

環境汚染物質（重金属など）の生体膜に対する作用

第 4 報

カドミウムによるミトコンドリアの K^+ 遊出作用及び カドミウムのミトコンドリア膜への結合に対するル テニウムレッドの作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導 緒方正名教授）

長 谷 川 亨

（昭和52年6月14日受稿）

目 的

産業界におけるカドミウムの慢性中毒は、肺気腫、腎障害及び骨粗鬆症として知られ、環境汚染によるいわゆるイタイ・イタイ病の中毒としては骨軟化症、高Ca尿などが知られている¹⁾。このカドミウムの生体に対する毒性の機序は不明の点が多い。著者らは²⁾、カドミウムの細胞に対する生物学的作用の機序の解明の一部として、ルテニウムレッドとカドミウムの相互作用について、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に関し検討を加え、ルテニウムレッドがカドミウムの毒性を著しく抑制する事を報告した。今回著者は、カドミウムのミトコンドリア膜に作用し発現する K^+ 遊出作用³⁾に関してもルテニウムレッドが抑制作用をもつかどうか、またこれらルテニウムレッドの抑制作用は、カドミウムのミトコンドリアの結合に関しても作用を発現し得るかどうかが検討してみた。その結果を報告する。

実験方法

1. ミトコンドリアの分離

ドンリウ系ラット（体重約250g）の肝臓からHogeboom, Schneiderの変法⁴⁾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製した。

3. K^+ 遊出の測定

0.15M Choline Chloride, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の反応液（反応温度25℃）2.5ml中にミトコンドリア（1～2mg Protein/ml）を添加し、反応液中に遊出してくる K^+ をカリウム電極（Beckman社製）で測定した。

4. ミトコンドリア膜に結合したCd量

0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の反応液（反応温度25℃）2.5ml中にミトコンドリア（3mg Protein/ml）を添加し、ルテニウムレッド、塩化カドミウムの水溶液を加え、10分間、反応させた後、再び遠心分離し、ミトコンドリアに結合したカドミウム及び上澄液のカドミウムを原子吸光分析法により定量した。（パーキンエルマ、360型原子吸光装置を用いた。）

実験結果

1. K^+ 遊出作用

Cd^{2+} はミトコンドリア膜に作用し、ミトコンドリア内部の K^+ を遊出させる³⁾。この Cd^{2+} による K^+ 遊出作用に対して、Ca結合部位に親和性があるといわれているルテニウムレッド⁽⁵⁾、プロカイン⁶⁾がどのような作用を示すかを各物質とも16 μ Mの終濃度において検索を行なった（図1）。いずれの物質も、明らかに Cd^{2+} による K^+ 遊出作用を抑制するが、特にルテニウムレッドの抑制効果が一番顕著である事は注目され

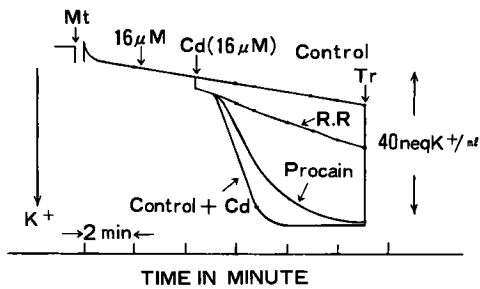


図1 Cd²⁺によるK⁺遊出に対するRR, Procaineの作用.
 反応液, 方法の項参照, Cd²⁺: 16μM, RR, Procaine: 16μM. Rat liver mitochondria (I my protein/ml)

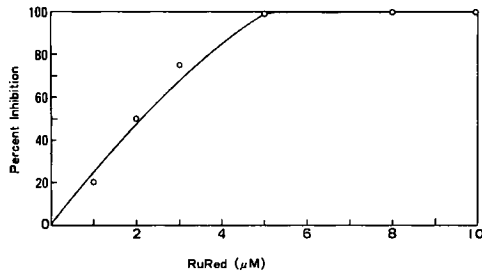


図2 RR濃度変化によるCd-K⁺遊出の抑制効果
 反応条件は図1に同じ, 但し, Cd²⁺: 10μM

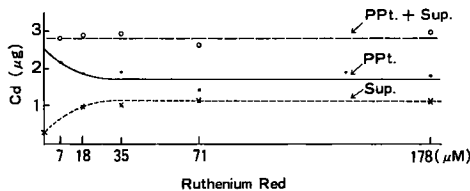


図3 Cd²⁺10μM存在下でのRR濃度変化に対するミトコンドリアに取り込まれたCd量
 反応条件は方法の項参照. CdCl₂: 10μM. Pi 2.5mM Na-succinate 5mM. Rat liver mitochondria (3 mg protein/ml)

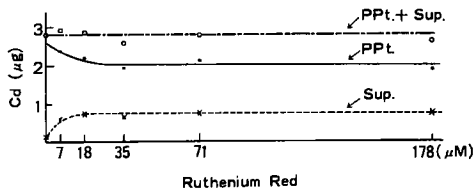


図4 Cd²⁺10μM存在下でのRR濃度変化に対するミトコンドリアに取込まれたCd量
 反応条件は図2と同じ, 但しNa-succinate 5mMを反応系から除いてある.

る。なお、ルテニウムレッドの濃度依存による抑制効果を、図2に示す。

2. ミトコンドリア膜に結合するCd量

ルテニウムレッドとCd²⁺の結合に関する競合を検討するために、7μMより178μMの濃度範囲内で、種々の濃度のルテニウムレッドを添加しておいて、一定量のCd²⁺ (10μM)を作用させ、ミトコンドリア膜に結合するカドミウムの量を測定してみた。(図3)は反応液中に呼吸基質としてNa-succinateを添加した場合のものであり、[図4]は外部呼吸基質の存在しない場合である。いずれの場合にも、ルテニウムレッドの7μMですでに抑制を示し、35μM以上ではCd²⁺の結合に対する抑制作用は一定値を示した。なおルテニウムレッドのミトコンドリアへのCd²⁺の結合に対する抑制効果は外部基質が存在する場合の方が、内部基質のみの場合よりも弱い事が認められた。この事象は、ルテニウムレッドとカドミウムの結合部位について共通する結合部位が存在する事を裏付けるものである。

考 察

本研究より、Cd²⁺の持つK⁺遊出作用に対しカルシウム結合部位に親和性をもつ物質として知られているルテニウムレッド⁵⁾、プロカイン⁶⁾、のうち、特にルテニウムレッドが著しい抑制効果を示す事が明らかになった。この事実は、カドミウムのミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する脱共役作用をルテニウムレッドが抑制するという前回の著者らの報告²⁾と考え合わせると、ルテニウムレッドがCd²⁺の生体膜に対する障害作用を抑制する事を示している。即ちカドミウムの生体膜に対する作用部位とルテニウムレッドの作用部位との間には共通の部分が存在する事を示唆する。

カドミウムの毒性の種々の症例は、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示唆される。本研究並びに、前回の報告²⁾より、Caの結合部位に親和性を持つルテニウムレッドがカドミウムの生体膜に対する阻害作用を抑制する事が明らかとなった。即ち、生体膜のカルシウム結合部位がカドミウムの毒性作用部位である可能性が示唆され、カドミウムのカルシウム代謝に対する影響に関して一つの示唆を与えるものとする。

結 論

カドミウムによるミトコンドリアからのK⁺遊出及

びミトコンドリアへのカドミウムの結合に対するルテニウムレッドの作用を検討し以下の結果を得た。

1. カルシウム結合部位に親和性を持つルテニウムレッド、プロカインはカドミウムによる K^+ 遊出を抑制し、その抑制効果はルテニウムレッド>プロカインの順であった。
2. ルテニウムレッドは $7\mu M$ から $178\mu M$ の範囲内でカドミウムのミトコンドリアへの結合を抑制する事が認められた。

本研究の要旨は第50回日本産業衛生学会大会にて発表した。

謝 辞

本論文の橋を終えるに当たり、御懇篤なる御指導御校閲を賜った恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表します。またカドミウムの定量に関し御援助頂いた公害保健センターの森田啓次郎氏に謝意を表します。

文 献

- 1) Thienes, C. H and Haley, T. J. "Clinical Toxicology" Lea &Febiger, Philadelphia, pp. 187-188, 1972.
- 2) 長谷川 亨, 野上裕作, 緒方正名, 岡山医学会雑誌, 88, 印刷中, 1977
- 3) 長谷川 亨, 岡山医学会雑誌, 88, 印刷中, 1977
- 4) Utsumi, K, Acta Med. Okayama, 17, 259-271, 1963.
- 5) Chance, B, Azzi, A. and Mela, L. "Molecular Basis of Membrane function, Englewood Cliffs, pp. 561, 1969.
- 6) Goodman, L. S. and Gilman, A. "The Pharmacological Basis of Therapeutics" The Macmillan company, London, pp. 609, 1971.

The effects of ruthenium red on the K^+ release of mitochondria induced by Cd^{2+} and on the binding of Cd^{2+} with mitochondrial membrane

Tohoru HASEGAWA

Department of Public Health, Okayama University Medical School of Okayama

(Director : Prof. Masana Ogata)

The effects of ruthenium red (RR) on the K^+ release induced by Cd^{2+} and on the binding of Cd^{2+} with mitochondrial membrane were examined and the following results were obtained.

- 1) The K^+ release of mitochondria induced by Cd^{2+} was inhibited by the compounds which had the affinity to the Ca^{2+} -binding site, in the order of RR, procaine.
- 2) Binding of Cd^{2+} with mitochondrial membrane was inhibited by RR.