栄養強化剤 Copper(II) Gluconate の投与によりマウス肝臓及び腎臓に誘導された
in Vivo での毒性及び Glutathione, Ascorbic Acid, 銅の濃度変化

北條康司,* 橋本育子, 宮本陽子, 川添禎浩, 水谷民雄
京都府立大学人間環境学部食保健学科食品安全性学研究室

In Vivo Toxicity, and Glutathione, Ascorbic Acid and Copper Level
Changes Induced in Mouse Liver and Kidney by Copper(II)
Gluconate, a Nutrient Supplement

Yasuji HOJO,* Ikuko HASHIMOTO, Yoko MIYAMOTO, Sadahiro KAWAZOE, and Tamio MIZUTANI
Department of Food Sciences and Nutritional Health, Kyoto Prefectural University,
Shimogamo, Kyoto 606-8522, Japan

(Received September 3, 1999; Accepted December 3, 1999)

While copper(II) gluconate (CuGL) is generally used as a nutrient supplement for infant foods and as an oral deodorant, little information is available regarding a toxic effect of CuGL on mammals. In this article, we examined *in vivo* induction of toxicity and change of level of glutathione and ascorbic acid, major biological antioxidants, lipid peroxide and copper (Cu) in liver and kidney 4 h after single intraperitoneal administration of CuGL at 0.05 and 0.10 mmol/kg to mice. Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) activity, an indicator of hepatotoxicity, significantly increased compared to control in proportion to doses of CuGL. Hepatic level of glutathione measured as nonprotein sulfhydryl was not proportional to CuGL doses, but enhanced after dosing of 0.05 mmol/kg and lowered by 0.10 mmol/kg. Like SGPT activity, serum urea nitrogen (SUN) concentration, an indicator of nephrotoxicity, significantly increased in proportion to doses of CuGL. Renal glutathione level was not different from control after dosing of 0.05 mmol/kg and lowered by 0.10 mmol/kg. In both organs, relative organ weight and lipid peroxide level were not affected by the treatment with CuGL; ascorbic acid level was elevated after dosing of 0.05 mmol/kg and was not different from control after treatment with 0.10 mmol/kg; like SGPT activity and SUN concentration, Cu level significantly increased in proportion to doses of CuGL. These results suggest that in the liver and kidney after the treatment with CuGL Cu accumulated may induce toxicity, leading to level changes of glutathione and ascorbic acid and to no induction of oxidative damage.

Key words—copper gluconate; hepatotoxicity; nephrotoxicity; glutathione; ascorbic acid; lipid peroxide

緒 言

Copper(II) gluconate (CuGL) は食品添加物として母乳代替食品用の栄養強化剤に使用され、¹⁻³⁾ 口臭防止剤としても用いられてきた。³⁾ しかし、その安全性・毒性に関する研究は、ほとんど見られない。銅は必須元素であるが、その過剰摂取が肝臓毒性をもたらすことは、動物でもヒトでも、よく知られている。⁴⁻⁶⁾ また、銅の先天性代謝異常疾患として知られる Wilson 病の患者は、銅を体内で運搬する血液タンパク質 ceruloplasmin を生合成することができないため、銅を各組織に運搬することができず、肝臓、腎臓、脳などの組織に銅が沈着して排泄不可能になり、肝臓障害や神経症状を引き起こす。⁴⁻⁶⁾ 一方、銅化合物への曝露による腎臓障害はほとんど知られていない。⁷⁾

本研究では、CuGL の低い投与量の急性腹腔内

投与によるマウス肝臓腎臓毒性誘導と、生体内の主要な抗酸化物質である glutathione (GSH) 及び ascorbic acid, 過酸化脂質, 銅の濃度変化について, *in vivo* で検討した結果を報告する。

実 験 の 部

実験動物 体重 29—31g の ddY 系雄性マウス (船橋農場, 千葉) を使用した。餌 (マウス・ラット用固形飼料 F-2, 船橋農場) 及び水 (イオン交換樹脂と蒸留により精製した水) を、自由摂取させ、日照サイクル 12 時間、温度 23±1°C、湿度 50±10% で飼育した。1 週間の予備飼育後、実験に用いた。統計学的解析を目的とした実験に使用した動物数は、各群共、5 匹であった。

動物実験 CuGL (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, U.S.A.) を生理食塩水に溶かし、マウス 1 kg 当たり 0.05 mmol 又は 0.10 mmol (いずれも溶

液量 10 ml) を, マウス腹腔内に単回投与した. コントロールとして, 生理食塩水を同様にして投与した. 屠殺 5 分前に, sodium pentobarbital 注射液 (大日本製薬) の腹腔内投与 (100 mg/kg) により麻酔し, 心臓からの採血により屠殺し, 肝臓及び腎臓を摘出した.

血清 Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT) 活性測定 血液を室温で 1 時間静置後, 遠心分離 (3000 rpm, 30 分) し, 得られた上清をさらに遠心分離 (1500 rpm, 10 分) し, その上清を血清試料とした. SGPT 活性は, トランスアミナーゼ測定用試薬 (イアトロザイム TA-LQ, ヤトロン) を用いて測定された.

血清尿素窒素 (SUN) 濃度測定 SUN 濃度を, 血清尿素窒素測定試薬 (尿素窒素 B テストワコー, 和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した.

過酸化脂質濃度測定 肝臓及び腎臓中の過酸化脂質濃度を, TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 値として測定し, nmol MDA/g 組織重量の単位で表した.⁸⁾ ここで MDA は malondialdehyde を表す.

非タンパク性 SH (NPSH) 濃度測定 肝臓及び腎臓中の NPSH 濃度を Ellman 試薬を用いた方法⁹⁾ で測定した.

Ascorbic Acid 濃度測定 肝臓及び腎臓中の還元型 ascorbic acid 濃度を folin phenol 試薬を用いた方法で測定した.¹⁰⁾

銅濃度測定 肝臓及び腎臓中の銅含有量をフレイム原子吸光光度法¹¹⁾により測定した.

統計学的解析 実験成績を, 平均値±標準偏差として表した. 各投与群の平均値の間の有意差検定には, 分散分析法及び, 多重比較法として Fisher's protected least significance difference test を用いた.

危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意とした.

結果と考察

CuGL の半数致死投与量は知られていないが, CuCl_2 及び $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ のマウス腹腔内投与による半数致死投与量は, 各々, 0.31 及び 0.13 mmol/kg である.⁶⁾ 我々は, これらより低い量 (0.05 及び 0.10 mmol/kg) の CuGL のマウス腹腔内投与後 4 時間での肝臓腎臓毒性誘導について検討した結果を Table 1 に示す.

CuGL の各投与群の体重変化率 (投与直前の体重に対する屠殺直前の体重の比率) は, コントロール群とくらべて有意な差は見られなかったことから, 全身的毒性誘導は起こっていないと推定される.

肝臓毒性の指標とされる相対的肝臓重量及び SGPT 活性¹²⁾ の内, 相対的肝臓重量は CuGL のどちらの投与群でもコントロール群とくらべて有意な変化は見られなかったが, SGPT 活性は CuGL の投与量に依存して有意な増加が認められたことから, CuGL による肝臓毒性の誘導が示唆された. 酸化的損傷の指標である過酸化脂質の肝臓中濃度は, CuGL のどちらの投与群でも有意な変化は見られなかった. NPSH として測定された GSH の肝臓中濃度は, 0.05 mmol/kg の CuGL 投与でコントロール群より有意に増加し, 0.10 mmol/kg 投与では逆に有意に減少した. CuGL 投与による, このような GSH 濃度の変化は, SGPT 活性の投与量に比例した増加と対応しないことから, 肝臓毒性の原因ではなく結果と考えるほうが合理的である. 0.05 mmol/kg の CuGL 投与で GSH 濃度が増加したのは, 弱い毒性に対する防御の変化かもしれない. 毒性を示さない濃度の trimethyltin 又は triethyltin の存在下で脳のグリア細胞を培養した場合, 細胞中の GSH 濃度及

Table 1. Toxicity Data in Mice at 4 h after Intraperitoneal Administration of 0.05 and 0.10 mmol CuGL/kg

Toxicity item	Control	0.05 mmol CuGL/kg	0.10 mmol CuGL/kg
Body weight change (%)	98.3 ± 1.2 ^{a)}	97.1 ± 0.9 ^{a)}	98.0 ± 1.6 ^{a)}
Liver weight (% of body weight)	5.66 ± 0.29 ^{a)}	5.70 ± 0.55 ^{a)}	5.63 ± 0.64 ^{a)}
SGPT (Karmen unit/ml)	33.6 ± 2.5 ^{a)}	93.6 ± 22.0 ^{b)}	136.6 ± 27.1 ^{c)}
TBARS (nmol MDA/g liver)	197.8 ± 59.4 ^{a)}	201.0 ± 35.3 ^{a)}	240.0 ± 44.7 ^{a)}
NPSH (μmol/g liver)	7.53 ± 0.30 ^{a)}	9.02 ± 1.25 ^{b)}	5.67 ± 0.62 ^{c)}
Ascorbic acid (μmol/g liver)	6.48 ± 0.59 ^{a)}	8.91 ± 0.96 ^{b)}	6.99 ± 0.70 ^{a)}
Cu (μmol/g liver)	0.08 ± 0.03 ^{a)}	0.36 ± 0.05 ^{b)}	0.45 ± 0.05 ^{c)}
Kidney weight (% of body weight)	1.12 ± 0.32 ^{a)}	1.13 ± 0.14 ^{a)}	1.17 ± 0.18 ^{a)}
SUN (mg %)	12.7 ± 1.5 ^{a)}	31.9 ± 6.1 ^{b)}	48.5 ± 9.7 ^{c)}
TBARS (nmol MDA/g kidney)	326.7 ± 14.9 ^{a)}	309.1 ± 37.9 ^{a)}	378.7 ± 85.2 ^{a)}
NPSH (μmol/g kidney)	5.95 ± 0.52 ^{a)}	5.45 ± 1.24 ^{a)}	4.13 ± 0.44 ^{b)}
Ascorbic acid (μmol/g kidney)	7.57 ± 0.72 ^{a)}	9.46 ± 0.83 ^{b)}	7.69 ± 0.64 ^{a)}
Cu (μmol/g kidney)	0.10 ± 0.04 ^{a)}	0.91 ± 0.22 ^{b)}	1.71 ± 0.25 ^{c)}

CuGL=Cu(II) gluconate. Body weight change (%)=percentage of body weight immediately before sacrificing to body weight immediately before administration. SGPT=serum glutamic pyruvic transaminase. TBARS=thiobarbituric acid reactive substances. MDA=malondialdehyde. NPSH=nonprotein sulfhydryl. SUN=serum urea nitrogen. Values are means ± S.D. of 5 mice. Means not sharing a common superscript letter a), b) or c) in each row are significantly different ($p < 0.05$).

び GSH-S-transferase 活性の増加が認められ、これは防御的な変化と考えられている。¹³⁾ 0.10 mmol/kg 投与で GSH 濃度が減少したのは、CuGL による酸化的作用の結果かもしれない。銅が肝臓中に通常の 30—50 倍も蓄積される Wilson 病患者⁴⁾の肝臓 GSH 濃度はコントロール値よりも有意に低いことが報告されている。¹⁴⁾ これは肝臓の酸化型 GSH 及び過酸化脂質の濃度上昇と GSH-S-transferase 活性の低下を伴うことから、肝臓 GSH 濃度の低下は過剰の銅による酸化的攻撃の結果と推定されている。¹⁴⁾

肝臓 ascorbic acid 濃度も GSH の場合と類似して、投与量に比例した変化は見られなかった。0.05 mmol/kg では弱い毒性の結果として濃度が防御的に増加し、0.10 mmol/kg では強い毒性の結果 0.05 mmol/kg の場合より濃度が低下し、コントロールのレベルに戻ったと考えられる。肝臓中の銅濃度は SGPT 活性と同様に、投与量に依存して有意に増加する傾向が見られた。以上のことから、肝臓では CuGL 投与により、銅濃度が増加することによって、SGPT 活性上昇に反映される毒性誘導が起こり、結果として GSH 及び ascorbic acid 濃度に変化が生じるが、明確な酸化的損傷は起こらない、と推定される。

腎臓毒性の指標とされる相対的腎臓重量及び SUN 濃度¹⁵⁾の内、相対的腎臓重量は CuGL のどちらの投与群でもコントロール群とくらべて有意な変化は見られなかったが、SUN 濃度は CuGL の投与量に依存して有意な増加が認められたことから、CuGL による腎臓毒性の誘導が示唆された。過酸化脂質の腎臓中濃度は CuGL のどちらの投与群でも有意な変化は見られなかった。腎臓中 GSH 濃度は 0.05 mmol/kg の投与で減少せず、0.10 mmol/kg 投与では有意に減少した。CuGL 投与による、このような GSH 濃度の変化は、SUN 濃度の投与量に比例した増加と対応しないことから、腎臓毒性の原因ではなく結果と考えるほうが合理的である。Ascorbic acid 濃度の変化は、肝臓の場合と類似し、GSH と同様、腎臓毒性の原因ではなく結果と考えられる。腎臓中の銅濃度は、SUN 濃度と同様に、投与量に依存して有意に増加する傾向が見られた。以上のことから腎臓でも CuGL 投与により、銅濃度が増加することによって、SUN 濃度上昇で示される毒性誘導が起こり、結果として GSH 及び ascorbic acid 濃度に変化が生じるが、明確な酸化的損傷は起こらない、と推定される。

CuGL 投与により、肝臓と腎臓で類似の有害な結果がもたらされた。SGPT 活性及び SUN 濃度のコントロール値に対する CuGL 投与群の相対値を用いて、CuGL 投与による肝臓と腎臓での毒性誘導の程度を比較すると、SGPT 活性の場合、control : 0.05 mmol CuGL : 0.10 mmol CuGL = 1 : 2.8 : 4.1, SUN 濃度の場合、control : 0.05 mmol CuGL : 0.10 mmol

CuGL = 1 : 2.5 : 3.8 となり、CuGL 投与群における SGPT 活性の相対値 (2.8 及び 4.1) と SUN 濃度の相対値 (2.5 及び 3.8) は比較的近似していることから CuGL 投与による肝臓と腎臓への毒性誘導は同じ程度と推定される。一方、CuGL 投与後の腎臓の銅蓄積濃度は肝臓より高い傾向にある (Table 1) ことから、CuGL 毒性に対する腎臓の抵抗力が肝臓より強いことが推定される。CuGL 水溶液をマウスに生涯飲ませた実験において、肝臓中銅濃度は増加し、腎臓中銅濃度は変化しなかったと報告されている。¹⁶⁾ 我々の結果と違うのは、投与方法、投与量、投与期間の違いによるのかも知れない。また、CuSO₄を含む餌で 13 週間飼育したラットの実験において、銅は肝臓及び腎臓中に蓄積し、コントロール値に対する相対的銅濃度は肝臓の方が高いことが見い出されたが、一方、SGPT 活性は高くなり、SUN 濃度は上昇しないと報告された。¹⁷⁾ 本研究では、これらとは異なり、CuGL 投与により、銅は肝臓及び腎臓中に蓄積したが腎臓中の方が高くなり、肝臓に匹敵する程度の毒性が腎臓に誘導されるという新規な結果となり、興味深い。両臓器に共通して、0.05 mmol/kg の投与で ascorbic acid 濃度はコントロール群より増加し、さらに、0.10 mmol/kg の投与により、GSH 濃度はコントロール群より減少したが、ascorbic acid 濃度の減少は見られなかった。このことは ascorbic acid が GSH に比べて、CuGL 投与に対する強い抵抗性を持つことを示しており、これが CuGL による酸化的損傷を防いでいる可能性も考えられる。

過剰な銅塩の継続的な投与により、脂質過酸化で示される肝臓の酸化的障害が起こることが報告されている。^{18—20)} 我々の結果と異なる原因は、投与期間や投与化合物の違いにあるのかも知れない。我々の場合、CuGL の構成成分である gluconic acid が酸化的障害を抑制している可能性もある。最近、バンガラディッシュでの copper sulfate 中毒により、高い死亡率 (24.9%) と、肝臓毒性の他に、急性腎臓障害の発生が報告された²¹⁾が、銅化合物摂取による腎臓障害は、ほとんど知られていない。⁷⁾ 我々の結果は、CuGL 投与により、肝臓毒性のみならず腎臓毒性が誘導されたという点で非常に興味深いと考えられる。

本研究において CuGL のマウス腹腔内投与により、肝臓及び腎臓で銅の蓄積が毒性を誘導し、結果として GSH 及び ascorbic acid の濃度変化をもたらした酸化的障害を生じないことが示唆された。

REFERENCES

- 1) "Commentary of the Japanese Standards for Food Additives. Fifth Edition", supervised by Ishidate M., Tanimura A., Hirokawa Publishing Co., Tokyo, 1987.

- 2) Food Hygienic Society of Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **40**, J112-J167 (1999).
- 3) "The Merck Index. Twelfth Edition," ed. by Budavari S., Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, U.S.A, 1996, p. 446.
- 4) Goering P. L., Klaassen C. D., "Comprehensive Toxicology," Vol. 9, ed. by McCuskey R. S., Earnest D. L., Elsevier Science Ltd., Oxford, 1997, pp. 389-406.
- 5) Goyer R. A., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 691-736.
- 6) Venugopal B., Luckey T. D., "Metal Toxicity in Mammals," Vol. 2, Plenum Press, New York, 1978.
- 7) Ruegg C. E., "Comprehensive Toxicology," Vol. 7, ed. by Goldstein R. S., Elsevier Science Ltd., Oxford, 1997, pp. 245-262.
- 8) Masugi F., Nakamura T., *Vitamins* (Japan), **51**, 21-29 (1977).
- 9) Sedlak J., Lindsay R. H., *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205 (1968).
- 10) Jagota S. K., Dani H. M., *Anal. Biochem.*, **127**, 178-182 (1982).
- 11) Puchyr R. F., Shapiro R., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 868-870 (1986).
- 12) Moslen M. T., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 403-416.
- 13) Cookson M. R., Slamon N. D., Pentreath V. W., *Arch. Toxicol.*, **72**, 197-202 (1998).
- 14) Summer K. H., Eisenburg J., *Biochem. Med.*, **34**, 107-111 (1985).
- 15) Goldstein R. S., Schnellmann R. G., "Casarett & Doull's Toxicology. Fifth Edition," ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 417-442.
- 16) Massie H. R., Aiello V. R., *Mech. Ageing Dev.*, **26**, 195-203 (1984).
- 17) Hébert C. D., Elwell M. R., Travlos G. S., Fitz C. J., Bucher J. R., *Fundament. Appl. Toxicol.*, **21**, 461-475 (1993).
- 18) Sokol R. J., Devereaux M., Mierau G. W., Hambidge K. M., Shikes R. H., *Gastroenterol.*, **99**, 1061-1071 (1990).
- 19) Sokol R. J., Devereaux M. W., OBrien K., Khandwala R. A., Loehr J. P., *Gastroenterol.*, **105**, 178-187 (1993).
- 20) Britton R. S., *Semin. Liver Dis.*, **16**, 3-12 (1996).
- 21) Ahasan H. A., Chowdhury M. A., Azhar M. A., Rafiqueuddin A. K., *Trop. Doct.*, **24**, 52-53 (1994).