

R-84-'85

# 重金属環境汚染による健康影響 評価手法の開発に関する研究

A Comprehensive Study on the Development of  
Assessment Techniques for Health Effects due to Environmental  
Heavy Metal Exposure

昭和57~59年度 特別研究総合報告

Final Report in 1982-1984

脇 阪 一 郎 編

*Edited by I. Wakisaka*

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

## 国立公害研究所研究報告 第 84 号

重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究

昭和 57～59 年度 特別研究総合報告

### R-84 正 誤 表

ページ	行	誤	正
6	番号⑤	dose	does
33	図 1 邦文説明	総タンパク排せつ量	総タンパク質排せつ量
34	図 2 邦文説明	総タンパク濃度の	総タンパク質濃度の
246	下より 8 行目	ガスクロマトグラフィ	ガスクロマトグラフィ
249	表 3 中の Sample の項	anurine	anuria
260	表 2 の中	Non	None
261	上より 12 行目	R <sub>3</sub> と略し,	R <sub>3</sub> と略記し,
262	表 3 の中	Non	None

## 序

最近の高度先端技術、すなわちハイテクノロジーの社会では、いろいろな材料が利用されるが、特に、カドミウム、水銀等、様々な重金属が用いられ、それらが廃棄物等となって環境に存在する。その上、従来からも鉱山や工場などでは重金属によって汚染された土壌が存在し、そこで収穫された作物を人間が口から摂取している。

その結果、これらの重金属は腎臓や肝臓に蓄積して、そのために人間の健康に被害が出る場合がある。

重金属の環境汚染による健康影響に関する問題は、汚染物質が微量で、かつ長期間にわたって人体が暴露されているのでいろいろ難しいことがある。一般にこのような慢性影響については、自覚症状があった段階ではすでに手遅れになることが多いので、早期にその影響を発見する必要がある。これがいわゆる早期診断である。

この研究を通じて、例えば早朝の尿中に総タンパク質が高いこと、尿中の $\alpha_1$ -ミクログロブリンが高いこと等や、また赤血球が減少して貧血を起こすことなどが分かった。ここでは動物実験も行ったが、主として疫学的な方法を用い、重金属に汚染されている地域の住民等の多大の協力によって完成したものである。この調査で地域の方々に積極的な協力をいただいたことは、その高い受診率によってもうかがうことができる。

一方では、生理・病理学的な研究から、健康被害が起こってくる原因を明らかにすることにも努力した。これは、主として研究所内で行った。そして、単なる老化の影響ではなくて、それと区別して重金属摂取の影響が発現する機作について追求した。

この他、本研究では、尿細管の損傷、甲状腺ホルモン分泌代謝異常、メタロチオネインのラジオイムノアッセイ、薬物代謝、脂質過酸化による傷害、貧血等身体異常や体液バランスの異常などについても、専門的な議論を進めることができた。

国立公害研究所では、このように環境の汚染が人間の健康にどのような影響を与えるかについて、従来から多大の関心を持っているが、人体について直接に実験を行うことは、倫理的にも許されないもので、なかなか思うように研究が進まない。しかしながら、今回、重金属の経口摂取の影響について、ある程度成果をまとめることができたので、ここに発表する次第である。この研究は、1982年から3か年計画で特別研究としてとりあげ、最近終了したものである。本報告に対してこの問題に関心を持たれる方々からのご批判を歓迎する。

1985年9月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

# 目 次

I. 研究成果の概要と意義 .....	1
協阪一郎	
II. 報 文	
1. カドミウム土壌汚染地域住民におけるカドミウムと $\beta_2$ -マイクログロブリンの 尿中排泄に関する研究 .....	13
中野篤浩・斎藤 寛・協阪一郎	
2. 人間集団の健康評価指標としての尿タンパク質濃度 .....	31
斎藤 寛・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・杉平直子 石原 裕・小林悦子	
3. 長崎県対馬のカドミウム汚染地住民における血液検査成績 .....	37
小林悦子・杉平直子・中野篤浩・遠山千春・三種裕子 斎藤 寛・協阪一郎	
4. カドミウム汚染地域住民における N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ 排泄増加の意義 .....	47
杉平直子・斎藤 寛・小林悦子・協阪一郎	
5. カドミウム暴露による腎機能障害の指標としての尿中 $\alpha_1$ -マイクログロブリン .....	61
遠山千春・小林悦子・斎藤 寛・杉平直子・中野篤浩 三種裕子・協阪一郎	
6. ICP を用いた毛髪分析法の検討と小坂町住民の毛髪試料への応用 .....	73
森田昌敏・斎藤 寛	
7. カドミウム汚染地域住民の尿浸透圧に関する研究 .....	81
中野篤浩・斎藤 寛・杉平直子・三種裕子・協阪一郎	
8. カドミウム汚染地域住民の甲状腺機能 .....	91
吉田克己・斎藤 寛・杉平直子・中野篤浩	
9. メタロチオネインの超微量定量法の開発と環境中カドミウムの健康影響 評価への応用 .....	97
遠山千春・三種裕子・斎藤 寛・杉平直子・小林悦子 中野篤浩・協阪一郎	

10.	ゲルクロマトグラフィーによるカドミウム汚染地域住民の尿の分析 .....	111
	三種裕子・遠山千春・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛・脇阪一郎	
11.	酸化及び金属置換反応における2種類のイソメタロチオネインの性質の 比較 .....	121
	鈴木和夫・米谷民雄・久保田憲太郎	
12.	<sup>1</sup> H-NMRによるCd <sup>2+</sup> 及び(Cd,Zn)-メタロチオネインの高次構造の 研究 .....	131
	三森文行・遠山千春	
13.	カドミウム汚染地域住民の呼気中炭化水素分析による過酸化脂質の測定 .....	151
	嵯峨井勝・市瀬孝道・杉平直子・鈴木和夫・斎藤 寛	
14.	カドミウムのステロイド代謝に及ぼす影響 .....	161
	安藤 満・安藤哲夫・高橋 弘・高橋慎司・清水 明 山元昭二・伊藤勇三	
15.	カドミウムによるラット赤血球の比重増加と生存期間の短縮 .....	167
	三浦 卓・国本 学・久保田憲太郎	
16.	カドミウムによるラット赤血球の老化に伴う変化の促進 .....	175
	国本 学・三浦 卓・久保田憲太郎	
17.	カドミウムの蓄積限界と必須金属濃度への影響 .....	185
	鈴木和夫・西川雅高・山田靖子・村上正孝・久保田憲太郎	
18.	腎臓におけるカドミウムの取り込みに対するL-システインの効果 .....	203
	村上正孝	
19.	カドミウム/システイン又はメタロチオネインの前投与が両錯体の 攻撃投与によるカドミウム腎毒性に与える影響 .....	215
	村上正孝・鈴木和夫・久保田憲太郎	
20.	重水による水代謝異常検査手法の検討——カドミウム暴露動物による実験—— .....	229
	松本 理・太田庸起子	
21.	重水を用いた病態時の水分代謝に関する研究 .....	243
	平野修助・太田庸起子	
22.	重金属吸入摂取に対する影響評価のための一知見——6価クロム暴露の 剖検例に関して—— .....	253
	太田庸起子・乾 道夫	

## CONTENTS

### Abstract

- I. Outline and Significance of the Studies Compiled in this Volume ..... 1
- I. WAKISAKA
- II. Research Reports
1. Studies on Urinary Cadmium and  $\beta_2$ -Microglobulin  
of Residents in Cadmium-Polluted Areas ..... 13
- A. NAKANO, H. SAITO and I. WAKISAKA
2. Urinary Protein Concentration as an Index to Evaluate Human  
Health on a Group Basis ..... 31
- H. SAITO, A. NAKANO, C. TOHYAMA, Y. MITANE, N. SUGIHIRA,  
H. ISHIHARA and E. KOBAYASHI
3. Results of Blood Examinations of the Inhabitants in a Cadmium-Polluted  
Area in Nagasaki Prefecture ..... 37
- E. KOBAYASHI, N. SUGIHIRA, A. NAKANO, C. TOHYAMA,  
Y. MITANE, H. SAITO and I. WAKISAKA
4. Significance of Increased Urinary Excretion of N-Acetyl- $\beta$ -D-  
Glucosaminidase in People Living in a Cadmium-Polluted Area ..... 47
- N. SUGIHIRA, H. SAITO, E. KOBAYASHI and I. WAKISAKA
5. Urinary  $\alpha_1$ -Microglobulin as an Indicator of Renal Dysfunction  
Caused by Cadmium Exposure ..... 61
- C. TOHYAMA, E. KOBAYASHI, H. SAITO, N. SUGIHIRA,  
A. NAKANO, Y. MITANE and I. WAKISAKA
6. Hair Analysis by ICP-AES and its Application to the Population at  
Kosaka, Akita ..... 73
- M. MORITA and H. SAITO
7. Studies on Urinary Osmolality of Residents in Cadmium-Polluted Areas ..... 81
- A. NAKANO, H. SAITO, N. SUGIHIRA, Y. MITANE and I. WAKISAKA
8. Thyroid Gland Function of People in a Cadmium-Polluted Area ..... 91
- K. YOSHIDA, H. SAITO, N. SUGIHIRA and A. NAKANO

9.	Development of an Ultramicro-determination of Metallothionein and its Application to the Assessment of Health Effects due to Environmental Cadmium Exposure .....	97
	C. TOHYAMA, Y. MITANE, H. SAITO, N. SUGIHIRA, E. KOBAYASHI and I. WAKISAKA	
10.	Gel Chromatographic Analysis of Urine from People Living in a Cadmium-Polluted Area .....	111
	Y. MITANE, C. TOHYAMA, A. NAKANO, E. KOBAYASHI, H. SAITO and I. WAKISAKA	
11.	Comparison of Properties of Two Isometallothioneins in Oxidation and Metal Substitution Reactions .....	121
	K. T. SUZUKI, T. MAITANI and K. KUBOTA	
12.	Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Tertiary Structure of Cd- and (Cd, Zn)-Metallothioneins .....	131
	F. MITSUMORI and C. TOHYAMA	
13.	Measurements of Lipid Peroxides of Habitants in an Area Polluted by Cadmium .....	151
	M. SAGAI, T. ICHINOSE, N. SUGIHIRA, K. T. SUZUKI and H. SAITO	
14.	Effects of Cadmium on Steroid Metabolism in Rat .....	161
	M. ANDO, T. ANDO, H. TAKAHASHI, S. TAKAHASHI, A. SHIMIZU, S. YAMAMOTO and Y. ITO	
15.	Density Increment and Decreased Survival of Rat Red Blood Cells Induced by Cadmium .....	167
	T. MIURA, M. KUNIMOTO and K. KUBOTA	
16.	An Apparent Acceleration of Age-Related Changes of Rat Red Blood Cells by Cadmium .....	175
	M. KUNIMOTO, T. MIURA and K. KUBOTA	
17.	Extent of Cadmium Accumulation and its Effect on Essential Metals .....	185
	K. T. SUZUKI, M. NISHIKAWA, Y. K. YAMADA, M. MURAKAMI and K. KUBOTA	
18.	The Effect of L-Cysteine on the Renal Uptake of Cadmium .....	203
	M. MURAKAMI	

19.	Effects of Pretreatment either with Cd/Cysteine or Metallothionein on Renal Toxicity of Cadmium Challenged with both Complexes .....	215
	M. MURAKAMI, K. T. SUZUKI and K. KUBOTA	
20.	A Study on Body Water Balance of Rats Exposed to Cadmium Using Heavy Water .....	229
	M. MATSUMOTO and Y. OHTA	
21.	A Study on Water Metabolism under Pathologic Condition Using Heavy Water .....	243
	S. HIRANO and Y. OHTA	
22.	Determination of Accumulated Heavy Metals and Other Substances in Lungs of an Autopsied Chromium Factory Worker, Evaluated to Unfavourable Effects of Hexavalent Chromium .....	253
	Y. OHTA and M. INUI	



## Abstract

In the contemporary society demand for heavy metals, their production and consumption have been considerably increased in a daily life. As a result, release of the metals to our environment not only gives a *continuous impact* but also raises serious or probable problems on human health.

The present research project entitled "A Comprehensive Study on the Development of Assessment Techniques for Health Effects due to Environmental Heavy Metal Exposure" was thus designed and carried out by researchers belonging to Divisions of Environmental Health Sciences and Basic Medical Sciences with collaboration of those in Divisions of Chemistry and Physics, Engineering, and Environmental Information during a fiscal period of 1982 to 1984.

The principal aims of the project were two fold : ( 1 ) to obtain a whole spectrum of health effects of heavy metals, particularly cadmium, in terms of a low level exposure for a *life span*. ( 2 ) to *find and develop new sensitive indicators* useful in evaluating health effects of heavy metals. The research project consists of eight independent, but partly inter-related research plans as described below. In the plans, experimental studies using laboratory animals and epidemiologic field survey on human population at risk were carried out.

The eight research plans are : ( 1 ) assessment of health effects in people living in heavy-metal-polluted areas, ( 2 ) effects of heavy metal exposure on the metabolism of essential elements, ( 3 ) effects of heavy metal exposure on homeostasis, particularly of endocrine system, ( 4 ) development of a metallothionein radioimmunoassay and its application to an epidemiologic study, ( 5 ) effects of heavy metal exposure on drug metabolizing enzyme system and on lipid peroxidation, ( 6 ) studies of heavy metal exposure on the onset of *anaemia*, ( 7 ) studies on modification factors of heavy-metal toxicity and ( 8 ) effects of heavy metal exposure on the regulation of body fluid and its constituents. Scientific achievements on these plans are described in 22 articles which are included in this report.

**Key words** : cadmium,  $\alpha_1$ -microglobulin,  $\beta_2$ -microglobulin, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, urinary total protein, metallothionein, lipid peroxide, red blood cell, pretreatment effect, renal tubular dysfunction, urinary osmolality, thyroid gland function, radioimmunoassay, environmental cadmium exposure, isometallothionein, cysteine, body water balance, chromium, copper, zinc.

## I 研究成果の概要と意義

### Outline and Significance of the Studies Compiled in this Volume

脇阪一郎<sup>1</sup>

Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

昭和57年から3か年計画で着手した「重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究」は、環境保健部、環境生理部を中心とし、これに計測技術部、技術部及び環境情報部から一部参加を得て実施されたものである。研究担当者の所属と氏名並びに客員研究員の氏名は、下記のごとくである。

#### A. 研究組織

##### 研究担当者<sup>1)</sup>

環境保健部長	脇阪 一郎 <sup>2)</sup>
環境保健部 人間生態研究室	斎藤 寛 <sup>3)</sup> , 遠山 千春
〃 環境保健研究室	三種 裕子, 杉平 直子, 石原 裕 <sup>4)</sup>
〃 環境疫学研究室	太田庸起子, 安藤 満
〃 環境疫学研究室	中野 篤浩, 三森 文行, 松本 理
〃 環境疫学研究室	小野 雅司
環境生理部長	久保田憲太郎
環境生理部 環境生理研究室	嵯峨井 勝 <sup>5)</sup> , 市瀬 孝道 <sup>6)</sup>
〃 環境病理研究室	村上 正孝, 米元 純三 <sup>7)</sup>
〃 急性影響研究室	三浦 卓 <sup>8)</sup> , 彼谷 邦光 <sup>9)</sup>
〃 慢性影響研究室	持立 克身, 国本 学
〃 慢性影響研究室	鈴木 和夫 <sup>10)</sup> , 米谷 民雄 <sup>11)</sup>
〃 慢性影響研究室	山村 充 <sup>12)</sup> , 青木 康展 <sup>13)</sup>
計測技術部生体化学計測研究室	森田 昌敏
技術部動物施設管理室	高橋 弘, 高橋 慎司
環境情報部長	廣崎 昭太

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

- 1) 58年度末における所属と氏名
- 2) プロジェクトリーダー
- 3) 57~58年度幹事, 現在 長崎大学医学部
- 4) 現在 静岡済生会病院
- 5) 現在 環境生理部慢性影響研究室
- 6) 同上
- 7) 59年度より参加
- 8) 57~59年度幹事
- 9) 現在 環境生理部環境生理研究室
- 10) 59年度幹事, 現在 環境保健部人間生態研究室
- 11) 現在 国立衛生試験所食品部
- 12) 現在 環境庁環境保健部保健調査室
- 13) 現在 環境保健部環境疫学研究室

## B. 客員研究員

本特別研究を遂行するにあたり, 以下の諸先生方に客員研究員として御協力いただいたことに謝意を表します。

荒記 俊一 (大分医科大学)	安藤 哲夫 (鹿児島大学医学部)
池田 正之 (東北大学医学部)	乾 道夫 (東京都監察医務院)
大井 玄 (帝京大学医学部)	大熊 勝治 (帝京大学薬学部)
大沢 基保 (帝京大学薬学部)	加須屋 実 (富山医科薬科大学)
児島 三郎 (秋田県衛生科学研究所)	児玉 泰 (産業医科大学)
河野 俊一 (金沢医科大学)	小林 悦子
小町 喜男 (筑波大学医学専門学群)	斎藤 和雄 (北海道大学医学部)
桜井 治彦 (慶応義塾大学医学部)	佐藤 洋 (北海道大学医学部)
佐藤 良博 (共立薬科大学)	清水不二雄 (新潟大学医学部)
清水 真 (杏林大学保健学部)	嶋本 喬 (筑波大学医学専門学群)
白石 浩二 (東京大学工学部)	鷺見 和 (聖マリアンナ医科大学)
鈴木 継美 (東京大学医学部)	角田 文男 (岩手医科大学医学部)
住野 公昭 (神戸大学医学部)	関野 宏 (医療法人宏人会)
滝 幸 (北里大学衛生学部)	竹林 茂夫 (福岡大学医学部)
竹本泰一郎 (長崎大学医学部)	田口 喜雄 (東北大学医学部)
田畑 米穂 (東京大学工学部)	田村 憲治 (土浦協同病院)
能川 浩二 (金沢医科大学)	萩野 昇 (萩野病院)
久道 茂 (東北大学医学部)	平野 修助 (東邦大学医学部)
藤田 敏郎 (筑波大学医学専門学群)	町田 和彦 (大分医科大学)

松田 晴夫 (石川県衛生公害研究所)	三浦 亮 (秋田大学医学部)
矢島 毅彦 (東邦大学薬学部)	芳野 充男 (東京大学農学部)
山口 誠哉 (筑波大学医学専門学群)	山村 行夫 (聖マリアン医科大学)
吉永 馨 (東北大学医学部)	吉田 克己 (東北大学医学部)

本研究は、文明生活に欠かせない重金属の需要利用の増大に伴い、その環境サイクルの中での人間の健康とのかかわりについて、長期間の微量暴露の影響の全ぼうを明らかにするとともに、人体に対する影響評価のために新しい鋭敏な指標の開発を目的としたものであり、八つの研究課題について、基礎的な動物実験から、人間集団を対象とした野外調査に至る様々の研究が行われた。各研究課題でとりあげた内容は、22編の報文としてまとめられ、ここに一冊の報告書として刊行されることになったものであり、その概要を以下に説明する。

#### (1) 重金属汚染地域住民の健康評価に関する研究 (報文番号 1~5)

重金属汚染が人の健康に及ぼす影響について、重金属汚染地域住民を対象とした悉皆調査を行い、重金属汚染の影響を疫学的見地から検討したものである。カドミウム汚染の指標として、尿中 $\alpha_1$ -マイクログロブリンも、 $\beta_2$ -マイクログロブリンと並んでよい指標であることが判明した。また、尿中の総タンパク質濃度の微量測定法を改良応用することによって、汚染地域住民の早朝尿に对照群よりも総タンパク質が多く排せつされていることを確認した。

カドミウム非汚染地域住民について尿中N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ活性を測定してその正常上限値を求めた。カドミウム汚染地域住民では尿中N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ活性値が、カドミウム暴露の程度を反映して、年齢に伴って増加していることから、N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼがカドミウム暴露による尿細管損傷を反映する鋭敏な指標であることを明らかにした。更に、カドミウム汚染地域在住の50歳以上の住民から採取した尿及び血清で、 $\alpha_1$ -マイクログロブリンの動向を疫学的に検討し、本指標が加齢によって上昇するものではなく、カドミウム暴露による近位尿細管機能低下を反映する鋭敏な指標であることを示した。カドミウム汚染地域住民のなかには尿細管障害に加え糸球体障害の傾向が見られる者がいることも示唆された。

#### (2) 重金属暴露が必須元素代謝に及ぼす影響の研究 (報文番号 6)

重金属の長期微量暴露下で生体内に蓄積した重金属が生体必須微量元素代謝に及ぼす影響を明らかにする目的で、頭髮の多元素分析を行った。重金属汚染地域住民について18元素の分析を行った結果、カドミウムと鉛の濃度が正常値より高いことが認められた。しかし、生体必須元素に関しては正常値との間に差は認められなかった。

(3) 重金属暴露がホメオスターシスに及ぼす影響の研究 (報文番号 7, 8)

カドミウム汚染地域住民の尿の浸透圧を測定し、尿中の $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度との関連性を調べた結果、両者の間に有意な逆相関関係があることを認めた。このことから、カドミウムによる腎尿細管障害が尿浸透圧の低下に関係していることが示唆された。また、甲状腺機能に与える影響を調べた結果からは、カドミウム汚染地域住民に、甲状腺ホルモンの分泌及び代謝の異常がひき起こされている可能性が示唆された。

(4) メタロチオネインのラジオイムノアッセイの開発と疫学的応用に関する研究 (報文番号 9~12)

カドミウム汚染による人への影響を知る指標の一つとして尿中のメタロチオネインの測定法を確立し、その意義を明らかにして疫学的研究への応用をはかるのが目的である。ラットのメタロチオネインを抗原としてウサギを免疫し、力価の高い抗血清を得て、これを用いたラジオイムノアッセイでngレベルでメタロチオネインを定量することを可能にした。また、カドミウム暴露との関係をラットで調べ、尿中へのメタロチオネインの排せつはカドミウム排せつに先立って上昇すること、人を対象とした調査でも尿中メタロチオネインレベルは尿中カドミウム及び銅レベルと高い相関を有することを見いだした。さらに、カドミウム汚染地域に在住し、それによる障害を持つ女性の尿をゲルクロマトグラフィーによって分析し、尿へのカドミウム、銅及び亜鉛の排せつにメタロチオネインが寄与していることを明らかにした。これらのことから、尿中のメタロチオネインがカドミウム暴露による尿細管障害のよい指標となることが示唆された。尿中のメタロチオネインのラジオイムノアッセイを行う上で、メタロチオネインの化学的安定性を知る必要があるため、ラットのメタロチオネインを用いて空気中の酸素の影響などを検討した。その結果、メタロチオネインI型がII型よりもすべての反応において反応性に富むことを見いだした。また、<sup>1</sup>H-NMRを用いて哺乳動物から得た5種類のメタロチオネインの高次構造に関する研究も行った。

(5) 重金属暴露による薬物代謝への影響と脂質過酸化の障害に関する研究 (報文番号 13, 14)

カドミウム投与による脂質過酸化は、雄ラットの方が雌ラットに比べ著しく促進されることから、カドミウムの毒性発現の雌雄差を解明するために、カドミウムのステロイド合成系、分解系に關与する薬物代謝系酵素への阻害作用を検討した。カドミウム投与による生体影響の一つとして、ステロイド代謝が阻害され、血漿中テストステロン濃度の低下を引き起こし、肝臓薬物代謝系酵素活性の低下をもたらすことをラットで確かめた。

カドミウム汚染地域において、60歳以上の住民の呼気中炭化水素と血清過酸化脂質濃度を測定したところ、カドミウムによる腎障害者においては、正常者に比して両者とも有意に低値を示した。また、実験的にカドミウム-メタロチオネインをラットに投与すると、呼気中プロパン濃度は

一過性に上昇するが数日後には初期レベルの半分以下に低下し、カドミウムによる腎障害と過酸化脂質生成との関連性が示唆された。

#### (6) 重金属暴露の貧血に及ぼす影響に関する研究 (報文番号 15, 16)

重金属汚染地域住民の間に貧血症が見いだされていることから、カドミウム暴露による貧血の発現機構を動物実験で検討した。

ラットにカドミウムを投与して、ヘマトクリット値の低下が起きる以前に赤血球比重の増加が進行していることを見いだした。また、赤血球を<sup>3</sup>Hでラベルしてカドミウム投与による消長を調べたところ、ラベルした赤血球が減少していることを見出した。さらに、溶血を起こさないカドミウム濃度でラット赤血球への影響を *in vitro* で検討し、比重増加、形態変化、変形能の低下等の赤血球の老化に伴う変化が、カドミウム濃度依存的に生じていることを見いだした。これらの変化は、赤血球膜のチオール基とカドミウムの相互作用によって引き起こされている可能性が示唆された。

#### (7) 重金属の毒性を修飾する因子に関する研究 (報文番号 17~19)

蓄積性汚染重金属であるカドミウムの代謝や毒性が、生理的条件下でどのような影響を受けるか、また、投与経路や化学形態が毒性にどのようなかわりがあるかを明らかにするのが目的である。

肝臓に対するカドミウムの蓄積限界と、それに伴う必須金属濃度への影響を明らかにするため、ラットを用いて投与実験を行い、カドミウムの体内における移動を示す模式図を提案した。

腎臓へのカドミウム取り込みに対する L-システインの影響を検討し、カドミウムと L-システインの同時投与によって、カドミウムの腎への移行が促進されることを見いだした。さらに、ラベルしたシステインが腎臓の組織中でどのような分布をとるかオートラジオグラフィで検討し、投与されたカドミウムが L-システインと錯体を生成して生体内を移動する可能性を示した。また、少量の異なる錯体を投与して腎臓にメタロチオネインを誘導した後、腎病変を起こさせる量のカドミウム錯体を投与することによっても、カドミウムの腎毒性発現機構を検討した。

#### (8) 環境中重金属の暴露による身体変調と体液バランスに関する基礎的研究 (報文番号 20~22)

有害物質が体内に摂取されたときの影響を全身症状として把握するため、水、電解質バランスをとりあげ、測定法として重水を指標とする技法を開発した。この方法を用いて、人に対する重水経口投与及びその尿中排泄量の測定を試み、腎不全患者の細胞内水分量を算出した。また、カドミウムを投与したラットを用いて、水代謝異常を調べ、カドミウム投与群の全体水分量が増加することを見いだした。

上記の8テーマに加えて、6価クロム取扱い作業者の剖検例についても報告した。  
本特別研究の成果として発表された論文等を以下に示す。

研究成果一覧  
〔印刷発表〕

番号	発表者	題 目	掲 載 誌	巻	ページ	刊 年
①	M.Ando	Cadmium effect on microsomal drug-metabolizing enzyme activity in rat livers with respect to differences in age and sex	Environ. Res.	27	446-456	1982
②	M.Kunimoto, T.Miura, K.Kubota	An apparent acceleration of age-related changes of rat red blood cells by cadmium	Toxicol. Appl. Pharmacol.	77	451-457	1985
③	M.Kunimoto, T.Miura	Density increment and decreased survival of rat red blood cells induced by cadmium	Environ. Res.			1986
④	斎藤 寛	血液蛋白総論, 尿蛋白	臨床検査 MOOK 12, 血漿蛋白 (高月清編, 金原出版, 221 p.)		36-42	1982
⑤	G.Ohi, S.Yamamoto, T.Fujino, Y.Itai, K.Ueno, H.Saito, Y.Inabe, K.Nakajima, K.Shiroshi	Urinary beta-2-microglobulin dose not serve as diagnostic tool for Minamata disease	Arch. Environ. Health	37	366-341	1982
⑥	斎藤 寛・中野篤浩・ 遠山千春・小野雅司・ 三種裕子・杉平直子・ 脇阪一郎	カドミウム土壌汚染地域住民健康調査報告 (1981年度)	環境保健レポート (イタイイタイ病およびカドミウム中毒, 日本公衆衛生協会, 222 p.)	48	105-111	1982
⑦	斎藤 寛	人間と重金属 (上) カドミウムからみた人間の健康	再生と利用 (下水汚泥資源利用協議会誌)	6	87-92	1983
⑧	斎藤 寛	人間と重金属 (下) カドミウムからみた人間の健康	再生と利用 (下水汚泥資源利用協議会誌)	6	99-104	1983
⑨	斎藤 寛	過剰の重金属に対する人間生態系の応答	文部省「環境科学」研究報告集 B199-R12-6		69-80	1983
⑩	斎藤 寛・中野篤浩	カドミウム環境汚染と人間の健康 - 生態中毒学的アプローチ	エコトキシコロジー (大井玄・鈴木継美・井村伸正編, 徳原出版, 204 p.)		119-130	1983
⑪	斎藤 寛	地域検診による重金属汚染の分析とその指標	衛生化学	30	9-13	1984
⑫	斎藤 寛	重金属と生活環境	薬局	35	1147-1152	1984

番号	発表者	題目	掲載誌	巻	ページ	刊年
⑬	斎藤 寛・中野篤浩・ 遠山千春・三種裕子・ 杉平直子・石原 裕・ 小林悦子・吉田克己・ 鈴木道子・桜井俊郎	カドミウム土壌汚染地域住民の尿 細管機能及び甲状腺機能(1983 年度研究報告)	環境保健レポート	50	134-136	1984
⑭	斎藤 寛	腎機能検査	臨床検査(医学書院)	28	1479-1487	1984
⑮	鈴木和夫	メタロチオネインの分析法の開発 とその応用	薬学雑誌	102	801-815	1982
⑯	鈴木和夫	メタロチオネインの構造的特徴と 生化学	化学増刊(金属イオンの 生物活性-生物無機 化学の新しい流れ-)	95	91-108	1982
⑰	K.T.Suzuki	Induction and degradation of metallothionein and their relation to the toxicity of cadmium	Biological roles of metallothionein (Foulkes, ed., Elsevier, 327p.)		215-235	1982
⑱	K.T.Suzuki, R.Ohnuki, K.Yaguchi, Y.K.Yamada	Accumulation and effects of Cd in rat spleen and pancreas after repeated injections	Eisei Kagaku	28	s-56	1982
⑲	K.T.Suzuki, K.Yaguchi, R.Ohnuki, M.Nishikawa, Y.K.Yamada	Extent of cadmium accumulation and its effect on essential metals in liver, kidney, and body fluids	J. Toxicol. Environ. Health	11	713-726	1983
㉑	K.T.Suzuki, R.Ohnuki, K.Yaguchi	Post-mortem and <i>in vitro</i> dimerization of metallothionein in cadmium- accumulated rat liver and kidney	Toxicol. Lett.	16	77-84	1983
㉒	K.T.Suzuki, R.Ohnuki, K.Yaguchi, Y.K.Yamada	Accumulation and chemical forms of cadmium and its effect on essential metals in rat spleen and pancreas	J. Toxicol. Environ. Health	11	727-737	1983
㉓	K.T.Suzuki, T.Maitani	Comparison of chemical proper- ties of metallothionein-I and -II	J. Pharm. Dyn.	6	s-20	1983
㉔	K.T.Suzuki, T.Maitani	Comparison of properties of the two isometallothioneins in oxidation and metal substitution reactions	Chem. Pharm. Bull.	31	4469-4475	1983
㉕	鈴木和夫	重金属の生体内動態とメタロチオ ネイン	保健の科学	25	767-770	1983
㉖	K.T.Suzuki	Studies of cadmium uptake and metabolism by the kidney	Environ. Health Perspect.	54	21-30	1984



番号	発表者	題目	掲載誌	巻	ページ	刊年
②⑤	K.T.Suzuki, Y.Tanaka, E.Miyamoto, R.Kawamura, M.Nishikawa, Y.K.Yamada, M.Yamamura	Effect of diet on tissue retention of cadmium heavily preaccumulated in rats	Arch. Environ. Contam. Toxicol.	13	609-619	1984
②⑦	K.T.Suzuki, E.Miyamoto, Y.Tanaka, R.Kawamura, M.Yamamura	Effect of diet on urinary and fecal excretion of cadmium, zinc and copper from the rats preaccumulated heavily with cadmium	Arch. Environ. Contam. Toxicol.	13	621-625	1984
②⑧	遠山千春	メタロチオネインのラジオイムノアッセイの確立とカドミウム毒性学への応用	変異原と毒性	5	94-106	1982
②⑨	遠山千春・斎藤 寛	カドミウムによる腎障害の新しい指標としての尿中メタロチオネイン	文部省「環境科学」研究報告集 B 199-R 12-6		81-88	1983
③⑩	Z.A.Shaikh, C.Tohyama	Urinary metallothionein as an indicator of cadmium body burden and of cadmium-induced nephrotoxicity.	Environ. Health Perspect.	54	171-174	1984
③⑪	三種裕子・遠山千春・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛	カドミウム汚染地域住民における尿中カドミウム、銅排泄とメタロチオネイン排泄との関連	医学のあゆみ	172	97-99	1983
③⑫	F.Mitsumori, C.Tohyama	Proton nuclear magnetic resonance studies of mammalian metallothioneins	J. Biochem.	96	533-543	1984
③⑬	村上正孝	人体に蓄積するカドミウムの加令による変動	医学のあゆみ	116	621-622	1981
③⑭	M.Murakami, C.Tohyama, K.Sano, R.Kawamura, K.Kubota	Autoradiographical studies on the localization of metallothionein in proximal tubular cells of the rat kidney	Arch. Toxicol.	53	185-192	1983
③⑮	村上正孝	カドミウムの毒性と生物学的暴露指標	学校保健研究	25	461-464	1983

[口頭発表]

番号	発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
①	安藤 満・安藤哲夫・脇阪一郎	カドミウムのステロイド代謝に及ぼす影響	第42回日本公衆衛生学会	横浜	58.11
②	石原 裕・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛・遠山千春・三種裕子・杉平直子・脇阪一郎	尿中諸成分のクレアチニン補正に関する検討	第54回日本衛生学会総会	米子	59.4
③	国本 学・三浦 卓	重金属イオンのラット赤血球の老化 (in vitro) に及ぼす影響	第56回日本生化学会大会	福岡	58.10

番号	発表者	題 目	学 会 等 名 称	開催都市名	年 月
④	国本 学・三浦 貞	カドミウムの赤血球膜構成成分の相互作用に及ぼす影響	第57回日本生化学会大会	東 京	59.10
⑤	斎藤 寛・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・杉平直子・脇阪一郎	カドミウム暴露と尿 $\beta_2$ -マイクログロブリン	第52回日本衛生学会総会	東 京	57. 3
⑥	斎藤 寛・中野篤浩・遠山千春・杉平直子・三種裕子・脇阪一郎	尿を用いての人間集団の健康評価	第31回東北公衆衛生学会	仙 台	57. 7
⑦	斎藤 寛・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・杉平直子・脇阪一郎	カドミウム土壌汚染地域住民健康調査報告(1982年度)	イタイイタイ病及び慢性カドミウム中毒に係る総合会議	東 京	58. 3
⑧	斎藤 寛・杉平直子・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・脇阪一郎	カドミウム暴露と尿 $\beta_2$ -マイクログロブリン(第2報)	第53回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
⑨	荒記俊一・横山和仁・村田勝敏・青野裕士・柳原 進・新沼幸子・牛尾耕一・石原信夫・山本玲子・斎藤 寛	ヒトにおける金属および有機物の腎排出機序の解析—血漿中濃度(糸球体濾過型)、濾過量、尿細管収支量の推定—	第56回日本産業衛生学会	大 阪	58. 4
⑩	小林悦子・斎藤 寛・中野篤浩・杉平直子・新田裕史・遠山千春・三種裕子・石原 裕・脇阪一郎	カドミウム土壌汚染地域住民における血清生化学検査成績	第42回日本公衆衛生学会	横 浜	58.11
⑪	斎藤 寛・杉平直子・遠山千春・小林悦子・三種裕子・中野篤浩・石原 裕・脇阪一郎	尿蛋白の研究—健康者の尿蛋白濃度の検討ならびに尿蛋白濃度による人間集団の健康評価	第26回日本腎臓学会	京 都	58.10
⑫	斎藤 寛	地域検診による重金属汚染の分析とその指標	日本薬学会第10回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム	東 京	58.10
⑬	斎藤 寛・杉平直子・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・石原 裕・小林悦子・脇阪一郎	カドミウム暴露と尿 $\beta_2$ -マイクログロブリン(第3報)	第54回日本衛生学会総会	米 子	59. 4
⑭	斎藤 寛・遠山千春・小林悦子・中野篤浩・三種裕子・杉平直子・石原 裕・脇阪一郎	Cd 土壌汚染地域住民における血清および尿 $\alpha_1$ -microglobulin (第2報) 尿中排泄機序	第54回日本衛生学会総会	米 子	59. 4
⑮	吉田克己・鈴木道子・桜田俊郎・中野篤浩・杉平直子・斎藤 寛	カドミウム土壌汚染地域住民の甲状腺機能	第54回日本衛生学会総会	米 子	59. 4
⑯	斎藤 寛・中野篤浩・遠山千春・三種裕子・杉平直子・石原 裕・小林悦子・吉田克己・鈴木道子・桜田俊郎	カドミウム土壌汚染地域住民の尿細管機能及び甲状腺機能(1983年度研究報告)	イタイイタイ病およびカドミウム中毒研究班総会	東 京	59. 3

番号	発表者	題 目	学 会 等 名 称	開催都市名	年 月
⑰	杉平直子・斎藤 寛・ 中野篤浩・小野雅司・ 遠山千春・三種裕子・ 脇阪一郎	カドミウム汚染地域住民における N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼの尿中排泄	第 52 回日本衛生学会総会	東 京	57. 3
⑱	杉平直子・斎藤 寛・ 中野篤浩・遠山千春・ 新田裕史・三種裕子・ 脇阪一郎	カドミウム汚染地域及び非汚染地域住民における N-アセチル-β-グルコサミニダーゼの尿中排泄	第 53 回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
⑲	杉平直子・斎藤 寛・ 中野篤浩・小林悦子・ 脇阪一郎	カドミウム環境汚染による尿細管損傷の指標としての尿中 NAG	第 26 回日本腎臓学会総会	京 都	58.10
⑳	杉平直子・斎藤 寛・ 中野篤浩・小林悦子・ 脇阪一郎	カドミウム汚染地域住民における N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼの尿中排泄に関する疫学的研究	第 54 回日本衛生学会総会	米 子	59. 4
㉑	鈴木和夫・米谷民雄	メタロチオネイン-I と-II の化学的性質の比較	第 1 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム	千 葉	57. 6
㉒	鈴木和夫	重金属とメタロチオネイン	日本化学会第 46 秋季年会, 化学関係学協会連合協議会研究発表会	新 潟	57.10
㉓	鈴木和夫・宮本栄子・ 田中康宜・河村涼子・ 山村 充・久保田憲太郎	Cd を蓄積したラット肝中の Cd, Zn と Cu 濃度におよぼす低蛋白飼料の影響 I	第 53 回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
㉔	鈴木和夫・田中康宜・ 宮本栄子・山村 充・ 河村涼子・ 久保田憲太郎	Cd を蓄積したラット腎中の Cd, Zn と Cu 濃度におよぼす低蛋白飼料の影響 II	第 53 回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
㉕	鈴木和夫・田中康宜・ 宮本栄子・河村涼子・ 山村 充・ 久保田憲太郎	Cd を蓄積したラット脾中の Cd, Zn と Cu 濃度におよぼす低蛋白飼料の影響 III	第 53 回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
㉖	鈴木和夫・宮本栄子・ 田中康宜・河村涼子・ 山村 充・ 久保田憲太郎	Cd を蓄積したラットの糞尿中への Cd, Zn と Cu の排泄におよぼす低蛋白飼料の影響 IV	第 53 回日本衛生学会総会	大 阪	58. 4
㉗	鈴木和夫・ 海老原佳之・ 秋富博之・河村涼子	胎児新生児期におけるラット肝中のインメタロチオネイン比と必須金属濃度の変化	日本薬学会第 103 年会	東 京	58. 4
㉘	K.T.Suzuki	Studies of cadmium uptake and metabolism by the kidney	Metallothionein Cadmium Nephrotoxicity Conf.	Research Triangle Park	58. 5
㉙	鈴木和夫・高原知子・ 渡部裕子・山村 充・ 河村涼子・村上正孝・ 久保田憲太郎	Cd/システインまたはメタロチオネインの前処理が両錯体の攻撃投与による Cd の蓄積に及ぼす影響	第 54 回日本衛生学会総会	米 子	59. 4
㉚	遠山千春・三種裕子・ 斎藤 寛・杉平直子・ 中野篤浩・脇阪一郎・ 小野雅司	トネイン-TP 法による Cd 汚染地域住民の尿中蛋白量について	第 52 回日本衛生学会総会	東 京	57. 3

番号	発表者	題 目	学 会 等 名 称	開催都市名	年 月
⑪	遠山千春・三種裕子・ 小林悦子・斎藤 寛	RIA 法によるメタロチオネインの定量	日本薬学会第10回環境 汚染物質とそのトキシコ ロジーシンポジウム	東 京	58.10
⑫	遠山千春・斎藤 寛・ 小林悦子・中野篤浩・ 三種裕子・杉平直子・ 石原 裕・脇坂一郎	Cd 土壤汚染地域住民における血清および尿 $\alpha_1$ -microglobulin (第1報) 各種指標との 関係	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
⑬	遠山千春・三種裕子・ 小林悦子・杉平直子・ 中野篤浩・斎藤 寛・ 脇坂一郎	環境中カドミウム暴露による尿中メタロチ オネイン排泄増加の意義	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
⑭	池井暢浩・小平 司・ 清水文夫・中嶋克行・ 遠山千春・斎藤 寛	新しい Tracer を用いた Metallothionein の Radioimmunoassay	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
⑮	上原 弘・青木康展・ 河村凉子・須長宏行・ 山村 充・西川雅高・ 下藤信弘・鈴木和夫	カドミウムの体内蓄積および毒性指標に及 ぼす飼料の影響	日本薬学会第11回環境 汚染物質とそのトキシコ ロジーシンポジウム	札 幌	59.10
⑯	中野篤浩・斎藤 寛・ 遠山千春・三種裕子・ 杉平直子・安達史朗・ 脇坂一郎	カドミウム汚染地域住民の早朝尿における カドミウムと必須元素との相関性について	第52回日本衛生学会総 会	東 京	57. 3
⑰	中野篤浩・斎藤 寛・ 三種裕子・杉平直子・ 安達史朗・脇坂一郎	カドミウム汚染地域住民尿中におけるカド ミウムと銅並びに $\beta_2$ -MG 濃度の相関性	第53回日本衛生学会総 会	大 阪	58. 4
⑱	中野篤浩・斎藤 寛・ 三種裕子・杉平直子・ 脇坂一郎	カドミウム汚染地域住民における Na と K の尿中排泄	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
⑲	中野篤浩・斎藤 寛・ 三種裕子・杉平直子・ 脇坂一郎	カドミウム汚染地域住民におけるオキシブ ロリンの尿中排泄	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
⑳	米谷民雄・綿引明美・ 鈴木和夫	カドミウムをシステインと投与した時の急 性腎傷害における腎中カドミウムの臨界濃 度	第2回金属の関与する生 体関連反応シンポジウム	京 都	59. 6
㉑	三浦 卓・国本 学	カドミウムによる溶血性貧血の発症機構	第56回日本生化学会大 会	福 岡	58.10
㉒	三浦 卓・国本 学	カドミウムによる溶血性貧血の発症機構 (2)	第57回日本生化学会大 会	東 京	59.10
㉓	三種裕子・小林悦子・ 遠山千春・中野篤浩・ 斎藤 寛・脇坂一郎	カドミウム暴露者の尿中におけるカドミ ウム、銅の排泄とタンパクとの結合状態につ いて	第53回日本衛生学会	吹 田	58. 4
㉔	三種裕子・遠山千春・ 斎藤 寛	RIA による臓器中メタロチオネイン定量の 分析条件の検討	日本薬学会第104年会	仙 台	59. 3
㉕	三種裕子・遠山千春・ 小林悦子・中野篤浩・ 斎藤 寛・脇坂一郎	ゲルろ過法によるイ病患者の尿中メタロチ オネインの分析	第54回日本衛生学会総 会	米 子	59. 4
㉖	三森文行・遠山千春	$^1\text{H-NMR}$ によるメタロチオネインの高次構 造の研究	第56回日本生化学会	福 岡	58. 8
㉗	村上正孝	$^{109}\text{Cd}$ -サイオネインの腎内分布	第54回日本産業衛生学 会	徳 島	56. 4

番号	発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
④⑧	村上正孝	カドミウム腎毒性に対するL-システインの影響	第51回日本衛生学会総会	札幌	56. 5
④⑨	村上正孝・ 久保田憲太郎・ 佐野憲一	カドミウム, <sup>35</sup> S-システイン投与時の腎中 <sup>35</sup> Sの分布	第52回日本衛生学会総会	東京	57. 3
⑤⑩	村上正孝・遠山千春・ 佐野憲一・河村涼子・ 斎藤 寛・久保田憲太郎	<sup>125</sup> I-Metallothionein のラット腎曲近位尿管上皮細胞内における分布	第53回日本衛生学会総会	大阪	58. 4
⑤⑪	村上正孝・河村涼子・ 鈴木和夫・久保田憲太郎	Cd/システインまたはメタロチオネインの前処理が両錯体の攻撃投与によるCdの腎毒性に及ぼす影響	第54回日本衛生学会総会	米子	59. 4
⑤⑫	太田庸起子・乾 道夫・ 脇阪一郎	クロム化合物取扱作業者の一部検例	第56回日本産業衛生学会	大阪	58. 4

II-1 カドミウム土壤汚染地域住民におけるカドミウムと  
 $\beta_2$ -マイクログロブリンの尿中排せつに関する研究

Studies on Urinary Cadmium and  $\beta_2$ -Microglobulin  
of Residents in Cadmium-Polluted Areas

中野篤浩<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>1,2</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Atsuhiko NAKANO<sup>1</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,2</sup> and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

要 旨

環境中カドミウム(以下Cdと略す)暴露とその健康影響の有用な指標である尿中Cd濃度及び尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン(以下 $\beta_2$ -mgと略す)濃度との関係を明らかにするために、Cd土壤汚染地域住民の早朝尿においてCd濃度と $\beta_2$ -mg濃度の関係を男女別、年齢別に検討した。

調査地域は、Cd土壤汚染地域として秋田県小坂町、石川県小松市、長崎県厳原町を、対照地域として秋田県井川町を選んだ。調査は1979年から1980年の間に行い、901人の被験者から早朝尿を採取した。尿中Cd濃度はフレイムレス原子吸光法で測定し、 $\beta_2$ -mg濃度はラジオイムノアッセイ法で測定した。濃度はクレアチニン比で表した。

尿中Cd濃度は全地域住民において年齢とともに直線的に上昇する傾向を示し、Cd土壤汚染地域住民が対照地域住民に比べて全年齢にわたり有意に高かった。尿中 $\beta_2$ -mg濃度はCd土壤汚染地域住民で男女とも40歳代から指数関数的に上昇し、対照地域住民では上昇はみられなかった。男女とも40歳代から尿中のCd濃度と $\beta_2$ -mg濃度が有意な正の相関関係を示し、Cdが腎尿細管機能に影響していること、また腎尿細管の機能異常によりCdの尿中排せつが促進されていることが示唆された。また、尿中 $\beta_2$ -mg濃度に対する尿中Cd濃度の回帰係数は加齢に従い減少し、両者の関係が加齢に強く影響されることが示唆された。

Abstract

To clarify the relationship of environmental cadmium(Cd) exposure in man with regard to urinary Cd and  $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ -mg) concentrations, the relationship between urinary Cd and  $\beta_2$ -mg levels in residents living in Cd-polluted areas was studied according to sex and age.

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 現住所:長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.

As target areas, Cd-polluted areas in Kosaka in Akita prefecture, Komatsu in Ishikawa prefecture and Izuhara in Nagasaki prefecture and as a reference area a non-polluted area in Ikawa in Akita prefecture were selected. Epidemiologic studies were carried out in 1979 and 1980 and an early-morning urine specimen was obtained from total of 901 subjects. Urinary Cd concentration was measured by flameless atomic absorption spectrometry. Urinary  $\beta_2$ -mg concentration was measured by radio-immunoassay. Both concentrations were expressed by creatinine ratios.

The urinary Cd level was significantly higher in both male and female residents of all age groups in Cd-polluted areas than that in non-polluted area, and it increased linearly with age. The urinary  $\beta_2$ -mg level in both male and female residents living in the Cd-polluted areas was found to increase exponentially over 40 years of age, whereas in the non-polluted area it did not increase with the age. There was a significant relationship between the urinary Cd level and  $\beta_2$ -mg level in those residents aged 40 and over. These results suggested that renal tubular function was influenced by Cd accumulated in kidney tissues, and that urinary Cd excretion was increased by renal tubular dysfunction. The regression coefficient of the urinary  $\beta_2$ -mg level to the urinary Cd level in the residents aged 40 and over was decreased with age. These results suggested that the relationship between the urinary Cd level and  $\beta_2$ -mg level was affected by aging.

## 1 はじめに

日本には、昔の鉱業活動によりカドミウム（以下 Cd と略す）による土壌汚染を引き起こした地域が存在している。これらの地域の住民は、そこで生産された米や野菜を食べて生活してきた。Cd 汚染米対策の進展や汚染土壌の改良などがなされ、住民への昔のような濃厚な暴露はなくなったと思われるが、現在でも一般人よりは高い Cd 暴露が続いているものと予想される。人体に対するこのような Cd の低濃度長期暴露がある場合、諸臓器の中で腎臓が標的臓器となり、最も高濃度に Cd を蓄積してゆく。この蓄積した Cd により、腎機能特に尿細管の低分子量タンパク質の再吸収機能が障害されてゆくものと考えられている<sup>1)</sup>。

尿中に排せつされる Cd は、腎臓中 Cd 濃度及び体内 Cd 負荷量をよく反映することから、Cd 暴露のよき指標とみなされている<sup>2,3)</sup>。また腎尿細管の低分子量タンパク質再吸収機能低下の指標としては、尿中に排せつされる  $\beta_2$ -マイクログロブリン（以下  $\beta_2$ -mg と略す）の濃度が最も鋭敏な指標と考えられている<sup>1)</sup>。

そこで、Cd による土壌汚染を引き起こした地域の住民において、Cd 暴露の指標である尿中 Cd 濃度と腎尿細管機能の指標である尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の関係を、地域別、男女別、年齢別に検討した。

## 2 対象及び方法

調査地域は、Cd による土壌汚染対策地域として指定されている秋田県鹿角郡小坂町細越地区、

石川県小松市金平地区及び長崎県下県郡蔽原町を選び、蔽原町の樫根地区を蔽原-1、下原、小茂田、椎根地区を蔽原-2とした。対照地域として秋田県南秋田郡井川町小竹花及び下中村地区を選んだ。これらの調査地域の5歳から80歳代までの全住民を調査対象とした。地域別、男女別、年代別の被験者数を表1に示した。総数は901人であった。これらの被験者数は、調査地域全住民の90%以上に相当した。また、これらの調査は1979年から1980年の間に行った。

表 1 カドミウム汚染地域及び対照地域住民における性別、年代別の被験者数  
Table 1 Number of subjects in cadmium-polluted (Kosaka, Komatsu, Izuhara-1 and Izuhara-2) and non-polluted (Ikawa) areas by sex and age

Area \ Age	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-	Total
	<b>Male</b>								
Ikawa	10	15	5	11	17	16	6	7	87
Kosaka	4	10	11	10	13	15	12	9	84
Komatsu	7	23	12	12	17	9	23	9	112
Izuhara-1	6	8	6	8	2	12	6	2	50
Izuhara-2						41	22	22	85
Total	27	56	34	41	49	93	69	49	418
	<b>Female</b>								
Ikawa	9	12	12	11	16	18	12	8	98
Kosaka	7	14	11	13	22	16	14	11	108
Komatsu	6	11	20	14	16	20	18	12	117
Izuhara-1	3	1	9	3	7	15	5	6	49
Izuhara-2						48	32	31	111
Total	25	38	52	41	61	117	81	68	483

これらの調査地域住民から早朝尿を採取した。この尿試料の一部を塩酸酸性にして持ち帰り、クレアチニンとCdを測定した。クレアチニンは原尿を20倍希釈し、Jaffeの反応<sup>4)</sup>で測定した。Cdは硝酸分解後10倍又は20倍に希釈して、D<sub>2</sub>ランプ補正下フレイムレス原子吸光法で測定した。ヒトの尿中のCdのフレイムレス原子吸光分析では、原子化干渉が強く直接検量線法では行えない。そこで、個々の尿のマトリックスを平均化するために混合尿を調整して、これにCdの標準液を添加し検量線を作成した<sup>5)</sup>。 $\beta_2$ -mgは、チモール添加リン酸緩衝液(pH 8.2, 0.2 M)を尿3 mlに2滴の割合で加え-20°Cで保存して、ラジオイムノアッセイ法(ファルマシア製 $\beta_2$ -マイクロテスト)で測定した。



Cdと $\beta_2$ -mgのこれら早朝尿における濃度は、クレアチニン1g当たりの $\mu\text{g}$ 数、すなわちCd/クレアチニン比( $\mu\text{g/g}$ クレアチニン)と $\beta_2$ -mg/クレアチニン比( $\mu\text{g/g}$ クレアチニン)で表現した。また、これらの濃度の差の検定はStudent's *t*-testに従った。

### 3 結果

Cd土壌汚染地域と対照地域住民の早朝尿におけるCd濃度を、表2、表3、図1、図2に示した。

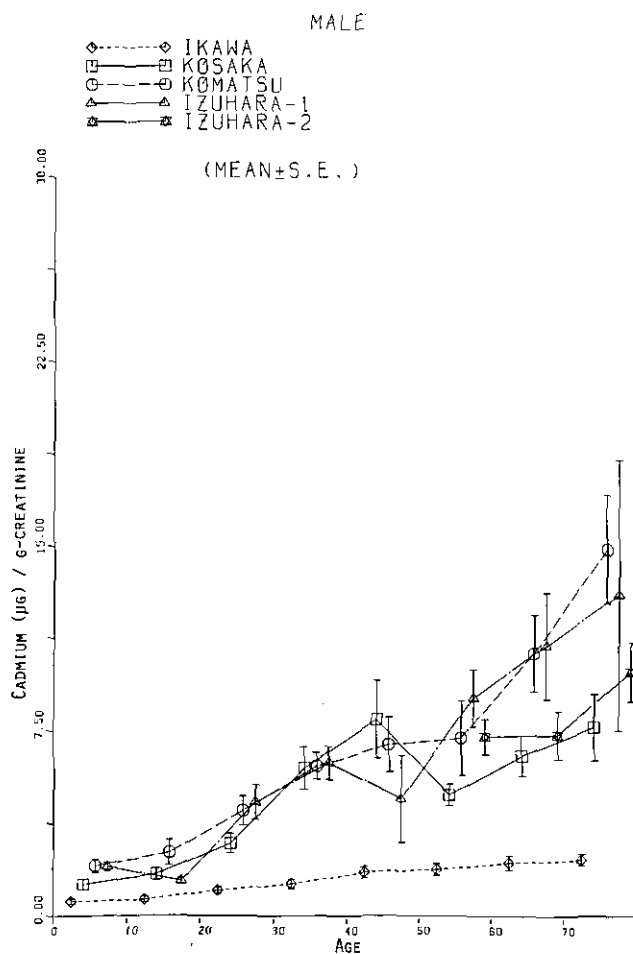


図 1 カドミウム汚染地域及び対照地域の男性住民における尿中カドミウム/クレアチニン比

Fig. 1 Cadmium/creatinine ratio in urine of male residents in cadmium-polluted (Kosaka, Komatsu, Izu-hara-1 and Izu-hara-2) and non-polluted (Ikawa) areas

尿中Cd濃度は、Cd土壌汚染地域住民の方が対照地域住民に比べて、男女とも全年齢にわたって有意差をもって高かった。男性の尿中Cd濃度は、Cd土壌汚染地域、対照地域とも年齢の上昇に応じて一次関数的に上昇した。一方女性では、調査地域の中で高濃度暴露の予想される「小松」と「畷原-1」において、50歳代に顕著なピークを示すCdの尿中排せつパターンを示した。

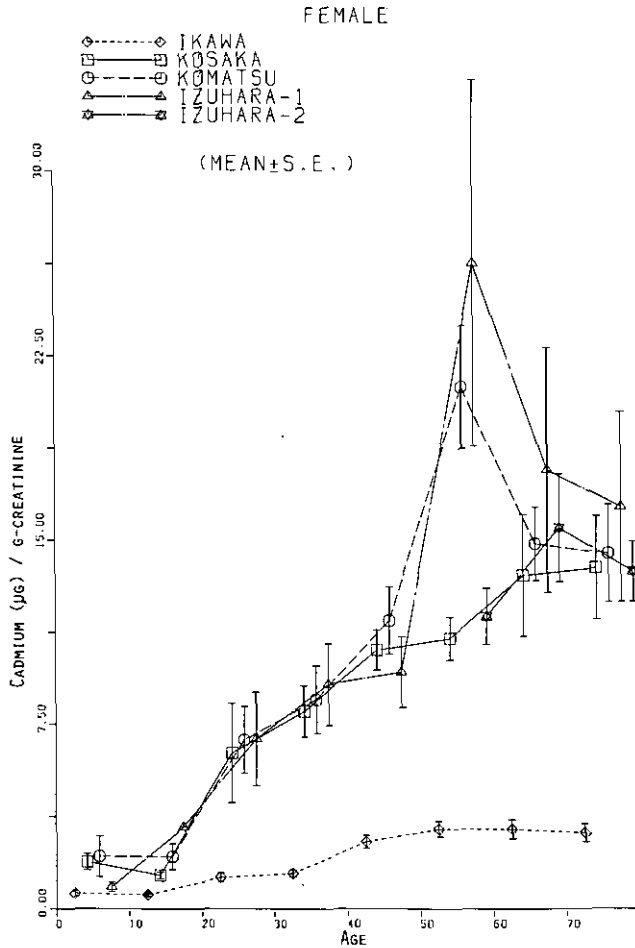


図 2 カドミウム汚染地域及び対照地域の女性住民における尿中カドミウム/クレアチニン比

Fig. 2 Cadmium/creatinine ratio in urine of female residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

表 2 カドミウム汚染地域及び対照地域の男性住民における尿中カドミウム／クレアチニン比

Table 2 Cadmium/creatinine ratio in urine of male residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

Area	Age	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-
	<b>Arithmetic mean (upper) and S. D. (lower)</b>								
Ikawa		0.59	0.66	1.05	1.32	1.79	1.90	2.17	2.28
		0.33	0.43	0.30	0.64	0.97	0.95	0.71	0.61
Kosaka		1.29	1.71	2.96	6.02	7.98	4.96	6.50	7.60
		0.42	0.84	1.33	2.71	5.66	1.70	2.86	4.04
Komatsu		2.04	2.59	4.28	6.10	6.97	7.23	10.64	14.87
		0.71	2.37	1.97	1.87	4.57	4.27	7.24	6.63
Izuhara-1		2.01	1.42	4.63	6.23	4.77	8.86	10.96	13.01
		0.42	0.36	1.69	1.90	2.50	4.00	5.28	7.77
Izuhara-2							7.29	7.34	9.89
							4.58	4.52	5.60
<b>Geometric mean (upper) and S. D.*(lower)</b> (S. D.* : antilogarithm of S. D. in the logarithmic scale)									
Ikawa (A)		0.52	0.56	1.00	1.19	1.58	1.69	2.08	2.22
		1.73	1.80	1.45	1.62	1.67	1.65	1.38	1.29
Kosaka (B)		1.22	1.53	2.69	5.53	6.78	4.58	5.77	6.81
		1.49	1.66	1.60	1.53	1.77	1.56	1.75	1.65
Komatsu (C)		1.91	2.02	3.82	5.79	5.52	6.22	8.34	13.65
		1.51	1.93	1.69	1.42	2.11	1.82	2.11	1.56
Izuhara-1 (D)		1.98	1.39	4.34	5.97	4.44	8.09	10.12	11.80
		1.23	1.26	1.51	1.37	1.73	1.55	1.51	1.89
Izuhara-2 (E)							6.21	6.00	8.36
							1.79	1.98	1.86
<b>P-value</b>									
A vs. B		0.016	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A vs. C		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A vs. D		0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
A vs. E							0.000	0.000	0.000
B vs. C		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B vs. D		0.035	NS	0.054	NS	NS	0.003	0.045	NS
B vs. E							0.071	NS	NS
C vs. D		NS	0.031	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C vs. E							NS	NS	0.040
D vs. E							NS	0.088	NS

NS : not significant

unit :  $\mu\text{g/g}$ -creatinine

表 3 カドミウム汚染地域及び対照地域の女性住民における尿中カドミウム／クレアチニン比

Table 3 Cadmium/creatinine ratio in urine of female residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

Area	Age							
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-
<b>Arithmetic mean (upper) and S. D. (lower)</b>								
Ikawa	0.62	0.57	1.27	1.44	2.72	3.25	3.23	3.09
	0.34	0.25	0.59	0.49	1.05	1.30	1.32	1.03
Kosaka	1.91	1.37	6.33	8.03	10.52	10.98	13.55	13.87
	0.89	0.49	6.70	3.74	3.83	3.47	9.28	7.00
Komatsu	2.13	2.12	6.84	8.50	11.71	21.21	14.83	14.46
	1.86	1.66	5.95	5.18	5.46	11.18	6.35	6.87
Izuhara-1	0.89	3.33	6.91	9.12	9.62	26.24	17.85	16.36
	0.35	0	5.71	2.88	3.81	28.82	11.15	9.47
Izuhara-2						11.88	15.50	13.73
						7.81	12.40	6.79
<b>Geometric mean (upper) and S. D.*(lower)</b> (S. D.* : antilogarithm of S. D. in the logarithmic scale)								
Ikawa (A)	0.54	0.53	1.16	1.36	2.52	3.02	3.01	2.93
	1.77	1.54	1.59	1.48	1.53	1.48	1.47	1.44
Kosaka (B)	1.74	1.29	3.95	7.13	9.93	10.45	11.75	12.08
	1.59	1.45	2.78	1.71	1.40	1.41	1.68	1.79
Komatsu (C)	1.63	1.63	4.69	7.11	10.40	18.28	13.61	12.82
	2.24	2.15	2.57	1.88	1.71	1.18	1.54	1.72
Izuhara-1 (D)	0.84	3.33	4.99	8.85	9.93	19.10	14.89	14.59
	1.56	0	2.38	1.35	1.53	2.13	2.01	1.66
Izuhara-2 (E)						9.82	12.76	12.30
						1.88	1.80	1.63
<b>P-value</b>								
A vs. B	0.001	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A vs. C	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A vs. D	NS	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A vs. E						0.000	0.000	0.000
B vs. C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B vs. D	0.051	0.027	NS	NS	NS	0.010	NS	NS
B vs. E						NS	NS	NS
C vs. D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C vs. E						0.000	NS	NS
D vs. E						0.001	NS	NS

NS : not significant

unit :  $\mu\text{g/g-creatinine}$

Cd 土壤汚染地域と対照地域住民の早朝尿における  $\beta_2$ -mg 濃度を、表 4、表 5、図 3、図 4 に示した。尿中  $\beta_2$ -mg 濃度は、Cd 土壤汚染地域住民と対照地域住民において、30 歳代までは男女とも前者が高い傾向は示すが有意差とはならなかった。しかしながら、Cd 土壤汚染地域住民では男女とも、40 歳で明らかな上昇を示し、その以後は年齢に対して指数関数的に上昇した。

また、 $\beta_2$ -mg の尿中排泄率は、加齢による生理的能力の低下により促進される可能性が考えられる。対照地域住民の女性の 70 歳代以上でわずかにその傾向がみられる。しかしながら、Cd 土

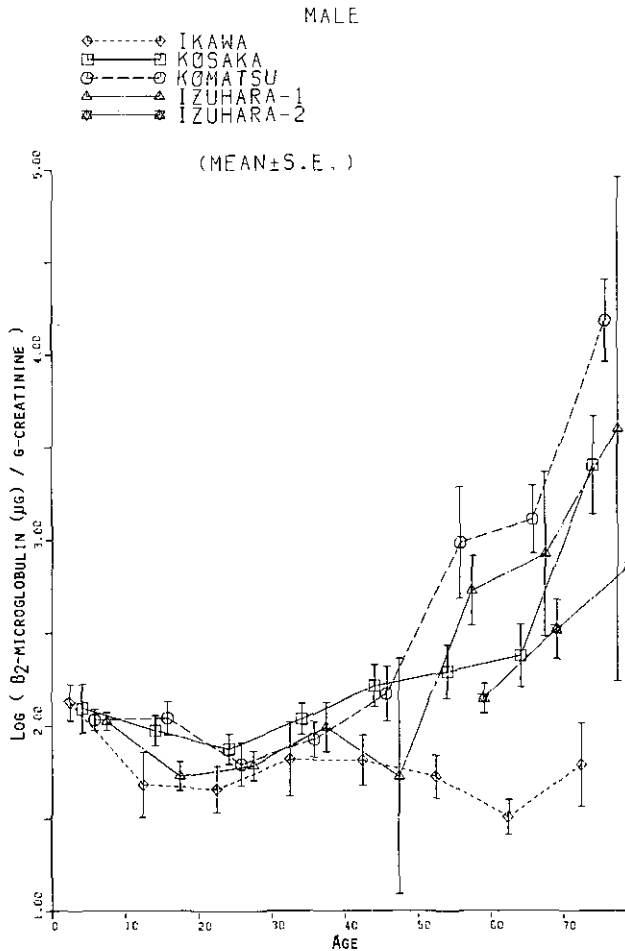


図 3 カドミウム汚染地域及び対照地域の男性住民における尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン/クレアチニン比

Fig. 3  $\beta_2$ -Microglobulin/creatinine ratio in urine of male residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

壤汚染地域住民の男女における40歳代からの急激な $\beta_2$ -mgの尿中排泄の増加は、加齢によると考えるよりも明らかにCdの影響を示唆するものであろう。

Cd土壌汚染地域の女性住民の尿中Cd排泄について、50歳代に急激な排泄増加のピークを示すパターンがみられたが、これに対する $\beta_2$ -mgの排泄増加のピークはみられなかった。このことは、尿中へのCdの急激な排泄増加が必ずしも顕著な腎尿管機能の低下を伴わないことを意味している。

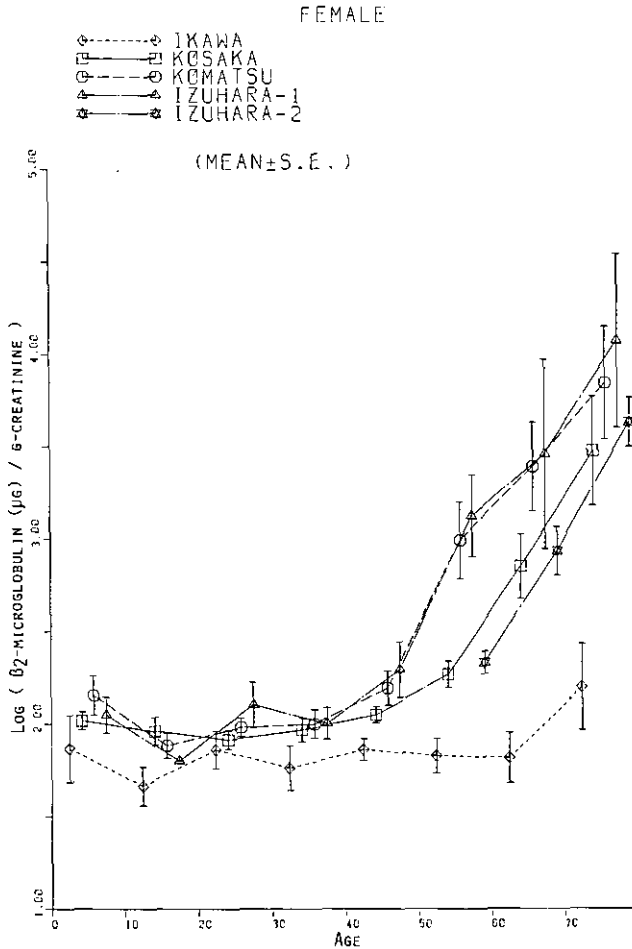


図 4 カドミウム汚染地域及び対照地域の女性住民における尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン/クレアチニン比

Fig. 4  $\beta_2$ -Microglobulin/creatinine ratio in urine of female residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

表 4 カドミウム汚染地域及び対照地域の男性住民における尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン/クレアチニン比

Table 4  $\beta_2$ -Microglobulin/creatinine ratio in urine of male residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

Area	Age	Age							
		5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-
Ikawa (A)	Min.	53	7	22	1	4	7	14	16
	Max.	662	185	83	275	204	402	54	979
	Mean	135	48	46	66	66	53	32	62
Kosaka (B)	Min.	64	45	33	58	54	62	68	93
	Max.	208	284	378	270	1050	9311	4943	38637
	Mean	125	94	75	109	165	197	238	2547
Komatsu (C)	Min.	78	21	12	33	27	79	47	1239
	Max.	219	145	438	508	7621	33497	69823	70469
	Mean	108	110	62	85	149	971	1294	15276
Izuhara-1 (D)	Min.	78	17	32	33	12	78	42	175
	Max.	162	103	126	307	232	3917	35400	91201
	Mean	606	54	61	98	53	535	839	3990
Izuhara-2 (E)	Min.						3	52	15
	Max.						1901	25527	17701
	Mean						141	331	723
<b>P-value</b>									
A vs. B		NS	NS	NS	NS	0.003	0.004	0.003	0.001
A vs. C		NS	NS	NS	NS	0.008	0.003	0.000	0.000
A vs. D		NS	NS	NS	NS	NS	0.000	0.023	0.043
A vs. E							0.006	0.000	0.005
B vs. C		NS	NS	NS	NS	NS	0.028	0.014	0.038
B vs. D		NS	0.049	NS	NS	NS	0.072	NS	NS
B vs. E							NS	NS	NS
C vs. D		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C vs. E							0.024	0.089	0.000
D vs. E							0.002	NS	NS

Min. : minimum value, Max. : maximum value,  
Mean : geometric mean, NS : not significant

unit : ( $\beta_2$ -mg) $\mu$ g/g-creatinine

表 5 カドミウム汚染地域及び対照地域の女性住民における尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン/クレアチニン比Table 5  $\beta_2$ -Microglobulin/creatinine ratio in urine of female residents in cadmium-polluted and non-polluted areas

Area	Age	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-
		Ikawa (A)	Min. Max. Mean	8 462 73	12 211 46	21 511 72	12 152 58	32 209 72	8 506 67
Kosaka (B)	Min. Max. Mean	81 175 104	36 372 91	47 132 82	37 340 93	40 452 112	48 625 185	99 8318 710	212 114551 3006
Komatsu (C)	Min. Max. Mean	71 357 143	45 267 76	52 357 96	52 615 100	58 1064 156	51 68865 982	105 123595 2466	130 116145 7015
Izuhara-1 (D)	Min. Max. Mean	72 153 111	63 63 63	50 899 127	72 142 100	72 798 197	57 49204 1334	117 151008 2884	337 128825 11885
Izuhara-2 (E)	Min. Max. Mean						38 4721 215	74 90573 865	110 58210 4315
<b>P-value</b>									
A vs. B		NS	0.029	NS	NS	0.013	0.001	0.000	0.005
A vs. C		NS	NS	NS	NS	0.005	0.000	0.000	0.001
A vs. D		NS	NS	NS	NS	0.004	0.000	0.001	0.002
A vs. E							0.000	0.000	0.000
B vs. C		NS	NS	NS	NS	NS	0.003	0.095	NS
B vs. D		NS	NS	NS	NS	NS	0.002	NS	NS
B vs. E							NS	NS	NS
C vs. D		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C vs. E							0.006	0.076	NS
D vs. E							0.003	NS	NS

Min. : minimum value, Max. : maximum value,  
Mean : geometric mean, NS : not significant

unit : ( $\beta_2$ -mg) $\mu$ g/g-creatinine



Cd 土壤汚染地域と対照地域の両住民における尿中 Cd 濃度と  $\beta_2$ -mg 濃度の相関係数を、男女別、年代別に表 6 に示した。男女とも 40 歳代以後で有意な正の相関関係を示した。このことは、Cd 土壤汚染地域住民における  $\beta_2$ -mg の尿中排せつ増加、すなわち腎尿細管の低分子タンパク質の再吸収機能の低下が、腎臓組織に蓄積している Cd の影響であることを示唆している。一方、40 歳代からの尿中 Cd 濃度と  $\beta_2$ -mg 濃度の有意な正の相関関係は、腎尿細管の低分子タンパク質の再吸収機能の低下により、Cd の尿中排せつが促進されていることも示唆している。

尿中における  $\beta_2$ -mg 濃度に対する Cd 濃度の回帰性は、加齢により変わってゆく。これらの関係を図 5, 6, 7, 8 に示した。上記の回帰係数は、年齢の上昇に従い低下してゆく傾向を示している。

以上のごとく尿中への Cd と  $\beta_2$ -mg の排せつは、加齢による生理的状态の変化に強く影響されている。

表 6 カドミウム汚染地域と対照地域住民の性別、年代別における尿中のカドミウム濃度と  $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度の相関係数

Table 6 Correlation coefficient between urinary cadmium and  $\beta_2$ -microglobulin concentrations in residents in cadmium-polluted and non-polluted areas by sex and age

Sex	Age	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-
	Male		-0.083	0.250	0.316	0.237	0.398**	0.460***	0.652***
Female		0.373	0.216	0.260	0.177	0.462***	0.642***	0.606***	0.546***

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001

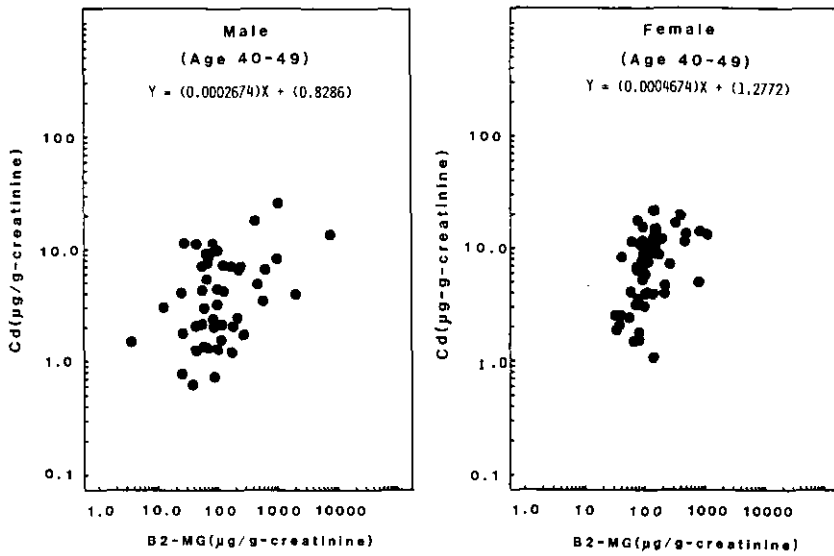


図 5 カドミウム汚染地域及び対照地域の40歳代住民における尿中の $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度とカドミウム濃度の関係

Fig. 5 Relationship between  $\beta_2$ -microglobulin and cadmium concentrations in urine of male and female residents aged 40-49 in cadmium-polluted and non-polluted areas

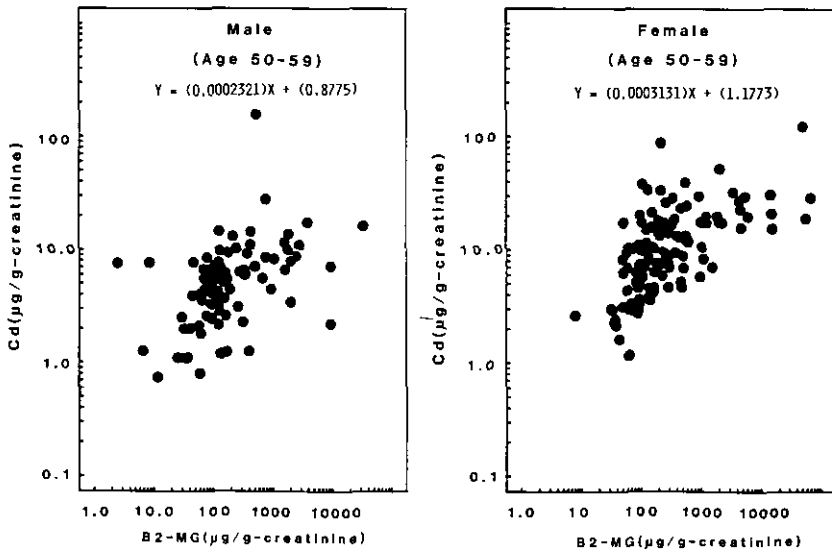


図 6 カドミウム汚染地域及び対照地域の50歳代住民における尿中の $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度とカドミウム濃度の関係

Fig. 6 Relationship between  $\beta_2$ -microglobulin and cadmium concentrations in urine of male and female residents aged 50-59 in cadmium-polluted and non-polluted areas

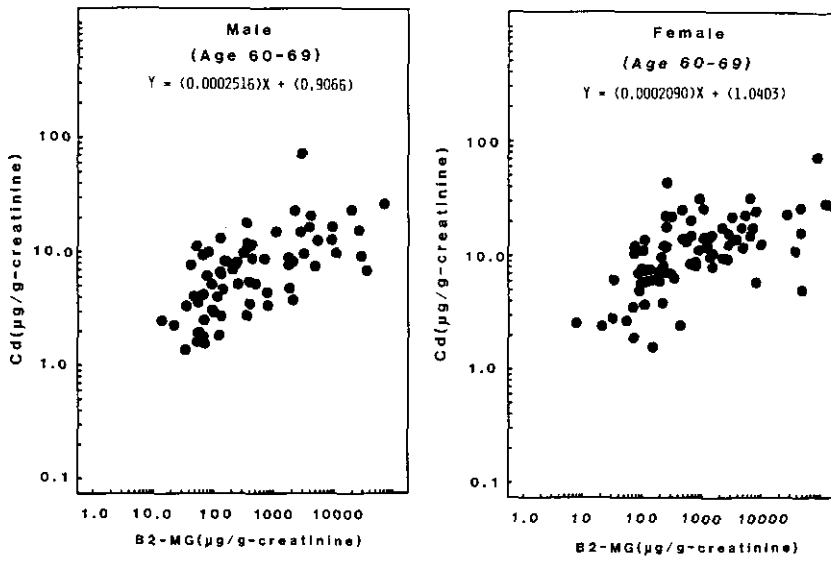


図 7 カドミウム汚染地域及び対照地域の 60 歳代住民における尿中の  $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度とカドミウム濃度の関係

Fig. 7 Relationship between  $\beta_2$ -microglobulin and cadmium concentrations in urine of male and female residents aged 60-69 in cadmium-polluted and non-polluted areas

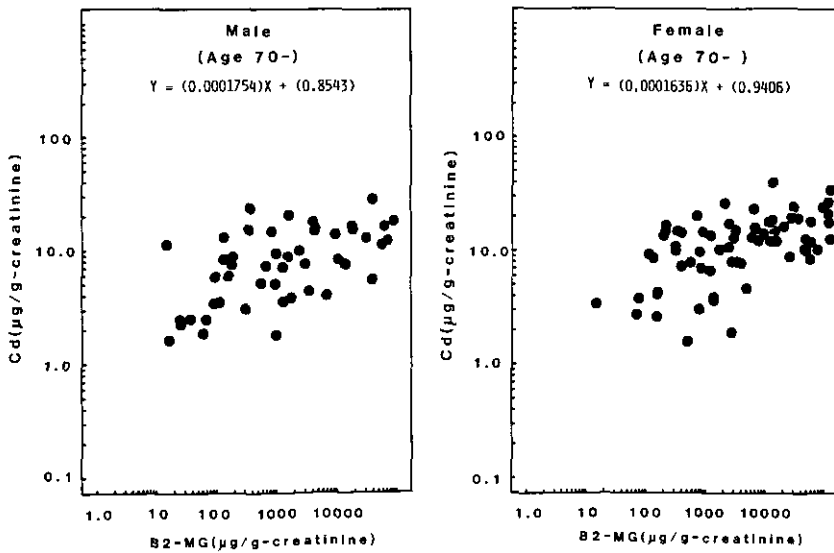


図 8 カドミウム汚染地域及び対照地域の 70 歳以上の住民における尿中の  $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度とカドミウム濃度の関係

Fig. 8 Relationship between  $\beta_2$ -microglobulin and cadmium concentrations in urine of male and female residents aged over 70 in cadmium-polluted and non-polluted areas

#### 4 考 察

日本人は特別な暴露歴のない一般人においても、世界最高の体内Cd負荷量を持つことが報告されている<sup>9)</sup>。我国に存在しているCd土壌汚染地域の住民は、一般人より更に高いCd暴露を受けており、明らかな腎尿細管機能障害を呈する者が存在していると報告されている<sup>7,8)</sup>。

Cdの環境汚染による人間への暴露様式には大別して二つの様式がある。一つは、Cdを取り扱う産業現場の労働環境のCd汚染による、高濃度ではあるが労働時間内だけのCd暴露である。この様式では、主に経気道的な暴露であり、暴露者はほとんど男性労働者である。もう一つの様式は、Cd土壌汚染地域のように低濃度ではあるが生活環境がCdに汚染される場合である。この様式では、Cdに汚染された米や野菜や水などを摂取することにより、主に経口的なCd暴露がなされる。そこに居住している期間中ずっとCdに暴露され、子供から大人までのすべての住民が暴露者となる。

これまでのCdの人体影響に関する研究は、大部分が産業医学的研究であり、成人の男性労働者に関するものがほとんどである。子供や女性へのCd暴露に関する研究報告は非常に少ない。Cd土壌汚染地域住民のように、生まれたときから老人になるまでの全生涯にわたりCdに暴露される場合には、子供から大人まで男女を問わず全住民に対するCdの影響研究が必要と思われる。そこで我々は、調査地域の5歳から80歳以上までの全住民を研究対象とした。

経口的暴露により体内に取り込まれたCdは、肝臓、腎臓その他の臓器や組織に蓄積してゆく。これらの臓器や組織の中で、腎臓が標的臓器となり最も高濃度にCdを蓄積し、肝臓中濃度がこれに続く。この腎臓と肝臓の蓄積量がCdの体内負荷量のほとんどを占めると考えられている<sup>9)</sup>。尿中に排せつされるCdの濃度が、Cdの体内負荷量、特に腎臓のCd濃度をよく反映することが報告されている<sup>2,3)</sup>。このために、尿中Cd濃度は、Cd暴露量推定のおよき指標とされている。しかしながら、腎尿細管障害が発現すると、この尿中Cd濃度の指標としての有効性は弱まると報告されている<sup>10)</sup>。

Cd暴露による腎尿細管障害発現の機序は、Fribergらの研究<sup>11)</sup>に始まり、その後のCdやメタロチオネインの代謝に関する研究<sup>11-13)</sup>により、下記のように考えられるようになってきた。

経口的に取り込まれたCdは、腸管で吸収され肝臓にゆき、低分子量タンパク質であるメタロチオネインを誘導合成してCdチオネインとなり、まず肝臓に蓄積する。この肝Cdチオネインが肝臓組織のターンオーバー等により血流に漏出し、腎糸球体でろ過され腎尿細管で再吸収される。ここで新たに腎臓Cdチオネインに再合成されて蓄積してゆく。腎尿細管組織のCdの蓄積濃度が上昇するに従い、蓄積率は次第に低下してゆき、ゆっくりと臨界濃度に達するだろうと考えられている。

正常な腎臓組織においても、常に組織のターンオーバーによる細胞の分解と合成が繰り返されている。分解した細胞中のCdが尿中に排せつされる。これが正常な組織のターンオーバーの規則性に従っているため、腎中Cd濃度を反映するものと考えられている。

腎臓中 Cd の蓄積濃度が上昇してゆき、臨界濃度に達するところから、尿細管細胞の活力が低下してくる。このような状態になってくると、腎組織のターンオーバーも再生よりも崩壊が優先するようになり、腎機能障害、すなわち腎尿細管の低分子量タンパク質の再吸収機能も徐々に低下してゆくものと考えられている。肝臓由来の血流中の Cd チオネインは、腎機能が正常である場合はほとんど腎尿細管で再吸収されるが、再吸収機能が低下してくると直接尿中へ排せつされるようになる。一方、腎組織の崩壊が促進されると、腎臓由来の Cd チオネインの尿中排せつも増加することになる。このように腎尿細管の低分子量タンパク質の再吸収機能が低下するところから、尿中 Cd 濃度は必ずしも腎臓中 Cd 濃度を反映しなくなるものと考えられている。

我々は前報<sup>14)</sup>で、Cd 暴露者と特別な暴露歴のない対照者において、年齢が Cd の累積暴露量に相関するものとの仮定のもとに、年齢と尿中 Cd 濃度の相関関係を検討した。Cd 土壌汚染地域及び対照地域の住民男女とも、5 歳から 49 歳までの間は年齢と尿中 Cd 濃度の間に非常に強い正の相関関係を示した。50 歳代以後では、特に Cd 土壌汚染地域の女性住民において、年齢と尿中 Cd 濃度の相関性の低下がみられた。このことは、50 歳までは尿中 Cd 濃度が腎臓中 Cd 濃度をよく反映するが、50 歳代以後の腎尿細管の機能低下が発現する頃から、尿中 Cd 濃度は必ずしも腎臓中 Cd 濃度を反映しなくなることを示唆しているものと考えた。

また、腎尿細管の低分子量タンパク質再吸収機能低下の指標としては、尿中に排せつされる  $\beta_2$ -mg 濃度が最も鋭敏な指標と考えられている。これまでに、Cd 暴露による  $\beta_2$ -mg の尿中排せつ増加が、Bernard ら<sup>15)</sup>、野見山ら<sup>16)</sup>、斎藤ら<sup>17)</sup>によって報告されている。 $\beta_2$ -mg は血液中にはほぼ一定の濃度で存在する、低分子量の血漿タンパク質である。経口的な Cd 暴露の場合、Cd は  $\beta_2$ -mg の代謝に対してほとんど直接的には影響しない。腎機能が正常である場合には、血液中の  $\beta_2$ -mg は糸球体でろ過され、そのほとんどが腎尿細管で再吸収され、尿中にはごく微量しか排せつされない。低分子量タンパク質であり、分子量の類似した Cd チオネインにより腎尿細管が障害されると、尿中への  $\beta_2$ -mg の排せつが顕著になる。

我々の成績では、Cd 土壌汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度が、対照地域住民のそれに比べて 40 歳代から有意に高くなり、その後の 50 歳代から指数関数的に上昇した。一方、Cd の暴露のない一般人において、50 歳頃から諸種の腎機能の低下<sup>18)</sup>や腎重量の低下<sup>19)</sup>などが起こることが報告されている。このようなことから、50 歳頃から腎臓の加齢による生理機能の低下は顕著になるものと考えられる。 $\beta_2$ -mg の加齢による尿中排せつ増加の可能性も考えられるが、対照地域住民の 70 歳代以上でわずかにその傾向がみられたただけであった。Cd 土壌汚染地域住民における、40 歳代からの顕著な尿中への  $\beta_2$ -mg の排せつ増加は、加齢によるものではなく、Cd による腎尿細管の低分子量タンパク質再吸収機能異常によるものと思われる。

また、尿中の  $\beta_2$ -mg 濃度と Cd 濃度の間で、男女とも 40 歳代以後において有意な正の相関関係がみられた。腎尿細管機能低下のもとでは、必ずしも尿中 Cd 濃度が腎中 Cd 濃度を反映しなくなるが、この相関性は腎臓に蓄積している Cd が腎尿細管機能異常の原因であることを示唆している

ものであろう。この両者の関係を、 $\beta_2$ -mg 濃度の Cd 濃度に対する回帰性を検討すると、加齢とともにその回帰係数は低下している。腎尿細管障害は蓄積 Cd に対しては排せつ促進的にはたつき、腎中 Cd 濃度及び Cd 体内負荷量を低下させる傾向を示唆している。加齢とともに、指数関数的な  $\beta_2$ -mg の尿中排せつ増加を示す腎尿細管の機能低下は、蓄積性の強い Cd の長い年月にわたる腎尿細管への作用の累積を示唆している。

以上のように、Cd の人体への影響は、その 20~30 年と推定される非常に長い生物学的半減期<sup>20)</sup> のために、年齢により説明されるところが非常に大きい。

### 引用文献

- 1) Friberg, L., M. Piscator, G. F. Nordberg and T. Kjellstöm (1974) : Cadmium in the Environment. CRC, Press, Cleveland, 101-130.
- 2) Lauwerys, R. R., J. P. Buchet and H. A. Roels (1976) : The relationship between cadmium exposure or body burden and the concentration of cadmium in blood and urine in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **36**, 275-285.
- 3) Roels, H. A., R. R. Lauwerys, J. P. Buchet, A. Bernard, D. R. Chettle, T. C. Harvey and I. K. Al-Haddad (1981) : In vivo measurement of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal : Its significance with respect to cadmium in blood and urine. *Environ. Res.*, **26**, 217-240.
- 4) Bonsnes, R. W. and H. H. Taussky (1945) : On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.*, **158**, 581-591.
- 5) Hitachi Technical Data, AA No. 14 (1977) : 血液、尿、血漿中のカドミウムの定量分析。
- 6) Friberg, L. and M. Vahter (1983) : Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring : Results of a UNEP/WHO global study. *Environ. Res.*, **30**, 95-128.
- 7) Saito, H., R. Shioji, Y. Hurukawa, K. Nagai, T. Arikawa, T. Saito, Y. Sasaki, T. Furuyama and K. Yoshinaga (1977) : Cadmium-induced proximal tubular dysfunction in a cadmium-polluted area. *Contr. Nephrol.*, **6**, 1-12.
- 8) 蔀 幸三・斎藤 寛・中野篤浩・海上 寛・高田健右・佐藤徳太郎・古山 隆・吉永 馨・有川 卓・永井謙一 (1981) : カドミウム環境汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -microglobuline 一世代別、性別の検討ならびに近位尿細管検査成績との比較。 *日本腎臓学雑誌*, **23**, 45-62.
- 9) 日本化学会 (1977) : カドミウム。丸善、東京、119-130.
- 10) 小林悦子 (1982) : 環境中カドミウムの人体影響に関する疫学的研究 (第 2 報), Cd 汚染地居住期間別尿所見。 *日本公衆衛生雑誌*, **29**, 201-207.
- 11) Nordberg, G. F. (1976) : Effects and dose-response relationships of toxic metals. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 371-379.
- 12) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1982) : Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium. *Arch. Toxicol.*, **50**, 159-166.
- 13) Suzuki, K. T. (1984) : Studies of cadmium uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 21-30.
- 14) 中野篤浩・斎藤 寛・三種裕子・杉平直子・蔀 幸三 (1984) : カドミウム土壌汚染地域住民のカドミウムの尿中排せつに関する研究。 *国立公害研究所研究報告*, 第 67 号, 207-218.

- 15) Bernard, A., H. Roels, G. Hubermont, J. P. Buchet, P. L. Masson and R. R. Lauwerys (1976) : Characterization of the proteinuria in cadmium-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **38**, 19-30.
- 16) 野見山一生・世取山守 (1976) : ヒトにおけるカドミウムの量-反応関係-尿中カドミウム濃度と尿中  $\beta_2$ -microglobulin 濃度-. *環境保健レポート*, **38**, 147-149.
- 17) 斎藤 寛・永井謙一・有川 卓・斎藤喬雄・古山 隆・吉永 馨 (1977) : カドミウム環境汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -microglobulin 濃度 — カドミウム負荷量との dose-effect relationship について. *医学のあゆみ*, **100**, 350-352.
- 18) 尾前照雄・藤見 惺・上田一雄 (1976) : 高血圧と腎障害. *綜合臨床*, **25**, 1799-1804.
- 19) 上田一雄・尾前照雄・広田安夫 (1974) : 久山町剖検例にもとづく腎硬化性病変の臨床病理学的研究. *日本老年医学会雑誌*, **11**, 147-152.
- 20) Task group on metal accumulation (1973) : Accumulation of toxic metals with special reference to their absorption, excretion and biological half-times. *Environ. Physiol. Biochem.*, **3**, 65-107.

## II-2 人間集団の健康評価指標としての尿タンパク質濃度

### Urinary Protein Concentration as an Index to Evaluate Human Health on a Group Basis

斎藤 寛<sup>1,2</sup>・中野篤浩<sup>1</sup>・遠山千春<sup>1</sup>・三種裕子<sup>1</sup>  
杉平直子<sup>1</sup>・石原 裕<sup>1,3</sup>・小林悦子<sup>4</sup>

Hiroshi SAITO<sup>1,2</sup>, Atsuhiko NAKANO<sup>1</sup>, Chiharu TOHYAMA<sup>1</sup>, Yuko MITANE<sup>1</sup>,  
Naoko SUGIHARA<sup>1</sup>, Hiroshi ISHIHARA<sup>1,3</sup> and Etsuko KOBAYASHI<sup>4</sup>

#### 要 旨

カドミウム土壌汚染地域（長崎県厳原町、秋田県小坂町）及び対照地域の住民の早朝尿及び24時間尿を採取し、トネイン-TP法により尿中総タンパク質を測定した。

尿中総タンパク質排泄量は若年者から壮老年者まで互いに等しく加齢による変化は認められなかった。早朝尿総タンパク質濃度は各年齢層で差がなく、調査したどの人間集団でも総タンパク質濃度は対数正規分布を示した。カドミウムによる尿細管障害が確認されている人間集団（汚染地域の壮老年者）の早朝尿総タンパク質濃度累積度数分布は対照群（健常者）と明らかな差を示した。

尿中総タンパク質を測定することにより、特定の人間集団のなんらかの腎障害性因子（重金属、薬剤、高血圧など）による健康影響を迅速簡便確実に診断できることを立証した。

#### Abstract

Epidemiologic studies were carried out in cadmium (Cd)-polluted areas (Izuhara in Nagasaki prefecture and Kosaka in Akita prefecture) and a non-polluted area. People living in these areas were requested to provide an early-morning and a 24-hour urine specimens. Protein amounts in the urine specimens were determined with Tonein-TP method. Excreted amounts of protein appear to be independent of age and their values approximated a log-normal distribution in any of the three different populations. Cumulative frequency curves on urinary protein amounts of people in

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 現在：長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.
3. 現在：静岡済生会病院 〒422 静岡市小鹿1-1-1  
Present address: Shizuoka Saisei-Kai Hospital, Shizuoka 422, Japan.
4. 昭和57～59年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1982-1984).



Cd-polluted areas showed a marked difference from those in a non-polluted area. It is concluded, from these results, that measurement of the excreted amounts of protein is very simple and also expedites in evaluating renal effects of some risk factors such as heavy metals, drugs and hypertension.

## 1 はじめに

タンパク質尿の出現（尿中タンパク質量の異常増加）はあらゆる腎病変に必発の徴候として重要視されている。

尿は biological fluid である。したがって腎に機能的にも形態的にもなんの異常のない人間の尿であっても微量のタンパク質（数 mg/dl）を含んでいる。腎に病的変化が出現すると、尿タンパク質は健常者の数 mg/dl のオーダーから数百 mg/dl、さらには g/dl のオーダーにまで増加するが、この間の変化は連続的である。これまで尿タンパク質測定法に感度のよいものがなかったために、臨床医学でも産業医学でも、また地域保健でも 30~50 mg/dl を検出の下方限界とする半定性試験紙法によりタンパク質尿の検査を実施せざるを得なかった。これまでの経験から、臨床医学で問題にすべき腎病変を有する人間の尿タンパク質は 30~50 mg/dl 以上ということが明らかにされている。したがって明らかな病者の発見ということからいえば半定性試験紙法は十分に有用であるといえよう。

しかしながら、上に述べたように人間の尿タンパク質量はごくごく微量のものから数 g/dl のオーダーまで連続的であり、また当然のことながら、すべての腎病変において病初期には健常者と変わらないか、わずかに増加しているだけのことがあるはずである。この状態を把握することができれば各種原因による腎病変の早期発見・早期診断が可能となる。

最近、健常者の尿タンパク質量をも正確に測定できる方法が開発された（トネイン-TP 法）<sup>1)</sup>。我々はこの方法を用いて、カドミウムなどの環境中の腎毒性物質の生体内侵入による健康影響（腎変化）の早期診断に応用できないかを検討した。

## 2 方法及び対象

1981年に秋田県小坂町立中学校、茨城県土浦市立第六中学校及び同県谷田部町、学校法人若溪学園中学校の3年男子合計179人の早朝尿を採取した。3中学校の3年男子生徒総数の99%に相当する。

1982年に小坂町立中学校及び若溪学園中学校3年男子生徒合計142人（受診率100%）の早朝尿を採取した。

1981年に長崎県厳原町佐須地域（カドミウム土壌汚染地域）及び秋田県井川町下中村（非汚染地域）の50~69歳男子住民（それぞれ65人、47人）の早朝尿を採取した。受診率は佐須94%、

下中村 92%であった。

1981～1983年に岩手県大迫町、茨城県協和町、同県筑波町（いずれも非汚染地域）の男子住民 101 人の 24 時間尿を採取した。

早朝尿及び 24 時間尿の一部をチモール添加して  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

尿中総タンパクは尿  $100\ \mu\text{l}$  にトネイン-TP 試薬（Coomassie brilliant blue G-200 法，大塚アッセイ） $5\ \text{ml}$  を加え，転倒混和，発色後に島津比色計（ $590\ \text{m}\mu$ ）により測定した。標準タンパク質溶液は測定キット添付のヒトアルブミンを用いた。

### 3 結果

カドミウム土壌汚染のない大迫町，協和町，筑波町の一般男子住民 101 人の 1 日（24 時間）尿総タンパク質排せつ量をみると，住民の 90%までが  $150\ \text{mg}$  以下であり，従来の定説と一致した。また加齢によっても尿総タンパク質排せつが増加するという事実のないことが明らかとなった（図 1）。

上と同じ 3 地域において同年齢，同数の女子住民についても検討したところ，男子住民と全く同じ成績が得られた。ただしタンパク質排せつ量は男子よりもやや少なめで 90%までが  $120\ \text{mg/d}$  以下であった。

1981年に採取した小坂町立中学校（カドミウム土壌汚染地域），土浦第六中学校及び若溪学園中学校（非汚染地域に所在）の 3 年生男子生徒 179 人の早朝尿総タンパク質濃度の累積度数分布を図 2 に示した。尿総タンパク質濃度は対数正規分布をとり，95%タイル値は  $20\ \text{mg/dl}$  であった。

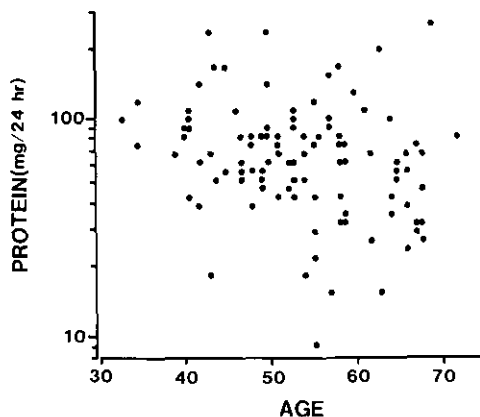


図 1 成人男子の 1 日尿総タンパク質排せつ量 (mg/24 h)

Fig. 1 Urinary excretion rate of protein in male subjects (mg/24 h)

岩手県大迫町，茨城県協和町及び同県筑波町在住の 30 歳以上の一般住民， $n=101$ ，1981-1983 調査。

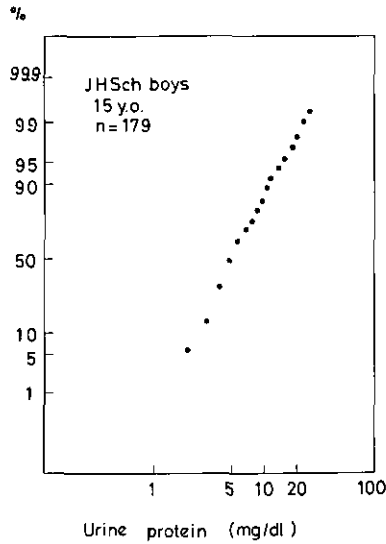


図 2 早朝尿総タンパク濃度の累積度数分布

Fig. 2 Cumulative frequency curve of protein concentration in morning urine in junior high school boys (senior class)

中学校3年男子,  $n=179$ .

これも従来の説と一致した。

1982年に採取した小坂町立中学校及び若溪学園中学校3年男子生徒, それぞれ58人及び84人の早朝尿総タンパク質濃度累積度数分布もまた対数正規分布を示し, 両者は互いによく一致しており, 95%タイルは20 mg/dlであった(図3)。

なお, 1981~1982年の3地域の中学校3年男子と同時に3年女子についても尿検査を実施した。男子と全く同様の成績が得られた。

1981年に行ったカドミウム非汚染地域住民(男子, 年齢50~69歳)の悉皆調査では尿総タンパク質濃度は若年者(中学校3年男女)と同じく対数正規分布を示し, 95%タイルは20 mg/dlであった。一方, カドミウム土壌汚染地域住民は同年齢の対照の非汚染地域住民よりも尿総タンパク質濃度が高く, 累積度数分布には両者間に有意の差を認めた(図4)。上記2地域の女子住民についても悉皆調査を行った。男子住民と全く同様の所見が得られた。

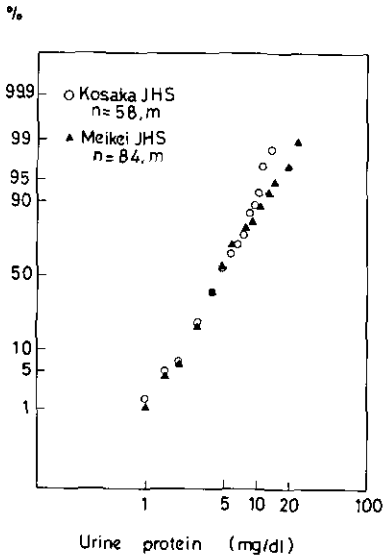


図 3 早朝尿総タンパク質濃度累積度数分布の比較

- 秋田県小坂町立中学校3年男子,  $n=58$  (カドミウム土壌汚染地域)
- ▲ 茨城県谷田部町, 学校法人茗溪学園中学校3年男子,  $n=84$  (非汚染対照地域).

Fig. 3 Comparison of cumulative frequency curves of protein concentration in morning urine from Kosaka junior high school boys (cadmium-polluted area) and Meikei junior high school boys (non-polluted area)

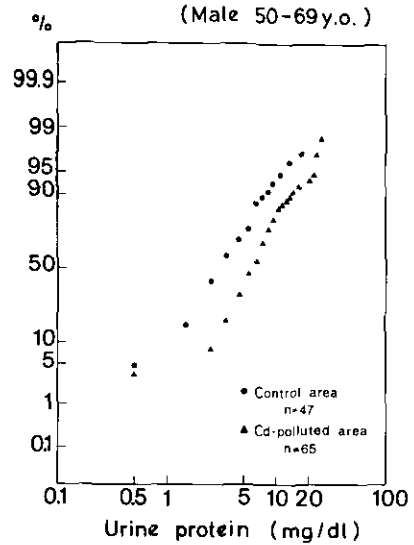


図 4 早朝尿総タンパク質濃度累積度数分布の比較

- ▲ カドミウム土壌汚染地域住民 (長崎県叡原町佐須地域), 50~69歳男子,  $n=65$ , 受診率 94%.
- 非汚染対照地域住民 (秋田県井川町下中村地域), 50~69歳男子,  $n=47$ , 受診率 92%.

Fig. 4 Comparison of cumulative frequency curves of protein concentration in morning urine from residents with age from 50 to 69 in a cadmium-polluted and a non-polluted area

#### 4 考 察

尿中微量タンパク質を正確かつ容易に測定する方法がなかったために、健常者の尿タンパク質に関しては多数例の検討があるとはいえないが、しかし健常者の1日(24時間)尿総タンパク排泄量は100~150 mg以下、随時尿の総タンパク質濃度は10~20 mg/dl以下ということにはまず異論がない。

今日、広く使用されている試験紙法は半定量的という限界があるが、30~50 mg/dl以上のタンパク質尿に対しては原則として false negative をきたさないという事実、すなわち病的に増加した尿タンパク質量を示す対象者を見逃さないという点では十分に有用であった。腎にはっきりした変化(機能的、形態的)のある例では尿総タンパク質濃度が30~50 mg/dl以上となるというこ

ともまた事実だからである。

しかし、この半定性的試験紙法による尿検査では各種原因による腎病変の早期診断が困難であることは本文のはじめに述べたとおりである。

我々の研究により、健常者の1日尿総タンパク質排せつ量及び早朝尿総タンパク質濃度は従来の通説のとおりそれぞれ100~150 mg以下、10~20 mg/dl以下であることが確認され、また総タンパク質排せつ量は単なる加齢によっては増加しないこと、早朝尿総タンパク質濃度は一般の年少者と壮~老年者の間で差がなく、いずれの集団も対数正規分布をとることがはじめて明らかになった。

我々が明らかにしたこの新事実は、ある特定の間人集団について早朝尿総タンパク質濃度累積度数分布を観察したとき、対照となる健常者群の分布に対して図4のような右方転移を示している場合は当該人間集団になんらかの原因による腎障害が出現していることを意味することになる。

図4で右方転移を示している人間集団はカドミウム土壤汚染地域(長崎県敵原町佐須)の50~69歳の男子住民である。この住民の半数以上に近位尿細管機能障害が存在し、尿中に $\beta_2$ -マイクログロブリンなどの血漿低分子タンパク質が健常者の10~1,000倍量(数mg/dl)も排せつされていることを我々は確認している<sup>2,3)</sup>。

周知のように、腎障害時の尿中総タンパク質排せつ増加は2種類あり糸球体障害時はアルブミン増加が、尿細管障害時には $\beta_2$ -マイクログロブリンなどの低分子血漿タンパク質増加が本態である<sup>4)</sup>。

カドミウムなど重金属による腎障害は尿細管障害が本態であり、当然のことながら本報告集で別に述べたとおり尿 $\beta_2$ -マイクログロブリンなどの低分子タンパク質の測定が最も特異性が高い。しかしこの $\beta_2$ -マイクログロブリンほかの低分子タンパク質排せつ量の増加は総タンパク質量排せつ増加としてもとらえることは図4に示したとおりである。

トネイン-TP法による尿中総タンパク質量は極めて簡単な比色法であるのに対し、 $\beta_2$ -マイクログロブリンは放射免疫測定法であり、測定上の簡便さ、低コストという特色を前者は有している。

なんらかの腎障害性因子(重金属、薬剤、高血圧、糖尿病など)の関与が想定される人間集団の健康評価(腎障害発現の有無)に尿中総タンパク質測定は極めて有効であることを強調したい。

## 引用文献

- 1) 斎藤 寛 (1984): 産業医学に用いられる機能検査 3. 腎機能検査. 臨床検査, 28, 1479-1487.
- 2) 斎藤 寛 (1984): 地域検診による重金属汚染の分析とその指標. 衛生化学, 30, 9-11.
- 3) 中野篤浩・斎藤 寛・協阪一郎 (1985): カドミウム土壤汚染地域住民におけるカドミウムと $\beta_2$ -マイクログロブリンの尿中排せつに関する研究. 国立公害研究所報告, 第84号, 13-30.
- 4) 斎藤 寛 (1979): 尿細管性タンパク尿——その概念, 出現機構, 臨床的意義. 臨床病理, 36 (特集), 173-196.

## II-3 長崎県対馬カドミウム汚染地住民における血液検査成績

### Results of Blood Examinations of the Inhabitants in a Cadmium-Polluted Area in Nagasaki Prefecture

小林悦子<sup>1</sup>・杉平直子<sup>2</sup>・中野篤浩<sup>2</sup>・遠山千春<sup>2</sup>

三種裕子<sup>2</sup>・斎藤 寛<sup>2,3</sup>・脇阪一郎<sup>2</sup>

Etsuko KOBAYASHI<sup>1</sup>, NAOKO SUGIHIRA<sup>2</sup>, Atsuhiko NAKANO<sup>2</sup>  
Chiharu TOHYAMA<sup>2</sup>, Yuko MITANE<sup>2</sup>, Hiroshi SAITO<sup>2,3</sup>  
and Ichiro WAKISAKA<sup>2</sup>

#### 要 旨

長崎県対馬のカドミウム汚染地で、尿細管障害を生じている住民の血液所見の特徴を把握するために、50歳以上の住民285人(男119人、女166人)について血液検査を実施した。検査成績は尿 $\beta_2$ -マイクログロブリン排泄量の多寡によって、 $\beta_2$ -マイクログロブリン陽性群と陰性群に分けて観察した。結果は以下のとおりである。

1.  $\beta_2$ -マイクログロブリン陽性群の、特に女では、尿細管障害を反映して、カリウム、尿酸の低下、 $C_{\beta_2\text{-mg}}$  (%Ccr),  $C_{\text{UA}}$  (%Ccr)の上昇がみられた。また障害が糸球体にまで進行していることを示唆する成績として、 $\beta_2$ -マイクログロブリン、 $\alpha_1$ -マイクログロブリン、クレアチニンの上昇が得られた。さらにアルカリフォスファターゼの上昇、ストロンチウムの増加がみられ、骨代謝が亢進していることが推察された。

2. 女の $\beta_2$ -マイクログロブリン陽性群では、鉄の低下が観察され、鉄欠乏性貧血が生じている可能性が示唆された。

#### Abstract

Two hundreds and eighty five blood samples were collected from 119 men and 166 women aged 50 and over living in a Cd-polluted area in Nagasaki prefecture. They were analyzed for Na, K, Mg, Ca, P, Fe, Cu, Zn, Sr, total protein, albumin,  $\beta_2$ -microglobulin,  $\alpha_1$ -microglobulin, alkaline phosphatase, GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP, BUN, uric acid, creatinine, total cholesterol, free cholesterol and triglyceride.

1. 昭和57~59年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1982-1984).
2. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 現在:長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.

When subjects were divided to two groups based on a cutoff value of urinary  $\beta_2$ -microglobulin concentrations (1000  $\mu\text{g/g}$  creatinine), a group of female subjects whose urinary  $\beta_2$ -microglobulin were abnormally high ( $\beta_2$ -mg (+) groups) manifested lower levels of serum K and uric acid, and higher values of  $C_{\beta_2\text{-mg}}$  (% Ccr) and  $C_{\text{UA}}$  (%Ccr) than that of  $\beta_2$ -mg (-) groups. These findings reflect the renal tubular dysfunction observed particularly in female subjects.

The results that the levels of  $\beta_2$ -microglobulin,  $\alpha_1$ -microglobulin and creatinine in serum in  $\beta_2$ -mg (+) groups were also high may reflect renal dysfunction in the glomerulus which seemed to be caused secondarily by renal tubular dysfunction.

The levels of alkaline phosphatase and Sr in serum were increased in  $\beta_2$ -mg (+) groups, suggesting that the metabolism of bone was altered in the  $\beta_2$ -mg (+) groups.

Further, the Fe levels in serum were decreased in the women in  $\beta_2$ -mg (+) groups suggesting a possibility of the occurrence of an iron deficiency anemia.

## 1 はじめに

環境がカドミウム (以下 Cd) によって汚染されたとき、ヒトの健康被害として腎障害が発生することは、既によく知られている。Cd による腎障害は尿細管障害が特徴的とされ、タンパク尿特に低分子タンパク尿、糖尿、アミノ酸尿などがその所見としてあげられている<sup>1-3)</sup>。我々も、長崎県対馬の Cd 汚染地域の住民について調査し、50 歳以降の住民において、低分子タンパクの一つである  $\beta_2$ -マイクログロブリン (以下  $\beta_2$ -mg) の尿中排せつが増加していることを報告してきた<sup>4)</sup>。

一方、環境中 Cd 暴露による健康影響を多面的に把握するためには、尿所見のみでは十分とはいえず、理学的所見とともに、血液所見が非常に重要である。しかし血液を採取するには、被験者の多大な理解と協力が必要であり、尿の採取に比して困難である。Cd 汚染地域は日本各地に存在するが<sup>5)</sup>、住民の血液所見が報告されている例は非常に少ない。富山県神通川流域に発生したイタイタイ病 (以下イ病) 患者<sup>6-8)</sup>、及びその流域住民について<sup>9)</sup>と、骨軟化症患者の発生が報告されている<sup>10)</sup>、兵庫県市川流域の住民についての報告があるだけである<sup>11)</sup>。

今回我々は、前述の長崎県対馬の Cd 汚染地住民について、血液学的検索を実施することに成功したので、腎障害の認められる住民の血液所見の特徴を把握し、既報の Cd 汚染地における成績と比較検討し、その所見の意義を考えた。

## 2 調査方法

### 2.1 調査対象者及び受診者

長崎県対馬の Cd 汚染地域である厳原町の下原、樫根、小茂田、椎根の 4 部落に居住する 50 歳以上の全住民を対象とした。検診は 1982 年 5 月 29 日、30 日に実施した。受診者は 285 人 (男 119 人、女 166 人) で、受診率は 87.4% (男 85.7%、女 88.6%) であった。

## 2.2 尿の採取と分析方法

### 2.2.1 採尿

ポリエチレン容器を各家庭に配布し、検診当日の早朝尿をとってもらい、検診会場で回収した。回収した尿は直ちに測定項目別に、ポリエチレン試験管に小分けして凍結し（ $-20^{\circ}\text{C}$ ）、分析時まで保存した。 $\beta_2$ -mg 測定分には、 $\beta_2$ -mg の減少を防ぐために、凍結前にリン酸緩衝液（pH8.5）を滴下して pH をあげ、防腐剤としてアジ化ナトリウムを添加した。

### 2.2.2 検査項目と分析方法

クレチニン及び尿酸…自動分析計（東芝バイオケミカルアナライザー TBA-360）

$\beta_2$ -mg…Radioimmunoassay 法（以下 RIA 法）（ファルマシア）

## 2.3 血液の採取と分析方法

### 2.3.1 採血

検診会場で肘静脈より採血後、血清を分離し、用途別にポリエチレン小試験管に小分けしてドライアイスで凍結した後、冷凍庫に移して（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）分析時まで保存した。

### 2.3.2 検査項目と分析方法

カルシウム（以下 Ca）、無機リン、総タンパク、アルブミン、アルカリフォスファターゼ、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP、BUN、総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセライド…自動分析計（東芝バイオケミカルアナライザー TBA-580）

クレアチニン…自動分析計（東芝バイオケミカルアナライザー TBA-360）

$\beta_2$ -mg…RIA 法（ファルマシア）

$\alpha_1$ -マイクログロブリン（以下  $\alpha_1$ -mg）…Enzymeimmunoassay 法（富士レビオ）

ナトリウム（以下 Na）、カリウム（以下 K）…硝酸と過酸化水素水で湿式灰化後、EDTA 液さらに希硝酸で希釈して、原子吸光光度計（島津 AA-640-12）で測定した。

マグネシウム（以下 Mg）、鉄（以下 Fe）、銅（以下 Cu）、亜鉛（以下 Zn）、ストロンチウム（以下 Sr）…Na、K 測定用と同様の前処理を行い、ICP 発光分析計（Jarrell-Ash975）で測定した。

血清量の少ないものについては、分析を実施してない項目がある。したがって表 1、2 から分かるように、測定数は必ずしも一致していない。

## 2.4 統計検定

表 1 及び表 2 におけるグループ間の有意差の検定には、Student-t 検定（ただし分散に差のある場合は Welch の方法を用いた。）を行った。各グループにおける血清の測定項目の値は、必ずしも正規分布をしているとは限らないが、便宜的に正規分布をしているものとして取り扱った。した



表 1  $\beta_2$ -マイクログロブリン陽性群<sup>a)</sup>と陰性群における血液検査成績の比較  
(女, 年齢階級別)

Table 1 Comparison of blood findings of people excreting abnormally high concentrations of  $\beta_2$ -microglobulin<sup>a)</sup> and those excreting normal levels of  $\beta_2$ -microglobulin  
(Female)

Parameter	50 - 69 (y. o.)						70 (y. o.) -					
	$\beta_2$ -mg (-) group			$\beta_2$ -mg (+) group			$\beta_2$ -mg (-) group			$\beta_2$ -mg (+) group		
	N	M	S.D.	N	M	S.D.	N	M	S.D.	N	M	S.D.
Na (mg/l)	64	3292	69	20	3312	92	10	3298	81	24	3297	85
K (mg/l)	64	164	22	20	156 <sup>c)</sup>	15	10	168	17	24	165	20
Mg (mg/l)	64	20	1.4	20	20	3.1	10	21	1.3	24	21	1.7
Ca (mg/dl)	78	9.27	0.67	25	9.14	0.64	17	9.34	0.66	27	9.07	0.69
P (mg/dl)	78	3.67	0.47	25	3.54	0.54	17	3.54	0.52	27	3.30	0.55
Fe (mg/l)	64	0.88	0.29	20	0.69 <sup>d)</sup>	0.36	10	1.02	0.48	24	0.68 <sup>e)</sup>	0.28
Cu (mg/l)	64	0.98	0.14	20	1.01	0.17	10	1.00	0.15	24	1.06	0.22
Zn (mg/l)	64	0.71	0.11	20	0.64 <sup>e)</sup>	0.08	10	0.75	0.07	24	0.69 <sup>e)</sup>	0.09
Sr ( $\mu$ g/l)	63	22	10	20	31 <sup>d)</sup>	14	10	26	9	24	29	11
Total protein (g/dl)	78	6.88	0.58	25	6.64 <sup>e)</sup>	0.66	17	6.66	0.62	27	6.56	0.65
Albumin (g/dl)	78	4.38	0.37	25	4.23 <sup>e)</sup>	0.36	17	4.36	0.30	27	4.21	0.43
$\beta_2$ -microglobulin (mg/l)	78	1.72	0.51	25	2.05 <sup>e)</sup>	0.64	17	2.29	1.02	27	3.38 <sup>e)</sup>	1.52
$\alpha_1$ -microglobulin (mg/l)	77	12.99	3.63	24	15.33 <sup>e)</sup>	2.62	17	14.99	3.75	27	18.96 <sup>d)</sup>	6.64
Alkaline phosphatase (IU/l)	78	172	51	25	214 <sup>d)</sup>	86	17	207	55	27	244 <sup>e)</sup>	87
GOT (IU/l)	78	12.0	7.1	25	15.5 <sup>d)</sup>	6.5	17	14.5	7.0	27	11.4	4.2
GPT (IU/l)	76	8.5	7.9	25	10.2	6.3	17	9.3	6.7	26	5.3	2.9
$\gamma$ -GTP (IU/l)	78	12.0	6.6	25	12.5	4.9	17	10.9	4.6	27	10.9	5.1
BUN (mg/dl)	78	14.2	3.3	25	15.0	3.0	17	15.4	3.4	27	17.0	5.3
Uric acid (mg/dl)	78	3.78	1.19	25	3.22 <sup>e)</sup>	1.00	17	4.52	1.42	27	3.70 <sup>d)</sup>	1.08
Creatinine (mg/dl)	77	0.94	0.15	25	1.01 <sup>d)</sup>	0.16	16	1.02	0.27	27	1.27 <sup>d)</sup>	0.36
Total cholesterol (mg/dl)	78	197	45	25	187	43	17	192	29	27	190	51
Free cholesterol (mg/dl)	78	59	13	25	57	13	17	59	9	27	62	14
Triglyceride (mg/dl)	78	112	60	25	109	48	17	94	48	27	105	46
$C_{\beta_2\text{-mg}}$ (% $C_{Cr}$ ) <sup>b)</sup> (% $\times 100$ )	77	7.2	2.5	25	184.0 <sup>e)</sup>	3.0	16	9.5	2.5	27	784.0 <sup>e)</sup>	4.7
$C_{UA}$ (% $C_{Cr}$ ) (%)	77	21.6	8.6	25	29.9 <sup>e)</sup>	13.6	16	18.2	6.8	27	32.0 <sup>e)</sup>	13.4
Age (years old)	78	57.1	5.3	25	59.3 <sup>c)</sup>	4.7	17	73.8	4.6	27	77.4 <sup>d)</sup>	6.0

a) : 陽性レベル  $\beta_2$ -mg 1000 $\mu$ g/g クレアチニン

N : 検査人数

M : 平均値

S.D. : 標準偏差

b) : 幾何平均値と標準偏差

c) :  $\beta_2$ -mg(-)群と比較して有意差あり (p<0.10)

d) : 同上 (p<0.05)

e) : 同上 (p<0.01)

表 2  $\beta_2$ -マイクログロブリン陽性群<sup>a)</sup>と陰性群における血液検査成績の比較  
(男, 年齢階級別)

Table 2 Comparison of blood findings of people excreting abnormally high concentrations of  $\beta_2$ -microglobulin<sup>a)</sup> and those excreting normal levels of  $\beta_2$ -microglobulin  
(Male)

Parameter	50 - 69 (y. o.)						70 (y. o.) -					
	$\beta_2$ -mg (-) group			$\beta_2$ -mg (+) group			$\beta_2$ -mg (-) group			$\beta_2$ -mg (+) group		
	N	M	S.D.	N	M	S.D.	N	M	S.D.	N	M	S.D.
Na (mg/l)	47	3292	78	6	3243	81	12	3285	99	6	3270	97
K (mg/l)	47	168	18	6	172	20	12	157	21	6	170	18
Mg (mg/l)	47	19	1.6	6	19	1.0	12	19	2.0	6	19	0.4
Ca (mg/dl)	71	9.18	0.59	9	8.73 <sup>d)</sup>	0.78	15	8.97	0.41	7	8.79	0.56
P (mg/dl)	71	3.29	0.46	9	3.13	0.55	15	3.08	0.46	7	3.46	0.83
Fe (mg/l)	47	1.08	0.34	6	1.03	0.64	12	0.91	0.42	7	0.96	0.19
Cu (mg/l)	47	1.01	0.15	6	1.01	0.16	12	1.02	0.10	7	0.89	0.17
Zn (mg/l)	47	0.74	0.14	6	0.70	0.17	12	0.67	0.09	7	0.73	0.16
Sr ( $\mu$ g/l)	47	23	8.7	6	19	8.0	12	23	12.3	6	23	3.0
Total protein (g/dl)	71	6.70	0.56	9	6.47	0.54	15	6.55	0.42	7	6.49	0.55
Albumin (g/dl)	71	4.35	0.30	9	4.18	0.36	15	4.09	0.29	7	3.96	0.21
$\beta_2$ -microglobulin (mg/l)	70	1.69	0.51	9	2.11	1.05	13	2.23	0.57	7	3.91	3.90
$\alpha_2$ -microglobulin (mg/l)	68	13.88	2.95	9	17.29 <sup>d)</sup>	4.26	13	14.74	3.69	7	18.76	14.92
Alkaline phosphatase (IU/l)	71	168	51	9	156	45	15	178	61	7	165	44
GOT (IU/l)	71	15.9	11.6	9	21.0	8.6	15	11.9	4.6	7	15.7	9.1
GPT (IU/l)	71	9.7	6.2	9	9.8	5.9	15	7.5	5.3	7	7.9	5.3
$\gamma$ -GTP (IU/l)	71	43.8	109.8	9	26.2	24.2	15	15.9	6.5	7	20.1	18.0
BUN (mg/dl)	70	16.7	4.1	9	17.8	4.3	15	14.7	3.7	7	24.9	19.3
Uric acid (mg/dl)	71	5.36	1.69	9	3.90 <sup>d)</sup>	1.46	15	5.10	1.17	7	5.44	2.22
Creatinine (mg/dl)	69	1.11	0.16	9	1.34 <sup>e)</sup>	0.23	15	1.13	0.18	7	1.78	1.80
Total cholesterol (mg/dl)	71	179	36	9	172	39	15	174	32	7	172	17
Free cholesterol (mg/dl)	71	54	12	9	53	14	15	57	9	7	55	9
Triglyceride (mg/dl)	71	117	82	9	127	93	15	97	31	7	85	66
$C_{\beta_2\text{-mg}}$ (% $C_{Cr}$ ) <sup>b)</sup> (% $\times 100$ )	68	5.9	2.4	9	254.6 <sup>e)</sup>	4.0	13	9.2	2.7	7	132.8 <sup>e)</sup>	3.3
$C_{UA}$ (% $C_{Cr}$ ) (%)	69	16.5	6.6	9	28.9 <sup>d)</sup>	13.8	15	14.3	6.7	7	20.1 <sup>d)</sup>	7.5
Age (years old)	71	57.8	5.2	9	62.1 <sup>e)</sup>	4.9	15	75.9	4.5	7	76.7	3.1

a) : 陽性レベル  $\beta_2$ -mg 1000 $\mu$ g/g クレアチニン

N : 検査人数

M : 平均値

S. D. : 標準偏差

b) : 幾何平均値と標準偏差

c) :  $\beta_2$ -mg(-)群と比較して有意差あり (p<0.10)

d) : 同 上 (p<0.05)

e) : 同 上 (p<0.01)

がって成績の評価に際しては、その点を考慮する必要がある。尿  $\beta_2$ -mg 排せつは、明らかに対数正規分布をしていたので、 $C_{\beta_2\text{-mg}}$  (%Ccr) については、幾何平均値を用いた。

### 3 調査成績

血液検査成績を、尿  $\beta_2$ -mg 排せつの陰性者と陽性者に分けて、性、年齢別に比較検討した。尿  $\beta_2$ -mg の陽性レベルは  $1000\mu\text{g/g}$  クレアチニンとした。各検査項目の平均値と標準偏差を表 1 及び表 2 に示してある。

$\beta_2$ -mg 陽性群が  $\beta_2$ -mg 陰性群に比較して、有意に低い値を示したのは、女では K、総タンパク、アルブミン (以上は 50~69 歳)、GPT (70 歳以上)、Fe、Zn、尿酸 (以上は全年齢層) であり、男では Ca と尿酸 (両者とも 50~69 歳) であった。逆に  $\beta_2$ -mg 陽性群で有意に上昇していた項目は、女の Sr と GOT (両者とも 50~69 歳)、 $\beta_2$ -mg、 $\alpha_1$ -mg、アルカリフォスファターゼ、クレアチニン (以上は全年齢層) 及び男の  $\alpha_1$ -mg とクレアチニン (両者とも 50~69 歳) であった。

表 1 及び表 2 に付記した、 $\beta_2$ -mg クリアランス/クレアチニンクリアランス比 (以下  $C_{\beta_2\text{-mg}}$  (%Ccr)) 及び尿酸クリアランス/クレアチニンクリアランス比 (以下  $C_{\text{UA}}$  (%Ccr)) は、女では全年齢層で、男では 50~69 歳で  $\beta_2$ -mg 陽性群が有意に高い値を示した。

### 4 考察

我々は今回の調査成績を、尿  $\beta_2$ -mg 排せつの多寡によって (陽性レベルは  $1000\mu\text{g/g}$  クレアチニン)  $\beta_2$ -mg 陽性群と陰性群に分けて観察した。尿  $\beta_2$ -mg が環境中 Cd 暴露によって生ずる尿細管障害の鋭敏な指標であることは、既に明らかにされている<sup>12-14)</sup>。 $\beta_2$ -mg 陽性群のうち、 $\beta_2$ -mg 排せつ増加の程度が比較的軽度な人々については、その腎障害は可逆的な、一過性のものかもしれない。しかし検診時において  $\beta_2$ -mg 陽性群の住民は、陰性群に比べて相対的に尿細管機能に異常をきたしていたとみなすことは、十分妥当性があると考えた。

環境中 Cd 汚染者の血液生化学的所見について報告されたものなかで、腎障害を反映している成績を抜粋すると、まず初期の頃のイ病患者に関する中川<sup>6)</sup>、武内ら<sup>7)</sup>の報告がある。中川は 10 人のイ病患者について検査した結果、高クロル血症性のアンドーシスと低カリウム血症を報告している。4 名のイ病患者について検索した武内らは、低カリウム血症を除いて同様の成績を得ており、両者とも、イ病患者の腎障害は尿細管性の障害であるとしている。近年のイ病患者については、能川らが 40 人を検査して、その腎障害が尿細管のみでなく、糸球体にも及んでいることを報告している<sup>8)</sup>。すなわち、尿細管障害を反映する K、尿酸の低下のほか、糸球体障害を示唆する尿素窒素、クレアチニンの上昇を観察している。また能川らは、兵庫県市川流域の 50 歳以上の女 26 人について調査した結果、尿中の低分子タンパクの一つである Retinol Binding Protein (以下 RBP) 陽性者で Cl、尿素窒素、クレアチニンの上昇などの同様の成績を得ている<sup>11)</sup>。今回我々が調査した対馬の Cd 汚染地住民においても、 $\beta_2$ -mg 陽性群の、特に女ではその血液所見は基本的に上述の

報告に一致するものであった。尿細管再吸収障害を反映してK, 尿酸の低下,  $C_{\beta_2\text{-mg}}$  (%Ccr),  $C_{\text{UA}}$  (%Ccr) の上昇がみられ, また糸球体障害を示唆する成績として,  $\beta_2\text{-mg}$ ,  $\alpha_1\text{-mg}$ , クレアチニンの上昇が認められた。

骨代謝に関連した血液所見としては, イ病患者については中川<sup>9)</sup>, 武内ら<sup>7)</sup>, 能川ら<sup>8)</sup>ともに, 無機リンの低下とアルカリフォスファターゼの上昇を報告している。またイ病患者が発生した神通川流域の住民約 6000 人について疫学調査を行った福島らは, レ線骨所見のみられなかった発生地住民のうち, 尿 (タンパク・糖) 陽性者で同様の傾向があることを認めている<sup>9)</sup>。能川らは市川流域の住民でも, RBP 陽性者ではCa, 無機リンの低下, アルカリフォスファターゼの上昇を観察している<sup>11)</sup>。すなわち, イ病患者を含めたCd汚染地住民で, 腎障害の重篤な者は, 血液生化学的意味での骨軟化症傾向を有していることが示唆されている。今回の対馬の住民においては, 女の $\beta_2\text{-mg}$ 陽性群では陰性群に比して, 全年齢層でアルカリフォスファターゼの上昇が認められた。しかしCaや無機リンの低下はみられず, 上記の報告されているCd汚染地住民の, 骨変化に関連した項目の成績とは, 程度に差があるように思われた。今回の我々の得た血液所見をもとに, 骨代謝の状態を推測してみると, まず骨代謝の亢進が考えられる。それは血清Sr濃度の上昇(50~69歳のみ有意差)で示唆される。Srは体内での動態がCaによく似ているとされている<sup>15)</sup>。その放射性同位元素が骨スキャンの骨検索子として用いられていることから分かるように, 骨ハイドロキシアパタイト中の結晶格子内に入ることができ, 結晶内のCaイオンと置換できる。すなわちSrは骨蓄積性が極めて高いので, 対馬の女の $\beta_2\text{-mg}$ 陽性群で, 血清中に増加しているSrは, 骨由来であることが考えられる。血清Caの恒常性維持の機構が働く過程で,  $\beta_2\text{-mg}$ 陽性群では陰性群に比較して, より多くの骨Caが動員され, それに付随して骨Srも血中に流出し, 血清濃度が上昇したのではないかと推察される。次に血清アルカリフォスファターゼの上昇から, 女の $\beta_2\text{-mg}$ 陽性群では, 骨の石灰化が陰性群よりも不十分であると考えられる。しかしはじめに述べたように, 血清Caの低下は認められないので, その程度は軽いものであろう。

対馬の住民におけるその他の特徴的血液検査成績としては, 女の $\beta_2\text{-mg}$ 陽性群でFeの低下が観察され, 鉄欠乏性貧血が生じている可能性が示唆された。Cd暴露により貧血が生ずることは, 人間においても<sup>16-20)</sup>, 動物実験によっても<sup>21-33)</sup>観察されている。Cd作業員についての土屋の報告でみられる貧血は<sup>20)</sup>, 小球性低色素性貧血に相当するようと思われる。そしてその貧血状態は, Cd暴露減少後ほぼ正常にまで回復したとされている。イ病患者については, 中川は初期の頃の臨床所見についての報告の中で, 赤血球数とヘモグロビン量の減少を観察し, ビタミンD治療により貧血状態は次第に改善したとしている<sup>9)</sup>。これは骨折の治癒や痛みの緩和により, 食欲が回復して栄養状態が改善されたことによるのではないかと推測される。一方能川らは, 現在のイ病患者の貧血は鉄欠乏性のもととは異なり, 正球性正色素性貧血であり, 有効な治療が困難であると報告している<sup>34)</sup>。初期の頃のイ病患者では, Cd経口摂取により, 腸管からの鉄吸収障害による鉄欠乏を主体とした貧血が生じ, それはビタミンD治療や, ビタミンC, 鉄剤の投薬により改善可能であっ

た。腎障害がさらに進行するとともに、造血因子に関与するといわれるエリスロポエチンの産生が低下し、改善の困難な腎性貧血が発症したと考えると、イ病患者の貧血に関する両者の観察結果の相違を、かなり説明できるように思われる。今回の対馬の成績は、前者の場合に一致するように思われるが、正確な実態を明らかにするには、貧血に関する調査が必要であろう。

以上のように、長崎県対馬のCd汚染地住民について、尿検査に加えて血液検査を実施した結果、尿所見から尿細管障害が起こっていると思われる人々には、糸球体障害も認められ、また女では骨代謝の亢進、鉄欠乏性貧血が生じている可能性が示唆された。これらの血液所見を、他のCd汚染地住民特にイ病患者の所見と比較することで、類似点と相違点が明らかになり、対馬の住民のCd暴露による健康影響を把握するうえで、有用であったと考えられた。

## 引用文献

- 1) Saito H., R. Shioji, Y. Furukawa, K. Nagai, T. Arikawa, T. Saito, Y. Sasaki, T. Furuyama and K. Yoshinaga (1977) : Cadmium-induced proximal tubular dysfunction in a cadmium-polluted area. *Contr. Nephrol.*, **6**, 1-12.
- 2) 能川浩二・小林悦子・本多隆文・石崎有信 (1979) : 慢性カドミウム中毒の臨床化学的研究 (第1報) 尿検査成績. *日本衛生学雑誌*, **32**, 407-414.
- 3) 小林悦子 (1982) : 環境中カドミウムの人体影響に関する疫学的研究 (第1報) 性, 年齢別尿検査成績. *日本公衆衛生学雑誌*, **29**, 123-133.
- 4) 斎藤 寛・中野篤浩・杉平直子・三種裕子・脇阪一郎 (1981) : カドミウム土壌汚染地域住民の健康調査 (1979-1980年度の成績). *環境保健レポート*, (47), 173-174.
- 5) 山本宣正 (1972) : カドミウム環境汚染の現状. *環境保健レポート*, (11), 7-12.
- 6) 中川昭忠 (1960) : 富山県に発生した骨軟化症の研究 (所謂いたいたい病). *金沢医理学叢書*, **56**, 1-56.
- 7) 武内重五郎・篠田 晤・小林一到・中本 安・高沢 至・黒崎正夫 (1963) : イタイイタイ病の腎障害. *内科*, **21**, 876-884.
- 8) 能川浩二・小林悦子・石崎有信 (1979) : 慢性カドミウム中毒の臨床化学的研究 (第2報) 血液検査成績. *日本衛生学雑誌*, **34**, 415-419.
- 9) 福島匡昭・石崎有信・坂元倫子・能川浩二・小林悦子 (1975) : イタイイタイ病発生地住民の腎障害に関する疫学的研究 (第2報) 精検査の尿異常所見とCd排せつの居住地及び診断との関係に関する観察. *日本公衆衛生学雑誌*, **22**, 217-224.
- 10) Nogawa K., A. Ishizaki, M. Fukushima, I. Shibata and N. Hagino (1975) : Studies on the women with acquired Fanconi syndrome observed in the Ichi river basin polluted by cadmium (Is this Itai-itai disease?). *Environ. Res.*, **10**, 280-307.
- 11) 能川浩二・石崎有信・小林悦子・稲岡宏美 (1975) : 兵庫県市川流域のCd汚染地住民の腎障害に関する研究. *日本衛生学雑誌*, **30**, 549-555.
- 12) 斎藤 寛 (1974) : 慢性カドミウム中毒—とくに慢性カドミウム腎症の診断について—. *東北医学雑誌*, **87**, 36-42.
- 13) 永井謙一・斎藤 寛・有川 卓・斎藤喬雄・古川洋太郎・塩路隆治・古山 隆・吉永 馨 (1977) : カドミウム環境汚染地域住民に認められた $\beta_2$ -microglobulinuria (カドミウム環境汚染による健康障害

- の指標として)。日本腎臓学会誌, **19**, 1-11.
- 14) 小林悦子 (1982) : 環境中カドミウムの人体影響に関する疫学的研究 (第2報) Cd 汚染地居住期間別尿所見. 日本公衆衛生学雑誌, **29**, 201-207.
  - 15) Jowsey, J. (1977) : *Metabolic diseases of bone*. W. B. Sanders Company.
  - 16) Princi, F. (1947) : A study of industrial exposures to cadmium. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **29**, 315-320.
  - 17) Friberg, L. (1950) : Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med. Scand.*, **138** (Suppl. 240), 1-124.
  - 18) Tsuchiya, K. (1967) : Proteinuria of workers exposed to cadmium fume. *Arch. Environ. Health*, **14**, 875-880.
  - 19) Lauwerys, R., J. P. Buchet, H. A. Roels, J. Brouwers and D. Stanescu (1974) : Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. *Arch. Environ. Health*, **28**, 145-148.
  - 20) Tsuchiya, K. (1976) : Proteinuria of cadmium workers. *J. Occup. Med.*, **18**, 463-466.
  - 21) Friberg, L. (1955) : Iron and liver administration in chronic cadmium poisoning and studies of the distribution and excretion of cadmium. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **11**, 168-178.
  - 22) Decker, L. E., R. U. Byerrum, C. F. Decker, C. A. Hoppert and R. F. Langham (1958) : Chronic toxicity studies. 1. Cadmium administered in drinking water to rats. *A. M. A. Arch. Ind. Health*, **18**, 228-231.
  - 23) Berlin, M. and L. Friberg (1960) : Bone-marrow activity and erythrocyte destruction in chronic cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health*, **1**, 478-486.
  - 24) Barlin, M. and M. Piscator (1961) : Blood volume in normal and cadmium poisoned rabbits. *Arch. Environ. Health*, **2**, 576-583.
  - 25) Axelsson, B. and M. Piscator (1966) : Serum proteins in cadmium poisoned rabbits. *Arch. Environ. Health*, **12**, 374-381.
  - 26) Piscator, M. and B. Axelsson (1970) : Serum proteins and Kidney function after exposure to cadmium. *Arch. Environ. Health*, **21**, 604-608.
  - 27) Fox, M. R. S. and B. E. Fry Jr. (1970) : Cadmium toxicity decreased by dietary ascorbic acid supplements. *Science*, **169**, 989-991.
  - 28) Fox, M. R. S., B. E. Fry Jr., B. E. Harland, M. E. Schertel and C. E. Weeks (1971) : Effects of ascorbic acid on cadmium toxicity in the young coturnix. *J. Nutr.*, **101**, 1295-1306.
  - 29) Pond, W. G. and E. F. Walker (1972) : Cadmium-induced anemia in growing rats, Prevention by oral or parenteral iron. *Nutr. Rep. Int.*, **5**, 365-370.
  - 30) Itokawa, Y., T. Abe, and S. Tanaka (1974) : Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health*, **28**, 149-154.
  - 31) Stowe, H. D., R. A. Goyer and P. Medley (1974) : Influence of dietary pyridoxine on cadmium toxicity in rats. *Arch. Environ. Health*, **28**, 209-216.
  - 32) Popescu, G. and F. Popescu (1978) : The effect of body protein supply on resistance to cadmium. *Br. J. Ind. Med.*, **35**, 154-160.
  - 33) Sjöbeck, M. and A. Larsson (1978) : The effect of cadmium on the hematology and on the activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in blood and hematopoietic tissues of the flounder, *Pleuronectes flesus* L. *Environ. Res.*, **17**, 191-204.
  - 34) 能川浩二・小林悦子・石崎有信・加藤孝之・金森ちえ子 (1979) : 慢性カドミウム中毒の臨床化学的研究(3)貧血. 日本衛生学雑誌, **34**, 574-579.

II-4 カドミウム汚染地域住民における N-アセチル-  
 $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ排泄増加の意義

Significance of Increased Urinary Excretion of  
N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase in People Living  
in a Cadmium-Polluted Area

杉平直子<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>1,2</sup>・小林悦子<sup>3</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Naoko SUGIHIRA<sup>1</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,2</sup>, Etsuko KOBAYASHI<sup>3</sup>  
and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

要 旨

N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ (NAG) は、腎尿細管上皮細胞に局在するライソソーム酵素のひとつであり、尿細管損傷によってその尿中排泄が増加することが知られている。

今回は、カドミウム (Cd) 汚染地域である長崎県敵原町住民及び茨城県内の非汚染地域住民の尿中 NAG 活性を測定し、その意義について検討した。

結果は次のとおりである。

1. 非汚染地域住民の尿中 NAG 活性の分布は対数正規分布に近似できた。非汚染地域住民の尿中 NAG 活性の対数正規確率図から尿中 NAG 活性の正常上限値を求めた。
2. Cd 汚染地域住民の尿中 NAG 活性は、40 歳以上のすべての年齢階級で、非汚染地域住民に比べ高値を示した。
3. Cd 汚染地域住民の尿中 NAG 活性は、Cd 暴露の程度を反映すると思われる尿中 Cd 濃度と有意の相関関係が認められた。
4. Cd 汚染地域住民の尿中 NAG は年齢とともに直線的に増加した。
5. Cd 汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン ( $\beta_2$ -mg) 濃度と尿中 NAG 活性との間には有意の相関関係が得られたが、 $\beta_2$ -mg 濃度が正常であるのに NAG 活性が正常上限値以上の被験者が見られ、その大部分は 50 歳代であった。

以上のことから、尿中 NAG 活性は Cd 暴露による尿細管損傷を反映する鋭敏な指標であることが示唆された。

- 
1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 現在：長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町 12 番 4  
Present address : Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.
  3. 昭和 57~59 年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1982-1984).

### Abstract

N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) is one of the enzymes which are known to localize in lysosomes of the proximal tubular epithelial cells. It has been reported that urinary excretion of NAG increases due to renal tubular injury.

In the present study urinary activity of NAG of people in a cadmium (Cd)-polluted area, Izuhara, Nagasaki prefecture, and in non-polluted areas in Ibaraki prefecture was determined and its significance was studied.

The results obtained were follows :

1. The frequency distribution of urinary NAG activity of people in the non-polluted areas showed close proximity of log-normal distribution. Upper limits of normal activity of urinary NAG were determined from log-normal probability plots of urinary NAG activity of people in the non-polluted areas.

2. On a group basis, people living in the Cd-polluted area excreted increased amounts of urinary NAG compared with those of people living in the non-polluted areas in all age classes over 40 years old.

3. The urinary NAG activity in people living in the Cd-polluted area showed a significant correlation with their urinary Cd concentration that is considered to reflect the extent of Cd-exposure.

4. The urinary NAG activity of people living in the Cd-polluted area tended to increase linearly with age.

5. Although a significant correlation was obtained between urinary  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -mg) concentration and urinary NAG activity, there were some subjects who excrete normal concentration of  $\beta_2$ -mg but abnormally high activity of NAG, and most of them belong to a age group of 50-59 years old.

These results support the supposition that the urinary NAG activity is a sensitive indicator which reflects the extent of proximal tubular injury due to Cd.

### 1 はじめに

富山県神通川流域をはじめとするカドミウム（以下 Cd と略す）土壌汚染地域に居住し、食物を通して長年にわたり Cd の大量摂取を続けてきたと考えられる住民の多くには、近位尿細管障害が認められている<sup>1)</sup>。Cd 汚染による尿細管障害の指標としては、タンパク尿、アミノ酸尿、腎性糖尿、またリン酸再吸収率の低下などが用いられているが、特に低分子タンパク質である  $\beta_2$ -マイクログロブリン（以下  $\beta_2$ -mg）の尿中排せつ増加は、Cd による尿細管機能障害を表す鋭敏な指標とされ、Cd 土壌汚染地域住民の健康調査に応用されている<sup>2,3)</sup>。

一方、尿中には種々の酵素が存在するが、そのうちのひとつ、N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミナーゼ (NAG) は、近位尿細管上皮細胞に多く含まれるグリコシダーゼのひとつである。尿中 NAG 活性は、尿細管損傷との関連で最近注目されており、慢性糸球体腎炎や本態性高血圧などの原発性あるいは続発性腎疾患の重症度の判定<sup>4,5)</sup>、また薬物の腎毒性の指標<sup>6)</sup>として数多く報告されてい



る。しかし、Cdなどの重金属の健康影響の指標としての尿中NAG活性の検討は、イタイイタイ病患者<sup>7)</sup>、Cd暴露作業<sup>8)</sup>等の限られた集団について報告がなされている程度である。

そこで我々は、Cd汚染による尿細管損傷の指標として尿中NAGに着目し、Cd土壌汚染地域住民の悉皆調査において尿中NAG活性を測定した。非汚染地域住民の尿中NAG活性との比較、及び尿中Cd濃度との関係、さらに排せつ機構の異なる $\beta_2$ -mgの尿中濃度との関係について検討を加え、指標としての尿中NAGの有用性を検討したので報告する。

## 2 対象と方法

Cd土壌汚染地域である長崎県対馬厳原町檜根地区5歳以上の住民及び同町下原、小茂田、椎根地区50歳以上の住民合計316人（男性136人、女性180人、対象者総数の93%）より尿を採取し、分析に供した。また対照として、Cd汚染の認められない茨城県協和町40歳以上の住民並びに国立公害研究所勤務者、茨城県内の某中学校3年生合計298人（15歳～79歳、男性158人、女性140人）より尿を採取した（表1）。

採取した尿の一部はリン酸緩衝液（pH 8.5）を添加し、pHを6以上に調整したのち、 $\beta_2$ -mg測定まで凍結保存（-20°C）した。尿の残りは二つに分け、いずれも凍結保存（-20°C）し、一方はNAG、クレアチニンの分析に、他方はCd濃度の分析に供した。

尿中NAG活性は、尿中NAG活性測定試薬「NAGテストシオノギ」（塩野義製薬）を用い、東芝生化学分析装置TBA-360で測定した。尿中 $\beta_2$ -mg濃度は、ラジオイムノアッセイ法（ $\beta_2$ -マイクロテスト、ファルマンア）で、尿中Cd濃度は、尿を濃硝酸、過酸化水素水で湿式灰化したの

表 1 分析対象者数  
Table 1 Number of subjects

Age	Male		Female	
	Ibaraki	Nagasaki	Ibaraki	Nagasaki
- 9	-	5	-	4
10-19	16	5	14	4
20-29	24	3	4	6
30-39	10	11	3	8
40-49	38	2	35	4
50-59	30	54	32	67
60-69	27	32	35	40
70-79	13	19	17	33
80-	-	5	-	14
Total	158	136	140	180

ち、偏光ゼーマン原子吸光光度計（日立 180-70 形）を用いて測定した。また尿中クレアチニン濃度は、Jaffè (rate) 法により、東芝生化学分析装置 TBA-360 で測定した。尿中 NAG 活性、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度、及び尿中 Cd 濃度は、尿中クレアチニン 1g 当たりの比として求めた。

なお、データの統計学的解析には、分散分析及び t 検定を用いた。

### 3 結果

#### 3.1 非汚染地域住民の尿中 NAG 活性

非汚染地域である茨城県住民の尿中 NAG 活性の幾何平均値を年齢階級別に表 2 に示した。茨城県住民の尿中 NAG 活性は、男女ともに 10 歳代から 50 歳代までは各年齢階級の間には有意差が認められず、また 60 歳代と 70 歳代との間に有意差はなかった。一方男女ともに 60 歳未満と 60 歳以上の両グループの間には有意差が得られた。このことから 60 歳未満と 60 歳以上の 2 群について男女別に検討した。男性の 60 歳未満、60 歳以上（図 1-a）、女性の 60 歳未満、60 歳以上（図 1-b）についてそれぞれ一人一人の尿中 NAG 活性を対数正規確率紙にプロットした。図 1-a, b のいずれの図もほぼ直線を示し、尿中 NAG 活性の分布は対数正規分布に近似できた。図 1-a, b の各図から 95 パーセンタイル値を求め、正常上限値とした。60 歳未満の男性は 4.9、女性は 4.5、60 歳以上の男性は 9.0、女性は 8.8 U/g クレアチニンという値が求められた（表 3）。なお、分布形からはずれた低い値は、95 パーセンタイル値に影響を及ぼさなかった。

表 2 非汚染地域住民の尿中 NAG 活性と尿中  $\beta_2$ -mg 濃度  
Table 2 Urinary NAG activity and urinary  $\beta_2$ -mg concentration of people in non-polluted areas

Age	N <sup>1)</sup>	Male				Female				
		NAG (U/g cr.)		$\beta_2$ -mg ( $\mu$ g/g cr.)		NAG (U/g cr.)		$\beta_2$ -mg ( $\mu$ g/g cr.)		
		Geometric mean	Range	Geometric mean	Range	Geometric mean	Range	Geometric mean	Range	
10-19	16	2.0	1.0- 5.5	-	-	14	1.8	1.4- 3.0	-	-
20-29	24	2.2	1.0- 4.3	51	7- 111	4	2.8	1.5- 4.4	132	43-364
30-39	10	2.3	1.5- 3.7	140	61- 397	3	3.4	2.1- 5.2	50	14-116
40-49	38	1.9	0.3- 9.8	105	15- 357	35	2.1	0.1- 4.7	89	18-686
50-59	30	2.4	0.6- 8.1	82	9- 634	32	2.6	0.7- 7.9	98	17-300
60-69	27	3.4	0.3-10.3	83	11-1582	35	3.4	0.8-12.4	61	16-759
70-79	13	4.3	2.4- 7.1	89	15-1097	17	3.6	1.1-12.7	110	18-877

注 1) 分析対象者数

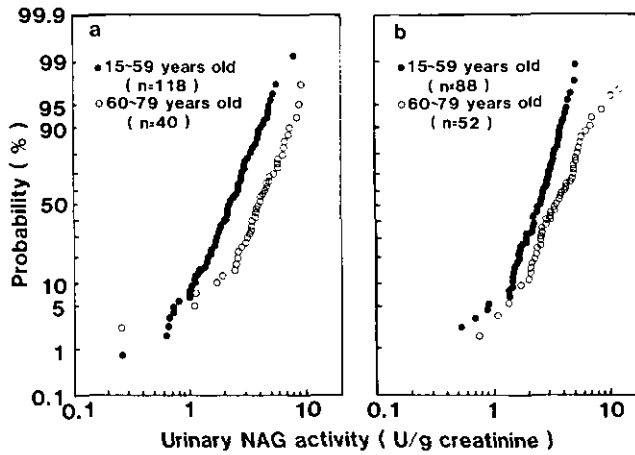


図 1 非汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における尿中 NAG 活性の対数正規確率図  
 Fig. 1 Log-normal probability plot of urinary NAG activity of male (a) and female (b) subjects in non-polluted areas

表 3 尿中 NAG 活性の正常上限値  
 Table 3 Upper limit of normal activity of urinary NAG

Age	Male	Female
	U/g cr.	U/g cr.
10-59	4.9	4.5
60-79	9.0	8.8

### 3.2 非汚染地域住民の尿中 $\beta_2$ -mg 濃度

非汚染地域である茨城県住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の幾何平均値を年齢階級別に表 2 に示した。ただし、10 歳代については  $\beta_2$ -mg 濃度を測定していない。茨城県住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度は男性では、20 歳代と 30 歳以上の両グループの間に有意差が見られ、30 歳以上では各年齢階級の間にも有意差が認められなかった。30 歳未満と 30 歳以上の 2 群について、尿中 NAG 活性の場合と同様にして 95 パーセンタイル値を求め正常上限値とした。女性では 20 歳代から 70 歳代まで各年齢階級の間にも有意差が認められなかった。20 歳以上全員をまとめ 95 パーセンタイル値を求めて正常上限値とした。尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の正常上限値は、男性では 20 歳代が 94、30 歳以上が 470  $\mu\text{g/g}$  クレアチニン、女性では 20 歳以上で 357  $\mu\text{g/g}$  クレアチニンと求められた (表 4)。

表 4 尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の正常上限値

Table 4 Upper limit of normal value of urinary  $\beta_2$ -mg

Male		Female	
Age	$\mu\text{g/g cr.}$	Age	$\mu\text{g/g cr.}$
20-29	94	20-79	357
30-79	470		

3.3 Cd 汚染地域住民と非汚染地域住民の尿中 NAG 活性の比較

Cd 汚染地域である長崎県厳原町住民と、非汚染地域である茨城県住民の年齢階級別平均尿中 NAG 活性をプロットしたのが図 2 である。男性では、40 歳以上のすべての年齢階級で厳原町住民が茨城県住民に比して高値を示し、50 歳代で両者の間に有意差が認められた (図 2-a), ( $p < 0.01$ )。女性においても、40 歳以上のすべての年齢階級で厳原町住民が茨城県住民に比して高値を示したが、その差は男性よりも顕著であり、40 歳以上すべての年齢階級で両者の値に有意差が認められた (図 2-b,  $p < 0.05$  ないし  $p < 0.001$ )。

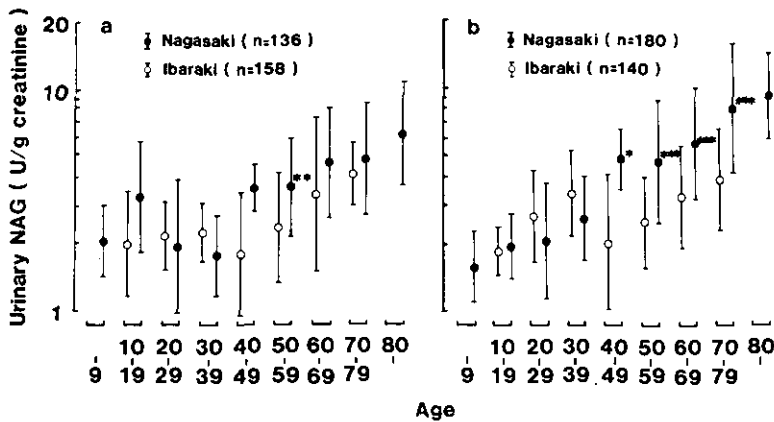


図 2 Cd 汚染地域と非汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における尿中 NAG 活性

Fig. 2 Urinary NAG activity of male (a) and female (b) subjects in Cd-polluted and non-polluted areas

図中の●及び○は、幾何平均値±標準偏差値を表す。\*非汚染地域住民の活性に対して  $p < 0.05$  で有意差が認められる。\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  で同様に有意差が認められる。

### 3.4 Cd 汚染地域住民における尿中 Cd 濃度と尿中 NAG 活性との関係

敵原町住民の尿中 Cd 濃度と尿中 NAG 活性との関係を図 3 に示した。男性 (図 3-a) では相関係数 0.362 ( $n=136$ ) で、女性 (図 3-b) では相関係数 0.537 ( $n=180$ ) であり、男女ともに  $p < 0.001$  で有意の相関関係が得られた。

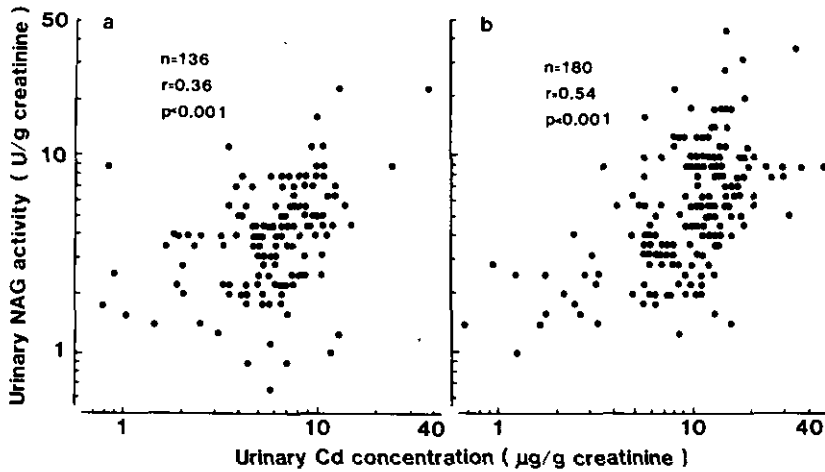


図 3 Cd 汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における尿中 Cd 濃度と尿中 NAG 活性との関係

Fig. 3 Relationship between urinary Cd concentration and urinary NAG activity of male (a) and female (b) subjects in a Cd-polluted area

### 3.5 Cd 汚染地域住民における年齢と尿中 NAG 活性との関係

敵原町住民の年齢と尿中 NAG 活性との関係を図 4 に示した。男性の場合は、両者の間に相関係数 0.420 ( $n=136$ ),  $p < 0.001$  の有意の相関が得られたが、ほぼ 50 歳くらいまでは上昇の傾向はなく、50 歳を過ぎる頃から加齢とともに増加していた (図 4-a)。それに比べて女性では、尿中 NAG 活性は若年層から高年層へと加齢とともに直線的に上昇し、相関係数も 0.588 ( $n=180$ ) と高く、 $p < 0.001$  で有意の相関関係が認められた (図 4-b)。

### 3.6 Cd 汚染地域住民における年齢と尿中 $\beta_2$ -mg 濃度との関係

敵原町住民の年齢と尿中  $\beta_2$ -mg 濃度との関係を図 5-a, b に示した。男性は相関係数 0.288 ( $n=136$ ,  $p < 0.01$ ), 女性は相関係数 0.533 ( $n=180$ ,  $p < 0.001$ ) でいずれも有意の相関が得られた。しかし、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度は男女とも 50 歳くらいまでは正常範囲内で、50 歳を過ぎた頃から急激に異常値が増加していた。この尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の推移は、尿中 NAG 活性が女性の場合加齢とともに直線的に増加したのと対照的であった。

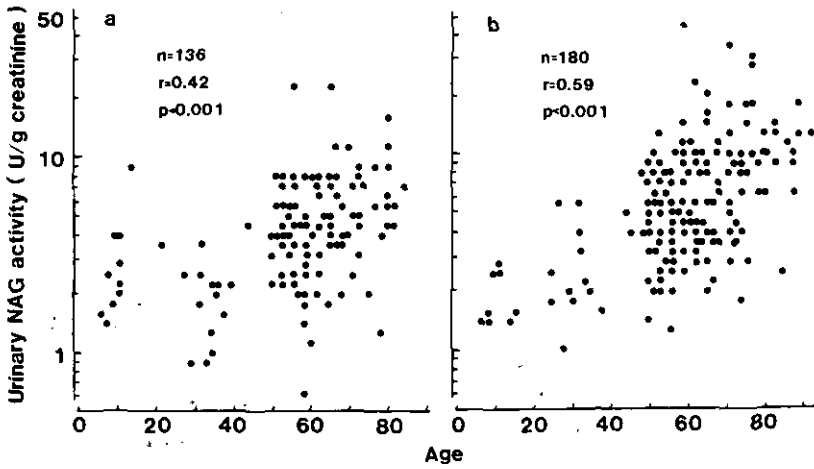


図 4 Cd 汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における年齢と尿中 NAG 活性との関係  
Fig. 4 Relationship between age and urinary NAG activity of male (a) and female (b) subjects in a Cd-polluted area

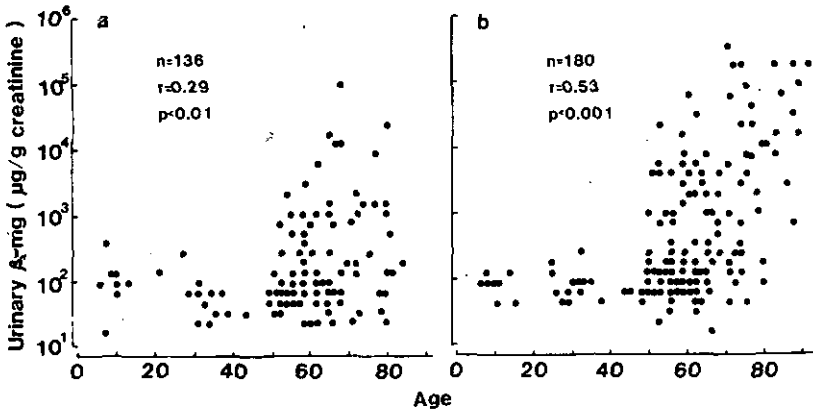


図 5 Cd 汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における年齢と尿中  $\beta_2$ -mg 濃度との関係  
Fig. 5 Relationship between age and urinary  $\beta_2$ -mg concentration of male (a) and female (b) subjects in a Cd-polluted area

### 3.7 Cd 汚染地域住民における尿中 $\beta_2$ -mg 濃度と尿中 NAG 活性との関係

蔽原町住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度と尿中 NAG 活性との関係を図 6-a, b に示した。相関係数は、男性 0.371 ( $n=136$ )、女性 0.624 ( $n=180$ ) で、男女ともに  $p<0.001$  で有意の相関関係が得られた。図中破線は、茨城県住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度から求めた正常上限値（男性 30 歳以上：470  $\mu\text{g/g}$  クレアチニン、女性 20 歳以上：357  $\mu\text{g/g}$  クレアチニン、表 4）と尿中 NAG 活性の 60 歳未満、60 歳以上の正常上限値（男性 60 歳未満：4.9 U/g クレアチニン、60 歳以上：9.0 U/g クレアチニン、女性 60 歳未満：4.5 U/g クレアチニン、60 歳以上：8.8 U/g クレアチニン、表 3）を示している。男女とも 40 歳代までの若年層はほとんど、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度、尿中 NAG 活性ともに正常範囲内にあり、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度、尿中 NAG 活性とも正常上限値以上の者は大部分が 60 歳以上であった。女性においては、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度が正常上限値以下であるのに尿中 NAG 活性が正常上限値以上であるような被験者が多く存在し、そのうちの大部分が 50 歳代であった。また男性においても、女性ほど顕著ではないが同様の傾向が見られた。

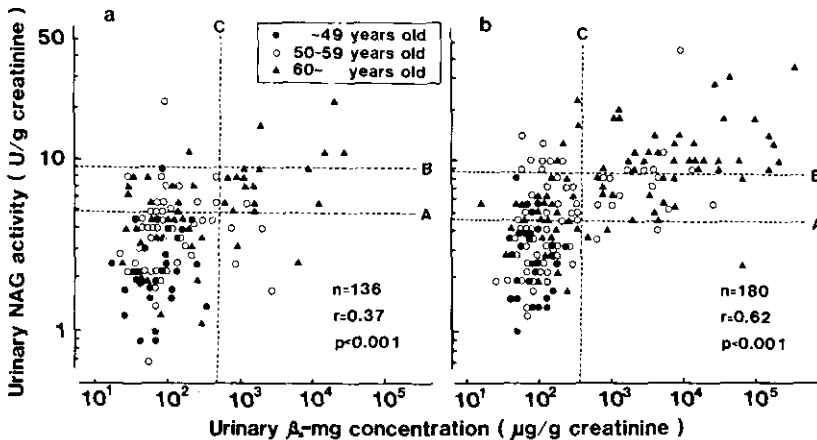


図 6 Cd 汚染地域の男性 (a) 及び女性 (b) 住民における尿中  $\beta_2$ -mg 濃度と尿中 NAG 活性との関係

Fig. 6 Relationship between urinary  $\beta_2$ -mg concentration and urinary NAG activity of male (a) and female (b) subjects in a Cd-polluted area

破線 A と B は、10 歳から 59 歳まで (A) と、60 歳から 79 歳まで (B) の尿中 NAG 活性の正常上限値を表す。破線 C は、男性で 30 歳から 79 歳まで、女性では 20 歳から 79 歳までの尿中  $\beta_2$ -mg 濃度の正常上限値を表す。

## 4 考 察

尿中には種々の酵素が含まれ、それらは血漿由来のものと腎組織由来のものに大別できる<sup>9)</sup>。今回測定した NAG は、近位尿管上皮細胞に多く存在するライソソーム酵素であり、分子量が約 12

万と大きく、通常は糸球体基底膜を通過しないこと<sup>10)</sup>、また血清と尿中におけるアインザイムに差が見られること<sup>11)</sup>から尿中 NAG の由来は腎組織であると考えられている。尿中 NAG 活性は、各種腎疾患の重症度や活動性の診断の指標<sup>4,9,12)</sup>、腎移植後の拒絶反応の早期発見の指標<sup>13,14)</sup>、またアミノグリコシド系抗生剤やアスピリン等薬剤による腎毒性の指標<sup>6,15,16)</sup>として、その有用性についての報告は数多い。NAG は、尿細管細胞損傷時に腎組織から尿中に逸脱してくると考えられている<sup>10)</sup>。また Pierce ら<sup>17)</sup>は、ラットに Cd を連続投与し、尿中への Cd の排せつ増加に伴って NAG の尿中排せつが上昇したと報告している。そこで本研究では、Cd による尿細管細胞損傷の指標として、尿中 NAG 活性を Cd 汚染地域住民の健康調査に応用することを検討した。

日本人の尿中 NAG 活性の正常レベルの設定は、多くの研究者によってなされているが、例数が不十分であったり、算術平均から求めている場合が多いため、値がまちまちである。本研究では、Cd 汚染の認められない茨城県の住民の尿中 NAG 活性を用いて正常上限値を設定することを試みた。茨城県住民の、クレアチニン比として表した尿中 NAG 活性は、男女とも 10 歳代から 50 歳代までの各年齢階級の間で有意差はなかった。しかし、60 歳未満に比べて 60 歳以上の住民の尿中 NAG 活性は有意に高かった。Kunin ら<sup>18)</sup>は、健常人で尿中 NAG 活性を測定し、生後 2 歳までと 56 歳以上が高い値を示し、それを除けば子供から大人まで尿中 NAG 活性のクレアチニン比は比較的一定であったと報告している。今回我々の成績でも 60 歳以上が 60 歳未満に比べて有意に高値を示した。我々は、健常人 209 人の 24 時間尿のクレアチニン分析データから、体重 kg 当たりのクレアチニン 1 日排せつ量が、年齢とともに低下することを確認している<sup>19)</sup>。非汚染地域住民の尿中 NAG 活性のクレアチニン比が 60 歳以上で高値を示したのは、クレアチニン排せつ量が高齢層で低いためと考えられる。Paigen ら<sup>20)</sup>は、健常人で尿中に排せつされるライソソーム酵素の活性の分布は対数正規分布であることを示した。我々の得た茨城県住民の尿中 NAG 活性の分布も、性・年齢を問わず対数正規分布に近似できた (図 1)。尿中成分の分析値を統計的に取り扱う際にはその分布形を考慮することが必要である。茨城県住民の尿中 NAG 活性を対数正規確率紙にプロットした図から 95 パーセントイル値を求め正常上限値とした (表 3)。その結果、同じ年齢層では性差は見られなかった。

Cd 汚染地域である長崎県厳原町住民と、茨城県住民とを年齢階級別に比較すると、男女ともに 40 歳以上の年齢階級で、厳原町住民の方が茨城県住民より高値を示した (図 2)。また厳原町住民の尿中 Cd 濃度と尿中 NAG 活性との間には統計的に有意な相関関係が得られた (図 3)。尿中 Cd 濃度は Cd の生体負荷量を反映する<sup>21)</sup>ことから、Cd の生体負荷量と尿中 NAG 活性との間に密接な関係があることが示唆された。これらの結果から尿中 NAG 活性は、Cd 生体暴露による尿細管損傷を反映する良い指標であることが推察された。

今回の調査対象である長崎県厳原町住民は、この地域に生まれ育った人々であるので、年齢はほぼ居住年数とみなすことができ、したがって Cd 暴露量を表しているといえる。年齢と尿中 NAG 活性との関係を見ると、男女ともに有意な相関関係が得られたが、女性の方がより顕著であり、



尿中 NAG 活性は年齢とともに直線的に増加していた (図 4-b)。男性については、50 歳ぐらいから上昇し始めていた (図 4-a)。Cd による尿細管障害は、男性よりも女性の方に顕著に現れるといわれており<sup>22)</sup>、今回の尿中 NAG 活性の成績もそれとよく一致している。

一方、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度は、男女ともに年齢が約 50 歳までは一定の値をとり、50 歳を過ぎる頃から急激に異常値が増した (図 5)。尿中  $\beta_2$ -mg 濃度は、Cd による尿細管再吸収機能障害の結果として増加すると考えられる<sup>23)</sup>が、図 5 の成績は、あるいき値以上の Cd 負荷があったときにはじめて尿細管再吸収障害が生じ  $\beta_2$ -mg の尿中排せつが増加し始めることを示唆している。一方、尿中 NAG 活性は、女性では年齢とともに直線的に増加していたが、これは尿細管機能障害が出現する以前の段階での尿細管細胞損傷の存在の可能性を表しているものと考えられる。

敵原町住民の尿中  $\beta_2$ -mg 濃度と尿中 NAG 活性との関係を見ることにより、 $\beta_2$ -mg と NAG の尿中排せつの機序の違いはより明確になる (図 6)。尿中  $\beta_2$ -mg 濃度と尿中 NAG 活性の間には、男女ともに有意の相関が認められたが、特に女性において敵原町住民は散布図の上で主として三つのグループに分かれた (図 6-b)。すなわち、(1)尿中  $\beta_2$ -mg 濃度も尿中 NAG 活性もともに正常範囲内、(2)尿中  $\beta_2$ -mg 濃度が正常範囲内であるのに尿中 NAG 活性は正常上限値以上、(3)尿中  $\beta_2$ -mg 濃度も尿中 NAG 活性もともに正常上限値以上、の 3 グループである。40 歳代までの若年層はほとんど(1)のグループに入り、(3)のグループは 60 歳以上の高年齢層が大部分であった。なお、60 歳以上住民の一部に、尿中  $\beta_2$ -mg 濃度が正常上限値以上で、尿中 NAG 活性が正常上限値を超えない者があった。これらの人々の尿中 NAG 活性は、ほとんどの場合正常上限値に近く、高値であると考えるが、今後検討する必要がある。注目すべきは(2)のグループで、ここに入るのは大部分が 50 歳代であった。このことは、尿細管低分子タンパク質再吸収障害が起こり  $\beta_2$ -mg の尿中排せつが増加する以前に、尿細管細胞損傷 (おそらくは細胞変性・壊死など) が生じて NAG の尿中への逸脱が起こっている可能性を示唆している。Ellis ら<sup>23)</sup>は、犬に塩化水銀を投与した結果、尿細管機能に変化が生じる前に、尿中 NAG 活性の異常な上昇が起こったと報告している。Cd の場合も、今回のように汚染地域住民を集団レベルで見ると、尿中 NAG 活性は、尿細管再吸収機能障害の発現よりも早期に Cd による生体影響を反映することが推測できた。

以上のように、NAG は尿細管細胞の変性、壊死などの損傷に際し尿中に逸脱してくるが、今回、その尿中排せつが、Cd 汚染による尿細管に対する影響を表す鋭敏な指標として用い得ることが示唆された。今後、尿中  $\beta_2$ -mg のような尿細管再吸収機能障害の指標と組み合わせて用いることによって、Cd 環境汚染地域住民の健康調査において個人及び集団レベルでより多くの情報が得られるものと思われる。

引用文献

- 1) Saito, H., R. Shoji, Y. Hurukawa, T. Arikawa, T. Saito, K. Nagai, T. Furuyama and K. Yoshikawa (1977) : Chronic cadmium poisoning induced by environmental cadmium pollution. Renal lesions (multiple proximal tubular dysfunctions) identified in residents of cadmium-polluted Hosogoe, Kosaka town, Akita prefecture, Japan. *Jpn. J. Med.*, **16**, 2-13.
- 2) 永井謙一・斎藤 寛・有川 卓・斎藤喬雄・古川洋太郎・塩路隆治・古山 隆・吉永 馨 (1977) : カドミウム環境汚染地域住民に認められた  $\beta_2$ -microglobulinuria. *日本腎臓学会誌*, **19**, 1-11.
- 3) 藤 幸三・斎藤 寛・中野篤浩・海上 寛・高田健右・佐藤徳太郎・古山 隆・吉永 馨・有川 卓・永井謙一 (1981) : カドミウム環境汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -microglobulin-世代別, 性別の検討, ならびに近位尿管検査成績との比較. *日本腎臓学会誌*, **13**, 45-61.
- 4) 副島昭典・長沢俊彦 (1983) : 尿中 NAG 活性測定の基礎的検討及び原発性糸球体腎炎における変動. *臨床病理*, 特集第 56 号, 122-131.
- 5) Maruhn, D. (1979) : Evaluation of urinary enzyme patterns in patients with kidney diseases and primary benign hypertension. *Curr. Probl. Biochem.*, **9**, 135-149.
- 6) 石本不見男・柴崎敏昭・村井誠三・児玉和也・大野岩男・五味秀穂 (1983) : 腎疾患患者における尿中 NAG 活性の臨床的意義—抗生剤使用例とネフローゼ症候群を中心に—. *臨床病理*, 特集第 56 号, 147-159.
- 7) Nogawa, K., Y. Yamada, R. Honda, I. Tsuritani, M. Ishizaki and M. Sakamoto (1983) : Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and  $\beta_2$ -microglobulin in 'Itai-itai' disease. *Toxicol. Let.*, **16**, 317-322.
- 8) 原田 章・広田昌利・渋谷保文・谷口 勝・高山 正・吉田康久・河野公一 (1982) : カドミウム作業者の尿中 N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ活性値について. 第 55 回産業衛生学会講演集, 594-595.
- 9) Dance, N., R. G. Price, W. R. Cattell, J. Lansdell and B. Richards (1970) : The excretion of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase and  $\beta$ -galactosidase by patients with renal disease. *Clin. Chim. Acta*, **27**, 87-92.
- 10) 浅見 直 (1980) : 尿中  $\beta$ -D-N-Acetyl-glucosaminidase の諸性質と小児腎疾患における臨床的意義. *日本腎臓学会誌*, **22**, 117-135.
- 11) Ellis, B. G., S. M. Tucker, A. E. Thompson and R. G. Price (1975) : Presence of serum and tissue forms of N-acetylglucosaminidase in urine from patients with renal disease. *Clin. Chim. Acta*, **64**, 195-202.
- 12) Wellwood, J. M., B. G. Ellis, R. G. Price, K. Hammond, A. E. Thompson and N. F. Jones (1975) : Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activities in patients with renal disease. *Br. Med. J.*, **5**, 261-265.
- 13) Wellwood, J. M., B. G. Ellis, J. H. Hall, D. R. Robinson and A. E. Thompson (1973) : Early warning of rejection? *Br. Med. J.*, **5**, 261-265.
- 14) Corbett, R., G. J. Gardner, P. R. N. Kind, A. E. Thompson and R. G. Price (1983) : Comparison of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and urinary fibrin degradation products for diagnosis of rejection after renal transplantation. *Clin. Chim. Acta*, **128**, 141-150.
- 15) Lockwood, T. D. and H. B. Bosmann (1979) : The use of urinary N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in human renal toxicology II. Elevation in human excretion after aspirin and sodium salicylate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 337-345.

- 16) Price, R. G. (1979) : Studies on the nephrotoxicity of *p*-nitrophenylarsonic acid : Changes in rat kidney and urinary enzyme activities following the administration of *p*-nitrophenylarsonic acid. *Chem.-Biol. Interact.*, **24**, 241-255.
- 17) Pierce, R. J., R. G. Price and J. S. L. Fowler (1977) : The effect of cadmium administration on activities of enzymes in the urine of rat and marmoset. *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 238-241.
- 18) Kunin, C. M., R. W. Chesney, W. A. Craig, A. C. England and C. DeAngelis (1978) : Enzymuria as a marker of renal injury and disease ; studies of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics*, **62**, 751-760.
- 19) 石原 裕・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛・遠山千春・三種裕子・杉平直子・脇阪一郎 (1984) : 尿中諸成分のクレアチニン補正に関する検討. *日本衛生学雑誌*, **39**, 469.
- 20) Paigen, K. and J. Peterson (1978) : Coordinacy of lysosomal enzyme excretion in human urine. *J. Clin. Invest.*, **61**, 751-762.
- 21) Bernard, A., A. Goret, J. P. Buchet, H. Roels and R. Lauwerys (1980) : Significance of cadmium levels in blood and urine during long-term exposure of rats to cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health*, **6**, 175-184.
- 22) 薮 幸三・斎藤 寛・有川 卓・塩路隆治・古山 隆・吉永 馨 (1978) : カドミウム環境汚染地域住民の尿中 $\beta_2$ -microglobulin-性差の検討. *医学のあゆみ*, **106**, 720-722.
- 23) Ellis, B. G., R. G. Price and J. C. Topham (1973) : The effect of tubular damage by mercuric chloride on kidney function and some urinary enzymes in the dog. *Chem.-Biol. Interact.*, **7**, 101-113.

II-5 カドミウム暴露による腎機能障害の指標としての  
尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリン\*

Urinary  $\alpha_1$ -Microglobulin as an Indicator of Renal Dysfunction Caused  
by Cadmium Exposure\*

遠山千春<sup>1</sup>・小林悦子<sup>2</sup>・斎藤 寛<sup>1,3</sup>・杉平直子<sup>1</sup>  
中野篤浩<sup>1</sup>・三種裕子<sup>1</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Chiharu TOHYAMA<sup>1</sup>, Etsuko KOBAYASHI<sup>2</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,3</sup>  
Naoko SUGIHARA<sup>1</sup>, Atsuhiko NAKANO<sup>1</sup>, Yuko MITANE<sup>1</sup>  
and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

要 旨

環境中カドミウム (Cd) 暴露によって生じる近位尿細管の再吸収障害の早期スクリーニングのための新しい指標の一つとして、 $\alpha_1$ -マイクログロブリン ( $\alpha_1$ -mg) の有用性とこの低分子タンパクの腎における処理について検討した。

対象地域として Cd 土壌汚染地域である長崎県厳原町佐須地域の 4 部落を選び、ここに居住する 50 歳以上の全住民 (男 119 人, 女 166 人) を対象に疫学調査を行い、血液及び尿試料の提供を受けた。

尿中へ排せつされる  $\alpha_1$ -mg レベルは、加齢に伴って上昇する傾向を示したが、 $\alpha_1$ -mg クリアランスも同様の傾向を示した。このことは、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは、単に加齢によって上昇するのではなく、近位尿細管の再吸収機能低下によることを示唆する。

尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは、Cd 暴露の程度を反映すると考えられる尿中 Cd レベル、並びに、Cd 暴露によって排せつが増加する尿中 Cu レベルと有意な正の相関を示した。さらに、近位尿細管機能障害の指標である尿中総タンパク、 $\beta_2$ -mg レベル、 $\beta_2$ -mg クリアランス、尿酸クリアランス (以上男女共) 及びリン酸クリアランス (女のみ) が高い程、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルも高くなる傾向を示した。

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.
  2. 昭和 57~59 年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for the Environmental Studies (1982-1984).
  3. 現在: 長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町 12 番 4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.
- \* 本論文の一部は、Tohyama, C., E. Kobayashi, H. Saito, N. Sugihira, A. Nakano and Y. Mitane: Urinary  $\alpha_1$ -microglobulin as an indicator of renal tubular dysfunction caused by environmental cadmium exposure. J. Appl. Toxicol. (in press)である。

今回の調査対象者のうち県行政当局がCd中毒症の精査のため経過観察が必要と認定した近位尿細管機能障害を有する患者においても、 $\alpha_1$ -mg クリアランス値及び尿中  $\alpha_1$ -mg レベルの増加が認められた。

以上の結果、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは、Cd 土壌汚染地域住民に見いだされる近位尿細管機能低下を反映する鋭敏な指標であることが示された。

### Abstract

As a new indicator for an early diagnosis of proximal tubular dysfunction due to environmental cadmium (Cd), usefulness of  $\alpha_1$ -microglobulin ( $\alpha_1$ -mg) and its handling in the kidney were studied in people living in a Cd-polluted area. As a target population people (119 males and 166 females) who were 50 years of age and over and living in a Cd-polluted area, four hamlets in Sasu, Izuhara, Nagasaki Prefecture were selected and requested to participate the health examination and to provide blood and urine specimens.

The  $\alpha_1$ -mg level urine tended to increase with age and a similar trend was also observed in the  $\alpha_1$ -mg clearance level, suggesting that the increase in the urinary  $\alpha_1$ -mg level is not due to aging but due to the deterioration of renal tubular absorption.

The urinary  $\alpha_1$ -mg level also showed a significant correlation not only with the urinary Cd level that is considered to reflect the extent of Cd-exposure but also with the urinary copper level that is known to increase upon Cd exposure. Further, the increase in the urinary  $\alpha_1$ -mg level was closely associated with the increase in urinary levels of various indices of renal tubular dysfunction, *i.e.* total protein,  $\beta_2$ -microglobulin, clearances of  $\beta_2$ -microglobulin, uric acid (in male and female subjects) and of phosphate (in female subjects only). The urinary  $\alpha_1$ -mg and  $\alpha_1$ -mg clearance levels were observed to increase in some patients suspected of having renal tubular dysfunction caused by Cd exposure.

The present results strongly support the supposition that the urinary  $\alpha_1$ -mg level is an sensitive indicator which reflects the extent of proximal tubular dysfunction due to Cd exposure.

### 1 はじめに

カドミウム（以下Cdと略す）土壌汚染地域に長年にわたり居住している住民の間に、低分子タンパク尿、糖尿、アミノ酸尿、及びリン酸再吸収率低下などを特徴とする多発性近位尿細管障害が見いだされている<sup>1,2)</sup>。この障害を個人及び集団レベルで早期に検出し、予防に役立つために、尿中に排せつされる各種の低分子タンパク（レチノール結合タンパク、 $\beta_2$ -マイクログロブリン（以下 $\beta_2$ -mgと略す））が指標として用いられてきた<sup>1,2)</sup>。

最近、低分子タンパク質の一つである $\alpha_1$ -マイクログロブリン（以下 $\alpha_1$ -mgと略す）の血清及び尿中レベルが、腎機能障害の初期変化を反映する新たな指標となり得ることが示唆された<sup>3)</sup>。このタンパクは、1975年に、Ekströmらによって、Cd取扱作業員及び健康人の尿中から分離精製された。その分子量は33,000ドルトンで、ヘキソース、ヘキソースアミン、シアル酸を22%含有する糖タンパクであり、電気泳動上fast  $\alpha_1$ -regionに泳動される性質を有する<sup>4)</sup>。

近年、河合らによって、このタンパク質の酵素免疫測定法（以下 ELISA と略す）が確立され、アッセイをルーチン化することが可能となった<sup>5)</sup>。現在までのところ、Cd 土壌汚染地域住民における  $\alpha_1$ -mg の尿中排泄の意義についての検討はほとんどなされていない。そこで、本報告では、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと腎機能障害の他の諸指標との関連を明らかにし、加えて腎における  $\alpha_1$ -mg の処理 (handling) について検討した。

## 2 調査方法及び分析方法

### 2.1 対象地域及び被験者

調査地域として、Cd 土壌汚染地域である長崎県敵原町佐須地域の 4 地区（樫根、小茂田、椎根、下原）を選んだ。被験者として、椎根地区では 5 歳以上の男女住民全員、他の 3 地域では 50 歳以上の男女住民全員を選び、検診への協力を依頼した。調査は 1982 年 5 月 29、30 日の 2 日間行った。本報告では、被験者のうち 50 歳以上の男女住民の試料について分析を行った。被験者数は 285 人（男 119 人、女 166 人）で、受診率は 87.4%（男 85.7%、女 88.6%）であった。

### 2.2 分析項目及び方法

被験者からは早朝尿及び血液の提供を受けた。尿は、あらかじめ各家庭に配布しておいた採尿容器に、検診当日の早朝尿を採尿してもらい、検診場所にて回収した。尿はできるだけ速やかに、小分けした後に、ドライアイスで冷凍した。 $\beta_2$ -mg 測定用の尿は、リン酸緩衝液 (pH 8.5) を添加し、pH を 6 以上に調整した。

血液は、遠心分離後に血清を回収して小試験管に分注し、ドライアイスにて凍結した。尿及び血清試料は凍結したまま研究所に送付し、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。なお、重金属分析のため、尿及び血液の採取、分注、保存の器具は、注射器と針以外は、すべて硝酸洗浄したものを用いた。

血清及び尿中の物質のうち、クレアチニン (Jaffé 法) 無機リン (モリブデン青法)、尿酸 (酵素比色法) は生化学自動分析装置 (東芝 TBA-360 又は TBA-560) を用いて分析した。

血清及び尿の  $\beta_2$ -mg はラジオイムノアッセイ法 (ファルマシア/塩野義)、 $\alpha_1$ -mg は ELISA (富士レビオ)、尿中総タンパクは、トネイン-TP 法 (大塚製薬) を用いて分析した。

尿中 Cd、銅 (Cu) 及び亜鉛 (Zn) は、尿をクレアチニン濃度に応じて希釈後、前 2 者については日立ゼーマン無炎原子吸光法により、Zn については  $\text{D}_2$  補正有炎原子吸光法により分析した。

## 3 結果及び考察

今回の対象地域である Cd 土壌汚染地域男女住民の尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと他のパラメータ (年齢、尿中 Cd、Cu、Zn、総タンパク、 $\beta_2$ -mg 及び NAG、並びに  $\beta_2$ -mg クリアランス (%Ccr)、尿酸クリアランス (%Ccr)、リン酸クリアランス (%Ccr)) との関係を表 1 に示した。参考値として、各パラメータの算術平均値又は幾何平均値並びに最大値と最小値を併記した。後述するように、

表 1 Cd 土壤汚染地域住民の各種パラメータとその値<sup>10)</sup>Table 1 Various parameters and those values of people in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

	Male					Female				
	Number of subjects <sup>1)</sup>	mean <sup>2)</sup>	median	min.	max.	Number of subjects <sup>1)</sup>	mean <sup>2)</sup>	median	min.	max.
Age	109	62.2	60.0	50.0	84.0	153	63.6	61.0	50	92
<b>Urine</b>										
Cadmium ( $\mu\text{g/g}$ creatinine)	"	6.59	6.56	1.849	36.7	"	11.24	11.40	2.92	47.8
Copper ( $\mu\text{g/g}$ creatinine)	"	18.3	17.3	6.31	127.6	"	30.3	25.9	10.0	295.1
Zinc ( $\mu\text{g/g}$ creatinine)	"	427.6	448.7	111.4	2440	"	342.8	352.4	77.3	1920
Protein (mg/g creatinine)	"	98.6	89.1	31.3	2430	"	162.9	131.8	32.7	3270
$\beta_2$ -microglobulin <sup>3)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ creatinine)	97	159.6	79.4	21.0	77800	"	657.7	266.1	16.7	340400
$\alpha_1$ -microglobulin ( $\mu\text{g/g}$ creatinine)	109	1291	1164	86.9	56490	"	3622	3540	62.7	326600
<b>Clearance</b>										
$\beta_2$ -mg (%Ccr)	97	0.111	0.060	0.0126	48.9	144	0.327	0.150	0.0174	83.6
Uric acid (%)	100	15.9	16.1	5.86	60.0	"	22.3	22.2	6.11	63.0
Phosphate (%)	"	20.2	19.6	2.37	63.5	142	18.8	18.7	8.20	48.0
$\alpha_1$ -mg (%)	96	0.104	0.0928	0.007	5.05	"	0.255	0.248	0.006	17.1
<b>Serum</b>										
$\alpha_1$ -microglobulin ( $\mu\text{g/l}$ )	99	14600	14000	7720	52100	145	14800	13700	7120	38200

1. 調査協力者男 109 人, 女 153 人のうち, 血清又は尿試料が不足したために, 実際に分析できた項目の数は, これらの値よりも小さい。
2. 年齢の平均値は算術平均値, 残りのパラメータの平均値は幾何平均値。
3. 尿  $\beta_2$ -mg レベルは, 極めて高い値を示す被験者 (要観察者) がいるため, 厳密には対数正規とはならないが, 慣例により対数変換した値を用いて解析した。

尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと他の大部分のパラメータとの関係は男よりも女の住民については顕著であり, これら指標間の関係の散布図も示した。

まず尿中への  $\alpha_1$ -mg 排泄と年齢との関係を検討した。男女住民とも, 尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは, 加齢とともに上昇する傾向を示した (表 2, 図 1)。

ヒトの尿中 Cd レベルは, Cd の体内蓄積量を反映すると考えられている<sup>1)</sup>。そこで, Cd 暴露の程度の指標として尿中 Cd レベルを取り上げ, これと尿中  $\alpha_1$ -mg レベルとの関係を調べたところ, 尿中への Cd 排泄レベルが大きい程, 尿中  $\alpha_1$ -mg レベルも上昇する傾向を示した (表 1, 図 2(a))。興味深いことは, 男女ともに, 尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは, 尿中 Cd レベルよりも尿中 Cu レベルとより高い正の相関を示したことである (表 2, 図 2(b))。他方, 尿中 Zn レベルとの間には, 何らの相関も認められなかった (表 2, 図 2(c))。今回の対象地域にある鉱山では, 近年まで, 鉛, Zn, その副産物として Cd が産出されていた。そのため, この地域ではこれら重金属による土壌汚染があったが, 銅による汚染は特に知られていない<sup>2)</sup>。したがって, この地域住民に, 銅への

表 2 尿  $\alpha_1$ -マイクログロブリン及び  $\alpha_1$ -マイクログロブリンクリアランスと他のパラメータとの関係<sup>10)</sup>  
 Table 2 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin and its clearance with other parameters<sup>10)</sup>

Parameters		Male					Female				
X	Y	n	Regression equation	r	Statistical significance <sup>1</sup>	n	Regression equation	r	Statistical significance <sup>1</sup>		
Age	urinary $\alpha_1$ -microglobulin	109	Log Y = 0.0175 X + 2.02	0.294	**	153	Log Y = 0.0368 X + 1.22	0.556	***		
urinary Cadmium	"	109	= 0.737 Log X + 2.51	0.281	**	"	= 1.21 Log X + 2.29	0.416	"		
urinary Copper	"	109	= 1.047 " + 1.79	0.447	***	"	= 1.74 " + 0.973	0.716	"		
urinary Zinc	"	109	= 0.0479 " + 2.99	0.019	n. s.	153	= 0.0126 " + 3.53	0.004	n. s.		
urinary Protein	"	108	= 1.13 Log X + 0.851	0.594	***	153	= 1.345 " + 0.585	0.761	***		
urinary $\beta_2$ -microglobulin	"	109	= 0.581 " + 1.83	0.794	***	"	= 0.603 " + 1.86	0.908	"		
$\beta_2$ -microglobulin (%Cr)	"	97	= 0.628 " + 3.71	0.800	***	144	= 0.633 " + 3.86	0.903	"		
Uric acid (%Cr)	"	100	= 0.901 " + 2.03	0.312	***	"	= 1.70 " + 1.27	0.481	"		
Phosphate (%Cr)	"	99	= 0.457 " + 2.51	0.143	n. s.	142	= 1.43 " + 1.72	0.349	**		
$\alpha_1$ -microglobulin (%Cr)	"	95	= 0.964 Log X + 4.06	0.980	***	142	= 0.996 " + 4.15	0.990	***		
Age	$\alpha_1$ -microglobulin (%Cr)	95	= 0.0184 " - 2.13	0.300	**	142	= 0.037 " - 2.94	0.543	"		
Serum $\alpha_1$ -microglobulin	"	95	= 0.200 " - 1.83	0.296	**	"	= 2.324 " - 10.2	0.416	"		

1. 有意差有り ((\*) P=0.05, (\*\*) 0.01 and (\*\*\*) 0.001), n. s.=有意差なし。

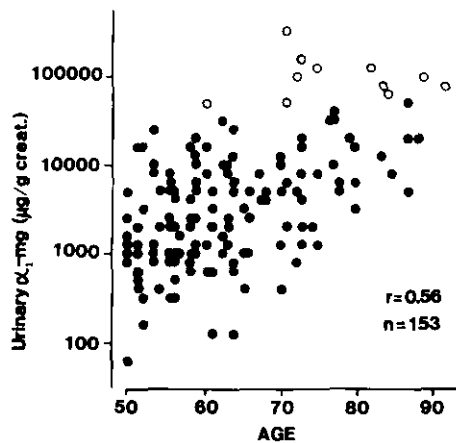


図 1 Cd 土壌汚染地域の女子住民における尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリンと年齢との関係<sup>10)</sup>

Fig. 1 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin with age in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

○印は要観察者



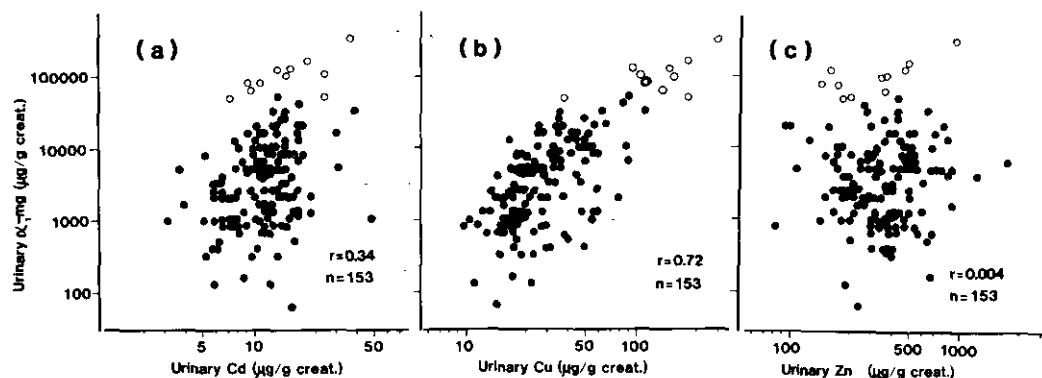


図 2 Cd 土壌汚染地域の女子住民における尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリンと尿中 Cd (a), 銅 (b), 亜鉛 (c) との関係<sup>10)</sup>

Fig. 2 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin with urinary Cd (a), copper (b) and zinc (c) in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

過剰暴露があったとは考えにくい。既に報告したように<sup>6-8)</sup>、尿中への銅の排せつは、Cd 暴露によって体内で生合成されたメタロチオネインの尿中排せつと密接な関連があると考えられる。尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと尿中銅レベルとの有意な正の相関は、恐らく、近位尿細管の再吸収機能低下によって、低分子タンパクである銅結合メタロチオネインの排せつが増加したことの反映であろう。

腎機能、特に近位尿細管障害と尿中への  $\alpha_1$ -mg 排せつとの関係を調べるために、尿の各種パラメータの尿中レベルとの関係を検討した。尿中の総タンパクレベル及び  $\beta_2$ -mg レベルの間には、男女被験者ともに、有意に高い正の相関が認められた (表 2, 図 3 (a, b))。さらに、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルは、クレアチニンクリアランスに対する  $\beta_2$ -mg の相対的クリアランス、すなわち  $\beta_2$ -mg クリアランス (%Ccr) との間に、男女とも、極めて高い正相関が認められた (表 1, 図 4 (a))。尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと近位尿細管障害を反映する指標として従来から用いられているリン酸クリアランス (%Ccr) 及び尿酸クリアランス (%Ccr) との関係については、女子被験者の場合にはこれら両者との間に有意な正相関が認められ、男の被験者の場合には、尿酸クリアランス (%Ccr) との間のみ有意な正相関が観察された (表 2, 図 4 (b, c))。以上の調査成績は、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルが、近位尿細管障害の程度を極めて鋭敏に反映する指標であるとされている尿中  $\beta_2$ -mg レベルと同程度に表用な指標であり、尿酸クリアランス (%Ccr) 及びリン酸クリアランス (%Ccr) よりも鋭敏な指標であることを示唆している。

尿中への  $\alpha_1$ -mg 排せつ量の増加の意義をさらに検討するために、クレアチニンクリアランスに対する  $\alpha_1$ -mg の相対的クリアランス、すなわち  $\alpha_1$ -mg クリアランス (%Ccr) を算出した。この  $\alpha_1$ -mg クリアランスは (%Ccr) 値は、男女ともに、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと極めて高い相関を示した (表 2, 図 5)。 $\alpha_1$ -mg クリアランス (%Ccr) も、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルと同様、加齢に伴い、上昇する傾向を示した (表 2, 図 6)。したがって、先述した尿中  $\alpha_1$ -mg レベルの加齢に伴う上昇傾

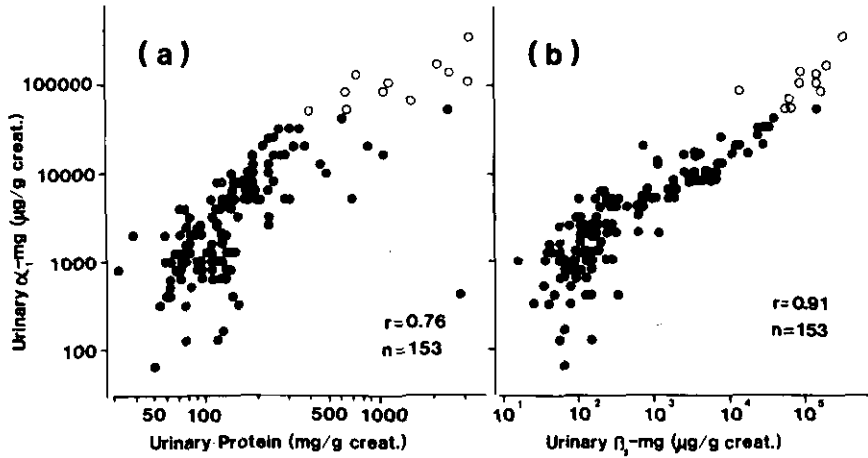


図 3 Cd 土壌汚染地域の女子住民における尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリンと尿中総タンパク (a), 及び  $\beta_2$ -マイクログロブリン (b) との関係<sup>10)</sup>

Fig. 3 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin with urinary protein (a) and  $\beta_2$ -microglobulin (b) in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

図 (a) の右下の 1 点は異常値とも考えられるが、ここでは、解析の対象に含めてある。

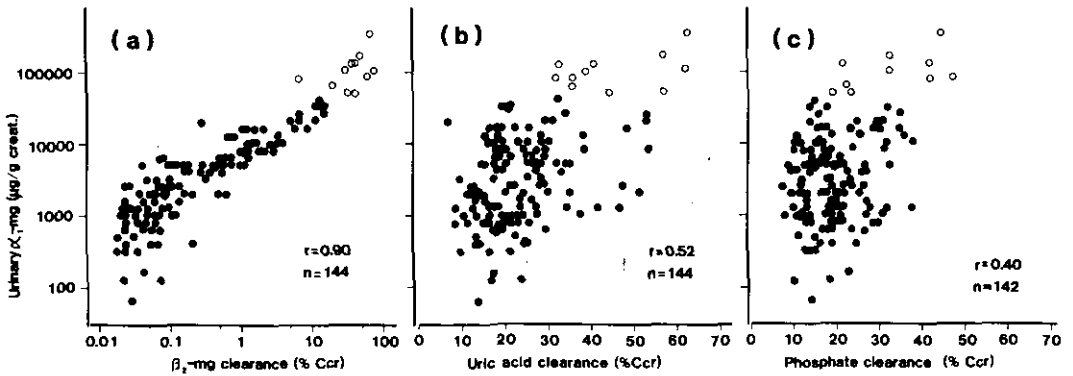


図 4 Cd 土壌汚染地域の女子住民における尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリンと  $\beta_2$ -マイクログロブリンクリアランス (a), 尿酸クリアランス (b) 及びリン酸クリアランス (c) との関係<sup>10)</sup>

Fig. 4 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin with clearances of  $\beta_2$ -microglobulin (a), uric acid (b) and phosphate (c) in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

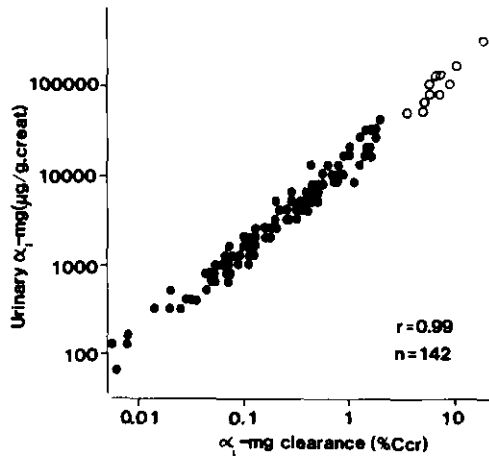


図 5 Cd 土壌汚染地域の女子住民における尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリンと  $\alpha_1$ -マイクログロブリンクリアランスとの関係<sup>10)</sup>

Fig. 5 Relationship of urinary  $\alpha_1$ -microglobulin with  $\alpha_1$ -microglobulin clearance in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

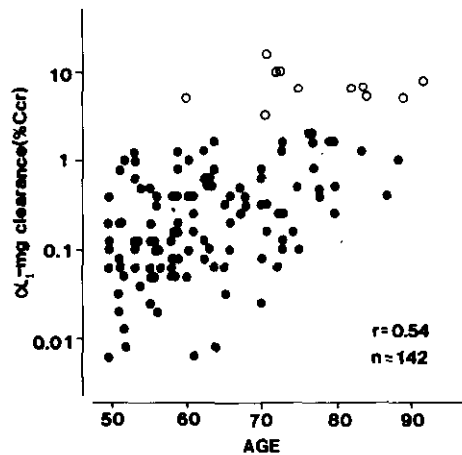


図 6 Cd 土壌汚染地域の女子住民における  $\alpha_1$ -マイクログロブリンクリアランスと年齢との関係<sup>10)</sup>

Fig. 6 Relationship of  $\alpha_1$ -microglobulin clearance with age in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

向は、クレアチニン補正による見かけ上の上昇ではなく、単位ネフロン当たりの再吸収機能の低下によるものと推論できよう。

一般に、分子量5万以下の血漿タンパクは、糸球体基底膜をろ過された後、近位尿細管において再吸収され、主として、尿細管上皮細胞のライソゾームにおいて加水分解され、ごく一部が尿中に排せつされる<sup>9)</sup>。内因性クレアチニンクリアランスに特別な異常のない健常人の血清中  $\alpha_1$ -mg レベルは、一元免疫拡散法による定量で  $21.8 \pm 10.8 \text{ mg/l}$  ( $n=8$ )、クリアランス値は  $0.63 \pm 0.69\%$  ( $n=8$ ) との報告がある<sup>10)</sup>。健常人の場合、糸球体をろ過された  $\alpha_1$ -mg のうち、99.4% が再吸収されることになる。

本報告の対象者のうち、男では93%、女では90%が、血清  $\alpha_1$ -mg レベルは  $20 \text{ mg/l}$  以下であった。本報告では、 $\alpha_1$ -mg の測定にはELISAを用いているが、同一試料を分析した場合、一元免疫拡散法のほうが高目の値を示すことから<sup>5)</sup>、いわゆる正常値は  $20 \text{ mg/l}$  とみなして良いであろう。血清  $\alpha_1$ -mg レベルが  $20 \text{ mg/l}$  以下の生理的範囲に収まる被験者において、 $\alpha_1$ -mg クリアランス値の変動は、男の場合  $0.007 \sim 5.1\%$ 、女の場合  $0.006 \sim 17.1\%$  であった (図7)。

上述の河合らの報告値に比べて、高目の値を示す者が見いだされた。血清  $\alpha_1$ -mg 値は生理的範囲であることから、これら被験者の場合、単なる overflow ではなく、尿細管再吸収機能の低下並びに一部には尿細管における異化作用の低下によって、尿中  $\alpha_1$ -mg レベルが上昇していると考えられる。

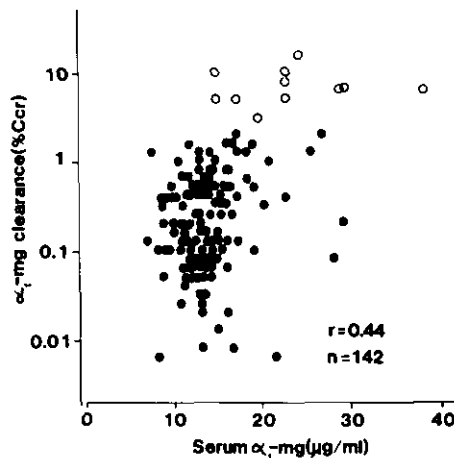


図 7 Cd 土壌汚染地域女子住民における  $\alpha_1$ -マイクログロブリンクリアランスと血清  $\alpha_1$ -マイクログロブリンとの関係<sup>10)</sup>

Fig. 7 Relationship of  $\alpha_1$ -microglobulin clearance with serum  $\alpha_1$ -microglobulin in female subjects in a Cd-polluted area<sup>10)</sup>

さらに、Cd 過剰暴露による中毒症が疑われている患者のうち、今回の調査において試料の提供を受けた男 2 人、女 11 人の血清及び尿の分析データを表 3 に示す。このうち、男 1 人、女 7 人は血清  $\alpha_1$ -mg レベルは 20 mg/l 以上の値を示し、女 1 人も 19.9 mg/l と高値であり、 $\alpha_1$ -mg クリアランス値も、比較的高値であった。これら患者では、尿中への Cd 及び Cu の排せつ量も多く、尿中  $\alpha_1$ -mg 量だけでなく、総タンパク、 $\beta_2$ -mg レベル、並びに尿酸クリアランス (%Ccr)、リン酸クリアランス (%Ccr) の増加が認められた。これらの事実は、尿中  $\alpha_1$ -mg 排せつレベルの増加が、近位尿細管再吸収機能低下を反映する指標であるという上述の考えを支持する。

また、これらの患者の中に、BUN 値が 15 mg/l、血清クリアチニン値 1.5 mg/dl、血清  $\beta_2$ -mg 値 4 mg/dl を超える被験者が見いだされたが (表 3)、これは尿細管機能異常に伴って生じた糸球体機能の二次的低下であろう。

以上、今回の長崎県厳原町の Cd 土壌汚染地域における疫学調査において見いだされた尿中への  $\alpha_1$ -mg 排せつレベルの増加は、環境中の Cd への暴露によって生じた近位尿細管の再吸収障害を反映する可能性が示唆された。血清及び尿  $\alpha_1$ -mg レベルは、Cd 土壌汚染地域住民の腎機能検査において、有用な新たな指標となり得ることが明らかとなった。

表 3 Cd 腎症要観察者の各種パラメータの値<sup>10)</sup>

Table 3 Values of various parameters of subjects suspected of having renal dysfunction due to Cd exposure<sup>10)</sup>

ID	Sex	Age	Serum				Urine							Clearance		
			$\alpha_1$ -mg	$\beta_2$ -mg	BUN	Crt	Crt	$\alpha_1$ -mg	$\beta_2$ -mg	Protein	NAG	Cd	Cu	$\alpha_1$ -mg	Uric acid	Phosphate
121	M	67	17.8	2.54	18.8	1.60	0.436	56,483	77,834	603	4.13	7.9	58.6	5.05	60.0	51.2
203	M	79	52.1	12.56	67.2	5.85	0.479	34,038	25,016	2431	10.86	3.4	91.1	3.82	23.3	63.6
3	F	75	29.5	3.78	18.2	1.70	0.479	118,519	92,686	765	17.50	16.3	94.7	6.84	33.4	22.2
11	F	83	29.5	5.26	31.4	2.23	0.553	74,564	16,054	678	8.86	10.5	112.1	5.65	36.2	41.6
36	F	92	23.1	5.86	14.7	1.91	0.266	87,273	182,984	1045	12.00	8.8	112.8	7.24	32.2	48.0
68	F	72	14.7	2.31	18.3	1.28	0.255	107,070	151,140	1124	8.62	24.7	167.0	9.29	38.9	32.6
88	F	73	23.1	5.92	21.9	1.60	0.202	141,628	203,475	2068	10.39	20.5	196.8	9.78	56.7	33.5
113	F	82	38.2	6.14	28.0	1.81	0.479	129,494	160,980	2507	14.41	13.3	157.3	6.13	41.4	42.2
124	F	60	14.7	2.26	16.8	1.38	0.213	53,439	72,695	667	7.99	25.0	202.5	5.02	57.4	23.6
135	F	84	22.9	5.73	23.7	1.70	0.798	70,574	66,272	1504	2.63	9.2	144.1	5.25	36.0	22.6
272	F	71	19.9	2.73	22.3	1.38	0.617	50,060	58,682	394	10.50	7.1	38.2	3.47	43.9	18.6
335	F	71	24.5	6.23	19.6	1.28	0.330	326,720	340,413	3154	36.70	34.7	295.2	17.05	62.9	44.7
339	F	89	17.5	3.25	15.9	1.06	0.447	89,989	97,465	3277	18.40	14.8	108.2	5.48	61.9	Not done

注) 単位は表 1 に同じ。

引用文献

- 1) Friberg, L., M. Piscator, G.F. Nordberg and T. Kjellstrom (1974) : Cadmium in the Environment. 2nd edition. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- 2) Tsuchiya, K. (ed.) (1978) : Cadmium studies in Japan : A Review. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 3) Takagi, K., K. Kin, Y. Itoh, T. Kawai, T. Kasahara, T. Shimoda and T. Shikata (1980) : Human  $\alpha_1$ -microglobulin levels in various body fluids. J. Clin. Pathol., **33**, 786-791.
- 4) Ekström, B. and I. Berggord (1977) : Human  $\alpha_1$ -microglobulin : Purification procedure, chemical and physicochemical properties. J. Biol. Chem., **252**, 8048-8057.
- 5) 河合 忠・高木皇輝 (1981) : ヒト  $\alpha_1$ -microglobulin の基礎的および臨床的研究. 日本医師会雑誌, **11**, 1483-1496.
- 6) Tohyama, C., Z.A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1982) : Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "Itai-Itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium. Arch. Toxicol., **50**, 159-166.
- 7) Tohyama, C., Y. Mitane, E. Kobayashi and H. Saito (1984) : Determination of metallothionein by radioimmunoassay. 衛生化学, **30**, s-59.
- 8) 三種裕子・遠山千春・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛 (1983) : カドミウム汚染地域住民における尿中カドミウム, 銅排せつとメタロチオネイン排せつとの関連. 医学のあゆみ, **127**, 97-99.
- 9) Carone, F.A., D.R. Peterson and G. Flouret (1982) : Renal tubular processing of small peptide hormones. J. Lab. Clin. Med., **100**, 1-14.
- 10) Tohyama, C., E. Kobayashi, H. Saito, N. Sugihira, A. Nakano and Y. Mitane : Urinary  $\alpha_1$ -microglobulin as an indicator protein of renal tubular dysfunction caused by environmental cadmium exposure. J. Appl. Toxicol. (in press)

## II-6 ICP を用いた毛髪分析法の検討と小坂町住民の毛髪試料への応用

### Hair Analysis by ICP-AES and its Application to the Population at Kosaka, Akita

森田昌敏<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>2,3</sup>

Masatoshi MORITA<sup>1</sup> and Hiroshi SAITO<sup>2,3</sup>

#### 要 旨

ICP 発光分析法を用いて、毛髪中の微量の元素についての分析を行った。測定された元素は、Na, K, Mg, Ca, Sr, Fe, Cu, Zn, Al, P, Cd, Pb, Se, Ni, V, Co, Cr, B の 18 種であった。As, Mo, Li などは測定が困難であった。日本人の平均的な分析値を求め、既報告と比較した。秋田県小坂町の住民約 150 名の分析を行った結果は、頭髪中に Cd と Pb が多いことが認められ、Pb の汚染の寄与も考慮すべきことが明らかとなった。

#### Abstract

Minor to trace elements in human hair sample were analysed by using ICP atomic emission spectrometry. Elements measured were Na, K, Mg, Ca, Sr, Fe, Cu, Zn, Al, P, Cd, Pb, Se, Ni, V, Co, Cr and B. Elements including As, Mo and Li were hard to determine. Average value for normal Japanese population was estimated and compared with reported values. The method was applied to the population of Kosaka-machi, Akita. The result indicated there were Cd and Pb contamination.

#### 1 はじめに

重金属等の汚染を調べるための材料として毛髪はかなり古くから用いられてきた<sup>1)</sup>。毛髪はこれらの元素を濃縮しているために分析化学上容易に分析できる試料である。また同時にサンプリン

1. 国立公害研究所 計測技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Chemistry and Physics Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 現在：長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町 12 番 4  
Present address : Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.

グに際し、苦痛を伴わず、保存性がよいために、取り扱いやすい試料であるという側面もある。一方、毛髪分析の欠点も指摘される。それは外部組織であるために、外部汚染の影響を受けやすく、体内負荷量を反映していない場合があることや、毛髪中の元素濃度のもつ生理学的意味がはっきりしていないことが多いことである。

毛髪中の微量汚染元素の多元素同時分析は、主として機器中性子放射化学分析法 (INAA) を用いて行われてきた。例えば国際原子力機構 (IAEA) による国際的な毛髪分析のプログラムはその代表的なものである<sup>2)</sup>。近年になって、ICP 発光分析法が台頭し、INAA に置き換わりようとしている。その理由は、原子炉を必要とせずに容易に分析ができること、また分析に要する時間が短いこと、INAA では測定できないが ICP では測定できる元素がある (逆の元素もあるが) ことが指摘されよう。ICP を用いた毛髪分析は既に米国では商業ベースにのっており、また日本でもものりつつある。同時に ICP 分析において、どのように分析の精度を確保するかは重要になっており、いくつかの機関で不正確なデータが出されているのが実情である。

本研究では、正確な分析に重点を置き、いくつかの集団の毛髪の実行を行うこととした。批判に耐えうる分析値のみが、役に立つと考えられるからである。

## 2 分析法

### 2.1 サンプルング

毛髪試料は、国立公害研究所職員とその家族、東京都立衛生研究所職員とその家族、茨城県及び東京都一般住民、徳島県小中学生から採取し、これを一般人 (対照群 320 名) とした。一方、今回調査対象として秋田県小坂町の住民の協力を得て 160 名の毛髪を採取した。採取に際し用いた記入事項は次のとおりである (図 1)。

### 2.2 試料の洗浄

毛髪分析において最初に重要なことは、洗浄方法である。過去においていくつかの方法が提案されている。ここでは非イオン界面活性剤を用いる方法を採用した。試料約 1g をビーカー (100 ml) にとり、これに 0.4% ポリオキシエチレングリコールラウリルエーテル水溶液 50 ml を加えて、超音波洗浄器にかけ、10 分間洗浄する。これをグラスフィルター付ロート上でろ過し、精製水を加えて何度も洗浄する。洗浄後、無灰ろ紙に包んでデシケーターに入れ、乾燥させる。

### 2.3 試料の灰化

洗浄乾燥した毛髪 1g を精秤し、50 ml のテフロンビーカーに移す。これに硝酸 8 ml 及び過塩素酸 2ml を加えてホットプレートにのせ 130°C 一夜加熱する。翌日、過塩素酸 1ml を加え、200°C にホットプレートの温度を上げ、白煙を出させながら、残液が 0.5 ml 程度になるまで過塩素酸を揮散させていく。最後に水を加えて溶解させ 20 ml 定容とし、ポリエチレン瓶に保存した。こ



氏名	( 才 )
	男・女
採取場所	
採取年月日	
採取部位	前頭・後頭・右側頭・左側頭
	毛根より      cm
洗髪	回/週
洗髪料	石けん (            )
	シャンプー (            )
	リンス (            )
	その他 (ミカロン・・・)
パーマメント	有・無      回/年
染毛	有・無      色 (            )
NOTE	
タバコ	本/日

図 1 毛髪サンプリングに際しての記録  
Fig. 1 Protocol for hair sampling

のうちの一部をザルトリウスメンブランフィルターを用いてろ過し、ICP分析にかけた。

水は、蒸留水をミリポア Q システムを通して精製し、次いでヤマト科学製石英ガラス二段蒸留装置で蒸留したものを使用した。また硝酸は半導体工業用（関東化学 ELSS グレード）を、過塩素酸は和光純薬有害金属用を、クリーンルーム内のクリーンドラフト内において、非沸騰型合成石英製蒸留器を用いて蒸留精製して用いた。また実験に使用する器具類は、硝酸 3 規定液に 3 日以上漬け、蒸留水で洗浄したものをを用いた。灰化操作はすべてクリーンルーム内で行った。

## 2.4 ICP 発光分析

ICP 発光分析器は、本研究の Jarrel Ash Atom Comp 975 を用いた。本機は 28 元素多元素測定用ポリクロメーターと N+1 channel の単元素測定用モノクロメーターをもち、合計 29 元素が同時に測定できる。

ICP 発光分析器の操作条件は、RF Power 1.1 kW, プラズマガス流量 18 l/min ネブライザーガス流量 3 l/min である。使用した元素標準液は、多くの元素について 1% 硝酸溶液を用いた。また検量線の零は、蒸留水を用いた。

## 3 結果と考察

### 3.1 ICP 発光分析法の検討

微量元素の分析は、特に多元素同時分析として行うとき、分析途上の汚染との闘いであるといっても過言ではない。上から降下する大気粉じん、溶液化に用いる酸類、そして水からくる汚染を最小限にすることが必要である。ICP 発光分析は、フレイムレス原子吸光法に比べて高感度とは言えないが、有意な誤差を発生させない程度のクリーン度は必要である。本研究で用いたクリーンルーム、クリーンドラフト、酸、水、テフロンビーカーの使用等は完全ではないが、この規準には合格する。しかしまれに微量の汚染がブランク試験でみられることもあり、精度管理に十分な配慮を必要とした。

分析値の確度の検定には標準毛髪 (NIES No.5) を使用した。標準毛髪 (NIES No.5) についての ICP 分析結果を以下に示す (表 1)。本標準試料は、メノウを不純物 (約 3%) として含んでおり、通常の硝酸分解や硝酸過塩素酸分解では不溶性沈殿物が残渣として残る。これはフッ化水素酸を加えることにより溶解するが、このため用いる酸により (つまり分解の程度により) 分析値が異なることとなる。メノウは主成分はケイ酸であるが、不純物として、Ca, Mg, Na, K, Mn, Fe, Al, Ti などを含んでおりこれらの元素について、灰化法による分析値が異なってくる。その他の元素については両灰化法とも分析値が一致してくる。

標準毛髪試料中の元素として ICP を用いて検出定量可能であったのは、この表にある 19 元素であった。As, Se, Sb, Tl, Sn, Rb, Hg などは ICP の検出感度不足や光学干渉のため測定されていない。なお、S は新しい分光器によって現在は可能となっている。

### 3.2 健常日本人毛髪中の元素濃度

毛髪中の元素濃度は、洗浄法によって大きく値が異なる元素があることが知られている。IAEA が採用した方法はアセトン洗浄法であった。本研究では非イオン界面活性剤 (ポリエチレングリコールラウリルエーテル) を用いて洗浄した。洗浄法の違いによる分析値の違いについては若干の報告がある<sup>5)</sup>。

本研究で分析した健常日本人の毛髪の実験値を最近の二つの報告と合わせて表 2 に示す<sup>3,4)</sup>。値

表 1 毛髪標準試料中の元素濃度  
Table 1 Element concentration in hair reference material (NIES No.5)

	灰化法 (I)*	灰化法 (II)**
Al	180.4±6.8	245
B	3.3±0.9	
Ca	607±46	722
Cd	0.20±0.03	0.21***
Co	0.34±0.07	
Cr	1.37±0.13	1.39***
Cu	16.3±2.2	16.7
Fe	214.4±8.8	224
K	20.6±1.6	38.7
Mg	162.2±9.1	211
Mn	4.69±0.22	5.3
Na	11.1±2.6	26
Ni	2.8±1.5	1.85***
P	174.1±7.6	168
Pb	6.8±0.7	
Sr	2.1±0.1	2.2
Ti	11.8±0.6	23.0
V	0.67±0.07	
Zn	164.1±9.1	174

\* HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>分解

\*\* HNO<sub>3</sub>/HF/HClO<sub>4</sub>分解 (岡本による)

\*\*\* 原子吸光分析 (岡本による)

が異なっている理由として、母集団の違いや分析法の違いがある。分析法の違いはかなり重要であり、不適切な分析法の適用による奇妙な値等もこの表には含まれている。例えば、鎌倉のAsの値は明らかにおかしい。分析法の精度と確度を確保する必要がある、このために今回の研究では標準試料を用いて分析の確度の検定を行っている。本報告の分析値は分析法上からの問題は余りないと考えている。

表 2 一般日本人の毛髪中元素濃度  
Table 2 Element concentration in hair of Japanese normal population

	竹内ら***) (INAA)	鎌倉****) (ICP)	森田 (ICP)
Ag	0.39±0.43		
Al	12.8±9.9	{ M12.7±114 F 8.8± 9.3	{ M12.3±12.4 F 16.2± 8.9
As	0.103±0.078	{ M1.9±10.7 F1.6± 1.2	—————
Au	0.035±0.122		
B			{ M3.0±0.8 F 4.3±3.3
Br	16.4±38		
Ca	1150±1140	{ M 642±519 F 1253±969	{ M482±112 F 1260±554
Cd	1.6±2.0	{ M0.49±9.44 F 0.24±0.81	{ M0.15±0.06 F 0.34±0.31
Cl	540±550		
Co	0.08±0.22	{ M1.20±30.5 F 0.25±0.14	{ M0.18±0.07 F 0.29±0.21
Cr	0.82±1.66	{ M0.33±0.24 F 0.32±0.15	{ M0.18±0.07 F 0.29±0.21
Cu	13.1±9.9	{ M12.4± 8.7 F 17.6±21.0	{ M14.2±5.9 F 17.9±5.3
Eu	0.0035±0.0030		
Fe	35±33	{ M27.8±215 F 21.5± 54	{ M17.0± 8.0 F 31.8±14.6
Hg	4.2±2.0	{ M5.10±4.30 F 3.47±1.86	
I	1.4±3.3		
K	18.7±23	{ M156±179 F 119±161	{ M35.0±17.4 F 35.6±26.6
La	0.028±0.022		
Li		{ M0.14±0.25 F 0.15±0.12	
Mg	127±136	{ M71.5±74.4 F 153.1±148.6	{ M84.1±53.1 F 231±174
Mn	1.10±3.8	{ M0.63±1.96 F 1.52±1.41	{ M0.8±0.5 F 3.3±1.7
Mo		{ M0.32±0.16 F 0.34±0.24	—————
Na	23±64	{ M367±385 F 293±372	{ M43.1±18.2 F 51.6±52.7

	竹内ら <sup>**3)</sup> (INAA)	鎌倉 <sup>**4)</sup> (ICP)	森田 (ICP)
Ni		{ M0.66±2.21 F0.89±4.43	{ M0.55±0.02 F1.56±0.98
P		{ M172±49 F160±38	{ M132±15 F131±21
Pb		{ M4.16±8.15 F4.41±5.91	{ M4.5±1.3 F5.0±1.4
S(%)	4.4±0.38		
Se	1.18±4.2	{ M2.5±3.4 F2.3±1.5	1.2付近
Si			{ M2.5±1.0 F3.5±1.4
Sm	0.0059±0.0070		
Sr			M2.0±1.1
V	0.072±0.568	{ M0.41±1.59 F0.39±0.23	{ M0.2±0.1 F0.3±0.2
Zn	183±59	{ M154±42 F168±65	{ M125±38 F173±27

\* アセトン洗浄/中性子放射化分析法

\*\* EDTA 洗浄/ICP-AES

M : male, F : female

(男) (女)

### 3.3 小坂町住民の毛髪中元素濃度

小坂町の住民について調査した結果を図2に示す。図のタテ軸1は対照群の平均値をとったものである。図を見て明らかなように、この集団に特異的に多い元素はPbとCdであった。Cdとこの地域の疾病については既に斎藤らによる研究がある<sup>6)</sup>。Pbについては今まで余り考慮されてこなかったもので、今後Cdとともにあわせて検討する必要があるだろう。

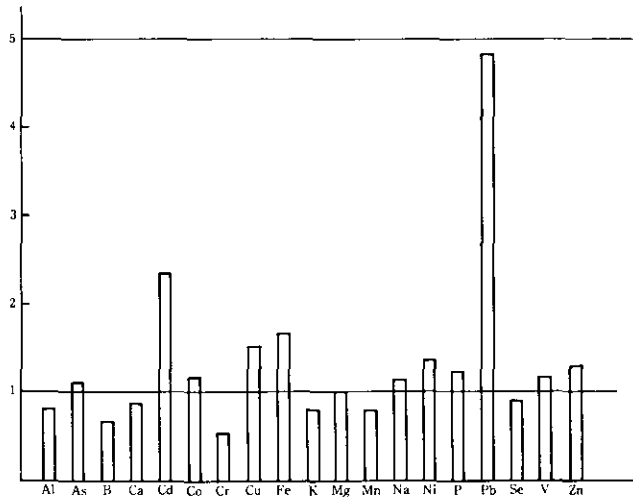


図 2 小坂町住民の毛髪中の元素濃度

Fig. 2 Concentration of trace elements in the hair of Kosaka-machi residents  
(日本人の平均的濃度を1として表示)

### 引用文献

- 1) Laker, M.(1982) : On determining trace element levels in man. The use of Blood and Hair, The Lancet, Vol. 2, July 31, 260-262.
- 2) Report IAEA/RL 41 H (1977) : Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants.
- 3) Takeuchi, T., T. Hayashi, J. Takada, M. Koyama, H. Kozuka, H. Tsuji, Y. Kusaka, S. Ohmori, M. Shinogi, A. Aoki, K. Katayama and T. Tomiyama (1978) : IAEA-SM-227/17, 545.
- 4) Kamakura, M.(1983) : A study of the characteristics of trace elements in the hair of Japanese. Jap. J. Hyg., 37, 827-837.
- 5) Salmela, S., E. Vuori and J. O. Kilpiö (1981) : The effect of washing procedure on trace element content of human hair. Anal. Chem. Acta, 125, 131-137.
- 6) Saito, H. and K. Shitomi (1979) : Chronic cadmium poisoning, Fanconi's syndrome and osteomalacia. Proceedings of the Conference on Cadmium-Induced Osteopathy, Shigematsu, I. and K. Nomiya (eds.), 1979-08 Hakone, Japan Public Health Association, 139-143.

## II-7 カドミウム汚染地域住民の尿浸透圧に関する研究

### Studies on Urinary Osmolality of Residents in Cadmium-Polluted Areas

中野篤浩<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>1,2</sup>・杉平直子<sup>1</sup>

三種裕子<sup>1</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Atsuhiko NAKANO<sup>1</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,2</sup>, Yuko MITANE<sup>1</sup>

Naoko SUGIHIRA<sup>1</sup> and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

#### 要 旨

カドミウム汚染地域住民において、重要な腎臓機能の一つである尿浸透圧形成に対する、カドミウム暴露の影響を明らかにする目的で、尿浸透圧を測定して尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度やカドミウム濃度との関係を検討した。調査地域は、カドミウム汚染地域として秋田県小坂町、石川県小松市、長崎県厳原町を、対照地域として秋田県井川町を選んだ。調査は1979年と1980年の間に行い、901人の被験者から早朝尿を採取した。

尿浸透圧は、カドミウム汚染地域住民と対照地域住民の間で有意差は示さなかった。しかしながら、カドミウム汚染地域住民の男性において60歳以上で、また女性においては50歳以上で、尿浸透圧と尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度が有意な逆相関を示した。この結果は、カドミウムによる腎尿細管障害がある程度尿浸透圧の低下に関連することを示唆している。

#### Abstract

To clarify the effects of cadmium exposure on the formation of urinary osmolality, which is an important renal function, urinary osmolality levels and relationship between urinary osmolality levels and  $\beta_2$ -microglobulin levels were studied with residents in cadmium-polluted and / or non-polluted areas. As target areas, cadmium-polluted areas in Kosaka in Akita prefecture, Komatsu in Ishikawa prefecture and Izuhara in Nagasaki prefecture and as a reference area a non-polluted area in Ikawa in Akita prefecture were selected, respectively. Epidemiologic studies were carried out in 1979 and 1980 and an early-morning urine specimen was obtained from total of 901 subjects.

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 現在：長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address : Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.

There was not a significant difference in urinary osmolality levels between residents in cadmium-polluted and non-polluted areas by sex and age. It was, however, found that there was a significant opposite correlation between urinary  $\beta_2$ -microglobulin levels and osmolality levels in male aged 60 years and over and in female aged 50 years and over. These results suggest that the decreased osmolality level in urine is considerably linked to renal tubular dysfunction.

## 1 はじめに

人体がカドミウムに長期間暴露されると低分子タンパク尿, アミノ酸尿, 糖尿等を呈する近位尿細管障害が誘発される<sup>1)</sup>。

一方腎臓は, 生体内における水代謝やミネラル代謝等のホメオスタシスの維持について重要な機能を果している。この腎臓機能の有用な指標の一つが尿浸透圧である。

そこで, カドミウムによる腎障害の水代謝やミネラル代謝に及ぼす影響を明らかにする為に, カドミウム汚染地域住民において尿浸透圧を測定し, カドミウムによる腎尿細管機能障害の指標である尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度との関係を検討した。

## 2 対象及び方法

調査地域と対象者は, 「カドミウム暴露量と尿細管機能障害発症に係る量・効果関係の検討」と同様である。Cd 汚染地域として秋田県鹿角郡小坂町細越地区, 石川県小松市金平地区, 長崎県下県郡厳原町を選び, 厳原町の檜根地区を厳原-1と下原・小茂田・椎根地区を厳原-2とした。特別な汚染がない対照地域としては, 秋田県南秋田郡井川町の小竹花及び下中村地区を選んだ。調査時期は1979年から1980年の間であり, 各調査地域の5歳から80歳以上までの全住民を対象として総数は901人であった。

これらの被験者より早朝尿を採取して, その一部を無処理でドライアイスで凍結して持ち取り氷点降下法で浸透圧を測定した。またクレアチニンはJaffeの反応で, カドミウムは $D_2$ ランプ補正フレームレス原子吸光法で,  $\beta_2$ -マイクログロブリンはファルマンアキットによるラジオイムノアッセイ法で測定した。カドミウムと  $\beta_2$ -マイクログロブリンの濃度は, クレアチニン1g当たりの $\mu\text{g}$ 数で表現した。

## 3 結果

カドミウム汚染地域と対照地域住民の尿浸透圧を, 地域別, 性別, 年代別に表1と図1, 図2に示した。対照地域である井川町住民とカドミウム汚染地域住民の尿浸透圧には, 地域別, 性別, 年代別にみて系統的な有意差はなかった。しかし全地域住民において, 尿浸透圧は加齢とともに低下する傾向を示した。



表 1 カドミウム汚染地域及び非汚染地域住民の尿浸透圧  
 Table 1 Osmolality in urine of residents in cadmium polluted  
 and/or non-polluted areas

Area	Age							
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-70	70-
<b>Male</b>								
Ikawa	784	899	933	817	747	818	645	619
	288	250	113	214	212	156	165	202
Kosaka	657	936	821	964	866	843	769	588
	179	278	288	156	178	258	145	134
Komatsu	917	852	626	750	686	561	574	590
	211	205	335	228	288	194	170	170
Izuhara-1	752	877	951	801	1033	741	761	532
	213	159	211	236	245	184	251	228
Izuhara-2						752	716	627
						182	202	192
<b>Female</b>								
Ikawa	802	895	823	758	697	595	615	648
	232	337	245	180	229	222	134	118
Kosaka	952	972	954	851	681	647	568	656
	446	371	231	310	242	212	209	206
Komatsu	854	875	706	541	554	580	531	473
	322	298	193	210	227	260	186	152
Izuhara-1	824	619	799	848	897	578	612	570
	284	0	193	321	181	191	203	138
Izuhara-2						661	660	525
						216	193	196

数字は平均(上)と標準偏差(下)を示す。

単位: mOsm/kg · H<sub>2</sub>O

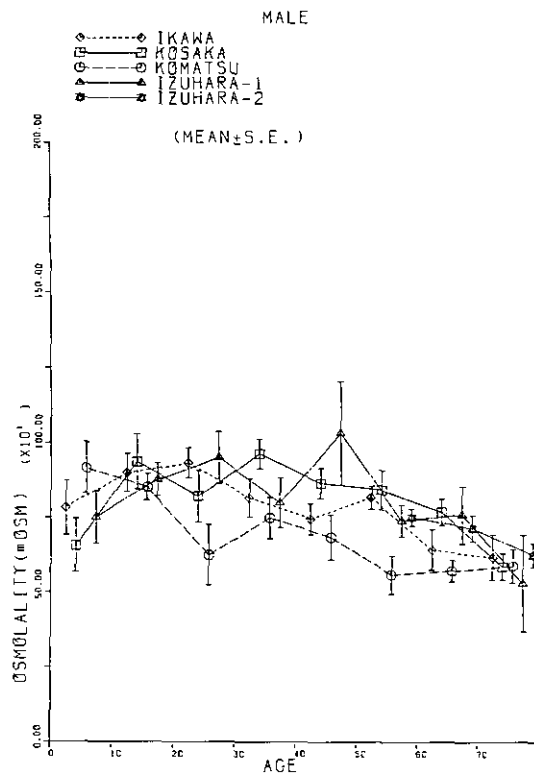


図 1 カドミウム汚染地域及び非汚染地域の男性住民における尿浸透圧

Fig. 1 Osmolality in urine of male residents in cadmium polluted and/or non-polluted areas

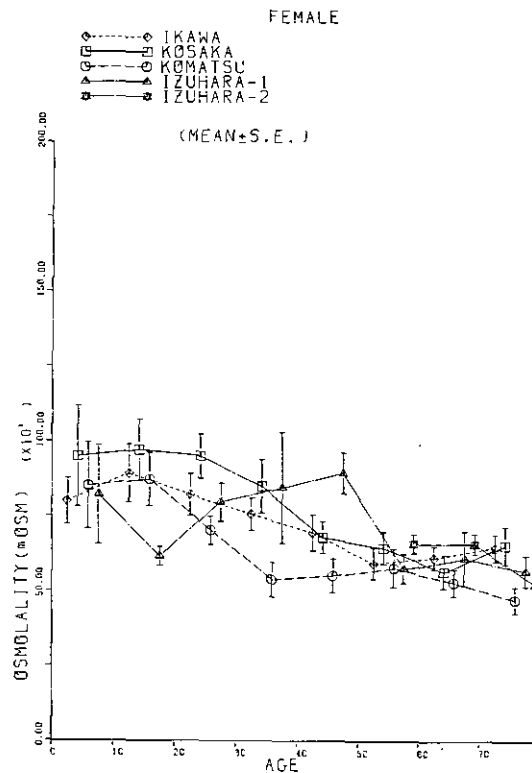


図 2 カドミウム汚染地域及び非汚染地域の女性住民における尿浸透圧

Fig. 2 Osmolality in urine of female residents in cadmium polluted and/or non-polluted areas

クレアチニン濃度を地域別、性別、年代別に表2と図3、図4に示した。クレアチニン濃度もカドミウム汚染地域と対照地域住民の間において、地域別、性別、年代別に系統的な有意差はみられなかった。しかし各地域住民集団において、男性はほぼ20歳代を女性はほぼ10歳代をピークとして、その後は加齢とともに低下する傾向を示した。

表 2 カドミウム汚染地域及び非汚染地域住民の尿中クレアチニン濃度  
Table 2 Creatinine concentration in urine of residents in cadmium polluted and/or non-polluted areas

Area	Age							
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-70	70-
<b>Male</b>								
Ikawa	0.969	1.891	1.939	1.384	1.223	1.456	0.855	0.911
	0.418	0.766	0.455	0.537	0.510	0.619	0.185	0.414
Kosaka	0.562	1.325	1.453	1.320	1.318	1.087	0.873	0.638
	0.281	0.502	0.682	0.450	0.415	0.325	0.291	0.324
Komatsu	0.853	1.328	1.311	1.277	1.231	0.750	0.806	0.776
	0.166	0.485	1.037	0.625	0.619	0.320	0.440	0.256
Izuhara-1	0.733	1.634	1.590	1.610	1.435	1.116	1.071	0.530
	0.334	0.504	0.524	0.782	0.081	0.551	0.507	0.382
Izuhara-2						1.250	1.062	0.946
						0.509	0.495	0.489
<b>Female</b>								
Ikawa	1.020	1.594	1.482	1.107	0.913	0.716	0.681	0.935
	0.415	0.618	0.716	0.308	0.327	0.425	0.217	0.549
Kosaka	0.822	1.281	1.246	0.922	0.729	0.572	0.512	0.519
	0.411	0.772	0.465	0.503	0.344	0.340	0.178	0.194
Komatsu	0.958	1.425	1.077	0.840	0.771	0.606	0.552	0.517
	0.389	0.705	0.605	0.492	0.335	0.444	0.385	0.277
Izuhara-1	1.196	0.921	1.200	0.960	1.270	0.534	0.527	0.457
	0.398	0	0.516	0.502	0.356	0.284	0.181	0.210
Izuhara-2						0.858	0.692	0.460
						0.384	0.273	0.244

数字は平均(上)と標準偏差(下)を示す。

単位: mg/ml

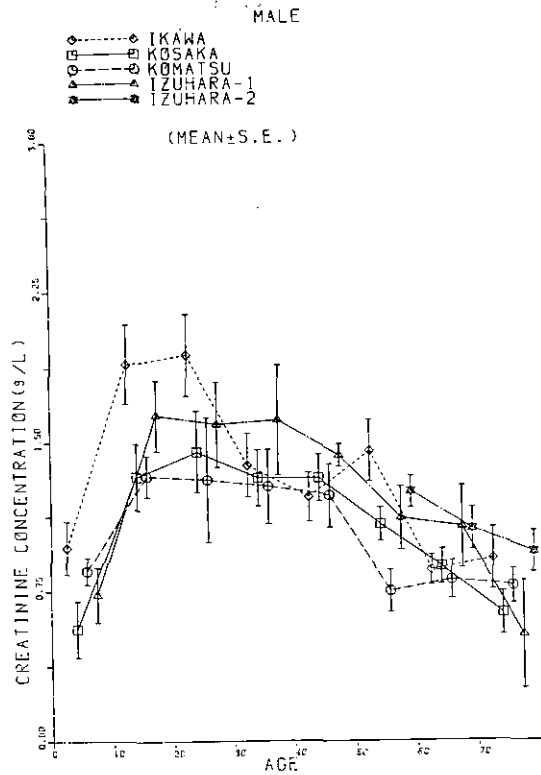


図 3 カドミウム汚染地域及び非汚染地域の男性住民における尿中クレアチニン濃度  
 Fig. 3 Creatinine concentration in urine of male residents in cadmium polluted and/or non-polluted areas

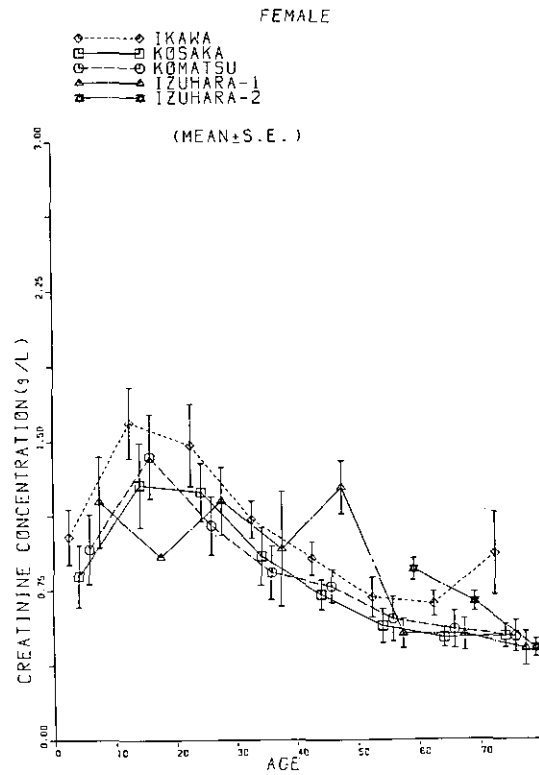


図 4 カドミウム汚染地域及び非汚染地域の女性住民における尿中クレアチニン濃度  
 Fig. 4 Creatinine concentration in urine of female residents in cadmium polluted and/or non-polluted areas

尿浸透圧とクレアチニン濃度そして尿中カドミウム濃度と $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度の間の相関関係を、性別と年代別で検討して表3に示した。尿浸透圧と $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度の関係は、男性の60歳代以後と女性の50歳代以後で有意な逆相関を示して、カドミウムによる腎臓の尿浸透圧形成への影響が示唆された。しかしカドミウムによる腎尿細管機能低下の指標である尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度は、加齢とともに急上昇する。尿の浸透圧は加齢とともに低下するが、 $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度ほど顕著ではない。両者の相関関係からみて、カドミウムによる腎臓の尿浸透圧形成への影響は、 $\beta_2$ -マイクログロブリンの排せつ増加にみられる低分子タンパクの再吸収機能の低下とは、必ずしも同一機序ではなさそうである。

尿浸透圧とクレアチニン濃度は、男女とも各年代において非常に強い正の相関関係を示した。クレアチニン濃度が年齢に対して、男と女で20歳代と10歳代にピークを示すパターンになるために、年齢の要因は考慮せねばならないが、腎臓における尿浸透圧形成とクレアチニン排せつの関係の深さを物語っている。

表 3 カドミウム汚染地域住民の尿における性別・年代別の浸透圧とクレアチニン・ $\beta_2$ -マイクログロブリンとカドミウムの濃度の相関係数

Table 3 Coefficients of correlation between concentrations of cadmium,  $\beta_2$ -microglobulin, creatinine, and osmolality levels in urine of residents in cadmium polluted areas by sex and age

Sex	Age	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-	
		<b>Male</b>								
	Cd - $\beta_2$ -mg	0.069	0.324	0.230	0.046	0.261*	0.303*	0.586***	0.397**	
	Crea. - Osmo.	0.790***	0.590***	0.847***	0.543***	0.791***	0.614***	0.685***	0.769***	
	$\beta_2$ -mg - Osmo.	0.146	-0.126	-0.146	0.192	-0.171	-0.124	-0.402***	-0.311*	
		<b>Female</b>								
	Cd - $\beta_2$ -mg	0.155	-0.043	0.222	-0.207	0.280*	0.560***	0.454***	0.388**	
	Crea. - Osmo.	0.749***	0.884***	0.727***	0.640***	0.829***	0.806***	0.751***	0.747***	
	$\beta_2$ -mg - Osmo.	-0.090	0.105	-0.283	0.188	-0.005	-0.384**	-0.298*	-0.280*	

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001

#### 4 考 察

人体がカドミウムに長期間暴露されれば、肝臓や腎臓のカドミウム濃度が上昇してゆき、いずれ腎臓が標的臓器となり腎障害が誘発される。体内に取り込まれたカドミウムは、まず肝臓で低分子タンパクであるメタロチオネインを誘導合成し、カドミウムチオネインとして蓄積される。この肝カドミウムチオネインが血流を介して腎臓へ移行してゆき、低分子タンパクであるために、糸球体でろ過され、近位尿細管で再吸収されてそこに蓄積してゆく。腎臓において、カドミウムが臨界濃度に達して障害が発現してくる場合、メタロチオネインという低分子タンパクの再吸収部位である近位尿細管の機能低下が先行して発現し、その他の障害がこれに続くものと考えられている<sup>2-5)</sup>。我々の成績においても、腎尿細管における低分子タンパク吸収の機能低下の指標である尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度が、カドミウム暴露者群において、男女とも40歳代から有意な上昇を示している。

一方人間の体液の浸透圧は、常に286~296 mOsm/kg $\cdot$ H<sub>2</sub>Oの狭い範囲内に保たれている。この浸透圧維持には腎臓が非常に大きな役割を果たしている。腎臓の尿形成における希釈あるいは濃縮に参与している因子は複雑多岐にわたり、GFR、近位尿細管の再吸収、髄質高浸透圧形成にあずかる対向流増幅系としてのヘンレ係蹄と対向流交換系としての直血管、さらに髄質高浸透圧形成に關する尿素の集合管からヘンレ係蹄へのリサイクリング、集合管での再吸収、特にADH存在下での水、尿素の透過性亢進などが上げられる<sup>6)</sup>。

そこで、カドミウムによる近位尿細管障害が、腎臓の尿浸透圧形成にどれほどの影響を与えているかということになる。我々の成績(表3)によれば、年齢的にみて $\beta_2$ -マイクログロブリンの尿中排せつ増加にしばらく遅れて、尿浸透圧と $\beta_2$ -マイクログロブリン濃度が有意な逆相関を示すようになり、両指標により表現されるカドミウムの腎臓への影響は、必ずしも同一機序ではなさそうである。

#### 謝 辞

本研究の遂行に際して御指導と御協力を頂いた、環境疫学研究室・新田裕史研究員(現東京大学医学部保健学科)に厚く感謝する。

#### 引 用 文 献

- 1) Saito, H., R. Shioji, Y. Hুরুkawa, T. Arikawa, T. Saito, K. Nagai, T. Furuyama and K. Yoshinaga (1977): Chronic cadmium poisoning induced by environmental cadmium pollution. Renal lesions (multiple proximal tubular dysfunctions) identified in residents of cadmium polluted Hosogoe, Kosaka town, Akita prefecture, Japan. *Jpn. J. Med.*, 16, 2-13.
- 2) Friberg, L., M. Piscator, G. F. Nordberg and T. Kjellström (1974): Systemic effects and dose-response relationships. *In: Cadmium in the Environment*, Friberg, L. *et al.* (eds.), CRC Press,

Cleveland, 101-130.

- 3) 斎藤 寛・永井謙一・有川 卓・斎藤喬雄・塩路隆治・古川洋太郎・古山 隆・吉永 馨 (1977): カドミウム環境汚染地域住民の尿  $\beta_2$ -microglobulin 濃度—カドミウム負荷量との Dose-Effect Relationship について. 医学のあゆみ, **100**, 350-352.
- 4) 斎藤 寛・薮 幸三・有川 卓・斎藤喬雄・古山 隆・吉永 馨 (1977): カドミウム環境汚染地域住民の尿  $\beta_2$ -microglobulin 濃度—対照群との年齢別の比較. 医学のあゆみ, **102**, 751-753.
- 5) 薮 幸三・斎藤 寛・中野篤浩・海上 寛・高田健右・佐藤徳太郎・古山 隆・吉永 馨・有川 卓・永井謙一 (1981): カドミウム環境汚染地域住民の尿中  $\beta_2$ -microglobulin—世代別, 性別の検討ならびに近位尿細管検査成績との比較. 日本腎臓学雑誌, **23**, 45-62.
- 6) 加藤暎一・阿部信一 (1980): 水代謝異常. 臨床腎臓病講座, 第一巻, 上田 泰・阿部 裕・東條静夫編, 金原出版, 35-52.

II-8

カドミウム汚染地域住民の甲状腺機能

Thyroid Gland Function of People in a Cadmium-Polluted Area

吉田克己<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>2,3</sup>・杉平直子<sup>2</sup>・中野篤浩<sup>2</sup>

Katsumi YOSHIDA<sup>1</sup>, Hiroshi SAITO<sup>2,3</sup>, Naoko SUGIHARA<sup>2</sup>  
and Atsuhiro NAKANO<sup>2</sup>

要 旨

昭和57年5月にカドミウム土壌汚染地域である長崎県対馬厳原町の住民258名について、血清中の thyroxine ( $T_4$ )と 3,5,3'-triiodothyronine ( $T_3$ ) 濃度及び  $T_3$  摂取率を測定し、 $T_4$  及び  $T_3$  濃度と  $T_3$  摂取率との積から free  $T_4$  index ( $FT_4I$ ) 及び free  $T_3$  index ( $FT_3I$ ) を算出し、性と年齢を合致させた対照地域住民230名の値と比較した。対馬では対照地域に比べて  $T_4$  は60及び70歳代で、 $T_3$  は50、60及び70歳代で、 $FT_4I$  は70歳代で、 $FT_3I$  は60及び70歳代で、いずれも有意に低下していたが、 $T_3$  摂取率は各年代で有意差がみられなかった。以上のことから、カドミウム汚染地域の住民では、甲状腺ホルモンの分泌及び代謝の両者に異常が惹起されている可能性が考えられた。

Abstract

In May, 1982, serum concentrations of thyroxine ( $T_4$ ) and 3,5,3'-triiodothyronine ( $T_3$ ) and  $T_3$  uptake were measured in 258 adults living in a cadmium-polluted area for a long time (Izuhara-machi, Tsushima, Nagasaki Pref. Japan), and the values were compared with those obtained in age- and sex-matched 230 adults living in cadmium-non-polluted areas. Free  $T_4$  index and free  $T_3$  index were calculated from serum  $T_4$  and  $T_3$  concentrations multiplied by  $T_3$  uptake. Free  $T_4$  index in the seventies, and free  $T_3$  index in the sixties and seventies in Tsushima area were significantly lower than those obtained in the control areas. These results indicate that cadmium may have some effects on both thyroid hormone secretion and metabolism.

1. 昭和57~59年度 国立公害研究所客員研究員 (東北大学医学部 〒980 仙台市星陵町1-1)  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1982-1984).  
(Tohoku University School of Medicine, Sendai, Miyagi 980, Japan.)
2. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 現在: 長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.



## 1 はじめに

甲状腺ホルモンは、主として thyroxine ( $T_4$ ) として分泌され、肝や腎などの末梢組織で 5'-deiodinase により脱ヨードをうけて 3,5,3'-triiodothyronine ( $T_3$ ) になり、ホルモン作用を発揮する<sup>1)</sup>。本酵素活性は、dithiothreitol や還元型グルタチオンなどの-SH 基を有する物質により活性化され、一方、絶食や種々の急性及び慢性疾患、経口胆嚢造影剤などの薬剤により抑制される<sup>1)</sup>。カドミウム、水銀、鉛などの重金属イオンは、-SH 基と結合しやすく、本酵素活性を阻害する可能性が考えられ、水銀がラット肝  $T_4$  5'-deiodinase 活性を *in vitro* で抑制するという報告<sup>2)</sup>がある。また、重金属が甲状腺あるいは下垂体に取り込まれて、甲状腺ホルモンの産生を抑制する可能性も考えられ、この点については鉛中毒で甲状腺のヨード摂取率並びに血中甲状腺ホルモン濃度が低下すると報告<sup>3)</sup>されている。以上のように、重金属が甲状腺ホルモンの分泌及び代謝に影響を与える可能性が考えられるため、本研究ではカドミウム汚染地域住民の甲状腺ホルモン濃度を測定し、対照地域住民の値と比較した。

## 2 対象並びに方法

1982年5月にカドミウム土壌汚染地域である長崎県対馬厳原町の住民258名及び対照地域として秋田県井川町、岩手県大迫町及び茨城県筑波町の性と年齢を合致させた住民230名から採血し、血清中の  $T_4$  と  $T_3$  濃度、 $T_3$  摂取率及び thyroid stimulating hormone (TSH) を測定した。 $T_4$  濃度はダイナボット社製  $T_4$ RIA キット (正常範囲 4.5~13.0  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) で、 $T_3$  濃度は既に報告した我々の方法<sup>4)</sup>によるラジオイムノアッセイ (正常範囲 70~180  $\text{ng}/\text{dl}$ ) で、 $T_3$  摂取率はコーニング社製 Magic  $T_3$  Uptake キット<sup>5)</sup> (正常範囲 26.2~35.0%) で、TSH 濃度は第一ラジオアイソトープ社製 TSHRIA キット (正常範囲 0~8  $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) で測定し、血清  $T_4$  及び  $T_3$  濃度と  $T_3$  摂取率との積から free  $T_4$  index ( $\text{FT}_4\text{I}$ ) 及び free  $T_3$  index ( $\text{FT}_3\text{I}$ ) を算出した。これらの index はタンパク質と結合していない、遊離のすなわち活性型のホルモンを示している。汚染地域住民と対照地域住民の血清  $T_4$  及び  $T_3$  レベルと  $T_3$  摂取率は、その平均値を、Student の t 検定を用いて解析し、比較した。なお、 $T_4$  及び  $T_3$  レベルがともに高値 (対馬2例、対照2例) 及びともに低値 (対馬1例) を示した症例は、統計的処理から除外した。

## 3 結果

表1に示すように、対馬では対照地域に比べて血清  $T_4$  濃度は60及び70歳代で、血清  $T_3$  濃度は50、60及び70歳代で有意に低下しており、 $T_3$  摂取率は各年代で有意差がみられなかった。表2及び表3に  $\text{FT}_4\text{I}$  及び  $\text{FT}_3\text{I}$  を示す。 $\text{FT}_4\text{I}$  は対馬では年齢によりほとんど変動がみられなかったのに対し、対照地域では70歳代で40及び50歳代に比べて有意に高値を示した。対馬では対照地域に比べて30歳代から60歳代までは有意差が認められなかったが、70歳代では有意に低値を示した。一方、 $\text{FT}_3\text{I}$  は対馬では年齢に伴い低下する傾向を示し、60及び70歳代ではそれぞれ30、40

表 1 カドミウム汚染地域と対照地域住民の血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>濃度及び T<sub>3</sub>摂取率  
 Table 1 Serum T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> levels and T<sub>3</sub> uptake of adults living in Cd-polluted and non-polluted areas

	血清 T <sub>4</sub> (μg/dl)		血清 T <sub>3</sub> (ng/dl)		T <sub>3</sub> 摂取率 (%)	
	対照地域	対馬	対照地域	対馬	対照地域	対馬
30歳代	9.3±2.1 (n=33)	9.4±1.7 (n=19)	110.3±22.2 (n=33)	124.8±21.5 (n=18)	31.2±3.2 (n=31)	30.7±3.9 (n=16)
	n. s.		P<0.05		n. s.	
40歳代	8.7±1.7 (n=46)	9.4±0.7 (n=6)	110.7±19.7 (n=45)	124.0±15.0 (n=6)	30.7±2.7 (n=47)	30.4±3.7 (n=4)
	n. s.		n. s.		n. s.	
50歳代	8.9±2.0 (n=86)	8.4±1.7 (n=120)	115.2±21.2 (n=87)	106.4±21.1 (n=120)	30.7±2.9 (n=79)	31.4±3.0 (n=85)
	n. s.		P<0.05		n. s.	
60歳代	9.6±2.1 (n=46)	8.8±1.9 (n=60)	118.2±23.9 (n=45)	103.3±19.4 (n=59)	30.5±2.8 (n=39)	30.4±3.3 (n=37)
	P<0.05		P<0.01		n. s.	
70歳代	10.0±1.7 (n=17)	8.8±1.7 (n=50)	118.5±16.6 (n=17)	100.1±21.6 (n=50)	30.0±2.4 (n=16)	31.8±3.2 (n=35)
	P<0.05		P<0.01		n. s.	

注) n. s. : 有意差なし

表 2 カドミウム汚染地域と対照地域住民の free T<sub>4</sub> index  
 Table 2 Free T<sub>4</sub> index of adults living in Cd-polluted and non-polluted areas

	対 照 地 域	対 馬
30 歳代	2.89±0.44 (n=30)	2.88±0.46 (n=16)
	n. s.	
40 歳代	2.64±0.43 (n=48)	2.92±0.49 (n=4)
	n. s.	
50 歳代	2.71±0.54 (n=79)	2.71±0.58 (n=84)
	n. s.	
60 歳代	2.89±0.55 (n=39)	2.70±0.51 (n=37)
	n. s.	
70 歳代	3.07±0.50 (n=16)	2.68±0.50 (n=36)
	p<0.05	

注) n. s. : 有意差なし

表 3 カドミウム汚染地域と対照地域住民の free T<sub>3</sub> index  
 Table 3 Free T<sub>3</sub> index of adults living in Cd-polluted and non-polluted areas

	対 照 地 域	対 馬
30 歳代	34.4±6.1 (n=31)	38.6±6.2 (n=16)
	p<0.05	
40 歳代	33.2±6.8 (n=48)	38.4±7.3 (n=4)
	n. s.	
50 歳代	35.4±6.3 (n=79)	35.0±6.0 (n=84)
	n. s.	
60 歳代	35.5±6.0 (n=39)	31.6±5.4 (n=37)
	p<0.01	
70 歳代	35.5±3.9 (n=16)	31.2±6.4 (n=36)
	p<0.01	

注) n. s. : 有意差なし

及び50歳代に比べて有意に低下していたのに対し、対照地域では30歳代から70歳代まで各年代ではほぼ一定の値を示した。対馬では対照地域に比べると30、60及び70歳代で有意に低下していた。表4に示すように、血清TSH濃度は各年代で対馬と対照地域の間には有意差は認められなかった。

表 4 カドミウム汚染地域と対照地域住民の血清 TSH 濃度  
 Table 4 Serum TSH levels of adults living in Cd-polluted and non-polluted areas  
 ( $\mu\text{U/ml}$ )

	対 照 地 域	対 馬
30 歳代	2.9 $\pm$ 4.2 (n=33)	2.7 $\pm$ 1.4 (n=17)
	n. s.	
40 歳代	2.5 $\pm$ 1.5 (n=47)	3.3 $\pm$ 1.8 (n=5)
	n. s.	
50 歳代	3.4 $\pm$ 2.8 (n=87)	2.8 $\pm$ 1.9 (n=110)
	n. s.	
60 歳代	2.7 $\pm$ 1.7 (n=45)	2.3 $\pm$ 1.4 (n=58)
	n. s.	
70 歳代	2.3 $\pm$ 1.0 (n=18)	3.2 $\pm$ 1.9 (n=44)
	n. s.	

注) n. s.: 有意差なし

#### 4 考 察

カドミウム環境汚染の健康に及ぼす影響については、腎障害及び骨軟化症がよく知られている<sup>6)</sup>。冒頭にも述べたように、重金属が甲状腺ホルモンの分泌及び代謝に影響を与える可能性が十分に考えられるにもかかわらず、カドミウムの甲状腺機能に及ぼす影響については現在までほとんど報告がみられない。

本研究では、カドミウム土壌汚染地域である長崎県対馬厳原町住民の血中甲状腺ホルモン濃度を測定し、FT<sub>4</sub>I は 70 歳代で、FT<sub>3</sub>I は 60 及び 70 歳代で、いずれも対照地域住民の値に比べて低下していた。

成人の場合、血清甲状腺ホルモンの年齢に伴う変動については、一般に T<sub>4</sub>及び遊離 T<sub>4</sub>はほぼ不変であり、T<sub>3</sub>及び遊離 T<sub>3</sub>は高齢になるに従い低下すると考えられているが<sup>7)</sup>、高齢者でも健康に生活している人を対象にすると T<sub>3</sub>濃度は低下しないという報告<sup>8)</sup>もみられる。今回の我々の検討では、対照地域の FT<sub>3</sub>I は 30 歳代から 70 歳代までほぼ一定の値を示しており、後者の報告を支持する結果が得られた。一方、対馬地域では、FT<sub>3</sub>I は 60 及び 70 歳代で、いずれも 30、40 及び 50 歳代に比べて有意に低下していた。

以上のことから、対馬地域の高齢者では、カドミウムに長期間暴露された結果、腎あるいは他の臓器の障害が起り、T<sub>4</sub>から T<sub>3</sub>への転換が低下するとともに、甲状腺からの T<sub>4</sub>の分泌も低下しており、血清 TSH 濃度には変化がみられなかったものの、潜在性甲状腺機能低下状態になっている可能性が考えられた。

潜在性甲状腺機能低下症と動脈硬化性疾患との関連は以前より注目されているところであり<sup>9)</sup>、一方、カドミウム投与家兎での高コレステロール症の発症<sup>10)</sup>や、カドミウム汚染地域住民の血中カドミウム値と動脈硬化性疾患との関連<sup>11)</sup>も報告されており、これらにカドミウムによりひきおこされた甲状腺ホルモンの変化がどのように関与しているか今後の検討を要する。

#### 謝 辞

本研究の遂行に当たり、御協力いただいた東北大学医学部第二内科、鈴木道子博士、桜田俊郎博士に深く感謝します。

#### 引 用 文 献

- 1) Chopra, I.J., D.H. Solomon, U. Chopra, S.Y. Wu, D.A. Fisher and Y. Nakamura (1978): Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.*, **34**, 521-567.
- 2) Visser, T.J., I.V.D. Does-Tobé, R. Doctor and G. Hennemann (1976): Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine into tri-iodothyronine and possible involvement of essential thiol groups. *Biochem. J.*, **157**, 479-492.
- 3) Robins, J.M., M.R. Cullen, B.B. Connors and R.D. Kayne (1983): Depressed thyroid indexes associated with occupational exposure to inorganic lead. *Arch. Intern. Med.*, **143**, 220-224.
- 4) 桜田俊郎・山口 徹・山本蒔子・出村黎子・出村 博・福地総逸・斎藤慎太郎 (1972): triiodothyronine の radioimmunoassay. *日本内分泌学会雑誌*, **48**, 559-568.
- 5) 吉田克己・桜田俊郎・野村 隆・鈴木道子・海瀬和郎・海瀬信子・貴岡博史・深沢 洋・板垣洋一・山本蒔子・斎藤慎太郎 (1984): Magic T<sub>3</sub> Uptake による T<sub>3</sub> 摂取率測定法の基礎的ならびに臨床的検討. *医学と薬学*, **11**, 1061-1066.
- 6) Saito, H., R. Shioji, Y. Hurukawa, K. Nagai, T. Arikawa, T. Saito, Y. Sasaki, T. Furuyama and K. Yoshinaga (1977): Cadmium-induced proximal tubular dysfunction in a cadmium-polluted area. *Contr. Nephrol.*, **6**, 1-12.
- 7) Havard, C.W.H. (1981): The thyroid and aging. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **10**, 163-178.
- 8) Sakata, S., S. Nakamura, K. Kamikubo, N. Kojima, T. Komaki and K. Miura (1984): Effect of aging on serum T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and TSH levels in healthy. Program of the VII th International Congress of Endocrinology, 1097 P. (Abstract).
- 9) Fowler, P.B.S., J. Swale and H. Andrews (1970): Hypercholesterolemia in borderline hypothyroidism, stage of premyxedema. *Lancet II*, 488-491.
- 10) Yoshikawa, H., M. Ohsawa, and M. Kaneta (1974): Clinicochemical studies on subacute cadmium poisoning in rabbits. *Ind. Health*, **12**, 127-140.
- 11) Carroll, R.E. (1966): The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *J. Am. Med. Assoc.*, **198**, 177-179.

II-9           メタロチオネインの超微量定量法の開発と環境中  
                  カドミウムの健康影響評価への応用

**Development of an Ultramicro-determination of Metallothionein  
and its Application to the Assessment of Health Effects due  
to Environmental Cadmium Exposure**

遠山千春<sup>1</sup>・三種裕子<sup>1</sup>・斎藤 寛<sup>1,2</sup>・杉平直子<sup>1</sup>  
小林悦子<sup>3</sup>・中野篤浩<sup>1</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Chiharu TOHYAMA<sup>1</sup>, Yuko MITANE<sup>1</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,2</sup>  
Naoko SUGIHARA<sup>1</sup>, Etsuko KOBAYASHI<sup>3</sup>, Atsushi NAKANO<sup>1</sup>  
and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

**要 旨**

メタロチオネイン (MT) は、カドミウム (Cd) への暴露によって体内での生合成が誘導され、Cd 等重金属を結合する低分子のタンパク質である。微量 ( $1 \times 10^{-9}$ g) のこのタンパク質を特異的に定量する方法として、今回、ラジオイムノアッセイ (RIA) を確立し、Cd の毒性評価に関する実験的及び疫学的研究に応用した。

ラット MT を抗原とし、ウサギ及びウズラに免疫したが、RIA に使用可能な抗血清を産生したものは、ウサギ 24 羽のうち 2 羽のみであった。この抗血清を用いた RIA では、1~100 ng の MT を定量することが可能である。

Cd 暴露と臓器中及び尿中 MT との関係を調べるために、ラットに Cd 塩を 10 週間にわたって投与した。尿中への MT の排せつは、尿中への Cd に先立って上昇し、排せつレベルは暴露とともに増加した。肝臓及び腎臓においては、投与 1 週間後には既に大量 (それぞれ対照群の 44 倍と 9 倍) の MT が生合成され貯留していた。これらの結果から、尿中 MT レベルは、Cd 暴露程度を反映する特異的指標となり得ることが示唆された。

本来の研究対象である人間集団について、Cd 土壌汚染地域住民 (長崎県厳原町) の検診を行い、Cd 暴露と腎尿管障害との関係を検討した。尿中 MT レベルは尿中 Cd 及び銅レベルとの間に有意な相関が認められ、また、近位尿管再吸収機能低下を反映する種々の

- 
1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 現在 : 長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町 12 番 4  
Present address : Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.
  3. 昭和 57~59 年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for the Environmental Studies (1982-1984).

指標との間にも統計的に有意な正の相関が認められた。

以上の成績から、尿中 MT レベルは、環境中 Cd 暴露の程度を鋭敏に反映し、かつ Cd 暴露による腎機能低下を評価するうえで有用な新しい指標となり得ることが示唆された。

### Abstract

Metallothionein is a low-molecular-weight and heavy-metal-binding protein, the biosynthesis of which is induced upon Cd exposure. As a specific determination method of a very little amounts of the protein ( $10^{-9}$ g), we have developed a radio-immunoassay of MT and applied the assay to experimental and epidemiologic studies. Although rabbits and Japanese quails were immunized with different kinds of rat MT-1 preparations, only two out of 24 rabbits produced antisera utilizable in the RIA. Using the antisera a range of 1 to 100 ng of MT was determined with sufficient precision.

In order to investigate relationships of Cd exposure with MT levels in tissues and in urine, rats were injected Cd salts over a 10 week period. The urinary excretion of MT was found to increase with duration of Cd-exposure, preceding to the increased Cd excretion. It should be noted that the liver and kidney of the Cd-exposed rats retained considerable amounts (44 and 9 times as high as control levels of saline-injected rats) of MT. In a health examination of people living in a Cd-polluted area in Izuhara, Nagasaki Prefecture, the relationship between Cd exposure and renal tubular dysfunction was examined. The urinary MT level showed a significant correlation not only with urinary Cd and Cu levels but also with various indices of renal proximal tubular dysfunction.

The present results, thus, support the supposition that the urinary MT level reflects with high sensitivity the extent of environmental Cd exposure and that it could be a new specific indicator of evaluating the renal dysfunction caused by the Cd exposure.

### 1 はじめに

1960年代初頭に、カドミウム (Cd) を高濃度に含有する低分子タンパク質が、馬の腎皮質から初めて分離精製され、メタロチオネイン (MT) と命名されて以来、同様の物理化学的特徴を有するタンパク質は、ほ乳類のみならず、微生物、高等植物にも遍在することが明らかとなった。いまだ、このタンパク質の生理的役割は明らかではないが、必須金属である亜鉛 (Zn) と銅 (Cu) の代謝並びに Cd と水銀 (Hg) の毒性軽減に関与していると考えられている。このような生理学的役割とは対照的に、Cd を結合している MT (以下、Cd-MT) が腎毒性を有することも観察された。Cd に暴露後に、循環血流中及び尿中へ出現すると予想されている MT と Cd によって引き起こされる腎障害との関連も検討される必要がある<sup>1-3)</sup>。

MT の生理学的及び毒性学的意義を解明するために、MT を特異的かつ感度良く定量する方法が不可欠である。この目的のためには抗原抗体反応に基づいたラジオイムノアッセイ (RIA) が最

適である。ほぼ時を同じくして、我々及びGarveyらによって、ナノグラム量のMTをRIAによって定量できることが報告された<sup>4,7)</sup>。

MTのRIAの開発に際して困難な点は、力価及び親和性の大きい抗体を作製することであり、測定感度の高いアッセイ系を確立することである。本報告では、これらの点並びに、RIAによって初めて定量可能となった尿中へのMT排泄レベルがCdによる腎障害の指標として有用である点について、Cdを投与した実験動物の場合と、Cd土壌汚染地域住民の場合について検討を加える。

## 2 材料と方法

### 2.1 メタロチオネイン (MT) の分離精製

RIAの系を確立するために必要な抗体を得るためには、高純度の抗原が必要である。既に明らかにしたように、ラット由来のMTに対する抗体は、ヒト由来のMTに対しても完全に交叉性を示す<sup>5)</sup>。そこで、抗原として用いたMTは、あらかじめの塩化カドミウム水溶液を皮下注射してMTを産生させておいたラットの肝臓から、既報の方法に基づいて単離精製した。分離精製法の概要を図1に示す。精製したイソタンパク質であるMT-1とMT-2の純度は、Davisの方法に基づくポリアクリルアミド電気泳動で、単一のタンパク質として泳動されることを確認した<sup>4,5)</sup>。

作製した抗体との免疫学的交叉性を調べるために、剖検で得た、病変のないヒトの腎組織から、上記の方法に基づいて、MT-1及び2を分離精製した。

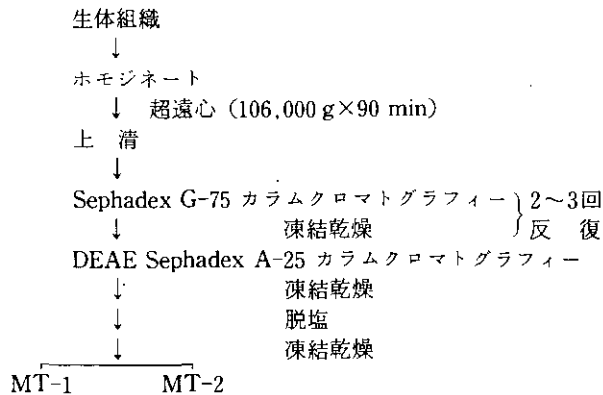


図 1 メタロチオネインの分離精製の手順

Fig. 1 A scheme of the isolation and purification of metallothionein

### 2.2 抗体の作製

ラット肝臓から分離精製したMT-1もしくはMT-2を用い、5種類の異なる免疫用注射液を調



製した。それらは、(1)Rat MT-1 ポリマー、(2)Rat MT-2 ポリマー、(3)Rat MT-1 と牛血清アルブミン (以下 BSA) との複合体、(4)Rat MT-2 と BSA との複合体、(5)Rat MT-1 と回虫由来タンパク質の粗精製品との複合体、(6)Rat MT-1 とウサギ IgG との複合体、(7)ヒト MT-1 とヤギ IgG との複合体、(8)ヒト MT-1 と回虫タンパク質の粗精製品との複合体、(9)Rat MT-2 と回虫タンパク質の粗精製品との複合体、並びに(10)Rat MT-2 とメチル化 BSA との混合液である。

これらの抗原(1)~(5)は2匹ないし5匹のウサギにそれぞれ注射した。また、(2)及び(10)については、本研究所動物棟において継代繁殖しているニューカッスル病ウィルスに対する抗体産生能の高いウズラを用いた。

以上のうち、RIA に用いることが可能な抗体を産生したものは、上記(3)又は(5)を免疫したウサギ各5頭のうちの1頭であった。以下に、その抗原の調製法を記す。

Rat MT-1 (20 mg) と BSA (11 mg) もしくは回虫粗精製タンパク質 (15 mg) を 5 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。この液に 14% グルタルアルデヒド 175  $\mu$ l を、5 分に一滴の速度で添加した。反応液は 30 分間室温に放置し、その後生理食塩水 5 l に対して一昼夜、透析した。透析後、反応液をタンパク質濃度が MT として、1 ml 当たり 0.4 mg となるように生理食塩水で希釈した。アジュバントを用いた場合には、等量を抗原液と混ぜ、乳化させた。

体重 2.5 kg の New Zealand 系ウサギの背中 (5 cm 四方) の皮内 40 か所に、2 週間間隔で 4 回免疫した。最初の 2 回は Freund's incomplete adjuvant (FIA) を用い、次の 2 回は Freund's complete adjuvant (FCA) を用いた。免疫量は 1 ml で、MT として 200  $\mu$ g であった。5, 6 回目はアジュバントを用いず、0.2 ml を耳静脈から注入した。

コントロール用血清は、免疫開始前に採取した。抗体産生の程度を調べるため、注射後 5~7 日ごとに採血し、血清を得た。

標識抗原としては、Bolton-Hunter 試薬 (N-succinimidyl 3-(4-hydroxy 5-[<sup>125</sup>I] iodophenyl propionate) を用いた。MT にはチロシン残基が存在しないために、従来の方法では、ヨード化できないためである。標識には Rat MT-2 を用いた。図 2 に示すように、標識 MT は Sephadex G-25 クロマトグラフィーにより void volume (分画 16~26) に溶出された。標識の収率は 10~30% であった。

抗体産生の程度を調べるために、硫酸アンモニウム (硫安) による塩析法を用いた。正味 (特異的) 結合率は、Rat MT-1 及び BSA 複合体に対する抗血清の場合最終希釈度 600 倍で 11.6  $\pm$  1.2% (n=5)、非特異的結合率は 3.11  $\pm$  0.44% (n=5) であった。この条件では、既報<sup>9)</sup>の我々のアッセイ条件に比べ、特異的結合率と非特異的結合率の比が、2.2 倍から 3.7 倍へ改善された。

RIA の至適条件を検討した結果、アッセイは以下の手順で 4°C で行うこととした。希釈用緩衝液として、75 mM NaCl, 10 mM EDTA を含む 125 mM borate-NaOH 緩衝液 (pH 8.3) を用いた。試料の希釈液としては、透析して MT を除去したウマ血清を上記緩衝液で 10 倍希釈したも

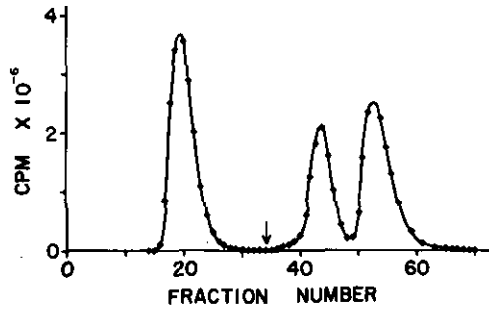


図 2 セファデックス G-25 カラムクロマトグラフィーによる<sup>125</sup>I-MT の分離

Fig. 2 Isolation of <sup>125</sup>I-labelled metallothionein by Sephadex G-25 column chromatography

のを使用した。

試料は、尿については10倍以上、臓器上清は500倍以上に希釈した。検量線又は免疫学的交叉性を検討するために、既知量のMTを溶解した液を調製した。これらの生体試料希釈液又はMT溶液100 $\mu$ lをプラスチック試験管にとり、これに抗血清またはコントロール血清を100 $\mu$ l添加後、<sup>125</sup>I-標識ラットMT-2溶液(～20,000cpm)を100 $\mu$ l加えて混合した。5時間以上4 $^{\circ}$ Cで放置後、抗原抗体複合体を遊離抗原から分離するために100%飽和硫酸を200 $\mu$ l加え、十分にかくはんし、30分間4 $^{\circ}$ Cで放置した。2,000gで20分間遠心後、上清をアスピレーターで吸引除去し、沈殿は40%飽和硫酸500 $\mu$ lで洗い、再度、同様に遠心した。上清を除去後、沈殿に含まれる<sup>125</sup>Iの放射能を $\gamma$ 線用井戸型シンチレーションカウンターで測定した。

RIAのデータの標準化のために、非放射性抗原の存在する場合、すなわち生体試料または既知量のMTを含む溶液の場合に得られる正味の結合パーセント値(B/T)を、非放射性抗原が存在しない場合に得られる正味の値(B<sub>0</sub>/T)で割って得られる商(B/B<sub>0</sub>)を用いた。また、試料中のMT値を、コンピューターを用い算出するために、以下の式を用いて、logit-log変換<sup>9)</sup>を行い、直線近似できる範囲(通常、B/B<sub>0</sub>値が10～90%)で、MT値を求めた。

$$Y = a + bX \quad \text{ただし、} Y = \text{logit } y = \log \frac{y}{1-y},$$

$$y = \frac{B}{B_0}$$

$$X = \log x; x = \text{dose}$$

### 2.2.1 Cd投与ラットにおける尿中及び臓器中MTの定量

Wistar系の雌ラット(11週齢)をステンレス飼育箱で飼い、この間、食飼と飲料水は自由に摂取させた。実験群として45匹を1群5匹ずつ9群に分け、10週間にわたって塩化カドミウムを、体重1kg当たりCdとして1mg週5回、皮下注射した。コントロール群として、5匹には生理食

塩水を同様に皮下注射した。ラットは、一定期間ごとにガラス製代謝ケージにて24時間飼育し、採尿した。採尿管は、冷却槽において5°Cにて保った。なお、尿への重金属類の外部からの混入を防ぐために、採尿期間の給飼は行わなかった。採尿終了後、エーテル麻酔下で解剖し、肝臓及び腎臓を摘出した。重金属測定のため、代謝ケージ等ガラス器具はすべて硝酸洗浄したものをを用いた。尿及び臓器の一部は重金属分析のため、混酸（硝酸、過塩素酸、硫酸を50:48:2の割合で混合）にて湿式灰化した。残りの試料は分析まで-80°Cにて保存した。

臓器は窒素置換したRIA用緩衝液を用いて10%ホモジネートを調製し、超遠心機にて200,000×gで40分間遠心し、上清を得た。上清及び尿は、RIAの検量線の至適域に納まるように希釈し、MTの定量を行った。

### 2.2.2 Cd 土壤汚染地域住民を対象とした疫学研究

対象地域及び被験者及び分析方法は、基本的には、本報告集の別報告に記した内容と同様である<sup>9)</sup>。すなわち、Cd 土壤汚染地域の一つである長崎県敵原町の4地区の50歳以上の男女住民である。血清又は尿中の物質については、クレアチニン、無機リン、尿酸、 $\beta_2$ -ミクログロブリン、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、総タンパク質、N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ (NAG)、重金属 (Cd, Cu, Zn) を分析した。尿中MTは、上述のように、尿を緩衝液で10倍希釈後に分析した。

## 3 結果

### 3.1 メタロチオネインのRIAの確立

今回免疫を試みたウサギ24羽のうち、MTのRIAに可能な抗血清を産生したものは、Rat MT-1とBSAの複合体、もしくはRat MT-1と回虫粗精製品との複合体を抗原としたもの各1羽であった。MTの抗原性が極めて弱い理由は、一つには異なる動物種のMTのアミノ酸配列が極めて類似しているためであろう。ちなみにRat MT-2ポリマー、もしくはRat MT-2とメチル化BSA混合物を投与したウズラにおいても、抗体産生が見いだされなかった。

Rat MT-1とBSAとの複合体に対する抗体を用いて、MTのRIAの系を作製した。図3に示したように、この抗原に対する抗血清は、ラット肝臓及びヒト腎臓由来のMT-1とMT-2と、完全に免疫学的に交叉した。この知見は、我々の既に報告した知見<sup>4,5)</sup>及びGarveyらの知見と一致する。この点、様々な抗原特異性を示す抗MTモノクローナル抗体<sup>10)</sup>とは、性質が異なっているように考えられる。

図4に、標準曲線及びlogit-log変換図の一例を示す。50%阻害値は、測定感度の指標の一つとして用いられている。この値は、試験管当たり約20ngであり、試料1ml当たり200ngとなる。ただし、実際のMT量は、試料の希釈度を乗じた値となる。今回、動物実験及び人間集団の疫学調査の試料分析に際しては、試験管当たりのMT値が1ないし2ngから100ngの範囲でアッセイを行った。

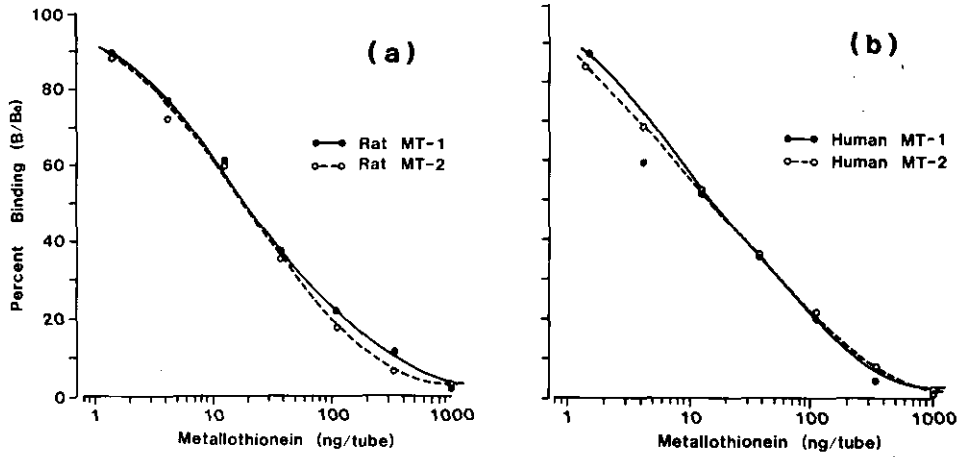


図 3 ラット及びヒトのメタロチオネイン-1及び-2とラットメタロチオネイン-1 に対するウサギ抗血清との交叉性

Fig. 3 Cross-reactivity of rat and human metallothionein-1 and 2 with rabbit antiserum against rat metallothionein-1

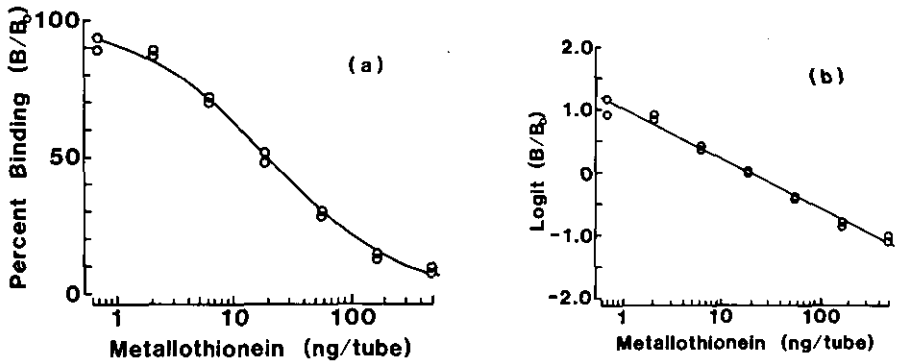


図 4 メタロチオネインのRIAの標準曲線(a)及びそのlogit-log変換図(b)

Fig. 4 Standard curve of metallothionein radioimmunoassay (a) and its logit-log transformation (b)

### 3.2 Cd 投与ラットにおける尿中 MT 及び臓器中 MT の意義

図5に示したように、Cdの暴露量が増加するに従い、肝臓及び腎臓のCd濃度は上昇し、投与開始後6週後に、それぞれ、550  $\mu\text{g/g}$ と190  $\mu\text{g/g}$ に達し、プラトー状態となった。臓器中MTレベルについて、肝臓では既に投与開始1週間で3.3  $\text{mg/g}$ に達し、その後上昇して6週目以降6.0  $\text{mg/g}$ で横ばいとなった。腎臓のMTレベルは、1週目で0.6  $\text{mg/g}$ であり、肝臓と同様6週目でプラトーに達し、10週目で減少傾向を示した(図6)。

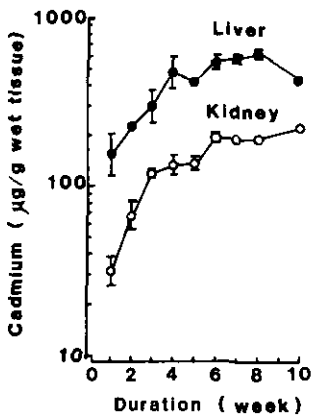


図 5 Cd 投与ラットにおける肝臓及び腎臓中 Cd レベルの経時的変化

Fig. 5 Change in Cd levels in the liver and kidney of Cd-treated rats

(●—●: Cd 投与群, ○—○: 対照群)

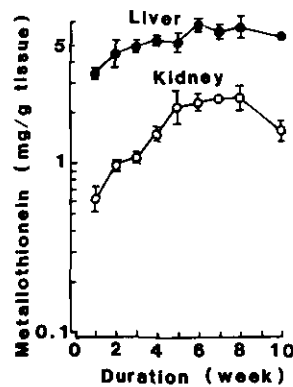


図 6 Cd 投与ラットにおける肝臓及び腎臓中メタロチオネインレベルの経時的変化

Fig. 6 Change in metallothionein levels in the liver and kidney of Cd-treated rats

(●—●: Cd 投与群, ○—○: 対照群)

Cd 暴露の程度を反映すると考えられる尿中 Cd レベルは、投与開始後3週目まではコントロールのラットと同様、1日1  $\mu\text{g}$  以下であったが、4週目以降上昇し続け、9週及び10週目では1日当たり130  $\mu\text{g}$  にまで達した(図7)。尿中へのMTの排せつは、投与開始後から9週目までそのレベルの対数値は、ほぼ直線的に増加し、10週目でやや減少する傾向を示した(図8)。

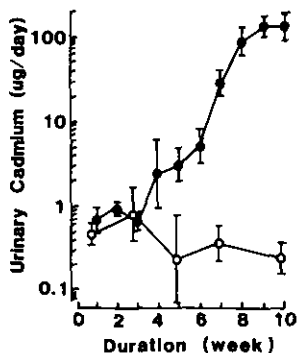


図 7 Cd 投与ラットにおける尿中 Cd の経時の変化  
 Fig. 7 Change in the urinary Cd level of Cd-treated rats  
 (●—●: Cd 投与群, ○—○: 対照群)

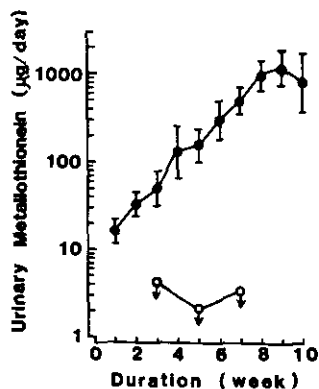


図 8 Cd 投与ラットにおける尿中 MT レベルの経時の変化  
 Fig. 8 Change in the urinary MT level of Cd-treated rats  
 (●—●: Cd 投与群, ○—○: 対照群)

### 3.3 Cd 土壤汚染地域住民における尿中への MT 排せつ増加の意義

本報告では、50 歳以上の住民のうち女 154 人 (受診率 91.0%) について検討し、このうち、定量限界 (269  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) 以上の MT を排せつしている 129 人のデータについて解析を行った。図 9 に年齢と尿中 MT レベルとの関係を示す。加齢に伴い、尿中への MT 排せつはやや上昇するように

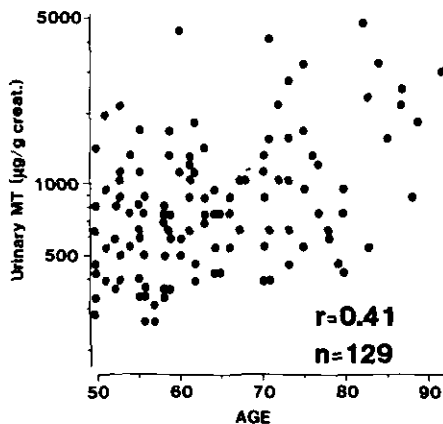


図 9 Cd 土壤汚染地域女子住民における尿中メタロチオネインレベルと年齢との関係  
 Fig. 9 Relationship of the urinary metallothionein level with age in women living in a Cd-polluted area

も見受けられるが、統計的に有意な関係は認められなかった。

尿中MTレベルと、MTに結合する重金属のうちCd, Cu, Znの三金属の尿中レベルとの関係を調べてみると、Cd, CuはMTと有意な相関が認められたが(図10(a), (b)), Znとの間には有意な相関は認められなかった(図10(c))。

腎機能障害の指標である尿中タンパク質レベル, また近位尿細管再吸収機能の障害の非特異的指標である尿中総タンパク質,  $\beta_2$ -mg及び $\alpha_1$ -mgレベル並びに,  $\beta_2$ -mgクリアランス(%Ccr), リン酸クリアランス(%Ccr), 尿酸クリアランス(%Ccr)との関係を調べてみると, いずれの指標とも危険率0.1%で有意な正相関が認められた(図11(a)~(g))。さらに, 近位尿細管上皮細胞のライソゾームに局在することが知られ, この細胞の損傷の指標である尿中NAGレベルの間にも有意な正の相関が認められた(図11(g))。さらに興味深いことは, 尿中 $\beta_2$ -mgレベルのしきい値は, 約1400  $\mu\text{g/g}$ クレアチンである<sup>11)</sup>が, 図11(b)から明らかなように, ほぼこの値を境にして尿中へのMT排せつも増加する傾向が認められた。

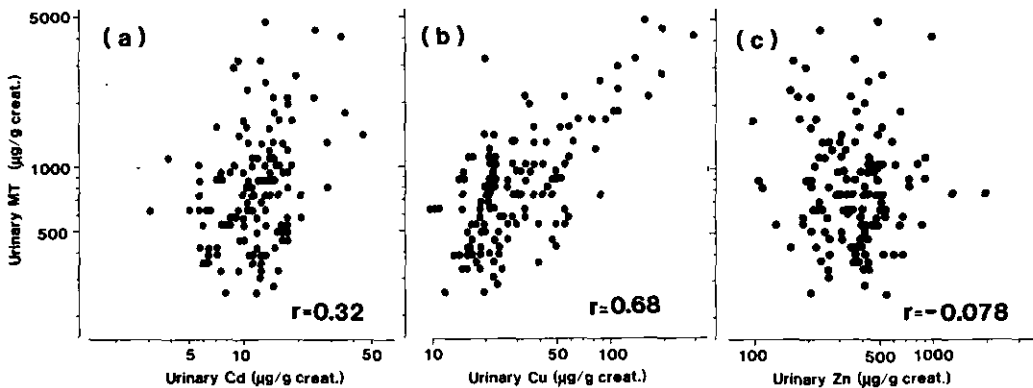


図 10 Cd土壌汚染地域女子住民における尿中メタロチオネインレベルと尿中 (a) Cd, (b) Cu及び(c) Znレベルとの関係

Fig. 10 Relationship of the urinary metallothionein level with the urinary (a) Cd, (b) Cu and (c) Zn levels in women living in a Cd-polluted area

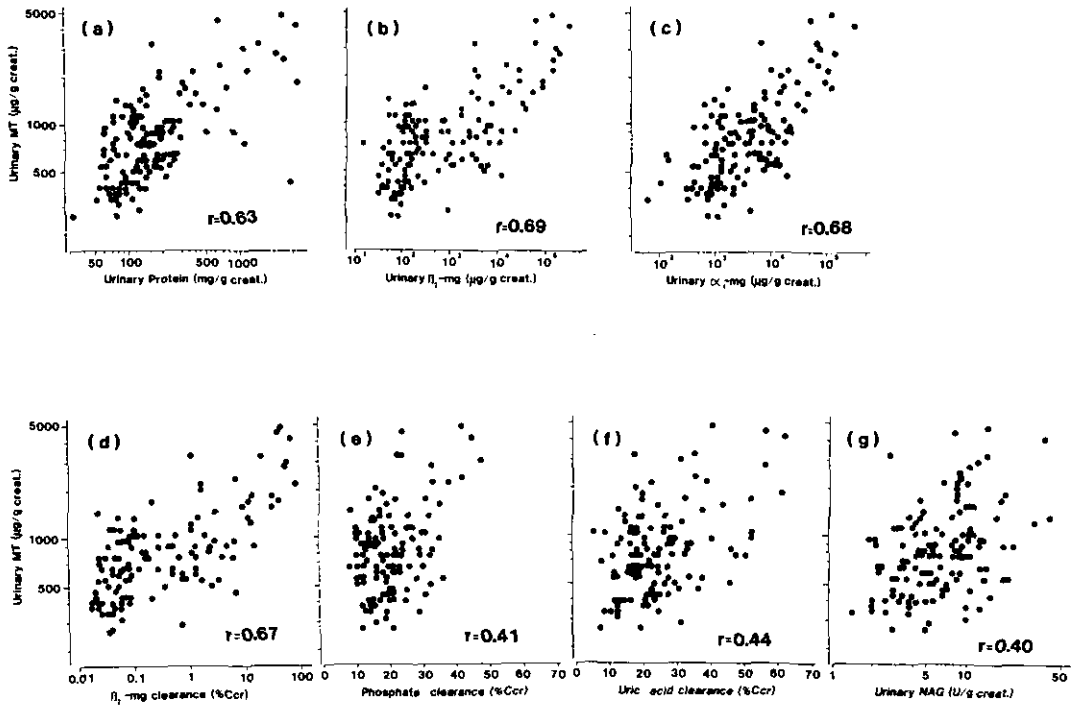


図 11 Cd 土壌汚染地域女子住民における尿中メタロチオネインレベルと腎機能障害の各種指標との関係

Fig. 11 Relationships of the urinary metallothionein level with various indices of renal dysfunction in women living in a Cd-polluted area

(a) 尿中総タンパク質, (b) 尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン, (c) 尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリン, (d)  $\alpha_1$ -マイクログロブリンクリアランス (%Ccr), (e) リン酸クリアランス (%Ccr), (f) 尿酸クリアランス (%Ccr), (g) 尿中 N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ



#### 4 考察

本研究で作製した抗血清は、1 ng～100 ng の範囲内で MT を定量するために十分なものであり、この測定領域は、我々が既に報告した MT の RIA の系とほぼ同じ範囲である<sup>5)</sup>。ただし、抗血清の最終力価は 600 倍であり、既報の条件に比べて 4 分の 1 であった。この抗血清は、特異的結合率の非特異的結合率に対する比が 2.2 倍から 3.7 倍へと改善された。

この抗血清も、既に我々及び Garvey らが報告したように、ラット及びヒト由来の MT-1 と MT-2 との間で完全に交叉性を示した<sup>4-7)</sup>。このことは、この抗血清及び標識ラット MT-2 を用いて、ラット及びヒト MT の定量が可能であることを示している。Bremner らの最近の報告<sup>12)</sup>によると、ラット MT-1 とウサギ IgG をグルタルアルデヒドにて架橋した可溶性抗原を用いてヒツジに免疫し抗血清を作製したところ、この抗血清は MT-1 にのみに特異性を示し、MT-2 とは反応を示さなかった。一般に、ポリクローナル抗体の場合には、MT-1 とウサギ IgG 複合体の複数の抗原決定基に対する抗体から成ると考えられる。また MT-1 と MT-2 は、数個のアミノ酸が異なるだけであり、ポリクローナル抗体が、この両者を完全に識別するとすれば、アミノ酸組成の違いとそれによる立体構造の違いが、MT-1 と MT-2 との抗原決定基の違いとして機能していると考えられよう。

今回確立した MT の RIA のアッセイ系を Cd を投与した動物実験に応用した。従来から、Cd を投与した実験動物の血液及び尿中に MT 様タンパク質が出現することが知られていた。MT の RIA を用いることによって、Cd を注射したラットの血漿中及び尿中に MT が検出され<sup>5,7)</sup>、従来からその存在が報告されていた“MT 様タンパク質”は、MT そのものであることが確認されたのである。本報告において明らかのように、尿中への MT 排せつ増加は、尿中への Cd 排せつに先立って生じ、Cd 暴露量とともに上昇した (図 7,8)。尿中へ排せつされる MT の由来は明らかではない。しかし、Cd 暴露開始後 1 週間で既に高濃度の MT が肝において生合成され (図 6)、既報で示したように、Cd 暴露後、速やかに血漿中 MT レベルが上昇することを考える<sup>5)</sup>と、肝臓から漏出した MT により血漿中レベルが上昇し、腎機能が正常のうち主としてオーバーフローにより尿中に排せつされ、Cd 暴露によって尿細管再吸収機能障害が発現すると、さらに尿中への排せつが増加すると考えられよう。以上の動物実験のデータは、尿中への MT 排せつ増加が、Cd 暴露程度の鋭敏な指標であることを示している。

尿中への MT 排せつが、Cd に職業的に暴露している労働者及び Cd 土壌汚染地域住民において上昇することは、RIA を用いることにより初めて明らかとなった<sup>13-16)</sup>。それらによれば Cd 取扱作業員及び Cd 土壌汚染地域住民ともに、尿中 MT レベルと尿中 Cd レベルとの間には、極めて有意な正の相関があることが示されている。これらの報告では、極めて限られた数の対象者について解析が行われており、対象者がその所属する母集団の特性を反映するかどうかについては更に検討が必要であった。本報告に示したように、Cd 土壌汚染地域の悉皆調査によっても、集団としては、尿中 MT レベルを尿中 Cd レベルとは有意な正相関が認められた。これらの結果は、上述

の動物実験の結果と同様、尿中 MT が Cd 暴露程度を反映することを示唆する。

興味深いことに、尿中に排せつされる MT レベルは、Cd よりむしろ尿中 Cu レベルを有意な正相関を示した。この知見は、少数例ではあるが、神通川流域の汚染地域住民及び金沢市の非汚染地域住民の分析成績とも同様であった<sup>16)</sup>。この理由は、Cd への過剰暴露によって肝臓で生合成された MT が血流中に放出された結果、本来 MT に結合している Cd と Zn がこれらの重金属よりも MT に対して親和性の大きい Cu イオンによって置換され、大部分が Cu 結合 MT として尿中へ排せつされたためと考えることもできるであろう。実際イタイタイ病患者及び要観察者の尿をゲルろ過法で分析すると、尿中の Cd と Cu のそれぞれ 30%以上が MT と結合して排せつされる<sup>17)</sup>。ヒトの腎臓は、ラットに比べ、Cu レベルは低く、特別に重金属暴露のないヒトの腎臓から分離精製された MT が結合している金属は Cd と Zn と考えられる<sup>11)</sup>。したがって、ヒトの尿中に排せつされる MT は、主として肝臓由来のものである可能性が大きいと言えよう。加えるに、尿中 MT レベルと尿中 NAG レベルとの間に有意な正の相関が観察されたこと（図 11(g)）は、尿中へ排せつされる MT の一部は近位尿細管上皮細胞由来のものも含まれている可能性を示唆する。

尿中 MT レベルは、近位尿細管における再吸収障害の指標である尿中  $\beta_2$ -mg レベル及び  $\beta_2$ -mg クリアランス (%Ccr)、 $\alpha_1$ -mg クリアランス (%Ccr)、リン酸クリアランス (%Ccr)、尿酸クリアランス (%Ccr) との間に正の相関が認められた。MT が Cd の暴露によって生体内で誘導されるタンパクであることを考えると、尿中 MT レベルは、単に Cd 暴露の程度の指標にとどまらず、Cd による腎障害の指標ともなり得ると考えられる。

ラットにおいて、尿中 MT レベルは、Cd だけでなく、Hg, Cu, Zn 投与によっても上昇する<sup>18)</sup>。人間集団においては、Cu, Zn の過剰暴露の事例はまれと考えられるが、無機水銀取扱作業者については検討の余地がある。さらに、特別な重金属暴露のない種々のタイプの腎疾患の患者における腎における MT 処理についても研究する必要があるであろう。

以上の成績から、RIA による MT の微量定量が可能となった結果、Cd の健康影響のうち、腎尿細管の機能低下を特異的かつ鋭敏に検出する新たな指標として、尿中 MT が有用であることが明らかとなった。

## 謝 辞

ラジオイムノアッセイの統計的処理については環境保健部（現在、東京大学医学部疫学教室）新田裕史博士の援助を受けた。ニューカッスル病ウィルスに対する抗体産生能の高いウズラは技術部動物管理室 高橋慎司博士・高橋弘博士から供与して頂いた。ラジオイムノアッセイの遂行のために、筑波大学医学 RI 棟施設を使用させて頂いた。関係各位に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Kägi, J.H.R. and M. Nordberg (1979) : Metallothionein. Birkhauser Verlag, Basel, 41-116.
- 2) 鈴木和夫 (1981) : 最近の研究動向からみたメタロチオネイン. 医学のあゆみ, **116**, 611-620.
- 3) Webb, M. (ed.) (1979) : The chemistry, biochemistry and biology of cadmium, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 195-266.
- 4) Tohyama, C. and Z. A. Shaikh (1978) Cross-reactivity of metallothioneins from different origins with rabbit anti-rat hepatic metallothionein antibody. Biochem. Biophys. Res. Commun., **84**, 907-913.
- 5) Tohyama, C. and Z. A. Shaikh (1981) : Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. Fundam. Appl. Toxicol., **1**, 1-7.
- 6) Vander Mallie, R.J. and J.S. Garvey (1978) : Production and study of antibody produced against rat cadmium thionein. Immunochemistry, **15**, 857-868.
- 7) Vander Mallie, R. J. and J. S. Garvey (1979) : Radioimmunoassay of metallothioneins. J. Biol. Chem., **254**, 8416-8421.
- 8) 鎮目和夫・熊原雄一 (編) (1977) : ラジオイムノアッセイ, 朝倉書店, 東京, 78-98.
- 9) 遠山千春・小林悦子・斎藤 寛・杉平直子・中野篤浩・三種裕子・脇阪一郎 (1985) : Cd 暴露による腎機能障害の指標としての尿中  $\alpha_1$ -マイクログロブリン. 国立公害研究所研究報告書第 84 号, 61-72.
- 10) Masui, T., T. Utakoji and M. Kimura (1983) : Monoclonal antibodies to metallothionein from Cd<sup>2+</sup>-resistant Chinese hamster lung fibroblasts. Experientia, **39**, 182-183.
- 11) 永井謙一・斎藤 寛・有川 卓・斎藤喬雄・古川洋太郎・塩路隆治・古山 隆・吉永 馨 (1977) : カドミウム環境汚染地域住民に認められた  $\beta_2$ -microglobulinuria. 日本腎臓学会誌, **19**, 1-11.
- 12) Mehra, R. K. and I. Bremner (1983) : Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein-I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. Biochem. J., **213**, 459-465.
- 13) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. J. Elilis, and S. M. Cohn (1981) : Metallothionein excretion in urine upon cadmium exposure : its relationship with liver and kidney cadmium. Toxicology, **22**, 181-191.
- 14) Chang, C. C., R. J. Vander Mallie and J. S. Garvey (1980) : A radioimmunoassay for human metallothionein. Toxicol. Appl. Pharmacol., **55**, 94-102.
- 15) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1981) : Elevated urinary excretion of metallothionein due to environmental cadmium exposure. Toxicology, **20**, 289-297.
- 16) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1982) : Urinary metallothionein as a new index of dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium. Arch. Toxicol., **50**, 159-166.
- 17) 三種裕子・遠山千春・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛 (1983) : カドミウム汚染地域住民における尿中カドミウム, 銅排泄とメタロチオネイン排泄との関連. 医学のあゆみ, **127**, 97-99.
- 18) Lee, Y. H., Z. A. Shaikh and C. Tohyama (1983) : Urinary metallothionein and tissue metal levels of rats injected with cadmium, mercury, lead, copper or zinc. Toxicology, **27**, 337-345.

## II-10 ゲルクロマトグラフィーによるカドミウム汚染 地域住民の尿の分析

### Gel Chromatographic Analysis of Urine from People Living in a Cadmium-Polluted Area

三種裕子<sup>1</sup>・遠山千春<sup>1</sup>・中野篤浩<sup>1</sup>  
小林悦子<sup>2</sup>・斎藤 寛<sup>1,3</sup>・脇阪一郎<sup>1</sup>

Yuko MITANE<sup>1</sup>, Chiharu TOHYAMA<sup>1</sup>, Atsuhiko NAKANO<sup>1</sup>  
Etsuko KOBAYASHI<sup>2</sup>, Hiroshi SAITO<sup>1,3</sup> and Ichiro WAKISAKA<sup>1</sup>

#### 要 旨

カドミウム (Cd) 汚染地域に居住し、Cdによる重篤な障害を有する3名の女性と、非汚染地域の住民、女性1名を対象とし、尿中Cd、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn) 及びメタロチオネイン (MT) の分析をゲルクロマトグラフィーによって行った。Cd 汚染地域住民のうち1名の尿では、分子量約1万の分画 (MT-F) にラジオイムノアッセイ法によってMTが検出され、さらにその分画にCdとCuのピークが観察された。一方、他の2名のCd 汚染地域住民の尿では、MT-FにMTが検出されたが、重金属のピークは認められなかった。これらの尿を2-メルカプトエタノールで還元した後、分析を行うと、MT-FにCdとCuのピークが現れた。また酸化防止剤としてジチオスレイトール (DTT) を採尿時に添加し、保存しておいた尿では、60%以上のCdとCuがMT-Fに検出された。

以上の結果より、MTは非常に酸化されやすく、それによって結合していた重金属がMTから離れ、高分子分画や低分子分画に移行する可能性が指摘された。また、Cd 汚染地域住民におけるCdとCuの尿中排せつ増加に、MTは直接的に大きく寄与していることが示唆された。

#### Abstract

Gel chromatographic analysis of urinary cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn) and metallothionein (MT) of three women living in a Cd-polluted area and having severe renal dysfunction due to Cd exposure and of an inhabitant (female) of non

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.
3. 現在：長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町12番4  
Present address : Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki, Nagasaki 852, Japan.
2. 昭和57~59年度 国立公害研究所客員研究員  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1982-1984).

-polluted area was carried out. In one of the three Cd-exposed women MT was detected in the fraction corresponding to mol. wt. about 10,000 (MT-F) by radioimmunoassay and Cd and Cu peaks were observed in MT-F. However, in the other two subjects no metal peak was found in MT-F although MT alone was detected in it. When these urine specimens were treated with 2-mercaptoethanol before chromatography, Cd and Cu peaks appeared in MT-F. In a sample to which dithiothreitol (DTT) was added at the time of sampling more than 60% of both Cd and Cu were recovered in MT-F. These results suggest that MT is so susceptible to oxidation that metals bound to MT may be released from it and distribute into high and low mol. wt. fractions. It is also suggested that urinary Cd and Cu are excreted with MT and that MT is directly involved in the increased excretion of these metals in people living in Cd-polluted areas.

## 1 はじめに

カドミウム (Cd) 土壌汚染地域住民において、Cd だけでなく銅 (Cu) の尿中排せつも増加することが報告されている<sup>1,2)</sup>。この尿中 Cu 濃度が尿中  $\beta_2$ -マイクログロブリン ( $\beta_2$ -mg) 濃度と高い相関をもつことから<sup>3)</sup>、尿中 Cu 排せつ増加に尿細管障害が関与していることが示唆された。一方、ラットに Cd を投与すると、Cd と Cu を結合したメタロチオネイン (MT) の尿中排せつが増加する<sup>4)</sup>。またヒトにおいても Cd 汚染地域において尿中 MT 排せつが増加していることが見いだされている<sup>5)</sup>。そこで、Cd により誘導された MT が血中に出て、尿細管再吸収障害のために尿中に多量に排せつされるようになり、その MT に結合した Cd や Cu の尿中排せつも増加するのではないかと考えることができる。しかし一方では、Cd 暴露により糸球体障害が生じるという報告もあり<sup>6)</sup>、セルロプラスミンのような高分子タンパクに結合して Cu の尿中排せつが増加する可能性も否定できない。そこで、Cd 汚染地域に居住し、Cd による最も重篤な障害を有するイタイイタイ病 (イ病) 患者を中心に、その尿をゲルろ過法により分析し、尿中タンパク排せつと重金属排せつとの関連を明らかにしようとした。

## 2 対象及び方法

### 2.1 尿試料

富山県神通川流域の Cd 汚染地域に居住するイ病患者 2 名 (女, 67 歳及び 80 歳) と、要観察者 1 名 (女, 76 歳) 並びに非汚染地域である茨城県筑波町住民 (女, 69 歳) 1 名を対象とした。これらの被験者からスポット尿を採取し、分析項目別に小分けした。ゲルろ過分析用の尿試料には Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と  $\text{NaN}_3$ 、さらにタンパク質分解酵素阻害剤として aprotinin と phenylmethyl sulfonyl fluoride を終濃度がそれぞれ 0.02 M, 0.05%, 0.3 U/ml 及び 0.001 M になるように添加した。またゲルろ過分析用の尿試料の一部には酸化防止剤としてジチオスレイトー

ル (DTT) を終濃度が 0.005 M になるように添加した。これらの尿試料は直ちに凍結し、分析時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

## 2.2 尿分析

尿中クレアチニン濃度は Jaffe 法により、 $\beta_2$ -mg 濃度及び MT 濃度はラジオイムノアッセイ (RIA) 法 (ファルマシア)<sup>7)</sup> によって測定した。セルロプラスミン濃度は尿を 15 倍に濃縮し、免疫拡散板 (ヘキストジャパン) を用いて分析した。Cd と Cu 濃度は偏光ゼーマン原子吸光光度計 (日立 180-70 形) を用いて、標準添加法により求めた。Zn 濃度は、尿を硝酸で湿式灰化後、フレイム原子吸光光度計 (島津 640 形) を用いて測定した。

## 2.3 ゲルクロマトグラフィー

$-20^{\circ}\text{C}$  で保存しておいた尿は、解凍後、不溶物を 1,700 g, 15 分間の遠心分離によって除去し、直ちに、あるいは 10 分の 1 容量の 2-メルカプトエタノールを加えて 30 分間室温で還元後、Sephadex G 100 カラム (2.2×75 cm) にかけた。流出は、0.15 M の NaCl を含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用い、UV モニター (ISCO) で 280 nm の吸光度を観測しながら流速 11.0 ml/h で行った。溶出液の 3.7~3.8 ml を 1 分画とし、それぞれ二分して重金属分析用とタンパク質分析用とした。重金属分析用の各分画には、硝酸、Triton X-100 と硝酸アンモニウムを終濃度がそれぞれ 1.5 N, 0.3% 及び 5% となるように加えて、偏光ゼーマン原子吸光光度計により Cd と Cu 濃度を、フレイム原子吸光光度計により Zn 濃度を測定した。なお今回の実験では、操作中に尿中重金属の再分配やタンパク質の変性が起こることを避けるため、尿を濃縮せずに分析に用いた。その結果、溶出液の重金属濃度は非常に低くなり (Cu < 0.02  $\mu\text{g/ml}$ )、溶出中に周囲からの重金属の汚染が生じると、分析が困難になると予想された。そこで硝酸洗浄したフラクションチューブは溶出時のみ 10 本ずつフラクションコレクターにセットするようにし、溶出の終わったチューブには速やかにふたをしながらゲルろ過を行って、外部汚染を極力防ぐように努めた。

各分画中のタンパク質の分析として、免疫拡散板 (LC-パルチゲン; ヘキストジャパン) を用いてセルロプラスミン, IgG, アルブミン, レチノール結合タンパク (RBP) を分析し、RIA 法により MT を分析した。

溶出体積と分子量の関係を求めるためのマーカーとして Blue Dextran (mol. wt. 200,000), BSA (67,000), ovalbumin (45,000), chymotrypsinogen A (25,000), cytochrome C (12,400) を用いた。

## 3 結果

イ病患者、要観察者及び対照者の尿中 Cd, Cu, Zn,  $\beta_2$ -mg と MT 濃度を表 1 に示した。イ病

表 1 女性対象者の尿の分析結果  
Table 1 Urinalysis of female subjects

Subject	age	Cd ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{cr}^a$ )	Cu ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{cr}^a$ )	Zn ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{cr}^a$ )	$\beta_2$ -mg <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{cr}^a$ )	MT <sup>c</sup> ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{cr}^a$ )
1 "itai-itai" disease patient	67	30.7	191	281	55600	6300
2 "	80	5.3	190	98.6	85700	6100
3 suspected patient	76	24.4	160	468	131900	3600
4 normal subject	69	3.3	8.4	464	257	N.D. <sup>d</sup>

a cr : クレアチニン  
b  $\beta_2$ -mg :  $\beta_2$ -マイクログロブリン  
c MT : メタロチオネイン  
d N.D. : 検出限界以下

患者と要観察者の尿中 Cu 濃度は対照者に比べて著しく高い値を示した。また腎尿細管障害の指標とされる  $\beta_2$ -mg 濃度も前者の値ははるかに高かった。尿中 MT 濃度は、イ病患者と要観察者では測定されたが、(6300, 6100及び3600mg/g $\cdot$ cr), 対照者では検出限界以下 (<50 $\mu\text{g/l}$ ) であった。セルロプラスミンはいずれの尿試料においても検出されなかった(検出限界<120mg/ml)。

図1は症例1(イ病患者, 女, 67歳)の尿を採取後3日後に Sephadex G 100 で分析した結果

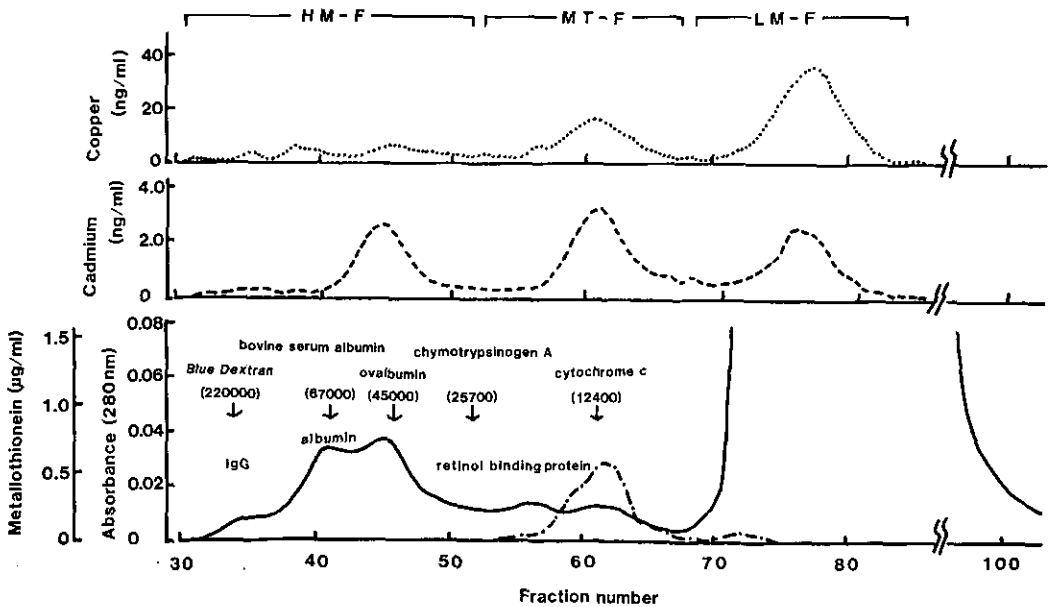


図 1 症例1(イ病患者, 女, 67歳)の尿のセファデックスG 100によるゲルろ過図<sup>13)</sup>

Fig. 1 Sephadex G 100 elution profile of urine from subject 1 ("itai-itai" disease patient, female, 67 years old)<sup>13)</sup>

である。IgG が 33~37 番の分画に、アルブミンが 39~43 番に、RBP は 56~59 番の分画にそれぞれ検出された。セルロプラスミンは検出されなかった。分子量約 10,000 の分画には、MT のピークが RIA 法により観察された。Cd は、分子量約 45,000 の高分子分画 (HM-F)、MT が溶出されなかった分画 (MT-F) と分子量 4,000 以下の低分子分画 (LM-F) に三つのピークをもって溶出された。Cu は主に HM-F と LM-F に溶出された。MT-F 中に回収された Cd と Cu は、それぞれ全体の 37.3% 及び 31.8% であり、モル比は Cd : Cu = 1 : 11.6 であった。また MT に対する重金属 (Cd+Cu) のモル比は 4.7 であった。症例 1 の尿を採尿後 6 日目に、再び同様に分析したところ、Cd は三つのピークに分かれたが、Cu は MT-F の割合が 13.8% に減少し、LM-F の割合が増えた。MT-F 中の MT に対する重金属 (Cd+Cu) の比は 2.0 に減少した。

症例 2 の尿は採尿後 24 日目に分析を行った。図 2(a) に示すように、分子量約 10,000 の MT が溶出されるべき分画 (MT-F) には重金属のピークは観察されなかった。Cd は分子量約 45,000 の HM-F と LM-F に、Cu は主に LM-F にそれぞれ溶出された。この症例 2 の尿に 10 分の 1 量の 2-メルカプトエタノールを加えて室温で 30 分間反応させて後、同様に分析すると、図 2(b) に示すように、Cd と Cu のピークが MT-F に現れ、それぞれ全体の 43.3%、87.1% を占めた。またこの分画中の Cd と Cu のモル比は Cd : Cu = 1 : 30.6 であった。

症例 3 の尿を採尿後 27 日目に分析した結果を図 3(a) に示す。症例 2 と同様、MT-F には MT は検出されたが、重金属のピークは認められなかった。Cd は HM-F と LM-F に、Cu と Zn は主に LM-F にそれぞれ溶出された。次に症例 3 の尿を 2-メルカプトエタノールで還元後、同様に分析を行った (図 3(b))。Zn の分布は変化しなかったが、Cu については LM-F のピークが消失し、MT-F に、MT のピークと重なって Cu のピークが現れた。Cd については HM-F のピークが減少し、MT-F にピークが現れた。ゲルろ過で回収された Cd と Cu のそれぞれ 28.1%、59.4% が MT-F に検出された。MT-F 中の Cd と Cu のモル比は Cd : Cu = 1 : 23.1、MT に対する (Cd+Cu) のモル比は 3.0 であった。図 3(c) は採尿直後に SH 基の酸化防止剤である DTT を添加し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 44 日間保存後、分析した結果である。MT-F には、MT のピークとともに Cd の Cu のピークが観察された。HM-F の void volume 付近に、280 nm の吸収ピークと重なって、Cd、Cu、Zn のピークが認められた。MT-F に回収された Cd と Cu はそれぞれ全体の 62.9% 及び 60.0% であり、そのモル比は Cd : Cu = 1 : 13.5 であった。また MT に対する Cd+Cu のモル比は 5.3 であった。

図 4 は非汚染地域住民である症例 4 の尿のゲルろ過パターンである。Cd と Zn は LM-F のみにピークが観察され、Cu は主に HM-F に認められた。この尿を 2-メルカプトエタノールで還元して同様に分析してもゲルろ過パターンは変化しなかった。



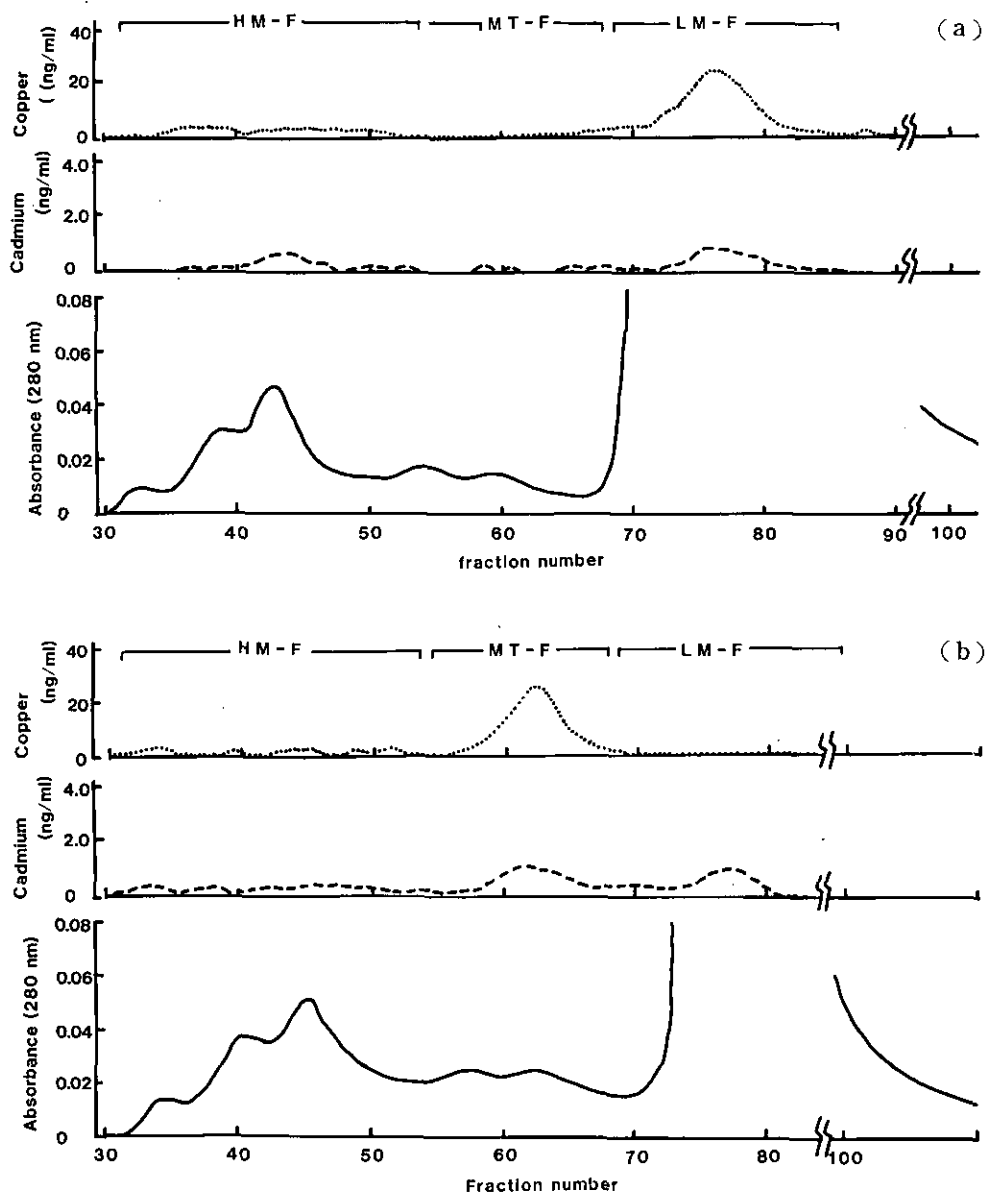


図 2 症例 2 (イ病患者, 女, 80 歳) の尿のセファデックス G 100 によるゲルろ過図

Fig. 2 Sephadex G 100 elution profile of urine from subject 2 ("itai-itai" disease patient, female, 80 years old)

(a) : 未処理 (b) : 分析前に 2-メルカプトエタノールで環元

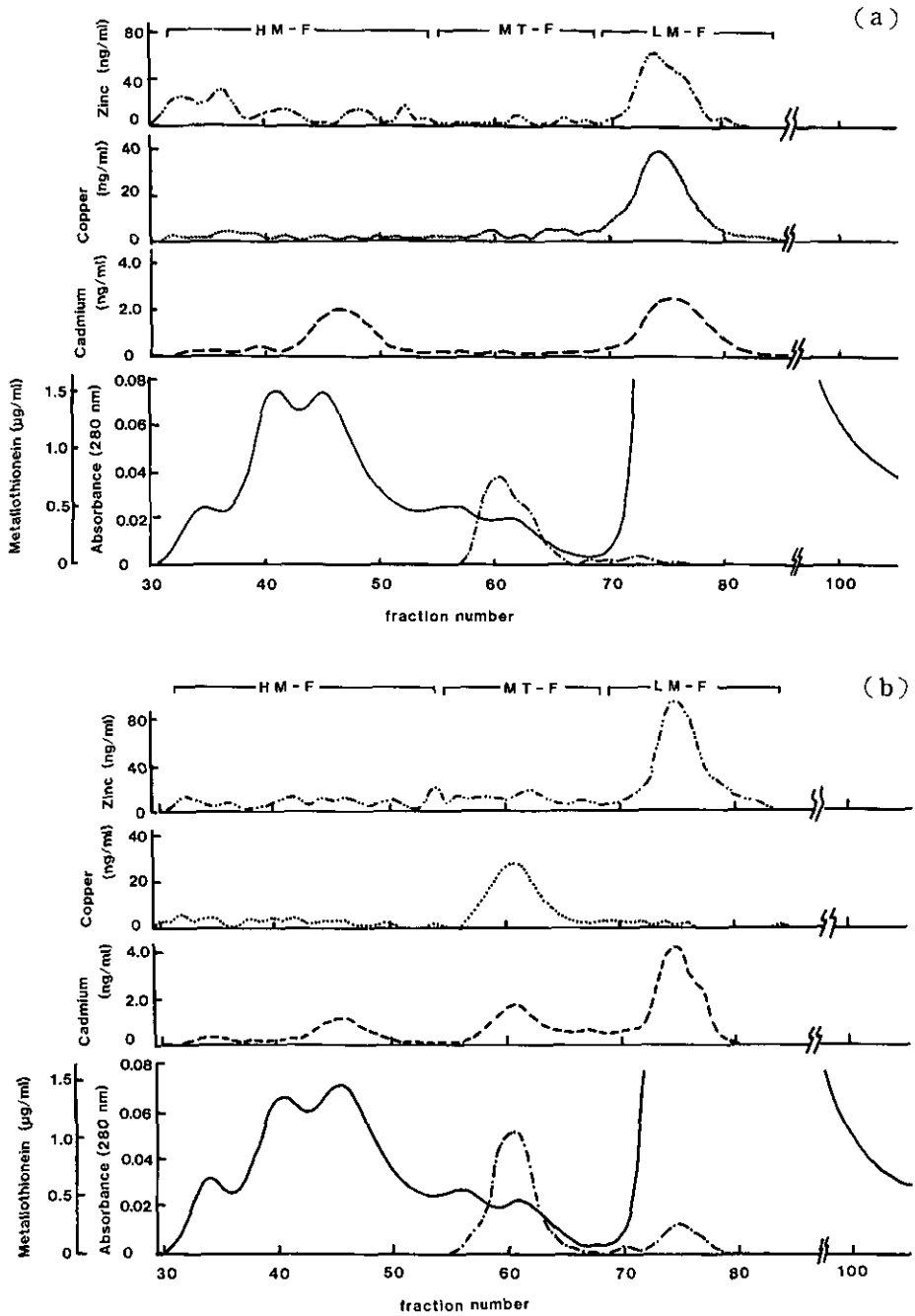


図 3 症例3 (要観察者, 女, 76歳) の尿のセファデックスG100によるゲルろ過図  
 Fig. 3 Sephadex G 100 elution profile of urine from subject 3 (suspected patient female, 76 years old)

(a) : 未処理 (b) : 分析前に2-メルカプトエタノールで環元 (c) : 採尿時にDTTを添加して保存

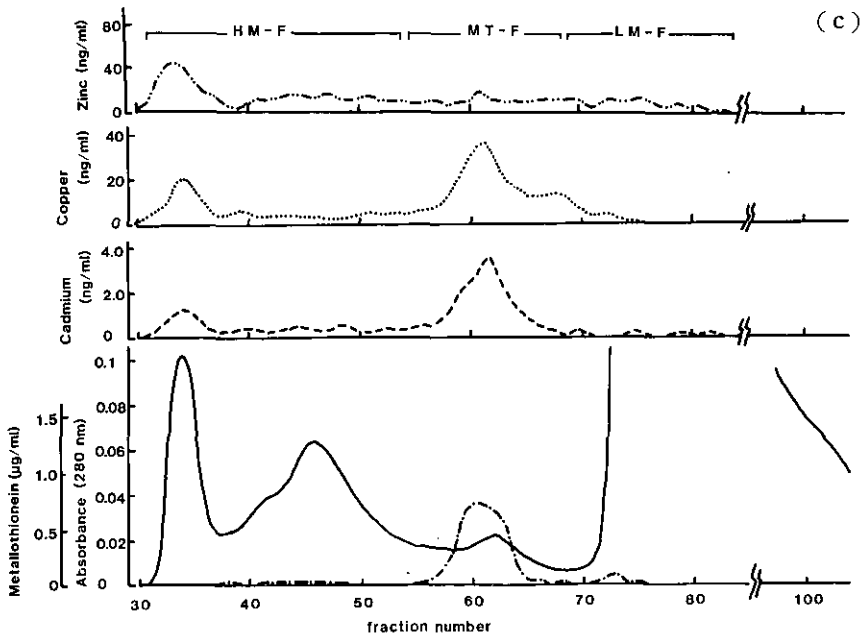


図 3 つづき  
Fig. 3 Continued

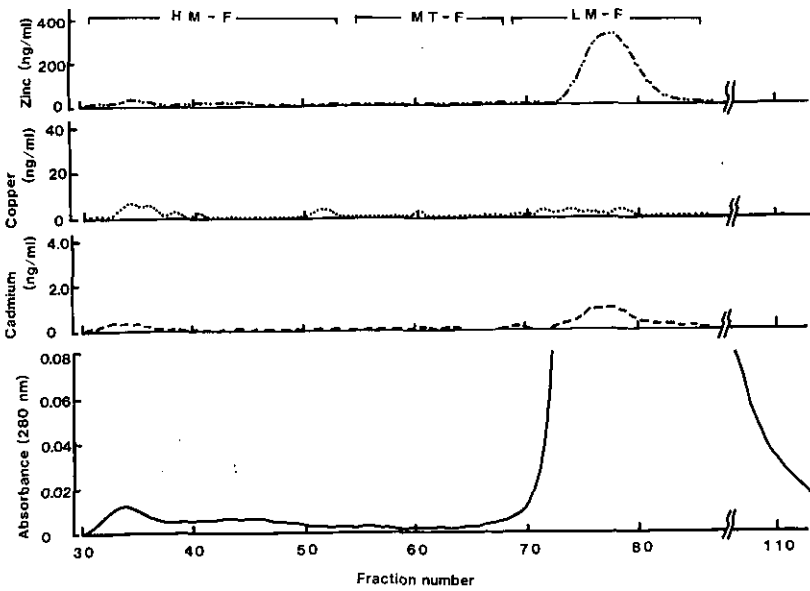


図 4 症例 4 (対照者, 女, 69 歳) の尿のセファデックス G 100 によるゲルろ過図  
Fig. 4 Sephadex G 100 elution profile of urine from subject 4 (normal subject, female, 69 years old)

#### 4 考 察

今回の実験で用いた尿試料中にはセルロプラスミンは検出できず、またセルロプラスミンが溶出されるべき高分子分画に、セルロプラスミン、Cuいずれのピークも認められないことから、Cd汚染地域で観察される尿中Cu排せつ増加に対して、セルロプラスミンはほとんど寄与していないと考えられる。むしろ尿中Cu、Cd排せつに対してはMTが大きく寄与していることが明らかにされた。

症例1を除いて、症例2及び3の尿ではMT-Fに重金属のピークは認められず、MTのみRIA法により観察されたが、これは酸化によりMTが結合していた重金属を失い、アポチオネインになったためと考えられる。MTはシステイン基を非常に多く含み、酸化を受けやすいことが知られている<sup>9)</sup>。症例2と3の尿は採取してから分析するまでの保存期間が症例1より長かったため、より酸化が進行したのかもしれない。2-メルカプトエタノールによる還元によりMT-FにCdとCuのピークが現れたが、MTに対する(Cd+Cu)のモル比は症例3では3.0であった。還元せずにMT-Fに重金属のピークが認められた症例1の尿ではその比は2.0であった。MTは1分子当たり、Cd、Znは7原子、Cuは10原子結合するとされている。分画中のMT濃度が低いため、RIA法で測定したその値にはある程度誤差が含まれるとしても、これらのMTに対する重金属の比は低く、MTの一部が酸化された状態にあることを示している。一方、DTTを添加して保存した症例3の尿ではその比は5.3と高かった。すなわち、かなり有効にMTの酸化を防ぐことができたと考えられる。なお、この尿試料ではHM-Fのvoid volume近くに280nmの高い吸収ピークとCd、CuとZnのピークが観察された。これが何に起因するのかかわからないが、DTTの関与により、タンパク質と重金属のcomplexが形成されているのかもしれない、さらに検討を要する。

DTT添加により、60%以上のCd及びCuがMT-Fに回収され、これら重金属の排せつにMTが直接、大きく関与していることが示された。遠山らは、イ病患者的尿中MT濃度とCd、Cu濃度との間に強い相関関係を見だしているが<sup>9)</sup>、今回の結果は直接それを裏付けるものである。なお、MTに含まれる重金属は、Cdに比べ圧倒的にCuの方が多かった。Cd暴露によってなぜCuを多く含むMTが尿中に排せつされるのか、その機構については明らかではない。ヒトの肝臓、腎臓中のMTはZnを多く含み、Cuはほとんど含まない<sup>10,11)</sup>。一方、MTのZnはそれより親和性の高いCuと血漿中で置換されることが*in vitro*で示されている<sup>12)</sup>。したがって、Cdによって臓器に誘導されたCd、Zn-MTが血中に出ると、MT中の重金属がそれより親和性の高いCuと置換されてCuを多く含むCu、Cd-MTとなり、それが尿細管再吸収障害のために尿中に多く排せつされるようになって、Cuの尿中排せつ増加をもたらすのではないかと考えられる。尿細管障害の指標とされる尿中 $\beta_2$ -mg濃度は、Cd汚染地域住民において、尿中Cu濃度及び尿中MT濃度とそれぞれ高い相関関係があることが報告されており<sup>3,9)</sup>、上記の考えを支持する。

なお、尿中Cu排せつに関してはMTの寄与によるものとして大半が説明できるが、Cd排せつについては、症例1、2、3のいずれの尿においても分子量約45,000のCdに対し親和性の高いタ

ンパク質が観察されており、このタンパク質の寄与についてはさらに研究する余地があろう。

### 引用文献

- 1) 渡辺 弘・村山ヒサ子・松下純雄・小野一男・永倉苑子・奥野俊博・荒木万嘉・荒木容子・山本昭夫・山本 淳 (1974) : カドミウム汚染地域住民の腎尿管機能変化に関する疫学的研究. 環境保健レポート, **31**, 12-17.
- 2) 河村俊一・大村外志隆・中川秀昭・梅 博久・西 正美・松尾羊次郎 (1981) : 腎尿管障害と尿中重金属排泄量の関連について. 環境保健レポート, **46**, 248-255.
- 3) 小林悦子 (1981) : カドミウム暴露者の血清及び尿中銅濃度. 金沢医大誌, **6**, 119-122.
- 4) Suzuki, Y. (1981) : Cadmium, copper, and zinc excretion and their binding to metallothionein in urine of cadmium-exposed rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **8**, 479-487.
- 5) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1981) : Elevated urinary excretion of metallothionein due to environmental cadmium exposure. *Toxicology*, **20**, 289-297.
- 6) Bernard, A., H. Roels, G. Hubermont, J. P. Buchest, P. L. Masson and R. R. Lauwerys (1976) : Characterization of the proteinuria in Cd exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **38**, 19-30.
- 7) Tohyama, C. and Z. A. Shaikh (1981) : Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by single antibody radioimmunoassay. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 1-7.
- 8) Minkel, D. T., K. Poulsen, S. Wielgus, C. F. III Shaw and D. H. Petering (1980) : On the sensitivity of metallothionein to oxidation during isolation. *Biochem. J.*, **191**, 475-485.
- 9) Tohyama, C., Z. A. Shaikh, K. Nogawa, E. Kobayashi and R. Honda (1982) : Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium. *Arch. Toxicol.*, **50**, 159-166.
- 10) Pulido, P., J. H. R. Kägi and B. L. Vallee (1966) : Isolation and properties of human metallothionein. *Biochemistry*, **5**, 1768-1777.
- 11) Bühler, R. H. O. and J. H. R. Kägi (1972) : Human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.*, **39**, 229-234.
- 12) 鈴木康友 (1979) : 血漿中メタロチオネイン様タンパクと金属輸送. 第52回産業衛生学会講演集 (東京), 136-137.
- 13) 三種裕子・遠山千春・中野篤浩・小林悦子・斎藤 寛 (1983) : カドミウム汚染地域住民における尿中カドミウム, 銅排泄とメタロチオネイン排泄との関連. *医学のあゆみ*, **127**, 97-99.

II-11

酸化及び金属置換反応における2種類の

イソメタロチオネインの性質の比較\*

Comparison of Properties of Two Isometallothioneins in Oxidation  
and Metal Substitution Reactions\*

鈴木和夫<sup>1,2</sup>・米谷民雄<sup>1,3</sup>・久保田憲太郎<sup>1</sup>

Kazuo T. SUZUKI<sup>1,2</sup>, Tamio MAITANI<sup>1,3</sup> and Kentaro KUBOTA<sup>1</sup>

要 旨

2種類のイソメタロチオネイン(ラットの肝臓より単離した亜鉛-及びカドミウム-チオネインの2種類のイソタンパク質)の反応性を *in vitro* 系で比較した。金属とチオール基からなるメルカプチド結合に特徴的な反応として以下の反応を選んだ。それらは、5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)による分子内のジスルフィド結合の形成、空気による分子内と分子間酸化反応、及びエチレンジアミン四酢酸(EDTA)によるリガンド交換反応の3反応である。2種類のイソメタロチオネインの相対的な比率と反応生成物を高性能液体クロマトグラフィー原子吸光法によって決定した。メタロチオネインのI型がII型よりも、すべての反応において反応性に富むことがわかった。これらの結果、メタロチオネインを定量するとき影響を及ぼすと予想されるメタロチオネインの反応生成物とその生成過程とともに明らかとなった。

Abstract

The reactivity of two isometallothioneins (two isoforms of rat liver zinc- and cadmium-thioneins) was compared *in vitro*. Reactions characteristic of metal-thiol mercaptide bonds were selected as follows; oxidative formation of intramolecular

- 
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 現在: 国立公害研究所 環境保健部  
Present address: Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies.
  3. 現在: 国立衛生試験所 食品部 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
National Institute of Hygienic Science, 18-1, kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan.
- \* 本論文の一部は以下の Suzuki, K.T. and T. Maitani (1983): Comparison of properties of two isometallothioneins in oxidation and metal substitution reactions. Chem. Pharm. Bull., 31, 4469-4475.  
Suzuki, K.T. and T. Maitani (1983): Comparison of chemical properties of metallothionein-I and -II. J. Pharmacobio. Dyn., 6, s-20. に発表。

disulfide bonds by 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), intra- and inter-molecular oxidations by air and ligand substitution reaction with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The relative ratio of the two isometallothioneins and the reaction products were determined by high performance liquid chromatography-atomic absorption spectrophotometry. Metallothionein-I was shown to be more reactive than metallothionein-II in all reactions tested in this study.

## 1 はじめに

重金属中毒による尿細管傷害の特異的な指標物質として、尿中に排泄されるメタロチオネインが注目され、その測定手段としてラジオイムノアッセイ法が開発されている<sup>1-4)</sup>。メタロチオネインに結合している金属はすべてチオール基を配位子としているが、チオール基が酸化されたり、結合している金属が変わったりすると、メタロチオネインの立体構造が変化し（抗原としての構造が変化し）、ラジオイムノアッセイ法による定量法に影響を与えられ考えられる。そこで金属結合タンパク質としてのメタロチオネインを最も特徴付ける金属とチオール基からなるメルカプチド結合に特異的な反応を行い、その生成物を特徴付けることを目的とした実験を行った。

ほ乳動物のメタロチオネインに共通したアミノ酸配列として、61個のアミノ酸残基の内20個を占めるシステイン残基が全く同じ配列位置をとっていることが知られている。ほ乳動物のメタロチオネインには、この20個のシステイン残基以外の構成アミノ酸の一部が異なっている2種類のイソタンパク質（メタロチオネインI型及びII型と呼んでいる）が存在する<sup>5)</sup>。しかし2種類のイソメタロチオネインの化学的な性質や生物学的な役割はほとんどわかっていない。本実験ではメタロチオネインのラジオイムノアッセイに影響を与える構造上の変化に関する基礎的データを得るとともに、メルカプチド結合の化学的性質をも明らかにすることを目的とした。

メルカプチド結合を特徴付ける反応として、酸化反応によってジスルフィド結合を形成させる反応<sup>6)</sup>と、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を共存させてメタロチオネインに結合している金属を競争的に脱離させるリガンド交換反応<sup>7)</sup>を選んだ。前者の酸化反応としては、チオール基の定量に用いる5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)とのジスルフィド結合の交換による酸化及び空気中の酸素による酸化の両反応を行い、生成する分子内及び分子間生成物を分析定量した。

## 2 材料及び方法

### 2.1 亜鉛及びカドミウム-チオネインの調製

雌性ウィスターラット（平均体重198g）に酢酸亜鉛を亜鉛として12mg/kg体重、1回腹腔内注射し、18時間後にと殺した。肝臓を3倍量の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4, 0.25Mグルコース含有、使用前に窒素ガスで置換)中でポリトロンホモジェナイザーを用いて窒素気流下で

ホモジェナイズした。ホモジェネートを170000 gで60分間超遠心した。得られた上清10 mlを直接又は塩化カドミウム(1 mg Cd/ml)と混和した後、セファデックス G-75 カラム(2.6×90 cm)に添加し、10 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.6 で溶出させた。亜鉛-チオネイン又はカドミウム-チオネイン分画の内、2種類のイソメタロチオネインを約1:1で含む分画を集めた。イソメタロチオネインの比率は高性能液体クロマトグラフ(HPLC)-原子吸光(AAS)法で分析した<sup>8)</sup>。

## 2.2 SW ゲルカラムによるゲルろ過分析

ゲル浸透カラム(TSK ゲル3,000 SW, 7.5×600 mm)を装着したHPLC分析器(東洋曹達 HLC 803 A)の出口を直接、原子吸光分光器(AAS, 日立 170-50 A)のネプライザーチューブに接続した<sup>8)</sup>。カラムを50 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0, 流速1.0 ml/minで溶出した。溶出液の254と280 nmの吸収及び金属濃度を連続的にモニターした。

## 3 結果と考察

### 3.1 カドミウム-チオネインとDTNBの反応

通常チオール基定量反応においては、チオール基に対して大過剰のDTNBを使用する。事実、メタロチオネイン中のチオール基を定量する場合にも大過剰のDTNBが用いられているが<sup>7)</sup>、本実験においては当量以下のDTNB(メタロチオネイン中のチオール基に対して0.42モル当量)をカドミウム-チオネインと反応させ、反応過程を追跡した。

反応過程はDTNBが反応して生成する5-チオ-2-ニトロベンゾエートの412 nmの吸収を測定することによって追跡した(図1)。反応は約7時間で終了した。反応により1分子の5-チオ-2-ニトロベンゾエートが形成されると仮定したときの412 nmの吸光度は0.73であるが、図1の結果は2分子の5-チオ-2-ニトロベンゾエートが形成されていることを示している。このことは1分子のDTNBから5-チオ-2-ニトロベンゾエートが1分子でなく2分子形成されていることを示しているとともに、メタロチオネインのチオール基と5-チオ-2-ニトロベンゾエート間でジスルフィド結合が形成されていないことを示している。またこの反応過程は1分子の5-チオ-2-ニトロベンゾエートが形成されるまでの反応が速いことも示している。

メタロチオネインとDTNBの反応中におけるカドミウムの分布は図2に示したように変化した。I型のカドミウムのピークはII型のものより速く減少し、I型とII型よりも保持時間の長いピークが出現した。カドミウムの分布の変化は最初の内は明らかであったが、約40分後は明らかでなかった。また図2はI型、II型よりも保持時間の短いピークが存在しないことから、分子間でジスルフィド結合が形成された2量体が存在しないことも示している。さらにメタロチオネインと5-チオ-2-ニトロベンゾエート間の分子間ジスルフィド結合も存在しないことを示している。

図3は反応終了後のカドミウムの分布を示しているが、ピーク面積から算出したカドミウムはDTNB添加以前のピーク面積の16%であった。メタロチオネイン中のチオール基に対して0.42倍



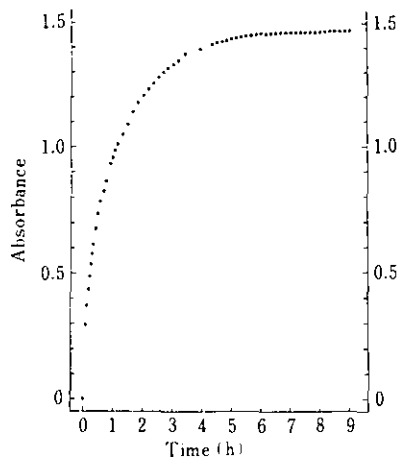


図 1 カドミウム-チオネインと DTNB の反応の経時変化<sup>9)</sup>

Fig. 1 Time course of reaction between cadmium-thionein and DTNB<sup>9)</sup>

カドミウム-チオネイン溶液 (pH 8.6 の 50 mM トリス塩酸緩衝液 1 ml 中に 6.1  $\mu$ g の Cd を含む) 1 ml と 10 mM DTNB を含む pH 7.0 M リン酸緩衝液 6.4  $\mu$ l を混合し、窒素気流下に放置し、412 nm の吸光度を経時的に測定した。

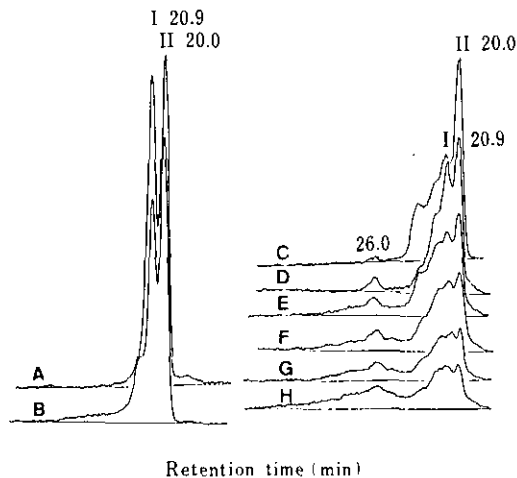


図 2 カドミウム-チオネインと DTNB の反応におけるカドミウムの分布の経時変化<sup>9)</sup>

Fig. 2 Change in distribution profiles of cadmium with time on reaction between cadmium-thionein and DTNB<sup>9)</sup>

図 1 に示したカドミウム-チオネインと DTNB の混合溶液中のカドミウムの分布を HPLC-AAS 法で測定した。反応液 0.1 ml ずつを SW カラムに添加。図 A は DTNB 添加前の対照。図 B-H はカドミウム-チオネインと DTNB を混合し、次の時間経過後測定: B (1.5 分), C (6.5 分), D (16 分), E (26 分), F (40 分), G (60 分), H (100 分), I と II はメタロチオネイン-I と-II を示す。

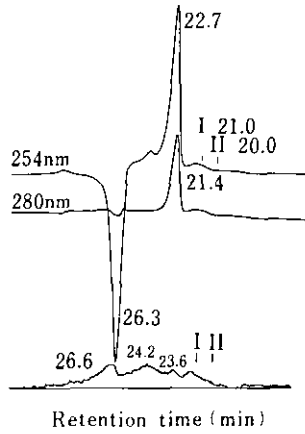


図 3 カドミウム-チオネインと 1/2 当量以下の DTNB を混合後、20 時間のカドミウムの分布<sup>9)</sup>  
 Fig. 3 Distribution profile of cadmium 20 h after mixing cadmium-thionein with less than a half molar equivalent of DTNB relative to thiol groups<sup>9)</sup>

量の DTNB を添加した結果、2 分子の 5-チオ-2-ニトロベンゾエートが検出されたことは、メタロチオネインのチオール基の 84% が酸化されたことを示している。したがって、図 3 の結果はカドミウム 7 原子当たり 20 個のチオール基が存在するとの仮定とよく一致した。

メタロチオネインと DTNB の反応を模式的に示すと図 4 のようになる。過剰の DTNB 存在下では  $n > m$  の場合に相当する反応をし、等量以下の DTNB 存在下では  $2n < m$  の場合に相当する反応過程をとる。本実験は後者の場合に相当する。

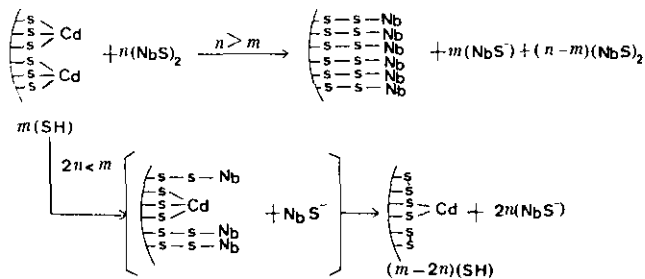


図 4 カドミウム-チオネインと DTNB の反応過程の模式図<sup>9)</sup>  
 Fig. 4 Schematic presentation of the reaction between cadmium-thionein and DTNB<sup>9)</sup>

$m$  モルのチオール基を含むカドミウム-チオネインと  $n$  モルの DTNB ( $(\text{NbS})_2$  と略記) が反応して  $n$  と  $m$  の量比に従って  $\text{NbS}^-$  (412 nm の吸収を示す) が生成される。

### 3.2 カドミウム-及び亜鉛-チオネインの空気酸化

カドミウム-チオネインの希薄及び濃縮溶液を空気存在下で放置し、経時的にカドミウムの分布の変化を調べた結果を図5に示す。I型が酸化されやすいこと、並びに濃縮溶液中では分子間酸化による2量体ができやすいことなどがわかる。亜鉛-チオネインの濃縮(図6)及び希薄溶液(図7)を用いて同様の検討をしたが、やはりI型が酸化されやすいことが明らかとなった。また一部酸化された生成物がさらに酸化されやすくなるためか、酸化生成物がほとんど検出されなかった。

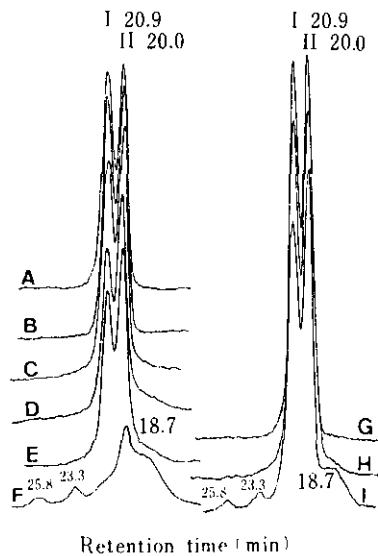


図 5 カドミウム-チオネインの濃縮及び希薄溶液中の空気酸化<sup>9)</sup>

Fig. 5 Air-oxidation of cadmium-thionein in concentrated and dilute solutions<sup>9)</sup>

カドミウム-チオネインを 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) に高濃度 (345  $\mu\text{gCd/ml}$  を 10  $\mu\text{l}$ ) 又は希薄溶液 (12.2  $\mu\text{gCd/ml}$  を 150  $\mu\text{l}$ ) とするよう調整し、24°C で放置することにより空気酸化させた。カドミウムの分布図 A~F と G~I はそれぞれカドミウム-チオネインの高濃度及び希薄溶液に相当する。各図は 24°C で以下の日数放置して空気酸化することによって得られた (ただし A は -20°C で保存した) A (20), B (2), C (3), D (5), E (7), F (20), G (2), H (7), 及び I (17 日)。メタロチオネイン-I (I) と-II (II) は 20.9 と 20.0 分に溶出された。分子間酸化生成物 (2 量体) と分子内酸化生成物は 18.7 と 23.3, 25.8 分に溶出された。

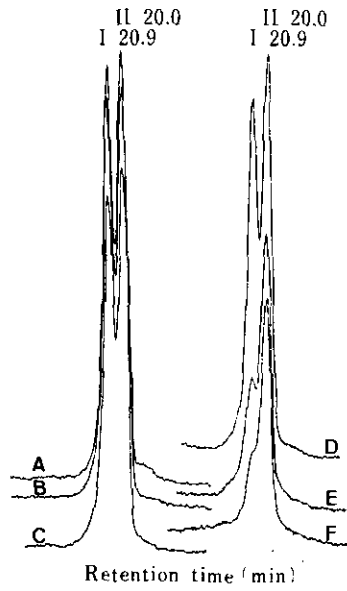


図 6 亜鉛-チオネインの高濃度溶液中における空気酸化<sup>9)</sup>

Fig. 6 Air-oxidation of zinc-thionein in concentrated solution<sup>9)</sup>

10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 中に亜鉛-チオネインを 243  $\mu\text{gZn/ml}$  含む溶液 10  $\mu\text{l}$  を 24°C で以下の日数放置した (ただし A は -20°C で保存した): A (19), B (2), C (4), D (8), E (15) と F (19 日)。I と II はメタロチオネイン-I と-II を示す。

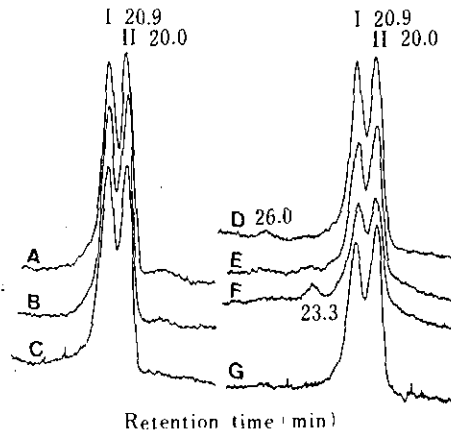


図 7 亜鉛-チオネインの希薄溶液中における空気酸化<sup>9)</sup>

Fig. 7 Air-oxidation of zinc-thionein in dilute solution<sup>9)</sup>

10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 中に亜鉛-チオネインを 7.6  $\mu\text{gZn/ml}$  含む溶液 150  $\mu\text{l}$  を 24°C で以下の日数放置した (ただし G は窒素気流下放置した): A (1), B (2), C (4), D (6), E (15), F (19) と G (19 日)。I と II はメタロチオネイン-I と-II を示す。

### 3.3 カドミウム-及び亜鉛-チオネインと EDTA のリガンド交換反応

メタロチオネインは金属酵素などの金属タンパク質と比べ、結合している金属を容易にはずすことができる。EDTA を共存させることにより、メタロチオネインに結合している金属をはずすリガンド交換反応を行った結果を図8に示す。カドミウム-チオネインも亜鉛-チオネインも I 型の方が金属がはずれやすいことがわかる。またカドミウムよりも亜鉛の方がはずれやすいこともわかる。

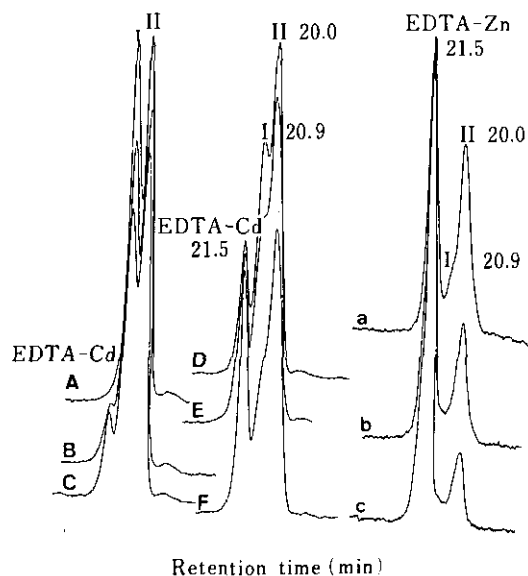


図 8 カドミウム-及び亜鉛-チオネインと EDTA のリガンド交換反応<sup>9)</sup>

Fig. 8 Ligand substitution reaction of cadmium- and zinc-thioneins with EDTA<sup>9)</sup>  
 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 中にカドミウム-チオネインを 12.2  $\mu\text{gCd/ml}$  含む溶液 92  $\mu\text{l}$  又は亜鉛-チオネインを 7.6  $\mu\text{gZn/ml}$  含む溶液 86  $\mu\text{l}$  を 0~100  $\mu\text{l}$  の 1.0 mM EDTA と混合した後、192 又は 186  $\mu\text{l}$  に希釈した。各溶液を 22°C で、窒素気流下 15 分間放置した後、100  $\mu\text{l}$  を SW カラムに添加し、分析した。A~F 図はカドミウム-チオネインと EDTA を以下の EDTA/Cd 比になるように混合した：A (10), B (20), C (40), D (60), E (80) と F (100)。一方 a~c 図は亜鉛-チオネインと EDTA を以下の EDTA/Zn 比となるように混合した：a (10), b (40) と c (80)。メタロチオネイン-I と-II 及び EDTA-金属錯体は 20.9, 20.0 と 21.5 分に溶出された。

以上の結果をまとめると、メタロチオネインを最もよく特徴付けるメルカプチド結合の反応性を、酸化反応とリガンド交換反応で調べた結果、I 型の方が II 型のメタロチオネインよりも反応性が高い (メルカプチド結合が弱い) ことが明らかとなった。またこれらの反応生成物がカラム

上でどのような挙動をとるかについても明らかとなった。これらの結果はメタロチオネインのラジオイムノアッセイを行うに当たり、その検出能に最も影響を与えると思われるメタロチオネインの構造上の変化が起こったとき、それらの検出手段が確立されたことを意味する。

## 引用文献

- 1) Tohyama, C. and Z.A. Shaikh (1981) : Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. *Fund. Appl. Toxicol.*, **1**, 1-7.
- 2) Garvey, J. S. and C. C. Chang (1981) : Detection of circulating metallothionein in rat injected with zinc or cadmium. *Science*, **214**, 805-807.
- 3) Nordberg, G. F., J. S. Garvey and C. C. Chang (1982) : Metallothionein in plasma and urine of cadmium workers. *Environ. Res.*, **28**, 179-182.
- 4) Mehra, K. and I. Bremner (1983) : Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein-I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. *Biochem. J.*, **213**, 459-465.
- 5) Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (*eds.*)(1979) : *Metallothionein*, Birkhäuser Verlag, Basel, 378 p.
- 6) Li, T. Y., D. T. Minkel, C. F. Shaw III and D. H. Petering (1981) : Reactivity of metallothioneins with 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. *Biochem. J.*, **193**, 441-446.
- 7) Li, T. Y., A. J. Kraker, C. F. Shaw III and D. H. Petering (1980) : Ligand substitution reactions of metallothioneins with EDTA and apocarbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 6334-6338.
- 8) Suzuki, K. T. (1980) : Direct connection of high speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis : Metallothionein. *Anal. Biochem.*, **102**, 31-34.
- 9) Suzuki, K. T. and T. Maitani (1983) : Comparison of properties of two isometallothioneins in oxidation and metal substitution reactions. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4469-4475.

II-12  $^1\text{H-NMR}$  による Cd- 及び (Cd, Zn)-  
メタロチオネインの高次構造の研究\*

Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Tertiary Structure  
of Cd- and (Cd, Zn)-Metallothioneins\*

三森文行<sup>1</sup>・遠山千春<sup>1</sup>

Fumiyuki MITSUMORI<sup>1</sup> and Chiharu TOHYAMA<sup>1</sup>

要 旨

$^1\text{H-NMR}$  を用いて、ほ乳動物より精製した5種のメタロチオネインについて高次構造の研究を行った。用いたタンパク質は、ラット、ウサギのメタロチオネイン1及び2、ヒトのメタロチオネイン-2の5種類である。カドミウムを結合したメタロチオネインは、互いによく似た $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示し、はっきりした、しかも動物種によらないよく似た高次構造を有していることを示した。一方、カドミウムと亜鉛をともに結合したメタロチオネインは、カドミウムだけを含むメタロチオネインとはやや異なるコンホメーションを有していることが明らかになった。

NMR二重共鳴、pH滴定の結果と、一次構造の少しずつ異なるこれらのメタロチオネインの $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの比較検討により、5種類のメタロチオネインの大部分のメチル基共鳴線を、それぞれ個々のメチオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、スレオニン、アラニン残基に帰属することができた。

またメタロチオネイン中のアラニン残基の $\alpha$ -プロトンの共鳴線は、その化学シフト値が4.1 ppm 付近にあるものと、4.4 ppm 付近にあるものの2種類に区分されることが見いだされた。しかも、この両区分に属するアラニン共鳴線の数はそれぞれ、メタロチオネインのC末端ドメイン、N末端ドメインに存在するアラニン残基の数と一致することが明らかになった。このことはアラニン残基の $\alpha$ -プロトンの化学シフト値がメタロチオネインのドメイン構造を反映していることを強く示唆する。

Abstract

Proton nuclear magnetic resonance studies of various mammalian metallothioneins are described. Metallothioneins-1 and 2, isolated from rat and rabbit, and also metallothionein-2 from humans, were investigated. Proton NMR spectra showed that mammalian metallothioneins containing Cd have similar tertiary structures regardless of their sources. On the other hand, metallothioneins containing both Cd

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

\* 本論文の一部は、Mitsumori, F. and C. Tohyama (1984): J. Biochem., 96, 533-543.に発表。

and Zn have a slightly different conformation from those containing Cd alone. Almost all methyl resonances of Cd-metallothioneins were assigned to those of Met, Ile, Leu, Val, Thr, and Ala residues by NMR double resonance techniques, pH titration, and spectral comparison of these metallothioneins. Alpha-proton resonances of Ala residues were classified into two groups, one of which arose around 4.1 ppm, the other around 4.4 ppm. Moreover, the number of  $\alpha$ -proton resonances around 4.1 ppm and 4.4 ppm agreed with the number of Ala residues in the COOH-terminal and NH<sub>2</sub>-terminal domains of the metallothionein, respectively. This finding suggests that the chemical shift values of  $\alpha$ -protons of Ala residues are reflective of the domain structure of the metallothioneins.

## 1 はじめに

メタロチオネイン (MT) はシステイン残基に富み Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>などの重金属と結合する、分子量 6000-7000 の低分子量タンパク質である<sup>1,2)</sup>。MT の生体内における機能についてはまだ確定されていないが、有害な重金属の無毒化、あるいは生体に必須な Zn や Cu などの重金属の代謝に重要な役割を果たしていることが示唆されている。MT はまた多くの動植物や、微生物中に普遍的に存在し、互いに良く似た一次構造を有していることが明らかになってきた。特に、ほ乳動物の MT は、一次構造の相同性が非常に高い。一般に、一つの動物種からは、一次構造のわずかに異なる二つのメタロチオネイン、MT-1 及び MT-2 が得られる。また、ウマ、ウサギ、ヒト及びサルにおいてはこれらのイソタンパク質の中に、さらにアミノ酸配列の置換が生じた分子種が存在することが知られている。

この特異なタンパク質の構造を明らかにするために、これまで紫外線吸収スペクトル、円二色性 (CD)<sup>3,4)</sup>、EXAFS<sup>5)</sup>、NMR<sup>6-14)</sup>、ESR<sup>15-17)</sup>などさまざまな分光分析法が用いられてきた。特に、<sup>113</sup>Cd-NMR 法により MT 中の Cd は金属クラスターを形成していることが示された。すなわち、MT 1 分子中に結合される 7 個の Cd が 4 個 (クラスター-A) と 3 個のクラスター (クラスター-B) の 2 種に分かれて存在していること、さらにサブチリンンを用いた MT の限定分解と<sup>113</sup>Cd-NMR の組み合わせにより、クラスター-A が MT の C 末端ドメインに、クラスター-B が N 末端ドメインに対応していることが明らかにされた<sup>18,19)</sup>。

MT 中の金属の構造が上記のように明らかにされてきたのに比べ、ペプチド側の高次構造についてはあまり情報が得られていない。タンパク質構造の全貌を明らかにするのに有効な X 線結晶解析には多大な努力が払われているが、今までのところ成功例はない。溶液中の MT のペプチド部分のコンホメーションに関して、<sup>1</sup>H-NMR を用いた研究が 2, 3 ある<sup>6-8)</sup>。この方法により Vašák らは MT がはっきりした高次構造を有していること、システイン残基が金属の結合に関与していることを確認した<sup>8)</sup>。彼らはまた、<sup>1</sup>H-NMR 信号と構成アミノ酸種との対応付けを行ったが、高次構造解析の基礎となる、<sup>1</sup>H-NMR 信号の各アミノ酸基への帰属はまだ行われていない。



本研究においては、MT のペプチド側の高次構造についての知見を得るためにラットの MT-1, MT-2, ウサギの MT-1, MT-2, 及びヒトの MT-2 の5種のタンパク質について400MHz <sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、比較研究を行った。この結果、MT 中のメチル基信号を一次構造上のイソロイシン、ロイシン、バリン、スレオニン、アラニンの各アミノ酸残基に帰属することができた。また、MT の高次構造についても議論を進める。

## 2 材料及び方法

### 2.1 メタロチオネイン

MTは、それぞれの実験動物に毎日5 $\mu$ mol/kg体重のCdCl<sub>2</sub>を2週間以上注射することにより誘導させた。エーテル麻酔下で肝臓を採取し、生理食塩水で洗浄後、精製操作を行うまで、-80°Cで保存した。MTの分取及び精製は、既報の方法に従ってゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを用いて行った<sup>20,21)</sup>。ヒトのMTは、病理解剖時に得られた、特別の腎病変のない腎臓より同様の方法により精製した。

### 2.2 MT中のZnのCdへの置換

Cdのみを結合したMTを得るために次の方法で本来MT中に含まれているZnをCdに置換した。1mgのMT(0.14 $\mu$ mol)を100mM Trisバッファ(pH 7.4) 0.45mlに溶解する。これに100mMジチオスレイトール(DTT) 0.05mlを加え、さらに1mM CdCl<sub>2</sub> 0.5mlを加え、30分間4°Cに放置する。混合液をSephadex G-75カラム(1.6 $\times$ 75cm)に通して脱塩を行う。ろ液の254/280nmの吸光度比の高い画分を分取し、凍結乾燥によりCd置換したMTを得た。MTの純度を検定するためにCd置換の前後にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。MT中の金属組成を知るためにJarrel-Ash model 975分光計を用いて発光分析を行った。

### 2.3 NMR測定

約1mgのMTを0.1M NaClを含む重水0.5ml中に溶解しNMR測定用試料とした。試料pHは0.1M又は0.01MのNaOD, DClを用いて8.5前後に調整した。NMRの測定はJEOL GX-400分光計を用い、FT法により1000-4000回の積算を行った。繰り返し時間は1.74秒、スペクトル幅5000Hzとし、8K $\times$ 2点のデータを取得した。ゼロサブリメント後16K $\times$ 2点についてフーリエ変換を行った。スペクトルの分解能向上のためコンボリューションディファレンスを行った。化学シフト値はキャピラリーに封入した2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-サルホン酸ナトリウム(DSS)を基準として測定した。測定温度は37°C。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 金属組成と高次構造

図1に主にCdを含む(Cd/Zn=96/4)ラットMT-2の重水中における<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。芳香族アミノ酸残基を完全に欠いていることから予想されるとおり、スペクトルの5.5 ppmより低磁場側には全く信号が現れない。0.8-1.6 ppmの間にはメチル基に由来する、よく分離したダブルット信号がいくつか認められる。2.09 ppm, 2.03 ppmにはそれぞれMet-1及びそのN-アセチル基の信号が大きなシングレットとして観測される。MTに含まれる20残基のシステインのメチレン基は、3.0 ppm周辺に重なって出現している。また、すべての残基の $\alpha$ -プロトン由来の信号が4.0 ppmを中心とした広い範囲に観測される。

本研究においては、各信号の帰属の第一段階として、よく分離したメチル基信号の解析を行った。しかし、動物より精製したCd, Znをととも含むMT ((Cd, Zn)-MT) においては、<sup>1</sup>H-

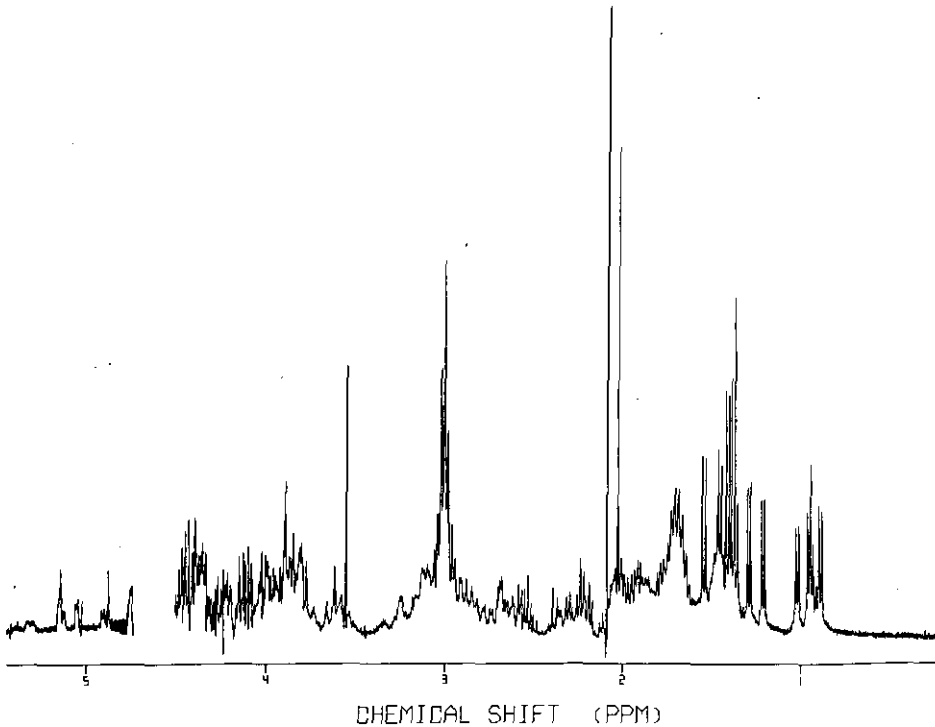


図1 ラットCd-メタロチオネイン-2の400 MHz <sup>1</sup>H-NMR スペクトル<sup>30)</sup>

Fig. 1 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of rat Cd-metallothionein-2<sup>30)</sup>

pH 8.46 測定温度: 37°C, 化学シフト基準: 外部DSS。コンボリューションディフレーション処理。

NMRスペクトルはそれほど単純ではない。図2Aにラットの (Cd, Zn)-MT-2及び、このZnをCdに置換して得た Cd-MT-2の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。同様に図2Bにラットの (Cd, Zn)-MT-1、及び Cd-MT-1の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。いずれにおいても、(Cd, Zn)-MTではCd-MTに比べて、スペクトルが複雑化していることが容易にわかる。

この違いをさらに詳細に検討するために、図2A, 2Bで観測されたメチル基ピークの各アミノ酸残基への同定を試みた。1.1 ppmより高磁場側における共鳴線は、Val及びIleに由来すると考えられる。1.1 ppmより低磁場側のダブルレット信号はAla及びThrによる。AlaとThrのメチル基ピークの弁別には、以下の判定基準を用いた。1) MTのように芳香族アミノ酸残基からの大きな環電流シフトがない系においては、Thrのメチル基は一般にAlaよりも高磁場側で共鳴する。2) Thrのメチルダブルレットのスピンの結合定数はおよそ6.7 Hzであるのに対し、Alaではやや大

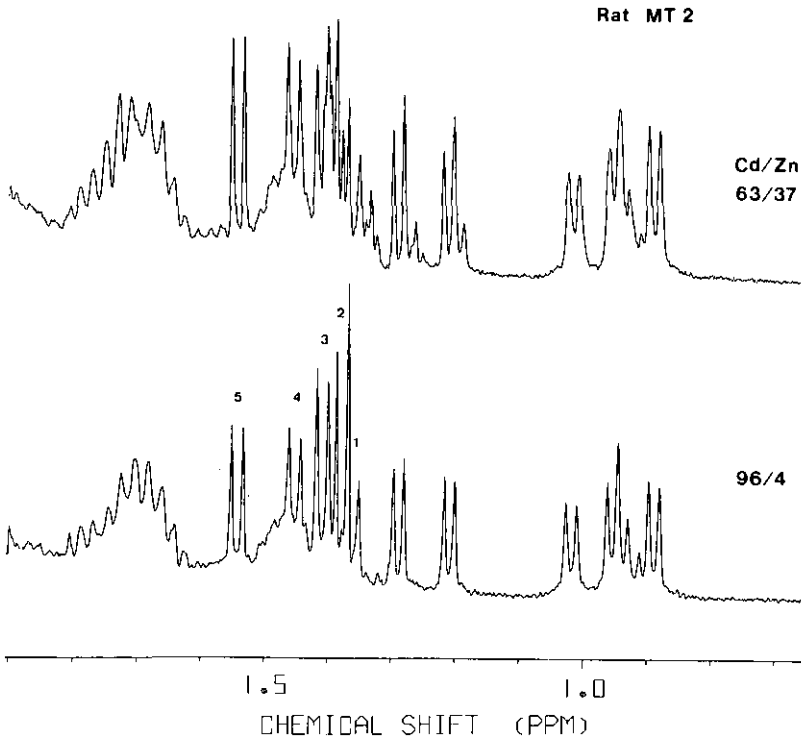


図 2A ラット メタロチオネイン-2の400MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル (0.7-1.9 ppm)<sup>30)</sup>

Fig. 2A 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectra between 0.7 and 1.9 ppm of rat metallothionein-2<sup>30)</sup>  
(a) Cd/Zn=96/4, pH 8.46 (b) Cd/Zn=63/37, pH 8.53 測定温度: 37°C 化学シフト基準: 外部 DSS。コンボリューションディファレンス処理。

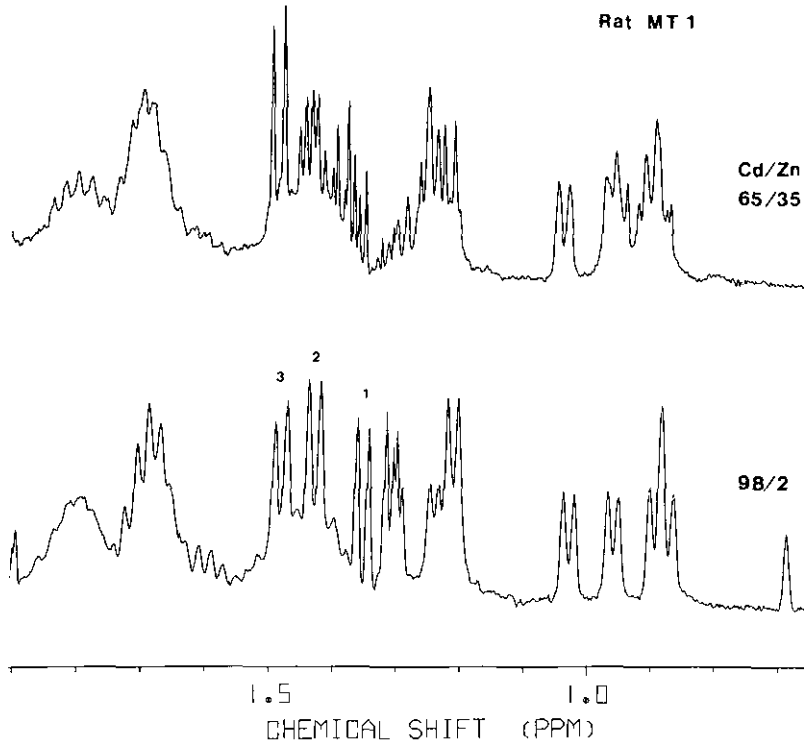


図 2B ラット メタロチオネイン-1の400MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル (0.7-1.9 ppm)<sup>30)</sup>

Fig. 2B 400 MHz <sup>1</sup>HMR spectra between 0.7 and 1.9 ppm of rat metallothionein-1<sup>30)</sup>  
(a) Cd/Zn=98/2, pH 8.28 (b) Cd/Zn=65/35, pH 8.74 測定温度: 37°C 化学シフト基準: 外部 DSS。コンボリューションディファレンス処理。

きく、7.3 Hz 前後である。3) メチル基のダブレット信号をプロトン照射したとき、そのメチル基が Ala 由来のものであれば、 $\alpha$ -プロトンはデカップルされてシングレットとなるが、Thr 由来であれば、スピン結合の相手は  $\beta$ -プロトンであるのでデカップルされてもシングレットにはならない。この三つの判定基準に基づいて、(Cd, Zn)-MT-2 においては 9 個の Ala メチル基ピーク、及び 4 個の Thr メチル基ピークが同定された。一方、Cd-MT-2 においては、5 個の Ala 及び 2 個の Thr が同定された。

アミノ酸分析の結果、ラットの MT-2 は、5 個の Ala、2 個の Thr を有していることが知られている<sup>22)</sup>。Cd-MT-2 の <sup>1</sup>H-NMR の結果は、このアミノ酸分析の結果と一致している。しかし、(Cd, Zn)-MT-2 の場合は、4 個の Ala ピーク、2 個の Thr が余分に観測されている。この原因として MT の純度がまず疑われるが、Cd 置換の前後で実施したポリアクリルアミドゲル電気泳動に

よる純度検定の結果では、いずれのMTも $R_m=0.71$ に強い単一バンドを示し、ほぼ単一のタンパク質であることが示された。一方、元素分析の結果は、Cd置換前のMT-2ではCd/Zn比が63/37であるのに対し、Cd置換後にはこれで96/4と大部分のZnがCdに置換されていることを裏付けた。いずれのMTでもCuは検出限界付近で、その量は無視し得る。上述のとおり、(Cd, Zn)-MT-2とCd-MT-2の基本的な違いはCd, Znの組成のみと考えられるので、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで認められた差は、この金属組成の違いに由来するものであると考えられる。

この結果は、Cd, Znをとともに結合したMTのコンホメーションがCdのみを結合したMTとは少し異なっていることを強く示唆し、(Cd, Zn)-MT-2で観測された余分のAla, Thr信号は、分子内に一部Znを結合したMT分子種に由来するものであると考えられる。この違いの最も特徴的な例が図2AのThrのメチル基に認められる。Cd-MT-2においては1.21 ppm及び1.29 ppmに2組のThrダブルレットが認められる。一方、(Cd, Zn)-MT-2においてはこれに対応する2組のダブルレット(1.21 ppm, 1.29 ppm)に加えて、それぞれの高磁場側に小さなThrピークが余分に観測されている(1.20 ppm, 1.28 ppm)。この小さなピークは分子内にZnを含んだMTに由来すると考えられるが、メチル基及びβ-プロトンの共鳴位置がともに、隣接の大きなピークと近いことから、それぞれ隣接したピークと一次構造上同一のThr残基に由来するものと考えられる。すなわち、1.20 ppm及び1.28 ppmの小ピークは、一次構造は同一でも、分子内に存在するZnのために高次構造がCd-MT-2とはやや異なるために1.21 ppm, 1.29 ppmのピークよりも、わずかに高磁場側に共鳴位置がシフトしたものと推定される。Cd-MT-2と(Cd, Zn)-MT-2の違いはこのほかにも、スペクトルのさまざまな部分で見いだされる。

Vašákらはウマの(Cd, Zn)-MT-IAの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにおいて、分子内にただ1個存在するVal残基のメチル基信号が2本以上観測されることを報告している<sup>8)</sup>。Otvos, Armitageは、ウサギの(Cd, Zn)-MTの<sup>113</sup>Cd-NMRスペクトルがCd-MTに比べて、ずっと複雑で構造が不均一であることを報告している<sup>12)</sup>。彼らはまた、(Cd, Zn)-MT-2の<sup>113</sup>Cd-NMRスペクトルパターンの解析から、Znが金属4個のクラスターよりも金属3個のクラスターに偏って存在しているというモデルを提出している<sup>23)</sup>。この結果は、(Cd, Zn)-MT-2においてはZnはランダムに存在するのではなく、特異的な結合部位を有していることを示唆する。本研究で<sup>1</sup>H-NMRより得られた結果も上記の結果と一致しており、(Cd, Zn)-MTはCd-MTとはコンホメーションが少し異なる分子種を含むことを示唆している。(Cd, Zn)-MTにおいて観測された、Ala, Thrの余分のピークは、<sup>113</sup>Cd-NMRで示唆された特定のCd, Znクラスターを有するMT分子種に対応しているのかもしれない。

### 3.2 Ile, Leu, Val残基の帰属

MTの高次構造を明らかにするために、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル上の各ピークを一次構造上の特定の残基へと帰属する試みを行った。CdとZnの混在によるスペクトルの複雑化を避けるために、

以後の実験ではすべて高いCd/Zn比を有するMTを用いて測定を行った。図3に示すように5種のCd-MTは互いに良く似た<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを与え、ほ乳類のMTは動物種によらず、相同

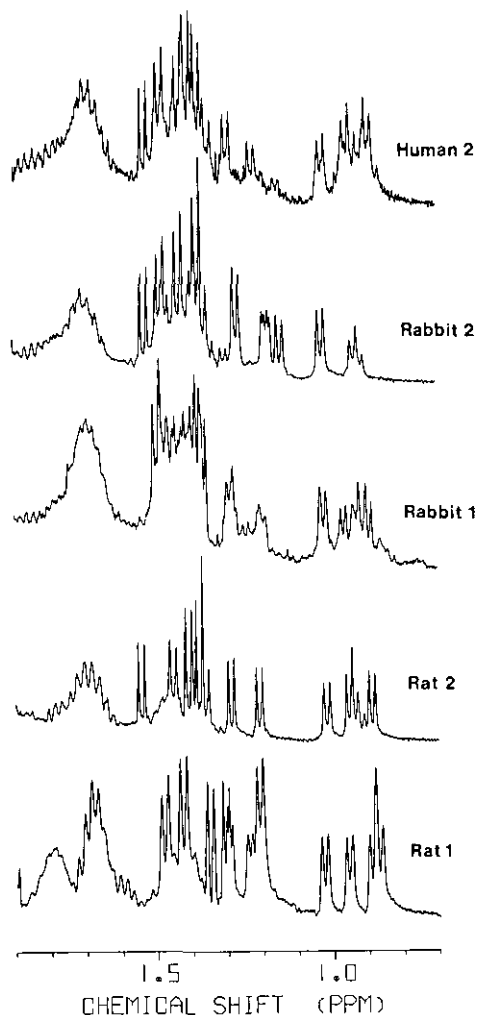


図 3 各種ほ乳類Cd-メタロチオネオインの400 MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル (0.7-1.9 ppm)<sup>30)</sup>

Fig. 3 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectra between 0.7 and 1.9 ppm of various mammalian Cd-metallothioneins<sup>30)</sup>

(a) ラット メタロチオネイン-1, pH 8.28 (b) ラット メタロチオネイン-2, pH 8.46 (c) ウサギ メタロチオネイン-1, pH 8.70 (d) ウサギ メタロチオネイン-2, pH 8.17 (e) ヒト メタロチオネイン-2, pH 8.28 測定温度: 37°C, 化学シフト基準: 外部DSS。コンボリューションディファレンス処理。

性の高い高次構造を有していることを示した。Met, Ile, Leu, Val, Thr, Ala 残基に由来するすべてのメチル基が、分離したピークとして観測され、それぞれのピークの数、MTのアミノ酸組成から得られた値と一致している。ヒトのMT-2<sup>24)</sup>及びウサギのMT-2<sup>25)</sup>(木村ら、未発表資料)については、全一次構造が明らかにされている。ウサギのMT-1(木村ら、未発表資料)、ラットのMT-2<sup>22)</sup>, MT-1<sup>26)</sup>については部分的な一次構造が報告されている。ラットMTの一次構造については、相同性の極めて高いマウスMTの全一次構造が明らかにされているので、一次構造未決定部分については、これを参考にした<sup>27)</sup>。

5種のMTのIle, Leu, Val残基について、メチル基ピークの化学シフト値と一次構造上の位置を図4に示す。ウサギMT-2は1個のIleのみを有し、Leu, Valを含まないので、1.03 ppmのダブルット信号及び0.93 ppmのトリプレット信号はただちにIle-49の $\gamma$ -CH<sub>3</sub>,  $\delta$ -CH<sub>3</sub>に帰属される。Ileの2個のメチル基は相異なる炭素に結合しているため、二重共鳴によるデカップリングのされ方がLeu, Valとは異なる。これを用いて、ヒトMT-2, ウサギMT-1, ラットMT-2においてもIle-49の帰属を行った。この結果、ヒトMT-2, ラットMT-2においては、残りの2組のダブルット信号がVal-39に帰属された。マウスMT-1との一次構造の相同性から、ラットMT-2はVal-39, Val-49の2個のVal残基を有すると類推される。ヒトMT-2, ラットMT-2のVal-39の $\gamma$ -CH<sub>3</sub>の化学シフト値との比較により、ラットMT-1の0.90 ppm, 0.97 ppmのピークをVal-39に帰属した。したがって0.88 ppm, 1.04 ppmのピークはVal-49に帰属される。ウサギ

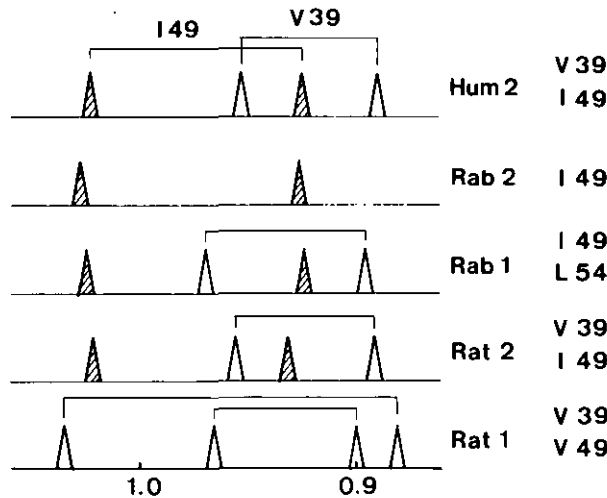


図 4 ほ乳類メタロチオネインのIle, Leu, Val残基のメチル基ピークのダイアグラム及び一次構造上の位置<sup>30)</sup>

Fig. 4 Chemical shift diagrams of methyl signals of Ile, Leu, and Val residues and their positions in amino acid sequences in various mammalian metallothioneins<sup>30)</sup>

MT-1においては0.90 ppm, 0.97 ppmのピークが未帰属であるが, このタンパク質では54番目の残基にSerを有する分子種とLeuを有する分子種が存在しているので<sup>28)</sup>, 上記の二つのピークは, 後者のLeu-54の $\gamma$ -CH<sub>3</sub>に帰属した。

以上ですべてのIle, Leu, Valの帰属が完了したが, 各MTでのIle-49及びVal-39のメチル基の化学シフト値の差はそれぞれ0.01 ppm以内に納まっており, ほ乳類MTの高次構造の相同性の高さを示している。また, この結果は, 一次構造の少しずつ異なるMTのピーク位置の比較が, 信号の帰属に有効な方法であることも示している。

### 3.3 Thr 残基の帰属

図5に各MTのThr残基のメチル基ピークの化学シフト値と, 一次構造上の位置を示す。両者の比較から, ヒトMT-2, ウサギMT-1, ラットMT-2の1.29 ppmの信号をThr-27に帰属した。ヒトMT-2, ラットMT-2ではThr残基の数は2個であるので, 残りの信号をThr-14 (1.22 ppm), Thr-9, (1.21 ppm)とそれぞれ帰属した。ラットMT-1では, Thr-9とThr-14が1.22 ppmに重なって出現している。この帰属の結果から, ラットの(Cd, Zn)-MT-2で論じられた2本のThr信号(図2A)はThr-27及びThr-9であることがわかった。Thr信号についてはこれ以上の帰属は行っていない。Thrのメチル基信号の化学シフト値は, Ile, Valの場合と異なりMT間でのばらつきが大きい。これはThrの $\beta$ 位に存在するOH基が水素結合に関与し, メチル基の

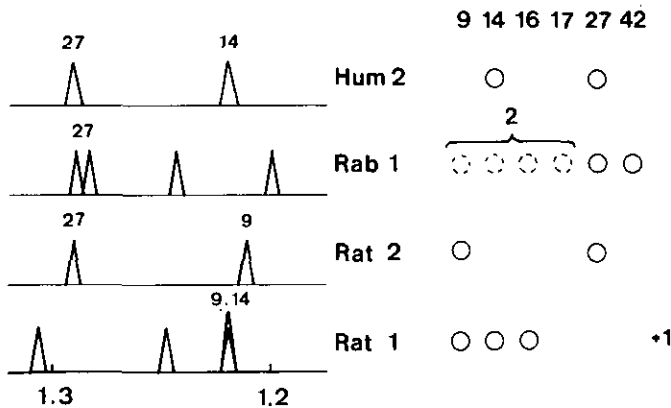


図 5 ほ乳類メタロチオネインのThr残基のメチル基ピークのダイアグラム及び一次構造上の位置<sup>30)</sup>

Fig. 5 Chemical shift diagrams of methyl signals of Thr residues and their positions in amino acid sequences in various mammalian metallothioneins<sup>30)</sup>

ラットメタロチオネイン-1では1個のThr残基の一次構造上の位置が未定。ウサギメタロチオネイン-1では, 9-19番残基の間に2個のThr残基が存在することが明らかにされている。



共鳴位置に影響を与えているためではないかと考えられる。

### 3.4 Ala 残基の帰属

図6に各MTのAla残基のメチル基ピークの化学シフト値及び一次構造上の位置を示す。化学シフト値のダイアグラムはかなり複雑で、これまでに行ってきた単純なピーク位置の比較は有効ではない。しかし、Alaの一次構造上の存在位置が完全に同一なヒトMT-2とウサギMT-2のダイアグラムが極めて近似していることは注目値する。

本実験で用いた5種のMTのCOOH末端残基はすべてAlaであることがわかっているので<sup>2,10)</sup>まず、pH滴定を行うことにより、このCOOH末端Ala残基の帰属を試みた。図7にラットMT-2、MT-1のAlaメチル基ピークのpH滴定の結果を示す。ラットMT-2では1.38 ppmのピーク2が、ラットMT-1では1.36 ppmのピーク1がpH5以下で化学シフト値の変化を示し、これらのピークがCOOH末端のAla-61であると帰属された。同様に、ウサギMT-2においても、高磁場側から2本目の1.38 ppmのピークをAla-61と帰属した。ウサギMT-1、ヒトMT-2においてはpH滴定を行っていないが、ピーク位置の比較から、1.38 ppmのピークがAla-61であると考えられる。

二重共鳴によるAla残基の $\alpha$ -プロトン信号の同定の結果、次のような興味ある事実が判明した。すなわち、Ala残基の $\alpha$ -プロトンは、4.1 ppm付近に出現するものと4.4 ppm付近に現れるもの

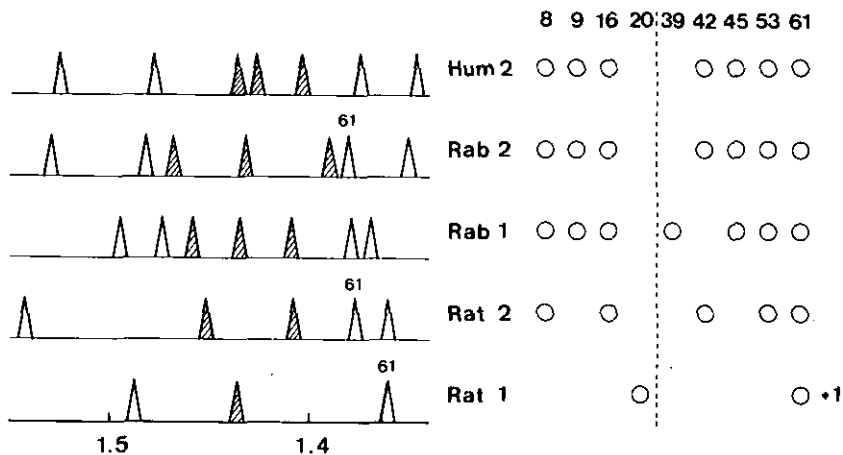


図6 ほ乳類メタロチオネインのAla残基のメチル基ピークのダイアグラム及び一次構造上の位置<sup>30)</sup>

Fig. 6 Chemical shift diagrams of methyl signals of Ala residues and their positions in the amino acid sequences in various mammalian metallothioneins<sup>30)</sup>

一次構造中の点線は二つのドメインの境界を示す。ダイアグラム上の斜線を施したピークはNH<sub>2</sub>ドメインにあると考えられるAlaを示す。

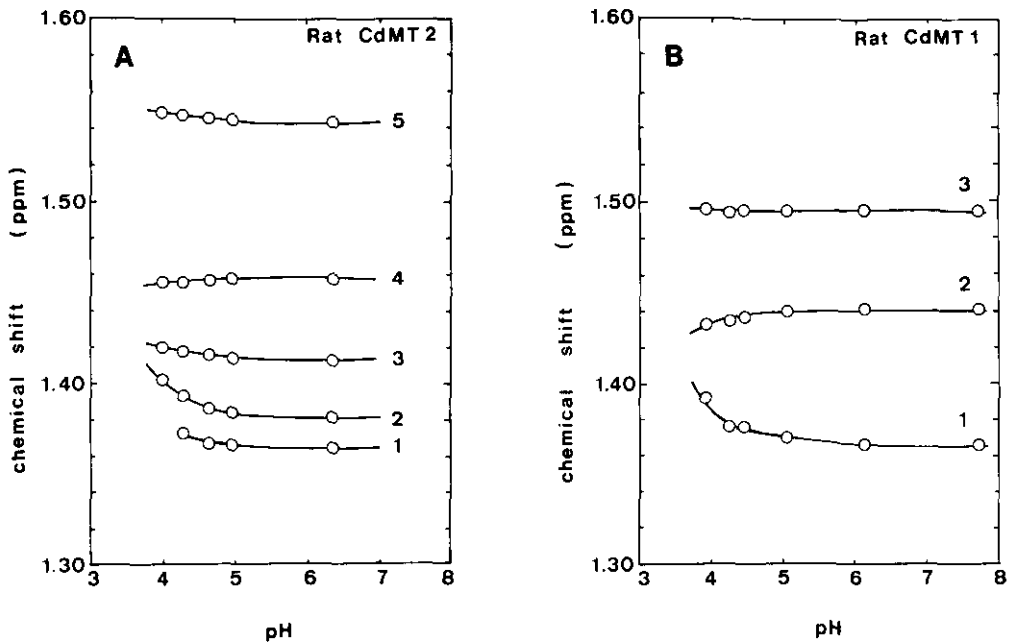


図 7 (A) ラット Cd-メタロチオネイン-2 及び (B) ラット Cd-メタロチオネイン-1 の Ala メチル基ピークの化学シフト値の pH 依存性<sup>30)</sup>

Fig. 7 The pH dependence of chemical shift values of Ala methyl peaks of (A) rat Cd-metallothionein-2 and (B) rat Cd-metallothionein-1<sup>30)</sup>

図中の番号は図 2 A, 2 B のピーク番号と対応。

の 2 組に区別され、しかも、それぞれの組に含まれる  $\alpha$ -プロトン信号の数は、MT の COOH ドメイン (30-61 番残基) 及び  $\text{NH}_2$  ドメイン (1-29 番残基) に存在する Ala 残基の数と一致するというものである。図 8 に一例としてラット MT-2 の  $\alpha$ -プロトン領域の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す。さらに、この区分された  $\alpha$ -プロトンとメチル基との対応を示すために、図 6 のメチル基ピークのうち、対応する  $\alpha$ -プロトンが 4.4 ppm 付近にあるものに斜線を施した。斜線ピークは 1.45 ppm 付近にまとまって出現することが明らかである。以上の事実から、MT 中の Ala 残基の  $\alpha$ -プロトンが 2 組に区別されるのは、その化学シフト値が MT の二つのドメインの差を反映したものであるとの仮説が導かれる。

pH 滴定により帰属された Ala-61 のメチル基ピークはいずれも、図 6 のダイアグラムにおいて斜線を施されないピークに属しており、このことは、上述の仮説から導かれる、斜線ピークは  $\text{NH}_2$  ドメインの Ala 残基、という結果と一致している。さらに、ラット MT-2 の COOH ドメインのフラグメント ( $\alpha$ -フラグメント) については、500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルが報告されており、その Ala メチル基領域には 3 本のダブルット信号が認められるものの、1.45 ppm 付近には全く信号が出現していない。この事実は、前述の仮説の妥当性を支持するものである。

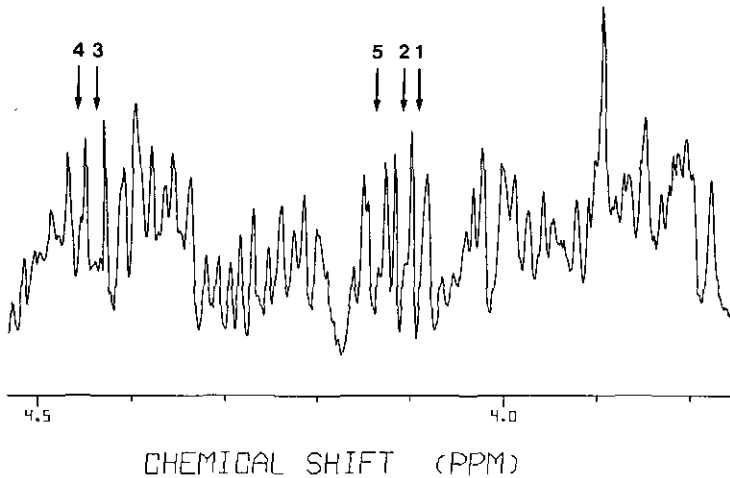


図 8 ラット Cd-メタロチオネイン-2 の  $\alpha$ -プロトン領域の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (3.8-4.5 ppm)<sup>30)</sup>

Fig. 8 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum between 3.8 and 4.5ppm of rat Cd-metallothionein-2<sup>30)</sup>

pH 8.46, 測定温度: 37°C 矢印は Ala 残基の  $\alpha$ -プロトン位置を示す (番号は図 2 A のメチル基ピークとの対応を示す)。コンボリューションディファレンス処理。

上記の仮説を認めれば、 $\alpha$ -プロトンの化学シフト値を用いて、COOH ドメインと NH<sub>2</sub> ドメインにある Ala 残基を区別することができる (図 6 の非斜線ピークと斜線ピーク)。この結果、図 6 のダイアグラムは単純化され、ピーク位置の比較による帰属が可能となる。まず、非斜線ピークについて比較を行う。ウサギ MT-1 と MT-2 においては、一次構造上の Ala 位置は、39 番目と 42 番目が入れ替わっただけである。化学シフトダイアグラム上では、最も低磁場にある 1.50 ppm (MT-1)、1.53 ppm (MT-2) のピークがこれに対応すると考えられる。したがって、これらを Ala-39, Ala-42 に帰属した。この結果から、ヒト MT-2, ラット MT-2 においても、1.53 ppm, 1.54 ppm のピークを Ala-42 と帰属した。一次構造上の位置と化学シフトダイアグラムの比較により、ラット MT-1 以外の MT の最も高磁場側のピークは Ala-53 と考えられる。したがって、ヒト MT-2, ウサギ MT-2, ウサギ MT-1 に見られる 1.48 (1.47) ppm のピークは Ala-45 と帰属される。

次に斜線ピークの比較を行う。ラット MT-1 の唯一の斜線ピークは Ala-20 と帰属される。ヒト MT-2, ウサギ MT-2 及び MT-1 における 1.43 ppm 近傍のピークは Ala-9 と帰属した。ラット MT-1 以外の MT で共通して観測される 1.40 ppm, 1.45 ppm 付近の 2 本のピークは、Ala-8 又は Ala-16 に対応すると考えられるが、この両者は、本実験で用いた MT の比較からは区別できない。ラット MT-1 においては、現在一次構造上の 30-61 番目で位置が特定できない Ala 残基が 1 個存在している。化学シフトダイアグラム上で未帰属の 1.49 ppm のピークは、この残基に対応す

ると考えられ、その化学シフト値から、この Ala 残基は Ala-45 ではないかと推定される。以上のように MT 中の Ala 残基の化学シフト値が MT のドメイン構造を反映しているという仮説に基づけば、ほとんどすべての Ala ピークは矛盾なく帰属できる。

Ala 残基の  $\alpha$ -プロトンの化学シフト値が MT のドメイン構造を反映する理由は現在のところ明らかではないが、MT の二つのドメインの性質が異なっていることを示す結果は多い。NH<sub>2</sub>ドメインは3個の金属を結合するが、COOHドメインは4個の金属結合サイトを有する<sup>19)</sup>。Cu や Zn は NH<sub>2</sub>ドメインに優先的に結合することが報告されている<sup>13,23)</sup>。このことは両ドメインの構造の違いを示唆している。Boulanger らは、MT の金属クラスター構造をもとに、Chou-Fasman 理論によるポリペプチドの2次構造予測を援用し、MT の高次構造モデルを提出した(図9)<sup>29)</sup>。このモデルによれば、ポリペプチド鎖は NH<sub>2</sub>ドメインに比べ COOHドメインの方がより緊密な折りたたみ構造を示しており、COOHドメインにある Ala 残基の  $\alpha$ -プロトンが、この折りたたみ、又は金属クラスターによってより大きな遮へいを受け、高磁場シフトすることは考えられる。

本研究において、は乳動物の、Cd を結合した MT は互いに良く似た高次構造を有していることが示された。これらの MT の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル上におけるほとんどすべてのメチル基ピークを各アミノ酸残基に帰属できた(表1)。また、Ala 残基の  $\alpha$ -プロトンは、その化学シフト値により、2種類に区分され、MT の二つのドメインに対応していることが推定された。MT のポリペプチドの<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにドメイン構造が反映しているというデータが得られたのは本研究が初めてである。本研究で行われた<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの帰属は、MT という特異なタンパク質の全体像を明らかにする上で、MT の構造と機能の関連を解明する上で有用な基礎資料となると考えられる。

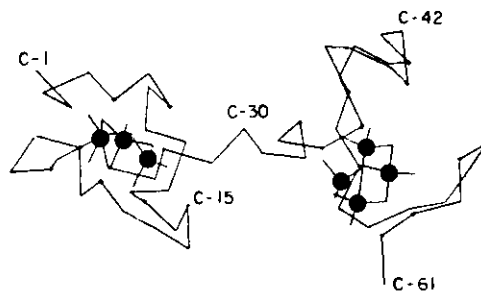


図 9 Boulanger らの提案したメタロチオネインの高次構造モデル<sup>29)</sup>

Fig. 9 A structure model of metallothionein proposed by Boulanger *et al*<sup>29)</sup>

●は金属位置を示す。

表 1 ほ乳類Cd-メタロチオネインのメチル基ピークの帰属<sup>30)</sup>

Table 1 The assignment of methyl resonances in various mammalian Cd-metallothioneins<sup>30)</sup>

化学シフト基準：外部 DSS, 測定温度：37°C, pH 8.28 (ラット メタロチオネイン-1), 8.46 (ラット メタロチオネイン-2), 8.70 (ウサギ メタロチオネイン-1), 8.17 (ウサギ メタロチオネイン-2), 8.28 (ヒト メタロチオネイン-2),  
S：シングレット, D：ダブルット, T：トリプレット

species and isotype	$\delta_{\text{methyl}}^a$ (ppm)	multiplet structure	J (HZ)	assignment	$\delta_{\text{coupled}}^b$ (ppm)
rat 1	0.88	D	7.3	val 49	2.52
	0.90	D	7.3	Val 39	1.93
	0.97	D	6.7	Val 39	1.93
	1.04	D	6.7	Val 49	2.52
	1.22	D	6.7	Thr 9	4.42
	1.22	D	6.7	Thr 14	4.42
	1.25	D	5.5	Thr	4.29
	1.31	D	6.1	Thr	4.38
	1.36	D	7.3	Ala 61	4.10
	1.44	D	7.3	Ala 20 <sup>c</sup>	4.45
	1.49	D	7.3	(Ala 45) <sup>c</sup>	4.12
	2.03	S	-	N-Acetyl	-
	2.09	S	-	Met 1	-
	rat 2	0.89	D	6.7	Val 39
0.93		T	7.0	Tle 49 $\delta$	
0.96		D	6.7	Val 39	1.95
1.02		D	6.7	Ile 49 $\gamma$	2.20
1.21		D	6.1	Thr 9	4.49
1.29		D	6.1	Thr 27	4.29
1.36		D	7.3	Ala 53 <sup>c</sup>	4.09
1.38		D	7.3	Ala 61	4.11
1.41		D	7.3	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.44
1.45		D	7.3	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.46
1.54		D	7.3	Ala 42 <sup>c</sup>	4.14
2.03		S	-	N-acetyl	-
2.09		S	-	Met 1	-
rabbit 1		0.90	D	6.1	Leu 54
	0.92	T	6.1	Ile 49 $\delta$	
	0.97	D	6.1	Leu 54	1.61
	1.02	D	6.4	Ile 49 $\gamma$	2.23

表 1 つづき  
 Table 1 continued

species and isotype	$\delta_{\text{methyl}}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplet structure	J (HZ)	assignment	$\delta_{\text{coupled}}^{\text{b}}$ (ppm)
	1.20	D	6.1	Thr	4.31
	1.24	D	6.1	Thr	4.24
	1.28	D	6.4	(Thr 27)	4.30
	1.29	D	6.4	(Thr 27)	4.17
	1.37	D	6.7	Ala 53 <sup>c</sup>	4.29
	1.38	D	7.3	Ala 61	4.11
	1.41	D	7.0	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.38
	1.44	D	7.3	Ala 9 <sup>c</sup>	4.45
	1.46	D	7.1	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.43
	1.47	D	7.0	Ala 45 <sup>c</sup>	4.30
	1.50	D	7.6	Ala 39 <sup>c</sup>	4.12
	2.03	S	-	N-acetyl	-
	2.09	S	-	Met 1	-
rabbit 2	0.93	T	7.0	Ile 49 $\delta$	
	1.03	D	7.0	Ile 49 $\gamma$	2.24
	1.14	D	6.7	Thr	4.42
	1.18	D	6.4	Thr	4.24
	1.18	D	6.1	Thr	4.59
	1.27	D	6.4	Thr	4.29
	1.35	D		Ala 53 <sup>c</sup>	3.96
	1.38	D	7.3	Ala 61	4.11
	1.39	D		Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.48
	1.43	D	7.3	Ala 9 <sup>c</sup>	4.45
	1.47	D		Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.31
	1.48	D	7.6	Ala 45 <sup>c</sup>	4.10
	1.53	D	7.3	Ala 42 <sup>c</sup>	4.12
	2.03	S	-	N-acetyl	-
	2.09	S	-	Met 1	-
human 2	0.89	D	6.7	Val 39	1.91
	0.92	T		Ile 49 $\delta$	
	0.95	D	6.7	Val 39	1.91
	1.02	D	6.7	Ile 49 $\gamma$	2.23
	1.22	D	6.1	Thr 14	4.64
	1.29	D	6.7	Thr 27	4.25

表 1 つづき  
Table 1 continued

species and isotype	$\delta_{\text{methyl}}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplet structure	J (HZ)	assignment	$\delta_{\text{coupled}}^{\text{b}}$ (ppm)
	1.35	D	7.9	Ala 53 <sup>c</sup>	4.04
	1.37	D	7.3	Ala 61	4.10
	1.40	D	7.3	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.28
	1.43	D	7.3	Ala 9 <sup>c</sup>	4.45
	1.44	D	7.3	Ala 8 or 16 <sup>c</sup>	4.45
	1.48	D	7.3	Ala 45 <sup>c</sup>	4.10
	1.53	D	7.3	Ala 42 <sup>c</sup>	4.12
	2.02	S	-	N-acetyl	-
	2.09	S	-	Met 1	-

a : メチル基の化学シフト値

b : メチル基とカップリングしているプロトンの化学シフト値

c : アラニン残基の同定は、アラニンの $\alpha$ -プロトンがメタロチオネインのドメイン構造を反映していると仮定して行った。

### 引用文献

- 1) Margoshes, M. and B.L.Vallee (1957) : A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814.
- 2) Nordberg, M. and Y. Kojima (1979) : Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 41-116.
- 3) Bühler, R. H. O. and J. H. R. Kägi (1979) : Spectroscopic properties on zinc-metallothionein. *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 211-220.
- 4) Rupp, H. and U. Weser (1978) : Circular dichroism of metallothioneins. A structural approach. *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 209-226.
- 5) Garner, C. D., S. I. Hasnain, I. Bremner and J. Bordas (1982) : An EXAFS study of the zinc sites in sheep liver metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.*, **16**, 253-256.
- 6) Rupp, H., W. Voelter and U. Weser (1974) : 270MHz proton magnetic resonance spectra of metallothionein. *FEBS Lett.*, **40**, 176-179.
- 7) Galdes, A., M. Vašák, H. A. O. Hill and J. H. R. Kägi (1978) : <sup>1</sup>H NMR spectra of metallothioneins. *FEBS Lett.*, **92**, 17-21.
- 8) Vašák, M., A. Galdes, H. A. O. Hill, J. H. R. Kägi, I. Bremner and W. Young (1980) : Investigation of the structure of metallothioneins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **19**, 416-425.
- 9) Suzuki, K. T. and T. Maitani (1978) : Cadmium-113 FT NMR-spectra of rabbit liver metallo-

- thioneins. *Experientia*, **34**, 1449-1450.
- 10) Sadler, P. J., A. Bakka and P. J. Beynon (1978) :  $^{113}\text{Cd}$  nuclear magnetic resonance of metallothionein. *FEBS Lett.*, **94**, 315-318.
  - 11) Otvos, J. D. and I. M. Armitage (1979) :  $^{113}\text{Cd}$  NMR of metallothionein : direct evidence for the existence of polynuclear metal binding sites. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7734-7736.
  - 12) Otvos, J. D. and I. M. Armitage (1980) : Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7094-7098.
  - 13) Briggs, R. W. and I. M. Armitage (1982) : Evidence for site-selective metal binding in calf liver metallothionein. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1259-1262.
  - 14) Nicholson, J. K., P. J. Sadler, K. Cain, D. E. Holt, M. Webb and G. E. Hawkes (1983) : 88MHz  $^{113}\text{Cd}$ -n. m. r. studies of native rat liver metallothioneins. *Biochem. J.*, **211**, 251-255.
  - 15) Vašák, M. (1980) : Spectroscopic studies on cobalt (II) metallothionein : Evidence for pseudo-tetrahedral metal coordination. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3953-3955.
  - 16) Vašák, M., J. H. R. Kägi, B. Holmquist and B. L. Vallee (1981) : Spectral studies of cobalt (II)- and Nickel (II)-metallothionein. *Biochemistry*, **20**, 6659-6664.
  - 17) Vašák, M. and J. H. R. Kägi (1981) : Metal thiolate clusters in cobalt (II)-metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6709-6713.
  - 18) Winge, D. R. and K.-A. Miklossy (1982) : Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3471-3476.
  - 19) Boulanger, Y., I. M. Armitage, K.-A. Miklossy and D.R. Winge (1982) :  $^{113}\text{Cd}$  NMR study of a metallothionein fragment. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13717-13719.
  - 20) Tohyama, C. and Z. A. Shaikh (1978) : Cross-reactivity of metallothioneins from different origins with rabbit anti-rat hepatic metallothionein antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 907-913.
  - 21) Tohyama, C. and Z. A. Shaikh (1981) : Metallothionein in plasma and Urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 1-7.
  - 22) Kissling, M. M., C. Berger, J. H. R. Kägi, R. D. Anderson and U. Weser (1979) : The amino-terminal sequence of a rat liver metallothionein (MT-2). *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 181-185.
  - 23) Otvos, J. D. and I. M. Armitage (1982) : Elucidation of metallothionein structure by  $^{113}\text{Cd}$  NMR. *Biochemical Structure Determination by NMR*, Bothner-by, A. A., J. D. Glickson and B. D. Sykes (eds.), Marcel Dekker, New York, 65-96.
  - 24) Kissling, M. M. and J. H. R. Kägi (1979) : Amino acid sequence of human hepatic metallothioneins. *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 145-151.
  - 25) Kimura, M., N. Otaki and M. Imano (1979) : Rabbit liver metallothionein tentative amino acid sequence of metallothionein-B. *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 163-168.
  - 26) Berger, C., M. M. Kissling, R. D. Anderson, U. Weser and J. H. R. Kägi (1981) : Abstract of 2 nd International Metallothionein Meeting. Aberdeen, Scotland.
  - 27) Huang, I-Y., H. Tsunoo, M. Kimura, H. Nakashima and A. Yoshida (1979) : Primary structure of mouse liver metallothionein-I and-II. *Metallothionein*, Kägi, J. H. R. and M. Noreberg (eds.), Birkhäuser, Basel, 169-172.
  - 28) 木村正己・小滝規子・小泉信滋・猿渡雄彦・増井 徹・宇多小路正 (1983) : 母乳類メタロチオネイン.



生化学, 55, 990.

- 29) Boulanger, Y., C. M. Goodman, C. P. Forte, S. W. Fesik and I. M. Armitage (1983) : Model for mammalian metallothionein structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1501-1505.
- 30) Mitsumori, F. and C. Tohyama (1984) : Proton nuclear magnetic resonance studies of mammalian metallothioneins. J. Biochem., **96**, 533-543.

II-13 カドミウム汚染地域住民の呼気中炭化水素分析  
による過酸化脂質の測定

Measurements of Lipid Peroxides of Habitants  
in an Area Polluted by Cadmium

嵯峨井勝<sup>1</sup>・市瀬孝道<sup>1</sup>・杉平直子<sup>2</sup>  
鈴木和夫<sup>1,3</sup>・斎藤 寛<sup>2,4</sup>

Masaru SAGAI<sup>1</sup>, Takamichi ICHINOSE<sup>1</sup>, Naoko SUGIHIRA<sup>2</sup>  
Kazuo T. SUZUKI<sup>1,3</sup> and Hiroshi SAITO<sup>2,4</sup>

要 旨

慢性的にカドミウム (Cd) 負荷を受けていた Cd 汚染地域の 60 歳以上の住民の呼気中炭化水素と血清過酸化脂質濃度を測定したところ, Cd による腎障害を起しているかと判定されている, いわゆる「要経過観察者」の呼気中プロパンと血清過酸化脂質濃度は同地域に住む正常者の値より有意に低い値を示した。

一方, ラットにカドミウム-メタロチオネイン (Cd-MT) を投与すると, *in vivo* の過酸化脂質の指標としての呼気中プロパン濃度は Cd-MT 投与初期に一過性の増加ピークを示したが, 数日後には逆に初期レベルの 50% 以下に低下するという顕著な変化を示した。

これらの結果より, Cd-MT による腎障害と過酸化脂質生成との関連が示唆され, 特にプロパンの前駆体である  $\omega$  4 族の脂肪酸の過酸化との関連が示唆された。同時に, 呼気中炭化水素分析法の疫学研究への応用の可能性も示唆された。

Abstract

Breath hydrocarbons and serum thiobarbituric acid (TBA) values as indices of lipid peroxidation of habitants in an area polluted by cadmium for long times were examined. Breath propane and serum TBA values of habitants with kidney harmed

- 
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 国立公害研究所 環境保健部  
Environmental Health Sciences Division.
  3. 現在: 国立公害研究所 環境保健部  
Present address: Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies.
  4. 現在: 長崎大学医学部 〒852 長崎市坂本町 12 番 4  
Present address: Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan.

chronically by cadmium were lower significantly than those of normal habitants.

Breath propane of female rats administered intraperitoneally with cadmium-metallothionein (Cd-MT, 300 $\mu$ g as Cd<sup>2+</sup>/kg body weight) increased twice after 18h, and then decreased to one-half of the initial level after several days. For these results, a relationship between lipid peroxidation, especially peroxidation of  $\omega$ 4 family fatty acids as a precursor of breath propane, and kidney damage by Cd-MT was suggested. Furthermore, possibility of application to epidemiological research of breath propane-measurement was also discussed.

## 1 はじめに

重金属による細胞毒性の発現機序については i) 重金属と生体内 SH 基との反応<sup>1-4)</sup>, ii) 重金属によるミトコンドリア機能の阻害<sup>3,4)</sup>, iii) 重金属による ATPase 活性の阻害<sup>2,4)</sup>などが報告されているが、過酸化脂質の生成も細胞毒性の主要なメカニズムの一つと考えられている<sup>3,5-9)</sup>。これは生体膜脂質の過酸化により、細胞膜の透過性<sup>9-12)</sup>や構造が変化したり、膜結合酵素が不活性化<sup>12-14)</sup>されたりすることによるものと考えられている。カドミウム (Cd) による生体内脂質過酸化反応の促進に関しても多くの研究者によって報告されている<sup>15-17)</sup>。しかしながら、Cd 投与ラットにおいては *in vivo* の脂質過酸化の指標である呼気中ペンタン<sup>18)</sup>あるいはエタン<sup>19)</sup>の排出促進は認められないという報告がある。これに加えて、Cd による脂質過酸化反応は水銀や銅の例と同様に細胞毒性とは関連しないという肝浮遊細胞による報告<sup>20,21)</sup>もあり、その毒性と脂質過酸化の関連については多くの未解決の問題が残されている。また、長期間にわたって Cd 負荷を受けてきた Cd 汚染地域住民の中には Cd に起因する腎障害の例が数多く報告されている<sup>22)</sup>が、これら住民の生体内過酸化脂質に関する報告は見当たらない。

メタロチオネインは例えば Cd などの重金属が生体内に入った時に体内で合成される金属結合タンパク質であり、これまでは重金属を無毒化する作用を有するタンパク質と考えられてきた。しかし、近年になってカドミウム-メタロチオネイン (Cd-MT) をラット等に投与すると Cd-MT は体内、特に腎臓で分解されて遊離の Cd イオンに変化し、この遊離の Cd が顕著な腎障害を引き起こすことが知られてきた<sup>23)</sup>。

我々は上記のような Cd による細胞毒性と脂質過酸化との関連性を明らかにすることを目的に Cd-MT 投与ラットの過酸化脂質生成を呼気中炭化水素分析法を用いて検討中に、呼気中のプロパン濃度が Cd-MT 投与初期に増加するが、その数日後には初期レベルの 50% 以下に低下することを見いだした。一方、エタンやペンタンも Cd-MT 投与初期には増加するが数日後には初期レベルに戻り、それ以下に低下することはなかった。このことから、呼気中プロパンは腎障害に対して特異性の高い指標である可能性が示唆された。この指標が慢性的に Cd 負荷を受けた Cd 汚染地域住民に対しても特異的であるかどうかを調べたところ、同地域内の「正常者」と Cd により腎障害

を起こしていると判定された「要経過観察者」の間を明らかに区別しうる指標であることが判明したので、その結果について報告する。

## 2 材料と方法

### 2.1 Cd 汚染地域住民の呼気中炭化水素と血清過酸化脂質の測定

呼気中炭化水素と血清過酸化脂質の測定は長崎県対馬郡厳原町檜根地区に居住している60歳以上の住民を対象として行った。検診に訪れた60歳以上の対象者は男性8名、女性14名の合計22名で、これら対象者の平均年齢は70.7歳であった。このうち、臨床検査等の結果から「要経過観察者」の判定を受けていた人は男性1名、女性7名であった。

対象者の呼気は炭化水素を含まない高純度空気ボンベ（Zero U Air, 製鉄化学製）からダグラスバックに移した空気をリブレスバルブで10分間呼吸させ、肺の中の汚れた空気を十分に洗い出した後に約1 lの呼気をテドラー・バッグに移し取り、その中の300 mlをラットの場合と同様の方法にて濃縮して測定に供した。なお、呼気採取場所から国立公害研究所までの輸送中のサンプルの変化を補正するため、呼気採取現場で対照用としてテドラー・バッグに純空気をつめたものも持ち帰り、その測定値をヒトの測定値から差し引いた値をデータとした。

また、対象者の血清TBA値測定は八木法<sup>24)</sup>によったが、血清は採取現地で10%リンタングステン酸で沈殿とし、ドライアイスで凍結して研究所へ運んでから発色、定量した。

### 2.2 動物の過酸化脂質の測定

実験には、6週齢で購入し、検疫と環境に馴らすために2週間正常飼育した8週齢のJcl:ウィスター系雌ラットを用いた。Cd-MTはCdに換算して体重kg当たり300 µgを腹腔内に投与した。過酸化脂質の指標としてのエタン、プロパン、ペンタン等の呼気中炭化水素の測定は嵯峨井が記載した方法<sup>25)</sup>に準じた。測定には6匹の動物を用い、Cd-MT投与直前の値を対照値とし、その後も同一ラットを用いて経時的変化をフォローした。なお、投与したCd-MTはSuzukiら<sup>26)</sup>の方法に従って調製したものを用いた。

## 3 結果

### 3.1 Cd 汚染地域住民の過酸化脂質

正常なヒトの呼気中炭化水素のFID-ガスクロマトグラフィー分析チャートを図1に示した。ピークは出現順にメタン、エタン、エチレン、プロパン、iso-ブタン、n-ブタン、iso-ペンタン及びn-ペンタンを示す。なお、プロパンとiso-ブタン及びn-ブタンとiso-ペンタンの間のピーク（P IとP II）はGC-MSなどの結果よりフレオンガスと同定されており<sup>27)</sup>、これは生体成分に由来するものではなくスプレー噴霧剤として用いられている環境汚染フレオンガスに由来するものだろうと思われる。

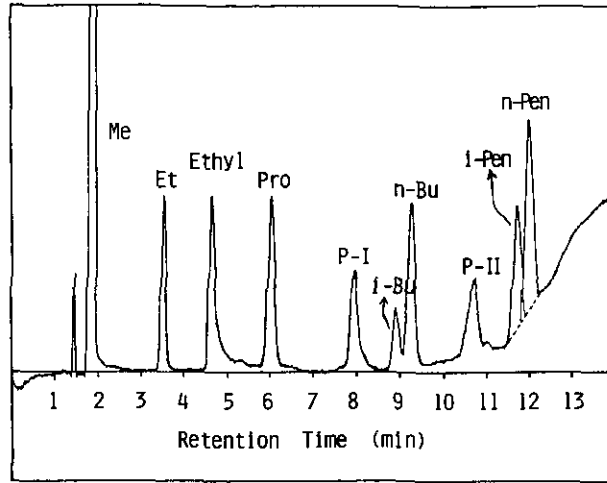


図 1 ヒト（正常者）の呼気中炭化水素の分析チャート

Fig. 1 A gas chromatography of hydrocarbons in the practical breath of normal human

Me:メタン; Et:エタン; Ethyl:エチレン; Pro:プロパン; Bu:ブタン; Pen:ペンタン; P I and P II:フロンガス

呼気中炭化水素を測定した 22 名の対象者を他の臨床検査等の結果から、正常者と「要経過観察者」及び喫煙者の 3 群に分け、各群の年齢、血清過酸化脂質、呼気中エタン、プロパン及びペンタンの平均値を表 1 に示した。表から理解できるように喫煙者群の呼気中炭化水素はエタン、プロパン及びペンタンとも他の 2 群より著しく高い値を示しているが、これは既報<sup>28)</sup>の結果よりタバコの煙の中の炭化水素に由来するものと考えられる。

正常者と「要経過観察者」について比較すると、エタンとペンタンは両者の間に有意差は認められないが、プロパンと血清過酸化脂質濃度は「要経過観察者」の値が正常者の値より有意に低い値を示していた。両群の個人個人の呼気中エタンと血清過酸化脂質値の分布を図 2 に、呼気中ペンタンと血清過酸化脂質値の分布を図 3 に示した。図 2 のエタンと血清過酸化脂質の分布を見ると正常者（○印）と「要経過観察者」（●印）の値は入り混じった分布を示しており、特に正常者と「要経過観察者」を区別する指標とはなりえないようである。また、ペンタンと血清過酸化脂質の分布も両者とも入り混じっており、エタンと同様に両者を区別する指標とはなりえなかった（図 3）。これに対し、プロパンと血清過酸化脂質の分布（図 4）は円に囲んだように正常者と「要経過観察者」の値は明らかに異なる分布範囲を示しており、特にプロパンについては  $6 \mu\text{moles}/100 \text{ ml} \cdot \text{breath gases}$  を境界として明確な分布の相違を示し、Cd 慢性負荷に伴う生体影響検索の有効な指標となりうることを示唆している。しかし、図 4 中の a と b は互いに別のグループ内に局在した。

表 1 カドミウム汚染地域住民の過酸化脂質値

Table 1 Lipid peroxides of habitants in an area polluted by cadmium

	正 常 者		要経過観察者		喫 煙 者	
	N±SD	%	M±SD	%	M±SD	%
検 査 者 数 (n)	8		8		6	
年 齢 (歳)	66.0±5.6		76.0 ±10.5 <sup>a)</sup>		69.8 ±5.5	
血 清 TBA値 <sup>1)</sup>	10.21±1.94		8.10±1.37 <sup>a)</sup>		10.97±2.25	
呼 気 中 エ タ ン <sup>2)</sup>	3.59±2.76		3.74±1.78		27.21±10.13 <sup>c)</sup>	
呼 気 中 プ ロ パ ン <sup>2)</sup>	7.37±2.08		3.35±2.27 <sup>b)</sup>		18.23±5.14 <sup>c)</sup>	
呼 気 中 ペ ン タ ン <sup>2)</sup>	6.09±2.82		4.48±2.04		12.64±2.14 <sup>c)</sup>	
尿 中 β <sub>2</sub> -mg <sup>3)</sup>	1.492±1311		39.305±10.556 <sup>c)</sup>		2.870±1.172	

1) n moles of MDA/ml

2) p moles of hydrocarbon/100ml of breath

3) μg/l

a) 正常者群に対する有意差 (Student の t-検定による), P<0.05

b) P<0.01

c) P<0.001

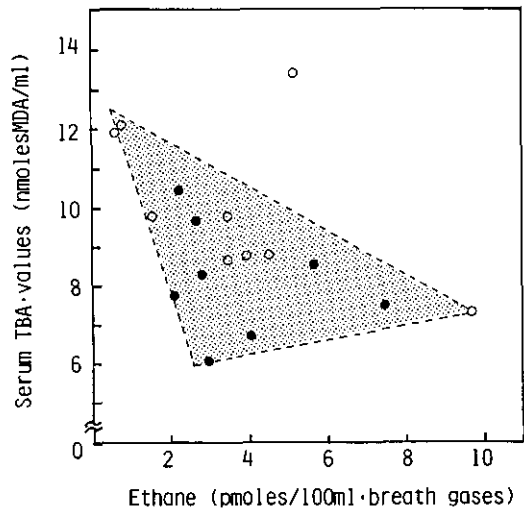


図 2 カドミウム汚染地域の 60 歳以上の住民の呼気中エタンと血清 TBA 値の分布

Fig. 2 Distribution of breath ethane and serum TBA values of habitants in an area polluted by cadmium

○ 正常者；● 要経過観察者

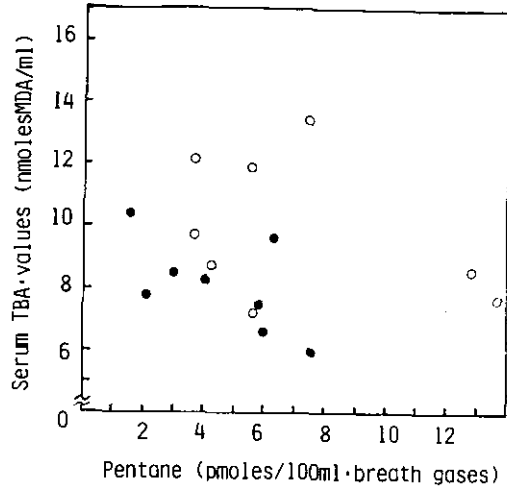


図 3 カドミウム汚染地域の 60 歳以上の住民の呼気中ペンタンと血清 TBA 値の分布

Fig. 3 Distribution of breath pentane and serum TBA values of habitants in an area polluted by cadmium

○ 正常者；● 要経過観察者

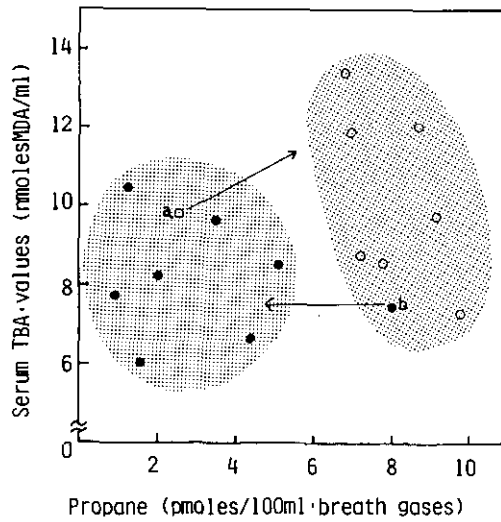


図 4 カドミウム汚染地域の 60 歳以上の住民の呼気中プロパンと血清 TBA 値の分布

Fig. 4 Distribution of breath propane and serum TBA values of habitants in an area polluted by cadmium

○ 正常者；● 要経過観察者

### 3.2 Cd-MT 投与によるラットの過酸化脂質生成

Cd-MT を投与したラットの呼気中エタンとプロパン濃度の経時変化を図5に示した。なお、0時間目の値はCd-MT 投与直前の値を示している。エタンの0時間目の値は2.3 p moles/min/100 g・体重である。Cd-MT 投与後、エタンは急速に増加し、18時間目前後で約2倍に達し、その後低下して3日目には初期レベルに戻った。これに対し、プロパンのCd-MT 投与前の値は8.7 p moles/min/100 g・体重でありエタンの約4倍の値を示していた。Cd-MT 投与後のプロパンの経時変化はエタンの場合とよく似ているが、投与3日目にはCd-MT 投与前の約半分に低下していた。

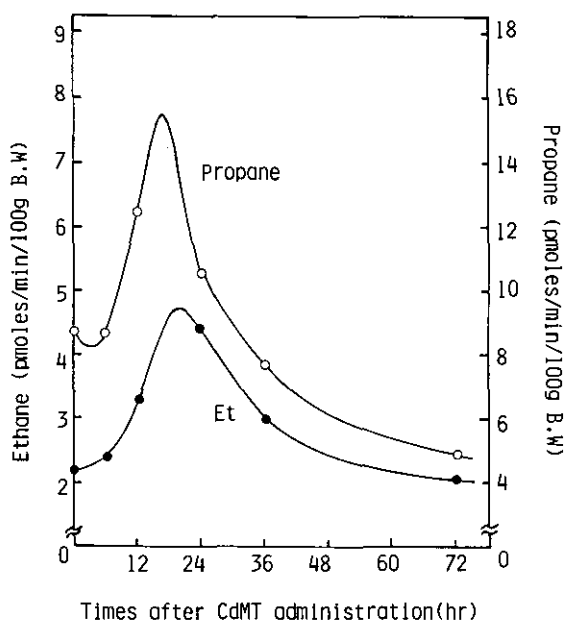


図 5 カドミウム-メタロチオネイン投与ラットの呼気中エタンとプロパンの経時変化

Fig. 5 Periodical changes of breath ethane and propane of rats administered with cadmium-metallothionein (Cd-MT)

Cd-MT was administered intraperitoneally at a dose of 300  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /kg body weight.

## 4 考 察

近年、生体内過酸化脂質の測定法として呼気中炭化水素分析法が注目されている。我々はこの分析法を用いて、障害を受ける臓器の違いによって呼気中炭化水素の生成割合が著しく異なることを見いだした。例えば、 $\text{NO}_2$ のような肺障害の場合には呼気中エタンが増加し<sup>29,30)</sup>、無機水銀による腎障害時にはペンタンとプロパンが増加し<sup>31)</sup>、四塩化炭素による肝障害時にはエタンとペンタ



ンが著しく増加する<sup>32)</sup>。また、メチル水銀のような肝臓と腎臓に障害を及ぼす物質ではエタン、ペンタン及びプロパンが増加していた<sup>33)</sup>が、初期の肝障害が強い時期にはエタンとペンタンが増加し、後期に腎障害を起こしはじめる時期にはエタンは低下し、ペンタンとプロパンが著しく増加した。これらの結果より、プロパンは腎障害に特異的な指標と思われたので、最近著しい腎障害を起こすことが知られてきた Cd-MT についても調べた。その結果は図 5 に示したごとく、初期にはエタンとプロパンが顕著に増加したが、後期にはプロパンが対照レベルの半分以下に低下し、この Cd-MT による結果も腎障害とプロパンの関連を示唆した。

プロパンは Octadecatrienoic acid (C 18 : 3,  $\omega$  4) や Eicosatetraenoic acid (C 20 : 4,  $\omega$  4) のような  $\omega$  4 族脂肪酸の過酸化反応後の  $\beta$  分解によって生じるものと考えられている<sup>25)</sup>。それゆえ、腎の  $\omega$  4 族の脂肪酸は腎毒物によって過酸化を受けやすい状態にあると同時に生理的に重要な役割を果たしていることが推測される。

一方、これまで化学物質による細胞障害の場合、過酸化脂質が増加すると考えられてきたが、上記のような結果からみると、Cd 汚染地域の「要経過観察者」の呼気中プロパンと血清 TBA 値の低下は矛盾しているように思われる。しかしながら、Cd-MT 投与ラットの例では呼気中プロパンは一過性に増加した後では「要経過観察者」の例と同様に正常時の 50% 以下に低下している。このことは Cd 汚染地域住民の腎障害のうち Cd だけでは説明しえない部分は Cd-MT の作用による可能性を示唆し、本測定法は Cd-MT による腎障害のより詳しい研究に有益な手法となるかもしれない。

## 引用文献

- 1) Rothstein, A. (1959) : Cell membrane as site of action of heavy metals. *Fed. Proc.*, **18**, 1026-1038.
- 2) Vallee, B. L. and D. D. Ulmer (1972) : Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 91-128.
- 3) Chvapil, M. (1973) : New aspects in the biological role of zinc : A stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci.*, **13**, 1041-1049.
- 4) Webb, M. (1977) : Metabolic targets of metal toxicity. *In* : *Clinical Chemistry and Chemical Toxicity of Metals*. S. S. Brown (ed.), Amsterdam : Elsevier/North-Holland, 51-64.
- 5) Tappel, A. L. (1975) : Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. *In* : *Pathobiology of Cell Membranes*. B. F. Trump and A. Arstila (eds.), Acad. Press, N. Y. Vol. 1, 145-170.
- 6) Plaa, G. L. and H. Witschi (1976) : Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 125-141.
- 7) Köster-Albrecht, D., H. Kappus and H. Remmer (1978) : Lipid peroxidation and cell damage in isolated hepatocytes due to bromotrichloromethane. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **46**, 499-505.
- 8) Willson, R. (1977) : Zinc : A radical approach to disease. *New Sci.*, **1**, 558-560.
- 9) Kinter, W. B. and J. B. Pritchard (1977) : Altered permeability of cell membranes. *In* : *Handbook of Physiology*, Sect. 9, Reactions to Environmental Agents. Lee, D.H.K., H.L. Falk, S.D. Murphy

- and S.R. Geige (*eds.*), Bethesda, Md. : American Physiological Society. 563-576.
- 10) Tappel, A. L. (1973) : Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, **32**, 1870-1874.
  - 11) Vladimirov, Yu. A. (1980) : Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *In* : "Adv. Lipid Res", Paoletti, R. and D. Kritchevsky (*ed.*), Acad. Press, N. Y., Vol. 17, 173-249.
  - 12) Rice-Evans, C. and P. Hochstein (1981) : Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxidation of lipid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **100**, 1537-1542.
  - 13) Schaefer, A. (1975) : Lipid peroxidation as the cause of the ascorbic acid induced decrease of adenosine triphosphatase activities of rat brain microsomes and its inhibition by biogenic amines and psychotropic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1781-1786.
  - 14) Adam-Vizi, V. and A. Seregi (1982) : Receptor independent stimulatory effect of noradrenaline on Na, K-ATPase in rat brain homogenate. Role of lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2231-2236.
  - 15) Omaye, S. T. and A. L. Tappel (1975) : Effect of cadmium chloride on the rat testicular soluble selenoenzyme, glutathione peroxidase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **12**, 695-711.
  - 16) Gabor, S., Z. Anca and E. Bordas (1978) : Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes. Effect of zinc and copper. *Rev. Roum. Biochem.*, **15**, 113-117.
  - 17) 佐二木順子・福島悦子・藤代良彦 (1983) : カドミウムによる精巣障害の発症過程における脂質過酸化について. *衛生化学*, **29**, 389-393.
  - 18) Tappel, A. L. (1980) : Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **355**, 18-31.
  - 19) Harvey, M. J. and C. D. Klaasen (1983) : Interactions of metals and carbon tetrachloride on lipid peroxidation and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **71**, 316-322.
  - 20) Stacey, N. H., L. R. Cantilena, Jr. and C. D. Klaasen (1980) : Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 470-480.
  - 21) Stacey, N. H. and C. D. Klaasen (1981) : Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 139-147.
  - 22) Saito, H., R. Shioji, Y. Hurukawa, K. Nagai, T. Arikawa, T. Saito, Y. Sasaki, T. Furuyama and K. Yoshinaga (1977) : Cadmium-induced proximal tubular dysfunction in a cadmium-polluted area. *Cor. Nephrol.*, **6**, 1-12.
  - 23) Suzuki, K. T. (1984) : Studies of cadmium uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 21-30.
  - 24) 八木国夫 (1975) : チオバルビツール酸による血清過酸化脂質の測定. *ビタミン*, **49**, 403-408.
  - 25) 嵯峨井勝 (1983) : 生体内過酸化脂質の測定. C. 呼気分析. 過酸化脂質実験法, 金田尚志・植田伸夫 (編), 医歯薬出版, 98-108.
  - 26) Suzuki, K. T., S. Takenaka and K. Kubota (1979) : Fate and comparative toxicity of metallothioneins with differing Cd/Zn ratio in rat kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 85-95.
  - 27) 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・長谷川鎮雄・嵯峨井勝 (1985) : 呼気ガス炭化水素測定の臨床応用, 第2報, 過酸化脂質研究, (印刷中).
  - 28) 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・市瀬孝道・嵯峨井勝・長谷川鎮雄 (1983) : 呼気ガス炭化水素測定の臨床応用, 第1報, *日本臨床生理学雑誌*, **13**, 108-112.
  - 29) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982) : Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
  - 30) Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984) : Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective

- system in rat lung upon life span exposure to low levels of  $\text{NO}_2$ . *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.
- 31) Yonaha, M., Y. Ohbayashi, T. Ichinose and M. Sagai (1982) : Lipid peroxidation induced by mercuric chloride and its relation to the toxicity. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1437-1442.
- 32) 嵯峨井勝・A. L. Tappel (1979) : 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. *過酸化脂質研究*, **3**, 1-8.
- 33) Yonaha, M., M. Saito and M. Sagai (1983) : Stimulation of lipid peroxidation by methyl mercury in rats. *Life Sci.*, **32**, 1507-1514.

II-14

カドミウムのステロイド代謝に及ぼす影響

Effects of Cadmium on Steroid Metabolism in Rat

安藤 満<sup>1</sup>・安藤哲夫<sup>2</sup>・高橋 弘<sup>3</sup>・高橋慎司<sup>3</sup>  
清水 明<sup>3</sup>・山元昭二<sup>3</sup>・伊藤勇三<sup>3</sup>

Mitsuru ANDO<sup>1</sup>, Tetsuo ANDO<sup>2</sup>, Hiroshi TAKAHASHI<sup>3</sup>, Shinji TAKAHASHI<sup>3</sup>  
Akira SHIMIZU<sup>3</sup>, Shoji YAMAMOTO<sup>3</sup> and Yuzo ITO<sup>3</sup>

要 旨

この特別研究ではカドミウムのステロイド代謝への影響を研究した。塩化カドミウムは、尿中尿素、クレアチニン、尿酸含量を変化させない。さらに、塩化カドミウムは尿中17-β-ヒドロキシコルチコステロイド含量にも影響しない。

一方、塩化カドミウムは血漿中テストステロン濃度の低下を引き起こす。カドミウムによる血漿中テストステロン濃度の低下は、尿中17-オキシステロイド含量の低下として反映する。17-オキシステロイドの尿中排せつは、カドミウム投与量の増加に伴い低下する。

カドミウムによるチトクローム P-450 の破壊と血漿中テストステロン濃度の低下は、肝臓薬物代謝系酵素活性の低下をもたらし、ペントバルビタール麻酔時間を延長させる。

Abstract

The effect of cadmium on the steroid metabolism was investigated. Cadmium chloride did not affect the content of urea, creatinine and uric acid in urine. Cadmium chloride did not affect the content of 17-hydroxy corticosteroid (17-OHCS) in urine either.

On the other hand, cadmium chloride caused the reduction of plasma testosterone concentration. The reduction of plasma testosterone concentration by cadmium caused the decrease of 17-oxo-steroid content in urine. The decrease of 17-oxo-steroid excretion depended upon the dose level of cadmium.

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和57~59年度 国立公害研究所客員研究員 (鹿児島大学医学部 〒890 鹿児島市宇宿町1)  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies.  
(Faculty of Medicine, University of Kagoshima, Kagoshima 890, Japan.)
3. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

The destruction of cytochrome P-450 and the reduction of plasma testosterone concentration by cadmium caused the reduction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme activity and prolonged the pentobarbital sleeping time.

## 1 はじめに

環境中に常在する重金属、カドミウムは腎臓、肝臓、精巣等広般な生体機能の障害を引き起こす。カドミウムは肝臓薬物代謝系酵素を著しく阻害し、そのため外来性汚染物質の代謝が遅延する<sup>1)</sup>。

この薬物代謝の阻害は、一つはミクロゾームのチトクローム P-450 のチトクローム P-420 への変成により引き起こされる。このことは *in vitro*<sup>2,3)</sup> と、*in vivo*<sup>4,5)</sup> の両方において証明されている。

このカドミウムによる薬物代謝系の阻害は雄ラットにおいて著しく、阻害からの回復も遅い。一方雌ラットでは阻害作用が弱く、阻害からの回復も早い。さらに動物の age により薬物代謝系酵素の阻害作用が著しく異なり、成熟ラットにおいて阻害が強く現れ阻害からの回復も遅い<sup>5)</sup>。一方、ラットにおける肝臓薬物代謝系酵素の活性は雌雄差が著しく、この雌雄差はテストステロンによる薬物代謝系酵素の誘導により引き起こされる<sup>6)</sup>。重金属によるステロイドホルモンの変動は、各種生体機能の障害をもたらすと考えられる。

カドミウムによる精巣壊死作用は顕著であるため<sup>7,8)</sup>、カドミウムのステロイドホルモン代謝への影響を検討した。

## 2 方法

5, 21, 42 週齢の雌雄のウィスター系ラット、90 匹を実験に供した。各週齢の雌雄ラットを 1 群 3 匹ずつに分け、個別に代謝ケージに入れ、カドミウム投与前の 24 時間尿を氷冷下採取した。尿採取後塩化カドミウムを体重 kg 当たり 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 mg 腹腔内投与し、投与後さらに 2, 7, 14 日目に 24 時間尿を採取した。採尿後直ちに、ラットは心採血により脱血死させた。

24 時間尿、血漿等は採取後直ちに -20°C 凍結保存した。尿中窒素、クレアチニン、尿酸含量等を自動分析法により、また尿中 17-ヒドロオキシコーチコステロイド (17-OHCS)、17-オキシステロイド (17-OS) は神戸川法を用い比色計 (410, 520 nm) にて測定した。尿中ステロイドの組成はガスクロマトグラフィー (2%, OV-1, 80/100 メッシュ, 2 mm×2 m) を用い測定した。

血漿中テストステロン濃度は、抽出後ラジオイムノアッセイ法により測定した。

## 3 結果

今回の実験においては、カドミウム投与により尿中尿素窒素、クレアチニン、尿酸含量に変化は認められなかった。17-OHCS、17-OS は個体差が著しいため、カドミウム投与前を基準とし、

各投与群ごとに相対変化量(%)を比較し検討した。

副腎由来のステロイドの代謝産物である17-OHCSは、雌ラット、雄ラットとも、カドミウム投与により有意な変化は示さない。週齢が異なっても、カドミウム投与の影響はみられない。

17-OSもまた雌ラットについては、カドミウム投与による影響はみられない。しかしながら雄ラットについては著明な変化がみられた。

図1は5週齢の雄ラットの尿中17-OSのカドミウム投与後の経時変化を示す。0.3 mg/kg(○)のカドミウム投与では、17-OSの排せつに影響がみられない。これに対し0.6 mg/kg(▲)のカドミウムの投与では、1週間目に17-OSの著明な低下を示す。2週間目には、正常値に回復する。1.2 mg/kg(△)のカドミウムの投与では、投与二日目より17-OSの著明な低下を示す。17-OSのこのような低下は、2週間目にはほぼ正常値に回復する。2.4 mg/kg(■)のカドミウム投与では、投与二日目にみられる17-OSの著明な低下は、投与後2週間目になっても回復がみられない。このようにカドミウム投与量に比例した17-OSの排せつ量の低下が認められる。

図2は21週齢の雄ラットの尿中17-OSのカドミウム投与後の経時変化を示す。0.3 (○), 0.6 mg/kg(▲)のカドミウム投与では、17-OSの排せつに影響がみられない。1.2 (△), 2.4 mg/kg(■)のカドミウム投与により、投与後二日目より17-OSの著明な低下がみられる。17-OSの低下

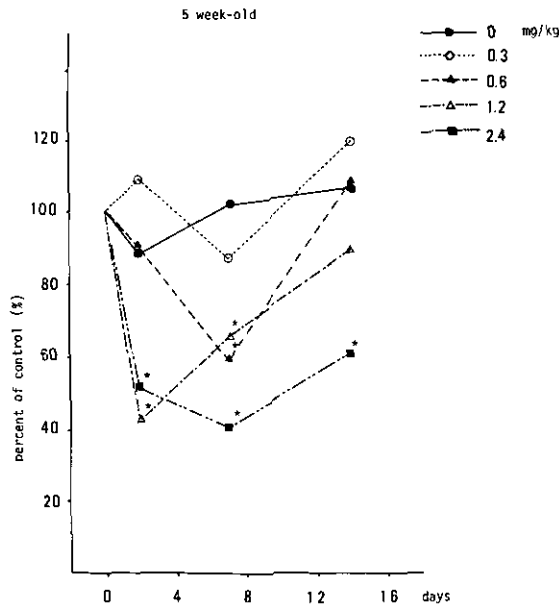


図 1 5週齢雄ラットにおけるカドミウム投与後の17-OS排せつの経時変化

Fig. 1 The time course of 17-OS excretion of 5-weeks-old male rats after cadmium administration

\*印はコントロール群(0 mg/kg)に対し、有意差有り(p<0.05)

は投与後2週間目になっても回復しなかった。

図3は42週齢の雄ラットの尿中17-OSのカドミウム投与後の経時変化を示す。21週齢の雄ラットの場合と同じく、1.2 (△), 2.4 mg/kg(■)のカドミウム投与により17-OSの著明な低下がみられ、かつその低下は2週間後になっても回復しなかった。

17-OSの低下は精巣由来のテストステロンの産生低下によると考えられるため、血漿中テストステロン濃度を測定した。カドミウム投与量に応じた血中テストステロンの著しい低下がみられた。

表1にカドミウム投与後の5, 21, 44週齢ラットのペントバルビタール麻酔時間の経時変化を示す。17-OSの経時変化と類似した変化を示す。

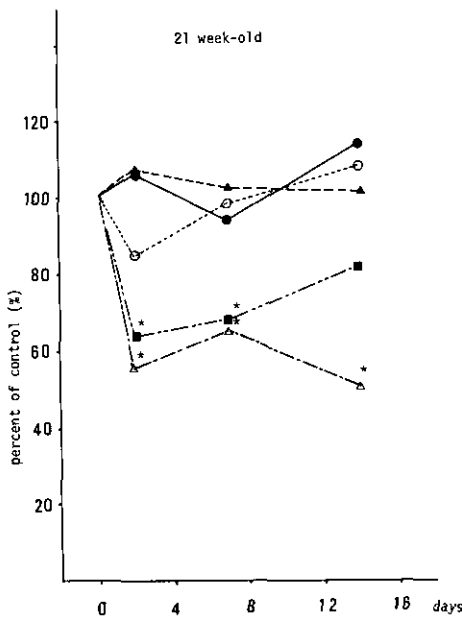


図 2 21週齢雄ラットにおけるカドミウム投与後の17-OS排泄の経時変化

Fig. 2 The time course of 17-OS excretion of 21-weeks-old male rats after cadmium administration

図1の説明参照

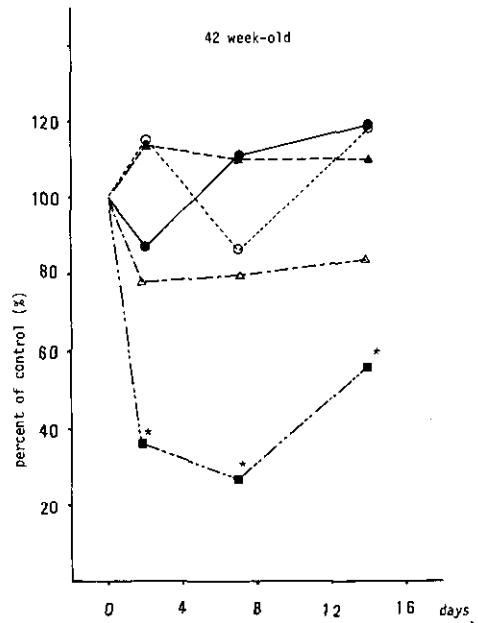


図 3 42週齢雄ラットにおけるカドミウム投与後の17-OS排泄の経時変化

Fig. 3 The time course of 17-OS excretion of 42-weeks-old male rats after cadmium administration

図1の説明参照

#### 4 考 察

カドミウムによる精巣壊死作用は敏感でかつ著明であることが報告されている<sup>7,8)</sup>。一方、カドミウムは雄ラットの肝臓薬物代謝系酵素を著しく阻害し、成熟ラットにおいては阻害からの回復

表 1 カドミウム投与後の5, 21, 44週齢雄ラットのペントバルビタール麻酔時間の経時変化

Table 1 The time (min) course of the sleep of 5-, 21- and 44-weeks-old male and female rats after cadmium administration (units=minutes)

Dose	Male					Female				
	2nd Day	1st Week	2nd Week	3rd Week	4th Week	2nd Day	1st Week	2nd Week	3rd Week	4th Week
5-weeks-old Rats										
0	69±15	65±11	67±11	69±10	70±5	151±28	153±29	144±37	152±17	159±52
0.3	78±6	69±16	67±22	67±16	68±10	135±18	114±19	150±30	134±21	136±16
0.6	90±21	71±9	77±25	69±20	61±4	145±20	143±28	166±18	164±7	147±50
1.2	128±33**	93±15**	97±27*	113±43*	119±46*	136±27	139±26	121±38	147±35	150±21
2.4	138±34**	85±24	112±23**	135±35**	142±40*	156±23	167±23	163±18	179±21	184±15
21-weeks-old Rats										
0	105±23	100±17	86±9	100±28	93±17	153±23	146±17	170±60	166±51	171±42
0.3	124±39	100±23	94±13	94±18	100±23	192±37	168±20	155±54	174±62	184±45
0.6	181±45**	134±33*	106±18*	106±9	88±18	166±20	160±21	169±52	159±43	173±55
1.2	194±53**	144±46*	134±30**	138±24*	114±15	195±18**	169±23	165±35	161±16	174±52
2.4	5 rats dead	—	—	—	—	206±47*	166±21	198±24	146±56	189±36
44-weeks-old Rats										
0	157±16	128±34	120±22	125±26	129±18	208±33	223±31	230±41	224±72	250±46
0.3	182±38	153±19	134±23	157±40	157±46	205±24	214±67	199±27	204±21	204±40
0.6	188±57	139±35	134±33	137±27	133±42	220±24	218±37	241±56	256±43	239±35
1.2	306±55**	265±58**	230±66**	229±53**	230±69**	231±31	223±46	248±56	239±52	242±59
2.4	438±37**	309±37**	253±50**	386±71**	319±39**	293±46**	220±11	204±56	232±40	257±63

\*コントロール群 (Cd 無投与群) との間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

\*\*コントロール群との間に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。



も遅いことが確証されている<sup>5)</sup>。

精巣はテストステロンの生合成を行う臓器であり、肝臓薬物代謝系はステロイドホルモンの代謝を行う主要な部位である。このことから、カドミウムはステロイド代謝に著しく影響し、ステロイドの生体内バランスをかく乱し、それによる健康障害をもたらすと考えられる。

この実験ではカドミウム投与により、尿中尿素窒素、クレアチニン、尿酸含量に変化は認められなかった。著しい排せつ障害は起こっていないと考えられる。

副腎由来のステロイドホルモンの代謝物である 17-OHCS の排せつには、このような濃度のカドミウム投与により、各週齢の雌雄のラットとも影響がみられない。カドミウムは副腎皮質に著しい急性の機能障害は起こさないと推察される。

これに対し、17-OS の排せつは、カドミウム投与により、雄ラットに著明な変化がみられた。1.2 mg/kg 以上のカドミウム投与により、各週齢の雄ラットとも尿中 17-OS の排せつ量が著しく低下する。血漿中テストステロン濃度もこれに並行し、カドミウム投与により著しい低下を示した。

このような尿中 17-OS の排せつ量の低下は、17-OHCS の結果と比較して考えると、カドミウムの精巣機能障害作用によると考えられる。カドミウムによるテストステロン生産低下がステロイドの生体内バランスを壊し種々の機能障害をもたらす一助となっていると考えられる。肝臓薬物代謝系酵素の阻害もその一部は、カドミウムによるテストステロン生産低下に起因すると考えられる。

## 引用文献

- 1) Ando, M. (1979) : Effects of cadmium on the metabolism of p, p'-DDT in rats. *Environ. Res.*, **19**, 70-78.
- 2) Ichikawa, Y. and T. Yamano (1967) : Reconversion of detergent and sulfhydryl reagent produced P-420 to P-450 by polyols and glutathione. *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 490-497.
- 3) Sagai, M., F. Shiraiishi and K. Kubota (1977) : The effects of cadmium on microsomal drug metabolizing enzyme system in rat livers. *Japan. J. Hyg.*, **32**, 463-471.
- 4) Ungar, M. and J. Clausen (1973) : Liver cytochrome P-450 activity after intraperitoneal administration of cadmium salts in the mouse. *Environ. Physiol. Biochem.*, **3**, 236-242.
- 5) Ando, M. (1982) : Cadmium effect on microsomal drug-metabolism enzyme activity in rat livers with respect to differences in age and sex. *Environ. Res.*, **27**, 446-456.
- 6) Kato, R. and J. R. Gillette (1965) : Sex differences in the effects of abnormal physiological states on the metabolism of drugs by rat liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 285-291.
- 7) Pařízek, J. (1957) : The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.*, **15**, 56-63.
- 8) Pařízek, J. (1960) : Sterilization of the male by cadmium salts. *J. Reprod. Fertility*, **1**, 294-309.

## II-15 カドミウムによるラット赤血球の比重増加と生存期間の短縮\*

### Density Increment and Decreased Survival of Rat Red Blood Cells Induced by Cadmium\*

三浦 卓<sup>1</sup>・国本 学<sup>1</sup>・久保田憲太郎<sup>1</sup>

Takashi MIURA<sup>1</sup>, Manabu KUNIMOTO<sup>1</sup> and Kentaro KUBOTA<sup>1</sup>

#### 要 旨

赤血球の比重と生存期間に及ぼすカドミウム (Cd) の影響を調べるために、Wistar 系雄ラットに CdCl<sub>2</sub> を皮下投与した。1 mgCd/kg 体重の投与により以下の変化が観察された。1) 投与後 1-3 日目までに、比重の大きな赤血球量の増加と比重の小さな赤血球量の減少が進行した。2) 3 日目には脾臓重量が増加した。3) 5 日目にはヘマトクリット値の低下と比重の小さな赤血球の増加が起こった。4) 7 日目にはヘマトクリット値が対照群のレベルに回復した。ヘマトクリット値は、Cd 投与後 5 日目で、1.0 及び 1.5 mgCd 投与群で有意な低下を示した。脾臓重量は、0.5 mg 以上の Cd で有意に増加した。

赤血球寿命に及ぼす Cd の効果を調べるために、<sup>3</sup>H-diisopropyl fluorophosphate (<sup>3</sup>H-DFP) をラットに注入し赤血球を標識した。標識後 11 日目に、0.5 又は 1.0 mgCd を投与し経時的に<sup>3</sup>H-標識された赤血球量を測定した。Cd 注入後 6 日目では、0.5 及び 1.0 mgCd により標識された赤血球は対照群の 76% 及び 68% (p<0.05) に低下していた。

これらの結果は、Cd が赤血球比重を増加させることによって、赤血球のおそらくは脾臓での捕そくを促進し貧血を起こすことを示している。

#### Abstract

Male Wistar rats were injected with CdCl<sub>2</sub> (Cd) subcutaneously to examine *in vivo* effects of Cd on density and survival of red blood cells. During seven days after administration of 1.0 mg/kg, the following sequence of events occurred: 1) a progressive increase in the amount of denser red blood cells concomitant with a decrease in that of lighter red blood cells from the first to the third day, 2) an increase in the spleen weight at the third day, 3) a decrease in the hematocrit value and an increase in the amount of lighter red blood cells at the fifth day, and 4) a recovery of the hematocrit value at the seventh day. Five days after administration, the hematocrit value

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,  
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

\* 本論文の一部は、Kunimoto, M. and T. Miura: Density increment and decreased survival of rat red blood cells induced by cadmium. Environ. Res. (in press).である。

decreased significantly at the 1% level at 1.0 and 1.5 mg Cd/kg. A highly significant splenomegaly was also observed at 0.5 to 1.5 mg Cd/kg. In order to label red blood cells *in vivo*,  $^3\text{H}$ -diisopropyl fluorophosphate ( $^3\text{H}$ -DFP) was injected into rats. At day 11, Cd at either 0.5 or 1.0 mg/kg was administered to  $^3\text{H}$ -DFP-prelabeled animals. Cd-administration accelerated  $^3\text{H}$ -labeled red cell clearance from the blood. Six days after Cd-administration, the radioactivity of red blood cells was 76% and 68% ( $p < 0.05$ ) of the control at 0.5 and 1.0 mg Cd/kg, respectively. These results show that Cd at low dose can cause anemia by increasing red cell density and by accelerating red cell sequestration, presumably in the spleen.

## 1 はじめに

カドミウム (Cd) は、投与された実験動物<sup>1-3)</sup>あるいは被曝した作業員<sup>4)</sup>に貧血を起こすことが知られている。この貧血は、溶血性あるいは鉄欠乏性と説明されている<sup>5)</sup>。しかしながら、Cdによる貧血の発症機構は、いまだ不明である。

経口あるいはその他の方法で投与すると、Cdはまず血液中に現れ、次いで血液によって各種臓器に運ばれる<sup>6)</sup>。Garty ら<sup>5)</sup>は、皮下投与された Cd が血液から 3 時間目まで急速に除去され、その後は一定の値に留まることを報告している。血液中の Cd は、主に赤血球に局在している<sup>5-9)</sup>。例えば、ラビットに連続投与すると、血液中の Cd の 90% 以上が赤血球に見いだされる<sup>7)</sup>。Garty ら<sup>5)</sup>は、赤血球中の Cd の大部分が赤血膜画分に分布していると報告している。

赤血球は、血流中で老化するにつれて比重が増加し、比重の増加した赤血球は細網内皮系に捕そくされ死を迎える<sup>10,11)</sup>。赤血球の寿命は、細胞内を還元状態に維持している還元型グルタチオンの生成が阻害される条件下で短縮される。そのような例として、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損あるいはビルビン酸キナーゼ欠損では、赤血球の変形能の低下が起こって細網内皮系に捕そくされやすくなり、慢性的溶血性貧血となる<sup>12,13)</sup>。また、SH 基反応試薬で処理すると、赤血球は脾臓に捕そくされやすくなり血流中での寿命が短縮される<sup>14,15)</sup>。Cd は、SH 基反応性重金属であるので赤血球膜の SH 基と反応し、赤血球の細網内皮系での捕そくを容易にして溶血性貧血を発症させるとも考えられる。そこで、Cd が *in vivo* で赤血球の比重と寿命に及ぼす効果を検討した。また、低濃度の Cd をラットに皮下投与し、脾臓重量とヘマトクリット値の変化についても検討した。

## 2 方法

### 2.1 Cd の投与方法及び試料の採集法

一群 6 匹の Jcl: Wistar 系雄ラット (420-470 g) に、生理的食塩水に溶解した  $\text{CdCl}_2$  を皮下投与した。経時的にヘパリン血を採集して密度こう配遠心法による赤血球の分画に使用した。また、血液の一部は、ヘマトクリット値の測定に用いられた。

## 2.2 密度こう配遠心による赤血球の分画

Cd 投与したラットから採集した血液は、0.25 容の 50% デキストラン溶液と混合し先に報告したようにデキストランの段階的密度こう配に重層した<sup>16)</sup>。デキストラン T 40 溶液は、Abraham ら<sup>17)</sup>の方法により調製した。遠心により赤血球は 5 層に分かれ、遠心管の上部より V, IV, III, II, I と命名した。各層の赤血球を回収後ヘモグロビン測定試薬で 10 ml とし、各層のヘモグロビン量を測定した。

## 2.3 赤血球寿命の測定

赤血球を *in vivo* で diisopropyl fluorophosphate (DFP) 標識するために、生理的食塩水に溶解した 5  $\mu$ Ci の [1,3-<sup>3</sup>H]-DFP (5.2 Ci/mmol, New England Nuclear) を 1 群 4 匹のラットの尾静脈より注入した。<sup>3</sup>H-DFP 標識後 2 ないし 11 日目に、ラットは 0.5 又は 1.0 mg Cd/kg 体重を注入された。Cd 投与後経時的に約 0.4 ml の血液を眼窩静脈より採集し放射活性の測定に供した。

## 2.4 赤血球及び血漿中の放射活性の測定

血液 0.15 ml は、全血中の放射活性の測定に使用し、残りの血液は血漿の調製に使用した。血液は、1 ml のプロトゾール (New England Nuclear) と混合し 60°C で 60 分間インキュベーション後、0.5 ml の 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と更に 60°C で 30 分間インキュベーションした。透明な溶液となった血液は、シンチレーター (Bioflour, New England Nuclear) と混合し、<sup>3</sup>H の放射活性の測定に用いられた。血漿は、直接同じシンチレーターと混合し、<sup>3</sup>H 放射活性の測定に用いられた。

## 2.5 有意性の検定法

対照群と Cd 暴露群との差は、ANOVA により複数の検定法で有意性を調べた。

## 3 結果

### 3.1 体重、脾臓重量及びヘマトクリット (Ht) 値に及ぼす Cd の効果

1.0 mg の Cd をラットに皮下投与し、経時的に体重、脾臓重量及び Ht 値を測定した結果を図 1 に示した。体重は有意な変化を示さなかったが、脾臓重量は Cd 投与後 3 日目に対照群の 156% ( $p < 0.001$ ) に増加し、7 日目まで有意に高い値を維持した。脾臓重量とは逆に、Ht 値は経時的に減少し 5 日目には対照群の 86% ( $p < 0.01$ ) になった。その後回復し、7 日目には対照群のレベルに至った。

表 1 に、体重、脾臓重量及び Ht 値に及ぼす Cd 投与濃度の効果を示した。脾臓重量は、0.5、1.0 及び 1.5 mg の Cd 投与後 5 日目で対照群の 147% ( $p < 0.01$ )、141% ( $p < 0.01$ ) 及び 150% ( $p < 0.001$ ) に増加した。一方、Ht 値は、0.5、1.0 及び 1.5 mg Cd 投与により対照群の 3%、9%

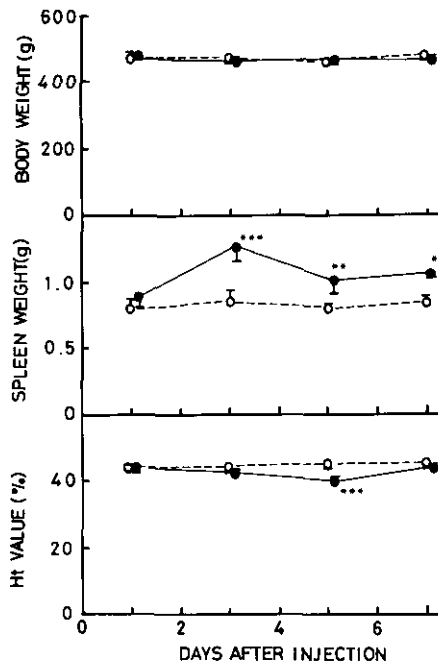


図 1 カドミウム投与後7日間における体重，脾臓重量，ヘマトクリット値の変化

Fig. 1 Changes in the weights of body and spleen and the hematocrit value during seven days after administration of 1 mg Cd/kg

1群6匹のラットの平均値と標準偏差を示した。○---○，対照群；●---●，暴露群，  
\*\*p<0.01；\*\*\*p<0.001

表 1 カドミウム投与後5日目における体重，脾臓重量，ヘマトクリット値の変化

Table 1 The weights of body and spleen and the hematocrit values five days after Cd-administration

	Cd-administration (mg Cd/kg)			
	Control	0.5 mg	1.0 mg	1.5 mg
Body weight (g)	454±19	430±11	424±21	418±26
Spleen weight (mg)	854±119	1,258±172***	1,146±97***	1,270±132***
Hematocrit (%)	44.7±1.5	43.5±0.5	40.8±1.5**	39.9±1.8**

数値は，1群6匹のラットの平均値±標準偏差で示した。\*\*p<0.01，\*\*\*p<0.001

( $p < 0.001$ ) 及び 11% ( $p < 0.01$ ) だけ低下した。体重は、Cd 投与後 5 日目で有意な変化を示さなかった。

### 3.2 Cd により誘導される赤血球比重の変化

赤血球比重に及ぼす Cd の効果を調べるために、1.0 mg の Cd を投与したラットより血液を経時的に採集し、赤血球を比重により分画した。Cd 投与により比重の小さい画分 V + IV の赤血球量は 1 日目より減少し、3 日目には最低値 (対照群の 41%,  $p < 0.001$ ) に達した (表 2)。これとは逆に、より比重の大きな画分 III と最も比重の大きい画分 II + I の赤血球量は、増加を示し 3 日目で各々対照群の 325% ( $p < 0.001$ ) と 300% ( $p < 0.001$ ) となった。Cd 投与後 5 日目には、画分 V + IV が対照群のレベルに回復し、画分 III と画分 II + I が対照群の約半分に減少した。7 日目には、Cd 投与群と対照群との間に有意な差が認められなくなった。以上の結果から、Cd 投与は赤血球比重を増加させると結論された。

表 2 カドミウム投与による赤血球比重の変化  
Table 2 Changes in red cell density induced by Cd-administration

		The hemoglobin content (arbitrary unit)		
		V + IV	III	II + I
1 day	Control	1.9 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1
	Exposed	1.4 ± 0.2**	0.8 ± 0.1***	0.3 ± 0.2
	E/C	0.74	2.18	2.46
3 days	Control	2.0 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0
	Exposed	0.8 ± 0.4***	1.1 ± 0.4***	0.3 ± 0.0***
	E/C	0.41	3.25	3.10
5 days	Control	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	Exposed	1.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
	E/C	1.06	0.44	0.56
7 days	Control	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	Exposed	1.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	E/C	0.92	1.22	1.04

数値は、1 群 6 匹のラットの平均値 ± 標準偏差で示した。

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### 3.3 Cdの赤血球寿命に及ぼす影響

赤血球の血流中の寿命に及ぼすCdの効果調べるために、ラットに $^3\text{H}$ -DFPを静注して赤血球を $^3\text{H}$ 標識した。 $^3\text{H}$ -DFPの静注後、赤血球及び血漿の放射活性は指数関数的に減少し、10日目にはほぼ定常値となった。そこで、11日目に0.5又は1.0 mgのCdを $^3\text{H}$ -DFP標識したラットに皮下投与し、経時的に血液及び血漿中の放射活性を測定した(図2)。Cd投与により $^3\text{H}$ 標識した赤血球は血流中からの除去を促進され、投与後3日目には1.0 mg Cdで対照群の86% ( $p < 0.05$ )に低下した。6日目には、赤血球の放射活性が0.5及び1.0 mg Cd投与で対照群の各々76%及び68% ( $p < 0.05$ )となった。以上の結果から、Cd投与は赤血球の血流からの除去を促進すると結論された。

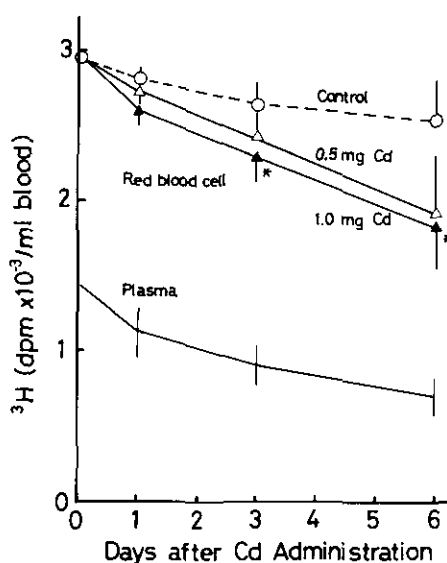


図 2 カドミウムの赤血球寿命に及ぼす影響

Fig. 2 *In vivo* effect of Cd on red cell clearance

1群4匹のラットの平均値±標準偏差を示した。

○—○, 0.5 mg Cd/kg; ●—●, 1.0 mg Cd/kg; ○---○, 対照群;

×---×, 血漿中の放射活性; \* $p < 0.05$

### 4 考 察

慢性影響実験によると、血液中のCdは主に赤血球に局在している<sup>6,18</sup>。Cdの1回投与によっても同様の結果が得られている<sup>8</sup>。最近、Gartyら<sup>5</sup>は、静注されたCdが赤血球の膜画分と細胞質画分の両方に同程度に増加すると報告している。赤血球の比重がCd投与により増加する機構は現在不明である。細胞膜の損傷を検出する一般的な方法であるカリウムイオンの漏出が、Cd等の重金属で起こるとされている<sup>19</sup>。したがって、Cdは赤血球膜成分に結合し、赤血球の物理化学的性質

を変化させると考えられる。最近、著者らは、*in vitro*で赤血球をCd処理すると、本来細胞膜に存在するタンパク質がCdとともに細胞骨格に検出されることを見いだした。Cdは、SH基反応性重金属であるので、細胞骨格と細胞膜タンパク質との間に架橋結合を作ることができる。したがって、Cdによる赤血球比重の増加は、Cdを介した架橋結合が一部原因となり起こると考えられる。

Cd投与は、<sup>3</sup>H標識した赤血球の血流からの除去を促進した(図2)。<sup>3</sup>H標識赤血球の血流からの除去は、Cd投与後1-6日の間直線的に進行した。一方、比重の大きな赤血球量は、Cd投与後3日目まで増加し、次の2日間で3日目の1/2以下に減少した(表2)。赤血球は、血流中での老化の過程で、比重の増加をきたし、比重の大きくなった赤血球は血流中から速やかに除去されるようになる<sup>10,11)</sup>。これらの現象を総合して考えると、Cd投与により増加する比重の大きな赤血球は、血流中における老化した赤血球の場合と同様に、速やかに血流中から除去されると考えられる。

Cdにより脾臓の肥大が起こることは、マウスで報告されてきた<sup>20-22)</sup>。本研究の結果では、0.5 mg Cd投与によっても有意な脾臓の肥大が観察された(表1)。赤血球は、血流中での老化の過程で脾臓に捕そくされるので、脾臓の肥大はCdが赤血球の脾臓での捕そくを促進した結果とも考えられる。この仮説は、SH基反応性試薬で赤血球を処理すると、赤血球が脾臓に選択的に捕そくされるようになることから支持される<sup>13,14)</sup>。

本研究は、低濃度のCdをラットに皮下投与すると、以下の一連の現象が誘導されることを明らかにした。

- 1) 赤血球比重の増加
- 2) 脾臓の肥大
- 3) 比重の大きな赤血球の減少とHt値の低下
- 4) 血液中での若い赤血球の増加とHt値の回復

この過程で、赤血球は血流からの除去を促進された。したがって、Cdは低濃度で赤血球比重を増加させ、赤血球の脾臓での捕そくを促進させることによって、貧血を発症させうると結論付けられる。

## 引用文献

- 1) Friberg, L., M. Piscator, G.F. Nordberg and T. Kjellstrom (1974): Cadmium in the Environment, 2nd ed., CRC Press, Cleveland, Ohio.
- 2) Abe, T. and Y. Itokawa (1973): Experimental cadmium poisoning. III. Effect of cadmium on Na, K, Mg-dependent ATPase, Mg-dependent ATPase and transketolase. Jpn. J. Hyg., 28, 243.
- 3) Nomiya, K. (1975): Effects of dietary cadmium on rabbits. (1) Early signs of cadmium intoxication. Toxicol. Appl. Pharmacol., 24, 625-635.



- 4) Klaassen, C.D. and F.N. Kotsonis (1977) : Biliary excretion of cadmium in the rat, rabbit, and dog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 101-112.
- 5) Garty, M., K-L. Wong and C.D. Klaassen (1981) : Redistribution of cadmium to blood of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 548-554.
- 6) Friberg, L. (1952) : Further investigations on chronic cadmium poisoning ; study on rabbits with radioactive cadmium. *A.M.A. Arch. Indust. Hyg.*, **5**, 30-36.
- 7) Carlson, L.A. and L. Friberg (1957) : The distribution of Cd in blood after repeated exposure. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **9**, 67-70.
- 8) Nordberg, G.F., M. Piscator and M. Nordberg (1971) : On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacol.*, **30**, 289-295.
- 9) Hildebrand, C.E. and L.S. Cram (1979) : Distribution of cadmium in human blood cultured in low levels of CdCl<sub>2</sub>, accumulation of cadmium in lymphocytes and preferential binding to metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **161**, 438-443.
- 10) Winterbourn, C.C. and R.D. Batt (1970) : Lipid composition of human red cells of different ages. *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 1-8.
- 11) Cohen, N.S., J.E. Ekholm, M.G. Luthra and D.J. Hanahan (1976) : Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 229-242.
- 12) Allen, D.W., G.J. Johnson, S. Cadman and M.E. Kaplan (1978) : Membrane polypeptide aggregates in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient and *in vitro* aged red blood cells. *J. Lab. Med.*, **91**, 321-327.
- 13) Johnson, G.J., D.W. Allen, S. Cadman, V.F. Fairbanks, J.G. White, B.C. Lampkin and M.E. Kaplan (1979) : Red cell-membrane polypeptide aggregates in glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants with chronic hemolytic disease. A clue to the mechanism of hemolysis. *N. Engl. J. Med.*, **301**, 522-527.
- 14) Jacob, H.S. and J.H. Jandl (1962) : Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. *J. Clin. Invest.*, **41**, 1514-1523.
- 15) Johnson, G.J., D.W. Allen, T. P. Flynn, B. Finkel and J.G. White (1980) : Decreased survival *in vivo* of diamide-incubated dog erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **66**, 955-961.
- 16) Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya and T. Miura (1984) : Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats : Alteration of cell membrane components and populational changes of red blood cells during *in vivo* exposure to NO<sub>2</sub>. *Environ. Res.*, **33**, 361-369.
- 17) Abraham, E.C., D. Walker, M. Gravely and T.H.J. Huisman (1975) : Major hemoglobins in sickle cell anemia,  $\beta$ -thalassemia, and related conditions : A study of red cell fractions isolated by density gradient centrifugation. *Biochem. Med.*, **13**, 56-77.
- 18) Truhaut, R. and C. Boudene (1954) : Recherches sur le sort du cadmium dans l'organisme au cours de intoxications interest en medecine du travail. *Arch. Hyg. Rada. Toksikol.*, **5**, 19-48.
- 19) Grims, A.J. (1980) : Human Red Cell Metabolism. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 20) Bozelka, B.E., P.M. Burkholder and L.W. Chang (1978) : Cadmium, a metallic inhibitor of antibody-mediated immunity in mice. *Environ. Res.*, **17**, 390-402.
- 21) Yamada, Y.K., F. Shimizu, R. Kawamura and K. Kubota (1980) : Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. *Toxicol. Lett.*, **8**, 49-55.
- 22) Suzuki, K.T., Y.K. Yamada and F. Shimizu (1981) : Essential metals and metallothionein in cadmium-induced thymic atrophy and splenomegaly. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1217-1222.

## II-16 カドミウムによるラット赤血球の老化に伴う変化の促進\*

### An Apparent Acceleration of Age-Related Changes of Rat Red Blood Cells by Cadmium\*

国本 学<sup>1</sup>・三浦 卓<sup>1</sup>・久保田憲太郎<sup>1</sup>

Manabu KUNIMOTO<sup>1</sup>, Takashi MIURA<sup>1</sup> and Kentaro KUBOTA<sup>1</sup>

#### 要 旨

溶血を起こさない濃度での、カドミウム (Cd) のラット赤血球への *in vitro* での影響について検討し、水銀 (Hg) の作用との比較を行った。赤血球を 0.5–2.0 mM CdCl<sub>2</sub> 存在下、37°C、60 分間、インキュベーションすると、比重増加、形態変化、変形能の低下等の赤血球の老化に伴う変化が、濃度依存的に引き起こされた。0.5 及び 1.0 mM CdCl<sub>2</sub> とのインキュベーションにより赤血球の *in vivo* での寿命の短縮が認められた。2 mM 以下の CdCl<sub>2</sub> とのインキュベーションでは、ATP、グルタチオンの減少等の代謝阻害、あるいは、カリウムイオンの漏出は認められなかった。HgCl<sub>2</sub> の赤血球の老化に伴う変化への影響は、CdCl<sub>2</sub> の 5–20 倍強かった。以上の結果より、溶血を起こさない濃度で Cd は、赤血球の老化に伴う変化を促進し、これが、赤血球膜のチオール基と Cd の相互作用によって引き起こされている可能性が示唆された。

#### Abstract

The effect of Cd<sup>2+</sup> at the nonhemolytic concentration on rat red blood cells was examined *in vitro* and compared with that of Hg<sup>2+</sup>. When red blood cells were incubated at 37°C with 0.5 to 2.0 mM CdCl<sub>2</sub> for 60 min, the age-related changes of red blood cells like increases in the cell density and the number of echinocytes and decrease in the filterability were developed dose-dependently. The incubation of red blood cells with 0.5 and 1.0 mM CdCl<sub>2</sub> resulted in their shortened *in vivo* survival. Neither metabolic blockade such as a fall in the ATP and GSH contents nor K<sup>+</sup> leakage occurred at nonhemolytic concentrations of Cd<sup>2+</sup>. The effect of HgCl<sub>2</sub> on age-related changes of red blood cells were 5–20 fold higher than those of CdCl<sub>2</sub>. These results show that age-related changes were apparently accelerated by nonhemolytic concentrations of Cd<sup>2+</sup> and may be, at least in part, due to the interaction of Cd<sup>2+</sup> with thiol residue of cell membranes.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,  
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

\* 本論の一部は、Kunimoto, M., T. Miura and K. Kubota (1985) : An apparent acceleration of age-related changes of rat red blood cells by cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**, 451–457. に発表。

## 1 はじめに

カドミウム (Cd) はよく知られた環境汚染物質であり, Cd 投与動物において, 貧血は一般的に認められる現象である<sup>1,2)</sup>。Cd による貧血は, 溶血性あるいは鉄欠乏性とされているが<sup>1)</sup>詳細なメカニズムは, いまだ明らかではない。

赤血球は, 血流中で一定の寿命を持ち, 老化した赤血球は, 細網内皮系で捕そくされるようになる<sup>3,4)</sup>。血流中での老化に伴い, 赤血球は比重が増加し, 小型化する<sup>5,6)</sup>。老化した赤血球は, 変形能が低く<sup>7)</sup>, 円盤状の形態が失われ<sup>8)</sup>, 赤血球内カリウムイオンが, 低下しており<sup>6,8)</sup>, 酵素活性の低下も認められている<sup>9)</sup>。

チオール基反応性物質処理により, 赤血球の変形能が低下し, 血流中での寿命の短縮と, 脾臓での捕そくが認められることが既に報告されている<sup>10-12)</sup>。Cd は, チオール基反応性の金属の一種であり, Cd が赤血球の細網内皮系での捕そくを促進することにより, 溶血性貧血に引き起こすという可能性が考えられる。本論文で我々は, 溶血を引き起こさない濃度の Cd が, *in vitro* で見かけ上ラット赤血球の老化に関連した変化を促進することを示し, Cd の作用と水銀 (Hg) の作用との比較を行う。

## 2 方法

### 2.1 赤血球の調製とインキュベーション

Jcl : Wistar の雄ラット (420-470 g) より, 既に述べた方法<sup>13)</sup>により, 赤血球を調製した。重金属の影響を検討するため, 赤血球を3倍容の 5 mM KCl, 116 mM NaCl, 11.1 mM グルコース, 0.54 mM アデニン, 12.7 mM イノシン及び, 各濃度の CdCl<sub>2</sub>あるいは HgCl<sub>2</sub>を含む 50 mM グリシルグリシン, pH 7.4 と混ぜ, 37°C で1時間, ゆるやかに振とうしながらインキュベーションした。

### 2.2 密度こう配遠心による赤血球の分画

インキュベーションした赤血球懸濁液の一部を, 1/3 容の 34% デキストラン T 40 溶液と混ぜ, デキストランの段階的密度こう配遠心にかけた<sup>14)</sup>。遠心後, 赤血球は5画分に分かれ, 上層から, 画分 V-I とした。遠心管の底に沈でんした赤血球は, 画分 0 とした。各画分を回収し, 一定量として, そのヘモグロビン含量を測定した。

### 2.3 走査型電子顕微鏡観察

インキュベーションした赤血球懸濁液の一部を, 10 倍容の 1% グルタルアルデヒドと混ぜ, 室温で2時間固定した。固定した赤血球は, 等張のリン酸緩衝液で2回, 蒸留水で2回洗浄した後, スライドガラスにまき, 風乾した。試料は, 金-パラジウム (60:40) でコートした後, 日立 HHS-2R 型, 走査電顕で, 加速電圧 10 kV, ステージ角 35°で撮影した。

## 2.4 赤血球カチオン含量の測定

インキュベーションした赤血球懸濁液の一部を、2 ml の 10% 蔗糖を含む 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 に重層し、3000 回転で 10 分間遠心した。得られた赤血球を 1 ml の  $\text{HNO}_3/60\% \text{HClO}_4$  (5:1) で灰化し、1%  $\text{HNO}_3$  で 3 ml とした。カチオンの含量は、プラズマ発光分光分析装置（日本ジャーレル・アッシュ）で測定した。

## 2.5 赤血球の ATP, グルタチオン含量の測定

ATP 含量は、赤血球の過塩素酸抽出液を用い、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法で測定した。また、主に還元型グルタチオンである赤血球内チオール基は、Beutler の方法<sup>15)</sup>により定量した。

## 2.6 赤血球の filterability

インキュベーション後、遠心によって得た赤血球 2 ml を、Teitel の方法<sup>16)</sup>に従い、ガラスロートにセットしたろ紙（東洋 No. 5A）に載せた。Filterability は、半分の赤血球（1 ml）がろ過されてくるまでの時間の対数である pT index で表した。

## 2.7 Cd 処理赤血球の血流中での寿命

赤血球を、腹大動脈から得た血液より無菌的に調製し、血漿中で、 $^3\text{H}$ -ジイソプロピルフルオロフォスフェート（ $^3\text{H}$ -DFP）で標識後、前記のごとく Cd 処理した。Cd 処理赤血球を洗浄後、再び血漿と混ぜ、尾静脈よりラットに注入した。注入より 3, 24, 96 時間後、眼窩より採血し、血中の放射能を液体シンチレーション法により測定した。

# 3 結果

## 3.1 Cd 及び Hg 処理による赤血球の溶血と ATP, グルタチオン含量の変化

赤血球を各濃度の  $\text{CdCl}_2$  と 37°C, 60 分間インキュベーションすると、懸濁液に加えた Cd の約 1/3 が赤血球に取り込まれ、その 5-10% は、赤血球膜に存在した。0.1 mM  $\text{HgCl}_2$  あるいは、2.0 mM  $\text{CdCl}_2$  とのインキュベーションで、わずかに溶血が認められたが、有意ではなかった（表 1）。それ以下の濃度では溶血は認められず、また、赤血球の ATP, グルタチオン含量も、ほとんど変化はなかった（表 1）。

## 3.2 Cd 及び Hg 処理による赤血球の比重と形態の変化

表 2 に Cd 及び Hg の、赤血球の比重と形態に対する影響を示した。赤血球の比重は、溶血を起こさない濃度の Cd で、濃度依存的に、増加した。0.5 mM  $\text{CdCl}_2$  では、Top 画分のヘモグロビン (Hb) の減少と同時に、Middle 画分の Hb の増加が認められ、1.0 mM  $\text{CdCl}_2$  では、Top 画分の Hb は、対照の半分にまで減少し、Middle, Bottom 画分の Hb の増加が認められた。Hg も、濃

表 1 CdCl<sub>2</sub>とHgCl<sub>2</sub>の赤血球の溶血及びATP, グルタチオン含量への影響  
 Table 1 Effects of CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> on hemolysis and the contents of ATP and GSH of red blood cells

Addition (mM)	Hemolysis (%)	ATP content* (μmol/g Hb)	GSH content* (μmol/g Hb)
None	1.86	4.35±1.05	8.17±0.53
CdCl <sub>2</sub> (0.5)	1.21	4.19±0.83	8.19±0.28
" (1.0)	1.18	4.55±0.97	8.14±0.30
" (2.0)	2.26	4.11±0.75	8.19±0.13
HgCl <sub>2</sub> (0.05)	1.80		
" (0.10)	2.04	3.84±0.83	7.83±0.18

\*平均値±標準偏差 (試料数3)

表 2 CdCl<sub>2</sub>とHgCl<sub>2</sub>による赤血球の比重と形態の変化  
 Table 2 Changes in density and shape of red blood cells induced by incubation with CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub>

Addition (mM)	Distribution of Hb (%)			Content of discoidal cells (%)
	Top	Middle	Bottom	
None	50.7	33.1	16.2	68.4
CdCl <sub>2</sub> (0.5)	30.1	53.6	16.2	38.5
" (1.0)	24.3	51.4	24.5	26.4
" (2.0)	20.6	48.9	30.3	8.3
HgCl <sub>2</sub> (0.05)	22.0	55.2	22.8	57.5
" (0.10)	10.1	36.9	53.0	25.0

度依存的に赤血球比重を増加させ、0.05 mM HgCl<sub>2</sub>は、1.0 mM CdCl<sub>2</sub>と同等の効果を示した。また、溶血を起こさない濃度のCd, Hgは、赤血球形態にも影響を及ぼし、外方突出型の形態変化が認められた(図1)。正常の円盤状赤血球の比率は、0.5, 1.0 mM CdCl<sub>2</sub>処理によりそれぞれ、対照の56%, 39%となり、0.1 mM HgCl<sub>2</sub>は1.0 mM CdCl<sub>2</sub>と同等の効果を示した。

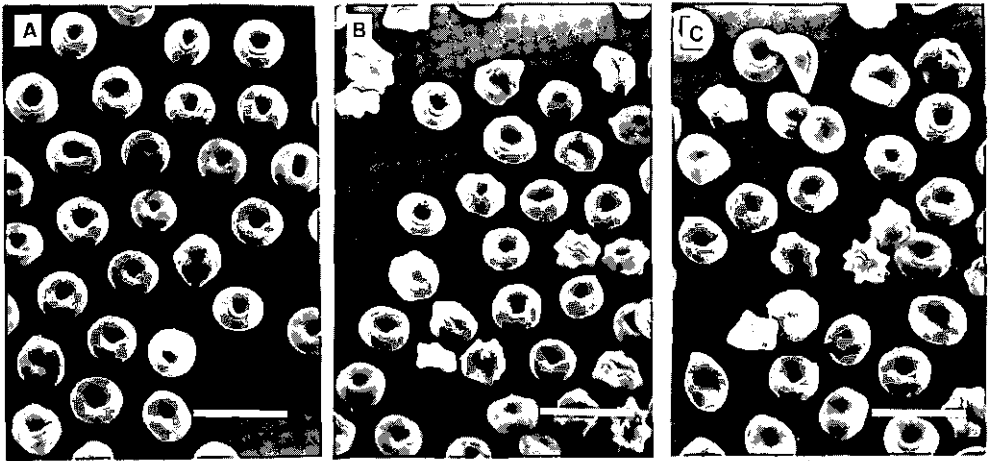


図 1 CdCl<sub>2</sub>及びHgCl<sub>2</sub>とインキュベーションした赤血球の電子顕微鏡写真  
 Fig. 1 Electron micrographs of red blood cells incubated with CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub>  
 (A) 対照, (B) 1 mM CdCl<sub>2</sub>, (C) 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> スケール 10 μm

### 3.3 Cd 及び Hg 処理による赤血球のカリウムイオン (K<sup>+</sup>), ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) 含量の変化

Cd, Hg を含む数種の重金属は、赤血球からの K<sup>+</sup>の漏出を引き起こし、赤血球の収縮をもたらすことが知られている<sup>17)</sup>。この K<sup>+</sup>の漏出の赤血球比重増加への関与を検討するため、赤血球の K<sup>+</sup>含量の変化を測定した。0.1 mM HgCl<sub>2</sub>及び、2.0 mM CdCl<sub>2</sub>とのインキュベーションで、K<sup>+</sup>含量は有意に減少した(表 3)。それ以下の濃度では、Cd, Hg とも有意な変化はもたらさなかった。赤血球の Na<sup>+</sup>含量は、Cd 処理により増加傾向は認められたが有意ではなかった。一方 Hg は 0.05, 0.1 mM いずれでも有意な Na<sup>+</sup>の減少を引き起こした。インキュベーションの際のメディウム中の Na<sup>+</sup>を K<sup>+</sup>に置き換えて(高 K<sup>+</sup>メディウム)赤血球内外の濃度こう配を消失させ、K<sup>+</sup>の漏出を抑えた場合でも、Cd, Hg による赤血球比重の増加は、ほとんど影響されなかった。したがって、赤血球比重の増加に、K<sup>+</sup>の漏出は必ずしも関与していないと考えられる。

### 3.4 Cd 及び Hg 処理による赤血球の filterability の変化

赤血球の filterability と、赤血球の血流中での残存時間の相関性が知られている<sup>18)</sup>。そこで Cd, Hg の赤血球の filterability への影響を検討した結果、Cd は、濃度依存的に filterability を減少(pT index を増加)させた(図 2)。対照の pT index が、0.57 であるのに対し、0.5, 1.0, 2.0 mM CdCl<sub>2</sub>とインキュベーションした赤血球では、それぞれ、0.91, 1.11, 1.73 と増加しており、0.1 mM HgCl<sub>2</sub>は、0.5 mM CdCl<sub>2</sub>と同等の効果を示した。

表 3 CdCl<sub>2</sub>とHgCl<sub>2</sub>による赤血球のK<sup>+</sup>及びNa<sup>+</sup>含量の変化

Table 3 Changes in the contents of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> of red blood cells produced by incubation with CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub>

Addition (mM)	K <sup>+</sup> content (g cation/g Fe)	Na <sup>+</sup> content (g cation/g Fe)
None	3.41±0.11	0.097±0.040
CdCl <sub>2</sub> (0.5)	3.38±0.16	0.102±0.020
" (1.0)	3.17±0.27	0.130±0.014
" (2.0)	2.98±0.11*	0.168±0.009
HgCl <sub>2</sub> (0.05)	3.28±0.11	0.187±0.004*
" (0.10)	3.01±0.08*	0.231±0.043*

\* p<0.05 (平均値±標準偏差, 試料数3)

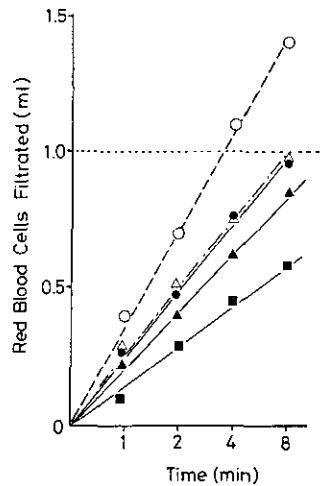


図 2 CdCl<sub>2</sub>及びHgCl<sub>2</sub>とインキュベーションした赤血球の filtration

Fig. 2 Filtration of red blood cells incubated with CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub>

対照(○), 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> (△), 0.5 mM CdCl<sub>2</sub> (●), 1 mM CdCl<sub>2</sub> (▲), 2 mM CdCl<sub>2</sub> (■)

### 3.5 Cd 処理による赤血球の血流中での残存時間の変化

$^3\text{H}$ -DFP で標識した赤血球を 0.5, 1.0 mM  $\text{CdCl}_2$  と 1 時間インキュベーションした後, 再びラット血流中に戻し, それらの血流中での残存量の経時変化を測定した。対照の赤血球は, 尾静脈より注入後, 24 時間, 96 時間で, 3 時間目のレベルの, それぞれ, 53%, 20% に減少していた (図 3)。Cd 処理した赤血球はより速く血流中から消失し, Cd 濃度に依存した変化であった。注入後 3 時間で, 1.0 mM  $\text{CdCl}_2$  で処理した赤血球は, 対照の 80% と有意に減少しており, 24 時間では, 0.5, 1.0 mM  $\text{CdCl}_2$  処理群で, それぞれ対照の 48%, 36% に減少していた。96 時間後には, 対照群は 20% が残存しているにもかかわらず, Cd 処理群は, ほぼ完全に血流中から消失していた。したがって, *in vitro* での Cd 処理は, 赤血球の血流中 (*in vivo*) での残存時間を短縮すると結論されよう。

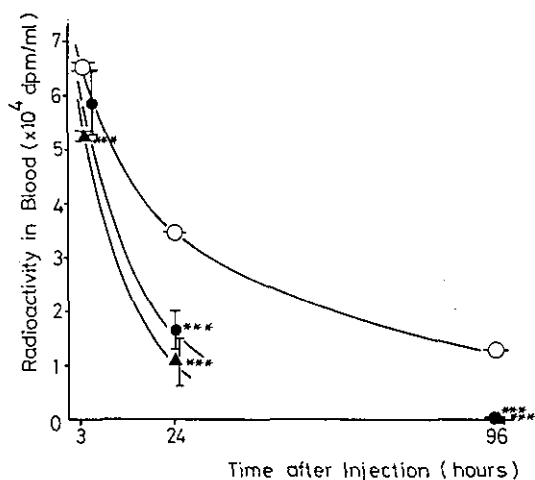


図 3 *In vitro* で  $\text{CdCl}_2$  とインキュベーションした赤血球の血流中 (*in vivo*) での残存時間

Fig. 3 *In vivo* survival of red blood cells incubated with  $\text{CdCl}_2$  *in vitro*  
0.5 mM  $\text{CdCl}_2$  (●), 1.0 mM  $\text{CdCl}_2$  (▲), 対照 (○), たて棒は標準偏差 (試料数 4) を表す。p<0.001

## 4 考 察

一般に赤血球は, 血流中での老化に伴い, 比重の増加と変形能の低下をきたし, 細網内皮系で捕そくされるようになる。本研究で, 溶血を引き起こさない濃度のカドミウム (Cd) 及び水銀 (Hg) とのインキュベーションにより, 赤血球の老化に関連した変化 (比重の増加, 円盤状形態の消失, filterability の減少) の促進が認められた。変形能 (deformability) あるいは filterability の変化



は、赤血球の血流中での寿命と密接な関連があるとされている。したがって、Cd 処理によって赤血球の老化に伴う変化が促進されたため、Cd 処理赤血球が血流中より速やかに除かれるものと考えられる。最近我々は、1 mg/kg 以下の Cd 投与により、ラット血流中の赤血球比重が増加し、ヘマトクリット値が減少し、赤血球寿命が短縮されることを見いだした<sup>19)</sup>。したがって、溶血を起こさない濃度の Cd は、赤血球の血流中からの除去を促進することにより貧血を引き起こす可能性が考えられる。

Cd と Hg は、赤血球からの K<sup>+</sup> 漏出を引き起こすことが知られている<sup>17)</sup>。しかし、Cd によって引き起こされた赤血球の老化に伴う変化は、K<sup>+</sup> の漏出が主因とは考えにくい。なぜならば、0.5 mM CdCl<sub>2</sub> あるいは 0.05 mM HgCl<sub>2</sub> では、赤血球の比重増加、形態変化 (表 2)、filterability の減少 (図 2) は認められたにもかかわらず、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 含量はほとんど変化していなかったからである (表 3)。また、解糖系から供給される ATP によって維持されている赤血球の形態、変形能が、代謝障害による ATP 含量の減少によって影響を受けることが考えられるが、2.0 mM CdCl<sub>2</sub> あるいは 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> でも、ATP 含量、グルタチオン含量は影響を受けなかった (表 1)。したがって、ATP あるいはグルタチオン含量の変化は、Cd による赤血球の変化に関与してはいなかった。

Hg は強いチオール基反応性を持っている。Hg の赤血球の老化に関連した変化への影響は Cd に比べはるかに強かった。特に、0.05-0.1 mM HgCl<sub>2</sub> によって引き起こされた赤血球比重の増加、形態変化は、1.0 mM CdCl<sub>2</sub> によるものとほぼ同等であった (表 2)。また、0.1 mM HgCl<sub>2</sub> による filterability の減少は 0.5 mM CdCl<sub>2</sub> とほぼ同等であった (図 2)。これらの結果から、Cd、Hg による赤血球の老化に関連した変化の促進は少なくとも一部は、赤血球の、おそらく赤血球膜に存在するチオール基との相互作用によるものと考えられる。これを支持するものとして、p-クロロマーキュリー安息香酸、N-エチルマレイミド、ヨード酢酸等のチオール基反応試薬は、赤血球膜成分と反応し、filterability を含めた赤血球機能の修飾と、血流中での残存時間の短縮等を引き起こすという報告がある<sup>10,11,20)</sup>。また、ジアミド、マロンジアルデヒド等の 2 価反応試薬は、膜タンパク質を架橋し、赤血球の変形能を低下させ、血流中での寿命を短縮することが知られている<sup>12,21)</sup>。しかし、溶血を引き起こさない濃度の Cd、Hg は、膜タンパク質の架橋は引き起こさなかった。また、最近我々は、赤血球、あるいは赤血球膜を Cd で処理すると、膜タンパク質と細胞骨格の相互作用が修飾を受けることを見いだした<sup>22)</sup>。このような相互作用の変化が、赤血球の変形能あるいは形態の変化につながることも考えられる。以上の結果より、Cd、Hg によって認められた赤血球の老化に関連した変化の促進は、主に、Cd、Hg と赤血球膜成分との相互作用によって引き起こされているものと考えられる。

## 謝 辞

赤血球内カチオン濃度の測定をして下さった西川雅高氏 (計測技術部, 分析室) 及び走査型電子顕微鏡写真をとって下さった宮坂恵子氏 (計測技術部, 分析室) に心より感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Friberg, L., M. Piscator, G. F. Nordberg and T. Kjellstrom (1974) : *In* : Cadmium in the Environment., 2nd ed., CRC Press, Cleveland, Ohio.
- 2) Nomiyama, K. (1975) : Effects of dietary cadmium on rabbits. (1) Early signs of cadmium intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **24**, 625-635.
- 3) Cooper, R. A. and S. J. Shattil (1971) : Mechanism of hemolysis—The minimal red-cell defect. *New Engl. J. Med.*, **285**, 1514-1520.
- 4) Weed, R. I. (1970) : The importance of erythrocyte deformability. *Am. J. Med.*, **49**, 147-150.
- 5) Winterbourn, C. C. and R. D. Batt (1970) : Lipid composition of human red cells of different ages. *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 1-8.
- 6) Cohen, N. S., J. E. Ekholm, M. G. Luthra and D. J. Hanahan (1976) : Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 229-242.
- 7) Weed, R. I., P. L. LaCelle and E. W. Merrill (1969) : Metabolic dependence of red cell membrane deformability. *J. Clin. Invest.*, **48**, 795-809.
- 8) Shiga, T., N. Maeda, T. Suda, K. Kon and M. Sekiya (1979) : The decreased membrane fluidity of *in vivo* aged human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **553**, 84-95.
- 9) Seaman, C., S. Wyss and S. Piomelli (1980) : The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its relationship to cell death. *Am. J. Hematol.*, **8**, 31-42.
- 10) Jacob, H. S. and J. H. Jandl (1962) : Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. II. Studies *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **41**, 1514-1523.
- 11) Fisher, T. M., C. W. M. Haest, M. Stohr, D. Kamp and B. Deuticke (1978) : Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents. *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 270-282.
- 12) Johnson, G. J., D. W. White, T. P. Flynn, B. Finkel and J. G. White (1980) : Decreased survival *in vivo* of diamide-incubated dog erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **66**, 955-961.
- 13) Kunimoto, M., H. Tsubone, N. Tsujii, K. Mochitate, K. Kaya, N. Shimojo and T. Miura (1984) : Effects of nitrate and nitrite, chemical intermediates of inhaled nitrogen dioxide, on membrane components of red blood cells of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **74**, 10-16.
- 14) Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984) : Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats : Alterations of cell membrane components and populational changes of red blood cells during *in vivo* exposure to NO<sub>2</sub>. *Environ. Res.*, **33**, 361-369.
- 15) Beutler, E. (1975) : In *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.*, 2nd ed., Grune and Stratton, New York, 112 p.
- 16) Teitel, P. (1967) : Le test de la filtrabilité érythrocytaire (TFE). Une méthode simple d'étude de certaines propriétés microrhéologiques des globules rouges. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **7**, 195-214.
- 17) Vincent, P. C. and C. R. B. Blackburn (1958) : The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. I. Comparisons of the action of several heavy metals. *Aust. J. Exp. Biol.*, **36**, 471-478.
- 18) Grimes, A. J. (1980) : In *Human Red Cell Metabolism.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1-86.
- 19) Kunimoto, M. and T. Miura (1985) : Density increment and decreased survival of rat red blood cells induced by cadmium. *Environ. Res.*, (in press).
- 20) Allen, D. W. and S. Cadman (1976) : Comparison of the effects of *N*-ethylmaleimide and iodoacetamide on red blood cell membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**, 318-321.

- 21) Hochstein, P. and S. K. Jain (1981) : Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.*, **40**, 183-188.
- 22) Kunimoto, M. and T. Miura (1985) : Vesicle release from rat red cell ghosts and increased association of cell membrane proteins with cytoskeletons induced by cadmium. *Biochim. Biophys. Acta*, **816**, 37-45.

## II-17 カドミウムの蓄積限界と必須金属濃度への影響\*

### Extent of Cadmium Accumulation and its Effect on Essential Metals\*

鈴木和夫<sup>1,2</sup>・西川雅高<sup>3</sup>・山田靖子<sup>1,4</sup>

村上正孝<sup>1</sup>・久保田憲太郎<sup>1</sup>

Kazuo T. SUZUKI<sup>1,2</sup>, Masataka NISHIKAWA<sup>3</sup>, Yasuko K. YAMADA<sup>1,4</sup>

Masataka MURAKAMI<sup>1</sup> and Kentaro KUBOTA<sup>1</sup>

#### 要 旨

臓器の内でも特に肝臓に対するカドミウムの蓄積限界とそれに伴った必須金属濃度への影響を明らかにすることを目的とした実験を行った。雌性ウィスター系ラットにカドミウムを体重1 kg 当たり3.0 mg, 週4回, 1, 2, 3, 4, 5及び6週間皮下投与した。肝臓についてはカドミウムと5種類の必須金属濃度を発光分光法で測定した。肝臓中のカドミウムは3週目まで直線的に増加し, 次のほとんど定常な最大濃度(440 µg Cd/g 湿重量)を2週間たった後, 減少した。全肝臓中と熱に安定なタンパク質に結合したカドミウム濃度の差は, カドミウム濃度がプラトーとなっている時点で他の時点より大きくなっていた。肝臓中の亜鉛並びに腎臓中の銅濃度はカドミウムの投与とともに劇的に変化したが, その変化は血漿並びに尿中の変化と密接な関係があった。腎臓中の鉄濃度はカドミウムの投与と

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 現在: 国立公害研究所 環境保健部  
Present address: Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies.
  3. 国立公害研究所 計測技術部  
Chemistry and Physics Division, the National Institute for Environmental Studies.
  4. 現在: 国立予防衛生研究所 〒190-12 東京都武蔵村山市学園4-7-1  
Present address: National Institute of Health, 7-1, Gakuen 4-chome, Musashimurayama, Tokyo 190-12, Japan.
- \* 本論文の一部は以下の Suzuki, K. T., K. Yaguchi, R. Ohnuki, M. Nishikawa and Y. K. Yamada (1983): Extent of cadmium accumulation and its effect on essential metals in liver, kidney and body fluids. *J. Toxicol. Environ. Health*, **11**, 713-726.  
Suzuki, K. T., R. Ohnuki, K. Yaguchi and Y. K. Yamada (1983): Accumulation and chemical forms of cadmium and its effect on essential metals in rat spleen and pancreas. *J. Toxicol. Environ. Health*, **11**, 727-737.  
Suzuki, K. T. (1984): Studies of cadmium uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 21-30. に発表。

ともに減少した。マグネシウムに対するカルシウムの含量比は肝臓の浮腫がみられるとき高かった。尿中のカドミウムは、肝臓中にカドミウムが高濃度にあるときは、直接肝臓に由来すると推定された。

脾臓と膵臓中のカドミウムは、肝臓で最大蓄積量を示した後も増加し続けた。脾臓中の亜鉛、カルシウム及びマグネシウム含量は脾臓の肥大化とともに増加したが、鉄含量は減少した。膵臓中のカルシウム、マグネシウムと鉄の濃度は減少したが、亜鉛濃度は一次的な増加を示した。脾臓と膵臓の上清中のカドミウムはほとんどメタロチオネインに結合していた。膵臓中のメタロチオネインは非常に酸化されやすかった。

カドミウムの体内における移動を示す模式図を提出した。

### Abstract

Cadmium was injected sc into female Wistar rats at a dose of 3.0 mg Cd/kg body weight, 4 times a week for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 weeks. Cadmium and five essential metals in the livers and kidneys were determined simultaneously by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Concentration of cadmium in the livers increased linearly up to 3 weeks, remained at an almost constant and highest value ( $440\mu\text{g Cd/g wet liver}$ ) for the following 2 weeks, and then decreased. The difference between cadmium in the whole livers and cadmium bound to heat-stable proteins was wider during the plateau than during the other periods. Cadmium in the kidneys was close to a plateau after 6 weeks of injections. Concentrations of zinc in the livers and copper in the kidneys changed dramatically with injections of cadmium, and the changes were related to the changes in concentrations of the two metals in plasma and urine. Concentration of iron in the kidneys decreased with injections of cadmium. The content ratio of calcium to magnesium was high in the case of liver edema and was suggested to be an indicator. Cadmium in urine was assumed to originate from the liver in the case of high accumulation of the metal.

Cadmium in the spleen and pancreas increased even after maximum concentration was attained in the liver. Contents of zinc, calcium, and magnesium in the spleen increased with splenomegaly, while content of iron decreased. Concentrations of calcium, magnesium, and iron decreased in the pancreas, while concentration of zinc showed a transitory increase. Cadmium in the spleen and pancreas supernatants was mostly bound to metallothionein, and metallothionein in the pancreas was highly susceptible to oxidation reaction. The spleen and pancreas were histologically less affected by cadmium loading compared to the liver and kidney, and the pancreas showed only slight alterations after injections for 5 and 6 weeks.

### 1 はじめに

体内に蓄積したカドミウムがどのような化学的形態をとっているか、またその化学的形態（存在状態）と毒性との間にどのような関係があるか明らかにすることを目的とした研究の一環として、本実験を計画した。

カドミウムの毒性を、体内に蓄積しているカドミウムの量でなく、その化学的形態と関連付け

ようとする努力はこれまでもなされてきた<sup>1-5)</sup>。肝臓や腎臓中ではカドミウムの大部分はメタロチオネインに結合しているが、蓄積量が増えると相対的にメタロチオネインに結合しているカドミウム量が減少し、細胞中に存在する高分子量のタンパク質に結合しているカドミウム量が増えることが明らかにされている<sup>1,3)</sup>。高分子量タンパク質に結合しているカドミウムは、“活性な”カドミウムと推定され、毒性の本体ではないかと言われている。メタロチオネインとしてカドミウムを捕そくすることによって、その毒性を軽減させることが生体の防御機構であると考えられていることから、カドミウムが毒性を示す本体が、この“活性”カドミウムであるとする考えは興味深いものである。

カドミウムの蓄積量が増加することに伴った存在状態の変化として、“活性”カドミウムの増加以外にもいくつかの変化が現れることはこれまでも指摘した<sup>2)</sup>。それらはメタロチオネインの酸化生成物（2量体や分子内酸化生成物）の増加であり、メタロチオネインに結合している金属の内、カドミウム以外の共存金属（生体に必須な亜鉛と銅）量の減少である<sup>2)</sup>。

主としてメタロチオネインを中心として現れるこのようなカドミウムの存在状態の変化が現れることが予想される。本実験においては、カドミウムが体内に蓄積する限界を明らかにするとともに、その過程でどのような存在状態の変化以外にも、各臓器に特異的な必須金属濃度の変化がみられるか明らかにすることを目的とした。経口的な投与方法をとったとき、吸収過程における相互作用が起こり、現象の解析が複雑になるため、非経口的にカドミウムを投与した。またカドミウム以外にも主な必須元素量の変化を追跡したが、本論文では亜鉛、銅、鉄、マグネシウム並びにカルシウムについてのみ報告する。臓器としては肝臓、腎臓、脾臓並びに膵臓、体液としては血液と尿について検討した。

## 2 方法

雌性のウィスターラット（JCL、日本クレア；実験開始時に8週齢）に塩化カドミウムを3.0 mg Cd/kg 体重ずつ、1週間に4回、1,2,3,4,5及び6週間、皮下投与した。対照群には生理食塩水（0.1 ml/ラット）を同様に投与した。各群のラット（5匹/群）は最終投与3日後にエーテル麻酔下にと殺した。

肝臓（約1.5 g）並びに腎臓（1.5個分）を9倍量の0.1 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.4, 0.25 M グルコース含有）（使用前に窒素ガスで置換）中でポリトロンホモジェナイザーを用いてホモジェナイズし、170.000gで1時間超遠心した。上清を窒素流下-20°Cで保存した。上清各1.0 ml ずつをとり、70°C 10分間熱処理することによって熱に不安定なタンパク質を変性除去させた。

組織のホモジェネート、上清並びに熱処理上清中の金属濃度は、各溶液0.5 mlを1.0 mlの混酸（過塩素酸：濃硝酸=1：5）で湿式灰化した後、発光分光法で分析した。

1.0 mlのヘパリン血並びに血漿は2.0 mlの混酸で湿式灰化した。また24時間尿（最終投与後3日から4日にかけて採尿）の1.0 mlも1.0 mlの混酸で灰化した。血中並びに尿中の金属濃度は

原子吸光法によって測定した。

各臓器上清中の金属の分布はSW 3000 カラム (TSKgel, 東洋曹達工業 (株), 7.5×75 mm のプレカラム付の7.5×600 mm カラム) を用いて, 原子吸光分光器を検出器とした高性能液体クロマトグラフ (HPLC-AAS 法) によって分析した<sup>2,3,6)</sup>。カラムは50 mM トリス塩酸緩衝液 (25°C でpH 8.0, 0.1%NaN<sub>3</sub>含有, 溶存ガスは減圧下 80°C で除去) を1 ml/min の流速で流した。

金属の濃度と含量は5 試料の平均土標準偏差として示し, Student の t 検定によって有意差の検定を行った [(\*)p<0.05, (\*\*\*)p<0.01, (\*\*\*)p<0.001]。

### 3 結果

#### 3.1 体重と臓器重量

対照群の体重は実験中に186±6 g から264±11 g に増加したが, カドミウム投与群の体重は図1 A に示したようにカドミウムを投与するにつれて減少した。一方, 投与群の肝臓重量は対照群の1.7 倍にも増加し, 腎臓の重量も各対照群よりも増加していた。また脾臓の重量は対照群では0.5~0.6 g の間にあり経時的な変化はみられなかったが, カドミウム投与により増加して1.7 g にまでなった (図1 B)。

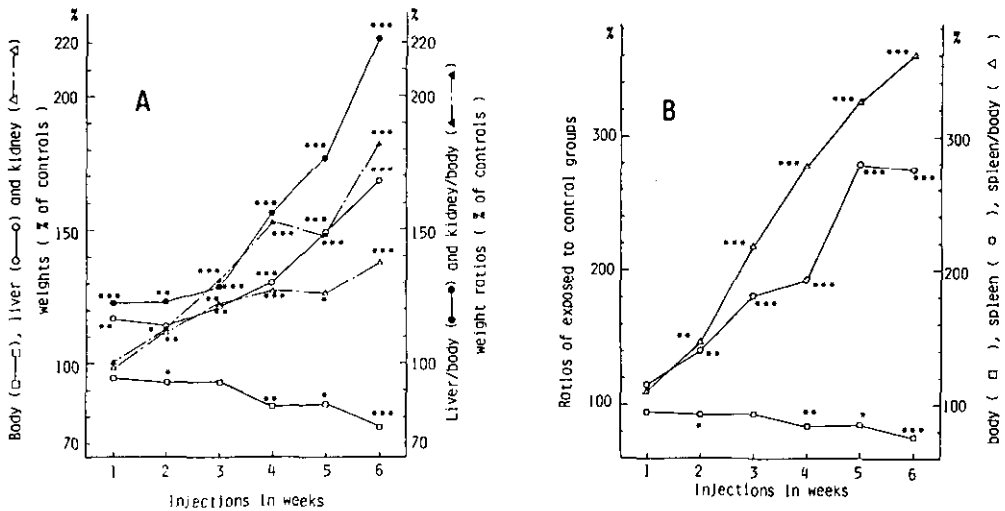


図 1 カドミウムの投与による体重と臓器重量の変化<sup>17,18)</sup>

Fig. 1 Changes in body and tissue weights with injections of cadmium<sup>17,18)</sup>

カドミウムの投与に伴った体重, 臓器重量並びに各臓器の体重に対する比重量を, 対照群に対する百分率で示した。

### 3.2 肝臓中の金属

肝臓中のカドミウムは濃度 (mg/g 湿重量) と含量 (mg/肝臓) で示した (図 2)。濃度で示したカドミウムの蓄積過程は、投与 3 週間まで直接的に増加したが、その後の 2 週間はプラトーとなった。さらに第 6 週目には、カドミウムを投与し続けているにもかかわらず濃度が突然減少した。含量で示したカドミウムは、5 週間目まで直線的に増加した後、減少しはじめた。4 及び 5 週目の含量の増加は肝重量の急激な増加と関連していた (図 1 A, 図 2)。

肝臓中のカドミウムについてはさらに、上清画分に抽出可能なカドミウムと熱に安定なタンパク質に結合したカドミウムに分別定量した。これらの分画中のカドミウム量は肝臓全体に含まれるカドミウム量とほぼ類似した変化を示したが、図 2 に示したごとく、3~5 週の間では、その差が大きくなった。

カドミウム投与による肝臓中の必須金属濃度への影響を調べた結果を図 3 に示す。亜鉛量はカドミウムの投与につれて増加したが、カドミウム濃度がプラトーになった時点より減少し始めた (図 3 a)。亜鉛量の増加は主としてメタロチオネインに結合した亜鉛によることが図 4 に示した結果よりわかる。しかし、亜鉛濃度が対照群と同じレベルにまで減少した 6 週目においても、メタロチオネインに結合している亜鉛量は対照群よりはるかに高かった (図 3 a, 図 4 w-6 w)。

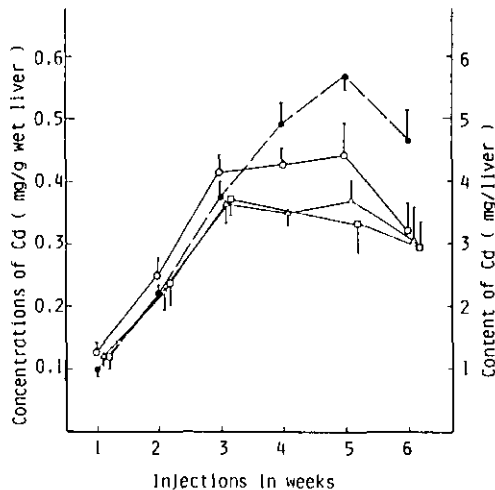


図 2 カドミウムの投与に伴った肝臓中のカドミウムの濃度と含量の変化<sup>17)</sup>

Fig. 2 Changes in concentrations and content of cadmium in the livers with injections of cadmium<sup>17)</sup>

肝臓を 9 倍量の緩衝液中でホモジェナイズした後、170,000 g で 60 分間遠心した。上清を 70°C、10 分間熱処理した後、2,300 g で 10 分間遠心した。ホモジネート (—○—), 上清 (—△—), 及び熱処理上清 (—□—) の中のカドミウム濃度を 10 倍し、5 試料の平均土標準偏差として示した。カドミウム含量は—●—で示した。



肝臓中の銅とマグネシウム濃度は5週目まで対照群と同じであったが、その後減少した。鉄濃度はカドミウム投与によって対照群より低い値をとり続けていた。カルシウム濃度はカドミウム投与によって有意に増加した。

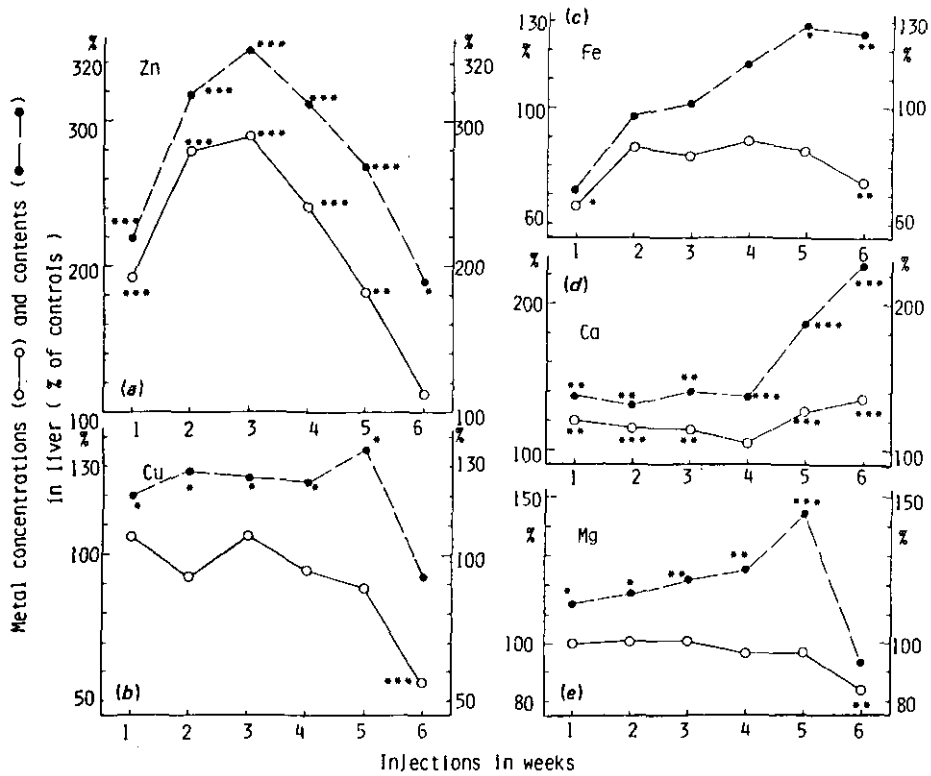


図 3 カドミウムの投与に伴った肝臓中の5種類の必須元素の濃度と含量の変化：(a)亜鉛，(b)銅，(c)鉄，(d)カルシウム，(e)マグネシウム<sup>17)</sup>

Fig. 3 Changes in concentrations and contents of the five essential metals in the livers with injections of cadmium : (a)Zn, (b)Cu, (c)Fe, (d)Ca and (e)Mg<sup>17)</sup>

肝臓中の5種類の元素の濃度(—○—)と含量(—●—)を5試料の平均±標準偏差で計算し、各対照群に対する百分率で示した。

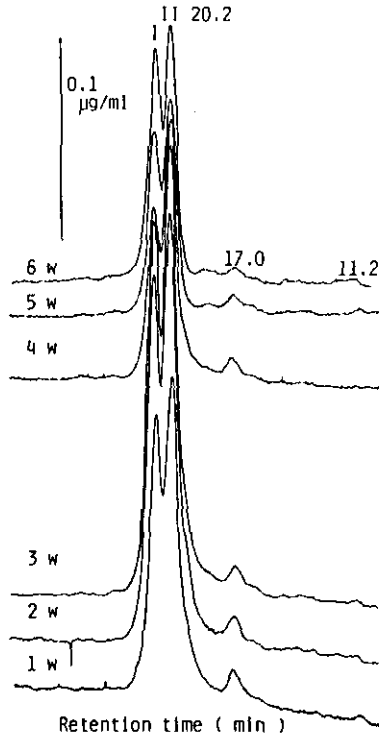


図 4 カドミウムの投与に伴った肝臓上清中の亜鉛の分布の変化<sup>17)</sup>

Fig. 4 Changes in the distribution profiles of zinc in liver supernatant with injections of cadmium<sup>17)</sup>

肝臓上清中の亜鉛の分布を HPLC-AAS 法で分析した。I (21.2 分) と II (20.2 分) はメタロチオネイン-I と II を示す。11.2 分と 17.0 分のピークはカラムの排除容積とスーパーオキシドデイスムターゼに相当する。

### 3.3 腎臓中の金属

腎臓へのカドミウムの蓄積過程は図 5 に示すようなものであった。肝臓中のカドミウムとは対照的に、6 週目においてもカドミウム濃度はプラトーの状態であった。一方、全腎臓中のカドミウム濃度と熱に安定な分画中のカドミウム濃度の差は、カドミウムの投与とともに大きくなった。

腎臓の 5 種類の必須金属濃度の変化を図 6 に示した。亜鉛濃度はカドミウムの投与とともに増加したが、その増加の程度は肝臓中の亜鉛よりも少なかった (図 6 a)。

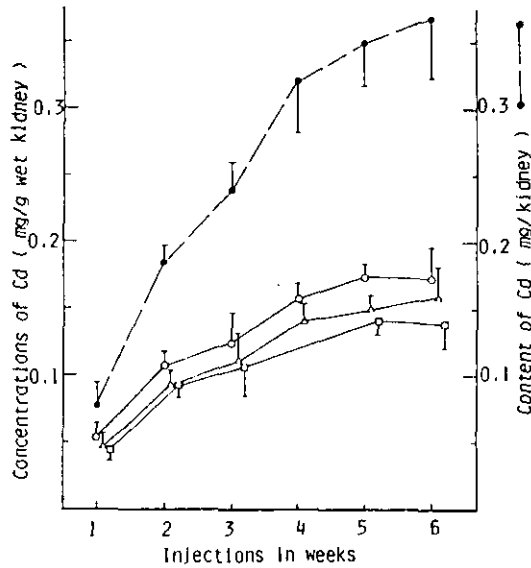


図 5 カドミウムの投与に伴った腎臓中のカドミウムの濃度と含量の変化<sup>17)</sup>  
 Fig. 5 Changes in concentrations and content of cadmium in the kidneys with injections of cadmium<sup>17)</sup>

図2の脚注に示した肝臓に対する処理方法と同様に腎臓を処理した。ホモジェネート(—○—), 上清(—△—)と熱処理上清(—□—)中のカドミウム濃度を10倍し, 5試料の平均±標準偏差として示した。含量は—●—で示した。

腎臓中の銅濃度は投与2週目まで増加したが, その後突然対照群と同じレベルにまで減少した(図6b)。同じような変化は既にこれまでも観察し, メタロチオネインに結合している銅量の変化として説明した<sup>2)</sup>。6週目の銅濃度は対照群よりも有意に低くなっていた。腎臓中の鉄はカドミウム投与とともに減少し, 6週目においては対照群の30%の濃度にまで下っていた(図6b)。カルシウムとマグネシウムの濃度は投与初期には増加したが, その後対照群より低いレベルにまで減少した(図6d, e)。

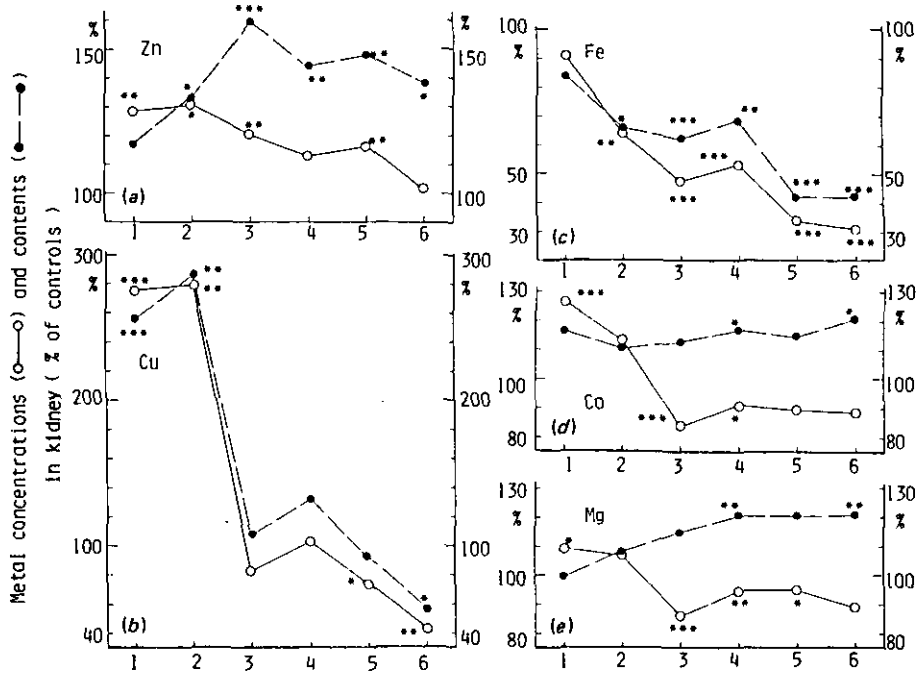


図 6 カドミウムの投与に伴った腎臓中の5種類の元素の濃度と含量の変化：  
(a) 亜鉛, (b) 銅, (c) 鉄, (d) カルシウム, (e) マグネシウム<sup>17)</sup>

Fig. 6 Changes in mean concentrations and contents of the five elements in the kidneys with injections of cadmium: (a)Zn, (b)Cu, (c)Fe, (d)Ca and (e)Mg<sup>17)</sup>  
図3と同様に濃度(○—○)と含量(●—●)を対照群に対する百分率として示した。

### 3.4 脾臓中の金属

脾臓中のカドミウム濃度は、カドミウムを投与するとともに増加したが、特に6週目の増加は著しかった(図7)。この著しい増加は脾臓重量の増加が止まり(図1B)、体重の減少が始まった時期(図1A)と一致するとともに、肝臓中のカドミウム含量が減少しはじめた時期とも一致した(図2)。

脾臓中の必須金属濃度の変化をまとめたものが図8である。亜鉛濃度は対照群とほぼ同一レベルであったが、重量が増加したため、含量は有意な変化を示した(図8a)。類似した変化を示した元素としてマグネシウム(図8b)とカルシウム(図8c)がある。一方、これら元素とは違い

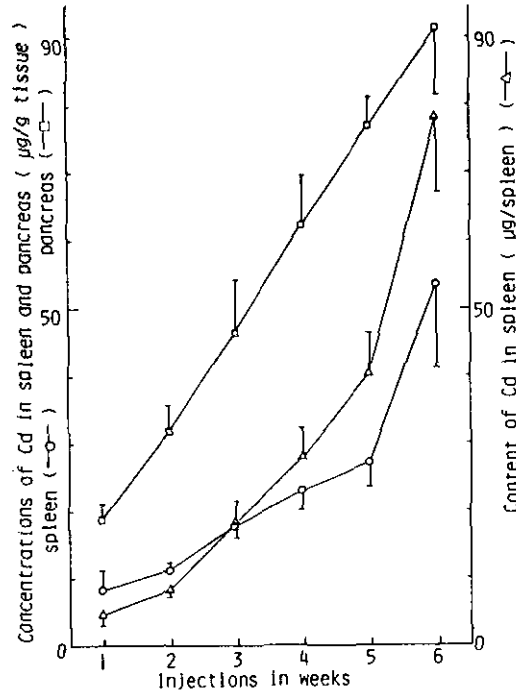


図 7 カドミウムの投与に伴った脾臓 (○) と膵臓 (□) 中のカドミウムの増加<sup>18)</sup>

Fig. 7 Increases of cadmium in spleen (○) and pancreas (□) with injections of cadmium<sup>18)</sup>

脾臓中のカドミウム含量は—△—で示した。

鉄濃度は図 8 d にみられるような少し変わった変化のパターンを示した。これは使用した動物の脾臓中の鉄濃度が、年齢とともに増加 (250 から 1100 µg/g 湿重量にまで 6 週間の間に増加した) している時期に当たることも関連していると思われる。銅濃度は低く、信頼限界以下であった。

脾臓中のカドミウムの化学形態についての報告は少ない<sup>7)</sup>。カドミウムの蓄積に伴って化学形態がどのように変化するか明らかにする目的で、脾臓上清を HPLC 用のゲルろ過カラムである SW 3000 カラムに添加し、カドミウムの分布を調べた結果を図 9 に示す。カドミウムは大部分メタロチオネインを結合していることが明らかになった。

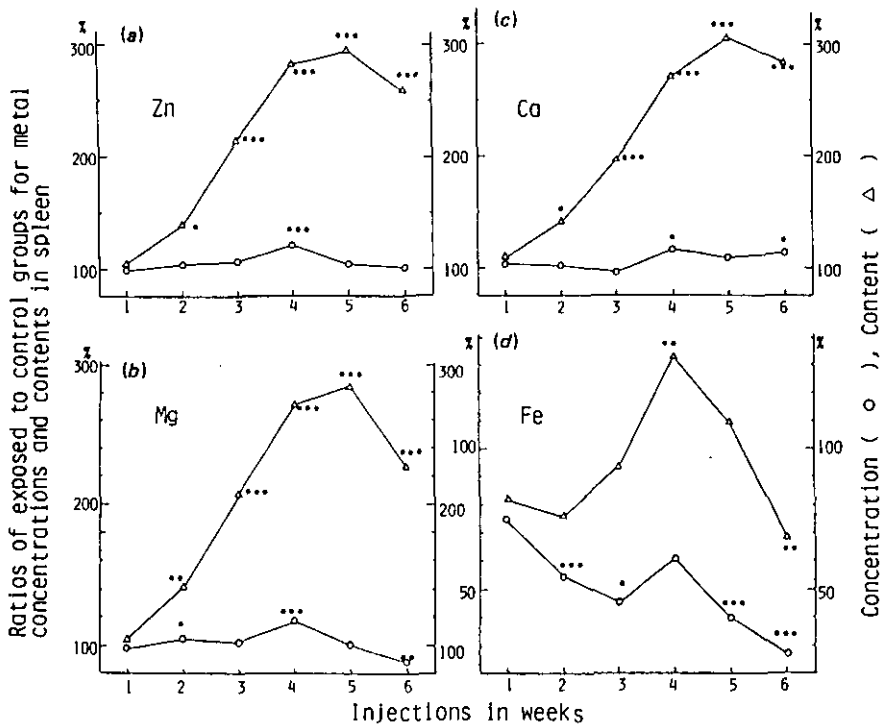


図 8 カドミウムの投与に伴った脾臓中の金属の濃度 (—○—) と含量 (—△—) の変化：(a) 亜鉛，(b) マグネシウム，(c) カルシウム，(d) 鉄<sup>18)</sup>

Fig. 8 Changes in the ratios, for exposed versus control of concentrations (—○—) and contents (—△—) of metals in spleen with injections of cadmium: (a)Zn, (b)Mg, (c)Ca and (d)Fe<sup>18)</sup>

データは平均濃度及び含量の各対照群に対する比率として示した。

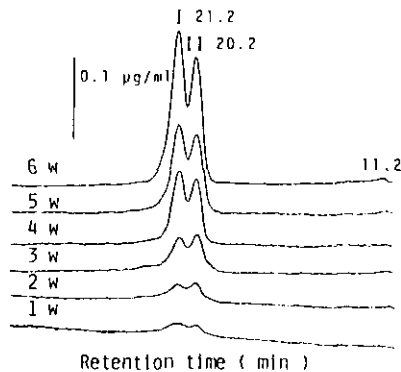


図 9 カドミウムの投与に伴った脾臓上清中のカドミウムの分布の変化<sup>18)</sup>

Fig. 9 Changes in the distribution profiles of cadmium in the spleen supernatants with injections of cadmium<sup>18)</sup>

### 3.5 膵臓中の金属

肝臓や腎臓と異なり、全膵臓を分けとることは不可能であるため、膵臓中の金属は濃度でのみ示した。カドミウム濃度は図7にみられるように、投与量に比例して6週目まで直線的に増加した。また、そのときのカドミウムの存在状態を膵臓と同じようにSWカラムで調べた結果、上清中に存在するカドミウムは主としてメタロチオネインに結合していることがわかった。しかし、図10でも明らかなように、メタロチオネイン以外のピークも観察された。これらのピークの帰属についてはメタロチオネインが分子内酸化されることによって生成したピークであることを別途に明らかにした。

膵臓中の必須金属濃度の変化についてまとめた結果を図11に示す。カドミウム投与1週目には亜鉛濃度は対照群より低くなっていたが、その後3週目まで増加した。しかし、4週目以降は再び減少しはじめ、5週と6週目では対照群より有意に低くなっていた。膵臓中の金属の内、カドミウム投与により対照群より有意に高い濃度となったものは亜鉛のみであった。

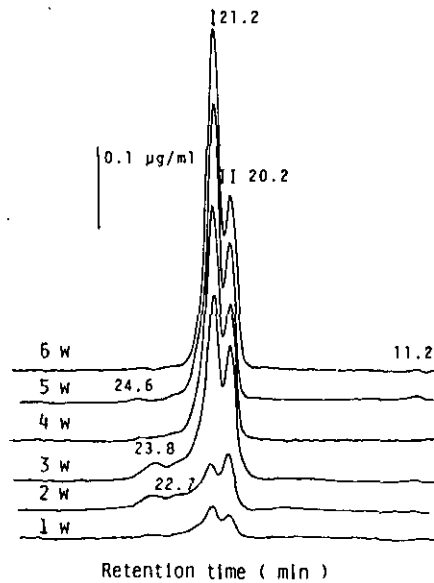


図 10 カドミウムの投与に伴った膵臓上清中のカドミウムの分布の変化<sup>18)</sup>  
 Fig. 10 Changes in the distribution profiles of cadmium in pancreas supernatants with injections of cadmium<sup>18)</sup>

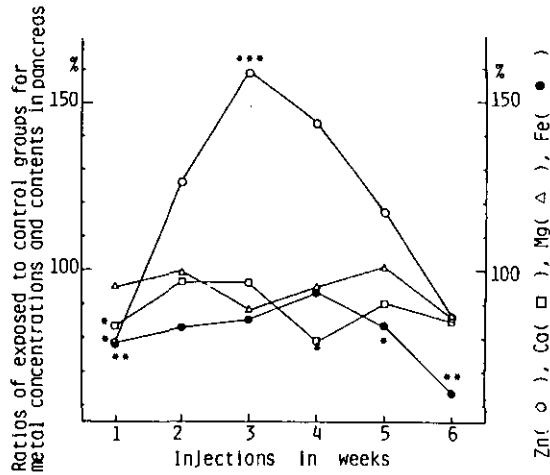


図 11 カドミウムの投与に伴った膵臓中の金属濃度の変化：亜鉛(○)，カルシウム(□)，マグネシウム(△)，鉄(●)<sup>18)</sup>

Fig. 11 Changes in the exposed/control ratios for concentrations of metals in pancreas with injections of cadmium : Zn(○), Ca(□), Mg(△) and Fe(●)<sup>18)</sup>

各金属の濃度を5試料の平均土標準偏差として算出し、各対照群に対する百分率で示した。

### 3.6 血液中の金属

血液中的カドミウムの濃度については、全血液と血漿について調べた(図12)。血漿中の濃度は全血液中の濃度の1/10程度であり、血液中的カドミウムの大部分が血球中に存在していることを示している。全血液中的カドミウム量は、投与回数が増加するにつれて、ほぼ同じ割合で増加したが血漿中のカドミウム濃度は5週目以降で急に増加し、全血液中とは変化の仕方が異なっていた。

血液中的亜鉛と銅の濃度についても、全血液と血漿に分けて調べた(図13)。亜鉛に比べて、銅濃度は全血液中でも血漿中でも同じパターンで劇的に変化し、カドミウムの影響を示すよいマーカーとなっていることが推定された。



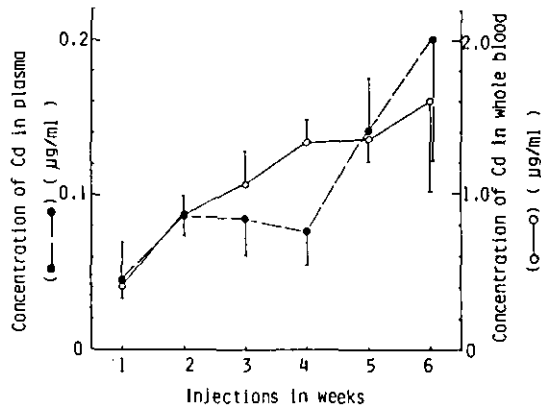


図 12 カドミウムの投与に伴った全血液 (—○—) と血漿 (—●—) 中のカドミウム濃度の変化<sup>17)</sup>

Fig. 12 Changes in concentrations of cadmium in whole blood (—○—) and plasma (—●—) with injections of cadmium

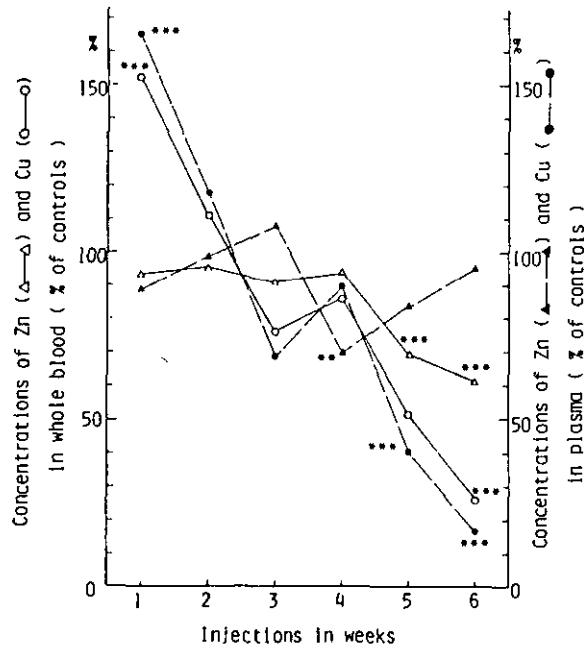


図 13 カドミウムの投与に伴った全血液中の亜鉛 (—△—) と銅 (—○—), 及び血漿中の亜鉛 (—▲—) と銅 (—●—) 濃度の変化<sup>17)</sup>

Fig. 13 Changes in concentrations of zinc (—△—) and copper (—○—) in whole blood with injections of cadmium, and of zinc (—▲—) and copper (—●—) in plasma<sup>17)</sup>

亜鉛と銅濃度は各対照群に対する百分率で示した。

### 3.7 尿中の金属

尿に排せつされるカドミウム量は図 14 に示すようにカドミウムの投与とともに増加したが、特に 5 週目以上の排せつ量の増加は著しかった。尿中への亜鉛と銅の排せつ量は 1 週目においては対照群より減少したが、その後カドミウムの投与とともに増加した (図 15)。しかし 4 週目にはプラトーに達しており、カドミウムの排せつパターンとは違っていた。

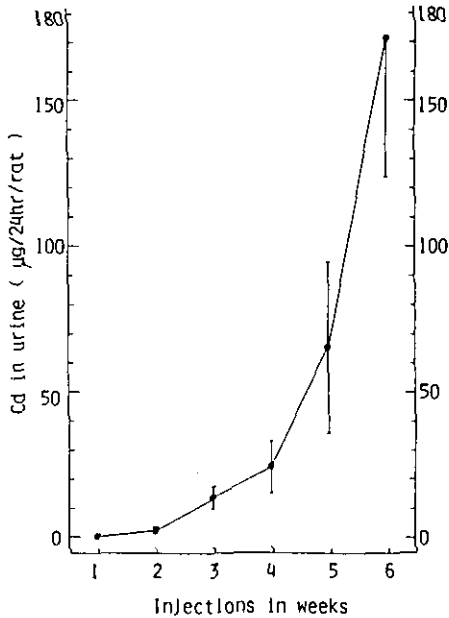


図 14 カドミウムの投与に伴った尿中のカドミウム量の変化<sup>17)</sup>

Fig. 14 Changes in amounts of urinary cadmium with injections of cadmium<sup>17)</sup>

尿は各週における最終投与後 3 日から 4 日目にかけて 24 時間尿を採取した。

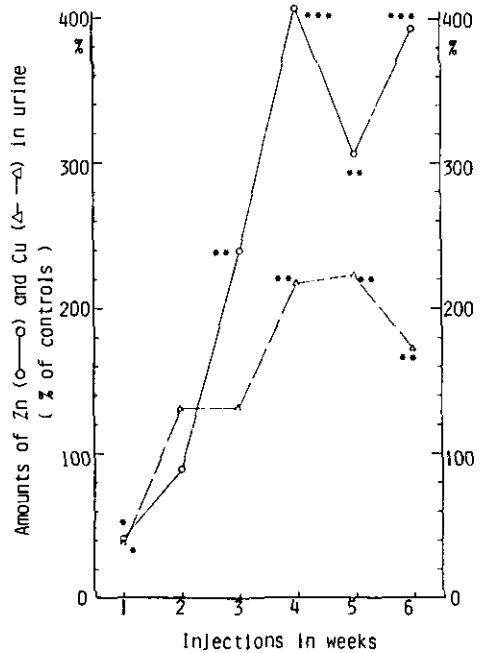


図 15 カドミウムの投与に伴った尿中の亜鉛 (○) と銅 (△) 含量の変化<sup>17)</sup>

Fig. 15 Changes in amounts of urinary zinc (○) and copper (△) with injections of cadmium<sup>17)</sup>

### 4 考 察

本実験に用いたカドミウムの投与方法によるカドミウムの蓄積限界は、肝臓では 440 µg/g 湿重量であった。これは 5.67 mg Cd/肝臓に相当した。蓄積量は Nomiyama (1980)<sup>7)</sup> が指摘しているように投与量を始めとする様々な条件によって左右される。今回用いた投与量は比較的多量であったため、腎臓よりも肝臓の方が早く飽和された。

組織中の全カドミウム量と熱に安定なタンパク質に結合しているカドミウム量との差は、カド

ミウムの投与回数の増加とともに大きくなったが、6週目では逆に小さくなった。熱に安定なタンパク質はメタロチオネイン並びに関連したカドミウム-結合タンパク質であることから<sup>3)</sup>、今回の結果は、カドミウムの投与回数の増加とともに熱に不安定なタンパク質に結合しているカドミウムと他の分画中に存在するカドミウムが増加することを示している。6週目にこの差が減少した現象は、メタロチオネイン中のCd/Zn比が増加したこと、及びカドミウムの存在状態の変化<sup>2)</sup>との関連で興味深い。理由は明らかでないが、この結果はカドミウムをより多く蓄積した肝細胞からカドミウムが選択的に失われていることを示している可能性を示している。またもう一つの可能性として、肝臓の実質細胞とそれ以外の細胞の間でカドミウムの蓄積性と感受性に違いがあることも考えられる<sup>8,9)</sup>。

投与4週目以降に血漿中のカドミウムが突然増加したことと、尿中のカドミウムが突然増加したことの間には密接な関連があった。しかし、腎臓中のカドミウムは連続的な増加過程をとっており、突然増加した血漿中のカドミウムが腎臓では再吸収されなかったことを示している。血漿中に増加したカドミウムは、肝臓毒による肝傷害の場合<sup>10)</sup>と同じようにカドミウムによって傷害された肝臓に由来すると推定されるが、このカドミウムが直接尿中に排せつされたと考えられる。この結果は、カドミウムを多量に蓄積した肝臓が傷害を受けたとき観察された結果<sup>10)</sup>と一致するが、カドミウムの蓄積量が少ない肝臓の結果並びにメタロチオネインを注射したときの結果<sup>11-14)</sup>とは異なっていた。この違いはカドミウムを高濃度に蓄積した腎臓ではカドミウム(メタロチオネイン)の再吸収率が下がっていることで説明できる。この結果はカドミウムの蓄積量が多いときには、尿中のカドミウムが主として肝臓に由来することも示している。

必須金属の内では、亜鉛はメタロチオネインを介してカドミウムと密接に関連している。肝臓と腎臓中の亜鉛濃度の変化は大部分メタロチオネインに結合しているものとして説明可能であった。両組織中の銅濃度の変化、特に腎臓中の変化についても同様に説明可能であった。1週目において尿中の亜鉛と銅量が対照群より低かったことは、肝臓による亜鉛及び腎臓による銅の取り込みの増加で説明できる。その後の両金属の排せつ量の増加は肝臓からの亜鉛と腎臓からの銅の排せつが促進されたと推定される。カドミウム、亜鉛及び銅の排せつパターンはSuzukiとYoshikawaの報告例とも類似していた<sup>15)</sup>。

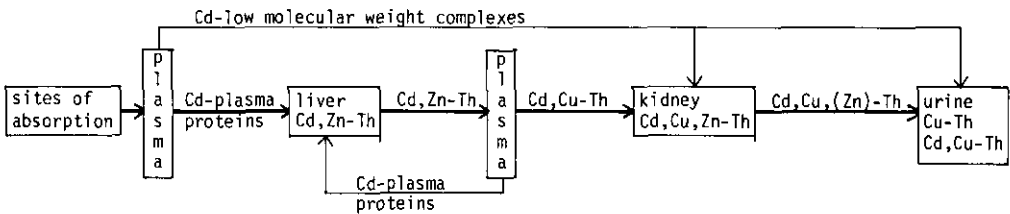
脾臓と膵臓中のカドミウムの蓄積量は肝臓や腎臓よりも低かったが、肝臓と腎臓中のカドミウム濃度が最大値又はプラトーに達した後も増加し続けた。また脾臓と膵臓中のカドミウム濃度はまだまだ増加しうるということが推定されるとともに、メタロチオネインの合成量も増える余地があることが示された。

脾臓と膵臓中のカドミウムの存在状態に関する報告は少ない。今回の実験結果は両組織中のカドミウムの蓄積過程とともに、その存在状態についても明らかにしたのは初めての報告である。特に膵臓中のメタロチオネインが非常に酸化されやすいことを指摘し、その取り扱い方に注意が必要であることを示した。

鉄の濃度は肝臓と腎臓、特に後者で著しく減少したが、この意味については今回明らかにしなかった。またカルシウムとマグネシウムの濃度の変化についても、現象を把握したのみであり、その解析は行わなかった。

本実験において得られた結果とこれまでに明らかにされている結果をあわせて、生体に吸収されたカドミウムの代謝過程を模式的に示すと、図 16 のようにまとめることができる。詳細については原報<sup>16)</sup>を参照されたい。

i) In the case of low accumulation



ii) In the case of high accumulation

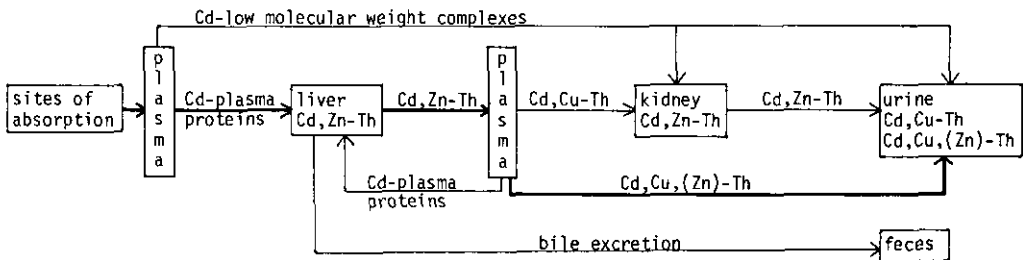


図 16 吸収されたカドミウムの代謝過程の模式図<sup>16)</sup>

Fig. 16 Schematic presentation of the metabolic pathways of absorbed cadmium in rats<sup>16)</sup>

### 引用文献

- 1) Sato, M. and Y. Nagai (1980) : Mode of existence of cadmium in rat liver and kidney after prolonged subcutaneous administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 90-94.
- 2) Suzuki, K. T., M. Yamamura, Y. K. Yamada and F. Shimizu (1980) : Decreased copper content in rat kidney metallothionein and its relation to acute cadmium nephropathy. *Toxicol. Lett.*, **7**, 137-142.
- 3) Suzuki, K. T., M. Yamamura, Y. K. Yamada and F. Shimizu (1981) : Distribution of cadmium in heavily cadmium-accumulated rat liver cytosols : Metallothionein and related cadmium-binding proteins. *Toxicol. Lett.*, **8**, 105-114.

- 4) Suzuki, Y. (1980) : Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. *J. Toxicol. Environ. Health*, **6**, 469-482.
- 5) Nomiyama, K. and H. Nomiyama (1982) : Tissue metallothioneins in rabbits chronically exposed to cadmium, with special reference to the critical concentration of cadmium in the renal cortex. *In* : *Biological Roles of Metallothionein*, E. C. Foulkes (*ed.*), Elsevier North-Holland New York, 47-67.
- 6) Suzuki, K. T. (1980) : Direct connection of high speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: Metallothionein. *Anal Biochem.*, **102**, 31-34.
- 7) Suzuki, K. T., T. Motomura, Y. Tsuchiya and M. Yamamura (1980) : Separation of metallothioneins in rat liver, kidney and spleen using SW and Sephadex columns. *Anal. Biochem.*, **107**, 75-85.
- 8) Nomiyama, K. (1980) : Steps to approach the critical concentration of cadmium in human renal cortex. Edited Proceedings of the Second International Cadmium Conference, Cannes, London : *Metal Bulletin*. 172-175.
- 9) Cain, K. and D. N. Skilleter (1980) : Selective uptake of cadmium by parenchymal cells of liver. *Biochem. J.*, **188**, 285-288.
- 10) Sciortino, C. V., M. L. Failla and D. B. Bullis (1982) : Identification of metallothionein in parenchymal and non-parenchymal liver cells of the adult rat. *Biochem. J.*, **204**, 509-514.
- 11) Tanaka, K., H. Nomura, S. Onosaka and K. Min (1981) : Release of hepatic cadmium by carbon tetrachloride treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 535-539.
- 12) Tanaka, K., K. Sueda, S. Onosaka, and K. Okahara (1975) : Fate of <sup>109</sup>Cd-labeled metallothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 258-266.
- 13) Cherian, M. G. and Z. A. Shaikh (1975) : Metabolism of intravenously injected cadmium-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 863-869.
- 14) Suzuki, K. T., S. Takenaka and K. Kubota (1979) : Fate and comparative toxicity of metallothionein with differing Cd/Zn ratios in rat kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 85-95.
- 15) Suzuki, Y. and H. Yoshikawa (1981) : Cadmium, copper, and zinc excretion and their binding to metallothionein in urine of cadmium-exposed rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **8**, 479-487.
- 16) Suzuki K. T. (1984) : Studies of cadmium uptake and metabolism in the kidney. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 21-30
- 17) Suzuki, K. T., K. Yaguchi, R. Ohnuki, M. Nishikawa and Y. K. Yamada (1983) : Extent of cadmium accumulation and its effect on essential metals in liver, kidney and body fluids. *J. Toxicol. Environ. Health*, **11**, 713-726.
- 18) Suzuki K. T., R. Ohnuki, K. Yaguchi and Y. K. Yamada (1983) : Accumulation and chemical forms of cadmium and its effect on essential metals in rat spleen and pancreas. *J. Toxicol. Environ. Health*, **11**, 727-738.

## II-18 腎臓におけるカドミウムの取り込みに対する L-システインの効果

### The Effect of L-Cysteine on the Renal Uptake of Cadmium

村上正孝<sup>1</sup>

Masataka MURAKAMI<sup>1</sup>

#### 要旨

Cd (10  $\mu$ mol/kg 体重) を皮下に、L-cysteine を腹腔内に同時投与すると、L-cysteine の投与量 (0.2, 1.0, 5.0 mmol/kg 体重) の増加に伴って、注射部位からの Cd の体内への移動が促進され、次いで腎臓での Cd の取り込み量が増加した。一方、<sup>35</sup>S-L-cysteine を Cd と同時投与すると (3  $\mu$ mol Cd, 1.5 mmol cysteine/kg 体重)、投与直後より血液及び腎臓中の<sup>35</sup>S は最高の濃度を示し、この状態は投与2時間後においても認められ、その後、両者ともに減少し続けた。投与後7時間まで腎臓中の<sup>35</sup>S 濃度は血液の約5倍の濃度比率を保ち、10時間以降は急速に血液中の<sup>35</sup>S 濃度は減少した。この条件下での投与直後における腎切片の<sup>35</sup>S のオートラジオグラフィの結果は、腎髄質のouter stripeの直近位尿細管に<sup>35</sup>S が集中することを示した。これは<sup>109</sup>Cd と L-cysteine を同時投与した (10  $\mu$ mol Cd, 5.0 mmol cysteine/kg 体重) 報告<sup>14)</sup>の<sup>109</sup>Cd のオートラジオグラフィの結果と同一であった。さらに、本論においてこの条件下で投与された Cd が、L-cysteine と錯体を生成して、その錯体の構成成分として、生体内を移動する可能性について考察した。

#### Abstract

In Wistar female rats, simultaneous administration of L-cysteine (0.2, 1.0 and 5.0 mmol/kg, i.p.) caused a dose-dependent decrease in the retention of Cd (10  $\mu$ mol/kg) at the s.c. injection site and increase in the renal uptake of Cd. Renal concentration of <sup>35</sup>S was maximal at 0.5 and 1 hour after administration with Cd (3  $\mu$ mol/kg) and <sup>35</sup>S-L-cysteine (1.5 mmol/kg), after then decreased gradually in proportion to the blood <sup>35</sup>S concentration. Autoradiographic studies with <sup>35</sup>S-L-cysteine revealed that <sup>35</sup>S accumulated by the kidney under these conditions, was concentrated in proximal tubules in the outer stripe of the outer medulla. These findings are consistent with the renal <sup>109</sup>Cd distribution, administered with 10  $\mu$ mol <sup>109</sup>Cd, 5.0 mmol L-cysteine/kg, reported earlier (Murakami, 1981)<sup>14)</sup>. Possible mechanism of the effect of L-cysteine on the renal transport and uptake of Cd are discussed.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,  
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

## 1 はじめに

長期間、Cdに暴露された場合、Cdはmetallothioneinの構成成分として大量に腎臓に蓄積され、やがて腎障害が発症する<sup>1)</sup>。しかしながら障害が認められるのは腎病変の発症後であり、その障害発生の初期の段階における機構を明らかにすることは難しかった。

ところが、Cdの取り込みによって肝臓や腎臓に誘導生成されたmetallothioneinを直接、投与した動物において、Cdとしては低用量であるにもかかわらず著明な腎病変の発症が認められた<sup>2,3)</sup>。その病変の起こり方<sup>4,5)</sup>は慢性のCd中毒腎において観察される病変<sup>6)</sup>、すなわち腎組織内において病変が初発する部位、その病巣の広がり方、さらに細胞レベルでの変化など、極めて共通する点が多いという興味ある現象がみられた。さらに、このmetallothioneinによる急性腎病変のおこる機構は、この物質が腎皮質、cortexの曲近位尿管S<sub>1</sub>とS<sub>2</sub>の上皮細胞のendocytotic system<sup>7,8)</sup>によって急速に取り込まれ、引き続いてライソゾーム酵素によって分解を受け、あるいは腎臓内での必須金属イオンの量の著しい変化に伴って、metallothioneinからCdイオンが解離することによるものと推定されている<sup>9)</sup>。

一方、Cdを大量のキレート物質、例えばL-cysteine, 2,3 dimercaptopropanol, penicillamine<sup>9-13)</sup>などと同時に動物に投与すると、metallothionein投与の場合と同様に、Cdの腎臓での取り込みが著しく急速に促進され、引き続いて腎病変が発症する。ここにおいて、Cdによる初期の段階における腎障害の機構を明らかにするモデルとして、キレート物質とCdとの同時投与による実験が有効であると考えられた。Cdとして10 μmols/kg, b. w. のCdCl<sub>2</sub>水溶液 (s.c.) と5 mmols/kg, b. w. のL-cysteine水溶液 (i.p.) をラットに同時投与したところ、投与後2時間にして、腎臓中のCd濃度は21 μg/gと急速に、しかも最高濃度に達した。しかもCdは腎髄質のouter medullaにある直近位尿管S<sub>3</sub>に集中して取り込まれ、2時間後には電子顕微鏡観察により細胞質の空胞変性を認め、24時間後には壊死に至るという現象がとらえられた<sup>14)</sup>。

そこでこのouter stripeにあるS<sub>3</sub>に急速にCdが取り込まれる機構を明らかにするため、以下の実験を行った。

## 2 方法

### 実験1 Cdの生体内分布に対するL-cysteineの効果

Wistar系雌ラット、9週齢(200g)。Cdは10 μmols/kg, b. w., CdCl<sub>2</sub>・2 $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O水溶液(1.0 ml/kg, b. w.)を右後肢大腿部の皮下に注射し、その直後に投与直前に調整されたL-cysteine(0.2, 1.0, 5.0, 10.0 mmols/kg, b. w.)水溶液(10.0 ml/kg, b. w.)を腹腔内に注射した。なお、Cd注射液には比放射能0.5 μCi/μmolの<sup>109</sup>Cdが加えられている。24時間後に各群5匹のラットの右後肢、両側の腎臓及び肝臓が摘出され、その放射能をLKB wallacの1282 Compu Gammaで測定し、Thompsonの方法<sup>15)</sup>で肝臓、腎臓を湿式灰化し、そのCd量を原子吸光法によって測定した。

## 実験2 $^{35}\text{S}$ -L-cysteine の生体内分布

(1) Wistar 系雌ラット, 4 週齢 (100 g)。Cd は投与 24 時間後においても腎病変を認めない用量の  $3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ , b.w.,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  水溶液 ( $1.0 \text{ ml}/\text{kg}$ , b.w.) 及び L-cysteine の  $1.5 \text{ mmol}/\text{kg}$ , b.w. を実験 1 と同様に投与した。投与直後から 48 時間に至る  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine の生体内の挙動と分布を知るために, L-cysteine 注射液は  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine (比放射能  $0.033 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) が加えられた。

(2) 投与後 30 分, 及び 1 時間後の L-cysteine の腎臓内分布をオートラジオグラフィーによって知るために, L-cysteine 液に  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine (比放射能  $2.1 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) が加えられた。

所定の時間の経過後, 動物をエーテルで麻酔し, (1) では肝臓, 腎臓, 心臓, 血液を摘出, 採取して, Cd 及び  $^{35}\text{S}$  を実験 1 と同様の方法で測定した。(2) のオートラジオグラフィー用の腎臓は, 固定液<sup>16)</sup> (2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.5% tannic acid, 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) を用いて, 3 時間固定し, 常法どおり, ethanol 脱水, propylene oxide で浸透し, Epon 812 に包埋して厚さ  $1 \mu\text{m}$  の切片を作製し, オートラジオグラフィー用乳剤 SAKURA NR-M<sub>2</sub> を塗布して, 6 週間, 暴露し, konidol X で現像した。

## 3 結果

### 実験 1

$\text{CdCl}_2$  ( $10 \mu\text{mol}/\text{kg}$ , b.w.) を単独投与して 24 時間後, 腎臓の Cd 濃度は  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{g}$  であった。これに対して, cysteine (0.2, 1.0, 5.0, 10.0 mmol/kg, b.w.) をそれぞれ同時投与した場合の腎臓の Cd 濃度は, 3.3, 5.1, 18.0, 17.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  と増加した。表 1 に示すように注射部位における Cd の残留率は, L-cysteine  $10.0 \text{ mmol}/\text{kg}$ , b.w. の場合を除けば, L-cysteine の投与量の増加に伴って減少した。一方, 肝臓全体での Cd の取り込み量は減少する傾向がみられた。この実験において測定はしていないが, おそらく L-cysteine の各投与量レベルにおいて, 注射部位より体内に移行した Cd 量から肝臓に移行した Cd 量を差し引いた分が腎臓に含まれる Cd 量に比べて, 大きいことから, Cd の尿中への排出が L-cysteine によって促進されたものと推定される。もっとも, L-cysteine を  $10 \text{ mmol}/\text{kg}$ , b.w. 投与した場合, Cd の注射部位よりの移行がむしろ妨げられた。しかし, 移行した肝臓及び腎臓での Cd 量は  $5 \text{ mmol}/\text{kg}$ , b.w., L-cysteine 投与の場合と, それほど変わらなかった。投与された Cd がより体内に移行しやすくなるという観点からは, Cd,  $10 \mu\text{mol}/\text{kg}$ , b.w. に対して L-cysteine,  $5 \text{ mmol}/\text{kg}$ , b.w. が適当な実験条件と考えられた。



表 1 Cd と L-cysteine を同時に投与したとき (10  $\mu$ mol/kg, Cd/kg 体重と 0.2, 1.0, 5.0, 10.0 mmol/kg, L-cysteine/kg 体重) の注射部位, 腎臓, 肝臓中に存在する投与 Cd 量の分布

Table 1 Effect of the simultaneous administration of L-cysteine on the distribution of Cd at 24 h after the s.c. injection of 10  $\mu$ mol/kg, Cd ( $^{109}\text{Cd}$ )/kg, b.w. to Wistar rats

Organ/Tissue	L-cysteine dose (mmol/kg, i. p.) <sup>b)</sup>				
	0.0	0.2	1.0	5.0	10.0
Injection site <sup>a)</sup>	50.4 $\pm$ 16.6	34.4 $\pm$ 11.6	36.2 $\pm$ 11.6	18.2 $\pm$ 7.4	42.4 $\pm$ 3.8
Kidneys	1.9 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 1.8	13.4 $\pm$ 1.5
Liver	56.1 $\pm$ 9.7	52.4 $\pm$ 5.8	51.7 $\pm$ 3.2	45.5 $\pm$ 3.4	41.6 $\pm$ 4.4

a) Cd は, 右後肢大腿部皮下投与  
すべての実験群の動物数は 5 匹

b) 分散分析の結果, 有意水準 5% で投与した L-cysteine の量は投与部位に残留した Cd 量及び移行した腎, 肝中 Cd 量に影響を及ぼしたといえる。

## 実験 2

先の報告<sup>14)</sup>において, 10  $\mu$ mol/kg, b.w. と 5 mmol/kg, b.w. の L-cysteine を同時投与した結果, 著明な尿細管上皮細胞の壊死が生じた。そこで, 病変を起こさない用量の 3  $\mu$ mol/kg, b.w. に, Cd 投与量<sup>17)</sup>を減少して, 1.5 mmol/kg, b.w. の L-cysteine を同時投与した場合の  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine の臓器内分布の時間的経過を追跡した結果が表 2 に示されている。血液中の  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine は投与直後が最高で, この状態が 4 時間目まで続き, 以後 7 時間は 1/2, 10 時間以降, 1/4 と緩慢に減少した。一方, 肝臓, 腎臓の濃度の減衰傾向は血液と濃度のレベルが異なるものの, 極めて似かよった比率で減衰してゆくの認められた。しかも, 肝臓, 腎臓ともに各時間ごとの濃度レベルはほとんど差がなかった。これに対して心臓は初めから血液と同程度の濃度レベルで推移し, 48 時間後には肝臓, 腎臓もこのレベルまで低下した。

一方, Cd 投与なしに  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine を単独投与した場合においても, 同時投与の場合の各臓器中の  $^{35}\text{S}$  濃度の減衰傾向とほとんど同じであり, この条件下においては Cd が L-cysteine の生体内分布に何らの影響も与えないようにみえた。

Cd の腎臓での取り込みは, 10  $\mu$ mol/kg, b.w. の Cd 投与の場合と同様に 3  $\mu$ mol/kg, b.w. の Cd 投与の場合も, L-cysteine の存在によって促進されることが表 3 によって示されている。

極めて興味のある結果は, 図 1 に示される 3  $\mu$ mol/kg, b.w. と 1.5 mmol/kg, b.w. を同時投与して 30 分後の  $^{35}\text{S}$ -L-cysteine による腎臓組織のオートラジオグラフィである。なお投与後 1 時間も同様の  $^{35}\text{S}$  の分布パターンを示した。 $^{35}\text{S}$  によって生じた現像銀粒子の腎臓組織における分布は, 腎髄質, inner medulla, そして, outer medulla の inner stripe に相当する部

分、及び腎皮膜から arciform arteries を含む腎皮質, cortex の部分にほとんど認められない。しかし、arciform arteries を含む cortex を避けるようにして、medullary ray を含む outer medulla の outer stripe にある直近位尿管 S<sub>3</sub> に<sup>35</sup>S による現像銀粒子が集中して存在することが確認された。

表 2 <sup>35</sup>S-L-cysteine (1.5 mmols/kg 体重) 単独あるいは Cd (3 $\mu$ mols/kg 体重) を同時投与したときの、腎臓、肝臓、心臓及び血液中<sup>35</sup>S 濃度の経時的变化

Table 2 Renal, hepatic, cardiac and blood concentrations of <sup>35</sup>S at different times after the injection of <sup>35</sup>S labelled L-cysteine (1.5mmols/kg, b.w.) alone and together with Cd (3 $\mu$ mols/kg, b. w.) in Wistar rats<sup>b)</sup>

Time (h)	Kidney		Liver		Heart		Blood	
	Cys alone	Cys+Cd	Cys alone	Cys+Cd	Cys alone	Cys+Cd	Cys alone	Cys+Cd
0.5	10.0 $\pm$ 2.2 (n=4)	9.0 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 2.9	8.4 $\pm$ 2.2	1.7 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.2*	2.1 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.5
1	12.5 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 2.3	8.9 $\pm$ 1.7	9.8 $\pm$ 1.4	2.4 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 1.1* (n=4)	2.3 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.2
2	8.2 $\pm$ 1.1	8.1 $\pm$ 1.3 (n=4)	10.4 $\pm$ 1.9	10.8 $\pm$ 3.7 (n=4)	1.9 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.5 (n=4)	2.1 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.8 (n=4)
4	6.1 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.8	8.7 $\pm$ 1.2	9.1 $\pm$ 1.7	2.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 1.1
5.5	4.7 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.7*	7.3 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 1.7	1.7 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.6
7	4.5 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 1.5	6.4 $\pm$ 1.4	1.7 $\pm$ 0.3 (n=4)	1.8 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.5
10	4.2 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 0.3 (n=4)	4.7 $\pm$ 1.6	5.6 $\pm$ 0.7 (n=4)	1.7 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.4 (n=4)	0.5 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3 (n=4)
24	3.4 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.2*	2.5 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2*
48	1.8 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2

a)  $\times 10^{-2} \mu\text{Ci/g}$  湿重量

すべての実験群の動物数は 5 匹

b) 各時点における各臓器中の濃度値について、両群の平均値検定 (t-検定) を行った。\*  $P < 0.05$

表 3 Cd 単独 (3  $\mu$ mols/kg 体重) あるいは L-cysteine (1.5 mmols/kg 体重) を同時投与したときの腎臓中 Cd 濃度の経時的变化

Table 3 Renal concentration of Cd at different times after the injection of Cd (3  $\mu$ mols/kg, b.w.) alone and together with L-cysteine (1.5 mmols/kg, b.w.)<sup>b)</sup>

Time (h)	Cd+Cys Cd alone	
	a)	
0.5	1.38 $\pm$ 0.30	0.15 $\pm$ 0.02*
1	1.47 $\pm$ 0.15	
2	2.44 $\pm$ 0.43	
4	2.91 $\pm$ 0.69	0.29 $\pm$ 0.06* (n=4)
5.5	2.76 $\pm$ 0.04	
7	2.60 $\pm$ 0.59	0.38 $\pm$ 0.02*
24	1.92 $\pm$ 0.25	0.51 $\pm$ 0.07*
48	0.97 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.10*

a) Cd  $\mu$ g/g腎湿重量

すべての実験群の動物数は5匹

b) 各時点における両群の濃度値について、平均値の検定

(t-検定)を行った。\*P<0.05

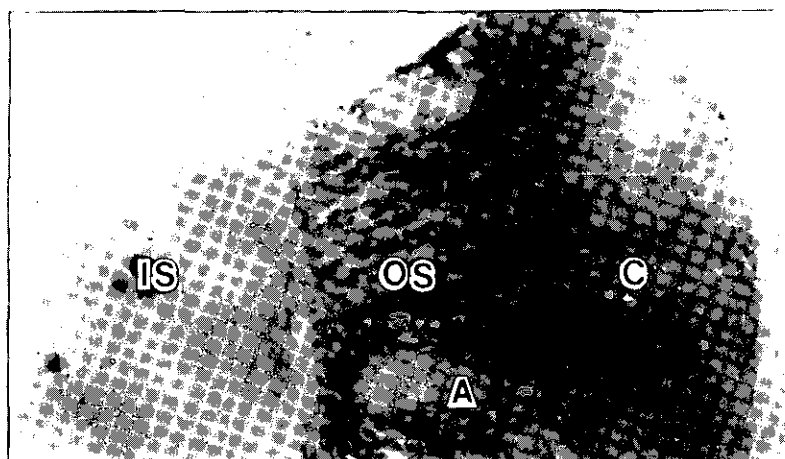


図 1 Cd と<sup>35</sup>S-L-cysteine を同時投与後 30 分の腎切片のオートラジオグラフィ

Fig. 1 Autoradiograph of Epon-embedded section of the kidney at 30 min after the injection of Cd (3  $\mu$ mols/kg, b.w.) and <sup>35</sup>S labelled cysteine (1.5 mmols/kg, b.w.)

<sup>35</sup>S による現象銀粒子は腎髄質の outer stripe (OS) にある直近位尿細管に集中し、腎皮質 (C) 及び腎髄質の inner stripe (IS) には、ごくわずかしが認められなかった。弓状動脈 (A)。x 23

## 4 考察

Cdによって腎病変が発生するネフロン部位はcortexの曲近位尿細管、 $S_1$ と $S_2$ である<sup>17-19</sup>。Cd-metallothioneinによって起こる急性中毒腎障害においても、同様に $S_1$ と $S_2$ が障害を受ける<sup>4,5,7</sup>。

一方、Cdと多量のL-cysteineを同時投与した場合においてはcortexにある曲近位尿細管 $S_1$ + $S_2$ ではなく、outer medullaのouter stripeにある直近位尿細管 $S_3$ が障害を受けた<sup>14</sup>。このことは図2によって明らかに示されるように投与されたCdがouter stripeの $S_3$ に集中し、その結果、その部位において毒性が発揮されたためと考えられる。

では、何故、cysteineと同時にCdを投与した場合、Cdはouter stripeの $S_3$ に取り込まれるのであろうか。

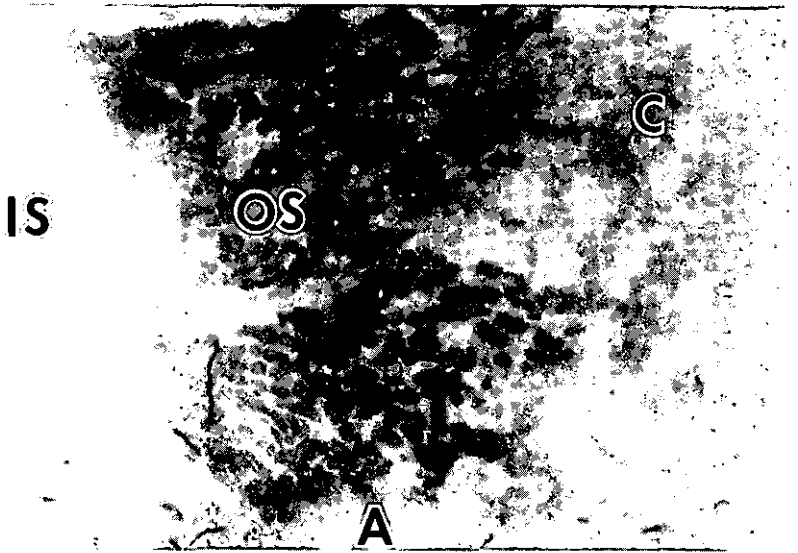


図 2  $^{109}\text{Cd}$ とL-cysteineを同時投与後4時間の腎切片のオートラジオグラフィ<sup>14</sup>

Fig. 2 Autoradiograph of Epon-embedded section of the kidney at 4 hours after the injection of  $^{109}\text{Cd}$  ( $10\mu\text{mols/kg}$ , b.w.) and L-cysteine ( $5\text{ mmols/kg}$ , b.w.)

Cdは腎髄質のouter stripe (OS)にある直近位尿細管に集中し、腎皮質 (C)の曲近位尿細管には、ごくわずかしが認められない。さらに近位尿細管の存在しない腎髄質のinner stripe (IS)には全くCdは認められない。弓状動脈 (A)。x 60

水溶液中において、Cdとcysteineとが錯体を生成するという事実から、動物にCdとL-cysteineを同時投与した場合においても、生体内で、直接的証拠は得られないものの、CdとL-cysteineとが錯体を生成する可能性が十分あり得る。しかし、その錯体生成の条件として体液中における両者の存在する量あるいはモル比率が重要であるようだ。すなわち水溶液中においてCdとL-cysteineを極端に差のないモル比率で、混合・生成したCd-L-cysteine錯体<sup>20,21)</sup>を動物に投与したところ、腎臓でのCdの取り込みと、その毒性のレベルはCd単独投与の場合と変わらない。それは投与されたCd錯体が生体内において、解離したためと考えられた<sup>22)</sup>。

実験1において、10  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , b.w. のCdに対して、1  $\text{mmol}/\text{kg}$ , b.w. 以下の量のL-cysteineを投与した場合、注射部位からのCdの移動は増加したものの、肝臓、腎臓でのCdの取り込みには、それほど影響はもたらさなかった。しかし、用量を増加して5  $\text{mmol}/\text{kg}$ , b.w. のL-cysteineを投与した場合、肝臓でのCdの取り込みは減少し、腎臓での著しい増加が認められた(表1)。この事実は、あるレベル以上の量のL-cysteineの投与が生体内でのCd-L-cysteine錯体の存在を可能にし、注射部位からのCdの移動を容易にし、腎臓での取り込みを増加させる条件として必要であることを示している。

一方、実験2において、L-cysteineの生体内での挙動に注目する。表2は実験2-(1)において<sup>35</sup>S-L-cysteine投与後の血液、腎臓、肝臓、心臓に含まれる<sup>35</sup>S濃度の経時変化を示したものであるが、L-cysteine単独投与とCdとL-cysteineとの同時投与を比較した場合、各臓器における<sup>35</sup>Sの挙動に差がないことを示した。すなわち、L-cysteineの投与量に比べて、低用量であるCdは、<sup>35</sup>Sの挙動に全く影響を与えなかった。

実験2-(2)において、単独あるいはCdと同時に投与した<sup>35</sup>S-L-cysteineの投与直後30分及び1時間の腎臓内における<sup>35</sup>Sのオートラジオグラフィーの結果は、同時に投与したCdが取り込まれる部位であるouter medullaのouter stripeにあるS<sub>3</sub>に特異的に取り込まれることを示し、<sup>35</sup>S-L-cysteineがS<sub>3</sub>に取り込まれる可能性を強く示唆するものである。従来、cysteinuriaについて数多くの報告があるものの、腎臓内でのネフロンにおけるcysteineの輸送について検討された報告は見当たらない。L-cysteine以外のアミノ酸でouter stripeのS<sub>3</sub>に取り込まれることが確認されている物質としてはmethionine<sup>23)</sup>, alanine<sup>24)</sup>, ethionine<sup>25)</sup>, di-iodo-tyrosine<sup>26)</sup>などがオートラジオグラフィーによって示され、さらにethionine<sup>25)</sup>, histamine<sup>27)</sup>は血液から、直接S<sub>3</sub>に取り込まれることが確認されている。これらのアミノ酸に共通する特徴などについては、腎生理学上、興味ある課題であるにもかかわらず、いまだ、よく分かっていない。

ここで再び実験2-(1)に戻って投与後のL-cysteineとCdの挙動を考察する。<sup>35</sup>S-L-cysteineは血液においては、投与直後より4時間後まで、 $2.1 \times 10^{-2} \mu\text{Ci}^{35}\text{S}/\text{g}$ のレベルで推移し、その後は徐々に減少する。一方、肝臓、腎臓は両者同じ濃度レベルで変動し、ともに投与直後の期間が最高濃度で、以後、血液の濃度の減少に伴って減少した。アミノ酸の取り込みの能力が大きいとは考えられない心臓は、ほとんど投与直後から低いレベルで変わらない。しかし、アミノ酸の再吸

取能力の高い腎臓においては、投与直後から血液中の $^{35}\text{S}$ の濃度に対応して高濃度を示した。当初からの急速な L-cysteine の腎近位尿細管の  $\text{S}_3$  での取り込みと、 $^{35}\text{S}$  の腎臓中濃度が次第に減少する現象を次のように考える。すなわち、L-cysteine あるいは Cd-L-cysteine の錯体は近位尿細管上皮細胞に取り込まれたあと、分解・代謝され、その代謝産物は $^{35}\text{S}$  でラベルされたものとあわせて尿細管腔より尿中に排出される。一方、血液中の L-cysteine 濃度は時間の経過とともに減少し、これに伴って  $\text{S}_3$  での L-cysteine の再吸収量も減少するであろう。従って、腎臓内に存在する $^{35}\text{S}$  の量は、 $\text{S}_3$  において取り込まれた $^{35}\text{S}$ -L-cysteine の分量から、分解代謝されて腎から排出された $^{35}\text{S}$  の分量を差し引いた量ということになる。結果的に、腎臓内での $^{35}\text{S}$  濃度は表 2のごとく当初から減衰するパターンを示すことになる。肝臓の $^{35}\text{S}$  濃度は腎臓と極めてよく似た挙動を示すが本論では議論しない。

一方、同時に投与された Cd の挙動であるが、実験 1 において同時投与された L-cysteine の量の増加に伴って、注射部位から移行する Cd の量が増加することが示された。さらに、この移行に関与する血液に含まれる Cd 量も cysteine の増加に伴って、増加することが確かめられた。未発表資料ではあるが、Cd 投与量を  $3 \mu\text{mols/kg}$  体重として L-cysteine の投与量を増加 ( $0.06, 0.3, 1.5, 5.0 \text{ mmols/kg}$  体重) してゆくと、投与 1 時間後の血液中の Cd 濃度が、Cd 単独投与時の血液中 Cd 濃度を 1 としたとき、 $1.0, 1.3, 2.5, 3.0$  というように上昇する<sup>28)</sup>。

生体は一般に Cd に暴露されると、取り込み速度に遅速はあるものの、一方的に、その腎臓中の Cd 濃度が増加してゆく。CdCl<sub>2</sub> 及び、Cd-metallothionein 投与の場合、腎近位尿細管上皮細胞に取り込まれた Cd は、細胞に以前から存在していた Zn-metallothionein あるいは新たに誘導生成された metallothionein の構成成分として細胞内にとどまり、尿中には排出され難い<sup>1)</sup>。この Cd-cysteine 錯体の場合においても、上皮細胞内に取り込まれた Cd は metallothionein の構成成分として上皮細胞内に貯留されるものと考えられる。 $10 \mu\text{mols/kg}$  体重の Cd と  $5 \text{ mmols/kg}$  体重の L-cysteine を同時投与した前報<sup>14)</sup>において、腎臓に Cd は急速に取り込まれ、投与 1 時間後に最高濃度の 70% に達し、以後緩慢に上昇して 2 時間後にほぼ最高の濃度に達した。このことは腎近位尿細管での Cd の取り込み速度が初めは大きく、時間の経過とともに減少したことを示す。

本報告の実験結果は、当初の期間、血液、腎臓中の $^{35}\text{S}$  濃度は高く、以後減少したのに対して、腎臓での Cd の取り込み速度は当初急こう配で、時間の経過とともに、こう配は鈍くなった。なお、血液中の Cd 濃度も当初は高く、以後は減少するものと推測される。したがって、血液中に存在するところの生成された Cd-L-cysteine 錯体の濃度も L-cysteine 濃度と同様に投与直後高く、時間の経過とともに減少する。さらに、これに対応して腎臓の近位尿細管上皮細胞の、この錯体の取り込み量は減少するが、蓄積された腎中 Cd 濃度は上昇するという機構の存在を推察させる。

以上のことから、生体内で生成されると推測される Cd-L-cysteine の錯体は、L-cysteine の生体内での挙動に伴って移動し、腎臓の outer stripe の  $\text{S}_3$  に取り込まれたものと考えられる。

謝 辞

本研究は佐野憲一技官（筑波大学・社会医学系）との共同研究によるものであり、考察において環境保健部、鈴木和夫博士が討論に加わったことを特に記す。

参 考 文 献

- 1) Webb, M. (1979) : The metallothioneins. *In* : The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium. M. Webb (*ed.*), Elsevier/North Holland, Amsterdam, 195-266.
- 2) Nordberg, G.F., R. Goyer and M. Nordberg (1975) : Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride in the mouse. *Arch. Pathol.*, **99**, 192-197.
- 3) Webb, M. and A.T. Etienne (1977) : Studies on the toxicity and metabolism of cadmium-thionein. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 25-30.
- 4) Fowler, B.A., H.S. Jones, H.W. Brown and J.K. Haseman (1975) : The morphologic effects of chronic cadmium administration on the renal vasculature of rats given low and normal calcium diets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **34**, 233-252.
- 5) Cherian, M.G. and R.A. Goyer (1976) : Cadmium-metallothionein induced nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**, 399-408.
- 6) Kawai, K., K. Fukuda and M. Kimura (1976) : Morphological alterations in experimental cadmium exposure with special reference to the onset of renal lesion. *In* : effects and dose-response relationships of toxic metals. G.F. Nordberg (*ed.*), Elsevier, Amsterdam, 343-370.
- 7) Murakami, M., K. Cain and M. Webb (1983) : Cadmium-metallothionein-induced nephropathy : A morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *J. Appl. Toxicol.*, **3**, 237-244.
- 8) Murakami, M., C. Tohyama, K. Sano, R. Kawamura and K. Kubota (1983) : Autoradiographical studies on the localization of metallothionein in proximal tubular cells of the rat kidney. *Arch. Toxicol.*, **53**, 185-192.
- 9) Tepperman, H.M. (1947) : The effect of BAL and BAL-glucoside therapy on the excretion and tissue distribution of injected cadmium. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **89**, 343-349.
- 10) Kennedy, A. (1968) : The effect of L-cysteine on the toxicity of cadmium. *Br. J. Exp. Pathol.*, **49**, 360-364.
- 11) Gunn, S.A., T.C. Gould and W.A.D. Anderson (1968 a) : Specificity in protection against lethality and testicular toxicity from cadmium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**, 591-595.
- 12) Gunn, S.A., T.C. Gould and W.A.D. Anderson (1968 b) : Selectivity of organ response to cadmium-injury and various protective measures. *J. Path. Bact.*, **96**, 89-96.
- 13) Lyle, W.H., J.N. Green, V. Gore and J. Vidler (1968) : Enhancement of cadmium nephrotoxicity by penicillamine in the rat. *Postgrad. Med. J. (Suppl.)*, 18-21.
- 14) Murakami, M. and M. Webb (1981) : A morphological and biochemical study of the effects of L-cysteine on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **62**, 115-130.
- 15) Thompson, R.H. and W.J. Blanchflower (1971) : Wet-ashing apparatus to prepare biological materials for atomic absorption spectrophotometry. *Lab. Practice*, **20**, 859-861.
- 16) Murakami, M., S. Suzuki, K. Hirosawa and H. Katsunuma (1977) : Renal distribution of <sup>109</sup>Cd by light and electron microscopic autoradiographies. *Ind. Health*, **15**, 149-158.
- 17) 村上正孝・河村涼子・鈴木和夫・久保田憲太郎 (1984) : Cd/システインまたはメタロチオネインの前

- 処理が両錯体の攻撃投与による Cd の腎毒性に及ぼす影響。日本衛生学雑誌, 39, 474.
- 18) 岸野信子・村上正孝・鈴木庄亮 (1975) : くり返し Cd 投与ラットにおける低分子蛋白尿出現と腎近位尿細管の形態的变化の時期的関係についての検討。第 48 回産業衛生学会講演集, 452.
  - 19) Kawai, K., Y. Kyono, T. Sakai and M. Murakami (1977) : Localization of cadmium in the renal cortex. *In* : Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, S.S. Brown (*ed.*), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 113-118.
  - 20) Lenz, G.R. and A.E. Martell (1964) : Metal chelates of some sulfur-containing amino acids. *Biochemistry*, 3, 745-750.
  - 21) Shindo, H. and T.L. Brown (1965) : Infrared spectra of complexes of L-cysteine and related compounds with zinc (II), Cadmium (II), Mercury (II) and Lead (II). *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1904-1909.
  - 22) McGivern, J. and J. Mason (1979) : The effect of chelation on the fate of intravenously administered cadmium in rats. *J. Comp. Path.*, 89, 1-9.
  - 23) Messier, B. and C.P. Leblond (1957) : Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 96, 7-10.
  - 24) Longley, J.B. (1969) : Histochemistry of the kidney. *In* : The kidney, C. Rouillet and E.F. Muller, (*eds.*), Academic Press, New York and London, 227-230.
  - 25) Klavins, J.V., T. Kinney, N. Kaufman and S. Davies (1962) : Deposition of iron in acid mucopolysaccharides in renal tubules and vessels after administration of ethionine. *Am. J. Clin. Path.*, 37, 168-175.
  - 26) Darmady, E.M., J. Durant, E. Mallhews and F. Stranack (1960) : Localization of  $^{131}\text{I}$ -Pitressin in the kidney by autoradiography. *Clin. Sci.*, 19, 229-241.
  - 27) Schwartz, J.C., Y. Cohen and G. Valette (1966) : Etude autoradiographique de la repartition de l'histamine- $^{14}\text{C}$  et de ses metabolites dans le rein de rat. *Biochem. Pharmacol.*, 15, 55-61.
  - 28) 村上正孝・佐野憲一 : 未発表資料.



## II-19 カドミウム/システイン又はメタロチオネインの前投与が 両錯体の攻撃投与によるカドミウム腎毒性に与える影響

### Effects of Pretreatment either with Cd/Cysteine or Metallothionein on Renal Toxicity of Cadmium Challenged with both Complexes

村上正孝<sup>1</sup>・鈴木和夫<sup>1,2</sup>・久保田憲太郎<sup>1</sup>

Masataka MURAKAMI<sup>1</sup>, Kazuo T. SUZUKI<sup>1,2</sup> and Kentaro KUBOTA<sup>1</sup>

#### 要 旨

動物に Cd と L-cysteine (Cd/cys) を同時に投与、あるいは Cd-metallothionein (Cd-MT) を投与した場合、Cd は前者では腎髄質の直近位尿管 (S<sub>3</sub>) 上皮に、後者では腎皮質の曲近位尿管 (S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>) 上皮に取り込まれ、上皮細胞に壊死病変が引き起こされる。そこで、病変を引き起こさない量の Cd/cys あるいは Cd-MT を前投与して Cd を S<sub>3</sub> あるいは S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub> に取り込ませ、24 時間後に、病変を引き起こす量の両 Cd 錯体を、それぞれ投与したところ、攻撃投与した両錯体の Cd は Cd/cys では S<sub>3</sub> に、Cd-MT では S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub> に取り込まれた。その Cd の腎蓄積量は前投与と攻撃投与の相加、あるいは、それ以上の効果で増加した。特に Cd-MT を攻撃投与したとき、相加作用以上の取り込み効果を示した。一方、病変は前投与として、いずれの Cd 錯体であれ、攻撃投与で生ずる腎病巣の領域、すなわち Cd/cys では腎髄質にある S<sub>3</sub>、Cd-MT では腎皮質にある S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub> に限られた。しかし病巣の範囲は前投与なしに単独投与で起こされた病巣と比較して、より限局され、縮小されており、病変の程度も核の消失した著明な壊死病変から、核濃縮を伴った壊死あるいは変性病変のレベルに軽減されていた。

#### Abstract

Renal distributions of <sup>109</sup>Cd-cysteine (cys) and <sup>109</sup>Cd-metallothionein (Cd-MT) have been studied morphologically and autoradiographically with special reference to the site specific damage of the segment of proximal tubules. In the kidney of rats administered simultaneously with 10 μmols Cd/kg, b.w., s. c. and 5 mmols cys/kg, i. p., the lesion and <sup>109</sup>Cd were located mainly in the S<sub>3</sub> segment of the outer stripe of outer medulla<sup>1)</sup>. On the other hand, <sup>109</sup>Cd was confined to the damaged S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub> segment throughout the cortex in the case of 7 μmols <sup>109</sup>Cd-MT/kg, b.w., i.v.<sup>2)</sup>. Effects of

- 
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 現在：国立公害研究所 環境保健部  
Present address: Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies.

pretreatment either with non-toxic dose of Cd/cys ( $3\mu\text{mol}$ s Cd +  $1.5\text{mmol}$ s cysteine) or that of Cd-MT ( $0.5\mu\text{mol}$ s) on the renal distribution of Cd as well as the lesion induced with a toxic dose of Cd/cys ( $7\mu\text{mol}$ s Cd and  $3.5\text{mmol}$ s cys) or that of Cd-MT ( $2.7\mu\text{mol}$ s) were investigated.

The present studies revealed that the ratio of  $^{109}\text{Cd}$  concentration of medulla to one of cortex was different between  $^{109}\text{Cd}$ /cys administration and  $^{109}\text{Cd}$ -MT. The former was twice higher than the latter. Irrespective as to whether rats were pretreated with none, Cd/cys or Cd-MT, the  $^{109}\text{Cd}$  ratios by challenge with  $^{109}\text{Cd}$ /cys were similar among different pretreatment groups. The challenge with  $^{109}\text{Cd}$ -MT also showed almost the same ratio regardless of the above pretreatment types. It is suggested that any pretreatments with different Cd-complexes did not affect on the renal distributions of the challenged  $^{109}\text{Cd}$ /cys and  $^{109}\text{Cd}$ -MT. When administered singly with either Cd/cys or Cd-MT, Cd concentrations in the kidneys of highly dosed animals did not increase in proportion to their administered doses. The group challenged with a low dose of Cd/cys or Cd-MT after pretreatment with Cd/cys or Cd-MT increased additively in renal Cd concentration. On the other hand, the renal Cd concentrations in the challenged high dose groups increased, more than the sum of Cd uptake expected from the results of single treatments. The administration with  $7\mu\text{mol}$ s Cd/cys alone and  $2.7\mu\text{mol}$ s Cd-MT alone caused the proximal tubular necrosis without nuclei throughout the outer stripe of medulla and the cortex, respectively. On the other hand, when challenged with  $7\mu\text{mol}$ s Cd/cys after non-toxic dose of  $3\mu\text{mol}$ s Cd/cys, the morphological change of the proximal tubular epithelia was limited to necrosis with pyknotic nuclei throughout the outer stripe. When pretreated with non-toxic dose of  $0.5\mu\text{mol}$ s Cd-MT, the challenge of  $7\mu\text{mol}$ s Cd/cys induced the same degree of lesion in the outer stripe as mentioned above with the lack of changes in other renal areas. A challenge with  $2.7\mu\text{mol}$ s Cd-MT after  $0.5\mu\text{mol}$ s Cd-MT, the lesion was reduced to the area around the arciform artery and subcapsular part in the cortex, in which proximal tubules were necrosed with pyknotic nuclei or degeneration. The challenge with  $2.7\mu\text{mol}$ s Cd-MT after  $3\mu\text{mol}$ s Cd/cys, induced the same lesion as occurred in the pretreatment with  $0.5\mu\text{mol}$ s Cd-MT.

These findings suggested that pretreatment either with Cd/cys or Cd-MT permits the proximal tubular epithelia to obtain the capacity of resistance against the challenged Cd-complexes regardless of the renal different distribution of Cd between Cd/cys and Cd-MT.

## 1 はじめに

動物に Cd とキレート物質である L-cysteine を同時投与した場合、あるいは Cd-metallothionein を投与した場合、投与された Cd は前者においては腎臓組織の髄質、outer medulla の outer stripe にある直近位尿細管 ( $S_3$ ) に<sup>1)</sup>、後者においては皮質、cortex の曲近位尿細管 ( $S_1 + S_2$ ) に特異的に取り込まれ<sup>2)</sup>、しかも Cd を集中的に取り込んだ近位尿細管上皮細胞に病変的变化が生ずることが認められている<sup>1,2)</sup>。

そこで、あらかじめ、Cd-cysteineあるいはCd-metallothioneinなどのCd錯体を投与しておいてCdをそれぞれ、outer stripe及びcortexの近位尿細管上皮に取り込ませ、その後で、Cd-cysteineあるいはCd-metallothioneinを投与したとき、攻撃投与したCd錯体の腎組織内での分布がどう変わるか。病巣の局在部位、病変の進展にどのような影響を及ぼすか。この疑問を確かめるために、以下の実験を行った。

## 2 方法

動物はWistar系ラットの雌で5週齢(100g)。前投与の処置として、CdとL-cysteineとの同時投与(Cd/cysと略す)あるいはCd-metallothionein(Cd-MTと略す)を投与する。Cd/cys(3)はCdとして $3\mu\text{mols/kg, b. w.}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 水溶液(1.0ml/kg, b. w.)を右後肢大腿部皮下に注射し、引き続き調整直後のL-cysteine 1.5mmols/kg, b. w., 水溶液(10.0ml/kg, b. w.)を腹腔内に注射する。一方、Cd-MT(0.5)はCd中毒ラット肝より得たものであるが<sup>3)</sup>、その0.5 $\mu\text{mols/kg, b. w.}$ を腹腔内に注射する。Cd/cys(3)及びCd-MT(0.5)はいずれも投与24時間後に腎病変が生じない投与量である。それぞれのCd錯体を投与24時間後に、Cd/cys(3)あるいはCd/cys(7)(すなわち7 $\mu\text{mols Cd/kg, b. w.}$ , s. c.と3.5mmols cysteine/kg, b. w., i. p.)をそれぞれ攻撃投与する。あるいは攻撃投与のCd/cysの代わりにCd-MT(0.5)又はCd-MT(2.7)(すなわち2.7 $\mu\text{mols Cd-MT/kg, b. w.}$ , i. p.)を攻撃投与する。このCd/cys(7)及びCd-MT(2.7)の投与量は明らかに24時間後に腎病変を引き起こす量である。これらの攻撃投与24時間後にラットを麻酔して腎臓を摘出し、右腎を湿式灰化、原子吸光法<sup>4)</sup>にて、そのCd量を測定した。一方、左腎はホルマリン固定、パラフィン包埋、H-E染色して光学顕微鏡的観察を行った。

実験群は次に示す15群からなり、各群5匹である。実験は、Cd/cys(I)、Cd-MT(II)そしてCd(VII)をそれぞれ単独に投与したときの、Cdの腎中濃度、腎内分布及び病変を観察するための実験と、この結果をふまえて、さらにCd/cys(III, V)あるいはCd-MT(IV, VI)を攻撃投与したときの結果を知るための実験から構成されている。

### I Cd/cys 単独投与群

- (1) Cd/cys(3) : 3 $\mu\text{mols Cd}$ , 1.5mmols cys/kg, b. w.
- (2) Cd/cys(7) : 7 $\mu\text{mols Cd}$ , 3.5mmols cys/kg, b. w.

### II Cd-MT 単独投与群

- (3) Cd-MT(0.5) : 0.5 $\mu\text{mols Cd-MT/kg, b. w.}$
- (4) Cd-MT(2.7) : 2.7 $\mu\text{mols Cd-MT/kg, b. w.}$

### III Cd/cys 前投与+ Cd/cys 攻撃投与群

- (5) Cd/cys(3)+Cd/cys(3)
- (6) Cd/cys(3)+Cd/cys(7)

IV Cd/cys 前投与 + Cd-MT 攻撃投与群

(7) Cd/cys(3) + Cd-MT(0.5)

(8) Cd/cys(3) + Cd-MT(2.7)

V Cd-MT 前投与 + Cd/cys 攻撃投与群

(9) Cd-MT(0.5) + Cd/cys(3)

(10) Cd-MT(0.5) + Cd/cys(7)

VI Cd-MT 前投与 + Cd-MT 攻撃投与群

(11) Cd-MT(0.5) + Cd-MT(0.5)

(12) Cd-MT(0.5) + Cd-MT(2.7)

VII Cd 単独投与群

(13) 3  $\mu$ mol Cd/kg, b.w., 1.0 ml 水溶液/kg, b.w., s.c.

(14) 7  $\mu$ mol Cd/kg, b.w., 1.0 ml 水溶液/kg, b.w., s.c.

VIII(15) 無処置群

一方、攻撃投与した Cd 錯体による Cd の腎臓内での分布を知るために、実験群(1), (3), (5), (7), (9)及び(11)において攻撃投与する Cd 錯体の Cd 溶液のなかに、Cd/cys(3)には、比放射能 83.3  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Cd, Cd-MT(0.5)には、500  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Cd の<sup>109</sup>Cd が加えられた。これらのラットは単独投与後、あるいは攻撃投与後 24 時間を経てエーテル麻醉し、腎臓を摘出し、中央で横断、2 分したあと、固定液 (2.5% glutaraldehyde, 0.5% tannic acid, 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) を用いて 24 時間、固定後、前述の断面を断端とする厚さ約 1 mm の切片を 2 枚切り出し、低倍率の顕微鏡下において、図 1 に示すように、弓状動脈 (arciform arteries) を境界として、腎皮質 (cortex) (6.3 $\pm$ 1.8 mg) と腎髄質 (medulla) (19.0 $\pm$ 4.3 mg) に相当するブロックを切り出した。その重量は括弧内に示されている。この medulla のブロックは outer medulla の outer stripe と inner stripe 及び inner medulla から構成されている。なお、固定液への組織からの<sup>109</sup>Cd の流出分は、約 2.4~5.0% であり、固定前の<sup>109</sup>Cd の腎臓内での分布を知るために、ほとんど無視できる量であった。なお、<sup>109</sup>Cd は、LKB wallac の 1282 Compu Gamma で測定した。

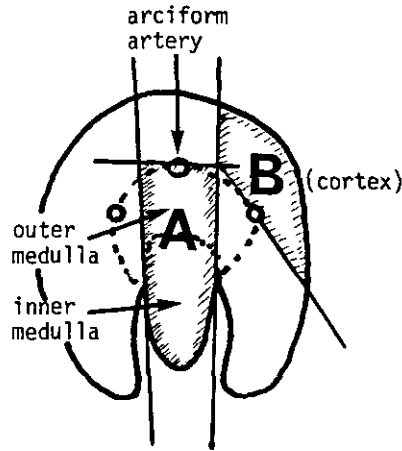


図 1 腎臓組織中 $^{109}\text{Cd}$ 測定のための皮質と髄質の切り出し方法

Fig. 1 Method to separate the cortical tissue and the medullary tissue from the whole kidney

攻撃投与された両錯体の $^{109}\text{Cd}$ の腎臓組織内での分布傾向を知るために、腎臓の水平断切片を図に示すごとく、弓状動脈(arciform artery)を境界として、皮質部分(B, cortex)と髄質部分(A, medulla)のブロックに顕微鏡下で切り分け、各々に含まれる $^{109}\text{Cd}$ の濃度を測定した。Bに対するAの濃度比、すなわち

$$\text{The Ratio of } \frac{^{109}\text{Cd Concentration of Medulla (A)}}{^{109}\text{Cd Concentration of Cortex (B)}}$$

をもって $^{109}\text{Cd}$ の腎臓内分布の指標とした。

### 3 結果と考察

先に報告したオートラジオグラフィーを用いての実験。すなわち、図2に示すように $^{109}\text{Cd}$ -metallothionein投与後の $^{109}\text{Cd}$ あるいは $^{125}\text{I}$ -metallothionein投与後の $^{125}\text{I}$ <sup>5)</sup>(図3)はcortexに分布するのに対して、 $^{109}\text{Cd}$ -cysteine投与後の $^{109}\text{Cd}$ (図4)はouter medullaのouter stripeに特異的に局在し<sup>1)</sup>、Cdの結合する錯体によってCdは異なる腎臓内分布パターンを示すことが明らかとなっている。

本実験で用いられた腎臓ブロックの作製法において、cortexとouter stripeの部分を腎臓からブロックとして完全に分離することが可能ならば、その結果は上述のオートラジオグラフィーで示されたように、両者の濃度が明らかに異なるデータが得られるはずである。しかし、outer medullaのouter stripeにおいて、その一部であるmedullary rayがarciform arteryより腎皮膜方向に突出して存在すること、また、outer stripeとinner stripeの境界が無染色の固定組織では不明りょうであることから分離に正確が期待し難い。この点を克服するためにmedullaに相当するブロックにはouter medullaのouter stripeの大部分と、あえてCdの取り込み量の極度に少ないouter medullaのinner stripeとpapilla tipを含むinner medullaを含ませることにした。このような

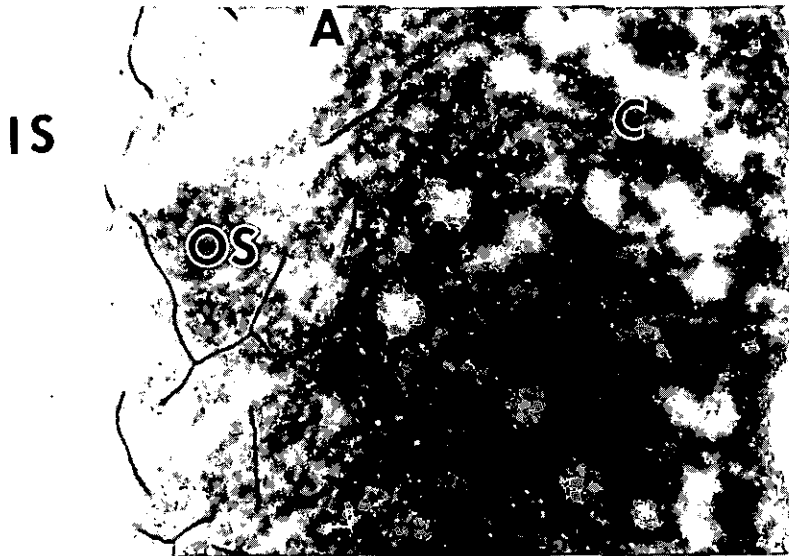


図 2  $^{109}\text{Cd}$  を標識した metallothionein を投与後 7 時間の腎切片のオートラジオグラフィ<sup>2)</sup>

Fig. 2 Autoradiograph of Epon-embedded section of the kidney at 7 h after the injection of Cd-MT ( $195\mu\text{Ci}/\mu\text{g Cd}$ ,  $0.8\text{ mg Cd-metallothionein/kg, b.w.}$ )<sup>2)</sup> Cd は腎皮質 (C) の曲近位尿細管に集中し、腎髄質の outer stripe (OS) にある直近位尿細管にはわずかに存在するが、近位尿細管のない腎髄質の inner stripe (IS) 及び弓状動脈 (A) には Cd は認められなかった。×60

便宜的方法によっても、使用する RI 量がオートラジオグラフィに比較して著しく少量で足りること、その結果、実験に供する動物数が多くデータを統計的に処理できるという利点がある。

このようにして分離された腎組織中の $^{109}\text{Cd}$ 直接測定法によって、cortexとmedulla組織中の $^{109}\text{Cd}$ の濃度を計算し、その濃度比率が表 1 に示されている。Cd/cys(3)を単独投与して 24 時間後の $^{109}\text{Cd}$ の腎臓内での分布は、Cd-MT(0.5)単独投与の場合に比較して、cortex に対する medulla の $^{109}\text{Cd}$ の濃度比率が 2 倍も高いことが示された。このことは Cd/cys(3)単独投与の場合、Cd-MT(0.5)単独投与の場合と比べて、Cd は medulla の、特に outer stripe に取り込まれる割合が増加することを示唆している。

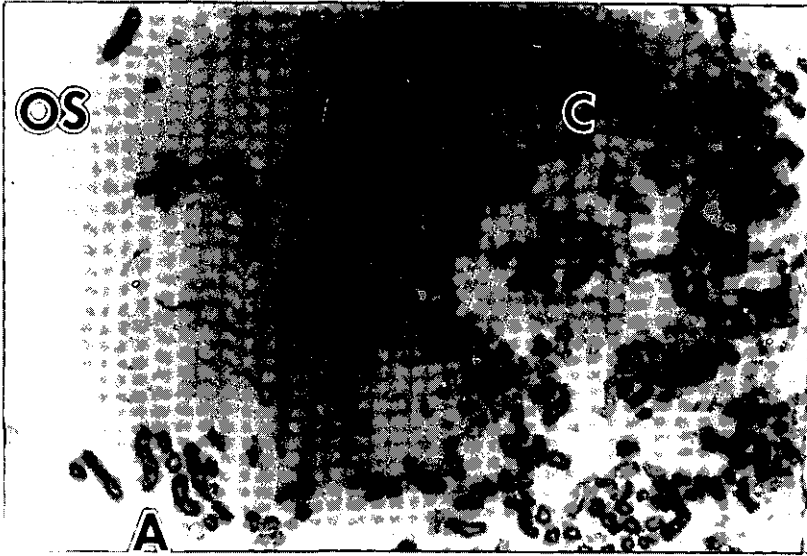


図 3  $^{125}\text{I}$  を標識した metallothionein を投与後 30 分の腎切片のオートラジオグラフィ<sup>5)</sup>

Fig. 3 Autoradiograph of Epon-embedded section of the kidney at 30 min after the injection of  $^{125}\text{I}$ -metallothionein [ $29\mu\text{g}$  metallothionein ( $710\mu\text{Ci}$ )/kg, b.w.]<sup>5)</sup>  
 $^{125}\text{I}$  は、腎皮質 (C) の曲近位尿細管に認められたが、腎髄質の outer stripe (OS) 及び inner stripe (IS) には認められなかった。なお、曲近位尿細管の管腔には $^{125}\text{I}$  は存在していなかった。×60

一方、Cd/cys(3)あるいはCd-MT(0.5)を前投与後、 $^{109}\text{Cd}$ -MTを攻撃投与した場合、 $^{109}\text{Cd}$ のcortexに対するmedullaの濃度比率は $^{109}\text{Cd}$ -MT単独投与の場合と同じ比率であった。ちなみに、この3群の比率について分散分析を行うと、有意水準1%で有意の差が認められなかった。一方、Cd/cys(3)を攻撃投与した場合、前投与としてCd/cys(3)あるいはCd-MT(0.5)を処置しても、Cd/cys(3)単独投与に比べて、その比率はやや低いものの、傾向としては同じレベルであった。ちなみに、この3群の比率についての分散分析の結果、有意水準1%で、有意の差は認められなかった。この事実はCd/cys(3)あるいはCd-MT(0.5)などのCd-錯体の前処置が攻撃投与される両錯体の $^{109}\text{Cd}$ の腎臓内での分布に、ほとんど影響を与えないことを意味する。

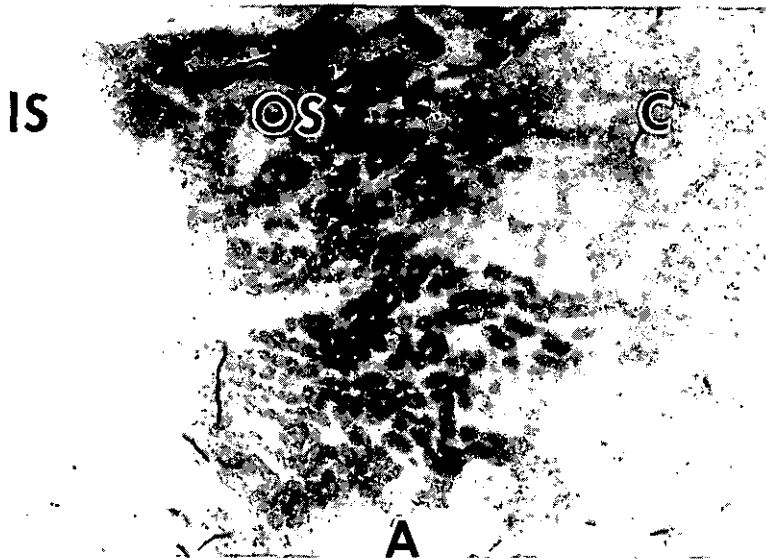


図 4  $^{109}\text{Cd}$  と L-cysteine を同時投与後 4 時間の腎切片のオートラジオグラフィ<sup>1)</sup>

Fig. 4 Autoradiograph of Epon-embedded section of the kidney at 4 hours after the injection of  $^{109}\text{Cd}$  ( $90.5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol CdCl}_2$ ,  $10\mu\text{mol Cd/kg, b.w.}$ ) and L-cysteine ( $5\text{ mmols/kg, b.w.}$ )<sup>1)</sup>

Cd は腎髄質の outer stripe (OS) にある直近位尿細管に集中し、腎皮質 (C) の曲近位尿細管には、ごくわずかしが認められず、さらに近位尿細管のない腎髄質の inner stripe (IS) には全く認められなかった。×60

表1には各実験群において腎臓内に取り込まれたCd濃度が示されている。Cd/cysあるいはCd-MTを単独に投与した場合、それぞれ、その投与量が増加しても、単純に腎臓内のCdが相加的に増加するというわけにはいかなかった。しかしながら、前投与に加えて攻撃投与した場合は、単独に投与した場合と結果が明らかに異なっている。すなわち、両錯体を前投与してCd/cys(3)、Cd/cys(7)あるいはCd-MT(0.5)を投与すると、その腎臓中のCd量は前投与で蓄積されたCd量に加えて、攻撃投与で与えられた量のCd錯体が単独投与されたときに蓄積される量のCdが加算されたものとして示された。他方、両錯体を前投与して、Cd-MT(2.7)を投与すると、Cd-MT(2.7)単独に投与されたときの腎蓄積量の約2倍量と前投与で蓄積された量を加算した値を示した。このことは、Cdの腎臓での取り込みに関して、前投与、攻撃投与の2回の処置は、相加作用あるいはそれ以上の効果をもたらすことを意味している。



表 1 腎中Cd濃度, 攻撃投与<sup>109</sup>Cdの腎内分布及び病巣の腎臓内分布と病変の程度

Table 1 Cd concentration and distribution in the kidney and the grade of renal damage

Treatment	Renal Cd concentration	Cortex	Medulla <sup>e</sup>		Ratio of medulla/cortex
			Outer Stripe	Inner Stripe	
Cd/Cys(3) <sup>a</sup> alone	7.1±0.4 <sup>b</sup> (3) <sup>c</sup>	—	—	—	0.175±0.007 <sup>d</sup> (3) <sup>e</sup>
Cd/Cys(7) alone	10.5±1.2 (4)	—	++	—	
Cd-MT(0.5) alone	3.9±0.2 (5)	—	—	—	0.073±0.018 (4)
Cd-MT(2.7) alone	6.7±0.7 (5)	++	—	—	
Cd/Cys(3)+Cd/Cys(3)	11.7±1.5 (4)	—	—	—	0.130±0.027 (5)
Cd/Cys(3)+Cd/Cys(7)	21.1±1.0 (3)	—	+	—	
Cd/Cys(3)+Cd-MT(0.5)	10.8±1.3 (4)	—	—	—	0.061±0.008 (4)
Cd/Cys(3)+Cd-MT(2.7)	22.8±3.1 (5)	+	—	—	
Cd-MT(0.5)+Cd/Cys(3)	9.4±1.8 (5)	—	—	—	0.114±0.020 (4)
Cd-MT(0.5)+Cd/Cys(7)	17.5±1.2 (5)	—	+	—	
Cd-MT(0.5)+Cd-MT(0.5)	7.7±0.3 (4)	—	—	—	0.067±0.015 (4)
Cd-MT(0.5)+Cd-MT(2.7)	16.1±3.4 (4)	+	—	—	
Cd(3) alone	0.7±0.1 (5)	—	—	—	
Cd(7) alone	1.7±0.2 (5)	—	—	—	
Control	N.D. (5)	—	—	—	

Cd/cys: Cd/cysteine. Cd-MT: Cd-metallothionein. a)  $\mu\text{mols/kg}$  体重 b)  $\mu\text{g/g}$  腎湿重量 c) 実験動物数 d) 腎髄質中の<sup>109</sup>Cd濃度/腎皮質中の<sup>109</sup>Cd濃度 e) 腎病変の程度: (—) 近位尿管上皮は全く病変なし。(+) 一部の近位尿管上皮細胞に核濃縮を伴った壊死病変を認める。その上皮細胞の一部は核の消失したものが散見する。(++) すべての近位尿管上皮細胞に核消失を伴った壊死病変を認める。

さて、病理学的的所見についてであるが、Cd/cys(7)単独(第(2)群, 図5)あるいはCd-MT(2.7)単独(第(4)群, 図6)投与24時間後において、前者はouter medullaのouter stripeに、後者ではcortexにそれぞれ存在する近位尿管上皮細胞が決定的な壊死に陥り、病巣の腎組織における局在部位は明らかに異なっていた。ところが、Cd/cys(3)の前投与後、Cd/cys(7)を攻撃投与する(第(6)群, 図7)と病変はCd/cys(7)単独に比べてouter stripeの病巣範囲が縮少し、病巣にある近位尿管上皮細胞は、Cd/cys(7)では核も認められないほどの壊死を起こしたのに対して、核濃縮を伴った壊死へと病変が軽減した。他方、Cd-MT(0.5)の前投与後に、Cd/cys(7)を攻撃投与(第(10)群, 図8)した場合においても、同様に病巣の縮少と壊死病変の軽減がouter stripeにおいて認められた。一方、Cd-MT(0.5)を前投与後にCd-MT(2.7)を攻撃投与(第(12)群, 図9)した場合、病巣部位はCd-MT(2.7)単独ではcortex全域が病巣であったのに対して、arciform arteries周辺及び腎皮膜直下のcortexに限局され、病巣部位の近位尿管上皮

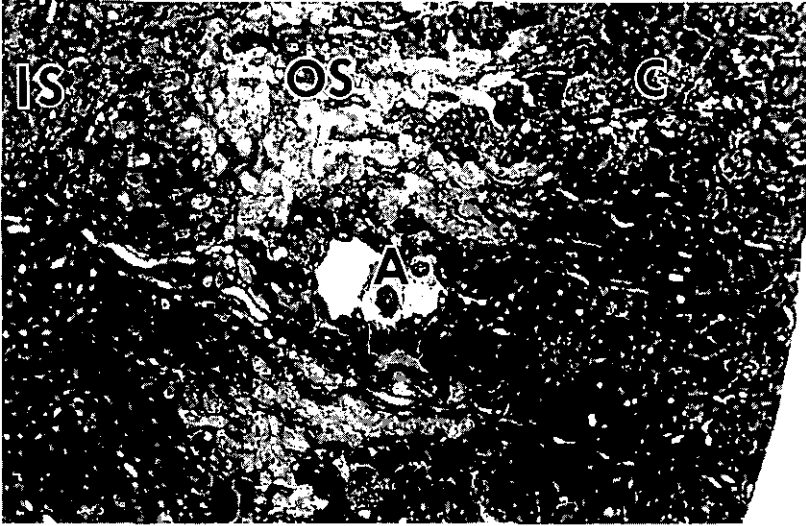


図 5 Cd/cys (7) 単独投与の腎病変

Fig. 5 Section of the kidney treated with Cd/cys (7) alone

腎髄質にある outer stripe (OS) の直近位尿細管上皮細胞は核が全く消失するほどの壊死を起こしている。一方、腎皮質 (C) にある近位尿細管は病変がみられない。H-E 染色。×60

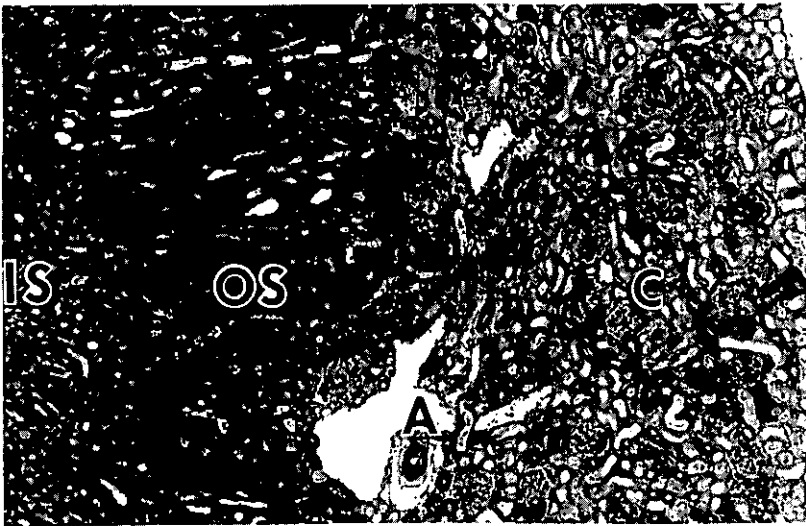


図 6 Cd-MT (2.7) 単独投与の腎病変

Fig. 6 Section of the kidney treated with Cd-MT (2.7) alone

腎皮質 (C) にある曲近位尿細管上皮細胞は核が全く消失するほどの壊死をおこしている。一方、腎髄質にある outer stripe (OS) にある近位尿細管は病変がみられない。H-E 染色。×60

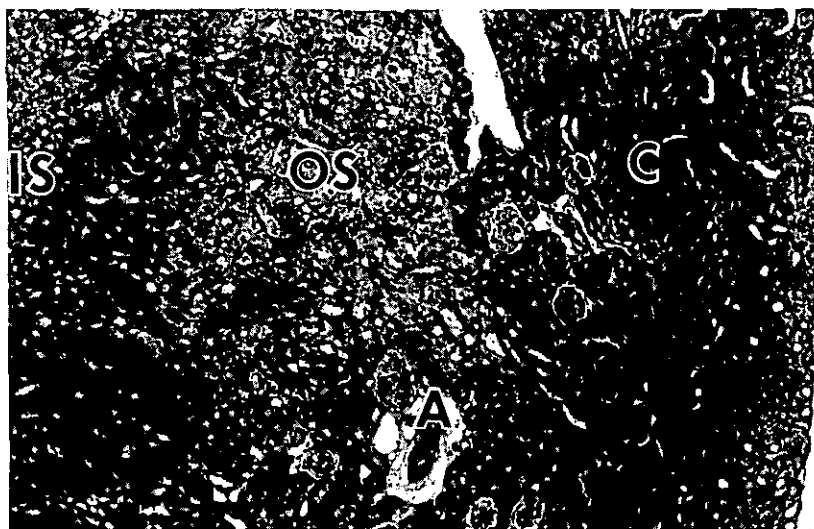


図 7 Cd/cys (3) + Cd/cys (7) 投与の腎病変

Fig. 7 Section of the kidney treated with Cd/cys (3) + Cd/cys (7)

Cd/cys (3) + Cd/cys (7) 図7, Cd-MT (0.5) + Cd/cys (7) 図8 両実験群ともに、腎髄質の outer stripe (OS) にある直近位尿細管上皮細胞が核濃縮を伴った壊死におちいっているが、Cd/cys (7) 単独投与 (図5) に比較して、明らかに病変が軽減している。皮質 (C)、腎髄質の inner stripe (IS) などには病変は認められない。H-E 染色。× 60

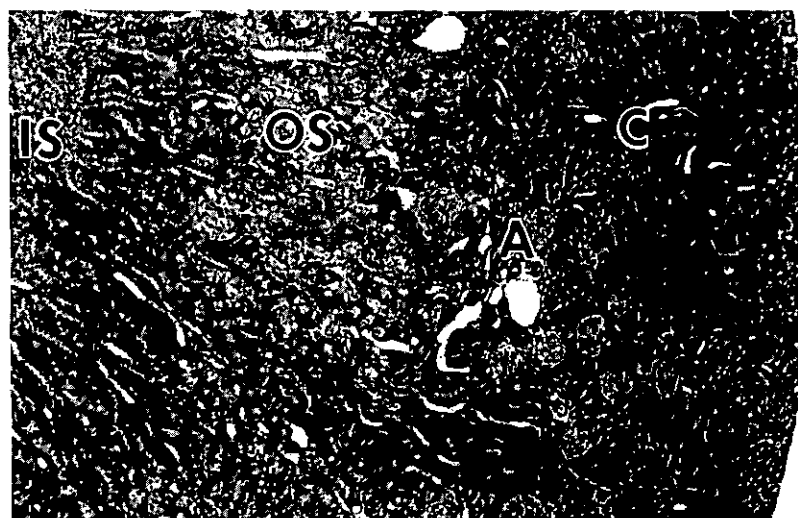


図 8 Cd-MT (0.5) + Cd/cys (7) 投与の腎病変

Fig. 8 Section of the kidney treated with Cd-MT (0.5) + Cd/cys (7)

H-E 染色。× 60

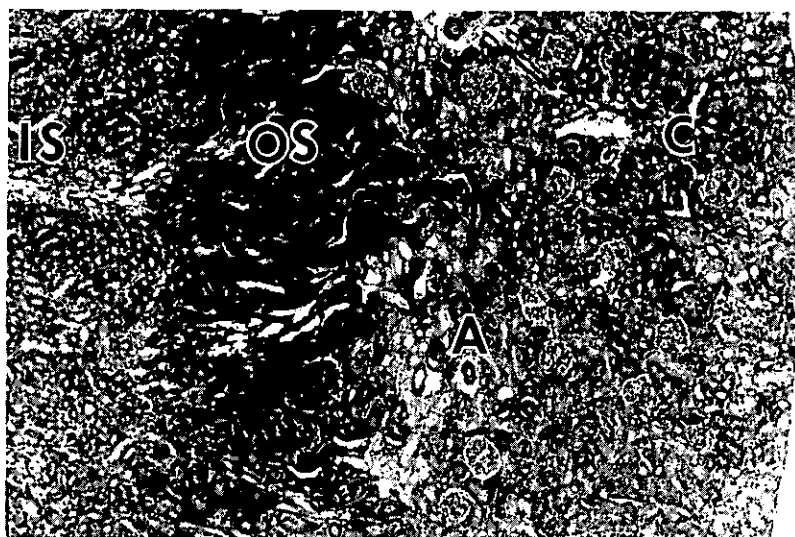


図 9 Cd-MT (0.5) + Cd-MT (2.7) 投与の腎病変

Fig. 9 Section of the kidney treated with Cd-MT (0.5) + Cd-MT (2.7)

Cd-MT(0.5) + Cd-MT (2.7) (図9), Cd/cys (3) + Cd-MT (2.7) (図10) 両実験群ともに、病巣は腎皮質にある弓状動脈周辺及び腎皮膜直下の曲近位尿細管上皮に限局され、その上皮の病変は核濃縮を伴った壊死あるいは変性病変へと Cd-MT (2.7) 単独投与 (図6) に比較して軽減している。腎髄質には病変は認められない。H-E 染色。×60

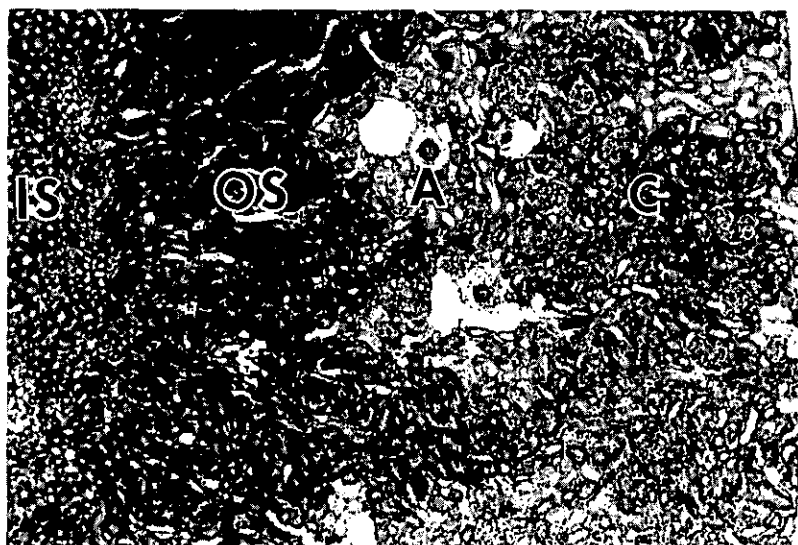


図 10 Cd/cys (3) + Cd-MT (2.7) 投与の腎病変

Fig.10 Section of the kidney treated with Cd/cys (3) + Cd-MT (2.7)

H-E 染色。×60

細胞は核濃縮を伴った壊死あるいは変性へと病変が軽減されていた。さらに Cd/cys(3)前投与後、Cd-MT(2.7)攻撃投与(第(8)群, 図10)の場合においても同様の効果が認められた。

このようにすべての組み合わせ条件において、病変が軽減される事実は実験前においては予想されなかった。すなわち、同種のCd錯体による攻撃投与(第(6), (12)群)の結果、腎病巣が縮小し病変が軽減したことは、前投与、攻撃投与によるCd錯体が腎組織の同一部位に取り込まれることから理解できることである。しかし異種のCd錯体による攻撃投与に際して、同種の場合と同様のレベルで腎病巣が縮小し、病変が軽減することは、それぞれのCd錯体の取り込まれる腎組織の領域が異なることから予想できなかった。

この現象の解釈として、異種のCd錯体の攻撃投与の場合においても、同種のCd錯体の攻撃投与の場合と同様のレベルで腎臓中のCd濃度が上昇するという事実から、この攻撃投与のCd錯体によって運ばれるCdを取り込むだけの用意が、攻撃投与のCd/cys(第(10)群)あるいはCd-MT(第(8)群)を処置する以前に、既に前者においてはouter medullaのouter stripeにある直近位尿細管上皮細胞に、後者ではcortexにある曲近位尿細管上皮細胞に準備されていたと考えられる。

その準備とは、攻撃投与の後に細胞内に取り込まれたCd錯体由来のCdが錯体から解離してCdイオンとして存在しないように無毒化する耐性能力を、標的となる近位尿細管上皮細胞に与えたことを意味している。

すなわち、直接の確認は今後の問題として残されているが、攻撃投与されたCd錯体のCdを取り込んで解毒するのに十分な量のmetallothioneinが新たに生成されたものと推測される。なお、このmetallothioneinの局在については方法論を含めて目下、検討中である。

## 謝 辞

本実験は佐野憲一技官(筑波大・社会医学系)並びに故河村凉子博士との共同研究によってなされたものである。

なお、本実験材料の検索に当たって、その熟練した技術によって協力された 沢田美子氏に深く感謝いたします。

## 引 用 文 献

- 1) Murakami, M. and M. Webb (1981): A morphological and biochemical study of the effects of L-cysteine on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium. *Brit. J. Exp. Path.*, **62**, 115-130.
- 2) Murakami, M., K. Cain and M. Webb (1983): Cadmium-metallothionein-induced nephropathy: A morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *J. Appl. Toxicol.*, **3**, 237-244.
- 3) Suzuki, K.T., S. Takenaka and K. Kubota (1979): Fate and comparative toxicity of metallothioneins with differing Cd/Zn ratio in rat kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 85-95.

- 4) Thompson, R.H. and W.J. Blanchflower (1971) : Wet-ashing apparatus to prepare biological materials for atomic absorption spectrophotometry. *Lab. Practice*, **20**,859.
- 5) Murakami, M., C. Tohyama, K. Sano, R. Kawamura and K. Kubota (1983) : Autoradiographical studies on the localization of metallothionein in proximal tubular cells of the rat kidney. *Arch. Toxicol.*, **53**, 185-192.

II-20

## 重水による水代謝異常検査手法の検討

### —カドミウム暴露動物による実験—

## A Study on Body Water Balance of Rats Exposed to Cadmium Using Heavy Water

松本 理<sup>1</sup>・太田庸起子<sup>1</sup>

Michi MATSUMOTO<sup>1</sup> and Yukiko OHTA<sup>1</sup>

#### 要 旨

カドミウムを投与したラットを使用して、重水のトレーサ利用による水代謝異常検査手法の検討を行った。カドミウム投与により体重増加の停止、臓器の肥大、臓器へのカドミウムの蓄積及び腎近位尿細管上皮の変性が観察された。カドミウム投与後重水を投与し、4日間にわたって一日尿を採取した。尿中の重水濃度は疎水性白金触媒カラムと TCD 付ガスクロマトグラフを組み合わせた重水分析計により測定し、全体水分量、水の代謝回転率及び生物学的半減期を計算により求めた。カドミウム投与群では対照群に比べて全体水分量の増加が観察されたが、半減期は両群で差がなかった。

#### Abstract

The body water balance was studied by tracer technique using heavy water. The purpose of this study was to develop methods for precise measurement of body water balance when renal function was disordered by exogeneous toxic metals. In this study we especially dealt with the toxicity of cadmium.

The experiment was performed using rats exposed to cadmium, and the slight histological changes were observed in the renal tubular epithelium of the rats. Heavy water (99.8 atom% D<sub>2</sub>O) was administered to the rats by subcutaneous injection after cadmium exposure, and the urine was collected from the cadmium-exposed rats and the control rats every 24 hours for four days.

The urine samples were purified by pseudo-sublimation. The concentration of heavy water in urine was measured with a heavy water-analyzer, which is a TCD-gas chromatograph connected with a hydrophobic platinum catalyst column, and the amounts of total body water were obtained. The turnover rate and the biological half-life of water were also calculated.

In the cadmium-exposed group the amounts of total body water were larger than

---

1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

in the control group, however, there was no significant difference of the biological half-life of water in both groups.

## 1 はじめに

急性糸球体腎炎, ネフローゼ症候群などの腎疾患や, 心不全, 肝硬変など多くの疾患における浮腫, あるいは腎不全, 尿崩症, ファンコニー症候群などにおける脱水症といった病的な水分代謝異常は臨床上しばしばみられる症状である。体液のバランス異常は全身症状を引き起こし, 重篤時には死にもつながる。これらの水分代謝の状態は尿検査, 腎機能検査, 血液検査, 排せつ・分泌液の検査及び体液量の直接測定などによって把握することができる。一般には尿量・尿比重・血液 Ht 値の検査と患者の臨床症状を考え合わせれば水分の過不足の程度を判定することができるが, 体液量の測定を行えばさらに精密な判定をすることが可能である。

体液は細胞内液と細胞外液に分けることができ, 細胞外液はさらに主として血漿と組織間液に分けられる。全体水分量, 細胞外液量, 及び循環血漿量の測定を行えば体液の量的分布の変動を知ることができる。各体液区画の測定はそれぞれ適当な指示薬を用い希釈法により行う。用いた指示薬により分布空間が多少異なるため, 測定値に差があることが知られている<sup>1)</sup>。全体水分量の測定には生体の全水分中に分布し, 体内で変化したり選択的に排せつされたりすることのない物質を用いることが理想的であり, 重水 ( $D_2O$ ), tritium oxide ( $T_2O$ ,  $THO$ ), アンチピリン, NAAP (N-acetyl-4-aminoantipyrine) などが用いられる。Hevesy ら<sup>2)</sup>が重水を用いて全体水分量の測定を行ってから種々の指示薬を用いての希釈法による測定<sup>3-7)</sup>が行われているが, 一般には測定が簡便で特殊な装置, 設備等を要しない NAAP が多く使われてきた。しかし厳密な意味では生体に最初から存在する水と同等である  $D_2O$  や  $T_2O$ ,  $THO$  が望ましい。 $T_2O$ ,  $THO$  は放射性の標識化合物であるため, 高価で, 使用, 測定に関して特殊な設備が必要であり, また臨床上の応用が難しいが,  $D_2O$  は安定同位体であるため取り扱いも容易であり, 大量でない限り生体にとっても危険がなく臨床上的の使用も可能である。重水中の重水素濃度の測定には従来質量分析法や赤外分光法が用いられてきたが, 最近ガスクロマトグラフ利用による簡便な重水分析法が開発された<sup>8,9)</sup>。本研究ではカドミウム投与を行ったラットを例としてこの分析法により水分代謝異常の観察を行うことを試みた。

## 2 実験方法

### 2.1 カドミウム投与実験

$CdCl_2$  1 mgCd/ml の溶液を滅菌水にて調製し, Wistar 系雄ラット (9 週齢, 体重 262~282 kg) に 2 mg Cd/kg/d で皮下投与を行った。投与間隔は平均 1.7 日に 1 回で, 25 日間にわたり 15 回の投与を行った。Cd 投与総量は約 30 mg/kg b.w.である。



## 2.2 重水投与及び採尿

Cd 投与による水代謝への影響を観察するために、Cd 投与ラット及び対照ラットに重水を投与し、代謝ケージ内で飼育して1日尿～4日尿を24時間ごとに採取した。重水は99.8 atom% $D_2O$ を使用し、1 ml/kg b. w. を皮下注射にて投与した。実験は2回行い、Cd 投与終了後3日目及び10日目に重水を投与した。またCd 投与終了後7日目、14日目、21日目にラットのうち一部を解剖し、肺、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉を採取した。各組織中のCdをはじめとする元素の濃度をICP（プラズマ発光分光分析）法により測定した。肝臓、脾臓、腎臓の一部はホルマリン固定を行い組織標本を作成して病理組織学的観察を行った。また一部についてはCd 投与終了後102日目に解剖し、同様に組織中の元素濃度の測定を行った。

## 2.3 試料の調製

尿試料中の重水濃度をガスクロマトグラフにより測定する場合、共存する不純物を除去し水分のみを取り出す必要がある。本研究では試料の調製には、A. Hvidt, K. Linderstrøm-Lang 考案のインシュリン、リボヌクレアーゼのD-H交換測定方法に準じた真空蒸留（昇華）法<sup>8-11)</sup>を採用した。この方法はガスクロマトグラフィばかりでなく質量分析法や振動式密度法による重水測定の前処理法としても用いられており、空気中の水分を取り込まないように注意さえすれば同位体効果を考慮する必要のない簡便な方法である。試料は $-20^{\circ}C$ に冷凍保存しておき、調製時に解凍し各3 ml を真空蒸留により精製した。

## 2.4 ガスクロマトグラフによる重水の分析

前述した前処理法により精製した重水試料を熱伝導度型検出器（TCD）付ガスクロマトグラフ（昭光通商 重水分析計 HK-1）を用いて測定を行った。この分析法<sup>8,9)</sup>は試料を疎水性白金触媒カラムに通して試料中の重水と水素を接触させ、 $D_2O$ をHDに変換してTCDで検出するものである。キャリアガスには高純度の水素を用いた。分析計には触媒カラムとTCDの間に水分吸収のためのモレキュラーシーブ充てんの吸着カラムが装着されている。各試料2  $\mu$ l を注入して測定を行った。

# 3 結果

## 3.1 Cd 投与による体重変化

Cd 投与前のラットの体重は $272 \pm 6$  g (range : 262~282 g) で、対照群と投与群に差はなかったが、投与開始後対照群の体重は直線的に増加し終了時点で $347 \pm 12$  g (range : 329~366 g) と増加したのに対し、Cd 投与群は投与開始後数日で体重が減少し、しばらくして回復、増加した後、再び減少、その後横ばい状態が続き投与終了時点で $273 \pm 12$  g (range : 255~291 g) であった。

### 3.2 臓器重量

各回の重水投与及び採尿の実験がそれぞれ終了した動物のうち対照群, Cd 投与群より 1~2 匹を取り出し解剖, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 筋肉(右大腿筋)を採取した。また実験終了後飼育を続けた動物を Cd 投与終了後 21 日目及び 102 日目に解剖し同様に組織を採取した。

Cd 投与終了後 7 日目, 14 日目で肝臓, 脾臓の重量が投与群で高く, 特に脾臓は体重の 0.4~0.5% に達した(対照群では 0.2%)。21 日目では肝臓, 脾臓に加えて腎臓も投与群で高値を示した。肺重量には差がなかった。102 日目でも肝臓, 脾臓, 腎臓の重量は投与群で増大したままであった。例数が少ないが, 測定値(2 匹の場合は平均値)を体重比で表したものを表 1 に示す。

表 1 Cd 投与群と対照群における臓器重量の比較  
Table 1 Weight of organs of control and Cd-exposed rats

Group		Lung	Liver	Spleen	Kidney
		%	%	%	%
Cd	- 7*	0.4	5.3	0.4	0.9
	14	0.5	5.0	0.4	0.9
	21	0.4	5.1	0.5	0.8
	102	0.3	3.8	0.4	0.8
Control-		%	%	%	%
	7	0.4	4.3	0.2	0.8
	14	0.4	4.1	0.2	0.8
	21	0.4	3.5	0.2	0.6
	102	0.3	3.2	0.2	0.5

値は体重に対する%で示した。

\*印の数字(7,14,21,102)はカドミウムの最終投与後の日数を示す。

### 3.3 組織中元素濃度

前項で採取した臓器, 組織中の元素濃度を ICP 法で測定した。Cd は Cd 投与群の肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 筋肉のすべての組織で検出されたが, 対照群では検出されなかった。Cd の蓄積は肝臓, 腎臓で著しかった。また肺, 肝臓, 筋肉中の Cd が Cd 投与中止後徐々に減少を示しているのに対し, 腎臓, 脾臓中の Cd はほぼ一定で 102 日後もそのレベルは変わらなかった(図 1, 2)。また他の元素で Cd 投与群と対照群との間に差がみられたのは肝臓中の Cu, Zn, 肺, 腎臓中の Zn の濃度であった(図 3)。

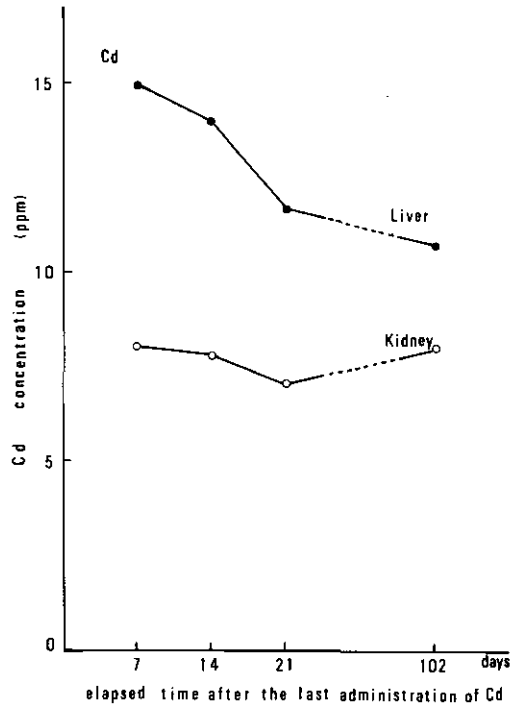


図 1 カドミウム投与ラットの肝臓及び腎臓中のカドミウム濃度  
Fig. 1 Cadmium concentration in liver and kidney of cadmium-exposed rats

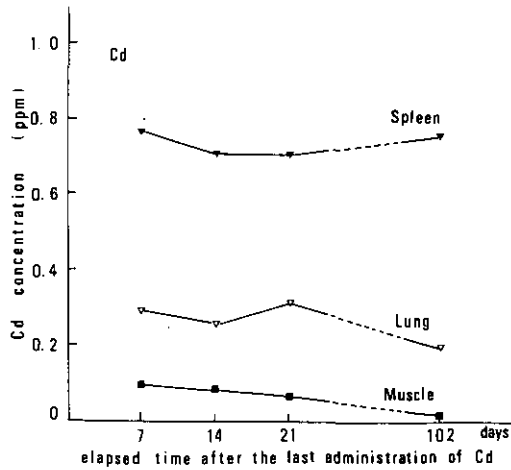


図 2 カドミウム投与ラットの肺, 脾臓と筋肉中のカドミウム濃度  
Fig. 2 Cadmium concentration in lung, spleen and muscle of cadmium-exposed rats

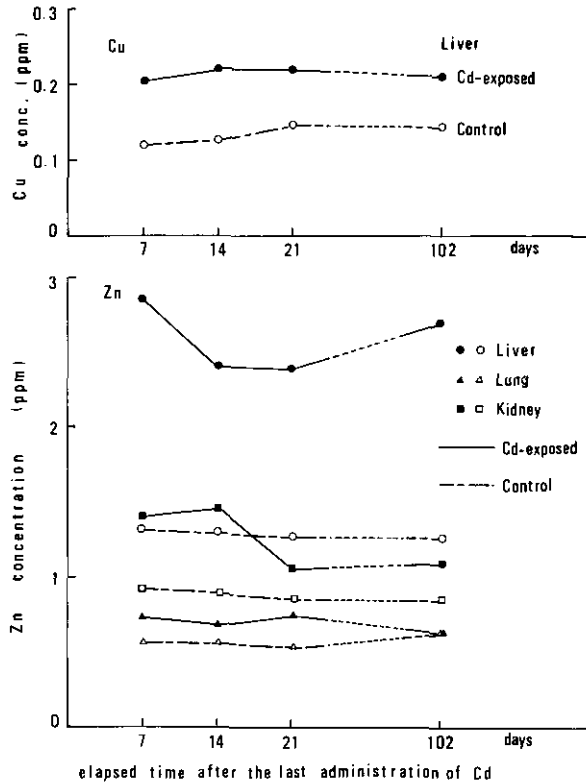


図 3 カドミウム投与群及び対照群におけるラット肝臓中の銅濃度と肺、肝臓と腎臓中の亜鉛濃度

Fig. 3 Copper concentrations in liver and zinc concentrations in lung, liver, and kidney of cadmium-exposed and control rats

### 3.4 病理組織学的観察

Cd 投与終了後 7 日目、14 日目、21 日目に肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、常法に従い病理組織標本を作成、H-E 染色及び PAS 染色により組織学的観察を行った。

肝臓では一部肝細胞の変性とそれに伴う壊死、再生が認められたが投与群と対照群に差は認められなかった。

脾臓においては投与群で脾腫が認められた。これはうっ血によるものと考えられる。

腎臓では H-E 染色による顕像では糸球体の変化は特に見られず、細胞の増加、毛細血管、メサンギウム等に対照群と比較して著変は認められなかった。基底膜は PAS 染色では変化が認められず、やや肥厚の傾向を示す程度であった。尿細管では投与群に上皮細胞の変性（細胞の膨化、腫大、核の大小不同、細胞の管内へのはく離脱落等）、壊死（図 4、5）が認められたがいずれも近位尿細管に限られ、遠位尿細管の変化はほとんどないと思われる。また基底膜の変化

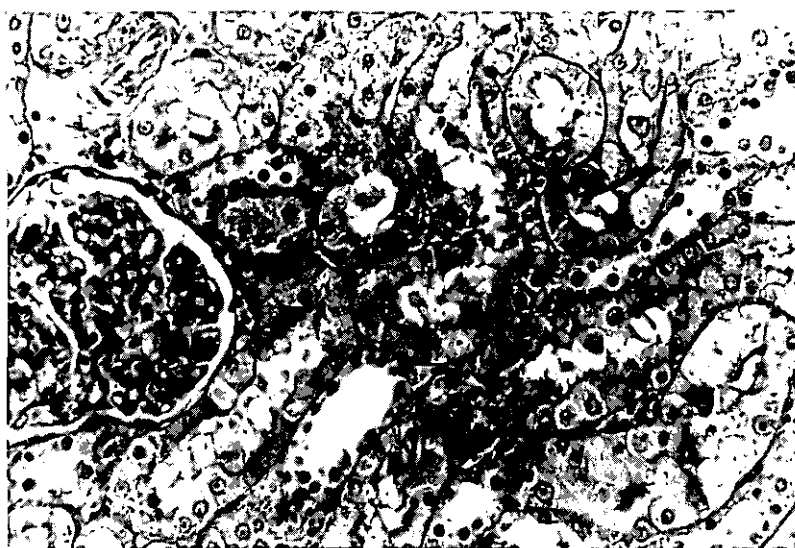


図 4 カドミウム投与終了後 14 日目のラットの腎臓  
Fig. 4 Degeneration of renal tubular epithelium—swelling of epithelial cells—from a rat 2 weeks after the last administration of cadmium  
PAS staining  
尿細管上皮の変性—上皮細胞の腫大 PAS 染色

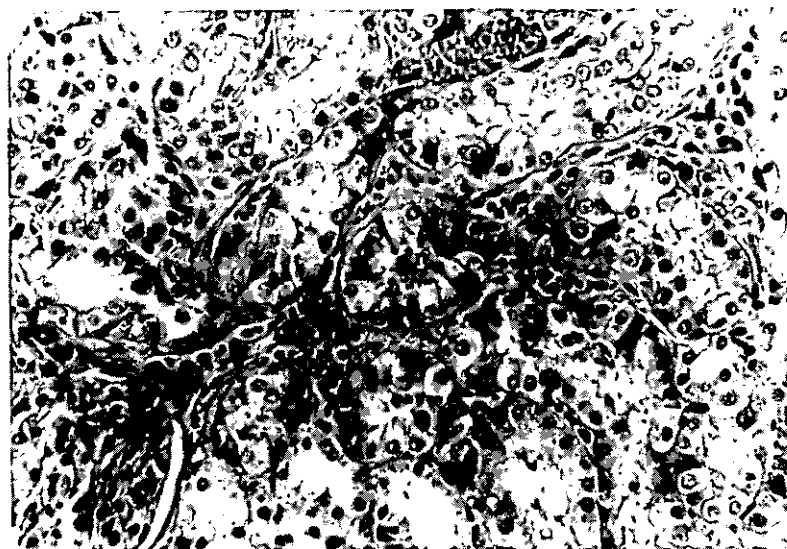


図 5 カドミウム投与終了後 21 日目のラットの腎臓  
Fig. 5 Renal tubular necrosis from a rat 3 weeks after the last administration of cadmium  
H-E staining  
尿細管壊死 H-E 染色

もほとんど観察されなかった。いずれも障害の程度は軽く、腎不全等を起こすほどの障害には至っていないと思われた。

### 3.5 尿 量

Cd 投与群, 対照群共に個体差が大きくほとんど差はみられない。初回の実験 (実験 1) において投与群でわずかに多尿の傾向がみうけられるが有意な差ではない。

### 3.6 尿中重水排せつ量

Cd 投与終了後 3, 10, 17 日目に重水を投与し, 24 時間ごとに 4 日間採尿を行った。尿中の  $D_2O$  の存在率を測定し片対数方眼紙にプロットしたものを図 6(a)~(d) に示す。

一般に健康体の場合, 尿中の重水存在率は 1 日尿, 2 日尿と減少し, その状態は,

$$Y = A_0 e^{-\lambda t} \quad (1)$$

で表される<sup>10)</sup>。故に片対数方眼紙に時間に対して存在率をプロットしたものは直線を示す。図 6 の測定結果よりそれぞれ回帰式を求め  $A_0$  と  $\lambda$  を得た。直線からはずれた値が見られたため, 回帰式をあてはめた時の残差の各々に対しその値を除いて評価した標準偏差を用いた t 検定で両側 0.1% 有意に絶対値の大きい残差があれば, その測定値を除外して回帰式を求め直した (図 6)。図 6 において回帰直線を実線で示した ( ( ) で囲んだ点は除外した測定値)。

### 3.7 全体水分量

尿中への重水排せつ量から同位体希釈法の原理により全体水分量を求めることができる。成書<sup>12)</sup>によると全体水分量は次の式で表される。

$$V_F = \frac{C_I V_I - C_E V_E}{C_F} \quad (2)$$

ただし,  $C_I$  : 投与した指示薬の濃度

$V_I$  : 投与した指示薬の容量

$C_E$  : 平衡に達するまでに尿中に喪失した指示薬の濃度

$V_E$  : 平衡に達するまでに排せつした尿量

$C_F$  : 平衡に達したのちの指示薬の血中濃度

$V_F$  : 全体水分量

指示薬とはここでは重水のことである。平衡に達するのが速くて尿中への喪失が少なければ, 式(2)は

$$V_F = \frac{C_I V_I}{C_F} \quad (3)$$

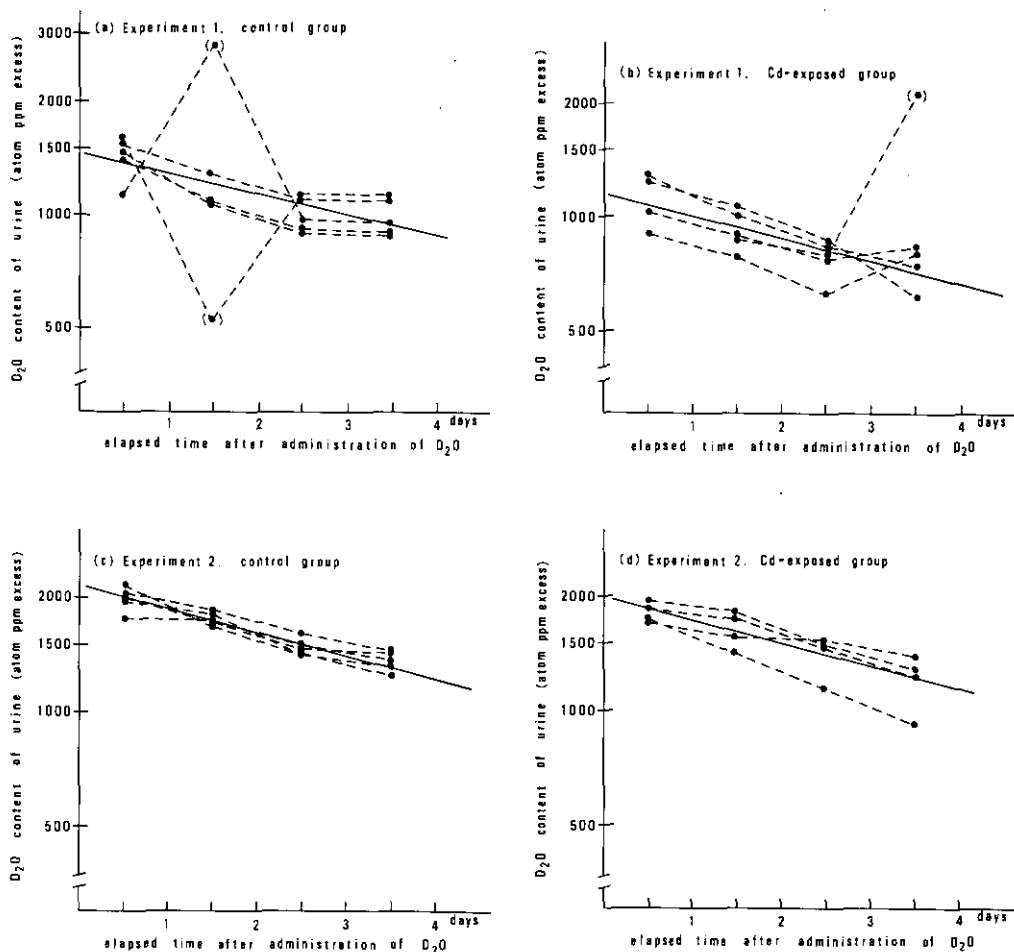


図 6 尿中重水排せつの経時変化

Fig. 6 Time course of urinary excretion of deuterium oxide

- (a) 実験 1. 対照群
- (b) 実験 1. Cd 投与群
- (c) 実験 2. 対照群
- (d) 実験 2. Cd 投与群

で表される<sup>12)</sup>。また重水の場合尿中濃度と血中濃度は相まって変化する<sup>7,10)</sup>。筆者らの別のラットを使った実験でも同様の結果が得られている。故に指示薬の血中濃度 ( $C_p$ ) は尿中の濃度で代用することができる。重水投与後尿中濃度は2時間ぐらいで平衡状態に達する<sup>7)</sup>ためそれ以前に尿中に喪失した量はわずかであると考えられる。平衡に達したときの尿中濃度は式(1)において  $t=0$  のときの値  $A_0$  となる。グラフより  $A_0$  を読みとり、次式

$$V_F = \frac{C_1 V_1}{A_0} \quad (4)$$

により  $V_F$  を求めることができる。

本実験において投与した重水の濃度は 99.8 atom%, 投与量は 1 ml/kg b.w. である。式(4)に代入すると

$$V_F(\text{ml}) = \frac{99.8(\%) \times W}{A_0(\text{ppm}) \times 10^{-4}} \quad (5)$$

$W$ : 体重 (kg)

全体水分量 (TBW) を体重比で表すと,

$$\text{TBW}(\%) = \frac{V_F}{W \times 10^3} \times 100 \quad (6)$$

故に次式により全体水分量が求められる。

$$\text{TBW}(\%) = \frac{99.8 \times 10^3}{A_0(\text{ppm})} \quad (7)$$

本実験では重水投与後 24 時間たつまでは採尿を行っていないため、3.6 において求めた  $t=0$  のときの外挿値  $A_0$  により全体水分量を求めた。

また式

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (8)$$

により、生物学的半減期  $T_{1/2}$  を求めた。これらの結果を表 2 に示す。全体水分量、生物学的半減期については標準誤差の範囲を ( ) 内に示した。2 回目の実験 (実験 2) においては前回重水投与の影響がまだ残っていると考えられるので、実験 1 の回帰式より  $t=7$  (日) のときの尿中重水存在率を求め、実験 2 で求めた  $A_0$  より差し引いて  $t=0$  のときの値とした。実験 1 では Cd 投与群において全体水分量の増加が観察されたが実験 2 では差はみられなかった。生物学的半減期は両群で顕著な差はなかった。

#### 4 考 察

重水のトレーサ利用は水が身近な物質であるにもかかわらず、その分析法が複雑であったり、高度の技術を要したり、また費用がかかったりするということから、現在でもそれほど広くは行われていない。それも主として地球化学の分野での利用であり、生物学、医学の分野でのトレーサ利用による研究はわずかである。我が国では「重水による体液バランスの研究」<sup>10)</sup>のテーマで文部省の研究が手がけられたことがある。最近ではフランスの E. Roth<sup>13)</sup>, G. Basset ら<sup>14)</sup>のグループが重水を利用しての全体水分量の測定や肺の水分量の測定などから病状の診断への応用が可能なることを報告している。また妊娠中の婦人の体液バランスと脂肪の関係などについて研究した報



告<sup>15)</sup>もある。

今回我々は新しく開発された簡便な方法を用い、重水のトレーサ利用により水分代謝の状態を観察することでどの程度重金属暴露などによる身体の異常を把握することができるかを知るために、カドミウムを投与したラットを使っての動物実験を試みた。結果としては例数が少なかったこと、人間と異なり尿量が少ないために採尿が頻繁に行えないこと、重水による全体水分量の測定以外の体液区画の測定を実施しなかったことなどから完全なものを得られなかった。ラットは15回にわたるカドミウムの投与により体重増加の停止、臓器の重量増加、カドミウムの蓄積、それに伴う元素含量の変化などを起こしており、身体に何らかの影響が及んでいることは明らかである。しかし病理組織学的観察によると多少の変化は見られるものの腎障害、腎不全に至るほどのものではなく、回復の様子もうかがえる。重水の尿中排せつ量から全体水分量、代謝回転率、半減期などを求めてみた(表2)が、投与群と対照群の差はそれほど明らかではない。実験1では投与群にやや浮腫の傾向が見られたが実験2では差は小さくなった。これはCd投与中止によって急性の変化が回復していることを示すものではないかと思われる。脾臓、肝臓などに見られる重量増加は浮腫を裏付けるものとも考えられる。実際組織標本において脾腫が観察されている。しかし臓器の肥大はCd投与終了後21日目、102日目にも継続したままであり、また腎臓に関しては後になるほど肥大の傾向が大きくなっている。これらは必ずしも水分量の増加が肥大につながっているものではないことを示している。

表 2 全体水分量、代謝回転率と生物学的半減期  
Table 2 Total body water, turnover rate and biological half-life

Experiment	Group	No.	TBW (%)*	$\lambda \pm SE$	$T_{1/2}$ (day)
1	Control	5	69.1(65.4~73.1)	0.126 $\pm$ 0.024	5.50(4.62~6.80)
	Cd-exposed	5	87.7(82.1~93.7)	0.138 $\pm$ 0.029	5.02(4.15~6.36)
2	Control	5	63.8(61.9~65.8)	0.137 $\pm$ 0.010	5.06(4.72~5.46)
	Cd-exposed	4	64.5(59.7~69.8)	0.141 $\pm$ 0.027	4.92(4.12~6.08)

\*TBW :total body water. % of body weight

全体水分量は両群ともに実験1よりも実験2の方が減少している。これはひとつには加齢による水分の減少を反映していることが考えられる。人間の場合も加齢に伴い76%から43%ぐらいまで水分量が減少するとされている<sup>12,16)</sup>。しかし、今回の実験結果からだけでは加齢の影響とCd投与群における回復効果を分離して考察することができず、この点については新たに検討を行う必要があると考えている。ただ、週齢差はわずか1週間であり、実験2において投与群と対照群の差がなくなっていることは急性影響の回復を示していると考えてよいと思われる。

重水のトレーサ利用による体液バランスの観察は安全で測定にも特別な技術を要しない手軽な診断方法になり得ると思われる。しかし実際に臨床への応用を行うにはさらなる簡便さと大きなメリットが要求される。簡便さに関しては、たとえば他の指示薬による他の体液区画の測定などを同時に行えること<sup>17)</sup>や判定に必要な時間の短縮などであり、メリットは他の様々な診断法と比較しての有用性であろう。実際的な診断方法の開発にはさらに研究が必要であると思われる。今回の研究はCd暴露による全体水分量の増加という点において、明らかな病変の現れる以前に急性の全身的な影響をとらえられる可能性を示したものと考える。さらに例数を増やし時間をかけて検討することにより明確な結論を導くことができるかもしれない。しかしCd暴露の急性影響の正確な判定には他の多くの診断法を併用しての詳細な検討が必要であろう。

### 引用文献

- 1) 吉利 和 (1979) : 生体の水電解質の構成. 新内科学大系, 吉利 和・中尾喜久・山形徹一・三辺 謙・黒岩義五郎・織田敏次・山村雄一監修, 第48巻A, 中山書店, 東京, 3-11.
- 2) Hevesy, G. and E. Hofer (1934) : Die Verweilzeit des Wassers im menschlichen Körper, untersucht mit Hilfe von "schwerem" Wasser als Indicator. *Klin. Wochenschr.*, **13**, 1524-1526.
- 3) Moore, F. D. (1946) : Determination of total body water and solids with isotopes. *Science*, **104**, 157-160.
- 4) Pace, N., L. Kline, H. K. Schachman and M. Halfenist (1947) : Studies on body composition. IV. Use of radioactive hydrogen for measurement in vivo of total body water. *J. Biol. Chem.*, **168**, 459-469.
- 5) Edelman, I. S., J. M. Olney, A. H. James, L. Brooks and F. D. Moore (1952) : Body composition : Studies in the human being by the dilution principle. *Science*, **115**, 447-454.
- 6) Steele, J. M., E. Y. Berger, M. F. Dunning and B. B. Brodie (1950) : Total body water in man. *Am. J. Physiol.*, **162**, 313-317.
- 7) Schloerb, P. R., B. J. Friis-Hansen, I. S. Edelman, A. K. Solomon and F. D. Moore (1950) : The measurement of total body water in the human subject by deuterium oxide dilution : With considerations of the dynamics of deuterium distribution. *J. Clin. Invest.*, **29**, 1296-1310.
- 8) Noda, S., T. Morishita, S. Ohkoshi, T. Takahashi and T. Sato (1982) : Simplified analysis of heavy water by utilization of gas chromatograph. *Proceedings of the International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds, Kansas-City*, 57.
- 9) 森下諦三・野田茂行 (1983) : ガスクロマトグラフ利用による重水の分析法とトレーサ利用. ライフサイエンスのための安定同位体利用技術, 日本アイソトープ協会編, 丸善, 東京, 115-123.
- 10) 高井俊夫他 (1959) : 重水による体液バランスの研究. 昭和33年度文部省総合研究報告集録, 409-418.
- 11) Inoue, Y., K. Tanaka and Y. Kasida (1981) : Measurement of heavy water concentration with density meter. *Analyst*, **106**, 609-619.
- 12) Hays, R. M. (1980) : Dynamics of body water and electrolytes. *In* : *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism.*, M. H. Maxwell and C. R. Kleeman (eds.), 3rd ed., McGraw Hill Comp., New York, 1-36.

- 13) Roth, E., G. Basset, J. Sutton, M. Apfelbaum and J. Marsac (1982) : Use of water labelled with deuterium for medical applications. Proceedings of the Fourth International Conference on Stable Isotopes. H.-L. Schmidt, H. Förstel and K. Heinzinger (*eds.*), Jülich, 1981-03. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Scientific Publishing Comp., 337-344.
- 14) Basset, G., F. Moreau, M. Scaringella, S. Tistchenko, F. Botter and J. Marsac (1975) : Simple method of measuring pulmonary extravascular water using heavy water. Proceedings of the Second International Conference on Stable Isotopes, Oak Brook, Illinois, 310-324.
- 15) Pipe, N. G. J., T. Smith, D. Halliday, C. J. Edmonds, C. Williams and T. M. Coltart (1979) : Changes in fat, fat-free mass and body water in human normal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **86**, 929-940.
- 16) Weitzman, R. and C. R. Kleeman (1980) : Water metabolism and the neurohypophyseal hormones. *In* : Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism., M. H. Maxwell and C. R. Kleeman (*eds.*), 3rd ed., McGraw Hill Comp., New York, 531-645.
- 17) Basset, G., G. Martet, F. Bouchonnet, J. Marsac, J. Sutton, F. Botter and R. Capitini (1981) : Simultaneous detection of deuterium oxide and indocyanine green in flowing blood. *J. Appl. Physiol.*, **50**, 1367-1371.

II-21

重水を用いた病態時の水分代謝に関する研究

**A Study on Water Metabolism under Pathologic  
Condition Using Heavy Water**

平野修助<sup>1</sup>・太田庸起子<sup>2</sup>

Shusuke HIRANO<sup>1</sup> and Yukiko OHTA<sup>2</sup>

**要 旨**

腎不全患者の水分代謝を、正常対照例と比較し検討したので報告する。

患者の細胞内水分量を inulin を使用して算出し、正常例と比較すると、その量は正常例に比べて少なかった。また、本症例は無尿症例のため透析を行ったが、その際の水の生物学的半減期は、正常例の9日間に比べて、7時間と極めて短く、水の交替率は正常の30倍にも達した。

以上の結果から、体内の水分代謝について考察を試み、体液代謝の重要性を明らかにしようとした。

**Abstract**

The water metabolism of the patients disturbed kidney function was investigated and the data was compared with normal persons.

The intracellular water space calculated by inulin assumption for patients was smaller than that of the normal persons. When a treatment of rapid dialysis for circulating blood was performed for the patients. The biological half life of body water was only about seven hours and the turn-over rate of body water was thirty times as fast as the control, since the biological half life of the normal persons was about nine days.

- 
1. 昭和57~59年度 国立公害研究所客員研究員 (東邦大学医学部 〒143 東京都大田区大森西5丁目)  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies. (School of Medicine, Toho University, Ohmori, Ohta-ku, Tokyo 143, Japan.)
  2. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

## 1 はじめに

重金属及びその他の有害物質が体内に摂取された時、急性影響又は慢性影響の差はあるにしても、全身症状として把握する必要がある。その一つに水電解質バランス異常が考えられる。体液バランスの異常をきたす疾患はいくつかあるが、重金属の体内摂取との関係を推定するものとして、重金属の蓄積が特異的である部位（臓器）についての検討は意義があるものとする。

生体水分代謝の状況は、尿検査、腎機能検査、血液検査、排泄分泌液の検査、体液量の直接測定などにより判定されうるが、全体液量及び細胞外液量の測定を行えば精密な判定ができる。このために、生体液分中に等分に分布し、変化せず選択的に排せつされることのない水のうち、重水（D<sub>2</sub>O）を用いての測定が望ましい。

本研究では、重金属の中でもカドミウムが腎、肝に蓄積し、カドミウム暴露量が多ければ腎障害を起こすといわれていることから、腎の機能異常に対処する所見の基礎的知見を求めるための検査手法を検討した。本特別研究報告書の中に、松本らが、動物ラットを用いて重水による体液量の変化を試験的に観察した知見を報告している。しかし、細胞外液及び細胞内液の量の変化を求めるには動物実験が困難である。このため、腎機能異常患者について、重水によるトレーサー手法を用いてこれらの検査を行うことを目的とした。本手法は、重金属暴露が原因で生じた浮腫、脱水症等の水代謝異常がみられる場合に適用できるとして本特別研究の中にとりあげたが、これら症状の認められるその他の疾患、または身体変調、生理的变化に対しても、ヒトへの応用が可能と考えている。

水は体の構成成分の60%以上を占めており、水が生体の機能に及ぼす影響は極めて大きい<sup>1)</sup>。例えば小児における水の交替率は成熟時とを比較すれば数倍に及ぶといわれ、機能の盛んな乳幼時においては水分代謝も極めて旺盛であることが伺える。したがって体内における水の動態を明らかにすることは生命を維持するために重要な最も基本的な課題であるといえる。

水の動態を調べるのに最も容易に用いられるものは標識化合物である重水である。重水は標識化合物ではあるが、非放射性標識化合物であるために放射性障害を考慮することなく、しかもその毒性はほとんどなく、体液の15%を置換しても異常はみられず0.5%の重水置換を4か月の長期間にわたり続けても悪影響はなかったという。したがって重水を通常の投与量で用いても、その障害を特に考えることなく使用できるといってよい。

さて、体内水分の分布は、細胞内に40%、細胞外に20%に存在しており、これらが常に栄養物や老廃物とともに流動し体内の新陳代謝にかかわってくる。したがって細胞内・外の水分代謝の様相を知ることは生体機能の変動を知る上でも重要な課題である。細胞内及び細胞外を分けて水分代謝を知るためには、細胞に対して毒性を持たず、しかも細胞内に入らないといわれるinulinを用いる方法が使われる。

以上の観点に立ち、本研究では病態時の体液動態について研究を進めひいては諸機能の変化における水分代謝の重要性を明らかにしようとした。

## 2 研究方法

### 2.1 重水の毒性試験

大量の重水投与においては毒性を考慮する必要があるが、今回は少量の投与でも病態時であることを考えバイロジェン・テストを施行した後に経口投与を行った。すなわち、一定量を皮下に注射し発赤の有無をあらかじめ調べた。全例についてバイロジェン・テストの結果で発赤の発現は認められなかった。

### 2.2 inulin による細胞内及び細胞外液の算定方法

ヒトにおける細胞内・外の測定用の inulin 溶液 (Sigma 製) を使用し、一定量を静脈内に投与する。一定時間後に、血液を採取して血清中の inulin 濃度を測定する。その後さらに2ないし3回血清中の inulin 濃度を一定時間の間隔で測定する。これらの inulin 濃度が直線的な変化を示すようになったとき、全身の細胞外に均等に inulin が分布したと考えられるので、そのときの血中濃度を  $b(\text{mg})/\text{ml}$  とする。その時点での排尿中の inulin 総量を  $c(\text{mg})$  とし、血中への投与量を  $a(\text{mg})$  とすると、 $a-c(\text{mg})$  は血中濃度  $b(\text{mg})/\text{ml}$  のときの細胞外における inulin 総量ということになる。したがって  $a-c/b=d(\text{ml})$  が細胞外水分量ということになる。細胞内水分量は2.3で求められる体液総量からの差として求められる。

また、細胞外液には循環血漿と細胞間液とがあるので、細胞間液量は求められた細胞外液量から循環血漿量を差し引いたものである。また、循環血漿量は $^{131}\text{I}$ で標識されたヒト血清アルブミンを投与し、その希釈濃度から算出する、いわゆる RIHSA 法を用いて測定された。

### 2.3 重水による体液量の測定

inulin の場合と同様に、まず 99.8 Atom% の重水を一定量経口投与し、一定時間ごとに3~4回採血し、それらの Atom% 値の変化が直線性を示したとき、投与した重水が均等に全身へ拡散したと考える。その際に得られた排せつ尿内の総 Atom% の重水を投与総量の重水から差し引いたものが体内に存在する重水総量である。これを血漿 1 ml 当たりの重水 Atom% で除した値が体液総量である。ちなみに、その際に分泌されている尿中の重水濃度は血液中の重水濃度と等しいと考えられる。

### 2.4 測定法

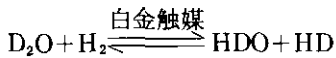
#### a) 重水の Atom% 値の測定法

重水の Atom% の測定は、水素及び重水素の熱伝導度が異なること (表1) を利用したガスクロマトグラフィ測定器 (GC/TCD) を用いた<sup>2)</sup>。この熱伝導法を用いた測定の原理は、ガスクロマトグラフの検出器として使用されている TCD に水素ガスをキャリアーガスとして流しながら、この中に重水素ガス又は重水素化水素をパルス状に注入するとクロマトグラムのピークが検出さ

表 1 熱伝導度  
Table 1 Heat conductivity  
(cal. cm<sup>-1</sup>. s<sup>-1</sup>. deg<sup>-1</sup>.)

	0°C	100°C
H <sub>2</sub>	419	547
D <sub>2</sub>	306	377
H <sub>2</sub> +D <sub>2</sub>		507
N <sub>2</sub>	57	76
He	343	408

れる。しかしこのままでは重水中の重水素濃度 D Atom%は測定できないので、重水試料を HD に変えるために、疎水性白金触媒に重水と水素を接触させ、発生した HD を TCD に導入する。



試料 1 μl 程度を注入するオートインジェクターを用い、インテグレーターにより自動化をして連続測定を行う。なお、触媒の寿命を考慮して高純度のキャリアーガスを用い、水分吸収剤にはモレキュラーシーブが充てんされた。

重水素の分析の場合、常に同位体効果<sup>3)</sup>に留意しなければならないが、この分析システムの工程中では、同位体効果の影響を考慮する必要がない。したがって同位体効果に関しては、重水試料をこのシステムにかける前に含有不純物を除く操作が必要で、重水抽出には低温真空蒸留を行った。すなわち、採取した血清の入った試験管を二又管の一方に装着し、他方に清浄な空の試験管を同様に装着し、血清の入った試験管のみを液体窒素で冷却しながら 10<sup>-3</sup>Torr に減圧する。低下にしたまま血清の入った試験管から冷却用の液体窒素を取り除き、次に他方の試験管を液体窒素で冷却して放置すると、その中に血清中の水のみを移し出すことができる。これを前述したガスクロマトグラフィで分析測定した。その分析パターンは (図 1) に示した。

b) inulin の測定法

Higashi らの方法<sup>4)</sup>に従って行った。

c) 生物学的半減期及び交替率の測定

次の式によって求めた。

$$C = C_{oe} e^{-\lambda t}$$

C : t 時の重水 Atom% 値  
C<sub>o</sub> : 投与時の重水 Atom% の濃度  
λ : 交替率 t : 時間

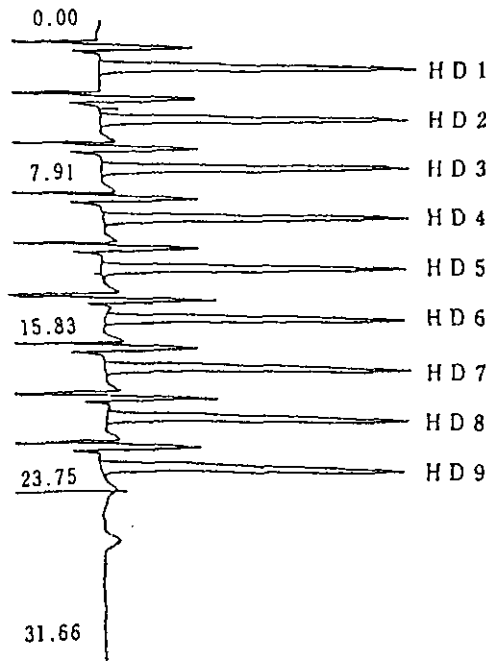


図 1 重水のガスクロマトグラム  
Fig. 1 Gas-chromatographic pattern of heavy water

すなわち生物学的半減期とは現在の濃度が  $1/2$  に減少するまでの時間であり、体内の水の 50% が交換される時間といえる。

## 2.5 実験手順

正常者及び腎機能不全のための無尿患者に 99.8 Atom% の重水を 17 ml 経口的に投与し、同時に inulin 及び  $^{131}\text{I}$ -ヒト血清アルブミンを静脈内に投与した。その後継時的に血液を採取し、重水の Atom% と inulin 濃度及び  $^{131}\text{I}$ -放射能を測定し、前述の方法に従い体液総量、循環血漿量及び細胞内・外液量を算定した。

## 3 結果

### 3.1 透析法について

正常人の場合は、投与した重水は吸収され、腎により尿分泌が行われ継時的にみると漸次 Atom% の減少が認められるが、患者の場合は無尿患者であるため血液中の Atom% は一定値を示すようになる。したがって、正常人では減少が直線的になったときに、また患者の場合は一定値を 2 回にわたって示した時点で投与された重水が全身に行き渡ったと考えた。



その時点で、患者が無尿患者であるため透析を行い血液の浄化を計った。この場合の透析法は図2に示す方法で、急速にポンプを用いて血液を吸引し、透析によって失われた血液水分は継時的に自動的に補給するようにしてある。

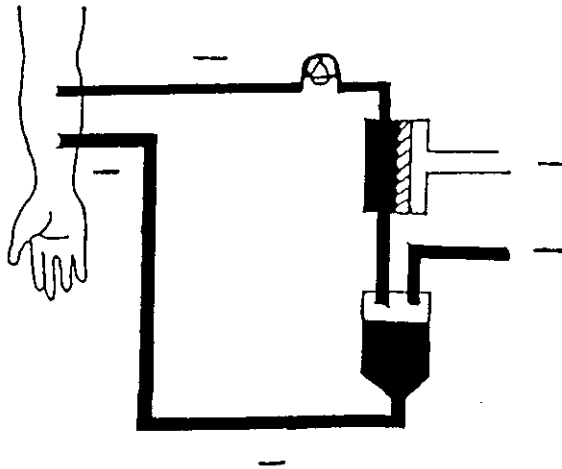


図 2 血液透析法  
Fig. 2 Method of dialysis for circulating blood

### 3.2 体液の体内分布について

正常人における体液の分布は(表2)に示すように、全体液量の中で細胞外液は20%で細胞内液は40%を占めている。細胞外液中で循環血漿量は全体液量の5%であり、細胞間液の占める%は15%であった。この数値は二人の被検者の平均値であるが、正常人である若い医師であることもあって、標準値<sup>1)</sup>を示していた。

表 2 体液の体内分布(体重当たりの%)  
Table 2 Distribution of body fluid (% of body weight)

Composition of body water	anuric patient	control (normal)
Extracellular fluid	21.9	20
Plasma fluid	7.1	5
Interstitial fluid	14.7	15
Intercellular fluid	32.0	40

腎不全患者である無尿患者の2例の平均値を示したのが(表2)の患者例の結果であるが、細胞外液の体液分布率は21.9%で正常に比べ高い傾向を示し、外液分布のうちで循環血漿の占める割合は正常に比べ高かった。また細胞内液の占める割合は正常に比べ低値を示した。

### 3.3 水分代謝について

方法の項で示した算出方法によって、生物学的半減期、交換量を調べると、(表3)に示すような結果を得た。正常人では生物学的半減期は約9日で平均体内寿命は13日位であり、交換量は1日で約2.5lである。

無尿患者の場合は、強制的にポンプにより透析を行い透析液の中から自動的に継続して必要水分量を補給する操作を行うので、交換量は5時間の短時間で22.6lにも及ぶ。したがって生物学的半減期は7.29時間で正常人の30倍にも及ぶ早さで交換したこととなった。

表 3 水分代謝  
Table 3 Water metabolism

Sample	Biological half-life	mean span of life	exchange rate ( )
anurine	7.29 hours	10.5 hours	22.6 ( 5 hours)
normal	male	13.25 days	3.0 (24 hours)
	female	13.25 days	2.3 (24 hours)

## 4 考 察

### 4.1 毒性及び同位体効果について

水は体内の60%以上を占めており、体内の構成成分の上でも極めてその占める割合は大きい。しかも細胞内において占める割合は、体内水分量の70%近くで細胞の機能活動の上で水は極めて大きな役割を占めていると考えられる。すなわち脱水状態においては、細胞の機能活動が急激に低下してこん睡を招きひいては死に至ることはコレラの場合でみられるようによく知られた事実である。一方、腎機能不全症において尿分泌障害がおきて水分が体内に貯留した際にも浮腫や尿毒症を引き起こし、脱水症と同様にこん睡や死を招くことの例からも考えられるように、水は常に流動し水分代謝として新陳代謝が行われてこそ生命維持に連なると考えてよい。

さて、このような水分の動的な変化をみるためには、標識された水の流れを追跡するのが最もよい方法と考えられる。水を標識するには $^3\text{H}_2\text{O}$ 又は $^2\text{H}_2\text{O}$ がしばしば用いられるが、 $^3\text{H}$ は放射性標識化合物であるために生物に対しての放射性障害を考えねばならない点から人に使用するためには重水が適応できる標識化合物といえる。しかしながら、安定同位体の使用に当たって留意す

べきことは同位体効果が引き起こされることである。しかもこの効果は軽同位体と重同位体との両者の質量の2乗に反比例して起こり、反応速度の面では質量による反応速度への影響は質量が増すほど効果が減少するといわれる。すなわち、軽同位体と重同位体の比が大きければ大きい程、同位体効果は大きく現れる。つまり、Hと重水素Dとの速度係数を $K_H$ 、 $K_D$ とすると、その効果は $2^2/1^2=4.0$ であり、窒素の軽同位体と重同位体である $^{14}\text{N}$ と $^{15}\text{N}$ についてみられる同位体効果である $K^{14}\text{N}/K^{15}\text{N}=1.48$ に比べれば極めて大きい。

しかし、重水素化合物を用いて重水素の代謝転位を観察するのと異なり、重水そのものの動きをみる点ではあまりこの同位体効果を考慮する必要はない。

次に、投与した場合の毒性に関してであるが、はじめに述べたように体液の15%を置換しても、また0.5 Atom%の重水を4か月にわたって投与しても悪影響がみられなかったことから、今回のように7 mlの経口投与では全く異常を起こしうることはないと考えてよい。

#### 4.2 体液分布について

体液のうちで細胞内及び外液の区分についてはinulinを用いる以外NaあるいはClを用いた方法が行われている。すなわち細胞内には $\text{Na}^+$ あるいは $\text{Cl}^-$ が細胞外に比べ極めて少ないことから細胞内には存在しないという仮定のもとで行う算出方法である。しかしNaあるいはClの代謝を追究するには不適当な方法である。例えば脳組織において、脳構成細胞の一つであるアストロサイトでは神経機能の変化に伴ってCl代謝の変動が引き起こされることが知られており<sup>5)</sup>、また神経細胞においては酸素欠乏の際に細胞膜の $\text{Na}^+$ に対する透過性が増大し、細胞外に高濃度に存在するNaClが細胞内に侵入し細胞内水分量の増加も起こってくる現象もみられており<sup>6)</sup>、このような場合での細胞内水分量の算出にNa又はCl量を用いることはできない。このような観点に立てば、inulinは外来性の物質であるから、NaあるいはCl代謝を含めて細胞内・外の水分量を算出するには適していると考えられる。

さて、本研究例でinulinを用いた場合に正常例では多数の報告例と同様に細胞外の体液分布は体重の20%であり細胞内は40%であった。

そして細胞外液のうちで循環血漿量は体重の5%である。無尿患者の例では循環血漿量は7.1%と正常に比べ水分量は増大していた。この測定値は透析終了後の状態であるため、ポンプによる急速な透析方法によるための結果であるかも知れない。この2%の増大が細胞外液量の増大として表れている。これに反して細胞内液の分布は正常に比べ8%も少ない。細胞内の水分量は細胞が正常の機能をする上では、ほぼ正常と同様の分布をしなくてはならない。浮腫の状態が引き起こされたとしても水分の貯留は細胞間げきに起こり、細胞内水分の増加としては認められることはない。

前述したとおり細胞内での水分増加は細胞内に存在する諸物質—特に機能変化に対応して急速に変動するイオン濃度の低下に連なるものであり、このことは細胞の機能低下を意味するといえ

る。本症の場合も、腎機能不全の患者であるが、その他の臓器である肝、脳あるいは筋などは正常に活動しており、また理学的所見によっても異常は観察できていなかった。以上のことを考えると細胞内水分量の低下は見掛け上のものであると考えられる。すなわち inulin は細胞内に侵入しないと考えたことによるもので、もし細胞内に侵入していたと想定すれば細胞外の inulin 濃度は少なくなり、そのため投与した inulin 総量を細胞外 inulin 濃度で除した細胞外水分量は見掛け上大きく計算されてくることになる。本症例における細胞内水分量の低下は、この結果として導かれてきたものであると考えられる。本症例の2例についても同様の傾向が示されていたことは、腎不全患者の特徴とも思われる。特に本症例は無尿患者であり、透析直前の状況下で行った検査であるため血液中の尿素及び尿酸値、いわゆる非タンパク性窒素 (NPN) は正常に比し 100 倍に近い高値を示していた。既に知られているように NPN のうち尿素は細胞膜を通過しやすい物質の一つであり、そのため細胞内に尿素の侵入が起こるとともに細胞外と等浸透圧を保つため細胞内への水分貯留も引き起こされていたと考えるべきであろう。このような条件下での inulin 投与においては、inulin が細胞内にも入りうる可能性を否定できない。

以上のことを考えると、透析技術の進歩が腎不全患者の延命を助けたとしても、長期間にわたる NPN の高値の持続が他臓器に及ぼす影響まで除くことは困難と思える。以上のことを勘案すれば、心不全に対するペースメーカーの植え込みと同様に、従来のような不連続的な透析方法でなく持続的な血液清浄装置の開発が望まれるゆえんである。

#### 4.3 水分代謝について

先に述べた測定式によって生物学的半減期等を算出すると、体内の水分代謝は正常人で約9日であった。このことは9日間で正常人の場合は体液の1/2が交換することを意味する。

つまり1日で約3/4の体液の交換が起こっていることを示している。本症例における交換量は急速な透析例であるため5時間で22.6lであった。したがって本症例での生物学的半減期は7.3時間ということになり正常の30倍近くである。無尿患者の体液の清浄を行うため従来は一昼夜を必要としたものが短時間で行い得て、しかも透析効果としては従来のもので変わり得ない点で有用と考えられる。

#### 4.4 まとめ

重水を用いた水分動態の研究は、単に体液の移動という点のみならず、体液中に溶解している溶質の動態を調べる上で極めて重要と考えられる。今回の無尿患者という極めて重篤な腎不全患者を用いた研究からも明らかにされたように、inulin を用いた細胞内水分量の減少は溶媒に含まれる NPN 濃度の上昇が健常と思われる腎以外の臓器にも強く影響を及ぼしていることを示唆していると考えられる。現在、問題にされている血圧と食塩の関係についても血漿中の Na 濃度が測定限界内で上昇しているとは決して考えられず、長期にわたる高濃度の食塩摂取が血圧変動に反応す

る細胞の機能変化を起し、その結果として浮腫を引き起こすこともあり得ると考えられる。

今後、体液動態を各方面から観察することが疾病の予防や治療に連なり、健康の維持に大きく役立つことを期待したいと考える。

#### 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、東邦大学医学部腎センター・平田清文教授、東邦大学医学部高木芳夫助手、同研究生平野清氏、同、大石勝彦氏らのご協力を得たことをここに記し、感謝の意を表します。

#### 引 用 文 献

- 1) Lassiter, W. E. and C. W. Gottschalk (1974) : Volume and composition of the body fluids. *Medical Physiology*, V. B. Mountcastle (*ed.*), The C. V. Mosby Company, 1049-1141.
- 2) 森下諦三 (1982) : 重水素の測定法, ガスクロマトグラフィー, 赤外分光法. 重水素トレーサー利用に関するシンポジウム, 抄録集, 和光市, 41-48.
- 3) 平野修助 (1982) : 医薬, 薬学分野における重水素トレーサー利用. *Isotope news*, **11**, 2-7.
- 4) Higashi, A. and L. Peters (1950) : Rapid colorimetric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 475-482.
- 5) Gill, T. H., O. M. Young and D. B. Tower (1974) : The uptake of  $^{36}\text{Cl}$  into astrocytes in tissue culture by a potassium-dependent saturable process. *L. Neurochem.*, **23**, 1011-1018.
- 6) Tsukada, Y., Y. Nagata, S. Hirano and T. Matsutani (1963) : Active transport of amino acid into cerebral cortex slices. *J. Neurochem.*, **10**, 241-256.

II-22 重金属吸入摂取に対する影響評価のための一知見  
——6価クロム暴露の剖検例に関して——

**Determination of Accumulated Heavy Metals and Other Substances  
in Lungs of an Autopsied Chromium Factory Worker, Evaluated to  
Unfavourable Effects of Hexavalent Chromium**

太田庸起子<sup>1</sup>・乾 道夫<sup>2</sup>

Yukiko OHTA<sup>1</sup> and Michio INUI<sup>2</sup>

**要 旨**

重金属の吸入摂取による人体影響を評価するための知見として、6価クロムの暴露を受け、鼻中隔穿孔の障害があった剖検試料について、多面的な結果を得、考察を加えた。

病理組織学的所見では、肝に6価クロム結晶沈着を伴う好酸球性肉芽腫が認められ、肝小結節から微量のクロムを検出したことはまだ報告のない知見であった。

剖検試料の肺、肝、腎、頭髮等よりクロム、その他の重金属蓄積量を求めてクロムの体内移行を考察した。肺については疾病歴のない対照群12例を含めて肺黒色沈着物のみを化学的に分離し、その組成元素濃度及び大気中に存在する結晶性物質の同定等を行った。さらに黒色沈着物からフリーラジカルを検出した。黒色沈着物より高濃度のクロム蓄積、また、マンガン、アンチモン、コバルト等も多く、作業に由来したものと考えられた。このように多面的な分析手法による知見は評価をより確実にするものであった。

**Abstract**

In order to obtain up-to-date results of chromium inhalation on human body, sample from an autopsied chromium factory worker was examined. In addition, the lungs of deceased residents of the Tokyo Metropolitan area with no history of lung disease were taken for comparison with the chromium exposed lung. Tissues of lung, liver, kidney, hair and black dust deposited in lungs were analyzed by several techniques.

- 
1. 国立公害研究所 環境保健部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2  
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
  2. 昭和59年度 国立公害研究所客員研究員 (東京都監察医務院 〒112 東京都文京区大塚4丁目21-18)  
Visiting fellow of the National Institute for Environmental Studies (1984). (Tokyo Metropolitan Medical Examiner's Office, Ohtsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan.)

The results were divided into four groups.

In the first group, pathohistological studies were performed. Eosinophilic granuloma with crystalized deposition of hexavalent chromium were found in liver, chromium in minute amounts was chemically determined in hepatic noduli.

In the second group, neutron activation analysis and X-ray microanalysis were used to determined the concentration of elements in tissues and composition of accumulated particulate.

Thirdly, electron spin resonance was used to detect free radicals in the untreated black dust deposited in lungs.

Finally, the crystal structure in the black dust was analyzed using X-ray diffraction, and alpha-quartz was found.

The chromium concentration in lung was higher than any other specimens, Mn, Co and Sb were also high.

The result obtained by our experiments provided interesting and new information.

## 1 はじめに

クロムは通常  $\text{Cr}^0$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  及び  $\text{Cr}^{6+}$  として存在する。しかし、2 価のクロムは比較的不安定で、速やかに 3 価の状態に酸化される。したがって、3 価と 6 価のクロムが自然界にみられる。6 価から 3 価の型への酸化還元電位が大きく、6 価状態（酸化クロム、クロム酸塩、重クロム酸塩）では、ほとんどが、酸素と結合して強い酸化剤であり、酸性溶液中で有機物と容易に反応し、3 価に還元される。6 価クロムは生体膜を容易に通過するが、毒性の低い 3 価クロムにはこの性質はない。このように 6 価クロムは生体にとって有毒である。6 価クロムにヒトが暴露される形態は、クロム酸塩作業に従事したような場合で、呼吸器系と皮膚に対する障害となって現れてくる<sup>1,2)</sup>。さらに、クロムによる肺がんもクロム酸塩作業者にみられている<sup>3-10)</sup>このようにヒトについてのクロムの有害作用の知見は産業現場におけるものがほとんどである。

クロムは必須金属であるため、生体に対して不足量、適当量、中毒量、致死量が存在する。クロムの生体に対する作用についてはクロムの原子価を考慮する必要があり、自然環境中では、生体に関係するのは 3 価と 6 価であるが、生体内で生理作用をしているのは 3 価クロムと考えられている。

クロムの一般環境汚染とその健康影響については評価が難しいが、産業現場で起こるものとは異なると考える。しかし、クロム廃棄物として環境中に放置された場合は、大気中浮遊粒子となったものを吸入したり、皮膚沈着をするためにその身体影響を考えねばならない。

昭和 40 年代後半より昭和 50 年にかけて東京で起こったクロム鉱さい投棄による埋立て事件はまさに、この問題を提起している。

クロムの体内分布及び蓄積についての動物実験による報告は多いが、その多くは経皮又は注射による投与である。したがって、空気中のクロムを吸入摂取した場合を評価する必要があり、こ

この際、クロム酸塩作業者の一部検試料を用いて、クロムの体内蓄積量を求め、病理組織学的所見と併せてクロムの体内移行を検討することを目的とした。一般にヒト組織中のクロム濃度は肺が最高で、その濃度は地域によって著しく変動するといわれている<sup>11)</sup>。これに関する基礎的知見を得るために、東京都区内居住者の剖検肺についても分析を行い、得られた結果と6価クロム暴露例との比較検討を行うこととした。

## 2 実験方法及び結果

### 2.1 材 料

対象剖検試料は、クロム酸塩製造作業に7年間従事して昭和40年頃退職した54歳の男子（東京都江東区居住）。

比較対象試料は、東京都区内居住者の剖検肺12例である。いずれも、肺に疾病歴がなく、慢性疾患の共存もない。薬物等の治療も受けていないが、喫煙歴は明らかである。多くは虚血性心不全であった。

### 2.2 解剖学的及び組織学的診断

6価クロム暴露例については以下の結果であった。

- (1) 虚血性心不全
- (2) 慢性い縮性気管支炎
- (3) 動脈硬化症
- (4) 6価クロムによる病変

#### ① 鼻中隔穿孔

② 肝における小豆大の灰黄色散在性結節が認められた。組織学的には6価クロム結晶沈着を伴う好酸球性肉芽腫（図1）。一部に中心部壊死を伴っている（図2）。

ジフェニルカルバジド法の比色分析の結果、肝小結節より微量のクロムを検出した（図1）。

図3は肝組織壊死周辺部にみられた異物型巨細胞を示す。



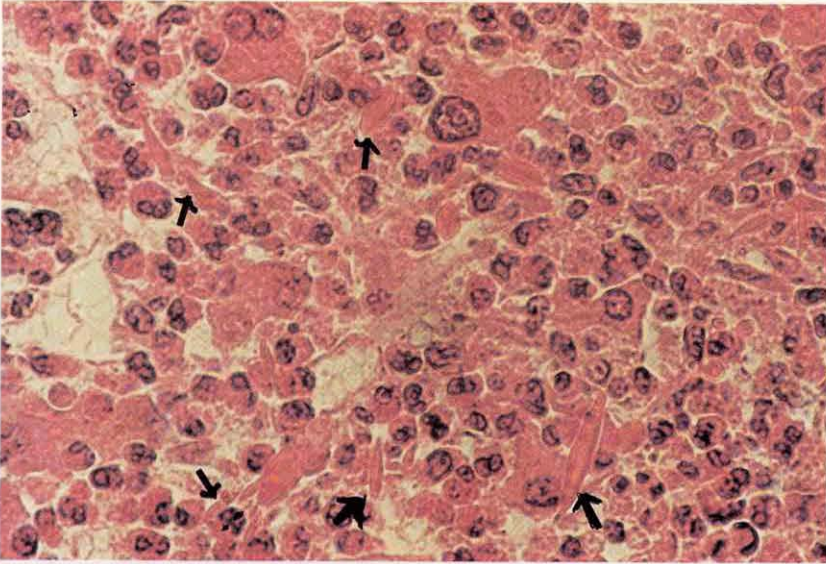


図 1 肝組織の肉芽腫の中に赤色に染色されたクロム針状結晶 (矢印)  
H. E. 染色, 400 倍

Fig. 1 Needle-like, crystalline chromium in granuloma (red colour), Liver  
( $\times 400$ )



図 2 肝組織, 中心部壊死を伴う肉芽腫, 40 倍

Fig. 2 Necrosis in the center of granuloma, Liver ( $\times 40$ )

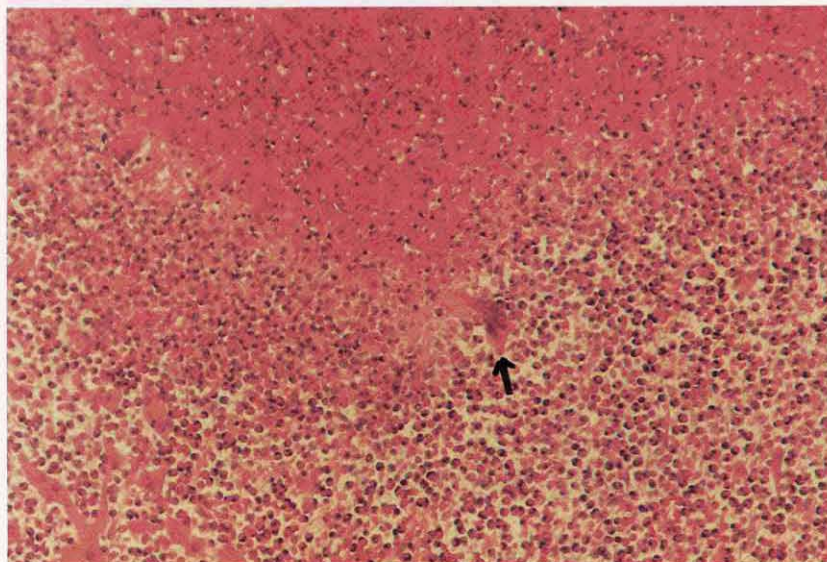


図 3 肝組織，壊死周辺部にみられる異物型巨細胞（矢印），100 倍  
Fig. 3 Exogenous giant-cells around the necrosis, Liver (×100)

## 2.3 生体内クロム濃度と他の元素濃度の比較

### (1) 対象組織

肺，肝，腎，頭髪を分析対象とした。肺については，肺組織とは別に，組織に沈着している黒色物（炭粉）のみを分離して分析を行った。12 例の比較対象群については炭粉を分析対象とした。組織より分離して得た黒色粉体は大部分が身体外由来性物質と考えることができる。

### (2) 黒色沈着物の分離<sup>12)</sup>

肺組織を 0.5 N NaOH 溶液にて溶解させた後，超・高速遠心分離操作を繰り返し，黒色沈殿物として分離し，最終的には，水，アセトン等で洗浄後，黒色粉体として回収した。組織湿重量 1 g 当たりの黒色粉体量を炭粉沈着率として求めた結果，2.7 mg/組織湿重量 (g) であった。50 歳より 59 歳まで 15 例の平均値は 1.6 mg/組織湿重量 (g) で 0.59~3.1 mg/組織湿重量 (g) の範囲であった。

(3) 元素濃度

クロム及びその他の元素の分析については、迅速、かつ非破壊微量分析に優れている中性子放射化分析法を用いた。武蔵工大原子炉研究所、原子炉（TRIGA-II型）の気送管（熱中性子束密度 $\approx 1.5 \times 10^{12} \text{n/cm}^2 \cdot \text{s}$ ）及び中央実験管（熱中性子束密度 $\approx 3 \times 10^{12} \text{n/cm}^2 \cdot \text{s}$ ）にて照射した。Ge(Li) 検出器（相対効率 15%，1332 keV での半値幅 2.0 keV）と多重波高分析器（GAMA システム）により $\gamma$ 線測定を行った。分析結果については、表 1 に肺、肝、腎、頭髪中の濃度、表 2 に組織から分離して得た黒色粉体中の元素濃度を示す。

6 価クロム肺では、組織中クロム濃度は高く、Mn, V についても肺組織中濃度が他の臓器組織中の含有量よりも多かった。この傾向は炭粉試料についてもみられた。その他、Sb, Co も多かった。Mn 濃度が高かったことは、本例が勤務していた工場で過マンガン酸カリも製造していたことに由来するものと考えられる。さらに、SEM-XMA<sup>13)</sup>による元素分析の結果 (wt%) は、Mg:0.36, Al:8.10, Si:21.4, P:1.46, S:1.71, K:2.45, Ca:17.3, Ti:1.02, Fe:39.8, Cr:6.34, V:0.05 で、Cr, V, Fe の各濃度は他の検体試料に比較して多かった。

表 1 6 価クロム暴露の剖検組織中の元素濃度  
Table 1 Concentration of elements in tissues of a specimen exposed to hexavalent chromium

Tissue	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ wet tissue)						
	Cr	Zn	Hg	Se	Al	Mn	V
Lung	309	58.6	0.645	1.00	701	20.8	2.83
Liver	19.9	163	0.660	1.76	22.6	7.43	N.D.
Kidney (cortex)	29.7	245	1.62	4.06	70.2	5.64	0.589
(medulla)	68.7	108	0.73	1.60	258	9.57	0.553
Hair	0.40	153	5.0	0.45			

注) N. D. : 検出限界以下

表 2 肺黒色粉体の組成元素濃度, 特に6個クロム暴露試料(Y)との比較  
 Table 2 Concentration of elements in black dust deposited in lungs, compared to specimen Y exposed to hexavalent chromium

Specimen (Occupation)	Age	Sex	Tobacco /day	Concentration of elements ( $\mu\text{g/g}$ of dust)												
				Al	Ti	V	Mn	Fe	Hg	Zn	Cr	Co	Ag	Cd	Sb	As
Y (Worker)	54	M	-	15920	2066	69.1	323	58364	4.50	698	10221	9.62	46.4	6.54	127	2.76
A (Medical doctor)	78	M	30	11960	918	13.3	42.5	36061	4.71	238	125	1.99	16.2			
B (Non)	65	M	30	22680	2044	28.4	139	46715	3.91	295	233	3.52	28.0			
C (Clerk)	50	M	10	5851	842	7.57	66.1	6504	5.24	316	204	2.39	31.8			
D (Student)	20	M	-	2296	361	2.66	21.0	3410	3.13	192	69.1	1.19	33.5	3.58	5.04	0.199
E (Housewife)	68	F	-	5950	396	6.94	25.7	11618	1.27	153	58.2	0.932	6.47	6.08	6.15	0.528
F (Uncertain)	78	F	-	12490	1667	12.9	53.8	35877	2.55	187	424	0.255	12.6	2.71	41.8	2.46
G (Student)	19	M	20	3944	473	3.08	27.1	4383	2.84	1499	26.1	0.900	25.1	12.2	2.16	0.256
H (Secretary)	26	F	-	2502	368	3.29	18.7	3370	1.89	35.8	67.5	0.776	18.2	7.13	3.92	0.370
I (Student)	21	M	20	7065	3140	4.68	134	14364	4.72	991	513	2.76	42.0			
J (Clerk)	37	M	20	5577	607	5.20	54.2	10068	3.70	370	190	2.51	34.5			
K (Non)	65	M	10	11580	821	13.5	65.7	33111	20.1	442	235	3.25	23.8			
L (Clerk)	64	M	?	6875	783	4.19	39.2	20224	2.76	385	85.6	1.01	12.9			

## 2.4 結晶性物質の同定<sup>14)</sup>

肺より得た黒色粉体は大気及びその他身体外に由来する物質の組成であると考えて、その中の結晶性物質の存在の有無について検討した。粉末微量 X 線回折法により同定を行った結果、 $\alpha$ -石英（大気中粉じん由来）が検出された。クロムについては、原子価、2, 3, 6 価について同定を検討したが、結晶性物質はなく、たとえ、微粒子との錯体であっても結晶ではなかった。

## 2.5 ラジカル種の測定<sup>15)</sup>

ヒトの肺の黒色沈着物からフリーラジカル（炭素ラジカル）を既に検出しており<sup>15)</sup>、6 価クロム暴露肺沈着物についても検討を試みた。

-80°C に凍結保存させておいた肺組織を室温状態にして、肉眼的にも観察できる黒色沈着物のみを取り出し、直ちに凍結乾燥をした。

測定には電子スピン共鳴法（ESR）を用い、室温にて測定した。

結果は 3 種類の常磁性種が検出された。これらを  $R_1$ 、 $R_2$  並びに  $R_3$  と略し、既報告<sup>15)</sup>と同様にまとめたのが表 3 である。この結果、炭素を中心としたラジカルのスペクトルは検出されたが、本例は喫煙歴がなかったため、タバコとは別の要因によると考えられる炭化水素類の熱分解や燃焼の際に生じたものではないかと推察する。図 4 に試料全体のスペクトルを示す。広い磁場掃引によるスペクトルであるが、 $R_1$ 、 $R_2$  の有機ラジカルと違って幅も広く（約 500 G）、 $g$  因子のシフトも大きい 1 本線が観測されている。この  $R_3$  成分は無機イオン種と考えられ、 $g$  因子や元素分析の結果から  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  が主成分と思われる。炭粉中の遷移金属の由来は土ほこりの吸入によるのが大いと考えられる。しかし、本 6 価クロム例は、過マンガン酸カリ製造、クロム酸塩製造等の作業に関係していたことから、重金属を吸入していた事実を推定できる。上記無機イオン種の他に、クロムはもちろんのこと、バナジウムも含有量は多かった。これら遷移金属イオンはその置かれている環境によって同じ原子価状態でもスペクトルが大きく変化する。 $Cr^{3+}$  も配位の対称性が良い場合には  $g \approx 2.0$  の所に鋭い吸収を示すとのことであるが、対称性が低い場合には異方性が生じ、非常に幅の広いスペクトルとなる。

$R_1$  成分がフリーラジカル、 $R_2$  成分が共役炭素系に酸素が付加した形のラジカルの存在を推定したが、6 価クロムの吸入暴露を受けた剖検肺よりラジカルを検出した報告はいまだない。しかも、喫煙と関係がないとすれば、炭化水素類の熱分解や燃焼の際に生じて、空気中の存在を経たと考えられ、かえって注意すべきかもしれない。フリーラジカルの生体組織中の存在は、還元反応が起こることも考えられる一方、比較的安定ラジカルかもしれない。しかし、外来性物質として好ましいものではない。

表 3 肺の黒色沈着物中のラジカル濃度と常磁性イオン濃度  
 Table 3 Concentration of radicals and of paramagnetic ions in black dust deposited in lungs

Specimen (Occupation)	Age	Sex	Pathohistological findings	Cigarette /day	Total radical concentration $R_1 + R_2$ (Spin/g)* <sup>1</sup>	Relative concentration of paramagnetic ions $R_3$
Y (Worker)	54	M	Exposed to hexa- valent chromium	-	$0.56 \times 10^{16}$	0.84
A (Medical doctor)	78	M	Cell desquamation due to bronchitis emphysema	30	$1.05 \times 10^{16}$	1.0
B (Non)	65	M	Metaplasia of bronchiolar epithelium	30	$0.78 \times 10^{16}$	3.7
C (Clerk)	50	M	Emphysema (slightly)	10	$0.67 \times 10^{16}$	0.48
D (Student)	20	M	Plumonary edema	-	$0.47 \times 10^{16}$	0.99
E (Housewife)	68	F	Emphysema	-	$0.57 \times 10^{16}$	1.3
F (Uncertain)	78	F	Chronic bronchiolitis	-	$0.39 \times 10^{16}$	0.76
G (Student)	19	M	Non	(20)* <sup>2</sup>	$0.21 \times 10^{16}$	0.18
H (Secretary)	26	F	Non	-	$0.18 \times 10^{16}$	0.15

\* 1 誤差 100%の可能性もありうる。

\* 2 喫煙期間が年齢からみて非常に短いと考えられる。

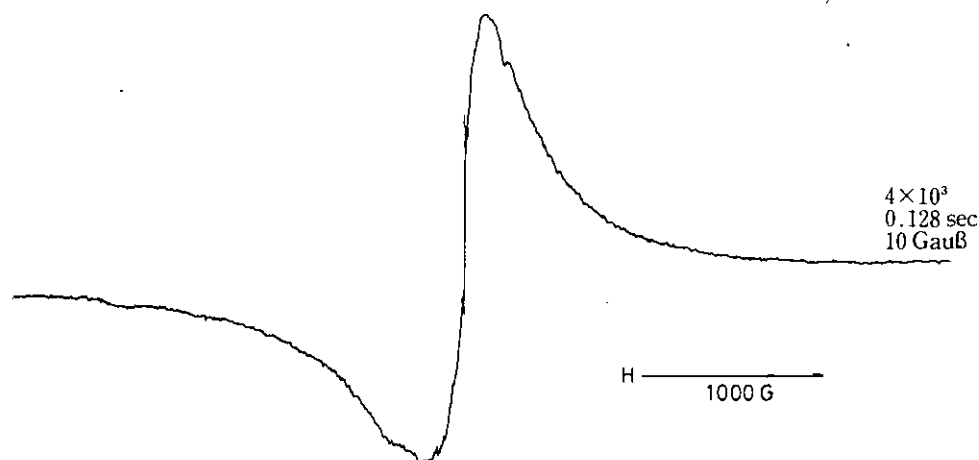


図 4 試料 Y の ESR 全体スペクトル

Fig. 4 The whole ESR spectrum of specimen Y taken with a wide magnetic field sweep

中央部の短く、鋭いピークはフリーラジカル、広い磁場掃引による全体のスペクトルは無機イオン種。変調幅=10 G, Gain= $4 \times 10^3$

### 3 おわりに

クロムの呼吸器系侵入による体内移行と影響の基礎的知見を得るために、ヒト剖検試料を用いて検討した。

クロム酸塩製造作業に従事して、6価クロムの吸入暴露を受けた職業歴の試料である。その肺、肝、腎、頭髮の組成と肺黒色沈着物について、クロム及び他の元素濃度を求めた。比較対照群は肺黒色沈着物のみについて分析をした。その結果、暴露を受けたクロム、マンガン等は明らかに肺に高濃度に蓄積していた。例えば、クロムは対象群12例についての20ないし390倍、マンガンは同じく2.3ないし17倍、アンチモンは同じく3.0ないし59倍、コバルトが2.7ないし38倍と顕著であった。

肺黒色沈着物よりフリーラジカル（炭素ラジカル）を検出した。タバコ以外の由来によると考えている。さらに、結晶性物質として、大気中に存在する $\alpha$ -石英を全例に検出した。

また、 $\text{Cr}^{3+}$ と $\text{Cr}^{6+}$ の原子価同定に関して、光電子分光装置（ESCA）により測定を試みたが試料が少量であったことから同定は困難であった。

解剖学的及び組織学的診断では、6価クロムによる呼吸器障害である鼻中隔の潰瘍と穿孔が認められているとともに、肝組織に6価クロム結晶沈着を伴う好酸球性肉芽腫がみられていること、肝小結節からは微量のクロムを検出したこと等はいまだ報告のない新しい知見であった。複数の分析手法を用いて、多角的に得た分析知見は、組織学的所見をより確実にするものであった。

クロムの蓄積量のみから生体影響を評価することは困難である。本例はクロム取扱作業現場を離れてから10数年経過していたにもかかわらず、クロム、マンガン等の重金属暴露による生体内蓄積量が多かった。しかし、肺組織への粒子沈着率では特別に多い値ではなかった。6価クロムは容易に肺より吸収されると考えられるため、肝組織にも影響を与えていた。肺に蓄積しているクロムの原子価を実験的に検討できなかったが、大部分は3価の状態であると考えられる。クロム酸塩作業中に吸入した6価クロムは肺の中で3価に還元されたと考えられることもできる。その過程において、肺組織への好ましくない作用も推察できる。また、腎髄質中のクロム濃度が高かったことは尿への排せつを意味するが、それに反してクロムの頭髪への移行量は少ないといえる。

これらの知見から、6価クロムの吸入による生体影響は、既に報告が多くみられている鼻中隔穿孔にみられる呼吸器系皮膚障害及び肺がんの他に、肝についても考察すべき結果を得たこと、明らかに取扱い作業に由来するクロム、マンガンの肺蓄積、及びその他の重金属の肺蓄積もみられたこと、タバコ由来ではないと考えられるラジカル種を肺沈着物より検出し得たこと等、考察すべき点は残されている。しかし、動物実験では再現できない条件で6価クロムの長期暴露を受けたヒトの組織から得た知見は、現実的でありかつ、貴重であった。

#### 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ESRスペクトルの解析にご教示下さった、東京大学工学部助手白石浩二氏（客員研究員）、ESCAの測定にご協力いただいた当研究所計測技術部底質土壌計測研究室長相馬光之氏に感謝の意を表します。

#### 引 用 文 献

- 1) 木村正己・小野 哲・和田 攻訳 (1977): 環境汚染物質の生体への影響 2. クロム・バナジウム, National Research Council (編), 東京化学同人, 東京, 5-8.
- 2) 吉川 博 (1975): クロム化合物. 日本公衆衛生協会, 37-49.
- 3) 渡部真也 (1974): 職業性クロム肺癌の疫学調査 (第1報). 産業医学, 16, 382.
- 4) 渡部真也・福地保馬 (1975): クロムによる職業がん. 科学, 45, 688-693.
- 5) 岸 玲子・大崎 饒・阿部庄作 (1975): クロムによると思われる職業性肺がん患者の臓器中、血液中および尿中クロム量. 産業医学, 17, 404.
- 6) 岸 玲子 (1975): クロムによると思われる職業性肺がん患者の臓器中クロム量. 医学のあゆみ, 92, 387-388.
- 7) 常田育宏・木村清延・阿部庄作・大崎 饒・村尾 誠 (1976): クロムと肺癌発生に関する知見. 肺癌, 16, 272.
- 8) 露口 勝・杉本友則・宇山幸久・原田邦彦・井上権治 (1976): クロム酸塩製造従事者にみられた肺癌の2切除例. 肺癌, 16, 273.
- 9) 阿部庄作・大崎 饒・常田育宏・木村清延・村尾 誠・牧野幹男 (1976): クロム酸塩製造従事者の肺癌. 肺癌, 16, 273.



- 10) 渡辺真也 (1976) : クロムと肺がん. 労働の科学, 31, 4-9.
- 11) 木村正己・小野 哲・和田 攻訳 (1977) : 環境汚染物質の生体への影響 2. クロム・バナジウム, National Research Council (編), 東京化学同人, 東京, 36-40.
- 12) 太田庸起子 (1984) : 肺組織から炭粉じんあいの分離に関する研究. 国立公害研究所研究報告, 第 67 号, 91-94.
- 13) 太田庸起子 (1984) : SEM-XMA による元素分析. 国立公害研究所研究報告, 第 67 号, 95-104.
- 14) 太田庸起子 (1984) : 炭粉じんあい中の存在物質の同定に関する研究. 国立公害研究所研究報告, 第 67 号, 121-124.
- 15) 太田庸起子・白石浩二・田畑米穂 (1984) : 炭粉じんあい中の炭素ラジカルとタバコに関する研究. 国立公害研究所研究報告, 第 67 号, 115-120.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 — 霞ヶ浦を対象域として — 昭和 51 年度. (1977)  
第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和 51/52 年度 研究報告. (1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- ※ 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)  
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和 52 年度 中間報告. (1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素-窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究 — 昭和 51, 52 年度 研究報告. (1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II) — 霞ヶ浦を中心として. — 昭和 53 年度. (1979)
- ※ 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)  
(日本産ユスリカ科 20 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- ※ 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和 52, 53 年度 研究報告. (1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和 53 年度 中間報告. (1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和 51~53 年度 特別研究報告. (1979)
- ※ 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)  
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)  
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)  
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.  
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.  
(多摩川に発生するユスリカの研究  
— 第 1 報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係 —  
— 第 2 報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の 20 種について —)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和 53, 54 年度 特別研究報告. (1980)
- ※ 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和 54 年度 特別研究報告. (1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測. (1980)

- ※ 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果——臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——昭和 53, 54 年度 特別研究報告。(1980)
- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)  
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- ※ 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (III)——霞ヶ浦(西浦)の湖流——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (IV)——霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (V)——霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VI)——霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VII)——湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VIII)——富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (IX)——*Microcystis* (藍藻類) の増殖特性——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (X)——藻類培養試験法による AGP の測定——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (XI)——研究総括——昭和 53, 54 年度。(1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究——昭和 54, 55 年度 特別研究報告。(1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)  
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.  
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.  
(多摩川に発生するユスリカ類の研究  
——第 3 報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthoclaadiinae 各種の記載と, その分布の下水汚染度との関係について——  
——第 4 報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載——)
- ※ 第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究——昭和 54, 55 年度 特別研究報告。(1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和 55 年度 特別研究報告。(1981)
- 第 32 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究——環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究 I)——昭和 54 年度 特別研究中間報告。(1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——大気運動と大気拡散過程のシミュレーション——昭和 55 年度 特別研究報告。(1982)
- ※ 第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和 55 年度 特別研究報告。(1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究。(1982)
- 第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究——昭和 55, 56 年度 特別研究報告。(1982)
- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究。(1982)

- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)  
(環境標準試料「池底質」の調製、分析及び保証値)
- 第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和 56 年度 特別研究報告. (1982)
- 第 40 号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和 56 年度 特別研究報告. (1983)
- ※ 第 41 号 土壤環境の計測と評価に関する統計学的研究. (1983)
- ※ 第 42 号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究. (1983)
- ※ 第 43 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)  
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.  
Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.  
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.  
(多摩川に発生するユスリカ類の研究  
— 第 5 報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する 6 月の調査成績とユスリカ亜科に属する 15 新種等の記録 —  
— 第 6 報 多摩本流より 6 月に採集されたユスリカ亜科の各種について —  
— 第 7 報 多摩本流より 3 月に採集されたユスリカ科の各種について —)
- 第 44 号 スモッグチャンバーによる炭化水素—窒素酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) — 昭和 54 年度 特別研究中間報告. (1983)
- 第 45 号 有機廃棄物、合成有機化合物、重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和 53/55 年度 特別研究総合報告. (1983)
- 第 46 号 有機廃棄物、合成有機化合物、重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和 54/55 年度 特別研究報告 第 1 分冊. (1983)
- 第 47 号 有機廃棄物、合成有機化合物、重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和 54/55 年度 特別研究報告 第 2 分冊. (1983)
- ※ 第 48 号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析. (1983)
- 第 49 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和 57 年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 50 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (I) — 霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 51 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (II) — 霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 52 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (III) — 霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 53 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (IV) — 霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 54 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (V) — 霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 55 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VI) — 富栄養化防止対策 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 56 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VII) — 湯ノ湖における富栄養化とその防止対策 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告. (1984)
- 第 57 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VIII) — 総括報告 — 昭和 55~57 年度 特別研究

- 報告。(1984)
- 第 58 号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究 — 昭和 55~57 年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第 59 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学スモッグチャンバーによるオゾン生成機構の研究 — 大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告 (第 1 分冊)。(1984)
- 第 60 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学エアロゾル生成機構の研究 — 昭和 55~57 年度 特別研究報告 (第 2 分冊)。(1984)
- 第 61 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 1) — 昭和 55~57 年度 特別研究報告 (第 3 分冊)。(1984)
- 第 62 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究 — 昭和 56~58 年度 特別研究中間報告。(1984)
- ※ 第 63 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和 56 年度 特別研究報告。(1984)
- ※ 第 64 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和 54~56 年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第 65 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants — Part 1. (1984)  
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第 1 分冊)
- ※ 第 66 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants — Part 2. (1984)  
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第 2 分冊)
- 第 67 号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究 — 昭和 54~56 年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※ 第 68 号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究 — 昭和 56~57 年度 特別研究報告。(1984)
- 第 69 号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- 第 70 号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park (1984)  
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.  
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.  
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究  
— 第 1 部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究 —  
— 第 2 部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的、形態学的研究 — )
- ※ 第 71 号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第 72 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) — 昭和 55~57 年度 特別研究報告 (第 4 分冊)。(1985)
- 第 73 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 昭和 55~57 年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※ 第 74 号 都市域及びその周辺自然环境に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標 — その考え方と作成方法 — 昭和 59 年度 特別研究報告。(1984)
- 第 75 号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)  
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)
- 第 76 号 Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)  
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第 77 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和 58 年度 特別研究報告。(1985)

- 第 78 号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第 79 号 Studies on the method for long term environmental monitoring — Research report 1980-1982. (1985)  
(環境汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)
- 第 80 号 海域における赤潮発生のモデル化に関する研究 — 昭和 57/58 年度 特別研究報告。(1985)
- 第 81 号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究 — 地方公共団体の制度運用を中心として。(1985)
- 第 82 号 植物の 대기環境浄化機能に関する研究 — 昭和 57~58 年度 特別研究報告。(1985)
- 第 83 号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)  
(日本の湖沼のユスリカの研究)
- 第 84 号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究 — 昭和 57~59 年度 特別研究総合報告。(1985)

※ 残部なし

### Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1\* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1976. (1977)
- No. 2\* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[ Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to: ]

### Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- ※ No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5\* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6\* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura. – Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※ No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- ※ No. 8\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10\* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- ※ No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
  - Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
  - Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No.14\* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※ No.15\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1980)
- No.16\* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※ No.17\* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- ※ No.19\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)

- No.20\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)
- No.21\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.22\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of argal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of researches – 1978-1979. (1981)
- No.28\* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)
- No.29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)  
 Part 3. Species on the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.  
 Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※ No.30\* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1979-1980. (1982)
- No.31\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1980. (1981)
- No.32\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. (Part 1). (1982)
- No.33\* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Simulation of atmospheric motions and diffusion processes – Progress report in 1980. (1982)
- ※ No.34\* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1980. (1982)
- No.35\* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No.36\* Studies on the method for long term environmental monitoring – Progress report in 1980-1981. (1982)
- No.37\* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy – The evaluation laboratory of Man-Environment Systems. (1982) . . . . .
- No.38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
- No.39\* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1981. (1983)
- No.40\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants –



Research report in 1981. (1983)

- ※ No.41\* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical condition of soil – with special reference to heavy metals –. (1983)
- ※ No.42\* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics of mud transportation. (1983)
- ※ No.43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
  - Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June, with description of 15 new species.
  - Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
  - Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No.44\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No.45\* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – *Outlines of special research project – 1978-1980.* (1983)
- No.46\* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979 –1980, Part 1. (1983)
- No.47\* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979 –1980, Part 2. (1983)
- ※ No.48\* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No.49\* The development and evaluation of remote measurement method for environmental pollution – Research report in 1982. (1984)
- ※ No.50\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Estimation of input loading in Lake Kasumigaura – 1980-1982.* (1984)
- ※ No.51\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *The function of the ecosystem and significance of sediment in nutrient cycle in Lake Kasumigaura – 1980-1982.* (1984)
- No.52\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura – 1980-1982.* (1984)
- No.53\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacia in Lake Kasumigaura – 1980-1982.* (1984)
- No.54\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura – 1980-1982.* (1984)
- No.55\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Measures for eutrophication control – 1980-1982.* (1984)
- No.56\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Eutrophication in Lake Yunoko – 1980-1982.* (1984)
- No.57\* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Summary of researches – 1980-1982.* (1984)
- No.58\* Studies on the method for long term environmental monitoring – *Outlines of special research project in 1980-1982.* (1984)
- No.59\* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system – *Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber –*

- Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds – Research report in 1980–1982. (1984)
- No.60\* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system – Formation mechanisms of photochemical aerosol – Research report in 1980–1982. (1984)
- No.61\* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. – Research report in 1980–1982. (1984)
- No.62\* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems – Progress report in 1980–1983. (1984)
- ※ No.63\* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1981. (1984)
- ※ No.64\* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Final report in 1979–1981. (1984)
- No.65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 1. (1984)
- ※ No.66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 2. (1984)
- No.67\* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques – Project research report in 1979–1981. (1984)
- ※ No.68\* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil – Research report in 1981–1983. (1984)
- No.69\* Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji – Basic research report. (1984)
- No.70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park – Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park. – Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※ No.71\* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No.72\* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-oxides sulfur oxides-system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere – Research report in 1980–1982. (1985)
- No.73\* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides-system – Final report in 1980–1982. (1985)
- ※ No.74\* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality. Environmental indices-basic notion formation – Research report in 1984. (1984)
- No.75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No.76 Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- No.77\* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution. (1985)
- No.78\* Study on citizens' role in conserving the living environment. (1985)
- No.79 Studies on the method for long term environmental monitoring – Research report 1980–1982. (1985)
- No.80\* Modeling of red tide blooms in the coastal sea – Research report 1982–1983. (1985)
- No.81\* A study on effects of implementing environmental impact assessment procedure – With particular reference to implementation by local governments. (1985)

No.82\* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants – Research report in 1982-1983. (1985)

No.83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)

No.84\* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure – Final report in 1982-1984. (1985)

\* in Japanese

※ out of stock

RESEARCH REPORT FROM  
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 84

国立公害研究所研究報告 第 84 号

(R-84-'85)

---

昭和 60 年 9 月 30 日発行

編 集 国立公害研究所編集委員会

発 行 環境庁国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2

---

印 刷 株式会社 明 文 社

東京都中央区日本橋蠣殻町 1 - 24 - 8

Published by the National Institute for Environmental Studies

Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

September 1985