

担癌マウスにおける肝メタロチオネインの増加について

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導: 青野 要教授)

木 本 真

(昭和60年8月2日受稿)

Key words : Metallothionein, zinc,
tumor-bearing mouse, EATC

序 論

1957年, Margoshes と Vallee によってウマの腎皮質からカドミウムを多量に含有する低分子の蛋白質として発見された(1) Metallothionein (MT)が, 蛋白化学の領外で注目をされるようになったのは, この蛋白がカドミウムの投与によって誘導されることを, Piscator が示してからである(2). その後, MT は亜鉛, 銅, 水銀, 金, 銀等でも誘導されることが明らかとなり, さらには, ホルモンや生理的ストレスでも誘導されることが報告されるに至り(3-9), 中毒学の分野だけではなく, 生理学の分野からも注目されるようになった(10-29). 現在までに金属やホルモン以外でMTを誘導あるいは増加させるものとしては以下のようなものがある. 温度変化, 運動, 絶食, 手術, やけど, 四塩化炭素への曝露, アルキル化剤の投与, 細菌感染, エンドトキシン, インターロイキン I, X線照射, エタノール投与, 麻酔剤の投与(19-30). しかし, その誘導機構やその生物学的役割については依然不明のまま残されている. 従来から考えられてきたこの蛋白質の生物学的役割としては前述したように, この蛋白質がカドミウム等の重金属によって誘導合成されることから重金属の解毒作用が考えられてきたが, 最近ではこの他に, 成長期(胎児)や生理的ストレス下における亜鉛代謝や銅代謝への関与も考えられている. しかし, 実際にこの蛋白質が生体内で, 特に肝臓内でどのような役割をしているのか, 不明の点が多い(31-35).

ところでMTの誘導合成については, 亜鉛と

グルココルチコイドが, そのコントロールをしていると考えられているが(10-18), 担癌生体におけるこれら二つの因子は正常生体に比較すると大きく変動していることが報告されており(36-41), したがって生体でのMTの誘導合成が影響を受けていることが予期される. In vivoでの癌細胞や担癌生体でのMTの動態についてはわずかにマウスに継代された肝癌(H₆)とその肝臓について, マウスでのエールリッヒ癌細胞でのMTの誘導合成についての報告がされているだけで(42, 43), 諸組織でのMTや, あるいはMTの合成と亜鉛代謝やホルモンバランスの変動との関係, その生物学的役割については不明のまま残されている. 以上のことから担癌生体における諸組織のMTの動態, 並びに血清や組織亜鉛量, 血清コルチコステロンの変動を明らかにすることは, 担癌生体でのMTの誘導機構や生物学的役割を考える上で重要と思われることから, 実験を行い若干の結果を得たので報告する.

材 料 と 方 法

- (1) 実験動物: スドー生物材料センターから購入したSPF-ICRオスマウス(体重30-40g)を使用した. なお, マウスは, 購入後, 室温22°C, 照明時間7:00-19:00(蛍光灯80w)の飼育室内で, 飼料としてオリエンタル固型飼料MF, 飲料水として, 水道水で一週間以上の飼育を行った後実験に使用した.
- (2) 試薬: Sephadex G-75, Sephacryl S-300 SF, Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals), Bovine serum albumin, Ferritin,

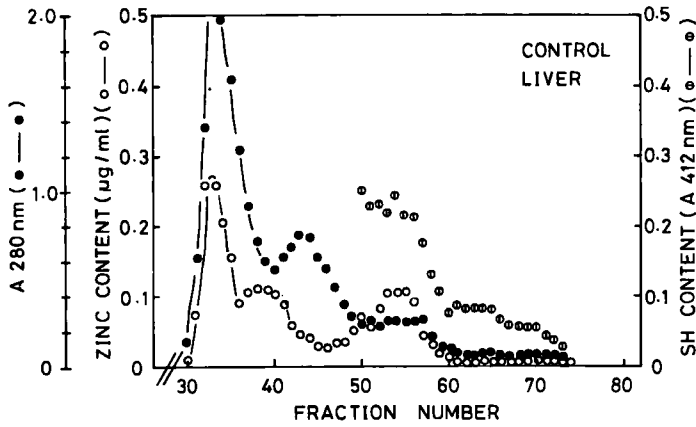


Fig. 1-A

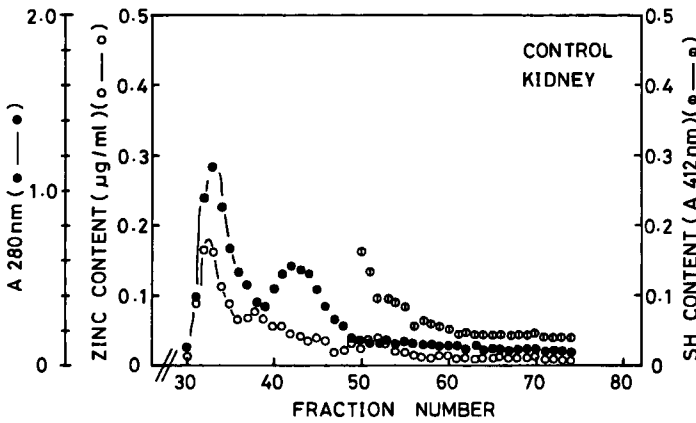


Fig. 1-B

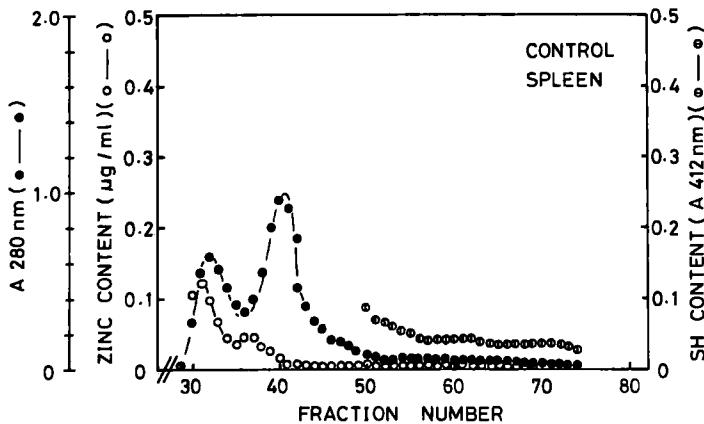


Fig. 1-C

SF, Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals), Bovine serum albumin, Ferritin, Cytochrome C (Sigma chemical Company) Dithiothreitol (DTT), 5-5'-thiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 1-10-phenanthroline (半井化学), Hemoglobin, 亜鉛, カドミウム, 銅標準液 (和光純薬). この他実験には特級の試薬を使用した.

(3) 癌細胞の移植: エールリッヒ癌細胞はICRマウスに継代して実験に使用した. 細胞の移植は腹腔内あるいは大腿部皮下に行った. 腹腔内移植グループの場合は移植後3日目から8日目の間に実験に使用した. 皮下移植グループの場合は移植後14日目に実験に使用した.

(4) 亜鉛, カドミウム, アクチノマイシンD投与: 亜鉛あるいはカドミウムは生理食塩水に溶かして10 mg/kg, あるいは1 mg/kgの割合で投与した. 投与は癌細胞移植後4日目から6日目まで行い, 7日目に動物を処分し, その臓器あるいは癌細胞を取り実験に使用した. アクチノマイシンD (Actinomycin D)はPropylene glycol-0.9% NaClに溶かして800 μ g/kgの割合で投与した. 投与は癌細胞移植後5日目に行い, 6日目あるいは7日目に動物を処分し, 肝臓を取り実験に使用した.

(5) 血清の調製: 断頭放血により採取した血液を37°Cで60分間静置し, その後3000rpm, 20分の遠心を行い, その上清

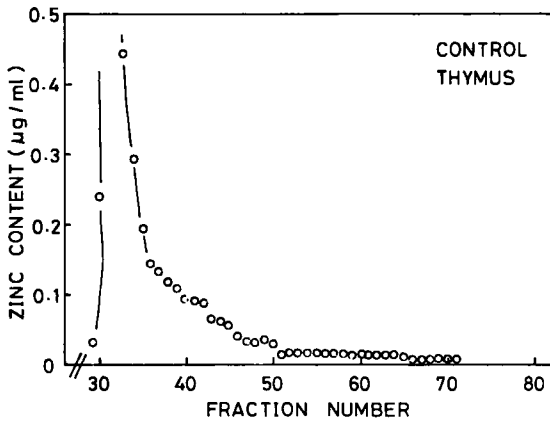


Fig. 1-D

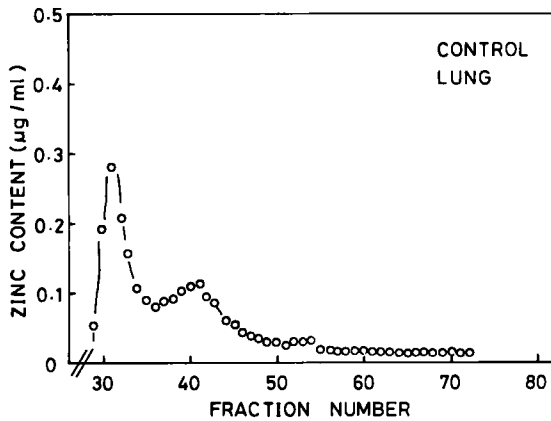


Fig. 1-E

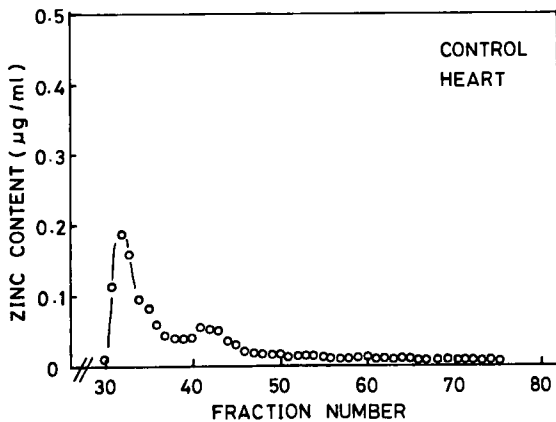


Fig. 1-F

を血清として使用した。

(6) 細胞可溶性分画の調製：
マウスを断頭放血後、臓器を摘出し、0.15 M KCl-10 mM Tris/HCl 緩衝液で洗浄し使用するまで -20°C で保存した。尚組織の保存は1週間以内とした。 -20°C で保存して置いた各臓器を室温解氷後、湿重量10g当たり50-40mlの0.15 M KCl-10 mM DTT-10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH7.4) を加えて、ガラスホモジナイザーに続いて、テフロンホモジナイザーを使用した二度のホモジナイズによって、組織ホモジネートを調製した。これらの組織ホモジネートからさらに 4°C 下で1万G、30分間、10万G、60分間の二度の遠心によって細胞可溶性分画を得た。調製した可溶性分画は実験に使用するまで -20°C で保存した。

(7) メタロチオネイン (MT) 量の測定：各組織の可溶性分画(50-100mg 蛋白)をセファデックスG-75(Sephadex G-75)のカラム(2.5×90cm)に添加し、50mM Tris/HCl 緩衝液 (pH8.4) を流速20ml/hの割合で流下し、 $4-5^{\circ}\text{C}$ 下でゲル濾過を行い溶出したMT分画の亜鉛量、SH量、蛋白量を測定することにより、MT量の指標とした。また、この他にMTを含む臓器上清にCdを添加してMTに結合したCd量からMT蛋白量を求めた。Cdの処理はOnosaka et al. (44)の方法に従って行った。組織上清5 mlにCd溶液(1 mg/ml)100ulを添加して 25°C

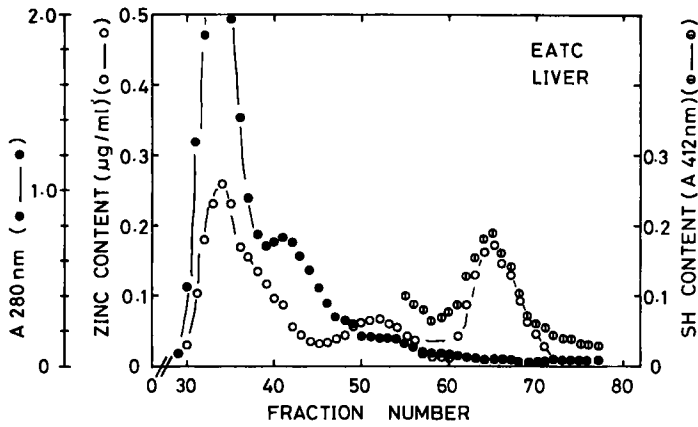


Fig. 1-G

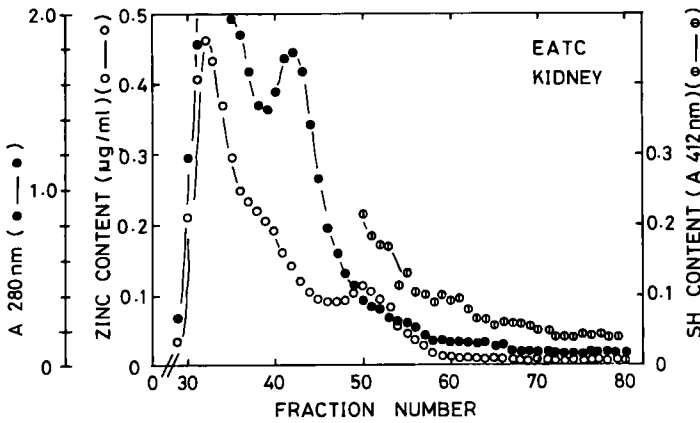


Fig. 1-H

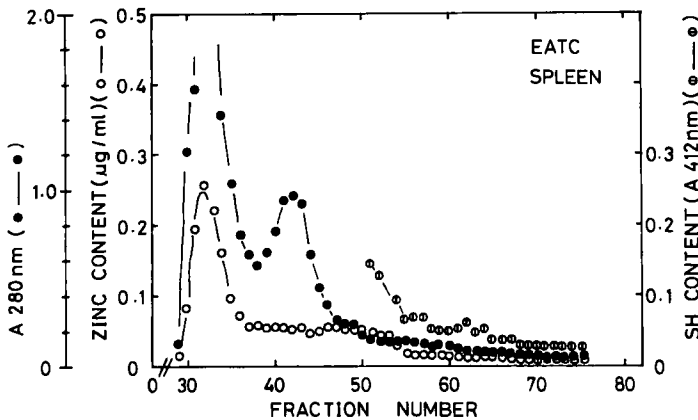


Fig. 1-I

で5分間反応した後、この反応液にヘモグロビン溶液(5 mg/ml)を加えて80°Cで3分間加熱処理後冷却し、5000 rpm、10分間遠心分離して上清を得た。この操作を3回行った後、直接にこの上清中のCd量を原子吸光法で測定し、この総Cd量からMTの分子量6,000、金属結合量6 gatom/molとして、MT蛋白量を求めた。

(8) 血清のセファクリルS-300 (Sephacryl S-300)によるゲルろ過：血清をS-300のカラム(2.5×90cm)に添加し0.1M NaCl-25mM Tris/HCl緩衝液(pH8.4)を流速20ml/hの割合で流下し、4-5°C下でゲルろ過を行い分画した各口液中の亜鉛量を原子吸光法により、蛋白量を280nm分光法により測定した。

(9) アルブミン分画の亜鉛含量：血清をCL-6Bカラム(2.5×30cm)に添加し、その後50mM NaCl-50mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)420mlを流下し非吸着性分画を洗い流し、その後、0.2M NaSCN-50mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)を流すことで、アルブミンを溶出し、さらに、アルブミンに緩い結合をしていてCL-6Bに吸着した亜鉛を溶出するために、50mM NaCl-0.4mM EDTA-50mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)を流し、各分画口液中の亜鉛量と蛋白量を測定した。

(10) 亜鉛、銅量の測定：各分画口液中、あるいは試料中の金属量は島津原子吸光度計(AA-640-13)を使用して、原

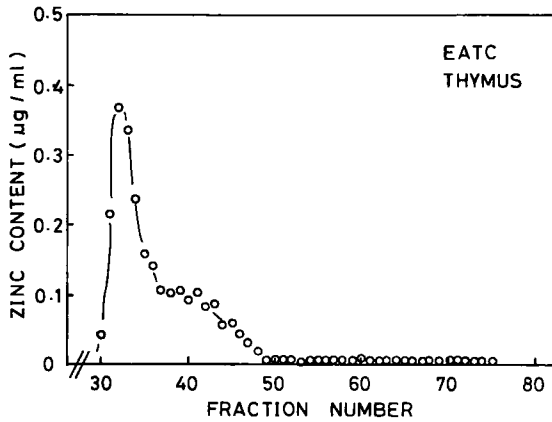


Fig. 1-J

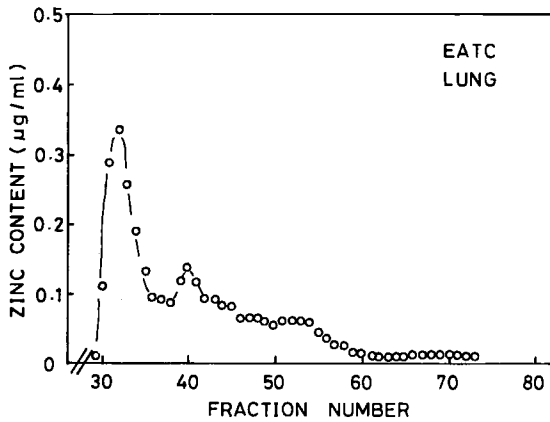


Fig. 1-K

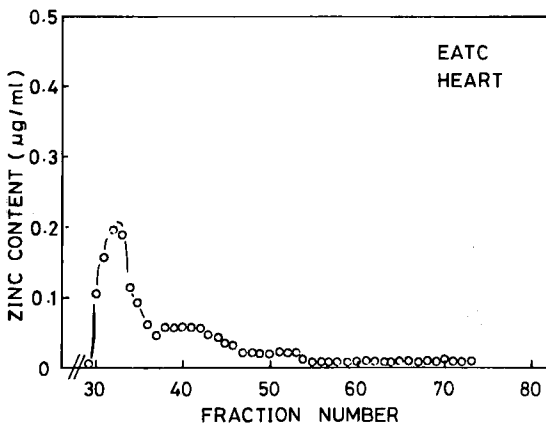


Fig. 1-L

子吸光法により測定した。なお、血清は0.05N HClで希釈して、組織は硝酸/H₂O₂で灰化して試料とした。標準液としては、和光純薬製の亜鉛、銅標準液を0.05N HCl溶液で希釈したものを用いた。

(1) その他：SH量はTakeda(27)の方法を参考にして測定した。蛋白質の測定はアルブミンあるいはグロブリンを標準物質として色素法(45)により行った。血清コルチコステロン量はUsui et al.(46)の蛍光法によって測定した。MT 11の分離精製はラット肝臓よりWeser et al.(47)の方法に従って行った。

結 果

(1) エールリッヒ移植マウスの主要臓器の可溶性分画のセファデックスG-75でのゲルろ過における亜鉛の分布：担癌生体の臓器中あるいは癌細胞のメタロチオネイン(MT)量を詳細に測定した報告はなく、わずかにマウスの肝癌(H₆)とその肝臓(42)についてとマウスのエールリッヒ癌細胞(43)のMTについての報告があるのみで他の臓器についての報告はみあたらない。そこで、ETCを腹腔内に移植したマウスの肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胸腺、EATCのMTについての検討を行った。

Fig. 1は対照群とETCを腹腔内移植後7日間のマウスの肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胸腺とエールリッヒ癌細胞の細胞可溶性分画のセファデックスG-75でのゲルろ過における亜鉛、-SHと蛋白の分布を示したものである(Fig. 1A-M)。対照群での各臓器の亜鉛の分布は一つから三つのピークとして認められた(Fig. 1A-F)。第一、そして第二のピークは分画番号30-50にかけて認められた。この分画の亜鉛は分子量60,000以上の蛋白質に結合して存在する亜鉛であり、可溶性分画の大部分の亜鉛はこの分画に認められた。第三ピークは肝臓あるいは腎臓で認められるもので、分子量30,000前後の蛋白質に結合したものであった。マーカー蛋白(Ferrithin M.W.=480K, BSA

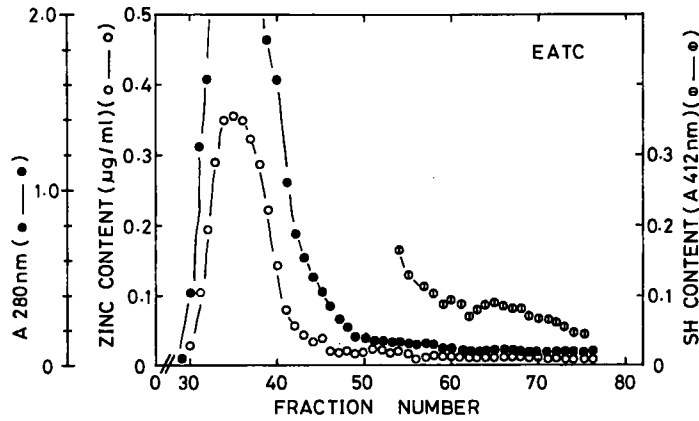


Fig. 1-M

Fig. 1. Sephadex G-75 elution profiles of zinc in cytosol of tissue from normal and tumor-bearing mouse. Cytosol (100 or 50 mg protein) prepared from pooled tissues was applied a Sephadex G-75 column, and eluted with 50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.4, at 5 °C. 6 ml aliquots were collected and used for assay. The tumor-bearing mouse was killed 7 days after tumor implantation. Other experimental conditions are described in text. (○), Zinc content ; (●), A_{280 nm} ; (○●), SH content

TABLE I
ZINC AND METALLOTHIONEIN IN LIVER OF CONTROL AND TUMOR-BEARING MOUSE.

Group	Liver		Metallothionein	
	Zinc µg/g ^a	Cu µg/g ^a	MT-Zn µg/g ^a	MT µg protein/g ^b
Control	29.104 ± 1.104	6.262 ± 0.200	0.839 ± 0.083	11.540 ± 0.226
Tumor	41.973 ± 1.874*	5.693 ± 0.500	10.565 ± 0.515*	193.937 ± 57.879*

The mouse was killed by decapitation 7 days after implantation.

Mean ± SD of three mice. a: Concentration in micrograms per gram of wet weight.

b: Concentration in micrograms protein per gram of wet weight. * Significantly different from control (P < 0.01).

M.W.=66 K, Superoxide dismutase M.W.=32 K, Cytochrome C M.W.=12.5 K, Hepatic metallothionein M.W.=6.0 K)の溶出パターンによれば、ラット肝 MT は分画番号60-70の分子量10,000の分画に溶出することからマウスのMTもこの分画に溶出するものと判断されるが、対照群ではどの臓器においてもこの分画の亜鉛量は低い値を示していた。このゲル通過

の亜鉛のパターンから考えて対照群においてはMTはほとんど存在しないものと推定された。一方、担癌マウスの臓器での亜鉛の分布も対照群とほとんど同じで、一つから三つのピークとして認められた (Fig. 1 G-M)。しかしこのなかで肝臓においてのみ分画番号60-70のMTが溶出される分画に亜鉛のピークが認められた (Fig. 1 G)。また、この分画にはSH量の増加

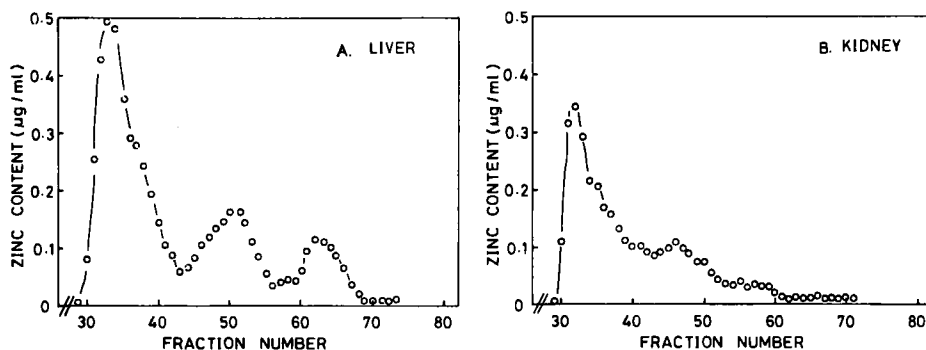


Fig. 2 - A

Fig. 2 - B

Fig. 2. Sephadex G-75 elution profiles of zinc in cytosol of liver and kidney from tumor-bearing mouse. The tumor-bearing mouse was killed 14 days after tumor implantation(subcutaneous injection). Cytosol(100mg protein)prepared from livers and kidneys were applied a Sephadex G-75 column. Other experimental conditions are described in text. (○), Zinc content.

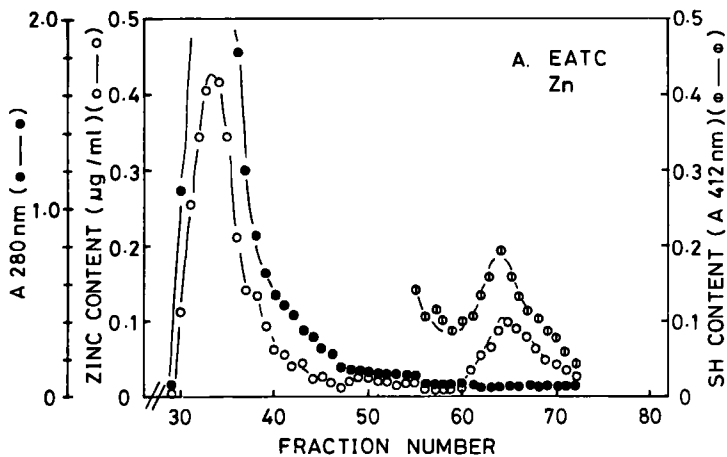


Fig. 3 - A

Fig. 3. Sephadex G-75 elution profiles of zinc and cadmium in cytosol of tumor from zinc or cadmium loaded tumor-bearing mouse. Cytosol(100mg protein)prepared from tumor was applied a Sephadex G-75 column. Other experimental conditions are described in text. (○), Zinc content ; (○), Cadmium content ; (●), A 280 nm ; (○), SH content.

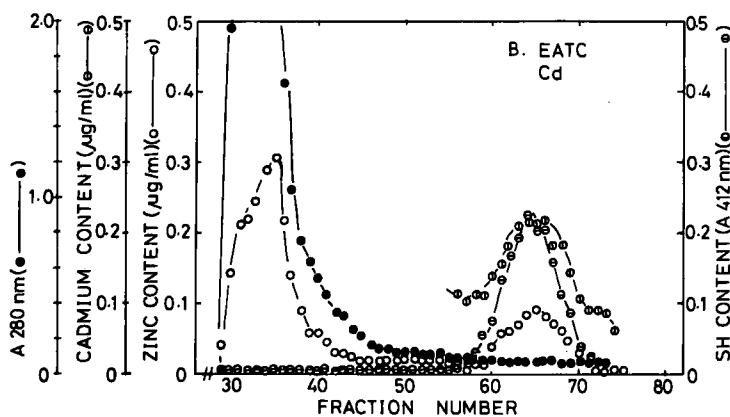


Fig. 3 - B

TABLE II
EFFECT OF ACTINOMYCIN D ON SERUM,
LIVER AND METALLOTHIONEIN ZINC CON-
TENT IN TUMOR-BEARING MOUSE.

Group	Serum Zn ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Liver Zn ($\mu\text{g}/\text{g}$) ^a	MT-Zn ($\mu\text{g}/\text{g}$) ^a
Control	1.190 \pm 0.078	29.103 \pm 1.101	0.839 \pm 0.083
6 day	0.603 \pm 0.009*	38.727 \pm 1.874*	5.327 \pm 1.319*
6 day(Act.D)	1.320 \pm 0.028	27.167 \pm 0.566	1.257 \pm 0.435
7 day	0.621 \pm 0.062*	41.973 \pm 1.875*	10.565 \pm 0.515*
7 day(Act.D)	1.169 \pm 0.111	24.023 \pm 0.770	1.475 \pm 0.683

The mouse was killed by decapitation 6 days and 7 days after implantation. Actinomycin D was administered(i.p.) 5days after implantation.

Mean \pm SD of three mice . * Significantly different from control($P < 0.01$).

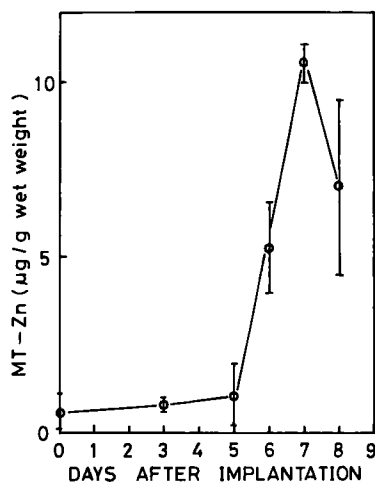


Fig. 4. The time course of appearance of hepatic metallothionein. The mouse was killed at various time after tumor implantation. Zinc content of metallothionein fractions were estimated from each elution profiles on the Sephadex G-75 column as shown in Fig. 1. Data are presented as mean \pm S.D.(n=3)

も認められることからMTが増加しているものと思われた。

(2) エールリッヒ移植マウスの肝MTの増加：
肝臓MTの増加をさらに確認するため、Cd結合

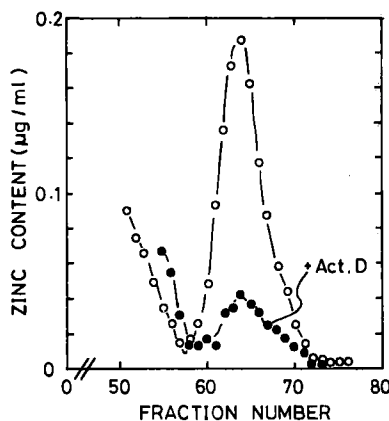


Fig. 5. Sephadex G-75 elution profiles of zinc in cytosol of livers from tumor-bearing mouse and actinomycin D loaded tumor-bearing mouse. Experimental conditions are described in text. (○), Zinc content.

法を用いて検討した。Table 1はセファデックスG75でのゲルろ過から求めた、MT結合亜鉛量を、またCd結合法により求めたMT蛋白質量をまとめたものである。肝臓ではMTに結合した亜鉛量は、対照群では0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weightと低値を示していた。この時Cd結合法で求めたMT量も11 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weightと低い値を示した

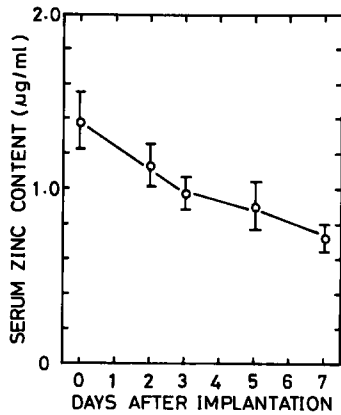


Fig. 6. Changes in zinc level of serum in tumor-bearing mouse. Experimental conditions are described in text. Data are presented as mean \pm S.D. (n=3).

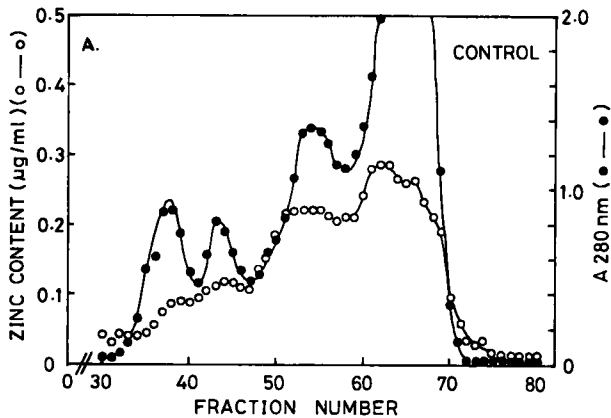


Fig. 7-A

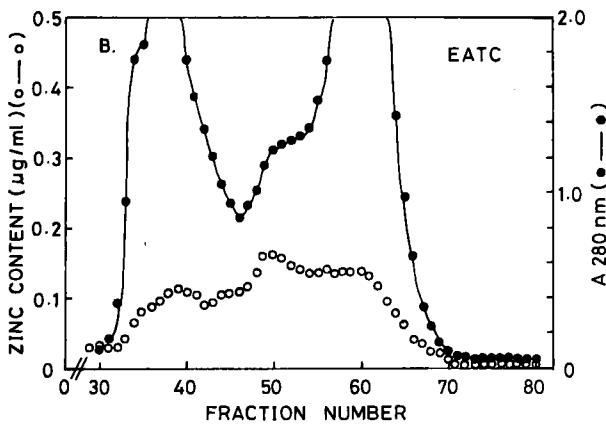


Fig. 7-B

Fig. 7. Chromatography of serum on Sephacryl S-300. The tumor-bearing mouse was killed 7 days after tumor implantation. Experimental conditions are described in text. A, Control mouse (Serum 6.5 ml); B, Tumor-bearing mouse (Serum 7.0 ml); (○), Zinc content; (●), $A_{280 \text{ nm}}$.

ことから、MTは存在しないものと思われた。一方、EATC移植後7日目のマウスの肝臓ではMTに結合した亜鉛量 $11 \mu\text{g/g}$ wet weightと高い値を示し、またMT蛋白量も $194 \mu\text{g/g}$ wet weightと対照群の肝臓に比較して17倍と有意に高い値を示していた。これらの結果からも肝臓MTが増加していると判断された。

以上のようにETCを腹腔内に移植した時に肝臓にMTの増加が認められたことから、このような肝臓でのMTの増加が癌細胞の移植した場所でのどのような影響を受けるか検索するためETCを皮下に移植した時のマウスの肝臓、腎臓のMT量について検討した。Fig. 2はETCを皮下に移植した14日目のマウスの肝臓と腎臓のゲル透過における亜鉛の分布を示したものであるが、肝臓ではMT分画に亜鉛の蓄積が認められMTの増加が推定されたが(Fig. 2 A)、腎臓ではその増加は認められず腹腔内移植の時と同じであった(Fig. 2 B)。以上のETC腹腔内、皮下移植の結果よりETCが増殖したマウスでは、検索した範囲の臓器では肝臓においてのみMTの誘導合成が生じていると結論した。

(3) 担癌マウスへの亜鉛、カドミウム投与による癌細胞のメタロチオネインの誘導：ところで、ETCについてはMTの存在がすでに報告(43)されているが、本実験条件下(ETC腹腔内移植後7日目)ではMT分画の亜鉛量から判断して、MTの存在量は極めて少ないように思われた(Fig. 1)。ETCのMT合成能の有無を検索するためETC腹腔内移植後4日目から、腹腔内に亜鉛あるいはカドミウムを投与

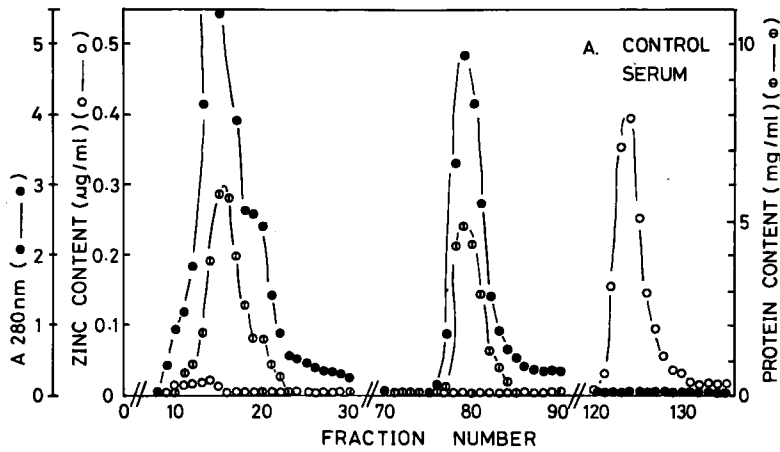


Fig. 8-A

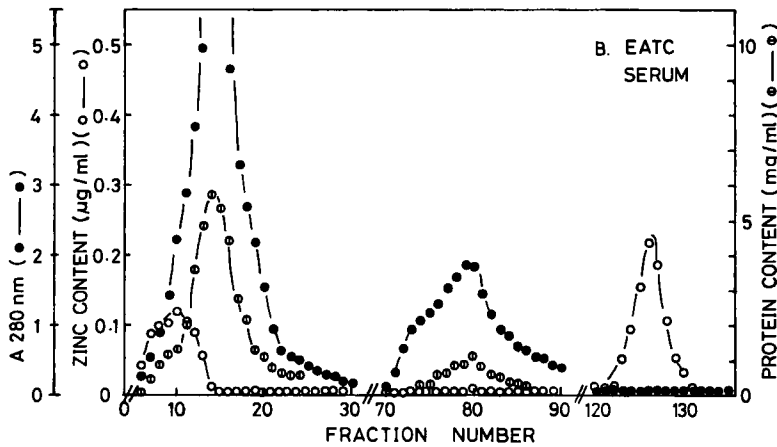


Fig. 8-B

Fig. 8. Blue Sepharose CL-6 B elution profiles of serum prepared from normal and tumor-bearing mouse. The tumor-bearing mouse was killed 7 days after tumor implantation. Experimental conditions are described in text. A, Control mouse (Serum 9.0 ml); B, Tumor-bearing mouse (Serum 10.0 ml); (○) Zinc content; (●), A_{280 nm}.

し、7日目に調整した癌細胞のMT量を測定した。Fig. 3は亜鉛あるいはカドミウムを投与したマウスから調製したETCの可溶性分画のセファデックスG-75でのゲルろ過での亜鉛、あるいはカドミウムの分布を示したものである。亜鉛投与の場合、亜鉛の分布は二つのピークとして認められた(Fig. 3 A)。第一のピークはVoid volume分画に認められるもので、このピークは対照群にも存在していた(Fig. 1 M)。第二の

ピークは分子量1万分画に存在するもので、SHのピークとの一致から考えてMT由来の亜鉛であると判断した。同様の結果はカドミウム投与の場合にも認められ、この場合は、亜鉛は二つのピークとして認められ、カドミウムは一つのピークとして認められた(Fig. 3 B)。これらの結果から、亜鉛やカドミウムの投与によってMTが増加していると考え、Koch et al. (43)が報告しているようにMT合成能は存在すると

TABLE III
TISSUE ZINC CONTENT IN CONTROL AND TUMOR-BEARING MOUSE.

Tissue	Zn($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
	Control	Tumor
Liver	29.104 \pm 1.104	41.973 \pm 1.874*
Kidney	24.235 \pm 0.805	21.351 \pm 0.407**
Spleen	21.687 \pm 0.745	22.657 \pm 0.125
Thymus	20.633 \pm 2.585	23.377 \pm 3.786
Lung	18.057 \pm 0.251	16.393 \pm 1.340
Heart	18.260 \pm 0.242	19.013 \pm 0.761

The mouse was killed by decapitation 7 days after implantation. Mean \pm SD of three mice. * Significantly different from control ($P < 0.01$). ** Significantly different from control ($P < 0.05$).

TABLE IV
CORTICOSTERONE LEVEL IN SERUM OF CONTROL AND TUMOR-BEARING MOUSE.

Group	Corticosterone level($\mu\text{g/ml}$)
Control	0.114 \pm 0.038
3 day	0.145 \pm 0.040
7 day	0.283 \pm 0.021*

The mouse was killed by decapitation 3 days and 7 days after implantation. Mean \pm SD of six mice.

* Significantly different from control ($P < 0.01$).

判断した。

(4) 肝MTの増加に対するアクチノマイシンD投与の影響：このような肝臓MTの誘導合成がETC移植後どのような経過で起きるかETC移植後経時的に肝臓MT量を測定した。Fig. 4に示すように肝臓MTが認められたのは移植後、6-8日目で、3-5日目ではその増加は認められなかった。この結果から考えて、ETCの増殖がかなり進行した段階で肝MTの誘導が起き

ることが推定された。このMT誘導合成のスケジュールについて検索するため6日目、あるいは7日目に生じるMTの増加に対する蛋白合成の影響について検討した。Fig. 5はETC移植後5日目にアクチノマイシンDを投与し、24時間後に処置した群(Act. D投与群)と対照群(ETC移植6日目のG-75でのゲルろ過におけるMT分画での亜鉛の分布を示したものである。対照

群では亜鉛は著明なピークとして認められたが、アクチノマイシンD投与群では、亜鉛は低値を示していた。

これらの結果についてまとめたものがTable 11である。アクチノマイシンD投与群では、6、7日目共にMT結合亜鉛量は対照群に比較して低値を示していたことから、アクチノマイシンD投与によってRNA合成、蛋白合成が阻害されそのためにMTの増加が抑制されたものと判断した。この時血清亜鉛量はアクチノマイシンD投与群では、担癌生体群で認められる著明な減少が抑制され対照群と同じ程度の値を示していた。また、肝臓総亜鉛量も担癌群で認められる、その増加がアクチノマイシンD投与群では認められなかった。これらの結果はアクチノマイシンD投与によってMTの合成だけでなく、血清から肝臓への亜鉛の蓄積も阻害されることを示していると思われた。

(5) 肝MTの増加と血清亜鉛の変動：肝MTの増加と血清亜鉛の減少は密接な関係にあると思われることから(32)、血清中の亜鉛量を経時的に測定した。Fig. 6に示すように、血清中の亜鉛は癌細胞移植後ただちに減少していき、肝MTの増加が認められない癌細胞移植後、3-5日目でも対照群に比較して有意に減少していた。そして、MTの増加が認められる7日目では移植前に比較して0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の減少を示していた。

以上のように血清亜鉛量が変化する事が明らかとなったが、この変化が血清亜鉛のどの分画によるものであるか検討するため血清のクロマトグラフィーを行った。Fig. 7はセファクリルS-300によるゲル透過における亜鉛と蛋白の分布を示したものである。対照群では血清亜鉛と蛋白の大部分は分画番号50-70に認められた(Fig. 7A)。担癌群でも亜鉛の分布自体には大きな変化は認められなかったが、分画番号50-70の量的な減少が認められた(Fig. 7B)。この減少について更に検討するためアルブミンのアフィニティゲルとして知られているブルーセファロースCL-6Bを用いてアルブミン分画の亜鉛量の測定を行った。Fig. 8は血清と蛋白の分布を示したものである。血清中の亜鉛は、20-30%は

α_2 -マクログロブリンと強固に、60-70%はアルブミンと緩く結合しているとされているが(40-50)、CL-6Bによって分画すると亜鉛は三つの分画として溶出された。第一の分画は α_2 -マクログロブリンに強く結合したもので、次の分画はアルブミンとともに溶出されたもので、最後の分画は亜鉛だけが溶出されたものであった。現在までの報告から考えてアルブミンに緩く結合した亜鉛は第二、三の分画であると思われることから(49, 50)、担癌群では対照群に比較してアルブミン結合亜鉛量が、減少していることが示唆された。またこの結果からアルブミンも減少していることが明らかとなった。この減少は結果には示さないがSDS-PAGEによっても確認することができた。

(6) エールリッヒ移植マウスにおける組織亜鉛量の変動について：以上のように血清亜鉛量が低下することが明らかとなったが、それでは他の組織の亜鉛量はどのような変動を示すかETC腹腔内移植7日目の群と対照群でその比較をおこなった。結果をTable 111に示すが担癌生体群の組織で対照群に比較して、肝臓では13 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight程度の増加が認められた。肝臓以外の組織(腎臓、脾臓、胸腺、肺、心臓)では著明な変化は認められなかった。この結果や血清亜鉛の低下から考えて肝臓MTに結合した亜鉛の大部分は血清に由来しているであろうと推定した。

(7) エールリッヒ移植マウスにおける血清コルチコステロンの変動について：MTの増加を考えるうえで重要なもうひとつの因子としてコルチコステロンが考えられる。また担癌生体の血清コルチコステロンについては癌細胞増殖期に増加するという報告(37)もあることから、ETC腹腔内移植後、3日と7日目の血清コルチコステロンの測定を行った。結果はTable IVに示すように対照群に比較して、癌細胞移植後3日目では有意な変化は認められなかったが、7日目では2.5倍とその増加が認められた。

考 察

In vivoでの癌細胞のMTについてはHidelgo et al. (42)やKoch et al. (43)によってその存在が報告されている。Hidelgo et al. はマウス

に hepatoma 由来の H₆ を移植し、移植後14-16日目のマウスからの癌細胞と肝臓とに MT の存在を報告している。一方、Koch et al. はエールリッヒ細胞を移植したマウスにカドミウムを投与し、癌細胞に MT が存在することを報告している。しかし、担癌生体での亜鉛代謝やホルモンバランスの変動といった点と MT の誘導を関係づける研究、報告はされていない。本研究においては、担癌生体の亜鉛代謝やホルモンバランスの変動に注目し以下の点を明らかにすることができた。

- ① EATC 担癌マウスでは肝臓で MT の増加が認められたが、他の臓器(腎臓、心臓、肺、脾臓、胸腺)では認められなかった。また継代した癌細胞では MT はほとんど認められなかったが、亜鉛やカドミウムを投与したものでは認められた。このように肝臓においてのみ MT の増加が認められたことは、亜鉛代謝における肝臓の重要性明らかにしているように思われる。
- ② アクチノマイシン D 投与によって、肝 MT の増加は抑制されたことから、この増加には核酸蛋白合成が関与することが推定された。この時、肝臓亜鉛量の増加も抑制されていることから、亜鉛の肝臓への取り込みにも何らかの形で蛋白合成が関与していることが推定された。これは MT が合成されないから肝臓内への亜鉛の取り込みが抑制された為なのか、あるいは亜鉛の輸送に関係する蛋白が存在し、その合成が抑制されたために起きたのか不明である。
- ③ 組織亜鉛量で顕著な変化を示したものは肝臓の増加のみで他の臓器では顕著な差を認めなかった。そして、血清亜鉛量は癌細胞移植直後から減少し始め、MT の増加時期との一致は認められなかった。この低下した亜鉛はアルブミンに結合したタイプであった。生体における亜鉛の動きとしては、血清中のアルブミンに結合した亜鉛が何らかのコントロールの基に肝臓や癌細胞に取り込まれるという流れが推定される。
- ④ 血清コルチコステロン量は担癌生体群では、対照群に比較して有意に増加していた。この増加が MT 誘導の引き金に成っているのか否かは不明である。

ところで、MT の誘導合成を考える場合、亜

鉛とコルチコステロンの MT の誘導合成が明らかにされていることから(10-18)、亜鉛とコルチコステロンの動態は重要であると考えられる。現在までのところ、亜鉛とホルモンは互いに独立的なメカニズムで MT の合成を誘導すると考えられているが(10-18)、エールリッヒ癌移植マウスの肝臓 MT の増加にこれら二つの因子がどのように係るかは現在の所不明の点が多い。本実験で明らかにした点や生理的ストレス下における肝 MT の誘導で考えられている機構を(33, 35)参考にして、担癌マウスの MT の誘導合成に考察を加えてみた。担癌状態における、亜鉛の動きを推定して見ると食物から取り込まれた亜鉛はアルブミンを輸送蛋白として、肝臓や癌細胞に取り込まれていくと考えられる。癌細胞の場合その増殖に亜鉛が必要とされるために通常 MT はほとんど存在していないと考えられるが、過剰の亜鉛やカドミウムが存在すれば MT を生成すると思われる。肝臓の場合は、生体が担癌状態という生理的ストレスを受けているために、これに対して生体を正常な状態に維持するように応答していると考えられる。亜鉛が貯蔵所(血清)から動員され、肝臓へ蓄積し、MT 濃度が増加して、肝臓での代謝が促進される。このような過程のなかでグルココルチコイドが何らかの係りを持つことは明らかで、あるいは他のホルモンも係わりあっているかもしれない。ホルモンによる制御が直接 MT の合成を誘導するのか、ホルモンの変動が亜鉛代謝に影響して MT を誘導するのか現在の所全く不明である。

以上のような考察を行ったが、不確定な要素が多く、あくまでも推定の域をでていない、また MT が肝臓での代謝促進の中でどのような役割を持つのか十分な説明ができないのが現状である。MT の生理的役割については、今後、更に検討する必要がある。

要 旨

- (1) エールリッヒ癌細胞を腹腔内に移植した7日目の担癌マウスの臓器では、対照群に比較して肝臓のみで MT の増加が認められ、他の臓器(腎、肺、心、脾、胸腺)では認められなかった。この肝 MT の増加は癌細胞を大腿部皮下移植し

た場合にも認められた。

(2) エールリッヒ癌細胞のMTは、腹腔内で継代したものでは認めなかったが、担癌マウスに亜鉛やカドミウムの前投与した場合には認められた。

(3) 肝MTの増加は移植後、6日目から認められ、それ以前には認められなかった。アクチノマイシンD投与によって肝MTの増加、肝臓への亜鉛の蓄積、血清亜鉛の低下は抑制された。

(4) 血清亜鉛は癌細胞移植後から徐々に減少し、移植後7日目では対照群の半分の値を示した。そしてこの減少した亜鉛はアルブミンに結合したものであることが明らかとなった。

(5) 担癌生体の組織亜鉛量は肝臓で増加した以外、他の組織では著明な変化は認められなかった。

(6) 担癌生体の血清コルチコステロン量は対照群に比較して有意に増加していた。

謝 辞

原稿を終わるに当たり御懇切なる御指導を頂いた放射線医学教室青野要教授、並びに、白石則之助手と教室の各位に誠意を表します。また、実験機器の使用につき御配慮下さいました麻酔学教室小坂二度見教授、並びに教室の各位に謝意を表します。

文 献

1. Margoshes, M. and Vallee, B.L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813—4814, 1957.
2. Piscator, M.: On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium-exposed rabbits. *Nord. Hyg. Tidskr.* 45, 76—82, 1964.
3. Wisniewska-Knayıpl, J.M., Trojanowska, B., Piotrowski, J. and Jakubowski, M.: Binding of mercury in the rat kidney by metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 754—763, 1970.
4. Winge, D.R., Premarkumar, R. and Rajagopalan, K.V.: Metal-induced formation of metallothionein in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 242—252, 1975.
5. Bremner, I. and Davies, N.T.: The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149, 733—738, 1975.
6. Bremer, I. and Young, B.W.: Isolation of (copper, zinc)-thioneins from the livers of copper-injected rats. *Biochem. J.* 157, 517—520, 1976.
7. Chen, R.W., Vasey, E.J. and Whanger, P.D.: Accumulation and depletion of zinc in rat liver and kidney metallothionein. *J. Nutr.* 107, 805—813, 1977.
8. Magilinicka, E.M. and Piotrowski, J.M.: Inducible gold-binding proteins in rat kidneys. *Biochem. Pharmacol.* 28, 2625—2631, 1979.
9. Winge, D.R., Geller, B.L. and Garvery, J.: Isolation of copper thionein from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 208, 160—166, 1981.
10. Failla, M.L. and Cousins, R.I., Zinc accumulation and metabolism in primary cultures of adult rat liver cells. *Biochem. Biophys. Acta* 543, 293—304, 1979.
11. Etzel, K.R., Shapiro, S.G. and Cousins, R.J.: Regulation of liver metallothionein and plasma zinc by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem. Res. Commun.* 89, 1112—1126, 1979.
12. Karin, M. and Herschman, I.R.: Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in HeLa cell cultures. *Science* 204, 176—177, 1979.
13. Karin, M., Herschman, H.R. and Weinstein, D.: Primary induction of metallothionein by dexamethasone in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1052—1059,

- 1980.
14. Hildebrand, C.E. and Enger, M.D.: Regulation of Cd/Zn-stimulated metallothionein synthesis during induction, deinduction, and superinduction. *Biochemistry* **19**, 5850—5859, 1980.
 15. Etzel, K.R. and Cousins, R.J.: Hormonal regulation of liver metallothionein zinc: Independent and synergistic action of glucagon and glucocorticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **167**, 233—236, 1981.
 16. Karin, M. and Herschman, H.R.: Induction of metallothionein in HeLa cells by dexamethasone and zinc. *Eur. J. Biochem.* **113**, 267—272, 1981.
 17. Karin, M., Andersen, R.D. and Hershman, H.R.: Induction of metallothionein mRNA in HeLa cells by dexamethasone and heavy metals. *Eur. J. Biochem.* **118**, 527—531, 1981.
 18. Karin, M. Slater, E.P. and Herschman, H.R.: Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by metals and glucocorticoids. *J. Cell Physiol.* **106**, 63—74, 1981.
 19. Oh, S.H., Deagen, J.T., Whanger, P.D. and Weswig, P.D.: Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am. J. Physiol.* **234**, E282—E285, 1978.
 20. Sobocinski, P.Z., Canterbury, Jr., W.J., Mapes, C.A. and Dinterman, R.E.: Involvement of hepatic metallothioneins in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am. J. Physiol.* **234**, E399—E406, 1978.
 21. Ohkaki, H., Hasegawa, K. and Koga, M.: Zinc binding protein in the livers of neonatal, normal and partially hepatectomized rats. *Biochem. J.* **174**, 999—1005, 1978.
 22. Kotosonis, A.N. and Klaassen, C.D.: Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **51**, 19—27, 1979.
 23. Klaassen, C.D.: Induction of metallothionein by adrenocortical steroids. *Toxicology* **20**, 275—279, 1981.
 24. Brady, F.O.: Synthesis of rat hepatic zinc thionein in response to the stress of sham operation. *Life Sci.* **28**, 1647—1654, 1981.
 25. Aono, K.: Induction of metallothionein synthesis in the liver of rats by X-ray irradiation. *Okayama Igakkai Zasshi* **93**, 1083—1090, 1981.
 26. Shiraiishi, N., Aono, K. and Utsumi, K.: Increased metallothionein content in rat liver induced by X irradiation and exposure to high oxygen tension. *Radiat. Res.* **95**, 298—302, 1983.
 27. Takeda, Y.: Increase in metallothionein content in rat tissues induced by X-irradiation. *Okayama Igakkai Zasshi* **96**, 271—287, 1984.
 28. Waalkes, M.P., Hjelle, J.J. and Klaassen, C.D.: Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 230—236, 1984.
 29. DiSilvestro, R.A. and Cousins, R.J.: Glucocorticoid independent mediation of interleukin-I induced changes in serum zinc and liver metallothionein levels. *Life Sci.* **35**, 2113—2118, 1984.
 30. 突沖満則, 阿部晋也, 水川俊一, 真嶋良昭, 松三昌樹, 板野義太郎, 小坂二度見: ハロセン吸入によるラット肝メタロチオネインの増加. 日本麻酔学会抄録集, pp.278, 1985.
 31. Whanger, P.D. and Ridlington, J.W.: Role of metallothionein in zinc metabolism. In *Biological Roles of Metallothionein*, ed. E.C. Foulkes, Elsevier/Holland, pp.263—278, 1982.
 32. Webb, M. and Cain, K.: Functions of metallothionein. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 137—142, 1982.
 33. Brady, F.O.: The physiological function of metallothionein. *Trends Biochem. Sci.* **143—144**, 1982.

34. 森田昌敏：メタロチオネインとその生物学的役割。代謝，20，23—32，1983.
35. 木村正己：メタロチオネインの生理的意義。生命の科学，34，391—400，1983.
36. 黒田吉男：担がん動物の金属代謝。総合医学，20，801—805，1963.
37. Ludvik, P.-G. and Russell, S.J.: Corticosterone in lymphoma-bearing rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 317—319, 1963.
38. 西野和彦：担癌生体とホルモン。代謝，1，339—343，1964.
39. 黒田吉男：担癌生体と亜鉛。代謝，3，337—343，1966.
40. 吉村 和，山村雄一，山田弘三，林 高操，島蘭順雄 編集：病気の生化学，癌，第17巻，中山書店，東京，pp.130—132，1967.
41. Clinical aspects of zinc metabolism. In *Zinc*, subcommittee on zinc, committee on metabolic and biologic effects of environmental pollutants, University Park Press, Baltimore, pp.225—248, 1979.
42. Hidalgo, H.A., Koppa, V. and Bryan, S.E.: Induction of cadmium-thionein in mouse tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 521—530, 1978.
43. Koch, J., Wielgus, S., Shankara, B., Saryan, L.A., Shaw, C.F. and Petering, D.H.: Zinc-, copper- and cadmium-binding protein in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. J.* 189, 95—104, 1980.
44. Onosaka, S. and Cherian, M.G.: The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts. *Toxicology* 22, 91—101, 1982.
45. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248—254, 1976.
46. Usui, T. and Kwamoto, H.: Fluorimetric determination of serum 11-hydroxysteroids. Calculative correction of deviations in complex fluorescence spectra. *Clin. Chim. Acta* 30, 663—669, 1970.
47. Weser, U., Hartmann, H.J., Fretzdorff, A. and Strobel, G.J.: Homologous copper(I)-(thiolate)₂-chromophores in yeast copper thionein. *Biochem. Biophys. Acta* 493, 465—477, 1977.
48. Laurell, C.B.: Metal-binding plasma proteins and cation transport. In *The Plasma Proteins*, ed. F.W. Putnam, Academic Press, New York, pp.349—378, 1960.
49. Smith, K.T., Failla, M.L. and Cousins, R.J.: Identification of albumin as the plasma carrier for zinc absorption by perfused rat intestine. *Biochem. J.* 184, 627—633, 1978.
50. Shiraishi, N., Yamamoto, H., Kimoto, M., Shiragami, T., Togami, I., Niiya, H. and Aono, K.: Distribution of protein-bound zinc in serum of analbuminemic rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 45—51, 1984.

Increase in hepatic metallothionein in tumor bearing mice

Shin KIMOTO

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. K. Aono)

The amount of metallothionein was examined in mice after Ehrlich-tumor-cell implantation. The amount of hepatic metallothionein in tumor-bearing mice increased 10-fold 7 days after tumor implantation as compared with control mice.

Actinomycin D administration inhibited zinc uptake into liver and hepatic metallothionein synthesis induced in tumor-bearing mice. The increase in hepatic metallothionein content did not appear earlier than 6 days. In other tissues and tumor, an increase in metallothionein content was not observed for 7 days after tumor implantation. However, in tumors from zinc- or cadmium-loaded, tumor-bearing mice, an increase in metallothionein content was observed. The zinc level in the serum of tumor-bearing mice gradually decreased, and the zinc content was one half of the control content 7 days after implantation. Actinomycin D administration inhibited the decrease in serum zinc content. The zinc content of liver was increased as compared with control mice 7 days after implantation, but in other tissues changes in zinc content were not observed. The corticosterone level in the serum of tumor-bearing mice increased 2.5 fold 7 days after implantation as compared with control mice.