

# 重金属の肝細胞内分布におよぼすフェノバルビタール,コルヒチンの影響

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
著者	浅野, 隆司 保刈, 成男
巻/号	44号
掲載ページ	p. 222-227
発行年月	1987年3月

## 重金属の肝細胞内分布におよぼすフェノバルビタール、 コルヒチンの影響

浅野 隆 司\*・保 刈 成 男\*

(昭和61年10月24日受理)

### Effect of Phenobarbital and Colchicine on Intracellular Distribution of Heavy Metals in the Rat Liver

Ryuji Asano\* and Shigeo Hokari\*

The effects of phenobarbital and colchicine on intracellular distribution of copper (Cu), zinc (Zn) and manganese (Mn) were studied to clarify the mechanism of metabolism of these heavy metals. Phenobarbital-treatment (20 and 80 mg/kg/day, i.p. for 5 days) caused increase in the hepatic concentrations of Cu and Zn, and decrease in the proportion of Cu, Zn and Mn in the microsomes. Colchicine-treatment (0.1 and 0.5 mg/kg/day, i.p. for 5 days), however, caused decrease in the hepatic Cu and Zn concentrations. Colchicine also induced decreases in Cu and Zn in the nuclei and Mn in the microsomes, and increase in Zn and Mn in the soluble cytosol fraction (cytosol). When colchicine was given intravenously in a large dose (40 mg/kg), the concentrations of Cu, Zn and Mn increased significantly in the cytosol, and decreased in the nuclei.

Key words: Phenobarbital, Colchicine, Heavy metals, Intracellular distribution

哺乳動物において、通常経口的に摂取され、小腸より吸収された銅、亜鉛、マンガンなど重金属の多くは、その代謝の主要臓器である肝臓に取り込まれ蓄積される、という事実はよく知られている[1~3]。これら肝臓に取り込まれた重金属の肝細胞内分布に際して、各種の金属結合蛋白が関与しているとの報告もなされているが[4~6]、そのメカニズムについては不明な点が少なくない。こうした肝臓内における重金属代謝のメカニズム解明の一助として、肝細胞に種々の影響をおよぼすことが知られているフェノバルビタール[7]、コルヒチン[8]を投与したラットにおける銅、亜鉛、マンガンの肝細胞内分布について検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 動物および薬剤投与

###### (1) 使用動物

体重 180~200 g の Sprague-Dawley 系雄ラット (静岡県実験動物農業協同組合) を室温 23±1℃、湿度 55±10%、照明時間 14 時間/日の条件で予備飼育し、体重 220~250 g の時点で実験に使用した。飼育期間中、飼料 (MF, オリエンタル酵母) と飲水は自由に摂取させた。

###### (2) 薬剤投与

予備飼育後、ラットを無作為にフェノバルビタール投与群、コルヒチン投与群および対照群とに分け、コルヒチン投与群はさらに腹腔内および頸静脈内投与群に分けた。各投与群について投与量毎に各 5 匹のラットを使

\* 日本大学農獣医学部 獣医薬理学研究室  
(Lab. Veterinary Pharmacology, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.)

用した。

フェノバルビタール投与群：10%フェノバルビタール注射液（フェノバル<sup>®</sup>，三共）を20および80 mg/kg/日（フェノバルビタールとして）の割合で、各々5日間連日腹腔内注射し最終投与の24時間後に肝臓を摘出した。

コルヒチン腹腔内投与群：コルヒチン（半井化学薬品）を0.05%溶液（生理的食塩水で溶解）として、0.1および0.5 mg/kg/日（コルヒチンとして）の割合で、各々5日間連日腹腔内注射し、最終投与の24時間後に肝臓を摘出した。

コルヒチン頸静脈内投与群：コルヒチンを2%溶液として40 mg/kgの割合で、肝臓摘出1時間前、8時間前、12時間前に頸静脈内注射した。

## 2. 肝細胞の分画

ラットを断首放血し、肝臓を速かに摘出し生理的食塩水で洗浄した。肝臓は各分葉で重金属の含有量が異なるため[9]、小片に刻み全体を均一化し、その3gを肝臓全体としての各金属濃度の測定のための試料とした。さらに残り3gを各金属の細胞内分布の測定用として肝細胞の分画を行った。分画は Sourkes と Lal[10]の方法を一部改変して行った。肝小片3gに0.3M スクロース溶液を12 ml 加え、Polytron<sup>®</sup>（CH-6010, Kinematika）で1分間ホモジナイズし、これを600×g、10分間（4℃）遠心した。この沈渣に0.3M スクロース溶液10 mlを加え、再びホモジナイズした後、600×g、10分間（4℃）遠心し、その沈渣を核分画として採取した。また、この上清

と最初の遠心上清を合わせて12,000×g、30分間（4℃）遠心し、この沈渣に0.3M スクロース溶液10 mlを加え再び12,000×g、30分間（4℃）遠心し、その沈渣をミトコンドリア分画として採取した。さらに、この2つの上清を合わせて105,000×g、45分間（4℃）遠心し、沈渣をミクロソーム分画として、上清を可溶性細胞分画として採取した。

## 3. 各金属の定量

肝臓および肝細胞各分画を乾式灰化したのち[11]、原子吸光法により銅、亜鉛、マンガンの定量を行った。

## 結 果

### 1. 銅

各投与群における肝臓1g（湿重量）当たりの銅含有量（銅濃度）およびその肝細胞内分布を Table 1 に示した。対照群の銅濃度は5-16 μg/g で、肝細胞内分布は核に21.1%、ミトコンドリアに24.3%、ミクロソームに7.2%、可溶性細胞分画に47.4%であった。

フェノバルビタール投与群では、80 mg/kg 群で銅濃度の有意な増加（ $p < 0.02$ ）が認められた。肝細胞内分布では、ミトコンドリアにおいて増加傾向がみられたが、ミクロソームでは有意な減少（20 mg/kg 群； $p < 0.02$ 、80 mg/kg 群； $p < 0.01$ ）が認められた。

コルヒチン腹腔内投与群では、0.1 mg/kg 群（ $p < 0.01$ ）、0.5 mg/kg 群（ $p < 0.001$ ）ともに銅濃度の有意な減少が認められた。肝細胞内分布は、0.5 mg/kg 群で

Table 1 Effect of phenobarbital<sup>a</sup> and colchicine<sup>b</sup> on intracellular distribution of hepatic copper in rats

Group	Hepatic Cu concentration <sup>c</sup>	Fraction <sup>d</sup>			
		Nuclei	Mitochondria	Microsomes	Cytosol
Control	5.16±0.52	21.1±1.2	24.3±2.2	7.2±1.6	47.4±3.4
Phenobarbital					
20 mg/kg	5.46±0.88	21.7±1.7	26.6±2.9	4.3±1.4 <sup>f</sup>	47.4±3.7
80 mg/kg	6.19±0.57 <sup>g</sup>	21.9±1.3	27.1±2.3	3.5±1.3 <sup>h</sup>	47.5±3.4
Colchicine					
0.1 mg/kg	3.85±0.56 <sup>h</sup>	20.2±1.5	23.4±1.6	8.6±0.8	47.8±2.7
0.5 mg/kg	3.34±0.42	18.1±1.9 <sup>h</sup>	24.6±2.2	9.1±1.4	48.2±2.8
40 mg/kg <sup>e</sup>					
1 hr	5.20±0.44	15.0±1.3 <sup>i</sup>	24.3±2.1	7.9±2.1	52.8±2.5 <sup>f</sup>
8 hr	5.32±0.76	15.0±1.1 <sup>i</sup>	22.2±2.1	7.4±1.1	55.4±2.5 <sup>h</sup>
12 hr	5.70±0.45	14.7±1.4 <sup>i</sup>	19.9±2.5 <sup>g</sup>	7.1±1.2	58.3±2.4 <sup>i</sup>

a : Phenobarbital was administered 20 and 80 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days.

b : Colchicine was administered 0.1 and 0.5 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days, and separately 40 mg/kg, i.v.

c : Expressed as mean ± standard error in μg per gram wet weight of liver in 5 rats.

d : Percent distributions expressed as mean ± standard error.

e : Rats were sacrificed at 1, 8 and 12 hr after the injection.

f : Significantly different from controls,  $P < 0.05$ . g :  $P < 0.02$ . h :  $P < 0.01$ . i :  $P < 0.001$ .

Table 2 Effect of phenobarbital<sup>a</sup> and colchicine<sup>b</sup> on intracellular distribution of hepatic zinc in rats

Group	Hepatic Zn concentration <sup>c</sup>	Fraction <sup>d</sup>			
		Nuclei	Mitochondria	Microsomes	Cytosol
Control	18.43±1.21	15.0±1.5	21.4±1.1	12.3±1.9	51.3±2.5
Phenobarbital					
20 mg/kg	19.29±1.08	16.3±1.5	22.2±1.7	10.1±1.6	51.4±2.6
80 mg/kg	23.84±1.33 <sup>b</sup>	16.4±1.9	22.9±1.4	8.8±1.3 <sup>e</sup>	51.9±3.0
Colchicine					
0.1 mg/kg	17.71±0.99	9.5±1.4 <sup>h</sup>	16.7±1.7	14.6±1.7	59.2±2.8 <sup>h</sup>
0.5 mg/kg	16.73±1.01 <sup>f</sup>	10.2±1.5 <sup>h</sup>	17.9±1.8	13.2±2.0	58.7±1.5 <sup>h</sup>
40 mg/kg					
1 hr	18.22±1.48	10.9±1.4 <sup>g</sup>	18.7±1.7	12.2±1.7	58.2±2.8 <sup>g</sup>
8 hr	18.24±1.32	11.2±1.9 <sup>g</sup>	16.8±1.5	11.8±1.5	60.2±3.1 <sup>g</sup>
12 hr	18.76±1.36	11.7±1.1 <sup>g</sup>	16.5±1.1	10.4±1.6	61.4±2.1 <sup>h</sup>

a : Phenobarbital was administered 20 and 80 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days.

b : Colchicine was administered 0.1 and 0.5 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days, and separately 40 mg/kg, i.v.

c : Expressed as mean ± standard error in µg per gram wet weight of liver in 5 rats.

d : Percent distributions expressed as mean ± standard error.

e : Rats were sacrificed at 1, 8 and 12 hr after the injection.

f : Significantly different from controls P<0.05. g : P<0.01. h : P<0.001.

核において有意な減少 ( $p<0.01$ ) が認められた。また、ミクロソームにおける増加も認められた。

コルヒチン頸静脈内投与群では対照群と比較し銅濃度に大きな変動はみられなかった。肝細胞内分布では、核においてコルヒチン投与 1 時間後から極めて有意に減少 ( $p<0.001$ ) し、またミトコンドリアにおいても投与 12 時間後に有意に減少 ( $p<0.02$ ) した。一方、可溶性細胞画分では有意な増加 (コルヒチン投与 1 時間後;  $p<0.05$ , 8 時間後;  $p<0.01$ , 12 時間後;  $p<0.001$ ) が認められた。

## 2. 亜鉛

対照群の肝臓における亜鉛濃度は 18.43 µg/g で、肝細胞内分布は核に 15.0%, ミトコンドリアに 21.4%, ミクロソームに 12.3%, 可溶性細胞画分に 51.3% であった (Table 2)。

フェノバルビタール投与群では、亜鉛濃度に増加傾向がみられ、とくに 80 mg/kg 群では極めて有意な増加 ( $p<0.001$ ) が認められた。肝細胞内分布は、80 mg/kg 群でミクロソームにおいて有意な減少 ( $p<0.01$ ) が認められた。

コルヒチン腹腔内投与群では、0.5 mg/kg 群で亜鉛濃度の有意な減少 ( $p<0.05$ ) がみられた。肝細胞内分布については、0.1 mg/kg 群、0.5 mg/kg 群ともに核における有意な減少 ( $p<0.001$ ) と可溶性細胞画分における有意な増加 ( $p<0.001$ ) が認められた。

コルヒチン頸静脈内投与群では対照群と比較し亜鉛濃

度に変動はみられなかった。肝細胞内分布では、核においてコルヒチン投与 1 時間後から有意な減少 ( $p<0.01$ ) がみられたが、一方可溶性細胞画分において投与 1 時間後から有意な増加 (投与 1 時間後 および 8 時間後;  $p<0.01$ , 12 時間後;  $p<0.001$ ) が認められた。

## 3. マンガン

対照群の肝臓におけるマンガン濃度は 2.06 µg/g で、肝細胞内分布は核に 22.5%, ミトコンドリアに 23.6%, ミクロソームに 17.0%, 可溶性細胞画分に 36.9% であった (Table 3)。

フェノバルビタール投与群では、対照群と比較し、マンガン濃度に変動は認められなかった。しかし、肝細胞内分布では、ミクロソームにおいて減少傾向がみられ、とくに 80 mg/kg 群では有意な減少 ( $p<0.001$ ) が認められた。また、可溶性細胞画分では増加傾向がみられ、80 mg/kg 群では有意な増加 ( $p<0.05$ ) が認められた。

コルヒチン腹腔内投与群では、対照群と比較し、マンガン濃度にはほとんど変動は認められなかった。肝細胞内分布については、ミクロソームで有意な減少 (0.1 mg/kg 群;  $p<0.02$ , 0.5 mg/kg 群;  $p<0.001$ ) がみられたのに対し、可溶性細胞画分では増加傾向がみられ、とくに 0.5 mg/kg 群では有意な増加 ( $p<0.01$ ) が認められた。

コルヒチン頸静脈内投与群では、マンガン濃度は増加傾向を示したものの、対照群と比較し大きな変動はみられなかった。肝細胞内分布については、核、ミトコンド

Table 3 Effect of phenobarbital<sup>a</sup> and colchicine<sup>b</sup> on intracellular distribution of hepatic manganese in rats

Group	Hepatic Mn concentration <sup>c</sup>	Fraction <sup>d</sup>			
		Nuclei	Mitochondria	Microsomes	Cytosol
Control	2.06±0.25	22.5±1.1	23.6±1.5	17.0±1.2	36.9±1.5
Phenobarbital					
20 mg/kg	2.05±0.16	22.8±1.4	23.3±1.8	15.8±1.4	38.1±1.6
80 mg/kg	2.43±0.28	22.8±1.9	24.6±1.9	12.1±1.3 <sup>f</sup>	40.5±2.6 <sup>f</sup>
Colchicine					
0.1 mg/kg	1.93±0.12	22.5±1.0	25.0±2.1	14.3±1.6 <sup>h</sup>	38.2±1.0
0.5 mg/kg	1.92±0.11	23.5±1.6	25.5±1.5	10.2±2.1 <sup>i</sup>	40.8±2.1 <sup>h</sup>
40 mg/kg					
1 hr	2.14±0.25	16.8±1.9 <sup>i</sup>	22.7±1.9	16.5±1.2	44.0±2.1 <sup>i</sup>
8 hr	2.46±0.75	17.0±1.4 <sup>i</sup>	19.0±1.7 <sup>h</sup>	16.1±1.5	47.9±2.1 <sup>i</sup>
12 hr	2.57±0.48	16.9±2.0 <sup>i</sup>	18.6±2.1 <sup>h</sup>	14.7±1.7 <sup>f</sup>	49.8±2.6 <sup>f</sup>

a : Phenobarbital was administered 20 and 80 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days.

b : Colchicine was administered 0.1 and 0.5 mg/kg/day, i.p. respectively for 5 days, and separately 40 mg/kg, i.v.

c : Expressed as mean ± standard error in μg per gram wet weight of liver in 5 rats.

d : Percent distributions expressed as mean ± standard error.

e : Rats were sacrificed at 1, 8 and 12 hr after the injection.

f : Significantly different from controls, P<0.05. g : P<0.02. h : P<0.01. i : P<0.001.

リア、ミクロソームで減少傾向がみられ、核ではコルヒチン投与1時間後から (p<0.001)、ミトコンドリアでは8時間後から (p<0.01)、ミクロソームでは12時間後 (p<0.05) に有意な減少が認められた。一方、可溶性細胞画分では投与1時間後から極めて有意な増加 (p<0.001) がみられた。

## 考 察

### 1. 銅

フェノバルビタール投与群では、80 mg/kg 群で肝臓における銅濃度の有意な増加が認められた。これは小腸における銅の吸収が促進され、結果的に肝臓へ輸送される銅量が增大したためであると考えられる。すなわち、フェノバルビタールによって小腸壁の粘膜上皮細胞の増殖が促進されること [7] や小腸粘膜細胞内の銅結合蛋白の合成が促進されること [12] によるものといえる。また、フェノバルビタールによって肝ミクロソームにおける銅結合蛋白の合成が促進された結果 [4, 13]、肝臓への銅の取り込みが増大したことも一因と考えられる。一方、肝細胞内分布では、ミトコンドリアにおける増加率が他の分画と比較して若干高い値を示した。Sourkes と Lal [10] は、肝臓の銅含有量が增加する際に、核およびミトコンドリアへの銅の分布が増大すること、特に肝臓の銅濃度が 100 μg/g に達するまではミトコンドリアへの分布が最も増大することを報告しており本実験結果と一致する。ところで、80 mg/kg 群でミクロソームにおける銅含有

量の減少がみられたが、これはフェノバルビタールによってミクロソームあるいはミクロソーム内の銅結合蛋白が何らかの影響を受けたためと考えられる。

コルヒチン腹腔内投与群では、肝臓の銅濃度の有意な減少がみられた。Levin [14] や Race ら [15] は、コルヒチンによって消化管粘膜上皮細胞が減少することや消化管粘膜の酵素活性が低下することを報告している。こうしたことによって、小腸における銅の吸収が抑制され、その結果、肝臓への輸送量が減少し、必然的に肝臓における銅濃度が減少したと考えられる。また、コルヒチンによって肝細胞における銅結合蛋白の合成が抑制されたことも一因と考えられる。肝細胞内分布では、核において有意な減少が認められた。

Gregoriadis と Sourkes [16] は、肝臓の銅濃度が減少する際に、ミトコンドリアおよび可溶性細胞画分における銅含有量の減少率が他の分画に比較して高くなることを報告しているが、本実験では逆の結果が得られた。

コルヒチン頸静脈内投与群において、肝臓の銅濃度に変動はみらなかったものの、肝細胞内分布では、核、ミトコンドリアにおける著明な減少と可溶性細胞画分における極めて有意な増加が認められた。これは当用量 (40 mg/kg) のコルヒチンが肝細胞の構造に直接的な影響を与えたことを示しており、特に核、ミトコンドリアに対する作用は極めて強力なものと考えられる。従って、可溶性細胞画分における銅含有量の増加は、コルヒチンによる核、ミトコンドリアの障害によって、これらに含ま

れる銅が細胞質内に流出した結果であると考えられる。

## 2. 亜鉛

フェノバルビタール投与群において、肝臓の亜鉛濃度は銅濃度と同様に 80 mg/kg 群で有意な増加が認められた。肝細胞内分布でも銅の場合と同様に、ミトコンドリアにおける若干の増加とミクロソームにおける極めて有意な減少が認められた。従って、この結果は銅と同様のメカニズムによるものと思われる。

コルヒチン腹腔内投与群における肝臓の亜鉛濃度およびその肝細胞内分布も銅の場合とほぼ同様のパターンを示し、肝臓の亜鉛濃度は 0.5 mg/kg 群で有意に減少し、肝細胞内分布では核において有意な減少が認められた。この結果も銅の場合とほぼ同様のメカニズムによるものと思われる。

コルヒチン頸静脈内投与群においても銅の場合と同様に、肝臓の亜鉛濃度に大きな変化はみられなかったものの、細胞内分布では、核、ミトコンドリアにおける減少と可溶性細胞画分における増加が認められた。この結果も銅の場合と同様にコルヒチンの肝細胞への直接的影響によるものと考えられる。

## 3. マンガン

フェノバルビタール投与群では、対照群と比較し肝臓のマンガン濃度にほとんど変動はみられなかった。一方、銅、亜鉛濃度には有意な増加がみられたことから、マンガンはその蓄積に関与する結合蛋白や体内移行のメカニズムが、銅、亜鉛とは若干異なるものと思われる。肝細胞内分布では、ミクロソームにおける減少と可溶性細胞画分における増加が認められた。これはフェノバルビタールがミクロソームに影響をおよぼした結果、ミクロソーム内のマンガンが細胞質に流出したためであると考えられる。

コルヒチン腹腔内投与群でも、肝臓のマンガン濃度には大きな変化はみられなかったが、ミクロソームで有意な減少が認められた。この結果からも、マンガンの蓄積や体内移行のメカニズムが、銅、亜鉛とは異なることが推測できる。

コルヒチン頸静脈内投与群において、肝臓のマンガン濃度およびその肝細胞内分布は、銅、亜鉛とほぼ同様の変化を示した。すなわち、肝臓のマンガン濃度に大きな変化はみられなかったものの、核、ミトコンドリアにおける減少と可溶性細胞画分における増加が認められた。この結果も銅、亜鉛の場合と同様に、40 mg/kg という量のコルヒチンが肝細胞の構造に直接的な影響を与えたためであると考えられる。

## 結 論

フェノバルビタールおよびコルヒチンを投与したラットについて、銅、亜鉛、マンガンの肝臓における濃度とその肝細胞内分布を測定した。

フェノバルビタールによって、肝臓の各金属濃度の増加とミクロソームへの分布の低下が認められた。

コルヒチンによって、肝臓の銅、亜鉛濃度の減少が認められた。肝細胞内分布では、各金属について核における減少と可溶性細胞画分における増加が認められた。また高用量のコルヒチンの頸静脈内投与によって、肝臓における各金属の濃度に変化はみられなかったものの、肝細胞内分布では、核における減少と可溶性細胞画分における減少と可溶性細胞画分における増加が認められた。

## 文 献

- 1 G.E. Cartwright and M.M. Wintrobe 1964: Copper metabolism in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 14, 224-232.
- 2 H. Spencer 1976: Intake, excretion and retention of zinc. 345-351, In "Trace Elements in Human Health and Diseases, Vol. 1", Academic Press, New York.
- 3 A.B.R. Thompson, D. Olatunbosun and L.S. Valberg, 1971: Interrelation of intestinal transport system for manganese and iron. *J. Lab. Clin. Med.*, 78, 642-655.
- 4 G.W. Evans 1973: Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol. Rev.*, 53, 535-570.
- 5 G.W. Evans 1976: Zinc absorption and transport. 181-183, In "Trace Elements in Human Health and Diseases, Vol. 1", Academic Press, New York.
- 6 R.C. Keefer, A.J. Barak and J.D. Boyett 1970: Binding manganese and transferrin in rat system. *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 390-393.
- 7 F.B. Thomas, F.S. McGullough and N.J. Greenberger 1972: Effect of phenobarbital on the absorption of inorganic and hemoglobin iron in the rat. *Gastroent.*, 62, 590-599.
- 8 H. Wisniewski, M.L. Shelanski and R.P. Terry 1968: Effects of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments in anterior horn cells. *J. Cell. Biol.*, 38, 224-229.
- 9 S. Haywood 1981: The non-random distribution of copper within the liver of rats. *Br. J. Nutr.*, 45, 295-300.
- 10 T.L. Sourkes and S. Lal 1977: Intracellular distribution of copper in the liver during chronic administration of copper sulfate to the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 562-572.
- 11 R. Asano and S. Hokari 1983: Effect of phenobarbital on the absorption of copper by rat small

- intestine. Jpn. J. Vet. Sci., 45, 577-583.
- 12 R. Scharf and V. Ullrich 1973: *In vitro* induction of drug monooxygenase activity by phenobarbital in the isolated mouse jejunum. Neunyn-Schmiedeburg's Arch. Pharmacol., 278, 329-332.
- 13 G.W. Evans, R.S. Dubois and K.M. Hambidge 1973: Wilson's disease. Identification of an abnormal copper-binding protein. Science, 181, 1175-1176.
- 14 R.J. Levin 1966: Effect of colchicine on intestinal function in the rat. Gut., 7, 250-257.
- 15 T.F. Race, I.C. Paes and W.W. Faloon 1970: Intestinal malabsorption induced by oral colchicine. Comparison with neomycin and cathartic agents. Am. J. Med. Sci., 259, 32-41.
- 16 G. Gregoridias and T.L. Sourkes 1967: Intracellular distribution of copper in the liver of the rat. Can. J. Biochem., 45, 1841-1851.