

新たに見い出された先天性アルコール代謝不全ラットに
おける関連酵素遺伝子異常の解析

(0 6 6 7 0 5 6 8)

平成 7 年度 科学研究費補助金 (一般研究 C)

研 究 成 果 報 告 書

平成 8 年 4 月



研究代表者

高 後 裕

(旭川医科大学医学部教授)

研 究 組 織

研究代表者： 高後 裕（旭川医科大学医学部教授）
研究分担者： 根田 寛（札幌医科大学医学部講師）
研究分担者： 加藤淳二（札幌医科大学医学部講師）
研究分担者： 小野 稔（旭川医科大学医学部助手）

研 究 経 費

平成 6 年度	1,200千円
平成 7 年度	1,000千円
計	2,200千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

1. Nakaya, R., Kohgo, Y., Mogi, Y., Nakajima, M., Kato, J., and Niitsu, Y.: Regulation of asialoglycoprotein receptor synthesis by inflammation-related cytokines in Hep G2 cells. J Gastroenterol, 84 : 24-30 (1994)
2. Kohgo, Y., Mogi, Y., Kato, J., Nakaya, R., Nakajima, M., Katsuki, S. and Niitsu, Y.: Ethanol inhibits asialoglycoprotein receptor synthesis but augments its mRNA expression in a human hepatoma cell line. J Gastroenterol, 29 : 598-604 (1994)
3. Kobune, M., Kohgo, Y., Kato, J., Miyazaki, E. and Niitsu, Y.: Interleukin-6 enhances hepatic transferin uptake and ferritin expression in rats. Hepatology, 19 : 1468-1475 (1994)
4. Nakajima, M., Kato, J., Kohgo, Y., Takeichi, N. and Niitsu, Y.: Point mutation of aldehyde dehydrogenase-2 gene in mutant strains of Long-Evans rats. Alcohol Alcoholism, 29 : 39-43 (1994)
5. 中島正博, 加藤淳二, 勝木伸一, 乾 典明, 高後 裕, 新津洋司郎: アルコール性肝疾患における血清アジアロ糖蛋白レセプター (AGPR) 測定の有用性: AGPR 測定系の再評価および培養肝癌細胞をもちいた AGPR 遊離機構の検討. アルコールと医学生物学, 14 : 145-148 (1994)
6. 加藤淳二, 高後 裕, 中島正博, 勝木伸一, 乾 典明, 新津洋司郎: LEA および LEC ラットにみられたアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH-2) 遺伝子異常の解析. アルコールと医学生物学, 14: 52-55 (1994)
7. Yago, H., Kohgo, Y., Kato, J., Sakamaki, S., Watanabe, N. and Niitsu, Y.: Detection and quantification of soluble asialoglycoprotein receptor in human serum. Hepatology, 21 : 383-388 (1995)
8. Katsuki, S., Kato, J., Kohgo, Y., Inui, N., Sasaki, K. and Niitsu, Y.: Analysis of CA repeats in first intron of class 1 ADH gene in Long-Evans Cinnamon rats developing fetal intoxication after ethanol intake. Alcohol Clin Exp Res (1995) in press.

9. Inui, N., Kato, J., Kohgo, Y., Katsuki, S. and Niitsu, Y.: Detection of activity in the conditioned medium of ethanol-treated Hep G2 cells which stimulates collagen synthesis in IMR-90 cells. Alcohol Clin Exp Res (1995) in press.
10. Numata, T., Kato, J., Kohgo, Y., Katsuki, S. and Niitsu, Y.: Auto antibody against a 79 kD membrane protein of HepG2 cells recognized with sera of patients with alcoholic liver diseases. J Gastroenterol (1995) in press.
11. 勝木伸一, 加藤淳二, 中島正博, 乾 典明, 佐々木勝則, 高後 裕, 新津洋司郎: LEC ラット肝における class I ADH 遺伝子の解析. アルコールと医学生物学, 15:105-109 (1995)
12. Ohhira M, Ono M, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M, Fujimoto Y, Nagao M, Mori M.: Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. J Gastroenterol, 30:619-623 (1995)
13. 高後 裕, 大平基之, 小野 稔: アルコール性肝障害に合併した原発性肝癌症例の臨床的検討. 日本アルコール・薬物医学会雑誌 (1996) 印刷中

(2) 口頭発表

1. 加藤淳二, 高後 裕, 中島正博, 勝木伸一, 佐々木勝則, 新津洋司郎: LEC および LEA ラットにみられたアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH-2) 遺伝子異常の解析.
第14回アルコール医学生物学研究会学術集会, 2月, 1994年
2. 中島正博, 高後 裕, 加藤淳二, 矢後弘和, 勝木伸一, 新津洋司郎: 培養肝癌細胞 (HepG2) の培養上清中へのアジアロ糖蛋白受容体遊離の証明とエタノール処理による変化について.
第14回アルコール医学生物学研究会学術集会 2月, 1994年
3. 高後 裕, 加藤淳二: 新たなアルコール性肝障害のマーカーとしての血中アジアロ糖蛋白受容体測定の意義.
第80回日本消化器病学会総会, 4月, 1994年
4. 小船雅義, 加藤淳二, 中島正博, 高後 裕, 菅原直毅, 武市紀年, 新津洋司郎: LEC ラットに起きる激症肝炎の除鉄食飼育による予防効果.
第4回 LEC ラット研究会, 6月, 1994年
5. 中島正博, 加藤淳二, 高後 裕, 勝木伸一, 佐々木勝則, 武市紀年, 新津洋司郎: LEC ラットにおけるエタノール代謝不全, アルコール脱水素酵素およびアセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子異常の解析.
第4回 LEC ラット研究会, 6月, 1994年
6. 中島正博, 加藤淳二, 勝木伸一, 佐々木勝則, 高後 裕, 新津洋司郎: Long Evans 系ラットにみられたアセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子の点突然変異による不活性化.
第30回日本肝臓学会, 7月, 1994年
7. 小船雅義, 加藤淳二, 中島正博, 高後 裕, 菅原直毅, 武市紀年, 新津洋司郎: LEC ラットの肝障害発生機構における鉄イオンの関与.
第53回日本癌学会総会, 10月, 1994年
8. 勝木伸一, 加藤淳二, 中島正博, 佐々木勝則, 高後 裕, 新津洋司郎: LEC ラット肝に

における ADH 遺伝子異常と ADH mRNA 発現の低下.

第15回アルコール医学生物学研究会学術集会, 3月, 1995年

9. 乾 典明, 加藤淳二, 松本修二, 勝木伸一, 高後 裕, 新津洋司郎: エタノール処理により, HepG2 細胞の培養上清中に出現する fibroblast collagen 産生因子 TGF- α の同定.

第15回アルコール医学生物学研究会学術集会, 3月, 1995年

10. Kato, J., Kohgo, Y., Sugawara, N., Kobune, M., Katsuki, S., Niitsu, Y.: Plenary lecture "Deprivation of iron prevents the development of spontaneous hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats" International Conference of Bioiron (ICBI) Ashville, USA, 4月, 1995年

11. 小船雅義, 加藤淳二, 高後 裕, 菅原直毅, 勝木伸一, 新津洋司郎: 長期鉄欠乏食飼育による LEC ラットの自然肝腫瘍発生予防効果.

第5回 LEC ラット研究会, 7月, 1995年

12. 小船雅義, 加藤淳二, 高後 裕, 菅原直毅, 勝木伸一, 新津洋司郎: 長期鉄欠乏食飼育による LEC ラットの肝癌発症予防効果.

第31回日本肝臓学会総会, 7月, 1995年

13. 小船雅義, 加藤淳二, 中村とき子, 勝木伸一, 新津洋司郎, 菅原直毅, 高後 裕: 長期鉄欠乏食飼育による LEC ラットの自然肝癌発症予防効果.

第19回鉄代謝研究会, 8月, 1995年

14. 大平基之, 小野 稔, 高後 裕: アルコール性肝障害に発生した肝癌症例の臨床的検討.

第30回日本アルコール医学会総会, 9月, 1995年

15. 大平基之, 藤本佳範, 大竹孝明, 松本昭範, 小野 稔, 高後 裕: アルコール性肝障害に合併した原発性肝癌の臨床的検討と ALDH-2 遺伝子多型の解析.

第16回アルコール医学生物学研究会学術集会, 2月, 1996年

1. はじめに

Long-Evans Cinnamon (LEC) および Long-Evans Agouti (LEA) ラットは、ともに Long-Evans ラットより分離された mutant strains である。LEC ラットは、生後約 4 カ月頃に劇症肝炎を発生し約半数は死亡するが、生存例は慢性肝炎を経て約 1 年後に全例肝癌へ移行する肝炎・肝癌自然発生ラットである。一方、LEA ラットは肝病変を発症しない¹⁾⁻³⁾。われわれはこれまで、両ラットをエタノール添加 Lieber 食で飼育すると 2 週間以内に全例死亡してしまうことを見出した。さらに、肝総アセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性が Wistar ラット に比べて有意に低下していたことから、両ラットに遺伝的な ALDH 遺伝子異常が存在することを推定した⁴⁾。そこで今回、エタノール代謝に重要であるとされる両ラットの ALDH、アルコール脱水素酵素 (ADH) の酵素活性や遺伝子構造、さらにエタノール代謝系路のもう一つの重要な経路である microsome ethanol oxidizing system (MEOS) の中心的役割を果たす cytochromeP450 2E1 (以下 P450 2E1) の動態も検討した。

2. 対象および実験方法

6 週齢の LEC, LEA ラット, および対照として同週齢の Long-Evans および Wistar ラットを使用した。

(1) 血中アセトアルデヒド、エタノール濃度の測定

ラットの腹腔内にエタノールを 2g/kg body weight 投与し、経時的に内頸静脈より採血し、血中アセトアルデヒドおよびエタノール濃度をガスクロマトグラフィーで測定した⁵⁾。

(2) 肝 low Km ALDH 活性の測定

肝 low Km ALDH 活性の測定は、肝ミトコンドリア分画を調製し、Sugata らの方法⁶⁾により測定した。

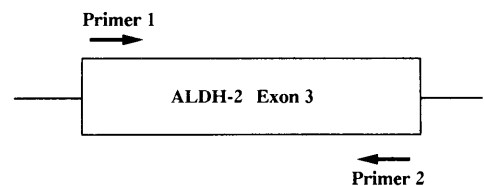
(3) 肝 ALDH-2 遺伝子の解析

i) Polymerase chain reaction-restriction enzyme fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

解析：各ラット肝より RNAzol[®] を用いて total RNA を調製し、すでに報告されているラット ALDH-2 遺伝子の cDNA 配列⁷⁾から作製した 2 種類のプライマー (図 1) を用いて第 3 エクソン内の 109 塩基長を reverse transcriptidase-PCR (RT-PCR) 法⁸⁾にて増幅した。次に、RT-PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素 *Dde* I および *Ava* I で消化し、5 % アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色し、DNA 断片のサイズを検討した。

ii) 塩基配列決定：上記の RT-PCR 産物を pUC119vector に組み込み、*E. coli* (MV 1184) をトランスフォームさせサブク

ローン化し、dideoxy 法を用いて反応させた。その後 6 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ナイロン膜に転写して Sequencing high キット (TOYOBO) で発色させ、全核酸塩基配列を決定した。



Primer 1: 5'ACCGTCAACCCCTTCCACG 3' (203 - 220 nt)
Primer 2: 5' GCGAGCCCAGCTGGAAG 3' (295 - 311 nt)

図 1 ラット ALDH-2 遺伝子 (エクソン 3) 検出のためのプライマー

(4) Class I ADH 遺伝子第 1 イントロン内の TG 配列の解析

Carr ら⁹⁾ は、ラットの class I ADH 遺伝子第 1 イントロン内に purine/pyrimidine 繰返し配列領域が存在し、その多様性により、ADH 活性が変化する可能性を指摘している。そこでわれわれは、LEC および Wistar ラットの肝より proteinase K/phenol 法¹⁰⁾ で高分子 DNA を調整した後、図 2 に示した 2 種の primer を用い、PCR 法で第 1 イントロン内 TG 繰返し配列部位を含む領域を増幅した。得られた PCR 産物を 6 % アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、バンドの易動度を比較検討した。

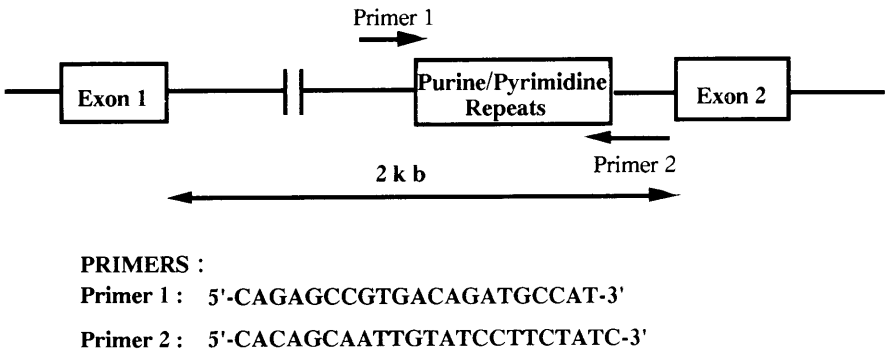


図 2 ラット class I ADH 遺伝子第 1 イントロン内 TG 繰返し領域の PCR 法による増幅

(5) エタノール投与ラットにおける肝 P450 2E1 の発現

エタノール投与前および7日後に屠殺した LEC ラットより肝を摘出した。P450 2E1 の発現量は、Ardies らの方法¹¹⁾ に従い肝 microsome 分画を調整し、その100 μ g を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、PVDF 膜に転写し、抗 cytochrome P450 2E1 モノクローナル抗体 (OXYGENE) を用いた Western blot 法で検討した。

3. 結 果

(1) エタノール投与後の血中アセトアルデヒド濃度変化 (表 1)

血中アセトアルデヒド濃度は、エタノール投与後3時間値で LEC ラットが $43.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ であり、Wistar ラットの $32.6 \pm 4.4 \mu\text{M}$ に比べ有意 ($p < 0.05$) に上昇していた。

表 1 Wistar および LEC ラットにおける血中アセトアルデヒド濃度

ラット	アセトアルデヒド濃度 (μM)			
	0.5	1	2	3 (hr)
Wistar	9.1 ± 1.5	20.1 ± 5.2	30.1 ± 5.1	32.6 ± 4.4
LEC	13.8 ± 2.0	24.6 ± 1.4	$38.0 \pm 2.1^*$	$43.2 \pm 0.3^*$

* $p < 0.05$, compared to Wistar rats (Student's *t* -test)

(2) エタノール投与後の血中エタノール濃度変化 (図 3)

血中エタノール濃度は、エタノールを腹腔内投与30分後に最高濃度に達し、そのレベルは LEC, Wistar 共に約 200 mg/dl であり、両者間に差はなかった。その後、両者の血中エタノール濃度はともに5時間後まで漸減したが、その間の LEC ラットの血中エタノール濃度は Wistar ラットのそれに比べ、有意に遅延していた。

(3) 肝 low Km ALDH 活性 (図 4)

肝 low Km ALDH 活性は、Wistar ラットの $3.91 \pm 0.35 \text{ U/g liver}$ に対し、LEA ラットでは $1.01 \pm 0.15 \text{ U/g liver}$ 、LEC ラットでは $0.08 \pm 0.1 \text{ U/g liver}$ と、それぞれ Wistar ラッ

トの約26%, 約20%と減少していた。

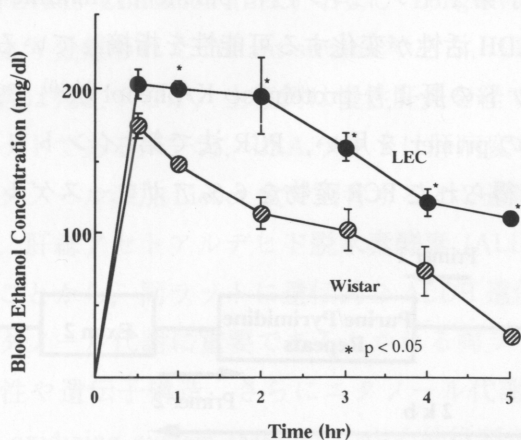


図3 ラット腹腔内エタノール投与後の血中エタノール濃度の推移

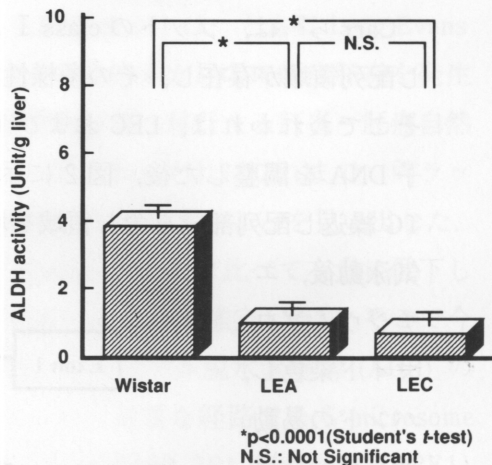


図4 Wistar, LEA および LEC ラットにおける肝 low Km ALDH 活性

(4) ALDH-2 遺伝子解析

第3エクソン内の第67アミノ酸残基を含む野生型の ALDH-2 遺伝子の塩基配列は CTCAG であり, 制限酵素 *Dde I* で切断し得る. そこで, RT-PCR 法にて増幅した DNA 断片を *Dde I* で切断した. 図5に示すように Wistar および Long-Evans ラットでは, *Dde I* によって完全に切断されたが, LEA および LEC ラットでは切断されない DNA 断片が検出された.

一方, 同部位を塩基配列 CTCGGG を認識する制限酵素 *Ava I* で切断すると LEA および LEC ラットは切断されたが, Wistar および Long-Evans ラットでは切断されなかった. そこで次に, この PCR 産物をサブクローン化し, その核酸塩基配列を決定した. 図6に示すように, 野生型すなわち Wistar および Long-Evans ラットの ALDH-2 遺伝子第67アミノ酸残基はグルタミン酸をコードする CAG であったが, LEA および LEC ラットではアルギニンをコードする CGG となっており, ALDH-2 遺伝子の A から G への点突然変異の存在が確認された.

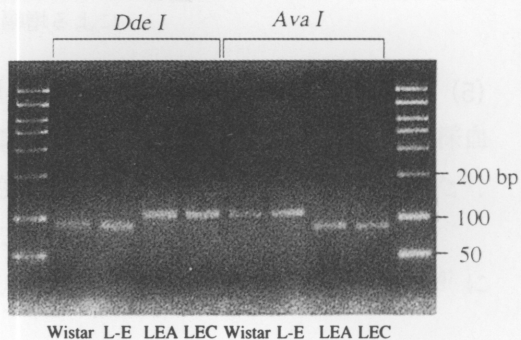


図5 Wistar, Long-Evans, LEA および LEC ラットにおける ALDH-2 遺伝子の PCR-RFLP 解析

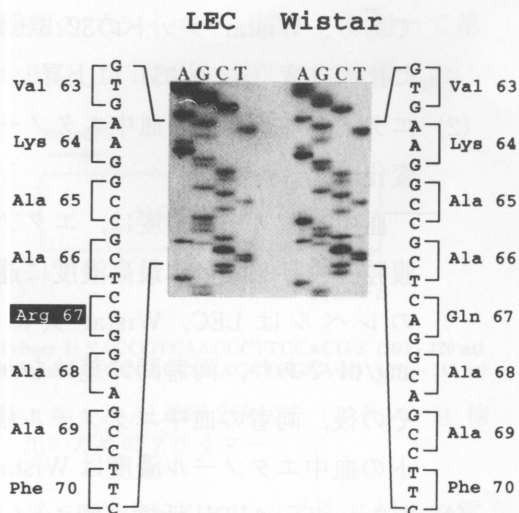


図6 Wistar および LEC ラットにおける ALDH-2 遺伝子 (エクソン3) の塩基配列

(5) class I ADH 遺伝子第一イントロン内の TG 繰返し配列の解析

PCR 法により TG 繰返し領域を増幅した。

得られた DNA フラグメントを電気泳動した結果を図 7 に示すが、Wistar ラット (3 匹) では 80bp 長であるのに対し、検討した 8 匹の LEC ラットでは、すべて 98bp 長であり、後者に 18bp の insertion があるものと考えられた。

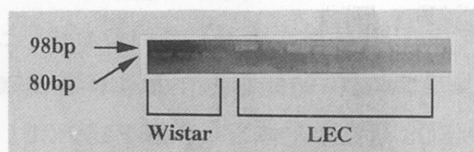


図 7 ラット class I ADH 遺伝子第 1 イントロン内 Purine/Pyrimidine 繰返し領域の電気泳動結果

(6) エタノール投与ラットにおける肝 P450 2E1 発現量の変化

LEC ラットのエタノール投与 7 日目の肝 P450 2E1 の発現量を Western blot で検討した結果を図 8 に示す。さらにバンドをデンシトメーターで半定量したところ、投与前に比べ約 8 倍に増加しており、エタノールにより同酵素の誘導が認められた。

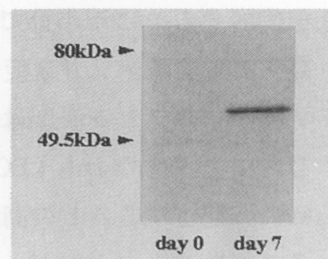


図 8 エタノール投与前後の LEC ラット肝 P450 発現の変化

4. 考 察

LEC ラットは、肝炎・肝癌を自然発生し、その病因として生後 12~13 週齢より、肝組織中に異常蓄積してくる銅および鉄による代謝異常によるラジカル生産の惹起が重要視されている¹²⁾⁻¹⁴⁾。われわれは当初、エタノールの肝癌発症に与える影響を検討することを目的として、LEC ラットにエタノールを投与したが、LEC ラットのみならず、対照として用いた肝病変を全く発症しない LEA ラットも数日以内に全例死亡してしまった。さらに、両ラットにおいて肝総 ALDH 活性を測定したところ対照 (Wistar ラット) の約 4 分の 1 に低下していたことにより、ALDH の遺伝的異常が推定された⁴⁾。初めに、LEC および Wistar ラットの血中アセトアルデヒド濃度を測定したところ、Wistar ラットに比べ LEC ラットでは遅延していた。次に、エタノール代謝に最も重要であるとされる肝 low Km ALDH 活性を測定した結果、LEC および LEA 両ラットの肝 low Km ALDH 活性は、対照の Wistar ラットに比べ約 4 分の 1 に著減していた。そこで、肝 low Km ALDH の遺伝子である ALDH-2 遺伝子の異常の有無につき検討を加えた。Carr らはアルコールを好まないラットである NP ラットにおいて、ALDH-2 遺伝子第 3 エクソン内のコドン 67 番目に点突然変異が存在することを見出し、同部位のアミノ酸変異が ALDH-2 活性に重要である可能性を指摘した¹⁵⁾。そこで、LEC および LEA ラットの ALDH-2 遺伝子第 3 エクソン内の塩基配列を調べたところ、同様に 67 番目のコドンに Gln → Asp へのアミノ酸置換を伴う点突然変異を起こしていることが明らかになった。このように strain の異なる 2 種のラットに、ALDH-2 遺伝子の同部位に点突然変異を起こしていたことから、本部位がヒトの ALDH-2 遺伝子第 12 エクソンの 487 番目のコドンが mutation の hot spot であるように¹⁶⁾、ラットにおける hot spot である可能性が考えられる。しかし、前述の NP ラットはエタノール投与により死亡するわけではなく、LEC および LEA ラットがエタノール投与後に死亡したことが、ALDH-2 遺伝子の異常のみでは説明できない。さらに

LEC ラットの血中エタノール濃度は、エタノール投与5時間でも Wistar ラットの3.7倍と高度にエタノール代謝が遅延していた。この原因は肝での low Km ALDH 活性の低下に加えて、ADH 活性が著減しているため⁴⁾と推定されるが、エタノール投与初期の肝でのエタノール代謝の20-30%を担うとされる MEOS 活性¹⁷⁾も調べる必要があると考えられた。そこで MEOS 活性の主体をなす肝 P450 2E1 の発現を Western blot 法で検討したところ、エタノール投与7日目には、P450 2E1 投与前の約8倍に誘導された。

しかし実際にはエタノール摂取7日以内に3分の2の LEC ラットが死亡していることから、P450 2E1 が誘導される以前に死亡してしまったか、あるいはその誘導レベルがエタノールを代謝するのに不十分である可能性が考えられた。ところで LEC ラットの死亡原因には、高アセトアルデヒド血症が寄与していると推定され、実際にエタノール投与3時間後に血中アセトアルデヒド濃度は約40 μ M と最高値をとり、投与後5時間を経過しても30 μ M と遷延していた。すなわち LEC ラットでは、ADH、ALDH 両者の活性の低下が同時に存在するために、死亡するほどの高アセトアルデヒド血症を来すと考えられる。

そこで次にわれわれは、ADH 活性低下の原因を調べる目的で同ラットの class I ADH 遺伝子につき検討を加えた。まず class I ADH 遺伝子の変異を考慮して、その mRNA 配列をダイレクトシーケンシング法で検討したが、変異は見いだされなかった（未発表データ）。

そこで次に、ADH の転写に影響を与える第1イントロン TGREPEAT 部位の変異の有無⁹⁾を検討した。その結果、今回検討したすべての LEC ラットで同部位に18bp 長の insertion が認められた。Carr ら⁹⁾は、マウスを用いた検討で、アルコール嗜好性と ADH 活性の低下および第1イントロンの TGREPEAT の多型性が相関することを報告しているが、この部位の変異が ADH 遺伝子の転写活性に影響を及ぼしている可能性を示唆している。他の遺伝子において、第1イントロンが転写を制御するという報告はすでに α 1 (I) collagen gene¹⁸⁾ や 4F2 heavy chain gene¹⁹⁾で示唆されている。

LEC ラットの class I ADH mRNA の発現は Wistar ラットのそれに比べて低下していることから（未発表データ）、LEC ラットに存在する第1イントロンの TG 繰返し配列の異常が肝 ADH 遺伝子の転写活性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、それを直接証明するためには、LEC ラットの第1イントロンを含めた class I ADH 遺伝子のプロモーター活性に与える影響を調べる必要があると考えられ、現在検討中である。

以上、われわれは LEC ラットに ALDH-2 gene と class I ADH gene に異常があることを明らかにしたが、これらの異常が LEC ラットの発癌にリンクするか否かは不明である。しかし、LEC ラットには他にも多数の遺伝子異常や発現異常が存在することが報告されている。例えばヒト Wilson 病の原因遺伝子である p-type ATPase gene (hts gene) の deletion²⁰⁾ や metallothionein mRNA 発現異常²¹⁾、transferrin の調節異常²²⁾ などである。LEC ラットに存在する多数の遺伝子異常の本態は genetic instability にあることが推測される。

参考文献

- 1) Sasaki M, Yoshida MC, Kagami K, et al : Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats. *Rat News Lett*, 14 : 4-6, 1985.
- 2) Yoshida MC, Masuda R, Sasaki M, et al : New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. *J Hered*, 78 : 361-365, 1987.
- 3) Takeichi N, Kobayashi H, Yoshida MC, et al : Spontaneous hepatitis in Long-Evans rats. *Acta Pathol Jpn*, 38 : 1369-1375, 1988.
- 5) Erikson CJP, Mizoi Y, Fukunaga T : The determination of acetaldehyde in human blood by the perchloric acid precipitation method: The characterization and elimination of artefactual acetaldehyde formation. *Anal Biochem*, 125 : 259-263, 1982.
- 6) Sugata K, Takada A, Takase S, et al : Determination of aldehyde dehydrogenase isozyme activity in human liver, *Alcohol*, 5 : 39-43, 1988.
- 7) Farres J, Guan KL, Weiner H : Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences. *Eur J Biochem*, 180 : 67-74, 1989.
- 8) Saiki RK, Gelfand DH, Stoppel S, et al : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491, 1988.
- 9) Carr LG, Koivisto C, Eriksson JP, et al : Detection of CA repeat polymorphism in the rat class I alcohol dehydrogenase gene. *Alcohol Clin Exp Res*, 17, 107-109, 1993.
- 10) Maria GB, Pierre O, Pierre C : Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem*, 36, 32-38, 1973.
- 11) Ardies CM, Lasker JM, Ueber CS : Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase system of hamster liver microsomes, effects of prior treatment with ethanol and other xenobiotics. *Biochem Pharmacol*, 36, 3613-3619, 1987.
- 12) Ono T, Abe S, Yoshida MC : Hereditary low level of plasma ceruloplasmin in LEC rats associated with spontaneous development of hepatitis and liver cancer. *Jpn J Cancer Res*, 82 : 486-489, 1991.
- 13) Kato J, Kohgo Y, Niitu Y, et al : Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats. *Jpn J Cancer Res*, 84 : 219-222, 1993.
- 14) Ohhira M, Ono M, Ohhira M, et al : Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. *J Gastroenterol*, 30 : 619-623, 1995.
- 15) Carr LG, Mellencamp RJ, Crabb DW, et al : Polymorphism of the rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase cDNA. *Alcohol Clin Exp Res*, 12 : 753-756, 1991.
- 16) Shibuya A, Yoshida A : Frequency of the atypical aldehyde dehydrogenase-2 gene (ALDH2) in Japanese and Caucasians. *Am J Hum Genet*, 43 : 741-743, 1988.
- 17) Lieber CS, DeCarli LM, et al : Hepatic ethanol oxidizing system : in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J Biol Chem*, 245, 2505-2512, 1977.

- 18) Paul B, John M, Deann J, et al : Interactions between the promoter and first intron are involved in transcriptional control of $\alpha 1$ (I) collagen gene expression.
Mol Cell Biol, 8, 4851-4857, 1988
- 19) Beverly AK, Li-Hsuan Y, Phillip C, et al : The first intron of the 4F2 heavy-chain gene contains a transcriptional enhancer element that binds multiple nuclear proteins.
Mol Cell Biol, 9, 2588-2597, 1989.
- 20) Wu J, Forbes JR, Chen HS, et al : The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene.
Nature Genet, 7, 541-545, 1994.
- 21) Yamada T, Suzuki Y, Agui T, et al : Elevation of metallothionein gene expression associated with hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon mutant rat.
Biochem Biophys Acta, 115, 188-191, 1992.
- 22) Kato J, Kohgo Y, Katsuki S, et al : Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats.
Jpn J Cancer Res, 84, 219-222, 1993.