〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
33 (5) 360-364 (1987)

ラットに気管内投与した重金属の影響 (第2報) 塩化カドミウム
投与後の肺の元素濃度の変化

小林悦子, 須長宏行, 鈴木和夫

国立公害研究所環境保健部

Effects of Heavy Metals Instilled Intratracheally into Rats. II.
Changes in Element Concentrations in the Lung after
Instillation of Cadmium Chloride

ETSUKO KOBAYASHI HIROYUKI SUNAGA and KAZUO T. SUZUKI

National Institute for Environmental Studies, Yatabe,

Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

(Received May 6, 1987)

Cadmium chloride dissolved in physiological saline (0.4 ml) was instilled intratracheally into male Wistar rats (10 weeks old; body weight, approximately 270 g) at eight doses (40—0.313 μg Cd/rat). Concentrations of elements (calcium, copper, iron, magnesium, phosphorus, sulfur and zinc) in the lung were determined along with cadmium by inductively coupled argon plasma-atomic emission spectrometry (ICP) and/or flameless Zeeman atomic absorption spectrophotometry. The body weight decreased significantly, while the lung weight increased significantly at doses higher than 5.0 μg Cd/rat. Changes in lung weight and element concentrations suggested that lung edema was induced at a dose of as low as 2.5 μg Cd/rat. Distributions of copper and zinc in the supernatants of the lungs were determined on a gel permeation column by high performance liquid chromatography-ICP, indicating that superoxide dismutase in the lung decreased with a cadmium instillation at doses higher than 2.5 μg Cd/rat.

Keywords—cadmium; intratracheal instillation; lung; lung edema; copper; superoxide dismutase

緒 言

経気道的なカドミウム (Cd) 暴露による生体影響に関しては、ヒトについての臨床化学的研究^{1,2)} はもちろん、動物を用いた報告³⁻¹⁰⁾ も数多くみられる。しかし、組織学的、あるいは酵素を中心とした生化学的アプローチが主で、分析化学的検索は皆無である。Cd を経口的に、あるいは腹腔内に投与した場合、銅や亜鉛を中心に、体内の必須元素の分布に変化が生じることはよく知られている。¹⁷⁾ そこで今回、ラットに塩化カドミウム (CdCl_2) を気管内投与し、肺の元素レベルにみられる影響を、Cd 投与量との関係で観察することを目的とした実験を行った。合わせて、Cd 投与による一般的な生体影響指標として、体重と肺重量の変化も観察した。

実験方法

ウィスター系雄性ラット (10週齢, 体重約270 g) に、Cd 投与群では CdCl_2 を生理食塩水に溶解したものを、対照群には生理食塩水のみを、それぞれ 0.4 ml ずつ気管内投与した。Cd の投与量はラット 1 匹当たり 40 μg から、20, 10 μg と漸次半量に減らして 0.313 μg までの 8 段階とした。気管内投与法は前報¹⁸⁾ に従った。

体重は Cd 投与直前と、2 日後に失血死させる直前に測定し、その差を求めた。肺は採取後秤量し、Cd 投与量との関係を検討した。また、肺を等量の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4, 0.25 M glucose 含有) 中、窒素ガス気流下、ポリトロンでホモジナイズし、ホモジネイトの一部を混酸 (硝酸: 過塩素酸 = 5:1, v/v) で湿式灰化

し、硫黄 (S), 磷 (P), カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), 亜鉛 (Zn), 銅 (Cu), 鉄 (Fe) を高周波誘導結合プラズマ発光分析計 (ICP) (セイコー電子 JY48PVH) で定量した。対照群, Cd 投与 2.5 μg 群と 20 μg 群のホモジネイトの一部は, 群ごと (3—5 匹) にまとめて 170000 g で 60 分間超遠心し, 上清を高速液クロ-発光分析法 (HPLC-ICP 法)¹⁹⁾ による分析試料とした。HPLC には Asahipak GS-520 カラム (旭化成工業, 7.6 $\times$ 500 mm) を使用し, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.05% NaN₃ 含有) を流速 1.0 ml/分 で溶出させた。

観察結果は, 群ごとに平均値と標準偏差を求め, 対照群と各 Cd 投与群との比較を, Student-*t* 検定 (ただし分散に差がある場合は Welch の方法) で行った。

結 果

ラットに CdCl₂ を Cd 量として 1 匹当り 40—0.313 μg 気管内投与し, 2 日後に観察を行った。Cd 投与 40 μg 群のラットは, 2 日以内に全匹が死亡し, 結果を得ることができなかった。

1. Cd 投与量と体重変化との関係

Cd 投与直前と, 投与 2 日後にラットを失血死させる直前とに測定した体重の差を体重変化として表した。対照群に比して, Cd 投与群では有意に体重が減少していた (Fig. 1)。対照群のラットが 2 日間で平均 9 g の体重増加を示したのに対し, Cd 投与 2.5 μg までの群では体重増加がみられず, Cd 投与 5 μg 群では 13 g, 10 μg

Fig. 1. Dose-Dependent Change in Body Weight Difference after a Single Intratracheal Instillation of Cadmium Chloride into Male Wistar Rats (10 Weeks Old)

Body weights of individual rats before the injection were subtracted from those at 2 d after the injection. The values for body weight differences were expressed as means $\pm$ S.D. of 3 to 5 samples.

Significance from the control was marked as follows ;

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$.

Fig. 2. Dose-Dependent Changes in Wet Weight of Lung (—●—) and Relative Ratio of Lung to Body Weight (···○···)

The values for the same rats as indicated in the legend to Fig. 1 are expressed as means $\pm$ S.D.

Significance from the control was marked as follows ;

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$.

群と 20 μg 群では 30 g も体重が減少した。

2. Cd 投与量と肺の湿重量及び比体重との関係

ラットの体重に対する肺の湿重量の百分率を比体重として表した。肺の湿重量, 比体重ともに, Cd 投与量が増加するにしたがって直線的に増加した (Fig. 2)。対照群と比較して, 肺の湿重量は Cd 投与 2.5—10 μg 群で, また, 肺の比体重は 0.625—10 μg 群で有意な増加がみられた。Cd 投与 20 μg 群では, それぞれ対照群の 2.3 倍と 2.7 倍であった。各群の平均値を用いて関係式を求めると, 危険率 $p \leq 0.05$ で, 肺の湿重量では $Y = 0.065X + 0.992$ (相関係数 $r = 0.999$), 比体重では $Y = 0.029X + 0.361$ ($r = 0.998$) (ただし Y は肺の重量, X は Cd 投与量) が得られた。

3. Cd 投与量と肺の元素 (S, P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe) 濃度及び含有量の変化との関係

Cd 投与量 1.25 μg 以上の群で, 肺の S, P, Mg, Zn, Fe の濃度が減少し, 含有量が増加する傾向があった (Fig. 3)。対照群と比較して, S, P, Mg, Zn の濃度は Cd 投与 1.25 μg 群から, Fe 濃度は 2.5 μg 群から有意に減少していた。また, S, P, Mg, Zn の含有量は Cd 投与 5 μg 群と 10 μg 群で, Fe 含有量は 20 μg 群で有意に増加していた。一方, Ca の濃度は Cd 投与量が増加しても, ほとんど変化が認められず, 含有量のみが漸次増加していた (Cd 投与 2.5—10 μg 群で有意に増加)。Cu の濃度は Cd 投与によって減少した (Cd 投与 0.313—10 μg 群で有意に減少)。しかし, Cu 濃度の変化は直線的ではなく, Cd 投与 1.25 μg 群までは投与量に反比例して減少し, 2.5 μg 以上の群では増加の傾向を

Fig. 3. Dose-Dependent Changes of Essential Elements (S, P, Cd, Mg, Zn, Cu and Fe) Concentrations (—●—) and Contents (···○···) in Lung

The values are expressed as means $\pm$ S.D.

Significance from the control was marked as follows;

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$.

示した。Cu 含有量も Cd 投与 1.25 μg 群までは直線的に減少し (有意な変化), 2.5 μg 以上の群では増加しはじめたが, 2.5 μg 群の値はまだ対照群にくらべて有意に低かった。Cd 投与 5 μg 以上の群では対照群よりも大きな値を示した (Cd 投与 5 μg 群で有意な変化)。

4. Cd 投与量と肺上清中の Cu 及び Zn の分布

対照群と Cd 投与 2.5 μg 群及び 20 μg 群の肺上清中の Cu と Zn の分布を HPLC-ICP 法で検索した (Fig. 4): 保持時間 12.3 分に溶出するセルロプラスミン画分の Cu のピークは, Cd 投与 20 μg 群で高くなった。13.7 分に溶出するスーパーオキシドデスムターゼ (SOD) 画分の Cu と Zn のピークは, Cd 投与量が多いほど低く

なった。また, 15.1 分に溶出するメタロチオネイン (MT) 画分の Cu のピークは, 対照群ではみとめられず, Cd 投与によって順次高くなった。

考 察

ラットに CdCl_2 を気管内投与したときの, 生体影響の 1 つとして体重の変化をみた。観察期間中に対照群では体重が増加したのに対し, Cd 投与群では, Cd 投与 2.5 μg 群までは体重増加が停止し, 5 μg 以上の群では体重が減少した。特に Cd 投与 10 μg と 20 μg 群では体重が 30 g も減少した。Cd を 40 μg 投与した群のラットが全匹死亡した事実と考え合わせると, ウィスター系の雄性ラット (10 週齢, 体重約 270 g) に対して気管

Fig. 4. Distribution Profiles of Copper and Zinc in the Lung Supernatants of Rats Instilled Intratracheally with Cadmium Chloride at Doses of 0 (A), 2.5 (B) and 20 (C) μg /rat on an Asahipak GS-520 Column by HPLC-ICP

CP, ceruloplasmin; SOD, superoxide dismutase; MT, metallothionein.

内投与する Cd 量が、1 匹当り $5 \mu\text{g}$ 以上では、ラットに重篤な傷害を与えることが判明した。

Cd の気管内投与が肺の元素レベルに及ぼす影響をみると、Cd 投与量が増加するにしたがって肺の湿重量も増加することから、各元素の濃度と共に含有量も考慮に入れて検討しなくてはならない。対照群において、肺よりも血漿中の方がその濃度が低い元素すなわち S, P, Mg, Zn, Fe の肺中濃度は、Cd 投与量が増加するにつれて低くなっていた。血漿と肺中濃度がほぼ同レベルの Ca は、Cd 投与量が増加しても、肺における濃度に変化がみられなかった。また、それらの元素の肺中の含有量は、肺重量の増加と同じように、Cd 投与量とともに増加した。このことから、Cd の気管内投与によって、血漿成分が肺へ浸潤し、肺の湿重量を増加させた、つまり肺水腫が生じたのではないかと推察される。今回の実験では肺の含水量を測定していないため、断定はできないが、Cd の経気道暴露実験で、動物に肺水腫が起こったという報告は多数みられる。³⁻⁶⁾

従来の動物実験ではかなり高用量の Cd を投与している。第 1 報¹⁸⁾で報告したように、Cd 投与 $2.5 \mu\text{g}$ 以下の群では、投与した Cd 量の 90% 以上が肺に蓄積したが、それ以上の投与群では蓄積率が急減した。また、今回の実験結果においても、Cd 投与による体重変化は、Cd 投与 $2.5 \mu\text{g}$ までの群では増減がなく一定した値を示したが、 $5 \mu\text{g}$ 以上の投与群では負の値を示した。これらの事実から、Cd の気管内投与では、ラット 1 匹当り $2.5 \mu\text{g}$ までと、それ以上の用量とでは、生体が受ける影

響に、何らかの質的な違いがあると思われる。しかし、肺の湿重量が Cd 投与 $2.5 \mu\text{g}$ から、肺の比体重が $0.625 \mu\text{g}$ から、また、ほとんどの肺の元素の濃度が Cd 投与 $1.25 \mu\text{g}$ から、という低用量から対照群に比較して有意の変化を示したことは注目に値する。

Cd 投与による肺の Cu 濃度の変化は複雑であり、他の元素と異なって、肺水腫の発症だけでは説明がつかない。そこで、Cd 投与量による肺上清中の Cu の分布の変化を、HPLC-ICP 法で検討した。血漿成分であるセロプラスミンを含む画分の Cu が、特に Cd 投与 $20 \mu\text{g}$ 群で増加しており (Fig. 4)、ここでも肺への血漿成分の浸潤、つまり肺水腫発症の可能性が示唆された。また、MT 画分の Cu も、Cd 投与量の多い程増加していた。肺で MT が生成されることは既に報告されている。²⁰⁻²⁴⁾ 一方、SOD 画分の Cu のピークは、Cd の投与量にしたがって小さくなった。SOD に Cu と等量含まれている Zn も、Cu と同様の傾向を示した。ただし、Zn の場合、今回用いた HPLC 用カラムでは、SOD の溶出画分に、SOD 以外の Zn を結合する熱に不安定な蛋白質が含まれているため、Cu に比べて Zn の変化が明確ではない。こうした Cu と Zn の変化から、Cd 投与によって肺の SOD 量が減少していることが示唆される。Minami らは、ラットに 16 nmol/m^3 の CdO を 1 時間吸入させると、1 時間後に肺の SOD 活性が 70% に低下し、1 日後に回復したと報告している。¹²⁾ 肺中の Cu 濃度及び含有量が、Cd 投与量の増加によって、いったん減少し、再び増加するといった変化を示すのは、Cd 投与によるセロプラスミンと MT の増加、SOD の減少という 3 つの要因の複合によって生じた結果だと考えられる。肺中の Zn も、MT の増加と SOD の減少により影響を受けていると考えられるが、Cu ほど明確な変化を示さないのは、Cu に比べて Zn は臓器中で SOD 以外の多くの酵素とも関連しており、SOD の占める割合が低いためではないかと思われる。

結 語

ラットに CdCl_2 を気管内投与し、体重と肺重量の変化、及び肺の元素濃度の変化を、Cd の投与量 (Cd $0.313\text{--}40 \mu\text{g}/\text{rat}$) との関係において観察し、以下の結論を得た。

1. ウィスター系雄性ラット (10 週齢、体重約 270 g) に CdCl_2 を 1 匹当り Cd 量として $5 \mu\text{g}$ 以上気管内投与すると、体重が減少し、肺の湿重量が増加して、肺に重篤な傷害を与えたことが推測された。
2. 肺の湿重量と、元素濃度の変化から、Cd $2.5 \mu\text{g}$ 以下の低用量投与でも、肺水腫が生じていることが推察

された。

2.5 μg の低用量投与群でも惹起されていた。

3. HPLC-ICP 法による肺の Cu 及び Zn の分布の
検索から, Cd 投与によって肺の SOD 量が減少するこ
とが示唆された。また, この減少は肺水腫と同様に, Cd

謝辞 本研究を実施するにあたり, 御鞭撻を賜った
小泉 明前環境保健部長に感謝致します。

引用文献

- 1) R.R. Lauwerys, H.A. Roels, J-P. Buchet, A. Bernard, D. Stanescu, *Environ. Health Perspect.*, **28**, 137 (1979).
- 2) E. Adamsson, M. Piscator, K. Nogawa, *Environ. Health Perspect.*, **28**, 219 (1979).
- 3) K.C. Palmer, G.L. Snider, J.A. Hayes, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **112**, 173 (1975).
- 4) R.H. Strauss, K.C. Palmer, J.A. Hayes, *Am. J. Pathol.*, **84**, 561 (1976).
- 5) J.A. Hayes, G.L. Snider, K.C. Palmer, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **113**, 121 (1976).
- 6) J.S. Bus, A. Vinegar, S.M. Brooks, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **118**, 573 (1978).
- 7) C.E. Cross, S.T. Omaye, D.C. Rifas, G.K. Hasegawa, K.A. Reddy, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 381 (1979).
- 8) R.F. Henderson, A.H. Rebar, J.A. Pickrell, G.J. Newton, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **50**, 123 (1979).
- 9) R.K. Mithal, *Ind. Health*, **18**, 139 (1980).
- 10) M. Boisset, C. Boudene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 335 (1981).
- 11) M. Fukuhara, G. Bouley, J. Godin, F. Girard, M. Boisset, C. Boudene, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 715 (1981).
- 12) M. Minami, K. Koshi, K. Homma, Y. Suzuki, *Arch. Toxicol.*, **49**, 215 (1982).
- 13) M. Aihara, R.P. Sharma, J.L. Shupe, *Toxicology*, **36**, 109 (1985).
- 14) R.S. Kutzman, R.T. Drew, R.N. Shiotsuka, *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 175 (1986).
- 15) D.E. Gardner, *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 191 (1986).
- 16) K. Amanuma, K.T. Suzuki, *Toxicology*, **44**, 321 (1987).
- 17) K.T. Suzuki, Y.K. Yamada, F. Shimizu, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1217 (1981).
- 18) 小林悦子, 鈴木和夫, 衛生化学, **33**, 360 (1987).
- 19) H. Sunaga, E. Kobayashi, N. Shimojo, K.T. Suzuki, *Anal. Biochem.*, **160**, 160 (1987).
- 20) C.C. Cox, M.D. Waters, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 385 (1978).
- 21) J.M. Benson, R.F. Henderson, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 370 (1980).
- 22) C.T. Post, K.S. Squibb, B.A. Fowler, D.E. Gardiner, J. Illing, G.E.R. Hook, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2966 (1982).
- 23) C.E. Sampson, C.O. Chichester, J.A. Hayes, H.M. Kagan, *Am. Res. Respir. Dis.*, **129**, 619 (1984).
- 24) B.A. Hart, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 281 (1986).