無機スズ経口投与ラットにおける生化学的指標の変動

山口正義, 岡田昌二

静岡薬科大学¹⁾

Alterations of Biochemical Index in Rats orally Administered Inorganic Tin

MASAYOSHI YAMAGUCHI and SHOJI OKADA

Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received April 28, 1979)

The toxic effect of orally administered tin compounds was examined in rats. Stannous chloride and concentrated solution of tin eluted from canned citric acid (can-tin solution) were used. The latter is a model compound of tin from canned food. The rats were administered with the compounds, at a dose of 30 mg Sn/kg at each time, 6 times at 12 hr intervals, and then bled 17 hr after the last administration.

Both compounds caused femoral deposition of tin. The deposition was also found in the stomach only after stannous chloride. Of the biochemical markers tested, gastric acid secretion, duodenal alkaline phosphatase activity, serum calcium concentration, hepatic phosphorylase activity, and femoral calcium content were significantly reduced by the administration of stannous chloride. On the other hand, only femoral calcium content was significantly decreased by can-tin solution.

These results suggest that, in the experimental condition of the present study, bone is the target organ of inorganic tin compounds, possibly, in any chemical form.

Keywords—inorganic tin; toxicity and distribution of tin; bone calcium; serum calcium; gastric acid secretion; duodenal alkaline phosphatase; liver phosphorylase

緒 言

スズは古くから人間の生活に利用されてきた金属のひとつである。とくに近年、鋼板にスズメッキしたブリキ缶による缶詰飲食品の普及に伴って、一層、生活に密着した形で利用されている。その反面、スズが溶出した缶詰飲食品の摂取に起因する中毒事例がいくつか報告されている。

例えば、Luff ら²⁾は 730 ppm のスズ濃度を含む缶詰桜桃の摂取によるスズ中毒の事例を 1890 年に報告している。Kwantes³⁾は 250 ppm のスズ含有飲食物の摂取により嘔吐、下痢をひき起こすことを、また Omori ら⁴⁾は

452 ppm のスズ含有みかん果汁を摂取させた動物の 80% に嘔吐を誘起することなどを報告している。しかし、これらの事例は、いずれもかなり高濃度のスズについてのものであり、250 ppm 以下の濃度でのスズ中毒については報告がわずかである。これらの状況から、一般に無機スズの毒性はあまり強くないものと考えられているが、毒作用についての十分な知見に欠けるためにその無作用量は明らかにされていない。

著者らは、これまでに無機スズの毒作用を動物実験的に研究する中で、塩化第一スズ溶液を短期経口投与すると、胃酸分泌の低下^{5,6)} 糖代謝異常^{7,8)} およびカルシウ

1) Location: 2-2-1 Oshika, Shizuoka, 422, Japan (静岡市小島 2 丁目 2 番 1 号)。

2) A.P. Luff, J.H. Metcalfe, *Br. Med. J.*, **1**, 833 (1890)。

3) W. Kwantes, Report of the royal society of health conferences on safety of canned foods, 1965. Royal Society of Health (London), p.143, 1966.

4) Y. Omori, A. Takanaka, S. Tanaka, Y. Ikeda, T. Fruya, *J. Food Hyg.*, **14**, 69 (1973)。

5) 山口正義, 山本丈夫, 日衛誌, **31**, 453 (1976)。

6) M. Yamaguchi, T. Endo, T. Yamamoto, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 417 (1978)。

7) M. Yamaguchi, H. Suzuki, T. Yamamoto, *Toxicol. Lett.*, **2**, 111 (1978)。

8) M. Yamaguchi, H. Suzuki, T. Yamamoto, *Toxicol. Lett.*, **2**, 171 (1978)。

ム代謝異常^{9,10)}をひき起こすことを見いだしてきた。本研究においては、これらの知見を基礎に、無機スズ経口摂取時の無作用量を明らかにすることを目標にして、まず無機スズ化合物の短期経口投与ラットにおける生化学的指標について検索し、興味ある知見を得た。なお、無機スズ化合物としては、塩化第一スズ以外に食品衛生学的見地から実際の缶詰中に存在すると考えられる缶溶出スズ濃縮液¹¹⁾を用いて両者を比較した。

実験方法

1. 供試動物 ウイスター系雄ラット体重100—110 gのものをを用いた。実験期間中、ラットは25±1°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, M. F.）と精製蒸留水を自由に摂取させた。

2. スズ溶液の調製 塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) は 6 N HCl 溶液 2 滴を加えた精製蒸留水で溶解し、Sn として 3.0 mg/ml の溶液 (pH 約 1.8) を調製した。このスズ溶液を Sn として 30 mg/kg 体重の割合で 1 日 2 回、3 日間経口投与した。対照にはスズ溶液調製時に用いた HCl 溶液 (pH 約 1.8) を経口投与した。

缶溶出スズ濃縮液（東洋食品研究所堀尾嘉友博士より分与、クエン酸水溶液を缶詰とした場合のスズ溶出液、Sn 2150 ppm およびクエン酸約 0.6 % を含有、pH 3.9)¹¹⁾ は同様に Sn として 30 mg/kg を 1 日 2 回、3 日間経口投与し、対照としては使用したクエン酸水溶液を用いた。

3. 測定方法 a. 臓器内スズ量の測定——ラットはスズの最終投与後 17 時間目にエーテル麻酔下で殺すことなく心臓せん刺により採血し、臓器を摘出した。血液、胃、十二指腸、肝臓、腎臓、脾臓、肺臓、心臓、脳、筋肉組織、脂肪組織、および大腿骨を濃硝酸で 110°で 2 日間加熱分解し、フレイムレス原子吸光度計 (Perkin-Elmer, 403 型) でスズを測定した。

b. 胃液酸性度の測定——ラットはスズの最終投与から 17 時間絶食した。軽いエーテル麻酔下で腹部切開し、胃幽門部を結紮後、切開部を縫合した。この時に動物の

背中中央部に生理食塩水を 50 ml/kg の割合で皮下注射後 3 時間飼育し、再び腹部を切開し、食道部を結紮し、胃を摘出した。摘出した胃の内容物を取り出し、3000 rpm で 10 分間遠心分離後、胃液を回収した。胃液酸性度の測定は胃液 1 ml を精製蒸留水で 5 倍希釈し、フェノールフタレインを指示薬として 0.1 N NaOH により滴定した。

c. 十二指腸粘膜アルカリホスファターゼ活性の測定——十二指腸を反転し、氷冷下で粘膜細胞をかきとり、20 倍量の冷精製蒸留水を加え、Potter-Elvehjem ホモジナイザーでホモジネートとした。ホモジネート中のアルカリホスファターゼ活性の測定は Weiser¹²⁾ の方法により行なった。

d. 血清無機質および酵素活性の測定——血清は採血後ただちに分離し、4°に保存して測定用試料とした。血清カルシウムの測定は 10% トリクロロ酢酸で除蛋白後に原子吸光度計により行なった。¹³⁾

血清無機リンの定量は Taussky ら¹⁴⁾ の方法で行なった。また、血清グルコース量はグリテル-オルト-トルイジン試薬を用いて測定した。¹⁵⁾

一方、血清中のアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、アミラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、コリンエステラーゼおよび乳酸脱水素酵素活性の測定は和光純薬 K. K. の臨床検査用キットを用いて行なった。

e. 肝臓および腎臓の酵素活性の測定——肝臓の一定量を用い、氷冷下で 10% ホモジネートを調製し、ホスホリラーゼと グルコース-6-ホスファターゼ活性を測定した。ホスホリラーゼの全活性の測定は Cahill ら¹⁶⁾ の方法、また、グルコース-6-ホスファターゼ活性の測定は Schwartz¹⁷⁾ の方法に準じて行なった。一方、腎ホモジネート中の Ca-ATPase およびアルカリホスファターゼ活性の測定は Weiser¹²⁾ の報告にもとづいて行なった。酵素反応で生成した無機リン酸は Nakamura ら¹⁸⁾ の方法で定量した。なお蛋白質は Lowry ら¹⁹⁾ の方法で測定した。

9) M. Yamaguchi, T. Yamamoto, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**, 611 (1978).

10) M. Yamaguchi, Y. Kubo, T. Yamamoto, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 559 (1979).

11) T. Horio, Y. Iwamoto, M. Miyazaki, 6th international congress on canned foods, Paris, 1972.

12) M. M. Weiser, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2536 (1973).

13) J. B. Willis, *Nature* (London), **16**, 249 (1960).

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

15) A. Hyvarinen, E. A. Nikkila, *Clin. Chim. Acta.*, **7**, 140 (1962).

16) C. F. Cahill, Jr., J. Ashmore, S. Zottu, A. B. Hastings, *J. Biol. Chem.*, **224**, 237 (1957).

17) A. L. Schwartz, *Biochem. J.*, **126**, 89 (1972).

18) M. Nakamura, K. Mori, *Nature* (London), **182**, 1141 (1958).

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

Fig. 1. Change of Body Weight of Rats orally Administered with Stannous Chloride

The shaded bar represents the period of the administration of tin ($30 \text{ mg Sn}^{2+}/\text{kg}/\text{twice a day}$). Each point represents the mean of 5 animals. The vertical lines give the SE.

○—○—: control. —●—: tin.

f. 骨カルシウムの測定——摘出した大腿骨は、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ルツボに入れ、 650° で24時間灰化した。恒量にした骨質を精秤し、 1 N HCl で溶解後、原子吸光度計によりカルシウム量を測定した。

実験結果

1. スズ経口投与後の体重の変動

塩化第一スズ溶液をSnとして 30 mg/kg の割合で1日2回、9日間連続経口投与したときのラットの体重増加に及ぼすスズの影響を Fig. 1 に示した。体重増加はスズ投与中止5日後から対照群と比較して有意に抑制 ($p < 0.05$) され、21日目においても明らかに抑制 ($p < 0.01$) されていた。

2. スズ経口投与後の臓器内スズ量

Sn として 30 mg/kg の塩化第一スズあるいは缶溶出スズ溶液を1日2回、3日間経口投与し、スズ最終投与後17時間目（スズ投与開始後4日目）における臓器内スズ量を測定した。臓器内スズ量は対照群から得られた値に対する比で表わし Fig. 2 に示した。臓器内スズ量は塩化第一スズ投与群では胃、十二指腸、肝臓および大腿骨に多く、これに対して缶溶出スズ投与群では大腿骨にのみ著しく増加した。いずれの無機スズ化合物においても投与したスズは、他の臓器と比較して大腿骨に顕著に蓄積された。

3. 塩化第一スズ経口投与後の生化学的変動

Sn として 30 mg/kg の塩化第一スズを1日2回、3日間経口投与し、スズ最終投与後17時間目における生化学的変動を胃、十二指腸、血清、肝臓、腎臓および大腿

Fig. 2. Distribution of Tin in the Tissues of Rats orally Administered with Stannous Chloride and "Can-Tin Solution"

The rats were orally administered with stannous chloride or "can-tin solution" ($30 \text{ mg Sn}^{2+}/\text{kg}$) 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr. Each bar represents the mean of 5 animals. The vertical lines give the SE.

□: SnCl_2 . ■: "can-tin solution."

Fig. 3. Change of Gastric Acid Secretion in Rats orally Administered with Stannous Chloride

The rats were orally administered with stannous chloride ($30 \text{ mg Sn}^{2+}/\text{kg}$) for 6 times at 12-hr intervals. The rats were fasted for 14 hr after the last administration of tin, and they were bled 3 hr after pyloric ligation. Each bar represents the mean of 5 animals. The vertical lines give the SE.

□: control. ■: tin.

骨について調べ、対照群の場合と比較した、

胃液量はスズ投与によりわずかに減少したが、胃液酸性度は明らかに低下 ($p < 0.01$) した (Fig. 3)。

十二指腸粘膜ホモジネートのアルカリホスファターゼ活性はスズ投与により有意に低下 ($p < 0.01$) した (Ta-

TABLE I. Change of Alkaline Phosphatase Activity in the Duodenal Mucosa of Rats orally Administered with Stannous Chloride

Treatment	Alkaline phosphatase activity ^{a, b)} (nmol/min/mg protein)
Control	14.6 ± 0.79
Tin ^{c)}	10.1 ± 0.39 ^{d)}

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) Enzyme activity was expressed as nmoles of p-nitrophenol liberated/min/mg protein.

c) The rats were orally administered with stannous chloride (30 mg Sn²⁺/kg) for 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr.

d) $p < 0.01$ as compared with control.

ble I).

血清における生化学的变化を調べた結果を Table II に示した. 血清カルシウムはスズ投与により有意に減少 ($p < 0.01$) したが, 血清無機リンとグルコースには有意な変動がみられなかった. また, 血清のアルカリホスファターゼ, 酸性ホスファターゼ, アミラーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼ, ゴリンエステラーゼおよび乳酸脱水素酵素活性にも有意な変動がみられなかった.

肝および腎ホモジネートの酵素活性について調べた結果を Table III に示した. 肝ホモジネートのホスホリラーゼ活性はスズ投与により明らかに低下 ($p < 0.01$) したが, グルコース-6-ホスファターゼ活性は有意に変動しなかった. 一方, 腎ホモジネートの Ca-ATPase およびアルカリホスファターゼ活性はスズ投与により有意に低下しなかった.

大腿骨を骨端部と骨幹部に分け, その中のカルシウム量について調べた骨端部と骨幹部のカルシウム量はスズ

TABLE III. Changes of Enzyme Activities in the Liver or the Kidney of Rats orally Administered with Stannous Chloride

Enzyme	Enzyme activity (nmol/min/mg protein) ^{a)}	
	Control	Tin ^{b)}
Liver		
Phosphorylase ^{c)}	21.4 ± 0.87	12.1 ± 0.96 ^{e)}
Glucose-6-phosphatase ^{c)}	15.9 ± 0.85	15.3 ± 0.49
Kidney		
Ca-ATPase ^{c)}	71.4 ± 5.13	68.2 ± 1.99
Alkaline phosphatase ^{d)}	20.6 ± 1.03	17.6 ± 0.96

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) The rats were orally administered with stannous chloride (30 mg Sn²⁺/kg) for 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr.

c) Enzyme activity was expressed as nmoles of inorganic phosphate liberated/min/mg protein.

d) Enzyme activity was expressed as nmoles of p-nitrophenol liberated/min/mg protein.

e) $p < 0.01$ as compared with control.

投与により著しく減少 ($p < 0.01$) した (Fig. 4).

4. 缶溶出スズ経口投与後の生化学的変動

Sn として 30 mg/kg の缶溶出スズをラットに 1 日 2 回, 3 日間経口投与し, 塩化第一スズ経口投与で認められた胃液酸性度, 十二指腸粘膜アルカリホスファターゼ活性, 肝ホスホリラーゼ活性および大腿骨カルシウム量の変動を調べた. 缶溶出スズの経口投与は, 胃液酸性度 (Table IV), 十二指腸粘膜ホモジネートのアルカリホスファターゼおよび肝ホモジネートのホスホリラーゼ活性 (Table V) の有意な変動をひき起こさなかったが, 大腿骨のカルシウム量を骨端部と骨幹部ともに明らかに低下 ($p < 0.01$) させた (Table VI).

TABLE II. Biochemical Findings in Serum of Rats orally Administered with Stannous Chloride

Enzyme	Control ^{a)}	Tin ^{a, b)}
Calcium (mg/100 ml)	10.0 ± 0.2	9.2 ± 0.2 ^{c)}
Inorganic phosphorus (mg/100 ml)	8.3 ± 0.3	8.1 ± 0.2
Glucose (mg/100 ml)	120.4 ± 3.8	126.3 ± 4.6
Alkaline phosphatase (B-L U)	13.8 ± 1.0	13.8 ± 1.3
Acid phosphatase (K-A U)	22.8 ± 1.8	23.7 ± 0.4
Amylase (U/hr)	1518.2 ± 39.0	1534.0 ± 67.4
Leucine aminopeptidase (G-R U)	124.1 ± 3.0	125.9 ± 9.8
Cholinesterase (μ M/50/hr)	4.1 ± 0.5	3.1 ± 0.8
Lactic dehydrogenase (LDH U)	580.0 ± 31.2	594.0 ± 44.4

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) The rats were orally administered with stannous chloride (30 mg Sn²⁺/kg) for 6 times at 12 hr intervals, and then bled for 17 hr.

c) $p < 0.01$ as compared with control.

Fig. 4. Changes of Calcium Content in the Epiphysis and Diaphysis of Femur of Rats orally Administered with Stannous Chloride

The rats were orally administered with stannous chloride (30 mg Sn^{2+}/kg) for 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr. Each bar represents the mean of 5 animals. The vertical lines give the SE.

□ : control. ■ : tin.

TABLE IV. Change of Gastric Acid Secretion in Rats orally Administered with "Can-Tin Solution"

Treatment	Gastric volume ^{a)} (ml/100 g BW)	Total acidity ^{a)} ($\mu\text{eq}/1/100 \text{ g BW}$)
Control	5.4 ± 1.0	358.2 ± 41.6
"Can-tin solution" ^{b)}	4.8 ± 1.1	345.0 ± 33.1

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) The rats were orally administered with "can-tin solution" (30 mg Sn^{2+}/kg) for 6 times at 12-hr intervals. The rats were fasted for 14 hr after the last administration of tin, and then bled 3 hr after pyloric ligation.

考 察

Groot ら²⁰⁾ は Sn として 3000 ppm の塩化第一スズを含有した食餌を与えたラットでは 2 週間目から体重の抑制が現われることを報告している。本研究において、Sn として 30 mg/kg の塩化第一スズを 1 日 2 回、9 日間連続経口投与し、その後、スズ投与を中止したときにもスズ投与開始から 14 日以後に体重増加の有意な抑制が認

TABLE V. Changes of Duodenal Alkaline Phosphatase and Liver Phosphorylase Activities in Rats orally Administered with "Can-Tin Solution"

Treatment	(nmol/min/mg protein) ^{a)} Enzyme activity	
	Duodenal alkaline phosphatase	Liver phosphorylase
Control	13.6 ± 0.60	24.8 ± 1.00
"Can-tin solution" ^{b)}	13.1 ± 0.70	25.5 ± 1.11

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) The rats were orally administered with "can-tin solution" (30 mg Sn^{2+}/kg) for 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr.

TABLE VI. Changes of Calcium Content in the Epiphysis and Diaphysis of Femur of Rats orally Administered with "Can-Tin Solution"

Treatment	Calcium content (mg/g ash) ^{a)}	
	Epiphysis	Diaphysis
Control	411.3 ± 11.0	429.5 ± 14.9
"Can-tin solution" ^{b)}	355.8 ± 12.2 ^{c)}	354.8 ± 12.0 ^{c)}

a) Values are mean ± SE obtained from 5 animals.

b) The rats were orally administered with can-tin solution (30 mg Sn^{2+}/kg) for 6 times at 12-hr intervals, and then bled for 17 hr.

c) $p < 0.01$ as compared with control.

められた。体重増加の抑制はスズ毒性のひとつの指標で考えられる。

一方、無機スズ化合物の経口摂取により引き起こされる生化学的変動についての報告はわずかである。

Groot²¹⁾ は、3000 ppm のスズを含有した食餌をラットに摂取させたときに小腸からの鉄の吸収を低下せしめ、ヘモグロビン量の減少をきたし、貧血を引き起こすことを示唆している。また著者ら²²⁾ は、50 ppm のスズ溶液を 100 日間ラットに飲水させたとき、血清グルコースの低下と腎皮質カルシウムの増加を認めている。

本研究において、Sn として 30 mg/kg の塩化第一スズを 1 日 2 回、3 日間経口投与したときのラットの生化学的指標について検索した。その結果、スズ投与により、胃液酸性度、十二指腸粘膜アルカリホスファターゼ活性、血清カルシウム量、肝ホスホリラーゼ活性および大腿骨

20) A. P. De Groot, V. J. Feron, H. P. Til, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 19 (1973).

21) A. P. De Groot, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 955 (1973).

22) 山口正義, 佐藤秀司, 山本丈夫, 衛生化学, **24**, 200 (1978).

カルシウム量などの明らかな低下が認められた。これらの変動はスズ毒性の生化学的指標として重要であると考えられる。

食品衛生学的見地から、実際の缶詰中に存在すると考えられる缶溶出スズ濃縮液¹¹⁾を用いて、毒性発現の差異を塩化第一スズの場合と比較検討したところ、缶溶出スズの経口投与により胃液酸性度、十二指腸粘膜アルカリホスファターゼおよび肝ホスホリラーゼ活性は有意に変動しなかった。これは塩化第一スズ投与の場合に認められた胃、十二指腸、肝へのスズの蓄積が缶溶出スズでは認められなかった結果 (Fig. 2) と一致する。このことから、缶溶出スズでは、上記の臓器に蓄積されたスズ量が塩化第一スズのそれよりも低いために、スズによる生化学的変動がひき起こされなかったものと推察される。

しかしながら、塩化第一スズ、缶溶出スズのいずれの経口投与によってもスズが大腿骨に著しく蓄積され、しかも大腿骨のカルシウム量が明らかに減少したことから、骨に対しては塩化第一スズと缶溶出スズはともに毒作用を発現するものと推察される。おそらく骨は無機スズ化合物の標的臓器であると考えられる。

結 語

無機スズ化合物の毒作用をラットにおいて生化学的に研究した。無機スズ化合物としては塩化第一スズと缶溶

出スズを用い、ラットに 30 mg Sn/kg を 1 日 2 回、3 日間経口投与し、スズの毒性の生化学的指標を検索したところ、次のような知見を得た。

- 1) 各々のスズ化合物の経口投与によるスズの臓器蓄積は他の臓器と比較して骨に顕著であった。
- 2) スズ毒性の生化学的指標を検索したところ、塩化第一スズ投与により、胃液酸性度、十二指腸アルカリホスファターゼ活性、血清カルシウム量、肝ホスホリラーゼ活性 および 大腿骨カルシウム量が有意に減少した。
- 3) 缶溶出スズの投与は、上記の変動の中で、大腿骨カルシウム量の有意な低下のみをひき起こした。

これらの結果から、骨が無機スズ化合物の標的臓器であると考えられる。

謝辞 本研究を行なうにあたり有益なる御意見をいただいた国立衛生試験所、内山充博士に、缶溶出スズを分与して下さった東洋食品研究所堀尾嘉友博士に深謝いたします。また、フレイムレス原子吸光光度計の使用の便を与えられた静岡県衛生研究所 渡辺与八郎氏、永野隆夫氏に感謝いたします。なお、本研究の一部は昭和53年度厚生省食品衛生調査研究費によって行なったことをあわせて感謝いたします。