

微量栄養素としてのクロムに関する研究

和田 攻

(東京大学医学部衛生学教室*)

Studies on the Function of Chromium as a Trace Nutrient

Osamu WADA

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Chromium is intimately related to glucose and lipid metabolism. Chromium deficiency is known to impair glucose tolerance and raise serum cholesterol levels in animals, and many studies in humans have suggested that dietary supplementation with this trace element might improve glucose tolerance and lower cholesterol.

Glucose tolerance factor (GTF), a trivalent chromium compound naturally occurring in brewer's yeast, is supposed to be the responsible chromium compound for the activity. Although the structure of GTF is considered to be a nicotinic acid-chromium axis with ligands of glutamic acid, glycine and cysteine, GTF has not been purified completely.

In the course of study on the metabolism of chromium in the body, we purified a low-molecular-weight chromium-binding substance (LMCr) from liver of dogs. LMCr was identified to be an anionic, organic chromium compound with a molecular weight of 1500. LMCr showed a lower acute toxicity in mice and had a higher rate of urinary clearance in rabbits than Cr^{6+} or Cr^{3+} inorganic salts. So, we supposed that LMCr plays an important role in the detoxification and excretion of chromium in mammals.

In the next study, we tried to purify GTF from bovine colostrum and rabbit liver, and isolated a biologically active, low molecular-weight chromium-binding substance (LMCr-GTF) from both materials.

The purified LMCr-GTF appeared to be an anionic, organic chromium compound with a molecular-weight of 1500. It contained aspartic acid, glutamic acid, glycine and cysteine in a ratio of 5 : 4 : 2 : 1.

*所在地：東京都文京区本郷7丁目3-1 (〒113)

本稿は第7回微量栄養素研究会シンポジウムにおいて行われた特別講演の内容をとりまとめたものである。

Furthermore, it stimulated the rates of both C^{14} -glucose oxidation and H^3 -glucose conversion into lipid in rat epididymal adipocytes at chromium concentrations greater than 1.5ng/ml in relation to insulin action. The LMCr-GTF lost its activity almost completely when chromium was deprived and the recombination of Cr^{3+} into apo-LMCr resulted 90% recovery of its original activity.

In the near future, LMCr-GTF might be used as an anti-diabetic and an anti-atherosclerotic drug. However, the safety and efficacy of chromium compounds must be completely examined before its usage.

1. クロムについて

クロムは、原子番号24、原子量52の元素で、 -2 から $+6$ までの酸化数を取り、自然界では $+2$ 、 $+3$ 、 $+4$ 価の型がみられるが、 $+2$ 価クロムは不安定で、また 6 価クロムも生体内では容易に還元され 3 価の安定な型で存在する。

わが国では、 6 価クロム事件以来、クロムは毒性の面のみが強調され、確かに皮膚潰瘍、皮膚炎、鼻中隔穿孔、肺癌を起こすことは証明されているが、近年、その微量栄養素としての役割が注目を集めている。

2. 栄養素としてのクロムの認識

1950年代になって、クロム欠乏実験が行われるようになり、クロム欠乏動物では耐糖能の低下がみられること、さらに食餌中に無機のクロム (Cr^{+3}) を添加するか、後述の耐糖因子 (glucose tolerance factor ; GTF) を添加すると、耐糖能が正常化することから、クロムは糖代謝に関与する栄養素であることが認識された。¹⁾

ヒトの糖尿病についても1960年代より、クロム添加実験が行われ、食物中に Cr^{+3} として 1日 $150\mu g$ 程度の添加で、多くの糖尿病患者の耐糖能の改善がみられている。^{1,5)} その代表的な報告を Table 1 に

Table 1. Effect of GTF (Cr) supplementation on glucose tolerance tests^{1,5)}

	Mean plasma glucose levels (mg/dl)			Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
	0 hr	1 hr	2 hr		
before GTF(11)	106 ± 4	201 ± 8	178 ± 8	245 ± 9	121 ± 8
After GTF(9)	99 ± 4	162 ± 11	132 ± 5	205 ± 10	112 ± 12
Significance	NS	< 0.01	< 0.001	< 0.01	NS

	Mean serum insulin levels (microunits/ml)		
	0 hr.	1 hr.	2 hr.
before GTF	24 ± 6	78 ± 17	118 ± 17
After GTF	26 ± 12	70 ± 8	83 ± 8

Mean ± S.E.; number of tests in parentheses. Supplement: 4 gm Yeastamin/day. GTT: 100 gm oral load.

示す。⁵⁾しかし、全ての報告が有効性を示していないことも事実であり、すべての耐糖能異常はクロム欠乏のみでないことは明らかである。

ヒトでクロム欠乏が明らかに耐糖能低下を来たすことを明らかにしたのは、近年、外科領域で広く用いられている高カロリー輸液による糖尿病の出現と、クロム添加によるその是正である。現在まで3例²⁻⁴⁾ほどの報告があるが、腸切除を受けた患者で長期(5ヶ月～5年)に亘り高カロリー輸液を受け、血糖上昇、体重減少がみられインスリン療法に反応し難く血清クロム値は0.55ng/ml(正常値の1/10～1/20)と低下、塩化クロム250 μ g/日の添加で改善がみられている(Table 2)。

Table 2. Chromium deficiencies (diabetes mellitus) due to intravenous hyperalimentation and their recovery by chromium administration

Reporters	Cases	Serum Cr	Cr therapy	Fasting blood sugar (mg/dl)	Insulin required (IU/day)
Jeejeebhoy ²⁾ (1977)	35, F Before After	0.55ng/ml 5 ~ 10	250 μ g $\times$ 14days	75 ~ 175 73 ~ 110	45 0
Freund ³⁾ (1979)	45, F Before After	0.5 μ g/dl	150 μ g $\times$ 55days	200 ~ 600 73 ~ 200	20 ~ 25 0
Brown ⁴⁾ (1986)	63, F Before After	0.1 μ g/dl 1 μ g/dl	200 μ g $\times$ 14days	120 ~ 300 100 ~ 110	30 0

一方、クロム欠乏動物で高コレステロール血症がみられ、クロム投与で改善することも明らかにされた。ヒトの糖尿病および高コレステロール血症患者に対し、GTF含有酵母を1日9g、8週間経口投与した研究で、血糖のみならずコレステロールの低下もみられ、とくにコレステロールの前値が300mg/dl以上の者で、その低下が顕著であった。また、高比重リポ蛋白(HDL)コレステロール値の上昇の報告も多い。(Table 3)⁶⁾

Table 3. Effect of GTF(Cr) supplementation on serum lipids⁶⁾

Lipids	n	Before GTF	After GTF	Difference
Cholesterol (mg/dl)	44	225 $\pm$ 8	204 $\pm$ 8	- 21 *
HDL cholesterol	45	53 $\pm$ 2	58 $\pm$ 2	+ 5.0 *

* $p < 0.01$, Supplement : brewer's yeast power 9g/day $\times$ 8weeks

以上のように、クロム、とくにGTFは、ヒトの糖および脂質代謝に深く関わっていることは確か

ようである。しかも、いずれも成人病との関係が深く、米国での体内クロム量測定の結果、クロム含量は、出産時に最も高く、加齢と共に肺以外の臓器のクロム含量は低下すること、米国人のクロム含量は、他の国の人々に比べ低いこと、食品の精製によって食物中のクロム量は著しく低下することから、文明国での成人病増加の原因の一つとして、栄養素としてのクロムの摂取量の低下が挙げられるとの主張もみられている。すなわち、食事中のクロムの低下と加齢によるクロム低下、さらには糖分過剰摂取によるクロムの消費（糖負荷で体内クロムは血中へ動員され、さらに尿に排泄されることが知られている）が重なって耐糖能の低下と高インスリン血症をきたし、これが成人発症型糖尿病および高コレステロール血症などの脂質代謝異常をきたし、動脈硬化による成人病の増加をもたらすというものである。⁷⁾

3. クロム含有耐糖因子 (GTF) について

動物実験で無機クロムよりもクロム含有率の高いビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* など) 投与の方が耐糖能改善により効果のあること、食品中のクロムとビール酵母のグルコース利用率の関係を調べると全クロムよりも50% アルコール抽出クロムの方が相関が大であることなどから、特定の形態のクロムが耐糖因子と考えられ、おおそ分子量300~1,500で陽イオン性クロム形態を含有し、ニコチン酸、グルタミン酸、グリシンおよびシステインを多く含む物質がGTFとして想定されている。⁹⁾しかし各国の研究室での努力にもかかわらず、今のところ精製されていない。また、GTFの有効性の研究は、全てビール酵母の50%~90% アルコール抽出乾燥粉末を用いている。

GTFの効果判定には、①クロム欠乏ラットの副睾丸脂肪細胞を用いて¹⁴C-グルコースのCO₂へのとり込みをみる方法と②ビール酵母をワールブルグ管で培養し発生するCO₂を測定する方法がある。¹⁾

GTFは体内でも無機クロムより合成されると考えられているが、遺伝的糖尿病マウスでは無機クロムは全て無効で、GTFは有効であった¹⁰⁾ことより、この動物では体内でのGTFの合成が欠如しているとも推定されており、ヒトの一部の糖尿病でも同様の欠如がある可能性がある。

GTFはインスリンの存在下でのみインスリン作用の増強をきたす。また無細胞系ではその効果はない。これらのことからGTFの作用機序は①インスリンの機能形態の安定性増強、②インスリナーゼ阻害、③細胞レセプターでのインスリンの結合ないし細胞内とり込みの増強などが考えられているが詳細は不明である。

酵母を用いたグルコースのCO₂へのとり込み実験で、GTFはグルコースからCO₂産生のミカエリスプロットでV_{max}は3~4倍に増強するが、K_m値は変化がないこと¹¹⁾から、インスリンと同様にグルコースの膜輸送を促進していると考えられている。

糖尿病患者では血清および尿中クロム含量が低いこと、糖負荷による血清クロムの上昇率が低いことなどクロム欠乏ないしクロム代謝異常がみられるとされるがデータの不一致もみられる。注意すべきことは年代と共にクロムの“正常値”が著しく低下してきていることであり、測定値の判断や実際の測定に際し注意する必要がある。血清クロムの“正常値”は1960年代で1000 μg/l、1980年では0.1~0.2 μg/lである。

4. 低分子クロム結合物質の研究

私たちの研究室では、金属の結合物質の研究をすすめたことがあり、その過程で発見されたものが低分子クロム結合物質 (low molecular weight, chromium binding substance; LMCr) と命名したものである。

体内にとり込まれたクロムは、大部分が肝や腎にとり込まれ、かなり早く排泄されるが、肝や腎では80%以上が細胞上清に存在する。細胞上清をクロム投与後経時的にゲル濾過すると低分子分画から高分子分画へとクロムは往復するが、常に分子量およそ1,500の低分子分画に集まることを知り、この分画の精製を行った。¹²⁾

クロム投与犬の肝よりエタノール処理、Sephadex ゲル濾過、イオン交換などをくり返し最終的にShodex OHPAK 液体クロマトグラフィーで紫外吸収、示差屈折率とクロム含有が一致するピークが得られた。分子量は1,480、1分子あたりのクロム含量は1原子、アミノ酸構成はグルタミン酸、グリシンおよびシステインが全体の70%を占めていた。この時点でのGTF作用はみられなかったが、肝、血漿、尿の経時的移行からみて、本物質は体内のクロムキャリアーと考えられ、事実、無機クロムに比べ毒性は著しく低いこと (Table 4)¹²⁾、腎からの排泄も無機クロム化合物に比べ著しく早いこと (Fig. 1)¹²⁾、クロムをはずしたLMCrは、クロム急性中毒マウスの救命効果があることなどが明らかにされ、また尿細管再吸収率は6価クロムが85.7%、3価クロムが95.2%であるのに対し、LMCrは23.5%であった。これらのことより LMCr は体内でのクロムのキャリア、排泄キャリアとして働いていると推定された。

Table 4. Acute intraperitoneal LD₅₀ values for LMCr, K₂Cr₂O₇ and CrCl₃ in mice¹²⁾

Chromium compound	LD ₅₀ (mg Cr/kg body wt)	95% Confidence limits
LMCr	134.9	99.3-183.2
K ₂ Cr ₂ O ₇	13.1	7.2- 23.9
CrCl ₃	32.8	27.1- 37.4

For each dose of the chromium compound, a group of 10 mice was recorded up to 14days after the dose of chromium compounds. The LD₅₀ value for LMCr was significantly different from those for K₂Cr₂O₇ and CrCl₃ ($p < 0.01$)

5. ウシ初乳および家兎肝よりの GTF の精製

上述の LMCr は、分子量、アミノ酸構成などから、極めて前述の GTF に類似していると考えられたことより、メルカプトエタノールなどによる SH 基の保護などの安定化対策と精製スピード化などを行いつつ、クロム含量の多いウシ初乳¹³⁾さらにはクロム投与家兎肝より GTF の精製を試みた。

ウシ初乳からは Cr/蛋白比で2,000倍以上に精製され (Table 5)¹⁴⁾、アミノ酸分析ではグルタミン酸、

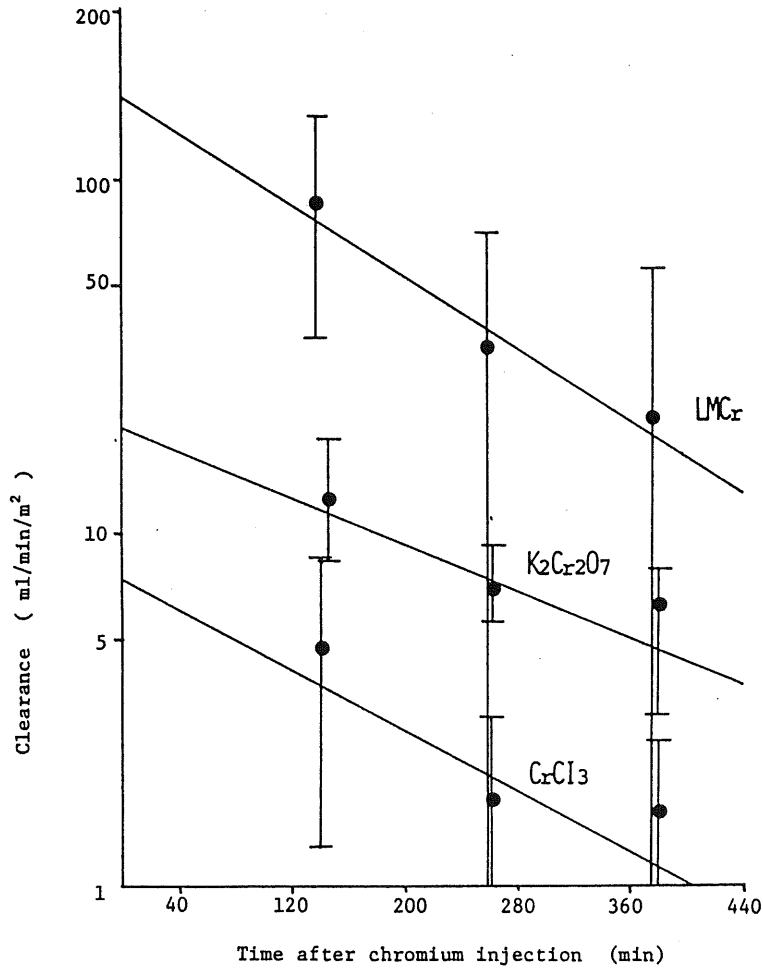


Fig. 1. Time course of chromium clearance after intravenous administration of LMCr, K₂Cr₂O₇, and CrCl₃. Values represent the mean $\pm$ 2S.D. for three rabbits.¹²⁾

Table 5. Purification of LMCr from bovine colostrum¹⁴⁾

Fraction	Cr	Protein	Cr/protein
	μ g	g	ng/mg
Colostrum	220	1035	0.193
Skimmed milk	252	1172	0.215
EtOH extract	52.5	735×10^{-3}	71.43
DEAE Sephadex	5.65	19.5×10^{-3}	289.7
Sephadex G-25	2.90	3.25×10^{-3}	890.8
Sephadex G-15 (1st)	2.30	1.09×10^{-3}	2115
Sephadex G-15 (2nd)	2.38	n.d.	—

グリシン、システインのほかアスパラギン酸が多く (Table 6) ¹⁴⁾, さらにインスリン存在下で、量依存的にグルコースの CO₂ へのとり込み、および脂質へのとり込みを促進することが証明された (Fig. 2) ¹⁴⁾。

クロム投与家兎の肝からも、ほぼ同様に分子量1,500のアミノ酸構成も同じ GTF 活性のある分画が得られた。Cr/アミノ酸末端残基比は 4 : 1 であった。 ¹⁵⁾

この LMCr (GTF) を塩酸と EDTA で処理し、クロムをはずし、更に再結合させて GTF 活性の変化をみたところ、Cr を除去した LMCr には GTF 活性は無く、Cr 再結合で GTF 活性は回復することが証明され、GTF 活性にクロムが重要な役割を果していることが分かった (Fig. 3, 4)。 ¹⁶⁾

6. 微量元素の薬理効果と問題点

クロムは、その薬理効果としての糖・脂質代謝の改善が期待され、さらには鉄は潜在的鉄欠乏性無力症、免疫能の改善が、亜鉛は創傷治療、感染抵抗性、発育促進、味覚障害是正、セレンは抗癌作用、虚血性心疾患予防、ビタミン E 作用が期待される。 ¹⁷⁾

かつてのビタミン同様、微量元素ブームが到来している。しかし、微量元素の普通の摂取量は、一日必要量とほぼ同じで補充としてはそれほど必要なものでなく、もし薬理作用を期待する場合は、安全性や有効性を十分に検討すべきである。一般に微量元素の安全摂取量は、一日必要量の数倍程度で、10倍以上摂取では中毒が出現する可能性があることを十分認識すべきであろう。

Table 6. Amino acid composition of LMCr from bovine colostrum ¹⁴⁾

Amino acid	Mole %	Molar ratio
Asx	32.96	4.12
Thr	0.43	0.05
Ser	0.94	0.12
Glx	40.00	5.00
Gly	15.84	1.98
Ala	0.80	0.10
Cys ²	7.40	0.93
Val	0.19	0.02
Met	0.00	0.00
Ile	0.16	0.02
Leu	0.56	0.07
Tyr	0.08	0.01
Phe	0.24	0.03
Lys	0.02	0.02
His	0.16	0.02
Arg	0.08	0.01
Total	99.97	12.50

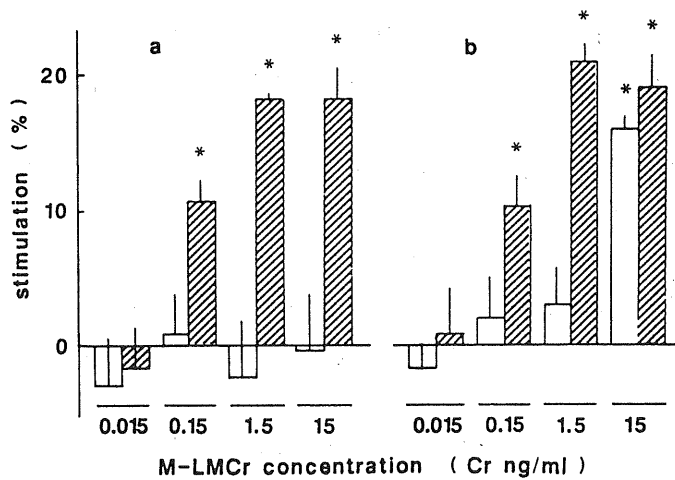


Fig. 2. Effect of LMCr on $^{14}\text{CO}_2$ production from $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucose (a) and $[\text{3-}^3\text{H}]$ glucose incorporation into lipids (b) by rat adipocytes with (shaded bars) or without (white bars) insulin ($5 \mu\text{u/mL}$). The results are expressed as percentages over the control values in the absence of LMCr in each experiment and are means $\pm$ S.D. for three or more determinations. The basal values per 4×10^4 cells without insulin were 1115 ± 29 dpm for (a) and 1446 ± 34 dpm for (b), and the values with insulin were 3724 ± 213 dpm for (a) and 5236 ± 218 dpm for (b) ($n = 3$), respectively. * Significant difference (Student's t-test) from the values obtained by the incubation without M-LMCr ($p < 0.05$). Similar results were obtained in three separate experiments.¹⁴⁾

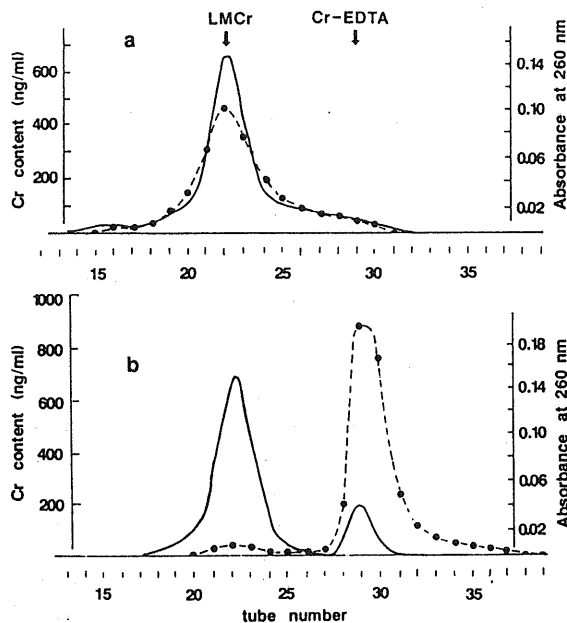


Fig. 3. Separation of Cr-depleted LMCr on Sephadex G-15 chromatography. LMCr treated with HCl (a) or HCl and EDTA (b) at pH 3.0 was applied to a column ($1.0 \times 40\text{cm}$) and eluted with 50mM ammonium acetate buffer, pH 6.5, (3ml/hr). One ml of fraction was collected. Every fractions No. 20-25 were pooled, lyophilized and served for the rat adipocyte assay as control LMCr (fraction A) or Cr-depleted-LMCr (fraction B). Cr content (- -) and absorbance at 260 nm (-) profiles are shown.¹⁶⁾

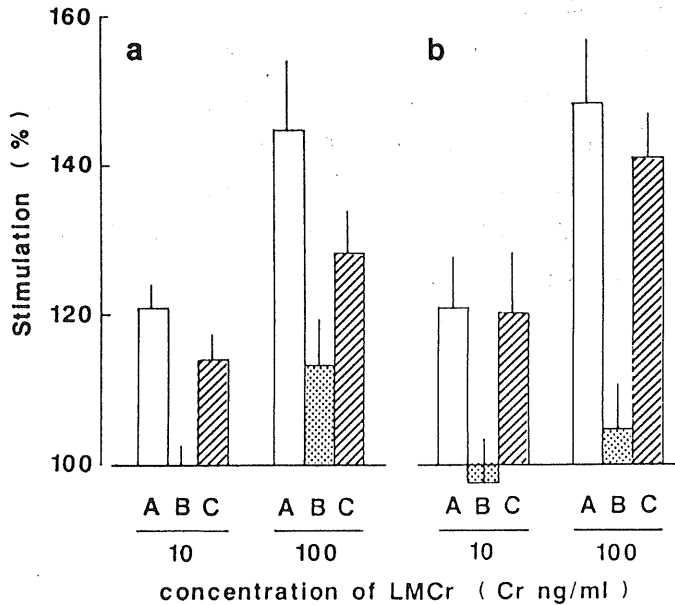


Fig. 4. Chromium dependency on the effects of LMCr on ^{14}CO production from $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucose (a) and $[3\text{-}^3\text{H}]$ glucose incorporation into lipids by rat adipocytes. In the presence of insulin ($2.5 \mu\text{U/ml}$), the cells were incubated with LMCr (A), Cr-deprived-LMCr (B) or Cr-rebined-LMCr (C), at equivalent amounts of ligand to a concentration of Cr as indicated. The results are expressed as percentages over the control values in the absence of LMCr in each experiment and are means $\pm$ S.D. for three or more determinations. The basal values per 4×10^4 cells with insulin were $(185.8 \pm 3.5) \times 10^2$ dpm and $(229.1 \pm 14) \times 10^2$ dpm for b, respectively. Similar results were obtained in three separate experiments.¹⁶⁾

文 献

1. 和田攻, 真鍋重夫 (1983) 代謝 7 : 33
2. JEEJEEBHOY, K. N. (1977) Am. J. Clin. Nutr. 30 : 1977
3. FREUND, H. (1979) JAMA, 241 : 496
4. BROWN, R. D. (1986) Dig. Dis. Sci. 31 : 661
5. DOISY, R. Y., D. H. P. STREETEN and A. J. SCHNEIDER (1976) Chromium metabolism. in Trace Elements in Human Health and Disease vol II, ed by Prasad, A. S. Acad. Press, New York : pp. 79 ~104
6. ELWOOD, J. C. (1982) J. Am. College Nutr. 1 : 263
7. BOYLE, E. (1977) Southern Med. J. 70 : 1449
8. TOEPFEL, E. W. and W. MERTZ (1973) J. Agr. Food Chem. 21 : 69
9. MERTZ, W. (1974) Fed. Proc. 33 : 2275
10. TUMAN, R. W. and R. J. DOISY (1977) Diabetes 26 : 820

11. MIRSKY, N. (1981) *J. Inorg. Biochem.* 15 : 275
12. WADA, O., A. YAMAMOTO, S. MANABE and T. ONO (1983) *Environ. Res.* 32 : 228
13. YAMAMOTO, A., O. WADA and H. SUZUKI (1987) *Tohoku J. exp. Med.* 152 : 211
14. YAMAMOTO, A., D. WADA and H. SUZUKI (1988) *J. Nutr.* 118 : 39
15. YAMAMOTO, A., O. WADA and T. ONO (1987) *Eur. J. Biochem.* 165 : 627
16. YAMAMOTO, A., O. WADA and S. MANABE (1990), *FEBS Letter* : in Press
17. 和田攻 (1989) *ファルマシア* 25 : 568