

カドミウムの精巣障害に及ぼす VitaminE の影響について

佐二木順子 福島悦子 福田芳生

Effects of Vitamin E on the Injury of Testes in Rats Administered CdCl₂

Junko SAJIKI, Etsuko FUKUSHIMA and Yoshio FUKUDA

Summary

To clarify the relation of lipoperoxide to inflammatory changes induced by CdCl₂ in the testes of rats, we observed the changes of lipoperoxide level and the degree of inflammation in the testes, liver, and kidneys, when Vitamin E was premedicated for 5 days before CdCl₂ administration. We also observed these changes pathologically using light microscope and scanning electron microscope.

Lipoperoxide concentrations in serum, kidneys, and testes of rats administered CdCl₂ alone increased to the level of 5%, 5% and 1%, respectively. However, lipoperoxide levels in rats given both Vitamin E and CdCl₂ were roughly the same as control levels.

Administration of Vitamin E had no effect on the cadmium content in viscera.

From pathological observations of the testes, we saw that cadmium affected not only seminiferous tubules but also blood vessels in interstitial tissue. In particular, the injury of the endothelium of blood vessels in the interstitial tissue of rats intoxicated with CdCl₂ alone was severe. However, this injury was present only to a small extent in those rats premedicated with Vitamin E.

I はじめに

著者らは、カドミウム中毒時に観察される障害精巣で、過酸化脂質が投与量に比例して増加する事実をすでに認め、過酸化脂質の生成がカドミウムによる精巣障害に一因を担っていることを示唆した。¹⁾

今回は、過酸化脂質の精巣障害への関与をさらに明確にする目的で、Cd中毒ラットに抗酸化剤であるd,l-α-トコフェロール(VitaminE)を投与した場合の、過酸化脂質の動態について調べた。また、この場合、精巣における炎症の程度に違いが生ずるかどうかについても病理学的観察を加えた。

II 材料ならびに実験方法

1. 材料

動物は体重 200 g 前後のウイスター系成熟雄ラットを用いた。カドミウムは塩化カドミウム(CdCl₂)の水溶液 1.0mg/0.1 ml を皮下(背部)に1回注射した。投与量の設定は Parizek²⁾ の報告に準じた。

VitaminE(以下VEと略)は、d,l-α-トコフェロールを10%非イオン性界面活性剤(HCO-60, ニッコークエミカ

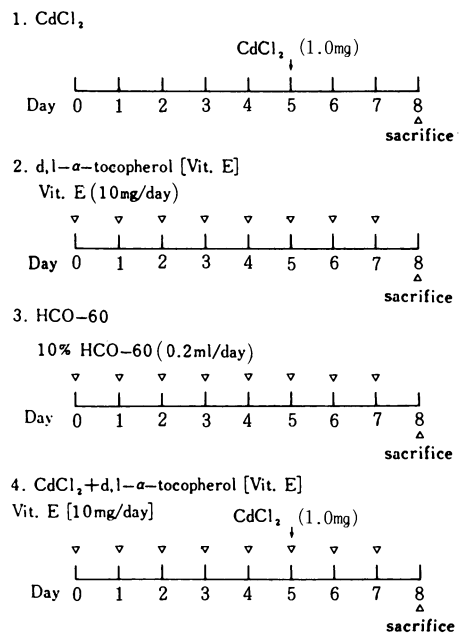


Fig.1 Design of the experiment

千葉県衛生研究所

(1982年10月1日受理)

ルKK)に溶解させたもの(エーザイKK)10mg/day/0.2mlを皮下(背部)に注射した。

実験は、図1に示したプロトコールに従って行なった。

各群6匹ずつ5群(無処置対照群, α -トコフェロール単独投与群, 10%HCO-60単独投与群, CdCl₂単独投与群, CdCl₂と α トコフェロール並行投与群)を設け, CdCl₂投与後72時間目に殺処分を行なった。心より採血後直ちに各臓器(肝, 腎, 精巣)を取りだし, 精巣の一部は組織学的検索のため, 10%ホルマリンにて固定した。また一部は走査電顕の試料として2%グルタルアルデヒド(PH7.4)にて固定し, 残りはFaupelらの方法³⁾に従いあらかじめ, 液体N₂中で冷却したアルミ厚板にて瞬間的に-80℃以下で圧延したものを臓器中過酸化脂質測定用の試料とした。過酸化脂質の測定はすべて殺処分後24時間以内に行なった。

2. 血清中過酸化脂質の測定

血液50 μ lを生食1ml中にけんだくさせた後, 血球を沈殿させた上清を試料とし, TBA法⁴⁾に従い, 測定した。上清に1/12N H₂SO₄, 10%リンタングステン酸を加え生じた沈殿に, TBA試薬を加え, 沸とう水浴中で60分間加熱し, 冷却後, TBAと過酸化脂質の反応生成物をn-ブタノールにて抽出した。分光蛍光光度計(励起波長515nm, 蛍光波長553nm)にてn-ブタノール層の蛍光強度を測定して, 1, 1, 3, 3テトラエトキシプロパンを標準とし, 過酸化脂質含量を算出した。

3. 臓器中過酸化脂質の測定

Ohkawa⁵⁾によるTBA法にもとずいて測定を行なった。各臓器に生食を加え10%homogenateを作成し, homogenateに8.1%SDS, 20%Acetate buffer (pH3.5), 0.8%TBA試薬を加えた反応液を沸とう水浴中で60分

間加熱後冷却し, 反応生成物をn-ブタノール, ピリジン層, (15:1)に抽出させ, 分光光度計(532nm)にて吸光度を測定し, 1, 1, 3, 3テトラエトキシプロパンを標準として過酸化脂質含量を算出した。

4. 血清中, VE (α -トコフェロール)の測定

蛍光法⁶⁾にもとずいて測定を行なった。血清に無水エタノールを加え混和後, VEをn-ヘキサンにて抽出し, n-ヘキサン層の蛍光強度(励起波長295nm, 蛍光波長320nm)を測定し, α -トコフェロールを標準として血清中 α -トコフェロール含量を算出した。

5. 臓器中Cdの測定

硝酸により各臓器を湿式分解した後, フレーム原子吸光(Perkin-Elmer305)にて測定を行なった。

6. 病理学的検索

光学顕微鏡による病理組織学的検索に供した試料は, アルコール系列を通して順次脱水し, パラフィン包埋とした。その後, 厚さ5 μ の切片を作成し, H.E染色して検鏡した。走査電子顕微鏡の検索のための試料は, アセトン, 酢酸イソアミルを経て, 臨界点乾燥装置(日立HCP-II型)を用い, 脱水した。脱水過程を終了した試料は, イオンコーターIBII型(エイコーエンジニアリング製)により金を15分間蒸着し, 走査型電子顕微鏡(日立450型)による観察に供した。その時の加速電圧は20kvであった。

すべてのデータについての有意差の検定はt-testによった。

III 結果

投与したVEの体内における吸収効果を確認する

Table 1. Concentrations of d. l- α -tocopherol (Vitamin E) in serum of rats.

treatments	Vit. E μ g/ml	Significance †
Control	5.35 \pm 1.08 (n=6)	
CdCl ₂	5.58 \pm 1.47 (n=6)	
CdCl ₂ + Vit. E	47.84 \pm 2.06 (n=6)	*
Vit. E	43.36 \pm 6.79 (n=6)	*
HCO-60	5.83 \pm 1.64 (n=6)	

† t-tst

* p < 0.01

Table 2. Concentrations of Cadmium in viscera of rats.

treatments	Vit. E (α -tocopherol) μ g/g wet wt	Significance †
Control	11.10 \pm 1.15	
CdCl ₂	23.07 \pm 4.35	*
CdCl ₂ + Vit. E	29.84 \pm 9.15	*
Vit. E	21.33 \pm 2.68	*
HCO-60	9.60 \pm 0.28	

† t-test

* p < 0.01

目的で血清中 V E の定量を行なった。その結果は表 1 のとおりであった。V E 投与群は、明らかに高値を示していた。各臓器中の Cd 含量は、表 2 に示したとおりである。肝、腎、精巣とともに、V E 投与による有意な変動は認められなかった。精巣における Cd 含量は、肝、腎のそれに比べると著しく低いものであった。各群ラットの血清中ならびに、肝、腎、精巣の過酸化脂質値は、図 2 のとおりであった。血清中過酸化脂質は対照群に比べ Cd 単独投与群で高値であった ($P < 0.05$)。しかし、この Cd による血清中の過酸化脂質の増加は、V E 投与により抑えられた。

臓器中の過酸化脂質値については、肝では V E 単独投与群で危険率 5% 以下で有意な低下、腎では、Cd 単独投与群で 5% レベルの有意な増加を示した。一方、精巣においては、Cd 投与により危険率 1% 以下で過酸化脂質値の有意な増加を認めた。これらの増加は、V E 投与により正常値付近にまで抑えられた。

過酸化脂質値に有意な増加が認められた Cd 単独投与ラットの精巣の光学顕微鏡による病理組織学的所見 (Fig 3-1.2.3.) では、激しい間質の浮腫、出血、多数の食細胞の出現を伴う炎症像、精細管の萎縮、精上皮の壊死が観察された。また、間質の細動脈及び静脈の内皮は剥離消失していた。(Fig 3-3) V E を

5 日間前投与後 Cd を投与したものでは、間質の軽度の浮腫ならびに一部の精細胞の空胞化をのぞいたほかは、正常群と殆ど変わるところはなかった。

一方、この組織の走査電子顕微鏡による観察では、Cd 単独投与群の精上皮は崩壊し、その間に大きな間隙が形成されていた。この時の血管壁は、内皮の剥離消失による下層のコラーゲンの露出、遊走細胞の出現、ならび血管周囲に赤血球の漏出が観察された。

しかしながら、V E の前投与により、これらの著しい変性は抑えられたが、血管内皮表面に直径 0.2μ 前後の円型を呈した顆粒状構造が散在しているのが観察された。又、内皮の一部が消失し、円型の小孔を形成していた。このような変化は正常群、V E、界面活性剤群には認められなかった。

IV 考察

各種疾患において、各組織を構成している不飽和脂肪酸の過酸化という現象が深い意義をもつものとして注目されている。この過酸化脂質の生成は、生体の維持に重要な DNA の構造を変化させ、⁷⁾ 多糖類を分解させる等の著しい障害作用を示すスーパーオキシドならびに⁸⁾ 重金属イオン等によって惹起されることが明らかにされている。

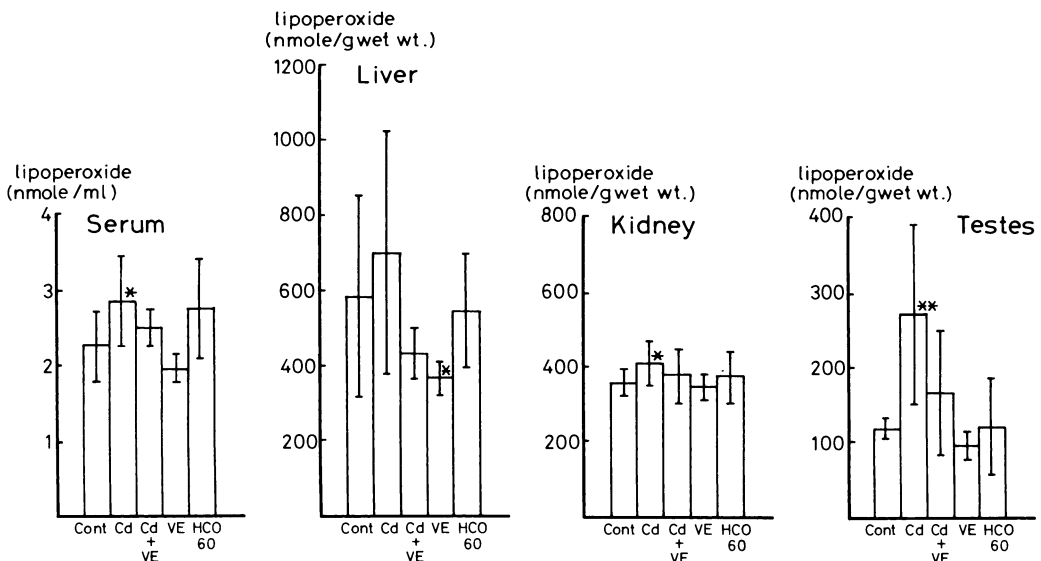


Fig. 2 Lipoperoxide levels in serum and in viscera of rats at the time of sacrifice. Significance of differences was obtained by t-test.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

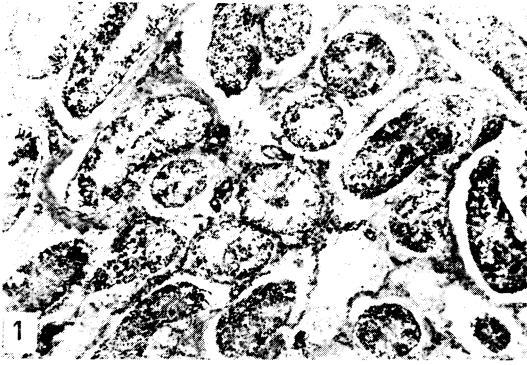
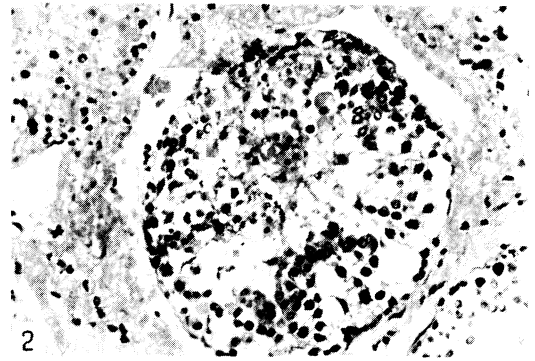
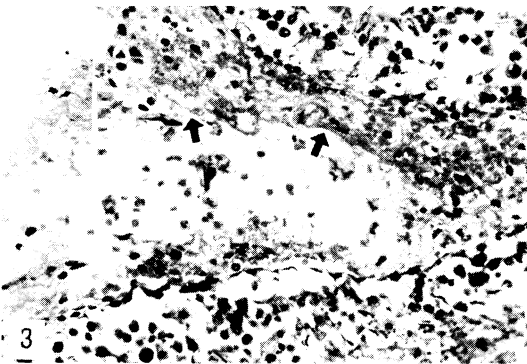


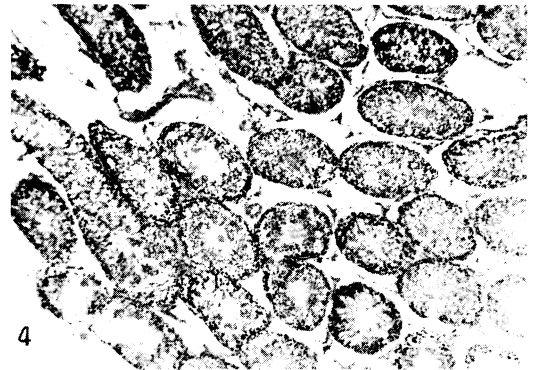
Fig. 3 (1) Micrograph, using light microscope, of the testes of rats, 72hrs after $CdCl_2$ administration. Necroses of seminiferous tubules, severe hemorrhage and inflammatory changes of interstitial tissues are evident (H-E stain, x100).



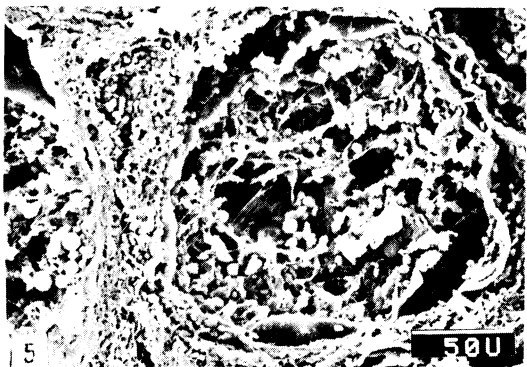
(2) Partial enlargement (x200) of Fig. 1.



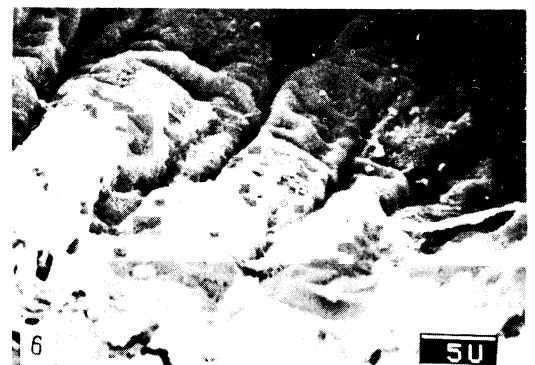
(3) Blood vessels in the interstitial tissue. Arrow indicates the denudation of endothelium (H-E stain, x200).



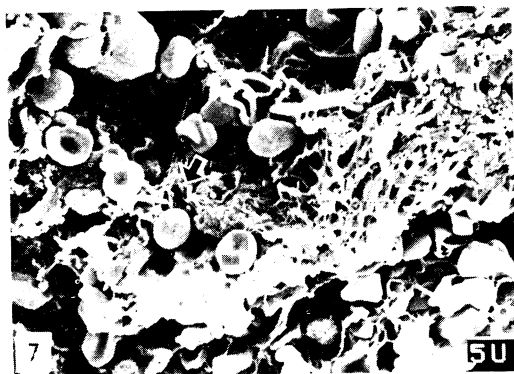
(4) Testes of rats, 72 hrs after $CdCl_2$ administration with premedication of Vitamin E for 5 days. Although vacuolation of seminiferous epithelium is seen, normal spermatogenesis is observed. Moderate edematous change (indicated by an arrow) is seen in a part of interstitial tissues (H-E stain, x100).



(5) Scanning electromicrograph of the testes of rats, 72 hrs after $CdCl_2$ administration.



(6) The surface of venous endothelium of the control testes.



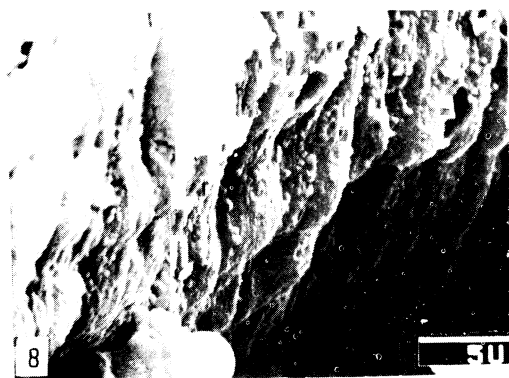
(7) The surface of a blood vessel in the interstitial tissue of rats, 72 hrs after administration of $CdCl_2$. Either denudation or disappearance of the endothelium of blood vessel is seen (arrow). Denudation of collagen fibriles under endothelium is seen.

一方、これら脂質の過酸化反応に対する生体内の防御機構としては、スーパーオキシディスムターゼ(SOD)ならびに V.E, V.C P-amino benzoic acid, グルタチオン等の生物学的抗酸化剤等が考えられている。

なかでも V.Eの防御作用については、広く研究がなされており、生体を光化学スモッグ曝露から保護するのにも大量の V.E投与が推奨されている⁹⁾。食事中的 V.Eが欠乏するとミクロゾーム膜の脂質の過酸化が増大し、それに伴い膜が不安定になる⁶⁾ことが明らかになっている。

カドミウム投与ラットで観察される精巣障害時(出血現象, 間質の浮腫, 血管壁の傷害, 精細管内への遊走細胞の浸潤, 精細胞の空胞化等の症状を呈する, Fig 3)に過酸化脂質が著明に増加することを認めたが、これらの現象は、V.Eの premedicationにより著しく改善された (Fig2)。この場合、肉眼的にも、光学顕微鏡の観察からも、出血、間質の著しい浮腫等の所見は観察されなかった。ただ、精細管の空胞化、ならびに走査電子顕微鏡による観察で認められた血管内皮表面の円型顆粒ならびに小孔は正常群とは異なる所見であった。これら円型顆粒ならびに小孔は、オゾン中毒時、ラットの肺胞細胞 (alveoli) および遠・近位細気管支表面に観察されている¹²⁾ものと類似していた。オゾン中毒の際、肺の過酸化脂質が著明に増加することが明らかにされており、¹³⁾今回認められたこれらの所見は、過酸化脂質による傷害像の一部を示すものとして興味深い。

V.Eの前投与により組織障害が抑えられたこと



(8) The surface of venous epithelium in the interstitial tissue of the rats premedicated with Vitamin E for five days before $CdCl_2$ intoxication. Heavy damage such as denudation and disappearance of vessel epithelium are not seen, but numerous small, round bodies (0.2μ diameter) and elliptic holes ($0.5-2.5\mu$ diameter) on the surface of endothelium of blood vessels can be seen.

は、カドミウムのひきおこす一連の精巣障害に、過酸化脂質が大きく関与していることを示唆するものと考えられた。Gunnら¹⁴⁾は、すでに還元物質の1種である SH化合物投与が Cd障害を抑制しうることを報告している。

最近、八木¹⁵⁾らは、過酸化脂質の一種であるヒドロパーオキシドをウサギ耳静脈より注入した際、静注後24時間目に、大動脈内皮細胞の傷害と血中成分の凝集付着を走査電子顕微鏡にて観察している。今回のカドミウム中毒ラット精巣の血管内皮像も同様の所見であり、過酸化脂質の関与を裏付けるものと考えられる。

今回、カドミウム中毒時、精巣中の過酸化脂質が増加した原因については不明な点が多いが、脂質の過酸化を考える上で不飽和脂肪酸から Prostaglandin (PGS) への代謝系も重要な要因と思われる。

Prostaglandin_{E2}をはじめいくつかの PGS は炎症反応と密接な関係があるものと考えられており^{16,17)}、今回のカドミウム障害精巣で Prostaglandin代謝がどのように行なわれているのか非常に興味ある問題である。M.Ali¹⁸⁾らは VitaminEが Prostaglandin代謝の key enzymeである cyclooxygenase活性を量依存的に阻害することを報告、又、Gwebu¹⁹⁾らは Vit.Eが血小板の lipoxigenaseを阻害することを報告している。

V 文献

- 1) Sajiki, J., Y. Fukuda and E. Fukushima, (1981) On the Lipoperoxide Concentrations in the Viscera of Rats Intoxicated by Cadmium Chloride., *J. Appl. Biochem.*, 3, 467-471,
- 2) Parizek, J & Z. Zahor., (1956) Effect of cadmium salt on testicular tissue, *Nature*, 177, 1036-1037, 1956
- 3) Faupel, R.P. (1972) The problem of tissue sampling from experimental animals with respect to freezing technique, anoxia, stress and necrosis., *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 509-522,
- 4) Yagi, K, (1976) A sample fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma., *Biochem. Med.*, 15, 212-216,
- 5) Ohkawa, H., N. Ohishi & K. Yagi, (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction., *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎, (1975)血清トコフェロールの蛍光定量栄養と食糧, 28, 277-280
- 7) White, H. L. & White, J. R., (1966) Interaction of streptonigrin with DNA in vitro, *Biochim. Biophys. Acta*, 123, 648-651.
- 8) Harris, M. J., Herp, A., & Pigman, W., (1971) Depolymerization of polysaccharides through the generation of free radicals at a platinum surface: Free radical oxidations, *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 615-622.
- 9) Fletcher, B. L. & A. L. Tappel, (1973) Protective effects of dietary alpha-tocopherol in rats exposed to toxic levels of ozone and nitrogen dioxide, *Environ. Res.* 6, 165-175.
- 10) McCay, P. B., Poyer, J. L., Pfeifer, P. M., May, H.E. & Glliam, J.M., (1971) A function for alphanatocopherol: Stabilization of the microsomal membrane from radical attack during TPNH-dependent oxidations, *Lipids*, 6, 297.
- 11) Mead, J.F., (1976) Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes, *Free Radicals in Biology*, vol. 1. W.A.Pryor, ed., Academic Press, New York, p 51.
- 12) Sato, S., M. Kawakami, S. Maeda and T. Takishima, (1976) Scanning Electron Microscopy of the Lungs of Vitamin E-Deficient Rats Exposed to a Low Concentration of Ozon, *American review of respiratory disease*, 113, 809-821.
- 13) Goldstein, B. D. Lodi, C., Collinson, C. and Baldhum, O. J., (1969) Ozon and lipid peroxidation, *Arch. Environ. Health*, 18, 631-635.
- 14) Gunn, S.A., T.C.Gould & W.A.D.Anderson (1966) Protective effect of thiol compounds against cadmium-induced vascular damage to testis, *Pro. Sci. Exp. Biol. Med.*, 122, 1036-1039.
- 15) Yagi, K. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yamashita, M. & Nakashima, T., (1981) Lesion of Aortic Intima Caused by Intravenous Administration of Linoleic Acid Hydroperoxide, *J. Appl. Biochem.*, 3, 58-65.
- 16) Bonta, I.L., M.J.Parnham & M.J.P.Adolfs, (1977) Reduced exudation and increased tissue proliferation during chronic inflammation in rats deprived of endogenous prostaglandin precursors, *Prostaglandins* 14, 295-307.
- 17) Cook, J. A., W. C. Wise & P. V. Halushka, (1980) Elevated thromboxan levels in the rat during endotoxic shock: Protective effects of imidazole, 13-azoprostanoic acid or essential fatty acid deficiency. *J. Clin. Invest.* 65, 227-230.
- 18) Ali, M. C.G.Gudbramson & J.W.McDonald, (1980) Inhibition of Human Platelet Cyclooxygenase by Alpha-Tocopherol, *Prostaglandins* 4, 79-85.
- 19) Gwebu, E.T. R.W.Trenyn, D.G. Cornwell & R.V.Panganamala, (1980) Vitamin E and the inhibition of platelet lipooxygenase., *Research Communications in chemical pathology and Pharmacology* 28, 361-376.