カドミウムの生体内挙動に及ぼすシステインの影響^{*1}

(昭和 54 年 12 月 22 日受理)

田中之雄^{*2} 田中涼一^{*2} 榎本 隆^{*2}Effect of Cysteine on the Fate of Cadmium in the Rat
(Studies on the Fate of Heavy Metals in Animals. I.)

Yukio TANAKA, Ryoichi TANAKA and Takashi KASHIMOTO

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 3-69, Nakamichi 1-chome,
Higashinari-ku, Osaka)

The distribution of cadmium in the liver and kidneys of rats was studied after simultaneous oral administration of cadmium and amino acid, or cadmium and organic acid.

When L-cysteine was given simultaneously with cadmium, the intake of cadmium increased 5 times in the liver and 15 times in the kidneys compared with administration of cadmium alone (3.4 mg/rat).

In a study of the behavior of absorbed cadmium and its distribution in the liver and kidneys, it was found that the synthetic process of metallothionein in the liver and kidneys differed depending on the route of administration (oral or intravenous injection) and the coexistence of cysteine.

Furthermore, the synthesis of metallothionein in the liver and kidneys was examined in terms of the incorporation of [¹⁴C] cysteine into metallothionein. Incorporation was observed 1 hour after simultaneous oral administration of cadmium and [¹⁴C] cysteine and was very high in the liver after 6 hours.

(Received December 22, 1979)

緒 言

カドミウム (Cd) の毒性については近年よく研究されていて、生体内の挙動すなわち吸収、分布ならびに排泄について漸次解明されつつある。Cd の蓄積や毒性はミネラル類^{1), 2)}、タンパク質³⁾、ビタミン類⁴⁾などの栄養摂取の状態により修飾されることが報告されている。また、Cd の消化管からの吸収には種々の食品成分が影響を及ぼすことが知られている。児島ら^{5), 6)}は Cd の *in vitro* でのラット小腸透過に及ぼす食品成分の影響について検討し、特にアミノ酸のうち L-システインや L-ヒスチジンが腸管透過を促進することを認めている。

そこで著者らは、Cd のラット体内分布に及ぼすアミノ酸、有機酸の影響をみるために同時経口投与して Cd の吸収、体内分布を検討した。また、生体内に吸収された Cd とアミノ酸 (システイン) の挙動を追跡し若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試 薬

塩化カドミウム ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)、アミノ酸、有機酸は和光純薬工業 (株) 製試薬特級を使用した。

標識化合物 L-[U-¹⁴C] システイン塩酸塩は Radiochemical Center (Amersham, England) 製で、比放射能は 27.0 mCi/m mol である。液体シンチレーターは Amersham 社製 PCSTM を使用した。

2. 投与試料の調製

塩化カドミウム単独経口投与試料は、29.78 mM ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 6.8 mg/ml) および 5.96 mM (1.36 mg/ml) の濃度に蒸留水で溶解して調製した。同時経口投与試料は、L-システイン塩酸塩を塩化カドミウム 29.78 mM に対してはモル濃度で 1~50 倍、また塩化カドミウム 5.96 mM に対しては 1~500 倍となるように添加溶解して調製した。他のアミノ酸、有機酸も各々塩化カドミウム 29.78 mM に対してモル濃度で 50 倍となるように調製した。

塩化カドミウム単独静脈注射用試料は、塩化カドミウ

^{*1} 重金属の生体内挙動に関する研究 (第 1 報)^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区中道 1-3-69

ム 9.85 mM の濃度に生理食塩水に溶解して調製し、システイン同時静脈注射用試料は、L-システイン塩酸塩を塩化カドミウム 9.85 mM に対してモル濃度で 50 倍となるように添加溶解して調製した。

トレーサー実験による塩化カドミウムおよび $[^{14}\text{C}]$ システイン同時経口投与試料は、比放射能が $10 \mu\text{Ci/ml}$ となるように標識化合物を 0.0588 mg/ml の濃度に溶かし、さらに塩化カドミウム 29.78 mM に対してモル濃度で 50 倍となるように L-システイン塩酸塩を添加溶解して調製した。

3. 動物実験

Sprague dawley 系雄性ラットを日本クレア(株)より 4 週令で購入し、室温 23°, 湿度 50% の飼育環境に約 10 日間馴らし体重 130~150 g のものを実験に供した。なお飼育には日本クレア(株)製 CE-2 固型飼料を用いた。試料の投与は 1 回経口投与とし、投与前 17 時間絶食して投与試料の 0.5 ml/rat を胃ゾンデにて強制投与した。また、静脈注射用試料は尾静脈より 0.2 ml/rat を注入した。投与後 1, 3, 6, 24 時間にラットをエーテル麻酔後心臓穿刺により血液を採取し、ついで臓器を摘出し生理食塩水でよく洗浄して以下の測定用試料とした。

4. 臓器中の Cd の測定

摘出した臓器を精秤して、できるだけ細かく切り低温灰化用サンプルボードにとった。血液はサンプルボードにとって、あらかじめ真空凍結乾燥器 (Atomo-Vac) を用いて凍結乾燥しておいた。上記試料を低温灰化装置 (International Plasma Corporation 社 1101B 型) で radio frequency power 200 W, 酸素流量 200 ml/min の条件で低温灰化した。灰化後灰分を少量の希硝酸に溶

Fig. 1. Effect of L-cysteine molarity on the intake of cadmium in rat liver

Concentration of cadmium was expressed as the mean $\pm$ S.E. for 3 rats at 24 hr after oral administration

Administ. dose $\square$: CdCl_2 , 3.4 mg (29.78 mM)/rat
 $\square$: CdCl_2 , 0.68 mg (5.96 mM)/rat

* Significantly different ($p < 0.05$) from Cd only administration

Fig. 2. Effect of L-cysteine molarity on the intake of cadmium in rat kidney
 For details see Fig. 1

Fig. 3. Distribution pattern of cadmium in rat organs after oral administration
 Administ. dose: CdCl_2 was 3.4 mg/rat
 L-cysteine was 50 times of CdCl_2 on molarity

解後水浴上で蒸発乾固して、これに 0.5N 硝酸を加えてよく溶解し一定容とした。これを適宜 0.5N 硝酸で希釈してフレイム原子吸光光度計 (日本ジャーレルアッシュ(株)製 AA-781 型) で D_2 補正を行って測定した。

5. 肝臓および腎臓上清分画のゲルろ過

摘出した臓器に 5 倍量の 0.25M ショ糖溶液を加え、水冷しながらホモジナイズし遠心分離器 ((株)日立製作所製分離用超遠心器 55-P-2 型) で超遠心分離 (105,000 $\times g$ 1 時間 4°) して上清分画を得た。この上清 2 ml を Sephadex G-75 のカラム (2.0 $\times$ 40 cm) を用いてゲルろ過 (0.01 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4 30 ml/hr) した。分取した溶出液 (5 ml/tube) について Cd 濃度, タンパク質量, 吸光度 (280 nm および 250 nm), $[^{14}\text{C}]$ システインの放射活性を測定した。Cd の分析は原子吸光法で直接定量し, タンパク質は Bio-Rad 社 protein assay 法によりタンパク質を発色させ, 595 nm における吸光度を測定した。 $[^{14}\text{C}]$ システインの放射活性は, 溶出液 5 ml をカウンティングバイアルにとり液体シンチレー

Table 1. Effect of Amino Acids and Organic Acids on the Distribution of Cadmium in Rat Organs

Control	(μg/g)					
	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung	Blood
	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Cd	6.00±0.07	1.45±0.30	0.42±0.10	0.28±0.08	0.19±0.03	0.04±0.01
Cd+L-Cysteine	30.10±4.43*	22.60±4.06*	1.97±0.69*	1.02±0.22*	1.64±0.46*	0.14±0.02*
Cd+L-Histidine	21.76±3.40*	5.19±1.26*	1.34±0.30*	0.72±0.23*	1.00±0.21*	0.11±0.02*
Cd+L-α-Alanine	10.30±2.62	1.51±0.21	0.40±0.16	0.33±0.13	0.21±0.03	0.06±0.01
Cd+L-Proline	5.85±1.54	1.26±0.29	0.48±0.20	0.27±0.08	0.24±0.08	0.05±0.02
Cd+L-Valine	6.48±1.96	1.64±0.21	0.53±0.15	0.26±0.09	0.21±0.04	0.05±0.02
Cd+L-Threonine	6.07±1.37	1.29±0.31	0.45±0.12	0.31±0.09	0.23±0.04	0.04±0.01
Cd+Citric acid	24.07±5.85*	7.07±1.87*	1.26±0.31*	1.11±0.30*	0.95±0.29*	0.10±0.03*
Cd+DL-Malic acid	8.09±3.00	1.24±0.35	0.41±0.12	0.34±0.14	0.28±0.03	0.04±0.02
Cd+Lactic acid	5.46±2.18	1.03±0.30	0.32±0.11	0.22±0.07	0.20±0.07	0.04±0.01
Cd+L-Ascorbic acid	9.28±3.05	1.48±0.28	0.78±0.10	0.33±0.12	0.20±0.04	0.05±0.02
Cd+DL-Tartaric acid	4.50±1.26	0.99±0.22	0.38±0.12	0.24±0.07	0.18±0.03	0.03±0.01
Cd+Succinic acid	16.37±2.93*	2.16±0.44	0.95±0.28*	0.40±0.12	0.41±0.11*	0.06±0.01

Administ. method: Single oral administration

Administ. dose: CdCl₂ was 3.4 mg/ratAmino acid and organic acid were 50 times of CdCl₂ on molarity

The values represent mean±S.E. for 5 rats at 24 hr after oral administration

* Significantly different ($p<0.05$) from Cd administration

ター 10 ml を加え、液体シンチレーション計数装置 (Packerd Model 3315) を用いて測定した。

実験結果および考察

1. Cd の肝臓および腎臓への取り込みに及ぼす L-システインの影響

塩化カドミウムを経口投与すると、吸収された Cd の大部分が肝と腎に取り込まれることはよく知られている⁷⁾。そこで、塩化カドミウムとして 3.4 mg/rat および 0.68 mg/rat を 1 回経口投与し、その際同時投与する L-システイン濃度を変え Cd の肝および腎への取り込みに及ぼす影響をみた。その結果を Fig. 1, 2 に示す。

肝では、Cd 高濃度投与群において、Cd に対して L-システイン量をモル比で 50 倍にすると、肝への Cd の取り込み量が著しく増加した。このような Cd の取り込み増大効果は、Cd 低濃度投与群では L-システイン量を Cd の 1~500 倍としてもいづれも認められなかった。腎では、Cd 高濃度投与群において、L-システイン量がモル比で Cd の 20 倍より徐々に Cd の取り込み増加がみられ、肝と同様に 50 倍で最高の値を示した。Cd 低濃度投与群は、L-システイン量が Cd の 100 倍までは Cd の取り込み増加を認めなかったが、250~500 倍で顕著な Cd の取り込み増加を認めた。この結果から、Cd の肝および腎への取り込みには、投与する Cd の量より

も共存する L-システイン量が影響するものと思われる。また、Fig. 1, 2 の結果から腎における L-システインの Cd 取り込み増大効果が肝に比して大きいことより、腎の方が肝よりもシステインの影響を受けやすいのではないかと考えられる。

2. Cd の肝臓、腎臓および血液中への取り込みの経時変化

Cd の肝および腎への取り込みには、Cd 高濃度投与群で L-システイン量がモル比で Cd の 50 倍の時に顕著な Cd 取り込み増加を認めたので、この条件で投与後 24 時間以内での Cd 濃度の経時変化をみた。その結果を Fig. 3 に示す。

同時投与群において、肝では経時的に Cd 濃度は増し、腎では投与後 3 時間で最大となり、以降 6 時間で半減し 24 時間まで同じ値を示した。血液では投与後 1 時間で最大となり以後減少し、6 時間から 24 時間まで同じ値であった。また、Cd 単独投与の経時変化もみたが、低い濃度レベルで同時投与群とほぼ同じ傾向を示した。

3. Cd の臓器分布に及ぼすアミノ酸、有機酸の影響

1 の結果より、Cd の用量が 3.4 mg/rat で L-システイン量がモル比で Cd の 50 倍の時に、肝および腎への Cd の取り込み量が著しく増加したので、他のアミノ酸、有機酸の影響についても Cd の 50 倍モル濃度で検討した。投与後 24 時間における Cd の臓器分布をみた結果を

Fig. 4. Typical chromatography of liver and kidney supernatant layer after oral administration Administ. dose: Details see Fig. 3

Table 1 に示す。

アミノ酸と有機酸各 6 種のうち、アミノ酸では L-システインと L-ヒスチジン、有機酸ではクエン酸とコハク酸の Cd 取り込み効果が大きかった。特に L-システインの Cd 取り込み効果が顕著であり、Cd 単独投与に比べて腎では約 15 倍、肝では約 5 倍、他の臓器では約 3~8 倍の Cd 取り込みを示し、腎への取り込み比率が高かった。

Cd の組織への取り込みに対する L-システインの影響については、Gunn ら⁹⁾は L-システインの腹腔内投与によりマウスの Cd による腎臓障害がより顕著になることを見出し、Cd (0.012 mM/kg, 皮下注射) と L-システイン (6 mM/kg, 腹腔内投与) を同時投与後 1 時間で、腎の Cd レベルは Cd の単独投与群より 30 倍も高かったと報告している。また、児島ら^{5), 6)}はラット反転小腸を用いて Cd の腸管吸収を検討し、Cd とのキレート安定度定数の大きい L-システインや L-ヒスチジンが Cd の小腸透過を促進したとしている。

4. Cd の生体内存在様式

4.1 Cd および L-システイン同時投与後の肝、腎上清分画のゲルろ過

Cd および L-システイン (50 倍モル濃度) 同時経口投与後 1 時間の肝ならびに投与後 6 時間の腎の Sephadex G-75 によるゲルろ過の結果を Fig. 4 に示す。

肝の Cd の溶出パターンは二つのピークに分かれ、最初のピークは高分子量タンパク質の溶出位置にあたり、次の Cd ピークはチトクローム c の溶出位置と一致した。このことより 2 番目のピークの Cd はメタロチオネイン (MT)^{9), 10)} と結合していると思われる。腎の Cd 溶出パターンも二つに分かれ肝と同様である。

4.2 経口投与後の Cd のゲルろ過

Cd および L-システイン (50 倍モル濃度) 同時経口投与後 24 時間における肝、腎の Cd のゲルろ過パターン

を Fig. 5 に示す。

肝では投与後 1 時間から 24 時間までゲルろ過パターンに変化はなく、投与後 1 時間でもすでに上清分画の 90% 以上の Cd が MT 画分に存在していた。経時的には Cd は増加する傾向を示したが、増加した Cd は MT 画分に入っていた。一方、腎では投与後 1 時間では大部分の Cd は高分子タンパク質画分に存在していた。しかし、この Cd は経時的に MT 画分へ移行していき、24 時間では大部分の Cd は MT 画分に入っており Cd の取り込みは 24 時間で全く逆転した。

以上のゲルろ過パターンの経時変化は、今までに報告されたゲルろ過パターン¹¹⁾とは肝と腎において全く逆の結果を示した。この結果の相違は、著者の Cd の投与は Cd および L-システインを同時経口投与しており、これがパターンの変化となって現れてくるものと考えられた。しかし、Cd 単独経口投与のゲルろ過パターンをみたが、低い濃度レベルで Fig. 5 と全く同様のパターンを示した。すなわち経口投与では、パターンの相違は投与の際の L-システインの有無によるものではないことがわかった。

4.3 静脈注射後の Cd のゲルろ過

Cd 単独および Cd+L-システイン (50 倍モル濃度) を尾静脈より投与して、肝および腎のゲルろ過パターンをみた。その結果を Fig. 6, 7 に示す。

Cd 単独静脈注射の場合は、今までに報告されたパターン¹¹⁾と同一であり、肝では Cd は経時的に高分子タンパク質画分より MT 画分へ移行し、腎では経時的パターンの変化はなく 1 時間後から MT 画分に存在していた。次に Cd+L-システイン (50 倍モル濃度) 静脈注射の場合、肝のパターンは Cd 単独静注と同一であったが、腎のパターンは異なり、Cd は高分子タンパク質画分より MT 画分へ徐々に移行していった。すなわち静脈注射では、L-システインの有無が腎のパターンの相違とな

Fig. 5. Gel filtration of liver and kidney supernatant layer after oral administration
Administ. dose: Details see Fig. 3

Fig. 6. Gel filtration of liver and kidney supernatant layer after intravenous injection
Administ. dose: CdCl_2 was 0.45 mg/rat

ることがわかった。

4.2, 4.3 の結果から, Cd 単独投与では経口投与と静脈注射の投与方法を変えると, 肝および腎において Cd による MT の生成過程が異なり, 更に L-システインの同時投与によって, 経口投与の時には MT の生成過程が Cd 単独投与と同じであるが, 静脈注射の時には異なるという興味ある事実が明らかとなった。今までの報告

では, 投与する金属種 (例えば Hg と Cd) の相違により, MT の生成に明らかな差異のあることが認められている¹²⁾。今回の実験における Cd の投与方法の相違および同時投与する化合物 (L-システイン) によって, MT の生成過程に差異があるということは, 金属による MT の誘導ならびに毒性を考える上で重要なことであると考える。

Fig. 7. Gel filtration of liver and kidney supernatant layer after intravenous injection
 Administ. dose: CdCl_2 was 0.45 mg/rat
 L-cysteine was 50 times of CdCl_2 on molarity

Fig. 8. Gel filtration of liver and kidney supernatant layer after oral administration of $\text{CdCl}_2 + [^{14}\text{C}]$ cysteine
 Administ. dose: CdCl_2 was 3.4 mg/rat
 L-cysteine including $[^{14}\text{C}]$ cysteine was 50 times of CdCl_2 on molarity

5. Cd および $[^{14}\text{C}]$ システイン同時経口投与後の $[^{14}\text{C}]$ システインの挙動

Cd と同時経口投与したシステインの生体内挙動をみるために $[^{14}\text{C}]$ システインを用いた。すなわち、MT の

構成全アミノ酸の約 1/3 がシステインであることより、 $[^{14}\text{C}]$ システインの MT への取り込みを利用してこのタンパク質の生成過程を検討した。Cd および $[^{14}\text{C}]$ システイン同時投与後24時間の各時間における肝、腎の Se-

phadex G-75 による ^{14}C システインのゲルろ過パターンを Fig. 8 に示す。

肝では投与後1時間で MT 画分への ^{14}C システインの取り込みを認め、経時的に取り込み量の増加傾向を示し、6 時間後からは著しい増加を認めた。腎では投与後1時間で MT 画分への ^{14}C システインの取り込みをわずかに認める程度であったが、肝と同様に経時的に取り込みを増していった。なお、 ^{14}C システイン単独投与では、Cd による MT の誘導がないため ^{14}C システインの取り込みを認めなかった。以上の MT の生成過程と Fig. 5 に示した Cd の MT 画分への取り込みとを照合してみると、肝では Cd が MT 画分へ取り込まれてから6時間ぐらい経ってから急速に MT の生合成が高まるものと思われる。腎では Cd の MT 画分への取り込みにはほぼ比例して MT が生合成されていった。

^{14}C システインの MT への取り込みについては、Piotrowski ら¹²⁾は ^{14}C システインの腹腔内投与で肝 MT および腎 MT に取り込みを認めているが、MT の生合成が肝と腎で関連をもって起こるのか、全く互いに関係なく起こるのか明らかにされていない。また、Probst ら¹³⁾はマウスを用いて、Cd を腹腔内投与後の経時的な MT への ^3H システインの取り込み量を測定して、肝と腎の MT 生成速度を調べた。それによると、肝 MT への ^3H システインの取り込みは Cd 投与後6~12 時間で最大となり、腎 MT へは3 時間で最大となることを認めている。その結果と、著者らの経口投与で得た結果とを比較してみると、肝 MT への取り込みに関してはよく一致したが、腎 MT への取り込みは一致しなかった。この理由は Fig. 5, 6 で示したように、Cd の投与方法により MT 画分への Cd の取り込み過程が異なるので、これに伴って MT への放射性システインの取り込み量も違ってくることによると思われる。いずれにせよ Fig. 8 で明らかなように、MT 画分への ^{14}C システインの取り込みは、腎より肝の方が大きいことより、Cd による MT 生成の主要な臓器は肝であると言える。

要 約

Cd のラット体内分布に及ぼすアミノ酸、有機酸の影響および生体内に吸収された Cd とシステインの挙動を検討して次の結果を得た。

1. Cd の吸収に及ぼすアミノ酸、有機酸の影響をみたが、L-システインの Cd 取り込み効果が顕著であり、L-システイン量をモル比で Cd の 50 倍同時経口投与したときの臓器内 Cd 濃度は、Cd 単独経口投与 (3.4 mg/rat) と比較して肝では約 5 倍、腎では約 15 倍を示した、

2. 肝と腎に取り込まれた Cd を Sephadex G-75 によるゲルろ過を行いその挙動を調べた。その結果、経口投与と静脈注射による Cd の投与方法の相違および同時投与するシステインの有無により、MT の生成過程に差異のあることが明らかとなった。

3. ^{14}C システインの MT への取り込みを利用して肝と腎における MT の生成過程を調べた。その結果、Cd と ^{14}C システイン同時経口投与後1時間で肝 MT および腎 MT への ^{14}C システインの取り込みを認め、経時的にその取り込みを増していった。特に肝では6~24時間後に ^{14}C システインの取り込みが大きいことを認めた。

終りに臨み本研究を行うにあたり多大の御指導御助言をいただきました大阪大学薬学部、近藤雅臣教授、国立衛生試験所、内山 充部長および当所、国田信治副所長に深謝いたします。なお、本研究の一部は環境庁環境保全研究助成金の援助を受けたことを付記して深謝いたします。

文 献

- 1) 小林 純, 中原裕子, 長谷川利子: 日衛誌. **26**, 401~407 (1971).
- 2) Bunn, C. R., Matrone, G.: J. Nutrition, **90**, 395~399 (1966).
- 3) Itokawa, Y., Abe, T., Tanaka, S.: Arch. Environ. Health, **26**, 241~244 (1973).
- 4) Stowe, H. D., Goyer, R. A., Medley, P.: *ibid.*, **28**, 209~219 (1974).
- 5) 児島昭次, 津住護雄: 薬誌. **94**, 695~701 (1974).
- 6) Kojima, S., Kiyozumi, M., Kamiya, M.: J. Food Hyg. Soc. Japan, **19**, 553~558 (1978).
- 7) 安藤正典, 佐谷戸安好, 外村正治: 衛生化学, **19**, 73~81 (1973).
- 8) Gunn, S. A., Gould, T. C., Anderson, W. A. D.: J. Pathol. Bacteriol., **96**, 89~96 (1968).
- 9) Margoshes, M., Vallee, B. L.: J. Am. Chem. Soc., **79**, 4813~4814 (1957).
- 10) Kägi, J. H. R., Vallee, B. L.: J. Biol. Chem., **235**, 3460~3465 (1960).
- 11) 田中慶一, 末田香里, 岡原国男: 衛生化学, **20**, 98~101 (1974).
- 12) Piotrowski J. K., Trojanowska, B., Wiśniewska-Knypl, J. M., Bolanowska, W.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **27**, 11~19 (1974).
- 13) Probst, G. S., Bousquet, W. F., Miya, T. S.: *ibid.*, **39**, 51~60 (1977).