カドミウム中毒ラットの十二指腸粘膜・腎臓皮質・髄質から 得られた蛋白のカルシウム結合能力について

Calcium Binding Activity of Duodenal Mucosa, Renal Cortex and Medulla in Cadmium Poisoning in Rats

札幌医科大学公衆衛生学教室

菅 原 直 毅

Naoki Sagawara

Department of Public Health, Sapporo Medical College, Sapporo

To determine the calcium binding activity of duodenal mucosa, renal cortex and medulla, drinking water containing cadmium (300 ppm) was administered to rats (Wistar strain, ♀) for 30 days.

In the experimental group, the calcium binding activity of the duodenal mucosa (16,000 g supernatant) was decreased to about 1/5 (t-test, $p < 0.05$) that of the control group.

In the renal cortex supernatant, this activity was decreased to about 1/2 (t-test, $p < 0.01$) that of the control group. But this activity of renal medulla protein did not differ from that in the control group.

The loss of this protein's activity may contribute to the calcium deficiency in cadmium poisoning.

I. 緒 言

経口投与された Ca は主に十二指腸上部から能動的に輸送されることは、多くの報告に¹⁻³⁾ よって明らかである。この能動輸送に際して、Ca-binding protein が重要な役割を受け持っていることを、Wasserman ら⁴⁾は報告している。この蛋白の合成は十二指腸粘膜で de novo に行なわれているとされているが、完全な作用機構は未解決な部分が多い。

経口投与された Cd も同様に十二指腸から吸収されるが、これが能動輸送によるものかどうか確かな証拠はまだないが、この際、食餌からの Ca の吸収が阻害されることについては⁵⁾、すでに報告してある。

従来、食餌中の Ca と Sr を置き換えることによって、Sr rickets 動物が、できあがることは古くから知られていたが、この原因については、骨組織の石灰化に際して、Sr が Ca の占めるべき場所を相競的に占めるための石灰化異常と考えられていたが、Omdahl ら⁶⁾は、これは、Sr がビタミン D の代謝、特に、腎臓での $25-(OH)-D_3 \rightarrow 1,25-(OH)_2-D_3$ の代謝を阻害することによって、小腸で Ca 輸送が起らなくなるためであると報告した。この報

告は、それ以前に発表された Corradino ら⁷⁾の結果をも支持するものである。

著者は⁸⁾、以前、Cd 長期経口投与によって、Ca の生体でのバランスが負に傾き、特に、この傾向が Cd 投与の初期に著しく、また、この時期は、十二指腸粘膜層への好酸球浸潤が強く、びらんも認められたが、この粘膜への障害は次第に回復するものの、依然として、Ca の吸収は増加を示さないことから、他にまだ別な原因が存在することを示唆しているものとして報告した。

今回は、十二指腸での Ca 輸送と密接な関係を有する Ca binding protein と Cd の関係について、特に、⁴⁵Ca のこの蛋白への結合能力から検討を加えたので報告する。

II. 実験方法

実験動物は、ウィスター系の雌ラットを用い、Cd を投与しない対照群と Cd (塩化カドミウムを使用) を飲料水 (地下水一回蒸溜) 中に 300ppm にして連日投与した実験群の 2 群として、それぞれ 5 匹、6 匹で構成した。飼料は、オリエンタル酵母 K・K 製の NMF 飼料を自由に与え、飲料水も自由に飲ませた。

30日間の投与終了後、直ちに、両群のラットを殺して、

血清, 十二指腸, 腎臓を得た。血清の Ca は原子吸光法で, リンは Allen 法⁹⁾で, 定量した。十二指腸は, 幽門から約15cmの長さで切り出し, 冷 buffer 溶液 (Tris-base, 0.0137M; NaCl, 0.12M; KCl, 4.74mM; β -mercaptoethanol, 1mM; pH 7.5) につけ, 不必要な腸間膜を取り除き, 小さな断片にして, 同 buffer 溶液で, 2度洗ってから, この buffer 溶液 5 ml で, ホモジェナイズ後, 16,000g, 20分間の遠心によって得られた上清を以後の実験に用いた。腎臓は, 直ちに, 氷上シャーレで, 皮質部分と髄質部分に別け, 皮質部分は, buffer 溶液, 3 ml で, 髄質部分は, 2 ml の buffer 溶液で, ホモジェナイズ後, 700g, 10分間遠心し, 得られた上清をさらに, 16,000g 20分間遠心して得られた上清を, 以後の実験にそれぞれ使用した。

上清中の Cd 定量は, 十二指腸の上清は, 5~10mg の蛋白量 (Lowry の方法¹⁰⁾で定量) を, 腎臓の上清は, 0.5~1 mg の蛋白量を, 試験管に取って, 硝酸一過塩素酸で湿式分解してから, 脱イオン水で希釈して, そのまま, 原子吸光度計で行なった。

⁴⁵Ca 結合能力は, 得られた上清蛋白の0.5~1 mg に, ⁴⁵Ca (2.5 μ Ci/ml) を0.1~0.2ml を加え, さらに chelex-100 (樹脂: buffer 溶液 = 1 : 1) を0.2ml 加えて, buffer 溶液で, 全量を 1.3ml に合わせ, 室温で反応させ, その後, 遠心し, 上清から適当量を取って, これを, 液体シンチレーション溶液 (Patterson の方法¹¹⁾に準じて調製) 10ml に加えて, 液体シンチレーション・スペクトロメーター (堀場・LS-700形) でカウントし¹²⁾, 蛋白を加えて反応させた上清の CPM から buffer 溶液のみで反応させた上清の CPM を差し引いて, その値を蛋白量で除した。

III. 実験成績

1. 体重の変化

実験に用いたラットは, 実験開始時すでに両群とも約 270g 前後の体重で, 十分に成長していた (図1)。実験群は, Cd 投与によって, 体重の低下が著しく, 特に, 投与開始7日間内の変化が大であったが, 対照群は, これに比べて, きわめて緩慢な体重増加を示し, 30日目では, 実験開始時の約1.05倍であったが, 実験群は, 0.79倍であった。

2. 血清の Ca, P 値

表1に, Cd 投与30日目の血清の Ca と P 値を示す。Ca 値は, 対照群, 実験群の間に差はなく, きわめて安定していたが, P 値は, 実験群で, 対照群に比べて有意 (t-

test, $P < 0.05$) に低く, カドミウム中毒特有の低リン血症をすでに呈示していた。

3. 上清蛋白の Cd

表2に, 十二指腸, 腎臓皮質・髄質の16,000g 上清の Cd 濃度を示す。実験群では, 皮質の蛋白あたりの Cd は髄質のその約9倍の高濃度で蓄積されていたことになる。対照群では, 湿式分解に用いた蛋白量で, 皮質で2検体が $1.8 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{protein}$, $1.5 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{protein}$ を示したが他は検出されず, 髄質では, すべての検体で検出されなかった。一方, 十二指腸では, 1検体で $0.3 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{protein}$ が検出されただけであった。

Fig. 1. Body Weight Curve. All data are given $M \pm SE$.

Table 1 Concentration of Ca and P in Serum

group	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
Control (5)	13.4 ± 0.6	5.5 ± 0.5
Experiment (6)	13.3 ± 0.2	$*3.9 \pm 1.0$

The number within parentheses is the number of rats. All data are represented by $M \pm SD$ and analyzed according to the t-test (* $p < 0.05$).

Table 2 Cd Concentration of Duodenal Mucosa, Renal Cortex and Medulla

	duodenum mucosa	kidney cortex	kidney medulla
Cd $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein ($\times 10^{-2}$)	16.8 ± 2.5	26.1 ± 2.5	3.1 ± 0.9

All data are represented by $M \pm SD$ of the experimental group (6 rats).

4. Ca binding activity

表3に, 十二指腸, 腎臓皮質, 髄質の16,000g 上清蛋

白の ^{45}Ca 結合能力を示した。この蛋白は、充分な精製を行っていない粗蛋白ではあるが、実験群から得られた十二指腸蛋白の ^{45}Ca 結合能力は、対照群のそれと比べて、有意 (t -test, $P < 0.05$) に低下していた。

一方、腎臓の皮質と髄質で得られた、この蛋白の結合能力は、皮質で得られた蛋白のほうが、能力が大で、これは、この蛋白が皮質部分に多く存在することを示唆した過去の報告¹³⁾とも一致する。腎臓から得られた蛋白の結合能力を、対照群と実験群で比較すると、実験群は、皮質上清蛋白で有意 (t -test, $P < 0.01$) な低下を示したが、髄質上清蛋白では、両群において差がみられなかった。

Table 3 Calcium Binding Activity of Duodenal Mucosa, Renal Cortex and Medulla Supernatants of Rats

group	duodenum	kidney	
	mucosa (cpm/mg protein)	cortex (cpm/mg protein)	medulla (cpm/mg protein)
Control (5)	3368 $\pm$ 2408	1346 $\pm$ 198	243 $\pm$ 85
Experiment (6)	*631 $\pm$ 215	**735 $\pm$ 151	194 $\pm$ 75

The number within parentheses is the number of rats. All data are represented by $M \pm SD$ and analyzed according to the t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

IV. 考 察

Ca binding protein の諸性質としては、分子量は、報告者によって、それぞれ異っているが、約 2.8×10^4 で、蛋白1分子当り1個のCaと結合しており、 $280\text{m}\mu$ の紫外部に吸収を有すること等が報告^{12,14)}されている。一方、この蛋白の十二指腸粘膜、腎皮質での生合成あるいは、その作用機序については、一部明らかになっているものの完全な説明はなされていないが、Caの輸送と関係していることは確かなようである。

表3に示した様に、十二指腸16,000g上清蛋白の ^{45}Ca 結合能力は、実験群で明らかに低下しており、その平均値を比べると、約1/5である。Wassermanら¹⁵⁾は、十二指腸からの ^{47}Ca の吸収と十二指腸のこの蛋白の ^{45}Ca 結合能力の間には、平行関係が成立し、 ^{45}Ca の結合が1/2に低下することによって、吸収も1/2に低下することをみており、さらに、食餌中のCaレベルを種々かえての実験では、 ^{47}Ca の十二指腸からの吸収の高い群は、この蛋白の比活性も高いことを報告している。この様な事実からも、今回得た数値から、十二指腸でのCaの吸収が低下しているのではないかと推測は可能である。

Ingersollら¹⁶⁾は、この蛋白が、Caの輸送に関して、重金属類で阻害されることを、*in vitro*で実験して、特に、Cdによる阻害が、その程度が著しく、これは、この蛋白に対するCdのaffinityが高いために生じたのであると報告している。しかし、この蛋白のアミノ酸組成をみると、SH基を含むアミノ酸が特別多いわけではない。今回の実験で得られた実験群の蛋白には当然Cdが含まれているわけで、binding assayに用いた溶液には、モル濃度にして、十二指腸の場合には、 $(1.8 \pm 0.5) \times 10^{-6}\text{M}$ 、腎臓皮質と髄質の場合には、 $(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $(1.9 \times 0.8) \times 10^{-7}\text{M}$ のCdが含まれていた。このCd濃度は、Ingersollら¹⁶⁾の実験でbinding assay用に加えたCd濃度と比較すると約1/1,000~1/10,000で、きわめて低い濃度である。

Drescherら¹⁷⁾は、この蛋白が、十二指腸で、*de novo*に合成されるなら、この蛋白の前駆体の存在の可能性があると考え、実験を行ない、この前駆体からこの蛋白への合成には、 $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ が関与しているのではないかと報告している。一方、木村ら¹⁸⁾は、Cd中毒ラットで、 $25-(\text{OH})\text{-D}_3$ を活性化する1-hydroxylase活性は、考えていた程には、Cdによって阻害されないが、300ppm投与群では、50%活性が低下したことを報告していることから、今回の上清蛋白の ^{45}Ca の結合能力の低下をもたらした原因は、Cd affinityだけではなく酵素系も関与しているのではないかと考えられる。

Cd中毒の場合は、腎臓のCa再吸収機構にも留意しなければならない。腎臓での、この蛋白は、未だ完全には精製されていないが、腎臓の皮質に多く存在することは、確かなようで、この皮質でのこの蛋白の役割については、Sandsら¹⁹⁾は、Caの再吸収と大いに関係があり、この蛋白の結合能力の低下は、Caの尿細管でのCaの再吸収能の低下となってあらわれるのではないかと報告している。

今回得られた表3の結果は、皮質の上清蛋白で、実験群は対照群に比べて約1/2にその結合能力が低下したことを示している。これは、Cdが腎臓のこの蛋白に対しても、その合成あるいは活性に阻止的作用を行なっていることは明らかである。この能力の低下が、そのまま、尿中のCa量の増加となって、あらわれてくる可能性、あるいは、他の重金属によっても観察されるものか等に関しては、この蛋白の精製をも含めてさらに実験を遂行中である。

V. 結 論

Cdを飲料水中に添加して、ラットに経口的に30日間

連日投与して、十二指腸、腎臓皮質・髄質の上清蛋白の ^{45}Ca 結合能力を定量して、次の結果を得た。

1) 十二指腸粘膜から得られた上清蛋白の ^{45}Ca 結合能力は、実験群で約1/5に低下した。

2) 腎臓皮質から得られたこの蛋白の ^{45}Ca 結合能力は、実験群で約1/2に低下したが、髄質のそれは、変化がなかった。

以上のことは、Ca binding proteinの活性の低下が、Cd中毒での生体のCa代謝に影響を与える因子の一つとしての可能性を有することを示唆している。

本研究の遂行にあたり、御助力頂いた三宅浩次教授に感謝の意を表わします。

文 献

- Schachter, D. & Rosen, S. M.: Active transport of Ca by the small intestine and its dependence on vitamin D, *Am. J. Physiol.*, **196**, 357-362 (1959).
- Wasserman, R. H., Kallfelz, F. A. & Comar, C. L.: Active transport of calcium by rat duodenum in vivo, *Science*, **133**, 883-884 (1961).
- Wilson, T. H. & Wiseman, G.: The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface, *J. Physiol.*, **123**, 116-125 (1954).
- Wasserman, R. H. & Taylor, A. H.: Vitamin D_3 -induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa, *Science*, **152**, 791-793 (1966).
- Sugawara, N. & Sugawara, C.: Effect of cadmium intake and parturition on calcium and phosphorus metabolism, *Medicine and Biology*, **87**, 185-187 (1973). (Japanese)
- Omdahl, J. L. & DeLuca, H. F.: Strontium induced rickets metabolic basis, *Nature*, **174**, 949-950 (1971).
- Corradino, R. A., Ebel, J. G., Craiz, P. H., Taylor, A. N. & Wasserman, R. H.: Calcium absorption and vitamin D_3 -dependent calcium binding protein, *Calc. Tiss. Res.*, **7**, 81-92 (1971).
- Sugawara, C. & Sugawara, N.: Cadmium toxicity for rat intestine, especially on the absorption of calcium and phosphorus, *Jap. J. Hyg.*, in the press.
- Allen, R. J. L.: The estimation of phosphorus, *Biochem. J.*, **34**, 858-865 (1940).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- Patterson, M. S. & Greene, R. C.: Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsion, *Analy. Chem.*, **37**, 854-857 (1965).
- Wasserman, R. H., Corradino, R. A. & Taylor, A. N.: Vitamin D-dependent calcium-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3978-3986 (1968).
- Sands, H. & Kessler, R. H.: A calcium binding component of dog kidney cortex and its relationship to calcium transport, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 1267-1273 (1971).
- Drescher, D. & DeLuca, H. F.: Vitamin D stimulated calcium binding protein from rat intestinal mucosa, purification and some properties, *Biochemistry*, **10**, 2302-2307 (1971).
- Wasserman, R. H. & Taylor, A. N.: Vitamin D-dependent calcium-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3987-3993 (1968).
- Ingersoll, R. J. & Wasserman, R. H.: Vitamin D_3 -induced calcium-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2808-2814 (1971).
- Drescher, D. & DeLuca, H. F.: Possible precursor of vitamin D stimulated calcium binding protein in rats, *Biochemistry*, **10**, 2308-2312 (1971).
- Kimura, M., Otaki, N., Yoshiki, S., Suzuki, M. & Suda, T.: The role of metallothionein in cadmium poisoning, *Jap. J. Hyg.*, **29**, 66 (1974).

(受付 1974年4月10日)