ヒト臓器中のメタロチオネイン濃度について

小野坂敏見,^a 関 庚善,^a 福原千佳子^a

田中慶一,^a 田代真一,^b 古田陸廣^b

清水一良,^b 安富 徹^b

神戸学院大学栄養学部,^a 国立京都病院^b

Concentration of Metallothionein in Human Tissues

SATOMI ONOSAKA,^a KYONG-SON MIN,^a CHIKAKO FUKUHARA,^a

KEIICHI TANAKA,^a SHIN-ICHI TASHIRO,^b ICHIRYO SHIMIZU^b

MUTSUHIRO FURUTA^b and TOHRU YASUTOMI^b

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,^a Igawadani-cho,

Nishi-ku, Kobe 673, Japan and Kyoto National Hospital,^b

Fukakusa, Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan

(Received May 7, 1985)

A concentration of metallothionein in the human tissues was determined and the following results were obtained.

1. The concentration of metallothionein in the liver in eight of nine cases was higher than 100 $\mu\text{g/g}$. Metallothionein in the liver was Zn, Cu, Cd-thionein. A strong, positive relationship was found between zinc and metallothionein concentrations ($r=0.987$, $p<0.01$). The regression equation was $\text{MT} (\mu\text{g/g}) = -168 + 14.5 \times \text{Zn} (\mu\text{g/g})$.
2. Mean $\pm$ S.D. of the concentration of metallothionein in the kidney was $933 \pm 177 \mu\text{g/g}$. Metallothionein in the kidney was abundant in cadmium. The most part of cadmium in the kidney was bound to metallothionein.
3. Although the concentration of metallothionein was high in one case of pancreas (168 $\mu\text{g/g}$), the concentration of metallothionein in the lung, heart or spleen was less than 20 $\mu\text{g/g}$.

These results indicate that the concentration of metallothionein in the human liver and kidney was remarkably higher than that in the mouse or rat tissues.

Keywords—metallothionein; cadmium; zinc; liver; kidney; human

緒 言

Metallothionein (MT) は Cd, Zn 及び Hg などの重金属を結合している分子量約 7000 の蛋白質である。¹⁾ この MT は Cd や Zn などの金属を投与することによって、あるいは種々のストレスなどによって主として肝臓及び腎臓中で誘導することができる。^{2,3)} MT の生理的意義としては Cd や Hg などの重金属の解毒及び Zn や Cu などの必須金属の取込みなどが報告されている。^{4,5)} このような MT による作用は臓器中のその濃度に依存していると推定される。著者らも Cd 投与によるマウスの死亡率と Ca 投与によって肝臓中に予め誘導さ

れた MT には負の相関があることを認めた。⁶⁾ また過剰 Zn 投与時には、血漿中の Zn 濃度は肝臓中の Zn-MT 濃度と負の相関があることを示した。⁷⁾ しかし、ヒト臓器中の MT 濃度についての定量的な報告はほとんど見当たらない。

著者らは肝ガン患者の臓器中の MT 濃度を測定し、非ガン部組織ではマウスやラットよりも高く、ガン部組織では非ガン部組織よりも顕著に減少することを明らかにした。⁸⁾ 今回、肝臓ガン患者以外の肝臓中の MT 濃度を測定するとともに、腎臓などの臓器中の MT を定量したので報告する。

実験方法

1. 試料 試料は国立京都病院外科で糖尿病, 肝硬変, 肝炎及び甲状腺ガンの患者から得た. 患者が特別に金属で汚染された経歴は見当らない. 試料は測定時まで -70°C 以下で保存した.

2. MT 及び金属の測定 MT 濃度は Cd-hem 法によって, 金属は臓器のホモジネートを加水分解してのち前報に従って測定した.^{9,10)}

結果

1. 臓器中の MT と金属濃度

臓器中の MT, Zn, Cd 及び Cu の濃度を測定した (Table I).

肝臓中の MT 濃度は 686 及び 1181 $\mu\text{g/g}$ の高い 2 例及び 24 $\mu\text{g/g}$ の低い 1 例を除くと他の 6 例は 100—300 $\mu\text{g/g}$ であった. 腎臓中の MT 濃度はいずれも高く, その平均と標準偏差は $933 \pm 177 \mu\text{g/g}$ であった. 脾臓中の MT 濃度も 168 $\mu\text{g/g}$ と高い値を示した. しかし, 肺, 心臓及び脾臓中の MT 濃度はいずれも低く, 50 $\mu\text{g/g}$ 以下であった.

臓器中の金属濃度を測定すると, 肝臓中の MT 濃度が高かった 2 例の Zn 濃度は 60.0 及び 91.8 $\mu\text{g/g}$ と高い値を示した. Cd 濃度はすべて 5 $\mu\text{g/g}$ 以下であった. 腎臓中の Zn 濃度は他の臓器に比べて高く 26.4—45.6

TABLE I. Concentration of Metallothionein and Metals in the Human Tissues

Tissue	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$)	Metals ($\mu\text{g/g}$)		
		Zn	Cd	Cu
Liver	686	60.0	1.8	7.2
	1181	91.8	3.6	8.4
	288	24.0	2.4	1.8
	278	25.2	2.4	2.4
	197	29.4	0.6	3.0
	216	27.0	1.8	29.4
	24	21.6	1.8	3.0
	134	19.2	3.6	2.4
	115	19.8	0	22.8
Kidney	734	26.4	27.6	1.8
	936	36.0	49.2	1.8
	1128	45.6	37.8	1.2
Pancreas	168	22.8	1.8	— ^{a)}
Lung	14.4	10.2	0	0.6
Heart	14.4	18.0	0	2.4
Spleen	9.6	15.6	0.6	1.2
	9.6	14.5	0.6	1.2

a) not determined.

$\mu\text{g/g}$ であり, Cd 濃度も 27.6—49.2 $\mu\text{g/g}$ と高かった.

2. ゲルろ過

MT の結合金属を明らかにするためにセファデックス G-75 を用いて肝臓及び腎臓のいくつかの試料の上清についてゲルろ過を行った (Fig. 1).

MT 濃度が 686 及び 1181 $\mu\text{g/g}$ と高かった 2 例について肝臓中の MT 画分の Zn: Cd: Cu のモル比を算出すると, 1.00:0.06:0.12 及び 1.00:0.06:0.09 であった. したがってこの MT は Zn, Cu, Cd-MT である. また MT 画分の Zn は肝臓中の Zn の 42 及び 40% であった. 3 例の腎臓では MT 画分の Zn を 1.00 とすると Cd はモル比でそれぞれ 1.03, 1.60 及び 0.67 であった. ゆえに腎臓中の MT は肝臓中の MT と異なり, Zn 以外に Cd を結合していることは明らかである. また MT 画分の Cd は腎臓中の Cd の 98, 69 及び 81% であり高

Fig. 1. Gel Filtration of Human Liver and Kidney Supernatant

Liver or kidney homogenate was centrifuged at $12000 \times g$ for 20 min, and 2.0 ml of the supernatant were applied on the Sephadex G-75 superfine column ($1.8 \times 45 \text{ cm}$) equilibrated with 30 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The sample was eluted with the same buffer, and 4.4 ml fractions were collected. The concentrations of Zn, Cd and Cu in each fraction were determined directly by the use of a Hitachi 208 atomic absorption spectrophotometer. The concentration of metallothionein in the liver was 1181 $\mu\text{g/g}$, and that in the kidney was 734 $\mu\text{g/g}$ by the Cd-hem method.

○: Zn, ●: Cd, ▲: Cu.

Fig. 2. Relationship between Zinc and Metallothionein Concentrations in Human Liver

□; diabetes, ■; cancer of thyroid.
▲; cirrhosis, ▽; hepatitis.
 $y = -168 + 14.5x$ ($r = 0.987$).

分子画分中に Cd のピークは見られなかった。なおいずれの試料でも MT 画分に Cu のピークは認められなかった。

3. 肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度との相関性

肝臓中の MT は主として Zn を結合していたので、肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度について相関分析と回帰分析を行った (Fig. 2)。

肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度の単相関係数は 0.987 となり強い正の相関を示した ($p < 0.01$)。そこで肝臓中の Zn 濃度を x ($\mu\text{g/g}$)、MT 濃度を y ($\mu\text{g/g}$) として 1 次回帰式を求めると、 $y = -168 + 14.5x$ となった。なお肝臓中の Cd 濃度と MT 濃度、あるいは Cu 濃度と MT 濃度には有意な単相関は認められなかった。

考 察

ヒトの肝臓及び腎臓中の MT についてはいくつかの報告がこれまでに見られる。¹¹⁻¹⁷⁾ しかしその濃度については、ほとんど論及されていない。著者らはヒト肝臓のガン部及び非ガン部組織中の MT 濃度を測定して、ヒト肝臓中の MT 濃度は他の動物よりも高いことを示した。⁸⁾ これまで MT について実験動物を用いて多くの報告がなされている。しかし、ヒト臓器中の MT 濃度に関する定量的な報告が少ないこともあって、実験動物の臓器中の MT 濃度とヒト臓器中の MT 濃度との差についてはほとんど考慮されていない。MT は重金属による毒性の防禦や必須金属の代謝に重要な役割を果たしている。^{4,5)} したがって、ヒトと動物との臓器中の MT 濃度の差異を明確にすることは毒性学上あるいは栄養学的に重要であると考えられる。そこで、入手し得た種々の

ヒト臓器中の MT 濃度を測定した (Table I)。

肝臓中の Zn 濃度は肝ガンや肝硬変などの病変に伴って低下することが知られている。¹⁸⁻²⁰⁾ しかし、その原因については明らかにはされていない。著者らは先に肝ガンの患者の肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度には正の相関が見られることを報告した。⁸⁾ そこで本実験で得たすべての肝臓についても Zn 濃度と MT 濃度の相関を検討した。試料は肝硬変や糖尿病などの患者から得たので肝臓の生理的環境が異なっているにもかかわらず、肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度は $r = 0.987$ と強い正の相関を見出した (Fig. 2)。したがって、肝臓中の病変に伴う Zn 濃度の変動は MT 濃度の変化と密接な関連があることは明らかである。

肝臓中では Zn 濃度と MT 濃度には強い正の相関が見られ、その 1 次回帰式は $y = -168 + 14.5x$ であった (Fig. 2)。この回帰式は肝臓のガン部および非ガン部組織から得た回帰式 $y = -129 + 13.1x$ とほぼ一致する。⁸⁾ 正常人の Zn 濃度の平均値は報告によって差があるが、48, 76.6, 78 あるいは $55 \mu\text{g/g}$ である。¹⁸⁻²¹⁾ 正常人の肝臓を入手することができなかったため、その Zn 濃度を $50 \mu\text{g/g}$ と仮定してこの値を 1 次回帰式 $y = -168 + 14.5x$ に代入すると、正常人の MT 濃度は $557 \mu\text{g/g}$ となる。この値と比較すると 2 例は Zn 及び MT 濃度ともに正常人の範囲であるが、7 例の肝臓中の MT 濃度は低い (Table I)。この理由としてはこれらの肝臓が正常人のものではないことによると推察される。事実、7 例中 5 例は肝硬変及び肝炎の患者から得たものであり、これらの結果は肝臓の病変によって Zn 濃度だけでなく MT 濃度も変動することを強く示唆している。しかし成熟したマウスやラットの肝臓中の MT 濃度は $50 \mu\text{g/g}$ 以下であり、¹⁰⁾ ヒトではこれらの病変があってもヒトの肝臓中の MT 濃度は他の動物よりも高いと推定される。

本実験で得た肝臓の MT 濃度は 1 例を除いて、 $100 \mu\text{g/g}$ 以上であった (Table I)。Ca 投与によって肝臓中の MT 濃度を $100 \mu\text{g/g}$ にすると、マウスでは Cd による死亡率を有意に減少することができた。⁶⁾ したがって、ヒトの肝臓中の MT 濃度が高いことの原因及び生理的意義は不明であるが、ヒトは Cd などの急性毒性に対して他の動物よりも抵抗性が強いと推論される。また肝臓中の MT は肝臓への Zn の取り込みや血漿中の Zn 濃度のホメオスタシスにも関与しているため、^{5,7)} この観点からの検討も必要であろう。

ヒト腎臓中でも MT 濃度が高かったが、その MT は肝臓中のものとは異なり、Cd を多く結合していた

(Fig. 1). その理由として, ①腎臓中の Cd 濃度は MT を誘導するのに十分な濃度であったので,¹⁰⁾ 肝臓中の MT とは異なり, Cd によって誘導された, ②疾病の影響, ③ MT に結合していた Zn と Cd との置換が考えられる. ヒト腎臓中の MT 濃度が高いことの意義は不明である. しかし, 腎臓中の MT が Hg によるマウスの急性中毒や MT に結合した Cd による腎障害を軽減するので,^{22,23)} ヒトの腎臓中の MT もこのような重金属による毒性を防禦するのに役立っていると考えられる. ゆえに腎臓中の Cd の大部分が MT に結合している型で存型することは (Fig. 1), ヒトにおいても腎臓中の MT は Cd や Hg による毒性を防禦するのに役立っていることを示している.

肝臓及び腎臓以外の臓器では, 1 例ではあるが脾臓中の MT 濃度が高いことを見出した. しかし, 前立腺を

除くとヒトの他の臓器中の Zn 濃度はそれほど高くはない.²¹⁾ したがって, 肝臓及び腎臓以外の臓器中の MT 濃度はヒトにおいてもマウスやラットと著明な差はないであろう. しかし, マウスやラットの肝臓及び腎臓中の MT 濃度はヒトより著しく低いことは明らかであり, MT に関する研究はこれらの動物の肝臓や腎臓を用いていることが多いので, MT に関する結果をヒトに適用するには慎重に行う必要がある.

ヒトの血漿中及び尿中の MT 濃度は Cd などの重金属による汚染によって増加することが報告されている.^{24,25)} 肝臓ばかりでなくヒト腎臓中の MT 濃度が高いという結果は, その機序の解明に役立つであろう. 今後, 例数を増やしてヒトの肝臓や腎臓中の MT 濃度が高い原因及び意義について更に検討を加えたい.

引用文献及び注

- 1) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 2) M. Piscator, *Nord. Hyg. Tidskr.*, **45**, 76 (1964).
- 3) S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whanger, P.H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **254** E282 (1978).
- 4) Y. Suzuki, H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **12**, 141 (1974).
- 5) M.P. Richards, R.J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1215 (1975).
- 6) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 407 (1983).
- 7) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **30**, 371 (1984).
- 8) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 田代真一, 古田睦廣, 安富 徹, 衛生化学, **30**, 173 (1984).
- 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) P. Pulido, J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *Biochemistry*, **5**, 1768 (1966).
- 12) J.M. Wiśniewska-Knypl, J. Jabłońska, Z. Myślak, *Arch. Toxikol.*, **28**, 46 (1971).
- 13) Z.A. Shaikh, O.J. Lucis, *Arch. Environ. Health*, **24**, 419 (1972).
- 14) R.O.H. Bühlur, J.H.R. Kägi, *FEBS Lett.*, **39**, 229 (1974).
- 15) T.L.M. Syversen, *Arch. Environ. Health*, **30**, 158 (1975).
- 16) J.R. Riordan, V. Richards, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5380 (1980).
- 17) M. Sato, Y. Takizawa, *Toxicol. Lett.*, **11**, 269 (1982).
- 18) K.B. Olson, G.E. Heggen, C.F. Edwards, *Cancer*, **11**, 554 (1958).
- 19) 荒地秀明, 奈医誌, **23**, 195 (1972).
- 20) M.C. Kew, R.C. Mallett, *Br. J. Cancer*, **29**, 80 (1974).
- 21) 日本化学会訳編, “微量元素,” 第1版, 丸善, 東京, 1975, p.209.
- 22) 小山祐子, 中戸川邦子, 永沼 章, 井村伸正, 小野坂敏見, 田中慶一, 第54回日本衛生学会総会, 米子, 1984年4月.
- 23) 関 庚善, 八田晶子, 福原千佳子, 小野坂敏見, 田中慶一, 大田憲哉, 岡田芳男, 日本薬学会第105年々会, 金沢, 1985年4月.
- 24) C.C. Chang, R.J. Vander Mallie, J.S. Garvey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 94 (1980).
- 25) C. Tohyama, Z.A. Shaikh, *Fundam. Toxicol.*, **1**, 1 (1980).