

高取吉太郎, 石黒伊三雄, 社本みと子, 内藤純子

DAB 投与ラットの肝臓内銅量の変動について

Kichitaro Takatori, Isao Ishiguro, (Miss) Mitoko
Syamoto and (Miss) Junko Naito:

Copper Metabolism of Experimental Hepatic Carcinoma by DAB

Copper content in the rat liver of experimental hepatic carcinoma by DAB was quantitatively determined. As the results, the cont. of copper in the rat liver was decreased for the 3~5 weeks after the administration of DAB, and thereafter it was gradually increased.

(Received September 20, 1961)

1936年木下, 原田, 水田, 丸谷, 榎本¹⁾は当時人造バター着色料として使用されていた Butter yellow すなわち p-dimethylaminoazobenzene (DAB) の強い肝癌発生作用を発見した。その後この脂溶性癌原性アゾ色素は動物実験癌の研究に使用され, その発癌機構の生化学的研究に関しても古くから多数の報告がある。

当教室ではすでに DAB 投与ラットにおける尿中アミノ酸の変動をペーパークロマトグラフィーによって観察して報告した。その結果特に芳香族アミノ酸の一つチロジンが DAB 投与の比較的初期に増量することを確めた。そしてこれを定量的に観察するとともに DAB による肝癌形成時におけるチロジンの意義について研究を続けている。

一般に肝のチロジンはその酵素 tyrosine-oxidizing enzyme³⁾により代謝されているが, この酵素は微量の Cu^{2+} が関与することが知られている。また銅は肝臓内では蛋白と結合しヘパトキューブレインとして存在し, この複合蛋白も生理的に重要な意義を持っている。このような銅は肝癌組織においても発癌過程とともに何等かの変動があるものと予想される。すでに Greenstein⁴⁾は肝癌組織の銅量について観察し, 明らかに増量することを認めている。しかるに生体組織における微量の銅を定量する方法には, これまでいろいろの欠点に伴って十分正確な数値は得られていない。それ故近年これに関する検討が行われ, 現在では灰化法⁵⁾と塩酸抽出法⁶⁾が実際に行われているようである。そこで著者らはこれら2つの方法について比較観察するとともに, DAB 投与による発癌の初期過程における肝臓内銅量の変動について行った成績について報告したい。

実 験 之 部

1) 実験材料および方法

a) 実験材料

体重 100 g 前後の純系ラットを対照群と DAB 投与群に別け, この両群に主食として小米を与えて数週間飼育した。次にこの DAB 投与群には飼料として常法のように 1 kg の小米に 3% DAB オリーブ油 20ml を均等に混和したものを毎日秤取して投与した。そして 1 週間毎に残存飼料を秤量して摂取 DAB 量を計算した。

1) 木下, 原田, 水田, 丸谷, 榎本: 大阪医学会雑誌 **35**, 403 (1936).

2) 高取, 石黒, 浅野, 西田: 第11回日本薬学会報告 (昭33).

3) Knox, W. E., LeMay-Knox, M.: Biochem. J. **49**, 686 (1951).4) Greenstein, J. P. & Thompson, J. W: J. Natl. Cancer Inst., **3**, 405 (1943).

5) Braun & Schaeffer: Biochem. Z., 304 (1940).

6) Gubler, C. J., Lahey, M., Achenbicker, H., Carwright, E., & Wintrobe, M. M., J. Biol. Chem., **196**, 209 (1952).

実験は、DAB 投与のラットを1週間毎に3匹ずつ撰び、それぞれ屠殺脱血して速やかに肝臓を摘出し、その一定量を秤取してから等張 KCl によって10% ホモゼネートを調製し、測定試料とした。また同時にその一定量をマイクロキールダール法に従ってN量を測定し、N当りのCu量を算出した。

b) 微量の Cu 定量法

銅の微量定量法としては、ポーラログラフィー、焰光分析、滴定等による方法が考えられるけれども、有機試薬には dithizon, bathocuproin, diethyl dithiocarbamate (DDC) 等が挙げられる。これらのうち DDC が最もよく利用されている。また普通組織に分布する銅は極めて少量であるから、それをあらかじめ抽出する前操作が大切であるが、これには、多くの改良法がある。現在では Braun, Schaeffer による灰化法と Wintrobe らによる塩酸抽出法⁶⁾がよく使われている。著者らはこれらの両方法を同一材料について比較観察した。

i) 灰化法

1940年 Braun, Schaeffer⁵⁾は灰化法の場合、共存する鉄を除去する条件について吟味し、0.2~2.0% の Cu を正確に定量し得ることを報告した。

実施法はさきに調製した試料1ml を硬質酸化管に取り、濃硫酸1ml を加えて加熱する。この際5分間ぐらいで白煙を生ずるので、更に強く加熱し、最後に無色透明な液となるまで続ける。冷後蒸留水で共栓遠沈管へ流し込み、全量を10ml とする。次にピロ燐酸炭酸塩溶液 ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 4g を50% K_2CO_3 100ml に溶解) 5ml を加えアルカリ性となし、全量25ml にする。更に0.5% DDC溶液0.5ml、イソアミルアルコール5.0ml を加え、密栓して充分振盪し、30分間放置後、イソアミルアルコール層を分取し、分光光度計で435m μ の波長で比色定量した。特に本法において湿式灰化に用いる試薬濃硫酸は銅を含むことが多いので、十分吟味した特級品を用いることが必要である。

ii) 塩酸抽出法

生体内の銅は蛋白と結合した状態で存在するか、これは普通強固な結合をしていないため酸によって容易に抽出される。本法は灰化法により簡便で正確度が高いため、生化学的定量によい方法とされている。

実施法は共栓遠沈管に試料2ml と2N-HCl 2.0ml を加え、よく攪拌し、室温に10分間放置する。次いで20%トリクロール酢酸2.0ml を加えて攪拌し、3000回転10分間遠沈した後、上清4.0ml 取り、濃アンモニア水

第1表 塩酸抽出法における既知濃度溶液の Optical Density

稀釈銅濃度 ($\mu\text{g}\%$)	440m μ の Optical Density	E-F $^\circ$
0	0.018	
80	0.051	0.033
160	0.066	0.048
240	0.092	0.074
320	0.102	0.084
400	0.137	0.119

2.0ml, 飽和ピロ燐酸ソーダ1.0ml, 0.1% DDC 溶液1.0ml を加え、蒸留水で全量10ml とし、これにイソアミルアルコール5.0ml 加えて振盪抽出し、30分間放置後イソアミルアルコール層を取り、分光光度計で440m μ の波長について比色定量した。

2) 実験成績

a) 標準曲線作製に関する吟味

本法を実施する前に既知濃度の標準溶液を用いて検討を行った。先ず塩酸抽出法による場合は第1表に示す稀釈濃度における440m μ の optical density を測定してみると表に示す結果が得られた。この数値からこれら銅濃度では直線関係が成立するものと思われた。灰化法においては同様な実験から直線関係が得られるが、実験を繰返してもその勾配が一定化しなかった。このことについては定量操作に不備な点があるのか、あるいは呈色に対

する因子が与かるものかの問題が残される。そこで著者らは灰化法では標準曲線を基本とした測定法を行わず、実験にあたって常に 80% の標準液を用いて測定することにした。

b) DAB 投与ラットの肝臓内銅量の変動について

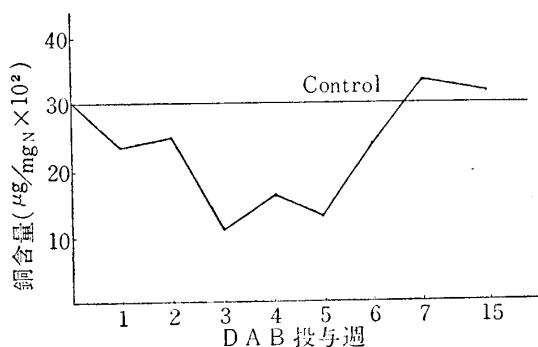
実験は正常ラット 3 例, および DAB 投与群では DAB 投与による発癌の比較的初期過程について観察する目的から 1~7 週の各週と 15 週について観察した。測定はこのようなラットの肝から等張 KCl で 10% homogenate を調製し, さきの塩酸抽出法と灰化法の両方法により同一材料を用いて比較し, 第 2 表の結果を得た。なお DAB 投与群は各週 3 匹の平均値で示している。

第 2 表 塩酸抽出法と灰化法による DAB 投与ラットの肝臓内銅量の変動について

Exp. Group	DAB 投与期間	肝 Homogenate の N 量 (mg/ml)	塩酸抽出法		灰化法	
			μg/ml of Homog	μg/mg of N	μg/mg of Homog	μg/mg of N
Normal	—	3.262	1.086	0.333	0.960	0.294
	—	3.190	0.895	0.289	0.895	0.281
	—	3.038	0.859	0.282	1.719	0.565
平均		3.163	0.946	0.301	1.191	0.380
DAB 投与群	1 週目	2.205	0.527	0.239	0.640	0.290
	2 週目	2.344	0.589	0.251	0.800	0.341
	3 週目	2.251	0.255	0.113	0.800	0.356
	4 週目	2.925	0.483	0.165	0.409	0.139
	5 週目	2.366	0.313	0.132	1.412	0.591
	6 週目	2.368	0.579	0.244	0.933	0.394
	7 週目	2.365	0.800	0.338	0.800	0.338
15 週目	1.820	0.589	0.323	0.233	0.128	

それによると正常ラット肝の銅量は塩酸抽出法では平均 0.301 μg/mgN であるに対して灰化法は 0.380 μg/mgN の値を示し, 同一材料でも灰化法の方がやや高い値を示した。このことは恐らく灰化法では操作上の誤差が大きいためによるものと思われる。次に塩酸抽出法による試料で定量すると DAB 投与ラットの肝銅量は DAB 投与初期において減少し, 3~5 週が最も低値であったが, 更に DAB 投与を続けて 7 週以後になると対照例の平均値を超えて高い値を示すようになった (第 1 図)。灰化法では同一材料にもかかわらず測定値が一致

第 1 図 塩酸抽出法による DAB 投与ラットの肝臓内銅量の消長



せず, 各例の変動が激しかったためか塩酸抽出法と結果が平行しなかった。このような結果から灰化法による組織内銅量の測定はかなり誤差を生じ, この場合の測定法としては不適當と考えられる。いづれにしても, DAB 投与ラットの肝臓内銅量は DAB 投与初期において減少し, 発癌末期に増量する傾向を示した。

結 語

DAB 投与ラットの肝臓内銅量を, 塩酸抽出法と灰化法によって抽出後 DDC 比色法により定量し, 次の結果を得た。

- 1) 臓器組織内の微量銅の比色定量法として、塩酸抽出法が灰化法より誤差が少なく適した方法と思われる。
 - 2) 正常ラットの肝臓内銅量は塩酸抽出法、灰化法ともに平均 $0.3 \mu\text{g}/\text{mgN}$ を示した。灰化法の方が塩酸抽出法よりやや高い値を示した。
 - 3) DAB 投与ラットの肝臓内の銅量は DAB 投与の初期 3～5 週において減少し、7 週以後において明らかに再び増量する傾向を示した。
- 終りに臨み本研究に当り終始御鞭撻を賜った本学学長宮道悦男先生に深甚の謝意を表します。

加藤好夫：ビタミンCの安定性に関する研究

Yoshio Kato: Studies on the Stability of Vitamin C

When *l*-ascorbic acid (V. C) is mixed with medical substances of various kinds, it is a matter of great importance to consider the effect of the relative humidity of these mixtures upon the decomposition of V. C. Therefore, the following medical substances have been chosen as those that are commonly presumed to be easily mixed with V. C: —sodium carbonate, lactose, starch, sucrose, glucose, magnesium oxide, magnesium carbonate, calcium carbonate, synthetic aluminium silicate, dried aluminium hydroxide gel, citric acid, tartaric acid, nicotinic acid, nicotinamide and methionin.

These mixtures of V. C and medical substances have been preserved in a vessel of constant humidity at the relative humidity of 92.9%, 80.1% and 74.8% at the temperature of 22.8°C; and the quantity of V. C and the relative humidity of these mixtures were determined at every 24 hours during 10 days, and thus the relationship of decomposition between V. C and the relative humidity has been determined. As a result, in the mixture of V. C (CRH=96%) with various medical substances which have high percentage of respective critical relative humidity (CRH), when that CRH of mixtures was higher than the preserving humidity, the relative humidity was low and V. C was stable, but when it was lower, the relative humidity showed high percentage and the decomposition of V. C was remarkable. For instance, when the mixture of lactose (CRH=97%) compounded with V. C has been preserved for 7 days at the humidity of 80.1% and 74.8%, the relative humidity has not been found, while the V. C has remained totally undecomposed.

When citric acid and tartaric acid were mixed with V. C, the relative humidity was high, but V. C was comparatively stable. The combination of V. C with nicotinic acid and methionin, when preserved in any humidity, has shown no relative humidity and V. C has been almost stable. Therefore, the medical substances that can be mixed with V. C were lactose, starch, sucrose, nicotinic acid and methionin, while those that can not be mixed were magnesium oxide, magnesium carbonate, calcium carbonate, synthetic aluminium silicate and dried aluminium hydroxide gel. (cf. the table)

(Received August 1, 1961)

抗壞血性ビタミンとして広く知られているビタミンC (*l*-ascorbic acid. 以下VCと略す) は無色の結晶で、融点 191°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +20.5^{\circ} \sim +21.5^{\circ}$ でその水溶液は酸味を呈し、 $256\text{m}\mu$ に極大の吸収帯を示す。また分子中にエンジオール基を有するために強力な還元力を有し、糖類のようにフェーリング溶液を還元するが、この場合VC (I) 自身は可逆的に dehydroascorbic acid (II) に酸化される。乾燥状態ではかなり安定であるが、その水溶液は空気中に放置すると速やかに酸化分解され、この酸化は pH5.0 以下の酸性では徐々に、しかも可逆的に行われるが、中性またはアルカリ性では分解はさらに進んで、先ずラクトン環が開いて生物学的に無効な 2,3-diketo-*l*-gulonic acid (III) となり、再び酸化され分子が開裂して *l*-threonic acid (IV) とシユウ酸(V) に分解されるが、この場合の酸化は不可逆的であるとされている。