塩酸抽出法による臓器銅定量法の研究

行徳内科学教室 (主任 行徳健助教授)

松 谷 宏

Hiroshi Matutani

栄養学教室 (主任 島田敏夫教授)

吉 野 芳 夫

Yosio Yosino

緒 言

銅の生体内分布は広く筋肉、骨、臓器、血液及び皮膚等に見出される¹⁾。現在銅蛋白体として知られているものは Hemocuprein, Hepatocuprein²⁾, Ceruloplasmin 等であるが、又 Tyrosinase³⁾, Cytochrome Oxidase 等の構成成分であると云われている。

著者等は主として臓器銅の定量的研究を行つているが、従来は組織を灰化しその灰分について銅を定量している⁴⁾⁵⁾。然し灰化法は多数の標本を測定するのに不便であるのみでなく銅蛋白体には鉄に於ける Hematin の様に強靱な化合物は見られないので銅を単離するのは是非とも灰化を要するかどうか疑はしい。そこで操作が簡単な抽出法によつて定量可能なら、それに越した事はないのでその成否について検討した。その結果著者等の塩酸抽出法による銅量は灰化総銅量に等しい事を認めたので、組織銅定量法を考案した。いささか見るべきものと信じ報告する。

実 験

1) Et. Carbamate による銅の呈色について

Et. Carbamate は銅 Ion に特異的に反応するものでない。従つて各種金属 Ion の混合液より銅を測定する場合何等か前処置を加えて銅以外の金属による発色を抑えなくてはならない。第 1 表に示すように各種

金属塩溶液に Et. Carbamate を加えると、 Cu^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} では褐色沈澱、 Co^{++} , Ni^{++} では黄緑色沈澱、 Ca^{++} , Cd^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} では白濁する。これを Isoamylalcohol で抽出すると抽出層は Cu^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} では褐色透明、 Co^{++} , Ni^{++} は黄緑色透明その他は透明である。又上記の各塩溶液に飽和 Pyro 磷酸 Na 溶液を加え次に Et. Carbamate を加え呈色させ Isoamylalcohol で振ると抽出液は Cu^{++} を含むもののみが褐色を呈し Co^{++} , Ni^{++} は黄緑色その他は総て無色となつた。即ち Pyro 磷酸 Na の添加で Co^{++} , Ni^{++} は依然として呈色するが Cu^{++} の色調とは異なる事及び鉄の呈色は抑制される事を知つた。

2) 銅測定時の至適条件

被検物として銅液、混合鉄液と銅鉄混合液の 3 者を用い、その塩酸 Trichlor 酢酸溶液又はそれを中和したものに Pyro 磷酸 Na を添加した後、Et. Carbamate で呈色 Isoamylalcohol で抽出して定量化への条件を検べてみた。その結果 (第 2 表, 第 3 表) 銅の呈色は塩酸酸性より中性にわたり安定であるが安門鹼性になるとやや呈色度が落ちる。2 価, 3 価混合鉄液の場合は強塩酸酸性では抽出液は緑色を呈色し、一時間放置で褪色すること、pH 4, 5 では強い黒褐色、pH 6 では鉄呈色は全く認められぬことをみた。銅鉄

第 1 表 種々の金属 Ion と Et. Carbamate との呈色に及ぼす Pyro 磷酸 Na の影響

		Cu^{++} 100 γ	Fe^{++} 1 mg	Fe^{+++} 1 mg	Co^{++} 100 γ	Ni^{++} 100 γ	Ca^{++} 100 γ	Cd^{++} 100 γ	Mg^{++} 100 γ	Zn^{++} 100 γ
無 処 置	水	褐+	褐+	褐+	黄緑+	黄緑+	白 濁	白濁	白濁	白濁
	Al	褐-	褐-	褐-	黄緑-	黄緑-	無 -	無-	無-	無-
ピロ磷酸 Na 添加	水	褐+	無-	無-	黄緑+	黄緑+	無 -	白濁	無-	無-
	Al	褐-	無-	無-	黄緑-	黄緑-	無 -	無-	無-	無-

註 水：金属塩水溶液 Al：呈色後 Isoamylalcohol で抽出した部分 +：沈澱あり -：透明

第2表 銅鉄 Et. Carbamate 錯塩の呈色と pH との関係

	Cu ⁺⁺ 10 γ	Fe ⁺⁺ + Fe ⁺⁺⁺ 1 mg	Cu ⁺⁺ +Fe ⁺⁺ + Fe ⁺⁺⁺ 混合液	
			1時間後	24時間後
1. HCl	0.224	0.006	0.246	0.232
2. HCl+3 Cl	0.224	0.006	0.246	0.236
3. Buffer (pH 4)	0.224	0.114	0.724	0.324
4. Buffer (pH 5)	0.224	0.212	0.836	0.354
5. Buffer (pH 6)	0.224	0.006	0.234	0.231
6. HCl+3 Cl →中和 +Buffer	0.224	0	0.224	0.224
7. Ammonia alkali	0.209	0	0.215	0.215
8. 対 照	0.224	0	0.224	0.224

第3表 Pyro 磷酸 Na 添加時の溶媒の条件と 鉄 Et. Carbamate の呈色について

	水溶液	抽出直後	1時間後
1. HCl	黒褐色	緑 色	無 色
2. HCl+3 Cl	黒褐色	緑 色	無 色
3. Buffer (pH 4)	黒褐色	黒褐色	黒褐色
4. Buffer (pH 5)	黒褐色	黒褐色	黒褐色
5. Buffer (pH 6)	無 色	無 色	無 色
6. HCl+3 Cl→中和 +Buffer	淡黄色	無 色	無 色
7. Ammonia alkali	褐 色	無 色	無 色
8. そのまゝ	無 色	無 色	無 色

混合液では pH 6 で呈色させたものが最も安定であつた。これ等の結果を定量的に見ると第2表の様に塩酸 Trichlor 酢酸混合液を 5% Ammonia 水で中和し酢酸緩衝液で pH 6 に補正したものが最も対照値と一致した。

3) 検量曲線

各種濃度の銅液に Pyro 磷酸 Na, Et. Carbamate を加えて発色, Isoamylalcohol 6 ml 添加し振盪抽出し, Alcohol 層を厚さ 1 cm, Filter 420 mμ で測定すると(第1図)銅 1~15 γ 迄の間 Beer の法則にかなう事が判る。

4) 塩酸加温法による臓器銅抽出実験

Gubler 等⁹⁾によると終濃度 1N 塩酸 10 分間の作用で血漿銅は完全に抽出されると云う。組織銅 0.5 g に 2N 塩酸 2 ml を加へ煮沸浴中で加温浸出し, 次で Trichlor 酢酸で除蛋白しその上清について銅を測定すると第2図の様に加温 7 分でその値は極限に達

(Ex) 第1図 検量曲線

(γ/g) 第2図 2N 塩酸・100°C 加温時の抽出時間

実験動物：海猿肝

し, 15分値迄不変である。

次に組織銅 0.5 g に蒸溜水又は各種濃度の塩酸を加え加温抽出した試料について銅量を求めると(第4表), 単に臓器蛋白質を加温変性させたものでは抽出不充分であり, 2N 又は 4N 塩酸抽出銅量は共に同一検体を灰化測定したものと相等しい。例えば湿性灰化銅量に比較して兎肝臓では平均 96%, 海猿では平均 100% の抽出率を示す。又牛, 馬, 豚の肝臓, 脾臓,

第4表 煮沸浴中加温 10 分間に於ける抽出銅量

抽 出 液			抽出銅量 (γ/g)
蒸 溜 水			8.8
1 N 塩 酸			9.9
2 N 塩 酸			11.9
4 N 塩 酸			11.9
灰 化 実 験			11.5

実験動物：海猿肝(新鮮臓器)

腎臓でも灰化銅量によく一致した。従つて塩酸抽出銅は臓器総銅量を示すものとみてよい（第5表、その1, 2）。

第5表 (1) 実測値その1

材 料	酸抽出法 (r/g)	灰 化 法 (r/g)	比
兎 肝 臓	13.2	13.8	0.96
	9.8	9.3	1.05
	4.8	4.1	1.17
	18.9	22.7	0.83
	14.8	14.7	1.00
	8.6	8.9	0.96
	10.4	10.8	0.96
	5.8	6.0	0.96
	9.7	9.8	0.98
	12.4	12.4	1.00
平 均	10.8	11.3	0.96
海 猿 肝 臓	7.6	7.0	1.08
	8.3	8.6	0.97
	5.1	5.4	0.94
	8.4	8.4	1.00
平 均	7.4	7.4	1.00

(新鮮臓器)

第5表 (2) 各種動物の実測値その2

動物種類	材 料	酸抽出法 (r/g)	灰 化 法 (r/g)
牛	肝	11.4	11.4
	脾	21.0	22.8
	腎	5.2	6.2
馬	肝	3.9	4.6
	脾	9.9	10.2
	腎	4.3	5.6
豚	肝	10.8	9.8
	脾	17.4	11.6
	腎	6.6	6.2
海 猿	肝	8.4	8.4
	脾	0.7	1.0
	腎	8.1	8.1
家 兎	肝	8.9	8.5
	脾	2.1	2.5
	腎	4.7	4.5

(新鮮臓器)

5) 同一測定値の安定性

同一海猿の肝臓、脾臓、腎臓及び脳組織より数個の

測定標本を作り、2N 塩酸抽出性銅を測定すると第6表に示す如くその測定値は夫々極めて良く一致する。

第6表 同一測定値の変動

臓 器	試験管 番号	1	2	3	4	平均
肝 臓		7.8	8.1	8.4	8.4	8.18
脾 臓		1.2	1.9	1.2	1.4	1.43
腎 臓		4.2	4.2	3.9	4.2	4.13
脳		5.1	5.4	5.4	5.1	5.25

単位：新鮮臓器 1g あたりの含銅量 (r)

6) 添加実験

海猿肝臓 0.5g に標準銅液を 5r, 10r, 15r 加え、総銅量を求めその添加銅量の再検値をみると平均 100%~98%の割合に検出される。(第7表)

第7表 添加実験

添 加 量	測定値	理論値	検出率
肝臓 0.5g	6.1r	6.1r	
肝臓 0.5g+Cu5r	11.1r	11.1r	100%
肝臓 0.5g+Cu10r	16.0r	16.1r	99%
肝臓 0.5g+Cu15r	20.8r	21.1r	98%

実験動物：海猿

7) 臓器色素の Isoamylalcohol 移行性

銅, Et. Carbamate の呈色は黄褐色なので臓器色素殊に Flavin 色素の妨害は注意を要する。然し第8表に示す様に塩酸抽出液から Flavin 色素は Isoamylalcohol に移らない。Flavin 色素以外のものが肝臓ではごく僅か移行する様であるが誤差範囲に入るものと考えてよい。

第8表 Isoamylalcohol による Flavin 抽出の有無

	E_x
Flavin (0.1 mg)	0
Flavin+Et. Carbamate	0.002
Flavin+肝臓 0.5g	0.006

8) 測定実施法

(i) 器具と試薬

器具：内容 15cc 硬質遠沈管

ガラス棒

ガラス粉末

無灰濾紙

試薬：2N 塩酸

20% Trichlor 酢酸

5% Ammonia 水

飽和 Pyro 磷酸 Na 溶液

2 M 酢酸緩衝液 (pH 6)

0.1% Et. Carbamate 水溶液 ※1

Isoamylalcohol

標準銅液 (Cu 5 r/ml) ※2

※1 Diethyl Dithiocarbamin 酸 Na 100 mg を水に溶かし全量 100 ml とする。褐色壺内保存。

※2 標準銅液, 規準銅液 (Cu 1 mg/ml) 硫酸銅純結晶 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 392.8 mg. を水に溶かし, 正確に 100 ml とする。この規準液を 200 倍に稀釈し標準銅液とする。標準銅液は毎回新らしく作る。

(ii) 操作

組織片 0.5 g を内容 15 ml の硬質遠沈管にとりガラス粉末約 1 g とガラス棒で細挫した後, 2 N 塩酸 2 ml を加え, 緩やかに攪拌しながら煮沸浴中で 10 分間加温抽出する。ついで取出し放冷してから 20% Trichlor 酢酸 2 ml を加え, 緩やかに攪拌後約 15 分間放置する。之を 3000 r.p.m. で約 15 分間遠沈し上清をとる。次に沈渣に再び 2 N 塩酸 2 ml, 20% Trichlor 酢酸 2 ml を加え攪拌し遠沈上清をとる。前後 2 回の上清を同一試験管にとり 5% Ammonia 水を滴下し Lackmus 中性とする。これに 2 M 酢酸緩衝液 (pH 6) 2 ml, 標準銅液 (Cu 5 r/ml) 1 ml, 飽和 pyro 磷酸 Na 溶液 2 ml, 0.1% Et. Carbamate 溶液 1 ml を振盪しながら順次加える。最後に精製 Isoamylalcohol 6 ml を加へ約 15 秒間激しく振盪し銅呈色を Alcohol 層へ移行させる。此の際 Alcohol 層の濁濁する事がしばしばあるが, 少時放置後 Alcohol 層のみを乾いた無灰濾紙で濾すと容易に除く事が出来

る。Alcohol 層は銅の存在に応じて黄金色～黄褐色を呈する。対照として標準銅液 1 ml に同様に試薬と操作を加えたものを作る。被検物, 対照の双方を Filter 420 $\text{m}\mu$ で比色測定し吸光度より銅量を求める。

計算。

$$\frac{E_x - E_0}{K} \times \frac{1}{\text{臓器重量}} = \text{臓器銅量 } r/g$$

E_x : 被検物の吸光度

E_0 : 対照 (銅 5 r) の吸光度

K : 検量曲線より得た銅 1 r の示す吸光度

結 論

1) 塩酸加加温法によつて臓器銅を定量的に抽出し得る。此の事実にもとづいて臓器銅微量定量法を組立てた。

2) 銅測定法を組立てる上に必要な条件を吟味した。

文 献

1. M.M. Wintrobe, G.E. Cartwright, and C.J. Gubler: J. Nutrition **50**, 395 (1953)
2. T. Mann, and D. Keilin: Proc. Roy. Soc. Lond. **126**, 303 (1938)
3. T.B. Fitzpatrick, S.W. Becker, J.R., A.B. Lerner, and H. Montgomery: Science **112**, 223 (1950)
4. 吉川春寿: 臨床医化学 **I**, 321 (昭 30, 協同医書出版社, 東京)
5. 茂在敏司, 豊田正輝: 日新医学 **39**, 273 (1952)
6. C.J. Gubler, M.E. Lahey, H. Ashenbucker, C.E. Cartwright and M.M. Wintrobe: J. Biol. Chem. **196**, 209 (1952)