

X線照射によるラット臓器中の メタロチオネインの変動について

岡山大学医学部放射線医学教室（指導：青野 要教授）

竹 田 芳 弘

（昭和58年11月10日受稿）

Key words：メタロチオネイン，肝臓
腎臓，X線，血清

緒 言

1957年，MargoshesとVallee¹⁾によってウマの腎皮質からカドミウム (Cd) を多量に含有する低分子蛋白質として発見された Metallothionein (MT)が，蛋白化学の領域外で注目されるようになったのは，この蛋白がCdの投与によって誘導合成されることをPiscator²⁾が示してからである。その後，MTは亜鉛 (Zn)，銅 (Cu)，水銀 (Hg)，金 (Au)，銀 (Ag)，等でも誘導されることが明らかとなり³⁻⁸⁾さらには，このような金属の投与以外のホルモン⁹⁻¹²⁾や種々のストレス¹³⁻²²⁾でもこの蛋白の誘導合成が起ることが報告されるに至り，中毒学の分野だけでなく，生理学の分野からも注目されるようになった。

以上のような報告から，現在では，MTの生物学的役割として，古くから考えられてきた重金属の解毒蛋白²³⁻²⁵⁾としての働きだけでなく，亜鉛や銅の代謝，生体内維持機構への関与も考えられるに至っている²⁶⁻²⁸⁾。

一方，この蛋白質の組織分布としては，主に肝臓，腎臓，小腸といったものの報告が多いが，この他にも脳，脾臓，膵臓，睾丸，赤血球，マクロファージ，ガン細胞，更には微生物等と多岐にわたる²⁸⁻³⁰⁾。このことはこの蛋白の誘導合成能が種々の組織に存在することを示しており，Metallothioneinの生物学的役割が生物体内において，きわめて広範囲に及んでいること

を示唆するものである。

前述したように，この蛋白質は，金属の投与によって種々の臓器に誘導合成されるばかりでなく，種々のストレスによっても，主として肝にその合成の誘導が認められることが報告されている。これらのストレスとしては，温度変化 (低温)¹⁴⁾などの環境条件の変化，運動¹⁴⁾，絶食¹³⁾，手術^{16),19)}やけつなどの生理的条件の変化，四塩化炭素への曝露¹⁴⁾，麻酔剤²¹⁾やアルキル化剤^{17),18)}を含めた広範囲の有機化合物の投与，細菌感染¹⁵⁾，X線照射^{20),22)}，高圧酸素曝露^{20),22)}などが含まれており，これらのストレスの多くが生体内亜鉛維持機構へ影響を与えると考えられることから，ストレス→ホルモン系→MT誘導合成，あるいは，ストレス→ホルモン→血清亜鉛→亜鉛とり込み→MT誘導合成といった機序も考えられているが，その詳細については，不明である^{31),32)}。

X線照射後，生体は種々の変化を示すが，非照射群と比較して，照射群ではMTが顕著にラットの肝臓で増加することを，青野²⁰⁾，Shiraishiら²²⁾はすでに報告している。この現象がX線障害に対する生体の防御反応の1つであることは推定できるが，それがどのような防御反応の結果なのか，またMTの増加という現象がどのような過程を経たものであるかなど，その詳細は不明のままである。

前述したように，MTの組織分布は多岐に及ぶことから，X線照射後，肝以外の臓器においてもこの蛋白の増加が認められるか否か，また

生体での亜鉛の動きを知る上で重要である血清中の亜鉛量は、肝臓で MT が増加している時に、どのような変化を示すのか、といった点を明らかにすることは、X線照射後に認められる MT の増加の過程やその生物学的役割を考える上で、重要と考えられることから、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：実験動物としては、Wistar 系♂ラット(体重150~200g)を使用した。なお、実験に使用したラットは、購入後、室温22℃~23℃下で、照明(蛍光灯80W, 照明時間7:00~19:00)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。

2) 試薬：Sephadex G75, Sephacryl S-300 SF (Pharmacia Fine Chemicals), Ferritin, Bovine Serum Albumin, Cytochrome C, (Sigma Chemical Company), Dithiothreitol (DTT), 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-10-phenanthroline, (半井化学) 亜鉛, カドミウム, 銅標準液(和光純薬), Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)(同仁), その他、実験には全て、特級の薬品を使用した。

3) X線照射：ラット6匹あるいは、9匹を1群として、東芝製 KXC, 18型深部 X線治療装置を使用して、全身一回照射を行った(69 rad/min)。なお、照射時に使用したケージ内に照射群と同じ時間だけ入れておいた群を対照群とした。

4) 亜鉛投与による Metallothionein の誘導：亜鉛投与による MT の誘導は、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 mg/kg 体重) 生理食塩水溶液を3日間腹腔内投与することで行った。

5) 臓器摘出：対照および処置群のラットより、断頭放血後、肝、脾、心、肺、腎の各臓器を摘出し、実験に使用するまで-20℃で保存した。

6) 血漿、赤血球の調製：断頭放血により、4%クエン酸ソーダ溶液存在下で採取した血液から、3000 rpm, 10分間の遠心によって血漿と赤血球とを調製した。赤血球は、更に、0.15 MKCl, 0.5 mMDTT-10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH

7.4) により2度の遠心洗浄を行い、白血球の除去を行った。以上、調製した血漿と赤血球は、実験に使用するまで-20℃で保存した。

7) 血清の調製：断頭放血により採取した血液を37℃で60分間静置し、その後3000 rpm, 20分間の遠心を行い、その上清を血清として実験に使用した。

8) 細胞可溶性分画の調製：-20℃で保存して置いた各臓器を室温解水後、湿重量10g当り50 ml の0.15 MKCl-0.5 mMDTT-10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加えて、ガラスホモゲナイザーに続いて、テフロンホモゲナイザーを使用した。二度のホモゲナイズによって、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℃下で、10,000×g 30分間、100,000×g 60分間の2度の遠心によって細胞可溶性分画を得た。なお、血漿の場合も同様に、4℃下で100,000×g 60分間の遠心を行いその上清を実験に使用した。

9) メタロチオネイン含量の測定：各可溶性分画(100 mg 蛋白)をセファデックスG75のカラム(2.5×95 cm)に添加し、50 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 8.4) を流速20 ml/時間の割合で流下し、7℃下でゲル濾過を行い(各分画濾液6 ml) 溶出したメタロチオネイン分画の各濾液中の亜鉛量を測定することにより、メタロチオネインの増加の指標とした。

10) 血清の Sephacryl S-300 によるゲル濾過：血清中の亜鉛の分布を検索するため血清5 ml を Sephacryl S-300 カラム (2.5×95 cm) に添加し、0.1 M NaCl-25 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 8.4) を流速20 ml/時間の割合で流下し、7℃下でゲル濾過を行い(各分画濾液6 ml) 分画した各濾液中の亜鉛量を原子吸光法により、そして蛋白量を280 nm 分光法により測定した。

11) 亜鉛, カドミウム, 銅の定量：各濾液中の金属量は、島津原子吸光度計 (AA-640-13) を使用して、原子吸光法により測定した。なお、標準液としては、和光試薬製、亜鉛, カドミウム, 銅標準液を0.05 NHCl 溶液で希釈したものを用いた。

12) SH 含量：SH 量の測定は、Li, et al らの方法³³⁾に準じて行った。なお、SH 量を求め

る場合の TNB アニオンの分子吸光係数は、13,600 を使用した。

13) 蛋白量: 蛋白量の測定は、BSA を標準物質として、Lowry 法³⁴⁾、あるいは、Biuret法により行った。なお、試料の前処理は、Bensadoun & Weinstein の方法³⁵⁾ に準じて行った。

14) *in vitro* での Metallothionein 中の亜鉛のカドミウムによる置換: *in vitro* で、Metallothionein の結合金属である亜鉛をカドミウムと置換させるため、可溶性分画 (100 mg 蛋白) に DTT (1 mM) 存在下でカドミウム (3 mM) を添加し、4℃18時間の反応を行った。反応後、100,000×g 60分間の遠心を行い、上清中の15ml をカラムに添加し、前述した条件でセファデックス G75 のカラムクロマトを行い、各分画濾液中のカドミウム量、亜鉛量の測定を行った。

15) 血清亜鉛量の測定: 血清中の亜鉛量は、血清を蒸留水で適当 (1/4~1/3) に希釈後、原子吸光法により測定した。なお、血清調製中の溶血による血球内亜鉛の血清への混入量について測定するため、Markland³⁶⁾ の血清ヘモグロビン測定の方法を利用して、血清への血球からの亜鉛混入量を算出し、原子吸光法によって測定した値からこの値をさし引き、血清亜鉛量として表示した。

16) ラット肝 Metallothionein の分離精製: Metallothionein (MT) は、亜鉛投与ラット肝より、Oh ら¹⁴⁾ の方法に従って分離し、Weser ら³⁷⁾ の方法に従って MTI, II を得た。

結 果

1) 対照ラット臓器での可溶性分画のゲル濾過における亜鉛分布

Fig. 1 —(A)~(G) は対照群の各臓器可溶性分画のセファデックスG75 によるゲル濾過における亜鉛の分布を示したものである。セファデックスG75によるマーカー蛋白の溶出パターンは、Fig. 1 —(H)に示すように Void volume 付近に Ferritin (M.W. 480,000) Bovine serum albumin (BSA, M.W. 6,600) が溶出され、続いて Superoxide dismutase (SOD, M.W. 32,000) そして Cytochrome C (cyt, C, M.W. 12,500) となっている。亜鉛投与により誘導し

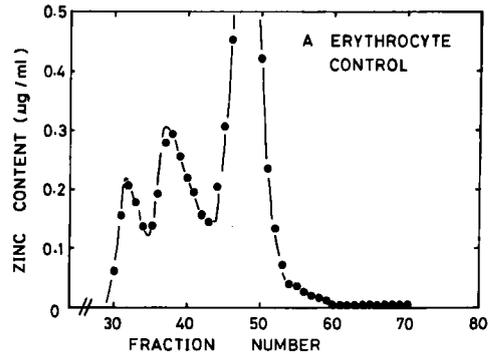


Fig. 1 —(A)

Fig. 1. Sephadex G-75 elution profiles of cytosol from tissues of normal rats.

Cytosol (100 mg prot.) prepared from six pooled tissues was applied a 2.5x 95 cm column, and eluted with 50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.4, at 5°C, 20 ml/h. 6 ml aliquots were collected and assayed by atomic absorption for zinc.

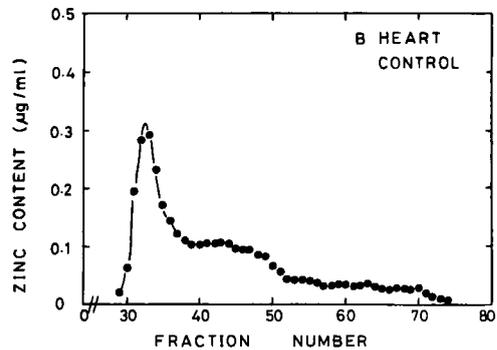


Fig. 1 —(B)

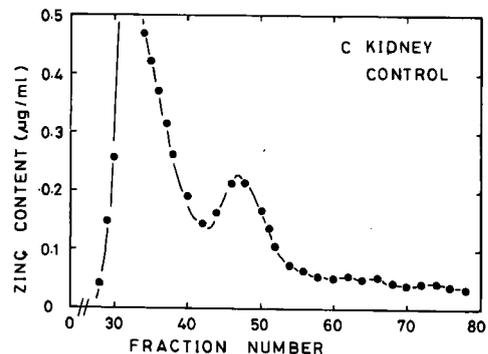


Fig. 1 —(C)

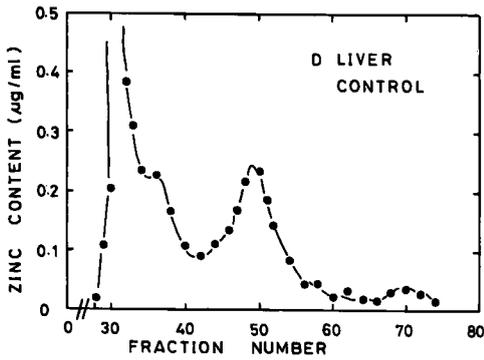


Fig. 1-(D)

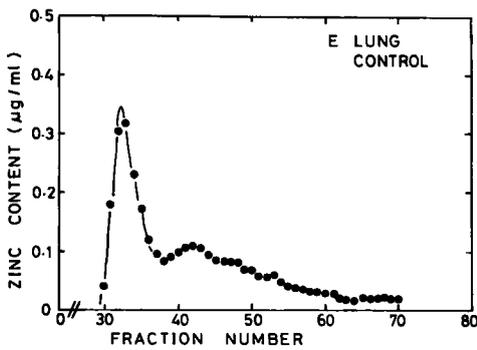


Fig. 1-(E)

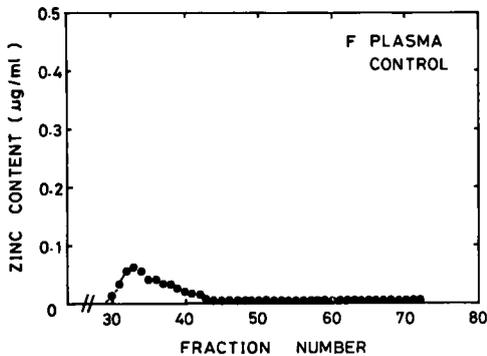


Fig. 1-(F)

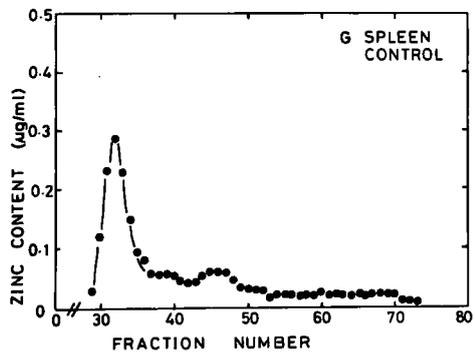


Fig. 1-(G)

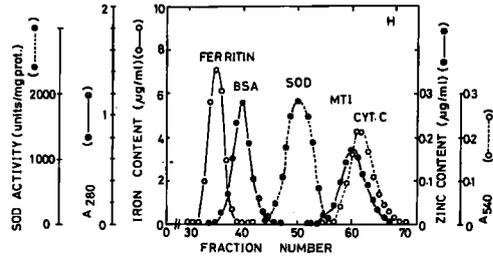


Fig. 1-(H)

た肝臓のMetallothionein I (MT I, M.W.6,500) は Cyt. C と同じ分画に溶出された。この溶出パターンを基にして各臓器の亜鉛の溶出パターンをみると、赤血球を除く他の臓器では、Void volume 分画に可溶性分画の亜鉛量の60~100%の溶出が認められた。この他のピークとしては肝臓、腎臓、赤血球などで、分子量30,000の分画に SOD や Carbonate dehydratase (M. W. 31,000) 等に由来すると考えられるピークが認められ、これらは可溶性分画亜鉛量の30~60%に当る量の溶出であった。Metallothionein が溶出されると考えられる分子量10,000分画では、どの臓器においても著明なピークは認められず、この分画の占める亜鉛量は可溶性分画亜鉛量の7%以下であった。

2) X線照射ラット臓器での可溶性分画のゲル濾過における亜鉛分布

Fig. 2-(A)~(G) は X線照射 (2,000 rad) 72時間後の各臓器可溶性分画における亜鉛の分布を示したものである。すでに報告されているように^{20),22)}、肝臓においては Void volume 分画、あるいは分子量30,000分画の亜鉛のピーク以外にも分子量10,000分画に Metallothionein 由来の亜鉛のピークが認められるようになる。しかも、この分画の亜鉛量は、可溶性分画亜鉛量の30%近くの値を占めていた。肝臓以外の臓器でこの分画にピークが認められたのは腎臓で、肝臓と同じく30%近くの亜鉛量を占めていた。この他の脾臓、心臓、肺臓、赤血球、血漿では亜鉛のピークは認められず、対照群と同じく、この分画の占める亜鉛量は全体の10%以下であった。以上の結果から考えて、今回対象とした臓器の中で X線照射後に Metallothionein の

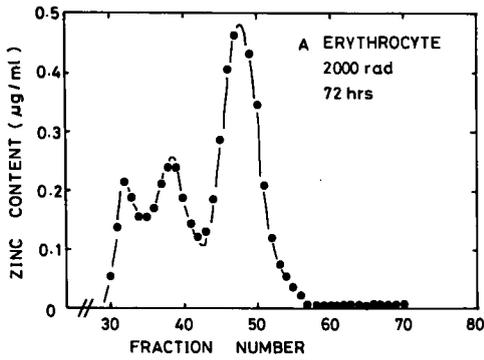


Fig. 2-(A)

Fig. 2. Sephadex G-75 elution profiles of cytosol from tissues of X-irradiated rats. Cytosol (100 mg prot.) prepared from six pooled tissues of irradiated rats (2000 rad, after 3 days) applied a 2.5 x 95 cm column, and eluted with 50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.4, at 5°C, 20 ml/h. 6 ml aliquots were collected and assayed by atomic absorption for zinc.

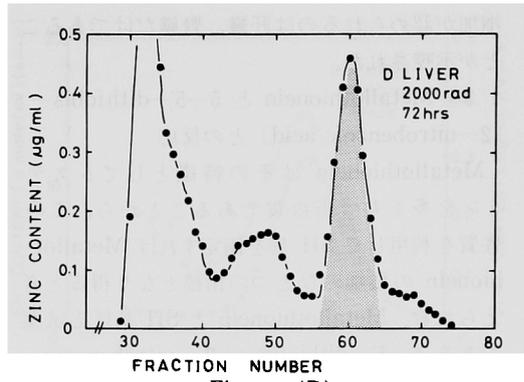


Fig. 2-(D)

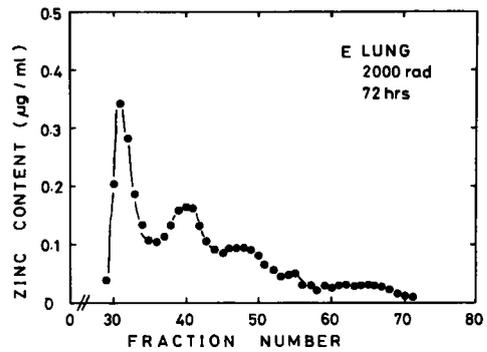


Fig. 2-(E)

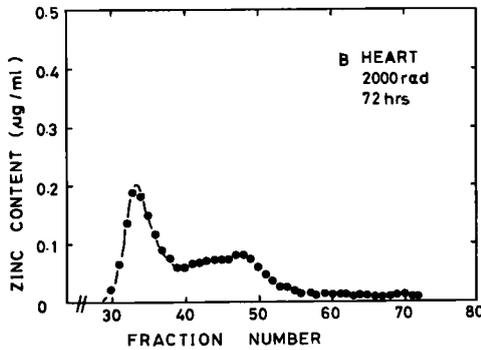


Fig. 2-(B)

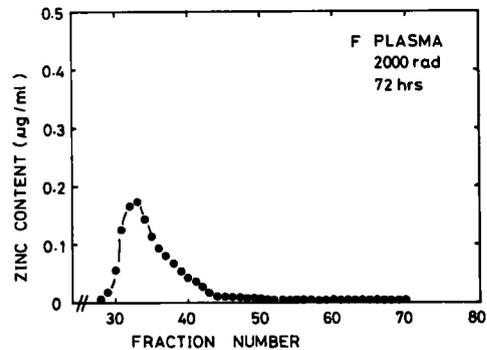


Fig. 2-(F)

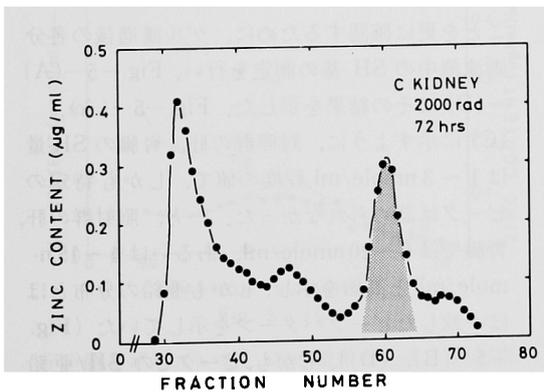


Fig. 2-(C)

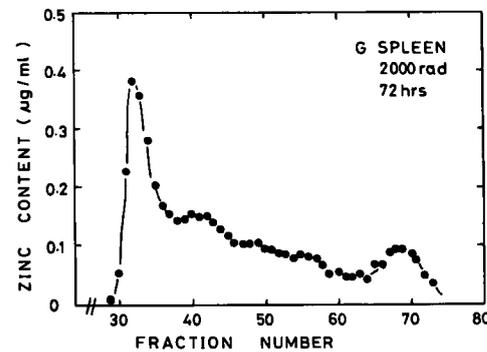


Fig. 2-(G)

増加が認められるのは肝臓、腎臓だけであることが示唆された。

3) Metallothionein と 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) との反応

Metallothionein はその特徴としてシステインを多くもつ蛋白質であることから、この性質を利用して SH 基を測定すれば Metallothionein の増加のひとつの指標となり得ると考えられる。Metallothionein と SH 基反応試薬である 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) との反応については、Li ら³³⁾ がすでに報告している。そこで、この方法がセファデックスG75のカラム操作によって得た各分画濾液中の SH 基を測定するのに利用できるか否かの検討を行った。

Fig. 3 は亜鉛投与ラット肝より、セファデックスG75のカラム操作から得た粗 Metallothionein 分画と NBTS との反応を412 nm の吸光度の変化からみたものである。Fig. 3 に示すように、NBTS と Metallothionein との反応は、Li らが報告しているように初め速く、序々に遅くなる傾向を示していた。この初速度は O-phenanthroline (OP) や EDTA の存在下では著しく促進され、また定常状態になるまでの時間も対照と比較すると短くなっていた。

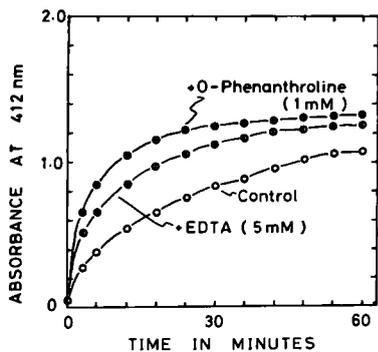


Fig. 3. Reaction of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) with crude metallothionein. Crude metallothionein, prepared from livers of rats given repeated intraperitoneal injections of $ZnSO_4$, was reacted with DTNB ($2\mu M$) in 3 ml cuvette at $25^\circ C$ and at pH 8.4 in 50 mM Tris/HCl buffer without (○—○) and with 5 mM EDTA (□—□) or 1 mM O-phenanthroline (●—●). The reaction was monitored at 412 nm.

この OP 存在下での、定常状態と考えられる30分後の412 nm の吸光度変化量から SH 量を計算し、添加蛋白量に対してプロットすると、一定の相関が認められた (Fig. 4)。この結果

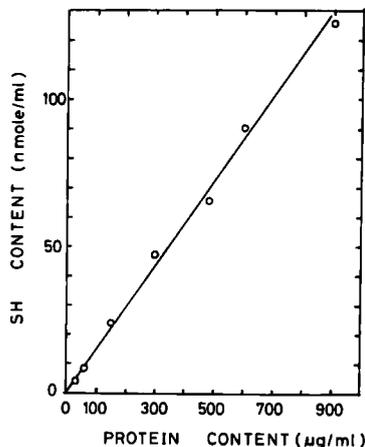


Fig. 4. Dependency of protein concentration for the reaction of DTNB with metallothionein.

Crude metallothionein was reacted with DTNB ($2\mu M$) in 3 ml cuvette at $25^\circ C$ and at pH 8.4 in 50 mM Tris/HCl buffer in the presence of O-phenanthroline (1 mM). After 30 min, the reaction was monitored at 412 nm.

より、ゲル濾過後の各濾液中の SH 量を測定する方法になり得ると判断し、以下の実験に使用した。

4) Metallothionein 分画の SH 量の変動

X線照射後 (2,000 rad 照射, 72時間後) のラット肝、腎臓に Metallothionein が増加していることを更に確認するために、ゲル濾過後の各分画濾液中の SH 基の測定を行い、Fig. 5-(A)~(D) にその結果を示した。Fig. 5-(A), (C) に示すように、対照群の肝、腎臓の SH 量は 1~3 nmole/ml 程度の値で、しかも特定のピークは認められなかった。一方、照射群の肝、腎臓では 6~20 nmole/ml、あるいは 4~15 nmole/ml と高値を示し、しかも亜鉛の分布とほぼ一致したピークパターンを示していた (Fig. 5-(B), (D))。しかも、ピークでの SH/亜鉛比 (mole/mole) は肝臓で 2.7、腎臓で 3.3 の値を示し、亜鉛 Metallothionein の値である 3 に

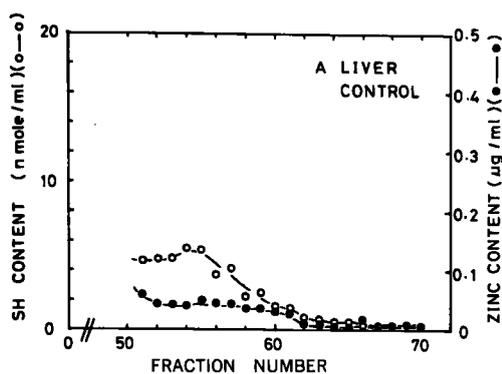


Fig. 5 —(A)

Fig. 5. Thiol and zinc contents of metallothionein fraction.

Cytosol (100 mg prot.) was fractionated on a Sephadex G-75 column. 6 ml aliquots were collected and 3 ml aliquots were used for the assay of thiol content. The others were assayed by atomic absorption for zinc. Other experimental conditions are described in Fig. 2. and Fig. 4. (○—○), thiol content; (●—●), zinc content.

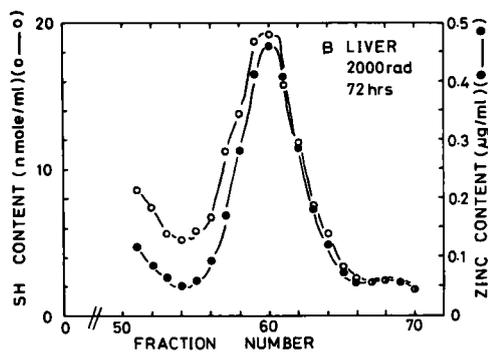


Fig. 5 —(B)

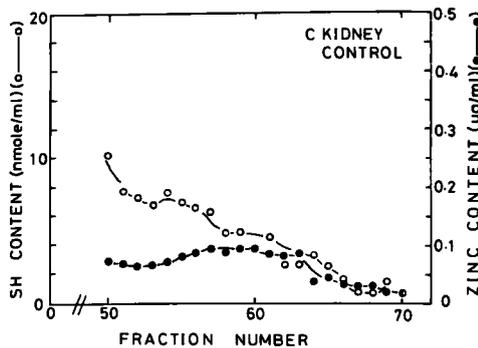


Fig. 5 —(C)

近い値を示していた。この結果からも、照射群の肝、腎臓において Metallothionein の増加が起きていることは明らかであると思われた。

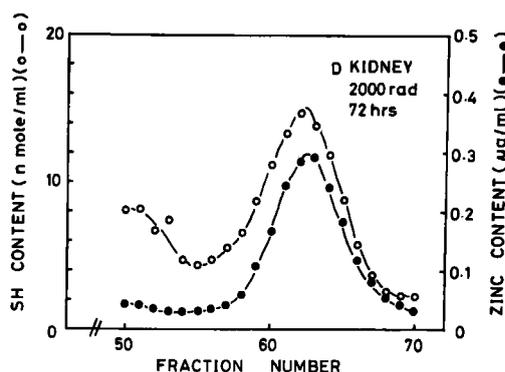


Fig. 5 —(D)

5) X線照射ラット肝、腎臓可溶性分画の Metallothionein へのカドミウムの結合

Metallothionein の金属に対する親和性は、水銀>銅>カドミウム>亜鉛の順になっていることから³⁸⁾、Metallothionein 中の亜鉛は比較的簡単にカドミウム、銅、水銀によって置換される。この性質を利用して、X線照射後のラット肝、腎臓の可溶性分画に存在する Metallothionein へのカドミウムの結合をみたものが、Fig. 6である。Fig. 6—(A), (C)に示すように、対照群の Metallothionein 分画のカドミウム結合量は $0.05 \mu\text{g/ml}$ 程度の低値を示しているのに対して、X線照射群(2000 rad 照射, 72時間後)では、Fig. 6—(B), (D)に示すように、肝臓で $0.15 \sim 0.29 \mu\text{g/ml}$ の、腎臓で $0.10 \sim 0.23 \mu\text{g/ml}$ のカドミウムの結合が認められた。しかもカドミウムの結合が認められるのに対して、亜鉛の結合は認められないことから、Metallothionein の亜鉛が全てカドミウムに置換していることが示唆された。

6) Metallothionein 分画に認められる金属の種類について

以上のように、Metallothionein に結合している亜鉛、あるいはSH基の検出、そしてカドミウムでの置換等の多角的な実験結果からX線照射により Metallothionein は、確実に増加することが明らかとなったので、この蛋白に結合する金属の種類についてもその検索を行った。

Fig. 7—(A), (B)に示すように、Metallothionein 分画のピークに肝臓では亜鉛以外の金属は認めることができなかったが、腎臓では Me-

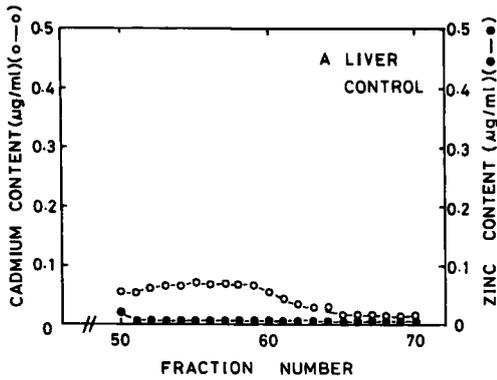


Fig. 6-(A)

Fig. 6. Conversion of zinc-thionein into cadmium-thionein in vitro.

Cadmium (3 mM) was added in vitro to the cytosol (100 mg prot.) in the presence of dithiothreitol (1 mM) and the mixed solution was incubated at 4 °C for 18 hr. After incubation, the solution was centrifuged at 100,000 x g for 60 min at 4 °C. The cadmium treated supernatant was chromatographed on a Sephadex G-75 column as described in Fig. 1. 6 ml aliquots were collected and assayed by atomic absorption for zinc and cadmium. (●-●), zinc content; (○-○), cadmium content.

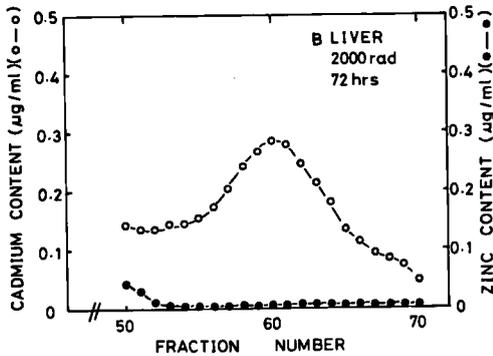


Fig. 6-(B)

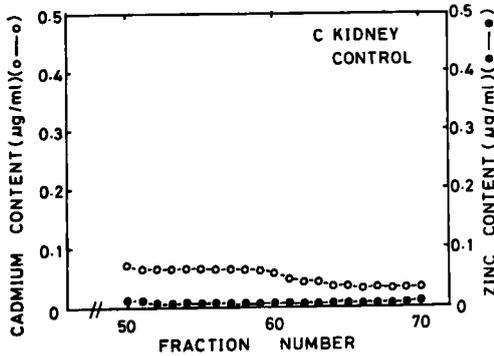


Fig. 6-(C)

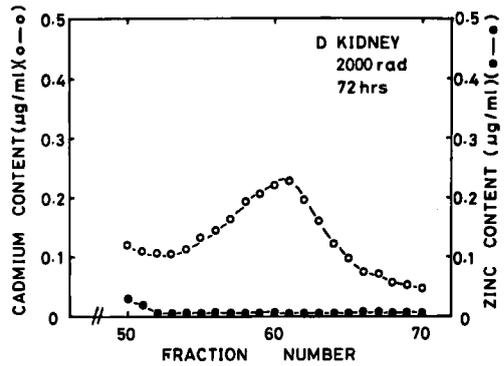


Fig. 6-(D)

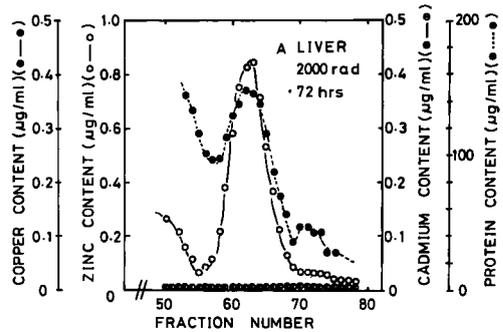


Fig. 7-(A)

Fig. 7. Sephadex G-75 elution profiles of zinc, copper and cadmium in the cytosol of liver and kidney from X-irradiated rat.

Cytosol (200 mg prot.) prepared from six pooled livers and kidneys were applied a Sephadex G-75 column. Experimental conditions are described in Fig. 2. (●-●-●), protein content; (○-○), zinc content; (●-●), copper content; (●-●), cadmium content.

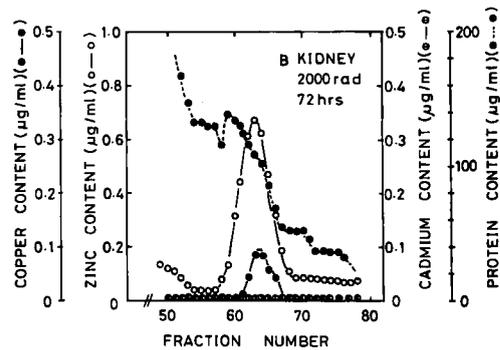


Fig. 7-(B)

tallothionein 分画のピークに亜鉛 (6.24 ng/mg 蛋白) 以外に、銅の存在も認められた (0.73 ng/mg 蛋白). しかしガドミウムは検出できなかった.

この結果から推定すると、X線照射後に増加するMetallothioneinに結合している金属は、主に亜鉛であり、これに少量の銅が存在しているのではないかと考えられる。

7) ラット肝、腎臓におけるMetallothioneinの増加と照射線量について

2,000 rad 全身一回照射、72時間後に肝、腎臓にMetallothioneinの増加が認められたことから、増加に対する線量の影響について検討した。Fig. 8-(A)の肝臓の結果では、250, 500rad

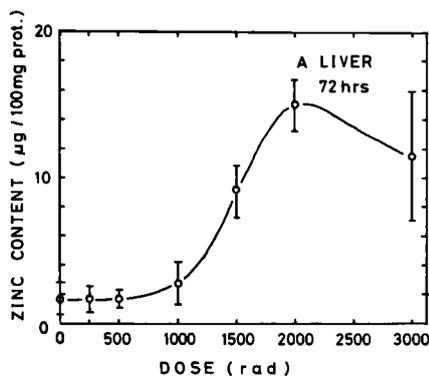


Fig. 8-(A)

Fig. 8. Effects of various doses of X-ray on the content of metallothionein in liver and kidney.

Whole body irradiation was administered at various doses of X-ray. The rats were killed 3 days after irradiation. The metallothionein content in liver and kidney were estimated from each elution profiles on Sephadex G-75 column as described in Fig. 2. Data are presented as means \pm S.D. (n = 3 - 6)

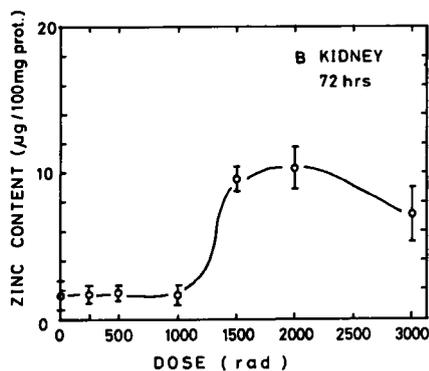


Fig. 8-(B)

照射では対照群と比較してその値に増加は認められなかったが、1,000 rad 照射から増加傾向

が出現し、(2.659 \pm 1.160 μ g 亜鉛/100 mg 可溶性蛋白)、1,500, 2,000 rad と上昇が認められ、(9.0 \pm 1.98, 15.0 \pm 1.96), 3,000 rad では低下傾向(11.4 \pm 4.63)を示した。一方、腎臓では、Fig. 8-(B)に示すように1,000 rad までは増加を認めなかったが、1,500 rad, 2,000 rad では対照と比較して値の増加が認められた(9.76 \pm 0.68, 10.14 \pm 1.11)。そして、3,000 rad では若干低下した(7.13 \pm 1.76)。

8) 一回全身照射時におけるMetallothioneinの増加の経時的变化について

一般的に肝Metallothioneinの誘導増加は速くエンドトキシン³⁹⁾、肝切除¹⁶⁾、麻酔剤投与²¹⁾の例などでは、処置後3~6時間で肝臓のMTが増加すると報告されている。これらの実験例とX線照射における時間的推移を比較する目的で、照射後の肝臓および腎臓におけるMTの経時的变化について検討した。

Fig. 9-(A)に示すように肝臓ではX線照射後6時間ですでに、対照群のMT分画の亜鉛量に比較して3倍の増加が認められている(1.794 \pm 0.334 μ g/100 mg cytosol protein \rightarrow 6.392 \pm 1.188)。そして、その後、12時間(9.808 \pm 2.576)、24時間(12.360 \pm 2.100)と増加傾向を示し、72時間では対照群の値と比較して8.3倍の値を示していた(14,880 \pm 1.820)。一方、腎臓ではFig. 9-(B)に示すように、肝臓MTの変化と異なり、照射後12時間までは増加を示さず(0.410 \pm 0.254, 1.429 \pm 0.257)、照射前の値(1.173 \pm 0.660)と差が認められなかった。照射後、24時間(4.178 \pm 0.850)で増加が認められ、有意の差を示し72時間でさらに著明に増加した(10.427 \pm 1.149)。

以上の結果から考えると、X線照射によるMTの誘導や合成は、肝臓では極めて速く、これに対して腎臓では遅れており、X線照射による障害や誘導能の違いが示唆された。

9) X線照射によるMetallothioneinへの亜鉛の蓄積と血清亜鉛の変動について

X線照射後にラットの肝臓や腎臓中にMetallothioneinの増加が認められるが、この時のMTに蓄積する亜鉛量の動態はまた興味もたれる。即ち、種々のストレス下におけるMTの誘導と

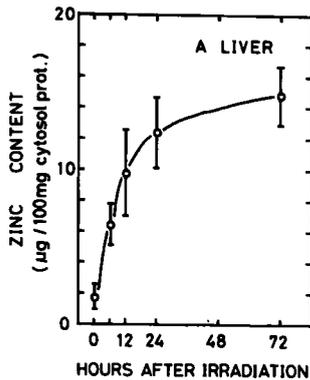


Fig. 9-(A)

Fig. 9. Changes in the metallothionein content in liver and kidney after X-irradiation.

Whole body irradiation was administered at a dose of 2,000 rad. The rats were killed at various time after irradiation. Other experimental conditions are described in Fig. 8. Data are presented as means \pm S.D. (n=4-6)

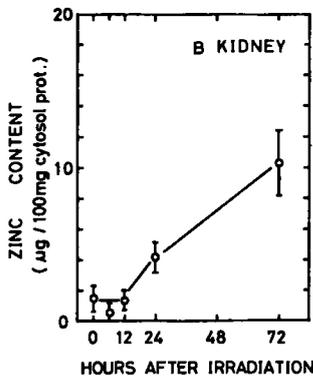


Fig. 9-(B)

血清亜鉛の変動については、Ohらが報告しているが¹⁴⁾、低温、運動、四塩化炭素曝露などのストレスによってMTの誘導と血清亜鉛の低下が示されており、血清亜鉛の肝臓あるいは腎臓への移動、そしてMTへの蓄積といった流れが示唆されている。

X線照射(2,000 rad)72時間後における各組織可溶性分画の亜鉛量とMT分画の亜鉛量をTable Iに示す。この条件下で対照群と比較する時、可溶性分画で亜鉛の変動が認められるのは、心臓、肝臓、血漿で、特に肝臓、血漿では

対照群と比較して有意に増加していた。一方、他の臓器では変化は認められず、腎臓ではMT分画に亜鉛の蓄積が認められるにもかかわらず大きな変化を示していなかった。MTが増加している条件下での血清亜鉛の値を測定してみたが、Table IIに示すように、X線照射後、どの時間においても有意の変化を示さなかった。

10) Sephacryl S-300によるゲル濾過における血清亜鉛の分布

血清亜鉛量については、照射後の変化が認められなかったが、照射後、血清蛋白の含有組成に変化が生ずることが知られており⁴⁰⁾⁻⁴⁹⁾血清亜鉛の質的变化も考えられることから、対照群とX線照射群(2,000 rad, 72時間後)との血清のゲル濾過を行い、亜鉛量の比較検討を行った。その結果をFig. 10-(A), (B)に示す。溶出した亜鉛の中で、フラクション番号30から60までに全体の90%以上の亜鉛が認められ、この分画以外には、検出できなかった。また、亜鉛の溶出パターンを見ると近接しているが、3つのピークを示していた(Fig. 10-(A))。このような亜鉛が、どのような蛋白由来なのか十分な検討は行っていないが、現在まで報告された結果を考慮するとこの溶出されている亜鉛の大部分は、Albuminや α^2 -マクログロブリン由来ではないかと考えられる⁵⁰⁾⁻⁵⁴⁾。Sephacryl S-300カラムによる溶出パターンから考えると、フラクション番号50から65にかけてAlbumine(M. W.=66,000)が溶出されており、さらにこの分画に注目してみると、対照群と比較して照射群では亜鉛量の低下が認められていることが明らかである(Fig. 10-(A), (B))。この点を詳しく検討するため、フラクション番号30から40、41から50、そして51から65までの総亜鉛量をカラムクロマトの溶出結果から算定した(Table III)。

その結果、フラクション番号30から40にかけては、対照群より照射群の方が高値を、フラクション番号41から50にかけても高値を示していたが、フラクション番号51から65にかけては、逆に低値を示しており、照射により血清中の亜鉛に何らかの影響がでていることが示された。特に、フラクション番号51から65にかけての

Table I. Effect of X-irradiation on accumulation of zinc in metallothionein fraction in liver and kidney of rat.

Tissue		Zn content in cytosol*	level of significance	Zn content in MT**	level of significance
Erythrocyte	control	22.262 ± 0.913		0.087 ± 0.015	
	irradiation	25.489 ± 2.203	N. S.	0***	0.01 < P < 0.02
Heart	control	18.182 ± 0.748		0.910 ± 0.716	
	irradiation	13.825 ± 1.734	0.01 < P < 0.02	0.631 ± 0.340	N. S.
Kidney	control	26.706 ± 1.916		1.737 ± 0.662	
	irradiation	29.369 ± 2.286	N. S.	10.427 ± 1.149	P < 0.001
Liver	control	31.842 ± 1.794		1.794 ± 0.634	
	irradiation	48.890 ± 2.200	P < 0.001	14.880 ± 1.823	P < 0.001
Lung	control	13.417 ± 2.888		1.096 ± 0.210	
	irradiation	15.648 ± 3.072	N. S.	1.266 ± 0.115	N. S.
Plasma	control	2.320 ± 0.249		0.043 ± 0.043	
	irradiation	7.256 ± 1.012	P < 0.001	0***	N. S.
Spleen	control	16.558 ± 2.624		0.927 ± 0.203	
	irradiation	23.340 ± 3.864	N. S.	1.726 ± 0.578	N. S.

Zn content were estimated from each elution profile on the Sephadex G-75 column as shown in Fig. 1. and Fig. 2. All numbers show mean value ± S.D. (n = 4-8). *Values are micrograms zinc in 100 mg of cytosol protein. **Values are micrograms zinc in metallothionein fraction per 100 mg of cytosol protein. 0***, Not detected; N. S., Not significant differences (P > 0.05)

Table II. Effect of X-irradiation on zinc levels in sera of rats

Hours after irradiation	Zn content (µg/ml)		level of significance
	control	irradiation	
0	1.181 ± 0.144		
6	1.268 ± 0.062	1.162 ± 0.169	N. S.
12	1.251 ± 0.075	1.112 ± 0.123	N. S.
24	1.135 ± 0.040	1.198 ± 0.089	N. S.
72	1.145 ± 0.098	1.018 ± 0.166	N. S.

All numbers show mean ± S.D. (n = 4-12)
N.S., Not significant differences (P > 0.05)

Table III. Distribution of zinc in sera of normal and X-irradiated rats

Fraction number	Zn content (µg)	
	control	irradiation
30-40	1.422 ± 0.195	2.901 ± 0.540*
41-50	5.141 ± 0.343	7.385 ± 0.535**
51-65	8.759 ± 0.931	6.929 ± 0.405*

Zn content were estimated from each elution profile on the Sephadex S-300 column as shown in Fig. 10. All numbers show mean value ± S.D. (n = 3-4)
* Significantly different (P < 0.05) from control.
**Significantly different (P < 0.02) from control.

Albumin 分画で亜鉛量が低下していることは、肝臓や腎臓での MT の増加が他の研究の報告であったような血清亜鉛の低下を伴う MT の増加と同様の機構によることを示唆するものかもしれない、更に詳細な検討が必要と思われる。

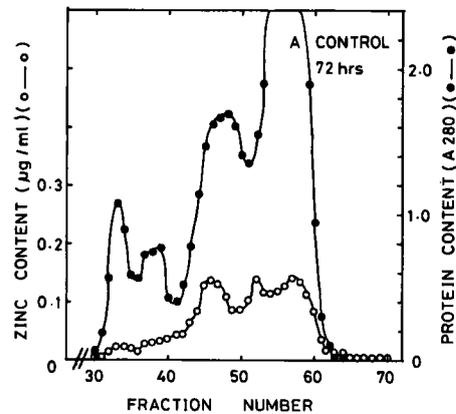


Fig. 10—(A)

Fig. 10. Sephadex S-300 elution profiles of sera prepared from normal and X-irradiated rats.

Sera (5 ml) prepared from six (normal) and twelve rats (irradiated) were applied a 2.5 x 95 cm column, and eluted with 0.1 M NaCl-50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.4, at 5°C, 20 ml/h. 6 ml aliquots were collected and assayed by atomic absorption for zinc. (●—●), protein content; (○—○), zinc content.

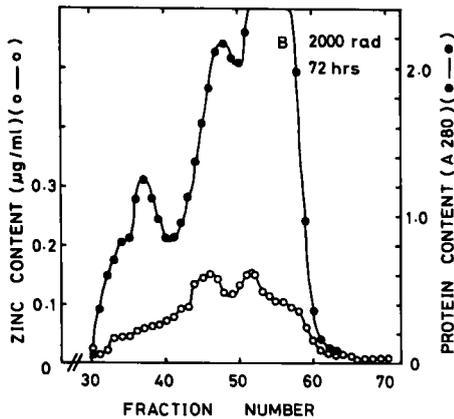


Fig. 10-(B)

考 察

MTは現在までに数多くの生物種から見い出されている蛋白質であり、その範囲は、藍藻、酵母、アカバシカビ等微生物からヒトにまで及んでいる^{28),55)~57)}。セキツイ動物で、この蛋白質の存在が報告されているものとしては、Human, Monkey, Horse, Bovine, Calf, Sheep, Pig, Dog, Hamster, Rat, Mouse, Seal Chicken, Fish といったものがあり多岐に及んでいる²⁸⁾。臓器としては、肝臓、腎臓、小腸といったものの報告が多いが、脾臓、脳、膵臓、睪丸、マクロファージ、腫瘍といったものについての報告^{28)~30)}もあり極めて広範囲の生物種、組織に存在する蛋白質と言える。

しかし、正常な状態では多量に存在する蛋白質ではなく、上述したような報告も、その多くは、重金属を投与したり、あるいは自然環境レベルの重金属を体内に取り込んで、増加したMTについてである。現在までに知られているMTを誘導または高濃度に存在させる条件を大きく分類すると次のようになる。

(1)胎児や新生児のMT：妊娠後期の胎児では、肝MT濃度が高くなり、新生児でも高いがその後、急激に減少する^{58)~65)}。

(2)重金属の投与：亜鉛、銅、カドミウム等の投与によって、MTが誘導される^{3)~8)}。

(3)ホルモン：グルココルチコイドの中でも特に、合成品であるデキサメサゾンにはMTの誘

導能が強いことが知られている^{9)~12)}。

(4)ストレス：温度変化などの環境条件の変化、絶食、手術、やけどなどの生理的条件、麻酔剤、アルキル化剤を含めた広範囲の有機化合物の投与、細菌感染など広い意味でのストレス^{13)~22)}。

この中で(1)と(4)は、何らかの形でホルモン系と結びつきがあることが考えられる。

青野²⁰⁾、Shiraishiら²²⁾、そして今回報告したX線照射後に起きるMTの増加はこの区分に従えば(4)に入るものと考えられるが、他の例と同様にホルモン系の関与を考える必要があると思われる。

X線照射による生体のコルチコステロイド含量に対する影響については、Flemming⁶⁶⁾によって報告されているが、1000Rの全身照射後、5分ですでに血中コルチコステロイドが著しく上昇すること、そしてその後減少し、12~24時間であらたに増加することなどを示している。

ところで、現在までに報告されているストレス下でのMTの誘導あるいは増加は肝臓についての報告が多く、他の臓器については、ほとんどなされていない。

Ohら¹⁴⁾の報告でも、低温、熱、運動、四塩化炭素曝露といったもので肝MTが誘導されるのに対して、腎臓では低温でわずかに誘導が認められるに過ぎない。今回の結果でも2000rad、照射3日後という条件下でMTの増加が認められたのは、肝臓と腎臓だけであり、他の臓器では認められなかった。また、肝臓と腎臓の増加にしても、照射線量に対しての増加には大きな違いは認められなかったが、照射後の増加の経時的変化には違いが認められ、肝臓でのMTの増加が照射後6時間で認められるのに対して、腎臓では24時間後となっていた。このような差異が何に起因するのか今後更に検討する必要がある。

もうひとつの問題点としてMTに結合している金属である亜鉛、銅の生体内における動態がある。

MTが増加する種々のストレス下での血清亜鉛の動きについてはOhら¹⁴⁾、Webbら³²⁾が報告しているが、低温、運動、四塩化炭素曝露、Endotoxin¹⁵⁾、Hepatectomy¹⁶⁾などのストレス

下での血清亜鉛の低下を示している。また、他の例として、担ガン動物で血清亜鉛の低下とMTの増加についての報告もあり⁶⁷⁾血清亜鉛がMTに結合している亜鉛の源である可能性を示している。X線照射後においても同様な現象が生じていることを予期したが、今回の結果では、血清亜鉛の低下は認められなかった。しかし、Sephacryl S-300のゲル濾過での亜鉛の溶出パターンから推察すると血清亜鉛に質的变化が生じていることが、推定された。

一般的に血清中の亜鉛の大部分は、Albuminにそして α_2 -macroglobulinに存在していると報告され、特にAlbuminに結合している亜鉛は、loosely bound zincであることから⁵¹⁾この分画の亜鉛の動きに注目する必要があると思われる。今回の結果では、Albumin分画以外では、照射群で亜鉛の増加が認められることから、Albumin分画の亜鉛が肝臓や腎臓へ移行していると考えられるが、さらに詳しく分析する必要があると思われる。

MTの生物学的役割については、現在もなお模索が続いている段階であるが、①重金属の解毒、②亜鉛や銅の代謝への関与、③SH基の反応性といったものが推定されている⁶⁸⁾⁻⁷⁰⁾。X線照射後に、増加する肝臓、腎臓のMTの役割を推定することは困難であるが、X線の生体に対する障害という点から推定するとX線照射後、ホルモン系を経由して、あるいは直接に生じた障害によって亜鉛あるいは銅の恒常性がみだされ、それによって生ずる亜鉛、銅の代謝異常に対する役割としてMTの増加が認められるよ

うになると思われる。

今後の問題点としては、照射方法や領域によってこの蛋白質の変動がどのようになるか、また血清中の亜鉛の動態について詳細な分析等が残されている。

要 旨

(1)ラット肝Metallothioneinが増加する2000 rad, 72時間後にMTの増加が認められるのは、腎臓のみで他の臓器(心臓, 肺, 脾臓, 赤血球, 血漿)では認められなかった。

(2)肝, 腎臓のMTの照射線量に対する増加には差が認められなかった。

(3)照射後の経時的変化では、肝臓が6時間からその増加が認められるのに対して、腎臓では、24時間と大きな違いが認められた。

(4)照射後の血清亜鉛量に低下傾向は、認められないが、Sephacryl S-300のゲル濾過の結果では、Albumin分画の亜鉛量に低下傾向が認められ、血清亜鉛に質的变化が生じていることが示唆された。

謝 辞

稿を終るに当り御懇切なる御指導を頂いた青野要教授、並びに、放射線医学教室の白石則之助手に深甚なる謝意を表します。また、原子吸光度計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-Knypl, 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 Young, B.W.: Isolation of (copper, zinc)-thioneins from the livers of copper-injected

- rats. *Biochem. J.* **157**, 517—520, 1976.
6. 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.
 7. Magilnicka, E.M., and Piotrowski, J. M.: Inducible gold-binding proteins in rat kidneys. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2625—2631, 1979.
 8. Winge, D.R., Geller, B.L. and Garvery, J.: Isolation of copper thionein from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 160—166, 1981.
 9. Failla, M.L. and Cousins, R.J.: Zinc accumulation and metabolism in primary cultures of adult rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **543**, 293—304, 1978.
 10. Etzel, K.R., Shapiro, S.G. and Cousins, R.J.: Regulation of liver metallothionein and plasma zinc by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 1120—1126, 1979.
 11. Karin, M. and Herschman, H.R.: Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in Hela cell cultures. *Science* **204**, 176—177, 1979.
 12. 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.
 13. 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—938, 1975.
 14. 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—285, 1978.
 15. 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.
 16. Ohtaki, H., Hasegawa, K. and Koga, M.: Zinc binding protein in the livers of neonatal, normal and partially hepatectomised rats. *Biochem. J.* **174**, 999—1005, 1978.
 17. Kotosonis, F.N. and Klaassen, C.D.: Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **51**, 19—27, 1979.
 18. Klaassen, C.D.: Induction of metallothionein by adrenocortical steroids. *Toxicology* **20**, 275—279, 1981.
 19. Brady, F.O.: Synthesis of rat hepatic zinc thionein in response to the stress of sham operation. *Life Sci.* **28**, 1647—1654, 1981.
 20. Aono, K.: Induction of metallothionein synthesis in the liver of rats by X-ray irradiation. *Okayama Igakkai Zasshi* **93**, 1083—1090, 1981.
 21. 板野義太郎, 南 和光, 八塚秀彦, 阿部晋也, 山田輝夫, 多田恵一, 小坂二度見: Gramoxone 投与ラット肝における初期 metallothionein の誘導と細胞質 SOD 活性の変化. *救急医学*, **3**, 208—209, 1982.
 22. Shiraishi, 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.
 23. Nordberg, G.F., Nordberg, M., Piscator, M., and Verterberg, O.: Separation of two forms rabbit metallothionein by isoelectric focusing. *Biochem. J.* **126**, 491—498, 1972.
 24. Webb, M.: Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2751—2765, 1972.
 25. Anderson, R.D., Winter, W.P., Mahler, J.J. and Berstein, I.A.: Turnover of metallothionein in rat liver. *Biochem. J.* **174**, 327—338, 1978.
 26. Kagi, T.H.R.: Hepatic metallothionein. In *Int. Congr. Biochem. Abstr.*, 8th, Switzerland, September, p130, 1970.

27. Evans, G.W., Majors, P.F. and Cornatzer, W.E.: Mechanism for cadmium and zinc antagonism of copper metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1142—1148, 1970.
28. Nordberg, M. and Kojima, Y.: Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. In *Metallothionein*, ed. J.H.R., Kagi, and M. Nordberg, Birkhauser Verlag, Basel, pp.41—135, 1979.
29. Hidalgo, H.A., Koppa, V. and Bryan, S.E.: Induction of cadmium-thionein in mouse tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 521—530, 1978.
30. 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 tumor cells. *Biochem. J.* **189**, 95—104, 1980.
31. Karin, M., Herschman, H.R. and Weinstein, D.: Primary induction of metallothionein by dexamesasone in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1052—1059, 1982.
32. Webb, M. and Cain, K.: Function of metallothionein. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 137—142, 1982.
33. Li, T.Y., Minkel, D.T., Shaw III, C.F. and Petering, D.H.: On the reactivity of metallothioneins with 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Biochem. J.* **193**, 441—446, 1981.
34. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
35. Bensadoun A. and Weinstein, D.: Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241—250, 1976.
36. Marklund, S.: Determination of plasma or serum haemoglobin by peroxidase activity employing 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulphonate-6) as chromogen. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **38**, 543—547, 1978.
37. Weser, U., Hartmann, H.J., Fretzdorff, A., and Strobel, G.J.: Homologous copper(I)-(thiolate)₂-chromophores in yeast copper thionein. *Biochim. Biophys. Acta* **493**, 465—477, 1977.
38. Webb, M.: The metallothioneins. In *Topics in Environmental Health*, ed. M. Webb, Vol. 2, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 195—266, 1979.
39. Suzuki, K.T. and Yamamura, M.: Induction of hepatic zinc-thionein in rat by endotoxin. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 2260, 1979.
40. Hohne, G., Jaster, R. and Kunhell, H.A.: Elektrophoretische Untersuchungen am Serum Röntgenbestrahlter Ratten. *Klin. Wochschr.* **30**, 952, 1952.
41. 若林 勝, 河村文夫: X線の蛋白質に及ぼす影響(第1報)血清蛋白質の電気泳動的な研究, 日本医放会誌, **11**, 31—35, 1952.
42. Hohne, G., Kunkel, A. and Anger, R.: Die serumeiweisskörper der ratte nach röntgenganzbestrahlung mit 3,000 r. *Klin. Wochschr.* **33**, 284, 1955.
43. Fisher, M.A., Magee, M.Z. and Coulter, E.P.: Studies on the serum proteins of the X-irradiated rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 66—74, 1955.
44. Leone, C.A., Hartnett, A.R., Crist, R., and Mcbeth, C.: Paper electrophoretic analysis of sera from irradiated Rhesus monkeys. *Radiat. Res.* **10**, 357—369, 1959.
45. 吉野純男: X線の家兎血清蛋白質に及ぼす影響について(特にX線全身一時照射の影響について). 日本医放会誌, **20**, 1330—1344, 1960.
46. 新井慎治: 放射線による家兎血清蛋白質の変化, 日本医放会誌, **20**, 949—955, 1960.
47. 柴田良治: X線照射の血清蛋白質分層に及ぼす影響について. 日本医放会誌, **19**, 2517—2535, 1960.
48. Ditzel, J.: The effect of total-body X-irradiation on serum proteins in the hamster. *Radiat. Res.* **5**, 694—702, 1962.
49. Ehara, K: Effect of X-irradiation in rats bearing Walker-256-carcinoma and normal. -Changes in

- serum proteins. *Okayama Igakkai Zasshi* **90**, 59—68, 1978.
50. Dennes, E., Tupper, R. and Wormald, A.: Studies on zinc in blood. *Biochem. J.* **82**, 466—476, 1962.
 51. Parisi, A.F. and Valle, B.L.: Isolation of a zinc α -macroglobulin from human serum. *Biochemistry* **9**, 2421—2426, 1970.
 52. Giroux, E.L. and Henkin, R.I.: Competition from zinc among serum albumin and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **273**, 64—72, 1972.
 53. 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, 1979.
 54. Chesters, J.K. and Will, M.: Zinc transport proteins in plasma. *Br. J. Nutr.* **46**, 111—118, 1981.
 55. Prinz, R. and Weser, U.: A naturally occurring Cu-thionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 767—776, 1975.
 56. Olafson, R.W., Abel, K. and Sim, R.G.: Prokaryotic metallothionein: Preliminary characterization of a blue-green alga heavy-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 36—43, 1979.
 57. Lerch, K.: Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* **284**, 368—370, 1980.
 58. Porter, H.: The particulate half-cysteine-rich copper protein of newborn liver. Relationship to metallothionein and subcellular localization in non-mitochondrial particles possibly representing heavy lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 661—668, 1974.
 59. Hartmann, H. -J. and Weser, U.: Copper-thionein from fetal bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 211—222, 1977.
 60. Ryden, L. and Deutsch, H.F.: Preparation and properties of the major copper-binding component in human fetal liver. *J. Biol. Chem.* **253**, 519—524, 1978.
 61. Wong, K. -L. and Klaassen, C.D.: Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 12399—12403, 1979.
 62. Mason, R., Bakka, A., Samarwickrama, G.P. and Webb, M.: Metabolism of zinc and copper in the neonate: accumulation and function of (Zn, Cu)-metallothionein in the liver of the newborn rat. *Br. J. Nutr.* **45**, 375—389, 1980.
 63. Bakka, A. and Webb, M.: Metabolism of zinc and copper in the neonate: Changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 721—725, 1981.
 64. Mason, R.: Metabolism of cadmium in the neonate: Effect of hepatic zinc, copper and metallothionein concentrations on the uptake of cadmium in the rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1765—1771, 1982.
 65. Brady, F.O.: Metabolism of zinc and copper in the neonate: Zinc thionein in developing rat brain, heart, lung, spleen, and thymus. *Life Sci.* **32**, 2981—2987, 1983.
 66. Flemming, K.: Strahlenwirkungen und Nebennierenrinde. IV. Untersuchungen an Ratten über den 'ersten corticosteroidanstieg' nach Ganzkörper-röntgenbestrahlung. *Int. J. Radiat. Biol.* **14**, 93—105, 1968.
 67. 白石則之, 木本 真, 竹田芳弘, 上者郁夫, 森本節夫, 青野 要: 担ガンマウスにおける肝メタロチオネインの増加について. 生化学, vol.55, p.939, 1983.
 68. Brady, F.O.: The physiological function of metallothionein. *TIBS*, **7**, 143—145, 1982.
 69. 菅原直毅: 金属代謝におけるメタロチオネインの生物学的役割. 変異原と毒性, **5**, 119—129, 1982.
 70. 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.

**Increase in metallothionein content in rat tissues
induced by X-irradiation**

Yoshihiro TAKEDA

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan.

(Director: Prof. Aono)

The amount of metallothionein in rat liver and kidney was increased 72 hr after irradiation by a high dose of X-irradiation (2,000 rad), but in other tissues the amount of metallothionein was not increased. An increase in metallothionein contents in rat liver and kidney was induced 72 hr after irradiation when rats were exposed to a single dose between 1,500 and 3,000 rad. Below a single 1,000-rad dose, the increase in metallothionein content was not observed. An increase in the metallothionein content in the liver was observed 6 hr after irradiation (2,000 rad). In kidney, the increase in the metallothionein content was observed 24 hr after irradiation. Although the zinc content in serum did not change significantly after irradiation (2,000 rad), the zinc content of the albumin fraction decreased slightly.