

## LEC ラットにおける微量元素の動態

桜井 弘<sup>1)</sup>・佐野 由幸<sup>1)</sup>・増山 伸幸<sup>1)</sup>・村上 貴代<sup>1)</sup>・田和 理市<sup>1)</sup>・  
中嶋 克行<sup>2)</sup>・鈴木 慶二<sup>3)</sup>・浅野 英俊<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>京都薬大\*, (<sup>2)</sup>日本抗体研\*\*, (<sup>3)</sup>群馬大医技短大\*\*\*, (<sup>4)</sup>日本チャールズリバー\*\*\*\*)

### Food-and Age-dependent Changes of Trace Elements in LEC Rats

Hiromu SAKURAI<sup>a</sup>, Yoshiyuki SANO<sup>a</sup>, Nobuyuki MASUYAMA<sup>a</sup>, Takayo MURAKAMI<sup>a</sup>, Riichi TAWA<sup>a</sup>,  
Katuyuki NAKAJIMA<sup>b</sup>, Keiji SUZUKI<sup>c</sup> and Hidetoshi ASANO<sup>d</sup>

<sup>a)</sup> Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, <sup>b)</sup> Japan Immunoresearch Laboratories Co., <sup>c)</sup> Gumma University School of medicine, <sup>d)</sup> Charles River Japan Inc.

The LEC (Long-Evans Cinnamon) rats develop spontaneous hepatic injury with unusual copper accumulation. The LEC rat is considered to be an useful animal model for human liver disease, such as Wilson disease. We obtained evidence which shows an unusual accumulation of copper in the liver of LEC rats, followed by the induction of copper-metallothionein (Cu-MT). We suggested the mechanism for the development of hepatitis in LEC rats, in relation to the accumulated copper and induced Cu-MT.

We investigated the food-and age-dependent changes of bio-trace elements such as Cu, Zn, Fe and Mn as well as those of metallothionein in the liver of LEC rats. Further, we studied the generation of active oxygen species like hydroxyl radicals in the reaction of Cu-MT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to know the mechanism for the development of hepatitis and hepatoma. Development of hepatitis and hepatoma was indicated to relate the accumulation of copper and induction of Cu-MT, which in turn generates the hydroxyl radicals when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is present in the cell.

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットは遺伝的に肝臓に銅を蓄積し、黄疸発症から肝ガンに至る一連の病態を自然発症する特性をもつため、Wilson 病をはじめとするヒト肝疾患のモデル動物としての可能性が期待されている。我々はこれまでに LEC ラットの肝に銅が異常蓄積し<sup>1)</sup>、それにより多量の銅

---

\*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607)

\*\*所在地：高崎市西横手町351-1 (〒370)

\*\*\*所在地：前橋市昭和町3-39-15 (〒371)

\*\*\*\*所在地：滋賀県蒲生郡日野町下駒月735 (〒592-16)

メタロチオネイン (Cu-MT) が誘導されることを見いだしており、これらが LEC ラットの肝炎発症に深く関与していると考えている<sup>2),3)</sup>。

今回の実験では、飼料中の銅濃度が LEC ラットの肝組織中の銅を含む 4 種の金属及びメタロチオネインの動態にどのように関与するかを研究し、続いて Cu-Mt がフリーラジカル産生にどのように関わっているか<sup>4)</sup>を検討した。

## 実験方法

ラットは Crj LEC ラット (Charles River Japan, Inc.) 5, 10, 15 週令および 30 週令前後の雄, 雌それぞれ 6 匹ずつの計 12 匹を一群として使用した。肝組織中の銅, 鉄, マンガンおよび亜鉛レベルは肝ホモジネートを湿式灰化後フレイムレス原子吸光法で, また MT レベルはラジオイムノアッセイ法により測定した。組織の染色は HE 染色法, PCNA 染色法, そして MT に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法 (MT 染色法) を用いた。LEC ラットには通常食として CRF-1 (Oriental Yeast Co.) または精製飼料 (PD) の 2 種類の飼料を用いた。Cu-MT からのヒドロキシラジカル産生は, スピントラップ剤として DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide) を用いる ESR スピントラップ法により測定した。LEC ラット肝上清画分はゲルろ過法により分離し, それぞれのフラクションの銅含量および吸光度を測定した。

## 結果と考察

通常食として使用した CRF-1 は飼料 100g 中に 0.9-1.0mg の銅を含んでいた。また, 銅欠乏食として作成した精製飼料 (PD) に含まれていた銅含量は飼料 100g 中に 0.1mg 以下であった。

Fig. 1 に示すように, 通常食で飼育したラット (CRF 群) における肝組織中の銅含量は週令依存的に増加し, 銅欠乏食で飼育したラット (PD 群) では, 肝組織中の銅含量は週令依存的に減少した。肝組織中の鉄含量は CRF 群および PD 群のどちらも週令依存的に増加した。マンガンおよび亜鉛含量は CRF 群において 15 週令でのみ有意な金属レベルの減少が見られた。これは, 15 週令付近で見られる LEC ラットの体重の減少や黄疸の発症時期とほぼ一致しており, 肝細胞損傷により金属が肝外へ逸脱している可能性が示唆された。これら 4 種類のすべての金属において雌雄間に明確な金属レベルの差はみられなかった。

CRF 群において MT レベルは週令依存的に増加し, また PD 群では週令依存的に減少を示した。MT レベルはどちらの飼料を用いた群においてもすべての週令において雌性の方が高いという結果が得られた (Fig. 2)。

組織染色の結果を Table に示した。MT 染色では, CRF 群では雌雄とも週令を重ねるに従い MT 陽性が強くなり, PD 群では弱い MT 陽性および陰性を示し, 前述の肝組織中の MT レベルの結果とよく一致した。PCNA 染色において CRF 群では週令を重ねるごとに強く染色され, 次第に肝細胞の損傷の割合が増大していることが示唆された。また, HE 染色から CRF 群の 15 週令雌の肝細胞に好酸性壊死, 肝細胞の乱れ, 二核細胞が認められ, 32 週令の雌性においては 5 匹中 2 匹にガンの発症が認められた。

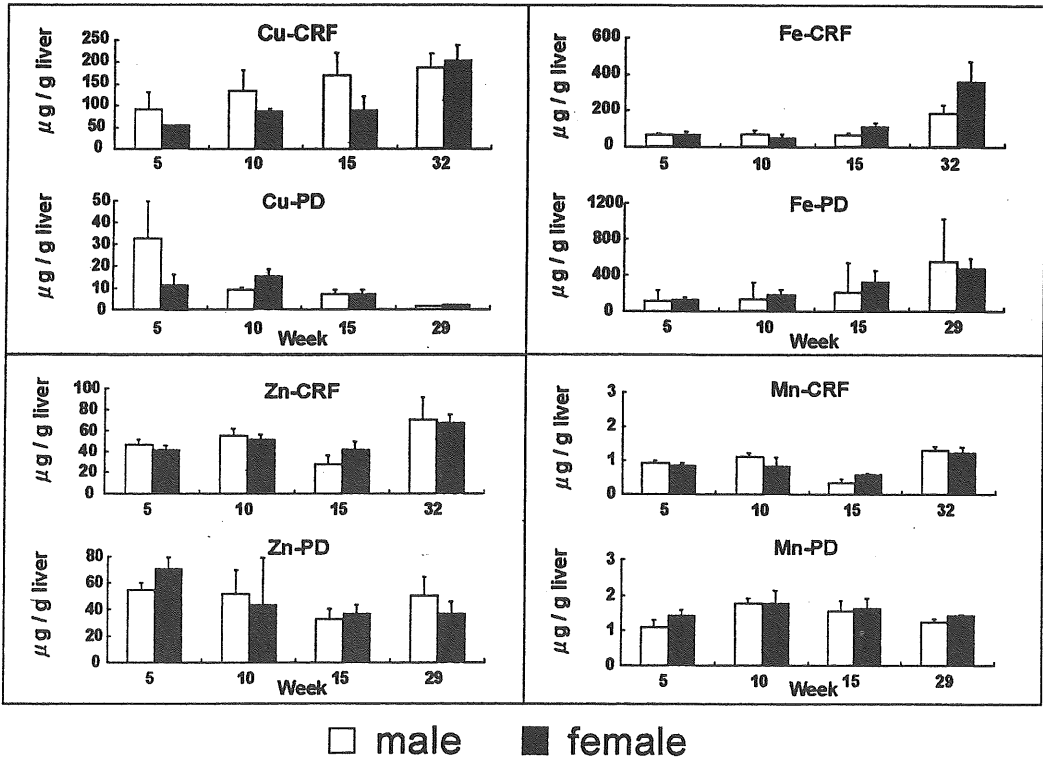


Fig. 1 Metal contents in the Liver of LEC rats

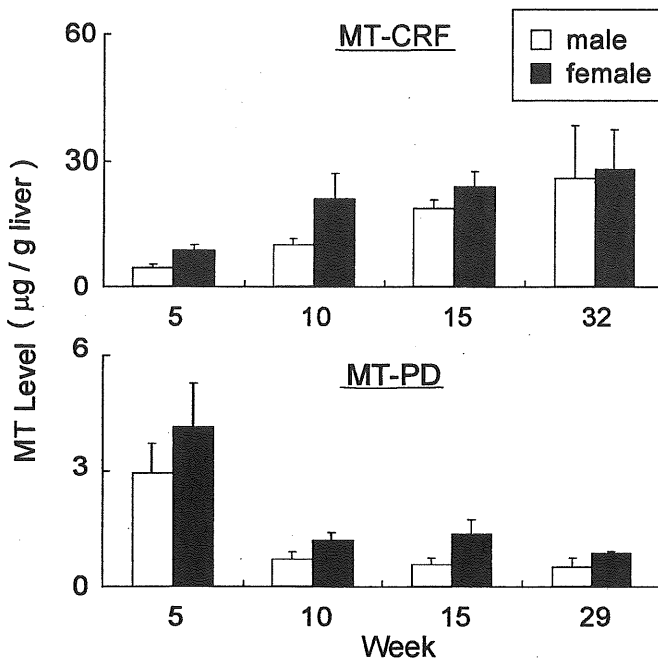


Fig. 2 Metallothionein contents in the liver of LEC rats

**Table.** Stainings for MT, PCNA and HE in the liver of LEC rats

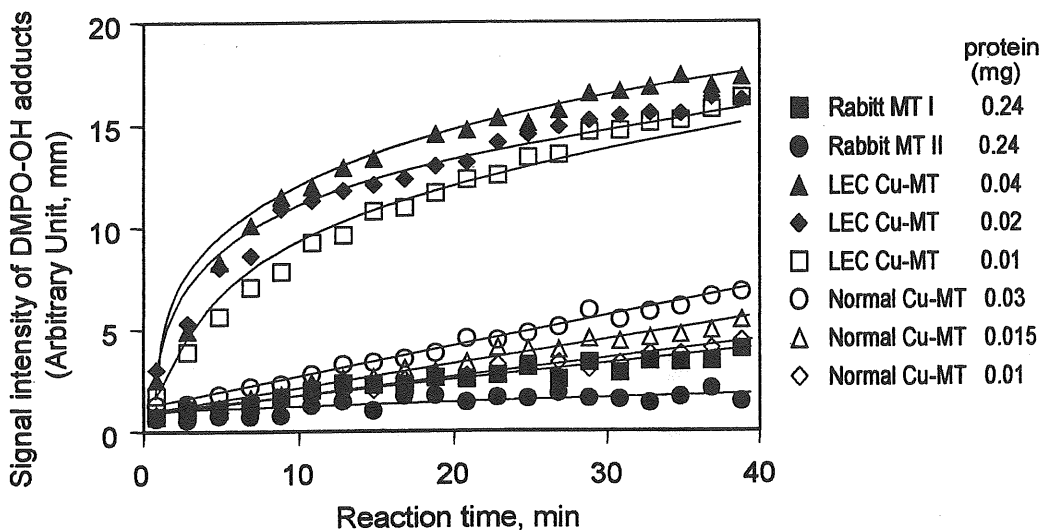
Diet	Weeks	MT staining		PCNA staining		HE staining	
		male	female	male	female	male	female
CRF-1	5	±	+	+	+	±	±
	10	+	++	+	++	±	±
	15	++	++	++	+++	+	++
	32	++	++	+++	+++	++	++
PD	5	±	±	+	+	±	±
	10	±	±	+	+	±	-
	15	-	-	+	+	±	±
	29	-	-	+	+	±	-

Evaluation : (-) negative, (±) weakly positive, (+) positive, (++) strong, (+++) very strong

PD 群は PCNA 染色, HE 染色とも正常所見を示した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下 Cu-MT によるヒドロキシラジカルを ESR スピントラップ法を用いて測定を行った。DMPO-OH adduct はシグナル強度 1 : 2 : 2 : 1 からなる特徴的な 4 本のシグナルを示した。この 4 本のシグナルのうち低磁場側から 2 本目のシグナルの長さをはかり、経時変化を観察した。

Fig. 3 より normal ラット Cu-MT, ウサギ MT I および MT II の発生するヒドロキシラジカルの量に大差は見られなかったが, LEC ラットの Cu-MT では多量のヒドロキシラジカル産生が観測された。LEC ラットの Cu-MT は他の MT よりも過酸化水素と反応しやすく, 細胞質や細胞核内の過酸化水素と容易に反応し, 多量のヒドロキシラジカルを産生する可能性が示唆された。また, 液体窒素温度 77K での LEC および normal ラット Cu-MT の ESR での測定結果より, 1 価銅が過酸化水素によって酸化され 2 価銅になる反応に共役して Fenton 様反応が生じていると考えられる。

**Fig. 3** ESR spin-trapping of Cu-MT with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

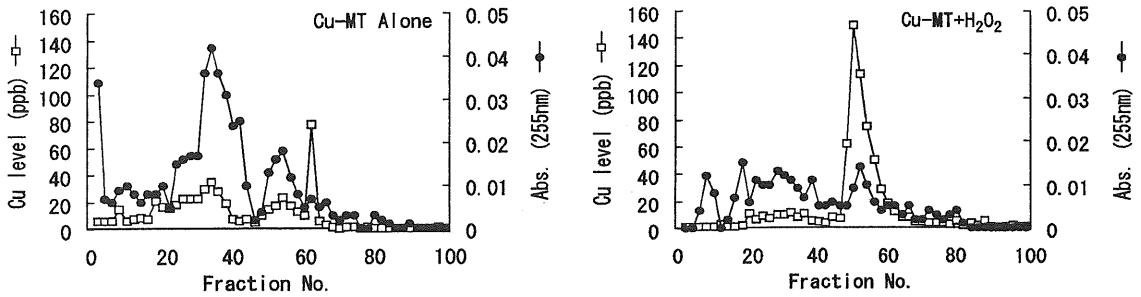


Fig. 4 Gel filtration in cytosols of the liver of LEC rats

Fig. 4 に Cu-MT 単独および過酸化水素と反応後の Cu-MT のゲルろ過の結果を示した。Cu-MT は 255nm で検出した。Cu-MT 単独では、Fr. No. 20~40 付近に大きなそして、Fr. No. 50 前後に小さなタンパクと銅のピークフラグメントが見られた。過酸化水素処理後の Cu-MT では Fr. No. 20~40 のピークフラグメントがなくなり、Fr. No. 40~60 に大きな銅のピークフラグメントが見られた。これらのことより過酸化水素処理前に重合体であった MT が酸化されて単量体に変化したか、もしくは分解によって低分子量化したと考えられる。

これらの結果から、LEC ラットの肝臓に蓄積する銅および誘導された Cu-MT、そして Cu-MT と過酸化水素によって産生されるヒドロキシラジカルは LEC ラットにおける肝炎・肝ガンの発症に深く関与している可能性が示唆された。

## 文 献

1. Hiromu Sakurai, Akihito Fukudome, Riichi Tawa, Masahiro Kito, Shigeo Takeshima, Masami Kimura, Noriko Otaki, Katuya Nakajima, Takuroh Hagino, Kazuya Kawano, Shoji Hirai, Shoji Suzuki (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1393-1397.
2. Hiromu Sakurai, Hiroko Kamada, Akihito Fukudome, Masahiro Kito, Shigeo Takeshima, Masami Kimura, Noriko Otaki, Katuya Nakajima, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 548-552.
3. Hiromu Sakurai, Katuya Nakajima, Hiroko Kamada, Hiromi Sato, Noriko Otaki, Masami Kimura, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 893-898.
4. Hiromu Sakurai, Hiromi Sato, Akihiko Hatanaka, Takashi Sawada, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino, Katsuyuki Nakajima (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 313-318.