鉛およびカルシウムの肝沈着による
肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的な阻害について

山口正義, 道祖土和代, 山本丈夫
静岡薬科大学¹⁾

The Chronical Inhibition of Alkaline Phosphatase Activity
in Rat Liver Deposited Lead and Calcium

MASAYOSHI YAMAGUCHI, KAZUYO SAIDO

and TAKEO YAMAMOTO

Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received January 28, 1974)

In order to elucidate the mechanism of liver disorders in lead poisoning, alkaline phosphatase activity in rat liver was examined after a single intraperitoneal administration of lead. The serum alkaline phosphatase activity showed the lowest level on 5th day after injection of lead, increased, thereafter, and returned to the normal level 10 days. On the other hand, liver alkaline phosphatase value was lower on 4th day being 75 % of that of normal rats, and this lowered level continued until 30th day after treatment with lead.

The decrease of hepatic alkaline phosphatase activity was in proportion to the amount of lead administered. In the administration of tin, zinc, manganese, calcium, or lead, the decrease of hepatic alkaline phosphatase activity was the largest in the case of treatment with lead, and the activity did not change by the administration of calcium or zinc. The amount of calcium in the liver increased rapidly after the administration of lead, and calcium at 30 days was approximately 8 times compared with the normal level.

緒 言

鉛中毒時の肝臓における酵素活性の影響に関する報告の中で、酸性フォスファターゼ²⁾およびアデノシン三リン酸分解酵素(ATP ase)活性³⁾に関する研究は見られるが、アルカリ性フォスファターゼ活性については余りないように思われる。特に、鉛中毒時におけるアルカリ性フォスファターゼ活性に関する研究は血清において多くなされており、⁴⁻⁶⁾ 従来、血清アルカリ性フォスファターゼ活性の低下は、血中に増加した鉛イオンに原因し、それによる直接的な酵素阻害によるものであると考えら

れている。⁵⁾

一方、血清アルカリ性フォスファターゼの産生は、肝、腎、小腸および骨などの臓器に由来しており、最近、著者ら⁷⁾は鉛中毒時の肝細胞核分画の蛋白質に内因性のカルシウムが鉛とともに著明に増加することを認めた。この事実をも考慮すると、鉛中毒時の血清アルカリ性フォスファターゼ活性の低下は、鉛イオンによる酵素自体の阻害だけではなく、他の可能な原因の1つとして、肝細胞内でのカルシウムの著明な沈着が肝臓の酵素蛋白質の産生の減少を惹起せしめた結果であると推察される。

- 1) Location : 2-1, Oshika 2-chome, Shizuoka-shi (静岡市小鹿2丁目2番1号)。
- 2) J. Sroczynski, K. Zajusz, *Arch. Immunol. Therap. Exptl.*, **14**, 391 (1966)。
- 3) P. Boscolo, C. Mincarelli, O. Marras, *Lav. Um.*, **23**, 314 (1971)。
- 4) S. Kosmider, *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej.*, **32**, 1101 (1962)。
- 5) S. Kosmider, *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej.*, **32**, 1253 (1962)。
- 6) S. Kosmider, *Intern. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.*, **20**, 11 (1963)。
- 7) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 309 (1973)。

このような観点から、鉛中毒時の肝臓障害の発現機序解明の研究の一環として、今回、急性鉛中毒時における肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性について検討した結果、著明なカルシウム肝沈着がその酵素活性の慢性的な阻害を誘導させ得る事実を認めたので報告する。

実 験

1. 実験動物および投与方法 実験動物は体重100—120gのウィスター系雄ラットを用い、実験期間中、粉末飼料（オリエンタル酵母工業 K.K 製）と精製水を自由に摂取させ、25° の恒温室中で飼育した。

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+} 20 mg/ml の溶液を調整し、この溶液 (1.0 ml/体重 100 g) を上記ラットの腹腔内に1回投与した。

鉛投与した動物は実験の目的に応じて経日的に解剖した。血液は軽いエーテル麻酔下で解剖し殺すことなく心臓せん刺により約 3 ml 採血し、3000 rpm, 10 分間遠心分離後血清を採取した。また、摘出した肝臓は冷 0.25M ショ糖溶液に浸し、すみやかに洗浄後測定試料に供した。

2. 測定方法 肝臓ホモジネートは、摘出した肝臓の一定量に冷却した3倍容の 0.25M ショ糖溶液を加え、Porter-Elvenjer ホモジナイザーを用いて碎水の入った容器で、冷却しながら 1000 rpm, 2 分間ホモジネートして調整した。

肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性の測定は Morton の方法⁸⁾ を応用して行なった。すなわち、酵素反応試薬として β -グリセリン酸ナトリウム 20 μmoles , 酢酸マグネシウム 10 μmoles , エタノールアミン塩酸 (pH 9.5) 40 μmoles を精製水 4.0 ml に溶解し、これに粗酵素液として上記のホモジネート液 1.0 ml を加え、好氣的に 37°, 30 分間恒温水槽中で振盪しながらインキュベートした。インキュベート後、30%トリクロ酢酸 (TCA) 1.0 ml を加えて反応を停止し、15 分間碎水中に放置後 3000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清 2.0 ml を用いて、遊離した無機リンの測定を行なった。無機リンの定量は Allen の方法⁹⁾ により行なった。

血清アルカリ性フォスファターゼ活性の測定¹⁰⁾は、上

記1の如く得られた血清について基質として *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを用いて行なった。また、血清中の無機リンの定量は Taussky の方法¹¹⁾ で行なった。

肝臓中の鉛およびカルシウム量は、臓器の一部を正確に秤量し、塩素酸溶液で加熱分解後、原子吸光分析計 (Perkin-Elmer, 303 型) で定量した。¹²⁾

結 果

酢酸鉛水溶液を鉛イオンとして 200 mg (0.965 mmoles)/kg の割合でラットの腹腔内に1回投与し、その後の血清アルカリ性フォスファターゼ活性と血清無機リン量の経日的変化を Fig. 1 に示した。血清アルカリ性フォスファターゼ活性は、鉛投与後1日目に投与前の値の約50%に低下 ($p > 0.01$) し、5日目ではもっとも低い値を示したが、その後次第に上昇し10日目には正常値を示した。一方、血清無機リン量は鉛投与後1日目にわずかに上昇したが、その後の変化は血清アルカリ性フォスファターゼ活性の挙動と相関していた。

これに対して、鉛投与後の肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性は、鉛投与後急激に低下し、4日目には投与前の値の約75%の低下 ($p < 0.01$) を示し、その後も低値を維持し、投与後30日目でも酵素活性は投与前の値には回復しなかった。このように、鉛投与後の肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性の変化は血清アルカリ性フォスファターゼ活性の場合とは相異した挙動を示すことが認められた。

次に、鉛投与時に肝臓のカルシウム量が著明に増加す

Fig. 1. Changes of Alkaline Phosphatase Activity and Inorganic Phosphorus in Serum of Rats Treated with Lead

Enzyme activity expressed as Bessey Lowry unit (BL unit). Average data of six animals. Standard errors are indicated by the vertical bars. Lead was administered intraperitoneally.

- 8) R.K. Morton, *Biochem. J.*, **53**, 595 (1954).
- 9) R.J.L. Allen, *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- 10) O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock, *J. Biol. Chem.*, **164**, 321 (1946).
- 11) H.H. Taussky, *J. Biol. Chem.*, **202**, 675 (1953).
- 12) 山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 53 (1973).

Fig. 2. Changes of Alkaline Phosphatase Activity in Liver of Rats Treated with Lead

Enzyme activity expressed as μ moles phosphate liberated/30 min/g wet of liver. Average data of six animals. Standard errors are indicated by the vertical bars. Lead was administered intraperitoneally.

Fig. 3. Changes of the Amount of Lead and Calcium in Liver of Rats Treated with Lead

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

●—●: calcium ○—○: lead

ることが認められている¹²⁾ので、鉛の1回腹腔内投与後の肝臓中の鉛およびカルシウム含量の経日的変化を検討した (Fig. 3). 肝臓中のカルシウム量は鉛投与後に著明に増加し、30日目でも正常値の約8倍を示した. また投与した鉛も肝臓に著しく蓄積されており、多量の鉛とカルシウムが長期にわたって肝臓に沈着していることが認められた.

そこで、肝臓に沈着された鉛およびカルシウム量と等濃度の鉛、カルシウムイオンを正常ラットの肝臓ホモジネートに添加し、肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性に及ぼす鉛およびカルシウムイオンの影響について検討した. Table I に示した如く、酵素活性の有意な低下は金属イオンの添加により認められなかった.

鉛の1回腹腔内投与後の肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性は投与後4日目でもっとも低い値を示したので、鉛投与後4日目における肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性に及ぼす鉛の投与量の影響につ

TABLE I. Changes of Alkaline Phosphatase Activity by the Addition of Lead or Calcium to Liver Homogenate

Addition		% of Control
Calcium acetate (μ M)	Lead acetate (μ M)	
—	—	100
0.6	—	103
1.2	—	98
2.4	—	96
4.8	—	89
7.2	—	90
—	0.1	104
—	0.2	105
—	0.4	100
—	0.8	103
—	1.2	104
0.6	0.1	93
1.2	0.2	94
2.4	0.4	93
4.8	0.8	101
7.2	1.2	90

average data of five samples

Fig. 4. Effect of Lead on Alkaline Phosphatase Activity in Liver of Rats

Enzyme activity expressed as μ moles phosphate liberated/30 min/g wet of liver. The rats were killed 4 days after a single intraperitoneal administration of lead. Average data of five animals. Standard errors are indicated by the vertical bars.

いて検討し、その結果を Fig. 4 に示した. 酵素活性は鉛の投与量の増加に相関して低下することが認められた.

上記した如く、鉛投与の結果、肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性の著明な低下が認められたが、この現象が鉛金属に特異的であるのか、また、鉛以外の金属を投与した場合にはどのように変化するのかを検討した. すなわち、鉛と等濃度 (金属イオンとして

Fig. 5. Alkaline Phosphatase Activity in Liver of Rats Treated with Various Metallic Agents. Enzyme activity expressed as μ moles phosphate liberated/30 min/g wet of liver. The rats were killed 4 days after a single intraperitoneal administration of metallic agents. Average data of five animals. Standard errors are indicated by the vertical bars.

0.483 mmol/kg) のカルシウム、亜鉛、スズおよびマンガン酢酸塩水溶液としてラットの腹腔内に1回投与し、投与後4日目における肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性を測定した。酵素活性は、正常の場合と比較して鉛投与の場合がもっとも低い値を示し、正常値の約50% ($p < 0.01$) の低下を示し、ついでマンガ、スズ投与の順であったが、カルシウムと亜鉛の投与の場合には有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

考 察

鉛中毒時の血清アルカリ性フォスファターゼ活性の低下は、血中鉛イオンが酵素蛋白質の-COOH基、-SH基に結合することによる直接的な酵素阻害であると考えられている。⁹⁾ 著者ら¹³⁾ は、鉛の1回腹腔内投与の結果、血清アルカリ性フォスファターゼ活性が著しく阻害されることを認め、その酵素の産生が肝臓、腎臓、小腸および骨に由来していることから、活性低下の機序としては、血中鉛イオンによる酵素阻害だけで誘引されるものではなく、鉛投与時の著明なカルシウム肝沈着によるこの酵素の肝での合成系の障害にも影響されているのではないかと推察した。本実験において、鉛の1回腹腔内投与後の血清および肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の経時変化を検討し、これらの酵素活性の低下がともに相関した挙動を示したことから、鉛投与の初期に見られた血清アルカリ性フォスファターゼ活性の低下は、少なくとも部分的には肝臓での酵素活性の減少に起因しているものと考えられる。

しかしながら、Fig. 1 および Fig. 2 に示した如く、鉛投与後5日目以後では血清アルカリ性フォスファター

ゼ活性の低下が徐々に回復していくのに対し、肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性は鉛投与後長期にわたって低い値を示し、いわゆる酵素阻害の慢性化という現象を惹起させた。一方、肝臓中のカルシウム量は、Fig. 3 に示した如く、鉛投与後急激に増加し、4日目以後では、ほぼ一定の高い値 (約8倍) を維持し、30日目でもその値が保たれていた。そこで、肝沈着した鉛およびカルシウム量と等濃度か、あるいは、それ以上の濃度の同種の金属イオンを正常ラットの肝臓ホモジネートに直接添加し、*in vitro* 実験を試みたが、*in vivo* で見られたような著明な酵素活性の阻害は認められなかった (Table I)。また、肝臓中のカルシウム量の増加は、鉛の投与量に相関しており、¹²⁾ 鉛、亜鉛、スズ、カルシウムおよびマンガなどの金属投与の中で、鉛投与の場合にのみ特異的であることが認められている¹²⁾ が、これらの現象と同様に、Fig. 4 および Fig. 5 に示した如く、肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の低下も鉛の投与量に相関しており、投与された金属の中で鉛投与の場合がもっとも大きかった。これらの事実を考慮すると、鉛投与後の肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の長期間にわたっての低下は鉛とカルシウムの著明な肝沈着に起因しているものと考えられる。

最近、Walton¹⁴⁾ は、単離された肝臓ミトコンドリアに鉛とカルシウムを添加して培養し、培養後のミトコンドリア内に鉛とカルシウムの両方を含有した顆粒体の形成を認め、そのことが、細胞自身を代謝的かつ構造的に維持するための細胞機能の破壊を誘起するであろうと報告している。著者ら⁷⁾ は、鉛投与後の肝臓に増加した鉛とカルシウムがミトコンドリア分画よりも核分画に多量に存在していることを認めており、鉛とカルシウムは肝細胞核の蛋白質と強固に結合している。

本実験において、鉛投与後に肝臓の脆弱化と器質的变化が観察されたが、著明な鉛とカルシウムが肝細胞核に長期間沈着していることをも考慮すると、急性鉛中毒時における肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的な阻害は、肝細胞自体の壊死による酵素変性と細胞内酵素蛋白質の産生の低下を惹起せしめた結果であると考察される。

本実験で認められた事実は、鉛投与後に誘導された著明なカルシウム肝沈着が鉛中毒時における慢性的な肝臓障害の発現に重要な因子になっていることを示唆している。

13) 山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 271 (1973).

14) J.R. Walton, *Nature*, **243**, 100 (1973).