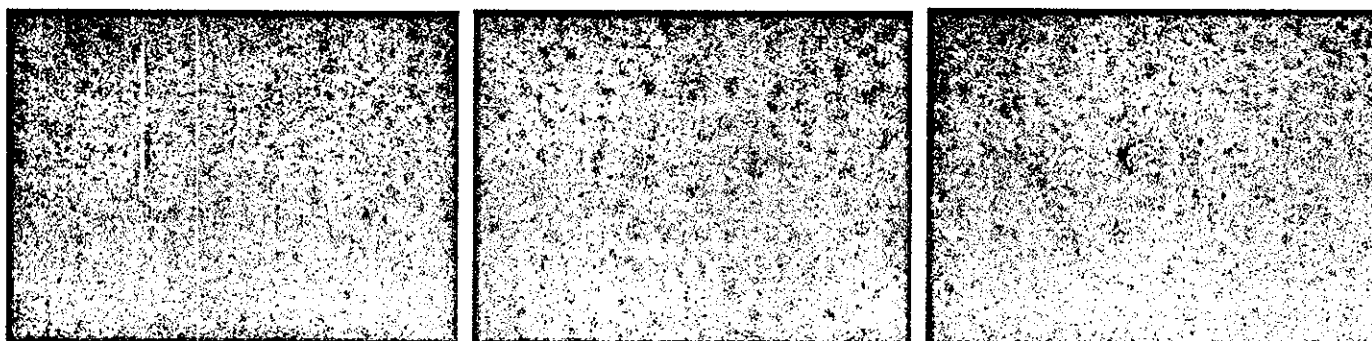


オートメタログラフィー（水銀染色）：複合曝露（蒸気水銀＋メチル水銀）

MT+群

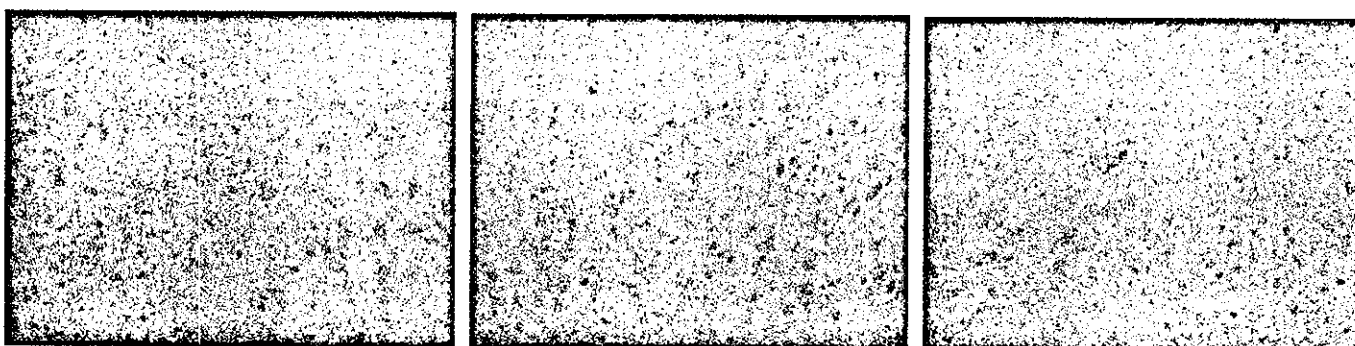


海馬

大脳皮質

延髄

MT-群



海馬

大脳皮質

延髄

・考察

野生型マウスの脳組織中の水銀濃度測定の結果、対照群に比べ、蒸気水銀単独曝露群では約2倍、メチル水銀単独曝露群では約180倍、複合曝露群（蒸気水銀、メチル水銀）では約380倍を示した。しかしながら水銀染色でこれらの濃度差を裏付ける所見は認められなかった。

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

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
欠損および野生型マウスにおける TIMP4 (tissue inhibitor of
metalloproteinase 4) の組織標本上での発現・局在

分担研究者 島田章則 鳥取大学農学部獣医病理学教授

研究要旨

周生期にメチル水銀曝露されたマウスの出生後 10 日目の脳における遺伝子発現については、別項（佐藤氏）で報告したが、マイクロアレイにおいて、MT-I, II ノックアウト系統では TIMP4 (tissue inhibitor of metalloproteinase 4) の発現促進を認め、これはリアルタイム RT-PCR では、野生型・ノックアウトの両系統で確認された。この TIMP4 の発現変動が、タンパク質のレベルでも確認できるか否かを免疫組織学的に検討した。その結果、これまでの報告と同様に、大脳全域にわたり astrocytes の細胞質にタンパク質としての発現が確認された。しかし、曝露の有無による発現強度あるいは発現分布の変化は認められず、タンパク質レベルでの影響を確認するには至らなかった。

・はじめに

周生期にメチル水銀曝露されたマウスの出生後 10 日目の脳における遺伝子発現については、別項で佐藤氏が報告した。出生後の1時点における全脳サンプルを対象としたデータではあるが、マイクロアレイを用いた検討で、MT-I, II ノックアウトともにメチル水銀曝露による発現の促進が認められた。この発現促進をリアルタイム RT-PCR で確

認したところ、野生型・ノックアウトの両系統ともに、軽度ではあるが曝露による発現促進が確認された。これらの結果を踏まえ、本研究においては、同じコホートの曝露動物を用いて、脳における TIMP4 のタンパク質レベルでの発現について検討を行った。

・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、大脳を採取し、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、免疫染色を行った。

免疫染色：抗 TIMP-4 抗体を用いた免疫組織化学的検索

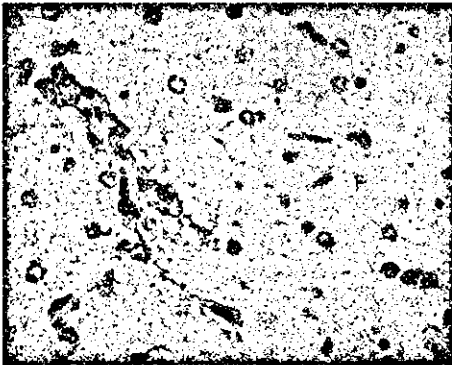
1. 間脳レベルの横断大脳の薄切切片（組織 3 μ m）を脱パラフィン処理し、水道水および蒸留水で洗浄した。
2. マイクロウェーブ処理により抗原の不活化を行った。
3. 内因性ペルオキシダーゼ阻害のため、3% 過酸化水素水に室温で 15 分間浸漬した。
4. 蒸留水で洗浄後、非特異的結合を防ぐため、10% Normal Goat serum を切片にマウントし、マイクロウェーブ処理下で 5 分反応させた。
5. 抗 TIMP-4 ウサギ抗体（T8312, SIGMA 社、USA）を 0.01M PBS で希釈（300 倍）し、切片上にマウントして、マイクロウェーブ処理下で 20 分反応させた。
6. 0.01MPBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。
7. ビオチン化抗ウサギ抗体（ $\times 200$ 、DAKO 社、日本）を 0.01MPBS で希釈し、切片上にマウントして、マイクロウェーブ処理下で 7 分反応させた。
8. 0.01M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。

8. 0.01M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。
9. 0.01M PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を切片上にマウントし、マイクロウェーブ処理下で 7 分反応させた。
10. 0.01M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。
11. 0.03% 過酸化水素水含 0.2% DAB 溶液 (0.01M PBS) に浸し発色させた。
12. 水洗後ヘマトキシリンで核染色した。
水洗後、脱水、透徹、封入後鏡検した。

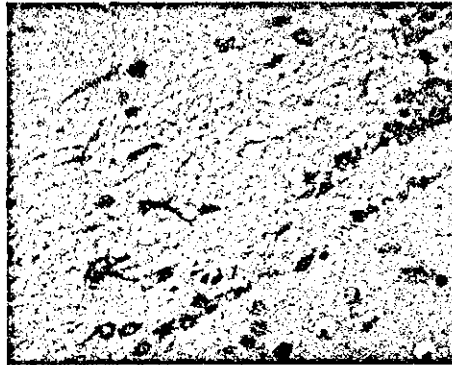
・結果

メタロチオネイン欠損および野生型マウスの何れにおいても大脳全域の神経膠細胞（アストロサイト）細胞質において突起状の強い陽性所見が得られた。この所見は、メタロチオネインの有無およびメチル水銀投与の有無に関わらず同様に認められた。

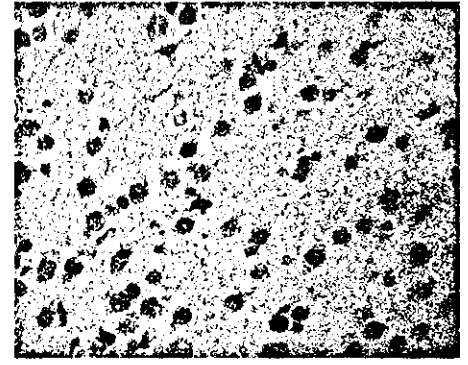
MT - 群



海馬

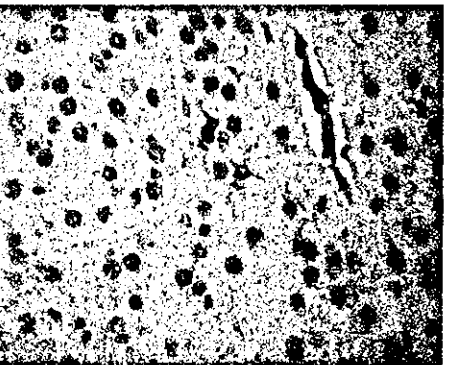
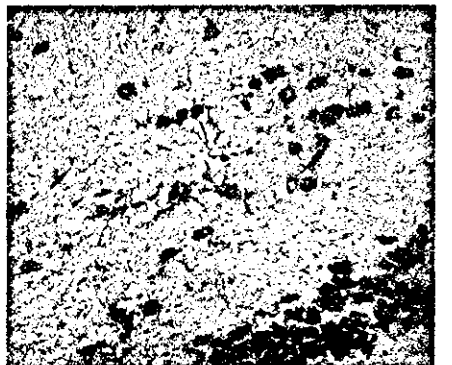
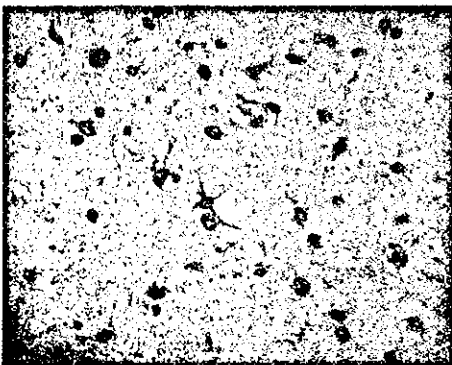


大脳白質



大脳皮質

MT + 群



・考察

これまでの文献報告と同様に、メタロチオネイン欠損および野生型マウスの何れにおいても大脳全域の神経膠細胞（アストロサイト）細胞質において突起状の強い陽性所見が得られた。

メタロチオネインの有無およびメチル水銀投与の有無に関わらず、陽性所見の程度に差は認められなかった。リアルタイム RT-PCR 法による検索では、メチル水銀投与により軽度の TIMP4 mRNA の軽度増加が認められた。しかし、免疫組織化学による検索（組織標本上での TIMP4 蛋白の局在・発現強度の確認）では明確な差（分布、陽性所見の程度の明らかな違い）は認められなかった。

厚生労働科学研究費補助金（科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 吉田克巳 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助手

研究要旨

甲状腺ホルモンの代謝酵素のひとつである 2 型ヨードチロニン脱ヨード酵素 (D2) 活性の抑制は中枢神経系における T3 供給の減少につながり、これにより胎児期・新生児期の脳の発育が障害される可能性が考えられる。すでに我々はメチル水銀 (MeHg) がマウス NB41A3 において D2 活性を抑制することを報告してきたが、D2 活性の抑制が実際に甲状腺ホルモン作用の発現を阻害するかは不明であった。本年度は、メチル水銀による D2 活性の阻害により甲状腺ホルモン依存性の成長ホルモン(GH)分泌も抑制されるかを検討するため、ラット下垂体由来細胞 GH3 を用いてメチル水銀添加後の D2 活性と GH 分泌を測定した。その結果、T3 あるいは T4 添加により GH3 細胞からの GH 分泌は濃度依存性に増大した。メチル水銀を甲状腺ホルモンと同時に添加すると、T4 による GH 分泌のみが抑制された。D2 阻害剤であるイオパノ酸 (IOP) を T4 と同時に添加するとメチル水銀と同様に GH 分泌は抑制された。このことより、メチル水銀は D2 活性の阻害を介して、T4 による GH 産生のみを抑制すると考えられる。T4 を培地に添加して培養すると D2 活性は濃度依存性に抑制されたが、T3 添加は D2 活性にあまり影響しなかった。メチル水銀

を T4 または T3 と同時に加えると D2 活性は同様に強く抑制された。このことより、GH 産生の抑制は、T4 により低下した D2 活性がメチル水銀によりさらに抑制され、それにより T3 供給量が減少したためと考えられる。以上より、GH3 細胞においてメチル水銀は D2 活性を抑制し、これにより甲状腺ホルモン作用の発現が阻害されることが示唆された。

はじめに

昨年までの報告で、マウス neuroblastoma cell line NB41A3 において、メチル水銀 (MeHg) は 2 型脱ヨード酵素 (D2) 活性を抑制することを明らかにした。D2 は中枢神経系においてプロホルモンである T4 を活性型甲状腺ホルモンである T3 に変換するため、D2 活性の抑制は中枢神経系においては T3 供給の減少につながる。これによって、特に甲状腺ホルモンが脳の発育に重要な胎児期・新生児期の脳の発育を障害する可能性が考えられ、メチル水銀の中枢神経毒性発現の機序の一つとなりうる知見を得たことになる。しかし D2 活性の抑制が実際に甲状腺ホルモン作用の発現を阻害するかは NB41A3 細胞では適切な指標がなく不明なままであった。そこで D2 活性があり、かつ T3 応答性遺伝子である成長ホルモンを分泌するラット下垂体細胞 GH3 を用いて、メチル水銀による D2 活性の阻害が甲状腺ホルモン依存性 GH 分泌を抑制するかを検討した。

方法

GH3 細胞は 10%ウマ血清および 2.5%FBS 含有 DMEM/F12 培地で培養した。メチル水銀添加 3~4 日前に血清は活性炭処理をし甲状腺ホルモンを除去した血清に置換した。メチル水銀添加 2 日後に D2 活性を測定した。酵素活性は ^{125}I で標識した T4 ないし rT3 からの ^{125}I の放出を測定し求めた。また培養上清中の GH は市販のキット (enzyme immunoassay 法) で測定した。

結果

GH3 細胞からの GH 分泌は T3 および T4 添加により濃度依存性に増大したが、T3 の方が T4 より数十倍低濃度で GH 分泌を増加させた (図 1 と 2)。メチル水銀を甲状腺ホルモンと同時に添加すると、T4 による GH 分泌のみ抑制された (図 3 と 4)。このことよりメチル水銀が D2 活性を抑制することで、T4 による GH 分泌が抑制される可能性が示唆された。そこで D2 阻害剤であるイオパノ酸 (IOP) を T4 と同時に添加するとメチル水銀と同様に GH 分泌は抑制された (図 5)。

GH3 細胞においてもメチル水銀は D2 活性を阻害するが、NB41A3 細胞よりも高濃度 (1~3 μM) のメチル水銀が必要であった (図 6)。既報のごとく T4 を培地に添加して培養すると D2 活性は濃度依存性に抑制されたが、T3 添加は D2 活性にあまり影響しなかった (図 7 と 8)。メチル水銀を T4 または T3 と同時に加えると D2 活性は同様に強く抑制された (図 9 と 10)。また IOP も D2 活性を抑制した (図 9)。

考察

GH3 細胞による GH の分泌は既報のように甲状腺ホルモン依存性である。メチル水銀は T4 による GH 産生のみを抑制すること、また D2 阻害剤の IOP も GH 分泌を抑制することから、メチル水銀による GH 産生の抑制は D2 活性の阻害を介することが示唆された。実際 NB41A3 細胞と同様にメチル水銀は濃度依存性に D2 活性を阻害した。T4 を加えて細胞を培養すると D2 活性は抑制されるため細胞内の T3 産生量は低下すると考えられるが、GH 産生を誘導するにはより低濃度の T3 で十分なため、T4 添加時でも GH 産生が誘導されると考えられる。メチル水銀は T3 ないし T4 存在下のいずれにおいても、D2 活性を強く抑制した。T4 により低下した D2 活性がメチル水銀によりさらに抑制されることで T3 供給量が著減し、GH 産生の抑制につながったと考えられる。一方メチル水銀により T3 存在下での D2 活性は強く抑制されるが、培地から T3 が直接細胞に供給されるため、T3 誘導性の GH 分泌はメチル水銀の影響を受けないと考えられる。

まとめ

GH3 細胞においてメチル水銀のターゲットの1つはD2であり、これにより甲状腺ホルモン作用の発現の阻害がもたらされることが示唆された。このことからメチル水銀の毒性発現機序の解明には甲状腺ホルモン代謝・作用の阻害という新しい面からのアプローチが必要であることが明らかになった。

図1 T3によるGH分泌刺激

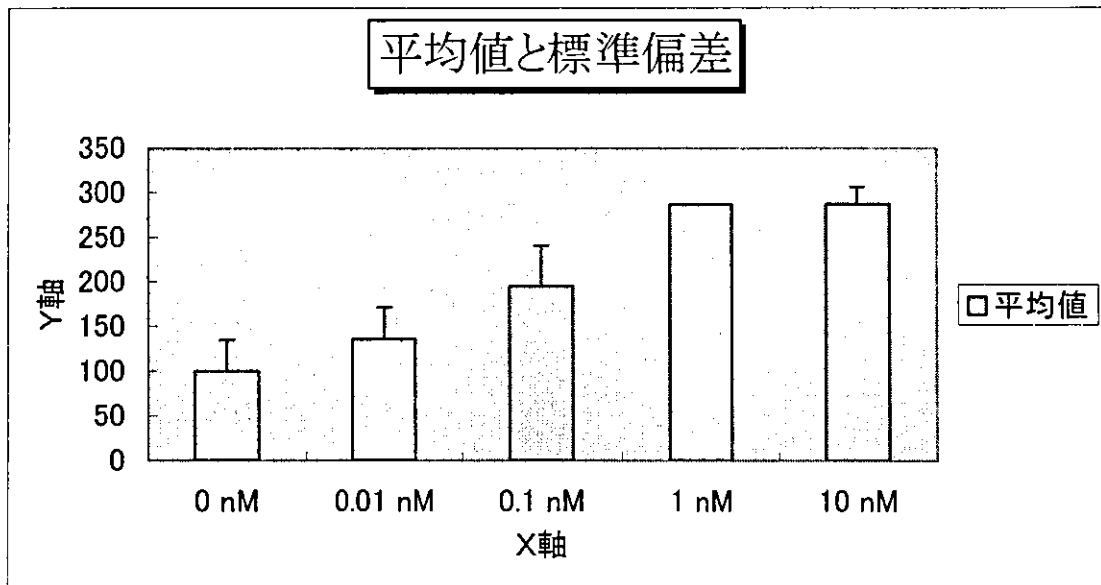


図2 T4によるGH分泌刺激

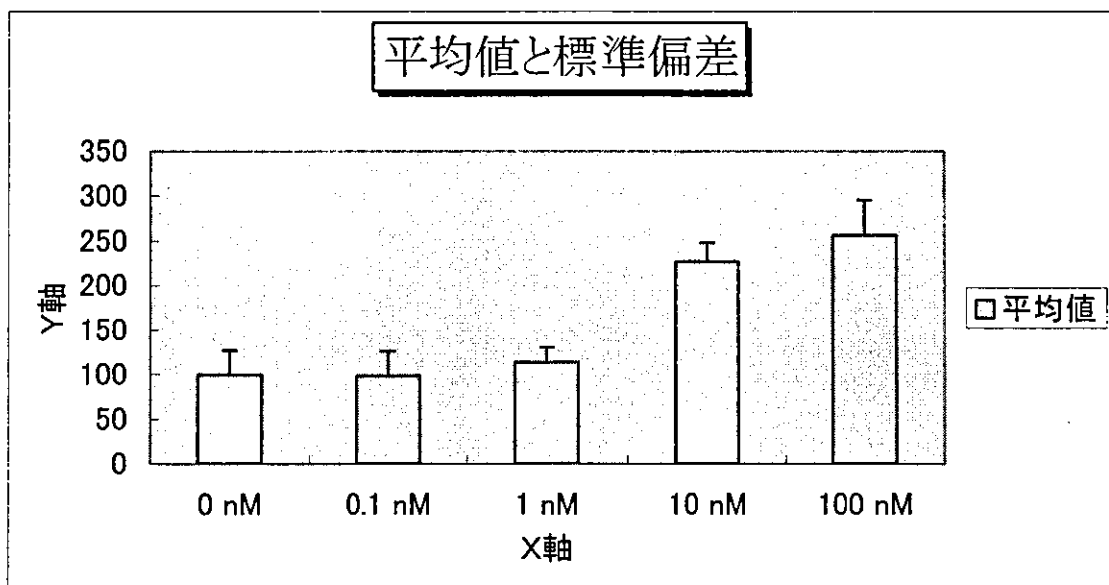
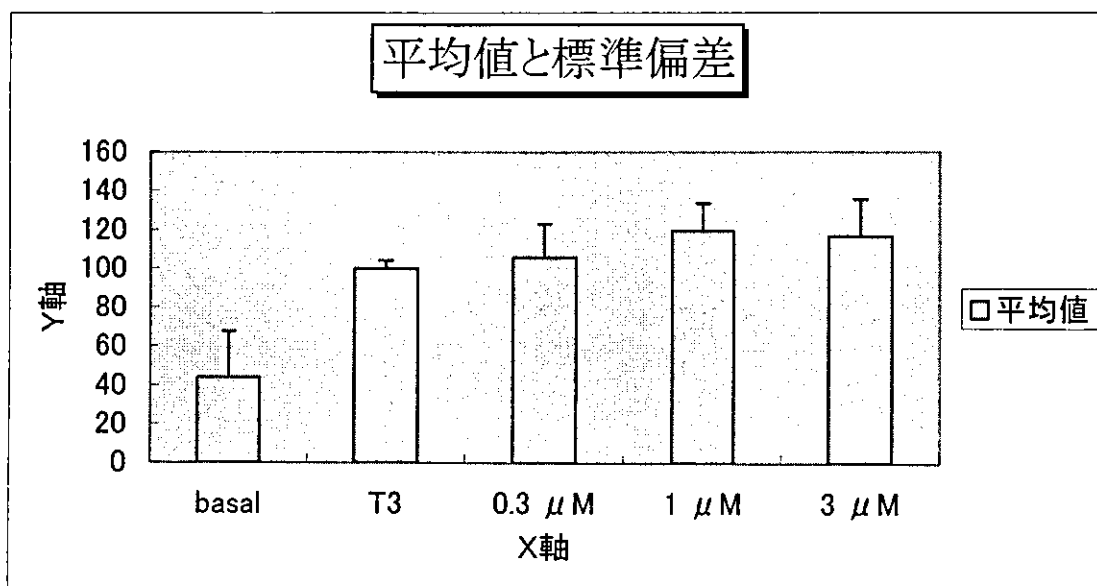
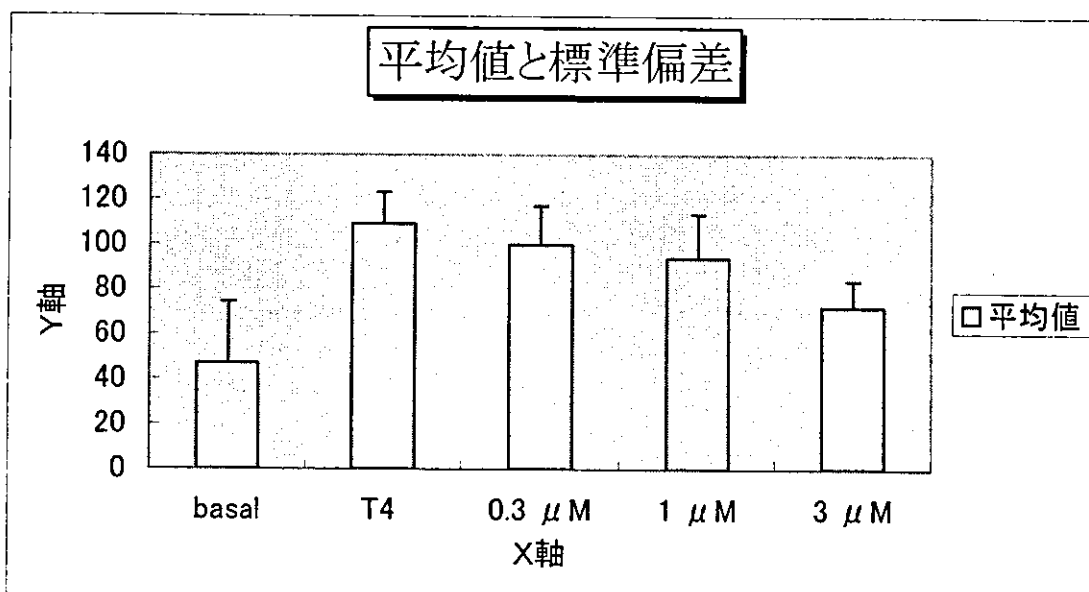


図3 MeHgのT3誘導性GH分泌に対する影響



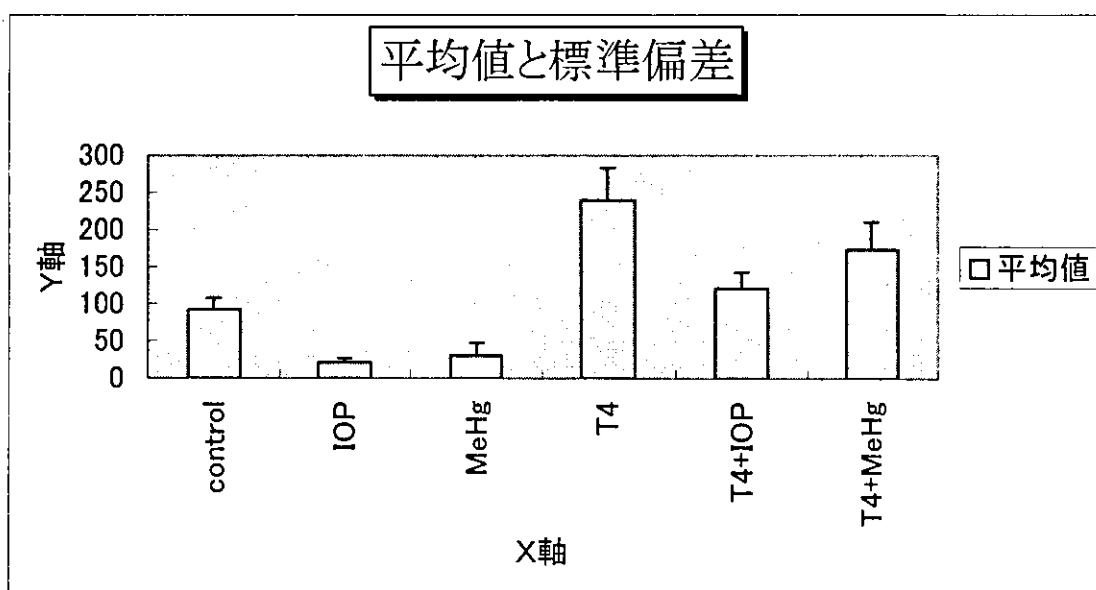
(濃度は MeHg のもの、T3 1 nM)

図4 MeHgのT4誘導性GH分泌に対する影響



(濃度は MeHg のもの、T4 10 nM)

図5 T4誘導性 GH 分泌の MeHg および IOP による抑制



(T4 ; 10 nM, MeHg 3 μ M, IOP 100 μ M)

図6 MeHg による D2 活性の抑制

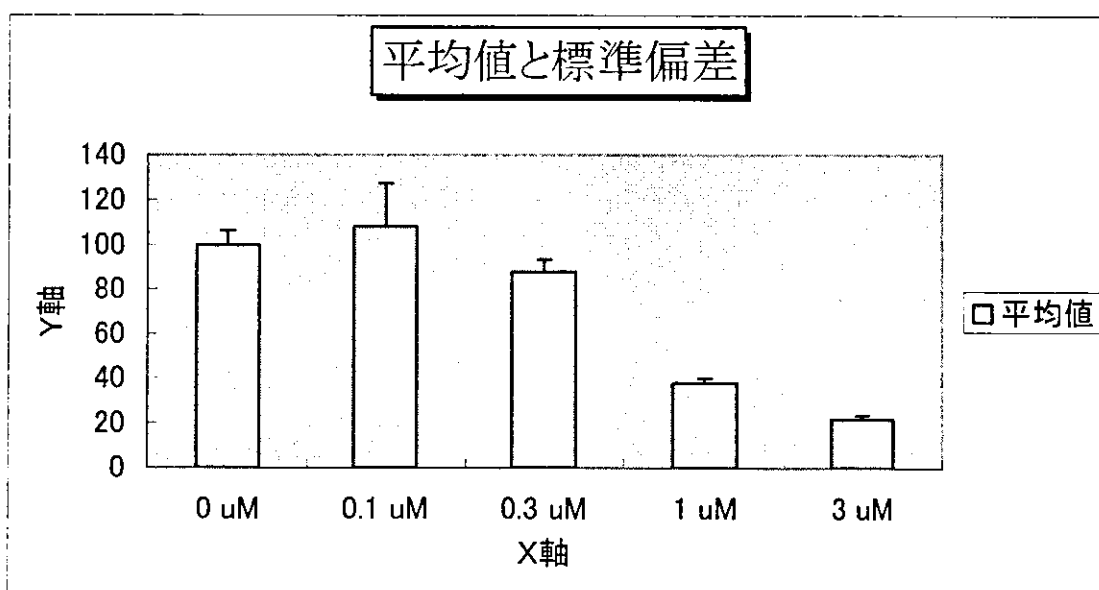


図7 T4によるD2活性の抑制

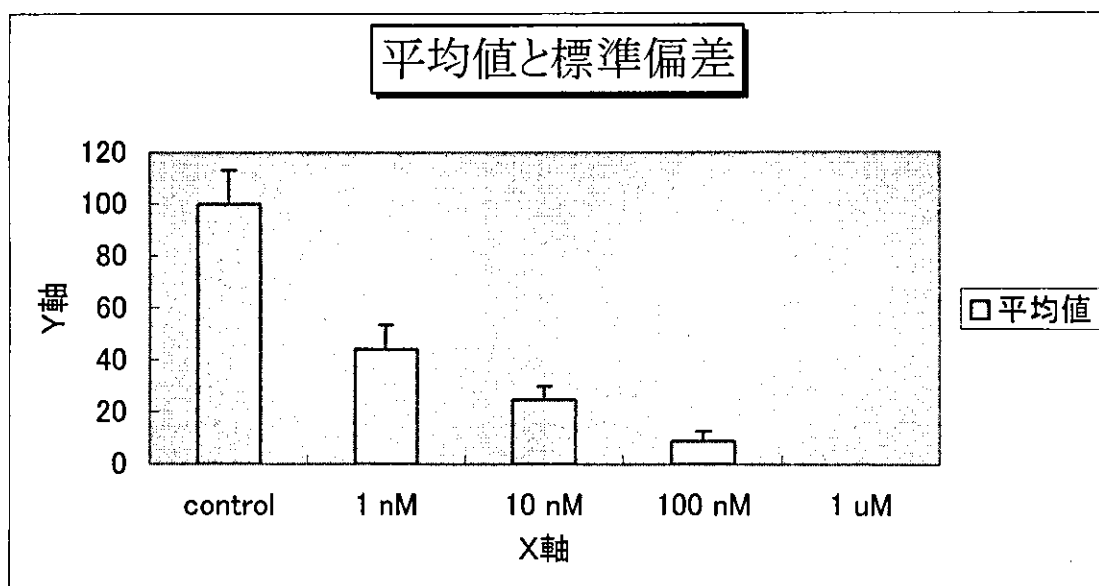


図8 T3のD2活性に及ぼす影響

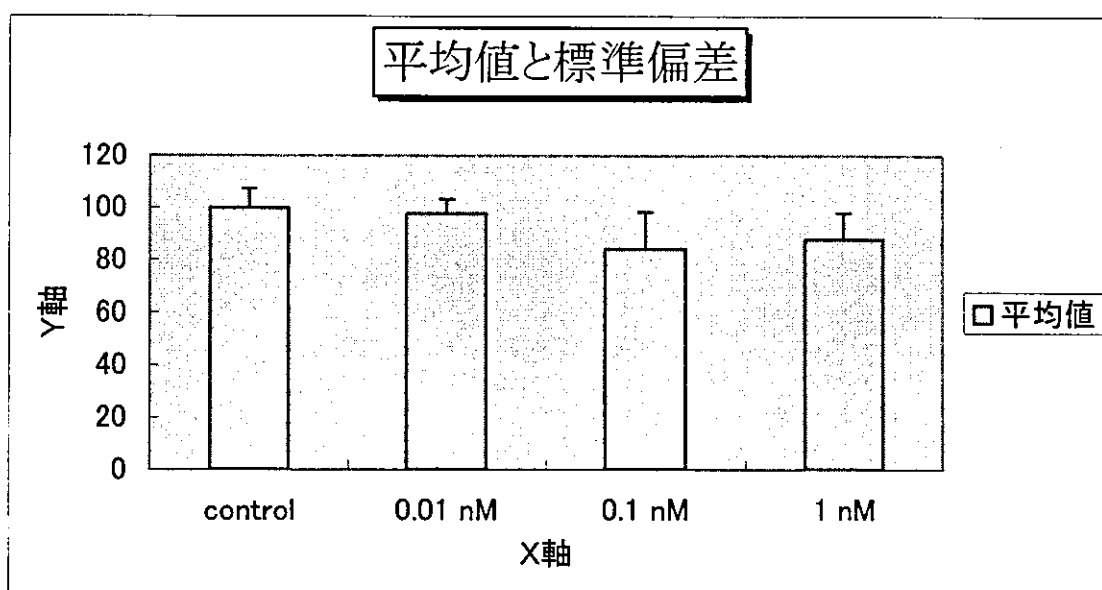
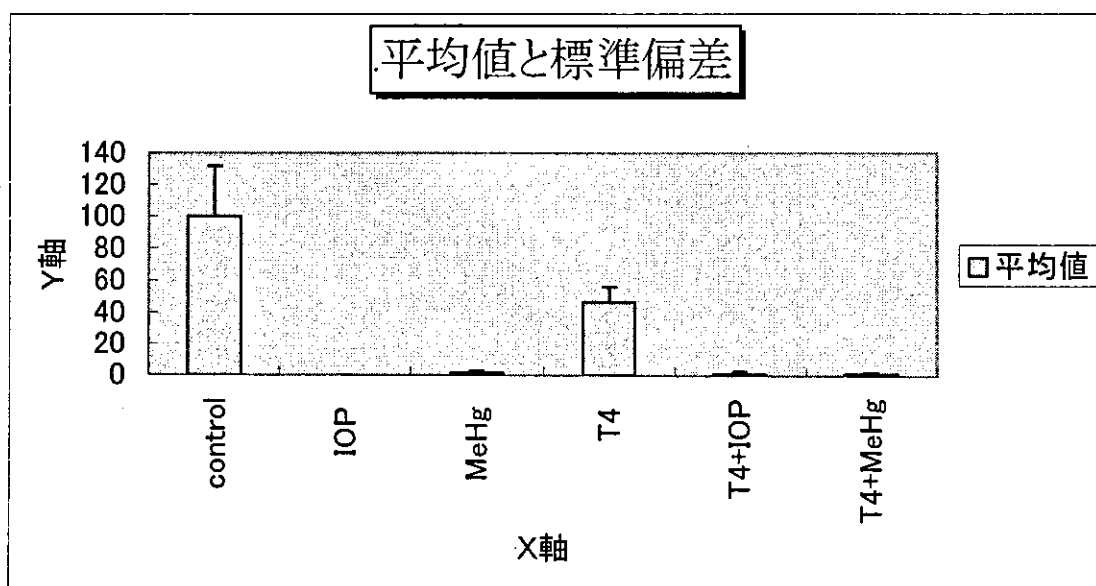
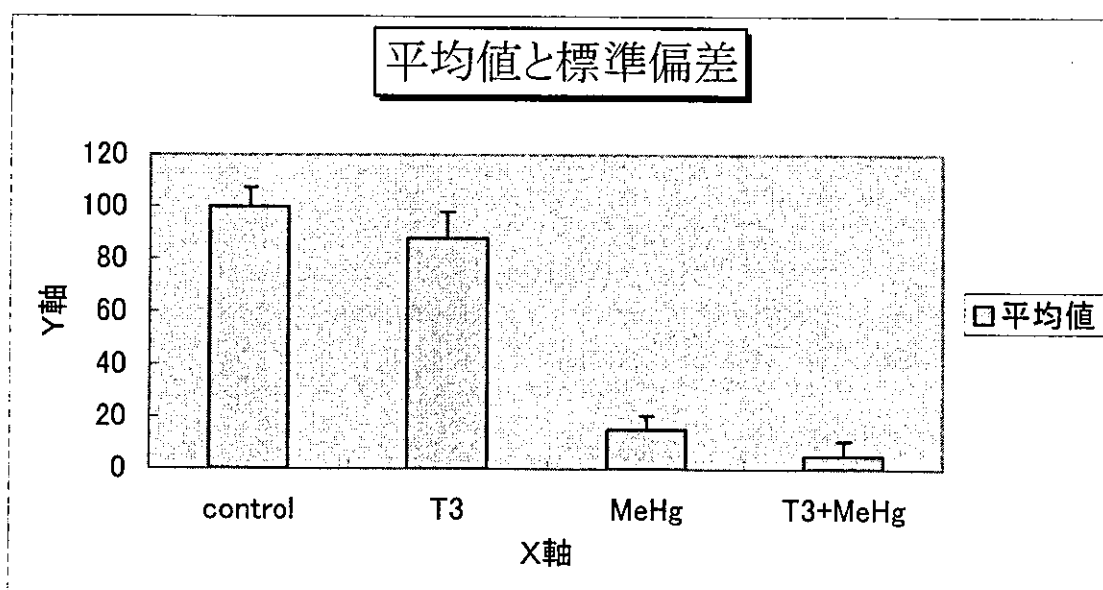


図9 MeHgおよびIOPのT4処理細胞D2活性に及ぼす影響



(T4; 10 nM, MeHg 3 μ M, IOP 100 μ M)

図10 MeHgのT3処理細胞D2活性に及ぼす影響



(T3 1 nM, MeHg 3 μ M)

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かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理プロジェクト主任研究員

A. 研究目的

外来の化学物質に曝露することによりヒトの脳・神経系の発達が影響を受けることを示唆する事例がいくつか報告されている。セブソでの工場爆発事故の後に周辺住民の子供の行動に変化がみられたことや、あるいはミシガン湖周辺のコホート調査による胎児期PCB類曝露レベルとIQ値との間に負の相関がみられたことなどがその例である。脳・神経系の発達に内分泌因子が重要な役割を果たしているが、ダイオキシン類とPCB類とはいずれも内分泌系をかく乱させることが知られており、上記現象への関与が予想される。一方自然界に存在する水銀はより有毒なメチル水銀に変換され、食物連鎖の上位に位置するマグロ、カジキあるいはクジラの肉に高濃度に蓄積している。メチル水銀は、成人に影響を及ぼさない用量でも胎児の脳・神経系への発達に影響を及ぼすことが知られている。これらのことから厚生労働省薬事・食品衛生審議会では、日本人の摂取量と曝露量とを勘案してサメ、メカジキ、キンメダイ、ツチクジラ、バンドウイルカ、コビレゴンドウ及びマッコウクジ

ラの7種については妊婦に対して食べる頻度を週2回以下に制限するよう呼びかけている。

平成16年度は胎生期のメチル水銀曝露による脳神経毒性発現が、内分泌器官の一つである副腎皮質を切除した場合にいかなる影響を受けるかを検討した。特に母体に副腎切除術を施して低グルココルチコイド状態にし、かつメチル水銀に曝露した場合にのみ水頭症の所見の見られる仔が少数ながら生まれてきたので、本報告ではこれについて詳細に報告する。

B. 研究方法

C57/BLマウス（雌）に副腎切除術を施し（ADXマウス）、1週間経過後に無手術雄マウスと交配させた。プラグ確認後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染色に供した。副腎切除を施し、かつメチル水銀曝露した母マウスは16匹であり、これらから生まれた65匹のうち少なくとも2匹は水頭症の所見を示している（現在病理組織学的検索を実施中であり、この数字は大きくなる可能性がある）。

C. 研究結果

図1に無処置の母親から生まれたマウス（左）とADXマウスから生まれたマウス（右）の脳のクレシルバイオレット染色を示す。いずれの母マウスもメチル水銀は曝露されている。ADXマウスから生まれたマウスの脳の右側が明らかに変形している。皮質内側に褐色色素を有するマクロファージが出現しており（図2）、側脳室も拡大している（図3）。髄液の膨張により水頭症が生じたものと思われる。また神経傷害の指標でもあるアストログリアが活性化している（図4）。拡張した側脳室の付近にはTUNEL陽性細胞が多数見ら

れ、アポトーシスが生じていることを示している（図5）

D. 考察及び今後の展望

母体のグルココルチコイドはそのレベルが適量より多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にするとともにさらにメチル水銀曝露も行っているが、このデザインの実験は従来にないものである。低グルココルチコイド状態と水銀曝露が交互作用としてより脳神経系の発達障害が増強されるものと考えられる。ただ片側のみの水頭症所見は極めて不自然（脳脊髄液の循環障害では一般に左右対称性）であるため、より詳細な脳組織の変性性変化の確認が必要であると思われる。なお、水頭症の所見を示したもう1匹の例では肉眼的には両側性であると思われる（切片を作成中）。今後は他のマウス切片についても脳組織の変性性変化の詳細（組織像、原因、病理発生）をHE染色などによって確認する予定である。

図1

無処置の母親から生まれたマウス（左）とADXマウスから生まれたマウス（右）の脳のクレシルバイオレット染色

（いずれの母マウスもメチル水銀は曝露されている）

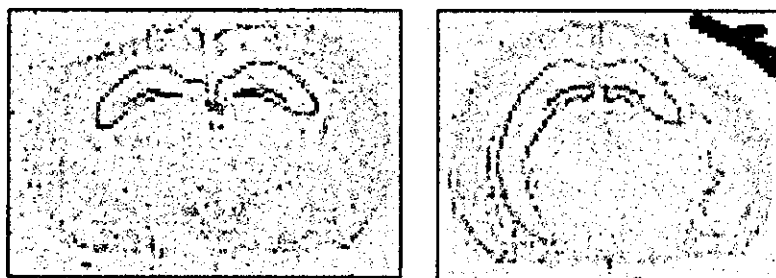


図2

右側の一部の拡大図。褐色色素を含有したマクロファージの出現（矢印）がわかる。

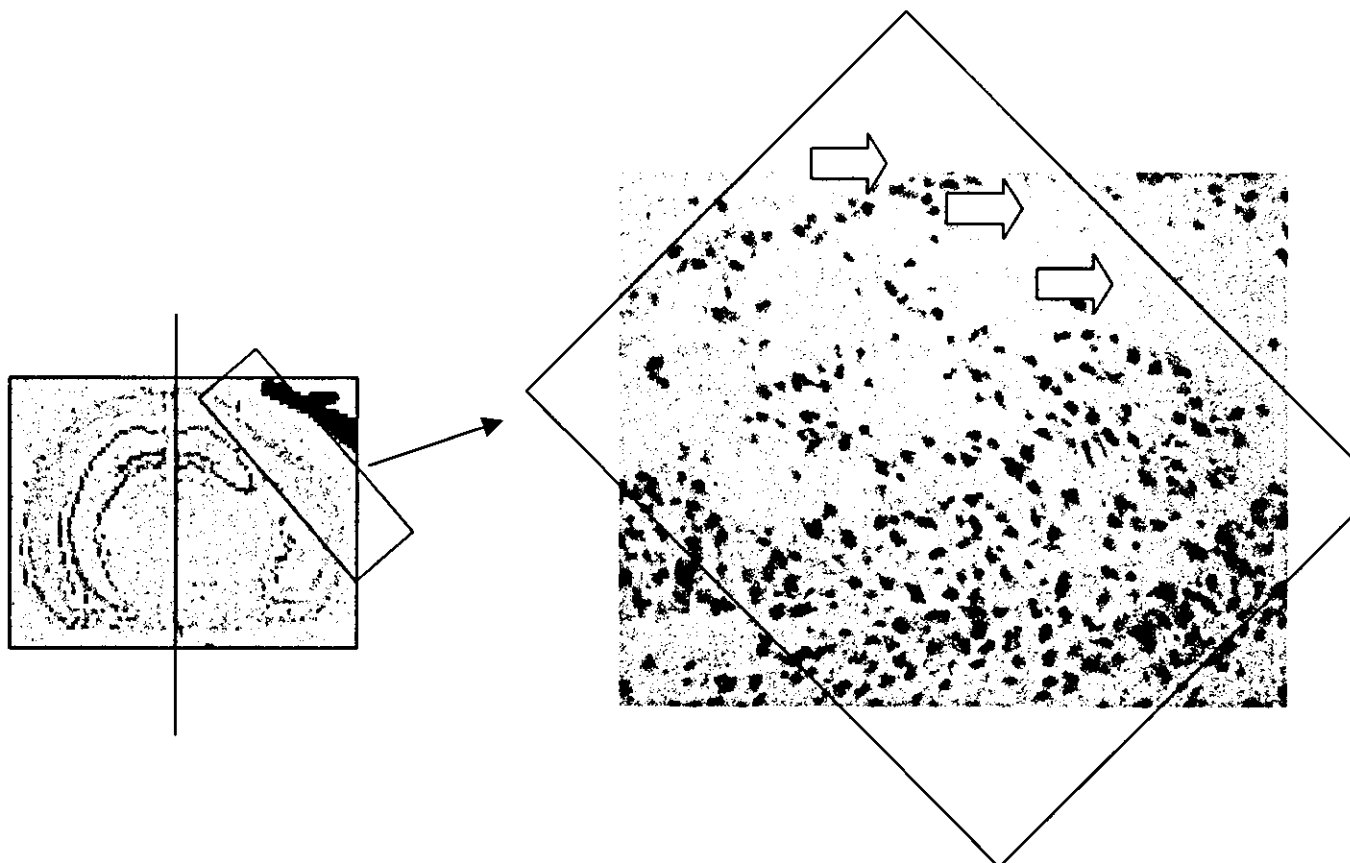


図3

側脳室部分の拡大。片側の側脳室が拡張している。

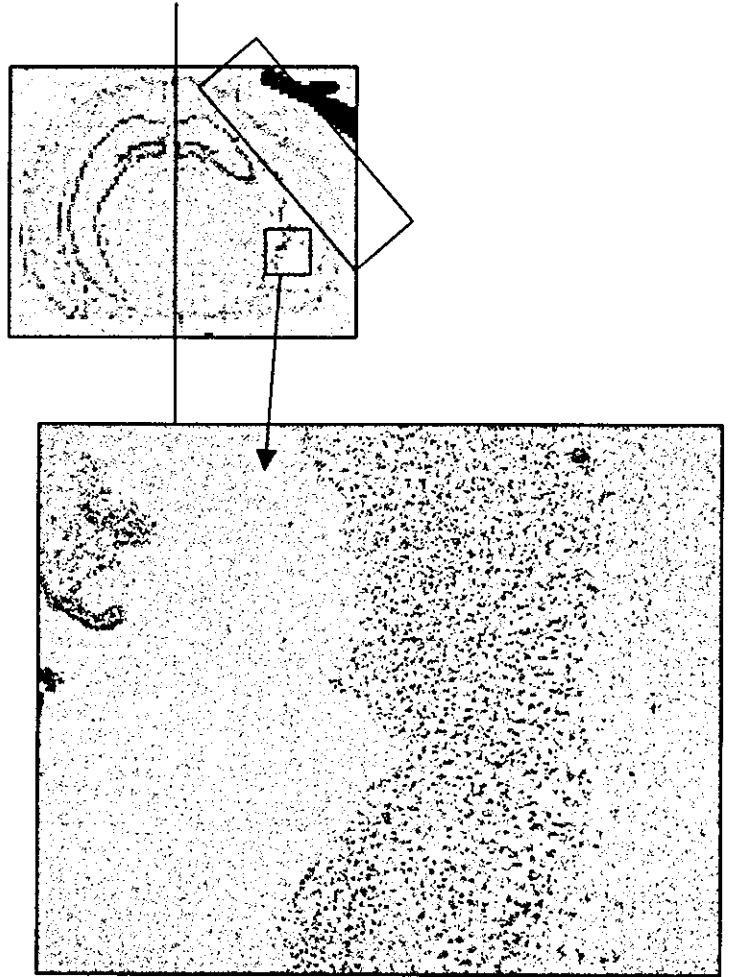


図4
アストログリア細胞の出現（矢印）

