

カドミウム経口投与サル血清および 尿 β_2 ミクログロブリンの変動

—栄養要因の影響—

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

小 瀧 規 子

（昭和61年11月25日受稿）

Key words : Cadmium

Monkeys

Serum and urinary Beta-2-Microglobulin

はじめに

β_2 -ミクログロブリン (β_2 -MG と略) は1968年に Berggård ら¹⁾によって腎尿細管性タンパク尿を伴った Wilson 氏病患者や慢性 Cd 中毒患者の尿から分離された100箇のアミノ酸残基をもつ分子量11800の低分子量タンパク質である。このタンパク質は有核細胞の表面にある組織適合抗原 (HLA) の一成分であり²⁾、イムノグロブリン分子の定常域と共通のアミノ酸配列をもつ³⁾。この HLA 複合体は Heavy chain の分解と Light chain の β_2 -MG の生体液中への脱落により代謝回転する⁴⁾。

β_2 -MG の分子量が11800 dalton という低分子量であることから容易に腎の糸球体膜を通過し、近位尿細管で再吸収される。従って、正常な腎では、 β_2 -MG は糸球体において口過され、尿細管で再吸収、異化されるため、尿中に排出される β_2 -MG の量は少ない。慢性 Cd 中毒、Fanconi 症候群、Wilson 氏病などのような尿細管再吸収障害を伴う疾患では、 β_2 -MG のような低分子量タンパク質の尿中の値が上昇するので、尿中タンパク質の組成の違いにより、糸球体障害を伴う腎疾患と明瞭に区別できる⁵⁾。

β_2 -MG はリンパ球をはじめ、有核細胞で産生され、生体の免疫機構と関係しているため、血中の β_2 -MG 値は各種のがん、例えば多発性骨髄腫をはじめとして SLE (全身性エリスマトーシス) や慢性リンパ性白血病のような各種の免疫疾患などのマーカーとして有用であるとされている⁶⁻¹³⁾。また、血清 β_2 -MG は腎移植時の病状観察の指標のひとつとしても利用されている¹⁴⁻¹⁵⁾。しかし、 β_2 -MG の生理学的意義については現在まだ十分に解明されていない。

実験動物の尿中タンパク質については、主としてゲル口過や電気泳動などによって β_2 -MG が定性されている。精製された動物の β_2 -MG を抗原として、その抗血清作成し、その抗血清を利用したラジオイムノアッセイ (RIA) により生体液中の微量の β_2 -MG を測定することが出来る。この方法により、正確に、しかも簡単に β_2 -MG の血清や尿のレベルを知ることができれば、実験動物による免疫性疾患や発がん、また腎移植や腎障害の機序に関する実験において有用である。

日本における公害病の一つであるイタイイタイ病は慢性経口摂取によるカドミウム中毒であ

るとされている。栄養不足や妊娠などの状況下において、カドミウムを長期間にわたって経口摂取した場合、尿細管性腎機能不全が起こり、その結果骨軟化症を発症するという。その病因追求のために、数多くの動物実験¹⁶⁾がなされてきたが、現在に至るまでその病因が完全に解明されているわけではない。

尿細管性腎機能障害は低分子量タンパク尿の出現によって同定されていて、カドミウム曝露作業^{17,18)}やカドミウム汚染地区住民¹⁹⁾などの血清や尿の β_2 -MG レベルの上昇が報告されている。しかし、その発症のメカニズムや β_2 -MG 値の変動などの詳細については不明な点が多い。特に、ひとたび腎機能障害が起れば、連続的に β_2 -MG の尿中漏出が起るといふ考えに対しては、疑問が持たれている。

ヒトと近縁な霊長類であるサルを使用して、種々の栄養条件下でCdを長期間経口投与したときの生体影響を観察し、イタイイタイ病の病因解明の基礎的研究を試みた。特に、この論文では、Cd投与によって誘起される腎機能異常を血清、尿および腎臓中のCdと血清中および尿中の β_2 -MGの変動から検討した。

各種動物(マウス、ラット、ウサギなど)の β_2 -MGが報告されているが²⁰⁻²³⁾、サルの β_2 -MGについてはまだ報告されていない。そこでサルの尿から β_2 -MGを分離精製し、その抗血清を作成し、RIA法を確立して、本実験に適用している。

材料と実験方法

試薬類

特記しない場合はすべて特級品を用いた。Sodium chromate, Chloramine T, Metabisulphite, Ammonium carbonate, 精密分析用の硝酸, 硫酸および過塩素酸, 原子吸光分析用の Methyl isobutyl ketone は和光純薬製を, Potassium Iodide は国産化学製を, Anti rabbit IgG goat serum は Miles-Yada (Israel) 製を用いた。Bovine serum albumin は Sigma Chemical Company (USA) より, Complete Freund's Adjuvant は Difco Laboratories (USA) より, ¹²⁵Ina は New England Nuc-

lear. (USA) より購入した。

Sephadex G-100, G-75 および G-25 は Pharmacia Fine Chemicals (Sweden) 製を, DEAE-cellulose は Brown Chemicals (USA) 製を使用した。

β_2 -MG の分離精製

カニクイザル (Macaca fascicularis, female, 体重約2.5kg, 2頭) に1頭当たり30mg の Sodium chromate を1回皮下注射にて投与して、急性の腎障害を起させ、投与後1週間の尿を氷冷下に集めた。ウリスティクス試験紙(マイルス・三光KK)にてタンパク尿(+)以上の尿を精製用試料とし、Ohsawaらの方法²⁴⁾に準じて以下のように精製を行なった。尿は冷却下に遠心して不溶物を除き、その上清を直ちに Sephadex G100 (カラムサイズ; 7.6cm×140cm, 溶出液; 0.02M Ammonium carbonate) を用いてゲルろ過した。溶出画分について280 nm の紫外部吸収 (HITACHI-181 Spectrophotometer) を測定して溶出曲線を作成し、ヒト β_2 -MG の溶出位置を参考に β_2 -MG 画分をわけとった。凍結乾燥後 Sephadex G75 (カラムサイズ; 5 cm×93cm, 同一溶出液) にて、再クロマトグラフィーを行い β_2 -MG 画分を凍結乾燥後、DEAE-cellulose (カラムサイズ; 2 cm×40cm, 溶出液; 0.02M リン酸緩衝液, NaCl の0M-0.2M の濃度勾配) によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。NaCl 濃度0.02M 近傍に溶出される主区分を Sephadex G25 (溶出液; 0.01M Ammonium carbonate) により脱塩して、精製 β_2 -MGを得た。尿の処理と分離精製は低温実験室(5-7℃)にて行った。

純度の検定

精製した β_2 -MG 標品について、アミノ酸分析 (JEOL-6AH および-8AH), SDS 電気泳動, 等電点電気泳動および高速液体クロマトグラフィー (JASCO, Trirotor-III) などでその純度を検討した。

抗血清の作成

精製サル β_2 -MG (2 mg) を0.05M リン酸緩衝液 pH 7.5-生食液 1 ml に溶解し, Complete Freund adjuvant 1 ml と混和し, ウサギ

(ニュージーランドホワイト種)のかかと次いで背部皮下の数ヶ所に1週間毎に4回投与した。最終投与後、1mgの β_2 -MGをboosterとして静注し、数日後に採血して、抗血清を得た。RIA法の確立

精製サル β_2 -MGの標識化は常法に従って、 ^{125}I によりChloramine T法で行った²⁵⁻²⁶⁾。

標識化 β_2 -MGと抗 β_2 -MGウサギ血清を用い、二抗体法でRIA法を確立した。その方法は次の通りである。

精製サル β_2 -MG溶液又は検体 $100\mu\text{l}$ 、 ^{125}I -サル β_2 -MG溶液($1-2\times 10^4$ cpm/tube) $100\mu\text{l}$ 、希釈ウサギ血清 $50\mu\text{l}$ 、および希釈抗サル β_2 -MG血清 $100\mu\text{l}$ の混合溶液を 4°C で2日間反応させ、さらに希釈抗ウサギIgG血清(ヤギ) $50\mu\text{l}$ を加えて1夜 4°C に放置する。反応終了後、 3000rpm にて5分間遠心(Kubota KN-70)し、その沈殿物の放射能(cpm)をガンマカウンター(Packard Auto gamma scintillation spectrometer Model 5220)で測定する。標準曲線を作成し、未知検体の β_2 -MG量を算定する。

サルのCd経口投与実験の条件

アカゲザル(インド産, *Macaca mulatta*, female, 購入時体重 $3.85-6.4\text{kg}$, 4-7歳)40頭を以下のような群にわけて、実験をおこなった²⁷⁾。

No. 1群およびNo. 5群(正常餌群)に対しては、正常餌-カルシウム(0.9%), リン(0.9%), タンパク質(20%), ビタミンD(240 I. U.)-を、No. 2群およびNo. 6群(低栄養群)に対しては、低栄養餌-カルシウム(0.3%), リン(0.3%), タンパク質(14%), ビタミンD(240 I. U.)-を、No. 3群およびNo. 7群(低ビタミンD群)に対しては、低ビタミンD餌-正常餌からビタミンD(240 I. U.)を減じたもの-を、さらにNo. 4群およびNo. 8群に対しては、低栄養+低ビタミンD餌を、それぞれ与えた。

No. 5, No. 6, No. 7, No. 8群には最初の1年間は 3ppmCd を、それ以降は 30ppmCd を CdCl_2 の形で餌に混ぜて与えた。

各群のサルの頭数は1群5頭, 2群4頭, 3

群4頭, 4群4頭, 5群5頭, 6群4頭, 7群4頭, 8群10頭とした。

分析試料検体

実験開始時から7年間(84ヶ月)の6ヶ月毎に血清を、3ヶ月毎に一日尿を集めて検体とした。測定に供するまで、 -20°C に凍結保存した。尿中のカドミウムの定量

尿 20ml を分解管にとり、硫・硝酸湿式灰化後、methyl isobutyl ketoneで抽出してフレーム原子吸光計(HITACHI 170-50 または HITACHI 6000)にて定量した。

血清中のカドミウムの定量

血清を 0.13N 硝酸にて希釈してフレームレス原子吸光計(HITACHI 180-80)で定量した。

臓器(腎臓)のカドミウム分析

生検例は $0.8-4\text{mg}$ の腎臓小片を乾燥後秤量し、剖検例は採取した腎臓皮質の小片の重量をはかり、硝酸・過塩素酸湿式灰化後原子吸光計にて測定した。

尿の β_2 -MGの定量

実験開始30ヶ月目以降の尿検体について、必要に応じて生理食塩水で希釈して上述のRIA法により測定した。

血清の β_2 -MGの定量

実験開始30ヶ月目以降の血清について、生理食塩水で16倍に希釈して上述のRIA法により測定した。

実験結果

精製 β_2 -MGの収量と純度

抗体作成用にサル原尿 150ml から $2-3\text{mg}$ の精製 β_2 -MGを得た。収量は約20%であった。等電点電気泳動で単一バンドを得、その等電点は $\text{pH}6.9$ で、ヒト、ウサギなどの等電点と異なっていた。SDS電気泳動から分子量は 10500 と算定された。

アミノ酸分析の結果からAsp(12), The(5), Ser(7), Glu(9), Pro(8), Gly(8-9), Ala(2), Cys(2), Val(6), Met(2), Ile(3), Leu(6), Tyr(5), Phe(5), Trp(2), His(4), Lys(8), Arg(5)計99-100個のアミノ酸組成が推定された。高速

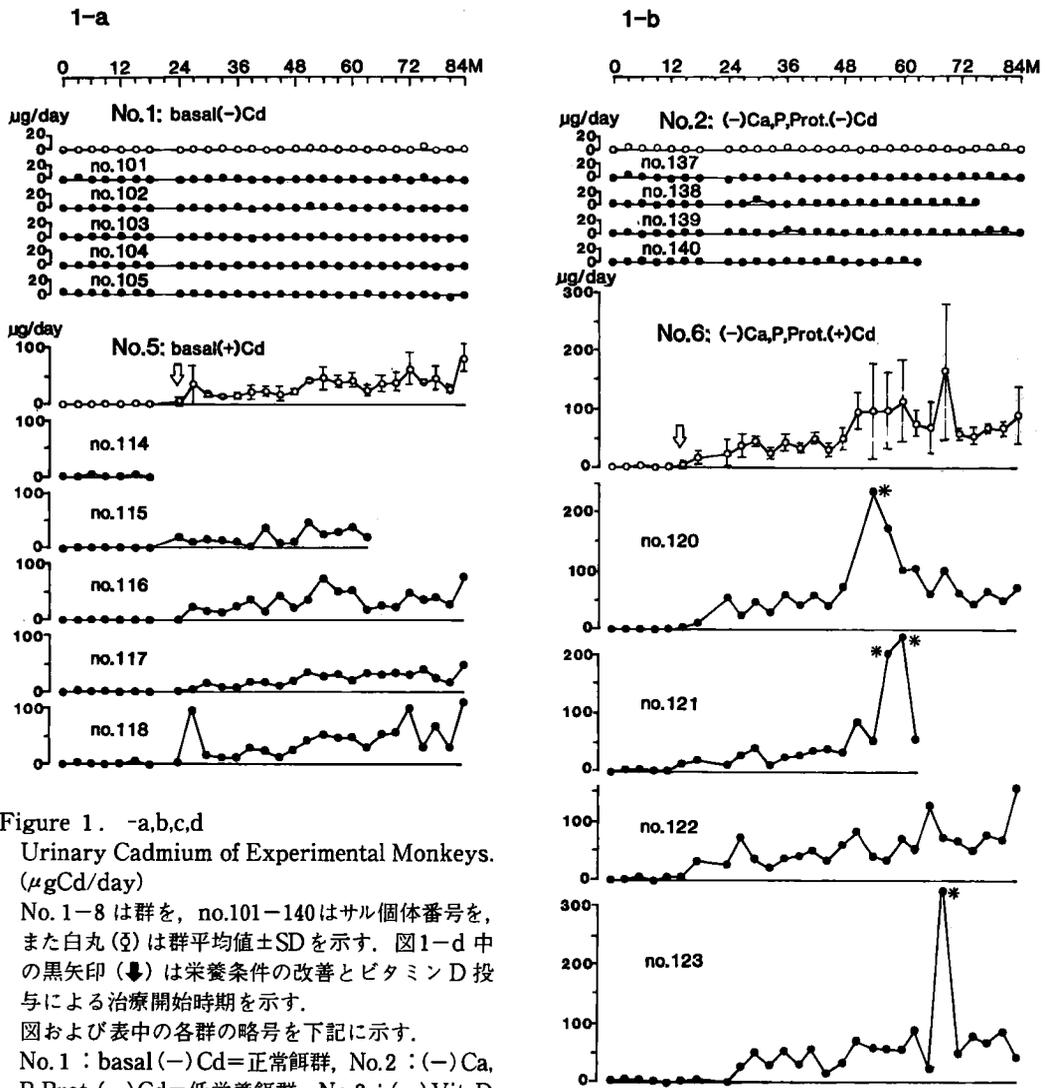


Figure 1. -a,b,c,d
Urinary Cadmium of Experimental Monkeys.
(µgCd/day)

No. 1-8 は群を, no.101-140はサル個体番号を, また白丸(○)は群平均値±SDを示す. 図1-d中の黒矢印(↓)は栄養条件の改善とビタミンD投与による治療開始時期を示す.

図および表中の各群の略号を下記に示す.
No. 1 : basal(-)Cd=正常餌群, No. 2 : (-)Ca, P, Prot.(-)Cd=低栄養餌群, No. 3 : (-) Vit. D (-)Cd=低ビタミンD餌群, No. 4 : (-) Ca, P, Prot. Vit. D(-)Cd=低栄養+低ビタミンD餌群, No. 5 : basal(+)Cd=正常餌+Cd群, No. 6 : (-)Ca, P, Prot.(+)Cd=低栄養餌+Cd群, No. 7 : (-)Vit. D(+)Cd=低ビタミンD餌+Cd群, No. 8 : (-)Ca, P, Prot. Vit. D(+)Cd=低栄養+低ビタミンD餌+Cd群.

液体クロマトグラフィー (カラム, Toyo Soda 120T, 溶出液; 50%アセトニトリル (0.05% TFA 含有) に対して80%アセトニトリル (0.05% TFA 含有) のグラジエント, 流速 1 ml/min) では, 単一ピークを示した.

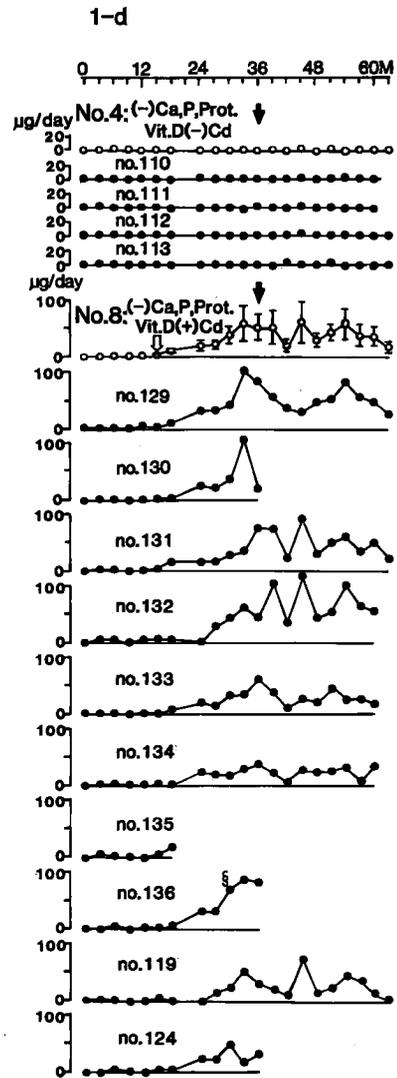
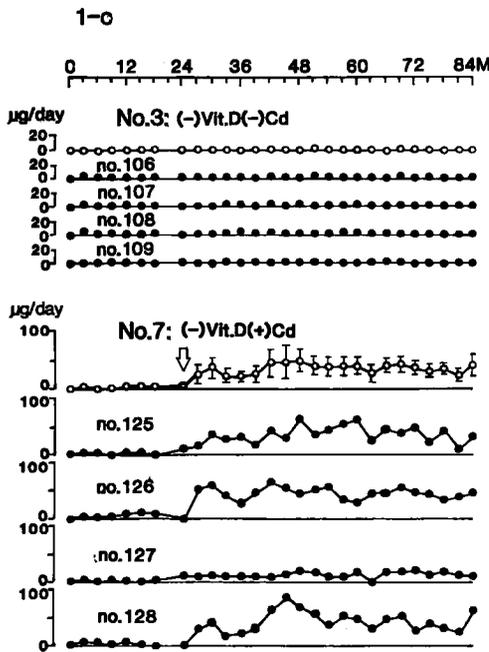
尿中カドミウム排泄

3ヶ月毎の検体について測定した尿中カドミウムの値を図1-a, b, c, dに示す.

群別に栄養条件に違いはあっても, Cd(-)群の全頭はこの飼育期間を通して尿中へのCdの排泄はほとんど認められなかった.

Cd(+)群では, 全群 (No. 5-No. 8群) で, 初めの1年目(12M)までは, 尿中へのCd排泄は, ほとんど認められなかったが, 30ppmCdを含有する飼料に換えると, 栄養条件が苛酷な群ほど早期にCdが尿中に認められるようになった.

即ち, No. 8群(低栄養+低ビタミンD餌+



Cd) [1-d] では、15ヶ月 (図中白矢印) を経過した時点から尿中 Cd 排泄が徐々に増加し、30ヶ月時点には50 µg/day を越える個体 (No. 136, 図中§印) もあった。

No. 6群 (低栄養餌 + Cd) [1-b] では、No. 8群と同様に尿中 Cd 量の上昇が観察された。4-5年目 (48M-60M) からは尿中 Cd 量が増大し、200 µg/day を越えるレベル (図中*印) も認められ、増減をくりかえしていた。

これに比べて、No. 5群 (正常餌 + Cd) [1-a] とNo. 7群 (低ビタミンD餌 + Cd) [1-c] では、24ヶ月 (図中白矢印) 以降、ゆっくり上昇し、変動は比較的小さかった。

No. 8群については、36ヶ月を過ぎた頃から衰弱がひどくなり、ビタミンD治療 (正常餌 + Cd のNo. 5群の餌に換え、多量のビタミンDを経口または皮下注射によって投与、図中黒矢印) を開始したところ、尿中の Cd 排泄は増減は認められるものの、ほぼ5群にみられるような低値を保持するようになった。

血清 Cd 量の推移

6ヶ月毎の検体についての測定結果を図2-a, b に示す。

尿検体と同様、Cd(-)群では全期間を通じ

て、血清中に Cd はほとんど認められなかった。

Cd(+)群では、12M を経過したところから、徐々に血清中に Cd がみとめられるようになった。

正常餌 + Cd のNo. 5群 [2-a] では、実験開始1年 (12M, 図中白矢印) 経過時点では血清中にほとんど Cd が認められなかったが、以後徐々にそのレベルの上昇が観察された。しかし他の Cd 群と比較すると低い。

低栄養餌 + Cd のNo. 6群 [2-a], 低ビタミンD餌 + Cd のNo. 7群 [2-b] および低栄養 + 低ビタミンD餌 + Cd のNo. 8群 [2-b] の栄養条件の悪い群では、実験開始の比較的初

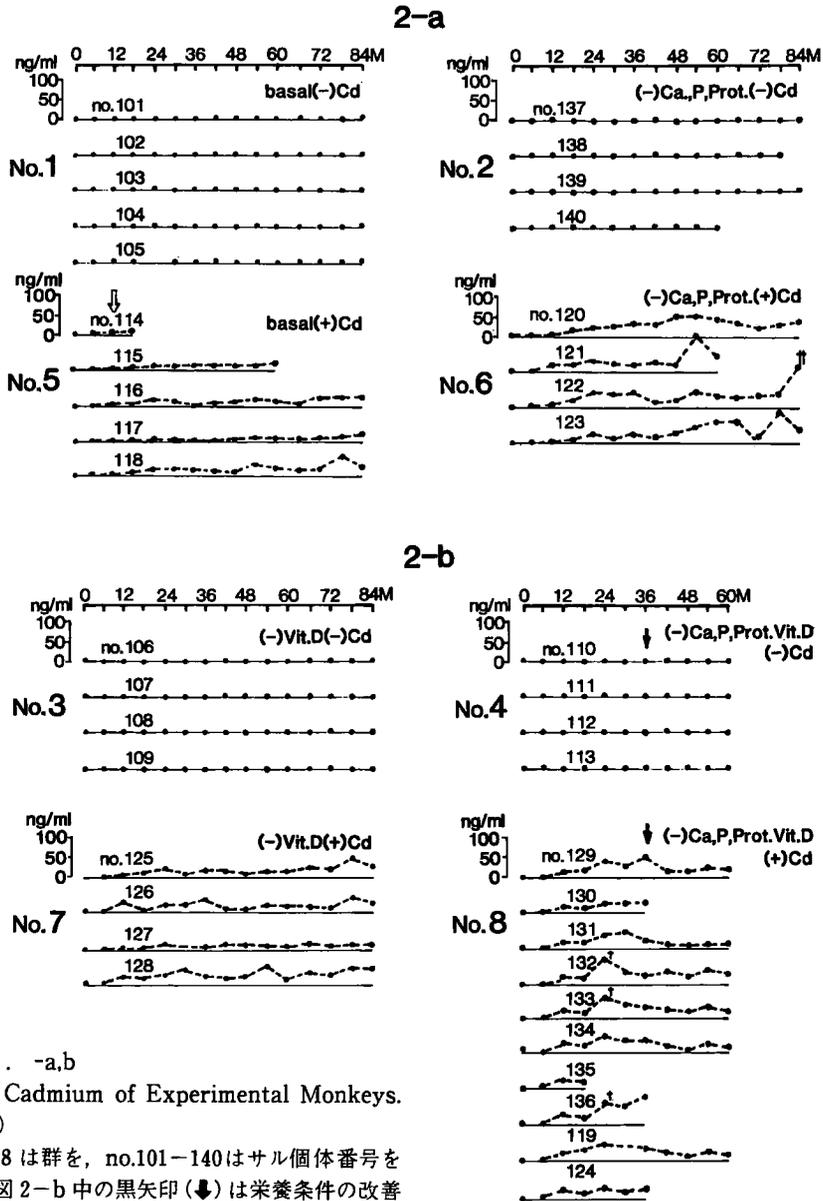


Figure 2. -a,b
 Serum Cadmium of Experimental Monkeys.
 (ng/ml)
 No. 1-8 は群を, no.101-140はサル個体番号を示す。図 2-b 中の黒矢印(↓)は栄養条件の改善とビタミンD投与による治療開始時期を示す。

期 (6-12ヶ月) から, 血清 Cd レベルの上昇がみられ, 以後高低をくりかえしている。

2年目(24M)の血清 Cd の平均値±SD は, No. 5 群では 12.2 ± 4.4 ng/ml, No. 6 群では 28.5 ± 7.1 ng/ml, No. 7 群では 18.9 ± 3.9 ng/ml, No. 8 群では 41.7 ± 12.7 ng/mlであった。No. 8 群には50 ng/mlを越える個体もあった。

(図中+印) その後は, 各群とも血清 Cd レベ

ルは増加していたが, 特にNo. 6 群に100 ng/mlにも及ぶ個体が出現した。(84ヶ月のサルNo. 122, 2-a 中+印)。

3年経過後栄養条件の改善とビタミンDの投与による治療を受けたNo. 8 群では血清 Cd レベルが治療前より低値を示す傾向が観察された。

腎臓中の Cd 含有量

実験開始より12, 18, 36, 50および63ヶ月目

Table 1 Cd Concentration in Kidneys of Experimental Monkeys from Biopsy and Autopsy samples (μg Cd/g of wet weight)

Cd (±)	monkey group	monkey no.	12 M	18 M	36 M	50 M	63 M
			3 ppmCd	30 ppmCd			
Cd (-)	No. 1 basal	101	17	56		46	
		102	6	11		33	
	No. 2 (-)Ca, P, Protein	138	nd	1		28	
		139	nd	12		19	
		140					[70]
	No. 3 (-)Vit. D	106	nd	37		46	
		108	nd	45		48	
	No. 4 (-)Ca, P, Protein Vit. D	110	61	105		81	[74]
		111	nd	58		53	[53]
		112				29	[36]
		113				37	[43]
	Cd (+)	No. 5 basal	114		[338]		
115							[1116]
117			33	173		1255 [#]	
118			47	168		627	
No. 6 (-)Ca, P, Protein		121	110				[381]
		122	128	486		911	
No. 7 (-)Vit. D		125	29	228			
		126	97	547			
No. 8 (-)Ca, P, Protein Vit. D		129					[1060]
		130			[751]		
		131				693	[1244]
		132	279*	766		850	[1247]
	133					[1051]	
	134				1155 [#]		
	135	50	[529]				
	136			[611]			
119				1129 [#]	[1082]		
124			[1016]				

nd; not detectable. M; experimental months.

[]内の数値は剖検試料, それ以外は生検試料の分析値を表す.

[乾燥重量から湿重量への換算] 試料をP₂O₅存在下で48時間真空乾燥.

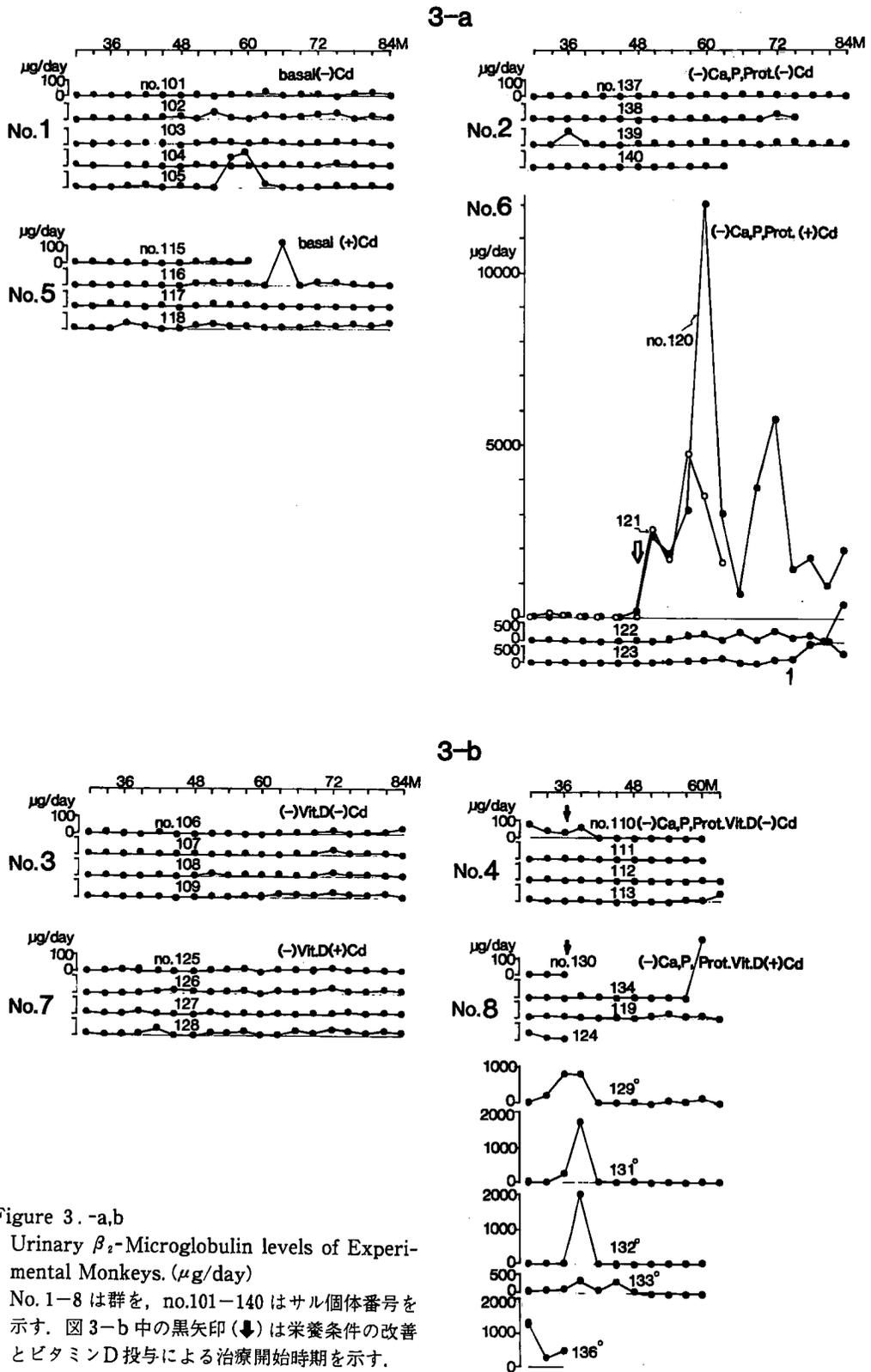
(乾燥重量) = (湿重量) × 0.25 で計算.

の生検個体または剖検個体の腎臓中のカドミウム含有量 (μg/g 湿重量) を表1に示す.

Cd 非投与群の餌中にはごく微量の Cd (0.05-1.28 ppm, 平均 ± SD ; 0.26 ± 0.11 ppm, n = 45) が含まれているので, この実験における Cd(-)群では, 18ヶ月時には検索した個体全頭の腎臓に Cd が検出された. 栄養条件の最も苛酷な低栄養+低ビタミンD餌のNo.

4群では, 他の群に比べてやや高い腎臓中のカドミウム値が観察された. (表中アンダーラインの値).

Cd(+)群では検索したいずれの個体にも Cd が検出された. 特に, 低栄養+低ビタミンD餌 + Cd 群 (No. 8群) には 3ppmCd で 12M の飼育期間でも腎臓中 Cd が200 μg/g 湿重量を越えた個体があった. (サルNo. 132, 表中※印).



12および18ヶ月目のCd(+)群の腎臓中Cd量によれば、Cd単独投与群であるNo. 5群は、低栄養やビタミンDの条件下にあるCd投与群のNo. 6, No. 7, No. 8群と比較して腎臓に蓄積されるCd量が少ないことが認められた。しかし、Cd投与の期間が長くなれば、腎臓中のCd量にCd単独投与群(No. 5群)と低栄養や低ビタミンDの条件下にあるCd投与群(No. 6, No. 7, No. 8群)との区別はつかない。50ヶ月検索時には1000 $\mu\text{g/g}$ 湿重量に達する個体も出現した。(表中#印)

RIA法による β_2 -MGの測定

精製 β_2 -MGを用いた標準曲線から10-500 ng/mlの範囲で直線性が見られた。

尿中 β_2 -MG値

実験開始時より30ヶ月から84ヶ月目までの各3ヶ月毎の尿中 β_2 -MGをRIAにて測定した結果を図3-a, bにしめす。

Cd(-)群の全頭、Cd(+)群のなかのNo. 5(正常餌+ Cd)とNo. 7群(低ビタミンD餌+ Cd)の全頭は、30ヶ月から84ヶ月まで尿中への β_2 -MGの漏出は、2, 3の例外はみられるものの、僅かであった。

36ヶ月の頃に、No. 8群のサルで健康状態の悪化が観察され、尿中 β_2 -MGの漏出が多い個体(サルNo. 129, 131, 132, 133, 136)が出現した[3-b, ○印]。腎機能の異常を反映して、 β_2 -MGが漏れ出てきたと推測された。しかし、この尿中 β_2 -MGの漏出も栄養条件を改善しビタミンDの投与(図中黒矢印)を開始すると早期に止まり、正常のレベルにまで戻り、低値を保持していた。

No. 6群(低栄養餌+ Cd)[3-a]では、48ヶ月目(図中白矢印)を過ぎた頃より4頭中の2頭(サルNo. 120, 121)に尿中への β_2 -MGの漏れが増え、それ以降は増減をくりかえした。一時期12000 $\mu\text{g/day}$ (60M)にも達し、時には600 $\mu\text{g/day}$ (66M)に戻るといような現象が観察された(サルNo. 120)。一時期腎機能異常を示すもののその修復が行われているものと考えられる。他の2頭(サルNo. 122, 123)も75M経過時点(図中↑印)から徐々に尿中 β_2 -MGレベルが高くなる傾向がみ

られた。

No. 6群とNo. 8群のなかで、 β_2 -MGの漏出の時期に差がみられるのは個体差によるものと思われる。

血清の β_2 -MG値

実験開始時より30ヶ月から84ヶ月目までの6ヶ月毎に採取された血清の β_2 -MGをRIA法にて測定した結果を表2に示す。

サル血清の β_2 -MGの正常レベル(No. 1群; 最小値0.80-最大値3.74mg/l, 表中アンダーライン, 平均値 \pm SD; 1.69 \pm 0.42mg/l)はヒトの血清の β_2 -MG正常レベル(0.9-3.0mg/l)と同程度のレベルを示していた²⁸⁻²⁹。実験期間中の血清 β_2 -MGのレベルは低栄養餌のNo. 2群では1.79 \pm 0.35mg/l, 低ビタミンD餌のNo. 3群では1.71 \pm 0.44mg/l, 低栄養+低ビタミンD餌のNo. 4群では1.59 \pm 0.50mg/lで、ほぼ正常レベル範囲であった。

Cd(+)群では、正常餌+ CdのNo. 5群では最小値0.64-最大値2.88mg/l(表中アンダーライン), 1.59 \pm 0.38mg/lで、前記の正常レベル範囲であった。低栄養餌+ CdのNo. 6群, 低ビタミンD餌+ CdのNo. 7群および低栄養+低ビタミンD餌+ CdのNo. 8群の血清 β_2 -MGレベルはそれぞれ2.30 \pm 0.54mg/l, 1.96 \pm 0.36mg/l, 1.86 \pm 0.39mg/lで、前記の正常レベルを大きく逸脱しているとは考えられない。

本実験では、Cd摂取によって、また低栄養条件下のCd摂取によって、特に血清中の β_2 -MGレベルが変動したとは考えにくい。

考 察

サル尿から β_2 -MGを分離精製し、その抗血清を用いて高感度のRIAを確立して、Cd経口投与実験のサルの血清と尿の β_2 -MG値を実験開始30ヶ月日から84ヶ月日まで測定した。

ヒトをはじめとし、ウシ、ウサギ、モルモット、マウスなどの β_2 -MGは既に分離精製され、化学構造も明らかにされている^{22,30-34}。ヒトの β_2 -MGのRIAは広く臨床検査に利用されているが³⁵、動物の β_2 -MGのRIAはまだ動物実験に適用されている例がない。RIAはゲ

ル口過や電気泳動法による分析法と比較して、その方法の簡便さや感度、精度の点から、動物実験にとって極めて有用であることは論をまたない。

著者の開発したサルの β_2 -MGのRIAは、Cd経口長期投与サルの血清および尿中の β_2 -MGの微量測定を可能にした。

Cdによる生体影響とされているイタイイタイ病の病因を解明する基礎的研究のために、ヒトに近縁な霊長類サルを用いたCdの長期曝露実験を行った。実験では、栄養要因によるCdの生体影響の修飾について検討した。

実験群；投与する餌の成分組成を正常餌（カルシウム0.9%，リン0.9%，タンパク質20%，ビタミンD 240IU）、低栄養餌（カルシウム0.3%，リン0.3%，タンパク質14%，ビタミンD 240IU）、低ビタミンD餌（カルシウム0.9%，リン0.9%，タンパク質20%，ビタミンD無添加）および低栄養+低ビタミンD餌（カルシウム0.3%，リン0.3%，タンパク質14%，ビタミンD無添加）として、Cd(+)群ではそれぞれの対照群の餌に初めの1年間は3ppm、以後30ppmのCdを添加した。実験開始後7年間にわたり種々の検査を行い、その生体影響を観察した。特にこの論文ではCdの血清および尿中のレベル、腎臓中のCd蓄積量さらに血清および尿中 β_2 -MGレベルの変動について報告し、Cdの慢性曝露による腎機能障害の発現の様子を明らかにした。

血清中のCd量と尿中へのCdの排泄；Cd非投与群ではほとんど認められないが、Cd投与群では、栄養条件の違いにより血清中のCd量と尿中へのCd排泄量に差がみられる。低栄養条件が加わった群では、加わらない群とくらべて、血清Cd量の上昇と尿中へのCdの排泄が早く（12ヶ月頃）観察され、低栄養+低ビタミンD餌+ CdのNo. 8群と低栄養餌+ CdのNo. 6群が最も早く、ついで低ビタミンD餌+ CdのNo. 7群、正常餌+ CdのNo. 5群の順であった。

生検および剖検例の腎臓中のCd；分析結果からCd投与初期で、低栄養餌やビタミンD餌条件の群（No. 6, No. 7およびNo. 8群）で

は正常餌にCdが添加されていた群（No. 5群）より腎臓Cd濃度が高かった。低Ca食は高Ca食より腎へのCd蓄積が高いことはラットなどで確認されているが³⁶⁻³⁸⁾、サルの場合も、低栄養餌条件下でCdが投与されると腎臓により速やかに蓄積されることが確認された。しかし、この場合実験頭数が少ないため、No. 6, No. 7およびNo. 8群間での蓄積の速さの差異を論ずることは難しい。

実験経過とともに、Cdの腎臓への蓄積は増大し、No. 8群では、36ヶ月経過時点で、腎皮質濃度が1000 $\mu\text{g/g}$ を越える個体が出現した。その時点でのNo. 5, No. 6およびNo. 7群の実測値がないので、これらの群でどの程度蓄積があったか判らないが、No. 5およびNo. 6群とも50ヶ月経過時点でNo. 8群とほぼ同程度の濃度の腎臓Cdを有する個体が観察されている。この時期には、Cd投与群のNo. 5, No. 6およびNo. 7群では腎Cd濃度が飽和値に達していると推察される。No. 8群では、3年経過時点での栄養条件の改善とビタミンD投与による治療後もCd投与は継続されていて、飽和値を保持していたと考えられる。3ppmCd 1年間ついで30ppmCdを連続経口投与されていたサルの腎皮質Cd濃度の飽和値は約1000 $\mu\text{g/g}$ 湿重量であると推定される。

No. 6群の一頭（No. 121）の腎皮質Cd濃度が63ヶ月目で極端に低くなっているが、これは腎機能障害が発症し、蓄積されていたCdが多量に漏出していることを物語っている。腎臓では摂取されたCdは蓄積を重ねながら、やがて飽和値に達し、腎障害の発症と共に尿中へCdを急速に放出し、腎Cd濃度が減少したように観察される。この現象はラットなどの動物でも確認されている³⁹⁾。

低栄養餌条件下でCdを投与されていたサルは、Cdをよく腸管から吸収し、血清中のCd濃度も高くなり、腎臓に蓄積すると推察される。したがって正常餌条件下でCdを摂取していたサルよりもCdの腎蓄積はより速く飽和値に達すると考えられる。Cdによる腎機能への障害の起点はまだ明らかにされていないが、Cdによって誘導されたメタロチオネイン（このタン

パク質と結合した Cd は無毒化されるといわれている) が細胞質にたまってしまった結果、各種の代謝が順調に行なわれなくなるとか、メタロチオネインに結合していない Cd が増加し代謝反応を阻害しているとか、Cd による腎機能障害の発症が考えられる。証明されているわけではないが、食餌中の低 Ca, 低 P, 低タンパク質などの影響に対するバランス保持のために、無理な代謝をしている生理状態も推定される。両者合いまってこの低栄養条件下にあるサルでは Cd による腎機能障害が起るのであろう。

血清 β_2 -MG 値; 本実験で測定したサル血清 β_2 -MG のレベルはヒト血清の β_2 -MG 正常レベルとほぼ同じ範囲にあり、3ppmCd 1 年次いで 30ppmCd の計 7 年の飼育期間では血清の β_2 -MG レベルに変動を及ぼすような β_2 -MG の産生はないと考えられる。

水銀などの重金属によって、リンパ球から β_2 -MG が産生されるという報告があり⁴⁰⁾、Cd による効果も推察されるが、本実験では、血清中の Cd 濃度が 100ng/ml に達したような No. 6 群のサル No. 122 でさえも、必ずしも血清中の β_2 -MG のレベルの上昇はみられていない。従って、本実験でみるかぎり、Cd 経口投与サルでは Cd による血清 β_2 -MG の産生の促進はみられない。

尿中 β_2 -MG; Cd 非投与群 (No. 1-No. 4 群) では、尿中への β_2 -MG の漏出はほとんどない。また、Cd 投与群でも正常餌を与えられている No. 5 群および低ビタミン餌の No. 7 群には、ほとんど尿中への β_2 -MG の漏出がみられていない。腎皮質の Cd の蓄積が飽和値となり、Cd の排泄がありながら、 β_2 -MG の漏出がないことは、これらの腎臓はまだ十分に機能し、尿細管性腎機能異常を引き起こしていないといえよう。

低栄養+低ビタミン D 餌 + Cd 群である No. 8 は 9 頭中 3 頭に 1000 μ g/day にも達する β_2 -MG の尿中漏出がみられるので、腎機能異常が出現したと推定される。しかし、No. 5 群と同じ餌でビタミン D の多量投与によってこの β_2 -MG の漏出が消失したことから、発病した

腎障害は極めて軽度のもと考えられる。また、低栄養餌群の No. 6 群でも 48ヶ月経過時点から尿中に β_2 -MG を大量にだす個体が 2 頭出現した。高いレベルは 12000 μ g/day にも達し、腎機能異常の発症が認められたが、後には 600 μ g/day のレベルに低下することもあり、このような増減が繰り返された。従って、Cd の蓄積によって腎障害が発現するとはいえ、その異常の修復が行われていることが示唆された。

尿中への β_2 -MG の漏れは腎の再吸収に異常が生じた結果と推定できる。ここには示していないが、腎機能の検索 (例えばクレアチニンクリアランス、PSP 排出試験、%TRP 並びに生検や剖検検体の病理学的所見など)⁴¹⁾ では、重篤な腎病変がみられなかったことから、この β_2 -MG の尿への漏れは腎の機能異常の初期に観察される生体影響のサインといえる。おそらくこの病状が重篤なものになれば、 β_2 -MG の尿への漏れは持続し、増加傾向を示すであろう。尿細管性腎障害の指標として尿中の β_2 -MG のレベルをとりあげる場合には、断片的でなく、連続的な観察が必要であることがわかる。少なくとも、Cd による腎障害は軽度の場合には修復作用を受けるのではないかと推定される。

尚、イタイイタイ病が経産婦に多い点についてはカルシウム代謝と関係すると考えられるが、今後の検討を要する。

結 論

アカゲザル (メス) 40 頭を正常餌、低栄養餌、低ビタミン D 餌、低栄養+低ビタミン D 餌の 4 種類の餌 [Cd(-) 群] とそれぞれの餌に Cd を初めの 1 年間は 3ppm それ以降は 30ppm 添加した餌 [Cd(+)] 群] で 7 年間にわたり飼育し、Cd による慢性経口投与実験をおこなった。そして血清と尿中の Cd、腎臓中の Cd 測定と開発した β_2 -MG の RIA 法による血清および尿中の β_2 -MG レベルを測定し、Cd による腎機能障害の発現の様子を検討した。

1) 尿中 Cd 排泄; Cd(-) 群では、尿中への Cd 排泄は認められなかった。Cd(+)] 群では、全頭に尿中への Cd 排泄が認められ、低栄養+低ビタミン D 餌 + Cd の群、低栄養餌 + Cd の

群>低ビタミンD餌+Cdの群>正常餌+Cdの群の順序で出現した。長期間にわたる観察結果では低栄養餌の群に200 $\mu\text{g/day}$ を越えるレベルも認められた。

2)血清のCdレベルの変動;Cd(-)群では、血清中にCdはほとんど認められなかった。Cd(+)群でのCdの血清レベルは徐々に上昇し、低栄養+低ビタミンD餌+Cdの群>低栄養餌+Cdの群>低ビタミンD餌+Cdの群>正常餌+Cdの群の順に高かった。

3)腎臓中のCd蓄積;生検や剖検による腎Cd量の測定によれば、Cd(-)群でもわずかながらCdの蓄積が認められた。Cd(+)群では、大量のCdの蓄積がみられ、その飽和値は1000 $\mu\text{g/g}$ 湿重量と考えられた。特に低栄養餌群の方が早く飽和値に達した。

低栄養条件下では摂取したCdの体内への取り込みが増大し、血清中のCdレベルも高くなり、腎臓へのCdの蓄積も早まると推察した。

4)尿 β_2 -MG;Cd(-)の全群、正常餌+Cdおよび低ビタミンD餌+Cdの群にはこの実験期間では尿中への β_2 -MGの漏れはほとんど認められないか、僅少であった。3ppmCd 1年間30ppmCd 6年間にわたる長期間のCd摂取によってもこれらの群のサルでは、尿細管性腎障害につながる腎機能異常は発症していなかった。

低栄養+低ビタミンD餌+Cdの群では36ヶ月頃から、また低栄養餌+Cdの群では48ヶ月頃から多量の β_2 -MGの漏れの認められる個体があった。しかしこの漏れは栄養状態が良くなると消えることや高低を繰り返すことから、腎機能異常が修復されることを物語っている。

5)血清 β_2 -MG値;血清の β_2 -MGレベルはCdの有無や栄養条件の違いによって変動はみ

られず、ヒトの血清 β_2 -MG正常値とほぼ同じ範囲にあった。

以上の結果から、Cd長期経口摂取による腎障害について下記のような推察を行なった。

Cdが添加されていて栄養条件の悪い餌を長期間にわたって経口摂取していたサルは、Cdが添加されているにもかかわらず、栄養条件の良い餌を摂取していたサルに比べて、腎臓により早くCdが蓄積する傾向が認められた。栄養条件の良い場合、腎臓のCd蓄積が飽和値に達し、さらに長期間Cdを摂取しつづけても尿中 β_2 -MGの漏出は観察されなかったが、栄養条件の悪い場合、蓄積飽和値に達してから比較的早い時期から尿中 β_2 -MGの漏出が観察され、尿細管性腎臓障害の発症が予測された。Cdの影響と悪い栄養条件下の生体内環境によりこの腎機能異常が出現したものと考えられるが、 β_2 -MGの漏出が修復されているので、この障害は回復可能であり、従ってまだ軽度であると推定した。

謝 辞

本実験は環境庁の委託実験で「サルにおけるカドミウム投与に対する栄養要因の影響」の一部であり、各班員諸先生方との共同実験によった。特に動物の飼育に関して実験動物中央研究所の谷岡邦功先生の御協力によるものが大きい。

論文を作成するにあたりご助言を賜りました岡山大学医学部公衆衛生学教室の緒方正名教授に感謝いたします。また、研究の機会をお与えいただき、長年にわたってご指導をいただいた元労働省産業医学総合研究所実験中毒部の木村正己博士に感謝いたします。重金属分析にご協力いただいた渡辺真理子さんに感謝いたします。

文 献

1. Berggård I and Bearn A G: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. J Biol Chem (1968) 243, 4095-4103.
2. Nakamuro K, Tanigaki N and Pressman D: Multiple common properties of human β_2 -microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. Proc Natl Acad Sci USA (1973) 70, 2863-2865.

3. Peterson P A, Cunningham B A, Berggård I and Edelman G M: β_2 -Microglobulin-A free immunoglobulin domain. Proc Natl Acad Sci USA (1972) **69**, 1967-1701.
4. Karlsson F A, Groth T, Sege K, Wibell L and Peterson P A: Turnover in humans of β_2 -microglobulin: The constant chain of HLA-antigens. Eur J Clin Invest (1980) **10**, 293-300.
5. Peterson P A, Evrin P-E and Berggård I: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: Determinations of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin, and total protein. J Clin Invest (1969) **48**, 1189-1198.
6. Evrin P-E and Wibell L: Serum β_2 -microglobulin in various disorders. Clin Chim Acta (1973) **43**, 183-187.
7. Kithier K, Čejka J, Belamaric J, Al-Sarraf M, Peterson Jr W D, Vaitkevicius V K and Poulik M D: β_2 -Microglobulin: Occurrence in fetal life and malignancy. Clin Chim Acta (1974) **52**, 293-299.
8. Nakao Y, Matsumoto H, Miyazaki T, Watanabe S, Masaoka T, Takatsuki K, Kishihara M, Kobayashi N, Hattori M and Fijita T: Genetic and clinical studies of serum β_2 -microglobulin levels in haematological malignancies. Clin Exp Immunol (1981) **46**, 134-141.
9. Child J A, Crawford S M, Norfolk D R, O' Quigley J, Scariffe J H and Struthers L P L: Evaluation of serum β_2 -microglobulin as a prognostic indicator in myelomatosis. Br J Cancer (1983) **47**, 111-114.
10. Campos L, Vu Van H, Ville D, Imbert C, Gentilhomme O, Luo V C, Fiere D and Viala J J: Serum beta 2 microglobulin in adult myeloid acute leukemias. Blut (1984) **48**, 221-226.
11. Evrin P E and Ström T: β_2 -Microglobulin and its binding activity in serum from patients with SLE. Ann Rheum Dis (1984) **43**, 267-274.
12. Constantinides I P, Pathouli C, Karvountzis G, Papadopoulos P, Varvoutsis-Constantinides M, Eliakis P, Hadziyannis S and Komninos Z: Serum β_2 -microglobulin in malignant lymphoproliferative disorders. Cancer (1985) **55**, 2384-2389.
13. Alexanian R, Barlogie B and Fritsche H: Beta₂ microglobulin in multiple myeloma. Am J Hematol (1985) **20**, 345-351.
14. Schweizer R T, Moore R, Bartus S A, Bow L and Hayden J: Beta₂-microglobulin monitoring after renal transplantation. Transplant Proc (1981) **13**, 1620-1623.
15. Roxe D M, Siddiqui F, Santhanam S, del Greco F and Wolf J: Rationale and application of beta-2-microglobulin measurements to detect acute transplant rejection. Nephron (1981) **27**, 260-264.
16. Tsuchiya K: Cadmium studies in Japan: A review: Kodansha Tokyo and Elsevier/North-Holland Biochemical Press Amsterdam. New York Oxford (1978)
17. Iwao S, Tsuchiya K and Sakurai H: Serum and urinary beta-2-microglobulin among cadmium-exposed workers. J Occup Med (1980) **22**, 399-402.
18. Elinder C-G, Edling C, Lindberg E, Kagedal B and Vesterberg O: β_2 -Microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium: Follow-up and dose response analyses. Am J Indust Med (1985) **8**, 553-564.
19. 永井謹一, 斎藤 寛, 有川 卓, 斎藤喬雄, 古川洋太郎, 塩路隆治, 古山 隆, 吉永 馨: カドミウム環境汚染地域住民に認められた β_2 -microglobulinuria - カドミウム環境汚染による健康障害の指標として - . 日腎誌 (1977) **14**, 1-11.
20. Natori T, Tanigaki N, Apella E and Pressman D: Amino acid composition and physicochemical properties of mouse β_2 -microglobulin. Biochem Biophys Res Commun (1975) **65**, 611-617.
21. Logdberg L, Ostergren P-O and Berggård I: Rat β_2 -microglobulin. Isolation, properties and relation to β_2 -microglobulin from other species. Mol Immunol (1979) **16**, 577-587.

22. Berggård I: Isolation and characterization of a rabbit β_2 -microglobulin: Comparison with human β_2 -microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* (1974) **57**, 1159-1165.
23. Gates III F T, Coligan J E and Kindt T J: Complete amino acid sequence of rabbit β_2 -microglobulin. *Biochemistry* (1979) **18**, 2267-2272.
24. Ohsawa M and Kimura M: Isolation of β_2 -microglobulin from the urine of patients with itai-itai (ouch-ouch) disease. *Experientia* (1973) **29**, 556-558.
25. Hunter W M and Greenwood F C: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* (1962) **194**, 495-496.
26. Greenwood F C, Hunter W M and Glover J S: The preparation of 131 I-labelled human growth hormone of high specific radio-activity. *Biochem J* (1963) **89**, 114-123.
27. 野村達次, 河合清之: サル第三次実験昭和53年度報告. 環境保健レポート (1979) **45**, 46-53.
28. Evrin P-E and Wibell L: The serum levels and urinary excretion of β_2 -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J Clin Lab Invest* (1972) **29**, 69-74.
29. 金 衡仁, 河合 忠: β_2 マイクログロブリン. 臨床検査 (1977) **21**, 31-36.
30. Cunningham B A, Wang J L, Berggård I and Peterson P A: The complete amino acid sequence of β_2 -microglobulin. *Biochemistry* (1973) **12**, 4811-4811.
31. Groves M L and Greenberg R: Complete amino acid sequence of bovine β_2 -microglobulin. *J Biol Chem* (1982) **257**, 2619-2626.
32. Wolfe P B and Cebra J J: The primary structure of guinea pig β_2 -microglobulin. *Mol Immunol* (1980) **17**, 1493-1505.
33. Ramanathan L, Dubois G C, Robinson E A and Appella E: Purification and characterization of mouse beta-2 microglobulin: Allelic variants from two different strains. *Mol Immunol* (1982) **19**, 435-446.
34. Gates III F T, Coligan J E and Kindt T J: Complete amino acid sequence of murine β_2 -microglobulin: Structural evidence for strain-related polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 554-558.
35. Evrin P-E, Peterson P A, Wide L and Berggård I: Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluids. *Scand J Clin Lab Invest* (1971) **28**, 439-443.
36. 松田 悟: 慢性カドミウム中毒の実験的研究—非水溶性のCd化合物による実験—. 金沢大学十全医学会雑誌 (1968) **76**, 239-253.
37. 阿部登茂子, 田中清介, 糸川嘉則: 実験的カドミウム中毒に関する研究(2)低たんぱく質, カルシウム欠乏がラットのカドミウム中毒に及ぼす影響. 日衛誌. (1972) **27**, 308-315.
38. Itokawa Y, Abe T, Tabei R and Tanaka S: Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning: histological and biochemical approaches. *Arch Environ Health* (1974) **28**, 149-154.
39. Suzuki Y: Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. *J Toxicol Environ Health* (1980) **6**, 469-482.
40. Ohsawa M and Kimura M: Enhancement of β_2 -microglobulin formation induced by phytohemagglutinin and mercuric ion in cultured human leucocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (1979) **91**, 569-574.
41. 野村達次, 谷岡功邦, 谷本義文, 木村正己, 田崎 寛, 出口修宏, 須田立雄, 吉木周作, 畠 亮: サルにおけるカドミウム投与に対する栄養要因の影響 (サル第三次実験昭和59年度報告). 環境保健レポート (1986) **51**, 39-96.

**Serum and urinary β_2 -microglobulin levels of monkeys orally
exposed to cadmium under malnutritional conditions**

Noriko OTAKI

**Department of Public Health, Okayama University Medical School,
2-5-1 Shikata-cho, Okayama Japan**

(Director: Prof. M. Ogata)

Urinary and serum cadmium levels as well as cadmium contents in kidneys of female rhesus monkeys given a cadmium (Cd)-containing diet and subjected to malnutrition were slightly elevated during the experimental period of 7 years. Particular, greater excretion of cadmium in urine, elevation of serum cadmium and greater accumulation of cadmium in kidneys were observed early in the malnutritional groups (groups No. 6, 7 and 8) as compared to the basal diet group (group No. 5). One monkey in the low-nutritional and low-vitamin D group fed with Cd (group No. 8) accumulated over 1000 μg of Cd per g wet weight in the kidneys even at 36 months.

No remarkable changes in serum β_2 -microglobulin were observed in the Cd-treated groups (group No. 5 to No. 8) nor in the non-Cd treated groups (groups No. 1 to No. 4) during the experimental period. Although no significant leak of urinary β_2 -microglobulin was seen among the basal diet group fed with Cd (group No. 5), the basal diet and low-vitamin D group fed with Cd (group No. 7) and the non-Cd treated group (groups No. 1 to No. 4), much urinary β_2 -microglobulin began to leak at 36 months in the low-nutritional and low-vitamin D group fed with Cd (group No. 8) and at 48 months in the low-nutritional group fed with Cd (group No. 6).

The high levels of urinary β_2 -microglobulin seen in group No. 8 reverted to normal with medical treatment, and the high levels observed in group No. 6 sometimes decreased. These observations suggest mild renal dysfunction among the malnourished monkeys (groups No. 6 and No. 8) exposed to Cd.