

研究報文

酢酸鉛投与による肝カルシウム量の増加 へのグルタチオンの関与

中川 一夫, 小林加代子, 西村 美紀

Association of glutathione with the decrease in hepatic
calcium content induced by lead acetate.

Kazuo Nakagawa, Kayoko Kobayashi, and Miki Nishimura

I. はじめに

我々は既に、酢酸鉛の急性的投与により肝グルタチオン量が減少することを報告した¹⁾。この結果は水銀²⁾やカドミウム³⁾の負荷の場合と同様に、肝グルタチオンが鉛の体外排泄に関与していることを示唆するものである。グルタチオンは鉛の毒性軽減に有効であると考えられる。しかし、グルタチオン量の減少は、グルタチオンの果している他の生理機能の能力低下を引起すおそれがあることも考慮しなければならない。

ミトコンドリアには代謝回転の遅いグルタチオンプールが存在しているが^{4,5)}、その機能については未知の部分が多い。ミトコンドリアは細胞内カルシウム貯蔵部位としても知られ、細胞内カルシウムホメオスタシスの制御にミトコンドリアのグルタチオンが関与している可能性が指摘されている⁶⁻⁸⁾。

本研究では鉛投与によるグルタチオン代謝の変動が、細胞内カルシウムイオンの動態に影響を与えるか否かを探るため、鉛投与後のマウス肝カルシウム量とグルタチオン量の変動を検討した。その結果、酢酸鉛の投与により肝グルタチオン量が減少するとともに、肝カルシウム量は著しく増加することが判明した。

カルシウム量の増加は細胞障害または細胞死につながる現象であると認識されている⁹⁻¹¹⁾ので、グルタチオン代謝と肝カルシウムの動態との関連を検討することは、毒性学的に意味あることと言えるだろう。鉛投与による肝カルシウム量の増加に関するグルタチオンの役割について、若干の推論を行った。

II. 実験方法

1. 実験動物および試薬：実験動物としては日本エスエルシー(株)から購入した ddY 系雄性マウス (体重25~30 g) を使用した。マウスは室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 10\%$ に調節された飼育室で、12時間毎の明暗サイクルのもとで飼育した。マウスには、オリエンタル社製固形飼料と水道水を自由に摂取させた。ただし、酢酸鉛の経口投与を行う場合には、酢酸鉛 500 ppm または 1,000 ppm に調製した飲料水を自由摂取させた。

マウス頸椎を脱臼して致死させたのち、開腹して肝臓を露出させ、次いで肝臓を冷生理食塩水で還流したのち摘出した。

グリオキサラーゼ I はシグマ社製を使用し、カルシウム測定用キットはヤトロン社製を使用した。そのほかの試薬は市販特級を用いて調製した。

2. 肝カルシウム量の測定：肝カルシウムの定量は、Connerty と Briggs の方法¹²⁾を原法とするオルトクレゾールフタレインコンプレクソン (OCPC) 法に従い、市販のカルシウム測定用キットを用いて行った。概略

を述べると、まず約 200 mg の肝臓を秤取して9倍容の 2N HClO₄-1N NaOH (1:1) 混液でホモジナイズし、遠心分離を行った。上清 0.5 ml に OCPC とヒドロキシキノリンを含む呈色液 5.0 ml を混和したのち、波長 570 nm で吸光度を測定した。なお、実験に用いたガラス器具は、通常の洗浄を行ったのち 0.5 N HCl に一晩つけ、脱イオン水、次いで脱イオン蒸留水ですすいだのち乾燥して用いた。

3. 還元型グルタチオンの定量：肝臓の還元型グルタチオン量は、Akerboom と Sies の記載¹³⁾ に準じて測定した。すなわち、肝臓を9倍容の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 0.5 mg/ml の ethylenediamine tetraacetic acid を含む) でホモジナイズして試料液を作製した。恒温水還流装置をつけたダブルビーム分光光度計内のキュベットに 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml をとり、試料液 0.1 ml および 5 units のグリオキサラーゼ I を加えて 240 nm での吸光度を記録した。次いで 20 μ l のメチルグリオキサールを加えて反応を開始して吸光度の増加をモニターし、反応終了後の吸光度を測定した。さらに、20 μ l のメチルグリオキサールを加えて増加した吸光度を測定し、先に測定した吸光度を補正した。還元型グルタチオン量は、分子吸光係数 3,370 M⁻¹ · cm⁻¹ を用いて計算した。

4. δ -アミノレブリン酸脱水酵素 (δ -ALAD) 活性の測定： δ -ALAD 活性は、Granick と Mauzerall の方法¹⁴⁾ に従って測定した。肝臓を4倍容の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8, 10 mM 還元型グルタチオンを含む) でホモジナイズしたのち遠心分離を行い、上清を得た。この上清をさらに上記緩衝液で20倍に希釈し酵素標品とした。0.2 ml の酵素標品を 37°C の恒温槽に30分間放置したのち、3.45 mM δ -アミノレブリン酸 0.5 ml を加え、さらに60分間インキュベーションを行った。4%トリクロル酢酸 (20 mM HgCl₂ を含む) 1 ml を加えて反応を停止し、遠心分離して得られた上清にエールリッヒ試薬を加えて発色させ、波長 555 nm で吸光度を測定した。分子吸光係数 68,000 M⁻¹ · cm⁻¹ を用いて酵素活性を算出した。

5. 実験結果の統計解析：実験結果の有意差検定は、Student *t*-test により行った。

III. 実験結果

1. 酢酸鉛腹腔内投与の影響：酢酸鉛 (100 mg/kg) をマウス腹腔内に注射し、3時間後および7日後に肝臓のカルシウム量を測定した。Fig. 1 に示すように、酢酸鉛投与動物の肝カルシウム量は、投与3時間後で

は約2倍に増加し、7日後では20倍以上にも増加した。

酢酸鉛投与により肝臓の総グルタチオン量 (還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンを合わせた量) が減少することは既に報告した¹⁵⁾ が、本研究では、還元型グルタチオンは鉛投与3時間後に有意に ($P < 0.05$) 低下することが判明した。しかし投与7日後になると、対照群と鉛投与群のグルタチオン量には有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

ところで、鉛投与によりヘム合成系が抑制されることは良く知られている。本研究においても肝臓の δ -ALAD 活性は鉛投与3時間後には有意に抑制されており ($p < 0.05$)、7日後においても顕著な抑制を受け、対照群の約半分程度の活性しか検出できなかった (Fig. 3)。

2. 酢酸鉛経口投与の影響 (Table 1)：酢酸鉛を飲料

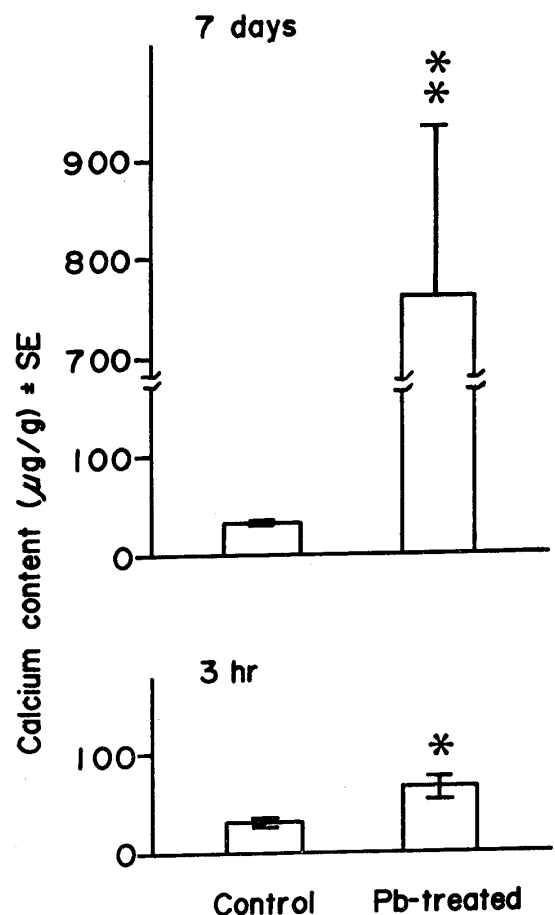


Fig. 1 Calcium content in livers of mice treated with lead acetate. Mice were killed 3 hr (bottom) or 7 days (upper) after intraperitoneal injection of lead acetate (100 mg/kg). Each bar represents the mean \pm SE. * $p < 0.05$ ($n=6$), significantly different from control group. ** $p < 0.01$ ($n=4$), significantly different from control group.

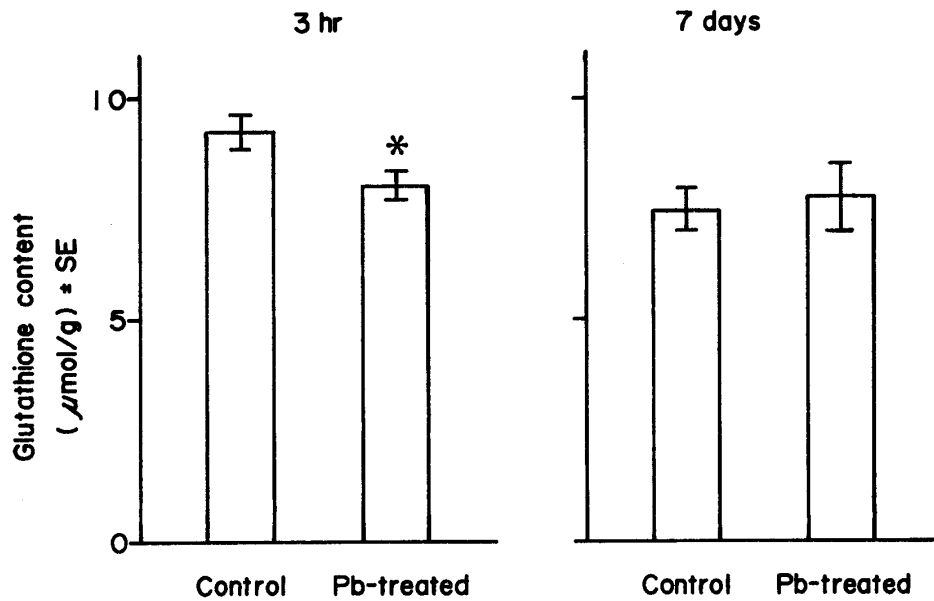


Fig. 2 Glutathione content in livers of mice treated with lead acetate. Mice were killed 3 hr or 7 days after intraperitoneal injection of lead acetate (100 mg/kg). Each bar represents the mean ± SE of 4 animals.
* $p < 0.05$, significantly different from control group.

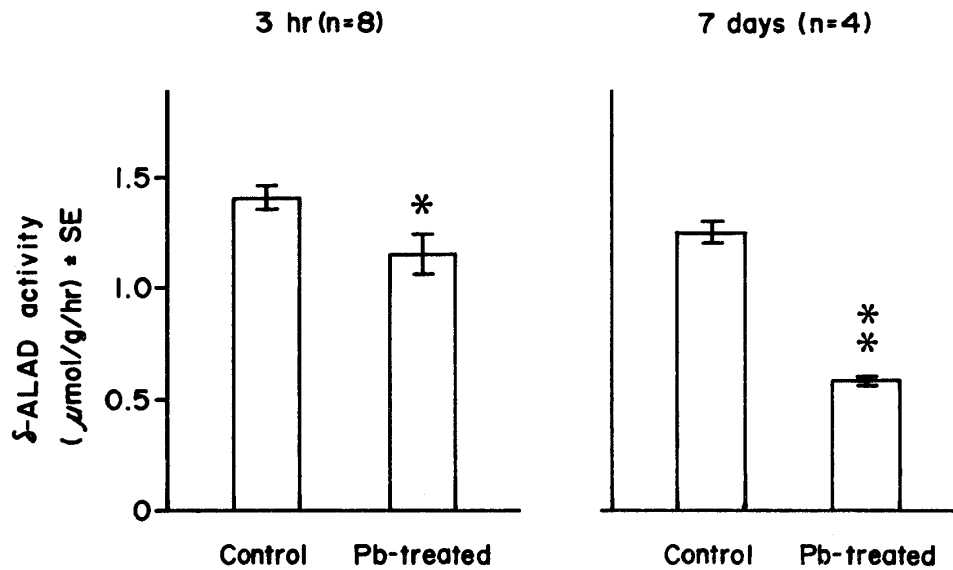


Fig. 3 δ-Aminolevulinate dehydratase (δ-ALAD) activity in livers of mice treated with lead acetate. Mice were killed 3 hr or 7 days after intraperitoneal injection of lead acetate (100 mg/kg). Each bar represents the mean ± SE.
* $p < 0.05$, significantly different from control group. ** $p < 0.001$, significantly different from control group.

水に 500 ppm および 1,000 ppm の濃度になるように溶解し、7日間経口投与を行った。肝カルシウム量は、1,000 ppm 酢酸鉛投与群で有意に増加した ($p < 0.05$)。しかし、肝グルタチオン量には大きな変化は認められず、1,000 ppm 酢酸鉛投与群においても軽度

減少したにすぎない。一方、肝 δ-ALAD 活性は、500 ppm 酢酸鉛投与群ではわずかに低下し、1,000 ppm 酢酸鉛投与群では有意に抑制された ($p < 0.01$)。

3. マレイン酸ジエチル投与の影響 (Table 2) : グルタチオン枯渇剤のマレイン酸ジエチル (0.7 ml/kg) を

Table 1. Effects of oral administration (1 week) of lead acetate on calcium content, glutathione content, and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAD) activity in livers of mice.

	Calcium content ($\mu\text{g/g liver}$) \pm SE	Glutathione content ($\mu\text{mol/g liver}$) \pm SE	δ -ALAD activity ($\mu\text{mol/g liver/hr}$) \pm SE
Control	22 \pm 1.7 (4)	8.59 \pm 0.44 (5)	1.30 \pm 0.08 (6)
Pb (500 ppm)	29 \pm 4.2 (5)	8.79 \pm 0.32 (5)	1.13 \pm 0.05 (4)
Pb (1,000 ppm)	31 \pm 3.0*(4)	7.31 \pm 0.67 (4)	1.01 \pm 0.03**(6)

Each number represents the mean \pm SE. The number of mice is indicated in parentheses.

* $p < 0.05$, significantly different from control group.

** $p < 0.01$, significantly different from control group.

Table 2. Calcium content, glutathione content, and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAD) activity in livers of mice treated with diethyl maleate (DEM).

	Calcium content ($\mu\text{g/g liver}$) \pm SE	Glutathione content ($\mu\text{mol/g liver}$) \pm SE	δ -ALAD activity ($\mu\text{mol/g liver/hr}$) \pm SE
Control	42 \pm 4.4 (6)	7.45 \pm 0.26 (6)	1.44 \pm 0.02 (4)
DEM-treated	43 \pm 6.9 (6)	5.48 \pm 0.38*(6)	1.22 \pm 0.06**(4)

Each number represents the mean \pm SE. The number of mice is indicated in parentheses.

* $P < 0.05$, significantly different from control group.

** $p < 0.02$, significantly different from control group.

腹腔内に注射したところ、3時間後には肝グルタチオン量は有意に減少した ($p < 0.05$)。しかし、肝カルシウム量はほとんど変らなかった。一方、 δ -ALAD 活性は有意に抑制された ($p < 0.02$)。

IV. 考 察

本研究で酢酸鉛の腹腔内投与および経口投与のいずれの方法によっても肝臓のカルシウム量が増加したことは、カルシウム量の増加が種々の薬物による細胞死の共通項である¹¹⁾という観点から、興味ある事実と考える。しかも、鉛投与時におけるカルシウム量の増加が、鉛中毒時に鋭敏に変化する δ -ALAD 活性の変化と逆相関的に生じた事と考えあわせると、鉛投与動物のカルシウム量の増加は、鉛による細胞障害を示す1つの尺度になる可能性がある。

従来より、 Pb^{2+} と Ca^{2+} の生物学的な相互作用は、腸管における両元素の吸収に関して^{15,16)}や、肝細胞での Ca^{2+} のセカンドメッセンジャーとしての働きに関して¹⁷⁾観察されている。また、 Pb^{2+} は Ca^{2+} の関与する種々の細胞機能において、時には Ca^{2+} に代って作用することができる^{18,19)}。これらの Pb^{2+} - Ca^{2+} 相互作用は、直接、細胞機能障害の原因になり得るところで

あるが、本研究で見られた肝カルシウム量の著しい増加は、非特異的な細胞障害をもたらすおそれがある。

細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの調節は、大別して、細胞膜を介した Ca^{2+} 輸送と細胞内カルシウム貯蔵部位での放出および取込みの2通りの機能により行われている^{7,20)}。前者には受容体を介した Ca^{2+} チャンネル系、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送、 Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} の排出機構がある。また、後者の細胞内カルシウム貯蔵部位としては、ミトコンドリア、小胞体および Ca^{2+} 結合たんぱく質をあげることができる。 Ca^{2+} 容量は細胞外が最も大きく、生理機能発現時に急速に上昇する遊離 Ca^{2+} 濃度の主たる供給源になっている。しかし、ミトコンドリアや小胞体も Ca^{2+} 容量は小さいが Ca^{2+} ホメオスタシスにとっては重要な細胞内小器官であり、これらの部位での Ca^{2+} 動態変化は、細胞障害の初期反応にも関与している可能性がある^{8,10)} とされる。

ミトコンドリアでの代謝変化と Ca^{2+} 動態との関連について、Lehninger ら²¹⁾は、ピリジンスクレオチドの酸化によりミトコンドリアから Ca^{2+} の放出がおけると提唱し、Richter と Frei²²⁾は、ピリジンスクレオチドの加水分解により生じた ADP-リボシルによりミ

トコンドリア内膜たんぱく質のADP-リボシル化が起り、 Ca^{2+} の放出につながるという実験成績を提出している。さらに、たんぱく質のSH基やグルタチオンの酸化還元状態の変化が、ミトコンドリアや小胞体の Ca^{2+} の動態に関与するようである；これらのSH基の酸化は、膜透過性を変え、 Ca^{2+} の貯蔵部位からの遊離を増加させる。

ところで、細胞内グルタチオンの大部分は細胞液中にあるが、ミトコンドリアには代謝回転の遅い安定なグルタチオンプールの存在することが知られている⁴⁵⁾。そしてミトコンドリア内にもNADPHを補酵素するグルタチオン還元酵素系が存在し、グルタチオンの還元状態の維持に関わっている⁶⁾。従ってミトコンドリアのグルタチオンは、ミトコンドリア外のグルタチオンと同様に、膜たんぱく質のSH基の酸化還元やピリジンヌクレオチドの存在状態、さらにおよんでは Ca^{2+} 動態に影響をもつ可能性がある。

このような細胞内 Ca^{2+} 動態およびそのグルタチオンとの関係を背景にして、我々の実験結果をながめたい。今回の結果では鉛投与により還元型グルタチオン量の減少がみられたが、グルタチオンの減少が直接の原因となってカルシウム量の増加が起こった可能性は小さいと考える。その理由は、マレイン酸ジエチルによりグルタチオンの減少が起ったにもかかわらず、カルシウム量の増加がみられなかったからである。マレイン酸ジエチルが Ca^{2+} 動態に無効であることは、Thorら²³⁾が肝細胞を使った実験でも報告している。しかし、 Pb^{2+} はSH基との親和性が高い²⁴⁾ので、グルタチオンの減少は、たんぱく質SH基が Pb^{2+} の攻撃をうけることを容易にし、間接的に Ca^{2+} 動態に影響をもつことが考えられる。

Poundsら²⁵⁾は初代分離培養肝細胞を使って、 Pb^{2+} が細胞内のすべての Ca^{2+} コンパートメントの Ca^{2+} 量を増やし、特にミトコンドリアを含むコンパートメントでの増加が著しいと報告している。この変化の機序については、 Pb^{2+} の細胞膜への影響の結果として Ca^{2+} の細胞内への流入が増加したためであろうとしているが、直接の証拠は示していない。

一方、Chávezら²⁶⁾は、腎ミトコンドリアからの Ca^{2+} の遊離が Pb^{2+} により増加することを報告している。彼らはミトコンドリア内膜のSH基に Pb^{2+} が結合し、膜電位の低下やNAD(P)Hの酸化が起り、 Ca^{2+} の遊離が増加したと考えている。また、彼らは、グルタチオンは内膜SH基の保護に重要であると考えている。このChávezらの成績はPoundsらの成績と対

立するようと思われるが、根本的に相異なるものではなく、一連として起っている Ca^{2+} 動態変化の異った位相を見ている可能性がある。

細胞内小器官での Ca^{2+} 動態変化が、細胞内の他の部位での Ca^{2+} 動態にどのような影響を与えるのか、あるいは、細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が、どのような機序で細胞障害をもたらすのか、その詳細は明らかではない。次に述べることは、上記の知見を手がかりとして得られた、 Pb^{2+} の作用機序についての作業仮説である。

Pb^{2+} と Ca^{2+} との結合部位での置換が起るため、あるいは、膜の透過性を制御しているたんぱく質SH基の一部が Pb^{2+} との結合により失活するため、ミトコンドリアや小胞体から Ca^{2+} の遊離や、細胞外からの Ca^{2+} の流入が起る。この変化はグルタチオンの減少により増巾されるであろう。細胞質に増加した Ca^{2+} は、生理的な Ca^{2+} 調節機構により Ca^{2+} 貯蔵部位に再び取込まれる。このような Ca^{2+} cyclingが持続して起ると、エネルギー消費が増大する。鉛がATP量を減少させることは知られており²⁷⁾、ミトコンドリアのATP減少は、細胞膜や小胞体にある Ca^{2+} -ATP系による Ca^{2+} ホメオスタシス機構の機能を低下させる。その結果、細胞膜を介しての Ca^{2+} 排出が減少したり、小胞体への Ca^{2+} 取込みが減少し、細胞質の遊離 Ca^{2+} 濃度を増加させることになる。さらに、細胞質に増加した遊離 Ca^{2+} により Ca^{2+} 依存性の蛋白分解酵素やphospholipase A₂の活性化が起り²⁸⁾、細胞膜の傷害をもたらされ、このことも細胞外 Ca^{2+} の流入の増加を招くであろう。そして、 Ca^{2+} のセカンドメッセンジャーとしての機能²⁹⁾は破壊され、最終的には細胞死に至ると考えられる。

V. 要 約

酢酸鉛投与により肝カルシウム量は著しく増加した。その機序は明らかではないが、鉛投与時にみられる還元型グルタチオンの減少が直接の原因となって肝カルシウム量を増加させる可能性は小さいと考える。むしろ、グルタチオンによる細胞内還元型SH基の保護作用が低下するので、 Pb^{2+} と膜たんぱく質SH基との結合が起りやすくなり、結果として細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスが破綻し、細胞外からの多量の Ca^{2+} の流入を招くのではないかと推論した。

引用文献

- 1) K. Nakagawa, *Japan. J. Pharmacol.*, **51**, 173-179, 1989.
- 2) N. Ballatori and T. W. Clarkson, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **4**, 816-831, 1985.
- 3) C. D. Klaassen, W. M. Bracken, R. E. Dudley, P. L. Goering, G. A. Hazelton and J. J. Hjelle, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**, 806-815, 1985.
- 4) M. J. Meredith and D. J. Reed, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3747-3753, 1982.
- 5) O. W. Griffith and A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 4668-4672, 1985.
- 6) M. C. Beatrice, D. L. Stiers and D. R. Pfeiffer, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1279-1287, 1984.
- 7) S. Orrenius and G. Bellomo, in *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects* (eds. D. Dolphin, O. Avramovic and R. Poulson), Part B pp. 383-409, Wiley, New York, 1989.
- 8) D. J. Reed, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 603-631, 1990.
- 9) 加藤隆一, トキシコロジーフォーラム, **11**, 610-620, 1988.
- 10) 神坂和明, 代謝, **26**, 1107-1112, 1989.
- 11) F. A. X. Shanne, A. B. Kane, E. E. Young and J. L. Farber, *Science*, **206**, 700-702, 1979.
- 12) H. V. Connerty and A. R. Briggs, *Amer. J. Pathol.*, **45**, 290-296, 1966.
- 13) T. P. M. Akerboom and H. Sies, in *Methods in Enzymology* (ed. W. B. Jakoby), vol. 77, pp. 373-382, Academic Press, New York, 1981.
- 14) S. Granick and D. Mauzerall, *J. Biol. Chem.*, **232**, 1119-1140, 1958.
- 15) P. A. Meredith, M. R. Moore and A. Goldberg, *Biochem. J.*, **166**, 531-537, 1977.
- 16) M. A. Toraason, J. S. Barbe and E. A. Knecht, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 62-65, 1981.
- 17) J. G. Pounds, D. Morrison, R. Wright, D. A. Casciano and J. G. Shaddock, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 402-408, 1982.
- 18) S. -H. Chao, Y. Suzuki, J. R. Zysk and W. Y. Cheung, *Mol. Pharmacol.*, **26**, 75-82, 1984.
- 19) T. J. B. Simons, *Br. Med. Bull.*, **42**, 431-434, 1986.
- 20) 山本 慧, 笹川展幸, トキシコロジーフォーラム, **11**, 582-594, 1988.
- 21) A. L. Lehninger, A. Verces and E. Bababunmi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1690-1694, 1978.
- 22) C. Richter and B. Frei, *Free Rad. Biol. Med.*, **4**, 365-375, 1988.
- 23) H. Thor, M. T. Smith, P. Hartzell, G. Bellomo, S. A. Jewell and S. Orrenius, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12419-12425, 1982.
- 24) B. J. Fuhr and D. L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6944-6950, 1973.
- 25) J. G. Pounds, R. Wright, D. Morrison and D. A. Casciano, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 389-401, 1982.
- 26) E. Chávez, D. Jay and C. Bravo, *J. Bioener. Biomemb.*, **19**, 285-295, 1987.
- 27) J. M. Amatruda, A. J. Staton and L. A. Kiesow, *Biochem. J.*, **166**, 75-79, 1977.
- 28) P. Nicotera, P. Hartzell, C. Baldi, S. -A. Svensson, G. Bellomo and S. Orrenius, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14628-14635, 1986.
- 29) H. Rasmussen, *Science*, **170**, 404-412, 1970.