〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
31 (5) 324-328 (1985)

マウスにおける臓器中のカドミウム及びメタロチオネイン濃度に対する種々の化合物の影響

小野坂敏見, 中田浩次, 松田康行, 関 庚善

福原千佳子, 田中慶一

神戸学院大学栄養学部

Effect of Reagents on Cadmium and Metallothionein Concentrations in Tissues of Mice

SATOMI ONOSAKA, KOJI NAKATA, YASUYUKI MATSUDA,

KYONG-SON MIN, CHIKAKO FUKUHARA,

and KEIICHI TANAKA

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,

Igawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 673, Japan

(Received May 7, 1985)

Effects of various reagents on cadmium and metallothionein concentrations in the liver, kidney, small intestine and pancreas were examined by simultaneous injections of the reagent (*i.p.*) and cadmium (3 mg/kg, *s.c.*) to mice. Compared to the mice injected with cadmium alone, little effect on the cadmium and metallothionein concentrations was observed by the injection of *o*-iodosobenzoic acid, KBrO_3 , ascorbic acid or glutathion. The concentration of cadmium and metallothionein in the four tissues decreased significantly after the injection of ethylenediaminetetraacetic acid. By the injection of diethyldithiocarbamic acid, the concentration of cadmium decreased in the four tissues and the concentration of metallothionein decreased in the liver, kidney and small intestine. By the injection of phytine, the concentration of metallothionein in the liver increased significantly.

A significant increase in metallothionein concentration in the liver was observed by the injection of olive oil (10 ml/kg) or phytine (500 mg/kg) alone. By the pre-injection of these reagents, mortality of mice injected with cadmium (10 mg/kg, *s.c.*) decreased significantly than that of mice injected cadmium alone.

Keywords — oxidizing agent; reducing agent; chelating agent; phytine; olive oil; cadmium; metallothionein; mouse acute toxicity

緒 言

カドミウム (Cd) は生体にとって有害な金属であり, 細尿管性の腎障害, 精巣壊死あるいは染色体異常を引き起こすばかりでなく, 強力な発ガン作用を有することもよく知られている.¹⁾ なかでもイタイタイ病はこの Cd に起因する疾患とされている.²⁾

生体中の大部分の Cd は Metallothionein (MT) に結合した形で存在する.³⁾ 種々の金属を前投与することによって Cd による急性中毒は防禦されること,⁴⁾ MT に結合した Cd は酵素活性を阻害しないこと⁵⁾ などは MT に結合した Cd は毒性が低いことを示している.

著者らも⁶⁻⁸⁾ シクロヘキシイミド, カルシウムあるいは高用量の Zn を投与して, MT が Cd の急性毒性を防禦していることを明らかにした. 更に, 化学型の異なる Cd をラットに投与して, MT をあらかじめ誘導しておくこと Cd による腎障害を防禦できることを見出した.⁹⁾ それゆえ Cd による毒性の発現は, 単にその濃度ばかりでなく, その生体内での存在型と密接に関連していることは明らかである. なかでも MT は Cd の毒性に対する防禦機構として重要な役割を果していると推論される.

これらの知見から, Cd の毒性を防禦するには Cd を

生体から排泄することと共に、臓器中（特に標的臓器中）の MT 濃度を増加させることも有効な方法であると考えられる。これまで生体中の Cd による毒性を防禦するために多くの薬品が試みられている。¹⁰⁻¹⁶⁾ しかし、薬品投与時の生体中の MT 濃度への影響についてはほとんど論及されていない。そこで食品添加物を含む種々の化合物と Cd をマウスに併用投与して、臓器中の Cd 及び MT 濃度に対する化合物の影響を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、馴化のため 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. 種々の化合物の Cd 及び MT 濃度に対する影響

アスコルビン酸 (1000 mg/kg), グルタチオン (1000 mg/kg), *o*-ヨードソ安息香酸 (100 mg/kg), 臭素酸カリウム (100 mg/kg), ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC, 150 mg/kg), クエン酸ナトリウム (1000 mg/kg), フィチン (500 mg/kg), エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA, 100 mg/kg) またはプロトボルフィリン二ナトリウム (200 mg/kg) を蒸留水に溶解又は懸濁し、体重 1 kg あたり 10 ml をマウス (1 群 3 匹以上) の腹腔内に投与したのち、ただちに 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 24 時間後に肝臓、腎臓、小腸及び膵臓を摘出して、その Cd 及び MT 濃度を測定し、Cd のみを投与したものを対照として t 検定を行った。なおアスコルビン酸は和光純薬製を、これ以外の化合物は半井化学製を用いた。

3. オリーブ油及びフィチンの効果 オリーブ油(大矢薬品)は 10 ml/kg の用量でフィチンは蒸留水に懸濁して 500 mg·10 ml⁻¹·kg⁻¹ の用量でマウスの腹腔内に投与した。その 24 時間後に肝臓及び腎臓を摘出して、MT 濃度を測定した。別のマウスを 1 群 8 匹として等用量のオリーブ油又はフィチンを投与し、24 時間後に CdCl₂ 溶液を 10 mg Cd·10 ml⁻¹·kg⁻¹ の用量で皮下注射して 3 日間観察して死亡率を算出し、Cd のみを投与したマウス 8 匹を対照群として χ^2 検定を行った。

4. Cd 及び MT 濃度の測定 臓器中の Cd 及び MT 濃度は前報に従い、⁹⁾ MT は Cd-hem 法で金属濃度は HCl で加水分解した後、日立 208 型原子吸光光度計で測定した。

結果

1. 酸化剤及び還元剤の影響

酸化剤として *o*-ヨードソ安息香酸、臭素酸カリウム

を、還元剤としてアスコルビン酸又はグルタチオンを Cd と併用投与して、肝臓、腎臓、小腸及び膵臓中の Cd 及び MT 濃度を測定した (Fig. 1)。

これらの化合物を投与しても、いずれの臓器においても Cd 濃度に有意な差は認められなかった。但し、グルタチオン投与時の腎臓中の Cd 濃度は約 2 倍に増加した ($p < 0.05$)。

一方、肝臓中の MT 濃度は減少する傾向を示したが

Fig. 1. Effect of Oxidizing and Reducing Agents on the Cadmium and Metallothionein Concentrations in the Mouse Tissues

Ascorbic acid (Asc, 1000 mg/kg), glutathione (Glu, 1000 mg/kg), *o*-iodosobenzoic acid (Iod, 100 mg/kg) or KBrO₃ (KBrO, 100 mg/kg) was injected *i. p.*, and immediately followed by CdCl₂ (3 mg Cd/kg, *s. c.*). The concentrations of cadmium and metallothionein in the tissues were determined 24 h after the injection, and compared to those of the mouse (Con) injected with cadmium alone. Data indicate mean ± S.D. in the A) liver, B) kidney, C) small intestine and D) pancreas of 3 or 4 mice.

□; metallothionein, ●; cadmium.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

有意差は認められなかった ($p>0.05$). 小腸内の MT 濃度はアスコルビン酸投与によってのみ有意に増加した ($p<0.05$).

以上の結果は *in vivo* では臓器中の Cd 及び MT 濃度は酸化剤及び還元剤によって影響されにくいことを示している.

2. キレート剤の効果

種々のキレート剤を Cd と併用投与して、臓器中の Cd 及び MT 濃度に対する影響を検討した (Fig. 2).

Cd 濃度は DDTC の投与によってどの臓器中でも Cd 単独群の約30%に、EDTA 投与によって30%以下に減少した ($p<0.01$). フィチン投与によっては肝臓、腎臓及び小腸中の Cd 濃度が有意に減少した ($p<0.01$ 又は 0.05). プロトポルフィリン投与では腎臓及び小腸中の Cd 濃度は減少した ($p<0.01$ 又は 0.05). クエン酸投与によっては脾臓中の Cd 濃度が増加した ($p<0.05$).

臓器中の MT 濃度については、EDTA を投与するとすべての臓器中の MT 濃度が減少した ($p<0.01$ 又は 0.05). DDTC を投与すると肝臓及び腎臓中の MT 濃度が減少したが ($p<0.01$ 又は 0.05), 脾臓中ではむしろ増加した ($p<0.05$). またフィチンは肝臓及び脾臓中の、プロトポルフィリンは脾臓中の MT 濃度を有意に増加させた ($p<0.05$).

3. Cd による急性毒性に対するオリーブ油及びフィチンの効果

オリーブ油及びフィチンのみを投与して、Cd の標的臓器である肝臓及び腎臓中の MT 濃度を測定した (Table I). これらの化合物を投与すると、肝臓中の MT 濃度は有意に増加した ($p<0.01$).

これらの化合物を前投与して、Cd による急性毒性に対する防禦効果を検討した (Table I). オリーブ油またフィチンを前投与することによって、マウスの Cd による死亡率は有意に減少した ($p<0.01$).

したがって、オリーブ油及びフィチンは肝臓中の MT 濃度を増加させ、Cd による急性毒性を防禦することは明らかである.

Fig. 2. Effect of Chelating Agents on the Cadmium and Metallothionein Concentrations in the Mouse Tissues

Sodium diethyldithiocarbamate (DDTC, 150 mg/kg), sodium citrate (Cit, 1000 mg/kg), phytine (Phy, 500 mg/kg), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, 100 mg/kg) or protoporphyrin disodium salt (Pro, 200 mg/kg) was injected *i.p.*, and immediately followed by CdCl_2 (3 mg/kg, *s.c.*). The concentrations of cadmium and metallothionein in the tissues were determined 24 h after the injection, and compared to those of the mouse (Con) injected with cadmium alone. Data indicate mean $\pm$ S.D. in the A) liver, B) kidney, C) small intestine and D) pancreas of 3 or 4 mice. □; metallothionein, ●; cadmium.

a) $p<0.05$, b) $p<0.01$.

TABLE I. Effect of Olive Oil and Phytine on Acute Cadmium Toxicity

	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}		Mortality ^{b)}		
	Liver	Kidney	1	2	3
None	9.6 $\pm$ 5.5	11.2 $\pm$ 5.5	4/8	8/8	8/8
Olive oil	98.0 $\pm$ 24.0 ^{c)}	17.0 $\pm$ 3.0	2/8	2/8 ^{c)}	2/8 ^{c)}
Phytine	402 $\pm$ 36.7 ^{c)}	19.2 $\pm$ 4.8	0/8	0/8 ^{c)}	1/8 ^{c)}

a) Determined 1 d after the olive oil (10 ml/kg, *i.p.*) or phytine (500 mg/kg, *i.p.*) injection. mean $\pm$ S.D. of 3 mice.

b) Observed for 3 d after the cadmium (10 mg/kg, *s.c.*) injection.

c) $p<0.01$.

考 察

Cd による毒性の発現には単に臓器中の Cd 濃度だけではなく、その化学型が重要な因子として挙げられる。生体中の Cd はその大部分が MT に結合した形で存在すること、³⁾ MT に結合した Cd は毒性が低いこと、³⁾ MT に結合した Cd は特異的に腎臓に取り込まれること¹⁷⁻¹⁹⁾ などから、生体中では MT が Cd の最も重要な化学型であると考えられる。したがって、Cd による毒性の軽減には①生体外への Cd の排泄はもちろん、②重金属の前投与によって Cd による毒性を防禦できることから、⁴⁾ 臓器中の MT 濃度を増加させて、MT に結合していない Cd を減少させることも有効であると推論される。そこで Cd による毒性を軽減する化合物を見出すために、種々の化合物を Cd と併用投与して、臓器中の Cd と MT 濃度を測定した。臓器としては Cd がよく蓄積する肝臓、腎臓、小腸及び脾臓を選び、化合物としてはキレート剤及び食品中の成分を中心にして検討した。

生体中の金属を排泄するためにキレート剤が用いられている。Cd についてもキレート剤によって排泄が促進されることが報告されている。¹⁰⁻¹⁶⁾ そこでキレート剤を Cd とマウスに併用投与して、その効果を検討した。この結果、DDTC 及び EDTA の投与によってすべての臓器中の Cd 濃度は減少した (Fig. 2)。したがって、これまでの報告と同様にこれらのキレート剤は Cd の排泄の促進に有効であることは明らかである。しかし、各臓器中の Cd 濃度の減少率はほぼ一定であり、特定の臓器中のみの Cd を減少させるキレート剤は見出せなかった。また肝臓、腎臓及び小腸中の MT 濃度の増減は Cd 濃度にほぼ対応していた。ゆえに実験条件を考慮すると、Waalkes ら²⁰⁾ の報告のように、これらのキレート剤は臓器中から Cd を排泄するのではなく、主として血液中の Cd を排泄することによって臓器に蓄積する Cd を減少させていると推定される。

2,3-dimercaptopropanol (BAL) が Cd の排泄に有効であるとの Cherian²¹⁾ の報告を除くと、Cd が臓器中に蓄積したあとではキレート剤を投与してもほとんど無効である。¹⁰⁻¹⁵⁾ 臓器中の Cd は MT と強固に結合しているので生体外へ排泄しにくいことも考えられる。そこで臓器中の MT 濃度を变化させる試みとして、*in vitro* では *o*-ヨードソ安息香酸の添加によって Cd は

MT から完全に脱離したので、²²⁾ 酸化剤及び還元剤の影響について検討した。グルタチオン投与によっては腎臓中の Cd 濃度が増加したにもかかわらず、MT 濃度の増加は見られなかった (Fig. 1)。臓器中の Cd 濃度と MT 濃度には正の相関が見られるので、²³⁾ この原因はシステイン投与の場合と同様に、²⁴⁾ 取り込まれた Cd によって MT の生合成が抑制されたことによると考えられる。したがってグルタチオンは MT に結合していない Cd を増加させることによって、Cd による毒性をむしろ増強すると推定される。この他の化合物が臓器中の Cd 及び MT 濃度に影響しなかった原因は、*in vitro* の場合と異なり、これらの酸化剤あるいは還元剤が臓器中で MT に作用するのに十分な濃度に達していなかったからであろう。あるいはこれらの化合物が臓器中の MT 以外の成分と反応しやすいのかもしれない。

生体内の Cd の半減期は報告によって差があるが、10—30年と長い。この原因として、臓器中の Cd の大部分が MT に結合していることも考えられる。しかし、MT から脱離した Cd も脾臓からは排泄されにくいという興味ある報告²⁵⁾ を考慮すると、Cd は MT に結合しているので体外へ排泄されにくいとは断定できない。したがって、Cd による毒性防禦の観点からは標的臓器中の MT 濃度を高める方法も有効であると考えられる。たとえば、フィチンを Cd と併用投与した群では Cd 単独群よりも肝臓中の MT 濃度が有意に増加することを見出した (Fig. 2)。そこで、オリーブ油又はフィチンのみを投与した。この結果、オリーブ油では有意に、フィチンでは顕著に肝臓中の MT 濃度が増加していた。更にオリーブ油あるいはフィチンを前投与することによって Cd によるマウスの死亡率を有意に減少させることができた (Table I)。以上の結果は、臓器中の MT 濃度を増加させることも Cd 中毒の防禦に有効であることを示唆している。

種々の化合物を高用量で投与したにもかかわらず、MT 濃度を顕著に変化させる化合物はキレート剤を除いて見出せなかった。しかし、オリーブ油及びフィチンが Cd による急性毒性の防禦に有効であることを新たに見出した。したがって、本実験に用いた化合物を併用投与して Cd 濃度だけでなく MT 濃度も測定する方法は Cd による毒性を修飾する因子あるいは防禦する化合物のスクリーニングに応用できると考えられる。

引用文献及び注

- 1) L. Friberg, M. Piscator, G.F. Nordberg, "Cadmium in the Environment," 2nd ed., CRC PRESS, Cleveland, 1974.
- 2) 厚生省, 富山県におけるイタイイタイ病に関する厚生省の見解, 1968年5月8日.
- 3) J.H.R. Kagi, M. Nordberg (eds.), "Metallothionein," *Experientia Supplementum* 34, Birkhäuser Verlag, Basel, 1979.
- 4) H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **8**, 184 (1970).
- 5) M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi, T. Suda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340 (1974).
- 6) 小野坂敏見, 川原和司, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 312 (1983).
- 7) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 407 (1983).
- 8) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **31**, 133 (1985).
- 9) 関 庚善, 八田晶子, 福原千佳子, 小野坂敏見, 田中慶一, 日本薬学会第105年々会, 金沢, 1985年4月.
- 10) G.F. Nordberg, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 213 (1984).
- 11) B. Engström, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 219 (1984).
- 12) C.D. Klaassen, M.P. Waalkes, L.R. Cantilena, Jr., *Environ. Health Perspect.*, **54**, 233 (1984).
- 13) M.G. Cherian, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 243 (1984).
- 14) O. Andersen, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 249 (1984).
- 15) V. Eybl, J. Sykora, J. Koutenský, D. Caisová, A. Schwartz, F. Mertl, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 267 (1984).
- 16) 児島昭次, 浄住護雄, 松本幸江, 山本美登, 中村千鶴子, 新保和子, 衛生化学, **23**, 43 (1977).
- 17) K. Tanaka, K. Sueda, S. Onosaka, K. Okahara, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 258 (1975).
- 18) M.G. Cherian, Z.A. Shaikh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 863 (1975).
- 19) M. Nordberg, G.F. Nordberg, *Environ. Health Perspect.*, **12**, 103 (1975).
- 20) M.P. Waalkes, J.B. Watkins, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **68**, 392 (1983).
- 21) M.G. Cherian, *Nature* (London), **287**, 871 (1980).
- 22) 小野坂敏見, 田中慶一, 末田香里, 岡原國男, 衛生化学, **22**, 206 (1976).
- 23) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).
- 24) 小野坂敏見, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 投稿準備中.
- 25) D.M. Templeton, M.G. Cherian, *Toxicology*, **29**, 251 (1984).