〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
31 (2) 59-71 (1985)

培養骨におけるカドミウムの骨代謝に及ぼす作用及び
カドミウムと銅、亜鉛との相互作用

宮原龍郎, 狐塚 寛
富山医科薬科大学

The Direct Effect of Cadmium on Bone Metabolism and Interaction between
Cadmium and Zinc or Copper in Tissue Culture

TATSURO MIYAHARA and HIROSHI KOZUKA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical & Pharmaceutical
University, 2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan

The direct effect of cadmium on bone metabolism and interaction between cadmium and zinc or copper in tissue culture are described in this review. One ppm cadmium stimulated ^{45}Ca release from ^{45}Ca -prelabeled bone from 9-d-old chick embryo, but 30 ppm cadmium inhibited ^{45}Ca release. Mineralization and collagen synthesis were inhibited by cadmium of 1 ppm and above. Since Cd-treated bones in the culture system showed a decrease in both mineral and collagen, the change in the cultured bone is not osteomalatic but osteoporotic and agrees with the bone change of cadmium-treated animal rather than with that of Itai-itai diseased patient. The difference in bone lesion between humans and cadmium-treated animals suggests that factors other than cadmium participate in the etiology of Itai-itai disease. We gave attention to zinc, copper and lead as factors other than cadmium, which were found in the bones of Itai-itai diseased patients and in cadmium-polluted rice.

A cadmium-induced decrease in collagen content was protected by zinc but enhanced by copper. A cadmium-induced decrease in mineral content was unaffected by zinc and copper. These results point out that copper aggravates cadmium-induced osteoporotic change and cadmium plus zinc-treated bone shows a decrease in mineral without a decrease in bone matrix to give an osteomalacia-like change. Therefore, it is suggested that a ratio as well as each dose of three metals influences whether bone damage *in vivo* is osteoporotic or osteomalatic.

Keywords—cadmium; zinc; copper; bone metabolism; Itai-itai disease; mineralization; collagen synthesis; ^{45}Ca release; tissue culture; zinc-copper-cadmium interaction

はじめに

イタイイタイ病（イ病）の発症にカドミウム（Cd）が関与している¹⁾とされてから、イ病でみられる骨軟化症が Cd 投与動物で再現されるか明らかにするために、いろいろな観点から多くの研究がなされてきたが、いまだはっきりした結論が出されていないというのが現状である。

Cd 投与動物で認められた骨変化の多くは Table I に示すように骨粗しょう症であるが、骨軟化症であることを認めた報告もないわけではない。いずれにしても Cd

により骨障害が生じることは明らかであり、その発症機序としては Cd によって腎^{9,12,13)}や腸管^{14,15)}が障害を受け、その結果、骨に障害を生ずるという間接作用と骨に直接 Cd が作用して骨障害が引き起こされるという直接作用が考えられている。骨に Cd が直接作用し得るとする根拠は Cd の経口投与の早期に骨変化が生じ、それが腎変化より先行することである。^{3,6)}このことはイ病の剖見例で骨軟化症が認められたのにもかかわらず、腎障害が認められない場合がある¹⁶⁾ということからも興味を持たれるところである。著者らはこの Cd の骨に対する

TABLE I. Histological Bone Changes Caused Solely by the Administration of Cd

Animal	Dose of Cd	Feeding period	Histological changes in bone	
			porotic	malatic
Rat ²⁾	200 ppm in diet	12 weeks	+	+
Mouse ³⁾	150 ppm in drinking water	110 d	+	—
Rabbit ⁴⁾	200 ppm in drinking water	380 d	+	+
Rat ⁵⁾	50, 100, 200 ppm in drinking water	12 months	+	—
Rat ⁶⁾	30, 100, 300 ppm in diet	12 weeks	+	—
Rat ⁷⁾	10, 50, 100, 200 ppm in drinking water	8.5 months	+	—
Monkey ⁸⁾	300 ppm in diet	1 year	—	—
Rat ⁹⁾	100 ppm in diet + 150 μ g $\times$ 22 times (subcutaneously)	500 d	—	+
Rat ¹⁰⁾	10, 50, 100 ppm in diet	19 months	—	+
Monkey ¹¹⁾	100 ppm in diet	5 years	—	—

TABLE II. The Content of Cd, Zn, Cu and Pb in Rice, Human Bone and Hair

Sample	Cd	Zn	Cu	Pb
(μg/g ash)				
Bone of patients with Itai-itai disease ¹⁾				
example No. 1	300	800	11	37
2	270	6700	33	280
3	3800	3000	390	530
Bone of the death by accident	6	74	9	23
The average value of 99 bones in America	ND	66	0.6	6.6
(μg/g dry weight)				
Cd-polluted rice ²²⁾	2.35	17.7	3.33	0.18
Cd-unpolluted rice	0.07	14.4	1.54	0.01
Hair of women in Cd-polluted area ²³⁾	1.5	250	9.6	—
Hair of normal Japanese women	0.4	199	12.6	—

直接作用に着目し、Cd が骨に直接作用し得るのか、直接作用すればどのような作用を示すのか明らかにするために培養骨を用いて研究を開始した。

ところで、先に述べたように Cd 投与動物では骨粗しょう症様の骨変化が主であるのに対し、イ病患者では骨軟化症とされている。両者の識別は組織学的になされるものであるが、量的には両者の共通点は骨塩の減少で、相違点は前者では骨基質も減少するのに対し、後者では減少しないことである。培養骨では Cd により骨塩の減少と共に骨基質の減少が見られた¹⁷⁾ので、Cd 投与動物の場合と同様の結果が得られたことになる。

イ病の場合は Cd 以外の因子が多く存在すると考えられるわけで、その因子の関与を明らかにするために低カルシウム (Ca)・低たん白食^{3,18-20)}や妊娠の負荷²¹⁾などの影響が検討されたが、これらの条件はむしろ骨粗しょう症骨変化を増強するものであった。したがって、これら以外の何らかの因子が Cd の骨基質含量の低下作用を減弱している可能性がある。著者らはそのような因子

として Cd と共存する元素に着目した。Table II に示すように、イ病患者の骨¹⁾には一般人に比べ Cd は勿論、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu)、鉛 (Pb) が多く含まれることがわかる。著者らが分析した Cd 汚染米²²⁾では非汚染米に比べ Cd と共に Pb が多いが、Zn, Cu はそれほど多くなかった。最近の毛髪分析によれば富山県神通川流域の Cd 汚染地域住民では非汚染地域住民に比べ Cd が約 4 倍、Zn は約 1.3 倍と多いのに対して Cu は逆に少ない結果が得られている。²³⁾このように分析する対象により Cd と共存する Zn, Cu, Pb の量や Cd との比は異なるが、イ病患者の骨の分析結果からは少なくともイ病患者が Cd と共に Zn, Cu, Pb を摂取したことは間違いない事実といえよう。

そこで、これら Zn, Cu, Pb が Cd の作用にどのような影響を与えるか検討したところ、Zn が Cd の骨基質含量低下作用に対して保護的に作用する²⁴⁾のに対して、Cu は Cd によるこの作用を増強する²⁵⁾ことが明らかにになったので、以下に詳述する。

I. 骨の機能・形態の概要とその培養方法

骨は骨基質と骨塩とから成り、骨塩は骨基質に沈着している。骨塩が沈着していない類骨組織が観察された場合が骨軟化症であり、最近、その検出法が吉木²⁶⁾により考案され、イ病の骨生検にも使用されている。¹⁶⁾ ところで、骨は絶えず再構成され、骨吸収時には骨基質の分解と骨塩の放出が同時に起こり、次いで骨基質が形成され、骨塩が沈着する。²⁷⁾ したがって骨の維持には骨形成と骨吸収のバランスがとれていることが重要である。Cd 投与動物やイ病患者において観察されている骨塩の脱出は骨吸収の促進あるいは骨形成の阻害によって、このバランスがくずれた結果と考えられる。このことから著者らは骨吸収と骨形成の両面から Cd の骨に対する作用を検討することとした。

ところで、骨の培養体としては長管骨と膜性骨の両方が用いられるが、後者は骨吸収実験に繁用される²⁸⁾ のに対し、前者は骨形成及び骨吸収の両方に用いられている。著者らは遠藤の方法²⁹⁾ に従い前者に属する 9 日目鶏胚の大腿骨及び脛骨を用いた。これらの骨では軟骨細胞が主である骨端部と骨皮質部に石灰化が見られる骨幹部とから成る。両部位共にコラーゲンとコンドロイチン硫酸の両方を含有するが、骨端部の方が合成活性が高く量的にもこれら化合物が多い。軟骨でなく骨の代謝をみるためには骨端部を切り離して骨幹部の分析をする方がより適切な場合もある。培養方法は Roller-tube 法²⁹⁾ と Stainless-steel grid 法³⁰⁾ を用いたが、前者は平角試験管に骨を付着させ、回転ドラムにセットして回転しながら培養する方法で、骨が培地と気相に交互に接触することになり、非常に良い方法であるが、骨を付着させることや pH 調節に難点がある。後者はステンレスのリングの上にグリッドを置き、その上に骨を置いて CO₂ ふ卵器中で培養する方法で、前者に比べ操作が簡単で pH 調節も容易であるが、静置法であるという欠点はある。このように両者の方法には一長一短があるので、実験の都合上で骨形成は Roller-tube 法で、骨吸収は Stainless-steel grid 法で行なった。

培地は当初、血清や胚抽出液を含む天然培地³¹⁾ を用いていたが、培地の分析の必要性や、これらに含まれるホルモン等の影響を排除するために遠藤の合成培地²⁹⁾ を用いた。この培地は基質合成には問題はなく、石灰化が先の天然培地に比べ劣るが、著者らの目的には大きな支障はなかった。

II. 骨代謝に対する Cd の作用

In vivo における Pb, Sn, Zn, Cd, Al などの金属イオンによる生体内 Ca 代謝異常の発現に関して、最近、

山口³²⁾ が本誌に優れた総説を発表しているので、Table III には組織培養における骨代謝に対する金属イオンの効果をまとめた。表中の金属イオンの中では Cd, Cu, Hg に強い骨代謝障害作用が認められる。なお、最近、透析患者でみられる骨軟化症の原因とされている Al について著者らの系で検討したところ、Al が石灰化の阻害と脱塩の促進を引き起こし、この点 Cd の作用と類似しているが、Al が骨基質代謝に影響を及ぼさない点で Cd と異なることを明らかにした。⁴⁰⁾ ところで、表中に示したように著者らが研究する以前に久保田³³⁾ が組織培養において Cd による鶏胚骨の成長阻害を認めているが、詳細な検討はなされていなかった。そこで、まず Cd 単独の作用を骨吸収と骨形成の両面から検討した。

1. 骨吸収に対する Cd の作用⁴¹⁾ ⁴⁵Ca で prelabel した 9 日目鶏胚脛骨を 0.2, 1.0, 5.0 及び 30.0 ppm の Cd と 6 日間培養し、培地へ放出された ⁴⁵Ca を測定したところ、0.2 及び 5 ppm の Cd ではコントロールと有意な差はなかったが、1 ppm の Cd では有意な ⁴⁵Ca の放出の促進が見られ、30 ppm の Cd では逆に抑制が見られた (Table IV)。この結果から骨中にある量の Cd が蓄積すると ⁴⁵Ca の放出が促進され、更に高濃度に蓄積すると逆に阻害的に作用することが考えられる。ここで注目したいのは 1 ppm という低い Cd 濃度で ⁴⁵Ca の放出が促進されたことで、以下にその促進機構について検討した。

骨中の ⁴⁵Ca が培地中の stable な Ca と交換するのを Cd が促進する可能性があるが、⁴⁵Ca の放出に伴って骨塩含量の低下が見られたので、その可能性は打ち消された。次に Cd が骨塩に取り込まれ骨塩の溶解を促進させる可能性については Hydroxyapatite (HA) の結晶を Cd と pH 7.5 のトリス緩衝液中で 3 日間保温して調べたところ、むしろ逆に HA の溶解は Cd により抑制され、この可能性は無いと思われたが、この点を更に確かめるために active な骨吸収を抑えるため骨を 75°C、5 分間処理して Cd の効果を調べた。この不活性化した骨では intact bone でみられた Cd による ⁴⁵Ca の放出促進は認められなかった。したがって、Cd による ⁴⁵Ca の促進は active resorption の促進によるものと考えられた。

ところで、Parathyroid Hormone (PTH) による active resorption の促進のメカニズムは Vaes⁴²⁾ によって次のように考えられている。PTH は解糖を促進し、乳酸の生成を増加させ、乳酸は骨塩を溶解し、一方では PTH は lysosomal enzyme の合成を高め、その酵素が骨塩の除去された骨基質を分解する。

TABLE III. The Effect of Metal Ion on the Bone Metabolism in Tissue Culture

Metal ion	Explants	Concentration	Effects on bone metabolism
Be ²⁺ ³¹⁾	Tibia from 9-d-old chick embryo	10000 μM	Alkaline phosphatase ↓ Ca content ↓
Cd ²⁺ ³³⁾	Tibia from 9-d-old chick embryo	>7.3 μM	Bone growth ↓
Cu ²⁺ ³⁴⁾	Tibia and femur from 7.5-d-old chick embryo	>79 μM	Length and wet weight ↓
Zn ²⁺ ³⁴⁾	Tibia and femur from 7.5-d-old chick embryo	38—118 μM	Length and wet weight ↑
		>153 μM	Length and wet weight ↓
Rh ³⁺ ³⁵⁾	Calvaria from 21-d-old-rat fetus	10 μM	Collagen synthesis ↓
Au ³⁺		100 μM	Collagen synthesis ↓
Co ²⁺		100 μM	Collagen synthesis ↓
Ni ²⁺		100 μM	Collagen synthesis ↓
Pd ²⁺ ³⁶⁾	Tibia from 10-d-old chick embryo	>60 μM	Collagen synthesis ↓ Prolyl hydroxylase ↓ (Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Pt ⁴⁺)
Hg ²⁺ ³⁷⁾	Tibia from 10-d-old chick embryo	>10 μM	Protein synthesis ↓ Collagen synthesis ↓ Chs synthesis ↓
		100 μM	DNA and RNA synthesis ↓
Li ⁺ ³⁸⁾	Long bone from 21-d-old rat fetus	>3000 μM	⁴⁵ Ca release ↓ Lysosomal enzyme release ↓
Cu ²⁺ ³⁹⁾	Calvaria from 6-d-old mouse	>1 μM	⁴⁵ Ca and Hyp release ↓
		>10 μM	Collagen, DNA and protein synthesis ↓
Al ³⁺ ⁴⁰⁾	Femur from 9-d-old chick embryo	>100 μM	Mineralization ↓ Demineralization ↑

TABLE IV. Effect of Cd Concentrations on the Release of Previously Incorporated ⁴⁵Ca from Chick-Embryo Tibias Cultured for 6 d

Cd treatment (ppm)	⁴⁵ Ca release (% total radioactivity)	
	Control	Treated
0.2	55.3±0.9	57.1±1.6
1.0	52.3±1.7	59.5±1.1 ^{a)}
5.0	55.9±1.7	57.0±2.0
30.0	55.9±1.4	45.2±1.2 ^{b)}

Each value represents the mean±S.E. of four samples.

a) Significantly different from paired control value, $p < 0.05$.b) Differs from control, $p < 0.01$.

培地への酸性フォスファターゼの放出及びコラーゲンの分解は 1 ppm の Cd によってむしろ抑制されたが、乳酸の生成は促進された (Table V). この乳酸生成をモノヨード酢酸 (IAA) で抑えると Cd による ⁴⁵Ca の放出促進は認められなかった. これらの結果から, Cd による骨塩の放出時には PTH の場合と異なって lysosomal enzyme の放出及び骨基質の分解の促進を伴わないこと及び Cd による骨塩の放出促進は乳酸の生成促進が 1 つの要因となっていることが考えられた. なお, Cd はアンカプラーの作用を有する⁴³⁾ので, Cd が二次的に解糖を亢進して乳酸生成の増加を来したものと推察される. このことはラット肝培養細胞において Cd により乳酸/ピルビン酸比が上昇する⁴⁴⁾ことから可能性が

TABLE V. Effect of Cd on the Lactate Production and ^{45}Ca Release in Bones Cultured for 2 d in the Presence and Absence of 1 mM Monoiodoacetic Acid (IAA)

Treatment	Lactate production (μg)		^{45}Ca release (% total radioactivity)	
	Control	1 ppm Cd	Control	1 ppm Cd
Untreated bone	250.0 $\pm$ 6.4	287.6 $\pm$ 10.9 ^{a)}	58.6 $\pm$ 0.7	61.7 $\pm$ 0.5 ^{a)}
IAA-treated bone	22.6 $\pm$ 2.9	27.0 $\pm$ 6.2	47.5 $\pm$ 1.5	48.9 $\pm$ 1.9

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of four samples.

a) Significantly different from paired control value, $p < 0.01$.

Fig. 1. Effect of Cd Concentrations on the Pi Content of Embryonic Chick Femurs Cultivated for 6 d

a) Significantly different from control value, $p < 0.05$.

b) Significantly different from control value, $p < 0.01$.

c) % Difference in Pi content

$$= \frac{\text{Pi content of (treated-untreated)bone}}{\text{Pi content of untreated bone}}$$

Fig. 2. Effect of Ca Concentrations on the Pi Content of Embryonic Chick Femurs Cultivated for 6 d in the Presence of 5 ppm Cd

b), c) See footnote to Fig. 1.

ある。

以上のように、低濃度の Cd によって骨塩の放出が促進されたことから、Cd が直接骨からの脱灰を引き起こす可能性が示された。

2. 骨形成に対する Cd の作用

2.1 石灰化に対する Cd の作用⁴⁵⁾——骨吸収の場合と同じ濃度の Cd で大腿骨と 6 日間培養したところ、骨中無機リン (Pi) 含量は 1 ppm 以上の Cd で減少することが認められた (Fig. 1)。また、 ^{45}Ca 及び ^{32}P の取り込みも 2 日間培養で Cd によって抑制された。したがって、Cd は石灰化に対して抑制作用を有することが示された。Fig. 2 は Pi 濃度を 2 mM と一定にし、Ca 濃度を変化させた場合の骨中 Pi 含量に対する Cd の影響をみたもので、Ca 濃度が低くなるにつれ、Cd の石灰化

抑制作用が強まることが認められた。同様な結果は Pi 濃度を低下させた場合も認められ、これらの結果は *in vivo* で Cd による腸管や腎障害によって血清中の Ca や Pi 濃度が低下した場合、Cd の石灰化に対する作用が増強される可能性を示すもので興味ある結果である。骨吸収の場合と異なり、IAA で不活性化した骨においても Cd による石灰化阻害が認められたので、Cd による石灰化阻害はむしろ物理化学的な骨塩沈着の阻害によるものと思われる。

ところで、骨塩の生成過程はまず Ca^{2+} と Pi から無晶形のリン酸カルシウム (ACP) が生成し、その ACP が結晶性の HA に変換し、次いで HA の結晶が成長してゆくと考えられている。⁴⁶⁾ この生成過程の内どの部分で Cd が抑制的効果を示すか、non-vital な系であるが

TABLE VI. Effect of Cd on Collagen Synthesis and Degradation of Embryonic Chick Bone Cultured for 6 d

Cd level in medium (ppm)	Hyp ($\mu\text{g}/\text{bone}$) recovered			Hyp synthesized ($\mu\text{g}/\text{bone}$) (4)	% Degradation ($2/3 \times 100$)
	Bone (1)	Medium (2)	Total bone and medium (3)		
0	13.1 ± 0.5	18.9 ± 0.8	32.1 ± 0.6	22.5 ± 0.4	59.0 ± 1.7
0.2	15.0 ± 0.4	$15.3 \pm 0.7^{a)}$	30.2 ± 0.8	20.5 ± 0.9	50.2 ± 1.2
1.0	$11.7 \pm 0.8^{a)}$	$13.8 \pm 0.9^{a)}$	$25.5 \pm 0.9^{a)}$	$15.4 \pm 0.5^{a)}$	54.0 ± 2.7
5.0	$10.6 \pm 0.8^{a)}$	$12.8 \pm 0.6^{a)}$	$23.4 \pm 1.2^{a)}$	$14.2 \pm 0.6^{a)}$	55.0 ± 1.5
30.0	$10.1 \pm 0.4^{a)}$	$13.0 \pm 0.5^{a)}$	$23.1 \pm 0.8^{a)}$	$13.3 \pm 0.4^{a)}$	56.4 ± 1.2

Values are means $\pm$ S.E. for 4 sets of bones.

a) Significantly different from the control value, $p < 0.05$.

Fig. 3. Inhibitory Effect of Cd on the Rate of Formation of Hydroxyapatite as Measured Titrimetrically at pH 7.4 with a pH-Stat Instrument

Number in figure is a concentration (ppm) of Cd added.

検討した。Fig. 3 は pH-stat 法⁴⁷⁾で調べたものであるが、Cd 無添加の場合において見られる1度目のアルカリ消費の上昇は ACP の生成に、2度目の上昇は HA の生成に由来するものである。Cd の添加により ACP の生成は影響を受けていないが、HA の生成は明らかに抑制されることが認められた。濁度法⁴⁸⁾によっても同様の結果が得られたことから、Cd は ACP の生成過程には影響せず、HA への変換の過程を阻害することが明らかになった。なお、Cd はアルカリ性フォスファターゼ (ALP) を阻害する⁴⁹⁾ので、ピロリン酸 (PPi) を分解するといわれる ALP が阻害されれば PPi が蓄積し ACP から HA の変換を阻害する⁴⁰⁾可能性があり、biological な石灰化に対する Cd の作用も無視できない。

このように Cd が石灰化抑制作用も有することが明らかになり、骨塩の放出促進と石灰化の阻害の両作用により骨塩含量の低下を引き起こすことが示された。同様な

結果は安藤ら⁵⁰⁾によって *in vivo* で得られており、Cd の長期摂取は骨への Ca 沈着の低下と骨吸収の刺激により骨 Ca の減少を引き起こすものと考察している。

2.2 コラーゲン代謝に対する Cd の作用⁵¹⁻⁵³⁾——Cd による腎及び腸管障害の面から骨塩代謝に関して多くの研究がなされているが、骨基質の代謝に関しては余り研究されていない。井口らはイ病患者的の骨においてコラーゲンの分解が亢進していることを指摘し、⁵⁴⁾ コラーゲンの架橋に関与する lysyl oxidase が Cd によって抑制される⁵⁵⁾ことを報告している。安藤ら⁵⁰⁾は Cd 投与動物で骨の酸性水解酵素の活性上昇がみられたにもかかわらず、骨コラーゲン含量には影響がなかったと報告しているが、坂元ら⁵⁶⁾は Cd 投与動物で [¹⁴C]-Proline (Pro) 代謝に影響が見られたと報告している。

著者らは骨基質の主成分であるコラーゲンの代謝に対する Cd の作用を検討した。鶏胚大腿骨に Cd を添加し 6 日間培養後、骨と培地中の hydroxyproline (Hyp) を分析したところ、Table VI の結果を得た。Hyp の合成量は 1 ppm 以上の Cd で低下しており、Hyp の培地中への放出も 0.2 ppm 以上の Cd で抑制されているが、分解率はコントロールと有意な差が見られなかった。更に [³H]-Pro から [³H]-Hyp の生成を 2 日間培養骨で調べたところ、0.5 ppm 以上の Cd で抑制された。これらのことから、Cd はコラーゲンの分解系には影響を及ぼさず、コラーゲンの合成を阻害することが明らかにされた。

ところで、Pro はまずコラーゲン性ペプチドであるプロトコラーゲンに取り込まれ、Fe²⁺ などの cofactor の存在下で prolyl hydroxylase によって水酸化されて Hyp になる。そこでこの Hyp 生成のどの段階で Cd によって阻害を受けるのか検討した。Table III に Cd が prolyl hydroxylase を阻害する³⁰⁾との報告はあるが、その阻害濃度などについて一切の報告がなされてい

TABLE VII. Effect of Cd on the Incorporation of ^3H -Proline into Collagenase-Digestible Protein (CDP) and Non-Collagen Protein (NCP) in Chick-Embryo Tibias Cultured for 2 d

Treatment	TCA soluble fraction (dpm $\times 10^{-3}$)	CDP (dpm $\times 10^{-3}$)	NCP (dpm $\times 10^{-3}$)
Control	16.4 $\pm$ 2.7 (100)	21.3 $\pm$ 3.8 (100)	23.1 $\pm$ 4.1 (100)
1 ppm Cd	8.6 $\pm$ 1.8 (52)	10.2 $\pm$ 4.0 (48)	15.2 $\pm$ 3.7 (66)
Control	23.3 $\pm$ 3.9 (100)	18.9 $\pm$ 5.1 (100)	28.1 $\pm$ 5.6 (100)
2 ppm Cd	7.0 $\pm$ 1.4 (30)	3.8 $\pm$ 1.1 (23)	12.6 $\pm$ 2.4 (50)

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 samples.

なかったので、まず部分精製した本酵素に対する Cd の作用を調べた。

Prolyl hydroxylase に対して 0.5 ppm 以上の Cd が阻害を示したが、2 ppm の Cd と培養した骨では本酵素の活性は低下していなかった。次にプロトコラーゲンの生成に対する Cd の作用をみるために培養骨の TCA-insoluble fraction に protease free の collagenase を作用させ collagenase-digestible protein (CDP) と non-collagen protein (NCP) を得て、CDP と NCP への ^3H -Pro の取り込みを調べた。Table VII に示すように CDP への ^3H -Pro の取り込みは Cd によって低下することが認められた。なお、CDP 中の ^3H -Pro と ^3H -Hyp を測定したところ、 ^3H -Hyp/ ^3H -Pro の比は Cd によって変わらず、また、水酸化の不完全な underhydroxylated collagen⁵⁷⁾ も Cd 培養骨で蓄積されることが認められた。これらのことから、Cd による Hyp 生成の抑制はプロトコラーゲン中の Pro の水酸化抑制によるものでなく、プロトコラーゲンの合成抑制に起因するものと考えられた。この点、水酸化抑制が原因でコラーゲン合成阻害を引き起こす Pd⁵⁸⁾ や Pb⁵⁹⁾ と異なるところである。

以上の骨吸収と骨形成に対する Cd の作用の結果から考えると、骨塩の放出促進と石灰化阻害により骨塩の減少を引き起こす Cd の濃度でコラーゲン含量の低下が観察されたことは Cd 培養骨における骨変化は骨粗しょう症様の変化であることを示唆するもので、組織学的な所見¹⁷⁾ でも同様な結果が得られた。すなわち、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からの化骨の進行が明瞭で、造骨細胞の増生と密な骨梁生成が認められるが、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。

III. Cd と他の金属との相互作用

金属の相互作用について 和田⁵⁹⁾ や山根⁶⁰⁾ の優れた総

説があるが、Cd と他の金属との相互作用についてまとめたのが Table VIII である。この表から Cd の種々の毒性は Zn, Cu, Se, Co, Ca, Fe で保護されるが、Cu, Co の場合、逆に Cd の毒性を増強するということが分かる。それらの報告の中でも Cd 投与動物の骨重量の減少が Cu により増強されるという小島ら⁶¹⁾ の報告は本研究との関連で特に興味をもたれた。また、清水ら⁶¹⁾ はラットにおいて Cd によって引き起こされた骨の水分と Ca 含量の異常な割合は Zn との同時投与により保護されると報告している。骨における Cd と他の金属との相互作用を調べた報告はこの 2 例位で、しかも充分な検討がなされていないように思われる。この点においても Cd の骨に対する作用が他の金属でどのような影響を受けるか著者らの系で検討する必要性を痛感した。

1. Cd と Zn の相互作用²⁴⁾ 8.9 μM (1 ppm) の Cd に 1, 2, 4 倍量の Cu, 1, 3, 9 倍量の Zn, 又は 5, 10 倍量の Pb を共存させ、大腿骨と 6 日間培養したところ、Fig. 4 に示すように Zn 濃度の増加に従って Cd による Hyp 含量の低下が打ち消されたが、Cu 及び Pb の共存の場合は Zn と同様な保護効果は認められなかった。なお、Cd による石灰化阻害はいずれの金属の共存によっても打ち消されなかった。

Zn による保護効果が Cd の骨への取り込み抑制によるか見るために骨中の Cd 含量を測定したところ、Zn 共存の場合の方が Cd 単独の場合に比べ Cd 含量が多いことが見出された (Table IX)。Cu 及び Pb ではそのような結果は得られなかった。

次に骨中の Cd の細胞内分布を調べたところ、培養 4 日間、6 日間になるにつれ、細胞質画分の Cd が Zn と Cd の共存で Cd 単独に比べ著しく増加することが認められた。この細胞質画分の Cd の存在形態を知るためにゲル透過したところ、Cd は void volume (HM)、分子量約 10000 (MM) と約 2500 (LM) の 3 つの画分に見出され、MM 画分の Cd が培養 4 日以降 Zn と Cd 共

TABLE VIII. Interaction between Cd and Other Metals

Metals	Toxic effect of Cd	Influence of the metal on the toxicity of Cd
Zn ⁶¹⁾	Weight depression and abnormal proportion of water and Ca in bone	protect
Zn ⁶²⁾	Damage to the Gausserian ganglion and spinal sensory ganglia	protect
Zn ⁶³⁾	Lesion in the cerebrum and cerebellum	protect
Zn ⁶⁴⁾	Damage to the cultured cerebellum	protect
Zn ⁶⁵⁾	Toxicity for mouse cells	protect
Zn ⁶⁶⁾	Decrease in body weight and renal tubular injury	protect
Zn ⁶⁷⁾	Reduction of bone alkaline phosphatase	protect
Zn ⁶⁸⁾ Ca ⁶⁸⁾	Growth inhibition of tetrahymena	protect
Zn ⁶⁹⁾ Se ⁷⁰⁾	Teratogenic malformation	protect
Zn ⁷¹⁾ Co ⁶²⁾ Se ⁷²⁾	Testicular injury	protect
Zn ⁷³⁾ Ca ⁷⁴⁾ Se ⁷⁵⁾	Hypertension	protect
Zn ⁷⁶⁾ Cu ⁷⁶⁾ Fe ⁷⁷⁾	Anaemia	protect
Se ⁷⁸⁾	Ovarian damage	protect
Se ⁷⁹⁾	Damage to the cultured cerebrum	protect
Cu ⁸⁰⁾	Mortality in chick	protect
Cu ⁸¹⁾	Decrease in weight of kidney, bone and pancreas	enhance
Cu ⁸²⁾	Mortality in mouse	enhance
Cu ⁸³⁾	Mortality in rat	enhance
Cu ⁸⁴⁾ Co ⁸⁴⁾	Damage to the cultured cerebellum	enhance

Fig. 4. Effect of Zn, Cu, or Pb on the Hydroxyproline Content in Bone Cultured with Cd

Nine-d-old chick embryonic femur was cultured for 6 d with different concentrations of Zn, Cu, or Pb in the presence of 8.9 μM Cd. Values are the means $\pm$ S.E. for three or four bones. a) Significantly different from Cd treatment, $p < 0.05$.

存で著しく増加することが認められた (Fig. 5). MM 画分は分子量が約 10000 と低分子であること, [^{14}C]-シスチンが取り込まれ, [^3H]-ロイシンが取り込まれないこと, Cd とシスチンの比が約 1:3 であることからメタロチオネイン⁸⁵⁾ (MT) 様たん白と考えられた. 回復効果のなかった Cu 及び Pb の場合, Zn と Cd の共存の場合に比べ MM 画分への Cd の取り込みは非常に少

TABLE IX. Effect of Zinc, Copper, and Lead on the Cadmium Content in Bone

Treatment	Cd (nmol/bone)
Cd 8.9 μM	2.9 $\pm$ 0.4
Cd 8.9 μM + Pb 44.5 μM	3.4 $\pm$ 0.3
+ Pb 89.0 μM	2.7 $\pm$ 0.2
Cd 8.9 μM + Cu 8.9 μM	1.6 $\pm$ 0.4
+ Cu 17.8 μM	2.0 $\pm$ 0.4
+ Cu 35.6 μM	2.1 $\pm$ 0.4
Cd 8.9 μM + Zn 8.9 μM	6.3 $\pm$ 0.3 ^{a)}
+ Zn 26.7 μM	6.0 $\pm$ 0.4 ^{a)}
+ Zn 80.1 μM	4.6 $\pm$ 0.8 ^{a)}

Values are means $\pm$ S.E. for three or four bones.

a) Significantly different from Cd treatment, $p < 0.001$.

なかった.

これらのことから, Zn による回復効果は次のように考えられる. すなわち, Cd 単独の場合, Cd により MT 様たん白が誘導され, 一部の Cd が捕捉されるが, 捕捉されない Cd が毒性を発現する. Zn が共存すると Zn により誘導された多量の MT 様たん白に Cd が捕捉され, Cd の毒性が発現しないのであろう. *In vivo* で Cd⁸⁶⁾ や Hg⁸⁷⁾ の毒性が Zn で打ち消されるメカニズムも同様に考えられているが, 最近 Zn が MT の誘導の他に脂質過酸化の防禦機構を高めることにより無機水銀の毒性を抑制する⁸⁸⁾ ことが示唆されているので,

Fig. 5. Sephadex G-75 Elution Profile of 100000g Supernatant Fraction from 30 Bones cultured for 2 [A], 4 [B], or 6 [C] days with $8.9 \mu\text{M}$ Cd in the absence (—) or presence (.....) of Zn ($26.7 \mu\text{M}$)

Molecular weight was estimated by blue dextran (a), egg albumin (b), chymotrypsinogen (c), cytochrome c (d), and DNP-alanine (e).

MT の誘導以外の面からのアプローチも必要と思われる。

なお、Cd により骨で MT が誘導されるか現在まだ明らかではない。木村ら⁸⁹⁾は Cd 投与動物の骨で MT 様たん白が誘導されることを初めて報告したが、廣野ら⁹⁰⁾によれば Cd 投与ラットの骨から得られた MT 様たん白は肝の MT とアミノ酸組成がかなり異なるとされている。著者らの幼若骨と彼等の成熟骨とではかなり異なるが、Cd の骨に対する作用を考える上で、Cd や Zn 等で骨においても果して肝と同じ MT が誘導されるか明らかにする必要がある。

Cd と Zn の共存による結果から、Cd 単独では骨塩とコラーゲンの両者の含量が低下し、骨粗しょう症様の骨変化を呈するのに対し、Cd と Zn の共存では骨塩含量は低下するが、コラーゲン含量は低下せず、骨軟化症様の骨変化が生ずる可能性が示された。

2. Cd と Cu の相互作用²⁵⁾ III-1 で行なった実験より更に低濃度の Cd と Cu の組み合わせで 4 日間培養したところ、Fig. 6 に示すように 2.3 または $4.5 \mu\text{M}$ の Cd に 4.5 または $8.9 \mu\text{M}$ の Cu を添加すると、それぞれの Hyp 合成量の低下は Cd 単独による低下と Cu

Fig. 6. Interaction between Cd and Cu in Relation to the Collagen Synthesis of the Bone Cultured for 4 d

Values are $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ for five bones.

a) Significantly different from control, $p < 0.05$.

b) Significantly different from control, $p < 0.01$.

単独による低下の和より明らかに大きいことが認められた。この結果は Hyp の合成に対して Cd と Cu が相乗的に阻害効果を発揮することを示す。なお、培地へ放出された Hyp 量も Fig. 6 と類似のパターンを示したが、コラーゲン分解率でみると Cd と Cu の共存では単独の場合よりむしろ減少したので、Cd と Cu 共存の場合の Hyp 合成の低下はコラーゲン分解の亢進によるものではないと考えられる。

Hyp 合成に対する Cd と Cu の相乗阻害がプロトコラーゲン合成と水酸化のいずれの過程で見られるのかを知るために、 $[^3\text{H}]$ -Pro と 4 日間培養した骨と培地について CDP と NCP への $[^3\text{H}]$ -Pro の取り込みを調べたところ、NCP においても CDP と同様に Cd と Cu の相乗阻害が認められた。なお、プロトコラーゲンの水酸化の段階で Cu による阻害が見られたが、この阻害は Cd の共存によってむしろ打ち消された。したがって Cd と Cu の相乗阻害はプロトコラーゲンの生成過程で起こっているものと考えられる。

一方、骨中 Cu 量は Cd の共存により Cu 単独に比べ増加した。Cd 共存による Cu の増量は主として骨端部においてみられ、更に細胞分画の結果、核、ミトコンドリア (Mt)、細胞質画分で Cu の増量が見られ、特に細胞質画分での Cu の増量が著しかった。そこで細胞質画分をゲル透過したところ、Fig. 7 に示すように Cu 単独 (A) では分子量約 10000 の MM 画分にあまり Cu が見られないのに対し、Cd と Cu 共存 (C) では MM 画分への Cu の取り込みがかなり見られ、その取り込み量は Cd の取り込み量とほぼ等しく、両者の取り込み量の和は Cd 単独 (B) の場合の Cd の MM 画分への取り込み量とほぼ等しかった。このことは Cu が Cd より MT に対する親和性が高い⁹¹⁾ため、Cd で誘導され

Fig. 7. Sephadex G-75 Elution Profile of Cd (—), Cu (·····) and 1/2 Cystine (— · —) in 100000g Supernatant Fraction from 45 Bones Cultured with 4.45 μ M Cu (A) or 4.45 μ M (B) or Both (C) in the Presence of 0.06 μ Ci/ml of L-[14 C(U)]cystine for 4 d

Molecular weight was estimated by blue dextran (a), egg albumin (b), chymotrypsinogen (c), cytochrome c (d), and DNP-alanine (e).

た MT 様たん白に結合していた Cd の一部と Cu が置換したためと考えられる。この結果から、Cd と Cu の共存で骨端部において増量した Cu の大部分は MT 様たん白に捕捉され、毒性の発揮し得ない状態にあると推測される。

骨中 Cd 量も Cu の共存により増加し、この Cd の増加は骨端・骨幹の両部位で見られたが、細胞分画の結果では核、Mt、骨塩画分で Cd 量の増加が見られ、特に骨塩画分での増加が著しかった。この骨塩画分に増量した Cd も不活性型と考えられるので、核及び Mt における Cd の増量が先の Cu の増量と相まって相乗阻害の一因を成しているものと考えられる。

Irons ら⁸³⁾ はラットにおいて Cd による致死率が Cu の共存で高まる理由として、Cu により MT が凝集して Cd が捕捉されないことを指摘している。著者らの場合、Cu による MT の高分子化は見られなかったため、Cu により MT から追い出された Cd が相乗阻害の発現に寄与している可能性が強いと思われる。いずれにしても、Cd 単独であれば本来 MT に捕捉される Cd が、Cu 共存により MT に捕捉されなくなるところに相乗阻害が表われる要因があるように考えられる。

Cd と Cu の共存による結果から、Cd と Cu はコラ

TABLE X. Interaction between Cd and Cu or Zn in Relation to Bone Metabolism in Tissue Culture

Metal	Bone content		Histological bone change
	Mineral	Matrix	
Cd	↓	↓	osteoporotic
Cd+Cu	↓	↓ ↓	osteoporotic ?
Cd+Zn	↓	→	osteomalatic ?

ーゲン合成に対し相乗阻害を示したので、Cu は Cd による骨粗しょう症化を増悪する可能性が示され、Cu と Zn は相反する効果を示すことが明らかにされた。

おわりに

Cd が骨に直接作用し得るかという単純な考えから研究を始めたわけであるが、研究が進むにつれ、Cd の作用の多面性が明らかにされ、しかもその作用が共存し得る Zn, Cu により修飾されることが明らかにされた。すなわち、Table X に示すように Cd 単独では骨塩とコラーゲン含量の両者を低下させて骨粗しょう症様の骨変化を呈するが、Cu 及び Zn は Cd の石灰化阻害作用に影響を及ぼさないのに対し、Cd のコラーゲン合成阻害作用に対して Cu と Zn は相反する効果を示した。Cu は Cd による骨粗しょう症化を増悪させるのに対して、Zn は Cd による骨粗しょう症化を保護し、むしろ骨軟化症様の骨変化へ導く可能性が示された。なお、Cd 単独の場合しか組織学的検索を行っていないが、Table X 中の共存の場合の組織学的な骨変化は骨中の骨塩と基質含量から推測したものであり、現在類骨組織の証明などの組織学的検討を進行中である。

ところで、実際の生体影響を考える場合は Cd, Cu, Zn の 3 者が共存しているわけで、3 者の濃度は勿論、3 者の存在比が微妙に影響して、*in vivo* の骨変化に反映されるものと思われる。今後、*in vitro* で得られた結果が *in vivo* で証明できるか検討したいと考えているが、投与時の 3 者の比をどれ位にしたらよいか難しい。イ病発症時の河川濃度や患者の血清濃度に関しては資料が無いので、イ病患者の骨や Cd 汚染米の濃度からそれらの比を類推するしかない。イ病患者の骨¹⁾の Cd : Zn : Cu のモル比は 1 : 1.4—44 : 0.06—0.2 で、Cd 汚染米²²⁾のそれらの比は 1 : 13 : 2.5 である。Cu は多くて Cd の 3 倍弱であるが、Zn は Cd に比べかなり多いことが注目される。なお、非汚染の場合の比は骨の場合、1 : 150—350 : 1.3—4.3 で、米の場合 1 : 350 : 38 であり、両者の場合とも当然乍ら Cd に対する Zn, Cu の比が Cd 汚染により低下している。

最近, 山口ら⁹²⁾により高用量の Zn 投与動物で骨障害を生ずることが報告され, 著者らも高濃度の Zn が培養骨の骨形成を阻害することを報告した.⁹³⁾ これらの報告は Zn の濃度が高いと Zn 単独でも骨粗しょう症様変化を生じる⁹⁴⁾ ことを示すものである. したがって, 骨軟化症変化を呈するには Cd 又は Cu による骨粗しょう化を防ぐのに十分な Zn 濃度が必要であるが, Zn 濃度が高すぎない範囲に着目しなければならないであろう. 著者らの結果からは Zn 濃度は Cd の10倍以下であれば Zn による直接の障害は生じないと思われる.²⁴⁾

更に *in vivo* の実験で予測しにくいのは投与時の濃度比が必ずしも血清濃度に反映されないことである. Cd, Zn 及び Cu 同時投与の場合の血清濃度を測定した例はないが, Cd 単独の経口投与で 0.2 ppm の血清濃度が得られている.⁹⁵⁾ この濃度は著者らの系での Cd の作用発現開始濃度である 0.5—1 ppm に比べ低いが, 3者の同時投与時には Cd に Zn 及び Cu が加算されて, Cd 1 ppm 相当量又はそれ以上の金属濃度に達することが予想され, 石灰化に対して3者が協同的に阻害作用を示すと思われる. しかも, Zn濃度が Cd や Cu より高ければ Cd 及び Cu の骨基質低下作用を防禦し, 骨軟化症様の骨変化を生ずることが期待される.

ところで, イ病の発症メカニズムの1つとして Cd による腎障害により低リン血症となり骨軟化症になると考えられているが, イ病患者で腎障害が見られないのに骨障害が見られる例¹⁶⁾ があることは何を意味するのであるか. まず, 腎障害がみられないのは(1)腎に対する Cd の作用濃度が低かったためか, (2)動物実験で示されているように Zn によって Cd の腎障害が保護⁶⁶⁾ され

た可能性が考えられる. (1)の場合, 骨障害が生じ得るのは1つにはイ病患者の腸管障害が著しいことから村田⁹⁾ が主張しているように Cd の腸管障害による Cd, Pi 及びビタミンDなどの吸収低下のためと考えられ, この場合, 骨軟化症を呈する可能性は高い. もう1つの可能性は動物実験^{3, 6)} や著者らの培養骨の実験から骨に Cd が直接作用した場合であるが, Cd 単独では骨粗しょう症しか呈しないであろう. その点, (2)の場合は Cd と Zn の同時暴露の場合であり, Cd の腸管障害も Zn で保護されるものとすれば, なお更, Cd と Zn が骨に直接作用した可能性が考えられ, この場合の骨変化は先にも触れたように著者らの培養骨における Cd と Zn の相互作用の結果から骨軟化症を呈することが予想される.

このように暴露時の Cd 濃度や Zn などの共存元素の濃度が一定でなかったと考えられ, 更に栄養条件や出産回数などの個人差を考慮すると, イ病の発症機序は一元的に捕えられるものでなく, いろいろなメカニズムが単独で, あるいは重複することによってイ病の骨障害が引き起こされたと考えるのが妥当と思われる. したがって, Cd 単独よりも Zn などとの複合暴露であるという視点に立ち, しかも骨に直接的に作用し得るという観点から培養骨を用いて行なった著者らの研究結果はイ病の発症機序の1つを提示し得る点において意義があると考えられる.

ただ, イ病の発症には Cd などの原因物質の他に出産や労働などの影響が無視できないとされており, 著者らの系ではこの点が検討できないわけで, これらの点を充分考慮に入れた *in vivo* の実験で著者らの実験を補強, 発展する必要があると考えている.

引用文献

- 1) 萩野 昇, 吉岡金市, 日整会誌, **35**, 812 (1961).
- 2) 松田 悟, 金沢大学十全医会誌, **76**, 239 (1968).
- 3) 末永良治, 福山裕三, 石本美穂子, 久保田憲太郎, 高柳尹立, 医学と生物学, **81**, 33 (1970).
- 4) 広田昌利, 岐阜大学医学部紀要, **19**, 82 (1971).
- 5) 村田 勇, 日本医師会雑誌, **65**, 15 (1971).
- 6) S. Yoshiki, T. Yanagisawa, M. Kimura, N. Otaki, M. Suzuki, *Arch. Environ. Health*, **30**, 559 (1975).
- 7) K. Kawai, K. Fukuda, M. Kimura, "Effects and Dose-Response Relationships of Toxic Metals," ed. by G.F. Nordberg, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1976, pp. 343—370.
- 8) 野見山一生, 環境保健レポート, **44**, 14 (1978).
- 9) 小林悦子, 能川浩二, 石崎有信, 環境保健レポート, **45**, 131 (1979).
- 10) M. Takashima, S. Moriwaki, Y. Itokawa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 223 (1979).
- 11) 赤堀文昭, 野見山一生, 政岡俊夫, 野見山紘子, 野村靖夫, 小林好作, 鈴木立男, 環境保健レポート, **49**, 1 (1983).
- 12) 石崎有信, 田辺 鋼, 松田 悟, 坂本倫子, 日衛誌, **20**, 398 (1966).
- 13) L. Friberg, M. Piscator, G. Nordberg, T. Kjellström, "Cadmium in the Environment, 2nd. ed.," CRC Press, Cleveland, 1974.

- 14) 須田立雄, 鈴木ミチ子, 藤井克之, 佐々木 哲, 吉木周作, 骨代謝, **7**, 65 (1973).
- 15) 菅原千枝子, 菅原直毅, 日衛誌, **28**, 511 (1974).
- 16) 北川正信, 三輪淳夫, 村井嘉寛, 環境保健レポート, **49**, 140 (1983).
- 17) 酒井立夫, 宮原龍郎, 実井佳代, 野村 昇, 高柳尹立, 衛生化学, **21**, 35 (1975).
- 18) Y. Itokawa, T. Abe, S. Tanaka, *Arch. Environ. Health*, **26**, 241 (1973).
- 19) Y. Muto, Y. Shidoji, S. Suzuki, *Nutrition and Food*, **28**, 1 (1975).
- 20) 前原 毅, 日整会誌, **42**, 287 (1968).
- 21) 菅原千枝子, 菅原直毅, 医学と生物学, **87**, 185 (1973).
- 22) 小橋恭一, 中井 昇, 長谷純一, 宮原龍郎, 狐塚 寛, 藤井正美, 衛生化学, **24**, 314 (1978).
- 23) 武内孝之, 大森佐与子, 青木 敦, 加須屋実, 日本公衛誌, **31**, 693 (1984).
- 24) T. Miyahara, Y. Oh-e, E. Takaine, H. Kozuka, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **67**, 41 (1983).
- 25) T. Miyahara, S. Sugiyama, T. Kaji, R. Yamashita, Y. Oh-e, T. Kurano, H. Kozuka, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**, 479 (1984).
- 26) S. Yoshiki, *Stain Technol.*, **48**, 233 (1973).
- 27) 高橋栄明, “カルシウム代謝と骨疾患,” 医歯薬出版, 東京, 1979, pp. 182—204.
- 28) J.J. Reynolds, J.T. Dingle, *Calcif. Tissue Res.*, **4**, 399 (1970).
- 29) 遠藤浩良, 結合組織, **6**, 139 (1974).
- 30) F.C. Jensen, R.B. Gwatkin, J.D. Biggers, *Exp. Cell Res.*, **34**, 440 (1964).
- 31) Y. Miyazaki, H. Katsuta, Y. Aoyama, H. Endo, T. Takaoka, Y. Oishi, *Jpn. J. Exp. Med.*, **27**, 331 (1957).
- 32) 山口正義, 衛生化学, **30**, 45 (1984).
- 33) 久保田憲太郎, 農村医学, **20**, 90 (1971).
- 34) J.R. Rest, *Br. J. Nutr.*, **36**, 243 (1976).
- 35) R. Spivastava, N. Lefebvre, C. Onkelinx, *Proc. Eur. Soc. Toxicol.*, **17**, 191 (1976).
- 36) R.S. Rapaka, K.R. Sorensen, S.D. Lee, R.S. Bhatnagar, *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 63 (1976).
- 37) R.S. Bhatnagar, F.M. Von Dohlen, K.R. Sorensen, M.Z. Hussain, S.D. Lee, *Toxicol. Lett.*, **2**, 217 (1978).
- 38) H.M. Holak, L.G. Raisz, *Endocrinology*, **104**, 908 (1979).
- 39) T. Wilson, J.M. Katz, D.H. Gray, *Calcif. Tissue Int.*, **33**, 35 (1981).
- 40) T. Miyahara, M. Hayashi, H. Kozuka, *Toxicol. Lett.*, **21**, 237 (1984).
- 41) T. Miyahara, M. Miyakoshi, Y. Saito, H. Kozuka, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 477 (1980).
- 42) G. Vaes, *J. Cell Biol.*, **39**, 676 (1968).
- 43) E.E. Jacob, M. Jacob, D.R. Sanadi, L.B. Bradley, *J. Biol. Chem.*, **223**, 147 (1956).
- 44) N.H. Stacey, L.R. Cantilena, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 470 (1980).
- 45) 宮原龍郎, 宮越 護, 狐塚 寛, 日本公衛誌, **27**, 323 (1980).
- 46) 林 泰史, 骨代謝, **10**, 36 (1977).
- 47) M.D. Francis, R.G.G. Russel, H. Fleisch, *Science*, **165**, 1264 (1969).
- 48) J.D. Termine, A.S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**, 307 (1970).
- 49) T. Miyahara, T. Kato, S. Nakagawa, H. Kozuka, T. Sakai, N. Nomura, N. Takayanagi, *Eisei Kagaku*, **24**, 36 (1978).
- 50) 安藤正典, 佐谷戸安好, 大沢利昭, 衛生化学, **24**, 19 (1978).
- 51) T. Miyahara, T. Komurasaki, M. Matsuzaki, H. Kozuka, S. Seta, *Eisei Kagaku*, **26**, 167 (1980).
- 52) T. Miyahara, T. Komurasaki, H. Kozuka, *Toxicol. Lett.*, **6**, 137 (1980).
- 53) 宮原龍郎, 小紫 俊, 大江善則, 狐塚 寛, 日本公衛誌, **27**, 361 (1980).
- 54) 井口 弘, 佐野晴洋, 日衛誌, **29**, 65 (1974).
- 55) H. Iguchi, S. Sano, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 126 (1982).
- 56) 坂元倫子, 串畑 隆, 出村礼子, 第6回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集, 1979, p. 78.
- 57) T.L. Chen, L.G. Raisz, *Calcif. Tissue Res.*, **17**, 113 (1975).
- 58) D.T. Vistica, W.A. Ahrens, W.R. Ellison, *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 15 (1977).
- 59) 和田 攻, 代謝, **12**, 219 (1975).
- 60) 山根靖弘, “環境汚染物質と毒性・無機物質編,” 化学の領域増刊126号, 南江堂, 東京, 1960, pp. 35—45.
- 61) K. Shimizu, K. Shizama, Y. Takeo, M. Nazawa, K. Maekawa, *Connective Tissue*, **8**, 15 (1976).
- 62) G. Gabbiani, D. Baic, C. Déziel, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **45**, 443 (1967).
- 63) K. Nomiya, Y. Sugata, H. Nomiya, N. Yamamoto, *Jpn. J. Ind. Health*, **15**, 578 (1973).
- 64) 青島恵子, 加須屋実, 日本公衛誌, **27**, 756 (1980).

- 65) R.T. Christian, T.E. Cody, C.S. Clark, R. Lingg, E.J. Cleary, *Am. Inst. Chem. Eng. Sym. Ser.*, **15**, 21 (1973).
- 66) 中村健一, 高田 勲, 鈴木永子, 杉浦由美子, 小林てるみ, 日衛誌, **35**, 851 (1981).
- 67) F.W. Bonner, L.J. King, D.V. Parke, *Chem.-Biol. Interact.*, **29**, 369 (1980).
- 68) 米山京子, 永田久紀, 山田寿子, 日衛誌, **35**, 226 (1980).
- 69) V.H. Ferm, S.J. Carpenter, *Nature* (London), **216**, 1123 (1967).
- 70) R.E. Holmberg, V.H. Ferm, *Arch. Environ. Health*, **18**, 873 (1969).
- 71) J. Pařízek, *J. Endocrinol.*, **15**, 56 (1957).
- 72) A.B. Kar, R.P. Das, B. Mukerji, *Proc. Nat. Inst. Sci. India. Biol. Sci.*, **26B**, 40 (1960).
- 73) H.A. Schroeder, J. Buckman, *Arch. Environ. Health*, **14**, 693 (1967).
- 74) H.A. Schroeder, A.P. Nason, J.J. Balassa, *J. Nutr.*, **93**, 331 (1967).
- 75) H.M. Perry, H.W. Erlanger, *Fed. Proc.*, **33**, 357 (1974).
- 76) H.G. Petering, *Environ. Health Perspect.*, **25**, 141 (1978).
- 77) G. Matrone, W.L. Payne, C.W. Barker, *J. Nutr.*, **80**, 227 (1963).
- 78) J. Pařízek, I. Ošťádalová, I. Beneš, J. Piňha, *Fed. Proc.* **33**, 357 (1974).
- 79) 青島恵子, 加須屋実, 日衛誌, **35**, 223 (1980).
- 80) C.H. Hill, G. Matrone, *Fed. Proc.*, **29**, 1474 (1970).
- 81) 小島良平, 田中英子, 医学と生物学, **86**, 173 (1973).
- 82) 小島良平, 石黒英子, 谷井美樹子, 日本公衛誌, **21**, 281 (1973).
- 83) D. Irons, J.C. Smith, *Chem.-Biol. Interact.*, **15**, 289 (1976).
- 84) 青島恵子, 加須屋実, 日衛誌, **36**, 358 (1981).
- 85) J.H.R. Kagi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 86) A.P. Leber, T.S. Miya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **37**, 403 (1976).
- 87) Y. Yamane, H. Fukino, M. Imagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1509 (1977).
- 88) 薛 玉梅, 平井正巳, 吹野秀亀, 山根靖弘, 日本薬学会104年会講演要旨集, 1984, pp. 638.
- 89) M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi, T. Suda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340 (1974).
- 90) 廣野善昭, 市川富夫, 近藤雅臣, 衛生化学, **27**, 212 (1981).
- 91) K.T. Suzuki, *J. Syn. Org. Chem. Japan*, **39**, 1073 (1981).
- 92) M. Yamaguchi, A. Mochizuki, S. Okada, *J. Pharmacobio-Dyn.* **5**, 619 (1982).
- 93) T. Miyahara, E. Shirakawa, T. Kaji, T. Kato, H. Kozuka, *Eisei Kagaku*, **29**, 117 (1983).
- 94) H.W. Ferguson, A.G. Leaver, *Calcif. Tissue Res.*, **8**, 265 (1972).
- 95) H. Yoshikawa, K. Kawai, K. Fukuda, M. Ohsawa, Proc. 46th Annual Meeting Japan. Assoc. Ind. Health., Osaka, 1973.