

カドミウムの生体作用に対する実験的研究

第 2 報

ラットへのカドミウムとカルシウム同時投与による肝、 腎ミトコンドリアに対するカドミウム分布 及び酸化的リン酸化反応への影響

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

野 上 祐 作

（昭和54年10月26日受稿）

Key words : カドミウム, カルシウム, ミトコンドリア,
カドミウム分布, 酸化的リン酸化

緒 言

カドミウムは、工業的にメッキ、可融合合金、軸受合金、ハンダ、銀ろうなどの金属材料として広く利用されている。また、原子炉内反応の制御材料としても近時使用されている。産業活動の急激な発展は、環境中のカドミウム濃度を増大させ、環境汚染物質としてのカドミウムに対する科学的関心をもたらし、そして、カドミウムの健康影響に関する研究活動が活発になり、膨大な報告がなされている。しかし、カドミウム中毒の色々な発現の背景にあるメカニズムを理解するには、金属中毒学としての基礎的な研究が必要であり、その中で特に、カドミウムと他の金属、必須あるいは非必須の金属、との相互関係に関する研究が今後の重要な課題と思われる。例えば、カドミウム毒性の発現が亜鉛との同時投与によって防がれること¹⁻³⁾、あるいは、消化管からのカドミウムの取込みにおいて、カルシウムが重要な役割を演じること^{4, 5)}が知られている。また、カドミウムと銅同時投与の及ぼす効果⁶⁾に関する報告もみられる。

著者⁷⁾は、先に *in vitro* で、カドミウムがひきおこすラット肝ミトコンドリア膜からの K^+ 遊出作用がカルシウム結合部位と高い親和性を示すランタンによって抑制されることを報告した。そして、生体内のカルシウム輸送とカドミウムの生体作用が密接に

関連しているものと考え、カドミウムとカルシウムの同時投与実験を試みた。なお、投与方法については、特に、用量-反応関係を重視し、投与量を明らかにするために腹腔内投与を用いた。

環境中のカドミウムとカルシウムが共存している例としては、セメント工場周辺において顕著である（図1）。セメント工場からのカドミウムの濃縮排出に関しては、板野ら⁸⁾の報告などにみられる。

材料及び方法

材料

ドンリゅう系ラット（体重150-250 g）に、 $CdCl_2$ （5 or 10mg/kg）及び $CaCl_2$ （50mg/kg）の生理食塩水溶液を同時に異なる部位から腹腔内投与し、2時間後に、肝、腎臓器を摘出した。その一部（0.5-1.0 g）を臓器中の Cd, Ca の分布量を測定する試料とし、残りの肝、腎から各々ミトコンドリアの分画を行い、酸化的リン酸化反応の測定及びミトコンドリア中の Cd, Ca の分布量の測定に供した。

ミトコンドリアの分離

ミトコンドリアの分画に用いた分離液は、0.25M 蔗糖、0.25%牛血清アルブミン、3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、0.2mM EDTA を使い、遠心分画操作で分離後、0.25M 蔗糖、0.25%牛血清アルブミン、3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中に懸濁した。

蛋白量の測定

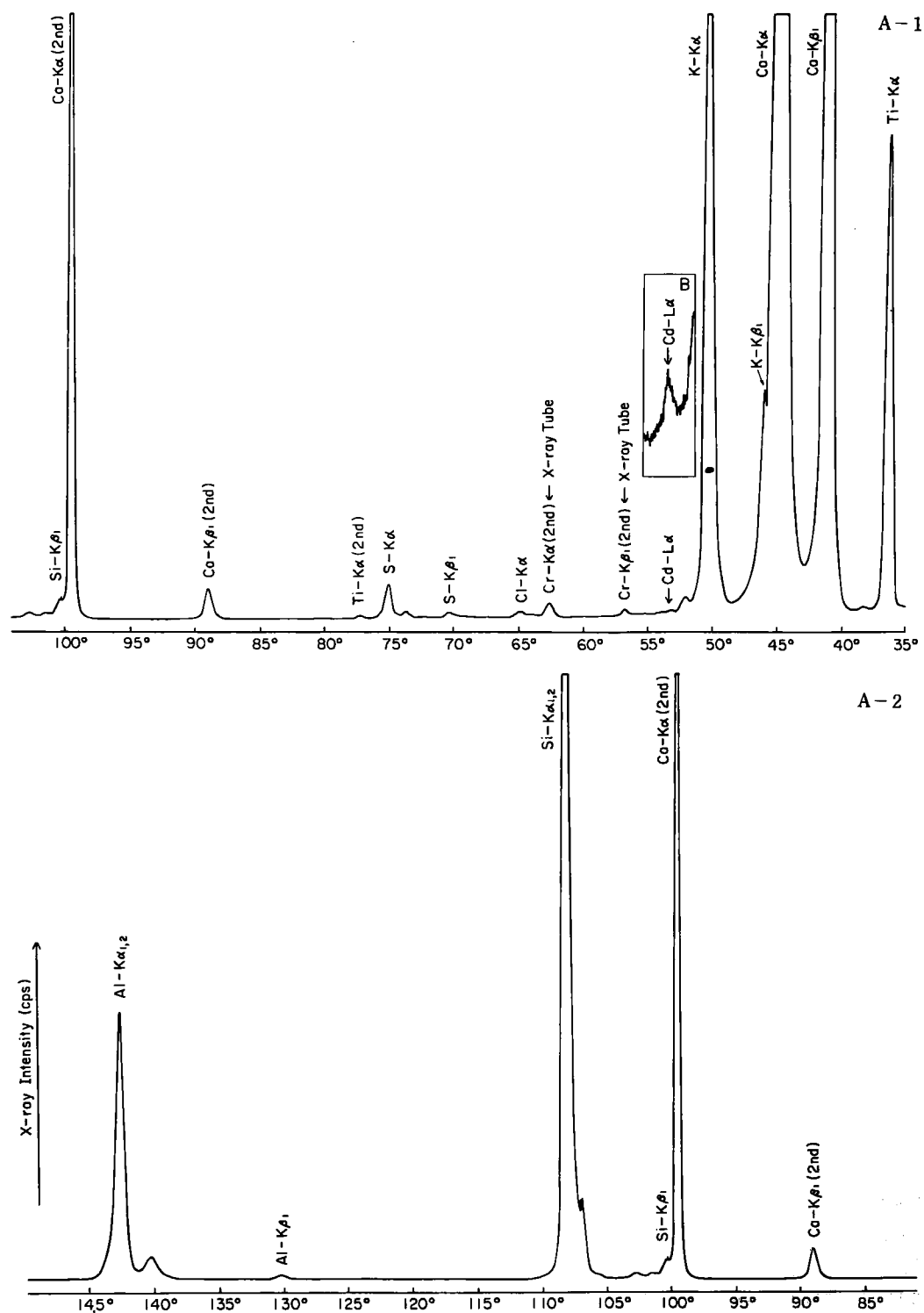


図1 セメント工場周辺の降下じんのかげ光X線スペクトルの一例

〔測定条件〕 Target: Cr, Tube intensity: 50kv 50mA, Analyzing cristal: EDDT, Detector: F-PC, Path: Vacuum, Fullscale: 1×10^4 cps, P.H.A: DiFF $\times 1$ ただし, Bについては, Analyzing cristal: Ge, Full scale: 1×10^3 cps で行った.

臓器及びミトコンドリアの蛋白量の測定はビュレット法によった。

ラット肝、腎臓器中のカドミウム及びカルシウムの測定

臓器中の Cd, Ca 分布量の測定用試料を肝、腎、別々にホモジネートしたものに硝酸、過塩素酸を加え、加熱分解して灰化液を作成した。Cd については、さらに APDC-MIBK 抽出を行い、また、Ca については、1ppm 塩化ストロンチウム溶液を同量混和して原子吸光分析法により定量した。分析装置は日立製 208 を使用した。

ラット肝、腎ミトコンドリア中のカドミウム及びカルシウムの測定

ミトコンドリア中の Cd, Ca の測定は、ミトコンドリアの懸濁液 100 μ g を分取し、硝酸、過酸化水素を用いて加熱分解して灰化液とし、Cd については、高感度測定可能な炭素炉原子吸光法（第二精工舎製 ASA/727 型原子吸光光度計＋フレイムレスアトマイザー ASA/727 型）により行った。Ca についてはフレイム法で行った。

ラット肝、腎ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応 0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の反応液 3.5ml 中に Pi 2.5mM, ミトコンドリアを添加し、呼吸基質として Na-Succinate 5mM, リン酸化基質として Na-ADP 0.3mM を加え、経時的に反応液中の溶存酸素消費量をガルバーニ-酸素電極（給水化学製）を用いて測定した。呼吸調節能, ADP/O 比は、Hagiwara の方法⁹⁾によって計算した。

試薬

使用した試薬は、全て特級を用い、使用時に調製した。

実験結果

肝、腎臓器中のカドミウム及びカルシウム

ラットの腹腔内へ CdCl_2 単独投与した場合と CdCl_2 と CaCl_2 を同時投与した場合の 2 時間後における

肝、腎臓器中の Cd 濃度及び Ca 濃度の比較を表 1 に示した。いずれの場合も、肝の Cd 量は著しく増加すること、しかも投与量と関係していることが認められた。 CaCl_2 同時投与の場合、 CdCl_2 単独投与に比べ蓄積量がやや低い傾向を示した。腎臓器の Cd 量も良く似た傾向を示したが、2 時間後では、肝臓に比べて全体的に低濃度であった。

一方、Ca についてみると、コントロールとの顕著な差は認められなかった。Ca は、肝臓よりも腎臓においてやや高い濃度を示しているように思われた。

肝、腎ミトコンドリア中のカドミウム及びカルシウム

ラットの腹腔内へ CdCl_2 単独投与した場合と CdCl_2 と CaCl_2 を同時投与した場合の 2 時間後における肝、腎ミトコンドリア中の Cd 濃度及び Ca 濃度の比較を表 2 に示した。Cd 単独投与に比べ Ca との同時投与の場合は、ミトコンドリアへの Cd の蓄積が抑制された。腎ミトコンドリアへの蓄積は、肝ミトコンドリアに比べ低いが、同じ傾向がみられた。

Ca は、臓器同様、コントロールとの差はみられなかった。

肝、腎ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応

ラットの腹腔内へ CdCl_2 単独投与した場合と CdCl_2 と CaCl_2 を同時に投与した場合の 2 時間後における肝、腎ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応について比較した（表 3）。Cd 単独投与の場合、 CdCl_2 濃度に依存して、肝ミトコンドリアの呼吸調節能の低下がみられた。Ca との同時投与を行うと、呼吸調節能の低下が抑制される傾向を示した。ADP/O 比でも同様な傾向がみられた。腎ミトコンドリアでも同様な傾向がみられるが、肝に比して、顕著ではなかった。

考 察

腹腔内投与による Cd の分布は、投与量や時間に

表 1 ラット肝、腎臓器中のカドミウム及びカルシウム分布 $n = 3$

		Liver		Kidney	
		Cd μ g/gwet.	Ca μ g/gwet.	Cd μ g/gwet.	Ca μ g/gwet.
CdCl_2	5 mg/kg	18.8 $\pm$ 3.1	43 $\pm$ 5	4.3 $\pm$ 0.8	85 $\pm$ 6
	10mg/kg	55.1 $\pm$ 7.7	50 $\pm$ 6	7.3 $\pm$ 1.8	66 $\pm$ 4
CdCl_2 + CaCl_2 (50mg/kg)	5 mg/kg	17.6 $\pm$ 7.4	65 $\pm$ 4	0.7 $\pm$ 0.1	70 $\pm$ 11
	10mg/kg	25.0 $\pm$ 10.6	63 $\pm$ 5	2.7 $\pm$ 1.0	75 $\pm$ 6
CaCl_2 (50mg/kg)		0.2 $\pm$ 0.1	40 $\pm$ 3	0.4 $\pm$ 0.1	65 $\pm$ 3
Control		0.3 $\pm$ 0.1	53 $\pm$ 4	0.5 $\pm$ 0.1	54 $\pm$ 2

mean $\pm$ S.E.M.

表2 ラット肝腎ミトコンドリア中のカドミウム及びカルシウム分布

n = 3

		Liver		Kidney	
		Cd ng/mg Protein	Ca μ g/mg Protein	Cd ng/mg Protein	Ca μ g/mg Protein
CdCl ₂	5 mg/kg	9.3±0.6	1.1±0.2	4.3±0.7	2.9±0.9
	10mg/kg	20.0±1.3	0.9±0.1	8.6±1.5	2.9±0.9
CdCl ₂	5 mg/kg	10.1±0.6	1.2±0.2	2.8±0.5	1.7±0.1
	10mg/kg	12.2±1.1	0.9±0.0	3.2±0.4	4.0±0.5
+CaCl ₂ (50mg/kg)					
CaCl ₂ (50mg/kg)		ND(<0.1)	1.2±0.1	0.6±0.1	2.5±0.2
Control		ND(<0.1)	0.9±0.1	0.6±0.2	1.1±0.1

mean±S.E.M.

表3 ラット肝、腎ミトコンドリアの呼吸調節能及びADP/O比

n = 3

		Liver		Kidney	
		RCI	ADP/O	RCI	ADP/O
CdCl ₂	5 mg/kg	5.2±0.6	1.84±0.08	2.8±0.6	1.80±0.20
	10mg/kg	4.4±0.4	1.78±0.11	2.4±0.4	1.65±0.17
CdCl ₂	5 mg/kg	6.1±0.1	2.07±0.07	3.8±0.3	1.89±0.25
	10mg/kg	5.1±0.4	1.90±0.04	4.0±0.1	1.74±0.03
+CaCl ₂ (50mg/kg)					
CaCl ₂ (50mg/kg)		6.0±0.5	2.04±0.09	3.7±0.5	1.85±0.25
Control		6.2±0.4	2.00±0.08	3.8±0.2	1.90±0.08

mean±S.E.M.

よって、かなり変動するものと思われる。Johnson & Miller¹⁰⁾は、ラットを用いて0.01~0.02mg/kgのCd投与実験を行い、5分後に最大血液Cdレベルに到達し、80分後には最大値の12%に下り、血液からの速やかなクリアランスを示すと報告している。また、吉川¹¹⁾は3 mg/kgのCdを1回腹腔内注射した後、4日目までの肝臓中Cd蓄積量及び各肝分画中のCd含有比率を報告しているが、それによるとCdは投与後4時間で1/2以上が上清分画に存在し、時間の経過とともに他の分画中のCdが減少し、上清分画に集積していく。肝臓中のCdは時間とともに増加するが、ミトコンドリア分画では、逆に減少していくと述べている。臓器レベルでは、初期においては、大部分のCdが肝臓に分布し、比較的少量のCdが腎臓に分布するが、時間の経過とともに腎臓中のCdが増加するものと思われる。

今回は、腹腔内投与2時間後を中心に検討したが、Cd₂⁺単独投与により肝臓中のCd蓄積が顕著に認められ、しかも投与量に依存する結果を得た。この傾向は、濃度が相対的に低いけれども腎臓においても認められた。一方、ミトコンドリア分画においてもCd蓄積はみられ、特に肝ミトコンドリアで顕著であった。なお、ミトコンドリアに蓄積されるCd量が

全体にやや低い傾向を示しているかもしれないが、今回の実験では、Cd²⁺投与により上清分画中に多量に分布すると思われるCdの影響を避ける意味で、分離液に牛血清アルブミンを加えたことに起因することなどが考えられる。Ca²⁺との同時投与でも、ほぼ同様の傾向を示したが、Cd²⁺単独投与に比べ、臓器、ミトコンドリアともにCdの分布量が幾分、低いように思われる。また、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応についても、Ca²⁺との同時投与の場合が、Cd²⁺単独投与に比べ、呼吸調節能、ADP/O比とも高い傾向を示した。例数が少ないため、正確には言えないが、CdCl₂を10mg/kg単独投与した場合とCaCl₂ 50mg/kgをCdCl₂と同時に投与した場合との間には、臓器及びミトコンドリアのCd分布量、呼吸調節能とも有意差がみられた。これらを併せて考察すると、Ca²⁺が何らかの形でCd²⁺の分布に影響を与えることが考えられる。

一方、Ca²⁺については、投与後2時間で、Cd²⁺単独の場合も、Ca²⁺との同時投与の場合も臓器、ミトコンドリアとも、その分布量に顕著な差はみられなかった。

Ca²⁺との同時投与によってCdの分布量が減少することが、単なるCd²⁺の輸送の時間的ずれによるも

のか、結合部位に関与しているものかは、経時的な面からの長期の検討から明らかになるものと思われる。

結 論

ラット肝、腎に及ぼすカドミウムの影響をカルシウムとの腹腔内同時投与によって検討した。投与量 5 mg/kg と 10 mg/kg の CdCl_2 に対して 50 mg/kg の CaCl_2 の同時投与を行い、2 時間後の肝、腎について

- 1) 肝臓器中のカドミウム濃度は、単独投与に比べ、やや、低い傾向を示したが、かなりの蓄積が認められた。また、 Cd^{2+} 投与量に依存すること
- 2) 肝ミトコンドリアにおいても、単独投与に比べ、カドミウム蓄積量が低いこと
- 3) 肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応でも、単独投与に比べ、呼吸調節能、ADP/O 比が大きいこと

4) 腎臓についても、臓器、ミトコンドリアとも、カドミウム分布及び酸化的リン酸化反応に同様の傾向がみられたが、カドミウム分布量そのものは低いこと

5) カルシウムの分布については、肝、腎臓器及びミトコンドリアとも大差がみられなかったこと

6) Ca^{2+} が Cd^{2+} の輸送に影響を与えること等が判明した。

謝 辞

稿を終るにあたり終始、御懇篤なる御指導、御校閲をいただきました恩師緒方正名教授に深く謝意を表します。またカドミウム等の定量に関し御援助いただいた岡山県環境保健センターの熊城一男、森田啓次郎両氏に感謝いたします。

文 献

1. Parizek, J.: The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.* 15, 56-63, 1957.
2. Vigliani, E. C.: The biopathology of cadmium. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* 30, 329-340, 1969.
3. Sporn, A., Dinu, I., Stoenescu, L., and Cirstea, A.: Beitrage zur ermittlung der wechselwirkungen zwischen cadmium und zink. *Nahrung* 13, 461-469, 1969.
4. Larsson, S. E., and Piscator, M.: Effect of cadmium on skeletal tissue in normal and calcium-deficient rats. *Isr. J. Med. Sci.* 7, 495-498, 1971.
5. 小林純, 中原裕子, 長谷川利子: カドミウム汚染米投与による動物体内へのカドミウムの蓄積. 日衛誌 26, 401-407, 1971.
6. 小島良平, 石黒英子, 谷井美樹子: カドミウムと銅同時投与のマウスに及ぼす影響. 日本公衛誌 21, 281-289, 1974.
7. 板野義太郎, 河田昌東, 依田欣哉: 加熱集じん工程と重金属の濃縮排出. 科学 44, 487-494, 1974.
8. 野上祐作: カドミウムの生体作用に対する実験的研究, 第 1 報ラット肝ミトコンドリアのヌクレオタイドに対するカドミウムの作用, 及び K^+ -遊出に対するカドミウムとランタンの相互作用. 岡山医学会雑誌, 印刷中.
9. Hagiwara, B.: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biophys. Acta* 46, 134-142, 1961.
10. Johnson, A. D., and Miller, W. J.: Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl testis. II. Distribution of injected ^{109}Cd . *J. Reprod. Fertil.* 21, 395, 1970.
11. 吉川博: 吸収, 排泄, 体内分布カドミウム. 総合臨床 23, 29-36, 1974.

**Cadmium distribution and oxidative phosphorylation
in the liver and kidney of rats simultaneously injected
with cadmium and calcium**

Yusaku NOGAMI

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Ogata)

Rats were injected intraperitoneally with cadmium chloride (5 or 10 mg/kg body weight) and calcium chloride (50 mg/kg body weight) simultaneously. Rats were killed after 2 hours. The accumulation of cadmium and calcium in the liver and kidney, and in liver and kidney mitochondria was examined. The mutual effect of cadmium and calcium on the respiration of the mitochondria was also investigated. The results were as follows:

- 1) concentrations of cadmium in the liver were lower in the presence of calcium than in its absence, but the accumulation of cadmium was marked.
- 2) concentrations of cadmium in liver mitochondria were lower in the presence of calcium than in its absence.
- 3) the decrease in respiratory control index and ADP/O ratio of liver mitochondria was lower in the presence of calcium than in its absence.
- 4) the same statements are true for kidney and kidney mitochondria.
- 5) The concentrations of calcium in the liver and kidney in the presence of both cadmium and calcium were similar to the those when calcium was absence.