衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
23 (4) 262-265 (1977)

ラット大腿骨の酸性フォスファターゼと β -N-アセチルグルコサミダーゼ
活性におよぼすカドミウム、鉛および亜鉛の相互作用

山口正義, 鉄明美, 山本丈夫
静岡薬科大学¹⁾

Interaction of Cadmium, Lead, and Zinc on Acid Phosphatase and
 β -N-Acetylglucosaminidase Activities in Femur of Rats

MASAYOSHI YAMAGUCHI, AKEMI KUROGANE
and TAKEO YAMAMOTO
Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received January 7, 1977)

The acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase activities of femur were examined in rats intraperitoneally administered cadmium acetate, lead acetate, zinc acetate, or combined metals (0.89 μ mol as a metal ion/100 g body weight) 5 times at 2-day intervals.

Acid phosphatase activity in the diaphysis was significantly decreased by the administration of cadmium and increased by the injection of lead or zinc compared with that of normal rats, but this enzyme activity in the epiphysis was significantly elevated by cadmium alone.

Also, β -N-acetylglucosaminidase activity in the diaphysis was significantly reduced by the administration of cadmium or zinc and enhanced by the treatment with lead compared with that of normal rats, but this enzyme activity in the epiphysis was significantly increased by cadmium alone.

On the other hand, these enzyme activities in both diaphysis and epiphysis after injection of combined metals did not show a significant alteration.

The present results indicate that the specific action of each metal was modified by the administration of these metals in combination.

Keywords—rats ; acid phosphatase ; β -N-acetylglucosaminidase ; lead ; cadmium ; zinc

緒言

さきに著者らは、カドミウム、鉛および亜鉛投与時のラット大腿骨中無機質²⁾ならびに有機質量³⁾の変動について調べ、骨成分においては金属の単独投与時に発現した作用が金属の相互効果のために修飾を受けることを報告した。

骨の代謝は骨組織内に存在する osteoblast および osteoclast という細胞により調節され、osteoblast が骨形

成に機能しているのに対して、osteoclast は骨吸収に関与している。この osteoclast の活性化は骨塩溶解を誘起させるが、カドミウム、鉛投与時に観察された骨カルシウムの減少の要因は、これらの金属による骨形成の遅延か、あるいは骨吸収の促進にもとづくものと推察される。骨吸収に際して、有機質の溶解が先か、無機結晶の溶解が先であるかは、まだ定見が得られていないものの、少なくとも有機質の溶解はリソゾーム酵素の細胞外

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, 山本丈夫, 衛生化学, **22**, 190 (1976)。

3) 山口正義, 山本丈夫, 衛生化学, **22**, 319 (1976)。

放出によって始まるものと理解されている。

そこで本報では、骨の無機質あるいは有機質を分解消化する働きのある骨酸性水解酵素である酸性フォスファターゼおよび β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性におよぼすカドミウム、鉛および亜鉛の抑制について検討した。その結果、カドミウム投与時に現われた大腿骨の骨端部における酸性水解酵素活性の上昇は、鉛および亜鉛の混合投与で修飾されることを認めた。

実験方法

1. 実験動物および投与方法 体重約 100 g のウィスター系雄ラットを前報²⁾ 同様に飼育し実験に供した。投与試料溶液は、カドミウム、鉛および亜鉛の酢酸塩を精製水を用いて金属イオンとして $0.89 \mu\text{mol/ml}$ の濃度に調製した。これらの金属溶液は $0.89 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ 体重の割合で上記動物に隔日に連続 5 回腹腔内投与した。動物は最後の投与 48 時間後に軽いエーテル麻酔下で解剖し、左右の大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の筋肉繊維および骨髄を冷生理食塩水ですみやかに洗浄除去し、骨幹部と骨端部に分けた。これらを細く破碎し、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。⁴⁾ 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出された可溶画分中の酵素活性の測定のために使用した。

2. 測定方法 酸性フォスファターゼ活性の測定は Linhardt ら⁵⁾ の方法に準じて行った。酵素反応は、試験管内に 50 mm クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 1.0 ml, 5.5 mm *p*-ニトロフェニルリン酸 0.1 ml, 酵素抽出液 0.1 ml を加えて 37° で 30 分間行った。反応は

0.1 N NaOH 4.0 ml の添加により停止した。

また、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の測定は Vaes ら⁶⁾ の方法に準じて行った。酵素反応は、試験管に 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 0.8 ml, 8 mm, *o*-ニトロフェニル N-アセチル- β -D-グルコサミニド 0.1 ml, 酵素抽出液 0.1 ml を加えて 37° で 6 時間行った。反応は 2.75% (w/v) トリクロロ酢酸 1.5 ml の添加により停止した。

酵素活性の単位は、酵素蛋白質 1 mg あたりで 1 分間の反応時間により生成した *p*-あるいは *o*-ニトロフェノールの量として表示した。酵素蛋白質量の測定は Lowry ら⁷⁾ の方法で行った。

実験結果

カドミウム、鉛および亜鉛の等モル量 ($0.89 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ 体重) を隔日に連続 5 回腹腔内投与したラット大腿骨の骨幹部と骨端部における酸性フォスファターゼ活性および β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の変動について調べ、その結果をそれぞれ Table I または Table II に表示した。

まず酸性フォスファターゼ活性は、骨幹部において、カドミウム投与で有意 ($p < 0.01$) に低下したのに対して、鉛、亜鉛投与時にはいずれも有意 ($p < 0.01$) に上昇した。しかしながら、カドミウム、鉛および亜鉛の混合投与時の酵素活性は正常と比較して有意な変動を示さなかった。また、骨端部での酵素活性は 3 つの金属の中でカドミウム投与時のみ有意 ($p < 0.01$) に上昇したが、この上昇は鉛および亜鉛の同時投与で抑制され、正常値にまで低下することが認められた (Table I)。

TABLE I. Effects of Cadmium, Lead, and Zinc on Acid Phosphatase Activity in Femur of Rats

Treatment ^{a)}	Number of rats	Acid phosphatase activity ^{b)}	
		Diaphysis	Epiphysis
Normal	5	0.233 ± 0.012^c	0.249 ± 0.024
Cadmium acetate	6	0.160 ± 0.002^d	0.315 ± 0.017^d
Lead acetate	6	0.391 ± 0.057^d	0.255 ± 0.011
Zinc acetate	6	0.283 ± 0.017^d	0.279 ± 0.036
Cadmium, lead, and zinc acetate	6	0.288 ± 0.005	0.242 ± 0.039

a) Metallic reagents ($0.89 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ body weight) were administered intraperitoneally 5 times at 2-day intervals.

b) Enzyme activity was expressed as μmoles of *p*-nitrophenol liberated per min per mg protein.

c) Values are mean $\pm$ SEM.

d) Differs from respective normal, $p < 0.01$.

- H. H. Messer, W. D. Armstrong, L. Singer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**, 690 (1973).
- K. Linhardt, K. Walter, "Methods of Enzymatic Analysis," ed. by H. V. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1965, p. 783.
- G. Vaes, P. Jacques, *Biochem. J.*, **97**, 380 (1965).
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

一方、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は、骨幹部においてカドミウム、亜鉛投与で有意に減少し、鉛投与で著しく増加したが、カドミウム、鉛および亜鉛の同時投与では有意な変動を現わさなかった。これに対して、骨端部の酵素活性は、カドミウム投与時にのみ有意 ($p < 0.01$) に上昇することが認められた (Table II)。

このように、カドミウム、鉛および亜鉛を投与したラット大腿骨の骨幹部と骨端部での酸性水解酵素活性の変動が等モル量のカドミウム、鉛および亜鉛を混合投与することにより修飾され、金属間の相互作用が発現することを見出した。

考 察

カドミウムは、イタイイタイ病の原因物質として考えられており、骨代謝に対するカドミウムの作用についての研究がなされ、それによると実験的にカドミウムを摂取した動物の骨組織に骨萎縮症の像が観察されている。⁸⁾ しかしながら、骨組織の生化学的分析はまだ十分に行われていないようである。

骨コラーゲンは、骨塩沈着の母体となっている骨の有機質成分であり、カドミウム経口摂取によって雌雄ラットに骨萎縮症の像が見られ、骨コラーゲンの架橋結合に質的变化が認められている。⁹⁾ また雄性ラットに 10—300 ppm の塩化カドミウムを含むビタミンD欠乏食を3

週間与えた時に、カドミウムは主に肝ならびに腎臓に蓄積されるが、骨への蓄積は極めて少なく、肝臓、腎臓におけるビタミンDの活性化は余り影響を受けないことが知られている。¹⁰⁾ これらの事実からカドミウムによる骨異栄養症的な変化は、カルシウム代謝の他の関連臓器に障害作用をおよぼす時期にはるかに先行して起こることから、骨組織に対するカドミウムの作用には直接的なものと間接的なものがあることが推定されている。¹¹⁾

この研究において、カドミウム投与時には酸性フォスファターゼおよび β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性のいずれの活性も骨幹部では低下するのに対して、骨端部では有意に増加することを見出した。これらの酸性水解酵素の活性上昇は、骨塩溶解を誘起して骨カルシウムの血液への移動を促進するものと考えられている。¹²⁾ 従って、カドミウム投与時に骨カルシウムの減少が起こると推察されるが、事実、カドミウム投与により骨幹部ではなく骨端部のカルシウム量の著しい減少を観察している。⁸⁾ このようにカドミウム投与時に誘起した大腿骨の骨端部のカルシウム低下は酸性水解酵素活性の上昇にもとづくものと理解される。

一方、イタイイタイ病者の骨中にカドミウム、鉛および亜鉛が多量に存在していることが知られている。¹³⁾ このことから、カドミウム、鉛および亜鉛が骨代謝に複合

TABLE II. Effects of Cadmium, Lead, and Zinc on β -N-Acetylglucosaminidase Activity in Femur of Rats

Treatment ^{a)}	Number of rats	β -N-Acetylglucosaminidase activity ^{b)}	
		Diaphysis	Epiphysis
Normal	5	34.2 $\pm$ 0.96 ^{c)}	26.6 $\pm$ 1.76
Cadmium acetate	6	23.9 $\pm$ 0.69 ^{d)}	30.1 $\pm$ 2.31 ^{d)}
Lead acetate	6	40.2 $\pm$ 2.20 ^{d)}	27.1 $\pm$ 1.43
Zinc acetate	6	30.0 $\pm$ 1.45 ^{d)}	28.2 $\pm$ 1.66
Cadmium, lead, and zinc acetate	6	32.8 $\pm$ 1.18	26.1 $\pm$ 1.61

a) Metallic reagents (0.89 μ mol/100 g body weight) were administered intraperitoneally 5 times at 2-day intervals.

b) Enzyme activity was expressed as mumoles of *o*-nitrophenol liberated per min per mg protein.

c) Values are mean $\pm$ SEM.

d) Differs from respective normal, $p < 0.01$.

- 8) S. Yoshiki, T. Yanagisawa, M. Kimura, N. Otaki, M. Suzuki, T. Suda, *Arch. Environ. Health*, **30**, 559 (1975).
- 9) 木村正巳, 環境保健レポート, No. 38, 日本公衆衛生協会発行, 1976年, p. 126.
- 10) M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi, T. Suda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340 (1974).
- 11) 須田立雄, 木村正巳, 小滝規子, 吉木周作, 環境保健レポート, No. 38, 日本公衆衛生協会発行, 1976年, p. 123.
- 12) G. Vaes, "Lysosomes in Biology and Pathology," Vol. I, ed. by J. T. Dingle and H. B. Fell, North-Holland Publishing, Company, Amsterdam, 1969, pp. 217—253.
- 13) 小林 純, 科学, **39**, 286 (1969).

的な影響を発現させるものと考えられたので、先にラット大腿骨の骨幹部ならびに骨端部のカルシウム量²⁾および蛋白質量³⁾に対する作用を調べたところ、カドミウム、鉛および亜鉛の単独投与時の各々の作用が混合投与で修飾されることを見出した。また、この実験においてカドミウム投与により引き起こされた大腿骨の酸性水解

酵素活性の変動がカドミウム、鉛および亜鉛の混合投与で修飾されることを知った。これらの事実から、カドミウム、鉛および亜鉛が骨に蓄積されたとしても、これらの金属による骨代謝への複合的な影響の発現を認めにくいことが示唆される。