衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
20 (6) 305-309 (1974)

鉛中毒ラット肝のカルシウム沈着におよぼすクエン酸ナトリウムの影響について

山口正義, 西沢雅彦, 祐田泰延, 山本丈夫

静岡薬科大学¹⁾Effects of Sodium Citrate on the Deposition of Calcium
in the Liver of Rats intoxicated with LeadMASAYOSHI YAMAGUCHI, MASAHICO NISHIZAWA,
YASUNOBU SUKETA, and TAKEO YAMAMOTOShizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received May 13, 1974)

Experiments were designed to determine whether chelating agents would affect the amount of lead and of calcium, and alkaline phosphatase activity in the liver of rats treated with lead acetate. The rats were intraperitoneally given 200 mg/kg of sodium citrate and calcium disodium ethylenediaminetetraacetate ($\text{Na}_2\text{Ca-EDTA}$) 6 days after a single intraperitoneal administration of 200 mg lead/kg.

The amount of liver calcium increased by administration of lead was reduced to the range of normal level after treatment with chelating agents, and lead accumulated after lead administration also decreased significantly. On the other hand, the hepatic alkaline phosphatase activities 6 days after lead administration decreased to about one-quarter compared with control rats. However, by the injection of sodium citrate or $\text{Na}_2\text{Ca-EDTA}$ to rats administered lead, the hepatic alkaline phosphatase activity recovered approximately to two-thirds and one-half of the control value, respectively. Thus, the removal of lead and calcium deposited in the liver by injection of chelating agents elevated hepatic alkaline phosphatase activity which was significantly inhibited after lead administration. Also, the data obtained in the present studies suggest that sodium citrate has an antagonistic effect on lead intoxication.

緒 言

著者らは、鉛中毒時における肝障害の発現機序解明の手がかりを得ることを目的として、鉛投与時のラットの肝臓における生体内微量金属の動態を検討した結果、肝臓カルシウム量の異常増加を認め、²⁾ しかも多量のカルシウムが長期にわたって肝細胞内に沈着しており、³⁾ そのことが肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的な阻害を惹起せしめるという事実⁴⁾ を見出した。いわゆる急性的な鉛中毒による影響の慢性化であり、カルシウムの肝沈着が肝障害発現の重要な因子になっているこ

とを報告した。

肝に沈着したカルシウムは細胞の約65%が核分画に存在している。³⁾ クエン酸はカルシウムの生体内輸送に関係しており、生体構成成分の中ではカルシウムと極度に錯体を形成しやすく、*in vitro* 実験では、核に結合しているカルシウムがクエン酸塩添加により著しく除去されることが認められている。³⁾

一方、エチレンジアミン四酢酸塩は鉛中毒時の肝細胞に沈着しているカルシウムおよび鉛の除去に有効であり、³⁾ 現在、鉛中毒の拮抗剤として臨床的に用いられて

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) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 309 (1973)。4) 山口正義, 道祖土和代, 山本丈夫, 衛生化学, **20**, 200 (1974)。

いるが、動物実験的に生体内微量金属の動態に異常をきたすなどの二次的な問題がある。

そこで、本研究においては、酢酸鉛の1回腹腔内投与により、ラットの肝臓に著明なカルシウム沈着を誘起させた後に、クエン酸塩の投与が肝細胞内に沈着したカルシウムの放出に、また、肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的阻害の回復にいかなる影響をおよぼすかをエチレンジアミン四酢酸塩の場合と比較検討し、若干の知見を得た。

実験方法

1. 実験動物 実験動物は体重100—120 g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。

2. 試料溶液の調製および投与方法 酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を精製水に溶解して、鉛イオンとして20 mg/mlの酢酸鉛水溶液を調製した。また、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸ナトリウムカルシウム（以下EDTAと略す）を精製水に溶解して、10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/mlの各濃度の溶液を調製し、同様に、10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/mlのクエン酸ナトリウム溶液を調製した。

鉛の投与方法は、酢酸鉛水溶液（1.0 ml/100 g 体重）を上記1.のラットの腹腔内に1回投与し、鉛投与後6日目に上記のそれぞれのキレート剤溶液（1.0 ml/100 g 体重）をラットの腹腔内に1回投与した。キレート剤溶液投与後、24時間目、3日目および10日目に軽いエーテル麻酔下で、放血と殺を行ない、肝臓を摘出採取し、冷0.25 M ショ糖溶液中で洗浄した。

3. 測定方法 肝臓中の鉛およびカルシウム量²⁾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。

肝臓摘出後ただちに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。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0.25 M ショ糖溶液を加え、Porter-Elvenjer ホモジナイザーで、冷却しながら1000 rpm, 2分間ホモジネートして調製した。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Morton⁵⁾の方法を応用して、前報⁴⁾同様に行なった。酵素反応試薬として β -グリセロリン酸ナトリウム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分間恒温水槽中に振盪しながらインキュベートした。インキュベート後、ただちに30%トリクロロ酢酸1.0 mlを加えて反応を停止し、15分間碎氷中に放置後、3000 rpm, 5分間遠心分離し、上清1.0 mlを用いて、インキュベートにより遊離した無機リンをAllen⁶⁾の方法により定量した。

実験結果

酢酸鉛投与ラットの肝臓中に鉛およびカルシウム量が沈着増加していることが知られている²⁾ことから、これらにおよぼすキレート剤投与の影響について検討した。キレート剤としてはクエン酸ナトリウムとエチレンジアミン四酢酸ナトリウムカルシウム（以下EDTAと略す）を用いた。前報³⁾の*in vitro*実験では核分画の蛋白質に結合しているカルシウムの除去を観察するためにエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを用いたが、今回の*in vivo*実験では、鉛中毒の拮抗剤として使用されているエチレンジアミン四酢酸ナトリウムカルシウムを用いた。Fig. 1は、ラットの腹腔内に酢酸鉛 (Pb^{2+} 200 mg/kg) を1回投与し、投与後6日目に、キレート剤としてクエン酸ナトリウムおよびEDTAをさらに腹腔内投与し、投与後24時間目における肝臓中のカルシウム量におよぼすキレート剤の投与量変化の影響について比較検討した結果である。臓器中の金属は、臓器1 g（湿重量）当たりの μg で表わし、5匹の動物についてその平均値と標準誤差を示した。肝臓中のカルシウム量は、鉛投与後7日目には正常値の約8倍を示していたが、クエン酸ナトリウム（100 mg/kg）投与により、24時間後には正常値の約2倍の値にまで低下することが認められた。これに対して、EDTA投与の場合には、投与量100 mg/kgでは有意な変化を示さなかったが、200 mg/kg以上の投与量では著しく低下し、ほぼ正常値に近い値を示した。

以上に示したごとく、前報³⁾の*in vitro*実験同様に、本実験でもクエン酸ナトリウム（100 mg/kg）、EDTA（200 mg/kg）投与により、鉛中毒時に著明に肝に沈着増加したカルシウム量は著しく低下することが認められた。しかしながら、クエン酸ナトリウム（10 mm）を用いた*in vitro*の実験において、核に結合している鉛を除去し得なかった。³⁾そこで、クエン酸ナトリウムが肝に沈着しているカルシウムと同様に鉛をも除去し得るか否かを検討する目的で、400 mg/kgの投与量において、肝臓中の鉛量におよぼすクエン酸ナトリウムの影響をEDTAの場合と比較検討した。Fig. 2に示したごとく、使用されたキレート剤の投与量で、肝臓中の鉛量は

5) R.K. Morton, *Biochem. J.*, **53**, 595 (1954).

6) R.J.L. Allen, *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).

Fig. 1. Effect of Sodium Citrate and Calcium Disodium EDTA on the Amount of Calcium in Livers of Rats Treated with Lead

The rats were killed 24 hours after a single intraperitoneal administration of Na₃-citrate and Na₂Ca-EDTA, that had been intraperitoneally administered with lead acetate (Pb²⁺ 200 mg/kg) 6 days before the administration of chelating reagents.

●—● : Na₂Ca-EDTA, ○- -○ : Na₃-citrate

カルシウム量と同様に、著明に低下することが認められた。

次に、鉛投与時に肝に沈着増加した鉛およびカルシウム量が、キレート剤の1回腹腔内投与後1日目で著しく低下したが、その後の経日変化に対してどのような挙動を示すのかを検討し、その結果を Table I および Table II に示した。キレート剤のいずれの投与の場合においても、鉛投与後に肝に沈着増加したカルシウムと鉛量は、キレート剤投与後1日目にそれぞれ約 25 %, 35%以下に低下し、その値は3日目および10日目でも維持されていた。

鉛投与時に蓄積増加した鉛およびカルシウムが肝細胞内に強固に沈着した結果、肝臓ホモジネートのアルカリ性フォスファターゼ活性が慢性的に阻害されることが知られている。⁴⁾ そこで、キレート剤投与により、肝に沈着した鉛およびカルシウムを除去した場合、この酵素活性がどのように変化するかを検討した。酢酸鉛の1回腹腔内投与後9日目において、肝臓ホモジネート中のアルカリ性フォスファターゼ活性は正常値の約25%に低下していたが、Table III に示したごとく、低下していた酵素活性はキレート剤投与により著しく増加することが認められ、しかも、EDTA (200 mg/kg) 投与の場合よ

Fig. 2. Effect of Sodium Citrate and Calcium Disodium EDTA on the Amount of Calcium and Lead in Livers of Rats Treated with Lead

The rats were killed 24 hours after a single intraperitoneal administration of Na₃-citrate, Na₂Ca-EDTA, and mix of Na₃-citrate and Na₂Ca-EDTA, that had been intraperitoneally administered with lead acetate (Pb²⁺ 200 mg/kg (6 days before the administration of chelating reagents.

□ : calcium, ▨ : lead

りもクエン酸ナトリウム (200 mg/kg) 投与の方が、その程度はわずかに大きかった。一方、クエン酸ナトリウム (100 mg/kg) と EDTA (100 mg/kg) との混合投与時の酵素活性の回復の程度はクエン酸ナトリウム (200 mg/kg) の単一投与の場合と同じであったが、それぞれ 200 mg/kg を混合投与した場合には、酵素活性の回復の程度は他の投与の場合と比較してもっとも小さかった。

考 察

細胞内構造物に結合している 2 価金属はエチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA) などの錯体形成試薬により容易に除去されるが、著者らは、カルシウムの生体内輸送に関係し、カルシウムと極めて親和的に錯体を形成するクエン酸塩を用いて、鉛中毒ラットの肝細胞核に細胞全体の約 50 % 以上が結合している鉛とカルシウムの除去を *in vitro* 実験で試みた。その結果、10mM 濃度のクエン酸塩の添加により細胞核に結合しているカルシウムが約 70% 除去されるが、鉛はほとんど除去されないで結合していることを報告した。³⁾

本実験において 200 mg/kg 体重のクエン酸塩投与により、鉛中毒時に肝臓に沈着増加した鉛とカルシウムは同程度に著しく減少することが認められた。キレート剤投与により減少した肝臓中のカルシウムおよび鉛量は、Table I および Table II に示したごとく、クエン酸塩、EDTA 投与後1日目の値と10日目のそれとはほとんど同じ値を示しており、キレート剤との錯体形成で

TABLE I. Effect of Chelating Reagents on the Amount of Calcium in Livers of Rats Treated with Lead

Treatment	Number of rats	Amount of calcium ($\mu\text{g/g}$)		
		1 day ^{a)}	3 day	10 day
Normal	5	12.0 $\pm$ 2.14	11.5 $\pm$ 1.55	10.1 $\pm$ 2.01
Lead ^{b)}	5	94.3 $\pm$ 10.5	80.4 $\pm$ 7.14	83.9 $\pm$ 5.40
Lead+citrate (200 mg/kg)	5	25.6 $\pm$ 1.28	25.4 $\pm$ 3.18	24.0 $\pm$ 0.72
Lead+EDTA (200 mg/kg)	5	15.2 $\pm$ 3.74	26.2 $\pm$ 2.09	21.0 $\pm$ 5.77
Lead+citrate (100 mg/kg) +EDTA (100 mg/kg)	5	21.5 $\pm$ 2.01	26.6 $\pm$ 1.90	30.2 $\pm$ 2.56
Lead+citrate (200 mg/kg) +EDTA (200 mg/kg)	5	20.6 $\pm$ 1.24	28.0 $\pm$ 1.84	23.7 $\pm$ 1.30

a) The rats were killed after a single intraperitoneal administration of Na₃-citrate, Na₂Ca-EDTA, and mix of Na₃-citrate and Na₂Ca-EDTA, that had been intraperitoneally administered with lead acetate (Pb²⁺ 200 mg/kg) 6 days before the administration of chelating reagents.

b) The rats were killed 7, 9 or 16 days after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb²⁺ 200mg/kg).

TABLE II. Effect of Chelating Reagents on the Amount of Calcium in Livers of Rats Treated with Lead

Treatment	Number of rats	Amount of lead ($\mu\text{g/g}$)		
		1 day ^{a)}	3 day	10 day
Lead ^{b)}	5	67.5 $\pm$ 9.52	54.0 $\pm$ 4.10	53.0 $\pm$ 3.45
Lead+citrate (200 mg/kg)	5	20.9 $\pm$ 1.49	23.3 $\pm$ 1.98	29.9 $\pm$ 2.75
Lead+EDTA (200 mg/kg)	5	19.0 $\pm$ 1.64	19.1 $\pm$ 1.46	13.1 $\pm$ 2.15
Lead+citrate (100 mg/kg) +EDTA (100 mg/kg)	5	20.2 $\pm$ 2.11	19.4 $\pm$ 1.58	17.8 $\pm$ 1.81
Lead+citrate (200 mg/kg) +EDTA (200 mg/kg)	5	20.0 $\pm$ 2.81	16.2 $\pm$ 0.49	16.2 $\pm$ 1.16

a) The rats were killed after a single intraperitoneal administration of Na₃-citrate, Na₂Ca-EDTA, and mix of Na₃-citrate and Na₂Ca-EDTA, and mix of Na₃-citrate and Na₂Ca-EDTA, that had been intraperitoneally administered with lead acetate (Pb²⁺ 200 mg/kg) 6 days before the administration of chelating reagents.

b) The rats were killed 7, 9 or 16 days after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb²⁺ 200mg/kg).

TABLE III. Effect of Chelating Reagents on Alkaline Phosphatase Activity in Livers of Rats Treated with Lead

Treatment	Number of rats	Enzyme activity ^{a)}	
		3 day ^{b)}	10 day
Normal	5	21.1 $\pm$ 0.65	20.7 $\pm$ 0.22
Lead ^{c)}	5	4.8 $\pm$ 0.61	5.5 $\pm$ 0.72
Lead+citrate (200 mg/kg)	5	13.1 $\pm$ 0.29	12.2 $\pm$ 0.45
Lead+EDTA (200 mg/kg)	5	10.1 $\pm$ 0.36	11.5 $\pm$ 0.53
Lead+citrate (100 mg/kg) +EDTA (100 mg/kg)	5	14.9 $\pm$ 1.12	11.2 $\pm$ 0.27
Lead+citrate (200 mg/kg) +EDTA (200 mg/kg)	5	8.4 $\pm$ 0.26	8.0 $\pm$ 0.19

a) Enzyme activity was expressed as μmoles of phosphate liberated per 30 minute per gr. weight liver.

b) The rats were killed after a single intraperitoneal administration of Na₃-citrate, Na₂Ca-EDTA, and mix of Na₃ citrate and Na₂Ca-EDTA, that had been intraperitoneally administered with lead acetate (Pb²⁺ 200mg/kg).

c) The rats were killed 9 or 16 days after a single intraperitoneal administration of lead acetate (Pb²⁺ 200mg/kg).

肝細胞内から遊出された鉛およびカルシウムは再び細胞内に取り込まれ蓄積されないことがわかる。

一方、肝細胞への鉛およびカルシウムの沈着により、肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的な阻害が惹起される⁴⁾が、クエン酸塩および EDTA を投与することにより、低下していた肝臓アルカリ性フォスファターゼの活性は有意に上昇した (Table III)。この現象はキレート剤投与により肝細胞内の鉛とカルシウムの両方が除去されたことが第一義的な原因であり、その結果、肝細胞内代謝系の機能の回復によるものであると推察される。しかしながら、Table III に示されているごとく、キレート剤投与後3日目と10日目の酵素活性はほぼ同じ値を示しており、一度阻害された酵素活性は鉛とカルシウムを除去してもほとんど完全に正常な状態にまでは回復されないことがわかる。いわゆる、鉛中毒ラットの肝臓におけるアルカリ性フォスファターゼ活性の慢性的な阻害は、前報⁴⁾でも考察したように、肝に沈着した鉛とカルシウムによる直接的な阻害よりも、それらの金属の細胞内沈着により誘起された細胞内代謝機能の破壊に起因しているものと考えられる。

鉛中毒の臨床的拮抗剤として EDTA が一般的に使用されているが、動物実験的に EDTA を長期間投与する

ことにより肝臓と腎臓に機能的障害が生ずることが知られている。⁷⁾ EDTA が生体内に沈着している鉛と錯体を形成する時に EDTA から放出されるカルシウムは、蛋白質と結合しやすく、細胞内代謝系に影響をおよぼすことが考えられる。EDTA 投与の際には組織に存在する生体内金属を固定して活性化する酵素を阻害し、例えば血清アルカリ性フォスファターゼ活性は EDTA により活性因子であるマグネシウムが除去されて酵素活性が低下する。⁸⁾ また、EDTA は組織中の鉄含量を低下せしめ赤血球への鉄の取り込みを妨害し、⁹⁾ 血清中の鉄、銅、マグネシウムなどの濃度を減少させる¹⁰⁾ことが報告されており、生体内微量金属の動態に異常をきたす。

本実験において、EDTA およびクエン酸塩投与により鉛中毒ラットの肝臓中に沈着した鉛とカルシウムを除去して、慢性的に阻害されていた肝臓アルカリ性フォスファターゼ活性を回復させるが、その程度は EDTA 投与の場合よりもクエン酸塩の場合の方が大きいことが認められた。クエン酸は生体内成分であり、その毒性も少ないと考えられるが、従来、鉛中毒の拮抗剤として検討された報告はほとんどなく、クエン酸塩の鉛中毒の拮抗剤としてその有効性がさらに検討される必要があると考える。

7) M.D. Reuber, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **11**, 321 (1967).

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

9) J. Sroczynski, G. Jonkerko, J. Watras, *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secm. Soc.*, **26**, 465 (1965).

10) J. Sroczynski, J. Kubicka, M. Buczkowski, *Med. Pr.*, **19**, 64 (1968).