マウス骨格筋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: 酵素組織化学的観察

今井 常彦^{*1}, 原 田 孝^{*2}

^{*1}東邦大学医学部衛生学教室, ^{*2}東邦大学医学部第1整形外科教室

The Effects of Long-term Intake of Restricted Calcium, Vitamin D, Vitamin E and Cadmium-added Diets on the Skeletal Muscles of Mice: An Enzyme Histochemical Study

Tsunehiko IMAI^{*1} and Takashi HARADA^{*2}

^{*1}*Dept. of Environmental and Occupational Health, Toho Univ. Sch. of Med., Tokyo*

^{*2}*1st Dept. of Orthopedic Surgery, Toho Univ. Sch. of Med., Tokyo*

Abstract To clarify the effect of chronic cadmium exposure on muscles, 29-day-old female ICR strain mice were separated into 7 groups and various diets were given to each group. Group I a commercial diet (Intact), Group II a diet low in calcium and low in vitamin D, Group III a diet low in Ca, low in D and low in vitamin E, Group IV a low in Ca, low in D and 20ppm cadmium-added 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. The levels of vitamin D and vitamin E were designed to be low in each diet but their amounts fulfilled the minimum nutritional requirements.

The experimental period was long, ranging from 29 days to 24 months. Using a microscope, two skeletal muscles, the soleus (red muscle) and the gastrocnemius (white muscle) of mice with chronic Cd effects were observed after staining with H. E. and analyzed after enzyme histochemical reaction to ATPase. Using ATPase stain, type I muscle fibers were distinguished from type II muscle fibers.

The long-term effects of cadmium.

1) Comparisons among groups II, IV and V.

After 18 months it was found in group IV that myopathic muscle damage (increased random variation of fiber size [Size] and widening of interstitial tissue [Widening]) were more prominent than in group II. In group V myopathic muscle damage (Size and Widening) and type II atrophy were more prominent than in group IV.

At 24 months it was found in group IV that myopathic muscle damage (Size, internal nuclei [IN] and Widening) and type I and type II atrophy were more prominent than in group II. In group V myopathic muscle damage (Size, IN and Widening) and type I and type II atrophy were more prominent than in group IV.

2) Comparisons among groups III, VI and VII.

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

At 18 months it was found in group VI that myopathic muscle damage (Size, IN and Widening) and type I and type II atrophy were more prominent than in group III. In group VII myopathic muscle damage and fiber size showed no appreciable difference compared with group VI.

At 24 months it was found in group VI that myopathic muscle damage (Size, IN and Widening) and type I and type II atrophy were more prominent than in group III. In group VII myopathic muscle damage and muscle fiber size showed no appreciable difference compared with group VI.

Myopathic muscle damage (Size, IN and Widening) and type I and type II atrophy were found to be prominent in all mice with Cd their diets. These findings were more prominent in the 40ppm Cd diet group than in the 20ppm Cd diet group. Similar findings were observed in 24-month-old mice and 18-month-old mice given Cd-added diets and the damage increased with age.

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. Aging progressed quicker in the soleus muscle than in the gastrocnemius muscle.

These results indicate that Cd promotes aging of skeletal muscles.

Key words: Cadmium(カドミウム), Chronic exposure(慢性曝露), Skeletal muscle(骨格筋), Muscle fiber types (筋線維型), Myopathy (ミオパチー), ICR strain mouse (ICR系マウス)

はじめに

カドミウム (Cd) の生体組織への影響観察において、急性影響としては睾丸の萎縮、壊死¹⁾が、また慢性影響としては腎病変や骨変化²⁻⁶⁾が報告されている。

環境汚染物質としての Cd の慢性曝露影響が疑われているイタイイタイ病 (イ病) では、自覚症状としての腰痛、下肢筋肉痛、その初期症状に蛋白尿、糖尿が認められ、さらに進むと骨軟化症、多発性の病的骨折など骨変化が著明であること^{6,7)}が報告されている。初期症状の一つに筋影響が挙げられている⁸⁾にもかかわらず、Cd の筋組織影響に関する実験的研究報告は、大本⁹⁾の報告があるのみである。骨と骨格筋とは構造上密接に関連して機能するものでありながら、Cd による影響に関して未だ十分に研究されているとは言えない。

本研究において、著者らは Cd の長期摂取の骨格筋への影響を組織学的および酵素組織化学的に観察を試みた。実施にあたり、イ病患者の疫学的調査研究から、Cd 曝露に加え、蛋白質、脂質、ビタミンA、ビタミンD、カルシウム等の低摂取が指摘されている¹⁰⁾こと、種々の有害物質の生体影響の観察において栄養の修飾のあることは周知であることをふまえ、Cd 添加の他に成育障害のない程度にカルシウム(制限Ca)、ビタミンD(制限D)、ビタミンE(制限E)およびこれら条件下のCd添加の条件設定下における骨格筋影響について、前報¹¹⁾で骨観察

を行ったマウスを用い組織学的および酵素組織化学的観察を行った。

実験方法

1) 使用動物および飼育条件

観察対象動物は前報¹¹⁾の実験IIにおいて他の諸臓器および骨について観察した対象動物を用いた。すなわち、ICR系雌性マウス(日本クレアK.K)144匹を生後29日齢時より下記7種類の飼育飼料により510日間乃至541日間(18カ月、以下18Mと略)および693日間乃至722日間(24カ月、以下24Mと略)飼育した。実験期間を通して、飼料および飲料水(水道水)は自由摂取した。

飼育環境は、本学医学部実験動物センター準バリアシステム内、室温23±3°C、8-20時明期とした。

2) 飼育飼料 (Table 1)

飼育飼料条件はI群:市販固型飼料(CE-2・日本クレアK.K)群(Intact群)、II群:制限Ca(市販飼料の15%・所要量の36%)・D(市販飼料の22%・所要量の330%)飼料群(実験飼料II)(制限Ca・D群)、III群:制限Ca・D・E(市販飼料の50%・所要量の250%)飼料群(実験飼料III)(制限Ca・D・E群)、IV群:実験飼料II+Cd 20 ppm添加飼料群(制限Ca・D・Cd 20 ppm群)、V群:実験飼料II+Cd 40 ppm添加飼料群(制限Ca・D・Cd 40 ppm群)、VI群:実験飼料III+Cd 20 ppm添加飼料群(制限Ca・D・E・Cd 20 ppm群)、VII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	(μ g/g)	0	0	20	40	0	20	40	
Group		I	II	IV	V	III	VI	VII

Photo 1. ATPase-stained soleus muscle.

Group I 18-month subject, routine (pre-incubated at pH 9.4) Classification of muscles into type I (light) and type II (dark) fiber. (x100)

実験飼料III + Cd 40 ppm 添加飼料群 (制限 Ca・D・E・Cd 40 ppm 群) の7群とした。

3) 骨格筋の観察

18 M時及び24 M時にジエチルエーテル麻酔下、放血屠殺後右下肢より、赤筋としてヒラメ筋、白筋として腓腹筋を採取。ろ紙上に筋線維の横断面が観察できるよう載せ、予め低温に維持したドライアイス-アセトン中にて急速凍結した。クリオスタットチャックにトラガントガムで固定し、この新鮮凍結組織を-25℃以下でクリオスタットにて6 μ m 前後の切片としてスライドグラスにはりつけ、室温にて乾燥させた。染色は、a) hematoxylin and eosin (H.E) 染色、b) routine adenosine triphosphatase (ATPase) 染色 (酵素活性により遊離された無機のリン酸をリン酸カルシウムとして捕らえ、このリン酸カルシウムをリン酸コバルトを経て硫酸コバルトとし

て検鏡できる特性を利用し、筋線維を myofibril A-band ATPase 活性の低い I 型線維 (淡染), myofibril A-band ATPase に富む II 型線維 (濃染) に型分する¹²⁻¹⁴⁾ (Photo 1)。型分け後の線維径計測には顕微接眼ミクロメーター (OSM-2 型・オリンパス光学工業 K.K) を使用し、型別に線維径分布をヒストグラムにあらわした。

統計処理について組織所見の変化の程度の検定は Mann-Whitney U-test, その他の検定は Student's t-test により行った。

結 果

各飼育飼料群における骨格筋の組織学的および酵素組織化学的観察

観察された組織学的変化所見は、筋線維の大小不同 (①) (Photo 2B), 再生筋線維の特徴である中心核線維 (②) (Photo 2B), 間質の増加 (③) (Photo 2A) などであった。

A) 筋の加齢変化 (Table 2) (Table 3)

生後 18 M時および 24 M時の比較

1) I 群 (市販飼料群)

組織所見は、ヒラメ筋 (生後 18 M時 6 例, 生後 24 M時 5 例) および腓腹筋 (生後 18 M時 6 例, 生後 24 M時 5 例) で筋線維の大小不同, 再生筋線維の特徴である中心核線維, 間質の増加が観察されたが, 2 群の間に所見の変化の程度に有意差は見られなかった。

筋線維径については、ヒラメ筋では I 型線維, II 型線維共に 18 M時に比較し 24 M時では有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小していた。腓腹筋では II 型線維は 24 M時で有意 ($p < 0.01$) に縮小していた。

型別筋線維径分布はヒラメ筋および腓腹筋の I 型, II 型両線維共に一峰性であり, 24 M時では 18 M時に比較

Photo 2. Histopathological muscle tissue findings in mice.

A: Soleus of group VI 18-month subject.

Slight widening of interstitial tissue (③) is demonstrated.

H.E. stain (x100)

B: Gastrocnemius of group VII 24-month subject.

Marked variation of fiber size (①) and moderate internal nuclei (②) are indicated.

H.E. stain (x200)

Table 2 Histopathological muscle tissue findings in mice.

Group	I				II				III				IV				V				VI				VII				
Grade	-	±	+	##	-	±	+	##	-	±	+	##	-	±	+	##	-	±	+	##	-	±	+	##	-	±	+	##	
18M																													
Soleus	(N)	(6)			(4)				(4)				(6)				(5)				(5)				(6)				
Random variation of fiber size		2	4		2	1	1		1	3	b*		4	2			1	4	d*		1	4			1	5			
Internal nuclei		4	2		3	1			2	2			3	2	1		4	1			1	2	2	f*	4	2		g*	
Widening of interstitial tissue		6			2	2		b*	4		b*		2	3	1		1	3	1		1	4		f*	3	3		f**g*	
Gastrocnemius		(6)			(4)				(4)				(4)				(6)				(5)				(6)				
Random variation of fiber size		2	3	1		4			1	2	1		1	1	2		2	4	d*		1	1	2	1		1	2	3	
Internal nuclei		5	1		2	2			4				3	1			5	1			3	2			5	1			
Widening of interstitial tissue		6			4				2	1	1	b*	3	1			5	1			4	1			1	5			
24M																													
Soleus	(N)	(5)			(4)				(4)				(3)				(6)				(9)				(6)				
Random variation of fiber size			4	1		3	1			4			1	1	1		2	1	3		1	5	2	1		2	4		
Internal nuclei		3	2		2	2			3	1			1	2			4	2			3	3	2	1		4	1	1	
Widening of interstitial tissue		4	1		4				2	2			2	1	d**		1	5	d**		1	8		f**	2	4		g**g**	
Gastrocnemius		(5)			(5)				(4)				(4)				(9)				(10)				(7)				
Random variation of fiber size			3	2		2	1	2		1	1	1	1	1	2		5	1	3		1	3	6	g**		3	1	3	
Internal nuclei		4	1		4	1			3	1			1	3			2	2	4	1	g**d**	2	1	4	3	g*,f*	3	2	2
Widening of interstitial tissue		4	1		4	1			1	3			2	2	g**d**	1	6	2	g**d**	3	3	4			3	3	1		

Grade: (-) No lesions, (±) Minimal, (+) Slight, (##) Moderate, (###) Marked.

a: Significant difference between 18-month group and 24-month group.

*p<0.05 **p<0.01.

b: Significant difference between group I and group II, group III.

c: Significant difference between group II and group III.

d: Significant difference between group II and group IV, group V.

e: Significant difference between group IV and group V.

f: Significant difference between group III and group VI, group VII.

g: Significant difference between group VI and group VII.

by Mann-Whitney U-test.

しその左方移動が観察された (Fig. 1)。

2) II群 (制限 Ca・D群)

組織所見は、ヒラメ筋 (生後 18 M時 4 例, 生後 24 M時 4 例) および腓腹筋 (生後 18 M時 4 例, 生後 24 M時 5 例) の所見の変化の程度は 18 M時と 24 M時で有意差は見られなかった。

筋線維径については、ヒラメ筋では I 型, II 型両線維共に 18 M時に比較し 24 M時は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小していた。腓腹筋では I 型, II 型両線維共に 24 M時が縮小傾向であり, 特に I 型線維は 24 M時では有意 ($p < 0.05$) に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共に, いずれの筋線維も一

峰性であり, 24 M時には 18 M時と比較しその左方移動が観察された。

3) III群 (制限 Ca・D・E群)

組織所見は、ヒラメ筋 (生後 18 M時 4 例, 生後 24 M時 4 例) および腓腹筋 (生後 18 M時 4 例, 生後 24 M時 4 例) の所見の変化の程度は 18 M時と 24 M時で有意差は見られなかった。

筋線維径については、ヒラメ筋では I 型, II 型両線維共に 18 M時に比し 24 M時では有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小していた。腓腹筋では I 型, II 型両線維共に 24 M時で有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共にいずれの筋線維も一峰

Fig. 1 Age related changes in the distribution of diameters of each fiber type in mice.

性であり、24 M時においては18 M時に比較しその左方移動が観察された。

4) IV群(制限Ca・D・Cd 20 ppm群)

組織所見は、ヒラメ筋(生後18 M時6例, 生後24 M時3例)での所見の変化の程度は18 M時と24 M時では有意差は見られなかった。腓腹筋(生後18 M時4例, 生後24 M時4例)では間質の増加が18 M時に比較し24 Mで有意($p<0.05$)に強度であった。

筋線維径については、ヒラメ筋および腓腹筋のI型, II型両線維共に18 M時に比較し24 M時では有意($p<0.01$, $p<0.01/p<0.01$, $p<0.01$)に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共にいずれの筋線維とも一峰性であり、24 M時においては18 M時に比較しその左方移動が観察された。

5) V群(制限Ca・D・Cd 40 ppm群)

組織所見は、ヒラメ筋(生後18 M時5例, 生後24 M時6例)における所見の変化の程度は18 M時と24 M時で有意差は見られなかった。腓腹筋(生後18 M時6例, 生後24 M時9例)では筋線維の大小不同, 中心核線維, 間質の増加が24 M時で強い傾向であり、特に中心核線維, 間質の増加は24 M時で有意($p<0.01$, $p<0.01$)に顕著であった。

筋線維径については、ヒラメ筋および腓腹筋のI型, II型両線維共に18 M時に比較し24 M時では有意($p<0.01$, $p<0.01/p<0.01$, $p<0.01$)に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共にいずれの筋線維とも一峰性であり、24 M時においては18 M時に比較しその左方移動が観察された。

6) VI群(制限Ca・D・E・Cd 20 ppm群)

組織所見は、ヒラメ筋(生後18 M時5例, 生後24 M時9例)における所見の変化の程度は18 M時と24 M時で有意差は見られなかった。腓腹筋(生後18 M時5例, 生後24 M時10例)では24 M時が筋線維の大小不同, 中心核線維, 間質の増加が強い傾向であり、特に筋線維の大小不同, 中心核線維は有意($p<0.05$, $p<0.05$)に強度であった。

筋線維径については、ヒラメ筋および腓腹筋のI型, II型両線維共に18 Mに比較し24 M時では有意($p<0.05$, $p<0.01/p<0.01$, $p<0.01$)に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共にいずれの筋線維とも一峰性であり、24 M時においては18 M時に比較しその左方移動が観察された。

7) VII群(制限Ca・D・E・Cd 40 ppm群)

組織所見は、ヒラメ筋(生後18 M時6例, 生後24 M

時6例)では間質の増加が18 M時に比較し有意($p<0.05$)に強かった。腓腹筋(生後18 M時6例, 生後24 M時7例)では筋線維の大小不同, 中心核線維, 間質の増加が有意差はないものの24 M時で強い傾向であった。

筋線維径については、ヒラメ筋および腓腹筋のI型, II型両線維共に18 M時に比較し24 M時では有意($p<0.01$, $p<0.01/p<0.01$, $p<0.01$)に縮小していた。

型別筋線維径分布は両筋肉共にいずれの筋線維とも一峰性であり、24 M時においては18 M時に比較しその左方移動が観察された。

B) 栄養制限による影響 (Table 2) (Table 3)

市販飼料群 (I群) と制限低Ca・D飼料群 (II群), 制限Ca・D・E飼料群 (III群) の比較

①) 生後18 M時

1) ヒラメ筋

組織所見は、筋線維の大小不同はI群に比較しII群, III群で強い傾向があり、特にIII群は有意($p<0.05$)に顕著であった。間質の増加もII群, III群で有意($p<0.05$, $p<0.01$)に強く見られた。

筋線維径は、I群に比較しII群・III群のI型およびII型線維は縮小傾向であり、特にI型線維はII群・III群共にI群に比較し有意($p<0.01$, $p<0.01$)に縮小し、II型線維ではIII群はI群・II群に比較し有意($p<0.01$, $p<0.05$)に縮小していた (Fig. 2)。

2) 腓腹筋

組織所見は、間質の増加がI群に比較しIII群で有意($p<0.05$)に強く見られた。

筋線維径は、I群に比較してII群・III群のI型線維, II型線維はいずれも有意($p<0.01$, $p<0.05/p<0.01$, $p<0.01$)に縮小していた。II群, III群の間にはI型, II型両線維共に有意差は見られなかった。

②) 生後24 M時

1) ヒラメ筋

組織所見はI群, II群, III群の3実験群間で所見の強さの程度に差は見られなかった。

筋線維径についてI型線維はI群に比較しII群, III群は有意($p<0.01$, $p<0.01$)に縮小し、II型線維ではI群に比較しIII群が有意($p<0.01$)に縮小していた。II群とIII群との間に有意差は見られないもののI型, II型両線維共にIII群が縮小の傾向であった。

2) 腓腹筋

組織所見はI群, II群, III群の3実験群間で所見の強さの程度に差は見られなかった。

筋線維径はI型線維はI群に比較しII群, III群は有意

Table 3 The diameters of each fiber type in mice.

Soleus					Gastrocnemius			
Fiber Type Group	Age	(N)	I	II	(N)	I	II	
I	18M	(485)	31.6±5.9	(295) 27.0±4.8	(158)	32.0±4.9	(420) 32.0±7.5	
	24M	(221)	28.9±5.5 ^{a**}	(145) 22.4±4.8 ^{a**}	(129)	33.1±4.6	(383) 28.3±7.6 ^{a**}	
II	18M	(367)	28.9±5.3 ^{b**}	(237) 26.5±4.9	(98)	29.9±4.8 ^{b**}	(191) 29.5±7.2 ^{b**}	
	24M	(96)	27.2±4.9 ^{a**,b**}	(72) 21.4±5.0 ^{a**}	(330)	28.4±5.8 ^{a*,b**}	(764) 28.4±7.7	
III	18M	(457)	29.0±6.0 ^{b**}	(239) 25.3±5.5 ^{b**,c*}	(94)	29.4±4.9 ^{b**}	(175) 30.5±7.5 ^{b*}	
	24M	(112)	26.1±5.4 ^{a**,b**}	(102) 20.9±4.3 ^{a**,b*}	(243)	27.9±6.6 ^{a*,b**}	(507) 23.1±7.1 ^{a**,b*,c**}	
IV	18M	(470)	29.1±6.1	(279) 25.7±5.0	(77)	29.1±4.8	(184) 30.4±8.6	
	24M	(143)	25.3±6.4 ^{a**,c*}	(89) 21.3±5.5 ^{a**}	(172)	26.8±5.1 ^{a**,c**}	(405) 24.3±5.4 ^{a**,c**}	
V	18M	(357)	28.9±5.3	(231) 24.9±4.9 ^{c**}	(78)	30.9±5.1	(197) 26.5±5.9 ^{c**,d**}	
	24M	(123)	25.7±5.4 ^{a**,c*}	(106) 20.3±5.5 ^{a**}	(275)	24.0±5.3 ^{a**,c*,d**}	(621) 18.9±5.5 ^{a**,c*,d**}	
VI	18M	(583)	27.8±5.3 ^{c**}	(345) 23.4±4.4 ^{c**}	(124)	27.5±6.1 ^{c*}	(223) 29.6±8.3	
	24M	(171)	26.8±5.6 ^{a*}	(140) 21.0±5.4 ^{a**}	(202)	25.3±6.2 ^{a**,c**}	(540) 21.7±6.3 ^{a**,c**}	
VII	18M	(732)	28.2±5.9	(471) 23.9±5.2 ^{c**}	(64)	27.9±4.9	(158) 28.3±9.1 ^{c*}	
	24M	(96)	25.0±6.6 ^{a**}	(84) 19.2±6.5 ^{a**,c*}	(266)	25.0±5.1 ^{a**,c**}	(591) 21.4±6.2 ^{a**,c**}	

Mean±S.D. (μm)

^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.
by Student's t-test.

(p<0.01, p<0.01)に縮小していた。II型線維はIII群がI群, II群に比較して有意(p<0.01, p<0.05)に縮小していた(Fig. 2)。

C) カドミウム添加による影響 (Table 2) (Table 3)

I) 制限Ca・D群(II群)と制限Ca・D・Cd 20 ppm群(IV群), 制限Ca・D・Cd 40 ppm群(V群)の比較

① 生後18M時

1) ヒラメ筋

組織所見は, 筋線維の大小不同がCd摂取のIV群, V群では強い傾向であり, 特にV群はII群に比較し有意(p<0.05)に顕著であった。

筋線維径はCd摂取によりII型線維は縮小の傾向であり, 特にV群はII群に比較し有意(p<0.01)に縮小していた(Fig. 3)。

2) 腓腹筋

組織所見は, 筋線維の大小不同がCd摂取群では強い傾向であり, 特にV群はII群に比較し有意(p<0.05)に顕著であった。

筋線維径はV群のII型線維がII群およびIV群に比較し有意(p<0.01, p<0.01)に縮小していた。

② 生後24M時

1) ヒラメ筋

組織所見は, 筋線維の大小不同, 間質の増加がCd摂取群で強い傾向であり, 特に間質の増加はIV群, V群がII群に比較し有意(p<0.01, p<0.01)に強度であった。

筋線維径はI型線維, II型線維ともにCd摂取群で縮小の傾向であり, 特にI型線維はII群に比較してIV群およびV群は有意(p<0.05, p<0.05)に縮小していた。

2) 腓腹筋

組織所見は, 筋線維の大小不同, 中心核線維, 間質の増加がCd摂取群では強い傾向であり, 特に中心核線維はV群がII群に比較し有意(p<0.05)に顕著であり, 間質の増加もIV群, V群がII群に比較し有意(p<0.01, p<0.01)に強度であった。

筋線維径はI型線維ではII群に比較してIV群, V群は有意(p<0.01, p<0.01)に縮小し, II型線維においてもII群に比較しIV群, V群は有意(p<0.01, p<0.01)に縮小していた。加えてV群はIV群に比較してI型線維およびII型線維は有意(p<0.01, p<0.01)に縮小していた(Fig. 3)。

II) 制限Ca・D・E群(III群)と制限Ca・D・E・Cd 20 ppm群(VI群), 制限Ca・D・E・Cd 40 ppm群(VII

Fig. 2 Effects of undernutrition on the distribution of diameters of each fiber type in mice.

群)の比較

① 生後18M時

1) ヒラメ筋

組織所見は、中心核線維、間質の増加がCd摂取群で強い傾向であり、特にⅥ群はⅢ群に比較し有意 ($p<0.05$, $p<0.05$) で強度であった。

筋線維径は、Ⅰ型線維はⅢ群に比較しⅥ群およびⅦ群は有意 ($p<0.01$, $p<0.05$) に縮小し、Ⅱ型線維もⅢ群に比較しⅥ群およびⅦ群は有意 ($p<0.01$, $p<0.01$) に縮小していた (Fig. 4)。

2) 腓腹筋

組織所見は、3群の間で所見の変化の程度に有意差は

見られなかった。

筋線維径はCd摂取により縮小の傾向であり、Ⅲ群に比較しⅥ群のⅠ型線維およびⅦ群のⅡ型線維は有意 ($p<0.05$, $p<0.05$) に縮小していた。

② 24M時

1) ヒラメ筋

組織所見は間質の増加がCd摂取群で強い傾向であり、特にⅥ群はⅢ群に比較し有意 ($p<0.05$) に顕著であった。

筋線維径はⅢ群とⅥ群の間ではⅠ型線維およびⅡ型線維ともに有意差は見られず、Ⅶ群のみⅢ群に比較し縮小の傾向であり、特にⅡ型線維は有意 ($p<0.05$) に縮小し

Fig. 3 Effects of cadmium on the distribution of diameters of each fiber type in mice.

ていた。

2) 腓腹筋

組織所見は、筋線維の大小不同、中心核線維、間質の増加のいずれも Cd 摂取群で強い傾向であり、特に中心核線維はⅢ群に比較しⅥ群では有意 ($p < 0.05$) に顕著であった。

筋線維径はⅠ型線維ではⅢ群に比較しⅥ群およびⅦ群は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小し、Ⅱ型線維においてもⅢ群に比較しⅥ群およびⅦ群は有意 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) に縮小していた (Fig. 4)。

考 察

1) 筋の加齢変化

朝長ら¹⁵⁾、東儀ら¹⁶⁾は高齢者の骨格筋組織変化は多彩であり、神経原性疾患による脱神経筋では小径線維が存在しグループをなしている群萎縮やタイプⅠ、タイプⅡ線維が各々群をなし存在するタイプ群化等の神経原性の変化や再生筋線維の特徴である中心核線維、間質増加、細胞浸潤、壊死等の筋原性変化が見られ、酵素組織化学的にはⅡ型線維の萎縮が顕著であったとしている。

本実験の生後 18 M 齢時と生後 24 M 齢時の比較において、ヒラメ筋および腓腹筋のいずれにおいても筋線維大

Fig. 4 Effects of cadmium on the distribution of diameters of each fiber type in mice.

小不同, 間質の増加等の筋原性変化が生後 18 M に比較して 24 M により強度に認められ, 酵素組織化学的にはヒラメ筋および腓腹筋の線維径は I 型, II 型両線維ともに顕著に縮小し, 型別筋線維径分布はいずれも一峰性であり, 生後 24 M では生後 18 M に比較して左方移動が見られたことから, これら萎縮は単純萎縮であると考えられる。そしてヒラメ筋は腓腹筋に比較してより早朝に萎縮が認められた。

2) 筋の栄養制限による影響

① 制限カルシウム, 制限ビタミン D の影響

低 Ca の神経筋に対する影響は筋の脱力, 痙攣などであるが, Smith ら¹⁷⁾ は低 Ca 血症により骨軟化症性ミオ

パチーが見られるとし, Mallette ら¹⁸⁾ は筋生検からその筋病変は神経原性であるとしている。

D 欠乏の筋影響については, Curry ら¹⁹⁾ は D 欠乏により筋小胞体内の Ca 濃度が低下し, 筋小胞体内からの Ca 放出量が少量となるため細胞内の Ca 濃度が上昇せず, 筋収縮力の低下が見られたとしている。また, 山田²⁰⁾ は D 欠乏の骨格筋影響は組織変化として筋線維の大小不同, 中心核線維の存在, 結合組織の増加等の筋原性変化であり, 酵素組織化学的には I 型線維の円形化が見られたが, 線維径分布図上から型別萎縮は認められなかったとしている。

本実験における I 群と II 群の比較から, II 群ではヒラ

メ筋は間質の増加, 腓腹筋は筋線維大小不同がやや強い傾向であり, I 型線維の萎縮が顕著であったが筋線維径分布において一峰性であり, 左方移動を示すことから単純萎縮であると考えられ, 本実験の結果から制限 Ca による筋影響は明確でなく, 制限 D による筋影響とされている筋原性変化が観察されたものと考えられる。

② 制限ビタミン E の影響

Machlin ら²¹⁾, Chan ら²²⁾, Tomas²³⁾ は E 欠乏の骨格筋影響は組織変化として筋線維萎縮, 小角形態, 多核線維, 間質増殖であり, 酵素組織化学的には I 型および II 型の両線維が萎縮し, 特に II 型線維の萎縮が顕著であるとしている。

本実験における II 群と III 群の比較から, III 群ではヒラメ筋および腓腹筋の筋線維大小不同, 間質の増加が強い傾向であり, 18 M 時ではヒラメ筋の II 型線維の有意な萎縮, 24 M 時ではヒラメ筋および腓腹筋の I 型, II 型両線維の萎縮傾向, 特に腓腹筋の II 型線維の萎縮は有意で, 一峰性であり, 左方移動を示したことから制限 E の筋影響は筋原性変化で, I 型および II 型線維の萎縮特に II 型線維がやや強い単純萎縮であると考えられる。

3) カドミウムによる影響

滝澤²⁴⁾ は Cd の筋肉中貯留について, 成長抑制の見られない程度の低栄養条件下での低濃度の Cd 摂取では貯留は見られず, 高濃度の長期摂取により初めて Cd の貯留が見られたとしている。Itokawa ら²⁵⁾ は成育抑制が見られた低栄養条件下における Cd 摂取は比較的短期であっても筋への Cd の貯留が見られたとしている。しかし Cd 投与の筋影響の報告は皆無に等しい。

本実験における体重抑制が見られない程度の制限栄養条件下における Cd 摂取について, 同制限栄養条件下の Cd 添加の有無の比較において, ヒラメ筋では 18 M 時において制限 Ca・D・E 条件下において Cd 添加群は無添加群に比較し間質の増加が強く, 40 ppm 群で顕著であり, I 型, II 型両線維の萎縮も顕著であった。制限 Ca・D 条件下の 40 ppm 添加群においても II 型線維の萎縮が観察された。24 M 時においては制限 Ca・D 条件下においても Cd 添加群は無添加群に比較し間質の増加が強く, I 型, II 型両線維の萎縮も顕著であった。腓腹筋では 18 M 時には組織変化の強さの程度に Cd 添加影響はほとんど観察されなかったが, いずれの制限栄養条件下においても 40 ppmCd 添加群で II 型線維の萎縮が顕著であった。24 M 時には制限 Ca・D 条件下での Cd 添加群は無添加群に比較し間質の増加が顕著であり, いずれの制限栄養条件下においても Cd 添加群は I 型, II 型両線維の萎縮も

顕著であった。ヒラメ筋, 腓腹筋ともに I 型, II 型両線維の筋線維径分布は一峰性であり, 左方移動を示した。以上より Cd 添加による筋萎縮は筋原性の単純萎縮であった。ヒラメ筋は腓腹筋に比較してより早期に萎縮した。それらの変化は 40 ppmCd 添加群が 20 ppmCd 添加群に比較し強い傾向であり, 濃度依存的であった。Cd 長期摂取の影響は, 制限 Ca・D・E 条件における影響と同様, 加齢変化に類似した変化であったことから, Cd 長期摂取の筋影響は加齢変化の促進であると考えられる。

4) 筋影響と腎障害, 骨軟化症の関連について

Cd の慢性曝露による生体影響としては腎障害があり, Cd がその原因とされているイ病では骨軟化症が惹起するとされている。腎障害と筋変化の関連について, ヒトでは Floyd ら²⁶⁾, Ahonen²⁶⁾ は透析患者を含む慢性腎不全患者の骨格筋の酵素組織化学的所見は II 型線維の選択的萎縮であるとしている。一方, 水入ら²⁷⁾ は非透析の慢性腎不全患者の骨格筋の組織変化所見は神経原性変化を示すもの, 筋原性変化を示すもの, そして神経原性変化と筋原性変化が混在して見られたものと様々であり, 酵素組織化学的所見も I 型線維の萎縮が見られたもの, II 型線維の萎縮が見られたもの, I 型および II 型線維の萎縮がみられたものと多彩であるとしている。また実験的には, Bundschu ら²⁸⁾ は慢性腎不全ラットの骨格筋の酵素組織化学的所見は筋線維の均一な萎縮であり, 線維型による選択的萎縮は示さなかったとしている。また, Mallette ら¹⁸⁾, 広瀬ら²⁹⁾ は Fanconi 症候群患者の筋には神経原性変化が見られたとしている。

骨軟化症と筋変化の関連については, Smith ら¹⁷⁾, Prineas³⁰⁾ は骨軟化症では筋力低下が主症状となる場合もあるとし, Barwich³¹⁾ は骨軟化症では骨変化に先行し, 著しい筋力低下を示し, 筋ジストロフィーなどの筋原性疾患が見られたとしている。中村ら³²⁾ は骨軟化症例の組織所見は筋線維の散在性萎縮, 筋線維の横断面の円形化, 中心核線維, 間質増殖等の筋原性変化であり, 酵素組織化学的所見は II 型線維の選択的萎縮であるとしている。

本実験における Cd 摂取による筋組織変化は筋線維の大小不同, 中心核線維の存在, 間質の増加等の筋原性変化であり, 骨軟化症例と類似していたが, 酵素組織化学的所見は I 型および II 型線維の顕著な萎縮であり II 型線維の選択的萎縮は認められず骨軟化症による筋変化と確定するには至らなかった。従って Cd の長期摂取時に筋に観察された組織変化は筋原性変化で, 酵素組織化学的には I 型線維および II 型線維の単純萎縮で, これら変化

は加齢による筋変化と類似のものであることから、Cd 筋影響は加齢の促進であると考える。

Cd による筋影響である線維径の縮小は、まず制限 Ca・D・E 条件下で顕著に見られ、より長期では制限 Ca・D 条件下においても顕著に見られたことから、Cd の筋影響の発現には制限栄養条件が重要であると考ええる。また制限栄養条件の筋線維の萎縮への関与については、制限 Ca・D 条件は I 型線維への影響が強く、制限 E 条件は II 型線維への影響が顕著であると考ええる。

結 語

本実験においては成育障害の殆ど起こらない程度の制限栄養条件下で長期 Cd 摂取の筋影響を観察した。

雌性マウスを用い、I 群：市販飼料群、II 群：制限 Ca・D 飼料群、III 群：制限 Ca・D・E 飼料群、IV 群：制限 Ca・D・Cd 20 ppm 飼料群、V 群：制限 Ca・D・Cd 40 ppm 飼料群、VI 群：制限 Ca・D・E・Cd 20 ppm 飼料群、VII 群：制限 Ca・D・E・Cd 40 ppm 飼料群の 7 飼料群に分け、生後 29 日齢時より 18 M 時および 24 M 時までの期間飼育し、加齢、制限栄養、Cd の骨格筋(ヒラメ筋および腓腹筋) への影響を組織学的および酵素組織化学的に観察し次の結果を得た。

- 1) 加齢による筋組織変化は筋線維の大小不同、中心核線維、間質の増加等の筋原性変化であり、酵素組織化学的には I 型、II 型両線維の萎縮が見られ、特に II 型線維の萎縮が顕著であった。筋線維径の型別線維径分布から、この萎縮は一峰性であり、その左方移動を示す単純萎縮であった。
- 2) 制限 Ca・D による組織変化はほとんど観察されず、酵素組織化学的には I 型線維、II 型線維の単純萎縮が見られ、特に I 型線維の萎縮が顕著であった。
- 3) 制限 Ca・D・E による組織変化は間質の増加が強く、酵素組織化学的には I 型線維および II 型線維の単純萎縮であり、特に II 型線維の萎縮が顕著であった。
- 4) Cd による組織変化は筋線維の大小不同、中心核線維、間質の増加等の筋原性変化であり、酵素組織化学的にはまず制限 Ca・D・E 条件下で線維径の縮小が顕著に見られ、より長期では制限 Ca・D 条件下においても縮小が顕著に見られたことから、Cd の筋影響の発現には低栄養条件が重要である。
- 5) 骨格筋への影響の強さは、制限 Ca・D・E・40 ppmCd 添加>制限 Ca・D・E・20 ppmCd 添加=制限 Ca・D・40 ppmCd 添加>制限 Ca・D・E=制限 Ca・D・20 ppmCd 添加>制限 Ca・D の順であった。

以上、本実験の制限栄養条件下における、長期 Cd 摂取による骨格筋の組織学的変化および酵素組織化学的变化は、ともに加齢変化と類似していた。長期 Cd 摂取による骨格筋への影響は加齢の促進として観察された。

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わします。

本研究の一部は昭和 59 年度東邦大学医学部プロジェクト研究費(課題番号 59-10)による。

文 献

- 1) Omaye, S.T. and Tappel, A.L.: Effect of cadmium chloride on the rat testicular soluble selenoenzyme, glutathion peroxidase, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **12**, 695-711 (1975).
- 2) Itokawa, Y., Abe, T. and Tanaka, S.: Bone changes in experimental chronic cadmium poisoning, Arch. Environ. Health, **26**, 241-244 (1973).
- 3) Itokawa, Y., Abe, T. and Tanaka, S.: Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning, Arch. Environ. Health, **28**, 149-154 (1974).
- 4) Yoshiki, S., Yanagisawa, 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).
- 5) 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).
- 6) Ishizaki, A.: On 'itai-itai' (ouch-ouch) disease, Asian Med. J., **14**, 421-436 (1971).
- 7) 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).
- 8) 村田 勇: イタイイタイ病の研究, 日医師会誌, **65**, 15-42 (1971).
- 9) 大本美彌子, 今井常彦, 茂手木三男, 原田 孝: Cd の骨影響に関する研究—Cd 添加および Ca, 蛋白質, VitD, E 制限食餌のマウス腓腹筋におよぼす影響の酵素組織化学的検索, 日衛誌, **40**, 523 (1985).
- 10) 高瀬武平, 重松逸造, 水本 潔, 赤須文男, 石崎有信, 野村 進, 沢田大成, 久田欣一, 梶川欽一郎, 河野俊一, 早筋田正澄, 小林一到, 平松 博, 一前久芳: 富山県下に発生するいわゆるイタイイタイ病

- の本態をめぐって, 日臨, **25**, 379-397 (1967).
- 11) 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: 組織学およびX線の観察, 日衛誌, **50**, 660-682 (1995).
 - 12) 山本三希雄, 原田 孝: 骨・軟骨の酵素組織化学的研究法, 整形外科, **31**, 177-184 (1980).
 - 13) 埜中征哉: 筋疾患, 形態学的検査法, 小児内科, **12**, 2467-2474 (1980).
 - 14) 鈴木陽子: 筋生検, 小児科Mook, Vol.12, pp. 203-213, 金原出版, 東京, (1980).
 - 15) 朝長正徳, 万年 徹, 亀山正邦: 老年者における骨格筋の変化—神経筋疾患との化比—, 日本老年医学会雑誌, **11**, 15-19 (1974).
 - 16) 東儀英夫, 清水輝夫, 井上聖啓, 朝長正徳: 筋の年齢変化に関する組織化学的定量的研究, 臨床神経, **15**, 791-797 (1975).
 - 17) Smith, R. and Stern, G.: Myopathy, osteomalacia and hyperparathyroidism, Brain, **90**, 593-602 (1967).
 - 18) Mallette, L.E. and Patten, B.M.: Neurogenic muscle atrophy and osteomalacia in adult Fanconi syndrome, Ann. Neurol., **1**, 131-137 (1977).
 - 19) Curry, O.B., Basten, J.F., Francis, M.J.O. and Smith, R.: Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D-deficient rabbits, Nature, **249**, 83-84 (1974).
 - 20) 山田信興: ビタミンDの骨格筋に及ぼす影響に関する研究, 臨床神経, **23**, 480-487 (1983).
 - 21) 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).
 - 22) Chan, A.C. and Hegarty, P.V.J.: Morphological changes in skeletal muscles in vitamin E-deficient and refed rabbits, Br. J. nutr., **38**, 361-370 (1977).
 - 23) Tomasi, L.G.: Reversibility of human myopathy caused by vitamin E deficiency, Neurology, **29**, 1182-1185 (1979).
 - 24) 滝澤行雄: ラットにおけるカドミウム連続経口投与実験(2), 環境保健レポート, **45**, 54-74 (1979).
 - 25) Floyd, M., Ayyar, D.R., Barwick, D.D., Hudgson, P. and Weightman, D.: Myopathy in chronic renal failure, Q. J. Med. (New Series), **43**, 509-524 (1974).
 - 26) Ahonen, R.E.: Light microscopic study of striated muscle in uremia, Acta Neuropathol. (Berl.), **49**, 51-55 (1980).
 - 27) 水入苑生, 小原武博, 森木光司, 松下肇頭, 平田清文, 北沢吉昭: 慢性腎不全における骨格筋障害 病理学的ならびに電気生理学的研究, 日内会誌, **70**, 850-859 (1981).
 - 28) Bundschu, H.D., Pfeilsticker, D., Matthews, C. and Ritz, E.: Myopathy in experimental uremia, Res. Exp. Med., **165**, 205-212 (1975).
 - 29) 広瀬源二郎, 小副川寛: 活性型ビタミンDにより寛解した成人型 Fanconi 症候群にみられた神経原性筋萎縮と骨軟化, 臨神経, **21**, 698-705 (1981).
 - 30) Prineas, J.W. and Masom, A.S.: Myopathy in metabolic bone diseases, Br. Med. J., **1**, 1034-1036 (1965).
 - 31) Barwich, D.: Myopathie und Osteomalazie nach langdauernder antiepileptischer Behandlung, Munch. Med. Wocheschr., **116**, 2113-2116 (1974).
 - 32) 中村利孝, 吉川靖三, 田辺 等, 今村哲夫: 骨軟化症の筋病変について, 日整外会誌, **52**, 319-331 (1978).
- (受付 1994年11月21日 受理 1995年4月24日)