酢酸鉛投与ラットの骨酸性水解酵素活性におよぼすカドミウムの影響について

山本丈夫, 山口正義, 佐藤秀司
静岡薬科大学¹⁾

Effect of Cadmium Acetate on Bone Acid Hydrolases
Activity in Rats treated with Lead Acetate

TAKEO YAMAMOTO, MASAYOSHI YAMAGUCHI
and HIDEJI SATO
Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received February 28, 1975)

The activity of β -glucuronidase and β -galactosidase in the femur of rats was examined after single intraperitoneal administration of lead (10.0 mg/100 g) or cadmium (0.15 mg/100 g) acetate, and the following results were obtained. Bone β -glucuronidase and β -galactosidase activities increased significantly ($p < 0.01$) 1 day after lead or cadmium administration compared with control rats, and these enzyme activities were significantly increased 7 days after lead or cadmium administration. Bone β -glucuronidase and β -galactosidase activities were slightly elevated by the administration of a mixture of lead and cadmium.

These results suggest that lead or cadmium may cause metabolic disorder in the bone tissue of rats.

結 言

急性および慢性の鉛中毒時に体内に吸収された鉛が骨髄に多量に蓄積し、長期にわたって貯留されることが知られており、²⁾ 無機鉛化合物をラットに筋肉注射した場合、15分後にハーバース管の周囲に鉛が現われる。³⁾ 体内に吸収された鉛は、その70—90%が骨に沈着し、骨沈着量の60%は緻密質のハーバース管(骨の栄養血管)の少ない部分にあり移動しにくい形で存在しているが、緻密質のハーバース管周囲および海綿質に残りの鉛が沈着し移動しやすい性質を有している。⁴⁾ このように鉛摂取時に骨に沈着された鉛が骨における無機質代謝に障害を与えるものと推察される。骨基質は無機質と有機基質とからなり、無機質は骨塩結晶としてカルシウム、リン、炭酸などが主成分である。著者らは、酢酸鉛をラットの

腹腔内に1回投与した後の大腿骨に沈着する鉛量が投与後急激に増加するのに対して、大腿骨中のカルシウム量は鉛投与後に有意に減少することを認めている。⁵⁾

酵素細胞化学的には骨芽細胞中に強いアルカリ性フォスファターゼの活性が認められることが古くから知られており、電顕的にもその局在が細胞膜に観察されている。また、 β -グルクロニダーゼ等の酸性水解酵素などは骨細胞中のリソゾーム顆粒に存在しており、著者らは、酢酸鉛投与後にラットの大腿骨の緻密質から抽出した酸性水解酵素の活性が増加することを認めている。⁶⁾

一方、カドミウム(Cd)中毒時の骨障害は、腎におけるカルシウム再吸収能力の低下および腸管からのカルシウム吸収障害に由来する低カルシウム血症、⁷⁾ 続発性副甲状腺機能亢進による骨の脱灰を誘起させる二次的なも

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

2) S. Haumont, J. Vincent, *Exp. Cell. Research*, **18**, 404 (1959)。

3) G.E. Voigt, L.E. Larrison, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **47**, 256 (1959)。

4) J. Teisinger, *Int. Arch. Gowerbeepat. Gewerbehyg.*, **25**, 240 (1969)。

5) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **20**, 287 (1974)。

6) M. Yamaguchi, H. Sato, T. Yamamoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **23**, 1789 (1975)。

7) 菅原直毅, 日衛誌, **29**, 399 (1974)。

のと考えられているが,⁸⁾ 最近では, Cd 投与時に骨に沈着したわずかな Cd が直接的に骨代謝障害を引き起こす可能性が示唆されている.⁹⁾ しかしながら, 骨代謝に関係した骨細胞中の酵素活性におよぼす影響についての報告は少ないものと思われる.

本報においては, 酢酸鉛投与後の骨酸性水解酵素である β -グルクロニダーゼおよび β -ガラクトシダーゼ活性の増加に与える Cd 投与による複合的な影響について検討し, かつ, 酢酸鉛投与時に肝および血清カルシウム量が増加することが知られているので, それに与える影響についても記述した.

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, 固型飼料 (オリエンタル酵母工業 KK 製, MF) と精製水 (イオン交換法によって脱イオンした後に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, $25 \pm 1^\circ$ の恒温室中で飼育した.

2. 投与および測定方法 酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) および酢酸カドミウム ($\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を精製水に溶かして, それぞれ金属イオンとして 10.0 mg/ml, 0.15 mg/ml の水溶液を調製した. また, 精製水 1 ml 当り酢酸鉛 (Pb^{2+} 10.0 mg) および酢酸カドミウム (Cd^{2+} 0.15 mg) の両方を含む混合溶液を調製した. これらの金属試料溶液を上記 1. のラットの腹腔内に 1.0 ml/100 g 体重の割合で 1 回投与した. 第 1 群を正常群とし, 第 2 群, 第 3 群はそれぞれ酢酸鉛投与群, 酢酸カドミウム投与群とし, 第 4 群を酢酸鉛と酢酸カドミウムの混合投与群とした. 金属投与後, 動物は経口的に軽いエーテル麻酔下で開腹後, 心臓せん刺により殺すことなく採血後, 肝臓および両後肢の大腿骨を切除した.

切除した大腿骨は, 冷生理食塩水中で筋肉繊維を取り去り, 骨髓を洗滌除去して得た骨質を細く破碎し, 7.5 mm バルビタール緩衝液 (pH 7.4) 3.0 ml に入れ, 超音波処理で 30 秒間振盪させ骨細胞を破壊した.¹⁰⁾ 5 分間, $6000 \times g$ で遠心分離後に得られた上清液は骨組織から抽された可溶画分中の酵素活性の測定のために使用した.

酵素活性の測定は, β -グルクロニダーゼおよび β -ガラクトシダーゼについて Vase 等¹¹⁾ の方法に準じて行なった. 酵素活性は, 1 分間の反応に対する蛋白質 mg 当りの基質分解の $\text{m}\mu\text{moles}$ として表示した. 反応は常に酵素蛋白を除いた基質溶液だけで空試験を行なった. 蛋白質は標準蛋白として牛血清アルブミンを用いて Lowry 等¹²⁾ の方法により定量した.

採集された血液はただちに遠心分離して血清を得た後にカルシウムおよび無機リンを測定した. 血清中カルシウム量は, 15% トリクロロ酢酸で除蛋白後, 原子吸光分析計 (Perkin-Elmer, 303 型) にて測定した.¹³⁾ 血清中無機リンの定量は Taussky 等¹⁴⁾ の方法により行なった.

肝臓中カルシウム量の測定は, 摘出した肝臓の表皮を剝離し, 葉身の中央部を切除し, その一定量を塩酸溶液中で加熱分解後, 上記原子吸光分析計で行なった.¹⁵⁾

結果および考察

ラットの大腿骨における酸性水解酵素である β -グルクロニダーゼおよび β -ガラクトシダーゼ活性に与える酢酸鉛 (10 mg/100 g), 酢酸カドミウム (0.15 mg/100g) 投与の影響について検討し, その結果を Fig. 1, Fig. 2 に示した. 結果は各 5—6 匹の動物の平均値とその標準誤差で表示した. 骨 β -グルクロニダーゼ活性は, 鉛投与後 1 日目において有意 ($p < 0.01$) に増加し, その値は投与後 7 日目においても認められた. また, カドミウム投与では投与後 1 日目で酵素活性は有意 ($p < 0.01$) に増加し, 投与後 1 日目および 3 日目の値は鉛投与の場合よりも大きかった. これに対して, 鉛とカドミウムを混合投与した場合には, 酵素活性は鉛, カドミウム単独投与の場合と比較して投与 1 日目では有意に増加しなかったが, 投与 3 日目において著しく ($p < 0.01$) 増加することが認められた.

一方, 骨 β -ガラクトシダーゼ活性は, 鉛およびカドミウム投与において, いずれの場合においても投与前の値と比較して, 投与後 1 日目で急激に増加し, 投与後 7 日目においても有意 ($p < 0.01$) に増加していた. 鉛とカドミウムの混合投与の場合には, 酵素活性は投与後 1 日目において鉛およびカドミウムのいずれの投与の場合

8) 鈴木継美, 鈴木庄亮, 臨床薬理, **1**, 86 (1970).

9) 木村正巳, 小滝規子, 吉木周作, 須田立雄, 鈴木ミチ子, 日衛誌, **29**, 66 (1974).

10) H.H. Messer, W.D. Armstrong, L. Singer, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **143**, 690 (1973).

11) G. Vaes, P. Jacques, *Biochem. J.*, **97**, 380 (1965).

12) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

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

14) H.H. Taussky, E. Shorr, *J. Biol. Chem.*, **202**, 675 (1953).

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

Fig. 1. The Time Course of the Increase of β -Glucuronidase Activity in Bone Tissues of Rats after a Single Intraperitoneal Administration of Lead or Cadmium

The rats were killed after a single intraperitoneal administration of lead (Pb 10 mg/100 g) or cadmium (Cd 0.15 mg/100 g). β -Glucuronidase was measured in a total volume of 1 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, with 1.5 mM phenolphthalein glucuronidate as substrate. The reaction was stopped by the addition of 3.0 ml of a solution containing glycine (0.133 M), NaCl (0.067 M) and Na_2CO_3 (0.083 M), pH 10.7. Each point represents the mean value of 7 or 8 animals. The vertical lines give the standard error.

●—●: lead ○—○: cadmium
▲—▲: lead+cadmium

よりも大きな増加を示した。

本実験において、酢酸鉛投与の場合と同様に、酢酸カドミウム投与においても骨酸性水解酵素活性が増加することが認められた。副甲状腺から分泌される副甲状腺ホルモンは、骨酸性水解酵素を活性化させ、骨からのカルシウムの遊出を引き起こすが、¹⁶⁾ 鉛投与ラットの骨酸性水解酵素活性の増加は甲状腺および副甲状腺の同時摘出した場合においても認められ、¹⁷⁾ 鉛投与後の骨酸性水解酵素活性の増加は副甲状腺ホルモンの作用を媒介しているものではなく骨緻密質に沈着した鉛に起因するものであろう。前報¹⁷⁾ で考察したように 鉛投与後の骨緻密質中のカルシウム量の減少は、鉛投与後の骨酸性水解酵素の活性増加により、骨カルシウムの遊出を引き起こしたものと推察される。

Fig. 2. The Time Course of the Increase of β -Galactosidase Activity in Bone Tissues of Rats after a Single Intraperitoneal Administration of Lead or Cadmium

The rats were killed after a single intraperitoneal administration of lead (Pb 10 mg/100 g) or cadmium (Cd 0.15 mg/100 g). β -Galactosidase was assayed in a total volume of 1.0 ml of 0.1 M citrate buffer, pH 3.6, with 3.75 mM *o*-nitrophenyl β -D-galactoside as substrate. The reaction was stopped by the addition of 1.5 ml of 2.75% trichloroacetic acid. Each point represents the mean value of 7 or 8 animals. The vertical lines give the standard error.

●—●: lead ○—○: cadmium
▲—▲: lead+cadmium

カドミウム中毒時においてみられる骨の異常について、従来、腎尿細管の障害との関係で論じられている。⁸⁾ 最近では、腸管からのカルシウム吸収が阻害され、腎でのカルシウム再吸収に関与しているカルシウム結合蛋白の結合能力の低下が知られており、⁷⁾ カドミウム中毒時の骨軟化症の一因である低カルシウム血の原因になり得ているものと考えられている。また、カドミウム摂取時 (30 ppm で3週間) に腎に多量の カドミウムが蓄積されるが、カルシウム輸送と骨塩動員を促進させる活性型ビタミン D_3 (1,25-(OH) $_2$ - D_3) の腎での生成に対して何等の影響をも与えず、骨ではカドミウムがチオネインと結

16) G. Vaes, *J. Cell. Biol.*, **39**, 676 (1968).

17) M. Yamaguchi, T. Yamamoto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 1882 (1974).

TABLE I. The Serum Calcium and Inorganic Phosphorus, and Liver Calcium Concentrations in Rats treated with Lead or Cadmium Intraperitoneally

Treatment ^{a)}	Number of rats	Serum calcium (mg/dl)	Serum Inorganic phosphorus (mg/dl)	Liver calcium (μ g/gwet)
Normal	7	9.80 $\pm$ 0.16	10.53 $\pm$ 0.16	12.9 $\pm$ 1.3
Lead acetate	8	11.52 $\pm$ 0.12 ^{b)}	9.76 $\pm$ 0.57 ^{c)}	53.7 $\pm$ 8.2 ^{b)}
Cadmium acetate	7	9.72 $\pm$ 0.14	9.87 $\pm$ 0.18 ^{c)}	34.9 $\pm$ 3.4 ^{b)}
Lead acetate + cadmium acetate	7	9.66 $\pm$ 0.15	7.85 $\pm$ 0.24 ^{b)}	76.0 $\pm$ 14.5 ^{b)}

Values are mean $\pm$ standard error.

a) The rats were killed 1 day after a single intraperitoneal administration of lead (Pb 10 mg/100 g) or cadmium (Cd 0.15 mg/100 g).

b) significant difference from normal, $p < 0.01$

c) significant difference from normal, $p < 0.05$

合しているものが20%で、他の80%はカドミウムイオンの状態にあり、骨組織学的所見から、骨組織に直接何等かの毒作用をおよぼしているのではないかと考えられている。⁹⁾ 本実験において、鉛投与の場合よりもきわめて少量のカドミウム投与で鉛の場合と同程度の骨酸性水解酵素活性の増加が認められたことから、骨に沈着しているカドミウムが直接骨組織の代謝系に影響をおよぼしているものと思われる。

酢酸鉛投与後の血清カルシウムおよび無機リン量、肝カルシウム量に対する酢酸カドミウムの影響について検討し、その結果を Table I に示した。血清カルシウム量は、正常の場合と比較して、投与後1日目において有意($p < 0.01$)に増加し、カドミウム投与では正常レベルを示したのに対して、鉛およびカドミウムの混合投与の場合には鉛の単独投与の時にみられた血清カルシウムの増加は認められず、いわゆる鉛投与後の血清カルシウム上昇に対してカドミウム投与が拮抗する現象が認められた。著者らは、¹⁸⁾ラットに酢酸鉛および酢酸カドミウムをそれぞれ金属イオンとして0.1 mgを毎日1回30日間連続経口投与した場合において、鉛およびカドミウムを単独投与した場合には対照と比較して有意な低下は認められないが、混合投与することにより血清カルシウム量は著明($p < 0.05$)に低下することを報告している。血清無機リン量は、鉛およびカドミウムの単独投与によりいずれも有意($p < 0.05$)に低下し、これらの混合投与により相加的に減少することが認められた。鉛とカドミウムを経口投与した場合にも同様な現象が認められている。¹⁸⁾

肝細胞中のカルシウム量は、投与後1日目において、鉛投与では正常の約4倍に、カドミウム投与では約2.5倍に増加したのに対して、鉛とカドミウムの混合投与の場合には、それぞれの単独投与よりも増加し、正常の約6倍を示し、この値は投与7日目でも認められた。細胞内へのカルシウム流入は受動的な現象であり、流出は代謝的に依存した能動的な現象であるが、¹⁹⁾鉛投与ラットの肝カルシウムの蓄積現象は、鉛投与後の血清カルシウム量の増加に依存し、カルチトニンによるカルシウムの肝細胞外流出の阻害の結果であると考えられている。²⁰⁾カドミウム投与後の肝カルシウム量の増加は、肝細胞によるカルシウムの流出入にカドミウムが影響した結果であると推察されるが、本実験のような腹腔内投与で認められた場合と逆の現象がカドミウム(0.1 mg)の30日間連続経口投与実験で発現された。¹⁸⁾これは投与方法の相違によるものと思われるが、経口投与の場合には腸管に障害を与えカルシウムの吸収が阻害されることが知られている。⁷⁾

結 論

酢酸鉛(10 mg/100 g)の1回腹腔内投与後の骨 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ活性、血清カルシウム、無機リン量および肝カルシウム量におよぼす酢酸カドミウム(0.15 mg/100 g)投与の影響を検討し、次の如き結果を得た。

骨 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ活性は、正常と比較して、鉛、カドミウム投与により有意に増加し、混合投与によりわずかに高められた。血清カルシウム量は鉛投与により有意に増加したが、この増加はカド

18) 山口正義, 西沢雅彦, 山本丈夫, 衛生化学, **20**, 236 (1974).

19) A.B. Borle, *Endocrinology*, **83**, 1316 (1968); A.B. Borle, *Endocrinology*, **85**, 194 (1969); A.B. Borle, *J. Gen. Physiol.*, **53**, 57 (1969); A.B. Borle, *J. Gen. Physiol.*, **53**, 43 (1969).

20) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **21**, 282 (1975).

ミウム投与により阻害され、血清無機リン量は単独投与で有意に減少し、混合投与で相加的に低下した。肝カルシウム量は、鉛、カドミウム投与で、それぞれ正常の約4倍、約2.5倍に増加し、混合投与では約6倍を示した。

本実験で得られた結果は、鉛およびカドミウムが骨代

謝障害を引き起こす可能性を示唆しており、また、鉛投与時のカルシウム代謝にカドミウムが複合的な影響をおよぼすものと考えられる。

謝辞 本実験に際し適切な助言を賜った当研究室 祐田泰延博士に謝意を表する。