

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：

副腎摘出マウスを用いた検討の試み

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

A. 研究目的

脳神経系は出生前後の極めて短い期間に発達し、この期間における内分泌系の支配を大きく受ける。たとえば生殖に関連するといわれているバゾプレシン陽性ニューロンは出生前後のテストステロンレベルにより高密度に発達するし、低周波領域の聴神経は出生前の母体の甲状腺ホルモンレベルにより発達の度合いが左右される。したがって胎生期に母体が曝露する化学物質によって生じる脳神経系発達への影響は、母体内分泌系の状態によりその度合いが変化することが考えられ、このことは成長後に顕在化する行動異常においても同様当てはまるであろうことは容易に考えられる。

昨年度（平成14年度）は副腎皮質系を操作（副腎切除術(ADX)とグルココルチコイドの慢性投与）したラットに有機錫を投与し、脳内海馬領域のグリア細胞の活性化を指標として神経細胞傷害を観察した。

平成15年度はこの有機錫投与動物を使用して神経細胞傷害のメカニズムをより詳細に検討するためプログラム細胞死（細胞が自らのDNAや細胞膜を破壊して積極的に死ぬこと。apoptosis（アポトーシス）ともいわれ、外因的作用のみで死ぬ細胞壊死とは区別される）を観察した。さらに、これらの方法論を胎生期の水銀曝露による新生仔の神経細胞傷害に対するグルココルチコイドの影響に応用することを試みた。

B. 研究方法

apoptosisの検出はTUNEL法によった。また、以下の方法により胎生期の水銀曝露による新生仔の神経細胞傷害に対するグルココルチコイドの影響についてメタロチオネインノックアウトマウスを用いて検討した。C57/BLマウス（雌）及び同系のメタロチオネイン遺伝子ノックアウトマウス（以下KOマウス）（雌）にADXを生後6週齢以降に施し1週間後に無施術雄マウス（C57/BL）と交配させた。プラグ確認後から直ちに、メチル水銀を5ppmの濃度で混和した餌を出産後10日まで与えた。生まれた仔マウスは原則として雄雌各4匹に間引きし、6週齢に達した時点で断頭屠殺し、脳を取り出した。脳はクライオスタットを用いて14ミクロンの薄切切片として凍結保存し後日の

クレシルバイオレット染色およびTUNEL染色に供する予定である。

C. 研究結果

図1は有機錫を投与して5日目のラット脳内の海馬領域におけるTUNEL陽性細胞である。海馬のCA1領域からCA3領域および歯状回の上下両方のブレードにおいて広範囲にapoptosisの生じているのがわかる（図2は歯状回上ブレードの拡大）。

これまでに（平成16年3月末）得られているADXを施した母マウスから生まれた仔のサンプルは、MT-null系統の水銀非曝露群が2匹（いずれも雌）、野生型マウスの水銀曝露群が23匹（雄14匹、雌9匹）、野生型マウスの水銀非曝露群が9匹（雄4匹雌5匹）である。なおMT-null系統の水銀曝露群については、これまで妊娠したマウスはあるものの、出産後新生仔を直ちに食殺したため脳サンプルは得られていない（3月末に漸く3腹分の新生仔が無事出産し、その後順調に生育しているので4月下旬には脳サンプルが得られる予定である）。

D. 考察および来年度の展望

母体のグルココルチコイドはそのレベルが適量より大きくても少なくとも胎仔の脳神経発達を傷害するとされている。今回の実験では母体にADXを施して低グルココルチコイド状態としたところで、メチル水銀曝露を実施したが、このような複合的な条件

を用いた実験は従来にないものと思われる。これとは逆のグルココルチコイド過剰の条件については、Ahlbomら（2000）が検討を行った。彼らによると、ラットに妊娠14日目から合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン投与しておき、1週齢の仔ラットから小脳の細胞を取り出し、これを培養して、メチル水銀を添加、これによるアポトーシスの誘導を見たところ、デキサメタゾン投与群由来の小脳細胞では、非投与群のもの比べて、アポトーシスの誘導が有意に亢進していた。低グルココルチコイド状態でもメチル水銀曝露による脳神経系の傷害が増強されるものであれば、このAhlbomらと類似したことが得られるものと予想される。

無論、これらの事象をメタロチオネイン遺伝子欠損動物を用いて検討した報告はない。上述のAhlbomらの報告では、アポトーシスの誘導に酸化ストレスが関与していたことが示されている。メタロチオネインには、ラジカル消去作用も報告されていることを考えると、低グルココルチコイド状態という厳しい状況では、MT-nullは水銀による脳神経細胞傷害により敏感な可能性がある。実際にメタロチオネインの存在によりメチル水銀毒性軽減されることが確認できれば、水銀のリスク評価に有用な知見となることが期待される。MT-nullのHg曝露群で喰殺が見られたことは、この可能性を支持しているかも知れない。

なお、エリチェ会議(1995)、先進国環境担当閣僚会議(1997)及びOECD内分泌かく乱化学物質の試験及びアセスメントに関する試験法開発に関する各国調整官及びリスクア

セメント専門家合同会議(1997)において外因性化学物質の胎児・小児への曝露がその後の中枢神経系発達に及ぼす影響が指摘され、国際的には同影響に関する研究推進の重要性が広く認識されていることをつけ加えておきたい。

E. 参考文献

Ahlbom E, Gogvadze, V., Chen, N., Celsi, G., and Ceccatelli, S. (2000) Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. PNAS 97, 14726-30.

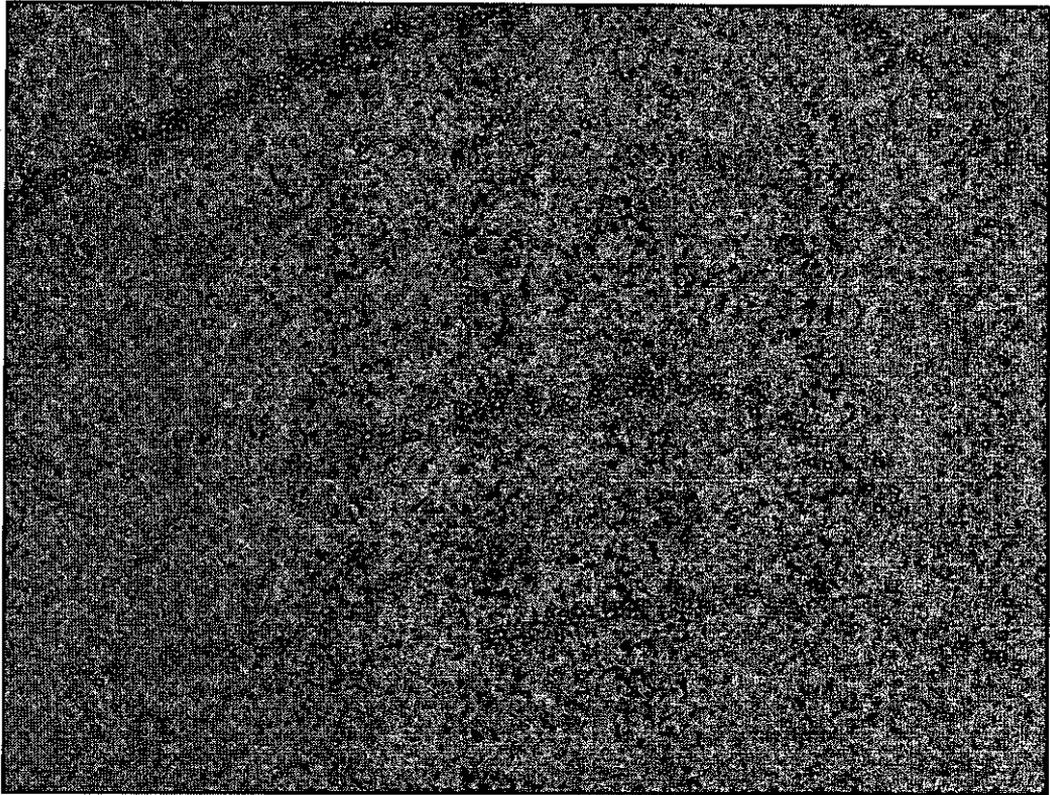


図1 有機錫投与ラット脳の海馬における
TUNEL陽性細胞

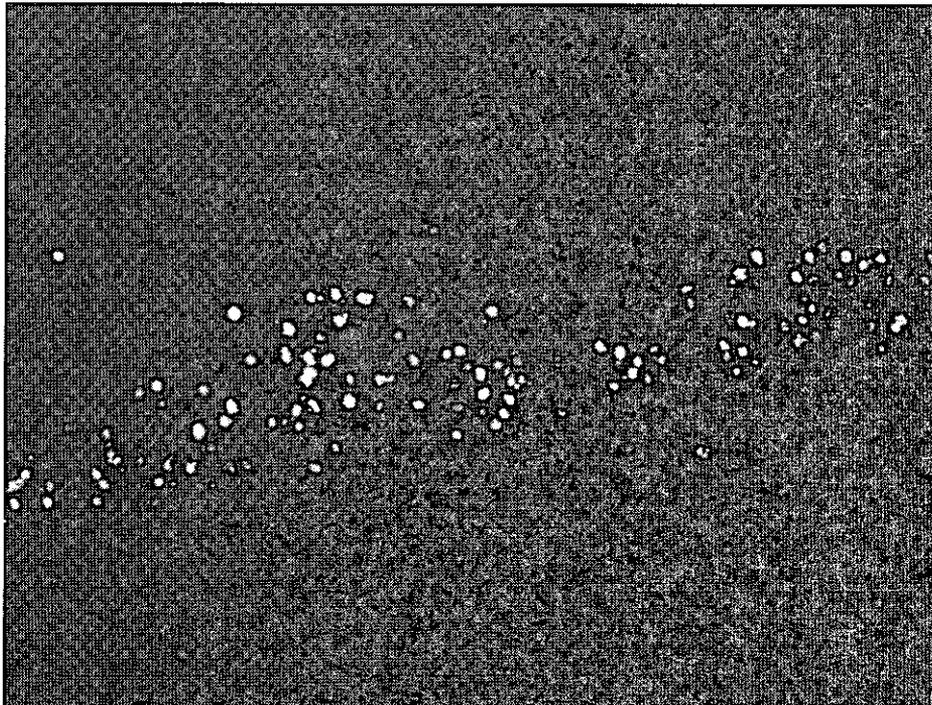


図2 海馬歯状回の拡大