

慢性カドミウム中毒の実験的研究：
カドミウム投与とビタミンD欠乏による、ラット骨中
ミネラルの変動

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9069

慢性カドミウム中毒の実験的研究

—カドミウム投与とビタミンD欠乏による、
ラット骨中ミネラルの変動—

金沢大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 岡田 晃教授)

尾 山 光 一

(昭和58年3月15日受付)

カドミウム (Cd) 投与とビタミンD (V.D) 欠乏が骨中のミネラルの変動に及ぼす影響を比較検討するために、成長期ラット (体重 135 g) を用いて飼料中の Cd (100 ppm), V. D₂ (5 IU/100 g 飼料) 添加の有無の組み合わせにより4群に分けて最長557日間飼育し、期間中の各時点で死亡ないし失血死させたラットの大腿骨中 Cd, Ca, Zn, Mg, Cu, Fe 量を原子吸光法により、また P 量を Allen 法により測定した。更に成熟期ラット (337 g) についても Cd 添加群には Cd の経口投与の他に前半期に 150 μ g の Cd の14回皮下投与を加えて、666日間、同様の実験を行った。その結果、成長期ラットでは、対照群と比べて Cd 添加・V. D 添加群は Zn と Fe 濃度の明らかな低下を示し、Ca, P, Mg 濃度も557日の時点では有意に低下を示した。一方、Cd 非添加・V. D 欠乏群では Ca, P, Mg 濃度は明らかな低下を示したが、Zn 濃度については一定の傾向を示さなかった。更に、Cd 添加・V. D 欠乏群では Ca, P, Mg, Zn 濃度は早期より著明な減少を示した。しかし、Cu 濃度については群間に有意差を認めなかった。また、骨中 Cd 濃度は経時的に増加傾向を示したが、個体差も大きく、更に、V. D 添加群は欠乏群より高値を示した。成熟期ラットでは、骨中の各元素濃度の経時変化は成長期ラットに比べて小さく、また、Cd 添加・V. D 添加群では、後半期に Ca, P, Mg 濃度の有意な低下を示し、骨中 Cd 量と Ca, P, Zn, Mg 量とは負の相関関係を認めた。なお、Ca 量と P, Zn, Mg 量とは、対照群の Mg 量を除き、正の相関関係を認めた。以上の結果から、Cd 投与により骨中の各ミネラルは固有の変動を示すこと、そしてそれに V. D 欠乏が加わることによって、その変動は著しく促進されることが示された。

Key words Cadmium intoxication, Vitamin D, Bone, Minerals, Age

カドミウム (以下 Cd と略) は生体にとっては必須金属に数えられ、生活環境汚染物質の1つとして、わが国では特に、富山県神通川流域に多発したイタイイタイ病¹⁾の原因物質に指摘されて以来注目され、Cd 中毒の研究もその関連で進んでいる。Cd は生物学的半減期が長く、生体に摂取されると蓄積性を有し、従って微量 Cd の長期摂取による慢性中毒が問題となる。

イタイイタイ病は骨軟化症類似の骨病変と腎尿細管障害が特徴とされており、動物実験でも腎・骨障害、貧血その他の病変が見出されている²⁾。Cd 中毒による骨病変発生の機序については、これまでに腎障害による Ca の再吸収障害、腸管からの Ca、ビタミンD (以

下 V. D と略) の吸収障害、腎での V. D 活性化障害による2次的 V. D 欠乏、更には Cd の骨への直接作用等の諸説が検討されているが、未だ結論に達していない。

V. D はもともと、その欠乏が骨軟化症病変を来たすことから Cd 中毒による骨障害との関連が考えられてきた。そこで本実験では、長期間の Cd 投与と V. D 欠乏が骨中の各ミネラルの変動に及ぼす影響について比較検討を行った。近年、Cd 投与により Ca, P 以外にも Zn, Cu, Fe, Mg その他の生体必須金属の代謝や機能に影響して、その生体内分布や動的平衡状態に変化のおこることが知られるようになった。それは主として Cd の主要蓄積臓器である肝と腎についての報告が多

An Experimental Study on Chronic Cadmium Intoxication —Changes of Mineral Concentrations in the Bone of Rats by Cadmium Administration and Vitamin D Deficiency. **Kōich Oyama**, Department of Public Health (Director: Prof. A. Okada), School of Medicine, Kanazawa University.

く、骨はそれらミネラルを豊富に含み、その出納が注目されるが、長期にわたり経時的に骨のそれらの変動をみた報告は少ない。本研究では、骨中の Cd, Ca, P とともに、Zn, Cu, Fe, Mg 量についてその経時的推移を観察した。

更に、Cd 中毒による骨変化は加齢に伴う骨代謝の相異によって、とりわけ骨の成長期と成熟期によって異なることが考えられる。そこで、成長期及び成熟期の 2 系列のラットを用いて実験を行い、年齢差についても検討を加えた。

対象および方法

1. 実験動物及び実験条件

Wistar 系雌ラット 94 匹を用いて次の 2 つの実験を行った。

実験 A : 68 匹のラット (平均体重 135 g) を飼料中の Cd 添加の有無, V. D 添加の有無により表 1 に示す A-1, A-2, A-3, A-4 の 4 群に分け飼育した。Cd は塩化 Cd (和光純薬製試薬特級) を用い、飼料に Cd として 100 ppm の濃度となるように添加し、自由摂取によ

り経口投与した。V. D としては V. D₂ (和光純薬製) を大豆油に溶かして用い、基本飼料 100 g 当り 5 I. U の割合に添加した。飼育期間は昭和 54 年 6 月 14 日~55 年 12 月 24 日の 557 日間である。

実験 B : 26 匹のラット (平均体重 337 g) を同様に、表 2 に示す B-1, B-2, B-3 の 3 群に分け飼育した。Cd は上記経口投与に加えて皮下投与を行った。つまり、塩化 Cd を滅菌した生理食塩水に Cd として 300 ppm の濃度となるように溶解し、その溶液 0.5 ml を背部皮下に飼育開始後 24 週から 36 週の間計 14 回にわたり注射した。V. D は実験 A と同じものを同濃度に添加した。飼育期間は昭和 55 年 1 月 22 日~56 年 11 月 17 日の 666 日間である。

基本飼料は表 3 に示す内容からなり、各食品を機械的によく混合して作成した。なお、各群のラットは原則として毎週体重測定を行った。

2. 骨の採取及び測定法

実験 A では、癌や変死の 9 匹を除き、失血死させた 33 匹 (132 日後 8 匹, 191 日後 8 匹, 557 日後 17 匹) と途中死亡の 26 匹の計 59 匹について、死後直ちに右

Table 1. Experimental conditions for each group (Exp. A)

Group No.	V. D	Cd	Number of rats		Number of rats examined	Food consumption g/Rat/Day
			Initial	Final		
A-1	+ ^a	-	15	5	10	14.5
2	+ ^a	+ ^b	20	11	20	14.2
3	-	-	15	1	13	13.5
4	-	+ ^b	18	0	16	10.5

a: Vitamin D was added to the control diet at the rate of 5 IU/100 g of the diet.

b: Cadmium was added in the form of cadmium chloride to the control diet in a concentration of 100 ppm.

Table 2. Experimental conditions for each group (Exp. B)

Group No.	V. D	Cd	Number of rats		Number of rats examined
			Initial	Final	
B-1	+ ^a	-	7	0	5
2	+ ^a	+ ^b	12	0	10
3	-	-	7	1	2

a: Vitmin D: refer to Table 1.

b: In addition to oral administration of Cd (Cd, 10mg/100 g of diet), a 0.5 ml of cadmium chloride solution (Cd, 300 µg/ml) was injected subcutaneously 14 times during the experimental period.

Table 3. Composition of control diet

contents	Percentage Composition (g/100 g of diet)
Rice powder	60
Defatted soybean	30
Bean oil	5 ^a
Mineral mixture	3 ^b
Vitamin mixture	1 ^c
Lactose or CdCl ₂	1
Observed mineral concentration (mg/100 g of diet)	
Cd	0.008
Fe	5.59
Zn	4.76
Cu	1.18
Ca	89
Mg	43
P	275

a: Vitamin A was added to bean oil at the rate of 200 IU/5 g.

b: Salt mixture: NaCl 10.552 g, Na₂CO₃ 22.038 g, K₂CO₃ 48.494 g, MgCO₃ 14.298 g, ZnCO₃ 0.527 g, FeSO₄·7H₂O 1.702 g, CuSO₄·5H₂O 0.269 g, MnSO₄·H₂O 2.113 g, KI 0.005 g.

c: Vitamin mixture: V. B₁-HCl 59 mg, Nicotinic acid 294 mg, Ca-panthotenate 234 mg, V. B₆ 29 mg, Inositol 1176 mg, V. C 588 mg, Choline chloride 15000 mg, Biotin 1 mg, Folic acid 2 mg, V. B₁₂ 0.2 mg, V. B₂ 60 mg, Lactose 82556.8mg.

大腿骨を取り出して重量測定後、分析時まで-20°Cで凍結保存した。

実験Bでは、同様に癌や変死の9匹を除き、途中死亡16匹と666日後失血死させた1匹の計17匹について同様の処置を行った。

骨は硝酸、塩酸、過塩素酸で湿式灰化した後、灰化液の適当量を取り、Ca量(SrCl₂添加)、Zn量(硝酸添加)、Mg量(La溶液添加)、Fe量(そのまま)をフレイム原子吸光度(日立180-80型偏光Zeemann式原子吸光度計)により、Cd量とCu量をピロリジンチオカルバミン酸アンモニウム-メチルイソブチルケトンで抽出後、フレイムレス原子吸光度(同光度計)により測定した。また、P量はAllen法³⁾により測定した。

成 績

1. 体重の推移(図1)

Cd添加のA-2, A-4群は非添加のA-1, A-3群に比

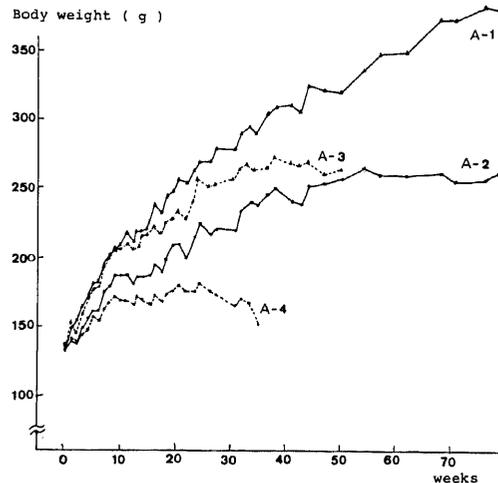


Fig. 1. Growth curve of each group in Exp. A. A-1 group= vitamin D-positive (VD⁺) & cadmium-negative (Cd⁻); A-2 group=VD⁺, Cd⁺; A-3 group=VD⁻, Cd⁻; A-4 group=VD⁻, Cd⁺. When the number of existent rats is less than five, the curve is omitted.

べて当初より体重増加速度が遅く、両群とも10週頃から体重増加が止まり、A-2群は再度増加を示すが、A-4群は増加を認めない。A-3群も10週頃から増加速度が鈍化し、その後A-1群との差は拡大している。図には示してないがB-2, B-3群はB-1群に比べ発育抑制を認め、Cd添加のB-2群では体重減少を認めた。

途中死亡ラット数は10週頃から増加し、A-4群では14匹死亡して、殺したものを含め60週までにすべて死亡し、A-3群も実験期間中に9匹死亡して、実験終了時点では1匹生存するだけであった。A-1, A-2群は各6匹の死亡であった。一方、B群はB-2群が20週までに8匹死亡した他、666日後の終了時点までに1匹を残してすべて死亡した。各群の骨重量の平均値は、生育期間は異なるが、A-4群(0.57g)が他の群(0.73~0.81g)に比べ有意に低値を示したものの、A-1, A-2, A-3群間、Bの各群間に有意差は認められなかった。

2. 大腿骨中各元素濃度の推移

1) Cd濃度(図2)

A-2群は経時的に増加傾向を認め、V. D添加のA-2群は非添加のA-4群に比べ高値を示す。しかし、終了時点の個体差も大きい。B-2群は500日を過ぎた時点では高値を示す。

2) Ca濃度(図3)

V. D添加のA-1, A-2群に比べて、非添加のA-3,

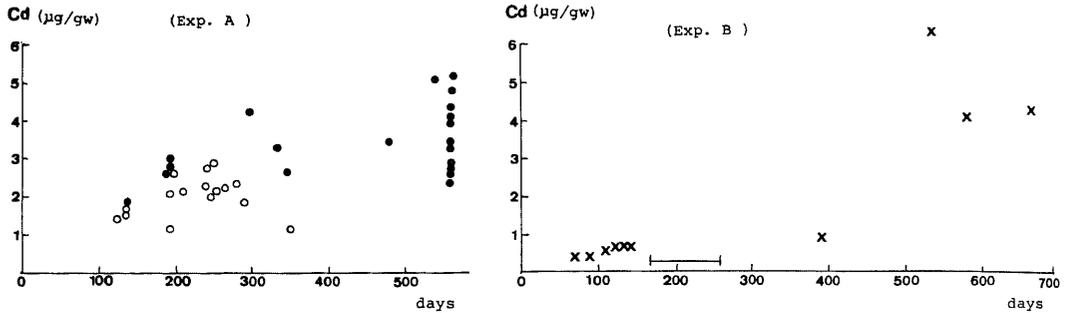


Fig. 2. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of cadmium in the femur. (Exp. A) ● = A-2 group (VD⁺, Cd⁺); ○ = A-4 group (VD⁻, Cd⁺). (Exp. B) × = B-2 group (VD⁺, Cd⁺). |—|: In B-2 group, besides oral administration of Cd, 150 µg of Cd was injected subcutaneously 14 times during the period.

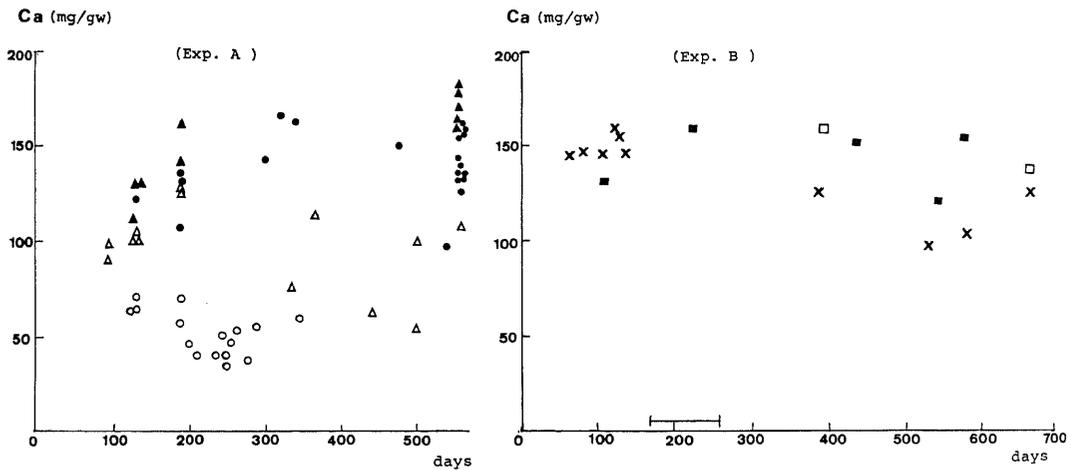


Fig. 3. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of calcium in the femur. (Exp. A) ▲ = A-1 group (VD⁺, Cd⁻); ● = A-2 group (VD⁺, Cd⁺); △ = A-3 group (VD⁻, Cd⁻); ○ = A-4 group (VD⁻, Cd⁺). (Exp. B) ■ = B-1 group (VD⁺, Cd⁻); × = B-2 group (VD⁺, Cd⁺); □ = B-3 group (VD⁻, Cd⁻). |—|: refer to Fig. 2.

A-4 群は低値を示し、A-4 群で明らかな減少傾向を認める。A-2 群は後半に軽度の低下を示して、557 日の時点では A-1 群より有意に低値を示す。B-1 群は変化なく、Cd 添加の B-2 群は後半、有意に低下を示す。

3) Zn 濃度 (図 4)

Cd 非添加の A-1, A-3 群に比べて、添加の A-2, A-4 群は低値を示し、A-4 群で減少傾向を認めた。なお、A-3 群は後半、低値を示すのみがみられ、一定の傾向を認めない。B-2 群は B-1 群に比べ低値を示すが有意な経時的変化は認められない。

4) Mg 濃度 (図 5)

V. D 添加の A-1, A-2 群は軽度の減少を示す一方、非添加の A-3, A-4 群は明らかな減少傾向を認め、A-

4 群でそれが顕著であった。なお、終了時点で A-2 群は A-1 群に比べ有意に低値を示す。B-1 群は変化なく、B-2 群は後半、有意に低下を示す。

5) Cu 濃度 (図 6)

B-1 群が増加傾向を示した他は、経時的変動傾向は認め難い。

6) Fe 濃度 (図 7)

Cd 添加の A-2, A-4 群が非添加の A-1, A-3 群に比べ低値を示しているが経時的変動傾向は認め難い。

7) P 濃度 (図 8)

Ca 濃度と同様の変化を示した。

3. 大腿骨中各元素間の相関関係 (図 9~16, 表 4)
Cd 量と各元素間の相関は、A-2 群で Mg 量と、A-4

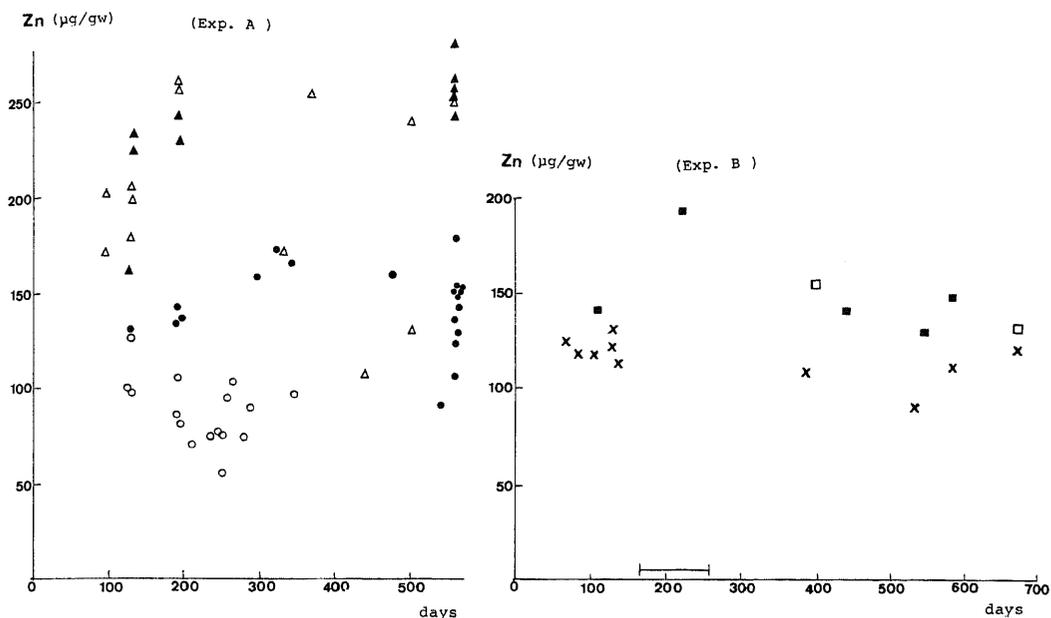


Fig. 4. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of zinc in the femur. Symbols: refer to Fig. 3.

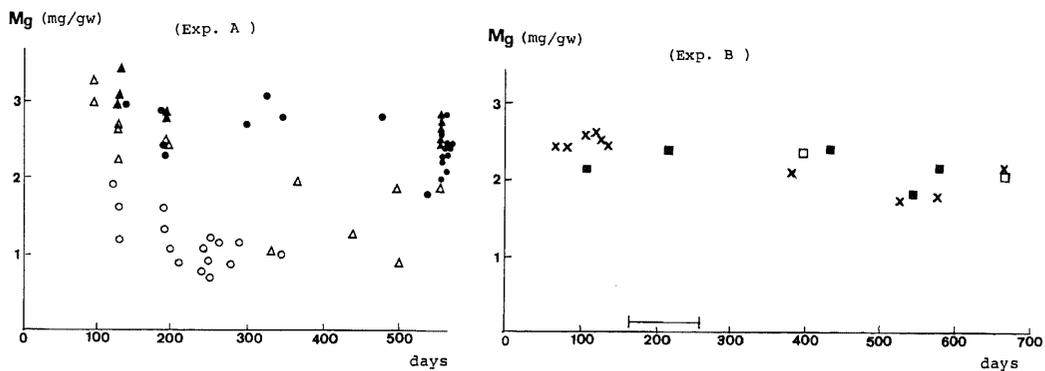


Fig. 5. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of magnesium in the femur. Symbols: refer to Fig. 3.

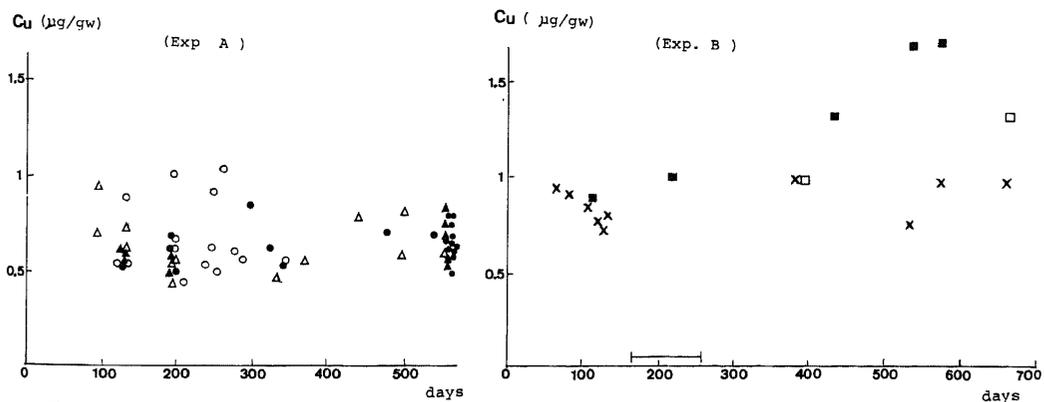


Fig. 6. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of copper in the femur. Symbols: refer to Fig. 3.

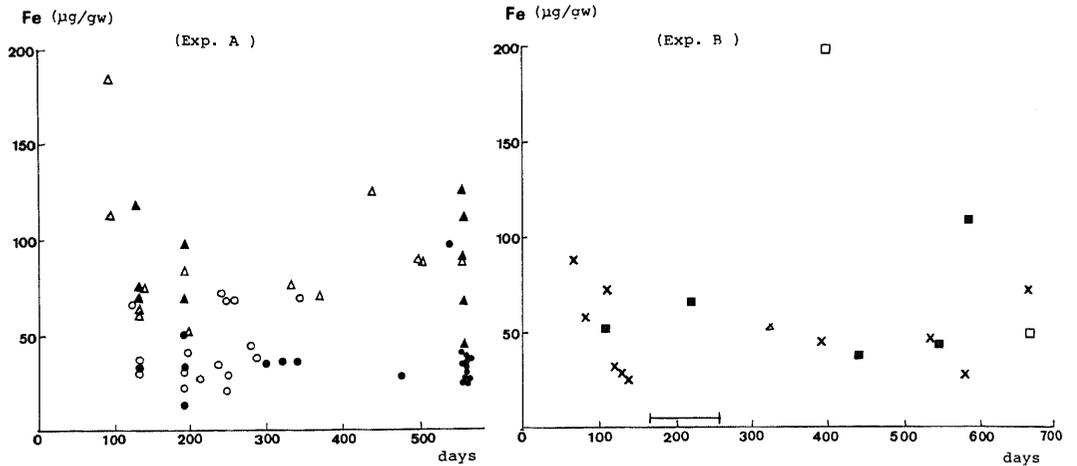


Fig. 7. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of iron in the femur. Symbols: refer to Fig. 3.

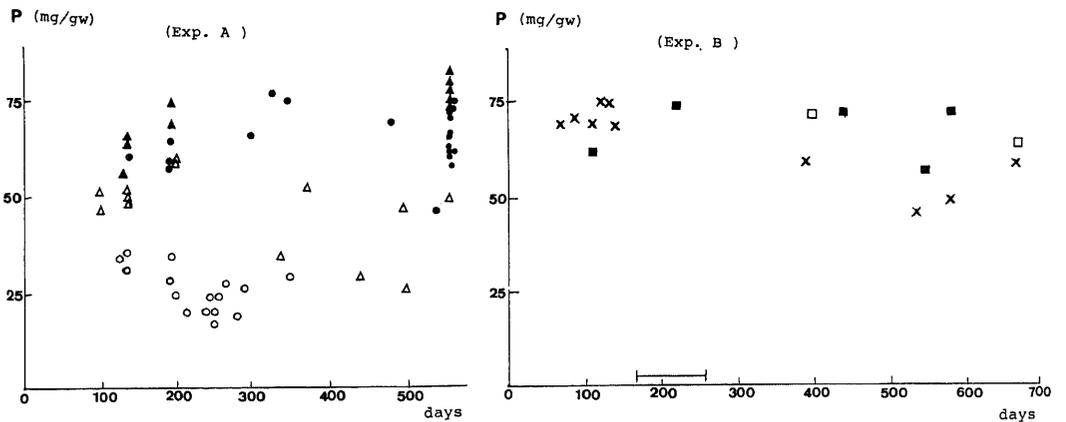


Fig. 8. Effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on the concentration of phosphorus in the femur. Symbols: refer to Fig. 3.

群で Ca, P 量と、B-2 群で Ca, P, Zn, Mg 量と各々、負の相関関係を認め、一方、Cu, Fe 量とは A-2 群で Cu 量と正の相関関係を示す他は、有意な相関関係は認められない。

Ca 量と P 量とはどの群も高い正の相関関係を示し、Ca/P 比の平均値は、A-4 群 (2.04) が他の群 (2.10~2.15) に比べ有意に低値を示し、B-2 群 (2.12) も B-1 群 (2.14) に比べ有意に低値を示した。更に Ca 量と Zn, Mg 量とは A-1 群の Mg 量を除き、正の相関関係を認めた。

考 察

本実験では、1 年半余に及ぶ Cd 投与ないし V. D 欠乏による骨の慢性影響を観察した。そのために、基本飼料は V. D 欠乏で、しかもその骨影響が発現するような Ca/P 比とし、なおかつ長期間の飼育が可能ないように調製した。

成長期の発育状況は Cd 添加群が非添加群に比べ当初より発育抑制を認め、Cd 添加・V. D 欠乏群で顕著であった。また、Cd 非添加・V. D 欠乏群も遅れて発育抑制を認めて、Cd 添加、V. D 欠乏のいずれも発育

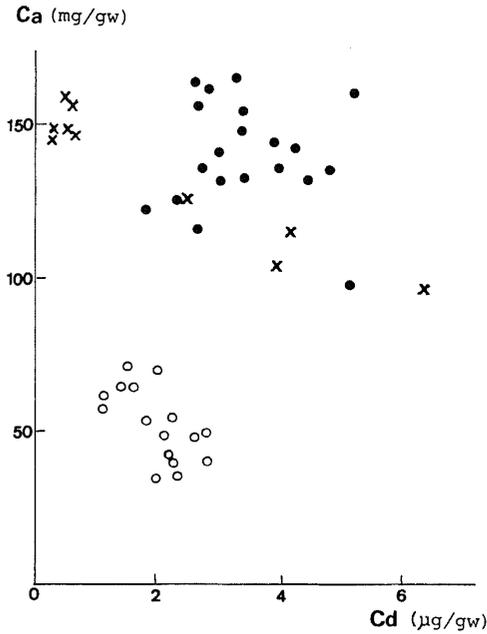


Fig. 9. Relationship between Cd and Ca concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig.2.

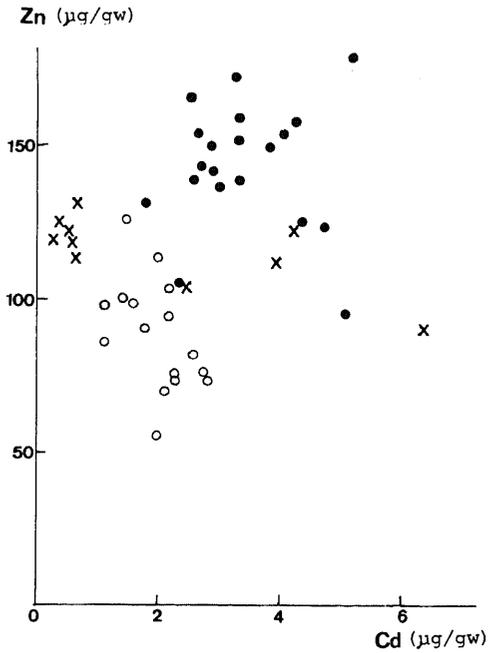


Fig.10 Relationship between Cd and Zn concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig.2.

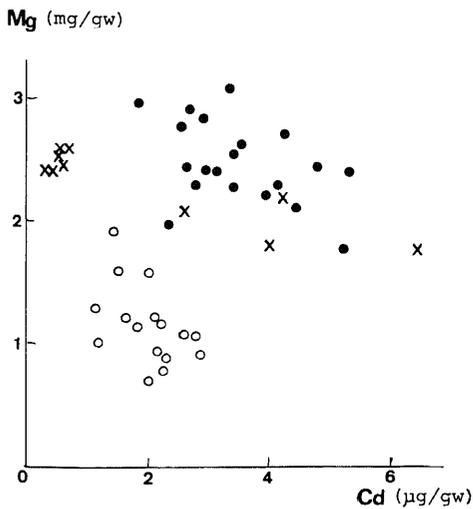


Fig. 11. Relationship between Cd and Mg concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig. 2.

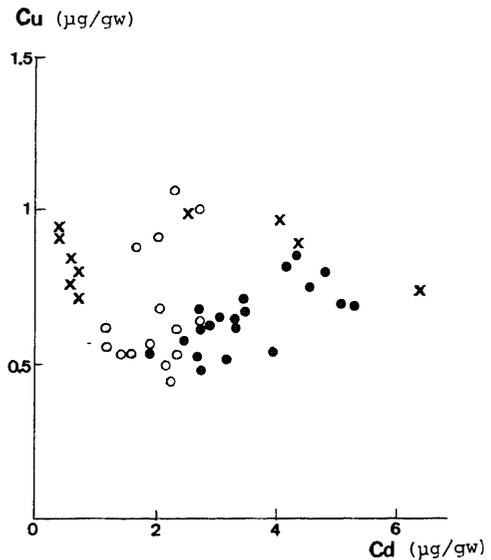


Fig.12. Relationship between Cd and Cu concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig. 2.

阻害効果を示し、能川ら⁴⁾の報告と同様の成績であった。Cd 添加による発育阻害の一因として Cd 添加に起因した食欲低下による飼料摂取量の減少が考えられるが、今回の成績では Cd 添加・V.D 欠乏群に摂取量の明らかな低下を認めたが、V.D 添加群の中で Cd 添加群は非添加群に比べ摂取量は 2% 少ないだけで、摂取

量当りの体重増加量は明らかに低値を示した。その点に関して Takashima ら⁵⁾は飼料摂取量を同一にした条件で実験を行い、Cd 添加群に体重増加が少ないことから、Cd 中毒による発育抑制効果であると報告している。

慢性 Cd 中毒による Ca 代謝異常並びに骨変化についてはすでに多くの動物実験で証明されており、その骨変化の多くは Cd 投与量に応じた骨粗鬆症様変化を示すものであるが⁶⁾⁷⁾、骨軟化症様変化を認めた報告もみられる⁸⁾⁹⁾。今回の成績では骨の Ca 濃度は、V.D 添加群の中で Cd 添加群が非添加群より低値を示すものの、約 150 mg/gw の最大量に達した後、低下する推移を示して、脱灰の進行には更に長期を要するものと思われた。一方、V.D は腸管からの Ca 吸収促進、骨からの Ca 動員作用があり、V.D 欠乏食によって一般に骨軟化症病変をきたすが、ラットは V.D 抵抗性を有し、Ca/P 比によって骨変化の発現が大きく左右されることが知られており¹⁰⁾、今回の実験では比較的低 Ca 食により飼育した。その結果、V.D 欠乏群の中で Cd 非添加群は後半期に、体重増加の止まる時期と一致して Ca 濃度の低下傾向を示し、一方、Cd 添加群は他の群が Ca 濃度の増加している早期に減少傾向を示した。Cd 投与に低 Ca や低蛋白等の低栄養条件が加わることによって、骨変化が増強されることはよく知られている^{11)~14)}。今回の実験条件では、V.D 欠乏による

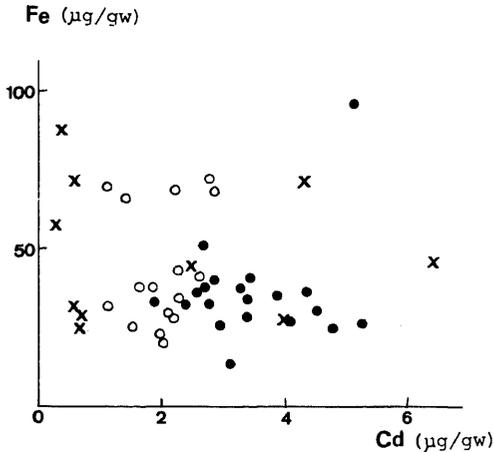


Fig. 13. Relationship between Cd and Fe concentrations in the femurs of rats in different conditions.
Symbols: refer to Fig. 2.

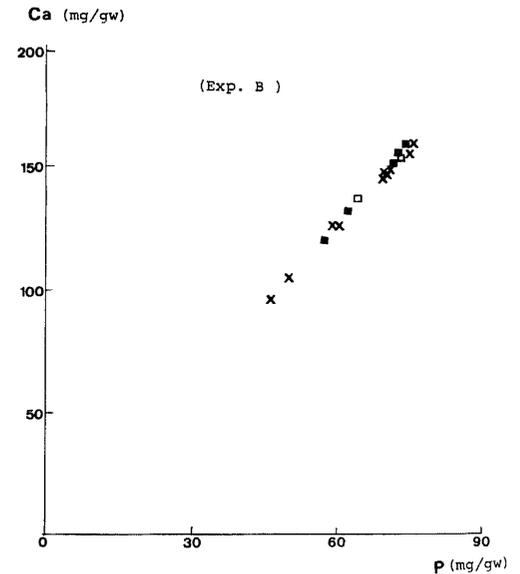
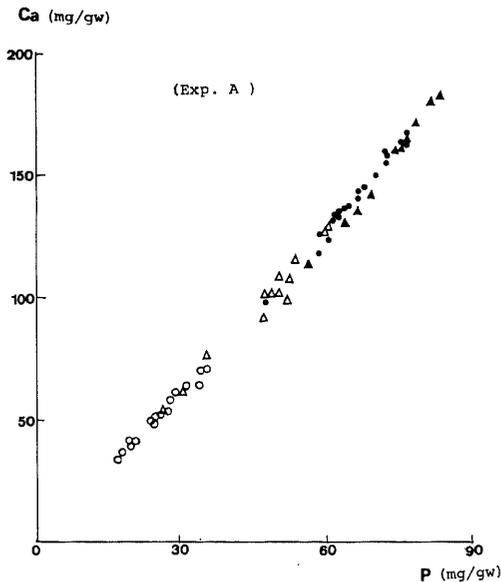


Fig. 14. Relationship between Ca and P concentrations in the femurs of rats in different conditions.
Symbols: refer to Fig. 3.

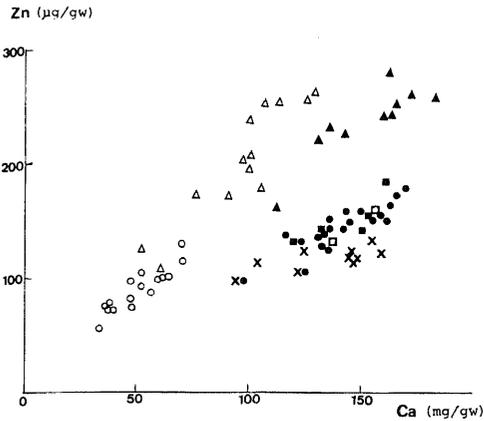


Fig. 15. Relationship between Cd and Zn concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig. 3.

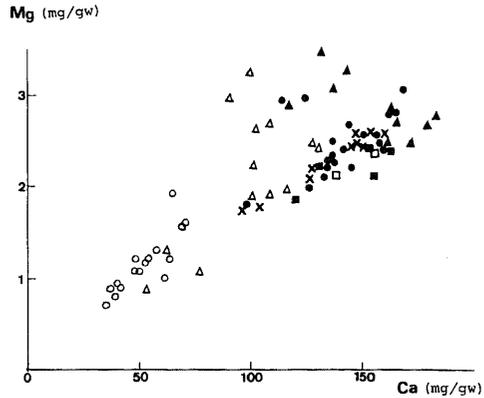


Fig. 16. Relationship between Ca and Mg concentrations in the femurs of rats in different conditions. Symbols: refer to Fig. 3.

Table 4. Correlation coefficient among elements in the femur

Group No.	Number of rats examined	Cd	Cd	Cd	Cd	Cd	Cd	Ca	Ca	Ca
		× Ca	× P	× Zn	× Mg	× Cu	× Fe	× P	× Zn	× Mg
A-1	10							1.00 ^c	0.90 ^c	-0.64 ^a
2	20	-0.10	-0.21	-0.04	-0.45 ^a	0.66 ^b	0.23	0.99 ^c	0.84 ^c	0.47 ^a
3	13							0.98 ^c	0.91 ^c	0.62 ^a
4	16	-0.60 ^a	-0.58 ^a	-0.46	-0.46	0.27	0.18	0.99 ^c	0.91 ^c	0.85 ^c
B-1	5							0.99 ^c	0.73	0.83
2	10	-0.94 ^c	-0.94 ^c	-0.71 ^a	-0.91 ^c	0.02	-0.01	0.99 ^c	0.77 ^b	0.99 ^c

a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$

影響が Cd 添加によるそれよりも骨 Ca 濃度の低下に対して強くあらわれ、両負荷によって相乗効果を示す結果であった。従って、本実験経過では Cd 投与による骨中 Ca, P 濃度の低下は軽度であったが、V. D 欠乏状態が加わることによって、その骨変化は急速に進むことが考えられる。P 濃度は Ca 濃度と対応した変化を示し、Ca/P 比の各群の平均値は、成長期ラットの中で Cd 添加・V. D 欠乏群が、成熟期ラットの中で Cd 添加群が各々有意に低値を示したものの、どの群も 2.04~2.15 の範囲の値であった。骨中の Ca と P は、ハイドロキシ・アパタイトの結晶 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を形成して存在することが知られており、これら骨変化によっても、その Ca/P 比は、それとほぼ同等の値を示したことは注目される。

体内に取り込まれた Cd の大半は肝と腎に蓄積される一方、骨は比較的低濃度蓄積を示す臓器に数えられる²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。骨の Cd 蓄積量が、投与した Cd 量に応じた増加を示す報告は数多くみられるが⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、Cd の長期投与による骨中の Cd 蓄積過程を経時的にみた報告は少ない。Bonner ら¹⁹⁾はラットを用いて 75 ppm の Cd を含む飼料を投与して 8 週後から 48 週まで観察し、大腿骨中の Cd 濃度が経時的に直線的増加を示すことを認め、吉川¹⁵⁾はマウスに 1 mg/kg の Cd を連日皮下投与して 25 週間観察し、初期には肝・腎で急速に Cd が蓄積し、飽和に達する 20~30 日頃に骨を含む小臓器に Cd が蓄積し、以後再び増加速度が緩慢となることを観察している。今回の成績では Cd 濃度は経時的に増加傾向を認めたが、個体差もまた大きいものであった。

また、V. D 添加群は非添加群に比べて骨の Cd 濃度は高値を示し、V. D の骨への Cd 蓄積効果を認めた Worker ら²⁰⁾の成績と一致する結果であった。

近年、Cd 投与により生体各臓器中に含まれる必須金属量に変動の生じることが明らかとなったが、その生体影響については、まだよく知られていない。主として Cd の主要蓄積臓器である肝と腎において、Zn 量や Cu 量の増加を認めた報告が多い^{21)~25)}。骨はミネラルの貯蔵庫でもあり、骨組織からのそれらミネラルの出納により生体の恒常性維持に重要な役割を果していることから、また、骨障害による影響も注目されるが、骨についてみた報告は少ない。今回の骨中 Zn, Mg, Cu, Fe 濃度の成績は、対照群と比べて Cd 添加群では Zn と Fe が、V. D 欠乏群では Mg が、Cd 添加・V. D 欠乏群では Zn と Mg が各々早期から明らかな低下傾向を示し、両負荷群でそれが顕著であった。しかし、Cu については群間に有意差は認められなかった。Bonner ら¹⁹⁾は前述の実験で、Cd 投与群が対照群に比べて Zn, Fe 濃度は有意に低下傾向を示し、Cu は遅れて低下して 48 週の時点では各々対照群の 63%, 51%, 76%であることを報告している。本実験では 557 日の時点の平均値でみると、Cd 添加・V. D 添加群は対照群に比べて Zn, Fe, Cu, Mg, Ca 濃度は各々、55%, 36%, 96%, 89%, 85%であり、Cu 以外は有意差を認めた。Takashima ら⁸⁾は、ラットに 19 カ月間 50 ないし 100 ppm の Cd を含む飼料を投与した群で、Zn と Fe 濃度は有意に低下を示したが、Cu, Mg 濃度は有意差を認めなかったと報告している。Itokawa ら¹³⁾、阿部ら¹²⁾は Cd 長期経口投与群で Zn と Mg 濃度の低下を、能川ら²⁶⁾は Zn と Cu 濃度の低下を、田丸¹⁷⁾は Fe 濃度の低下を、小島ら¹⁶⁾、大方²⁷⁾は Zn 濃度の低下をそれぞれ報告している。一方、V. D 欠乏群では Mg 濃度の低下傾向を認めたが、V. D が Mg の腸管吸収を高める作用を有することはよく知られている。Worker ら²⁰⁾²⁸⁾、Masuhara ら²⁹⁾は、V. D 欠乏のニワトリのヒナに V. D を投与することによって、Ca 以外に Mg, Zn, Fe, Cd 等の骨への沈着増加を認め、一方、Wasserman³⁰⁾は同様の実験で Ca, Mg の腸管吸収の増加は認めるが、Cu, Fe, Zn の有意な増加は認められなかったと報告している。ところで、Cd 投与による骨中の各ミネラルの低下をもたらす要因として、それらミネラルの腸管吸収障害や排泄増加、他臓器への蓄積、更には骨での Cd との相互作用等が考えられる。腸管吸収に際して Cd 経口投与により、Ca, Zn, Fe, Cu が主として拮抗阻害を受けることが報告されている^{31)~33)}。また、Cd 投与により、腎障害によると思われる、それらミネラルの尿中排泄増加が報告されている²³⁾。更に、

Zn, Cu が Cd 投与により肝、腎中に蓄積し、それら臓器中で Cd により誘導、合成されたメタロチオネインに結合した形で存在していることが知られているが¹⁸⁾²²⁾、骨中の Cd の大半はメタロチオネインの形をとっていない¹⁸⁾。従って、生体の負の出納や他臓器への蓄積によって骨からそれらミネラルが動員されることは十分考えられる。更には骨での Cd と、化学的に似た性質を持つ 2 価の金属との置換反応も考えられるが、それらの骨での存在様式についてはよく知られていない。そして各ミネラルによって変動の主たる機序は異なると考えられる。また、Cd 中毒による腎障害に起因した V. D の不活性化によって 2 次的 V. D 欠乏状態が加われば、その影響も受けることになる。今回の成績で、Cd 添加に V. D 欠乏の加わった群で骨中ミネラルが顕著な減少傾向を示したことは、Cd 中毒による骨変化に対して V. D 欠乏の関与の重要性を示唆したものと考えられる。更に、骨中のこれら必須金属の減少が骨障害をどのように修飾するのかは、それら金属が種々の酵素活性を担い、骨の成長に重要な役割を果していることから興味もたれる。なお、骨中 Cd 量と、V. D 添加群の Mg 量、非添加群の Ca, P 量とに負の相関関係を、また、対照群を除く各群で Ca 量と Zn, Mg 量に正の相関関係を示して、Ca, Zn, Mg 量の変動に類似性が認められた。

Cd 中毒に及ぼす年齢の影響をみた報告は少ない。一般に動物実験では未熟期ないし成長期の方が成熟期よりも Cd 中毒に対して抵抗性が認められており³⁴⁾³⁵⁾、今回の実験でも成熟期ラットの Cd 添加群に早期死亡例が多くみられた。しかし、骨変化について年齢による比較検討を行った報告は見当らない。本実験では成長期（体重 135 g）と成熟期（同 337 g）の 2 系列のラットを用い、後者の Cd 添加群には経口投与の他に、前半期に 150 μg の Cd の 14 回皮下投与を加えた。骨中の各元素濃度は成熟期ラットが成長期ラットに比べて経時的変化が小さく、Cd 添加群では Ca, P, Mg 濃度が後半期に有意に低下を示したものの、Zn, Cu, Fe 濃度の有意な変化は認められなかった。しかし、成熟期ラットの Cd 添加群では骨中 Cd 量と Ca, P, Zn, Mg 量とは負の、Ca 量と Zn, Mg 量とは正の相関関係を認め、各元素間の変動に関連性が認められた。

本研究では、ラットを用いて 1 年半を越える長期にわたり、Cd 添加飼料ないし V. D 欠乏飼料を与えて実験し、骨中の各ミネラルの変化を観察した。その結果、骨中の各ミネラルは Cd 投与、V. D 欠乏によってそれぞれ固有の変動を示し、更に両負荷により顕著な変化を示した。Cd 投与による骨変化について、御輿ら³⁶⁾は、Cd を含む飲料水を 4 週間ラットに投与した後、大腿骨

の圧縮強度を測定して、5 ppm の Cd 濃度で有意に低下し、骨の脆弱化がおこることを報告している。従来、Cd 中毒の標的臓器として腎が重視されてきたが、今回の実験結果からも、骨も Cd 中毒の重要な標的臓器の1つとして、V. D 欠乏との関係も含めて今後更に検討を要するものと考えられる。

結 論

Cd 投与と V. D 欠乏が骨中ミネラルに及ぼす影響を比較検討するために、成長期ラット (135 g) を飼料中の Cd 添加、V. D 添加の有無により 4 群に分けて最長 557 日間飼育し、期間中の各時点で死亡ないし失血死させたラットの大腿骨中の各元素量を測定した。更に、成熟期ラット (337 g) についても、Cd 添加群には経口投与の他に前半期に 150 μg の Cd の 14 回皮下投与を加えて、666 日間同様の実験を行った。

1) Cd 添加群は早期から発育抑制を示し、V. D 欠乏群も遅れて発育抑制を示した。Cd 添加・V. D 欠乏群で発育阻害が顕著であった。

2) 骨中 Cd 濃度は、Cd 添加・V. D 添加群がほぼ最大量に達した後、軽度の低下を示したのに対し、V. D 欠乏群は後半、明らかな減少を示し、Cd 添加・V. D 欠乏群は早期から著しい減少を認めた。一方、P 濃度は Cd 濃度と対応した変化を示し、Ca/P 比はほぼ一定であった。

3) 骨中の Cd 濃度は経時的に増加傾向を認めたが、個体差も大きく、更に V. D 添加群は非添加群に比べ高値を示した。

4) 骨中の Zn, Mg, Cu, Fe 濃度について、対照群と比べて Cd 添加群は Zn と Fe が、V. D 欠乏群は Mg が、Cd 添加・V. D 欠乏群は Zn と Mg の各濃度が早期から低下を示し、両負荷群で減少が著明であった。しかし Cu 濃度は群間に差は認められなかった。

5) 骨中 Cd 量と、V. D 添加群の Mg 量、非添加群の Ca, P 量とに負の相関関係を、また、Ca 量と P, Zn, Mg 量とは、対照群の Mg 量を除き、正の相関関係を認めた。

6) 成熟期ラットは成長期ラットに比べて各元素濃度の経時的変化は小さく、Cd 添加群では Ca, P, Mg 濃度は後半期に有意に低下を示したが、Zn, Cu, Fe 濃度の有意な変化は認められなかった。しかし、Cd 添加群では骨中 Cd 量と Ca, P, Zn, Mg 量の間負の相関関係を認めた。

以上の結果から、Cd 投与、V. D 欠乏によって骨中の各ミネラルは固有の変動を示し、更に、Cd 投与に V. D 欠乏が加わることによって相乗的な効果を示して、Cd 中毒による骨変化に対して V. D 欠乏の関与の重

要性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師岡田晃教授に深甚なる感謝の意を表します。また、有益なる御助言、御指導を頂きました金沢医科大学能川浩二教授に深謝致しますとともに、動物の飼育、検体の測定には小林悦子先生、本多隆文先生の御援助を頂いたことを記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) 石崎有信・福島匡昭：イタイイタイ病。日衛誌，23, 271-285 (1968)。
- 2) Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G. F. & Kjellström, T.: Cadmium in the environment, 2nd ed., CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
- 3) Allen, R. J. L.: The estimation of phosphorus. Biochem. J., 34, 858-865 (1940)。
- 4) 能川浩二・石崎有信・小林悦子：カドミウム投与ラットに及ぼすビタミン D の影響。日本公衛誌，23, 73-77 (1976)。
- 5) Takashima, M., Nishino, K. & Itokawa, Y.: Effect of cadmium administration on growth, excretion and tissue accumulation of cadmium and histological alterations in calcium sufficient and deficient rats: an equalized feeding study. Toxicol. Appl. Pharmacol., 45, 591-598 (1978)。
- 6) Yoshiki, S., Yanagisawa, T., Kimura, M., Otaki, N., Suzuki, M. & Suda, T.: Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication. Arch. Environ. Health, 30, 559-562 (1975)。
- 7) 河合清之：実験的カドミウム中毒の病理像。環境保健レポート，24, 60-62 (1973)。
- 8) Takashima, M., Moriwaki, S. & Itokawa, Y.: Osteomalacic change induced by long-term administration of cadmium to rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 54, 223-228 (1980)。
- 9) Nogawa, K., Kobayashi, E. & Konishi, F.: Comparison of bone lesions in chronic cadmium intoxication and vitamin D deficiency. Environ. Research, 24, 233-249 (1981)。
- 10) Shohl, A. T.: Rickets in rats. The low calcium-high phosphorus diets at various levels and ratios upon the production of rickets and tetany. J. Nutr., 11, 275-291 (1936)。
- 11) 武藤泰敏・四童子好広・鈴木庄亮：ラットにおける慢性カドミウム中毒の発症におよぼす低栄養条件の影響(I)。栄養と食糧，28, 1-8 (1975)。

- 12) 阿部登茂子・田中清介・糸川嘉則：実験的カドミウム中毒に関する研究(2)。低たんぱく質，カルシウム欠乏がラットのカドミウム中毒に及ぼす影響。日衛誌，**27**，308-315 (1972)。
- 13) Itokawa, Y., Abe, T. & Tanaka, S.: Bone changes in experimental chronic cadmium poisoning. Arch. Environ. Health, **26**, 241-244 (1973)。
- 14) Larsson, S. & Piscator, M.: Effect of cadmium on skeletal tissue in normal and calcium deficient rats. Israel J. Med. Sci., **7**, 495-498 (1971)。
- 15) 吉川博：カドミウム長期間投与による臓器中カドミウムの蓄積と銅・亜鉛・マンガン量の変動。産業医学，**21**，171-177 (1979)。
- 16) 小島良平・田中英子・久保田憲太郎：カドミウム連続経口投与における各臓器の感受性と臓器内重金属の分布。医学と生物学，**85**，285-290 (1972)。
- 17) 田丸忠良：実験的カドミウム中毒による貧血。臓器中鉄，カドミウム量及びV. D欠乏との関係。日衛誌，**35**，573-583 (1980)。
- 18) Kimura, M., Otaki, N., Yoshiki, S., Suzuki, M., Horiuchi, N. & Suda, T.: The isolation of metallothionein and its protective role in cadmium poisoning. Arch. Biochem. Biophys., **165**，340-348 (1974)。
- 19) Bonner, F. W., King, L. J. & Parke, D. V.: The effect of dietary cadmium on zinc, copper and iron levels in the bone of rats. Toxicology Letters, **5**，105-108 (1980)。
- 20) Worker, N. A. & Migicovsky, B. B.: Effect of vitamin D on the utilization of zinc, cadmium and mercury in the chick. J. Nutr., **75**，222-224 (1961)。
- 21) Schroeder, H. A. & Nason, A. P.: Interaction of trace metals in rat tissues. Cadmium and nickel with zinc, chromium, copper, manganese. J. Nutr., **104**，167-178 (1974)。
- 22) Stonard, M. D. & Webb, M.: Influence of dietary cadmium on the distribution of the essential metals copper, zinc and iron in tissues of the rat. Chem. - Biol. Interact., **15**，349-363 (1976)。
- 23) Bonner, F. W., King, L. J. & Parke, D. V.: The tissue disposition and urinary excretion of cadmium, zinc, copper and iron, following repeated parenteral administration of cadmium to rats. Chem. - Biol. Interact., **27**，343-351 (1979)。
- 24) Doyle, J. J. & Pfander, W. H.: Interactions of cadmium with copper, iron, zinc and manganese in ovine tissues. J. Nutr., **105**，599-606 (1975)。
- 25) 吉川博：Cd投与後の体内蓄積とそれに伴うCuとZnの変動。産業医学，**16**，488-489 (1974)。
- 26) 能川浩二・小林悦子：慢性カドミウム中毒の実験的研究。骨中Cd・Ca・Zn・Cu。日衛誌，**35**，217 (1980)。
- 27) 大方一義：低カルシウムおよびカドミウム添加が生体諸組織のカドミウム，亜鉛，銅の濃度におよぼす影響について。日大医誌，**31**，105-123 (1972)。
- 28) Worker, N. A. & Migicovsky, B. B.: Effect of vitamin D on the utilization of beryllium, magnesium, calcium, strontium and barium in the chick. J. Nutr., **74**，490-494 (1961)。
- 29) Masuhara, T. & Migicovsky, B. B.: Vitamin D and the intestinal absorption of iron and cobalt. J. Nutr., **80**，332-336 (1963)。
- 30) Wasserman, R. H.: Studies on vitamin D₃ and intestinal absorption of calcium and other ions in the rachitic chick. J. Nutr., **77**，69-80 (1962)。
- 31) Hamilton, D. L. & Valberg, L. S.: Relationship between cadmium and iron absorption. Am. J. Physiol., **227**，1031-1037 (1974)。
- 32) Starcher, B. C.: Studies on the mechanism of copper absorption in the chick. J. Nutr., **97**，321-326 (1968)。
- 33) Lease, J. G.: Effect of graded levels of cadmium on tissue uptake of ⁶⁵Zn by the chick over time. J. Nutr., **96**，294-302 (1968)。
- 34) 吉川博：カドミウム中毒に対する2, 3の問題。環境保健レポート，**36**，153-156 (1976)。
- 35) Nomiya, K., Nomiya, H. & Yotoryama, M.: Ageing, a factor aggravating chronic toxicity of cadmium. Toxicology Letters, **6**，225-230 (1980)。
- 36) 御興久美子・青木善也・車谷典男・森山忠重：微量カドミウム投与ラット骨組織の力学的強度変化。(I)圧縮強度について。日衛誌，**36**，584-595 (1981)。

An Experimental Study on Chronic Cadmium Intoxication-Changes of Mineral Concentrations in the Femurs of Rats by Cadmium Administration and Vitamin D Deficiency Kōichi Oyama, Department of Public Health (Director: Prof. A. Okada), School of Medicine, Kanazawa University Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., **92**, 377-389 (1983)

Key words: Cadmium intoxication, Vitamin D, Bone, Minerals, Age.

Abstract

The effect of cadmium administration and vitamin D deficiency on minerals in the bone was studied by using female growing Wistar rats with an average body weight of 135g. The animals were divided into 4 groups according to the combination of the presence or absence of cadmium or vitamin D₂ added to the diet (Cd, 10mg/100g of diet; vitamin D₂, 5 IU/100g of diet), and raised for 557 days at the longest. The contents of Cd, Ca, Mg, Zn, Cu and Fe in the femurs of the rats, which were killed at certain times or died during the experimental period, were examined by atomic absorption spectrophotometry; P was estimated according to the Allen's method. Furthermore, a similar study was performed by using mature rats with an average body weight of 337g; the experiment was continued for 666 days. For the mature rats that were treated by oral administration of Cd, 150μg of Cd was injected subcutaneously 14 times during the first half of the experimental period. The results were as follows. In the cadmium-treated and vitamin D-sufficient growing rats, concentrations of Zn and Fe in the femurs decreased evidently and those of Ca, P and Mg also decreased significantly against the control rats on the 557th day. On the other hand, in the vitamin D-deficient control rats, concentrations of Ca, P and Mg in the femurs decreased distinctly, but that of Zn did not show constant results. In the cadmium-treated and vitamin D-deficient rats, Ca, P, Mg and Zn in the femurs markedly decreased at an early stage of the experiment, but no significant difference of the concentration of Cu was observed among the 4 groups. The concentration of Cd in the femurs seemed to increase but considerably varied among the rats used, while the concentrations of Cd in the vitamin D-sufficient rats were higher than those in the vitamin D-deficient rats. It was disclosed that concentrations of those minerals changed less markedly in the femurs of mature rats than in those of growing rats. In the cadmium-treated and vitamin D-sufficient mature rats, however, concentrations of Ca, P and Mg in the femurs decreased significantly at the latter half of the experimental period and a negative correlation was observed between the contents of Cd and of Ca, P, Mg and Zn. Also, a positive correlation was observed between the contents of Ca and of P, Mg and Zn in the femurs of rats in all the groups, except that of Mg in the control rats. The results indicate that the change of the concentration of each mineral in the bone shows a specific change owing to cadmium administration and is accelerated by vitamin D deficiency.