

# 環境汚染物質(重金属など)の生体膜に対する作用

## 第 3 報

### カドミウムとルテニウムレッドの相互作用, 特にミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して

岡山大学医学部公衆衛生学教室

長谷川 亨・野上 裕作・緒方 正名

〔昭和52年6月7日受稿〕

#### 目 的

カドミウムは産業中毒のなかの原因物質として、あるいは環境汚染によるイタイ・イタイ病の原因物質として注目されている。カドミウムの慢性中毒は、肺気腫、腎障害、低分子蛋白尿を主徴とする<sup>1)</sup>。また慢性暴露では、特有の骨粗鬆症を起し、いわゆる「イタイ・イタイ病」は骨軟化症、高Ca尿を主症状としている<sup>2)</sup>。

このカドミウム毒性の発現の背景にあるメカニズムについては、今なお不明の点が多く、カドミウムの生体内作用、特に細胞に対する生物学的作用については多くの検討が必要と思われる。

我々は、Piscator and Larsson<sup>3)</sup>の報告、即ち低カルシウム食及び正常食で、0~10 $\mu$ g/gの濃度範囲でカドミウムを飲料水に加え、1年間ラットに与えると、カルシウム欠乏の動物は正常カルシウム食のラットよりも肝、腎に約2倍のカドミウムを保有するという報告に興味を持ち、ミトコンドリア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、カルシウム結合部位修飾剤であるルテニウムレッド<sup>4)</sup>とカドミウムとの相互作用について検討を加えた。その結果、ルテニウムレッドがカドミウムと強い拮抗作用を有する事が認められたので報告する。

#### 材料及び方法

##### 1. ミトコンドリアの分離

ドンリュウ系ラット(体重約250g)の肝臓から Ho-geboon, Schneider の変法<sup>5)</sup>により分画した。

##### 2. 試薬,

使用した試薬は全て特級を用い、使用時に図に示した濃度になるよう調整した。

##### 3. 酸化的リン酸化反応

0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の反応液3.5ml 中にミトコンドリアを添加後、呼吸基質としてNa-Succinate 5mM, リン酸化基質としてNa-ADP (0.3mM)を加え、経時的に、反応液中の溶存酸素消費量をガルバニー酸素電極(給水化学)を用いて測定した。呼吸調節能, ADP/0比は Chance, William らの方法<sup>6)</sup>によって計算した。

#### 実験結果

ミトコンドリアの機能障害を検討する場合の指標として、しばしば、その呼吸調節能とADP/0比が用いられる。それらは、コハク酸を呼吸基質に用いた場合、それぞれ5~6, 1.8の値を示す<sup>7)</sup>。ミトコンドリアがなんらかの機能障害をおこすと、これらの値は低下してくる。今、Cd<sup>2+</sup>をミトコンドリア懸濁液に添加すると、図1にみられるように、呼吸調節能(RCI)がCd<sup>2+</sup>2 $\mu$ M付近から顕著に低下してくるのに反し、ADP/0比の低下は判然としない。従って、ミトコンドリアに対するCd<sup>2+</sup>の障害作用をみる指標としては、呼吸調節能の変化を利用する事が有効であると思われる。このCd<sup>2+</sup>による呼吸調節能の低下は、図2の結果から明らかな如くstate 4時の呼吸活性の増大に起因し、これはCd<sup>2+</sup>の脱共役作用を示している。

##### 2) , ルテニウムレッドの抑制作用

ルテニウムレッドがCd<sup>2+</sup>によるK<sup>+</sup>遊出作用を著しく抑制するという事に着目し、上に述べた呼吸調

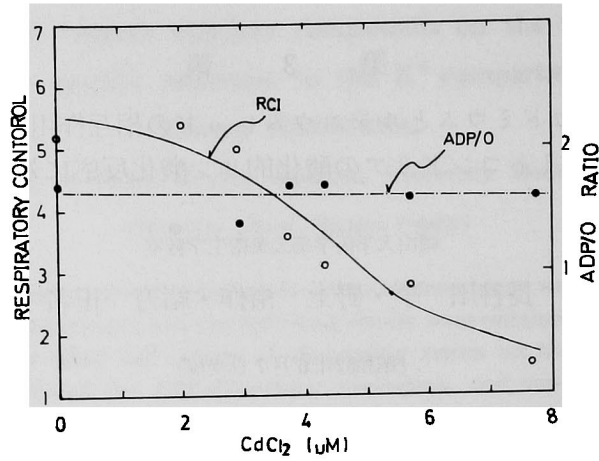


図1 ラットミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する Cd<sup>2+</sup> の作用  
 反応系: 0.15MKCl, 10mM Tris-HCl (pH7.5), Pi2.5mM.  
 Rat liver mitochondria (2mg Protein/ml)  
 反応容量: 3.5 ml 反応温度25℃

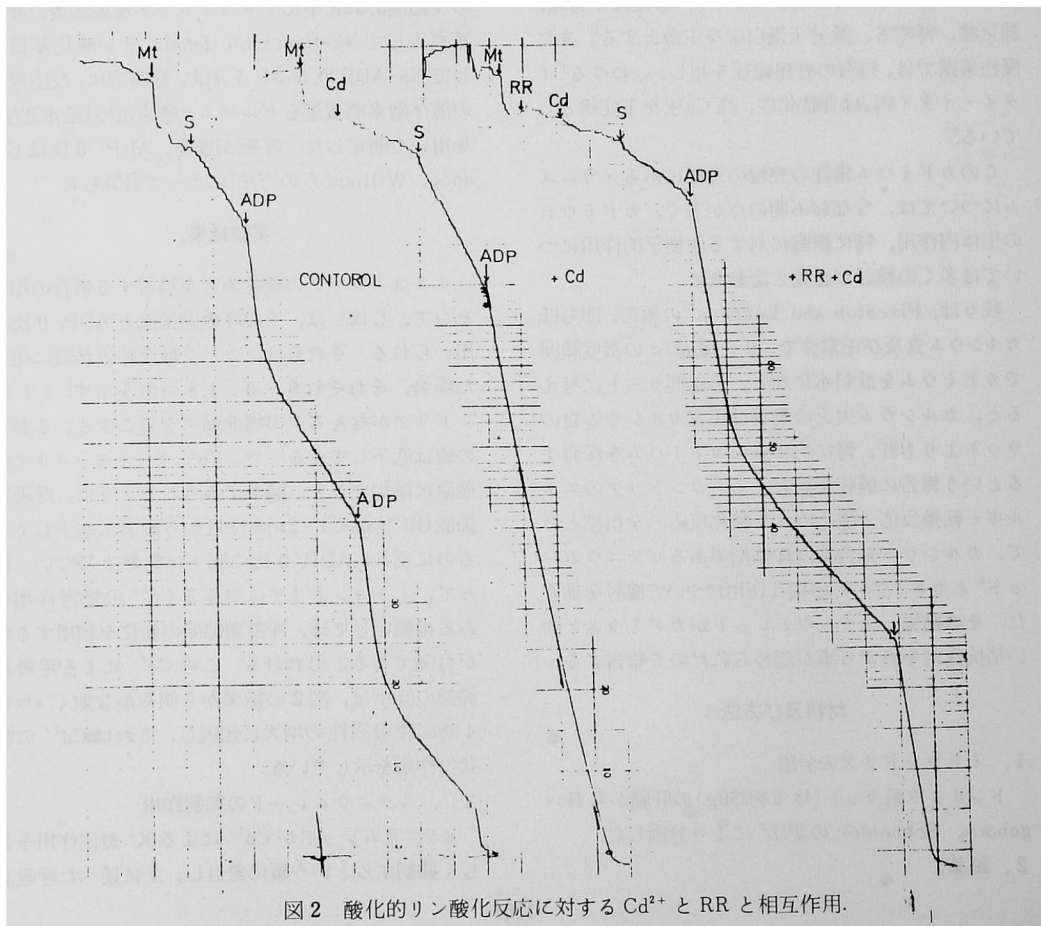


図2 酸化的リン酸化反応に対する Cd<sup>2+</sup> と RR と相互作用.  
 反応系: 図1と同じ, 但し, CdCl<sub>2</sub>10μM. RR 5μM

節能のカドミウムによる低下現象に如何なる作用をルテニウムレッドが示すかを検討してみた(図2).

10 $\mu$ MのCd<sup>2+</sup>を作用させると, State 4の呼吸活性は対照に比較して著しく大きく(即ち脱共役状態を示す)これに対し, ルテニウムレッドを先に添加ししておく, この様なCd<sup>2+</sup>の脱共役作用はほぼ完全に抑制される. そこで, ルテニウムレッドとCd<sup>2+</sup>の濃度依存性をみるために, 10 $\mu$ M濃度のルテニウムレッド存在下で, Cd<sup>2+</sup>の濃度を変化させ, 呼吸調節

能の変化を調べたのが図3である. その結果, Cd<sup>2+</sup>による障害作用は, 8 $\mu$ Mまでほとんど抑制される事が認められた. 更に, 10 $\mu$ MのCd<sup>2+</sup>存在下で, ルテニウムレッドの濃度を変化させてみると, 図4の如くになり, ルテニウムレッド5 $\mu$ M以上で完全にカドミウムに対する抑制が生ずる事が認められた. この様な事象は, ルテニウムレッドとCd<sup>2+</sup>の作用部位が何らかの形で競合する事を示唆している.

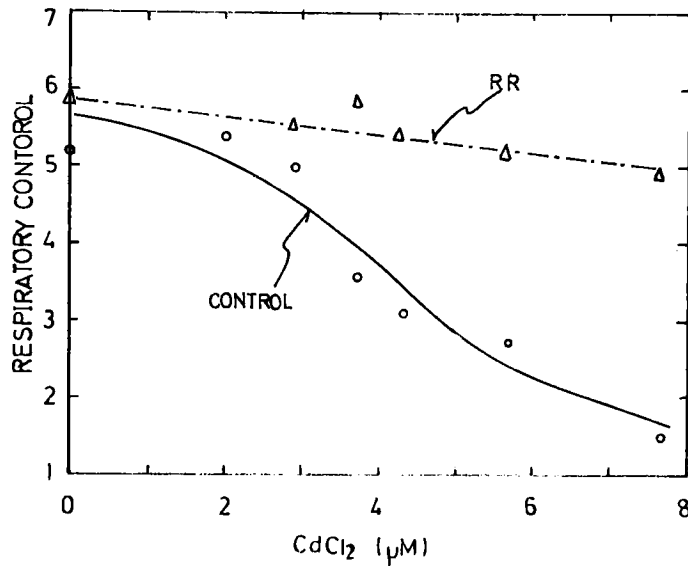


図3 呼吸調節能に対する Cd<sup>2+</sup>とRRの相互作用  
反応系図1と同じ, 但し, RR 10 $\mu$ M

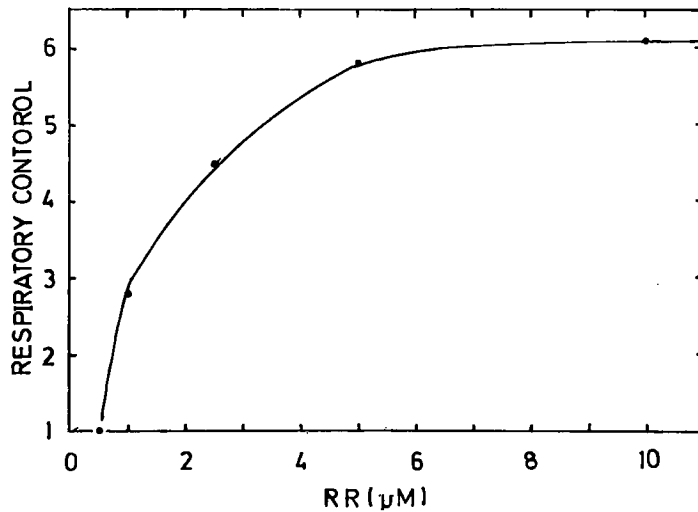


図4 呼吸調節能に対する Cd<sup>2+</sup>とRRの相互作用  
反応系図1と同じ, 但し CdCl<sub>2</sub> 10 $\mu$ M

## 考 察

カドミウム毒性の発現の背景にあるメカニズムについては、今なお不明の点が多いが、カドミウム毒性の種々の症例、肝機能障害を併なう特有の骨粗鬆症、いわゆる「イタイ・イタイ病」の骨軟化症、高Ca尿<sup>2</sup>等から、カドミウムが生体のカルシウム代謝と何らかのかかわりを持つ事が推察される<sup>3</sup>。また、カドミウム投与ラットに<sup>45</sup>Caを経口投与すると血中<sup>45</sup>Ca濃度が対照群に比較して低い事から、CdとCaの拮抗作用がin vivoにおいても証明されている<sup>4</sup>。

カドミウムは、in vitroで肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応及びそれに関連した機能に阻害的に作用する。即ち脱共役的作用を示す<sup>5</sup>。この脱共役作用の機序はミトコンドリア膜にカドミウムは何らかの傷害を与え、K<sup>+</sup>等の遊出を誘引する事<sup>7</sup>により脱共役を示すものと考えられる。

このようなカドミウムの傷害作用をカルシウム結合

部位修飾剤であるルテニウムレッドがほぼ完全に抑制するという事実は極めて興味深い。また、ルテニウムレッドが添加されていると、カドミウムのミトコンドリア膜への取込みが抑制されるという事象<sup>6</sup>と併せて考えると、カドミウムの傷害作用部位をルテニウムレッドが占有する事が予想され、この競合部位がカルシウム結合部位である可能性が十分考えられる。

## 結 論

カドミウムとルテニウムレッドの相互作用に関し、ラット肝ミトコンドリアのエネルギー転換反応を指標にして検討した。その結果カドミウムに誘導される酸化的リン酸化反応の脱共役作用をルテニウムレッドが抑制した。この事は、カドミウムの毒性作用部位をルテニウムレッドが占有する事が示唆され、この作用部位がカルシウム結合部位である可能性が十分に考えられる。

## 文 献

- 1) 三浦豊彦, 斉藤一, 狩野広之, 藤本武, 多田治編, 「新労働衛生ハンドブック」労働科学研究所, 東京, pp 787-789, 1974.
- 2) Thienes, C. H. and Haley, T. L. "Clinical Toxicology" Lea & Febiger, Philadelphia, pp187-188, 1972
- 3) Larsson, S. E. and Piscator, M., Isr. J. Med. Sci., 7, 495-498, 1971
- 4) Utsumi, K. Acta. Med. Okayama, 17, 259-271, 1963.
- 5) Chance, B. and Williams, G. R., Adv. in Enzymol., 17, 65-134 1956
- 6) 菅原直毅, 菅原千枝子, 三宅浩次, 産業医学, 18, 474-475, 1976
- 7) 長谷川亨, 岡山医学会雑誌, 印刷中.
- 8) 野上裕作, 長谷川亨, 緒方正名, 産衛講演集, pp433, 1977.

**The mutual effects of  $\text{Cd}^{2+}$  and ruthenium red  
on rat liver mitochondrial energy transfer reaction**

**Tohoru HASEGAWA, Yusaku NOGAMI and Masana OGATA**

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

The mutual effects of  $\text{Cd}^{2+}$  and ruthenium red on rat liver mitochondrial energy transfer reaction are described. In results, ruthenium red recovered the depression of the oxidative phosphorylation induced by  $\text{Cd}^{2+}$ . Ruthenium red suppressed the  $\text{K}^+$  release induced by  $\text{Cd}^{2+}$ . As the binding site of the  $\text{Cd}^{2+}$  have other than the binding site of ruthenium red, the site of ruthenium red is greatly related with the inhibitory effect of  $\text{Cd}^{2+}$  and this site is similar to the binding site of  $\text{Ca}^{2+}$ .