カドミウム汚染地域住民の腎障害に関する研究

(第1報) 5種類の分子量の異なる血漿

由来蛋白の定量にもとづく尿中蛋白排泄パターン分類の試み

Studies of Renal Dysfunction among the Inhabitants of a Cadmium Polluted Area
I. Classification of urinary protein excretion patterns according to the quantitative analysis of the five proteins

富山医科薬科大学医学部公衆衛生学教室

窪 田 裕 子

Yuuko Kubota

*Department of Public Health, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama*

Five urinary proteins were analysed among the 121 inhabitants, 63 males and 58 females aged 2-86 years, of a cadmium polluted area in the Jinzu river basin. The relation between the progression of renal dysfunction and the patterns of protein excretion in urine was studied.

1) The urinary excretion of low molecular weight (LMW) proteins larger than β_2 -microglobulin (β_2 -m), such as retinol binding protein and α_1 -microglobulin, increased in proportion to urinary β_2 -m concentration. When the concentrations of β_2 -m in urine were over 10 mg/g. cr, the excretion of intermediate molecular weight (IMW) proteins, such as albumin (Alb) and Gc-globulin, in urine increased.

2) According to the β_2 -m and Alb concentrations, the urinary protein excretion patterns were classified. Among the inhabitants of the cadmium polluted area, normal type: β_2 -m under 0.59 mg/g. cr and Alb under 40 mg/g. cr was 57.9%, LMW protein dominant type: β_2 -m over 0.59 mg/g. cr and Alb under 40 mg/g. cr was 26.4%, LMW and IMW protein mixed type: β_2 -m over 0.59 mg/g. cr and Alb over 40 mg/g. cr was 15.7% and IMW protein dominant type: β_2 -m under 0.59 mg/g. cr and Alb over 40 mg/g. cr was none. The glomerular dysfunction was found by analysis of creatinine clearance and serum creatinine concentrations among inhabitants showing LMW and IMW protein mixed type.

3) As age class became higher or residence time in the polluted area became longer, the rates of cases showing LMW protein dominant type or LMW and IMW protein mixed type increased in both sexes in the polluted area. The rates of the cases showing LMW and IMW protein mixed type were higher among females than males. For reference, 47 out of 49 inhabitants of a non polluted area showed normal type and all 34 itai-itai disease patients showed LMW and IMW protein mixed type.

The classification mentioned above would be useful and convenient for differentiation of the stages of renal dysfunction caused by cadmium.

Key words: Cadmium, Renal dysfunction, Population survey, β_2 -microglobulin, Albumin
カドミウム, 腎障害, 住民調査, β_2 -ミクログロブリン, アルブミン

緒 言

Friberg¹⁾が1984年、Cd 取り扱い作業者の低分子蛋白尿を特徴とする腎障害を報告して以来、多数の研究者がCd による腎障害について詳細な検討を行ってきた。そして、その主病変は近位尿細管障害であり、低分子蛋白尿のみならず、腎性糖尿、アミノ酸尿、リン再吸収率の低下なども伴うことが示された^{2,3)}。Cd による腎障害の経時的变化や予後に関して、Cd 取り扱い作業者やイタイイタイ病（以下イ病）患者では、障害の回復は困難で、一部に尿細管機能や糸球体機能の悪化が報告されている³⁻⁶⁾。しかし、一般環境汚染による住民の腎障害の予後は十分明らかにされていない。また、Cd 取り扱い作業者や汚染地域住民では、低分子蛋白以外の albumin など、尿中に増加していることが報告されている^{7,8)}が、その病態的な意義や、腎障害の進行との関連性は明らかではない。

富山県神通川流域のCd 汚染地域では、1967年以降これまでに種々の疫学調査がなされ、広汎な住民に腎障害が認められ報告されている⁹⁻¹¹⁾。そこで、当地域住民の腎障害の予後を明らかにすることを目的に、約10年前に萩野の疫学調査により尿蛋白の polyacrylamide gel disc 電気泳動（以下 disc 電気泳動）が実施された家族^{12,13)}を対象に、追跡調査を計画した。

本研究では、腎障害の進行にともなう尿中への蛋白の排泄状況の変化を明らかにするために、分子量の異なる5種類の血漿由来の蛋白の定量的分析を行い、非汚染地域住民やイ病患者と比較しつつ横断的に検討した。その結果、汚染地域住民の尿中蛋白排泄パターンは、いくつかの特徴的なパターンに分類できること、またそれにより腎障害の進行の程度を把握しうることが示唆されたので報告する。

研究 方 法

1. 調査方法

1971年、神通川流域 Cd 汚染地域の40世帯の家族構成員145名について、尿の disc 電気泳動が実施されている^{12,13)}。このうち、記録が十分保存されていた30世帯の家族構成員を対象に、1983年10月に調査を実施した。1983年10月時点の家族構成員数は、1971年に尿の disc 電気泳動がなされていた73名を含めて148名であった（以下汚染地域住民）。各家庭を訪問し蛋白等の分析のためのスポット尿の採取と、居住歴および生活歴に関する質問調査を行った。対象世帯の居住地は、Fig. 1 に示したように神通

Fig. 1 Resident hamlets of 30 families in cadmium polluted area.

川左岸と牛ヶ首用水に囲まれた6部落に分布していた。なお、この地域はイ病多発地帯であることが明らかにされている¹⁴⁾。また、福島らの調査では、この地域の水田土壌中のCd濃度は2 ppmを超え、神通川流域の中でも濃厚汚染地域であることが報告されている¹⁵⁾。

汚染地域住民の尿所見を横断的に検討するため、参照集団として、非Cd汚染地域でFig. 1に示した汚染地域から約10 km離れた富山県大山町（常願寺川水系）に居住し、汚染地域居住歴のない18世帯49名（以下非汚染地域住民）に対して、1983年10月、同様に調査を行った。また、イ病認定患者13名および要観察患者21名、あわせて34名（以下イ病群）から1983年4月スポット尿を採取し、尿蛋白等を同様に分析した。

また、汚染地域の22名については、1985年6月あらためて2時間尿と血液を採取し、creatinine clearance

(Ccr) と血清 Cr を測定した。

2. 分析方法

尿蛋白分析に用いた尿は、希アンモニア水により pH 7.0～8.0 に調整し、分析時まで -20℃ で凍結保存した。定量的分析を行った尿蛋白は β_2 -microglobulin (β_2 -m), α_1 -microglobulin (α_1 -m), Retinol Binding Protein (RBP), Gc-globulin (Gc) および albumin (Alb) の 5 種類である。 β_2 -m と α_1 -m は酵素免疫法^{16,17)} (β_2 -mEIA kit, α_1 -m EIA Kit, 富士レビオ K.K.) により測定した。また, RBP, Gc および Alb は、一元免疫拡散法¹⁸⁾ (SRID) により測定した。SRID 用抗体は抗ヒト特異抗血清 (DAKO 社製) を用い、標準血清は標準ヒト血清 (Behring 社製) を使用した。SRID は polyethylenglycol による増感法¹⁹⁾ で実施したので、いずれも測定限界は約 1 mg/l であった。Cr は Folin-Wu 法¹⁹⁾ で測定した。

また, Cd 分析に用いた尿は、0.1 N 硝酸酸性とし、5℃ で保存した。Cd はキレート樹脂 (chelex-100) を用いる簡易前処理法^{20,21)} を行った後、フレイムレス原子吸光法で測定した。

なお、分析にはスポット尿を用いたので、データーの検討はすべて Cr 補正したもので行った^{22,23)}。

結 果

1. 汚染地域住民の性年齢別分布

Table 1 Age and sex distribution of inhabitants of 30 families in cadmium polluted area and samples collected.

Age class (years)	Male		Female	
	Inhabitants	Samples(%)	Inhabitants	Samples(%)
0 - 9	8	3(37.5)	9	1(11.1)
10 - 19	13	6(46.2)	4	2(50.0)
20 - 29	6	5(83.3)	6	6(100)
30 - 39	14	12(85.7)	13	13(100)
40 - 49	9	9(100)	7	7(100)
50 - 59	11	11(100)	12	12(100)
60 - 69	10	10(100)	8	8(100)
70 - 79	5	5(100)	9	8(88.9)
80 - 89	2	2(100)	2	1(50.0)
Total	78	63(80.8)	70	58(82.9)

汚染地域の対象世帯の家族構成員と、受検者の性年齢分布を Table 1 に示した。30世帯の家族構成員はあわせて148名であり、このうち尿検査を実施できたのは121名(81.8%)であった。受検者は、男性は78名中63名(80.8%)、女性は70名中58名(82.9%)であり、年齢は男性は2歳から86歳、女性は8歳から82歳に分布していた。なお対象者の中には、2名のイ病認定患者ならびに2名の要観察患者が含まれていたが、参照イ病群には含まなかった。

Table 2 Concentrations of β_2 -microglobulin, α_1 -microglobulin and albumin in urine among inhabitants of cadmium polluted area classified by age and sex.

Sex	Age class (years)	No.	β_2 -microglobulin G.M. (Range)		α_1 -microglobulin G.M. (Range)		Albumin G.M. (Range)	
			mg/l	mg/g·cr	mg/l	mg/g·cr	mg/l	mg/g·cr
Male	2 - 29	14	0.09 (0.03-0.35)	0.08 (0.02-0.73)	1.07 (0.45-3.41)	0.93 (0.28-7.43)	6.4 (2.3-16.2)	5.5 (2.3-12.2)
	30 - 49	21	0.17 (0.05-1.48)	0.16 (0.03-1.79)	2.83 (0.57-13.85)	2.70 (0.51-18.13)	6.8 ^{(18)*} (N.D-67.0)	6.7 ^{(18)*} (N.D-60.1)
	50 - 69	21	1.68 (0.09-23.88)	1.91 (0.14-32.75)	11.97 (2.87-338.25)	13.61 (2.09-199.91)	9.9 (2.9-48.8)	11.2 (1.8-73.6)
	70 - 86	7	11.61 (0.57-58.60)	17.78 (0.93-125.68)	14.96 (0.73-50.20)	22.86 (0.80-103.79)	21.1 (3.2-68.2)	32.3 (5.2-125.7)
Female	8 - 29	9	0.09 (0.03-0.44)	0.10 (0.05-0.73)	0.53 (0.24-1.07)	0.57 (0.11-1.90)	4.9 ^{(8)*} (N.D-11.6)	5.0 ^{(8)*} (N.D-8.2)
	30 - 49	20	0.10 (0.03-0.44)	0.12 (0.02-0.77)	0.99 (0.23-5.32)	1.15 (0.31-3.78)	5.2 ^{(18)*} (N.D-21.4)	6.1 ^{(18)*} (N.D-28.7)
	50 - 69	20	1.32 (0.05-20.79)	2.71 (0.03-107.27)	7.48 (1.16-49.33)	15.45 (0.83-151.79)	8.9 (1.8-53.0)	18.4 (3.3-163.1)
	70 - 82	9	26.18 (0.84-58.43)	66.53 (0.83-194.28)	37.41 (8.85-102.50)	95.28 (8.75-208.60)	44.4 (16.0-95.4)	112.7 (16.8-242.8)

G.M.: geometric mean, Range: minimum-maximum, N.D: non detectable, *: The number of detectable samples which are used for calculation of mean value.

2. 汚染地域住民の尿検査成績

汚染地域住民の β_2 -m, α_1 -m, Alb の尿中濃度を, 性年齢階級別に Table 2 に示した。年齢階級は, 30歳未満, 30~49歳, 50~69歳, 70歳以上の4群に分けた。年齢階級別の β_2 -m の幾何平均値は, 男性は0.08 mg/g. cr から17.78 mg/g. cr, 女性は0.10 mg/g. cr から66.53 mg/g. cr の範囲に広く分布していた。男性も女性も年齢階級が上がるにつれて β_2 -m 濃度が増加する傾向があり, 男女とも30~49歳と50~69歳の間, および50~69歳と70歳以上の間に, 統計的有意差が認められた (t 検定, $p < 0.05$)。

尿中 α_1 -m 濃度は, 男性も女性も年齢階級が高くなるにしたがって上昇し, 男性は0.93 mg/g. cr から22.86 mg/g. cr, 女性は0.57 mg/g. cr から95.28 mg/g. cr の範囲に分布していた。男女とも30~49歳, 50~69歳, 70歳以上の各年齢階級の間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

Alb は, 男性は5.5 mg/g. cr から32.3 mg/g. cr, 女性は5.0 mg/g. cr から112.7 mg/g. cr の範囲に広く分布し, 加齢とともに増加する傾向を認めた。男女とも30~49歳, 50~69歳, 70歳以上の各年齢階級間に統計的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

3. 尿中 β_2 -m 濃度と他の4種類の蛋白の尿中排泄との関連性について

尿中 β_2 -m 濃度にもとづいて汚染地域住民を5群に分け, 各群の α_1 -m, RBP, Gc, Alb の陽性率を Fig. 2 に示した。5群に分けるにあたっては, まず, β_2 -m が正常範囲内と超えるものに大きく分け, 越えたものは, 人数の分布がほぼ均等になるように4群に分けた。蛋白の尿中濃度の正常範囲については別に詳述したが²⁴⁾, 非汚染地域住民49名(男性21名, 女性28名, 30歳未満12名, 30~49歳14名, 50~69歳19名, 70歳以上4名)の測定値の分布の95%信頼区域を統計的に計算し設定した。すなわち, β_2 -m は0.59 mg/g. cr 以上, α_1 -m は11.0 mg/g. cr 以上, Alb は40 mg/g. cr 以上をもって陽性とした。また, RBP ならびに Gc は, 非汚染地域住民は全例, 定量限界(約1 mg/l) 以下であったので, 1 mg/g. cr 以上を陽性とした。

β_2 -m が0.59 mg/g. cr 未満を示した70名は全例, α_1 -m, RBP, Gc, Alb はすべて正常範囲内にあった。 β_2 -m が0.59 mg/g. cr 以上1.0 mg/g. cr 未満の12名では, 全例が α_1 -m, RBP, Gc は正常範囲内, Alb は1名(8.3%)が陽性であった。 β_2 -m が1.0 mg/g. cr 以上10 mg/g. cr 未満の12名ではすべての例で α_1 -m, RBP は陽性, 1名

Fig. 2 Relationships between urinary β_2 -microglobulin concentrations and the positive rates of other urinary protein fractions.

(8.3%) が Gc 陽性, 1 名 (8.3%) が Alb 陽性であった。 β_2 -m が10 mg/g. cr 以上100 mg/g. cr 未満の20名は, 全例が α_1 -m, RBP 陽性, 7 名 (35.0%) が Gc 陽性, 10 名 (50.0%) が Alb 陽性であった。 β_2 -m が100 mg/g. cr 以上を示した7名は, 全例が α_1 -m, RBP, Alb 陽性であり, Gc は6名 (85.7%) が陽性であった。

以上の結果から, β_2 -m 濃度が高くなるに伴い, その他の蛋白の尿中陽性率も高くなることが明らかになった。分子量2~3万のRBPと α_1 -mは, β_2 -m が1 mg/g. cr 未満では全例陰性であったが, 1 mg/g. cr 以上では全例陽性となり, 1 mg/g. cr を境に区別された。分子量5~7万のGcとAlbは, β_2 -m が10 mg/g. cr 以上で陽性率が高くなった。

4. 尿蛋白の定量的分析による尿中蛋白排泄パターン

Fig. 3 Classification of urinary protein excretion patterns among inhabitants of cadmium polluted area, non polluted area and itai-itai disease patients. Correlation between β_2 -microglobulin and albumin concentrations in urine among inhabitants of cadmium polluted area was expressed: $\log Y = 1.09 + 0.38 \log X$ ($r = 0.78$, $n = 121$).

分類

β_2 -m の尿中濃度が高くなるにつれて、中分子蛋白も尿中に増加するとの所見が得られたので、低分子蛋白の排泄の指標として β_2 -m、中分子蛋白の排泄の指標として Alb を選び、両者の濃度により Fig. 3 のように尿中蛋白排泄パターン（以下尿蛋白型）の分類を試みた。 β_2 -m、Alb とも正常範囲内にあるものを正常型（N型）、 β_2 -m は 0.59 mg/g. cr 以上で Alb は正常範囲内にあるものを低分子蛋白主体型（L型）、 β_2 -m は 0.59 mg/g. cr 以上で Alb は 40 mg/g. cr 以上のものを低分子—中分子蛋白混合型（M型）、 β_2 -m は正常範囲内で Alb は 40 mg/g. cr 以上のものを中分子蛋白主体型（I型）とした。また L型と M型は、 β_2 -m 濃度 20 mg/g. cr 未満と以上でそれぞれ L1, M1 型と L2, M2 型に細分類した。 β_2 -m 濃度 20 mg/g. cr は、汚染地域住民の β_2 -m と Alb の尿中濃度の一回帰式から、Alb が 40 mg/g. cr を示す値として求めた。

汚染地域住民は N型 70名 (57.8%), L1 型 30名 (24.8%), L2 型 2名 (1.7%), M1 型 2名 (1.7%), M2 型 17名 (14.0%) であり、I型は見い出されなかった。汚染地域住民中に含まれていた、イ病認定患者および要観察者 4名は、いずれも M2 型を示していた。また、非汚染地域住民は、49名中 47名 (95.9%) は N型、1名 (2.0%) は L1 型、1名 (2.0%) は I型であった。非汚染地域住民のうち L1 型を示したのは 71 歳女性、I 型を示したのは 65 歳男性であった。また、イ病群は 34 名すべて M2 型

を示した。

5. 尿蛋白型別、糸球体機能検査

Fig. 4 Creatinine clearance (Ccr) among inhabitants classified by urinary protein excretion patterns.

Fig. 5 Serum creatinine concentration among inhabitants classified by urinary protein excretion patterns.

汚染地域住民のうち22名について、1985年6月、糸球体機能検査としてCcrと血清Crを測定し、その結果をFig. 4とFig. 5に示した。1985年の尿蛋白型は、N型12名、L1型4名、M2型6名であった。なお、M2型6名のうち2名は1983年にはL1とL2型であったが、その他の例では尿蛋白型に変化はなかった。

Ccrの正常値が70 ml/min以下の低値を示したのは、N型では12名中2名(16.7%)、L1型は4名中2名(50%)に認めたが、いずれも50 ml/min以上であった。これに対して、M2型では6名中6名が70 ml/min以下を示し、そのうちの4名(66.7%)は50 ml/min未満であった。またM2型6名中3名は血清Crが1.5 mg/dl以上を示した。

6. 年齢階級別、性別、尿蛋白型出現頻度

Table 3には汚染地域住民について、性年齢階級別に各尿蛋白型の出現頻度を示した。 β_2 -mが0.59 mg/g.cr

以上のLまたはM型を示す頻度は、男女とも30~49歳と50~69歳の間で有意差(X^2 検定, $p < 0.001$)を認めた。すなわち、30歳未満は男性は14名中1名(7.1%)、女性には9名中1名(11.1%)、30~49歳では男性は21名中2名(9.5%)、女性20名中1名(5.0%)、50~69歳は男性21名中14名(66.7%)、女性20名中16名(80.0%)、70歳以上は男性7名中7名(100%)、女性9名中9名(100%)がLまたはM型を示した。

β_2 -mが20 mg/g.cr以上かつAlb 40 mg/g.cr以上を示すM2型の頻度をみると、男女とも50歳未満では存在せず、50~69歳は男性は2名(9.5%)、女性4名(20.0%)、70歳以上は男性は3名(42.9%)、女性8名(88.9%)と70歳以上に多く認められた。各年齢階級ごとに男女間で比較すると、統計的には有意差は認めないが、男性に比べ女性に多い傾向があった。

7. 汚染地域居住年数別、性別、尿蛋白型出現頻度

Table 3 Urinary protein excretion patterns among inhabitants of cadmium polluted area classified by age and sex.

Sex	Age class (years)	No.	Urinary protein excretion pattern				
			N type No. (%)	L1 type No. (%)	L2 type No. (%)	M1 type No. (%)	M2 type No. (%)
Male	2 - 29	14	13(92.9)	1(7.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	30 - 49	21	19(90.5)	2(9.5)	0(0)	0(0)	0(0)
	50 - 69	21	7(33.3)	10(47.6)	1(4.8)	1(4.8)	2(9.5)
	70 - 86	7	0(0)	3(42.9)	1(14.2)	0(0)	3(42.9)
Female	8 - 29	9	8(88.9)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	30 - 49	20	19(95.0)	1(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)
	50 - 69	20	4(20.0)	11(55.0)	0(0)	1(5.0)	4(20.0)
	70 - 82	9	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)	8(88.9)

Table 4 Urinary protein excretion patterns among inhabitants of cadmium polluted area classified by resident time and sex.

Sex	Resident time (years)	No.	Average age (years) G.M. $\pm$ S.D.	Urinary protein excretion pattern				
				N type No. (%)	L1 type No. (%)	L2 type No. (%)	M1 type No. (%)	M2 type No. (%)
Male	2 - 19	10	12.3 $\pm$ 10.6	9(90.0)	1(10.0)	0(0)	0(0)	0(0)
	20 - 39	19	33.3 $\pm$ 8.5	19(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	40 - 59	21	55.3 $\pm$ 9.1	11(52.3)	9(42.9)	1(4.8)	0(0)	0(0)
	60 - 86	13	68.7 $\pm$ 8.8	0(0)	6(46.1)	1(7.7)	1(7.7)	5(38.5)
Female	8 - 19	17	29.7 $\pm$ 9.8	15(88.2)	2(11.8)	0(0)	0(0)	0(0)
	20 - 39	16	45.1 $\pm$ 13.1	11(68.8)	5(31.3)	0(0)	0(0)	0(0)
	40 - 59	13	54.1 $\pm$ 7.8	5(38.4)	4(30.8)	0(0)	1(7.7)	3(23.1)
	60 - 86	12	72.7 $\pm$ 5.7	0(0)	3(25.0)	0(0)	0(0)	9(75.0)

Table 4 には汚染地域住民について、汚染地域居住年数別、性別に、各尿蛋白型の出現頻度を示した。 β_2 -m が 0.59 mg/g. cr 以上の L または M 型の出現頻度は、居住年数が長くなるにつれて高くなる傾向を示した。男性は居住20年未満では10名中1名(10.0%)、20~39年は19名中0名、40~59年は21名中10名(47.7%) 60年以上は13名中13名に認めた。女性は、居住20年未満は17名中2名(11.8%)、20~39年は16名中5名(31.3%)、40~59年は13名中8名(61.6%)、60年以上は12名中12名に認めた。男女間で比較すると、居住40年未満では女性は男性に比べて有意に(Fisherの直接確率法, $p < 0.05$), L または M 型の出現頻度が高かった。なお、女性の40歳未満で L 型を示した7例のうち5例は、非汚染地域から嫁いできたものであった。

β_2 -m が 20 mg/g. cr 以上、Alb が 40 mg/g. cr 以上の M2 型の出現頻度も、居住年数が長くなるにつれて高くなった。男性は60年未満では認められず、60年以上では5名(38.5%)、女性は40年未満では認められず、40~59年では3名(23.1%)、60年以上では9名(75.0%)であった。男女間で比較すると居住40年以上では女性に高い傾向があり、居住40~59年では有意差($p < 0.05$)が認められた。

8. 性年齢別、尿蛋白型別尿中 Cd 濃度

尿中 Cd 濃度を、性年齢別に Fig. 6 に示した。男性は、

Fig. 6 Urinary cadmium concentrations among inhabitants of cadmium polluted area classified by urinary protein excretion pattern, age and sex.

年齢階級が上がるにしたがって、尿中 Cd 濃度が高くなる傾向が認められた。女性は50~69歳までは、年齢階級が上がるにしたがって高くなるが、50~69歳と70歳以上の間に差は認められなかった。

尿蛋白型を N 型、L または M1 型、および M2 型の 3 群に分けて、尿中 Cd 濃度を検討した。男性の30~49歳では、L 型は21.5 μg/g. cr と N 型の3.8 μg/g. cr に比べて有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。50歳以上では、男女とも尿蛋白型 3 群の間に尿中 Cd 濃度の差は認められなかった。男女間で比較すると、50~69歳では N 型は男性が6.6 μg/g. cr、女性が15.6 μg/g. cr、L または M1 型は男性が9.9 μg/g. cr、女性が16.8 μg/g. cr で有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

考 察

富山県神通川流域の Cd 汚染地域では、Cd による腎障害を持つ住民が多数認められている。小林は、1976年神通川流域の9部落の全住民を対象に、腎障害に関する調査を行い、尿中 β_2 -m 陽性者が20歳代から出現し、年齢が上がるるとともに陽性率が高くなることを報告している¹⁰⁾。また、Kjellström らは51~69歳の女性に限って調査し、尿中 β_2 -m 濃度と居住年数、保有米中の Cd 濃度、川水の飲用経験など、Cd 暴露歴との間に関連があることを示した¹¹⁾。しかし、この地域の住民の腎障害の経時的変化や予後は十分明らかにされていない。また、汚染地域住民や Cd 取り扱い作業者では、低分子以外の蛋白の尿中増加も認められ^{7,8)}、それらの病態的意義や腎障害の進行との関連性の検討は残された課題である。これらの課題を明らかにするために、神通川流域 Cd 汚染地域で、1971年萩野が行った住民調査の対象家族^{12,13)} について、追跡的調査を実施した。Cd による腎障害では糸球体腎炎など通常の糸球体性の腎障害の場合と異なり、尿中に排泄される蛋白の総量は少ない²⁵⁾。そのため、 β_2 -m など低分子蛋白の定量的分析法²⁶⁾ が確立する以前は、Cd による腎障害の疫学的研究には電気泳動法による尿の定性的分析が行われていた^{27,28)}。1971年の萩野の調査は、これを神通川流域住民について最初に適用したものの一つであり、住民の腎障害の長期間の変化を追跡するには良い資料と考えられた。

本研究では、5種類の分子量の異なる血漿由来の尿蛋白を定量し腎障害の進行にともなう尿中蛋白排泄パターンの変化を横断的に観察した。葎らは、尿中 β_2 -m 濃度とリン再吸収率や尿酸クリアランスなどの5種類の尿細管機能検査との関係を検討して、 β_2 -m 濃度は尿細管障害の

存在を示すだけでなく、障害の程度を反映することを報告している²⁹⁾。そこで、尿中 β_2 -m 濃度が正常範囲内とそれを超えるもの、また、正常範囲を超えるものはさらに 4 群にわけ、各 β_2 -m 濃度の段階での α_1 -m, RBP, Gc, Alb の尿中排泄状況を検討した。 β_2 -m が正常範囲内 (0.59 mg/g. cr 未満) の場合や、 β_2 -m が正常範囲を超えていても、1 mg/g. cr 未満と比較的少量の場合は 1 例を除き、他の尿蛋白分画はすべて陰性であった。このことから、今回測定した蛋白の中で分子量 1.2 万の β_2 -m は最も早期に Cd の影響を受け、尿中排泄が増加することが示された。また、 β_2 -m が 1 mg/g. cr 以上になると、すべての例で α_1 -m (分子量 3.3 万), RBP (分子量 2.1 万) が陽性になった。 β_2 -m が 10 mg/g. cr 以上になると、段階的に Alb (分子量 6.6 万), Gc (分子量 5.6 万) の中分子蛋白の陽性率も高まり、100 mg/g. cr 以上では、ほぼ全例が陽性になった。これらのことから、Cd による腎障害では、まず低分子蛋白主体の蛋白尿にはじまり、障害の進行とともに、低分子蛋白と中分子蛋白が混合した蛋白尿に変化する様子が横断的に観察された。そして、Alb など中分子蛋白だけが高値を示すものや、 β_2 -m は 10 mg/g. cr 以上の高値を示し中分子蛋白は正常範囲にあるものは稀であることが明らかになった。

以上の知見にもとづき、対象者の尿中蛋白排泄パターンを、低分子蛋白の排泄の指標としての β_2 -m と、中分子蛋白の排泄の指標としての Alb の両者の組み合わせにより分類した。汚染地域住民は年齢が高くなるにつれて β_2 -m が 0.59 mg/g. cr を超える例の出現頻度が高まり、男女とも 50 歳を境界に出現頻度が大きく異なっていた。また、低分子一中分子蛋白混合型のなかでも、 β_2 -m が 20 mg/g. cr 以上を示す M2 型の出現頻度は 70 歳以上に高かった。これに対して、非汚染地域住民については別に詳細に報告したが、 β_2 -m も Alb も加齢にもなって増加する傾向はあったものの、正常範囲を超えた例は稀であった²⁴⁾。つまり 50~69 歳の 19 名のうち β_2 -m が 0.59 mg/g. cr 以上を示したものはなく、Alb が正常範囲を超えていたものは 1 名だけであり、また 70 歳以上では、4 名中 1 名が 0.59 mg/g. cr を超えていたが 0.81 mg/g. cr と比較的低い値を示し、Alb は正常範囲を超える例は認められなかった。これらのことから、汚染地域の 50 歳以上の住民に高頻度で認められた尿中の β_2 -m および Alb の増加は、Cd 暴露の影響によると考えられた。

腎性蛋白尿は、Alb を主な成分とする糸球体性蛋白尿、低分子蛋白を主とする尿細管性蛋白尿に大きく分類される³⁰⁾。Cd 汚染地域住民にみられた低分子一中分子蛋白混

合型の尿中 Alb 排泄増加が糸球体障害の合併によるかどうかは明らかではなく、尿中 Alb 濃度の最高値も 240 mg/g. cr と通常の糸球体障害性の疾患に比べて低かった。しかし、一部の例について、1985 年にあらためて糸球体機能検査として、Ccr と血清 Cr を測定したところ、M2 型を示すもの 6 人中全員が Ccr 70 ml/min 以下を示し、M2 型では尿中 Alb 排泄増加の所見とともに、糸球体機能の低下の存在が示唆された。また、イ病患者や Cd 作業業者では光顕レベルで糸球体に特別な変化は認められていない^{2,31,32)}が、血清 Cr や Ccr など糸球体機能の低下が認められると報告されている^{2,33,34)}。これは tubuloglomerular balance を保つために、二次的に糸球体濾過値が落ちると説明されているが、Cd による糸球体の直接的な障害がないとは言いきれず、Alb などの透過性の昇進が考えられるが、今後さらに検討を要する問題である。

これまでに、イ病では認定患者と要観察患者はともに尿中 β_2 -m 濃度が高く、その他の尿検査成績にも差がないことが報告されている³⁵⁾。今回の調査でもイ病認定患者、要観察患者はすべて M2 型を示した。イ病患者では Cd による尿細管障害のため、高クロール血性代謝性アシドーシス、血清無機リン値の低下が示され、骨病変の成立とこれらのかかわりが指摘されている^{36~39)}。また、能川らは、神通川流域住民について、尿中 β_2 -m 濃度が 100 mg/g. cr 以上になるとリン再吸収率が低下することを報告している³⁴⁾。これらのことから、イ病患者以外で M2 型を示した住民でも、代謝性アシドーシスや低リン血症をともなっている可能性が高いと考えられるが今後の検討課題である。また、著者らは、イ病患者で Vit. D 結合蛋白である Gc の尿中排泄が増加しその一部は Vit. D と結合していることから、尿中への Gc 排泄増加が Vit. D 活性化障害の一因となりイ病の骨軟化症成立に関与している可能性を指摘した^{40,41)}。M2 型を示したほとんどの例で尿中への Gc の排泄が増加していたことから、M2 型でも同様の Vit. D 活性化障害が存在している可能性がある。従って、骨障害を予防する上から M2 型を区別して扱うことは意義があると考えられる。また、汚染地域住民のなかには、N 型と M2 型の中間的な段階と考えられる型を示すものが多数認められたが、今後 M2 型に移行することも考えられ経過をみていく必要がある。

汚染地域住民の尿蛋白型を汚染地域居住年数別に検討すると、女性は男性に比べて短い居住期間で L 型の出現が認められた。ただし、女性の居住 40 年未満の L 型例の多くは非汚染地域から嫁いできていたため、居住 40 年未

満での男女間のL型の頻度の差はCd暴露開始年齢の差と考えられた。つまり、暴露開始が出生時の場合と20歳前後の場合ではCd暴露の総量や体内への吸収率が異なり、それが腎障害の頻度の差として表れたのであって性別による出現頻度の差ではないと考えられた。また、 β_2 -mが20 mg/g. cr以上、Albが40 mg/g. cr以上のM2型の頻度は同じ年齢層または同じ居住年数の男性に比べて女性に多かった。

イ病発生は男性に比べて女性に多いことはよく知られている¹⁴⁾が、腎障害の程度にも性差があることは興味深い。藪らは、秋田県小坂町のCd汚染地域で調査を行い、女性は男性に比べて尿中 β_2 -m濃度が高いことを報告している²⁹⁾。Cdの体内蓄積量の性差が腎障害の性差の原因と考えられるようないくつかの知見は報告されている。すなわち、動物実験で、妊娠授乳期間中に消化管でのCdの吸収が増強することが示されている⁴²⁾。また、特別なCd暴露がない一般住民の剖検で、女性は男性に比べ肝臓や腎皮質のCd濃度が高いことが報告されている^{43,44)}。またCd汚染地域住民で、女性の尿中Cd濃度は男性に比べて高く特に50歳代で顕著なことが示されている¹⁰⁾。しかし、腎障害があると、Cd暴露量と尿中Cd濃度は相関しないことも知られている⁴⁵⁾。そこで、今回は尿蛋白型別に尿中Cd濃度を検討したが、50～69歳では各型で女性は男性に比べて高い傾向を示した。

以上のように β_2 -mとAlbの両者の尿中濃度を指標に尿蛋白排泄パターンを分類することによって、尿細管障害だけでなく糸球体の変化も加えて、Cdによる腎障害の進行度をとらえることができる可能性があると考えられた。今後、尿蛋白排泄パターンと各種腎機能検査との対比を行い分類の意義を更に検討するとともに、疫学的に活用しCdによる腎障害の本態を明らかにしていきたい。また、今回の調査のもう一つの目的は、1971年に調査された住民について、尿蛋白のdisc電気泳動を実施し1971年のものと比較し腎障害の予後を検討することであった。本報告での横断的な検討から、腎障害の進行につれて低分子蛋白以外の中分子蛋白の尿中排泄も増加することが明らかになったので、この点を考慮して電気泳動パターンを比較する必要があると考えられた。その結果は第2報に譲る。

結 論

富山県神通川流域カドミウム汚染地域の121名(男性63名、女性58名、年齢2～86歳)について、5種類の尿蛋白の定量的分析を実施し、腎障害の進行と尿蛋白排泄パ

ターンの関係を検討した。

(1) 尿中 β_2 -microglobulin (β_2 -m)濃度と他の蛋白の尿中排泄の関連を検討した。 β_2 -mの増加とともに、Retinol Binding Proteinや α_1 -microglobulinなど、 β_2 -mより分子量の大きい低分子蛋白の尿中排泄も高まった。 β_2 -mが10 mg/g. cr以上になるとalbumin (Alb)やGc-globulin等中分子蛋白の排泄も高まり、低分子一中分子蛋白混合型の蛋白尿を呈することが明らかになった。

(2) 尿中蛋白排泄パターンを β_2 -m濃度とAlb濃度を指標に分類した。汚染地域住民は β_2 -m 0.59 mg/g. cr未満、Alb 40 mg/g. cr未満の正常型は57.9%、 β_2 -m 0.59 mg/g. cr以上、Alb 40 mg/g. cr未満の低分子蛋白主体型は26.4%、 β_2 -m 0.59 mg/g. cr以上、Alb 40 mg/g. cr以上の低分子一中分子蛋白混合型は15.7%であった。 β_2 -m 0.59 mg/g. cr未満、Alb 40 mg/g. cr以上の中分子蛋白主体型は認められなかった。また、低分子一中分子蛋白混合型を示した例ではcreatinine clearance、血清creatinineの値から糸球体機能の低下が認められた。

(3) 汚染地域住民では、年齢階級が上がるにつれて、または汚染地域居住年数が長くなるにつれて、低分子蛋白主体型や低分子一中分子蛋白混合型を示す頻度が高くなった。男女間で比較すると、女性は男性に比べて低分子一中分子蛋白混合型の出現頻度が高いことが明らかになった。

参照集団の非汚染地域住民は、49名中47名が正常型を示し、イタイイタイ病患者34名はすべて低分子一中分子蛋白混合型を示した。

以上の成績より、上記のような尿中蛋白排泄パターンの分類は、疫学的にCd腎障害の進行度をとらえるうえで簡便かつ有用と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた富山医科薬科大学医学部公衆衛生学教授加須屋実先生、研究に御協力頂いた同教室員の皆様、ならびに貴重な資料の提供と御助言を頂いた萩野昇博士に深く感謝いたします。また、 β_2 -microglobulinと α_1 -microglobulinの測定にあたってキットを提供して頂いた富士レビオ社に感謝いたします。

文 献

- 1) Friberg, L.: Proteinuria and kidney injury among workman exposed to cadmium and nickel dust, J. Ind. Hyg. Toxicol., 30, 32-36 (1948).

- 2) Kazantzis, G., Flynn, F.V., Spowage, J.S. and Trott, D.G.: Renal tubular malfunction and pulmonary emphysema in cadmium pigment workers, *Q.J. Med.*, **32**, 165-196 (1963).
- 3) Adams, R.G., Harrison, J.F. and Scott, P.: The development of cadmium-induced proteinuria, impaired renal function, and osteomalacia in alkaline battery workers, *Q.J. Med.*, **38**, 425-443 (1969).
- 4) 篠田晤, 由利健久: イタイイタイ病患者の内科的所見とくに腎病変の推移, 環境保健レポート, **45**, 114-118 (1979).
- 5) 城石和子, 清水隆作, 植竹久雄: イタイイタイ病要観察者腎機能の経年変化について, 環境保健レポート, **50**, 182-185 (1984).
- 6) Roels, H., Djugang, J., Buchet, J.P., Bernard, A. and Lauwerys, R.: Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure, *Scand. J. Work. Environ. Health*, **8**, 191-200 (1982).
- 7) 金井正光, 百瀬正, 相沢孝夫, 奥平貞英, 本間達二, 萩野昇: イタイイタイ病患者とその家族における尿中および血中 β_2 -microglobulin 測定の臨床的意義について, 最新医学, **31**, 1793-1799 (1976).
- 8) Bernard, A., Roels, H., Hubermont, G., Buchet, J. P., Masson, P. and Lauwerys, R.: Characterization of the proteinuria in cadmium-exposed workers, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **38**, 19-30 (1976).
- 9) 福島匡昭, 石崎有信, 能川浩二, 坂元倫子, 小林悦子: 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1報, 神通川流域住民の尿検査成績, 日本公衛誌, **21**, 65-73 (1974).
- 10) 小林悦子: 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, 日本公衛誌, **29**, 123-133 (1982).
- 11) Kjellström, T., Shiroishi, K. and Evrin, P.E.: Urinary β_2 -microglobulin excretion among people exposed to cadmium in the general environment, *Environ. Res.*, **13**, 318-344 (1977).
- 12) 萩野昇: イタイイタイ病発生地域における家族別尿ディスク電気泳動像, 医学と生物学, **84**, 175-179 (1972).
- 13) 萩野昇: イタイイタイ病発生地域住民の尿ディスク電気泳動像, 日衛誌, **27**, 60 (1972).
- 14) 石崎有信, 福島匡昭: イタイイタイ病, 日衛誌, **23**, 271-285 (1968).
- 15) 福島匡昭, 石崎有信, 坂元倫子, 小林悦子: 神通川流域水田土壌中の重金属分布状況の調査, 日衛誌, **24**, 526-535 (1970).
- 16) Takagi, K., Kobayashi, Y., Itoh, Y., Enomoto, H. and Kawai, T.: Enzyme-immunoassay of human- α_1 microglobulin, *Jap. J. Clin. Chem.*, **10**, 30-40 (1981).
- 17) 木村良子, 伊藤義仁, 進士鶴夫, 岡田加代子, 上条隆雄, 影山信雄: EIA 法による β_2 -ミクログロブリン測定法の比較検討, 社会保険医学雑誌, **23**, 29-33 (1983).
- 18) 右田俊介: 一元免疫拡散法, 免疫血清反応検査, 第2版, p. 284-298, 日本公衆衛生協会, 東京 (1979).
- 19) Bonsnes, R.W. and Taussky, H.H.: On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction, *J. Biol. Chem.*, **158**, 581-591 (1945).
- 20) 加藤輝隆, 青島恵子, 窪田裕子, 田中旨子, 寺西秀豊, 加須屋実: キレート樹脂 (Chelex 100) を用いる尿中重金属測定の簡易前処理法, 北陸公衛誌, **11**, 42-43 (1984).
- 21) Kingston, H.M., Barnes, I.J. and Rains, T.C.: Separation of eight transition elements from alkali and alkaline earth elements in estuarine and seawater with chelating resin and their determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.*, **50**, 2064-2070 (1978).
- 22) Elkins, H.B., Pagnotto, L.D. and Smith, H.L.: Concentration adjustments in urinalysis, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **35**, 559-565 (1978).
- 23) 斉藤寛, 蔀幸三, 中野篤浩: カドミウム暴露者の尿 β_2 -microglobulin 排泄増加の機序の研究, 国立公害研究所研究報告, **67**, 167-176 (1984).
- 24) 窪田裕子, 寺西秀豊, 青島恵子, 加藤輝隆, 西条旨子, 加須屋実: 地域集団における尿蛋白分画, アルブミン, β_2 -ミクログロブリンおよび α_1 -ミクログロブリンの正常範囲に関する研究, 北陸公衛誌, **12**, 27-32 (1985).
- 25) Shiroishi, K., Kjellström, T., Kubota, K., Evrin, P. E., Anayama, M., Vesterberg, O., Shimada, T., Piscator, M., Iwata, T. and Nishino, H.: Urine

- analysis for detection of cadmium-induced renal changes, with special reference to β_2 -microglobulin, *Environ. Research*, **13**, 407-424 (1977).
- 26) Peterson, P.A., Evrin, P.E. and Berggard, I.: Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria, determination of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin and total protein, *J. Clin. Invest.*, **48**, 1189-1198 (1969).
- 27) Piscator, M.: Proteinuria in chronic cadmium poisoning, I. An electrophoretic and chemical study of urinary and serum proteins from workers with chronic cadmium poisoning, *Arch. Environ. Health*, **4**, 607-621 (1962).
- 28) 城石和子, 田中英子, 石本美穂子, 久保田憲太郎: DISC電気泳動を用いたイタイイタイ病患者の尿蛋白について, *生物物理化学*, **17**, 49-54 (1973).
- 29) 蔀幸三, 斉藤寛, 中野篤治, 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: カドミウム環境汚染地域住民の尿中 β_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, *日腎誌*, **23**, 45-61 (1981).
- 30) Heinemann, H.O., Maack, T.M. and Sherman, R. L.: Proteinuria, *Am. J. Med.*, **56**, 71-82 (1974).
- 31) 北川正信, 三輪淳夫, 村井嘉寛: 富山県イタイイタイ病の27剖検例, *環境保健レポート*, **49**, 140-145 (1983).
- 32) Blainey, J.D., Adams, R.G., Brewer, D.B. and Harvey, T.C.: Cadmium-induced osteomalacia, *Br. J. Ind. Med.*, **37**, 278-284 (1980).
- 33) 篠田晤, 由利健久, 中川昭忠: イタイイタイ病患者の現状, 内科的所見について, *環境保健レポート*, **41**, 44-52 (1977).
- 34) Nogawa, K., Kobayashi, E., Honda, R., Ishizaki, A., Kawano, S. and Matsuda, H.: Renal dysfunctions of inhabitants in a cadmium-polluted area, *Environ. Res.*, **23**, 13-23 (1980).
- 35) 能川浩二, 小林悦子, 本多隆文, 石崎有信: 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, *日衛誌*, **34**, 407-414 (1979).
- 36) 青島恵子, 寺西秀豊, 加須屋実, 萩野昇: 最近の二症例からみたイタイイタイ病の発生機転と病態, とくにビタミンD代謝について, *日内会誌*, **73**, 838-848 (1984).
- 37) 加須屋実, 寺西秀豊, 青島恵子, 加藤輝隆, 小橋恭一, 近藤真理子, 萩野昇: イタイイタイ病の治療に関する研究, *環境保健レポート*, **47**, 212-224 (1981).
- 38) 中川昭忠: 富山県に発生した骨軟化症の研究 (所謂いいたい病), *金沢医理学叢書*, **56**, 1-51 (1960).
- 39) 斉藤寛, 蔀幸三, 古川洋太郎, 塩路隆治, 古山隆, 吉永馨: カドミウム腎障害, 慢性カドミウム中毒およびいわゆるイタイイタイ病の腎病変と骨軟化症, *日本臨床*, **36**, 3431-3438 (1978).
- 40) Teranishi, H., Kasuya, M., Aoshima, K., Kato, T. and Migita, S.: Demonstration of vitamin D-binding protein (Gc-globulin) in the urine of itai-itai disease patients, *Toxicol. Lett.*, **15**, 7-12 (1983).
- 41) 加須屋実, 寺西秀豊, 青島恵子, 加藤輝隆, 窪田裕子, 小橋恭一, 近藤真理子, 田中美穂, 萩野昇: イタイイタイ病の尿中ビタミンD結合蛋白 (Gc-globulin) と尿中ならびに血中 25-OH-D の動向, *環境保健レポート*, **49**, 160-162 (1983).
- 42) Bhattacharyya, M.H., Whelton, B.D. and Peterson, D.P.: Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation, II. continuous exposure studies, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 368-375 (1982).
- 43) 石崎有信, 福島匡昭, 坂元倫子: イタイイタイ病患者および北陸地方住民の臓器のCdおよびZn濃度について, *日衛誌*, **26**, 268-273 (1971).
- 44) Sumino, K., Hayakawa, K., Shibata, T. and Kitamura, S.: Heavy metals in normal Japanese tissues, *Arch. Environ. Health*, **30**, 487-494 (1975).
- 45) 小林悦子: 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, *日本公衛誌*, **29**, 201-207 (1982).

(受付 1985年10月28日 受理 1986年1月24日)