

カドミウム中毒ラットの精巣炎症における トコフェロールの役割

佐二木順子

The Role of Tocopherols in the Injury of Rat Testis Given CdCl₂

Junko SAJIKI

Summary

To investigate the role of tocopherols (Tocs) for the inflammation induced by CdCl₂ in the testis of rats, the concentrations of Tocs in the testis and serum were compared between two groups of rats, the one being administered with CdCl₂ only (designed as Group A) and the other with CdCl₂ after pre-medication with α -Toc. (designated as Group B). Serum α -Toc level was higher in the Group B than the Group A. In the testis of Group A, however, hemorrhagic inflammations were observed and the levels of lipoperoxide and α -, β - and γ -Toc were increased. On the other hand, in the testis of rats of the Group B, the inflammation was reduced and the level of lipoperoxide was suppressed to the level of the normal control.

These results suggest that internal Tocs play its role as an antagonistic agent for the inflammation of the testis induced by CdCl₂. Levels of α -, β - and γ -Toc *in vivo* are not sufficient to suppress the inflammatory damage of the testis induced by CdCl₂, while enriched concentration of α -Toc in the target organ reduces serial oxidation and accordingly lightens the symptom.

I はじめに

ラットに塩化カドミウム(CdCl₂)を皮下投与すると、精巣に出血性の炎症が引き起こされる。その際、投与後初期に精巣内血管の透過性¹⁾ならびに脂質の過酸化²⁾が著しく亢進する。

ところが、抗酸化剤である α -Tocopherol(Toc)をあらかじめ投与しておく、CdCl₂による精巣の炎症は著しく軽減され、脂質の過酸化も抑制される。³⁾一方、CdCl₂の単独投与を受けたラットの精巣中の α -Toc含量は有意に増加し、炎症部位における抗酸化剤の果たす役割が大きいかを指摘してきた。⁴⁾

今回は、抗酸化剤としてのToc類が精巣中でどのような役割を果たすか明らかにするため、CdCl₂単独投与で生ずる著しい炎症を軽減する量の α -Tocを併用したラット血清中、精巣中のToc類の含量を測定した。なお、炎症部位で生ずる酸化反応の指標として過酸化脂質の測定もあわせて行ない知見を得たので報告する。

II 実験材料

カドミウムは塩化カドミウム(市販特級)を用いた。Tocは、dl- α -Tocを10%非イオン性界面活性剤(HCO-60, ニッコーケミカルK.K.製)にて溶解させたもの(1ml中50mg α -Toc, 100mgHCO-60を含む、エーザイK.K.製)を用いた。

動物は、体重200g前後のウイスター系雄ラットを用いた。

III 実験方法

ラット25匹を5群に分け、以下のような処置を施した。

1) CdCl₂単独投与群; CdCl₂(5.0mg/kg)を皮下に一回注射し、投与後72時間目にエーテル麻酔の下心採血を行ない精巣を摘出した。2) CdCl₂と α -Toc併用群; α -Toc(50mg/kg)を連続8日間皮下投与した。なお、 α -Toc連続投与6日目にCdCl₂(5.0mg/kg)を1回皮下投与した。CdCl₂投与72時間後にCdCl₂単独投与群と同様に処理した。3) α -Toc単独投与群; 4) HCO-60(hydrogenated castor oil trioxo ethylen ether)単独投与群、すなわち α -

Toc (50mg/kg) あるいはHCO-60 (100mg/kg) をそれぞれ8日間連続投与し、CdCl₂ 単独投与群と同様に処理した。5) 無処置対照群; 無処置ラットについてCdCl₂ 単独投与群と同様に処理した。

採血後、過酸化脂質測定用の検体をのぞいた血液をただちに血清分離し、N₂ ガス添加した血清をToc測定まで-70°C以下にて保存した。精巣については、摘出、重量測定後直ちに過酸化脂質を測定し、精巣の一部はエーテル、n-ヘキサンにてTocを抽出した後、蒸発乾固させToc類測定まで-70°C以下にて保存した。保存期間は約2週間であった。血清中Tocの定量は、蛍光法にて行なった⁵⁾。精巣中Toc類の定量は、組織よりTocをエーテルおよびn-ヘキサンにて抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) - 蛍光定量法⁶⁾ によって行なった。高速液体クロマトグラフは、JASCO FLC-350、検出器は、JASCO FP-4を用いた。分析条件は以下のとおりである。

カラム: JASCOPACK WC-03-500

(2.3 i.d. × 500mm)

移動相: イソプロピルエーテル・n-ヘキサン

(0.8:99.2)

流速: 0.8ml/min

検出器: Ex298nm, Em325nm

血漿中、精巣中の過酸化脂質の測定は、TBA法^{7,8)} によって行なった。なお、1, 1, 3, 3-テトラエトキシプロパンを標準物質として用いた。

データは、最小二乗法による分散分析により有意差が認められたものについて、Turkeyの多重検定法⁹⁾ により分析した。

IV 実験結果

肉眼的所見によると、CdCl₂ 単独投与群ラットの

精巣は出血を伴っており暗赤色を呈していた。一方α-Tocで処置した後CdCl₂ を投与したラットでは出血は抑えられ、正常に近い状態であった。体重に対する精巣重量比は、表1に示したとおりである。α-Toc単独投与群がCdCl₂ 単独群、正常群、α-TocとCdCl₂ 併用群より高値を示した (P<0.01)。

血清および精巣中のToc含量は表2に示した。血清では、α-Tocを体外から投与した群はCdCl₂ の投与いかんにかかわらず高値を示した (P<0.01)。CdCl₂ 単独投与群は対照群とに差がなかった。精巣中のToc含量についてはCdCl₂ 単独投与群でα-, β-, γ-Tocともに有意な高値を示した (P<0.01)。とくにα-Toc含量は、α-Tocをあらかじめ体外から投与した群と同じレベルまで高まっていた。α-Tocを体外から投与した群については、CdCl₂ 投与いかんにかかわらずα-Tocは高値を示したが、β-Tocはむしろ減少の傾向にあった。HPLCのチャートの一部を図1に示した。

炎症時亢進する酸化反応の指標となる過酸化脂質値については表3に示した。血漿中の過酸化脂質値については、α-Toc単独投与群で低下が認められた (P<0.05)

Table 1. Values of the testis weight relative to the body weight

Treatments	Mean ± SD	
	Testis wet weight	Body weight (×10 ⁻²)
α-Toc+ CdCl ₂	1.06 ± 0.05	b
CdCl ₂	0.96 ± 0.05	b
α-Toc	1.24 ± 0.09	a
HCO-60	1.06 ± 0.13	ab
Control	1.02 ± 0.04	b

Data were analyzed according to one-way analysis of variance (P<0.01) Significant differences were observed between different letters

Table 2. Tocopherol concentrations in the serum and testis

Treatments	Serum (**1) (μg/ml)	Testis (μg/g wet wt)		
		α-Toc **	β-Toc **	γ-Toc **
α-Toc+ CdCl ₂	3 6.2 ± 3.7 a2)	2 9.8 ± 9.2 a	0.3 ± 0.1 bc	0.3 ± 0.1 b
CdCl ₂	7.3 ± 1.8 b	2 3.1 ± 4.4 ab	1.1 ± 0.1 a	1.0 ± 0.2 a
α-Toc	3 4.7 ± 7.7 a	2 1.3 ± 2.7 ab	0.2 ± 0.03 c	0.3 ± 0.04 b
HCO-60	7.1 ± 0.5 b	9.6 ± 0.3 b	0.4 ± 0.1 bc	0.3 ± 0.1 b
Control	6.9 ± 0.5 b	1 1.1 ± 1.2 b	0.5 ± 0.1 b	0.4 ± 0.1 b

1) Data were analyzed according to one-way analysis of variance ** P<0.01

2) Significant differences were observed between different letters

のみであった。精巣中については、CdCl₂ 単独投与群の値が他の群に比べて高かった (P<0.01)。

V 考察

著者らはすでにCdCl₂の単独投与により炎症がひきおこされたラットの精巣中でα-Toc含量が高まっていることを報告した。⁴⁾ その高まりは体外からα-Tocをあらかじめ投与することにより炎症が抑えられた精巣中のα-Tocとほぼ同じレベルであり、この結果は酸化反応を伴った炎症部位における抗酸化剤の抗炎症作用を示すものと考えられた。⁴⁾

今回、著しい出血性の炎症が観察され、過酸化脂質の増加が認められた (表3) CdCl₂ 単独投与ラットの精巣で、α-Tocのみならずβ-, γ-Tocについても高値を示した (表2)。このCdCl₂単独投与ラット精巣におけるToc値の増加の原因については、次のような可能性が考えられる。

① 精巣内脂質含量が増加することによりTocが精巣内に多く溶け込む。

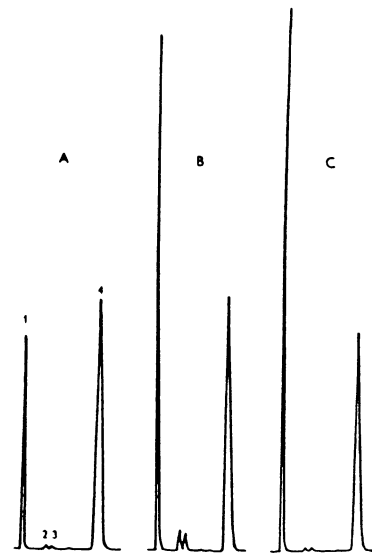


Fig 1. Chromatogram of tocopherols in the testis of rats
 A : Control B : CdCl₂ treated
 C : CdCl₂ treated after premedication with α-Toc
 1, α-Toc 2, β-Toc
 3, γ-Toc 4, Tocol

Table 3. Lipoperoxide values in the plasma and testis

Treatments	Mean ± SD	
	Plasma * 1) TBA reactants (nmole/ml)	Testis ** 1) TBAreactants log (nmole/g wet wt)
α-Toc+CdCl ₂	2.5 0 ± 0.2 3 b 2)	1.9 2 ± 0.1 3 ab
CdCl ₂	2.8 4 ± 0.6 0 b	2.2 0 ± 0.1 0 a
α-Toc	1.9 4 ± 0.1 7 b	1.6 7 ± 0.0 6 b
HCO-60	2.6 4 ± 0.6 6 b	1.7 0 ± 0.0 1 b
Control	2.2 6 ± 0.4 8 b	1.9 0 ± 0.1 7 b

1) Data were analyzed according to one-way analysis of variance ** P<0.01
 * P<0.05
 2) Significant differences were observed between different letters

② 精巣内に細胞が多く集まり、それらの膜中のTocが測定される。

③ 精巣内で生じている酸化反応を抑える目的で生体内Tocが精巣に動員される。

①の可能性については、柴田らが著者とほぼ同量のCdCl₂をラットに投与し、72時間目の精巣中脂質を測定している。その結果、脂質の構成に変化が認められる (リン脂質が低下し、遊離脂肪酸やトリグリセリドが増加する) が、総脂質量に変化はなかったと述べており、¹⁰⁾ 精巣中脂質増加にもとづくToc増加は考えにくい。②に関して、CdCl₂ 単独ラット精巣中の総蛋白量はすでに

¹¹⁾ 報告したとおり対照群に比べ有意に低下した (P<0.01)。しかしながら、組織学的には遊走細胞の浸潤が認められており、⁴⁾ これら遊走細胞膜のTocの影響は無視できないものと考えられる。今後、CdCl₂ 中毒ラット精巣中に出現する遊走細胞の膜中のTocの定量を行なう必要がある。

一方、著者らはこの精巣における炎症発生過程で白血球由来と考えられる活性酸素 (H₂O₂) の生成が亢進していることを観察し、このラジカル反応がCdCl₂のひきおこす炎症に重要な役割を果たしていることを報告した¹¹⁾ なおYagiらは¹²⁾ 活性酸素 (O₂⁻) がα-Tocを酸化する反応を *in vitro* の実験により確認している。

これらの事実は、③の可能性を示唆するものと考えられるが、現時点において、生体内Tocが合目的に転送されるという報告は極めて少ない。また、今回の実験では血清中のToc量に変化が認められていない。今後炎症発生過程における血清中、臓器中のTocの変動を経時的に調べることは、精巣中のToc増加のメカニズムを解明する上で意義あることと考えられる。

次に、体外からあらかじめ α -Tocを投与した群においては、CdCl₂投与いかんにかかわらず β -、 γ -、Toc値に有意な変動は認められなかった。この結果については、 α -TocがCdCl₂中毒ラット精巣に出現する白血球等の遊走を阻止した結果、白血球由来の β -、 γ -Tocが定量されなかったものか、あらかじめ投与した α -Tocが十分抗炎症作用を示したため β -、 γ -Tocの動員が行なわれなかったのかさらに検討する必要がある。

VI まとめ

カドミウムの投与により生ずる精巣の炎症に抗酸化剤がいかなる役割を果たすかを調べる目的でCdCl₂単独投与ラットと α -Toc処置後CdCl₂を投与したラットについて血清中、精巣中のToc含量を測定した。

血清中においては、 α -Toc処置ラットのみで α -Toc含量が高かった。

精巣中では、著しい出血性の炎症が観察され、かつ過酸化脂質も増加を示したCdCl₂単独投与ラットで α -、 β -、 γ -Tocのいずれも高値を示した。あらかじめ α -Tocを投与した後CdCl₂を投与した場合、精巣の炎症は軽減され過酸化脂質も正常値近くまで抑えられた。このラット精巣では α -Toc含量のみ高値を示し、 β -Tocはむしろ減少傾向にあった。

謝辞

Tocの供給およびToc定量に際し、援助を賜ったエーザイ株式会社に謝意を表します。

文献

- 1) Gupta,R.K.,Barnes,G.W.,Skalton,F.R.:Am. J.Pathol.,51,191-205 (1967)
- 2) Sajiki,J.,Fukuda,Y.,Fukushima,E.,J.Appl. Biochem.,3, 467-471 (1981)
- 3) Saiiki,J.,Fukuda,Y.Fukushima,E.,Eisei Kagaku,28, 55 (1982)
- 4) Sajiki,J.,Fukuda,Y.,Fukushima,E.,Hirai, A.,Tamura,Y.,Kumagai,A.:J.Appl. Biochem.,4, 339-348 (1982)
- 5) 阿部皓一, 勝井五一郎, : 栄養と食糧, 28,277-280 (1975)
- 6) 阿部皓一, 大前雅彦, 勝井五一郎, ビタミン, 50, 453-457 (1976)
- 7) Yagi,K.:Biochem. Med.,15,212-216 (1976)
- 8) Ohkawa,H.,Ohishi,N.,Yagi,K.:Anal. Biochem.,95, 351-358 (1979)
- 9) 吉田実:実験計画法, 養賢堂, pp84-86 (1975)
- 10) 柴田朋子, 吉田祐子, 和久敬蔵, 第9回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム抄録, pp 130-132 (1982) 岡山
- 11) 佐二木順子, 平井愛山, 田村泰, :炎症, 3, 217-221 (1983)
- 12) Yagi,K.,Yamada,H.,Nishikimi,M.:Tocopherol,Oxygen and Biomembranes,(Eds.C deDuve, Hayaishi,O.:North Holl and Biomedical Press) pp 1-11 (1978)