

めん羊の銅代謝におよぼすモリブデンとイオウの作用における  
テトラチオモリブデン酸塩の役割

石田 直彦・川島 良治・矢野 史子

(京都大学 農学部\*)

**Role of Tetrathiomolybdate in the Antagonistic Effect of Molybdenum  
and Sulfate on Copper Metabolism in Sheep**

Naohiko ISHIDA, Ryoji KAWASHIMA and Fumiko YANO

*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University*

The effects of oral administration of molybdate+sulfate, molybdate+sulfide, tetrathiomolybdate (TM) and a high level of molybdate on the copper metabolism in rats are examined.

Either molybdate+sulfide or TM but not molybdate+sulfate caused a decrease in systemic copper with a marked decline of caeruloplasmin (Cp) activity and the appearance of TCA insoluble copper fraction in plasma. On the contrary, a high level of molybdate produced a large increment in copper content of liver and plasma. Cp activity was kept at the level of control rats whereas more than half of plasma copper was in TCA insoluble form.

Gel chromatography of cytosol from liver and kidney cortex showed that any treatment of molybdate+sulfide, TM or a high level of molybdate was associated with the accumulation of copper and molybdenum in the fraction eluting with 1.2 of  $v/v_0$  ratio.

The significance of these results in relation to the role of TM in copper-molybdenum-sulfur interaction in sheep is discussed.

---

\* 所在地：京都市左京区北白川追分町（〒606）

放牧されている反すう家畜において銅 (Cu) 欠乏症が発生し、時として大きな経済的打撃を与えることがある。ほとんどの場合、この欠乏症が Cu-Mo-S 三者間の相互作用の結果もたらされることから、畜産学の分野では古くから興味を持たれ研究されている。Cu-Mo-S間の相互作用は単胃動物でもみられるが、反すう動物とは様相を異にする。例えば、羊では過剰のモリブデン酸塩 ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) を摂取すると、血液や肝臓中の Cu が減少するが、ラットでは Cu の蓄積が生じる。この時食飼中の硫酸塩 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) は、羊では  $\text{MoO}_4^{2-}$  の作用を強めるが、ラットでは逆に抑制する<sup>1)</sup>。また両者で共通する点としては、過剰の  $\text{MoO}_4^{2-}$  摂取により、生長の遅延や貧血がもたらされるが、食飼中の Cu 含量を増やしてやると回復する。このように Cu-Mo-S の相互作用は複雑で、その作用機構についてはまだ明確な答えが得られていないようである。近年発表された  $\text{MoO}_4^{2-}$  と  $\text{S}^{2-}$  の共存下で生成された thiomolybdate (TM;  $\text{MoO}_n\text{S}_{(4-n)}^{2-}$  ( $n=0\sim 3$ )) が、Cu の非利用化機構における鍵物質であるとする仮説は<sup>2)</sup> 相互作用の動物種差をも含めて合理的に説明できることから注目されている。これによると、反すう動物の第一胃内は通常強い還元状態に保たれており、摂取された  $\text{SO}_4^{2-}$  の大部分は、*Desulfovibrio* や *Desulfovibrio desulfuricans* などの  $\text{SO}_4^{2-}$  還元菌による異化性還元を受け、多量の  $\text{S}^{2-}$  が産生される。 $\text{SO}_4^{2-}$  と  $\text{MoO}_4^{2-}$  の同時投与は、第一胃内での  $\text{S}^{2-}$  産生の増大による不溶性 CuS の生成や、 $\text{Cu}^{2+}$  と結合してこれを非吸収型にする TM の生成を亢進し、消化管からの Cu 吸収を抑える。また吸収された TM は組織内の  $\text{Cu}^{2+}$  と結合し、生物学的に不活性な型に変える。これが 5% トリクロル酢酸中で蛋白と共に沈澱する画分 (TCA 不溶性 Cu 画分) として血漿中に現われる。一方肝臓では endogenous な  $\text{S}^{2-}$  の  $\text{SO}_4^{2-}$  への酸化が行われるが、 $\text{MoO}_4^{2-}$  は Sulfite oxidase 活性またはサルファイド酸化能を抑制することから、 $\text{MoO}_4^{2-}$  の多量摂取は肝臓中  $\text{S}^{2-}$  プールの増大による TM 生成をもたらし、組織内での TCA 不溶性 Cu の形成による Cu 蓄積量の増加が起こる。またラットにおいて、 $\text{MoO}_4^{2-}$  の作用を  $\text{SO}_4^{2-}$  が軽減するのは、 $\text{MoO}_4^{2-}$  と  $\text{SO}_4^{2-}$  の膜吸収が、共通のキャリアーによる能動輸送によるため消化管での吸収や腎尿細管での再吸収過程で拮抗し、結果として  $\text{MoO}_4^{2-}$  の体内貯留を減少させるためだとしている。ここでは、 $\text{S}^{2-}$  の消化管内産生が無いとされるラットを用いて、TM あるいは  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  投与により、 $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  投与羊にみられる Cu-Mo-S 相互作用と同様の相互作用を再現できるかどうか、また  $\text{MoO}_4^{2-}$  投与による血液および臓器中 Cu の変化をラットと羊で比較し、その差が TM 生成部位の違いにより説明可能かどうかを検討すると共に、めん羊の Cu-Mo-S 相互作用における TM 関与の可能性について論考した。

## 方 法

ウィスター系雄ラット30頭を5つのグループに分け、表1に示した濃度で  $\text{MoO}_4^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{MoS}_4^{2-}$ 、 $\text{S}^{2-}$  を各々  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 、 $\text{CaS}$  の形で基礎飼料に混入して与え、6週間の飼育の後屠殺した。全血漿、肝臓、腎臓皮質を湿式灰化し、Cuは常法でMoはMIBK抽出法に従い共に原子吸光法で測定した。TCA可溶性のCu、MoはSmithらの方法<sup>3)</sup>で、セルロプラスミン(Cp)活性は、Ravinの方法<sup>4)</sup>で、またダイレクトリアクティングCu(DR-Cu)はSuttleらの方法<sup>5)</sup>で測定した。肝臓および腎臓皮質のcytosol中のCu、Moの分布を調べるため、組織を0.01M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)中でホモジナイズし、70000gで1.5時間遠心分離して得た上清液についてSephadex G 75によるゲルろ過を行った。

## 結 果 と 考 察

ラットでの実験結果を表1にまとめて示した。 $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  は血漿や腎臓皮質中のMo含量を高めたが、Cu代謝のいずれの指標にも有意な影響をおよぼさなかった。これに対して  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  では、組織Mo濃度の上昇と共に血漿中にTCA不溶性のCu、Moが現われ、組織Cuの減少ないしは減少傾向がみられた。またCuの利用性を反映するCp活性は、ほとん

**Table 1.** Influence on tissue Cu and Mo content and plasma caeruloplasmin activity of dietary supplementation of  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$ , and  $\text{MoS}_4^{2-}$  in rats<sup>1)</sup>

Dietary supplement (mg/Kg)	Mo S	Treatment groups <sup>2)</sup>				
		Control	$\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$	$\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$	$\text{MoS}_4^{2-}$	$\text{MoO}_4^{2-}$
	0	0	20	20	12	1000
	0	0	3000	3000	16	0
Total plasma Cu ( $\mu\text{g/ml}$ )		1.68±0.47	1.76±0.38	1.42±0.06	0.74±0.15*	6.21±3.44**
Plasma TCA-soluble Cu ( $\mu\text{g/ml}$ )		1.45±0.37	1.46±0.15	0.59±0.04*	0.43±0.03**	2.55±0.34**
Total plasma Mo ( $\mu\text{g/ml}$ )		0.03±0.02	0.14±0.03**	2.13±0.08**	0.82±0.10**	7.05±4.81**
Plasma TCA-soluble Mo ( $\mu\text{g/ml}$ )		0.03±0.04	0.04±0.01	1.22±0.17**	0.20±0.02**	1.47±0.59**
Plasma direct-reacting Cu ( $\mu\text{g/ml}$ )		0.70±0.23	0.53±0.09	0.92±0.10	0.75±0.06	1.92±0.41**
Caeruloplasmin activity (O. D.)		0.58±0.07	0.62±0.06	0.01±0.00**	0.00±0.00**	0.58±0.19
Liver Cu ( $\mu\text{g/g}$ dry matter)		12.57±1.08	13.67±0.28	3.71±0.39**	2.77±0.70**	16.34±2.85**
Liver Mo ( $\mu\text{g/g}$ dry matter)		2.23±0.19	2.28±0.19	2.71±0.36*	2.97±0.93*	6.72±2.03**
Kidney Cu ( $\mu\text{g/g}$ dry matter)		30.22±10.65	22.75±0.52	21.85±3.50	19.50±5.55*	41.25±11.91
Kidney Mo ( $\mu\text{g/g}$ dry matter)		1.10±0.11	1.88±0.28**	12.34±2.97**	9.21±4.02**	20.22±9.56**

1) Basal diet contained 8.0 mg Cu/Kg and 1.1 mg Mo/Kg.

Values with asterisks are significantly different from control values. (\* P<0.05, \*\* P<0.01)

2) After one week of prefeeding on basal diet, six animals for each group were kept on experimental diet for six weeks.

どゼロになった。MoS<sub>4</sub><sup>2-</sup>は、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+S<sup>2-</sup>と同様の影響をもたらし、その程度はより強いものであった。ここで比較のため、先に行った羊にMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を投与した時の結果<sup>6)</sup>を表2に示す。羊では、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>区でDR-Cuの増加を除いて変化はなく、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>投与ではじめてTCA不溶性Cuの出現やCp活性の低下が生じている。ここには示していないが、別の実験で羊にMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を投与すると肝臓Cuの減少、腎皮質中のCuの増加が生じることを確かめている。今回のラットの実験では、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+S<sup>2-</sup>あるいはTM投与で腎皮質Cuの減少が生じている。この相違は、後でも述べるが、腎皮質cytosol内のCu分布におけるラットと羊の違いによるもので、相互作用の本質的な相違によるものではないと考えられる。またSuttleは<sup>7)</sup>TMを羊に投与すると、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>投与時と同様の影響が生じることを報告している。これら一連の実験結果は、羊のCu-Mo-S相互作用によるCu欠乏が、主として第1胃内でのTM生成によるCu吸収の低下を通して生じ、副次的には吸収されたTMによる組織Cuの非利用化が生じることを間接的ではあるが示している。DR-Cuは、ジエチルジチオカルバメートでキレート抽出されるCuで、羊へのMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>投与時に血漿中で増加し、血漿蛋白とゆるく結合していると考えられている<sup>3)</sup>。しかしながら、その性質や作用については何も分かっていない。ラットにおいては、高レベルのMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>投与区でのみ、その増加がみられ、その他の処理区では変化がみられないことから、TCA不溶性Cuの生成とは直接関係がないものと思われる。またSuttleは<sup>7)</sup>羊において、DR-Cuの増加に必要なMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>量は、同時に摂取されるCu、S量により上下すると指摘しており、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Table 2. Influence on plasma Cu content and caeruloplasmin activity of dietary supplementation of Cu, Cu+Mo and CU+Mo+S in sheep<sup>1)</sup>

	Treatment groups					
	Cu <sup>2+</sup>		Cu <sup>2+</sup> +MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		Cu <sup>2+</sup> +MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> +SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
	Before	After	Before	After	Before	After
Dietary supplement (mg/Kg)	Cu 10		10		10	
	Mo		20		20	
	S				1700	
Total plasma Cu (μg/ml)	1.22±0.26	1.25±0.18	1.21±0.32	1.21±0.22	1.22±0.20	1.29±0.22
Plasma TCA-soluble Cu (μg/ml)	1.08±0.15	0.93±0.04	0.99±0.03	0.93±0.17	1.06±0.25	0.42±0.13**
Plasma direct-reacting Cu (μg/ml)	0.13±0.03	0.15±0.02	0.12±0.03	0.29±0.01**	0.13±0.05	0.89±0.09**
Caeruloplasmin activity (I. U.)	27.3±11.6	27.8±3.6	22.6±7.2	24.3±6.8	24.3±5.8	7.1±2.2**

1) Value with standard deviation in the table represent the mean of 8 estimations which were weekly made on two sheep for four weeks before and after the supplementation.

\*\* : Significant difference in the values before and after supplementation (P<0.01)

や  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  投与ラットで DR-Cu の増加がないのは、摂取  $\text{MoO}_4^{2-}$  が、Cu, S 量に比べて充分高くないためかも知れない。一方、ラットへの高  $\text{MoO}_4^{2-}$  投与は、 $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  や  $\text{MoO}_4^{2-}$  とは異なり組織への著しい Mo, Cu の蓄積をもたらすと共に、血漿中には多量の TCA 不溶性の Cu, Mo を生成した。

また、TCA 可溶性 Cu も増加しており、 $C_p$  活性の低下はみられなかった。この場合、TM 合成が組織内であるため、組織内 Cu の非利用化が進み TCA 不溶性 Cu が増加するものの、消化管からの Cu 吸収は妨げられないので依然として肝臓への Cu 供給が考えられる。従って肝臓中には  $C_p$  合成を維持するに十分な易利用性 Cu が存在すると考えても間違いはないと思われる。次に肝臓、腎臓皮質の cytosol における Cu, Mo の分布を図 1 と図 2 に示す。ここで注目されるのは、肝臓、腎臓のいずれにおいても、 $V/V_0$  が約 1.1 で溶出する最初の Cu ピークの相対的増加が、 $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$ 、 $\text{MoS}_4^{2-}$ 、高  $\text{MoO}_4^{2-}$  区に共通してみられることである。特に高  $\text{MoO}_4^{2-}$  区で、その増加が著しい。このピークには、Mo が重なって溶出してくるが、Bremner<sup>8)</sup> はこのピークが TCA 不溶性 Cu, Mo を含む唯一のピークであると報告している。このピークの相対的増加は、 $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  投与羊の肝臓や腎皮質の cytosol 中においてもみられる(図 3, 4)。また  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  区と  $\text{MoS}_4^{2-}$  区の腎臓皮質において、 $V/V_0$  約 2.1 で溶出してくるメタロチオネインを含むとされている<sup>9)</sup> Cu ピークの著しい減少がみられる。この Cu ピークの全体に占める割合は、対照ラットの溶出パターンに示されるように大きいので、このピークの激減が腎臓 Cu の減少をもたらしたものと思われる。一方羊では、このピークの割合は小さく  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  投与による初めのピークの増加が多いため腎臓 Cu の増加がみられたものと思われる。以上の結果は、いずれも TM 仮説を支持するものであるが、最近になって<sup>99</sup>Mo を使った羊でのトレース実験で、<sup>99</sup>Mo $\text{O}_4^{2-}$  の第 1 胃内投与により tetra-TM を除く di-, tri-TM が第 1 胃内で合成され吸収されて血漿中に現われることや<sup>10)</sup> 静注された di-, tri-, tetra-TM が体内で急速に異化されいずれも 24 時間以内で投与<sup>99</sup>Mo の 80% 近くが<sup>99</sup>Mo $\text{O}_4^{2-}$  として尿中に排出されることが<sup>11)</sup> 示されている。現時点において、羊の第 1 胃内における TM の合成ならびに吸収はほぼ証明されたと考えられる。今後の課題としては、TM あるいはその誘導体の代謝、特に体内での蛋白や Cu との結合様式が明らかにされる必要があるが、それには TM イオン種の分離定量法の確立が待たれる。MoOnS $_{(4-n)}^{2-}$  ( $n=0\sim 3$ ) の各 TM イオンは、275 m $\mu$  ~ 450 m $\mu$  の波長帯で各々互いに重なる複数の吸収帯をもつが、これまでの検出法は、これらイオンの各吸収波長での吸光係数の違いを利用して同定、測定しているもので、はなはだ非特異的で、その定量性には限界がある。そこで現在筆者らは、細管式等速電気泳動法によるこれら TM イオンの定量分析法の確立を急い

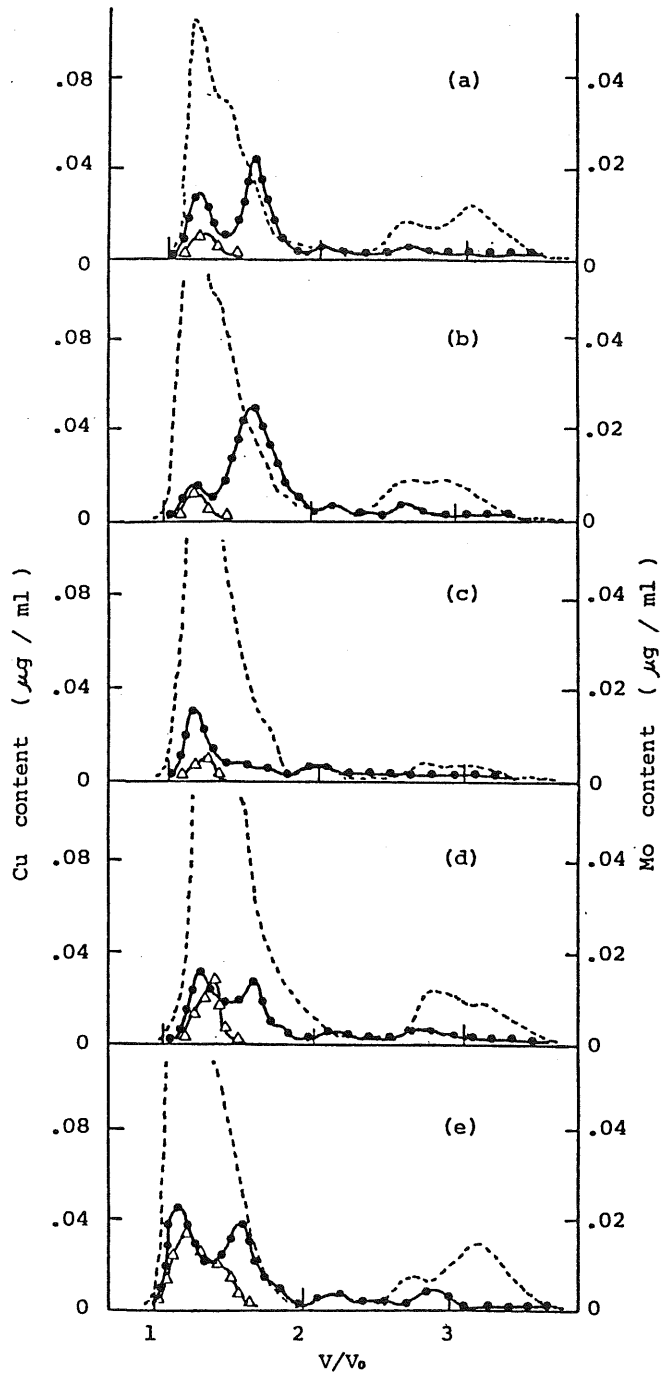


Fig. 1. Sephadex G-75 chromatography of hepatic cytosol from rats receiving: basal diet (a) and diets supplemented with  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  (b),  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  (c),  $\text{MoS}_4^{2-}$  (d) and  $\text{MoO}_4^{2-}$  (e). Content of Cu (—●—) and Mo (—△—) and absorbance at 280 nm (-----) are shown.

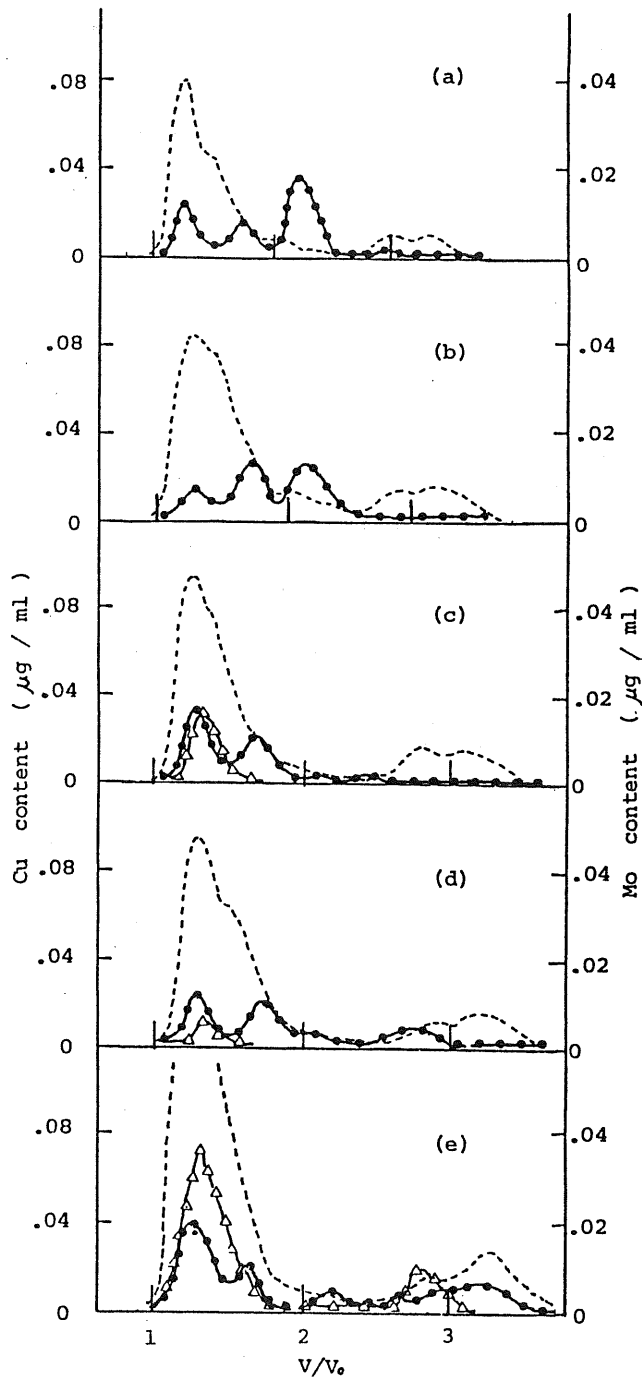


Fig. 2. Sephadex G-75 chromatography of kidney cortex cytosol from rats receiving: basal diet (a) and diets supplemented with  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  (b),  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{S}^{2-}$  (c),  $\text{MoS}_4^{2-}$  (d) and  $\text{MoO}_4^{2-}$  (e). Content of Cu ( $-\bullet-$ ) and Mo ( $-\triangle-$ ) and absorbance at 280 nm (-----) are shown.

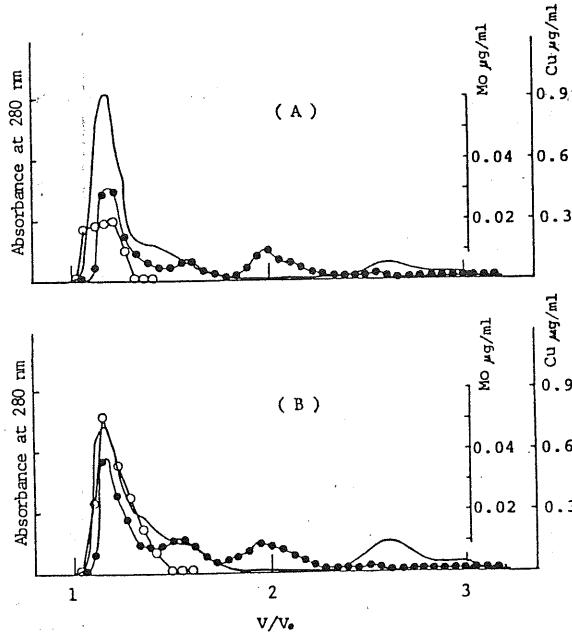


Fig. 3. Sephadex G-75 chromatography of the supernatant fraction from the homogenate of liver from sheep before (A) and after (B) the dietary treatment of  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$ ; Concentration of Cu (—●—) and Mo (—○—) and absorbance at 280 nm (—) are shown.

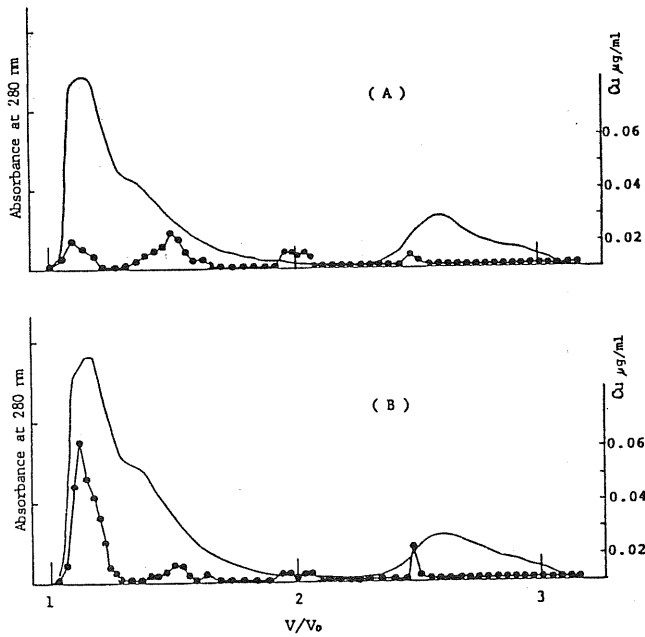


Fig. 4. Sephadex G-75 chromatography of the supernatant fraction from the homogenate of kidney cortex from sheep before (A) and after (B) the dietary treatment of  $\text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$ ; Concentration of Cu (—●—) and absorbance at 280 nm (—) are shown.



でいる。

文 献

1. SUTTLE, N. F. (1974) *Proc. Nutr. Soc.* 33: 299
2. DICK, A. T., D. W. DEWEY and J. M. GAWTHRONE (1975) *J. Agric. Sci. Camb.* 85 : 567
3. SMITH, B. S. W. and H. WRIGHT (1975) *J. Comp. Path.* 78 : 449
4. RAVIN, H. A. (1961) *J. Lab & Clin. Med.* 58 : 161
5. SUTTLE, N. F. and A. C. FIELD (1968) *J. Com. Path.* 78 : 351
6. ISHIDA, N., T. YOSHIKAWA and R. KAWASHIMA (1982) *Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto Univ.* 119 : 23
7. SUTTLE, N. F. (1980) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 35 : 195
8. BREMNER, I. and B. W. YOUNG (1978) *Br. J. Nutr.* 39 : 325
9. BREMNER, I., W. G. HOEKSTRA, N. T. DAVIES and R. B. WILLIAMS (1978) *Trace Element Metabolism in Man and Animals-3*, (ed M. Kirchgessner), Weihenstephan, Fed. Rep. of Germany
10. MASON, J., C. A. KELLEHER and J. LETTERS (1982) *Br. J. Nutr.* 48 : 391
11. MASON, J., M. LAMAND and M. J. HYNES (1983) *J. Inorg. Biochem.* 19 : 153