



Title	A Marked Increase in Free Copper Levels in the Plasma and Liver of LEC Rats : an Animal Model for Wilson Disease and Liver Cancer
Author(s)	小泉, 雅彦
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40729
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	小 泉 雅 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 10 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	A Marked Increase in Free Copper Levels in the Plasma and Liver of LEC Rats: an Animal Model for Wilson Disease and Liver Cancer (LECラット血漿・肝臓中の遊離銅の顕著な増加：ウィルソン病・肝癌の動物モデル)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 井上 俊彦
	(副査) 教 授 谷口 直之 教 授 岡本 光弘

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

遷移金属の銅や鉄は遊離状態では生体にとって有害なため、血中ではセルロプラスミンやトランスフェリン、組織中はメタロチオネインやフェリチンなどの結合蛋白に結合し結合型の銅・鉄として無毒化されている。遊離状態になるとフェントン反応（金属触媒ハーバー・ワイズ反応）を介して活性酸素のうちで最も反応性の高いヒドロキシラジカル（HO[•]）を生成し、組織障害を起こす。一方、ウィルソン病・肝炎肝癌自然発症モデル動物である LEC ラットでは、銅輸送ポンプの異常により肝臓に銅が蓄積していることはよく知られているが、それがどのような存在形態をとっているかは不明である。また銅の輸送蛋白であるセルロプラスミンの低下が指摘されているが、セルロプラスミンは鉄の酸化に関わるフェロキシダーゼ活性も有するので、鉄の輸送との関わりも考えられる。

本研究では LEC ラットにおける血漿中・肝臓中での、遊離銅・遊離鉄を定量し、加齢による変動を解析した。さらにフェロキシダーゼ活性を測定することによって血漿中のセルロプラスミンを定量し、遊離銅・遊離鉄と併せて肝炎・肝癌発症に及ぼす機構について推察した。

【方法】

若年期(12W 未満)、急性肝炎期(16-28W)、慢性肝炎期(30-49W)、肝癌期(50W 以上)の年代群に分類した LEC ラットについて、同齢の LEA ラットをコントロールとして比較した。急性肝炎期の LEC ラットは肉眼的黄疸の有無で黄疸群、非黄疸群に分類した。各群の固体数は10~28匹で、麻酔下に屠殺し血液と肝臓を採取した。慢性肝炎期・肝癌期の LEC ラットの肝臓については、肉眼的な結節部ないし癌部とそれ以外の非癌部とに分けて分析した。肝臓は摘出し生理食塩水で洗浄した後、重量の 6 倍のトリス緩衝液中でホモジナイズした。このホモジネート中の蛋白及び、総銅量・総鉄量を定量した。更に、これを超遠心分離し、分子量5,000以下を含む上澄み液の濾液中の遊離銅・遊離鉄を定量した。

遊離銅および遊離鉄の定量は、Gutteridge らによる DNA 結合性のキレート剤を利用する方法を用いた。血漿及び肝臓抽出物にサケ精子 DNA と、銅の定量には1,10-フェナントロリン・メルカプトエタノールを、鉄の定量にはブレオマイシン・アスコルビン酸をキレート剤・還元剤として加える。還元型の銅・鉄とキレート剤との複合体は DNA 分解活性を持つので、酸化分解物のマロンジアルデヒドをチオバルビツール酸と強酸性条件下で反応させ、鉄は532 nm の吸光度を、銅は532nm/553nm の蛍光を測定することによって定量した。血漿と肝臓のホモジネートを用い原

子吸光法により総銅量、総鉄量（結合型と遊離型を含む）をそれぞれ直接定量した。血漿フェロキシダーゼ活性はコンアルブミンと、二価鉄のモール塩を用い、460 nm の吸光度変化で求めた。全活性からアジ化ナトリウム存在下で測定したⅡ型活性を引いたものをⅠ型（セルロプラスミン）活性として算出した。

【成績】

血漿中の総銅量については、黄疸群を除いて LEC ラットの方が LEA ラットより低値となった。遊離銅については、黄疸の有無に関わらず急性肝炎期の LEC ラットでは、LEA ラットの約 5 倍程度の高値を示し、その 2 ～ 3 割が遊離型であった。一方、血漿中の総鉄量については、LEC ラットで低値を示すが、遊離鉄については、明らかな差は認められず、黄疸群の LEC ラットでのみ有意に高値を示した。

肝臓中では、総銅量・遊離銅とも LEC ラットの方が LEA ラットに比べ全年代で高値を示した。遊離銅は、黄疸の有無に関わらず急性肝炎期で顕著に高くなり、以降減少するといった血漿値と相関する経時変化を示した。また、総銅量については非癌部で高値であったのに対し、遊離銅については癌部で高値であった。一方、肝臓中では総鉄量・遊離鉄とも LEC ラットは LEA ラットに比べ、肝癌期の癌部以外でむしろ底値となった。

血漿フェロキシダーゼ活性については、Ⅰ型（セルロプラスミン）活性が低い LEC ラットでは全年代層で底値であった。セルロプラスミン活性については若年期・急性肝炎期の非黄疸群で非常に低く、慢性肝炎期以降増加するといった、遊離銅と逆の変動を示した。

【総括】

LEC ラットでは、特に急性肝炎期の肝臓ならびに血漿中に遊離銅が顕著に増加していることが明らかになった。一方、遊離鉄は黄疸群の血漿中のみで高値を示したが、他群では LEA ラットと大きな差はなかった。遊離銅が増加するにもかかわらず血漿中のセルロプラスミン活性が急性肝炎期で低いのは、銅の輸送に異常があるために遊離型が増加したためと考えられる。遊離銅は肝臓中・血中でフェントン反応を引き起こし、HO[•]を生成する。肝臓中では肝細胞障害の原因となり、銅の遊離が促進される一方、血中では血球系、血管内皮細胞の障害を引き起こすと考えられる。急性肝炎期では赤血球さらにヘモグロビンの破壊による黄疸を生じ、遊離した鉄によるフェントン反応を促進すると推察される。このように LEC ラットでは、銅の代謝異常の結果遊離銅が著しく増加し、それが黄疸を伴う肝炎の発症と引き続く発癌の誘導にも、深く関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

生体内では銅や鉄は種々の結合蛋白中に存在し無毒化されているが、病的状態では銅や鉄イオンは遊離し活性酸素を生成することから、それらの意義が論じられている。一方、Wilson 病・肝炎肝癌自然発症モデル動物である LEC ラットでは、肝臓での銅の蓄積が見られ、血中銅の輸送蛋白であるセルロプラスミン活性が低下することはよく知られている。しかし、遊離銅・遊離鉄については不明である。本研究は初めて LEC ラットの血漿中・肝臓中の遊離銅・遊離鉄を定量し、セルロプラスミン活性を ferroxidase 活性として求め、それらの加齢による変動を解析した。

LEC ラットはコントロールの LEA ラットに比べ、特に急性肝炎期の肝臓中・血漿中で遊離銅が顕著に増加し、一方、遊離鉄は黄疸群の血漿中のみで高値だったが他では差がないことを明らかにした。急性期に ferroxidase 活性が減少し血中に銅を正常に輸送できず遊離することを関係づけた。さらに遊離した銅が肝内、血中で Fenton 反応により活性酸素ヒドロキシラジカルを生成し組織障害を起こす可能性を示唆した。

本研究は初めて LEC ラットの血漿中・肝臓中の遊離銅が顕著な増加を示すことを見出し、肝炎の発症に関わっている可能性を指摘した。よって、学位の授与に値すると考えられる。