〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
29 (5) 312-317 (1983)

マウスの急性カドミウム中毒に対する肝臓中のメタロチオネインの役割. I. シクロヘキシミドの影響

小野坂敏見, 川原和司, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一
神戸学院大学栄養学部

Roles of Metallothionein in the Liver on Acute Cadmium Toxicity in Mice. I. Effects of Cycloheximide

SATOMI ONOSAKA, KAZUSHI KAWAHARA, KYONG-SON MIN,
CHIKAKO FUKUHARA and KEIICHI TANAKA
*Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,
Igawadani, Nishi-ku, Kobe 673, Japan*

(Received June 2, 1983)

In order to investigate the role of metallothionein in acute cadmium (Cd) toxicity, the following results were obtained by administrating cycloheximide to mice.

- 1) The concentration of metallothionein in the liver of mice to which Cd and cycloheximide were administered decreased more than that given only Cd.
- 2) Metallothionein did not take part in the incorporation of Cd into the liver.
- 3) The rate of death in the mice to which Cd and cycloheximide were administered increased.
- 4) The concentration of metallothionein in the liver of mice given Cd and cycloheximide decreased with an increase in the amount of Cd administered.
- 5) After metallothionein was induced by Cd, the concentration of metallothionein in the liver of the group given cycloheximide was higher than that of the group to which no cycloheximide was administered.

Keywords — cycloheximide; metallothionein; cadmium; acute toxicity; liver

緒 言

Metallothionein (以下 MT と略す) の生理的意義としては重金属に対する毒性防禦, 必須金属である Zn や Cu の代謝や貯蔵に関与していることなどが考えられている.¹⁾ そのなかでも MT による重金属に対する毒性防禦の観点からは多くの研究がなされており, MT が誘導される条件下では Cd の毒性に対して MT は防禦的に作用することがよく知られている. すなわち, 重金属の投与によって MT の生合成が誘導されること,²⁾ 重金属の前投与によって追加投与した重金属による死亡率を低減できること,³⁾ MT に結合している Cd は酵素活性を低下させないこと⁴⁾ など多くの知見が得られている. これとは逆に, タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドの投与によって MT の生合成を抑制すると投与による死亡率が増加することも観察されている.⁵⁾

このように生体内の MT 濃度は Cd の毒性の発現と密接に関係していると考えられる. しかし, 生体内の MT 濃度についての知見は比較的少く, なかでも MT の誘導を抑制した場合の報告はあまり多くはない.⁶⁻⁸⁾

そこで MT 濃度を抑制するためにシクロヘキシミドをマウスに投与した. そして Cd 投与時の肝臓および腎臓中の MT 濃度を測定するとともに, この場合の Cd の急性毒性に対するシクロヘキシミドの影響についても検討したので報告する.

実 験 方 法

1. 動物 体重約 25 g の ddy 系雄性マウスを静岡実験動物農業協同組合より購入し, 順化のため 1 週間以上飼育したのち, 体重 30—38 g のものを以下の実験に供した.

2. MT の誘導に対するシクロヘキシミドの影響 (実

験1) 45匹のマウスを5群に分け、各群に0, 50, 100, 150 または 200 mg・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量でシクロヘキシミドの水溶液を腹腔内注射し、同時に CdCl₂ 溶液を 3 mg Cd・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で皮下注射した。そして、Cd を注射した6または12時間後に各群から3匹の肝臓と腎臓を摘出し、その MT 濃度と Cd 濃度を測定した。

3. Cd による死亡率に対するシクロヘキシミドの影響および MT 濃度の変化(実験2) マウスに CdCl₂ 溶液を 1.5—10 mg Cd・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で皮下注射した。シクロヘキシミド投与群には、Cd 投与時およびその6時間後にシクロヘキシミドの水溶液を 50 mg・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で腹腔内注射し、3日間観察した。なお、Cd の各投与量ごとに6匹以上を1群とした。また、3.0および6.0 mg Cd/kg 投与群についてはべつに Cd 注射6および12時間後の肝臓および腎臓中の MT 濃度を測定した。

4. シクロヘキシミド併用投与時の投与 Cd 量と臓器中 MT 量との関係(実験3) CdCl₂ 溶液を 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 または 6.0 mg Cd・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で皮下注射した。同時および6時間後にシクロヘキシミドの水溶液を 50 mg・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で腹腔内に注射して Cd 投与12時間後の肝臓および腎臓中の MT 濃度を測定した。

5. 臓器中 MT 濃度に対するシクロヘキシミド後投与の影響(実験4) CdCl₂ 溶液を 3.0 mg・10 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で皮下注射した。その3, 4および5日後にシクロヘキシミド溶液を 150 mg・15 ml⁻¹・kg⁻¹ の用量で毎日腹腔内注射し、6日目の肝臓中の MT, Zn および Cd 濃度を測定して Cd のみ、またはシクロヘキシミドのみを投与した群と比較した。なお、シクロヘキシミド投与群は4匹中3匹が、Cd とシクロヘキシミド併用投与群では6匹中5匹が、Cd 単独投与群では5匹の全て

が生存していたので、生存していたものについて平均と標準偏差を求めた。

6. 臓器中の MT および金属濃度の測定 摘出した臓器に5倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加え、そのホモジネート 0.5 ml に等量の濃塩酸を加えて1週間放置したのち、蒸留水で希釈し、3,000 rpm で5分間遠心分離してその上清の金属濃度を日立 208 型原子吸光分光光度計で直接噴霧法で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について、すでに報告した Cd 飽和ヘモリゼート処理法^{9,10,19})によって MT を定量した。

結 果

1. Cd による MT の誘導に対するシクロヘキシミドの影響

シクロヘキシミドの投与量を変えて Cd 投与時の臓器中 MT 濃度を経時的に測定した (Table I)。

シクロヘキシミド非投与群と比較すると、シクロヘキシミド投与群では投与量に応じて肝臓中の MT 濃度が減少した。すなわち、Cd 投与6時間後ではシクロヘキシミド非投与群に比較して 50, 100, 150 または 200 mg/kg 投与群でそれぞれ平均 45, 68, 82 または 89% の有意な ($p < 0.01$) 減少が見られた。12時間後でも3匹とも死亡していた 200 mg/kg を除いて、シクロヘキシミド投与群で有意に ($p < 0.01$) 減少した。しかし、6時間から12時間後にかけての MT の増加はシクロヘキシミド非投与群の約 270 $\mu\text{g/g}$ に比べるとシクロヘキシミド 50, 100 または 150 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では、それぞれ約 170, 300 および 190 $\mu\text{g/g}$ とそれほど大きな差はなかった。また腎臓では6時間後には差が見られたが、12時間後ではほぼ同じ値であった。

以上の結果はシクロヘキシミド投与によって肝臓において Cd で誘導される MT の生合成が抑制されること、シクロヘキシミド投与6時間を経過するとその抑制作用が持続しないことを示している。

TABLE I. Effect of Cycloheximide on the Concentration of Metallothionein in the Liver and Kidney in Mice

Cycloheximide (mg/kg)	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ liver)			Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ kidney) ^{a)}		
	6 h	9 h	12 h	6 h	9 h	12 h
0	289 $\pm$ 34	339 $\pm$ 40	560 $\pm$ 26	118 $\pm$ 3	104 $\pm$ 5	131 $\pm$ 22
50	158 $\pm$ 30	270 $\pm$ 15	326 $\pm$ 6	73 $\pm$ 12	107 $\pm$ 10	110 $\pm$ 0
100	95 $\pm$ 23	180 $\pm$ 43	392 $\pm$ 10	43 $\pm$ 5	67 $\pm$ 13	126 $\pm$ 15
150	53 $\pm$ 5	161 $\pm$ 22	241 $\pm$ 22	40 $\pm$ 3	88 $\pm$ 8	88 $\pm$ 17
200	34 $\pm$ 5	90 $\pm$ 10	— ^{b)}	34 $\pm$ 5	56 $\pm$ 3	— ^{b)}

a) Mean $\pm$ SD of 3 mice.

b) not determined.

Fig. 1. Relationship between Metallothionein and Cadmium Concentrations in the Liver of Cadmium-injected Mice after Cycloheximide Injection.

Mice were injected s.c. with 3 mg Cd/kg and i.p. with 0, 50, 100, 150 or 200 mg cycloheximide/kg simultaneously. The concentrations of metallothionein and Cd in the liver were determined 6 h (a) and 12 h (b) after the Cd injection.

2. シクロヘキシミド投与時における肝臓での MT と Cd 濃度との関係

肝臓中の Cd 濃度と MT 濃度には正の相関が見られる。¹⁰⁾ このことは MT が肝臓への Cd の取り込みに関与している可能性を暗示しているので、この点について検討した。すなわち、実験 1 で得た Cd 投与 6 時間後および 12 時間後の肝臓中の MT と Cd 濃度との相関を分析した (Fig. 1)。

MT が Cd の取り込みに関与しているならば、肝臓中の MT 濃度の変化にともなって Cd 濃度も変動すると推定される。しかし、シクロヘキシミド投与によって MT の生合成が抑制されても Cd 投与 6 時間後では Cd 濃度はあまり変化せず、一次回帰式は $Cd (\mu g/g) = -0.00586 \times MT (\mu g/g) + 17.9 (r=0.332)$ と算出されたが有意な正の相関は見出せなかった。12 時間後では $Cd (\mu g/g) = 0.0114 \times MT (\mu g/g) + 19.0 (r=0.755)$ が得られ、有意な正の相関 ($p < 0.01$) が認められた。

したがって、肝臓での投与 6 時間以内の Cd の取り込みに MT は関与していないと考えられる。

3. Cd による死亡率に対するシクロヘキシミドの影響

Cd の急性毒性に対する防禦効果が MT に無いと仮定すると、シクロヘキシミドによって MT の生合成を抑制しても Cd による死亡率は変わらないと推定される。そこで実験 2 のように Cd 単独投与群とシクロヘキシミドおよび Cd 併用投与群の死亡率を比較した (Fig. 2)。

シクロヘキシミド単独投与群ではマウスは死亡せず、Cd (6mg/kg) 単独投与群では 6 匹中 1 匹が死亡した。

Fig. 2. Effect of Cycloheximide on Acute Cadmium Toxicity of Mice.

Mice were injected s.c. with 1.5–10 mg Cd/kg. Mice of the Cd + cycloheximide group were injected 50 mg cycloheximide/kg 0 h and 6 h after the Cd injection. Mortality was determined 3 d after the Cd injection.

—○—: cadmium.

—●—: cadmium + cycloheximide.

一方 Cd (6mg/kg) とシクロヘキシミドを併用で投与すると 7 匹中 1 日後に 6 匹が、2 日後には全てのマウスが死亡した。その死亡率を Cd 単独投与群とイエーツの修正式を用いてカイ 2 乗検定を行うと、併用投与群が有意に ($p < 0.05$) 高かった。投与 Cd 量を変えて LD_{50} を算出すると、Cd 単独投与群では 7.3 mg Cd/kg であった。一方、シクロヘキシミド併用投与群では 3.6 mg/kg と Cd 単独投与群の約 1/2 であった。

以上の結果は、シクロヘキシミドの併用投与によって Cd の毒性が増強されることを示している。

4. シクロヘキシミドによる臓器中の MT 濃度の変化

シクロヘキシミド併用投与によって Cd による LD_{50} が低下した。その原因として MT 濃度の変化が考えられるので、実験 2 の条件下での臓器中の MT 濃度を測定した (Fig. 3)。

全例が生存した 3.0 mg Cd/kg 投与群ではシクロヘキシミド非投与群と比べると、シクロヘキシミド併用投与によって肝臓中の MT 濃度が Cd 投与 6 時間後で 45%、12 時間後で 36% 減少していた ($p < 0.01$)。しかし、6 時間から 12 時間にかけて MT は併用投与群で平均 201 $\mu g/g$ 増加しており、Cd 単独投与群の増加の 74 % に相当した。一方、全例が死亡した 6.0 mg Cd/kg 投与群

Fig. 3. Time Course of the Metallothionein Concentration in the Liver of Mice.

Mice were injected s.c. with 3 mg Cd/Kg (a) or 6 mg Cd/kg (b). Mice of the Cd + cycloheximide group were injected i.p. with 50 mg cycloheximide/kg 0 h and 6 h after the Cd injection. The concentration of metallothionein in the liver was determined 0, 6 and 12 h after the Cd injection. Data indicate mean $\pm$ s.d. of 3 mice.

—○—: cadmium.

—●—: cadmium + cycloheximide.

でもシクロヘキシミド併用投与によって肝臓中の MT 濃度が低下した。とくに Cd 投与 6 時間から 12 時間にかけての MT 濃度は Cd 単独投与群が 406 μ g/g 増加したのに対し、併用投与群ではその 4% にすぎない 16 μ g/g であり、有意な増加は認められなかった。

また、シクロヘキシミド併用投与群と比較すると、12 時間後の 6.0 mg Cd/kg 投与群の肝臓中の MT 濃度は 134 ± 34 μ g/g であり、3.0 mg Cd/kg 投与群の 359 ± 26 μ g/g より有意に低かった ($p < 0.01$)。

一方、腎臓ではシクロヘキシミドを併用投与しても、腎臓中の MT 濃度は Cd 単独投与群と有意な差は認められなかった。

5. シクロヘキシミド併用投与時の投与 Cd 量と MT 濃度の関係

臓器中の MT 濃度は投与 Cd 量に応じて増加することはよく知られている。^{10,11)} しかし、実験 2 においてシクロヘキシミド併用投与によっては、逆の結果を得たので、この点をさらに検討するために実験 3 を行った (Fig. 4)。

Cd を 2.0 から 6.0 mg/kg まで投与量を増加するにしたがって、肝臓中の Cd 濃度は増加したが、MT 濃度は 315 から 139 μ g/g に減少した。このときの投与 Cd 量 (mg/kg) を x 、肝臓中の MT 濃度 (μ g/g) を y とすると、一次回帰式は $y = 402 - 38.6x$ ($r = 0.909$) と計算

Fig. 4. Effect of Cycloheximide on the Metallothionein Concentration in the Liver and Kidney of Cd-injected Mice.

Mice were injected s.c. with 2–6 mg Cd/kg and i.p. with 50 mg cycloheximide/kg 0 h and 6 h after the Cd injection. The concentration of metallothionein in liver was determined 12 h after the cadmium injection. Data indicate mean $\pm$ s.d. of 3 mice.

—●—: liver.

—■—: kidney.

され、有意な ($p < 0.05$) 負の相関が見られた。一方、腎臓中の MT 濃度は Cd の投与量を変えても約 120 μ g/g の値を示し、ほとんど差は見られなかった。

この結果はシクロヘキシミド併用投与によって肝臓のみで Cd の毒性が増強されることを暗示している。

6. シクロヘキシミド後投与の肝臓中 MT 濃度に対する影響

シクロヘキシミドの同時投与によって肝臓中の MT 濃度が減少したので誘導された肝臓中の MT についてもシクロヘキシミドの後投与によって影響されることが推測される。そこで実験 4 のように、Cd を投与して MT を誘導し、そののちシクロヘキシミドを投与してその影響を検討した (Table II)。

シクロヘキシミド後投与群では肝臓中の MT 濃度は 1048 ± 110 μ g/g であり、Cd 単独投与群より有意に高かった ($p < 0.01$)、また Zn 濃度もシクロヘキシミド投与群が Cd 単独投与群より有意に高かったが ($p < 0.05$)、Cd 濃度についての両群の有意な差は見出せなかった。

腎臓においては MT 濃度、Zn 濃度および Cd 濃度の

TABLE II. Effect of Post-injection of Cycloheximide on Concentrations of Matallothionein, Zinc and Cadmium in the Liver and Kidney in Mice

Treatment	Liver			Kidney		
	MT ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Zn ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Cb ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	MT ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Zn ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Cd ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)
Cycloheximide	82 $\pm$ 3	41.2 $\pm$ 2.8	— ^{b)}	8 $\pm$ 3	24.4 $\pm$ 1.5	— ^{b)}
Cd	743 $\pm$ 56	49.2 $\pm$ 2.5	35.1 $\pm$ 2.3	287 $\pm$ 87	24.8 $\pm$ 3.8	17.0 $\pm$ 5.6
Cd + Cycloheximide	1048 $\pm$ 110 ^{c)}	70.9 $\pm$ 14 ^{c)}	35.8 $\pm$ 1.8	350 $\pm$ 56	27.9 $\pm$ 4.7	18.2 $\pm$ 3.8

a) Mean $\pm$ S.D. of 3 mice.

b) not determined.

c) $p < 0.05$, compred to the group of Cd-injected mice.

いずれについてもシクロヘキシミド後投与群と Cd 単独投与群に有意な差は認められなかった。

考 察

MT の生理的意義が必ずしも明確でないゆえか、生体中の MT 濃度のコントロールという観点からの研究はほとんど見当たらない。著者らは種々の金属を投与することによって諸臓器中の MT 濃度が増加することを報告した。^{10,13,14)} 本実験ではこれまでとは逆に MT 濃度の増加を抑制するためにシクロヘキシミドを Cd と併用投与し、その影響を検討したところ (Table I) 肝臓において Cd で誘導される MT が減少したが、腎臓中の MT 濃度にはほとんど影響しなかった。この結果はシクロヘキシミド投与によって肝臓中での MT の誘導を抑制できるというこれまでの報告⁶⁻⁸⁾ を支持している。

そこでシクロヘキシミドの後投与によって Cd 投与後の肝臓中の MT、ひいては Cd 濃度が減少すると予想して実験を行った (Table II)。しかし、予想に反して、肝臓中の MT 濃度はシクロヘキシミド後投与群の方が有意に高かった。その差は約 300 $\mu\text{g/g}$ であり、シクロヘキシミド単独投与群の 80 $\mu\text{g/g}$ の 3 倍以上の値であった。しかし、このことはシクロヘキシミド後投与によって MT の生合成が促進されたことを必ずしも意味しない。Cd 濃度に差が認められなかったこと、Cd 単独投与群の肝臓中の Zn 濃度はシクロヘキシミド後投与群より低く、その差 (平均 21 $\mu\text{g Zn/g}$) は MT 濃度の差 (平均 305 $\mu\text{g/g}$) が Zn-thionein の差であると仮定して計算するとよく一致すること、Zn-thionein は Cd-thionein より不安定であること¹⁵⁾ などを考え合せると、シクロヘキシミド後投与によって MT の分解が抑制されたとも考えられる。アクチノマイシン D の投与によっては、スーパーインダクションの現象が報告されており、¹⁶⁾ シクロヘキシミド投与による MT 濃度の差異についてもその機構を明らかにする必要がある。

MT が金属の取り込みに関与しているか否かについ

ては小腸において MT が Zn の取り込みに関与しているとの報告¹⁷⁾ はあるが明確ではない。MT が Cd の取り込みに関与しているならば、シクロヘキシミド投与によって肝臓中の Cd 量は減少すると推定される。そこでシクロヘキシミド併用投与時における肝臓中の MT と Cd 濃度の関係を検討した (Fig. 2)。6 時間後ではシクロヘキシミドの併用投与によって MT 濃度は変化した。Cd 濃度は約 18 $\mu\text{g/g}$ とほぼ一定であった。12 時間後では MT と Cd 濃度には正の相関が認められたが、その一次回帰式の y 軸の切片は 19.0 であり、6 時間後の値とほぼ一致していた。このことは投与後 6 時間以内あるいは一定濃度に達するまで肝臓への Cd の取り込みは MT の生合成に左右されないことを示しており、その量は本実験条件下では投与 Cd 量の約 40 % に相当していた。

MT の生理的意義の 1 つとして重金属に対する毒性防禦が考えられている。¹⁾ この仮説を明確にするために菅原ら⁵⁾ はシクロヘキシミドを投与して MT の生合成を阻害すると、単独では死亡しない 2.5 mg Cd/kg の腹腔内投与で 60 % のマウスが死亡することを観察している。本実験で得た結果はそれを支持した (Fig. 2)。Cd 投与によって死亡する群の肝臓の MT 濃度はシクロヘキシミド併用投与によって減少していた (Fig. 3)。さらにシクロヘキシミド併用投与群では投与 Cd 量に応じて肝臓中の MT 濃度が減少するという Cd 単独投与群とは全く逆の結果を得た (Fig. 4)。これらの結果はシクロヘキシミド併用投与によって MT の誘導が抑制されるばかりでなく、それによって MT に結合していない Cd が増加し、その Cd が MT の生合成を阻害することを示しており、さらに他のタンパク質の生合成も阻害されていることを暗示している。腎臓では MT の生合成については、いずれの場合もシクロヘキシミドによってほとんど影響されていないので、肝臓の MT が Cd の急性中毒を防禦していると推論される。Cd の大量投

与時の死因として肝臓の障害を推定している報告もあるが,¹⁸⁾ 不明確な点も残されている。Cdの急性中毒におけるMTの役割については死因となる障害をうける臓器の探究とともに、さらに検討する必要がある。

謝辞 有益な御助言を賜りました札幌医科大学 菅原直毅先生に深謝致します。

引用文献および注

- 1) J.H.R. Kägi, M. Nordberg, "Metallothionein," *Experientia Supplementum* 34, Birkhauser Verlag, Basel 1979.
- 2) M. Piscator, *Nord. Hyg. Tidsker.*, **45**, 76 (1964).
- 3) H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **8**, 184 (1970).
- 4) M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi, T. Suda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340 (1974).
- 5) N. Sugawara, C. Sugawara, *Ind. Health.*, **19**, 177 (1981).
- 6) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751 (1972).
- 7) K.S. Squibb, R.J. Cousins, *Environ. Physiol. Biochem.*, **4**, 24 (1974).
- 8) M.K. Richards, R.J. Cousins, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **156**, 505 (1977).
- 9) 小野坂敏見, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男, 衛生化学, **24**, 128 (1978).
- 10) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).
- 11) J.K. Piotrowski, B. Trojanowska, J.M. Wiśniewska-Knypl, W. Bolanowska, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 11 (1974).
- 12) 田中慶一, 土井雅子, 小野坂敏見, 岡原國男, 栄養と食糧, **34**, 253 (1981).
- 13) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **23**, 11 (1982).
- 14) 小野坂敏見, 吉屋祥子, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 221 (1983).
- 15) B.C. Starcher, J.G. Glauber, J.G. Madaras, *J. Nutr.*, **110**, 1391 (1980).
- 16) F.A. Day, B.J. Coles, F.O. Brady, *Bioinorg. Chem.*, **8**, 93 (1978).
- 17) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **234**, 3460 (1960).
- 18) R.E. Dudley, D.J. Svoboda, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**, 302 (1982).
- 19) MTは1モルあたり6—7モルの金属を結合しているとされているが、ここでは前報(引用文献10)にしたがい、6モルと仮定した。そこでCd-thioneinの分子量は6720としてMT量を算出した。