

## 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

### (2)飼料へのメチオニン添加からみたF1ラットの含硫アミノ酸代謝

Effect of Protein Nutrition on Hepatitis and Hepatic Cancer in LEC (Long Evans Cinnamon) Rat

(2)Feeding of F1 (LEC × Fischer) Rats a Soy Protein Diet With or Without Addition of Methionine

菅原直毅・菅原千枝子・湯浅資之・頼 玉熔・三宅弘次・森 道夫  
(札幌医科大学)

山口昭弘 (札幌市衛生研究所)

太田智樹 (北海道食品加工研究センター)

Naoki SUGAWARA<sup>1</sup>, Akihiro YAMAGUCHI<sup>2</sup>, Chieko SUGAWARA<sup>1</sup>,  
Motoyuki YUASA<sup>1</sup>, Yu-rong LAI<sup>1</sup>, Tomoki OHOTA<sup>3</sup>, Hirotugu Miyake<sup>1</sup>  
and Michio MORI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo 060

<sup>2</sup>Sapporo City Institute of Public Health, Sapporo 003

<sup>3</sup>Hokkaido Food Processing Research Center, Ebetsu 069

## ABSTRACT

The LEC rat suffers from spontaneous hereditary hepatitis and liver cancer. The severity of the hepatitis and incidence of hepatic cancer depend on nutritional conditions, for example protein components. We prepared soy protein (12.5%) diets containing methionine at the level of 0.13% or 0.43%. F1 (LEC × Fischer) male rats were fed the diets for 35 days from 70 days of age. With the low methionine diet (0.13%), hepatic GGT ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase) activity was higher in F1 rats than in Fischer rats. However, the low methionine diet led to larger decreases of the serum homocysteine concentration in the F1 group than in the Fischer group. The correlation coefficient between liver GGT activity and serum homocysteine was significant ( $P < 0.01$ ) for all groups rats. The high sensitivity for methionine shortage found in F1 rats may be implicated in their high susceptibility to chemical carcinogens. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 128-132, 1995.

LEC (Long Evans Cinnamon) ラットは生後120日前後で全例、黄疸を自然発症し、その後肝癌に至る<sup>1)</sup>。このラットには銅 (Cu) の排泄障害があり<sup>2)</sup>、Cu制限食で肝炎・肝癌の発症が阻止されるが、化学発癌剤に

対する感受性の高さは保持される。さらに、この性質がCu代謝異常とは独立で、F1ラットに引き継がれることが報告された<sup>3)</sup>。

我々は、LECラットがメチオニン (Met) 要求量が高

く、飼料たん白質の種類によって肝炎の進行が異なること、肝炎前の血清のアミノ酸パターンは、明らかな低ホモシスチン (HomoCys) 血症となることをすでに確認している<sup>4)</sup>。今回、F1ラットが含硫アミノ酸代謝に

どのような特徴を示すか、大豆たん白質を使った飼料で検討した。

## 方 法

Table 1. Food constituent

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| $\alpha$ -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)  | 4.0   |
| Vitamin mixture         | 1.5   |
| DL-Methionine           | 0.3   |

Salt and vitamin mixture were prepared by the prescription of Harper without copper compound. DL-Methionine (0.3%) was added to a diet of Met (+) group, only.

大豆たん白質12.5%の基礎飼料 (Met(-) 群; Met 0.13%) とこれに0.3% Metを添加した添加飼料 (Met (+) 群; Met 0.43%) を調製した (Table 1)。これは、第15回大豆たん白質研究会で報告した実験と同じ組成である<sup>4)</sup>。生後70日齢のF1 (LEC  $\times$  Fischer) 雌ラットをMet (-) 群とMet (+) 群の間でpair-feedingし、35日間飼育した。対照としてFischerラットとLECラットを飼育した。一夜の絶食後、エーテル麻酔下に心採血した。血清含硫アミノ酸はdithioerythritolですべて還元型としてHPLCで測定した<sup>5)</sup>。肝臓のCuは、硝酸-過塩素酸の混液で湿式灰化した後、原子吸光法で測定した。肝GGT ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase EC 2.3.2.2) 活性は0.15 M KClホモジネートの900 g上清を

Table 2. Body weight increase and clinical findings in serum

| Strain                   | Met addition       | Rat | Body weight increase (%) | Albumin (g/100 mL) | GOT (Karmen U) |
|--------------------------|--------------------|-----|--------------------------|--------------------|----------------|
| F1                       | —                  | 7   | 8.9 $\pm$ 2.2            | 3.78 $\pm$ 0.15    | 103 $\pm$ 27   |
|                          | +                  | 6   | 11.2 $\pm$ 1.5           | 3.70 $\pm$ 0.18    | 129 $\pm$ 41   |
| Fischer                  | —                  | 6   | 13.5 $\pm$ 3.7           | 4.11 $\pm$ 0.21    | 120 $\pm$ 43   |
|                          | +                  | 7   | 13.2 $\pm$ 4.2           | 4.20 $\pm$ 0.14    | 111 $\pm$ 43   |
| LEC                      | —                  | 2   | 5.4, 6.4                 | 3.3, 3.5           | 85, 96         |
| Statistical significance | F1 vs Fischer      |     | *                        | **                 | NS             |
|                          | Met (-) vs Met (+) |     | NS                       | NS                 | NS             |

“Body weight increase” was calculated as an increase during feeding/initial BW in (%). Each data represents Mean  $\pm$  SD.

Asterisk marks \* and \*\* mean  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

“NS” means not significant.

Table 3. Liver glutathione concentration and GGT activity

| Strain                   | Met addition       | GSH (mg/g)      | GGT ( $\mu$ mole p-nitroaniline /g prot 30 min) | Cu ( $\mu$ g/g) |
|--------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-----------------|
| F1                       | —                  | 2.88 $\pm$ 0.69 | 8.5 $\pm$ 2.7                                   | 6.3 $\pm$ 0.6   |
|                          | +                  | 2.41 $\pm$ 0.49 | 4.5 $\pm$ 2.7                                   | 6.2 $\pm$ 0.3   |
| Fischer                  | —                  | 2.79 $\pm$ 0.47 | 4.0 $\pm$ 2.3                                   | 5.8 $\pm$ 0.3   |
|                          | +                  | 2.97 $\pm$ 0.68 | 2.6 $\pm$ 1.7                                   | 5.2 $\pm$ 0.4   |
| LEC                      | —                  |                 | 29, 29                                          | 268, 224        |
| Statistical significance | F1 vs Fischer      | NS              | **                                              | **              |
|                          | Met (-) vs Met (+) | NS              | *                                               | NS              |

GSH : Glutathione

GGT :  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase

Table 4. Sulfur containing amino acids in serum

| Strain                   | Met addition       | HomoCys ( $\mu$ M) | Cys ( $\mu$ M) | GSH ( $\mu$ M) |
|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| F1                       | —                  | 3.7 $\pm$ 0.4      | 289 $\pm$ 24   | 43 $\pm$ 4     |
|                          | +                  | 6.3 $\pm$ 0.6      | 321 $\pm$ 19   | 42 $\pm$ 5     |
| Fischer                  | —                  | 11.3 $\pm$ 2.0     | 311 $\pm$ 39   | 45 $\pm$ 8     |
|                          | +                  | 12.4 $\pm$ 1.6     | 299 $\pm$ 32   | 42 $\pm$ 8     |
| LEC                      | —                  | 3.8, 3.1           | 310, 306       | 44, 38         |
| Statistical significance | F1 vs Fischer      | **                 | NS             | NS             |
|                          | Met (—) vs Met (+) | **                 | NS             | NS             |

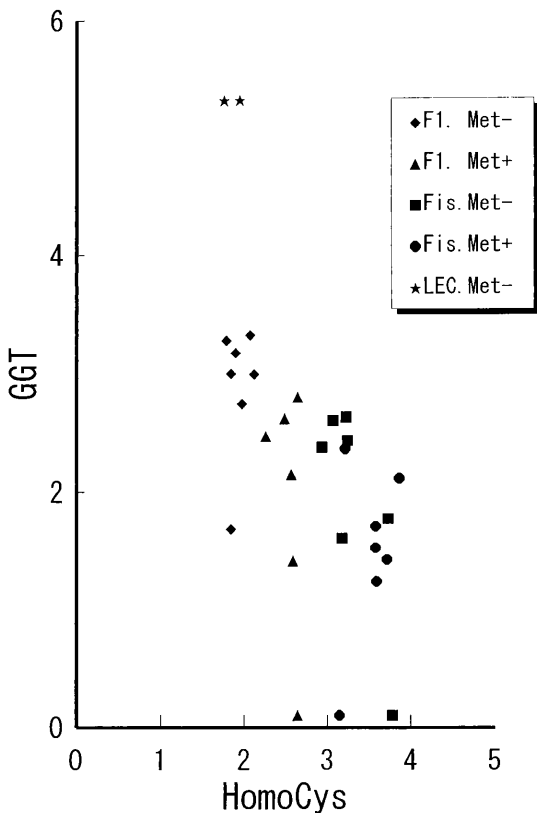


Fig. 1. Correlation between serum HomoCys and liver GGT. Serum HomoCys ( $\mu$ M) and liver GGT activity ( $\mu$ mole p-nitroaniline/g protein 30 min) are plotted in logarithmic scale. A correlation coefficient between them is  $-0.619$  ( $n=28$ ,  $P<0.01$ ).

使い  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide を基質として、肝GSH (還元型) は glutathione reductase を用いる Tietze らの方法で測定した。

Met 添加の効果, strain 間の差は ANOVA-test により有意性 ( $P<0.05$ ) を判定した。

## 結 果

F1 ラットは Met (+) 群に比べ Met (—) 群で体重増加が少なかった (Table 2)。F1 の肝Cu濃度は Fischer にほぼ等しく (Table 3), 血清GOTの上昇もない。しかし, 血清HomoCysは低く (Table 4), 特に, Met (—) 群で LEC ラットに近い値となった。逆に, 肝GGT活性は F1 ラットで上昇し, 特に Met (—) 群で高い値となった。血清HomoCys濃度と肝GGT活性を両対数グラフにプロットすると相関係数  $r=-0.619$  となり有意 ( $n=28$ ,  $P<0.01$ ) に相関した (Fig. 1)。

## 考 察

大豆, または大豆加工食品の抗腫瘍性については多くの研究がある<sup>6)</sup>。しかし, 大豆たん白質の特徴である「Met濃度の低さ」と「健康」の問題に限って考えると, 単一の答えはない。一般に, 植物性たん白質はMet濃度が低く, 成長期のたん白質源としては考慮されるべき点だが, 逆に, これが利点となる場合がある。進行した肝硬変, 肝癌患者では肝不全の予防, 癌細胞の増殖抑制に低Met食は有利とされ<sup>7,8)</sup>, これら患者のため, Met欠の輸液が試みられている。一方, Met, コリンの不足による酸化性ストレスの増加が知られている<sup>9)</sup>ことから, 我々はMet含量の低い大豆たん白質が, 肝炎の発症過程にどのような影響をもつのか, 肝炎肝癌自然発症 LEC ラットで検討してきた。

肝炎発症前の血清アミノ酸分析から LEC ラットは決定的なアミノ酸代謝障害はもたないが, 含硫アミノ酸のうちHomoCysがFischerラットに比べて明らかに低いことを見いだしたり。

HomoCysはMetからTauへ至る trans-sulfuration pathwayでCys方向とMetへリサイクルされる方向の分岐点に位置する。ヒトの高HomoCys血症は先天性

Cystathionine synthase欠損や高齢者にみられるビタミンB<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>の不足による例<sup>10)</sup>が報告され, 閉塞性動脈硬化が問題となっているが, 低HomoCys血症は報告が少ない。妊娠後期で低HomoCys血症の観察例があり, この場合, Cys需要の増加が原因と思われる<sup>11)</sup>。LECラットの低HomoCys血症はCu排泄障害をもつ例での観察であり, この現象の意味を考えるには, Cu排泄障害のないF1ラットでの観察が有効と思われる。

肝のGSH濃度はF1, FischerラットいずれもMet濃度に関係なく変化がない。しかし, 肝GGT活性が低Met飼料, 特にF1ラットで高く, GSHの分解が高まっていると思われる。これに合わせて血清HomoCys濃度がF1ラットで低く, 特に, 低Met飼料でLECラットに近い値となった。血清HomoCysと肝GGT活性が有意の相関を示すことから, 血清HomoCysの低下はGSHの代謝回転の上昇によりCys方向への流れが高まった結果と推測される。これはF1での観察結果であり, Cuの排泄障害とは独立した現象と言える。

肝のGGT酵素は低Met飼料だけでなく, 発癌性化学物質を負荷された時にも誘導され, GST-p (glutamyl s-transferase-placenta form) 酵素とともに前癌病巣のマーカーとなる<sup>12)</sup>。東らは複数の化学発癌剤を使ったラット肝癌の研究で, 発癌に先だってGGT活性の増加があること, 非発癌の変異系ラットでGGT活性の増加がおこらずGSHの代謝が遅いことを述べている<sup>13)</sup>。GGT酵素の誘導と肝癌の関係は不明の点が多いが, この酵素と鉄イオンの存在下にGSHがラジカル反応をおこす可能性が示されている<sup>14)</sup>。

Metはメチル化剤, GSHの原料として肝炎, 肝癌の発症過程に大きな影響を持つ。F1ラットにも受け継がれたMet不足に対する感受性の高さは, 肝炎・肝癌の発症機構との関係で興味をもたれる。

## 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) Hattori A, Sawaki M, Enomoto K, Tsuzuki N, Isomura H, Kojima T, Kamibayashi Y, Sugawara N, Sugiyama T and Mori M (1995): The high hepatocarcinogen susceptibility of LEC rats is genetically independent of abnormal copper accumulation in the liver. *Carcinogenesis*, **16**, 491-494.
- 4) 菅原直毅, 菅原千枝子, 李 丹, 三宅弘次, 森 道夫, 山口昭弘(1994): 肝炎・肝癌モデル動物: LEC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. 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 134-139.
- 5) 山口昭弘, 福士 勝, 水嶋好清, 佐藤 稔, 清水良夫, 菊地由生子, 高杉信男(1989): 高速液体クロマトグラフィーによる血中総ホモシステインおよび総システイン測定法の開発. 臨床小児医学, **37**, 109-113.
- 6) Messina M and Barnes S (1991): The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
- 7) 標葉隆三郎, 森 昌造(1990): 外科患者の栄養, 最近の知識. 外科, **52**, 1467-1476.
- 8) 鶴知光(1993): メチオニン欠如アミノ酸インバランスTPNとポリアミン合成阻害剤併用療法の抗腫瘍効果. 外科と代謝・栄養, **27**, 427-437.
- 9) Rogers AE (1995): Methyl donors in the diet and responses to chemical carcinogens, *Am J Clin Nutr*, **61** (suppl), 659s-665s.
- 10) Ubbink JB (1994): Vitamin nutrition status and homocysteine: An atherogenic risk factor. *Nutr Rev*, **52**, 383-387.
- 11) Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L and Isaksson A (1992): Decreased serum homocysteine in the pregnancy. *Eur J Clin Biochem*, **30**, 377-379.
- 12) 佐藤清美(1991): 肝癌発生の生化学的動態. 代謝, **28**, 645-652.
- 13) Higasi T and Sakamoto Y (1989): Induction of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in rat liver exposed to carcinogen with special reference to carcinogen-resistant rats. In: Glutathione Centennial, Taniguchi N et al., eds., Academic Press. pp.227-239.
- 14) Stark AA, Zeiger E and Pagano DA (1993): Glutathione metabolism by  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: char-

actarization of the system and relevance to  
hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **14**, 183-189.