結核症の銅代謝に関する臨床的研究

第1報　血清銅の変動について

河　合　　潔

国立中野療養所

受付 昭和32年1月5日

緒　言

結核その他の感染症における血清銅値の上昇は Krebs[1], Heilmeyer[2], 福島[3], 若田部[4], Brenner[5] らにより報ぜられてきた。また結核症に対する銅療法は Streptomycin 出現以前かなり研究されたが多くは成果を挙げることはできなかつた。ただしこれらの諸研究は結核症の銅代謝自体にはほとんど考慮は払われていなかつたのである。しかし1951年 Polster[6] は銅製剤 Ebesal と Conteben およびPASとの併用療法を試みて好結果を得たと報じ，Sorkin[7], Roth[8] らは銅イオンと 8-oxychinolin, PAS, INAH 等との錯化合物の持つ抗結核性につき幾多の実験を重ね，銅イオンの各種化合物に対する抗結核菌作用の増強性を報告した。

他方1930年 Menkin[9] は鉄の結核病巣への集積を発表しているが銅に関しては1948年に至り Schubert[10] が放射性銅を使用しモルモットにて結核肺への銅の集中を報じている。しかし臨床材料における検討は未だほとんど行われていない。

著者は穿刺液のいわゆる Catechol 反応[11] なるものを研究中 Polyphenol oxydase の本態は銅蛋白なりとの説[12] に示唆を受け穿刺液中の銅含有量を測定したところ，一般に炎症性滲出液に非炎症性漏出液に比し多量の銅を証明して以来結核患者における銅代謝，ことに炎症局所を中心とした銅の移動に興味を抱き血清，各種の胸膜水，切除肺病巣内の銅含量を検討するに至つた。

要するに本研究に着手した著者の最終目的は現在の行き詰つた感のある化学療法を打開する道として銅イオンないし銅代謝上の諸現象を利用できないか，という点にあり，以下の報告がこの方面の将来の発展に役立てば幸いである。

基礎実験

測定法は Robinson 法[13] である。

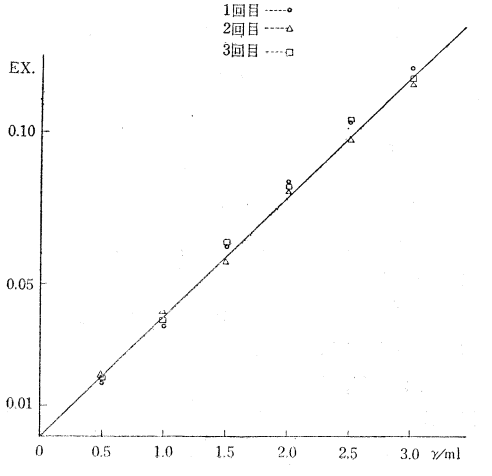
ガラス器具類は使用前にガラス製全接合蒸溜器にて作つた再蒸溜水で清洗し金属イオンによる汚染をできるだけ避けた。各試薬内の金属の除去ならびに精製は原法通りに行つた。銅標準液は第一化学製のものを使用した。振盪器は水平往復運動型であり，光度計は島津製のQB50型である。測定装作上の主な改良は Sodium Diethyl Dithiocarbamate（以下 Carbamate と略）を加えた後直ちにIsoamyl alcohol を5m'加え30分間振盪した点であり，その理由は後述の実験で明らかにした。以上の方法で作成した検量線と Calibration constant 算出の基礎データおよび銅含有量の算出方法は表1，図1に示す通りである。

表1　銅標準液の Extinction（吸光度）と算出法

Cu	第1回	第2回	第3回	平均	Cu/Ex.
0.5γ/ml	0.018	0.020	0.019	0.019	26.3
1.0	0.036	0.041	0.037	0.038	26.4
1.5	0.062	0.057	0.064	0.061	26.6
2.0	0.084	0.081	0.083	0.082	24.4
2.5	0.104	0.098	0.105	0.102	24.3
3.0	0.121	0.115	0.117	0.118	25.4
Calibration c nstant (Copper/Extinction)……25.3γ					

算出法　1. Carbamate加血清のアミル抽出液の吸光度をCe（Cu-carbamate extractの略）
2. Carbamate を加えない血清のアミル抽出液の吸光度をBb（Biological blankの略）
3. Reagent blankの吸光度をRbとすると1dl中の銅量：〔Ce−(Bb+Rb)〕×25.3γ×100

図1　検量線



基礎実験としてはその他 Robinson 法が比較的等閑視していると見做される諸点の再検討と健康者正常値の決定を行つた。

1) 銅の遊離機転についての検討：血清銅の測定上銅がどのように蛋白より遊離するか否かは最も重大な問題の一つである。これらを次の如く検討した。

a) Isoamyl alcohol(以下アミルと略）を血清に加え振盪遠心するだけで銅が遊離するか否かの実験：健康者血清を使用し Robinson 法により得た Reagent blank は0.009，Biological blank は0.031，呈色試薬の加わつた検体（すなわち Cu-carbamate extract）は0.085の吸光度を示す時，Biological blank のアミルを他の試験管に移し Carbamate 試薬（通常使用する水溶液ではアミルと混ぜず，したがつてエチルアルコールに2％の割に溶解したもの）の0.2*ml* を加え振盪し再測定した吸光度は0.04に止つた。しかしこの Carbamate の加わつたアミルを元の Biological blank の試験管に逆し再振盪15分，遠心15分後，再び測定した吸光度は0.105に達した。故にアミルによる振盪のみでは銅はほとんど遊離しないことが判つた。

b) Carbamate 試薬のみで銅が遊離するか否かの実験：健康者血清4 *ml* を次の組合せで同一波長の 440*mμ* にてその吸光度の変化を追求した。

A） 血清 1 *ml* ＋飽和ピロ燐酸ソーダ 0.2 *ml* ＋2％ Carbamate 0.2*ml* ＋蒸溜水にて終末量5 *ml* とす。

A′） Carbamate の代りに蒸溜水を加う。

B） A)にさらに11％アンモニア 0.04*ml* を加う。

B′） B)の Carbamate の代りに蒸溜水を加う。

その結果表2の如くアンモニアにて pH を変えたB群の方に銅の遊離が多いが遊離速度は共に極めて遅々としている。故に原法の如く Carbamate を加えた後振盪までに1時間放置することは無意味であり著者は本実験では直ちにアミルを加え振盪することとした。

表 2 血清にCarbamateを加えた際の吸光度の増加状況

区別 ＼ 時間		15分	60分	120分	180分	24時間
NH_3 (−)	A	0.182	0.185	0.193	0.192	0.197
	A′	0.182	0.182	0.182	0.181	0.171
	A−A′	0	0.003	0.010	0.011	0.026
NH_3 (＋)	B	0.193	0.196	0.201	0.199	0.205
	B′	0.179	0.179	0.179	0.177	0.164
	B−B′	0.014	0.017	0.022	0.022	0.041

C） Cu-carbamate complex 抽出に要する振盪時間の問題：Robinson 原法では15分であるがその多寡により測定値に変化をきたすとしたら結果は重大であるので次のような実験を行つた。

すなわち健康者血清計6 *ml*を使用し，規定の如く装作しアミル4 *ml*を加えた後水平位に振盪器に固定し，一定時間振盪し遠心後測定した(表3)。

表 3 振盪時間の測定値への影響

区分 ＼ 時間	15分	30分	60分
Reagent blank (Rb)	0.004	0.005	0.008
Biological bl. (Bb)	0.043	0.046	0.052
Carbamate extract (Ce)	0.098	0.104	0.111
Copper, γ/dl	129	134	129

表の如く振盪時間の延長に併い Biological blank は増加するが Carbamate extract も共に増加するので抽出銅量にはほとんど変化がない。しかし著者は機械振盪の持つ銅錯化合物抽出の重要性を考慮し本実験では30分振盪を採用した。

アミルの量の問題：原法は 3 *ml* を使用し Colemann 型光度計を用いているが Beckmann 型の角型厚さ1 *cm* のキュベットでは振盪遠心後得られる上清が少量にすぎて測定不能である。そこで血清 0.5および 1.0*ml* に対しアミル4 *ml* と5 *ml* を加えた場合につき比較検討したのが表4である。

表 4 Isoamyl alcohol の量が測定値に及ぼす影響

症例	Combination	Copper, γ/dl
[redacted]	Serum 0.5*ml*+Isoamyl alcohol 4 *ml*	139
	1.0 ＋ 4	141
	1.0 ＋ 5	140
[redacted]	0.5 ＋ 4	141
	1.0 ＋ 4	上清量不足
	1.0 ＋ 5	133

表示の如く血清およびアミルの量により銅値に変化をきたすことは少ない。またアミル4 *ml*の場合は時として4,000廻転15分間遠心では上清が3 *ml* に及ばず，測定に必要な最少量に不足を生じた。故に著者はアミル量は血清の場合原則として5 *ml* とした。

2) 測定誤差について：同一試料における測定値の分散を同一血清につき同時に同方法で5検体宛測定し計3例検討した(表5)。

銅量の算出に当つては，使用前予め測定したキュベット間のアミルに対する吸光度の差異を補正したがなお僅少な測定値のチラバリは免れなかつた。しかし著者は少しでも分散を少なくせんとして常に一定のキュベットを用い予めキュベット自身の同一溶媒に対する吸光度の差異を測定する等キュベットの取扱には相当な注意を払つた。

3) 健康者の血清銅値について：成人健康男子ならび

表5　測定誤差について

症例	測定値の幅 γ/dl	算術平均 γ/dl	標準偏差 γ/dl
[redacted]	112 ～ 122	118.0	± 3.9
[redacted]	103 ～ 109	106.4	± 2.3
[redacted]	90 ～ 98	93.6	± 2.9

表6　正常血清銅値

男		女	
年　令	Cu γ/dl	年　令	Cu γ/dl
67	84	45	107
65	108	44	126
58	124	39	81
58	118	36	90
57	67	32	122
56	136	32	98
55	72	31	98
53	79	31	120
45	101	29	100
43	127	28	99
42	100	28	74
35	89	26	89
35	121	25	111
30	108	23	112
30	118	22	98
29	99	22	79
28	121	22	113
28	78	21	99
27	94	21	104
27	77	21	86
算術平均	101	算術平均	100
標準偏差	± 20.5	標準偏差	± 13.4

に女子（月経時は避けた）各20名計40名より昼食前の空腹時に採血し血清銅を測定し，性別，年令順に表示した(表6)。

表のように各個人差は相当にあるが男女子各平均値間にはほとんど差なくまた年令差は認め難い。なお平均に対する標準偏差は男性側に大であつた。

検査対象ならびに方法

対象とした患者は全部で51名であり，本研究開始時の化学療法の状態により分類すると次の如くなる(表7)。

表7　化学療法の有無による全症例の分類

A群：化学療法を現在まで全く受けていないもの…14例
B群：化学療法をすでに施行中のもの……33
C群：化学療法を過去には受けたが現在は受けてないもの……4
51

A群14例は化学療法施行後も4カ月間毎月血清銅値を測定しその変化を追求した。B群中13例はその後肺切除術を施行したので術後の血清銅値の変動も併せ観察しA群の対照たらしめた。B，C群中にはSM，PAS，INAHのうち一種または数種に抵抗性を有する患者16例を含んでおり化学療法による非軽快例の血清銅として検討した。なお血清銅の測定は前述の Robinson 変法である。

1)　A群の血清銅値について：A群14例を米国結核協会の分類法に基きX線像により分けると重症4例，中等症12例，軽症なしとなる。それらの血清銅値の推移を表示すると次の通りである(表8)。

表8　A群の血清銅値の変動

氏　名	分類	使用薬剤	血清銅 γ/dl 前	1月	2月	3月	4月	臨床像
1. [redacted]	重	SH*，PAS	154	146	139	75	92	軽快
2. [redacted]	重	SH，PAS	247	109	89	76	87	軽快
3. [redacted]	重	SM，PAS	190	192	175	170	135	不変
4. [redacted]	重	SH，PAS	172	170	124	115	105	軽快
		（平均値）	191	154	132	109	105	
5. [redacted]	中	SH，PAS	158	88	55	75	86	軽快
6. [redacted]	中	SH，PAS	151	91	96	84	84	軽快
7. [redacted]	中	SH，PAS	118	90	125	95	84	不変
8. [redacted]	中	SH，PAS	135	106	96	64	56	軽快
9. [redacted]	中	SH，PAS	131	126	122	157	131	不変
10. [redacted]	中	SH，PAS	157	41	86	49	83	軽快
11. [redacted]	中	SH，PAS	151	79	74	66	94	軽快
12. [redacted]	中	SH，PAS	185	111	50	92	94	軽快
13. [redacted]	中	SH，PAS	211	132	134	124	122	軽快
14. [redacted]	中	SM，INAH	163	124	99	112	106	軽快
		（平均値）	156	99	94	92	94	

* SHとはアイナマイシン（科研）で使用法はSMと同じである

表のように使用前血清銅値は重症例に一般に高く，また重症例では中等症例に比し薬剤使用後の血清銅値の低下が遅く標準値である100γ/dl附近に達するのに3月を要している。これに反し中等症例では平均1カ月後にはすでに正常値に降下している。また臨床所見より軽快例と不変例とに分けて観察すると不変例の症例3，7，9では血清銅値の低下は不著明であつた。これらの状況は図2に示した。

図2　A群の血清銅値の変動

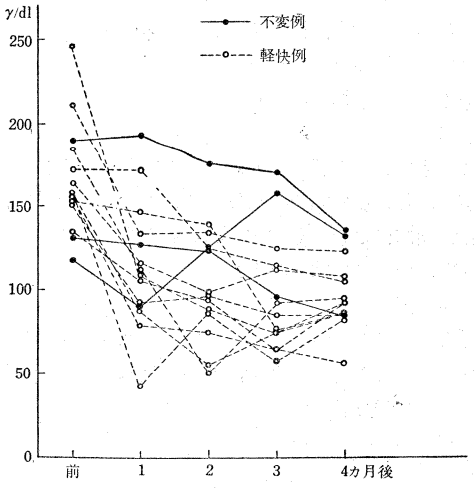


表9　B群中の非軽快例と軽快例との比較

症	例	分類	SM	PAS	INAH	Cu γ/dl
非軽快例	1. [redacted]	重	71	2,900		144
	2. [redacted]	重	90	6,310	56	108
	3. [redacted]	重	85	8,420	161	122
	4. [redacted]	重	85	7,800	144	105
	5. [redacted]	重	146	10,510	89	133
	6. [redacted]	重	85	2,380	51	161
	7. [redacted]	重	200		160	215
	8. [redacted]	重	120	2,400	160	189
	9. [redacted]	重	50	500	78	170
	10. [redacted]	重	150	5,800	18	102
	11. [redacted]	重			204	135
	12. [redacted]	重	100	3,600	20	186
	13. [redacted]	重	50	1,800	180	226
	14. [redacted]	中	80	4,820	30	137
	15. [redacted]	中	200	6,400	240	112
	16. [redacted]	中	50	3,980	69	141 / 149
軽快例	1. [redacted]	中	36*	1,200		73
	2. [redacted]	中	41*	1,400		59
	3. [redacted]	重	45*	1,560		89
	4. [redacted]	中	36*	1,260		95
	5. [redacted]	重	47*	1,630		113
	6. [redacted]	中	75	5,250	69	110
	7. [redacted]	中	57	5,400	99	95
	8. [redacted]	重	73	10,000	160	115 / 94

*はアイナマイシン例である

2)　B，C群中の化学療法による非軽快例と軽快例の血清銅について：本研究開始時すでに化学療法を施行中かまたは終了後のB，C群よりその失敗例と成功例を比較表示した(表9)。非軽快例とは充分量の化学療法後も排菌停止せず，各種薬剤に対する抵抗性をすでに証明した者で検査時より1月以内に結核菌を塗抹または培養にて証明した16例であり，軽快例とは当初は排菌を証明したが，X線像の軽快と共に検査前3カ月以上連続培養陰性化した8例である。また表中の病型分類は測定時に最も近き時期のX線像によつた。薬剤使用量は現在までの総量で非軽快例では全例が断続かつ不規則使用である。

表のように非軽快例ではいずれも100γ/dl以上の血清銅値を示し最高226γ/dlに及んでいる。また非軽快例では臨床的に見て進行性のもの例えば症例7，13等に高値を示し，排菌はあるが病状の長期固定している症例2，3，5等では同じ重症例でも低い。軽快例の血清銅値は一般に正常標準値以下である。

3)　手術例の血清銅値の変動について

化学療法単独治療群に対する対照として，B群中にて外科手術を施行した13例の血清銅を手術前数日以内に1回，術後2～3カ月まで毎月1回ずつ測定した(表10)。

表10　B群中手術例の血清銅値の変動

症例	手術名	合併症	輸血量	血清銅 γ/dl 前	1月	2月	3月後
1. [redacted]	区域切除		800	97	178	82	92
2. [redacted]	部分切除		600	116	158	60	71
3. [redacted]	区域切除		1,200	110	154	129	108
4. [redacted]	剝皮術	膿胸	2,400	142	145	79	85
5. [redacted]	区域切除		600	94	185	64	78
6. [redacted]	区域切除		800	94	107	109	105
7. [redacted]	部分切除		1,000	134	179	181	132
8. [redacted]	剝皮＋区切	膿胸	3,800	167	126	113	100
9. [redacted]	区域切除		800	108	152	91	90
10. [redacted]	剝皮＋部切	膿胸	3,800	145	162	86	
11. [redacted]	肺葉切除		4,400	152	146	109	
12. [redacted]	区域切除		800	60	148	86	
13. [redacted]	区域切除		1,200	116	157	134	
			(平均)	118	154	102	96

表にて注目されるのは症例8，11を除き全例共に1カ月後の血清銅値は上昇し増加量は3γ/dlより88γ/dlに及んだこと，2カ月以後には次第に低下し，ことに膿胸を合併せる3例では明らかに術前値よりも低い等の点である。

考　　案

Gubler[14]らは測定法に関して Robinson 法[13]を批判し血清自体の色調のアミルへの移行が多いと非難しているが著者の経験ではそれほどでなくMetabolic Methods[15]の例のように0.06に及んだことなく通常0.02以下である。他方 Gubler 法自身にも強酸性の水溶液中にて銅イオンと Carbamate を反応させるため，生じた銅錯化合物が不安定であり沈澱を形成する傾向がありしたがつて原著者の述べる如く数時間後には吸光度が低下するという欠点がある。しかし Gubler 法の利点は血清1*ml*でできる点であり，Robinson 法でも1*ml*で行うことが不可能ではないが血清が半量となれば呈色も減少するので測定誤差が大となる危険がありこの点が Robinson 法では劣つている。また Braun-Scheffer 法[16]は0.5*ml*でできるとしてもやや複雑にすぎると思う。

計算法に関して Metabolic Methods では Dilution factor として3倍しているがこれは誤りで原法通りにすべきである。

検量線では3γ/*ml*までは Beerの法則に従い Robinson のいうような2γ/*ml*以上における著明な直線の偏向は認められなかつた。

健康者血清銅値は簡単には100γ/*dl*[17]とされているが測定法により若干の差が認められる。内外の諸文献[2)~5)13)16)~18)]によれば Cartwright 法[19]，Braun-Scheffer 法ではやや高く，Heilmeyer[2)], Gubler, Robinson 法等では低い。前者は方法がやや複雑であり後者は簡便である点に原因が求められるかも知れない。また例数の多寡もかなりの個人差が存在する以上正常標準値を決定するに当つては重要な問題だと思う。性による差異は Heilmeyer と同様著者は全く認めなかつた。

結核症も含めて広く感染症の場合に血清銅が増加することはすでに Heilmeyer, Schaich[20], Cartwright[18], 若田部[4]，三方ら[17]の報告により明らかであり著者の結果もほぼ同様であるが，肺結核の際注目されるのは病勢の進行期において高いという点であり，すべての肺結核症全般において必ず上昇している訳ではないことはすでに指摘した通りで，このようなことは Brenner[5]によれば小児結核症でも同様である。また軽快例では1ヵ月後には血清銅値の著明な低下が起ることは若田部も指摘した如くその後の経過を推察する良き指標となる。

手術例では1ヵ月後の血清銅値が上昇した例が多くこれは生体に対する手術自体の影響という面よりは興味深いがこれらの点は結核症自体の銅代謝の問題よりは離れるので別個にさらに探求すべき課題である。

福島，千田[3]は鉄と銅の動員は肝臓を基地として行われしかも因子（重要因子としてアセチール・ヒヨリン）が肝臓に直接働きかけると称しているが結局問題はどのような機転で上昇するのか，という基本的なものに帰せられるであろう。

結　　論

著者は Robinson 法につき基礎的検討を加えた後，健康者40例，肺結核患者51例の血清銅を計182回測定し次の結論を得た。

1)　健康者の血清銅値は成人男子20名の平均101γ/*dl*，成人女子20名の平均100γ/*dl* で性別差は存在しない。

2)　肺結核患者の血清銅値は病巣の活動性に応じて高まり最高例は247 /*dl* に及んだが，化学療法による軽快例では治療開始2ヵ月後にはすでに正常値附近に下降し最低例は41γ/*dl*であつた。

3)　肺切除術例では術後1ヵ月後には多くの場合血清銅値は上昇するが後には次第に術前値以下となつた。

（文献は第2報に一括した）