

図47. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型マウスの肝臓 (HE 染色)

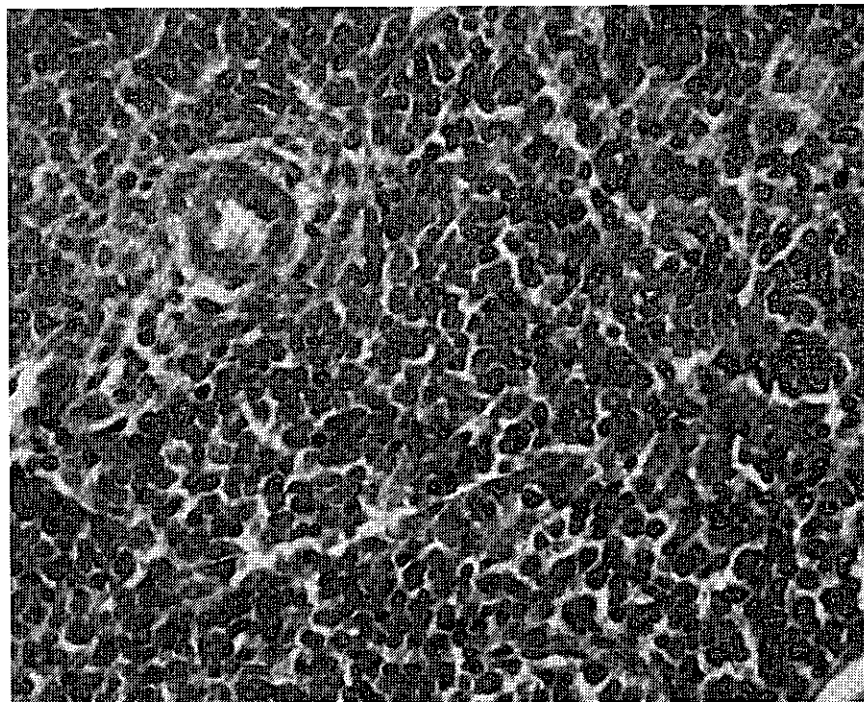


図48. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型マウスの脾臓 (HE 染色)

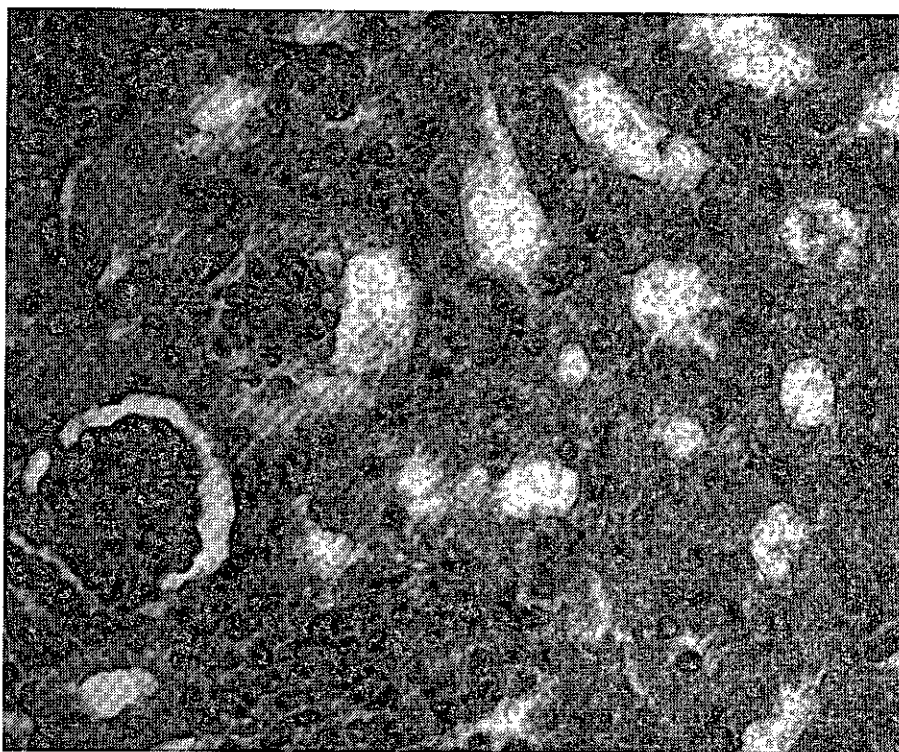


図49. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型マウスの腎臓 (HE 染色)

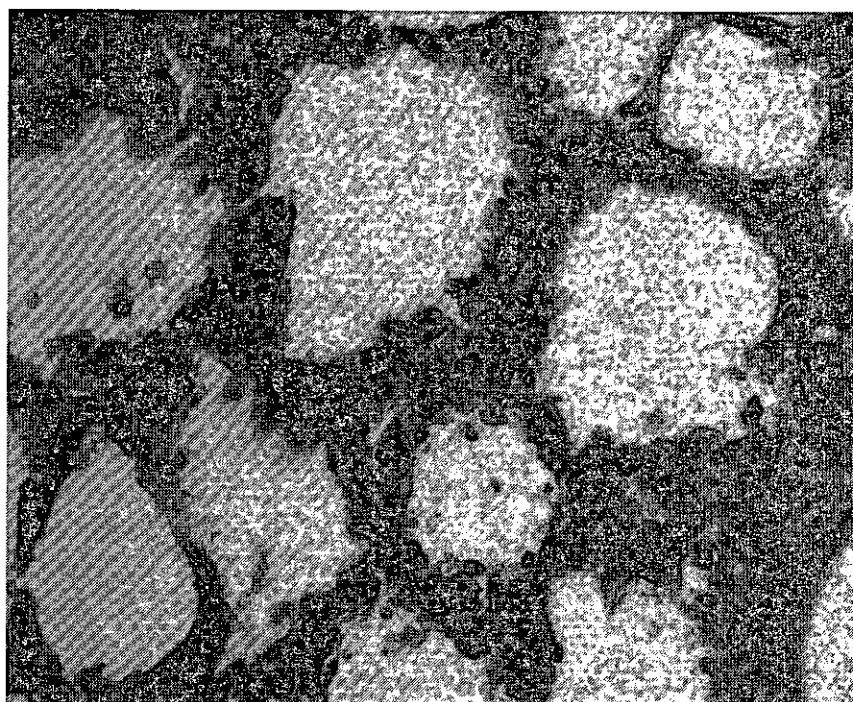


図50. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型マウスの肺 (HE 染色)

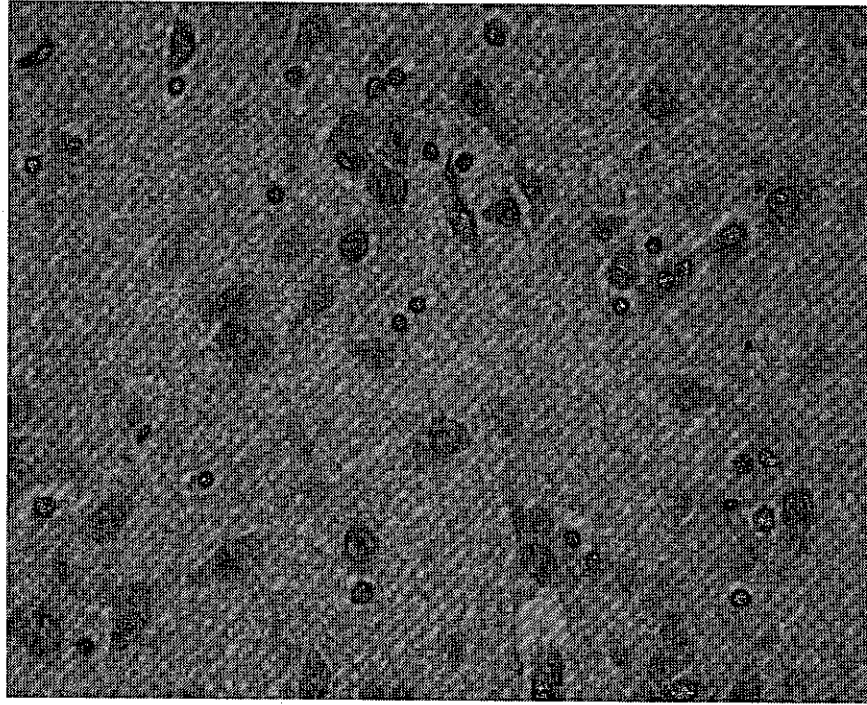


図51. メタロチオネイン欠損マウスの視床下部 (HE 染色)

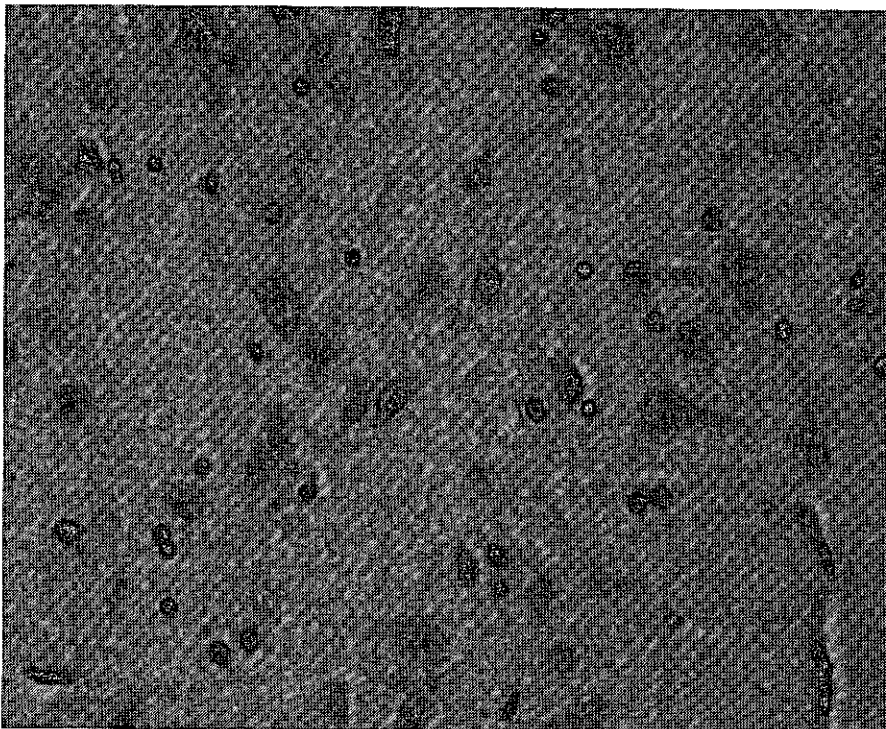


図52. メチル水銀曝露メタロチオネイン欠損マウスの視床下部 (HE 染色)

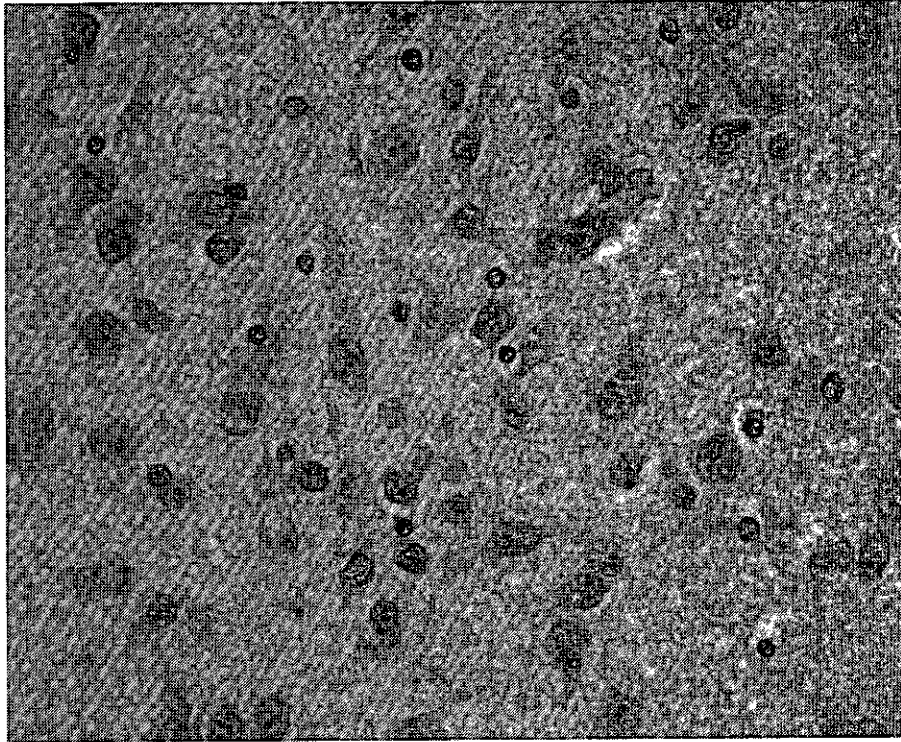


図53. メタロチオネイン野生型マウスの視床下部
(HE 染色)

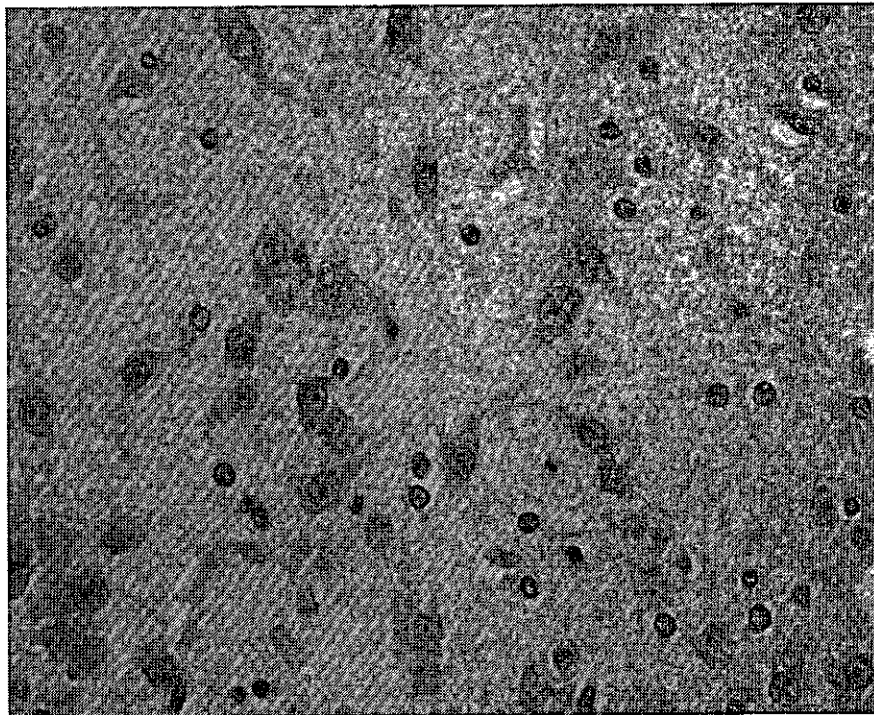


図54. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型マウスの視床下部 (HE 染色)

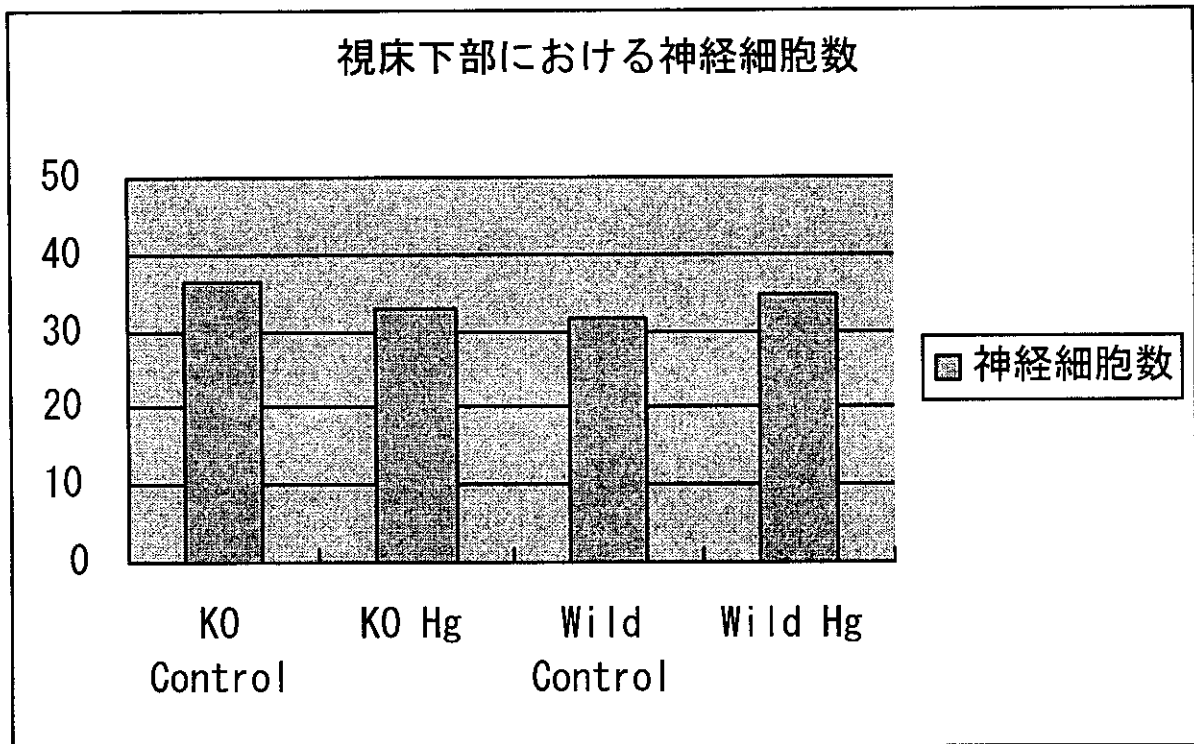


図55. 視床下部における神経細胞数

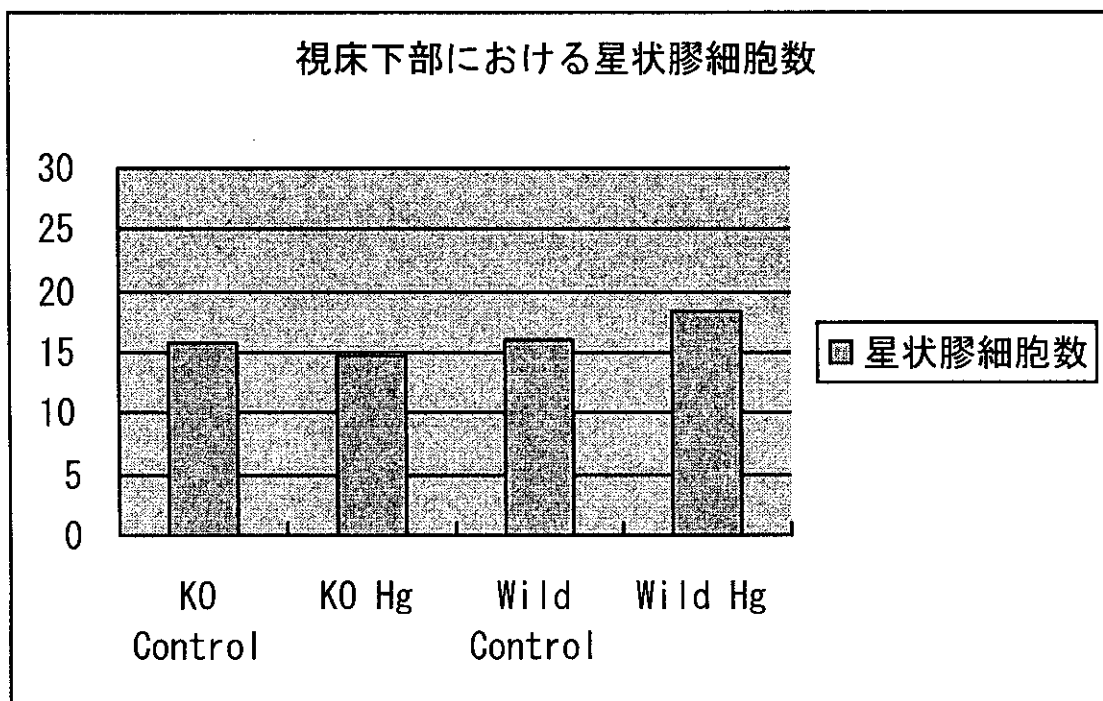


図56. 視床下部における星状膠細胞数

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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

研究協力者 森弘毅 東北大学大学院医学系研究科内分泌学

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であり、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（3種類のアイソザイムが存在）はいずれも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、これら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。本年度は、*in vivo* ならびに *in vitro* の系を用いて、金属とこれら酵素の活性ならびに甲状腺ホルモンレベルの関連を探った。*in vitro*: 神経芽細胞腫由来の NB41A3 細胞（神経細胞における甲状腺ホルモン作用・代謝の研究モデルとして用いられている）をメチル水銀に曝露し、脳における甲状腺ホルモン活性化において最も重要な2型の脱ヨード酵素活性を検討したところ、30nM という低濃度において有意な活性抑制を見いだした。*in vivo* : 胎生期 MeHg 曝露群および Cd 曝露群を生後 10 日齢で解剖し、肝（1型）、脳（2および3型）の脱ヨード酵素活性、および血清中 T4 を測定した。その結果、MeHg 曝露は T4 濃度には大きな影響を及ぼさないが、

脳の3型酵素活性を系統にかかわらず抑制する結果を得た。中等度の少数回投与において得られた結果とほぼ一致していた。一方でCd曝露により、血清T4は系統にかかわらず有意に低値となり、脳の2型活性はこれを補償する方向に変化を示した。特にMTnullにおいてこの傾向は強く現れた。以上のように、新生仔脳の甲状腺ホルモン環境は、周生期におけるこれらの重金属曝露に対して敏感に反応することが見いだされた。これらの変化がいかなるメカニズムによるものなのか、また、別項で述べられるような行動影響に関連しているのかは今後の課題である。一方で、これらの結果は、甲状腺ホルモン代謝に異常があるような個体がCd, MeHgに対して感受性が高い可能性を示唆しているとも考えられた。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン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、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こと、は前年度の報告書に詳しく述べた。

胎仔・新生仔期における甲状腺ホルモン環境の修飾と重金属毒性との関連を明らかにし、甲状腺ホルモン環境を実験的に操作した場合の重金属毒性への感受性の変化を検討することが本研究の最終的な目的である。特に、発達期の脳の甲状腺ホルモンレベルの制御の上で重要なヨードチロニン脱ヨード酵素 (iodothyronine deiodinases) に注目し、周生期の重金属曝露がこれらのこの脱ヨード酵素に及ぼす影響に焦点をあてて解析している。脱ヨード酵素は、いずれもセレンを含む酵素で、タイプ1, 2, 3という基質特異性、組織局在、触媒反応の異なる3種類のアイソザイムが知られている。

前年度は、周生期のマウス脳におけるタイプ2, 3の活性のontogenyについて検討し、マウスがラットに似通った経時的パターンを示すこと、新生仔脳の抽出液にメチル水銀を添加し

た場合の影響を検討し、タイプ2の活性が比較的高濃度のメチル水銀で抑制され、タイプ3の活性は明確な影響を受けないことを報告した。今年度は、*in vivo*、*in vitro* にまたがって3つの実験を行った。

1) *in vivo* では、周生期CdまたはMeHg曝露マウスの生後10日における甲状腺ホルモン代謝：曝露マウスを出生後10日目（曝露が続いている状態）で解剖し、脳および肝の脱ヨード酵素活性ならびに血清甲状腺ホルモン濃度を測定した。

2) *in vitro* NB41A3マウス神経芽細胞腫細胞の脱ヨード酵素活性に対するメチル水銀 (MeHg) の影響：マウス脊髄腫瘍 (C1300 Jackson tumor) 由来の細胞を用いて、タイプ2脱ヨード酵素の活性にメチル水銀が及ぼす影響について検討した。この細胞の特徴としては、

- ・アドレナリン及びコリン作動性ニューロンの特徴を有する

また、特に甲状腺ホルモン作用と代謝とに関連する特徴として、

- ・タイプ II 脱ヨード酵素の存在 (T3の供給)

- ・核内甲状腺ホルモンレセプター (TR) の存在

- ・カテコールアミン代謝系酵素 (TH, MAOなど) 活性化に関与

などが挙げられ、ニューロンにおける甲状腺ホルモン作用・代謝の研究モデルとして用いられている。

B. 研究方法

1) *in vivo* : 周生期 Cd および MeHg 曝露を行い、出生後 10 日齢で解剖した C57BL/6 の新生仔脳および肝は、それぞれ佐藤氏 (岐阜大) および吉田稔氏 (聖マリアンナ医大) から提供を受けたものである。アッセイ方法は前年度報告書と同様で、radioimmunoassay を用いた (Watanabe et al., 1999; Mori et al. , 1993).

2) *in vitro* :

1. NB41A3細胞は5%FBS添加RPMI1640培地で培養した。
2. D2活性を誘導するため、細胞回収前24時間は無血清とし、また1mM Bu2cAMP 添加18時間後に細胞を回収した。
3. 各種濃度のMeHgを培地に添加し、タイプII5'-deiodinase (D2)活性を測定した。

C. 研究結果

1) in vivo

Cd…… 系統にかかわらず Cd 投与群では新生仔血清中 T4 の濃度が非投与群に比べて低い値をしめした, 図1に見るように, 特に MT-null において投与の影響が強いことがうかがわれた. 新生仔肝のタイプ1の脱ヨード酵素活性については, Cd は影響を与えなかった(図2). 新生仔脳の種類2脱ヨード酵素活性については, 2元配置分散分析において Cd 投与の効果が有意であり, 投与によって活性が高くなっていたことを反映していた. 群間比較でみると, MT-null でのみ, 投与群と非投与群との間に有意差を認めた(図3). タイプ3活性は, 特に MT-null においてはタイプ2への影響の mirror image のようにも見えるが, 有意差には至らなかった(図4).

MeHg…… 血清 T4 については, 全体として2元配置では系統差が認められ, MT-null が高値であった. MeHg の効果は有意ではなかった(図5). 肝のタイプ1には影響が認められなかった(図6). 脳ではタイプ3で MeHg の効果が有意であり, 投与によって活性が抑制された. 群間比較では, 野生型のみで投与群<非投与群という差が有意だった(図7). タイプ2では系統・曝露ともに効果は有意ではなかった(図8).

2) in vitro

MeHg を培養液に添加すると, 濃度依存的にタイプ2脱ヨード酵素活性の抑制が認められた.

対照群と比較した場合、30nM 以上で有意な抑制であった (図 9)。100nM の添加条件において、経時的变化を観察したところ、曝露時間が長いほど抑制の程度が強くなった (図 10)。チオール保護剤である DTT を共存させると MeHg による活性抑制はほとんど認められなくなった (図 11)。LB プロットにより、活性抑制のキネティクスを検討した結果、MeHg による活性抑制は競合阻害であることが示された (図 12)。

D. 考察

胎生期の重金属曝露によって、甲状腺ホルモン環境がどのような影響を受けるかについて検討した報告は少ないと思われる。我々は妊娠マウスの妊娠中期に 3mgHg/kg/day という比較的高い用量のメチル水銀を 3 日間投与し、胎生期の 17 日目に解剖して、同様の検討を行った (Watanabe et al., 1999)。その結果、胎仔脳においてタイプ 3 が抑制され、タイプ 2 は促進された。今回の結果においても、タイプ 3 は抑制され、タイプ 2 は (野生型において) 有意ではないが、わずかに促進される傾向が示されていて、基本的に両者の結果は矛盾しないと言える。また、血清 T 4 レベルについては MeHg の効果はなく、この点でも一致を見ている。前報において胎仔脳内の水銀濃度は 10ppm を超えており、本実験とは 10 倍以上の開きがある (吉田稔氏による項を参照)。このような低いレベルの脳内濃度でも同様の結果が得られたことから、これらの酵素系が MeHg のターゲットとなっている可能性が示唆される。脳はそれ自身が必要とする T 3 を局所的に産生していて、循環血流中の T 3 には依存しない。脳の甲状腺ホルモン環境にとっては、むしろ循環血流中の T 4 のレベルが重要である。この T 4 レベルに大きな変化がないにもかかわらず、脱ヨード酵素活性が変化することから、脳内に達した MeHg が直接酵素活性に影響を及ぼしている可能性も示唆される。活性変化のメカニズムとともに重要なのが、活性変化による脳組織内での T 3 レベルの変化である。単純に考えて、得られた変化は (前報と共通して) T 3 の過剰をもたらす側へのシフトであるが、果たして実際に T 3 レベルの上昇が認められるのか、将来の課題である。

メチル水銀による酵素活性の修飾についての *in vitro* の結果は、*in vivo* の結果と一致していない。DTTの添加 (*live cell*および*cell extract*) 実験より、おそらくMeHgはタイプ2の活性中心に非可逆的に結合し、活性を阻害すると考えられる。この活性中心はDTTにより速やかに保護されるため、*cell extract*にMeHgを添加する場合かなり高い濃度のMeHgが活性阻害に必要なが、*live cell*に添加する場合はかなり低濃度のMeHgで活性は阻害される。また *live cell* ではMeHgの細胞内への輸送がDTTより遅いため、DTT存在下で培養するとMeHgによるタイプ2活性阻害は生じない。

in vivo で測定された脳内濃度はおよそ 2 μM であり、*in vitro* での添加濃度 (細胞内濃度は不明であるが) より遙かに高い。これより高い濃度領域で組織抽出液を用いて添加実験を行っても同様の結果が得られ、タイプ2については添加実験を行う限りは活性抑制しか観察されていない。現在のところ、この実験系による食い違いが何に由来するものかは明らかでない。既に述べた妊娠期中期における中等度投与の影響を検討した結果では、タイプ3について、胎仔脳では若干の抑制が認められたのに対し、胎盤では活性の亢進が認められている。両組織においてMeHgの濃度は同程度であったことから、母体循環のホルモンレベルの影響の可能性はあるものの、組織特異的な因子とMeHgとの相互作用という可能性も考えておく必要がある。

Cdが甲状腺ホルモンに対して影響を及ぼすという今回の結果は全く予想外であったが、脱ヨード酵素の活性への影響自体は、血清中T4レベルの変化への反応と解釈できる。すなわち、Cd曝露によって血清T4が低下するため、これに対して補償的にタイプ2の活性があがっていると考えられる。T4レベルの低下が、MT-nullでより強く認められた点も注目しておくべきであろう。これに対応して群間比較ではMT-nullのみで曝露群と非曝露群とにタイプ2活性の有意差があり、タイプ3の活性も有意差には至らないものの、曝露群がやや低値を示している。MT-nullにおいてCd毒性が増強されるという結果は、様々なエンドポイントについて示されているが、仔の甲状腺ホルモンに関連するシステムにも当てはまるといって

よいと思われる。

げっ歯類では胎生期の後半から胎仔の甲状腺が機能を果たし始めており、授乳期の仔は自身の甲状腺に依存していると考えてよい。T4の低下が新生仔の甲状腺機能の低下によるものなのか否かについての検討が必要であろう。Cdが甲状腺ホルモンに及ぼす影響についての知見は極めて限られている。最近、ドイツで産業廃棄物焼却場周辺に居住する7-10才の小児を対象に実施された疫学調査において、血中のCdとfree T4が負に相関する一方で、TSHが正に相関するという結果が得られている (Osius et al., 1999)。また、妊娠ラットにおいてCdの投与によって血清中T4、T3のレベルが低下したとの報告がある。これらの報告と今回得られた結果とは影響の方向という点で矛盾しない。

E. 結論

比較的低濃度のCdおよびMeHgに周生期に曝露された場合、脳の甲状腺ホルモン環境に影響が検出された。影響はCdとMeHgでは異なっており、Cdについては血清中のT4の低下が脳内の脱ヨード酵素活性の変化を惹き起こしたものと思われ、循環中T4の低下の機構を解明する必要がある。MeHgの影響はT4の変化を起こさずに脳内脱ヨード酵素活性にT3産生を増加する方向の変化を誘導するものであり、脳内に分布したMeHgが直接作用している可能性が示唆される。しかし、*in vitro*で認められたタイプ2の抑制という観察とは相容れなかった。組織特異的な因子との相互作用という可能性も含めた検討が必要であろう。これとは別に、*in vitro*におけるタイプ2への影響は極めて低い濃度で認められており、この系がMeHgに極めて敏感であることが示された。

今後の課題として、重金属曝露マウス脳組織中のT3濃度の定量、T3応答性遺伝子の発現解析、培養細胞系におけるタイプ2活性阻害機序の解明などがあげられよう。Cdについては、最近エストロゲン様の作用も確認されており、甲状腺ホルモン系への作用も注目すべきである

と思われる。また、本研究の中心課題である感受性の修飾要因として、甲状腺機能を含めた甲状腺ホルモンの制御の不全が関与する可能性も示唆されたと考えられる。

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.
- Osius N, Karmaus W, Kruse H., and Witten J (1999) Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in Children. *Environmental Health Perspectives*, 107, 843-849.

Fig1

Effect of Cd on T4 [microg/dL]

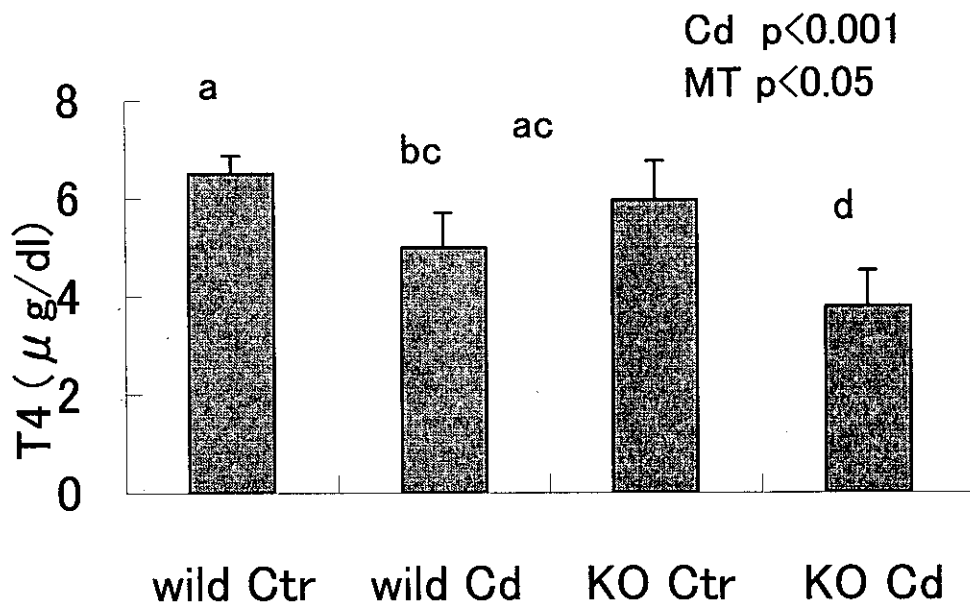


Fig2

Effect of Cd on liver D1 [U/mg]

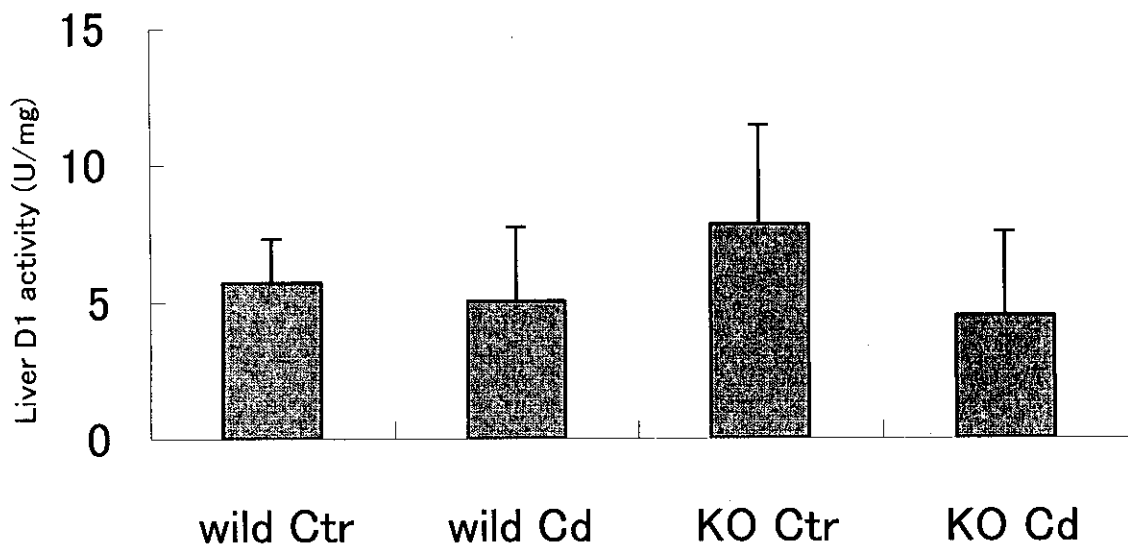


Fig3

Effect of Cd on brain D2 [U

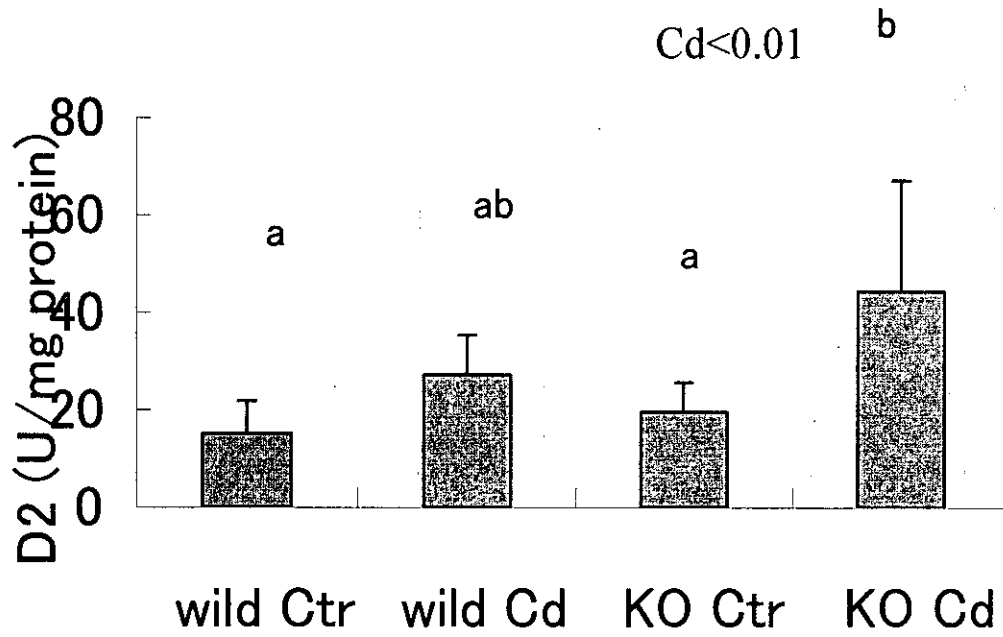


Fig4

Effect of Cd on brain D3 [U/mg]

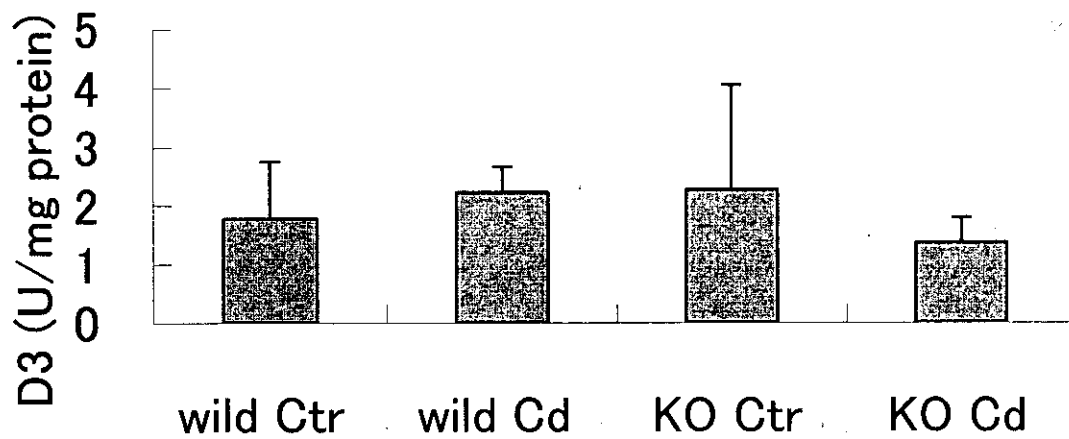


Fig5

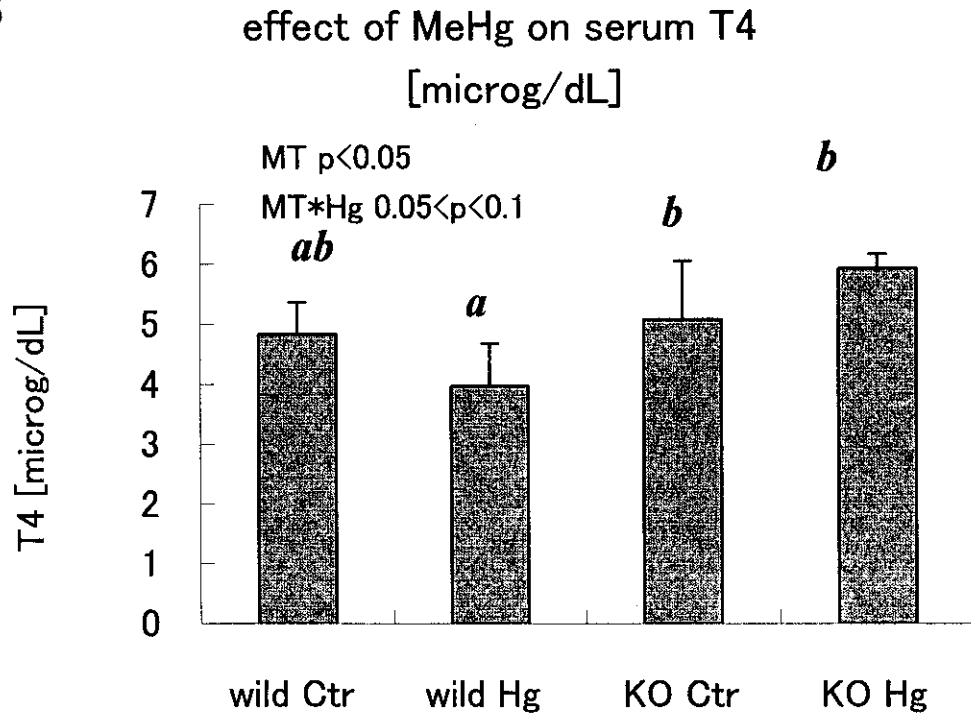


Fig6

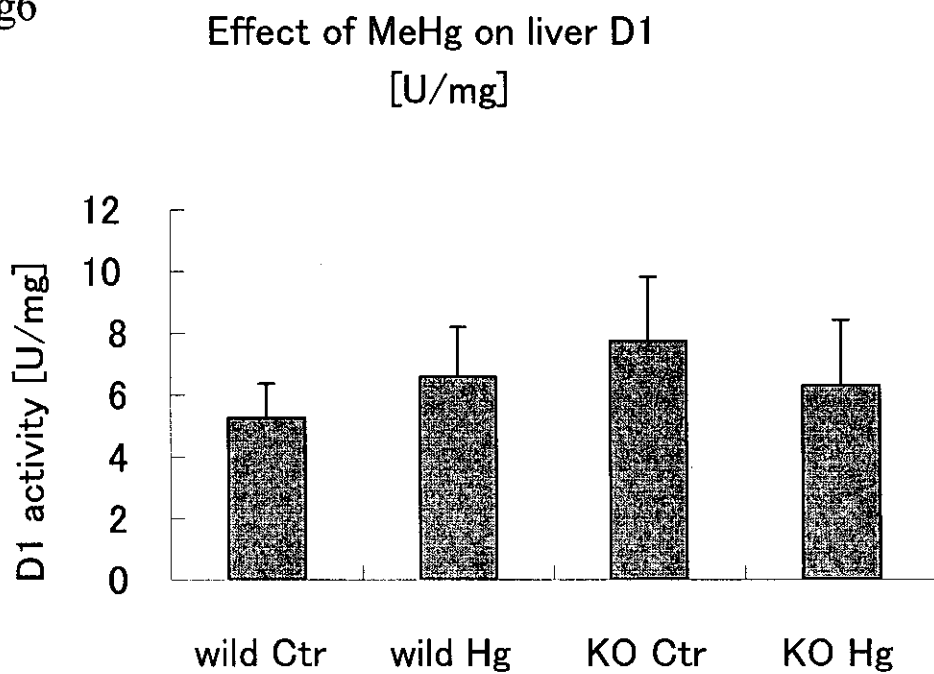


Fig7

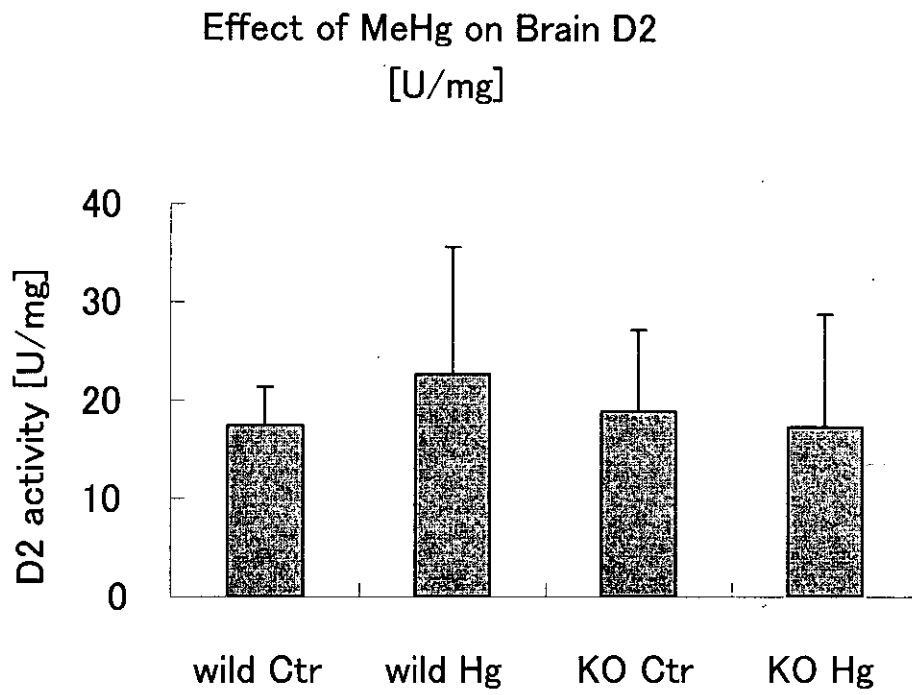
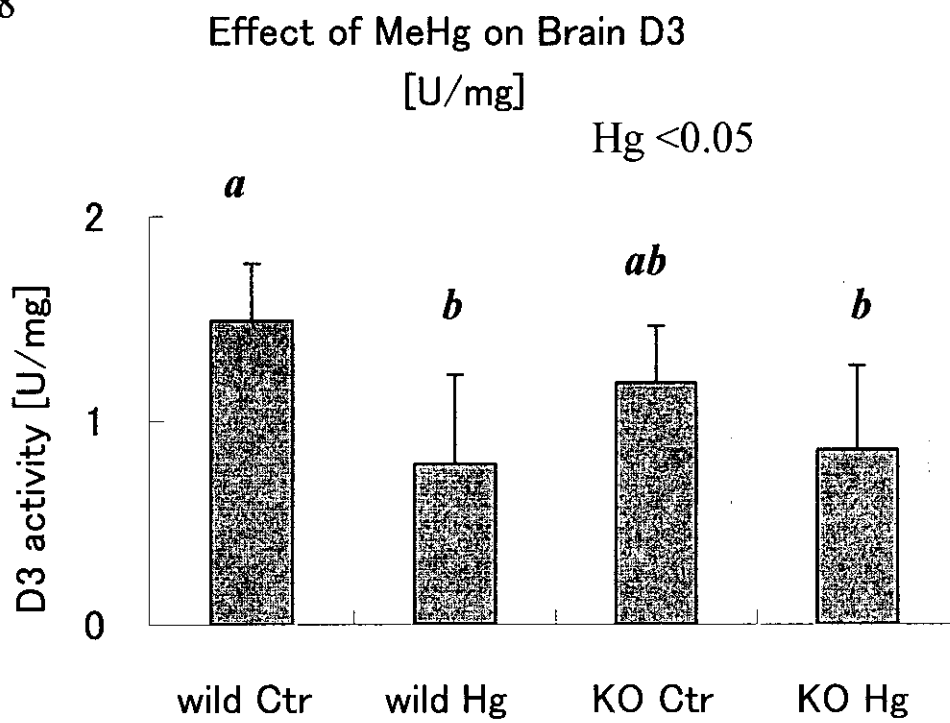


Fig8



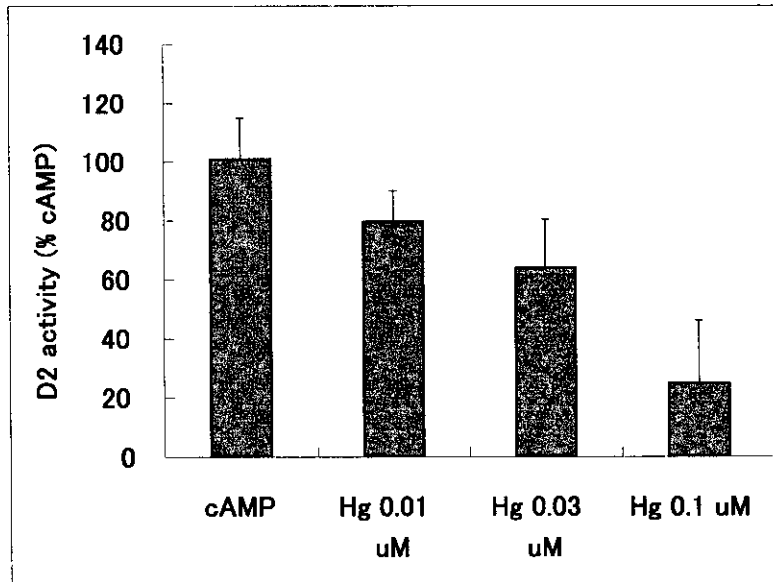


図9. 各種濃度のMeHgによるD2活性の抑制
(MeHg添加2日後にD2活性を測定)

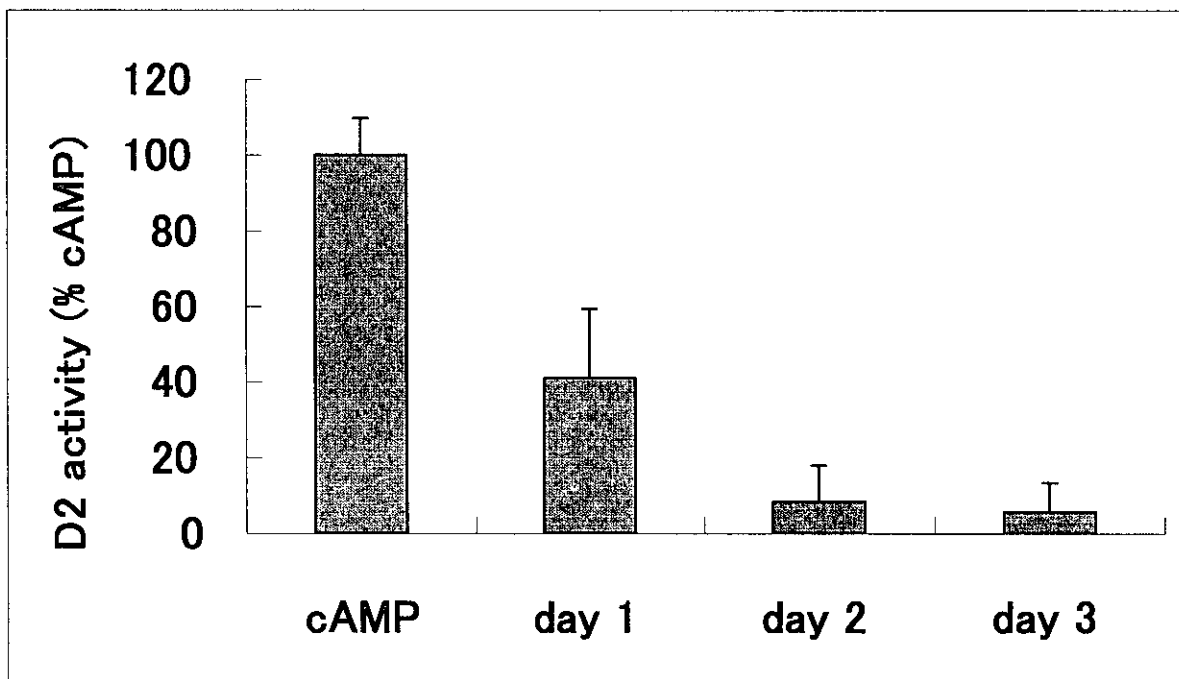


図10. 0.1 μ M MeHgによるD2活性の抑制
(time course study)

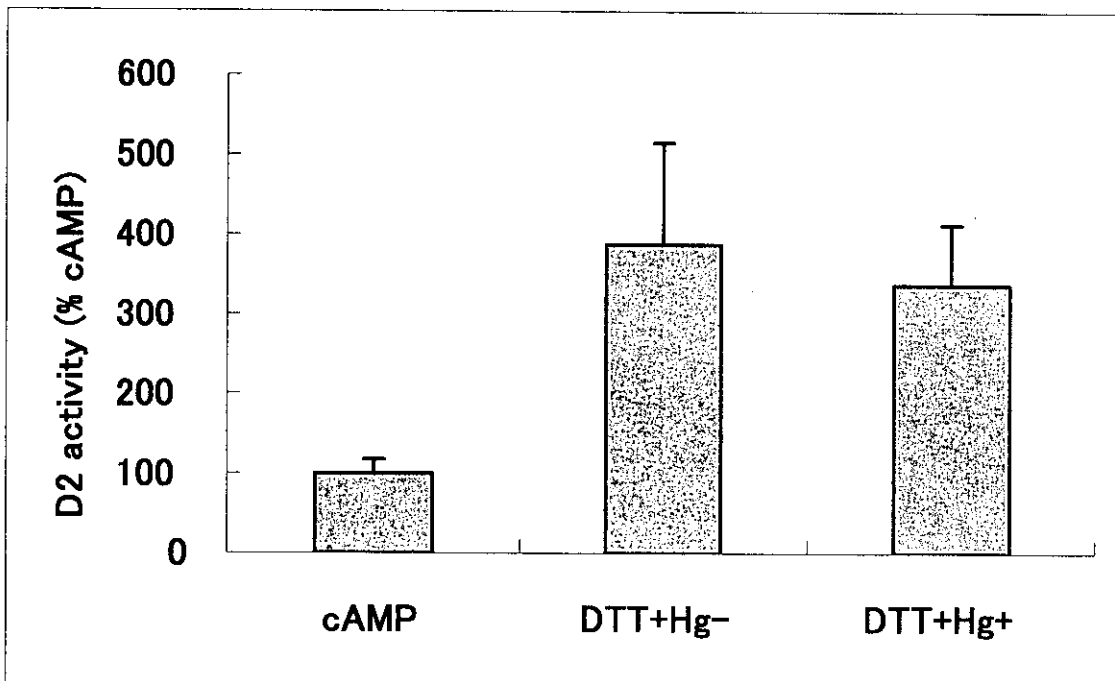


図11. DTT添加の影響
(DTTとMeHgは同時に添加し2日後にD2活性を測定)

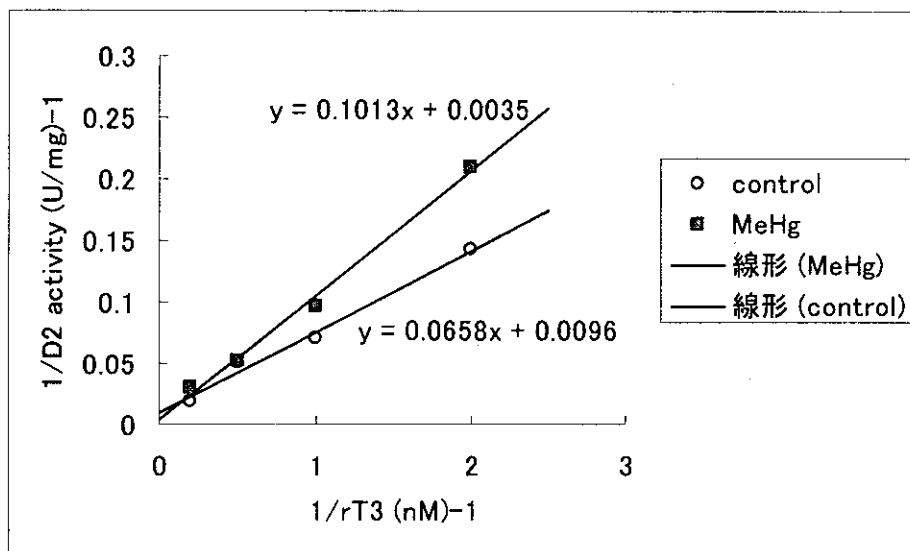


図12. Lineweaver-Burk plot: competitive inhibitionであった
(0.1 μM MeHg添加1日後にD2活性を測定)

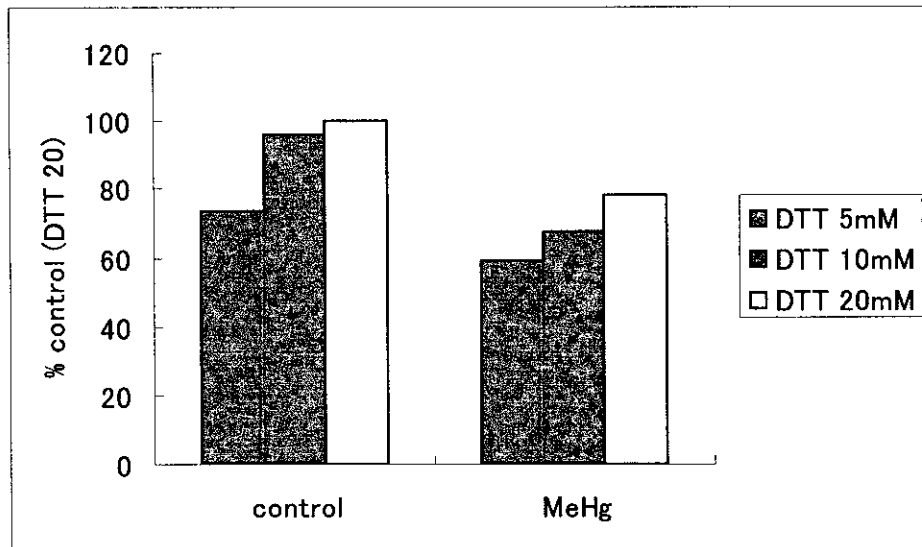


図13. D2活性測定時のreaction mixture内のDTT濃度の影響
(MeHg添加1日後に活性測定)

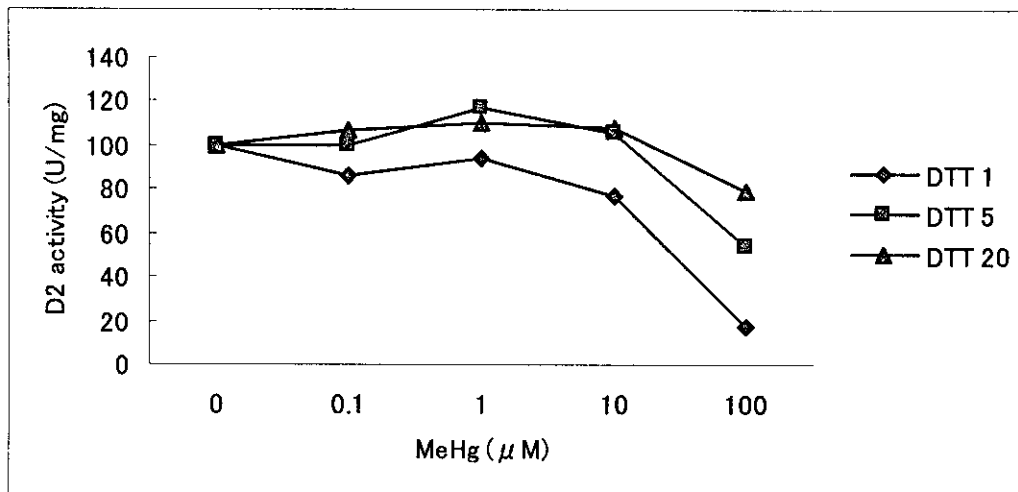


図14. D2活性測定時のreaction mixture内のDTT及びMeHg濃度の
酵素活性に及ぼす影響(無処理細胞のcell extractを使用)