

学 位 論 文 題 名

Studies on Cadmium Transfer to Eggs
from Hens Exposed to Cadmium

（カドミウム投与母鶏の卵へのカドミウム移行に関する研究）

学位論文内容の要旨

カドミウムは、水銀や亜鉛と同じく、周期律表IIB族に属する遷移金属で、イタイイタイ病の原因物質として擬せられて以来、環境汚染物質として注目されて続けている。

胎生動物の母体がカドミウムに曝露されると、その胎盤にカドミウムが蓄積し、母体から胎児への移行は阻止されることが知られている。たとえば、ヒトでは、胎児の肝臓のカドミウム濃度は低く、母親の肝臓の約1000分の1にあたるといわれている。また、ラットをはじめマウス、ウサギなどの妊娠中の母体にカドミウムを投与すると、それらの胎盤にカドミウムが蓄積し、胎児へのカドミウムの移行は認められなかったという報告がなされている。一方、これら胎生の動物と比較して、鳥類などの卵生の動物では、カドミウムに曝露された母体から卵へカドミウムの移行に関する報告は、ほとんどない。本研究の目的は、カドミウムを投与した母鶏から卵へカドミウムが移行するか否かを明らかにすることである。

方法を述べる。産卵期にあるニワトリに、異なる量のカドミウムを2日ごとに1～6回腹腔内投与し、最終投与の1日後あるいは、再度、産卵開始後に屠殺した。対照群として、生理的食塩水を投与した。投与後、産まれた卵を集め、血液を採取し、屠殺して肝臓と卵巣の卵胞を摘出した。卵胞は卵胞壁と卵胞卵黄に、また、産まれた卵は卵黄と卵白に分けた。試料を湿式灰化し、そのカドミウム濃度を原子吸光法により定量した。卵胞壁および肝臓のメタロチオネインは、ゲル濾過法および陰イオン交換法を用いて精製し、アミノ酸組成と紫外吸収スペクトルを調べ、同定した。また、ニワトリ受精卵の卵黄にカドミウムを投与後、胚発生を孵化まで観察し、生存数を求め、カドミウムの胚発生・孵化への影響を検討した。

結果を以下に述べる。

1) 血液および肝臓のカドミウム濃度

母体が、どの程度カドミウム曝露を受けたかを調べるために、血液と標的臓器のひとつである肝臓のカドミウム濃度を測定した。その結果、カドミウム投与量の増加に応じ、血液および肝臓のカドミウム濃度は、増加した。肝臓のカドミウム量は、総投与量の40～50%を占めていた。このことから、カドミウムは母体の肝臓に多量蓄積し、さらに一部は血液を介して母体内を循環していることが示された。

2) 卵胞の卵黄と卵胞壁のカドミウム濃度

生殖器官のひとつである卵胞(卵胞壁と卵胞卵黄)では、卵黄物質は卵胞壁を介して蓄積することが知られているので、卵胞壁と卵胞卵黄にカドミウムが蓄積するかどうかを調べた。その結果、投与量に応じて卵胞壁のカドミウム濃度は、肝臓中の濃度と同様に、増加していることが認められた。一方、卵胞卵黄にもカドミウムは、少量蓄積している傾向がみられ、その濃度は血液より低かった。これらのことから、卵胞卵黄においてカドミウム濃度が低いのは、カドミウムに対する親和性が低いのか、あるいは、卵胞壁は、カドミウムが卵胞卵黄へ透過しにくいバリアである可能性が示唆された。

3) 卵胞壁・肝臓のカドミウム結合成分

卵胞壁は肝臓に対してカドミウム濃度比で約10%を占めたので、カドミウムが卵胞壁でどのような生体成分と結合しているかを調べた。卵胞壁の可溶性画分に全体の約70%のカドミウムが見いだされたので、これを出発材料としてカドミウムと結合している生体成分を精製し、同定した。この成分は、低分子量タンパク質であり、27モル%という高いシステイン含量を有していた。また、次に多いアミノ酸としてリジン、セリンが認められたこと、フェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸はほとんど含まれていないことが明らかになった。この結合成分の吸収スペクトルでは、中性域のpHで245~255 nmの範囲にかけて肩をもち、これを酸性条件下にすると、その肩が明らかに消失していることが認められた。この現象は、VasakとKägiの解析により、カドミウムがシステイン残基のSH基を介して結合していることを示していた。これらの結果から、肝臓の場合と同様に、卵胞壁から得られたカドミウム結合成分は、メタロチオネイン(重金属結合低分子量タンパク質)であることが明らかになった。

4) カドミウム投与後の産卵の停止

カドミウムを多量投与後、産卵の停止が認められた。卵胞卵黄は卵として形成されず、母体内でなんらかの形で、吸収されているか、あるいは、退行していることが考えられた。

5) 産まれた卵のカドミウム濃度

一方、産まれた卵へカドミウムは移行しているかどうかを検討した。その結果、卵黄のカドミウム濃度は、0.04 $\mu\text{g/g}$ 湿重量 以下であった。卵白では検出限界以下であった。

また、産卵停止したのち、再び産みはじめた卵の卵黄では、カドミウム濃度は、0.02~0.03 $\mu\text{g/g}$ 湿重量という範囲の値であった。このことは、母体から産まれた卵へのカドミウムの移行が制限されることを示していた。

6) カドミウムの胚発生・孵化に対する影響

産まれた卵に検出されたカドミウムは、胚発生・孵化にどのような影響を与えるかを評価するために、産まれた卵の卵黄に含まれていたカドミウム量に相当するカドミウム量をニワトリ受精卵の卵黄に投与した。その生存数は、生理的食塩水投与群に対して、ほとんど変わらなかった。一方、これより多い量を投与した群では、孵化日数とともに、生存数は著しく減少した。このことより、産まれた卵に含まれたカドミウム量は、胚発生・孵化に影響を与えないことが明らかになった。

本研究をまとめると、胎生動物における胎児(仔)へのカドミウムの移行の制限と同様に、卵生動物の一種、すなわちニワトリの母体から卵へのカドミウムの移行が制限されるという結論を得た。カドミウムが、母体の肝臓にあるいは、卵胞の卵胞壁に蓄積することにより、卵への移行は制限されている可能性が考えられた。さらに、様々な機構が考えられるが、肝臓の場合と同様に、卵胞壁で見いだされたメタロチオネインがカドミウムを捕捉することにより卵胞卵黄への移行の制限を担っている可能性も考えられた。本結果から、これらの可能性を特定することは、今後の課題として残されるが、ニワトリの母体から卵へ

のカドミウムの移行が制限されることを明確にした点に本研究の特色がある。

過去、飼料中のカドミウムを摂取した産卵鶏の産卵率の低下、あるいは食卵中のカドミウム汚染の有無に関する研究がある。本研究では、新しい知見として、カドミウム投与した母鶏が産んだ卵のカドミウム濃度が低いこと、卵胞では、卵胞卵黄のカドミウム濃度は、卵胞壁より低いこと、産まれた卵の卵黄に含まれていたカドミウム量は、胚発生・孵化に影響を与えないこと、さらにカドミウムが蓄積した卵胞壁ではメタロチオネインが存在することを明らかにした点が挙げられる。

本研究は、母から子(仔)への重金属の移行の機構の解明に貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 島 豊
副 査 教 授 齋 藤 和 雄
副 査 教 授 保 原 喜志夫
副 査 助教授 井 上 勝 一
副 査 助教授 神 山 昭 男

学 位 論 文 題 名

Studies on Cadmium Transfer to Eggs from Hens Exposed to Cadmium

(カドミウム投与母鶏の卵へのカドミウム移行に関する研究)

環境汚染物質であるカドミウムが、胎生動物の母体に曝露されると、その胎盤にカドミウムが蓄積し、母体から胎児への移行が阻止されることが知られている。たとえば、ヒトでは、胎児の肝臓のカドミウム濃度は、母親の肝臓の濃度に比べ、非常に低いといわれている。また、ラット、マウス、ウサギなどの妊娠中の母体にカドミウムを投与すると、それらの胎盤にカドミウムが蓄積し、胎児へのカドミウムの移行は認められないという報告がなされている。これに対して、申請者は、鳥類などの卵生の母体から卵へのカドミウムの移行に関する研究を行ってきた。事実、卵へのカドミウムの移行およびそのメカニズムに関する研究は、ほとんどなされていなかった。本論文では、卵生動物の母体から卵へカドミウムが移行するか否かを明らかにすることを目的として、産卵期にあるニワトリに異なる量のカドミウムを投与し、その移行と機構に関して述べた。

申請者は、カドミウム投与後、産まれた卵を採取し、最終投与の1日後あるいは、再度、産卵開始後の母鶏を屠殺した。血液、肝臓および卵巣の卵胞を摘出し、卵胞を卵胞壁と卵胞卵黄に、また、産まれた卵を卵黄と卵白に分け、湿式灰化後、カドミウム濃度を原子吸光法により定量した。

カドミウム投与量の増加に応じ、母鶏の血液および肝臓のカドミウム濃度は増加した。また肝臓のカドミウム量は、総投与量の40～50%を占めていた。このことは、カドミウムは母体の肝臓に多量蓄積し、さらに、その一部は血液を介して母体内を循環していることを示していた。生殖器官のひとつである卵胞(卵胞壁と卵胞卵黄)では、卵黄物質は卵胞壁を介して蓄積することが知られている。申請者は、卵胞卵黄にカドミウムが蓄積するかどうかを検討した。投与量に応じて卵胞壁のカドミウム濃度は、肝臓中の濃度

と同様に、増加していることが認められた。一方、卵胞卵黄にもカドミウムは、少量蓄積している傾向がみられ、その濃度は血液より低かった。

次に、卵胞壁にカドミウムが蓄積していたので、申請者は、カドミウム結合生体成分をゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。この成分は、低分子量蛋白質であり、アミノ酸組成分析の結果から高いシステイン含量を有していることが明らかになった。紫外部吸収スペクトルは、中性条件下において245～255nmに肩を示し、酸性条件下では、その肩は消失した。これらのことから、申請者は、肝臓の場合と同様に、卵胞壁でも、カドミウム結合成分はメタロチオネイン(重金属結合低分子量蛋白質)であることを明らかにした。

一方、カドミウムに多量曝露された母鶏では、産卵の停止が認められた。卵胞卵黄は卵として形成されず、母体内でなんらかの形で、吸収されているか、あるいは退行していることが考えられた。これに対して、産まれた卵の卵黄のカドミウム濃度は、 $0.04 \mu\text{g/g}$ 湿重量以下であった。卵白では、検出限界以下であった。また、産卵停止したのち、再び産みはじめた卵の卵黄では、カドミウム濃度は、 $0.02 \sim 0.03 \mu\text{g/g}$ 湿重量という範囲の値であった。これらの事実は、母体から産まれた卵へのカドミウムの移行が、制限されていることを示している。また、カドミウムを受精卵の卵黄に投与したところ、産まれた卵の卵黄中のカドミウム濃度では、胚発生・孵化に影響を与えないことを証明した。

以上のように申請者は、胎生動物における胎児(仔)へのカドミウムの移行の制限と同様に、卵生動物の一種、すなわちニワトリの母体から卵へのカドミウムの移行が制限されることを証明した。過去、飼料中のカドミウムを摂取した産卵鶏の産卵率の低下、あるいは食卵中のカドミウム汚染の有無に関する研究はあった。これに対して、本論文では新しい知見として、カドミウム投与した母鶏が産んだ卵のカドミウム濃度が低いこと、卵胞では卵胞卵黄のカドミウム濃度は卵胞壁より低いこと、産まれた卵の卵黄に含まれていたカドミウム量では胚発生・孵化に影響を与えないこと、さらにカドミウムが蓄積した卵胞壁ではメタロチオネインが存在することを明らかにした点が挙げられる。本研究は、母から子(児・仔)への重金属の移行の機構の解明に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士(環境科学)の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。