

エンドトキシンが体内亜鉛代謝に 及ぼす影響に関する実験的研究

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (指導: 小坂二度見教授)

松 三 昌 樹

(平成3年2月14日受稿)

Key words: エンドトキシン, 亜鉛, メタロチオネイン

緒 言

亜鉛は、生体にとって必須微量元素で、成人の体内には、1.4~2.3 g/70kg含まれている。亜鉛の機能としては、従来より、動物の成長、創傷治癒、生殖機能等が報告され¹⁾、DNA polymerase, RNA polymerase 等の亜鉛酵素の活性中心でもある¹⁾。

感染症、特にエンドトキシン血症においては、ヒトや動物の血清亜鉛は急激に低下する²⁾。また、従来から報告されていた作用以外に Chvafil らの一連の研究により、亜鉛は、膜安定化作用³⁾、脂質過酸化反応の抑制作用⁴⁾、多形核白血球⁵⁾・血小板諸機能への影響⁶⁾、補体系活性化の抑制作用⁷⁾など、生体防御に関する重要な生理作用が明らかにされてきた。しかし、エンドトキシンショックにおける亜鉛の動態、細胞内局在様式ならびにそれらの病態生理学的意義については、いまだ不明な点が多い。

亜鉛結合蛋白メタロチオネイン (以下 MT と略) は、in vivo においてエンドトキシン投与⁸⁾、熱傷⁹⁾、放射線照射¹⁰⁾等のストレスによって肝内に誘導される。MT は1957年、Margoshes と Vallee¹¹⁾によって発見され、分子量約6000、約60個の構成アミノ酸のうち約30%がシステインであり、芳香族アミノ酸やヒスチジンを含まないという特徴を有する¹²⁾。また、MT は、亜鉛チオネインとして、通常1分子中に6~7個の亜鉛原子を含んでいる¹²⁾。MT の生理学的役割として、亜鉛の代謝¹²⁾、free radical scavenger¹³⁾などが示唆されている。しかし、エンドトキシ

ンショック時に MT の果たす役割はいまだ明らかではない。

今回、エンドトキシンショック時に亜鉛の果たす役割を解明する第一歩として、エンドトキシン投与ラットにおける血清亜鉛および肝内亜鉛の動態について検討を加えた。特にいまだ、報告されていない肝細胞画分の亜鉛動態について詳細な検討を行なった。次に、亜鉛動態の変動に伴う MT の合成がエンドトキシンショックに果たす役割を追求するために、エンドトキシンによる肝内 MT 誘導を検討した。さらに、MT の primary inducer¹⁴⁾である亜鉛およびデキサメサゾンによる MT-I, MT-II (Iso-MTs) 誘導とエンドトキシンによる Iso-MTs 誘導を比較検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1) 実験動物

実験動物としては、体重180~220 gの雄性 Sprague-Dawley 系ラット (Charles-River Co.) を使用し、実験直前まで市販の固形飼料 (オリエンタル酵母社) と水を自由摂取させた。

2) 試 薬

Sephadex G-50は、Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden) より、DEAE Bio-Gel A は、BIO-RAD laboratories (Richmond Calif.) より、それぞれ購入した。エンドトキシンとして Lipopolysaccharide : E. coli : 0127 : B 8 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) を使用した。また、濃硝酸と塩酸 (有害金属測定用) は和光純薬製を使用した。

3) エンドトキシン投与

エンドトキシンを1 mg/mlの割合で生理食塩水に溶解し、5 mg/kgをラットの腹腔内に投与した(エンドトキシン投与群)。また、同量の生理食塩水を腹腔内投与したラットを対照群とした。なお、両群はそれぞれ6例ずつとした。エンドトキシンあるいは生理食塩水投与後は絶食とし、0、3、9、18時間後にケタミン麻酔下に開腹、腹部大動脈より血液を採取した。その後、氷冷生理食塩水により肝を灌流摘出した。

4) 血清、肝組織および肝細胞画分の亜鉛濃度の測定

a. 測定試料の調製

① 血清の調製

採取した血液から3000rpm、10分間の遠心によって血清を分離した。この血清を蒸留水で10倍に希釈し原子吸光分析用試料とした。

② 肝組織

肝を湿重量にして0.5 g採取し、120°C、3時間乾燥させたのち、乾燥重量を測定した。この試料に濃硝酸約3 mlを加え、加熱湿式分解を1時間行ない、その後0.05 N 塩酸で10mlに定溶し濾過した。さらに0.05 N 塩酸で10倍希釈し、原子吸光分析用試料とした。

③ 肝細胞画分の調製

湿重量10 gの肝に9倍容の0.25 M 蔗糖-10 mM-Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)を加えて、Potter-Elvehjem-homogenizerにて肝ホモジネートを調製し、以下の方法により肝細胞画分を行なった。すなわち、得られた肝ホモジネートを800 g、10分間遠心分離し、その上清を0.25 M -0.34 M 蔗糖-10mMTris-HCl 緩衝液上に重層して密度勾配遠心(1,000 g、10分間)を行なった。次に上清を7,000 g、15分間遠心分離し、得られた沈渣をミトコンドリア画分とした。さらに、その上清を100,000 g、60分間遠心分離を行ない、上清を可溶性画分、沈渣をマイクロゾーム画分とした。ミトコンドリアとマイクロゾームは、蒸留水で5 mlに定溶した。以上の操作はすべて4°Cで行なった。

これら各細胞画分1 mlにそれぞれ濃硝酸2 mlを加え、加熱湿式分解を1時間行ない、0.05 N 塩酸で5 mlに定溶後濾過し、原子吸光分析用試

料とした。また、各細胞画分の蛋白濃度を、Bradford法により測定した。

b. 亜鉛の定量

血清、肝組織、肝細胞画分(ミトコンドリア、マイクロゾーム、可溶性画分)の亜鉛含量は、それぞれ島津製原子吸光光度計(AA-640-12)を使用して、原子吸光法により測定した。なお、亜鉛標準液としては、原子吸光分析用亜鉛標準液(和光純薬)を0.05 N 塩酸で希釈したものを使用した。亜鉛濃度については、血清は $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 、肝組織は $\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量、肝細胞画分は $\mu\text{g}/100\text{mg}$ 蛋白でそれぞれ表わした。

5) メタロチオネイン(MT)の測定および分析

a. 肝細胞質可溶性画分の調製

湿重量10 gの肝に3倍容の0.25 M 蔗糖-10 mM-Tris-HCl 緩衝液(pH 8.6)を加え、Potter-Elvehjem-homogenizerにて肝ホモジネートを調製した。得られたホモジネートは、12,000 g 20分間の遠心分離を行ない、その上清をさらに100,000 g 60分間遠心することにより上清を得、これを細胞質可溶性画分とした。

b. ゲル濾過によるメタロチオネイン(MT)の分離定量

肝細胞質可溶性画分の一定量をSephadex G-50カラム($\phi 2.5\text{cm} \times 90\text{cm}$)に添加し、10mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.6)によって溶出し、溶出液を5 mlずつ試験管に分取した。各試験管の亜鉛濃度を原子吸光法により測定し、 V_e/V_o (相対移動度)1.7にMT画分を得た。MTの定量は、MT画分の総亜鉛量をカラムに添加した細胞質可溶性画分の総蛋白量で除し、ng 亜鉛/mg 蛋白で表した。

c. イオン交換クロマトグラフィーによるIso-MTsの分離

ゲル濾過により得られたメタロチオネイン画分をプールし、10mMTris-HCl 緩衝液(pH 8.6)で平衡化したイオン交換樹脂、DEAE Bio Gel Aカラム($\phi 2.5\text{cm} \times 35\text{cm}$)に添加した。このカラムを10mM -150mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.6)の緩衝液勾配にて溶出し、5 mlずつ試験管に分取した後、各試験管の亜鉛濃度を原子吸光法により測定した。

6) デキサメサゾンおよび亜鉛によって肝内に誘導された Iso-MTs の分析

亜鉛 (ZnSO₄) 5 mg/kgあるいはデキサメサゾン 2 mg/kgをラット腹腔内に投与し、18時間後に肝を摘出した。エンドトキシン投与ラットと同様に肝細胞質可溶性画分の一定量を Sephadex G-50カラム (φ2.5cm×90cm) に添加し、10 mMTris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) によって溶出、MT 分画を得た。この分画を DEAE Bio-Gel Aカラム (φ2.5cm×35cm) に添加し、10mM-150 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) の緩衝液勾配

にて溶出し、溶出液を 5 mlずつ試験管に分取し、各試験管の亜鉛濃度を原子吸光法により測定した。

7) 統計学的処理

各時間でエンドトキシン投与群と対照群の比較を、Student's t-test で行い、P<0.05を有意差ありとした。なお、すべての値は平均値±標準誤差で表わした。

結 果

1) 血清亜鉛濃度の経時の変化 (図1, 表1)

血清亜鉛濃度は、対照群では 3, 9, 18時間後に、それぞれ121.0±5.1μg/100ml, 132.4±5.6 μg/100ml, 102.0±7.2μg/100mlであったのに対

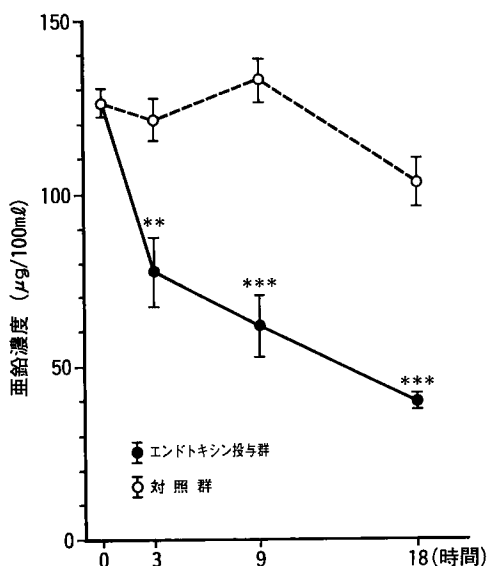


図1 血清亜鉛濃度の経時の変化
Mean±SE (n=6)
** P<0.01
*** P<0.001

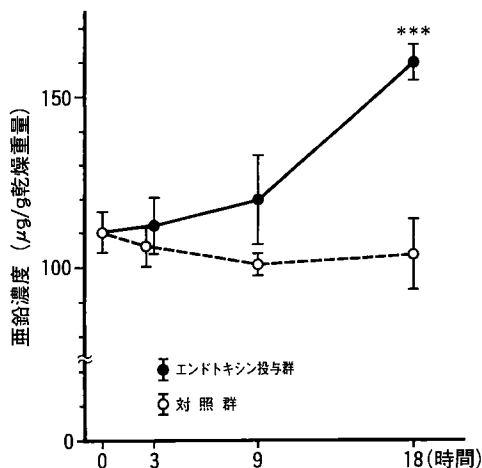


図2 肝内亜鉛濃度の経時の変化
Mean±SE (n=6)
*** P<0.001

表1 血清亜鉛濃度の経時の変化

群 \ 時間	0	3	9	18
エンドトキシン投与群	126.0±4.1	77.4±9.8	60.6±8.7	39.0±1.1
対照群		121.0±5.1	132.4±5.6	102.0±7.2

(単位 μg/100ml)
Mean±SE (n=6)
** p<0.01
*** p<0.001

表2 肝内亜鉛濃度の経時的变化

時 間 群	0	3	9	18
エンドトキシン 投 与 群	110.1±5.9	112.3±8.0	118.9±13.4	159.2±5.3
対 照 群		106.0±5.9	100.6±2.8	102.7±9.3

(単位 $\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量)
Mean±SE (n=6)
***p<0.001

表3 肝細胞画分亜鉛濃度の経時的变化

(a) ミトコンドリア

時 間 群	0	3	9	18
エンドトキシン 投 与 群	28.5±7.0	24.0±5.4	47.9±14.0	74.7±16.0
対 照 群		27.2±8.7	25.1±8.5	15.3±3.5

(b) ミクロゾーム

時 間 群	0	3	9	18
エンドトキシン 投 与 群	21.6±4.8	19.6±8.0	17.4±2.2	18.2±3.0
対 照 群		19.3±7.3	23.6±4.3	14.5±2.4

(c) 細胞質可溶性画分

時 間 群	0	3	9	18
エンドトキシン 投 与 群	18.6±1.6	29.6±5.2	35.9±4.9	41.6±5.2
対 照 群		21.9±3.3	26.9±2.5	27.1±1.9

(単位 $\mu\text{g}/100\text{mg}$ 蛋白)
Mean±SE (n=6)
*p<0.05
**p<0.01

し、エンドトキシン投与群では、3、9、18時間後に $77.4\pm 9.8\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、 $60.6\pm 8.7\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、 $39.0\pm 1.1\mu\text{g}/100\text{ml}$ と各時間で対照群に比べ有意に減少した。

2) 肝内亜鉛濃度の経時的变化 (図2, 表2)

肝内亜鉛濃度は、対照群では0、3、9、18

時間後に、それぞれ $110.1\pm 5.9\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量、 $106.0\pm 5.9\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量、 $100.6\pm 2.8\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量、 $102.7\pm 9.3\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量であったのに対し、エンドトキシン投与群では、3、9時間後に $112.3\pm 8.0\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量、 $118.9\pm 13.4\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量と経時的に増加傾向が見られ、18時

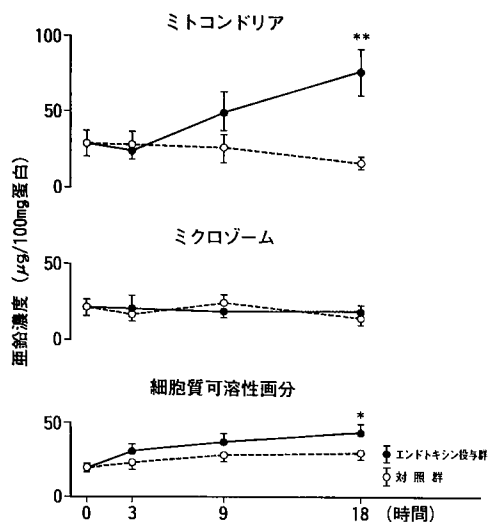


図3 肝細胞画分亜鉛濃度の経時的变化
Mean±SE (n=6)
* P<0.05
** P<0.01

間後には、159.2±5.3μg/g 乾燥重量と対照群に比べ有意に増加した。

3) 肝細胞画分亜鉛濃度の経時的变化 (図3, 表3)

ミトコンドリアでは、エンドトキシン投与後、亜鉛濃度は経時的に増加傾向を示し、18時間後には、対照群15.3±3.5μg/100mg蛋白に対し、エンドトキシン投与群74.7±16.0μg/100mg蛋白と有意に増加した。ミクロゾームでは、亜鉛濃度の有意な変化はみられなかった。細胞質可溶性画分では、エンドトキシン投与群で、亜鉛濃度は経時的に増加傾向を示し、18時間後には、対照群27.1±1.9μg/100mg蛋白に対し、エンドトキシン投与群41.6±5.2μg/100mg蛋白と有意に増加した。

4) エンドトキシン投与ラットおよび対照ラットの肝細胞質可溶性画分のゲル濾過パターン (図4)

エンドトキシン投与ラット (投与18時間後) では、Ve/Vo 1.7に MT 由来の亜鉛のピークが認められた。一方、対照ラットで、MT が溶出されると考えられる分画に著明な亜鉛のピークは認められなかった。

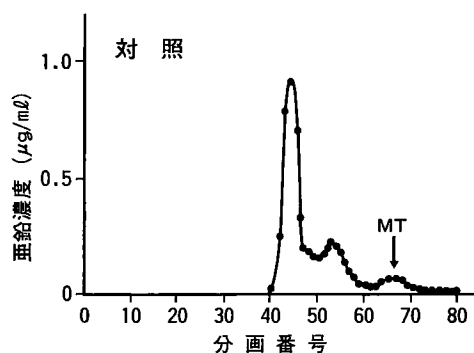
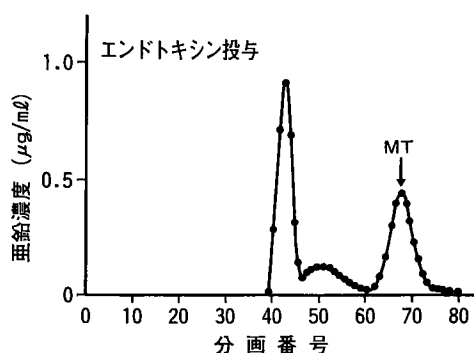


図4 肝細胞質可溶性画分のゲル濾過パターン (Sephadex G-50)

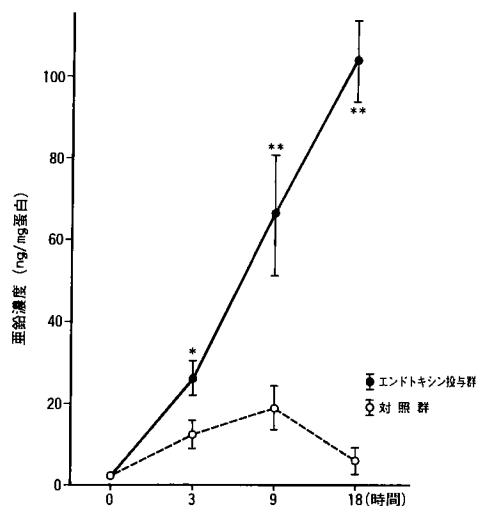


図5 肝内メタロチオネイン画分の亜鉛濃度の経時的变化
Mean±SE (n=6)
* P<0.05
** P<0.01

表4 肝内メタロチオネイン分画の亜鉛濃度の経時的变化

時間 群	0	3	9	18
エンドトキシン 投与群	2.0±0.5	26.7±3.7	66.1±15.6	104.6±8.4
対照群		12.0±3.6	18.9±3.2	6.3±2.9

(単位ng/蛋白)
Mean±SE (n=6)

*p<0.05

**p<0.01

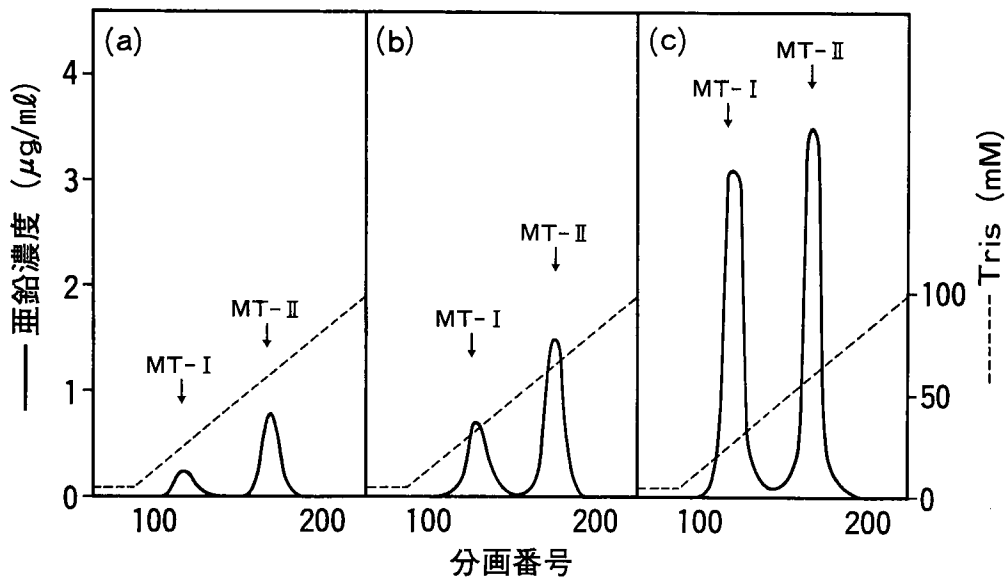


図6 メタロチオネインのイオン交換クロマトグラフィー
(DEAE Bio-Gel A)

(a) エンドトキシン投与 (b) デキサメサゾン投与 (c) 亜鉛投与

5) 肝内MT分画の亜鉛濃度の経時的变化(図5, 表4)

肝内MT分画の亜鉛濃度は, 対照群では, 3, 9, 18時間後に, それぞれ12.0±3.6ng/mg蛋白, 18.9±3.2ng/mg蛋白, 6.3±2.9ng/mg蛋白であったのに対し, エンドトキシン投与群では, 26.7±3.7ng/mg蛋白, 66.1±15.6ng/mg蛋白, 104.6±8.4ng/mg蛋白と各時間で対照群に比べて有意な増加が見られた。

6) エンドトキシン投与ラットの肝内 Iso-MTsの分析(図6-a)

エンドトキシンによって誘導されたMTは, DEAE Bio-Gel A イオン交換クロマトグラフィーにより, MT-IとMT-IIに分離された。Tris緩衝液の濃度勾配によって, MT-I, MT-IIのピークは, それぞれ30mM, 60mM付近に溶出された。また, MT-IIがMT-Iに比べて主なIso-MTであった。

7) デキサメサゾンおよび亜鉛投与により肝内に誘導された Iso-MTs の分析 (図 6-b, c)

デキサメサゾンおよび亜鉛によって肝内に誘導された MT は、それぞれ DEAE Bio-Gel A イオン交換クロマトグラフィーにより MT-I と MT-II に分離された。デキサメサゾン投与ラットでは、MT-I に比べて MT-II が多かった。一方、亜鉛投与ラットでは、MT-I と MT-II の量に大きな差を認めなかった。

考 察

人や動物における血清亜鉛は、正常時きわめて一定に保たれているが、感染症とくにエンドトキシン血症および種々の炎症時には、急激に減少することが知られている²⁾。しかし、この血清亜鉛濃度の低下の病態生理学的意義や臨床的意義についてはいまだ明らかではない。

今回の実験において、血清亜鉛は、図 1、表 1 に示すようにエンドトキシン投与群で 3 時間後より対照群に比べ有意な減少がみられ、18 時間後には、対照値の約 5 分の 2 に低下した。阿部ら¹⁵⁾は、*in vitro* の実験で生理的亜鉛濃度付近において好中球の superoxide 産生能は、亜鉛濃度が減少するにつれて増加し、好中球の細菌殺菌能が高まることを報告した。このことより、血清亜鉛の低下は、*in vivo* においても好中球機能を賦活化しやすい状態にさせることを示唆しており生体防御の面からみれば合目的な反応と考えられる。

一方、肝内亜鉛濃度は、図 2、表 2 に示すように、エンドトキシン投与群で 3 時間後より増加傾向がみられ、18 時間後には、対照群の約 1.5 倍の有意な増加がみられた。すなわち、エンドトキシン投与により、亜鉛の体内分布が変化し、血清中の亜鉛が肝に再分配されたと考えられる。Disilvestro ら¹⁶⁾もエンドトキシン投与ラットにおいて、血清亜鉛濃度と肝内亜鉛濃度の変化を検討し、同様の結果を得ている。

肝細胞画分亜鉛濃度は、図 3、表 3 に示すように、ミトコンドリアと細胞質可溶性画分において、エンドトキシン投与 18 時間後に、対照群に比べ有意な増加が見られた。特にミトコンドリアでは、対照群の約 5 倍の増加であった。

エンドトキシンショックにおける臓器障害には、補体系の活性化¹⁷⁾、C 5 a による白血球の遊走、白血球からのフリーラジカルの発生による血管内皮細胞の障害、膜脂質の過酸化反応¹⁸⁾、リソゾーム膜障害による水解酵素の遊出、ミトコンドリア・細胞膜の障害等が関与していることが示唆されている。一方、Chvapil ら³⁾は、亜鉛が生体膜におよぼす影響を検討し、ラット肝リソゾーム膜の安定化を β -グルクロニダーゼの遊離を指標としてみた結果、亜鉛が濃度依存性に遊離を阻害することを報告している。さらに、脂質過酸化反応による肝障害を引き起こす四塩化炭素の投与に対する亜鉛の保護効果の検討⁴⁾では、ミトコンドリアおよびミクロゾームともに、亜鉛投与により過酸化脂質生成量が低下し、遊離の β -グルクロニダーゼも減少したと報告している。また、Cagen ら¹⁹⁾も四塩化炭素投与ラットを使った実験で、亜鉛投与により、トランスアミナーゼの上昇が有意に抑制されたことから、亜鉛の保護作用を強調している。

エンドトキシンは、脂質過酸化による膜傷害に起因する肝障害を引き起こすと考えられる。しかし、本研究の結果が示すように肝内、特にミトコンドリア、細胞質可溶性画分に増加した亜鉛は膜安定化作用を介して、エンドトキシンによる臓器障害に対して防衛的に作用すると考えられる。特に生体にとって重要なシステムである電子伝達系を有するミトコンドリアで亜鉛濃度が大きく上昇したのは生体防御の観点から興味深い。

本研究では、エンドトキシン投与による肝の細胞質可溶性画分における亜鉛濃度の増加をさらに詳細に検討するために、エンドトキシンによる亜鉛結合蛋白 MT の誘導を検討した。MT は、図 4 に示すようにエンドトキシン投与によりラット肝細胞質可溶性画分内に誘導された。また、エンドトキシンによる肝内 MT 誘導は、図 5 に示すように経時的には投与後 3 時間では対照群に比べ、すでに有意な増加がみられ、18 時間後には、対照値の約 17 倍の増加を示した。この結果は、Disilvestro ら¹⁶⁾の報告で、エンドトキシン投与後 6 時間より肝内 MT の増加がみられ、18 時間後まで増加し続けている結果と一

致している。

また、Iso-MTsに関する今回の検討では、エンドトキシン投与ラットおよびデキサメサゾン投与ラットでは、図6に示すようにMT-IIがMT-Iに比べて優位なIso-MTであった。しかし、亜鉛投与ラットでは、図に示すようにMT-IとMT-IIは、ほぼ同レベルであった。DEAE Bio-Gel A イオン交換クロマトグラフィーを用いたエンドトキシン、デキサメサゾンおよび亜鉛によるMT-I、MT-IIの誘導様式の比較は著者の報告が最初である。Lehman-McKeeman²⁰⁾は、ラットにデキサメサゾンを投与して肝のIso-MTを高速液体クロマトグラフィーで分析し、やはり、MT-IIがMT-Iより優位であったと報告している。また、肝切除のようなストレスによるMT誘導もMT-IIがMT-Iに比べて優位であったと報告されている²¹⁾。

エンドトキシン投与によるMT誘導物質として、ストレスにより副腎皮質から放出されるglucocorticoid, glucagon等のホルモン²²⁾, interleukin-1²³⁾, interferon²⁴⁾等のサイトカインが報告されている。また著者らは、最近、エンドトキシンによって刺激されたマクロファージより遊出した因子が培養肝細胞内にMTを誘導することを発見し²⁵⁾, このマクロファージ因子が、エンドトキシンの刺激によってマクロファージより遊出する物質であるinterleukin (IL)-1, interferon, tumor necrosis factor, IL-6以外の物質であることを明らかにした²⁶⁾。

今回の検討では、MTの有意な増加は、肝内亜鉛および細胞質可溶性画分の亜鉛濃度が有意に増加するのに先だって認められた。また、Iso-MTsの誘導様式が、エンドトキシン投与ラットとデキサメサゾン投与ラットでは相似していたが、亜鉛投与ラットでは前2者と異なっていた。これらの結果は、エンドトキシンによるMTの誘導が、肝内亜鉛の増加によるものではなく、glucocorticoid等のホルモンあるいは、IL-1, マクロファージ因子等のサイトカインによることを支持すると考えられる。

急性炎症時やエンドトキシンショック時には、肝で急性期蛋白が合成される。MTは、急性期蛋白に分類されていないがエンドトキシン投与

という侵襲に対する生体反応の一つとして肝において早期に合成される。その結果、血清亜鉛は低下し、肝に亜鉛が集積すると考えられる。血清亜鉛の低下により、好中球やマクロファージの遊走能²⁷⁾, 食食能²⁷⁾, 殺菌能¹⁵⁾が亢進し、補体系の活性化が容易となり⁷⁾, 生体防御機能が高められると考えられる。しかし、これらの生体防御反応、特に食食殺菌の過程で発生する活性酸素は、生体に脂質過酸化による膜傷害を引き起こし、かえって不利な結果におちいる。1985年、ThornalleyとVasak¹³⁾は、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、肝内亜鉛の増加は、種々の酵素活性を上昇させたり、膜構造の安定化させることにより、組織の保護、修復、再生を容易にすると考えられる。また、同時に肝細胞内に合成されたMTは、過剰に産生される活性酸素を除去することにより、生体にとって保護的に作用すると考えられる。

結 論

エンドトキシン投与ラットにおける血清亜鉛、肝内亜鉛濃度の変動を検討した。特に、いまだ報告されていない肝細胞画分内亜鉛動態について詳細な検討を加えた。同時にエンドトキシン投与により、ラット肝細胞質可溶性画分に誘導される亜鉛結合蛋白メタロチオネイン(MT)の合成についても検討した。さらに亜鉛およびデキサメサゾンによるIso-MTs誘導の差異を明らかにした。

1. 血清亜鉛濃度は、エンドトキシン投与群で3時間後より対照群に比し、有意な減少がみられ18時間後には、対照群の約5分の2に低下した。一方、肝内亜鉛濃度は、エンドトキシン投与群で3時間後より増加傾向がみられ、18時間後には、対照群の約1.5倍の増加がみられた。また、肝細胞画分亜鉛濃度では、ミトコンドリアおよび細胞質可溶性画分において、エンドトキシン投与群で18時間後に対照群に比し、有意な増加がみられた。一方、ミクロゾームでは、有意な変化はみられなかった。

2. 肝内 MT 分画の亜鉛濃度は、エンドトキシン投与群で3時間後より対照群に比し、有意な増加がみられ、18時間後には、対照群の約17倍の増加を示した。また、Iso-MTs の検討では、エンドトキシン投与ラットとデキサメサゾン投与ラットでは、MT-IIが主なIso-MTであった。一方、亜鉛投与ラットでは、MT-IとMT-IIは、ほぼ同レベルであった。

3. エンドトキシン投与時の血清亜鉛の低下、

肝内亜鉛の増加および肝内のMTの合成は、それぞれ、好中球活性化作用、亜鉛の膜保護作用、MTのfree radical scavenger作用を介して生体防御に合目的な反応であることが示唆された。

稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり、終始、懇切なる御指導、御鞭撻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。

文 献

- 1) 岡田 正：亜鉛の生理；亜鉛と臨床，岡田 正，高木洋治編，朝倉書店，東京（1984）pp 5—9.
- 2) Beisel WR, Pekarek RS and Wannemacher Jr RW : Homeostatic mechanisms affecting plasma zinc levels in acute stress ; in Trace Elements in Health and Disease, Prasad ed, VOL 1, Academic Press, New York (1976) pp 87—106.
- 3) Ludwig JC and Chvapil M : Reversible stabilization of liver lysosomes by zincions. J Nutr (1980) **110**, 945—953.
- 4) Chvapil M, Ryan JM and Zukoski C : Effect of zinc on lipid peroxidation in liver microsomes and mitochondria. (1972) **141**, 150—153.
- 5) Chvapil M, Stankova L, Zukoski C IV and Zukoski C III : Inhibition of some functions of polymorphonuclear leucocytes by zinc in vitro. J Lab Clin Med (1977) **89**, 135—146.
- 6) Chvapil M, Weldy L, Stankova L, Clark DS and Zukoski CF : Inhibitory effect of zinc ions on platelet aggregation and serotonin release reaction. Life Sci (1975) **16**, 561—572.
- 7) Montgomery DW, Chvapil M and Zukoski CF : Effects of zinc chloride on guinea pig complement component activity in vitro : Concentration-dependent inhibition and enhancement. Infect Immun (1979) **23**, 424—431.
- 8) Sobocinski PZ, Canterbury WJ, Mapes CA and Dnterman RE : Involvement of hepatic metallothionein in hypozincemia associated with bacterial infection. Am J Physiol (1978) **234**, E 339—406.
- 9) Oh SH, Deagen JT, Whanger PD and Weswig PH : Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. Am J Physiol (1978) **234**, E 282—285.
- 10) 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.
- 11) Margoshes M and Vallee BL : A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc (1957) **79**, 4813—4814.
- 12) Hamer DH : Metallothionein. Annu Rev Biochem (1986) **55**, 913—951.
- 13) Thornalley PJ and Vasak M : Possible role for metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress · : Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochem Biophys Acta (1985) **827**, 36—44.
- 14) Karin M and Herschman HR : Induction of metallothionein in Hela cells by dexamethasone and zinc. Eur J Biochem (1981) **113**, 267—272.
- 15) 阿部晋也，松三昌樹，突沖満則，水川俊一，高橋 徹，飯島義雄，板野義太郎，小坂二度見：亜鉛代謝と生体防御。ICU とCCU (1986) **10**, 203—210.

- 16) Disilvestro RA and Cousins RJ : Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am J Physiol* (1984) **247**, E 436—441.
- 17) Morrison DC and Ulevitch RJ : The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* (1978) **93**, 527—617.
- 18) 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.
- 19) Cagen SZ and Klaassen CD : Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity : studies in developing rats and protein by zinc. *Fed Proc* (1980) **39**, 3124—3128.
- 20) Lehman-Mckeeman LD, Andrews GK and Klaassen CD : Induction of hepatic metallothioneins determined at isoprotein and messenger RNA levels in glucocorticoid-treated rats. *Biochem J* (1988) **249**, 429—433.
- 21) Cain K and Griffiths BL : A comparison of isometallothionien synthesis in rat liver after partial hepatectomy and parental zinc injection *Biochem J* (1984) **217**, 85—92.
- 22) Cousins RJ and Coppen DE : Regulation of liver zinc metabolism and metallothionein by cAMP, glucagon and glucocorticoids and supression of free radicals by zinc. In *Metallothionein II*, Kagi JHR and Kojima Y eds, Birkhauser Verlag, Basel (1987) pp 545—553.
- 23) Karin M, Imbra RJ, Heguy A and Wong G : Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol Cell Biol* (1985) **5**, 2866—2869.
- 24) McMahon M, Stark GR and Kerr IM : Interferon-induced gene expression in wild-type and interferon resistant human lymphoblastoid (Daudi) cells. *J Virol* (1986) **57**, 362—366.
- 25) Takahashi T, Iijima Y, Matsumi M, Abe S, Itano Y and Kosaka F : Induction of metallothionein synthess in cultured cells by substances releasd from endotoxin-activated macrophages. *Acta Med Okayama* (1987) **41**, 19—23.
- 26) 松下幹晴 : エンドトキシンによる培養肝細胞内メタロチオネイン mRNA 発現に関する実験的研究. *岡山医誌* (1989) **101**, 875—886.
- 27) Chvapil M : Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med Clin North Am* (1976) **60**, 799—812.

Zinc metabolism in the endotoxin-treated rats

Masaki MATSUMI

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. F. Kosaka)

The effect of endotoxin administration on zinc metabolism was studied in rats. In the endotoxin-treated rats, serum zinc concentration was significantly reduced as compared to saline-treated rats (control group). On the other hand, hepatic zinc concentration was significantly increased after endotoxin administration as compared to the control group. However, the zinc concentrations of the liver cell components showed slightly dissimilarity. In the mitochondria and cytosol, the concentration increased significantly after endotoxin administration as compared to the control group, whereas no change was observed in the microsomes. Furthermore, we have examined whether the increase of the zinc level in the cytosol of the liver is associated with zinc-binding protein metallothioneins (MTs) or not. MTs also increased significantly after endotoxin administration. Furthermore hepatic MTs were analyzed for MT isoforms. In the endotoxin-treated MT-II was the major Iso-MT. Judging from these results and some other published reports, the role of zinc metabolism in endotoxemia is proposed to be as follows. In endotoxemia the serum zinc concentration is reduced and as a result the production of superoxide by polymorphonuclear leukocytes is increased as zinc has an inhibitory effect on it. This free radical helps the host against the organism. On the other hand zinc accumulation in the liver following endotoxin administration increases the activity of the zinc binding-enzyme and also stabilizes the plasma membrane. MTs induced by endotoxin protect the host from the harmful effects of the free radical on the host by its scavenging action.