

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

II. 分担研究報告

2. 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 (佐藤雅彦)

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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： カドミウム胎生期曝露が及ぼす影響については未解明な点が多い。基礎的情報を得るため、曝露レベル、胎仔移行などについて検討した。また、Cd 毒性への遺伝的感受性要因としてメタロチオネイン I/II 欠損マウス (MTKO) を用い、野生型 C57BL/6J と比較した。胎生期 (1~19 日目) 曝露実験をとして、Cd 10, 50ppm を含む水で妊娠マウスを飼育し、19 日目に解剖して、Cd の胎仔移行を調べた。その結果、胎生期曝露において Cd は胎仔に移行することが示された。MTKO では母体の肝・脳・胎盤における腎 Cd が野生型より高い一方で、腎 Cd 濃度が低下した。さらに、胎仔肝・脳でも Cd 濃度が上がったことより、母体の腎 MT が胎仔への Cd の移行の制御に重要な役割を示すことが判明した。Cd により出生後の体重の伸びが抑制されたが、MTKO マウスにおいて、抑制が著しく、MTKO が F1 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。

A. 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、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、両者を結合して、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、本研究においては、胎生期および授乳期におけるカドミウム経口曝露を行ない、カドミウムの体内動態を特に胎仔移行に着目して明らかにするとともに、メタロチオネインが体内動態に及ぼす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。

【実験準備】

メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスの繁殖・維持

同一週齢の雌雄のメタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスを多数供給するための繁殖を開始し、定期的に 50~80 匹程度の同一週齢の雌雄マウスを供給できる体制を整えた。

【実験】

(1) 胎生期および授乳期カドミウム (50 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

[方法]

メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスをそれぞれ雌雄番いで 1 日交配し、翌日 (妊娠 1 日目) から 50 ppm のカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。妊娠 19 日目に、妊娠マウスと非妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳、肝臓および腎臓をそれぞれ摘出し、妊娠マウスについては胎盤並びに胎仔をそれぞれ摘出した。さらに、胎仔から脳、肝臓および腎臓を摘出した。

残りの妊娠マウスと非妊娠マウスは、引き続き 50 ppm のカドミウムを含む飲料水を出産後 21 日目 (授乳期間) まで自由飲水させた。出産後 21 日目に母マウスおよび非妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳、肝臓および腎臓をそれぞれ摘出した。さらに、新生仔をエーテル麻酔死した後に脳、肝臓および腎臓を摘出した。摘出した臓器は、 -80°C で保存した。

各臓器中カドミウム濃度は、硝酸で湿式灰化後 ICP-MS を用いて測定した。なお、胎仔の脳、肝臓および腎臓は、1 腹分をまとめて 1 検体としてカドミウムを測定した。

[結果]

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。胎生期に 50 ppm のカドミウムを曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの母体の腎臓中カドミウム濃度は、野生型マウスに比べて有意に低値を示したが、母体の肝臓および脳中カドミウム濃度は両系統のマウス間で有意な差は認められなかった (Table 1)。一方、胎盤および胎仔の肝臓並びに脳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高値を示した (Table 1)。なお、胎仔腎臓中カドミウム濃度は、両マウス共に検出限界以下であった。

また、野生型マウスにおいて、妊娠マウスの母体肝臓中カドミウム濃度は、非妊娠マウスに比べて有意に増加したが、腎臓および脳中カドミウム濃度には妊娠による影響は認められなかった (Table 1)。一方、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスの肝臓、腎臓および脳中カドミウム濃度は、いずれも妊娠マウスと非妊娠マウスとの間に有意な差は認められなかった (Table 1)。

胎生期および授乳期に 50 ppm のカドミウムを曝露した母マウス並びに新生仔の臓器摘出まで実験が終了し、現在、各臓器中カドミウム濃度を ICP-MS を用いて解析中である。なお、出生後 21 日目の新生仔の体重は、50 ppm のカドミウムの曝露によって野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに、コントロールに比べて有意に低値を示したが、両系統のマウス間には有意な差は認められなかった (Table 2)。

(2) 低用量カドミウム (10 ppm) 胎生期および授乳期曝露によるカドミウムの体内動態並びに子マウスの行動機能に及ぼすメタロチオネインの影響

[方法]

メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよび野生型マウスをそれぞれ雌雄番いで 1 日交配し、翌

日（妊娠1日目）から出産後21日目（授乳期間）まで10 ppmのカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。また、コントロール群として、メタロチオネイン-I/II欠損マウスおよび野生型マウスをそれぞれ雌雄番いで1日交配し、翌日（妊娠1日目）から出産後21日目（授乳期間）まで蒸留水を自由に与えた。

出産後21日目に、一部の母マウスおよび非妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳、肝臓および腎臓をそれぞれ摘出した。さらに、新生仔をエーテル麻酔死した後に脳、肝臓および腎臓を摘出した。摘出した臓器は、 -80°C で保存した。

残りのマウスは、出産後21日目にカドミウムを含む飲料水から蒸留水に換えて、飼育を継続している。

[結果]

胎生期および授乳期に10 ppmのカドミウムを曝露した一部の母マウス並びに新生仔の臓器摘出まで実験が終了し、現在、各臓器中カドミウム濃度をICP-MSを用いて解析中である。残りのマウスは、成熟期および老齢期に子マウスの行動機能を検討するために、出産後21日目にカドミウムを含む飲料水から蒸留水に換えて、飼育を継続している。なお、最終飼育期間は、1年6ヶ月間を予定している。

出生後21日目の新生仔の体重は、10 ppmのカドミウムの曝露によって野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II欠損マウスともに、コントロールに比べて有意に低値を示し、両系統のマウス間で比較すると、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（Table 2）。

[考察]

以上のように、胎生期のカドミウム曝露により、微量ながら胎仔へのカドミウム移行が起こることが示された。胎仔組織について見ると、脳のカドミウム濃度は、肝・腎などのそれより低く、脳-血液関門の未発達な胎仔においても脳への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。

50 ppm のカドミウムの胎生期曝露による脳でのカドミウムの蓄積について、母マウスと胎仔とを比較すると（脳-血液関門と胎盤-血液関門のカドミウムの通過について）、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに母マウスの方が胎仔より多く蓄積していた。（カドミウムは胎仔へ移行しにくいので当然かもしれない）

しかしながら、脳中カドミウム濃度を肝臓中カドミウム濃度との比で比較すると（肝臓中カドミウム濃度との比で比べることに意味がないかもしれませんが）、胎仔の方が母マウスに比べて脳へのカドミウムの蓄積する割合が多いことが示された。従って、胎仔の方が母マウスより、体内に取込まれたカドミウムが脳へ蓄積する割合が高いことを示唆している。（胎仔期は脳-血液関門が完全ではないので、当然かもしれない。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、胎仔の脳中（脳の発達期）にカドミウムが多く蓄積することから、脳神経行動に悪影響を及ぼすかもしれない。

一方で、ラットを用いた実験では、新生仔脳でのカドミウムが 4ng/g 以下という低い濃度で、脳内神経伝達物質であるセロトニンが大脳皮質、線条体、海馬において減少したことが報告されている [Andersson et al., 1997]。こうした低濃度のカドミウムが胎仔脳に及ぼす影響が、結果的にどのような機能の変化をきたすのかは不明であるが、カドミウムによって亜鉛・銅などの必須微量元素の動態が変化することも予想され、これらの金属が発達に重要な役割を果たすことを考えると、こうした側面からの検討も重要であると思われる。前述した WHO のドキュメントは、ATSDR を引用して、妊娠 7-15 日に 0.6mg/kg のカドミウムを経口的に投与されたラットから生まれた仔において、活動性低下や学習機能の低下などが認められたとしている。

メタロチオネイン欠損マウスでは、母体においては腎のカドミウム濃度が低下することが観察された。一方で、胎盤および胎仔組織（肝・脳）では欠損マウスにおいて蓄積が著しく増加していた。このように移行したカドミウムがどのような化学形態をとっているのか（何と各組織中で結合しているのか）など、解明すべき問題は多いが、少なくとも母体腎にカドミウムをとどめておくことができずに、胎仔側への移行が増加したと考えられる。すなわち、母体が胎仔にとってのバリアーとなる上でメタロチオネインが重要な役割をになっていたものと推察された。これより、メタロチオネイン欠損マウスが、胎仔カドミウム毒性のモデル動物として有用である可能

性が示唆されよう。欠損マウスの仔世代における体重増加の抑制が、こうしたカドミウム蓄積そのものによるものかどうかは現時点では不明であるが、対照群（カドミウム非投与群）ではこのような体重差が認められなかったことから、欠損にカドミウム曝露が重なった場合に発達に何らかの影響が認められる可能性を示唆しており、来年度以降の検討において、重要なポイントとなるであろう。

なお、10ppm カドミウムに曝露した群の F1 世代は授乳期までの曝露を終了し、現在飼育持続中である。

[結論]

以上の結果より、50 ppm のカドミウムを胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、母体腎臓中カドミウムの蓄積が低下すること、そして胎盤および胎仔の肝臓並びに脳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、胎仔におけるカドミウムの蓄積低下に深く関与することが示唆された。

[研究発表]

佐藤雅彦，本田晶子，長谷川達也，瀬子義幸，遠山千春，永瀬久光 カドミウム妊娠期曝露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関与 第73回日本衛生学会総会，大分

図1. 母体肝中のカドミウム濃度

wt=野生型, MTKO=メタロチオネインI/II欠損
preg=妊娠, non-preg=非妊娠

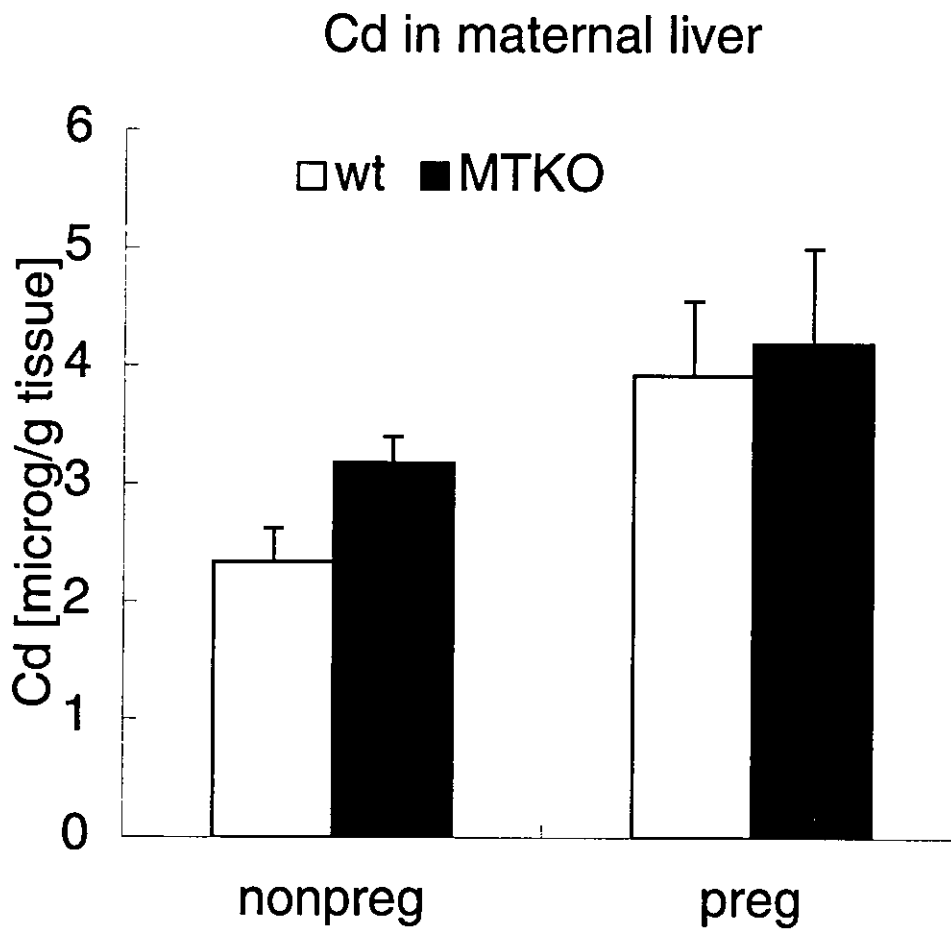


図2. 母体腎のカドミウム濃度

wt=野生型, MTKO=メタロチオネインI/II欠損
preg=妊娠, non-preg=非妊娠

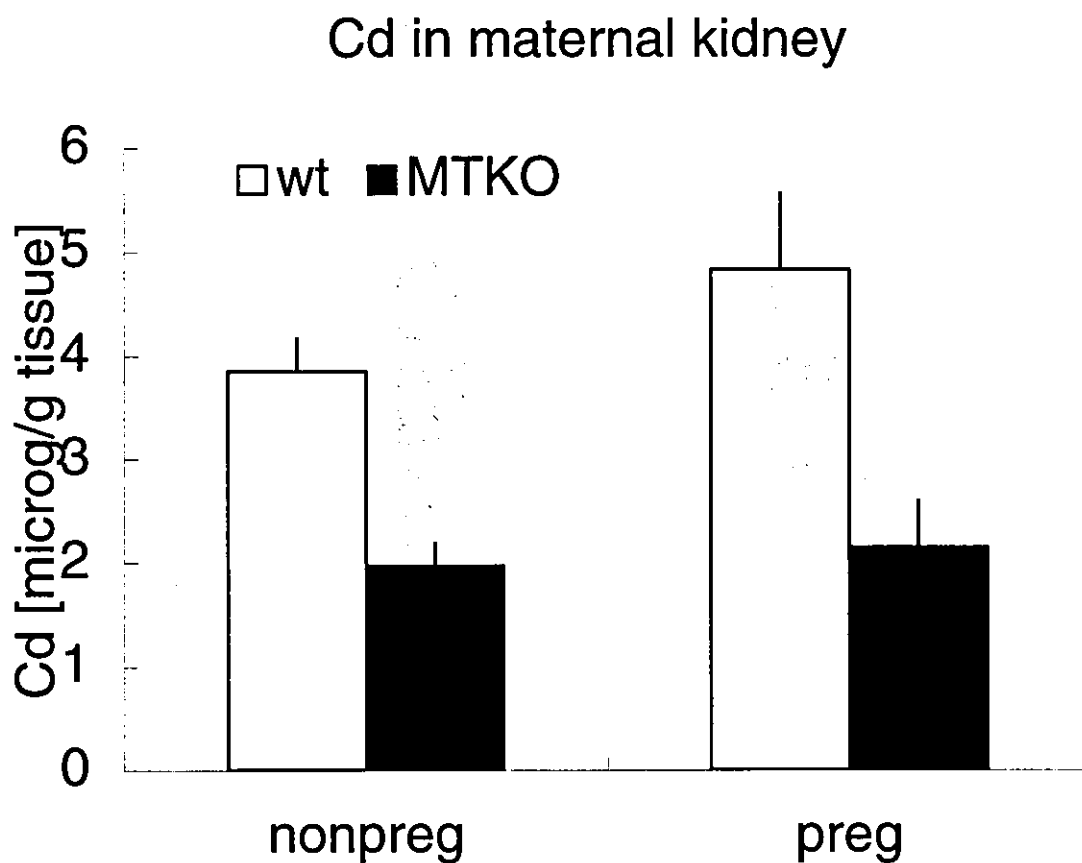
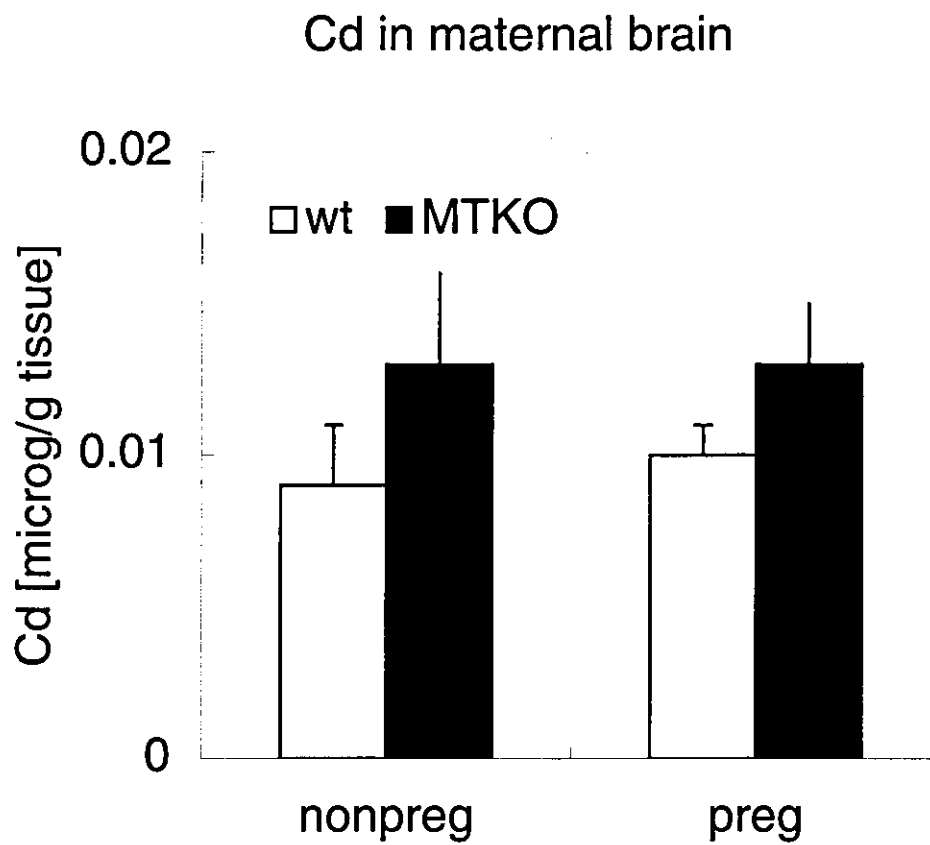


図3. 母体脳のカドミウム濃度

wt=野生型, MTKO=メタロチオネインI/II欠損
preg=妊娠, non-preg=非妊娠



Cd in placenta

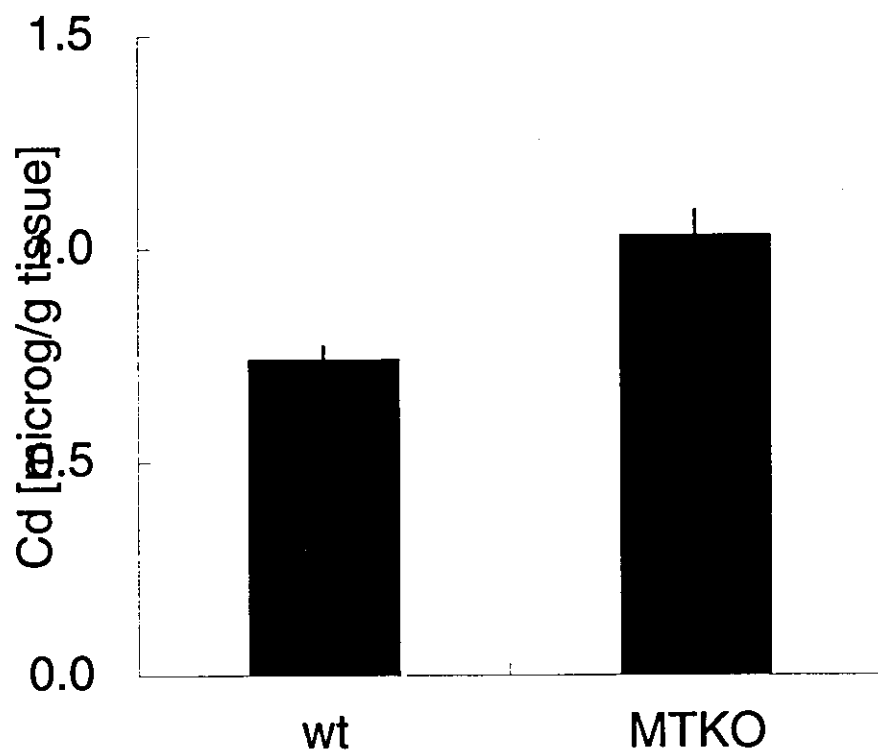


図4. 胎盤のカドミウム濃度

wt=野生型, MTKO=メタロチオネインI/II欠損

図5. 胎仔肝・脳のカドミウム濃度

wt=野生型, MTKO=メタロチオネインI/II欠損
いずれの組織において, MTKOの方が有意に高い.

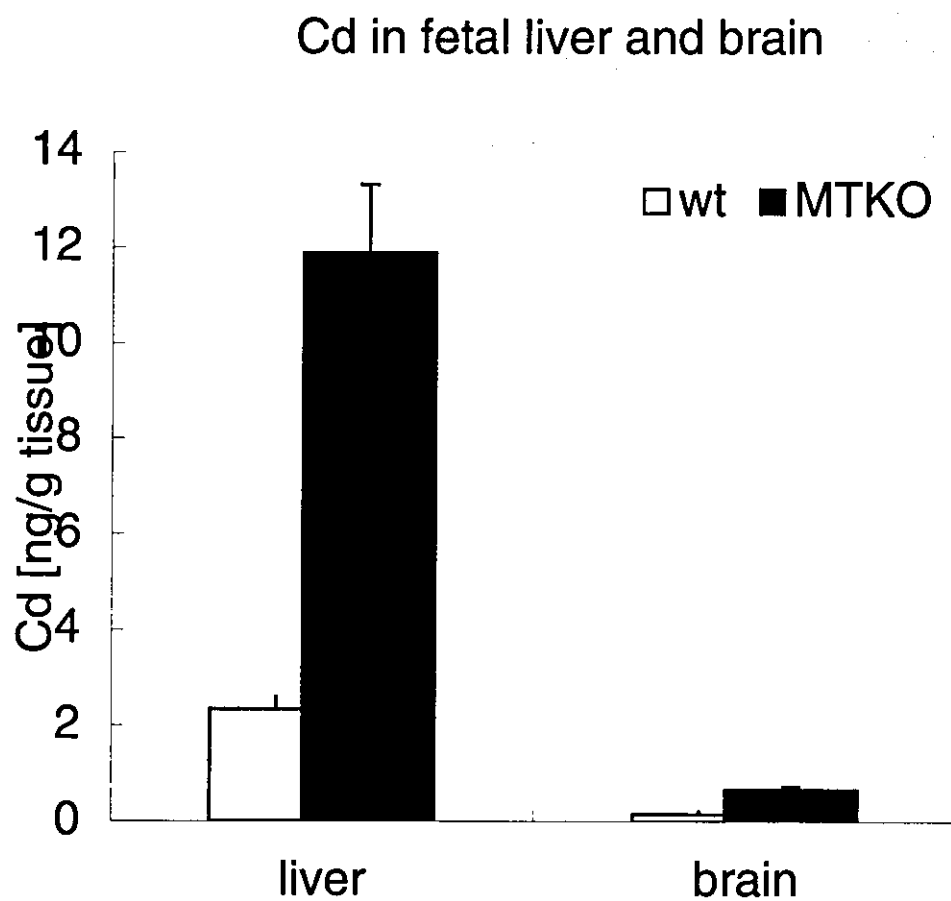
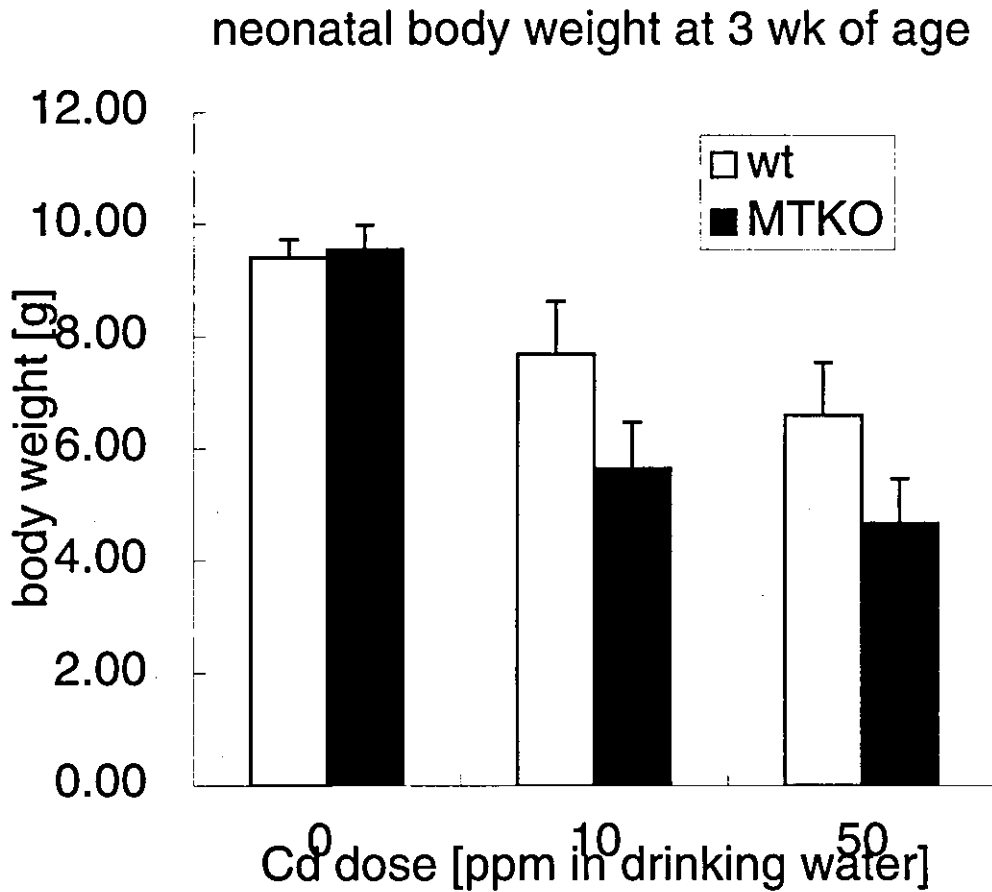


図6. カドミウム曝露が出生後の体重におよぼす影響

体重は 10ppm でも抑制され，抑制の程度は MTKO において顕著に現れる．



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枢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ヘパリン処理、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取りあげた。

<操作の流れ>

total RNA の抽出

↓

cDNA の作製