資料１

カドミウム評価書（第２版）以降に得られた知見 概要集（案）
（実験動物等における有害性評価（腎臓及び骨））

【事務局より】
専門委員及び専門参考人より選定を頂いた各文献に記載されている内容をまとめています。また、Brzóska の骨に関する文献は一連の研究のため、姫野座長に雌雄及びばく露期間ごとにまとめて記載していただきました。第３版への組み込み方は別途ご相談させていただければと考えております。
※追記、修正は見え消しで、コメントは校閲のコメント機能でご意見いただけますと幸いです。
※目次の項目名は仮です。

＜目次＞（仮）

Ⅰ．実験動物等における有害性評価 1
１．慢性影響 1
（１）腎臓への影響 1
（２）（カルシウム代謝及び）骨への影響 4
①Brzóska らによる一連の研究 4
②その他 21

Ⅰ．実験動物等における有害性評価

１．慢性影響

（１）腎臓への影響

Wistar ラット（2 か月齢、雄、各群 36 匹）に塩化カドミウム（$CdCl_2$）（0、5 又は 50 mg Cd/L）を 6、12 又は 24 週間飲水投与し腎臓への影響を検討した。カドミウムの平均ばく露量は、5 mg/L 投与群で 157.6±1.4 μg/日（0.3205～0.6784 mg/kg 体重/日）、50 mg/L 投与群で 913.6±9.0 μg/日（1.9639～4.487 mg/kg 体重/日）であった。体重は 5 mg/L 投与群では対照群と同様であった。50 mg/L 投与群では投与 6 及び 12 週で体重増加量が有意に低下したが、24 週後ではみられなかった。投与 6、12 又は 24 週間後に各群 12 匹ずつ 24 時間畜尿、血液及び腎臓を採取した。腎臓については、カドミウム測定及び病理組織学的検討を行った。血液及び尿について、カドミウム、クレアチニン、タンパク及び尿素濃度を測定した。また尿については、尿素近位尿細管障害のマーカーとして総 N-アセチルグルコサミニダーゼ（total N-acetyl-β-D-glucosaminidase：NAG-T）、NAG isoenzyme B（NAG-B）及びアルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase：ALP）を測定した。

血中（図 1）、腎臓中（図 2）及び尿中（図 3）のカドミウム濃度は用量及び投与期間に依存していた。

主な試験結果を表 1 に示す。

なお、腎臓の絶対重量及び体重に対する相対重量は、50 mg/L 投与群の 12 週後の相対重量の有意な増加（8%）を除き投与による影響はみられなかった。この相対重量の増加は、体重増加の低下によるものと考えられた。

5 mg/L 投与群では、投与 12 週後から尿中の NAG-T 及び NAG-B 活性の上昇を伴って尿細管上皮の構造的な損傷がみられ、カドミウム濃度は、腎臓中で 4.08±0.33 μg/g、尿中で 4.31±0.28 μg/g cre であった。50 mg/L 投与群では、投与 6 週後に腎臓中のカドミウム濃度が 24.09±1.72 μg/g となり、尿細管の損傷（尿細管上皮組織像が不鮮明、刷子縁の萎縮、管腔への核放出を伴う部分的な細胞の断片化、尿中 NAG-T、NAG-B 及び ALP 活性の上昇）がみられた。50 mg/L 投与群では、投与 12 週後から糸球体の輪郭の欠如が顕著となり、投与 24 週後には毛細血管壁の肥厚及びろ過領域の拡張が明らかであった。また、尿素濃度が血清中で上昇、尿中で低下し、尿素のクリアランスが低下していることが示唆された。総タンパクの排泄が増加したが、内因性のクレアチニンのクリアランスに影響はみられなかった。5 mg/L 投与の投与 24 週後では、糸球体の機能的ではない器質的な損傷の兆候も明らかであった。

以上の結果から、著者らは、カドミウムの慢性ばく露は用量依存的に腎臓全体に器質的、機能的に損傷を与え、その損傷は、主要な再吸収部位（近位尿細管曲部及び直部）及びろ過部位（糸球体）に影響を及ぼすとしている（主要な標的部位は尿細管）。カドミウムの腎臓影響の閾値は、4.08±0.33 μg/g より小さく、腎臓損傷の兆候がみられなかった腎臓中濃度 2.40±0.15 μg/g よりも大きな値と推察している。（Brzóska et al. 2003）（参照 1） No.220

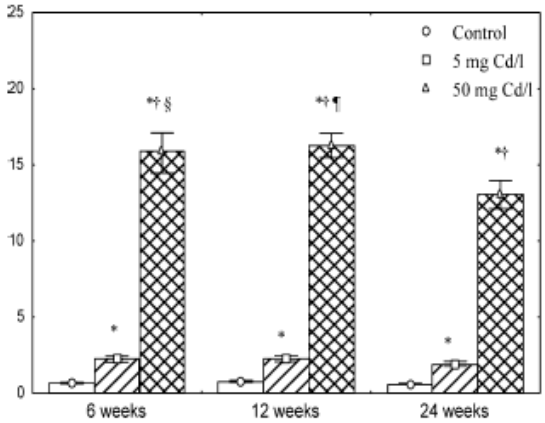


図 1　血中カドミウム濃度（Fig. 2 より抜粋）

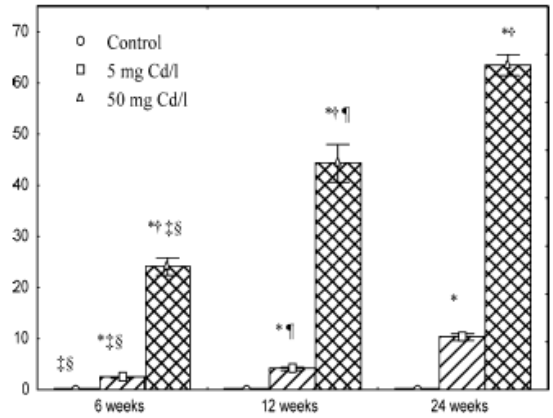


図 2　腎臓中カドミウム濃度（Fig. 3 より抜粋）

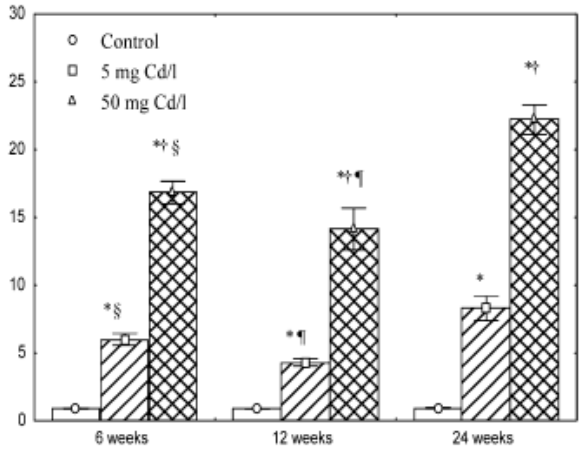


図 3　尿中カドミウム濃度（Fig. 4 より抜粋）

表 1　主な試験結果

指標		測定時点（投与開始後）		
		6 週	12 週	24 週
尿中 NAG-T		↑50[1)]	↑5,50	↑5,50
尿中 NAG-B		↑50	↑5,50	↑5,50
尿中 ALP		↑50	↑50	↑5,50
総タンパク	血清	N.S.	N.S.	N.S.
	尿	N.S.	N.S.	↑50
尿素	血清	N.S.	N.S.	↑50
	尿	N.S.	N.S.	↓50
血清クレアチニン		N.S.	N.S.	N.S.

クレアチニンクリアランス		N.S.	N.S.	N.S.
病理組織学的所見	hematoxylin and eosin（H&E）染色	5：器質的病変なし。 50：近位尿細管曲部/直部病変あり。	5：尿細管上皮の器質的病変(変性)。 50:6 週後よりさらに病変顕在化。	5,50：用量依存的なネフロン全体の損傷。
	periodic acid-Schiff（PAS）染色	50：一部の刷子縁では限局性の PAS 染色の欠失。	5,50：近位尿細管曲部/直部の刷子縁の染色低下。 糸球体の所見は 6 週と同様。	12 週と同様な所見。

N.S.：有意差なし。
1）有意差が見られた用量(mg/L)。

（２）骨への影響

①Brzóska らによる一連の研究

Brzóska らは、ラットの雌又は雄に様々な濃度、投与期間でカドミウムを与え、骨に対する影響を系統的に検討している。これらの知見はまとめて検討を行うことが適当と判断し、a. ばく露期間 12 か月（雌及び雄）と b. ばく露期間 24 か月（雌）に分けて記載した。各論文での測定項目等について表 2 に示す。

表 2　Brzóska らの一連の研究の項目

No.	雌雄	用量 (mg/L)	期間	測定項目	参照	No.
1	雌	1,5,50	12 か月	大腿骨／腰椎骨量、骨代謝マーカー、カルシウム排泄率	Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2005a（参照 2）	225
2	雌	1,5,50	12 か月	大腿骨部位別骨密度、骨力学試験（3、6、9、12 か月）	Brzóska et al. 2005（参照 3）	226
3	雄	1,5,50	12 か月	大腿骨・腰椎骨量、骨代謝マーカー、カルシウム、リン代謝	Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2005b（参照 4）	227
4	雄	1,5,50	12 か月	大腿骨／脛骨骨密度、骨力学試験（12 か月のみ）	Brzóska et al. 2010（参照 5）	024
5	雌	1	24 か月	腰椎（L4）骨力学試験、骨密度、ミネラル含量	Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2004a（参照 6）	223
6	雌	1	24 か月	大腿骨・腰椎骨密度、骨代謝マーカー	Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2004b（参照 7）	222
7	雌	1	24 か月	カルシウム、リン代謝、腎機能	Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2005c（参照 8）	224

8	雌	1	24 か月	大腿骨／脛骨骨力学試験、ミネラル含量	Brzóska 2012 (参照 9)	025

a. 雌雄ラット 12 か月飲水投与試験（No. 1～No. 4）

（i）試験方法

○カドミウム投与：

離乳直後の Wistar ラット（3 週齢、雌雄、各群 10 匹）に塩化カドミウム水和物（$CdCl_2$-2$^1/_2$ H_2O）（0、1、5 又は 50 mg Cd/L）を 3、6、9 又は 12 か月間飲水投与した。1 mg/L はカドミウムばく露を受けていない一般住民のレベル、5 mg/L は軽度のカドミウムばく露、あるいは喫煙者のレベル、50 mg/L はカドミウムによる明確な汚染があるレベルに対応するものとして設定された。

○骨量の評価：

大腿骨、腰椎（L1 – L5）及び骨格全体の骨塩量、骨面積、及び骨密度を二重エネルギーX 線吸収測定法（Dual-energy X-ray absorptiometry：DXA 法）で測定した。骨密度の Z スコアから、WHO（1994）[1]によるヒトの基準値に基づいて、正常（>−1）、骨塩量減少（−1 ～ −2.5）、骨粗しょう症（≤−2.5）を判定した。

骨密度の Z スコア ＝

(投与群の骨密度－対照群の骨密度平均値)／対照群の骨密度標準偏差

○骨力学試験：

大腿骨の近位部及び遠位部末端で圧縮試験（横断面方向）、骨幹で切断試験（横断面方向）を行った。雄については、さらに脛骨の圧縮試験（骨軸方向）と 3 点曲げ試験も行った（図 4）。

[1] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organization technical report series. 1994;843:1-129.

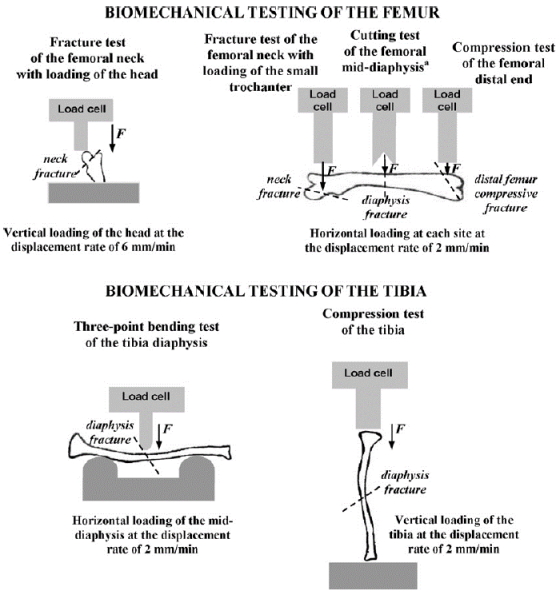


図４　力学試験模式図（No.４　Fig.1.より抜粋）
↓ F: direction of loading(荷重方向);　- - -: site of fracture(破断部位)

○骨代謝マーカー：

骨形成マーカーとして血清中のオステオカルシン（Osteocalcin : OC）、血清中 ALP 及び大腿骨の皮質骨及び海綿骨の ALP、骨吸収マーカーとして血清及び尿中Ｉ型コラーゲン架橋 C テロペプチド（C-terminal cross-linking telopeptides of type I collagen： CTX）を測定した。

○カルシウム、リン代謝：

血清及び 24 時間畜尿中のカルシウム濃度を測定し、尿中カルシウム分画排泄率（fractional excretion of Ca : FECa）を算出した。雄については、さらに血清中リン酸濃度及び尿中リン酸分画排泄率（FEphosphate）、カルシウム調節ホルモンとして、血清中 25-ヒドロキシビタミン D（25-hydroxyvitamin D : 25OHD）、1,25-ジヒドロキシビタミン D（1,25-dihydroxyvitamin D : 1,25(OH)$_2$D）、カルシトニン（calcitonin : CT）及び副甲状腺ホルモン（parathormone : PTH）濃度を測定した。

（ii）試験結果

表 3 に骨量、力学的特性、骨代謝マーカー、表 4 にカルシウム、リン代謝関連指標、図 6、表 5 にばく露状況に関する主な結果を示す。

●雌の結果

○骨密度：

対照群において、大腿骨、腰椎の骨密度は試験開始から 6 か月までに顕著に増加し、その後 12 か月までは緩慢に上昇したことから、生後 7 か月までに骨形成が盛んに起こっていると考えられた。カドミウムばく露により、大腿骨、腰椎の骨密度は、5、50 mg/L 群では 3 か月から有意に低下し、1 mg/L 群では 6 か月から有意に低下した。骨密度の Z スコア≤2.5 を骨粗しょう症とした場合、1 mg/L 群では、12 か月間発生しなかったが、5 mg/L 群では 6 か月で初めて観察され、9～12 か月の間は 20～40%のラットで認められた。50 mg/L 群では 3 か月から 1 匹に骨粗しょう症が認められ、6 か月で 40%、9～12 か月では 50～80%のラットに認められた。いずれのカドミウムばく露群も、骨密度の Z スコアは 9 か月までに濃度、及び時間依存的に低下し、9 か月と 12 か月の差は少なかった。

○骨の力学的特性：

大腿骨の圧縮試験の結果について最大荷重で比較すると、近位部末端では 5、50 mg/L 群で 6 か月から有意な低下を示し、遠位部末端では 5、50 mg/L 群で 3 か月から有意な低下を示した。一方、骨幹の切断試験では、50 mg/L 群のみが 9 か月から最大荷重の有意な低下を示した。著者らは、遠位部、近位部末端と骨幹の強度の差については、末端に強度の低い海綿骨が多く、骨幹には強度の高い皮質骨が多いためであると考察している。

○骨代謝マーカー：

骨形成マーカーの血清 OC は、いずれのカドミウムばく露群においても 3～6 か月で対照群より有意に低かった。血清 ALP は 1、5 mg/L 群ではほとんど変化しなかったが、大腿骨の海綿骨中 ALP はいずれのカドミウムばく露群においても 3～9 か月で対照群より有意に低かった。一方、骨吸収マーカーの血清 CTX は、いずれのカドミウムばく露群においても、3～6 か月では対照群より低く、9～12 か月では逆に有意に高かった。

○カルシウム代謝：

FECa は、6 か月までほとんど上昇せず、9 か月において、カドミウムの用量依存的に増加した。

○まとめ：

飲水からのカドミウムばく露により、5、50 mg/L 群では、骨密度の Z スコアで骨粗しょう症と判定されるレベルの骨密度の低下を起こした。骨密度は用量、及び時間依存的に低下した。骨力学試験では、5、50 mg/L 群で特に大腿

骨の遠位部と近位部末端が脆弱性を示した。著者らは、この結果について、試験開始から 6〜9 か月までの骨形成の盛んな時期において、カドミウムばく露によって骨形成が抑制され、9〜12 か月の骨格の成熟期には骨吸収が高まったためであると考察している。

●雄の結果

○骨密度：

1、5 mg/L 群の大腿骨、腰椎の骨密度は、3〜12 か月のいずれの時期においても対照群と有意差を示さなかった。50 mg/L 群の骨密度は 3 か月から有意に低下した。

○骨の力学的特性：

雄では 12 か月後においてのみ力学試験を行った。50 mg/L 群においては、大腿骨の近位部、遠位部末端の圧縮試験、骨幹の切断試験、脛骨の 3 点曲げ試験、骨軸方向の圧縮試験で最大荷重の有意な低下を示した。5 mg/L 群は大腿骨近位部、遠位部末端の圧縮試験、脛骨の 3 点曲げ試験で最大荷重が有意に低下した。

○骨代謝マーカー：

12 か月の時点で、骨形成マーカーの血清 ALP は 5、50 mg/L 群で低下したが、大腿骨の ALP、及び血清 OC は明確な変化を示さなかった。一方、骨吸収マーカーの尿中 CTX は、5、50 mg/L 群が対照群より有意に高い値を示した。

○カルシウム、リン代謝：

12 か月の時点で、FECa は 5、50 mg/L 群で、FEphosphate はすべてのカドミウムばく露群で対照群より有意な上昇を示し、その変化はカドミウムの用量依存的であった。また、すべてのカドミウムばく露群で、血清中 1,25$(OH)_2$D と CT の有意な減少、5、50 mg/L 群で PTH の有意な増加が認められた。各種マーカーの相関を調べた結果、12 か月での FECa、FEphosphate 及び尿中 CTX は大腿骨、腰椎の骨密度と有意な負の相関を示した。この結果から、著者らは、カドミウムが骨に直接作用するだけでなく、カルシウム、リン代謝異常を介して間接的にも骨吸収を加速していると考察している。

○まとめ：

雌と同じ条件で長期間のカドミウムばく露を受けた雄ラットは、50 mg/L 群

では明らかな骨密度の低下と力学的な脆弱性を示した。しかし、1, 5 mg/L 群ではほとんど変化は認められず、カドミウムによる骨障害には明らかな雌雄差があった。12 か月の時点で骨吸収マーカーが増加していた。カドミウムばく露により腎臓での尿中カルシウム、リン排泄が増加し、それに応じてカルシウム調節ホルモンが変動していた。

（iii）ばく露レベルの比較

○カドミウムばく露量：

飲水量から、各群のカドミウムばく露量の範囲を求めた。雌の 1、5、50 mg/L 群は、それぞれ 0.059～0.219、0.236～1.005 及び 2.247～9.649 mg/kg 体重/日、雄の 1、5、50 mg/L 群は、それぞれ 0.049～0.223、0.238～0.977 及び 2.073～10.445 mg/kg 体重/日であった。

○血中、尿中カドミウム濃度：

図 6 に a）雌と b）雄の血中、尿中カドミウム濃度の経時変化を示した。血中、尿中カドミウム濃度いずれも、1、5、50 mg/L 群間の差が明確であった。しかし、雌の 50 mg/L 群では、6～12 か月の間はほとんどカドミウム濃度が変化せず、1、5 mg/L 群においても、3～12 か月の間の増加は非常に緩慢であった。

12 か月での雄の血中カドミウム濃度はカドミウムの用量依存的に増加した。しかし、各群の血中カドミウム濃度は雌の 12 か月の測定値とあまり差がなかった。雄の尿中カドミウム濃度は、50 mg/L 群で経時的に上昇したが、1、5 mg/L 群では 3～12 か月の間の濃度上昇はわずかであった。また、12 か月の時点での尿中カドミウム濃度に顕著な雌雄差はなかった。

○大腿骨中カドミウム濃度：

大腿骨は脱脂、乾燥後にカドミウム濃度を測定した。雌雄をまとめた結果を表 5 に示す。雌雄ともに、カドミウムの用量依存的に大腿骨中カドミウム濃度が増加した。雌について経時変化を見ると、1 mg/L 群では 9 か月まで、5 mg/L 群は 6 か月まで増加傾向を示したが、50 mg/L 群は、3 か月の時点でのカドミウム濃度が最も高く、その後は減少傾向を示した。

○まとめ：

血中、尿中、大腿骨中カドミウム濃度は、雌雄ともに、カドミウムの用量依存的に増加した。雌の 50 mg/L 群では、6 か月以降血中、尿中、大腿骨中カドミウム濃度はほとんど増加しなかった。また、1、5 mg/L 群では、尿中

カドミウム濃度に雌雄差はほとんど認められず、雌雄ともに 3 か月以降はほとんど増加しなかった。

＜参考：ATSDR による Brzóska らのデータの活用＞

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) による "Toxicological Profile for Cadmium" (2012)において、Brzóska の一連の研究に基づいて、Intermediate-Duration（15～364 日）Oral MRL（Minimal Risk Level）として、0.5 μg Cd/kg 体重/日という値が報告されている。この報告では、雌への 12 か月間のばく露試験のうち、下記のデータを用いて MRL を求めている。

○カドミウムばく露量：

雌の 1、5、50 mg/L 群のカドミウムばく露量は、それぞれ 0.059～0.219、0.236～1.005 及び 2.247～9.649 mg/kg 体重/日と報告されている。ここから、ATSDR は、1、5、50 mg/L は、0.2、0.5、4 mg/kg 体重/日に相当すると算出している。

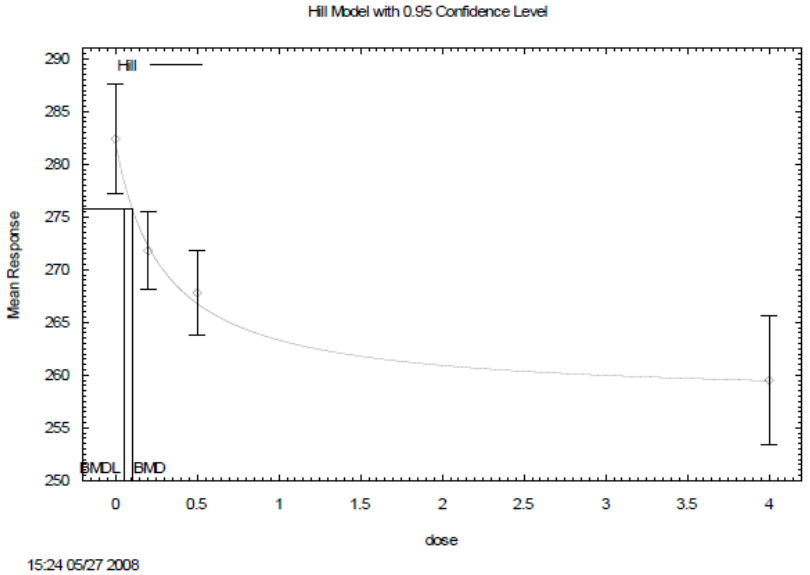
○POD の選定：

骨形成期でのカドミウムばく露が骨密度に影響を及ぼしていることに基づき、9 か月目の腰椎の骨密度を POD とした。

○MRL の算出：

上記のカドミウムばく露量と 9 か月目の腰椎の骨密度との関係に基づいて BMD 及び BMDL を算出し、$BMDL_{(sd1)}$として 0.05 mg/kg 体重/日が得られた（図５）。この値を不確実係数 100 で除して、0.5 μg Cd/kg 体重/日を Intermediate-Duration の MRL とした。

Figure A-1. Predicted and Observed Incidence of Changes in Lumbar Spine Bone Mineral Density in Female Rats Exposed to Cadmium in Drinking Water for 9 Months (Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2005d)*



*BMDs and BMDLs indicated are associated with a 1 standard deviation change from the control, and are in units of mg Cd/kg/day.

図 5　カドミウム摂取量と骨密度についての BMD／BMDL
（ATSDR 2012 より抜粋）

1　表 3　骨量、力学的特性、骨代謝マーカー

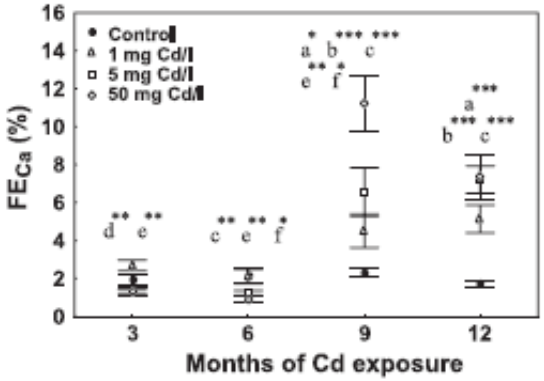
評価項目	測定試料	指標	雌				雄			
			3 か月	6 か月	9 か月	12 か月	3 か月	6 か月	9 か月	12 か月
骨量測定	大腿骨	骨塩量	↓5,50[1)]	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓50	↓50	↓50	↓5,50
		骨密度	↓5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓50	↓50	↓50	↓50
		骨面積	N.S.	↓50	↓50	↓5,50	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	腰椎	骨塩量	↓50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓50	↓50	↓50	↓50
		骨密度	↓5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓50	↓50	↓50	↓50
		骨面積	N.S.	↓50	↓50	↓50	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	骨格全体	骨密度	↓50	↓5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓50	↓50	↓50	↓50
骨塩減少／骨粗鬆症の割合（%）（Z スコアで判定）	大腿骨	1	0/0[2)]	50/0	60/0	60/0	0/0	0/0	20/0	20/0
		5	30/0	60/20	60/20	70/20	0/0	20/0	30/0	30/0
		50	90/10	70/30	40/60	30/70	50/0	50/30	50/30	60/40
	腰椎	1	30/0	60/0	50/0	60/0	0/0	10/0	30/0	40/0
		5	30/0	60/10	60/20	60/40	0/0	20/0	40/0	50/0
		50	30/10	60/40	40/60	20/80	50/0	70/30	60/40	30/70
	骨格全体	1	20/0	30/0	50/0	60/0	0/0	0/0	20/0	20/0
		5	40/0	40/0	50/30	60/30	0/0	0/0	30/0	40/0
		50	30/10	60/40	50/50	30/70	60/0	60/20	70/20	60/40
力学的特性（大腿骨）	圧縮試験（断面方向の荷重）近位部末端	降伏荷重	N.S.	↓50	↓5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓5,50
		最大荷重	N.S.	↓5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓5,50
		剛性	N.S.	N.S.	N.S.	↑50	－	－	－	N.S.
		降伏点変位	N.S.	↓5,50	N.S.	↓50	－	－	－	N.S.
		破断点変位	↓1,5,50	↓50	↓1,5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓1,5,50
		吸収エネルギー	↓5,50	↓50	↓5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓5,50

評価項目	測定試料	指標	雌				雄			
		力学指標	3 か月	6 か月	9 か月	12 か月	3 か月	6 か月	9 か月	12 か月
力学的特性（大腿骨）	圧縮試験（断面方向の荷重）遠位部末端	降伏荷重	↓5,50	↓5,50	↓5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓50
		最大荷重	↓5,50	↓50	↓1,5,50	↓5,50	－	－	－	↓5,50
		剛性	↓1,5,50	N.S.	N.S.	↑1,5,50	－	－	－	↑1,5,50
		降伏点変位	N.S.	↓5,50	↓50	↓1,5,50	－	－	－	↓1,5,50
		破断点変位	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓1,5,50
		吸収エネルギー	N.S.	N.S.	N.S.	↓50	－	－	－	↓5,50
	切断試験骨幹	降伏荷重	N.S.	N.S.	↓5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓50
		最大荷重	N.S.	N.S.	↓50	↓50	－	－	－	↓50
		剛性	↑50	↑1,5,50	↑1,5,50	↑1,5,50	－	－	－	N.S.
		降伏点変位	↓50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	－	－	－	↓5,50
		破断点変位	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	－	－	－	N.S.
		吸収エネルギー	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	－	－	－	↓50
			3 か月	6 か月	9 か月	12 か月	3 か月	6 か月	9 か月	12 か月
骨代謝マーカー	大腿骨	海綿骨中 ALP	↓1,5,50	↓1,5,50	↓1,5,50	↓5、↑50	－	－	－	N.S.
		皮質骨中 ALP	↓50	N.S.	N.S.	↑50	－	－	－	N.S.
	血清	ALP	N.S.	↓50	↓50	↓50	－	－	－	↓5,50
		OC	↓1,5,50	↓1,5,50	N.S.	N.S.	－	－	－	N.S.
		CTX	↓1,5,50	↓1,5,50	↑1,5,50	↑1,5,50	－	－	－	↑5,50
	尿	CTX	－	－	－	－	N.S.	↑50	↑5,50	↑5,50

N.S.：有意差なし。
－：記載なし。
1) 有意差がみられた用量。
2) 数値(%)は、(−1>Z スコア>−2.5)/(Z スコア≤−2.5)（骨量減少/骨粗鬆症）の割合を示す。

1　表 4　カルシウム、リン代謝関連指標

		投与 12 か月後							
	指標	雌				雄			
		FECa				対照群	1 mg/L 群	5 mg/L 群	50 mg/L 群
カルシウム	FECa(%)					0.44±0.09[1)]	0.63±0.10	1.20±0.10*	2.16±0.23*
	血清中カルシウム (mg/dL)					9.84±0.20	9.57±0.16	9.57±0.10	9.78±0.25
	血清中 CT (pg/mL)					13.94±1.77	9.09±0.53*	9.24±1.02*	8.25±0.37*
	血清中 PTH (pg/mL)					146.3±19.5	215.1±30.8	290.5±37.2*	258.0±22.8*
リン酸	FEphosphate(%)	―	―	―	―	8.60±0.70	15.79±2.48*	36.40±3.20*	61.91±5.27*
	血清中リン酸(mg/dL)	―	―	―	―	5.84±0.24	5.47±0.30	5.44±0.14	4.90±0.36



2　*：有意な変化。
3　―：記載なし。
4　1) mean±SE
5

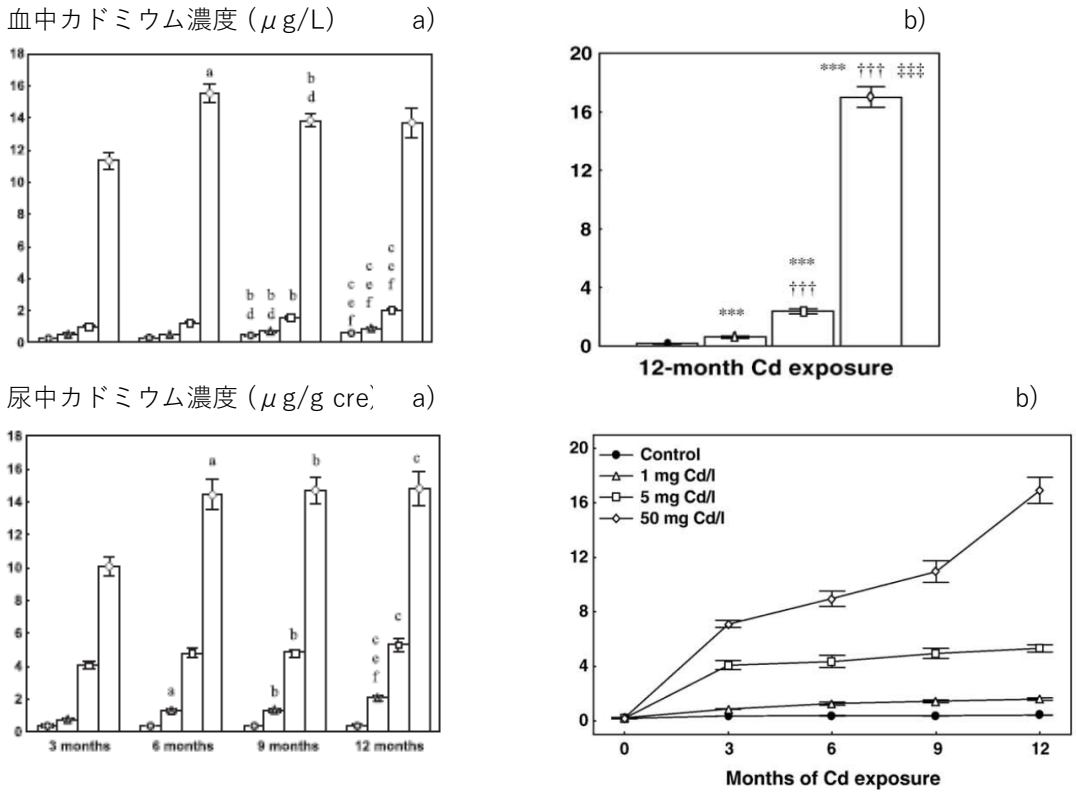


図 6　血中、尿中カドミウム量

a)雌（文献 No.1　Fig.5 より抜粋）、b)雄（文献 No.3　Fig.6 より抜粋）

表 5　大腿骨中カドミウム濃度（雌：No.2、雄：No.4）

投与群 (mg/L)	測定時点（投与開始後）				
	雌				雄
	3(か月)	6	9	12	12
対照	0.036±0.004[1)]	0.038±0.002	0.062±0.003	0.060±0.004	0.032±0.003
1	0.041±0.002	0.061±0.005*	0.098±0.005*	0.091±0.005*	0.056±0.007*
5	0.170±0.023*	0.227±0.010*	0.254±0.008*	0.259±0.012*	0.172±0.006*
50	0.934±0.047*	0.791±0.027*	0.677±0.020*	0.655±0.033*	0.732±0.051*

*：対照群に対して有意な変化
1) mean±SE (μg/g 脱脂乾燥重量)

b. 雌ラット 24 か月飲水投与試験（No.5～No.8）

（i）試験方法

○カドミウム投与：

離乳直後の Wistar ラット（3 週齢、雌、各群 10 匹）に塩化カドミウム水和

物（$CdCl_2$-2½ H_2O）（0 又は 1 mg Cd/L）を 24 か月間飲水投与した。

○骨量、骨力学試験、骨代謝マーカー：

a. 雌雄ラット 12 か月飲水投与試験と同様の方法で測定した。

○カルシウム、リン代謝：

a. 雌雄ラット 12 か月飲水投与試験と同様の方法でカルシウム、リン濃度とカルシウム代謝関連ホルモンの測定をした。さらに、カルシウム、リンの腎尿細管再吸収率（renal tubular reabsorption of Ca：TRCa 及び renal tubular reabsorption of phosphate : TRP）並びに糸球体ろ過量（glomerular filtration rate：GFR）を算出した。

（ii）試験結果

24 か月間の観察により、骨の成長期（6 か月まで）、成熟期（6～12 か月）、老化による減少期（12～24 か月）の全体について、骨密度、骨代謝マーカー、力学的特性の変化が明らかになった。

○骨密度：

対照群のラットにおいても、大腿骨、腰椎の骨密度は 12 か月でピークとなり、18～24 か月には徐々に低下した（図 7）。カドミウムばく露により、12 か月の骨密度のピーク値が対照群に比べて腰椎で 3.5%、大腿骨で 6%低下していた。18～24 か月での減少傾向がカドミウムばく露で加速され、24 か月では対照群に比べて腰椎で 14%、大腿骨で 10%低くなった（図 7）。24 か月の時点で大腿骨の骨密度は対照群より 8.5%低下し、脛骨の骨密度は 9.5%低下していた。

12 か月の時点での骨密度を基準とした T スコアから骨減少症（–1～–2.5）、骨粗しょう症（≤ –2.5）を判定すると、対照群においても骨減少症が増加し、腰椎については 24 か月で 70%が骨減少症、30%が骨粗しょう症と判定された（表 6）。カドミウムばく露により、骨密度の T スコアは 12～24 か月で低下し、24 か月の時点で腰椎の 100%が骨粗しょう症と判定された（表 6）。対照群に対する Z スコアで評価した場合も、カドミウムばく露群で 6 か月から骨減少症の増加が認められ、18 か月では腰椎の 30%、24 か月では 100%が骨粗しょう症と判定された。大腿骨も同様の変化を示したが、その程度は腰椎より弱かった（表 7）。

24 か月での Z スコアから、大腿骨では 20%が骨減少症、80%が骨粗しょう症、脛骨では 30%が骨減少症、70%が骨粗しょう症と判定された。

○骨の形状と骨力学試験：

24 か月間のカドミウムばく露により、大腿骨頸部骨折が 30%に認められた（X 線写真はなし）。24 か月における骨力学試験において、大腿骨の頸部、遠位末端での圧縮試験（横断面）、脛骨の 3 点曲げ試験、圧縮試験（骨軸方向）での最大荷重がカドミウムばく露によってそれぞれ 23%、33%、32%、22%の有意な低下を示した。それぞれの部位における骨密度と最大荷重は、いずれも有意な正の相関を示した。

骨密度の低下が顕著であった腰椎（L1～L5）のうち、L4 について形状の観察と骨力学試験が行われた。カドミウムばく露により骨面積が約 50%に低下していた。腰椎前部と後部の長さの差と比率を測定した結果、30%が変形、40%が骨折と判定された。骨折と判定された L4 はすべて骨密度の Z スコアから骨粗しょう症と判定されている。L4 の圧縮試験（骨軸方向）での最大荷重は、カドミウムばく露によって 37%低下し、骨密度と正の相関を示した。

○骨代謝マーカー：

骨形成マーカーの ALP は、血清中、骨中いずれもカドミウムばく露で低下した（表 8）。骨吸収マーカーの尿中 CTX はカドミウムばく露により、6 か月では対照群より低かったが、12 か月以降は逆に対照群より増加した。2 年目（12～24 か月）における腰椎、大腿骨の骨密度は、血清中、骨中 ALP と正の相関、血清中、尿中 CTX と負の相関を示した。このことから、著者らは、カドミウムばく露による骨形成の低下と骨吸収の増加が 12～24 か月の時期の骨密度の低下の原因となっていると考察している。

○骨のミネラル含量：

L4 腰椎のカルシウム、リン、マグネシウム、亜鉛、銅含量は、カドミウムばく露によって対照群よりそれぞれ 19%、21%、27%、20%、21%低下していた。L4 腰椎のカルシウム、リン、マグネシウム、亜鉛、銅含量は、いずれも圧縮試験の最大荷重と高い正の相関を示した。

○カルシウム、リン代謝：

尿中カルシウム排泄は、対照群においても加齢とともに増加したが、カドミウムばく露によってさらに有意に増加した。24 か月の時点での FECa は、対照群で 5.86±1.00%、カドミウムばく露群で 16.37±1.78%であった。

腎臓におけるカルシウム再吸収率の指標である TRCa は、カドミウムばく露によって対照群より約 9%低下していたが、リンの再吸収率の指標である

TRP は 60%以上も低下していた（表 9）。さらにカドミウムばく露によってGFR が 0.162 にまで低下した。しかし、腎臓中のカドミウム濃度は、カドミウムばく露群においても 2.381±0.188 μg/g と低い値であった。カドミウムばく露により、カルシウム代謝に関わる 25OHD、1,25$(OH)_2$D はそれぞれ対照群より 50%、31%低下し、CT と PTH はそれぞれ 5.2 倍、29%上昇していた。また、TRP、GFR などの腎機能の指標は 25OHD、1,25$(OH)_2$D と正の相関を示し、さらに 25OHD、1,25$(OH)_2$D は、大腿骨と腰椎の骨密度、骨中の ALP と正の相関を示し、血中・尿中カドミウム濃度と負の相関を示した。これらの結果から、著者らは、Cd ばく露による腎機能の低下がビタミン D 代謝異常と Ca 調節ホルモンの変化を起こし、骨障害に関与したと考察している。

○まとめ：

雌ラットにカドミウムを飲水（1 mg Cd/L）投与により 24 か月間ばく露させ、骨形成期、成熟期、老化による減少期のうち、特に老化による減少期（2 年目）におけるカドミウムばく露の影響を検討した。18～24 か月において、対照群でも加齢による骨密度の低下が認められたが、カドミウムばく露によって対照群より約 10%程度骨密度が低下した。そのレベルの骨密度の低下であっても、一部のラットに腰椎の変形と骨折、大腿骨頸部の骨折が認められ、骨力学試験での脆弱性が増していた。これらの変化には、特に 2 年目における骨形成の低下と骨吸収の増大が関与していると考察している。さらに、ばく露終了後の腎臓中カドミウム濃度は 5 μg/g 以下であるにもかかわらず、GFR の顕著な低下、カルシウム、リン排泄亢進、ビタミン D や PTH などのカルシウム調節因子の変動が認められた。

（iii）ばく露レベル

○カドミウムばく露量：

24 か月間の投与群のカドミウムばく露量の平均値（範囲）は、24.84±0.23 μg/日（17.1～38.0 μg/日（0.0393～0.313 mg/kg 体重/日））であった。

○腎臓中カドミウム濃度：

24 か月後の腎臓のカドミウム濃度の平均値は、対照群で 0.354±0.016 μg/g、投与群で 2.381±0.188 μg/g であった。

○尿中カドミウム濃度：

尿中カドミウム濃度は、ばく露開始後 9 か月まで上昇し続けたが、9～24 か月の間は非常に緩慢な変化であった（図 8）。

○骨中カドミウム濃度：

投与 24 か月後の椎体（L4）中のカドミウム量は、対照群で 7.05±0.56、投与群で 10.67±1.19 ng であり有意に増加した。24 か月後の骨中カドミウム含量は、対照群に対して大腿骨では 68%、脛骨では 73%の有意な増加が認められた。

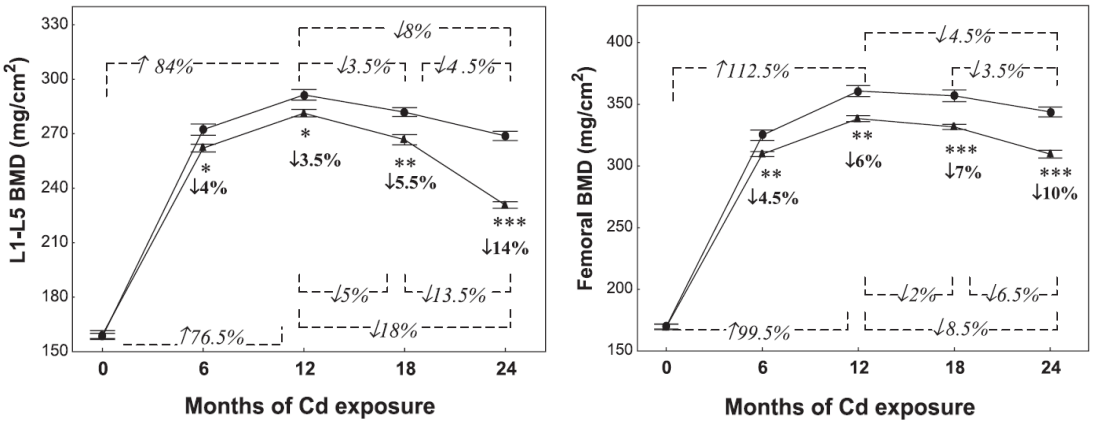


図 7　腰椎（L1 - L5）、大腿骨の骨密度の経時変化
（文献 No.6　Fig.2 より抜粋）

表 6　T スコアによる骨密度の経時変化

部位	T スコア	対照群		カドミウムばく露群（1 mg Cd/L）		
		18 か月	24 か月	12 か月	18 か月	24 か月
大腿骨	−1 ～ −2.5	20%	40%	60%	80%	30%
	≤−2.5	0	0	0	0	70%
腰骨	−1 ～ −2.5	50%	70%	50%	60%	0
	≤−2.5	0	30%	0	40%	100%

T スコアは、12 か月の動物の骨密度の値に対する数値

表 7　Z スコアによる骨密度の対照群との比較

部位	Z スコア	カドミウムばく露群（1 mg Cd/L）			
		6 か月	12 か月	18 か月	24 か月
大腿骨	−1 ～ −2.5	60%	70%	90%	70%
	≤−2.5	0	0	0	30%
腰椎	−1 ～ −2.5	40%	50%	70%	0
	≤−2.5	0	0	30%	100%

Z スコアは、同じ時期の対照群に対する数値

表 8　骨代謝マーカー

評価項目	測定試料	指標	24 か月	
			対照群	1 mg/L 群
骨代謝マーカー	大腿骨	皮質骨中 ALP(IU/g protein)	112.43±2.74	63.17±4.17*
		海綿骨中 ALP(IU/g protein)	187.29±11.67	86.37±5.45*
	腰椎	椎体中 ALP	212.26±7.86	148.81±5.99*
	血液	血清中 CTX(ng/mL)	22.20±3.13	34.83±2.94*
		血清中 OC(ng/mL)	27.04±2.85	29.21±3.56
		血清中 ALP(IU/L)	27.94±1.11	16.43±1.58*
	尿	尿中 CTX(ng/mg cre)	8.33±1.33	15.80±1.91*

*：有意な変化。

表 9　カルシウム、リン代謝関連指標

指標	24 か月	
	対照群	1 mg/L 群
TRCa (%)	94.14±1.00[1)]	83.94±1.96*
血清中カルシウム濃度（mg/100mL）	8.857±0.267	8.156±0.212
TRP (%)	95.18±0.71	31.95±2.95*
血清中 Pi 濃度（mg/100mL）	5.741±0.403	5.699±0.399
GFR (mL/min)	0.607±0.022	0.162±0.013*

*：有意な変化。
1) mean ±SE

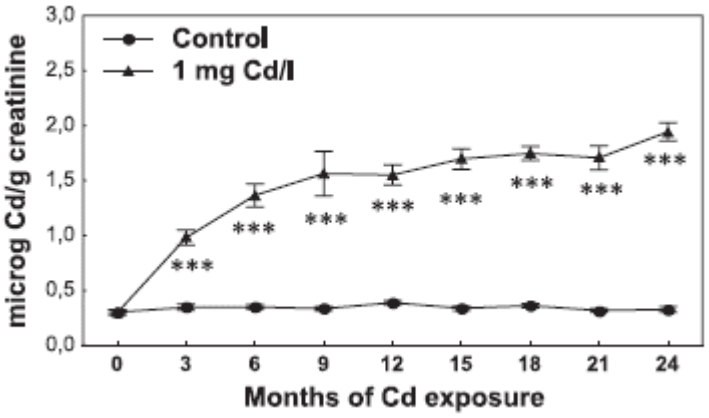


図 8　尿中カドミウム濃度の推移（文献 No. 6 Fig. 5. より抜粋）

Fig.5. Cd concentration in the urine of control and Cd-exposed female rat. Each symbol represents the mean±SE. ***P<0.001 versus control group (ANOVA + Kruskal-Wallis ranks test).

②その他

SD ラット（8 週齢、雄、各群 6 匹）にカドミウム（0、2、10 又は 50 mg/L）を 12 週間飲水投与し、脛骨、腰椎への影響を検討した。試験期間中の各投与群のカドミウムばく露量は、83～101、346～426 及び 1756～2300 μg/日であった。投与 12 週後に 24 時間畜尿、腰椎（L1～L5）、左右脛骨及び血液の採取を行った。腰椎の骨密度を測定し、組織化学的に左脛骨の骨梁数、骨梁幅及び骨梁間隙を評価し、さらに右脛骨について酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate resistant acid phosphatase : TRAP）染色による破骨細胞の同定を行った。脛骨については免疫組織染色によるオステオプロテゲリン（Osteoprotegerin : OPG）及び核因子カッパ B リガンド（Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand : RANKL）の発現も検討した。また、血清中の OC 及び骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（Tartrate resistant acid phosphatase 5b : Tracp 5b）を測定した。

血清及び尿中のカドミウム濃度は投与量に依存して増加し、特に 10 及び 50 mg/L 投与群では顕著であった。

表 10 に有意差のみられた変化を示す。

この他、脛骨の組織学的観察では、骨梁数、骨梁幅及び骨梁の接合部位（conjunction point）の減少、骨梁間隙及び末端剥離の増大がみられ、特に 50 mg/L 投与群で顕著であった。また、OPG 及び RANKL の免疫組織染色による観察では、カドミウム投与群、特に 50 mg/L 投与群の骨芽細胞及び軟骨細胞で RANKL が強く発現し、OPG の発現は弱かった。

50 mg/L 投与群において骨密度及び骨微細構造の指標が明らかに低下した。カドミウム投与により血清中 Tracp 5b が高値となり、組織学的検討でカドミウム投与による用量依存的な破骨細胞の形成促進、免疫組織学的検討ではカドミウム投与による RANKL 発現の誘導及び OPG 発現の阻害が示された。以上の結果から、著者らは、破骨細胞を介した過剰な骨吸収がカドミウムの骨に対する毒性影響の重要な要因であり、OPG/RANKL が大きな役割を果たしている可能性が示されたとしている。（Chen et al. 2013）（参照 10） No.027

表 10　有意な変化がみられた試験結果

投与群(mg/L)	雄(各群 6 匹)
50	↓腰椎骨密度 ↑血清中 Tracp 5b
10 以上	↑脛骨中 TRAP 陽性細胞数 ↑脛骨中 TRAP 陽性細胞を伴う成長板の割合
2 以上	↑脛骨中 TRAP 陽性面積の割合

Buha ら（2019）は、ラット及びヒトの大腿骨へのカドミウムの影響について検討している。

（ｉ）ラット大腿骨へのカドミウムの影響

Wistar ラット（6～8 週齢、雄、各群 7 匹）に塩化カドミウム水和物（$CdCl_2xH_2O$）（0、0.3、0.6、1.25、2.5、5 又は 10 mg Cd/kg 体重/日）を 28 日間飲水投与し、大腿骨への影響を検討した。投与 28 日後血液及び右大腿骨の採取を行い、血液中のクレアチニン、尿素、アルブミン、カルシウム及びカドミウムを測定した。大腿骨については、カルシウム、リン、ホウ素、銅、ケイ素、マンガン及びマグネシウムを測定し、ベンチマークドーズ[2]法により、$CEDL_5$（$BMDL_5$）及び $CEDL_{10}$（$BMDL_{10}$）を算出した。

血液（図 9）及び大腿骨中（図 10）のカドミウム濃度は、用量依存的に増加した。対照群に比べて 1.25 mg/kg 体重/日以上の投与群では、有意な体重増加抑制がみられた。血清中アルブミン濃度が投与群で有意に低下し、用量反応関係がみられた。また、大腿骨中のカルシウム及びリン濃度が有意に低下し、この減少は最低用量の 0.3 mg/kg 体重/日投与群からみられ、それ以上の投与群でも減少の程度が同様であった。また、大腿骨中の亜鉛濃度は用量依存的に減少し、10 mg/kg 体重/日投与群では、対照群に対し約 30%低下した。その他の指標の有意な変化を表 11 に示す。大腿骨中の元素について算出した CEDL の中で、亜鉛が最も低い値であったことから、著者らは、亜鉛が最もカドミウムの影響を受けやすいものと考えられたとしている（表 12）。

（ⅱ）ヒト大腿骨へのカドミウムの影響

ヒト大腿骨骨頭サンプルについて、海綿骨の骨密度、カルシウム、亜鉛及びカドミウムの濃度を測定し、相関性を検討した。骨粗しょう症患者の女性 10 名（75～98 歳）及び骨粗しょう症ではない 6 名（男性 5 名、女性 1 名；58～90 歳）から採取した 20 サンプルを用いた。

カドミウムとカルシウム、カドミウムと亜鉛及びカドミウムと海綿骨の骨密度には負の相関（r=-0.45、-0.54 及び-0.44）が、亜鉛と海綿骨の骨密度には正の相関（r=0.48）がみられた。（Buha al. 2019）（参照 11） No.032

[2] 著者らは、データが連続値であることから、“Benchmark dose”、“Benchmark response”及び“BMDL(Benchmark dose lower confidence limit)”という用語の代わりに、“critical effect dose(CED)”、“critical effect size(CES)”及び“CEDL”という用語を用いた、としている。

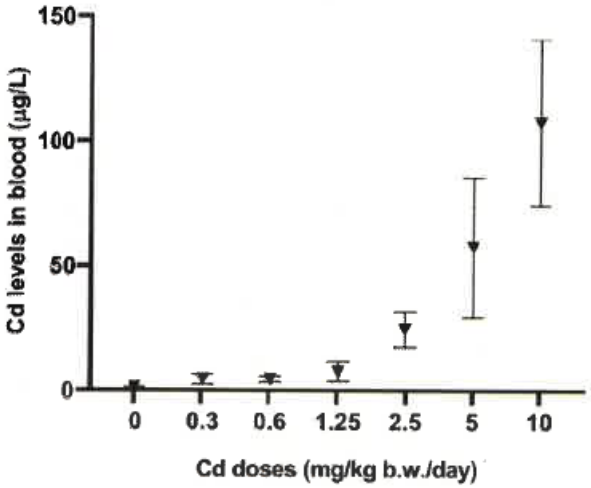


図 9　血液中のカドミウム濃度（Fig. 2. より抜粋）

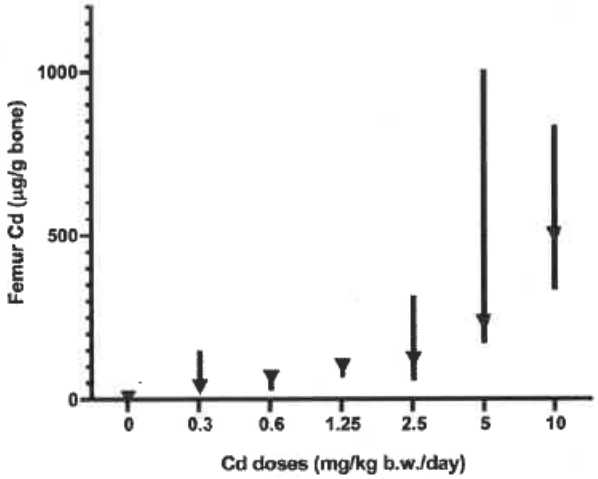


図 10　大腿骨中のカドミウム濃度（Fig. 4. より抜粋）

表 11　有意な変化がみられた試験結果

投与群 (mg/kg 体重/日)	雄(各群 7 匹)
10	↑血清中クレアチニン ↓大腿骨中銅濃度
5 以上	↑血清中尿素
2.5 以上	↑大腿骨中銅濃度（2.5 及び 5 mg/kg 体重/日のみ） ↓大腿骨中ケイ素濃度（2.5 及び 10 mg/kg 体重/日のみ）
1.25 以上	↓血液中カルシウム濃度 ↑大腿骨中ケイ素濃度（1.25 及び 5 mg/kg 体重/日のみ）
0.6 以上	
0.3 以上	↓大腿骨中ホウ素濃度 ↓大腿骨中マンガン濃度

表 12　ベンチマークドーズ法による CEDL

ミネラル	CED_5	$CEDL_5$	CED_{10}	$CEDL_{10}$
カルシウム				
リン	0.35	0.21	0.81	0.49
亜鉛	0.10	0.01	0.58	0.15
ホウ素	1.92	1.13	3.95	2.31
マグネシウム				
ケイ素				
銅				
マンガン	1.96	1.30	4.02	2.67

単位：mg Cd/kg 体重
CED：Critical Effect Dose
CEDL：Critical Effect Dose Lower confidence limit
5 又は 10%の CES が得られる CED の 95%信頼区間の下限値
斜線の元素は用量依存性がみられなかった。

＜参照＞

1. Brzóska M M, Kamiński M, Supernak-Bobko D, Zwierz K, and Moniuszko-Jakoniuk J: Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. Arch Toxicol 2003; 77: 344-52
2. Brzóska M M and Moniuszko-Jakoniuk J: Disorders in bone metabolism of female rats chronically exposed to cadmium. Toxicol Appl Pharmacol 2005a; 202: 68-83
3. Brzóska M M, Majewska K, and Moniuszko-Jakoniuk J: Weakness in the mechanical properties of the femur of growing female rats exposed to cadmium. Arch Toxicol 2005; 79: 277-88
4. Brzóska M M and Moniuszko-Jakoniuk J: Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. Toxicol Appl Pharmacol 2005b; 207: 195-211
5. Brzóska M M, Majewska K, and Kupraszewicz E: Effects of low, moderate and relatively high chronic exposure to cadmium on long bones susceptibility to fractures in male rats. Environ Toxicol Pharmacol 2010; 29: 235-45
6. Brzóska M M and Moniuszko-Jakoniuk J: Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure. Toxicol Sci 2004a; 82: 468-77
7. Brzóska M M and Moniuszko-Jakoniuk J: Low-level lifetime exposure to cadmium decreases skeletal mineralization and enhances bone loss in aged rats. Bone 2004b; 35: 1180-91
8. Brzóska M M and Moniuszko-Jakoniuk J: Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. Arch Toxicol 2005c; 79: 636-46
9. Brzóska M M: Low-level chronic exposure to cadmium enhances the risk of long bone fractures: a study on a female rat model of human lifetime exposure. J Appl Toxicol 2012; 32: 34-44
10. Chen X, Wang G, Li X, Gan C, Zhu G, Jin T et al.: Environmental level of cadmium exposure stimulates osteoclasts formation in male rats. Food Chem Toxicol 2013; 60: 530-5
11. Buha A, Jugdaohsingh R, Matovic V, Bulat Z, Antonijevic B, Kerns J G et al.: Bone mineral health is sensitively related to environmental cadmium exposure- experimental and human data. Environ Res 2019; 176: 108539