

図 1. 実験スケジュール (Hg⁰ 曝露)

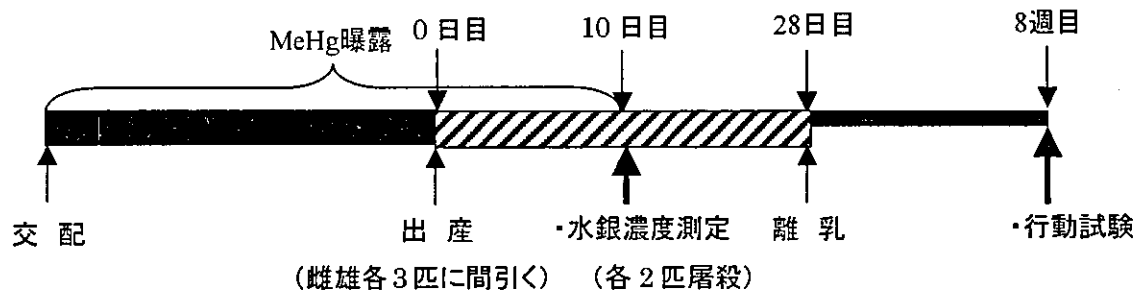


図 2. 実験スケジュール (MeHg 曝露)

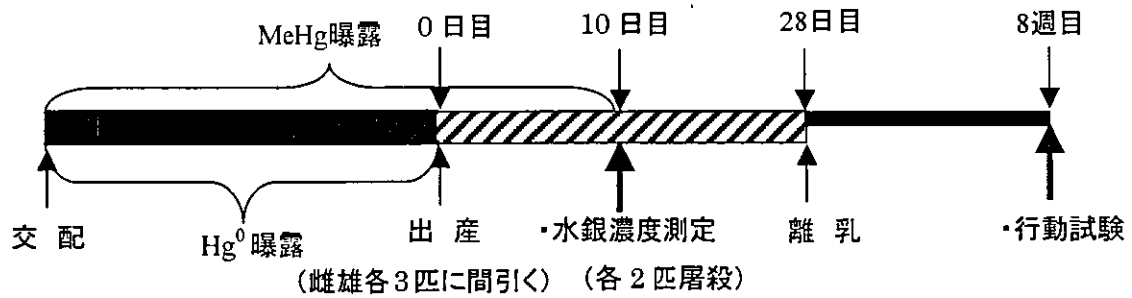


図 3. 実験スケジュール (Hg⁰+MeHg 複合曝露)

写真3. モリス水迷路試験の装置

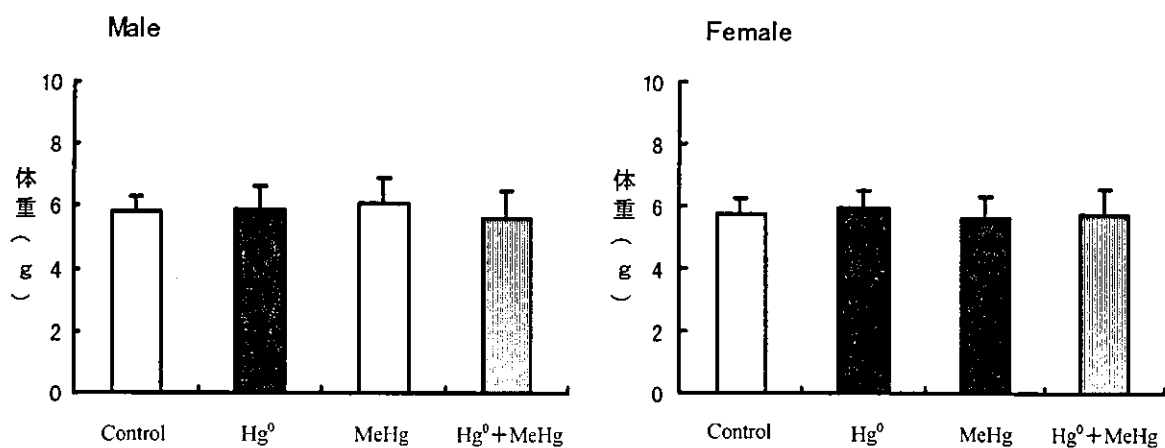


図 4. MT(+/+)マウスの出産 10 日目における体重

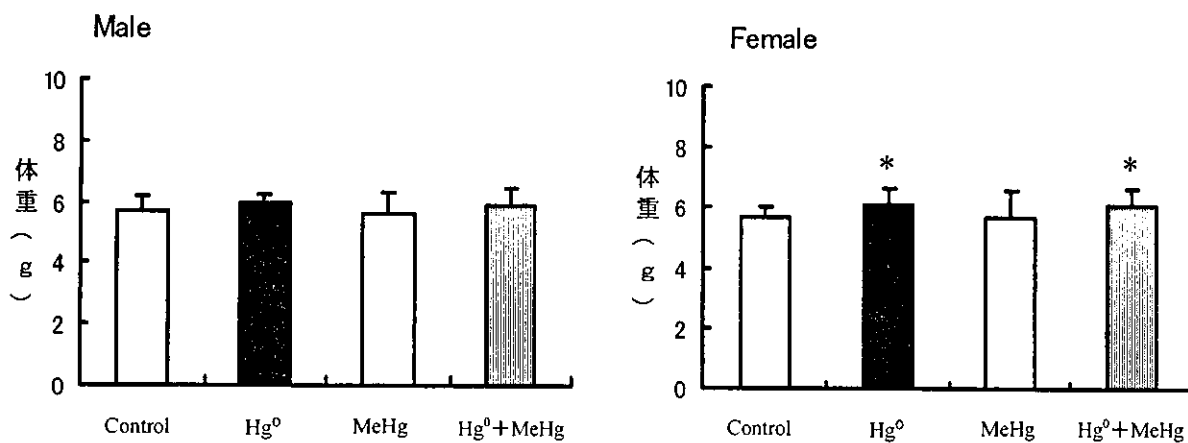


図 5. MT(-/-)マウスの出産 10 日目における体重

* $p < 0.05$ で対照群との間に有意差あり

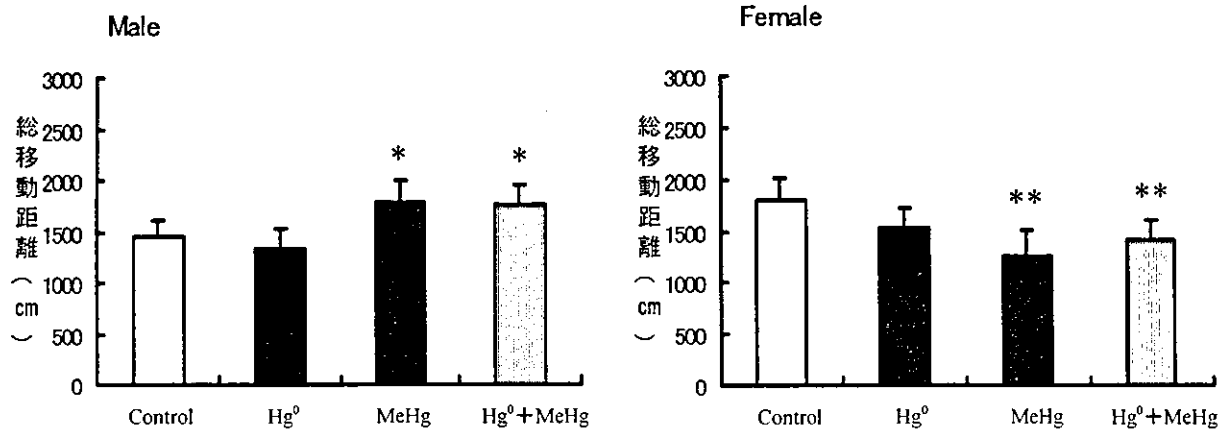


図 6. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢の OPF 試験における総移動距離

* $p < 0.05$ で対照群との間に有意差あり ** $p < 0.01$ で対照群との間に有意差あり

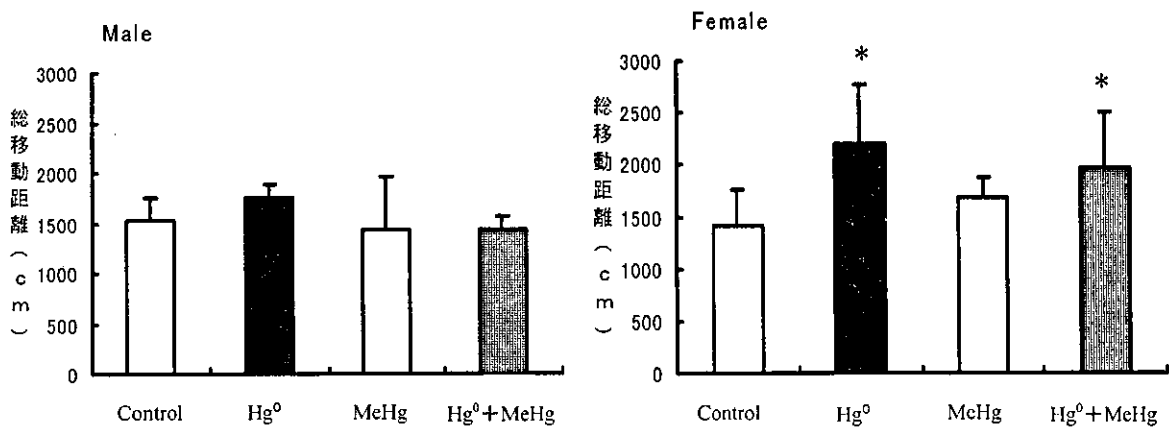


図 7. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後の OPF 試験における総移動距離

* $p < 0.05$ で対照群との間で有意差あり

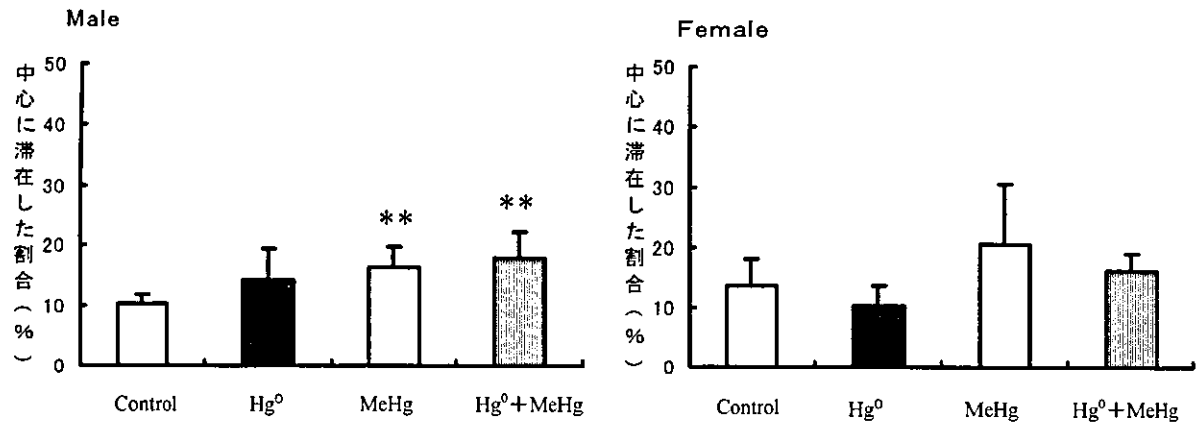
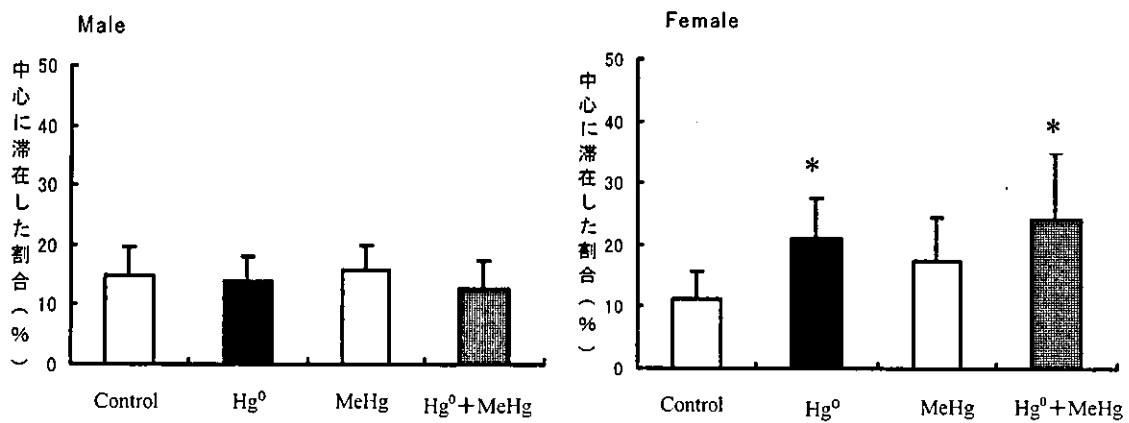


図 8. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢の OPF 試験での中心に滞在した割合
 **p<0.01 で対照群との間に有意差あり



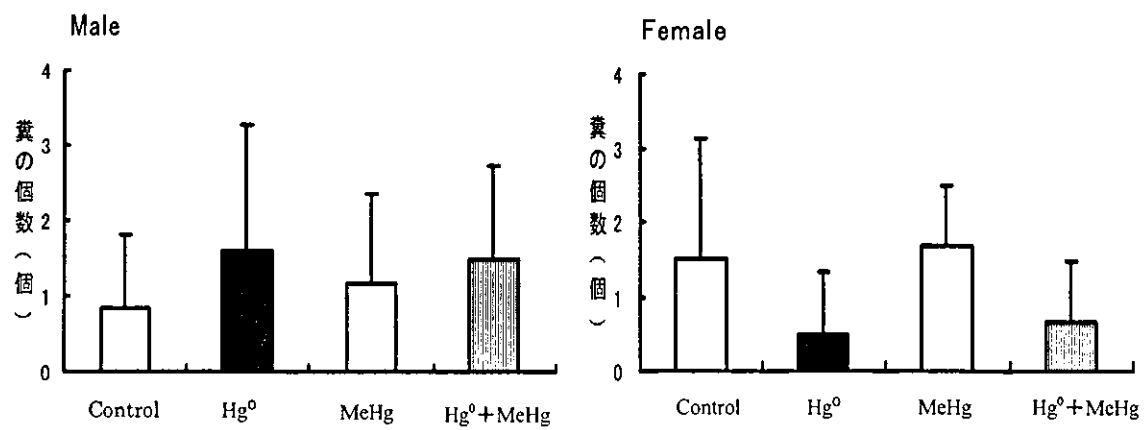


図 10. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢の OPF 試験での糞の個数

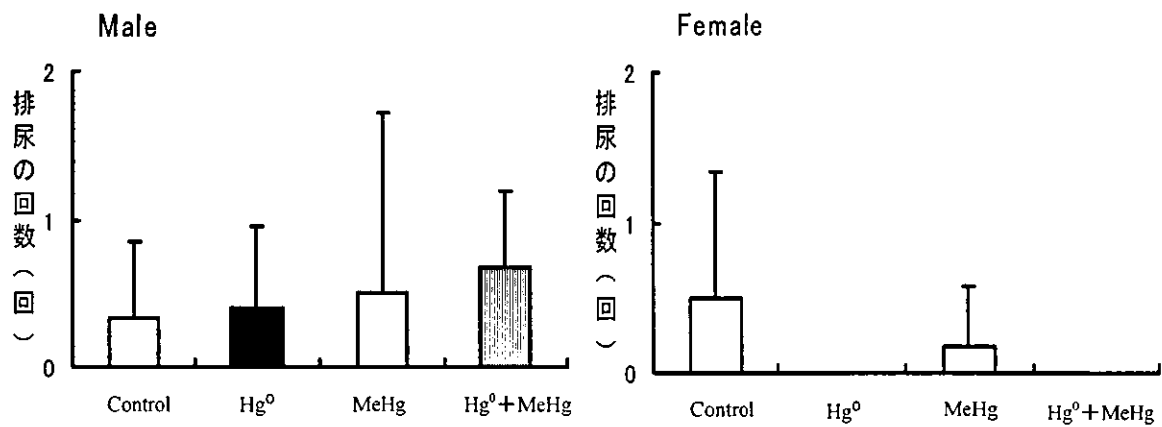


図 11. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢の OPF 試験での排尿の回数

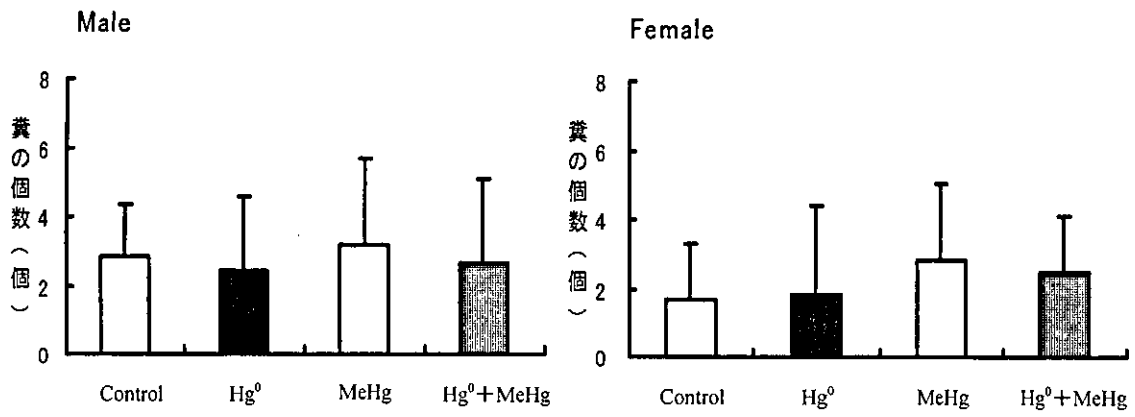


図 12. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後の OPF 試験での糞の個数

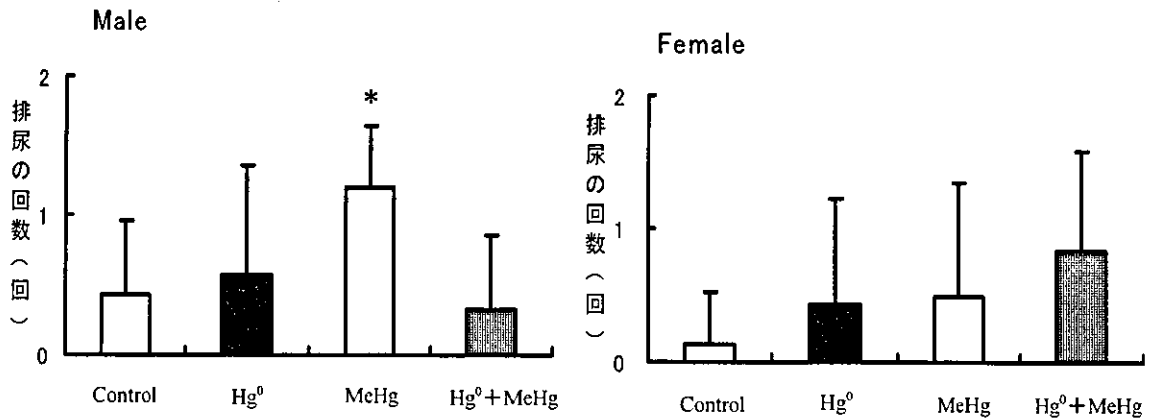


図 13. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後の OPF 試験での排尿の回数

* $p < 0.05$ で対照群との間で有意差あり

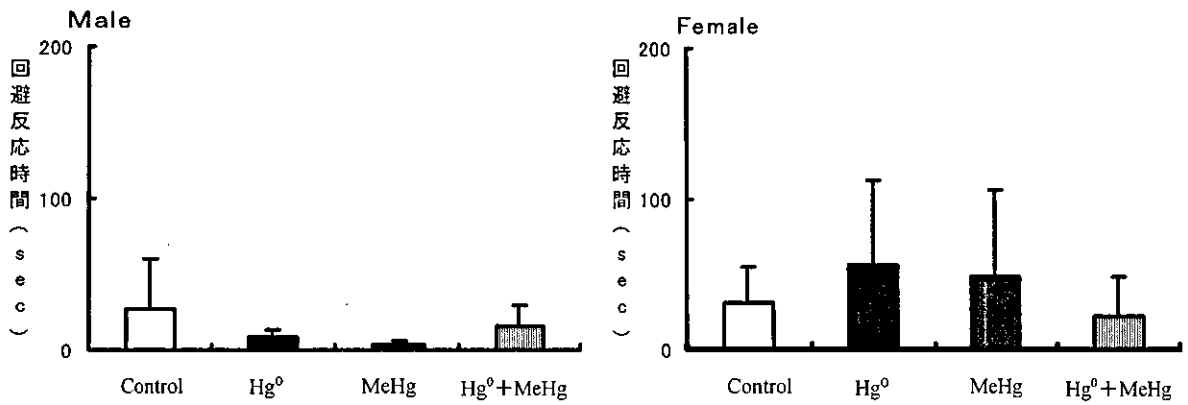


図 14. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後の PA 試験による訓練試行の回避反応時間

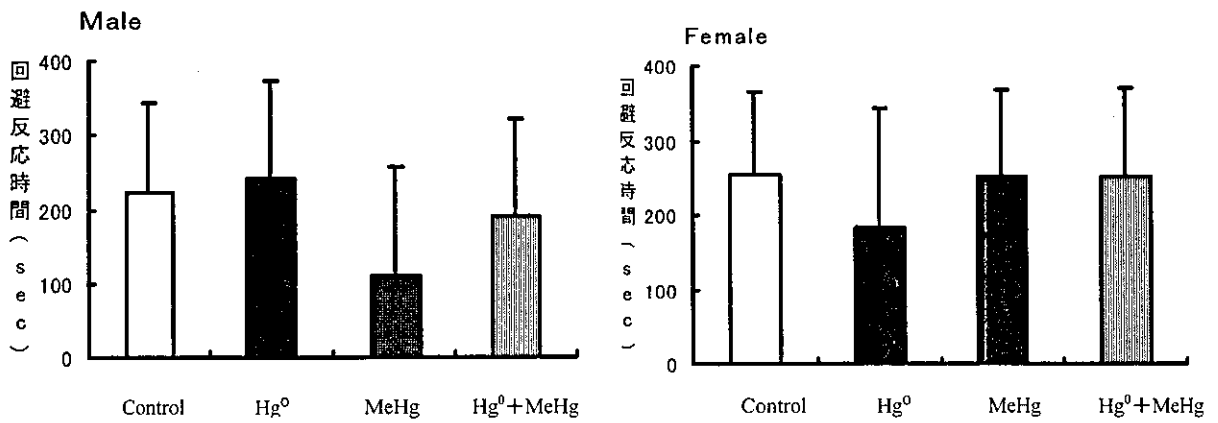


図 15. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後の PA 試験による保持試行の回避反応時間

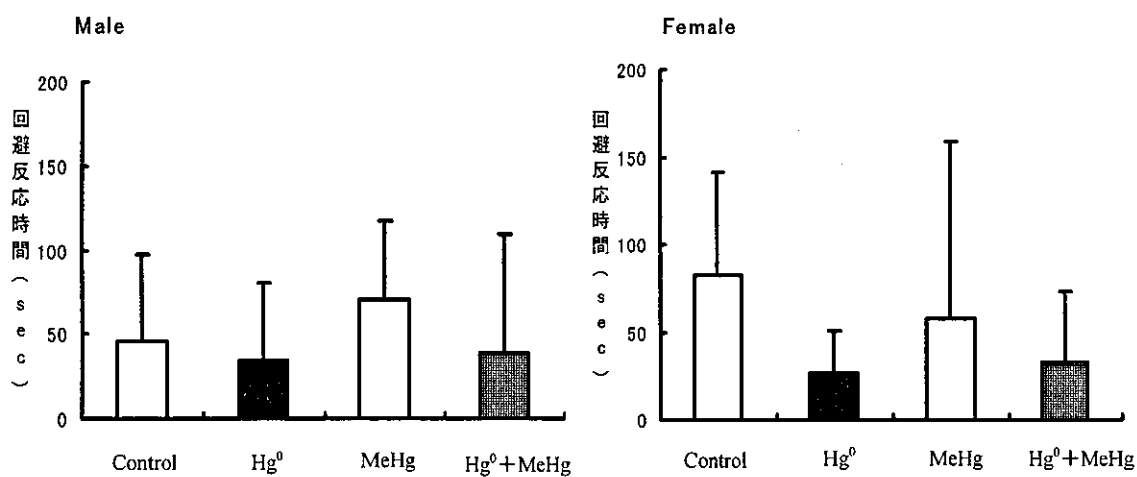


図 16. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後の PA 試験による訓練試行の回避反応時間

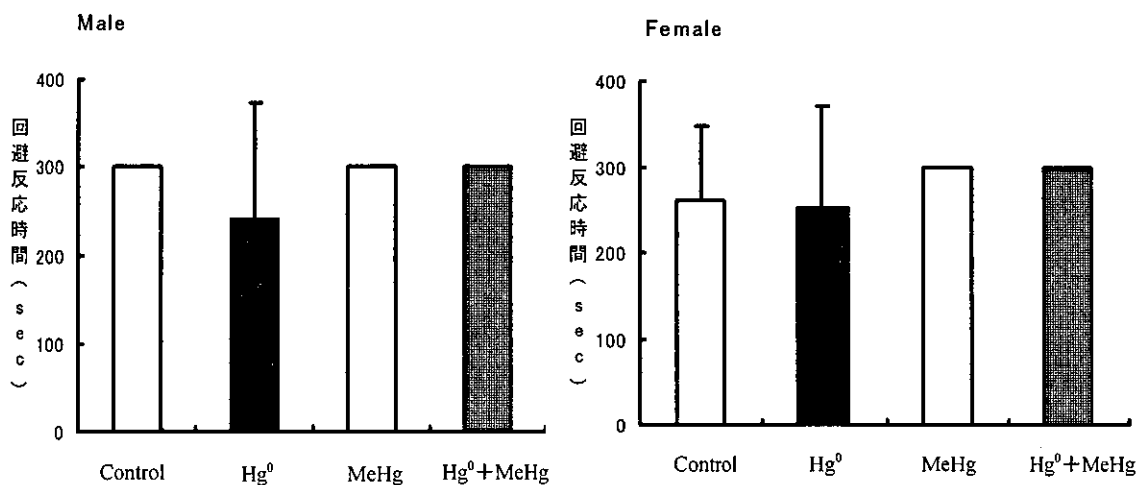


図 17. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後の PA 試験による保持試行の回避反応時間

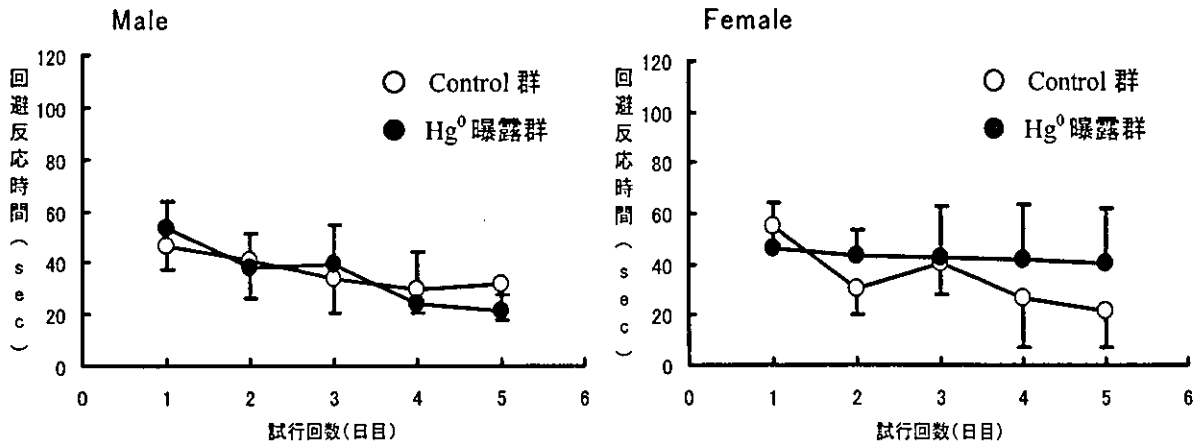


図 18. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における Hg⁰ 曝露群の回避反応時間

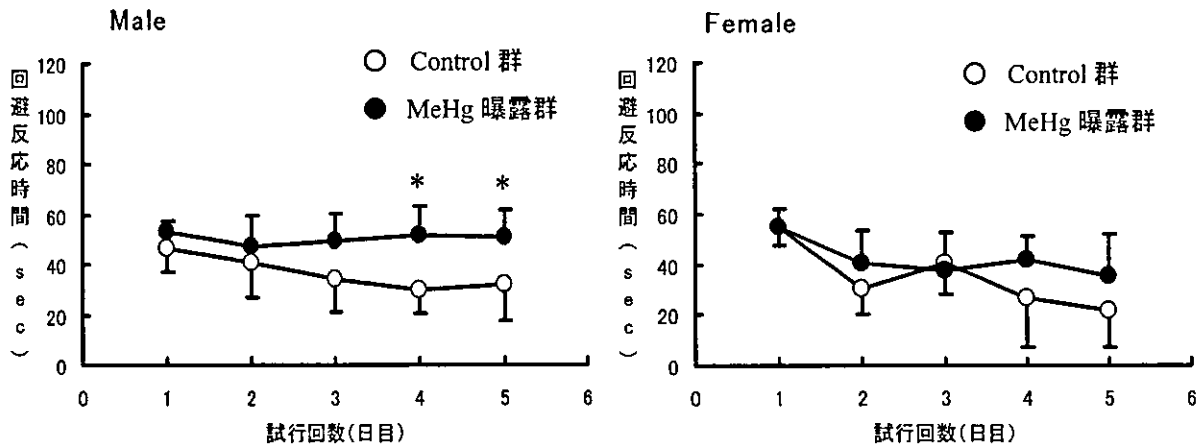


図 19. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における MeHg 曝露群の回避反応時間
* $p < 0.05$ で対照群との間で有意差あり

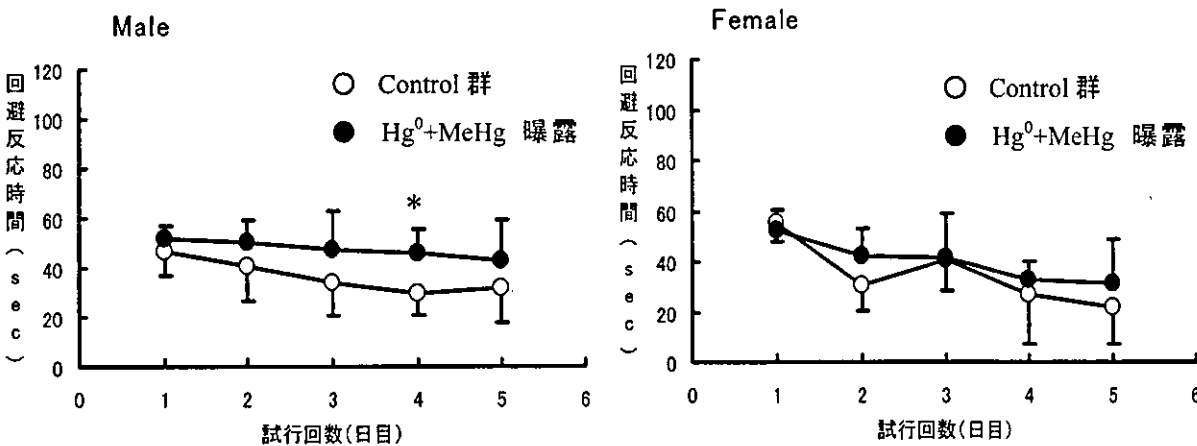


図 20. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における Hg⁰+MeHg 複合曝露群の回避反応時間

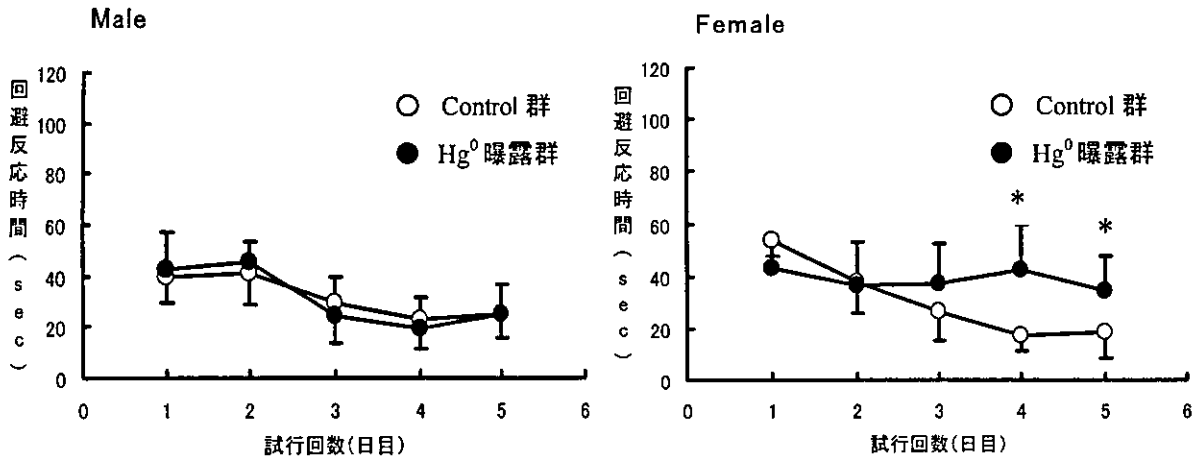


図 21. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における Hg⁰ 曝露群の回避反応時間
*p<0.05 で対照群との間で有意差あり

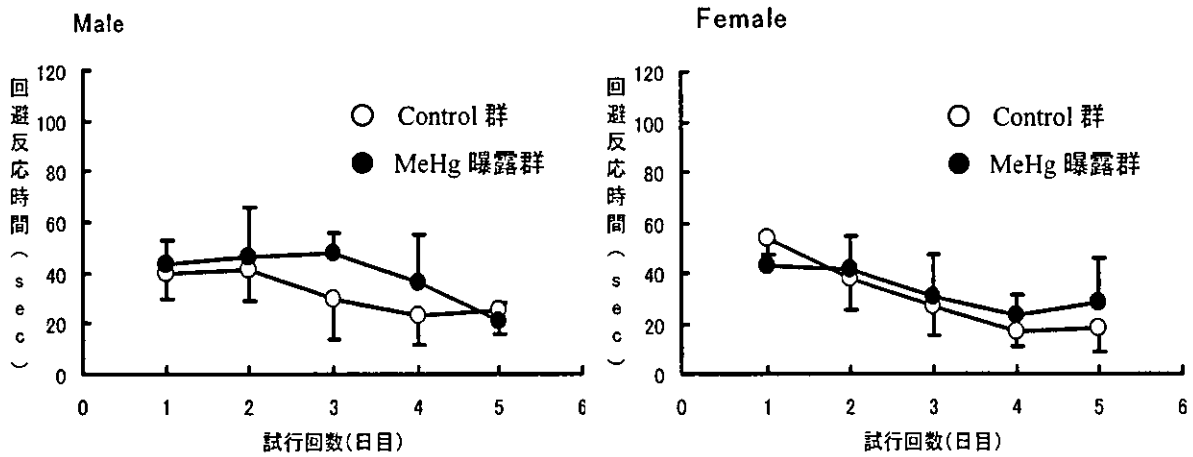


図 22. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における MeHg 曝露群の回避反応時間

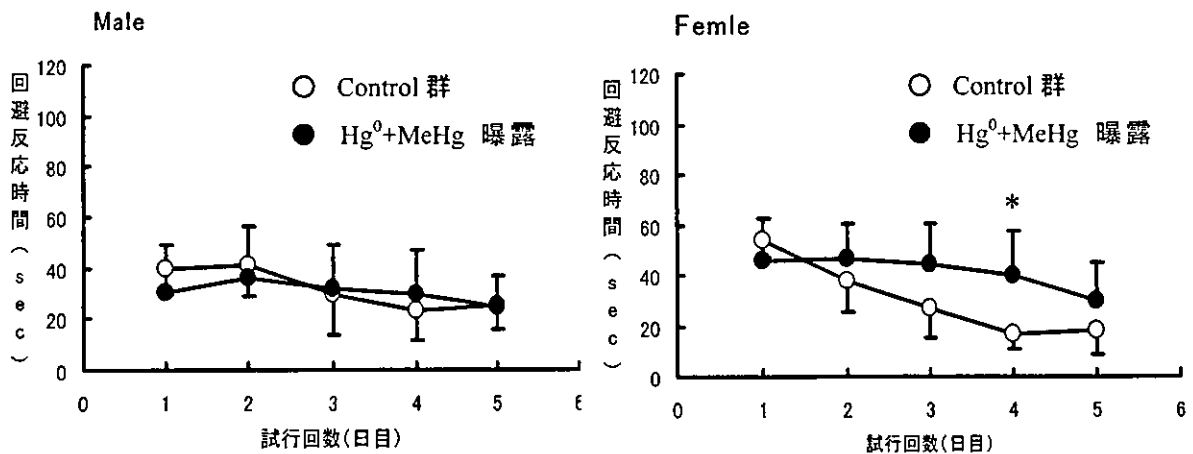


図 23. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験における Hg⁰+MeHg 複合曝露群の回避反応時間
*p<0.05 で対照群との間で有意差あり

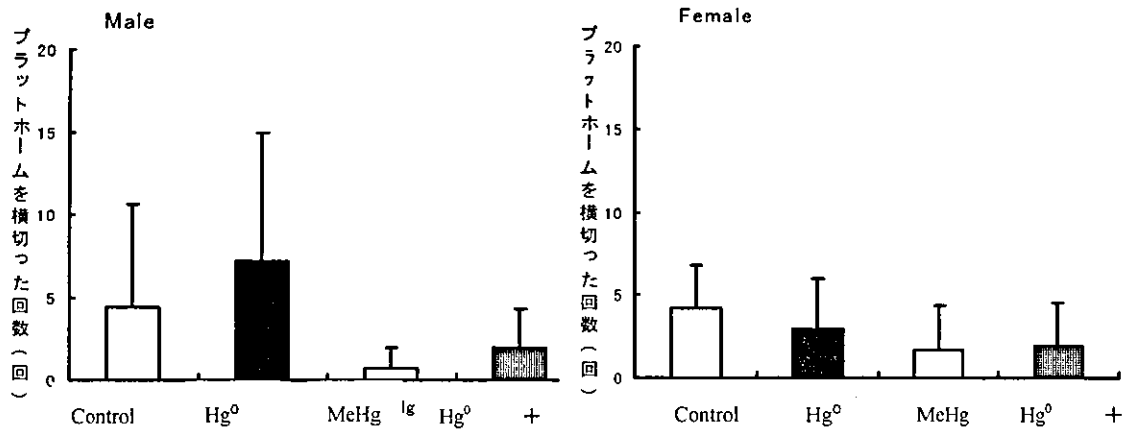


図 24. MT(+/+)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験でのプラットフォームを横切った回数

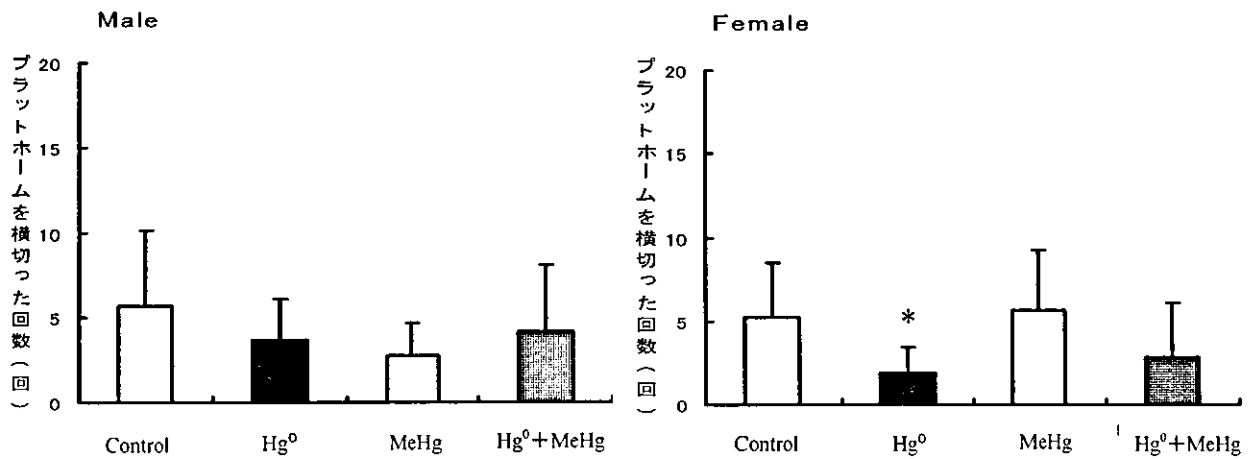


図 25. MT(-/-)マウスの出産 8 週齢後のモリス水迷路試験でのプラットフォームを横切った回数
*p<0.05 で対照群との間で有意差あり

表 1. 出産 10 日目における MT(+/+)マウスの雄の脳・肝臓・腎臓中の水銀濃度 (ng/g 重量)

	Male		
	Brain	Liver	Kidney
Control	1.7±0.4	5.3±2.5	19.5±0.9
Hg ⁰	3.0±0.3*	6.7±0.6	23.7±5.5
MeHg	340±91**	308±45**	397±50**
Hg ⁰ +MeHg	652±33**	425±81**	356±76**

*p<0.05 で対照群との間で有意差あり **p<0.01 で対照群との間で有意差あり

表 2. 出産 10 日目における MT(+/+)マウスの雌の脳・肝臓・腎臓中の水銀濃度 (ng/g 重量)

	Female		
	Brain	Liver	Kidney
Cont	2.07±0.4	6.0±1.0	18.0±1.6
Hg ⁰	3.2±0.6*	8.0±1.7	18.2±1.5
MeHg	380±89**	444±39**	267±28**
Hg ⁰ +MeHg	341±69**	588±62**	425±99**

*p<0.05 で対照群との間で有意差あり **p<0.01 で対照群との間で有意差あり

表 3. 出産 10 日目における MT(-/-)マウスの雄の脳・肝臓・腎臓中の水銀濃度 (ng/g 重量)

	Male		
	Brain	Liver	Kidney
Cont	2.1±0.3	5.7±1.2	21.8±1.3
Hg ⁰	3.0±0.8	6.0±0.1	20.4±5.2
MeHg	432±25.2**	301.6±99.9**	643.6±37.2**
Hg ⁰ +MeHg	513.7±11.7**	376.3±99.1**	808.4±120.7**

*p<0.05 で対照群との間で有意差あり **p<0.01 で対照群との間で有意差あり

表 4. 出産 10 日目における MT(-/-)マウスの雌の脳・肝臓・腎臓中の水銀濃度 (ng/g 重量)

	Female		
	Brain	Liver	Kidney
Cont	2.2±0.3	4.5±6.4	17.2±0.5
Hg ⁰	3.9±1.0*	13.3±3.5*	28.4±6.7*
MeHg	496.8±32.2**	291±77.4**	702.9±82.8**
Hg ⁰ +MeHg	679.7±88.7**	394±18.2**	559.5±90.1**

*p<0.05 で対照群との間で有意差あり **p<0.01 で対照群との間で有意差あり

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

胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳中遺伝子発現への
影響評価とメタロチオネインの関与に関する研究

分担研究者 佐藤雅彦 岐阜薬科大学衛生学助教授

研究協力者 本田晶子 岐阜薬科大学衛生学

研究要旨:

野生型(C57BL/6J系)マウスおよびメタロチオネイン-I/II欠損マウスを用いて、胎生期のカドミウムおよびメチル水銀曝露によって新生仔脳において発現が変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法並びにリアルタイム RT-PCR法により解析した。その結果、カドミウムの胎生期曝露では、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II欠損マウスでTrfr [transferrin receptor] の発現が促進されることが明らかとなった。一方、メチル水銀の胎生期曝露では、両系統のマウスともにTIMP4 [tissue inhibitor of metalloproteinase] の発現が促進されることが見いだされた。従って、Trfr(カドミウム曝露で変動)あるいはTIMP4(メチル水銀曝露で変動)の発現変動は、カドミウムあるいはメチル水銀の胎生期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】

これまで有害金属による健康影響としては、水俣病やイタイイタイ病などのように産業職場や環境汚染による比較的高用量の有害金属曝露によって種々の中毒症状が認められたが、今日のがわが国においては、産業職場や環境汚染による金属中毒はほとんど認められていない。しかしながら、その一方で、カドミウムやメチル水銀はそれぞれコメなどの食品や魚類などの食品を介し

て生涯にわたって身体に取り込まれるため、最近ではカドミウムやメチル水銀の微量長期曝露による健康影響が問題となっている。特に、胎生期における低濃度のこれらの重金属の曝露により仔に現れる健康影響が危惧されている。毒性発現が遺伝子発現の変化に伴うとすれば、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による脳神経系の次世代への影響を評価する上で、毒性発現に関与する遺伝子を特定することは重要である。

水銀や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る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・新生仔期における水銀や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。

そこで、本分担研究では、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による仔マウスの神経行動毒性に関与する遺伝子を特定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、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳における遺伝子発現に及ぼすメタロチオネインの影響を評価する。

昨年度までに、カドミウムの胎生期曝露後の新生仔脳における遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により解析したところ、Htr5b [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b] 遺伝子を含めて4種類の遺伝子がカドミウム曝露により高発現することを見いだした。本年度は、カドミウムの胎

生期曝露による新生仔脳における遺伝子発現の再現性を DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、吉田 稔分担研究者が実施した胎生期のメチル水銀曝露やメチル水銀および水銀蒸気の複合曝露後の仔マウス脳についても DNA マイクロアレイ法並びにリアルタイム RT-PCR 法により遺伝子発現の変動を解析した。また、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳における遺伝子発現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。

【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。

【実験方法】

1. DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

1) カドミウム胎生期曝露

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: 25 匹) および野生型マウス (コントロール群: 23 匹、カドミウム曝露群: 23 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 日目に新生仔をエーテル麻酔下で脳を摘出し、瞬時にドライアイスを用いて脳を凍結してから -80℃フリーザーで保存した。

カドミウム曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析し、発現量に変動が認められた遺伝子のうち一部の遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR 法により mRNA の発現量を確認した。

2)メチル水銀胎生期曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(“胎生期における水銀蒸気とメチル水銀の複合曝露が行動に及ぼす影響”[実験方法](2)メチル水銀曝露を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた新生仔脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された新生仔脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雄 3 検体と雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雄 1 検体と雌 1 検体であり、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおいてコントロール群が雄 3 検体と雌 1 検体で、メチル水銀曝露群が雄 1 検体と雌 3 検体であった。メチル水銀曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析し、発現量に変動が認められた遺伝子のうち一部の遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR 法により mRNA の発現量を確認した。

3)メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(同セクション [実験方法](2)メチル水銀曝露 を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた仔マウス脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された仔マウス脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雌 2 検体であり、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおいてコントロール群が雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雌 2 検体であった。メチル水銀胎生期曝露によって授乳 1 年目の仔マウス脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析した。

4)メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳10日目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(同セクション [実験方法](3)水銀蒸気とメチル水銀複合曝露 を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた新生仔脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された新生仔脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雌6検体で、メチル水銀曝露群が雌3検体であり、メタロチオネイン-I/II欠損マウスにおいてコントロール群が雌5検体で、メチル水銀曝露群が雌3検体であった。メチル水銀および水銀蒸気の複合曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法により解析した。

5)DNAマイクロアレイ法(二蛍光標識法による競合的ハイブリダイゼーション)

コントロール群と金属曝露群の臓器からそれぞれ Total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。それぞれの cDNA に Cy3 または Cy5 を蛍光標識して、DNA チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行い、各遺伝子の発現量の差をマイクロアレイ検出器で解析した。なお、DNA チップは、マウス 10,000 遺伝子 (Old-type) あるいは 30,000 遺伝子 (New-type) からデザインしたオリゴヌクレオチドを搭載したオリゴ DNA チップ (AceGene、Mouse Oligo Chip 30K、日立ソフト) を用いた。また、ハイブリダイゼーションは当研究室所有のマイクロアレイ用自動ハイブリダイゼーション装置 (Lucidea SlidePro、Amersham) を用い、マイクロアレイ検出器は当大学共通機器のマイクロアレイスキャナ (CRBIO IIe、日立ソフト) を使用した。

DNA マイクロアレイの解析は global normalization 法により行い、コントロール群と比べて2倍以上の増減を示したものを変動遺伝子の候補とした。また、発現量 (Fluorescence intensity signal) の低い遺伝子については、DNA マイクロアレイの信頼性が低いため、変動遺伝子の候補から除外した。

マイクロアレイ解析は、以下に示すような群間比較を行った。

5-1) カドミウム曝露:

- ①コントロール群(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)
- ②カドミウム曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ③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(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)
- ④カドミウム曝露群(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)

オリゴ DNA チップは 10,000 遺伝子チップを用いた。また、同一母体から出生した新生仔脳をプールし、さらに母体ごとにプールした新生仔脳を 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。

5-2) メチル水銀曝露(授乳 10 日目の仔マウス):

- ①メチル水銀曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ②メチル水銀曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)

オリゴ DNA チップは 10,000 遺伝子チップを用いた。また、新生仔脳を群ごとに 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。

5-3) メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス):

- ①メチル水銀曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ②メチル水銀曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)

オリゴ DNA チップは 30,000 遺伝子チップを用いた。また、仔マウス脳を群ごとに 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。