

Figure 4: The percentage of central entry of MT-null and wild type received exposure in utero to mercury vapor in the open field task. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (■) and control (□) mice. The number of animals is shown in parentheses. *Significant difference from control animals at $p < 0.05$.

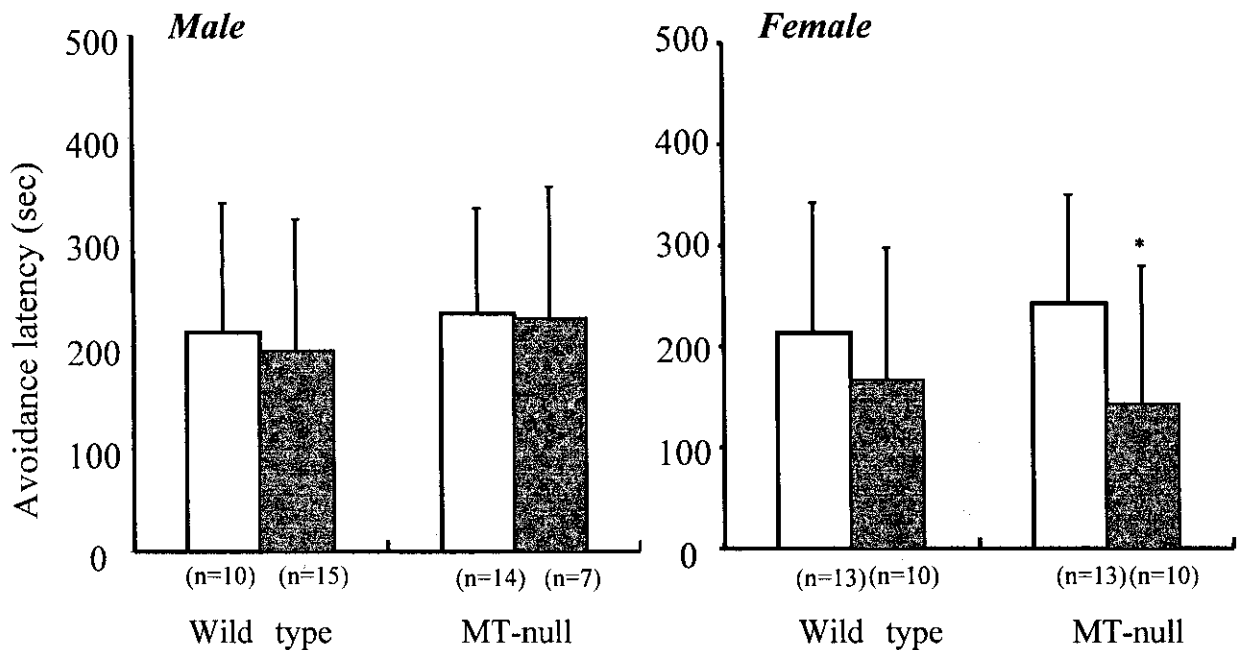


Figure 4: Avoidance latency of MT-null and wild type received exposure in utero to mercury vapor in the passive avoidance task. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (■) and control (□) mice. The number of animals is shown in parentheses. *Significant difference from control animals at $p < 0.05$.

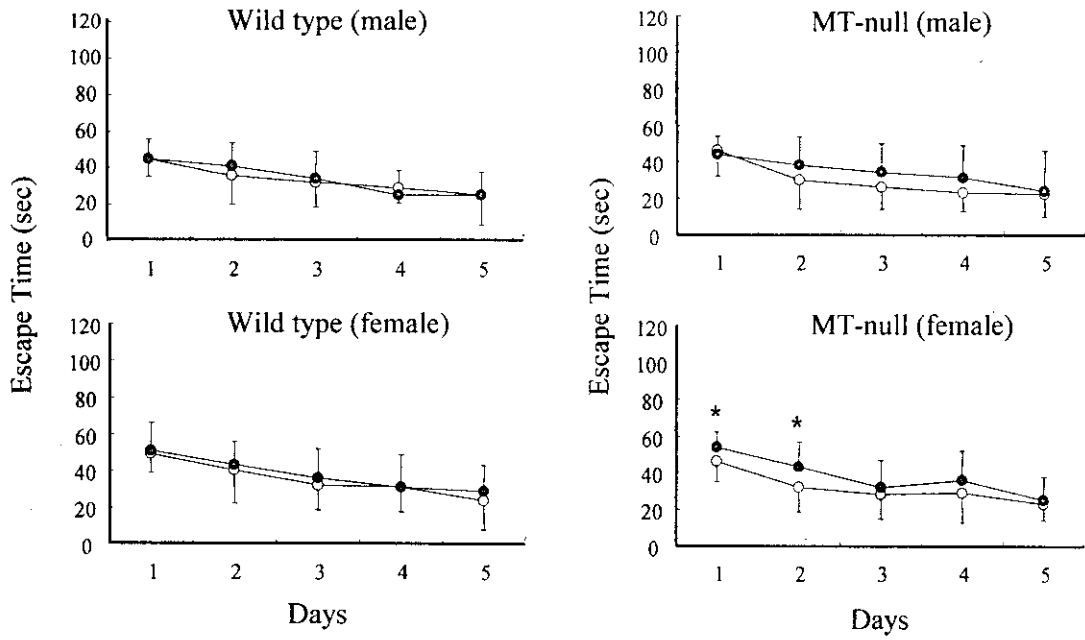


Figure 5: The Latency to reach the platform with Morris water maze for MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (●) and control (○) mice. *Significant difference from control animals at $p < 0.05$.

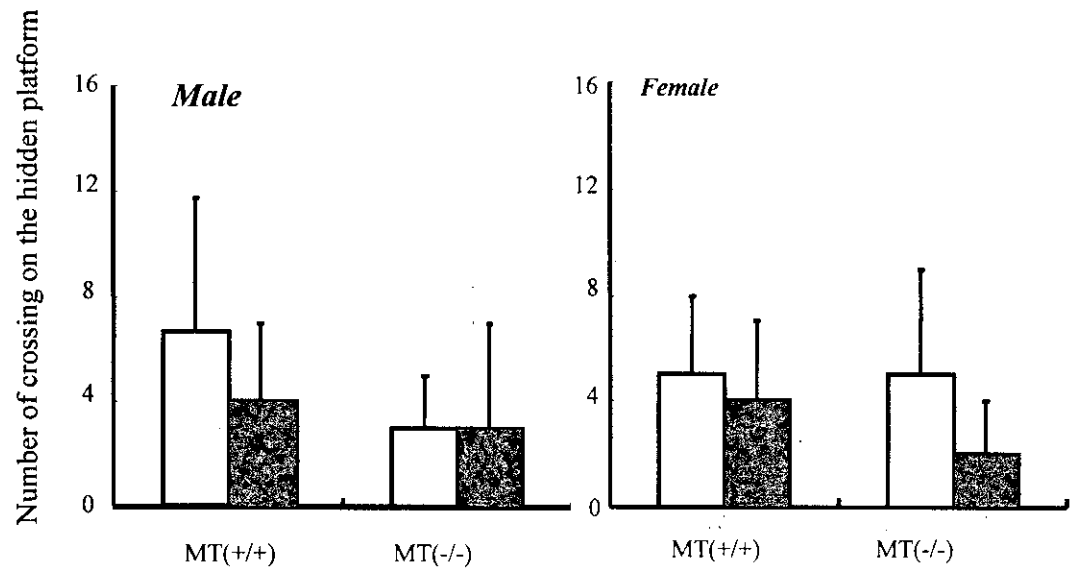


Figure 6: Results of probe test with Morris water maze for MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (■) and control (□) mice.

Table 1. Mercury concentration in the brain and kidneys of MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor.

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8 ± 1.2	8.2 ± 0.7*	4.9 ± 1.4	8.5 ± 0.9**
	Kidney	32.3 ± 5.2	43.0 ± 5.0**	29.2 ± 5.3	42.4 ± 5.4**
Female	Brain	7.3 ± 1.4	9.3 ± 1.1*	7.5 ± 0.9	11.3 ± 1.1**
	Kidney	20.2 ± 6.9	30.9 ± 4.0**	21.2 ± 6.3	42.6 ± 17.4*

Mercury concentration is expressed as ng Hg/g tissue. Values are means ± standard deviations. *Significant difference from control animals at $p < 0.05$. **Significant difference from control animals at $p < 0.01$.

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告

胎生期および授乳期カドミウム経口曝露によるカドミウムの体内動態
並びに行動機能に及ぼすメタロチオネインの影響に関する研究

分担研究者 佐藤雅彦 岐阜薬科大学衛生助教授

研究要旨: カドミウムの胎生期および授乳期曝露後のカドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響をメタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いて検討した。さらに、カドミウム曝露後の新生仔脳における遺伝子発現のスクリーニングをマイクロアレイ法により行った。その結果、10 ppm のカドミウムの胎生期および授乳 10 日間曝露において、メタロチオネインが新生仔の肝臓中カドミウムの蓄積低下や腎臓中カドミウムの保持に重要な役割を示すことが判明した。従って、メタロチオネインは次世代への影響についても感受性要因となる可能性が示唆された。また、新生仔脳中 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b: htr5b 遺伝子がカドミウム曝露により高発現することが判明し、カドミウム曝露による次世代の神経行動毒性に関与する可能性が示された。

【研究目的】

これまでカドミウムによる健康影響としては、産業職場や環境汚染による比較的高用量のカドミウム曝露によって腎、骨、呼吸器および循環器などに障害が認められたが、今日のわが国においては、産業職場や環境汚染によるカドミウム中毒はほとんど認められていない。その一方で、カドミウムはコメなどの食品や喫煙を介して生涯にわたって身体に取込まれるため、最近ではカドミウムの微量長期曝露による健康影響が問題になっている。しかし、現状ではリスク評価の基準となっているのは依然として腎毒性である。

水俣病のような胎児性の事例が報告されていないことを考えると、カドミウムがメチル水銀のような顕著な発達毒性を有してはいないという可能性が考えられる。一方で、過去の動物実験で胎生期から授乳期にかけてのカドミウム曝露が胎仔の中樞神経の異常をもたらすことを示したものが散見され、この点においてリスク評価が定まっているとはいえない。最近の WHO によるドキュメント(WHO Food Additive Series 46; Cadmium)によれば、在胎期における比較的低用量のカドミウム曝露で、出生後に行動異常が起こることを示した報告はいくつかあり、カドミウムが神経毒性を有する可能性がある」と結論されている。

カドミウムの毒性を修飾する因子の中でも、最もよく知られていて、重要な因子としてメタロチオネインが挙げられる。メタロチオネインは、金属結合タンパク質であり、生理的には亜鉛・銅を結合しているが、多くの有害金属と結合するほか、重金属をはじめとする有害化学物質、ストレスなどの因子によって誘導されることが知られている。カドミウム・水銀とも非常に親和性が高く、予めメタロチオネインを誘導しておいた動物にこれらの金属を投与すると、その毒性が著しく軽減されることから、メタロチオネインは両者と結合して、生体にとって危険な遊離型をなくすことにより、解毒剤として働くものと考えられている。近年、吉田ら[Yoshida et al., 2001]は、ヒト集団の中に、メタロチオネインが誘導されにくいサブグループがあることを見出しており、重金属などに対する感受性の個体差の少なくとも一部がこうしたメタロチオネインの誘導能の差として説明される可能性が考えられる。胎仔・新生仔期におけるカドミウム曝露のリスクが明確でない現在、この時期の曝露においてメタロチオネインが果たす役割についても当然明確にされていない。上述した WHO のドキュメントでも、胎生期カドミウム曝露が胎仔に影響を及ぼす可能性を認めた一方で、メタロチオネイン(特に胎盤のメタロチオネイン)による防御の可能性も指摘されている。

そこで、本研究では、カドミウムのマウス胎生期および授乳期曝露による仔マウスへのカドミウムの体内動態を評価することを目的とする。また、個体側の感受性要因としてメタロチオネインに着目して、カドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響を評価する。

本年度は、胎生期および授乳期カドミウム経口曝露を行ない、カドミウムの体内動態並びに行

動機能に及ぼすメタロチオネインの影響をメタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いて検討した。さらに、胎生期および授乳期カドミウム経口曝露後の新生仔脳における遺伝子発現のスクリーニングをマイクロアレイ法により行った。

【メタロチオネイン-I/II 欠損マウス】

遺伝子ターゲティング法によりメタロチオネインの I 型と II 型の発現を抑えたメタロチオネイン-I/II 欠損マウスは、Dr. A. Choo (オーストラリア王立小児病院マードック研究所) によって 1993 年に作製され、供与を受けた。このメタロチオネイン-I/II 欠損マウスは、129/Sv 系と C57BL/6 系の 2 系統を含んでいるが、現在では C57BL/6J マウスで 6 回戻し交配したマウスを用いている。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよびその野生型マウスは、当実験動物舎遺伝子改変マウス専用飼育室で繁殖・維持している。飼育室内は、室温が $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $55 \pm 10\%$ に保たれ、20 時から 8 時までを暗時とする 12 時間ごとの明暗周期に設定されている。餌および水は自由摂取させている。

【実験】

(1) 胎生期および授乳期曝露カドミウム(10 ppm)経口曝露後のカドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響

[目的]

カドミウム(10 ppm)の胎生期および授乳期 10 日間経口曝露後の母親マウス並びに新生仔におけるカドミウムの体内動態に及ぼすメタロチオネインの影響をメタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いて検討した。さらに、胎生期および授乳期 10 日間カドミウム経口曝露後の新生仔脳における遺伝子発現のスクリーニングをマイクロアレイ法により行った。

[方法]

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:36 匹)および野生型マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:30 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配し、翌日(妊娠1日目)から10 ppmのカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。7匹以上の仔マウスを出産した場合には、出生1日後(授乳1日目)に母マウス1腹につき新生仔が6匹になるように間引きを行った。また、3匹以下の仔マウスを出産した場合は、その後の実験を行わなかった。授乳10日目に母マウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳、肝臓、腎臓および小腸をそれぞれ摘出した。母マウスの各臓器中カドミウム濃度は、硝酸-過酸化水素水で湿式灰化後 ICP-MS を用いて測定した。また、新生仔についても下記用途別にそれぞれ解剖をおこなった。

1. 新生仔解剖

①カドミウム分析用

新生仔 2 匹をエーテル麻酔下で肝臓、腎臓および脳を摘出した。各臓器を硝酸-過酸化水素水で湿式灰化した後、臓器中カドミウム、銅および亜鉛濃度を ICP-MS を用いて測定した。

②マイクロアレイ用

新生仔 1 匹をエーテル麻酔下で肝臓、腎臓および脳を摘出し、瞬時にドライアイスを用いて摘出臓器を凍結した。

③甲状腺系への影響評価用

新生仔 1 匹をエーテル麻酔下で眼底採血(ヘマトクリット毛細管へパリン処理、HIRSCHMANN LABORGERATE)した後、血漿を採取した。さらに、肝臓および脳を摘出した。甲状腺系への影響を評価するため、摘出サンプルを東北大学へ搬送した。

④分子病理学的評価用

新生仔 2 匹(雌雄 1 匹づつ)をエーテル麻酔下で断頭し、頭部と胴体に分け、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。分子病理学的に評価するため、ホルマリン固定サンプルを鳥取大学へ搬送した。

2. マイクロアレイ法

新生仔脳について、下記操作方法に従ってマイクロアレイ(DNA チップ:1 万遺伝子、日立ソフト Ace Gene : Mouse Oligo Chip 30K)を行った。なお、マイクロアレイ解析は、①メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群)／野生型マウス(コントロール群)、②野生型マウス(カドミウム曝露群)／野生型マウス(コントロール群)、③メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(カドミウム曝露群)／メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群)、④メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(カドミウム曝露群)／野生型マウス(カドミウム曝露群)について行った。なお、遺伝子発現の解析において、遺伝子発現あるいは遺伝子発現の抑制が2倍以上認められた遺伝子をとりあげた。

<操作の流れ>

total RNA の抽出

↓

cDNA の作製

↓

CyDye 標識プローブの作製

↓

ハイブリダイゼーション:Lucidea Slide Pro (Amersham) を用いたハイブリ

↓

画像の取込み:CRBIO™ II e (日立ソフト) を用いてスキャン

↓

画像解析:DNASIS Array (日立ソフト) を用いて解析

①RNA の抽出

SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて、RNA の抽出(35 %のホモジネートから Cy3 標識 RNA = Cy5 標識 RNA = 約 20~30 µg を抽出)を行った。

RNA の質の確認 (1)

O.D.値

A260/A280 = 1.8~2.1

A260/A230 = 2.0 以上

A320 がブランクと同じ

また、O.D.値より Cy3 と Cy5 に標識するサンプル量をそろえる

②RNA エタ沈

サンプルの 1/10 量 3 M Sodium acetate

2.5 倍量の 100 %エタノールを加えボルテックス

↓

-80 °C, 20 分冷却

↓

最高回転, 60 分

↓

上清除く

↓

80 %エタノール 1 mL ボルテックス

↓

15000 g, 10 分遠心

↓

上清除く

↓

室温乾燥 (最初の 2-3 枚は捨て、キムワイプでカバー)

RNA の質の確認 (2)

電気泳動

rRNA の 28S :18S = 2:1 であることを確認する。

③逆転写反応

total RNA (20-50 μ g) + DW = 13.5 μ L

↓

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer 2 μ L

↓

70 °C, 10 分

↓
 氷上 5 分
 ↓ 6 μL 5×First-Strand Buffer
 ↓ 3 μL 0.1 M DTT
 ↓ 3 μL dNTPmix*
 ↓ 0.5 μL 40 U RNase Inhibiter
 42 °C, 2 分インキュベート
 ↓ 2 μL Super Script II™ Reverse Transcriptase (泡立てない)
 42 °C, 60–90 分インキュベート
 ↓ 5 μL 0.5 M EDTA
 ↓ 10 μL 1 N NaOH
 70 °C, 20 分インキュベート
 ↓
 12 μL 1 N HCl

*dNTPmix

100 mM dATP	5 μL
100 mM dGTP	5 μL
100 mM dCTP	5 μL
100 mM dTTP	3 μL
50 mM Aminoallyl-dUTP	4 μL
DW	78 μL
total	100 μL

④cDNA の精製

QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製
 (cDNA のスメアを電気泳動で確認する)

⑤cDNA エタ沈

サンプルの 1/10 量 3 M Sodium acetate
 2.5 倍量 100 % エタノールを加えピペッティング
 ↓

-80 °C, 20 分冷却

↓

最高回転, 60 分

↓

上清除く

↓

70 %エタノール 250 μL を加え、転倒混和

↓

15000 g, 10 分遠心

↓

上清除く

↓

室温乾燥 (最初の 2-3 枚は捨て、キムワイプでカバー)

⑥カップリング反応

乾燥させた cDNA を 0.2 M Sodium Bicarbonate buffer* 9 μL に溶解する

↓

CyDye*1 μL を加える

↓

遮光し、40 °C、1 時間インキュベート

↓

反応後の溶液に DW 45 μL を加えてメスアップ

↓

マイクロバイオスピнкаラム P30 でカラム精製

ゲルの入ったカラムを転倒混和

↓カラムの封を開く

2 mL の遠心チューブに置く

↓

2 分, 1000 g 遠心

↓

Buffer をすてる

↓

1.5 mL チューブにカラムを置く

↓ サンプルをアプライ

4 分, 1000 g 遠心

↓

サンプルがそれぞれの Cydye の色に着色していることを確認する。

↓

Cy3 標識用 cDNA と Cy5 標識用 cDNA を 1 つのチューブにまとめる

↓

5×Competitor 10 μL 入れる

*0.2 M Sodium Bicarbonate buffer

1. NaHCO₃ 1.68 g を 100 mL の H₂O に溶解する

2. Na₂CO₃ 2.12 g を 100 mL の H₂O に溶解する

3. 1 に 2 に加えながら pH 9.0 に調整する。

4. フィルター (0.22 μm) をろ過し、適量に分注する。(-20 °C 保存)

1, 2 の溶液は、Buffer を作製する前に調整する。

*Cydye 1vial あたり 45 μL DMSO で溶解する。-20 °C 保存で 3 週間使用可能

⑦cDNA エタ沈 (⑤cDNA エタ沈参照)

(電気泳動により標識の確認を行う)

⑧ハイブリダイゼーション (オートハイブリ用)

20×SSC 50 μL

10 % SDS 10 μL (塩の析出が起こる為、最後に入れる)

50×Denhardt's solution 16 μL

Hybridization solution (日立ソフト) 40 μL

DW _____ 62 μL

計 178 μL (ターゲット溶液)

標識したサンプルにターゲット溶液を加えてピペッティング

↓

ターゲット溶液を 95 °C で 2 分加熱後、室温で遠心により冷ます

(クラッシュアイスで急冷すると、塩が析出する)

↓

サンプル+ターゲット溶液	178 μ L
salmon sperm DNA (10 mg/mL)	2 μ L
<u>formamide</u>	<u>20 μL</u>
計	200 μ L

アプライするまで遮光で室温保存する

↓

Lucidea Slide Pro を用いたハイブリ

超純水、2×SSC/0.1 % SDS (フィルターろ過済み)、1×SSC (フィルターろ過済み)、イソプロパノールを各チューブにセットする

↓

チャンバーの中のダミーライドから DNA チップに変える時に 70 %エタノールでチャンバー内を拭き、エアスプレーで乾燥させた後、DNA チップをセットする

↓

ハイブリ

↓

洗浄

↓

乾燥

↓

チャンバーの中の DNA チップからダミーライドに変える時に 70 %エタノールでチャンバー内を拭き、エアスプレーで乾燥させてダミーライドをセットし、DNA チップを取り出す。

↓

スキャンするまで、遮光で室温保存する

↓

60 °Cのお湯を用いてオートハイブリの洗浄を行う

⑨スキャン

⑩解析

[結果]

1) マウスの出産割合とカドミウム曝露終了時の新生仔体重

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:36 匹)および野生型マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:30 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 25 匹中 5 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 36 匹中 5 匹、野生型マウスのコントロール群で 25 匹中 4 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 30 匹中 6 匹であった。

メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスともに飲水量に有意な違いは認められなかった。10 ppm のカドミウムを胎生期および授乳 10 日間曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔体重は、コントロールに比べて有意に低値を示した(図1)。野生型マウスについては、カドミウム曝露によって、有意差は認められなかったもの、新生仔体重の減少傾向が観察された(図1)。また、カドミウムを曝露した両マウスの体重を比較すると、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスより有意に体重の減少が認められた(図1)。

2) 10 ppm のカドミウムを胎生期および授乳期(10 日間)曝露した新生仔並びに母体の臓器中カドミウム、亜鉛および銅濃度

カドミウムを曝露した新生仔の臓器中カドミウム濃度をメタロチオネイン-I/II 欠損マウスと野生型マウスで比較したところ、脳では両マウス間で有意な差はなく(図2)、腎臓ではメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスより有意に低値を示し(図3)、肝臓ではメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスより有意に高値を示した(図4)。一方、カドミウムを曝露した母体脳および肝臓中カドミウム濃度は両マウス間で有意な差は認められなかったが(図5、7)、腎臓並びに小腸中カドミウム濃度はメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスに比べて有意に低値を示した(図6、8)。

新生仔の臓器中亜鉛濃度については、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの脳においてカドミウム曝露により僅かに高値を示し(図9)、カドミウムを曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの肝臓中亜鉛濃度が野生型マウスより低値を示した(図11)。その他では、カドミウム曝露の有無やメタロチオネイン-I/II 欠損マウスと野生型マウスとの間で亜鉛濃度の有意な変動は認められなかった(図9-11)。一方、母体の臓器中亜鉛濃度は、コントロール群およびカドミウム曝露群ともに、いずれの臓器においても僅かではあるがメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスより低値を示した(図12-15)。また、脳中亜鉛濃度は、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスともにカドミウム曝露により僅かに増加した(図12)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの小腸中亜鉛濃度はカドミウムの曝露により僅かに減少した(図15)。

新生仔の脳中銅濃度は、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスともにカドミウム曝露により僅かに増加し、しかも、カドミウム曝露群においてメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの方が野生型マウスより高値を示した(図16)。また、新生仔の腎臓および肝臓中銅濃度は、カドミウム曝露の有無やメタロチオネイン-I/II 欠損マウスと野生型マウスとの間で有意な変動は認められなかった(図17, 18)。一方、母体の臓器中銅濃度については、野生型マウスの脳中銅濃度はカドミウム曝露により僅かに増加し(図19)、カドミウムを曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの腎臓中銅濃度は野生型マウスより低値を示した(図20)。さらに、小腸中銅濃度はメタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスともにカドミウム曝露により有意に減少した(図22)。なお、その他では、カドミウム曝露の有無やメタロチオネイン-I/II 欠損マウスと野生型マウスとの間で臓器中銅濃度の有意な変動は認められなかった(図19-22)。

3) 胎生期および授乳期 10 日間カドミウム経口曝露による新生仔脳での遺伝子発現への影響評価(マイクロアレイ法による検討)

コントロールの野生型マウスとメタロチオネイン I/II 欠損マウスとを比較したところ、野生型マウスに対してメタロチオネイン-I/II 欠損マウスで 2 倍以上の発現が認められた遺伝子は receptor

(tnfrsf)-interacting serine-threonine kinase 1; ripk1をはじめ5種類であった(図23, 表1)。なお、2倍以上の発現抑制を示す遺伝子は確認できなかった。なお、スキッタープロットの赤線は、発現が1倍のライン、緑線が2倍、黄線が5倍である。

カドミウムを曝露した野生型マウスではコントロールの野生型マウスに比べて2倍以上の遺伝子発現が認められた遺伝子は、5-hydroxytryptamine(serotonin)receptor 5b; htr5bをはじめ4種類であった(図24, 表2)。また、カドミウム曝露によって、ancient ubiquitous protein; aup1をはじめ25種類の遺伝子が2倍以上の発現抑制を示した(図24, 表3)。一方、メタロチオネイン-I/II欠損マウスでは、カドミウム曝露による遺伝子の発現あるいは抑制は確認されなかった(図25)。

カドミウムを曝露したメタロチオネイン I/II 欠損マウスと野生型マウスとの比較では、野生型マウスに対してメタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは homolog to hypothetical 55.4 kda proteinをはじめ3種類の遺伝子で2倍以上の発現抑制が認められた(図26, 表4)。

(2)行動影響評価のための胎生期および授乳期カドミウム(10 ppm)経口曝露仔マウスの作製

[目的]

胎生期および授乳期におけるカドミウム(10 ppm)経口曝露後の仔マウスの行動影響評価を行うために、マウスにカドミウム(10 ppm)の胎生期および授乳10日間経口曝露を実施した。

[方法]

メタロチオネイン-I/II欠損マウス(コントロール群:20匹、カドミウム曝露群:40匹)および野生型マウス(コントロール群:20匹、カドミウム曝露群:40匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配し、翌日(妊娠1日目)から10 ppmのカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。7匹以上の仔マウスを出産した場合には、出生1日後(授乳1日目)に母マウス1腹につき新生仔が6匹になるように間引

きを行った。また、3 匹以下の仔マウスを出産した場合は、その後の実験を行わなかった。授乳 10 日目にカドミウム含有飲料水を蒸留水に交換して飼育した。

仔マウスの行動影響評価を行うため、出生 7 週後に 1 腹につき雌雄 1-2 匹の仔マウスを東京大学へ搬送した。

[結果]

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:20 匹、カドミウム曝露群:40 匹)および野生型マウス(コントロール群:20 匹、カドミウム曝露群:40 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 20 匹中 8 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 7 匹、野生型マウスのコントロール群で 20 匹中 6 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 8 匹であった。

【考察】

以上のように、野生型マウスにおいて、胎生期および授乳 10 日間のカドミウム曝露により、微量ながら新生仔へのカドミウム移行が起こることが示された。また、肝臓や腎臓中カドミウム濃度に対する脳中カドミウム濃度の比をとってみると、母体の脳中カドミウム濃度は肝臓や腎臓中カドミウム濃度の約 1/200 程度であったのに対して、新生仔では脳中カドミウム濃度は肝臓や腎臓中カドミウム濃度の約 1/25 程度であった。従って、カドミウムの脳への移行は、母体に比べて新生仔の方が高いことが明らかとなった。この理由としては、母体に比べて胎仔期および新生仔期の脳-血液関門が未発達なためと考えられる。しかしながら、新生仔組織について見ると、脳中カドミウム濃度は、肝臓や腎臓などのそれより低いことから、胎仔期および新生仔期の脳-血液関門が未発達ながらも脳へのカドミウム移行が何らかの形で抑制されていることがうかがわれた。

メタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いた検討により、カドミウムを胎生期および授乳 10 日間曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔では、腎臓中カドミウムの蓄積が低下することと

肝臓中カドミウムの蓄積が増加することが見いだされ、メタロチオネインが新生仔腎臓でのカドミウムの保持作用や新生仔肝臓へのカドミウムの蓄積抑制作用を示すことが明らかとなった。しかしながら、新生仔の腎臓と肝臓でカドミウムの蓄積に対してメタロチオネインは正反対に関与しており、その理由については今後の課題である。また、母体腎臓および小腸でのカドミウムの保持にもメタロチオネインが深く関与することも明らかとなった。さらに、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔の体重増加が、10 ppm のカドミウムの胎生期および授乳 10 日間曝露によって抑制されたことから、メタロチオネインの低下は次世代に対して高感受性要因となる可能性が示唆された。

一方、マイクロアレイによる遺伝子発現への影響については、カドミウム曝露した野生型マウスの新生仔脳で、5-hydroxytryptamine(serotonin)receptor 5b (htr5b)を含めて 4 種類の遺伝子が高発現していることが判明した。特に、カドミウム曝露による新生仔脳中 htr5b 遺伝子の高発現は、カドミウムの胎生期および授乳 10 日間曝露による仔マウスの神経行動毒性に関与する可能性があり、今後、詳細に検討する必要があると思われる。

【結論】

以上の結果より、10 ppm のカドミウムを胎生期および授乳 10 日間曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、母体腎臓並びに小腸や新生仔腎臓中カドミウムの蓄積が低下すること、そして新生仔の肝臓中カドミウムの蓄積が増加することが明らかとなった。従って、メタロチオネインは、母体や新生仔におけるカドミウムの体内動態に深く関与することが示唆された。また、カドミウムの曝露によって新生仔脳で htr5b 遺伝子などが高発現していることが判明した。

【研究発表】

1) 本田晶子, 佐藤雅彦, 長谷川達也, 瀬子義幸, 遠山千春, 永瀬久光. メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおける胎生期カドミウム経口曝露によるカドミウムの体内動態. 第 14 回日本微量元

素学会(2003年7月24～25日,吹田市).

2) 本田晶子, 長谷川達也, 瀬子義幸, 遠山千春, 佐藤雅彦, 永瀬久光. カドミウム妊娠期曝露による母体および胎仔へのカドミウムの分布におよぼすメタロチオネインの影響. 第4回メタロチオネイン研究会(2003年11月21～22日, 岐阜市).

3) 佐藤雅彦, 本田晶子, 長谷川達也, 瀬子義幸, 鈴木純子, 遠山千春, 永瀬久光. カドミウム妊娠期曝露における胎仔へのカドミウムの蓄積に及ぼすメタロチオネインの関与. 第74回日本衛生学会(2004年3月24～27日, 東京).

4) 本田晶子, 岡田知子, 長谷川達也, 瀬子義幸, 鈴木純子, 遠山千春, 佐藤雅彦, 永瀬久光. 胎生期カドミウム経口曝露によるカドミウムの胎仔への蓄積におけるメタロチオネインの関与. 日本薬学会第124年会(2004年3月29～31日, 大阪).

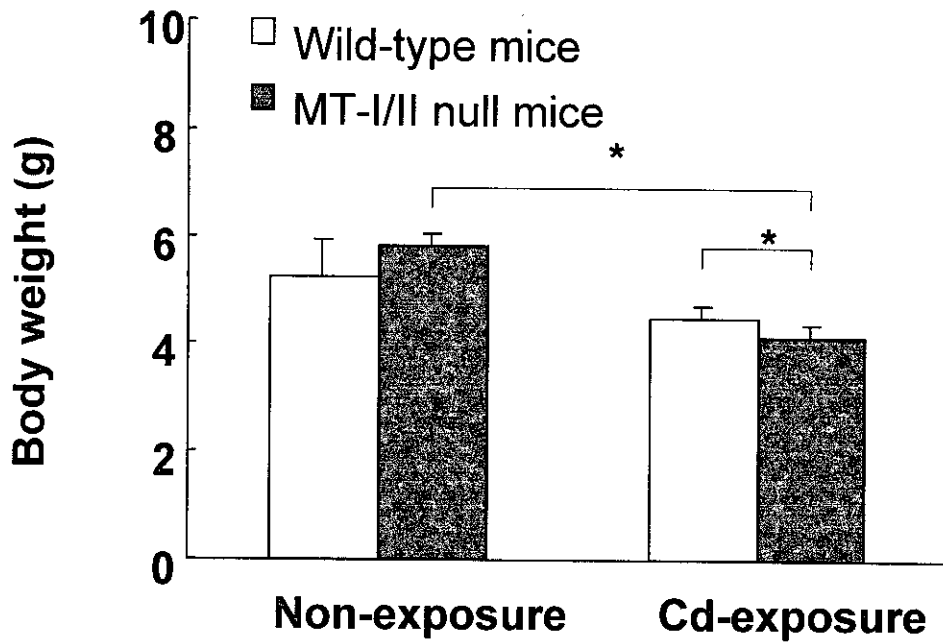


図1 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔体重 * p<0.05.

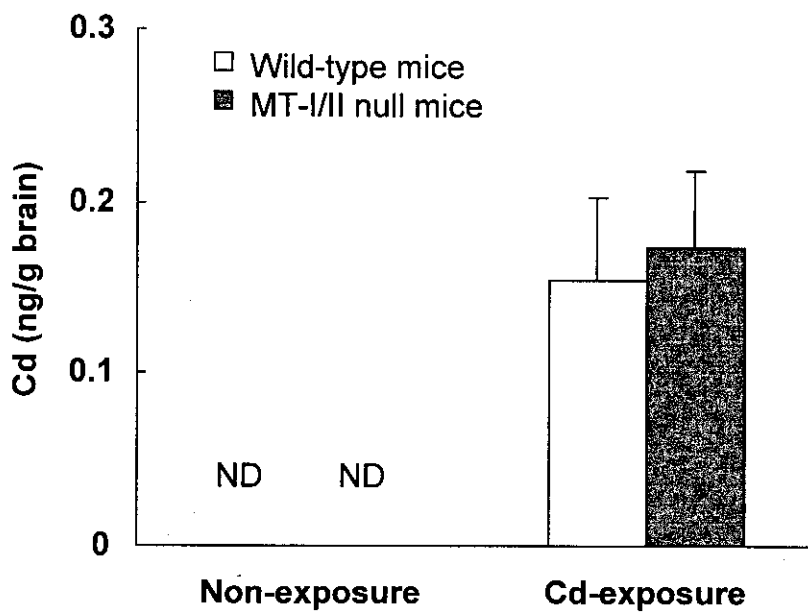


図2 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔脳中カドミウム濃度 ND: not detected.