

ラット肝ミトコンドリアに対するカドミウム, 銅, 亜鉛の単独及び複合作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

宮 地 芳 之

(昭和62年 2月29日受稿)

Key words : Mitochondria, Cadmium
Copper, Zinc, Oxidative phosphorylation
ATPase, Electron Transport System

緒 言

著者らはかつて、倉敷市、玉野市で採取した浮遊粉塵中の重金属成分を分析した結果、比較的高濃度に鉄、亜鉛、鉛、銅を検出し報告した¹⁾。又、玉野地域の大气中の金属成分を分析した結果、その一地域において、銅、カドミウムを比較的高濃度に検出したという報告もある²⁾。

一方において、神通川流域に発生したイタイイタイ病患者の骨や内臓から多量のカドミウム、亜鉛、鉛が検出され³⁻⁵⁾、群馬県安中市におけるカドミウム汚染においては、亜鉛精練工場の排煙、排水中にカドミウム、亜鉛、鉛が非常に高濃度に検出されたと報告されている⁴⁾。

生体の重金属に対する防禦機構として、ヒトの肝臓、腎臓、心臓においては、カドミウム、亜鉛、銅がメタロチオネインを産出することが知られている⁶⁻⁸⁾。そして、水銀、カドミウム、銅、亜鉛はSH基との親和性を有し⁹⁾、これらの重金属イオンが、酵素の活性原子団と結合することにより阻害作用を示すことが懸念される。

以上、環境中に共存しやすい重金属の中で生体内で同一のSH基と反応し、メタロチオネインを発生しやすいカドミウム、亜鉛、銅を選び、ラット肝ミトコンドリア機能に対する単独および複合作用を検討した。

すなわち、これまでカドミウム、銅、亜鉛の

生体に対する単独作用については、多数の報告がされているが、複合作用についての報告は少ない。金属間の相互作用については、現象として認められても、その機構は不明なものが多く、今後検討する課題を多く抱えている。複合的環境汚染の基礎的研究の見地からも、汚染物質間の相互作用は重要な意味を持つものと思われる。

前報¹⁰⁾において著者は重金属の生体膜に対する作用に注目して、ヒト赤血球膜を用いて、銅と有機水銀化合物であるPCMB (Sodium p-chloromercuribenzoate) 及びEMP (Etylmacury Phosphate) の単独及び複合作用について検討を行った。その結果、銅と有機水銀化合物を同時にヒト赤血球に作用した所、銅と有機水銀化合物の中間の阻害度を認め、両者による同一部位に対する競合阻害が示唆された。

今回著者は、カドミウム、銅、亜鉛の3種の重金属が、生体に及ぼす毒性の指標として、その重要な生体機能であるラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応、ATPase活性及び電子伝達系に与える影響を単独及び複合作用の見地から検討した。

材料及び方法

1) ミトコンドリアの分離

体重約200gのドンリュウ系ラット肝よりHogeboom-Schneiderの変法¹¹⁾で分画し、0.25

M Sucrose, 4 mM Tris-HCl Buffer (pH7.4) に懸濁し実験に供した。

2) 試薬

塩化銅, 塩化カドミウム, 酢酸亜鉛の和光特級を用い, それぞれ終濃度が100倍希釈されるよう反応液に添加した。

3) 酸化リン酸化反応の測定

反応後, 0.15M KCl, 10mM Tris-HCl Buffer (pH7.4) に磷酸 5 mM, ミトコンドリア (1~2 mg/ml) を添加し, 呼吸基質としてコハク酸 5 mM 磷酸化基質として ADP 0.3 mM を加える。消費された溶存酸素量を酸素電極 (給水化学) を用いて経時的に測定した。反応液 3.5 ml, 反応温度 25°C で行った。

4) ATPase 測定

a. 試薬

① 反応液: 0.15 M KCl-10 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) に 5 mM-ATP (終濃度), 2×10^{-5} M DNP (終濃度), ミトコンドリア各試薬を加えて全量 2 ml とする。

② 磷酸抽出液: 2% リンモリブデン酸アンモン 1 ml, 1.5N-硫酸 1 ml, イソブタノール 4 ml。

④ 呈色試薬: 0.5% アスコルビン酸の 0.05% 炭酸水素ナトリウム液。

b. 実験方法

反応温度 25°C の反応液中に ATP を添加し正確に15分間反応させ, 反応後, 反応停止液を加えて遠沈し, 上清 1 ml を氷冷中の磷酸抽出液に加えて激しく振盪させる。上清イソブタノール層 2 ml を取り, これにアスコルビン酸試薬 2 ml, エタノール 1 ml を加えて振盪し, 37°C に30分間加温して発色させ, 700 nm にて吸光度を測定した。

5) 電子伝達系に対する作用の測定

① Site 3呼吸阻害の測定

0.15 M KCl, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) の反応液 3.5 ml にミトコンドリア (70 mg/ml) 100 μ l と 2.4-Dinitrophenol (DNP) 2×10^{-5} M (final) を添加して呼吸を開放状態にし30秒後に呼吸基質のアスコルビン酸 5 mM (final) と電子伝達担体の N, N, N', N'-tetramethylphenylene diamine (TMPD) 0.1 mM (final) を添加, 30秒後に重金属試薬を添加して酸素の消費

量を経時的に測定した。反応温度は 25°C にて行った。尚, 重金属試薬については, 1回につき, 塩化銅 10 μ M (final), 塩化カドミウム 10 μ M (final), 酢酸亜鉛 5 μ M (final) を逐次添加した。

② Site 2呼吸阻害の測定

Site 3 と同様の方法で呼吸基質にコハク酸 5 mM (final) を加え, 各重金属試薬を添加して酸素の消費量を経時的に測定した。尚, 重金属試薬は1回につき, 塩化銅 10 μ M (final), 塩化カドミウム 10 μ M (final), 酢酸亜鉛 5 μ M (final) を逐次添加した。

③ Site 1呼吸阻害の測定

Site 3, Site 2 と同様の方法でミトコンドリア (70 mg/ml) 200 μ l, 呼吸基質 β -hydroxy butyric acid (β -OH) 5 mM (final) を加え, 各重金属試薬を添加して酸素の消費量を経時的に測定した。尚, 重金属試薬は1回につき塩化銅 15 μ M (final), 塩化カドミウム 15 μ M (final), 酢酸亜鉛 15 μ M (final) を逐次添加した。

結 果

1. 酸化リン酸化反応

A. 金属の単独作用

単独作用についての測定結果を表1及び図1~3に示す。

Cd⁺⁺ は [図1] で明らかなように State 3呼吸にはあまり影響を与えないで State 4呼吸活性を増大させるので, 脱共役作用が強いといえ

表1 Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ の State 3 及び State 4 呼吸における酸素消費量に対する単独作用

単独作用	酸素消費量(n atoms/min/mg prot.)		controlに対する比率(%)		
	State 3 呼吸	State 4 呼吸	State 3 呼吸	State 4 呼吸	
Cd ⁺⁺	0 μ M	107.4	14.9	100	100
	2 μ M	108.0	17.0	101	114
	4 μ M	103.8	19.5	97	131
	6 μ M	99.2	30.3	92	203
	8 μ M	102.8	37.0	96	248
Cu ⁺⁺	0 μ M	127.4	17.3	100	100
	4 μ M	121.1	14.0	95	80
	6 μ M	116.2	18.4	91	106
	8 μ M	91.7	25.4	72	146
	10 μ M	65.5	27.2	51	157
Zn ⁺⁺	0 μ M	109.0	21.6	100	100
	1 μ M	82.4	19.0	76	88
	2 μ M	54.5	14.6	50	67
	3 μ M	43.7	12.7	40	58
	5 μ M	31.7	11.4	29	53

る。

Cu⁺⁺ は [図 2] で明らかな如く、State 3 呼吸の抑制、State 4 呼吸の増大により呼吸調節能指標値 (以下呼吸調節能と略) [State 3 / State 4 = RCI] を低下させた。

Zn⁺⁺ は [図 3] で明らかな如く、State 3 及

び、State 4 呼吸の抑制が大きいので電子伝達阻害もしくは、エネルギー転移阻害が大きいといえる。従来、ミトコンドリアの酸化的磷酸化反応 (呼吸作用) について、呼吸調節能 (RCI) の比較では、不十分である。今回は State 3, State 4 呼吸について考察した。

B. 金属の複合作用

二種の金属の共存下における酸化的磷酸化反応として、異なる作用の金属が共存した場合の酸化的磷酸化反応について検討した。組合せは、
 ① Cd⁺⁺ (一定) + Cu⁺⁺, Cu⁺⁺ (一定) + Cd⁺⁺,
 ② Cd⁺⁺ (一定) + Zn⁺⁺, Zn⁺⁺ (一定) + Cd⁺⁺,
 ③ Zn⁺⁺ (一定) + Cu⁺⁺, Cu⁺⁺ (一定) + Zn⁺⁺

上記の組合せによる複合作用の測定結果を表 2 及び図 4 ~ 9 に示す。

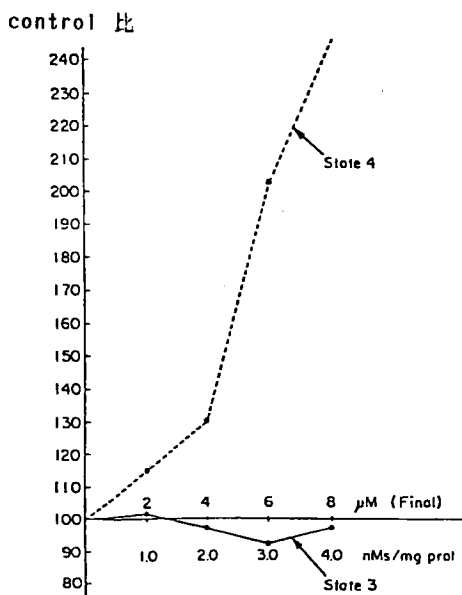


図 1 CdCl₂ 各種濃度によるミトコンドリア呼吸への影響
 蛋白濃度 69.4 mg/ml 100 μl (nMs は n moles の略)

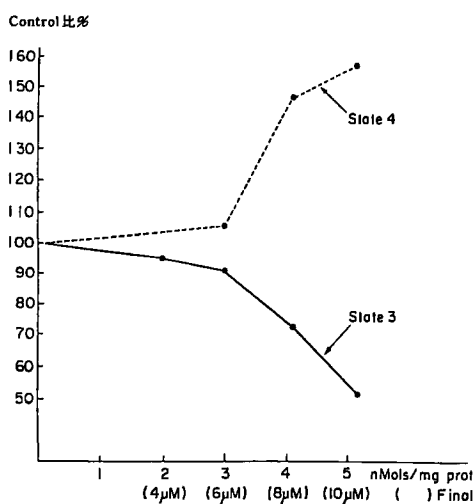


図 2 CuCl₂ 各種濃度によるミトコンドリアへの影響
 蛋白濃度 68 mg/ml 100 μl (nMols は n moles の略)

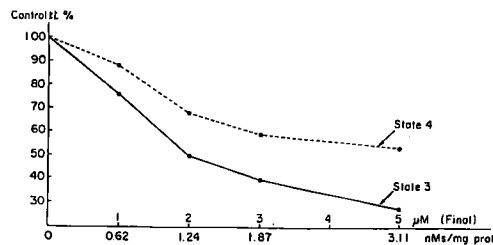


図 3 ZnAc₂ 各種濃度によるミトコンドリアへの影響
 蛋白濃度 56.3 mg/ml 100 μl (nMs は n moles の略)

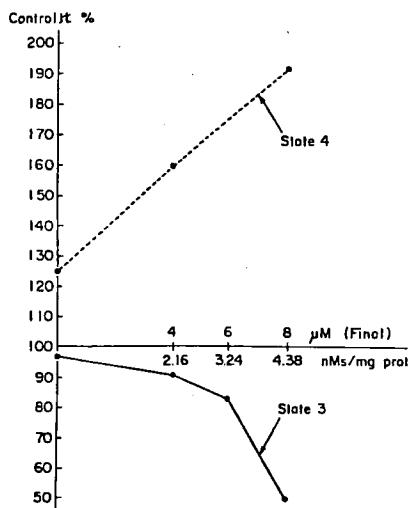


図 4 CdCl₂ 一定濃度 (4 μM Final, 2.16 nMs/mg prot) に各種濃度の CuCl₂ 添加
 蛋白濃度 64.7 mg/ml 100 μl 添加 (nMs は n moles の略)

①-a. Cd^{++} (一定) + Cu^{++}

Cd^{++} 一定濃度 (4 μM final, 2.16 n moles/mg prot.) に Cu^{++} の各種濃度を加えた場合は [図 4] で示されるように Cu^{++} 量の増加にしたがい State 3 呼吸の低下, State 4 呼吸の促進がみられた。

①-b. Cu^{++} (一定) + Cd^{++}

Cu^{++} 一定濃度 (6 μM final, 3.25 n moles/mg prot.) に Cd^{++} の各種濃度を加えた場合 [図 5] に示されるように Cd^{++} 量の増大により State 4 呼吸の活性が増大し, State 3 呼吸抑制がわずかに増大した。それらの曲線は Cd^{++} の単独投与に似ている。

②-a. Cd^{++} (一定) + Zn^{++}

Cd^{++} 一定濃度 (2 μM final, 0.97 n moles/mg

prot.) に Zn^{++} の各種濃度を加えた場合 [図 6] に示されるように Cd^{++} により上昇した State 4 呼吸活性が Zn^{++} により抑制された。State 3 呼吸も Zn^{++} により更に強く抑制された。

②-b. Zn^{++} (一定) + Cd^{++}

Zn^{++} 一定濃度 (1 μM final, 0.48 n moles/mg prot.) に Cd^{++} の各種濃度を加えた場合 [図 7] に示されるように State 4 呼吸活性が大きく上昇し, State 3 呼吸が抑制された。これは Cd^{++} 単独の曲線に類似している。

③-a. Zn^{++} (一定) + Cu^{++}

Zn^{++} 一定濃度 (1 μM final, 0.6 n moles/mg prot.) に Cu^{++} の各種濃度を加えた場合 [図 8] で示されるように Zn^{++} 単独の時は, State 3, State 4 呼吸とも抑制されているが, Cu^{++} 量の

表 2 Cd^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} の State 3 及び State 4 呼吸における酸素消費量に対する複合作用

複合作用		酸素消費量(n atoms/min/mg prot.)		control に対する比率(%)	
		State 3 呼吸	State 4 呼吸	State 3 呼吸	State 4 呼吸
$Cd^{++}+Cu^{++}$	$Cd^{++}0 \mu M$	125.6	18.6	100	100
	$Cd^{++}4 \mu M$	122.4	23.2	98	125
	$Cd^{++}4 \mu M + Cu^{++}4 \mu M$	115.2	29.7	92	160
	$Cd^{++}4 \mu M + Cu^{++}6 \mu M$	105.0	26.7	84	144
	$Cd^{++}4 \mu M + Cu^{++}8 \mu M$	74.1	35.6	59	191
$Cu^{++}+Cd^{++}$	$Cu^{++}0 \mu M$	118.7	13.2	100	100
	$Cu^{++}6 \mu M$	116.3	15.4	98	117
	$Cu^{++}6 \mu M + Cd^{++}4 \mu M$	114.0	18.6	96	141
	$Cu^{++}6 \mu M + Cd^{++}6 \mu M$	108.0	21.1	91	160
	$Cu^{++}6 \mu M + Cd^{++}8 \mu M$	104.4	26.4	88	200
$Cd^{++}+Zn^{++}$	$Cd^{++}0 \mu M$	124.0	17.4	100	100
	$Cd^{++}2 \mu M$	121.5	21.4	98	123
	$Cd^{++}2 \mu M + Zn^{++}1 \mu M$	99.2	21.4	80	123
	$Cd^{++}2 \mu M + Zn^{++}2 \mu M$	79.4	20.4	64	117
	$Cd^{++}2 \mu M + Zn^{++}3 \mu M$	58.3	15.8	47	91
$Zn^{++}+Cd^{++}$	$Zn^{++}0 \mu M$	117.3	16.1	100	100
	$Zn^{++}1 \mu M$	102.9	14.7	88	92
	$Zn^{++}1 \mu M + Cd^{++}2 \mu M$	97.7	21.6	83	134
	$Zn^{++}1 \mu M + Cd^{++}3 \mu M$	85.5	28.5	73	177
	$Zn^{++}1 \mu M + Cd^{++}4 \mu M$	83.2	34.3	70	213
$Zn^{++}+Cu^{++}$	$Zn^{++}0 \mu M$	113.6	23.8	100	100
	$Zn^{++}1 \mu M$	102.3	21.2	90	89
	$Zn^{++}1 \mu M + Cu^{++}4 \mu M$	78.4	23.3	69	98
	$Zn^{++}1 \mu M + Cu^{++}6 \mu M$	84.1	25.5	74	107
	$Zn^{++}1 \mu M + Cu^{++}8 \mu M$	63.1	31.4	56	132
$Cu^{++}+Zn^{++}$	$Cu^{++}0 \mu M$	106.1	20.1	100	100
	$Cu^{++}6 \mu M$	102.9	20.7	97	103
	$Cu^{++}6 \mu M + Zn^{++}1 \mu M$	79.6	18.3	75	91
	$Cu^{++}6 \mu M + Zn^{++}2 \mu M$	67.9	15.9	64	79
	$Cu^{++}6 \mu M + Zn^{++}3 \mu M$	57.3	14.1	54	70

増大により State 4 呼吸活性は増大し, State 3 呼吸活性は更に抑制された。

③-b. Cu^{++} (一定) + Zn^{++}

Cu^{++} 一定濃度 (6 μM final, 3.58 n moles/mg prot.) に Zn^{++} の各種濃度を加えた場合 [図 9] に示されるように Zn^{++} 量の増大により State 3 State 4 呼吸活性の抑制が見られた。その曲線は Zn^{++} 単独投与の場合と類似していた。

2. ATPase に対する作用

A. 金属の単独作用

単独作用における測定結果を表 3 及び図 10~12 に示す。

Cd^{++} は [図 10] で示される様に, DNP を加えないもの (Latent-ATPase) については, Cd の濃度の増大に従い P_i の遊出量が増大した。DNP を加えたもの (Stimulate-ATPase) については, P_i の遊出量の変動は少ないがやや抑制の傾向が

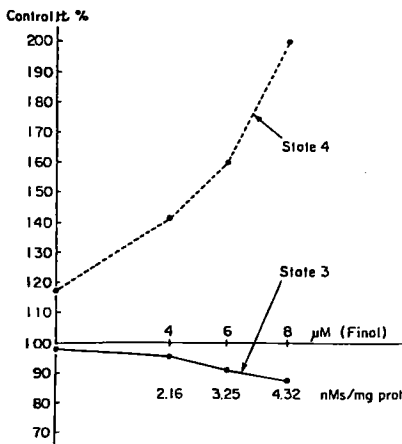


図 5 CuCl_2 一定濃度 (6 μM Final, 3.25 nMs/mg prot.) に CdCl_2 の各種濃度を添加 蛋白濃度 64.7 mg/ml 100 μl 添加 (nMs は n moles の略)

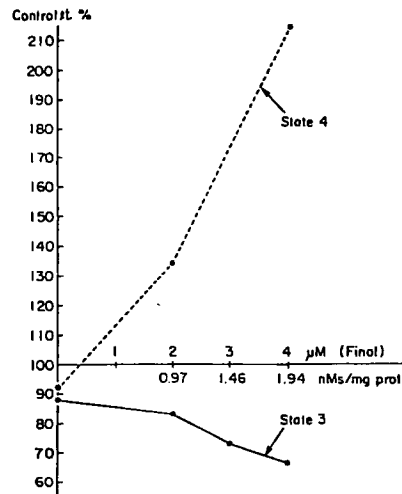


図 7 ZnAc_2 一定濃度 (1 μM Final, 0.48 nMs/mg prot.) に CdCl_2 各種濃度を添加 蛋白濃度 72.2 mg/ml 100 μl 添加 (nMs は n moles の略)

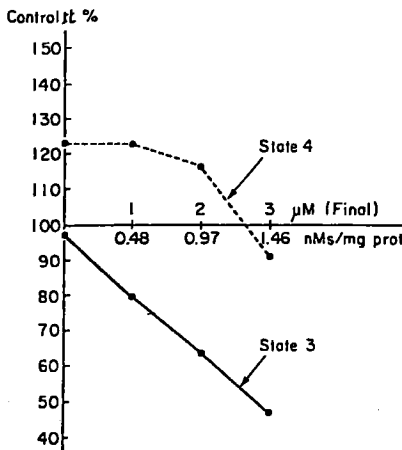


図 6 CdCl_2 一定濃度 (2 μM Final, 0.97 nMs/mg prot.) に ZnAc_2 各種濃度を添加 蛋白濃度 72.2 mg/ml 100 μl 添加 (nMs は n moles の略)

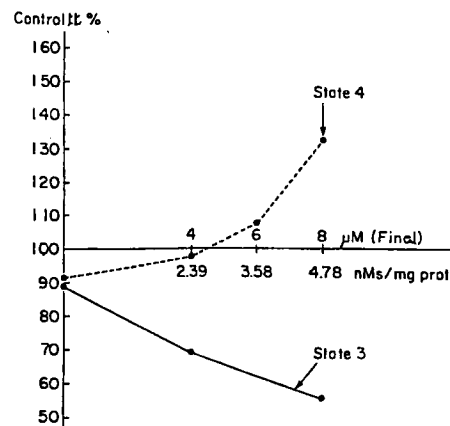


図 8 ZnAc_2 一定濃度 (1 μM Final, 0.6 nMs/mg prot.) に CuCl_2 各種濃度を添加 蛋白濃度 58.6 mg/ml 100 μl 添加 (nMs は n moles の略)

見られた。

Cu⁺⁺は[図11]で明らかな如く、DNPを加えないものについては濃度が増加するに従いPiの遊出量が増大するが、Cu⁺⁺の8μMを境にして抑制の傾向にある。DNPを加えたものについては、Cu⁺⁺の8μMまでは変動が無いとみなされるが、それを境にして遊出抑制がみられた。

Zn⁺⁺は[図12]で示される様に、DNPを加えないものについては、Zn⁺⁺濃度の増加に従いPiの遊出量が増大したが、DNPを加えたものについては、Piの遊出量が、やや抑制された。

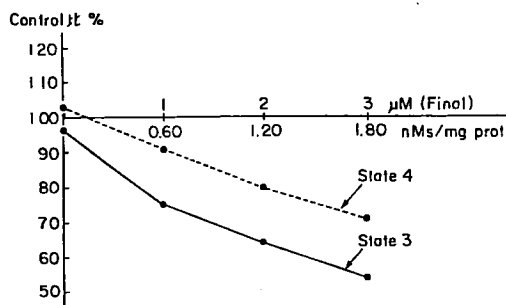


図9 CuCl₂一定濃度(6μM Final, 3.58 nMs/mg prot)に各種のZnAc₂添加
蛋白濃度58.6 mg/ml 100μl添加 (nMsはn molesの略)

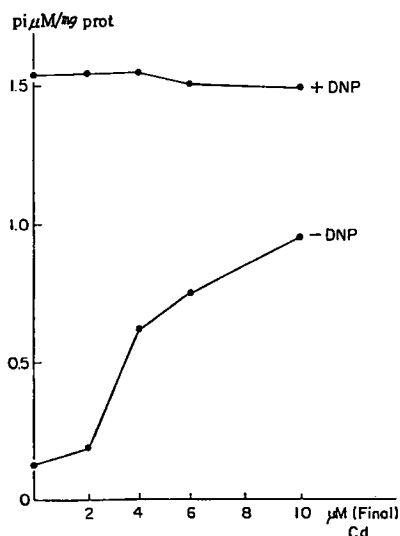
表3 Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺のATPase活性に対する単独作用

単独作用		Pi遊出量 ($\mu\text{M}/\text{mg prot.}$)	
		Latent ATPase	Stimulate ATPase
Cd ⁺⁺	0 μM	0.13	1.54
	2 μM	0.19	1.54
	4 μM	0.63	1.54
	6 μM	0.73	1.49
	10 μM	0.90	1.48
Cu ⁺⁺	0 μM	0.11	1.50
	2 μM	0.10	1.40
	4 μM	0.18	1.51
	8 μM	0.59	1.55
	15 μM	0.35	0.43
Zn ⁺⁺	0 μM	0.08	1.53
	2 μM	0.14	1.40
	5 μM	0.43	1.34
	8 μM	0.53	1.34
	10 μM	0.70	1.38

以上のことから、3種の金属とも濃度の増加に従いLatent-ATPaseは上昇し、Cu⁺⁺を除いてStimulate-ATPaseの変動は少なかった。

B. 金属の複合作用

二種の金属の共存下におけるATPase活性の変動について検討した。即ち、一種の金属の一定の濃度に他方の各種濃度の金属が共存した場合のATPase活性について検討した。組み合わせ



(縦軸は反応液2 ml中のPi濃度μMを示す。図2~図9も同様。)

図10 CdのATPase活性に対する作用

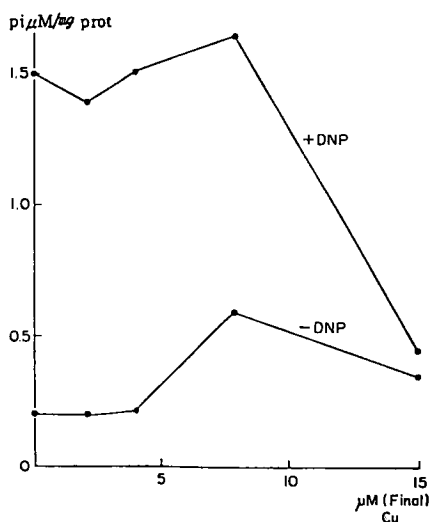


図11 CuのATPase活性に対する作用

- せは①Cd⁺⁺(一定)+Cu⁺⁺, Cu⁺⁺(一定)+Cd⁺⁺,
 ② Cd⁺⁺(一定)+Zn⁺⁺, Zn⁺⁺(一定)+Cd⁺⁺,
 ③ Zn⁺⁺(一定)+Cu⁺⁺, Cu⁺⁺(一定)+Zn⁺⁺.

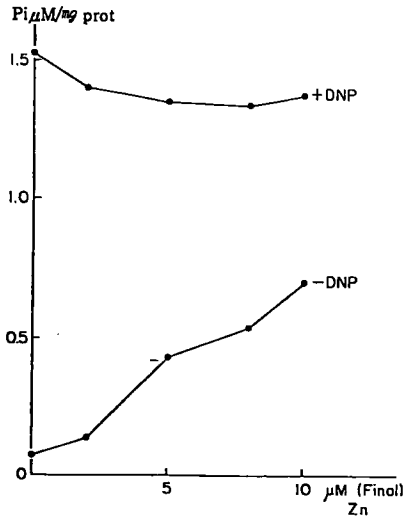


図12 ZnのATPase活性に対する作用

表4 Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺のATPase活性に対する複合作用

複合作用		Pi遊出量 (pi μM/mg prot.)	
		Latent ATPase	Stimulate ATPase
Cd ⁺⁺ +Cu ⁺⁺	Cd ⁺⁺ 4 μM	0.55	1.54
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Cu ⁺⁺ 4 μM	0.56	1.60
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Cu ⁺⁺ 6 μM	0.68	1.58
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Cu ⁺⁺ 8 μM	1.09	1.54
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Cu ⁺⁺ 15 μM	0.52	0.68
Cu ⁺⁺ +Cd ⁺⁺	Cu ⁺⁺ 6 μM	0.26	1.53
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Cd ⁺⁺ 2 μM	0.36	1.52
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Cd ⁺⁺ 4 μM	0.77	1.47
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Cd ⁺⁺ 6 μM	0.93	1.47
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Cd ⁺⁺ 10 μM	1.21	1.54
Cd ⁺⁺ +Zn ⁺⁺	Cd ⁺⁺ 4 μM	0.55	1.54
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Zn ⁺⁺ 2 μM	0.59	1.53
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Zn ⁺⁺ 3 μM	0.76	1.53
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Zn ⁺⁺ 5 μM	0.86	1.45
	Cd ⁺⁺ 4 μM + Zn ⁺⁺ 8 μM	0.90	1.46
Zn ⁺⁺ +Cd ⁺⁺	Zn ⁺⁺ 3 μM	0.24	1.52
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cd ⁺⁺ 2 μM	0.55	1.41
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cd ⁺⁺ 4 μM	0.86	1.43
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cd ⁺⁺ 6 μM	0.91	1.32
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cd ⁺⁺ 10 μM	0.88	1.28
Zn ⁺⁺ +Cu ⁺⁺	Zn ⁺⁺ 3 μM	0.05	1.51
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cu ⁺⁺ 4 μM	0.12	1.49
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cu ⁺⁺ 6 μM	0.14	1.53
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cu ⁺⁺ 8 μM	0.64	1.64
	Zn ⁺⁺ 3 μM + Cu ⁺⁺ 15 μM	0.83	0.85
Cu ⁺⁺ +Zn ⁺⁺	Cu ⁺⁺ 6 μM	0.18	1.52
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Zn ⁺⁺ 2 μM	0.34	1.49
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Zn ⁺⁺ 5 μM	0.69	1.54
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Zn ⁺⁺ 8 μM	0.74	1.55
	Cu ⁺⁺ 6 μM + Zn ⁺⁺ 10 μM	0.83	1.59

上記組み合わせによる測定結果を表4及び図13~18に示す。

①-a. Cd⁺⁺(一定)+Cu⁺⁺

Cd⁺⁺一定濃度(4 μM final)にCu⁺⁺の各種濃度を加えた場合[図13]で示されるように,Cu⁺⁺単独の濃度依存とほぼ同じカーブを示した。

①-b. Cu⁺⁺(一定)+Cd⁺⁺

Cu⁺⁺一定濃度(6 μM final)にCd⁺⁺の各種

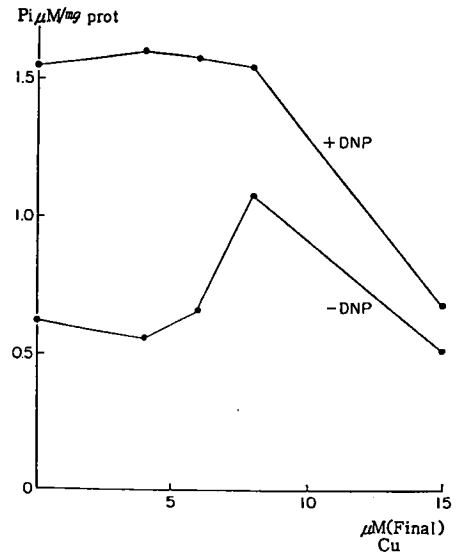


図13 Cd一定(4 μM)濃度とCu各種濃度

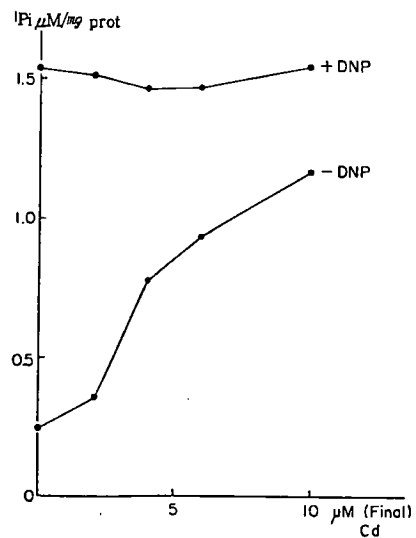


図14 Cu一定(6 μM)濃度とCd各種濃度

濃度を加えた場合 [図14] で示されるように、DNPを加えないものについては、 Cd^{++} の濃度の増加に従って遊出 Pi 量は増大し、その傾向は Cd^{++} 単独の場合と同じであった。遊出 Pi 量も Cu^{++} 6 μM の Pi を加算した量にほぼ同じである。DNPを加えたものについては Pi 遊出量に変動は見られなかった。

②-a. Cd^{++} (一定) + Zn^{++}

Cd^{++} 一定濃度 (4 μM) に Zn^{++} 各種濃度を添加した場合 [図15] で示されるように、 Zn^{++} 単

独に比べて DNP 添加の ATPase にわずかながら抑制が見られ、DNP を添加しない ATPase、即ち Latent ATPase 活性増大が抑制された。

②-b. Zn^{++} (一定) + Cd^{++}

Zn^{++} 一定濃度 (3 μM) に Cd^{++} の各種濃度を添加した場合 [図16] で示されるように、DNP で活性化された Stimulate ATPase 活性がやや抑制され、Latent ATPase 活性は Cd^{++} の濃度が低い場合は Cd^{++} 単独の傾向に似ているが、

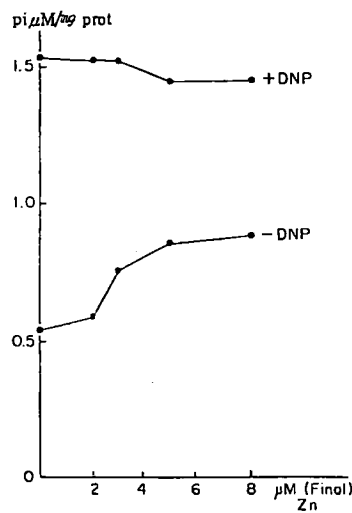


図15 Cd 一定 (4 μM) 濃度と Zn の各種濃度

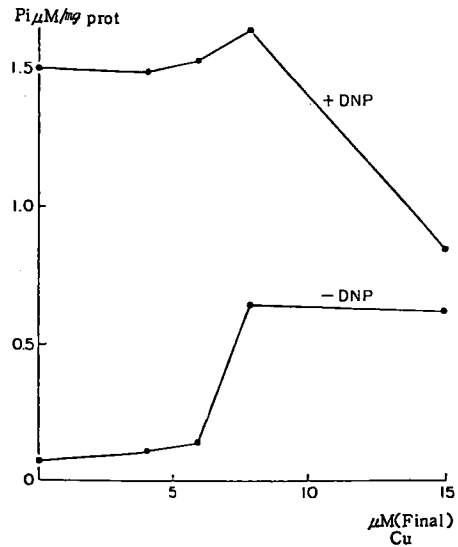


図17 Zn 一定 (3 μM) 濃度と Cu 各種濃度

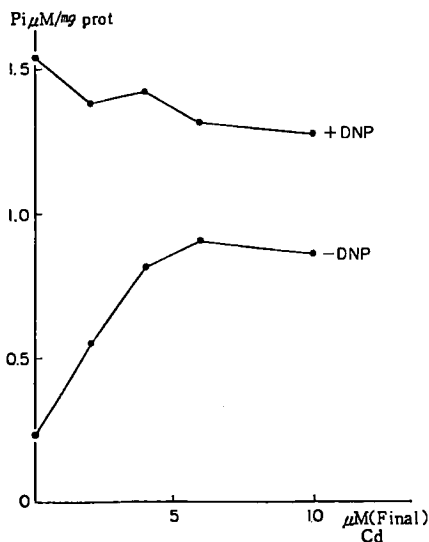


図16 Zn 一定 (3 μM) 濃度と Cd 各種濃度

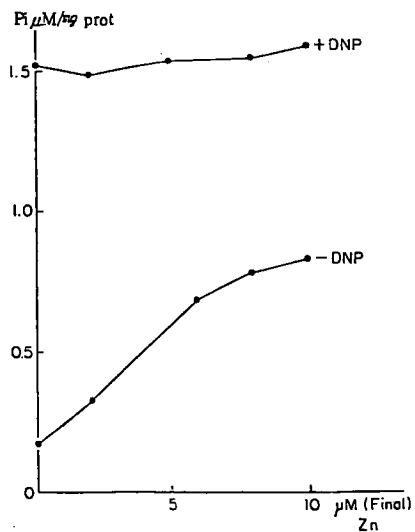


図18 Cu 一定 (6 μM) 濃度と Zn 各種濃度

濃度増加に従い抑制が見られた。

③-a. Zn^{++} (一定) + Cu^{++}

Zn^{++} 一定濃度 ($3 \mu M$) に Cu^{++} 各種濃度を添加した場合 [図17] で示されるように Cu^{++} 単独とほぼ同じ線を描いた。

③-b. Cu^{++} (一定) + Zn^{++}

Cu^{++} 一定濃度 ($6 \mu M$) に Zn^{++} 各種濃度を加えた場合 [図18] で示されるように DNP を添加したもの、即ち Stimulate ATPase の変動は少なく、DNP を添加しなかったもの即ち Latent ATPase の活性は Zn^{++} の濃度が増加するに従い促進された。

3. 電子伝達系に対する作用

A. 単独作用

Site 1 呼吸

[図19-1 : 実線] 及び [図19-2 : 実線] に示すように $Cd^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 15 \mu M$ (final), $Cu^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 15 \mu M$ (final) をそれぞれ添加したが、いずれも呼吸阻害作用を示さなかった。

[図19-3] に示す如く $Zn^{++} 15 \mu M$ (final) 添加により呼吸阻害作用を認めた。

Site 2 呼吸

[図20-1 : 実線] 及び [図20-2 : 実線] に示すように $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Cd^{++} 10 \mu M$ (final), $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) をそれぞれ添加したが、いずれも呼吸阻害作用を示さなかった。

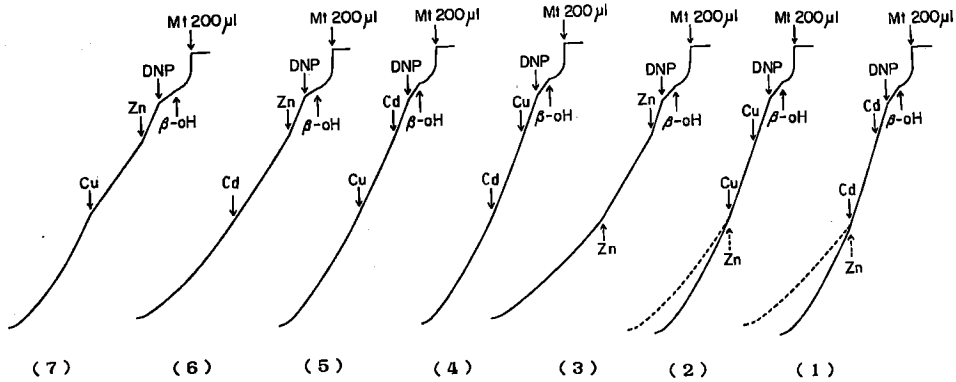


図19 ミトコンドリア電子伝達系に対する Cd, Cu, Zn の単独及び複合作用 (Site 1 酸素吸収)

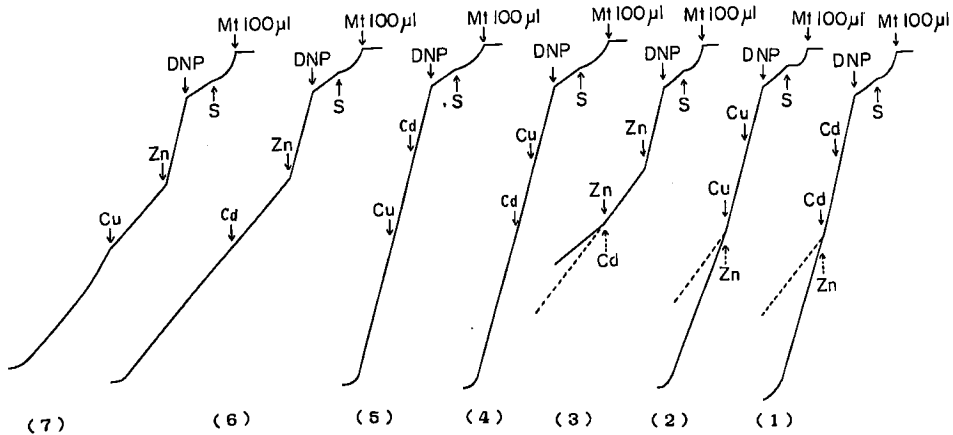


図20 ミトコンドリア電子伝達系に対する Cd, Cu, Zn の単独及び複合作用 (Site 2 酸素吸収)

【図20-3：実線】に示す如く $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) 添加により呼吸阻害作用を認めた。

Site 3 呼吸

【図21-1, 2, 3】に示すように $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Cd^{++} 10 \mu M$ (final), $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 10 \mu M$ (final), $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) \rightarrow $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) を添加したが、それぞれ呼吸阻害作用を認めなかった。

B. 複合作用

Site 1, Site 2, 及び Site 3 呼吸に対し, 2 種金属を順序を変えて添加し, 電子伝達系に対する作用を比較検討した。添加する順序は次の通りである。

① $Cu^{++} \rightarrow Cd^{++}$, $Cd^{++} \rightarrow Cu^{++}$, ② $Cd^{++} \rightarrow Zn^{++}$, $Zn^{++} \rightarrow Cd^{++}$, ③ $Cu^{++} \rightarrow Zn^{++}$, $Zn^{++} \rightarrow Cu^{++}$

Site 1 及び Site 2 呼吸

3 種の金属をそれぞれの電子伝達系に複合的に作用させた結果, Site 1 及び Site 2 呼吸において同様の作用を認めた。

① $Cu^{++} \rightarrow Cd^{++}$: 【図19-4 : Site 1】及び【図20-4 : Site 2】に示すとうり Site 1 呼吸においては $Cu^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Cd^{++} 15 \mu M$ (final), Site 2 呼吸においては, $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) + $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも呼吸阻害作用は認められなかった。

$Cd^{++} \rightarrow Cu^{++}$: 【図19-5 : Site 1】及び【図20-5 : Site 2】に示すとうり, Site 1 呼吸において

は $Cd^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 15 \mu M$ (final), Site 2 呼吸においては $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも呼吸阻害作用は認めなかった。

② $Cd^{++} + Zn^{++}$: 【図19-1 : 破線 : Site 1】及び【図20-1 : 破線 : Site 2】で示されるとうり Site 1 呼吸においては $Cd^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Zn^{++} 15 \mu M$ (final), Site 2 呼吸においては $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも Zn^{++} 単独添加と同じ呼吸阻害作用を示した。

$Zn^{++} + Cd^{++}$: 【図19-6 : Site 1】及び【図20-6 : Site 2】で示すとうり, Site 1 呼吸においては $Zn^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Cd^{++} 15 \mu M$ (final), Site 2 呼吸においては $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) \rightarrow $Cd^{++} 10 \mu M$ (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも Zn^{++} の単独添加と同じ呼吸阻害作用を示した。

③ $Cu^{++} + Zn^{++}$: 【図19-2 : 破線 : Site 1】及び【図20-2 : 破線 : Site 2】で示すとうり, Site 1 呼吸においては $Cu^{++} 15 \mu M$ (final) \rightarrow $Zn^{++} 15 \mu M$ (final), Site 2 呼吸においては $Cu^{++} 10 \mu M$ (final) \rightarrow $Zn^{++} 5 \mu M$ (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも Zn^{++} 単独添加よりやや弱い呼吸阻害作用を認めた。又, $Cu^{++} \rightarrow Zn^{++}$ の場合は, $Cd^{++} \rightarrow Zn^{++}$ に比較して, Site 1 及び Site 2 呼吸の両呼吸において, 阻害作用の減弱が認められた。

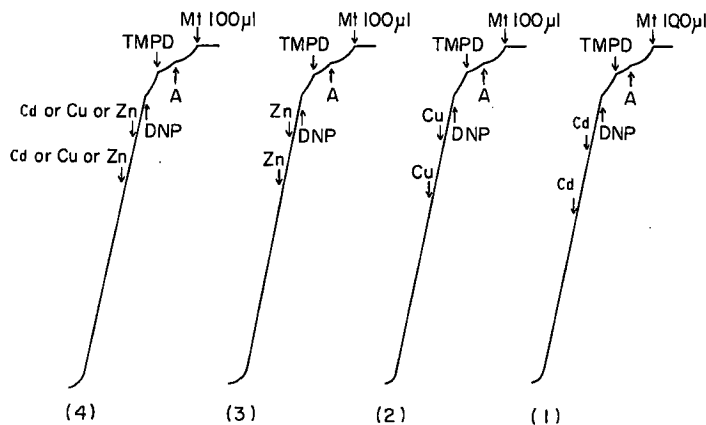


図21 ミトコンドリア電子伝達系に対する Cd, Cu, Zn の単独及び複合作用 (Site 3 酸素吸収)

Zn⁺⁺→Cu⁺⁺: [図19-7: Site 1] 及び [図20-7: Site 2] で示されるとおり, Site 1呼吸においては Zn⁺⁺ 15μM (final)→Cu⁺⁺ 15μM (final), Site 2呼吸においては Zn⁺⁺ 5 μM (final)→Cu⁺⁺ 10 μM (final) それぞれ添加したが, 両呼吸 Site とも Zn⁺⁺ の呼吸阻害作用が出現の途中, Cu⁺⁺ 添加により減弱することが認められた.

ただし, さらに高濃度の場合では, Cu⁺⁺, Cd⁺⁺ についても電子伝達系に対する呼吸阻害作用が現われた.

Site 3呼吸

[図21-4] で示される如く, Cd⁺⁺ 10 μM (final), Cu⁺⁺ 10 μM (final), Zn⁺⁺ 5 μM (final) について, これら 3種の重金属の中から 2種を選び, 逐次添加にて複合的に作用させた結果, いずれの重金属の組み合わせにおいても呼吸阻害作用は認められなかった.

考 察

単独作用について

カドミウム, 銅, 亜鉛のラット肝ミトコンドリア機能に対する単独作用について, 酸化的リン酸化反応, ATPase 活性に対する作用, 電子伝達系に対する作用の面から総合的に作用部位の検討を行い, 複合作用についての推察を行った. 即ち, ①酸化的リン酸化反応における State 3呼吸の抑制は, 電子伝達系阻害もしくは, エネルギー転移系阻害を示唆し State 4呼吸の促進は, 脱共役作用を意味する. ②ATPase 活性における Stimulate ATPase の抑制はエネルギー

ギー転移阻害との関連を示唆し, Latent ATPase 活性の促進は, 脱共役作用との関連を示唆する.

③電子伝達系に対する作用においては, 電子伝達阻害の有無及び作用部位について確認を行った. 以上3つの結果より, カドミウム, 銅, 亜鉛の単独作用部位は, 必然的に推察される.

カドミウム, 銅, 亜鉛の酸化的リン酸化反応, ATPase 活性及び電子伝達系に対する単独作用のまとめを表5に示す.

1) カドミウムについて

カドミウムの脱共役作用については, これまで多数報告されているが¹²⁻¹⁹, 電子伝達系に対する作用についての報告はない. 今回著者の行った実験成績においては [表5] に示す通り測定に用いた濃度範囲において, Site 1, Site 2 及び Site 3呼吸のいずれにも電子伝達阻害作用がないことが新しく認められた. 又 [表5] で認められる如く, カドミウムは測定に用いた濃度範囲において, State 4呼吸及び Latent ATPase 活性を促進することにより, 脱共役作用を有するという点でこれまでの報告と一致した. 即ち, カドミウムは, [表5] に示す濃度範囲において, 電子伝達系に対する阻害作用はなく, 主として化学説におけるエネルギー転移系に作用し, 脱共役作用を有すると推察される.

2) 銅について

銅のミトコンドリア機能に対する作用の報告は少なく, 著者の知り得た範囲では, 飯田¹³, Davis²⁰ による報告があるのみである.

又, 銅の酸化的リン酸化反応, ATPase 活性

表5 Cd, Cu, Znの酸化的リン酸化, ATPase, 電子伝達系に対する単独作用のまとめ

	酸化的リン酸化		ATPase		電子伝達系			特 性
	State 3	State 4	Latent	Stimulate	Site 1	Site 2	Site 3	
Cd ⁺⁺	→ (2~8μM)	↗ (2~8μM)	↗ (0~10μM)	→ (0~10μM)	— (30μM以下)	— (20μM以下)	— (20μM以下)	脱共役
Cu ⁺⁺	↘ (4~10μM)	↗ (4~10μM)	↗ (0~15μM)	↘ (0~15μM)	— (30μM以下)	— (20μM以下)	— (20μM以下)	エネルギー転移阻害 及 脱共役
Zn ⁺⁺	↘ (1~5μM)	↘ (1~5μM)	↗ (0~10μM)	→ (0~10μM)	+	+	— (10μM以下)	電子伝達阻害

括弧内は, 使用した濃度を示す.

及び電子伝達系に対する作用についての報告はない。

今回、著者の行った実験成績については、[表5]に示す如く、銅は測定に用いた濃度範囲において、State 3呼吸抑制、State 4呼吸促進、Latent ATPase活性促進、Stimulate ATPase活制抑制が認められる。しかし電子伝達系(Sitel, Site 2及びSite 3呼吸)に対する阻害作用が認められないことから、脱共役作用及びエネルギー転移阻害作用の両者の特性を有することが、今回新たに認められた。上記の成績より、銅は主として化学説におけるエネルギー転移系に作用するものと推察される。

3) 亜鉛について

亜鉛のミトコンドリア機能に対する作用については、これまでに多数報告されている²¹⁻²⁴⁾。

(a) 酸化的リン酸化反応に関しては、4 μ M以下の低濃度において呼吸活性作用(State 3呼吸上昇)を示し、10 μ M以上の高濃度においては電子伝達阻害作用を示すという報告²¹⁻²²⁾がある。今回、著者の行った実験成績については[表5]に示す如く、亜鉛は1～5 μ Mの低濃度において、State 3及びState 4呼吸の何れも抑制されており、これまでの報告とは異なる。そして、呼吸活性を上昇させることは考え難い事実である。

(b) 亜鉛の電子伝達阻害部位に関しては、当初アンチマイシン Aと同様であるとされていたが、その後の研究により、ユビキノン(CoQ)とチトクローム bの間であることがわかった²¹⁾。今回著者の実験成績においても、[表5]に示す如く、Site 1及びSite 2呼吸に対し電子伝達阻害作用を認め、Site 3呼吸では認められなかった。以上の成績は亜鉛の電子伝達阻害部位に関する上記の報告と一致する。

複合作用について

前述の如く、カドミウム、銅及び亜鉛の単独作用について、カドミウムは脱共役作用、亜鉛は電子伝達阻害作用、銅はエネルギー転移阻害作用及び脱共役作用の両方の特性を有することが推察された。従って、作用部位もカドミウムと銅の一部において脱共役作用として同一の部位に作用する他は、それぞれ作用部位は異なる

ことが示唆された。尚、この度の実験における、カドミウム、銅及び亜鉛の酸化的リン酸化反応及びATPase活性に対する複合作用を検討するにあたり、これら重金属のうちの2種1組を選び、1種の金属(基本金属とする)に他の金属の各種濃度(添加金属とする)を混合して用いた。電子伝達系に対する作用においては、各金属の単独液を用い、逐次添加にて行った。

1. 酸化的リン酸化反応について

カドミウム、銅、亜鉛の酸化的リン酸化反応に対する単独及び複合作用についてのまとめを[図22]に示す。以下の成績は、両金属を同時添加法にて、測定に用いた濃度範囲という条件の基においてのみ成立する。

a: カドミウムは単独作用において、State 4呼吸を促進する。

基本金属に、銅及び亜鉛を用い、カドミウムを添加した場合もState 4呼吸の促進を認める(図①②③)。

b: 銅は単独作用において、State 3呼吸抑制及びState 4呼吸促進を認める。

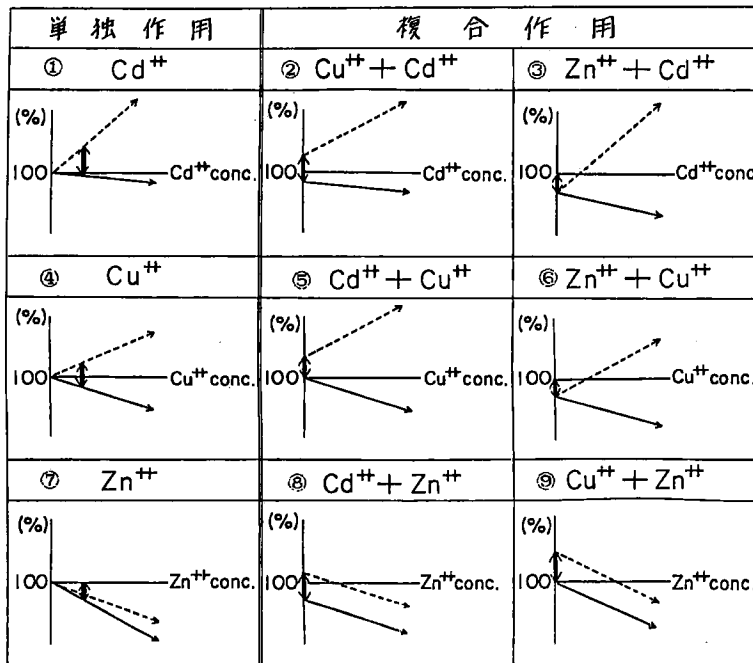
基本金属にカドミウム及び亜鉛を用い、銅を添加した場合も、State 3呼吸抑制、State 4呼吸促進を認める(図④⑤⑥)。

c: 亜鉛は単独作用において、State 3及びState 4呼吸とも抑制する。

この傾向は、カドミウム及び銅を基本金属として用い、亜鉛を添加した場合にも同様に認められる(図⑦⑧⑨)。即ち、基本金属の一定の作用の上に添加金属の単独作用が加わる形となる。a, b, cを総括すれば、これら3種の重金属について2種1組にして複合的に作用させた結果、いずれの金属の組み合わせの場合も、State 3及びState 4呼吸の各々については相加的傾向を示す。これは基本金属が比較的低濃度であった為、基本金属と添加金属の両金属が互いの作用を干渉せず基本金属の単独作用に添加金属の濃度依存的な単独作用が加わり、State 3呼吸及びState 4呼吸の各々について相加的傾向を示すものと推察される。

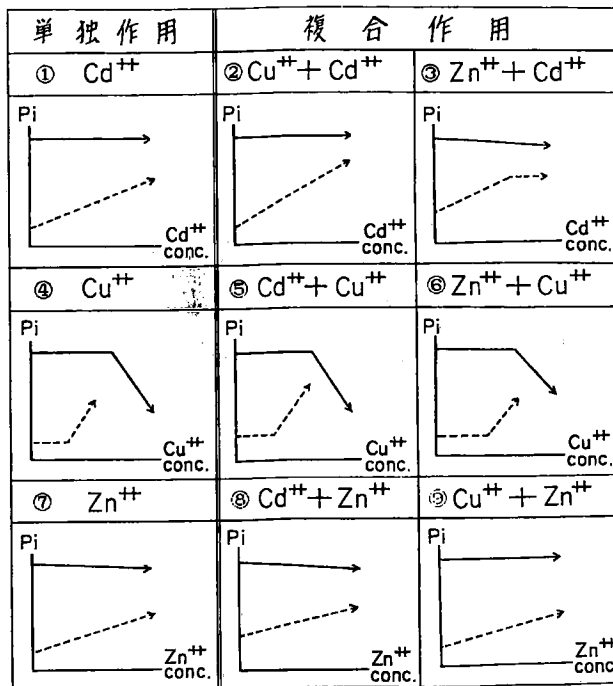
2. ATPase活性について

カドミウム、銅、亜鉛のATPase活性に対する単独及び複合作用のまとめを[図23]に示す。



—→ State 3呼吸, - - - -→ State 4呼吸, ↔ 重金属基本添加濃度における作用

図22 酸化的リン酸化反応のまとめ



—→ Stimulate ATPase.

- - - -→ Latent ATPase.

図23 ATPase に対する作用のまとめ

以下の成績は酸化的リン酸化反応における場合と同様、両金属を同時添加法にて測定に用いた濃度範囲という条件の基においてのみ成立する。

a: カドミウムは単独作用において Latent ATPase 活性を促進し, Stimulate ATPase 活性を抑制しない。

基本金属に銅及び亜鉛を用い, カドミウムを添加した場合もカドミウムの単独作用に類似した作用傾向を認める (図中 ①②③)。

b: 銅は単独作用において, Latent ATPase を促進し, Stimulate ATPase を抑制する。

基本金属にカドミウム及び亜鉛を用い, 銅を添加した場合も, 銅の単独作用に類似した作用傾向を認める (図中 ④⑤⑥)。

c: 亜鉛は単独作用において, Latent ATPase を促進し, Stimulate ATPase をわずかに抑制する。

基本金属にカドミウム及び銅を用い, 亜鉛を添加した場合も, 亜鉛の単独添加に類似した作用傾向を示す (図中 ⑦⑧⑨)。

以上 a, b, c より酸化的リン酸化反応と同様に, 基本金属が比較的低濃度の場合, 基本金属, 添加金属の両金属が互いの作用を干渉せず, Stimulate ATPase 及び Latent ATPase 活性のおのおのについて相加的傾向を示すものと推察される。

3. 電子伝達系について

[表5]に前述した如く, 銅は単独作用において, 測定した濃度範囲内では電子伝達系 (Site 1, Site 2 及び Site 3 呼吸) に対する阻害作用はなく, 亜鉛は単独作用において, 電子伝達系 (Site 1 及び Site 2 呼吸) に対し, 阻害作用を認めた。しかし, [図19-2: 破線], [図19-7], [図20-2: 破線], [図20-7]により示される如く,

Site 1 及び Site 2 呼吸において, 銅次いで亜鉛を添加した場合, カドミウム次いで亜鉛を添加した場合に比較して, 亜鉛の呼吸阻害作用が減弱されること, 又, 亜鉛に次いで銅を添加した場合, 亜鉛の電子伝達系 (Site 1 及び Site 2 呼吸) に対する阻害作用が減弱することが認められた。即ち, Site 1 及び Site 2 呼吸において亜鉛と銅の拮抗作用が認められる。このような拮抗作用は, 亜鉛とカドミウム及びカドミウムと銅の間には認められなかった。

前述の如く, 銅は単独作用において Site 1 及び Site 2 呼吸に対する阻害作用はない為, 亜鉛の電子伝達系阻害部位を競合阻害することは考え難い。よって亜鉛は, 電子伝達系を構成する複合蛋白と結合し, 阻害作用を示すのに対し, 銅は結合を解離するように作用するのではないかと推察される。この点については, アイソトープを用いて, 明確なる答を出す必要があり, 今後の研究課題となっている。このような電子伝達系 (Site 1 及び Site 2 呼吸) における銅と亜鉛の拮抗作用が酸化的リン酸化反応において認められなかった理由については以下のことが考えられる。

即ち, 酸化的リン酸化反応においては, 電子伝達系で用いた重金属濃度よりもかなり低濃度で用いたこと, 又, 酸化的リン酸化反応においては, 銅及び亜鉛を混合液として同時添加にて行ったが電子伝達系に対する作用においては, 銅及び亜鉛を単独液として逐次添加にて行ったことも関係するかもしれない。

ATPase 活性において銅と亜鉛の拮抗作用が認められなかった理由は, ATPase 活性はエネルギー転移系における作用を示唆するものである為, 電子伝達系における銅と亜鉛の拮抗作用

表6 生体内^{a)}及び試験管内^{b)}実験における, カドミウム, 銅, 亜鉛の相互作用について

基本金属	作用金属	効果
Cu ^{a)}	有機水銀	同一部位への作用、拮抗 ¹⁰⁾
Cu ^{b)}	Zn・Fe	Cu によって引き起こされる貧血を軽減 ²⁵⁾
Cd ^{b)}	Cu	代謝系において拮抗作用 ²⁶⁾
Cd ^{b)}	Cu	同時投与により相乗的毒性 ²⁷⁻²⁸⁾

は直接 Stimulate ATPase 及び Latent ATPase 活性のいずれにも影響を与えなかったものと推察される。

4. 試験内における本実験と生体内実験におけるカドミウム, 銅, 亜鉛の相互作用

生体内実験におけるカドミウム, 銅, 亜鉛の相互作用について, 総括して表 6 に示す。表 6 より, カドミウム, 銅, 亜鉛の相互作用については, 投与方法, 種差, 重金属濃度, 作用する生体機能により異なる相互作用を示すことが示唆される。ただし, 銅と亜鉛及び鉄については, 拮抗作用を示すという報告も存在する。

著者は, 前報¹⁰⁾において銅と有機水銀化合物との間にヒト赤血球に対し, 同一部位への競合阻害が示唆されたので, 今後, 銅, 亜鉛及び水銀について複合作用を検討し, 次報に述べる予定である。

結 論

ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応, ATPase に対する作用, および電子伝達系に対する作用について, カドミウム, 銅, 亜鉛の単独および複合作用を検討し, 以下の結果を得た。

1. カドミウムは State 4 呼吸, および Latent ATPase 活性を促進し, 電子伝達系に対する阻害作用はなく脱共役作用を有することを認めた。

2. 銅は State 3 呼吸抑制, State 4 呼吸促進, Stimulate ATPase 活性を抑制し, 電子伝達系に対する阻害作用はなく, 脱共役及びエネルギー転移阻害作用を有することを認めた。

3. 亜鉛は, State 3, State 4 呼吸を抑制し, Latent ATPase 活性を促進, Stimulate ATPase 活性をわずかに抑制, Site 1, Site 2 呼吸において電子伝達阻害作用を有することを認めた。

4. 上記 3 種の重金属を 2 種 1 組にして複合的に作用させた結果, State 3 呼吸, State 4 呼吸, Stimulate ATPase 及び Latent ATPase 各々について相加的作用を有することを認めた。

5. カドミウムと銅は単独作用において Site 1, Site 2 及び Site 3 呼吸に対し, 電子伝達阻害作用を認めなかった。亜鉛は単独作用において Site 1 及び Site 2 呼吸に対し, 電子伝達阻害作用を認めた。

上記の 3 種の重金属の 2 つの組み合わせについて 1 種の重金属液を単独液として加え, 次いで他の重金属液を逐次添加し, 電子伝達系に複合的に作用させた結果 Site 1 および Site 2 呼吸において, 銅と亜鉛の作用部位を中心とする拮抗作用を有することが認められた。しかし, カドミウムと亜鉛の間には拮抗作用が認められなかった。

文 献

1. 宮地芳之, 野上祐作, 石井邦彦: 倉敷市・玉野市で採取した浮遊粉塵の重金属成分の分析. 岡山医学会雑誌, 第99巻, 第7, 8号に掲載予定。
2. 福井温三, 野上祐作, 石井邦彦: 浮遊粒子状物質による大気汚染に関する研究. 第4報, 岡山県環境保健センター年報 (1979) 3, 88-90.
3. 小林 純: イタイイタイ病の原因の追求 I. 科学 (1969) 39, 286-293.
4. 小林 純: イタイイタイ病の原因の追求 II. 科学 (1969) 39, 369-375.
5. 小林 純: イタイイタイ病の原因の追求 III. 科学 (1969) 39, 424-429.
6. Webb M: Binding of cadmium by rat liver and kidney, Biochem Pharmacol (1972) 21, 2751-2765.
7. Margoshes M and Vallee BI: A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc (1957) 79, 4813-4814.
8. Kogi JHR and Vallee BL: Metallothionein: A cadmium and zinc-containing protein from equine

- renal cortex. *J Biol Chem* (1960) **235**, 3460-3465.
9. Jocelyn PC: *Biochemistry of SH Group*, Academic Press. London, New York (1972) pp 76-85.
 10. 宮地芳之: ヒト赤血球のグリセリン溶血に対する銅及び有機水銀化合物の単独及び複合作用. *岡山医学会雑誌*, **99**, 第7, 8号に掲載予定.
 11. Utsumi K: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med Okayama* (1963) **17**, 258-271.
 12. GP. Brierley: Ion transport by heart mitochondria. *J Biol Chem* (1962) **242**, 1115-1122.
 13. Iida Y: Studies of oxidative phosphorylative systems in mitochondria II. *In vitro* studies of the effects of various organic mercury compounds and heavy metals on rat-liver mitochondria. *Jpn J Hyg* (1978) **33**, 417-425.
 14. 長谷川亨, 野上裕作, 緒方正名: 環境汚染物質 (重金属など) の生体膜に対する作用. *岡山医学会雑誌* (1977) **89**, 1501-1505.
 15. Ogata M, Hasegawa T and Yamazaki Y: Effect of cadmium on changes in concentration of Adenine Nucleotides induced by mitochondria. *Acta Med Okayama* (1978) **32**, 387-392.
 16. Mustafa MG and Cross CE: Pulmonary alveolar macrophage. Oxidation metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron and energy-transfer reactions, *Biochemistry* (1971) **10**, 4176-4185.
 17. Jacobs EE, Jacobs M, Sanadi DR and Bradley LB: Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J Biol Chem* (1956) **223**, 147-156.
 18. Diamond EM and Kench JE: Effect of cadmium on the respiration of rat liver mitochondria. *Environ Physiol Biochem* (1974) **4**, 280-283.
 19. 剣持堅志: ミトコンドリアのATPase活性に対するカドミウム, ルテニウムレッド及びカルシウムの相互作用. *岡山医学会雑誌* (1978) **90**, 251-256.
 20. Davies NT, Lawrence CB and Mills CF: Studies on the effect of copper deficiency on rat liver mitochondria. II. Effect on oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* (1985) **809**, 362-368.
 21. Kleiner D: The effect of Zn^{2+} ions on mitochondrial function in rat liver. *Biochemi Pharmacol* (1982) **31**, 1289-1293.
 22. Yamaguchi M, Kura M and Okuda S: Role of zinc as an activator of mitochondrial function in rat liver. *Biochem Pharmacol* (1982) **31**, 1289-1293.
 23. Skulachev VP, Chistyakov VV, Jasaitis AA and Smirnova EG: Inhibition of the respiratory chain by zinc ions. *Biochem Biophys Res Commun* (1967) **26**, 1-6.
 24. Nicholls P and Malviya AN: Inhibition of nonphosphorylating electron transfer by zinc. The Problem of delineating interaction sites, *Biochemistry* (1968) **7**, 305-310.
 25. 不破敬一郎: 生体と重金属. 講談社, 東京 (1981) pp 171-176.
 26. Fox MRS: Nutritional influences on metal toxicity: cadmium as a model toxic element. *Environ Health Persp* (1979) **29**, 95-104.
 27. 小島良平, 田中英子: カドミウムの毒性に対する銅の添加効果. *医学と生物学* (1973) **86**, 173-176.
 28. 小島良平, 石黒英子, 谷井美樹子: カドミウムと銅同時投与のマウスに及ぼす効果. *日本公衛誌* (1974) **21**, 281-289.

**Effects of copper, cadmium, zinc and two mixtures of these metals
on oxidative phosphorylation, ATPase and electron transport
of isolated rat liver mitochondria.**

Yoshiyuki MIYAJI

Department of Public Health, Okayama University Medical School,

2-5-1 Shikata-cho, Okayama, Japan.

(Director : Prof. M. Ogata)

The effects of metals on oxidative phosphorylation, ATPase and electron transport were examined.

Cadmium accelerated state 4 respiration and increased latent ATPase activity, indicating that cadmium is an uncoupler of the energy transport reaction.

Cadmium did not inhibit site 1, 2 or 3 of the electron transport chain. Copper inhibited state 3 respiration, accelerated state 4 respiration, increased latent ATPase activity and decreased stimulated ATPase activity, indicating that copper is an uncoupler and effects the energy transport reaction. Copper did not inhibit site 1, 2 or 3 of the electron transport chain.

Zinc inhibited state 3 and state 4 respiration, increased latent ATPase activity, decreased stimulated ATPase activity slightly, and inhibited sites 1 and 2 of the electron transport chain. One pair of the 3 metals had additive effects on state 3 and 4 respiratory activity and on stimulated and latent ATPase activity. A competitive reaction between copper and zinc was observed in the effects on sites 1 and 2 of the electron transport chain.