

エンドトキシンによる培養肝細胞内 メタロチオネインの誘導機序に関する研究

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (指導: 小坂二度見教授)

高 橋 徹

(昭和62年3月25日受稿)

Key words: メタロチオネイン
エンドトキシン
マクロファージ
Chang liver cells

緒 言

Metallothionein (以下 MT と略) は1957年, Margoshes と Vallee¹⁾ によってウマの腎皮質より発見された分子量約6000の蛋白質である。MT は, 約60個のアミノ酸のうち30%が cysteine であり, 6~7個の亜鉛を含む。その生理学的役割は, 重金属の解毒²⁾, 亜鉛の代謝²⁾, free radical scavenger³⁾ などが報告されている。in vitro において, 重金属や glucocorticoid は, MT の primary inducer⁴⁾ である。一方, in vivo においては, エンドトキシン (lipopolysaccharide; 以下 LPS と略) 投与⁵⁾, 四塩化炭素投与⁶⁾, アルキル化剤投与⁷⁾, 熱傷⁶⁾, 放射線照射⁸⁾ 等のストレスによって肝臓内に MT が合成される。

感染の際には, 血清中の亜鉛は急激に減少する⁹⁾。また動物に LPS を投与すると血清亜鉛の減少と肝内亜鉛の増加がみられる^{9,10)}。著者らは, この亜鉛の再分配が, 肝内 MT の増加によるものと考え, 培養細胞を用いて LPS による MT 誘導の機序を追求してきた。しかし, LPS を単独で培地に加えても, 培養細胞内に MT を誘導することはできなかった¹⁰⁾。

今回, 著者は, LPS による培養肝細胞内の MT 誘導が, LPS によって刺激されたマクロフ

ージより放出される物質によって引き起こされるという結果を得たので報告する。また, この物質による MT の誘導と, MT の primary inducer である亜鉛, dexamethasone による MT の誘導様式を比較検討した。

材 料 と 方 法

材 料

ラットは, Wistar 系雄性ラット (体重250g-300g) を使用した。ヒト培養肝細胞として用いた Chang liver cell は, 小出典男博士より提供を受けた。 [³⁵S]-cysteine (1 × 10⁴ Ci/mmole) は New England Nuclear (Boston, Massachusetts) より購入した。Eagle's minimum essential medium は日本製薬製, 牛胎児血清 (fetal calf serum) は Gibco Laboratories (Grand Island, NY) 製を使用した。試薬はすべて特級を使用した。試薬を溶解する水はすべて蒸留水を用いた。LPS は Difco Laboratories (Detroit, MI) 製, *E. coli* 0127 : B8 を用いた。casein sodium および trypsin は和光純薬工業製を使用した。ラテックス粒子 (1.09 μm) は積水化学製を用いた。ethylene diamine tetraacetate disodium (以下 EDTA と略) は同仁化学製を用いた。ZnCl₂ は 0.005 M HCl に, dexamethasone は 99.5% ethanol 溶液に溶解して使用し

た。両者とも、半井化学薬品より購入した。acrylamide (電気泳動用) は第一化学薬品より、N,N'-methylenebisacrylamide (電気泳動用), sodium dodesyl sulfate (以下 SDS と略) および 2-mercaptoethanol は半井化学薬品より、また、N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) は Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) より購入した。dl-dithiothreitol は Sigma (St. Louis, MO) 製、iodoacetic acid は Merck (Darmstadt, West Germany) 製を用いた。オートラジオグラフィ用増感液は EN³HANCE[®] 溶液 (New England Nuclear, Boston, MA) を使用した。オートラジオグラフィ用 X 線フィルムは Kodak X-omat AR フィルム (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) を、現像液は Kodak GBX developer, 定着液は Kodak rapid fixer を用いた。培養プレートは、Nunc (Roskilde, Denmark) 製の 90 mm (培地量 10ml), 60mm (培地量 4ml) および 35 mm (培地量 2 ml) プレートをを使用した。異物濾過フィルターは、0.2 μ m ミリポアフィルター (Millex-PF, Millipore Corp., Bedford, MA) をを使用した。

炭酸ガス培養器は三洋電機特機製 MCO-165 型、原子吸光度計は島津製作所製 AA-640-12 型、デンストメーターは Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) 製 Model 1650 を使用した。

方法

1) 細胞の培養

培地にはウシ胎児血清 10% を含む Eagle's minimum essential medium (以下 FCS-MEM と略) を使用した。以下に述べるすべての細胞培養は、95% 空気 - 5% CO₂, 37°C の炭酸ガス培養器を用いて行った。継代培養には 90 mm プレートを、1 \times 10⁶ 個に増殖する毎に植えついで。実験に際しては 60 mm プレートまたは 35 mm プレートに細胞を接種し、培地 (FCS-MEM) 1 ml あたり 1 \times 10⁵ 個に増殖したところで実験を開始した。細胞の収穫には、Ca²⁺, Mg²⁺ free-phosphate buffered saline (以下 PBS(-) と略) に 0.1% trypsin, 0.02% EDTA を溶解した溶液を使用した。

2) マクロファージ因子の調製

マクロファージは、吉永ら¹¹⁾の方法に準じて調製した。PBS(-) に溶解した 2% カゼイン溶液 10 ml (オートクレーブ滅菌済) をラットの腹腔内に注射、72 時間後に開腹し、PBS(-) 20 ml で腹腔浸出細胞浮遊液を採取した。この細胞浮遊液を 500 \times g, 5 分間遠心し、細胞を得た。混在する赤血球は 0.2% NaCl で 30 秒処理し、溶血した後、同量の 1.6% NaCl を加え等張とした。この後、細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、FCS-MEM で 3 \times 10⁶ 個/ml に調整し、90 mm プレートで一時間培養した。振盪後、プレートから上清を除き、PBS(-) で 3 回洗浄し、吸着細胞をマクロファージとした。なお、マクロファージの純度検定は、ラテックス粒子を貪食させ、ギムザ染色で 95% 以上であることを確認した。

マクロファージが吸着したプレートに LPS 100 μ g/ml を含む FCS-MEM を加え、24 時間培養した。培養上清をミリポアフィルターにて濾過し、濾液をマクロファージ因子 (M ϕ +LPS) とした。また LPS を加えず、マクロファージのみで 24 時間培養した上清も同様に濾過し、その濾液をマクロファージ単独培養上清 (M ϕ -LPS) とした。

MT は、重金属によって誘導を受けるので、各培地中の、亜鉛、銅、カドミウムの濃度を直接原子吸光分析法によって測定した。

3) マクロファージ因子による MT 誘導実験

Chang liver cell を 60 mm プレートに接種し、FCS-MEM によって培養した。細胞が 4 \times 10⁵ 個/プレートに達したときに、プレートから培地を除き、マクロファージ因子 (M ϕ +LPS) 3 ml, FCS-MEM 1 ml および 5 μ Ci の [³⁵S]-cysteine を加え、培養した。別に、マクロファージ単独培養上清 (M ϕ -LPS) 3 ml に FCS-MEM 1 ml を加えたプレート、FCS-MEM 4 ml のみを加えたプレート (対照)、LPS 単独添加プレート (FCS-MEM 4 ml, LPS 100 μ g/ml) プレート、亜鉛添加プレート (FCS-MEM 4 ml, 0.01 M ZnCl₂ 40 μ l, 培地の亜鉛終濃度 100 μ M) プレートを作製し、各プレートに 5 μ Ci ずつの [³⁵S]-cysteine を加え、培養した。18 時間後、これらのプレートの細胞を収穫した。

4) マクロファージ因子の濃度による MT 誘導

Chang liver cell を 35 mm プレートに接種し、FCS-MEM によって培養した。細胞が 2×10^5 個/プレートに達したときに、プレートから培地を除き、新たにマクロファージ因子をそれぞれ 0 ml (総培地の 0%), 0.4 ml (20%), 0.6 ml (30%), 0.8 ml (40%), 1.2 ml (60%) および 1.6 ml (80%) を各プレートに分注した。同時に $4 \mu\text{Ci}$ の [^{35}S]-cysteine と共に各プレートの培地量が総量 2 ml になるように FCS-MEM を加えた。18 時間後に細胞を収穫した。マクロファージ因子の各濃度についてプレートはそれぞれ 3 枚ずつ使用した。

5) マクロファージ因子による MT 誘導の経時的変化

Chang liver cell を 35 mm プレートに接種し、FCS-MEM によって培養した。細胞が 2×10^5 個/プレートに達したときに、プレートから培地を除き、新たに、マクロファージ因子 1.5 ml、FCS-MEM 0.5 ml 及び $4 \mu\text{Ci}$ の [^{35}S]-cysteine を加えた。試料添加後、3 時間、6 時間、12 時間、16 時間、20 時間、24 時間の各時間に細胞を収穫した。各収穫時間についてプレートはそれぞれ 3 枚ずつ使用した。

6) 亜鉛および dexamethasone の濃度による MT 誘導

Chang liver cell を 35 mm プレートに接種し、FCS-MEM によって培養した。細胞が 2×10^5 個/プレートに達したときに、プレートから培地を除き、新たに $4 \mu\text{Ci}$ の [^{35}S]-cysteine を含む FCS-MEM 2 ml を加えた。培地中の亜鉛終濃度が、それぞれ $0 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ および $120 \mu\text{M}$ になるように、 0.01 M ZnCl_2 を加えた。同様に、培地中の dexamethasone 終濃度が、それぞれ $0 \mu\text{M}$, $0.001 \mu\text{M}$, $0.005 \mu\text{M}$, $0.01 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ および $1 \mu\text{M}$ になるように ethanol に溶解した dexamethasone を加えた。ethanol の培地中の最終濃度は 0.5% を越えないよう調整した。両者は、18 時間後に細胞を収穫した。亜鉛の場合も dexamethasone の場合も、各濃度についてプレートは 3 枚ずつ使用した。

7) 亜鉛および dexamethasone による MT 誘

導の経時的変化

Chang liver cell を 35 mm プレートに接種し、FCS-MEM によって培養した。細胞が 2×10^5 個/プレートに達したときに、プレートから培地を除き、新たに $4 \mu\text{Ci}$ の [^{35}S]-cysteine を含む FCS-MEM 2 ml を加えた。同時に、 $20 \mu\text{l}$ の 0.01 M ZnCl_2 (培地の亜鉛終濃度 $100 \mu\text{M}$) または $20 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{M}$ dexamethasone (培地の dexamethasone 終濃度 $0.1 \mu\text{M}$) を加えた。試料添加後、3 時間、6 時間、12 時間、16 時間、20 時間、24 時間の各時間に細胞を収穫した。各収穫時間についてプレートはそれぞれ 3 枚ずつ使用した。

8) 細胞質蛋白上清の調製

収穫した Chang liver cell の細胞浮遊液は $500 \times g$, 5 分間遠心した。上清を吸引除去し、沈澱した細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) $200 \mu\text{l}$ に懸濁した。この懸濁液を、 -70°C による凍結、融解 2 回、超音波処理 90 秒を行い、 15000 rpm , 3 分遠心し、細胞質蛋白上清を得た。

9) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動-フルオログラフィー (SDS-PAGE-Fluorography) による MT の定量

MT の定量は、Andersen と Weser¹²⁾ および小泉ら¹³⁾ の方法に従った。

上清蛋白質溶液 $50 \mu\text{l}$ に、8% SDS と 50% glycerol を含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) $25 \mu\text{l}$, 0.2 M dithiothreitol $10 \mu\text{l}$ を加え、5 分間煮沸後、冷却した。この溶液に、 1 M iodoacetic acid (pH 8.0, 1 M NaOH 溶液に溶解) $15 \mu\text{l}$ を加えて、 50°C で 15 分間反応させ、cysteine 残基の SH 基をカルボキシメチル化した。このカルボキシメチル化蛋白質溶液に 0.2% bromophenol blue 溶液 $10 \mu\text{l}$ を加え、電気泳動用試料とした。

Laemmli¹⁴⁾ の方法に従い、0.1% SDS-15% ポリアクリルアミドスラブゲル (1.5 mm 厚、分離ゲル長 10 cm) を作成した。1 試料あたり $70 \mu\text{l}$ をゲルにかけた。20 V で 2 時間泳動後、45 V で 12 時間泳動した。泳動後のゲルは 10% trichloroacetic acid/10% acetic acid/30% methanol 溶液で 1 時間固定し、水洗後、オートラジオグ

ラフィー用増感液に1時間、浸透させた。ゲルは、水洗、乾燥後、オートラジオグラフィー用X線フィルムに密着し、 -70°C で感光させた。一週間後、フィルムを現像してフルオログラムを作成した。フルオログラムは、各試料ごとにデンストメーター(透過光:波長600 nm, スリット幅 $0.2\text{ mm} \times 4\text{ mm}$)を用いて linear scanを行った。MTの濃度は、各々の試料について、全濃度に対するMTバンドの割合によって表示した。

結 果

1) SDS-PAGE-Fluorography による MT 誘導の解析

フルオログラフィーの結果を図1に、デンストメーターの結果を図1脚注に示す。MTの主要

構成アミノ酸である cysteine は、カルボキシメチル化によってマイナスの荷電を付加され、電気泳動によって、他のタンパク質から大きく分離できる^{12,13}。矢印に示す、速く移動しているバンドがMTである。マクロファージ因子(M ϕ +LPS)によるMT誘導は、対照(FCS-MEM)の約3倍、 $100\text{ }\mu\text{M}$ 亜鉛添加の約70%であった。一方、マクロファージ単独培養上清(M ϕ -LPS), LPS $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 添加におけるMT誘導は、対照(FCS-MEM)のそれぞれ1.3倍、0.9倍であった。

培地中の金属濃度を表1に示す。マクロファージ因子(M ϕ +LPS)およびマクロファージ単独培養上清(M ϕ -LPS)中の亜鉛、銅、カドミウムの濃度は、何れも対照(FCS-MEM)と同レベルであった。

2) マクロファージ因子の濃度による MT 誘導

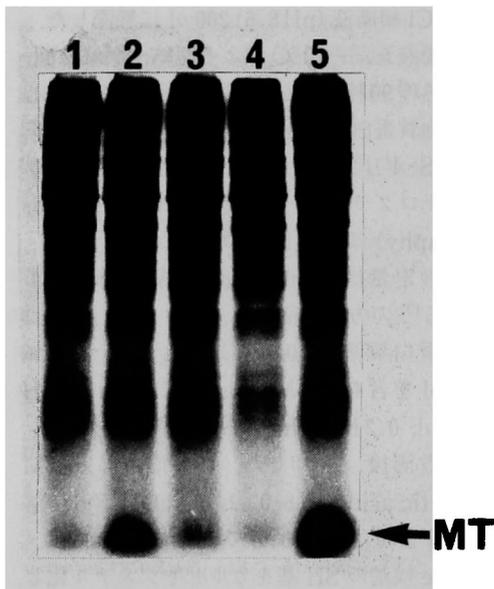


Fig. 1 Electrophoretic analysis of carboxymethylated [^{35}S]cysteine-labeled cytosol proteins from Chang liver cells.

Chang liver cells (4×10^4 cells/plate) were labeled with $5\text{ }\mu\text{Ci}$ of [^{35}S]cysteine for 18h in (1) control medium, (2) medium from M ϕ +LPS, (3) medium from M ϕ -LPS, (4) control medium + LPS $100\text{ }\mu\text{g/ml}$, and (5) control medium + $100\text{ }\mu\text{M}$ ZnCl₂. The Chang cell extracts were carboxymethylated and subjected to electrophoresis on 15% polyacrylamide-0.1% SDS slab gels. Fluorography and densitometry was carried out as described in Materials and Methods. The arrow indicates carboxymethylated metallothionein. The relative density of MT band: lane 1: 2.9; lane 2: 8.3; lane 3: 3.7; lane 4: 2.6; lane 5: 12:

Table 1 Metal concentrations of the medium (μM)^a

Metal	M ϕ +LPS ^b	M ϕ -LPS ^c	FCS-MEM ^d
Zn	4.42 ± 0.11	4.49 ± 0.16	4.81 ± 0.40
Cu	0.65 ± 0.13	0.59 ± 0.22	0.65 ± 0.15
Cd	N.D.	N.D.	N.D.

a Each value represents the mean \pm S.D. of at least three experiments.

b Macrophages were incubated in FCS-MEM with lipopolysaccharide ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) for 24 h.

c Macrophages were incubated in FCS-MEM without lipopolysaccharide for 24 h.

d MEM containing 10% FCS.

N.D.: not detectable.

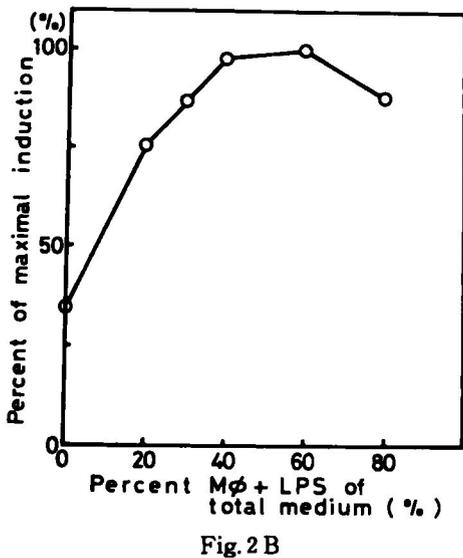
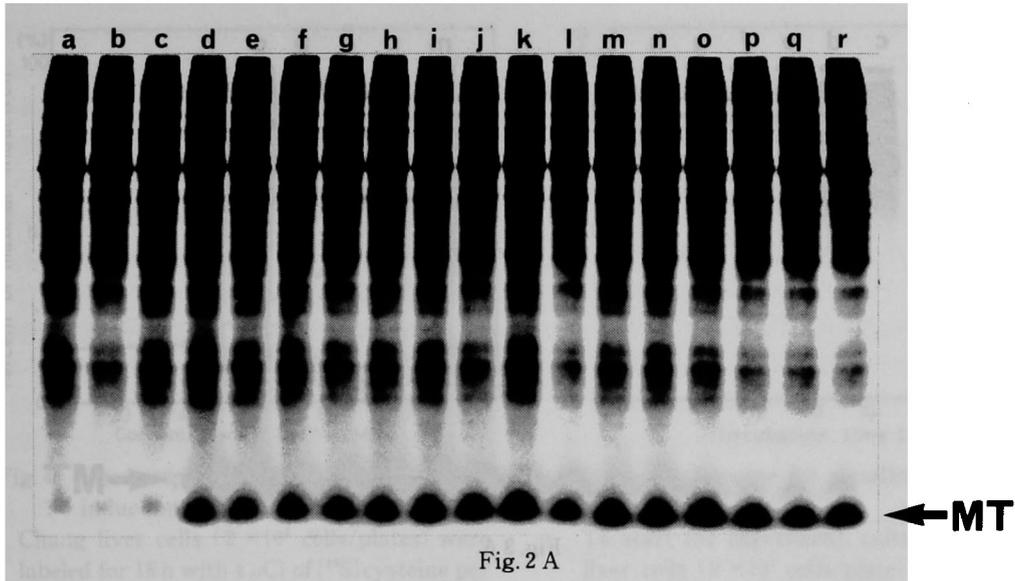


Fig. 2 Dose-response analysis for metallothionein (MT) induction by Mφ+LPS.

Chang liver cells (2×10^6 cells/plate) were labeled for 18h with $4\mu\text{Ci}$ of [^{35}S]cysteine per plate in the presence of Mφ+LPS at various percent of total medium. At the end of labeling period, cells were harvested and cell extracts were carboxymethylated and analysed by SDS-PAGE and fluorography. See details in Materials and Methods.

A) A fluorogram for MT induction by Mφ+LPS. Mφ+LPS percent of total medium: lane (a, b, c); 0: lane (d, e, f); 20%: lane (g, h, i); 30%: lane (j, k, l); 40%: lane (m, n, o); 60%: lane (p, q, r); 80%: lane (r). The arrow indicates MT band.

B) Dose-response for MT induction by Mφ+LPS. Relative density of MT band in each lane was analysed by densitometry. The densities averaged over the triplicate data were expressed as percent of the maximal induction.

マクロファージ因子の濃度によるMT誘導の結果を図2Aのフルオログラムに示す。図2Bは、図2Aをデンストメーターで分析し、最も強い誘導に対する百分率で表示した。MT誘導は、マクロファージ因子の濃度が上がるにしたがって増加し、全培地量の60%の濃度で対照の約3倍の誘導がみられた。マクロファージ因子が全培地量の80%の濃度ではMT誘導は最高値の88%とやや抑制された。

3) マクロファージ因子によるMT誘導の経時

的变化

図3Aはマクロファージ因子によるMT誘導の経時的变化を表すフルオログラムである。また、図3Bは、フルオログラムの分析結果を示す。マクロファージ因子によるMTの誘導は、培養時間が長くなるにしたがい増加し、20時間後には3時間後の約3倍に増加した。24時間後では20時間後の約92%とやや抑制された。

4) 亜鉛および dexamethasone の濃度によるMT誘導

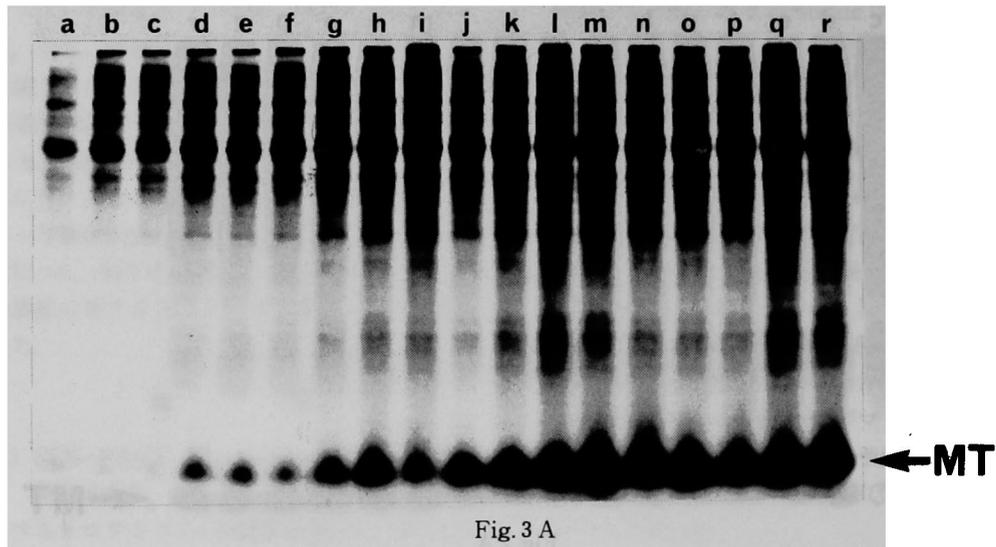


Fig. 3 A

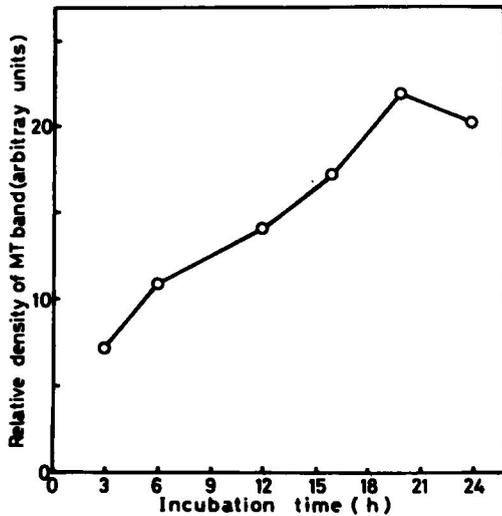


Fig. 3 B

Fig. 3 Time dependence of metallothionein (MT) induction by $M\phi$ +LPS.

To start the experiment, cultures of Chang cells (2×10^6 cells/plate) were supplemented with fresh medium containing 3 ml of $M\phi$ +LPS, 1 ml of FCS-MEM and $5 \mu\text{Ci}$ of [^{35}S]cysteine. The cells were harvested at the indicated time points, and cell extracts were carboxy-methylated and analysed by SDS-PAGE and fluorography. See details in Materials and Methods.

A) A fluorogram for time course of MT induction by $M\phi$ +LPS. Sampling time: lane (a, b, c): 3 h; lane (d, e, f): 6 h; lane (g, h, i): 12 h; lane (j, k, l): 16 h; lane (m, n, o): 20 h; lane (p, q, r): 24 h. The arrow indicates MT band.

B) Time course for MT induction by $M\phi$ +LPS. Relative density of MT band in each lane was analysed by densitometry. Each data is the average of three plates.

図4に示すように、亜鉛によるMTの誘導は、 $40 \mu\text{M}$ よりみられ、濃度が上がると共に増加し、 $120 \mu\text{M}$ では、対照(FCS-MEM)の約7倍の誘導がみられた。しかし、 $150 \mu\text{M}$ では、細胞は死滅した。

図5に示すように、dexamethasoneによるMTの誘導は、 $0.005 \mu\text{M}$ よりみられ、 $1 \mu\text{M}$ まで増加し続け、 $1 \mu\text{M}$ では対照の約4倍の誘導がみられた。亜鉛の場合も、dexamethasoneの

場合も、MTの誘導は、最も強い誘導に対する百分率によって表示した。

5) 亜鉛およびdexamethasoneによるMT誘導の経時的変化

亜鉛によるMT誘導の経時的変化を図6に示す。MT誘導は6時間後、12時間後と増加し、16時間後には3時間後の約2.5倍の誘導がみられた。20時間後には16時間後の93%、24時間後では87%と抑制された。

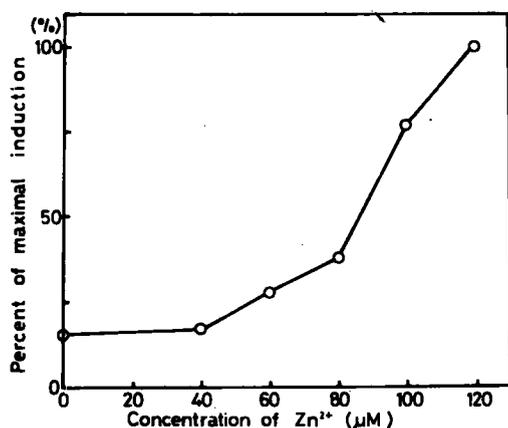


Fig. 4 Dose-response for metallothionein (MT) induction by Zn²⁺.

Chang liver cells (2×10^5 cells/plates) were labeled for 18 h with 4 μ Ci of [³⁵S]cysteine per plate in the presence of different concentrations of Zn²⁺. At the end of labeling period, the cells were harvested and treated as described in Materials and Methods. The averaged densities (triplicate) from fluorogram were expressed as percent of maximal induction.

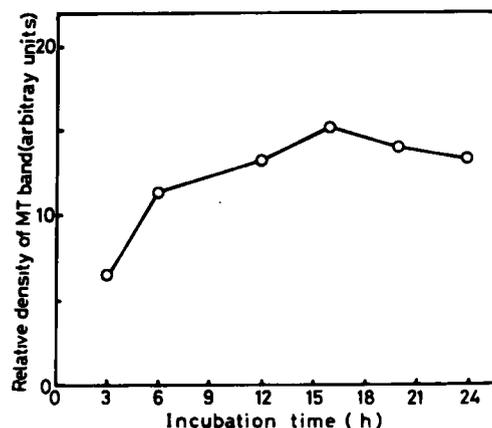


Fig. 6 Time course for metallothionein (MT) induction by Zn²⁺.

To start the experiment, cultures of Chang liver cells (2×10^5 cells/plate) were supplemented with fresh FCS-MEM containing 100 μ M Zn²⁺ and 4 μ Ci of [³⁵S]cysteine. The cells were harvested at the indicated time points, and treated as described in Materials and Methods. The value of each time point is the average of three plates.

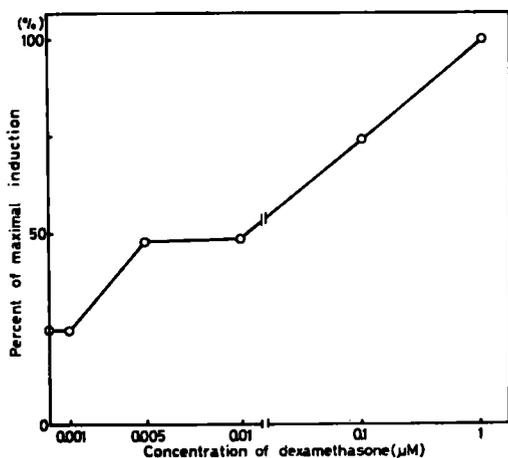


Fig. 5 Dose-response for metallothionein (MT) induction by dexamethasone.

Chang liver cells (2×10^5 cells/plate) were labeled for 18 h with 4 μ Ci of [³⁵S]cysteine per plate in the presence of different concentrations of dexamethasone. At the end of labeling period, the cells were harvested and treated as described in Materials and Methods. The averaged densities (triplicate) from fluorogram were expressed as percent of maximal induction.

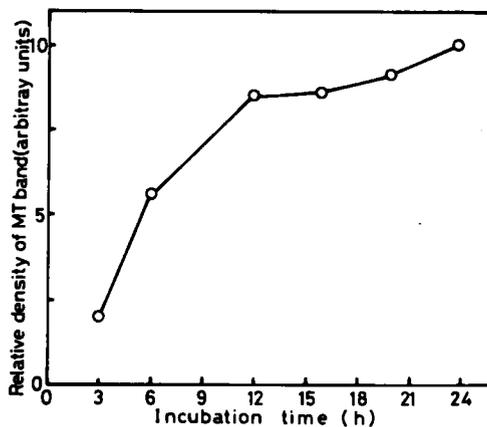


Fig. 7 Time course for metallothionein (MT) induction by dexamethasone.

To start the experiment, cultures of Chang liver cells (2×10^5 cells/plate) were supplemented with fresh FCS-MEM containing 0.1 μ M dexamethasone and 4 μ Ci of [³⁵S]cysteine. At the indicated time points, the cells were harvested and treated as described in Materials and Methods. The value of each time point is the average of three plates.

dexamethasone による MT 誘導の経時的変化を図 7 に示す。MT 誘導は 6 時間後、12 時間後と増加し、12 時間後には 3 時間後の約 4.3 倍に増加した。16 時間後、20 時間後、24 時間後には、MT 誘導は、12 時間後の各々、101%、107%、117%、と若干増加した。

考 察

ヒトの血清亜鉛濃度は、正常時には、極めて一定に保たれている (約 $1 \mu\text{g/ml}$) が、細菌感染の際には血清中の亜鉛は、急激に減少する⁹⁾。著者らは、以前から、重症感染症やエンドトキシシンショックにおける亜鉛代謝に注目し、ラットに LPS を投与すると、血清亜鉛が急激に減少し、肝、腎、肺の組織中亜鉛が急激に増加することを報告した¹⁰⁾。しかし、感染症において、血清亜鉛が組織へ再分配されることに関する病態生理学的意義や、臨床的意義はいまだ明らかではない。

著者らは、この亜鉛再分配が、組織中の亜鉛結合蛋白 (特に MT) の増加によるものと考え、LPS による MT 誘導の機序を追求してきた。MT は glucocorticoid によって誘導を受けるので、LPS 投与のようなストレス下では、ストレスによる血中 glucocorticoid の増加によっても肝 MT は増加する。しかし、Durnam ら¹⁵⁾ は、transgenic mouse を用いて LPS による MT の誘導が、glucocorticoid を介さないことを報告し、未知の mediator の存在を示唆した。

Chang liver cell を用いて得られた今回の結果では、図 1 に示すように、LPS で刺激したマクロファージ培養上清 (マクロファージ因子) を加えた場合のみ、MT が誘導された。また、表 1 に示すように、マクロファージ培養上清の金属濃度は対照 (FCS-MEM) と同レベルであったことから、LPS によってマクロファージが金属を遊離したとは考えられない。従って、LPS によって刺激されたマクロファージから遊離される液性因子が MT の合成に関与していると考えられる。また、ラットマクロファージ由来因子によって、ヒト培養肝細胞に MT が誘導されることから、このマクロファージ因子は種特異性を持たないと思われる。

マクロファージ因子が MT 誘導に及ぼす効果は、マクロファージ因子の割合が、全培地の 60% になるまで増加し、全培地の 80% では、最高値の 88% に抑制された (図 2)。80% の濃度でやや抑制がみられたことは、プレートに加える新鮮な培地の量が減少したことにより、MT の合成に用いられるアミノ酸の量が減少したことによると思われる。

マクロファージ因子による MT 誘導は、20 時間まで増加がみられた (図 3)。この結果は、阿部らの *in vivo* における報告¹⁰⁾ で、ラット肝 MT が 18 時間まで、増加し続けるという結果と類似している。

Karin ら^{4,16,17)} は、HeLa cell を用いて、亜鉛および dexamethasone による MT の誘導を検討している。

亜鉛の濃度による MT の誘導は、Chang liver cell では、 $40 \mu\text{M}$ – $120 \mu\text{M}$ と極めて狭い範囲でしか認められなかった。 $150 \mu\text{M}$ 亜鉛では、細胞は死滅したが、これは、亜鉛の細胞毒によると考えられる。これらの結果は、Karin らの報告⁴⁾ とほぼ一致している。一方、dexamethasone の濃度による MT の誘導は、Chang liver cell では $1 \mu\text{M}$ まで増加し続けているのに対し、HeLa cell¹⁶⁾ では、 $0.01 \mu\text{M}$ で既にプラトーに達している。この相違を生ずる理由の一つは、Chang liver cell と HeLa cell の、glucocorticoid に対するレセプター数の違いによるものと思われる。

亜鉛による MT 誘導の経時的変化は、Chang liver cell では 16 時間後まで増加し続けた。また、24 時間後ではやや抑制されたが、16 時間後の 87% であった。しかし、HeLa cell¹⁷⁾ では、6 時間後まで増加したが、以後次第に減少し、24 時間後では、6 時間後の 60% となっている。一方、dexamethasone による MT 誘導の経時的変化は、Chang liver cell では、12 時間まで急激に増加し、以後 24 時間後まで徐々に増加し続けた。しかし、HeLa cell¹⁷⁾ では、6 時間以後プラトーに達している。著者と Karin らの結果における相違は、以下の理由によると考えられる。著者の実験結果は、ある時間におけるまでの MT の合成と分解の総和である。一方、

Karinらの結果は、各時間で培養細胞を同位元素でパルスラベルすることによって得られた結果であるので、その時点におけるMTの合成速度を表すためである。

マクロファージ因子によるMTの誘導は、濃度効果および経時的变化の何れにおいても亜鉛、dexamethasoneとそのパターンが異なっている。従って、マクロファージ因子は、重金属あるいはglucocorticoidに加えて、MT誘導における第3の制御因子であることを示唆している。

最近、Karinら¹⁸⁾は、市販のinterleukin-1(以下IL-1と略)が、ヒト培養細胞内にMTを誘導するという事実を報告した。マクロファージがLPSによって刺激されるとマクロファージから種々の物質が放出される¹⁹⁾。IL-1もその1つであるが、著者らの実験²⁰⁾では、IL-1によって、Chang liver cell内にMTは誘導されなかった。急性炎症時やエンドトキシンショック時には、肝で急性期蛋白(acute phase protein)が合成される²¹⁾。この急性期蛋白は、IL-1によって誘導される²¹⁾。しかし、急性期蛋白のうちで、C reactive proteinの誘導は、IL-1に加えて補助因子を必要とする²²⁾。また、LPSによって刺激されたマクロファージが放出する物質のひとつであるhepatocyte-stimulating factorは、肝細胞に作用し、 α_2 -macroglobulin, α_1 -antichymotrypsin, α_1 -acid glycoprotein, α_1 -cysteine proteinase inhibitor, haptoglobinおよびfibrinogenを合成するが、IL-1とは異なる液性因子であると報告されている^{23, 24)}。

MTは急性期蛋白に分類されていないが、急性炎症時に肝で早期に合成される蛋白である。従って、MTを誘導するマクロファージ因子について、IL-1, hepatocyte-stimulating factorとの異同に加え、その性状および補助因子の検討が必要である²⁵⁾。

Kellerら²⁶⁾は、LPSで刺激したKupffer cellが肝細胞の蛋白合成を抑制することを報告し、Kupffer cellが活性化されると肝を障害することを示した。またSankariとPekkanen²⁷⁾は、LPSを投与したラットで肝の過酸化脂質が増加することを示し、エンドトキシンショックにおける肝障害には、活性酸素が関わっていること

を示唆している。一方、ThornalleyとVašák³⁾は、electron spin resonanceを用いて、MTが、superoxide dismutaseと同程度か、あるいはそれ以上にsuperoxide anionやhydroxyl radicalのscavengerであることを示した。

以上より著者は、エンドトキシンショック時におけるMTの役割を次のように考える。エンドトキシンショック時には、細菌やLPSによって、マクロファージ²⁸⁾、Kupffer cell²⁹⁾および好中球³⁰⁾が活性化され、活性酸素が発生し、隣接した血管内皮細胞や肝細胞膜を障害する。しかし、同時に遊離された液性因子によって、肝細胞内に誘導されたMTが、活性酸素を除去すると思われる。従って、MTは、生体防御の一翼を担っていると考えられる。

結 語

- 1) LPSによるMTの誘導をChang liver cellの系を用いて検討した。その結果、MTはLPS単独では誘導されず、LPSを加えたマクロファージ培養上清(マクロファージ因子)によってのみ、Chang liver cell内に誘導された。また、マクロファージ培養上清中の金属濃度は対照(FCS-MEM)と同レベルであった。
- 2) MT誘導に及ぼすマクロファージ因子の濃度とその経時的变化を検討した。その結果、マクロファージ因子の濃度が全培地量の60%の濃度で最も強い誘導がみられた。また、培養20時間後に3時間後の約3倍の誘導がみられた。
- 3) MT誘導に及ぼす亜鉛、dexamethasoneの濃度とその経時的变化を検討した。その結果、マクロファージ因子によるMT誘導のパターンは、亜鉛およびdexamethasoneの濃度効果、経時的变化の何れとも異なっていた。このことは、マクロファージ因子がMT誘導の新たな制御因子であることを示している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始懇切なる、御指導、御校閲を賜りました岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室の小坂二度見教授に深謝致します。また、終始直接の

御指導と御鞭撻をいただいた板野義太郎助手並びに飯島義雄助手に謝意を表します。さらに、本研究の遂行にあたり、御助言と御協力を頂いた阿部晋也助手、山田輝夫助手並びに岡山大学医学部麻酔・蘇生

学教室の諸先生および、培養細胞を快く提供して下さいました岡山大学医学部附属病院中央検査部小出典男講師に心より御礼申し上げます。

文 献

1. Margoshes M and Vallee BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* (1957) **79**, 4813-4814.
2. Vallee BL: Metallothionein. Historical review and perspective; in *Metallothionein*, Kägi and Nordberg eds, Birkhauser Verlag, Basel (1979) pp 19-40.
3. Thornalley PJ and Vašák M: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* (1985) **827**, 36-44.
4. Karin M and Herschman HR: Induction of metallothionein in HeLa cells by dexamethasone and zinc. *Eur J Biochem* (1981) **113**, 267-272.
5. Sobocinski PZ, Canterbury WJ, Mapes CA and Dinterman RE: Involvement of hepatic metallothionein in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am J Physiol* (1978) **234**, E399-E406.
6. Oh SH, Deagen JT, Whanger PD and Wesig PH: Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol* (1978) **234**, E282-E285.
7. Kotsonis FN and Klaassen CD: Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicol Appl Pharmacol* (1979) **51**, 19-27.
8. Shiraishi N, Aono K and Utsumi K: Increased metallothionein content in rat liver induced by X irradiation and exposure to high oxygen content. *Rad Res* (1983) **95**, 298-302.
9. Baisel WR, Pekarek RS and Wannemacher Jr RW: Homeostatic mechanisms affecting plasma zinc levels in acute stress; in *Trace Elements in Human Health and Disease*, Prasad ed, Vol 1, Academic Press, New York (1976) pp 87-106.
10. Abe S, Matsumi M, Mizukawa S, Takahashi T, Iijima Y, Itano Y and Kosaka F: Metallothionein and zinc metabolism in endotoxin shock rats; in *Metallothionein II*, Kägi and Kojima eds, Birkhauser Verlag, Basel (1987) pp 587-594.
11. Yoshinaga M, Nakamura S and Hayashi H: Interaction between lymphocytes and inflammatory exudate cells. I. Enhancement of thymocyte response to PHA by product (s) of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J Immunol* (1975) **115**, 533-538.
12. Andersen RD and Weser U: Partial purification, characterization and translation in vitro of rat liver metallothionein messenger ribonucleic acid. *Biochem J* (1978) **175**, 841-852.
13. Koizumi S, Otaki N and Kimura M: Estimation of thionein synthesis in cultured cells by slab gel electrophoresis. *Indust Health* (1982) **20**, 101-108.
14. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680-685.
15. Durnam DM, Hoffman JS, Quaife CJ, Benditt EP, Chen HY, Brinster RL and Palmiter RD: Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81**, 1053-1056.

16. Karin M and Herschman HR: Glucocorticoid hormone receptor mediated induction of metallothionein synthesis in HeLa cells. *J Cell Physiol* (1980) **103**, 35–40.
17. Karin M, Slater EP and Herschman HR: Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by heavy metals and glucocorticoids. *J Cell Physiol* (1981) **106**, 63–74.
18. Karin M, Imbra RJ, Heguy A and Wong G: Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol Cell Biol* (1985) **5**, 2866–2869.
19. Nathan CF, Murray HW and Cohn ZA: The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* (1980) **303**, 622–626.
20. Takahashi T, Iijima Y, Matsumi M, Abe S, Itano Y and Kosaka F: Induction of metallothionein synthesis in cultured cells by substances released from endotoxin-activated macrophages. *Acta Med Okayama* (1987) **41**, 19–23.
21. Sipe JD: Interleukin 1 as a key factor in the acute-phase response; in *The Acute-Phase Response to Injury and Infection*, Gordon and Koj eds, Vol 10, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1985) pp 23–35.
22. Dinarello CA: Interleukin-1. *Rev Infect Dis* (1984) **6**, 51–95.
23. Bauer J, Tran-Thi T-A, Northoff H, Hirsch F, Schlayer H-J, Gerok W and Heinrich PC: The acute-phase induction of α_2 -macroglobulin in rat hepatocyte primary cultures. Action of a hepatocyte-stimulating factor, triiodothyronine and dexamethasone. *Eur J Cell Biol* (1986) **40**, 86–93.
24. Baumann H, Hill RE, Sauder DN and Jahreis GP: Regulation of major acute-phase plasma proteins by hepatocyte-stimulating factors of human squamous carcinoma cells. *J Cell Biol* (1986) **102**, 370–383.
25. Woloski BMRNJ and Fuller GM: Identification and partial characterization of hepatocyte-stimulating factor from leukemia cell lines. Comparison with interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 1443–1447.
26. Keller GA, West MA, Cerra FB and Simmons RL: Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin activated Kupffer cells. *Ann Surg* (1985) **201**, 87–95.
27. Sankari S and Pekkanen T: The Effect of endotoxin on the liver lipid peroxide level and on the liver and plasma zinc concentrations in rats as related to time after administration. *Acta Vet Scand* (1982) **23**, 24–29.
28. Johnston RB, Godzik CA and Cohn ZA: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* (1978) **148**, 115–127.
29. Allen RC: Free-radical production by reticuloendothelial cells; in *The Reticuloendothelial System. A Comprehensive Treatise*, Sbarra and Strauss eds, Vol 2, Plenum Press, New York (1980) pp 309–338.
30. Curnutte JT and Babior BM: Biological defence mechanisms. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest* (1974) **53**, 1662–1672.

**Induction of metallothionein synthesis in cultured cells by
endotoxin activated macrophages**

Tooru TAKAHASHI

Department of Anesthesiology and Resuscitology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. F. Kosaka)

In order to elucidate the mechanism of metallothionein (MT) induction by bacterial endotoxin during acute phase alteration, I investigated direct and indirect inducers of MT by measuring the induced uptake of [³⁵S] cysteine into cultured cells. Although zinc or dexamethasone induce MT directly when added to the culture medium of human hepatic (Chang) cells, endotoxin added to the culture medium was found to be ineffective in inducing MT synthesis. Since MT was induced during acute phase alteration, I focussed on the role of macrophages. I found that the conditional medium from endotoxin-activated macrophages ("M ϕ +LPS") induced MT synthesis in Chang cells, while the incubation medium of nonactivated macrophages did not. Primary induction by zinc, copper or cadmium in "M ϕ +LPS" was denied, because the concentrations of these metals in "M ϕ +LPS" were almost the same as in the control medium. To clarify the details of the process of MT induction, the kinetics of MT synthesis by "M ϕ +LPS" in Chang cells were studied and compared with the kinetics of MT synthesis by zinc and dexamethasone in Chang cells. "M ϕ +LPS" induces MT synthesis, proportionally to the concentration of "M ϕ +LPS", whereas zinc and dexamethasone induce MT sigmoidally and biphasically, respectively. On the other hand, the time course of MT induction by "M ϕ +LPS" is similar to that by zinc, but different from that by dexamethasone. I conclude that: 1. Macrophages activated by endotoxin release a new factor which induces MT synthesis in human hepatic cells. 2. The new factor is different from dexamethasone and zinc.