

肝炎・肝癌モデル動物：LEC (Long-Evans Cinnamon)

ラットの病態の進展に及ぼす飼料たん白質の影響

(1) 飼料へのメチオニン添加からみた LEC ラットの含硫 アミノ酸代謝

PROTEINS FROM DIFFERENT SOURCES CAUSE A DIFFERENCE IN THE PROGRESS OF HEPATITIS AND HEPATIC CANCER IN THE LONG-EVANS CINNAMON (LEC) RATS; AN ANIMAL MODEL FOR HEPATITIS AND HEPATIC CANCER

(1) FEEDING LEC RAT A SOY-PROTEIN DIET WITH OR WITHOUT ADDITION OF METHIONINE

菅原直毅・菅原千枝子・李 丹・三宅浩次・森 道夫 (札幌医科大学医学部)

山口昭弘 (札幌市衛生研究所)

Naoki SUGAWARA¹, Chieko SUGAWARA¹, Akihiro YAMAGUCHI², Dan LI¹, Hirotsugu MIYAKE¹ and Michio MORI¹

¹School of Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo 060

²Sapporo City Institute of Public Health, Sapporo 060

ABSTRACT

The LEC rat is a mutant strain which develops hereditary hepatitis and hepatic cancer. An abnormal copper metabolism in the liver is, perhaps, responsible for the hepatitis. This strain has a high susceptibility to chemical carcinogens even though copper accumulation is protected against. If it is understood why they are vulnerable to carcinogens, the rats may be a useful model animal for screening cancer-promoting factors; for example nutritional circumstances. It is known that a deficiency in available methyl groups can result in hepatitis and hepatic cancer. In this experiment, female LEC rats (45 days old) were fed a soy-protein diet with or without addition of 0.3% methionine for 26 days. The ability to utilize the amino acid was evaluated from the concentration of the serum amino acid. The hepatic copper concentration of LEC rats was 35 times that of Fischer rats at the end of feeding. However, addition of methionine to the food increased food efficiency not only in Fischer but also in LEC rats. Addition of methionine did not increase the serum concentration of the amino acid. When these results were considered, it appears that a disability in methionine-activation process may not precede the hereditary hepatitis of the LEC rat. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 15, 134-139, 1994.

Long Evans Cinnamon (LEC) ラットは Long Evans Agutie (LEA) から自然突然変異で生じた cin-

namon 色のラットで、生後120日前後に突然黄疸を発現し、約40%が肝不全状態となり死亡する。残りの60

%は死を免れるが肝細胞壊死と再生を繰り返し、1年半後には全例に肝癌の発生をみる¹⁾(Fig. 1)。このように、LEC ラットは肝炎の発症と肝癌への進展を考える

上で有用なモデル動物となりうる。
LEC ラットの肝炎発症は胆汁への銅の排泄障害によるところが大きく²⁾、ウイルソン病のモデル動物と

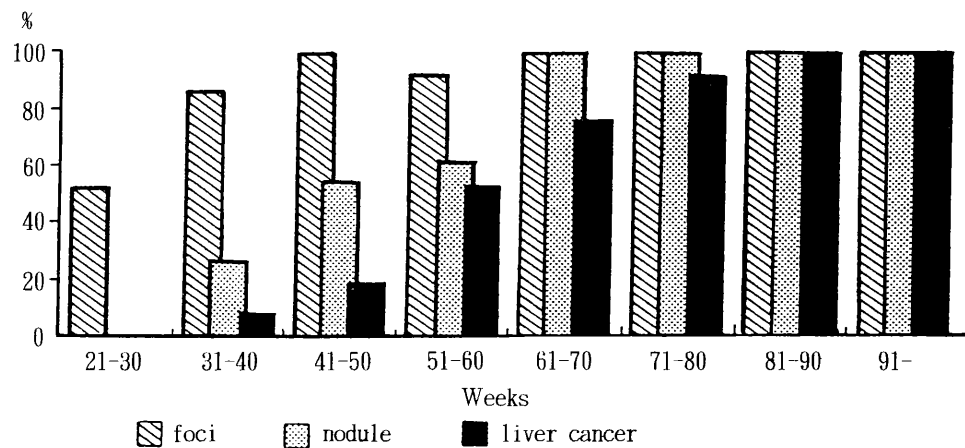


Fig. 1. Incidence of liver cancer in LEC rats.
by Mori M. et al (ref. 1)

Table 1. Food constituents

α -Potato starch	36.5%
Sucrose	40.0
Soy protein isolate	12.5
Corn oil	5.0
Cholesterol	0.1
Choline chloride	0.1
Salt mixture (Cu free) ¹	4.0
Vitamin mixture ¹	1.5
dl-Methionine ²	0.3

¹ Salt and vitamin mixtures were prepared by the prescription of Harper.

² dl-Methionine was added to a diet of methionine 'group'.

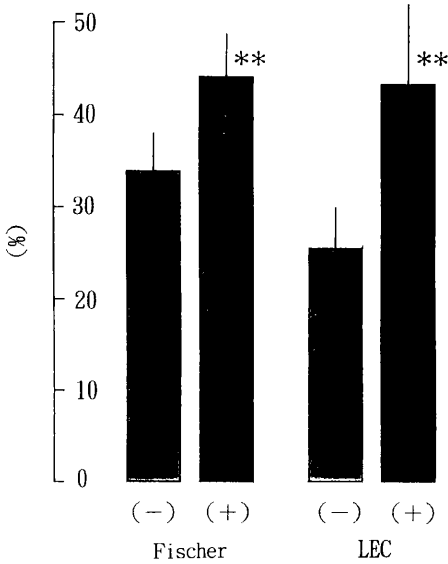


Fig. 2. Body weight increase. Body weight increase was calculated as BW increase during feeding/BW at the beginning of feeding. These data represent mean $\pm$ SD. Asterisk mark * or ** means $p<0.05$ or $p<0.01$ by t -test, when compared between Met (-) and Met (+) groups.

も考えられる³⁾。

また、LEC ラットの化学発癌剤に対する高い感受性は銅蓄積のない条件下でも存在する⁴⁾。これまで発癌物質のスクリーニングテストでエームズ法などによる

in vitro の結果が *in vivo* の結果と必ずしも一致しない問題があり、LEC ラットを用いた *in vivo* スクリーニングは、比較的短時間でヒトに有用な情報を与えると思われる。

Table 2. Copper concentrations in liver and fluids

Strain	Met	No. of rats	Metallothionein ($\mu\text{g/g prot}$)	Copper			Ceruloplasmin activity (unit/L)
				Liver ($\mu\text{g/g}$)	Bile ($\mu\text{g/mL}$)	Serum ($\mu\text{g/mL}$)	
Fischer	—	8	(—)	5.9 ± 0.6	0.97 ± 0.06	1.52 ± 0.05	134 ± 23
	+	8	(—)	$5.3 \pm 0.2^{**}$	$1.20 \pm 0.07^{**}$	1.52 ± 0.04	$171 \pm 26^*$
LEC	—	6	1998 ± 70	205 ± 25	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02	(—)
	+	6	$1791 \pm 120^{**}$	181 ± 44	$0.08 \pm 0.01^{**}$	0.10 ± 0.01	(—)

These data represent mean $\pm$ SD.

Asterisk mark * and ** mean $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

(—) means 'not detectable'.



Fig. 3. Amino acid concentration in serum.
These data represent relative values;
LEC/Fischer.

癌のイニシエーション、プロモーションの過程で、個体の遺伝要因ばかりでなく、栄養の要因は見逃せないが、LEC ラットの肝炎・肝癌について、飼料中銅濃度の影響以外ほとんど検討されていない。肝に滞った銅で metallothionein が誘導されこのキレート能力が限界に達して肝炎を発症し、肝癌へ進展することを考えた時、含硫アミノ酸、特にメチオニン (Met) の代謝に興味をもたれる。Met は DNA のプロセッシングに不可欠であり、飼料中 Met 濃度は肝癌の成立に影響を及ぼすと思われる。

今回はまず、Met を添加した大豆たん白質飼料を離乳間もない LEC ラットに与え、肝炎の発症以前に Met の代謝障害があるかどうか検討した。

方 法

分離大豆たん白質 (SPI) を用いて、たん白質濃度 12.5% の飼料を調製した (Table 1)。この飼料中の

dl-methionine 濃度は 0.13% で、この基本食 (銅濃度 2.0 ppm) に 0.3% の Met を加えてメチオニン添加食とした。雌の Fischer および LEC ラットを、離乳後、市販飼料 (オリエンタル MF, 銅濃度 7.4 ppm) で飼育し、生後 45 日から 71 日まで上記の合成飼料で飼育した。この間、飼料の摂取量は Met の添加、非添加群で差がないようにした。一夜の絶食後心採血し、肝臓を取り出した。血清のシステイン、ホモシステインとグルタチオンは dithioerythritol ですべて還元型とした後、除蛋白⁵⁾、他のアミノ酸は前処理せずに除蛋白して、HPLC で測定した。肝臓は硝酸 - 過塩素酸の混液で湿式灰化した後、原子吸光光度計で測定した。Met 添加の影響は、同系統内で比較 (t-検定, 有意水準 $p < 0.05$) 判定した。

結 果

26 日間の飼育期間中、飼料摂取量は Met 添加群と非

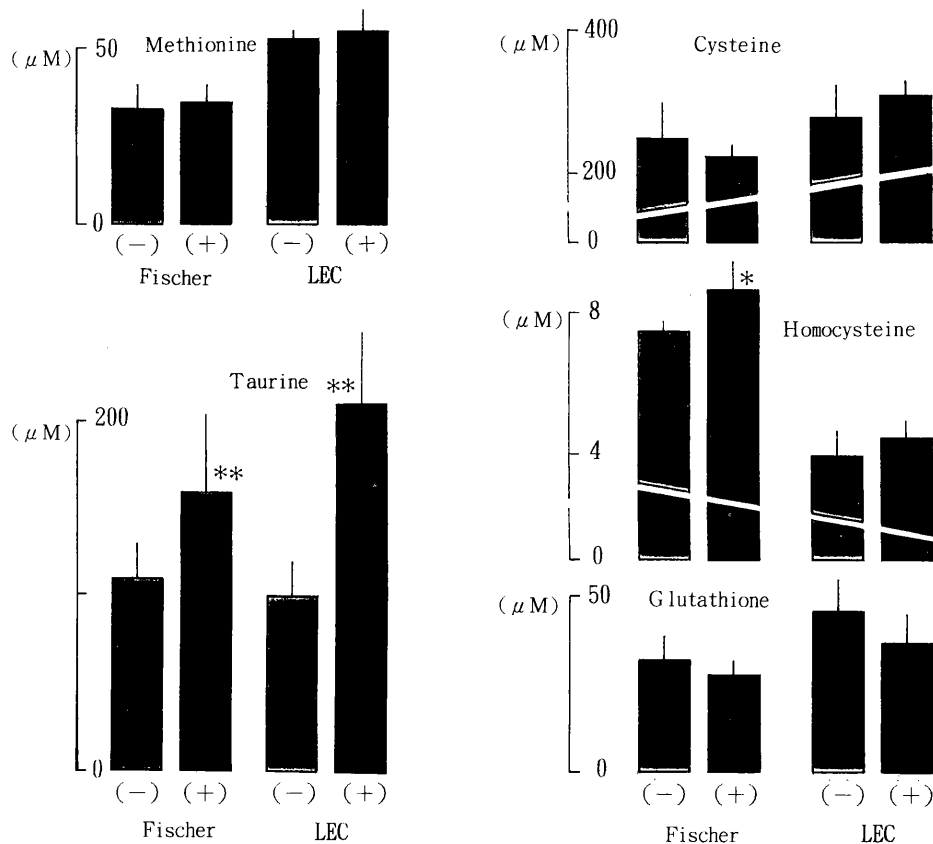


Fig. 4. Sulfur amino acids in serum. (+) and (-) mean with or without an addition of methionine to the diet, respectively.

添加群で違いがなかったが、Fischer および LEC ラットとも体重の増加は Met の添加で大きくなった (Fig. 2)。また、GOT など血清の臨床所見からいずれも肝炎の発症はないと考えられた。肝の銅濃度は、71 日齢の LEC ラットですでに Fischer ラットの35倍に達している。この異常蓄積は、胆汁への銅排泄の低下と血中へのセルロプラスミン放出の低下によることは、Table 2のデータから明らかであるが、胆汁流量は Fischer と LEC ラットで差がなかった。

Fischer ラットのそれぞれの血清アミノ酸濃度を 1 とした時、それに対応する LEC ラットのアミノ酸値は 1 を越え、汎アミノ酸血症の傾向があった (Fig. 3)。しかし、Met を添加した時、Fischer 比 $[(\text{Val} + \text{Leu} + \text{Ile}) / (\text{Phe} + \text{Tyr})]$ は LEC ラットでも低下しなかった (LEC - Met, 1.96 ± 0.32 vs +Met, 2.15 ± 0.27)。飼料への Met 添加で血清 Met 濃度は増加せず、タウリン (Tau) が増加したことから (Fig. 4)、LEC ラットで Met が代謝されずに滞るとは思われなかった。LEC ラットで他の含硫アミノ酸が増加傾向を示す中、ホモシステイン (HSH) 濃度が Fischer ラットに比べて有意に低かった。

考 察

肝炎の急性期や肝硬変の患者では血清中の Met が高く、負荷された Met のクリアランスが遅延することは多くの報告にある⁶⁾。この変化は S-adenosylmethionine synthetase によって S-adenosylmethionine (SAM) に活性化されるステップが障害されることによる。一方、ラットをコリン-Met 欠で飼育すると肝細胞癌が高率に発生し⁷⁾、メチル化剤としての SAM の不足は発癌プロセスのひとつの例として注目される⁸⁾。

肝炎を経過した LEC ラット肝で S-adenosylmethionine synthetase 活性が低下し、SAM 濃度も低下することが確認され⁹⁾、また、SAM を LEC ラットの腹腔に投与すると血清の GOT が低下し、cholangiofibrosis の発生頻度の低下することが報告されたが¹⁰⁾、肝炎の発症前から肝癌の成立まで全過程を視野に入れた報告は少ない。10週齢と16週齢の LEC ラットで肝 DNA 中 5-methylcytosine (5-mCyt) の割合を測定した例では対照ラットに比べて低下が認められず、肝癌が成立した段階で低下した¹¹⁾。しかし、肝炎の発症機構を考えるにはより幼若期の観察が重要で、今回、71日齢で観察した。

LEC ラットの肝臓銅濃度は Fischer ラットの35倍に達したが血清の酵素活性等から肝炎の兆候はなかつ

た。LEC ラットの血清アミノ酸濃度は Fischer ラットに比べて汎アミノ酸血症の傾向にあり、これが単なる系統間の違いなのか、肝機能の低下を意味するのか明らかでない。しかし、血清アミノ酸の Fischer 比を計算すると LEC ラットでも Met の添加で増加する傾向を示し、体重増加の観察結果とあわせて、Met は LEC ラットでも有効に利用されると思われる。

今回の実験で基礎飼料の Met 濃度は 0.13% で、Met の添加は 0.3% とした。市販のラット用飼料で Met 濃度が 0.5% 前後であることを考えると、今回の Met 添加飼料中 Met 濃度 (0.43%) は平常食の範囲と考えられる。この条件で飼料中へ添加した Met は Cys, GSH, Tau へと流れ、すでに銅の蓄積した LEC ラット肝臓でも Met から SAM への変換が含硫アミノ酸代謝の障壁にならないことを示した。

含硫アミノ酸代謝異常は芳香族アミノ酸代謝異常とともに肝障害時に現れやすいことが知られている⁹⁾。LEC ラットの Met 活性化ステップがさらに高濃度の Met 負荷に対してどの程度の処理能力をもつか検討する必要はあるが、ヒトの先天性代謝疾患であるメチオニン血症のように Met の活性化障害が病態の根源をなすとは思われなかった。

LEC ラットにおける肝炎の発症が胆汁への銅排泄障害に起因することはすでに報告したが¹²⁾、銅代謝における含硫アミノ酸の関与は具体的にはほとんど知られていない。しかし、銅が SH 基に強い親和性をもつことは、ペニシラミンが Wilson 病患者の銅の除去に有効なことでもわかる。LEC ラットの場合、肝臓に残存した銅は metallothionein (MT) を誘導する。この濃度は Fischer ラットの数百倍に及び¹²⁾、MT たん白質の30%が Cys で構成されることを考えると LEC ラットで Cys の要求が高まっていると想像される。多くの血清アミノ酸が Fischer ラットに比べて LEC ラットで高値となった中でホモシステイン (HSH) だけは有意に低値となったが、妊婦の血清での観察結果と同様¹³⁾、Cys 要求の増加が血清 HSH 濃度を下げたと思われる。また、HSH はペニシラミンと似た構造をもち、飼料に添加してラットを飼育した例で血漿セルロプラスミン活性の低下が報告されており¹⁴⁾、LEC ラットでも HSH が銅をキレートして沈着する可能性が考えられる。

LEC ラットを LEA ラットと比べた時、肝 P-450, γ -glutamyltranspeptidase (GGT) 活性など肝薬物代謝系酵素の偏倚が幼若時からあり¹⁵⁾、化学発癌剤に対して高い感受性を示す。一般に、これらの偏倚は化学発癌剤へ暴露された時に観察される。“化学発癌剤”に

対して高感受性を示す LEC ラットは, “栄養環境と発癌” の問題を考える時にも有効と思われる。

飼料中アミノ酸の分析は, 北海道立食品加工研究センターの太田智樹氏によるもので, ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 森 道夫, 高橋秀俊, 沢田典均, 榎本克彦, 水無瀬昂 (1989): 動物モデル; 肝炎, 肝癌自然発症ラット. 肝胆膵, **19**, 905-910.
- 2) Sugawara N, Sugawara C and Miyake H (1993): Decrease in biliary excretion of copper in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats causing spontaneous hepatitis due to a gross accumulation of hepatic copper. *Res Commun Chem Path Pharm*, **81**, 45-52.
- 3) Li Y, Togasi Y and Takeiti N (1991): Abnormal copper accumulation in the liver of LEC rats: A rat form of Wilson's disease. *In: The LEC Rat*. Mori M, Yosida MC, Takeiti N and Taniguti N eds., Springer-Verlag, Tokyo. pp. 122-132.
- 4) 服部淳夫, 佐脇正邦, 榎本克彦, 都築直人, 菅原直毅, 杉山俊博, 森 道夫 (1993): LEC ラット肝の発癌物質感受性と肝内銅蓄積との関連. 第3回 LEC ラット研究会, p. 29.
- 5) 山口昭弘, 福士 勝, 水嶋好清, 佐藤 稔, 清水良夫, 菊地由生子 (1989): 高速液体クロマトグラフィーによるシステイン測定法の開発. 臨床小児医学, **37**, 109-113.
- 6) Brown ML ed. (木村修一, 小林修平監訳) (1991): 肝臓病. 最新栄養学 (第6版), 建帛社, 東京. pp. 579-591.
- 7) Ghoshal AK and Farber E (1984): The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis*, **5**, 1367-1370.
- 8) Hoffman RM (1984): Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **738**, 49-87.
- 9) Shimizu K, Abe M, Yokoyama S, Takahasi H, Sawada N, Mori M and Tsukada K (1990): Decreased activity of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in hereditary hepatitis in Long-Evans rats. *Life Sci*, **46**, 1837-1842.
- 10) 国立裕之, 山東剛裕, 福田善弘 (1993): S-Adenosyl-l-methionine (SAME) による肝発癌予防の可能性. 肝臓, **34**, Suppl 1, 59.
- 11) Suzuki K, Sugiyama T, Ookawara T, Kurosawa T and Taniguti N (1991): High sensitivity to 5-azacytosine in LEC rats, a strain with a metabolic predisposition to hepatitis and hepatoma: Possible involvement of DNA methylation in the expression of cytochrome P-450 and γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem Intern*, **23**, 9-14.
- 12) 菅原直毅, 菅原千枝子, 佐藤政男, 高橋秀俊, 森道夫 (1992): 肝炎肝癌自然発症 LEC ラット肝の銅蓄積とメタロチネオイン誘導. 医学のあゆみ, **160**, 479-480.
- 13) Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L and Isaksson A (1992): Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Biochem*, **30**, 377-379.
- 14) Brown JCW and Strain JJ (1990): Effect of dietary homocysteine on copper status in rats. *J Nutr*, **120**, 1068-1074.
- 15) 杉山俊博 (1992): ウイルソン病モデル動物 (LEC ラット) における肝炎・肝癌自然発症機構. 秋田医学, **19**, 645-651.