

흰쥐 조직에서의 카드뮴 결합 고분자량 단백질의 유도

천기정* · 김봉희*

*한국원자력연구소 방사선응용그룹, 충남대학교 약학대학

(Received April 8, 1997)

Induction of Cd-binding High Molecular Weight Protein in Rat Tissues

Ki-Jung Chun* and Bong-Hee Kim*

*Korea Atomic Energy Research Institute,
College of Pharmacy, Chung Nam National University

Abstract—The study was carried out on the biochemical characters of Cd-BP(I) after isolation and purification of the protein from the liver of rat injected intraperitoneally with Cd. A continued study has been doing whether Cd-BP(I) could be induced by Cd or by other metals such as Zn and Cu. Antisera were made against the Cd-BP(I) from New Zealand white rabbits. Carried out were γ -globulin purification, then Ouchterlony test and gel immunodiffusion test. Cd-BP(I) was also found in normal tissues of rat. It was induced up to a considerable level by Cd, whose induced level was higher than that of Cu or Zn treatment. The level of induction by Cu or Zn pretreatment plus Cd treatment was lower than that by simple treatment of Cu or Zn. Such a result was presumably related to the Cd toxicity.

Keywords □ Cd-binding high molecular weight protein, Ouchterlony test, gel immunodiffusion test, induced level, Cd toxicity.

생체내 효소계중 단백질 측면에서 잘 알려진 metallothionein(MT)은 생체내 첫번째 유도 반응인 MT gene의 transcription level이 높아지면서 유도되는 것이다.¹⁾ 이와같이 MT gene의 transcription을 증가시킬 수 있는 요인은 물리화학적인 다양한 외부(environmental stimuli) 및 내부 자극(internal stimuli)에 의한 것이다.

MT는 세포질에서 카드뮴을 sequester하는 카드뮴 결합 단백질로 알려져 있으며²⁾ 또한 카드뮴의 간독성 및 치사 독성은 간의 MT농도를 증가시킬 수 있는 화합물을 선처리 하므로서 동물에서 독성이 억제되는 것으로 알려져 있다.³⁾

이와같이 카드뮴의 독성은 MT에 의해 막을 수 있으나⁴⁾ 카드뮴 주사직후에 간에서 독성을 보이기도 하였

다.⁵⁾ 이러한 카드뮴 주사직후의 카드뮴 독성은 MT유도 이전에 즉, MT에 의해 sequestration되기 전에 존재하는 카드뮴 이온의 독성으로 설명할 수 있다. 카드뮴 독성은 카드뮴이 표적분자와의 결합에 의한 것으로 생각할 수 있는데 MT보다 카드뮴과 가장 높은 친화력을 갖는 생물학적 성분이나 단백질이 독성을 유발하는 표적분자일 가능성을 암시하고 있다.⁶⁾

세포내에서 MT와 결합되지 않은 카드뮴은 대개 high molecular weight protein(HMWP) 분획에서 나타난다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 카드뮴과 결합되는 고분자량 단백질은 독성학적으로 중요할 것으로 생각되기 때문에 카드뮴과 친화력이 높은 고분자량 단백질에 대한 연구가 카드뮴의 독성을 이해하는데 절실히 요구된다.

그러므로 일차적으로 카드뮴과 친화력이 높은 고분자량 단백질인 Cd-BP(I)를 분리정제하여 분자량 및 isoelectric focusing 등 생화학적 특성을 밝혔고^{10,11)} 본 연구에서는 이 단백질이 카드뮴에 의해 새롭게 유도되

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5935 (팩스) 042-823-6566

는 것인지 아니면 기존에 존재하는 단백질을 밝히고 카드뮴 이외의 2가의 구리 및 아연과 같은 필수원소에 의해서도 유도되는 지를 밝히고자 함을 연구의 목적으로 하였다.

따라서 분리정제한 Cd-BP(I)를 항원으로하여 토끼에 면역을 주어 항혈청을 얻어 정성적으로는 Ouchterlony 실험을 통하여 유도여부를 관찰하였으며 정량적으로는 immunodiffusion 실험을 통하여 관찰하였다.

실험재료 및 방법

실험동물 - 각그룹당 체중 200 g 전후 수컷 Sprague Dawley를 5마리씩으로하여 사육실에서 *ad libitum* 하게 사료를 주면서 실온에서 사육하면서 실험하였다.

중금속 투여

카드뮴 투여 - 카드뮴은 $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ 를 사용하여 Cd 1 mg/Kg body wt.로 intraperitoneal(I.P.) 주사로 1일 1회, 연속 3일간 주사후 24시간 경과한 후에 간, 콩팥, 허파, 심장, 지라 및 고환조직을 적출하였다.

아연 또는 구리 투여 - 아연은 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하여 Zn 10 mg/Kg body wt.로 주사하였고 구리는 $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하여 구리 2.5 mg/Kg body wt.로 상기 카드뮴 투여 방법과 동일하게 실시하였다.

아연, 구리선투여 및 카드뮴 투여 - 상기아연 및 구리의 용량을 3일간 선투여한 후 상기 카드뮴 용량을 3일간 투여하여 상기 6가지 조직을 적출하였다.

시료의 조제 - 각각의 조직을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 4°C에서 glass homogenizer로 균질화 시킨후 Eppendorf tube에 넣어 원심분리(Eppendorf centrifuge 5414, Brinkmann)하여 상층액을 시료로 사용하였다.

단백질 정량 - 단백질 농도의 정량은 Bradford방법¹²⁾에 따라 측정하였다. Coomassie brilliant blue G 100 mg을 95% ethanol 50 ml와 85%(W/V) H_3PO_4 100 ml를 섞어 완전히 녹인 다음 증류수로 1,000 ml로 희석시켜 사용하였으며 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준단백질 곡선은 bovine serum albumin을 사용하였다.

Polyclonal antibody의 생산 및 Ouchterlony 실험 - Polyclonal 항체 형성을 위하여 NewZealand 백색 자성 토끼를 전주 우석의대로 부터 구입하여 사용하였다.

DEAE-Sephrose 및 S-Sephrose chromatography로부터 분리한 단백질을 재차 denaturing SDS-PAGE를 행하였다. 여기서 분리된 밴드를 gel상에서 오래내어 마쇄한 후 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)완충액에 1일간 passive elution시킨 후 10,000짜리 Amicon을 이용하여 Ultrafiltration하고 다시 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 다시 washing하여 농축시켰다. 농축시킨 단백질 300 μ g을 암컷의 NewZealand white rabbit에 Freund's complete adjuvant(Difco)와 동량 혼합하여 1주일 간격으로 토끼의 넓적다리 근육에 4회 주사하고 토끼의 뒷발 1/3부근의 정맥에서 소량의 혈액을 시험채취하여 Ouchterlony test로 항체 형성여부를 확인한 다음 1주후에 심장천자법(heart puncture)으로 혈액을 채취하고 상온에서 clotting 시킨 후 냉동원심분리기(Sorval RC 5B)로 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

γ -globulin의 정제 - 혈청에 동량의 35% saturated ammonium sulfate(pH 7.0)를 가해 포화시켜 4°C에서 2시간 방치후 15,000 \times g에서 20분간 원침하여 상층액의 albumin을 제거하고 침전물을 10 mM의 phosphate buffered saline(pH 7.0)에 녹였다. 상기 조작을 2번 반복한 후 침전물을 10 mM phosphate buffer용액에서 4°C에서 overnight동안 dialysis를 실시하여 crude γ -globulin을 얻었다. 이것을 DEAE-Sephrose column(2 cm \times 20 cm)을 통과시켜 용출된 분획을 10,000짜리 Amicon으로 ultrafiltration한후 denaturing SDS-PAGE를 실시하여 하나의 밴드를 확인한 다음 정제된 γ -globulin으로 사용하였다.

Western blotting - SDS-PAGE로 단백질을 분리한 다음 gel과 니트로셀룰로오스를 이전 완충액(15.6 mM Tris, 120 mM glycine)에 적신 후, 완충액에 적신 Whatman 3 MM 여과지를 밑에 깔고 그위에 니트로셀룰로오스와 gel 및 Whatman 3 MM 여과지를 순서대로 덮고 기포를 제거시킨다. Bio-RAD의 semi dry transfer로 30분간 25V로 단백질을 이전시켰다. 단백질이 이전된 니트로셀룰로오스는 3% BSA/TBS(2M Tris-HCl, 4M NaCl)로 1시간 blocking한 후 10분간 TBS로 3회 세척하였고, 1st antibody를 1:100으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 반응후 TBS로 10분간 3회 세척한 다음 peroxidase가 결합된 goat-anti-rabbit IgG(Sigma, 희석배율 1:1,000)로 1시간

반응시켰다. 뒤이어 TBS로 30분간 세척한 후 developing reagent(1 ml 3% chloronaphtol, 10 ml 100% methanol, 39 ml TBS, 30 μ l 30% H₂O₂)로 2~3분 반응시켜서 면역 반응을 수행하였다.

Gel immunodiffusion 실험 - 항원은 카드뮴을 주사한 (1.0 mg/kg body wt.) 흰쥐의 간, 콩팥, 고환, 지라 등을 카드뮴 주사 24시간후에 적출하여 10 mM phosphate buffer, pH 7.0을 가하여 glass homogenizer로 균질화한 후 Eppendorf tube에 넣어 원심분리하고 상등액을 취하여 항원으로 사용하였다. 항체는 상술한 정제된 γ -globulin을 사용하였다. 1% agarose (in barbital buffer, pH 8.6, ionic strength 0.02) 10 ml를 40~50°C 까지 식히고 항체 100 μ l를 가하여 잘 혼합한 후 유리판(7×7 cm)에 도포하였다. Agarose가 응고하면 직경 2.5 mm의 구멍을 일정 간격으로 뚫고 항원을 15 μ l씩 넣었다. 그다음 유리판을 밀폐된 용기에 넣고 실온에서 24시간 이상 반응시켰으며 phosphate buffered saline(0.85%)에 하루동안 투석한 후 염색은 50% methanol과 7% acetic acid용액에 녹인 0.125% Coomassie brilliant blue로 60°C에서 2시간동안 염색하여 10% acetic acid, 50% methanol용액으로 탈색시켜 침강부위의 직경을 계산하여 단백질의 생성량을 비교하였다.

실험결과 및 고찰

Western blotting 및 γ -globulin의 정제 - Cd-BP(I)을 SDS-PAGE하여 니트로 셀룰로오스에 이전시킨 후 항 Cd-BP(I) 항체로 Western blotting을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 Cd-BP(I)의 항원에 대한 항 Cd-BP(I) 항체가 형성되었음을 확인하였다.

Cd-BP(I)의 항혈청을 얻어 감마글로브린을 정제하여 전기 영동한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 그림은 Cd-BP(I)을 항원으로 하여 얻은 혈청과 정제한 감마글로브린의 전기 영동상을 나타내는 것으로 감마 글로브린을 제외한 알부민 및 그밖의 성분이 제거되었음을 나타내고 있다.

Cd-BP(I)의 조직내 유도 및 분포 - Cd-BP(I)에 대하여 기존조직내의 존재여부(Fig. 3)와 카드뮴에 의해 새롭게 유도생성되는지 여부(Fig. 4)를 정성적으로 확인하기 위하여 생체조직과 Cd-BP(I)의 항체를 이용하

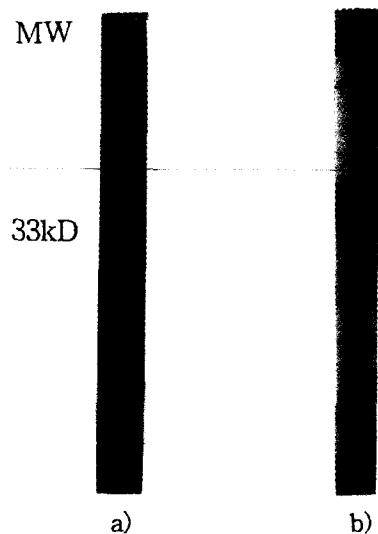


Fig. 1 - Western transblot of Cd-BP(I).
a) SDS-PAGE of purified Cd-BP(I)
b) Western transblot of Cd-BP(I) probed with anti Cd-BP(I)

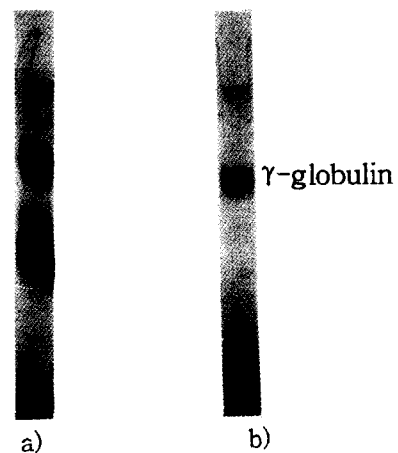


Fig. 2 - Purification of γ -globulin from rabbit anti Cd-BP(I) serum.
a) SDS-PAGE of rabbit anti Cd-BP(I) serum
b) SDS-PAGE of purified γ -globulin from a

여 Ouchterlony test를 실시하였다.

Fig.3 및 Fig. 4에서와 같이 정상 및 카드뮴 투여군에서의 모든 조직에서 항원-항체의 침강반응이 관찰되었다. 그러므로 Cd-BP(I)은 카드뮴에 의해서 새롭게 유도되는 단백질이 아니고 기존조직에도 존재하는 단백질임을 알 수 있었다. 이단백질의 조직내 분포를 정량적으로 알기 위하여 우선 Cd-BP(I)항원과 항Cd-BP(I)감마글로브린을 사용하여 gel immunodiffusion을 실시한 후 침강부위의 직경과 항원량을 갖고 표준곡선을 그

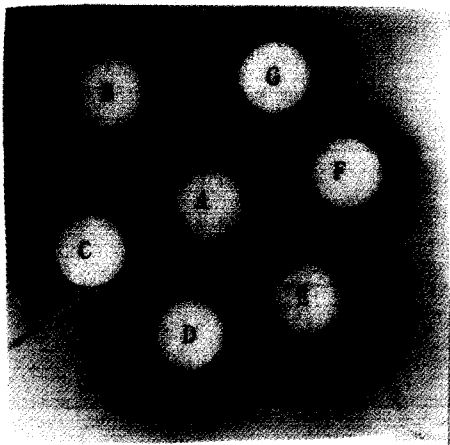


Fig. 3— Ouchterlony double immunodiffusion of Cd-BP(I) in normal tissues of rats. Well A contains anti Cd-BP(I) serum: B, kidney supernatant: C, lung supernatant: D, testis supernatant: E, liver supernatant: F, spleen supernatant: G, heart supernatant.

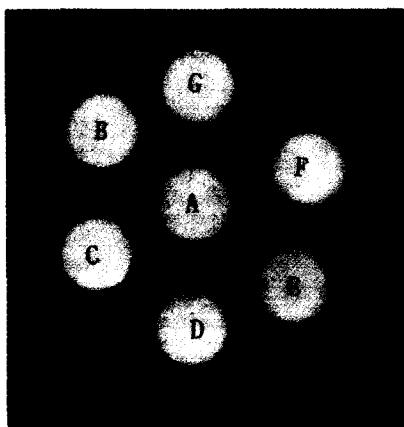


Fig. 4— Ouchterlony double immunodiffusion of Cd-BP(I) in various tissues of rat after Cd²⁺ treatment. Well A contains anti Cd-BP(I) serum: B, kidney supernatant: C, lung supernatant: D, testis supernatant: D, liver supernatant: F, spleen supernatant: G, heart supernatant.

려준 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서와 같이 침강부위의 직경과 항원량은 거의 비례적이었으며 이 표준곡선을 이용하여 Cd-BP(I)의 조직내 분포량을 계산해 주었다. 또한 흰쥐의 간, 콩팥, 허파, 심장, 고환, 지라의 조직에서 Cd-BP(I)의 양을 실험한 결과, 카드뮴을 투여치 않은 정상조직에서의 양

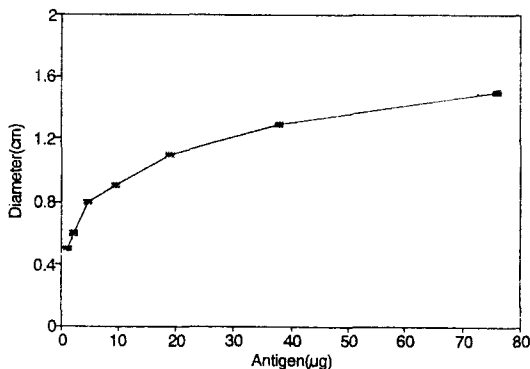


Fig. 5. Standard curve of Cd-BP(I) antigen of radial immunodiffusion.

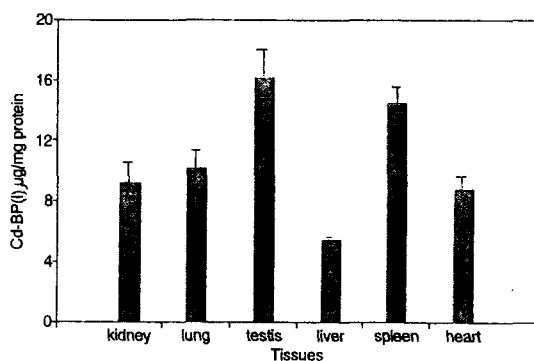


Fig. 6— Amount of Cd-BP(I) in normal tissues of rat. Data represent mean (box) ± sem (line), n=5.

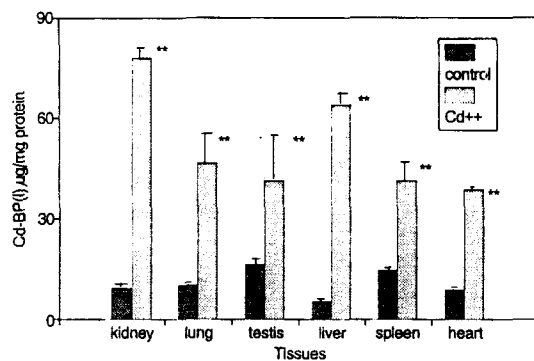


Fig. 7— Amount of Cd-BP(I) in various tissues of rat after Cd²⁺ treatment. Data represent mean (box) ± sem (line), n=5, **: p<0.01.

은 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서와 같이 Cd-BP(I)의 양은 흰쥐의 6개의 조직중 고환에서 가장 높았고 지라, 허파, 심장, 콩팥 및 간조직 순이었다.

카드뮴을 연속 3일간 처리한 경우는 Fig. 7과 같이 Cd-BP(I)의 양은 모든조직에서 정상조직에서 보다 상

당히 증가됨을 보이고 있다. 특히 콩팥과 간에서 상당히 Cd-BP(I)이 정상조직보다 거의 10배에 달하는 증가를 보이고 있으며 그밖에 조직에서는 3~4배의 증가를 보이고 있다. Colucci 등에 의하면 카드뮴은 낮은 농도 (0.5~1 mg/kg body wt.)로 주사한 경우는 상당히 MT와 복합체를 이루고 독성의 임상적인, 생리적인 증후는 발견치 못하였으며 간의 카드뮴치가 30 µg Cd/g liver wt.에서는 금속이 MT로서 sequester되었으나 독성은 나타나지 않았다.

반면 40 µg Cd/g liver wt. 이상일 때는 임상적인 독성이 나타났다. 간의 카드뮴치가 30 µg/g liver wt. 이상에서는 용출분획의 다른 부위에서 카드뮴이 발견되었는데 이 고분자량의 분획은 MT가 응집된 상태일 수 있고 또한 MT로부터 카드뮴이 떨어져 나가 다른 단백질 분획과 붙을 수 있다고 보고하고 있다.¹³⁾ 이렇게 생성된 카드뮴 결합 단백질은 생쥐에서 급성 카드뮴 독성인 testicular necrosis를 억제함을 보고하였다.¹⁴⁾

이와같이 카드뮴 결합 단백질은 적어도 두 개의 체계에서 카드뮴의 해로운 영향을 억제한다고 할 수 있다. 본 실험결과, Cd-BP(I)은 정상조직에서도 함유하고 있는 점으로 미루어 보아 이 단백질은 세포내 중요한 단백질이며 특히 독성이 강한 카드뮴 투여에 의해 상당히 유도되는 것으로 보아 카드뮴의 독성에 직접, 간접적으로 관여할 것으로 사료된다.

카드뮴이외의 2가의 필수원소인 구리만을 연속 3일간 처리하여 구리에 의해서 카드뮴과 결합되는 단백질이 유도되는가를 관찰한 결과는 Fig. 8과 같다. Fig. 8에서와 같이 모든 조직에서 정상조직 보다 약간씩 증가함을 보이나 카드뮴과 같이 콩팥과 간에서의 상당한

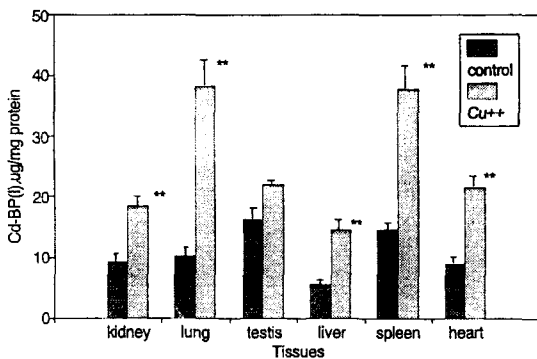


Fig. 8 — Amount of Cd-BP(I) in various tissues of rat after Cu²⁺ treatment. Data represent mean (box) ± sem(line), n=5. **: p<0.01.

증가는 없었으나 지라 및 허파에서 상당한 증가를 보이고 있으므로 아연에 의해서도 정도의 차이는 있으나 모든 조직에서 유도됨을 알 수 있었다. 그밖에 생체내에 2가의 필수 원소인 아연만을 연속 3일간 처리하여 아연에 의해 카드뮴과 결합되는 단백질이 유도되는 가를 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. Fig. 9에서와 같이 허파에서 가장 많이 유도되었으며 그다음은 지라에서 많이 유도되었고 콩팥과 간 및 심장에서 정상보다 약 2배 정도의 증가를 보였으며 교환의 경우에는 정상보다 약간의 증가를 나타내고 있다. 본 실험에서 사용한 용량에서 아연 보다는 구리투여를 한 경우에 모든 조직에서의 유도가 증가됨을 보여 주고 있다.

그외에 구리를 선투여후 카드뮴을 병행 투여시 조직내에서의 Cd-BP(I)의 분포도를 관찰한 결과는 Fig. 10과 같다. Fig. 10에서와 같이 교환조직을 제외하고

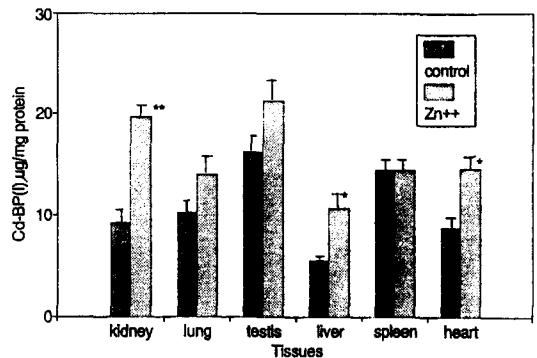


Fig. 9 — Amount of Cd-BP(I) in various tissues of rat after Zn²⁺ treatment. Data represent mean (box) ± sem(line), n=5. *: p<0.05. **: p<0.01.

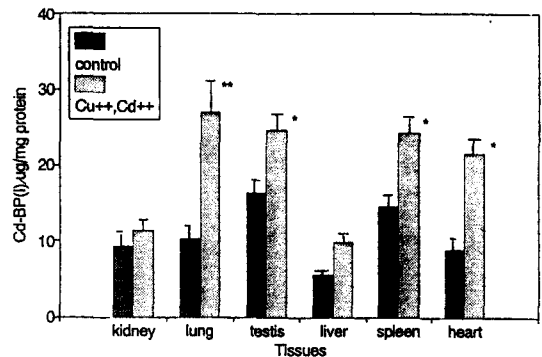


Fig. 10 — Amount of Cd-BP(I) in various tissues of rat by Cu²⁺ pretreatment and Cd²⁺ treatment. Data represent mean (box) ± sem(line), n=5. *: p<0.05. **: p<0.01.

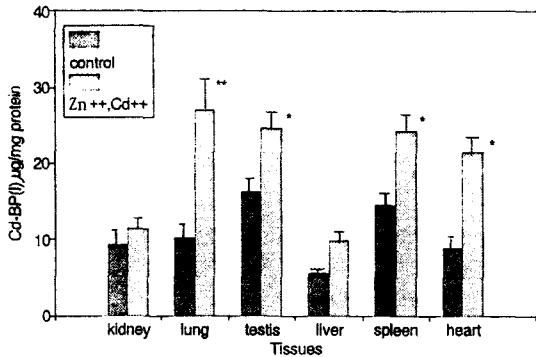


Fig. 11—Amount of Cd-BP(I) in various tissues of rat by Zn²⁺ pretreatment and Cd²⁺ treatment. Data represent mean(box) ± sem(lien), n=5, *: p<0.05, **: p<0.01.

모든 조직에서 구리만 처리했을 때보다 약간 적은 양이 유도됐음을 알 수 있었으며 아연을 선투여후 카드뮴을 병행 투여시 조직 내에서의 Cd-BP(I)의 분포를 관찰한 결과는 Fig. 11과 같다. Fig. 11에서와 같이 아연조직만을 투여했을 때보다 콩팥, 고환, 간은 거의 유사하였으나 특히 지라에서의 분포도는 훨씬 적었다. 이상의 결과로 볼 때 분리정제한 Cd-BP(I)의 분포는 흰쥐의 각 조직마다 투여되는 중금속의 종류에 따라 서로 다름을 알 수 있었다.

이미 카드뮴 및 수은과 같은 중금속의 독성을 억제하는 방안으로 아연을 미리 선투여하는 경우가 제시되어 왔으며^{15, 16)} 아연 선투여가 카드뮴 독성에 내성을 줄을 보고하기도 하였다.^{17, 18)} 이는 카드뮴에 아연처리하는 세포내 MT에 아연이나 카드뮴을 결합함으로써 간, 콩팥 및 췌장에 MT-1 mRNA치가 증가하므로 MT합성을 더욱 증가 시킴을 보고하고 있다. MT대사에서 아연의 중요성이 광범위하게 보고되고 있는데 MT 생성의 mode에 관계없이 hepatic MT의 성분 금속중의 하나가 아연이며¹⁹⁾ 카드뮴을 포함한 MT 생성 금속은 여러 가지 세포내 거대분자의 결합 장소들로부터 아연을 대치함으로써 내부의 아연 pool을 처음에 혼란 시킬 수 있고 이때 방출된 아연은 MT합성 inducer로서 제공될 수 있다. 아연과 카드뮴은 물리화학적 특성이 비슷하고 아연은 자연계에서 카드뮴과 함께 광석과 토양에 함께 행동하기 때문에²⁰⁾ 내성 효과에 대한 금속-금속간의 관계는 생물학적으로 중요하다고 할 수 있다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 카드뮴과 결합하는 고분자량 단백질인 Cd-BP(I)은 모두 MT와 다르게 기존 조

직에 존재하는 단백질 이었으며 카드뮴 이외의 아연 및 구리에 의해서도 약간 유도되었으나 카드뮴에 의해 가장 많이 유도되었다. 카드뮴 투여전에 필수원소인 구리 및 아연투여한 경우에 유도량의 감소를 나타내고 있어 아마도 Cd-BP(I)은 카드뮴 독성에 관여되는 것으로 생각된다. 카드뮴에 의한 카드뮴 결합 단백질 합성 조절은 카드뮴이 절대적이 아니며 적은 level에서의 합성이 계속 일어날 수 있으며 중금속 종류에 따라 조직에서의 유도가 서로 다름을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) Karin, M., Anderson, R. D., and Herschman, H. R. : Induction of metallothionein mRNA in HeLa cells by dexamethasone and by heavy metals. *Eur. J. Biochem.* **118**, 527-531 (1981).
- 2) Webb, M. : Toxicological significance of metallothionein. In *Experientia Supplementum Vol. 52. Metallothionein*(J. H. R. Kagi and Y. Kojima, Eds.), Birkhauser Verlag, Basel, pp. 109-134 (1987).
- 3) Goering, P. L., and Klaassen, C. D. : Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 299-307 (1985).
- 4) Rugstad, H. E., and Norseth, T. : Cadmium resistance and content of cadmium-binding protein in cultured human cells. *Nature* **257**, 136-137 (1975).
- 5) Mitane, Y., Aoki, Y., and Suzuki, K. T. : Cadmium-induced inhibition of protein secretion from liver: Pretreatment effect and specificity among cadmium, copper and zinc. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2225-2227 (1987).
- 6) Sunaga, H., Yamane, Y., Aoki, Y., and Suzuki, K. T. : Different distribution of cadmium in the liver supernatant between *in vivo* and *in vitro*. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **74**, 215-222 (1991).
- 7) Tao, L., and Wang, X. : Distribution of cadmium to blood components in rat. *Hunan Yike Daxue Xuebao* **17**, 25-28 (1992).
- 8) Polek, B. : Cadmium-binding proteins of digestive tract caterpillars of the species *Galleria mellonella*(Lepidoptera: Pyralidae). *Biologia.* **46**,

- 947-952 (1991).
- 9) Kershaw, W. C., Iga, T., and Klaassen, C. D. : Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**, 448-455 (1990).
 - 10) Chun, K. J., and Kim, B. H. : Isolation and purification of Cd-binding high molecular weight protein in rat liver(I). *Yakhak Hoeji* **38**, 608-613 (1994).
 - 11) Chun, K. J., and Kim, B. H. : Isolation and purification of Cd-binding high molecular weight protein in rat liver(II). *Yakhak Hoeji*, in press.
 - 12) Bradford, M. 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).
 - 13) Colucci, A. V., Winge, D., and Krasno, J. : Cadmium accumulation in rat liver. *Arch. Environ. Health*, **30**, 153-157 (1975).
 - 14) Nordberg, G. F. : Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice. *Environ. Physiol.* **1**, 171-175 (1971).
 - 15) Gunn, S. A., Gould, T. C., and Anderson, W. A. D. : Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis. *J. Reprod. Fertil.* **15**, 65-70 (1968).
 - 16) Yamane, Y., Fukino, H., and Imagawa, M. : Suppressive effect of zinc on the toxicity of mercury. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 1509-1515 (1977).
 - 17) Tanaka, K., Onosaka, M. D., and Okahara, K. : Substitution of zinc bound to metallothionein for cadmium in vitro and *in vivo*. *Eisei Kagaku* **23**, 229-233 (1977).
 - 18) Kudo, N., Yamahshina, S., and Waku, K. : Protection against cadmium toxicity by zinc: Decrease in the Cd-high molecular weight protein fraction in rat liver and kidney on Zn pretreatment. *Toxicology* **40**, 267-277 (1986).
 - 19) Sabbioni, C., and Marafante, E. : Heavy metals in cadmium binding protein. *Environ. Physiol. Biochem.* **5**, 132-141 (1975).
 - 20) Friberg, L., Kjellstrom, T., Nordberg, G., and Piscator, M. : Cadmium. In Handbook on the toxicology of metals(L. Friberg, G. F., Nordberg, and V. B. Vouk, eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical, New York, pp. 355-377 (1979).