

リタイヤ雌ラットにおける高カルシウム摂取の影響

武田 隆 司^{1,2)}, 中 村 孝 志¹⁾, 今 西 雅 代²⁾, 武 田 厚 子²⁾, 武 田 隆 久²⁾
太 井 秀 行³⁾, 横 山 嘉 人³⁾, 池 上 良 成³⁾, 木 村 美 恵 子²⁾

(¹⁾京都大学大学院医学研究科*, (²⁾タケダライフサイエンスリサーチセンター**, (³⁾赤穂化成***)

Effect of over calcium intake on plasma biochemical parameters in mature multiparous rat .

R. TAKEDA^{1,2)}, T. NAKAMURA¹⁾, M. IMANISHI²⁾, A. TAKEDA²⁾, T. TAKEDA²⁾, H. TAI³⁾,
Y. YOKOYAMA³⁾, Y. IKEGAMI³⁾ and M. KIMURA²⁾

¹⁾Graduate School of medicine Kyoto University

²⁾Takeda Research Institute of Life Science

³⁾Ako Kasei Co. Ltd.

Summary

To clarify effects of over dose or under dose of calcium intake in mature female rats were studied. Wistar mature female rats, over 25-wk-old, multipara (over 4 paras), were divided into five groups and diets of different amount of calcium ; (1) Ca 1/10 times, (2) Ca 1 times (control), (3) Ca 2 times, (4) Ca5 times, (5) Ca10, times were given for 4 weeks. Hematological parameters and biochemical parameters in plasma were monitored. ALP levels significantly decreased in the rats fed with low Ca diet (Ca1/10) compared to in control rats. GOT, GPT and UN levels significantly increased in the rats fed with high Ca diet (Ca10) compared to in control rats. TIBC levels significantly decreased in the rats fed with high Ca diet (Ca 5, Ca10) compared to in control rats. These results suggest that not only low intake of Ca but over intake of Ca is fallen into ill health.

目 的

骨粗鬆症は、高齢者、中でも閉経後の女性に多く、骨粗鬆症による骨折の危険性は女性では65歳以後、男性では70歳以後、5年経過するごとに5%増加すると言われており、高齢者における骨折の予防は高齢化社会における大きな課題となっている。このような中で、骨の健康保持のため、より多いカルシウム (Ca) の摂取が推奨され、Ca添加食品が店頭に氾濫し、また、サプリメントの利用により、通常の食事摂取では、考えられなかったような大量のCaの摂取も容易に可能となっている。私たちは、雄の幼若ラットを用い、Caの摂取量が生体へ与える影響について検討し、Ca欠乏のみならず、Caの多量摂取が成長障害、腎、尿路結石の形成などの健康障害を誘引することを明かにした^{1,2)}。今回、雌のリタイヤラットを用い、Ca摂取量の違い、特に、Caの大量摂取が生体へ与える影響について検討したので報告する。

*所在地：京都市左京区吉田近衛町 (〒606-8315)

**所在地：京都市下京区中堂寺南町17 京都リサーチパーク (〒600-8813)

***所在地：兵庫県赤穂市坂越329 (〒678-0193)

方 法

25週齢を過ぎた4産以上の経産リタイヤWistar系雌ラットを平均体重が同様になるように10匹づつ5群に分け、Table 1に示すCa含有量の異なる5種類の合成飼料1) Ca1/10倍：低Ca, 2) Ca 1倍：コントロール, 3) Ca 2倍, 4) Ca5倍, 5) Ca10倍を与えて、ステンレス製の個別ケージにて、23～25℃の室温下で、4週間飼育した。飲料水には、イオン交換蒸留水を与え、飼料と共に自由摂取とした。飼育4週間後、一晩絶食の後、ネンプタル麻酔下にて腹部大動脈から動脈採血し血液を得、一部は遠心、血漿を分離した。血球計数検査；白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hgb)、ヘマトクリット値(Hct)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、赤血球分布幅(RDW)、血小板数(PLT)、および平均血小板容積(MPV)を自動血球計数装置にて計測し、血漿生化学検査として、総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、グルタミン酸オキザロ酢酸転移酵素活性(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸転移酵素活性(GPT)、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)、ロイシンアミノペプチダーゼ活性(LAP)、コリンエステラーゼ活性(CHE)、乳酸脱水素酵素活性(LDH)、クレアチンフォスフォキナーゼ活性(CPK)、アミラーゼ活性(AMY)、総コレステロール(T-CHO)、高比重コレステロール(HDL-CHO)、中性脂肪(TG)、リン脂質(PL)、遊離脂肪酸(NEFA)、尿酸(UA)、尿素態窒素(UN)、クレアチニン(CRE)、鉄(Fe)および総鉄結合能(TIBC)を測定した。

統計処理は危険率5%で、一元配置分散分析を行い、有意のものについて、ボーンフェローニ型多重比較検定を行った。

Table 1. Composition of diets (%)

	1/10Ca	1Ca	Control		
			2Ca	5Ca	10Ca
Sucrose	34.13	33.00	31.52	27.07	19.66
Potato Starch	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Casein	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Olive oil	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Cellulose	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Mineral mixture* (Ca free)	1.93	1.93	1.93	1.93	1.93
Calcium hydrogenphosphate dihydrate	0.14	1.42	1.42	1.42	1.42
Calcium carbonate	0.07	0.65	2.14	6.58	13.99
Vitamin mixture#	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
H ₃ PO ₄	0.73	0.00	0.00	0.00	0.00

* Mineral mixture of Mameesh and Johnson (J.Nutr. 1958. 65. 161) excluding calcium hydrogenphosphate, calcium carbonate supplemented with selenium (0.5ug/g).

Panvitan powder (Takeda Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan)

結果と考察

Fig. 1に実験期間中のラットの体重変化を示した。各群の間に有意な体重変化は認められなかったが、コントロール群に比較して、Ca1/10倍群の低Ca摂取群よりもCa5倍群、Ca10倍g群のCa過剰摂取群で体重変化が顕著であった。離乳雄ラットを用いた場合の実験^{1,2)}では高Ca摂取(Ca5倍群、Ca10倍g群)によりで顕著な成長抑制が認められ、解剖所見では、目立った腎結石や膀胱結石が認められたが、リタイヤ雌ラットを用いた本実験系では、顕著な異常所見は認められなかった。Cashmanらの雌および雄のラットを用いたCaの吸収についての実験によると、飼料中Caの吸収は、雌よりも雄で大であったと報告されている³⁾。また、雌は、妊娠・授乳中には摂食量、Ca吸収、骨におけるCaの代謝回転が増加し、胎児の発達、乳の分泌のためにCaの利用性が増強される⁴⁾など激しいCaの体内環境の変化に対応して、高率で利用されているとしている。また、原井らによる雌ラットを用いたCa動態についての報告⁵⁾を見ると、真のCa吸収は74日齢、即ち約10週齢で有意に上昇し、その後減少し、116日齢、約16週で有意の減少を示す。ある一

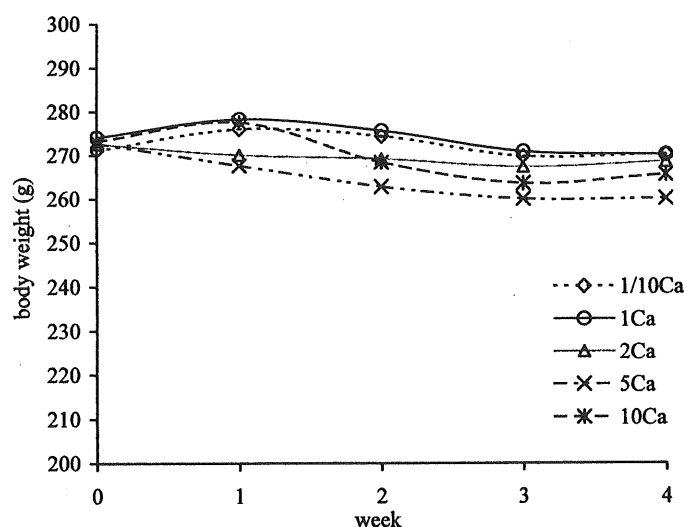


Fig. 1 Growth curve
Data are mean (n=9-10)

定の成長後は、高齢になるほど、Caの吸収率は低下していることが推測される。リタイア雌ラットでは、過剰のCaが、雄や雌の幼若ラットのように高率には吸収されず、結石等の形成にまでは至らなかったのかもしれない。しかし、Ca5倍群、Ca10倍群とCa投与量が基準量よりも増えるに従い、UNが上昇する傾向がみられ、Ca10倍群では、コントロール群に対し有意の高値をとり、Caの過剰摂取により、肉眼的な結石の形成にまでは至らなくても、組織レベルでのCa沈着がもたらされ、腎機能障害が惹起されていたことを示唆している。

血液・血漿生化学検査の結果をTable 2, 3に示す。血球計数検査には有意の変化は見られなかった。血漿生化学検査では、コントロール群に比較し、GOT, GPT, UNのCa10倍群での有意の上昇, ALPのCa 1/10群での有意の上昇, TIBCのCa5倍, 10倍群での有意の低下が認められた。

Ca1/10の低Ca投与群では、ALPがコントロール群に対し有意の上昇を示した。ALPは、骨疾患、肝臓、胆道系疾患で異常高値を示すことが多く、また、小児期は骨新生が盛んなため、成人値よりも高い活性値を示すことが知られている⁶⁾。Ca1/10群では、GOTやGPTの肝機能系の指標は上昇していないことから、骨由来のALP活性が上昇したものと考えられる。幼若雄ラットを用いた実験で、Ca欠乏食摂取により血中Ca濃度の低下が生じることを確認している⁷⁾。また、幼若および老齢雌ラットを用いたTalbotらの実験によると、低Ca食摂取により幼若、老齢ラット共に骨の代謝

Table 2. Hematological parameters of rat

		1/10Ca	1Ca	2Ca	5Ca	10Ca
WBC	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5.3 $\pm$ 0.27	5.5 $\pm$ 0.49	5.5 $\pm$ 0.40	5.6 $\pm$ 0.41	6.1 $\pm$ 0.52
RBC	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	7.10 $\pm$ 0.120	7.10 $\pm$ 0.171	7.31 $\pm$ 0.097	7.09 $\pm$ 0.054	6.94 $\pm$ 0.153
Hgb	(g/dl)	14.5 $\pm$ 0.36	14.6 $\pm$ 0.35	14.9 $\pm$ 0.23	14.4 $\pm$ 0.10	14.1 $\pm$ 0.31
Ht	(%)	38.6 $\pm$ 0.89	39.2 $\pm$ 0.96	40.1 $\pm$ 0.55	38.7 $\pm$ 0.27	37.9 $\pm$ 0.86
MCV	(fl)	55.4 $\pm$ 0.54	55.3 $\pm$ 0.45	54.8 $\pm$ 0.32	55.1 $\pm$ 0.32	54.7 $\pm$ 0.60
MCH	(pg)	20.8 $\pm$ 0.15	20.5 $\pm$ 0.14	20.3 $\pm$ 0.06	20.5 $\pm$ 0.10	20.3 $\pm$ 0.22
MCHC	(%)	37.5 $\pm$ 0.15	37.1 $\pm$ 0.16	37.3 $\pm$ 0.14	37.2 $\pm$ 0.17	37.2 $\pm$ 0.10
RDW	(%)	13.1 $\pm$ 0.45	12.3 $\pm$ 0.18	12.4 $\pm$ 0.28	13.3 $\pm$ 0.33	12.8 $\pm$ 0.28
PLT	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	624 $\pm$ 24.5	610 $\pm$ 72.1	668 $\pm$ 24.7	735 $\pm$ 39.2	636 $\pm$ 50.2
PDW	(fl)	6.5 $\pm$ 0.13	6.6 $\pm$ 0.13	6.7 $\pm$ 0.11	6.5 $\pm$ 0.12	6.7 $\pm$ 0.07

Data are mean $\pm$ SE (n=7-10)

#P<0.05 Significant different from the 1 Ca (control) group

Table 3. Biochemical parameters of rat plasma

		1/10Ca	1Ca	2Ca	5Ca	10Ca
TP	(g/dl)	5.6 ± 0.10	5.9 ± 0.11	5.7 ± 0.14	5.7 ± 0.09	5.6 ± 0.14
ALB	(g/dl)	4.1 ± 0.07	4.3 ± 0.09	4.2 ± 0.13	4.1 ± 0.14	4.0 ± 0.12
A/G		2.67 ± 0.057	2.73 ± 0.140	2.75 ± 0.256	2.88 ± 0.215	2.61 ± 0.106
GOT	(IU/L)	66 ± 2.9	71 ± 4.4	84 ± 5.0	85 ± 4.4	106 ± 6.1*
GPT	(IU/L)	24 ± 1.5	26 ± 2.0	35 ± 3.1	40 ± 3.6	66 ± 7.5*
ALP	(IU/L)	242 ± 18.9*	171 ± 11.1	215 ± 12.0	190 ± 14.8	177 ± 11.4
LAP	(IU/L)	95 ± 2.4	94 ± 3.0	98 ± 1.3	95 ± 2.0	96 ± 3.3
γ-GTP	(IU/L)	1 ± 0.0	1 ± 0.1	1 ± 0.0	1 ± 0.0	1 ± 0.2*
CHE	(IU/L)	3 ± 0.2	3 ± 0.0	3 ± 0.3	3 ± 0.1	3 ± 0.2
LDH	(IU/L)	288 ± 35.5	236 ± 24.1	210 ± 18.0	229 ± 18.7	298 ± 33.1
CPK	(IU/L)	316 ± 38.5	299 ± 31.5	246 ± 26.8	320 ± 34.4	293 ± 36.7
AMY	(IU/L)	576 ± 38.9	545 ± 16.3	527 ± 13.7	513 ± 16.8	522 ± 21.2
GLU	(mg/dl)	137 ± 5.1	134 ± 6.0	145 ± 4.1	130 ± 6.6	133 ± 4.2
T-CHO	(mg/dl)	72 ± 3.4	69 ± 5.2	65 ± 2.7	66 ± 5.1	59 ± 4.9
HDL-CHO	(mg/dl)	54 ± 3.1	53 ± 3.4	53 ± 2.0	55 ± 4.0	50 ± 4.3
TG	(mg/dl)	37 ± 6.0	33 ± 5.9	21 ± 2.8	30 ± 3.6	21 ± 2.9
PL	(mg/dl)	120 ± 3.7	116 ± 7.8	104 ± 5.5	107 ± 7.5	93 ± 6.6
NEFA	(μEq/L)	780 ± 106.6	593 ± 26.3	604 ± 42.3	634 ± 18.8	563 ± 54.3
UA	(mg/dl)	0.6 ± 0.07	0.6 ± 0.07	0.9 ± 0.12	0.8 ± 0.12	0.6 ± 0.14
UN	(mg/dl)	14.0 ± 0.78	13.7 ± 0.68	14.8 ± 0.55	16.0 ± 0.58	18.1 ± 1.41*
CRE	(mg/dl)	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.04	0.7 ± 0.03	0.7 ± 0.02	0.7 ± 0.03
Fe	(μg/L)	254 ± 30.4	205 ± 11.6	221 ± 16.4	206 ± 12.1	202 ± 13.7
TIBC	(μg/L)	397 ± 8.2	372 ± 6.0	344 ± 11.3	327 ± 6.6*	322 ± 15.6*

Data are mean ± SE (n=8-10)

*P<0.05 Significant different from 1 Ca (control) group

回転が上昇することを報告している⁸⁾。血中Ca濃度の低下により、PTHの分泌が亢進し、骨吸収が刺激され、骨代謝が亢進し、骨由来ALPが上昇したものと思われる。

Ca摂取量の増加に伴い、GOT、GPTの上昇がみられ、10倍のCa過剰投与群では、有意の高値を示し、肝機能の低下が示唆された。幼若雄ラットを用いた同様の高Ca摂取の実験では、過剰のCaの摂取により、Mg、Fe、Cuなど他のミネラルの動態も影響を受け、一般にMg、Feは欠乏傾向がみられ、Cuは肝臓中濃度が有意に上昇しているにもかかわらず、排泄経路の一つと考えられる腎臓中の濃度は有意に低下し、蓄積傾向がみられた^{1,2)}。肝臓へのCuの蓄積による肝障害の代表的疾病にウィルソン氏病があるが、Ca過剰による肝機能の低下も、このCuの蓄積との関連が考慮される。本実験においても、Ca過剰では血中TIBC濃度の低下がみられたが、肝機能低下による産生低下によるものであることが考えられる。

Ca栄養にはCaのみではなく、拮抗的役割を持つMg摂取量とのバランスが重要であることが知られている⁹⁾。骨粗鬆症の予防または治療にCaの経口投与が推奨、実施されることが多いが、この時、Mgの必要性にまで考慮されることはまれである。低Mg摂取の下で、Caサプリメントが使用されると、トロンボシスの危険性が増加すること、また、骨粗鬆症に対するエストロゲンの有効性はよく知られているが、このエストロゲンが骨粗鬆症に抵抗性を持つ一因として、軟組織や、骨へのMgの取り込みを増強し、Mgの利用性の向上をはかることが報告されている¹⁰⁾。また、低Mg食で飼育したラットは、血清中PTH、1,25(OH)₂ビタミンD濃度の低下と共に、骨芽細胞の減少、破骨細胞の増加をきたし、骨形成と骨吸収の連携を破綻し、骨量の消耗が認められた¹¹⁾、Ca/Mg摂取比の高値は、一般に小腸での吸収がCaとMgで共有されているため、Mgの吸収が負の影響を受ける¹²⁾、そして、Ca/Mg比が高く、ビタミンDの豊富な飼料で飼育したラットは、骨形成は進むが、脆い骨が形成された¹³⁾などの報告もある。我々の実験でも、Caの過剰投与（標準量の2倍、5倍、10倍）が幼若雄ラットの血中および、けい骨中Mg濃度の有意の低下をきたすという結果を得ており、この時、血液、けい骨中Ca濃度には有意の変化は認めず、解剖時には硬いが力を加えるとすぐに折れてしまう脆い骨が観察された^{2,3)}。Mg摂取状況を無視した、安易なCaサプリメントの利用の問題点が浮き彫りとさ

れた。しかし、Ca栄養への影響は、Mgのみではない。たんぱく質摂取の増加や、高Naの摂取は、Caの消耗、喪失を惹きし、骨のCa含有量を減少さるといった報告もある^{14,15)}。

様々な栄養素がお互いに何らかの影響を及ぼしあい、それぞれの役割を果たしていること、そして、Caの消耗が激しいと考えられる高齢経産ラットにおいても、低Ca摂取は勿論、Caの過剰摂取についても、必ずしも骨の強化にはつながらず、かえって健康障害を引き起こすことが明かとなった。Mgをはじめとした他の栄養バランスをも鑑みた適切なCa摂取量の重要性が改めて示唆された。

文 献

- 1) 木村美恵子, 武田隆久, 松村賢次, 初田直樹, 能美茂, 横山嘉人; カルシウム過剰摂取による生体内微量元素の動向: Biomed Res Trace Elements, 9, 3, 1998.
- 2) M.Kimura: Growth check and magnesium imbalance on young rats by over intakes of calcium. Current Status and New Developments, eds. by T.Theophanides and J.Anastassopoulou, Kluwer Academic Publishers 151-168, 1997.
- 3) Cashman KD, Flynn A, Effect of dietary calcium intake and meal calcium content on calcium absorption In the rat. Br J Nutr 1996 76 463-70.
- 4) Lotinun S, Limlomwongse L, Krishnamra N; The study of a significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats. Can J Physiol Pharmacol 1998 : 76 ; 218-28.
- 5) K Harai, T Morohashi, T Sano, S Yamada: Details of true calcium absorption and calcium excretion into feces in female rats during growth. J Nutr Sci Vitaminol 47, 52-56, 2001.
- 6) 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査免疫の検査—その数値をどう読むか— 276-279, 1995.
- 7) 岩渕敦子, 野谷千里, 筒井裕子, 木村美恵子, 糸川嘉則, カルシウム欠乏ラットにおけるマグネシウム及び各種ミネラルの変動について マグネシウム 4 45-51.
- 8) Talbott SM, Rothkopf MM, Shapses SA, Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density In younger and older female rats. J Nutr 1998 123 640-5.
- 9) ST McElroy, JE Link, RP Dowdy, KR Zinn, MR Ellersieck : Influence of age and magnesium on calcium metabolism in rats. J Nutr 121, 492-497, 1991.
- 10) MS Seelig : Interrelationship of magnesium and estrogen in cardiovascular and bone disorders, eclampsia, migraine and premenstrual syndrome. J Am Coll Nutr 12 (4) 442-58, 1993.
- 11) RK Rude, ME Kirchen, HE Gruber, MH Meyer, JS Luck, DL Crawford: Magnesium deficiency-induced osteoporosis in the rat: uncoupling of bone formation and bone resorption. Magnes Res, 12, 257-267, 1999.
- 12) IJ Cunningham : The influence of the level of dietary magnesium and calcium contents of the bone, the bodies and the blood serum of rats. NZ J Sci Tech 15 : 191-198, 1933.
- 13) ER Orent, HD Kruse, EV McCollum: Studies on magnesium deficiency in animals. VI Chemical changes in the bone, with associated blood changes resulting from magnesium deprivation. J Biol Chem 106 : 573-592, 1934.
- 14) T Takeda, M Kimura, Y Itokawa: Imbalance of calcium, magnesium and phosphorus in bone and other tissues of rats induced by low protein and calcium deficiency. J Nutr Sci Vitaminol 39 ; 355-363, 1993.
- 15) EL Chan, R Swaminathan : Calcium metabolism and bone calcium content in normal and oophorectomized rats consuming various levels of saline for 12 months. J Nutr 28, 633-639, 1998.