

カドミウム染色(QA1 染色)の方法

1. 標本をキシレンで脱パラシ、アルコールで脱水処理する
2. 標本をイオン交換水(もしくは蒸留水)に1分間浸ける
3. 10 mM TRIS amine (TAEA) : イオン交換水(もしくは蒸留水) = 1 : 29 で調整し、標本を15分間浸ける(Zn ブロック)
4. 0.5 N の NaOH を1滴加えた (CH₃)₂SO(ジメチルスルホキシド)0.5 ml に QA1 を 2~3 mg 溶かし、イオン交換水(もしくは蒸留水)30 ml を加える(染色液)
5. 標本を染色液に2~3時間浸ける
6. イオン交換水(もしくは蒸留水)で洗浄
7. 室温で完全に乾燥させる
8. キシレンで透徹
9. オイキットで封入

C. 研究結果

肉眼所見:交配 A および交配 C で胎仔 4 匹に発育不良が認められた。その他の胎仔に異常は認められなかった。交配 B においては胎仔に肉眼的な異常は認められなかった。以下の表 1 および 2 に胎仔の性別および遺伝子型を示す。母マウスには肉眼的に異常は認められなかった。

表 1. 正常胎仔の遺伝子型および性別

個体番号	23A	23B	23C	23D	23E
性別	*	♀	♂	♀	♀
遺伝子型	MT(-/-)	MT(+/-)	MT(+/-)	MT(+/-)	MT(+/-)

個体番号	23F	23G	23H	23I	23J
性別	*	♀	♂	♀	♀
遺伝子型	MT(+/-)	MT(-/-)	MT(-/-)	MT(-/-)	MT(-/-)

* : 確認不能

表 2. 発育不良胎仔の遺伝子型および性別

個体番号	1A	2C (図 6)	2G (図 7)	2H (図 8)
性別	*	*	♂	♂
遺伝子型	MT(+/-)	MT(+/+)	MT(-/-)	MT(+/-)

* : 確認不能

組織学的所見:

HE 染色: 発育不良胎仔は 4 例中 3 例 (1A, 2C, 2G) が胎齢 19 日であったが、1 例 (2H) は胎齢 13 日程度であった。組織学的には心臓、肺および腎臓において発育不良が顕著に認められた (図 9、10、11、12、13)。中枢神経系の発達の程度は組織学的に判断することは出来なかった。特に発育が遅い個体はメタロチオネインヘテロマウスであった。その他の発育不良個体はメタロチオネイン欠損が 1 例、野生型 1 例、ヘテロ 1 例と何れの遺伝子型においても観察された。交配 B で肉眼的に異常が認められなかった胎仔および母マウスの脳、肝臓、腎臓および胃には著変は認められなかった。

カドミウム染色: 検索を行ったすべての胎仔、胎盤および母マウスにおいて陰性であった (図 14)。

D. 考察

カドミウム曝露によって胎仔マウスに発生異常 (脳ヘルニア、口蓋裂、肋骨癒合および四肢の形成不全) が引き起こされることが知られている。カドミウムによる奇形例として口蓋裂、無眼球症などが知られているが、胎仔発育不全の報告はされていない。胎生期から授乳期におけ

るカドミウム曝露が胎仔の中樞神経系に異常を与えることが知られているが、本例では組織学的に判断することが出来なかった。しかしながら、明らかな発育不良が観察されたことは中枢神経系を含め、生後の発達に何らかの影響を与える可能性があることは否定出来ない。

発育不良個体はメタロチオネイン欠損が 1 例、野生型 1 例、ヘテロ 2 例と何れの遺伝子型においても観察された。メタロチオネインの有無に関わらず、何れの遺伝子型においても発育不良が観察されたことは、本実験で認められた発育不良はカドミウムの何らかの影響によるものであり、それはメタロチオネインには影響を受けないということが示唆された。

カドミウムの組織内局在を明らかにすることは、カドミウムによる組織障害発生メカニズムを解析する上で重要である。しかしながら、本実験では胎仔に移行したカドミウム量が非常に微量であったことから、組織学的にカドミウムを可視化させることが出来なかった。次年度はカドミウム染色の方法を改良し、カドミウムの組織内局在を詳細に検討していきたい。

(3). 長期低用量カドミウム経口曝露メタロチオネイン欠損および野生型マウスにおける組織学的検索およびカドミウムの組織内局在に関する検索

A. 研究目的

低容量カドミウム長期曝露によって肝臓および腎臓に病変が引き起こされることが知られている。メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。メタロチオネインをあらかじめ誘導されたマウスでは、カドミウム投与による毒性が軽減されることが知られている。

100 ppm のカドミウムを含む飲料水もしくは食餌を 180 日間にわたって自由摂取させたメタロチオネイン欠損マウスおよび野生型マウスにおいて、肝臓および腎臓に病変が認められることが知られている。また、メタロチオネイン欠損マウスにおいて認められる病変は野生型に比べ、重度であることが知られている。メタロチオネインはカドミウムの体内動態やカドミウム毒性に対する防御に関与することが知られているものの、詳細な機序については未だに明確にされていない。

本研究では、より低濃度である 10 ppm のカドミウムを含む飲料水を 24 週間にわたって自由飲水させたマウスにおいて、メタロチオネインがどのようにカドミウムの組織内局在や毒性発現に関与するのか明らかにすることを目的として実験を行った。また、本実験は妊娠期および授乳期の低濃度カドミウム経口曝露実験を行う際、母マウスに影響を与えるか否かを検討するための予備実験として行った。

B. 材料および方法

メタロチオネイン欠損マウス 4 匹および野生型マウス 5 匹に 180 日間にわたり、カドミウムを含む飲料水(10 ppm)を自由飲水させた。エーテル麻酔下で心採血し、肝臓、腎臓、小腸、脳および生殖器を摘出した。摘出した諸臓器を肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE 染色を行った。また、組織内における

カドミウムの局在を明らかにすることを目的とし、カドミウム染色を行った。

C. 研究結果

肉眼所見: 検索したいずれのマウスにおいても著変は認められなかった。

組織所見:

HE 染色: メタロチオネイン欠損および野生型マウスの肝臓 (図 15、16) および腎臓 (図 17、18) において、著変は認められなかった。

カドミウム染色: 検索した何れの個体においても陽性像は得られなかった (図 19、20)。

D. 考察

低容量カドミウム長期曝露によって肝臓および腎臓に病変が引き起こされることが知られている。100 ppm のカドミウムを含む飲料水もしくは食餌を 180 日間にわたって自由摂取させたメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおいて肝臓および腎臓に病変が認められることが知られている。また、その病変はメタロチオネイン欠損マウスにおいてより重度となる。

今回の実験において、10 ppm のカドミウムを含む飲料水を 24 週間にわたって、自由飲水させたメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおいて検索した諸臓器に病変は認められなかった。よって、妊娠期および授乳期における低容量カドミウム経口曝露実験の際、母体には組織学的な影響を与えないことが示された。

(4). 妊娠期および授乳期低用量カドミウム曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおける組織学的検索

A. 研究目的

妊娠期間中のカドミウム曝露によって、胎盤を介してカドミウムが胎児へ曝露されることが知られており、カドミウムの胎児への影響が懸念されている。メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。メタロチオネインをあらかじめ誘導されたマウスでは、カドミウム投与による毒性が軽減されることが知られている。カドミウムを妊娠期および授乳期に曝露された場合、子マウスへどのような影響を与えるのか知られていない。そこで、本研究ではカドミウムによる影響を受けやすい肝臓および腎臓を組織学的に検索した。また、中枢神経系への影響を検索するため、特に海馬に注目し、海馬歯状回および CA3 領域の神経細胞数を測定した。さらに、オスにおいては生殖器特に精巣への影響を組織学的に検索した。

B. 材料および方法

下記の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

カドミウム曝露群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

コントロール群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

メタロチオネイン欠損および野生型マウスに対して、交配の翌日より妊娠期間中(19日間)ならびに授乳期(10日間)カドミウムを含む飲料水(50 ppm)を自由飲水にて与えた。10日齢のマウス(MT+/-: ♀6, ♂4, MT-/-: ♀7, ♂6)をエーテル麻酔下で心採血し、脳、肝臓、腎臓および精巣を摘出した。摘出した諸臓器を肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE染色を行った。また、組織内における

カドミウムの局在を明らかにすることを目的とし、カドミウム染色を行った。脳は海馬歯状回およびCA3 領域においては、一定面積内に含まれる神経細胞数を測定し、分散分析法にて群毎の差を統計学的に解析した。

C. 研究結果

肉眼所見: 検索した諸臓器に著変は認められなかった。

組織所見:

HE 染色:

肝臓: カドミウム曝露群において、小葉中心部あるいは中間帯に肝細胞の空胞変性が認められた。細胞質内に微細な空胞が観察され、分布が限局的であったものを+、細胞質内の空胞が大きく、かつ、空胞変性の分布が広範であったものを++と評価した。曝露群における空胞変性の程度を表1に示した。メタロチオネイン欠損および野生型マウスの間で、空胞変性の程度および分布に差は認められなかった(図21、22)。また、コントロール群においては極軽度であるが、肝細胞の空胞変性が1例認められた。コントロール群における空胞変性の程度を表2に示した。

脳: 著変は認められなかった(図23-30)。また、海馬歯状回およびCA3領域における神経細胞数はカドミウム曝露により影響を受けなかった。また、雌雄差も認められなかった(図31、32)。

腎臓および精巣: 著変は認められなかった(図33-36)。

カドミウム染色: 検索した何れの臓器においても陽性像は認められなかった(図37、38)。

表1. カドミウム曝露群における肝細胞の空胞変性の程度

	1	2	3	4	5	6	7
MT(+ / +) ♀	+	++	+	++	+	++	NE
MT(+ / +) ♂	+	++	++	+	NE	NE	NE

MT(-/-) ♀	++	++	++	++	++	++	++
MT(-/-) ♂	++	++	++	++	++	++	NE

NE: 検索せず、-: 著変なし、+: 細胞質内に微細な空胞が観察され、分布が限局的、++: 細胞質内の空胞が大きく、かつ、空胞変性の分布が広範

表 2. コントロール群: 肝細胞の空胞変性

	1	2	3	4	5	6	7	8
MT(+/+)♀	-	-	-	-	NE	NE	NE	NE
MT(+/+)♂	+	-	-	NE	NE	NE	NE	NE
MT(-/-)♀	-	-	-	-	-	-	-	-
MT(-/-)♂	-	-	-	-	-	-	NE	NE

NE: 検索せず、-: 著変なし、+: 細胞質内に微細な空胞が観察され、分布が限局的

D. 考察

妊娠期間中のカドミウム曝露によって、胎盤を介してカドミウムが胎児へ曝露されることが知られている。本研究において、胎仔期および授乳期にカドミウム曝露されたマウスの肝臓には肝細胞の空胞変性が認められた。よって、今回の実験条件である 50 ppm という比較的低い濃度で曝露されたマウスも肝臓に何らかの障害が引き起こされることが示唆された。肝細胞の空胞変性の程度はメタロチオネイン欠損および野生型の間に差は認められなかった。よって、引き起こされた肝細胞傷害にはメタロチオネインは防御的に働かない可能性が示唆された。

カドミウムを曝露されたマウスの脳において組織学的な病変は認められなかった。また、海馬歯状回および CA3 領域における神経細胞数はカドミウム曝露により影響を受けなかった。行動学実験との関連性が興味深い点であるが、カドミウム曝露は記憶に関わる海馬領域の神経細胞の数的変化をもたらさなかったことから、行動学的な異常、特に記憶に関する異常には神経細胞の数的異常ではなく、機能的な影響を考慮する必要があると考えられる。よって、来年度、行動学的異常、特に記憶に関連した異常との関連性を調べるためには、機能的な異常を

示唆出来る検索法を行う必要がある。

今回のカドミウム曝露実験では、特に異常は認められなかった。しかし、カドミウムは環境ホルモン作用をもつといわれているため、今後も詳細に検討して行く必要があると思われる。

(5). 妊娠期および授乳期低用量カドミウム曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおける組織学的検索

A. 研究目的

妊娠期間中のカドミウム曝露によって、胎盤を介してカドミウムが胎児へ曝露されることが知られており、カドミウムの胎児への影響が懸念されている。メタロチオネインは金属結合タンパクであり、カドミウムをはじめとする重金属と結合する。メタロチオネインをあらかじめ誘導されたマウスでは、カドミウム投与による毒性が軽減されることが知られている。本研究では、10 ppmのカドミウムを妊娠期および授乳期に曝露された場合、子マウスへ組織学的な影響が与えられるか否かを検討する目的で実験を行った。特に神経系における異常の有無を明らかにすることを目的とした。

B. 材料および方法

下記の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

カドミウム曝露群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

コントロール群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

メタロチオネイン欠損および野生型マウスに対して、交配の翌日より妊娠期間中(19日間)ならびに授乳期(21日間)カドミウムを含む飲料水(10 ppm)を自由飲水にて与えた。21日齢のマウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳を摘出した。摘出した諸臓器を肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE染色を行った。

C. 研究結果

肉眼所見: 検索した諸臓器に著変は認められなかった。

組織所見:

HE 染色:

脳: 検索した何れのマウスにおいても、著変は認められなかった。海馬歯状回および CA3 領域の神経細胞にも特に異常は認められなかった(図 39 - 42)。

D. 考察

10 ppm のカドミウムを妊娠マウスに経口投与した場合、脳に組織学的な変化は確認されなかった。本研究では、脳、特に海馬領域における検索を重点的に行ったが、次年度の研究では、海馬領域以外の神経系諸細胞に注目し検討を行いたい。

10 ppm のカドミウム曝露により、メタロチオネイン欠損マウスのメスでは回避学習が低下している。しかし、今回の検索では、組織学的にその原因となる細胞傷害は認められなかった。次年度の研究では、分子病理学的なアプローチにより行動学的な異常との関連を追求して行きたい。

(6). 妊娠期低用量メチル水銀曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおける組織学的検索

A. 研究目的

メチル水銀は食物中に含まれ、日本では魚類(特に食物連鎖の上流にあり高濃度の水銀を含有するマグロのような大型の魚類)の摂取によるメチル水銀の過剰摂取が問題となっている。メチル水銀は全身的な毒性を持つが、多くの動物種において主な標的器官は神経系である。特に発生および発育途中の中樞神経系は他の器官に比べ、メチル水銀に対する感受性が高いとされている。よって、妊婦の魚類の摂取による胎児への影響が特に問題視され、日本でも2003年6月に厚生労働省より妊婦に対し週2回以上のメカジキなどの摂取を避けるように勧告が出されている(但しマグロは含まない)。

メチル水銀による神経毒性のメカニズムについては未解明の部分が多い。細胞レベルの実験においては、メチル水銀の曝露は神経伝達物質およびその受容体に対する影響があるとされている。また、成マウスへのメチル水銀曝露では行動学的な異常が生じると共に、セロトニンなどの神経伝達物質の放出量に変動が観察されたとの報告がある。以上のことから胎生期のメチル水銀曝露は、中樞神経系の発生に影響を及ぼす可能性が推察される。本研究は、胎仔期の5 ppmのメチル水銀経口曝露による中樞神経系への影響を調べる前段階の実験として、産子の中樞神経系を含む全身諸臓器の病理学的検索を行い、この濃度のメチル水銀が影響を及ぼすか否かを検討することを目的とした。

B. 材料および方法

下記の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

メチル水銀曝露群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

コントロール群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

メタロチオネイン欠損および野生型マウスに対して、交配の翌日より妊娠期間中(19日間)にメチル水銀を含む飲料水(5 ppm)を自由飲水にて与えた。出産後、子マウスをエーテル麻酔により安楽殺し、肉眼的に観察後、中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE染色を行った。

C. 研究結果

肉眼所見: 検索した諸臓器に著変は認められなかった。

組織所見:

HE染色:

脳、肝臓、脾臓、腎臓および心臓: メタロチオネイン欠損および野生型マウスの何れも、著変は認められなかった。(図 43 - 50)。

D. 考察

5 ppm のメチル水銀を妊娠マウスに経口投与した場合、全身諸臓器に組織学的な変化は確認されなかった。よって、本研究に用いた濃度では、産子に病理組織学的に大きな影響を与えないことが確認された。

(7). 妊娠期および授乳期低用量メチル水銀曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおける組織学的検索

A. 研究目的

メチル水銀は食物中に含まれ、日本では魚類(特に食物連鎖の上流にあり高濃度の水銀を含有するマグロのような大型の魚類)の摂取によるメチル水銀の過剰摂取が問題となっている。メチル水銀は全身的な毒性を持つが、多くの動物種において主な標的器官は神経系である。特に発生および発育途中の中枢神経系は他の器官に比べ、メチル水銀に対する感受性が高いとされている。よって、妊婦の魚類の摂取による胎児への影響が特に問題視され、日本でも 2003 年 6 月に厚生労働省より妊婦に対し週 2 回以上のメカジキなどの摂取を避けるように勧告が出されている(但しマグロは含まない)。胎生期においては、低濃度のメチル水銀曝露によっても中枢神経系へ影響を及ぼす可能性が推察される。そこで本研究は、胎生期および授乳期の 5 ppm のメチル水銀曝露における中枢神経系への影響を検討することを目的とする。また、中枢神経系への影響を検索するため、特に視床下部に注目し、視床下部の神経細胞数および星状膠細胞数を測定した。

B. 材料および方法

下記の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

メチル水銀曝露群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

コントロール群: (A) ♀MT(-/-) × ♂MT(-/-)

(B) ♀MT(+/-) × ♂MT(+/-)

メタロチオネイン欠損および野生型マウスに対して、交配の翌日より妊娠期間中(19 日間)ならびに授乳期(10 日間)にメチル水銀を含む飲料水(5 ppm)を自由飲水にて与えた。10 日齢のマウスをエーテル麻酔下で心採血し、脳を摘出後肉眼的に観察し、中性緩衝ホルマリン液

にて固定した。固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、HE 染色を行った。脳は視床下部においては、一定面積内に含まれる神経細胞数および星状膠細胞数を測定し、分散分析法にて群毎の差を統計学的に解析した。

C. 研究結果

肉眼所見: 検索した何れの臓器においても著変は認められなかった。

組織所見:

HE 染色:

脳: メタロチオネイン欠損および野生型マウスの何れも、著変は認められなかった。(図 51 - 54)。また、視床下部における神経細胞数および星状膠細胞数はメチル水銀曝露群とコントロール群との間に有意差は認められなかった。メタロチオネイン欠損および野生型マウスの間にも有意差は認められなかった(図 55、56)。

D. 考察

妊娠期および授乳期に 5 ppm のメチル水銀を経口投与した場合、マウスの脳において組織学的な病変は認められなかった。また、視床下部における神経細胞数および星状膠細胞数はメチル水銀曝露により影響を受けず、メタロチオネイン欠損および野生型マウスの間にも有意差は認められなかった。しかし、5 ppm のメチル水銀の経口投与による組織学的な影響は今回の検索で用いた手法では観察され得ない可能性もある。よって次年度の検索では、マイクロアレイの結果を踏まえ、in situ hybridization を用い組織中の mRNA の発現および局在への影響に関する研究を行って行きたい。

視床下部は内分泌、情動行動、睡眠等に関係している重要な領域である。今回の検索では視床下部に組織学的な影響は認められなかった。行動学実験との関連性が興味深い点であるが、メチル水銀曝露は視床下部の神経細胞および星状膠細胞の数的変化をもたらさなかったことから、行動学的な異常には細胞の数的異常ではなく、機能的な異常を考慮する必要があると考えられる。次年度は神経伝達物質に関する免疫組織化学および分子病理学的検索

によるアプローチを行いたい。

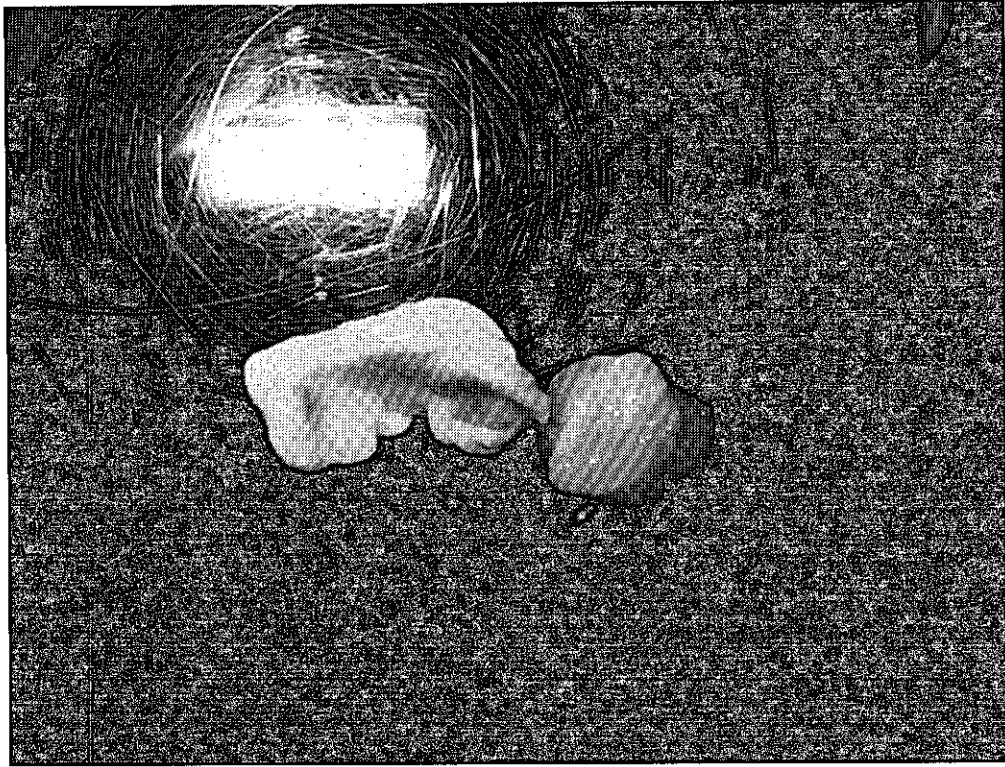


図1. 発育不良のメタロチオネイン欠損マウス胎子



図2. 発育不良のメタロチオネイン欠損マウス胎子 (剖面)

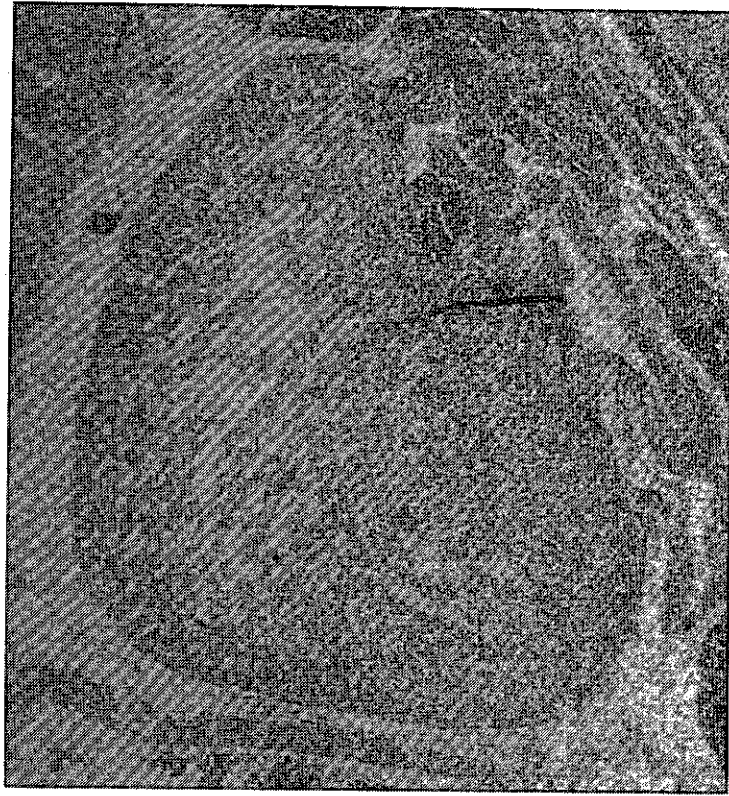


図3. 发育不良胎子の心臓 (HE 染色)



図4. 发育不良胎子の消化管 (HE 染色)



図5. 発育不良胎子の肺 (HE 染色)

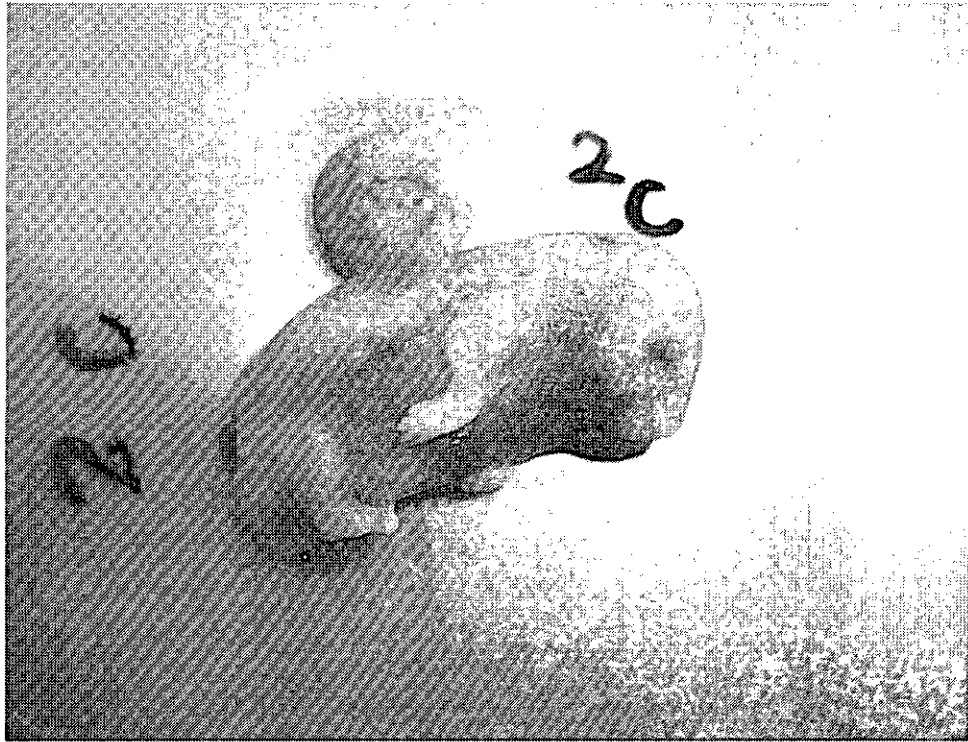


図6. 発育不良のメタロチオネイン野生型マウス胎子

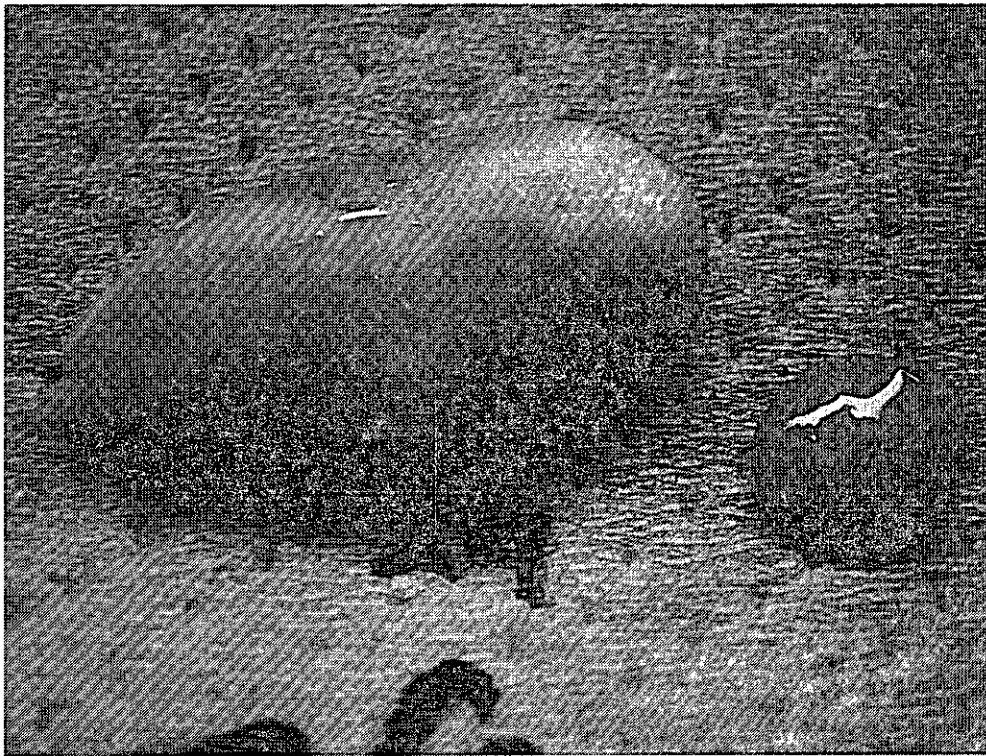


図7. 発育不良のメタロチオネイン欠損マウス胎子