酢酸鉛投与ラットの肝切片におけるカルシウム流出におよぼす
カルチトニンの影響について

山口正義, 山本丈夫
静岡薬科大学¹⁾

Effect of Thyrocalcitonin on Calcium Efflux in Liver
Slices from Rats treated with Lead Acetate

MASAYOSHI YAMAGUCHI and TAKEO YAMAMOTO
*Shizuoka College of Pharmacy*¹⁾

(Received February 20, 1975)

This experiment was made to examine whether the inhibitory effect of thyrocalcitonin (TCT) on calcium efflux is exhibited in liver slices from the lead-treated rats. Lead acetate solution of 20 mg Pb/100 g body weight was intraperitoneally administered. After 36 hr, animals were killed by decapitation. The liver slices were preincubated in 2 ml of krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing 2.5 μ Ci 45 Ca with 95% O₂—5% CO₂ as the gas phase. After preincubation, the slices were transferred to unlabeled media with or without TCT (8.0 MRC mU/ml), and incubated for an additional 30 or 60 min. Radioactivity was counted on a scintillation spectrometer.

In the liver slices from normal rat, the rate of calcium efflux is inhibited in the presence of TCT, and the decrease of calcium efflux rate after TCT treatment was about 25% of the control. On the other hand, in the liver slices from the lead-treated rat, the calcium efflux rate was inhibited by TCT treatment. Approximately 30 or 50% of control decreased during the incubation period of 30 or 60 min, respectively.

The present results suggest that liver calcium accumulation induced by lead administration is caused by the inhibitory effect of TCT on the calcium efflux in liver cells.

緒 言

酢酸鉛投与時にラットの肝臓におけるカルシウム量が著明に増加することが知られている。²⁾すでに著者らは、この現象が酢酸鉛投与後の血清カルシウム濃度の上昇に依存しており、³⁾しかも甲状腺および副甲状腺の同時摘出により発現され得ないことから、⁴⁾酢酸鉛投与により誘導された血清カルシウム濃度の上昇に刺激され、甲状腺から分泌されるカルチトニンにより誘起されている可

能性を示唆した。しかも、前報において、⁵⁾甲状腺および副甲状腺摘出により抑制されていた鉛投与後の肝へのカルシウムの蓄積はカルチトニンを連続投与することにより著しく高められることを見出した。このような事実から、酢酸鉛投与時の著明なカルシウムの肝への蓄積の機構として、その本態が肝に対するカルチトニンのカルシウム蓄積作用⁶⁾に起因していることを明らかにした。

- 1) Location : 2-1, Oshika, 2-chome, Shizuoka-shi (静岡市小島 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) M. Yamaguchi, T. Yamamoto, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 223 (1974).
- 4) 山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫, 衛生化学, **19**, 271 (1973).
- 5) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **21**, 66 (1975).
- 6) M. Yamaguchi, Y. Takei, T. Yamamoto, *Endocrinology*, **96**, 1004 (1975).

最近、著者らは、カルチトニンの肝細胞内へのカルシウム蓄積の作用が細胞内からの能動的なカルシウム流出の阻害による結果であることを報告している。⁷⁾そこで、酢酸鉛投与時に見られたカルシウム肝蓄積がカルチトニンにより引き起こされていることを更に *in vitro* 実験で確認するために、正常ラットからの肝切片で観察されたカルチトニンの細胞外へのカルシウム流出の阻害作用が酢酸鉛を投与したラットの肝切片においても同様に発現され得るのか否かを検討した。

実験方法

1. 投与試料溶液の調製 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、鉛イオンとして 20 mg/ml の酢酸鉛水溶液を調製した。カルチトニン (Armour Pharmaceutical Company 製のブタカルチトニンで山之内製薬から提供された) は冷却された精製水に溶解した。

2. 実験動物および投与方法 実験動物はウィスター系雄ラット (体重100—130 g) を使用した。実験期間中、動物は 25° の恒温室中で飼育し、固型飼料 (オリエンタル酵母工業 K.K 製, MF) と精製水 (イオン交換法によって脱イオンしたもの) を自由に摂取させた。

このように飼育した動物に上記1.の酢酸鉛溶液をラットの腹腔内に 1.0 ml/100 g の割合で1回投与し、鉛投与後36時間目に断頭瀉血によりと殺しすみやかに解剖した。肝臓は冷 0.25 M ショ糖溶液 10 ml で還流した後に摘出した。肝臓は洗浄後氷上のシャーレの中に保存した。

3. 肝切片によるカルシウムの取り込みと流出 上記2.の如く摘出された肝臓は葉身の先端を切り捨て、中心部を肝切片作製のために使用した。肝切片は氷冷下において Stadie-Riggs 型スライサーで重量約 72.5 mg (実験に用いた肝切片の平均重量) のものを作製した。肝切片作製後、ただちに重量を測定し、冷 0.25 M ショ糖溶液中で軽く洗浄後、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.7 mM), glucose (10.0 mM) を含有した Krebs-Ringer 重炭酸塩緩衝液 (pH 7.4) 2.0 ml の培養液の入ったフラスコに入れ、95% O_2 —5% CO_2 下で 37° で 15分間軽く振盪しながら前培養した。15分後にデカンテーションにより培養液を除去し、新鮮な上記培養液 2.0 ml の入ったフラスコに置換し、更に30分および60分間 37° において培養した。培養中に取り込まれたカルシウム量は、培養後に摘出した肝切片を冷 0.25 M ショ糖溶液中で軽く洗浄し、塩素酸溶液で加熱分解後、原子吸光分析計で測定した。²⁾

また、上記の如く作製された肝切片を $^{45}\text{CaCl}_2$ (2.5 μCi) を含有した上記 Krebs-Ringer 重炭酸塩緩衝液 2.0 ml に入れ 37° で 30 分間前培養し、 ^{45}Ca を取り込ませた。前培養後肝切片を取り出し、 ^{45}Ca を含まずカルチトニン (8 MRC mU/ml) を含有した新鮮な Krebs-Ringer 重炭酸塩緩衝液 2.0 ml の入ったフラスコに入れ、37° で 30分および60分間培養した。培養後、培養液および肝切片中の放射能を測定した。放射能の測定は、培養液はそのままで肝切片は灰化後、Bray 溶液を用いて液体シンチレーションカウンターで行なった。カルシウム流出の割合を計算するために、培養後に培養液中に存在していた放射能と肝切片中の放射能とを合わせた値を前培養により肝切片に取り込まれた全放射能とした。肝切片に取り込まれた ^{45}Ca の細胞外流出の割合は、培養中に肝切片から損失された放射能を前培養により肝切片に取り込まれた放射能と培養後の肝切片中に存在していた放射能との平均値で除した百分率で表わした。⁸⁾

結果および考察

著者らは、すでに、血清カルシウム低下作用を有するカルチトニンが正常ラット肝においてカルシウム蓄積作用を発現し、⁶⁾ その肝カルシウム蓄積作用がカルシウムの肝細胞外流出に対する阻害の結果⁷⁾であることを報告している。本研究において、カルチトニンの肝細胞へのカルシウム流出に対する阻害作用が、酢酸鉛 (20 mg/100 g) を1回腹腔内投与したラットの肝切片を用いた場合にも同様に発現され得るのかを検討した。Fig. 1 は、酢酸鉛投与ラットの肝切片に取り込まれた ^{45}Ca の細胞外流出におよぼすカルチトニン (8 MRC mU/ml) の影響について正常ラットの肝切片を用いた場合と比較検討した結果である。結果は5—6匹の動物から得られた平均値とその標準誤差を示している。正常ラットの肝切片を用いた場合には、取り込まれた ^{45}Ca 流出の割合は培養時間とともにほぼ直線的に増加していくのに対して、カルチトニン処理することにより、対照の場合と比較して約 25% ($p < 0.01$) の抑制を引き起こしながら増加した。一方、酢酸鉛投与ラットの肝切片を用いた場合には、 ^{45}Ca 流出はカルチトニン処理することにより対照と比較して30分間の培養において約 30% ($p < 0.01$) が、また 60分間の培養においては約 50% ($p < 0.01$) が抑制された。このように、カルシウムの細胞外流出に対するカルチトニンの阻害作用が正常ラットの肝切片の場合と同様に鉛投与ラットの肝切片の場合においても発現し得

7) M. Yamaguchi, T. Yamamoto, in press (1975).

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

Fig. 1. Effect of Thyrocalcitonin on the Rate of Radiocalcium Efflux in Liver Slices from Normal and Lead-Treated Rat

Liver slices were obtained from normal rats and lead-treated rats. Lead acetate (Pb 20 mg/100 g) was intraperitoneally administered and animals were killed by decapitation 36 hours after lead administration. Liver slices were preincubated at 37° for 30 min in the presence of 2.5 μ Ci ⁴⁵-Ca. At zero time the radioactive medium was decanted and the slices washed with nonradioactive buffer and transferred to unlabeled media with or without thyrocalcitonin (TCT), 8.0 MRCmU/ml of media, and incubated for an additional 30 or 60 min. Rate of radiocalcium efflux expressed as per cent of the beginning to the experimental period. A rise in rate reflects an increased efflux. Each point represents the mean of 5 or 6 liver slices. The vertical lines give the SE.

○—○, lead administered slices; ●—●, lead administered slices+TCT treatment; △—△, normal slices; ▲—▲, normal slices+TCT treatment

ることが認められた。

しかしながら、正常の肝切片を用いた実験では、⁴⁵Ca 流出の割合が直線的に上昇するのに対して、酢酸鉛投与した肝切片の場合にはカルシウム流出の割合が培養時間 30分と60分において同程度の値を示し、流出された ⁴⁵Ca が再び肝切片内に取り込まれているものと推察された。

一般に、腎細胞⁹⁾および HeLa 細胞¹⁰⁾ でなされた実験から、組織へのカルシウムの流入は受動的な現象であるが、カルシウムの細胞外流出は代謝的に依存された輸送過程であることが明らかにされている。細胞膜には強力なカルシウム (Ca²⁺) 透過 barrier が存在し、¹¹⁾ 細胞内外の Ca²⁺ 濃度差を保持しており、腎尿細管などの細胞膜は比較的 Ca²⁺ を通しやすいが肝細胞ではかなり通しにくいと考えられている。¹²⁾ そこで、肝細胞膜における

Fig. 2. Effect of Incubation Periods on Calcium Uptake by Liver Slices from Normal and Lead-Treated Rat

Lead acetate (Pb 20 mg/100 g) was intraperitoneally administered and animals were killed by decapitation 36 hours after lead administration. Liver slices were preincubated in 2 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing 2.7 mM Ca with 95 % O₂—5 % CO₂ as the gas phase. After preincubation at 37° for 15 min, the slices were transferred to fresh media and incubated for an additional 30 or 60 min. Each point represents the mean of 5 or 6 liver slices. The vertical lines give the SE.

○—○, liver slices obtained from normal rat

●—●, liver slices obtained from lead-treated rat

Ca²⁺ の透過性が鉛投与の結果どのように影響されるのかを検討するために、鉛投与ラットの肝切片による Ca²⁺ の取り込みについて正常の場合と比較し、Table I および Fig. 2 にその結果を示した。結果は 5—6 匹の動物から得られた平均値とその標準誤差を示している。15分間の前培養により肝切片中に取り込まれたカルシウム量は、実験に用いた肝切片中の endogenous カルシウム量を考慮すると、正常ラットの肝切片の場合と酢酸鉛投与の場合とでは有意な差は認められなかった (Table I)。それに対して、肝切片によるカルシウム取り込みは更にこの培養により増加し、カルシウム取り込み量は、正常ラットの肝切片よりも鉛投与した場合の方が有意 ($p < 0.01$) に増加することが認められた (Fig. 2)。また、Fig. 2 に見られる如く、培養時間の経過に対する肝切片によるカルシウム取り込みの変化は正常ラットの肝切片と鉛投与の場合とでは同様の傾向を示した。

培養実験における酢酸鉛投与ラットの肝切片のカルシ

9) A.B. Borle, *Endocrinology*, **83**, 1316 (1968).

10) A.B. Borle, *J. Gen. Physiol.*, **53**, 43 (1969).

11) C.P. Bianchi, *Cell. Calcium*. Butterworths. London. (1968).

12) 尾形悦郎, 代謝, **6**, 858 (1969).

TABLE I. Calcium Uptake by Liver Slices from Normal and Lead-Treated Rats during Preincubation

Treatment	Number of rats	Calcium ($\mu\text{g/g}$ wet slices)		
		Before preincubation	After preincubation	Uptake
Normal liver slices ^{a)}	5	12.6 $\pm$ 1.4 ^{b)}	155.2 $\pm$ 9.7	142.6
Lead-treated liver slices ^{c)}	6	45.2 $\pm$ 4.6	208.7 $\pm$ 7.6	163.5

a) Liver slices were preincubated for 15 min at 37° with the gas phase.

b) values represent the mean and SE

c) Lead acetate (Pb 20 mg/100 g) was intraperitoneally administered and animals were killed 36 hours after lead administration.

ウム量の増加は、肝細胞膜透過の刺激による受動的なカルシウム流入を促進させた結果か、あるいは能動的なカルシウム流出阻害により引き起こされているものと考えられた。カルチトニンの細胞外カルシウム流出の阻害作用は、本ホルモンの標的組織である骨細胞¹⁸⁾および腎細胞⁹⁾において実証されているが、Fig. 1 に示した如く、鉛投与ラットの肝切片においてもホルモンの作用が発現され得ることから、カルシウムの細胞外流出に対する鉛投与の影響はわずかであり、おそらく培養中における鉛投与ラットの肝切片中のカルシウム量の増加はカルシウムの細胞内への受動的な流入が促進されたことによるものと推察される。

著者らは、前報の *in vivo* 実験において、⁵¹ 甲状腺および副甲状腺の同時摘出後に酢酸鉛 (20 mg/100 g) を腹腔内投与した動物にカルシウム (2.0 mg/100 g) を4時間

の間隔で3回腹腔内に連続投与した場合には、カルシウム投与しなかった場合と比較して、肝カルシウム量は有意に増加せず、この場合に、カルチトニン (80 MRC mU/100 g) を連続投与することにより、肝カルシウム量は著しく増加し、*intact* な動物に鉛を投与した場合に得られた値の約70%にまで増加することを認めている。

前報⁹⁾ および本実験の結果をも考慮すると、酢酸鉛投与後に誘起された肝におけるカルシウム蓄積の機構としては、鉛投与の結果、カルシウムに対する肝細胞膜透過 *barrier* が刺激されカルシウム流入が引き起こされているものと考えられるが、鉛投与後の血清カルシウムの上昇にともない甲状腺から分泌されたカルチトニンによるカルシウムの細胞外流出阻害に起因していることが第一義的であると考察される。