

血清金属およびメタロチオネインレベルによるヒト肝疾患の新診断法の提案

中山 明 弘¹⁾, 江 原 正 明²⁾, 福 田 浩 之²⁾, 浜 崎 博³⁾, 桜 井 弘¹⁾

(1)京都薬科大学・代謝分析学*, (2)千葉大学・医・第1内科**, (3)京都薬科大学・健康科学*)

A New Diagnostic Method for Chronic Hepatic Disorders Based on Serum Metallothionein, Copper, and Zinc LevelsAkihiro NAKAYAMA¹⁾, Masaaki EBARA²⁾, Hiroyuki Fukuda²⁾, Hiroshi HAMASAKI³⁾, and Hiromu SAKURAI¹⁾1) *Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,*2) *First Department of Medicine, School of Medicine, Chiba University,*3) *Department of Health Science, Kyoto Pharmaceutical University.*

Hepatocellular carcinoma is one of the most frequent human tumors worldwide, and commonly evolved from chronic hepatitis and liver cirrhosis. It is therefore very important to detect and evaluate the progressing state of chronic hepatic disorders. Serum Cu and Zn levels and particularly their ratios are frequently reported to be good signals for diagnosing various diseases, including hepatic disorders. In the present study, the serum Cu/Zn ratio of patients with different hepatic diseases was confirmed to be significantly higher than those of the control. However, high diagnostic accuracy was not obtained by using the Cu/Zn ratio. On the other hand, serum MT levels of patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma were significantly lower than those of the control and chronic hepatitis. Thus, we introduced a new parameter, the (Cu/Zn)/MT ratio, to examine a possibility for diagnosing hepatic disorders. The calculated ratio distinguished the two groups, namely, the [control + chronic hepatitis] and [liver cirrhosis + hepatocellular carcinoma] groups; 88.6% of the patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma were classified by this ratio as members of the [liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma] group. On the basis of these results, we propose a new method to diagnose the pathophysiological changes of patients from chronic hepatitis to liver cirrhosis by using (Cu/Zn)/MT ratio.

肝癌は95%以上が慢性肝炎や肝硬変など慢性肝疾患から発症する¹⁾。したがって、慢性肝疾患患者の病態変化を血清パラメータなどを用いて分析することは、肝癌の早期発見につながる可能性があるため、重要研究課題であると考えられる。しかし、現在用いられている生化学的検査では慢性肝炎から肝硬変を経て肝癌に至る一連の病態を正確に把握することは困難であると考えられる²⁾。

ヒトやラットの肝癌組織中においてはCuの蓄積とZnの減少が見られ^{3,4)}、さらにヒト肝癌組織ではメタロチオネイン(MT)の減少が報告されている⁵⁾。これまで我々はLECラットで見られる肝癌発症には肝臓におけるCuの蓄積とヒドロキシルラジカル産生が関与することを見いだしている⁶⁾。すなわち、組織中の金属やMTと酸化的ストレスは細胞や組織障害に関与すると考えた。したがって、金属およびMTレベルの変動を調べることで、肝癌発症へ至る病態変化を明らかにできるかもしれないと考えられる。そこで我々はヒト血清中の金属およびMTレベルを精度良く定量し、これ

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

**所在地：千葉市中央区亥鼻1-8-1 (〒260-0856)

らの比を用いて肝疾患が診断できるかどうかを検討した。

実験方法

血清はインフォームドコンセントを得た後、京都薬科大学、千葉大学病院、横浜東病院および東陽病院にて採取した。対象をそれぞれコントロール、慢性肝炎、肝硬変および肝細胞群に分けた。各群の症例数および年齢をTable 1に示した。ただし、コントロール群は健常および肝実質に病変をもたない疾患患者を含む。血清金属レベル、MTレベルはそれぞれ誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) およびELISA法で定量した。

Table 1. Classification of the subjects in this study

Group	Age		n
	Mean $\pm$ SD	Range	
Ctrl	41.6 $\pm$ 25.5	18 - 99	68
CH	58.7 $\pm$ 15.1	28 - 73	9
LC	62.8 $\pm$ 9.32	53 - 73	4
HCC	60.9 $\pm$ 10.8	40 - 75	24
Total	48.4 $\pm$ 23.6	18 - 99	105

実験結果

慢性肝炎 (CH) 群の血清金属およびMTレベルはそれぞれコントロール (Ctrl) 群と比較して有意な差は見られなかった。肝硬変 (LC) 群および肝細胞癌 (HCC) 群の血清中のCuレベルはCtrlおよびCH群と比べて有意に高値を示した。血清中のZnレベルはHCC群においてのみCtrl群と比べて有意に低値を示した。また、血清中のCu/Zn比はCtrl群と比較してCH群では有意な差は見られなかったが、LC群およびHCC群では有意に高値を示した。一方、血清中のMTレベルはLC群およびHCC群においてCtrl群と比べて有意に低値を示した。

血清中の金属やMTレベルを用いて肝疾患の診断を試みたところ、これらの値単独では精度の高い判別は困難であった。そこで、これらの値を組み合わせると、(Cu/Zn)/MT値を用いるとLCおよびHCC群 ([LC + HCC]) とCtrlおよびCH群 ([Ctrl + CH]) とを判別できることが可能であった (Table 2)。このときカットオフ値を (Cu/Zn)/MT = 2.6 (μM^{-1}) に設定すると、[LC + HCC] と [Ctrl + CH] 群のそれぞれ89.3%および92.2%が組織学的な観察と一致した。

Table 2. Classification of diseases between the [LC + HCC] and [Ctrl + CH] groups

(Cu/Zn) / MT	Group		
	[LC + HCC]	[Ctrl + CH]	
> 2.60 μM^{-1}	25 (89.3%)	6 (7.8%)	31
< 2.60 μM^{-1}	3 (10.7%)	71 (92.2%)	74
	28 (100%)	77 (100%)	105

考 察

肝癌はほとんどが慢性肝疾患から発症するため、慢性肝疾患患者の病態変化を血清パラメータなどを用いて注意深く分析することは、疾患の早期発見および治療に有用と考えられる¹⁾。本研究において、Ctrl群およびCH群と比べてLC患者およびHCC患者の血清中のCuレベルが高く、MTおよびZnレベルが低いことが分かり、それらの比、すなわち (Cu/Zn)/MT比を用いればCtrl、CH群とLC、HCC群を区別できる可能性が示された (Table 2)。本研究の結果は慢性肝炎から肝硬変を経て肝細胞癌に至る一連の病態のうち、慢性肝炎から肝硬変への病態の変化を評価する新しい指標となるであろうと考えた。

参考文献

- 1) Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol* 2000 ; 14 : 703 - 709.
- 2) Burditt LJ, Johnson MM, Johnson PJ, Williams R. Detection of hepatocellular carcinoma specific alpha-fetoprotein by isoelectric focusing. *Cancer* 1994; 74 : 25 - 29.
- 3) Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Saisho H, Nagato Y, Suzuki K, Nakajima K, Yukawa M, Kondo F, Nakayama A, Sakurai H. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J Hepatol* 2000 ; 33 : 415 - 422.
- 4) Sakurai H, Kamada H, Fukudome A, Kito M, Takeshima S, Kimura M, Otaki N, Nakajima K, Kawano K, Hagino, Copper-metallothionein induction in the liver of LEC rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 185 : 548 - 552.
- 5) Nakayama A, Tawa R, Masuyama N, Ebara M, Fukuda H, Suzuki K, Nakajima K, Sakurai H. Chemical forms of metallothionein and cellular oxidative stress in human hepatocellular carcinoma: A comparative study with the hepatitis of LEC rat. *J Trace Elem Exp Med*, in press.
- 6) Sakurai H, Tsuji A, Sano Y, Masuyama N, Asano H, Suzuki K, Nakajima K, Dietary copper (Cu)-and age-dependent changes of Cu-metallothionein in relation to the level of nitric oxide (NO) in the liver of LEC (Long-Evans Cinnamon) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 10 : 89 - 100.