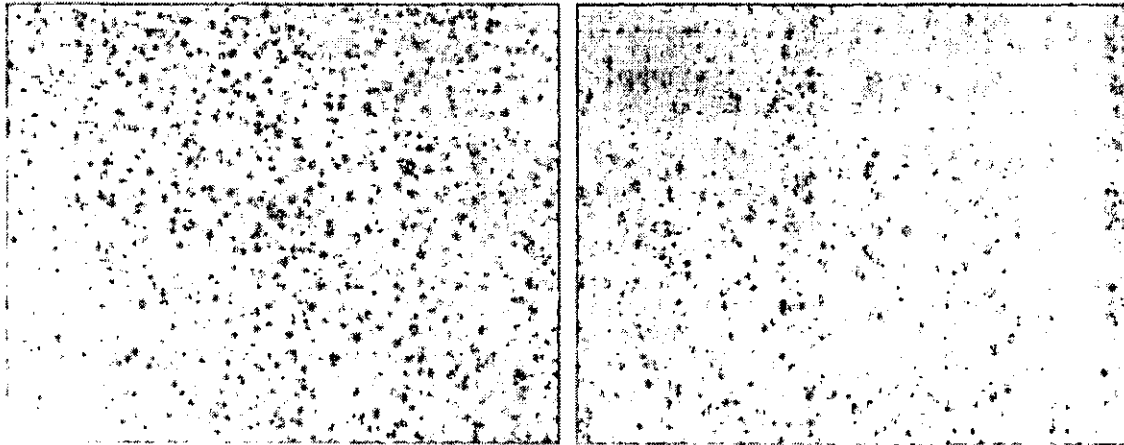
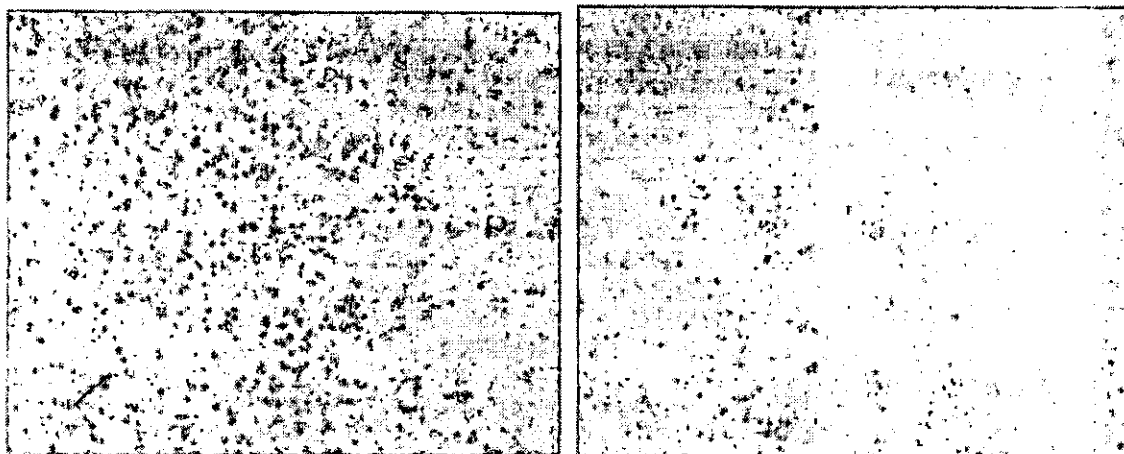


図 3. HE 染色の結果



MT wild、対照群、HE 染色

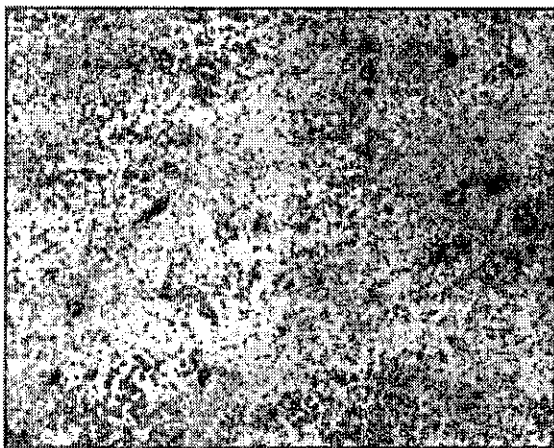
MT wild、曝露群、HE 染色



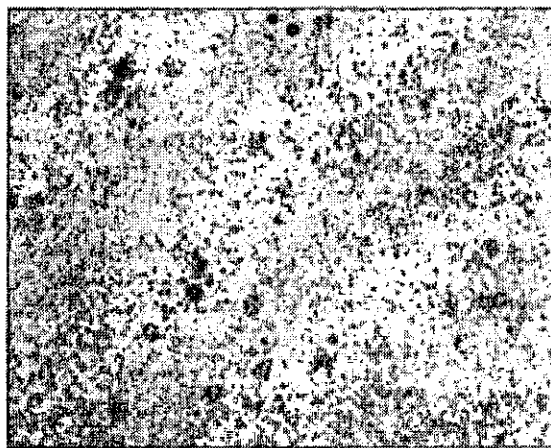
MT KO、対照群、HE 染色

MT KO、曝露群、HE 染色

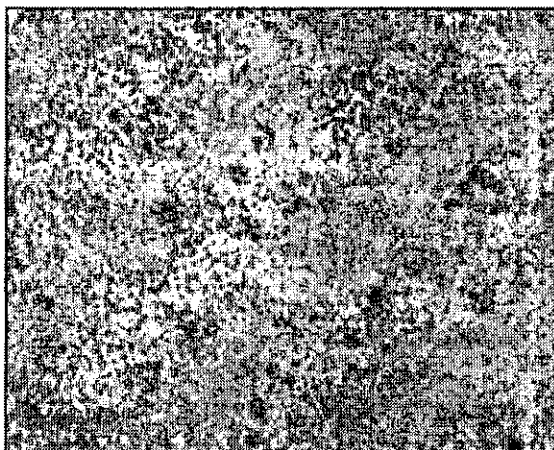
図4. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出



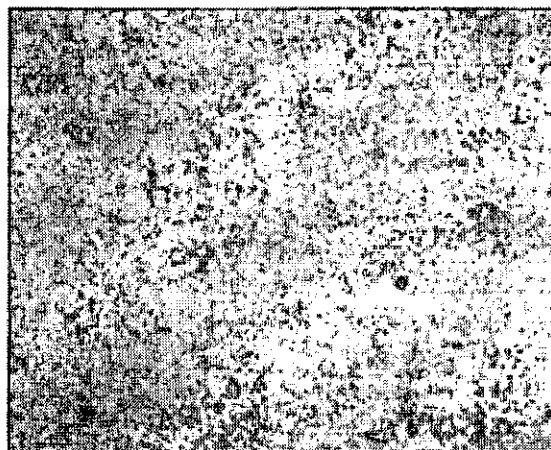
MT wild、対照群、TUNEL 法



MT wild、曝露群、TUNEL 法



MT KO、対照群、TUNEL 法



MT KO、曝露群、TUNEL 法

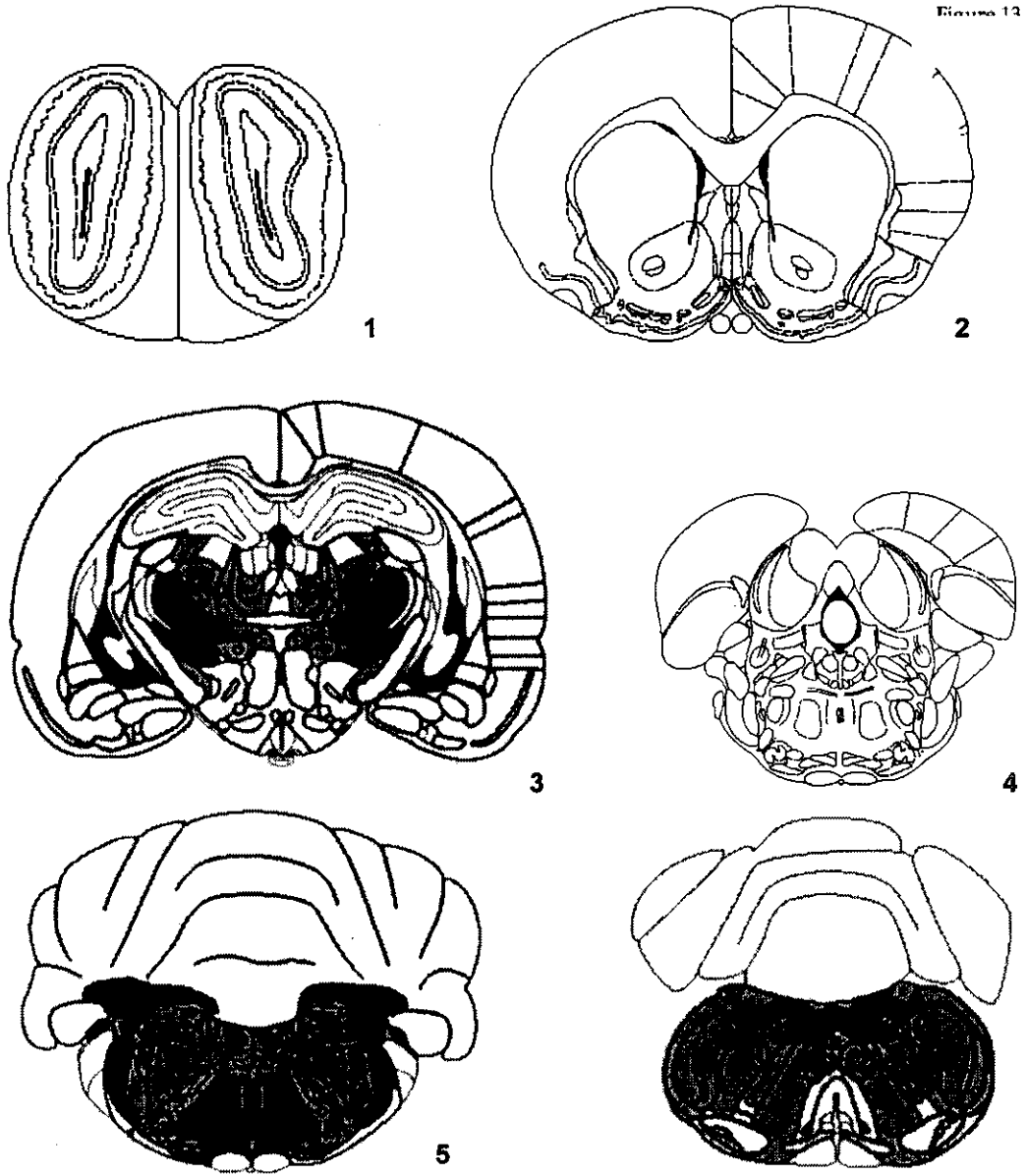
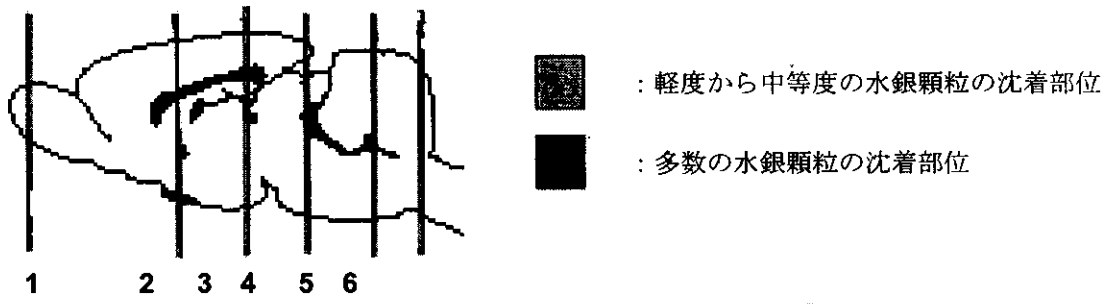


図5. MT *wild* マウスの脳における水銀顆粒の沈着の分布

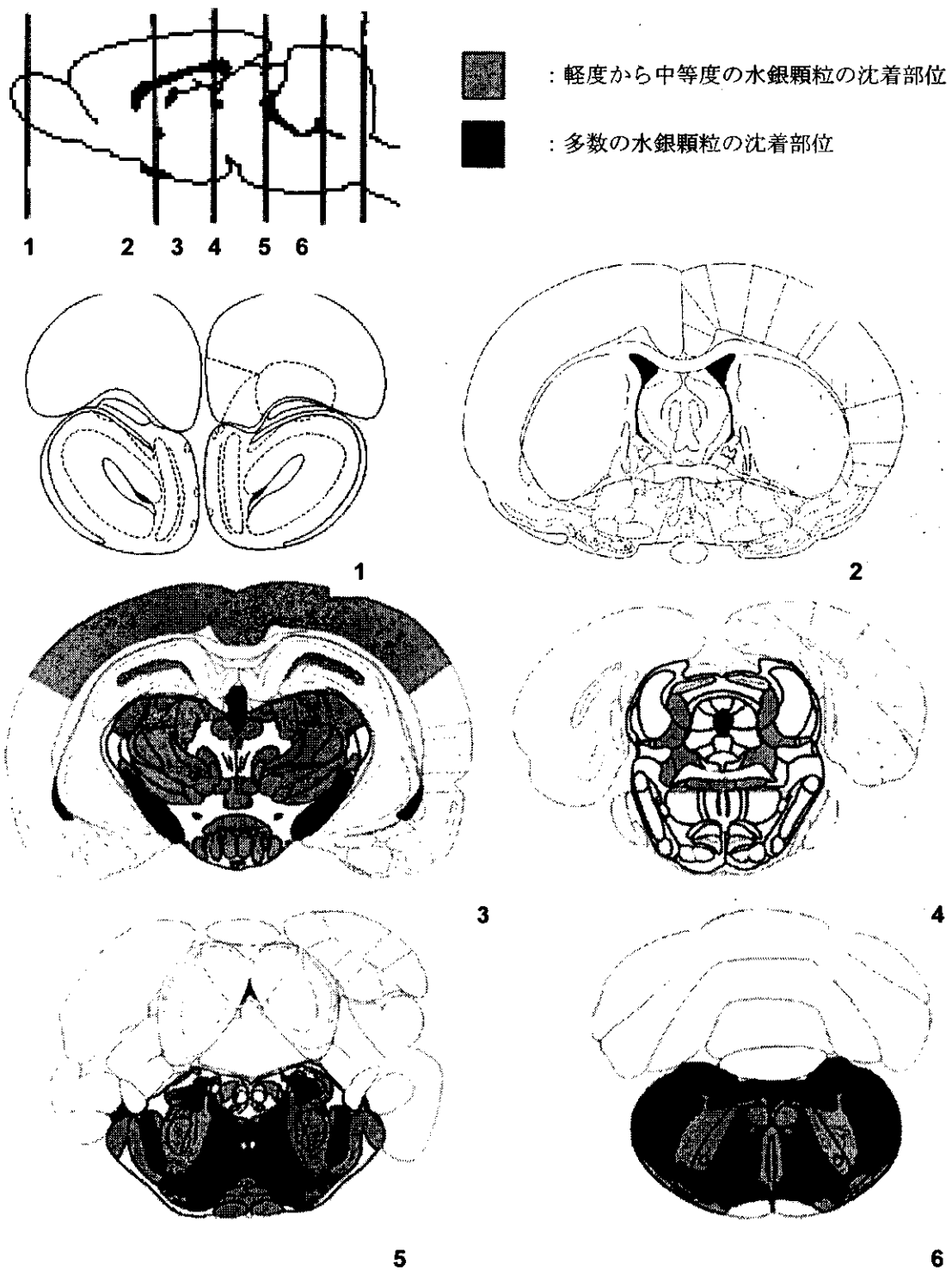


図6. MT 欠損 マウスの脳における水銀顆粒の沈着の分布

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

水銀あるいはカドミウムへの周生期曝露に対する

生理的感受性要因（甲状腺ホルモン系）に関する研究

分担研究者 吉田克己 東北大学大学院医学系研究科内分泌学助教授

研究要旨：甲状腺ホルモンは、発達期の脳に必須のホルモンにあり、その制御が障害されると脳の分化・成熟に重大な影響を及ぼすため、甲状腺ホルモンの制御が不全な場合、胎生期重金属の神経毒性に感受性になる可能性がある。一方で甲状腺ホルモンの代謝に重要な役割を持つ、ヨードチロニン脱ヨード酵素は重金属と相互作用することが知られるセレンを含むタンパク質であり、水銀やカドミウムは、この酵素への影響を介して、甲状腺ホルモン環境に影響を与える可能性がある。これらの可能性を検討するのが本研究の目的であり、本年度は上記の酵素の胎仔から新生仔期にかけての変化と、新生仔期脳の酵素活性にこれらの金属が及ぼす *in vitro* での影響を検討した。

#### A. 研究目的

甲状腺ホルモンは、成体においてはエネルギー代謝の制御などに関連するが、発達期の脳においては、その分化などを制御する重要な因子であることが明らかになってきている。したがって、発達期にある脳に化学物質が与える影響を考える場合、甲状腺ホルモン系は、化学物質のターゲットとして、あるいは化学物質への感受性を修飾する要因として重要であると考えられる。

発達期にある脳は、循環血流からチロキシン (T4)を取り込み、組織で局所的にトリヨードチロニン (T3) を産生している。また、胎児期の甲状腺が未発達な段階においては、胎児は母体の甲状腺ホルモンに依存しており、母体側循環から胎児側循環への甲状腺ホルモンの移行は、胎盤において制御されている。これらのプロセスにはヨードチロニン脱ヨード酵素 (iodothyronine deiodinases) と呼ばれる酵素が関与しているが、この脱ヨード酵素には、タイプ1, 2, 3と

いう3種類のアイソザイムが知られており、それぞれ、基質特異性、組織局在、触媒反応に違いがある。タイプ1はトリヨードチロニンの5位、5'位のどちらの位置にあるヨードも遊離することができるが、主要な作用は5'位からの脱ヨード反応であり、これによって、例えばT4を基質とする場合、活性型のホルモンであるT3を生ずる。タイプ1は、肝・腎・甲状腺などをはじめ、多くの組織に分布している。発達期の脳を考える場合、母体循環血流中の甲状腺ホルモンのレベルを決める酵素として関連している。発達期の脳により直接に関連するのは、タイプ2とタイプ3である。タイプ2は5'位のみでの脱ヨード反応を触媒し、脳・下垂体・褐色脂肪細胞(BAT)に局在が見られる。血流中のT4を取り込み、局所的にT3を産生するのがその役割である。脳は血流中からT3を取り込むのではなく、こうして局所的に産生されたT3に依存している。タイプ3は、タイプ2とは逆に5位のみでの脱ヨード反応を起こすため、T4に作用した場合は、非活性型のreverseT3を生ずる。タイプ3は、胎児(胎仔)の各組織ならびに胎盤に発現している。発達中の組織にT3は必須であるものの、その量は厳密に制御されている必要があり、タイプ3の酵素は、胎児組織を過剰のT3から保護する作用を持つものと考えられている。

1990年代に入ってから、これらの酵素がいずれもセレン(selenium)を含むセレン酵素であることが明らかにされた。セレンは生体にとっての必須微量元素の一つであり、多くの生理作用を有するが、一方で重金属と相互作用し、その毒性を軽減する場合があることも知られている。例えば水銀については、過剰のセレンがその毒性を軽減し、逆にセレン欠乏状態では、無機水銀・有機水銀ともに毒性が増強されることが報告されている。こうした相互作用のメカニズムについて、無機水銀の場合、セレン-水銀が直接結合して毒性のない複合体を形成することが知られているが、有機水銀の場合にどのようなメカニズムで相互作用がおこるかは、明らかにはなっていない。我々は、水銀が代表的なセレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの活性を低下させることから、同じセレン酵素であるヨードチロニン脱ヨード酵素でもこうした活性阻害が起こることを考え、妊娠期のマウスについてメチル水銀を投与し、胎仔・胎盤におけるこれらの酵素活性を調べ、胎仔脳でのT3過剰が起こる可能性を指摘した[Watanabe et al. 1999]。逆に胎児期の甲状腺ホルモン環境が何らかの原因で正常レベルから外れるか、あるいはその境界値にあった場合、メチル水銀による脱ヨード酵素活性への影響が加わることにより、脳の発達に異常が起

こる可能性がある。

カドミウムもまたセレンと相互作用することが古くから知られているが、そのメカニズムはよくわかっていない。しかし、カドミウムが発達期の脳に何らかの影響を与えるならば、甲状腺ホルモン環境への影響は無視できない。

マウス、ラットでは、脳の発育は人間よりも遅い時期に critical point を迎え、妊娠後期から新生児期が最も重要とされている。この中で、最も甲状腺ホルモンが必要とされる時期は生後 2 週目ぐらいである。例えば小脳は層状構造を作っているが、新生児期、特に生後 1 週から 2 週にかけて十分量の甲状腺ホルモンが供給されないと、各層を構成する細胞の適正な位置への移動が起こらないまま小脳の発育が止まってしまうことが報告されている。従ってこの頃までに必要量の T3 が脳に供給されるメカニズムが確立されている必要がある。こうしたメカニズムの中で最も重要なものがタイプ 2 の脱ヨード酵素であり、このタイプ 2 活性は新生児期にピークを迎えたとされている。

一方胎児期においては、甲状腺ホルモンの需要は低く抑えられており、必要量以上の甲状腺ホルモンの供給はかえって有害と考えられている。胎児期および新生児期のはじめは甲状腺ホルモンの不活性化反応を触媒するタイプ 3 型酵素の活性が高く、生後 1 ヶ月くらいで adult のレベルまで活性が低下するとされている。

本研究では、こうした胎仔・新生仔期における甲状腺ホルモン環境の修飾がこれら重金属の毒性に及ぼす影響を調べる一方で、甲状腺ホルモン環境を制御するこれらセレン酵素への影響を調べることが最終的な目的であるが、初年度は発達に伴うこれら酵素活性の変化を *in vivo* で確認するとともに、各金属による *in vitro* における酵素活性への影響を検討した。

## B. 研究方法

*in vivo*: 妊娠 10 日目の C57BL/6J マウスを購入し、在胎 14-17 日および出生後 2-4 日（出生の確認された初日を 1 日と数える）において胎仔・新生仔を解剖、脳を摘出し、タイプ 2、タイプ 3 酵素のアッセイを行なった。タイプ 2 アッセイ（脳組織の場合は、外環-outer-ring からの脱ヨード活性に等しい）は、組織から超遠心によって得られたミトコンドリア/ミクロソ

ーム分画を、ヨード（外環）を放射標識したT4およびジチオスレイトールの共在下で一定時間インキュベートして、遊離する放射Iを定量した。タイプ3アッセイ（内環からの脱ヨード活性）は、分画を、非標識T4およびジチオスレイトールの共在下でインキュベートし、生ずる reverseT3をラジオイミノアッセイで定量した。

in vitro: 出生後1-3日の新生仔から摘出した脳組織から調整したミトコンドリア/ミクロソーム分画について、様々な濃度の金属類（メチル水銀、カドミウムに加え、砒素についても実験を行なっている）を添加し、酵素活性をこれらの金属類が直接阻害するか否かを調べた。また、ジチオスレイトールの濃度を変化させて、その影響も検討した。

### C. 研究結果

図1は、胎仔期～新生仔期にかけての脳におけるタイプ2脱ヨード酵素活性の経時的変化を示している。一方、図2は同時期の脳におけるタイプ3活性の変化を示している。これらの図が示すとおり、タイプ2活性は胎児期には低く、新生仔期にはいと急速に高くなることが確認された。一方で、タイプ3活性については、胎仔期には低く、出生後2～3日目で活性が高くなり、これもラットなどにおける既知のパターンと一致するものであったといえる。

図3～5はin vitroでの金属添加実験の結果を示す。図3に示すとおりタイプ2酵素活性は、100  $\mu$ Mのメチル水銀によって60%ほどに低下した。メチル水銀による活性抑制は、ジチオスレイトールの濃度依存的であり、ジチオスレイトールが高濃度に共存する場合、抑制作用が軽減された（図4）。ここには示さなかったが、1～100 nMのヒ素および0.1～10 nMのカドミウムでは何ら活性の変化は認められなかった。一方、タイプ3酵素活性については、濃度依存的な変化が得られず、さらに検討の必要があるように思われる。

### D. 考察

in vivoにおける酵素活性の経時的変化は、これまでの知見を確認するものである。今回の結果から、1. タイプ3活性は胎児期には低いので、金属によって活性が低下するのを見るのならば、新生児期のマウスの方が変化を見やすいと思われる。2. タイプ3活性の場合は胎



児期も新生児期も adult よりも活性が高く、この間大きく変化はしないようなので、どの時期でも変化はとらえられると思われる。C57BL/6J マウスに関して、特に脱ヨードで特徴的なものは報告されていない。

in vitro の添加実験に関して、タイプ2の抑制は、以前の in vivo における結果 [Watanabe et al., 1999], ならびに in vitro 水銀添加の結果(未公表) と一致するものであった。タイプ3活性については、上記の in vivo 実験では、胎仔脳で抑制、胎盤で促進という結果が、胎仔脳を用いた in vitro 添加実験では in vivo に相当する濃度領域での抑制がそれぞれ確認されていた。今回のような in vitro における活性促進はこれらのいずれとも異なったものであった。このように、組織あるいは系によって結果が異なるメカニズムは現在のところ不明であるが、co-factor への影響を介する可能性あるいは、酵素との直接作用ではなく生合成などの過程に影響する可能性なども含めた検討が必要であろうと思われる。

なお、in vitro でのカドミウムの結果は、今回の佐藤班の結果を見ると 2nM 前後であり、添加実験に用いた濃度範囲に収まっているので、直接の阻害・促進作用はないように思われる。ヒ素については、同じセレン酵素の一つであるチオレドキシンレダクターゼを in vitro において、非常に低い濃度で阻害することが報告されている [Styblo et al., 2001]。これは、今回得られた脱ヨード酵素とは異なる結果であり、タイプ3の活性亢進をあわせて考えると、同じセレンノール基を持つセレンタンパク質であっても、相互作用がかなり異なることがわかる。

## E. 結論

初年度の目標としていたヨードチロニン脱ヨード酵素アッセイ系の確立と基本条件の検討を行ない、その結果に基づいて、発達に伴う脱ヨード活性の経時的変化、in vitro での添加試験を行なった。その結果、脳に発現する2つのタイプの脱ヨード酵素のうち、タイプ2は、在胎期終盤から出生後にかけて急速に活性があがってくることで、一方でタイプ3は出生後 2-3 日に高値を示すという、ラットで知られているパターンとよく一致した。

In vitro での添加実験の結果から、メチル水銀は神経組織に対する直接的な毒性に加え、タイプ2脱ヨード酵素活性を抑制することにより脳の発育を妨げる可能性が示唆された。しかし、

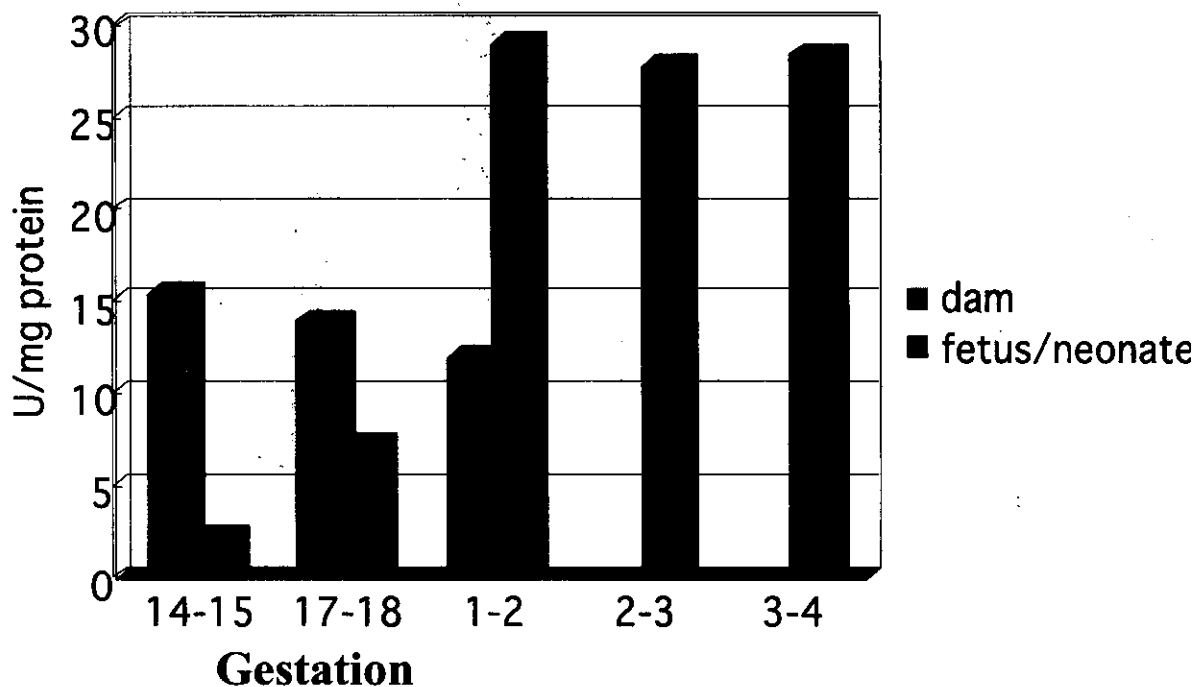
一方では in vivo と in vitro の結果が必ずしも一致しないことから、今後 in vivo の実験で、胎仔期と新生仔期との違いにも留意しつつ検討する必要があるものと思われた。また、このような酵素活性の抑制が、組織の T3 濃度にどの程度反映されてくるかについても検討が必要であろうと思われる。

以上の結果より、発達期にある脳の脱ヨード酵素系は、メチル水銀のターゲットとなる可能性があること、したがって、脱ヨード酵素系あるいは甲状腺ホルモン環境を修飾することにより、メチル水銀への感受性が修飾される可能性があることが示唆されたと考える。

#### 参考文献

- Watanabe C, Yoshida K, Kasanuma Y, Kun Y, and Satoh H (1999) In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. *Environmental Research Section A*, 80, 208-214.
- Mori K., Yoshida K., Kaise K., Kaise N., Fukuzawa H., Kikuchi K/, Abe K., and Yoshinaga K (1993) Inhibition of placental thyroxine 5-deiodinase activity decreases amniotic fluid concentration of 3, 3', 5'-triiodothyronine in rat. *Endocrin J.*, 40, 405-412.
- Friedrichsen S, Christ S, Heuer H et al., (2003) Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8<sup>-/-</sup> mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, 144, 777-784.

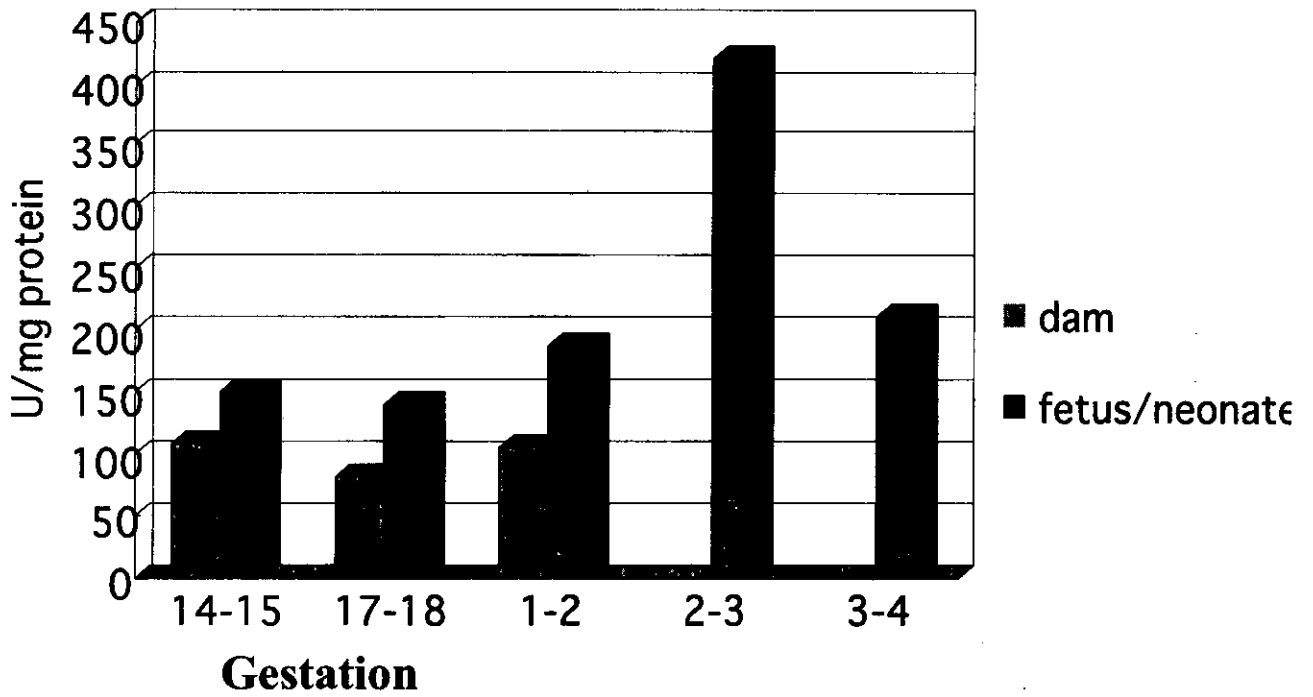
図 1. The ontogeny of type II deiodinase activity in the brain of C57BL/6J mice



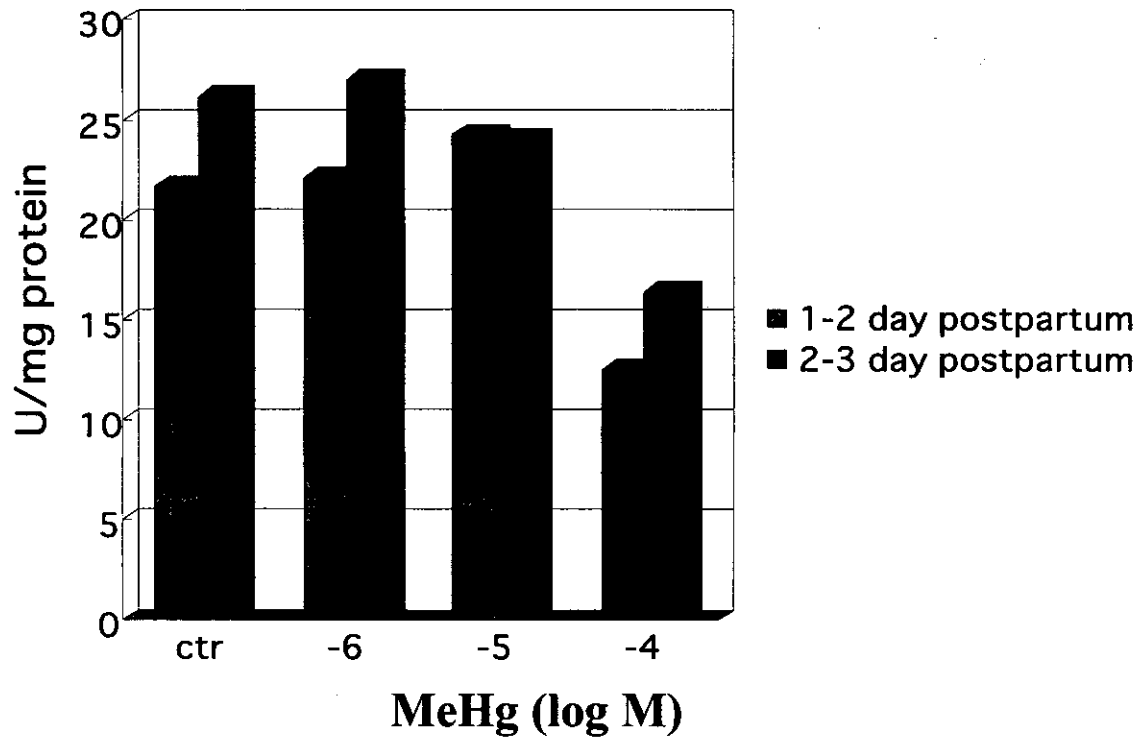
1-2 は、出生が確認された日を出生後 1 日目と数える場合には、出生後 2 日を意味する。

出生後における活性の急速な増加が特徴的である。在胎期においても出生が近づくにつれ、急に活性が上昇している様子がわかる。

☒ 2. The ontogeny of type III deiodinase activity in the brain of C57BL/6J mice

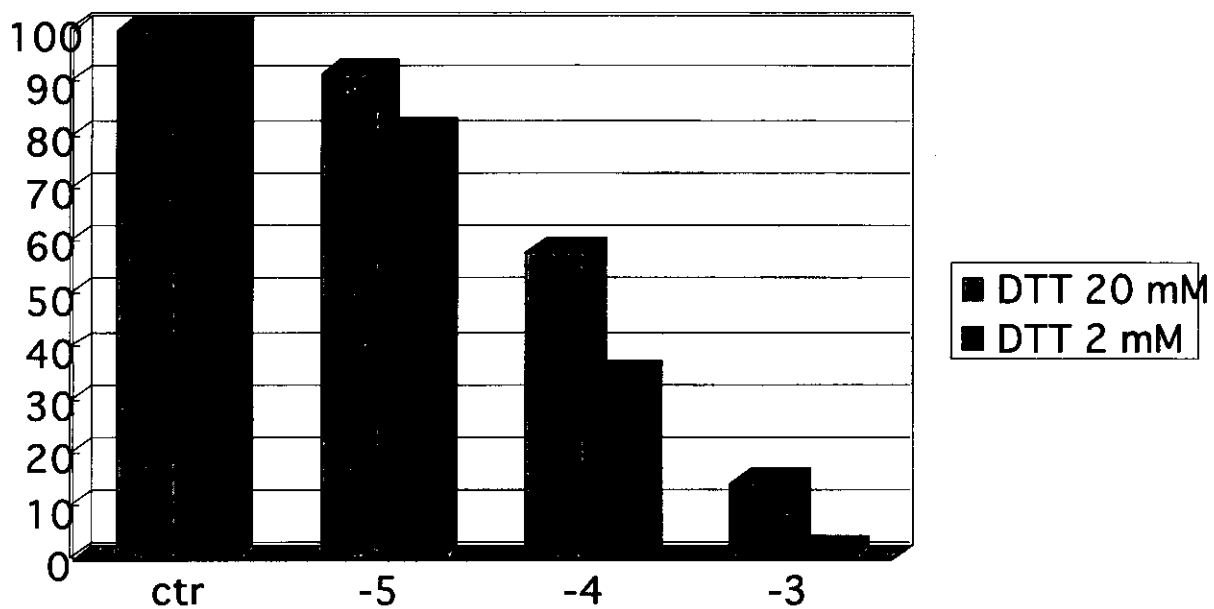


### 図 3. Effect of methylmercury on type II deiodinase activity in the neonatal mouse brain



In vitro で新生仔脳組織の抽出分画にメチル水銀を添加した場合の、タイプ2活性への影響。濃度依存的な抑制が認められる。

图 4 . Effect of co-existing DTT on the inhibition of D2 by methylmercury



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

水銀あるいはカドミウムへの周生期曝露に対する

生理的感受性要因（視床下部－下垂体－副腎系）に関する研究

分担研究者 今井秀樹

独立行政法人国立環境研究所内分泌攪乱・ダイオキシンリスク評価プロジェクト主任研究員

研究要旨： 有害金属を用いた海馬傷害モデルにおいて、異なるサブタイプのグルココルチコイド受容体が全く正反対の役割を果たすことを見いだした。水銀・カドミウム毒性の修飾にこのモデルを応用できるか否か検討中である。

A. 研究目的

本研究の目的は、視床下部－下垂体－副腎系（HPAaxis 系）の機能あるいはその発達に対し、胎生期の水銀あるいはカドミウム曝露が及ぼす影響を検討する一方で、HPAaxis 系の修飾がこれら重金属の毒性に及ぼす影響について検討することにより、感受性要因としての HPAaxis 系の重要性を評価することである。先行研究において、水銀が HPA 系に抑制的な影響を及ぼしたことが報告されている。Cd についてはグルココルチコイド受容体への影響を含め、グルココルチコイドの代謝などへの影響について比較的多くの報告がなされている。しかし、発達期に焦点をあてた解析は行なわれていない。

生体がストレスを受けて視床下部－下垂体－副腎皮質(HPA)系が賦活化されると副腎皮質ステロイドホルモン（ヒトではコルチゾール、マウス・ラットではコルチコステロン）の血液中濃度が上昇する。虚血(1)あるいは加齢(2)の際に海馬の神経細胞が傷害される原因のひとつがこの副腎皮質ステロイドホルモンレベル上昇であると考えられている。この副腎皮質ステロイドホルモンが生体内でその能力を発揮するには受容体と結合する必要がある。副腎皮質ステロイドホルモン受容体にはタイプ I とタイプ II との 2 種類がある。前者は生体がストレスを受けていない

状態、すなわち副腎皮質ステロイドホルモンが定常レベルの際にほとんどがリガンドと結合しているが、後者は生体がストレスを受けて HPA 系が賦活化されて血液中の副腎皮質ステロイドホルモン濃度が高くなった状態でその大部分がリガンドと結合する。副腎皮質ステロイドホルモンによる神経傷害にはこのタイプ II 受容体が重要な役割を果たしていると考えられてきた(3)。有機錫化合物のひとつであるトリメチル錫(trimethyl tin: TMT)をラットに経口投与するとストレス暴露と同様に海馬の錐体細胞層の神経細胞が脱落することが知られている。我々はこの神経細胞が脱落する以前、すなわち TMT 投与 3 ないし 4 日後にラットの血液中コルチコステロン濃度が上昇することを見いだしている(4)。本年度はこの有機錫化合物投与ラットの神経細胞傷害における副腎皮質ステロイドホルモン受容体の役割を検討した。

## B. 研究方法

副腎皮質ステロイドホルモン受容体の受容体アゴニストであるコルチコステロン(CORT)を含むペレットあるいはタイプ II 受容体の特異的なアゴニストのデキサメタゾン(DEX)を含むオスモティックポンプをラット (Sprague-Dawley 系雄、5 週齢) の皮下に副腎切除術(ADX)を施すと同時に埋め込んだ。ADX の 7 日後、TMT を 8mg/kg の用量で 1 回ラットに経口投与した。TMT 投与 14 日後に脳を取り出して切片を作成しクレシルバイオレット染色を施し、さらに神経傷害の指標としてグリオーシスのマーカーであるビメンチンおよびグリア繊維性タンパク(GFAP)の増加を免疫組織染色法により観察した。また錐体細胞層の生存細胞を領域ごと (図 1) に光学顕微鏡下でカウントした。

## C. 研究結果

クレシルバイオレット染色の結果から、TMT 投与により CA3b-c 領域に顕著に細胞脱落が生じ (図 2b-3, 2b-4)、ADX によりその脱落が CA3 領域全体さらには CA1 領域にまで拡大することが示された (図 2c)。図 2d および 2e は CORT あるいは DEX の慢性投与が錐体細胞に対して保護的に働いていることを示す。TMT 投与ラットの CA3a-c 領域における生存細胞数は対照群のそれに比較して有意に減少した (図 3)。ADX により CA1 領域においてもこの



数は対照群および TMT 投与群に比較して有意に少なくなった。CORT あるいは DEX の慢性投与は CA3a 領域および CA1 領域における細胞脱落数を減少させたが、CA3b 領域ではその効果は減弱し、CA3c 領域に至っては全く効果がみられなかった。図 4 a-1 から e-1 および a-2 から e-2 は各群のビメンチン免疫染色、a-3 から e-3 は GFAP 免疫染色の写真である。TMT 投与によって海馬の CA3a 領域から CA3c 領域にかけて生じたグリオシスが ADX によって CA1 領域にまで拡大した)。ここに CORT あるいは DEX を慢性投与するとグリオシスの範囲は TMT 投与単独によるものよりも縮小した。

従来タイプ I 受容体は海馬歯状回においては神経細胞に対して保護的效果を発揮し、一方タイプ II 受容体は神経傷害を増悪する方向に働くと考えられてきた。この実験にタイプ I 受容体のアゴニストであるアルドステロンを慢性投与した群も設定したのだが TMT 投与後 1 週間以内に死亡してしまったため、脳切片のサンプルは得ることができなかった。

#### D. 考察

一見従来の知見と矛盾した結果ではあるが、錐体細胞層に関してはタイプ II 受容体が TMT 由来の神経傷害を軽減していることは確かのようにである。Sapolsky らはタイプ I 受容体には permissive action、タイプ II 受容体には suppressive action と呼べる役割がありそれらを次のように説明している(4)。ストレスに対するタイプ I 受容体の permissive action、すなわちカテコールアミンやコルチコステロン放出ホルモンの分泌を促す効果は戦場で敵の攻撃を受けた際の最初の反撃に、一方タイプ II 受容体の免疫系を抑制するなどの suppressive action は過剰な反撃行動による味方に対する誤射などを抑制することになぞらえられる。副腎皮質ステロイドホルモンの働きはこのように神経細胞に対して二面性を呈する。同ホルモンの産生調節には内分泌系のみならずサイトカインなどの免疫系因子も深く関わっていることが明らかになりつつある。

#### E. 結論

HPAaxis を修飾することが明らかになっている金属化合物である TMT を in vivo で投与す

ると脳，特に海馬に神経細胞死が起こる。この神経傷害は，副腎切除により増悪し，グルココルチコイド投与により軽減することを見出した。この結果により，HPAaxis の修飾が，ある種の神経傷害を修飾し得ることが示された。HPAaxis を胎生期に修飾したマウスにおいて，出生後の脳を *ex vivo* でメチル水銀曝露した場合におこるアポトーシスが増悪されるという観察がある。このように，HPAaxis の胎生期における修飾は，金属毒性への感受性を変化させる可能性もある。このような知見を踏まえ，来年度は水銀あるいはカドミウム毒性の修飾に HPAaxis がおよぼす影響を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

なし

#### 参考文献

- 1) Kirino, T. :Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239: 57-69, 1982.
- 2) Sapolsky, R.M. :Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *J. Neurosci.*, 9: 1222-1227, 1985.
- 3) de Kloet E. R. et al.: Feedback action and tonic influences of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoendocrinology* 12: 83-105, 1987.
- 4) Imai, H. et al. :Interleukin-1 receptor antagonist inhibits transient increase of plasma corticosterone in the initial phase of trimethyltin-induced hippocampal necrosis. *Neurotoxicol.* 19: 163-166., 1998.
- 5) Sapolsky et al.: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev.* 21:

55-89, 2000.

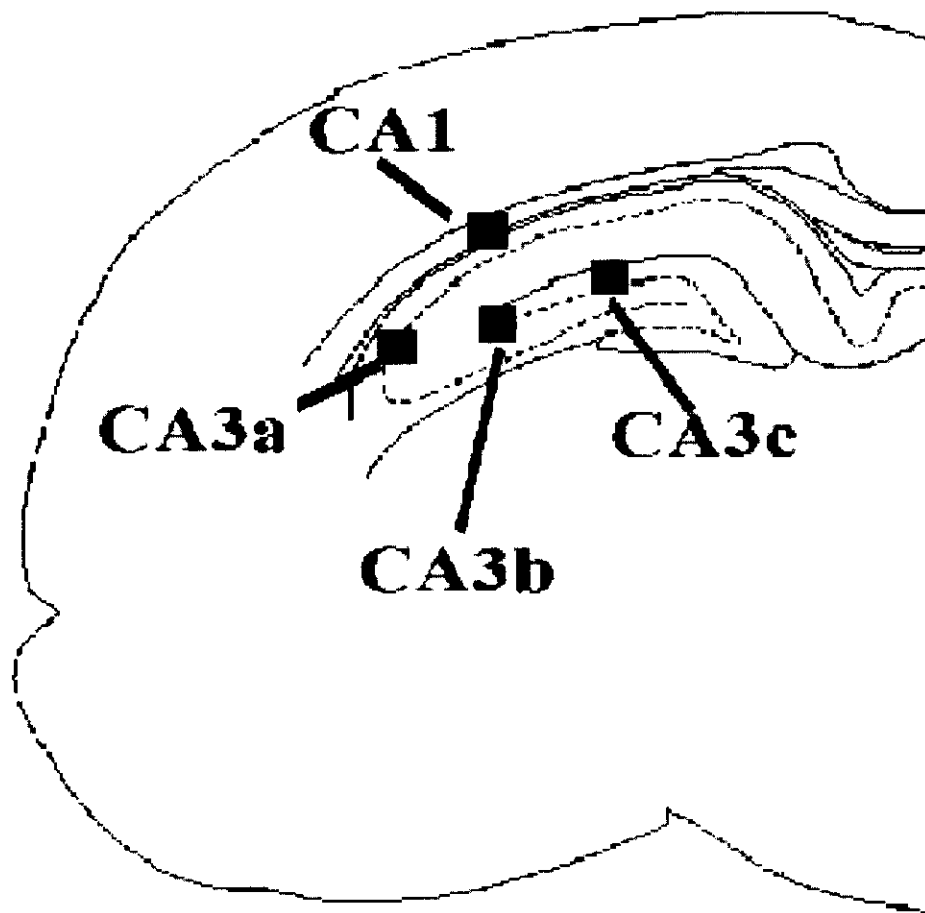


図1. 錐体細胞層において細胞数の計測を行った領域