〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (4) 173-176 (1984)

ヒト肝臓中のガン部および非ガン部組織におけるメタロチオネイン濃度について

小野坂敏見,^a 関 庚善,^a 福原千佳子,^a 田中慶一^a

田代真一,^b 古田睦廣,^b 安富 徹^b

神戸学院大学栄養学部,^a 国立京都病院^b

Concentration of Metallothionein in Malignant and Non-Malignant Tissues in Human Liver

SATOMI ONOSAKA,^a KYONG-SON MIN,^a CHIKAKO FUKUHARA,^a

KEIICHI TANAKA,^a SHIN-ICHI TASHIRO,^b

MUTSUHIRO FURUTA,^b and TOHRU YASUTOMI^b

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,^a Igawadani-cho,

Nishi-ku, Kobe 673, Japan and Kyoto National Hospital,^b

Fukakusa, Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan

(Received January 17, 1984)

By measuring concentrations of MT (metallothionein) and Zn in both malignant and non-malignant tissue of human liver, the following results were obtained.

1. MT concentration of non-malignant tissue in human liver was high and the data were 197, 538 and 552 $\mu\text{g/g}$.
 2. The mean value of MT concentration in malignant tissue of human liver was 30.4 $\mu\text{g/g}$.
 3. Between Zn concentration (x $\mu\text{g/g}$) and MT concentration (y $\mu\text{g/g}$) in the liver, a strong positive correlation ($r=0.970$) was observed. Its regression formula was $y=-129+13.1x$.
- The above results showed that MT concentration in human liver decreases by canceration.

Keywords—metallothionein; zinc; hepatoma; non-malignant tissue; liver; human.

緒 言

生体内の Cd 結合成分は Vallee らのグループによってはじめて見出され、1960年にウマの腎臓から精製されて metallothionein (以下 MT と略す) と命名された。^{1,2)} それ以来、MT あるいは MT 様タンパク質が多くの動物の種々の臓器中に見出されている。³⁾ ヒトについても肝臓や腎臓中などで MT が存在することが報告されている。³⁾ たとえば Cd の急性中毒の患者の肝臓や腎臓、Cd で汚染された米を食していたヒトの肝臓、腎臓および脾臓の上清をゲル透過することによって、MT 画分に Cd のピークが観察されている。^{4,5)} また成人の肝臓およびヒトの胎児の肝臓からは MT が精製され、^{6,7)} その一次構造も決定されて他の動物の MT ともよく似ていることが明らかにされている。⁸⁾

MT の生理的意義は必ずしも明確ではない。しかし、重金属中毒の解毒機構としての MT、あるいは Zn 代謝と MT との関係については多くの報告が見られる。^{3,9)} 最近では Zn-thionein による Zn の伝達、¹⁰⁾ Cu-thionein による O_2^- の減少など、¹¹⁾ 生体における MT の役割について分子レベルでの興味ある知見も蓄積されている。

このような MT の作用とその生体内での MT 濃度は当然のことながら密接な関係があると考えられる。著者らは、これまで Cd 飽和-ヘモリゼート処理法による MT の定量法を考案し、¹²⁾ 種々の金属をラットに投与してその臓器中の MT 濃度の測定に応用した。¹³⁻¹⁵⁾ さらに前投与した Ca によって誘導される肝臓中の MT 濃度と Cd 投与によるマウスの急性中毒には負の相関があることを認めた。¹⁶⁾

ヒトにおいても Cd や Hg などの毒性に対する防禦,あるいは Zn や Cu などの代謝などと生体中の MT は密接に関係していると推察される. しかし, その生体内の濃度に関する報告は, 血漿中および尿中の MT 濃度についての報告を除いて見当らない.^{17,18)} そこで著者らはヒト肝臓中の MT 濃度を測定したので, Zn 濃度との相関性と合わせて報告する.

実験方法

1. 試料 試料は国立京都病院外科で手術時に採取したもので, いずれも肝もしくは胆管のガンで切除した肝組織であり, 原発性ガン病巣ならびに切除された肝組織中の非ガン部を試料とした (Table I). 個々の症例は細胞診, 組織診で悪性良性の判定を行ない Table I の診断を確定した. 手術的除去直後に一部を病理診断用に除去し, 残余の部分から肉眼的にガン部, 非ガン部を判定して検体を採取し, 境界領域は可能な限り除去した. ガン病巣中に壊死は肉眼的には存在しなかった. それぞれの試料の一部を中性ホルマリン溶液中で固定し, ヘマトキシリン-エオジンで染色し, ガン部, 非ガン部であることを組織学的に確認し, 残りを凍結して保存し, MTならびに Zn の分析に用いた. ガン部とした試料中に正常肝細胞の混入は認めなかった. また壊死の像は組織学的にも認めなかった. 非ガン部とした検体は, aを除きガン組織周囲に繊維層を有し, aでは境界が明瞭ではなかったものの, いずれもガン細胞の非ガン部試料の組織標体への混入を認めなかった. また, いずれも悪性腫瘍細胞の混在はなかったとはいえ, 正常肝ではなく, 肝硬変の所見を認め, 多くの繊維の走行と擬小葉像を呈した. その他の特異な所見は認められなかった.

2. MT および Zn の測定 試料に 5 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズした. そのホモジネート 0.5 ml に等量の濃塩酸を加えて 1 週間放置したのち, 4.0 ml の蒸留水を加えてから 3000 rpm で 5 分間遠心分離し, その上清について日立 208 型原子吸光光度計で直接噴霧法によって Zn を測定して臓器中の Zn 濃度を算出した. 残りのホモジネートは $18000 \times g$ で 20 分間遠心分離し, その上清 0.5 ml を用いて, さきに報告した Cd 飽和-ヘモリゼート処理法によって臓器中の MT 濃度を定量した.^{12,13,19)}

結果

1. 肝臓中の MT 濃度と Zn 濃度

ヒトの肝臓中の MT 濃度と Zn 濃度を測定した (Table II).

非ガン部組織の MT 濃度は各々 538, 552 および 197 $\mu\text{g/g}$ と高い値を示した. また, Zn 濃度も 33.6—49.2

TABLE I. List of Patient

Age	Sex	Patient	Sample	
			Malignant	Non-malignant
52	Male	hepatoma	A	
		liver cirrhosis		a
57	Male	hepatoma	B	
		liver cirrhosis		b
54	Male	hepatoma	C	
		liver cirrhosis		— ^{a)}
59	Female	cholangioma		d

a) Not obtained.

TABLE II. Concentrations of Metallothionein and Zinc in Human Liver

Sample		Metallothionein ($\mu\text{g/g}$)	Zinc ($\mu\text{g/g}$)
Malignant	A	38.4	11.4
	B	38.4	9.6
	C	14.4	12.0
	Mean $\pm$ S.D.	30.4 ± 13.9	11.0 ± 1.3
Non-malignant	a	197	33.6
	b	538	49.2
	d	552	48.0

Fig. 1. Relationship between Zinc and Metallothionein Concentrations in Human Liver

● : malignant, ○ : non-malignant.
 $y = -129 + 13.1x$ ($r = 0.970$)

$\mu\text{g/g}$ と高い値を得た. これとは対照的に, ガン部組織の MT および Zn 濃度の平均と標準偏差は 30.4 ± 13.9 $\mu\text{g/g}$ および 11.0 ± 1.3 $\mu\text{g/g}$ であり, 明らかに非ガン部組織よりも低い値を示した.

2. 肝臓中の MT 濃度と Zn 濃度の相関性

金属で誘導された MT は結合金属として Zn を含んでおり、臓器中の Zn 濃度と MT 濃度には正の相関が見られる。^{14,15)} そこで、肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度について回帰分析と相関分析を行った (Fig. 1)。

肝臓中の Zn 濃度と MT 濃度の相関係数は 0.970 となり、有意な正の相関を示した ($p < 0.01$)。そこで肝臓中の MT 濃度を y ($\mu\text{g/g}$)、Zn 濃度を x ($\mu\text{g/g}$) として 1 次回帰式を求めると、 $y = -129 + 13.1x$ となった。

考 察

MT の実用的な定量法として Hg 飽和法、²⁰⁾ Cd 飽和法、²¹⁾ ポーログラフィー、²²⁾ HLC-AAS 法²³⁾ あるいはラジオイムノアッセイ^{17,18)}などが開発されている。生体中の MT 濃度は測定に用いた定量法によって差異はあるが、本実験で用いた Cd 飽和-ヘモリゼート処理法による成熟した正常のラット臓器中の MT 濃度は睾丸を除いて低く、いずれも $50 \mu\text{g/g}$ 以下である。¹⁴⁾ 肝臓中のガン部組織の MT 濃度の平均は $30.4 \mu\text{g/g}$ であった (Table II)。この値は正常ラット肝臓の値とほぼ同じである。同一患者のガン部組織と非ガン部組織を比較すると、たとえば試料 A の $38.4 \mu\text{g/g}$ と試料 a の $197 \mu\text{g/g}$ 、試料 B の $38.4 \mu\text{g/g}$ と試料 b の $538 \mu\text{g/g}$ のように、明らかにガン部組織では非ガン部組織よりも MT 濃度が低かった (Table II)。したがって、ガン部組織では MT 濃度が低下していることは明白である。

ガン化に伴ない MT 含量のみかけ上の低下が起こりうる機序として考えられるのは自然の、および抗ガン治療に伴うガン部の壊死であろう。しかし、今回の検体に関しては肉眼的、顕微鏡的所見とも壊死は認められなかった。したがってガン部組織での MT 濃度の低下は実験上、あるいは解釈上の誤りであるとは考えがたく、実際に低下が起こっていると考えられる。また、試料 a および b については背景として肝硬変を有しており、形態学的にも擬小葉像を認めるなど、非ガン部組織とはいえ正常肝ではない。したがって真の正常肝に比し、繊維化を起こし、コラーゲンなどの増加した分だけ重量当たりであれ、タンパク質量当たりであれ、MT の値は低くなっていると考えられる。それゆえ実際の正常組織とガン部組織との MT 濃度の差はさらに大きいものと推定される。

ヒト肝臓での Zn と MT 濃度との相関を検討して回帰式を算出したところ、両者には有意な正の相関が認められ、その回帰式は $y = -129 + 13.1x$ であった (Fig. 1)。この回帰係数はラットに Zn を投与して MT を誘導した場合¹⁴⁾の肝臓での値 14.6 とほぼ一致するので、Bühler

ら⁹⁾の報告のようにヒトの肝臓中の非ガン部組織には高濃度の Zn-thionein が存在すると推定される。また、ヒト肝臓中の Zn 濃度の変動は MT 濃度の変化と密接に関連していることをこの結果は示している。

ヒト肝臓中の Zn 濃度は病変によって変化することが知られている。肝臓ガンではその Zn 濃度は低下するが、試料 A、B および C の平均と標準偏差は $11.0 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ であったので、これまでの報告²⁴⁻²⁶⁾と一致する。また、試料 a および b は肝硬変患者の、d は正常者の範囲に入る。先に述べたように、臓器中の Zn 濃度と MT 濃度には強い正の相関があるので (Fig. 1)、Zn 濃度から MT 濃度を容易に推測することができる。ヒトの正常の肝臓中の Zn 濃度は 48, 76.6 または $78 \mu\text{g/g}$ と報告によって差があるが、²⁴⁻²⁶⁾これらを本実験で得た $y = -129 + 13.1x$ の回帰式に代入すると、肝臓中の MT 濃度はそれぞれ 500, 877 または $893 \mu\text{g/g}$ となる。いずれの値を採るにせよ、この結果はヒトの正常な肝臓では、MT 濃度は他の動物に比較するとはるかに高いこと、Zn の少くとも 50% 以上は MT に結合した型で存在すること、ガン化すると MT 濃度の低下に伴って Zn 濃度も減少することを暗示している。また MT は重金属による毒性の防禦、微量金属の代謝に関係しているので、毒性学上および栄養学上重要な位置を占めると考えられる。^{3,9)}他の動物と比較すると、ヒトの臓器中の Zn 濃度は高いので MT 濃度も高いと推定され、少くとも肝臓においてはそれを支持する結果を得た。故に、動物実験で得た重金属による毒性の発現、あるいは微量金属の栄養に関する結果をヒトに適用するには、特に臓器中の MT 濃度の種差を考慮する必要がある。

ラットの胎児あるいは新生児の肝臓中では MT 濃度が高く、成長するにしたがって、その濃度は減少するので、²⁷⁻²⁹⁾正常の成熟ラットの肝臓中の MT の定量は困難である。したがって、MT も胎児性タンパク質の 1 種であると考えられる。一般に胎児性タンパク質はガンになると増加すると考えられているので、³⁰⁾肝臓のガン部組織の MT 濃度も増加すると予測して実験を行った。予想に反して、ガン部組織の MT 濃度は非ガン部組織に比べると減少していた (Table I)。ガン化に伴い MT 濃度が激減する理由は不明であるが、MT の抗体がラジオイムノアッセイ^{17,18)}や細胞中の MT の局在部位の検討^{31,32)}に用いられていること、および肝臓中の MT は血液中に漏出して腎臓へ移行する場合があること³³⁾などを考え合えると、ガン化によって MT の漏出が起っている可能性があり、生体内の MT 濃度もひとつの腫瘍マーカーとしてガンの診断に利用できるかもしれない。

今回測定した検体は、いずれも胆ガン患者より得たものである。肉眼的、組織学的にガン組織、非ガン組織を判別しており、非ガン部組織中にガン病巣の存在しないことは確認しているものの、正常肝組織とは言い難い。事実3例中2例には肝硬変を伴っていた。しかし、ガン部組織との間にはMT濃度およびZn濃度のいずれ

に関しても極端な差を認めており、ガン化に伴い両者の濃度が減少することは明らかである。今後、例数を増やして、ヒトにおけるMTの役割を解明するとともに、ガンを始めとする各種疾患とMTとの関係についても検討したいと考えている。

引用文献および注

- 1) M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813 (1957).
- 2) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 3) J.H.R. Kägi, M. Nordberg (eds.), "Metallothionein," *Experientia Supplementum* 34, Birkhauser, Verlag, Basel, 1979.
- 4) J.M. Wiśniewska-Knypl, J. Jabłońska, Z. Myślak, *Arch. Toxicol.*, **28**, 46 (1971).
- 5) M. Sato, Y. Takizawa, *Toxicol. Lett.*, **11**, 269 (1982).
- 6) R.H.O. Bühler, J.H.R. Kägi, *FEBS Lett.*, **39**, 229 (1974).
- 7) J.R. Riordon, V. Richards, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5380 (1980).
- 8) M.M. Kissling, J.H.R. Kägi, *FEBS Lett.*, **82**, 247 (1977).
- 9) E.C. Foulkes (ed.), "Biological Roles of Metallothionein," Elsevier North-Holland, New York, 1982.
- 10) A.O. Udom, F.O. Brady, *Biochem. J.*, **187**, 329 (1980).
- 11) 白石則之, 森本節夫, 上者郁夫, 飯田莊介, 青野 要, 内海耕造, 医学のあゆみ, **126**, 245 (1983).
- 12) 小野坂敏見, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男, 衛生化学, **24**, 128 (1978).
- 13) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).
- 14) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **23**, 11 (1982).
- 15) 小野坂敏見, 吉屋祥子, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 221 (1983).
- 16) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 407 (1983).
- 17) C.C. Chang, R.J. Vander Mallie, J.S. Garvey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 94 (1980).
- 18) C. Tohyama, Z.A. Shaikh, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 1 (1981).
- 19) MTは1モルあたり6—7モルの金属を結合しているとされているが、ここでは前報(引用文献12)にしたがい、6モルと仮定した。そこでCd-thioneinの分子量は6720としてMT量を算出した。
- 20) A.J. Zelazowski, J.K. Piotrowski, *Acta Biochim. Pol.*, **24**, 97 (1977).
- 21) R.W. Chen, H.E. Ganther, *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 378 (1977).
- 22) P.F. Kehr, Thesis, Purdue University, 1973.
- 23) K.T. Suzuki, *Anal. Biochem.*, **102**, 31 (1980).
- 24) K.B. Olson, G.E. Heggen, C.F. Edwards, *Cancer*, **11**, 554 (1958).
- 25) 荒地秀明, 奈医誌, **23**, 195 (1972).
- 26) M.C. Kew, R.C. Mallett, *Br. J. Cancer*, **29**, 80 (1974).
- 27) F.O. Brady, M. Webb, R. Mason, "Biological Roles of Metallothionein," ed. by J.H.R. Kägi and M. Nordberg, Elsevier North-Holland, New-York, 1982, pp. 77—98.
- 28) K.-L. Wong, C.D. Klaassen, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12339 (1979).
- 29) M. Panemangalore, D. Banerjee, S. Onosaka, M.G. Cherian, *Dev. Biol.*, **97**, 95 (1983).
- 30) ユーリ S. タタリノフ (塚田 裕訳), 生化学, **55**, 104 (1983).
- 31) K.G. Danielson, S. Ohi, P.C. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 2301 (1982).
- 32) D. Banerjee, S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **24**, 95 (1982).
- 33) K. Tanaka, H. Nomura, S. Onosaka, K.-S. Min, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 535 (1981).