

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15243

研究課題名(和文)カドミウム中毒発症機序における銅欠乏の関与

研究課題名(英文)Effects of copper deficiency on cadmium toxicity

研究代表者

堀口 兵剛 (Horiguchi, Hyogo)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90254002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウム(Cd)中毒における銅の体内動態の関与を検討するため、低銅食飼育下にラットにCdを2mg/kgの投与量で週に1回、3カ月間皮下注射した(対照には生理食塩水)。Cd投与により肝臓中銅濃度の増加、腎近位尿細管障害、血漿中鉄濃度の低下を伴う腎性貧血などが見られた。それに低銅食飼育が加わると、尿中蛋白質の排泄量の増加、貧血の程度の若干の増強傾向が見られた。従って、Cd中毒の発症において、銅欠乏状態はわずかではあるがその影響を増強する作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To consider the effect of copper in the body on the development of chronic cadmium toxicity, rats were injected with cadmium at 2mg/kg once a week for 3 months (saline to control rats) fed by copper deficient diets. Cadmium induced an elevation of hepatic copper concentration, renal tubular dysfunction, renal anemia accompanied with a decrease of serum iron, etc. Feeding copper deficient diets in addition to cadmium injection, an increase in renal excretion of protein and slight enhancement of anemia were observed. These results suggest that copper deficiency, although only slightly, have an effect to enhance cadmium toxicity.

研究分野：重金属の毒性学

キーワード：カドミウム 銅 ラット

1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は米、野菜、海産物等の摂取により体内に取り込まれ、腎臓中に蓄積する。腎臓中 Cd 濃度は加齢とともに上昇するため、過剰の Cd 摂取を続けていると高齢で近位尿細管障害 (カドミウム腎症) が発症し、さらに骨軟化症や貧血 (イタイタイ病) が続発する危険性がある (Horiguchi et al., Environ Int, 2013; Horiguchi et al., Int Arch Occup Environ Health, 2010)。このような Cd 中毒の患者は今日においても富山県神通川流域の旧 Cd 汚染地域や秋田県に散在する鉱山や製錬所由来の Cd 汚染地域で新たにみついている (堀口, 腎と透析, 2014)。

Cd 中毒の発症機序における亜鉛、鉄、カルシウム等の必須金属や元素の関与はよく知られている。例えば、Cd 曝露により金属結合蛋白質であるメタロチオネインが誘導され、Cd と結合して毒性を軽減するが、同時に MT に結合する形で亜鉛の臓器中濃度が上昇する (Kägi, Methods Enzymol, 1991)。ところが、主要な必須金属のひとつである銅の Cd 中毒に対する関与については未だ不明のことが多い。カドミウム腎症やイタイタイ病の患者では、尿細管における再吸収障害により銅と結合した MT の尿中への排泄が増加し (Mitane et al., Fundam Appl Toxicol, 1986) 血中の銅のレベルが低下するとの報告がある (新村, 他, 環境保健レポート, 1984)。従って、Cd 中毒では重症化や栄養不良などにより銅欠乏状態になる危険性がある。実際に、銅欠乏食で飼育したラットでは Cd 投与により臓器中銅濃度の低下が亢進したとの報告がある (二宮, 日衛誌, 1993)。すなわち、銅が欠乏すると消化管からの Cd の吸収が亢進し (Mitane et al., 同上) さらに種々の含銅酵素の活性が低下する (小椋, 日衛誌, 2014) ことにより Cd 中毒が増悪するという機序が考えられる。特に、活性酸素消去作用のある含銅酵素の superoxide dismutase (SOD) の活性低下によりスーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素の発生が増強される可能性があるが、一方で Cd 中毒では臓器中铁濃度が上昇するため (Horiguchi et al., Toxicol Sci, 2011) 鉄過剰による Fenton 反応を介したヒドロキシラジカルの発生との関連も興味深い。

2. 研究の目的

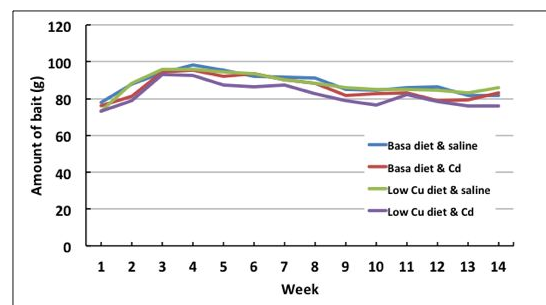
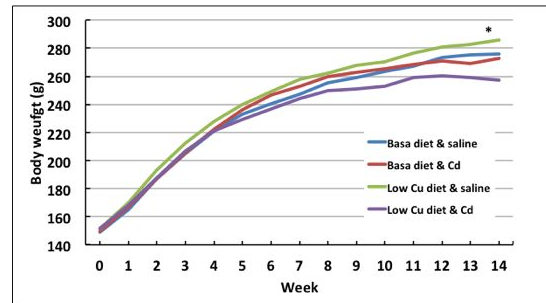
低銅食で飼育しながら Cd を投与したラットにおいて、血中・尿中・臓器中の各種金属や MT を測定し、種々の含銅酵素の活性の変化や活性酸素の発生を含む生体影響等を包括的に調べることにより、Cd 中毒の発症における銅欠乏の関与を解明する。

3. 研究の方法

Wistar ラット (、8w) を通常の餌及び低銅食の餌 (日本クレア) で飼育しながら、Cd を 2mg/kg の投与量で週に 1 回、3 ヶ月間皮下注射した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。すなわち、通常餌 + 生理食塩水、通常餌 + Cd、低銅餌 + 生理食塩水、低銅餌 + Cd の 4 群 (各群 9 匹) で観察した。3 ヶ月目に代謝ケージを用いてラットの 24 時間尿を採取した。尿検体は尿量測定、試験紙による一般検査、比重計による比重測定、等の後にチューブに分注してディープフリーザー内で保存した。また、麻酔下で末梢血、臓器を採取した。血漿中クレアチニン、鉄、TIBC (total iron binding capacity、総鉄結合能) エリスロポエチン、尿中蛋白質、NAG、グルコース、クレアチニンは BML に測定を依頼した。尿中メタロチオネインは ELISA で測定した (フロンティア研究所)。血算は全自動血球計数装置 (エルマ) を用いて測定した。臓器中元素濃度は原子吸光光度計で測定した (日立)。

4. 研究成果

3 ヶ月間の体重変化としては、低銅食飼育下の Cd 投与群の増加が最も低かったが、摂餌量も関与している可能性があった。



Cd 投与群では肝臓中 Cd 濃度が著明に上昇していたが、低銅食飼育による影響は見られなかった。しかし、Cd 投与群では肝臓中銅濃度が若干上昇する傾向が見られた。ちなみに、低銅食飼育により肝臓中銅濃度は明らかに低下していた。

Cd 投与群では尿量、NAG (N-acetyl- -D-glucosaminidase) メタロチオネインの尿中排泄量が増加しており、近位尿細管障害が明らかであったが、それに対

する低銅食飼育の増悪影響は見られなかった。

尿量 (mL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	8.0±2.3	8.8±2.8
Cd	10.1±2.8	10.2±2.4

尿中 N AG (U/g cr.)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	18.3±2.6	17.5±1.8
Cd	26.7±3.3*	28.2±1.2

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

尿中メタロチオネイン (µg/g cr.)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	251 ± 83	154 ± 75
Cd	6,182 ± 3,613	3,512 ± 4,920

一方で、Cd 投与群では血漿クレアチニンの上昇及び尿中蛋白質の排泄量増加などの腎系球体機能への影響も確認できたが、低銅食飼育により尿中蛋白質の排泄量がさらに増加していた。しかし、腎臓の HE 染色病理標本では形態学的な変化は認められなかった。従って、Cd の腎機能障害は銅欠乏状態により若干増強されることが判明した。

血漿クレアチニン (mg/dL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	0.26±0.03	0.26±0.02
Cd	0.34±0.05*	0.31±0.03

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

尿中蛋白質 (mg/g cr.)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	1.5±0.3	1.8±1.2
Cd	2.8±0.5*	4.2±1.1**

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

** : p<0.05, 通常餌 + Cd vs 低銅餌 + Cd

Cd 投与群では腎臓から産生される造血因子であるエリスロポエチンや鉄の血漿中濃度の低下を伴う貧血も進行していたが、それに低銅食飼育が加わると統計学的に有意ではないが若干貧血の程度が強くなる傾向が見られた。

末梢血ヘモグロビン (g/dL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	14.5±0.4	14.0±0.7
Cd	11.1±0.6*	10.5±0.5

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

血漿鉄 (µg/dL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	14.5±0.4	14.0±0.7
Cd	11.1±0.6*	10.5±0.5

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

TIBC (µg/dL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	600 ± 42	607 ± 49
Cd	895 ± 84*	956 ± 56

*: p<0.05, 通常餌 + 生理食塩水 vs 通常餌 + Cd

血漿エリスロポエチン (mIU/mL)

	通常餌	低銅餌
生理食塩水	1.8±2.7	0.9±0.7
Cd	1.4±0.8	2.6±1.7

以上の結果より、Cd による貧血惹起作用は銅欠乏状態によってわずかではあるが増強する作用があることが示唆された。今後の課題として、さらに長期の Cd 投与による腎障害に対する銅欠乏の影響を観察する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 堀口兵剛. イタイイタイ病, 日本医師会雑誌 特別号「環境による健康リスク」(印刷中). (査読無し)

2. 堀口兵剛. 2017. 産業保健におけるカドミウム中毒, 産業医学レビュー, 30(1), 1-17. (査読無し)

3. 大森由紀, 角田正史, 星 佳芳, 堀口兵剛, 相澤好治. 2016. 重金属の職業性曝露に関する最近の知見, 産業医学ジャーナル, 39 (6), 72-75. (査読無し)

4. Horiguchi H, Oguma E. 2016. Acute exposure to cadmium induces prolonged neutrophilia along with delayed induction of granulocyte colony-stimulating factor in the livers of mice. Arch Toxicol. 90(12), 3005-3015. (査読有り)
DOI: 10.1007/s00204-016-1661-7

[学会発表](計 6 件)

1. Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Katsuyuki Murata, Atsushi Komatsuda, Satoshi Sasaki, Yumiko Kumazawa, Tomoko Ohno, Kayoko Miyamoto. Cadmium exposure and its age-relevant hazardous effect on

renal tubular function among rice farmers in a cadmium-polluted area of northern Japan. The 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 12-16 March, 2017, Baltimore (U.S.A.) .

2.堀口兵剛、小熊悦子、村田勝敬、小松田敦、佐々木敏、熊澤由美子、大野智子、内田正美。秋田県の鉱山下流域農村の稲作農業者におけるカドミウム曝露とその腎機能への影響。2017年3月26日-28日、第87回日本衛生学会総会、フェニックス・シーガイア・リゾート（宮崎県宮崎市）。

3.堀口兵剛。忘れられたカドミウム汚染地 秋田県の農家におけるカドミウム経口曝露とその健康影響の現状、シンポジウム 19 「カドミウム研究の新たな展開 疫学から分子機構まで」。第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月29日-7月1日、ウインチあいち（愛知県名古屋市）。

4.堀口兵剛、小熊悦子、佐々木亨、荒川 明、小松田敦、横山和仁、千葉百子、松川岳久、大森由紀、上小牧憲寛。秋田県内の医療機関におけるカドミウム腎症スクリーニング。第86回日本衛生学会総会、2016年5月11日-13日、旭川市民文化会館（北海道旭川市）。

5.堀口兵剛、小熊悦子、村田勝敬、佐々木敏、宮本佳代子、小松田敦、澤村昌人、澤田賢一、涌井秀樹、熊澤由美子、大野智子、長嶋智子、高山裕子、松田律子、豊嶋瑠美子、鈴木景子、松川岳久、千葉百子、横山和仁、佐々木亨、大本直樹、荒川明、藤田秀文、小野地章一、高橋俊明、佐々木司郎、平山克、中村正明。カドミウム曝露を受けた秋田県の農業従事者に対する保健対策。第74回日本産業衛生学会東北地方会、2015年7月25日、秋田県医師会館（秋田県秋田市）。

6.澤村昌人、堀口兵剛、小熊悦子、松川岳久、千葉百子、村田勝敬、横山和仁、中村正明、涌井秀樹、小松田 敦。秋田県内の医療機関における腎機能低下患者に対するカドミウム腎症スクリーニングの試み。第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5-7日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）。

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀口 兵剛 (HORIGUCHI, Hyogo)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：90254002

(2)研究分担者

なし