

Title	X線全身照射による肝Metallothioneinの増加について
Author(s)	山本, 博道
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1986, 46(1), p. 66-71
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17811
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

X線全身照射による肝 Metallothionein の増加について

岡山大学医学部放射線医学教室

山 本 博 道

（昭和60年7月3日受付）

（昭和60年8月26日最終原稿受付日）

Increase of Hepatic Metallothionein Content Induced by Whole Body Irradiation

Hiromichi Yamamoto

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

Research Code No. : 401.3

Key Words : Whole body irradiation, Metallothionein, Zinc, Corticosterone, Liver

Hepatic metallothionein content was measured in rat at 18 hr after whole-body irradiation. The concentration of hepatic metallothionein was increased 5 fold in irradiated rats as compared with control. Prior administration of actinomycin D inhibited uptake of zinc into the liver and also irradiation-induced metallothionein synthesis. Serum zinc level did not change after irradiation, however zinc level of actinomycin D treated rat was significantly elevated. From these results, it is concluded that mRNA and protein synthesis is required at least in part for the increase in metallothionein content of the liver. The total zinc content was decreased in spleen and thymus, but was increased in liver or kidney after irradiation as compared with control. No changes in zinc content were observed in other tissues. Serum corticosterone level of irradiated rat did not change as compared with control at 6 hr after irradiation. These results suggest that zinc derived from tissues or cell damaged by irradiation accumulates in liver and this in turn may induce the synthesis of metallothionein.

序 論

1957年, Margoshes と Vallee によってウマの腎皮質からCdを多量に含有する低分子の蛋白質として発見されたMetallothioneinが¹⁾, 蛋白化学の領域外で注目をされるようになったのは, この蛋白質がCdの投与によって誘導されることが明らかにされてからである²⁾. その後, この蛋白はZn, Cu等によっても誘導されることが明らかにされ^{3)~9)}, 更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^{10)~20)}, 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ていく。現在までに金属やホルモン以外でMetallothioneinを誘導あるいは増加させる

ものとしては, 温度変化, 運動, 絶食, 手術, 火傷, 四塩化炭素への曝露, アルキル化剤の投与, 細菌感染, エンドトキシン投与, X線照射, エタノールや麻酔剤の投与等と広範囲に及んでいる^{19)~29)}. この中でX線照射については, この蛋白質が多量のCysteineやZnを含むことから, X線照射後のSH化合物やZn代謝との関連から注目され, 現在までに高線量照射によって肝臓や腎臓で増加することが報告されている^{25)~27)}. しかし, その増加の生理的意味や機序については現在までのところ明らかにされていない。Metallothioneinの誘導合成についてはZnやグルココルチコイドが重要な役割をすることが明らかにされているこ

とから^{10)~18)}, X線照射後の肝 Metallothionein の増加にこの二つの因子がどのように関与しているか明らかにするために実験を行い若干の結果を得たので報告する。

材料と方法

実験動物として Wistar 系雄ラット (150~200 g) を使用した。照射は東芝製深部 X 線治療装置を使用して 20Gy (2,000rad) の全身照射を行った (Cu 0.5mm + Al 0.5mm, 0.69Gy/min)。なお照射時に使用したケージに同一時間入れた群を対照群とした。Actinomycin D は 50% Propylene glycol-0.9% NaCl に溶かして 800 μ g/kg の割合で照射前 (2 時間) に腹腔内投与を行った。照射 18 時間後断頭によりラットを屠殺し、各臓器を摘出し実験に使用した。

Metallothionein 量はこの蛋白質に結合している Zn を測定する方法で求めた。肝臓の細胞可溶性分画を調製後、Sephadex G-75 によるゲルろ過を行い、Metallothionein 分画に存在する Zn 量を原子吸光法で測定し、その総量を Metallothionein 量として示した。細胞可溶性分画中の亜鉛量は、試料を 0.05N HCl で希釈した後、原子吸光法で測定した。組織の亜鉛量は、試料に硝酸を加えて加水分解後、希釈して原子吸光法で測定した。

マーカー蛋白として用いた Metallothionein 11 の分離精製は Weser et al.³⁰⁾ の方法を参考にして行った。亜鉛投与ラット肝より可溶性分画を調製し、Sephadex G-75 によるゲルろ過により粗 Metallothionein を調製した。この粗分画から DEAE-Sephadex A-50 でのイオン交換クロマトグラフィーにより、Metallothionein I, 11 を得た。SH 量は 1, 10-phenanthroline の存在下、Ellman 法³¹⁾ で、蛋白量は色素法³²⁾ で、血清中の Corticosterone 量は Usi et al. の蛍光法³³⁾ で測定した。

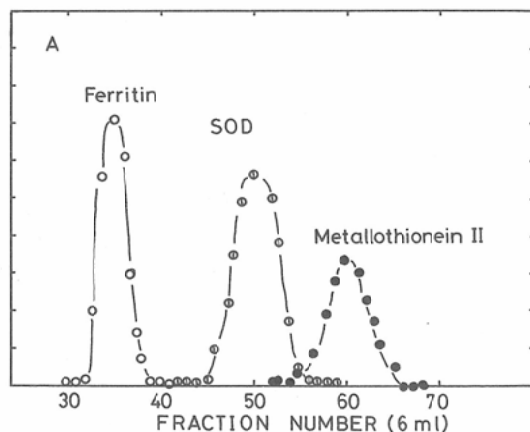
結 果

(1) X 線照射による肝 Metallothionein の増加に対する Actinomycin D 投与の影響について：X 線照射後 18 時間での肝 Metallothionein 量に対する Actinomycin D 投与の影響について検討した。Fig. は対照群, X 線照射群, Actinomycin D 2 時間前投与照射群の肝可溶性分画の Sephadex

G-75 でのゲルろ過における Zn, SH-と蛋白の分布とマーカー蛋白の溶出パターンを示したものである。G-75 でのマーカー蛋白 (Ferritin M.W. 480K, Superoxide dismutase M.W. 32K, Rat hepatic metallothionein 11 M.W. 6.5K dalton) の溶出パターンでは、マーカー蛋白である肝 Metallothionein 11 は分画番号 55-65, 分子量 10K dalton の分画に溶出された (Fig. 1-A)。各群の Zn の溶出パターンをみると、各群ともに四つのピークを示していた (Fig. 1-B, C, D)。しかし、対照群 (Fig. 1-B)、Actinomycin D 投与照射群 (Fig. 1-D) では第四のピークの Zn 量は低値を示し、照射群 (Fig. 1-C) でのみ高値を示していた。この Metallothionein 分画の亜鉛の分布のパターンは SH のパターンとも一致していた。

肝細胞総 Zn 量, 可溶性分画 Zn 量, 血清 Zn 量への Actinomycin D の影響を検討した。Table I に示すように、X 線照射群では総 Zn 量, 可溶性 Zn 量とも対照群に比較して、それぞれ 38, 54% の増加が認められるが、Actinomycin D 投与群では照射群の 80% にそれぞれ減少していた。一方、血清 Zn 量は、既に報告されているように²⁷⁾, 対照群と照射群で有意の差は認められなかったが、Actinomycin D 投与群では対照群の 1.7 倍近くに増加した。

(2) X 線照射後の組織亜鉛量の変動について：Actinomycin D 投与下で血清 Zn の増加が認められたことから、その由来を検索するため照射の組織亜鉛量への影響を検討した。Table II に示



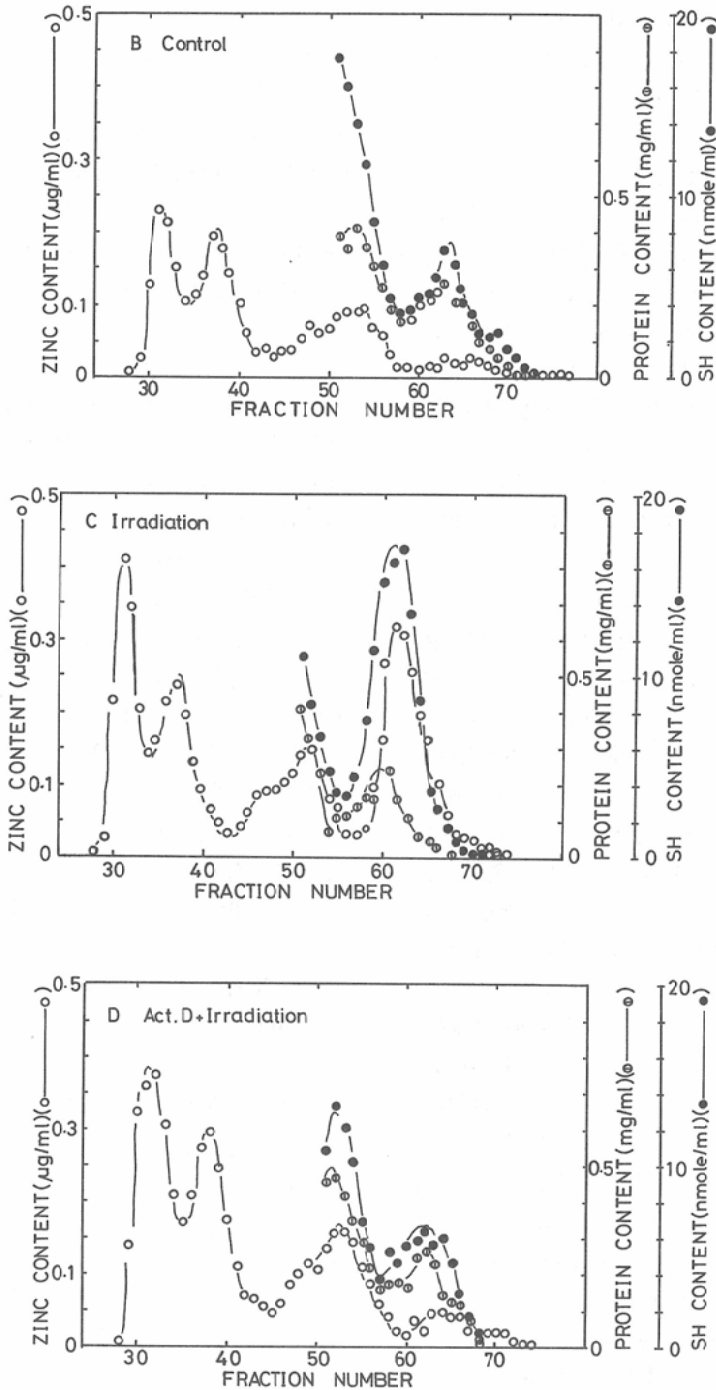


Fig. 1 Chromatography of rat liver cytosol on Sephadex G-75. Cytosol from equivalent amounts of liver was applied to each column. Rats were injected with 50% polyethylene glycol in 0.9% NaCl (control and irradiation) or actinomycin D at 20 hr before sacrifice. They were killed by decapitation at 18 hr after irradiation (2,000rad). A, marker proteins; B, control; C, irradiation; D, actinomycin D + irradiation.

Table I Effect of actinomycin D on zinc content of serum and zinc and metallothionein content of liver in X-irradiated rats.

Group	Serum-Zn ($\mu\text{g/ml}$)	Liver		
		Total tissue-Zn ($\mu\text{g/g}$) ^a	Cytosol-Zn ($\mu\text{g/g}$) ^a	MT-Zn ^b ($\mu\text{g/g}$) ^a
Control	1.415 \pm 0.094	34.153 \pm 1.945	24.320 \pm 1.145	1.937 \pm 0.697
Irradiation	1.513 \pm 0.107	47.367 \pm 1.271***	37.905 \pm 0.670*	9.601 \pm 0.648*
Actinomycin D +Irradiation	2.568 \pm 0.103* **	40.433 \pm 1.168****	30.430 \pm 0.839**	2.503 \pm 0.185**

The rats were killed by decapitation 18hr after irradiation (2,000rad). Actinomycin D was administered (ip) 2hr before irradiation. a, Concentration in micrograms per gram of wet weight. b, The metallothionein (MT)-associated zinc was determined after chromatography of cytosol on Sephadex G-75. MT-Zn is expressed as the total zinc content of all of the fractions that contained MT. Mean \pm SD of three experiments. *Significantly different from control ($p < 0.01$). **Significantly different from irradiation ($p < 0.01$). ***Significantly different from control ($p < 0.05$). ****Significantly different from irradiation ($p < 0.05$).

Table II Effect of X-irradiation on zinc content of various tissues of the rat.

Tissue	Zn ($\mu\text{g/g}$ wet weight)		Zn ($\mu\text{g/whole tissue}$)	
	Control	Irradiation	Control	Irradiation
Spleen	20.041 \pm 0.515	21.337 \pm 0.536	11.302 \pm 1.722	4.672 \pm 0.701*
Thymus	18.412 \pm 0.352	19.695 \pm 1.630	11.080 \pm 1.470	6.903 \pm 0.905*
Heart	17.951 \pm 1.081	16.965 \pm 0.796	10.760 \pm 0.653	10.735 \pm 0.229
Lung	19.878 \pm 1.061	16.613 \pm 1.738	18.153 \pm 1.239	16.617 \pm 1.647
Brain	12.238 \pm 0.783	11.998 \pm 0.493	20.827 \pm 1.995	20.730 \pm 0.767
Kidney	20.260 \pm 1.065	19.697 \pm 1.026	27.420 \pm 1.782	30.467 \pm 1.773**
Liver	35.202 \pm 4.227	48.462 \pm 3.374*	255.487 \pm 21.247	322.265 \pm 31.907*

The rats were killed by decapitation 18hr after irradiation (2,000rad). Mean \pm SD of six experiments. *Significantly different from control ($p < 0.01$). **Significantly different from control ($p < 0.05$).

すように、湿重量 (g) 当たりの Zn 量で著明な変化が認められた臓器は肝臓だけで他の臓器では著明な変動は認められなかった。しかし組織 Zn 量では組織重量に著明な減少が認められる脾臓と胸腺で対照群と比較して58, 37%の減少が認められた。

(3) X線照射後の血清 Corticosterone の変動について: Metallothionein 誘導機構を考える上で Zn の他に重要なもうひとつの因子として Corticosterone があげられる^{10)~18)}。X線照射による血清 Corticosterone への影響については Fleming et al.³⁴⁾によって報告されているが、それによれば血清 Corticosterone は全身照射後、短時間で上昇するとしている。しかし、また同時に疑似照射によっても上昇することを報告していることから、血清 Corticosterone レベルは容易に変化する

Table III Effect of irradiation on the serum corticosterone level.

Group	Corticosterone level ($\mu\text{g/ml}$)
Control I	0.124 \pm 0.048
Control II(sham treatment)	0.342 \pm 0.078*
Irradiation	0.356 \pm 0.053* **

The rats were killed by decapitation 6hr after treatment. Whole body irradiation was administered at a dose of 2,000rad. Mean \pm SD of six experiments.

*Significantly different from control I ($p < 0.01$).

**Not significantly different from control II.

ることが予想された。本実験においては肝 Metallothionein の増加がみられた照射後 6 時間(27)の血清 Corticosterone の測定を行った。Table III に示すように X線照射群と対照群(疑似照射群)共に無処置群と比較して増加し、しかも照射群と

疑似照射群との間には有意差を認めなかった。

考 察

X線照射後に認められる肝臓での Metallothionein の増加に関してはすでに報告されているが^{25)~27)}、本実験において更に以下の点を明らかにすることができた。

① X線照射によって誘導される肝臓への Zn の蓄積や肝臓 Metallothionein の増加は Actinomycin D によって抑制されていた。この結果は、肝臓 Metallothionein の増加には mRNA、蛋白合成が関与する事を示唆していると考えられる。② Actinomycin D 投与によって照射後、血清亜鉛の増加が認められるようになるが、この結果は Actinomycin D によって mRNA、蛋白合成が抑制され、そのために血清から肝臓への亜鉛の移行が充分に行われないうちに生じたものと推定された。③照射後、肝臓と腎臓では組織亜鉛量の増加が、脾臓と胸腺では組織亜鉛量の減少が認められた。これ以外の組織(脳、心臓、肺)には変化は認められなかった。④対照群(疑似照射)と照射群とのあいだの血清 Corticosterone レベルに差はなかった。

ところで Metallothionein の誘導に関しては金属とホルモンでの詳細な研究がなされており、それらの結果から金属とホルモンは互いに独立的な機構で、その合成の誘導を行うものと考えられている^{10)~18)}。X線照射後に認められる肝臓での Metallothionein の増加がどの誘導系によるのか明確ではないが、現在の所、組織亜鉛量の変化や、Actinomycin D 投与時の亜鉛の動態から考えて、照射に感受性の高い脾臓、胸腺、骨髄、リンパ節、末梢のリンパ球等が障害を受け、そして破壊されて、それから遊離した Zn が血清を介して肝臓や腎臓に蓄積し、Metallothionein を誘導するのではないかと推定している。ホルモンの関与についてはまだ不明の点が多く今後更に検討を加えたい。

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 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) Bremner, 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) Magilnicka, 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.J.: Zinc accumulation and metabolism in primary cultures of adult rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 543: 293-304, 1978
- 11) 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
- 12) Karin, M. and Herschman, H.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 Herschman, 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 heavy 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, W.J. Jr., 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) 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
 - 22) Kotosonis, F.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. *Toxicol.*, 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: 1674—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) 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
 - 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) 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*, 278, 1985
 - 30) 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
 - 31) Ellman, G.L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70—77, 1959
 - 32) 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
 - 33) Usui, T. and Kawamoto, H.: Fluorimetric determination of serum II-hydroxysteroids. Calculative correction of deviations in complex fluorescence spectra. *Clin. Chim. Acta*, 30: 663—669, 1970
 - 34) Flemming, K., Geierhaas, B., Hemsing, W. and Mannigel, U.: Strahlenwirkungen und nebennierenrinde. IV. Untersuchungen an ratten uber den 'ersten corticosteroidanstieg' nach ganzkorper-rontgenbestrahlung. *Int. J. Radiat. Biol.*, 14: 93—105, 1968