

論文の内容の要旨

論文題目 Developmental Toxicity of Perinatal Low-dose Exposure to Cadmium in Mice: with Special Reference to Tissue Metal Concentrations, Brain Gene Expressions and Reproduction

和訳 周生期低用量カドミウム曝露のマウス出生仔における発達毒性：組織中金属濃度、脳内遺伝子発現及び生殖機能に着目して

指導教員 渡辺知保教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 石飛裕美

【緒言】

ヒト及び実験動物の周産期カドミウム(Cd)曝露は早期産、胎児(仔)死亡、低出生体重児(仔)などを引き起こし、動物実験では脳の発達にも影響することが報告されている。Cd が胎児・新生児に及ぼす発達毒性の機序は明らかにされていないが、Cd が亜鉛(Zn)や銅(Cu)など成長に必要な微量元素の組織中濃度の減少をもたらすことによって毒性を発揮する可能性が示唆されている。げっ歯類を用いた動物実験では、妊娠・授乳期における比較的高用量 Cd 曝露により仔の組織(肝、腎、脳など)中 Zn、Cu 濃度が減少することが観察されている。しかし、ヒトでの曝露に近い低用量 Cd 曝露については報告がほとんどない。

周生期 Cd 曝露は新生仔の甲状腺ホルモン環境機能にも影響を及ぼすことが少数ながら報告されている。また、実験動物における妊娠期の甲状腺機能低下症では、仔の組織中の Zn や Cu 濃度の低下が見られている。このことから、周生期 Cd 曝露と甲状腺ホルモン環境の変動に相互作用が見られる可能性がある。

周生期 Cd 曝露による仔の行動の変化や学習障害などの脳機能への影響もわずかに報告されているが、その機構は明らかではない。脳に特異的に発現しているニューログラーニン(RC3)は甲状腺ホルモン応答性のタンパク質として知られており、この遺伝子欠損動物は学習障害などの脳機能異常を示す。前述のように Cd 曝露では血清中甲状腺ホルモン濃度の低

下が報告されており、周生期 Cd 曝露の影響及び甲状腺機能低下との相互作用を調べる上で好適な材料と考えられる。

さらに、Cd のエストロゲン様作用についても複数の報告があり、Cd がエストロゲン受容体(ER)mRNA 発現を抑制することや、胎仔期に Cd に曝露されたラット仔の性成熟が早まることなどが報告されている。女性ホルモン(エストロゲン、プロゲステロン)による性成熟と機能の調節では脳内のこれらホルモン受容体が重要な役割を果たしていることから、Cd 曝露によるこれらの遺伝子の新生仔期発現と、その後の性成熟/機能との関連を調べる必要がある。

本研究は、マウスを用い周生期低用量 Cd 曝露及び甲状腺ホルモン阻害剤メチマゾール(MMI)による甲状腺機能低下状態における Cd 曝露を行い、新生仔期の組織中 Zn/Cu 濃度に及ぼす影響を調べることで、発達に重要と考えられる遺伝子の脳内発現を調べ、脳の発達に及ぼす影響を検討すること、Cd の生殖内分泌攪乱作用を性成熟と性機能の面から評価することによって、カドミウムの発達毒性機構の一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】

Cd 単独曝露実験：

妊娠マウスに妊娠(GD)0 日目から授乳(PND) 10 日目まで、0、1、10 µg/ml の Cd 飲料水をそれぞれ与え、親は PND21 に、仔は PND0 及び 10 に解剖し、脳、肝及び腎を摘出した。親の脳はさらに大脳、小脳、脳幹に分け、各組織中の Cd、Zn 及び Cu 濃度を ICP-MS を用いて定量した。離乳(PND21)以降毎日雌仔の膈開口の有無を調べた。また、PND50 から連続 15 日間膈垢を採取し発情周期を調べた。

Cd 及びメチマゾール(MMI)複合曝露実験：

妊娠マウスを Cd 群(10 µg/ml Cd 水、投与期間 GD0~PND10)、MMI 群(0.025 % MMI 水、GD12~PND10)、Cd+MMI 群(投与量、投与期間はそれぞれの単独投与に準じる)、high MMI 群(0.1% MMI 水、GD12~PND10)、対照群(milliQ 水)の 5 群に分け、それぞれを含む飲用水で飼育し、通常通り出産させた。MMI には胎盤通過性かつ乳汁分泌性があることが知られており、本研究の目的に適していると考えられる。PND10 に仔を解剖し、血液、脳、肝及び腎を摘出した。血液は血清分離し、thyroxine(T4)を EIA 法にて測定した。組織中 Cd、Zn 及び Cu 濃度を同様に測定した。脳内 RC3、甲状腺ホルモン応答性で RC3 プロモーター領域に応答因子がある甲状腺ホルモン受容体(TR)-β、レチノイン酸受容体(RAR)-β、RC3 と同様に甲状腺ホルモン応答性で脳に特異的発現のある myelin basic protein (MBP)、女性ホルモン受容体の ER-α、ER-β 及びプロゲステロン受容体(PgR) (PgR は RC3 プロモーター領域に応答因子あり)の各 mRNA 発現を RT-PCR にて測定した。生後 8 週目にオープンフィールド

ト試験を行い、行動量を測定した。

【結果と考察】

Cd、MMI 曝露とも産仔数、出生時体重、性比など再生産への影響は見られなかった。

甲状腺ホルモン応答遺伝子としての RC3 発現への影響：

Cd 単独曝露による RC3 mRNA 発現の変化はなかった。一方、雌の Cd+MMI 群では RC3 mRNA 発現の低下がみられた。このことは Cd の単独投与曝露ではなく MMI との複合曝露において RC3 発現への影響が発揮された点で重要である。T4 の減少、TR-β や RAR-β mRNA 発現の減少はなかったが、PgR mRNA の発現が減少していた。RC3 遺伝子のプロモーター領域にはプロゲステロンの応答配列が確認されている。RC3 mRNA 発現の減少における PgR の関与は現時点では明確ではないが、これらの関連は検討に値すると思われる。また、Cd と MMI の RC3 または PgR の mRNA 発現に与える相互作用は未解明であるが、RC3 は脳機能の発達に重要であり、本研究で RC3 発現と行動試験における行動量との間に負の相関が見られたことは、Cd 曝露による脳機能の異常には、RC3 が関与している可能性を示唆している。

組織中 Cd 及び必須元素(Zn、Cu)濃度：

PND0 において Cd 曝露群の仔脳内 Cd 濃度が対照群より高く、1 μg/ml の Cd 水を飲用させた場合でも仔の脳に有意に蓄積が起こることが明らかになった。これまで胎盤は Cd の通過をある程度阻止すると考えられていたが、これまでの先行研究では測定感度が低いなどの問題点が指摘されており、今回用いた程度の用量でも Cd は胎盤を通過しうることが示されたことは注目すべき点である。胎仔期は血液脳関門が未熟なため、胎仔に移行した Cd は容易に脳に到達し、その後の脳内 Cd 蓄積がなくても脳機能や行動に影響を与える可能性が示唆された。

腎及び肝への Cd 蓄積は PND10 で顕著であった。Cd 曝露群の Cu 濃度は肝で低く、低用量 Cd でも高用量の Cd を用いた先行研究の結果と同様の影響を及ぼすことが示された。Cd は Cu の腸管吸収を阻害することが知られており、新生仔期肝中 Cu 濃度の減少の少なくとも一部を説明すると推察される。周生期の Cu 欠乏は出生後の非可逆的影響を残すことが知られている。本研究では、Cd 曝露による生後の体重、行動への影響はなかったが、Cd による Cu の減少は、Cd 毒性を考える上で重要であることが示唆された。

Cd、MMI の単独曝露で Cu 濃度の低下が見られたが、これらの Cu 濃度の低下に対する相互作用はなく、その仕組みについては明らかにされなかった。

Cd 曝露群においては、PND0 で肝・腎中 Zn 濃度の増加がみられた。比較的高用量 Cd を

親に投与した多くの先行研究では、仔の腎・肝中 Zn 濃度についても Cu 濃度同様減少するという報告が多く、上昇するという報告はほとんどない。低用量 Cd 曝露では、Zn 濃度に対して高用量曝露とは逆の影響を与えることが示された。

性成熟ならびに女性ホルモン受容体の遺伝子発現：

周生期 Cd 曝露では雌仔の膣開口が遅れる傾向がみられ、さらに発情周期の乱れが有意に高頻度に観察された。また、Cd を投与した雌仔(Cd 単独投与及び Cd+MMI 投与)では ER- α 及び PgR mRNA 発現が有意に減少あるいはその傾向にあった。膣開口や発情周期の調節を司る視床下部 GnRH や下垂体 LH、FSH は ER や PgR を介して分泌が調節される。周生期 Cd 曝露による新生仔脳内 ER および PgR 遺伝子発現の低下と膣開口の遅れや発情周期の乱れの関連は明らかではないが、今後の検討に値すると考えられる。膣開口の遅延、PgR の低下はエストロゲンの作用とは相反するものであり、生殖内分泌の攪乱が Cd のエストロゲン様作用によるものであるとは説明されにくいことが示唆された。しかし、周生期の低用量 Cd 曝露が生殖内分泌を攪乱することが観察され、Cd の発達毒性の一つが示された点で注目に値する。

本研究では周産期マウスに、多くの先行研究における曝露量と比較して低用量の Cd を経口投与した。これは従来の動物実験より 5-200 倍低い量であると考えられる。これまでヒトにおける母親の Cd 曝露と子の発達に関する研究はないため、この曝露条件下で組織中 Cu 濃度の減少、RC3 遺伝子の減少、また性成熟の遅れと発情周期の乱れが認められたことは、周産期の女性の Cd 曝露による子への影響を考える上で重要であると考えられる。

【結論】

- 1、Cd(10 μ g/ml 飲料水、GD0~PND10)と MMI(0.025 %)の複合曝露は脳内 RC3 mRNA 発現を低下させた。Cd の脳機能への影響は RC3 発現の低下により説明される可能性が示唆された。
- 2、本研究で用いた低用量の Cd でも胎盤を通過し、脳へ蓄積することが示された。Cd 曝露は仔の肝中 Cu 濃度を減少させた。先行研究より、この減少は成長・発達の障害へとつながる可能性があると考えられた。
- 3、周生期 Cd 曝露は生殖内分泌攪乱作用、すなわち、雌仔の脳内 ER 及び PgR 遺伝子発現の低下、性成熟の遅延、発情周期の攪乱作用を持つことが示唆された。これらの影響の全てをエストロゲン様作用として説明することは難しい。