衛生化学
EISEI KAGAKU
29(4) 221-225 (1983)

種々の金属投与時のラット諸臓器におけるメタロチオネインの誘導

小野坂敏見, 吉屋祥子, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一

神戸学院大学栄養学部

The Induced Synthesis of Metallothionein in Various Tissues of Rat after Injection of Various Metals

SATOMI ONOSAKA, SYOKO YOSHIYA, KYONG-SON MIN

TIKAKO FUKUHARA and KEIICHI TANAKA

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,

Igawadani, Nishi-ku, Kobe 673, Japan

(Received March 3, 1983)

Daily subcutaneous injection of twelve kinds of metal into rats were carried out for one, two or four days at a dosage of 10 mg per kg. After measuring the concentrations of metallothionein and metals in four kinds of organ, the following results were obtained.

- 1) The apparent inducibilities of metallothionein by Co and Ni in the liver were almost the same as that by Zn. Those by Ca and Mn were 0.44 and 0.36 times that of Zn, respectively. By the administration of Al, Cr, Fe, K, Mg, Na or Pb no significant increase in the concentration of metallothionein in the liver was detected.
- 2) The apparent inducibility of metallothionein by Ni in the kidney was about twice that by Zn. Co also had a weak apparent inducibility. No other metals used in this experiment increased the concentration of metallothionein in the kidney.
- 3) Metals other than Zn examined did not induce metallothionein in the small intestine and pancreas.
- 4) Although a positive correlation was detected between Zn and metallothionein concentration in the organs when metallothionein was induced, between metals administered and metallothionein concentration in the organs a positive correlation was not always given.

Keywords — metal; inducibility; metallothionein; liver; kidney

緒 言

Thionein は分子量約 6000 の SH 基に富んだタンパク質であり, Cd や Zn などの重金属と結合したものは metallothionein (MT) と総称されている.^{1,2)} Cd や Zn などの金属,^{3,4)} モノヨード酢酸などのアルキル化剤,⁵⁾ ストレス⁶⁾ あるいはホルモン⁷⁾ によっても MT の生合成が誘導されるが, 一方シクロヘキシミドなどのタンパク合成阻害剤⁸⁾ や Zn 欠乏状態⁹⁾ では, その誘導は抑制されることが知られている. このような種々の因子によって生体内の MT 濃度は影響されると推定されるので, その濃度を制御するには諸臓器中での MT 濃度とそれに関与する因子を解明する必要がある.

著者らは, さきに Cd 投与¹⁰⁾ によって8種の臓器で, Zn 投与¹¹⁾ によって4種の臓器で, それぞれ MT の生合成が誘導されることを明らかにした. 今回 MT 濃度に影響する因子として12種類の金属を投与して, Zn を投与した場合に MT 濃度が増加した肝臓, 腎臓, 小腸および脾臓中の MT 濃度を測定した. さらに, 金属による MT の見かけ上の誘導能を比較するとともに, その誘導機構についても検討したので報告する.

実 験 方 法

1. 動物実験 ウィスター系雄性ラット (180—260 g) を1群3匹とし, 金属として 10 mg/ml/kg の用量で24時間毎に1, 2または4回各群に皮下注射し, 最終

投与 24 時間後に肝臓、腎臓、小腸および脾臓を摘出した。なお投与液としては $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ または $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の水溶液を用いた。

2. 臓器中の MT と金属濃度の測定 摘出した臓器に 5 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズした。そのホモジネート 0.2 ml または 0.5 ml に等量の濃塩酸を加えて 1 週間放置したのち、1.6 ml または 4.0 ml の蒸留水を加えてから 3000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清について日立 208 型原子吸光度計で直接噴霧法によって、金属を測定して臓器中の金属濃度を算出した。残りのホモジネートは $18000 \times g$ で 20 分間遠心分離し、その上清 0.5 ml を用いて、さきに報告した Cd 飽和-ヘモリゼート処理法¹⁰⁾によって臓器中の MT 濃度を定量した。

結 果

1. 金属 4 回投与時の各臓器中の MT 濃度

ラットに 12 種類の金属塩を金属として 10 mg/kg の用量で 24 時間毎に 4 回皮下注射し、肝臓、腎臓、小腸および脾臓中の MT 濃度を測定した (Table I)。

本実験で MT の定量法として用いた Cd 飽和-ヘモリゼート処理法の感度および測定誤差などから無処置群の 2 倍以上の値を示し、かつ t 検定によって統計学的に有意差 ($P < 0.01$) を認めたときに、その臓器で MT の生合成が誘導されたとした。この結果、肝臓では Co の投与によって平均 580 $\mu\text{g/g}$, Ni では 557 $\mu\text{g/g}$ と Zn を投

与した場合とほぼ同程度の値であった。Ca または Mn 投与では、それぞれ 213, 254 $\mu\text{g/g}$ の値を示し、MT がこれらの金属の投与によって肝臓中で誘導されることは明らかである。腎臓では Co, Ni または Zn の投与によってそれぞれ MT 濃度は平均 118, 496 または 264 $\mu\text{g/g}$ の値を示し、これら 3 種の金属の投与によって MT の増加が見られた。一方、小腸および脾臓中では Zn 以外の 11 種類の金属の投与による有意な MT の増加は見出せなかった。

以上の結果は Ca, Co および Mn などの必須金属の投与によっても MT の生合成が誘導されることを示している。また、肝臓および腎臓中で MT が誘導されても、他の臓器中では MT は誘導されにくいことを示唆している。

2. 投与金属量と MT 濃度の関係

金属の投与によって MT が誘導されていることを確認するとともに、MT の増加が見られた金属による MT の見かけ上の誘導能を比較するために Ca, Co, Mn, Ni または Zn を投与回数を変えて皮下投与した。そして肝臓および腎臓中の MT 濃度を測定し、投与した金属の総量と MT 濃度の関係について検討した (Fig. 1)。なお、金属の誘導能は臓器に実際に取り込まれた金属量 (またはその濃度) の関数であると考えられるので^{10,11)} 投与量に対する臓器中の MT 濃度の増加率をその金属の見かけ上の誘導能とした。

肝臓では Ca, Co, Mn, Ni および Zn のいずれの場合にも投与した総量に応じて MT 量は直線的に増加した。投与した金属の総量 (mg/kg) を x とし、MT 濃度

TABLE I. Effect of Metals on Metallothionein Content in Tissues of Rats

Metal ^{a)}	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ tissue) ^{b)}			
	Liver	Kidney	Small intestine	Pancreas
None	14 $\pm$ 8	38 $\pm$ 5	3 $\pm$ 1	13 $\pm$ 6
Al	59 $\pm$ 25	56 $\pm$ 7	14 $\pm$ 8	19 $\pm$ 10
Ca	213 $\pm$ 24	56 $\pm$ 10	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 3
Co	580 $\pm$ 63	118 $\pm$ 8	24 $\pm$ 13	10 $\pm$ 0
Cr	118 $\pm$ 76	62 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 6
Fe	40 $\pm$ 36	53 $\pm$ 0	8 $\pm$ 6	8 $\pm$ 6
K	7 $\pm$ 3	46 $\pm$ 17	6 $\pm$ 3	3 $\pm$ 3
Mg	18 $\pm$ 6	43 $\pm$ 14	6 $\pm$ 3	5 $\pm$ 0
Mn	254 $\pm$ 46	19 $\pm$ 5	10 $\pm$ 0	8 $\pm$ 7
Na	11 $\pm$ 3	26 $\pm$ 7	5 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0
Ni	557 $\pm$ 60	496 $\pm$ 47	21 $\pm$ 6	21 $\pm$ 12
Pb	45 $\pm$ 12	26 $\pm$ 11	5 $\pm$ 0	8 $\pm$ 3
Zn	534 $\pm$ 15	264 $\pm$ 79	107 $\pm$ 56	784 $\pm$ 152

a) 10 mg/kg, sc, daily for 4 d.

b) Mean $\pm$ S.D. of 3 rats.

($\mu\text{g/g}$) を y とすると、その一次回帰式の回帰係数は各金属の見かけ上の誘導能を示している。Co, Ni または Zn を投与した場合の回帰係数を計算すると、それぞれ 14.5, 13.7, 13.3 であり、ほぼ同じであった。Mn を投与した場合の回帰係数は 5.8, Ca 投与では 4.8 であり、それぞれ Zn 投与時の 0.44 倍および 0.36 倍に相当した。

一方、腎臓では、Co を投与した場合の回帰係数は 1.8 であったが、Ni 投与では 11.8 と Zn 投与時の 5.7 の約 2 倍の値を示した。

以上の結果は、肝臓では Zn と同様に Co および Ni には強い見かけ上の MT 誘導能を有していること、Ca および Mn も MT を誘導すること、腎臓では Zn よりも Ni の方が強い見かけ上の誘導能を持っていることを

Fig. 1. Effects of Various Metals on Metallothionein Concentrations in the Liver and Kidney of Rats

Numbers under bars are total doses of injected metal (mg/kg). The data are presented as mean $\pm$ S.D. of 3 rats.

示唆している。

3. 臓器中 Zn 濃度と MT 濃度との相関

Cd や Hg で誘導された MT は結合金属として Zn を含んでおり,¹³⁾ また Zn を投与すると臓器中の Zn 濃度と MT 濃度には正の相関が見られる。¹¹⁾ そこで MT の誘導能が見られた金属について、臓器中 Zn 濃度と MT 濃度との相関関係 および 回帰式について検討した (Fig. 2)。

この結果、肝臓では Ca, Co, Mn, Ni および Zn の投与によっていずれの場合にも臓器中の Zn 濃度と MT 濃度には有意な正の相関 ($P < 0.05$ または 0.01) が見られた。腎臓においても Co, Ni および Zn の投与によって有意な正の相関 ($P < 0.01$) が見られた。

臓器中の Zn 濃度 ($\mu\text{g/g}$) と MT 濃度 ($\mu\text{g/g}$) の一次回帰式の回帰係数を算出すると Ca 投与時の肝臓、Co 投与時の腎臓および Mn 投与時の肝臓では、それぞれ 8.1, 9.6 および 9.8 であり、Zn 投与時の肝臓で得た 13.8 より小さかった。これとは対照的に、Co 投与時の肝臓、Ni 投与時の肝臓および腎臓では、それぞれ 24.8, 29.4 および 36.2 と Zn 投与時の約 2 倍の値を示した。

4. 臓器中の投与金属濃度と MT 濃度との相関

Cd または Zn を投与して MT を誘導すると臓器中の投与金属濃度と MT 濃度には正の相関が見られた。^{10, 11)} そこで臓器中の Ca, Co, Mn または Ni 濃度と MT 濃度との相関分析および回帰分析を行った (Fig. 3)。

投与金属濃度 ($\mu\text{g/g}$) を x とし、MT 濃度 ($\mu\text{g/g}$) を y とすると、Ca を投与した肝臓では正の相関を示し ($r = 0.937$, $P < 0.01$), 回帰式は $y = -117 + 6.6x$ であった。Co を投与した肝臓では正の相関を示したが、一次回帰 ($r = 0.949$, $P < 0.01$) よりも、むしろ対数回帰 ($r = 0.984$, $P < 0.01$) を示し、その回帰式は $y = -135 + 185 \ln x$ と計算された。Co を投与した腎臓でも正の相関を示し ($r = 0.880$, $P < 0.01$), その回帰式は $y = 39 + 3.9x$ であった。

Fig. 2. Relationship between Zn and Metallothionein Concentrations in the Liver and Kidney

●: liver, ■: kidney

Fig. 3. Relationship between Metal and Metallothionein Concentrations in the Liver and Kidney
●: liver, ■: kidney

CaおよびCo投与の場合とは異なり、Mn投与の肝臓ではMn濃度とMT濃度には危険率5%以下の有意な相関は見出せなかった。Ni投与の場合は肝臓中のNi濃度が定量限界以下であったので、肝臓でのNi濃度とMT濃度の相関を分析できず、また、腎臓では危険率5%以下の有意な相関は認められなかった。

考 察

MTを誘導する金属の種類およびその誘導能の強弱についてのこれまでの報告は必ずしも一致していない。¹²⁻¹⁸⁾ この原因は実験に用いた動物の種類、投与した金属の塩、投与方法、投与量およびMTの定量法の相違にもとづくと推定される。著者らの用いた実験条件下ではZn以外にCa, Co, MnおよびNi投与時に肝臓中で、CoおよびNi投与時に腎臓中で、それぞれMT濃度が増加していた (Table I)。この結果は金属の総投与量が増すにつれて臓器中のMT濃度が増加したこと (Fig. 1)。その場合に臓器中のZn濃度とMT濃度には有意な正の相関が見出されること (Fig. 2) から裏づけられた。したがって、Ca, Co, MnおよびNiがMTの誘導能を有していることは明らかであり、とくにCoは肝臓で、Niは肝臓と腎臓で強い見かけ上のMT誘導能を有していると考えられる。AlおよびこれまでにMTの生合成を誘導することが報告されているCr,¹⁴⁾ Fe¹⁷⁾ およびPb¹⁴⁾ は肝臓中のMT濃度を増加させる傾向があった (Table 1)。しかし、そのMT濃度が低いこともあって、dose-responseが認められず、また、肝臓中のZn濃度はこれらの金属の投与によっても増加していなかったため、Al, Cr, FeおよびPbはMTの誘導能を持たないか、あるいは弱いと推論される。一方、

K, MgおよびNaを投与した場合は、肝臓中のMT濃度は無処置群とほぼ同じであり、これらの金属は生体中に高濃度で存在するので、当然のことながら、MTの誘導能を有しないと考えられる。

臓器別で比較すると、金属の投与によっては肝臓でMTが誘導される場合が多く、次いで腎臓であった。小腸および脾臓では検討した金属のなかではZn投与の場合にのみMT濃度が有意に増加した。HgおよびBi投与では腎臓中のMT濃度が増加することが報告されているので、^{16,19)} MTは肝臓および腎臓で見かけ上誘導されやすく、他の臓器中ではされにくいと考えられる。ゆえにZnを投与すると脾臓中のMT濃度が最も高くなること²⁰⁻²²⁾ は脾臓中のZn-thioneinには特別な生理的意義があることを暗示している。

金属によるMTの誘導能についてはCd投与の場合は臓器中のCd濃度に正比例し、その誘導能は臓器の種類とは無関係であることをすでに明らかにした。¹⁰⁾ またZn投与の場合にも同様の結果を報告した。¹¹⁾ Ca投与時にはCdおよびZn投与の場合と同様、肝臓中でZn濃度とMT濃度、Ca濃度とMT濃度には正の相関が見られた (Fig. 2, 3)。しかし予想に反して、Co投与時の肝臓ではCo濃度とMT濃度が一次回帰を示さず、Mn投与時の肝臓、Ni投与時の肝臓および腎臓では、投与金属とMT濃度に有意な相関を見出すことは出来なかった。その原因は不明であるが、①MTの誘導機構がCdやZn投与時の場合と異なる、②CoやNiによってMTが間接的に誘導される、③あるいはCoやNiは*in vivo*でMTと結合しないことなどが推定され、これら金属による誘導機構と関連した検討が必要であろう。

Fe(NO₃)₃, MgSO₄ および NaCl などに見かけ上のMT誘導能がないかあるいは弱いことは、これらのアニオンであるNO₃⁻, SO₄²⁻ および Cl⁻ はMTの誘導能を持たないと考えられる。しかし、米谷ら^{23,24)} はポリアニオンであるカラゲニンおよびその類似化合物であるデキストラン硫酸によってMTが肝臓で誘導されたと報告している。この時、肝臓中のCa濃度も同時に増加することを見出しており、Ca濃度の増加とMTの誘導に関係があると述べている。本実験で認めたCaによる肝臓中の誘導はその推論を支持する。また肝臓中のCa濃度はカルチトニンやコルチゾンによって増加することが山口²⁵⁾ によって指摘されており、MTの誘導機構におけるCaとホルモンの関係についても今後検討したいと考えている。

引用文献および注

- 1) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 2) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435 (1961).
- 3) M. Piscator, *Nord. Hyg. Tidskr.*, **45**, 76 (1964).
- 4) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2767 (1972).
- 5) P.N. Kotsonis, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 19 (1979).
- 6) S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whanger, P.H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **254**, E282 (1978).
- 7) K.R. Etzel, S.G. Shapiro, R.J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1120 (1979).
- 8) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751 (1972).
- 9) I. Bremner, *Br. J. Nutr.*, **35**, 245 (1976).
- 10) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).
- 11) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **23**, 11 (1981).
- 12) E. Sabbioni, E. Marafante, *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 132 (1975).
- 13) D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242 (1975).
- 14) Y. Suzuki, H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **14**, 25 (1976).
- 15) E.W. Mogilnicka, J.K. Piotrowski, A. Tomaszewski, *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **9**, 357 (1976).
- 16) J.K. Piotrowski, J.A. Szymańska, *J. Toxicol. Environ. Health*, **1**, 991 (1976).
- 17) D.L. Eaton, N.H. Stacey, K. Wong, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 393 (1980).
- 18) T. Maitani, K.T. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4164 (1982).
- 19) J.K. Piotrowski, B. Trojanowska, J.M. Wisniewska-Knypl, W. Bolanowska, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 11 (1974).
- 20) S.H. Oh, H. Nakaue, J.T. Deagen, P.D. Whanger, G.H. Arscott, *J. Nutr.*, **109**, 1720 (1979).
- 21) P.D. Whanger, S.H. Oh, J.T. Deagen, *J. Nutr.*, **111**, 1207 (1981).
- 22) 小野坂敏見, 三隅一彦, 梅本佳弘, 加藤智康, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一, *衛生化学*, **28**, 346 (1982).
- 23) T. Maitani, K.T. Suzuki, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2353 (1981).
- 24) T. Maitani, K.T. Suzuki, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3051 (1982).
- 25) 山口正義, *生体の科学*, **33**, 471 (1982).