as an index of toxic effects on biomembranes.

The concentrations of solution used were 0.10, 0.25, 0.40 and 0.50 mM.

Results obtained were as follows.

1. MMT activated state 4 respiration at more than 0.20 mM solution, i.e. showing the uncoupling phenomenon.
2. Mitochondrial oxidative phosphorylation with MMT was greater than with MnCl<sub>2</sub>.
3. Both MMT and MnCl<sub>2</sub> induced K release from mitochondria, and a dose-response relationship between K release and MMT was recognized.
4. It was considered that one reason for the remarkable difference in uncoupling between MMT and MnCl<sub>2</sub> was the difference in lipid affinity.