

銅錯体の毒性研究 (第 1 報)

—— 銅セリンと銅サリチル酸 ——

茅原 紘・只左弘治・山本正敏*・柴野隆司*

内山孝一*・池辺裕行*・中川博司*

信州大学農学部 生物資源科学科 生物制御化学講座

Toxicology of Copper Complex (Part I)

Copper Serinate and Copper Salicylate

Hiroshi KAYAHARA, Koji TADASA, Masatoshi YAMAMOTO*, Takashi SHIBANO*,

Khoichi UCHIYAMA*, Hiroyuki IKEBE

and Hiroshi NAKAGAWA*

Division of Bio-organic Chemistry, Department of Bioscience and
Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

The availability of copper complex of organic compounds having the potency of scavenging superoxide has been demonstrated by many researchers as anti-rheumatoid arthritis, anti-inflammation, anti-ulcer, anti-tumor, etc.

On the other hand, harmful side effects of copper compounds such as hemolytic anemia and laundice have also been reported.

This report deals with the toxicology of copper salicylate and newly synthesized copper serinate which have been realized to be effective against rheumatoid and osteoarthritis. Copper serinate and copper salicylate were administered subcutaneously to adult female rats (6 rats per one group) at a daily dose of 50mg/kg for 7 days and their toxic effects were investigated. The same experiment was carried out by using $\text{Cu}(\text{OH})_2$ and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ respectively which were used to synthesize the complex. The results were as follows ;

1. One animal of the copper serinate group and 4 animals of the $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ group were died.
2. The behavior of raising the hip up by stretching the hindlimbs which suggests a lordosis reflex was observed in 2 animals of the copper serinate group.
3. Marked body weight loss was found in animals of the copper serinate and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ groups.
4. Hemolytic anemia was induced in animals of all 4 copper compound groups.
5. Histopathology revealed degeneration and necrosis of the hepatic cells and renal

* (株)イナ リサーチ, 長野県伊那市西箕輪8047

1991年9月30日 受付

tubular epithelium in animals of copper serinate and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ groups and enlarged Kupffer's cells in all 4 copper compound groups.

6. Thymic lymphocytes markedly decreased, particularly in animals of copper serinate and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ groups.
7. These toxic effects were due to copper itself and were severer in animals treated with copper serinate and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ than in those with copper salicylate and $\text{Cu}(\text{OH})_2$

Key words : Copper complex, toxicity

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 28 : 141-154, 1991)

要 約

Cu-serine および Cu-salicylate, ならびにそれらの合成に用いた $\text{Cu}(\text{OH})_2$ および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ をそれぞれ50mg/kg, 1群6匹の成熟雌ラットに7日間連日皮下投与し, その毒性を検討した。

- 1) Cu-serine 群の1匹, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群の4匹が死亡した。
- 2) Cu-serine 群の2匹で後趾をつっぱって腰部をもちあげる, いわゆるロードシス反射を示唆する行動が観察された。
- 3) Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群において著明な体重減少が認められた。
- 4) すべての銅化合物群で溶血性貧血が認められた。
- 5) 肝細胞および腎尿細管上皮の変性・壊死が Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群で, クッパー星細胞腫大がすべての銅化合物で認められた。
- 6) Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群で胸腺のリンパ球減少が特に著しかった。
- 7) これらの毒性効果は, 明らかに銅そのものに起因しており, Cu-salicylate および $\text{Cu}(\text{OH})_2$ よりも Cu-serine および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ において強かった。

緒 言

活性酸素 ($^{\circ}\text{O}_2^-$) が関与する疾患には, リウマチ, 各種炎症, 痙攣, 腫瘍, 潰瘍, 更には老人性痴呆症などさまざまな病気が報告されており, 生体内で活性酸素を除去する物質としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が知られている。そして, どの生物由来の SOD もアミノ酸数が151から153個のポリペプチドで, 現在までに5種類の SOD が見出されているが, 研究が最も進んでいるのは Cu, Zn-SOD であり, 活性に関係する1原子の銅と構造安定性にのみ関係する1原子の亜鉛を持った単量体2個から成り立っている。SOD は銅イオンで活性化されるが, 一方, 銅と各種有機化合物の錯体が SOD 様作用を持っており, 上記疾患に対する有用性が Sorenson ら多くの研究者によって報告されている¹⁾⁻¹¹⁾。しかしながら, 同時に銅イオンに由来すると思われる毒性も指摘されている。

今回, 我々はリウマチ性疾患に対して有効性が認められている銅サリチル酸および我々が銅サリチル酸よりも更にカラゲニン浮腫抑制効果が高いことを確認している新規に合成した銅セリンについてラットにおける各種毒性を研究したので報告する。

材料および方法

A 被験物質

銅セリン（以下，Cu-serine）は著者らが1989年に合成したもので，セリンを三水和硝酸銅と反応させて得た水に難溶な青色結晶性粉末である。

銅サリチル酸（以下，Cu-sal）は水酸化第二銅とサリチル酸をアルコール溶液中で溶解・反応させて得た，水に難溶な緑色結晶性粉末で，粉末8g中に銅錯体3gとサリチル酸5gを含む。本剤はALCUSAL INCORPORATED PTY. LTD. (Australia) で1988年に合成されたものである。

なお，懸濁に用いた生理食塩水（以下，saline）ならびに錯体合成に使用した水酸化第2銅および三水和硝酸銅を対照物質とした。

B 使用動物および飼育条件

日本エスエルシー株式会社（浜松市）で生産された14週齢のSD系ラット（Slc: Sd），雌30匹を用いた。投与開始時の体重は231～331gであった。試験実施期間中，動物をステンレス製ワイヤーケージ（29×22×21cm）に個別に収容し，温度22～24℃，湿度54%～62%，換気回数14回/時間および照明12時間/日のバリアーシステム飼育室で飼育した。その間，高圧蒸気滅菌したラット用固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）および上水道水を自由に摂取させた。

C 投与方法

生理食塩液に懸濁または溶解して1%液を作製し，体重1kgあたり50mgを1日1回，7日間連日背部皮下に投与した。群構成および使用動物数を下表に示した。

被験物質	投与量 (mg/kg)	動物使用数 雌
Saline	—	6
Cu-sal	50	6
Cu-serine	50	6
Cu(OH) ₂	50	6
Cu(NO ₃) ₂	50	6

D 観察項目

投与期間中毎日，一般状態を観察し，体重を測定した。また，最終投与の翌日にエーテルで麻酔し，後大静脈より採血して赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット値（Ht），白血球数（WBC）および血小板数（Plate.）（東亜シスメックス CC-180A 自動血球計数装置）を，また，血漿を用いてトランスアミナーゼ（GOT，GPT），アルカリフォスファターゼ（ALP），乳酸脱水素酵素（LDH），ビリルビン（T-Bil），クレアチンフォスフォ

キナーゼ (CPK), グルコース (Glu), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRNN), 総コレステロール (T-Cho), トリグルセライド (TG), リン脂質 (PL), 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), 無機リン (P), カルシウム (Ca) (日立705自動分析装置), ナトリウム (Na), カリウム (K) およびクロール (Cl) (日立750炎光度計) を測定した。なお, 剖検後, 臓器重量測定を行い, 主要臓器 (脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 卵巣) についてヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色標本を作製し, 病理組織学的検査を行った。また, 生存例については剖検時の膀胱内貯溜尿について潜血反応を調べた (マルティスティックス®, マイルス三共)。

E 統計学的解析

すべての計数値に対して, Saline の投与群と銅化合物投与群との間で t 検定 (2 群間検定) を行った。

結 果

1) 一般状態

Cu-serine 群で 1 匹 (投与 5 日目), Cu(NO₃)₂ 群で 4 匹 (投与 4 日目および 5 日目) に死亡がみられた。Cu-serine 群, Cu(NO₃)₂ 群ともに, 投与 2 日目ないし 3 日目より褐色尿の排泄, 眼球褪色, 立毛, 運動性の低下等の症状が観察された。また, Cu-serine 群の 2 匹で投与後 1~2 時間に, 後肢をつっぱって腰部をもちあげる動作がみられた。Cu-sal 群および Cu(OH)₂ 群では特記すべき異常は観察されなかった。

2) 体重

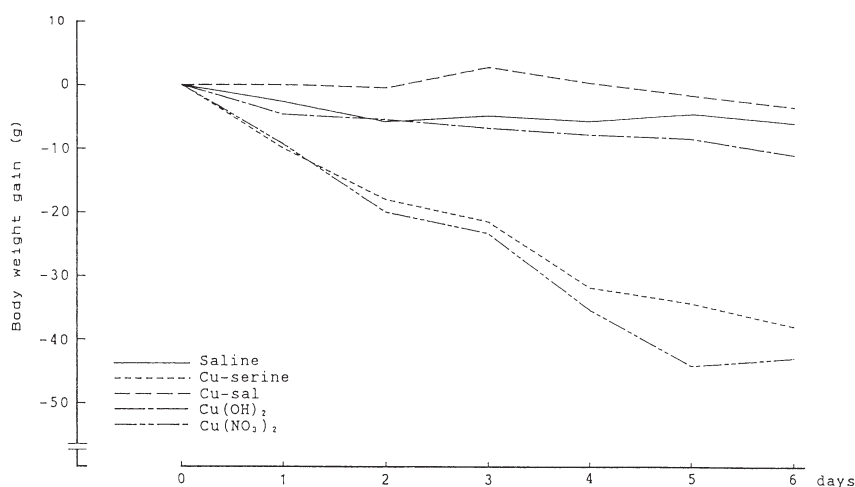


Fig. 1 Body weight gain in rats treated subcutaneously with copper compounds at a daily dose of 50mg/kg for 7 days

測定結果を体重増加量として Fig. 1 に示した。Cu-serine 群及び Cu(NO₃)₂ 群で顕著な体重低下が認められたが、Cu-sal 群及び Cu(OH)₂ 群では異常な変動は認められなかった。

3) 血液学的検査

検査結果を Table 1 に示した。Cu-serine 群および Cu(NO₃)₂ 群は類似の変化を示し、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の著しい低下と平均赤血球容積、白血球数、血小板数の著しい増加が認められた。

Cu-sal 群と Cu(OH)₂ 群でも Cu-serine 群および Cu(NO₃)₂ 群とほぼ類似する変化が観察されたが、その程度は明らかに軽度であった。なお、Cu(OH)₂ 群では平均赤血球容積および白血球数に有意な変動は認められなかった。

4) 血液生化学的検査

検査結果を Table 2 に示した。銅化合物群において GOT, LDH および無機リンの増加とグルコース、総蛋白およびアルブミン低下が認められた。Cu-serine 群では上記の他、ビリルビンと GPT の上昇例やトリグリセライドの増加例があり、Cu(OH)₂ 群では GPT の上昇例が、Cu(NO₃)₂ 群でトリグリセライドの上昇例があった。

5) 臓器重量

測定結果を Table 3 に示した。銅化合物群において胸腺および脾臓の重量低下と肝臓および腎臓の重量増加が認められ、その変化の程度は Cu-sal 群および Cu(OH)₂ 群に比較し、Cu-serine および Cu(NO₃)₂ 群で明らかに強かった。上述の変化の他、Cu-serine 群で心臓および副腎の有意な重量増加と子宮の有意な重量低下が、Cu(OH)₂ 群で副腎の有意な重量増加が認められた。

Table 1 Hematological findings in rats treated subcutaneously with copper compounds at a daily dose of 50mg/kg for 7 days

Agent No. of animals	Saline 6	Cu-serine 5	Cu-sal 6	Cu(OH) ₂ 6	Cu(NO ₃) ₂ 2
RBC (10 ⁴ /mm ³)	811±45	253±56**	614±60**	666±36**	279**
Hg (g/dl)	15.5±0.4	6.0±1.3**	11.7±1.3**	12.3±1.0**	6.0**
Ht (%)	46±2	21±4**	36±3**	37±2**	22**
MCV (μ ³)	56±1	81±4**	59±2**	56±1**	77**
MCH (pg)	19±1	24±2**	19±1**	18±1**	21*
MCHC (%)	34±1	29±3**	33±2**	33±1**	28**
WBC (10 ² /mm ³)	47±5	390±195*	69±17*	47±14	248**
Plate. (10 ⁴ /mm ³)	100±14	154±36**	158±11**	127±7**	175**

Values are means ± SD

* Singnificantly different from saline group, P<0.05

** Singnificantly different from saline group, P<0.01

Table 2 Biochemical findings in rats treated subcutaneously with copper compounds at a daily dose of 50mg/kg for 7 days

Agent No. of animals	Saline 6	Cu-serine 5	Cu-sal 6	Cu(OH) ₂ 6	Cu(NO ₃) ₂ 2
GOT (IU/l)	96±9	1498±2665	252±24**	331±122**	285
GPT (IU/l)	25±5	55±65	21±4	66±47	11
ALP (IU/l)	248±66	439±416	220±24	274±23	219
LDH (IU/l)	2479±649	11883±21713	3218±1103	4814±609**	2928
T-Bil (mg/dl)	0.34±0.03	0.75±1.01	0.32±0.04	0.31±0.04	0.38
CPK (IU/l)	650±183	859±1008	773±215	852±187	652
Glu (mg/dl)	151±28	111±16*	127±13	98±8**	96
BUN (mg/dl)	17±2	28±18	17±1	17±2	24
CRNN (mg/dl)	0.63±0.09	0.72±0.18	0.56±0.04	0.57±0.04	0.67
T-Cho (mg/dl)	52±7	54±16	60±8	51±14	45
TG (mg/dl)	62±46	185±54**	66±10	77±23	227
PL (mg/dl)	116±22	151±63	133±15	118±29	123
TP (g/l)	6.4±0.3	5.6±0.6*	5.4±0.3**	5.3±0.1**	5.6
Alb (g/dl)	3.1±0.2	2.0±0.4**	2.1±0.1**	1.6±0.3**	1.9
P (mg/dl)	6.5±1.3	9.8±1.4**	8.5±1.3*	8.2±0.4*	10.3
Ca (mg/dl)	10.3±0.8	10.1±0.6	9.9±0.6	9.5±0.2*	9.3
Na (mEq/l)	141±1	145±7	142±1	142±1	143
K (mEq/l)	4.4±0.8	5.2±1.1	5.1±0.9	4.7±0.2	5.5
Cl (mEq/l)	102±1	104±6	100±1*	100±1*	98

Values are means ± SD

* Singnificantly different from saline group, P<0.05

** Singnificantly different from saline group, P<0.01

6) 病理解剖学的所見

Cu-serine 群および Cu(NO₃)₂ 群でほぼ類似の所見があった。すなわち、肝臓の灰褐色化が Cu-serine 群と Cu(NO₃)₂ 群の各 2 例に、肝小葉像明瞭化が Cu-serine 群の 2 例に、胸腺の萎縮が Cu-serine 群の 3 例と Cu(NO₃)₂ 群の 1 例に、脾臓の腫大が Cu-serine 群の 6 例と Cu(NO₃)₂ 群の 2 例に、腎臓の表面粗造化あるいは灰褐色斑形成が Cu-serine 群と Cu(NO₃)₂ 群の各 1 例に、副腎の腫大が Cu-serine 群の 1 例に、投与部皮下における膿瘍形成が Cu-serine 群と Cu(NO₃)₂ 群の各 1 例に、投与部皮下における水腫形成が Cu-serine 群の 1 例に認められた。一方、Cu-sal 群では、投与部皮下での膿瘍形成が 1 例に、出血および水腫形成が 1 例に認められたが、内部臓器には特記すべき異常は観察されなかった。Cu(OH)₂ 群では、投与部皮下での膿瘍形成が 4 例に、肝小葉像明瞭化が 3 例に、副腎腫大が 1 例に認められた。

なお、膀胱内貯溜尿について試験紙を用いて潜血反応を調べた結果、陽性例が Cu-serine 群で 4/5 例、Cu-sal 群で 1/6 例、Cu(OH)₂ に群で 2/6 例、Cu(NO₃)₂ 群で 1/2 例に認められた。

Table 3 Organ weights of rats treated subcutaneously with copper compounds at a daily dose of 50mg/kg for 7 days

Agent No. of animals	Saline 6	Cu-serine 5	Cu-sal 6	Cu(OH) ₂ 6	Cu(NO ₃) ₂ 2
Body weight (g)	252±29	257±17	257±17	269±16	222
Brain (g)	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	2.0±0.0	1.9
Pituitary (mg)	15±4	13±2	13±3	14±5	15
Thymus (g)	0.30±0.07	0.08±0.02**	0.17±0.06**	0.20±0.06*	0.12
Lungs (g)	0.99±0.20	1.12±0.12	0.97±0.11	1.09±0.05	1.08
Heart (g)	0.75±0.11	0.91±0.09*	0.77±0.06	0.81±0.08	0.80
Liver (g)	7.9±1.2	10.3±0.9**	10.2±0.9**	10.3±0.3**	9.3
Spleen (g)	0.05±0.10	1.78±0.28**	0.74±0.10**	0.87±0.08**	1.45
Adrenal (mg) R	38±9	57±9**	39±4	49±5*	58
L	37±5	56±9**	38±5	46±6*	53
Kidney (g) R	0.75±0.11	0.99±0.09**	0.89±0.08	0.08±0.05*	1.02
L	0.78±0.09	1.00±0.10**	0.89±0.12	0.92±0.05*	1.01
Ovary (g) R	45±9	34±8	32±8	44±11	31
L	40±14	30±7	37±6	44±8	34
Uterus (g)	0.68±0.25	0.40±0.04*	0.48±0.10	0.50±0.07	0.30
Carcass (g)	199±24	206±12	204±12	211±13	176

Values are means ± SD

* Singnificantly different from saline group, P<0.05

** Singnificantly different from saline group, P<0.01

7) 病理組織学的所見

肝臓：Cu-serine 群の3例およびCu(NO₃)₂群の4例に巣状ないし塊状の壊死（Fig. 2）が認められた。死亡例ではさらに、類洞内にフィブリンの析出がみられ、クッパー星細胞は赤血球貪食により著明に腫大していた（Fig. 3）。生存例では、腫大したクッパー星細胞内にヘモシデリンと思われる黄褐色色素の沈着（Fig. 4）および一部には赤血球貪食像も観察され、髄外造血巣や肝細胞の脂肪化（Fig. 4）も認められた。一方、Cu-sal 群およびCu(OH)₂群では、肝細胞の軽度な脂肪化ならびにクッパー星細胞の軽度な腫大を認めるのみであった。

腎臓：Cu-serine 群およびCu(NO₃)₂群では、死亡例で近位尿細管上皮の広範な壊死（Fig. 5）がみられ、管腔内に壊死細胞破片を満たす尿細管基底膜は扁平な再生上皮によって被覆されていた。両群の生存例では、好塩基性の再生上皮（Fig. 6）を有する尿細管が散在性に観察され、少数例で尿細管管腔内での少量の壊死組織残存および近位尿細管内におけるヒアリン滴の軽度な出現が認められた。一方、Cu-sal 群およびCu(OH)₂群では、尿細管傷害を示す例は認められなかった。

胸腺：Cu-serine 群およびCu(NO₃)₂群では、胸腺リンパ球は著明に減少し、皮髄構造は不明瞭となっていた（Fig. 7）。また、死亡例の一部には、リンパ球の崩壊像が観察された。Cu-sal 群およびCu(OH)₂群では少数例にリンパ球のわずかな減少が認められるのみであった。

脾臓：銅化合物群ではすべての例に髄外造血の亢進 (Fig. 8) が認められたが、その変化は Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群で顕著であった。さらに Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群では白脾髄の萎縮もみられ、特に死亡例では、濾胞辺縁帯においてうっ血、フィブリン析出、赤血球を貪食して著明に腫大したマクロファージが観察された。

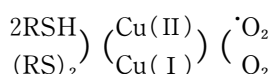
副腎：Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群では、皮質細胞の腫大による皮質層の拡大が観察された。Cu-sal 群および $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 群では著変はなかった。

肺：Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群の死亡例および少数の生存例において、うっ血やフィブリン血栓の形成が見られた他、血管内に好中球や巨核球が多数出現する例が認められた。

その他：脳、心臓および卵巣にはいずれの銅化合物群においても異常は認められなかった。なお、Saline 群ではいずれの器官においても異常は認められなかった。

考 察

銅は肝臓をはじめとしてほとんどの臓器に分布する微量元素で、主に酸化還元反応に関与している。投与された銅錯体の多くは、生体内でそのキレート結合がはずれ、 $\text{Cu}(\text{I})$ または $\text{Cu}(\text{II})$ の陽イオンとして銅親和性蛋白と結合する。また、 $\text{Cu}(\text{II})$ は superoxide dismutase に似た作用を示し、 $2\text{H}^+ + 2\cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ の反応を促進するが、その反応過程で急速に生ずる H_2O_2 と $\cdot\text{OH}$ が核酸に攻撃を与えたり、以下に示すように組織中の SH 基と作用することによって $\cdot\text{O}_2$ を産生させて細胞に酸化傷害を及ぼす¹²⁾⁻¹⁴⁾。



過剰な銅投与による変化としては肝毒性、腎毒性、溶血などの他、体重減少、心毒性、ヘム合成系酵素活性阻害などが報告されているが¹⁵⁾⁻²⁰⁾、アイソトープで標識した銅サルチル酸をラットに経皮適用した場合の銅の分布は、投与後6時間では血液、脳、腎臓、胸腺、肝臓、尿、心臓の順に多く、投与後24時間では肝臓、腎臓、尿、胸腺、心臓、血液、脳の順に多くなっており²¹⁾、主として肝臓、腎臓に蓄積性があることを示唆される。

今回、Cu-serine、Cu-sal、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ をラットに皮下投与してその毒性をみたが、その強度には差異はみられたものの、基本的にはほぼ共通して以下のような所見が得られた。

1) 溶血性貧血

赤血球数とヘモグロビン量の著しい減少とともに、脾臓の腫大と髄外造血亢進、褐色尿の排泄、GOT と LDH の著しい上昇など、溶血性貧血特有の変化があった。これらの変化は Cu-serine および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ で明らかに強く、Cu-sal および $\text{Cu}(\text{OH})_2$ では比較的軽度であった。なお、血液学的検査において、Cu-serine 群と $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群の多数例に著しい白血球数増加がみられたが、この増加は主に好中球によるもので、貧血に対する代償として著しい造血亢進があったことを示すものであった。銅化合物群で血小板数にも増加が観察されたが、同様の理由によると考えられる。また、銅化合物の多数例で無機リンの増加が認められたが、これも主に赤血球崩壊に由来する変化であろう。Cu-serine 群で認められた心臓重量増加については、組織学的に特に異常所見が認められないので、同様に、貧血に対する代償性変化

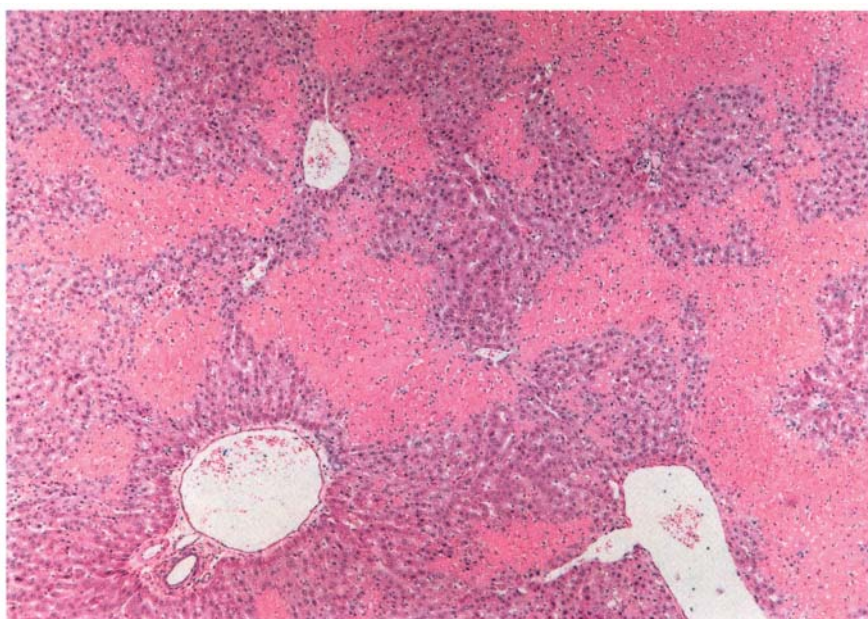


Fig. 2 肝臓：広汎な塊状壊死を認める。
Cu-serine群, No.13（7日間投与例）
H. E. 染色, $\times 45$

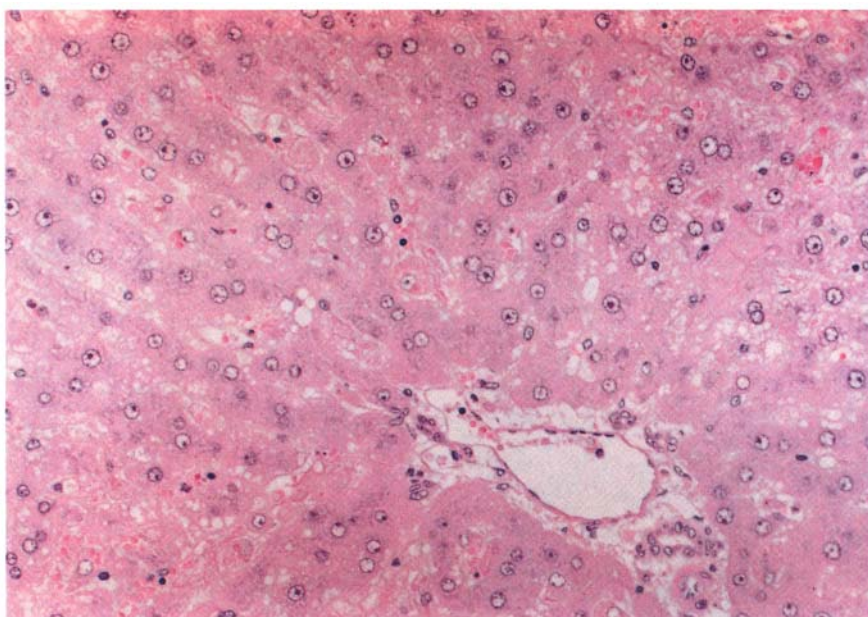


Fig. 3 肝臓：類洞内にはフィブリンの析出を認め、クッパー星細胞は赤血球貪食により著明に腫大している。
Cu-serine群, No.11（死亡例）
H. E. 染色, $\times 220$

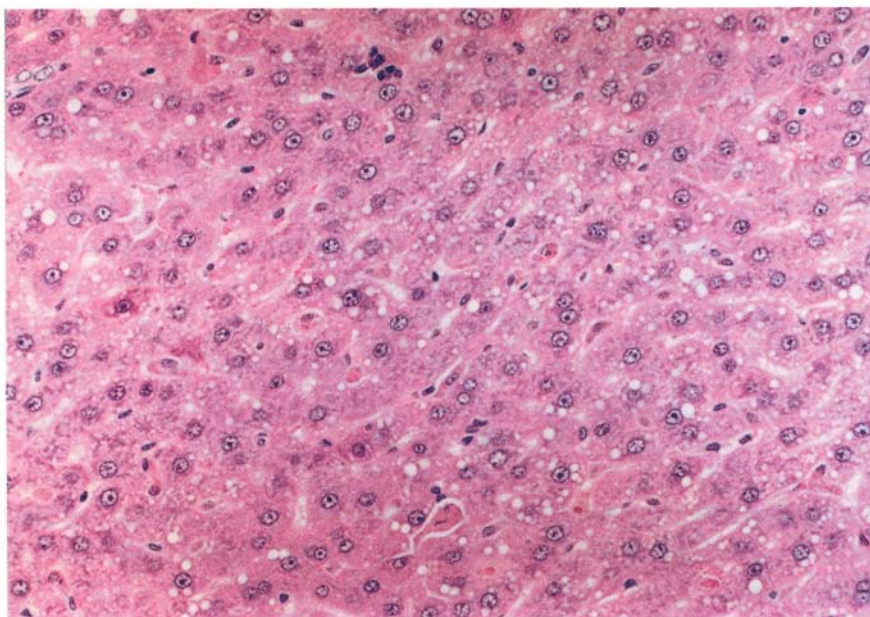


Fig. 4 肝臓：肝細胞の脂肪化とクッパー星細胞のヘモジデリン沈着像を認める。

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群, No.42 (7日間投与例)

H. E. 染色, $\times 200$

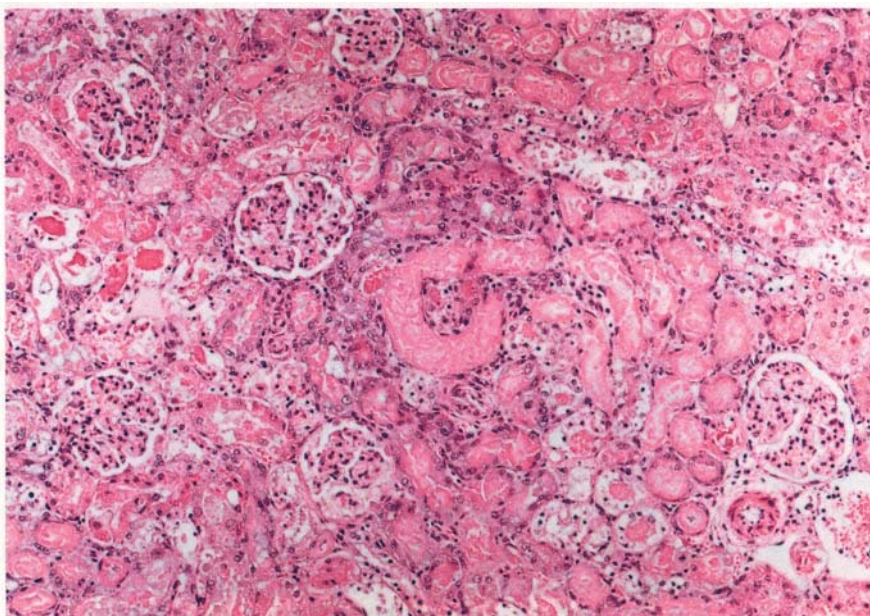


Fig. 5 腎臓：尿細管の広汎な壊死を認める。

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群, No.43 (死亡例)

H. E. 染色 $\times 110$

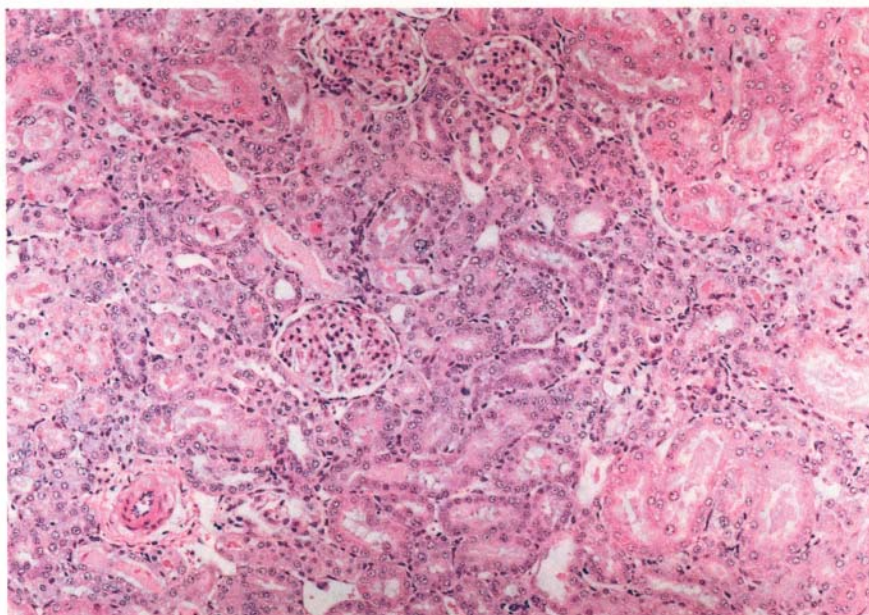


Fig. 6 肝臓：再生した好塩基性の尿細管上皮を認める。
Cu-serine群, No.13（7日間投与例）
H. E. 染色, $\times 110$

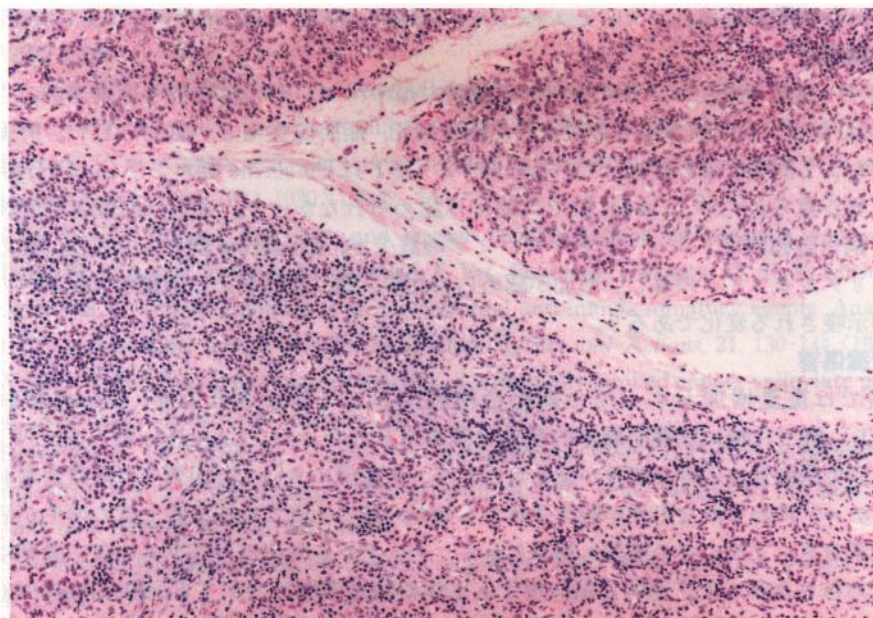


Fig. 7 胸腺：リンパ球は著明に減少し、皮髄構造は不明瞭である。
 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群, No.44（7日間投与例）
H. E. 染色, $\times 110$

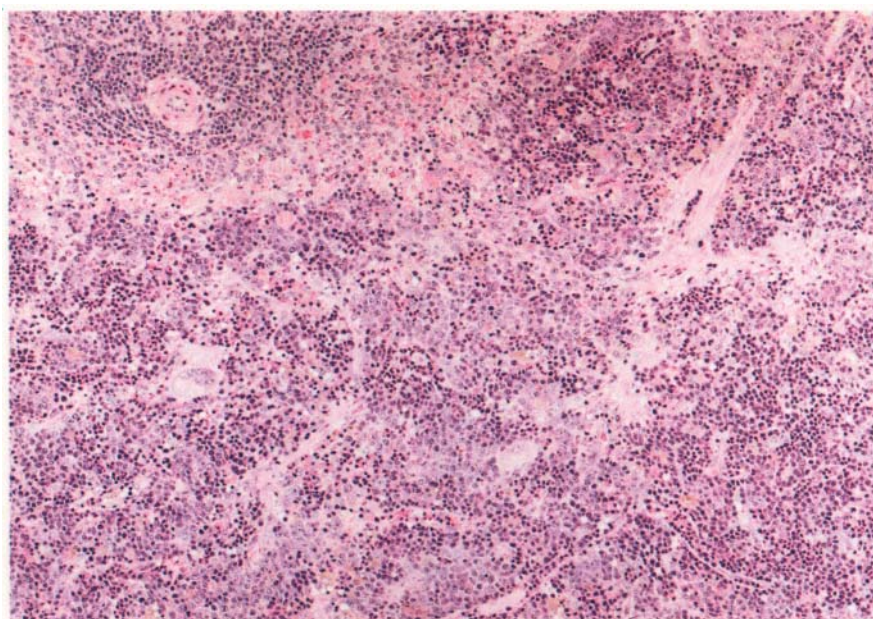


Fig. 8 脾臓：著明な髄外造血を認める。
Cu-serine群, No.14 (7日間投与例)
H. E. 染色, $\times 110$

ではないかと思われる。

2) 肝臓傷害

肝臓では重量の増加およびクーパー細胞腫大がすべての銅化合物群で観察され、さらに Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ で散在性の細胞壊死、脂肪変性などが認められた。肝臓の基質傷害をよく反映すると言われている血漿中の GPT は Cu-serine 群および $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 群の数例で上昇が見られたが、Cu-sal 群では変化は認められなかった。なお、血漿生化学検査において銅化合物群でグルコースとアルブミンの減少が、Cu-serine 群と $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群の多数例でトリグリセライドの著しい増加が認められたが、糖、蛋白および脂質の代謝系への銅の関与が示唆される変化であろう。

3) 腎臓傷害

腎臓では重量増加がすべての銅化合物群において認められたが、Cu-sal 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群では特に病理組織学的変化は認められなかった。Cu-serine 群と $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群の死亡例で尿細管に広範な壊死が認められたが、生存例においては血漿中の尿素窒素およびクレアチニンにわずかな上昇が観察されたものの、多くの例では尿細管上皮の再生が活発で、尿素窒素やクレアチニンの増加も認められず、ナトリウムおよびカリウムの血中濃度にも異常は認められなかった。過剰な銅に対する生体の耐性機構について Fuentealba (1988) ら²²⁾の研究があるが、尿細管の再生は、銅に対する耐性が比較的短期間に発現したことを意味するものと考えられる。

4) 胸腺の萎縮

リンパ球産生器官である胸腺では、重量減少がすべての銅化合物群でみられた。重量減少は特に Cu-serine 群と $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 群で著しく、組織学的にはリンパ球の減少、皮質構造消失、さらに強い萎縮がみられた例でリンパ球の核崩壊が観察された。同様な強い萎縮はステロイドを投与した場合にも観察されている。

5) その他

後肢をつっぱって腰部をもちあげる特徴的な動作が Cu-serine の少数例で投与後 1～2 時間に認められた。井上ら (1985)¹⁸⁾が硫酸銅をラットに腹腔内投与した時に認めたショック状態と同じ症状かどうかは明らかではないが、この行動は発情した雌ラットの後尾動作、すなわちロードシス反射²³⁾に類似しており、さらに銅は黄体形成ホルモン放出を刺激し、排卵を促すことから^{24)–25)}、エストロゲン作用によるのではないかと推察される。また、Cu-serine 群、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 群および $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ で副腎重量の増加がみられ、組織学的には Cu-serine 群と $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ でのみ皮質細胞に腫大が観察されているが、銅によるステロイド合成系への影響については今後の研究が待たれるところである。

以上のように、Cu-serine および Cu-sal には銅特有の毒性が認められ、その強度は明らかに Cu-serine において強かったが、それは銅の吸収量とキレート結合の強弱に関連があるのではないかと考えられる。銅錯体の開発に当たっては、これらの重篤な毒性が発現しない量で十分な有効性を示す化合物であることが重要であろう。

文 献

- 1) Bonta I. L. : Anti-rheumatic drugs ; Present deadrock and new vistas. *Prog. Med. Chem.*, **17**, 228-237 (1980).
- 2) Sorenson R. J. : Treatment of rheumatoid and degenerative diseases with copper complexes, A review with emphasis on copper-salicylate. *Inflammation*, **2**, 217-238 (1977).
- 3) Jacka C. C. A. : Copper salicylate as an anti-inflammatory and analgesic agent in arthritic rats. *Life Sciences*, **32**, 1023-1030 (1982).
- 4) Auer D. E. : Copper salicylate and copper phenylbutazone as topically applied anti-inflammatory agents in the rat and house. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, **13**, 67-75 (1990).
- 5) Okuyama S. : Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory agents. Analgesic activity and possible opioid receptor activation. *Agents and Actions*, **21**, 130-144 (1987).
- 6) Walker W. R. : Anti-inflammatory activity of a dermally applied copper salicylate preparation (Alucusal). *Agents and Actions*, **10**, 38-47 (1980).
- 7) Beverides S. J. : Lipophilic copper (II) formulations ; Some correlations between their composition and anti-inflammatory/anti-arthritis activity when applied to the skin of rats. *Agents and Actions*, **12**, 225-231 (1982).
- 8) Sorenson R. J. : Anti-convulsant copper complexes. *Trace Subst. Environ. Health*, **14**, 252-264 (1980).
- 9) Monti E. : Cardiotoxicity and antitumor activity of a copper (II)-doxorubicin chelate. *Cancer Chemother. Pharmacol*, **25**, 333-336 (1990).

- 10) Harrison J. R. : Inhibition of phorbol ester stimulated interleukin 2 production by copper (II) complexes. *Cancer Res.* **46**, 5571-5575 (1986).
- 11) Sorenson R. J. : Pharmacologic activities of copper compounds in chronic diseases. *Biol. Trace Element Res.* **5**, 257-273 (1983).
- 12) Sorenson R. J. : Copper chelate as possible active forms of the anti-arthritis agents. *J. Med. Chem.* **19**, 135-148 (1976).
- 13) Walker W. R. : Copper salicylate ; Physicochemical studies and potential importance. *Inorg. Perspec. Biol. Med.* **2**, 93-125 (1978).
- 14) 大柳善彦 : SOD と活性酸素調節剤—その薬理作用と臨床応用 (日本医学館) (1989).
- 15) Haywood S. : Copper toxicosis and tolerance in the rat. *Liver*, **5**, 267-275 (1985).
- 16) 井上知明 : 銅のラットに及ぼす影響—経口投与による影響。京都府衛生公害研究所年報, 30号, 53-58 (1985).
- 17) Rana S. V. : Liver and kidney function in molybdenum and copper poisoning. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **34**, 9-13 (1983).
- 18) 井上知明 : 銅のラットに及ぼす影響—腹腔内投与による影響。京都府衛生公害研究所年報, 26号, 37-40 (1985).
- 19) 近藤雅雄 : 緑青 (塩基性炭酸銅) の毒性に関する研究 III 緑青による造血系諸酵素活性の変動。食品衛生学雑誌, 26巻, 624-629 (1985).
- 20) McQueen E. G. : Aspirin and related drugs ; Their actions and uses. Supplement 1, Rainsford K. D. (ed.) Birkhauser Verlag (1977).
- 21) Beveridge S. J. : Biodistribution of ^{64}Cu in rats after topical application of two lipophilic anti-inflammatory Cu(II) formulations. *Agents and Actions*, **14**, 291-295 (1984).
- 22) Fuentealba I. : Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat ; Ultrastructural changes in the liver. *Liver*, **8**, 372-380 (1988).
- 23) 鈴木善祐 : 実験生殖生理学の展開 (ソフトサイエンス社) (1981).
- 24) Schwartz I. : Copper induces luteinizing hormone release and desensitization of pituitary gonadotropes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 417-425 (1986).
- 25) Reproduction in farm animals : Hafez E. S. E. (ed.) (1986).