衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
21 (1) 35-41 (1975)

環境汚染の衛生化学的研究 (第1報)

鶏胚脛骨の組織培養におけるカドミウムの作用について¹⁾

酒井立夫, 宮原龍郎, 実井佳代^{2a)}

野村 昇,^{2b)} 高柳尹立^{2c)}

富山大学薬学部,^{2a)} 富山大学教育学部,^{2b)} 富山市民病院^{2c)}

Hygienic Chemical Studies on Environmental Pollution. I.¹⁾ Effect of Cadmium Ion on Chick-embryo Tibia in Tissue Culture

TATSUO SAKAI, TATSURO MIYAHARA, KAYO SANEI^{2a)}

NOBORU NOMURA^{2b)} and NOBUTATSU TAKAYANAGI^{2c)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama University,^{2a)}

Faculty of Education, Toyama University,^{2b)} and

Toyama City Hospital^{2c)}

(Received August 9, 1974)

Tibia from 9-day chick embryo was cultivated at 38° for 5 days by watch-glass method, with and without (control) cadmium chloride. Growth of tibia was inhibited completely in the presence of 10 ppm cadmium chloride in the medium. In the tibia cultivated in the presence of 20 ppm CdCl₂, content of calcium, inorganic phosphate (iP), hydroxyproline (OH-Pro), uronic acid, and deoxynucleic acid (DNA) were determined. Transfer of cadmium from the medium into tibia was apparent, as none was detected in the control. It was observed that when CdCl₂ was added the increase of each content in the tibia after 5 days' cultivation was inhibited as follows: Ca 29 %, iP 61 %, OH-Pro 86 %, uronic acid 103 %, and DNA 154 %. Histopathological examination of the tibia cultivated in the presence of CdCl₂ showed that (1) all of the cartilage cells revealed various regressive changes such as pyknosis, karyorrhexis, and coagulative necrosis, (2) a very faint reaction appeared in both PAS-stained matrix and cells of the cartilage, and (3) ossification remained nearly in the state before the cultivation, showing necrosis of osteoblastic cells.

ま え が き

重金属は広く重用されるが、環境汚染などによる生体への影響が深刻になり諸種の観点からの対策が迫られている。その影響として、たとえば、カドミウムによって代表される骨障害がある。カドミウムはメッキ、顔料、塩化ビニール安定剤、原子炉制御、エレクトロニクスなどに広く利用されているが鉱業精錬、メッキなどに伴う汚染が原因となって、人体に吸収されると Fanconi 症

候群に由来する骨軟化症いわゆるイタイイタイ病をひき起こすといわれる。他方では幼若ラットを使った実験において、腎障害の現われる前に直接的な骨障害がみとめられている。³⁾

従来のカドミウムの骨障害に関する研究において実験動物を用いた場合に、作用物質ならびに関連物質の収支を把握することが困難であった。

著者らは物質収支の把握しやすい対象として培養骨組

1) 日本薬学会北陸支部第37回例会, 富山, 1973年10月.

2) Location: a, b) 3190, Gofuku, Toyama (富山市五福 3190); c) 6-16, Ohte-machi, Toyama (富山市大手町6-16).

3) 須田立雄, 鈴木ミチ子, 吉木周作, ビタミン, **47**, 468 (1973).

織を重金属の骨障害に関する研究に用いる方法の確立を企てた。今回は組織培養した鶏胚脛骨にたいするカドミウムの直接作用を検討したところ、カドミウムによって骨生長が阻害されることをみとめた。さらにカドミウムを添加した場合の培養骨について種々の生化学的分析と組織学的検索を行ない、骨生長の阻害に関して両者間に一致する2, 3の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

培養体 ふ卵9日の鶏胚から無菌的に摘出した脛骨を使用した。同一個体の左右骨のうち一方を培養しないで培養前の試料としての測定に用い、他方をカドミウムの作用などをしらべる培養実験に用いた。

培地 Eagle MEM 培地「ニッサン」0.94%, 子ウシ血清10%, 胚抽出液10%, グルタミン0.03%および NaHCO_3 0.1%を加えた1%寒天培地を用いた。なお、胚抽出液は胚を等重量のTyrode液とホモジナイズし遠沈して得た上清である。

培養方法 Watch-glass 法⁴⁾に従った。すなわち、シャーレの底に水をしみこませた脱脂綿をおき、その上に時計皿をのせ、培地を1.5ml 注加する。培地の表面に1個の脛骨をおき、炭酸ガスふ卵器で38°, 5日間培養した。培養後水洗、常温で減圧乾燥して重量の測定ならびに生化学的分析の試料とした。

生化学的分析 1) 測定機器——原子吸光法はShimadzu AA-610型原子吸光光度計を、比色法は日立139型分光光電光度計を用いて行なった。

2) 測定方法——i) カルシウム量：試料を3Mトリクロロ酢酸(TCA)と酢酸の1:1混液で加熱抽出後、 SrCl_2 を添加して422.7nmにおいて原子吸光法で測定した。⁵⁾

ii) 無機リン量：試料に5% TCAを38°で約18時間作用させて抽出後モリブデンブルー法⁶⁾で測定した。

iii) オキシプロリン量：試料を封管中3N HClと150°, 3時間加熱後ピロール化法⁷⁾で測定した。

iv) ウロン酸量：硫酸・カルバゾール法⁸⁾で測定し、グルクロノラクトンとして算出した。

v) DNA 量：試料を1N NaOHで38°, 約18時間処理後インドール法⁹⁾で測定した。

vi) カドミウム量：試料を HNO_3 で分解後MIBK-APDCで抽出し228.8nmにおいて原子吸光法で測定した。¹⁰⁾

組織学的手法 脛骨を10倍ホルマリン水で固定し、パラフィンに包埋後、切片を作り、一般組織学的検索にはhematoxylin-eosin (H-E) 染色を、多糖類などの検索にはperiodic acid-Schiff (PAS) 染色を行なった。

実験結果

1. 骨重量の増加におよぼす影響

培地に塩化カドミウム(以下Cdと略する)を0, 5, 10, 15, 20ppmの培地濃度になるように添加した場合のそれぞれの骨生長を検討したところ、骨重量ではFig. 1に示すようにCdを添加しない場合(コントロール)は培養によって2倍以上の重量増加をみたが、5ppmではコントロールに比べ骨重量増加に抑制がみられ、10ppm以上では培養による骨重量増加がほとんどみとめられなかった。長さではコントロールの場合は5日間の培養後において約50%の伸びがみられたのに対し、Cd 10ppm以上の添加濃度ではほとんど伸びがみとめられず、肉眼的形状も培養前に比べて著しい変化はみられなかった。そこでCdの骨生長の完全阻害濃度を20ppmとして以下の実験を行なった。

Cdが20ppmの濃度で培養した場合の骨重量について

Fig. 1. Dry Weight of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl_2

.....: before the cultivation

- 4) H. B. Fell, R. Robison, *Biochem. J.*, **23**, 769 (1929).
- 5) M. P. Sparrow, B. M. Johnstone, *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 425 (1964).
- 6) 中村道徳, 農化, **24**, 1 (1950).
- 7) D. S. Miyada, A. L. Tappel, *Anal. Chem.*, **28**, 909 (1956).
- 8) T. Bitter, M. M. Muir, *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 9) G. Ceriotti, *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955).
- 10) 山崎 登, 分析化学, **20**, 515 (1971).

て統計的処理を行なったのが Table I である。コントロールの場合は用いた脛骨の重量 0.46mg (16回の実験の平均値, 標準偏差は 0.08, 以下同様の形式で表に示した, X_0) が培養によって 1.16mg (Y_0) に増加した。Cd 添加の場合は用いた脛骨の重量 0.44mg (X_{20}) が培養によって 0.40mg (Y_{20}) に減少した。この結果からコントロールでは培養前に比べ培養後で 0.70mg の増加がみとめられたのにたいして, Cd 添加の場合は反って 0.04mg の減少がみとめられた。なお, これら両者間には t 検定を行なったところ 0.05% 以下の危険率で有意差があった。さらに以下の生化学的分析の結果も同じ手順で検定し同様の結果を得た。また, Cd 添加の生長におよぼす影響を明確に表現するため, コントロールの場合の生長にたいする阻害の割合を数値化した。生長抑制がみられずコントロールの場合と同等の生長をした場合に 0%, 生長が抑制されて培養による生長の増減が全くみられない場合に 100% で示されるように次式を設定した (以下

これによる算出値を阻害率とよぶ)。

$$\frac{(Y_0 - X_0) - (Y_{20} - X_{20})}{Y_0 - X_0} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

骨重量における阻害率は 105% であり, 20ppm の Cd 濃度で完全に骨生長が阻害されていることが判明した。

2. カルシウム含量におよぼす影響

Table II に示すようにコントロールの場合は用いた脛骨のカルシウム含量 13.4 μ g が培養によって 20.3 μ g に増加した。Cd 添加の場合は用いた脛骨のカルシウム含量 14.2 μ g が培養によって 19.1 μ g に増加した。この結果からコントロールでは培養前に比べ培養後では 6.9 μ g の増加がみとめられたのにたいして, Cd 添加の場合は 4.9 μ g の増加がみとめられた。これらの数値から Cd による阻害率を求めると 29% であり, カルシウム含量については Cd 添加による影響が僅少であった。

3. 無機リン含量におよぼす影響

無機リンの含量は Table III に示すようにコントロー

TABLE I. Dry Weight of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl₂

	Control		Cd ²⁺ 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=16$)	0.46mg	1.16mg	0.44mg	0.40mg
σ	0.08	0.15	0.08	0.13
$Y-X$	0.70mg		-0.04mg	

TABLE II. Calcium Content of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl₂

	Control		Cd ²⁺ 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=6$)	13.4 μ g	20.3 μ g	14.2 μ g	19.1 μ g
σ	1.41	1.56	2.98	2.52
$Y-X$	6.9 μ g		4.9 μ g	

TABLE III. Inorganic Phosphate Content of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl₂

	Control		Cd ²⁺ 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=6$)	9.1 μ g	12.9 μ g	9.4 μ g	10.9 μ g
σ	0.44	0.60	1.86	1.52
$Y-X$	3.8 μ g		1.5 μ g	

ルでは培養によって $3.8\mu\text{g}$ の増加がみられたのにたいして、Cdを添加して培養した場合は $1.5\mu\text{g}$ の増加にとどまり、Cdによる阻害率を求めると61%であった。

4. オキシプロリン含量におよぼす影響

オキシプロリン含量は Table IV に示すようにコントロールでは培養によって $8.8\mu\text{g}$ の増加がみられたが、Cdを添加して培養した場合は $1.2\mu\text{g}$ の増加にとどまり、Cdによる阻害率は86%であった。

5. ウロン酸含量におよぼす影響

ウロン酸含量は Table V に示すようにコントロールでは培養によって $29.6\mu\text{g}$ の増加がみられたのにたいして、Cdを添加して培養した場合は $0.8\mu\text{g}$ 減少した。Cdによる阻害率は103%でありコントロールとCd添加の場合とは大きな差がみられた。

6. DNA 含量におよぼす影響

DNA 含量は Table VI に示すようにコントロールでは培養によって $8.3\mu\text{g}$ の増加がみられたのにたいして、

Cdを添加して培養した場合は $4.5\mu\text{g}$ も減少した。Cdによる阻害率は154%でありコントロールとCd添加の場合とは著しい差がみられた。

7. カドミウム添加培養骨のカドミウム含量

Cd濃度が5ppmと20ppmになるように添加して培養した骨についてCd含量をしらべたところ、Table VII に示すように $0.44\mu\text{g}$ および $1.30\mu\text{g}$ であった。この値は乾燥重量当たり約880ppmおよび約2600ppmに相当する。コントロールではCd不検出であった。

なお、骨重量増加に抑制がみられたCd添加濃度5ppmの場合についても20ppmの場合と同様に乾燥重量、カルシウム含量、無機リン含量、オキシプロリン含量、ウロン酸含量、DNA含量を測定してその結果からそれぞれの阻害率を求めてCd添加濃度20ppmの場合の阻害率とともにTable VIIに示した。カルシウム以外の各成分の含量にみられる阻害率はCd添加濃度20ppmの場合に比べると5ppmにおいて全般的に小さいが、ウロン

TABLE IV. Hydroxyproline Content of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl_2

	Control		Cd^{2+} 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=6$)	$6.3\mu\text{g}$	$15.1\mu\text{g}$	$6.2\mu\text{g}$	$7.4\mu\text{g}$
σ	1.00	2.47	1.20	0.94
$Y-X$	$8.8\mu\text{g}$		$1.2\mu\text{g}$	

TABLE V. Uronic Acid Content of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in Existence of CdCl_2

	Control		Cd^{2+} 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=6$)	$11.5\mu\text{g}$	$41.1\mu\text{g}$	$10.9\mu\text{g}$	$10.1\mu\text{g}$
σ	0.95	1.41	2.19	2.57
$Y-X$	$29.6\mu\text{g}$		$-0.8\mu\text{g}$	

TABLE VI. DNA Content of 9-Day Tibia cultivated for Five Days in the Existence of CdCl_2

	Control		Cd^{2+} 20 ppm	
	Before the cultivation (X_0)	After the cultivation (Y_0)	Before the cultivation (X_{20})	After the cultivation (Y_{20})
Mean ($n=6$)	$13.0\mu\text{g}$	$21.3\mu\text{g}$	$12.6\mu\text{g}$	$8.1\mu\text{g}$
σ	2.57	3.73	3.46	1.87
$Y-X$	$8.3\mu\text{g}$		$-4.5\mu\text{g}$	

TABLE VII. Effect of CdCl_2 on 9-Day Tibia cultivated for Five Days

Concentration of CdCl_2	Inhibition index						Cd content
	Dry weight	Ca	iP	OH-Pro	Uronic acid	DNA	
5ppm	37 %	35 %	36 %	55 %	82 %	89 %	0.44 μg
20	105	29	61	86	103	154	1.30

酸および DNA 含量は Cd 5ppm でも著しい阻害をうけていることがみとめられ、乾燥重量増加にみられる阻害率を上回るものであった。一方カルシウム含量にみられる阻害は小さいが Cd 20ppm の場合の阻害とほぼ同程度であった。

8. 組織学的所見

Cd 添加培養骨とそのコントロールを対比すると肉眼像と同様、組織像においても著明な差異が見出された。

脛骨全般に分布する軟骨細胞は Cd 添加によって強い退行性変化を示す。細胞増殖の旺盛な骨端部を観察するとコントロールにおいては軟骨細胞の核、胞体の染色性

良好で、核は円形、類円形でクロマチンに富み、胞体は膨大して好塩基性を呈している (Fig. 2) が、これに反し、Cd 添加の方は軟骨細胞の形状不同が強く、核は濃縮、破壊し、さらには核が消失して壊死に陥った細胞も多くみとめられた (Fig. 3)。

骨幹中央部の化骨機序を比較すると、コントロールでは表層部よりの化骨の進行が明瞭で、造骨細胞増生と密な骨梁生成がみとめられる (Fig. 4) が、Cd 添加では軟骨膜下に化骨巣をみるものの骨質の形成が不良で健全な造骨細胞は全く見出されなかった (Fig. 5)。

Fig. 2. Epiphysis of the Tibia from a 9-Day Chick Embryo after Five Days' Control Culture (X 400, H-E stain)

Fig. 3. Epiphysis of the Tibia after Five Days' Cultivation in the Medium containing 20ppm of CdCl_2 (X 400, H-E stain)

Fig. 4. Central Zone of Diaphysis of the Tibia from a 9-Day Chick Embryo after Five Days' Control Culture (X 100, H-E stain)

Fig. 5. Central Zone of Diaphysis of the Tibia after Five Days' Cultivation in the Medium containing 20 ppm of CdCl_2 (X 100, H-E stain)

Fig. 6. The Distal Portion of Diaphysis of the Tibia from a 9-Day Chick Embryo after Five Days' Control Culture (X 200, PAS stain)

Fig. 7. The Distal Portion of Diaphysis after Five Days' Cultivation in the Medium containing 20ppm of CdCl_2 (X 200, PAS stain)

一方、PAS 染色によればコントロールの方が軟骨細胞とともにそれを取りまく基質の PAS 染色性が強い (Fig. 6) のに比べ、Cd 添加の方は軟骨基質が形成されてはいるものの PAS 染色性が極めて希薄であった (Fig. 7)。

考 察

組織培養骨に関して栄養要求の面あるいはホルモンの作用面などからの研究は多いが、有害性金属の作用についてはベリリウム¹¹⁾についてみられる程度であり検討されていない。

著者らは培地の Cd 濃度 5ppm ですでに鶏胚脛骨の生

長阻害が起こり、10ppm 以上ではほぼ完全に行なわれることを見出した。同時に骨生長に重要な成分含量にも変化をみとめた。

Cd 添加濃度 20ppm で無機リンと特にカルシウムの含量があまり影響をうけていないのに組織学的に化骨形成の不良がみとめられたことはカルシウム、無機リンが骨にとりこまれてもハイドロキシアパタイトの結晶にくみこまれず無構造のリン酸カルシウムとして存在することを示唆するものであり、また、骨形成の際、母核となるとされているコラーゲンの合成が強く阻害されていることも一因と推定される。

また、ウロン酸およびオキシプロリン含量が減少あるいは少ししか増加しなかったことは Cd によるコンドロイチン硫酸およびコラーゲンの合成阻害の原因となるものと推定されるが、このことは PAS 染色性が希薄であることによって組織化学的にも裏付けられたといえよう。

Cd 添加による特に著しい変化は DNA 含量の減少で、軟骨細胞の核濃縮、核崩壊とさらには壊死といった変化と深い関連性があると考えられる。

なお、細菌および動物組織における Cd の作用機作としては SH 阻害¹²⁾ oxidative phosphorylation の uncoupler 作用¹³⁾ 電子伝達系における dehydrogenase level での阻害¹⁴⁾ などあげられるが、骨生長に対する Cd の阻害機作はこれらの点を考慮に入れて今後検討する予定である。なお、さらに培養法として roller-tube 法¹⁵⁾ についても検討中である。

要 約

1. 塩化カドミウムは培地濃度 10ppm 以上で鶏胚脛骨の生長を阻害した。
2. 塩化カドミウムを 20ppm 濃度になるように添加した培養骨についてカルシウム、無機リン、オキシプロリン、ウロン酸、DNA の各含量をしらべたところ、培養による各成分の含量増加はカルシウムでは 29%、無機リンでは 61%、オキシプロリンでは 86%、ウロン酸では 103%、DNA では 154% 阻害された。
3. コントロールの培養骨では Cd が不検出であったが、Cd 添加培養骨では Cd のとりこみは明白であった。
4. 塩化カドミウム添加培養骨の組織学的所見とし

11) Y. Miyazaki, H. Hatsuda, Y. Aoyama, H. Endo, T. Takaoka, Y. Oishi, *Japan J. Exptl. Med.*, **27**, 331 (1957).

12) B. L. Vallee, J. F. Riordan, J. E. Coleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 109 (1963).

13) E. E. Jacobs, M. Jacobs, D. R. Sanadi, *J. Biol. Chem.*, **223**, 147 (1956).

14) C. E. Cross, A. B. Ibrahim, M. Ahmed, M. G. Mustafa, *Environmental Research*, **3**, 512 (1970).

15) Y. Ito, H. Endo, H. Enomoto, K. Wakabayashi, K. Takamura, *Exptl. Cell Res.*, **31**, 119 (1963).

て、軟骨細胞の高度の変性と壊死、軟骨基質の形成不良化、骨のほとんど完全な阻止などがあげられた。

謝辞 終わりに骨の組織培養についてご指導をいただいた国立遺伝研究所 黒田行昭博士に深謝いたします。