

バナジウム化合物投与ラットにおける4価及び総バナジウムの ESRと中性子放射化分析法による定量

土屋 浩一郎¹⁾・桜井 弘¹⁾・西田 幹夫²⁾・高田 実弥³⁾・(故)小山 睦夫³⁾
(徳島大学薬学部*, ¹⁾薬品分析学教室, ²⁾生化学教室, ³⁾京都大学原子炉実験所**)

Selective Determination of Vanadium in Organs of Rats Treated with Vanadium Complexes

Koichiro TSUCHIYA¹⁾, Hiromu SAKURAI¹⁾, Mikio NISHIDA²⁾, Jitsuya TAKADA³⁾ and Mutsuo KOYAMA³⁾

¹⁾Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima

²⁾Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima and

³⁾Research Reactor Institute, Kyoto University

Vanadium has been known to be an essential trace element for rats and chicks, an inhibitor for Na^+ , K^+ -ATPase, and a metal ion in the center of bromoperoxidase and to have an anti-cancer effect, and an insulin mimetic effect for diabetic rats. However, in humans the biological and physiological roles of this element has not yet been clear. To know the functions of vanadium, it is important to study the organ or subcellular distributions and oxidation states of vanadium in animals. Among many techniques for the determination of vanadium in biological specimens, we choose electron spin resonance (ESR) spectrometry, which enable us to quantitate the concentrations of vanadyl and total vanadium in the same samples. The total vanadium concentrations were compared with the neutron activation analysis method. As results, we obtained the following important features; (1) most of the vanadium are incorporated in the VO^{2+} state after the V (IV) or V (V) state of vanadium compound was given to rats, (2) vanadyl ion in tissues binds with oxygen ligands and forms square pyramidal structure.

バナジウム (V) は原子番号23の遷移金属であり、自然界に広く存在する微量元素の一つである。人体中には常に約15mgが含まれると推定されるが、その生理作用については十分な知見が得られていない¹⁾。Vと生体との関わりが初めて見出されたのは1911年である。Henzeは、海洋生物“ホヤ”の血球中にVが海水の 10^7 倍も濃縮されていることを発見した²⁾。その後、1971年に、Hopkins & Mohrある

*所在地：徳島市庄町1-78 (〒770)

**所在地：大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-04)

いは Strasia らがラットとヒヨコにおいて、V が生体必須微量元素の一つであることを³⁾、1977年には Cantley らが、5 価バナジウム [V (V)] が Na^+ , K^+ -ATPase の強力な阻害剤であることを発見した⁴⁾。最近では、実験的に糖尿病としたラットに V (V) を飲料水とともに与えると血糖値が正常化されること^{5,6)}、4 価バナジウム [V (IV)] も同様に血糖降下作用を持つこと⁷⁾、V (IV) が抗癌活性をもっていること、更には V を活性中心に持つ酵素プロモペルオキシダーゼなどが発見されている⁸⁾。V (V) である NaVO_3 のラットに対する毒性は、V (IV) である VOSO_4 と比較して約15倍高いことが報告されている⁹⁾。ラットに投与した V (V) は体内で還元を受けて大部分が V (IV) として存在し、また、投与した V の酸化数による V の体内分布と濃度には大きな差がないことが見出されている¹⁰⁾。V の定量方法には吸光度法、原子発光法、原子吸光法、中性子放射化分析法 (NAA)¹¹⁾、そして電子スピン共鳴 (ESR) 法¹²⁾が知られている。これらのうちで V を最も感度・精度よく定量できる方法は NAA であるが、この定量法には原子炉を必要とする。ESR 法は、これまでの報告では V (IV) の定量に用いられている。本研究では ESR を用いて生体試料中の ESR 活性な V (IV) と総 V の分別定量をおこない、NAA から得られた総 V 量と比較した。その結果に基づいて ESR による V の新しい定量法を提案する。

実験方法

1) 試料の調整

Wistar 系雄性ラット (体重180-200g) に V (IV) として VOSO_4 を、V (V) として NaVO_3 を、V 量として 3.125mg/kg になるように投与した。各群を 4 匹づつとし、V を 3 日間腹腔内投与し、4 日目にエーテル麻酔下頸動脈からの脱血により致死させ肝臓と腎臓を採取した。常法に従って細胞下画分を調製した。

2) V の定量

2-1 検量線の作成

種々の濃度の原子吸光用 V 標準液を 6% HNO_3 溶液としてアスコルビン酸で還元した後 ESR スペクトルを測定した。そのピーク高を V の濃度に対してプロットして低分子錯体型検量線とした。一方、同一濃度の V をタンパク (牛乳) と混合して更にアスコルビン酸で還元し、同様に ESR スペクトルを測定し高分子錯体型検量線を作成した。また、中性子放射化分析用の検量線は、原子吸光用 V 標準液を希釈したものをを用いた。

2-2 V の定量法

調製した細胞下画分は、空気酸化を防ぐためにアルゴンで置換した ESR 用測定管に入れて ESR を測定し、高分子錯体型検量線を用いて V (IV) の定量を行った。また、同一試料を湿式灰化後アスコルビン酸で還元して ESR を測定し、低分子錯体型検量線を用いて総 V の定量を行った。試料の一部は凍結乾燥し、京都大学原子炉実験所にて NAA を行い¹¹⁾、総 V 量を求めた。

結果と考察

Fig. 1 に低分子型及び高分子型 V (IV) の検量線を示した。相関係数はそれぞれ 0.9990, 0.9998 と、

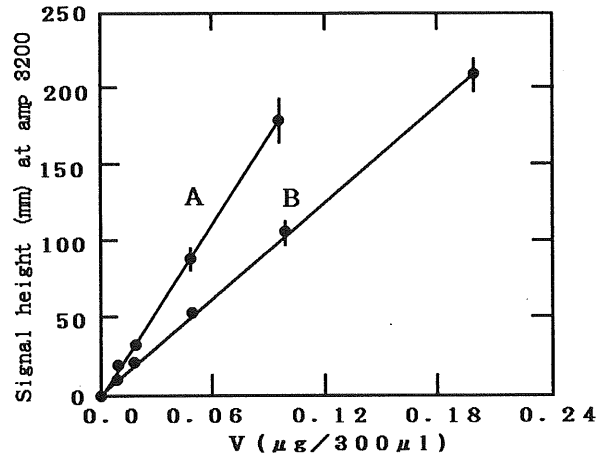


Fig. 1. Calibration curves for the low-molecular type (A) and the high-molecular type (B) of vanadyl sulphate.

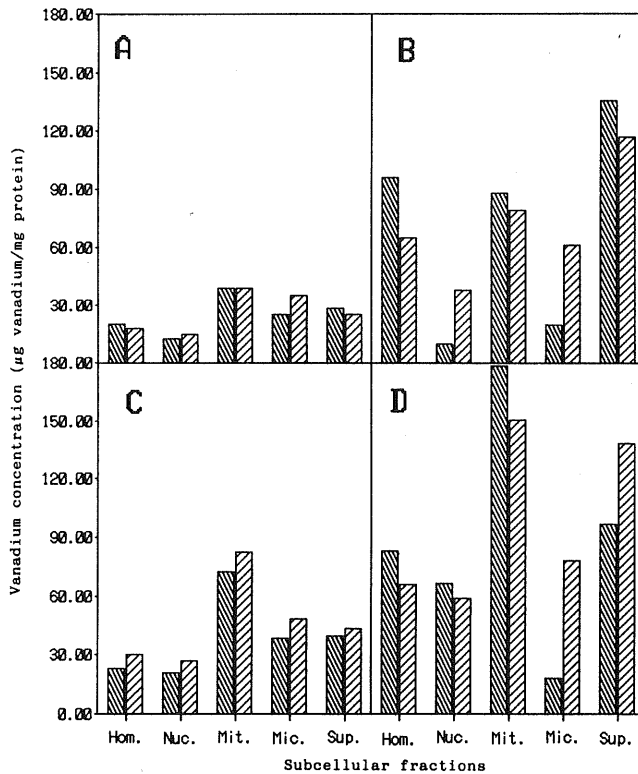


Fig. 2. Total vanadium concentrations in subcellular fractions of liver (A and C) and kidney (B and D) of rats treated with vanadyl sulphate (A and B) or sodium vanadate (C and D). and show the results of the quantitation of total vanadium concentrations by ESR and neutron activation analysis methods, respectively.

良い直線性を示すことから ESR によって V (IV) の定量が可能であることが見出された。なお、V の検出限界 (signal/noise ratio = 1:1) は、30 ng/ml であった。Fig. 2 は V (IV) 及び V (V) を投与したラットの肝臓と腎臓の細胞下画分における総 V 量を ESR 法と NAA とで比較したものである。どちらもほぼ良い一致を示したことから、ESR により総 V の定量も可能であると考えられた。Table 1 に各細胞下画分における総 V と V (IV) の割合を示した。V (IV) を投与したラットの肝臓及び腎臓では約90%が4価型で存在しており、さらに、V (V) を投与したラットの肝臓および腎臓でも約80%が4価型で存在している。調製した細胞下画分を直接 ESR を測定したときに得られる ESR パラメーターから、投与した V の酸化数に関わりなく、V は体内では、5 個の酸素原子を配位した四角錐型構造を持つことが明らかとなった。以上の結果より、① ESR による V の定量は、4 価型のみならず、灰化・還元という手法を用いると、総 V の定量が可能であり、②同一試料について4価型と総 V 量さらにその比が求められ、③ V (IV) 周辺の配位状態の考察が可能であることが見出された。さらに、本研究の成果は V の研究、とくに V の生体関連化学において重要なものと考えられる。

Table 1. Concentrations and ratios of total vanadium and vanadyl species in subcellular fractions of the liver and kidney of rats treated with vanadyl sulphate or sodium vanadate by ESR method

Treatment	Fractions	Total vanadium ($\mu\text{g V/mg prot.}$)	Vanadyl species ($\mu\text{g V/mg prot.}$)	Ratio (%) of ($\text{V}^{4+} / \text{total V}$)	
VOSO ₄	liver	homogenate	17.87	20.11	112.6
		nuclei	14.58	12.53	85.9
		mitochondria	39.01	39.01	100.0
		microsomes	35.01	25.48	72.8
		supernatant	25.45	28.79	113.1
	kidney	homogenate	64.56	95.82	148.4
		nuclei	37.63	9.62	25.6
		mitochondria	78.75	87.92	111.6
		microsomes	61.11	19.87	32.5
		supernatant	116.75	135.63	116.2
NaVO ₃	liver	homogenate	30.13	22.82	75.7
		nuclei	26.78	20.73	77.4
		mitochondria	82.51	72.56	87.9
		microsomes	48.07	38.16	79.4
		supernatant	43.44	39.26	90.4
	kidney	homogenate	65.95	83.04	125.9
		nuclei	58.64	66.29	113.1
		mitochondria	150.45	178.08	118.4
		microsomes	77.89	18.07	23.2
		supernatant	138.31	96.54	69.8

文 献

1. 田中久, 桜井弘編著 (1987) 生物無機化学, 廣川書店
2. a) 桜井弘, 道端齊 (1988) 不思議な元素, バナジウムの生物学と化学, 現代化学 10 : 18-23
b) 桜井弘 (1990) 細胞 22 : 13-17
c) 桜井弘 (1990) 化学と薬学の教室 New Ones No. 11 : 8-17
3. HOPKINS, L. L. Jr. and H. E. MOHR (1971) Newer trace elements in nutrition, ed. by W. Mertz and W. E. Cornatzen, Marcel Dekker, New York : pp. 195-213
4. CANTLEY, L. C. Jr., L. JOSEPHSON, R. WARNER, M. YANAGISAWA, C. LECHENE and G. GUIDOTTI (1977) J. Biol. Chem. 252 : 7421-7423
5. HEYLIGER, C. E., A. G. TAHILIANI and J. H. MCNEILL (1985) Science 227 : 1474-1477
6. MEYEROBITCH, J., Z. FRAFEL, J. SACK and Y. SHECHTER (1987) J. Biol. Chem. 262 : 6658-6662
7. a) 桜井弘, 土屋浩一郎, 糠塚守, 祖父江光広, 川田純 (1989) 微量栄養素研究 6 : 75-78
b) SAKURAI, H. and K. TSUCHIYA (1990) J. Endocrinol. 126 : 451-459
c) SAKURAI, H. J. Clin. Biochem. Nutr. in press
8. VILITER, H. (1984) Phytochem. 23 : 1387-1390
9. HUDSON, F. T. G. (1964) in Vanadium Toxicology and Biological Significance, Elsevier Publ. Co., New York : pp. 140
10. 桜井弘, 土屋浩一郎, 西田幹夫, 高田実弥, 小山睦夫 (1988) 微量栄養素研究 5 : 101-105
11. a) SAKURAI, H., M. NISHIDA, M. KOYAMA and J. TAKADA (1987) Biochim. Biophys. Acta 924 : 562-563
b) SAKURAI, H., M. NISHIDA, K. KIDA, M. KOYAMA and J. TAKADA (1987) Inorg. Chim. Acta 138 : 149-153
12. FITZGERALD, J. J. and N. D. CHASTEEN (1974) Analytical Biochemistry 60 : 170-180