鉛中毒ラットにおけるカルシウム代謝について

山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫

静岡薬科大学¹⁾

Study on Calcium Metabolism in Rats treated with Lead

MASAYOSHI YAMAGUCHI, YASUNOBU SUKETA

and TAKEO YAMAMOTO

Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received March 14, 1973)

To know the calcium metabolism of rats treated with lead acetate, the serum and urinary calcium levels were determined, and the hepatic calcium content was measured. No differences were demonstrated in the serum and urinary calcium levels in the lead-administered and control rats but significant difference was found between the two groups in the serum and urinary amount of inorganic phosphorus and in the serum alkaline phosphatase activity. Correlation between alkaline phosphatase activity and inorganic phosphorus was demonstrated in the serum. In the thyroparathyroidectomized rats, the serum calcium level of the lead-treated group increased 1.25 times ($P < 0.01$) that of the untreated group. The calcium content in liver of rats treated with lead was about 22 times that of the control rats. In the case of thyroparathyroidectomized rats, the former was only about 3 times that of the latter.

From these facts it is demonstrated that thyroid and parathyroid glands in lead-poisoned rat play an important part in high calcium accumulation in the liver.

緒 言

著者らはウイスター系雄ラットを用いた急性鉛中毒実験で、肝臓におけるカルシウムの異常沈着を認め、この現象が鉛と等濃度のマンガン、亜鉛、錫およびカルシウムなどの金属投与の場合と比較して、鉛だけに特異的なものであることを示した。²⁾ そして、鉛中毒により惹起した肝臓中のカルシウムの著明な沈着が鉛による骨代謝異常およびカルシウム代謝障害の結果であり、また、肝ミトコンドリアでのカルシウム・ポンプ機能障害によるカルシウム取り込みの促進によるものであろうと推論した。

さて、急性および慢性の鉛中毒において、体内吸収された鉛は臓器組織のうちで、骨髄にもっとも多量に蓄積

され、この鉛蓄積に関する報告は多数みられる。例えば J. Teisinger ら³⁾ の動物実験によれば、体内吸収された鉛の70%以上が骨に沈着され、骨沈着量の60%が緻密質のハーバース管（骨の栄養血管）の少ない部分に沈着しており、移動しにくい、残りの40%は緻密質のハーバース管周辺および海綿質に沈着し移動性である。いわゆる、体内に吸収された鉛がかなり長期にわたって骨髄に貯留し、骨代謝障害を引き起こす。⁴⁾

一方、鉛中毒時のカルシウム代謝に関する報告も多数みられ、大島,⁵⁾ 辻⁶⁾ は血中および尿中カルシウムについて中毒群と正常群との間には有意な変化がみられなかったと報告している。一方、Kosmider ら⁷⁾ は高濃度の酢酸鉛の投与のときにのみ血漿中のカルシウム量が増大

1) Location : 2-1 Oshika 2-chome, Shizuoka-shi (静岡市小鹿2丁目2番1号)。

2) 山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 53 (1973)。

3) J. Teisinger, *Int. Arch. Gowerbepat. Gewerbehyg.*, **25**, 240 (1969)。

4) 真角昭吾, 代謝, **6**, 882 (1969)。

5) M. Oshima, *Sikoku Igaku Zasshi*, **15**, 701 (1959)。

6) M. Tsuji, *Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi*, **9**, 627 (1960)。

7) S. Kosmider, *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej*, **32**, 1101 (1962)。

したと報告し、Makashev ら⁸⁾ はラットを用いた実験で投与した Ca の糞中排泄量が鉛中毒時には正常の場合よりも低下したと報告している。

このように、急性および慢性の鉛中毒において、尿中および血中のカルシウム量に相反する結果が報告されている。しかし、著者らは前記の如く、急性鉛中毒ラットの肝臓において著明なカルシウム沈着を認めており、このカルシウム肝沈着の原因を解明する目的で、甲状腺-副甲状腺切除ラットを用いて、鉛投与による血清カルシウムと肝へのカルシウムの移行に与える影響について検討した。また、カルシウムイオンはアルカリ性フォスファターゼなどを阻害し、リン代謝系に影響を与えることが知られていることから、鉛中毒時の血清および尿中のリン含量と血清アルカリ性フォスファターゼ活性についても検討し、若干の知見を得た。

実験方法

1. 実験動物 体重100—130 g のウィスター系雄ラットを用い、粉末飼料（オリエンタル酵母工業KK製，M. F）と精製水（イオン交換法によって脱イオンした後全パイレックスガラス装置によって蒸留した水）を自由に摂取させ、25° の恒温室中で飼育した。

2. 投与および測定方法 鉛の投与方法は、酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を精製水に溶かし、 Pb^{2+} 20mg/ml の溶液を調製し、この溶液（10 ml/kg）を上記ラットの腹腔内に1回投与した。投与後、72時間目にエーテル麻酔下で解剖して殺すことなく心臓せん刺により採血し、肝臓を摘出採取した。肝臓の一部を正確に秤量し、前報⁹⁾ 同様に処理し、鉛およびカルシウムを標準添加法により原子吸光分析計（Perkin-Elmer 303 型）で定量した。

また、同様のウィスター系雄ラットの両側甲状腺および副甲状腺をエーテル麻酔下で同時に摘除し、皮膚を連続縫合した後、そのままで上記飼料および水を与えて飼育し、72時間目に解剖した。鉛は手術後2時間目に腹腔内に1回投与した。肝臓中のカルシウムおよび鉛の定量は上記同様にしておこなった。

血清は心臓せん刺により採血後、ただちに分離し 4° に保存し、測定用試料とした。

尿は糞尿分離型ケージにより自動的に分離されたもの

を採取し、測定用試料とした。

尿中および血清中の無機リンの定量は、モリブデンブルー法⁹⁾ を応用した臨床検査用キット（和光純薬KK）を用い、分光光度計（日立 101 型）にて測定した。

血清カルシウムは、¹⁰⁾ 上記心臓せん刺により、採血分離した血清を用い、除蛋白後、原子吸光分析計で定量した。また、尿中カルシウムの定量は上記血清カルシウムの測定法に準じておこなった。

また、血清アルカリ性フォスファターゼ活性の測定はフェニルリン酸エステル¹¹⁾ を基質に用い臨床検査用キット（和光純薬KK）を用いて行なった。

肝ミトコンドリアは 0.25M ショ糖溶液で分画し、¹²⁾ 鉛およびカルシウムを上記肝臓の場合と同様にして測定した。

実験結果

Table I は急性鉛中毒ラットの血清カルシウム、無機リンおよびアルカリ性フォスファターゼ活性について正常の場合と比較検討した結果である。鉛中毒時におけるアルカリ性フォスファターゼ活性は、正常時と比較して、およそ40%低下した ($P < 0.01$)。また、血清無機リン量も鉛中毒では正常よりも低値 ($0.01 < P < 0.05$) を示した。一方、血清カルシウム量は、鉛投与により正常の場合と比較して有意な変化が認められなかったが、Ca/P の比は、正常時では 1.03 であったが、鉛中毒時では 1.24 であり、有意差 ($0.01 < P < 0.05$) が認められた。

また、Fig. 1 は鉛中毒における血清アルカリ性フォスファターゼ活性と無機リンとの相関性について検討したものであるが、この両者においては相関性が認められた。

鉛 (200 mg/kg) をラットの腹腔内に1回投与した後尿中カルシウムおよび無機リンの経日変化を、投与前の値との比で表わしたものが Fig. 2 である。鉛投与により投与前と比較して、尿中無機リンは4日目まで減少していくが、投与後5日目では上昇傾向を示した。これに対して尿中カルシウムは鉛投与後の経日変化は3日目より減少傾向を示したが、無機リンと同様、投与後5日目に上昇した。しかし、鉛投与後3日目（72時間）における尿中無機リン量は、投与前と比較して有意差 ($0.05 < P < 0.1$) が認められた。一方、尿中カルシウ

8) K.K. Makashev, Z.P. Pakhimova, "Izv. Akad. Nauk Kaz." SSR, Ser. Med. Nauk, 1964, pp.50—55.

9) H.H. Taussky, *J. Biol. Chem.*, **202**, 675 (1953).

10) J.B. Willis, *Nature*, **186**, 249 (1960).

11) P.R.N. Kind, E.J. King, *J. Clin. Path.*, **7**, 322 (1954).

12) G.H. Hogeboom, "Method in Enzymology," Vol. 1, Academic Press Inc., Publishers., New York, 1955, p. 16.

TABLE I. Calcium and Inorganic Phosphorus Levels and Alkaline Phosphatase Activity of Serum in Rats Treated with Lead

Group	Alkaline phosphatase activity (KA units) ^{a)}	Inorganic phosphorus (mg/dl)	Calcium (mg/dl)	Calcium/Inorganic phosphorus ratio
Normal rats (12) ^{b)}	41.1 ± 3.23	10.5 ± 0.27	10.8 ± 0.74	1.03 ± 0.07
Rats treated with lead (8) ^{c)}	17.3 ± 0.82	8.30 ± 0.11	10.3 ± 0.52	1.24 ± 0.08
<i>P</i> value ^{d)}	<i>P</i> < 0.01	0.01 < <i>P</i> < 0.05	<i>P</i> > 0.05	0.01 < <i>P</i> < 0.05

a) KA units: King Armstrong units

b) number of rats

c) The animals were killed at 72 hours after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb²⁺ 200mg/kg).

d) normal *vis.* treated

Fig. 1. Correlationship between Alkaline Phosphatase Activity and Inorganic Phosphorus in the Serum of Rats

●: normal rats, ○: rats treated with lead

ムについては有意差が認められなかった (Fig. 3).

以上の如く、鉛中毒時における尿中および血清カルシウムレベルは正常時の場合と比較して有意な変化が認められなかった。そこで、血清カルシウムレベルの調節臓器である甲状腺および副甲状腺の両臓器を摘出し、その後の血清および肝臓中のカルシウム量について検討した。Table II に示した如く、甲状腺および副甲状腺を摘出し、皮膚を連続縫合した後、72時間目に血清カルシウム量を測定すると、臓器を摘出しない正常のもののおよそ50%低下 ($P < 0.001$) した。これに対して、甲状腺および副甲状腺を同時摘出した後に鉛 (Pb²⁺ 200 mg/kg) をラットの腹腔内に1回投与した場合には、摘出のみを行ない、投与を行なわなかったものに比べ、血清カルシウム量は1.25倍 ($P < 0.01$) に増加した。一方、甲状腺お

Fig. 2. Changes of Calcium and Inorganic phosphorus in Urine of Rats Treated with Lead

Average data of six animals. Standard errors are indicated by the vertical bars. Lead was administered intraperitoneally.

よび副甲状腺を摘出しないで、鉛 (Pb²⁺ 200 mg/kg) 投与した場合には、血清カルシウム量は正常値を示した。

肝臓中のカルシウム量においては、鉛投与により正常の場合と比べ、およそ22倍 ($P < 0.001$) に増加するが、甲状腺および副甲状腺を摘出した後に鉛投与すると、正常の場合と比し、およそ3倍 ($P < 0.001$) の増加しか示さなかった。また、カルシウム (Ca²⁺ 50 mg/kg) をラットの腹腔内に1回投与し、72時間後の肝臓中のカルシウム量は正常の場合に比し、およそ3倍に増加するが、甲状腺および副甲状腺の同時摘除後にカルシウム (Ca²⁺ 50 mg/kg) を上記同様に投与すると、摘出しなかった場合に比較しておよそ60%に低下した。

次に、鉛投与ラット肝ミトコンドリアにおける鉛およびカルシウム含量について検討した。

TABLE II. Amount of Calcium in Liver and Serum of Thyroparathyroidectomized Rats

Treatment	Number of rats	Amount of calcium	
		Serum (mg/gdl)	Liver ($\mu\text{g/g}$)
Normals	7	10.3 $\pm$ 0.28	13.7 $\pm$ 1.28
Thyroparathyroidectomized	6	5.15 $\pm$ 0.18	14.6 $\pm$ 0.81
Thyroparathyroidectomized + treated with lead ^{a)}	6	6.46 $\pm$ 0.19	45.3 $\pm$ 2.35
Treated with lead ^{a)}	5	10.5 $\pm$ 1.37	299.1 $\pm$ 21.8
Thyroparathyroidectomized + treated with calcium ^{b)}	4	6.43 $\pm$ 0.23	22.1 $\pm$ 1.40
Treated with calcium ^{b)}	4	10.9 $\pm$ 0.31	37.9 $\pm$ 2.81

a) The animals were killed at 72 hours after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb^{2+} 200mg/kg).

b) Calcium (50 mg/kg) was administered a once intraperitoneally and then the animals were killed at 72 hours postinjection.

TABLE III. Amount of Lead and Calcium in the Mitochondria of Rats Treated with Lead

Subjects	Normal rats		Rats treated with lead ^{a)}	
	Calcium ($\mu\text{g/g}$)	Lead ($\mu\text{g/g}$)	Calcium ($\mu\text{g/g}$)	Lead ($\mu\text{g/g}$)
Whole liver (5)	12.8 $\pm$ 1.69	nd ^{b)}	278.9 $\pm$ 16.7	106.0 $\pm$ 8.15
Mitochondria (5)	3.80 $\pm$ 0.76	nd	11.2 $\pm$ 0.40	3.58 $\pm$ 0.33

a) The animals were killed at 72 hours after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb^{2+} 200mg/kg).

b) nd: not determined.

Fig. 3. Calcium and Inorganic Phosphorus in Urine of Rats Treated with Lead

The urine was sampled at 72 hours after a single intraperitoneal administration of lead (Pb^{2+} 200mg/kg).

■: control (n=6), □: treated with lead (n=6)

Table III に示した如く、鉛投与 72 時間後において肝ミトコンドリアの鉛含量は、肝全体の鉛量のわずか 3.4 % にすぎなかった。また、鉛投与時の肝臓におけるカル

Fig. 4. Relation between Content of Calcium in Whole Liver and Mitochondria of Rats Treated with Lead

シウム量は、投与により肝に蓄積した鉛量の 2 倍以上の高値を示した。肝ミトコンドリアにおけるカルシウム量は、鉛投与により正常の場合と比較して、およそ 3 倍に増加したが、肝全体のカルシウム量のわずか 4.8 % にすぎなかった。

そこで、鉛投与ラット肝全体におけるカルシウム含量とミトコンドリア分画でのカルシウム含量との関係を検討すると、Fig. 4 に示す如く、肝全体のカルシウム量が増大しても、肝ミトコンドリアのカルシウム量は一定の値を示した。

考 察

本実験において、鉛中毒では正常の場合に比し血清のアルカリ性フォスファターゼ活性の低下および血清無機リン量の減少を示したが、これらの間には高い相関性が認められた。また、鉛中毒時の尿中無機リンの排泄量が投与前に比し有意に低下していることを認めた。

急性および慢性の鉛中毒では、正常の場合と比較して血清カルシウム量に有意な変化が認められていないが、^{5,6)} 本実験においても同様の結果が得られ尿中カルシウム量も有意な変化を示さなかった。しかしながら、鉛投与により、血清アルカリ性フォスファターゼ活性および血清無機リン量が正常の場合に比し有意に減少していることから、骨基質であるリンの代謝障害を惹起し、骨代謝に何らかの影響をおよぼしているものと思われる。

一方、S. Kosmider¹³⁾ は、急性鉛中毒家兎実験においては血清アルカリ性フォスファターゼ活性が低下し、人血清を用いた *in vitro* 実験でも、酵素活性が酢酸鉛の濃度に相関して減少したと報告している。しかしながら、この酵素活性の低下は血中鉛による阻害だけでなく、鉛投与時に著しく肝沈着したカルシウム²⁾ によるこの酵素の肝での合成系の障害によるものではないかと考えられる。

また、鉛投与の結果、惹起される著明なカルシウム肝沈着²⁾ には、血清カルシウムレベルの調節臓器である甲状腺および副甲状腺が関与しているものと考えられる。副甲状腺摘出により、血清カルシウムレベルは正常の場合に比し、著しく低下するなどの知見¹⁴⁾ があるが、本実験においても、甲状腺および副甲状腺の同時摘出により血清カルシウムレベルは著しく低下することを認めた。一方、甲状腺および副甲状腺を摘出した後に鉛を投与すると、鉛投与しなかった場合に比し、血清カルシウムは有意に増加した。この結果は鉛投与時に骨カルシウムと鉛との脱換の可能性を示唆している。実際に、鉛が体内に入った際、骨髓にもっとも多量の鉛が沈着し、³⁾ 沈着した鉛は時間の経過により血流中に放出される。¹⁵⁾

鉛投与時に肝沈着したカルシウムは、甲状腺および副甲状腺の同時摘出により著しく低下するが、このことは、鉛投与時に骨から血中に放出されるであろうカルシ

ウムが、血清カルシウムの恒常性維持のために甲状腺から分泌されるカルシトニンの血清カルシウム低下作用を介して、血清中の余剰カルシウムを肝組織に移行し、沈着させたものと考えられる。Mac Intyre¹⁶⁾ はカルシトニンの一般的な作用として、細胞内へのカルシウムの取り込みを促進すると仮説だてており、Borle¹⁷⁾ はサル腎細胞を組織培養し、その細胞について、カルシトニンがカルシウムの取り込みを促進したと報告している。

前報において、²⁾ カルシウムの肝沈着の原因の一つとして、肝ミトコンドリアのカルシウム量の取り込み増大によるものではないかと推察したが、本実験においてはそのようなことが認められなかった。鉛投与時の肝ミトコンドリア中のカルシウム含量は正常の場合に比し、およそ3倍に増加したが、肝全体のカルシウム沈着量のわずか4.8%にすぎなかった。一方、正常ラット肝のカルシウム量は、Thiers¹⁸⁾ らの実験結果よりもやや低値を示したが、肝全体のカルシウム含量に対するミトコンドリア中のその割合はほぼ同じ値であった。また、ミトコンドリア内膜のカルシウム・ポンプは、細胞質の Ca^{2+} 濃度を低下させうるが、Weber¹⁹⁾ らは、心筋ミトコンドリアはカルシウム取り込みによりミトコンドリア外液の Ca^{2+} 濃度を 10^{-7}M に低下させると報告しているが、本実験においては、鉛投与時の肝ミトコンドリアのカルシウム量が肝全体のその増大に比例して増加せず、一定の値を示し、肝ミトコンドリアへのカルシウムの最大取り込みはおおよそ肝 g (湿重量) 当り $11\text{ }\mu\text{g}$ であることが認められた。

結 論

酢酸鉛投与ラットのカルシウム代謝について検討し、次の如き結果を得た。

1) 血清アルカリ性フォスファターゼ活性および血清無機リン量は、酢酸鉛投与により正常の場合と比し、有意に低下することを認めた。また、この両者の間には高い相関性が認められた。

2) 酢酸鉛投与により血清および尿中カルシウム量は有意に変化せず、鉛投与時の著明なカルシウム肝沈着は腎におけるカルシウムの排泄低下によるものではないと考えられる。

13) S. Kosmider, *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej*, **32**, 1253 (1962).

14) H. Morii, H. F. Deluca, *Am. J. Physiol.*, **213**, 358 (1967).

15) E. Browning, "Toxicity of Industrial Methods," Butterworths, London, 1969.

16) I. MacIntyre, "Calcium," Ishiyaku Publishers, Inc., Tokyo, 1970, pp. 201—209.

17) A. B. Borle, *Endocrinology*, **85**, 194 (1969).

18) R. E. Thiers, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **226**, 911 (1957).

19) A. Weber, R. Herz, J. Reiss, *Proc. Roy. Soc. B.*, **160**, 489 (1964).

3) 酢酸鉛投与における血清カルシウム量は、甲状腺および副甲状腺の同時摘除により、鉛投与しなかった場合よりも有意に増加することを認めた。

4) 酢酸鉛投与により著明に増加した肝臓中のカルシウムは、甲状腺および副甲状腺の同時摘除により著しく減少することを認めたことから、鉛投与時の著明なカル

シウム肝沈着に甲状腺および副甲状腺が関与しているものと考えられる。

5) 酢酸鉛投与における肝ミトコンドリアへのカルシウムの最大取り込みは、およそ $11 \mu\text{g/g}$ (湿重量) であると考えられる。