

Fig 3. Effect of Cd exposure to the dams during pregnancy and early lactation period on Cd (A), Zn (B) and Cu (C) concentrations in tissues of offspring at PND10.

Data are expressed as mean \pm SE.

#; $p < 0.05$ different from each other by one-way ANOVA

*; $p < 0.05$ compared with control

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告

甲状腺機能阻害剤の周生期投与による新生仔マウス臓器中微量元素の変動

主任研究者 渡辺知保 東京大学大学院医学系研究科人類生態学助教授

研究協力者 水上知広 東京大学大学院医学系研究科人類生態学教室

研究要旨

前年度までに、カドミウムが発達毒性を示すことを示唆する複数のデータを得ているが、前年度吉田（克己）氏らが示したように、詳細は不明ながら甲状腺機能への影響が認められた。したがって、カドミウムの発達毒性の少なくとも一部が甲状腺機能への影響を介したものである可能性が考えられる。前項で述べたように、カドミウムは必須微量元素の代謝に影響を及ぼし、甲状腺機能と微量元素には関係があることも示されているが、成長発達が盛んな新生仔期において、甲状腺機能と微量元素の関係を調べた報告はきわめて限られている。そこで、本研究ではマウスの妊娠 12 日目から仔の出生後 10 日目（PND10）にわたり MMI (methimazole) 0.008、0.025、あるいは 0.08%(v/w) を含む飲料水を摂取させることにより甲状腺機能を低下させ、PND10 に母子の脳、腎、肝中の銅、亜鉛濃度を ICP-MS を用いて測定した。MMI の投与によって、胎児期及び新生仔期における体重増加は量依存的に減少し、母子ともに解剖時において血漿中 T_4 濃度は低下していた。 T_4 の反応と MMI の投与量との関係は母と仔では異なっており、MMI に対する感受性は仔の方が高いと示唆された。

新生仔では、肝・腎ともに銅濃度は有意に低下し、亜鉛濃度は有意に上昇した。特に肝の銅濃度は、高濃度群において対照群の 1/4 にまで低下した。これら新生仔における変動は、本研究よりも甲状腺機能低下の程度がより大きい条件で実施された成獣における微量元素の変動とは反対であった。以上より、周生期における甲状腺機能の低下が新生仔臓器中微量元素に及ぼす影響は、成獣と異なること、それらの変化の方向は、低濃度のカドミウム曝露と同じであることが示された。

1. 緒言

銅と亜鉛は必須微量元素であり、ヒトの生存にとって不可欠である。銅の生体内での影響は多様であり、様々な銅酵素として働いている⁽¹⁾。亜鉛の生体内での影響もまた多様であり、300 以上の亜鉛酵素が存在している⁽²⁾。哺乳類では 30%以上の亜鉛が核内に存在し⁽³⁾、多くの亜鉛を含んだたんぱく質が遺伝子発現に関与している⁽⁴⁾。ヒトを含む哺乳類では正常な成長と発達に、銅と亜鉛が必要であることが示されており、胎児期や新生児期の銅欠乏は、催奇性⁽⁵⁾、脳中カテコールアミン量の減少^(6,7)、中枢神経系における髄鞘形成の低下^(8,9)を示す。また、胎児期や新生児期の亜鉛欠乏も催奇性を引き起こし^(10,11)、成長障害⁽¹⁰⁾や認知機能の変化⁽¹²⁾をもたらす。

ヒトの甲状腺機能低下症では、血清中の銅及び亜鉛濃度は低下することが知られている^(13,14)。実験動物では、妊娠マウスの甲状腺機能をプロピルチオウラシル (propylthiouracil: PTU) 投与によって低下させたとき、母体の脳、腎、肝の銅濃度が上昇したことが報告されている⁽¹⁵⁾。ただし、この実験では PTU 投与によって、母マウスのチアノーゼと新生仔の高い死亡率が観察された。また、甲状腺機能を低下させたラットでは、肝と腎の亜鉛濃度が低下する例も報告されている⁽¹⁶⁾。このように、甲状腺機能と微量元素には関係があることが示されているが、その詳しい仕組みはまだ明らかになっていない点が多い。

甲状腺ホルモンの作用は多様であり⁽¹⁷⁾、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、成長と分化を制御する因子である⁽¹⁸⁾。甲状腺ホルモンと亜鉛はともに成長を制御し、成長ホルモンと相互作用することが知られている。しかし、成長発達が盛んな新生仔期

において、甲状腺機能と微量元素の関係を調べた報告は極めて限られている。

メチマゾール (methimazole: MMI) は、甲状腺濾胞細胞において甲状腺ペルオキシダーゼを阻害し、甲状腺ホルモンの前駆物質であるチログロブリンのチロシン残基ヨウ素化を抑制する、代表的なチロキシン合成阻害剤である⁽¹⁹⁾。実験動物において、MMI は PTU とともに、甲状腺機能低下モデルを作るのによく用いられる⁽²⁰⁾。妊娠マウスに MMI を飲料水に溶かして投与すると、MMI は胎盤を容易に通過し、胎児と母の血中濃度比がほぼ 1 になる⁽²¹⁾。MMI は乳汁分泌性 (乳汁/血漿濃度比 1.0。c.f. PTU:0.1) もある^(22,23,24,25)。

本研究では、周生期マウスに MMI を投与して甲状腺機能を低下させ、新生仔期に脳、腎、肝中の銅と亜鉛濃度を測定することにより、甲状腺機能が臓器中微量元素に与える影響を、成長と関連させ明らかにすることを目的とした。

2. 対象と方法

2.1. 動物及び MMI 周生期投与

妊娠 1 日目のマウス(C57BL/6J)を日本クレア社から 17 匹購入した。餌は NIH-07PDL (オリエンタル酵母工業社製。成分《日本食品分析センター調べ》:水分 6.5%、粗たんぱく質 26.6%、粗脂肪 6.5%、粗繊維 1.7%、粗灰分 6.8%、可溶無窒素物 51.9%) を与えて飼育した。飼育室の温度は 23±2°C、湿度は 50±10%、明暗サイクルは 12 時間 (明: 7:00~19:00、暗: 19:00~7:00) に保った。

17 匹のマウスは投与する MMI の濃度によって 4 群に分けた。4 群はそれぞれ、対照群 (n=6)、低濃度群 (0.008% (w/v); n=4)、中濃度群 (0.025; n=4)、高濃度群 (0.080; n=4) とし、マウスは GD1~10 (妊娠後の日数; プラグ確認日を GD0 とした) の体重増加量の平均値が等しくなるよう割り付けた。MMI は精製水 (milliQ による) 中に溶かし、GD12 から PND10 (出産後 10 日目; 出産確認日を PND0 としている) まで各母マウスに投与した。MMI を含む飲料水は適宜再調製して補充した。PND0 に一腹の産子数及びその雌雄の数を記録した。PND1 に母マウス 1 匹あたりの仔を雄雌それぞれ 2 匹ずつ合計 4 匹にそろえた。ただし、新生仔の雌雄どちらかが 2 匹に満たない場合は合計 4 匹になるようにそろえ、合計 4 匹を満たない場合はそのままとした。新生仔の体重測定時

(PND0,3,6,10) に確認した仔数が、PND0 で記録された新生仔数より減少していた場合、その差を食殺数として記録した。

2.2. 母及び仔マウスの解剖

すべての母及び仔マウスの体重を GD1,10,12,14,16,18 及び PND0,3,6,10 に測定した。

PND10 にすべての母及び仔マウスを解剖し、脳、肝、腎、及び血液を採取した。母、仔（雄）、仔（雌）マウスの各臓器重量を測定し、微量元素の測定に備え-80℃で保存した。血液は 15 分間遠心分離（15,000 rpm、4℃）し、血漿を T₄（チロキシン）測定まで-80℃で保存した。この際、仔の血液は同じ母マウスから産まれた全ての仔のものをプールした。

2.3. 血漿 T₄（チロキシン）の測定

母及び仔マウスの血漿 T₄ は enzyme immunoassay (EIA) kit（Dainabot 社（東京）製。IMx T₄ ダイナパック）を用いて測定した。本測定は、東北大学大学院医学系研究科 腎・高血圧・内分泌内科 森弘毅先生に依頼して、東北大学において行われた。

2.4. 組織中微量元素濃度の測定

母、仔（雄）、仔（雌）マウスの各臓器中の銅と亜鉛の含有量は ICP-MS（Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry：誘導結合プラズマ質量分析法）を用いて測定した。ICP-MS は無機元素分析装置であるため、試料は湿式灰化した後測定を行った。

湿式灰化は以下の手順で行った。各臓器から組織 100 mg を採取し、硝酸と過塩素酸の 2:1 の混酸を加えた。試料を 90℃に加熱して 20 分その温度を維持した後、110℃で 5 時間加熱した。加熱灰化した試料は冷却した後、milliQ 精製水で希釈して保存し、ICP-MS を用いた測定に備えた。

ICP-MS 装置は HP-4500（Hewlett-Packard 社製）であり、イットリウムを内標準として添加し、絶対検量線法によって銅と亜鉛を定量分析した。ICP マルチエレメントスタンダード XXI MS 用（メルク社製）を用いて検量線を作成し、NIST-SRM (National Institute of Standards & Technology, Standard

Reference Material) 1577b Bovine Liver (ゼネラルサイエンスコーポレーション社製。成分：銅 160±8 µg/g、亜鉛 127±16 µg/g) を標準資料として測定し、銅、亜鉛とも保証値の範囲内であることを確認した。

2.5. 統計分析

統計パッケージとして JMP version 5.1.1 を用いた。本研究で測定した各指標について、「MMI 投与量」を効果とする一元配置分散分析を行った。また、仔から得られた各指標については「MMI 投与量」と「性差」を効果とする二元配置分散分析を行った。有意水準はいずれも 0.05 とした。

3. 結果

3.1. 母及び仔マウスの体重変化

GD1,12,18 において体重に有意差はなかったものの、MMI を投与開始した GD12 から GD18 までの体重増加量で群間に有意差 ($p < 0.05$) があった。これは、図 1 で示されるように、MMI 投与後 2 日間の体重増加の群間差 ($p < 0.01$) によるもので、この 2 日間における高濃度群の増加量は対照群と比べて有意に小さかった ($p < 0.05$; Dunnett)。[図 1]

出産日は GD19 で 5 匹、GD20 で 10 匹、GD21 で 2 匹であった。17 匹中 1 匹 (0.080%群) のマウスが仔を全て食殺し、食殺は全て PND0 から PND3 の間に起こった。表 1 で示されるように、一腹の産子数に有意差はなかったが、MMI 投与量によって出産日が異なる傾向が見られた。食殺は中濃度群と高濃度群で観察され ($p < 0.05$)、高濃度群の食殺数は対照群と比べて有意に多かった ($p < 0.01$; Dunnett)。[表 1]

図 2 に示されるように、新生仔の体重増加量は MMI の量依存的に小さくなった。その結果、PND0 の新生仔の体重に有意な差はないものの、PND10 の体重には有意差 ($p < 0.05$) があった。PND10 における高濃度群の平均体重は対照群の 89%であり、有意に小さかった ($p < 0.05$; Dunnett)。[図 2]

3.2. 母及び仔マウスの臓器重量

母マウスでは肝重量と腎重量が MMI の量依存的に増加した。また脳重量は、母仔ともに MMI

の低用量では対照群と比べて小さいが、投与濃度の増加に伴い大きくなるというパターンが見られ、仔では投与量の異なる群間で脳重量に有意差があった ($p<0.05$) が、性差は見られなかった。その他の仔の臓器では、重量には群間の差が見られなかった。母マウスの肝重量は群間に有意差があり ($p<0.01$)、高濃度群は対照群と比べて有意に大きかった ($p<0.01$; Dunnett)。

3.3. 血漿中 T_4 濃度

母及び仔マウスの血漿 T_4 量はそれぞれ群間で有意差があった。図 3 に示すように母マウス ($p<0.01$) では MMI を投与した群全てで血漿 T_4 濃度は低下し、仔マウス ($p<0.001$) では量依存的に低下した。母マウスでは投与群全ての血漿 T_4 濃度が対照群に比べて有意に低下し ($p<0.05$, 0.01, 0.05 ; Dunnett)、仔マウスでは中濃度群と高濃度群の血漿 T_4 量が対照群に比べて有意に低下した ($p<0.01$, 0.001 ; Dunnett)。[図 3]

3.4. 組織中微量元素濃度の変動

母及び仔マウスの各組織中の銅と亜鉛の濃度は表 2 のようになった。[表 2]

母マウスの各組織中の銅及び亜鉛の濃度に群間差は見られなかった。一方、仔マウスの組織中銅濃度は、投与群の脳、肝 (図 4)、腎 (図 5) で MMI の量依存的に低下し、脳及び腎では雌のほうが高かった。肝 ($p<0.0001$) 及び腎 ($p<0.05$) 中において、投与量の異なる群間で銅濃度に有意差が見られ、腎 ($p<0.05$) において性差が有意であった。また、高濃度群の肝中銅濃度が対照群に比べて有意に小さかった ($p<0.05$; Dunnett)。脳中の銅濃度は投与量の異なる群間で差は見られなかったが、腎と同様に性差が見られた ($p<0.001$)。[図 4] [図 5]

仔マウスの組織中亜鉛濃度は、脳においては、投与量の異なる群間での差も、性差も見られなかった。肝及び腎 (図 6) において MMI の量依存的な増加が見られ、腎では群間差が有意であった ($p<0.05$) が、性差は見られなかった。[図 6]

4. 考察

母及び仔マウスの血漿中 T_4 濃度から判断すると、MMI は低濃度群でも甲状腺機能を低下させており、モデルとしての有効性が示されたと考えられる。甲状腺機能低下によって周生期の成長が阻害されたことは、新生仔体重増加の減少や、妊娠中 MMI 投与開始直後の高濃度群における体重増加の一時的な抑制などとも整正された結果である。

T_4 の反応と MMI の投与量との関係は母と仔で異なっていた。新生仔では T_4 が MMI の量依存的に低下したが、母体では量依存性を認めなかった。ラット成獣を様々な濃度の MMI に暴露した実験⁽²⁰⁾では、飲料水中 MMI 濃度と血清中 MMI 濃度は相関したが、甲状腺中の MMI 濃度は、飲水中 MMI 濃度の増加に対して頭打ちとなった。また、ラット甲状腺で 50% のヨウ素結合抑制を示した投与濃度は、本研究の低濃度群より低い 0.003% (飲料水中) であった。マウスにおいても、本研究の投与濃度では甲状腺における作用が頭打ちとなり、母マウスの血漿中 T_4 濃度にも投与群間の差が見られなかった可能性がある。ただし、マウス成獣において MMI の投与により血漿中 T_4 をほぼ枯渇させた例もあることを考えると、血漿中 T_4 濃度が頭打ちになった理由は他にもあると考えられる。これに対し、仔マウスの血漿中 T_4 濃度が MMI の量依存的に低下したのは、MMI に対する感受性が異なるためと考察される。既に述べた先行研究^(22,23,24,25)によると、MMI の血漿/乳汁濃度比が 1.0 であると報告されており、これに基づけば、乳汁中の MMI の濃度は飲料水中 MMI 摂取量に相関している。また、血清中の MMI 濃度は飲料水中の濃度と比べて極めて低い (約 1/25) ことが知られているため⁽²⁰⁾、乳汁中 MMI 濃度は、飲料水中の濃度より低かったと考えられる。従って、仔マウスは、その血清中 MMI 濃度は親マウスよりも低いと予想されるにかかわらず、親マウスと同程度 (約 3/4) の T_4 濃度低下を示したことになり、MMI に対する感受性が高いと示唆される。このことは、仔マウスの血清中 MMI 濃度を実際に測定することによって検証する必要がある。

ラット成獣の臓器中微量元素は甲状腺機能低下状態において、銅が脳、肝、腎において増加し、亜鉛は肝、腎において減少する。このとき、PTU を投与したラットで、母体のチアノーゼと新生仔の高い死亡率が観測されており、肝、腎の亜鉛を測定したラットでは血清中 T_4 濃度は対照群の半分であった。本研究のモデルは、これらの先行研究よりも甲状腺機能低下の程度が弱かったことが、母マウスの臓器中微量元素に差が表れなかった原因と考えられる。

新生仔マウスのいずれの臓器においても銅濃度は低下し、肝、腎において亜鉛濃度が上昇した。この結果は、甲状腺機能低下の程度がより大きい条件下で行われたラット成獣と反対の結果である。また、新生仔マウスとラット成獣いずれにおいても銅と亜鉛の増減が反対に変動した。このことから甲状腺ホルモンは、臓器微量元素に影響を与える際に、この二つの元素を反対に変動させると予想される。新生仔のみで変化が認められたことは、上述した T_4 の効果の違いが関連しているのかもしれない。

新生仔の肝における、高濃度群の銅濃度の低下は特に顕著であった。MMI は Cu^{2+} の強力なキレート剤であり、セルロプラスミンやチロシナーゼなどの銅酵素（酸化酵素）を阻害する⁽²⁶⁾。このことから、肝中の銅濃度の低下は甲状腺機能への影響を介したのではなく、MMI の局所的なキレート効果による可能性も考えられる。しかし、血清 MMI 濃度の低いと推測される新生仔のみで銅濃度が低下したことから、キレート剤としての作用が肝中の銅濃度の変動原因であるとは考えにくい。また、MMI のキレート剤としての作用によって、生体内の銅量が減少したという報告も見あたらない。銅変動の他の理由としてメタロチオネイン（metallothionein: MT）が考えられる。MT は金属結合たんぱく質であり、生理的には亜鉛・銅を結合していて、重金属をはじめとする有害化学物質、ストレスなどの因子によって誘導されることが知られている⁽²⁷⁾。また、前述したラットの甲状腺機能低下モデルでは、肝 Zn の減少とともに、肝の MT 濃度が低下した。このことから、新生仔の肝の銅濃度が低下したのは、MT の減少による可能性も考えられる。

今回、脳、腎において銅濃度の変動に性差が見られたことから、これらの臓器では甲状腺ホルモンと性ホルモンの相互作用があると予想される。ただし、PND10 におけるマウスの微量元素の性差に関する報告は見あらず、そのメカニズムは不明である。

5. 結論

本研究において、周生期における甲状腺機能の低下が新生仔組織中微量元素に及ぼす影響は成獣と異なることが示唆された。また、臓器中の微量元素において、銅と亜鉛の変動が反対になることが示唆された。しかし、今回の実験だけでは詳しい仕組みがわからないので、更なる研究が必要である。

測定微量元素を増やし、PND10以降の臓器中微量元素の変動も調べ、臓器中の微量元素の変動を修飾する因子を同定していくことが今後の課題として挙げられる。

引用文献

1. Olivares M, Uauy R. 1996. Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr* 63:791-796.
2. Vallee BL, Falchuk KH. 1983. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118.
3. Smeyers-Verbeke J, May C, Drochmans P, Massart DL. 1977. The determination of Cu, Zn, and Mn in subcellular rat fraction. *Anal Biochem.* 83:746-753.
4. Vallee BL, Coleman JE, Auld DS. 1991. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci.* 88:999-1003.
5. Keen CL, Lonnerdahl B, Hurley LS. Teratogenic effects of copper deficiency and excess. In: Sorenson JRJ (ed), *Inflammatory Diseases and Copper*, Human Press, Clifton, New Jersey. Pp 106-121.
6. Morgan RF, O'Dell BL. 1977. Effect of copper deficiency on the concentrations of catecholamines and related enzyme activities in the rat brain. *J Neurochem* 28:207-213.
7. Feller DL, O'Dell BL. 1980. Dopamine and norepinephrine in discrete areas of the copper-deficient rat brain. *J Neurochem* 34: 1259-1263.
8. Dipaola RV, Kanfer JN, Newberne PM. 1974. Copper deficiency and central nervous system myelination in the rat: Morphological and biochemical studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 33:226-236.
9. Zimmerman AW, Matthieu J-M, Quarles RM, Brady RO, Hsu JM. 1976. Hypomyelination in copper-deficient rats. *Arch Neurol* 33:111-119.
10. Hurley LS, Swenerton H. 1966. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in

- rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 123:692-697.
11. Sandsted HH, Gillespie DD, Brady RN. 1972. Effect on brain of the suckling rats. *Pediatr Res* 6:119-125.
 12. Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS. 1980. Growth and development in postnatally zinc-deprived rats. *J Nutr* 110:201-211.
 13. Hassan MA, al-Awqati MA, Issac D, Yadav GK, Bahman MA. 1990. Free amino acids, copper, iron and zinc composition in sera of patients with thyrometabolic diseases. *Horm Metab Res* 22:117-120
 14. Saner G, Savasan S, Saka N. 1992. Zinc metabolism in hypothyroidism. *Lancet* 340:432-433.
 15. Sharper RE, Keen CL, Hurley LS, Zeman FJ. Hematologic and trace element alterations following chronic maternal ingestion of propylthiourea. *Exp Hematol* 10:44-55.
 16. Prasad R, Kumar V, Kumar R, Singh KP. 1999. Thyroid hormones modulate zinc transport activity of rat intestinal and renal brush-border membrane. *Am J Physiol* 276:774-782.
 17. McNabb FMA. 1992. *Thyroid Hormones*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
 18. Oppenheimer JH, Schwartz HL. 1997. Molecular basis of thyroid hormone-dependant brain development. *Endocr Rev* 18:462-475.
 19. Nagasaka A, Hidaka H. 1976. Effect of antithyroid agents 6-propyl-2-thiouracil and 1-methyl-2-mercaptoimidazole on human thyroid iodine peroxidase. *J Clin Endocrinol Metab.* 43:152-158.
 20. Cooper DS, Kieffer JD, Saxe V, Mover H, Ridgway EC. 1984. Methimazole pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *Endocrinology* 114:786-793.
 21. Marchant B, Brownlie BE, McKay-Hart D, Horton PW, Alexander WD. 1997 The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. *J Clin Endocrinol*

Metab 45:1187-1193.

22. Kampmann JP, Johansen K, Hansen JM, Helweg J. 1980 Propylthiouracil in human milk: Revision of Dogma. *Lancet* 1:736-738.
23. Tegler L, Lindström B. 1980 Antithyroid drugs in milk. *Lancet* 2:591.
24. Johansen K., Andersen AN, Kampmann JP, Hansen JM, Mortensen HB. 1982. Excretion of methimazole in human milk. *Eur J Clin Pharmacol* 23:339-341.
25. Cooper DS, Bode HH, Nath B, Saxe V, Maloof F, Ridgway EC. 1984. Methimazole pharmacology in man: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *J Clin Endocr Metab* 58:473-479.
26. Hanlon DP, Shuman S. 1975. Copper ion binding and enzyme inhibitory properties of the antithyroid drug methimazole. *Experientia* 31:1005-1006.
27. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:35-70.
28. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Orlando F, Stecconi R, Muzzioli M, Isani G, Carpena E. 2002. Metallothioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mech Ageing Dev* 123:675-94.

表1. マウスの出産日、一腹あたりの産子数、食殺数

dose [% (w/v)]	n ₁	delivery date			litter size	n ₂	killings
		19	20	21			
0.000	5	0	5	0	7.6±2.1	0	0.0±0.0
0.008	4	3	1	0	10.0±2.0	0	0.0±0.0
0.025	4	2	2	0	8.5±1.0	1	0.3±0.5
0.080	4	0	2	2	5.8±3.0	3	2.5±2.1*

n₁ 各群の匹数

n₂ 食殺を起こした匹数

Mean±SD

* 対照群 (0.000%) との有意差 (p<0.01 (Dunnett))

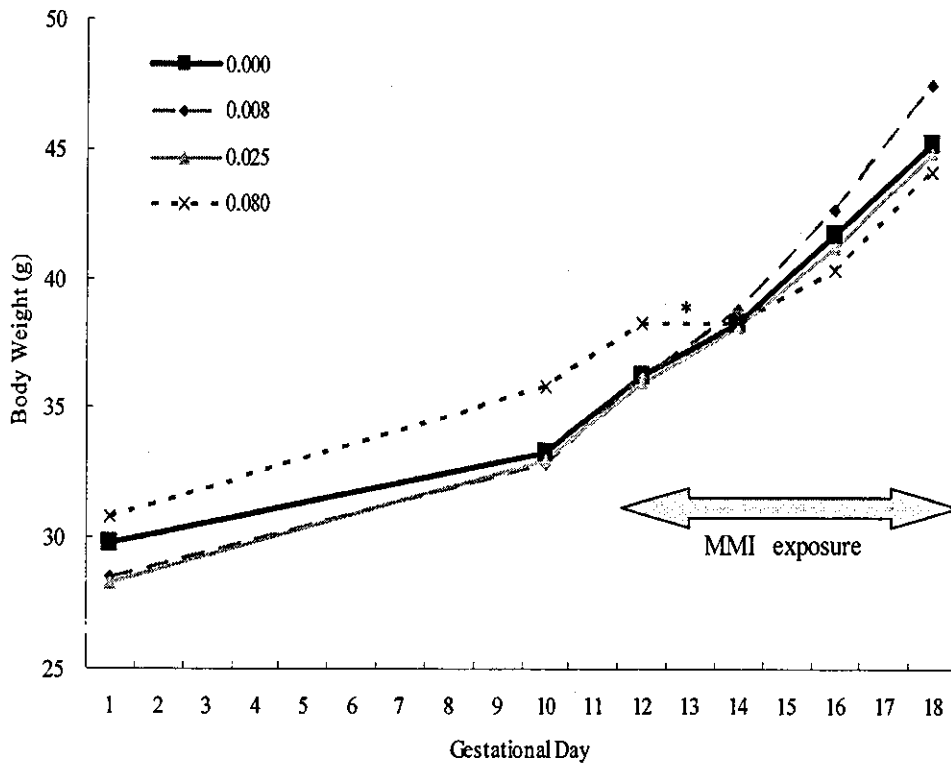


図1. 妊娠マウスの体重変化

GD12 から GD18 までの体重増加量で群間に有意差 (p<0.05) があった。

MMI 投与後 2 日間の体重増加の群間差 (p<0.01) があった。

* 対照群 (0.000%) との有意差 (p<0.05; Dunnett)

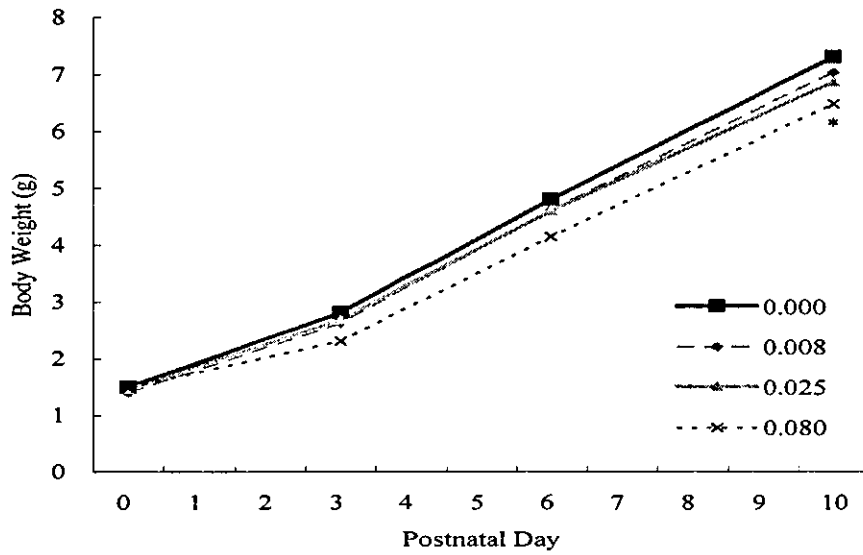


図2. 新生仔の体重変化

ANOVA (PND10) ; $p < 0.05$

* 対照群 (0.000%) との有意差 ($p < 0.05$; Dunnett)

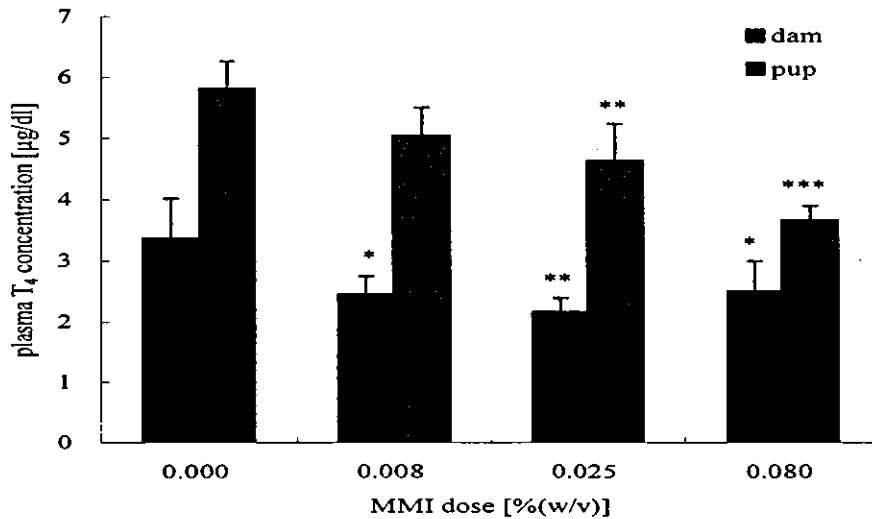


図3. 血漿中 T₄濃度

ANOVA: dam: $p < 0.01$, pup $p < 0.001$

* 対照群 (0.000%) との有意差 ($p < 0.05$; Dunnett)

** 対照群 (0.000%) との有意差 ($p < 0.01$; Dunnett)

***対照群 (0.000%) との有意差 ($p < 0.001$; Dunnett)

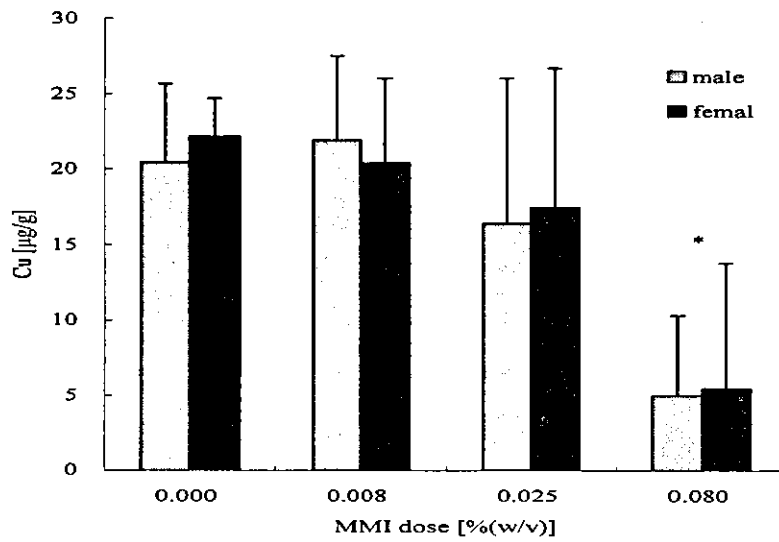


図4 仔マウスの肝の組織中銅濃度

ANOVA dose; $p < 0.0001$, sex; n.s., dose*sex; n.s.

* 対照群 (0.000%) との有差 ($p < 0.000001$; Dunnett)

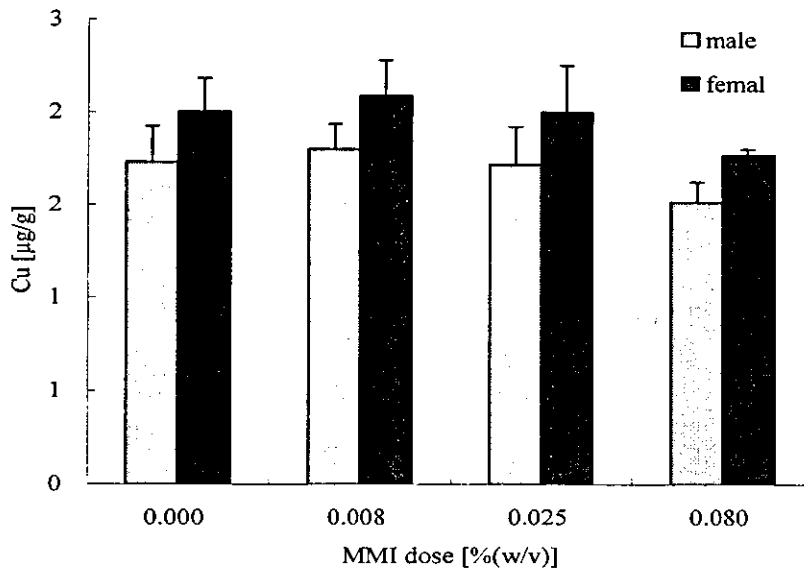


図5 仔マウスの腎の組織中銅濃度

ANOVA dose; $p < 0.05$, sex; $p < 0.05$, dose*sex; n.s.

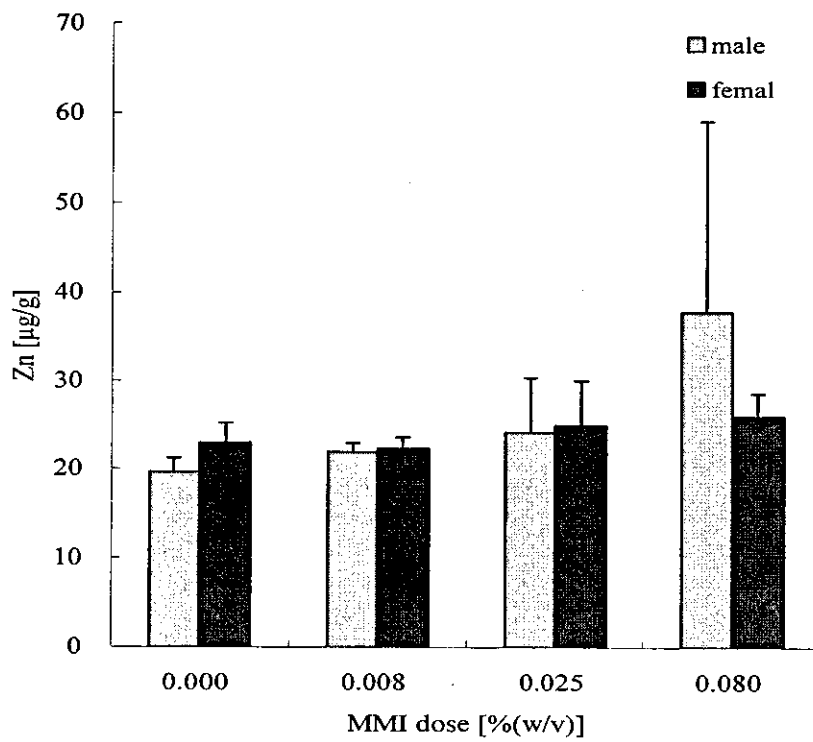


図6 仔マウスの腎の組織中亜鉛濃度

ANOVA dose; $p < 0.05$, sex; n.s., dose*sex; n.s.

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

胎生期のメチル水銀曝露による神経行動毒性に対する加齢と
遺伝的要因の影響

分担研究者 吉田 稔 聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野助教授

研究協力者 清水夏紀 聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野

研究要旨

一般環境、とくに食物を介しての胎生期を含む発育・発達期における低濃度メチル水銀曝露による神経行動影響についての知見は少なく、とくに胎生期にメチル水銀曝露を受けた場合の老年期における神経行動影響については殆ど知られていない。一方、生体内における重金属に対する共通の防御因子としてメタロチオネイン（金属結合蛋白質）が知られている。日本人には、メタロチオネインの合成能力の低い集団があり、このよう集団は遺伝的に重金属毒性に対し感受性が高く、一般環境から長期にわたりメチル水銀曝露を受けた場合の健康影響、特に中枢神経機能への影響については知られていない。本研究は遺伝的要因モデルとして近年、ジーンターゲティング法^{6),7)}により

メタロチオネイン-Iおよび-IIの発現を抑えたメタロチオネイン遺伝子欠損マウスを用いて、胎生期における低濃度メチル水銀曝露（以下、MeHgとする）が神経行動機能に対し、遺伝的要因や若年期そして老齢期においてどのような影響を及ぼすかについて検討した。

MeHg曝露は5ppmのMeHgを含む餌を妊娠0日目から出産10日まで与え、その後、コントロール飼料で仔を飼育した。仔が12週齢に達した時点（以下、若年マウスとする）と52週齢に達した時点（以下、加齢マウスとする）で、オープンフィールド、受動回避反応、モリス水迷路を用いて行動解析を行った。オープンフィールド試験による自発行動量は、若年マウスではMT(+/+), MT(-/-)マウスの雌雄ともにMeHg曝露群による影響は認められなかったが、加齢マウスではMT(+/+)マウスで雌雄ともに自発行動量は低下していた。加齢MT(-/-)マウスは雌雄ともにMeHg曝露群で、自発行動量の亢進が認められた。探索行動は、若年MT(-/-)マウスではMeHgによる探索行動の低下が認められた。加齢マウスでは雌雄ともにMT(-/-)マウスの探索行動の低下しており、MeHgの影響が認められた。嫌悪体験に対する学習獲得能力を評価する受動的回避反応試験では雌雄のMT(+/+), MT(-/-)マウスともに訓練試行と保持試行の両方でMeHg曝露群と対照群との間に回避反応時間に差異はなく、学習行動への影響は認められなかった。加齢マウスでは雌性MT(-/-)マウスにおいてMeHg曝露群が対照群に比べ回避反応時間は低下し、学習獲得能力の低下が認められた。空間学習能力を評価するモリス水迷路テストでは、若年マウスは、5日間の訓練試行過程で雌雄のMT(+/+), MT(-/-)マウスともにMeHg曝露群と対照群との間に回避反応時間に差異は見られなかった。これに対して加齢マウスでは、5日間の訓練試行過程で雄性MT(+/+)マウスそして雌性MT(-/-)マウスが対照群に比べ、MeHg曝露群で回避反応時間の遅延が認められた。その後に行ったプローブテストでは、雌性MT(-/-)マウスでは対照群に比べMeHg曝露群の成績が低下していた。

脳内の水銀濃度は神経行動毒性に密接に関連している。胎児および出産直後の脳内水銀濃度の測定を行わなかったが、出産10日目の脳内水銀濃度の結果から推測すると、胎児期の脳内水銀濃度は0.4~0.6 μ g/gより高値であったと思われる。またMT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに脳内水銀濃度は雄性マウスに比べ、雌性マウスにおいて高値であり、とくにMT(-/-)マウスにおいては約1.3倍雌性マウスの脳の濃度が高かった。雌性マウスのMeHgに対する神経行動毒性に対し高い感受性は雌性マウスの高い脳内水銀濃度が関与しているかもしれない。

以上の結果より、若年マウスでは見られなかったMeHgの神経行動毒性が加齢にともない出現す

ることが明らかとなった。とくに MT 欠損マウスに行動影響が顕著に現れており、遺伝的要因や年齢が MeHg の神経行動毒性の増強に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。

研究目的

水俣病やイラクにおけるメチル水銀中毒事件以来、環境汚染に対し社会的に関心が高まった。MeHg の標的器官は中枢神経系であり、胎生期における MeHg 曝露は胎児性水俣病に代表されるように、母親より胎児に対する MeHg の影響が大きいことが明らかとなった^{1),2)}。今日、高濃度の MeHg の曝露をうけるような環境は減少し、むしろ、低濃度の MeHg を長期間にわたる曝露による中枢神経機能への影響が危惧されている。フェロー諸島における疫学調査では、妊婦が多量の魚介類を摂取した場合、胎生期に食事由来の低濃度 MeHg 曝露を受け、その後児の発育・発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。アメリカ環境保護庁 (EPA) は、胎生期における MeHg 曝露の影響を危惧して、2001 年に、妊娠中または妊娠する可能性のある女性は大型魚類を摂取するべきではないと勧告し、MeHg の基準摂取量を 0.1 μ g/kg と定めた。日本では環境庁は魚肉に含まれる水銀の安全基準は総水銀値で 0.4ppm 以下と定められている。しかしながら、MeHg に対し、高感受性集団である胎児、新生児そして高齢者に健康リスクを考えた場合、食品中とくに魚介類に含まれる MeHg 濃度の安全基準について現在でも論議がなされている。一般環境、とくに食物を介しての胎生期を含む発育・発達期における低濃度 MeHg 曝露による神経行動影響についての知見は少なく、とくに胎生期に MeHg 曝露を受けた場合の老年期における神経行動影響については殆ど知られていない。

生体内では重金属に対する共通の防御因子としてグルタチオンや栄養素セレンが知られているが、これらに加えてメタロチオネイン (金属結合蛋白質) もまた重金属解毒作用を示すことが動物実験などで証明されている^{3),4)}。日本人には、メタロチオネインの合成能力の低い集団がいることを知られている⁵⁾。しかし、このよう集団は遺伝的に重金属毒性に対し感受性が高く、一般環境から長期にわたり MeHg 曝露を受けた場合の健康影響、特に中枢神経機能への影響については知られていない。

本研究は遺伝的要因モデルとして近年、ジーンターゲット法^{6),7)}によりメタロチオネイン-I および-II の発現を抑えたメタロチオネイン遺伝子欠損マウスを用いて、胎生期における低濃度 MeHg 曝露が神経行動機能に対し、遺伝的要因や若年期そして老齢期においてどのような影響を及

ばすかについて検討した。

実験方法

1) 動物とメチル水銀の曝露

OLA129/C57BL/6J 系の MT 遺伝子欠損マウス (MT(-/-)) と野生型マウス(MT(+/+))は Dr.Choo より供与を受けた。交配は両種のマウスが 10 週齢に達したとき雄と雌を一対一で同居させて行い、翌朝にプラグの確認をもって妊娠第 0 日とした。妊娠したマウスには直ちにメチル水銀 5ppm 含有飼料を与え、飼育した。メチル水銀含有飼料は出産 10 日まで与え、その後はメチル水銀を含まないコントロール飼料で飼育した。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃え、10 日目に雌雄各 2 匹を屠殺した。離乳は出産 28 日目に行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1 匹を供す、実験群は一群 5~6 匹とし、12 週齢及び 52 週齢で実施した (図 1)。2 週間ごとに体重測定を行い、行動実験終了後に、エーテル麻酔下で屠殺し、脳、腎臓、肝臓を摘出した。

2) 行動試験

1. オープンフィールド試験

マウスの自発運動量は Open field 装置 (小原医科産業株式会社製、東京) を用いて評価した。マウスを全く経験したことのない新しい環境 (Open field) におき、自発運動を調べた。この運動量は、固体の運動活動性、探索行動及び種々の情動反応を反映するものといわれている。室内の照明は消し、80 ルクスの照明のみで実験を行なった。マウスを中央においた筒 (直径 10×10cm) に入れ、30 秒間放置した。その後、筒を取り CCD カメラでマウスの行動を、装置 (60×60×60 cm) を 25 区画に分けて 10 分間観察し、その結果をコンピューターに取り込み解析した。試験終了後、脱糞、排尿の有無を確認した。マウスの臭いが残らないよう、装置内を 70%エタノールで拭いたのち、次の試験を開始した。

2. 受動的回避反応 (Passive avoidance) 試験

受動的回避反応 (passive avoidance) 試験は小原医科産業株式会社製 (東京) の装置を用いて行った。この試験はマウスやラットなどの小動物が暗い場所を好む習性を利用したもので、暗室に進入