〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
95 (9) 1119-1123 (1975)

UDC 546.16.09 : 615.273.076.9

カルシウム添加時の血液に対するフッ素の作用について¹⁾

藤本 尚, 奥田博久

東洋製薬化成株式会社研究所²⁾

The Action of Fluoride on the Calcium Pretreated Blood¹⁾

TAKASHI FUJIMOTO and HIROHISA OKUDA

Research Laboratories, Toyo Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received October 11, 1974)

The effect of calcium on the fluoride-treated blood was studied. The blood level of glucose increased rapidly, and the plasma level of total calcium decreased after administration of sodium fluoride to buccal mucosa. Morphological changes in the rabbit erythrocyte membrane induced by sodium fluoride *in vivo* was observed by scanning electron microscopy. These activities of fluoride were significantly depressed in the rabbit pretreated with calcium chloride.

緒 言

フッ素の生体への影響に関して、リンおよびカルシウム代謝などについては詳細に検討されており、多量のフッ素が生体に摂取された時の急性毒性の症状としてタンパク尿、低カルシウム血症などの障害が認められている。³⁾ これらの処置法として乳酸カルシウム、塩化カルシウムなどのカルシウム製剤の静注が勧められているが、その意義についてはほとんど検討されておらず明らかではない。

われわれはウサギを用いて *in vivo*, *in vitro* でカルシウム添加時のフッ素の血液系への作用について検討を行った。

実験材料と方法

動物 日本ラビット協会より購入した体重約 2 kg の日本白色雌雄兔を実験前 16 時間絶食後使用した。

試薬および機器 NaF, CaCl₂, glyoxalbis (2-hydroxyanil), 0.05M リン酸緩衝液 pH 7.4, その他すべて試薬特級を用いた。F 電極：オリオン社製 94-01, 90-01, pH メータ：日立堀場 F-7, 分光々度計：日立 124 型, 走査型電顕：日本電子 JSM-SI 型

投与量と方法 Gabler⁴⁾ の方法に準じて、気管を切開して気管カニューレを挿入し、食道上部を結紮した後、NaF の 220 mg/匹, 25 mg/kg, 12.5 mg/kg を口腔内に投与し、蒸留水で口腔内を満たした。

採血法 あらかじめ頸動脈にポリエチレンカニューレを挿入し、これより採血を一定時間毎に 24 時間後まで、1 回当たり約 3 ml を採取した。

F 濃度測定法 飯塚⁵⁾ らの方法に従って血漿中の濃度を測定した。

乳酸およびグルコース測定法 血液、または血球浮遊液中の乳酸およびグルコースの測定には各々ベーリンガーマンハイム社製キット (TCM-II, TC-B) を用いた。

1) 日本薬学会東海支部 9 月例会で発表, 岐阜, 1974 年 9 月。

2) Location: Tsurumi 2-5-4, Tsurumi-ku, Osaka.

3) a) 荻田善一, 代謝, 5, 119 (1968); b) L. Krintz, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47, 477 (1969); c) 飯塚喜一 “口腔衛生学,” 永末書店, 京都, 1972, pp. 244—246; d) 押鐘篤編, “歯学生化学,” 医歯薬出版, 東京, 1971, pp. 115—116; e) 飯塚喜一, 岡田昭五郎, “弗化物とその応用,” 医歯薬出版, 東京, 1973, pp. 15—27.

4) W.L. Gabler, *Archs. oral. Biol.*, 13, 619 (1968).

5) Y. Iizuka, C. Akiba, Y. Nakayama, *Bull. Tokyo. dent. Coll.*, 11 (3), 155 (1970).

Ca 測定法 血漿中 Ca の測定は Mager⁶⁾ らの方法に準じて行なった。

イオン性 Ca の測定法 血漿中イオン性 Ca の測定は Toribara⁷⁻¹⁰⁾ の方法に従って、350×g, 2 hr, 室温で行ない(汚液は 5% トリクロル酢酸で白濁を生じない)、以後血漿中 Ca 測定法に従った。

走査型電顕による赤血球の観察 赤血球の固定には 0.9% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液 pH 7.4) を赤血球浮遊液の約 5 倍量を加え室温、1 時間放置後遠沈し、沈殿した固定赤血球を精製水で 3 回洗浄し、精製水に浮遊させた液の少量をカバーガラス上にとり、室温乾燥後、カーボンと金で真空蒸着し、加速電圧 10 kV で観察した。

結果および考察

I. In Vivo

F の血漿中濃度 口腔粘膜に投与した F の吸収は Fig. 1 に示すように非常に速やかで、投与後 1 時間以内に最高血漿濃度を示し、24 時間後には血中から消失していた。

血中グルコースおよび乳酸量 12.5 mg/kg NaF を口腔に投与した時、血中グルコース濃度は著明に上昇し、4 時間後には正常値の約 2—2.5 倍に増加した。乳酸量の変化は投与後一旦減少したのちグルコースと同様に 4 時間後に最大値を示した。この結果を Fig. 2 に示した。

血漿中全 Ca 量 12.5 mg, 25mg/kg NaF を口腔へ投与し、対照には同量の蒸留水を与え、血漿中 Ca 量の変化を求めた結果を Fig. 3 に示した。NaF 25 mg/kg 投与では直後より血漿中全 Ca 量は減少し始めた。

赤血球形態変化の観察 25 mg/kg NaF を口腔に投与した、ウサギ赤血球の形態変化を投与前、投与 30 分、

2 時間および 7 時間後について比較した結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 に示すように投与 30 分後では一部の变化に留まり、全体への著しい変化はなかったが、2 時間後の形態変化は著しく、明らかに F 投与に基づく異常が認められた。

しかし、7 時間後になると観察される赤血球の変化は少なくなり、血中 F 濃度減少に伴う異常赤血球の捕捉および障害の修復等が行なわれていると考えられる。

II. In Vitro

F は血中 Ca 量、赤血球形態変化等に大きな影響を与えているので、*in vitro* で F および Ca の作用について検討を加えた。

血中グルコースおよび乳酸量 F と equivalent Ca Cl₂

Fig. 1. Determination of Fluoride in Plasma Following Oral Cavity Administration of a Single Dose of 220 mg NaF

Fig. 2. Effect of NaF on the Levels of Lactate, Glucose and Calcium in Blood of Rabbits

---▲---▲---: lactate, —○—○—: glucose,
—●—●—: calcium (plasma)

Fig. 3. Decrease of Total Calcium Levels in Plasma Following Oral Cavity Administration of a Single Dose of NaF

—●—●—: control, ---○---○---: 12.5 mg/kg,
-○-○-○-: 25 mg/kg

- 6) M. Mager, G. Farese, *Clin. Chem.*, **12**, 234 (1966).
- 7) T.Y. Toribara, *Anal. Chem.*, **25**, 1286 (1953).
- 8) T.Y. Toribara, A.R. Terepka, P.A. Dewey, *J. Clin. Invest.*, **36**, 738 (1957).
- 9) S. Katz, I.M. Klotz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 351 (1953).
- 10) M. Walser, *Anal. Chem.*, **32**(6), 711 (1960).

Fig. 4. Morphological Changes of Erythrocytes treated with Fluoride (*in Vivo*)

The erythrocytes harvested at 30 min, 2 and 7 hours after oral cavity administration of a single dose of 220 mg NaF. The erythrocytes were washed three times with physiological saline.

Fig. 5. Decrease of Glucose and Lactate in Incubated Blood (*in Vitro*)

Incubated solution consists of erythrocytes, NaF and equivalent CaCl_2 in pH 7.4 Tris isotonic buffer (final $\text{HC}=20$). Incubation was carried out at 37° for 2 hours.

---●---●---: lactate-contained equivalent calcium to fluoride
 ---○---○---: glucose-contained equivalent calcium to fluoride
 —●—●—: lactate
 —○—○—: glucose

を加えた pH 7.4 の等張 Tris 緩衝液中に新鮮な血液を加え、 37° 、2 時間インキュベートした後のグルコース量、乳酸量を測定した。この結果を Fig. 5 に示した。

グルコースの減少は F 濃度 0 の時と 200 ppm の時との差が非常にわずかであり、Ca を添加した時の影響も少なかった。しかし、乳酸量については、F 増加に伴い減少しており、これに equivalent の Ca を添加した血液の血中乳酸量は 50 ppm F 以上ではほとんど差がない。この結果について、Ca 添加した赤血球解糖系への F 作用が低下しているため、さらにその作用はほとんど一定であると考えられる。

赤血球形態変化の観察 血液を F,¹¹⁾ F および Ca と 37° 、2 時間インキュベートした後の赤血球形態変化について観察した。この結果を Fig. 6 に示した。1 mM 以下の F では形態変化は認められなかったが、1.7 mM—8 mM F を加えた Tris 緩衝液中でインキュベートした血液の形態変化は明らかに正常赤血球の形態はほとんど保たれていないが、17 mM F とほぼ equivalent の Ca を添加した赤血球は、正常形態を保っていた。

以上 *in vitro* で F の作用は Ca を添加することにより減少することが判明したが、次に血漿を F とインキュベートした後のイオン性 Ca の変化について検討を加えた。

Fig. 6. Morphological Changes of Erythrocytes treated with Fluoride (*in Vitro*)

The erythrocytes treated with only NaF or equivalent NaF and CaCl_2 in pH 7.4 Tris isotonic buffer. The erythrocytes incubated at 37° for 2 hours.

11) M. Nakao, T. Nakao, S. Yamazoe., *J. Biochem.*, **49**, 487 (1961).

イオン性 Ca 量の変化 血漿に 0—500 ppmF を加え、生理食塩水で 3 倍に希釈した後、30 分間、37° でインキュベートした時のイオン性 Ca 量の変化を求め、Fig. 7 に示した。

Fig. 7 に示したように F を加えた時の血漿中のイオン性 Ca 量は、native 試料中の全 Ca 量を 100% とし比較すると一時増加した後急激に減少し、全 Ca 量の 18—9% まで減少した。

III. *In Vivo* での Ca 作用について

等張 100 mM Ca Cl₂ 4 ml, 対照に同量の生食を静注した 5 分後に前述の方法で NaF 12.5 mg/kg を投与した。

血漿中グルコースおよび乳酸量について Ca を前投与した時、対照に比べて血中グルコース量の変化は少なく、正常値範囲内であり明らかに前投与した Ca の効果が認められた。この結果を Fig. 8 に示す。

血中乳酸量の変化は Ca 投与群の方が一時強く減少したが、対照に比べてその後の急激な増加現象は認められなかった。この結果を Fig. 9 に示した。

全 Ca およびイオン性 Ca 量の変化 Ca 前投与した血中の全 Ca 量は当然多いが、そのイオン性 Ca 量も投与 1 時間後付近で一度減少した後はほとんど投与前と変化がなかった。

しかし、Ca 投与をしない血中の Ca 量の変化は Fig. 3 に示したように減少していたがイオン性 Ca 量はほとんど変化がない。また、Ca および F を投与しない血中全 Ca は全く変化がない。この結果を Fig. 10 に示した。Ultrafiltration 法により得られるイオン性 Ca 量は F 投与によってもほとんど変化を受けず、またあって

Fig. 7. Recovery of Ultrafiltrable Calcium from fluoride treated Plasma (*in Vitro*)

Incubated solutions at 37° for 30 min consist of 2 vol. native plasma and 1 vol. NaF solution of various concentrations.

Fig. 8. Transition of Glucose Levels in Blood Following Oral Cavity Administration of a Single Dose of NaF (12.5 mg/kg)

---●---: pretreatment with calcium (*i.v.*)
—○—: control

Fig. 9. Transition of Lactate Level in Blood Following Oral Cavity Administration of a Single Dose of NaF (12.5 mg/kg)

---●---: pretreatment with calcium (*i.v.*)
—○—: control

Fig. 10. Transition of Total and Ultrafiltrable Calcium in Plasma of Rabbits Following Oral Cavity of a Single dose of NaF (12.5 mg/kg)

---○---: total calcium (pretreated with calcium)
---●---: ultrafiltrable calcium (pretreated with calcium)
—○—: total calcium (control)
—●—: ultrafiltrable calcium (control)

もそれは非常に短時間のうちにタンパク結合性 Ca からの遊離により平衡が保たれていると考えられる。

In vivo, in vitro で Ca 添加時の F の血液への作用について実験を行なったが、添加した Ca は F と、

$\text{Ca}^{2+} + \text{F} \rightleftharpoons [\text{CaF}^-] + \text{F} \rightleftharpoons \text{CaF}_2 \downarrow$ のように反応し、 CaF_2 の生成に基づく作用により以上の効果を示すと考えられ、Ca 投与が直ちに有効とするにはさらに検討を要するが、以上の結果から見れば有効であると思われる。

謝辞 本実験に際し、フッ素測定に御配慮頂きました大阪大学歯学部 佐治靖介博士に深謝致します。

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
95 (9) 1123-1127 (1975)

UDC 547.91.02.05 : 581.192 : 615.322.011.5

葛根の水溶性抽出物の研究 (第 1 報¹⁾) 活性エキスの製法および その含有成分について²⁾

中本泰正, 宮村宗次, 稲田和義, 中村信子

富士薬品工業株式会社研究所³⁾

The Study of the Aqueous Extract of Puerariae Radix. I.¹⁾ The Preparation and the Components of the Active Extract²⁾

HIROMASA NAKAMOTO, SOJI MIYAMURA, KAZUYOSHI INADA and NOBUKO NAKAMURA

Research Laboratories, Fuji Chemical Industries, Ltd.³⁾

(Received January 8, 1975)

From the aqueous extract of Puerariae radix, anticholinergic substances like daidzein, daidzin, and puerarin were removed as much as possible to make a syrup material which has a constant cholinergic activity. This syrup material was termed MTF-101. From MTF-101, two cholinergic substances and five other compounds were isolated; choline chloride (ca. 1.0%), acetylcholine chloride (ca. 0.1%), allantoin (ca. 3%), D-mannitol (ca. 15%), D-(+)-pinitol (ca. 8%), succinic acid (ca. 10%), and L-(+)-Mg lactate (ca. 15%).

葛根の成分中、抗コリン作用物質であるダイゼインやダイジン⁴⁾ およびプエラリン⁵⁾ を除去した葛根の水溶性抽出液中に、アセチルコリン作用物質が存在することが、柴田らにより暗示された⁶⁾。さらに、三浦らにより、アセチルコリン作用を有する微量物質の単離が報告された⁷⁾。

本報告で、著者らは、石川県宝達山産葛根 (*Pueraria hirsuta* MATSUMURA) の水溶性抽出液中に、塩化コリン、塩化アセチルコリンが存在していることを見出し、この抽出液のアセチルコリン様作用は、アセチルコリンに基づくものであり、さらに、この水溶性抽出液中に含有されている種々の天然物が、アセチルコリンを安定に保つのに大いに役立っているという考察に到達した。そこで、葛根の水溶性抽出物から、抗コリン作用物質であるダイゼインやダイジンなどのイソフラボン系物質およびタンニン類をできるだけ除去し、水溶性の、しかもアセチルコリン作用の力価が一定であるシロップ状抽出物を作ること成功した²⁾。そして、本物質を今後 MTF-101 と呼称することにする。

1) 三浦孝次, 竹田隆昌, 中本泰正, 斎藤晴夫, 応用薬理, 5, 247 (1971).

2) 三浦孝次, 中本泰正, 宮村宗次, 日本特許 705931 (Oct. 9, 1973).

3) Location: 530 Chokeiji, Takaoka-shi Toyama, 933, Japan.

4) 柴田承二, 村上孝夫, 西川嘉広, 薬誌, 79, 757 (1959).

5) 柴田承二, 村上孝夫, 西川嘉広, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 7, 134 (1959).

6) 柴田承二, 原田正敏, 村上孝夫, 薬誌, 79, 863 (1959).

7) 三浦孝次, 涉信敏, 東 妙子, 日本薬学会第 89 年会口演 (1969 年, 名古屋), 講演要旨集 p. 471.