

ラットに気管内投与した酸化カド
ミウムの代謝的動態と生体反応

平野靖史郎

①

論文題目

ラットに気管内投与した酸化カドミウムの代謝的動態と生体反応

学位申請者

平野 靖史郎

(国立公害研究所環境保健部

人類生態研究室)

本博士論文の内容は以下の通り発表した。

- 1) S.Hirano, N.Tsukamoto, E.Kobayashi and K.T.Suzuki(1989)
Toxicity of cadmium oxide instilled into the rat lung. I.
Metabolism of cadmium oxide in the lung and its effects on
essential elements. Toxicology, 55, 15-24.
- 2) S.Hirano, N.Tsukamoto, S.Higo and K.T.Suzuki (1989)
Toxicity of cadmium oxide instilled into the rat lung. II.
Inflammatory responses in broncho-alveolar lavage fluid.
Toxicology, 55, 25-35.
- 3) S.Hirano, N.Tsukamoto and K.T.Suzuki (1989) Biochemical
changes in the rat lung and liver following intratracheal
instillation of cadmium oxide. Toxicol. Lett., in press.

また、以下の論文の内容の一部を本論文の参考論文として考察の章
において用いた。

- 4) S.Hirano, S.Higo, N.Tsukamoto, E.Kobayashi and K.T.
Suzuki (1989) Pulmonary clearance and toxicity of zinc
oxide instilled into the rat lung. Arch. Toxicol., 63,
336-342.
- 5) 平野靖史郎、鈴木和夫 (1989) "総説" 肺に沈着した重
金属の代謝的動態と影響. 衛生化学, 35, 241-260.

目次

1. 略語	----- 3
2. 緒言	----- 5
2-1 重金属エアロゾル	
2-2 経気道曝露したカドミウムの生体影響	
3. 実験方法	----- 11
3-1 酸化カドミウムの調製	
3-2 使用動物	
3-3 投与方法	
3-4 カドミウムならびに必須元素濃度の測定	
3-5 肺の炎症指標の測定	
3-5-1 気管支肺胞洗滌法	
3-5-2 洗滌液に回収された細胞学的指標の測定	
3-5-3 洗滌液に回収された生化学的指標の測定	
3-6 抗酸化防御系に因与する生体物質の測定	
3-6-1 臓器灌流法	
3-6-2 テオール化合物の測定	
3-6-3 抗酸化防御系酵素の測定	
3-7 検定	
4. 実験結果	----- 24
4-1 酸化カドミウムの体内動態	
4-2 肺の必須元素濃度の変化	
4-2-1 肺組織の必須元素濃度の変化	
4-2-2 気管支肺胞洗滌液中の必須元素濃度の変化	
4-3 気管支肺胞洗滌液中の炎症指標の経時変化	
4-4 気管支肺胞洗滌液中の炎症指標の用量影響の変化	
4-5 肺の抗酸化防御系の変化	

4-6 肝臓の抗酸化防御系の変化

5. 考察	----- 57
5-1 酸化カドミウムの肺クリアランスと体内動態	
5-2 肺組織の元素濃度の変化	
5-3 気管支肺胞洗滌液所見によるカドミウムの肺毒性 の評価	
5-4 酸化カドミウムを気管内投与したラットにおける 生体防御反応	
5-5 重金属間の肺毒性の比較における本研究の意義	
6. 結語	----- 78
7. 謝辞	----- 79
8. 参考文献	----- 80

1 . 略 語

動力学的重量基準中央径 (mass median aerodynamic diameter)	MMAD
重量基準中央径 (mass median diameter)	MMD
酸化カドミウム	CdO
塩化カドミウム	CdCl ₂
肺胞マクロファージ	AMΦ
多形核白血球	PMN
乳酸脱水素酵素	LDH
β-グルクロニダーゼ	β-Glu
エチレンジアミン四酢酸	EDTA
アジ化ナトリウム	NaN ₃
還元型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチド	NADH
還元型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリニン酸	NADPH

酸化型ニコチンアミドアデニン	
ジヌクレオチドリリン酸	NADP ⁺
メタロチオネイン	MT
還元型グルタチオン	GSH
酸化型グルタチオン	GSSG
グルコース6リン酸脱水素酵素	G6PDH
グルタチオンペルオキシダーゼ	GPx
グルタチオンリダクターゼ	GR
スーパーオキシサイドジスムターゼ	SOD

2. 緒言

2-1 重金属エアロゾル

成人の気管支肺胞表面は呼吸にともない1日に $10 \sim 15 \text{ m}^3$ の空気と接している。この体積は、空気の平均分子量(約29)と 25°C 、1モルの気体の体積(約24.5)を用いて重量に換算すると $12 \sim 18 \text{ kg}$ に相当する。食事等により経口的に摂取する食物や飲物の量が数 kg 程度であることと比較すると、経気道の曝露により体内に取り込まれる有害物質は、たとえその濃度が低くても相当な量に上るものと推定される。したがって、腸管吸収率の低い物質では、呼吸器からの体内への取り込み量が腸管からの取り込み量を上回る場合も考えられる。さらに、肺胞域に沈着した物質の吸収率がほぼ100%であると考えられることから、経気道曝露した有害物質に関する毒性学的研究は、第一標的臓器である呼吸器への影響のみならず、肺に沈着した物質の他の臓器への移行と影響についても合わせてなされるべきである。

経気道的に曝露する汚染物は、大きくガス状物質と粒子状物質に分けられるが、Cdなどの重金属類は、大気環境中ではそのほとんどが粒子状物質として存在する。また、粒子状物質はその発生過程の違いにより次の3つに分類することができる。

① ダスト

： 破砕により生ずる1次粒子(例 アスベスト、フライアッシュ、炭粉、火山灰など)

② ミスト

： 霧化により生じる液滴粒子(例 硫酸ミスト、水和剤など)

③ ヒューム

： 蒸気の凝縮や凝集により生ずる粒子(例 各種金属酸化物、多環芳香族化合物など)

これらの粒子状物質は、空気を分散媒としそのコロイド状態が安定である時、浮遊粒子状物質(粒径 $10 \mu\text{m}$ 以下)またはエアロゾ

ルと呼ばれる。大気環境中の浮遊粒子状物質の粒径分布は $2\mu\text{m}$ を境にして二峰性を示し、一般にダストは粗粒子に、ミストとヒュームは微粒子に属する。

粒子状物質の呼吸器への影響をはじめとする毒性学的研究には、ガス状物質に比べ未解決の部分が多い。これは、ガス状物質に比べ粒子状物質を構成する化学物質の種類がはるかに多いこと、前述の①～③に示したように、粒子状物質と言ってもその発生過程や物理化学的諸性質が異なること、さらに毒性を評価する上で濃度のみならず粒径も合わせて考慮する必要があるなどの理由による。

粒子状物質の生体影響に関する実験的研究は、実際われわれが曝露する状況から考えると低濃度慢性吸入実験によって行われるべきである。しかし、慢性吸入実験には多大の労力と時間が必要とされることから、多くの種類の粒子状物質の毒性を調べたり、同じ条件下で用量影響関係を求めたりする研究には必ずしも適しているとは言えない。さらに、曝露装置の制約などもあり、吸入実験の実施には困難が伴うことが多い。一方、カニューレを用いて、試料を直接小動物の肺に注入する気管内投与法は、肺に沈着した物質の生体内挙動において、高濃度急性吸入実験の結果と良い一致を示すことが知られており[1,2]、簡便かつ経済的である上、生体への負荷量を特定できるという利点がある。以上の理由により、本研究では、カドミウム化合物のラットへの経気道曝露方法として気管内投与法を用いた。

ところで、カドミウムは最も毒性が高い重金属の一種あることが知られている。重金属とは、比重 4.0 または 5.0 以上の比較的比重が大きい金属元素の総称であり、また、その多くは生体に及ぼす影響が大きいことから、毒性学研究者の注目を集めてきた。一般大気環境や労働環境において、人が経気道的に曝露される重金属の多くは、粒子状物質の分類(前述)で示したダストとヒュームに属する。経気道曝露した重金属化合物の呼吸器への影響を論じた実験毒性学的研究例数は、静脈内や経口投与などの非経気道曝露による毒性研究例に比べ少ないが、ニッケル(Ni)、クロム(Cr)、バナジウム(V)、マンガン(Mn)、鉛(Pb)、カドミウム

(Cd) に関してはある程度情報を得ることが可能である。これら6種の重金属の肺毒性に関する研究例が多いのは、労働環境において曝露される機会が多いばかりでなく、化石燃料の燃焼にともない排出されたり(Ni, V, Mn)、自動車排ガス(Mn, Pb)やタバコ(Cd, Ni)に多く含まれること、さらには発癌性(Ni, Cr, Cd)が疑われることに起因しているものと考えられる。

2-2 経気道曝露したカドミウムの生体影響

一般人におけるCdの取り込みは、これまで主として食物由来であると考えられてきた。しかし、経気道曝露により体内に取り込まれるCd量は、土壌や飲料水のCd汚染が減少した現在では、体内への全取り込み量のかなり大きな部分を占めているものと推定される。例えば、タバコ1本には約 $1\mu\text{g}$ のCdが含まれており、20本喫煙することにより $1.5\mu\text{g}$ のCdが肺に沈着すると考えられている[3,4]。また、喫煙者の血中Cd濃度は非喫煙者の約1.5倍であり[5]、喫煙習慣のある妊婦の羊水中のCd濃度は非喫煙妊婦の約2.8倍であることが報告されている[6]。さらに、自動車排ガスや、精錬、溶接などの工程が大気中のCdの主たる発生源であり、全世界における大気中Cdの発生総量は年間約7,500トンと見積られている[7]。従って、経気道曝露したCdの生体内挙動を調べ毒性を評価することは、単に中毒学研究的発展のためだけではなく、大気汚染物質のヒトへの影響を考えるうえでも重要な意味をもっている。

経気道曝露したCdのヒトへの影響としては、偶発的に高濃度吸入した作業者に急性肺臓炎や金属ヒューム熱が、また、慢性吸入曝露によって肺気腫や肺線維症が起こることなどが報告されている[8-10]。一方、経気道曝露したCdに関する実験毒性学的研究は、肺に沈着したCdの体内動態を論じたものと呼吸器への影響を論じたものとに大別できる。

Oberdoersterらは、 $760\sim 930\mu\text{g Cd}/\text{m}^3$ の濃度のCdO(MMAD=0.46 μm)とCdCl₂(MMAD=0.36 μm)のエアロゾルをラ

ットに45分間吸入させCdの肺クリアランス速度を求めたところ、CdOとCdCl₂では半減期がともに67日であったと述べている[11]。この実験では、曝露直後の肺のCd負荷量は0.67~0.83μgCd/ラットであったと報告されている。また、Biossetらは、粒径が約1μm、濃度が9.43mg/m³のCdOエアロゾルを、1日あたりの曝露時間を30分間とし、連続5日間ラットに吸入させCdの肺クリアランス速度を調べたところ、曝露中止直後のCdの肺内沈着量は、17.5μgCd/ラットで、肺におけるCdの半減期は56日であったと報告している[12]。これら二つの報告は、何れも肺におけるCdの半減期は比較的に長いという結論に達している。しかし、MMD=0.39~0.43μmのCdCl₂エアロゾルを0.85mg/m³の濃度でラットに2時間曝露した直後の肺のCd濃度は、1.85μg/g-tissueで、6日後には1.0μg/g-tissueとなったという報告[13]、MMADが0.5~1.5μmで、濃度が4.5mg/m³のCdOまたはCdCl₂エアロゾルをラットに曝露して、曝露終了3日後における肺のCdの残存率を調べたところ、それぞれ54%と42%であったという報告[14]は、肺におけるCdの半減期は数日ないしは10日程度であることを示唆している。さらに、粒径が1μm以下のCdOを15μg/ラット(約13μgCd/ラットに相当)の用量で気管内投与したところ、1日後にはすでに投与量の24%に相当するCdしか肺に残存していなかったとの報告[15]や、ラットに0.25mg/kg体重(約60μgCd/ラット)の用量でCdCl₂を気管内投与してCdの体内動態を調べたところ、12時間後には投与量の64%に相当するCdが肝臓に移行していたという報告[16]、CdO(粒径4.4μm)とCdCl₂を1mgCd/ラットの用量で気管内投与したラットでは、両実験群ともに投与90分後には肺のCdの残存率が初期沈着量の半分に減り、CdOの肺クリアランス速度はCdCl₂より少し遅かったと報じた研究[17]は、肺におけるCdの半減期は1日以下であることを示唆している。

上述の研究報告例において、Cdの肺クリアランス速度に著しい

不一致（数時間～67日）が見られる。しかし、これら報告例における曝露直後の肺のCd負荷量を検討すると、肺が保持できるCd量には一定の限界があり、その限度をこえるとCdの肺クリアランスは急に速くなること、および、Cdの繰り返し曝露により肺が保持できるCd量の最大値が上昇することなどが推定される。さらに、不溶性のCdOも肺において可溶化される可能性が示唆されており、肺でのCdOの代謝を詳しく調べる必要があるものと考えられる。

一方、経気道曝露したCdの肺への影響についての研究は、様々な視点よりなされている。高濃度急性吸入曝露あるいは一回気管内投与した実験においては、肺の傷害と炎症およびそれに伴う肺組織の増殖についての報告[18-27]、コラーゲン合成能の上昇についての報告[28-30]、リン脂質合成能の変動に関する報告[31,32]、抗酸化防御系酵素の変動についての報告[14,26,32-35]、感染抵抗性の低下[36]や、AMφの機能低下についての研究報告[37,38]、コハク酸脱水素酵素、シトクロムcオキシダーゼ活性の低下とマレイニン酸脱水素酵素活性の上昇などミトコンドリア酵素活性の変動[13,39,40]や、薬物代謝能により調べたミクロソーム酵素活性の低下についての報告[41-43]などが見られる。また、低濃度慢性吸入実験、あるいは繰り返し気管内投与を行った実験においては、CdOの投与によりラットに良性の肺腫瘍が生じたが肺癌は生じなかったという報告[44]、ラットに12.5、25、50 $\mu\text{g Cd}/\text{m}^3$ の濃度のCdCl₂を18ヶ月間曝露することにより用量依存的に肺癌が生じたという報告[45]、さらに、肺胞壁の肥厚によりガス交換能が低下し、血中酸素分圧の低下と炭酸ガス分圧の上昇がみられたという報告[46]などがある。

一方、Cdの曝露により、肝臓や腎臓などでチオール基が豊富な低分子量蛋白質であるMTの合成が促進され、合成されたMTは、Cdイオンをキレートすることにより生体防衛的役割を果たしていることは広く知られているが[47]、Cdの経気道曝露により、肺においてもMTが誘導合成されることが報告されている[19,28,48-50]。

これらのCdの肺毒性についての報告は、Takenakaら[45]の発癌実験を除いては用量影響関係がはっきりせず、肺におけるCdの許容量は依然不明のままである。また、個々の研究は断片的であり、肺におけるCdの毒性発現機構やCdに対する生体防御機構は明らかにされていない。

以上の点をふまえ、本研究では肺に沈着したCdOの代謝的動態と肺毒性に関連した生体反応、ならびに生体防御反応を一連の実験において捉え、特に、以下に示した3点のことを中心に議論を展開した。

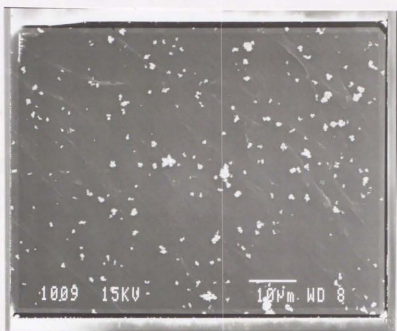
- ① CdO（不溶性）とCdCl₂（水溶性）のラット肺からの消失過程を調べ、肺に沈着したCdOの代謝機構ならびに体内動態を明らかにする。
- ② 気管支肺胞洗滌液に回収される炎症指標の用量影響関係を調べることにより、経気道曝露したCdOに対してラット肺が生理的生体反応を示し得る最大用量を求める。
- ③ CdOを気管内投与したラットにおいて、肺と肝臓におけるMTの生成ならびに抗酸化防御反応を調べ、経気道曝露したCdに対する生体防御機構を明らかにする。

3. 実験方法

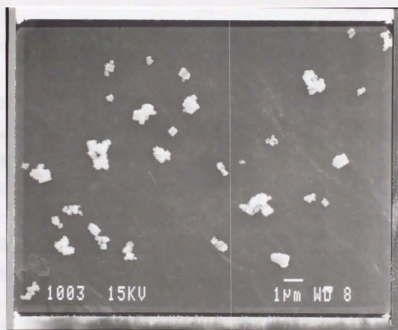
3-1 酸化カドミウムの調製

実験に用いたCdO粒子は、市販の特級試薬（関東化学）をボールミル（遊星型微粉砕機 P-7, フリッツェジャパン）にて5分間細粒化したものである。CdOの粒子は、水や生理食塩水中では安定した懸濁状態にはならず凝集してしまうことが確認されたので、100%のプロピレングリコール（特級、和光純薬）中に懸濁し保存した。懸濁保存液は、超音波洗浄器内で十分CdO粒子を分散させた後20分間放置し、その後、デカンテーションにより大きな粒子を除去し、さらに、目的の濃度になるようにプロピレングリコールで希釈したものである。懸濁保存液の一部をメンブレンフィルター（pore size=0.03 μ m, Nuclepore Co., Pleasanton, CA, USA）で濾過し、走査型電子顕微鏡（JSM-840, 日本電子）で粒径を測定した結果をFig. 1に示した。ここで得られたCdO粒子は球形ではなかったので、定方向径（グリーン径）を求めたところ、粒径はすべて2 μ m以下であった。また、CdOの比較実験において用いたCdCl₂投与液は、市販の特級試薬（和光純薬）を滅菌生理食塩水に溶解し、目的の濃度となるように調製した。

Fig.1 Scanning electron micrographs of CdO particles collected on a Nuclepore filter (pore size = 0.03 μ m). A micron marker [(a) 10 μ m, (b) 1 μ m] was shown in the lower right-hand side of each picture.



(a)



(b)

3-2 使用動物

使用した動物はすべて日本クレアより購入した Wistar 系雄性ラットである。ラットは、10週齢のもの（平均体重 270g）を一群3匹として用いたが、3-3に示した抗酸化防御系に関する実験では8-9週齢のラット（平均体重 215g）を一群4匹として用いた。一部の実験を除き、実験期間中ラットには餌と水は自由に摂取させた。

3-3 投与方法

ラットへのCd懸濁液またはCdCl₂溶液の投与はすべて気管内投与法を用いた。CdOの投与には3-1に示したCdO懸濁保存液を、投与直前に99倍量の蒸留水と混和したものをを用いた。ただし、後述の10μgCd/ラット用量の投与液は1%プロピレングリコール中では懸濁状態が不安定で、粒子の凝集が観察されたので、49倍量の蒸留水と混和し用いた（2%プロピレングリコール溶液となる）。気管内投与にあたっては、まず、ラットをエーテル麻酔し、片側に試料導入用のタイゴンチューブを付けた長さ10cmのポリエチレンカニューレ（No.5、ヒビキ）を気管に挿入した。次に、あらかじめ0.5mLの空気をいれた1mLの注射用シリンジに0.4mLの投与液を吸引し、カニューレの先に付けたタイゴンチューブより試料を気管に注入した。試料の注入はラットの呼吸に合わせ吸入時に瞬時にを行い、続いて注入時のショックによって起こる無呼吸による死亡を防ぐため、小動物用人工換気装置（SN-480-7、シナノ製作所）を用いて約10秒間陽圧換気を行った。対照群には、1%と2%のプロピレングリコール溶液、または生理食塩水をそれぞれ0.4mL投与した。

3-4 カドミウムならびに必須元素濃度の測定

CdOまたはCdCl₂を気管内投与したラットは、経時変化観察群では5μgCd/ラットの用量を注入後、0.5、3、12時間、1、2、3、7日後に、用量影響観察群では0.5、1、2、5、10μgCd/ラットの用量を注入後、2日後に解剖し、肺、

肝臓と腎臓を摘出した。対照群のラットは投与2日後に解剖した。

肺は、気管支肺胞洗滌（後述 3-5-1）後、20% ホモジネートを調製しその1 mLを、肝臓と腎臓は約0.25 gの組織を切取った後秤量し、それぞれ試験管に入れた。試料に、0.5~1 mLの混酸（ $\text{conc. HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 5 : 1$ ）を加えた後、ドライブロックバス（130℃）中で無色透明の液体となるまで約2日間湿式灰化した。硝酸と過塩素酸は重金属測定用のもの（和光純業）を使用した。気管支肺胞洗滌液は上清とペレットに分け（後述 3-5-1）、ペレットの一部は同様に湿式灰化した。灰化試料は純水にて2.5または5 mLに定容した。これら試料と気管支肺胞洗滌液上清（無処理）のCd濃度ならびに生体必須元素であるイオウ（S）、リン（P）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）、銅（Cu）、亜鉛（Zn）濃度を、プラズマ発光分光法分析器（JY48PVH、セイコー電子）を用いて測定した。

3-5 肺の炎症指標の測定

肺の炎症指標の測定は、最も感度が優れていると考えられる気管支肺胞洗滌液中の細胞数、酵素活性や蛋白質量を測定することにより行った。気管支肺胞洗滌に用いた肺は、3-4で述べた灰化用のものと同じ試料である。

3-5-1 気管支肺胞洗滌法

ラットを脱血死せしめた後、肺を心臓、気管や胸腺を付けたまま傷をつけないように取り出し、プロットングの後重量を測定し、60°に傾斜した台に保定した。三方活栓を用いて、37℃にインキュベートした6~7 mLの5 mMのトリス塩酸緩衝液（pH 7.4、0.25 Mのグルコース含有）をシリンジより気管を通して肺に注入し、別のシリンジに洗滌液を回収するという操作を繰り返した。この操作は35 mLの洗滌液が回収されるまで行い、洗滌液は氷冷したコニカルチューブ（Falcon 2070, Becton Dickinson Labware, CA）に入れた。この操作をもう一度繰り返し、全体で70 mL（35 mL×2本）の気管支肺胞洗滌液を得た。

肺組織は肺門部より切り取り、残りの心臓、気管、胸腺はまとめてブロッティングの後、重量を測定した。肺湿重量は、洗滌前の胸腔内全臓器重量より洗滌後の肺以外の組織の重量を差し引くことにより求めた。

洗滌液は、650 gで5分間遠心し(4℃)、上清とペレットに分離した。上清は最初に回収した35 mLから得たものを元素濃度(前述 3-5-4)と生化学的指標の測定(後述 3-5-3)に用い、ペレットは2本の遠沈管より得られたものを洗滌用緩衝液で2 mLの懸濁液とし、元素濃度(前述 3-5-4)と細胞数の測定(後述 3-5-2)に用いた。

3-5-2 洗滌液に回収された細胞学的指標の測定

3-5-1で得られたペレット懸濁液(2 mL)のうち、1 mLを遠心(650 g、5分間、4℃)し、上清を捨てた後、150 μMのNH₄Cl液(10 mMのKHCO₃を含む)を1 mL加え、混入している赤血球を溶血させた。さらに遠心操作を繰り返し、ペレットを一定量のダルベッコのリン酸緩衝液(Ca、Mg不含)に懸濁させた後、懸濁液の一部を血球計算盤(Burker-Turk型)に入れ全細胞数を数えた。残りの懸濁液は遠心後、ペレットを非動化(56℃、30分間)した氷冷牛胎児血清に懸濁させスライドガラスに塗抹した。これを、Write液(1分間)、20倍希釈したGiemsa液で染色し(15分間)検鏡した。細胞は、AMφ、リンパ球、PMN(大部分は好中球で一部好酸球も見られた)に分けて数え、気管支肺胞洗滌液中に回収された各細胞総数として表示した。リンパ球の同定は特に曝露群では難しく、他の方法(たとえば非特異的エステラーゼ染色)によらなければはっきりしないと考えられたので、本研究ではデータとしては示さなかった。

3-5-3 洗滌液中に回収された生化学的指標の測定

3-5-1で得られた気管支肺胞洗滌液(35 mL)の上清を用いてLDHとβ-Glu活性ならびに蛋白質量を測定した。LDHは凍結融解により活性を失うことが知られているので解剖当日に測定し、

β -Glu 活性と蛋白質量は -20°C で保存した後、解剖日より2週間以内に測定を行った。

LDH 活性の測定は、市販の分析用キット (LDH-UV Test Wako, 和光純薬) を用い、Wroblewski と LaDue [51] の方法にしたがって行った。ウォータージャケットを装着した分光光度計 (UV-260、島津製作所) にセルを入れた後 35°C に加温し、分光光度計は Time-Course Mode で測定波長を 340nm に設定した。セルの中にあらかじめ 35°C にインキュベートした基質液 (0.1M のリン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 中に $200\mu\text{M}$ の NADH と 0.72mM のビルビン酸を含む) を 2.5mL 入れ、数分後、 35°C にインキュベートした気管支肺胞洗滌液上清を 0.2mL 入れよく攪拌した。吸光度が安定してから、NADH の減少にもとづく吸光度の変化を5分間測定し記録した。気管支肺胞洗滌液上清中の LDH 活性は、洗滌液 35mL 中の全 LDH 活性値として求め国際単位 ($\text{IU}/35\text{mL}$) で表わした。計算には、NADH のモル吸光係数 6220 と 25°C への温度補正係数 2.04 を用いた。

β -Glu 活性は、Lockard と Kennedy [52] の方法にしたがって測定した。あらかじめ 37°C にインキュベートした基質液 ($1/15\text{M}$ 酢酸緩衝液 ($\text{pH } 4.5$) 中に 2.0mM の p -ニトロフェニル- β -D-グルクロニド (N1627, Sigma, St. Louis, MO, USA) を含む) 2.5mL に気管支肺胞洗滌液上清を 0.5mL 加えて 37°C で4時間インキュベートし、氷冷した 0.2N の NaOH 溶液 1mL を加え反応を終了させた後、波長 420nm での吸光度を測定した。標準曲線は基質液のかわりに 50 と $100\mu\text{M}$ の p -ニトロフェノールを含む緩衝液 2.5mL を用いて作製した。 37°C で1分間に $1\mu\text{mole}$ の p -ニトロフェノールを基質より遊離させる β -Glu の活性を1単位と定義し、気管支肺胞洗滌液中の β -Glu の活性は LDH 活性同様、 35mL 中の全 β -Glu 活性値 ($\text{mU}/35\text{mL}$) として表わした。 $100\mu\text{M}$ の標準液を用いたときの吸光度は 0.825 であった。

気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質量は、市販のプロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて行った。

気管支肺胞洗滌液上清 0.1 mL に水で 5 倍希釈した測定用試薬 5 mL を加えよく攪拌し、5 分間室温で放置した後、波長 595 nm で吸光度を測定した。標準曲線は、0.144、0.228、0.720 mg/mL の Bovine Plasma Albumin (Bio-Rad) 溶液を用いて作製した。気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質量は、35 mL 中の全重量としてあらわした。

3-4 と 3-5 で述べた操作手順を Fig. 2 に示した。この図において、気管支肺胞洗滌液中のリン (P) 含量は、サーファクタント量を示していると考えられるので (後述 3-3)、元素濃度ではなく生化学的指標に含めてある。

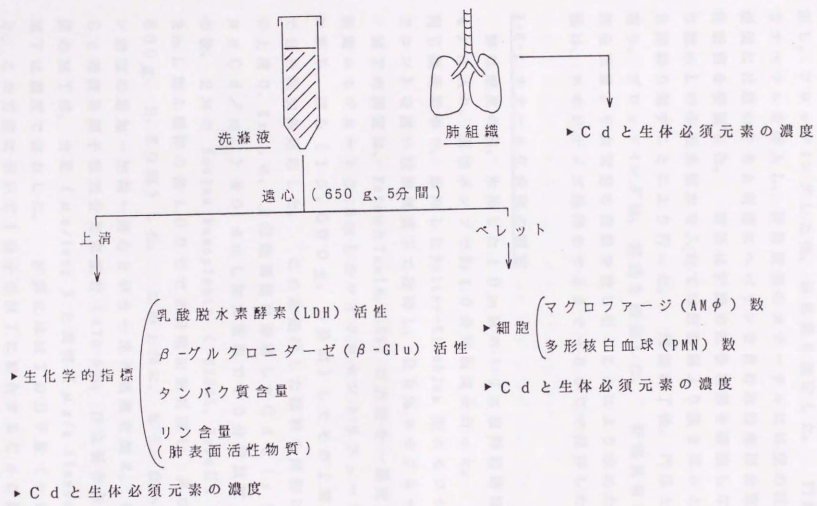
3-6 抗酸化防御系に關与する生体物質の測定

CdO を気管内投与した後、肺と肝臓の抗酸化防御系に關与する生体物質の量や活性の測定を行ったが、ここで測定した項目のうち GSH、GSSG ならびに酵素などは赤血球にも多く含まれていることが知られているので、これらの臓器は灌流により血液を除去した後、試料調製を行った。

3-6-1 臓器灌流法

胸腔内の全臓器を傷をつけないように気管を付けたまま取り出し、プロテイングの後、重量を測定した。大動脈を止血鉗子で止め、右心室より氷冷した生理食塩水 (ヘパリンを 1,000 U/L 含む) を注射器で入れ、肺が十分拡張したところで鉗子を緩めるという操作を肺が白くなるまで繰り返した。灌流後、肺組織を切取り、3-5-1 と同様の方法で肺湿重量を求めた。

Fig. 2 Diagrammatic representation of the experimental method. The bronchoalveolar lavage was performed by repeated instillation and withdrawal of 5mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.25 M glucose with each volume of 6-7 mL.



肝臓は、門脈と肝静脈を付けたまま傷を付けないようにして取り出し、ブロットイングした後、湿重量を測定した。門脈と肝静脈にカテーテルを挿入し、肝静脈側のカテーテルには空の注射筒を、門脈側には肺のときと同様にヘパリンを含む氷冷生理食塩水を入れた注射筒を接続した。灌流は肝臓の拡張状態を確認しながら門脈より数 mL の生理食塩水を入れては肝静脈より抜き取るという操作を3回繰り返すことにより行った。灌流終了後、門脈と肝静脈を切り、ブロットイング後、重量を測定した。肝湿重量は灌流前の臓器全重量より血管分の重量を差し引くことにより求めた。肺と肝臓は、ホモジナイズ処理をするまで -80°C で保存した。

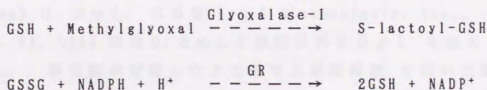
2-6-2 チオール化合物の測定

肺は解凍の後、氷冷した 10mM のトリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) に入れ、真空ポンプで約 10 分間脱気を行った。肺と肝臓は同じ緩衝液中で、氷冷したPotter-Elvehjem型ホモジナイザー(テフロン)を用い窒素気流下で磨砕し、 20% ホモジネートとした。

MTの測定は、EatonとToalら[53]の方法を一部変更して行った。組織ホモジネート 0.8mL をマイクロセントリフュージチューブに取り、遠心($10,000\text{g}$ 、 5 分間)してその上清を 100°C で 2 分間加熱処理した。この熱処理した試料を同様に遠心し、その上清 0.4mL に、上記緩衝液に溶解した CdCl_2 溶液 ($2\mu\text{g Cd/mL}$)を 0.4mL 加え室温で 10 分間放置した。その後、 2% のBovine Hemoglobin (H2625, Type II, Sigma)を 0.2mL 加え攪拌の後 100°C で 2 分間加熱処理し、再び遠心($10,000\text{g}$ 、 2.5 分間)した。この上清に、もう一度ヘモグロビン溶液の添加-加熱-遠心という一連の処理を加え、その上清中のCd濃度を原子吸光分光光度計($170-50\text{A}$ 、日立製作所)で測定した。肺のMTは、含量($\mu\text{g/lung}$)と濃度($\mu\text{g/g tissue}$)で、肝臓のMTは濃度で表わした。計算にはMTの分子量($=6,000$)と、この方法において1分子のMTに結合するCdの原子数($=6$)を用いた。

GSHとGSSGの測定は、BerntとBergmeyer[54]の方法に準

じて行った。組織ホモジネート 1 mL を 5 分間煮沸した後氷冷し、10% のトリクロロ酢酸溶液を 10 μ L 加え、10,000 \times で 5 分間遠心した。この上清 0.3 mL を予め 37 $^{\circ}$ C に加温した分光光度計 (波長を 240 nm に設定) のセルに入れ、さらに、0.25 M のリン酸緩衝液 2.5 mL、1% の Egg Albumin (A5503, grade V, Sigma) 溶液 0.2 mL と 250 μ g protein/mL に調製した Glyoxalase-I (G4252, Grade IV, Sigma) 20 μ L を加え攪拌の後数分放置した。加えた溶液は、予め 37 $^{\circ}$ C にインキュベートしておいた。吸光度が安定したところで 0.1 M の Methylglyoxal (Fluka, Buchs, Switzerland) を 20 μ L 加え 5 分間吸光度の変化を測定した。さらに 0.1 M の Methylglyoxal 20 μ L を加え、Methylglyoxal の添加そのものに基づく吸光度の上昇分を記録した。次に測定波長を 340 nm とし、1% の NaHCO₃ に溶解した 15 mM の NADPH (N1630, Type I, Sigma) 溶液を 20 μ L 加え攪拌した。吸光度が安定したところで、1.1 mg protein/mL に調製した GR (G4759, Type IV, Sigma) を 10 μ L 加え、NADPH の減少に基づく吸光度の減少を 3 分間測定した。以上に述べた操作の過程を化学反応式で示すと次のようになる。



GSH と GSSG はそれぞれ mg と μ g で表わし、肺の GSH は臓器全体の含量とグラム組織当りの濃度で、肝臓の GSH と GSSG は濃度として表わした。肺の GSSG は濃度が低く、本方法では正確な数値を出すことができなかったためデータとして示さなかった。

2-6-3 抗酸化防御系酵素の測定

肺と肝臓のホモジネートの一部を 4 $^{\circ}$ C、100,000 \times で 60 分間超遠心し、その上清を用いて G6PDH、GPx、GR、SO

Dの活性を測定した。それぞれの酵素活性は、肺では臓器全体とグラム組織当りの活性として、肝臓ではグラム組織当りの活性として示した。

G6PDH活性の測定は London [55]の方法に従って行った。測定用セルや試薬溶液は予め25℃に加温しておいた。セルの中に、水に溶解した25mMのグルコース6リン酸 (G7250, Sigma) 溶液0.1mL、0.2MのMgCl₂ 溶液0.1mL、2mMのNADP⁺ (N0505, Sigma) 溶液0.1mL、1Mのトリス塩酸緩衝液0.1mLと水を2.5mL入れ攪拌した。吸光度が安定したところで試料0.1mLを加え攪拌後、波長340nmで、NADPHの生成に基づき吸光度の上昇を測定した。25℃で1分間に1μmoleのNADPHを生成することのできるG6PDH活性を1単位(1U)と定義した。

GPx活性の測定は、PagliaとValentine [56]の方法に従い測定した。分光光度計は、G6PDH活性の測定時と同様に設定した(25℃、波長340nm)。セルの中に、4.0×10⁻³MのEDTAを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)を1.58mLと、上記緩衝液に溶解した0.01MのNaN₃ 溶液0.3mL、NADPH溶液0.3mL、10U/mLとしたGR (Sigma) 0.3mL、GSH (P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee, WI, USA) 溶液0.3mLと測定試料20μLを加えよく攪拌した。吸光度が安定したところで上記緩衝液を用いて調製した5.0mMのH₂O₂溶液0.1mLを加え攪拌の後、NADPHの減少に基づき吸光度の減少を測定した。GPx活性1単位は、25℃で1分間に1μmoleのNADPHを酸化することのできる活性と定義した。

GR活性の測定は、Packer [57]の方法に準じて行った。分光光度計の設定はG6PDH活性の測定時と同様である。セルの中に0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.6) 2.25mLと、この緩衝液に溶解して調製した2%のGSSG (G4501, Grade III, Sigma) 溶液0.3mL、1.5mMのNADPH溶液0.3mLを入れ攪拌した。この中に試料液50μLを加えよく攪拌した後、

NADPHの減少に基づく吸光度の減少を測定した。GR活性1単位は、25℃で1分間に1μmoleのNADPHを酸化することのできる活性と定義した。

SOD活性の測定は、Crapoら[58]の方法にしたがって行った。まず、超遠心上清を10mMのトリス塩酸緩衝液で5倍に希釈し、さらに試料を透析した。透析をした理由は、生体試料中の低分子化合物の中にSOD活性を示す物質(例えば、イオン状のCuもSODと同程度のSOD活性を示す)の存在が知られているためである。透析は、市販の透析膜(Seamless Cellulose Tubing 20/32, Viskase Co., Chicago, IL, USA)を用い、4℃で18時間、10倍量の上記緩衝液に対し2回行った。分光光度計の測定波長を550nmに設定し、セルならびに試薬溶液は予め25℃に加温しておいた。セルの中に、0.1mMのEDTAを含む50mMのリソ酸緩衝液2.2mLと、この緩衝液に溶解した0.2mMのシトクロームC(C7752, TypeIV, Sigma)溶液0.3mL、0.5mMのキサンチン(X0626, Sigma)溶液0.3mL、0.3mMのシアン化カリウム(特級試薬、和光純薬)溶液0.1mLと透析試料10~60μL(試料のSOD活性に合わせ加える量を調製)を加え攪拌した。シアン化カリウムを加えたのは、SOD活性の測定を妨害するシトクロームCオキシダーゼを阻害するためである。この溶液に、キサンチンオキシダーゼ(GradeIII, X4500, Sigma)溶液(0.6 units/mL)を加え、シトクロームCの還元にもとづく吸光度の増加を測定した。25℃において、SODを含まない(透析試料の代わりに同量の緩衝液を加えた)系で測定したシトクロームCの還元速度を半減させるSOD活性を1単位と定義した。

3-7 検定

実験により得られた数値は、平均値±標準偏差(mean±SD)または平均値±標準誤差(mean±SEM)であらわした。一部の実験において、対照群には1%と2%のプロピレングリコールを投与したが、この2群間に気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質量、LDHとβ-Glu活性、ならびに洗滌液ペレット中の細胞数に有意差は認めら

れなかったので、対照としては、1%プロピレングリコールを投与した群を検定に用いた。投与群と対照群あるいはC d O投与群とC d C l₂群との差の検定は、等分散検定を行い、等分散であるという仮定が成立しない場合はWelchの両側t検定で、それ以外の場合はStudentの両側t検定で行った。危険率が5%以下の場合に、両群間に有意差があると考えた。

C d O: 24.7 ± 2.02 (n=12) P=0.15
 C d C l₂: 24.7 ± 2.02 (n=12) P=0.15

1. 検定方法 (n=12)
 2. 検定結果 (n=12)
 3. 検定結果

4. 結果

4-1 酸化カドミウムの体内動態

CdOとCdCl₂をそれぞれ5μg Cd/ラットの用量で気管内投与した後の、肺組織ならびに気管支肺胞洗滌液中のCd含量の経時変化をFig. 3に示した。投与30分後には、CdOとCdCl₂投与群ともに用量の約65%に相当するCdが肺(組織+気管支肺胞洗滌液)に残存していた。その後、肺組織のCd含量は緩やかに減少したが、気管支肺胞洗滌液中のCdは投与3時間後には両群ともに検出されなかった。投与30分後の気管支肺胞洗滌液には、CdO投与群では投与量の10%が回収されたが、CdCl₂投与群ではごく微量しか回収されず、両群間には有意差が認められた。また、CdO投与群では気管支肺胞洗滌液中に回収されたCdのほとんどが洗滌液上清中に存在しており、洗滌液のペレット中では検出限界以下であった。これらのことは、CdOが気管支肺胞腔において速やかに(30分以内)可溶化され、イオン状のCdとして代謝されたこと、また、イオン状のCdは、30分以内に肺組織に吸収されたことを示唆している。投与したCdがすべて肺組織に取り込まれたと考えられる12時間以降の肺のCd含量に対し、1次の指数減衰曲線を当てはめ最小二乗法で計算すると次式が得られた。

$$\text{CdO:} \quad \ln y = -0.032t + 1.06 \quad r = -0.53$$

$$\text{CdCl}_2: \quad \ln y = -0.051t + 0.94 \quad r = -0.62$$

y: 肺のCd含量 (μg)

t: 投与後の日数 (days)

r: 相関係数

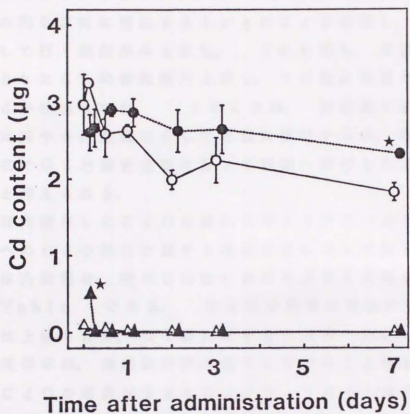


Fig.3 Cadmium content in the lung (● CdO, ○ CdCl₂) and the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid (▲ CdO, △ CdCl₂) after instillation at a dose of 5 µg Cd/rat. Each point represents mean ± SEM. ★ --- Significantly different from the corresponding CdCl₂-treated group (P < 0.05).

これらの式より、肺におけるCdの半減期を求めると、CdO投与群で22日、CdCl₂投与群で14日と算出された。CdO投与群における肺のCdクリアランスがやや遅いものの、両群間で、Cdの肺からの消失速度にあまり差がないことがわかった。一方、肺のCd含量の経時的減少に伴ない、肝臓と腎臓へCdが移行する様子を示したものがFig. 4である。肝臓には、投与12時間後に投与量の約20%に相当する1μgのCdが蓄積し、その後緩やかに減少して行く傾向がみられた。これに対し、腎臓では、時間の経過とともにCdの蓄積量が上昇し、7日後には投与量の10%程度のCdが検出された。このことは、肺組織に吸収されたCdの一部は速やかに血流を介して肝臓に移行するが、残りのCdは、前述の式で示した減衰曲線に従って腎臓へ移行したことを示しているものと考えられる。

以上、気管内投与したCdOの肺からのクリアランスと、肺から肝臓と腎臓へのCdの移行に関する経時変化について説明したが、このCdの体内動態を、投与2日後における用量反応関係として示したものがTable 1である。CdOの用量の増加に伴って肺のCd含量は上昇したが、投与量に対する百分率で表わした肺におけるCdの残存率は、用量依存的に低下していることがわかる。肝臓では、CdOの用量が2μg Cd/ラット以上の場合、用量の増加に伴いCdの移行率が上昇し、10μg Cd/ラットの用量では34%にも達した。しかし、腎臓では投与量の如何を問わず、移行率はほぼ5%と一定の値を示した。これらのことは、CdOの一回気管内投与において、投与量と肺のCdの蓄積量に直線関係が得られるのはおよそ2μg Cd/ラットまでであり、それ以上の用量を投与した場合、肝臓への移行率が急増すること、ならびに、肺組織に結合したCdは、徐々に代謝を受け腎臓に移行することを示唆しているものと考えられる。腎臓におけるCdの蓄積には、肺から肝臓へ移行したCdが、さらに腎臓へ移行した分も一部寄与しているものと考えられる。

4-2 肺の必須元素の変化

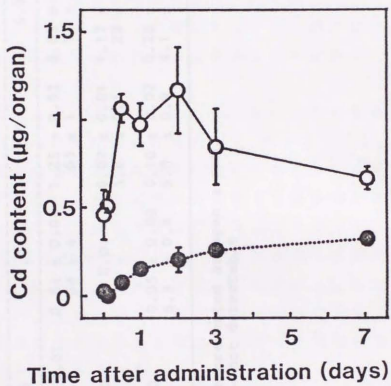


Fig. 4 Cadmium content in the liver (○) and kidney (●) after instillation of CdO into the rat lung at a dose of $5 \mu\text{g Cd/rat}$. Each point represents mean \pm SEM.

Table 1 Distribution of cadmium 2 days after instillation of CdO at various doses

		Dose of CdO (μg Cd/rat)				
		0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
Lung	$\mu\text{g}/\text{lung}$ % of dose	0.35 ± 0.01 70 ± 3	0.64 ± 0.04 64 ± 4	1.25 ± 0.03 63 ± 1	2.63 ± 0.28 53 ± 6	4.30 ± 0.17 43 ± 2
Liver	$\mu\text{g}/\text{liver}$ % of dose	N.D. -	N.D. -	0.07 ± 0.01 3.6 ± 0.1	1.17 ± 0.25 23 ± 5	3.40 ± 0.16 34 ± 2
Kidney	$\mu\text{g}/\text{kidney}$ % of dose	N.D. -	0.05 ± 0.00 5.3 ± 0.4	0.10 ± 0.02 5.0 ± 0.9	0.20 ± 0.07 4.1 ± 1.4	0.48 ± 0.01 4.8 ± 0.1

Data are presented as mean \pm SEM.
N.D. --- not detectable

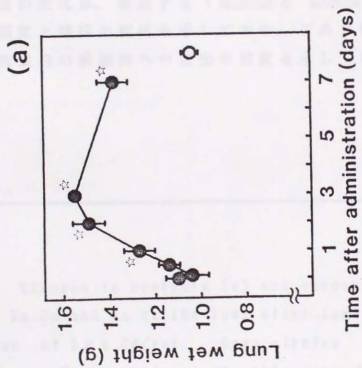
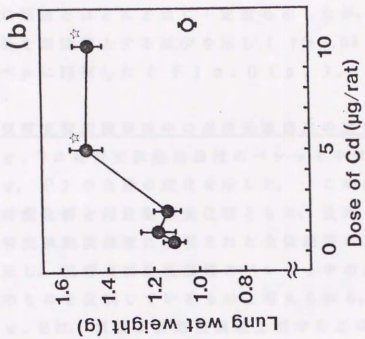
4-2-1 肺組織の必須元素濃度の変化

Fig. 5にCdOを気管内投与した後のラット肺湿重量の変化を示した。経時変化群では、投与3日後をピークとした肺湿重量の上昇がみられ、投与7日後も対照値に比べ有意な上昇を示した(Fig. 5(a))。この肺湿重量の上昇は、肺の炎症にともなう血漿成分の肺胞腔への浸出と肺傷害の修復に伴う組織の増殖の両者に由来するものと考えられる。また、用量影響変化群では、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量までは肺湿重量の有意な上昇はみられなかったが、 $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量を投与した群では著しい上昇がみられ、用量と肺湿重量には直線関係はみられなかった(Fig. 5(b))。

次に、この肺湿重量の上昇にともない、肺の必須元素濃度に変化が生ずるか否かについて検討を行った(Fig. 6)。元素は、プラズマ発光分光法により測定可能なものについて示したが、FeとCaはそれぞれ脱血されず肺に残存する赤血球と血漿(細胞外液)の著しい影響を受けるのでここでは示さなかった。必須元素を肺の含量(mgまたは $\mu\text{g/lung}$)として表わした場合(Fig. 6(a))、S, P, Mg, ZnとMnの含量は、ともに投与3日後をピークとした上昇がみられ、肺湿重量と同様の变化を示した。しかし、Cu含量は他の5元素と異なり、投与7日後に始めて対照値に比べ有意な上昇がみられた。

Fig. 5 Changes in lung wet weight following instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$ (a), and 2 days after instillation of CdO at doses of $0.5, 1, 2, 5, 10\mu\text{g Cd/rat}$ (b). Open circles indicate control values. Each point represents mean \pm SEM.

☆ --- Significantly different from the control value ($P < 0.05$).



同様に、これらの元素を肺における濃度として示した場合 (μg または mg/g lung)、S, P, Mg, ZnとMnの濃度は、実験期間中対照値とほとんど同じ一定値を示したが、肺のCu濃度は投与3日後を最低値とする減少を示し ($P > 0.05$)、7日後には対照値のレベルに回復した (Fig. 6 (b))。

4-2-2 気管支肺胞洗滌液中の必須元素濃度の変化

Fig. 7に気管支肺胞洗滌液のペレット中に回収された元素 (S, Mg, P) の含量の変化を示した。この必須元素含量の変化は、経時変化群と用量影響変化群ともに、後述する (4-3と4-4) 気管支肺胞洗滌液に回収された全細胞数の変化とほとんど同じ傾向を示し、気管支肺胞洗滌液のペレット中の必須元素含量は、細胞数そのものを反映しているものと考えられる。

Fig. 8は、気管支肺胞洗滌液上清中の必須元素濃度 (S, Ca, P) の経時変化と用量影響関係を示したものである。SとCa濃度の変化は、後述する (4-3と4-4) 洗滌液上清中の蛋白質濃度と同様の変化を示しており、この2種類の元素濃度の変化は血漿成分の肺胞腔への浸出の程度を示しているものと考えられる。

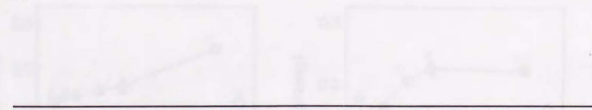
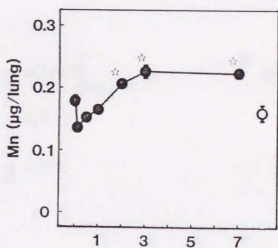
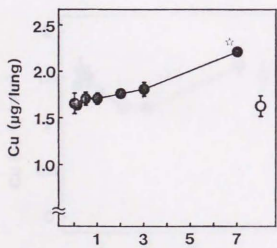
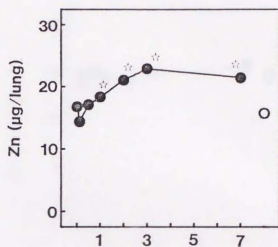
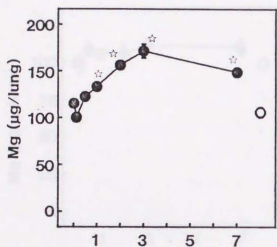
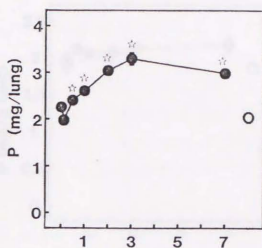
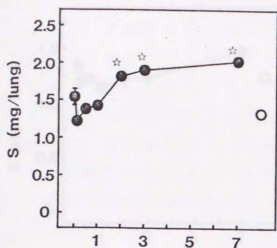
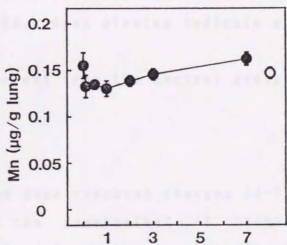
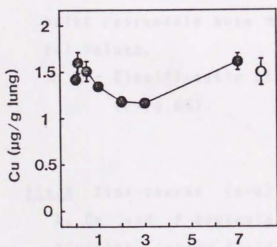
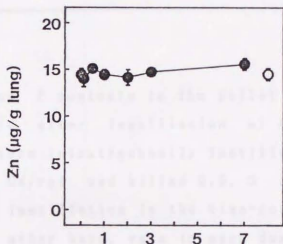
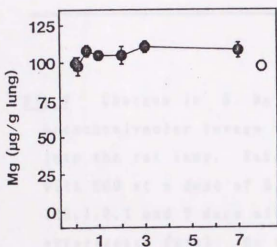
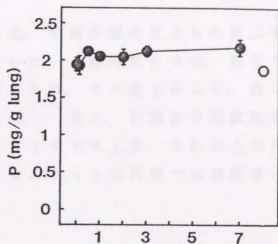
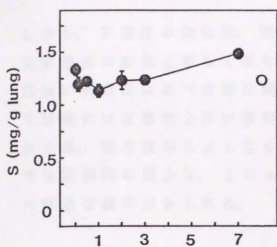


Fig. 6 Changes in contents (a) and concentrations (b) of S, P, Mg, Zn, Cu and Mn in the lung after instillation of Cd0 at a dose of $5 \mu\text{g Cd/rat}$. Open circles indicate control values. Each point represents mean \pm SEM.

☆ --- Significantly different from the control group ($P < 0.05$).



(a) Time after administration (days)



(b) Time after administration (days)

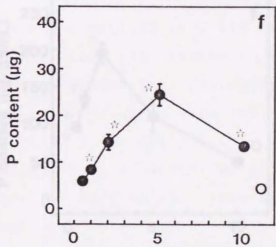
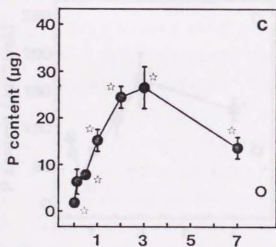
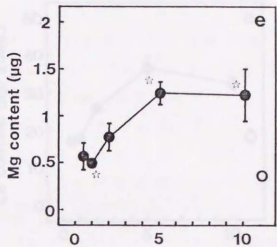
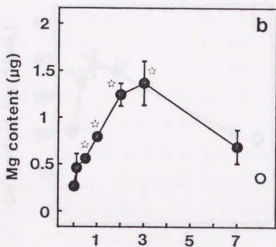
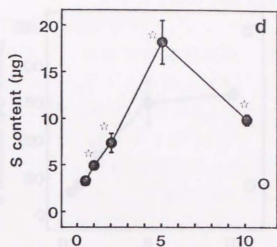
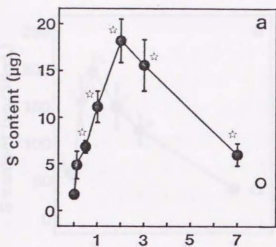
しかし、P濃度の変化は、経時変化、用量影響変化ともに前二者の元素濃度の変化と著しく異なっていた。経時変化では、投与3時間後に対照群に比べ有意な減少がみられ、その後上昇して、投与3、7日後には有意な上昇が観察された。また、P濃度の用量影響変化では、投与量が $2\mu\text{g Cd}$ /ラットまでは上昇、それ以上の用量では直線的に減少し、 $10\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量では対照値に比べ有意な減少がみられた。

Fig.7 Changes in S, Mg and P contents in the pellet of bronchoalveolar lavage fluid after instillation of CdO into the rat lung. Rats were intratracheally instilled with CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$ and killed 0.5, 3 and 12h, 1, 2, 3 and 7 days after instillation in the time-course experiments (a-c). On the other hand, rats in each dose group were killed 2 days after instillation (d-f). Each point represents mean \pm SEM. Open circles indicate control values.

☆ --- Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

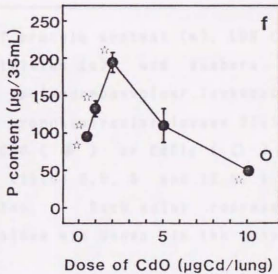
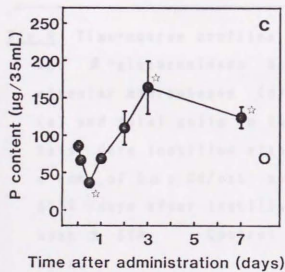
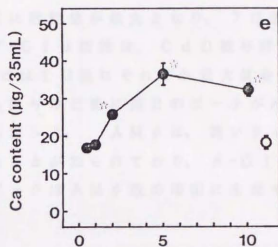
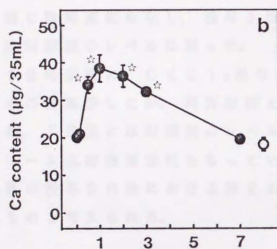
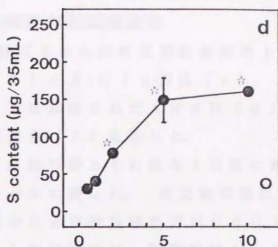
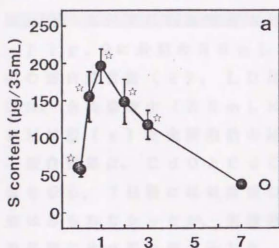
Fig.8 Time-course (a-c) and dose-response changes (d-f) in S, Ca and P contents in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid. See also the legend to Fig.7.

☆ --- Significantly different from the control group ($P < 0.05$).



Time after administration (days)

Dose of CdO ($\mu\text{gCd/lung}$)



4-3 気管支肺胞洗滌液中の炎症指標の経時変化

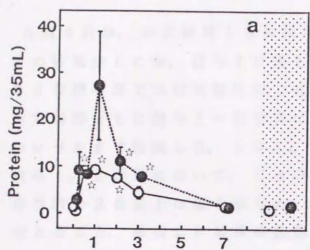
Fig. 9に最初の35 mLに回収された気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質含量 (a)、LDH (b) と β -Glu 活性 (c)、ならびに、全洗滌液中 (35 mL \times 2) に回収されたAM ϕ 数 (d)、PMN 数 (e) と全細胞数の経時変化 (f.) を示した。

蛋白質量は、CdO と CdCl₂ 投与群ともに投与1日目に最大値を示し、7日後には対照値のレベルに戻った。両実験群間に有意差はみられなかったが、実験期間中CdO投与群の方がCdCl₂投与群に比べ高い値を示した。LDH活性は、両実験群ともほぼ同じ経時変化を示し、投与1日目に活性値が最大となり、7日後には対照値のレベルに戻った。 β -Glu活性は、CdO投与群では12時間後に、CdCl₂投与群では1日後にそれぞれ最大値を示し、その後減少したが、両実験群とも投与3日後に第2のピークがみられ、7日後には対照値のレベルに戻った。AM ϕ は、高いライソゾーム水解酵素活性をもっていることが知られており、 β -Glu活性の投与3日後における第2のピークはAM ϕ 数の増加に由来するものと考えられる。

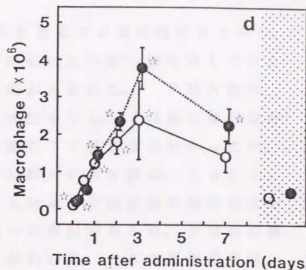
Fig. 9 Time-course profiles of protein content (a), LDH (b) and β -glucuronidase activities (c), and numbers of alveolar macrophages (d), polymorphonuclear leukocytes (e) and total cells in the bronchoalveolar lavage fluid. Rats were instilled with CdO (●) or CdCl₂ (○) at a dose of 5 μ g Cd/rat and killed 0.5, 3 and 12 h, 1, 2, 3, 7 days after instillation. Each point represents mean \pm SEM. Control values are shown in the shaded area.

☆ --- Significantly different from the control group (P < 0.05).

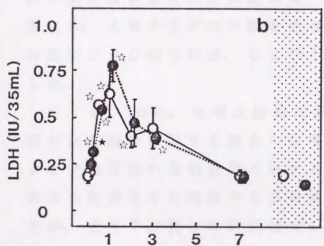
★ --- Significantly different from the CdCl₂-treated group (P < 0.05).



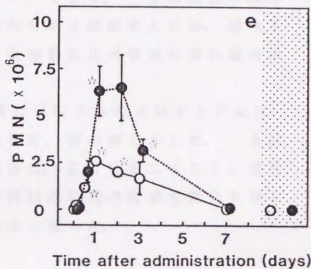
Time after administration (days)



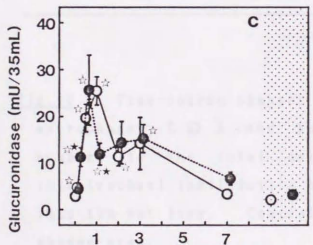
Time after administration (days)



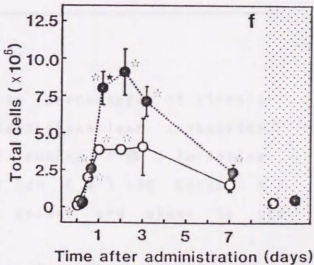
Time after administration (days)



Time after administration (days)



Time after administration (days)



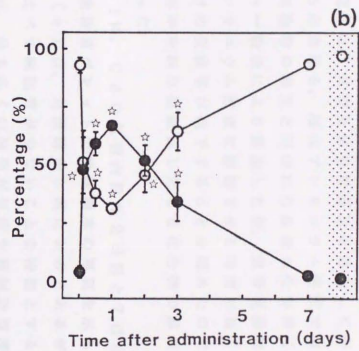
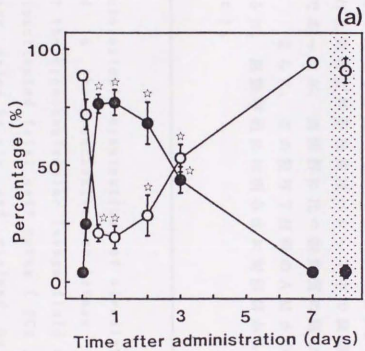
Time after administration (days)

AMφ数は、両実験群ともに投与3日目までほぼ直線的に上昇し、その後減少したが、投与7日後も対照値に比べ高い値を示しており、CdO投与群では対照値に対し有意差がみられた。PMN数は、両実験群ともに投与1～2日目に最大値を示し、7日後には対照群のレベルまで回復した。しかし、有意差こそ検出されなかったが、投与1、2日目において、CdO投与群のPMN数は、CdCl₂投与群の2倍以上の値を示した。AMφとPMN数の経時変化をまとめると、最初にPMNの肺胞腔への浸出がみられ、PMNの減少に続いてAMφ数が増加したことがわかる。この経時変化は、肺の炎症時に見られる典型的なパターンである。全細胞数の経時変化は、AMφとPMN数を合わせたものにはほぼ等しいが、投与1日目にCdO投与群は、CdCl₂投与群に比べ有意に高い値を示した。

Fig. 10に、気管支肺胞洗滌液に回収されたAMφとPMN数の全細胞数に対する割合の経時変化を、百分率で示した。AMφとPMN数の全細胞数に対する割合は、CdOとCdCl₂投与群ともに投与12時間から3日後に対照値に比べ有意な変化を示したが、投与7日後には対照値のレベルに戻った。

Fig.10 Time-course changes in percentages of alveolar macrophages (○) and polymorphonuclear leukocytes numbers to the total cell number (●) following intratracheal instillation of CdO (a) and CdCl₂ (b) into the rat lung. Control values are shown in the shaded area.

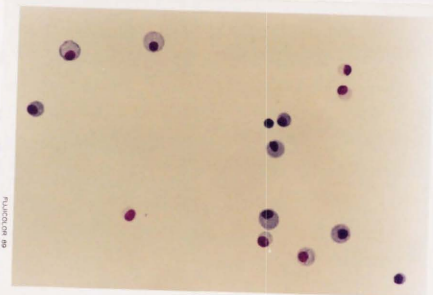
☆ --- Significantly different from the control group (P < 0.05).



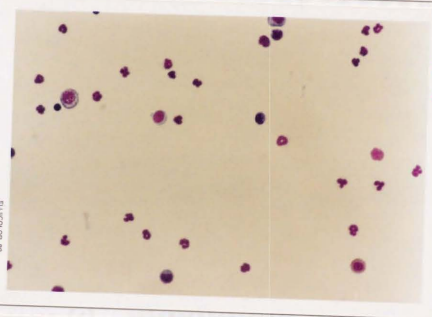
細胞数の測定は、気管支肺胞洗滌液を遠心して得られたペレット中に含まれる赤血球を、塩化アンモニウム溶液で溶血させてから行なった。細胞数の測定と同時に白血球の生存率 (viability) もトリパンブルー染色により算出したが、気管支肺胞洗滌液のペレットを塩化アンモニウム溶液に懸濁させる時間が長くなるにつれ、白血球の見かけの生存率が低下することを認めたので、本研究では、白血球の生存率を経気道暴露したCd化合物の肺毒性の指標としてはいなかった。

Fig. 11に、CdO気管内投与2日目と7日目に回収された気管支肺胞洗滌液ペレットの塗抹標本の写真を示した。一番上に示した写真(a)は、対照群から得たものであるが、細胞のほとんどが、核に比べて細胞質が少ないことを特徴とするAMφであった。投与2日後は、最も多くの細胞が気管支肺胞洗滌液に回収された時点であるが、好中球が多くみられ、また、AMφに混じって細胞質が赤く染まって見える好酸球も観察された(b)。CdO投与7日後に得られた気管支肺胞洗滌液ペレット中の細胞は、そのほとんどがAMφであったが、対照群に比べ細胞質に富む大きいAMφが観察された。さらに、この投与7日後のAMφの細胞質には多くの空胞が見られ、形態学的には明らかに対照群から得たAMφ異なっていた(c)。

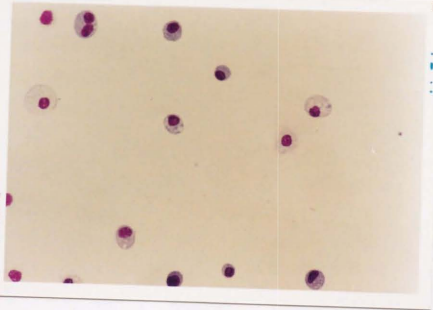
Fig. 11 Histological examination of alveolar free cells retrieved in the bronchoalveolar lavage fluid. The pellet of the bronchoalveolar lavage fluid was suspended in heat-inactivated fetal calf serum (FCS), smeared on a slide glass, dried by air and stained by Write-Giemsa. (a) control, (b) 2 days after instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$, and (c) 7 days after instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$. ($\times 400$).



(a)



(b)



(c)

4-4 気管支肺胞洗滌液中の炎症指標の用量影響的变化

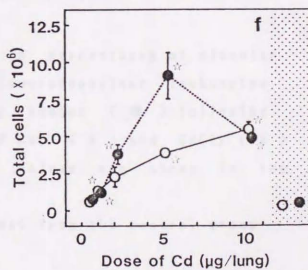
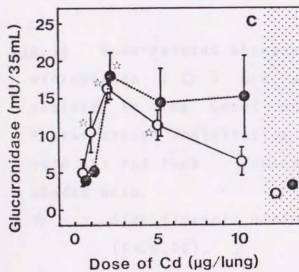
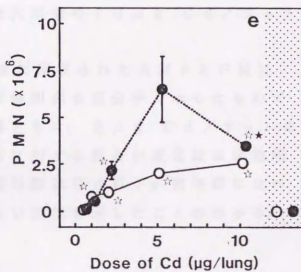
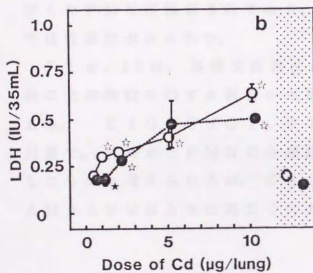
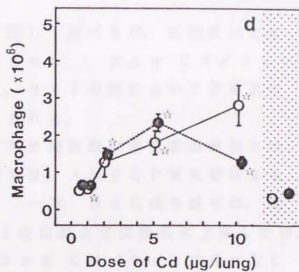
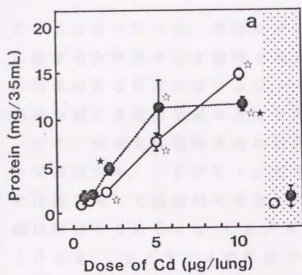
Fig. 9に示したように、CdOまたは、CdCl₂を気管内投与した後の生化学的ならびに細胞学的炎症指標の経時変化は、投与1から3日後に最大値を示した。そこで、気管支肺胞洗滌液に回収される炎症指標の用量影響関係を投与2日後において求めた (Fig. 12 (a) ~ (f))。

蛋白質量とLDH活性は、CdOとCdCl₂投与群ともに同様の变化を示し、用量にともなってほぼ直線的に上昇した。兩実験群ともに、蛋白質量は2 μ g Cd/ラット、LDH活性は1 μ g Cd/ラットの用量から対照群に比べ有意な上昇がみられた。これに対し、 β -Glu活性は、用量が2 μ g Cd/ラットまでは直線的に上昇したが、それ以上の用量では横ばいまたは減少する傾向にあった。この β -Gluの用量影響関係は、Fig. 8 (f)に示した気管支肺胞洗滌液上清中のP濃度の用量影響関係において得られた結果と同様の傾向を示した。

Fig. 12 Dose-effect profiles of protein contents (a), LDH (b) and β -glucuronidase activity (c), and numbers of macrophages (d), polymorphonuclear leukocytes (e) and total cells (f) in the bronchoalveolar lavage fluid. Male Wistar rats were instilled intratracheally with CdO (●) and CdCl₂ (○) at doses of 0.5, 1, 2, 5 and 10 μ g Cd/rat and killed 2 days after instillation. Each points represents mean \pm SEM. Control values are shown in the shaded area.

☆ --- Significantly different from the control group (P < 0.05).

★ --- Significantly different from the CdCl₂-treated group (P < 0.05).



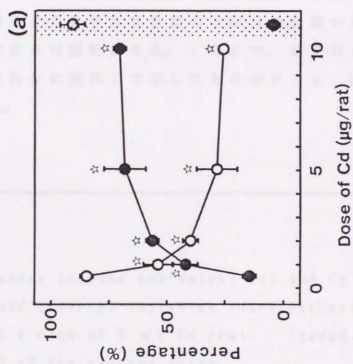
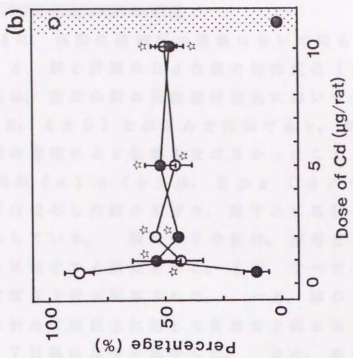
このことについては、考察において詳しく述べるが、両物質がともに細胞の分泌能を示す指標であることから、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量のCdOまたはCdCl₂は、ラットの肺において分泌能の昂進が起こる最大用量であると考えられる。

次に、気管支肺胞洗滌液に回収された細胞数の用量影響関係について説明する。CdCl₂投与群では、AMφとPMN数はともに用量に対して直線的に増加した。一方、CdO投与群では、両細胞数はともに $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量まで直線的に上昇したが、 $10\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量では $5\mu\text{g Cd}$ /ラットに比べむしろ低下した。また、CdO投与群では、CdCl₂投与群より多くのPMNが回収されており、最大用量の $10\mu\text{g Cd}$ /ラットでは有意差がみられた。

Fig. 13は、気管支肺胞洗滌液に回収されたAMφとPMN数の全細胞数に対する割合の用量影響関係を百分率で示したものである。CdOとCdCl₂投与群ともに、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量で、AMφとPMNの全細胞数に対する割合の変化はほぼ飽和したものと考えられるが、CdO投与群はCdCl₂投与群に比べAMφとPMNともに約20%大きい変化を示したことがわかる。

Fig.13 Dose-related changes in percentages of alveolar macrophages (○) and polymorphonuclear leukocytes numbers to the total cell number (●) following intratracheal instillation of CdO (a) and CdCl₂ (b) into the rat lung. Control values are shown in the shaded area.

☆ --- Significantly different from the control group (P<0.05).



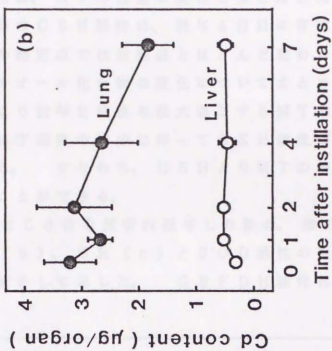
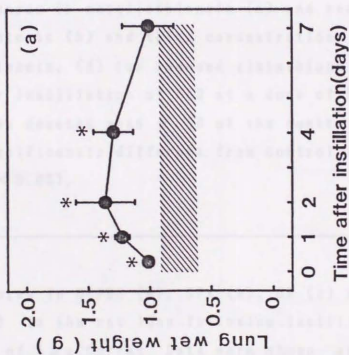
4-5 肺の抗酸化防御系の変化

Fig. 14に、抗酸化防御系の実験において得られた肺湿重量の変化(a)と、肺と肝臓のCd含量の経時変化(b)を示した。これらの変化は、前述の肺の炎症指標測定において得られた実験結果(Fig. 3、4と5)とほとんど同様であり、肺や肝臓のCd含量は、臓器の灌流により影響を受けなかったことがわかる。

Fig. 15の(a)と(b)は、 $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量でCdOを気管内投与した肺における、MTとGSH含量の経時変化をそれぞれ示している。肺のMT含量は、投与2日後まで急増した後、緩やかに減少する傾向を示し、また、すべての測定点对で対照群に対して有意な上昇が観察された。一方、肺のGSH含量は、投与2日後に初めて対照値に対して有意な上昇を示し、4日後に最大値となり、7日後にはやや減少した。また、投与2、4と7日後には対照値に対し有意差が検出された。しかし、Fig. 14(a)に示したように、肺湿重量は気管内投与後経時的に増加したので、肺のMTまたはGSH含量の上昇は肺組織の増殖による見かけの上昇である可能性がある。そこで、MTならびにGSH量を、肺の単位当りに換算して示したものがFig. 15の(c)と(d)である。

Fig.14 Changes in lung wet weight (a) and Cd contents in the lung and liver(b) following intratracheal instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd}$ /rat. Shaded area denotes mean \pm SD of the control value.

* --- Significantly different from control value
($P < 0.05$).



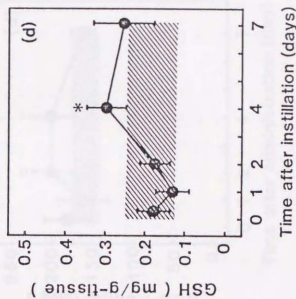
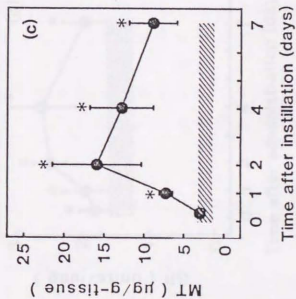
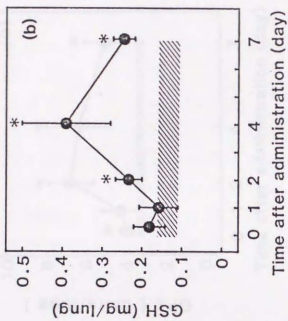
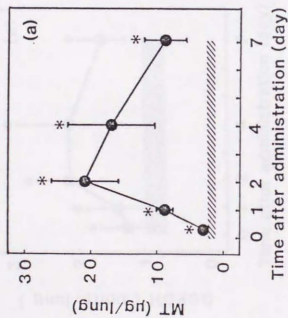
肺のMT濃度は、投与7時間後を除くすべての測定点で有意差がみられ、その変化は、MTの含量の変化とほとんど同じであった(c)。しかし、肺のGSH濃度は、投与4日目に有意な上昇がみられたものの、他の測定点では対照値とほとんど変わらなかった(d)。

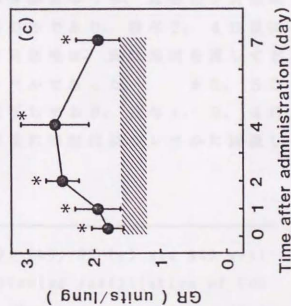
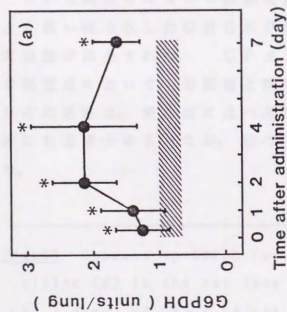
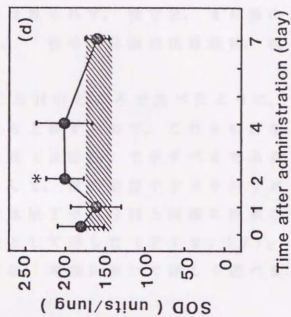
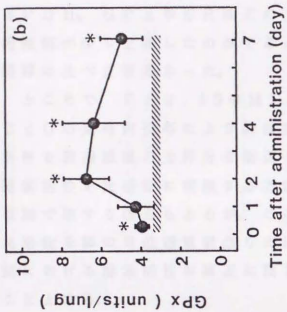
以上、肺のチオール化合物の変化についてまとめると、CdOの気管内投与により投与2日後を最大値とするMT濃度の上昇が起こり、その後、MT濃度の減少に伴ってGSH濃度がわずかに上昇したことがわかる。すなわち、GSHよりMTの合成が優先されたものと考えることができる。

Fig. 16にCdOを気管内投与した後の、肺のG6PDH (a)、GPx (b)、GR (c)とSOD活性の経時変化(d)を、肺全体の活性値として示した。G6PDH活性は、すべての測定

Fig.15 Changes in metallothionein (a) and reduced glutathione contents (b) and their concentrations (c) for metallothionein, (d) for reduced glutathione) in the rat lung after instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$. Shaded area denotes mean \pm SD of the control value.
* --- Significantly different from control value ($P < 0.05$).

Fig.16 Changes in G6PDH (a), GPx (b), GR (c) and SOD activities (d) in the rat lung following instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$. Data were shown as units/lung. Shaded area denotes mean \pm SD of the control value.
* --- Significantly different from control value ($P < 0.05$).





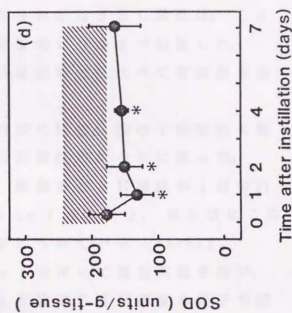
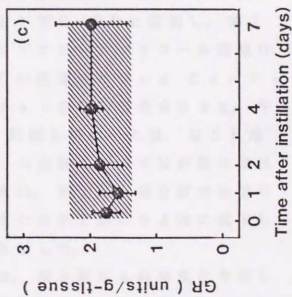
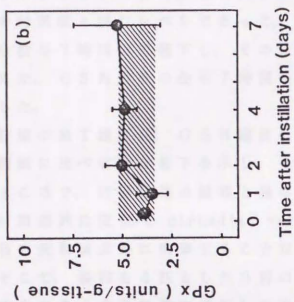
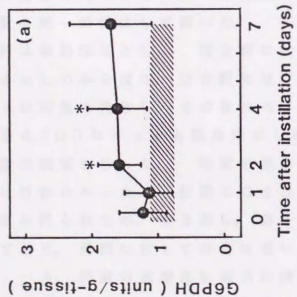
点において対照値より有意に高く、投与2、4日後には対照値の2倍以上の値を示した。GPxとGR活性も、G6PDH活性とはほとんど同じ経時変化を示し、投与2、4日目に最大値となり7日目にやや低下した。また、これらの酵素活性は、投与7日後も対照値に比べ有意に高い値を示した。これに対し、SOD活性は、G6PDH、GPxやGRほどの上昇は見られず、投与2、4日後の活性値が少し上昇したのみであった。投与2日後の活性値は、対照群に比べ有意差あった。

ところで、Fig. 15のMTとGSHのところでも述べたように、CdOの気管内投与により肺湿重量も上昇するので、これらの酵素活性も肺湿重量の上昇分を補正した値(比活性)で示すべきである。酵素活性を比活性に変換する方法として、蛋白質量やデオキシリボ核酸で除する場合もあるが、ここではMTやGSHと同様に酵素の比活性を肺の単位湿重量当りの活性として示した(Fig. 17)。肺における酵素活性の補正に関しては、考察において詳しく述べることとする。

ここで測定した4つの酸化防御系酵素のうち、比活性が対照値より高い値を示したのはG6PDHのみであり、投与2、4日後に有意差が検出された。GPxとGR活性は、実験期間を通してどの測定点においても対照値と同じレベルであった。また、SODの比活性は、対照値に比べ逆に低下しており、投与1、2、4日後に有意差がみられたが、投与7日後には対照値のレベルに回復した。

Fig. 17 Changes in G6PDH (a), GPx (b), GR (c) and SOD activities (d) in the rat lung following instillation of CdO at a dose of $5\mu\text{g Cd/rat}$. Data were shown as units/g-tissue. Shaded area denotes mean \pm SD of the control value.

* --- Significantly different from control value ($P < 0.05$).



4-6 肝臓の抗酸化防御系の変化

Table 2は、CdOを $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量で気管内投与した後の肝臓の湿重量とGSH、GSSGとMT濃度、ならびに単位肝臓組織重量当りの活性値として示したG6PDH、GPx、GRとSODの経時変化を表わしている。肝湿重量は、実験期間中対照値と同じレベルであった。GSHとGSSG濃度は、CdO投与7時間後に低下し、その後対照値のレベルまで回復した。また、GSH濃度の投与7時間後の値は対照値に比べて有意差を示した。

肝臓のMT濃度は、GSH濃度の経時変化同様、投与7時間後に対照値に比べ有意な低下を示し、その後対照値のレベルに戻った。ところで、肝臓は他の臓器と異なり、組織のGSH濃度が1日の内に周期的に変化(circadian variation)すること、ならびにこの日内変動は食餌に由来することなどが知られている[59-61]。そこで、各群を4匹とした3群のラットを用いて追加実験を行い、本当にCdOを気管内投与したラット肝臓のGSH濃度の低下が肺に沈着したCdOに基づく変化であるかどうかを、解剖時間と食餌量を同一条件にして調べた。実験を午前9:00に開始し、第1群は無処理群とし、第2群には1%プロピレングリコール溶液0.4 mLのみを投与、第3群にはCdOの懸濁液を $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量で投与し、その後すべてのラットを7時間絶食させた。午後4:00にラットを脱血死せしめ、肝臓を摘出した後、GSH濃度の測定を行った。時間の都合上、本実験においては肝臓の灌流は行わなかった。肝臓のGSH濃度は、第1群と第2群では同じ値が得られたが、第3群は、第1群または第2群の84%に低下しており、両群に対して有意に低い値を示した。

一方、肝臓の抗酸化防御系の酵素は、肺と異なる経時変化を示した。G6PDHの比活性値は、実験期間中いずれの測定点においても有意差はみられなかった。また、GPxは投与1日から7日目まで、対照値に対し有意に高い比活性値を示した。GRの比活性値は、投与4日後と7日後に対照値に比べ有意に低い値を示した。

Table 2: Biochemical changes in the rat liver following instillation of cadmium oxide

	Control	Time after administration						
		7hr	1day	2days	4days	7days		
Weight (g)	10.5 (0.488)	10.2 (0.946)	10.3 (0.175)	11.1 (0.596)	11.7 (1.27)	10.7 (0.583)		
GSH (mg/g)	1.08 (0.211)	0.733* (0.117)	0.952 (0.125)	0.956 (0.173)	0.887 (0.241)	1.16 (0.190)		
GSSG (µg/g)	39.5 (24.8)	25.5 (10.6)	47.6 (15.8)	36.3 (13.3)	38.4 (5.8)	38.5 (34.7)		
MT (µg/g)	18.7 (2.35)	12.8* (1.71)	15.7 (2.92)	22.7 (7.77)	16.1 (3.39)	22.2 (9.09)		
G6PDH (units/g)	0.861 (0.169)	0.762 (0.131)	0.875 (0.120)	0.726 (0.229)	0.704 (0.117)	0.905 (0.662)		
GPx (units/g)	18.7 (2.18)	19.1 (7.01)	24.5* (2.47)	22.6* (0.22)	23.6* (2.52)	22.1* (1.84)		
GR (units/g)	4.56 (0.168)	4.10 (0.540)	4.29 (0.236)	4.33 (0.746)	3.88* (0.188)	3.76* (0.480)		
SOD (units/g)	799 (60.1)	770 (77.8)	815 (50.8)	762 (78.6)	807 (158)	850 (169)		

Contents of thiol compounds and enzyme activities were expressed as per gram liver tissue. Data are presented as mean (±SD).

* --- Significantly different from control value (P<0.05).

これに対し、SODの比活性値は、実験期間中対照値に比べいかなる有意差も示さなかった。

Table 1. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 2. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 3. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 4. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 5. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 6. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Table 7. Effect of treatment on the activity of SOD in the liver of rats. The activity of SOD was measured in the liver of rats at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 days after treatment. The activity of SOD was expressed as the mean value of three rats in each group. The standard deviation (S.D.) is shown in parentheses. The significance of the difference between the control and the treated groups was determined by the Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

5. 考察

5-1 酸化カドミウムの肺クリアランスと体内動態

Fig. 1に示したように、本研究においてラットに気管内投与したCdOの懸濁液試料に、粒子の凝集が一部見られたが、その粒径(定方向径)は $2\mu\text{m}$ 以下であり、吸入実験においてほとんどが肺胞域に到達可能と考えられる大きさのものであった。

ところで、CdOは、水に不溶性の粒子である[62]。しかし、気管支肺胞腔においてCdO粒子は速やかに可溶化されるものと考えられる。このことは、Fig. 2において、気管支肺胞洗滌液に回収されたCdは投与30分後においてのみ投与量の10%程度検出され、3時間以降は回収されなくなったこと、また、投与30分後に気管支肺胞洗滌液に回収されたCdは、そのほとんどが洗滌液上清すなわち可溶性画分に存在しており、ペレット中には検出されなかったことより明かである。では、どうして*in vitro*では不溶性のCdO粒子が、*in vivo*では速やかに可溶化されたのであろうか。以下に、その理由について考察する。

CdO懸濁液の調製時に経験されたことであるが、CdO粒子を生理食塩水または水に懸濁させると、数分間で粒子が凝集し沈殿する事が観察された。この現象は、CdOが茶褐色の化合物であることから、肉眼ではっきり観察できた。上記の凝集反応は、気管内投与したCdO粒子の肺クリアランスと体内動態を論じる際に著しい影響を及ぼすと考えられたので、本実験ではCdO粒子をプロピレングリコール中に保存し、投与直前に水で希釈するという方法を用いた。この系では、CdO粒子の懸濁状態は極めて良好で、CdO粒子の気管支肺胞壁への沈着時にもFig. 1の写真に示した状態が保たれているものと考えられる。ところが、この安定した懸濁液中(1%または2%プロピレングリコール溶液中)では、1時間程度でCdO粒子の一部が溶解することが確認された。気管支肺胞腔におけるCdO粒子の可溶化には次の2つの機構が考えられる。

- (1) AMφがCdO粒子を貪食し、2次ライソゾーム中でCdO粒子が可溶化される。
- (2) CdO粒子が気管支肺胞腔で化学的に可溶化する。

ところで、MnO₂粒子が前者の機構(1)により可溶化されることは *in vitro* の系で証明されている[63]。しかし、この実験での培養時間は数日と長いので、ここで得られた結果は粒子の速やかな溶解機序を説明するものではない。また、一般に、肺胞腔に沈着した不溶性の粒子の大半がAMφに取り込まれるためには数時間~1日程度の時間が必要とされる[64]。しかし、今回の実験では可溶化が終了したのは30分以内と考えられること、また、気管支肺胞腔洗滌液のペレット中にはCdがほとんど検出されなかったことより、AMφによる貪食から始まる可溶化機構ではCdO粒子の肺胞腔での可溶化を説明することはできない。

後者の化学的可溶化機構(2)は、水や生理食塩水中ではほとんど起こりえないと考えられるが、気管支肺胞腔では十分に起こり得ることである。なぜならば、CdO懸濁液調製時にプロピレングリコール水溶液中ではCdO粒子の一部が溶解することが確認され、また、肺胞腔表面はジパルミトイルホスファチジルコリンを主成分としたリン脂質が豊富であり、強い界面活性作用すなわち粒子の分散作用が存在すると考えられるからである。ここで、CdOの *in vivo*での可溶化に気管内投与したプロピレングリコールが作用している可能性も考えられるが、プロピレングリコールを用いない気管内投与実験においてもCdO粒子の速やかな可溶化が確認されているので[15,17]、肺胞腔においてCdO粒子が速やかに溶解される時に、肺表面活性物質が大きな役割を果たしていることは明かである。

一方、Norsethは、水中では半分溶解するのに10年かかる硫化ニッケル粒子が、血清や腎可溶性分画中ではそれぞれ34日と21日で半分量溶解したと報告している[65]。このことは、不溶性の金属酸化物も生体試料中では速やかに溶解することを示唆しており、CdO粒子の肺胞腔における速やかな溶解機序と関連性がある

ものと考えられる。

ところで、Fig. 3において、CdOとCdCl₂投与群ともに、投与30分後における肺組織と気管支肺胞洗滌液のCd含量の合計は、投与量の7割弱であった。この理由としては、投与30分後に投与量の10%以上のCdが肺より血中に吸収されていたこと（Fig. 4より明らかなように、30分後には投与量の10%に相当するCdが肝臓へ移行している）と投与したCd化合物の一部が気管の下部ならびに第1気管支に沈着し吸収された可能性がある（肺組織は肺門部で切り取った）ことなどがあげられる。Cd化合物が気管支肺胞洗滌液に全く検出されなくなった投与12時間以降の肺におけるCd含量の値に、1次の指数減衰曲線を当てはめ半減期を求めたところCdOとCdCl₂投与群でそれぞれ14日と22日と算出され、両Cd化合物の肺クリアランス速度に大きな差異は検出されなかった。このことは、CdO粒子が気管支肺胞腔で速やかに可溶化され、イオン状のCdとして肺組織に吸収されたという前述の結論からすれば当然の事であり、他の研究例、すなわち肺に沈着したCdOとCdCl₂の肺クリアランス速度は同じ[11]か、またはCdCl₂の方がわずかに速いという報告[17]と一致する。

Fig. 4は、CdOを5μg Cd/ラットの用量で気管内投与した後の肝臓と腎臓へのCdの移行を示したものであるが、投与12時間後に用量の20%に相当するCdが肝臓に移行し、その後緩やかに肝臓のCd含量が低下したことがわかる。また、腎臓では、投与12時間後から実験終了時の7日後まで時間とともにCdが上昇し続けた。ところで、Cdをイオン状態で静脈内または腹腔内に投与すると主として肝臓に、また、MT-Cdとして投与すると主として腎臓にCdが蓄積することが知られている[66-68]。また、最近、イオン状のCdは血中では主としてメルカプトアルブミンに結合していることが報告されている[69]。これらのことと、CdOの気管内投与7時間後に肺のMT含量が有意に上昇した（Fig. 15）ことを考え合わせると、Fig. 4に示した経時変化は、次のように理解される。すなわち、CdOが肺胞腔で溶

解した後、肺組織に吸収されたCdの一部は12時間以内に血液中のメルカプトアルブミンに結合して速やかに肝臓へ移行するのに対して、残りのCdは肺組織でMTを誘導しMTに結合した状態でゆっくり代謝され腎臓に移行したものと考えられる。

上に述べたCdの代謝機構は、CdO気管内投与2日後で調べた用量反応関係においても矛盾することなく説明することができる (Table 1)。Cdの肺における残存率は投与量の上昇にともない低下したが、肝臓への移行率は用量が2 μ g Cd/ラットの時はわずか3.6%であり、5, 10 μ g Cd/ラットの用量ではそれぞれ23, 34%と急増した。このことは、1回気管内投与においてラットの肺組織が投与したCdのほぼ全量と結合し得る量は約2 μ gであり、それ以上の用量では肺から肝臓への移行率は急激に上昇することを示している。また、腎臓への移行率は用量の如何を問わず0.5-10 μ g Cd/ラットの範囲で5%とほぼ同じ値を示したが、これは用量に比例して肺でMTが合成され、一定の割合で腎臓にCdが移行したものと理解される (一部、肝臓から腎臓への移行も考えられる)。以上に述べた気管内投与後のCdの肺クリアランスと体内動態を流れ図としてFig. 16に示した。

5-2 肺組織の元素濃度の変化

肺は、傷害にともない重量が著しく増加することが知られている組織である。NO₂ [70]、アクロレイン [71]、シリカ [72]、アスベスト [73] などの化学物質のみならず、放射線の被曝 [73] によっても傷害の程度にしたがって肺湿重量が増加することが知られている。この肺湿重量の上昇の機構は非常に複雑であるが、一般的には、(1)肺炎や肺水腫においてみられるような炎症細胞の浸出 (infiltration of free cells) や、血漿成分の肺組織への浸潤 (exudation of plasma components) と、(2)傷害を受けた部分に対する補償作用としての肺組織の増殖 (reparative proliferation) との2相性の反応により起こるものと考えられている。Fig. 5(a) に示したCdO投与後の肺湿重量の経時変化もまた、上に述べた2つの反応機構により説明できるものと考えられる。

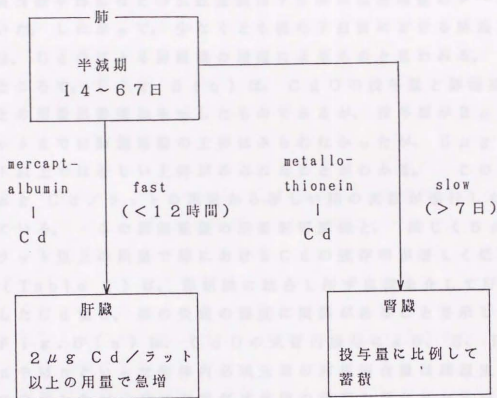


Fig. 18 Schematic representation of metabolic behavior of Cd instilled intratracheally into the rat lung. The half-time of pulmonary Cd was evaluated using the data obtained from 12h to 7days after instillation when the rapid translocation of Cd from the lung to liver was diminished.

Fig. 9 に示したように、気管支肺胞洗滌液に回収された PMN 数や酵素などの炎症指標は 7 日後には対照値のレベルに戻っていた。したがって、少なくとも投与 7 日後における肺湿重量の上昇は、CdO による肺組織の増殖によるものと思われる。

ところで、Fig. 5 (b) は、CdO の投与量と肺湿重量の変化との用量影響関係を示したものであるが、投与量が $2 \mu\text{g Cd}$ / ラットまでは肺湿重量の上昇はみられなかったが、 $5 \mu\text{g Cd}$ / ラット以上では著しい上昇がみられたことがわかる。このことは、 $5 \mu\text{g Cd}$ / ラットの用量から著しい肺の炎症が進行したことを示している。この肺湿重量の用量影響関係と、同じく $5 \mu\text{g Cd}$ / ラット以上の用量で肺における Cd の残存率が著しく低下したこと (Table 1) は、肺組織に結合し得ず血流を介して肝臓に移行した Cd 量と、肺の炎症の程度に関係があることを示している。

Fig. 6 (a) は、CdO の気管内投与により、S、P、Mg、Zn や Mn といった生体内必須元素の肺組織含量は肺湿重量と並行して変化したが、Cu 含量だけは他の元素と異なるパターンで変化したことを示している。Fig. 6 (a) で得られた結果を単位肺重量あたりで表わしたものが Fig. 6 (b) であるが、投与 2 ~ 3 日後の肺の Cu 濃度は有意ではないが低下していたことがわかる。小林らは、 CdCl_2 を気管内投与したラットの肺において、SOD 分画に相当する Cu 濃度が低下することを見だしており [75]、またコラーゲン合成に関与する金属酵素として知られている lysyl oxidase の Cu^{2+} は Cd^{2+} と置換可能であることが知られている [28, 29]。これらのことは、投与した Cd 化合物が、組織内の (endogenous) Cu の代謝に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

5-3 気管支肺胞洗滌液所見によるカドミウムの肺毒性の評価

気管支肺胞洗滌液中に回収される細胞数、蛋白質量や種々の酵素活性は、肺胞腔における傷害や肺の炎症を知る上で最も感度のよい指標であり [76]、臨床においても特発性肺臓炎やサルコイドーシス等の診断に用いられている [77, 78]。これは、腎尿細管障害ま

たは傷害において、尿中の低分子蛋白質量やN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ活性などがよい指標となることに類似している。

すなわち、臓器全体としてはそれほど大きな生理学的変化あるいは病理学的変化として捉えることができなくても、肺胞腔または尿中へ逸脱した物質を測定することにより、測定試料（気管支肺胞洗滌液や尿）における対照値が低い分だけ感度良く標的臓器（肺や腎臓）における影響を検出し得るわけである。

ところで、本研究では気管支肺胞洗滌液中に回収された物質の内、細胞学的指標としてAM ϕ とPMN数を、生化学的指標として蛋白質量、LDHと β -Glu活性について測定を行った。また、洗滌液中の必須元素濃度についても測定した。ここで、これらの指標の意義付けについて解説する。

まず細胞学的指標であるが、気管支肺胞洗滌液中に回収される有核の細胞としては、AM ϕ 、PMN（好中球、好酸球と好塩基球）、リンパ球や剝離した上皮細胞などの存在が考えられる。本研究では、気管支肺胞洗滌液中に回収されたこれらの細胞の中で、Wright-Giemsa染色により細胞種を同定したのはAM ϕ とPMNだけである。上皮細胞やリンパ球を除外した理由は、洗滌液中に回収されるこれらの細胞総数が少ないうえ、曝露群では細胞の形態が様々に変化しておりAM ϕ と区別がつきにくいからである。AM ϕ 総数は細胞全体に占める割合が大きいので、仮にリンパ球を加えてAM ϕ 総数を算出したり、本来AM ϕ である細胞をリンパ球と見なして除外したとしても誤差はわずかであり、実験結果を歪めることはないと考えられる。リンパ球をAM ϕ とはっきり区別するためには他の染色法（たとえば非特異的エステラーゼ染色法）によらなければならないが、これは時間の都合上困難であったので行わなかった。気管支肺胞洗滌液中に回収されるAM ϕ やPMNなどの細胞数の増加は、肺の炎症時にみられる非特異的な反応であり、経気道曝露した有害物質の肺毒性を評価する上で有用であると考えられる。

気管支肺胞洗滌液を遠心して得たペレット中の必須元素濃度の測定は、洗滌液に回収された細胞数の変化が元素濃度の変化で表わすことができるかどうかの確認と、洗滌液上清中の元素濃度との比較

のため行った。

次に、生化学的指標の意義について詳しく説明する。肺の炎症時には、肺の血管透過性が上昇することが知られている [79]。気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質質量の上昇は、主としてこの肺血管透過性の昇進により血漿蛋白質、とくにアルブミンなどが肺胞腔へ浸潤した結果として起こるもので、化学物質を吸入曝露したことにより引き起こされる肺傷害のよい指標となる。また、LDH活性はすべての細胞の可溶性画分に存在しており、細胞の壊死に伴い細胞外へ放出される。したがって、気管支肺胞洗滌液中のLDH活性の上昇は、気管支肺胞腔において壊死した細胞数を示す良い指標となる。β-Gluは、ライソゾームに存在する酵素であり、有害物質の曝露により細胞が壊死する以前に細胞外へ分泌されることが知られている [80]。したがって、洗滌液上清中におけるβ-Glu活性の上昇は、細胞の分泌能が昇進したことを意味しているものと考えられる。また、洗滌液上清中の必須元素の内、S含量が主として蛋白質質量を、P含量が主としてサーファクタント量を示しているものと考えられる。Toshimaらは、気管支肺胞洗滌液上清中のP含量の86%はサーファクタントに由来していると報告しており [81]、このことが、洗滌液中のP含量でサーファクタント量を代表させることができることの裏付けとなっている。ここで述べた肺の炎症指標の意義を、Fig. 19に模式的に示した。

Fig. 19 Schematic representation of the influx of alveolar macrophages (AMφ) and polymorphonuclear leukocytes (PMN), exudation of blood plasma protein, leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and secretion of β-glucuronidase (β-Glu) and surfactant from Type II pneumocytes into the bronchoalveolar milieu.

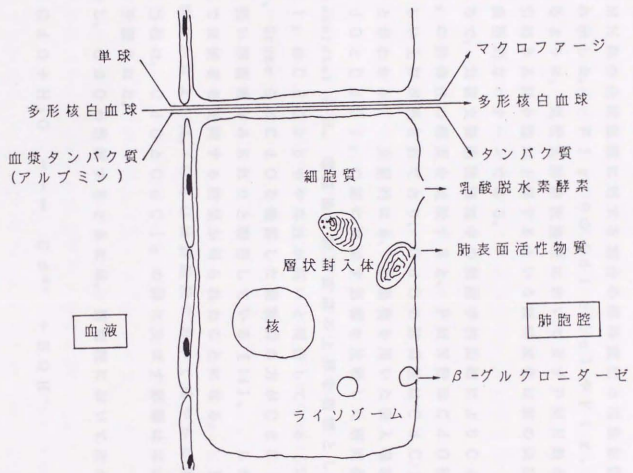


Fig. 9の(d)~(f)とFig. 12の(d)~(f)に、
 気管支肺胞洗滌液に回収されたAMφ、PMNと全細胞数の経時変化と用量影響関係を、また、Fig. 10とFig. 13にはAMφとPMN数の全細胞数に対する割合の経時変化と用量影響変化をそれぞれ示した。Fig. 9の(d)と(e)やFig. 10に見られるように、気管支肺胞洗滌液においてまずPMN数が上昇し、それに引続きAMφ数が上昇するという経時変化は肺の炎症時にみられる典型的なパターンである。

ところで、気管支肺胞洗滌液中の細胞学的指標によりCdOとCdCl₂の肺毒性の程度を比較すると、PMN数はCdO投与群の方に著しい上昇が見られており、CdOの肺毒性はCdCl₂より高いことがわかる。文献的にも、小動物を用いた吸入曝露実験によりCdOとCdCl₂の肺に及ぼす影響を比較した研究例がある。

Oberdoersterらは、曝露後の肺湿重量の上昇を指標とした場合、CdCl₂はCdOよりやや毒性が高いと報告している[11]。しかし、GroseらはCdOを曝露した実験群の方がCdCl₂曝露群より強い肺傷害がみられたと報告している[14]。したがって、本研究では後者を支持する結果が得られたことになる。Fig. 3より明らかのように、CdOは肺胞腔において速やかに溶解したので、当初は、CdOとCdCl₂の肺に及ぼす影響はほぼ等しいものと予想された。

しかし、CdOが溶解するときには、肺胞腔において次の反応



が起きていると考えられ、CdOを投与した実験群にCdCl₂投与群より強い肺の炎症がみられたのは、ここで生じたOH⁻によるアルカリ刺激によるものと考えることができる。また、CdOは粒子状物質であるので、AMφが粒子を貪食する際に放出されるスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻) [82]や、コラゲナーゼやエラスターゼといった蛋白分解酵素により引き起こされる肺傷害 [83,84]、ならびにこれらの刺激物質の相乗作用なども理由の一つ

として考えられる。

Fig. 7に示した気管支肺胞洗滌液ペレット中の必須元素含量の変化は、細胞数の変化とほぼ同じ傾向を示した。したがって、ここでは特筆すべき事項はあまりないが、以下に述べる気管支肺胞洗滌液上清中の必須元素含量との量的比較を行うと、上清中のSとP含量はペレットより約10倍程度多いことがわかる。

気管支肺胞洗滌液上清中の蛋白質、LDHや β -Glu活性の経時変化において、CdOとCdCl₂投与群は、ともに投与12時間～1日後に最大値を示し7日後には対照値に戻ったが、これらの生化学的指標によりCd化合物の肺毒性を評価した場合、両実験群間で大きな差はみられなかった(Fig. 9 (a)～(c))。

しかし、蛋白質量においては有意ではないものの、CdO投与群ではCdCl₂投与群に比べ強い影響が見られた。 β -Glu活性の経時変化は二峰性を示したが、投与3日目における第2のピークは、高い β -Glu活性を持つことが知られているAM ϕ の細胞数の変化と一致するので、この第2のピークはAM ϕ に由来するものと考えられる。

用量影響変化群において、洗滌液上清中の蛋白質量とLDH活性は用量依存的に上昇したが、 β -Glu活性はCdOとCdCl₂投与群ともに2 μ g Cd/ラットまでは上昇したものの、それ以上の用量では減少する傾向を示した。また、2 μ g Cd/ラットの用量では蛋白質量やLDH活性値の上昇が対照値のわずか2～3倍であったのに対し、 β -Glu活性は約7倍に上昇しており、気管支肺胞洗滌液中の β -Glu活性は、肺の傷害を検出するための鋭敏な指標であるといえる。Daviesらは、AM ϕ を用いた*in vitro*の実験において、培地ではLDH活性が上昇する前に β -Glu活性が上昇することを認めている[80]。このことは、細胞が壊死する以前にAM ϕ 内のライソゾーム酵素の放出が昂進されていることを示しており、本実験における上記結果と一致する。したがって、Fig. 12(c)に示した β -Glu活性の用量影響関係は、2 μ g Cd/ラットの用量まではライソゾーム酵素の分泌能の昂進、それ以上の用量では分泌の抑制がみられたことを示しているものと

考えることができる。

気管支肺胞洗滌液上清中の必須元素濃度の経時的あるいは用量影響変化において、SとCa含量は洗滌液上清中の蛋白質と類似した動きを示しており、この2つの元素は主として血漿成分の肺胞腔への浸出の指標として用いることができるものと考えられる(Fig. 8 (a), (b), (d), (e))。しかし、洗滌液中のP含量の経時的あるいは用量影響関係は、SやCa含量と全く異なった変化を示した(Fig. 8 (c), (f))。特に、用量影響関係においては、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量までは洗滌液中のP含量は上昇したがそれ以上の用量では逆に低下し、さらに $10\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量では対照群に比べ有意に低い値を示した。気管支肺胞洗滌液上清中のP含量の大部分はサーファクタントに由来しているので、このP含量の変化は肺のサーファクタント分泌能の変化として捉えることができる。

肺胞腔におけるサーファクタント量は、II型上皮細胞による産生とAM ϕ による代謝によりその恒常性が保たれている。したがって、高用量のCdOを気管内投与したことにより生じた気管支肺胞洗滌液上清中のP含量の低下は、AM ϕ の食食能の上昇に由来していたとも考えられる。しかし、経時変化においてはP含量が最大値を示した投与3日後にAM ϕ 数も最大となっていたこと(Fig. 9 (e))、また、用量影響関係において、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラット以下の用量を投与した群にP含量の上昇が見られたが、この場合にもAM ϕ 数が上昇していたことより、気管支肺胞洗滌液中のP含量の変化をサーファクタントを代謝するAM ϕ 数の変化により説明することはできない。したがって、洗滌液に回収されたP含量の変化は、II型上皮細胞のサーファクタント分泌能の変化を示しているものと考えられる。

ところで、Fig. 8 (f)とFig. 12 (c)において、ともに細胞の分泌能の指標である気管支肺胞洗滌液上清中の $\beta\text{-Glu}$ 活性とP含量の用量影響関係は同じパターンを示した。すなわち、 $2\mu\text{g Cd}$ /ラットの用量までは細胞の分泌能が昇進し、それ以上の用量では分泌の抑制が起こることが観察された。また、肺湿重

量は、 $5 \mu\text{g Cd}$ / ラットの用量からは急増したが $2 \mu\text{g Cd}$ / ラット以下の用量では変化がみられず (Fig. 5 (b))、肺における Cd の残存率も $2 \sim 5 \mu\text{g Cd}$ / ラットの間で減少がみられた (Table 1)。これらのことを総合すると、Cd 化合物の急性経気道曝露実験において、ラットの肺が生理的の反応を示すことができる最大用量は $2 \mu\text{g Cd}$ / ラットであることがわかる。生理的生体反応がみられる最大用量が $2 \mu\text{g Cd}$ / ラットであると数値で示せたことは、本研究でのもっとも大きな成果である。

ところで、ここで用いたラットの推定分時換気量は 111 mL であり、 $2 \mu\text{m}$ の粒子のラットの肺における沈着率は約 10% である [85]。これらの値を用いると、いまここで用いたラットが、Cd O エアロゾルを 8 時間 (作業場における 1 日の就業時間) 吸入した後に、肺に $2 \mu\text{g}$ の Cd が沈着するためのエアロゾル濃度 (C) は、

$$C \times 111 \times 60 \times 8 \times 0.1 \times (1/1000) = 2$$

より、

$$C = 0.38$$

すなわち、 $0.38 \text{ mg Cd} / \text{m}^3$ であると算出される。これは雄性ラットを用いた場合の結果であるが、他種の動物を用いて同様の実験を行うことにより人への外挿も可能になるものと期待される。

5-4 酸化カドミウムを気管内投与したラットにおける生体防衛反応

5-3 に経気道曝露した Cd 化合物によって引き起こされる肺傷害の経時変化、並びに用量影響関係について述べたが、では、肺に沈着した Cd は、どのような機構により毒性を発現するのであろうか。

Cd の毒性発現機構に関しては、呼吸器への影響のみならず、肝毒性や腎毒性を考える上でも重要な問題の一つである。この問題を解決するためには、Cd が細胞膜に及ぼす作用を分子レベルで解明する必要があると考えられるが、実験手法はまだ確立されておらず、Cd の毒性発現機構に関してははっきりした回答が得られてい

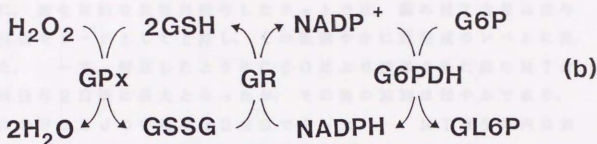
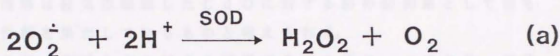
ないというのが現状である。

しかし、有害物質が細胞内に取り込まれると、生体にはその物質の毒性を軽減するための防御機構が働くので、その機構を明らかにすることにより間接的に毒性発現機構にアプローチできる場合がある。Cd化合物を曝露した生体における防御機構としてまず考えられるのは、Cdの捕捉剤として作用するMTやGSHなどのチオール化合物によるCdのキレーション作用である[47,86,87]。一方、Cdの毒性発現機構として活性酸素の関与も示唆されているが[19,33]、活性酸素種の代謝は、抗酸化防御系酵素と呼ばれる一群の酵素が行っている(Fig. 20)。前述したMTやGSHは、Cdのキレーターとして働くのみならず生体の抗酸化防御系を構成する成分でもある。

ところで、ラットにCdOを $5 \mu\text{g Cd}$ /ラットの用量で気管内投与した時に明らかに肺の傷害がみられ、また投与したCdOの約10~20%が肝臓に移行していたことは、前述した通りである。そこで、 $5 \mu\text{g Cd}$ /ラットの用量でCdOを気管内投与して、肺と肝臓におけるチオール化合物と抗酸化防御系酵素の経時変化を調べるための実験を行ったのであるが、以下に、その結果について考察する。

一般に、肺に炎症が起きた場合に肺湿重量は上昇するので、肺における構成成分や酵素活性の変化を論ずるためにはなんらかの補正が必要とされる。補正としては、肺全体として求められた活性値などを蛋白質量、DNA量や肺の重量で除するという方法が用いられる。しかし、蛋白質や肺の重量で補正した場合は浸潤した血漿蛋白質が、DNA量で補正した場合は浸出した血球成分がそれぞれ誤差要因となり、曝露以前の肺組織に起こった真の変化を表わすことは困難である。本研究では、補正法として最も簡単である肺湿重量を用いた。

Fig. 15~Fig. 17に示したように、CdOの気管内投与により肺のチオール化合物や抗酸化防御系酵素は、肺全体の量や活性で表わした場合はすべて有意な上昇を示していたが、補正後の値を見ると、MTとGSH濃度の上昇やG6PDH活性の上昇と



G6P : *D*-glucose 6-phosphate
 GL6P : *D*-glucono- δ -lactone 6-phosphate

Fig. 20 (a) Mechanism of superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot -}$) depletion by superoxide dismutase (SOD) and (b) detoxification of H_2O_2 to H_2O by antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH).

SOD活性の低下のみが有意な変化として認められた。とりわけMT濃度は、投与2日後に対照値の6倍程度の上昇を示しており、MTの誘導は経気道曝露したCdOに対する肺の防御系として最も重要な役割を果たしているものと考えられる。

ところで、亜鉛もまたMTを誘導する重金属の一つであり、気管内投与したZnOの肺における半減期は14時間であることを、本研究の参考論文として発表した[88]。Fig. 19に示したように、酸化亜鉛を気管内投与したラットでは、肺のMT含量は投与2日後をピークとして上昇し、その後速やかに対照値のレベルに戻った。一方、前述したようにCdOにより誘導された肺のMT含量は投与2日後に最大となったが、その後の減衰は緩やかであり、肺におけるCdの半減期は22日であった。MTは生体内においてこれらの重金属を強く捕捉する蛋白質であるので、肺におけるZnOとCdOの半減期の違いは、ZnとCdのMT誘導能やMTへの親和性の違いに起因するものと推測される。

また、GSH濃度はMTが減少し始めた4日後に有意に上昇していたが、このことは、肺のシステインが投与2日後までは主としてMTの合成のために使われていたものと理解される。MTの誘導がGSHの低下を伴うことは肝臓や腎臓で証明されており[89]、さらに、*in vitro*の実験においても細胞内のGSHとMT濃度の経時変化は対象的なパターンを示すことが知られている[90]。これらのGSHとMT濃度の経時的变化は、肺について得られた本実験結果とよい一致を示している。

ところで、肺単位重量当りのG6PDH活性は有意な上昇を示したが、本酵素は抗酸化防御系に関与するNADPHを産生するばかりではなく、核酸の合成のためにも重要な酵素である。G6PDH活性の上昇時には肺重量の上昇、すなわち肺組織の上昇も同時に起こっていたので核酸の合成も盛んになっていたことが推測される。したがって、本酵素活性の上昇は勿論ペントースリン酸回路の活性化を意味しているが、この活性化が肺の抗酸化的防御だけのため(NADPHの産生)に誘導されたと考えすることはできない[91]。

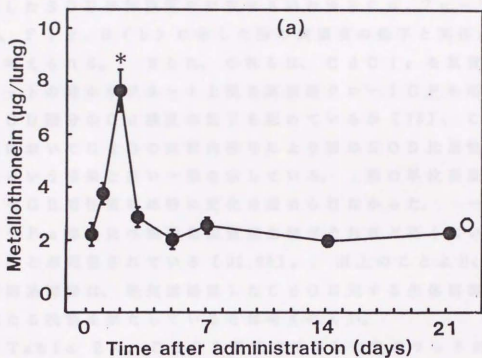


Fig. 21 Induction of metallothionein (MT) in the lung following intratracheal instillation of ZnO at a dose of 100 µg Zn/rat. The open circle indicates control level. Each point represents mean ± SEM.

* --- Significantly different from control value ($P < 0.05$).

また、SODの比活性が減少することが認められたが、ここで測定したSODは細胞質に存在するいわゆるCu, Zn-SODであり、Fig. 6(b)に示した肺の銅濃度の低下と関係があるものと考えられる。さらに、小林らは、CdCl₂を気管内投与したラットの肺ホモジネート上清を高速液クロマトグラフィーを用いて分析し、SOD画分のCu濃度の低下を認めているが[75]、これは、本実験においてCdOの気管内投与により肺のSOD比活性値が低下したという結果と良い一致を示している。肺の単位重量当りのGPxやGR活性値には特に変化は認められなかった。一方、Cdは、VやFe等に比べ過酸化脂質産生能がそれほど高くない重金属であることが報告されている[92,93]。以上のことより、肺の抗酸化防御系酵素は、経気道曝露したCdOに対する生体防御に関して、主たる役割を果たしているとは考えにくい。

Table 2に、CdOを気管内投与した後のラットの肝臓におけるチオール化合物と抗酸化防御系酵素活性の変動を示した。注目すべきは、投与7時間後におけるチオール化合物濃度の減少である。肝臓のGSH濃度は食餌時間に大きく依存し、日内変動を示すことが知られているので、同じ時間スケジュールで対照群と曝露群の投与と解剖を行い、かつ、その間食餌制限を行ってCdO投与7時間後のGSH濃度を調べた。この実験系においても、やはりCdO投与群は対照群に比べて有意に低い値を示した(4-6)。このことは、肝臓のGSHとMT量の低下は、CdOの気管内投与により肺でのシステインの要求量が増加したために起こったことを示している。一方、末梢部に起こった炎症や[94]、セファデックスビーズを気管内投与して起こした肺の炎症により肝臓のGSHレベルが低下したという報告がなされているが[95]、これらの結果も、肝臓のGSHが、他の組織におけるシステインの要求に伴い供給され得ることを示している。

肝臓の抗酸化防御系酵素活性の経時変化において、GPxの上昇とGR活性の低下がみられた。これは多分、肝臓におけるGSHやGSSGの代謝になんらかの変化が起こったためであろうと推定される。Cdの経口や皮下投与により、心臓、肝臓や腎臓のGP

x 活性が低下することが知られているが [96,97]、一方、Grose らは CdCl₂ の吸入実験において肺の GPx 活性の低下を認めている。本研究結果は、後者の報告を支持するものである。

5-5 重金属間の肺毒性の比較における本研究の意義

重金属化合物の中には毒性が高いものが多く、毒理学研究者たちの注目を集めてきた。しかし、経気道曝露した重金属化合物の毒性に関する研究例は少なく、全体像を捉えるためには今後の研究の発展に期待しなければならない。経気道曝露した有害物質の毒性評価は、本来長期吸入曝露実験により行われるべきであることは言うまでもないが、吸入実験は多くの費用と労力を必要とするため、数限りない化合物の肺毒性をスクリーニングする目的には合致しない。また、スクリーニングだけを目的とするのであれば *in vitro* の実験系で十分である。しかし、毒物の生体への影響は、曝露した物質の代謝的体内動態に基づいて発現されるものであり、やはり *in vivo* の実験において体内動態と影響を同時に調べる必要がある。

そこで、本論文で述べた実験方法、すなわち小動物に重金属化合物の溶液または懸濁液を気管内投与し、経時的あるいは用量反応的に、その体内動態と呼吸器への影響を調べるといふ実験系が有効であると考えられる。

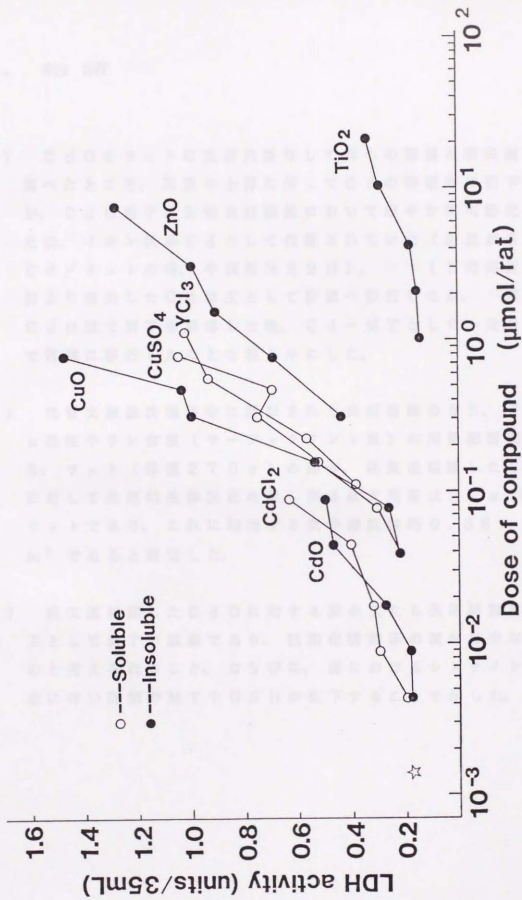
肺毒性の指標としては、最も感度が優れていると考えられる気管支肺胞洗滌液中に回収される酵素活性や細胞数を用いた。その中でも、LDH 活性は用量に対してよい直線性を示し、かつ、LDH 活性の上昇は細胞の壊死そのものを表わしているため、重金属間の毒性を比較する上において最も適当な指標であると考えられる [98]。

Fig. 22 に、同じ実験条件、すなわち平均体重 270 g の Wistar 系雄性ラットに重金属の溶液または懸濁液を 0.4 ml 気管内投与し、投与 2 日後に気管支肺胞洗滌を行うという方法でもとめた、洗滌液中の LDH 活性と重金属の用量との関係を示した。本研究で述べた CdO や CdCl₂ の肺毒性は "nuisance dust" であると考えられている TiO₂ の約 1,000 倍であり、ZnO や Cu 化合物はそれらの中間の毒性を、また、高度技術化産業などで

今後使用量が増大すると考えられる YCl_3 は Cu 化合物と同程度の肺毒性を示すことがわかる。さらに、難溶性の CdO や CuO は、水溶性の $CdCl_2$ や $CuSO_4$ とそれぞれ肺毒性のレベルがほとんど等しいことがわかる。これらのことは、呼吸器毒性学の分野において重要な知見であり、本論文で述べた実験方法の有用性を示している。

Fig. 22 Dose-effect profiles between doses of heavy metal compounds instilled into the rat lung and lactate dehydrogenase (LDH) activities in the bronchoalveolar lavage fluid used as an index of lung injury. The bronchoalveolar lavage was performed by repeated instillation and withdrawal of 5mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, containing 0.25 M glucose) with each volume of 6-7 mL until 35 mL wash fluid was obtained.

☆ --- denotes control value.



6. 結語

- 1) CdOをラットに気管内投与して肺への蓄積と消失過程を調べたところ、用量の上昇に伴ってCdの蓄積率は低下したが、CdO粒子は気管支肺胞腔において速やかに可溶化された後、イオン状のCdとして代謝されていた(用量が $5\mu\text{g Cd}$ /ラットの時、半減期は22日)。12時間以内に肺より消失したCdは主として肝臓へ移行したが、残りのCdは肺でMTを誘導した後、Cd-MTとして一定の割合で腎臓に移行したことを明らかにした。
- 2) 気管支肺胞洗滌液中に回収された炎症指標のうち、 $\beta\text{-Glu}$ 活性やリン含量(サーファクタント量)の用量影響関係より、ラット(体重270g)の肺が、経気道曝露したCdOに対して生理的生体反応を示し得る最大用量は $2\mu\text{g Cd}$ /ラットであり、これに相当する気中濃度は約 $0.38\text{mg}/\text{m}^3$ であると推定した。
- 3) 経気道曝露したCdOに対する肺の主たる生体防御反応は主としてMTの誘導であり、抗酸化防御系の関与は少ないものと考えられること、ならびに、肺におけるシステインの要求に伴い肝臓のMTやGSHが低下することを示した。

7 . 謝 辞

本学位論文を提出するにあたり、紹介教官としていろいろご助言下さいました東京大学医学部人類生態学教室の鈴木継美教授に、心よりお礼申し上げます。また、終始激励して下さいました国立公害研究所環境保健部の鈴木和夫人類生態学研究室室長、村上正孝環境保健部長はじめ、実験にご協力戴きました小林悦子博士、児玉直美さん（旧姓塚本）、肥後幸呼さん、ならびに、電顕の依頼測定を快く引き受けて下さいました柴田恵子さんに深謝致します。

8 . 参 考 文 献

- [1] Watson, J.A., Spritzer, A.A., Auld, J.A. and Guetthoff, M.A. (1969) Deposition and clearance following inhalation and intratracheal injection of particles. Arch. Environ. Health, 19, 51-58.
- [2] Pritchard, J.N., Holmes, A., Evans, J.C., Evans, N., Evans, R.J. and Morgan, A. (1985) The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. Environ. Res., 36, 268-297.
- [3] Nandi, M., Jick, H., Slone, D., Shapiro, S. and Lewis, G.P. (1969) Cadmium content of cigarettes. Lancet ii, 1329-1330.
- [4] Lewis, G.P., Jusko, W.J., Coughlin, L.L., and Hartz, S. (1972) Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. Lancet i, 291-292.
- [5] Watanabe, T., Koizumi, A., Fujita, H., Kumai, M. and Ikeda, M. (1983) Cadmium levels in the blood of inhabitants in nonpolluted areas in Japan with special references to aging and smoking. Environ. Res., 31, 472-483.
- [6] Siegers, C.-P., Jungblut, J.R., Klink, F. and Oberheuser, F. (1983) Effect of smoking on cadmium and lead concentrations in human amniotic fluid. Toxicol. Lett., 19, 327-331.

- [7] Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- [8] Barnhart, S. and Rosenstock, L (1984) Cadmium chemical pneumonitis. *Chest*, 86, 789-791.
- [9] Menzel, D.B. and McClellan, R.O. (1980) Toxic responses of the respiratory system. In: Doull, J., Klaassen, C.D. and Amdur, M.O. (Eds.) "Toxicology", Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pp.246-274.
- [10] Cotes, J.E. and Steel, J. (1987) "Work-related lung disorders." Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.247-248.
- [11] Oberdoerster, G., Baumert, H.-P., Hochrainer, D. and Stober, W. (1979) The clearance of cadmium aerosols after inhalation exposure. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 40, 443-450.
- [12] Biosset, M., Griard, F., Godin, J. and Boudene, C. (1978) Cadmium content of lung, liver and kidney in rats exposed to cadmium oxide fumes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 41, 41-53.
- [13] Prasada Rao, P.V.V. and Gardner, D.E. (1986) Effects of cadmium inhalation on mitochondrial enzymes in rat tissues. *J. Toxicol. Environ. Health*, 17, 191-199.
- [14] Grose, E.C., Richards, J.H., Jaskot, R.H., Menache, M.G., Graham, J.A. and Dauterman, W.C. (1987) A comparative

- study of the effects of inhaled cadmium chloride and cadmium oxide: Pulmonary response. *J.Toxicol.Environ. Health*, 21, 219-232.
- [15] Hadley, L.G., Conklin, A.W. and Sanders, C.L. (1980) Rapid solubilization and translocation of ^{109}Cd following pulmonary deposition. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 54, 156-160.
- [16] Tandon, S.K. and Asokan, P. (1981) Distribution of intra-tracheally administered cadmium in rats. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 49, 381-383.
- [17] Aihara, M., Sharma, R.P. and Shupe, J.L. (1985) Short term deposition of soluble vs. insoluble forms of cadmium in the rat lung after intratracheal administration: An autoradiographic assessment. *Toxicology*, 36, 109-118.
- [18] Yamada, H., Damiano, V.V., Tsang, A.-L., Meranze, D.R., Glasgow, J., Abrams, W.R. and Weibaum, G. (1982) Neutrophil degranulation in cadmium-chloride-induced acute lung inflammation. *Am.J.Pathol.*, 109, 145-156.
- [19] Hart, B.A. (1986) Cellular and biochemical response of the rat lung to repeated inhalation of cadmium. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 82, 281-291.
- [20] Martin, F.M. and Witschi, H.P. (1985) Cadmium-induced lung injury: Cell kinetics and long-term effects. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 80, 215-227.

- [21] Palmer, K.C., Mari, F. and Malian, M.S. (1986) Cadmium-induced acute lung injury: Compromised repair response following thyroidectomy. Environ. Res., 41, 568-584.
- [22] Strauss, R.H. Palmer, K.C. and Hayes, J.A. (1976) Acute lung injury induced by cadmium aerosol. I. Evolution of alveolar cell damage. Am. J. Pathol., 84, 561-578.
- [23] Asvadi, S. and Hayes, J.A. (1978) Acute lung injury induced by cadmium aerosol. II. Free airway cell response during injury and repair. Am. J. Pathol., 90, 89-98.
- [24] Palmer, K.C., Snider, G.L. and Hayes, J.A. (1975) Cellular proliferation induced in the lung by cadmium aerosol. Am. Rev. Respir. Dis., 112, 173-179.
- [25] Kutzman, R.S., Drew, R.T., Shiotsuka, R.N. and Cockrell, B.Y. (1986) Pulmonary changes resulting from subchronic exposure to cadmium chloride aerosol. J. Toxicol. Environ. Health, 17, 175-189.
- [26] Bus, J.S., Vinegar, A. and Brooks, S.M. (1978) Biochemical and physiologic changes in lungs of rats exposed to a cadmium chloride aerosol. Am. Rev. Respir. Dis., 118, 573-580.
- [27] Padmanabhan, R.V., Gudapaty, S.R., Liener, I.E. and Hoidal, J.R. (1982) Elastolytic activity in the lungs of rats exposed to cadmium aerosolization. Environ. Res., 29, 90-96.
- [28] Sampson, C.E., Chichester, C.O., Hayes, J.A. and Kagan, H.M.

- (1984) Alterations in collagen biosynthesis and in metallothionein in lungs of rats acutely or repeatedly exposed to cadmium chloride aerosol. *Am.Rev.Respir. Dis.*, 129, 619-624.
- [29] Chichester, C.O., Palmer, K.C., Hayes, J.A. and Kagan, H.M. (1981) Lung lysyl oxidase and prolyl hydroxylase: Increases induced by cadmium chloride inhalation and effect of β -aminopropionitrile in rats. *Am.Rev. Respir.Dis.*, 124, 709-713.
- [30] Koblir, V.K., Mirejovska, E., Holusa, R. and Hurych, J. (1986) Changes in pulmonary connective tissue proteins after a single intratracheal instillation of cadmium chloride in the rat. *Environ.Res.*, 40, 3-14.
- [31] Amanuma, K. and Suzuki, K.T. (1987) Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride on phospholipids in alveolar wash fluid. *Toxicology*, 44, 321-328.
- [32] Boudreau, J., Vincent, R., Nadeau, D., Trottier, B., Fournier, M., Krzystyniak, K. and Chevalier, G. (1988) Toxicity of inhaled cadmium chloride: Early responses of the antioxidant and surfactant systems in the rat lungs. *J.Toxicol.Environ.Health*, 23, 241-256.
- [33] Cross, C.E., Omaye, S.T., Rifas, D.C., Hasegawa, G.K. and Reddy, K.A. (1979) Biochemical effects of intratracheal instillation of cadmium chloride on rat lung. *Biochem. Pharmacol.* 28, 381-388.

- [34] Buckley, B.J. and Bassett, D.J.P. (1987) Pulmonary cadmium oxide toxicity in the rat. *J.Toxicol.Environ. Health*, 21, 233-250.
- [35] Grose, E.C., Richards, J.H., Jaskot, R.H., Menache, M.G., Graham, J.A. and Dauterman, W.C. (1987) *Toxicology*, 44, 171-179.
- [36] Bouley, G., Dubreuil, A., Despaux, N. and Boudene, C. (1977) Toxic effects of cadmium microparticles on the respiratory system. *Scand.J.Work Environ.Health*, 3, 116-121.
- [37] Greenspan, B.J. and Morrow P.E. (1984) The effects of in vitro and aerosol exposures to cadmium on phagocytosis by rat pulmonary macrophages. *Fundam.Appl. Toxicol.*, 4, 48-57.
- [38] Coin, P.G. and Stevens, J.B. (1986) Toxicity of cadmium chloride in vitro : Indices of cytotoxicity with the pulmonary macrophage. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 82, 140-150.
- [39] Hayes, J.A., Snider, G.L. and Palmer, K.C. (1976) The evolution of biochemical damage in the rat lung after acute cadmium exposure. *Am.Rev.Respir.Dis.* 113, 121-130.
- [40] Mustafa, M.G. and Cross, C.E. (1971) Pulmonary alveolar macrophage. Oxidative metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron- and energy-transfer reactions. *Biochemistry*, 10, 4176-

- [41] Fukuhara, M., Bouley, G., Godin, J., Griard, F., Biosset, M. and Boudene, C. (1981) Effects of short-term inhalation of cadmium oxides on rabbit pulmonary microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 715-720.
- [42] Biosset, M. and Boudene, C. (1981) Effect of a single exposure to cadmium oxide fumes on rat lung microsomal enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 57, 335-345.
- [43] Palmer, K.C., Naseem, S.M., Hayes, J.A. and Tishler, P.V. (1983) Lung aryl hydrocarbon hydroxylase: Inhibition following cadmium chloride inhalation. *Environ. Res.* 32, 432-444.
- [44] Sanders, C.L. and Mahaffey, J.A. (1984) Carcinogenicity of single and multiple intratracheal instillations of cadmium oxide in the rat. *Environ. Res.*, 33, 227-233.
- [45] Takenaka, S., Oldiges, H., Konig, H., Hochrainer, D. and Oberdorster, G. (1983) Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 367-371.
- [46] Prigge, E. (1978) Early signs of oral and inhalative cadmium uptake in rats. *Arch. Toxicol.*, 40, 231-247.
- [47] Cherian, M.G. and Goyer, R.A. (1978) Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, 23, 1-10.

- [48] Post, C.T., Squibb, K.S., Fowler, B.A., Gardner, D.E., Illing, J. and Hook, G.E.R. (1982) Production of low molecular weight cadmium-binding proteins in rabbit lung following exposure to cadmium chloride. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 2969-2975.
- [49] Hart, B.A. and Garvey, J.S. (1986) Detection of metallothionein in bronchoalveolar cells and lavage fluid following repeated cadmium inhalation. *Environ. Res.*, 40, 391-398.
- [50] 小林悦子、児玉弘、須長宏行、鈴木和夫 (1987) レットに気管内投与した重金属の影響 (第3報)。塩化カドミウム投与後の肺上清中のカドミウムの存在形態の変化。衛生化学、33、409-414。
- [51] Wroblewski, F. and LaDue, J.S. (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90, 210-213.
- [52] Lockard, V.G. and Kennedy, R.E. (1976) Alterations in rabbit alveolar macrophages as a result of traumatic shock. *Lab. Invest.*, 35, 501-506.
- [53] Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982) Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66, 134-142.
- [54] Bernt, E. and Bergmeyer, H.U. (1974) Glutathione. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* 4, Academic Press, New York, pp.1643-1647.

- [55] London, R.G. (1968) Glucose 6-Phosphate dehydrogenase from erythrocytes. In: Wood, W.A. (Ed.), *Methods in Enzymology* 9, Academic Press, New York, pp.126-131.
- [56] Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169.
- [57] Racker, E. (1955) Glutathione reductase (Liver and Yeast). In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology* 2, Academic Press, New York, pp.722-725.
- [58] Crapo, J.D., McCord, J.M. and Fridovich, I. (1978) Preparation and assay of superoxide dismutases. In: Fleischer, S. and Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology* 53, Academic Press, New York, pp.382-393.
- [59] Davies, M.H., Bozigian, H.P., Merrick, B.A., Birt, D.F. and Schnell, R.C. (1983) Circadian variations in glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse. *Toxicol. Lett.*, 19, 23-27.
- [60] Schnell, R.C., Bozigian, H.P., Davies, M.H., Merrick, B.A. and Johnson, K.L. (1983) Circadian rhythm in acetaminophen toxicity: Role of nonprotein sulfhydryls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71, 353-361.
- [61] Jaeschke, H. and Wendel, A. (1985) Diurnal fluctuation and pharmacological alteration of mouse organ gluta-

thione content. *Biochem.Pharmacol.*, 34, 1029-1033.

- [62] 日本化学会編、化学便覧、基礎編 I、丸善(1984)、
p p. 117.
- [63] Lundborg,M., Lind,B. and Camner,P. (1984) Ability of
rabbit alveolar macrophages to dissolve metals. *Exp.
Lung Res.*, 7, 11-22.
- [64] Brain,J.P., Bloom,S.B., Valberg,P.A. and Gehr,P (1984)
Correlation between the behavior of magnetic iron
oxide particles in the lung of rabbit and phago-
cytosis. *Exp.Lung Res.*, 6, 115-131.
- [65] Norseth,T. (1988) Metal carcinogenesis. *Ann.N.Y.Acad.
Sci.*, 534, 377-386.
- [66] Tanaka,K., Sueda,K., Onosaka,S. and Okahara,K. (1975)
Fate of ¹⁰⁹Cd-labeled metallothionein in rats.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 33, 258-266.
- [67] Nordberg,M. and Nordberg,G.F. (1975) Distribution of
metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in
mice:Preliminary studies. *Environ.Health Perspect.*,
12, 103-108.
- [68] Cherian,M.G., Goyer,R.A. and Delaquerriere-Richardson,
L. (1976) Cadmium-metallothionein-induced nephropathy.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 38, 399-408.
- [69] Suzuki,K.T., Sunaga,H., Kobayashi,E. and Shimojo,N.
(1986) Mercaptalbumin as a selective cadmium-binding

- protein in rat serum. Toxicol.Appl.Pharmacol., 88, 466-473
- [70] Evans, M.J., Cabral, L.J., Stephens, R.J. and Freeman, G. (1973) Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. Am.J.Pathol., 70, 175-190.
- [71] Kutzman, R.S., Popenoe, E.A., Schmaeler, M. and Drew, R.T. (1985) Changes in rat lung structure and composition as a result of subchronic exposure to acrolein. Toxicology, 34, 139-151.
- [72] Dethloff, L.A., Gilmore, L.B., Gladen, B.C., George, G., Chhabra, R.S. and Hook, G.E.R. (1986) Effects of silica on the composition of the pulmonary extracellular lining. Toxicol.Appl.Pharmacol., 84, 66-83.
- [73] Hirano, S., Ono, M and Aimoto, A. (1988) Functional and biochemical effects on rat lung following instillation of crocidolite and chrysotile asbestos. J.Toxicol. Environ.Health, 24, 27-39.
- [74] Collins, J.F., Johanson, W.G.Jr., McCullough, B., Jones, M.A. and Waugh, H.J.Jr. (1978) Effects of compensatory lung growth in irradiation-induced regional lung fibrosis in the baboon. Am.Rev.Respir.Dis., 117, 1079-1089.
- [75] 小林悦子、須長宏行、鈴木和夫 (1987) ラットに気管内投与した重金属の影響 (第2報)。塩化カドミウム投与後の肺の元素濃度の変化。衛生化学、33、360-364。

- [76] Henderson, R.F., Rebar, A.H., Pickrell, J.A. and Newton, G.J. (1979) Early damage indicators in the lung. III. Biochemical and cytological response of the lung to inhaled metal salts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 123-136.
- [77] Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O, Ferrans, V.J. and Crystal, R.G. (1979) Inflammatory and immune process in the human lung in Health and Disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.*, 97, 149-205.
- [78] Fulmer, J.D. Bronchoalveolar lavage. (1982) *Am. Rev. Respir. Dis.*, 128, 961-963.
- [79] 石橋正義、吉田稔、広瀬隆士 (1985) 肺血管透過性の定量的評価法について。呼吸と循環、33、609-614.
- [80] Davies, P., Allison, A.C., Ackerman, J., Butterfield, A. and Williams, S. (1974) Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. *Nature*, 251, 423-425.
- [81] Toshima, N. and Akino, T. (1972) Alveolar and tissue phospholipids of rat lung. *Tohoku J. Exp. Med.*, 108, 253-263.
- [82] Hatch, G.E., Gardner, D.E. and Menzel, D.B. (1980) Stimulation of oxidant production in alveolar macrophages by pollutant and latex particles. *Environ. Res.*, 23, 121-136.

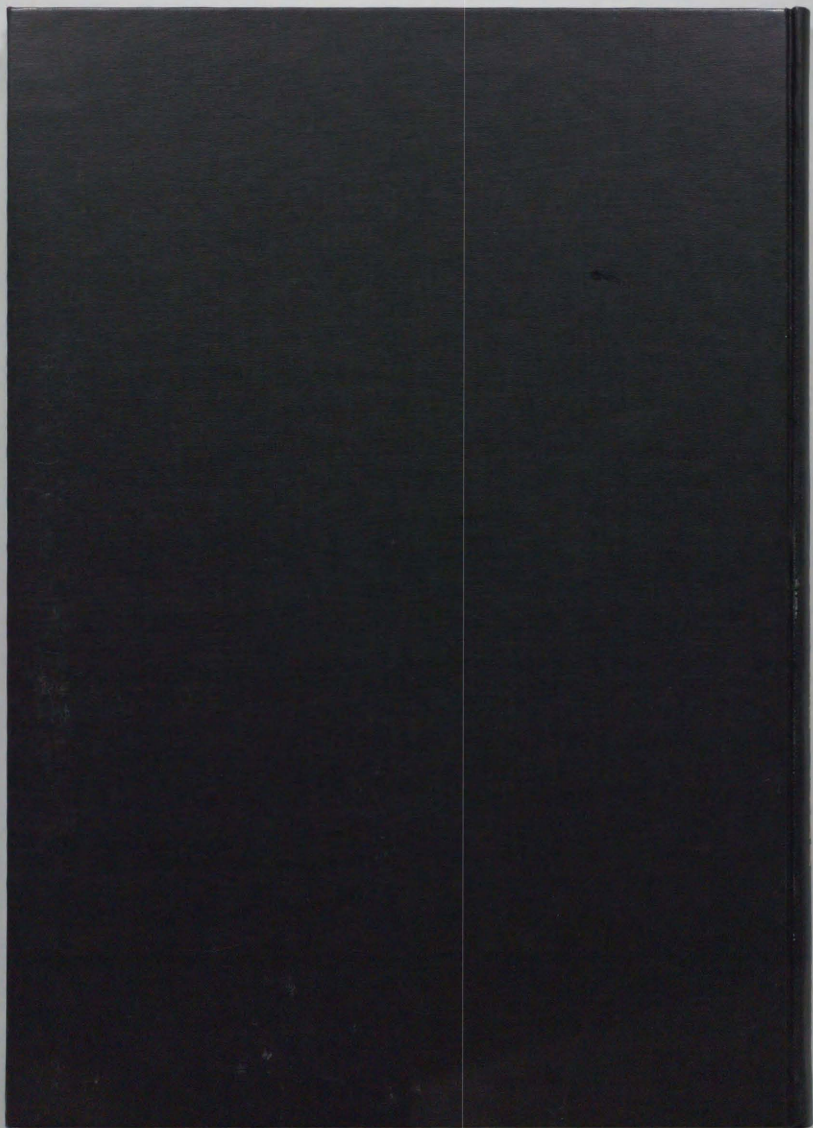
- [83] Werb,Z. and Gordon,S. (1975) Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. J.Exp.Med., 142, 346-360.
- [84] Werb,Z. and Gordon,S. (1975) Elastase secretion by stimulated macrophages. J.Exp.Med., 142, 361-377.
- [85] Raab,O.G., Yeh,H.-C., Newton,G.J., Phalen,R.F., Velasquez,D.J. (1977) Deposition of inhaled monodisperse aerosols in small rodents. In:Walton,W.H.(ed.) Inhaled Particles.IV, part 1., Unwin Brothers Limited, Old Working, Surrey, UK., pp.3-21
- [86] Stacey,N.H., Cantilena,L.R.Jr. and Klaassen,C.D. (1980) Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. Toxicol.Appl.Pharmacol., 53, 470-480.
- [87] Kang,Y.-J. and Enger,M.D. (1988) Glutathione is involved in the early cadmium cytotoxic response in human lung carcinoma cells. Toxicology, 48, 93-101.
- [88] Hirano,S., Higo,S., Tsukamoto,N., Kobayashi,E. and Suzuki,K.T. (1989) Pulmonary clearance and toxicity of zinc oxide instilled into the rat lung. Arch.Toxicol., 63, 336-342.
- [89] Wong,K.-L. and Klaassen,C.D. (1981) Relationship between liver and kidney levels of glutathione and metallothionein in rats. Toxicology, 19, 39-47.

- [90] Seagrave, J., Hildebrand, C.E. and Enger, M.D. (1983) Effects of cadmium on glutathione metabolism in cadmium sensitive and cadmium resistant Chinese hamster cell lines. *Toxicology*, 29, 101-107.
- [91] Buckley, B.J. and Bassett, D.J.P. (1987) Glutathione redox status of control and cadmium oxide-exposed rat lungs during oxidant stress. *J. Toxicol. Environ. Health*, 22, 287-299
- [92] Stacey, N.H. and Klaassen, C.D. (1981) Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, 7, 139-147.
- [93] Stacey, N.H. and Klaassen, C.D. (1981) Interaction of metal ions with cadmium-induced cellular toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 7, 149-158.
- [94] Bragt, P.C. and Bonta, I.L. (1980) Oxidant stress during inflammation: Anti-inflammatory effects of anti-oxidants. *Agents and Actions*, 10, 536-539.
- [95] Cotgreave, I.A., Johansson, U., Moldeus, P. and Brat-
tsand, R. (1988) Lung and systemic thiol homeostasis during an acute lung inflammation in the rat. *Toxicology*, 50, 331-343.
- [96] Jamall, I.S. and Smith, J.C. (1985) Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart: A possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol. Appl.*

Pharmacol., 80, 33-42.

[97] Jamall, I.S. and Smith, J.C. (1985) Effects of cadmium treatment on selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidase activities and lipid peroxidation in the kidney and liver of rats maintained on various levels of dietary selenium. Arch. Toxicol., 58, 102-105.

[98] 平野靖史郎、鈴木和夫 (1989) 肺に沈着した重金属の代謝の動態と影響. 衛生化学、35、241-260.



centimeters 1 2 3 4 5 6 7 8

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

