[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛生化学 (1995)
41 (5) 353-357

マウス臓器中のメタロチオネイン濃度に対する ほうれんそう抽出液の効果

小野坂敏見, 川井広美, 林 綾子, 大田光恵, 関 庚善
神戸学院大学栄養学部

Effects of Spinach Extract on Metallothionein Concentration in Mouse Tissues

SATOMI ONOSAKA, HIROMI KAWAI, AYAKO HAYASHI,
MITSUE OOTA and KYONG-SON MIN

Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University, Ikawadani-cho,
Nishi-ku, Kobe 673, Japan

(Received March 6, 1995)

An induction of metallothionein by spinach extract was studied in mice. Among determined vegetables, the greatest effect was observed after injection of spinach extract. Injection of the extract induced metallothionein in a dose-dependent manner. Metallothionein was induced not only in the liver but in the kidney by injection of the extract. A fibrinogen level in the blood increased after injection of the extract. It indicates that cytokine may be involved in the induction of metallothionein by the spinach extract.

Keywords — metallothionein; spinach; liver; kidney; cytokine

緒 言

メタロチオネイン (MT) は、分子量約 7000 の蛋白質である。^{1,2)} MT は、金属やホルモンばかりでなく種々の化合物によって、その生合成が誘導される。この性質の故に、MT には、Cd や Hg の毒性防御作用がある。³⁾ また、四塩化炭素による肝障害も、MT のラジカルスカベンジャー作用によって、抑制することができる。⁴⁾ さらに、制がん剤であるシスプラチンの副作用である腎毒性の軽減にも効果を示す。⁵⁾ このように、MT の誘導は、臨床的にも応用できる。

Cd などの毒性の化合物に対して、MT の生体内での防御作用を発揮させるには、MT の濃度を増加させておく必要がある。そこで、種々の化合物を投与して、臓器中の MT 濃度を測定した。その結果、ヘキサンなどの有機溶媒によって増加することを認め、肝臓毒や肝臓疾患用剤によっても増加することを明らかにした。⁶⁻⁸⁾ しかし、MT を増加させる化合物の安全性、臓器特異性、効力など、未解決な点が多い。

漢方薬である小柴胡湯の投与によって、肝臓中の MT が増加する。⁹⁾ そこで、植物成分として、ほうれんそうの抽出液を投与したところ、MT が増加することを見出したので報告する。

実 験 方 法

1. 動物 体重約 30 g の ddY 系雄性マウスを日本エスエルシー株式会社より購入した。1 週間以上馴化のため飼育した後、体重 33-39 g のものを、通常 1 群 3 匹として以下の実験に用いた。飼料は市販の固型飼料 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。

2. 野菜 野菜は、市販のものを適宜購入した。洗浄後、食する部分のみを細切し、50-100 g に蒸留水を加え、100°C で 1 時間加熱し、野菜の成分を抽出した。それを濾過して、抽出液とした。抽出液は、凍結乾燥後、粉末を蒸留水で 10 mg/ml の濃度に溶解し、マウスに皮下投与 (10 ml/kg) して、24 時間後の臓器中の MT 濃度を測定した。経口投与は、粉末を 5% になるように蒸留水で溶解し、10 日後の

MT 濃度を測定した。

3. 肝臓上清のゲル濾過 マウスに、ほうれんそう抽出液を 500 mg/kg の用量で皮下投与し、24 時間後に肝臓を摘出した。肝臓に 5 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加え、ホモジナイズした。ホモジネートは、27000×g で遠心分離し、上清を得た。その 4 ml を Sephadex G-75 カラムでゲル濾過した。カラムは、1.8×45 cm のものを用いた。溶出は 30 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.0) で行い、4.0 ml ずつ分取した。そして、各試験管の Zn 及び Cu 濃度を測定した。無処置のマウスについても、同様に処理して比較した。

4. フィブリノーゲン濃度の測定 マウスにほうれんそう抽出液を 500 mg/kg の用量で投与し、24 時間後の血漿を得た。これを、無処置のマウスと比較した。なお、フィブリノーゲン濃度の測定は、和光純薬工業株式会社のキット、フィブリノーゲン B テストワコーを用いた。肝臓中の MT 濃度も測定した。

5. 血清中の Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (GOT) の測定 ほうれんそう抽出液を 500 mg/kg の用量で、四塩化炭素投与の 24 時間前 (9 匹)、又は 48 と 24 時間前 (6 匹) に、皮下投与した。四塩化炭素は、2.5 ml/kg の用量で、皮下投与した。四塩化炭素の最終投与 24 時後に、血清中の GOT 活性を測定して、四塩化炭素のみを投与した群及び無処置の群 (10 匹) と比べた。GOT 活性の測定は、モノテスト GOT (ペリンガー・マンハイム) を用いて測定した。

6. MT 濃度の測定 臓器中の MT 濃度は、Cd-hem 法によって測定した。チオネインの分子量を 6050、チオネインと Cd との結合モル比を 1:7 とし MT 量を算出した。⁹⁾

結 果

1. 野菜抽出液の効果

市販の一般的な 18 種類の野菜を選び、MT に対する効果を検討した (Table I)。

もやし、しゅんぎく、ほうれんそう、かいわれだいこん抽出液の投与によって、肝臓中の MT 濃度が有意に増加した ($p < 0.01$)。その他の 14 種類の野菜抽出液を投与しても、MT の増加は認められなかった。

2. 臓器特異性

ほうれんそう抽出液を投与して、4 種の臓器中の MT 濃度を測定した (Table II)。

肝臓中の MT 濃度は、10 倍以上に増加した ($p < 0.01$)。腎臓でも、有意な増加が見られた ($p < 0.01$)。しかし、小腸及び脾臓では、有意な差は見られなかった。

3. 用量-反応曲線

投与量と MT 濃度との関係を検討した (Fig. 1)。

肝臓中の MT 濃度は、投与量が増加するのに対応して、用量依存的に増加した。500 mg/kg 投与時には、 $314 \pm 53 \mu\text{g/g}$ にまで達した。

4. 連続投与

ほうれんそう抽出液を、皮下に連続投与して、その効果を検討した (Fig. 2)。

肝臓、腎臓ともに、投与 2 回迄は増加した。しかし、3 回の投与では、連続投与の効果は見られず、肝臓及び腎臓中の MT 濃度の平均値は、2 回よりも低い値であった。予想外にも、4 回の連続投与では、死亡するマウスがあったので、測定しなかった。

なお、5%のほうれんそう抽出液を、10 日間、経口投与しても、肝臓、腎臓及び脾臓中の MT の増加は認められなかった。

5. 肝臓上清のゲル濾過

ほうれんそう抽出液を 3 匹のマウスに投与し、得られた肝臓の上清をゲル濾過して、無処置のマウス

TABLE I. Effect of Vegetable Extracts on Metallothionein Concentration in Mouse Liver

Vegetable	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ liver) ^{a)}
None	17 ± 6
Asparagus (asuparagasu)	21 ± 8
Bean sprouts (moyashi)	75 ± 11 ^{b)}
Burdock (gobou)	57 ± 17
Carrot (ninjin)	3 ± 2
Chinese cabbage (hakusai)	20 ± 7
Cucumber (kyuuri)	8 ± 3
Eggplant (nasu)	27 ± 13
Enokitake (enokitake)	41 ± 19
Garland chrysanthemum (syungiku)	108 ± 11 ^{b)}
Kinusayaendo (kinusayaendou)	20 ± 11
Onion (tamanegi)	19 ± 10
Pumpkin (kabocha)	29 ± 7
Shiitake (shiitake)	54 ± 28
Spinach (hourensou)	269 ± 48 ^{b)}
Sprouts (kaiwaredaikon)	75 ± 6 ^{b)}
Sweet pepper (piiman)	21 ± 7
Tomato (tomato)	32 ± 8
Welsh onion (negi)	32 ± 20

a) Mean ± S. D. of 3 mice. b) $p < 0.01$.

TABLE II. Effect of Spinach Extract on Metallothionein Concentration in Mouse Tissues

Spinach extract (mg/kg)	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ tissue)			
	Liver	Kidney	Small intestine	Pancreas
0	27 ± 5	20 ± 6	52 ± 34	197 ± 11
500	$348 \pm 87^a)$	$48 \pm 2^a)$	70 ± 2	234 ± 48

a) $p < 0.01$.

Fig. 1. Metallothionein Concentration in Mouse Liver after Injection of Spinach Extract

Mice were injected s.c. with spinach extract at the dose of 0, 100, 250 or 500 mg/kg. The concentration of metallothionein was determined 24 h after the injection by the Cd-hem method. Data indicate mean $\pm$ S.D. of 3 mice.

Fig. 2. Metallothionein Concentration in Mouse Liver and Kidney after Continuous Injection of Spinach Extract

Mice were injected s.c. with spinach extract at the dose of 500 mg/kg every 24 h. The concentration of metallothionein was determined 24 h after the last injection by the Cd-hem method. Data indicate mean $\pm$ S.D. of 3 mice.

10匹と比較した (Fig. 3).

ほうれんそう抽出液を投与すると, MT 画分に相当する試験管番号 19—23 に, 新たに Zn の大きなピークを見出した. なお, この画分の Cu 量は, Zn の 5% 以下であった.

6. Zn と MT との相関

肝臓中の Zn と MT 濃度との相関を求めた (Fig. 4).

Zn と MT 濃度には, 有意な正の相関が見られた ($p < 0.01$). Zn 濃度を x , MT 濃度を y とすると, 回帰式は $y = -373 + 16.0x$ であった.

7. フィブリノーゲン濃度

ほうれんそう抽出液を投与し, 血漿中のフィブリノーゲン及び肝臓中の MT 濃度を測定した (Table III).

ほうれんそう抽出液を投与すると, フィブリノーゲン濃度は約 2.4 倍に, 肝臓中の MT 濃度も有意に増加した ($p < 0.01$).

8. ほうれんそう抽出液による四塩化炭素の肝毒性軽減

ほうれんそう抽出液を前投与し, 四塩化炭素による肝障害に対する防御効果を検討した (Fig. 5).

四塩化炭素を投与すると, 血清中の GOT 活性は, 無処置の約 80 倍に増加した. ほうれんそう抽出液を前投与すると, その増加を抑制することができた ($p < 0.01$).

Fig. 3. Elution Profile of Zinc in the Liver on a Sephadex G-75 Column

Livers of 3 mice injected s.c. with spinach extract at the dose of 500 mg/kg were pooled 24 h after the injection. An aliquot (4 ml) of the liver supernatant was applied on a Sephadex G-75 column. Liver supernatant of normal mice was also applied on the column. --□--, control; —■—, spinach extract.

Fig. 4. Relationship between Zinc and Metallothionein Concentrations in the Mouse Liver

The concentrations of metallothionein were values in the liver of individual mouse shown in Fig. 1. The zinc concentration in the liver was determined after ashing with HNO_3 and HClO_4 (4:1).

TABLE III. Effect of Spinach Extract on Hepatic Metallothionein and Plasma Fibrinogen Concentrations of Mouse

Spinach extract (mg/kg)	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$ liver)	Fibrinogen (mg/dl plasma)
0	20 ± 17	195 ± 10
500	203 ± 46^a	458 ± 24^a

a) $p < 0.01$.

考 察

MTを臨床的に応用するには、なにより誘導する化合物の安全性が要求される。野菜成分は、日常食するので、人工的に合成した化合物と比較すると、一般的には安全性の条件を満たすと仮定して、MTの誘導能を検討した。

18種類の野菜のうち、4種類の野菜の抽出液の投与によって、肝臓中のMT濃度が増加した (Table I)。それらの濃度は高く、 $100 \mu\text{g/g}$ に近いかそれ以上であった。したがって、これら4種の野菜の抽出液を前投与すれば、Cdによる急性中毒を防御できることを指摘したい。⁹⁾

肝臓中のMT濃度を増加させた4種の野菜の中では、ほうれんそうが最も効果的であった。そこで、ほうれんそうについて検討を加えた。MTは、肝臓及び腎臓で増加し (Table II)、投与量の増加につれて、その濃度は増加した (Fig. 1, 2)。腎臓中のMT

Fig. 5. Effect of Spinach Extract against Hepatic Toxicity by Carbon Tetrachloride

Mice were injected s.c. with spinach extract at the dose of 500 mg/kg 24, or 48 and 24 h prior to an injection of carbon tetrachloride (2.5 ml/kg). Activities of GOT in the serum were determined 24 h after the injection of carbon tetrachloride. Data indicate mean $\pm$ S.D. of 10, 9 or 6 mice.

濃度は高いので、ほうれんそう抽出液は、腎臓でのMTの役割解明にも利用できるであろう。

誘導されたMTは、Znを結合したZn-MTであった (Fig. 3)。これはZnとMTとの回帰係数が16.0で、Znを投与した場合とほぼ一致することからも確認した (Fig. 4)。¹⁰⁾

ほうれんそう抽出液のどの成分がMTを誘導するのかは不明である。ただ、ほうれんそう抽出液は、混合物なので、一つの成分とは考えられない。経口投与ではMTが誘導されなかったため、MTを誘導する成分は、消化管から吸収されにくい、分解されやすいと推定される。なお、ほうれんそう抽出液中の肝臓MTを増加させる金属、すなわちCd, Co, Fe, Mn, Ni及びZn濃度も測定した。¹¹⁾しかし、投与量に換算すると、いずれの金属も 0.3 mg/kg 以下と、その含有量は、MTを誘導するには少なすぎる。故に、ほうれんそう抽出液中の金属が、MTの誘導に関与していないことは明らかである。

金属以外のMT誘導機構としては、グルココルチコイドを介することが推察される。¹²⁾しかし、ほうれんそう抽出液を投与すると、肝臓中のMT濃度は、 $300 \mu\text{g/g}$ 以上になり、グルココルチコイド投与時よりはるかに高い。したがって、ホルモンでは、説明できない。

サイトカインは、MTを誘導することが知られている。¹³⁾フィブリノーゲンは、急性期蛋白質の一種であり、サイトカインに対応してその濃度が増加する。そこで、ほうれんそう抽出液を投与して、その

濃度を測定したところ、458 mg/dl となった (Table III). この値を、フィブリノーゲン (x) と MT (y) との回帰式, $y=28.6+0.28x$ に代入すると, y は 157 となり, 実際の肝臓中の MT 濃度の 203 $\mu\text{g/g}$ に近かった.¹⁴⁾ 故に, ほうれんそう抽出液は, サイトカインを介して, 肝臓中の MT を誘導していると推定される.

四塩化炭素を投与すると, 肝障害を生じ, 血清中の GOT 濃度が上昇する. この障害は, Zn の前投与によって, 軽減される. これは, Zn によって誘導された MT によるとされている.⁴⁾ ほうれんそう抽出液の前投与によっても, 四塩化炭素による GOT の上昇が抑制されたことは, MT の作用によることを否定できない (Fig. 5). しかし, MT の直接作用によるものか否かについては, なお検討の必要がある.

本研究では, 結果的には, ほうれんそう抽出液の

連続投与によって, 予想外にもマウスが死亡し, 初期の目的である MT 誘導物質の安全性を満足させることができなかった. しかし, 致死成分を除去できれば, ほうれんそうの抽出液を MT の誘導に用いることができる. また, 最近サイトカインの臨床応用が行われつつあるが, サイトカインそのものを投与する以外に, サイトカイン誘導物質を投与することも有効ではないか. ほうれんそう抽出液が, サイトカインを介して MT を誘導するのであれば, その有効成分のサイトカイン誘導物質としての応用も提案したい.

また, 日常食するほうれんそうの抽出液に, 皮下注射とはいえ, 致死毒性があることは全く予想外であった. その成分については, 食品衛生学上のみならず毒性学的にも興味があり, 現在, 単離中である.

引用文献

- 1) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 2) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **236**, 3537 (1961).
- 3) Y. Suzuki, H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **12**, 141 (1974).
- 4) S.Z. Cagen, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 107 (1979).
- 5) A. Naganuma, M. Satoh, N. Imura, *Cancer Res.*, **47**, 983 (1987).
- 6) 小野坂敏見, 越智洋子, 関 庚善, 藤田由紀, 田中慶一, 衛生化学, **34**, 440 (1988).
- 7) 小野坂敏見, 越智洋子, 関 庚善, 藤田由紀, 田中慶一, 衛生化学, **35**, 162 (1989).
- 8) 小野坂敏見, 越智洋子, 関 庚善, 藤田由紀, 田中慶一, 田代真一, 衛生化学, **35**, 328 (1989).
- 9) S. Onosaka, K. Tanaka, "Metallothionein in Biology and Medicine," ed. by C.D. Klaassen, K.T. Suzuki, CRC Press, Boca Raton, 1991, p. 1.
- 10) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **23**, 11 (1982).
- 11) 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).
- 12) K.R. Etzel, S.G. Shapiro, R.J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1120 (1979).
- 13) R.L. Friedman, G.R. Stark, *Nature* (London), **314**, 637 (1985).
- 14) K.-S. Min, Y. Terano, S. Onosaka, K. Tanaka, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 152 (1991).