

食品保存剤パラベン（パラヒドロキシ安息香酸エステル）類の ミトコンドリア毒性

角田 香澄¹⁾ 北川 章²⁾

要 約

パラベン類はミトコンドリアの呼吸系に対して除共役作用，呼吸抑制作用を示し，また，内膜のイオン透過性変化（MPT）をもたらすことが知られている。これらの反応が細胞毒性にかかわっていると考えられている。本研究では，パラベンの分子構造と除共役作用との関連性を考察する目的で，最も繁用されているMPBおよびPPBについて単離ラット肝ミトコンドリアのNAD系呼吸に対する傷害作用を酸素電極法により検討した。その結果，両パラベンとも無傷ミトコンドリアの呼吸を傷害し，その作用はPPBのほうがMPBより強力であることを確認した。NAD系呼吸に対して両パラベンは呼吸抑制作用と除共役作用によりRC比およびADP/O比の低下を来した。各種pHでの紫外部吸収スペクトルを測定した結果，両パラベンともpH依存性のスペクトル変化を示し，pKa値が除共役作用の発現に適した生理的範囲を超えたアルカリ性側pH（約8.8）に局在することが判明した。

Key words: メチルパラベン，プロピルパラベン，ミトコンドリア毒性，除共役作用

緒 言

我々が日頃口にする多くの食品は，その保存性や品質を高めたり，風味や外観を保持したりする為に製造過程で様々な食品添加物が用いられている。食品添加物は，指定添加物，既存添加物，天然香料，一般飲食物添加物の4種類に分類され，使用基準や成分規格が食品衛生法により定められている。ところが，輸入品には甘味料のサイクラミン酸ナトリウムや乳化剤のポリソルベートのように海外では認可されているが，我国では認可されずその安全性について更に検討する必要があるものが使用されている可能性がある⁽¹⁾。

パラベン（パラヒドロキシ安息香酸エステル）類は安息香酸エステルのパラ位にフェノール性の水酸基を有する構造を持ち，グラム陰性菌を除く広範囲の微生物，特にカビや酵母に対して静菌的に作用することから⁽²⁾，化粧品や医薬品，食品の保存料として幅広く使用されている。

我国では5種類のエステル型（イソブチル，イソプロピル，エチル，ブチル，プロピル）が食品添加物として認可されており，アルコール飲料やゼラチン，ケチャップ等に用いられているが⁽³⁾，パラベン類はアルキル側鎖の長さが長い程抗菌作用が強い反面，溶解度が低くなる為，食品には主にMPB（メチルパラベン）およびPPB（プロピルパラベン）が用いられている⁽²⁾。

パラベン類は広く用いられているにもかかわらず，静

菌作用発現のメカニズムは未だ明らかとなっていないが，膜のイオン透過性亢進による膜電位の消失もしくはミトコンドリアの呼吸機能障害によることが先行研究により示唆されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

実験動物を用いた各種毒性試験においてパラベン類は比較的低毒性であることが確認されている⁽²⁾⁽⁶⁾がブチルパラベンをマウスに投与すると，酸化ストレスにより肝障害が起こることが報告されている⁽⁷⁾。また，パラベン類によるミトコンドリア機能傷害作用と細胞毒性との関連性も検討されている⁽⁸⁾。

ミトコンドリアは細胞内の諸種反応に必要な高エネルギー化合物ATPを供給する極めて重要な役割を果たす細胞内顆粒である。ミトコンドリアの機能損傷は従って細胞機能の低下や細胞死をきたすことになる。そこで今回食品の保存料として広く使用されているMPBおよびPPBがミトコンドリアの呼吸機能にどのような影響を及ぼすかについて酸素電極法により検討し，抗真菌性との関連性を考察した。

抗真菌活性を考察するためには真菌ミトコンドリアへの傷害作用を検討することが重要であるが，真菌細胞は強靱な細胞壁を有するため，高活性を示す無傷ミトコンドリアを十分な量調製することが困難である。そこで本研究では単離方法が確立され，構造・機能が詳細に解明されているラット肝ミトコンドリアを用いて実験を行った。

実験材料および方法

実験試薬

MPBおよびPPBは，N,N-dimethylformamide 溶液とし

1) 鹿兒島純心女子大学看護栄養学部健康栄養学科

2) 至学館大学健康科学部栄養科学科

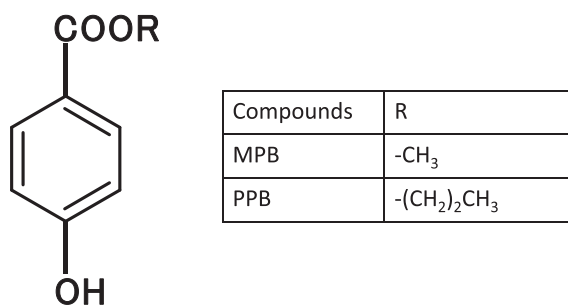


Fig.1 Structures of MPB and PPB.

て用いた。

Tris-(hydroxymethyl)aminomethane(Tris と略記), ADP, および牛血清アルブミン (BSA, fraction V) は, Sigma Chemical Co. よりそれぞれ購入した。その他の試薬は, 全て市販品特級試薬を用いた。

実験方法

ラット肝ミトコンドリア画分の調製

ミトコンドリア画分は, 基本的には Schneider の方法⁽⁹⁾ に従い, 河合らにより一部改良された方法⁽¹⁰⁾ により, ラット肝ホモジネートから調製した。ラットは Wistar 白色系雄ラット (200-250g 体重) を使用した。調製溶液には 0.5mM EDTA, 10mM Tris-HCl を含む 0.25M ショ糖液 (pH7.4) を用いた。操作は全て 4℃ 以下で行った。調製したミトコンドリア画分は, 2~3ml の冷ショ糖溶液に懸濁し, 氷冷下に保ち, 2~3 時間以内に実験が終了するように使用した。

ラット肝ミトコンドリアの呼吸活性の測定

ミトコンドリア画分は Galvani 型酸素電極 (飯島電子工業) を用いて測定した。呼吸活性測定用反応液は, 0.15M KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5mM 無機リン酸および 20mM Tris-HCl (pH7.4) を含み, 使用 30 分前から 30℃ の恒温槽中で温度および溶存酸素量を平衡化した。ミトコンド

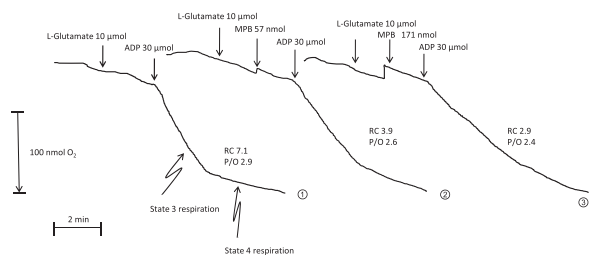


Fig.2 The impairing effect of MPB on NAD-linked respiration 10μmol L-glutamate contains 3μmol L-malate. Mitochondria were 1.2mg protein in a reaction medium. Other reaction condition was described in Materials and Methods.

リアを呼吸活性測定用反応液に懸濁させ, 呼吸基質 (グルタミン酸又はコハク酸) を添加し, その後 ADP を加えると, リン酸化反応が始まり呼吸が加速される (state 3 呼吸⁽¹¹⁾)。State 3 呼吸は ADP に依存した呼吸であり, 添加 ADP が消費されると呼吸は抑制される (state 4 呼吸⁽¹¹⁾)。RC (respiratory control) 比は state 3 呼吸と state 4 呼吸の比⁽¹¹⁾ を示し, 調製ミトコンドリアの無傷性を反映し, その値が大きいくほど高活性を意味し, 除共役剤や電子伝達阻害剤の添加により顕著に低下する。添加 ADP (nmol) と消費酸素量 (natom) の比率から ADP/O 比⁽¹¹⁾ が算出され, この値は酸化的リン酸化の除共役状態を反映して低下する。State 3 呼吸の阻害比はコントロール値を 100 として計算した。

MPB および PPB の紫外外部吸収スペクトルの測定

MPB および PPB の紫外外部吸収スペクトルは, Beckman 自記分光光度計 DU-70 を用いて測定した。

タンパク質の定量

タンパク質は BSA を標準物質とし, Lowry らの方法⁽¹²⁾ により測定した。

実験結果

MPB および PPB のミトコンドリア呼吸系への影響

L-グルタミン酸 (3mmol L-リンゴ酸を含む) を呼吸基質とした NAD 系呼吸への MPB の影響について酸素電極を用いて検討した (Fig. 2)。調製された無傷ミトコンドリアは, オキシグラフのコントロール曲線 (curve 1) で示されるように, 呼吸鎖とリン酸化系が強く共役した明瞭な state 3 および 4 呼吸が観察され, 高い RC 比と ADP/O 比を示した。本実験での RC 比と ADP/O 比はそれぞれ 7.1 と 2.9 であった。MPB を state4 呼吸に添加すると, state3 呼吸は抑制され state4 呼吸は加速した (curve 2)。さらに高濃度の MPB では, state3 呼吸がより顕著に抑制され, state 4 呼吸は僅少ではあるが加速

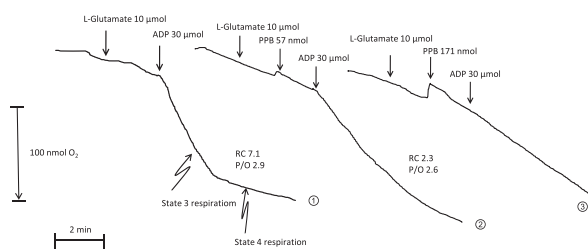


Fig.3 The impairing effect of PPB on NAD-linked respiration. Reaction condition was same as in Fig. 2

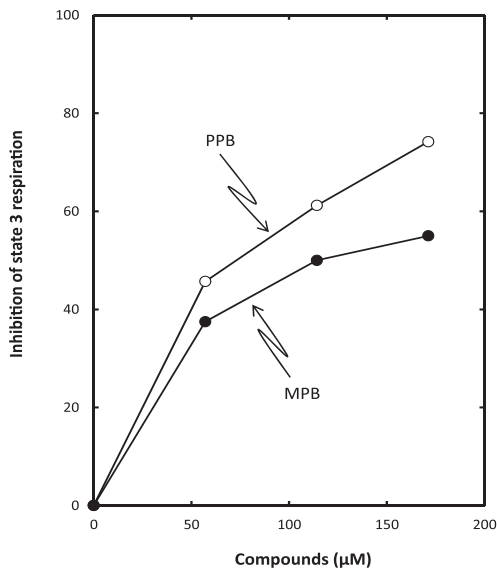


Fig.4 Effects of MPB and PPB on the state 3 respiration. Data were calculated from oxygraph.

された (curve 3)。

MPBと同様にPPBのNAD系呼吸への影響を検討した (Fig. 3)。State4呼吸にPPBを添加すると、その後のstate3呼吸が抑制され、state4呼吸は著しく加速した (curve 2)。さらに高濃度のPPBでは、もはやADPによるstate 3呼吸の誘導は確認されなかった (curve 3)。

各種濃度のMPBおよびPPBのstate3呼吸抑制作用について検討した結果をFig. 4に示した。MPBおよびPPBはstate3呼吸を用量依存的に阻害し、50%阻害濃度はそれぞれおよそ115 μMと60 μMとなり、PPBがMPBより強力な阻害作用を示すことが判明した。本報ではコハク酸酸化系呼吸に対する阻害作用についての実験結果を示さなかったが、MPB、PPBともコハク酸酸化系呼吸に対してNAD系呼吸への阻害濃度とほぼ同様の濃度でstate 4呼吸の解放 (除共役作用) のみを示し、state 3呼吸への阻害作用を示さなかった。

さらにMPBおよびPPBによるRC比およびADP/O比への影響について検討した (Fig. 5)。両パラベンによりRC比は用量依的に低下したが、ADP/O比への影響は僅少で高濃度 (50%阻害濃度以上) で低下を来した。この結果は、RC比が除共役作用よりstate 3呼吸の抑制による影響を強く反映していることを示し、除共役作用が強力でないことを示している。

MPB および PPB 溶液の紫外光吸収スペクトル

pH6.0から10.5までの各種pHにおけるMPBおよび

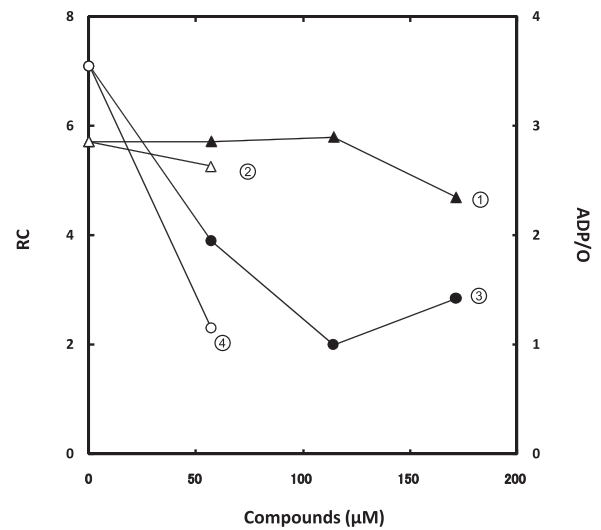


Fig.5 Effects of MPB and PPB on the RC and ADP/O ratios. Data were calculated from oxygraph. Curves 1 and 2 show the effects of variety concentrations of MPB and PPB on ADP/O ratio. Curves 3 and 4 show the effects of variety concentrations of MPB and PPB on the RC ratio respectively.

PPB溶液 (50mMリン酸カリウム) の紫外外部吸収スペクトルを測定した (Fig. 6)。MPBとPPBはともに270nm付近に等吸収点 isosbestic point を有するpH依存性のスペクトル変化を示した。アルカリ性pH領域では極大吸収波長が長波長側に移動 (red shift) し、296nmに極大吸収を示した。各pHにおける296nm吸光度をプロットし、両パラベンのpKa値を検討した結果をFig. 7に示した。両パラベン共pH8.8位にpKaを示し、生理的pH域での酸 (H⁺) 解離性が極めて小さいことが示唆された。

考 察

MPBおよびPPBのミトコンドリア呼吸系への阻害作用について単離ラット肝ミトコンドリアを用いて検討した。その結果、MPBおよびPPBは共にミトコンドリアのNAD系呼吸を抑制し、その阻害はMPBより親脂性の強いPPBの方がより強力であることを再確認した。MPBおよびPPBは共に添加により、state 3呼吸の抑制およびRC比とADP/O比の低下を来し、除共役作用を有することを確認した。これらの結果は、Nakagawaらによる研究結果と一致する⁽⁵⁾。

MPBおよびPPBの各種pHにおける吸収スペクトルを測定した結果、両物質共に270nm付近に等吸収点が現れ、アルカリ性領域では296nmに極大吸収が見られた。各種pHにおける極大吸収波長での吸光度をプロットすることにより、両パラベンのpKa値が弱アルカリ性側pH域に存在することが判明した。2,4-Dinitrophenol (DNP)をはじめとする多くのフェノール系除共役剤がミトコンドリア内膜の疎水性部位に強い親和性を有する弱酸 (脂

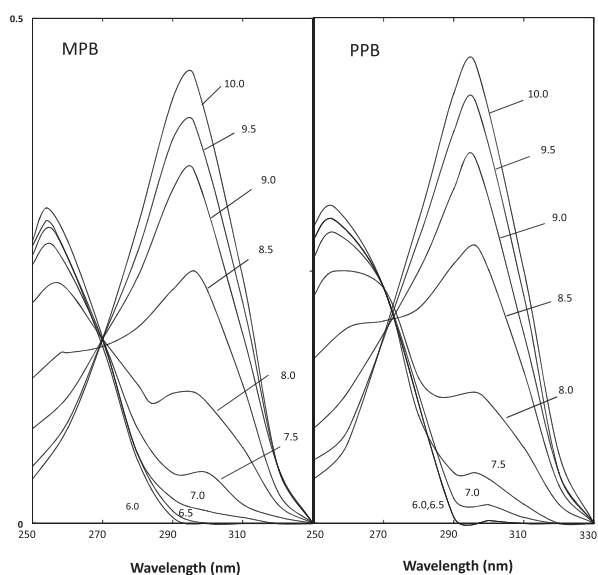


Fig.6 The pH-dependent changes of absorption curves of MPB and PPB.
Reaction medium was 50mM potassium phosphate (2ml), in which 20μM parabenes were dissolved.

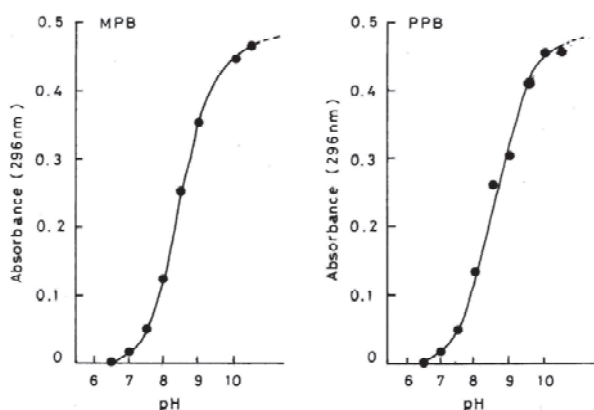


Fig.7 The peak-current alterations in the absorbance at 296nm

溶性弱酸) であり, 膜内で H⁺ 輸送体 (non-vectorial proton conductor) として作用することにより膜の電気化学的エネルギーを消去することが知られている⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。MPB および PPB もフェノール性水酸基を持ち脂溶性の弱酸であると考えられることから, DNP など従来の除共役剤⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾ と同様の機序で酸化リン酸化を除共役すると推測された。しかし, 実験の結果, 除共役作用は強力ではなく, また, pKa 値がアルカリ性側に偏っていることから内膜で H⁺ 輸送体として作用する可能性も低いと考えられる。

両パラベンが NAD 系呼吸を阻害し, コハク酸酸化系を阻害しないことは, NAD 系呼吸鎖の NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) を選択的に阻害することを示唆しているが, このことは電子伝達粒子を用いて確認することが必要である。阻害が強力ではないため, 毒

性との関連性が低いことから, 本研究では確認しなかった。

パラベンがミトコンドリア内膜におけるイオン透過性変化 (MPT) を誘起し, 膜電位を消去することが報告されている⁽⁸⁾。実験にはミトコンドリアの Ca²⁺ 誘発膨潤化現象が用いられている。Ca²⁺ は本来内膜の U-factor の放出を活性化することにより膨潤化を誘発する性質を有することが知られており⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾, 0.2M sucrose 存在下でパラベンの膨潤化誘起作用を検討しているのはパラベンの特異的な MPT 誘起作用ではなく, フェノールによる膜たんぱく質の変性による効果を観察している可能性も考えられ, 電子伝達阻害作用と同様に MPT 誘起作用についても詳細な研究を行いたい。

現在までにパラベン類はアルキル側鎖が長い程抗菌作用が強いことが確認されているが⁽³⁾, ミトコンドリア呼吸阻害作用 (ミトコンドリア毒性) の強さも MPB および PPB についても一致することから両パラベンのカビ, 酵母等の真核生物に対する静菌作用発現機序の一つにミトコンドリア呼吸阻害作用が含まれることを示唆している。

MPB および PPB がミトコンドリア呼吸阻害作用を示すことが再確認された。その作用は強力ではなく, また容易に加水分解される性質上⁽²⁾, 人体への影響は少ないと考えられるが, 近年パラベン類には一日摂取許容量 (ADI) 以下の濃度でエストロゲン様作用があることも確認されており⁽²²⁾, 長期的な視野で多量の摂取は控えることが望ましい。

謝 辞

本研究実施にあたり, 実験方法についてご指導くださいました至学館大学名誉教授 河合 清先生に深謝致します。

文献および資料

- (1) 伊藤澄夫.: 輸入食品監視状況 - 食品添加物の違反事例を中心として - .Foods Food Ingredients J. Jpn., Vol. 212, No. 10, 840-850, 2007.
- (2) Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA.: Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature., Food Chem Toxicol., 40(10):1335-73, 2002.
- (3) Smolinske SC.: Parabens, In: Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients. CRC Press, Boca Raton, FL., 251-258, 1992.
- (4) Bredin J, Davin-Régli A, Pagès JM.: Propyl paraben induces potassium efflux in Escherichia coli., J Antimicrob Chemother., 55(6):1013-5, 2005

- (5) Nakagawa Y, Moldeus P.: Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.*, 55(11):1907-14, 1998.
- (6) Inai K, Aoki Y, Akamizu H, Eto R, Nishida T, Tokuoka S.: Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hydroxybenzoates administered orally to mice. *Food Chem Toxicol.*, 23(6):575-8, 1985.
- (7) Butyl p-hydroxybenzoic acid induces oxidative stress in mice liver—an in vivo study. *Acta Pol Pharm.*, 68(6):875-9, 2011.
- (8) Nakagawa Y, Moore G.: Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.*, 58(5):811-6, 1999.
- (9) Schneider WC., Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fraction., *J Biol Chem.*, 176, 259-266, 1948.
- (10) 河合 清. ミトコンドリア. 毒性試験講座 6, 毒性生化学, 96-101, 1989.
- (11) Chance B, Williams GR., Respiratory enzymes and oxidative phosphorylation., *J Biol Chem.*, 217, 383-438., 1955.
- (12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ., Protein measurement with folin phenol reagent., *J Biol Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- (13) Mitchell P, Moyle J., Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature.*, 213(5072):137-9, 1967.
- (14) McLaughlin SGA, Dilger, JP., Transport of protons across membranes by weak acids, *Physiol. Rev.*, 60, 825-863, 1980.
- (15) Terada H., The interaction of highly active uncouplers with mitochondria, *Biochim Biophys Acta* 639, 225-242, 1981.
- (16) Hemker HC., Lipid solubility as a factor influencing the activity of uncoupling phenols, *Biochim. Biophys Acta*, 63, 46-54, 1962.
- (17) Weinbach EC, Garbus J., Protein as the mitochondrial site for action of uncoupling phenols, *Science* 145, 824-826, 1964.
- (18) Weinbach EC, Garbus J., The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein, *J. Biol. Chem.* 240, 1811-1819, 1965.
- (19) Lehninger AL, Remmert LF., An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation, *J. Biol. Chem.* 2459-2464, 1959.
- (20) Wojtaczak L, Lehninger AL., Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 51, 442-456, 1961.
- (21) Lehninger AL., Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation, *Physiol. Rev.* 42, 467-517, 1962.
- (22) 佐藤 かな子.: 食品中から検出されるか, またその可能性のある化学物質の内分泌かく乱作用. *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, Vol.212, No.5, 398-414, 2007.

Mitochondria toxicity of parabens (p-hydroxybenzoate ester), a preservative of beverage from fungal contamination

Kasumi Tsunoda¹⁾, Akira Kitagawa²⁾

1) Department of Health and Nursing, Faculty of Nursing and Nutrition,
Kagoshima Immaculate Heart University

2) Faculty of Wellness, Shigakkan University

Key words : methylparaben, propylparaben, mitochondria toxicity, uncoupling effect

Abstract

Parabens are known to impair mitochondrial respiration, repressing the respiration and uncoupling the oxidative phosphorylation. The effects of methylparaben (MPB) and propylparaben (PPB), which are most widely employed for preservatives of various foods, on mitochondrial respiration was studied by the experiment with oxygen electrode to discuss the toxicity mechanism. Both MPB and PPB were confirmed to impair mitochondrial respiration, causing the repression of state 3 respiration and the uncoupling of oxidative phosphorylation. PPB, which possesses stronger lipophilicity than MPB, exhibited stronger toxicity than MPB. MPB and PPB displayed pH-dependent spectral alterations in the UV region, giving a pKa value at about pH 8.8. Difference in the lipophilicity potency gave no influence to the pKa value of parabens at all.

These results suggest that the mitochondrial toxicity of parabens was enhanced by the increment of the lipophilicity potential, and that both parabens might uncouple the oxidative phosphorylation not by the mechanism of the H⁺-conductivity, but by the deterioration of the membrane integrity by binding to membrane proteins as phenol compounds..
