衛生化学
EISEI KAGAKU
26(2) 103-105 (1980)

ラット肝顆粒画分中のカドミウム¹⁾

佐藤政男, 長井 靖

福島県立医科大学附属中央研究所²⁾

Cadmium in Rat Liver Particulate Fraction

MASAO SATO and YASUSHI NAGAI

The Central Research Laboratory, Fukushima Medical College

(Received January 7, 1980)

Male Wistar rats were injected with 1.5 mg Cd/kg/day subcutaneously for six days. Four days after the last injection, the liver tissues were removed and homogenized. The homogenate was centrifuged at $27000 \times g$ for 60 min and the resultant precipitate was homogenized and further centrifuged twice. Surfactants such as Triton X-100, sodium deoxycholate and sodium dodecyl sulfate solubilized a Cd-containing component from the precipitate. The solubilized Cd-containing component was gel-filtrated on Sephadex G-75. Cadmium in the subcellular particle was mainly eluted as metallothionein.

Keywords—cadmium ; metallothionein ; mitochondria ; lysosomes ; active surfactant

緒 言

カドミウム投与動物の肝臓と腎臓の細胞内では, 80% 以上のカドミウムが可溶性画分に局在し, その大半が metallothionein (以下MTと略) の形で存在する.^{3,4)} このMTはカドミウム,⁵⁾ 水銀,⁶⁾ 亜鉛,⁷⁾ 銅⁸⁾等の金属によって誘導され, 解毒的役割⁹⁾を果たしていると考えられている. 従来, 細胞内カドミウムおよびMTの挙動については, その分布の大半を占める可溶性画分に関する報告がほとんどであった.

一方, 10 ppm カドミウム含有飲料水の24週摂取で腎滑面小胞体凝集, ミトコンドリア膨潤, ライソゾーム数増加等が観察された.¹⁰⁾ 30 ppm カドミウム含有飲料水摂取ラット肝のミトコンドリアのP/O比低下等も報告¹¹⁾され, また, Cd-MT投与により腎障害発現と共に細胞膜とミトコンドリア変性,¹²⁾ ライソゾーム体積の増加¹³⁾が観察された. カドミウム連続投与は細胞内顆粒中のカドミウム量を増加させる.¹⁴⁾ これらの事実はカドミウムによる障害発現機構を考える上で, 細胞内顆粒中の

- 1) 第49回日本生化学会で一部発表, 札幌, 1976年9月.
- 2) Location: Sugitsuma-cho, Fukushima 960, Japan (福島市杉妻町5番75号).
- 3) O. Lucis, M.E. Link, R. Lucis, *Arch. Environ. Health*, **18**, 307 (1969).
- 4) Z.A. Shaikh, O. Lucis, *Arch. Environ. Health*, **24**, 419 (1972).
- 5) G.S. Probst, W.F. Bousquet, T.S. Miya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 5 (1977).
- 6) J.K. Piotrowski, B. Trojanowska, J.M. Wisnieweka-Knypl, W. Bulanowska, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 11 (1974).
- 7) M.P. Richards, R.J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1215 (1975).
- 8) D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242 (1975).
- 9) M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi, T. Suda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340 (1974).
- 10) M. Nishizumi, *Arch. Environ. Health*, **24**, 215 (1972).
- 11) N. Sato, T. Kamada, T. Suematsu, M. Shichiro, N. Hayashi, T. Matsumura, Y. Kishida, H. Abe, F. Furuyama, F. Ishibashi, B. Hagiwara, *J. Biochem.*, **84**, 117 (1978).
- 12) M.G. Cherian, R.A. Goyer, L. Delaquerriere-Richardson, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**, 399 (1976).
- 13) B.A. Fowler, G.F. Nordberg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 609 (1978).
- 14) 佐藤政男, 長井 靖, 衛生化学, **24**, 71 (1978).

カドミウムの動態を考慮する必要性を示唆している。本研究では顆粒内カドミウム含有成分の可溶化を試み、その存在形態を明らかにしようとした。

実験方法

Wistar 系雄性ラット（体重約150 g）に 1.5mg Cd/kg 体重/日を CdCl_2 として6日間皮下注射し、4日後に肝臓を摘出した。4容の0.25M蔗糖液中で Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いて 1000 rpm 10回の homogenize を行なった。27000×g 60分遠心後上清と沈渣に分け、沈渣は、再度 homogenize し以後、同操作を繰り返した。3回目の遠心沈渣を洗って遠心後の沈渣を顆粒画分として用いた。可溶化は顆粒画分懸濁液（蛋白量 31.7 mg/ml）に界面活性剤を加えて 37° で 30 分 incubate した。用いた界面活性剤は Tween 80（和光純薬）、Triton X-100（和光純薬）sodium dodecyl sulfate (SDS)（2回再結晶）、sodium, deoxycholate (Na-DOC)（シグマ社）で Na-DOC のみ最終濃度 2%とし、他は 1%とした。27000×g 60分遠心後の上清と沈渣中のカドミウム、亜鉛および蛋白量（ビューレット法）を測定した。可溶化顆粒画分は Sephadex G-75 (2.6×60 cm) でゲルろ過を行なった。ゲルろ過法、金属分析法は前報¹⁴⁾ によった。

結果および考察

1. 顆粒画分の調製

細胞内カドミウムの80%以上は可溶性画分に局在するので、可溶性画分の顆粒画分への混入防止が必要である。本実験で用いた 27000×g 60分遠心沈渣は核、ミトコンドリア、ライソゾーム、重いミクロゾーム等を含むと考えられる。¹⁵⁾ 得られた沈渣に対して homogenize を繰り返し、遠心上清に遊離するカドミウム量が沈渣中のカドミウム量より少量になった第3回目の遠心沈渣を洗滌後顆粒画分として用いた。第1, 2, 3回の遠心後の上清のカドミウム含量は、それぞれ、168.2, 18.7, 3.5 $\mu\text{g/g}$ 、また、沈渣では、34.5, 13.4, 10.3 $\mu\text{g/g}$ であった。各回の上清を Sephadex G-75 でゲルろ過すると、カドミウムの95%（1回目）、94%（2回目）、91%（3回目）が、また、亜鉛では77%（1回目）、63%（2回目）、40%（3回目）がMTの形で存在した。この結果は第1回の上清と第3回の上清では異なった内容を有し、後者には第1回上清には少ない成分、すなわち、顆粒画分の壊れたものの一部が含まれると考えられる。

Fig. 1. Solubilization of Cd, Zn and Proteins from Liver Particulate by Various Surfactants

The liver particulate was incubated with surfactant agents (1% for Tween 80, Triton X-100, SDS and 2% for Na-DOC) at 37° for 30 min. A centrifugation at 27000×g for 60 min followed. The concentration of Cd, Zn and protein both in the supernatant and precipitate was measured. , supernatant; , precipitate.

逆に第3回目の顆粒画分には可溶性画分混入が少ないと思われる。

2. 顆粒画分の可溶化

沈渣画分を可溶化するために界面活性剤を用いた (Fig. 1)。カドミウム、蛋白および亜鉛の可溶化の程度に若干の相違がみられたが、SDS, Na-DOC, Triton X-100 ではカドミウム含有成分のほとんどが可溶化された。Triton X-100 で可溶化した顆粒画分を Sephadex G-75 で分画すると上清の場合と同様に $V_e/V_o=2$ の位置にカドミウムの単一ピークがみられた (Fig. 2)。この画分は 250 nm に shoulder を示したが、強酸性下で消失した (Fig. 3)。また、Sephadex G-25 のゲルろ過で、カドミウムは pH 8.6 で void volume (蛋白結合体)、pH 2 では遊離イオン部にみられた。Cd²⁺ と蛋白 SH 基の結合にもとづく 250 nm の吸収が¹⁶⁾ 強酸性下で消失するのは、その結合が解離することによると思われる。これらは、いずれも Kagi らの報告と一致する。^{16,17)} 以上から顆粒画分中のカドミウムの主な存在形態は MT と考えられた。

カドミウム投与の急性期にミクロゾームのヘム分解酵

15) 今井嘉郎, 蛋白質, 核酸, 酵素, **10**, 170 (1965).

16) J.R.H. Kagi, B.L. Valle, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).

17) J.R.H. Kagi, B.L. Valle, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435 (1961).

Fig. 2. Sephadex G-75 Gel Filtration Profile of Rat Liver Solubilized Particulate

The liver particulate fraction was incubated with Triton X-100 at 37° for 30 min. A centrifugation at $27000 \times g$ for 60 min followed. The supernatant was applied on Sephadex G-75 (2.6×60 cm) equilibrated with 1 mM Tris-HCl, pH 8.6. Four ml fractions were collected. —●—, Cd; —x—, Zn; ·····, Absorbance at 250 nm.

素の活性上昇がみられるが、カドミウムの少量前投与で半分に抑えられる。¹⁸⁾ この活性上昇はMT生成が不十分なためにMT以外の形態のカドミウムによってひきおこされと考えられる。しかし、MT生成が充分に行われうると考えられる経口投与でも肝および腎のミクロゾームでの薬物代謝系酵素に変化がおこる。¹⁹⁾ したがって、こうした変化がMT自身による可能性とMT代謝時に生成するMT以外の形で存在するカドミウムによってひきおこされる可能性とがある。

Fig. 3. Absorption Spectra of Cd-binding Protein in the Liver Particulate

Cd-binding protein was isolated from particulate solubilized by Triton X-100. —, pH 8.6; ·····, pH 2.

本実験では、主として顆粒画分の可溶化を目的とし、また、上清画分の混入を避ける条件をえらんだ。その結果、Triton X-100 で可溶化すると、カドミウムは主としてMTの形で存在することが判明したが、本法をもとに現在細胞内のそれぞれの顆粒画分中のカドミウムの挙動を検討中である。

結 論

ラット肝組織を homogenize, 遠心を繰り返すことによって細胞内可溶性画分混入の少ない顆粒画分を得た。顆粒中カドミウム含有成分は、Na-DOC, Triton X-100, SDS 等の界面活性剤を用いて可溶化できる。また、Triton X-100 で可溶化された成分を Sephadex G-75 で分画すると、カドミウムの単一ピークがえられ、MTと同じ性質を示した。

18) 吉田武美, 鈴木康男, 橋本嘉幸, 第5回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集, 1978, p. 45.

19) E. Hietanen, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **7**, 291 (1978).