

研究報文

毛の銅量と組織の銅量との相関について (ラットの場合)

新 納 英 夫

Relationships between Copper Concentration of Hair and
Other Tissues in Rats

Hideo Niiro

銅は生体内で多くの金属酵素の構成成分として存在し、不足すると血漿セルロプラスミンが減少して、鉄の利用阻害による貧血の起ることは古くから知られていた。近年生体内で多くの銅含有酵素が発見され、その中にはコラーゲンやエラスチンの分子間架橋の形成に関係しているリジルオキシダーゼも含まれ、銅不足により起る骨折や動脈破裂の原因が解明された。またセルロプラスミンは銅を含むアミン酸酵素であり、銅不足は神経の形成を阻げ、脂質代謝の異常から肥満や高コレステロール血を起すことが知られている^{1,2)}。

一方飲料水の浄化、食品加工の変化などは銅摂取量を減少させ、必要量を摂取していない人も存在すると思われる。現在多くの国で銅は亜鉛とともに栄養所要量に加えられている。わが国では1昨年8月より人工乳に銅、亜鉛の添加が認められ、調製粉乳に添加されるようになった。完全食品として考えられている牛乳、乳製品は銅、亜鉛に不足しており、精製糖や油脂の摂取量の増加、銅の吸収を阻害するスズなどの重金属塩、ポリリン酸などの摂取機会の増大する傾向にあるので、わが国でもこれら微量必須金属の摂取に今後注意すべきと思われる。

微量金属の含有量は同一名の食物、飲料水でも変動が大きいため、摂取食物より各個人の摂取量を求めることは難しい。また摂取量が判っても、同時に摂取する他の食品成分によって吸収・排泄の機構が影響さ

れるので、食餌中の銅摂取量から現在体内に十分量あるか不足しているかを判定しがたい。血漿中の銅や亜鉛の量は直前の食事の影響を大きく受けるので、その量から個体の金属充足度を推定することは危険を伴う。さらに吸収・排泄には個体の適応も考える必要がある。

毛は多くの金属を含有し、その量は肝臓その他の金属量と相関し、長期的な微量金属の栄養状態は、血漿中よりも毛中によくあらわれると考えられている^{3,4)}。そこで今回は毛の中の銅量から他の組織の銅量を推定し、銅の栄養状態をどの程度推定できるかを、ラットを用いて調べた。実験試料は当研究室で昭和48年から61年の間に飼育した Wistar 系 (W) および Sprague-Dawley 系 (SD) について毛、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、筋肉および血漿について銅を定量し、毛の銅量と組織の銅量がどの程度相関しているか、毛の銅量がどの位になれば、その個体が銅欠乏といえるかについて検討した。

I 実験方法

表1の組成のタンパク源としてカゼイン20%を含むものを基本食とした。無機塩の標準組成は表2で、塩類は試薬特級を用いた。カゼインは市販酸カゼイン、コンスターチ、蔗糖は市販品を購入し、銅・亜鉛等の定量を行い、これに基づいて無機塩中の銅・亜鉛量を調節した。カゼイン中の銅量はバラツキが大きく、実験室操作での除去は困難で、購入したカゼイン中の銅量が最低銅含量に影響するため、銅無添加の最低銅含量

表1 基本食餌組成 (100 g 中)

カゼイン	20.0 g
グラニウ糖	29.4
コンスターチ	34.5
無機塩混合物	5.0
セルロース末	1.0
ビタミン混合物	1.0
シスチン	0.1
大豆油	9.0

表2 無機塩基本組成

Ingredient	
NaCl	243.198 (g)
K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O	533
K ₂ HPO ₄	174
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	800
CaCO ₃	368
MgCO ₃	92
Fe ₂ (SO ₄) ₃	24.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—
MnSO ₄	2.8
K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O	0.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2
KI	0.1
ZnCO ₃	0.1
NaF	0.002
Total	2,237.7

の食餌でも、Cu 0.7 ppm を含んでいた。亜鉛およびスズの過剰食を、著しい銅欠乏ラットを作るために作成したが、この場合それぞれの酢酸塩として添加し、同量の蔗糖を基本食より減じた。ポリリン酸塩の添加および無機塩量を3%にした場合も、蔗糖で調節した。市販固形食としてはクレア CE-2 またはオリエンタル M を使用した。

ラットはW系およびSD系の自家繁殖のものおよび

3~5週齢で購入したものをを用いた。

飼育温度 24±1°C, 湿度50±20%, 12時間照明の飼育室で、ステンレスケージで飼育し、飲水は蒸留水、飼料は自由摂取で行った。

飼育期間終了時に、ラットはエーテル麻酔下で心臓採血により殺し、毛、血液、組織を速やかに分取した。組織は分析まで -20°C 以下で凍結保存し、凍結乾燥したものを、450°C 電気炉で乾式分解または硝酸・過塩素酸を用いての湿式分解をしたのち、2N-HCl に溶解し、定容としたものを分析試料とした。血液の採取はヘパリン (0.1 mg/血液 10 ml) を加えて行い、血漿を遠心分離し、湿式分解したのち定量した。毛は水、アルコール、アセトンで順次洗い、脱脂・乾燥後、硝酸で湿式分解し、最後に少量の過塩素酸を加えて完全に分解したのち定容とした。乾式分解は白金ルツボ中で行い、湿式分解に使用した硝酸・過塩素酸は和光純薬原子吸光分析用試薬を、塩酸は有害金属分析用試薬を用いた。

原子吸光分析は島津原子吸光フレーム分光光度計 610 S 型および AA 670 型を用い、標準液は和光純薬原子吸光分析標準液を用いた。

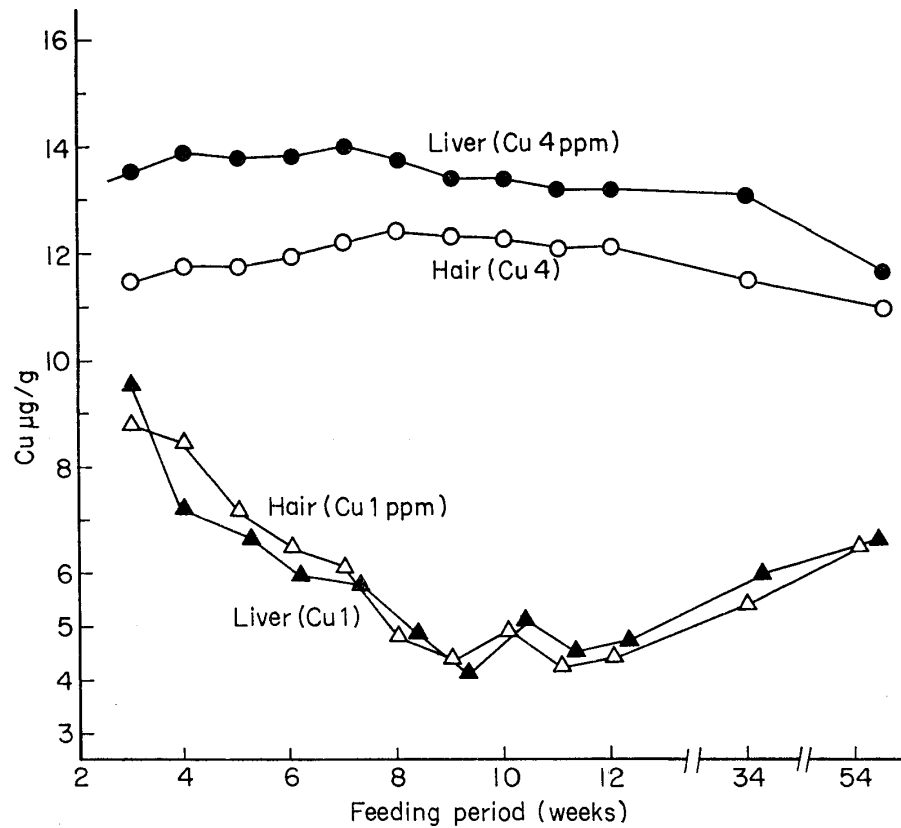
II 実験結果と考察

実験1. 毛の位置によって金属含量に差があるか否かを6頭の8~10週齢ラットについて頭部、背部、腹部に分けて採毛し、分析したところ、同じラットについては差が認められなかったため、以下の実験では汚れの少ない背部の毛を試料とした。

次に新しく生えた毛と古い毛で、銅量に差があるか否かを確かめるため、8週齢のW系雄ラットを4週間基本食で飼育した後、背の片側のみを採毛し、基本食および Cu 1.22 ppm の銅不足食で飼育した後、すべて新生した毛の部分(A)と、反対側の主として古い毛の部分(B)に分けて分析した。結果は表3の通りで、対照食についても、銅不足食についてもA部とB部の銅含量に差が認められなかった。よってラットの毛の

表3 新しい毛と古い毛の銅量

	Controll (Cu 4.0 ppm) (N=5)		Deficient (Cu 1.2 ppm) (N=5)	
	A	B	A	B
MEAN (Cu μg/g Hair)	11.44	11.53	7.39	7.37
ST. DEV.	0.38	0.42	0.29	0.28
VARIANCE	N. S.		N. S.	



第1図 毛および肝臓の銅量の飼育期間による変化

銅含有量は他の組織と同様に食餌中の銅量などの影響を受けて変動するものと考えられる。

実験2. 昭和48~60年に本研究室で飼育したラットの毛および組織の銅を定量し、その相関について調べた。他の金属についても定量したが、本報告では銅のみについて行う。血漿以外の組織中の銅量は乾燥重量1g当りのμgで示す。ラットは生時肝臓中に100μg/g以上の銅を含有するが、成長と共に速やかに減少し、5週齢では10~20μg/g程度になる。以後ラットの肝臓中の銅量は摂取銅量10~100μg/日のかかなり広い範囲で、肝臓中の銅量はこの値に保たれ、調節機構が存在していることが考えられる。ただし雌ラットでは妊

娠にともなって肝臓中の銅量が増大し、女性ホルモンの増加が銅の蓄積に関係している。この報告では雌ラットは妊娠あるいは授乳中のラットの値は含めないことにした。

図1は4週齢のW系雄ラットをCu 4 ppmの正常食およびCu 1.0 ppmの銅不足食で飼育したときの肝臓および毛の銅量の変化を示したもので、正常食では1年間の飼育期間を通じてほぼ一定に保たれる。銅不足食では毛および肝臓の銅量は12週まで次第に減少した。しかし体重増加がほとんどなくなる12週以後では、体重kg当りの銅摂取量が減少するにかかわらず、毛および肝臓の銅含有量が回復の傾向になり、1年後6

表4 食餌組成の変化が毛の銅量に与える影響

Diet	Cu μg/g Hair	Diet	Cu μg/g Hair
Cu-4*, Zn-10*	12.26+0.91***	Cu-1.2*, Zn-10*	4.56+0.90***
Cu-4, Zn-7*	13.14+1.21		
Cu-4, Zn-1250*	6.70+1.20	Cu-1.2, Zn-1250*	3.35+1.10
Cu-4, Zn-4000*	5.57+0.99		
Cu-4, Sn-3000*	4.55+1.20	Cu-1.2, Sn-3000*	3.65+0.50
Cu-4, Na-poly-P** 1%	6.20+1.14		
Cu-4, Na-poly-P 2%	4.85+0.65		

W♂ (Feeding period 9-12 weeks) * μg/gDiet ** ポリリン酸ナトリウム *** ST. DEV.

表5 銅不足食の組織の銅量に与える影響

	Controll (Cu 4 ppm)	Cu-deficient (Cu 1 ppm)
	(N=16)	(N=16)
Hair	11.05+ 1.20* $\mu\text{g/g}$	5.26+ 1.64* $\mu\text{g/g}$
Liver	12.03+ 2.76	5.34+ 1.88
Kidney	25.94+ 7.68	10.12+ 1.43
Heart	20.24+ 1.34	10.46+ 2.13
Spleen	6.49+ 0.89	3.55+ 0.78
Muscle	6.03+ 1.85	3.18+ 0.55
Plasma	121.9 +25.6 $\mu\text{g/dl}$	35.5 +13.8 $\mu\text{g/dl}$

SD-♂ (Feeding period 4 weeks) * ST. DEV.

$\mu\text{g/g}$ になった。

実験3. 基本飼料中の銅量 4 ppm は、ラットの正常成長の最低必要量と考えられ、酢酸亜鉛、酢酸第1スズの過剰添加、あるいはポリリン酸ナトリウムを食餌に加えると、ラットは銅不足になる。表4にこれらの塩を基本食および銅不足食に添加した飼料で、4週齢のW系雄ラットを9~12週間飼育したときの毛の銅量を示した。このとき毛の銅量に比例して組織の銅量の低下がみられた。表5に4週齢のSD系雄ラットを基本食および銅 1 ppm の銅不足食で飼育したときの毛および組織の銅量を示した。

実験4. ビタミンC (VC) は単なるビタミン剤として以外の目的で多量に摂取することのあるもので、金属に強い配位性をもっている。また銅イオンがVCの酸化を促進することも知られている。ラットはアスコルビン酸を体内で合成するので摂取の必要はないが、多量の添加は金属イオンの代謝に大きな影響を与えると考え、100gの食餌に60mgのVCを添加して4週齢のSD系雌ラットを飼育した。またVCが主として金属とキレートを作ったり、還元作用によって銅代謝に大きな影響を与えることも考えられる。そこで

化学的性質が同じで、ビタミンとしての効力はないと考えられるイソアスコルビン酸 (IVC) を同量加えた飼料でも飼育した。4週間飼育後の結果は表6の通りで、銅不足食に多量のVC、IVCの添加は組織の銅不足を促進した。ことに腎臓および脾臓の銅減少が著しかった。なおこのVCの添加量はラット体重kg当り40~60mg/日に当り、50kgの人で2~3g/日のVCを取ることもあるので、VCの多量摂取をする時は銅の栄養状態にも注意すべきである。

実験5. W系およびSD系ラットの毛の銅量と各組織の銅量との相関を性別に求めた。SD系ラットの飼育期間の違いによる相関係数の変化は表7の通りで、毛と肝臓の相関は飼育期間の延長と共に高くなったが、腎臓では一定せず、雌では雄に比べて相関が低く、性ホルモンが腎臓への蓄積に関係していると考えられた。飼育期間4~54週のW系およびSD系のラットについて、餌の組成を考慮することなく、性別に毛の銅量と組織の相関関係を調べ、毛の銅量の低下からどの程度組織の銅不足を推定できるかを調べた。第2図、第3図はSD系のラットの毛と肝臓の相関を示したものである。雄、雌共に高い相関を示し、毛の銅量が6 $\mu\text{g/}$

表6 アスコルビン酸添加の組織の銅量に及ぼす影響

Diet	Controll	Cu 1* (A)	A+VC	A+IVC
	(N=16)	(N=16)	(N=4)	(N=4)
Hair	10.55+ 2.85 $\mu\text{g/g}^{**}$	8.50+ 1.46 $\mu\text{g/g}^{**}$	6.36+1.16 $\mu\text{g/g}^{**}$	7.55+1.34 $\mu\text{g/g}^{**}$
Liver	12.44+ 1.59	7.01+ 3.05	6.43+1.51	5.79+1.10
Kidney	26.39+ 9.06	12.10+ 1.43	8.80+1.02	9.64+1.06
Heart	18.93+ 2.96	12.38+ 4.95	12.07+2.13	11.97+1.19
Spleen	5.40+ 1.01	1.13+ 1.00	2.84+0.70	2.57+0.64
Plasma	136.1 +22.6 $\mu\text{g/dl}$	46.8 +22.7 $\mu\text{g/dl}$	27.5 +2.9 $\mu\text{g/dl}$	32.5 +8.7 $\mu\text{g/dl}$

SD♀ (Feeding period 4 weeks)

* Cu 1 $\mu\text{g/g}$ Diet

** ST. DEV

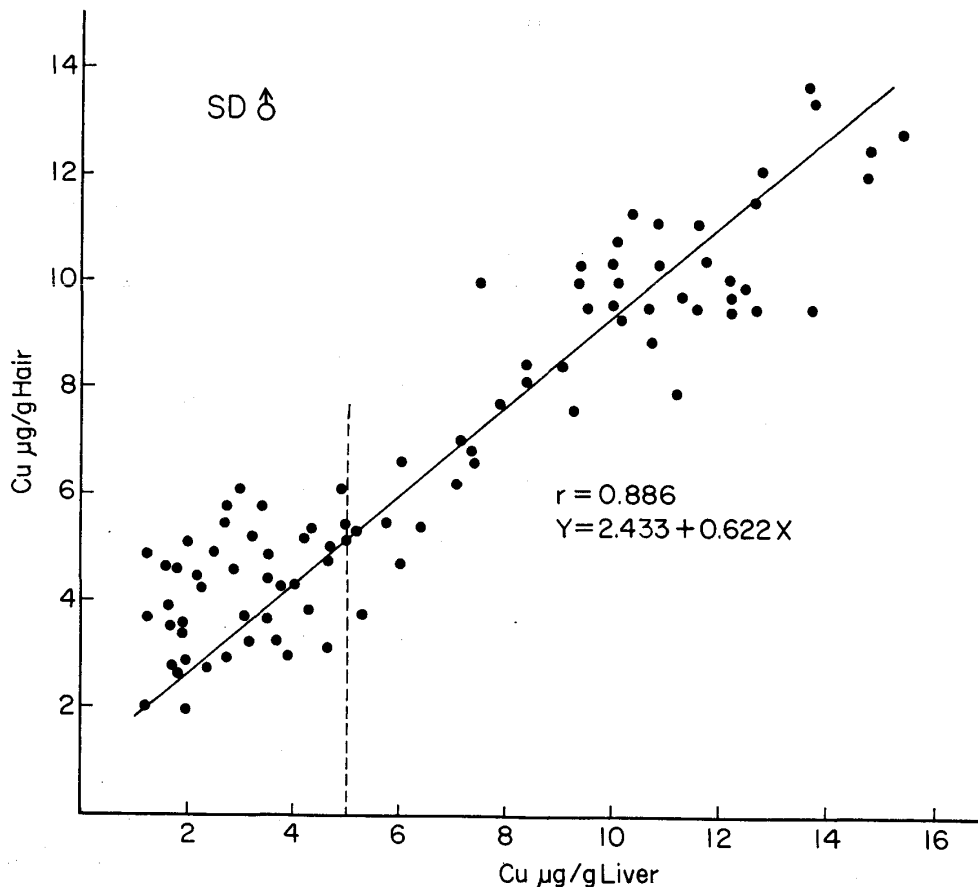
表7 飼育期間の変化が毛と組織の相関関係に与える影響

Feeding period	sex	Hair-Liver	Hair-Kidney	Hair-Plasma
4 weeks	SD ♂	0.7922 (N=32)	0.6136 (N=32)	0.6096 (N=32)
6 weeks	SD ♂	0.8475 (N=28)	0.8023 (N=28)	0.6241 (N=27)
8 weeks	SD ♂	0.8823 (N=18)	0.5897 (N=13)	0.8113 (N=18)
4 weeks	SD ♀	0.6691 (N=26)	0.4094 (N=14)	0.7107 (N=20)
6 weeks	SD ♀	0.7667 (N=22)	0.4797 (N=22)	0.5022 (N=22)

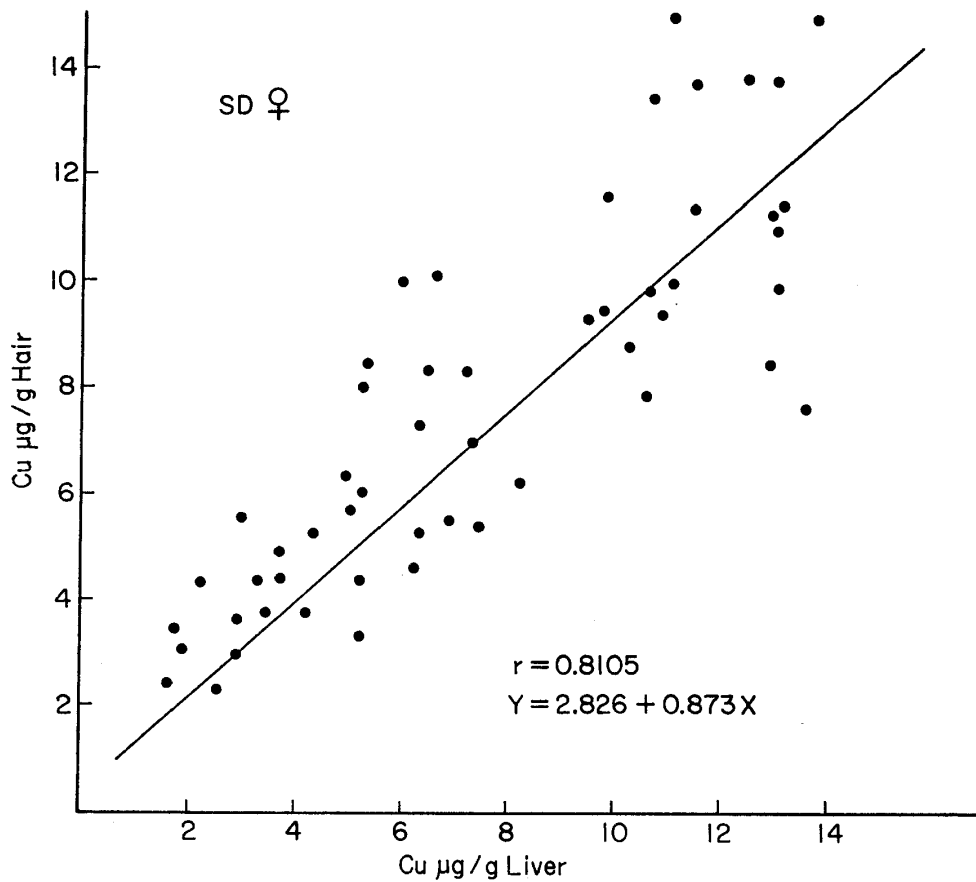
g 以下ならば、肝臓中の銅量は 5 μg/g 以下になっていることが解る。肝臓中の銅量 5 μg/g 以下では、W系、SD系とも、ヘマトクリット値の低下、心臓の肥大、雌にあっては正常の出産ができないなど著しい銅不足状態を示した。表8および表9にW系およびSD系ラットの毛と組織間の銅量を推定するための回帰式を示した。両系共に肝臓および心臓の銅量は毛の銅量とよく相関し、雄は雌より相関が高い。腎臓および脾臓も毛の銅量と有意の相関を示すが、相関が肝臓に比べて著しく低い。これは腎臓中の銅量が性ホルモンの影響を受けやすいこと、貧血に伴って脾臓の肥大が起こるため、組織の乾燥重量当りの銅量が低くなりすぎ

ることも関係していると考えられる。

肝臓および心臓の銅量と毛の銅量との相関係数は、これらの組織と血漿中の銅量とのものより高く、これは血漿中の量は摂取時間と採取時間の差の影響を受けやすいためと考えられる。また 50 mg も採毛すれば正確に分析できることから、血漿と異りラットをほとんど傷付けることなく行えるので、長期に亘る栄養実験中の銅の栄養状態を知るには最も適当な方法と考えられる。なおこの実験に含まれる飼料中の銅最高含量は 28 ppm で、このときの亜鉛含量は 60 ppm 以上としたが、この濃度で肝および毛の銅量は正常範囲で、他の組織でも銅の異常蓄積は認められなかった。



第2図 毛と肝臓の銅量の相関(1)



第3図 毛と肝臓の銅量の相関(Ⅱ)

表8 毛と組織の銅含量の相関(Ⅰ)

		相関係数	回帰式
Hair-Liver	W ♂	0.7485 (N=104)	$Y \mu\text{g/g} = 0.714 + 1.166 X$
Hair-Kidney	W ♂	0.7054 (N=72)	
Hair-Heart	W ♂	0.8294 (N=70)	$Y \mu\text{g/g} = 2.408 + 1.477 X$
Hair-Spleen	W ♂	0.1083 (N=60)	
Hair-Plasma	W ♂	0.7192 (N=95)	$Y \mu\text{g/dl} = -14.974 + 13.094 X$
Liver-Plasma	W ♂	0.7159 (N=80)	$Y \mu\text{g/dl} = 6.149 + 7.266 X$

表9 毛と組織の銅含量の相関関係(Ⅱ)

		相関係数	回帰式
Hair-Liver	SD ♂	0.8863 (N=110)	$Y \mu\text{g/g} = 2.433 + 0.622 X$
Hair-Liver	SD ♀	0.8324 (N=105)	$Y \mu\text{g/g} = 2.826 + 0.873 X$
Hair-Kidney	SD ♀	0.3239 (N=85)	
Hair-Heart	SD ♂	0.8186 (N=20)	$Y \mu\text{g/g} = 0.591 + 1.747 X$
Hair-Heart	SD ♀	0.8270 (N=65)	$Y \mu\text{g/g} = 4.496 + 1.088 X$
Hair-Spleen	SD ♀	0.3890 (N=69)	
Hair-Muscle	SD ♀	0.7456 (N=20)	$Y \mu\text{g/g} = 1.128 + 0.258 X$
Hair-Plasma	SD ♂	0.8049 (N=110)	$Y \mu\text{g/dl} = -37.829 + 15.603 X$
Hair-Plasma	SD ♀	0.8109 (N=80)	$Y \mu\text{g/dl} = -24.140 + 14.862 X$

本報告では市販固形食以外はタンパク源をカゼインに限り、糖質の組成も一定にしたが、デンプンを砂糖に変えることによって銅不足が著しく促進されることが知られており⁹⁾、タンパク質の違いや添加するアミノ酸、有機酸も銅の吸収・利用に影響すると考えられる。また今回は毛と組織の銅の相関に限って報告したが、組織中の銅量や食餌中の銅の吸収には亜鉛、鉄、その他の金属との相互関係が考えられるので、これらについても検討しており、今後報告する予定である。

III 要 約

生体から最も採取しやすい組織である毛の銅量の分析で、組織中の銅量をどの程度判定できるか、これによって動物の銅不足あるいは過剰の状態を推定できるかを知る目的で、カゼインをタンパク源とする銅その他の無機質の量を異にする食餌でラットを飼育し、毛と組織を分析し、検討して次の結論を得た。

1. 同一ラットでは毛の銅量に部位による有意差は認められない。また採毛後3週間以上同一食餌で飼育したラットでは、古い毛を含む部分と新生した毛の銅量に差が認められなかった。毛の銅量は生え変わらなくても、食餌の銅量の影響を受けて変動するものと考えられる。

2. 毛の銅量と肝臓、心臓、筋肉および血漿中の銅量はよく相関しており、その銅量が $6\mu\text{g}$ 以下になればラットは銅欠乏の状態にあるといえる。このことより長期の飼育実験における銅不足の判定には毛の分析が最もよい方法と考えられる。

3. 腎臓、脾臓中の銅と毛の銅量とは相関係数が小さく、ことに雌ラットで相関性が低くなる。

本研究の内容の一部は第22回日本栄養・食糧学会近畿支部大会で発表した。

IV 参 考 文 献

- 1) Underwood, E. J., Trace Elements in Human and Animal Nutrition 57~106(1971) Academic press, New York & London.
- 2) Mason, K. E., J. Nutr., **109** 1981(1979)
- 3) Jacob, R. A., Klevay, L. M. & Logan, G. M., Am. J. Clin. Nutr., **31** 477(1978)
- 4) Reinhold, J. G., Kfoury, G. A. & Thomas, T. A., J. Nutr., **92** 175(1967)
- 5) Fields, M., Ferretti, R. J., Smith, J. C. & Reiser, S., J. Nutr., **113** 1335(1983)