

# 原子吸光分光分析法による血清銅・亜鉛の 同時測定について

古 野 勝 志

岡山大学温泉研究所 温泉医学部門

(主任 森永 寛 教授)

(1977年1月22日受付)

## 1. 序 言

近年、原子吸光分光分析法の臨床化学検査領域への導入によって、生体試料中の微量金属元素の測定が簡易となり、各種疾患時の生体内微量金属元素の動態に関する研究が行なわれるようになってきた。

銅 (Cu)、亜鉛 (Zn) は、本分析法によると比較的測定感度の高い元素であって、測定法および、それらの臨床的意義に関する報告もふえつつある (FUWA 1964, 大岩 1968, LORBER 1968, ICHIDA 1969, 奥田 1970, HALSTED 1970, PRASAD 1976)。

今回、著者は原子吸光分光分析法による血清銅・亜鉛同時測定の基礎的検討を行ない、その特異性、簡便性と迅速性ならびに精確度を確認し、この方法により、健常人および慢性関節リウマチ患者の血清銅・亜鉛を測定したので、その結果を報告する。

## 2. 装置、試薬

### 2-1. 装置

原子吸光分光光度計 (日立207型)

ランプ : 日立 HLA 型銅中空陰極放電管

日立 HLA 型亜鉛中空陰極放電管

パーナー : プレミックス型パーナー

燃料 : アセチレンガス—空気

記録計 (日立 QPD-54 型)

### 2-2. 試薬

Cu, Zn の各標準溶液は、和光純薬製の原子吸光分析用標準溶液 (1000 PPM) を用い、0.01N-HCl で希釈し両元素とも 0.5 mg/100 ml, 1.0 mg/100 ml, 2.0 mg/100 ml, 3.0 mg/100 ml の保存液を作り、20%グリセリン溶液で10倍に希釈し、50 μg/100 ml, 100 μg/100 ml, 200 μg/100 ml, 300 μg/100 ml を調製した。ブランクは 0.01N-HCl を同様に20%グリセリン溶液で希釈した。

## 3. 血清銅・亜鉛の同時測定法の基礎的検討

3-1. 原子吸光分光光度計の使用条件 アセチレン流量について : Cu, Zn の標準溶液を用いて、空気圧 1.8 kg/cm<sup>2</sup> 流量 13.0 l/min と一定に保ち、アセチレン圧 0.5 kg/cm<sup>2</sup> に固定し、流量を 2.25~4.50 l/min の間で変化させた時の、吸光度におよぼす影響について検討した。両元素とも、アセチレン流量による大きな影響は見られなかった (Fig. 1)。しかし、流量増加に伴いベースラインが、不安定となる傾向を示した。そこで、両元素ともベースライン安定で、炎の良好な 3.0 l/min を選定した。

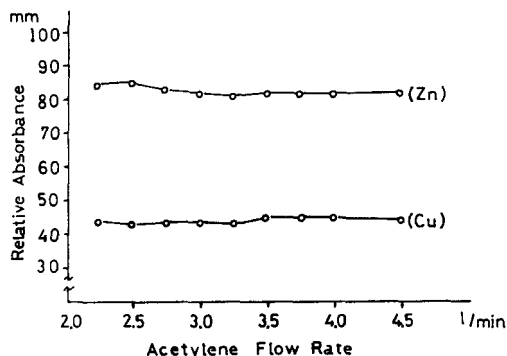


Fig. 1. Effect of acetylene flow rate on the sensitivity of copper and zinc.

Cu : 40 μg/100 ml Zn : 40 μg/100 ml

ランプ電流について : Cu, Zn の標準溶液を用いて、それぞれ測定元素専用ランプの作動電流を、5~20 mA の間で変化させた時の吸光度におよぼす影響について検討した (Fig. 2)。両元素いずれも、ランプ電流が小さくなるに従って、吸光度は増加した。一方、ノイズも大きくなった。そこで、感度最大、ノイズ最小となるように、Cu は 10 mA を、Zn は 9 mA をそれぞれ作動電流として選定した。

3-2. 酸による影響 Cu, Zn の標準溶液を用いて、各

種酸が共存する時の吸光度におよぼす影響について検討した (Table 1). Cu では, 硫酸濃度が10%以上で, 吸光度は減少したが, 5%以下および, 他の酸では, 濃度による著しい影響は見られなかった. Zn では, 硫酸, 塩酸の濃度が, それぞれ10%以上で吸光度は減少し, トリクロル酢酸の濃度10%以上では, 増加する傾向が見られたが, 他では, ほとんど影響は見られなかった.

**3-3. 共存元素の影響** Cu, Zn の標準溶液を用いて, 各種共存元素が吸光度におよぼす影響について検討した (Table 2). Cu, Zn いずれも共存元素による著しい影響はみられなかった.

**3-4. 希釈試験** 血清および20%グリセリン溶液で調製した両元素の標準溶液について, 脱イオン蒸留水で10倍まで希釈した時の吸光度の変化について検討した (Fig.

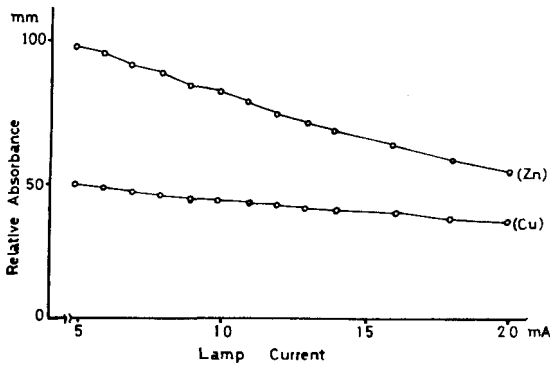


Fig. 2. Effect of lamps current on the sensitivity of copper and zinc. Cu : 40 $\mu$ g/100ml Zn : 40 $\mu$ g/100ml

3 a. b.). 血清および標準溶液とも4~5倍希釈以上で, 直線性を示した. そこで, 血清は5倍希釈を採用した.

**3-5. 標準曲線の作製** 20%グリセリン溶液で調製した Cu, Zn の標準溶液 50 $\mu$ g/100ml, 100 $\mu$ g/100ml, 200

Table 1. Influences of various acids on the absorbance of copper and zinc.

Acids	(%)	Relative absorbance*	
		Cu	Zn
Sulfuric acid	0	50.0	81.0
	0.5	51.0	81.5
	1.0	50.5	82.5
	5.0	48.0	79.0
	10.0	44.0	72.5
	20.0	36.0	47.5
Nitric acid	0	50.5	81.5
	0.5	49.5	81.5
	1.0	50.0	83.0
	5.0	51.0	82.0
	10.0	49.5	82.0
	20.0	47.0	82.0
Hydrochloric acid	0	50.0	81.0
	0.5	53.0	81.0
	1.0	51.0	83.5
	5.0	53.0	81.0
	10.0	47.5	76.0
	18.0	46.0	73.0
Trichloroacetic acid (TCA)	0	51.5	82.0
	0.5	53.0	82.5
	1.0	52.0	82.0
	5.0	55.0	82.0
	10.0	52.0	84.0
	20.0	51.0	88.0

\* Values represented scale reading (mm).  
Cu:40 $\mu$ g/100ml Zn : 40  $\mu$ g/100ml

Table 2. Influences of various cations on absorbance of copper and zinc.

Ions	Amounts of addition (ppm)	Absorbance (mm)	Ions	Amounts of addition (ppm)	Absorbance (mm)
Cu (40 $\mu$ g/100 ml)		50.0	Zn (40 $\mu$ g/100 ml)		81.0
Na	500	51.0	Na	500	81.0
"	4000	49.5	"	4000	77.0
K	500	49.0	K	500	79.0
"	4000	48.5	"	4000	81.5
Zn	500	49.0	Cu	500	79.0
Fe	500	50.0	Fe	500	81.0
Mg	500	46.5	Mg	500	81.5
Ca	500	49.5	Ca	500	79.0
Au	500	49.0	Au	500	80.0
Li	500	49.0	Li	500	81.5
Mn	500	50.0	Mn	500	81.0
Cr	500	49.0	Cr	500	81.0

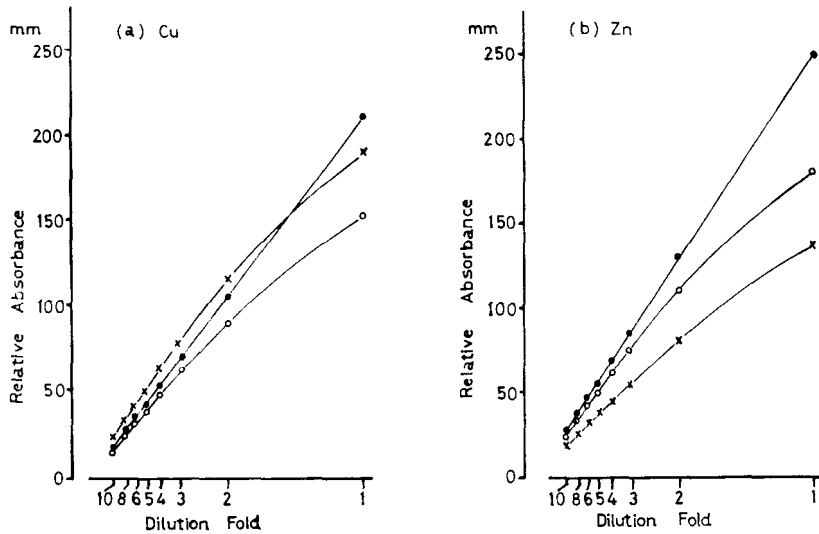


Fig. 3. Relation between absorbance and dilution fold of copper (a), zinc (b) in aq. dist., in 20% glycerine soln. and in serum.  
 —●—: 100 µg/100 ml in aq. dist. —○—: 100 µg/100 ml in 20% glycerine soln.  
 —×—: in serum.

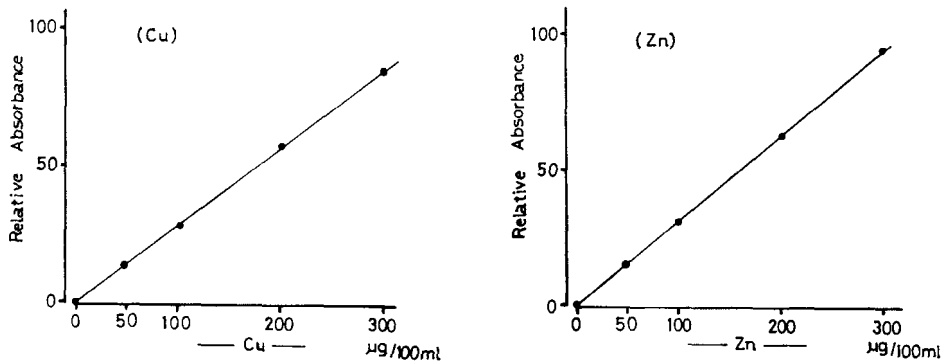


Fig. 4. Standard curve for copper and zinc.

µg/100 ml, 300 µg/100 ml を、それぞれ脱イオン蒸留水で、5 倍希釈した時の吸光度を測定し、標準曲線を作製した (Fig. 4)。Cu, Zn 両元素とも、その曲線は血清中に存在する濃度と思われる範囲内では、直線性を示した。

**3-6. 回収試験** 血清に Cu あるいは Zn を 100 µg/100 ml, 200 µg/100 ml 添加した時の回収率について検討した (Table 3)。Cu では 94.4~104.8%, 平均 100.5%, Zn では 98.1~103.0%, 平均 100.8% であった。

**3-7. 再現性について** 同一血清について、TCA 法 (トリクロル酢酸による除蛋白法)、灰化法 (低温灰化装置による灰化法) および直接法 (この実験で用いた方法)

の 3 方法により Cu, Zn を、各々 15 回連続測定した時の、各々の方法における再現性について検討した (Table 4)。変動係数 (C.V.) は Cu, Zn それぞれ TCA 法で 3.7%, 3.5%, 灰化法で 3.4%, 3.3%, 直接法で 1.3%, 1.7% であった。両元素とも直接法が、これら 3 方法のうちでも最も良好な再現性を示した。

#### 4. 測定試料と測定方法

**4-1. 測定試料** 岡山大学温泉研究所および岡山大学医学部附属病院三朝分院に勤務する職員で、定期健康診断で異常を認めなかった男性 43 例、女性 70 例、計 113 例を

Table 3. Recovery of copper and zinc added to human serum samples.

No.	Cu in serum ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Cu ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )		Recovery (%)	Zn in serum ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Zn ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )		Recovery (%)
		Added	Found			Added	Found	
1	123.8	100.0	224.6	100.8	78.8	100.0	181.8	103.0
2	132.7	100.0	237.5	104.8	103.4	100.0	203.1	99.7
3	178.1	100.0	275.9	97.8	123.1	100.0	224.9	101.8
4	200.8	100.0	295.2	94.4	89.4	100.0	190.4	101.0
5	202.6	100.0	300.4	97.8	84.6	100.0	182.7	98.1
6	145.0	200.0	350.0	102.5	89.4	200.0	294.2	102.4
7	101.5	200.0	304.5	101.5	78.8	200.0	282.8	102.0
8	147.8	200.0	355.7	103.9	74.9	200.0	272.7	98.7
9	129.3	200.0	329.4	100.1	133.3	200.0	338.3	102.5
10	98.9	200.0	301.1	101.1	89.9	200.0	286.7	98.5
Mean (%)				100.5				100.8
S.D. (%)				2.96				1.74

S.D. : Standard Deviation.

Table 4. Reproducibility of TCA-method, ashing-method and direct-method on the determination of copper and zinc in human serum.

No.	Cu in serum ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )			Zn in serum ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )		
	TCA method	Ashing method	Direct method	TCA method	Ashing method	Direct method
1	123.8	125.6	124.7	108.1	103.7	103.4
2	120.5	120.2	124.7	102.6	100.6	102.5
3	120.5	125.6	126.4	102.6	104.3	104.5
4	122.2	120.2	124.7	100.9	105.5	98.5
5	132.1	123.8	128.1	104.5	108.1	102.4
6	123.8	123.8	124.7	102.6	100.6	99.4
7	130.5	122.0	126.4	102.6	100.6	103.0
8	125.5	120.2	126.4	104.5	108.1	99.8
9	133.8	118.3	126.4	104.3	99.7	104.0
10	123.8	127.4	128.1	102.6	100.6	103.0
11	127.2	127.4	124.7	105.3	100.6	102.5
12	123.8	123.8	124.7	113.5	98.7	102.0
13	132.1	118.3	124.7	102.6	106.2	103.0
14	120.5	134.7	128.1	100.7	109.9	104.5
15	132.1	120.2	129.7	111.7	104.3	103.4
Mean	126.1	123.4	125.7	105.2	103.4	102.4
S.D.	4.6	4.2	1.7	3.7	3.4	1.8
Range	120.5 133.8	118.3 134.7	124.7 129.7	100.7 113.5	98.7 109.9	98.5 104.5
C.V.(%)	3.7	3.4	1.3	3.5	3.3	1.7

TCA : Trichloroacetic acid    S.D. : Standard deviation    C.V. : Coefficient of variation.

健常人とし、その肘静脈から採取した血清を測定試料とした。また、岡山大学医学部附属病院三朝分院で、アメリカ・リウマチ協会の診断基準に基づき、慢性関節リウマチと診断された男性19例、女性49例、計68例の血清を測定試料とした。

4-2. 測定方法—(直接法)— 血清、標準溶液およびブランク溶液を各々0.5mlとり脱イオン蒸留水2.0mlを加えて5倍に希釈し、測定用試料とした。原子吸光分光光度計は Table 5 に示す条件に設定した。吸光度は

Table 5. Conditions of copper and zinc determination. (HITACHI MODEL207)

	Cu	Zn
Wavelength (Å)	3247	2139
Lamp current (mA)	10	9
Slit	1	1
Burner (type)	Premix	Premix
Acetylene pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	0.5	0.5
flow rate (ℓ/min)	3.0	3.0
Air pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	1.8	1.8
flow rate (ℓ/min)	13.0	13.0

記録計により比例拡大し、記録紙上にスケール読み(mm)として読み取った。Cu, Znの標準曲線より算出した。

5. 測定結果

5-1. 健常人の場合 血清 Cu は、男性(43例)では  $103.0 \pm 14.5$  (S.D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性(70例)は  $108.7 \pm 19.6$  (S.D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  で女性がやや高値を示したが、両者の間に有意差を認めるに致らなかった ( $t=1.65 < t_{111}(0.05)=1.99$ )。5%棄却限界は、男性、女性それぞれ  $73.1 \sim 132.9 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 、 $69.0 \sim 148.4 \mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。

血清 Zn は、男性(43例)では  $116.2 \pm 18.6$  (S.D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性(70例)では  $110.3 \pm 14.7$  (S.D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  で、男性がやや高値を示したが、両者の間に有意差を認めるに致らなかった ( $t=1.87 < t_{111}(0.05)=1.99$ )。5%棄却限界は男性、女性それぞれ  $77.8 \sim 154.6 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 、 $80.5 \sim 140.1 \mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。

Cu/Zn 比を求めてみると、男性では  $0.89 \pm 0.17$  (S.D.)、女性では  $0.99 \pm 0.25$  (S.D.) で、男性に比べ、女性が有意 ( $p < 0.05$ ) に大であった ( $t=2.31 > t_{111}(0.05)=1.99$ )。5%棄却限界は男性、女性それぞれ  $0.54 \sim 1.24$ 、

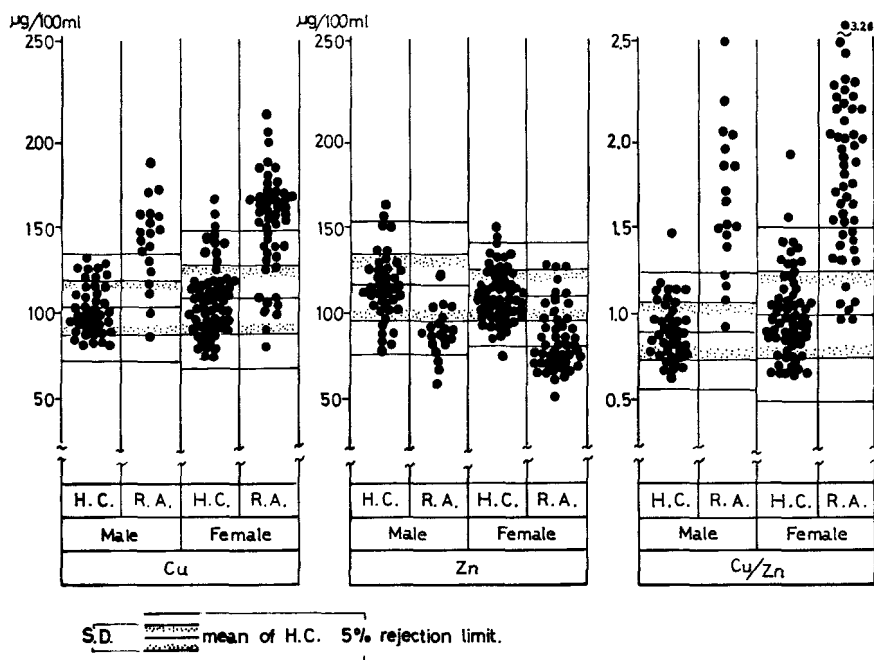


Fig. 5. Concentrations of copper and zinc in serum and Cu/Zn ratio in healthy controls and patients with rheumatoid arthritis. H.C. : Healthy controls. R.A. : Rheumatoid arthritis.

Table 6. Concentrations of Cu and Zn in serum and Cu/Zn ratio in healthy controls and patients with rheumatoid arthritis.

	Sex	Healthy Controls		Rheumatoid Arthritis		Compared with health controls and rheumatoid arthritis	
			(N)		(N)	(t)	(p)
Cu	Male	103.0±14.5	43	141.7±25.2	19	7.64	p<0.001
	Female	108.7±19.6	70	154.1±29.7	49	10.05	p<0.001
	Sex differences (t) (p)	1.65 N.S.		1.61 N.S.			
Zn	Male	116.2±18.6	43	89.1±14.5	19	5.63	p<0.001
	Female	110.3±14.7	70	86.7±18.1	49	7.83	p<0.001
	Sex differences (t) (p)	1.87 N.S.		0.52 N.S.			
Cu/Zn	Male	0.89±0.17	43	1.64±0.43	19	9.89	p<0.001
	Female	0.99±0.25	70	1.82±0.48	49	12.29	p<0.001
	Sex differences (t) (p)	2.31 p<0.05		1.43 N.S.			

Values represented the concentrations of Cu and Zn in serum (Mean±S.D. µg/100ml)

N.S. : Not Significant, N : Number of individuals.

0.48~1.50であった (Fig. 5, Table 6).

5-2. 慢性関節リウマチ患者の場合 血清 Cu は、男性 (19例) では141.7±25.2 (S.D.) µg/100ml, 女性 (49例) では154.1±29.7 (S.D.) µg/100ml で、女性にやや高値を示す傾向が窺われたが、両者の間には有意な差は認められなかった ( $t=1.61 < t_{66} (0.05) = 2.00$ ).

血清 Zn は、男性 (19例) では89.1±14.5 (S.D.) µg/100ml, 女性 (49例) では86.7±18.1 (S.D.) µg/100ml となり、Cu とは逆に男性にやや高値を示す傾向が窺われたが、両者の間には有意な差は認められなかった ( $t=0.52 < t_{66} (0.05) = 2.00$ ).

健常人と比較すると、慢性関節リウマチ患者は、血清 Cu では男性、女性ともに有意 ( $p < 0.001$ ) に高値を示した (男:  $t=7.64 > t_{60} (0.001) = 3.46$ , 女:  $t=10.05 > t_{117} (0.001) = 3.37$ ). Zn では男性、女性とも有意 ( $p < 0.001$ ) に低値を示した (男:  $t=5.63 > t_{60} (0.001) = 3.46$ , 女:  $t=7.83 > t_{117} (0.001) = 3.37$ ).

慢性関節リウマチ血清の Cu/Zn 比を求めてみると、男性では1.64±0.43 (S.D.), 女性では1.82±0.48 (S.D.) で、女性が大きい傾向が窺われたが、両者の間には有意な差は認められなかった ( $t=1.43 < t_{60} (0.05) = 2.00$ ). 健常人と比較すると、慢性関節リウマチ患者は男性、女性ともに有意 ( $p < 0.001$ ) に大であった (男:  $t=9.89 > t_{60} (0.01) = 3.46$ , 女:  $t=12.29 > t_{117} (0.001) = 3.37$ ).

慢性関節リウマチ患者の場合、血清 Cu は男性では、

19例中13例 (68%), 女性では、49例中30例 (61%) がそれぞれ健常人の5%棄却限界の上限値以上の値を示した。血清 Zn は男性では、19例中3例 (16%), 女性では、49例中23例 (47%) がそれぞれ健常人の5%棄却限界の下限値以下の値を示した。Cu/Zn 比は、男性では、19例中14例 (74%), 女性では49例中35例 (71%) がそれぞれ健常人5%棄却限界値以上であった (Fig. 5, Table 6).

## 6. 考 按

6-1. 原子吸光分光分析法を用いる血清 Cu, Zn の臨床化学的同時測定は、共存元素、酸、等の化学的因子に影響されることが少なく、特異性に優れ、また、測定感度も比較的高い。

生体内 Cu, Zn の総含有量は成人において、Cu では約100mg, Zn では、その20倍の約2.0g と推定されている (UNDERWOOD 1971) が、血清中の含量では、両元素とも50~200µg/100ml で、ほぼ同濃度範囲にあるため、直接法で希釈した同一血清試料を用い、測定ホローカソードランプと波長を変えるだけで、同時測定することができる。

血清を脱イオン蒸留水で希釈した場合、4~5倍希釈以上ならば両元素とも、吸光度と希釈倍率の間に直線関係が得られる。室温で血清とほぼ等しい粘度を示すと言われている20%グリセリン溶液 (奥田1968, 1970) を用いて調製した、標準溶液について希釈を行った場合も、

血清希釈時と同様の結果が得られた。直接法では、測定試料溶液の粘度の影響はアトマイザーを通過する試料量や、噴霧効果などに関係するため、その補正は重要であり、イオンフリー蛋白、あるいはアミノ酸溶液を用いた補正の報告もある (ICHIDA 1969) が、安価、調製が簡単で、しかもブランク値に影響しない等の点からみて、グリセリンの使用が最も適当であろう。

回収率は、Cuで100.5%、Znで100.8%、また、TCA除蛋白法、灰化法の他の前処理法による測定値に比べて、著明な差はなく、再現性においては、直接法が最も良好であった。

以上の点からみて、本測定法は少量の血清試料を用いて、より簡便、迅速かつ精確に血清 Cu, Zn を同時に測定することができ、臨床化学分析測定法として有用である。

## 6-2. 血清銅値

6-2-1. 健常人の血清 Cu, Zn の測定値を諸家の報告から引用し、比較したが、ほぼ一致する値であった (Table 7)。若干の差異は、測定法および測定条件の影響によるものと思われる。

健常人における性差に関しては、血清 Cu について山本 (1959)、清水 (1969)、McMURRAY ら (1975)、FISHER ら (1976) らは、それぞれ有意な差はないが、女性が高値を示す傾向にあるとしている。

血清 Cu は、その約95%が血清蛋白の  $\alpha_2$  グロブリン分画中のセルロプラスミンと強く結合した銅複合蛋白として存在し、他はアルブミンと緩く結合している (GUBLER ら, 1957, 清水 1961, 池田 1961)。そのため、血清 Cu の変動はセルロプラスミン値の影響によるところが極めて大きい。女性において経口避妊薬服用、妊娠の持続にともない血清 Cu, セルロプラスミン値は有意に上昇する (林 1964, HAMBIDGE ら 1974, McMURRAY ら 1975)。更に、寺田 (1974) は、エストロゲンが血清 Cu, セルロプラスミン値を上昇せしめることを報告している。一方、アンドロゲンでもその作用はあるが、その程度はエストロゲンに比べて軽度である (STUDNITZ ら 1957)。以上の点を考慮すれば、女性が血清 Cu の高値を示す傾向にあるのは、性ホルモンの影響は無視できない一因であろう。一方、池田 (1961) は慢性出血性貧血で、血清 Cu が高値を示すことから、女性の場合の血清 Cu の増加は、月経の影響による可能性もあると推論している。

6-2-2. 慢性関節リウマチ患者では、その血清蛋白中の  $\alpha_2$  グロブリン分画の増加 (石橋 1959, 花籠 1964, 清水 1969) と、それにもない同分画中のセルロプラスミン値の上昇 (池田 1961, BAJPAYEE 1975) が、血清 Cu の高値を示す結果と思われる。また、慢性関節リウマチでは、多くの場合貧血を合併していることも、その理由の

Table 7. Normal value of serum (plasma) Cu and Zn various reports.

Cu					Zn				
Author	Year	Method	Sex	Mean $\pm$ S.D. ( $\mu$ g/100ml)	Author	Year	Method	Sex	Mean $\pm$ S.D. ( $\mu$ g/100ml)
山本	1959	S	M	89.9 $\pm$ 14.8	岡	1960	S	M	137 $\pm$ 22
			F	99.9 $\pm$ 12.6				F	136 $\pm$ 19
清水	1969	S	M	105 $\pm$ 18	HALSTED	1970	AAS	M	96 $\pm$ 13
			F	110 $\pm$ 20				F	97 $\pm$ 11
土田	1971	AAS	M	113 $\pm$ 17	土田	1971	AAS	M	122 $\pm$ 21
			F	122 $\pm$ 16				F	120 $\pm$ 20
McMURRAY	1975	AAS	M	106.8 $\pm$ 7.7	玉利	1971	AAS	M	115 $\pm$ 20
			F	125.5 $\pm$ 11.4				F	109 $\pm$ 22
竹内	1976	AAS	M	105	竹内	1976	AAS	M	99
			F	107				F	88
FISHER	1976	AAS	M	104 $\pm$ 14.0	FISHER	1976	AAS	M	109 $\pm$ 14.2
			F	113 $\pm$ 12.6				F	94 $\pm$ 9.1
This Report	1977	AAS	M	103.0 $\pm$ 14.5	This Report	1977	AAS	M	116.2 $\pm$ 18.6
			F	108.7 $\pm$ 19.6				F	110.3 $\pm$ 14.7

S : Spectrophotometry    AAS : Atomic Absorption Spectrophotometry    M : Male    F : Female

一つであろう。

### 6-3. 血清亜鉛値

6-3-1. 血清 Zn について FISHER ら (1976) は、正常人で女性は男性に比べて、有意に低値を示したと報じ、土田 (1971)、玉利 (1971) は有意な差はないが、女性が低値を示す傾向にあるとしている。また、HALSTED ら (1970) は、ほとんど性差は認められなかったと報告している。

血清 Zn は HIMMELHOCH ら (1966)、PARISI ら (1970) によれば  $1/4 \sim 1/3$  が、BOYETT ら (1970)、GIROUX ら (1975) は  $1/7 \sim 1/5$  がそれぞれ  $\alpha_2$  マクログロブリン ( $\alpha_2M$ ) と強く結合し、残りは、ほとんどアルブミンと緩く結合した状態で存在すると報告している。一方、徳岡 (1957)、玉利 (1971) は、悪性腫瘍患者では血清 (漿) Zn および血清アルブミンの低下があり、血清 Zn とアルブミンの間には、正の相関関係が認められたとし、更に、BOYETT ら (1970) は、肝硬変患者について血清 Zn の分画測定を行ない、 $\alpha_2M$  量および  $\alpha_2M$  結合 Zn はほとんど不変であったが、アルブミン量およびアルブミン結合 Zn は正常者に比べて、それぞれ有意に低下していたと報告している。慢性関節リウマチにおいても、血清アルブミン量の低下が認められており (石橋 1959, 花籠 1964, 清水 1969)、著者の慢性関節リウマチ患者で血清 Zn の低下は、血清アルブミン低下もその一因と思われる。

6-3-2. NIEDERMEIER ら (1971) は、リウマチ患者で血清 Zn の低下と、関節液中 Zn の上昇を、徳岡 (1957)、松本ら (1969) は悪性腫瘍組織中の Zn 含有量は、正常組織に比べて有意に高いことを指摘している。高杉ら (1969) は  $^{65}Zn$  を用いて、癌患者では白血球への Zn 摂取率の増加が起こることを報告している。すなわち、慢性関節リウマチ患者での血清 Zn の低下は、炎症組織への Zn 取込みが亢進している結果とも考えられよう。

6-4. Cu/Zn 比 血清 Cu, Zn 両元素の相関関係について検討するため、Cu/Zn 比を算出したところ、健常人において、血清 Cu, Zn はいずれも有意な性差は認められなかったにもかかわらず、Cu/Zn 比では、女性が男性に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に大であった。これは、Cu は有意ではないが女性が高値を示し、Zn は有意ではないが女性が低値を示しており、両者の比を算出することにより、その差が一層明確に現われたものである。慢性関節リウマチ患者でも、血清 Cu, Zn を単独で比較した場合より、Cu/Zn 比を求めることにより、健常人との差がより明確となった。

高野ら (1968)、玉利 (1971) は、癌疾患において、癌の進行につれて Cu/Zn 比が上昇する傾向にあるとし、

FISHER ら (1976) は、肉腫において Cu/Zn 比は、原発性骨肉腫より転移性骨肉腫の方が有意に高値を示すと報告している。

今後、各種疾患について、血清 Cu, Zn および Cu/Zn 比を求め、比較検討すれば、更に興味ある結果が得られることと思われる。

## 7. 結 語

原子吸光分光光度計 (日立 207 型) を使用し、血清 Cu, Zn の同時測定の基礎的条件を検討した。また、健常人 113 例 (男性 43 例, 女性 70 例)、慢性関節リウマチ患者 68 例 (男性 19 例, 女性 49 例) の血清 Cu, Zn の同時測定を行った。その成績は以下の如くであった。

①アセチレン流量  $3.0 \text{ l/min}$ 、ランプ電流は Cu で  $10 \text{ mA}$ 、Zn で  $9 \text{ mA}$  をそれぞれの測定条件とした。

②共存元素、酸の化学的因子の影響は少なく、測定特異性が高いことが認められた。

③両元素の標準溶液は、20% グリセリン溶液を用いて調製し、血清、標準溶液とも  $4 \sim 5$  倍希釈以上で、直線性を示したので 5 倍希釈を選定した。

④回収率は Cu で  $100.5\%$ 、Zn で  $100.8\%$  であった。再現性は同一血清を用い、TCA 除蛋白法、灰化法、直接法の 3 法を比較し、両元素とも直接法が最も良好であった。

⑤健常人 113 例 (男性 43 例, 女性 70 例) の血清 Cu は、男性、 $103.0 \pm 14.5$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性、 $108.7 \pm 19.6$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。血清 Zn は、男性、 $116.2 \pm 18.6$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性、 $110.3 \pm 14.7$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。Cu, Zn いずれも有意な性差は認められなかった。

Cu/Zn 比は男性、 $0.89 \pm 0.17$  (S. D.)、女性、 $0.99 \pm 0.25$  (S. D.) で、女性が男性に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に大であった。

⑥慢性関節リウマチ患者 68 例 (男性 19 例, 女性 49 例) の血清 Cu は男性、 $141.7 \pm 25.2$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性、 $154.1 \pm 29.7$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。血清 Zn は男性、 $89.1 \pm 14.5$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、女性、 $86.7 \pm 18.1$  (S. D.)  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  であった。Cu, Zn いずれも有意な性差は認められなかった。Cu/Zn 比は男性、 $1.64 \pm 0.43$  (S. D.) 女性、 $1.82 \pm 0.48$  (S. D.) であり、有意な性差は認められなかった。

健常人に比べ、慢性関節リウマチ患者の血清 Cu は高値を、血清 Zn は低値を示し、いずれも有意差 ( $p < 0.001$ ) が認められた。また、Cu/Zn 比でも有意 ( $p < 0.001$ ) に大であった。

慢性関節リウマチ患者の血清銅・亜鉛値は、それぞれ単独で評価するより、Cu/Zn 比を求めることにより、



健康人との間に一層明確な差が認められることを知った (Fig. 5)。

### 文 献

- BAJPAYEE, D. P. (1975) Significance of plasma copper and ceruloplasmin concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.*, **34**, 162-165.
- BOYETT, J. D., SULLIVAN, J. F. (1970) Distribution of protein-bound zinc in normal and cirrhotic serum. *Metabolism*, **19**, 148-157.
- FISHER, G. L. *et al.* (1976) Copper and zinc levels in serum from human patients with sarcomas. *Cancer*, **37**, 356-363.
- FUWA, K., *et al.* (1964) Determination of zinc in biological materials by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.*, **36**, 2407-2411.
- GIROUX, E. L. (1975) Determination of zinc distribution between albumin and  $\alpha_2$ -macroglobulin in human serum. *Biochem. Med.*, **12**, 258-266.
- GUBLER, C. J., LAHEY, M. E., CARTWRIGHT, C. E., WINTROBE, M. M. (1957) Studies on copper metabolism. IX. The transpotation of copper in blood. *J. Biol. Chem.*, **224**, 405-413.
- 林 正 (1964) 産科領域における血清銅と血清Ceruloplasmin に関する研究. 昭和医誌, **24**, 233-247.
- HALSTED, J. P., SMITH, J. C. (1970) Plasma zinc health and disease. *Lancet*, **1**, 322-324.
- 花籠良一 (1964) リウマチ性疾患の血清蛋白像並びに血清糖蛋白の臨床的研究. 特に泉浴と血清蛋白像. リウマチ, **5**, 38-59.
- HAMBIDGE, K. M., DROEGEMUELLER, W., FACOG, M. D. (1974) Changes in plasma and hair concentrations of zinc, copper, chromium and manganese during pregnancy. *Obstetrics and Gynecol.* **44**, 666-672.
- HIMMELHOCH, S. R. *et al.* (1969) Spectrographic and chromatographic resolution of metalloproteins in human serum. *Biochemistry*, **5**, 2523-2530.
- 池田千之助 (1961) 各種疾患における Ceruloplasmin 値及びその変動について. 昭和医誌, **21**, 746-754.
- 石橋丸応 (1959) 温泉医学領域に於ける口紙分析法の研究温泉入浴と血清蛋白分層の変動. 岡大温研報, **24**, 54-79.
- ICHIDA, T., NOBUOKA, M. (1969) Determination of serum copper with atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chim. Acta*, **24**, 299-303.
- KENNEDY, A. C., *et al.* (1975) Zinc: Its relationship to osteoprosis in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheum.*, **4**, 243-245.
- LAHEY, M. E. *et al.* (1953) Studies on copper metabolism. VI. Blood copper in normal human subjects. *J. Clin. Invest.*, **32**, 322-328.
- LIDERMAN, R. D., CLARK, M. L., COIMORE, J. P. (1971) Influence of age and sex on plasma and red cell zinc concentrations. *J. Gerontol.*, **26**, 358-363.
- LORBER, A., CUTLER, L. S., CHANG, C. C. (1968) Serum copper levels in rheumatoid arthritis. : Relationship of elevated copper to protein alterations. *Arthritis Rheum.*, **11**, 65-71.
- MCMURRAY, W. *et al.* (1975) Urinary copper excretion in rheumatoid arthriits. *Rheumatol. Rehabil.*, **14**, 206-207.
- 松本裕之, 常松 潔, 白石忠雄 (1969) 胃癌組織の亜鉛量, 医学のあゆみ, **68**, 168-169.
- NIEDERMEIER, W., GRIGGS, J. H. (1971) Trace metal composition of synovial fluid and blood serum of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chron. Dis.*, **23**, 527-536.
- 岡 豊 (1960) 肝機能と亜鉛代謝の関係についての臨床的並びに実験的研究. 日本内科誌, **49**, 1030-1038.
- 大岩幸一郎, 木村多恵子, 牧野秀夫, 奥田光夫 (1968) 原子吸光分析法による血清および血球中亜鉛の定量. 分析化学, **17**, 810-815.
- 奥田 稔, 笹木 浩 (1968) 原子吸光分析法による Ca 定量法. 標準化の検討を中心に. 臨床病理, **17**, 380-384.
- 奥田 稔 他 (1970) 原子吸光分光分析による血清鉄, 銅の定量法, 最新医学, **25**, 1812-1817.
- PARISI, A. F., VALLEE, B. L. (1970) Isolation of a zinc  $\alpha_2$ -macroglobulin from human serum. *Biochemistry*, **9**, 2421-2426.
- PRASAD, A. S., OBERLEAS, D., HALSTED, J. A. (1965) Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 508-516.
- PRASAD, A. S. *et al.* (1976) Trace elements in sickle cell disease. *J. A. M. A.*, **235**, 2396-2398.

- 清水盈行, 八上亨司, 池田千之助, 桑田良英 (1961) Ceruloplasmin, 最新医学, **16**, 122-125.
- 清水盈行 (1969) 銅——その数値をどう読むか——日本臨床, **27**, 891-898.
- STRAIN, W.H., HIRSH, F.S., MICHEL, B. (1975) Increased copper/zinc ratios in acrodermatitis enteropathica. *Lancet*, **1**, 1196-1197.
- STUDNITZ, W.V., NYMAN, M. (1957) Effect of androgens on  $\alpha_2$ -globulin in woman. *J. Clin. Endocrinol.*, **17**, 910-912.
- 寺田道弘 (1974) Ceruloplasmin の合成と機能に関する研究. 昭和医誌, **34**, 115-123.
- 高杉年雄, 白石忠雄, 常松 潔, 松本裕之, 淵田正広, 棟 良夫, 石川一也, 荒川鎮明 (1967) 悪性腫瘍における亜鉛代謝の研究 (第3報) 第64回日本内科学会講演要旨, 863-864.
- 徳岡俊次 (1957) 悪性腫瘍患者の亜鉛代謝, 最新医学, **12**, 771-781.
- 高野喜久雄, 只野寿太郎, 齊藤正行, 片山敬子, 平沢征人 (1968) 癌患者の血清銅および亜鉛について. 癌の臨床, **15**, 797-800.
- 玉利尚之 (1971) 諸種疾患患者の血漿亜鉛および銅に関する知見. ことに悪性腫瘍について. 九州歯会誌, **24**, 612-648.
- 土田雅通 (1971) 癌患者の血中銅および亜鉛に関する研究. 第2報, 全血, 血漿, 赤血球ならびに白血球中銅ならびに亜鉛に関する知見. 殊に口腔癌および胃癌について. 九州歯会誌, **25**, 215-249.
- 竹内富美子, 岩在霽子 (1976) 人血清中の銅および亜鉛の正常値について. 東女医大誌, **46**, 583-587.
- UNDERWOOD, E.J. (1971) Trace elements in human and animal nutrition, 3rd. ed. New York Academic Press. pp 59 and 209.
- 山本泰久 (1959) 関節リウマチの貧血に関する臨床的研究, 岡大温研報, **26**, 31-49.

#### DETERMINATION OF COPPER AND ZINC IN SERUM BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY.

by Katsushi FURUNO (Director : Prof. H. MORINAGA) Division of medicine Institute for Thermal Spring Reserch, Okayama University.

*Abstract.* Copper (Cu) and Zinc (Zn) in serum

of 113 healthy controls (43 males and 70 females) and of 68 patients with rheumatoid arthritis (19 males and 49 females) were determined using a HITACHI MODEL 207 atomic absorption spectrophotometer. Wavelength and lamps current of Cu and Zn were setted at 3247 Å, 2139 Å, and 10mA, 9mA respectively. Flow rate of acetylene and air were setted at 3.0 l/min, and 13.0 l/min. The stock standard solutions of Cu and Zn were 0.5 mg, 1.0mg, 2.0mg and 3.0mg per 100ml in 0.01 N-HCl.

For working standard solutions, these stock standard solutions were diluted to 50 µg/100ml, 100 µg/100 ml, 200 µg/100 ml and 300 µg/100ml with 20% glycerine. Serum and working standard solutions of Cu and Zn were diluted five fold with deionized distillation water, then aspirated directly into the burner. The relative absorbance was expressed as scale reading by a HITACHI MODEL QPD-54 recorder. Various acids and other elements had few influences on the determinations of Cu and Zn. The mean recovery rate of Cu and Zn in serum were 100.5% and 100.8% respectively.

By this method, the levels of Cu and Zn in healthy controls were 103.0±14.5 (S.D.), 116.2±18.6 (S.D.) µg/100ml in males and 108.7±19.6 (S.D.), 110.3±14.7 (S.D.) µg/100ml in females respectively. No sex difference were observed. The ratio of Cu and Zn (Cu/Zn ratio) of healthy controls were 0.89±0.17 (S.D.) in males and 0.99±0.25 in (S.D.) females. The sex differences of Cu/Zn ratio were statistically significant (p<0.05).

The levels of Cu and Zn in rheumatoid arthritis were 141.7±25.2 (S.D.), 89.1±14.5 (S.D.) µg/100 ml and 154.1±29.7 (S.D.), 86.7±18.1 (S.D.) µg/100ml in females respectively. No sex differences were observed.

The Cu/Zn ratio were 1.64±0.43 (S.D.) in males and 1.82±0.48 (S.D.) in females, wich showed no sex differences. In patients with rheumatoid arthritis, serum Cu levels were significantly higher (p<0.001) and serum Zn levels were significantly lower (p<0.001) than in healthy controls in both sexes.

The Cu/Zn ratio were significantly higher ( $p < 0.001$ ) rheumatoid arthritis than in controls. The serum Cu in 13 of 19 males (68%), and 30 of 49 females (61%), with rheumatoid arthritis were shown to be above the upper limit of 5% rejection limit in healthy controls. The serum Zn in 3 of 19 males (16%), and in 24 of 49 (47%) with rheumatoid arthritis were shown to be below the lower limit 5% rejection limit in healthy con-

trols.

The Cu/Zn ratio in rheumatoid arthritis, in 14 of 19 males (74%), and in 35 of 49 females (71%) were shown to be above the upper limit of 5% rejection limit in healthy of males and females. So, differences in Cu/Zn ratio between healthy controls and rheumatoid arthritis were proved to be more pronounced.