〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (4) 177-182 (1984)

カドミウムによる精巣障害関連因子の経時的变化について

佐二木順子, 福田芳生

千葉県衛生研究所

Time Course of Changes in Various Factors Associated with the Injury of Rat Testis Induced by CdCl₂

JUNKO SAJIKI and YOSHIO FUKUDA

Chiba Prefectural Institute of Public Health

Nitona-cho, Chiba 280, Japan

(Received February 1, 1984)

Long-term experiments were carried out, for up to 300 d after CdCl₂ injection, to investigate the mechanism of the testis injury induced by CdCl₂.

The results are summarized as follows;

- 1) Testis weight and lipoperoxide concentration were increased significantly at 3 d after CdCl₂ injection, and thereafter decreased steadily. The values at 300 d were very much lower than those of control group.
- 2) Although hemoglobin content in the testes treated with CdCl₂ was significantly higher at 3 d, presumably because of the intensive hemorrhage *in situ*, it decreased gradually and the value at 300 d after injection had returned almost to the control level.
- 3) In the testis at 3 d after CdCl₂ injection, edematous was found in the interstitial tissue numerous neutrophils had migrated into the seminiferous tubules and the tubules were contracted. These changes, however, disappeared as time elapsed after CdCl₂ injection. By 300 d, the seminiferous tubules were filled with materials which had a high concentration of Ca and P. The concentration of Ca in the interstitial tissues was also high. The enhancement of Ca deposition was observed in the testes of rats 3 d after CdCl₂ injection.
- 4) Although the activities of serum GOT and GPT were significantly higher at 3 d after CdCl₂ administration, they returned to the control level by 15 d after the injection and thereafter they showed normal values throughout the remainder of the observation periods. On the contrary, Al-P activity decreased significantly at 3 d after the injection. However, the enzyme activity returned to the control level at 90 d.

Keywords—calcium content; cadmium injury; hemoglobin; lipoperoxide; pathological change; rat testis; serum enzyme

はじめに

我々はカドミウム投与によってラット精巣にひきおこされる出血性の炎症の発症に脂質の過酸化が深く関与していること^{1,2)} また炎症の生じた精巣中の Ca 含量が著明に高いこと³⁾ を認めている。

カドミウムによる精巣障害は極めて重篤であり、ラットの皮下に CdCl₂ (5 mg/kg) を 1 回投与するだけで、

機能は完全に失われることが明らかである。また、約 1 年放置すると間質の腫瘍が生ずると報告されている。⁵⁾

しかしながら、長期にわたる精巣障害のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで、本報では長期にわたるカドミウムの精巣障害に脂質の過酸化がどのように関与しているか、諸元素の変動はいかなるものか等について検討を加えた。

実験材料ならびに方法

200 g 前後の雄のウィスター系ラット 84 匹をカドミウム投与群, 無処置群に分け通常飼育を行なった。

カドミウム投与群には, CdCl_2 (5 mg/kg) を背側皮下より 1 回だけ注射した。

両群とも CdCl_2 投与日から 3, 15, 30, 90, 150, 210, 300 日目にそれぞれ 6 匹ずつエーテル麻酔の上心採血を行ないと殺した。と殺前約 16 時間は絶食とした。

と殺後各臓器を摘出し, 直ちに臓器重量を測定し, 臓器中過酸化脂質値, 精巣中ヘモグロビンの測定を行なった。精巣の一部は病理標本作成のため, 10%ホルマリン液に固定し, 一部は走査電子顕微鏡による観察を行なうため, 2%グルタルアルデヒド液に固定した。なお, X線による元素分析のための標本は, 摘出後, 直ちに凍結乾燥を行なった。

実験方法

実験期間中ほぼ10日の間隔で体重測定を行なった。

心採血により得た血液を $2000 \times g$, 10分間遠心し, 分離した血清について, アルカリホスファターゼ (AL-P), 乳酸脱水素酵素 (LDH), GOT, GPT の測定をオートアナライザー (ABBOTT-VP) により行なった。

精巣中ヘモグロビンの測定は, すでに報告した二波長分光光度法⁶⁾に従った。

臓器中過酸化脂質含量の測定は TBA 法⁷⁾にしたがった。

ホルマリンに固定した標本は, アルコール系列で脱水した後, パラフィンに包埋し, $5 \mu\text{m}$ の薄切標本作成し, ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施した。

グルタルアルデヒドに固定した標本は, アセトン, 酢酸イソアミルで脱水した後, 臨界点乾燥装置 (Hitachi HCP II) にかけ, イオンコーターにて金を蒸着した。走査電子顕微鏡は Hitachi S-450 であり, 加速電圧は 20 kV であった。

X線分析のための凍結乾燥標本は, カーボン蒸着した後, 上記の走査電子顕微鏡にセットされたX線分析装置 (Kevex 7000) にて分析した。

体重, 血清中の酵素活性値, 臓器中過酸化脂質値については, 誤差分散が平均値に比例していたので, 対数変換の後統計処理 (t -検定) を行なった。他のパラメーターについては, そのまま t -検定により処理した。

実験結果

CdCl_2 投与後 300 日までの体重変化曲線を Fig. 1 に示した。 CdCl_2 投与群は, 投与後対照群と類似した増加曲線を示したが, 実験期間中, 対照群に比べ低値であった。

Fig. 1. Changes of Body Weight of Rats throughout the Experimental Period

●—●, CdCl_2 treated; ○—○, control.

Differences between control and experimental groups were tested at each sacrifice point according to the t -test after log transformation.

a) $p < 0.01$; b) $p < 0.05$.

Fig. 2. Changes of the Tissue Weight Relative to Body Weight of Rats throughout the Experimental Period

●—●, CdCl_2 treated; ○—○, control.

Differences between control and experimental groups were tested at each sacrifice point according to the t -test after log transformation.

a) $p < 0.01$; b) $p < 0.05$.

Fig. 3. Changes of Serum Enzyme Activities throughout the Experimental Period

●—●, CdCl₂ treated; ○—○, control.
Differences between control and experimental groups were tested at each sacrifice point according to the *t*-test after log transformation.
a) $p < 0.01$; b) $p < 0.05$.

各時期における臓器（肝、腎、精巣）重量については Fig. 2 に示したとおりである。肝臓重量については、投与後 15 日までは投与群が有意に高かったが、30 日目には対照群とほぼ同じ値を示した。その後、90 日目に CdCl₂ 投与群が高値を示したほかは両群に有意差は認められなかった。腎臓においては、実験期間中両群間に有意差は認められなかった。精巣では、投与後 3 日目に、CdCl₂ 投与群が高値を示したが、15 日目には著しい重量減少を示し、その減少は 300 日目まで持続した。

実験期間中の血清中酵素活性値の変動については Fig. 3 に示した。LDH については実験期間中両群間に有意な差は認めなかった。GOT, GPT については、投与群が投与後 3 日目に有意な高値を示したが、15 日以降には両群間差は認められなかった。Al-P については、投与後 15 日まで投与群が有意に低い値を示したが、その後両群間差は縮まり、90 日以降では両群間差は認められなかった。

CdCl₂ 投与ラット精巣障害において、著しい出血が観察される。各時期における出血程度を把握するため精巣中ヘモグロビン含量を測定した。その結果を Fig. 4

Fig. 4. Changes of Hemoglobin Contents in the Testis of Rats throughout the Experimental Period

●—●, CdCl₂ treated; ○—○, control.
Differences between control and experimental groups were tested at each sacrifice point according to the *t*-test after log transformation.
a) $p < 0.01$; b) $p < 0.05$.

Fig. 5. Changes of Lipoperoxide Concentrations in the Tissues of Rats throughout the Experimental Period

●—●, CdCl₂ treated; ○—○, control.
Differences between control and experimental groups were tested at each sacrifice point according to the *t*-test after log transformation.
a) $p < 0.01$; b) $p < 0.05$.

Fig. 6-1. Scanning Electron Micrograph of the Control Rat Testis
($\times 150$)

6.2. X-ray Spectra for Control Rat Testis
Shown in Fig. 6-1

に示した。CdCl₂ 投与後3日目には重度の出血のため値は著しく高かった。その後値は急速に低下した。投与後90日目までは投与群が対照群に比べ有意に高かったが、300日目においては、両群間に差は認められなかった。

臓器中過酸化脂質値の変動については Fig. 5 に示したとおりであった。

肝臓、腎臓においては、実験期間中対照群と投与群間に差は認められなかった。精巣については、投与後15日まで CdCl₂ 投与群が高値を示したが、30日以降投与群の値は低下し、210日、300日目における投与群の値の低下は著しかった。

精巣の病理学的所見は、CdCl₂ 投与後3日目では、す

Fig. 7-1. Light Micrograph of the Testis of Rat, 300 d after CdCl₂ Administration

Contraction of seminiferous tubules is observed and the tubules are filled with the substances which are heavily stained with hematoxylin. (H. E. stain $\times 150$)

7-2. Scanning Electron Micrograph of Rat Testis, 300 d after CdCl₂ Administration

Almost all tubules are filled with amorphous and homogeneous substances. ($\times 80$)

7-3. Partial Enlargement of Fig. 7-2
($\times 500$)

7-4. X-ray Spectra of the Spot of A in Fig. 7-3

Peaks of Cl and K which are rich in control specimens as shown in Fig. 6-2 lowered in spot A. In the spot, the peak of Ca is remarkably high.

7-5. X-ray Spectra for the Spot of B Which is Filled up with Amorphous and Homogeneous Substance

Nothing but Ca and P are detected in the spot.

でに報告したとおり²⁾ 激しい間質の浮腫、出血、多数の好中球の出現を伴う炎症像、精細管萎縮、精上皮の壊死等が観察された。このような精巣障害は、300日を経過すると、全例に精細管の高度な硝子様変性像が観察された (Fig. 7-1)。走査電子顕微鏡による観察では、精細管は緻密かつ均一な物質によって埋めつくされていた (Fig. 7-2, 3)。この精細管ならびに間質のX線分析で

は、Fig. 7-4, 5 に示されたとおり、先の精細管内腔を埋めつくしていた均一な物質は、Ca, P を主体とする無機物によって構成されていることが明らかであった。間質においても対照群のもの (Fig. 6-2) で高い含有率を示す K, Cl のピークは著しく減少し、Ca のピークが非常に高かった。このような Ca 含量の高まり、並びに K, Cl のピークの低下は投与後 3 日目の個体でも観察された。なお、すでに投与後 15 日目の個体の一部には、光学顕微鏡下において、300 日目のものに観察された。精細管の硝子様変性像が観察された。

考 察

我々はすでに CdCl₂ 投与後、ごく初期に生ずる精巣障害の発症ならびに進展に脂質の過酸化という現象が関与していることを報告した。^{1,2,6)} また、このような障害発症期において好中球の浸潤が著しく、好中球の活性化に伴って生ずる活性酸素が脂質過酸化のプロモーターの一つであると考えた。⁸⁾

今回、病理学的所見において、好中球の浸潤は CdCl₂ 投与後 3 日目の精巣では著しいが、投与後 30 日以降のものでは認められなかった。なお、精巣中の過酸化脂質値は、CdCl₂ 投与後 30 日以降は投与群が対照群に比べ有意に低かった。これらの結果から、好中球に由来する活性酸素が脂質の過酸化と深く関連しており、脂質過酸化現象は、CdCl₂ 投与後ごく初期に生ずるものであることが明らかになった。

CdCl₂ 投与後 15 日以降 300 日に及ぶ精巣重量の著しい低下、ヘモグロビン含量の低下、精巣組織の器質化が、精巣中過酸化脂質の低下と相まっていた事実は、CdCl₂ 投与後初期に精巣内で生じた活性酸素による酸化反応が細胞構成成分である脂質や蛋白質を再生不能な状態に至らしめたことを示すものと推測される。

精巣障害過程の X 線分析による元素組成パターンによると、再生不能な状態に陥った投与後 300 日目の精巣において、精細管内腔は Ca と P を主成分とする物質で埋められていた。間質においても、対照群の精巣で観察される Cl, K が著しく低下し、一方、Ca は増加していた。この K の低下については、Nicholson ら⁹⁾ がカドミウム中毒ラットの腎臓の組織を透過電子顕微鏡にセットされた X 線分析装置による観察の結果でも認めており、Cd が Na⁺, K⁺-ATPase の活性を阻害するという事実との関連を示唆している。K, Cl 等は細胞質中に存在する重要な電解質であり、これら無機物の低下は、CdCl₂ 投与初期 (3 日目) にも明らかであり、これら元素の著しい乱れも一連の精巣障害に深く関与しているものと考えられる。

なかでも Ca の関与については、Cd 中毒を考える上でとくに重要である。すでに Cd 中毒の精巣では、リン脂質から遊離脂肪酸への分解が著しく亢進していることが明らかになっている。¹⁰⁾ リン脂質からアラキドン酸への分解には phospholipase A₂ が関与しているが、この反応は Ca イオンにより活性化されるという報告がある。¹¹⁾ なお、前述の好中球の Chemotaxis や炎症惹起物質の生成亢進にも Ca イオンが重要な因子と考えられている。^{2,3)} 今回の X 線分析によると、Ca ピークの増加はすでに投与 3 日目に明らかであり、15 日目以降は Ca の沈着がひんばんに観察された。

最近、小野坂ら¹⁴⁾ は Ca がメタロチオネインを誘導するという報告を行なっている。Cd 障害を受けた精巣においては、中毒初期にメタロチオネインを誘導し易い金属と考えられている Zn の含量は低下しており、³⁾ Cd 結合蛋白と考えられているメタロチオネインの誘導という観点からも Ca の動態は興味深い。

今回、肝臓、腎臓の病理組織像は示さなかったが、実験期間中、精巣で観察されるような重篤な変化は肝臓や腎臓では認められなかった。とくに、脂質の過酸化という現象については、実験期間中対照群のものと何ら変わることはなかった。この結果は、精巣の Cd に対する抵抗性の弱さを示すものと考えられる。実際、精巣における活性酸素のスキャベンジャーと考えられている superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 等の酵素活性値は、肝臓に比べ非常に低いことが明らかである。⁸⁾ また、精巣内での Cd の存在形態も肝臓や腎臓とは異なっている可能性もあり、今後 CdCl₂ に対する抵抗性の臓器間差について検討する必要がある。

血清中酵素の変動について、CdCl₂ 投与後初期 (3 日目) に GOT, GPT に認められた活性値の有意な増加は、おそらく種々の中毒動物で、通常、観察される現象と同様肝臓を主とする諸臓器に由来するものと考えられる。一方、Al-P 活性値が CdCl₂ 投与後 15 日にいたるまで有意な低下を示した理由については血清中で、Al-P の含有する Zn と Cd とが置換した可能性も十分考えられ、詳細については現在検討中である。

ま と め

カドミウムによる精巣障害のメカニズムを調べるため CdCl₂ (5.0 mg/kg) 投与後長期 (300 日) にわたる実験を行ない以下の結果を得た。

1. 精巣重量、精巣中過酸化脂質値ともに CdCl₂ 投与後 3 日目には値の有意な増加を認めるが、その後値は低下し続け 300 日目における値の低下は正常群の値に比

べ著しかった。

2. 精巢中ヘモグロビン含量については、 CdCl_2 投与後3日目には激しい出血のため、値の有意な増加を認めるが、その後値は低下し、300日目には正常群の示す値と変らなかった。

3. CdCl_2 投与後3日目の精巢では間質の浮腫、好中球の浸潤、精細管萎縮等著しい。日数経過とともにこの様な像は消失し、300日を経過すると精細管はCa, Pを

主体とする物質で埋め尽くされた。間質においてもCaの占める割合は高かった。なお、このようなCa含量の高まりは、すでに CdCl_2 投与後3日目の精巢でも観察された。

4. 血清中GOT, GPTは投与後3日目に高値を示すが、15日以降は正常値であった。一方、Al-Pは投与後3日目には著明な値の減少を示すがその後回復し、90日以降は正常値であった。

引用文献

- 1) J. Sajiki, Y. Fukuda, E. Fukushima, *J. Appl. Biochem.*, **3**, 467 (1981).
- 2) J. Sajiki, Y. Fukuda, E. Fukushima, A. Hirai, Y. Tamura, A. Kumagai, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 339 (1982).
- 3) 佐二木順子, 福島悦子, 福田芳生, 平井愛山, 田村 泰, 吉田 尚, 炎症, 「投稿中」.
- 4) A.B. Kar, R.P. Das, *Acta Biol. Med. Ger.*, **5**, 153 (1960).
- 5) S.A. Gunn, T.C. Gould, W.A.D. Anderson, *J. Natl. Cancer Inst.*, **31**, 745 (1963).
- 6) 佐二木順子, 福島悦子, 藤代良彦, 衛生化学, **29**, 389 (1983).
- 7) H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
- 8) 佐二木順子, 平井愛山, 田村 泰, 炎症, **3**, 217 (1983).
- 9) J.K. Nicholson, M.D. Kendall, D. Osborn, *Nature (London)*, **304**, 633 (1983).
- 10) T. Shibata, Y. Yoshida, K. Waku, *Eisei Kagaku*, **29**, 46 (1983).
- 11) H. Van den Bosch, *Biochem. Biophys. Acta*, **604**, 191 (1980).
- 12) P.H. Naccache, H.J. Showell, E.L. Becker, R.I. Shaafi, *J. Cell Biol.*, **83**, 179 (1979).
- 13) M.C. Conroy, R.P. Orange, L.M. Lichtenstein, *J. Immunol.*, **116**, 1677 (1976).
- 14) 小野坂敏見, 吉屋祥子, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一, 衛生化学, **29**, 221 (1983).