

ランタン投与ラットにおける高血清カルシウム濃度と低腎臓銅濃度には低リン状態が寄与している

野口 伸之助¹⁾, 湯川 法子¹⁾, 福永 健治¹⁾, 西山 利正²⁾, 吉田 宗弘¹⁾
 (¹⁾関西大学化学生命工学部食品工学研究室*, ²⁾関西医科大学公衆衛生学教室**)

Low Phosphorus Status Contributes to High Serum Calcium and Low Renal Copper Levels in Rats Administered Lanthanum

Shin-nosuke NOGUCHI¹⁾, Noriko YUKAWA¹⁾, Kenji FUKUNAGA¹⁾,
 Toshimasa NISHIYAMA²⁾ and Munehiro YOSHIDA¹⁾

¹⁾Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

²⁾Department of Public Health, Kansai Medical University

Summary

To examine a contribution of low phosphorus (P) status to high serum calcium (Ca) and variation of hepatic or renal trace element (iron (Fe), zinc (Zn) and copper (Cu)) contents of rats administered lanthanum (La), male 8-week Wistar rats were fed AIN93M diet (control diet; P content, 3 mg/g), a low-P AIN93M diet (low P diet; P content, 1.5 mg/g) or AIN93M diet supplemented with La carbonate (La-supplemented diet; La content, 9 mg/g) for 4 weeks, and Ca in the serum and femur, P in the serum, femur and feces and Fe, Zn and Cu in the liver and kidney were determined. The La administration increased fecal P excretion, caused the lowest luminal P absorption and induced hypophosphatemia. Lowered serum P was also observed in rats fed the low-P diet. Significantly higher serum Ca was observed in rats fed the low-P diet or the La-supplemented diet compared to those fed the control diet. Femur Ca and P were significantly decreased in rats fed the La-supplemented diet than those fed the low-P diet or the control diet. Compared to the control rats, rats fed the low-P diet or the La-supplemented diet showed significantly lower renal copper concentration. These results indicate that low P status contributed to the high serum calcium and low renal copper levels in rats administered La, and that the high serum Ca was caused by acceleration of bone resorption in response to the hypophosphatemia induced by La administration.

慢性腎不全のために人工透析を行う患者は、リンの除去が不十分であるため、高リン酸血症を引き起こす可能性がある。高リン酸血症は、致命的な副甲状腺機能亢進症、代謝性骨疾患、冠状動脈の石灰化とそれに伴うアテローム動脈硬化など、様々な合併症を引き起こすため、人工透析患者においては、食事由来のリンの吸収量を抑制することが必要である。しかし、低リン食は必然的に低タンパク質食であり、食事の質を低下させ、患者の生活の質をも低下させる。このため、透析患者の高リン酸血症予防のためには、消化管内で食事由来のリンと結合して、リンの消化管吸収を抑制するリン吸着剤が使用されることが多い¹⁾。

リン吸着剤として、かつてはアルミニウム製剤がもっともよく用いられた。しかし、アルミニウムが脳や骨に蓄積し、長期間の服用後にアルミニウム脳症、骨軟化症といっ

た副作用が生じることが明らかとなったことから、アルミニウム製剤は使用が禁止された²⁾。このため、現在ではリン吸着剤として、カルシウム製剤、ランタン製剤、イオン交換樹脂が用いられている。この中で、カルシウム製剤には、カルシウムの一部が腸管内でリンと結合することなく体内に吸収されて高カルシウム血症の原因となる可能性があること³⁾、イオン交換樹脂には、消化管内で膨潤して便秘を起こすこと⁴⁾、などの副作用が指摘されている。一方、希土類元素の一種であるランタンは、カルシウムの原子吸光分析においてリンの干渉を除くための吸着剤として用いられていることでもわかるように、pHの広範囲にわたってリンとの親和性がきわめて高い。さらにランタン自身の消化管吸収率がきわめて低く、排泄経路が胆汁であるため、腎不全患者においても臓器蓄積が非常に少ない。われわれ

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地：大阪府枚方市新町2-5-1 (〒573-1010)

も、ラットを用いた動物実験において、ランタンの臓器別蓄積を検討し、アルミニウムのような脳や骨への蓄積がほとんど起こらないことを確認した⁵⁾。近年では、このようなことから、ランタン製剤は、副作用が少なく、かつ効果も大きいリン吸収抑制剤として、もっとも広く普及している⁶⁾。

リンはリン脂質、核酸、ATP、骨塩などを構成しており、きわめて重要なミネラルである。しかし、リン欠乏食の調製が困難であるため、リン欠乏時に生じる代謝変化についての研究はあまり進展していない。リン欠乏食の調製が困難である理由は、リンがカゼインをはじめとする食品タンパク質に結合・吸着していること、およびミネラル配合からリンを除去すると他の主要ミネラルの含量にも変動が生じることなどがあげられる。ランタンとリンとの親和性の高さ、およびランタン自身の低吸収性と低蓄積性を考慮すると、ランタンを添加した飼料を用いることによって、容易に実験動物に低リン状態を起こすことができると思われる。事実、われわれは、健常な成熟ラットに、4週間にわたって、人工透析患者がランタン製剤を最大限服用した場合の食事中ランタン濃度（服用量（2250 mg）／乾燥食事量（400～500 g））の約2倍に相当する9 mg/gのランタンを含有する飼料を与えることによって、低リン酸血症が出現し、さらに低リン状態において、尿中リン排泄が著しく低下することを確認した⁵⁾。この実験では、ランタン投与ラットにおいて、血清カルシウム濃度と腎臓鉄濃度の上昇、肝臓鉄、腎臓亜鉛、腎臓銅濃度の低下が認められたが^{5,7)}、その理由については不明であった。本研究では、先の実験で認めた、血清カルシウムおよび臓器中微量元素濃度の変化が、ランタンの直接作用によるものなのか、それともランタンによって出現した低リン状態が引き起こしたのかを確認するため、飼料中のリンを減らした低リン食を与えたラットとランタン添加飼料を与えたラットを調製し、それらの血清カルシウム濃度、および臓器中微量元素濃度を通常食を与えたラットと比較した。

実験方法

1. 実験動物と飼料

8週齢のWistar系雄ラット18頭を6頭ずつA～Cの3群に分け、A群（対照群）にはリン濃度が3 mg/gであるAIN93M飼料（control diet）⁸⁾、B群（低リン群）にはAIN93M飼料のミネラル混合を調整してリン濃度を1.5 mg/gに減じた低リン飼料（low P diet）、C群（ランタン群）にはAIN93M飼料にランタン濃度が9 mg/gとなるように炭酸ランタンを加えた飼料（La-supplemented diet）を与え、自由摂取法で4週間飼育した。なお、低リン食の調製では、AIN93Mミネラル配合中のリン酸カリウムを減らしたが、その分、塩化カリウムを加えてカリウム濃度を他の飼料と同等になるように調整した。飼育期間

終了後、解剖し、血清、肝臓、腎臓、および大腿骨を摘出した。また、飼育終了直前の4日間は糞の採取を行った。本実験は、関西医科大学実験動物倫理委員会の承認を得て実施した。

2. 分析

血清のカルシウムとリン濃度の測定は日本医学研究所（貝塚市）に委託した。肝臓、腎臓、大腿骨は濃硝酸を用いて湿式灰化後、灰化液を純水で適宜希釈し、含有される鉄、亜鉛、カルシウム濃度をフレイム式原子吸光光度計、銅とランタンを誘導結合プラズマ質量分析装置、リンをバナドモリブデン酸吸光光度法⁹⁾で定量した。糞は、550℃で16時間灰化後、濃硝酸に溶かし、含有されるリンをバナドモリブデン酸吸光光度法で定量した。

3. 統計解析

得られた結果は平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析で解析した。有意水準は危険率5%とした。分散分析において有意であった場合には、Turkey-Kramerの多重比較を用いて群間の差を検討した。

結果と考察

飼育期間終了後の体重と臓器重量に群間の差は認められなかった。また、飼育期間中の体重変化、飼料摂取量、飲水量にも群間の差はなかった。Table 1には、各群ラットの肝臓と腎臓のランタン濃度をまとめた。ランタン非添加飼料を与えた対照群と低リン群の値はいずれも検出限界値（0.05 μg/g）付近であった。これに対して、ランタン添加飼料を与えたラットの臓器にはランタンが検出され、とくに肝臓には1～2 μg/g程度のランタン蓄積が認められた。この測定値は、先の実験⁵⁾とほぼ同水準である。飼料へのランタン添加量（9 mg/g）、飼料摂取量（約20 g/d）、飼育日数（4週間）にもとづく、ランタン群のラットは飼育期間中に数グラムのランタンを摂取した計算になる。それにもかかわらず肝臓のランタン濃度が最大でも2 μg/gであったことは、ランタンの低吸収性と低蓄積性を示すものと判断する。なお、われわれはランタン投与を半年近く継続した場合、4週間投与と同水準の臓器蓄積しか生じないことを認めており、この点からもランタンの低蓄積性は明らかだと思われる¹⁰⁾。

Table 1 Tissue lanthanum concentration in rats fed experimental diets for 4 weeks

Diets	Liver (μg/g)	Kidney (μg/g)
Control diet	< 0.05 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
Low P diet	< 0.05 ^a	< 0.05 ^a
La-supplemented diet	1.94 ± 0.34 ^b	0.19 ± 0.01 ^b

Values are means ± SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly (*p* < 0.05).

Table 2に各群ラットのリンの摂取量、糞排泄量、およ

び見かけの吸収量をまとめた。飼料中リン濃度が対照群の約半量である低リン群では、糞への相対的な排泄量が減少しており、見かけの吸収率が対照群に比較して明らかに高くなっていた。このことは、食事からのリンの供給が低下するとリンの消化管吸収率が高まることを意味しており、これまでの報告¹¹⁾と矛盾しない。一方、ランタン群では、糞へのリン排泄量が明らかに高まっており、もっとも低い見かけの吸収率が観察された。このことは、消化管内でリンとランタンが結合して、難吸収性の塩が形成されたことを意味している。ランタン群の見かけの吸収量が低リン群よりも少なかったことから、本実験における消化管からのリン吸収量は、多い順に、対照群>低リン群>ランタン群であったと判断できる。

Table 3には、各群ラットの血清と大腿骨のカルシウムとリン濃度をまとめた。血清リン濃度は見かけの吸収量を反映し、対照群>低リン群>ランタン群の順であり、ランタン群のラットが低リン酸血症の状態だった。これに対して、血清カルシウム濃度は、低リン群とランタン群において対照群よりも有意に高値だった。また、大腿骨のカルシウムとリン濃度はランタン群において他の2群よりも有意に低値だった。ランタン群においては、低リン酸血症から脱却するために骨吸収が促進され、その結果、血清カルシウム濃度が上昇した可能性が考えられる。一方、低リン群では、血清カルシウム濃度は上昇していたが、大腿骨のカルシウムとリン濃度には変化がなかった。低リン群ではランタン群よりもリン不足の状態が顕著ではなく、低リン酸血症には至らなかったために、骨塩量の減少が起らなかったと思われる。飼料中のリンを制限すると骨塩量が増

加するという報告が多いが¹²⁾、低リン酸血症下では、骨の石灰化の阻害と骨吸収の促進が生じるという報告も認められる¹³⁾。リン制限下の骨代謝に関しては、わずかな実験条件の違いによって様相が異なるのかもしれない。なお、飼料中のリンを減らすとカルシウム吸収の高まることが報告されていることから¹²⁾、飼料中リンが対照群の半量である低リン群、飼料中リンの相当量がランタンと結合したと考えられるランタン群では、消化管におけるカルシウムの吸収量が高まっていた可能性も考えられる。したがって、ランタン群の血清カルシウム濃度の上昇には、骨吸収促進と消化管のカルシウム吸収量増加の両面を考慮する必要があると思われる。いずれにしても、ランタン投与ラットにおいて認められた血清カルシウム濃度の上昇は、ランタンの直接作用ではなく、低リン状態が引き起こしたものと見える。

Table 4に肝臓と腎臓の鉄、亜鉛、銅濃度をまとめた。肝臓に関して、先の実験では、ランタン投与群では対照群に比較して鉄濃度のわずかな上昇を認めたが⁷⁾、今回の実験では、逆に鉄濃度はランタン投与によって若干低下する傾向を示した。また、先の実験では認めなかった亜鉛濃度のわずかな上昇をランタン群において認めた。先の実験と今回の実験を比較した場合、肝臓におけるランタン投与に伴う鉄および亜鉛濃度の変化には再現性がないといわざるを得ない。変化量がわずかであること、および肝臓へのランタン蓄積量が鉄、亜鉛に比較してきわめて少ないことから、ランタン投与が直接に肝臓の鉄と亜鉛濃度に影響を及ぼすことはないといえよう。また、銅濃度に関しては、3群の中で低リン群においてわずかに低下していることが認

Table 2 Apparent absorption of phosphorus in rats fed experimental diets for 4 weeks

Diets	Intake (mg/d)	Fecal excretion (mg/d)	Apparent absorption (mg/d)	Apparent absorption rate (%)
Control diet	65.0 ± 1.8 ^b	33.1 ± 1.0 ^b	31.9 ± 1.9 ^c	49.1 ± 1.9 ^b
Low P diet	32.0 ± 0.5 ^a	10.1 ± 0.9 ^a	21.9 ± 1.1 ^b	68.5 ± 2.8 ^c
La-supplemented diet	66.5 ± 2.7 ^b	52.8 ± 2.7 ^c	13.7 ± 1.8 ^a	20.6 ± 3.3 ^a

Apparent absorption was calculated as a difference between intake and fecal excretion. Values are means ± SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

Table 3 Calcium and phosphorus concentration in serum and femur of rats fed experimental diets for 4 weeks.

Diet	Serum (mg/dL)		Femur (mg/g)	
	Calcium	Phosphorus	Calcium	Phosphorus
Control diet	10.2 ± 0.1 ^a	5.6 ± 0.2 ^b	142 ± 2 ^b	67 ± 1 ^b
Low P diet	11.1 ± 0.2 ^b	4.7 ± 0.4 ^{ab}	143 ± 4 ^b	66 ± 1 ^b
La-supplemented diet	10.8 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.1 ^a	132 ± 2 ^a	61 ± 1 ^a

Values are means ± SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

Table 4 Iron, zinc and copper contents in liver and kidney of rats fed experimental diets

Diet	Liver			Kidney		
	Iron	Zinc	Copper	Iron	Zinc	Copper
Control diet	133.8 ± 7.3 ^a	24.4 ± 0.7 ^a	4.9 ± 0.2 ^{ab}	67.1 ± 1.6 ^a	26.3 ± 0.6 ^a	4.5 ± 0.4 ^b
Low P diet	129.7 ± 5.4 ^a	25.3 ± 0.4 ^a	4.4 ± 0.1 ^a	62.0 ± 1.6 ^a	25.1 ± 0.7 ^a	2.6 ± 0.1 ^a
La-supplemented diet	122.3 ± 5.0 ^a	27.4 ± 0.3 ^b	5.1 ± 0.3 ^b	57.5 ± 2.7 ^a	25.1 ± 0.4 ^a	2.4 ± 0.1 ^a

Values are means ± SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

められた。しかし、これに関しても変化量がわずかであることから、再現性があるかを確認した上で議論を進めるのが妥当と思われる。

一方、腎臓に関して、先の実験では、対照群に比較して、ランタン投与群において鉄濃度の上昇と亜鉛および銅濃度の低下を認めた⁷⁾。しかし、今回の実験では Table 4 に示すように、鉄濃度は逆にランタン投与によって低下傾向を示し、亜鉛濃度は群間の差を示さなかった。すなわち、肝臓の鉄、亜鉛濃度と同様に、腎臓の鉄、亜鉛濃度に及ぼすランタン投与の影響にも再現性はなかった。したがって、肝臓同様に腎臓の鉄、亜鉛濃度に対しても、ランタン投与が直接に影響を及ぼすことはないと判断する。これらに対して、銅濃度に関しては、ランタン群が対照群に比較して有意に低値を示し、先の実験結果⁷⁾が再現された。銅濃度に関しては、低リン群においても対照群より有意に低い値を認めたことから、この銅濃度の低下はランタンの直接作用ではなく、低リン状態によって生じた現象とみなせる。われわれは、クエン酸第二鉄大量投与ラットにおいて発生した低リン状態においても腎臓銅濃度の低下を認めている¹⁴⁾。今後、リンの供給減少と腎臓銅濃度低下の間に存在する機構の検討が望まれる。

今回の実験は、ランタン投与ラットに認められた高血清カルシウム濃度⁵⁾、および肝臓と腎臓の微量元素濃度の変化⁷⁾が、ランタンの直接作用なのか、それとも低リン状態が影響したものなのかを確認することが目的であった。ランタン投与の影響として明確な再現性があったのは高血清カルシウム濃度と低腎臓銅濃度のみであった。これらの濃度変化は、いずれも低リン食投与ラットでも認められたことから、ランタンの直接作用ではなく、ランタン投与の引き起こした低リン状態に関わる現象であると結論できる。

参考文献

- 1) Hutchison AJ (2004) Improving phosphate-binder therapy as a way forward. *Nephrol Dial Transplant* 19: i19-i24.
- 2) Savory J, Bertholf RL, Wills MR (1985) Aluminum toxicity in chronic renal insufficiency. *Clin Endocrinol Metab* 14: 681-702.
- 3) Rostand SG, Sanders C, Kirk KA, Rutsky EA, Fraser RG (1988) Myocardial calcification and cardiac dysfunction in chronic renal failure. *Am J Med* 85: 651-657.
- 4) 栗原 怜 (2004) 塩酸セベラマーの副作用と安全な使用法. *腎と骨代謝* 17: 363-370.
- 5) Yoshida M, Hosomi R, Kunimatsu M, Nakamura K, Fukunaga K, Kanda S, Nishiyama T (2012) Phosphorus balance in rats with hypophosphatemia induced by lanthanum carbonate. *Food Nutr Sci* 3: 405-410.
- 6) 吉田宗弘 (2009) 炭酸ランタン製剤経口投与後のランタンの臓器分布について. *Ther Res* 30: 971-974.
- 7) Yoshida M, Hosomi R, Noda H, Uemura K, Fukunaga K (2010) Effect of lanthanum-induced low phosphorus status on tissue trace mineral contents. In: *Proceedings of 15th international conference on heavy metals in the environment* (ed by Bargańska Ż, Beyer A, Klimaszewska K, Namieśnik J, Tobiszewski M, Rutkiewicz I), Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, p. 870-872.
- 8) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- 9) Quinlan KP, DeSesa MA (1955) Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdovanadophosphoric acid. *Anal Chem* 27: 1626-1629.
- 10) Yoshida M, Hosomi R, Fukunaga K, Kanda S, Nishiyama T (2012) Tissue lanthanum deposition and phosphorus balance in rats with long-term dietary administration of lanthanum carbonate. *Biomed Res Trace Elem* 23: 40-44.
- 11) Giral H, Caldas Y, Sutherland E, Wilson P, Breusegem S, Barry N, Blaine J, Jiang T, Wang XX, Levi M (2009) Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1466-1475.
- 12) Koshihara M, Katsumata S, Uehara M, Suzuki K (2005) Effect of dietary phosphorus intake on bone mineralization and calcium absorption in adult female rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1025-1028.
- 13) Bruin WJ, Baylink DJ, Wergedal JE (1975) Acute inhibition of mineralization and stimulation of bone resorption mediated by hypophosphatemia. *Endocrinology* 96: 394-399.
- 14) 吉田宗弘, 山川裕久, 湯川法子, 野口伸之介, 福永健治, 西山利正 (2013) 高用量のクエン酸第二鉄を投与したラットのトランスフェリン飽和率と臓器中鉄濃度. *Biomed Res Trace Elem* 24: 23-30.