短 報

金属 (Mn, Cu, Cr, Pb) の胆汁排泄における肝ライソゾームの寄与度について

Comparison of the Contribution of Liver Lysosomes to Biliary Excretion of Metals

Mn, Cu, Cr, Pb は電気工業, 鉄鋼工業等で広く使用され, 作業現場でのこれら金属の暴露による健康障害が知られている¹⁾. 生体内に吸収されたこれら金属の体内および細胞内分布や排泄 (糞または尿中) 量などについては, 比較的詳細な検討がなされているが, 細胞レベルにおけるこれら金属の排泄機序について検討した報告は少ない.

著者ら²⁾は, 先に, 生体内に過剰に投与された Mn は, 主に, 肝ライソゾームに取り込まれ胆汁に移行することを示唆した. 本報では, Mn に加えて, Cu, Cr, Pb の胆汁排泄における肝ライソゾームの寄与度を比較検討したので報告する.

実験材料および実験方法

dd-系雄性マウス (18~23 g) 48 匹を $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (49 mg/kg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6 mg/kg), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (15 mg/kg), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (38 mg/kg) の 4 投与群 (各群 12 匹) に分け, それぞれの金属化合物を 1 回, 腹腔内に投与した. 投与後, 肝および胆汁を採取し実験に供した.

Hogeboom³⁾ の方法に準じ, 肝を氷冷 0.25 M ショ糖溶液で十分に洗浄後, 10 倍量の 0.25 M ショ糖溶液にて, 肝ホモジネート (4 層ガーゼにて濾過) を得, 遠心により粗核画分 (770×g, 10 min, ppt) を除いた後その上清から, 粗ミトコンドリア画分 (5,000×g, 10 min, ppt) およびミトコンドリア-ライソゾーム (M+L) 画分 (10,000×g, 25 min, ppt) を沈殿部として得た. さらに, M+L 画分を 0.25 M ショ糖溶液に懸濁後, 60% w/v ショ糖 (1 ml) 上に, 40~8.5% w/v ショ糖の連続密度勾配 (10 ml) を作成した遠沈管に重層 (1 ml) し, 1,050×g, 3 時間遠心した. 遠心後, 遠沈管上部から 1 ml ずつ分取し, 10 画分を得た²⁾.

上記の各遠心画分について, ライソゾーム, ペルオキシゾーム, ミトコンドリアのそれぞれの標識酵素として酸性ホスファターゼ (AcPase; *p*-ニトロフェニルリン酸基質法), カタラーゼ (過酸化水素基質法), モノアミンオキシダーゼ (MAO; ベンジルアミン基質法) 活性を測定した²⁾.

Table 1. Metal content in mouse liver 2 hr and 6 hr after a single intraperitoneal injection of each metal (mean±S.D.).

Metal	Mn	Cu	Cr	Pb
Injected metal	$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Dose (mg/kg)	49	6	15	38
2 hr (μg/g liver)	41.5 ±3.5	25.0 ±3.0	40.0 ±2.7	10.6 ±0.4
6 hr (μg/g liver)	10.9 ±1.8	35.2 ±3.7	28.8 ±3.9	20.1 ±2.0

Fig. 1. Comparison of metal content ratio of bile (a) and of crude mitochondrial (Mt) fraction (b) to liver in mice (mean±S.D.).

肝ホモジネート, 肝細胞遠心画分, 胆汁中の Mn, Cu, Cr, Pb 量の測定は, 試料をそれぞれ 10~200, 50~500, 10~200, 20~200 ng/ml の金属濃度に希釈したのち, 無炎原子吸光法⁴⁾により行なった.

実験結果

投与された Mn, Cu, Cr, Pb のそれぞれの肝内含量を Table 1 に示す. それぞれの金属量は, 投与後 2 および 6 時間目には, ほぼ, 10~40 μg/g 肝の範囲にあった. Mn, Cu, Cr, Pb 投与後 2 時間目と 6 時間目における肝内金属量に対する胆汁中金属量の比および粗ミトコンドリア画分中金属量の比 (Fig. 1) は, 2 時間目と 6 時間目で, 肝内金属量が異なる (Table 1) にもかかわらず, ほぼ同様の傾向を示した. 肝内金属量に対する胆汁中金属量の比は $\text{Mn} \gg \text{Cu} > \text{Cr}, \text{Pb}$ の順で, Mn, Cu の胆汁排泄の多いことが認められた. また, 肝の粗ミトコンドリア画分に取り込まれる金属量の割合は, $\text{Mn} > \text{Cu}$

Fig. 2. Distributions of metals (a) and marker enzymes (b) after sucrose density gradient centrifugation of the liver mitochondrial-lysosomal fraction.

>Cr, Pb の順であった。さらに、金属投与後2時間目の肝M+L画分をショ糖密度勾配遠心法により分画した結果 (Fig.2-a, b), それぞれの金属量のピークから, Mn はライソゾームおよびミトコンドリア画分に, Cu はライソゾームおよびペルオキシゾーム画分に, Cr および Pb はライソゾーム画分に分布することが示された。また、肝ライソゾーム画分 (Fraction No. 2) に取り込まれる金属量の肝における割合は $Mn > Cu > Cr$, Pb の順であることを認めた。

考察

金属の排泄経路は金属により異なり, Mn, Cu, Pb では、主に、胆汁を介して糞に, Cr では、大部分、尿に排泄されることが認められている⁵⁾。ところで、これら金属の排泄機序は、とくに肝細胞内での金属輸送様式と密接に関係していると思われる。一般に、過剰量の金属とライソゾームとの間には、相互作用 (金属投与によるライソゾーム膜の性質やライソゾーム酵素活性などの変化、ライソゾームによる金属の取り込みなど) が知られており、また、ライソゾームは、細胞外への金属の排泄および細胞内金属のホメオスタシスを調節していると考えられている⁶⁾。しかし、これらの機序を認めうる十分な研究はなされていない。本報の実験結果 (Fig.1, 2) は、肝内金属量に対する肝ライソゾームおよび胆汁に取

り込まれる金属量の割合は、 $Mn > Cu > Cr$, Pb の順であることを示しており (他の肝細胞成分の場合には、この順と異なっていた)、金属の肝・胆汁系排泄の多少は、肝ライソゾームの金属の取り込みおよび胆汁への放出機能、すなわち、肝ライソゾームの寄与度の大小に依存していることを示唆していると思われる。なお、Cu は、ペルオキシゾーム画分に高濃度に認められたが、X線微小部分分析により、主に、この画分に混入する高電子密度顆粒に取り込まれることを別に報告した⁷⁾。

これらの事実、金属の排泄機序および体内量の調節を知るうえで重要であるだけでなく、これら金属の暴露による生体障害を研究するうえで意義があると思われる。

文 献

- 1) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎: 産業中毒便覧, 医歯薬出版, 東京, 1977.
- 2) 鈴木平光, 和田 攻, 小野 哲, 山本昭子, 小野弘子, 松井寿夫: マンガン代謝における肝ライソゾームの意義, 日衛誌, 36: 506-511, 1981.
- 3) Hogeboom, G. H.: Fractionation of cell components of animal tissues, in "Method in Enzymology," Vol. 1, 16-19, Academic Press, New York, 1955.
- 4) Fujiwara, K., Umezawa, Y., Numata, Y., Fuwa, K. and Fujiwara, S.: Direct atomization atomic absorption spectrometry for intact biological samples: Application to trace metal analysis in silk-worm egg and their hatched worms, Anal. Biochem., 94: 386-393, 1979.
- 5) Underwood, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 3rd ed., Academic Press, New York, 1971.
- 6) Sternlieb, I. and Goldfischer, S.: Heavy metals and lysosomes, in "Lysosomes in Biology and Pathology", Vol. 5, 185-200, North-Holland, Amsterdam, 1976.
- 7) 鈴木平光, 和田 攻: 銅代謝における肝細胞内顆粒の役割—生化学的検討および電子顕微鏡的観察—, 日衛誌, 36: 725-733, 1981.

鈴木平光, 和田 攻, 小野 哲, 松井寿夫

群馬大学医学部衛生学教室

Hiramitsu SUZUKI, Osamu WADA, Tetsu ONO and Hisao MATSUI

Department of Hygiene, Gunma University School of Medicine, Maebashi, 371 Japan

昭和56年5月13日受付

通信先: 鈴木あて, Reprint requests to H. Suzuki