

動物性食品中の重金属の存在状態に関する研究

鳥取大学医学部公衆衛生学教室 (前主任 石沢正一 名誉教授)

(現主任 能勢隆之 教授)

田中 俊行

重金属は古くから産業医学の分野で鉛 (Pb)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、水銀 (Hg) 等が職業病の原因物質として知られていた。近年は、メチル Hg の水俣病、カドミウム (Cd) のイタイイタイ病が日本の経済発達を象徴する公害病として衆目を集めた。また、Cr、ニッケル (Ni)、Cd、コバルト (Co) などの重金属がヒトを含めた哺乳動物の発癌物質であると言われており^{26), 31)}、重金属を有害視する傾向がある。

生体組織中の重金属は生体構成元素の分類で微量元素⁵³⁾の範疇にある。微量元素のうちには、栄養学の立場から哺乳動物およびヒトにとって正常な成長・発育および生理機能の維持に不可欠な必須微量元素として14元素が挙げられている⁴⁵⁾。その中に、バナジウム (V)、Cr、Mn、鉄 (Fe)、Co、Ni、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、モリブデン (Mo)、錫 (Sn) の10個の重金属が名を連ね、以前は有害金属と考えられていたものがむしろ必須金属とされてきている。この数は今後の研究の発展に伴って増えてゆくものと思われる。

食品中の重金属含有量に関して多くの研究がなされている。それらの研究の大部分は重金属による環境汚染の有害性に強い関心が払われてきた。しかし、重金属はその毒性のみならず必須性も重視しなければならない。重金属の生体に及ぼす影響を評価するためには食品中の含有量のみならず、食品中の化学形態を含む存在状態に関する研究が必要であるが、この方面の研究はきわめて少ない。

著者は、杉山ら^{48), 49)}、Martinら²⁶⁾がCd、Agなどの重金属を高度に濃縮していることを報告している海産食品のイカ肝臓と、重金属代謝について興味深い乳汁の2種類の動物性食品を対象にして、重金属Fe、Cu、Zn、Ag及びCdの存在状態に関する研究を行った。イカの肝臓は食品加工の分野で塩辛などの嗜好食品の材料として使われる海の幸である。食品衛生の観点からもその中に含まれる重金属の存在状態を知る意味は大きい。そこで、軟体動物イカ肝臓とCd、Ag投与の実験動物ラット肝臓についてFe、Cu、Zn、

Ag、Cdの存在状態を細胞分画、ゲル濾過分析によって比較検討した。乳汁は母乳、牛乳、粉乳を対象として選び、母乳中のFe、Cu、Zn、Ca、Mg含有量は産後日数による経時的変化を詳細に検討し、これら必須金属のうちでヒトの成長・発育に及ぼす効果が注目されているZn⁴⁰⁾について母乳と牛乳中の存在状態をゲル濾過分析によって比較検討した。

実験材料および実験方法

実験1. 天然のイカ肝臓とCd、Ag投与ラット肝臓の重金属 (Fe、Cu、Zn、Ag、Cd) の存在状態に関する実験

(1) 実験材料

イカ：日本海 (島根県隠岐諸島近海) で捕獲・凍結され、鳥取県境港に水揚げされたスルメイカ (*Todarodes pacificus*) を -20°C 以下で実験まで凍結保存した。

ラット：本教室で飼育した生後2~3カ月のWistar系雌ラットを使用した。Cd、Ag投与実験は、対照群、Cd投与群、Ag投与群、Cd+Ag投与群に各2匹ずつとして、Cd、Agを飲料水として自由に与え、約7カ月間行つた。Cd、Ag投与実験用飲料水は硝酸カドミウム ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、硝酸銀 (AgNO_3) を水に溶解させて調製した。対照群は水、Cd投与群はCdが $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ ($112\mu\text{g}/\text{ml}$)、Ag投与群はAgが $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ ($108\mu\text{g}/\text{ml}$)、Cd+Ag投与群はCd、Agがいずれも $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ の濃度になるように調製した。投与終了後は、大腿動脈より失血死させ、肝臓を摘出した。摘出した肝臓はただちに -20°C 以下で凍結保存した。

(2) 試薬

実験に用いた試薬はすべて市販の特級品を用い、水はイオン交換を行つたのち蒸留したものを用いた。

ゲル濾過実験用担体：Sephadex G-75ゲル (Pharmacia社製、粒子サイズ40~120 μm) を溶離緩衝液に加え、室温で1昼夜放置して、膨潤させたも

のを、脱気した後ガラスカラム (Pharmacia 社製、 2.6×70 cm) に充填して用いた。

ホモジネート作製用緩衝液 (0.02M Tris-HCl, pH 8.6, 0.25M ショ糖) : ショ糖 85.6g, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 2.42g を秤り取り、水で溶かして液量を約 970ml として、攪拌しながら 1M 塩酸を加え、pHメーターで pH 8.6 に調整した。次いで水を加え 1000ml に定容した。

溶離緩衝液 (0.02 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.05 M NaCl, 0.003M NaN_3) : トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 2.42g, 塩化ナトリウム 2.92g, アジ化ナトリウム 0.195g を秤り取り、以下はホモジネート作製用緩衝液の調製と同様に行つた。なお、緩衝液の pH 調整は 20°C で行つた。

分子量 (MW) 測定用マーカー : Blue Dextran 2000 (MW 2,000,000), bovine serum albumin (MW 67,000), ovalbumin (MW 43,000), chymotrypsinogen (MW 25,000), ribonuclease (MW 13,700), glucagon (MW 3,500), K_2CrO_4 (MW 200 以下) を用いた。 K_2CrO_4 が和光純薬製、glucagon が Novo Industri A/S 社製、その他は Pharmacia 社製の低分子量測定用キットのものを用いた。

(3) イカ肝臓の細胞分画

凍結保存したスルメイカは、冷室 ($2 \sim 4^\circ\text{C}$) で凍結したのち、肝臓を摘出した。ただちに、その肝臓をハサミで細片化して、その一定量 (約 $2 \sim 3$ g) に 4 倍容の 0.02 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.25 M ショ糖液を加えて、氷冷しながら Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザー (1,000rpm, 1~2 min) でホモジネートを作製した。ホモジネートは、Levine ら²⁵⁾と同様の differential centrifugation 過程に適用して、細胞分画した。装置は、富永製冷凍遠心機 S-62 型と日立分離用超遠心機 55 P-72 型を用い、まず $600 \times g$, 10 分間遠心分離した沈渣を nuclei and cell debris 画分、その上清を $10,000 \times g$, 10 分間遠心分離した沈渣を mitochondria 画分、更に、その上清を $100,000 \times g$, 60 分間遠心分離した沈渣を microsomes 画分、およびその上清を cytosol 画分として調製した。各画分中の重金属含有量を求めるために、ホモジネート、沈渣、上清の一定量に濃硝酸を加えて湿式灰化 (約 80°C , 1 昼夜) したのち、定容して、試料溶液を調製した。試料溶液は必要に応じて適宜希釈して、測定に用いた。

(4) イカ肝臓とラット肝臓の cytosol 画分のゲル濾過

(3)の細胞分画操作に準じて調製したイカ肝臓と Cd, Ag 投与ラット肝臓 cytosol 画分 ($100,000 \times g$ 上清) 3 ml を Sephadex G-75 カラム (2.6×62 cm) に添加して、 $2 \sim 4^\circ\text{C}$ の温度で溶離緩衝液 (0.02M Tris-HCl, pH 8.6, 0.05M NaCl, 0.003M NaN_3) を 20 ml/h の流速で流しながら、fraction collector (Gilson 社製, FC-80 型) で 5 ml ずつ分取した。各溶出 fraction について 280 nm での吸光度 (Altex 社製, Biochemical UV monitor 150 B 型) 及び重金属濃度を測定した。このゲル濾過過程で分離された重金属結合成分の分子量は、分子量測定用マーカーの溶出容量 (elution volume, V_e) をその分子量の対数値に対してプロットして作成した検定曲線から推定した^{1), 62)}。

(5) 重金属の分析

細胞画分の分解溶液およびゲル濾過溶出 fraction の Fe, Cu, Zn, Ag, Cd の濃度測定は、原子吸光分析法で行つた。試料溶液中の重金属濃度が比較的高い場合は空気-アセチレン炎法 (日本 Jarrel-Ash 社製, 原子吸光炎光共用分光分析装置 AA-855 型)、低い場合は黒鉛炉を電気加熱する方式 (日本 Jarrel-Ash 社製, 2チャンネル原子吸光炎光共用分光分析装置 AA-8500 型にフレームレスアトマイザー FLA-100 型を取り付けたもの) を用い、いずれも重水素ランプによるバックグラウンド吸光の同時補正を行つた。空気-アセチレン炎法の操作条件は空気 10 l/min, アセチレン 1.8 l/min であり、黒鉛炉・電気加熱法の操作条件は既報^{50), 51)} に準じた。

実験 2. 乳汁中の重金属 (Fe, Cu, Zn) の存在状態に関する実験

(1) 実験材料

母乳 : 昭和 54 年 10 月から昭和 55 年 9 月までの 1 年間に正常児を分娩した鳥取県中山町に在住の産婦 64 人 (19~39 才) から、初乳 (産後 2~4 日)、移行乳 (産後 6~10 日)、成熟乳 (産後 1 カ月, 2 カ月, 3 カ月, 4 カ月) を市販の乳吸器あるいは母乳搾乳器でポリエチレン容器に採取した。一部分を金属分析用として試験管に秤取り、残りはゲル濾過実験用として窒素ガスを封入して、 -20°C 以下で凍結保存した。

牛乳 : 鳥取県岸本町の放牧場で飼育されている Holstein 牛から産後 1 週以内と産後 1~3 カ月の乳汁を搾乳して、ポリエチレン容器に採取した。母乳と同様に一部分を金属分析用、残りはゲル濾過実験用として窒素ガスを封入して、 -20°C 以下で凍結保存した。

粉乳：昭和56年3月，米子市内の小売店より購入した市販5社の特殊調製粉乳10製品（各社製品につき製造年月日が異なつたものを2例）を用いた。製品名は雪印ネオミルクA，明治ソフトカードFA，森永ドライミルクG-80，和光堂レーベンスミルク60，SMA S-26である。

(2) 試薬

実験に用いた試薬類の調製は，実験1の(2)に準ずる。但し，ゲル濾過実験では，実験1で用いた溶離緩衝液のpHを7.4に調整して試料の希釈液および溶離液とした。

(3) 乳汁中のFe, Cu, Zn, Ca, Mgの分析

母乳，牛乳は5ml，粉乳は約5gを精秤し，濃硝酸・過酸化水素水で湿式灰化処理（約80°C，1昼夜）を行つた。次いで，加熱濃縮，濾過操作を行い，水で20mlに定容して試料溶液とした。測定金属の含有濃度レベルに応じて，試料溶液をそのまま，あるいは適切に希釈した溶液を空気-アセチレン炎・原子吸光分析にかけて，Fe, Cu, Zn, Ca, Mg濃度を測定した。但し，Ca, Mgの測定溶液にはリンの干渉を避けるため，塩化ランタンを添加してランタン濃度が10,000 μg/mlになるように調整した⁶³⁾。装置および操作条件は実験1の(5)の通りである。

(4) 母乳と牛乳のゲル濾過

凍結した母乳，牛乳試料は，2~4°Cで解凍したのち，遠心分離（1,000×g，5min）して脂肪を分離した。脂肪，沈渣を除いた試料は0.02M Tris-HCl, pH 7.4, 0.05M NaCl, 0.003M NaN₃緩衝液を等量加えて希釈した。その希釈液（3ml）を実験1で用いたSephadex G-75カラムに添加し，0.02M Tris-HCl, pH 7.4, 0.05M NaCl, 0.003M NaN₃緩衝液を流してゲル濾過した。他の操作条件は実験1の(4)，

(5)の通りである。

実験成績

実験1. 天然のイカ肝臓とCd, Ag投与ラット肝臓の重金属（Fe, Cu, Zn, Ag, Cd）の存在状態に関する実験

1. イカ肝臓の重金属の細胞内分布

天然のスルメイカの肝臓5例の細胞画分中Fe, Cu, Zn, Ag, Cd含有量を測定した結果をTable 1に示した。表の数値は，それぞれの重金属の各画分を合せた総量に対し各画分の含有量の比率を%で表した。本実験で，nuclei and cell debris, mitochondria, cytosol画分にそれぞれ平均でCdの26~33%，Znの24~35%が見い出され，CdとZnは同様の含有傾向を示した。しかしながら，Cdはcytosol画分よりmitochondria画分で，Znはmitochondria画分よりcytosol画分でその平均含有量が高かつた。

イカ肝臓とラット肝臓を比較するためにCdを経口投与したラット肝臓1例の細胞分画実験では，組織中Cdの76%，Znの67%がcytosol画分に見い出され，残りはnuclei and cell debris画分>mitochondria画分>microsomes画分の順に含有されていた。イカ肝臓とCd投与ラット肝臓はCd, Znの細胞内分布に大きな差異が認められた。

イカ肝臓のCuとAgは，それぞれ平均で63%，64%がcytosol画分に見い出され，次いでnuclei and cell debris画分には20%と15%，mitochondria画分には12%と14%，microsomes画分にはどちらも10%以下であつた。Feは，平均で42%がmicrosomes画分に見い出された。本実験で，天然のスルメイカ肝臓のCdとZn, CuとAgの細胞内分布が類似していたが，Feはmicrosomes画分に局在してい

Table 1. Subcellular distribution of iron, copper, zinc, silver and cadmium in liver homogenates of natural squids (*Todarodes pacificus*).

Subcellular fraction	Metal contents (% of reconstituted total)				
	Fe	Cu	Zn	Ag	Cd
Nuclei and cell debris	23±2.8	20±4.1	31±4.3	15±2.4	28±2.7
Mitochondria	20±2.3	12±1.5	24±3.3	14±2.4	33±5.1
Microsomes	42±2.3	4.8±1.0	9.0±0.9	6.6±1.6	14±1.1
Cytosol	14±0.9	63±4.9	35±2.1	64±4.3	26±2.7

Values represent means±SEM for 5 liver samples.

た。

2. イカ肝臓と Cd, Ag 投与ラット肝臓の cytosol 画分の重金属のゲル濾過プロフィール

Cd, Ag 投与実験の対照群, Cd 投与群, Ag 投与群, Cd+Ag 投与群についてラット肝臓の cytosol 画分 (100,000×g 上清) を Sephadex G-75 カラムに

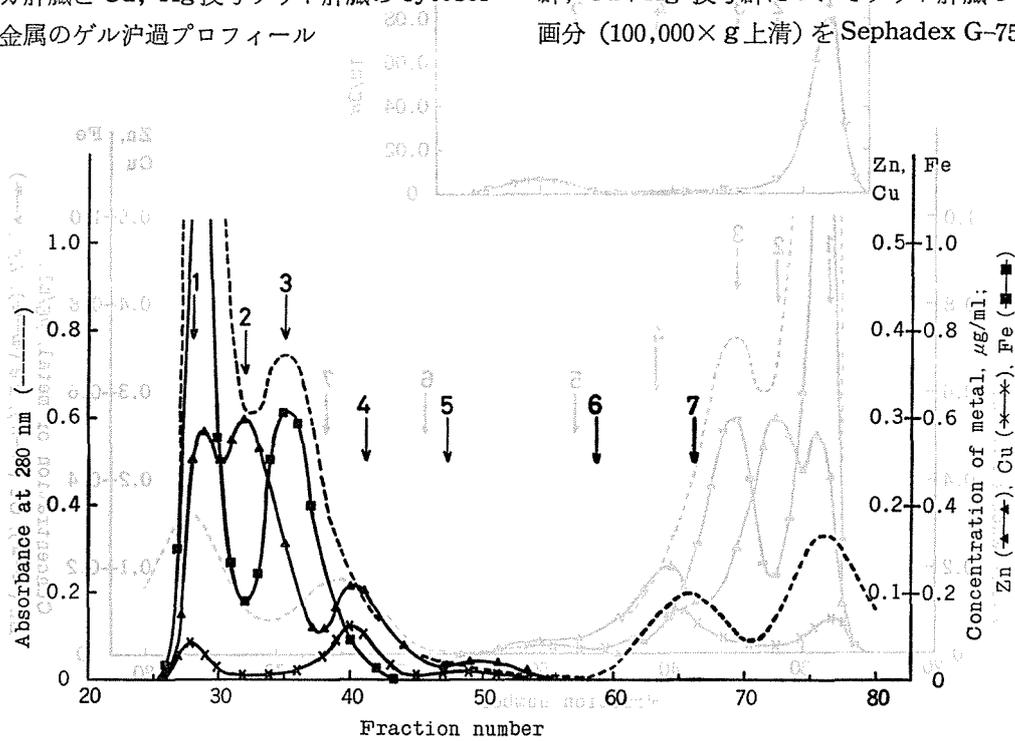


Fig. 1-A. Sephadex G-75 gel-filtration profile of the liver supernatant prepared from control rat. Numbered arrows designate the positions of molecular weight standards: 1, Blue Dextran 2000 (Vo); 2, bovine serum albumin; 3, ovalbumin; 4, chymotrypsinogen; 5, ribonuclease; 6, glucagon; 7, K_2CrO_4 .

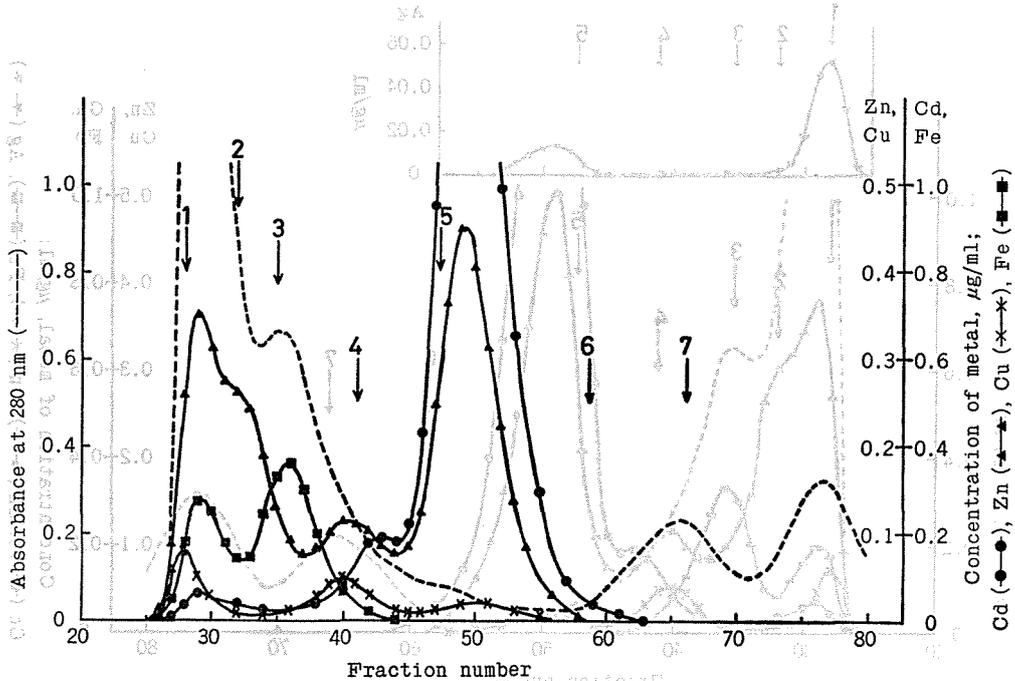


Fig. 1-B. Sephadex G-75 gel-filtration profile of the liver supernatant prepared from Cd-treated rat. Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

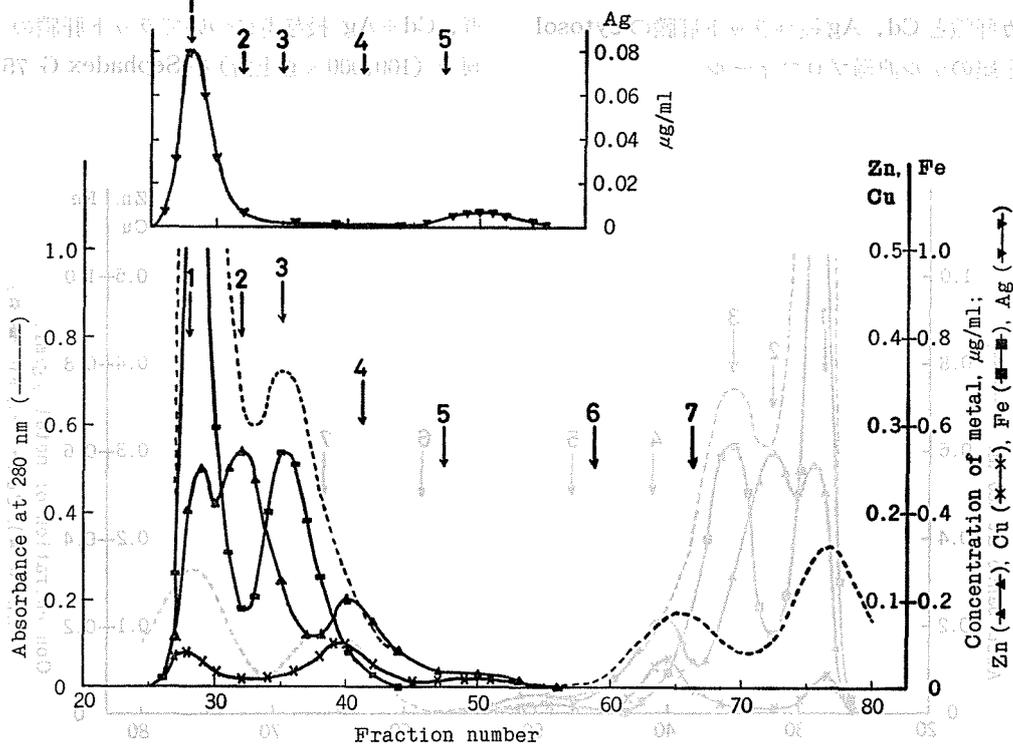


Fig. 1-C. Sephadex G-75 gel-filtration profile of the liver supernatant prepared from Ag-treated rat. Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

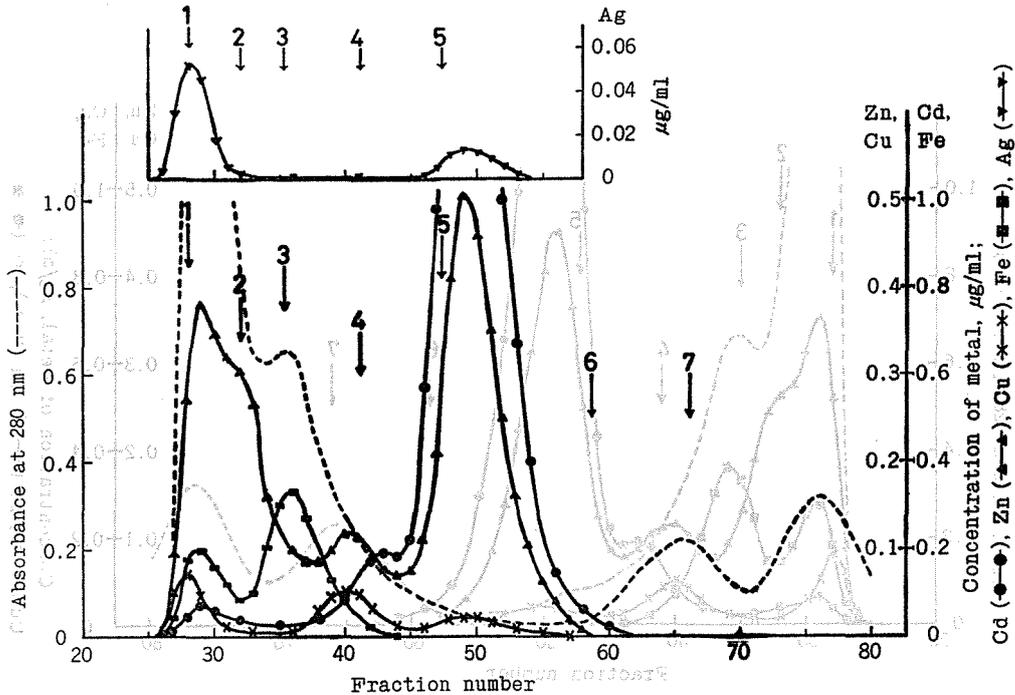


Fig. 1-D. Sephadex G-75 gel-filtration profile of the liver supernatant prepared from Cd and Ag-treated rat. Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

添加して得られたゲル濾過プロフィールを Fig. 1-A, 1-B, 1-C, 1-D に示した。また、天然のクルマイカ肝臓 cytosol 画分の典型的なゲル濾過プロフィールを Fig. 2 に示した。

(1) ラット肝臓

a) 対照群 (Fig. 1-A 参照)

280 nm での吸光度 (Abs.): 4 つのピークが観測された。ピークの高さは, fraction No.28~29 (ほぼ排除容量 void volume, V_0 に相当, MW 70,000 以上) (Abs. 2.0 以上) \gg No.35 (Abs. 0.6~0.8) $>$ No.76, No.66 (Abs. 0.4 以下) の順であった。この結果は, cytosol 画分の蛋白質 (芳香族アミノ酸含有) のうち MW 70,000 以上の蛋白質が最も多いことを示すものと思われる。

Fe: fraction No. 29 ($1 \mu\text{g/ml}$ 以上) $>$ No. 35 (約 $0.6 \mu\text{g/ml}$) にピークが観測された。

Cu: fraction No.28 (void volume), No.40 に $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下のピークが観測された。

Zn: fraction No.29, No.32 ($0.2 \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$) $>$ No.40 (約 $0.1 \mu\text{g/ml}$) \gg No.49~50 ($0.05 \mu\text{g/ml}$ 以下) にピークが観測された。

Ag, Cd: 検出されなかつた。

Cu と Zn のピークを同時に観測した fraction No.40 はその溶出容量と排除容量の比 (V_e/V_0) が $1.4 \sim 1.5$ であった。Bremner³⁾ は, ラット肝臓の $100,000 \times \text{g}$ 上清の Sephadex G-75 ゲル濾過実験で $V_e/V_0 = 1.4 \sim 1.5$ の位置に hepatocuprein を含む成分を観測している。fraction No.40 はそれに相当するものと思われる。ここで用いた \gg , $>$ の記号はピークの高さの大小を表した。 \gg はピーク高さの比が 3 倍以上の場合に用いた。以下同様に用いた。

b) Cd 投与群 (Fig. 1-B 参照)

280 nm での吸光度: 対照群とほぼ同様のプロフィールを示した。

Fe: 対照群と同じ fraction No.29, No.35 にピークが観測された。しかし, ピークの高さはいずれも $0.2 \sim 0.4 \mu\text{g/ml}$ と, 対照群にくらべてはるかに低いピークであった。

Cu: 対照群とほぼ同様のプロフィールを示した。

Zn: fraction No.49 ($0.4 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$) $>$ No.29 ($0.3 \sim 0.4 \mu\text{g/ml}$) $>$ No.40 (約 $0.1 \mu\text{g/ml}$) にピークが観測された。ほかに, No. 31~33 のあたりに

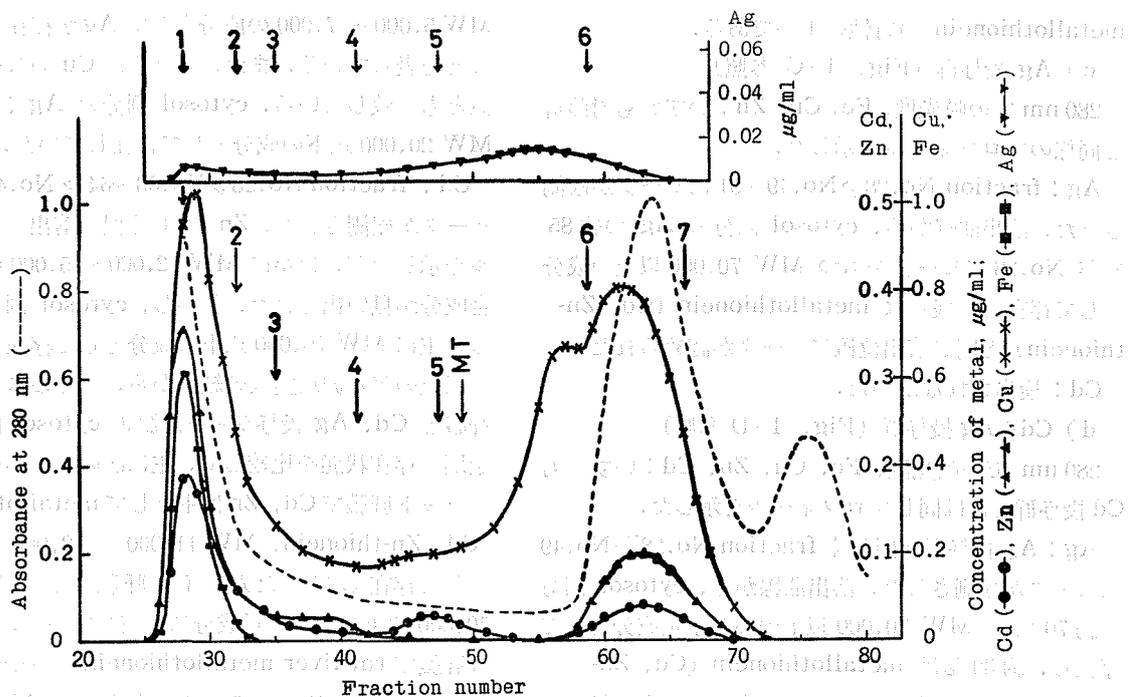


Fig. 2. Typical Sephadex G-75 gel-filtration profile of the liver supernatant prepared from natural squid (*Todarodes pacificus*). Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A. MT: rat liver metallothionein (Cd, Zn-thionein).

shoulder ピークが観測された。対照群との比較で著明な変化として、No. 49 に対照群の約 20 倍の高さのピークが観測された。溶出曲線から、cytosol 画分の Ag: 検出されなかつた。Cd: fraction No. 49 (1.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上) \gg No. 43 (約 0.2 $\mu\text{g/ml}$) $>$ No. 29 (0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下) にピークが観測された。Cd の溶出曲線をトレースした紙の重量から Cd 量を算定した結果、cytosol 画分の Cd の約 90% が No. 49 にピークをもつ成分として存在した。

対照群で観測されなかつた fraction No. 49 にピークをもつ Zn, Cd を高濃度含有している成分は、Cd を種々の脊椎動物に投与した実験でその肝臓、腎臓の cytosol 画分に出現することが報告されている特異な低分子量蛋白質 metallothionein (後述) と推定される。この成分の分子量は、分子量測定用マーカーの溶出容量 (Ve) vs. log (分子量) の検定直線から 11,000 ~ 12,000 と推定した。この値は、ラット肝臓の metallothionein (Cd, Zn-thionein) の分子量をゲル濾過法で推定した他の報告者の値と良く一致している^{19), 49), 60)}。また、この成分の紫外部領域 (220 ~ 300nm) の吸光度を観測した結果、通常の蛋白質溶液でみられる 280 nm での吸収極大がなかつた。これは metallothionein の特性の 1 つである。

c) Ag 投与群 (Fig. 1-C 参照)

280 nm での吸光度、Fe, Cu, Zn: いずれも対照群と同様のプロフィールを示した。

Ag: fraction No. 28 \gg No. 49 ~ 51 にピークが観測された。溶出曲線から、cytosol 画分の Ag の約 85% が No. 28 にピークをもつ MW 70,000 以上の成分として存在し、残りは metallothionein (Cd, Zn-thionein) と同じ溶出位置にピークが認められた。

Cd: 検出されなかつた。

d) Cd+Ag 投与群 (Fig. 1-D 参照)

280 nm での吸光度、Fe, Cu, Zn, Cd: いずれも Cd 投与群とほぼ同じプロフィールを示した。

Ag: Ag 投与群と同じく fraction No. 28 \gg No. 49 にピークが観測された。溶出曲線から、cytosol 画分の約 70% が MW 70,000 以上の高分子量成分として存在し、約 30% は metallothionein (Cd, Zn-thionein) の溶出位置のピークであつた。Ag 投与群と比較して、MW 70,000 以上の高分子量成分中の Ag が減少して、MW 11,000 ~ 12,000 の低分子量成分の Ag が相対的に増加していた。しかし、cytosol 画分

MW 11,000 ~ 12,000 の低分子量成分に結合した Ag より多い点は変わらなかつた。

(2) イカ肝臓 (Fig. 2 参照)
試料によつて各重金属のピーク高さにかなりの変動がみられたものがあつたため、その値は記さないで大小の傾向のみを記述した。

280 nm での吸光度: fraction No. 28 (void volume, MW 70,000 以上), No. 64 $>$ No. 76 にピークが観測された。cytosol 画分の蛋白質 (芳香族アミノ酸含有) は、MW 70,000 以上の高分子量のもと MW 3,000 以下の低分子量のものに大きく 2 分された。Fe: fraction No. 28 にただ 1 つのピークが観測された。

Cu: fraction No. 29 \geq No. 61 ~ 62, No. 55 ~ 58 (shoulder) にピークが観測された。cytosol 画分の Cu は MW 70,000 以上の成分、MW 5,000 以下の成分として存在している量が多かつた。Zn: fraction No. 28 \gg No. 63 ~ 64 にピークが観測された。いずれも、280 nm での吸光度のピークと一致している。

Ag: fraction No. 54 ~ 56 $>$ No. 29 にピークが観測された。この 2 つのピークは MW 70,000 以上、MW 5,000 ~ 7,000 の成分として Ag が存在していることを表している。また、それらは Cu のピークの位置とも一致している。cytosol 画分の Ag は大半が MW 20,000 以下の成分として存在していた。

Cd: fraction No. 28 \gg No. 63 ~ 64 $>$ No. 46 ~ 48 にピークが観測された。Zn とよく似た溶出プロフィールを示したが、ほかに MW 12,000 ~ 15,000 の Cd 結合成分が見い出された。しかし、cytosol 画分の Cd は、主に MW 70,000 以上の成分として存在した。

以上のゲル濾過実験の結果から、天然のスルメイカ肝臓と Cd, Ag 投与ラット肝臓の cytosol 画分の重金属の存在状態を比較して、主に次のことが分つた。

ラット肝臓で Cd, Zn は主として metallothionein (Cd, Zn-thionein, MW 11,000 ~ 12,000 と推定) として存在していたが、イカ肝臓では主に MW 70,000 以上の高分子量成分に存在していた。ただ、イカ肝臓で rat liver metallothionein よりやや高分子量の MW 12,000 ~ 15,000 の成分にも Cd が観測された。しかし、Zn は検出されなかつた。Ag は、ラット肝臓で MW 70,000 以上の高分子量成分として存在しているものが大半であつたが、イカ肝臓では MW 70,000 以上の成分より MW 20,000 以下の低分子量成

分の存在割合がはるかに大きかった。
 実験2. 乳汁中の重金属 (Fe, Cu, Zn) の存在状態に関する実験結果 (5) のことについて報告した。
 1. 母乳, 牛乳, 粉乳のFe, Cu, Zn含有量³⁵⁾
 母乳: 初乳から産後4カ月までの母乳試料179例のFe, Cu, Zn含有量を測定した。その結果を産後経過

日数別にTable 2に示した。また、同時に測定したCa, Mg含有量も付記した。産後1カ月乳のFe値はほぼ対数正規分布を示したので、幾何平均値を表示した。
 産後4カ月までの母乳中Fe, Cu, Zn, Ca, Mgの各産後経過日数別平均含有量はFeが0.23~0.59

Table 2. Concentrations of iron, copper, zinc, calcium and magnesium in human milk.

Stage of lactation days	No. of samples	Iron	Copper	Zinc	Calcium	Magnesium
2-4 ^a	42	0.59±0.26 ^c	0.42±0.19	8.8±3.6	265±57	33.7±8.4
6-10 ^b	38	0.42±0.14	0.58±0.12	4.7±1.6	286±63	29.0±5.8
20-40	41	0.41 ^d	0.43±0.09	3.0±1.2	281±61	25.0±5.0
50-70	32	0.32±0.13	0.32±0.04	1.8±0.8	278±44	29.3±5.2
80-100	16	0.36±0.14	0.29±0.07	1.2±0.5	285±36	31.6±6.2
110-130	10	0.23±0.09	0.20±0.03	1.1±0.6	273±51	34.2±4.8

^a Colostrum ^b Transitional milk ^c Mean±S.D. ^d Geometric mean

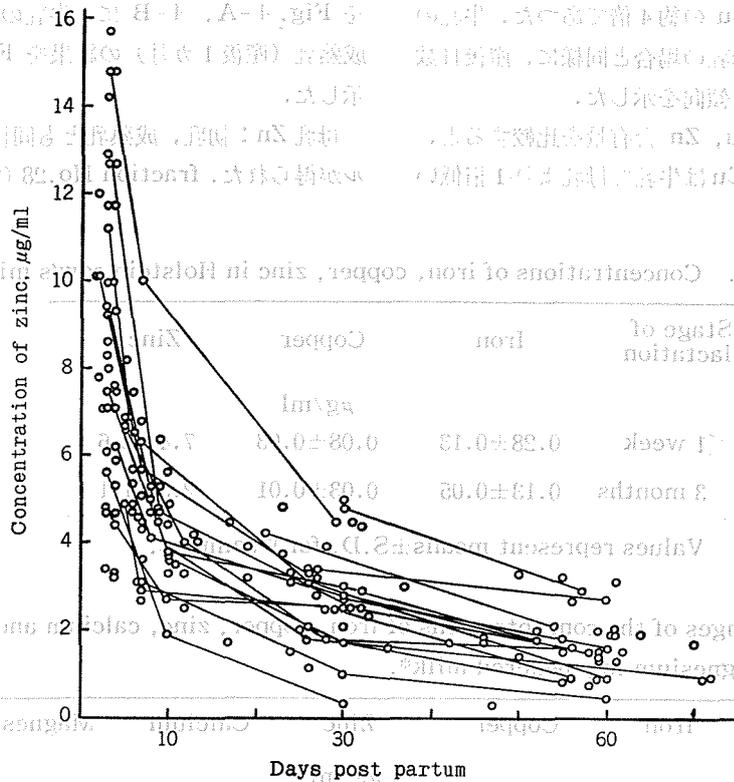


Fig. 3. Longitudinal change in the zinc concentration of human milk. The symbol (O-O) represents the analytical results of the samples which were collected from the same woman.

μg/ml, Cuが0.20~0.58 μg/ml, Znが1.1~8.8 μg/ml, Caが265~286 μg/ml, Mgが25.0~34.2 μg/mlであつた。母乳のZnはCuに対して4~21倍, Feに対して3~15倍の高い含有量を示した。また, Caは産後日数による変動が少なくほぼ一定の数値を示したのに対して, Fe, Cu, Zn含有量は産後日数の経過とともに減少する傾向を示した。Znはその傾向が著明であり, 初乳の8.8 μg/mlと産後4カ月の1.1 μg/mlはその濃度比が8:1であつた。特に, 産後10日以内に急激な減少が観測された (Fig. 3)。図中の直線で結んだプロットで個人別の母乳の分析値を示した。Fe, Cuは, 初乳と産後4カ月乳の濃度比が2~3:1であつた。Fe含有量が出産直後から減少傾向を示したのに対して, Cu含有量は初乳よりも移行乳(6~10日)で有意に高く (p<0.01), 以後減少傾向を示した。

牛乳: 産後1週以内と産後3カ月のHolstein牛から採取した牛乳試料(各5例)のFe, Cu, Zn含有量の分析結果をTable 3に示した。牛乳中のFe, Cu, Zn含有量は, Zn>>Fe>>Cuの順であつた。産後3カ月乳のFe, Cu, Zn含有量を比較すると, ZnはFeの約18倍, FeはCuの約4倍であつた。牛乳のFe, Cu, Zn含有量は母乳の場合と同様に, 産後日数の経過とともに減少する傾向を示した。

母乳と牛乳のFe, Cu, Zn含有量を比較すると, Feは牛乳でやや低値, Cuは牛乳で母乳より1桁低い

値, Znは同程度であつた。粉乳: 市販5社の特殊調製粉乳10製品(各社につき製造年月日の異なつたものを2製品)のFe, Cu, Zn, Ca, Mgを分析し, 乳児に与える14%調乳溶液中の含有量の範囲をTable 4に示した。Feは雪印ネオミルクの7.6 μg/mlから和光堂レーベンス60の10.4 μg/mlまで, Cuは雪印ネオミルクの0.020 μg/mlから森永ドライミルクG-80の0.056 μg/mlまで, Znは森永ドライミルクG-80の0.81 μg/mlから明治ソフトカードFAの1.74 μg/mlまで, Caは和光堂レーベンス60の422 μg/mlから明治ソフトカードFAの604 μg/mlまで, Mgは雪印ネオミルクの33 μg/mlからSMA S-26の64 μg/mlまでの濃度範囲であつた。

2. 母乳と牛乳のZnの存在形態

重金属のうちでZnは, 母乳, 牛乳にともにFe, Cuにくらべて極めて高濃度含まれている。乳汁の中のZnの存在形態の知見を得るために, あらかじめ1,000×gで遠心分離して脂肪, 沈渣を除いた母乳, 牛乳試料のSephadex G-75ゲル濾過分析を行った。母乳の初乳(産後3日)と成熟乳(産後1カ月)の分析結果をFig. 4-A, 4-Bに, 牛乳の初乳(産後5日)と成熟乳(産後1カ月)の結果をFig. 5-A, 5-Bに示した。

母乳Zn: 初乳, 成熟乳とも同様の溶出プロフィールが得られた。fraction No.28 (void volume, MW

Table 3. Concentrations of iron, copper, zinc in Holstein cow's milk.

Stage of lactation	Iron	Copper	Zinc
		μg/ml	
<1 week	0.28±0.13	0.08±0.03	7.4±2.6
3 months	0.13±0.05	0.03±0.01	2.3±1.1

Values represent means±S.D. for 5 samples.

Table 4. Ranges of the concentrations of iron, copper, zinc, calcium and magnesium in powdered milk*.

Dilution	Iron	Copper	Zinc	Calcium	Magnesium
			μg/ml		
14%	7.6-10.4	0.020-0.056	0.81-1.74	422-604	33-64

*Five types of commercial products; Yukijirushi's A, Wakodo's lebens 60, Meiji's FA, SMA S-26, Morinaga's G-80.

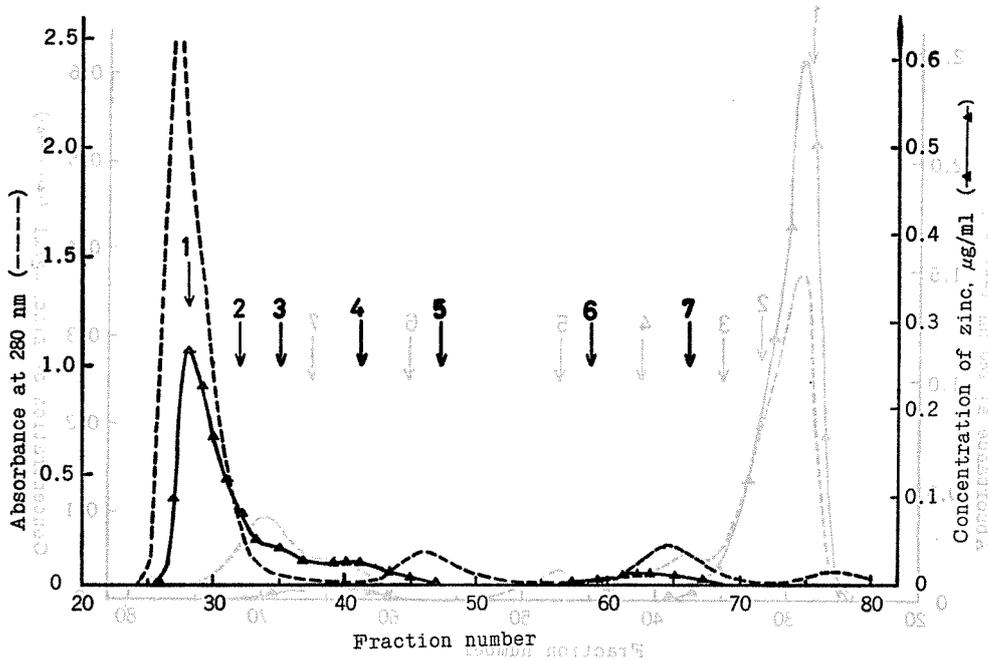


Fig. 4-A. Sephadex G-75 gel-filtration profile of human milk (3 days post partum). Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

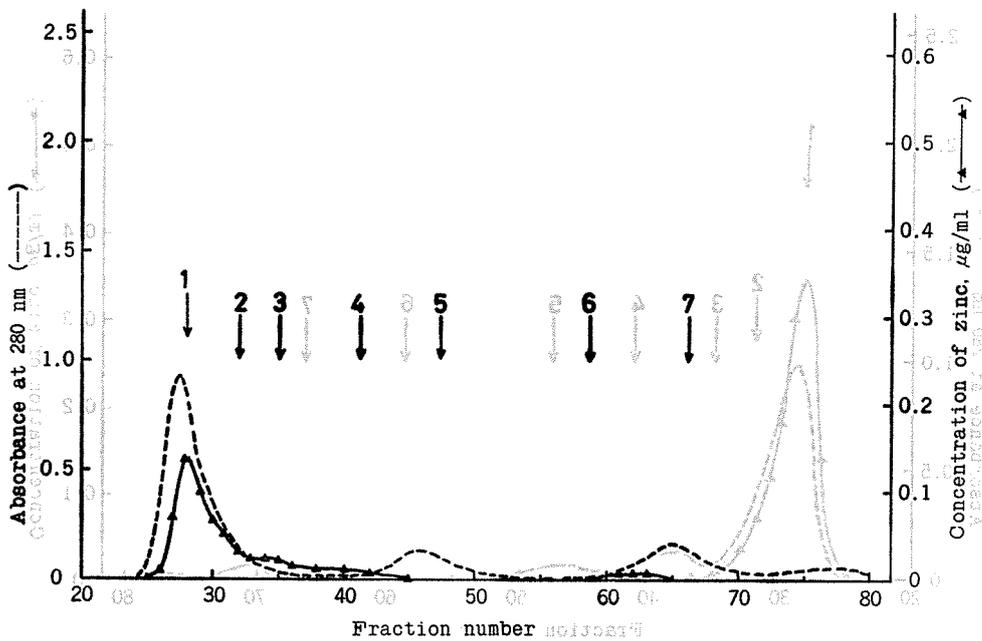


Fig. 4-B. Sephadex G-75 gel-filtration profile of human milk (1 month post partum). Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

70,000以上)≫No.61~65 (MW 3,000以下) にピークが観測された。また、No.28に引き続いて No.33

から No.45 (MW 20,000) までなだらかな溶出が観測された。MW 70,000以上, MW 3,000以下の成分

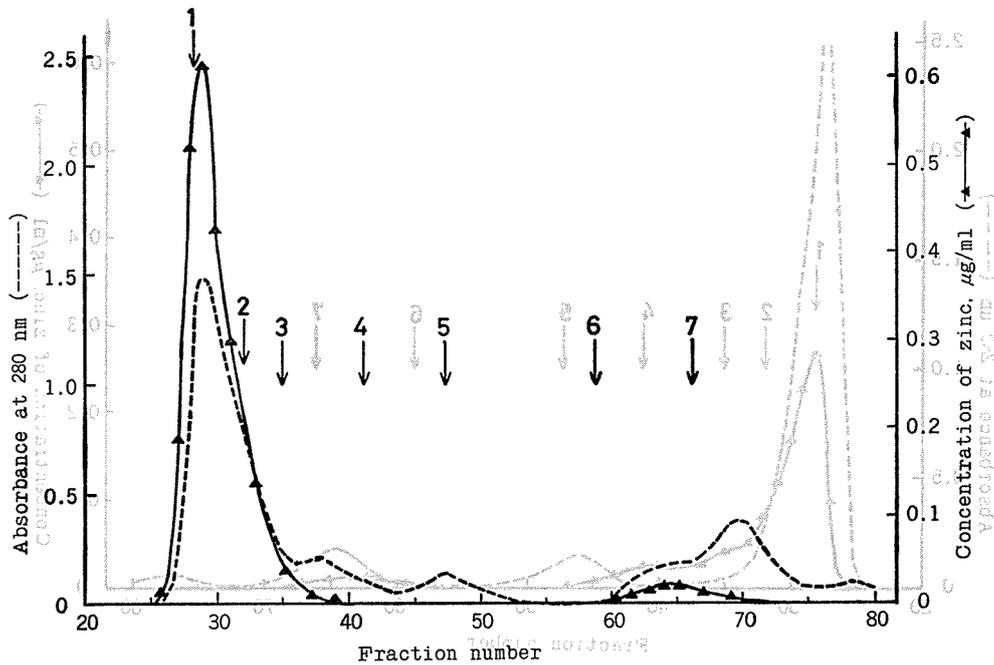


Fig. 5-A. Sephadex G-75 gel-filtration profile of cow's milk (5 days post partum). Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

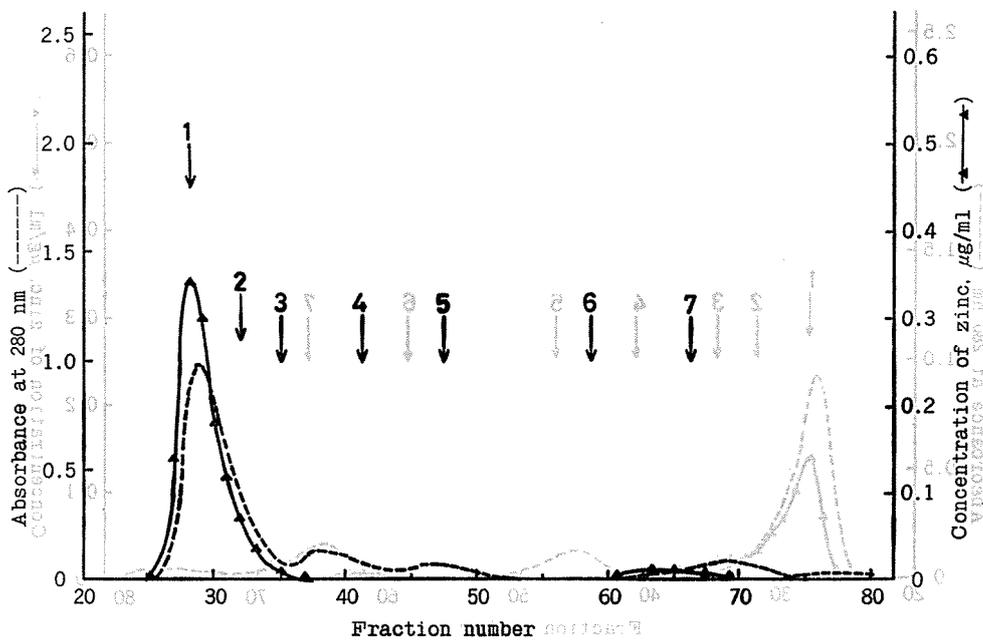


Fig. 5-B. Sephadex G-75 gel-filtration profile of cow's milk (1 month post partum). Numbered arrows designate the positions of the same molecular weight standards as shown in Fig. 1-A.

の Zn 量を溶出曲線から算定すると、初乳、成熟乳いずれも、MW 70,000 以上の成分の Zn 量は全 Zn の

約 75%、MW 3,000 以下の成分の Zn 量は約 5%であつた。残りの約 20%が MW 20,000 ~ 70,000 の成

分として存在した。牛乳 Zn: 初乳, 成熟乳とも同様の溶出プロフィールが得られた。fraction No.28 > No.63~66 (MW 3,000 以下) の2つのピークのみ観測された。MW 70,000 以上と MW 3,000 以下の成分の Zn 量を算定したところ, 初乳, 成熟乳いずれについても, MW 70,000 以上の成分に全 Zn の約 95%, MW 3,000 以下の成分に約 5% が含有されていた。母乳で観測された MW 20,000~70,000 の Zn 結合成分は, 牛乳では観測されなかつた。

考 察

重金属の生体組織中の存在状態は, 重金属の毒性及び栄養学的意義を評価し, 生体における重金属の相互作用を把握する上から, その意義が大きい。軟体動物イカの肝臓には人体に有害金属とされている Cd, Ag を含めた重金属が高度に濃縮している点が興味深い。著者は, 軟体動物イカ肝臓と Cd, Ag 投与した実験動物ラット肝臓の重金属の存在状態に関して, Cd, Ag を中心に考察する。有害金属 Cd を曝露させた実験動物の肝臓, 腎臓に Cd が蓄積され, その cytosol 画分に低分子量の Cd 結合蛋白質 metallothionein が多量に出現することが知られている。この metallothionein は, 1957年, 最初に Margoshes と Vallee²⁷⁾ によつて馬の腎臓皮質から Cd を多量に含有した低分子量の蛋白質として単離された。Kägi と Vallee^{21), 22)} は, この蛋白質の化学的性質をくわしく検討して, 金属 (metal) と結合した SH 蛋白質 (thionein) という意味で metallothionein と名付けた。Piscator²⁸⁾ は Cd 投与のウサギ肝臓から多量の metallothionein を単離し, Cd が metallothionein 産生を誘導することを報告し, はじめて重金属曝露と metallothionein 合成の関係を示した。それ以来, metallothionein が, いくつかの重金属に反応して, 多くの脊椎動物 (ヒト^{6), 41)}, ウマ, ブタ, ウサギ, ニワトリ, ラット, マウスなど) の肝臓, 腎臓に出現することが報告されている。metallothionein を誘導する重金属としては, Cd のほかに Hg^{5), 37)}, Ag⁶⁴⁾, Zn^{12), 43)}, Cu⁴⁾ などが報告されている。有害金属ばかりでなく必須金属の Zn, Cu も metallothionein を誘導する。metallothionein の誘導金属→metallothionein 結合金属の間に Cd→Cd+Zn, Hg→Hg+Zn, Ag→Ag+Zn, Zn→Zn, Cu→Cu+Zn とすべて Zn が関与している点^{23), 64)} が興味深い。著者も, Cd 投与のラット肝臓に metallothionein

(Cd, Zn-thionein) が見い出されることを観測した (Fig. 1-B)。metallothionein の化学的特性は, 現在までに (1) 重金属を多量に含有している, (2) 分子量が1万たらずの低分子量蛋白質である, (3) 全組成アミノ酸の約3分の1が cysteine 残基である, (4) 組成アミノ酸には芳香族アミノ酸がない, (5) そのため通常の蛋白質溶液にみられる 280 nm の吸収極大がないことなどが知られている^{23), 66)}。著者も, 今回の実験で (1), (2), (5) の化学的特性について確認している。

著者は, Ag が metallothionein (Ag, Zn-thionein) を誘導するかどうかについては疑問をもっている。その理由として, Winge ら⁶⁴⁾ が Ag を皮下注射したラット肝臓に metallothionein (Ag, Zn-thionein) を観測して, この蛋白質 1 mg 当り Ag 4.2 μg, Zn 7.4 μg と報告しているが, 本実験では Ag 投与ラット肝臓 cytosol 画分の Ag は大部分が MW 70,000 以上の高分子量成分に結合して存在していたからである。また, ゲル濾過実験で metallothionein (Cd, Zn-thionein) と同じ溶出位置に Ag の小さいピークを観測したが, Zn の溶出は対照群と同程度であつたからである。Chen ら⁹⁾ も, Ag 1,000 ppm 含有する食餌のラット肝臓に metallothionein (Ag, Zn-thionein) が観測されなかつたこと, cytosol 画分の Ag の大部分は高分子量成分 (void volume に溶出) として存在したことを報告している。ただ, 著者が Cd, Zn-thionein と同じ溶出位置に観測した Ag 結合成分は, Ag と Zn の含有量比が Winge ら⁶⁴⁾ の言う Ag, Zn-thionein とほぼ一致することから Ag, Zn-thionein であろう。しかし, 著者はこれを対照群のラット肝臓に微量は存在する metallothionein (Zn-thionein) に Ag が結合したものと推測している。また, metallothionein の溶出位置の Ag のピークが, Ag 投与ラットより Cd+Ag 投与ラットで高い結果を得ている (Fig. 1-C, 1-D) が, これは Cd によつて肝臓内で誘導された Cd, Zn-thionein に効率よく Ag が結合するためと考えている。Bremner ら³⁾ は, ラットの食餌制限実験を行い, 飢餓状態が Zn-thionein を誘導すると報告しており, 肝臓内の Zn 含有量の変動が Zn-thionein 合成と関係していると述べている点が本実験と関連して興味深い。

ラット肝臓の必須金属 Fe, Zn 含有量の Cd 曝露による変動に関して, Fe が減少^{7), 61)}, Zn は増加^{2), 7)} することが報告されている。石沢, 著者ら¹⁹⁾ は, Cd 曝露が各種臓器における Fe, Cu, Zn 含有量に及ぼす

影響について検討し、Cd 1.0×10^{-3} M の飲料水を7カ月間投与したラット肝臓で Fe は約 0.4 倍に減少し、Cu は変化がなく、Zn は約 2 倍に増加することを既に報告している。本実験によつて、この Zn 含有量の増加は肝臓で metallothionein (Cd, Zn-thionein) が産生されたことによると考えられる。Fe 含有量の減少は、Cd 曝露の生体影響として知られている貧血³⁹⁾と関係しているのであろう。本実験で、Cd 投与ラット肝臓の Fe 含有量の減少は MW 70,000 以上の成分に結合した Fe の減少に著明に反映されていることが分つた (Fig. 1-A, 1-B)。また、石沢、著者ら¹⁹⁾は、同時に Ag 投与 (1.0×10^{-3} M の飲料水を7カ月間) による影響も検討しており、ラット肝臓の Fe, Zn 含有量には著明な変化はみられなかつたが、Cu 含有量は約 4 倍に増加したことを報告している。しかし、本実験で cytosol 画分の Cu の溶出プロフィールには著明な変化はみられなかつた (Fig. 1-A, 1-C)。これは cytosol 画分以外の細胞画分の Cu 含有量の変動を示唆するものであり、今後の検討が必要と考えられる。

Cd, Ag を高度に濃縮している天然の軟体動物イカ肝臓の重金属の存在状態について考察する。軟体動物 (エッチュウバイ, 笠貝, あわび, カキなど) が重金属を濃縮することはよく知られているが、重金属の蓄積臓器の細胞内分布に関する報告は少ない^{24), 34)}。著者は、本実験で天然のイカ肝臓の重金属の細胞内分布に関して次の (1), (2) の知見を得た。

(1) Cd と Zn, Ag と Cu の細胞内分布がよく似ている (Table 1)。杉山⁴⁰⁾, Martin ら²⁸⁾ はイカ肝臓の重金属含有量を測定して、Cd と Zn, Ag と Cu の含有量の間が高い正の相関を得ており、この Cd と Zn, Ag と Cu の密接な関係が細胞内レベルでも存在することが明らかになつた。周期律表で Cd と Zn は第 II 族 B, Ag と Cu は第 I 族 B に属する元素であり、その化学的性質が類似していることが細胞内分布にも反映されていると考えられる。

(2) イカの肝組織の全 Cd の約 30% しか cytosol 画分に見い出されなかつた点が注目された。Cd 曝露の哺乳動物ラットの肝臓、腎臓では、Cd 投与後 1 日以上経過すると組織中 Cd の 60% 以上が cytosol 画分に見い出されることがいくつかの研究機関で報告されている^{15), 46)}。著者も、今回の実験で Cd 投与ラット肝臓について、組織中 Cd の約 80% を cytosol 画分に見い出している。これは、哺乳動物と軟体動物イカでは Cd の生理学的、あるいは栄養学的意義が相異

していることを示唆するものであろう。

しかし、最近の研究では Cd を添加した水で飼育した甲殻類のカニ³⁶⁾, 軟体動物のムラサキガイ^{16), 33)}などの無脊椎動物についても、哺乳動物の metallothionein と類似の性質をもつ Cd 結合蛋白質が生成されることが報告されている。著者も、天然のイカ肝臓 cytosol 画分に MW 12,000~15,000 の Cd 結合蛋白質 (ただし、Zn をほとんど含んでいない) を観測した (Fig. 2)。しかし、その量は少なく、cytosol 画分の Cd は主に MW 70,000 以上の高分子量成分に結合して存在している。Noël-Lambot³³⁾ も、天然のムラサキガイで軟部組織の cytosol 画分の Cd はほとんどが高分子量成分に結合して存在していることを観測している。ただし、Cd 曝露のムラサキガイでは哺乳動物の metallothionein によく似た Cd 結合蛋白質を観測している。

天然のイカ肝臓には、Cd を高度に濃縮しているにもかかわらず、哺乳動物で有害金属に対する protective agent とされている metallothionein あるいは metallothionein-like protein とみられるものが少ししか観測されなかつた。この事実から、哺乳動物に対して有害金属とされている Cd が軟体動物イカではむしろ必須金属ではないだろうとも考えられる。更に、その考えを1歩進めて、Cd は哺乳動物に対しても必須金属であるがそのレベルが極めて低いがために、現在の分析技術をもつてしても必須性の証拠があがらないのではあるまいか。それに対して、軟体動物イカではそのレベルが高いのではないかと著者は考えて検討を行つている。その意味では、metallothionein よりむしろイカ肝臓に存在する MW 70,000 以上の Cd 結合高分子量成分と MW 3,000 以下の低分子量 Cd 成分に注目したい。水棲生物のある種の酵素について Cd の高濃度レベルでは活性が阻害されるが、Cd の低濃度レベルでは逆に活性が上昇するという報告¹¹⁾もあり、今後、イカ肝臓で見い出した上記の2つの Cd 結合成分について詳細な検討を行つてゆきたい。

Ag も、イカ肝臓と Ag 投与ラット肝臓 cytosol 画分で存在状態はまったく異なっており、イカでは MW 20,000 以下の低分子量成分、ラットでは MW 70,000 以上の高分子量成分に Ag が多く存在していた。現在のところ、生体中の Ag の生理的意義に関する報告はほとんどなく、本研究は生体における Ag の生理的意義を探求するうえでイカ肝臓を検討する必要性を示唆した。

乳汁は乳児期の唯一の栄養源である。その中に含ま

れる微量重金属 Fe, Cu, Zn が乳児の成長・発育に重要な役割を演じていると考えられている。ヒト乳児に Fe 欠乏性貧血がときどき観察され、乳汁中の Fe の栄養学的重要性は古くから認識されてきた。しかし、Cu, Zn については見過されていた。

近年、Hambidge ら¹⁸⁾は、Denver (アメリカ合衆国)で新生児から成人まで 338 名の毛髪 Zn 含有量を測定して、3 か月から 4 か月までの乳児、幼児の毛髪 Zn が新生児、成人にくらべて極端に低値 (平均 88 ppm) を示し、毛髪 Zn が 70 ppm 以下の小児 (5 才以上) は成長の遅れ、食欲不振、味覚低下などの Zn 欠乏症候 (conditioned zinc deficiencies)⁴⁴⁾が高い割合で見い出されたことと、乳・幼児期の Zn 摂取不足による潜在性 Zn 欠乏症の存在を示唆して、注目された。また、Walravens ら⁵⁹⁾は、乳児の Zn 摂取量が成長・発育に及ぼす影響について報告をしている。市販粉乳 (Zn: 1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と Zn 添加粉乳 (Zn: 5.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を飲用した乳児の身長、体重を比較して、Zn 添加群の男は無添加群にくらべて 6 か月までの身長、体重に有意の増加を示した。

乳児の Cu 欠乏症について、1964 年、Cardano ら⁸⁾がペルーで乳児重症栄養失調と Cu 摂取量低下の関連を報告している。近年、同様の症例はアメリカ合衆国、メキシコでもみられている¹⁷⁾。乳児期の Cu 摂取不足は特に未熟児に問題とされる¹⁷⁾。

これらの報告は、乳児における Cu, Zn の栄養学的意義の重要性を指摘したものであり、乳児の Cu, Zn 摂取量の把握、ひいては Cu と Zn の必要量を評価する上で、乳汁中の Cu, Zn 含有量の信頼できるデータの蓄積が期待されている。

本研究で、著者は、19~39 才の 64 名の産婦から採取した母乳について、Fe, Cu, Zn, Ca 及び Mg の含有量を産後経過日数別に測定した (Table 2)。産婦は正常分娩し、疾病等の異常がなかつたことを同時に行つた母子健康調査で確認した。Table 2 は母乳中 Fe, Cu, Zn, Ca, Mg の産後経過日数による生理的変動値を示した数値として重要な基礎資料の 1 つと考える。初乳から産後 4 か月までの産後経過日数別に Ca, Mg, Zn, Fe, Cu の変動について述べる。

Ca は 260~290 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Mg は 25~35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zn は 1~9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Fe, Cu は 0.2~0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間にある。Zn は Fe, Cu にくらべて 1 桁高い値を示した。これは Zn の乳児栄養における重要性を示唆するものと考えられる。従来より、その栄養学的意義が重視されている Fe の母乳中含有量は日本食品標準成分

表に 2 ppm²⁰⁾とされているが、本調査結果において母乳の Fe は 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度域に全測定値の約 96 %が入っており、2 ppm よりはるかに低値である。最近の母乳 Fe 含有量は松永ら²⁹⁾ (富山県)、植地ら⁵²⁾ (神奈川県)、Vaughan ら⁵⁷⁾ (アメリカ合衆国)の報告ではいずれも本調査と同じレベルである。ゆえに、日本食品標準成分表の母乳 Fe 含有値 2 ppm を用いて乳児の Fe 摂取量を算定すると、実際の 2 倍以上の量を見積ることになると推測されることから、この値は再検討の必要があろう。本実験で母乳中 Fe, Cu, Zn 含有量は産後日数の経過によつて減少する傾向が認められる。産後日数経過による母乳 Zn, Cu の変動に関して、Vouri ら⁵⁸⁾、Rajalakshmi ら⁴²⁾も同様な報告をしているが、各個人を長期に渡つて追跡したものではない。本実験で、母乳 Zn は産後 10 日以内の著しい減少が特徴的であつた。その傾向は個人別にもはつきりと観測されており、初乳中含有量の多少にかかわらず同様であつた (Fig. 3)。この母乳 Zn の特徴的な変動は生理学的にも非常に興味深いところである。なお、母乳 Cu は移行乳で最も高く、以後減少傾向を示した。母乳 Cu と血清 Cu の変動を比較すると、妊娠後期に正常レベルの 2~3 倍に増加した妊婦の血清 Cu が分娩後 2~3 週間て正常レベルに戻る^{47), 55)}現象との関連も興味深い。

このように産後経過によつて、Fe, Cu, Zn含有量に大きな変動がみられることは、当然乳児の Fe, Cu, Zn 摂取量に反映されるので、産後経過日数別摂取量を把握しなければならないだろう。そこで、過去の産後経過日数別母乳哺乳量に関するデータを検討した。母乳 1 日哺乳量は産後 2~4 日で 150 ml, 産後 6~10 日で 480 ml, 産後 1 か月で 650 ml, 産後 2 か月で 800 ml, 産後 3 か月で 900 ml, 産後 4 か月で 850 ml として^{30), 32)}、本調査の母乳 Fe, Cu, Zn の産後経過日数別平均含有量の結果から母乳栄養児の 1 日摂取量を推定した。その値を Table 5 に示した。同様に算出した Ca, Mg の 1 日摂取量の推定値もあわせて記載した。産後 6~10 日から 4 か月までの 1 日推定摂取量は、Fe が 0.20~0.32 mg, Cu が 0.17~0.28 mg, Zn が 0.9~2.3 mg, Ca が 137~257 mg, Mg が 14~29 mg であつた。産後 2~4 日の 1 日推定摂取量について、Fe, Cu, Ca, Mg が産後 6~10 日以降と比較して約 0.2~0.5 倍の値であつたが、Zn は産後 2 か月時に相当する高値であることが分つた。

乳児の人工栄養は 1 つの重要なテーマであり、昨今の母親の社会的進出の急激な増加に伴つて、その意義

Table 5. Estimated daily intakes of iron, copper, zinc, calcium and magnesium on breast-fed infants.

Stage of lactation	Daily intake of milk*	Iron	Copper	Zinc	Calcium	Magnesium
days	ml	mg				
2-4	150	0.09	0.06	1.3	40	5
6-10	480	0.20	0.28	2.3	137	14
20-40	650	0.27	0.28	2.0	183	16
50-70	800	0.26	0.26	1.4	222	23
80-100	900	0.32	0.26	1.1	257	28
110-130	850	0.20	0.17	0.9	232	29

* References 30), 32)

はますます高まっている。そこで、現在、本邦で最も頻りに人工栄養として用いられている特殊調製粉乳について、微量金属の視点から母乳栄養と対比させて考察してみたい。今回の実験で母乳と14%調乳試料のFe, Cu, Zn, Ca, Mgを分析した結果(Table 2, Table 4)を比較すると、産後1カ月の母乳にくらべて調製粉乳溶液では、Feが約19~25倍、Caが約1.5~2.1倍、Mgが約1.3~2.6倍と高値を示したが、Cuが約0.05~0.13倍、Znが約0.27~0.58倍と低値を示した。母乳栄養は乳児にとって好適なものであると考えると、現在の特殊調製粉乳にはCu, Znに対する配慮が欠けている。粉乳中Cu含有量の極めて低い値は、原料である牛乳のCu含有量の低値が反映されている。

食品中の微量金属の生体内への吸収に関して、その存在形態は重要な因子である。特に、腸管吸収機能の未熟な乳児にとって、乳汁中の必須重金属の存在形態は体内吸収に大きな影響を及ぼすと考えられる。しかし、必須重金属の乳汁中の存在形態に関する報告は少ない。Feについては母乳、牛乳にMW 86,000のferrilactinと呼ばれるFe結合蛋白質の存在が知られている⁵⁴⁾。著者は、必須重金属のうちで乳汁中に極めて高濃度含まれるZnについて、母乳と牛乳の存在形態を検討した。Eckhartら¹³⁾は、現在、Zn欠乏症とされている腸性肢端皮膚炎(acrodermatitis enteropathica)が母乳栄養児の離乳開始後に発現することに着目して、母乳と牛乳のZnの存在形態の違いを検討している。彼らは、母乳、牛乳のSepharose 2Bによるゲル濾過実験の結果から、牛乳Znは主に高分子量成分として、母乳Znは低分子量成分として

多く存在すると報告している。しかし、Zn結合成分の分子量の推定、そのZn量の比率、産後日数による変動などについては検討していない。著者は、本実験で母乳、牛乳の1,000×g上清のZnの大部分はMW 70,000以上の成分として存在していることを明らかにした。ただ、母乳では、牛乳でみられないMW 20,000~70,000のZn結合成分が観測されたことが特徴的であった。しかし、Zn代謝と密接な関係が示唆されているmetallothionein (Zn-thionein)は母乳、牛乳に見い出されなかつた。また、産後日数の経過によるZnの存在形態の違いは、母乳、牛乳いずれについても本実験で観測されなかつた。一方、Evansら¹⁴⁾は、母乳、牛乳のMW 10,000以下の成分ではZnが母乳、牛乳ともMW 1,500以下の成分としてのみ存在していることを報告している。その成分は、著者が母乳、牛乳で観測しているMW 3,000以下のZn結合成分と一致するものと推測される。今後は、これらZn結合成分の栄養学的意義を評価するために、体内への吸収を検討してゆく必要があろう。また、分析機器の検出感度と実験システムの問題でFe, Cuの存在状態を明らかにすることが出来なかつたが、これも今後の研究課題である。

総 括

本研究は、有害金属とされているCd, Agを高濃度含有している天然のスルメイカ肝臓と必須金属のZnを高濃度含有している乳汁を対象にして、重金属の存在状態について検討した。

1. 軟体動物スルメイカの肝臓の重金属の細胞内分布に関して、Cdはnuclei and cell debris, mito-

chondria, cytosol 画分に全体の約 30% ずつが含有され、Zn も同様の分布を示した。Ag と Cu は約 60% が cytosol 画分に見い出され、Ag と Cu の細胞内分布が類似していた。Fe は全体の約 40% が microsome 画分に局在していた。Cd 曝露のラット肝臓の Cd は約 80% が cytosol 画分であり、天然のスルメイカ肝臓と Cd 曝露ラット肝臓の Cd の細胞内分布に大きな違いがあることが分つた。

2. Cd 曝露ラット肝臓の Cd は主に metallothionein (Cd, Zn-thionein, 推定 MW 11,000~12,000) として存在したが、天然のスルメイカ肝臓の cytosol 画分の Cd は主に MW 70,000 以上の高分子量成分として存在した。逆に、cytosol 画分の Ag は、Ag 曝露ラット肝臓で MW 70,000 以上の高分子量成分に結合したものが多く、天然のスルメイカ肝臓では MW 20,000 以下の低分子量成分と結合したものが多かつた。哺乳動物ラット肝臓と軟体動物スルメイカ肝臓の cytosol 画分で Cd, Ag の存在形態が明らかに異なっている点を指摘した。また、スルメイカ肝臓で MW 70,000 以上、および MW 3,000 以下の Cd 結合成分の生理学的意義が示唆された。

3. 正常児分娩の健康産婦 64 名 (19~39 才) から採取した母乳 179 試料を分析して、Fe, Cu, Zn, Ca, Mg の産後経過日数別含有量レベルを示した。産後 2~4 日から産後 4 カ月までの母乳中平均含有量は、Fe, Cu が 0.2~0.6 $\mu\text{g/ml}$, Zn が 1~9 $\mu\text{g/ml}$, Ca が 260~290 $\mu\text{g/ml}$, Mg が 25~35 $\mu\text{g/ml}$ の間であつた。日本食品標準成分表には母乳の Fe 含有量は 2 ppm とされているが、この値は本調査結果と大きく異なるので再検討すべきである。

母乳中 Fe, Cu, Zn 含有量は産後日数の経過とともに減少する傾向にある。特に、Zn は産後 10 日以内の著しい減少が特徴的であり、その傾向は、含有量の多少にかかわらず、個人別にもはつきりと観測された。また、母乳 Zn の Fe, Cu にくらべて 1桁高い含有量は、乳児期栄養における Zn の重要性を示唆すると考えられる。

母乳栄養児の Fe, Cu, Zn, Ca, Mg の 1日摂取量を推定した。産後 6~10 日から 4 カ月までの 1日推定摂取量は、Fe が 0.20~0.32 mg, Cu が 0.17~0.28 mg, Zn が 0.9~2.3 mg, Ca が 137~257 mg, Mg が 14~29 mg であつた。

4. 乳児の Fe, Cu, Zn, Ca, Mg の摂取について、母乳栄養と人工栄養での比較を試みた。市販五社の特殊調製粉乳の 14% 調乳溶液と母乳の Fe, Cu,

Zn, Ca, Mg 濃度を比較したところ、母乳にくらべて粉乳溶液では Fe, Ca, Mg が高値を示し、Cu, Zn が低値を示した。現在の特殊調製粉乳には Cu, Zn に対する配慮が欠けているものと思われる。

5. 母乳と牛乳の 1,000 \times g 上清の Zn の大部分は MW 70,000 以上の成分として存在していた。しかし、母乳には牛乳で観測されなかつた MW 20,000~70,000 の Zn 結合成分が観測された。

稿を終るに臨み、終始懇切丁寧なる御指導御校閲を賜りました恩師石沢正一鳥取大学名誉教授 (現広島市衛生研究所所長) ならびに鳥取大学医学部公衆衛生学教室能勢隆之教授に深甚なる謝意を捧げます。また、実験に際して研究施設を心よく提供して下さつた細菌学教室高木篤教授、ステロイド医学研究施設・生化学部門清水久太郎教授、足立幸一技官、臨床薬理学教室伊藤忠雄教授、医療技術短期大学部林康久前教授、R I 総合実験室鈴木孝夫助手に深謝致します。更に、試料採取にあたり御協力を賜つた鳥取県水産試験場境港分場佐野茂所長、川口哲夫氏、中山町役場の渡辺明美氏、山本登美子氏に感謝致します。最後に、本研究に御協力を頂いた公衆衛生学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第39回日本公衆衛生学会総会および第51回日本衛生学会総会で発表した。なお、この研究には、昭和54年度、昭和55年度文部省科学研究費補助金 (奨励研究 (A)) の御援助を受けた。

文 献

- 1) Andrews, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233, 1964.
- 2) Banis, R. J., Pond, W. G., Walker, E. F. and O'Connor, J. R.: Dietary cadmium, iron and zinc interactions in the growing rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **130**, 802-806, 1969.
- 3) Bremner, I., Davies, N. T. and Mills, C. F.: The effect of zinc deficiency and food restriction on hepatic zinc proteins in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 982-985, 1973.
- 4) Bremner, I., Young, B. W.: Isolation of (copper, zinc)-thioneins from the livers of copper-injected rats. *Biochem. J.* **157**, 517-520, 1976.

- 5) Bryan, S. E. and Hayes, E. F.: Partial characterization of liver proteins following exposure to mercury. *FEBS Lett.* **21**, 21-24, 1972.
- 6) Bühler, R.H.O. and Kägi, J.H.R.: Human hepatic metallothioneins. *FEBS Lett.* **39**, 229-234, 1974.
- 7) Bunn, C. R. and Matrone, G.: In vivo interactions of cadmium, copper, zinc, and iron in the mouse and the rat. *J. Nutr.* **90**, 395-399, 1966.
- 8) Cardano, A., Baertl, J. M. and Graham, G. G.: Copper deficiency in infancy. *Pediatrics* **34**, 324-336, 1964.
- 9) Chen, R.W., Whanger, P.D. and Weswig, P.H.: Rat liver metallothionein: Relationship to metal metabolism. *Fed. Proc.* **34**, 927, 1975.
- 10) Cherian, M.G.: Isolation and purification of cadmium binding proteins from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 920-926, 1974.
- 11) Coombs, T.L.: Cadmium in aquatic organisms. Webb, M. (ed.) *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*, pp. 123-132, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York and Oxford, 1979.
- 12) Davies, N.T., Bremner, I. and Mills, C.F.: Studies on the induction of a low-molecular-weight zinc-binding protein in rat liver. *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 985-988, 1973.
- 13) Eckhert, C. D., Sloan, M. V., Duncan, J. R. and Hurley, L. S.: Zinc binding: A difference between human and bovine milk. *Science* **195**, 789-790, 1977.
- 14) Evans, G. W., Johnson, P.E., Brushmiller, J. G. and Ames, R. W.: Detection of labile zinc-binding ligands in biological fluids by modified gel filtration chromatography. *Anal. Chem.* **51**, 839-843, 1979.
- 15) Friberg, L., Piscator, M. and Nordberg, G.: *Cadmium in the Environment*. p. 41, CRC Press, Cleveland, 1971.
- 16) George, S.G., Carpeno, E., Coombs, T.L., Overnell, J. and Youngson, A.: Characterization of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. *Biochim. Biophys. Acta* **580**, 225-233, 1979.
- 17) Hambidge, K. M.: Trace elements in pediatric nutrition. *Adv. Pediat.* **24**, 191-231, 1977.
- 18) Hambidge, K. M., Hambidge, C., Jacobs, M. and Baum, J. D.: Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth, and hypogeusia in children. *Pediatr. Res.* **6**, 868-874, 1972.
- 19) 石沢正一, 能勢隆之, 杉山恭子, 田中俊行, 大城等: 複合重金属 (Ag, Cu, Cd) の相互作用に関する動物実験. 第53回日本産業衛生学会講演集, pp. 153-154, 1980.
- 20) 科学技術庁資源調査会編: 三訂補日本食品標準成分表, p. 117, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1980.
- 21) Kägi, J.H.R. and Vallee, B. L.: Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* **235**, 3460-3465, 1960.
- 22) Kägi, J. H. R. and Vallee, B. L.: Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* **236**, 2435-2442, 1961.
- 23) 木村正己: メタロチオネイン. 山根靖広, 高島英伍, 内山充編, 環境汚染物質と毒性 (無機物質編), 化学の領域, 増刊 126 号, pp. 47-58, 南江堂, 東京, 1980.
- 24) Lee, S.S., Mate, B.R., von der Trenck, K. T., Rimerman, R. A. and Buhler, D. R.: Metallothionein and the subcellular localization of mercury and cadmium in the California sea lion. *Comp. Biochem. Physiol.* **57C**, 45-53, 1977.
- 25) Levine, W. G. and Singer, R. W.: Hepatic intracellular distribution of foreign compounds in relation to their biliary excretion. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **183**, 411-419, 1972.
- 26) Luckey, T. D. and Venugopal, B.: *Metal Toxicity in Mammals* • 1, Physiologic and

- Chemical Basis for Metal Toxicity, p. 196, Plenum Press, New York and London, 1977.
- 27) Margoshes, M. and Vallee, B. L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Amer. Chem. Soc. **79**, 4813-4814, 1957.
- 28) Martin, J. H. and Flegal, A. R.: High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium, and zinc. Marine Biology **30**, 51-55, 1975.
- 29) 松永明信, 渡辺正男: 人乳中の重金属含有量. 日本衛生学雑誌, **36**, 186, 1980.
- 30) 宮崎 叶, 高橋悦次郎, 川面美智: 新生児栄養の実態. 小児科臨床 **17**, 993-998, 1964.
- 31) 長尾美奈子: がんの引金となる化学物質. 現代化学 **116**, 18-27, 1980.
- 32) 二木 武: 哺乳能と哺乳量. 小児医学 **3**, 131-154, 1970.
- 33) Noël-Lambot, F.: Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium binding proteins similar to metallothioneins. Experientia **32**, 324-325, 1976.
- 34) Noel-Lambot, F., Bouquegneau, J. M., Frankenne, F. and Distèche, A.: Le rôle des metallothioneines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. Rev. Int. Oceanogr. Med. **49**, 13-20, 1978.
- 35) 能勢隆之, 田中俊行, 石沢正一, 渡辺明美, 山本登美子: 母乳中のカルシウム, マグネシウム, 亜鉛, 銅, 鉄含有量. 鳥取医学雑誌 **9**, 増刊号, 126-129, 1981.
- 36) Olafson, R. W., Sim, R. G. and Kearns, A.: Physiological and chemical characterization of invertebrate metallothionein-like proteins. Kägi, J. H. R. and Nordberg, M. (ed.) Metallothionein, pp. 197-204, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston and Stuttgart, 1979.
- 37) Piotrowski, J. K., Trojanowska, B., Winsniewska-Knypl, J. M. and Bolanowska, W.: Mercury binding in the kidney and liver of rats repeatedly exposed to mercuric chloride: Introduction of metallothionein by mercury and cadmium. Toxicol. appl. Pharmacol. **27**, 11-19, 1974.
- 38) Piscator, M.: Cadmium in the kidneys of normal human beings and the isolation of metallothionein from liver of rabbits exposed to cadmium. Nord. Hyg. Tidskr. **48**, 76-82, 1964.
- 39) Pond, W. G. and Walker, E. F.: Cadmium-induced anemia in growing rats prevention by oral or parenteral iron. Nutrition Reports International **5**, 365-370, 1972.
- 40) Prasad, A. S.: Deficiency of zinc in man and its toxicity. Prasad, A. S. and Oberleas, D. (ed.) Trace Elements in Human Health and Disease, Vol. 1, pp. 1-20, Academic Press, New York, San Francisco and London, 1976.
- 41) Pulido, P., Kägi, J. H. R. and Vallee, B. L.: Isolation and some properties of human metallothionein. Biochemistry **5**, 1768-1777, 1966.
- 42) Rajalakshmi, K. and Srikantia, S. G.: Copper, zinc, and magnesium content of breast milk of Indian women. Am. J. clin. Nutr. **33**, 664-669, 1980.
- 43) Richards, M. P. and Cousins, R. J.: Mammalian zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. **64**, 1215-1223, 1975.
- 44) Sandstead, H. H., Vo-Khactu, K. P. and Solomons, N.: Conditioned zinc deficiencies. Prasad, A. S. and Oberleas, D. (ed.) Trace Elements in Human Health and Disease, Vol. 1, pp. 33-49, Academic Press, New York, San Francisco and London, 1976.
- 45) Schwarz, K.: Essentiality versus toxicity of metals. Brown, S. S. (ed.) Clinical chemistry and toxicology of metals, pp. 3-22, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, New York and Oxford, 1977.
- 46) Shaikh, Z. A. and Lucis, O. J.: Cadmium and zinc binding in mammalian liver and kidneys. Arch. Environ. Health **24**, 419-425, 1972.

- 47) 清水盈行：銅，その数値をどう読むか。日本臨床，**34**，248-255，1976。
- 48) 杉山恭子：食品中の重金属含有量に関する研究。米子医誌 **32**，408-425，1981。
- 49) 杉山恭子，石沢正一，吉田暢夫：いかにの重金属含有量。日本衛生学雑誌 **29**，60，1974。
- 50) 田中俊行，林康久，船川彦，石沢正一：黒鉛炉・フレイムレス-2チャンネル原子吸光法による銀と銅の同時定量—生体試料を対象として—。分析化学第29年会講演要旨集，p. 582，1980。
- 51) 田中俊行，林康久，石沢正一：黒鉛炉・フレイムレス-2チャンネル原子吸光法による水中の微量のカドミウムと銅の同時定量。分析化学 **27**，499-504，1978。
- 52) 植地正文，池沢芳江，兵頭行夫，北山徹：母乳中微量元素 (trace element) の経時的変化について。小児科臨床 **33**，2230-2238，1980。
- 53) Underwood, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 3rd ed., pp. 1-9, Academic Press, New York and London, 1971。
- 54) Underwood, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 3rd ed., pp. 25-26, Academic Press, New York and London, 1971。
- 55) Underwood, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 3rd ed., pp. 69-71, Academic Press, New York and London, 1971。
- 56) Vallee, B. L.: Metallothionein: Historical review and perspectives. Kagi, J. H. R. and Nordberg, M. O. (ed.) Metallothionein, pp. 19-40, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston and Stuttgart, 1979。
- 57) Vaughan, L. A., Weber, C. W. and Kemberling, S. R.: Longitudinal changes in the mineral content of human milk. Am. J. clin. Nutr. **32**，2301-2306，1979。
- 58) Vouri, E. and Kuitunen, P.: The concentrations of copper and zinc in human milk; A longitudinal study. Acta Paediatr. Scand. **68**，33-37，1979。
- 59) Walravens, P. A. and Hambidge, K. M.: Growth of infants fed a zinc supplemented formula. Am. J. clin. Nutr. **29**，1114-1121，1976。
- 60) Weser, U., Donay, F. and Rupp, H.: Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in chicken and rats. FEBS Lett. **32**，171-174，1973。
- 61) Whanger, P. D.: Effect of dietary cadmium on intracellular distribution of hepatic iron in rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **5**，733-740，1973。
- 62) Whitaker, J. R.: Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem. **35**，1950-1953，1963。
- 63) Willis, J. B.: Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorption spectroscopy. Anal. Chem. **33**，556-559，1961。
- 64) Winge, D. R., Premakumar, R. and Rajagopalan, K. V.: Metal-induced formation of metallothionein in rat liver. Arch. Biochem. Biophys. **170**，242-252，1975。

ABSTRACT

Studies on the distributions of heavy metals in liver of natural squid and in human and cow's milk

Toshiyuki TANAKA

Department of Public Health, Tottori University School of Medicine, Yonago, Japan

The present study was performed to investigate the distributions and existing forms of heavy metals in the livers of natural squids (*Todarodes pacificus*) and in human milk, cow's milk and powdered milk. The results obtained were as follows;

1. The subcellular distributions of Fe, Cu, Zn, Ag and Cd in the livers of natural squids were examined. Approximately 30% fractions of total Cd in the liver tissue were present in the nuclear, mitochondrial and cytosolic fraction, respectively. The distribution of Zn was

similar to that of Cd. In contrast, approximately 60 % of Cu or Ag in the liver was observed in the cytosolic fraction. And approximately 40 % of Fe in the liver was localized in the microsomal fraction.

2. It was indicated by the gel-filtration experiments that most of Cd in the cytosolic fraction of the liver was associated with metallothionein (Cd, Zn-thionein, MW 11,000-12,000) for Cd-treated rats and that Cd was mainly associated with high-molecular-weight species (MW ≥ 70,000) in the cytosolic fraction of the livers of natural squids. On the contrary, the majority of Ag in the cytosolic fraction of the liver was found to be associated with high-molecular-weight species (MW ≥ 70,000) for Ag-treated rats and to be associated with low-molecular-weight species (MW ≤ 20,000) for natural squids.

3. The contents of Fe, Cu, Zn, Ca and Mg were examined in 117 samples of human milk from 64 healthy Japanese women, aged 19 to 39 years, who were delivered of normal infants. Mean levels of Fe, Cu, Zn, Ca and Mg in human milk at different stages of lactation (2-4 days to 4 months) were within the following concentration ranges; Fe, Cu: 0.2-0.6 μg/ml, Zn: 1-9

μg/ml, Ca: 260-290 μg/ml, Mg: 25-35 μg/ml. The concentrations of Fe, Cu and Zn tended to decrease during the course of lactation. In particular, the concentration of Zn, which was very high in colostrum, decreased rapidly by 10 days post partum. During 6-10 days to 4 months of lactation, daily intakes of Fe, Cu, Zn, Ca and Mg on breast-fed infants were estimated as 0.20-0.32 mg, 0.17-0.28 mg, 0.9-2.3 mg, 137-257 mg and 14-29 mg, respectively.

4. The ranges of the concentrations of Fe, Cu, Zn, Ca and Mg in 14% solution of powdered milk (five types of commercial products) were as follows; Fe: 7.6-10.4 μg/ml, Cu: 0.020-0.056 μg/ml, Zn: 0.81-1.74 μg/ml, Ca: 422-604 μg/ml, Mg: 33-64 μg/ml. Fe, Ca and Mg levels were higher in powdered milk solution than in human milk, but Cu and Zn levels in powdered milk solution were lower than those in human milk.

5. In both human milk and cow's milk, most of Zn in the fat-free 1,000×g supernatant was found to be associated with high-molecular-weight species (MW ≥ 70,000). Zn-binding species having molecular weights of 20,000 to 70,000 were also observed in human milk, but not in cow's milk.

受付 (1982-9-1)

動物性食品の重金属... 鉄、銅、亜鉛、カルシウム、マグネシウムの含有量を調べる。乳中の鉄、銅、亜鉛の濃度は、産後2-4日から4ヶ月の間、それぞれ0.2-0.6 μg/ml、0.17-0.28 mg、0.9-2.3 mgと推定された。乳中の鉄、銅、亜鉛の濃度は、産後2-4日から4ヶ月の間、それぞれ0.2-0.6 μg/ml、0.17-0.28 mg、0.9-2.3 mgと推定された。

動物性食品の重金属... 鉄、銅、亜鉛、カルシウム、マグネシウムの含有量を調べる。乳中の鉄、銅、亜鉛の濃度は、産後2-4日から4ヶ月の間、それぞれ0.2-0.6 μg/ml、0.17-0.28 mg、0.9-2.3 mgと推定された。乳中の鉄、銅、亜鉛の濃度は、産後2-4日から4ヶ月の間、それぞれ0.2-0.6 μg/ml、0.17-0.28 mg、0.9-2.3 mgと推定された。