本研究にあたりご指導ならびにご校閲を賜った京都大学 掛見喜一郎教授, 常にかたわらにあってご指導いただいた山本隆一博士, NMR スペクトルについてご教示をいただいた通 和夫博士ならびに IR スペクトルについてご助言をいただいた松井芳樹博士に深謝し, また実験に協力された河村光雄, 山本恵津子両氏ならびにスペクトルの測定, 元素分析を担当された当研究所の諸氏に感謝します。

塩野義製薬株式会社研究所

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
86(6) 521 ~ 524 (1966)

UDC 612.398.14

88. 湊 頭, 小木曾健人: 金属蛋白質の研究(第9報^{*1}) 亜鉛過剰投与による血清銅およびセルロプラスミン活性に対する影響^{*2}

Akira Minato and Taketo Ogiso: Studies on Metalloprotein. K.
The Effects of Excessive Dietary Zinc on Serum Copper
and Oxidase Activity of Ceruloplasmin.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba^{*3})

Excess dietary zinc resulted in the lowered growth, hemoglobin concentration, and ceruloplasmin activity, with significant decrease in the concentration of serum copper. The addition of 0.2% copper to the diet containing 1.0% zinc was effective in preventing anemia and decrease in ceruloplasmin activity. Administration of a large amount of copper alone caused an increase in serum copper and a marked increase in ceruloplasmin activity (Table I and II). The animals receiving excess dietary zinc developed a mild anemia and showed a significant decrease in ceruloplasmin activity. When copper-histidine chelate was administered intraperitoneally to the animals, the decrease in ceruloplasmin activity recovered, but the concentration of hemoglobin was little affected (Fig. 1).

These results suggested that the excess dietary zinc induced a copper-deficient state, and an antagonistic correlation existed between zinc and copper.

(Received December 6, 1965)

Sutton 等¹⁾ はシロネズミを亜鉛含有の飼料で飼育して, 貧血, 成長阻害および繁殖不全の現象を認めた。Smith 等²⁾ はまた 6.7%亜鉛含有の飼料を用いて同様な結果を得るとともに, かかる亜鉛中毒性の貧血は銅の投与によって回復しヘモグロビン濃度が上昇することを報告した。さらに Duncan 等³⁾ はこれらを追試して 1.0~1.5% 亜鉛含有飼料の投与によってヘモグロビン形成の低下とともにチトクロームオキシダーゼ活性の低下を認め, 0.03% 銅の添加飼料によって生長速度の回復, 貧血の改善, 同時にチトクロームオキシダーゼ活性の上昇することを認めた。彼等はこれらの事実より生体内における亜鉛, 銅の拮抗作用を想定している。

一方セルロプラスミンは Holmberg 等^{4,5)} によって血清中より分離された銅蛋白質であり, α_2 -グロブリンに含まれ, *in vitro* で *p*-phenylenediamine, quinol, catechol, pyrogallol, adrenaline, ascorbic acid, serotonin などを酸化して酸化酵素の一種と考えられている, しかしその生理作用については現在なお不明であるが, 臨床化学検査の一環として各種疾患の血中セルロプラスミン値が測定され, 銅代謝異常とその活性の高低が問題視されるに至っている。たとえば Wilson 氏病は多くの場合血清銅量が低下しているが, この場合セルロプラスミン活性の減少が著明に認められる⁶⁾。また脳内物質である serotonin, adrenaline がセルロプラスミンによって *in vitro*

*1 第8報: 本誌, 85, 596(1965).

*2 日本薬学会第84年年会において発表(1964年10月).

*3 Yahagi-cho, Chiba.

1) W.R. Sutton, J.E. Nelson: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **36**, 211(1937).

2) S.E. Smith, E.J. Larson: J. Biol. Chem., **163**, 29(1946).

3) G.P. Duncan, L.F. Gray, L.J. Danie: Proc. Soc. Biol. Med., **83**, 652(1953).

4) C.G. Holmberg, C.B. Laurell: Acta. Chem. Scand., **1**, 944(1947).

5) C.G. Holmberg, C.B. Laurell: *Ibid.*, **2**, 550(1948).

6) A.G. Bearn, H.G. Kunkel: Proc. Soc. Exp. Med., **85**, 44(1954).

で酸化されることより精神疾患とくに分裂症におけるその活性の変化が注目された⁷⁾。また清水等⁸⁾はセルロプラスミンを造血因子の一種と考え、貧血治療の好転の指標としてその活性測定の意義について報告している。

著者等は生体内微量金属の生理的意義とくに銅蛋白質あるいは微量銅の生体酵素系に対する影響について考察し、生体内の亜鉛が銅に対して拮抗作用を有する事実すなわち亜鉛過剰投与によって銅欠乏性の症状誘起の観点より、血清中の銅蛋白質であるセルロプラスミン活性に対する亜鉛の影響について検討した。

実 験 の 部

実験方法

本実験で用いた動物はハツカネズミ、シロネズミで購入後2週間市販固形飼料（日本クレア CE-2）にて飼育したのち、ハツカネズミは平均体重 19 g., シロネズミは 80 g. のいずれも雄を使用した。亜鉛含有の飼料は粉末飼料（日本クレア CE-2）に炭酸亜鉛を 1% の Zn を含有するように混合調製した。また銅含有の飼料は硫酸銅を 0.2% の Cu, 亜鉛-銅含有飼料は 1% Zn と 0.2% Cu を含有するようにそれぞれ調製した。いずれも *ad libitum* に水とともに投与した。

処置 1) 体重平均 19 g. の雄性マウス 80 匹を、1 群を 20 匹として 4 群にわけ、第 1 群を対照、第 2 群は 1% Zn 含有の飼料、第 3 群は 0.2% Cu 含有飼料、第 4 群は 1% Zn と 0.2% Cu を含有する飼料にてそれぞれ飼育を行なった。投与開始より 7 日目、14 日目にそれぞれ 10 匹ずつを用いて血中ヘモグロビン濃度および血清中のセルロプラスミンの活性を測定した (Table I)。

2) 体重平均 80 g. の雄性ラット 100 匹を用い対照群を 38 匹とし、実験群 62 匹を 1% Zn 含有飼料にて飼育し、経日的にセルロプラスミン活性および血中ヘモグロビン濃度の変動を追求した。セルロプラスミン活性低下後、3 γ /g. の銅および銅ヒスタジンキレートに腹腔内注射を行ない亜鉛-銅の拮抗性を検討した (Fig. 1)。

3) 体重平均 80 g. の雄性ラットを 1 群 10 匹として 3 群にわけ、第 1 群を対照、第 2 群を 1% Zn 含有飼料、第 3 群は 0.2% Cu 含有飼料にて飼育し、投与開始時より 14 日目に血清セルロプラスミン活性および血清中銅の定量を行なった (Table II)。

セルロプラスミン活性の測定 Ravin 等⁹⁾ の方法に準じ基質 *p*-phenyldiamine に対する酸化能を測定した。採血はハツカネズミ、シロネズミの股静脈より行ない遠心分離 (3000 r.p.m./10 min.) のち血清を得た。0.1 M. 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 1.0 ml. を試験管にとり、ついで血清 0.1 ml. を正確に加え、さらに 0.5% *p*-phenyldiamine (pH 6.0) 1.0 ml. を加える。同時に盲検として 0.1% sodium azide 1.0 ml. を添加して酵素活性を阻害したものを調製し、両者ともただちに 37° 温浴中に振盪しながら 1 hr. 放置する。反応終了後温浴中より取り出し本検体には 0.1% sodium azide 1.0 ml. を加えて反応を停止させ、3.0% NaCl 0.9 ml. を加えて全量を 5.0 ml. としたただちに 530 m μ の吸光度を測定した (セル幅 10 mm., スリット幅 0.02 mm.) 盲検との吸光度の差をもってセルロプラスミン活性単位とした。

ヘモグロビンの定量 シアンメトヘモグロビン法によった¹⁰⁾。採血用マイクロピペットにて 0.02 ml. の血液を採取し、試薬 (K₃Fe(CN)₆ 0.2 g., KCN 0.05 g., NaHCO₃ 1 g. を精製水 1 L. に溶解する) 5.0 ml. に加えて 30 min. 後に島津製 (RQ-50 型) 分光光度計にて 541 m μ を測定し、次式よりヘモグロビン量を計算した (セル幅 10 mm., スリット幅 0.04 mm.)

$$\text{Total Hb g./dl.} = \varepsilon_{541} \times v \times 0.1505 \quad v: \text{希釈率}$$

血清銅の定量 Gubler 等¹¹⁾ の方法に準拠して行なった。血清 1.0 ml. を 2N HCl 1.0 ml. とよく攪拌混合し約 10 min. 後に 20% CCl₃-COOH 1.0 ml. を加え 10 min. 室温に放置したのち 3,000 r.p.m. 10 min. 遠沈分離した。上清 2.0 ml. をとり飽和ピロリン酸 0.2 ml. 飽和クエン酸ナトリウム 0.2 ml., アンモニア水 (21% NH₃) 0.5 ml. を加えて 440 m μ の吸光度を測定した。しかるのち 0.1% sodium diethyldithiocarbamate 0.2 ml. を加えて再び 440 m μ の吸光度を測定した。血清の代わりに精製水を用いて盲検を行ない、呈色試薬を添加する前後の吸光度の差より検量線を用いて血清銅の含量を算出した。

実験結果

Table I に示すように亜鉛および銅投与群では 7 日目においてすでに体重の減少を示し、成長阻害が明らかに認められる。しかしヘモグロビン濃度およびセルロプラスミン活性の顕著な変動はみられない。14 日目においては成長阻害とともに異常なセルロプラスミン活性の低下がみられ同時にヘモグロビン濃度も減少した。有意差検定の結果、体重およびセルロプラスミン活性は 0.1% の危険率、またヘモグロビン濃度の変動は 5% の危険率をもってその有意性を認めた。これに対し銅投与群ではセルロプラスミンは低下せずやや増加の傾向を認めその有

7) C.C. Porter, D.C. Titus, B.E. Sanders, E.V.C. Smith: Science, **126**, 1014(1957).

8) 清水, 八上, 池田, 桑鶴: 最新医学, **16**, 122(1961).

9) H.A. Ravin: Lancet, **1**, 726(1956).

10) 松原: “鉄と血色素”, p. 201(1963) 南江堂.

11) C.J. Gubler, M.E. Laney, H. Aschenbrucker, G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe: J. Biol. Chem., **196**, 209(1952).

意性は危険率 1.0%であった。一方亜鉛-銅投与群では対照と比較したときセルロプラスミン活性の変化は認められずその有意性は危険率 5%であった。ヘモグロビン濃度は銅および亜鉛-銅投与群いずれも対照に比して著明な変化は示さなかったが体重の減少は認められた。

Table I. Effects of Excess Dietary Zinc and Copper on Ceruloplasmin Activity, Hemoglobin Level and Body Weight of Mice

	7 day			14 day		
	Body wt. (g.)	Ceruloplasmin	Hb (g./100 ml.)	Body wt. (g.)	Ceruloplasmin	Hb (g./100 ml.)
Group I	22.6±0.8	0.073±0.031	12.2±2.9	24.4±1.2	0.091±0.040	12.2±2.2
Group II	13.2±0.7	0.084±0.001	12.4±3.1	14.8±0.9	0.009±0.006	9.4±3.0
Group III	12.6±1.4	0.085±0.044	12.8±3.9	13.2±1.5	0.131±0.047	11.5±9.8
Group IV	13.8±1.6	0.149±0.031	13.6±2.8	14.3±1.8	0.114±0.011	12.8±3.7

Ten animals received the basal diet and the following supplement: group I none, group II 1% zinc, group III 0.2% copper, and group IV 1% zinc +0.2% copper. Ceruloplasmin activity represents optical density of test solution at 530 mμ. Values represent mean ± standard error.

Fig. 1. Development of Serum Ceruloplasmin Activity and Hemoglobin Level in Rat

Rats were maintained on normal cube diet (▲-▲-▲) and diet containing 1% zinc (○-○-○). After 15 days, 3g/g. copper (●-●-●) and copper-histidine chelate (⊙-⊙-⊙) was injected intraperitoneally. Figures refer to number of animals in each group.

の割合はセルロプラスミン活性ほど著明ではない。また亜鉛過剰投与による貧血の誘起はセルロプラスミン活性低下の後にみられることが判明した。このようにして得られた低セルロプラスミン血症のマウス群に銅および銅ヒスチジンキレートを経口投与した結果、いずれも2日目頃より活性の増加を示し、約5日目において対照群の活性まで回復することを認めた。また同時に銅イオンより銅ヒスチジンキレートの方が回復効果が迅速であることが判明した。なおヘモグロビン濃度に対する影響は認められなかった。

以上の結果すなわち亜鉛投与によりセルロプラスミン活性が著明に低下すること、またこの現象が銅投与によって拮抗的に阻害される事実から亜鉛の銅代謝に対する影響が考えられる。そこで亜鉛投与による血中セルロプラスミン活性の変化とともに血中銅の定量を行なった (Table II)。その結果セルロプラスミン活性の低下と同時に血中銅の減少を認め、1%の危険率でその有意性を確認した。銅投与群においてはセルロプラスミン活性の上昇とともに血中銅の増加を認めた (危険率 1%)。

考 察

生体内における金属間の拮抗的代謝の現象についてはいくつかの例が知られている。たとえばセレンの毒性は

Table II. Effects of Excess Dietary Zinc and Copper on Ceruloplasmin and each group was sacrificed at 14 th day

	Ceruloplasmin activity	Serum copper μg./100 ml.
Group I	0.54±0.19	117.1±6.9
Group II	0.05±0.04	24.3±2.5
Group III	1.09±0.36	288.3±13.9

group I : normal diet
group II : 1% zinc added diet
group III : 0.2% copper added diet
Values represent mean ± standard error.

以上の事実より亜鉛過剰摂取により血中セルロプラスミン活性が低下すること、銅投与によりこれが拮抗的に阻止されることが判明した。そこでさらに亜鉛のセルロプラスミンに対する影響を再確認するとともにその経日的な変動および亜鉛投与によって惹起する低セルロプラスミン血症が銅イオンまたは銅ヒスチジンキレート投与によって回復するかなどの問題についてマウスを用いて検討を行なった。

亜鉛投与とともに約5日目頃より血中セルロプラスミン活性は低下し、14日目においてはほとんどその活性は認められない。血中ヘモグロビン濃度はセルロプラスミン活性の低下とともに減少するが、その減少

微量の砒素により解毒されること、またモリブデンの毒性は銅投与によって解毒される事実がある¹²⁾。以前より亜鉛過剰投与によって生ずる貧血症が微量銅の投与によって改善されることは Smith 等²⁾ によって確認され、銅-亜鉛の拮抗が推定されている。一方銅の微量金属としての生理作用については銅欠乏食餌で飼育された動物の所見より明らかとなり、銅欠乏性の貧血はヘム生合成の抑制¹³⁾ と同時に小腸壁よりの鉄の吸収低下に起因するものであると考えられた¹⁴⁾。また同時に銅欠乏によってチトクロームオキシダーゼ活性の低下を招来し^{15,16)}、これはチトクロームオキシダーゼが銅含有酵素の一つであることによるものであると結論された¹⁷⁾。亜鉛過剰投与によってチトクロームオキシダーゼ活性が低下する事実から Duncan 等³⁾ は Smith 等²⁾ と同様に銅-亜鉛の拮抗性について報告している。このような事実より著者等は微量銅の生理的意義を追求する立場から亜鉛毒性による生体の異常症状に興味を持ち、銅含有酵素の一つであるセルロプラスミン活性に対する亜鉛の影響について検討した。そして亜鉛過剰投与によって血中セルロプラスミン活性の低下とともに血中銅含量の異常な低下を認めた。*in vitro* においてはセルロプラスミン活性は亜鉛添加によって変化しなかった。また肝硬炎、肝炎では正常に比して血中セルロプラスミン活性の上昇がみられる事実¹⁸⁾ より亜鉛投与による肝傷害のためとも考え難い。それえ亜鉛投与によるセルロプラスミン活性低下の原因は、銅代謝の恒常性が亜鉛摂取によって異常化するため、すなわち血中銅の減少に基づくものと考えられる。血中銅低下の原因としては銅の吸収阻害、排泄の昂進などが考えられるが、その詳細については不明である。亜鉛中毒による貧血は、銅欠乏でも貧血が誘起されることより血中銅含量の低下に起因する可能性がある。しかし亜鉛投与によるヘモグロビン濃度の減少がセルロプラスミン活性、および血中銅の低下に比して顕著でないこと、またセルロプラスミン活性、血中銅レベルの低下が貧血の発現より先行して起こることより、造血因子としての銅の生理的役割の複雑さを示唆している。清水等⁸⁾ がセルロプラスミンを造血因子の一つであると考えていることは、セルロプラスミンが生体銅の重要な一つの存在様式であること、またヘモグロビン生合成に鉄、コバルトとともに銅が必須であることより興味深い。

亜鉛投与によって生ずる低セルロプラスミン血症が、銅イオンおよび銅錯塩の一つである銅ヒスチジンキレート¹⁾の投与によって改善され、また亜鉛-銅含有の食餌では起こらないことより、亜鉛-銅の拮抗作用がセルロプラスミンに対しても起こり得ることを示している。同時にセルロプラスミン活性の変動は血中銅の含量と平行して起こることを認めた。このような事実は金属代謝の調節機構に対する金属相互の関与とともに、金属の生理作用の相関性を示唆するものと考えられる。現在セルロプラスミンの生理作用については不明である。著者等は得られた実験的低セルロプラスミン血症の動物を用いて今後セルロプラスミンの生理的意義について明らかにして行きたいと考えている。

総 括

亜鉛過剰投与によって成長阻害とともにセルロプラスミン活性およびヘモグロビン濃度の低下することを認めた。とくにセルロプラスミン活性は異常な低値を示し、同時に血中銅含量の低下が認められた。亜鉛-銅含有の食餌で飼育した実験群では、対照に比して成長阻害が認められるが、ヘモグロビン濃度およびセルロプラスミン活性の低下はみられなかった。亜鉛過剰投与によって生ずる低セルロプラスミン血症は銅添加によって回復され、このような事実より亜鉛-銅の拮抗現象がセルロプラスミンに対して起こり得ることを確認した。なお亜鉛投与によって惹起する貧血すなわちヘモグロビン濃度の減少は、セルロプラスミン活性および血中銅の低下について起こることを認めた。

本研究に協力された志沢寿保、鈴木 弘の両君に感謝する。

千葉大学薬学部

-
- 12) C.L. Comar, F. Bronner: "Mineral Metabolism", Vol. II. 546(1962) Academic Press, New York.
 - 13) R.L. Andarson, S.B. Tove: Nature, **182**, 315(1958).
 - 14) J.A. Bush, W.N. Jensen, J.W. Athens, H. Ashenbrucker, G.E. Cartwright, H.M. Wintrobe: J. Exp. Med., **103**, 701(1956).
 - 15) E. Cohen, C.A. Elvehjem: J. Biol. Chem., **107**, 97(1934).
 - 16) M.O. Shultze: J. Biol. Chem., **129**, 729(1941).
 - 17) W.W. Wainio, C.V. Wende, N.F. Shimp: J. Biol. Chem., **234**, 2433(1959).
 - 18) 赤堀, 沖中編: 臨床酵素学, 327(1964) 朝倉書店.