Ca^{45} によるカルシウム代謝の研究

Ca^{45} の吸収排泄と組織内分布

慶 大 内 科
山 田 隆 一 郎

Studies on Calcium Metabolism with the aid of
Radioactive Calcium Ca^{45} .

Ryuichiro Yamada

緒 言

生体内 Ca 代謝機構は極めて複雑であつて、その吸収排泄利用に関する文献も少ない。最近 Harrison 等のアイソトープによる研究の結果、従来極めて安定であるとされた骨格の Ca にも高度の可動性が證明され、生体内 Ca の99%を占める骨格の Ca 貯蔵が、糖質代謝に於ける肝グリコゲン貯蔵にも比せらるべき事が示唆され、 Ca 代謝の研究は一層の複雑さを加えるに至つた。又各臓器組織の Ca 量は個体差が大きく、實驗的に投與した Ca の組織内沈着の様相を追求する事は容易でなく、非生理的大量を以てしても尙正確な結果を知り難い事は Dennis 等の示した所である。更に尿尿中への排泄に就ても、尿中 Ca は食餌中 Ca の未吸収分と腸管内への再排泄分との和とされるが、兩者の比、吸収排泄の時間的、位置的な決定も在來の生化學的方法のみによつては盡し難い。従つて、放射性同位元素に依る Ca 代謝の研究は等しく望まれる所であつて1940年 Campbell, Greenberg, Pecher 等による Ca^{45} , Sr^{89} の排泄及び組織内分布の基礎的な實驗以來、その應用は次第に擴げられて來た。然し乍ら Ca^{45} の生産の困難さと、軟弱な放射能計測上の不便さの爲、 Ca^{45} に代用可能と考えられた Sr^{89} の應用も試みられ、Tweedy, Weissberger, Laurence, Pecher, Greenberg 等により Ca^{45} , Sr^{89} による石灰化組織の

代謝研究を中心とした幾つかの實驗が行われた。最近原子爐による Ca^{45} の比較的な量産が可能となると共に、その應用も活潑化し、1949年頃より石灰化組織の代謝、佝僂病とビタミン D、上皮小体機能等に関する研究が Armstrong, Migikovsky 及び Emslie, Harrison, Tweedy Goverts, Ulrich, Wallage 等により相次いで發表されるに至つた。然し乍ら Ca^{45} による業績は P^{32} 其他二三のアイソトープによる研究に比し今日尙極めて少く、問題の多くが將來に残されていると考えられる。著者は Ca 塩投與後の血中 Ca 値の變動、吸収、排泄及び利用に関する豫備的實驗の結果、上述の如き理由により生化學的に解明し難い点のあるのを知つたが、偶々1950年米國原子力委員會の好意により放射性同位元素 Ca^{45} の配分を得、幼若健康白鼠を對象とし $\text{Ca}^{45} \text{Cl}_2$ の吸収排泄及び組織内分布に關し實驗を行う事を得たので、その成績を報告する。

第1章 Ca^{45} の放射能計測

Ca^{45} は Ca 金屬をサイクロトロン中で重水素衝擊して得られ、又 Scandium の中性子衝擊によつても誘導可能である。 Ca^{45} は最大 0.250 Mev の軟 β 線を放射しつつ崩壊し、半減期180日、 β 線が極めて軟かく透過性が弱いため放射能の抽出、計測用材料の調製及び計測には特別の顧慮を必要とした。放射能計測には最初塩化 Ca の形で

抽出、計測に供した所、計測中吸濕の爲漸次自己吸収 Selfabsorption が増加し誤差を生ずる事を知り、稀酸 Ca 沈澱膜として計測することに變更した。

實驗動物は十分脱血し血中放射能による汚染を除外し可及的に被檢臓器自体の放射能を計測せんとした。被檢体は天秤又は Torsion balance にて迅速に秤量、坩堝中にて十分乾燥の上、乾性灰化し稀塩酸に溶解、大型遠心沈澱管中に移し醋酸曹達、氷醋酸、稀酸安門を介して稀酸 Ca の沈澱を得た。更に一夜放置後 2,000 R.P.M. 10 分間遠心沈澱して上清を捨て 2 回洗滌、沈澱を乾燥後一定量の水に均等に浮游し、一部を毛細管ピペットにて計測用小容器上にとり、沈澱をまつて、極めて徐々に乾燥し放射能計測に供した。計測用容器は表面積 4.9cm^2 のステンレス製のものに統一、軟 β 線計測の爲 Geiger 管は $3.5\text{mg}/\text{cm}^2$ の薄マイカ窓のもの (科研製) を用い科研 Geiger-Mueller 計數器、Model 16 を以て計測した。化學的定量は Sobel, Sklarsky 氏法を一部改變して行つた。

第 I 圖 補正曲線

第 2 章 補正曲線

Ca^{45} の β 線は最大 0.250Mev で Selfabsorption にもとづく誤差を無視出来ない。従つて豫備實驗として種々の量の Ca を含む一列の放射性被檢体に就き一定の條件下に放射能計測を行い、實測値と理論値とから補正值を求める必要がある。表面積 4.9cm^2 のステンレス製計測容器中に Ca 量が $0.08\sim 6.0\text{mg}$ となるように Ca^{45} 放射性被檢体の一列のサンプルを既述の方法により調製し、總て同一 Geometry 下に計測を行い第 I 圖の如き補正曲線を得た。即ち Ca 量が 0.5mg 以下の場合では實測値は理論値と略と一致したが、 6.0mg となると既に -31% の誤差を生じた。従つて、それらの計測値に對しては夫々の補正が必要である事を知つた。尙計測値には必要に應じ Ca^{45} の崩壊による減衰を補正し、又計測は總て同一 Geometry にて行ふ如く努めた。

第 3 章 實 驗

I. 實驗方法

實驗動物は 100 瓦前後の幼若健康白鼠とし、酸塩基平衡が生体の Ca 代謝に及ぼす影響を顧慮して一定の混合標準食を以て飼養した。使用した食餌は小麦粉 67.5, 全乳末 10.0, カゼイン 15.0, バタ 5.0, CaCO_3 1.5, NaCl 1.0 より成り水を加えて飼料の散亂を防ぎ、實驗動物は少くも實驗開始の前 3 日間及び實驗期間中、本標準食と水を與えられた。尿尿分離採取の目的には金網二重底の Metabolism Cage を用い、尿尿分離採取後 10 分量の稀塩酸を以て金網を洗滌、 H_2O は尿に加えた。動物は 3 日間標準食を與え、一夜絶食後、体重に應じ $0.5\sim 1.0\text{cc}$ ($3\sim 5\mu\text{c}$) の $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ 稀釋液を、1 群には胃管を以て直接送胃により投與、他群には背部皮下注射により投與した。 Ca^{45} の吸収、排泄及び組織内攝取の追求には、 Ca^{45} 投與後 10 分、20 分、30 分、1 時間、2 時間、及び 3 時間に夫々兩群共、各時間に 3 頭以上宛屠殺し、消化管内容消化管壁組織及び各内臓組織内の Ca^{45} 放射能を計測した。動物はエーテル麻酔下に、兩頸動脈切斷及び心穿刺を併用、十分脱血せしめた。消化管は胃、小腸及び大腸を兩端結紮を施し夫々別個に

剔出、内容を機械的に排出し、更に十分量の生理食塩水の灌注を行つて内腔を洗滌、洗液は上記各部内容に加えた。

II. 各種投與方式による血中 Ca^{45} の消長

Ca^{45} を使用し動物実験を開始するに先立ち、豫備実験として、放射性 $\text{Ca}^{45} \text{Cl}_2$ を健康白鼠に、皮下、靜脈内及び胃内に投與し、爾後の血中 Ca^{45} の消長の比較検討を試みた。

第II圖 Ca^{45} 投與後の血中 Ca^{45}

$\text{Ca}^{45} \text{Cl}_2$ 稀釋液約 47×10^4 C.P.M. を投與後、一定時間毎に尾靜脈より 0.02cc を採血、ステンレス製計測器上に一樣に塗抹、乾燥後、そのまゝ灰化して計測した結果である。成績は第II圖に示した如く、各投與方式により夫々特有の消長を示し皮下注射では1時間に、経口投與では2時間に最高値を示し、爾後漸次減少したが一般に生化学的方法に比し微量を長時間にわたり検知する事が出来た。尙これらの詳細正確な検索は別の機会に行う事とした。

III. 吸収、消化管内排泄と組織内分布

A. 消化管内容の Ca^{45}

各時間に於ける消化管内容中の Ca^{45} 發見率は第III圖の如き結果となつた。縦軸に示した放射能は投與した Ca^{45} 全量に對する百分率であり横軸には投與後の時間を示し、各点共夫々3頭以上の平均値である。上段の圖表は胃管投與後の消化管内 Ca^{45} 殘存量を、下段の圖表は皮下注射後の消化管内 Ca^{45} 發見量を示した。胃内投與後、各時間に於ける消化管内各部毎の Ca^{45} 殘存量には一部個体差の

著しいものもあり、主として胃内食物殘渣の殘留によるものと思われたが平均して10分後胃内容に39%、小腸内容に20%の Ca^{45} が發見され41%が消失、30分後58%、2時間後には70%が消化管内より消失し、その大部分は恐らく吸収されたものと考えられた。

第III圖 消化管内の Ca^{45}

一方皮下注射後は30分後既に僅か乍ら消化管内容中に Ca^{45} が發見せられ漸次時間と共に増加したが胃内容の Ca^{45} は小腸大腸内容に比し微量であつた。

B. 消化管壁の Ca^{45} 攝取

Ca^{45} 送胃後の消化管各部組織内に發見された Ca^{45} は第IV圖上段に、皮下注射後のものは同圖下段に圖示した。小腸壁組織内には Ca^{45} 送胃10分で4%、20分14%、30分15%、60分9%、120分4%の Ca^{45} が計測され消化管内容 Ca^{45} 殘存率と比較検討するに、内容の消失即ち吸収の盛んな時期

に一致して極めて著明な Ca^{45} の攝取が認められた。胃壁には送胃直後 4% 以下の Ca^{45} の攝取が認められたのが最高で他は極めて微量であり、大腸壁には 180 分後約 3% の攝取がみられた。皮下注射群では各部共 120~180 分に Ca^{45} 攝取が最高に達したが経口投與群にみられた如き特異な變動はなかつた。

第 IV 圖 消化管壁の Ca^{45}

C. 二、三臓器組織の Ca^{45} 攝取

上述の實驗に際し主要臓器組織の Ca^{45} の計測を行つたが経口群、皮下群共、石灰化組織を除き Ca^{45} の攝取は極めて少く投與量の 1% に達するものは稀であつた。第 V 圖に代表例として経口投與群に於ける腎、肝及び大腿骨の Ca^{45} の消長を示した。腎には特異の變動は見られず、肝に於ては 30 分後に頂点を示す比較的著明な消長が認められ、消化管よりの Ca^{45} の吸収曲線に一致すると見られ

る變動を示したが、その他の臓器には斯かる特異の變動は認められなかつた。一方大腿骨の Ca^{45} 攝取は極めて特異で、比較的緩徐乍ら常に増加の傾向を維持し 180 分後 2% に達し、6 時間の計測に於ても尙減少の傾向は見られなかつた。

第 V 圖 主要臓器の Ca^{45} の消長

D. 24 時間後の組織内分布

皮下注射群 3 例、経口投與群 2 例に就き 24 時間後の主要臓器組織内 Ca^{45} を計測し第 I 表の如き結果を得た。大腿骨には皮下群に於て 2.5%、経口群に於て 1.9% の攝取が見られ、湿性重量、瓦當り夫々 6.7%、4.3% に及び、既述の 3 時間値と大差

第 I 表 24 時間後の Ca^{45} の組織内分布

組織	皮下注射			経口投與		
	例数	湿性重量	放射能 %	例数	湿性重量	放射能 %
血液	3		0.031	2		0.030
肺	3	854	0.051	2	714	0.032
心	3	497	0.016	2	550	0.007
肝	3	4962	0.149	2	4026	0.123
脾	3	324	0.010	2	265	0.006
腎	2	1150	0.093	2	1173	0.033
胃	2	687	0.049	2	860	0.065
小腸	3	3744	0.147	2	3373	0.107
大腸	3	1509	0.227	2	1380	0.196
大腿骨	2	378	2.487	2	430	1.909

なかつたが、肺、心、肝、脾、腎の Ca^{45} はいずれも極めて微量で、臓器の湿性重量、瓦當りでは消化管を除き、投與量の0.1%に達するものすら無かつた。又兩投與方式に依る Ca^{45} 攝取量の差異には認むべきものなく、たゞ大腿骨のみは皮下投與群に於て稍々大であつた。骨格の Ca^{45} は3時間値と大差なかつたに反し、他の諸臓器に於ては3時間値に比し著明な減衰がみとめられた。

IV. ラジオ オートグラフ

骨格、歯牙及び臓器内の Ca^{45} 分布状態を知る目的で Radioautography を試みた。即ち56gの健康白鼠に 55.7×10^4 C.P.M の $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ を皮下注射し2時間後屠殺、所要臓器を剔出し Contact method による撮影を行つた。骨格、歯牙は研磨により薄片とし、臓器は凍結組織標本作製法により可及的に 10μ 程度の切片とし、卵白グリセリンを以て載物硝子上に固着、十分乾燥させた。次で Axelrod の方法に従い1%セロイデンにて表層を保護、寫眞乾板上に絆創膏にて密着させ、カセット中に收容、加圧密着させ、暗所に保存した。露出に要する時間の概略は Axelrod により示されているが Ca^{45} を用いた實驗報告もなかつた爲、試験的に骨格歯牙に約5カ月、臓器に約8カ月とし、前者はレ線用安全フィルム、後者にプロセス乾板を試用した。結果として前者は稍々露出過度であり後者は尙稍々不足と思われたが、 Ca^{45} の β 線が軟い爲、標本が厚かつたに拘らず比較的鮮鋭な影像を得る事が出来た。寫眞は別圖に示した如くで、

第II表に示した放射能計測の結果と黒化度とはよく一致した。即ち單位重量の放射能の大きな脾、肺、腎、心は黒化度大で、比較的明瞭な影像を示し、肝は最も不明瞭であり骨格歯牙の黒化度は極めて大であつた。骨に於ては骨軸よりも兩端部に Ca^{45} の集積大で、又骨實質の深層には Ca^{45} 少く、歯牙に於ては Dentin の Ca^{45} は Enamel より大で夫々の Turnover の度を示した。大腿骨は明瞭な影像に拘らず、Specific Activity が低かつたのは表層部の Ca^{45} の集積が極めて大である一方深層の Ca の大部分が殆ど全く Ca^{45} を攝取するに至らなかつた事による。

第II表 皮下注射2時間後の Ca^{45} 組織内分布

臓器	湿性重量	放射能* の%	組織1瓦 中の放射 能の%	Ca量mg	比放射能
肺	mg 650	0.269	0.419	0.270	0.995
心	282	0.105	0.373	0.290	0.358
肝	2170	0.408	0.188	0.772	0.528
脾	77	0.062	0.805	—	—
腎	611	0.215	0.352	0.317	0.679
大腿骨	310	1.190	3.859	59.600	0.200

白鼠 55.4瓦、 $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ 0.5cc= 55.7×10^4 C.P.M 投與

* 投與せる Ca^{45} に對する組織中 Ca^{45} の百分比

V. 尿尿中への Ca^{45} の排泄

動物の尿中に排泄された Ca は、食餌中の Ca の未吸収分と、一度吸収され新陳代謝に關與し再び腸管内に排泄された Ca の和である事は上述の實驗結果よりも考えられる所で、之はアイソトープによる追跡實驗を以てして、初めて解明し得る所である。經口及び非經口投與による Ca^{45} の尿尿中への排泄を比較検討し、この間の状況を追求する目的で本實驗を行つた。

標準食で飼養し一夜絶食させた約100gの幼若白鼠に $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ 5 μ c (1.0 cc)を送胃及び皮下注射により投與、Metabolism cage を用い96時間迄尿尿を分離採取した。成績は第III表第VI圖に示した如くで、經口投與群2例では96時間中に尿中2.17%及び2.07%、尿中13.27%及び12.59%の排泄が認められ、皮下注射群2例では尿中2.98%及び4.80%、尿中1.71%及び1.86%の排泄が見られた。尿中排泄量では兩群間に大差なく尿及び尿中への排泄比は經口群では1:6.1及び1:6.2皮

第III表 尿尿中への Ca^{45} 排泄

鼠 時 間	經口投與群				皮下注射群			
	No. 1		No. 2		No. 3		No. 4	
	尿	尿	尿	尿	尿	尿	尿	尿
12	%	%	%	%	%	%	%	%
24	1.31	9.09	0.82	5.95	0.23	0.49	1.31	0.96
36			0.45	3.64	0.93	0.28		
48	0.41	3.64			0.20	0.13	2.61	0.49
60			0.29	2.00	0.73	0.33		
72	0.10	0.45	0.39	0.59	0.47	0.30	0.38	0.26
96	0.35	0.09	0.12	0.40	0.52	0.18	0.58	0.15
計	2.17	13.27	2.07	12.59	3.08	1.71	4.80	1.86
尿:尿	1:6.2		1:6.1		1:0.6		1:0.4	

第VI圖 尿尿中への Ca^{45} の排泄
経口投與 皮下注射

下群では 1:0.6 及び 1:0.4 となつた。兩投與群に於ける尿中排泄量の差を 経口投與による吸収とすれば約 10% となり吸収後再び腸管内に排泄された Ca^{45} は 1.8% 内外と見られた。

總括及び考按

1) 生体の Ca の吸収、排泄及び利用に就て、在來の生化學的方法によつては盡し難い点を、新しく輸入された放射性同位元素 Ca^{45} を以て追求せんとした。 Ca^{45} の β 線は軟弱で Selfabsorption に基づく計測上の誤差が大きいので、先ずその補正曲線を求めた。放射能計測は初め Ulrichi が行つてゐる如く $\text{Ca}^{45} \text{Cl}_2$ の形で行つた所、操作中吸濕により漸次 β 線の Selfabsorption の増加する事を知り、本實驗に於ては蓂酸塩として實施した。本法は塩化 Ca 法に比し標本作製が繁雜であるが、均等な沈澱膜の得られる所からも適當なものと考えられた。

2) 動物に投與された Ca は小腸上部から吸収され一部は大腸から再び腸管内に排泄されると云われるが、腸管の Ca の吸収及び排泄能に關しては從來異論が少くない。之は消化管内の pH、脂肪、ビタミン D 等の外、動物の種族、年齢、榮養、或は酸塩基平衡等、數多くの要因により Ca 代謝が

支配を受けている結果であり、從つて又斯かる實驗を行う爲には可及的に之等諸條件を統一規定する必要を認めた。本實驗に於ては對象を約 100 瓦の幼若健康雄白鼠とし、標準食を與えた後一夜絶食せしめ空胃状態に於て實驗を開始するごとくした。

吸収の實驗は Cohn 等の K^{42} の吸収實驗の法に準じたが、 Ca^{45} の吸収は K^{42} に比し緩徐であり、更に Hamilton, Vezár 等の報告に照せば NaCl , Br , J , のいずれよりも緩徐であると推定されたが、豫想以上に速かで且つ完全に近いものと認められた。経口投與後消化管内からの Ca^{45} の消失に並行して著明な Ca^{45} の攝取が小腸壁に認められ、30 分後には 15% に及んだが、皮下注射によつては斯かる特異な現象の見られなかつた事或は消化管内の Ca^{45} 消失曲線等から Ca^{45} は主として小腸より吸収され、且つ吸収は投與後 1 時間以内に最も著明であると考えられた。又之と略と一致して、1.5% に及ぶ Ca^{45} 攝取が肝に認められその消長が小腸壁のそれとよく並行したが、他臓器或は皮下注射の際には斯かる特異の消長が見られなかつた事は、小腸—門脈—肝—大循環なる一系路上にある肝の位置的特性に基づき、又 Ca の吸収が恐らく斯かる経路を辿るものと推論された。肝の Ca^{45} 攝取の項点が Cohn の K^{42} に比し低かつた事は當然 Ca と K との生化學的差異によるものと考えられたが、肝の單位重量の Ca^{45} がむしろ他臓器のそれより少い事は Autography によつても明かにされ、又 3 時間値以後の成績からも肝に Ca が蓄積されない事が認められた。

3) 消化管の Ca^{45} 排泄能に關しては吸収の問題以上に異論の多い所である。Jonson, Mc Cane 等は人体で、Henry, Kon, Adolph 等は鼠で夫々消化管に Ca 排泄能のない事を報告したが、Bergheim は佝僂病鼠の下部腸管に Ca 排泄能を認め、Cowell, Pecher, Greenberg, Steggarda 等も腸管の Ca 排泄を肯定した。本實驗の結果は第 III 圖下段に示した如く大腸のみならず小腸にも亦 Ca 排泄能のある事を明かにした。

4) Ca の尿尿中への排泄に關しては Ca^{45} によ

る實驗の結果は尿中排泄を認める者が多いが、尿尿中への排泄比及び經口投與されたCaの吸収量等は報告者により著しい相違がある。然し乍ら既述の如く諸要因がCa代謝に相互複雑に關與している事から實驗條件を異にした報告が夫々相異つた結果を示す事は當然豫想される所である。本實驗の結果ではCa⁴⁵ Cl₂ 投與後96時間内に經口投與群では平均尿中12.9%, 尿中2.2%, 皮下注射群では尿中1.8%, 尿中3.9%の排泄が計測され、成熟鼠を使用した Tweedy, 速水の成績とは一部相違しているが、又彼等二者間の成績も一致を欠いている。極めて最近 Wallage 等は鼠にCa⁴⁵ Cl₂ を經口投與し年齢による排泄相の差異を追求し、尿中排泄量に著明な年齢差があり尿中排泄量には本質的差異なき事を明かにし、幼若鼠に於ける尿中Ca量の低値は成長期に於けるCa需要の増大によると結論した。著者の實驗成績はWallage等の幼若群のそれと近かつた事から、成熟動物を使用した Tweedy 等の成績との差異の主因は年齢によるCa需要の差によると考えられた。

尿中Caは食餌中Caの未吸収分と、吸収後、生体のCa代謝に關與し再び腸管内に排泄されたCaとの和と考えられるが、經口、皮下兩投與法による尿中排泄量の差から眞の吸収量を推定する事が出来る。本實驗の結果は腸管内排泄量は約1.8%以上であり、眞の吸収量は約89%となり幼若鼠のCaの吸収が極めて良好であつた事が了解される。

5) Caの生体内利用の研究にはRadioautographyの應用が考えられたが現在迄知りえたのはUlrich 等の大腿骨に關するものが唯一である。

著者は極めて長期の露出により骨の他、主要臓器の撮影をも行い得て、Ca⁴⁵の組織内分布研究に利用し得べき事を知つたが、その展開は將來によつ所大であると考えられた。

結 論

1) 放射性同位元素Ca⁴⁵ Cl₂を用い、幼若健康白鼠に於けるCa代謝に關する研究を行つた。

2) 幼若白鼠に於ては投與したCaの約90%が吸収された。

3) Ca吸収は主として小腸に於て營まれ、吸収は投與後1時間内に最も著しい。

4) 吸収されたCaは肝を通過して後各臓器に入ると思われるが、肝に貯藏はされない。

5) 投與されたCaは尿中、尿中双方に排泄されるが、腸管に於ては大腸のみならず小腸からも排泄される。

6) RadioautographyによりCa⁴⁵の組織内分布を見ると投與後短時間に於ては各種臓器にCa攝取が見られるが、骨齒牙に最も著明である。

7) 投與後長時間の臓器のCa貯藏は殆ど石灰組織に限られる。

主要文献

- 1) Hevesy G: Radioactive Indicators 1948.—2) U.S.A.F.: A. F. Technical Report 5669, 1948.—3) Barkowski, et al. Analytical Chem. 29, 3, 1949—4) Axelrod D.J.: The Radioautographic Technique 1948.—5) Duncan: Diseases of Metabolism 1949.—6) Wallage H.D. et al: Journ. of Nutrition 43, 4., 1951.—7) Ulrich F. et al: Endocrinology 48, 3., 1951.—8) Joseph, Cohn et Greenberg: Journ. of Biol. Chem. 128, 3., 1939.—9) Campbell and Greenberg: Proc. Nat. Acad. Sci. 26, 3., 1940.—10) Tweedy W.R.: Endocrinology 47, 4., 1950.

第1圖 肺

第4圖 脾

第2圖 心

第5圖 腎

第3圖 肝

第6圖 胃

第7圖 小腸

第8圖 大腸

第9圖 大腿骨

第10圖 大腿骨

第11圖 齒牙及顎骨內面

第12圖 同外側面