衛生化学
EISEI KAGAKU
24(6) 295-298 (1978)

骨中カドミウムの挙動に関する研究 (第2報¹⁾)

カドミウムの骨中分布と存在型について

岡野登志夫,^{2a)} 市川富夫, 近藤雅臣^{2b)}

神戸女子薬科大学,^{2a)} 大阪大学薬学部^{2b)}

Studies on Behavior of Cadmium in Bone. II.¹⁾

Distribution and Living Form of Cadmium in Bone

TOHSIO OKANO,^{2a)} TOMIO ICHIKAWA

and MASAOMI KONDO^{2b)}

Kobe Women's College of Pharmacy,^{2a)} and Faculty of

Pharmaceutical Science, Osaka University^{2b)}

(Received March 24, 1978)

Distribution and form of radioactive cadmium in the metaphyseal bone of a rat femur were examined after intraperitoneal administration of $^{109}\text{CdCl}_2$, and the following results were obtained.

- 1) Radioactivity was found mainly in the state bound to high molecular compounds in the 105000 $\times g$ supernatant fraction of the bone.
- 2) These cadmium-bound high molecular compounds were fractionated sequentially by Sephadex G-75, G-100, and DEAE-cellulose columns, and were compared with metallothionein in the kidney. As a result, these compounds were very similar to metallothionein in points of the charge and molecular size.
- 3) From the *in vitro* experiments on binding, it was found that these compounds were induced after administration of cadmium.

Keywords—cadmium ; metaphyseal bone ; distribution ; binding activity ; partially purification

緒 言

カドミウムの骨に対する影響を明らかにするうえで、基本的に重要な問題と思われる骨中カドミウムの存在意義に関しては、未だ不明な点が多い。このうち、骨中に存在するカドミウムが如何なる型で存在するかという点に関しては、カドミウムの骨組織内における毒性を考察するうえにおいて、重要な問題と考えられる。カドミウムは、一般に、生体内でカドミウムイオンとして存在する場合、極めて強い毒性を発揮する。しかし、生体は体

内に吸収されたカドミウムを、主に、肝臓あるいは腎臓で metallothionein と呼ばれる特殊な蛋白 (sequester protein) と結合させ、有機カドミウムとして無毒化することにより、生体の防御を行っていると考えられている。³⁻⁷⁾ この metallothionein は、主に、カドミウム親和性臓器である肝臓、腎臓、腸管、脾臓などの組織において存在が認められており、この蛋白の存在がカドミウムの標的臓器の指標ともなりうると考えられる。前報⁸⁾ において、大腿骨骨中へのカドミウムの取込み機序につい

- 1) 第2回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム, 岐阜, 1975年10月, 一部発表。
- 2) Location : a) Motoyamakita, Higashinada-ku, Kobe (神戸市東灘区本山北) ; b) 133-1 Yamadakami, Suita, Osaka (大阪府吹田市山田上133-1)。
- 3) K. Tanaka, K. Sueda, K. Onosaka, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 258 (1975)。
- 4) K. Singh, R. Nath, R.N. Chakravarti, *J. Reprod. Fert.*, **36**, 257 (1974)。
- 5) K. Tanaka, K. Sueda, *Jap. J. Hyg.*, **28**, 492 (1973)。
- 6) T.L.M. Syversen, *Arch. Environ. Health.*, **30**, 510 (1975)。
- 7) D.E. Amacher, H.L. Ewing, *Arch. Environ. Health.*, **30**, 510 (1975)。
- 8) 岡野登志夫, 池辺克彦, 市川富夫, 近藤雅臣, 衛生化学, **24**, 213 (1978)。

て検討し、カドミウムが metaphyseal bone に高い取込み親和性を示すことを明かにしたが、この現象から骨中にもカドミウム受容体が存在し、その存在状態の差異によって骨組織間の取込み活性の差となつてあらわれるのではないかと推察される。そこで、これらの点を明らかにするため、今回、さらにカドミウムの取込み活性の高い metaphyseal bone での組織内分布ならびに存在型について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. カドミウム溶液 CdCl_2 および $^{109}\text{CdCl}_2$ (比放射能 $14.8 \mu\text{Ci}/\text{mg Cd}$) を生理食塩水で $1 \text{ mg}/\text{ml}$ となるように調製したものを、カドミウム溶液とした。

2. 動物実験 体重 $150\text{--}200 \text{ g}$ の Wistar 系雄性ラットを用い、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の ^{109}Cd 溶液を体重 1 kg あたり 1 ml 毎日 1 回連続腹腔内投与し、最終投与 12 時間後に撲殺、瀉血し、大腿骨を採取した。この大腿骨の末端軟骨部を除き、注射針により骨髓を冷生理食塩水で洗浄、除去し、さらに骨膜および骨内膜を剥離した後、凍結乾燥した。ついで、この凍結乾燥骨の骨幹端部 (metaphyseal bone) を低温下、磨砕、粉末としたものを 1 定量とり、5 倍量の 0.5 M シュエクロース溶液中にけん濁し、十分に均等化した後、このホモジネートを $3000 \times g$, $10000 \times g$, $105000 \times g$ で順次、遠心分離し、各遠心画分を実験に供した。

3. 結合カドミウムの分離とカドミウム量の測定

各遠心画分の放射性カドミウムの量は、分画液について直接、ガンマシンチレーションカウンターにより測定した。また、結合カドミウムの分離分画には、Sephadex G 25, 75, 100 および diethylaminoethyl (DEAE)-Cellulose カラムを用いて行った。Sephadex カラムの溶出には、 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を用い、 $13 \text{ ml}/\text{hr}$ の流速で行った。また、DEAE-Cellulose カラムの溶出には、 0.05 M Tris-HCl 緩衝液と 0.25 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を用いて linear gradient で流速 $11 \text{ ml}/\text{hr}$ で行った。なお、各カラム操作は 5° の低温室で行った。

実験結果および考察

1. カドミウムの骨組織内分布

ラットに $^{109}\text{CdCl}_2$ を連続腹腔内投与し、遠心分離法により ^{109}Cd の放射活性の組織内分布を検討した。結果は Table I に示すとおりである。 $3000 \times g$ 沈では、主に不溶性リン酸カルシウムおよびコラーゲンなどの高分子組織間物質を含む画分であり、 $10000 \times g$ 沈では、核、ミクロゾーム、ミトコンドリアなどの細胞内オルガネラを含む画分である。Table I より ^{109}Cd の放射活性の

TABLE I. Distribution of ^{109}Cd Radioactivities in Subcellular Fraction of Metaphyseal Bone

Fraction	Radioactivity of ^{109}Cd (cpm/g of dry bone)		
	3 days	7 days	14 days
$3000 \times g$. ppt. ^{a)}	251	947	2073
$10000 \times g$. ppt. ^{a)}	114	312	801
$105000 \times g$. ppt. ^{a)}	35	102	438
$105000 \times g$. sup. ^{b)}	2679	8596	14557
$105000 \times g$. sup. ^{b)} dialysate. ^{c)} ^{109}Cd	542	1037	3186
Non-dialysate. ^{c)} ^{109}Cd	1807	6820	11661

a) ppt. : precipitate.

b) sup. : supernatant fraction.

c) Dialysis of supernatant fraction was carried out by using of Visking tube in Tris-HCl buffer solution for 24 hrs at 4° .

大部分が $105000 \times g$ 上清に認められ、このうち、非透析性 ^{109}Cd が $70\text{--}80\%$ を占めることがわかった。また、各画分における ^{109}Cd の分布を経時的にみると、各画分ともに放射活性は投与期間が長くなるにつれて増加するが、その割合はほぼ一定で、 $105000 \times g$ 上清が常に ^{109}Cd の全放射活性の大部分を占めていた。この結果より、骨に取り込まれたカドミウムは、主に、細胞質内で高分子物質と結合あるいは会合した状態で存在するものと推察される。

2. 結合性および非結合性カドミウムの経日変化

$^{109}\text{CdCl}_2$ 投与後、3, 7, 14, 21 日目のラットの metaphyseal bone より調製した $105000 \times g$ 上清を Sephadex G25 カラムによりゲルろ過すると、11—12 本目の void volume 付近に高分子結合性 ^{109}Cd が溶出し、27—28 本目に遊離の ^{109}Cd が溶出した。Fig. 1 に示すように、高分子結合性 ^{109}Cd の放射活性は 21 日目まで経日的に増加が認められた。

3. 高分子結合性カドミウムの部分精製

$^{109}\text{CdCl}_2$ 連続 2 週間投与ラットの metaphyseal bone より得た $105000 \times g$ 上清を Sephadex G25 カラムに適用し得られた高分子溶出画分を、さらに、Sephadex G100 カラムによりゲルろ過を行った。Fig. 2 に示すように、 ^{109}Cd の放射活性は void volume 付近の P1 と高分子溶出部分 P2、低分子溶出部分 P3 に分かれた。このうち、P1 と P2 については放射活性ピークと 280 nm の蛋白に由来すると思われる吸収ピークと一致したが、主ピークである P3 部分では 280 nm の吸収はほとんど認められなかった。この P3 を合取し、低温下、限外ろ過法によ

Fig. 1. Gel Filtration of 105000×g Supernatant Fraction of Metaphyseal Bone on Sephadex G 25 Column

a) Days were expressed as the number of single intraperitoneal administration of ^{109}Cd per day.

Fig. 2. Gel Filtration of 105000×g Supernatant Fraction of Metaphyseal Bone on Sephadex G 100 Column

—○—: ^{109}Cd×...: OD 280 nm.

り濃縮した後、Sephadex G 75 カラムによりゲルろ過を行った。Fig. 3 に示すように、24本目に ^{109}Cd の放射活性ピークが認められ、さらに低分子溶出部分の32本目に小さなピークが認められた。また、280 nm に対する 254 nm の吸光度を同時にプロットすると、この2つの放射活性ピークとほぼ一致する結果を得た。

4. DEAE-Cellulose カラムによる分離

Sephadex G 75 により得た再クロマト試料に対して、0.05 M から 0.25 M の Tris-HCl 緩衝液で linear gradient 法により分離を行った。Fig. 4 に示すように、A1, A2, A3 の3峰性のピークが得られ、このうち A1, A3 はニンヒドリン陽性物質であった。また、A1, A3 を酸

Fig. 3. Gel Filtration of P3' Fraction on Sephadex G 75 Column

—○—: ^{109}Cd . —×—: OD 254 nm/OD 280 nm.

Fig. 4. DEAE-Cellulose Column Chromatogram of Cd-Binding Protein of Bone

Sample solution was charged on a DEAE-Cellulose column (2×20 cm) and eluted with a linear gradient prepared with using 300 ml of 0.05 M and 300 ml of 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

加水分解した後、アミノ酸自動分析機に適用したところ、糖は検出されず、アミノ酸よりなることより、この両物質はタンパク質であると推察された。

5. DEAE-Cellulose カラムによる腎の Metallothionein の分離

骨の場合と同様に、カドミウムを連続腹腔内投与したラットより採取した腎を、常法に従って Sephadex G 75 に適用し metallothionein を分離分画した後、これを骨の場合と同様の条件で DEAE-Cellulose カラムに適用した。Fig. 5 に示すように、腎の metallothionein は2峰性の分離を示し、両ピークの溶出位置は骨の A1, A3 と等しいものであった。これらの結果より、骨に存在するカドミウム結合物質は、分子量ならびに荷電性ともに腎の metallothionein と近似するものと思われる。

6. In Vitro での結合実験

105000×g 可溶性分画に存在するカドミウム結合物質

Fig. 5. DEAE-Cellulose Column Chromatogram of Kidney Cd-Binding Protein

Sample solution was charged on a DEAE-Cellulose column (2 × 20 cm) and eluted with a linear gradient prepared with using 300 ml of 0.05 M and 300 ml of 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

が、本来、正常な骨組織に存在するものか、あるいは投与されたカドミウムにより誘導されるものかを明らかにするため、非放射性カドミウムを前投与したラットより調製した骨試料を用いて、 ^{109}Cd との結合実験を行った。すなわち、骨試料をホモジナイズした後、遠心分離して得られた $105000\times g$ 可溶性画分を、Sephadex G 25 カラムで脱塩ならびに遊離のカドミウムを除去した後、 ^{109}Cd と 37° , 30 分間インキュベートし、これを visking tube に入れて 4° , 24 時間透析した後、透析内液を Sephadex G 75 カラムに適用した。Fig. 6 に示すように、対照およびカドミウムを前投与したラットともに void volume 付近と高分子溶出部分に ^{109}Cd の放射活性が認められた。しかし、カドミウム前投与ラットにおいて明らかに 35 本目に ^{109}Cd の放射活性ピークが認められるのに反し、対照では認められず、また、この溶出位置は Sephadex G 75 で部分精製したカドミウム結合物質の溶出位置と一致するものであった。この結果より、正常な骨組織にもカドミウムと結合する高分子物質が存在するが、これとは別にカドミウムの侵入により誘導される低分子物質が存在する可能性が強く示唆された。

Fig. 6. Gel Filtration of Incubation Mixture of $105000\times g$ Supernatant Fraction with ^{109}Cd on Sephadex G 75 Column

Incubation was carried out for 60 min at 37° .

総括および結論

^{109}Cd を連続腹腔内投与したラットの大腿骨、metaphyseal bone 中のカドミウムの分布ならびに存在型について検討を行い、以下の結果を得た。

(1) 骨中に取込まれたカドミウムの大部分は、 $105000\times g$ 遠心上清で高分子結合性カドミウムとして存在し、これはカドミウムの投与量に応じて増加する傾向が認められた。

(2) $105000\times g$ 遠心上清の結合性カドミウムを、Sephadex G 25, 75, 100 カラムおよび DEAE-Cellulose カラムにより部分精製し、腎の metallothionein と比較検討した結果、分子量、荷電性ともに極めてよく近似していることが判明した。

(3) カドミウム結合性物質の生成由来を知る目的で、カドミウム前投与ラットと対照ラットの $105000\times g$ 遠心上清における *in vitro* での結合実験を行った結果、カドミウム投与により誘導されるカドミウム結合物質の存在を確認した。

謝辞

アイソトープ実験に御便宜をはかっていただいた大阪大学医学部放射線基礎医学教室、近藤宗平教授、竹部 啓助教授に感謝します。