〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30(2) 69-78 (1984)

銅化合物投与ラット臓器中の銅の分布と必須金属への影響

藤田昌彦, 土屋恵子, 高島英伍

国立公衆衛生院衛生薬学部

Distribution of Copper and Interaction of Copper with Other Essential Metals in Rat after Oral Administration of Cupric Compounds

MASAHIKO FUJITA, KEIKO TSUCHIYA

and EIGO TAKABATAKE

*Institute of Public Health Shiokaneda,
Minatoku, Tokyo 108, Japan*

(Received October 14, 1983)

The distribution of copper in selected tissues and the metabolic interaction of copper with other essential metals were determined after oral administration of cupric carbonate, basic, and the results were compared with those of cupric sulfate. Male Wistar rats were orally administered for 2, 5, and 11 d with 0.5 mmol/kg of cupric compounds. Distribution of copper and change in essential metal levels were quantified by atomic absorption analysis. In the case of cupric carbonate, the copper was much more distributed in tissues, especially in the liver, than in that of cupric sulfate. Copper level increased progressively in mitochondria-lysosomal fraction of the liver in proportion to the period of administration.

In the 105000 g supernatant fraction, copper was distributed in metallothionein fraction rather than in superoxide dismutase fraction which had been considered as copper storage protein. The administration of cupric compounds resulted in an increase of zinc level in the liver, kidney, and spleen, preferentially in metallothionein fraction of the liver, but it seemed to affect little on iron metabolism.

Keywords — cupric carbonate; cupric sulfate; copper; zinc; iron; metallothionein; superoxide dismutase; liver; kidney; blood

緒 言

銅は古くから広範囲に使用されている金属で, 身近な例としては装飾品に, 調理器具にまた給水給湯管に使用され, 最近では高級食器としての需要も伸びている. これら銅製品を使用することにより, 銅が体内に取り込まれ, 衛生上の危害を生ずるおそれと考えられる. そこで食品衛生法では「銅製調理器具, 食器は銅固有の光沢を有するものか, あるいは腐食によって生ずるさびを有しないもの」と規定している.¹⁾ この規定は緑青は銅そのものよりもはるかに猛毒であるという古来の説に由来するものと考えられるが, 緑青の毒性に関する文献はほとんどない.

本研究では緑青の主成分である塩基性炭酸銅の毒性を明らかにするための一段階として強制的に塩基性炭酸銅をラットに経口投与したときの体内分布及び必須金属である亜鉛, 鉄の体内分布への影響を明らかにした. また母乳代替食品に食品添加物として使用が認められた²⁾ 硫酸銅の体内分布と必須金属の体内分布への影響と比較した.

実 験

動物とその処置 ウィスター系雄性ラット (静岡県実験動物農業協同組合より購入) をコントロール群 (体重 123.5 ± 4.7 g), 硫酸銅投与群 (125.8 ± 3.7 g), 塩基性炭酸銅投与群 (125.9 ± 6.7 g) に分け, コントロール

群には5%アラビアゴム水溶液を2 ml/kg 体重の割合で硫酸銅投与群には硫酸銅（和光純薬製特級， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）の水溶液を0.5 mmol (31.7 mg Cu)/2 ml/kg 体重の割合で、塩基性炭酸銅投与群には塩基性炭酸銅（関東化学製，特級， $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）を5%アラビアゴム水溶液に懸濁した溶液を0.5 mmol (63.5 mg Cu)/2 ml/kg 体重の割合で、1日1回強制経口投与した。投与期間は2日、5日または11日とし、最終投与24時間後に心臓から脱血して殺した。

肝臓は生理食塩水で灌流した後、摘出し、1.15% KCl-50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中でホモジナイズし、常法に従ってミトコンドリア・ライソソーム画分、ミクロソーム画分、サイトソール画分に分画した。

分析法 血液・臓器中の金属濃度は硝酸・過塩素酸で分解した後、日立フレイム型原子吸光光度計 207 型で測定した。

ゲルろ過クロマトグラフィーは Sephadex G-100 をつめたカラム (28 ϕ × 480 mm) にサイトソール 4.0 ml をのせ、緩衝液 (0.02 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.005 M 2-メルカプトエタノール, 0.05 M KCl, 0.003 M NaN_3) で、流速 0.3 ml/min で溶出し、100 滴/1 画分ずつ分取した。溶出液中の重金属濃度は溶出液をフレイム型原子吸光光度計にそのまま噴霧して測定した。

ゲルろ過クロマトグラムの分子量同定は、ベーリンガー・マンハイム山之内社製分子量測定用標準タンパク質キット(チトクローム C: 分子量12000, キモトリプシノーゲン A: 25000, オバルブミン: 45000, アルブミン: 68000, カタラーゼ: 240000) を用いて行なった。

結 果

銅化合物投与を続けると、体重に対する肝臓の比重量は減少した (Table I)。特に塩基性炭酸銅投与群の方

が硫酸銅投与群より影響がやや顕著であった。同様な傾向は腎臓においてもみられたが、脾臓ではほとんど変化がみられなかった。

次に血液及び臓器中の銅の分布を Table II に示した。血中の銅濃度は投与5日後から有意に増加したが、増加の割合は小さかった。これに対し、肝臓中の銅濃度は投与2日後から急速に増加し、その増加の割合は硫酸銅投与群より塩基性炭酸銅投与群の方が著しかった。塩基性炭酸銅投与11日後には銅濃度は亜鉛濃度よりはるかに高濃度となった。対照動物群の腎臓中の銅濃度は肝臓に比して高く、約2倍量の銅が含まれていた。これに銅化合物を投与すると、銅濃度は有意に増加したが、肝臓中の銅濃度ほど増加しなかった。ここでも塩基性炭酸銅投与群の方が多量の銅を蓄積した。脾臓の銅濃度は銅化合物投与によってわずかに増加したにすぎなかった。

つぎに肝細胞内の銅の分布をみるために、肝臓のホモジネートを遠心分画し、各画分中の金属濃度を測定し、肝臓1g 当りの濃度に換算した。対照群の肝臓中の銅はサイトソール画分中に最も多く分布していた。銅化合物を投与すると、この画分中の銅濃度も増加したが、それにもましてミトコンドリア・ライソソーム画分中の銅濃度が増加した。その増加の割合は硫酸銅投与群よりも塩基性炭酸銅投与群の方が顕著であった。ミクロソーム画分中の銅濃度も銅化合物投与日数に比例して増加したが、わずかであった。銅化合物投与によるミクロソーム画分中の銅濃度の増加はわずかであるというこれまでの報告³⁻⁵⁾と一致していた。腎臓についてはサイトソールへの銅の分布を調べた。対照群の腎臓中の銅は約80%がサイトソール画分中に分布しており肝臓の場合よりはるかに高い値であった。銅化合物を投与するとサイトソール画分中の銅濃度は1.7—2.0 倍に増加した。これは肝

TABLE I. Effect of Cupric Compounds on Relative Organ Weight to Body Weight (g/100 g body weight)

Treatment		Liver	Kidney	Spleen
Control		5.33 ± 0.60	1.56 ± 0.07	0.24 ± 0.03
CuSO_4	2 d	5.18 ± 0.13	1.49 ± 0.07	0.24 ± 0.03
CuSO_4	5 d	4.97 ± 0.10 ^{a)}	1.44 ± 0.09	0.27 ± 0.03
CuSO_4	11 d	4.98 ± 0.61	1.63 ± 0.06	0.26 ± 0.01
$\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$	2 d	5.15 ± 0.22	1.03 ± 0.05 ^{b)}	0.23 ± 0.02
$\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$	5 d	4.96 ± 0.46 ^{a)}	1.23 ± 0.19 ^{b)}	0.26 ± 0.01
$\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$	11 d	4.66 ± 0.32 ^{a)}	1.61 ± 0.17	0.23 ± 0.01

Values are means ± standard deviations of 5 rats for each group.

Rats were orally given a solution of cupric sulfate (0.5 mmol/kg body weight) or a suspension of cupric carbonate in 5% arabic gum solution (0.5 mmol/kg body weight) once a day for above period.

a) Significantly different from control group, $p < 0.05$.

b) Significantly different from control group, $p < 0.01$.

TABLE II. Concentration of Copper in Blood and Some Tissues after Oral Administration of Cupric Compounds ($\mu\text{g Cu/g wet weight}$)

Treatment		Blood	Hematocyte ^{c)}	Plasma ^{c)}	Liver	Liver cytosol
Control		0.83 $\pm$ 0.04	0.68	0.83	4.0 $\pm$ 0.7	2.05 $\pm$ 0.19
CuSO ₄	2 d	0.92 $\pm$ 0.05	nd	nd	8.7 $\pm$ 0.8 ^{a)}	3.13 $\pm$ 0.43 ^{a)}
	5 d	1.01 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.60	0.90	19.8 $\pm$ 5.9 ^{a)}	4.55 $\pm$ 0.81 ^{a)}
	11 d	1.11 $\pm$ 0.24	0.56	1.05	22.9 $\pm$ 5.5 ^{a)}	5.55 $\pm$ 2.20 ^{b)}
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	0.97 $\pm$ 0.12	0.64	1.05	33.0 $\pm$ 5.2 ^{a)}	4.70 $\pm$ 0.89 ^{a)}
	5 d	1.03 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.55	0.60	72.6 $\pm$ 8.3 ^{a)}	6.78 $\pm$ 1.16 ^{a)}
	11 d	1.06 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.60	1.00	98.9 $\pm$ 3.7 ^{a)}	7.89 $\pm$ 1.71 ^{a)}
Treatment		Liver microsome	Liver mitochondria	Kidney	Kidney cytosol	Spleen
Control		0.21 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.09	8.00 $\pm$ 1.83	6.38 $\pm$ 1.09	1.18 $\pm$ 0.10
CuSO ₄	2 d	0.44 $\pm$ 0.02 ^{a)}	5.60 $\pm$ 1.35 ^{a)}	8.93 $\pm$ 1.59	6.29 $\pm$ 0.84	1.03 $\pm$ 0.13
	5 d	0.55 $\pm$ 0.21 ^{b)}	14.08 $\pm$ 4.19 ^{a)}	11.30 $\pm$ 0.96 ^{b)}	9.19 $\pm$ 0.80 ^{a)}	1.60 $\pm$ 0.18
	11 d	0.75 $\pm$ 0.03 ^{a)}	nd	11.00 $\pm$ 3.50	10.01 ^{c)}	1.32 $\pm$ 0.03
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	0.76 $\pm$ 0.14 ^{a)}	16.97 $\pm$ 0.35 ^{a)}	8.98 $\pm$ 1.92	6.82 $\pm$ 1.70	1.20 $\pm$ 0.01
	5 d	1.18 $\pm$ 0.29 ^{a)}	35.00 $\pm$ 1.59 ^{a)}	16.02 $\pm$ 2.24 ^{a)}	13.57 $\pm$ 0.72 ^{a)}	1.60 $\pm$ 0.13
	11 d	1.45 $\pm$ 0.65	nd	18.70 $\pm$ 1.30 ^{a)}	13.20 ^{c)}	1.40 $\pm$ 0.09 ^{b)}

The experimental details are as described in Table I.

The results represent means $\pm$ SD for 5 rats.

Significantly different from control, a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$.

c) Result for pooled sample for each group.

nd: not determined.

TABLE III. Concentration of Zinc in Blood and Some Tissues after Oral Administration of Cupric Compounds ($\mu\text{g Zn/g wet weight}$)

Treatment		Blood	Hematocyte ^{c)}	Plasma ^{c)}	Liver	Liver cytosol
Control		4.79 $\pm$ 0.72	6.75	2.10	20.9 $\pm$ 2.8	16.5 $\pm$ 2.7
CuSO ₄	2 d	5.15 $\pm$ 0.13	nd	nd	22.2 $\pm$ 1.7	18.7 $\pm$ 1.5
	5 d	5.82 $\pm$ 0.07 ^{b)}	5.85	2.70	28.7 $\pm$ 2.1 ^{b)}	23.9 $\pm$ 1.4 ^{a)}
	11 d	5.60 $\pm$ 0.22	6.06	2.70	26.0 $\pm$ 3.5	22.9 $\pm$ 1.4 ^{a)}
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	5.15 $\pm$ 0.59	6.20	2.80	22.1 $\pm$ 1.3	19.1 $\pm$ 1.7
	5 d	5.24 $\pm$ 0.06	5.80	2.85	30.8 $\pm$ 5.8	26.2 $\pm$ 7.1 ^{b)}
	11 d	5.50 $\pm$ 0.12	6.50	3.35	23.9 $\pm$ 2.0	20.6 $\pm$ 1.9 ^{b)}
Treatment		Liver microsome	Liver mitochondria	Kidney	Kidney cytosol	Spleen
Control		2.55 $\pm$ 0.24	3.95 $\pm$ 0.19	19.7 $\pm$ 5.2	17.0 $\pm$ 1.6	18.6 $\pm$ 3.0
CuSO ₄	2 d	2.48 $\pm$ 0.54	4.65 $\pm$ 0.19 ^{a)}	19.0 $\pm$ 2.4	18.5 $\pm$ 1.2	14.0 $\pm$ 2.1
	5 d	2.95 $\pm$ 0.27	5.95 $\pm$ 1.01 ^{b)}	26.9 $\pm$ 1.2 ^{b)}	21.0 $\pm$ 0.5 ^{a)}	22.3 $\pm$ 2.5
	11 d	2.33 $\pm$ 0.25	nd	26.3 $\pm$ 1.0 ^{b)}	21.8 ^{c)}	21.0 $\pm$ 0.8
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	2.70 $\pm$ 0.10	4.50 $\pm$ 0.20 ^{a)}	17.1 $\pm$ 1.5	16.4 $\pm$ 0.9	17.2 $\pm$ 0.6
	5 d	2.88 $\pm$ 0.35	4.95 $\pm$ 0.38 ^{a)}	26.4 $\pm$ 1.2 ^{b)}	20.2 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.5
	11 d	2.00 $\pm$ 0.20 ^{a)}	nd	26.7 $\pm$ 1.3 ^{b)}	18.3 ^{c)}	21.1 $\pm$ 1.1

The experimental details are as described in Table I.

The results represent means $\pm$ SD for 5 rats.

Significantly different from control, a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$.

c) Result for pooled sample for each group.

nd: not determined.

TABLE IV. Concentration of Iron in Blood and Some Tissues after Oral Administration of Cupric Compounds ($\mu\text{g Fe/g wet weight}$)

Treatment		Blood	Hematocyte ^{c)}	Plasma ^{c)}	Liver	Liver cytosol
Control		386.0 $\pm$ 94.2	730.0	1.6	44.6 $\pm$ 5.3	10.0 $\pm$ 1.6
CuSO ₄	2 d	284.2 $\pm$ 60.2	nd	nd	38.0 $\pm$ 8.8	8.7 $\pm$ 1.7
	5 d	402.7 $\pm$ 32.6	698.5	3.6	36.9 $\pm$ 7.9	10.7 $\pm$ 0.9
	11 d	445.1 $\pm$ 85.0	581.7	2.0	34.9 $\pm$ 8.6	10.7 $\pm$ 3.7
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	306.3 $\pm$ 12.2	640.0	5.6	34.4 $\pm$ 4.3 ^{b)}	8.1 $\pm$ 1.3
	5 d	371.1 $\pm$ 25.5	571.0	2.1	36.7 $\pm$ 6.0	7.9 $\pm$ 1.7
	11 d	389.6 $\pm$ 66.8	715.0	2.7	47.6 $\pm$ 36.9	10.0 $\pm$ 8.2

Treatment		Liver microsome	Liver mitochondria	Kidney	Kidney cytosol	Spleen
Control		19.0 $\pm$ 3.5	10.4 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 1.7	17.1 $\pm$ 2.3	180.1 $\pm$ 16.2
CuSO ₄	2 d	17.1 $\pm$ 6.4	10.2 $\pm$ 2.8	30.8 $\pm$ 3.5	13.4 $\pm$ 1.3 ^{b)}	132.4 $\pm$ 11.4 ^{a)}
	5 d	16.7 $\pm$ 2.6	8.8 $\pm$ 1.1	31.2 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 0.4	168.4 $\pm$ 26.1
	11 d	13.0 $\pm$ 5.8	nd	34.0 $\pm$ 10.4	16.0 $\pm$ 2.3	177.0 $\pm$ 0.0
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	18.0 $\pm$ 0.8	8.5 $\pm$ 0.8 ^{b)}	28.8 $\pm$ 4.0	13.4 $\pm$ 1.4 ^{b)}	188.8 $\pm$ 44.3
	5 d	13.9 $\pm$ 2.6	7.2 $\pm$ 1.0 ^{a)}	28.2 $\pm$ 1.2 ^{a)}	11.6 $\pm$ 2.0 ^{a)}	156.5 $\pm$ 22.3
	11 d	19.6 $\pm$ 23.3	nd	32.9 $\pm$ 4.3	10.5 $\pm$ 2.3 ^{a)}	166.8 $\pm$ 39.5

The experimental details are as described in Table I.

The results represent means $\pm$ SD for 5 rats.

Significantly different from control, a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$.

c) Result for pooled sample for each group.

nd: not determined.

サイトソール中の銅濃度の増加 (2.7–3.8 倍) よりも少なかった。

Table III に必須元素である亜鉛濃度に対する銅化合物投与の影響を示した。血中の亜鉛濃度は銅濃度と同様に銅化合物投与によって増加の傾向がみられた。しかし、その増加の割合は銅濃度の増加の割合よりも小さかった。肝臓中の亜鉛濃度も血中の場合と同様に増加の傾向がみられたが、その増加は有意ではなかった。腎臓中の亜鉛濃度は銅化合物投与 2 日後では変動がみられなかったが、5 日後からは有意に増加し、約 26 $\mu\text{g/g}$ という平衡濃度に達した。また、脾臓中の亜鉛濃度も銅化合物投与によって増加の傾向がみられたが、有意ではなかった。

肝細胞内画分中の亜鉛濃度はミクロソーム画分中では銅化合物投与によってもほとんど変らなかったが、サイトソール画分中では有意に増加した。また、ミトコンドリア・ライソソーム画分中에서도有意に増加したが、銅濃度の増加程ではなかった。

腎臓中の亜鉛は対照動物群で約 86% がサイトソール画分に分布し、銅化合物投与によってサイトソール画分中の亜鉛濃度も増加した。

また、必須元素である鉄の血液、臓器中濃度への銅化

合物投与の影響を Table IV に示した。銅化合物投与 2 日後には血中鉄濃度は顕著に減少したが、その後鉄濃度は回復し、硫酸銅投与群では対照群よりわずかに高い値にまで上昇した。肝臓、腎臓及び脾臓中の鉄濃度は血中鉄濃度と類似した変動を示した。いずれの臓器でも硫酸銅投与 2 日後に顕著な鉄濃度の減少がみられた。

肝細胞内画分中の鉄濃度は肝臓中の鉄濃度の変動とおおよそ同じ動きを示したが、腎サイトソール中の鉄濃度は塩基性炭酸銅投与によって大きく低下した。

肝臓のサイトソールを Sephadex G-100 でゲルろ過すると、銅は大きく 3 つのピークに、亜鉛は 4 つのピークに分れた。鉄は高分子量画分に 1 つのピークとなって分布した。典型的なゲルろ過クロマトグラムを Fig.1 に示した。そこで分子量 100000 以上の A 画分 ($V_e/V_o = 1.00$)、分子量約 30000 の B 画分 ($V_e/V_o = 1.25$) と分子量約 10000 の C 画分 ($V_e/V_o = 1.78$) の 3 つの画分に分け、それぞれの画分中の銅、亜鉛含量を測定し、銅化合物投与期間との関係を解析した。

これら各画分中の銅含量に対する銅化合物投与の影響をみると (Table V)、A 画分中の銅は銅化合物投与によりわずかに増加の傾向がみられたが、その増加は有意ではなかった。対照動物群では B 画分中に銅の大部分 (92

Fig. 1. Elution Profile of Hepatic and Renal Cytosol Obtained from Control Rat and Cupric Carbonate-Loaded Rat on a Sephadex G-100 Column

The rat was orally administered with cupric compound on a dose of 0.5 mmol/kg/d once a day for 2, 5, and 11 d. The rat was killed 24 h after the last administration and the tissue was homogenized in 1.15% KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.4). The homogenate was fractionated by differential centrifugation at 4°C in Hitachi 20PR-5 refrigerated centrifuge and 55P-ultracentrifuge into the following fractions; nuclear—consisting of nuclei, unbroken cell and cell debris (600 g, 10 min); mitochondrial—consisting of mitochondria and lysosomes (24500 g, 10 min); microsomal-(105000 g, 1 h); cytosolic-(supernatant fraction from microsomal fraction). A 4 ml portion of cytosol was applied on a Sephadex G-100 column (28×480 mm). The column was eluted with a buffer (0.02 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.005 M 2-mercaptoethanol-0.05 M KCl-0.003 M Na₂S₂O₃) and 100 drops fraction was collected. Metal concentration in each fraction was determined with a flame type atomic absorption spectrometer. The allows (I, II, III, IV and V) indicated the eluted positions of catalase (MW 240000), albumin (68000), ovalbumin (45000), chymotrypsinogen A (25000) and cytochrome C (12000), respectively. A; control rat liver, B; control rat kidney, C; cupric carbonate-loaded rat liver for 5 d, D; cupric carbonate-loaded rat kidney for 5 d.

—: Cu. : Zn. - · - : Fe.

%) が分布していたが、銅化合物投与によってもB画分中の銅濃度はほとんど増加しなかった。一方、C画分中の銅濃度は銅化合物投与によって大きく増加し、硫酸銅投与11日後には対照群の25倍、塩基性炭酸銅投与の場合は58倍となった。従ってB画分中の銅濃度の全肝濃度に占める割合は大きく低下した。

次に、亜鉛のサイトソール画分中の分布をみると (Table V), 対照群では高分子量画分 (A) 中に55%の亜鉛が分布し、ついでB画分に多く分布していた。これに銅化合物を投与するとA及びB画分中の亜鉛含量はほとんど変動がみられなかったが、メタロチオネンを含むC画分中の亜鉛量は有意に増加した。しかし、このようにC画分中の亜鉛量が増加しても、サイトソール中の亜鉛の大部分はA画分 (48—49%) 及びB画分 (30—34%) に分布していた。

鉄はほとんどA画分に存在し、銅化合物投与によっても分布の移動は認められなかった。

腎臓サイトソール中の銅の分布 (Table VI) をみる

と、肝臓とは大きく異なって対照動物群で銅の大部分 (78%) が、C画分に分布していた。ついでB画分に18.5%の銅が分布していた。これに銅化合物を投与すると、メタロチオネン (MT) を含むC画分中の銅が有意に増加したが、A及びB画分中の銅濃度はほとんど増加がみられなかった。

腎臓サイトソール中の亜鉛はA画分に最も多く分布し、次に34%の亜鉛がC画分に分布していた。銅化合物を投与すると、A、B及びC画分中の亜鉛量はそれぞれ増加したが、特にC画分中の亜鉛量の増加が大きく、A画分中の亜鉛量よりも多くなった。しかし、その増加は肝臓中の亜鉛の増加に比べるとはるかに小さい。

対照動物群の鉄の分布は肝臓の場合と大きく様相を異にしていた。肝臓ではA画分に1つの大きなピークとして分布していたが、腎臓ではB画分に大きなピーク、それより少し小さなピークがA画分に、そして小さな広がったピークが低分子量画分に存在していた。これらの鉄の分布に対しては銅化合物投与の影響はほとんどみられ

TABLE V. Subcellular Distribution^{b)} of Copper and Zinc in Hepatic Cytosol after Oral Administration of Cupric Compounds ($\mu\text{g Metal/g liver}$)

Treatment ^{a)}		Copper			Zinc		
		Fr. A ^{c)}	Fr. B	Fr. C	Fr. A	Fr. B	Fr. C
Control		0.04 $\pm$ 0.03	1.81 $\pm$ 0.26	0.11 $\pm$ 0.11	10.06 $\pm$ 1.33	7.90 $\pm$ 1.21	0.34 $\pm$ 0.33
CuSO ₄	2 d	0.11 $\pm$ 0.05	2.14 $\pm$ 0.18	1.10 $\pm$ 0.29 ^{e)}	11.22 $\pm$ 2.79	8.07 $\pm$ 0.78	3.71 $\pm$ 0.81 ^{e)}
	5 d	0.13 $\pm$ 0.09	2.08 $\pm$ 0.19	2.50 $\pm$ 0.94 ^{e)}	12.54 $\pm$ 0.85	7.40 $\pm$ 0.67	5.38 $\pm$ 1.12 ^{e)}
	11 d	0.32 ^{f)}	1.83 ^{f)}	2.52 ^{f)}	10.53 ^{f)}	7.49 ^{f)}	3.87 ^{f)}
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	0.14 $\pm$ 0.06 ^{d)}	2.33 $\pm$ 0.12 ^{d)}	2.86 $\pm$ 0.71 ^{e)}	10.17 $\pm$ 1.08	7.21 $\pm$ 1.26	3.99 $\pm$ 0.64 ^{e)}
	5 d	0.19 $\pm$ 0.12	2.22 $\pm$ 0.32	4.40 $\pm$ 0.81 ^{e)}	11.97 $\pm$ 1.75	7.28 $\pm$ 0.44	5.17 $\pm$ 1.34 ^{e)}
	11 d	0.77 ^{f)}	1.96 ^{f)}	5.86 ^{f)}	nd	nd	nd

All values are average of four analyses.

a) See the legend to Table I.

b) See the legend to Fig. 1.

c) Fraction A, B and C correspond to high molecular weight fraction ($V_e/V_0=1.00$), ceruloplasmin fraction (1.25) and metallothionein fraction (1.78), respectively.

d) Significantly different from control group, $p<0.05$.

e) Significantly different from control group, $p<0.01$.

f) Result for pooled sample of each group.

nd: not determined.

TABLE VI. Subcellular Distribution^{b)} of Copper and Zinc in Renal Cytosol after Oral Administration of Cupric Compounds ($\mu\text{g Metal/0.8 g kidney}$)

Treatment ^{a)}		Copper			Zinc		
		Fr. A ^{c)}	Fr. B	Fr. C	Fr. A	Fr. B	Fr. C
Control		0.18 $\pm$ 0.10	0.91 $\pm$ 0.17	3.82 $\pm$ 1.27	5.61 $\pm$ 0.36	3.31 $\pm$ 0.28	4.69 $\pm$ 1.04
CuSO ₄	2 d	0.11 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.15	4.01 $\pm$ 0.56	4.54 $\pm$ 2.01	3.81 $\pm$ 1.13	6.41 $\pm$ 0.58
	5 d	0.12 $\pm$ 0.12	1.15 $\pm$ 0.17	5.74 $\pm$ 0.76 ^{d)}	6.37 $\pm$ 0.51	3.97 $\pm$ 0.33 ^{d)}	6.30 $\pm$ 1.73
	11 d	0.08 ^{f)}	0.91 ^{f)}	7.04 ^{f)}	6.96 ^{f)}	3.16 ^{f)}	7.80 ^{f)}
CuCO ₃ Cu(OH) ₂	2 d	0.14 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.04	4.71 $\pm$ 1.28	5.50 $\pm$ 1.19	3.41 $\pm$ 0.76	5.16 $\pm$ 0.75
	5 d	0.14 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.36	8.95 $\pm$ 0.49 ^{e)}	6.32 $\pm$ 0.77	4.42 $\pm$ 0.32 ^{e)}	5.74 $\pm$ 0.39
	11 d	0.33 ^{f)}	1.27 ^{f)}	12.38 ^{f)}	6.64 ^{f)}	3.78 ^{f)}	7.36 ^{f)}

Legends are as described in Table V.

なかった。

考 察

銅は食品中に広く含まれ、日本人は食品を通して毎日平均 1.60mg の銅を摂取している。⁶⁾ また、銅は必須金属として WHO は成人に対し 1 日最低必要量を 50 $\mu\text{g/kg}$ 体重と勧告している。⁷⁾ 一方、銅を多量に摂取した場合、中毒症状を呈するが、中毒発症量と最低必要量との差が大きいため、あまり中毒事例は報告されていない。

一般に、銅化合物の経口毒性は腸管からの吸収率によって規定される。腸管からの吸収率は水及び腸液への溶解度と強い負の相関関係がある。緑青の主成分である塩基性炭酸銅は硫酸銅よりも水及び人工腸液への溶解度はるかに小さい。したがって溶解度から考えた場合、塩

基性炭酸銅の方が硫酸銅よりも毒性は低いと判断される。長橋ら⁸⁾ は LD₅₀ (24 h) 値を硫酸銅 240 mg/kg、塩基性炭酸銅 540 mg/kg と報告し、銅化合物の LD₅₀ 値は人工腸液及び水への溶解度と負の相関関係にあると報告している。また、銅化合物は一般に経口投与した場合、可溶性の塩の場合でも腸管からの吸収は悪く、投与した銅の 80—90% 以上はそのまま排泄される。⁹⁾ しかし、その一部は体内に取り込まれ特に肝臓中に蓄積する。^{11,12)} 人工腸液の溶解度から、硫酸銅と塩基性炭酸銅の体内取り込み蓄積量を考えると、溶解度の小さい塩基性炭酸銅の方が体内への蓄積量は硫酸銅よりも小さいと推定されるが、今回の実験では塩基性炭酸銅投与群の方が臓器中にはるかに高濃度の銅の蓄積をみた (Table

II). 投与量は両化合物ともモル数としては0.5mmol/kg体重と等しいが、銅の量としては塩基性炭酸銅の方が約2倍多い。それにしても臓器中には2倍以上の銅が蓄積した。このことは塩基性炭酸銅には腸管から吸収され易い何らかの機構が存在することを示すものとする。

腸管から吸収された銅は血液中でアルブミンと結合し、体内を循環し肝臓に取り込まれる。肝ミクロソームでセロプラスミンに合成され、再び血中に放出され体内を循環する。¹³⁾ そこで血清中の銅の95%がセロプラスミンに結合している¹⁴⁾とされている。しかし、Table IIに示した如く、銅化合物投与によっても血中銅濃度は顕著に増加することなく、また血漿中の銅濃度は血液中に占める割合も高くなく、またほとんど増加しなかった。これまで銅過剰投与によっても血液中の銅濃度はほとんど変動しないとの報告¹⁵⁻¹⁷⁾があり、血中銅濃度が増加する時は肝壊死が伴う¹⁸⁻¹⁹⁾という。このことから血中銅濃度は肝によりその恒常性が維持され、その維持機能はかなり強力なものと推定され、また今回の実験の投与量では肝壊死を起こさなかったと考えられる。

肝臓は銅の主要な貯蔵器官であるため、動物に銅を投与すると肝臓中の銅濃度は20倍、¹¹⁾ 45倍、¹⁰⁾ 90倍¹²⁾に増加する。そして肝臓中では主にサイトソール画分に分布するという報告²⁰⁻²²⁾がある一方、サイトソールと同時にミトコンドリア・ライソソーム画分に銅が蓄積するという報告、¹⁰⁾ またミトコンドリア・ライソソーム画分に最も多くの銅が蓄積するという報告^{23,24)}があり、銅の細胞内分布については研究者によって若干異なっている。これはサイトソールに分布した銅は時間とともに減少し、¹⁰⁾ それとともにミトコンドリア・ライソソーム画分に増加する²²⁾ことから、上記の分布の差は銅投与期間や銅投与から殺すまでの時間の差によるものと考えられる。今回の実験では投与期間が長期になるに従い、Fig. 2に示す如く、ミトコンドリア・ライソソーム画分中の銅濃度は増加していった。このことから肝臓に貯留する銅の大部分はミトコンドリア・ライソソーム画分に貯り、従って Goldfisher²⁵⁾が示唆したようにこの画分は肝臓での銅の最終貯蔵部位と考えられる。このミトコンドリア・ライソソーム画分中に蓄積した銅はMTに由来するものと考えられる。すなわち、ライソソームはMTを取り込み分解する²⁶⁾ことから、それは銅を含むMTを取り込み、MTを分解した後、銅を貯留するものと考えられる。また、銅を含むMTは特に酸化され易い²⁷⁾ため、低温で分画してもMTが酸化され多量体となり、それがミトコンドリア・ライソソーム画分に分布²⁸⁾したという可能性もある。

Fig. 2. Subcellular Accumulation of Copper in Liver after Administration of Cupric Compounds

The rat was treated and the subcellular fractions were divided as described in Fig. 1.

— : liver, whole.
 --- : mitochondrial fraction.
 : cytosolic fraction.

対照群の腎臓には肝臓の約2倍の銅が含まれ、その約80%がサイトソール画分に分布していた。この値は肝サイトソール中の濃度よりもはるかに大きな値である。ラットの腎MTは他の臓器中のMTや他の動物のMTと違い銅含量が非常に高く、週令とともにMT含量も増加する²⁷⁾ことから、サイトソール中の銅はMTに由来するものと考えられる。このサイトソール中の銅は銅化合物投与によって11日後には対照群の1.6—2.1倍に増加した。

ラット肝サイトソールを Sephadex G-100でゲルろ過すると、銅は主に3つのピークに分れた。このゲルろ過パターンは銅化合物投与のラット、^{10,30,43)} 牛、³¹⁾ 羊、³²⁾ 山羊³³⁾や豚³⁴⁾など各種動物についても報告されているが、銅の投与方法や動物種によって銅の分布はかなり異なっている。最初のピークはオキシダーゼ活性よりセロプラスミン(CP)を含む画分で、CPは分子量132000の蛋白、1モル当り6ケの銅原子を含む。³⁵⁾ また、ゲルろ過画分についてスーパーオキシドデスムターゼ(SOD)活性を測定³⁶⁾するとFig. 3に示す如く、銅の第2のピークはSOD活性の溶出位置と一致した。SODは以前肝臓の銅貯蔵蛋白とみなされていたが、最近では組織中に広く分布し、O₂・ラジカルを分解し、H₂O₂とO₂に変える活性を有し、分子量34000、0.34%の銅を含む³⁷⁾

Fig. 3. Distribution of SOD Activity and Cu in Fractions Obtained after Gel-Filtration on Sephadex G-100

Rat was orally administered with cupric carbonate, basic on a dose of 0.5 mmol/kg/d for 5 d. The hepatic cytosol was prepared and gel-filtered as described in Fig. 1. SOD activity was assayed according to method of Beauchamp and Fridovich.³⁶⁾

—: Cu.: SOD.

とされている。第3のピークは分子量と銅投与でラット肝臓に MT が誘導合成されるという報告^{20,30,38-40)}から、MT を含む画分と考えられる。銅は MT の主要な構成金属⁴¹⁾であり、MT 内での結合力も強い^{31,42,43)}ことから、銅化合物を投与することにより、投与された銅は MT を形成してC画分中に含まれるものとする。C画分中の銅は硫酸銅投与11日後に対照動物群の25倍、塩基性炭酸銅投与により58倍にも増加した。MTは銅の細胞内代謝で重要な役割を演じており、^{30,39,40)}銅を先ず蓄積してついで SOD を含むB画分に銅を伝達するというが、今回の実験ではB画分中の銅濃度はほとんど増加せず、C画分の銅濃度が増加するにとどまった。このことは銅貯蔵蛋白とみなされていた SOD が銅の最終貯蔵蛋白ではないことを示すものとする。一方、A画分中の銅濃度もわずかながら増加した。この結果はこれまで報告されている結果^{30,45,46)}と同じであり、A画分にも高分

子の銅結合蛋白が存在する⁴⁷⁾ものと考えられる。

また、肝サイトソール中の亜鉛についてゲルろ過パターンをみると、銅と異なって高分子画分 (A画分) に最も多く、ついでB画分に多く含まれ、これら2つの画分の亜鉛を合計すると98%にも達した。これに銅化合物を投与するとA画分及びB画分中の亜鉛量はほとんど増加しないのに対し、MT 画分 (C画分) 中の亜鉛が有意に ($p < 0.01$) 増加した。これは銅投与により MT が生成し、そこに亜鉛が蓄積⁴⁸⁾したものとする。

腎臓中の亜鉛濃度は対照動物群において肝臓中の亜鉛濃度とほとんど同じであったが、その亜鉛の86%はサイトソール画分に分布していた。このサイトソールの G-100 ゲルろ過パターンは肝臓のそれとは異なり、分子量約10000近辺に大きなピークがあった。これは Suzuki²⁹⁾が指摘するように、本来存在している Cu,Zn-MT のピークと考える。

銅は鉄代謝に深いかわりを持ち、鉄が肝臓からヘモグロビン合成に移送される際に Fe(II)の Fe(III) への酸化を触媒する。^{49,50)}従って銅欠乏は貧血や肝臓中の鉄濃度の上昇をもたらす^{19,50,51)}が、一方銅過剰投与も鉄代謝に影響を与え、鉄利用が低下することによりヘモグロビン生産が低下する。⁵²⁾また、ヒトでは肝、腎の障害、メトヘモグロビン血症、^{50,53)}豚では鉄吸収阻害による小赤血球低色素性貧血、^{19,52)}羊では肝壊死につづいて肝臓からの銅の遊出、血中銅濃度の増加、メトヘモグロビン血症、溶血^{17,54)}が報告されている。しかし、今回の実験では血液及び臓器中の鉄濃度にはほとんど影響が認められず、従って0.5 mmol/kg 体重の投与量はラットの鉄代謝にほとんど影響を与えなかったと考える。

以上の結果をまとめると、塩基性炭酸銅は硫酸銅に比較すると体内に多量に取り込まれ、特に肝臓中に多く蓄積した。そして肝細胞中では投与期間とともにミトコンドリア・ライソソーム画分に銅が一番多く蓄積し、この画分は銅の最終貯蔵部位と考えられた。また、サイトソール画分中では SOD 画分より、むしろ MT 画分に蓄積した。肝臓中の亜鉛量は銅化合物投与により増加し、その増加はサイトソール画分に顕著であった。一方、血液、臓器中の鉄濃度は銅化合物投与によってもほとんど変動がみられず、塩基性炭酸銅 0.5 mmol/kg 11日間投与では鉄代謝に大きな影響をもたらさないものと思われる。

謝辞 本研究の一部は厚生省食品衛生研究費によって行なった。

引用文献

- 1) 厚生省告示第370号, 食品添加物等の規格基準 (1959).
- 2) 厚生省令第36号, 昭和58年 8 月27日.
- 3) R.G. Helman, L.G. Adams, K.R. Pierce, C.H. Bridges, E.M. Bailey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **67**, 238 (1983).
- 4) S. Lal, T.L. Sourkes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **18**, 562 (1971).
- 5) G. Gregoriadis, T.L. Sourkes, *Can. J. Biochem.*, **45**, 1841 (1967).
- 6) 山県 登, “微量元素,” 産業図書, 東京, 1977. p. 183.
- 7) WHO, WHO Technical Report Series, No. 532 (1973).
- 8) 長橋 捷, 和田 攻, 小野 哲, 岩井秀明, 山口喜久, 野口 晟, 日衛試, **31**, 129 (1976).
- 9) C.A. Owen, *Am. J. Physiol.*, **207**, 1203 (1964).
- 10) T. Kassanov, E. Russanov, *Bulg. Acad. Sci.*, **4**, 13 (1978).
- 11) C.A. Owen, J.B. Hazelrig, *Am. J. Physiol.*, **215**, 334 (1968).
- 12) S. Lal, R. Papeschi, R.J.S. Duncan, T.L. Sourkes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**, 395 (1974).
- 13) N. Marceau, N. Aspin, *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 351 (1973).
- 14) C.G. Holmberg, C.B. Laurell, *Acta Chem. Scand.*, **5**, 921 (1951).
- 15) G.W. Evans, *Physiol. Rev.*, **53**, 535 (1973).
- 16) G.S. Shields, H. Morkowitz, W.H. Klassen, G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe, *J. Clin. Invest.*, **40**, 2007, (1961).
- 17) E.C. Theil, K.T. Calvert, *Biochem. J.*, **170**, 137 (1978).
- 18) C. Gopinath, J. McC. Howell, *Res. Vet. Sci.*, **19**, 35 (1975).
- 19) W.F. Gipp, W.G. Pond, J. Tasker, D.V. Campen, L. Krook, W.J. Visek, *J. Nutr.*, **103**, 713 (1973).
- 20) H. Suzuki, O. Wada, *Ind. Health*, **20**, 35 (1982).
- 21) R.E. Thiers, B.L. Valee, *J. Biol. Chem.*, **226**, 911 (1957).
- 22) R.G. Helman, L.G. Adams, K.R. Pierce, C.H. Bridges, E.M. Bailey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **67**, 238 (1983).
- 23) S. Goldfischer, E. Sternlieb, *Am. J. Pathol.*, **53**, 883 (1968).
- 24) G.W. Evans, *Physiol. Rev.*, **53**, 535 (1973).
- 25) S. Goldfisher, *Am. J. Pathol.*, **46**, 977 (1965).
- 26) S.L. Feldman, M.L. Failla, R.J. Cousins, *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 638 (1978).
- 27) K.T. Suzuki, M. Yamamura, T. Maitani, *J. Lig. Chromatogr.*, **3**, 1385 (1980); T. Maitani, *Biochem. J.*, **199**, 289 (1981).
- 28) H. Porter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 61 (1974).
- 29) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Toxicol. Lett.*, **6**, 301 (1980); K.T. Suzuki, K. Kubota, S. Takenaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2792 (1977).
- 30) T. Terao, C.A. Owen, Jr., *Tohoku J. Exp. Med.*, **120**, 209 (1976).
- 31) I. Bremner, R.B. Marshall, *Br. J. Nutr.*, **32**, 293 (1974); *idem, ibid.*, **32**, 283 (1974).
- 32) G. Norheim, N.E. Soli, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 178 (1977).
- 33) M.M. Grimsrud, N.E. Soli, T. Silvertsen, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 319 (1979).
- 34) I. Bremner, *Br. J. Nutr.*, **35**, 245 (1976); A. Frosli, G. Norheim, *Acta Vet. Scand.*, **18**, 471 (1977).
- 35) E. Frieden, “Biological Roles of Copper,” *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1980, p. 94.
- 36) C. Beauchamp, I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **44**, 276 (1971).
- 37) J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 38) A.E. Port, D.M. Hunt, *Biochem. J.*, **183**, 721 (1979).
- 39) F.A. Day, M. Panemangalore, F.A. Brady, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **168**, 306 (1981).
- 40) T. Terao, C.A. Owen, *Am. J. Physiol.*, **224**, 682 (1973).
- 41) R.D. Irons, J.C. Smith, *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 289 (1976); I. Bremner, *Br. J. Nutr.*, **35**, 245 (1976).
- 42) A.D. Garnica, W.Y. Chan, O.M. Rennert, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **8**, 302 (1978).
- 43) I. Bremner, R.K. Mehra, *Chem. Scr.*, **21**, 117 (1983).
- 44) I. Bremner, N.T. Davies, *Br. J. Nutr.*, **36**, 101 (1976).

-
- 45) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 471 (1979).
 - 46) I. Bremner, "Biological Roles of Copper," Excerpta Medica, Amsterdam, 1980, p. 41.
 - 47) V. Wesen, H. Rupp, F. Donay, F. Linnemann, W. Veelter, W. Voetsch, G. Jung, *Eur. J. Biochem.*, **39**, 127 (1973).
 - 48) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Toxicol. Lett.*, **6**, 301 (1980).
 - 49) E. Frieden, H.S. Hsieh, *Adv. Enzymol.*, **44**, 187 (1976).
 - 50) J.L. Evans, P.A. Abraham, *J. Nutr.*, **103**, 196 (1973).
 - 51) E.B. Hart, H. Steenbock, J. Waddel, C.A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.*, **77**, 797 (1928).
 - 52) M.F. Gipp, W.G. Pond, F.A. Kallfelz, J.B. Tasker, D.R.V. Campen, L. Krook, W.J. Visek, *J. Nutr.*, **104**, 532 (1974).
 - 53) K.S. Chugh, P.C. Singhal, B.K. Sharma, *Ann. Intern. Med.*, **82**, 226 (1975).
 - 54) J.R. Todd, R.H. Thompson, *Nature* (London), **191**, 89 (1961).