

↓

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™ IIe (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 $^{\circ}$ C, 10 分

↓

氷上 5 分

↓ 6 μ L 5 \times First-Strand Buffer

↓ 3 μ L 0.1 M DTT

↓ 3 μ L dNTPmix*

↓ 0.5 μ L 40 U RNase Inhibiter

42 $^{\circ}$ C, 2 分インキュベート

↓ 2 μ L Super Script IITM Reverse Transcriptase (泡立てない)

42 $^{\circ}$ C, 60~90 分インキュベート

↓ 5 μ L 0.5 M EDTA

↓ 10 μ L 1 N NaOH

70 $^{\circ}$ C, 20 分インキュベート

↓

12 μ L 1 N HCl

*dNTPmix

100 mM dATP

5 μ L

100 mM dGTP	5 μ L
100 mM dCTP	5 μ L
100 mM dTTP	3 μ L
50 mM Aminoallyl-dUTP	4 μ L
DW	78 μ L
<hr/>	
total	100 μ L

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 $^{\circ}$ C, 20 分冷却
↓
最高回転, 60 分
↓
上清除く
↓
70 %エタノール 250 μ L 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 μ L に溶解する
↓

CyDye*1 μL を加える

↓

遮光し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、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nc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. NaHCO_3 1.68 g を 100 mL の H_2O に溶解する

2. Na_2CO_3 2.12 g を 100 mL の H_2O 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)ろ過し、適量に分注する。(-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL
salmon sperm DNA (10 mg/mL)	2 μL
formamide	20 μL
計	200 μL

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スライドから 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)。

新生仔の脑中銅濃度は、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、野生型マウスの脑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、スキャ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 2 4, 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 2 4, 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 2 5)。

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 2 6, 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).

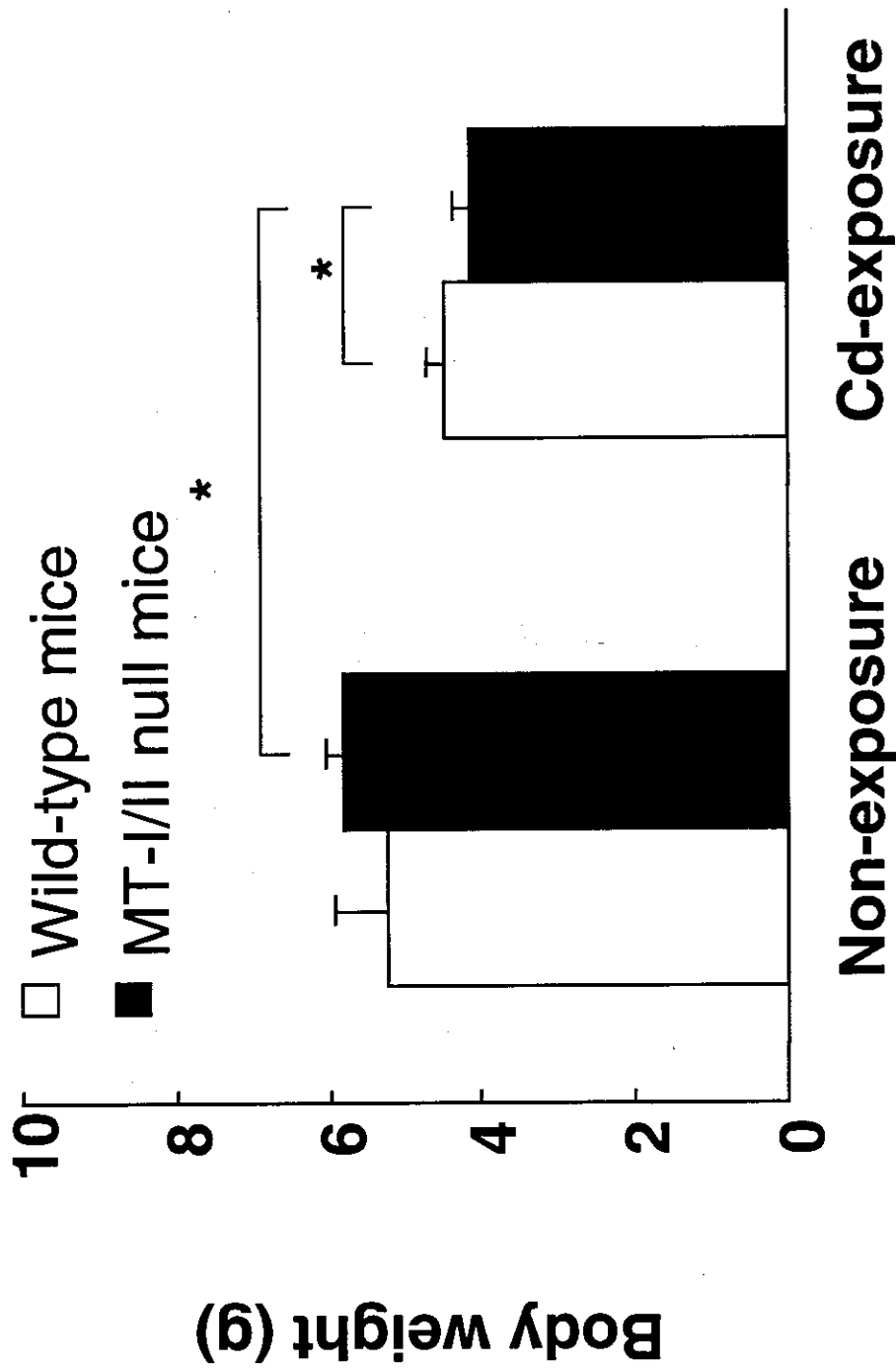


図1 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔体重 * p<0.05.

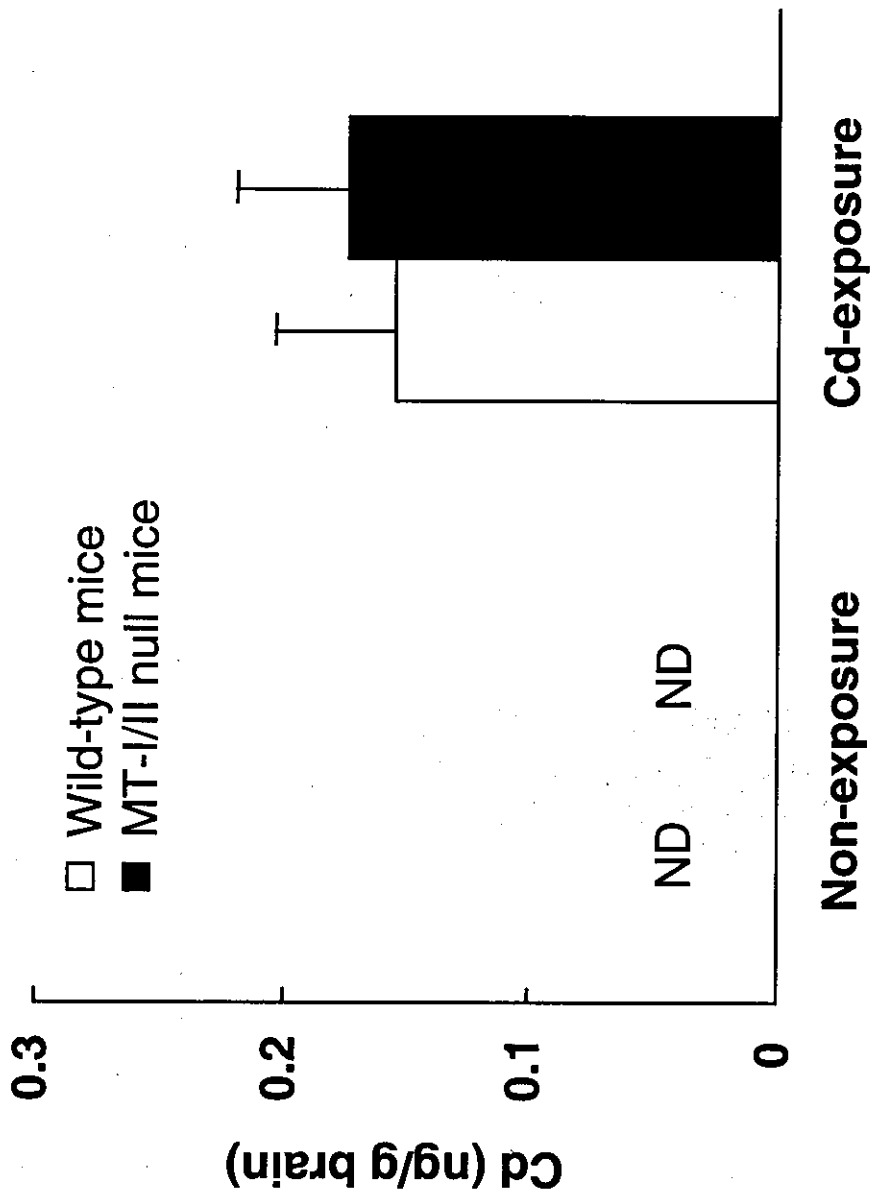


図2 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔脳中カドミウム濃度
 ND: not detected.

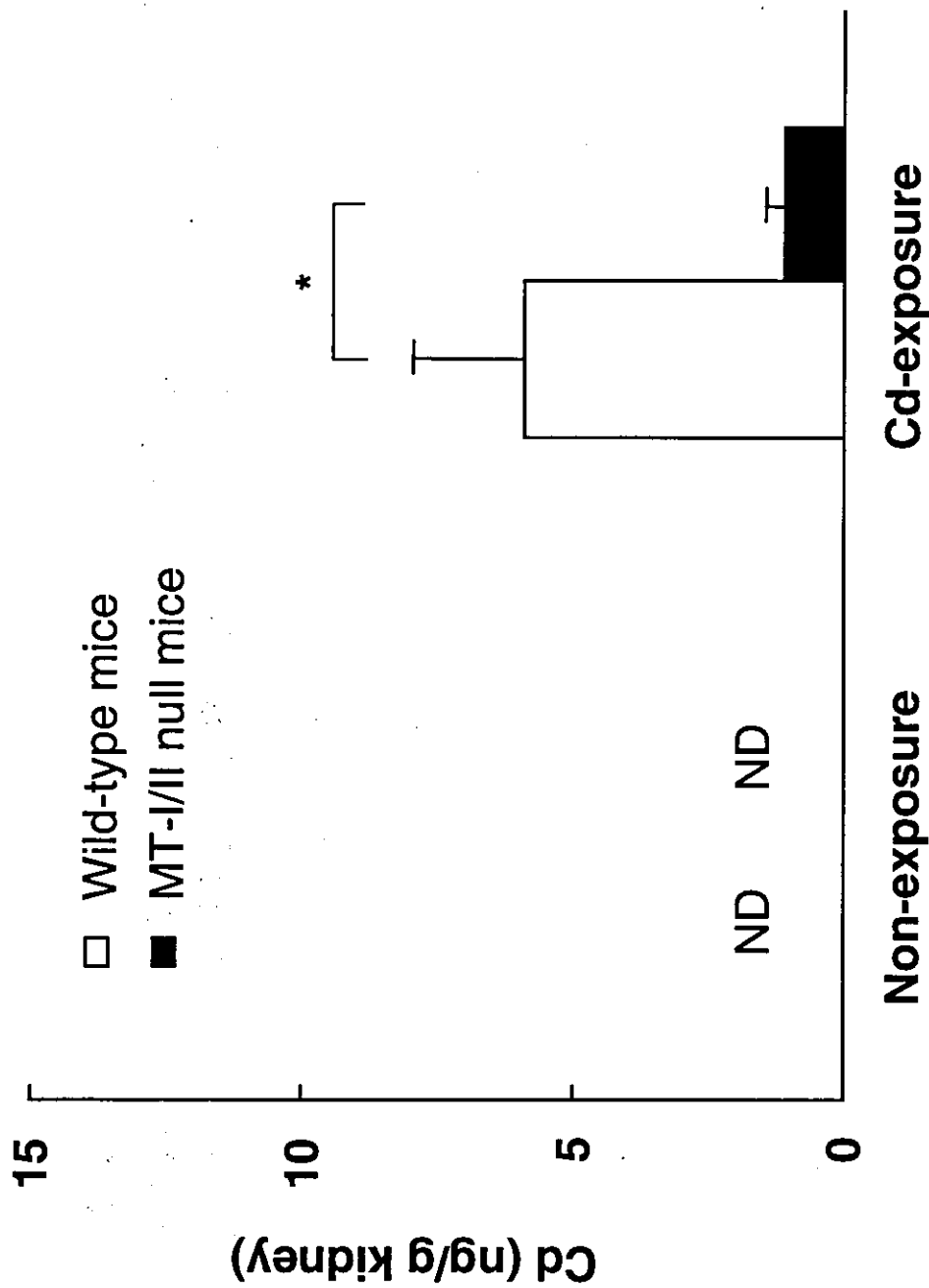


図3 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔腎臓中カドミウム濃度
 ND: not detected. * p<0.05.

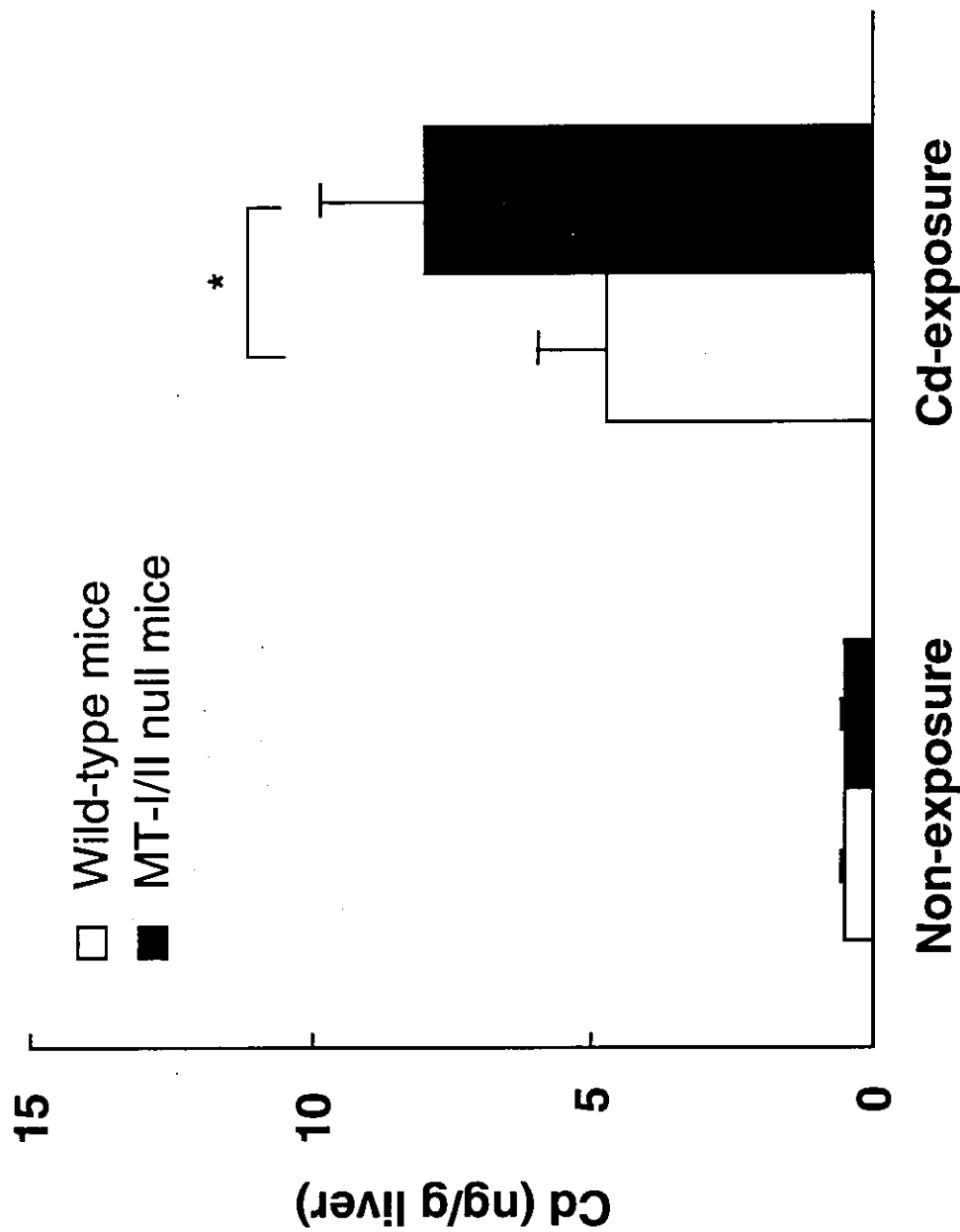


図4 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの新生仔肝臓中カドミウム濃度

* $p < 0.05$.

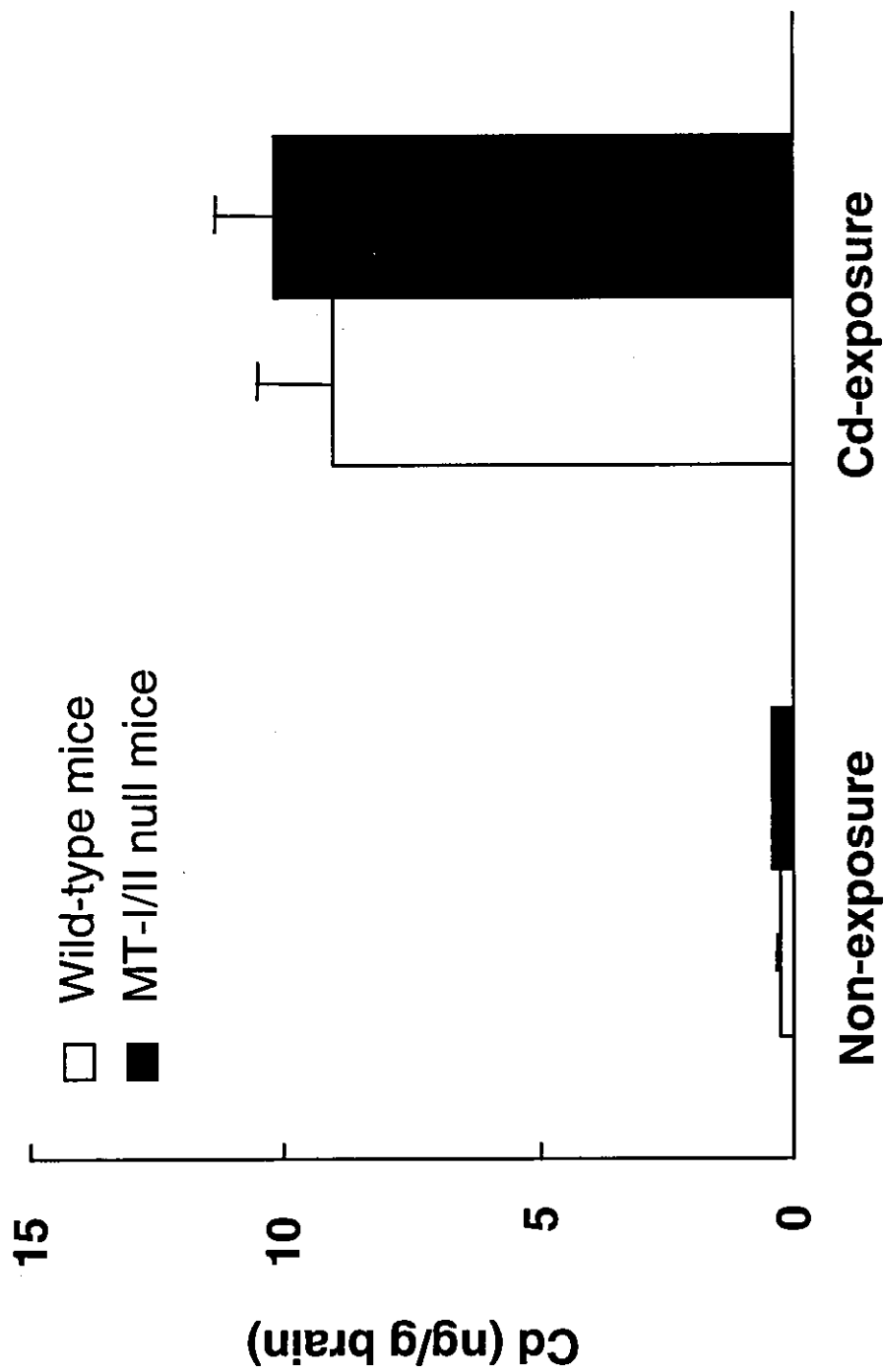


図5 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体脳中カドミウム濃度

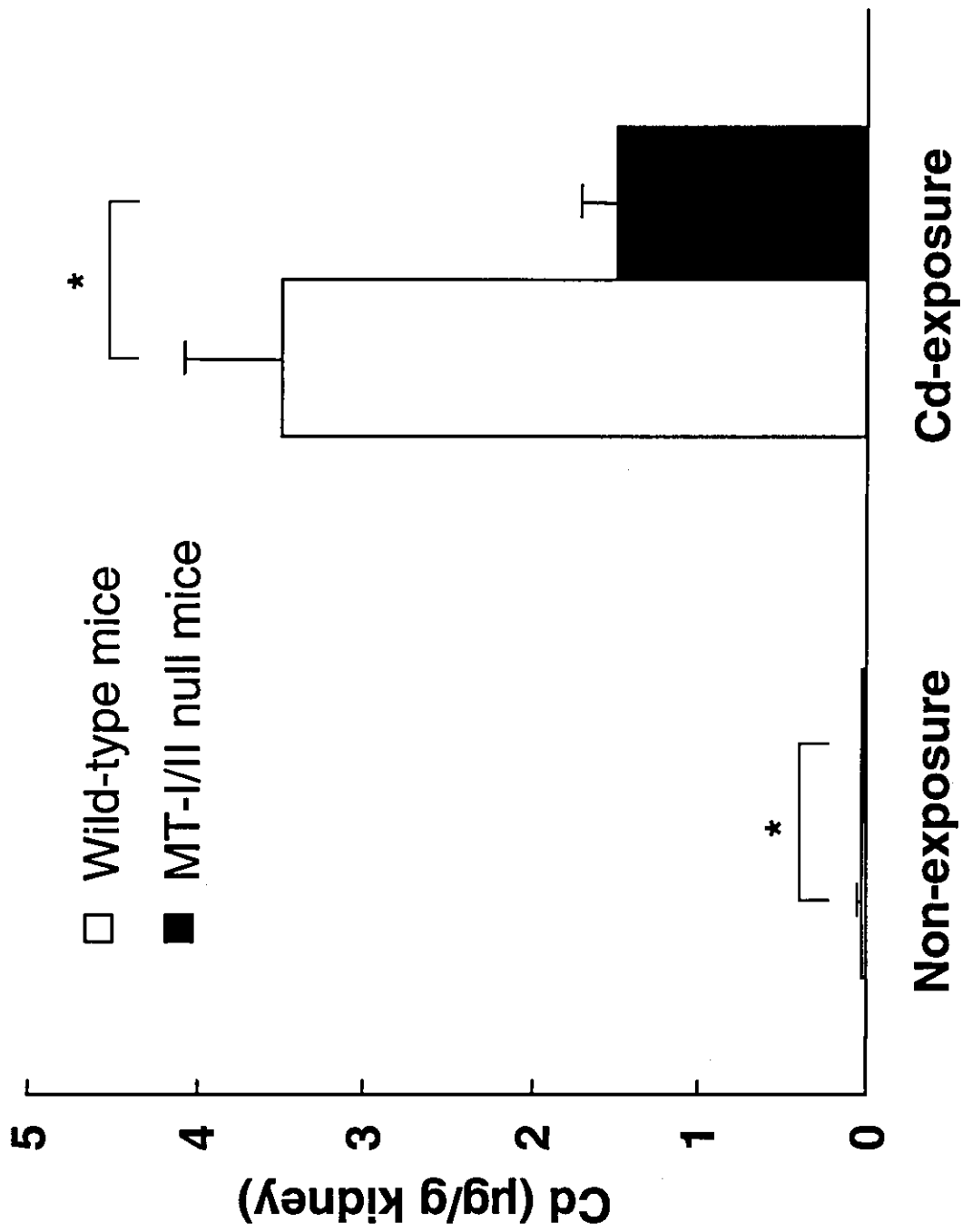


図6 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体腎臓中カドミウム濃度
* p<0.05.

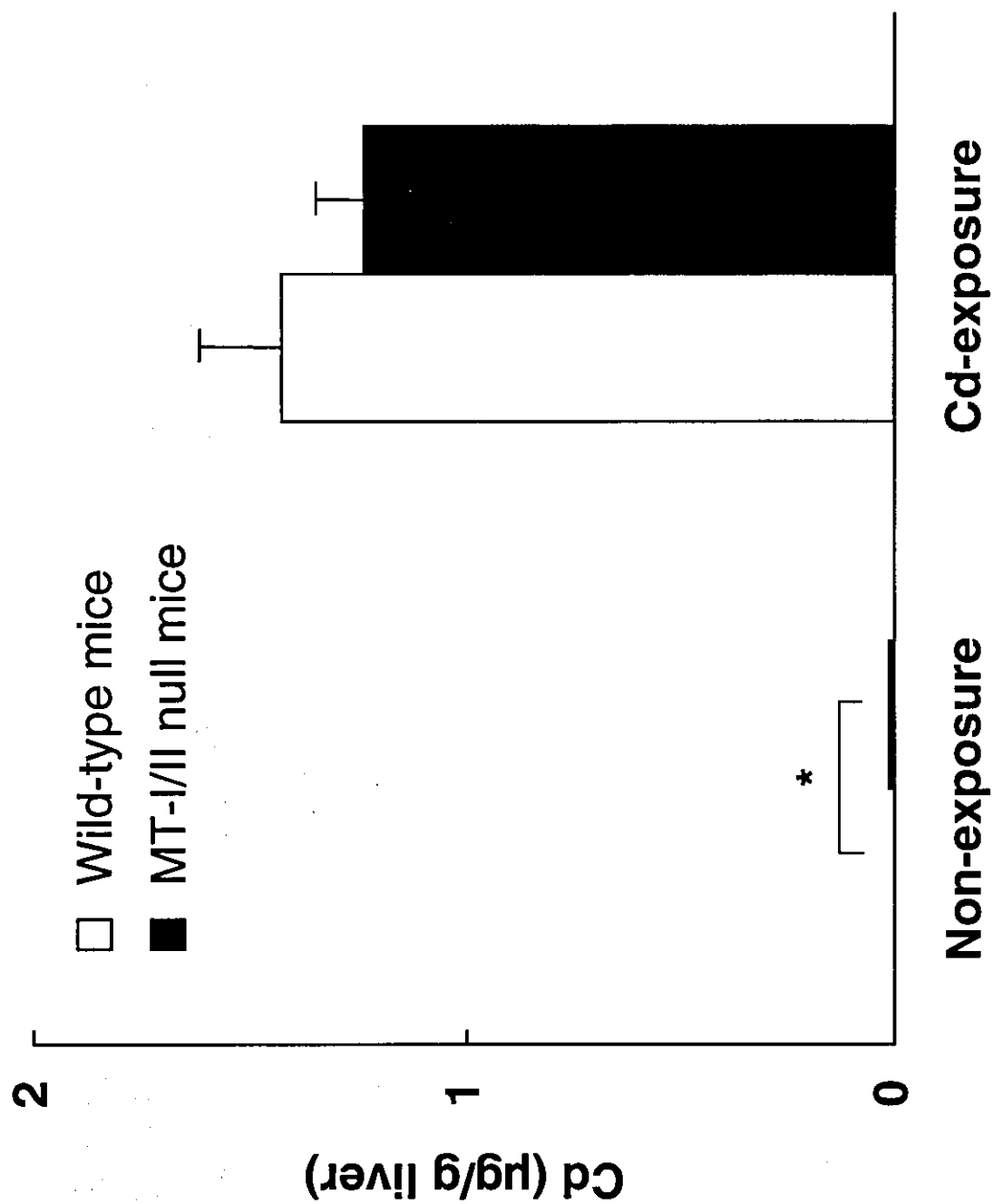


図7 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体肝臓中カドミウム濃度

* $p < 0.05$.

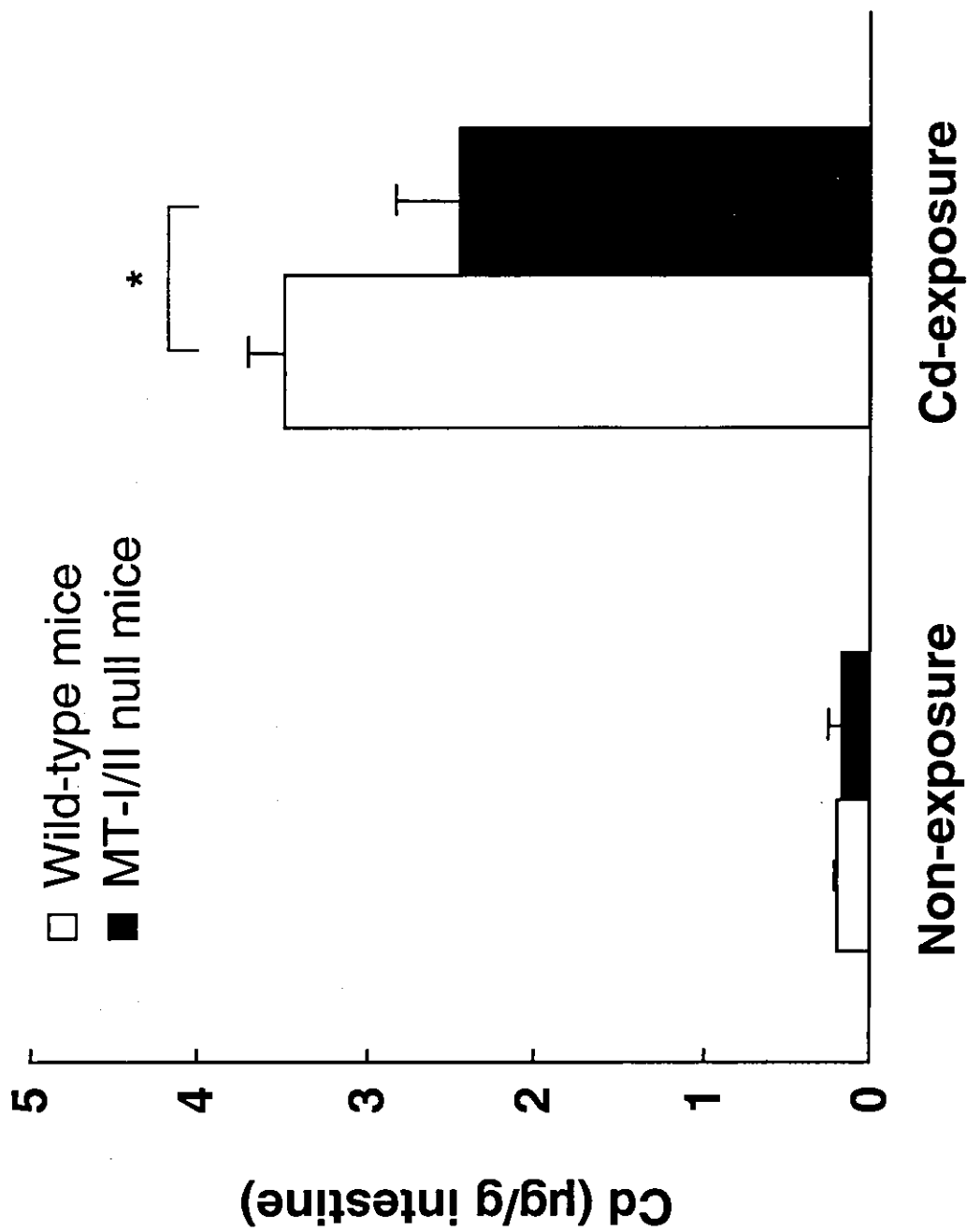


図8 カドミウムを胎生期および授乳10日間曝露したメタロチオネイン-I/II欠損マウス並びに野生型マウスの母体小腸中カドミウム濃度

* $p < 0.05$.