マウス大腿骨骨量におよぼすカルシウム、ビタミンD、ビタミンE制限および カドミウム添加食餌長期摂取の影響：Microdensitometry による観察

今 井 常 彦

東邦大学医学部衛生学教室

The Effects of Long-term Intake of Restricted Calcium, Vitamin D, and Vitamin E and Cadmium-added Diets on the Bone Mass of Mouse Femoral Bone: A Microdensitometrical Study

Tsunehiko IMAI

Dept. of Environmental and Occupational Health, Toho Univ. Sch. of Med., Tokyo

Abstract Effects of undernutrition on development of cadmium (Cd) poisoning were investigated in mice over a long experimental period ranging from 29 days to 24 months. The study was designed to examine low in calcium, low in vitamin D and low in vitamin E diets, which were considered neither to induce lesions of Ca, vitamin D and vitamin E deficiency nor innutrition.

Twenty-nine-day-old female ICR strain mice were separated into 7 groups and different diets were given to each group. Group I a commercial diet (Intact), Group II a low in Ca and low in D diet, Group III a low in Ca, low in D and low in E diet, Group IV a low in Ca, low in D and 20ppm Cd diet, Group V a low in Ca, low in D and 40ppm Cd diet, Group VI a low in Ca, low in D, low in E and 20ppm Cd diet and Group VII a low in Ca, low in D, low in E and 40ppm Cd diet.

Using X-rays of the hind legs, the bone density was measured at the middle of the femur employing a densitometer; effects of the undernutrition and the cadmium-added diet on bone density were investigated referring to five indices: 1) peaks of the density of the middle of the bone cortex (h_1 , h_2) (the maximum density of the bone cortex $(h_1+h_2)/2$ [h_{max}]), 2) the lowest density of the middle of the bone marrow (h_3) (the minimum density of the bone marrow [h_{min}]), 3) the bone cortical width (d_1+d_2), 4) the bone marrow width (d) and 5) the cortical bone index (the ratio of cortical bone width to bone width. [CBI]).

The long-term effects of cadmium.

a) Comparisons among groups II, IV and V.

At 18 months it was found in group IV that h_{max} and d were small, while h_{min} , d_1+d_2 and CBI were not appreciably different compared with group II. In group V h_{min} , d_1+d_2 and CBI were small, and h_{max} and d were not appreciably different compared with group IV.

At 24 months it was found in group IV that h_{min} and d were small, whereas h_{max} , d_1+d_2 and CBI were not appreciably different compared with group II. In group V

Reprint requests to: Tsunehiko Imai, Department of Environmental and Occupational Health, Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omori-Nishi, Ota, Tokyo 143 Japan

hmax and hmin were small, d was large, and d1+d2 and CBI showed no appreciably different compared with group IV.

b) Comparisons among groups III, VI and VII.

At 18 months it was found in group VI that hmax and hmin were small, d1+d2 and CBI were large, and d was not appreciably different compared with group III. In group VII hmax, hmin, d1+d2 and CBI were small, and d was large, compared with group IV.

At 24 months it was found in group VI that hmax, d1+d2, d and CBI were small, and that hmin was not appreciably different compared with group III. In group VII d was small, and hmax, hmin, d1+d2 and CBI were not appreciably different compared with group VI.

The Cd concentration exhibited essentially the same pattern as aging.

We concluded from these results that aging progressed quickest in the 40ppm Cd-administration low-Ca, D, E diet.

The diets promoted the effects of Cd in the following order: low Ca, D, E diet > low Ca, D diet.

These results indicate that Cd promotes aging of bone.

Key words: Cadmium (カドミウム), Chronic exposure (慢性曝露), Femoral bone (大腿骨), Microdensitometry (マイクロデンシトメトリー), ICR strain mouse (ICR系マウス)

緒 言

環境汚染物質としてのカドミウム(以下Cd)の慢性曝露による健康障害としてはイタイイタイ病(以下イ病)が疑われている。イ病は経産女性に多発しその初期において腰痛、下肢筋肉痛などの自覚症状、蛋白尿、糖尿がみられ、骨軟化、多発性病的骨折を発症するとされている¹⁻³⁾。

イ病に特有の骨病変はCdのみにより起こりうるのか、カルシウム(以下Ca)やビタミンD(以下D)の欠乏、低蛋白等の栄養要因、あるいはさらに他の要因の関与、またCdの関与の有無等を含めその原因解明に向けて、多くの実験的研究が行われている。大本ら⁴⁻⁸⁾はCd長期経口摂取マウスにおけるCdの体内分布、成長、妊娠出産、および骨X線像所見等に加齢的影響が示唆されたが、尿中アミノ酸像には明らかな影響のないことを報告している。Itokawaら⁹⁾は低蛋白、Ca欠乏栄養条件下でのCd摂取により骨軟化症が見られたとし、武藤ら¹⁰⁾も低蛋白、低Ca栄養条件下でのCd摂取により骨軟化症発症の可能性があるとしている。しかし、大方¹¹⁾、Yoshikiら¹²⁾はCa欠乏栄養条件、広田¹³⁾、今井ら¹⁴⁾は制限Ca栄養条件、滝澤¹⁵⁾は低Ca、低Dの各栄養条件下でのCd投与による骨変化は骨粗鬆症様変化であるとしている。そして土屋¹⁶⁾はCdの健康障害について臨床症状、病理所見、動物実験結果などを総合して多面的な整合性は見いだされず、Cdと骨障害については、なお多くの検討を必

要としているとしている。

著者らは前報¹⁷⁾において、Caを制限(制限Ca)、Dを制限(制限D)、ビタミンEを制限(制限E)の影響および同栄養条件設定下におけるCd摂取影響を諸臓器および骨組織の変化から観察したが、本研究においては、骨観察に適した軟X線(ソフテックス)撮影による骨X線像についてデンシトメトリーにて検討を試みた。

実験方法

1) 実験動物

ICR系雌性マウス144匹を使用し、生後29日齢時より510日間から541日間(以下18M時)および693日間から722日間(以下24M時)飼育した。飼料および飲料水(水道水)は自由摂取とした。本学医学部実験動物センター内準バリアシステム内飼育を行った。室温23±2°C、湿度55±5%、8-20時明期とした。飼育期間中、週2回の体重測定を行った。実験期間は1982年11月25日-1984年11月17日、1985年5月20日-1986年11月3日である。

2) 飼育飼料条件 (Table 1)

I群:市販飼料(CE-2・日本クレアK.K)飼育群、II群:制限Ca(市販飼料の15%・所要量の36%に制限)(制限Ca)・D(市販飼料の22%・所要量の330%に制限)飼料(実験飼料II)飼育群(制限Ca・D群)、III群:制限Ca・D・E(市販飼料の50%・所要量の250%に制限)飼料(実験飼料III)飼育群(制限Ca・D・E群)、IV群:

Table 1 Compositions of experimental diets.

		Commercial diet (CE-2)	Experimental diet						Nutritional requirement
			II			III			
Net protein	(%)	26.6	27.5			27.5			16~20
Net fat	(%)	4.8	4.3			4.3			3~12
Net fiber	(%)	3.3	4.1			4.1			~6
Calcium	(%)	1.17	0.18			0.18			0.5
Phosphate	(%)	1.04	0.73			0.73			0.5
Vitamin D	(IU/100g)	220	50			50			15
Vitamin E	(mg/100g)	10	12			5			2
Cadmium	(μg/g)	0	0	20	40	0	20	40	
Group		I	II	IV	V	III	VI	VII

Roentgenological assay of the bone mass of the shaft of a femoral bone (microdensitometry).
Scanning of the X-ray picture at a right angle to the axis of the bone with densitometer measures intensity, which is converted to density by means of the standard aluminum wedge. An M-shaped bone pattern is obtained.

- 1) The maximum density of the bone cortex (h_{max}) = $(h_1 + h_2) / 2$
- 2) The minimum density of the bone marrow (h_{min}) = h_3
- 3) The bone cortical width = $d_1 + d_2$
- 4) The bone marrow width = d
- 5) The cortical bone index (CBI) = $(d_1 + d_2) / (d_1 + d_2 + d)$

Fig. 1 Densitometrical determination of five indices of femoral bone.

実験飼料II + Cd 20 ppm 添加飼料飼育群 (制限 Ca・D・Cd 20 ppm 群), V 群: 実験飼料II + Cd 40 ppm 添加飼料飼育群 (制限 Ca・D・Cd 40 ppm 群), VI 群: 実験飼料III + Cd 20 ppm 添加飼料飼育群 (制限 Ca・D・E・Cd 20 ppm 群), VII 群: 実験飼料III + Cd 40 ppm 添加飼料飼育群 (制限 Ca・D・E・Cd 40 ppm) の7種である。

3) 骨X線観察方法 (Fig. 1)

骨X線撮影は超軟X線発生装置 (soft X-ray generator) (SOFTEX-CSM 型・ソフテックス K.K.) を使用し、

撮影条件は電源 100 v, 二次電圧 25 kv, 管球電流 10 mA, 曝射時間 15 秒, 焦点フィルム距離 45 cm とした。X-ray フィルム (FR・富士フィルム K.K.) を黒色ビニール袋に包んだ上, 軟組織を除去した後肢骨の直下に置き撮影した。この際, 0.25 mm 段差 10 段の aluminun step wedge を同一フィルムに撮影^{18), 19)}。現像は調合現像液 (レンドール・富士フィルム K.K.) を用いた。

撮影したフィルムは, マイクロデンスitomーター (PDS-15・サクラ K.K.) を用い aluminun step wedge 陰

影を標準に計測²⁰⁻²³⁾を行った。密度測定は大腿骨の中間点において大腿骨前面側より後面側にスキヤニングし、骨陰影密度のパターンは50倍に拡大記録した。このデンスitomーターチャートより骨髄幅 (d)、骨皮質幅 (d_1+d_2)、骨幅と骨皮質幅の比 (Cortical Bone Index・CBI) ならびに alminum step wedge に換算した骨皮質中央部ピーク高 (h_1, h_2)、骨髄中央部ピーク高 (h_3) の計測を行い、骨皮質最大密度 (h max) ($(h_1+h_2)/2$)、骨髄最小密度 (h min) (h_3) 等の5指標を得、これらについて検討した。

計測値の有意差検定には Student's t-test を用いた。

実験結果

1) 加齢による変化 18 M時と 24 M時の比較

(Table 2)

各計測指標について、

① h max (骨皮質最大密度)：実験群 I～VII群の全実験群において、24 M時では18 M時に比較して低い密度の傾向であり、特に I 群, II 群, III 群, IV 群, V 群は有意 ($p<0.05, p<0.01, p<0.01, p<0.01, p<0.01$) に低密度であった。

② h min (骨髄最小密度)：全実験群において 24 M時では18 M時に比較し低い密度の傾向であり、特に III 群, IV 群は有意 ($p<0.01, p<0.01$) に低い密度であつ

Table 2 Microdensitometrical determination of five indices of femoral bone in mice.

Group	I		II		III	
	Age	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)
h max	18M	(5) 3.59±0.58	(8) 3.59±0.36	(9) 3.24±0.57		
	24M	(6) 3.05±0.12 ^{a*}	(6) 2.68±0.39 ^{a**b***}	(8) 1.86±0.19 ^{a**b***c**}		
h min	18M	1.39±0.33	1.35±0.31	1.19±0.23		
	24M	1.31±0.16	1.18±0.29	0.79±0.24 ^{a**b***c**}		
d_1+d_2	18M	2.96±0.65	2.34±0.34	2.38±0.45		
	24M	2.74±0.22	2.01±0.21 ^{b***}	1.87±0.26 ^{a**b***}		
d	18M	5.86±0.74	7.13±0.55 ^{b***}	6.38±0.55 ^{c*}		
	24M	5.92±0.64	7.04±0.49 ^{b***}	6.71±0.74		
CBI	18M	0.335±0.074	0.249±0.025	0.271±0.051		
	24M	0.318±0.034	0.218±0.023 ^{a*,b***}	0.219±0.038 ^{a*,b***}		

Group	IV		V		VI		VII	
	Age	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)
h max	18M	(7) 3.31±0.36	(7) 3.27±0.51	(7) 2.60±0.49 ^{c**}	(8) 2.28±0.38 ^{c**}			
	24M	(9) 2.58±0.20 ^{a**}	(6) 1.99±0.42 ^{a**c**d*}	(6) 2.05±0.53	(7) 2.03±0.37			
h min	18M	1.30±0.18	1.13±0.33	1.06±0.25	0.89±0.36			
	24M	0.93±0.14 ^{a**}	0.78±0.21 ^{c*}	0.79±0.21	0.81±0.12			
d_1+d_2	18M	2.41±0.36	2.21±0.57	2.60±0.24	2.16±0.19 ^{f*}			
	24M	2.09±0.30	2.03±0.21	2.01±0.40 ^{a**}	1.99±0.23			
d	18M	6.79±0.67	6.83±0.84	6.47±0.42	6.75±0.67			
	24M	6.72±0.58	7.00±1.00	6.86±0.67	6.16±0.42			
CBI	18M	0.259±0.037	0.245±0.056	0.287±0.026	0.245±0.023 ^{f*}			
	24M	0.224±0.062	0.227±0.030	0.228±0.049 ^{a**}	0.244±0.019			

^a: Significantly different from 18-month group.

* $p<0.05$ ** $p<0.01$.

^b: Significantly different from group I.

^c: Significantly different from group II.

^d: Significantly different from group IV.

^e: Significantly different from group III.

^f: Significantly different from group VI.

by Student's t-test.

た。

③ $d_1 + d_2$ (骨皮質幅) : 全実験群において 24 M 時では 18 M 時に比較して縮小の傾向であり, 特にⅢ群, Ⅵ群は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小していた。

④ d (骨髄幅) : 24 M 時では 18 M 時に比較し拡大の傾向の実験群はⅠ群, Ⅲ群, Ⅴ群, Ⅵ群であり, Ⅱ群, Ⅳ群, Ⅶ群の 3 群は縮小の傾向であった。

⑤ CBI (Cortical Bone Index) : 全実験群において 24 M 時は 18 M 時に比較し低い傾向であり, 特にⅡ群, Ⅲ群, Ⅵ群は有意 ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$) に低値であった。

2) 栄養制限による影響 (Table 2)

1) 制限 Ca・D 影響 Ⅰ群とⅡ群の比較

① $h \max$ (骨皮質最大密度) : 18 M 時ではⅠ群とⅡ群の間に有意差は見られなかった。24 M 時ではⅠ群に比較しⅡ群は有意 ($p < 0.01$) に低い密度であった。

② $h \min$ (骨髄最小密度) : 18 M 時ではⅠ群とⅡ群の間に有意差は見られなかった。24 M 時ではⅡ群はⅠ群に比較し有意差は見られないものの低い密度の傾向であった。

③ $d_1 + d_2$ (骨皮質幅) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅡ群はⅠ群に比較し縮小の傾向であり, 特に 24 M 時では有意 ($p < 0.01$) に縮小していた。

④ d (骨髄幅) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅠ群に比較しⅡ群は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に拡大していた。

⑤ CBI (Cortical Bone Index) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの観察時期においてもⅡ群はⅠ群に比較して低い傾向であり, 特に 24 M 時では有意 ($p < 0.01$) に低値であった。

2) 制限 E 影響 Ⅱ群, Ⅲ群の比較

① $h \max$ (骨皮質最大密度) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅡ群に比較しⅢ群は低い密度の傾向であり, 特に 24 M 時では有意 ($p < 0.01$) に低い密度であった。

② $h \min$ (骨髄最小密度) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅡ群に比較しⅢ群は低い傾向であり, 特に 24 M 時では有意 ($p < 0.05$) に低い密度であった。

③ $d_1 + d_2$ (骨皮質幅) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅢ群はⅡ群に比較し縮小の傾向であった。

④ d (骨髄幅) : 18 M 時, 24 M 時のいずれの時期においてもⅢ群はⅡ群に比較し縮小の傾向であり, 特に 18 M 時では有意 ($p < 0.05$) に縮小していた。

⑤ CBI (Cortical Bone Index) : 18 M 時, 24 M 時のい

ずれの時期においてもⅢ群はⅡ群に比較し高い傾向であった。

3) Cd 添加影響 (Table 2)

1) Ⅱ群とⅣ群, Ⅴ群の比較

① $h \max$ (骨皮質最大密度) : 18 M 時ではⅤ群・Ⅳ群 < Ⅱ群の順であった。24 M 時ではⅤ群 < Ⅳ群 < Ⅱ群の順であり, 特にⅤ群はⅡ群, Ⅳ群に比較し, 有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に低い密度であった。

② $h \min$ (骨髄最小密度) : 18 M 時ではⅤ群 < Ⅳ群 < Ⅱ群の順であった。24 M 時においてもⅤ群 < Ⅳ群 < Ⅱ群と同様の順であり, 特にⅤ群はⅡ群に比較し, 有意 ($p < 0.05$) に低い密度であった。

③ $d_1 + d_2$ (骨皮質幅) : 18 M 時ではⅤ群 < Ⅱ群・Ⅳ群の順であったが, 24 M 時では 3 実験群がほぼ同値であり, 各実験群間に有意差は見られなかった。

④ d (骨髄幅) : いずれの観察時期においても各実験群間に有意差は見られないものの, 18 M 時ではⅣ群・Ⅴ群 < Ⅱ群の順であり, 24 M 時Ⅳ群 < Ⅴ群・Ⅱ群の順であった。

⑤ CBI (Cortical Bone Index) : いずれの観察時期においても各実験群間に有意差は見られないものの, 18 M 時ではⅤ群・Ⅱ群 < Ⅳ群の順であり, 24 M 時ではⅡ群 < Ⅳ群・Ⅴ群の順であった。

2) Ⅲ群とⅥ群, Ⅶ群の比較

① $h \max$ (骨皮質最大密度) : 18 M 時ではⅦ群 < Ⅵ群 < Ⅲ群の順であり, Ⅲ群に比較しⅥ群, Ⅶ群は有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に低い密度であった。24 M 時ではⅢ群 < Ⅵ群, Ⅶ群の順であった。

② $h \min$ (骨髄最小密度) : 18 M 時では有意差は見られないものの, Ⅶ群 < Ⅵ群 < Ⅲ群の順であり, 24 M 時では 3 実験群はほぼ同値であった。

③ $d_1 + d_2$ (骨皮質幅) : 18 M 時ではⅦ群 < Ⅲ群 < Ⅵ群の順であり, 特にⅦ群はⅥ群に比較して有意 ($p < 0.05$) に縮小していた。24 M 時ではⅢ群 < Ⅵ群・Ⅶ群の順であった。

④ d (骨髄幅) : いずれの観察時期においても各実験群間に有意差は見られないものの, 18 M 時ではⅢ群 < Ⅵ群 < Ⅶ群の順であった。24 M 時ではⅦ群 < Ⅲ群 < Ⅵ群の順であった。

⑤ CBI (Cortical Bone Index) : 18 M 時ではⅦ群 < Ⅲ群 < Ⅵ群の順であり, 特にⅦ群はⅥ群に比較して有意 ($p < 0.05$) に低値であった。24 M 時ではⅢ群 < Ⅵ群 < Ⅶ群の順であった。

考 察

1) 加齢による変化

ヒトにおけるデンシトメトリーによる骨の加齢変化の観察において、井上ら^{20),21),23)}は健康人の第二中手骨X線像について諸指標を計測し、女子では30歳を超えると加齢とともに骨皮質最大密度(h max), 骨髄最小密度(h min), および骨皮質幅(d_1+d_2), 本実験のCBIに当たるmetacarpal index(MCI)等は有意に低下し、骨髄幅(d)は有意に増大するとしている。動物ではMatsushitaら²⁴⁾、今井ら²⁵⁾はマウスの大腿骨についてソフテックス撮影によるX線像の計測から、加齢によりCBIの有意な低下があるとしている。

本実験の18M時から24M時の間における加齢変化は、市販飼料群のI群ではh max, h min, d_1+d_2 , CBIは低下傾向があり、特にh maxは有意($p<0.05$)の低下が見られた。

また、18M時から24M時の間における諸指標の変化は、制限Ca・D・E飼料のIII群ではh max, h min, d_1+d_2 , CBIの有意($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$)な低下が見られ最も顕著であった。次に変化の大きかった飼料群はIV群、続いてVI群、II群、V群、I群の順であり、18M時ですでに諸指標値が変動していたVII群は18M時から24M時の変化は最小であった。

2) 栄養制限の影響

制限Ca・Dの影響について、武藤ら¹⁰⁾はラットで体重増加に抑制が見られない程度の低Ca・低蛋白、低リン飼料飼育では骨影響は見られないとし、大方¹¹⁾はCa欠乏飼料飼育ラットの脛骨X線像においては本実験のCBIに当たる骨幅と骨皮質幅の比は顕著に低下したとしている。吉木ら²⁶⁾はCa欠乏飼料飼育ラットではosteoporosisは観察されたが、D欠乏飼料飼育ラットに骨変化所見は見られなかったとしている。Rasmussen²⁷⁾はD欠乏条件のみではラットに骨変化は見られなかったとしている。Oliver²⁸⁾はラットはD欠乏に対する感受性が低いため、D欠乏・Ca欠乏の骨影響はCa欠乏による影響がまず現れosteoporosisを生じ続いてD欠乏・Ca欠乏の影響によりosteomalaciaとなるとしている。

本実験における制限Ca・D飼料群(II群)と市販飼料群(I群)の比較から、18M時では骨密度に関連のh max, h minには有意差は見られず、骨皮質幅に関連の d_1+d_2 , CBIは有意差は見られないものの低値の傾向であり、骨髄幅に関連のdは有意($p<0.05$)な拡大が見られた。24M時ではh max, d_1+d_2 , CBIの有意($p<0.05$,

$p<0.01$, $p<0.01$)な低値、dの有意($p<0.01$)な拡大が見られたことは、市販飼料群に比較して体重増加に有意な抑制の見られない、本実験レベルの制限Ca・Dであっても骨髄幅の拡大、骨皮質幅の縮小、CBIの低値に続き、骨密度の低下が顕著に起こるものと考ええる。

制限Eの影響については、山本²⁹⁾はE欠乏飼料飼育ラットでは大腿骨、脛骨の長径および重量の低下、骨の弾性、硬度の低下が見られたとしている。Machlinら³⁰⁾はE欠乏飼料飼育ラットの骨X線像から骨皮質のわずかな菲薄、脊椎後側弯症が見られたとしている。

本実験において制限E影響を制限Ca・D飼料群(II群)と制限Ca・D・E飼料群(III群)の比較からみると、III群ではII群に比較し18M時ではh max, h min, dの低値、およびCBIの高値、24M時ではh max, h minの有意($p<0.01$, $p<0.05$)な低値、dおよび d_1+d_2 の低値の傾向が見られた。

体重増加の抑制は見られたものの、外部の形態変化は見られず、腎組織変化も軽微であり、骨変化は18M時で骨髄幅の縮小および骨密度のわずかな低下、24M時では骨密度の顕著な低下と骨皮質幅および骨髄幅の縮小であったことから、本実験レベルの制限E影響は骨粗鬆症様の骨萎縮であると考ええる。

3) Cdの影響

大方¹¹⁾はCd投与ラットの脛骨X線像においては本実験のCBIに当たる骨幅と骨皮質幅の比はCd非投与ラットに比較し有意差は見られないが低値の傾向であるとしている。広田¹³⁾はCd投与家兎の大腿骨X線像所見は骨皮質の菲薄、骨梁の萎縮、骨密度の減少等が観察されたとし、武藤ら¹⁰⁾もCd投与ラットの大腿骨X線像においては本実験のCBIに当たる骨幅と骨皮質幅の比は減少したとしている。Itokawaら⁹⁾は低蛋白・低Ca・Cd投与ラットのX線像から骨陰影の淡影、骨皮質の菲薄、脊椎前側弯症が観察されたとしている。Yoshikiら¹²⁾は離乳直後のラットへのCd投与は骨の発育を障害するとしている。

本実験におけるCd投与影響は、18M時の制限Ca・D飼料へのCd添加では骨密度の変化としては、20ppm群ではいずれの指標にも変化は見られず、40ppm群のh minにわずかな低下が観察されたのみであった。制限Eが加わった制限Ca・D・E飼料へのCd添加により、骨密度指標のh max, h minはいずれもCd添加群において低下し、40ppm添加群ではh maxは有意($p<0.01$)に低下した。24M時では、制限Ca・DへのCd添加によりh max, h minは低下し40ppm群では、h max, h

min は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) に低下した。制限 Ca・D・E 飼料への Cd 添加では、すでに、制限 Ca・D・E による h max, h min の低下が有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) であり、Cd 添加の影響は認められなかった。

4) Cd と骨軟化症, 骨粗鬆症, イ病について

井上ら^{20),21),23)} は骨デンストメトリーによる諸指標のヒトにおける疾患との関連について、骨粗鬆症患者では骨皮質の菲薄と骨髓幅の拡張が顕著、加えて骨密度の減少もあるとし、骨軟化症患者では骨密度の顕著な減少に加え骨皮質の菲薄、骨髓幅の拡張が認められるとし、透析患者では骨密度の減少が見られるとしている。藤田ら^{31),32)} は Cd がその発症に関与しているとされるイ病患者の大腿骨、第二中手骨および鎖骨等の X 線像において本実験の CBI に当たる骨幅と骨皮質幅の比を健常者のそれと比較し、大腿骨では有意な低値を示したが第二中手骨や鎖骨ではほぼ同値であったことから、イ病患者にみられる骨病変は中心骨を主体とした軸性骨粗鬆症であるとしている。青島ら³³⁾ は Cd 汚染地域住民の第二中手骨 X 線像についてデンストメトリーにより計測した諸指標は、カドミウムによる尿細管障害指標である尿中 $\beta 2$ -ミクログロブリン排泄量の多いものに骨密度指標の h max, h min の有意な低値, $d_1 + d_2$, 本実験の CBI にあたる metacarpal index (MCI) の有意な低下および d の有意な拡大が見られたとしている。

本実験における Cd 投与による諸指標の変化は、h max, h min 等の骨密度の顕著な減少、骨皮質幅の縮小および骨髓幅の縮小による骨萎縮であり、骨軟化症患者に観察された骨皮質幅の縮小および骨髓幅の拡張の両変化の共存は本実験では制限 Ca・D 群には認められたが、Cd 添加群においてはこれを増強する結果は認められず、Cd が骨軟化を惹起する結果は得られなかった。また本実験における Cd 添加による諸指標の変化は制限 E による変化と類似の骨粗鬆症様の変化であった。

5) デンストメトリーと X 線像所見および組織所見の関連について

同一動物の後肢骨のデンストメトリー計測値と X 線像および組織所見¹⁷⁾ との比較から、加齢影響については、デンストメトリーでは、h max, $d_1 + d_2$, CBI の低下および d のわずかな拡大であったことに対して、X 線像および組織所見では骨皮質の菲薄、骨梁の粗網、関節軟骨層の部分欠損、種子骨の増生および半月板の化骨の程度が強くなることであった。

栄養制限影響については、制限 Ca・D の影響はデンストメトリーでは h max, h min, $d_1 + d_2$, CBI の低下お

よび d の拡大であったことに対して、X 線像および組織所見では骨皮質の菲薄、骨梁の粗網の程度が強くなることであった。制限 E の影響はデンストメトリーでは h max, h min, $d_1 + d_2$, d の低下であったことに対して、X 線像および組織所見では骨皮質の菲薄、骨梁の粗網、関節軟骨細胞数の減数、種子骨の増生および半月板の化骨等の変化の程度が大きくなることであった。

Cd の影響は、特に 40 ppm 添加によりデンストメトリーでは無添加の同栄養条件群に比較して h max, h min, $d_1 + d_2$ の低下であったことに対して、X 線像および組織所見では骨皮質の菲薄、骨梁の粗網、関節軟骨細胞数の減数、種子骨の増生および半月板の化骨、骨細胞数の減数の程度が強くなることであった。

以上より、h max, h min の低下は骨梁の粗網に対応し、 $d_1 + d_2$ の低下は骨皮質の菲薄に対応していた。d は骨皮質の菲薄により拡大し、その後の関節軟骨細胞数および骨細胞数の減数により低下した。デンストメトリー計測値は X 線像所見および組織所見に対応するものであり、X 線像および組織学的観察に加えデンストメトリー計測により、栄養制限および Cd による骨影響がより客観的に示し得たと考える。

結 語

制限 Ca・D, 制限 Ca・D・E および Cd 添加により、骨構造にいかなる変化が見られるかを明らかにする目的で、生後 29 日齢時の ICR マウス 144 匹を、I 群(市販飼料群), II 群(制限 Ca・D 群), III 群(制限 Ca・D・E 群), IV 群(制限 Ca・D・Cd 20 ppm 群), V 群(制限 Ca・D・Cd 40 ppm 群), VI 群(制限 Ca・D・E・Cd 20 ppm 群), VII 群(制限 Ca・D・E・Cd 40 ppm) の 7 飼料飼育群として 18 M 時および 24 M 時まで飼育した。大腿骨の軟 X 線撮影フィルムをデンストメトリーによる計測を行った。骨皮質最大密度、骨髓最小密度、骨皮質幅、骨髓幅、Cortical Bone Index (CBI) 等を指標として、観察を行い次の結果を得た。

- 1) 加齢による影響は、Cd 無添加市販飼料飼育マウスの 18 カ月時および 24 カ月時の大腿骨観察により、骨皮質最大密度および骨髓最小密度の低下、骨皮質幅の縮小、CBI 値の低下であった。
- 2) 制限カルシウム・制限ビタミン D の影響は、骨皮質幅の縮小、骨髓幅の拡大、CBI 値の低下であり、24 カ月時においてはさらに骨皮質最大密度、骨髓最小密度の低下が加わった。
- 3) 制限カルシウム・制限ビタミン D・制限ビタミン E

の影響は、骨皮質最大密度、骨髄最小密度の低下、骨髄幅の縮小であり、24カ月時においてはさらに骨皮質幅の縮小が加わった。

- 4) カドミウム添加の影響は無添加の同栄養条件に比較して特に40ppm添加により骨皮質最大密度、骨髄最小密度の低下であった。
- 5) カドミウム添加の影響は制限カルシウム・ビタミンD・ビタミンE条件下において制限カルシウム・ビタミンD条件下に比較しより早期に顕著に発現したことから、カドミウムの影響は低栄養の負荷により増強した。
- 6) デンシトメトリー諸指標への影響の強さは、18M時では制限Ca・D・E・Cd 40ppm>制限Ca・D・E・Cd 20ppm>制限Ca・D・Cd 40ppm>制限Ca・D・E>制限Ca・D・Cd 20ppm>制限Ca・D>市販飼料の順であり、24M時では制限Ca・D・E・Cd 40ppm=制限Ca・D・E・Cd 20ppm=制限Ca・D・E=制限Ca・D・Cd 20ppm>制限Ca・D>市販飼料の順であった。

稿を終えるに臨み終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました衛生学教室大本美彌子教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Ishizaki, A.: On 'itai-itai' (ouch-ouch) disease, *Asian Medical Journal*, **14**, 421-436 (1971).
- 2) 萩野 昇: イタイイタイ病とビタミンD, *労働の科学*, **28**, 32-44 (1973).
- 3) 辻 達彦, 永田 稔, 伊藤洋子, 滝川弘志, 今村 晋, 芦沢義郎, 松井寿夫: 亜鉛精錬所従業員のカドミウム特殊健康診断成績の検討—第1報—1次健康診断成績の総括的観察, *日衛誌*, **27**, 316-325 (1972).
- 4) 大本美彌子, 石見敦子, 佐藤京子, 今井常彦, 野村良治: カドミウムの長期経口投与実績(1) カドミウムのマウス体内分布, *日衛誌*, **32**, 136 (1977).
- 5) 大本美彌子, 今井常彦, 佐藤京子, 額田 燦: カドミウムの長期経口投与実験(2)—Cd投与マウスの体重変化および臓器重量について, *日衛誌*, **32**, 137 (1977).
- 6) 大本美彌子, 佐藤京子, 今井常彦: カドミウムの長期経口投与実験(3)—カドミウム投与の妊娠, 出産, 出生仔等におよぼす影響, *日衛誌*, **32**, 138 (1977).
- 7) 大本美彌子, 今井常彦, 野村良治: カドミウムの長期経口投与実験(4)—Cd投与マウスの尿中アミノ酸像および後肢骨のX線所見, *日衛誌*, **33**, 169 (1978).
- 8) 大本美彌子, 今井常彦, 外間安次, 野村良治, 額田燦: カドミウムの長期経口投与実験(5)—Cd投与マウスの腎組織所見および後肢X線像の観察, *日衛誌*, **35**, 215 (1980).
- 9) Itokawa, Y., Abe, T., Tabei, R. and Tanaka, S.: Renal and skeletal lesions in experimental cadmium intoxication, *Arch. Environ. Health*, **28**, 149-154 (1974).
- 10) 武藤泰敏, 四童子好広, 鈴木庄亮: ラットにおける慢性カドミウム中毒の発症におよぼす低栄養条件の影響(1), *栄養と食糧*, **28**, 1-8 (1975).
- 11) 大方一義: 低カルシウムおよびカドミウム添加が, 生体諸組織のカドミウム, 亜鉛, 銅の濃度におよぼす影響について, *日大医誌*, **31**, 105-124 (1972).
- 12) Yoshiki, S., Yagisawa, T., Kimura, M., Otaki, N., Suzuki, M. and Suda, T.: Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication, *Arch. Environ. Health*, **30**, 559-562 (1975).
- 13) 広田昌利: 骨塩代謝に対するカドミウムの影響, *岐阜大学医学部紀要*, **19**, 82-115 (1971).
- 14) 今井常彦, 大本美彌子: Cdの骨影響に関する研究—Cd添加およびCa, 蛋白質制限食餌のマウスの脛骨・大腿骨骨端部におよぼす影響, *日衛誌*, **40**, 524 (1985).
- 15) 滝澤行雄: ラットにおけるカドミウム連続投与実験(II), *環境保健レポート*, No.45, 54-74 (1979).
- 16) 土屋健三郎: イタイイタイ病およびカドミウム中毒IV. 総括, *環境保健レポート*, No.58, 20-23 (1991).
- 17) 今井常彦, 大本美彌子, 関久美子, 原田 孝: マウス諸臓器および骨におよぼすカルシウム, ビタミンD, ビタミンE制限およびカドミウム添加食餌長期摂取の影響: 組織学的およびX線の観察, *日衛誌*, **50**, 660-682 (1995).
- 18) 小池 充, 水本由造: 軟X線写真の高校生物への応用, *遺伝*, **34**, 43-49 (1980).
- 19) 河津邦雄, 清水 学: 超軟X線撮影にあたっての基礎実験, *日本医学写真学会誌*, **21**, 63-66 (1983).
- 20) 井上哲郎, 串田一博, 宮本繁仁, 矢島秀世, 伊丹康人, 山下源太郎: X線像による骨萎縮度判定の試み, *骨代謝*, **13**, 187-195 (1980).
- 21) 井上哲郎, 串田一博, 山下源太郎: 手部X線像による方法, *骨代謝*, **14**, 91-104 (1981).
- 22) 奥村秀夫, 山室隆夫, 笠井隆一, 林 泰, 松下 睦:

- Microdensitometry による実験動物の肢骨X線像解析, 骨形態計測 第3巻(若松英吉, 本間哲夫編), pp.99-109, 西村書店, 新潟(1984).
- 23) Inoue, T., Kusida, K., Miyamoto, S. and Sumi, Y.: Quantitative assessment of bone density on X-ray picture, J. Jap. Orthop. Ass., **57**, 1923-1983 (1983).
- 24) Matsushita, M., Tsuboyama, T., Kasai, R., Okumura, H., Yamamuro, T., Higuchi, E., Higuchi, K., Kohno, A., Yonezu, T., Utani, A., Umezawa, M. and Takeda, T.: Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM) SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis, Am. J. Pathol., **125**, 276-283 (1986).
- 25) 今井敏夫, 竹木幸恵, 山崎省二, 弥郡彰彦, 丹羽源男: 老化促進モデルマウス (SAM/P/6) の骨量減少に対する低濃度長期フッ素摂取の影響について, 日衛誌, **47**, 618-626, (1992).
- 26) 吉木周作, 柳沢考彰: ラット骨組織におけるカルシウム, ビタミンD, およびカルシウムとビタミンD 欠乏の影響に関する組織学的ならびに組織化学的研究, 骨代謝, **6**, 17-24 (1973).
- 27) Rasmussen, P.: The action of vitamin D deficiency on bone tissue and epiphyseal plate in rats given adequate amounts of calcium and phosphorus in the diet, Arch. Oral Biol., **14**, 1293-1304 (1969).
- 28) Oliver, W.M., Leaver, A.G. and Scott, P.G.: The effect of deficiencies of calcium or calcium and vitamin D on the rate of oral collagen synthesis in the rat, J. Periodont. Res., **7**, 29-34 (1972).
- 29) 山本泰正: ビタミンE に関する実験的研究, ビタミン, **15**, 330-334 (1958).
- 30) Machlin, L.J., Filipski, R., Nelson, J., Horn, L.R. and Brin, M.: Effects of a prolonged vitamin E deficiency in the rat, J. Nutr., **109**, 1200-1208 (1977).
- 31) 藤田拓男, 加藤孝之, 大村外志隆: イタイイタイ病患者における骨の加齢の計測的研究, 環境保健レポート, No.41, 61-62 (1977).
- 32) 藤田拓男, 加藤孝之, 大村外志隆: イタイイタイ病要観察者における骨の計測的研究, 環境保健レポート, No.44, 131 (1978).
- 33) 青島恵子, 加須屋実: 富山県神通川流域カドミウム汚染地住民の骨代謝について, 日衛誌, **42**, 90 (1987).
- (受付 1994年11月21日 受理 1995年4月24日)