

図3 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腎臓中カドミウム濃度
 ND: not detected. * $p < 0.05$.

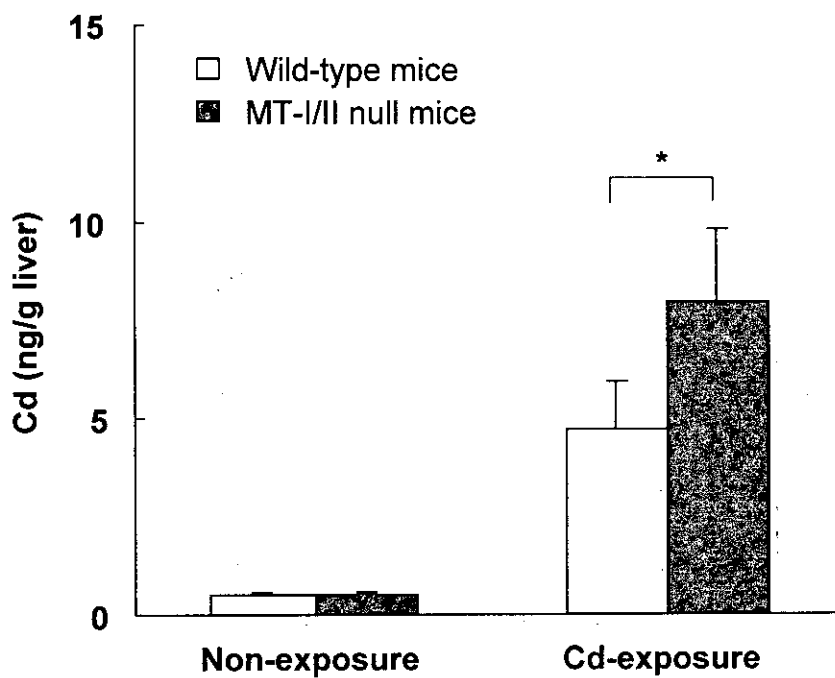


図4 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔肝臓中カドミウム濃度
 * $p < 0.05$.

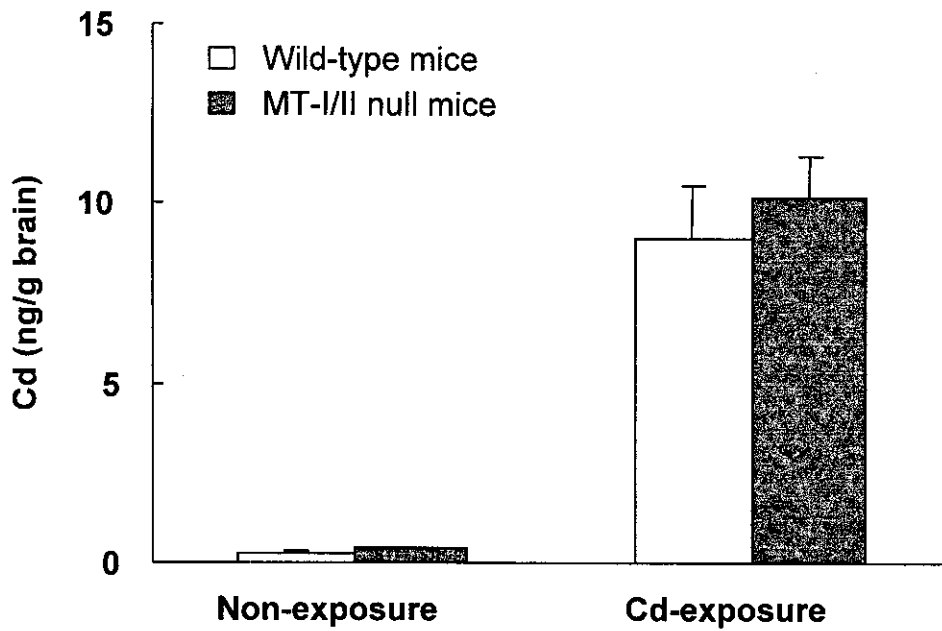


図5 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体脳中カドミウム濃度

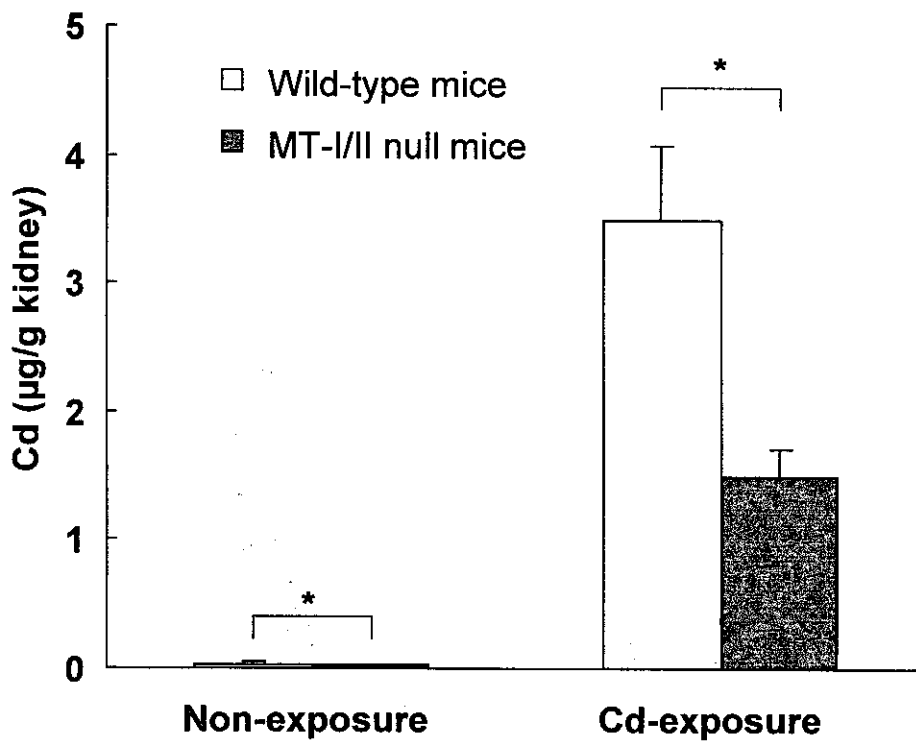


図6 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体腎臓中カドミウム濃度
* p<0.05.

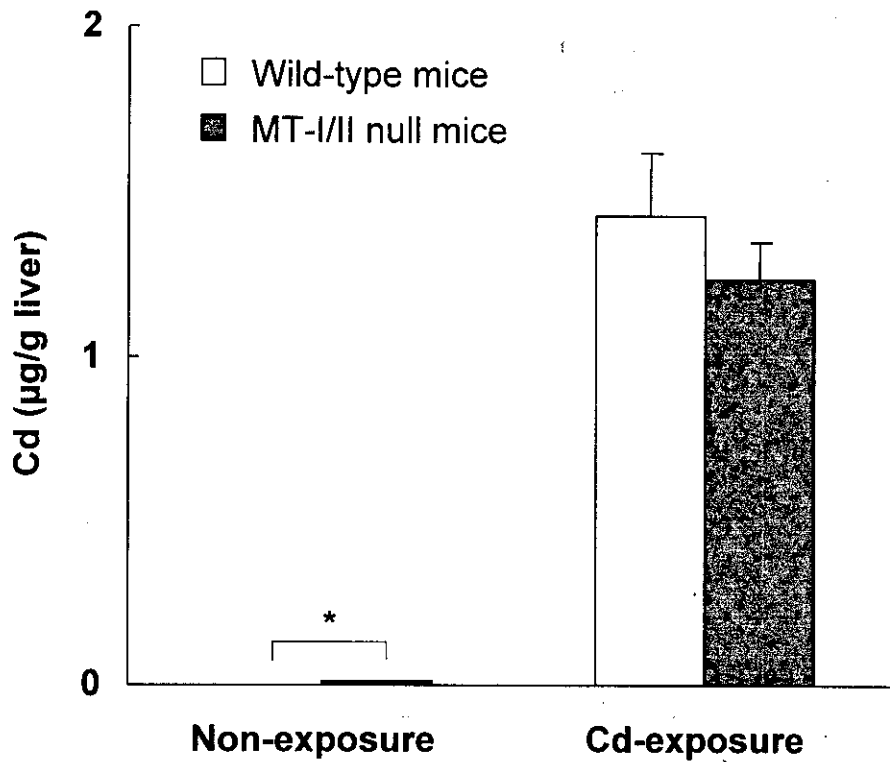


図7 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体肝臓中カドミウム濃度
* p<0.05.

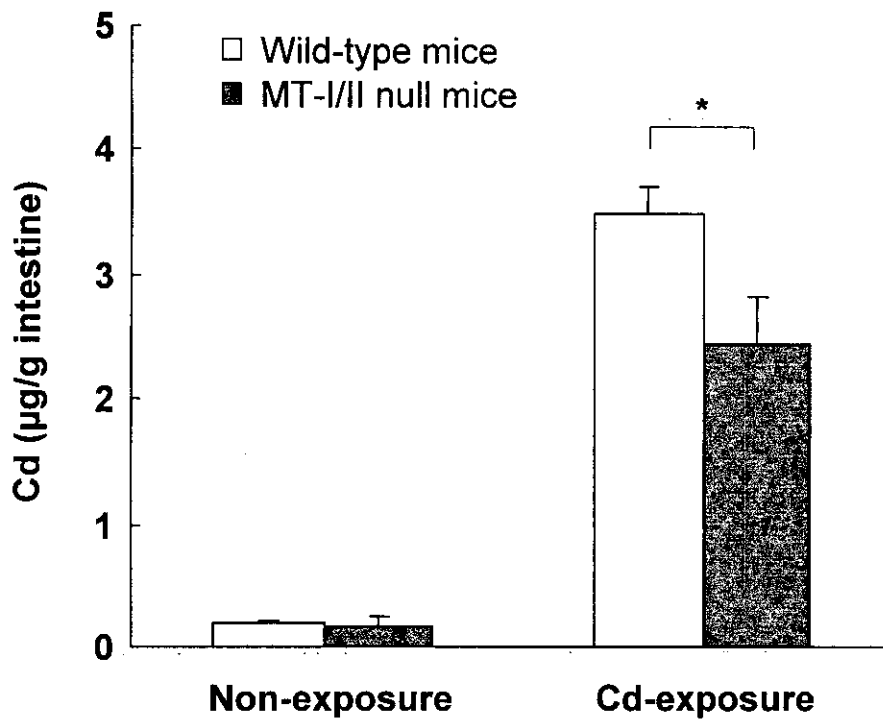


図8 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体小腸中カドミウム濃度
* p<0.05.

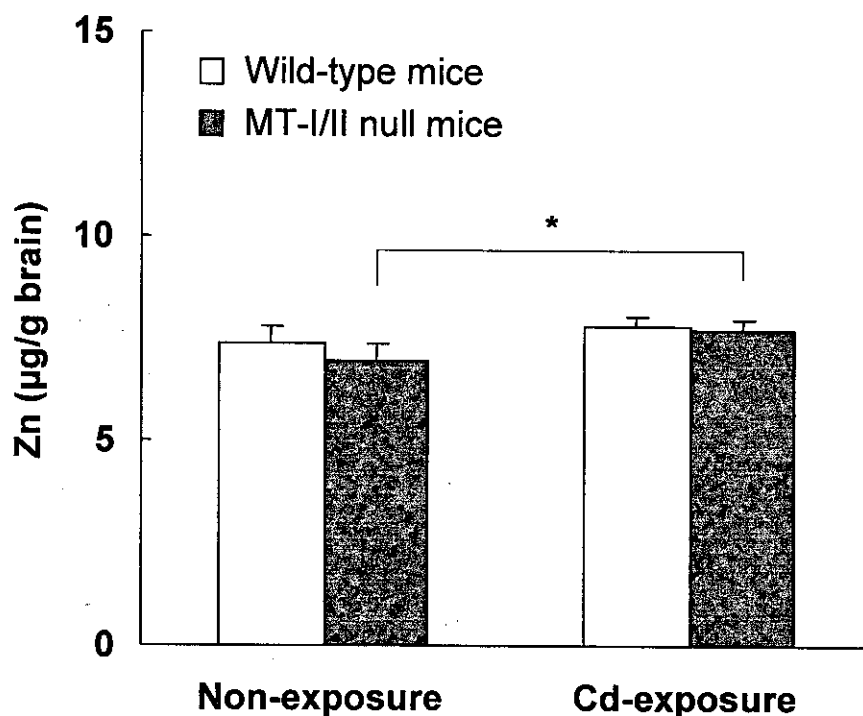


図9 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/11欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔脳中亜鉛濃度
* p<0.05.

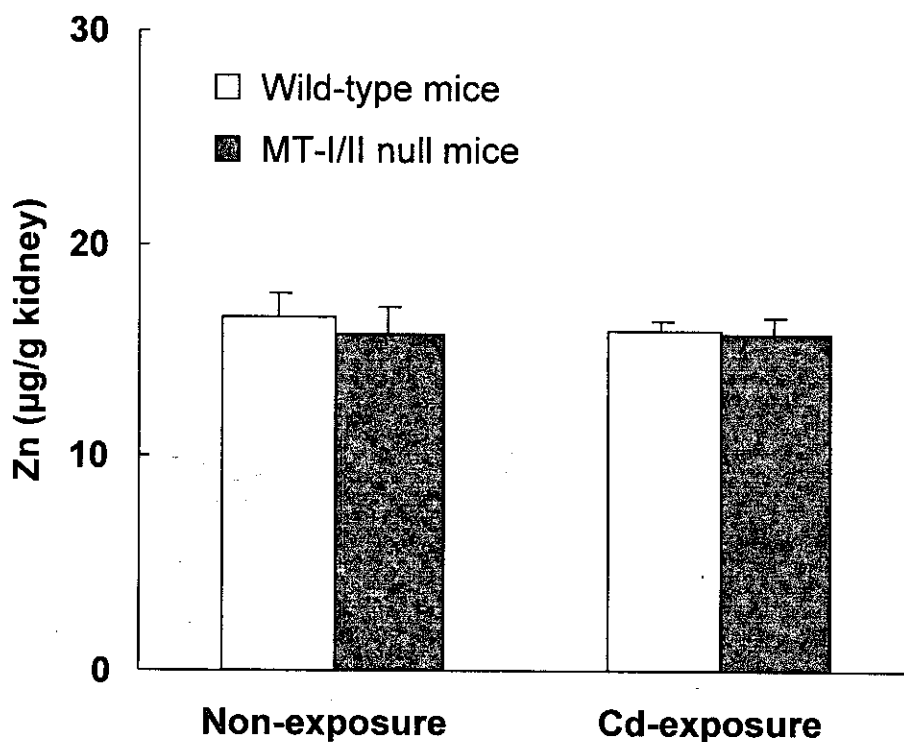


図10 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/11欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔腎臓中亜鉛濃度

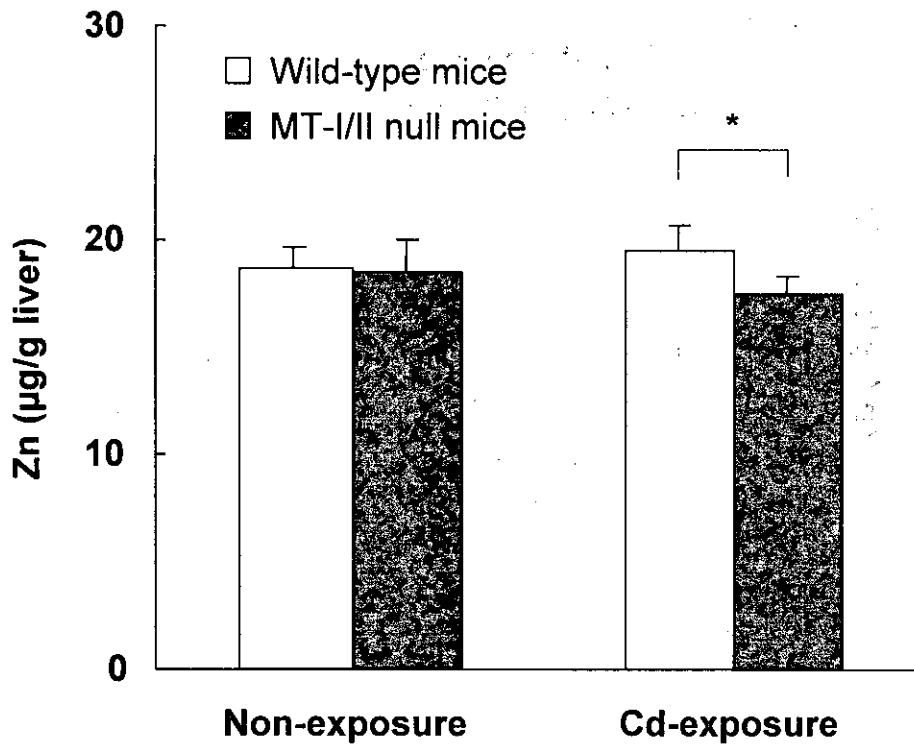


図 1 1 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-
I/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔肝臓中亜鉛濃度
* $p < 0.05$.

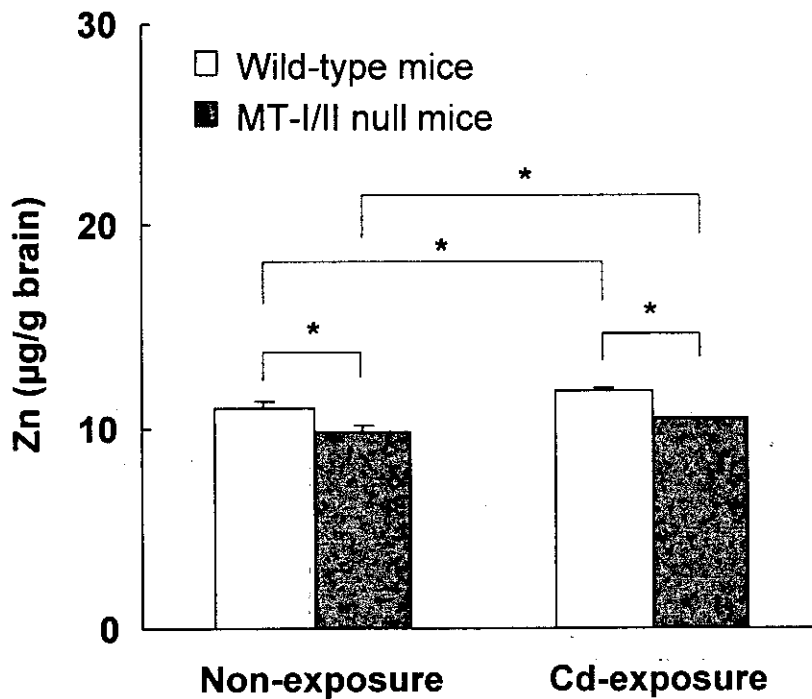


図 1 2 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-
I/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体脳中亜鉛濃度
* $p < 0.05$.

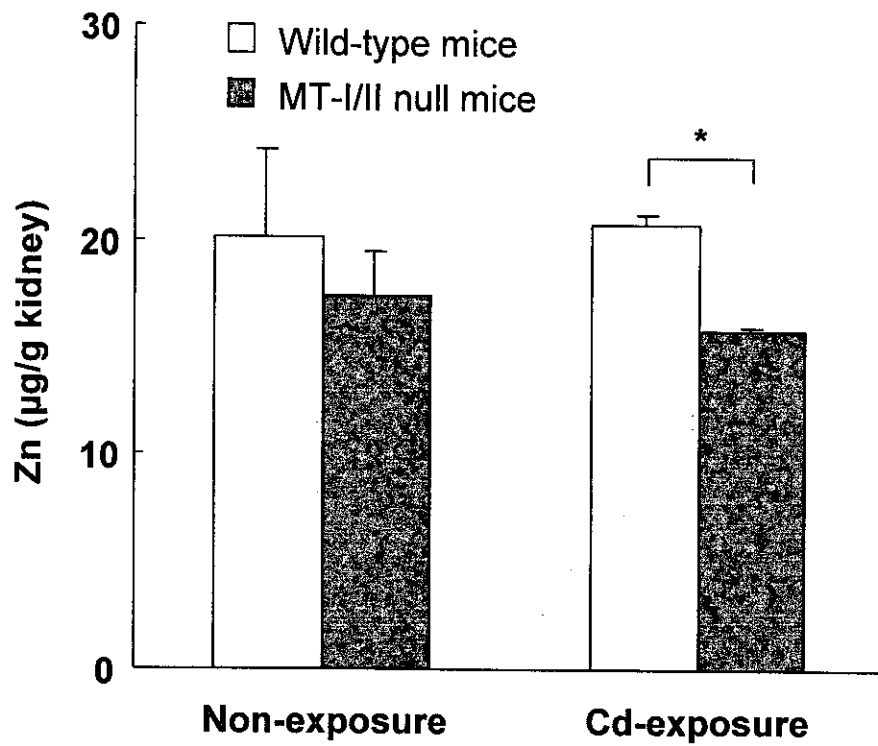


図 1 3 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体腎臓中亜鉛濃度
* $p < 0.05$.

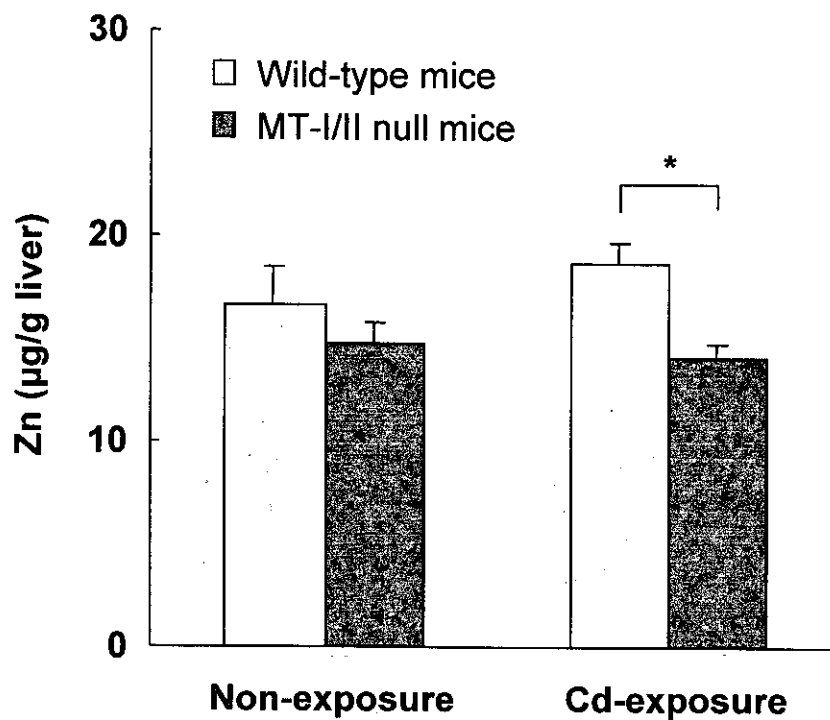


図 1 4 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体肝臓中カ亜鉛濃度
* $p < 0.05$.

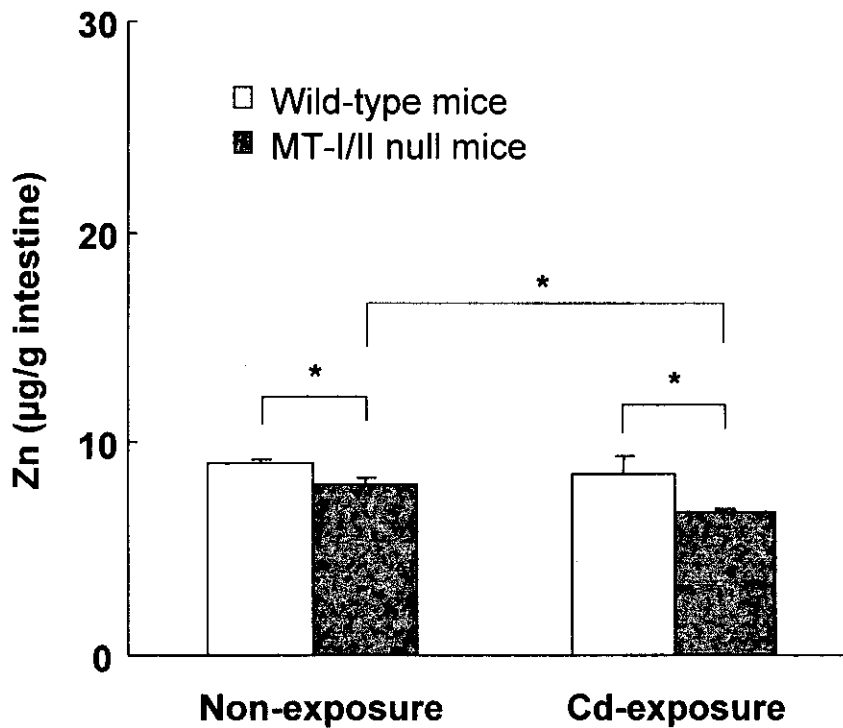


図15 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体小腸中亜鉛濃度
* p<0.05.

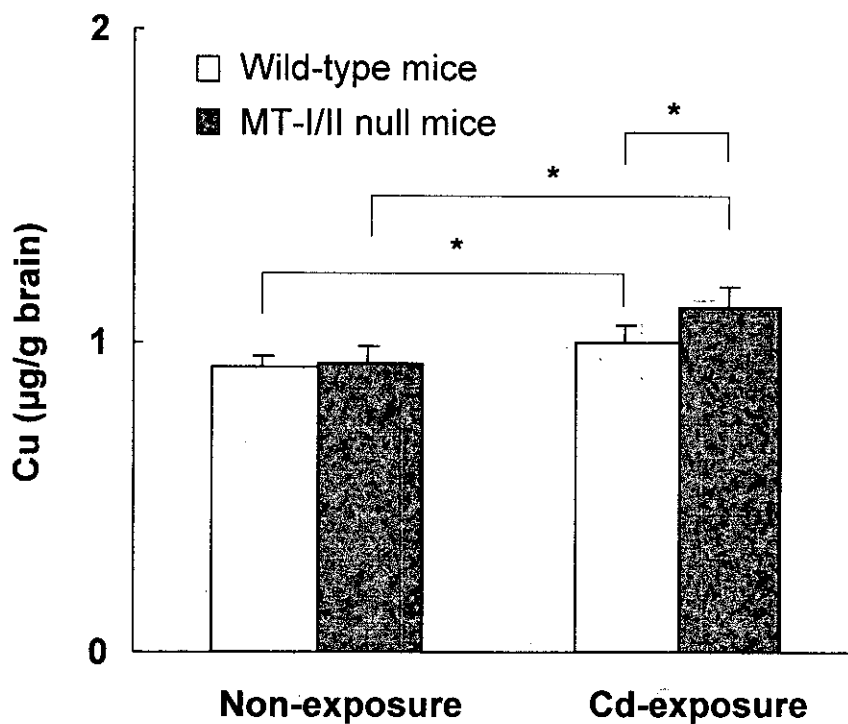


図16 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔脳中銅濃度
* p<0.05.

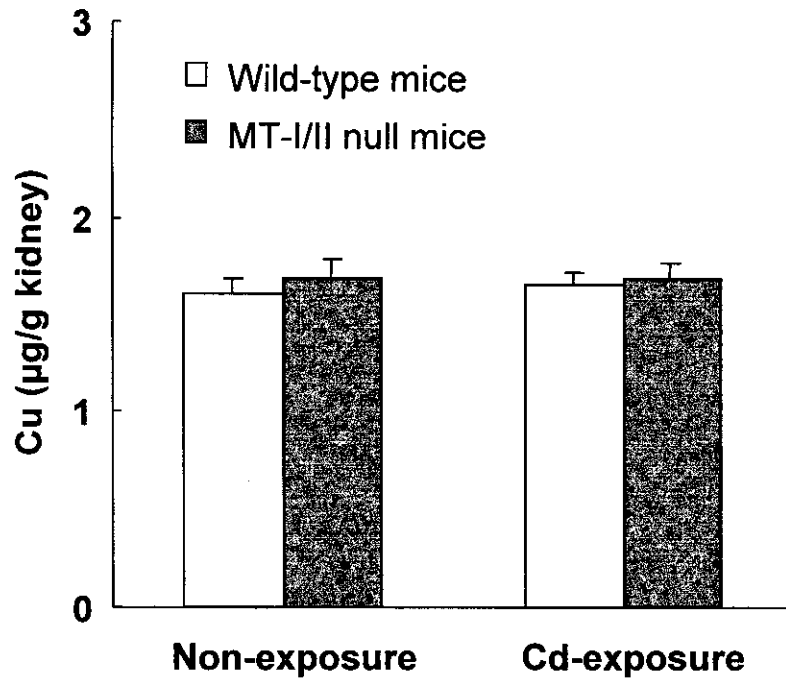


図17 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/11欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔腎臓中銅濃度
* p<0.05.

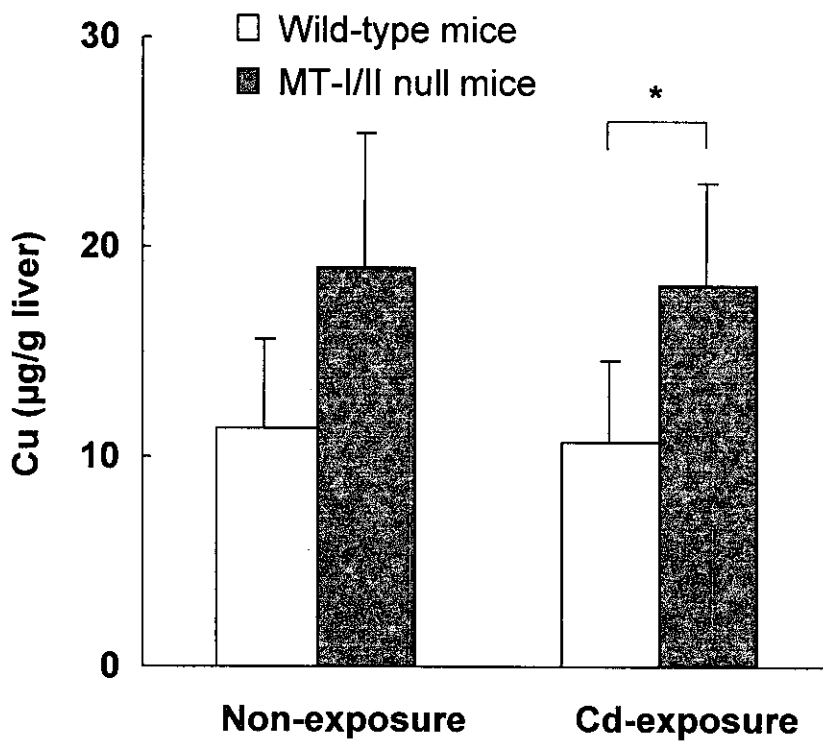


図18 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/11欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔肝臓中銅濃度
* p<0.05.

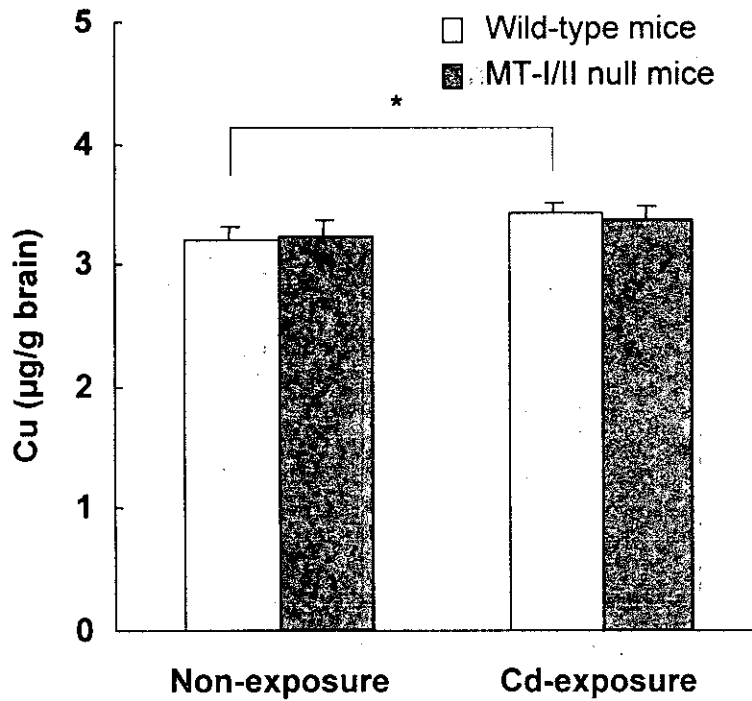


図19 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体脳中銅濃度
* p<0.05.

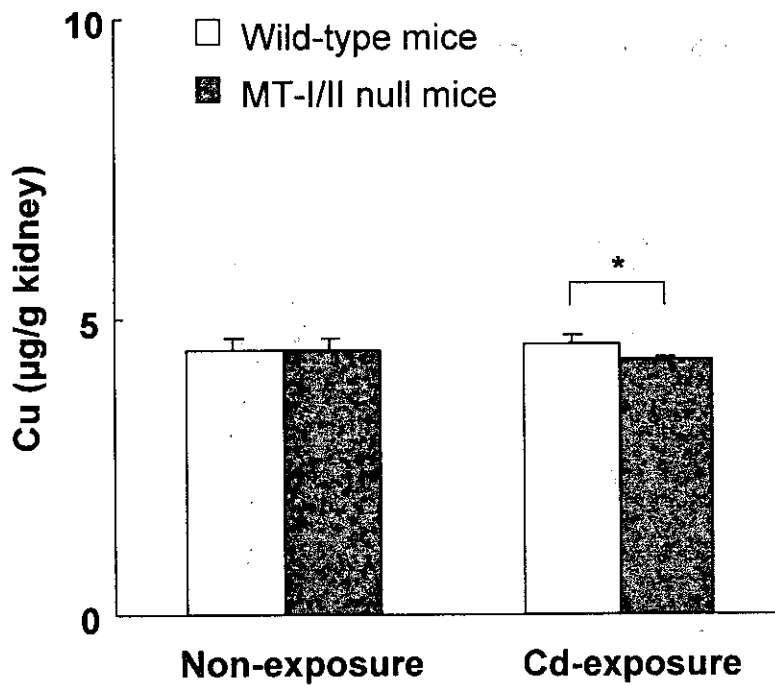


図20 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体腎臓中銅濃度
* p<0.05.

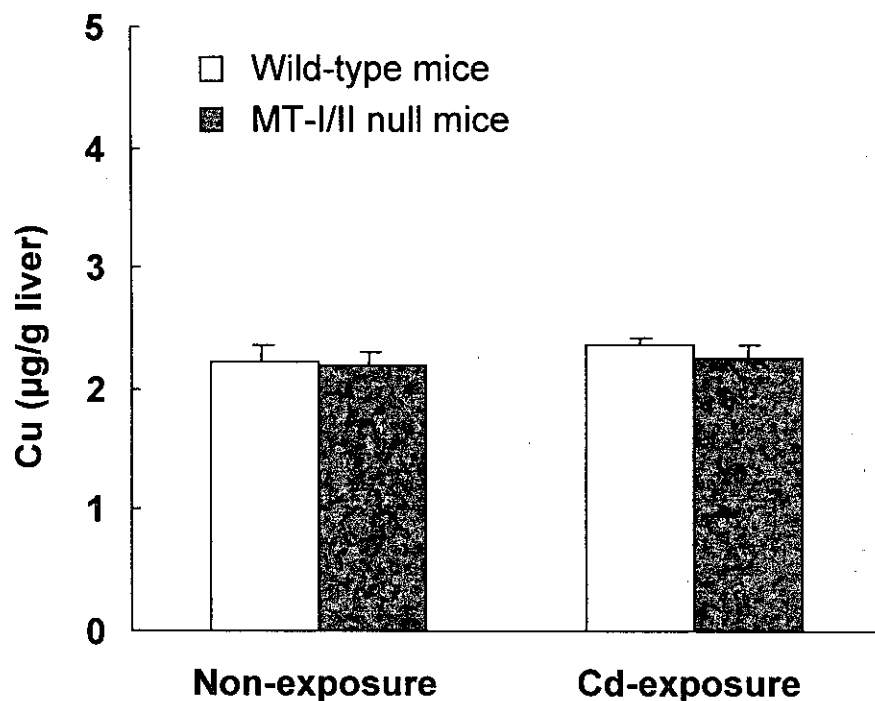


図2 1 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/1欠損マウス並びに野生型マウスの母体肝臓中銅濃度

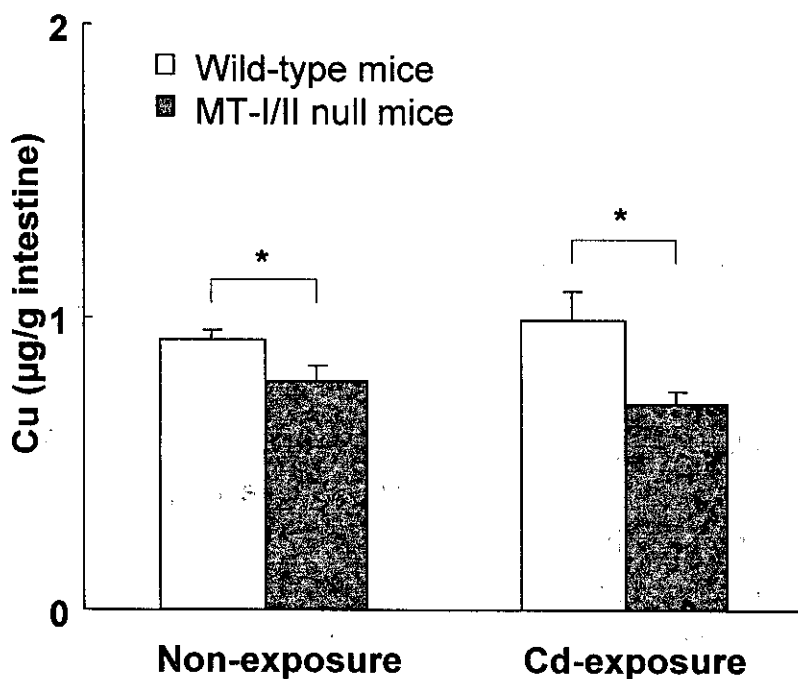


図2 2 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-1/1欠損マウス並びに野生型マウスの母体小腸中銅濃度

* p<0.05.

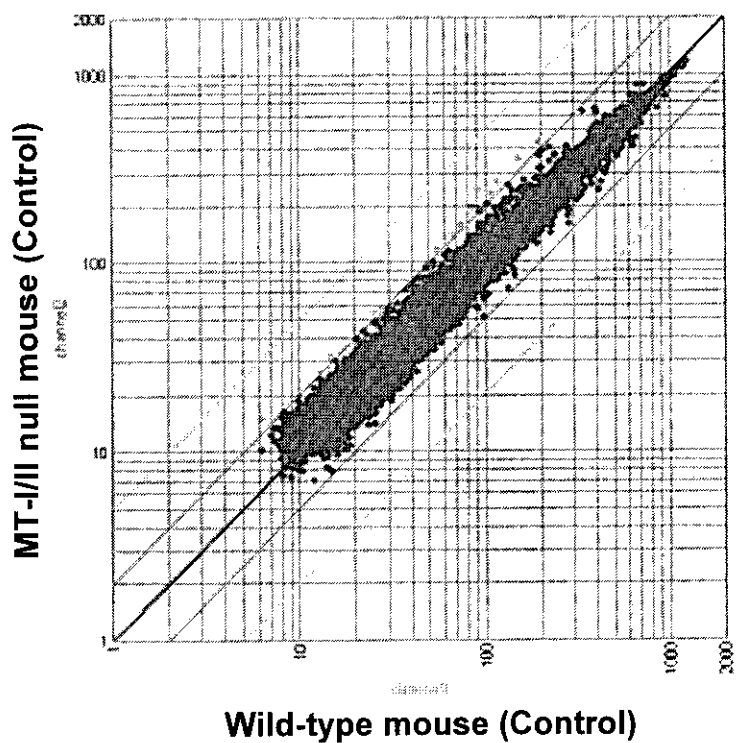


図 2 3 DNAマイクロアレイによるスクアタープロット (コントロールにおけるメタロチオネイン-1/11欠損マウスと野生型マウスの比較)

表 1 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現

Genes (Description)	Ratio
riken cdna 0610012d14 gene	2.3
receptor (tnfrsf)-interacting serine-threonine kinase 1; ripk1	2.3
ras homolog g (rhog); arhg	2.2
vascular endothelial zinc finger 1; vezf1	2.1
cytokine inducible sh2-containing protein; cish	2.1

MT-I/II null mice (Control) / Wild-type mice (Control) < 2

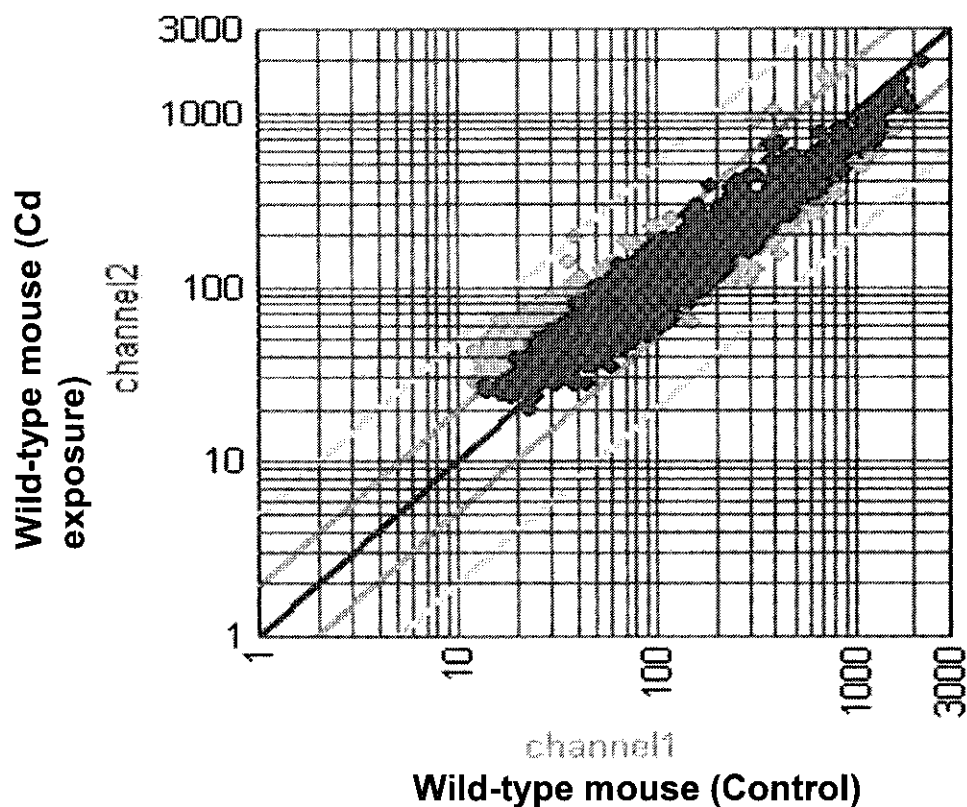


図24 DNAマイクロアレイによるスクタープロット
 (野生型マウスにおけるコントロール群とカドミウム曝露群との比較)

表2 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現

Genes (Description)	Ratio
5-hydroxytryptamine(serotonin)receptor 5b; htr5b	2.8
riken cdna 2010012I10;2010012I10rik	2.5
homolog to hypothetical 55.4kda protein	2.1
receptor(tnfrsf)-interacting serin-threonin kinase1; ripk1	2.0

Wild-type mice (Cd exposure) / Wild-type mice (Control) > 2

表3 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現

Genes (Description)	Ratio
ancient ubiquitous protein; aup1	0.4
v-ral simian leukemia viral oncogene homolog b (ras related); ralb	0.4
hypothetical protein	0.4
nth (endonuclease iii)-like 1 (e.coli); nth1	0.4
leucine rich protein, b7 gene; lrpb7	0.4
hypothetical protein	0.4
zinc finger protein 162; zfp162	0.5
hypothetical protein	0.5
phospholipase d3; pld3	0.5
dnaj (hsp40) homolog, subfamily b, member 6	0.5
phospholipase c-12; plc-12	0.5
homolog to putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit (eif-3) (fragment)	0.5
potassium voltage-gated channel, shal-related family, member 2; kcnd2	0.5
mslc9a3r2/e3karp/sip-1/tka-1/octs2	0.5
high mobility group protein i; hmga1	0.5
metallothionein containing protein (reverse)	0.5
c1q domain containing protein	0.5
homolog to antigen ny-co-10	0.5
homolog to snrna activating protein complex 19 kda subunit (snapc 19 kda subunit)	0.5
bimp2	0.5
zfp95	0.5
protein kinase c and casein kinase substrate in neurons 3; pacsin3	0.5
related to cg1826 protein	0.5
polymerase i and transcript release factor; ptrf	0.5
homolog to kiaa1610 protein (fragment)	0.5

Wild-type mice (Cd exposure) / Wild-type mice (Control) < 0.5

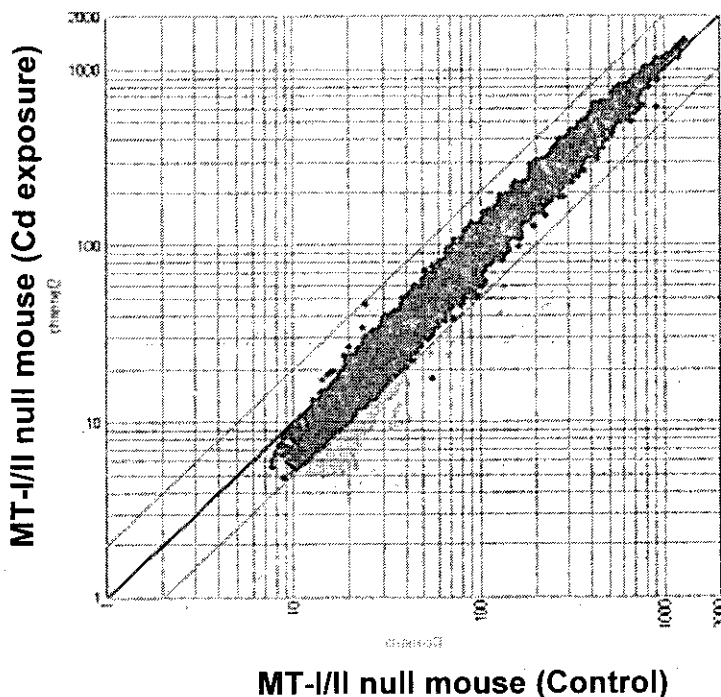


図25 DNAマイクロアレイによるスキャタープロット
 (メタロチオネイン-1/11欠損マウスにおけるコントロール群とカドミウム曝露群との比較)

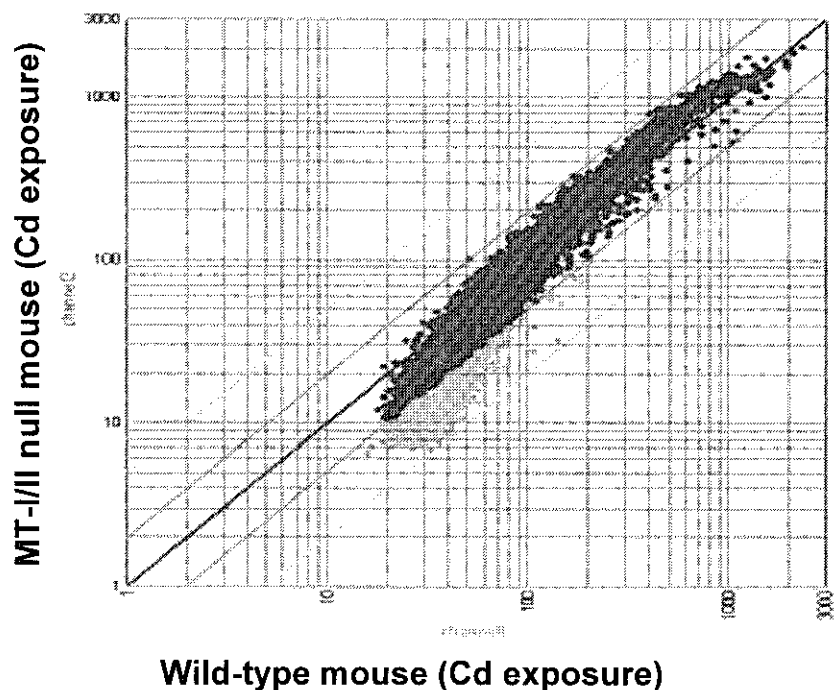


図 26 DNAマイクロアレイによるスクアタープロット
 (カドミウム曝露におけるメタロチオネイン-1/II欠損マウスと野生型マウスとの比較)

表 4 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現

Genes (Description)	Ratio
homolog to hypothetical 55.4 kda protein	0.5
riken cdna 2010012110; 2010012110rik	0.5
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b; htr5b	0.5

MT-I/II null mice (Cd exposure) / Wild-type mice (Cd exposure) < 0.5

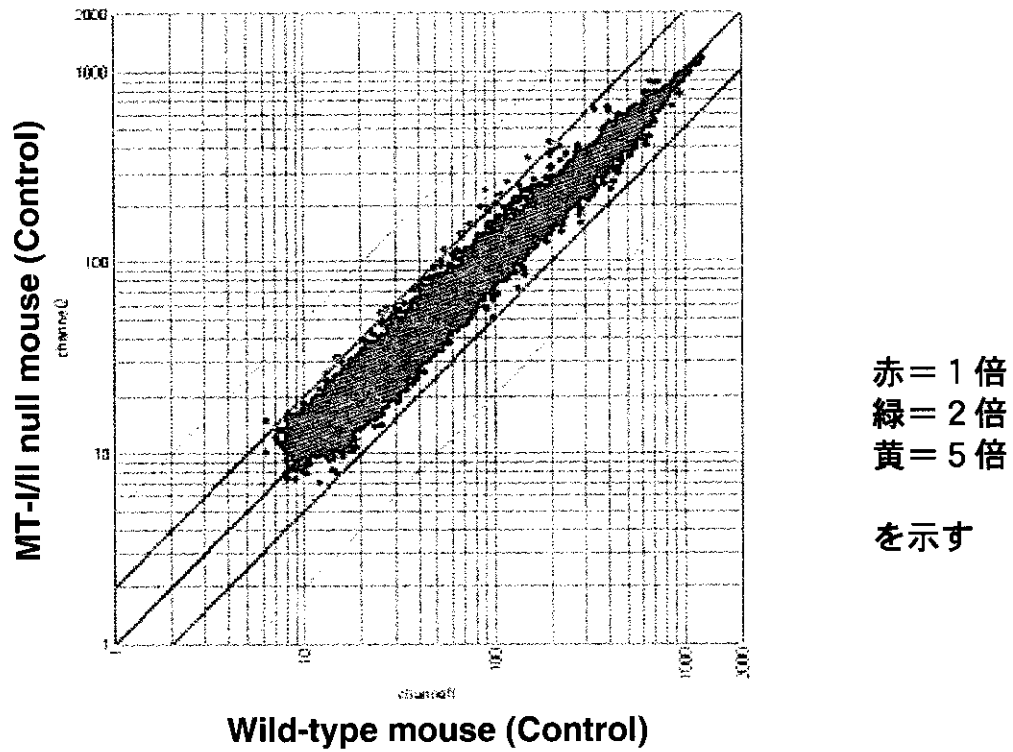


図 2 3 DNAマイクロアレイによるスクタープロット (コントロールにおけるメタロチオネイン-1/11欠損マウスと野生型マウスの比較)

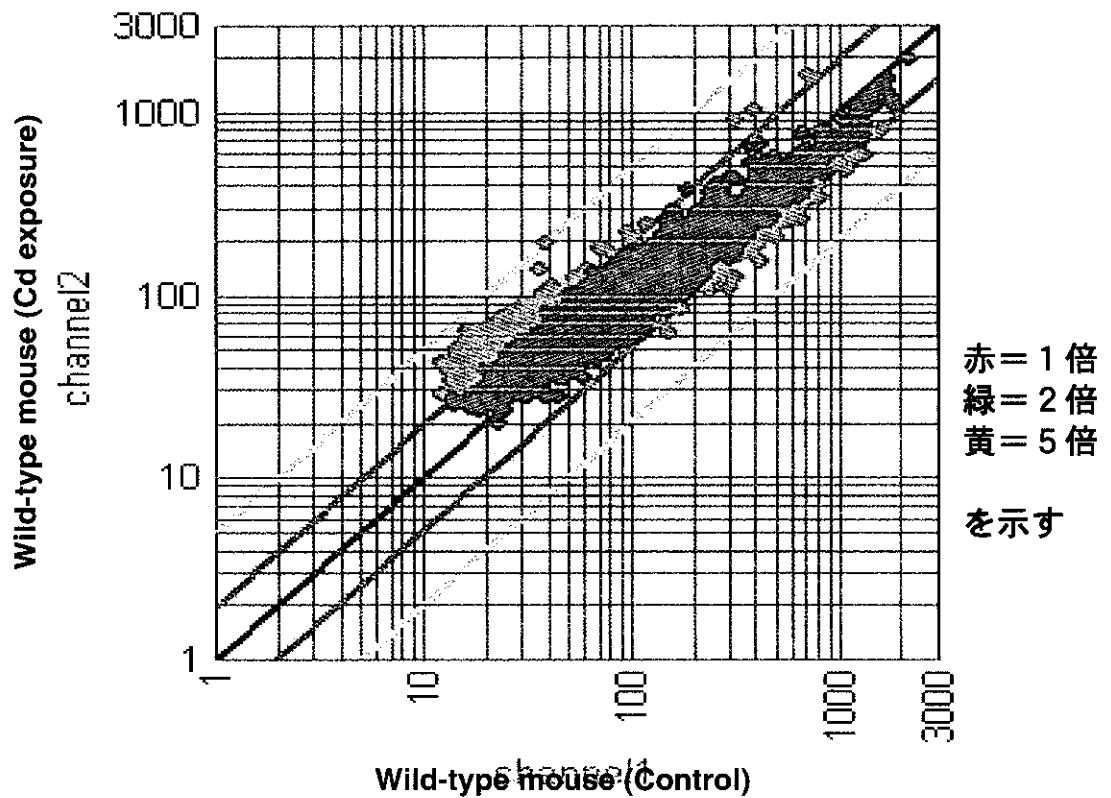
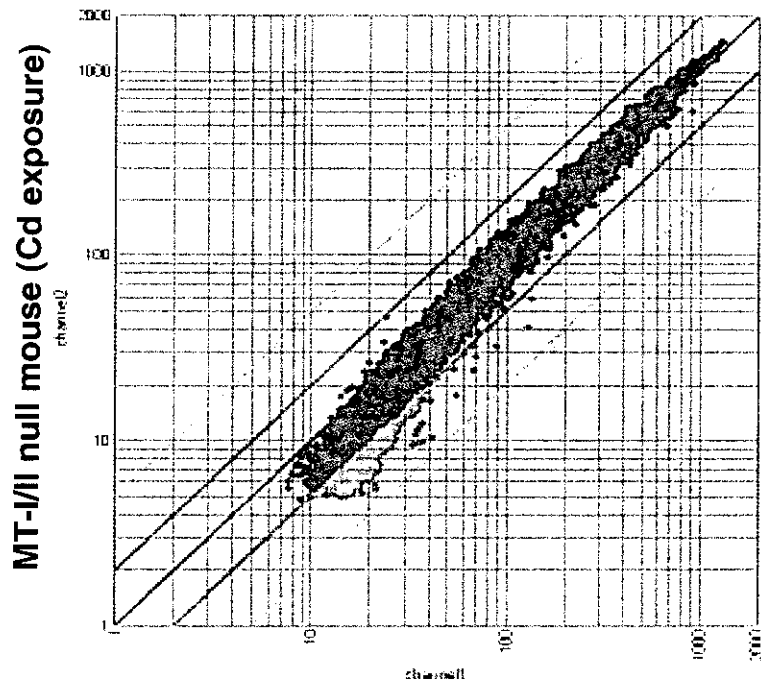


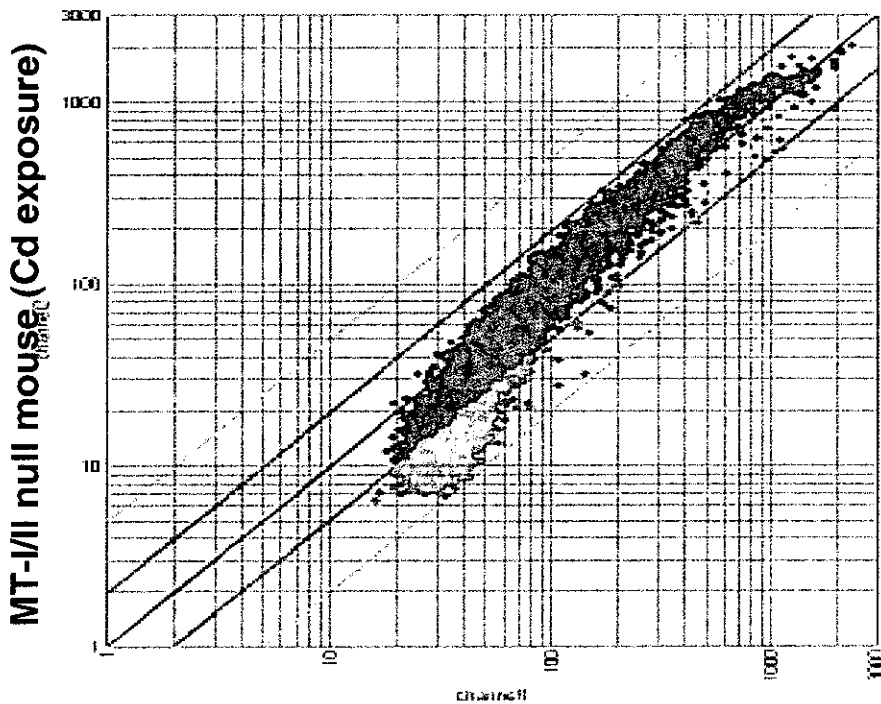
図 2 4 DNAマイクロアレイによるスクタープロット (野生型マウスにおけるコントロール群とカドミウム曝露群との比較)



赤 = 1 倍
 緑 = 2 倍
 黄 = 5 倍
 を示す

MT-1/II null mouse (Control)

図 2 5 DNAマイクロアレイによるスクタープロット
 (メタロチオネイン-1/II欠損マウスにおけるコントロール群とカドミウム曝露群との比較)



赤 = 1 倍
 緑 = 2 倍
 黄 = 5 倍
 を示す

Wild-type mouse (Cd exposure)

図 2 6 DNAマイクロアレイによるスクタープロット
 (カドミウム曝露におけるメタロチオネイン-1/II欠損マウスと野生型マウスとの比較)

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

分担研究者 島田章則 鳥取大学農学部獣医病理学教授

研究要旨:低用量のカドミウムならびにメチル水銀への周生期曝露が、発達中の神経系に及ぼす影響を、組織学的に検索した。50ppmのCdへの妊娠期曝露では発育不良を認めたが、組織学的異常は見いだされなかった。Cdの胎仔移行は極めて微量であるために、Cdを組織学的手法で可視化することはできなかった。50ppmCdに妊娠期～
合、新生仔肝に空胞変性を認めた。脳には組織学的病変を見いださなかった。したがって、行動異常との関連を知るためには機能的な異常を検索できる方法を用いることが重要であると考えられた。10ppmCdへの180日間に渡る曝露では、母体に組織学的異常は検出されなかった。

5ppmのメチル水銀を含む餌に妊娠期及び授乳期に曝露した新生仔で、視床下部の神経細胞および星状膠細胞の数的変化は検出されなかった。行動異常が観察されていることから、より機能的な異常の検索を行うため、神経伝達物質に関する免疫組織化学および分子病理学的検索によるアプローチが必要であることが示唆された。

(1). 妊娠期低用量カドミウム経口曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウス胎仔における組織学的検索

A. 研究目的

カドミウムは実験動物における催奇物質として知られている。例えば妊娠8日目のハムスターにカドミウムを投与した場合、口蓋裂、無眼球症などの奇形が生じる。また、マウスにおいては胎生期から授乳期におけるカドミウム曝露が胎仔の中枢神経系に異常を与えることが知られている。

メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。メタロチオネインをあらかじめ誘導されたマウスでは、カドミウム投与による毒性が軽減されることが知られている。

そこで、本研究では胎生期にカドミウム経口曝露を行い、メタロチオネインが胎仔に及ぼす影響を、メタロチオネイン欠損マウスを用いて病理組織学的に検索した。

B. 材料および方法

メタロチオネイン欠損マウスおよび野生型マウスに対して、妊娠 1 日目から自由飲水にて 50 ppm カドミウムを含む飲水を自由に与えた。妊娠 19 日目に妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、胎盤および胎仔を摘出した。摘出した胎盤および胎仔を肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE 染色を行った。

C. 研究結果

肉眼所見:メタロチオネイン欠損マウスの胎仔において、1 例の発育不良胎仔が認められた(図 1、2)。その他のメタロチオネイン欠損マウスおよび野生型マウスの胎仔には肉眼的に異常は認められなかった。

組織学的所見:発育不良胎仔は胎齢 19 日であったが、組織学的には心臓、消化管および肺(図 3、4、5)等の主要臓器の発達は胎齢 16 日程度であった。中枢神経系の発達の程度は組織学的に判断することは出来なかった。

D. 考察

カドミウムによる奇形例として口蓋裂、無眼球症などが知られているが、胎仔発育不全の報告はされていない。胎生期から授乳期におけるカドミウム曝露が胎仔の中枢神経系に異常を与えることが知られているが、本例では組織学的に判断することが出来なかった。しかしながら、明らかな発育不良が観察されたことは中枢神経系を含め、生後の発達に何らかの影響を与え

る可能性があることは否定出来ない。

メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。今回の実験により、メタロチオネイン欠損マウスにおいてのみ、発育不良個体が観察されたことから、メタロチオネイン欠損とカドミウム曝露が重複した場合、何らかの影響を与えることが示唆された。

(2). 妊娠期低用量カドミウム経口曝露によるメタロチオネイン欠損、ヘテロおよび野生型マウス胎仔における組織学的検索およびカドミウムの組織内局在に関する検索

A. 研究目的

妊娠期間中のカドミウム曝露によって、胎盤を介してカドミウムが胎児へ曝露されることが知られており、カドミウムの胎児への影響が懸念されている。メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。メタロチオネインをあらかじめ誘導されたマウスでは、カドミウム投与による毒性が軽減されることが知られている。しかしながら、母体および胎仔のメタロチオネインがどのようにカドミウムの組織内局在や毒性発現に関与するのかわかっていない。そこで、母体および胎仔のメタロチオネインがどのようにカドミウムの組織内局在や毒性発現に関与するのかわからかにする目的とし、その影響をメタロチオネインヘテロマウスを用いて検討する。

B. 材料および方法

下記(A~C)の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

A: ♀メタロチオネイン (MT)(-/-) × ♂MT(+/-)

B: ♀MT(+/-) × ♂MT(-/-)

C: ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

メタロチオネイン欠損、ヘテロおよび野生型マウスに対して、交配の翌日より妊娠期間中(19日間)、カドミウムを含む飲料水(50 ppm)を自由飲水にて与えた。妊娠 19 日目に妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、胎盤および胎仔を摘出した。また、母マウスの脳、肝臓、腎臓および胃を摘出した。摘出した胎盤、胎仔および母マウスの諸臓器を肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE 染色を行った。また、組織内におけるカドミウムの局在を明らかにすることを目的とし、カドミウム染色を行った。