Antagonistic Effect of Cupric Compounds on Chromium Toxicity in the Growth of HeLa Cells

Nobuyuki SUSA, Yoshinori FURUKAWA and Seiichi TSUBAKI

School of Animal Sciences, Kitasato University, Towada-shi, Aomori 034

(Received for publication November 18, 1977)

Abstract. To study the effects of various metal compounds on the cytotoxicity induced by hexavalent chromium of potassium dichromate, HeLa cells were incubated in Eagle's minimum essential medium (MEM) with or without the chromate alone, or both chromate and any one of cupric sulfate, zinc sulfate, cadmium nitrate, lead acetate and sodium selenite. After a given period of incubation, the growth and the chromium amount of the cells were calculated. The results obtained are summarized as follows. 1) The growth of HeLa cells in MEM with 1.7 μM chromate at 3 days of incubation was approximately 60% of that of the control in MEM without the chromate. The growth of HeLa cells in MEM containing the above-mentioned concentration of the chromate present with 1.6 μM or 8 μM cupric sulfate was approximately 80% in both concentrations of the cupric compound. Furthermore, 8.0 μM cupric compound could remarkably restore the growth inhibited with 3.4 μM chromate. Thus no remarkable restorative effect on growth was observed by 1.4 to 140 μM zinc sulfate, 5.2 nM to 3.2 μM cadmium nitrate, 0.21 to 26 μM lead acetate, or 4.6 to 580 nM sodium selenite present with the chromate in MEM. 2) The chromium amount (as Cr) of HeLa cells in MEM with 1.7 μM chromate at 9 hours of incubation was 0.16 $\mu\text{g}/10^6$ cells. When 8.0 μM cupric compound was present in MEM with 1.7 μM chromate, the chromium amount decreased to 1.0 $\mu\text{g}/10^6$ cells, indicating 40% reduction. Other metal compounds, such as 140 μM zinc sulfate, 26 μM cadmium nitrate, 5.3 μM lead acetate, and 0.58 μM sodium selenite, which existed with the chromate in MEM also showed a tendency to reduce the chromium amount. Nevertheless, the rate of reduction was considerably lower than that by the cupric compound. Values under 15% without dose-dependency were observed. 3) When 8.0 μM cupric acetate, cupric nitrate, or cupric chloride existed with 3.4 μM chromate in MEM, the chromium amount of HeLa cells at 9 hours of incubation was 50 to 60% of that in MEM containing no cupric compound. The results mentioned above suggested that cupric compounds might have inhibited the chromium uptake of HeLa cells from the surrounding medium, which was closely related with the restorative effect of cupric compound on the chromium-induced cytotoxicity.

6 価クロムの細胞毒性に対する銅化合物の拮抗作用

諏佐信行・古川義宣・椿 精一

北里大学畜産学部

緒 言

近年、環境汚染物質として多くの金属の毒性が指摘

されるにつれ、これら金属の生体内における拮抗的相互作用に関する知見も多く報告されている。

カドミウムによる特徴的な睾丸壊死を亜鉛の投与に

よって防止し得ることが、ラット [5, 37] やマウス [12] で認められており、さらに亜鉛はラットの кадミウム依存性の肝臓および脾臓機能障害を防止し [20], 牛の кадミウム中毒症状を軽減し [25], ヒナの кадミウムによる成長低下および筋胃の異常を改善する [14] ことなども認められている。またセレンも、カドミウムによるラットあるいはマウスの睪丸壊死を阻止し [5, 12], ハムスターに対するカドミウムの催奇形性を阻止する [16] ことが認められている。その他、カドミウムの毒性作用を銅 [14], 鉄 [1, 14], およびコバルト [12] が拮抗することも知られている。

水銀とセレンの相互作用に関して、セレンはメチル水銀の致死作用および向神経毒性を防止あるいは改善することが知られている [13, 21, 24, 30]。

銅と亜鉛の相互作用も知られており、銅の毒性あるいは腸管からの吸収を亜鉛が拮抗し [2, 10, 33, 35], 逆に亜鉛の作用を銅が拮抗する [6, 34] ことも知られている。また、銅の作用に対するカドミウム [1, 29, 33], モリブデン [8, 9], および銀 [15] の拮抗も認められている。

その他、金属間の相互作用に関しては、鉛の毒性に対する亜鉛 [3] およびセレン [4] の拮抗、セレンの毒性に対する銀および銅 [17], 砒素、水銀およびカドミウム [13] の拮抗などが報告されている。

さらに培養細胞を用いた実験では、カドミウムの細胞増殖抑制効果に亜鉛が拮抗することも知られている [28]。

このように、多くの金属間で拮抗作用が認められているにもかかわらず、クロムと他の金属との相互作用に関しては、著者らの知る限りでは Tsukada ら [32] の、ヒト血小板によるクロム取込みを鉄が促進し、銅が抑制するという報告だけである。6価クロムは環境汚染物質として近年問題を提起し、生体に対する毒性に関する報告も多く、著者ら [31] も培養細胞に対する毒性を検討し既に報告した。

本研究は、金属間の拮抗作用という観点から、6価クロムの毒性に拮抗する金属が存在するや否かを培養細胞を用いて検索したものである。本実験では銅、亜鉛、カドミウム、鉛、およびセレン化合物を選び、6価クロム化合物の細胞増殖抑制効果に対するこれら金属化合物添加の影響を検討した結果、銅化合物のみが6価クロムの細胞毒性に対し拮抗作用を示す成績を得たので報告する。

実験材料および方法

供試金属化合物：重クロム酸カリウム $K_2Cr_2O_7$, 硫酸銅 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 硫酸亜鉛 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 硝酸カドミウム $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 酢酸鉛 $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, および亜セレン酸ナトリウム Na_2SeO_3 を用いた。これらの化合物は、あらかじめ蒸留水で 1~100 mg/ml の濃度に溶解したものを membrane filter (孔径 45 m μ) で濾過滅菌し、保存液とした。

使用細胞および培養方法：細胞は HeLa 細胞 (大日本製薬) を用いた。培地には, Eagle's minimum essential medium (日水製薬) に 2 mM の L-glutamine を添加したものをを用い, これを $NaHCO_3$ で pH 7.2 に調整し, 10% の割に牛血清を加えて培養液とし (以下 MEM と略記), 培養は前報 [31] と同様に行なった。

細胞に対する金属化合物の処理方法: MEM 1 ml 当たり約 1×10^5 個の細胞を含有する細胞浮遊液 5 ml を, 直径 60 mm のペトリ皿に取り, 培養 1 日後に所要濃度のクロム, あるいはクロムと他の金属化合物とを含有する MEM で液交換を行ない, 以後 MEM の更新なしで 3 日間培養を続行した (以下それぞれをクロム単独処理あるいはクロムとの併用処理と記述する)。対照は, クロムや供試金属化合物をも含まない MEM で更新したものを同時に培養した。なお, クロム以外の金属化合物の濃度は, HeLa 細胞に対する 50% 増殖抑制濃度 (以下 ID_{50} と略記) 以下とした。予備実験で求めた各金属化合物の ID_{50} 値を Table 1 に示した。いずれの値も前報 [31] と同様, 処理 3 日後における, 対照群の生細胞数に対する各化合物処理群の生細胞数を百分率で表わし, これより増殖抑制率を求め, 濃度-反応曲線 (Fig. 1) より直接 ID_{50} 値を得たものである。

生細胞数の計測法: Trypan blue exclusion test により, 前報 [31] と同様に行なった。

細胞内のクロム定量法: 佐藤ら [28] の, 細胞内カドミウムおよび亜鉛の定量法に準じて行なった。250 ml 容培養角瓶中で約 $4-6 \times 10^6$ 個の HeLa 細胞を単層培養し, 1 日後に所要濃度のクロム, あるいはクロムと他の金属化合物とを含有する MEM 15 ml で液交換を行ない, 培養後経時的に培養瓶を取り出し, 細胞を, Ca, Mg を含まない Dulbecco のリン酸緩衝液 (以下 PBS(-) と略記) で 3 回洗った後, 0.1% トリプシン溶液で細胞を処理し剝離させた。次に遠心

Fig. 1. Dose-response curves obtained after 3-day incubation of HeLa cells in medium containing various concentrations of each metal compound

Remarks.

Se: Sodium selenite. Cd: Cadmium nitrate. Cu: Cupric sulfate. Pb: Lead acetate. Zn: Zinc sulfate.

Table 1. Fifty percent inhibitory doses (ID_{50}) of various metal compounds on growth of HeLa cells

Metal compound	ID_{50}^*	
	$\mu\text{g/ml}$	μM
Cupric sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	13.0	52.07
Zinc sulfate, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	38.0	132.16
Cadmium nitrate, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.0	32.42
Lead acetate, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	22.0	58.00
Sodium selenite, Na_2SeO_3	0.36	2.08

Remarks.

At 24 hours of incubation, medium was exchanged with the metal compound-containing one, in which cells were incubated for 3 days.

The number of viable cells was counted by the trypan blue exclusion test after 3 days' exposure to each metal compound.

*: Value was read directly from the dose-response curve obtained to express the growth-inhibitory effects of various concentrations of each metal compound (Fig. 1).

(1,000 rpm, 5 分間) して細胞を集め, これを 5 ml の PBS(一) に再浮遊させ, この浮遊中の細胞数を算定した後, 細胞を乾固させた. これに濃硝酸 1 ml を加えて加熱分解し, 乾固後 10% の硝酸溶液に溶解し, 原子吸光分光光度計 (島津 AA-630-01 型) を用いて全クロムの定量を行なった. 細胞内のクロム含量は, 細胞 10^6 個当りに換算して表わした.

実験結果

1. 6 価クロムの HeLa 細胞増殖抑制効果に対する金属化合物添加の影響

始めに, 細胞に対し中等度の増殖抑制効果を示す重

クロム酸カリウム $0.5 \mu\text{g/ml}$ ($1.7 \mu\text{M}$) の濃度と, 各種濃度の銅, 亜鉛, カドミウム, 鉛, およびセレン化合物とを併用処理して検討した. 成績は, 処理 3 日後における対照群の生細胞数に対するクロム単独処理群, およびクロムと各種金属化合物との併用処理群の生細胞数を百分率で表わし, これを細胞増殖率として Table 3 に示した.

次に, 重クロム酸カリウム $0.125\text{--}1.0 \mu\text{g/ml}$ ($0.4\text{--}3.4 \mu\text{M}$) の濃度範囲の増殖抑制効果に対する一定濃度の各種金属化合物の影響について検討した. クロムと同時に添加した各種金属化合物の濃度は, 上記実験でクロムによる増殖抑制を回復させた濃度, あるいは回復効果を示さなかった化合物については試験した最高濃度 (硫酸亜鉛は $20 \mu\text{g/ml}$) とした. 成績は上記と同様に, 各処理群の細胞増殖率を求め, これから得られた各々の濃度-反応曲線を Fig. 2 に示した.

1) 硫酸銅添加の影響

$0.08\text{--}10 \mu\text{g/ml}$ ($0.32\text{--}40 \mu\text{M}$) の濃度範囲について検討した結果, 重クロム酸カリウム $0.5 \mu\text{g/ml}$ 単独処理群の増殖率は対照の $58 \pm 1.85\%$ であったのに対し, 硫酸銅 $2 \mu\text{g/ml}$ ($8 \mu\text{M}$), および $0.4 \mu\text{g/ml}$ ($1.6 \mu\text{M}$) を添加した群ではそれぞれ 81 ± 4.79 , $82 \pm 6.54\%$ の増殖率を示し, 硫酸銅による増殖の回復が認められた. その他の濃度では, 重クロム酸カリウム単独処理群の増殖程度とほとんど差は認められなかった (Table 2-a).

次に硫酸銅 $2.0 \mu\text{g/ml}$ と各種濃度の重クロム酸カリウムとを併用処理した場合, 各濃度による増殖抑制に対し回復効果を示した. 特に重クロム酸カリウム $1.0 \mu\text{g/ml}$ ($3.4 \mu\text{M}$) 単独処理群の増殖率は対照の $16 \pm$

Table 2. Effects of various concentrations of several metal compounds on the growth of HeLa cells in medium containing 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of potassium dichromate

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($\mu\text{g/ml}$ of medium)	Metal compound ($\mu\text{g/ml}$ of medium)	% Growth of HeLa cells (Mean $\pm$ S.E., n=4)	% Inhibition of cell growth
a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			
—	—	100	
0.5	—	59 ± 1.85	41
0.5	0.08	63 ± 3.92	37
0.5	0.40	82 ± 6.54	18
0.5	2.00	81 ± 4.79	19
0.5	10.00	54 ± 6.42	46
b) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			
—	—	100	
0.5	—	62 ± 5.65	38
0.5	0.40	58 ± 5.50	42
0.5	2.00	61 ± 2.68	39
0.5	10.00	58 ± 5.15	42
0.5	20.00	60 ± 2.25	40
0.5	40.00	58 ± 3.94	42
c) $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$			
—	—	100	
0.5	—	62 ± 5.65	38
0.5	0.0016	58 ± 6.10	42
0.5	0.008	68 ± 3.16	32
0.5	0.04	59 ± 5.89	41
0.5	0.20	53 ± 2.85	47
0.5	1.00	37 ± 1.19	63
d) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$			
—	—	100	
0.5	—	53 ± 2.29	47
0.5	0.08	49 ± 3.66	51
0.5	0.40	58 ± 4.18	42
0.5	2.00	58 ± 1.03	42
0.5	10.00	40 ± 3.22	60
e) Na_2SeO_3			
—	—	100	
0.5	—	54 ± 4.25	46
0.5	0.0008	55 ± 0.71	45
0.5	0.004	54 ± 3.12	46
0.5	0.02	55 ± 3.49	45
0.5	0.10	57 ± 2.47	43

Remarks.

At 24 hours of incubation, the medium was exchanged with a medium containing chromium alone or chromium and another metal compound, in which cells were incubated for 3 days.

The number of viable cells was counted by the trypan blue exclusion test after 3-day exposure to compounds.

Table 3. Effects of three cupric compounds on the chromium uptake of HeLa cells from chromium-containing medium during 9 hours' incubation period

Chromate	Cupric compound	$\mu\text{g/ml}$ of medium	Chromium amount of HeLa cells ($\mu\text{g}/10^6$ cells)
1.0 μg of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ per ml of medium	+ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.60 (8 μM as Cu)	$0.078 \pm 0.008^*$
	+ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.93 (")	0.080 ± 0.009
	+ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.36 (")	0.073 ± 0.005
	None		0.143 ± 0.007

Remarks.

HeLa cells were incubated in the same manner as mentioned in Fig. 3.

*: Each value is presented by mean and standard error ($n=5$).

Fig. 2. Effects of various metal compounds on the growth-inhibition of HeLa cells induced by potassium dichromate

Remarks.

At 24 hours of incubation the medium was exchanged with a potassium dichromate-containing medium with or without other metal compounds, in which cell were incubated for 3 days.

The number of viable cells was counted by the trypan blue exclusion test after 3-day exposure to compounds.

—●—, Potassium dichromate alone; --○--, Both potassium dichromate and one of metal compounds; a) cupric sulfate, 2.0 $\mu\text{g/ml}$; b) zinc sulfate, 20 $\mu\text{g/ml}$; c) cadmium nitrate, 0.008 $\mu\text{g/ml}$; d) lead acetate, 2.0 $\mu\text{g/ml}$; e) sodium selenite, 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

Each point presents mean and standard error ($n=4$).

1.89%であったのが、硫酸銅添加により $68 \pm 4.94\%$ の増殖率を示した (Fig. 2-a).

2) 硫酸亜鉛添加の影響

0.4–40 $\mu\text{g/ml}$ (1.4–140 μM) の濃度範囲について検討したが、重クロム酸カリウム 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理群との間に増殖の差はほとんど認められなかった (Table 2-b).

また、硫酸亜鉛 20 $\mu\text{g/ml}$ (70 μM) と各種濃度の重クロム酸カリウムとを併用処理した場合にも、著明な増殖の回復は認められなかった (Fig. 2-b).

3) 硝酸カドミウム添加の影響

0.0016–1.0 $\mu\text{g/ml}$ (5.2 nM–3.2 μM) の濃度範囲について検討した結果、重クロム酸カリウム 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理群の増殖率と比較すると、0.008 $\mu\text{g/ml}$ (26 nM) を添加した場合わずかな増殖の回復が認められ、1.0 $\mu\text{g/ml}$ (3.2 μM) ではより低い増殖を示し、その他の濃度では、ほとんど増殖に差は認められなかった (Table 2-c).

硝酸カドミウム 0.008 $\mu\text{g/ml}$ と各種濃度の重クロム酸カリウムとを併用処理した場合、わずかな増殖の

回復傾向が認められた (Fig. 2-c).

4) 酢酸鉛添加の影響

0.08–10 $\mu\text{g/ml}$ (0.21–26 μM) の濃度範囲について検討した結果, 2 $\mu\text{g/ml}$ (5.3 μM) および 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (1.1 μM) を添加した場合, 重クロム酸カリウム 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理群よりわずかに高い増殖を示し, 10 $\mu\text{g/ml}$ 併用処理群では逆に低い増殖を示した (Table 2-d).

酢酸鉛 2 $\mu\text{g/ml}$ と各種濃度の重クロム酸カリウムとを併用処理した場合, 著明な増殖の回復は認められなかった (Fig. 2-d).

5) 亜セレン酸ナトリウム添加の影響

0.0008–0.1 $\mu\text{g/ml}$ (4.6–580 nM) の濃度範囲で検討したが, 重クロム酸カリウム 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理群との間に増殖の差はほとんど認められなかった (Table 2-e).

亜セレン酸ナトリウム 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と各種濃度の重クロム酸カリウムとを併用処理した場合には, わずかな増殖の回復傾向が認められた (Fig. 2-e).

これらの成績から, 硫酸銅は, 6 価クロムによる HeLa 細胞の増殖抑制に対し著明に拮抗し, 亜鉛, カドミウム, 鉛, およびセレン化合物は, 試験した濃度ではほとんど拮抗的效果を示さないことが認められた.

2. HeLa 細胞による 6 価クロムの取込みに対する各種金属化合物添加の影響

細胞を重クロム酸カリウム 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (3.4 μM), あるいは, クロムと共に所要濃度の各種金属化合物とを併用処理した場合の細胞内クロム含量を, 処理後 1, 3, 6, 9 時間目に定量し, 細胞 10^6 個当りのクロム含量に換算した成績を Fig. 3 に示した. なお, 細胞内クロムの原子価を明らかにし得なかったので全クロム量で表わした.

1) 硫酸銅添加の影響

重クロム酸カリウム単独処理群の細胞内クロム含量は, 時間に依存しほぼ直線的な増加を示したのに対し, 硫酸銅 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (8 μM) との併用処理群の細胞内クロム含量は著明な減少を示し, 9 時間後には $0.102 \pm 0.013 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ であった. この値は, 重クロム酸カリウム単独処理群の 9 時間後に得られたクロム含量 0.164 ± 0.009 と比較すると, 約 40% の減少であった. 硫酸銅添加による細胞内クロム含量の減少の程度は, 処理 3 時間後から著明であった (Fig. 3-a).

2) 硫酸亜鉛, 硝酸カドミウム, 酢酸鉛, 亜セレン酸ナトリウム添加の影響

硫酸亜鉛 40 $\mu\text{g/ml}$ (140 μM), 硝酸カドミウム 0.008 $\mu\text{g/ml}$ (26 nM), 酢酸鉛 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (5.3 μM),

Fig. 3. Effects of various metal compounds on the chromium uptake of HeLa cells from chromium-containing medium

Remarks.

At 24 hours of incubation the medium was exchanged with a potassium dichromate-containing medium with or without other metal compounds, in which cell were incubated for 9 hours.

Chromium amount of HeLa cells was estimated by atomic absorption spectroscopy.

—●—, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ of potassium dichromate alone; --○--, both 1.0 $\mu\text{g/ml}$ of potassium dichromate and one of metal compounds; a) cupric sulfate, 2.0 $\mu\text{g/ml}$; b) zinc sulfate, 40 $\mu\text{g/ml}$; c) cadmium nitrate, 0.008 $\mu\text{g/ml}$; d) lead acetate, 2.0 $\mu\text{g/ml}$; e) sodium selenite, 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

Each point presents mean and standard error (n=8).

Fig. 4. Inhibitory effects of cupric compounds on the chromium uptake of HeLa cells from chromium-containing medium during 9 hours' incubation period

Remarks.

*1: Value was calculated from Fig. 2.

*2: Value was calculated from Table 3.

および亜セレン酸ナトリウム $0.1 \mu\text{g/ml}$ ($0.58 \mu\text{M}$) をそれぞれ重クロム酸カリウム $1.0 \mu\text{g/ml}$ と併用処理した場合、細胞内クロム含量は処理6時後まではクロム単独処理群との間にほとんど差は認められず、9時間後にはそれぞれでわずかな減少傾向が認められたが(約15%以下)、硫酸銅の場合に比較して小さかった(Fig. 3-b~e).

これらの成績から、硫酸銅はHeLa細胞の6価クロム取込みを著明に抑制し、銅以外の金属化合物は試験した濃度でほとんど抑制しないことが示唆された。このことは、先の実験での6価クロムの細胞増殖抑制効果に対する成績とほぼ一致する傾向にあり、硫酸銅による6価クロムの細胞毒性の低下は、細胞のクロム吸収の減少によるように考えられた。

3. HeLa細胞による6価クロム取込みに対する各種銅化合物添加の影響

硫酸銅による細胞内クロム含量の減少が銅そのものによるのか、あるいは銅以外の物によるかを確認する目的でさらに酢酸銅 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、硝酸銅 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、および塩化第二銅 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を用いて、先の実験と同様に検討した。硫酸銅 $2.0 \mu\text{g/ml}$ は $8 \mu\text{M}$ の銅濃度に相当し、他の銅化合物も銅濃度を一定にするために全て $8 \mu\text{M}$ の銅濃度となるように添加し、重クロム酸カリウム $1.0 \mu\text{g/ml}$ と併用処理し、9時間後の細胞内クロム含量をTable 3に示した。さらにこれらの成績から、重クロム酸カリウム単独処理群のクロム含量に対する各種銅化合物併用処理群のクロム含量の百分率を求めFig. 4に示した。

重クロム酸カリウム単独処理群の細胞内クロム含量

は $0.143 \pm 0.007 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ であったのに対し、各種銅化合物併用処理群の値は、酢酸銅 $1.6 \mu\text{g/ml}$ 併用処理群、 0.078 ± 0.008 ; 硝酸銅 $1.93 \mu\text{g/ml}$ 併用処理群、 0.08 ± 0.09 ; 塩化第二銅 $1.36 \mu\text{g/ml}$ 併用処理群、 $0.073 \pm 0.005 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ であり(Table 3)、細胞内クロム含量は異なる銅化合物であっても40~50%の減少を示した(Fig. 4)。

これらの成績から、HeLa細胞のクロム取込みに対する銅化合物の抑制効果は、銅そのものによるように考えられた。

考 察

本実験で、6価クロムのHeLa細胞増殖抑制効果に対する銅、亜鉛、カドミウム、鉛、およびセレン化合物の影響について検討した結果、硫酸銅 $2.0 \mu\text{g/ml}$ ($8 \mu\text{M}$) の濃度と併用処理した場合、6価クロムの細胞毒性は軽減されたが、銅以外の金属化合物は試験した濃度で著明な効果は認められなかった。

生体内における金属間の拮抗作用に関して、和田[36]は4つの機構を提起している。即ち、①吸収低下、競合による奏効部位での奏効金属の低下、②排泄増加、奏効部位からの隔離による奏効金属の低下、③置換作用による奏効金属の低下、④閾値上昇による奏効効果の発現抑制である。培養細胞を用いた本実験においても上述のいずれかの機構による金属間の拮抗が存在すると考える。今回、6価クロムの細胞毒性に対する銅化合物の拮抗機序については詳しく検討し得なかったが、6価クロムと銅化合物とを併用処理した場合、HeLa細胞内のクロム含量が著明に減少した成績

(Fig. 3) から考えると、上述①の機序による可能性が大であると考えられた。

銅と他の金属間の拮抗に関して、Van Chanpen [34] は、銅と放射性亜鉛とをラットの結紮腸管部に注入した場合、亜鉛の吸収は減少し、また、銅を腹腔内に注射した場合、亜鉛の腸管からの吸収は減少しないことを示した。さらに、亜鉛は放射性銅の腸管からの吸収を抑制することも実験し [35]、これらのことから、銅と亜鉛との間には腸管からの吸収過程に競合拮抗が存在し、この拮抗は腸管上皮上あるいは上皮内のいずれかの場で行なわれると示唆している。Dowdy ら [8, 9] は、モリブデンが銅欠乏症を誘発し、 CuSO_4 と Na_2MoO_4 が不溶性の結合物を形成し、結合した銅は生物学的に不活性であることを示唆している。これらの知見から銅と 6 価クロムとの関係を考えて、銅とクロムとが細胞膜上で競合し、あるいは培養液中で結合して不溶性の結合物を形成するなどによって 6 価クロムの細胞への侵入が低下し、細胞内のクロム含量が減少することにより細胞障害が軽減し、その結果、細胞の増殖能が回復したとも考えられた。

その他の機序としては、銅による細胞内クロムの排泄増加、あるいは置換作用による細胞内クロムの低下も考えられるが、今回は銅と 6 価クロムとを同時に併用処理し、また細胞内の銅含量について検討してないので、今後は 6 価クロムと銅との処理時間の関係、培養液中、および細胞内のクロムと銅含量との関係についての詳細な検討と、さらには、生体内における銅と 6 価クロムとの関係についての詳細な検討が必要となろう。

その他の金属間の拮抗作用に関して Starcher [29] は、カドミウムおよび亜鉛がニワトリの十二指腸で分子量約 10,000 の蛋白質と結合し、銅と置換することにより銅の吸収に拮抗することを示しており、Cerklewski ら [3] は、食餌性亜鉛が鉛の腸管からの吸収を抑制することにより鉛の毒性に拮抗すると考えた。さらに、Cerklewski ら [4] は、食餌性鉛の毒性を低濃度の食餌性セレンが防止し、組織内鉛濃度を減少させることを示し、また鉛は、腎臓のセレン濃度を減少させることから、鉛はセレン代謝に対し拮抗することを示唆している。これらの知見をもとに、本実験でも 6 価クロムとカドミウム、亜鉛、鉛、およびセレンとの間に拮抗が存在するか否かを検討したが、これらの金属化合物は試験した濃度で 6 価クロムの細胞増殖抑制効果に対しほとんど拮抗を示さず (Table 2, Fig. 2)。

また細胞のクロム取込みに対しても著明な抑制効果は認められず (Fig. 3)、これらの金属と 6 価クロムとの間には、拮抗が存在しないように考えられた。

しかしながら、Webb [37] は、ラットに対しカドミウム投与前に亜鉛を注射すると、カドミウムの睾丸障害は防止し得る結果を得、これは、亜鉛が肝臓内でカドミウム結合蛋白質の合成を誘起し、カドミウムは蓄積され、固定されることを示している。さらに Webb ら [38] は、豚腎皮質由来細胞株を低濃度のカドミウム存在下で培養し、細胞の *metallothionein* 合成および蓄積を認め、Rugstad ら [26] も、ヒト皮膚由来上皮細胞株をカドミウム存在下で培養することにより高濃度のカドミウムの毒性に対し抵抗性を示し、このような細胞はカドミウム結合蛋白を含有することを認めた。これらの知見から HeLa 細胞に対しても亜鉛、カドミウムが金属結合蛋白の合成を誘起することも予想されるので、亜鉛、カドミウムに関しては 6 価クロムとの処理の時間関係を吟味する必要があるように考えられた。今後はさらにこれらの点を検討しなければならない。

クロムの毒性作用発現の機構に関して、生体膜への通過の難易さが関与することを示唆する報告がいくつもある。Donaldson ら [7] は、一般に毒性が強いとされている 6 価クロムは、毒性の弱い 3 価クロムよりラットの腸管からの吸収量は高いことを認め、MacKenzie ら [19] も、6 価および 3 価クロムをラットに飲水投与し、6 価クロム投与群の組織内クロム濃度は、3 価クロム投与群より約 9 倍高いことを認めている。さらに MacKenzie ら [18] は、ラットに放射性 6 価クロムを経口投与した場合、3 価クロムより高率に腸管から吸収され、6 価クロムを胃内に注入した場合は、腸管内に注入した場合より吸収率は低く、6 価クロムは胃内で 3 価クロムに還元されることを示唆している。Pirozzi ら [23] は、6 価クロムによるモルモットのクロム潰瘍に対し、アスコルビン酸が治療効果を有することを認め、Samitz ら [27] は、アスコルビン酸による 6 価クロムの不活性化の機構は、3 価クロムへの還元と、続いて起こる 3 価クロムの細胞成分との結合物形成であることを示している。著者ら [11] も、6 価クロムの HeLa 細胞増殖抑制効果に L-アスコルビン酸が拮抗することを確認し、HeLa 細胞による 6 価クロムの取込みを L-アスコルビン酸が抑制することを認めた。岡本 [22] は、ヒト口腔癌由来細胞に対する 6 価クロムの細胞毒性と、細胞のクロム取込み量とが相関

することを報告している。これらの知見と、本実験で得られた成績から、6価クロムの毒性作用は、組織あるいは細胞への6価クロムの侵入を抑制することにより軽減あるいは阻止し得ると考えられた。この仮説を証明するためには、さらに動物を使った詳細な検討が必要となろう。

要 約

6価クロム化合物（重クロム酸カリウム）の細胞毒性におよぼす各種金属化合物（硫酸銅、硫酸亜鉛、硝酸カドミウム、酢酸鉛および亜セレン酸ナトリウム）添加の影響を、HeLa細胞を用いて、処理後の増殖率および細胞内クロム含量から比較検討した。

1. 重クロム酸カリウム $0.5 \mu\text{g/ml}$ ($1.7 \mu\text{M}$) を単独処理した3日後の細胞増殖率は、対照の約60%であったが、硫酸銅 $0.4 \mu\text{g/ml}$ ($1.6 \mu\text{M}$) あるいは $2.0 \mu\text{g/ml}$ ($8 \mu\text{M}$) と併用処理した場合、それぞれ約80%の増殖率を示した。また硫酸銅 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 併用処理は、高濃度の重クロム酸カリウム ($1.0 \mu\text{g/ml}$, $3.4 \mu\text{M}$) の増殖抑制効果に対しても著明に拮抗した。銅以外の金属化合物では、試験した濃度（硫酸亜鉛, $0.4\text{--}40 \mu\text{g/ml}$, $1.4\text{--}140 \mu\text{M}$; 硝酸カドミウム, $0.0016\text{--}1.0 \mu\text{g/ml}$, $5.2 \text{ nM}\text{--}3.2 \mu\text{M}$; 酢酸鉛, $0.08\text{--}10 \mu\text{g/ml}$, $0.21\text{--}26 \mu\text{M}$; 亜セレン酸ナトリウム, $0.0008\text{--}0.1 \mu\text{g/ml}$, $4.6\text{--}580 \text{ nM}$) で著明な増殖の回復は認められなかった。

2. 重クロム酸カリウム $1.0 \mu\text{g/ml}$ ($3.4 \mu\text{M}$) 単独処理9時間後の細胞内クロム含量は、約 $0.16 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ であったが、硫酸銅 $2.0 \mu\text{g/ml}$ との併用処理では約 $0.10 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ を示し、約40%の減少が認められた。銅以外の金属化合物との併用処理（硫酸亜鉛 $40 \mu\text{g/ml}$, $140 \mu\text{M}$; 硝酸カドミウム $0.008 \mu\text{g/ml}$, 26 nM ; 酢酸鉛 $2.0 \mu\text{g/ml}$, $5.3 \mu\text{M}$; 亜セレン酸ナトリウム $0.1 \mu\text{g/ml}$, $0.58 \mu\text{M}$) でもクロム含量の減少傾向が認められたが、硫酸銅のそれに比較すると小さかった（約15%以下）。

3. 酢酸銅、硝酸銅あるいは塩化第二銅（銅濃度として $8 \mu\text{M}$ ）と重クロム酸カリウム $1.0 \mu\text{g/ml}$ とを併用処理した場合、9時間後の細胞内クロム含量をクロム単独処理群のそれに比較すると、40–50%の減少を示した。

上記の成績から、銅化合物はHeLa細胞のクロム取込みを抑制し、これが6価クロムの細胞毒性の軽減と密接な関係を有するように考えられた。

References

- [1] Banis, R. J., Pond, W. G., Walker, E. F., Jr., and O'Connor, J. R. (1969) Dietary cadmium, iron, and zinc interactions in growing rat. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **130**, 802–806.
- [2] Bremner, I., Young, B. W., and Mills, C. F. (1976). Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. *Brit. J. Nutr.*, **36**, 551–561.
- [3] Cerklewski, F. L., and Forbes, R. M. (1976). Influence of dietary zinc on lead toxicity in the rat. *J. Nutr.*, **106**, 689–696.
- [4] Cerklewski, F. L., and Forbes, R. M. (1976). Influence of dietary selenium on lead toxicity in the rat. *J. Nutr.*, **106**, 778–783.
- [5] Chen, R. W., Wagner, P. A., Hoekstra, W. G., and Canther, H. E. (1974). Affinity labelling studies with $^{109}\text{cadmium}$ in cadmium-induced testicular injury in rats. *J. Reprod. Fert.*, **38**, 293–306.
- [6] Cox, D. H., and Harris, D. L. (1960). Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat. *J. Nutr.*, **70**, 514–520.
- [7] Donaldson, R. M., Jr., and Barreras, R. F. (1966). Intestinal absorption of trace quantities of chromium. *J. Lab. clin. Med.*, **68**, 484–493.
- [8] Dowdy, R. P., and Matrone, G. (1968). Copper-molybdenum interaction in sheep and chicks. *J. Nutr.*, **95**, 191–196.
- [9] Dowdy, R. P., and Matrone, G. (1968). A copper-molybdenum complex: Its effects and movement in the piglet and sheep. *J. Nutr.*, **95**, 197–201.
- [10] Evans, G. W., Majors, P. F., and Cornatzer, W. E. (1970). Mechanism for cadmium and zinc antagonist of copper metabolism. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **40**, 1142–1148.
- [11] 古川義宣・諏佐信行 (1977). HeLa細胞のクロム摂取におよぼす各種化合物の影響. *Isotopes* (印刷中).
- [12] Gunn, S. A., Gould, T. C., and Anderson, W. A. D. (1968). Specificity in protection against lethality and testicular toxicity from cadmium. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **128**, 591–595.
- [13] Hill, C. H. (1975). Interrelationships of selenium with other trace elements. *Fed. Proc.*, **34**, 2096–2100.
- [14] Hill, C. H., Matrone, G., Payne, W. L., and Barber, C. W. (1963). In vivo interactions of cadmium with copper, zinc and iron. *J. Nutr.*, **80**, 227–235.
- [15] Hill, C. H., Starcher, B., and Matrone, G. (1964). Mercury and silver interrelationships

- with copper. *J. Nutr.*, **83**, 107-110.
- [16] Holmberg, R. E., and Ferm, V. H. (1969). Interrelationships of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis. *Arch. environ. Hlth*, **18**, 873-877.
- [17] Jensen, L. S. (1975). Modification of a selenium toxicity in chicks by dietary silver and copper. *J. Nutr.*, **105**, 769-775.
- [18] MacKenzie, R. D., Anwar, R. A., Byerrum, R. U., and Hoppert, C. A. (1959). Absorption and distribution of Cr^{61} in the albino rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 200-205.
- [19] MacKenzie, R. D., Byerrum, R. U., Decker, C. F., Hoppert, C. A., and Langham, R. F. (1958). Chronic toxicity studies. II. Hexavalent and trivalent chromium administered in drinking water to rats. *Amer. med. Ass. Arch. indust. Hlth*, **18**, 232-234.
- [20] Merali, Z., and Singhal, R. L. (1976). Prevention by zinc and cadmium-induced alteration in pancreatic and hepatic function. *Brit. J. Pharmacol.*, **57**, 573-579.
- [21] 大井 玄 (1976). メチル水銀とセレンの相互作用. 医学のあゆみ, **96**, 832-836.
- [22] 岡本幹三 (1977). KB 細胞における Cr(VI) のとり込み量と細胞毒性との関係. 医学と生物学, **94**, 447-452.
- [23] Pirozzi, D. J., Gross, P. R., and Samitz, M. H. (1968). The effect of ascorbic acid on chrome ulcers in guinea pigs. *Arch. environ. Hlth*, **17**, 178-180.
- [24] Potter, S., and Matrone, G. (1974). Effect of selenite on the toxicity of dietary methyl mercury and mercuric chloride in the rat. *J. Nutr.*, **104**, 638-647.
- [25] Powell, G. W., Miller, W. J., and Clifton, C. M. (1964). Influence of dietary cadmium level and supplemental zinc on cadmium toxicity in the bovine. *J. Nutr.*, **84**, 205-214.
- [26] Rugstad, H. E., and Norseth, T. (1975). Cadmium resistance and content cadmium-binding protein in cultured human cells. *Nature*, **257**, 136-137.
- [27] Samitz, M. H., Scheiner, D. M., and Katz, S. A. (1968). Ascorbic acid in the prevention of chrome dermatitis: Mechanism of inactivation of chromium. *Arch. environ. Hlth*, **17**, 44-45.
- [28] 佐藤温重・小沢和子・佐々木徹 (1974). 骨組織および歯胚由来培養細胞に対するカドミウムと亜鉛の作用について. 日薬理誌, **70**, 127-133.
- [29] Starcher, B. C. (1969). Studies on the mechanism of copper absorption in the chick. *J. Nutr.*, **97**, 321-326.
- [30] Sukra, Y., Sastrohadinoto, S., Haeruman, H. Js., and Bird, H. R. (1976). Effect of selenium and mercury on survival of chick embryos. *Poult. Sci.*, **55**, 1423-1428.
- [31] 諏佐信行・古川義宣・椿 精一 (1977). 培養細胞に対する六価および三価クロム化合物の毒性. 日獣誌, **39**, 325-336.
- [32] Tsukuda, T., Steiner, M., and Baldini, M. (1971). Mechanism and kinetics of chromate transport in human platelets. *Amer. J. Physiol.*, **221**, 1697-1705.
- [33] Van Campen, D. R. (1966). Effects of zinc, cadmium, silver and mercury on the absorption and distribution of copper-64 in rats. *J. Nutr.*, **88**, 125-130.
- [34] Van Campen, D. R. (1968). Copper interference with the intestinal absorption of zinc-65 by rats. *J. Nutr.*, **97**, 104-108.
- [35] Van Campen, D. R., and Scaife, P. U. (1976). Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.*, **91**, 473-476.
- [36] 和田 攻 (1975). 金属の生体内拮抗・相互作用. 代謝, **12**, 219-227.
- [37] Webb, M. (1972). Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2767-2771.
- [38] Webb, M., and Daniel, M. (1975). Induced synthesis of metallothionein by pig kidney cells in vitro in response to cadmium. *Chem.-Biol. Interactions*, **10**, 269-276.