Ceruloplasmin代謝にかんする研究

第2編 肝臓における銅, ceruloplasminの動態について

昭和大学医学部第二内科教室 (指導 清水盈行教授)

藤 井 陽 三

STUDIES ON CERULOPLASMIN METABOLISM

(II) DYNAMICS OF COPPER AND CERULOPLASMIN IN THE LIVER

Yozo Fujii

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Showa University

(Director: Prof. Mitiyuki Shimizu)

概要 第1編* 記載のごとくceruloplasmin合成の場合は主として肝であると推定されるが, ceruloplasminは血清蛋白であり, 肝における合成に加え, 血清への放出の機構も問題で, またWilson病についても肝における銅とceruloplasminの関連を重視したものも多く, ceruloplasmin代謝における肝の役割は大である. 肝での銅の動態追究によつて, 複雑な肝の役割の一端に検討を加えるべく, 肝スライスでの単純化された諸条件下のin vitroでの $^{64}\text{CuCl}_2$ を用いての実験を行ない, ceruloplasminの肝での合成と銅の肝への取り込みにはactive transportの機構が推定され, 一部は蛋白合成と関連したものと思われ, さらに肝内銅の存在様式が, そのtransportに影響する一因と推定された.

I. 緒 言

第1編* 記載のごとく, 家兎における ^{64}Cu の実験から, ceruloplasminの合成の場合は主として肝であることが容易に推定される. 一方ceruloplasminは貯蔵蛋白ではなく, 血清蛋白であるため, 肝における合成に加えて, 肝から血清中への放出の機構も考慮にいれなければならない.

そこで血清ceruloplasmin値の異常な低下を来すWilson病¹⁾²⁾についてこれを眺める時, 次の事実が観察される. すなわち, ^{64}Cu による血清内ceruloplasminの動態について正常と比較した際, 血清内放射活性の下降の緩徐, 二次的上昇の欠如³⁾, また肝, 脳などにおける銅の沈着⁴⁾⁵⁾, 尿中

への銅の著明な排泄増加⁶⁾, 銅の吸収増加⁷⁾⁸⁾および, 胆道中への排泄障害⁹⁾などがあげられる.

これらWilson病の真の病因は, ある種の組織蛋白の銅に対する異常な親和性によるとする説¹⁰⁾, および, ceruloplasmin合成の障害によるとする説¹¹⁾¹²⁾など, いまだ明らかではないが, 肝における銅とceruloplasminの関連を重視したものが多い. このような事実からもceruloplasmin代謝における肝の役割は大きく, かつ肝における銅の動態追究によつてのみ, 両者の関係をtraceできるものとする. これを追究するためには, 影響する他因子を除外して, 可能な限り単純化された条件下で検討する必要に迫られる. この意味で著者はin vitroにおける諸実験によつて複雑な肝の役割の一端をも明らかにしようと試みた.

[昭和43年12月19日受稿]

* 日内会誌 第58巻(4号) p. 303~p. 311参照

II. 実験方法

(A) 正常家兎肝スライスをを用い, mediumとして, 0.1Mol tris buffer (pH 7.4) に同量のamino酸混液 (10^{-5} Mol) を同量加え, これを 0.2% glucose, 0.03Mol KCl, 0.06Mol $MgCl_2$, 0.25Mol sucrose溶液となし, このmedium 100mlに対し, ほぼ $2\mu\text{C}$ 相当の $^{64}\text{CuCl}_2$ を加え, medium 7.5mlに対し, 肝スライス 3g を 37°C にて, 0, 15, 30, 60, 120分間incubateした後に肝スライスは tris buffer (0.05Mol, pH 7.4) にて, 2回洗浄し, 汚染による影響を出来るだけ防止し, 肝スライス 1g に取り込まれた ^{64}Cu を測定し, さらに肝スライスを 0.25Mol sucrose溶液にてhomogenizeし, Schneider法でミトコンドリア, リゾソーム, ミクロソーム, ミクロソーム上清の各分画に分けた.

(B) 細胞分画蛋白乾燥法として, 各分画をアルコール除蛋白した後, エーテル, アセトン, クロロホルムにて十分洗浄後乾燥し, 各分画の乾燥重量を測定した.

(C) あらかじめ肝に充分量の銅を沈着させておく目的で10~12時間前に, 次いで数時間前に2~5mg (銅量) の CuCl_2 (non-labeled) を静注しておき, 肝を摘出し, 正常家兎におけると同様のmediumを用いて, 同様の方法にてincubateし, 0, 15, 30, 60, 120分後における, 肝スライス 1g, 各分画乾燥重量 1mg に取り込まれる ^{64}Cu を測定し, 正常肝におけるものと比較した.

(D) 同様のmediumに CuCl_2 (non-labeled) を medium 1ml に対し 500 γ (銅量) と 1mg を加えたものにて, 正常家兎肝スライスを30分, 37°C にてincubateし (preincubate), 次に $^{64}\text{CuCl}_2$ を含むmediumにて 37°C , 30分間incubateし, 肝スライス 1g に取り込まれる ^{64}Cu を測定し, preincubateを行なわなかつた場合の肝スライス (control) と取り込み方を比較した.

(E) 各種代謝阻害薬による, 肝細胞への銅の取り込みに及ぼす影響を観察するために前述と同様のmediumを用い, これに 10^{-8} Molモノヨード酢

酸, 10^{-8} Mol 2,4ジニトロフェノール, 10^{-8} Mol 弗化ソーダ, 2×10^{-8} Molシアンカリ, 10^{-8} Mol フルオロ酢酸, および 10^{-8} Mol弗化ソーダを加えたmediumにてincubateしておき (preincubate), この肝スライスを用いる場合など. すなわち, 各種阻害薬の入ったmediumにて, 30分 37°C にてincubateし, 肝スライス 1g に取り込まれる ^{64}Cu を測定し, 阻害薬を用いない場合 (control) と比較し, その阻害度を出した.

(F) 代謝阻害薬の中で最も高い阻害度を示した, モノヨード酢酸 (10^{-8} Mol) を含むmediumにて, 肝スライスを30分, 37°C incubateし, これを細胞各分画に分け, 乾燥重量 1mg に対する ^{64}Cu の取り込みを測定, 代謝阻害薬を含まない場合 (control) と各分画について比較した.

(G) MediumのCu濃度の相違による肝スライスへの $^{64}\text{CuCl}_2$ の取り込みを比較するため, 同様のmediumを用いて, このmediumに CuCl_2 (non-labeled) を次の各濃度 (Cu量) に加えて, 30分, 37°C incubateし, 肝スライス 1g の ^{64}Cu の取込みを比較した. 1) $^{64}\text{CuCl}_2$ (labeledのみ) 4.06 γ /ml, 2) ①+ 500 γ /ml (non-labeled), 3) ①+ 1mg/ml, 4) ①+ 5mg/ml, 5) ①+ 10mg/ml, 6) ①+ 20mg/ml.

(H) 前述と同様のmedium ($^{64}\text{CuCl}_2$ を含む) にて30分, 37°C incubateし, これによつて得た肝スライス 1g を下記における各種のmediumに今一度, 30分間incubateし, これにreleaseされた ^{64}Cu をmedium 1ml について測定し, そのreleaseの割合を比較した. ①生理的食塩水, ②家兎血漿, ③ 0.28mg/mlのceruloplasminを含む生理的食塩水, ④ 11mg/mlのceruloplasminを含む生理的食塩水.

(I) ネズミ肝 1g を前述と同様のtris buffer (sucrose, KCl, $MgCl_2$ を含む) 1ml にてhomogenizeし, 10^{-5} アミノ酸混液 1ml, ロイシン ^{14}C 20 μC 溶液 1ml, グルコース 30mg を加えたmediumにて 15, 60分incubateし, 各分画乾燥重量mg当りの放射活性を測定す.

(J) 放射能測定はgas flow counterおよび,

Well type scintillation counterにて測定し、肝湿重量g当り、また細胞分画については乾燥蛋白重量mg当りとしてあらわした。

III. 実験結果

図1は正常家兎肝スライス、およびCuCl₂(non-labeled) 静注後の家兎スライスを用いてincubateした後における、各時点の肝スライス1gに取り込まれた⁶⁴Cuおよび、その細胞各分画に取り込まれた⁶⁴Cuを比較したものを示している。

肝スライス1gについては、正常家兎肝、およびCuCl₂静注後家兎肝、ともに15分から30分後に著明な銅の取り込みが認められ、60分後からはあまり増加の傾向はみられず、平行状態となつている。正常家兎肝とCuCl₂静注家兎肝との比較では、⁶⁴CuCl₂の取り込みはむしろCuCl₂静注家兎でまさつてゐることが示されている。

次に各分画における⁶⁴CuCl₂の取り込みについては、それぞれ、乾燥重量mg当りにして、ミクロゾーム、ミトコンドリア、ミクロゾーム上清の順に⁶⁴CuCl₂の取り込みは多く見られるが、その差には大差なく、各分画における取り込みの時間的差異については、まず15分において、ミクロゾーム分画に上昇をみ、これが最も早く、次いで30分には下降を示し、以後、平行状態を保つ。

ミトコンドリア分画においては、その上昇はミ

図1. 銅負荷後肝(静注)と無処置肝(対照)の⁶⁴Cuの取り込み(in vitro)

表 1

① 対 照	189912CPM/g
② 500γ/ml	279624CPM/g
③ 1mg/ml	198124CPM/g

表2. 各種代謝阻害薬による阻害率

モノヨード酢酸 (10 ⁻³ モル)	48%
2, 4 ジニトロフェノール (10 ⁻³ モル)	43%
弗化ソーダー (10 ⁻³ モル)	39%
シアソ加里 (2 × 10 ⁻³ モル)	30%
弗化ソーダー30分preincubate (10 ⁻³ モル)	20%
フルオロ酢酸 (10 ⁻³ モル)	5%

クロゾーム分画におけるよりややおくれて、30分から60分に現われ、120分後では減少する傾向を示す。

ミクロゾーム上清の場合には、時間的経過によつて、とくに強い上昇、下降などの一定の傾向は示されていない。

次に無処置肝と、CuCl₂静注後肝における差異では、肝スライス1gについても、各分画においても、銅の取りこみについてはあらかじめ銅を静注した肝において促進している。しかし、その時間的傾向などについてはとくに著明な差は認められない。

表1はCuCl₂ 500γ/mlと1mg/ml(non-labeled)を含有せるmediumにて30分37°C incubateした後(preincubate)に、⁶⁴CuCl₂を含むmediumにてさらに30分incubateして、肝スライス1gへの⁶⁴Cuの取り込みを、preincubateしない(control)ものと比較したもので、500γ/mlのCuを含有するmediumにてpreincubateしたものが最も多く取り込み、1mg/mlのものではcontrolと大差がない。

表2は各種代謝阻害薬による銅取り込みに対する影響について示したものである。阻害度はmediumに阻害薬を含まない場合の肝スライスの取り込みを阻害度0%として計算した。モノヨード酢酸において最も阻害度は強く約50%の阻害を、次いで2,4ジニトロフェノール、弗化ソーダ、シ

図2. モノクロ酢酸 (10^{-3} モル) による各細胞分画の阻害

表 3

^{64}Cu のみ (4 γ /ml)	19730 CPM/g
500 γ /ml	25693 CPM/g
1mg/ml	19613 CPM/g
5mg/ml	7508 CPM/g
10mg/ml	4992 CPM/g
20mg/dl	2773 CPM/g

アンカリ, 弗化ソーダによるpreincubateしたものの順となるが, その阻害度は約40~20%の間にあり, フルオロ酢酸では5%の阻害しか示されていない。

図2は最も強い阻害度を示したモノクロ酢酸を含有せるmediumにてincubateした肝スライスの各分画における銅取り込みを, controlと比較したものであるが, ミクロソーム上清分画を除いたものに強い阻害を示し, とくにミトコンドリアにおいては著明である。ミクロソーム上清では, 著明なものは認められない。

表3はincubateするmediumの CuCl_2 (non-labeled) 濃度の違いによつて $^{64}\text{CuCl}_2$ の取り込みに及ぼす影響を示したものである。non-labeled Cuを加えなかつたものをcontrolとしている。mediumに500 γ /ml~1 mg/mlを加えた場合にはあまり大きな影響は示されていない。しかし, 5 mg/ml~20 mg/mlとmedium中の銅が増すにしたがつて ^{64}Cu

表4. 各種mediumによるrelease率

Medium	Release の割合
生理的食塩水	3.7%
血漿	3.9%
0.28mg/mlのセルロプラスミン含	4.0%
11.0mg/mlのセルロプラスミン含	6.9%

表5. 各細胞分画のロイシン ^{14}C

分 画	15分	60分
ミトコンドリア	17.5CPM/mg	38.3CPM/mg
ミクロソーム上清	63.7CPM/mg	60.5CPM/mg
デスオキシコール酸可溶性分画	17.3CPM/mg	30.0CPM/mg
デスオキシコール酸不溶性分画	70.0CPM/mg	47.0CPM/mg

の取り込みは著明な減少を示す。

表4は ^{64}Cu を含むmediumにpreincubateし ^{64}Cu を取り込んだ肝スライスを各種のmediumに再incubateしてmediumにreleaseされる ^{64}Cu の率を示す。ceruloplasmin濃度の高いmediumにおけるreleaseの割合がすぐれているようであるが, 生理的食塩水 (ceruloplasmin含有せず) にても3.7%の値であり, ceruloplasmin11mg/mlを含むmediumの場合にも6.9%で, これより低いceruloplasmin濃度でも, 血漿にしても, とくに著明な差異を示してはいない。

表5はネズミ肝homogenateを用いての細胞各分画へのロイシン ^{14}C の転入状態を示す。15分後でミクロソーム分画に最も多く, デスオキシコール酸可溶性分画では60分後でやや増量し, ミトコンドリアは時間と共に増すが値はミクロソームなどより低く, ミクロソーム上清はあまり変動を示していない。

IV. 考 案

第1編に論じたように, 正常動物で $^{64}\text{CuCl}_2$ を静注した際に, きわめて早期に腎, 肝に多量に取り込まれ, 腎では2時間で極大を示し, これに平行して, 尿中にも初期から大量に出現し, かつ腎ではその可溶性成分に主として存在するに対し, 肝ではややおくれて, 12時間で最大の取り込みを

示す。さらに有形成分に主として摂取されており、また胆汁中には、尿中出現よりも、はるかに多くて排泄される。

一方では血漿中で、一旦極小となつた後、6時間ころより再度出現し、以後しだいに増加の一途をたどり、かつ、この際には大部分がceruloplasmin結合銅であることが証明された。これら一連のin vivoの実験から、銅は肝臓で処理されて後にはじめて本来の銅蛋白として血中に放出され、あるいは胆汁中に排泄されることが考えられ、したがってceruloplasminは肝臓で作られると考えるのが最も妥当であろう。

Ceruloplasminは、8原子の銅をその1分子中に含んでいる銅蛋白体であり、その合成に際しては肝で銅原子が蛋白に組み込まれるものと推定される。したがってceruloplasmin代謝の検討には、銅の動態についての追究が適当であるという考えにもとづいて、放射性銅をtracerとして使用して検討を進めた。

肝における銅の動態に問題を限定すれば、緒言にすでに述べたように、できるだけ簡単な条件のもとに観察することが必要であり、ここに著者はin vitroにおける緒条件を設定して実験を行なつた。さらにこれをceruloplasmin代謝にもとづいて考える時に、まず銅の肝への摂取、蛋白合成との関連性、およびその血中への再放出の諸機構を別個に検討することが最も望ましいと思われるが、今回は主として、銅の肝への取り込みを中心として観察し、併せて他の機構にも考察を試みた。

^{64}Cu のような低分子性放射性物質を使用した際には、その結果に対して常に汚染の問題を考えなければならない。汚染防止のために、一般には沈殿溶解を繰返して蛋白当りの放射能をもつて検討されているが、本実験における様に肝細胞による摂取率を目的とした時には蛋白当りの換算は必ずしも妥当とはいひ難く、著者は単位重量当りの摂取をもつてあらわし、かつその0 timeを基準とし、可及的洗浄をくり返した後に、それらの同一条件下に行なつた実験結果の比較値のみによつて

判定を下した。また後述するごとく、同時に肝細胞分画において蛋白当りの放射能を測定した結果、時間的にそれぞれ銅の動的变化を知り得た点からも併せ考える時、肝臓の重量あたりによる摂取の実験方法に汚染による誤差は少ないものと考ええる。

次に摂取された銅の動態追究の目的には、細胞内分画におけるturnover rateを観察し、さらに蛋白との相互関係によつて検討しなければならない。細胞分画はその分画とくに他成分の混入のことが最近いわれているが、今回は一応Schneider法¹⁸⁾にしたがつて各分画を洗浄精製して使用した。蛋白乾燥法にはSchneiderの法のごとく、トリクロール酢酸、加熱、アルカリ溶解、さらにアルコール、エーテルによる各操作が最も一般的であり、また放射性物質汚染防止の点で信頼性があると考えられる。

Ceruloplasminを例にとれば、pHが4.0以下になれば、銅と蛋白との結合はゆるくなり、わずかの操作により、あるいは放置により、自然に銅が蛋白体から遊離することが認められている。またZu蛋白体であるcarboxypeptidaseにしてもpHの変化によつて容易にその結合亜鉛を除去し、不活性化される。この様に銅を始めとする一般のmetal proteinは、いわゆるアミノ酸のpeptide鎖への取り込みと趣を異にしているため、上述のごときトリクロール酢酸による急なpHの低下などの激しい蛋白変性操作は避けなければならない。

本実験においても、放射性銅を使用して、その蛋白との結合をtraceすることを目的としているために、トリクロール酢酸を使用しないで、アルコールによる除蛋白、脂質除去の方法を選び、同時に放射能汚染を出来るだけ防ぐことを意図したものである。

A) 肝細胞の銅の取り込みについて

1) 正常家兎肝スライスをを用いて

肝細胞全体についてみると、15分から60分にかけて取り込みは盛んで、その後取り込まれた銅量は一定の状態であることが示されており、次に肝

細胞内各分画について検討してみると、ミクロゾームには15分後にはすでに ^{64}Cu はかなり多量に取り込まれ、時間とともに減少して来る。また、 ^{64}Cu の出現量はミクロゾーム、ミトコンドリアについてはほぼ同量である。ミクロゾームを除く他分画、ミクロゾーム上清成分などでは、後になつて ^{64}Cu の増加をきたし、この傾向はin vivoにおける各分画の傾向とほぼ同様で、また ^{14}C -ロイシンを使用し肝細胞分画の蛋白へのアミノ酸の取り込みを検討すると、初期にミクロゾーム分画に多く、しだいにそのデスオキシコール酸可溶性分画に増量することが認められた。これらの事實は、肝に摂取された銅が蛋白合成の場と密接な関係を有し、かつ時間と共にリボゾームからミクロゾーム膜性成分に移動する可能性を示しており、ceruloplasminも他の血清蛋白と同じ様な合成移動の過程¹⁴⁾を示していると推定させるものである。

2) 十分量の銅を肝細胞に負荷させた時

Wilson病では肝における銅の取り込みは悪いといわれている。その原因として肝に多量の銅が沈着しているためであろうと考えられている。これらはin vivoにおける血漿内 ^{64}Cu の減衰曲線から推定されているにすぎず、積極的にこれを証明し得る実験は認められない。

そこで著者は次の実験条件を設定してこれを検討した。

すなわち、in vivoで十分量と思われる銅を与えておき、この際in vivoの実験結果から最高に達すると思われる投与12時間後を選んだ。また、in vitroの際にはmediumに十分量と思われる銅を加え、このmediumにてincubateし(前処理)、十分に肝細胞に銅(non-labeled)を取り込ませた後にmediumに ^{64}Cu を加えたものでincubateし、肝細胞への取り込みをみた場合、銅(non-labeled)処理を受けた肝細胞において、controlよりも ^{64}Cu の取り込みは肝細胞全体および、各分画についても明らかにすぐれている結果が示されたのである。この場合、十分に銅を負荷され、銅を十分取り込んでいると思われる肝細胞においては、

^{64}Cu を含むmediumでincubateしても、controlに比し摂取率は低下していることが十分予想されたのであるが、結果はその逆であつた。このことは正常状態の肝細胞では予め、大量の銅がすでに存在していても、なお多量に新たなる銅の取り込みを行ない得ることを示す。この事実をさらに確認するために次の実験を行なつた。mediumにcarrier銅(non-labeled)を各種濃度に $^{64}\text{CuCl}_2$ と同時に加えた場合、かなり高濃度に至るまで ^{64}Cu の取り込みは低下せず、取り込み能力のあることを示している。この際も、さきのpreincubate実験と同じくnon-labeled銅 500 γ /mlの時に最も肝の取り込みは多かつた。これらの事實は、正常肝ではかなり多量に銅を摂取しても、これを充分利用し処理し得る状態にあると考えられる。Wilson病の肝に銅の取り込み能が少ないとすれば、その肝では銅の処理機能が不十分で代謝されずに沈着されるためと考えるべきであろう。この想定はまた本疾患で、胆道への銅の排泄障害⁹⁾がみられるといわれている事実によつても裏付けられる。一方、正常肝では早期に代謝されて肝外に再放出されると考えられ、したがつて肝細胞内の銅の処理能力が銅の取り込みに差異を来す一つの因子と考えたい。本実験において、各細胞分画とも取り込みの増加がみられるが、とくにミトコンドリアで著明であつたことは、呼吸、解糖系と関連していると考えられることでもある。

3) 各種代謝阻害薬の影響

Mediumに各種代謝阻害薬を加え、肝細胞への ^{64}Cu の取り込みを観察すると、解糖系阻害薬であるモノヨード酢酸で最も強い阻害を示し、約50%の阻害を認める。この場合、細胞各分画において阻害を示している。次に呼吸系に作用を及ぼす2,4ジニトロフェノールにて強い反応を認めるが、同じ呼吸系阻害薬であるKCNでは比較的阻害は軽度である。これら一連の薬物による阻害を通覧すると、肝細胞の銅の取り込みには、呼吸系よりむしろ解糖系の関与が大であるように思われ、あるいは、ATPを中心とする一連のenergy系

が関与しているのかもしれないが、絶対的なものでなく、一元的には了解できず、肝細胞の銅の up-take の機構はなお検討されなければならない。しかし、特定の薬物によつて影響される点は単なる濃度勾配のみでなく、その uptake には何か active transport の存在が推定される。

B) 摂取された銅の肝細胞からの release について

一旦取り込まれた肝スライスの ^{64}Cu が各種の medium に incubate された時、その release は生理的食塩水で最も低く、ceruloplasmin を多量に含む時多く、血漿と同程度の ceruloplasmin を含むものと血漿はほぼ同様の値であるが、いずれにしてもその量は 4~7% にすぎない。

すなわち、release の際にはあまり外液の影響はうけないことが認められている。しかし、短時間内の release であり、この間に十分生理的に処理されて放出されたものとは考え難く、さらにいかなる型で release されて来たのか、本実験からは知ることはいできない。Wilson 病の低血清 ceruloplasmin 値という事実¹⁾²⁾と結果を検討したとき、Wilson 病ととくに関連づけるものは認められていない。

以上、諸条件下の in vitro の実験を行なつてみたが、ceruloplasmin は主として肝で合成され、銅の肝への取り込みには active transport によるものが推定され、また少なくとも一部は蛋白合成と関連したものと考えられ、したがつて、Wilson 病における銅の沈着、肝の uptake の極端な低下は、銅の取り込み機構とともに、肝内における銅の処理ないし移動に障害があるためと考えられる。

V. 結 論

肝スライスを用いての in vitro の実験で ^{64}Cu 、ceruloplasmin の態度を追究し、次の結果を得た。

1) 肝細胞の ^{64}Cu の取り込みは 15 分から 30 分にて著明で、細胞分画ではミクロゾームに最も早く出現した。

2) 銅負荷後の肝と、無処置の肝への ^{64}Cu の取り込みを比較したところ、前者において肝細胞への取り込みが多く、各細胞分画についても同様の

所見が得られた。

3) 予め CuCl_2 medium に処置した肝スライスの方が無処置肝スライスよりも ^{64}Cu の取り込みが多かつた。ただし CuCl_2 の量がきわめて多くなると、逆に ^{64}Cu の取り込みの低下をみた。

4) 各種代謝阻害薬のうち、モノヨード酢酸が肝スライスへの ^{64}Cu の取り込みに最も強い阻害を示した。

5) 一度摂取された肝スライス内 ^{64}Cu は ceruloplasmin 濃度の高い medium におかれるとき、その放出率は高かつた。

6) 銅の肝への取り込みには active transport の機構が推定され、一部は蛋白合成と関連したものと思われる。さらに肝内銅の存在様式が、その transport に影響する一因と推定された。

文 献

- 1) Scheinberg, I.H. and Gitlin, D.: Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) *Science*, 116: 484, 1952.
- 2) Bearn, A.G. and Kunkel, H.G.: Abnormalities of copper metabolism in Wilson's disease and their relationship to the aminoaciduria. *J. clin. Invest.*, 33: 400, 1954.
- 3) Bearn, A.G. and Kunkel, H.G.: Metabolic studies in Wilson's disease using ^{64}Cu . *J. Lab. clin. Med.*, 45: 623, 1955.
- 4) Kun, E. and Fanshier, D.W.: Isolation and properties of a β -mercaptopyruvate cleaving copper enzyme. *Biochem. Biophys. Acta.*, 32: 338, 1959.
- 5) Haurowitz, F.: Über eine Anomalie des Kupferstoffwechsels. *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 190: 72, 1930.
- 6) Mandelbrote, B.M., Stanier, M.W., Thompson, R.H.S. and Thruston, M.N.: Studies on copper metabolism in demyelinating disease of the central nervous system. *Brain*, 71: 212, 1948.
- 7) Matthews, W.B.: The absorption and excretion of radiocopper in hepato-lenticular degeneration (Wilson's disease). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 17: 242, 1954.
- 8) Lahey, M.E.: Iron and copper in infant nutrition. *Amer. J. clin. Nutr.*, 5: 516, 1957.
- 9) Gitlin, D., Hughes, W.L. and Janeway, C.A.: Absorption and excretion of copper in mice. *Nature*, 188: 150, 1960.
- 10) Uzman, L.L.: On the relationship of urinary copper excretion to the aminoaciduria in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Amer.*

J. med. Sci., 226 : 645, 1953. —11) Cartwright, G.E., Bush, J.A., Markowitz, H., Mahoney, J.P. and Gubler, C.J.: Further Studies on the Abnormalities in the metabolism of copper in Wilson's disease. J. clin. Invest., 34 : 925, 1955. —12) Bickel, H., Schultze, H.E., Grüter, W. und Göllner, I.: Versuche zur Coeruloplasminsubstitution bei der Hepatocerebralen Degeneration (Wilson-

sche Krankheit). Klin. Wschr., 34 : 961, 1956. —13) Schneider, W.C. and Hogeboom, G.H.: Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. biol. Chem., 183 : 123, 1950. —14) 直良博人, 都筑惇治, 細胞とタンパク質合成. 細胞の構造と機能, 185, 1967.