〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
29 (6) 389-393 (1983)

カドミウムによる精巣障害の発症過程における脂質過酸化の関与について

佐二木順子, 福島悦子, 藤代良彦

千葉県衛生研究所

Involvement of Lipid Peroxidation to the Early Stage of the Injury in Rat Testis Induced by Cadmium

JUNKO SAJIKI, ETSUKO FUKUSHIMA

and YOSHIHIKO FUJISHIRO

Chiba Prefectural Institute of Public Health

Nitona-cho, Chiba 280, Japan

(Received May 24, 1983)

To investigate when the changes of lipoperoxide contents in early stage of the inflammation are induced in the testis of rats after CdCl_2 injection, we measured the lipoperoxide contents in plasma and tissues (liver, kidney and testis) at 1, 3, 5, 10, 15, 24 and 48 h after CdCl_2 (5.0 mg/kg) injection.

Lipoperoxide value in the testis increased significantly from 15 h after CdCl_2 injection. Although no change of lipoperoxide value was observed in the liver through the experimental period, the value in the kidney increased significantly at 10 and 48 h after CdCl_2 treatment.

Heme protein value which represents the degree of hemorrhage in the testis also increased from 15 h after CdCl_2 injection. This suggests that hemorrhage in the testis has a good correlation with an increase in lipid peroxidation *in situ*.

The fact that significant increases in lipoperoxide values and in the degree of hemorrhage were observed from 15 h after CdCl_2 injection, reveals the possibility that oxidative reactions occur in the testis of rats nearly 15 h after the treatment.

Assay of enzyme activities in serum was performed simultaneously. The activity of β -glucuronidase which is considered to be one of parameters showing the occurrence of an inflammation, increased significantly at an early time (from 1 to 5 h) after CdCl_2 treatment. This implies that some biochemical reactions occur in the testis before the time when the increase of lipoperoxide formation occurs.

In the liver where no fluctuation of lipoperoxide concentration was observed during the experimental period, the Zn contents increased as the time elapsed after CdCl_2 administration. On the contrary, a significant reduction of the Zn content was observed in the testis in which a considerable increase in lipoperoxide concentration was noticed, at 3-5 h after CdCl_2 administration. The inflammation of testis by Cd is supposed to be initiated at this time stage.

The difference of the Zn contents in these tissues may be considered to be one of factors which induce the difference among tissues in lipoperoxide concentration.

Keywords — cadmium ; inflammation ; rat testis ; lipid peroxidation ; serum enzyme ; tissue metal

はじめに

Parizek¹⁾によりカドミウムによる精巣障害が報告されて以来、精巣障害についての多くの研究があるが、障害発現のメカニズムについては明らかにされていない。

Gabor ら²⁾ が脂質の過酸化の精巣障害への関与を報告して以来、我々も塩化カドミウムをラットの皮下に投与すると、24時間後には精巣に出血性の炎症が生じ、その際、精巣の過酸化脂質値は有意な増加を示すことを報

告した.³⁾ また、この過酸化脂質の増加は、抗酸化剤であるビタミンEの前投与により、ほぼ正常値まで抑えられ、炎症の程度も著しく軽減された。これらの実験結果から、我々はカドミウムにより生成が亢進された過酸化脂質が精巣における炎症の発現に関与していることを示唆した。⁴⁾

今回は、脂質の過酸化という現象が精巣の炎症の直接の原因になっているかどうか知るため、カドミウム投与後経時的に過酸化脂質値の測定を行ない、他の炎症のパラメーターとの関連について検討した。

実験方法

1. 実験材料 ウィスター系雄ラット（体重 200 g 前後）35匹に塩化カドミウム (CdCl_2) 5.0 mg/kg を皮下注射し、注射後、1, 3, 5, 10, 15, 24, 48 時間に各5匹ずつ殺処分を行なった。エーテル麻酔の上心臓より採血を行ない、直ちに臓器（肝臓、腎臓、精巣）をとり出し、臓器重量の測定を行なった。

2. 血清中の酵素測定 心採血により得た血液を $2000 \times g$, 10 分間遠心し、血清を分離した。乳酸脱水素酵素 (LDH) アルカリホスファターゼ (Al-P) の測定は、オートアナライザー (ABBOTT-VP) を用い、酵素法にて測定した。 β -グルクロニダーゼ (β -GL) は基質に *p*-ニトロフェニルグルクロナイドを用い、生成される遊離 *p*-ニトロフェノールを測定する方法⁵⁾に従い、活性値は、一時間あたりの *p*-ニトロフェノール生成量で表した。

3. 血漿中ならびに臓器中の過酸化脂質の測定 血漿中過酸化脂質の測定は、チオバルビツール酸法 (TBA 法)⁶⁾ により測定した。臓器中過酸化脂質は、Ohkawa らによる TBA 法⁷⁾ にもとづいて測定した。

4. 精巣中へム蛋白の測定 精巣を生理食塩水にてホモジナイズした後、 $2000 \times g$, 5 分間遠心した。得られた上清について、二波長分光光度法⁸⁾ ($\lambda_2=540$, $\lambda_1=560$ nm) にてへム蛋白量を測定した。二波長分光光度計は日立 557 形を用いた。

5. 臓器中 Cd, Zn の測定 各臓器 (500 mg—1 g) に硝酸 (2 ml) を加え湿式分解したのち、フレイム原子吸光法⁹⁾ で Cd, Zn を測定した。原子吸光は PERKIN-ELMER 305 を用いた。

血清中の酵素活性値 (Al-P および LDH)、臓器中過酸化脂質値については、誤差の分散が平均値に比例しており、対数正規分布の特徴を示していたので、測定値を対数変換したのち、有意差検定 (*t* 検定) を行なった。また、精巣中へム蛋白含量についても同様の理由により適切な変換 ($x' = \{\log(x+1)\}^{1/4}$) を行なったのち *t* 検

定を行なった。その他のパラメーターについては、そのまま *t* 検定により処理した。

結 果

CdCl_2 投与後の精巣重量変化を Fig. 1 に示した。投与後10時間目から精巣重量は増加し ($p < 0.05$) 24時間まで増加しつづけたが、48時間目のものでは減少した。

Fig. 1. Changes of Testicular Weight against to Body Weight with Time after CdCl_2 Injection

Each Value represents the Mean $\pm$ SE of 5 rats.

Differences are tested according to *t*-test.

Fig. 2. Changes of Various Enzyme Activities in Serum with Time after CdCl_2 Injection

Each Value represents the Mean $\pm$ SE of 5 rats.

Differences are tested according to *t*-test.

TABLE I. Cadmium (Cd) and Zinc (Zn) Contents in Tissues with Time after CdCl₂ Treatment

h	Metals Tissues	Cd ^{a)} (μg/wet wt.)			Zn ^{a)} (μg/wet wt.)		
		Liver	Kidney	Testis	Livsr	Kidney	Testis
0		N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	39.48±1.22	42.92±0.65	22.80±0.43
1		9.60±0.92	1.43±0.10	0.18±0.003	31.45±0.44 ^{*b)}	26.85±0.90	25.63±0.64 ^{**b)}
3		17.03±0.59	1.65±0.03	0.22±0.01	38.82±1.08	22.76±0.31	20.73±0.31 ^{*b)}
5		25.29±0.76	2.98±0.17	0.28±0.01	43.36±0.90	26.08±0.33	17.70±1.21 ^{*b)}
10		31.53±1.36	3.53±0.13	0.31±0.01	49.40±0.51 ^{**b)}	24.98±0.27	20.93±0.26
15		37.56±2.03	4.70±0.41	0.33±0.03	52.26±0.91 ^{**b)}	23.70±0.36	21.45±0.63
24		40.81±0.67	5.92±0.32	0.33±0.004	63.12±0.77 ^{**b)}	23.62±0.35	24.08±0.53
48		44.03±0.54	14.97±0.74	0.25±0.01	67.58±1.37 ^{**b)}	25.10±0.39	21.50±0.44

a) Mean ± SE b) Differences are tested according to *t*-test of 5 rats. ^{**}*P*<0.01, ^{*}*P*<0.05 c) N. D., not detected.

Fig. 3. Changes of Lipoperoxide Values in the Plasma and Tissues Measured by TBA Method

Each Value represents the Mean ± SE of 5 rats.
Differences are tested according to *t*-test.

血清中の Al-P, LDH, β-GL の時間経過による値の変動は Fig. 2 に示したとおりであった。Al-P については、投与後24時間目から値の低下 (*p*<0.05) が観察され、48時間目にはさらに低下した (*p*<0.01)。LDH

Fig. 4. Changes of Heme Protein Values Expressed as Hemoglobin in the Testis

Each Value represents the Mean ± SE of 5 rats.
Differences are tested according to *t*-test.
*Units are described in "Methods" in detail.

については、15、24時間目に有意な値の増加が認められた (*p*<0.01)。β-GL は、投与後1時間目に有意な値の増加 (*p*<0.05) が認められ、5時間目まで増加した (*p*<0.01) が、その後は正常値にもどった。

血漿中の過酸化脂質値は、投与後初期に減少し、増加が認められたのは投与後24時間目のみ (*p*<0.05) であった (Fig. 3)。臓器中の過酸化脂質の時間経過にともなう変動は、Fig. 3 に示したとおりであった。肝臓では、実験期間中値の変動は認められなかった。腎臓では、投与後10時間目と48時間目に、それぞれ5、1%の水準で値の増加が認められた。精巣では、投与後15時間目以降の有意な増加が認められた。

精巣における出血の程度を示すヘム蛋白含量は、CdCl₂ 投与後15時間目に値が急速に増加し (*p*<0.01)、その後、24時間目まで徐々に増加した (Fig. 4)。

臓器中 Cd, Zn の含量の時間経過にともなう変動は、Table I に示したとおりである。投与後48時間目まで Cd の蓄積量は、肝臓が最も多かった。なお、肝臓、腎臓ともに Cd の蓄積量は、時間とともに増加したが、精

巢では15-24時間目がピークで、その後減少した。Zn含量については、肝臓でCdCl₂投与後1時間目に一時的に低下したが、その後徐々に増加し、10時間以降のZn含量はコントロール(0時間)値に比べ有意に大きかった。精巣では肝臓と全く逆で、投与後1時間目に一時的に増加し、3-5時間目には低下したが、その後正常にもどった。腎臓のZn含量には全く変化が見られなかった。

考 察

カドミウムをラットやマウスに投与すると、精巣内血管の透過性が著しく亢進し、精巣に出血性の炎症をひきおこすことが明らかである。今回、出血程度を示す指標と考えられるヘム蛋白含量を測定したところ、CdCl₂投与後15時間目に精巣中の値は有意に増加した。この時間はKarら¹⁰⁾がカドミウム投与ラットの精巣中に病理学的見地から、血管障害ならびに出血を認めた時間(12時間前後)とほぼ等しい。また、CdCl₂投与後15時間目には過酸化脂質も精巣で有意に増加しており(Fig. 2)、出血と脂質の過酸化とは深い関連があるものと思われる。なお、細胞損傷のパラメーターの一つと考えられているLDHがCdCl₂投与後15時間目に血清中で有意に増加したことは、この時期に組織障害が亢進していることを裏付けるものと考えられる。血清中のβ-GL活性値は、CdCl₂投与後1時間目という早い時期に高まった(Fig. 2)。β-GLは炎症のパラメーターとして重要なライソゾーム酵素である。この酵素活性値が投与後、極めて早期に血清中で増加した事実は、精巣で出血、脂質の過酸化の亢進が観察される以前に炎症と関連の深い何らかの生体反応が生じている可能性を示唆するものと考えられる。血清中で変動が認められたこれらの酵素については、今後、組織中の活性値との関連について、さらに検討する必要がある。

Setchellら¹¹⁾は、我々が用いた量とほぼ等しいCdCl₂をラットに投与し、投与後3-4時間目にアイソトープラベルのアルブミンが精巣の血管外に漏出したことから、カドミウム投与後かなり早期に血管の透過性が亢進していることを認めた。この事実は、血管の透過性の亢進が脂質の過酸化反応に先行することを示しており、このことはとりもなおさず、過酸化脂質がカドミウムの精巣炎症の直接の原因ではなく、炎症の発症過程で生ずる反応生成物である可能性を示すものと考えられる。

最近、Shibataら¹²⁾は、CdCl₂(3.07 mg/kg)を腹腔内に投与し、炎症を生じたラット精巣中の脂質組成について検討した。それによるとCdCl₂投与後6時間以降リン脂質含量は低下し、一方、アラキドン酸(20:4)、

ドコサペンタエン酸(22:5)等の高度不飽和脂肪酸の遊離が認められた。これら遊離した不飽和脂肪酸は、エステル型のものやトリグリセリドに比べ過酸化速度が速いことが報告されている。¹³⁾ また、アラキドン酸の遊離の亢進が認められた事実は、酵素的脂質過酸化反応系であるプロスタグランディン代謝を亢進させている可能性¹⁴⁾をも示しており、Shibataらの報告した脂肪酸の遊離が精巣内での脂質の過酸化を助長している可能性は大きい。

カドミウムの蓄積量の最も大きな肝臓では、脂質の過酸化の亢進が全く認められなかったのに反し、腎臓でも精巣と同様増加が認められた(投与後10時間目; $p < 0.05$, 48時間目; $p < 0.01$)。このようなカドミウム障害の臓器間に生ずる差の原因についてGunnら¹⁵⁾は臓器間での血管の形態学的な差を考えた。しかしながら、カドミウムの毒性を調節している因子と考えられているメタロチオネインの各臓器における関与の違いも障害の臓器間差を生みだす一因と考えられる。Wongら¹⁶⁾は、カドミウムのひきおこす精巣障害の程度はラットの週齢により異なるが、この障害程度の差には必ずしもメタロチオネインが関与しているとは限らないことを述べている。今後、カドミウムの存在形態と脂質の過酸化との関連について検討することは、障害の臓器間差の原因を究明する上で有意義と考えられる。

肝臓では、毒性発現抑制機構としてとりこまれたCd⁺⁺がZn-チオネインのZn⁺⁺と置換する事実が明らかにされている。¹⁷⁾ 今回、実験期間中過酸化脂質の増加が認められなかった肝臓においてはZnの著しい増加が観察され、一方、過酸化脂質の増加が認められた精巣、腎臓でZn含量が低かった事実は、Znと脂質の過酸化作用との関連性を示唆するものである。Znがライソゾーム膜の脂質の過酸化を抑えるという報告もあり、¹⁸⁾ 今後、カドミウム中毒時に精巣で観察される脂質の過酸化作用におけるZnの役割について、さらに検討を加える必要がある。

ま と め

カドミウム投与により、ラット精巣で生ずる出血性炎症の発症過程における過酸化脂質の変動を調べた。

CdCl₂(5.0 mg/kg)皮下注射後15時間目に精巣中の過酸化脂質値は有意な増加を示し、以降増加した。また、精巣内の出血程度を示すヘム蛋白含量も投与後15時間以降増加し、脂質の過酸化と出血との関連が示唆された。肝臓では実験期間中過酸化脂質値に変動はみられなかったが、腎臓では投与後10、48時間目に有意に増加した。

炎症のパラメーターである β -グルクロニダーゼは、血清中の測定項目中最も早く（投与後1—5時間）活性値が上昇した。

以上の結果より、 CdCl_2 投与後15時間前後に精巣内で酸化反応が亢進し、重篤な炎症に進展するものと考えられる。なお、脂質の過酸化が生ずる以前に何らかの炎

症に関連した反応が生体内で生じていることが示唆された。

また、実験期間中過酸化脂質値に変動が認められなかった肝臓では Zn 含量が時間とともに増加したが、一方、過酸化脂質値が増加した精巣では CdCl_2 投与後3—5時間目に Zn 含量は低下した。

参 考 文 献

- 1) J. Parizek, Z. Zabor, *Nature* (London), **177**, 1036 (1956); J. Parizek, *J. Endocr.*, **15**, 56 (1957).
- 2) S. Gabor, Z. Anca, E. Bordas, *Rev. Roum. Biochim.*, **15**, 113 (1978).
- 3) J. Sajiki, Y. Fukuda, E. Fukushima, *J. Appl. Biochem.*, **3**, 467 (1981).
- 4) J. Sajiki, Y. Fukuda, E. Fukushima, A. Hirai, Y. Tamura, A. Kumagai, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 339 (1982).
- 5) K. Kato, K. Yoshida, H. Tsukamoto, M. Nobunaga, T. Masuya, T. Sawada, *Chem. Pharm. Bull.*, **8**, 239 (1960).
- 6) K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 7) H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
- 8) B. Chance, *Science*, **120**, 767 (1954).
- 9) W. Slavin, S. Sprague, F. Rieders, V. Cordova, *Atomic Absorption News-letter*, **4**, 7 (1964).
- 10) A.B. Kar, R.P. Das, *Acta Biol. Med. Germ.*, **5**, 153 (1960).
- 11) B.P. Setchell, G.M.H. Wailes, *J. Endocr.*, **47**, 81 (1970).
- 12) T. Shibata, Y. Yoshida, K. Waku, *衛生化学*, **29**, p. 46 (1983).
- 13) 浅川具美, 野村幸弘, 松下雪郎, *油化学*, **24**, 88 (1975).
- 14) 早石 修, 山本尚三, *医学のあゆみ*, **81**, 247 (1972).
- 15) S.A. Gunn, T.C. Gould, W.A.D. Anderson, *Amer. J. Pathol.*, **42**, 685 (1963).
- 16) K.L. Wong, C.D. Klaasen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 456 (1980).
- 17) K. Tanaka, S. Onosaka, M. Doi, K. Okahara, *衛生化学*, **23**, 229 (1977).
- 18) M. Chvapil, J.N. Ryan, C.F. Zukoski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 150 (1972).