

学位論文

「カドミウムの母仔間移行に関する

メタロチオネインと金属トランスポーターの役割」

指導教授名 太田 久吉

申請者氏名 中村 康宏

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

# カドミウムの母仔間移行に関する メタロチオネインと金属トランスポーターの役割

中村 康宏

## 研究の背景

カドミウム (Cd) は、産業現場や環境汚染による急性、慢性暴露で、腎機能障害や骨軟化症・骨粗しょう症などを引き起こす毒性の強い重金属の一つとして知られている。また、Cd のような汚染重金属が生体内に侵入した時に、その金属の体内分布や蓄積濃度を修飾し、その毒性を軽減する因子として、金属結合タンパク質のメタロチオネイン (MT) の存在が知られている。この MT は、必須元素である亜鉛 (Zn) や銅 (Cu) 等とも結合し恒常性維持に関わることが報告されている。

一方、Cd の低濃度慢性暴露における母体から胎児への Cd 移行について、MT の役割は不明であり、特に Cd の生殖毒性との関連は重要な研究課題である。また、近年、必須元素の Zn、Cu、鉄 (Fe) を細胞内外に移送する金属トランスポーターの存在が報告されているが、これら金属トランスポーターと MT による、生殖臓器での金属元素の移送に対する修飾作用についても、その役割は不明な点が多い。

## 目的

本研究では、実験動物モデルにより Cd の母仔間移行に関する MT 及び金属トランスポーターの役割を解明する目的で実験を行った。

## 実験方法

実験動物：

Wistar 系雌ラットに Cd (CdCl<sub>2</sub> 水溶液) を 0 (対照群)、1、2 及び 5 mgCd/kg の濃度で、週 6 日間、定量的に経口投与した。Cd 投与後 3 週目 (9 から 10 週齢の時期) に 1 対 1 で雄ラットと交配させ、膣栓落下日を妊娠 0 日として、妊娠 19 日目に麻酔下心採血により安楽死させ、子宮、胎盤、胎仔等の生殖組織を摘出した。また、出産実験では、出産後 28 日間の哺乳期間中も Cd 投与を行い、仔ラットは出生後 1 日齢と 28 日齢で屠殺して、肝臓及び腎臓を摘出した。

金属測定：

母ラットの子宮及び胎盤を用いて、Cd、Zn 及び Cu 濃度、並びにその可溶性画分中の Cd、MT 結合型 Cd (MT-Cd) 及び非 MT 結合型 Cd (nonMT-Cd) の濃度を測定した。生後 1 日齢と 28 日齢の仔ラットの肝臓及び腎臓を用いて Cd 濃度を測定した。尚、各金属濃度は原子吸光度計で測定した。

遺伝子発現量の測定：

MT 及び各金属トランスポーターの遺伝子発現量を、リアルタイム PCR 法で定量した。尚、内部標準にはアクチン β を用いた。

胎盤の免疫組織学的染色：

母ラットの胎盤中における MT の局在は、1 次抗体に抗 MT ウサギポリクローナル抗体を使用して、Histofine SAB-PO キット (Nichirei Co.) により検出した。

## 結果

Cd、Cu 及び Zn 濃度 を測定した結果、母ラットの子宮中及び胎盤中で、Cd の蓄積量は Cd 投与量に依存した有意な増加がみられたのに対し、Cu 濃度は減少傾向にあった。また、Zn 濃度は変化がなく一定であった。

Cd の蓄積形態を調べたところ、母ラットの子宮中及び胎盤中に蓄積した Cd は、MT に結合された MT-Cd の形態に比べ、その多くが nonMT-Cd の形態であった。

生後 28 日齢の仔ラットでは、Cd は肝臓中よりも腎臓中に多く蓄積していたのに対し、生後 1 日齢の仔ラットでは、Cd は腎臓中よりも肝臓中に多く蓄積していた。さらに、5 mg 投与群の母ラットの胎盤では、合胞性栄養細胞等の萎縮がみられた。

Fe、Zn を細胞質内に取り込む金属トランスポーター DMT1 及び ZIP14 の遺伝子発現量は、胎盤中で Cd 投与量に依存した増加傾向がみられた。一方で、細胞質から細胞内小器官内へ Zn を移送する ZnT2 の遺伝子発現量についても、胎盤中において Cd 投与量に依存した増加傾向がみられた。その他の金属トランスポーターである ZIP8、ZnT1、ZnT4 及び ATP7A は、Cd 投与量に依存した変化はみられなかった。

胎盤中の金属トランスポーターの遺伝子発現量は、子宮中と比較して Cd 投与に応じた変化が顕著であった。

## 総括

本研究では、生後 1 日齢の仔ラットの Cd の生体内分布の結果や、胎盤の組織染色の結果から、MT は、Cd を胎盤で保持し胎仔への Cd の移行に関して抑制的に機能しており、わずかながら胎盤から胎仔へ移行する Cd は、nonMT-Cd の形態であると考えられた。また、金属トランスポーターのうち、胎盤中では、DMT1、ZIP14 及び ZnT2 の各遺伝子の発現量が、Cd 投与量に依存して増加することを認め、Cd の母仔間移行に関与する可能性が示唆される結果を得た。

## 今後の課題

MT や金属トランスポーターの役割をより明確するためには、今回行った遺伝子発現レベルの実験に加え、タンパク質レベルでの実験が必要となる。また、胎盤において網羅的に遺伝子発現量を観察し、Cd 移送に関与すると考えられる遺伝子発現をスクリーニングし、メカニズムの詳細を検討する必要があると考えられた。



## 1. 序論

カドミウム (Cd) は、産業現場や環境汚染による急性、慢性暴露で、腎機能障害や骨軟化症・骨粗しょう症などを引き起こす毒性の強い重金属の一つとして知られている (Jarup, 2002)。Cd は、食品中や飲料水中にも存在しており、動物やヒトの体内で主に肝臓や腎臓に蓄積する。環境中の Cd 濃度は一般的に低濃度だが、Cd の生体への影響の研究では、比較的高濃度の Cd を実験動物に投与している (Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk, 2004; Honda *et al.*, 2003)。

一方、必須元素の亜鉛 (Zn)、銅 (Cu) と結合し、体内での濃度を恒常的に調整するタンパク質として、メタロチオネイン (MT) がよく知られている。MT は、1957 年にウマの腎皮質から、Cd と結合したタンパク質として単離され (Margoshes and Vallee, 1957)、1960 年に MT として同定された (Kagi and Vallee, 1960)。MT は、鉄 (Fe)、Zn、Cu といった生体必須元素の吸収、輸送及び蓄積に関与する一方で、Cd など重金属の解毒の役割を持っていることが報告されている (Bremner, 1987)。

これまで、Cd 投与の実験では、腹腔内に投与する実験系が主であった。しかし、Cd の生体内への取り込みは、通常、食物を通じた経口的な経路であることから、より

適正な Cd の生体影響評価を行うために、Cd をラットに経口的に摂取させる実験が行われている。この実験の結果、腸管から体内に吸収された Cd のうち、MT と結合していない形態 (nonMT-Cd) の Cd は肝臓に多く蓄積され、MT と結合した形態 (MT-Cd) の Cd は、腎臓へ選択的に輸送されることが明らかになっている (Ohta and Cherian, 1991)。このように Cd は、その形態によりターゲット臓器が異なることが報告されている。

一方、妊娠期の Cd の影響を調べる為に、母ラットへ Cd を投与した実験では、母ラットの胎盤中に Cd が高濃度で蓄積したために、子宮や胎盤の血流が減少したり、胎盤の絨毛組織が損傷して、結果的に胎仔の死亡を引き起こしたことが報告されている (Levin *et al.*, 1981)。このような Cd の蓄積には MT の関与が指摘されており、その化学形態が重要視され (Arizono *et al.*, 1981; Hazelhoff Roelfzema *et al.*, 1989; Takin, 2011)、胎盤中 Cd の胎児への移行を MT が調節するという仮説がある (Goyer, 1991; Goyer *et al.*, 1992)。しかし、子宮、胎盤といった生殖に関わる臓器組織での MT の役割は不明な点が多く、特に母ラットから胎仔への Cd 移行時の MT の役割は明らかでない。そこで、本研究では母ラットから胎仔への Cd の輸送と、その MT の役割を解明

することを第一の目的として実験を行った。

更に、母ラットから胎仔への Cd の移行に関わる可能性がある他のタンパク質を探索するため、これまでに報告例のあるいくつかの金属トランスポーターに着目した。1つ目の、二価イオン結合金属輸送体 (DMT1) は、腸管での鉄イオンなどの金属の取り込みに関与しており、哺乳類において Cd の取り込みと解毒に関与することがわかっている。近年では、DMT1 の cDNA はクローニングされ、単離された DMT1 の遺伝子配列がわかっている (Gunshin *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2001)。2つ目の、ZIP (ZRT / IRT-様タンパク質) は、様々な遺伝子ファミリーがあり Zn の輸送に関与している (Grotz *et al.*, 1998; Girijashanker *et al.*, 2008)。特に、ZIP8 と ZIP14 は、鼻上皮と内耳を含む中枢神経系での Cd 輸送に関与していることが報告されている (Ma *et al.*, 2008)。最後に、Zn を細胞質ゾルから細胞外へ排出する因子である ZnT1 や (Cousins and McMahon, 2000)、Zn を細胞質ゾルから細胞内小胞に輸送する ZnT2 や ZnT4 の、ZnT 遺伝子ファミリーである (Cousins and McMahon, 2000; Palmiter *et al.*, 1996)。

しかし、本研究のターゲット臓器である子宮中や胎盤中での挙動に関する金属トラン



スポーターの報告はほとんど無い。そこで母ラットから胎仔への Cd 輸送のメカニズムを理解するために、Cd 輸送に関与する可能性のある金属トランスポーター各種のうち、上述の DMT1、ZIP8、ZIP14、ZnT1、ZnT2 及び ZnT4 との関係を調べることを第二の目的として研究を行った。

## 2. 方法

本実験研究は、ラットを用いて経口投与実験を行うことから、北里大学の動物倫理委員会承認によって行った。

また、Cd の日常的な人間の摂取量に相当する、ラットへの適切な経口投与量を推定するために、日本人の腎臓中 Cd 蓄積量に関する疫学研究(Yoshida *et al.*, 1998)と、ラットへの長期 Cd 経口投与を行った研究 (Ohta *et al.*, 2000)を参考にして、1 mg/kg/day の経口投与量が、ヒトにおける日常的な Cd 摂取量と同じレベルに相当すると判断した。

### 2-1. 実験動物について

Wistar 系の雌ラット (5 週齢) を日本クレア株式会社から購入した。雌ラットは投

与する Cd 量毎に、5 匹ずつ 4 つの実験群に分け、1 週間の予備飼育の後、6 週齢から Cd (CdCl<sub>2</sub>) の経口投与を開始した。4 群各々には、Cd を、0、1、2 及び 5 mgCd/ kg /day の用量で、週 6 日間経口摂取させた。雌ラットは、9 から 10 週齢の時期に同週齢の雄ラットと一対一で交配をさせ、妊娠、出産後、哺乳期間まで観察した。雌ラット (母ラット) は 28 日間の哺乳期間の後に、ネンブタール麻酔下で心採血により屠殺し、氷冷蔵塩水を使用して全身の血流を灌流して臓器を洗浄し、肝臓、腎臓、子宮等の臓器を摘出した。なお、母ラットへの Cd 投与は、開始から哺乳後に屠殺するまで継続して行った。生後 1 日齢の仔ラット、すなわち新生仔はジエチルエーテル麻酔により、また生後 28 日齢の仔ラットはネンブタール麻酔下で、心採血により屠殺した。その後、各仔ラットから肝臓及び腎臓を摘出した。

一方、上記と同様の実験群を用意して、妊娠期間中に屠殺することで母ラットの胎盤試料を得た。これら実験群の雌ラットは、交配の後、膣栓落下を確認した日を妊娠 0 日目として、妊娠 19 日目又は、20 日目にネンブタール麻酔下で心採血により屠殺後、氷冷蔵塩水を使用して全身の血流を灌流して臓器を洗浄し、胎仔及び胎盤を摘出した。

## 2-2. Cd、Zn 及び Cu 濃度の測定法

母ラットの血液、子宮及び胎盤の Cd、Zn 及び Cu の濃度と、仔ラットの肝臓及び腎臓の Cd 濃度は、原子吸光光度計（ゼーマン 180；日立製作所）を用いて測定した。各組織は硝酸により、110°C ヒートブロック使用して 5 時間処理し、それぞれの測定波長で金属濃度を測定した（Cd：228.8 nm、Zn：213.9 nm、Cu：324.8 nm）。

## 2-3. 可溶性画分の総カドミウム量（T-Cd）、MT-Cd 及び nonMT-Cd の測定法

金属測定とは別に、組織を 0.25M ショ糖中でホモジナイズし、105,000×g で 60 分間、遠心分離を行った。得られた上清（可溶性画分）の一部から総カドミウム（T-Cd）濃度を測定し、残りの上清からは、MT と結合している Cd（MT-Cd）と MT と結合していない Cd（nonMT-Cd）の濃度を測定した。T-Cd および MT-Cd の測定は、Cd の測定波長（228.8 nm）でフレイムレス原子吸光光度計（ゼーマン 180；日立製作所）を用いて測定した。さらに、nonMT-Cd は、T-Cd および MT-Cd の濃度差として、計算により算出した。尚、MT-Cd の測定に用いた上清には、遊離 Cd を除去する為の処理を行った。すなわち、hemolyzate 溶液を上清に添加して、攪拌後、沸騰水中で 150

秒間インキュベートし、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を得た。hemolyzate 溶液の添加から、遠心分離までの手順を 3 回繰り返し、得られた上清を MT-Cd の測定に用いた (Nomiyama and Nomiyama, 1982; Onosaka *et al.*, 1978)。

#### 2-4. 逆転写と定量的リアルタイム PCR

iso-MTs (I, II 及び III) と、金属トランスポーター (DMT1、ZIP8、ZIP14、ZnT1、ZnT2 及び ZnT4) をそれぞれコードする遺伝子の発現は、リアルタイム PCR 法を用いて定量した。各母ラットから摘出したそれぞれの子宮と胎盤の全 RNA サンプルは、ISOGEN 液 (ニッポンジーン) により調製した。第一鎖 cDNA は、各全 RNA の 0.1 $\mu$ g を PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix (タカラバイオ社) と混合し、7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、37 $^{\circ}$ C で 15 分の処理後に、85 $^{\circ}$ C で 5 秒のインキュベートを行って合成させた。

定量的リアルタイム PCR は、サイバーミックス Taq<sup>TM</sup> II キット (タカラバイオ社) を用いて行った。PCR に用いたプライマー対の配列を Table 1 に示した。尚、内部標準にはアクチン  $\beta$  を使用し、そのプライマー対の配列は、センス側が 5'-TCC TCC CTG

GAG AAG AGC TA-3'、アンチセンス側が 5'-ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC-3'である。

PCR 反応は、95°Cで 2 分の熱変性後、95°Cで 2 分、59°Cで 15 秒、72°Cで 34 秒を 1 サイクルとして、合計 45 サイクルを繰り返した。増幅データは、7500 システムの SDS ソフトウェア (Applied Biosystems 社) を用いて分析した。相対的な発現レベルは、アクチン  $\beta$  mRNA 量に対する各試料中の mRNA 量の比として算出した。

## 2-5. SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティング法

子宮の粗抽出液を 18%SDS-ポリアクリルアミド電気泳動でタンパク質を分離させ、PVDF 膜 (Amersham Pharmacia Biotech 社) へ転写させた。0.05%スキムミルクを含む TBS 緩衝液で (pH8.0) でブロッキング処理した後、Tween 20 を含む TBS 緩衝液 (Tween-TBS 緩衝液) で洗浄し、抗ラット精巢 MT 様 Cd 結合タンパク質ポリクローナルウサギ抗体を一次抗体として反応させた。尚、使用した抗ラット精巢 MT 様 Cd 結合タンパク質ポリクローナルウサギ抗体は、ラット MT に反応することが報告されている (Ohta *et al.*, 2000)。非特異的に PVDF 膜に吸着した一次抗体は、Tween-TBS 緩

衝液で洗浄し、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体と 90 分間反応させた。PVDF 膜は洗浄後に、シグマ社製のニトロブルーテトラゾリウム溶液 (NBT) と 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸溶液 (BCIP) 及び発色用緩衝液で発色させ、MT を検出させた。

## 2-6. MT の免疫組織染色法

胎盤中の MT の局在を観察するために、ラットの肝臓中の MT を染色した。すなわち、Nakajima *et al.* (1991) の方法により、ラットの胎盤組織の切片をパラフィン包埋の後、ミクロトームを用いて薄切を行った。薄切した胎盤組織のパラフィンを溶解させ脱パラフィンを十分に行った後、免疫組織染色のために、30 分間、メタノールと 0.3% 過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼ処理を行って、4℃のリン酸緩衝液で洗浄した。抗 MT ポリクローナルウサギ抗体で処理した後、リン酸緩衝液で洗浄し、ビオチン標識した抗ウサギ IgG ヤギ抗体を二次抗体として反応させた。最後に Histofine SAB-PO キット (ニチレイ社製) を用いて、ストレプトアビジン酵素との化学発色反応を、光学顕微鏡下で確認した。尚、本研究で用いた抗 MT ポリクローナルウサギ抗体

は、ヒト、ラット、ウサギの MT-I、MT-II を認識することが、あらかじめ報告されている (Nakajima *et al.*, 1991)。

## 2-7. 統計分析について

本実験で得られた結果は 5%有意水準で統計学的に評価した。各 Cd 投与群及び対照群との間に一元配置分散分析 (ANOVA) 法により有意差がみられた場合、Fisher の多重比較検定 (PLSD) 法で、有意差検定を行った。

## 3. 結果

### 3-1. 金属濃度測定について

子宮中の Cd 濃度は、1、2 及び 5 mg 投与群で対照群と比較して、Cd の用量に依存して有意に増加した (Fig. 1A)。しかし、子宮中の Zn 濃度は、各実験群に有意差はなく (Fig. 1B)、Cu 濃度は 2 及び 5 mg 投与群で対照群と比較して、有意に減少した (Fig. 1C)。

一方、胎盤中における Cd 及び Cu の濃度は、子宮中の金属濃度に類似した傾向がみら

れた。Cd 濃度は、1、2 及び 5 mg 投与群で対照群と比較して、Cd の投与量に依存して有意に増加し (Fig. 2A)、Cu 濃度は、2 及び 5 mg 投与群で有意に減少した (Fig. 2C)。一方、胎盤中の Zn 濃度は、5 mg 投与群でのみ、対照群と比べ有意に減少した (Fig. 2B)。

母ラットの血液中の Cd 濃度は、1、2 及び 5 mg 投与群で対照群と比較して、有意に増加し (Fig. 3A)、血液中の Zn 濃度は、Cd 投与量に反比例して、減少する傾向がみられたが、この変化に有意差がなかった (Fig. 3B)。Cu 濃度については、1 及び 5 mg 投与群で、対照群よりも有意に減少した (Fig. 3C)。

### 3-2. Cd の蓄積形態について

子宮中の T-Cd 量及び MT-Cd 量は、2 及び 5 mg 投与群で、対象群と比較して有意に増加した (Figs. 4A and 4B)。T-Cd 量及び MT-Cd 量を基に算出した nonMT-Cd 量は、2 及び 5 mg 投与群で、対象群と比較して有意に増加した (Fig. 4C)。また、胎盤中の MT-Cd 量が 2 及び 5 mg 投与群で対照群と比較して、有意に増加した (Fig. 5B)。T-Cd 量及び nonMT-Cd 量も 1 mg 以上の全ての Cd 投与群で、対照群と比較して、有意に増加した (Figs. 5A and 5C)。



### 3-3. MT 遺伝子発現量の定量及び MT タンパク質の定性分析

MT-I 及び MT-II の mRNA の発現量は、子宮中で Cd 濃度に依存した増加傾向にあったものの、有意な差はみられなかった (Fig. 6A)。反対に、胎盤中では、MT-I の mRNA 発現量は 1 及び 2 mg 投与群で、MT-II の mRNA 発現量は 2 及び 5 mg 群で、対照群と比較して有意に増加した (Fig. 6B)。また、子宮中、胎盤中共に MT-II の発現量が最も高値を示した。一方、MT-III の mRNA の発現量は、子宮及び胎盤中で顕著な変化は観察されなかった (Figs. 6A and 6B)。子宮中の MT タンパク質をウエスタンブロット法により定性的に分析した結果、全ての投与群で MT が検出できた。検出された MT の染色像は、2 mg 投与群、1 mg 投与群、5 mg 投与群、対照群の順で濃くなっていた (Fig. 6C)。

### 3-4. 胎盤中 MT の局在

全ての Cd 投与群において、胎盤の合胞体栄養細胞に MT が検出されたが、5 mg 投与群では、他の群と比べて MT の染色像が少なかった (Fig. 7)。また、2 及び 5 mg

投与群において、形態学的な変化が胎盤中でみられ、特に 5 mg 投与群では、組織の萎縮が顕著であった (Fig. 7D)。

### 3-5. 仔ラット中の Cd 濃度の測定

新生仔ラットの肝臓中及び腎臓中の Cd 濃度を測定した結果、母ラットへの Cd 投与によって、わずかながら胎仔期に Cd が移行していることが明らかとなった。新生仔ラットでは、腎臓よりも肝臓に多く蓄積する傾向があり (Fig. 8)、反対に生後 28 日齢の仔ラットでは、肝臓より腎臓に多く蓄積する傾向があった (Fig. 9)。生後 28 日齢の仔ラットの腎臓中では、特に 2 及び 5 mg 投与群で、Cd 蓄積量が対象群と比較して、有意に増加していた (Fig. 9)。

### 3-6. 金属トランスポーターの遺伝子発現量の定量

#### 3-6-1. DMT1 遺伝子の発現量について

子宮中の DMT1 遺伝子の発現量は、5 mg 投与群において、対象群と比較し、有意に増加した (Fig. 10A)。胎盤中の DMT1 遺伝子の発現量は、全ての投与群で対象群と

比較して、有意に増加した (Fig. 10B)。

### 3-6-2. ZIP8 及び ZIP14 遺伝子の発現量について

子宮中の ZIP8 遺伝子及び ZIP14 遺伝子の発現量は、全ての投与群で対象群と比較して、減少傾向が認められた。特に ZIP8 遺伝子の 1 及び 2 mg 投与群でのみ、遺伝子の発現量が対象群と比較して有意に減少した (Fig. 11A)。胎盤中における ZIP8 遺伝子及び ZIP14 遺伝子の発現量は、子宮中の発現量の傾向とは反対で、対象群と比較し用量に依存して増加しており、特に ZIP14 遺伝子の 2 及び 5 mg 投与群でのみ、遺伝子の発現量が、対象群と比較し有意に増加した (Fig. 11B)。

### 3-6-3. ZnT1、ZnT2 及び ZnT4 遺伝子の発現量について

子宮中の ZnT1、ZnT2 及び ZnT4 遺伝子は、1 mg 投与群で対象群と比較して、有意に増加したが、他の Cd 投与群では対象群と比較しても有意性はなかった (Fig. 12A)。胎盤中の ZnT2 遺伝子の発現量は、Cd 投与量に依存して増加し、特に 2 及び 5 mg 投与群では対象群と比較し有意に増加した (Fig. 12B)。

## 4. 考察

### 4-1. Cd 蓄積と MT

母ラットでは、投与した Cd 量と、子宮及び胎盤中に検出された Cd 濃度の関係は、Cd 投与量に依存して増加しており、MT-Cd 濃度及び nonMT-Cd 濃度についても同様に、投与した Cd 量に比例して増加した (Figs. 1A, 2A, 4 and 5)。一方、Cd の存在画分に着目したところ、子宮中の Cd 濃度と可溶性画分中の T-Cd 濃度から、子宮中 Cd の約 50% が可溶性画分中に存在することが明らかとなった (Figs. 1A and 4A)。それに対し、胎盤中では、T-Cd 濃度から Cd 量の約 90% が可溶性の画分中に存在した (Figs. 2A and 5A)。以上の結果から、投与した Cd は、母ラットの血液中で用量に依存して増加し (Fig. 3A)、血流を通して、最終的に胎盤へ蓄積すると考えられた。

さらに可溶性の画分中に含まれていた Cd の化学的形態を調べたところ、子宮中では MT-Cd の形態で存在していた割合が約 10%、nonMT-Cd の形態で存在していた割合が約 90% であった (Fig. 4)。この特徴的な比率の結果は、Cd 投与群のうち、2 及び 5 mg 投与群で観察されていたが、1 mg 投与群にはこのような現象が観察できなかった。また、胎盤中でも nonMT-Cd 量が、MT-Cd 量よりも多く存在している傾向がみられた (Fig.

5)。一方、1 mg 投与群の MT-Cd 量には、有意な増加はみられなかった (Fig. 5B)。

以上の結果から、胎盤中に蓄積していた Cd の多くは、nonMT-Cd の形態で存在し、2 mg/kg/day 以上の Cd 投与により、MT-Cd が顕著に増加するものと考えられた。

ここで、胎盤中の MT はどこで産生されたのか、について考察する。Chan *et al.* (1993) は、妊娠中のラットに Cd を経口投与して血漿中の MT が増加すると、Cd は MT-Cd の形態となって選択的に腎臓に多く蓄積すると報告している。さらに、Itoh *et al.* (1996) は、妊娠中のマウスを用いた単回の投与実験で、MT-Cd を静脈投与した時よりも、CdCl<sub>2</sub> を静脈投与した時の方が多くの Cd が胎盤に蓄積したことを報告している。つまり、胎盤中で増加した MT は、血流によって胎盤中へ移送されたのではなく、慢性的な Cd の経口投与の結果で蓄積した Cd によって、胎盤中で誘導合成されていたと考えられた。

MT のアイソフォーム (iso-MT) として、MT-I、MT-II 及び MT-III が存在することが報告されている。MT-I 及び MT-II は肝臓、腎臓、腸管等で発現され、金属の代謝等に機能することがよく知られているが、子宮、胎盤及び精巣等の生殖器中での役割は未だよくわかっていない。その上、MT-III については、脳や精巣で発現されることが

確認されているが、その詳細な役割についてはほとんど明らかになっていない。

そこで、子宮及び胎盤での MT 遺伝子の誘導合成について、各々の iso-MT の詳細を調べた。子宮では、MT- I 及び MT- II の遺伝子発現量が、Cd 投与量に依存して増加する傾向が認められた (Fig. 6A)。同様に MT タンパク質量を半定量的に検出するウエスタンブロット法を用いた結果でも、1 及び 2 mg 投与群で、遺伝子発現量と同じく増加する傾向がみられた (Fig. 6C)。しかし、5 mg 投与群では、MT 量の増加は認められなかった。この理由は、5 mg 投与群では、Cd 蓄積量が高濃度であったため、Cd の毒性による細胞の傷害により、タンパク質の翻訳過程が影響を受けたものと考えられた。

一方で胎盤では、MT- I 及び MT- II 遺伝子の発現量が、Cd の投与量に依存して増加しており (Fig. 6B)、組織切片の染色結果でも、1 及び 2 mg 投与群で MT の染色が、対象群よりも多く観察されている (Fig. 7)。この結果から、胎盤においても、MT- I 及び MT- II が誘導合成されると考えられる。さらに胎盤中の MT- I 遺伝子と MT- II 遺伝子の発現量を比較すると、MT- II が MT- I の 15 ~ 20 倍量となっており、胎盤中で発現している MT の多くは、MT- II であると考えられた。もう一つのアイソフォームである MT- III の遺伝子発現量は、子宮でわずかに発現が認められたものの、Cd 投与量に

依存した変化はなく、胎盤中では遺伝子発現がほとんどみられなかった。つまり、子宮及び胎盤では、Cd の投与による MT-III の誘導合成は起こっていないものと考えられた。

以上の結果をまとめると、子宮及び胎盤では MT-I、MT-II のみが誘導され、組織切片で確認された MT は、主に MT-II であると考えられた。

#### 4-2. Cd の母仔間移行への MT の関与について

出生後 1 日齢の新生仔ラットから肝臓及び腎臓を摘出し、その Cd 濃度を調べた。母ラットへの Cd 投与量に依存して、仔ラットの Cd 濃度も増加する傾向がみられた (Fig. 8)。さらに、出生後 28 日齢の仔ラットの肝臓及び腎臓中の Cd 濃度も同様に増加したが、特に 2 及び 5 mg 投与群の腎臓中で統計的有意な増加がみられた (Fig. 9)。ここで、Cd の蓄積するターゲット臓器について比較すると、28 日齢の仔ラットでは肝臓よりも腎臓に多くの Cd を蓄積させているが、1 日齢の新生仔ラットでは反対に、腎臓よりも肝臓に多くの Cd が蓄積していた。MT-Cd が腎臓に選択的に移送されることと、前述の結果と併わせると、28 日齢の仔ラットの腎臓中に蓄積した Cd は、母ラットへの Cd

投与の結果、母乳に輸送された Cd が仔ラットの腸管で吸収された後、MT と結合して、MT-Cd となり腎臓に移送されたと考えられた。それに対し、1 日齢の新生仔ラットの肝臓中に蓄積した Cd は、MT と結合していない nonMT-Cd であると考えられた。これまで、MT が子宮や胎盤で誘導合成されて、Cd を保持（トラップ）していると考えられてきたが、1 日齢の仔ラットの結果より、Cd は、胎盤関門を通過し胎仔へ移行していることから、MT の Cd 保持能は Cd の胎仔への移行を防ぐには十分なものではないことが示唆された。MT と結合されなかった Cd は、胎盤から胎仔へ流出し、nonMT-Cd の形態で胎仔へ移行するものと考えられた。さらに、胎盤組織の免疫化学染色の結果より、5 mg 投与群の母ラットの胎盤に組織障害（合胞性栄養細胞の萎縮）が認められ、2 mg 投与群でも軽度な形態変化が起きていた (Figs. 7C and 7D)。すなわち、2 mg/kg/day 以上の Cd を投与した場合には、胎盤に組織の障害性の変化が起きるため、Cd が胎盤から胎仔に流出した可能性が考えられた。

以上のことから、胎仔への Cd 移行には、MT が積極的には関与しておらず、MT に結合されずに保持されなかった Cd あるいは、胎盤の傷害によって流出した Cd が、胎仔へ移行するものと考えられた。



#### 4-3. Cd の母仔間移行と金属トランスポーターの関与について

近年、金属の体内移送に関与すると考えられる金属トランスポーターが注目されている。そこで、Fe などの二価イオンの移送に関与する DMT1(Gunshin *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2001)、Zn の移送に関与すると考えられている ZIP 遺伝子ファミリー及び ZnT 遺伝子ファミリー(Grotz *et al.*, 1998)、Cu のホメオスタシスの主要な因子である ATP7A (Adle *et al.*, 2007)に着目した。これら金属トランスポーターのうち、ATP7A は、その遺伝子発現量の結果より、Cd 投与との関係性がみられなかった。ATP7A タンパク質は、Cu 移送を調整するため哺乳類の血液脳脊髄液関門および血液脳関門を構成する細胞に存在している(Choi and Zheng, 2009)。しかし、ATP7A が Cd を移送させる役割が報告されているのは、酵母のみであり (Adle *et al.*, 2007)、本研究での結果を踏まえ、ATP7A が哺乳類で Cd の移送に関わる可能性は低いと考えられた。

着目した金属トランスポーターのうち、DMT1 の発現量は、母ラットの胎盤中で有意に増加した (Fig. 10B) 。Whanger (1979) や Schumann *et al.* (1996) は、ラットへの Cd 投与の結果、血中ヘモグロビン量の減少や鉄欠乏性貧血の発生を報告している。さらに貧血のラットでは、DMT1 発現量が増加することが報告されている

(Thompson *et al.*, 2007; Fleming *et al.*, 1998)。そこで、本研究で DMT1 の発現量が増加したことが、貧血に由来する可能性を調査した。母ラットの血液試料を用いて、貧血に関わる生化学指標として、ヘマトクリット値とヘモグロビン値を測定したが、5 mg 投与群でのみ対照群と比較し、わずかに血中のヘマトクリット値の減少がみられた程度で、全投与群のヘモグロビン値は一定であった。つまり、本研究のような低濃度の Cd 投与では、ラットに貧血は起こらず、胎盤中の DMT1 遺伝子の発現の有意な上昇は、貧血に由来したものではないと考えられた。一方、DMT1 は、Fe の他、鉛 (Pb) や Cd 輸送にも関与することが一部の報告では示されており (Bressler *et al.*, 2004)、Abouhamed *et al.* (2007) によれば、DMT1 が細胞質中のエンドソーム/リソソーム画分から Cd の放出に関与し、ラットの腎臓の近位尿細管の細胞でアポトーシスを誘導することが指摘されている。本研究の結果からは、はっきりと DMT1 が子宮や胎盤で Cd 輸送に関係するかは明らかにはできなかったが、胎盤の DMT1 遺伝子の発現量が Cd の投与量に依存して変化したことで、胎盤における Cd の移送の一部には関与する可能性が考えられた。

さらに、生体の必須である Zn の移送に関係する ZIP 遺伝子ファミリーについて、同

様の研究を行った。1 及び 2 mg 投与群では、子宮での ZIP8 遺伝子の発現量が有意に減少した (Fig. 11A)。反対に胎盤では、ZIP14 遺伝子の発現量は、全ての投与群で Cd 投与に依存した増加傾向がみられた (Fig. 11B)。ZIP14 は、Zn の細胞質中への取り込みに関与しているが、本研究では、胎盤中の Zn 濃度が一定であるのに (Fig. 2B)、遺伝子の発現量が増加するという結果が得られた (Fig. 11B)。この結果は、胎盤の ZIP14 は、Zn を取り込むよりむしろ、Cd の投与によって生体内で増加した Cd の取り込みに関与した可能性があると思われた。同様に Cd の取り込みに関与する報告があり、Cd の蓄積や Cd の毒性が表われる際、ZIP8 遺伝子及び ZIP14 遺伝子が関わっていることが報告されている。すなわち、Cd 耐性のマウスで、腎臓の近位尿細管上皮の頂端面の ZIP8 は発現量が少ないにもかかわらず、傷害を受けた腎臓中の ZIP8 は高度に発現した (He *et al.*, 2009)。さらに、ZIP14 は他の ZIP ファミリーの中でも、ZIP8 と遺伝子配列が類似しているため、その機能も似ているのではないかという仮説も提案されている (He *et al.*, 2009)。また、Himeno *et al.* (2009) の報告では、ZIP8 遺伝子が精巣の血管で、Cd の取り込みの役割を果たすとされている。さらに、DNA マイクロアレイ法やリアルタイム PCR 法を用いた研究によって、ZIP8 遺伝子及び ZIP14 遺伝

子の発現量は、Cd に耐性な細胞においては減少する傾向が観察されている (Fujishiro *et al.*, 2009; Fujishiro *et al.*, 2011)。

以上のように、ZIP8 及び ZIP14 は様々な器官内で発現し、細胞質ゾル中への Cd の取り込みに関与すると考えられてきたが、本研究の結果、胎盤でも、ZIP14 が Cd の取り込みに関与している可能性を新たに見出した。

ZnT 遺伝子については、原形質膜に存在する ZnT1 が、細胞質ゾルから細胞外へ Zn を排出させ (Cousins and McMahon, 2000)、細胞内小胞に存在する ZnT2 及び ZnT4 が、Zn を細胞質ゾルから細胞内小胞へ取り込む役割を持っていることがわかっている

(Cousins and McMahon, 2000; Palmiter *et al.*, 1996)。ZnT1 の遺伝子は、Zn だけでなく Cd によっても誘導合成されるとの報告があるが (Langmade *et al.*, 2000)、哺乳類で ZnT1 が Cd を移送するという報告は見当たらない。本研究の結果でも、ZnT1

遺伝子の発現量は用量に依存した変化はみられていないことから (Figs. 12A and 12B)、

子宮及び胎盤に存在する ZnT1 は、Cd の移送に関与する可能性は低いと考えられた。

一方、胎盤の ZnT2 遺伝子の発現は、2 及び 5 mg 投与群で有意に変化していたことから

(Fig. 12B)、ラット胎盤の ZnT2 タンパク質は、投与された Cd により胎盤内で Cd

の移行に関わる可能性が初めて示唆された。

## 5. 総括

本研究では、Cd の母仔間移行に関与する、MT と金属トランスポーターについて研究した。新生仔ラットで Cd が肝臓に多く蓄積していた結果より、Cd が MT と結合していれば選択的に腎臓に蓄積されるため、MT は母から胎仔への Cd 移送に、積極的に関与していないことが明らかとなった。むしろ MT は、胎盤内での Cd の蓄積や保持(トラップ)の役割を担い、Cd によって傷害を受けた胎盤からは、Cd が漏出して母から胎仔へ移送された。

一方、DMT1、ZIP14 及び ZnT2 の金属トランスポーターは、胎盤において各々の遺伝子発現量が、Cd の投与量に依存して増加しており、Cd の母仔間移行に関与している可能性を示唆する結果が得られた。

## 6. 今後の課題

Cd の母仔間移行に関する金属トランスポーターの役割をより詳細に検討するために

は、今回行った遺伝子発現レベルの実験に加え、タンパク質レベルでの実験が必要となる。また、本研究では子宮よりも胎盤で、Cdの投与に応じた遺伝子発現量の変化が認められていることから、胎盤を通じた母から胎児へのCd移行過程で、複数のタンパク質が複合的に働いていると考えられた。従って、今後、胎盤において網羅的に遺伝子発現量を観察し、Cd移送に関与すると考えられる遺伝子をスクリーニングして、移送機構の詳細を検討する必要があると考えられた。

最後に、本研究で妊娠中のラットの生殖に関わる臓器組織中での金属トランスポーターについて、遺伝子発現量の結果を示せたことは大変貴重であり、従来から研究が盛んであったMTの機能について解析する研究の他、母仔の生殖毒性についての有効な知見と考える。

## 7. 謝辞

この研究は、平成 16 年から 17 年度文部科学技術省連合、科学研究費補助金基盤研究（C（2）、課題番号 No.16590481）、日本公衆衛生協会（環境保健に関する健康科学研究助成）並びに独立行政法人環境再生保全機構の研究助成、北里大学医療衛生学部特別研究からの助成を受けた一連の研究であります。

また、本学医療衛生学部衛生管理学教室の太田久吉教授の研究指導の下、同教室の藪田十司先生、大場謙一先生からのご指導を頂戴し、様々な実験を行えたことを深謝いたします。

標本の作製にあたっては群馬大学医学部の鈴木慶二教授の技術指導並びに情報の解析について、ご助言いただきましたことを心より感謝しております。

また、博士論文申請に当たり、主査である山内博教授をはじめ、副査の堤明純教授、清和成教授、高橋伸一郎教授には論文のご指導を賜りましたことを、ここに深謝いたします。

この研究を遂行するにあたり、本学医療衛生学部 衛生管理学教室卒業生の前島幸さん、中川妙子さん、大川陽平さん、川原田萌さん、小林正明さん、山崎浩平さん、高部

俊輔さんから多くのご検討、ご協力が得られました、私の幸運の限りです。今一度、深く感謝申し上げます。

最後に、研究期間中ずっと応援してくれた、すばらしい妻に心から感謝します。



## 8. 引用文献

- Abouhamed M, Wolff NA, Lee WK, Smith CP, Thevenod F: Knockdown of endosomal/lysosomal divalent metal transporter 1 by RNA interference prevents cadmium-metallothionein-1 cytotoxicity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:705-12.
- Adele DJ, Sinani D, Kim H, Lee J: A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2007;282:947-55.
- Arizono K, Ota S, Ariyoshi T: Purification of metallothionein-like protein in rat placenta. *Bull Environ Contam Toxicol* 1981;27:671-7.
- Bremner I: Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Suppl* 1987;52:81-107.
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D: Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1012:142-52.
- Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J: Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: Studies on a rat model of human environmental exposure. *Toxicol Sci* 2004;82:468-77.
- Chan HM, Tamura Y, Cherian MG, Goyer RA: Pregnancy-associated changes in plasma metallothionein concentration and renal cadmium accumulation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;202:420-7.
- Choi BS, Zheng W: Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res* 2009;1248:14-21.

- Cousins RJ, McMahon RJ: Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr* 2000;130:1384-7.
- Ferguson CJ, Wareing M, Ward DT, Green R, Smith, CP, Riccardi D: Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:803-14.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC: Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1148-53.
- Fujishiro H, Okugaki S, Kubota K, Fujiyama T, Miyataka H, Himeno S: The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J Appl Toxicol* 2009;29:367-73.
- Fujishiro H, Doi M, Enomoto S, Himeno S: High sensitivity of RBL-2H3 cells to cadmium and manganese: an implication of the role of ZIP8. *Metallomics* 2011;3: 710-8.
- Girijashanker K, He L, Soleimani M, Reed JM, Li H, Liu Z, *et al.*: Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: Similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol* 2008;73:1413-23.
- Goyer RA: Transplacental transfer of cadmium and fetal effects. *Fundam Appl Toxicol* 1991;16:22-3.
- Goyer RA, Haust MD, Cherian MG: Cellular localization of metallothionein in human term placenta. *Placenta* 1992;13:349-55.
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D: Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 1998;95:7220-4.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF *et al.*: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482-8.
- Hazelhoff-Roelfzema W, Tohyama C, Nishimura H, Nishimura N, Morselt, AF: Quantitative immunohistochemistry of metallothionein in rat placenta. *Histochemistry* 1989;90:365-9.
- He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW: Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:250-7.
- Himeno S, Yanagiya T, Fujishiro H: The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie* 2009;91:1218-22.
- Honda R, Tsuritani I, Noborisaka Y, Suzuki H, Ishizaki M, Yamada Y: Urinary cadmium excretion is correlated with calcaneal bone mass in Japanese women living in an urban area. *Environ Res* 2003;91:63-70.
- Itoh N, Fujita Y, Nakanishi H, Kawai Y, Mayumi T, Hwang GS, *et al.*: Binding of Cd to metallothionein in the placenta of Cd-treated mouse. *J Toxicol Sci* 1996;21:19-27.
- Jarup L: Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:35-9.
- Kagi JH, Valee BL: Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* 1960;235:3460-5.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK: The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000;275:34803-9.

- Levin AA, Plautz JR, di Sant'Agnese PA, Miller RK: Cadmium: Placental mechanisms of fetal toxicity. *Placenta Suppl* 1981;3:303-18.
- Ma C, Schneider SN, Miller M, Nebert DW, Lind C, Roda SM, *et al.*: Manganese accumulation in the mouse ear following systemic exposure. *J Biochem Mol Toxicol* 2008;22:305-10.
- Margoshes M, Vallee BL: A Cadmium protein from equine kidney-cortex. *J Am Chem Soc* 1957;79:4813-4.
- Nakajima K, Suzuki K, Otaki N, Kimura M: Detection of metallothionein in brain. *Methods Enzymol* 1991;205:387-95.
- Nomiyama K, Nomiyama H: Tissue metallothioneins in rabbits chronically exposed to cadmium, with special reference to the critical concentration of cadmium in the renal cortex. *Dev Toxicol Environ Sci* 1982;947-67.
- Ohta H, Cherian MG: Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;107:63-72.
- Ohta H, Yamauchi Y, Nakakita M, Tanaka H, Asami S, Seki Y, *et al.*: Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Ind Health* 2000;38: 339-55.
- Onosaka S, Tanaka K, Doi M, Okahara K: A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku* 1978;24:128-31.
- Palmiter RD, Cole TB, Findley SD: ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* 1996;15:1784-91.
- Schumann K, Friebel P, Schmolke G, Elsenhans B: State of iron repletion and

cadmium tissue accumulation as a function of growth in young rats after oral cadmium exposure. Arch Environ Contam Toxicol 1996;31:483-7.

Tekin D, Kayaalti Z, Aliyev V, Soylemezo-lu T: The effects of metallothionein 2A polymorphism on placental cadmium accumulation: is metallothionein a modifying factor in transfer of micronutrients to the fetus? J Appl Toxicol 2011;15:1661.

Thompson K, Molina RM, Donaghey T, Schwob JE, Brain JD, Wessling-Resnick, M: Olfactory uptake of manganese requires DMT1 and is enhanced by anemia. FASEB J 2007;21:223-30.

Whanger PD: Cadmium effects in rats on tissue iron, selenium, and blood pressure; Blood and hair cadmium in some oregon residents. Environ Health Perspect 1979;28:115-21.

Yoshida M, Ohta H, Yamauchi Y, Seki Y, Sagi M, Yamazaki K, *et al.*: Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. Biol Trace Elem Res 1998;63:167-75.

## 9. 業績目録

### (I) 原著

- ◎ 1. Nakamura Y, Ohba K, Ohta H: Participation of metal transporters in cadmium transport from mother rat to fetus.  
J Toxicol Sci, 37:1035-1044, 2012.
- 2. Nakamura Y, Ohba K, Suzuki K, Ohta H: Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus.  
J Toxicol Sci, 37:149~156, 2012.
3. Ohta H, Nakamura Y, Ohkawa Y, Ohmori Y, Suzuki K: Maternal-to-fetal cadmium transfer and its effects on trace element regulation in the reproductive organs of female rats.  
Cell Biol Toxicol, Supplement No.1, 24:94~95, 2008.
4. Ohta H, Ohkawa Y, Nakamura Y, Ohba K, Nakazato K, Suzuki K: Role of Metallothionein (I, II, III) in cadmium-transfer from uterus-placenta to fetus.  
The Toxicologist Supplement to Toxicological Sciences, 398, 2007.
5. Ohba K, Okawa Y, Matsumoto Y, Nakamura Y, Ohta H: A study of investigation of cadmium genotoxicity in rat bone cells using DNA microarray.  
J Toxicol Sci, 32:107~109, 2007.
- 6. Ohba K, Okawa Y, Matsumoto Y, Nakamura Y, Ohta H: Transcriptome analysis of rat kidney cells continuously exposed to cadmium using DNA microarray.  
J Toxicol Sci, 32:103~105, 2007.

- 7. 太田久吉、中村康宏、大川陽平、大場謙一、大森義文：低濃度カドミウム摂取の母体骨代謝に及ぼす影響と母仔間移行。  
生物物理化学、50:59～65, 2006.
8. 大川陽平、太田久吉、中村康宏：ラットを用いたカドミウム投与実験によるヒトにおける耐用1日摂取量の推定。  
Biomed Res Treace Elements、15:367～369, 2004.
- 9. 中村康宏、大川陽平、前島 幸、中川妙子、太田久吉：カドミウム摂取による精巢中メタロチオネイン量と mRNA 発現量の変動。  
Biomed Res Treace Elements、15:284～285, 2004.
10. 太田久吉、前島 幸、中川妙子、中村康宏、大森義文、佐野 弘：低濃度摂取カドミウムの腸管吸収と体内蓄積指標の実験的検討。  
Biomed Res Treace Elements、14:344～346, 2003.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

(IV) -1. 学会誌(国際学会発表)

1. Ohta H , Inaba C , Nakamura Y , Fukase Y , Tsugami H , Ohba K : Role of metallothionein and metal transporters on cadmium transport from mother to

fetus in rat.

The 6th International Congress of Asia Society of Toxicology 2012 July, in Sendai, JAPAN.

J Toxicol Sci , 37:S378,2012.

2. Ohta H , Nakamura Y , Ohba K: Role of metallothionein and participation of metal transporters in the molecular transportation mechanism in placenta.

9th International Society of Trace Element Research in Humans 2011 October, in Antalya, TURKEY.

J Trace Elem Med Biol, Supplement:26S1,28,2011.

3. Ohta H , Nakamura Y , Ohkawa Y , Ohmori Y , Suzuki K: Maternal-to-fetal cadmium transfer and its effects on trace element regulation in the reproductive organs of female rats.

8th International Society for Trace Element Research in Humans 2007 October, in Crete, GREECE.

Cell Biol Toxicol 24, Supplement:No.1 S94-95,2008.

4. Ohta H , Ohkawa Y , Nakamura Y , Kondo Y , Aikawa H: Cadmium Transport from Mother Rat to Fetus and Newborn Rats and Participation of Metallothionein.

5th International Conference on Metallothionein 2005 October, in Beijing, CHINA.  
学会抄録集:17,2005.

5. Ohta H , Nakamura Y , Ohkawa Y , Ohmori Y , Sano H: Low-level cadmium intake together with lactation modulate bone metabolism and renal function in mother rats.

7th International Society for Trace Element Research in Humans 2004 November, in Bangkok, THAILAND.



J Trace Elem Exp Med , 17:231,2004.

6. Nakamura Y, Ohkawa Y , Ohta H: Adverse effect of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to newborn rats. 7th International Society for Trace Element Research in Humans 2004 November, in Bangkok, THAILAND.

J Trace Elem Exp Med , 17, 241~242, 2004.

(IV) -2. 学会誌(国内学会発表)

1. 大場謙一、深瀬陽平、津上尚士、中村康宏、太田久吉：女性における血液中汚染元素と骨代謝関連遺伝子との関係.

第 23 回日本微量元素学会学術集会 2012 年 7 月 東京.

Biomed Res Trace Elements, 23:167, 2012.

2. 大場謙一、中村康宏、太田久吉:カドミウム長期経口投与によるラットゲノム DNA のメチル化についての研究.

第 85 回日本産業衛生学会 2012 年 5 月 名古屋.

産業衛生学雑誌、54 臨時増刊号:528, 2012.

3. 大場謙一、中村康宏、太田久吉:ラット肝臓のカドミウム輸送における亜鉛輸送体の役割について.

第 84 回日本産業衛生学会 2011 年 5 月 東京.

産業衛生学雑誌、53 臨時増刊号 : 407, 2011.

4. 太田久吉、稲葉千晶、須田晴香、中村康宏、大場謙一：カドミウムの母胎仔間移行と必須元素の変動.

第 81 回日本衛生学会学術総会 2011 年 3 月 東京.

- 日本衛生学雑誌、66 : 467, 2011.
5. 太田久吉、稲葉千晶、須田晴香、中村康宏、大場謙一：女性の骨密度と血液中汚染元素の関係.
- 第 21 回日本微量元素学会 2010 年 7 月 京都.
- Biomed Res Trace Elements、21 : 139, 2010.
6. 太田久吉、中村康宏、大場謙一：カドミウムの母仔間移行におけるメタロチオネインと金属トランスポーターの役割.
- 第 37 回日本トキシコロジー学会 2010 年 6 月 沖縄.
7. 大場謙一、中村康宏、大森義文、太田久吉：婦人健診におけるエストロゲンレセプター $\alpha$ とオステオプロテグリン遺伝子多型と骨強度についての研究.
- 第 83 回日本産業衛生学会 2010 年 5 月 福井.
- 産業衛生学雑誌、52 臨時増刊号 : 495, 2010.
8. 太田久吉、中村康宏、大場謙一：カドミウムの母仔間移行における金属トランスポーターの関与.
- 第 80 回日本衛生学会 2010 年 5 月 仙台.
- 日本衛生学雑誌、65:359, 2010.
9. 大場謙一、松本由紀、中村康宏、大森義文、太田久吉：婦人健診における骨強度評価としてオステオプロテグリン遺伝子の多型検査.
- 第 82 回日本産業衛生学会 2009 年 5 月 福岡.
- 産業衛生学雑誌、51 巻臨時増刊号:813, 2009.
10. 太田久吉、山本小弥香、竹俣 葵、中村康宏、大森義文：哺乳とカドミウム摂取負荷による母体骨代謝障害の回復に関する研究.
- 第 79 回日本衛生学会 2009 年 3 月 東京.

日本衛生学雑誌、64:582, 2009.

- 1 1. 太田久吉、松本由紀、山本小弥香、竹俣 葵、中村康宏、大場謙一：カドミウム摂取により低下した母体骨密度の回復について。  
第 19 回日本微量元素学会 2008 年 7 月 東京。  
Biomed Res Trace Elements, 19:181, 2008.
- 1 2. 大場謙一、松本由紀、中村康宏、大森義文、太田久吉：婦人健診時の骨強度評価としての遺伝子多型検査。  
第 81 回日本産業衛生学会 2008 年 6 月 札幌。  
産業衛生学雑誌、50 巻臨時増刊号：CD-ROM 収録のためページなし, 2008.
- 1 3. 太田久吉、松本由紀、中村康宏、大場謙一、大森義文：婦人健診における骨密度と血中元素並びに生活習慣の関係。  
第 81 回日本産業衛生学会 2008 年 5 月 札幌。  
産業衛生学雑誌、50 巻臨時増刊号：CD-ROM に収録, 2008.
- 1 4. 太田久吉、中村康宏、松本由紀：カドミウム耐用（容）摂取量推定の試み。  
第 78 回日本衛生学会 2008 年 3 月 熊本。  
日本衛生学雑誌、63:576, 2008.
- 1 5. 太田久吉、大川陽平、松本由紀、中村康宏、大森義文、大場謙一、他：カドミウムの母仔間移行と胎盤と新生児ラットの微量元素の分布変動。  
第 18 回日本微量元素学会 2007 年 7 月 福井。  
Biomed Res Trace Elements, 18:178, 2007.
- 1 6. 太田久吉、松本由紀、中村康宏、大森義文、大場謙一：低濃度カドミウム摂取の母体骨代謝障害の回復に関する検討  
第 80 回日本産業衛生学会総会 2007 年 5 月 大阪。

産業衛生学雑誌、49 巻臨時増刊号：CD-ROM 収録のためページなし, 2007.

17. 大川陽平、中村康宏、太田久吉：カドミウムの母子間移行と胎盤におけるメタロチオネインの役割.

第 16 回日本微量元素学会 平成 17 年 6 月 30 日、7 月 1 日 京都

Biomed Res Trace Elements, 16:131, 2005.

18. 中村康宏、大川陽平、前島 幸、中川妙子、太田久吉：カドミウムの母仔間移行に関するメタロチオネインの役割.

第 75 回日本衛生学会総会 平成 17 年 3 月 新潟.

日本衛生学雑誌、60:249, 2005

19. 中村康宏、太田久吉、前島 幸、中川妙子：カドミウムの母仔間移行とメタロチオネインの関与.

第 74 回日本衛生学会総会 平成 16 年 3 月 東京

日本衛生学雑誌、59:155, 2004.

20. Nakamura Y , Maejima Y , Nakagawa T , Ohta H: Toxic effects to newborn rats by low-level cadmium intake of mother rats.

第 31 回日本トキシコロジー学会 平成 16 年 7 月 大阪.

J Toxicol Sci 29:461, 2004.

21. 中川妙子、太田久吉、前島 幸、中村康宏：慢性カドミウム（Cd）摂取と妊娠負荷による骨代謝関連ホルモンへの影響.

第 74 回日本衛生学会総会 平成 16 年 3 月 東京.

日本衛生学雑誌、59:152, 2004.

22. 前島 幸、太田久吉、中川妙子、中村康宏：母親ラットの慢性 Cd 曝露による仔ラットの生態影響.

第74回日本衛生学会総会 平成16年3月 東京.

日本衛生学雑誌、59:153, 2004.

10. 圖表

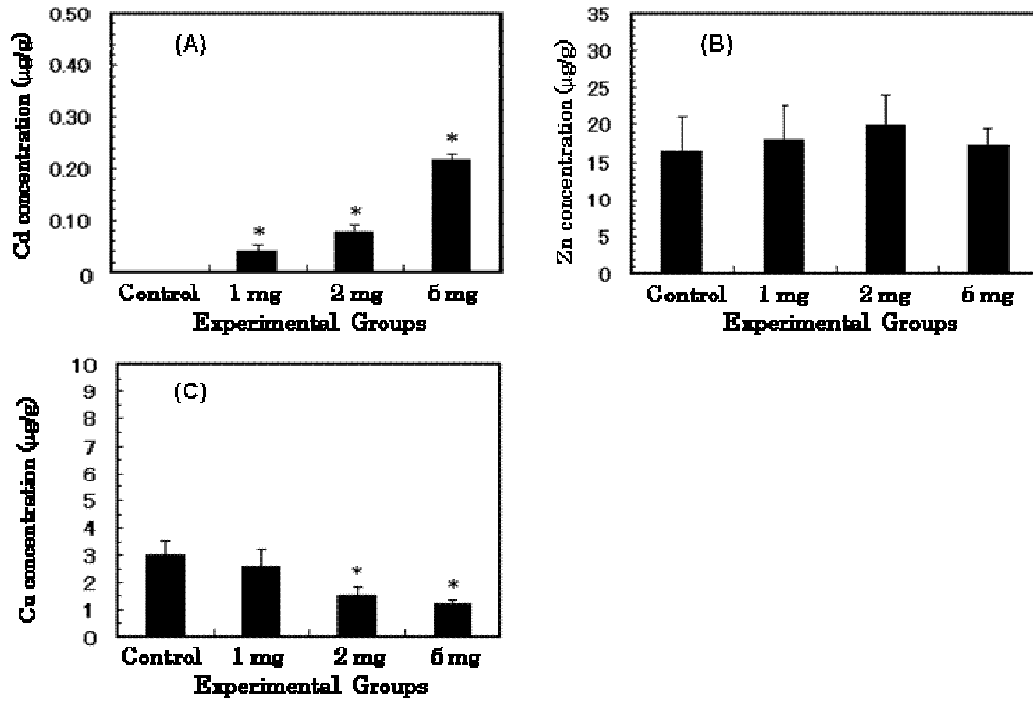


Figure 1.

Concentrations of cadmium (A), zinc (B), and copper (C) in the uterus of mother rats.

\* significantly different from control group, (n = 5,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

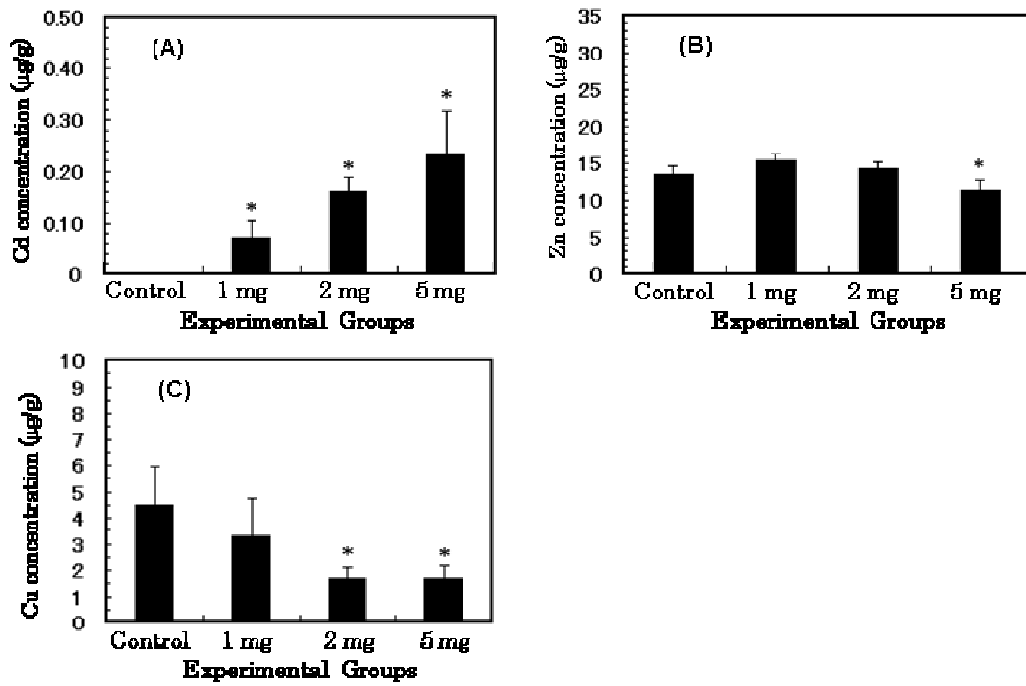


Figure 2.

Concentrations of cadmium (A), zinc (B), and copper (C) in the placenta of mother rats

\* significantly different from control group, ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

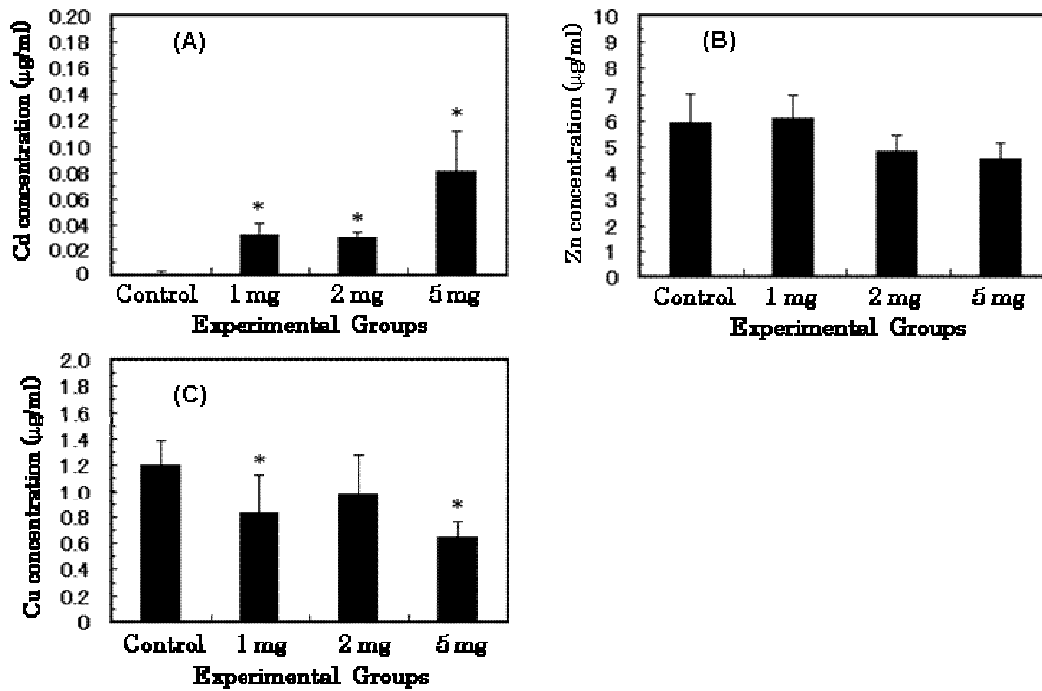


Figure 3.

Concentrations of cadmium (A), zinc (B), and copper (C) in the blood of mother rats.

\* significantly different from control group, ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).



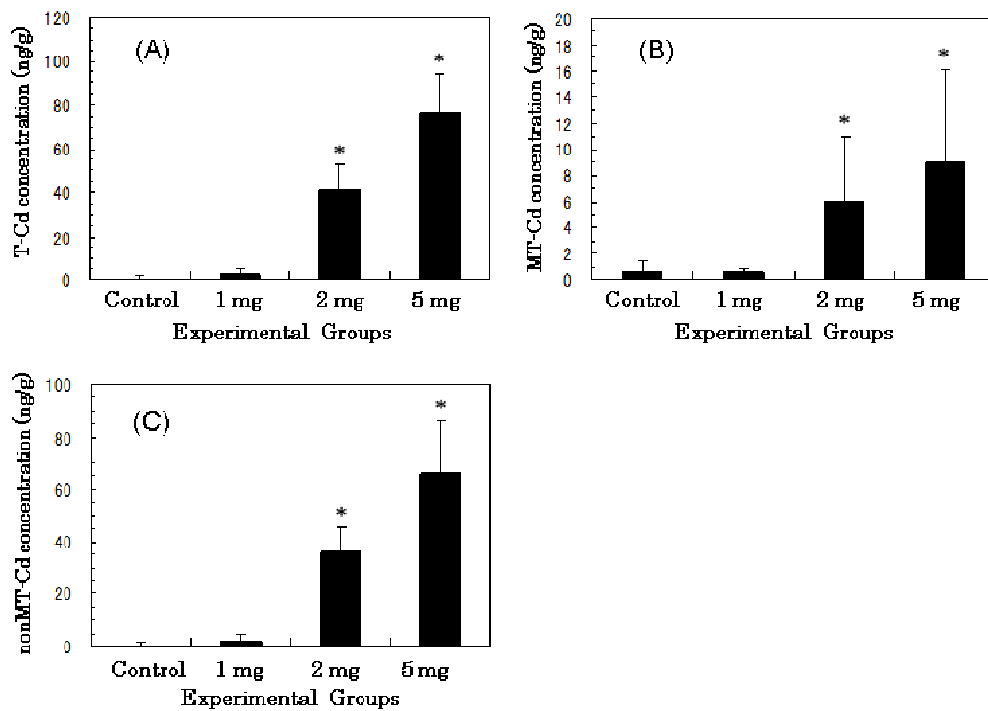


Figure 4.

Cadmium concentration in the uterus. Cadmium concentration in supernatant fraction (T-Cd) (A), concentration of cadmium bound by metallothionein in the supernatant fraction (MT-Cd) (B), concentration of cadmium not bound by metallothionein in the supernatant fraction (nonMT-Cd) (C).

\* significantly different from control group, (n = 5,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

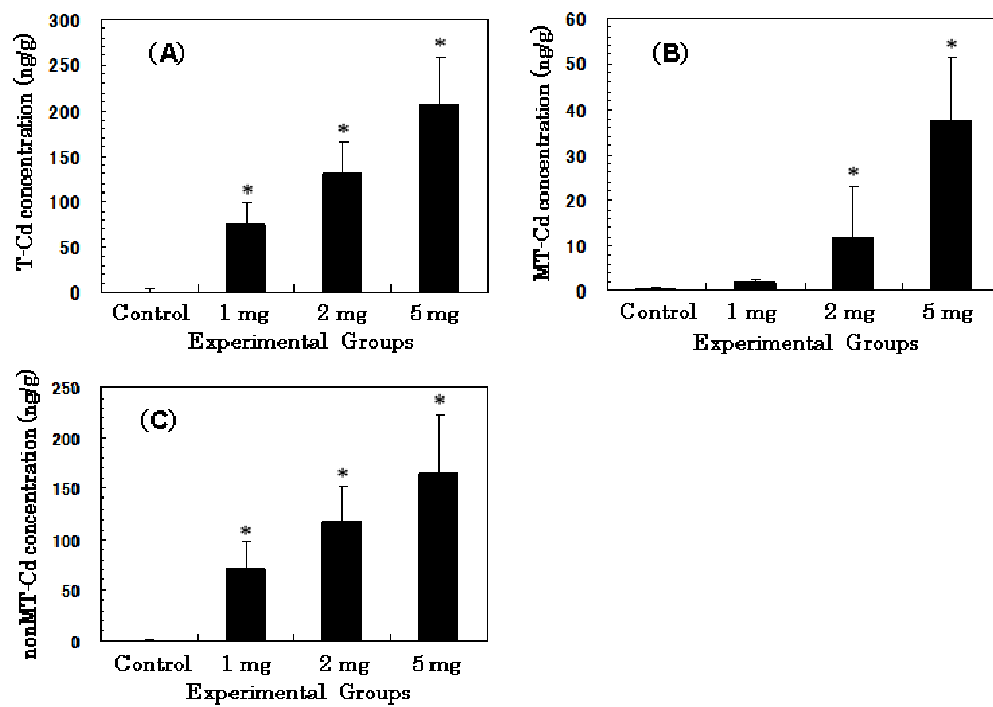


Figure 5.

Cadmium concentration in the placenta. Cadmium concentration in supernatant fraction (T-Cd) (A), concentration of cadmium bound by metallothionein in the supernatant fraction (MT-Cd) (B), concentration of cadmium not bound by metallothionein in the supernatant fraction (nonMT-Cd) (C).

\* significantly different from control group, (n = 5,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

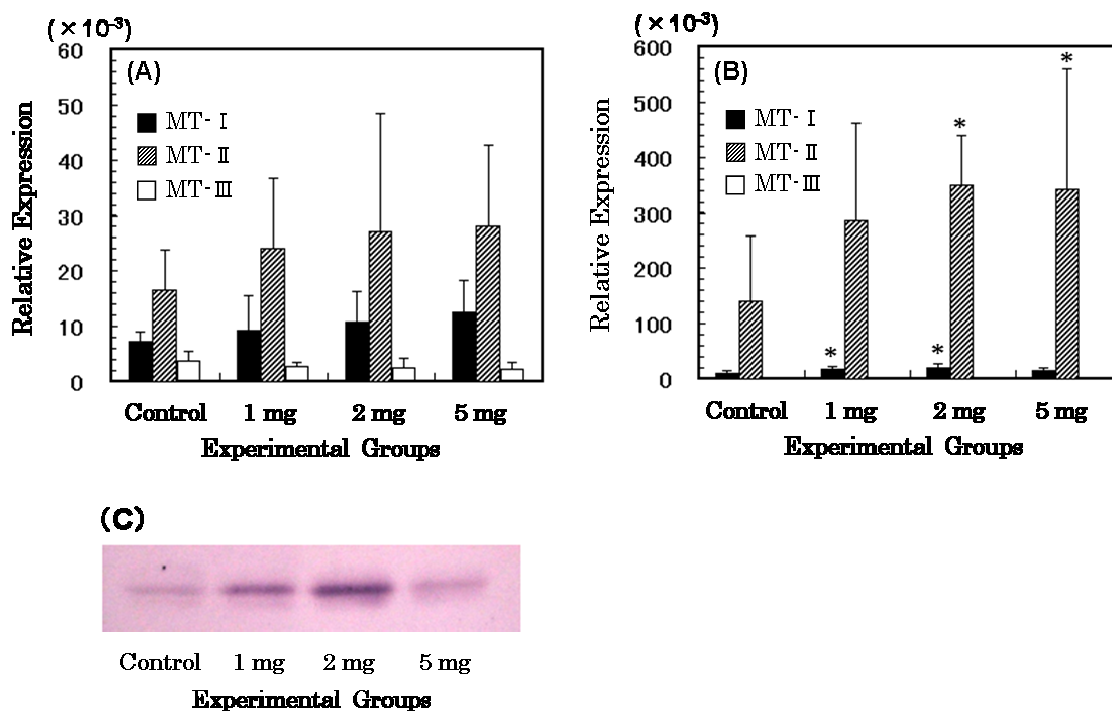


Figure 6.

Relative expression of metallothionein genes in the uterus (A) and placenta (B) of mother rats. Result of immunoblotting for the uterus using anti-metal-binding protein (metallothionein) antibodies (C).

\* significantly different from control group, ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

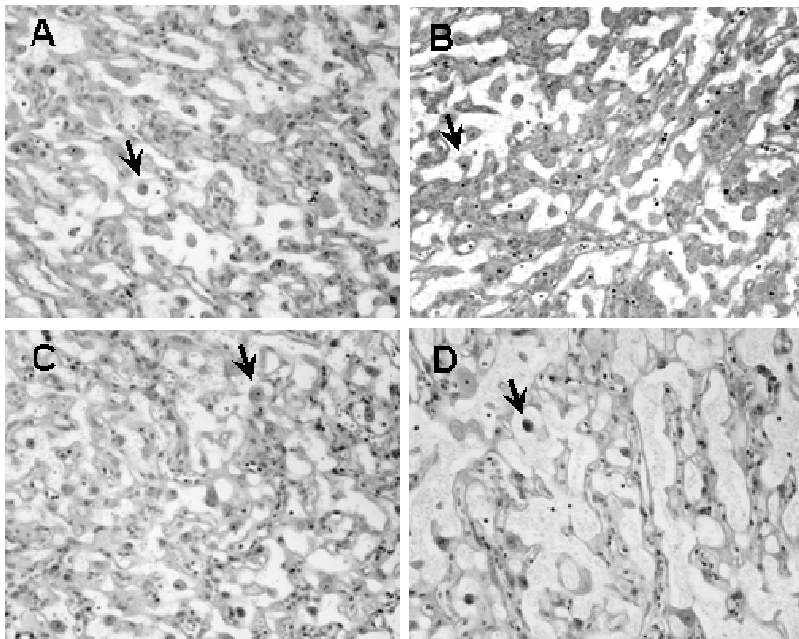


Figure 7.

Metallothionein localization in placental tissue after oral cadmium administration (immunohistochemical stain, original magnification  $\times 200$ ). Arrows indicate positive metallothionein staining in placental syncytiotrophoblast cells.

Experimental groups; A= Control, B= 1 mgCd/kg, C= 2 mgCd/kg, D= 5 mgCd/kg.

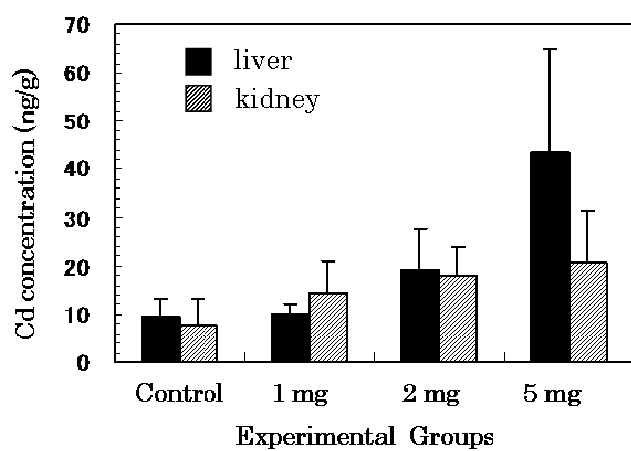


Figure 8.

Cadmium concentration in liver and in kidney of new born rat at first day after birth.

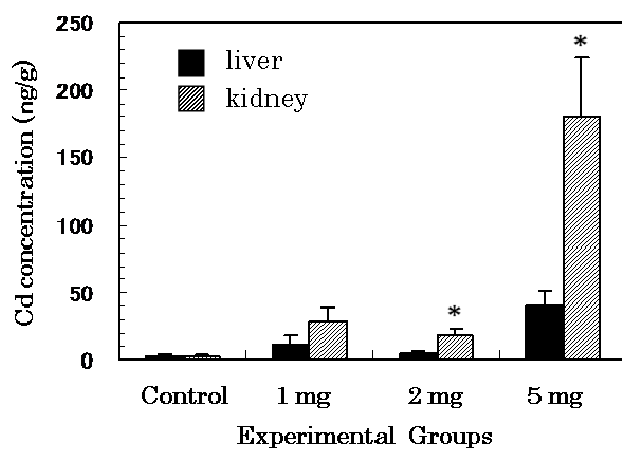


Figure 9.

Cadmium concentration in liver and in kidney of new born rat at the 28th day after birth.

\* significantly different from control group, (n = 4,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

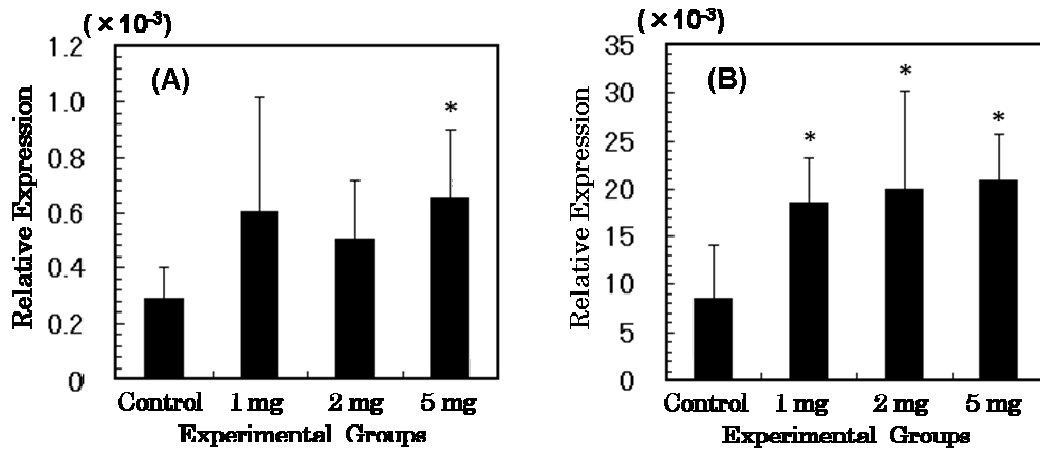


Figure 10.

Relative expression of the DMT1 gene in the uterus (A) and placenta (B) of mother rats.

\* significantly different from control group, (n = 5,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

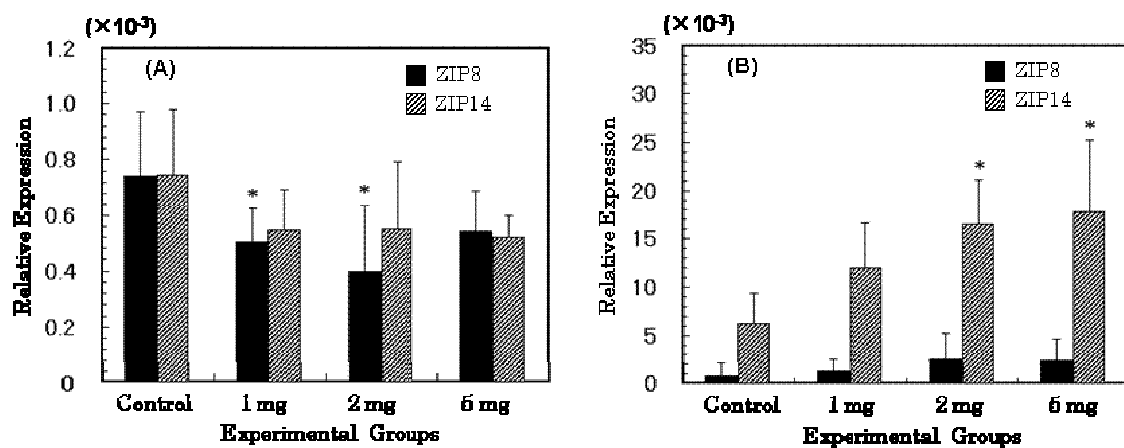


Figure 11.

Relative expression of ZIP family genes in the uterus (A) and placenta (B) of mother rats.

\* significantly different from control group, ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).



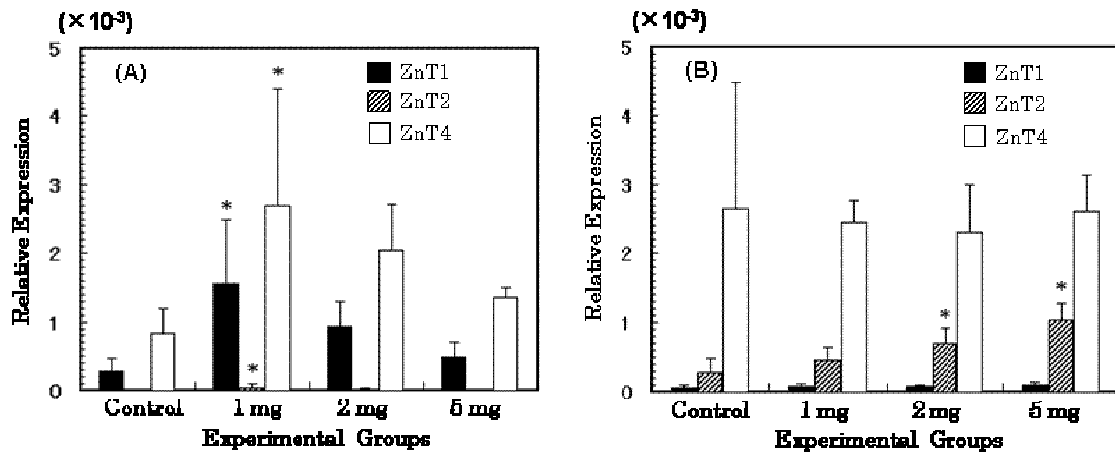


Figure 12.

Relative expression of ZnT family genes in the uterus (A) and placenta (B) of mother rats.

\* significantly different from control group, ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$  via ANOVA and Fisher's PLSD).

Table 1. Sense and antisense primer sequences for real time PCR measurements.

Gene		Primer sequence
MT-I	sense	5'-ATG GAC CCC AAC TGC TCC TGC TCC ACC-3'
	antisense	5'-TCA GGC ACA GCA CGT GCA CTT GTC-3'
MT-II	sense	5'-ATG GAC CCC AAC TGC TCC TGT GCC ACA-3'
	antisense	5'-TCA GGC GCA GCA GCT GCA CTT GTC-3'
MT-III	sense	5'-ATG GAC CCT GAG ACC TGC CCC-3'
	antisense	5'-TCA CTG GCA GCA GCT GCA TTT C-3'
DMT1	sense	5'-CAA CTC TAC CCT GGC TGT GG-3'
	antisense	5'-TCC TCC AGC CTA TTC CGT TG-3'
ZIP8	sense	5'-ACA CAT CCA CTT CGA CAC TG-3'
	antisense	5'-ACA GAG CGT GAT CAT CCA AG-3'
ZIP14	sense	5'-AAC GCT ACG GAG AGA ATG AC-3'
	antisense	5'-AAC CCA ATA CGA GAT CGC TC-3'
ZnT1	sense	5'-CCC AGC TTC ATA CAT GCA GGT G-3'
	antisense	5'-CCT TGC TCT CCC CTA TAT GCT C-3'
ZnT2	sense	5'-GAA CCT GCC CTC TGT TGA ACT G-3'
	antisense	5'-AAC ATG GTG TCC CCT TTG ATC TC-3'
ZnT4	sense	5'-GAT CGG AGA GCT TGT AGG TGG ATA C-3'
	antisense	5'-TCG GAG AAT TTG AAG GTA GGG AG-3'