銅欠乏とカドミウム投与ラットにおける 金属元素の臓器分布の変化

二 宮 ルリ子, 小 泉 直 子, 塚 本 利 之

兵庫医科大学公衆衛生学教室

Change of Metal Distribution in Organs of Cadmium-administered and Copper-deficient Rats

Ruriko NINOMIYA, Naoko KOIZUMI and Toshiyuki TSUKAMOTO

Department of Public Health, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya

Abstract To investigate the effect of Cu deficiency on the distribution of metals in organs when Cd was administered, 8-week-old female rats of the SD strain were fed a Cu-deficient diet (0.5 ppm Cu) or a basal diet (3.5 ppm Cu) and given 50 oral doses of 200 µg/rat of Cd. Then, the concentrations of Cd, Zn, Cu, Fe, Ca, Mn and Mg in each tissue were determined.

In the Cu-deficient state, the serum Cu concentration was decreased and it was further decreased by Cd administration to about 1/4 of the normal value. The accumulation of Cd in the liver and kidney was increased by Cu deficiency. Cu deficiency caused decreases in the Cu concentration of the liver, kidney, brain, lung and pancreas. The administration of Cd caused additional remarkable decreases in the Cu concentration in the blood as well as in the hematopoietic organs, such as liver and spleen. Fe was increased by the Cu deficiency in the brain, heart, pancreas and muscle, though this increase was inhibited by Cd administration. The changes in tissue Fe were more greatly affected by Cd administration than by Cu deficiency. The Zn concentration was increased in the liver and kidney by Cd administration but was not affected by Cu deficiency. Mn, Ca and Mg concentrations showed no changes caused by Cu deficiency or Cd administration.

Key words: Cadmium (カドミウム), Copper deficiency (銅欠乏), Essential metals (必須金属), Behavior in body (生体内挙動)

緒 言

カドミウム(以下Cdと略記)は、クラーク数の順位では62番目であり、地殻中には微量元素として存在し、その濃度はおよそ0.2 ppmと低い。しかしながら、Cdはヒト¹⁻⁵⁾やサル⁶⁾、ウマ^{7,8)}のようなある種の哺乳動物の肝・腎臓に特異的に高濃度に蓄積されており、ヒト体内には必須金属の鉄(以下Feと略記)や亜鉛(以下Znと略記)に次いで多く存在する重金属である¹⁾。ヒトにお

けるCd蓄積には、体内負荷量の約2/3が肝臓と腎臓に蓄積されていること⁹⁾、臓器濃度に性差がみられること³⁾、胎児や新生児の肝・腎臓には成人の数百～数万分の一の低濃度しか含まれておらず¹⁰⁻¹²⁾、生後積極的に体内に蓄積されることなどの特異性がみられる。

近年、Cd暴露によるZn, Cu等の必須金属の臓器内分布の変動が報告^{6, 13, 14)}されており、Cdの生体内蓄積の特異性の要因にはZn, Cuのような必須金属の代謝との関連性が推察されている。Cuは生体内に広く分布する

Reprint requests to : Ruriko Ninomiya, Department of Public Health, Hyogo College of Medicine,
1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya-city, Hyogo, 663, Japan

必須金属の一つで、主として金属酵素の重要な構成成分として種々の反応における触媒作用を有し、骨代謝、結合織代謝、造血などに重要な役割を果たしている。それ故、本研究では、CdとCuとの関連性に着目し、Cu欠乏状態でCd負荷を行うことにより、Cd蓄積に及ぼすCu欠乏の影響、すなわちCd負荷とCu欠乏による生体影響および必須金属の臓器内分布の変動等について検討を行った。

材料と方法

被験動物は、6週令のJcl: Sprague-Dawley Strain雌ラットをClea Japan, Inc. から購入し8週令より実験に用いた。摂取飼料量を正確に測定するために、ラットを個別にケージに入れ、温度19~20℃、湿度40~55%、点灯時間a.m. 6:30~p.m. 6:30の動物実験施設で飼育し、水、飼料は自由に摂取させた。実験期間を通じて、体重は週1回、飼料摂取量は週2回の飼料投与時に測定した。

実験に用いた調整飼料はClea Japan, Inc. の基礎配合飼料よりCuSO₄・5H₂Oを除いたものをCu欠乏食とし、基礎食は基礎配合飼料をそのまま用いた。表1は飼料の成分組成および金属濃度である。飼料中Cu濃度は基礎食3.5 μg/g、Cu欠乏食0.54 μg/gであり、Cu欠乏食は基礎食の15%の濃度である。

ラットは8週令より調整飼料に切り換え、3週間馴化した後頸静脈より採血し、Cu欠乏食群の血清Cu濃度が基礎食より低値を示すことを確認した後Cd投与を開始した。実験群はI群:基礎食Cd非投与(以下Cd(-)Cu(+))群と略称)(10匹)、II群:Cu欠乏食Cd非投与(以下Cd(-)Cu(-)と略称)(10匹)、III群:基礎食Cd投与(以下Cd(+))Cu(+)と略称)(11匹)、IV群:Cu欠乏食Cd投与(以下Cd(+))Cu(-)と略称)(11匹)の4群である。Cd投与はCdとして200 μg/rat (100 ppmを2 ml)をカテーテルを用い1日1回、5回/週の割合で10週間、計50回(計10 mg/rat)経口投与し、対照群には水道水を同様に投与した。最終投与後8日間採糞した後、心採血により屠殺し、肝・腎・脾・心・膵臓、脳、肺、大腿部筋肉および血液を分析試料として採取した。

Cd投与前の頸静脈より採取した血液については、ヘマトクリット(以下Htと略記)、ヘモグロビン(以下Hbと略記)および赤血球数と血清Cu濃度を測定し、屠殺時の血液についてはHt、Hb、赤血球数を、血清については、蛋白、アルカリフォスファターゼ(以下Al-Pと略記)、尿素窒素(以下BUNと略記)、尿酸(以下UAと略記)、無機リン(以下Pと略記)、血糖、Cu、カルシウム(以下Ca

と略記)、Zn、Fe、血清総鉄結合能(以下TIBCと略記)を測定した。各組織、糞および調整飼料は、硫酸、硝酸で湿式灰化後Cd、Zn、Cu、Fe、Ca、マンガン(以下Mnと略記)、マグネシウム(以下Mgと略記)濃度を測定した。

測定法は、Hbおよび赤血球数は自動血球計数装置(MICROCELL COUNTER CC-130A型、Sysmex製)、蛋白はビュレット法、Al-P活性はフェニルリン酸法、BUNはウレアーゼ・インドフェノール法、UAはウリカーゼ・TOOS法、Pはp-メチルアミノフェノール還元法、血糖はムロターゼ・GOD法、血清FeおよびTIBCはニトロソ・PSAP直接法、血清Cu、Zn、Ca、組織、糞および調整飼料中の各金属濃度は有炎または無炎原子吸光法(Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer 180-70型、Hitachi Co. Ltd. 製使用)を用いて測定した。

統計学的な実験データの処理は有意水準1%でt-検定を行った。

Table 1 Chemical composition and metal concentrations in basal and copper-deficient diets

Component		Basal diet	Cu-deficient diet ^a
Milk casein	%	24.5	24.5
Corn starch	%	45.5	45.5
Granulated sugar	%	10	10
Corn oil	%	6	6
Cellulose powder	%	5	5
α-starch	%	1	1
Vitamin mixture	%	1	1
Mineral mixture	%	7	7
CaCO ₃	mg/100g	1355.4	1355.4
KH ₂ PO ₄	mg/100g	1730	1730
CaHPO ₄ ・2H ₂ O	mg/100g	1500	1500
MgSO ₄ ・7H ₂ O	mg/100g	800	800
NaCl	mg/100g	600	600
FeC ₆ H ₅ O ₇ ・XH ₂ O	mg/100g	190	190
5ZnO・2CO ₂ ・4H ₂ O	mg/100g	6	6
CuSO ₄ ・5H ₂ O	mg/100g	1.26	—
CoCl ₂ ・6H ₂ O	mg/100g	0.4	0.4
Ca (IO ₃) ₂	mg/100g	1.54	1.54
MnSO ₄ ・4H ₂ O	mg/100g	15.4	15.4
Corn starch	mg/100g	800	801.26
Cd ^b	ppm	0.016±0.004	0.015±0.004
Zn ^b	ppm	37.2±3.6	35.1±0.1
Cu ^b	ppm	3.5±0.1	0.54±0.02
Fe ^b	ppm	334±31	351±23
Ca ^b	ppm	752±36	788±84
Mn ^b	ppm	37.2±10.7	30.8±4.4
Mg ^b	ppm	1110±300	881±105

^a The copper-deficient diet was prepared by removing CuSO₄・5H₂O from the basal diet.

^b Mean values±S.D.

These samples were analysed for each diet.

結 果

図1は各群の体重増加曲線である。実験期間中ラットの死亡は無く、体重増加、一般全身状態、飼料摂取量、飲水量において群間で差異はみられなかった。飼料からの1日平均Cu摂取量は、基礎食群で56 $\mu\text{g/day}$ 、Cu欠乏食群で8.6 $\mu\text{g/day}$ であった。

表2は屠殺時の臓器重量である。Cd投与およびCu欠乏による臓器重量の差異は、全く認められなかった。

表3-1、3-2はCd投与前および屠殺時の一般臨床血液所見である。統計的に一部の項目に有意差($p < 0.01$)が認められたが、全般的にはCd投与、Cu欠乏の影響はなかった。

図2はCd投与前および屠殺時の血清Cu濃度である。Cd投与前では、血清Cu濃度はI群 $2.1 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 、II群 $1.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ 、III群 $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ 、IV群 $1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ であり、Cu欠乏群(II、IV群)は基礎食群(I、III群)の1/2の血清Cu濃度を示した。屠殺時の血清Cu濃度は、I群 $1.8 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ 、II群 $1.4 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 、III群 $1.9 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ 、IV群 $0.55 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ であった。Cu欠乏でCdを投与しないII群では、個体差が大きく、ラットによっては基礎食群と同レベルの血清Cu濃度を示す個体も出現した。しかし、Cu欠乏でCdを投与したIV群では、血清Cu濃度は逆にCd投与前の1/2に減少した。

図3は各臓器中のCd濃度である。Cdを投与しない場合では、Cu欠乏食群の肝・腎・脾臓および血液中Cd濃

Fig. 1 Growth curves of animals

a shows the beginning of adjusted diet intake.

b shows the beginning of cadmium administration.

c shows the end of cadmium administration.

6-week-old Sprague-Dawley rats were purchased. After 2 weeks (a) rats were divided into two groups. One group was fed a basal diet and the other was fed a copper-deficient diet. After 3 weeks (b) each group was further divided into two subgroups. One of these was orally administered saline and the other was orally administered cadmium at a dose of 200 $\mu\text{g/rat}$, 1 time/day, 5 times/week for 10 weeks. Body weight gains with the basal diet ($\circ$), basal diet and cadmium-administered ($\bullet$), copper-deficient diet ($\triangle$) and copper-deficient diet and cadmium-administered ($\blacktriangle$) groups.

Table 2 Wet weight of organs^a of rats (g) (mean $\pm$ S.D.)

		No. of rats	Liver	Kidneys	Brain	Lungs	Spleen	Heart
Untreated	Basal	10	10.0±1.5	1.71±0.20	1.83±0.09	1.07±0.06	0.53±0.07	0.85±0.06
	Cu-deficient	10	9.45±0.77	1.66±0.17	1.81±0.09	1.10±0.08	0.54±0.04	0.84±0.12
Cd-treated	Basal	11	9.24±1.37	1.72±0.13	1.87±0.07	1.07±0.10	0.52±0.07	0.81±0.09
	Cu-deficient	11	9.70±1.65	1.74±0.18	1.85±0.08	1.09±0.11	0.51±0.05	0.80±0.09

^a These samples were collected at sacrifice.

Table 3-1 Clinical laboratory findings in blood^a of rats 2 days before Cd administration (mean±S.D.)

		Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	No. of erythrocytes ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
Untreated	Basal	48.1±2.2	15.4±1.4	886±88
	Cu-deficient	47.6±2.6	15.9±0.5	901±36
Cd-treated	Basal	45.7±2.3	15.3±1.5	882±77
	Cu-deficient	46.8±1.7	15.7±0.5	880±32

^aBlood in the jugular vein was collected 2 days before the beginning of cadmium administration.

Table 3-2 Clinical laboratory findings in blood^a and sera^a of rats at sacrifice (mean±S.D.)

		Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	No. of erythrocytes ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Total protein (g/dl)	Al-P (K-A unit)	BUN (mg/dl)
Untreated	Basal	44.3±1.8	14.6±0.8	813±49	8.4±1.1	18.4±5.4	23.1±2.6
	Cu-deficient	44.8±1.9	15.0±0.5	838±34	7.6±1.1	12.8±3.8	19.5±2.2*
Cd-treated	Basal	45.9±1.2	15.2±0.5	868±30	8.6±1.5	13.6±6.9	20.3±3.5
	Cu-deficient	45.2±1.8	14.7±0.6	865±38	8.9±1.0	14.2±7.6	20.4±3.8
		Uric acid (mg/dl)	Inorganic phosphorus (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Zn ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
Untreated	Basal	2.2±0.8	5.2±0.7	10.2±0.5	352±66	572±35	121±12
	Cu-deficient	1.3±0.6	5.8±0.4	10.3±0.6	378±60	527±39	113±9
Cd-treated	Basal	1.5±0.4	5.6±0.6	10.1±0.3	427±67	606±64	116±11
	Cu-deficient	1.5±0.7	5.2±0.9	10.4±0.6	328±56*	578±48	125±12

^aThese samples were collected at sacrifice.

* Significantly different from the basal diet, $p<0.01$.

Fig. 2 Copper concentrations in sera

A: Serum was collected 2 days before the beginning of cadmium administration.

B: Serum was collected at sacrifice.

Each bar shows mean value of each group.

* Significantly different from the basal diet, $p<0.01$.

Significantly different from untreated rats, $p<0.01$.

Legends are the same as those in Fig. 1.

Fig. 3 Cadmium concentrations in tissues^a

^a Samples were collected at sacrifice.

* Significantly different from the basal diet, $p < 0.01$.

Significantly different from untreated rats, $p < 0.01$.

Cadmium concentrations in tissues of the basal diet (□), basal diet and cadmium-administered (▤), copper-deficient diet (▨), and copper-deficient diet and cadmium-administered (■) groups.

度は基礎食群より高値を示し、脳、心臓中のCd濃度は低値を示した。Cdを投与した場合には、Cu欠乏食群の腎臓と血液中のCd濃度は基礎食群より有意な高値を示し、また肝臓、脳、脾臓中Cd濃度は個体差が大きいため有意差はみられないものの基礎食群より高くなる傾向を示した。Cd投与群における肝・腎臓のCd蓄積量は基礎食群では肝臓で $51.6 \pm 14.8 \mu\text{g}$ 、腎臓で $10.1 \pm 1.8 \mu\text{g}$ 、Cu欠乏食群では肝臓で $64.9 \pm 20.1 \mu\text{g}$ 、腎臓で $17.1 \pm 4.5 \mu\text{g}$ であり、Cu欠乏により増加する傾向を示した。

図4は各臓器中のCu濃度である。Cd非投与の場合、Cu欠乏により肝・腎・脾臓、脳、肺のCu濃度が減少し、特に腎臓における減少は著しく、腎臓中Cu濃度は基礎食群の約1/3の値を示した。脾臓、心臓、筋肉のCu濃度には基礎食との差は認められなかった。Cu欠乏でCdを投与した場合、臓器中Cu濃度は測定を行った全ての臓器においてCd投与の基礎食群より低値を示し、特に、肝臓、脾臓、血液ではCd投与基礎食群の1/2以下の値となった。肝臓、肺、脾臓、血液のCu濃度はCdを投与しないCu欠乏食群より低値となり、Cd投与によるこれら臓

器中Cu濃度の減少がみられた。基礎食群でCd投与を行った群では、Cd投与により肝・脾・心臓、筋肉のCu濃度が増加した。

図5は各臓器のFe濃度である。Cdを投与しない場合には、Cu欠乏により腎臓と血液のFe濃度が減少し、脳、心臓、脾臓、筋肉のFe濃度が増加していた。しかし、Cdを投与するとこれらの変動は抑制され、腎臓、心臓、血液のFe濃度は飼料中Cu量に関係なく同レベルを示し、正常値に復帰する傾向を示した。脳のFe濃度はCu欠乏により逆に基礎食より低い値を示した。脾臓と筋肉のFe濃度はCd投与により飼料中Cu量に関係なく減少し、正常値より低値を示した。

表4は各臓器中のZn, Ca, Mn, Mg濃度である。肝・腎臓中Zn濃度は基礎食・Cu欠乏食群ともにCd投与により上昇した。

臓器中Ca濃度の変動は少ないが、肺ではCu欠乏により増加しCd投与によりほぼ正常値となった。

臓器中Mn濃度の変化については、腎臓中のそれが基礎食群ではCd投与により低下し、Cu欠乏によっても低下

Fig. 4 Copper concentrations in tissues^a
Legends are the same as those in Fig. 3.

Fig. 5 Iron concentrations in tissues^a
Legends are the same as those in Fig. 3.

Table 4 Zinc, Calcium, Manganese and Magnesium concentrations in tissues^a of rats ($\mu\text{g/g}$ wet weight) (mean $\pm$ S.D.)

			Liver	Kidneys	Brain	Lungs	Spleen
Zn	Untreated	Basal	23.8±2.0	26.4±1.9	12.9±1.2	18.3±0.6	20.0±1.9
		Cu-deficient	24.9±1.1	24.9±1.2	13.0±0.3	18.6±0.7	19.8±0.7
	Cd-treated	Basal	32.8±4.7 [#]	29.2±1.0 [#]	13.0±0.6	18.9±0.4	21.1±1.0
		Cu-deficient	30.3±5.7 [#]	31.9±2.4 ^{*#}	12.6±1.0	19.4±1.2	21.3±0.7 [#]
Ca	Untreated	Basal	9.7±0.8	49.3±20.0	36.3±8.7	51.0±5.6	29.5±3.8
		Cu-deficient	10.6±0.9	55.0±14.7	30.1±6.5	65.0±12.6 [*]	26.2±2.7
	Cd-treated	Basal	10.3±0.6	59.0±20.5	29.0±7.1	47.9±5.0	23.3±3.6 [#]
		Cu-deficient	10.2±1.0	61.0±33.1	33.8±14.2	47.5±7.0 [#]	23.7±3.9
Mn	Untreated	Basal	2.10±0.22	1.01±0.16	0.43±0.08	0.22±0.03	0.24±0.07
		Cu-deficient	2.11±0.24	0.82±0.07 [*]	0.45±0.05	0.27±0.03 [*]	0.20±0.02
	Cd-treated	Basal	2.40±0.26 [#]	0.85±0.06 [#]	0.44±0.11	0.21±0.02	0.24±0.03
		Cu-deficient	2.07±0.65	0.86±0.11	0.40±0.03 [#]	0.23±0.04	0.20±0.01 [*]
Mg	Untreated	Basal	272±19	255±21	177±5	158±15	261±47
		Cu-deficient	289±17	259±24	180±8	155±8	257±17
	Cd-treated	Basal	304±23	256±15	183±35	168±35	259±12
		Cu-deficient	268±63	250±15	174±5	164±8	288±28 ^{*#}
			Heart	Pancreas	Muscle	Blood	
Zn	Untreated	Basal	16.0±0.6	28.2±2.3	10.2±0.5	5.44±0.21	
		Cu-deficient	16.9±0.9	29.9±3.2	10.2±0.9	5.48±0.25	
	Cd-treated	Basal	17.1±0.6 [#]	32.2±4.2	11.2±1.0	5.80±1.09	
		Cu-deficient	16.2±0.5 [*]	36.0±7.1	10.8±0.9	5.71±0.83	
Ca	Untreated	Basal	25.8±3.0	50.1±5.3	17.1±1.3	41.5±2.8	
		Cu-deficient	24.9±3.1	49.9±4.4	15.9±1.4	37.4±3.3 [*]	
	Cd-treated	Basal	27.0±2.0	47.4±4.4	16.1±0.6	37.1±4.1 [#]	
		Cu-deficient	21.9±3.5 [*]	50.0±5.6	15.1±1.4	37.2±4.3	
Mn	Untreated	Basal	0.44±0.03	1.82±0.16	0.085±0.010	0.015±0.006	
		Cu-deficient	0.47±0.11	1.94±0.17	0.104±0.023	0.011±0.002	
	Cd-treated	Basal	0.46±0.04	1.90±0.26	0.082±0.011	0.016±0.003	
		Cu-deficient	0.43±0.05	2.45±0.32 ^{*#}	0.073±0.007 [#]	0.017±0.008	
Mg	Untreated	Basal	280±29	337±22	342±19	46.5±7.9	
		Cu-deficient	283±30	395±86	314±12 [*]	43.2±1.7	
	Cd-treated	Basal	300±22	399±61 [#]	327±18	45.7±3.8	
		Cu-deficient	272±16 [*]	428±74	353±42 [#]	48.7±9.9	

^a These samples were collected at sacrifice. * Significantly different from the basal diet, $p < 0.01$.[#] Significantly different from untreated rats, $p < 0.01$.

した。脾臓のMn濃度はCu欠乏でCdを投与した群が他の3群より高値を示した。

臓器中Mg濃度の変化については、脾臓中のそれがCu欠乏でCdを投与した群において他の3群より高値であった。筋肉のMg濃度はCu欠乏により減少するが、Cd投与によりほぼ正常値となった。

全体的に、Cd投与およびCu欠乏によるCa, Mn, Mg濃度の変動は小さかった。

図6はCd投与終了後8日間に糞中に排泄されたCd量を1匹/日当たりで表したものである。基礎食群およびCu欠乏食群のCd排泄量にはほとんど差はなく、Cd投与群のCd量は投与中止後5日前後で非投与群のレベルとなった。

図7はCd投与終了後8日間の糞中1匹当たり1日Cu排泄量である。Cu排泄量は、Cd投与の有無に関わらず

飼料からの摂取Cu量とはほぼ同量であった。

考 察

飼料中の成分組成の差異による生体影響をみる実験では、飼料中の成分組成が常に一定であることが重要であるため、成分組成が明らかな基礎配合飼料を基礎食として用いた。この基礎食のCu濃度は3.5 ppmであり、実験期間中の1匹あたりの1日平均Cu摂取量は56 $\mu\text{g/day/rat}$ であった。ラットの成長期におけるCuの1日必要量は0.05 mg/ratであるという報告¹⁵⁾や、ヘモグロビン生成に対しては飼料中Cu濃度は1 $\mu\text{g/g diet}$ 、成長に対しては3 $\mu\text{g/g diet}$ が必要であるという報告^{16, 17)}等より、今回実験で用いた基礎食のCu濃度は通常の発育発達には十分な量であるといえる。Cu欠乏食としては出来得るかぎりのCu欠乏の状態で実験を行うため、基礎食

Fig. 6 Cadmium excretion in feces^a of each group after the end of cadmium administration

^a Samples of each group were collected daily for 8 days after the end of cadmium administration.

Legends are the same as those in Fig. 1.

よりCu SO₄•5H₂Oを除いた飼料を用いた。このCu 欠乏食のCu 濃度は0.54 ppmと基礎食の約1/6であった(表1)。ヒトの銅の1日必要量はWHOの勧告によれば、乳幼児は80 μg/kg/day、年長児は40 μg/kg/dayを摂取する必要があるとされている¹⁸⁾。今回、実験で用いた基礎食群の体重当たりの平均1日Cu 摂取量は約250 μg/kg/dayであり、ヒトの必要摂取量の約6倍に相当する。したがって、Cu 欠乏食群の体重当たりの1日Cu 摂取量はちょうどヒトの1日必要量にはば一致している。それ故、Cu 欠乏の基準は種属によりかなり差があると言えるが、この動物実験をヒトに外挿すると、このCu 欠乏レベルはヒトの1日必要摂取量に相当する。ラットやマウスでは、Cuの1日必要摂取量はヒトより大であり、Cu 欠乏の影響がヒトより現れやすいことが考えられる。また、このような条件下においては、CdとCuの関連性も強く出現することが推察される。

飼料にCdを添加した実験では、総Cd 摂取量の推定には飼料摂取量の正確な測定により行われるが、正確な飼料摂取量の把握は困難であり、また飼料摂取量には個体差があるため総Cd 摂取量に個体差が生じてくる。それ故、本実験では、総Cd 摂取量を一定量とするため、カテーテルを用いて強制的にCdの投与を行った。ラットに投与された総Cd量は10 mg/ratの一定量であり、この投与量はラットの1日飼料摂取量を10 gとすると、Cd 20 ppm 含有飼料を摂取した条件に相当し、汚染地域の米中Cd濃度の約20倍と推定され、環境汚染レベルを無視

Fig. 7 Copper excretion in feces^a of each group after the end of cadmium administration

Legends are the same as those in Fig. 6.

した非現実的暴露実験ではないといえる。

Cd 投与およびCu 欠乏による全身状態への影響についてみると、実験期間中の体重増加、飼料摂取量、飲水量には4群間に差は認められず、また屠殺時の臓器重量にも4群間に有意な差は認められなかった(図1、表2)。このことは、研究目的に影響を及ぼす実験計画上の問題点はなかったことを示している。

マウスやラットにCu 欠乏食を摂取させた場合、血清中のCu やセロプラスミンレベルは比較的短期間のうちに著しく減少すること¹⁹⁻²¹⁾が報告されている。本実験においても、Cu 欠乏食を摂取し始めて3週間後(Cd 投与前)にはCu 欠乏食摂取により血清Cu 濃度は基礎食の1/2に減少していた。しかし、Cu 欠乏食の摂取が3か月の長期になると(屠殺時)、血清Cu 濃度は0.94~1.84 μg/mlと個体差があるものの増加を示し、基礎食レベルまで復帰しようとする傾向を示した。恐らく生体の恒常性を維持しようとする機能が強く働くものと考えられる。一方、Cdを投与すると、血清Cu 濃度はさらに低下し、Cd 投与前の1/2、すなわち正常値の約1/4の低値となった(図3)。これは恐らく飼料中Cuの欠乏状態ではCd 投与がCuの腸管吸収を阻害することによると推測される。しかし、このような著しい血清Cuの低下にもかかわらず、他の血液臨床所見にはCu 欠乏およびCd 投与による変動はほとんど認められなかった。ヒトにおける血清Cuの正常範囲はかなり広く、欠乏症の診断としては40~50 μg/dl以下が異常低値^{22,23)}と考えられており、本実験で見られたこの血清Cu レベルの減少はCu 欠乏により臨

床症状を引き起こすところまでには達していないようである。

臓器中Cd濃度に対するCu欠乏の影響についてみると、Cdを投与しない場合では、肝・腎・脾臓および血液中Cd濃度はCu欠乏により上昇しており、特に脾臓と血液では基礎食の約2倍にまで上昇していた。一方、脳と心臓では逆にCu欠乏によりCd濃度は減少していた。Cdを投与した場合は、個体差が大きく有意な差は認められないものの、大部分の組織においてCu欠乏により臓器中Cd濃度は高くなる傾向を示し、特に腎臓では、基礎食の約1.7倍の高値($p < 0.01$)を示した。Cdを投与した場合の肝臓および腎臓のCd蓄積量は、基礎食摂取では肝臓で51.6 μg 、腎臓で10.1 μg であり、Cu欠乏食摂取では肝臓で64.9 μg 、腎臓で17.1 μg であり、腎Cd量のCu欠乏による著しい増加が認められた。

すなわち、Cuが不足している飼料を長期間摂取すると、Cdを投与しない場合においてもCdは積極的に体内に取り込まれ、肝臓や腎臓、脾臓中に蓄積されるものと考えられる。このCu欠乏状態でCdを投与すると、肝・腎・脾臓以外の組織においてもCd濃度の増加が認められ、Cu欠乏によるCd蓄積の増強効果がみられた。特に、腎臓へのCdの取り込みに対する増強効果が著しかった。

Cu欠乏食を飼料としCd負荷を行った報告^{19, 24)}では、いずれにおいても腎臓中Cd濃度はCu欠乏により増加することが認められており、今回の実験結果とよく一致していた。

Cu欠乏状態でなぜ腎臓がCdを積極的に蓄積するかについて、Bremner and Campbell¹⁹⁾やFoxら²⁴⁾は腸管における結合部位がCuとCdは同じであるためCuが低レベルになるとCdが結合しやすくなり吸収が促進された結果によるものと結論づけている。

Cuは、Cd投与により組織中に取り込まれ濃度が増加すること²⁵⁻²⁷⁾は既によく知られているが、本実験においても基礎食では、Cd投与により肝・腎・脾・心臓および筋肉中のCu濃度の増加が認められた。一方、Cu欠乏では、組織中Cu濃度は肝・腎・脾・心臓および筋肉において有意に減少するが、Cdを投与すると、Cu濃度の減少はさらに増強され、測定した全組織においてCu濃度は低値を示した。特に、肝臓、脾臓、血液においてこの減少は著しかった。すなわち、比較的長期にわたってCu欠乏食を摂取した場合、Cd非投与のラットでは体内におけるCuの恒常性を維持しようとするためか、一部の組織のCu濃度は基礎食と同じレベルを示すが、Cdを負荷されたラットではこの恒常性維持機能が低下する

ため、組織中Cu濃度はさらに減少することが認められた。

⁶⁴Cuを用いた幾つかの報告²⁸⁻³¹⁾では、Cuは腸管で主としてアミノ酸と結合した型で吸収され、腸管細胞内でメタロチオネインと結合し、一部は蓄積され、必要に応じて血中へ放出され、Cuの均衡調節が腸管内のメタロチオネインで行われている可能性が示されている。Hall, A.C.ら³¹⁾やDavis, N.T. and Campbell, J.K.²⁸⁾は、Cdの経口的な負荷が加わると、腸管内において⁶⁴Cu量やCu-MT量はCd添加量に比例して増加することが認められたが、粘膜細胞からの⁶⁴Cuの輸送はブロックされたと報告している。Bremner and Campbell¹⁹⁾は、Cu欠乏状態では飼料中のCd/Cuモル比が4:1になるとCuの吸収は1/2に減少し、肝・腎臓中のCu濃度が低下することを報告している。

これらのことより、Cu欠乏食を長期に摂取した場合は、腸管からのCu輸送量などの増加により、組織内Cu量は正常のレベルに復帰しようとするが、Cd負荷を行うと、Cdは腸管細胞内におけるMTの誘導合成を増強し、その結果、腸管細胞内にはMTと結合したCu量の増加がもたらされ、組織内へのCuの移行が阻止され、Cuの低下を来すことが推察される。

Znについては、Cuと互いに拮抗する作用を有することが報告^{19, 32)}されているが、本実験では、飼料中のCu量に関係なくCd投与により肝臓および腎臓のZn濃度は高値を示し、他の組織中Zn濃度にはCu欠乏およびCd投与による影響はほとんど認められなかった。Fox et al²⁴⁾は、うずらを用いた実験において肝・腎臓中のZn濃度はCu欠乏により影響されなかったと報告している。Keen, C.L. et al³³⁾は、ラットにCu欠乏でZn量を欠乏から過剰まで種々の段階に調整した飼料を6週間摂取させた場合、組織中のZn濃度はCu欠乏による変動はなく飼料中のZn濃度に依存したと報告している。これらの報告やわれわれの実験結果から、組織中のZnはCu欠乏よりむしろCd投与に影響されやすいものと考えられる。

脳、脾臓、心臓および筋肉のFe濃度は、Cu欠乏により増加し基礎食より高値を示すが、Cdを負荷すると逆に減少した。腎・脾臓中のFe濃度はCu欠乏およびCd投与により基礎食よりも低値となる傾向を示した。血液のFe濃度は、Cu欠乏により減少し、Cd負荷により基礎食のレベルに復帰した。すなわち、脳、肝臓、心臓、筋肉ではCu欠乏が組織へのFeの蓄積を増強させるもののCd投与がそれを抑制し、腎臓や脾臓ではCu欠乏もCd投与も同じようにFeの蓄積を抑制することがわかる。

Cu 欠乏と臓器中Fe濃度との関連についての報告^{20, 33)}は少なく, Keen, C.L. et al³³⁾は, 雄ラットを0.5 ppmの低Cu飼料で6週間飼育した場合, 肝臓のFe濃度の上昇が認められたと報告している。Taylor, C.G. et al²⁰⁾の報告では, 0.8 ppmの低Cu飼料で胎仔期から6週令まで飼育されたラットでは, 肝臓および肺のCu濃度の低下, 肝臓中Fe濃度の上昇が認められている。すなわち, Cuは生体内でセロプラスミンとして鉄酸化触媒酵素としての作用, 貯蔵鉄の動員, 血清鉄交代率の促進作用など鉄の代謝と密接な関係を有しており, Cu欠乏食を長期間摂取した場合, Feは積極的に臓器に蓄積され, その結果, 血液のFeは減少したものと考えられる。Feの蓄積増加の原因について明確なことは分らないが, CuとFeが腸管で拮抗することによりFeの腸管吸収が高まったのかもしれないし, 臓器内においても同様にCuとFeが拮抗的に作用し³²⁾, Cu濃度が減少することでFeの蓄積が促進されたのかもしれない。

CdとFeとの関連については, Cdを経口投与した場合, CdはFeの腸管吸収を阻害し, 組織内鉄濃度を低下させることが報告されている^{34~37)}。本実験においても, Cd投与によりCu欠乏でみられたFeの蓄積増加は阻止され, 脳, 脾臓, 筋肉のFe濃度は基礎食よりさらに低くなる傾向を示した。すなわち, Feはこれらの組織においては, Cu欠乏よりもCd投与の方が強く影響を受けると考えられる。このように, Feは臓器によりCu欠乏およびCd投与の影響が異なって発現してくるが, その理由は不明である。

これらのことより, 通常の飼料では, 臓器中Fe濃度の変動には, Cd投与による影響は少ないが, Cu欠乏状態ではCd投与がCu欠乏の影響をさらに増強したり, あるいはCu欠乏の影響に拮抗的に作用したりすることが分かった。また, 脳, 脾臓, 筋肉のFe濃度に対するCdの影響は, Cu欠乏の影響より強く発現されてくるようである。

CdとMnとの関連についてはいくつかの報告^{38~41)}がみられるが, Cd負荷は腸管におけるMnの吸収を阻害するという報告⁴¹⁾やMnの臓器濃度はCdで増加するという報告³⁸⁾や, 逆に減少するというもの³⁹⁾, 増加後正常のレベルに復帰する⁴⁰⁾というものなど, 相反する報告がなされている。臓器内におけるCdとCaとの関連性, CdとMgとの関連性およびCu欠乏によるMn, Ca, Mg等の濃度変動に関する報告はほとんど見受けられない。本実験においても, 今回測定したこれらの必須金属(Ca, Mn, Mg)の臓器中濃度には, Cu欠乏やCd投与による

著しい変動は認められておらず, それ故, これらの必須金属は生体内においてCdやCuとの関連性は少ないことが推察される。

経口投与されたCdは腸管吸収が非常に低く90%以上が糞中に排泄される^{4, 42)}ため, Cd排泄のパターンから飼料中Cu量の差異について考察することは危険であり, 本実験からもパターンの差異は認められなかった。

糞中へのCu排泄量は飼料中Cu量に依存しており, はば一日摂取量に等しいCu排泄が認められ, Cd投与による差異はみられなかった。

結 論

Cu欠乏の条件下でCd負荷を行い, Cd蓄積に及ぼすCu欠乏の影響, Cu欠乏およびCd負荷による生体影響や必須金属の臓器内分布の変動について検討した。8週令の雌ラットを基礎食(Cuとして3.5 ppm)およびCu欠乏食(Cuとして0.5 ppm)で3週間飼育した後, Cd 200 µg/rat/dayを週5回50回(計10 mg/rat)経口投与し, 最終投与の8日後に屠殺した。血液の臨床検査および各組織のCd, Zn, Cu, Fe, Mn, Ca, Mg濃度を測定し以下の結果を得た。

- 1) Cd投与前(3週間の馴化後)では, Cu欠乏食により血清Cuは著しく減少し, 基礎食の1/2のレベルとなった。Cd投与を行うとさらに減少し, 基礎食の約1/4のレベルを示した。Cdを投与しないものでは, 基礎食のレベルに復帰する傾向がみられた。
- 2) 臓器中Cd濃度はCu欠乏食により増加する傾向がみられ, Cd投与を行った場合, Cu欠乏食による肝・腎のCd蓄積の増強効果が認められた。
- 3) 臓器中Cu濃度はCu欠乏食により, 肝, 腎, 脳, 肺, 脾のCu濃度の減少がみられた。さらにCdを追加投与すると, 測定したすべての臓器においてCu濃度の減少がみられ, 特に肝, 脾, 血液の造血器官においてこの減少は著しかった。
- 4) Fe濃度はCu欠乏により脳, 心, 脾, 筋肉で増加していたが, Cd投与によりこの増加は抑制された。腎, 脾のFe濃度はCu欠乏およびCd投与により減少した。また組織中Fe濃度への影響はCu欠乏よりもCd投与の方が強かった。
- 5) 肝, 腎中のZn濃度は, 基礎食, Cu欠乏食ともにCd投与による増加がみられた。
- 6) Mn, Ca, Mg濃度には, Cu欠乏およびCd投与による著しい変動は認められなかった。

文 献

- 1) Tipton, I.H., Schroeder, H.A., Perry, H.M. and Cook, M.J.: Trace elements in human tissue. Part III. Subjects from Africa, the near and far east and Europe, *Health Phys.*, **11**, 403-451 (1965).
- 2) Schroeder, H.A. and Balassa, J.J.: Abnormal trace metals in man: Cadmium, *J. Chron. Dis.*, **14**, 236-258 (1961).
- 3) Sumino, K., Hayakawa, K., Shibata, T. and Kitamura, S.: Heavy metals in normal Japanese tissues, *Arch. Environ. Health*, **30**, 487-494 (1975).
- 4) 小泉直子: カドミウムの生体内動態に関する基礎的研究, *日衛誌*, **30**, 300-314 (1975).
- 5) Elinder, C.-G., Kjellström, T., Friberg, L., Lind, B. and Linnman, L.: Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits, *Arch. Environ. Health*, **31**, 292-302 (1976).
- 6) Nomiyama, K., Nomiyama, H., Nomura, Y., Taguchi, T., Matsui, K., Yotoriyama, M., Akahori, F., Iwao, S., Koizumi, N., Masaoka, T., Kitamura, S., Tsuchiya, K., Suzuki, T. and Kobayashi, K.: Effects of dietary cadmium on rhesus monkeys, *Environ. Health Perspect.*, **28**, 223-243 (1979).
- 7) Elinder, C.-G., Jönsson, L., Piscator, M. and Rahnster, B.: Histopathological changes in relation to cadmium concentration in horse kidneys, *Environ. Res.*, **26**, 1-21 (1981).
- 8) Elinder, C.-G., Nordberg, M., Palm, B. and Piscator, M.: Cadmium, zinc, and copper in horse liver and in horse liver metallothionein: Comparisons with kidney cortex, *Environ. Res.*, **26**, 22-32 (1981).
- 9) Nordberg, G.F., Kjellström, T. and Nordberg, M.: In "Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal Vol. 1 Exposure, Dose, and Metabolism" (Editors: Friberg, L., Elinder, C.-G., Kjellström, T. and Nordberg, G.F.), p.138, CRC Press, Cleaveland (1985).
- 10) Perry, H.M., Tipton, I.H., Schroeder, H.A., Steiner, R.L. and Cook, M.J.: Variation in the concentration of cadmium in human kidney as a function of age and geographic origin, *J. Chron. Dis.*, **14**, 259-271 (1961).
- 11) Chaube, S., Nishimura, H. and Swinyard, C.A.: Zinc and cadmium in normal human embryos and fetuses: Analyses by atomic absorption spectrophotometry, *Arch. Environ. Health*, **26**, 237-240 (1973).
- 12) Cumbrowski, V.J. and Auermann, E.: Beitrag zum Kadmiumgehalt von Neugeborenen, *Z. Gesamte Hyg.*, **26**, 345-346 (1980).
- 13) 吉川博: カドミウム長期投与による, 臓器中カドミウムの蓄積と, 銅・亜鉛・マンガン量の変動, *産業医学*, **21**, 171-177 (1979).
- 14) Koizumi, N., Hatayama, F., Akabori, F. and Masaoka, T.: Gel filtration pattern of cadmium, zinc, and copper in liver and renal cortex supernatants of cadmium-treated monkeys, *Kobe J. Med. Sci.*, **27**, 239-249 (1981).
- 15) 細谷憲政, 印南敏, 五島孜郎: 小動物を用いる栄養実験, p.173, 第一出版, 東京(1980).
- 16) Mills, C.F. and Murray, G.: The preparation of a semi-synthetic diet low in copper for copper-deficiency studies with the rat, *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 547-552 (1960).
- 17) 細谷憲政, 印南敏, 五島孜郎: 小動物を用いる栄養実験, p.185, 第一出版, 東京(1980).
- 18) WHO committee: Trace elements in human nutrition, Report of a WHO expert committee, WHO Teach. Rep. Ser. No. 532, Geneva (1973).
- 19) Bremner, I. and Campbell, J.K.: The influence of dietary copper intake on the toxicity of cadmium, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **355**, 319-332 (1980).
- 20) Taylor, C.G., Bettger, W.J. and Bray, T.M.: Effect of dietary zinc or copper deficiency of the primary free radical defence system in rats, *J. Nutr.*, **118**, 613-621 (1988).
- 21) Iguchi, H., Kasai, R., Okumura, H., Yamamoto, T. and Kagan, H.M.: Effect of dietary cadmium and/or copper on the bone lysyl oxidase in copper-deficient rats relative to the metabolism of copper in the bone, *Bone Miner.*, **10**, 51-59 (1990).
- 22) 西美和, 臼井朋包, 波多野修一: 金属欠乏症 3. 銅欠乏症, *臨床医*, **8**, 1524-1526 (1982).
- 23) 西美和, 波多野修一, 相原克昭, 木原幹夫: 1. 生化学的検査M. 金属 銅, *日本臨床*, **47**, 増刊号, 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査—その数値

- をどう読むか—, 上巻, 771-774 (1989).
- 24) Fox, M.R.S., Tao, S.-H., Stone, C.L. and Fry, B.E.: Effects of zinc, iron and copper deficiencies on cadmium in tissues of Japanese quail, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 57-65 (1984).
- 25) Stonard, M.D. and Webb, M.: Influence of dietary cadmium on the distribution of the essential metals copper, zinc and iron in tissues of the rat, *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 349-363 (1976).
- 26) Washko, P.W. and Cousins, R.J.: Role of dietary calcium and calcium binding protein in cadmium toxicity in rats, *J. Nutr.*, **107**, 920-928 (1977).
- 27) Klaassen, C.D.: Effect of metallothionein on hepatic disposition of metals, *Am. J. Physiol.*, **234**, E47-E53 (1978).
- 28) Davis, N.T. and Campbell, J.K.: The effect of cadmium on intestinal copper absorption and binding in the rat, *Life Sci.*, **20**, 955-960 (1977).
- 29) Bremner, I.: Cadmium toxicity. Nutritional influences and the roles of metallothionein, *World Rev. Nutr. Diet.*, **32**, 165-197 (1978).
- 30) Evans, G.W.: In "Metallothionein" (Editors: Kägi, J.H.R. and Nordberg, M.), p.321-329, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart (1979).
- 31) Hall, A.C., Young, B.W. and Bremner, I.: Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat, *J. Inorg. Biochem.*, **11**, 57-66 (1979).
- 32) Mills, C.F.: Interactions between elements in tissues: studies in animal models, *Fed. Proc.*, **40**, 2138-2142 (1981).
- 33) Keen, C.L., Reinstein, N.H., Lefevre, J.G., Lefevre, M., Lönnerdal, B., Schneeman, B.O. and Hurley, L.S.: Effect of dietary copper and zinc levels on tissue copper, zinc, and iron in male rats, *Biol. Trace Elem. Res.*, **8**, 123-136 (1985).
- 34) Hills, C.H. and Matrone, G.: Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements, *Fed. Proc.*, **29**, 1474-1481 (1970).
- 35) Sugawara, N., Sugawara, C. and Miyake, H.: Effects of subcutaneous and oral cadmium on iron metabolism: Role of ceruloplasmin and metallothionein, *Arch. Toxicol.*, **56**, 25-28 (1984).
- 36) Weigel, H.J., Elmadfa, I. and Jäger, H.J.: The effect of low doses of dietary cadmium oxide on the disposition of trace elements (zinc, copper, iron), hematological parameters, and liver function in rats, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 289-296 (1984).
- 37) Gruden, N. and Munić, S.: Effect of iron upon cadmium-manganese and cadmium-iron interaction, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**, 969-974 (1987).
- 38) Schroeder, H.A. and Nason, A.P.: Interactions of trace metals in rat tissues. Cadmium and nickel with zinc, chromium, copper, manganese, *J. Nutr.*, **104**, 167-178 (1974).
- 39) Doyle, J.J. and Pfander, W.H.: Interactions of cadmium with copper, iron, zinc, and manganese in ovine tissues, *J. Nutr.*, **105**, 599-606 (1975).
- 40) Friel, J.K., Borgman, R.F. and Chandra, R.K.: Effect of chronic cadmium administration on liver and kidney concentrations of zinc, copper, iron, manganese, and chromium, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**, 588-593 (1987).
- 41) Gruden, N.: Cadmium-manganese interaction in the rat's duodenum, *Environ. Res.*, **43**, 19-23 (1987).
- 42) Suzuki, S., Taguchi, T. and Yokohashi, G.: Dietary factors influencing upon the retention rate of orally administered $^{115m}\text{CdCl}_2$ in mice—with special reference to calcium and protein concentrations in diet, *Ind. Health*, **7**, 155-162 (1969).

(受付 1992年10月21日 受理 1993年8月13日)