

金投与後のラット腎臓内の酸化DNA損傷の局在とCpへの影響

¹⁾齋藤 秀, ²⁾冷牟田修一, ³⁾蔵崎正明, ³⁾細川敏幸, ³⁾齋藤 健, ⁴⁾吉田勝美

¹⁾北海道東海大学工学部, ²⁾出光興産, ³⁾北海道大学大学院地域環境科学研究科, ⁴⁾聖マリアンナ医科大学

Localization of oxidative DNA damage after Au injection and effects of Au on Cp in renal kidney

¹⁾Shigeru Saito, ²⁾Shuichi Hiyamuta, ³⁾Masaaki Kurasaki, ³⁾Toshiyuki Hosokawa, ³⁾Takeshi Saito, ⁴⁾Katsumi yoshida

¹⁾Hokkaido Tokai University, ²⁾Idemitsu kousan, ³⁾Hokkaido University, ⁴⁾St. Marianna University School of Medicine

Abstract

The present study was carried out to investigate the effect of gold (Au) injection on copper (Cu) and two types of ceruloplasmin (Cp), total Cp (ID1) and active Cp (ID2), metallothionein (MT) in the serum, kidney and liver, and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in the rat kidney. The Cu contents in sera and kidneys of Au-injected rats were 1.7 and 5.5 times higher than those in sera and kidneys of control rats, respectively. Significant increases of ID1 and ID2 were found in the sera of the control rats and Au-injected rats. The immunoreactivity of 8-OHdG was located in the cortex of the Au-injected rat. These findings suggested that the oxidative DNA damage in the kidneys of rats injected with Au is associated with Cu except Cu-MT.

Keywords : Gold (Au), Copper (Cu), Ceruloplasmin (Cp), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), Metallothionein (MT)

目的

以前より、リウマチ様関節炎の金含有治療薬による副作用の一つとして腎障害が生じることが知られている。我々は以前の学会で、その副作用の機序を明らかにするため、金を投与したところ、腎臓中に銅が異常に蓄積すること、金投与により腎臓内に誘導合成された銅と結合したメタロチオネイン(MT)は皮髄境界部に局在したことを報告した。今回はさらに金投与後のラット腎臓内の酸化DNA損傷の局在と血清中の銅輸送タンパク質であるセルロプラスミン(Cp)への影響を報告する。

方法

雄性のSprague-Dawleyラットの腹腔内にラット体重1 mgの金を一日一回5日間連続投与し、最終投与24時間後に心臓採血し、生理的食塩水を含む40mMTris緩衝液で灌流後、腎臓、肝臓を摘出した。金の化合物は塩化金ナトリウム・二水和物を使用し、対照群には生理的食塩水も同様の条件で投与した。酸化DNA損傷の局在は酸化DNA損傷の指標である8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の抗体(N45.1)を用い、顕微鏡並びに共焦点レーザー顕微鏡より観察した。血清中の全体のセルロプラスミンであるID1量とフェロオキシダーゼ活性をもつ活性型セルロプラスミンであるID2量はそれぞれID1とID2のモノクローナル抗体を用いて測定した。

連絡先：齋藤 秀

〒005-8601 北海道札幌市南区南沢5条1丁目1-1

北海道東海大学 工学部 共通教育部門

TEL : 011-571-5111

E-mail : ssaitou@hyper.ocn.ne.jp

論文受理日：平成17年10月20日

結果

金投与が血清、腎臓、肝臓中の金、銅、亜鉛濃度に及ぼす影響を調べた結果、金投与により血清中の金と銅濃度、肝臓中の金と亜鉛含量と腎臓中の金、銅、亜鉛含量は増加したが、血清中の亜鉛濃度、肝臓中の銅濃度は対

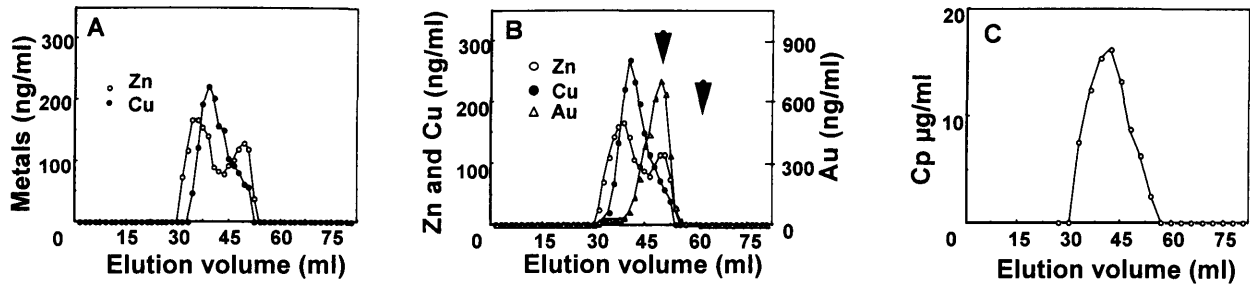


図1 金投与後のラットの血清の亜鉛、銅、金のゲル濾過パターン(B), 血清中のセルロプラスミンのゲル濾過パターン(C), 対照群の血清の亜鉛、銅のゲル濾過パターン(A)

表1 酸化的DNA損傷、Timm's法による銅およびメタロチオネインの局在データは文献3)より抜粋

酸化的DNA損傷の局在		
	対照群	金投与群
皮質	—	+
皮髓境界部	—	—
Timm's法による銅の局在 [3]		
	対照群	金投与群
皮質	—	+
皮髓境界部	—	—
メタロチオネインの局在 [3]		
	対照群	金投与群
皮質	—	—
皮髓境界部	—	+

対照群と比べて差異なかった[2]。特に金投与後のラットの血清中の銅濃度及び腎臓中の銅含量は対照群と比較してそれぞれ1.7倍と5.5倍高い値であった。Sephacryl S-200を用いたゲル濾過による血清中の金、銅、亜鉛の結合物質の動態(図1)を調べたところ、対照群と金投与群ラットの血清中の銅の多くは溶出量33-54mlのCp画分において観察された(図1AとB)。Cp画分はELISA法によりCpとして同定された(図1C)。金投与されたラット血清からのCp画分中の銅濃度は対照群と比べ、増加した。一方、金投与されたラット血清からの亜鉛の2つのピークは対照群と比べ、差異がなかった。金投与群の血清中の金の多くはBSAの溶出位置と一致した溶出量45-54mlにおいて確認されたので、金は血清アルブミンと結合したものと考えられた。金投与が血清、肝臓、腎臓の活性型セルロプラスミン濃度と全体のセルロプラスミン濃度及びMT量に及ぼす影響を調べたところ、金投与されたラットの血清中の全体のセルロプラスミンであるID1濃度と活性型セルロプラスミンであるID2濃度はともに対照群と比較して有意に増加した。金投与群のラット腎臓中のMT量は対照群

と比較すると、劇的に増加したが、肝臓におけるMT量は対照群と比較して顕著な増加は認められなかった。金投与が血清中の腎障害の指標であるBUNとcreatinine並びに肝障害の指標であるGOTとGPTに及ぼす影響を調べたところ、金投与によって血清中のBUNとcreatinine濃度、またGOTとGPT濃度に対して対照群と比較してほとんど影響を及ぼさなかった[2]。抗8-OHdG抗体によるラット腎臓内の8-OHdG局在を調べたところ、金投与後の腎臓の皮質においてペルオキシダーゼ活性染色による抗8-OHdG抗体の染色が観察された。さらに共焦点レーザー顕微鏡による金投与後の腎臓皮質を観察したところ、対照群の腎臓と金投与群の皮髓境界部においてはFITCで標識された抗8-OHdG抗体の蛍光が観察されなかったが、金投与後の腎臓の皮質の核の部分において観察された。これらの結果より、金投与後の腎臓の皮質において酸化的DNA損傷が生じたことがわかった。以前の結果とあわせてまとめると、金投与後のラット腎臓の皮質において酸化的DNA損傷とTimm's法による腎臓の銅の染色が腎臓の皮質において観察された。一方、銅結合メタロチオネインは酸化

的DNA損傷とは異なり、腎臓の皮髄境界部において観察された(表1)。結論として金投与により、血清中では銅濃度及びセルロプラスミン濃度が増加し、腎臓中では銅含量、MT量が増加した。また、8-OHdGは金投与されたラット腎臓の皮質において観察された。考察として、8-OHdGは腎障害の指標であるBUNやcreatinineよりも、金投与に対して感受性が高いことがわかり、8-OHdGは金投与による腎障害の指標として有効であることが示唆され、今後は測定が簡便な尿中の8-OHdGを調べることが必要であると考えられた。また、金投与により生じた8-OHdGはCu結合メタロチオネインの増加によるものではなく、メタロチオネイン以外の銅結合物質が関与しているものと考えられ、メタロチオネインは酸化的DNA損傷に直接関与していないことが示唆された。

文献

- 1) 齋藤 秀、葦崎正明、細川敏幸、齋藤 健、吉田勝美：金投与後のラット腎臓でのDNA損傷とCuの局在. Biol Trace Elem Res 14 : 356-358, 2003.
- 2) Saito S, et al.: The effect of Au injection on the ceruloplasmin, metallothionein and 8-hydroxydeoxyguanosine of rat serum, kidney and liver. Chemico-Biological Interaction 140 : 265-278, 2002.
- 3) Saito S, et al.: Localization of the induced Metallothionein and DNA Damage in Rat Kidney After Gold Injection. J of Histochem & Cytochem 50 : 1263-1271, 2002.