衛生化学
EISEI KAGAKU
32 (6) 455-459 (1986)

マウスの急性カドミウム中毒に対する肝臓中メタロチオネインの
役割 (第4報) 絶食では防御効果が無い

小野坂敏見, 関庚善, 大石加保里, 藤田由紀, 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. IV. No Preventive Effect of Starvation**

SATOMI ONOSAKA, KYONG-SON MIN, KAHORI OO-ISHI,
YUKI FUJITA and KEIICHI TANAKA
*Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,
Igawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 673, Japan*

(Received July 31, 1986)

The concentration of metallothionein in the mouse tissues was determined after starvation, and the effect of starvation against acute cadmium toxicity was examined. The concentration of metallothionein increased significantly in the liver ($101 \pm 30 \mu\text{g/g}$) and pancreas ($595 \pm 94 \mu\text{g/g}$) 24 h after starvation. The starved mice were injected s.c. with cadmium at the dose of 10, 8 or 7 mg/g, and observed for 3 or 2 d. The mortality of starved mice were not lower than that of control. The increase of the metallothionein concentration in the liver after sham-operation was also not effective against acute cadmium toxicity. At 8 h after the cadmium injection, the concentration of metallothionein in the liver of starved mice was significantly lower than that of mice pre-injected with olive oil.

These results indicate that acute cadmium toxicity in starved or wounded mice can not be prevented even if the concentration of metallothionein in the liver increased.

Keywords—starvation; metallothionein; liver; mice; acute cadmium toxicity

緒 言

高等動物のメタロチオネイン (以下 MT と略す) は、61分子のアミノ酸で構成されているタンパク質である。¹⁾ そのアミノ酸組成にはチロシンやトリプトファンなどの芳香族アミノ酸が見られないが、タンパク質1モル当たりシステイン残基を20モル含んでいるという特徴がある。¹⁾ MT はこのシステインを介して Cd, Hg や Zn などの重金属と強く結合している。²⁾ 更に MT の特徴として、種々の化合物あるいはストレスによってその生合成が主として肝臓や腎臓で誘導されることが挙げられる。MT の誘導物質としては Cd, Hg, Zn 及び Bi などの金属、モノヨード酢酸などのアルキル化剤、あるいはデキストランの誘導体が知られている。³⁻⁸⁾ MT を誘導するストレスとしては、絶食や寒冷暴露などが報告されている。^{9,10)}

生体中の MT の生理的意義としては、Cd や Hg による毒性に対する防御機構として作用することが認められ

ている。^{1,11)} また、放射線による障害を軽減することも最近報告されている。^{12,13)}

このように生体中で重要な役割を担っていると考えられる MT について、著者らも種々の化合物を投与してその誘導能を観察した。そして、シクロヘキシミドの併用投与によって肝臓中の MT 合成を阻害すると Cd による毒性が増すこと、Ca 投与によって肝臓中の MT 濃度をあらかじめ増加させておくと Cd による死亡率が低下することなどを認め、肝臓中の MT によって Cd による急性中毒が防御されることを明らかにした。¹⁴⁻¹⁶⁾ しかし、MT を誘導するには化合物の投与量が致死量に近いなどの厳しい条件が必要な場合もあり、絶食によっても肝臓中の MT 濃度が増加することを考慮すると、食餌量の減少に起因した肝臓中 MT の誘導による影響を否定できない。⁹⁾ したがって、絶食時の臓器中の MT 濃度を明確にすることは MT の誘導機構の解明などに役立つと考えられるが、詳細な検討結果は見当らない。

そこでマウスを絶食させたところ、MT 濃度は肝臓中で増加した。故に、絶食によって Cd による急性中毒を防御できると考えられるが、その効果が無いという従来の結果とは相反する現象を認めたので報告する。

実験方法

1. 動物 体重約 30 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、1 週間以上馴化のため飼育した後、体重 33—38 g のものを以下の実験に用いた。飼料は市販の固形飼料 MF (オリエンタル酵母) を用い、水 (水道水) は自由に摂取させた。以下の実験は通常 14:00—15:00 に開始した。

2. 絶食後の臓器中 MT 濃度 12 匹のマウスを 1 群 3 匹とし、絶食 0, 24, 48 及び 72 時間後に各群のマウスの肝臓、腎臓、小腸及び脾臓を摘出して MT 濃度を測定した。

3. 肝臓中の MT 濃度に対する食餌の影響 マウスを 1 群 3 匹として、市販の固型飼料の代わりに市販の椎茸、こんにゃく、きゅうり、さつま芋、角砂糖、いか (燻製)、チーズ、凍豆腐、卵白 (ゆで)、卵黄 (ゆで)、ピーナッツ又は牛脂をそのまま与え、自由に摂取させた。24 時間後に肝臓を摘出し、MT 濃度を測定した。

4. 急性 Cd 中毒に対する絶食の効果 マウスを 1 群 7—10 匹とし、24 時間絶食させた後、塩化カドミウム溶液を 10, 8 又は 7 mgCd $\cdot$ 10 ml $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ の用量で皮下注射した。食餌は Cd 投与後直ちに市販の固型飼料を与え、48 又は 72 時間観察して死亡率を算出し、非絶食群のマウスに対して χ^2 検定を行った。

5. Cd による MT 合成に対する絶食の影響 9 匹のマウスを 1 群 3 匹として無処置群、絶食群及びオリーブ油群に分けた。絶食群は Cd 投与前 24 時間から投与直前まで絶食させた。オリーブ油投与群はオリーブ油 (日局) を Cd 投与 24 時間前に 10 ml/kg の用量で腹腔内に投与した。各群のマウスに塩化カドミウム溶液を 8 mgCd $\cdot$ 10 ml $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ の用量で皮下投与し、8 時間後に肝臓を摘出して Cd 及び MT 濃度を測定した。

6. シャムオペレーションの効果 9 匹のマウスの腹部を約 1 cm 開腹し、直ちに縫合した。24 時間後に 3 匹のマウスの肝臓及び脾臓を摘出し、MT 濃度を測定した。残りのマウス及び無処置のマウス (8 匹) には塩化カドミウム溶液を 8 mgCd $\cdot$ 10 ml $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ 用量で皮下投与し、3 日間観察した。そして、死亡率を算出して χ^2 検定を行った。

7. MT 及び Cd 濃度の測定 臓器に 5 倍量の 0.25 M sucrose を加え、ホモジナイズした。このホモジネート 0.5 ml に等量の硝酸-過塩素酸混液 (4:1) を加え、湿

式灰化後日立 208 型 原子吸光度計を用い直接噴霧法で Cd 濃度を測定し、臓器中の Cd 濃度を算出した。残りのホモジネートは前報に従って処理して、臓器中の MT 濃度を Cd-hem 法で測定した。^{17,18)}

結果

1. 絶食後の臓器中 MT 濃度

マウスを絶食させて、臓器中の MT 濃度を測定した (Fig. 1)。

Fig. 1. The Concentration of Metallothionein in Mouse Tissues after Starvation

Twelve mice were starved, and the concentration of metallothionein in the tissues was determined by the Cd-hem method 24, 48 and 72 h after the starvation. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three mice.

●: liver, ■: kidney, ▽: small intestine, ▲: pancreas.

肝臓中の MT 濃度は 24 時間後には 101 ± 30 μ g/g, 48 時間後には 59 ± 15 μ g/g と有意に増加した ($p < 0.01$). 脾臓中の MT 濃度も 72 時間後まで有意に増加した ($p < 0.01$ 又は 0.05). しかし、腎臓及び小腸中では有意な増加は見られなかった。

2. 肝臓中の MT 濃度に対する食餌の影響

市販の固型飼料の代わりに種々の食品をマウスに与え、肝臓中の MT 濃度に対する影響を検討した (Table I).

絶食群と比較すると、どの食品を与えた群でも肝臓中の MT 濃度が減少する傾向が認められた。しかし、有意に減少したのはチーズ及び凍豆腐摂取群のみであった ($p < 0.05$).

3. Cd 急性毒性に対する絶食の効果

肝臓中の MT 濃度が高いと、Cd 投与による死亡率を低下させることができる。¹⁴⁻¹⁶⁾ 絶食によっても Fig. 1 のように肝臓中の MT 濃度が増加した。そこで、Cd による急性毒性に対する絶食の効果を検討した (Table II).

TABLE I. Effect of Various Diets on the Metallothionein Concentration in the Mouse Liver

Diet ^{a)}	Metallothionein ^{b)} ($\mu\text{g/g}$ liver)
Starvation	103 $\pm$ 48
Shiitake (raw)	82 $\pm$ 5
Devil's tongue (raw)	77 $\pm$ 22
Cucumber (raw)	54 $\pm$ 27
Sweet potato (raw)	38 $\pm$ 33
Cube sugar	38 $\pm$ 8
Squid (smoked)	72 $\pm$ 35
Process cheese	16 $\pm$ 8 ^{c)}
Kori-dofu (raw)	11 $\pm$ 6 ^{c)}
Egg white (boiled)	57 $\pm$ 25
Egg yolk (boiled)	74 $\pm$ 48
Peanuts	50 $\pm$ 11
Beef tallow (raw)	75 $\pm$ 28
Commercial diet	14 $\pm$ 5 ^{c)}

a) Mice were fed the diet for 24 h before MT determination.

b) Data indicate mean $\pm$ S.D. of three mice.

c) $p < 0.05$, compared to starvation.

TABLE II. No Preventive Effect of Starvation on Acute Cadmium Toxicity

Treatment	Mortality ^{a)}		
	1 d	2 d	3 d
Cd (10 mg/kg)	7/8	8/8	8/8
Starvation ^{b)} + Cd (10 mg/kg)	6/8	7/8	8/8
Cd (8 mg/kg)	7/10	10/10	10/10
Starvation ^{b)} + Cd (8 mg/kg)	5/7	6/7	7/7
Cd (7 mg/kg)	4/7	5/7	
Starvation ^{b)} + Cd (7 mg/kg)	7/7	7/7	

a) Mice were observed for 3 or 2 d after the Cd injection to calculate mortality.

b) Mice were starved for 24 h and were injected subcutaneously with Cd. Mice were fed a commercial diet after the Cd injection.

Cd を 10 mg/kg の用量で投与すると、絶食群と対照群との死亡率には有意な差を見出せなかった。Cd を 8 又は 7 mg/kg の用量で投与した場合にも絶食による効果は見られなかった。したがって、絶食時に増加する肝臓中の MT によっては急性 Cd 中毒は防御できないと考えられる。

4. Cd による MT 合成に対する絶食の影響

Cd 投与前に絶食させ、あるいはオリブ油を腹腔内に前投与して、致死量の Cd 投与後の肝臓中 Cd 及び MT 濃度を測定した (Table III)。

肝臓中の Cd 濃度を無処置群と比較すると、絶食群もオリブ油前投与群にも有意な差は認められなかった。

肝臓中の MT 濃度については、オリブ油前投与群は無処置群よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。しかし、絶食群では 224 $\pm$ 23 $\mu\text{g/g}$ であり、無処置群とはほぼ同じ濃度であった。

5. シャムオペレーションの効果

ストレスの 1 種であるシャムオペレーションを行い、その効果を検討した (Table IV)。

肝臓中の MT 濃度はシャムオペレーションによって

TABLE III. Effect of Starvation on Metallothionein Concentration in Mouse Liver after Cadmium Injection

Treatment	Cd ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	MT ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)
None	39.4 $\pm$ 3.9	238 $\pm$ 14
Starvation ^{b)}	41.0 $\pm$ 3.3	224 $\pm$ 23
Olive oil ^{c)}	32.4 $\pm$ 3.7	438 $\pm$ 60 ^{d)}

a) Concentrations of Cd and MT in the liver were determined 8 h after the Cd injection at the dose of 8 mgCd/kg. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three mice.

b) Mice were starved for 24 h before Cd injection. Mice were fed a commercial diet after the injection.

c) Mice were injected intraperitoneally prior 24 h to the Cd injection at the dose of 0.3 ml/kg.

d) $p < 0.01$, compared to the non-treated group.

TABLE IV. Effects of Stresses on the Metallothionein Concentration and Acute Cadmium Toxicity

Treatment	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}		Mortality ^{b)}		
	Liver	Pancreas	1 d	2 d	3 d
Cd	14 $\pm$ 5	251 $\pm$ 111	3/8	3/8	4/8
Sham operation ^{c)} + Cd	133 $\pm$ 40 ^{d)}	213 $\pm$ 10	3/6	4/6	4/6

a) Mice were sacrificed just before the Cd injection. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three mice.

b) Mice were observed for three days after the Cd injection (8 mg/kg, s.c.) to calculate the mortality.

c) Mice were sham-operated 24 h before the Cd injection.

d) $p < 0.01$.

133±40 µg/g と有意に増加したが ($p<0.01$), 脾臓中の MT 濃度には有意差は認められなかった。

肝臓中の MT 濃度がシャムオペレーションによって平均 133 µg/g に達したので, 致死量の Cd を投与して, 対照群と死亡率を比較した。しかし, 有意な死亡率の減少は認められなかった。

考 察

正常マウスの臓器中 MT 濃度を Cd-hem 法で測定したところ, 肝臓では 14.4±4.8 µg/g であったが, 脾臓中では 254±111 µg/g と高いことを見出した (Fig. 1)。幼弱ラットの肝臓中の MT 濃度が高いことは報告されているが,¹⁹⁾ 無処置のマウス脾臓中の MT 濃度がこのように高いとの報告は見当らない。また, 脾臓中の MT 濃度が増加することは Cd 及び Zn 投与時以外は報告されていない。²⁰⁾ 故に, 厳密な同定が必要であるが, 正常マウスは脾臓中の MT の役割を研究する上で有用であるかもしれない。

絶食によって肝臓中の MT 濃度が増加することが報告されている。⁹⁾ 本実験はその結果を支持した。すなわち, 絶食 1 日後の肝臓中の MT 濃度は 101±30 µg/g であり, 有意に増加していた ($p<0.01$) (Fig. 1)。更に, 肝臓ばかりでなく, 脾臓中에서도 595±94 µg/g と有意に増加することを新たに見出した ($p<0.01$) (Fig. 1)。

MT が誘導される臓器は投与金属によって異なるので, 諸器中の MT 濃度を測定することによって MT が誘導された原因を推定できる。²⁰⁾ 絶食時には肝臓と脾臓中の MT 濃度が増加するので (Fig. 1), 両臓器中の MT 濃度を測定して比較すれば, MT 濃度の増加が絶食に起因するか否かを判断できる。例えば, 著者らは Ca, オリブ油及びフィチンなどの食品成分によって肝臓中の MT 濃度が増加することを報告した。^{15,21)} しかし, これらの化合物を投与しても脾臓中の MT 濃度は増加しなかったため, 絶食状態になることによって MT が誘導されたのではないと考えられる。また, シャムオペレーションによっても肝臓中の MT は 133±40 µg/g と絶食時とほぼ同濃度に増加したが, 脾臓中では無処置群と比較して有意な増加は見られなかった (Table IV)。したがって, シャムオペレーション時も絶食時とは異なった機構で肝臓中の MT 濃度が増加すると推定される。

絶食によって MT が増加した原因を解明する目的で, 市販の飼料の代わりに種々の食品を与え肝臓中の MT 濃度を測定した (Table I)。食品成分表²²⁾ より求めた食品中のタンパク質, 脂質及び糖質の含量 (%) を説明変数, 肝臓中の MT 濃度を目的変数として多変量解析を行った (Table I)。そして, タンパク質含量と MT 濃

度に有意な単相関を認めた。また, MT 濃度とタンパク質含量の偏相関係数及び MT 濃度と糖質含量の偏相関係数はそれぞれ -0.607 及び -0.510 であった。以上の結果は, 絶食による肝臓中の MT 濃度の増加はタンパク質又は糖質の摂取不足に起因することを暗示している。しかし, 個々のマウスの実際の食餌の摂取量を測定していないので, この点については本実験は予備的なものであり, 更に検討する必要がある。

MT の生理的な役割として最も研究されているのは, 重金属による毒性に対する防御作用である。例えば, Cd を前投与することによって MT を誘導しておけば, 致死量の Cd 投与による死亡率を減少することができる。^{11,23)} 著者らも Ca やオリブ油をマウスに前投与して肝臓中の MT 濃度が約 100 µg/g に達していると, Cd 投与によるマウスの死亡率が有意に低下することを示した。^{15,21)} 絶食によっても肝臓中の MT 濃度は約 101 µg/g と同程度に増加したので, これらのマウスは致死量の Cd 投与にも耐え得ると予想して実験を行った。予想に反して, Cd 投与による死亡率は減少しなかった (Table II)。また, シャムオペレーションによっても肝臓中の MT 濃度がオリブ油投与時と同程度に増加したが, Cd による急性中毒に対して防御効果は認められなかった (Table IV)。これらの結果は, 肝臓の MT 濃度が高くても生理的な状態が悪いと Cd による急性中毒を防御できにくいことを示唆している。

このように MT 濃度が十分であるのに Cd による急性毒性を防御できない原因について検討を加えた。オリブ油を前投与しておく, Cd 投与 8 時間後の肝臓中の MT 濃度は Cd 単独投与と比較して有意に増加した ($p<0.01$) (Table III)。致死量の Cd を投与すると MT の生合成は阻害される。¹⁵⁾ したがって, オリブ油の前投与によって誘導された MT は Cd によるタンパク合成阻害を防止すると推察される。対照的に, 絶食時では Cd 投与時の肝臓中 MT 濃度は有意に増加しているにもかかわらず, Cd 投与 8 時間後の MT 濃度は Cd 単独投与とほぼ同程度であった (Table III)。この結果は, 絶食直後では生理的な状態が悪いので, 絶食時に増加した MT 濃度では投与した Cd によるタンパク質合成阻害を防止するには十分ではないことを示している。それ故, マウスの死亡率を指標にすると, Cd による急性中毒に対して効果が認められなかったと推察される。

Cd による毒性の発現には多くの因子が関与していると考えられるが, 生体内での Cd 濃度やその存在型ばかりでなく, 当然のことながら生理的な環境も重要な因子であることは本実験からも明らかである。

引用文献

- 1) J.H.R. Kagi, M. Nordberg (eds.), "Metallothionein," *Experientia Supplementum* 34, Birkhauser, Verlag, Basel, 1979.
- 2) J.H.R. Kagi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 3) M. Piscator, *Nord. Hyg. Tidskr.*, **45**, 76 (1964).
- 4) J.K. Piotrowski, B. Trojanowska, J.M. Wisniewska-Knypl, W. Bolanowska, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 11 (1974).
- 5) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751 (1972).
- 6) J.K. Piotrowski, J.A. Szymanska, *J. Toxicol. Environ. Health*, **1**, 991 (1976).
- 7) F.N. Kotsonis, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 19 (1979).
- 8) T. Maitani, K.T. Suzuki, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3051 (1982).
- 9) I. Bremner, T. Davis, C.F. Mills, *Biochem. Soc. Trans.*, **543**, 293 (1978).
- 10) S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whanger, P.H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **234**, E282 (1978).
- 11) Y. Suzuki, H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **12**, 141 (1974).
- 12) 松原純子, 科学, **56**, 86 (1986).
- 13) P.J. Thornalley, M. Vasak, *Biochim. Biophys. Acta*, **827**, 36 (1985).
- 14) 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).
- 15) 小野坂敏見, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 407 (1983).
- 16) 小野坂敏見, 関庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **31**, 133 (1985).
- 17) 小野坂敏見, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男, 衛生化学, **24**, 128 (1978).
- 18) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).
- 19) K.-L. Wong, C.D. Klaassen, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12399 (1979).
- 20) S. Onosaka, K. Tanaka, M.G. Cherian, *Environ. Health Perspect.* **54**, 67 (1984).
- 21) 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, 衛生化学, **31**, 324 (1985).
- 22) "食品成分表," 第4版, 科学技術庁資源調査会編, 第一出版, 東京, 1985.
- 23) G.S. Probst, W.F. Bousquet, T.S. Miya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 61 (1977).