

Table 7 Altered gene expression from microarray data of control group (Cy3) of wild-type mice vs MeHg+Hg⁰ -exposure group (Cy5) of wild-type mice hybridization

| Gene Description | Ratio |
|---|--------------|
| <u>Wild-type (MeHg+Hg⁰-exposure) / Wild-type (Control) > 2</u> | |
| Masp2 [mannan-binding lectin serine protease 2] | 0.28 |
| <u>Wild-type (MeHg+Hg⁰-exposure) / Wild-type (Control) < 0.5</u> | |
| None | |

Table 8 Altered gene expression from microarray data of control group (Cy3) of MT-1/1 null mice vs MeHg+Hg⁰ -exposure group (Cy5) of MT-1/1 null mice hybridization

| Gene Description | Ratio |
|---|--------------|
| <u>MT-1/1 null (MeHg+Hg⁰) / MT-1/1 null (Control) > 2</u> | |
| None | |
| <u>MT-1/1 null (MeHg+Hg⁰) / MT-1/1 null (Control) < 0.5</u> | |
| ENSMUST00000041202 acetolactate synthase [source:ensembl_protein_families;acc:ensmusf000 00004722]; acetolactate synthase | 0.44 |

II. 分担研究報告

3. 低濃度長期水銀曝露マウス脳の分子病理学的変化に関する研究 (島田章則)

- (1) 低濃度長期水銀曝露マウス脳の分子病理学的変化に関する研究
- (2) 低濃度長期水銀曝露マウス脳の分子病理学的変化に関する研究
- (3) 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 TIMP4(tissue inhibitor of metalloproteinase 4) の組織標本上での発現・局在
- (4) 胎児期における低濃度水銀曝露（単独：蒸気水銀、メチル水銀）（複合曝露：蒸気＋メチル水銀）の生後の影響（病理組織）
- (5) 低濃度水銀蒸気曝露マウスにおける脊髄内の水銀顆粒沈着部位の経時的変化

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告

低濃度長期水銀曝露マウス脳の分子病理学的変化に関する研究

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：5ヶ月間曝露の動物（F1世代）の脳を用い、大脳・小脳・脳幹にまたがる6レベル（等間隔の前額断切片）で標本作製・観察した。曝露群では、水銀の微粒子が脳の広範な部位において大型のニューロンの細胞質に見いだされ、特に脳幹に蓄積する傾向を認めた。これは、水銀蒸気曝露が低濃度で長期にわたる条件において水銀が脳に侵入する経路が、従来から考えられているような血行性ではなく、神経繊維連絡に沿った移行であることを示唆するとも考えられ、今後詳細が検討が必要であると思われた。HE染色、銀染色、ルクソールファーストブルー染色による一般的な病理検索では脳に病変は認められず、グリア繊維性酸性タンパク質（GFAP）によるグリア活性化、TUNELによるアポトーシスなども顕著ではなく、あるいはMT（-I, II）誘導を示唆する所見は得られなかった。今回得られている行動学的変化（吉田稔氏）は、顕著な神経学的病変を伴わずに起こっていることが判明した。

A. 研究目的

本分担研究では、胎生期メチル水銀およびカドミウム曝露によって起こる脳の神経化学的变化を、分子病理学的立場から検討することであり、特に来年度以降立ち上がるDNAアレイによる遺伝子発現への影響の検討結果を踏まえて、遺伝子・タンパク質の発現について、より空間的、解剖学的に詳細な検討をすることが主眼となる。本年度は、微量で長期にわたる水銀蒸気曝露（吉田稔氏による）脳における基礎的検討をおこなった。すなわち、5ヶ月間曝露の動物（F1世代）の脳を用い、大脳・小脳・脳幹にまたがる6レベル（等間隔の前額断切片）で標本作製、水銀の蓄積を細胞レベルで検討するとともに、水銀蓄積と関連する可能性のある変化として、メタロチオネイン（MT）の誘導、グリア酸性繊維性タンパク質（GFAP）によるグリオシスの評価、TUNEL法を用いたアポトーシスの評価、および通常のルクソールブルー染色による観察もあわせておこなった。微量、長期の水銀蒸気曝露に関して、病理的検討は極めて少ない。

B. 材料および方法

動物：マウス (C57/BL6 メタロチオネイン I, II 欠損マウス (MT KO) および野生型 wild type)、
メス、8 週齢

曝露群: MT KO: 3 匹

MT wild: 3 匹

対照群: MT KO: 2 匹

MT wild: 2 匹

曝露濃度：0.031-0.119 mg/m³ (吉田氏の報告参照)

曝露時間：1 日 8 時間、連日曝露

曝露期間：5 ヶ月間

検索方法：安楽殺後、脳を摘出し 10% 中性緩衝ホルマリンにて 3 日間固定した。固定後、嗅
脳、前頭葉、間脳、橋、小脳および延髄レベルで横断し、パラフィン包埋ブロックを
作製した。これらの 6 つのレベルで薄切後、HE 染色、Autometallography 法、TUNEL
法、抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。

Autometallography 法：組織中では水銀の大部分が硫化水銀の形で存在している。

Autometallography 法は、微量の硫化水銀分子の表面に付着した銀イオン (Ag²⁺) はハイ
ドロキノン (還元剤) によって単体の銀 (Ag⁰) に還元されるため、切片上の水銀が銀の黒
色顆粒として可視化される (Danscher and Mller-madsen, 1985)。

方法：

1. 薄切切片 (3 μm) 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. 硫化銀またはセレン化銀による非特異的反応を防ぐため、前処理として 1% シア
ン化カリウム溶液に 2 時間入れた。
3. 蒸留水で洗浄した。

4. 現像液に入れ、遮光して 26℃、40-60 分間反応させた。
5. 水道水で 30 分間、蒸留水で 10 分間洗浄した。
6. 切片上の未反応銀を除去するため、5%チオ硫酸ナトリウム溶液に 30 分間入れた。
7. 蒸留水で洗浄した。
8. ヘマトキシリンで核染色をした。
9. 水道水で色出しを行った。
10. アルコールで脱水、キシレンで透徹後封入した。

抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的検索

方法：

1. 薄切切片（組織 3 μm ）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. 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。
3. 蒸留水で洗浄後、0.01M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。
4. 非特異的結合を防ぐため、10% Normal Goat serum を切片上にマウントし、室温で 15 分反応させた。
5. 抗 GFAP ウサギ抗体（ $\times 3,000$ 、DAKO 社、USA）を 0.01M PBS で希釈し、切片上にマウントして、4℃ 冷蔵庫内で一晩反応させた。
6. 0.01MPBS で 5 分間ずつ洗浄した。
7. 二次抗体を 0.01MPBS で希釈し、切片上にマウントして、室温で 30 分間反応させた。
8. 0.01M PBS で 5 分間ずつ洗浄した。
9. 0.01M PBS で 400 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、室温で 30 分間反応させた。
10. 0.01M PBS で 5 分間ずつ洗浄した。
11. 0.05M Tris-HCl に浸した後、0.03% 過酸化水素水含 0.2% DAB 溶液（0.05M Tris-HCl, pH 7.6）に浸し発色させた。

12. 水洗後ヘマトキシレンで核染色した。

13. 水洗後、脱水、透徹、封入後鏡検した。

C. 研究結果

Autometallography 法 : MT KO および MT wild 両マウスにおいて、水銀顆粒の沈着の程度および部位には差は認められなかった。水銀顆粒は視床核、橋核、小脳核および延髄を中心に認められた。水銀顆粒の認められた程度および部位を模式図で示した(図 1, 5, 6)。

水銀顆粒の認められた程度および部位

多数の水銀顆粒の沈着 :

視床核 (図)、橋核、小脳核および延髄の大型神経細胞の細胞質

軽度から中等度の水銀顆粒の沈着 :

視床核、橋核、小脳核および延髄の大型神経細胞周囲の神経線維、

海馬分子層、大脳皮質錐体細胞

極軽度の水銀顆粒の沈着 : 嗅核

水銀顆粒の沈着が殆ど認められない細胞 : 血管内皮細胞、グリア細胞

抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的検索: MT KO および MT wild 両マウスにおいて、GFAP 陽性アストロサイトの増数を示唆する所見は認められなかった(図 2)。

HE 染色 : MT KO および MT wild 両マウスにおいて、著変は認められなかった(図 3)。

TUNEL 法 : MT KO および MT wild 両マウスにおいて、アポトーシスを示唆する所見は認められなかった(図 4)。

この他、銀染色、ルクソールファーストブルー染色による一般的な病理検索では脳に病変は認められず、MT (-I, II) 誘導を示唆する所見は得られなかった。

D. 考察

水銀蒸気の曝露では、単体の水銀は肺から血中に容易に達し、血中で速やかに酸化されると考えられている。水銀蒸気の標的は脳と腎であるが、水銀がどのような経路により脳に移行するのか詳細なメカニズムは明らかにされていない。しかしながら、血行性に循環し、脳血液関門を通過して脳に至るという経路が一般的であると考えられている。本研究で観察したマウス脳の血管内皮細胞およびグリア細胞に、水銀顆粒の沈着が殆ど認められなかったことは、血行性以外に脳に水銀が侵入する経路が存在する可能性が示唆された。

水銀蒸気への曝露は経気道的であるから、鼻腔から嗅神経を介して移行するという経路も考えられる。しかし、本研究においては嗅核を含む嗅球への水銀顆粒の沈着は極少数であったことからその可能性も低いと推察される。

この点から注目されるのが、視床核、橋核、小脳核および延髄の大型神経細胞の細胞質に多数の水銀顆粒が認められた点である。それに対し、小型神経細胞への沈着は軽度であった。一般に長い軸索を伸ばす神経細胞の細胞体が大型であり、小型の神経細胞は近傍の神経細胞にのみ投射する人が多いので、これらの所見は遠距離の神経連絡を持つ細胞に水銀がより多く蓄積していることを示している。つまり、神経核間の神経線維を介して水銀が移行した可能性が示唆された。

本研究において、水銀の脳への移行経路として従来推察されていた血行性または鼻腔を介する経路については否定的な結果を得た。視床核、橋核、小脳核および延髄の大型神経細胞の細胞質に多数の水銀顆粒の沈着が認められた。前述の考察を踏まえ、これらの部位に至る経路を考察すると、蒸気水銀は肺の神経叢に沈着後、迷走神経を經由して脊髄内を求心性に延髄の神経核に移行し、さらに上行して視床に至るという経路が考えられる。

小脳核の大型神経細胞の細胞質に多数の水銀顆粒の沈着が認められた。これらの細胞はプルキンエ細胞から遠心性の入力を受けている。しかし、プルキンエ細胞には殆ど水銀顆粒の沈着は認

められなかった。よって、本研究では小脳核への水銀顆粒の移行は、プルキンエ細胞を介さない経路、すなわち視床下部からの遠心性に投射する線維を介して小脳核に水銀が移行した可能性が示唆された。

水銀蒸気の曝露の場合に、脳内への移行が神経連絡を通じて起こる可能性は、本研究での課題のひとつであるメチル水銀との複合曝露の影響（水銀蒸気への曝露による、メチル水銀リスクの一見かけ上の一増大の可能性）を考える上で重要である。侵入の経路が脳内分布を決めるとすれば、メチル水銀の侵入によって決まる脳内分布との重なりによって、複合曝露において感受性の高まる部位あるいは細胞が推測されるからである。その意味で、神経連絡を介した脳への侵入の可能性については、今後、長期微量曝露におけるメチル水銀の脳内分布の知見と照合しつつ、また、神経線維に沿った移行がおこるとした場合に、どのようなメカニズムで繊維内を移動し、どのようにシナプスを超えるのかなど、さらに検討を重ねる必要がある。

HEなどの conventional な染色では病理的な変化は認められず、GFAPでグリア増生の証拠も選らなかったことは、TUNELにおいてアポトーシスを認めなかった点をあわせ、本研究で用いた水銀蒸気の dose では著しい組織学的障害、細胞障害がないことを示している。このことは、行動学的に見出された変化（吉田稔氏による）については、神経細胞死など以外のメカニズムを考える必要があることを示唆している。

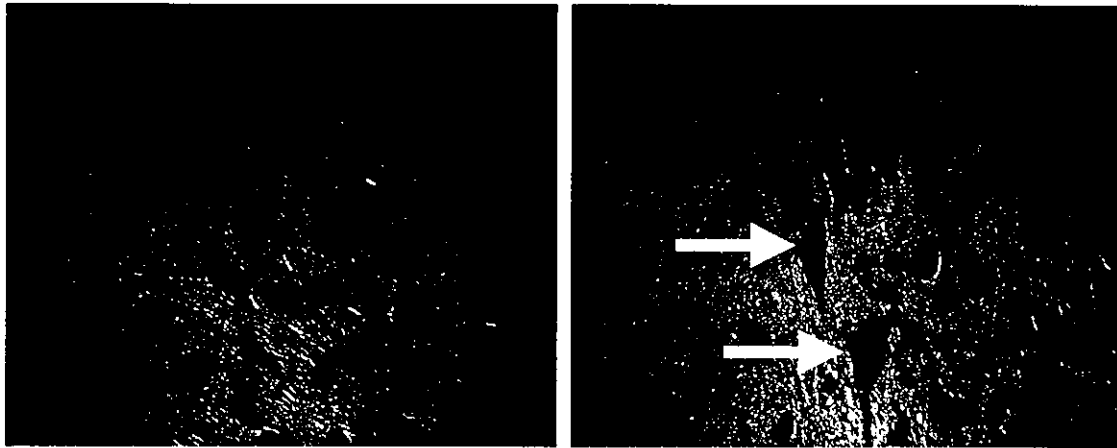
E. 結論

マウスを低濃度かつ長期に水銀蒸気に曝露し、脳への水銀蓄積ならびに分子病理的变化について検討した。その結果、水銀は主として大型の神経細胞に蓄積が見られるなど、分布の特徴より、曝露後、血行を介さず、神経線維に沿って移行し、蓄積に至った可能性が示唆された。HE、GFAP、TUNELなどの免疫組織染色では異常を認めず、この曝露条件で観察された行動学的影響は、著しい細胞障害やアポトーシスなどに由来するという証拠は得られなかった。

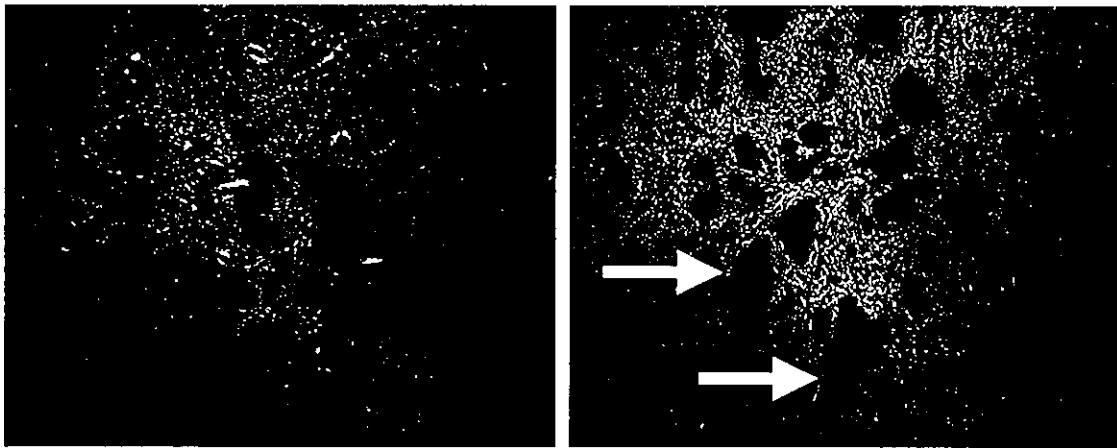
G. 論文発表

なし

図1. 脳への水銀沈着

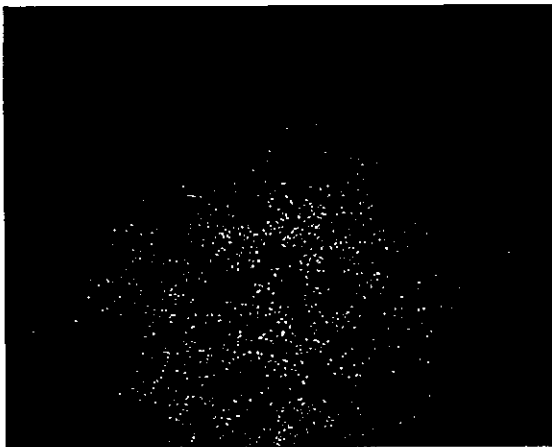


MT wild、対照群、Autometallography 法 MT wild、曝露群、Autometallography 法

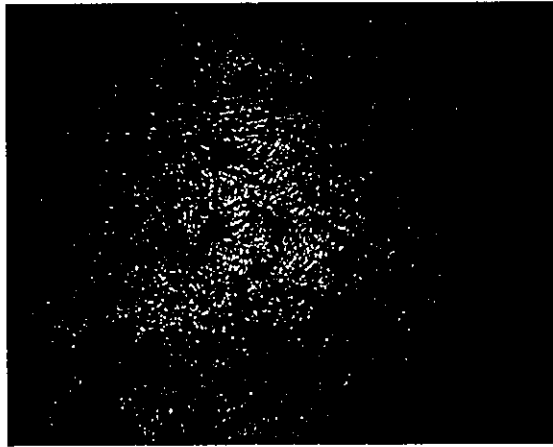


MT KO、対照群、Autometallography 法 MT KO、曝露群、Autometallography 法

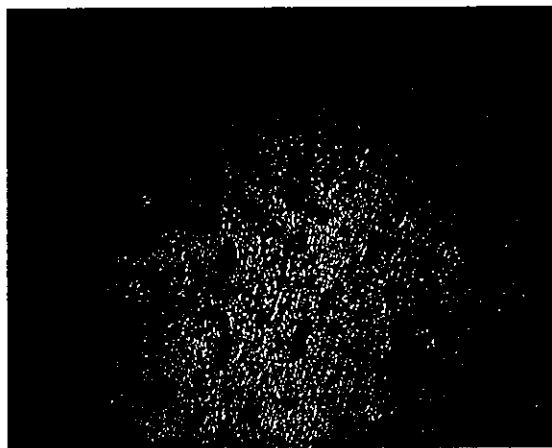
図 2. GFAP 染色の結果



MT wild、対照群、GFAP 免疫染色



MT wild、曝露群、GFAP 免疫染色

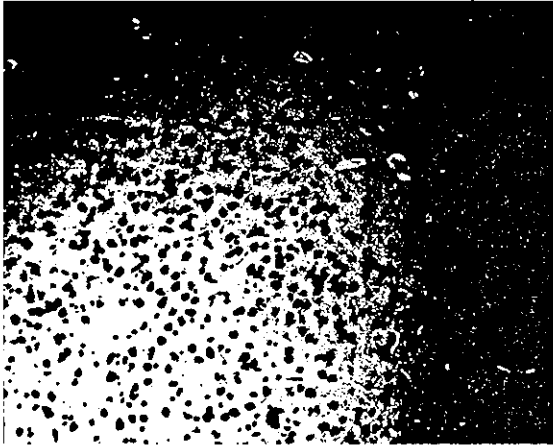


MT KO、対照群、GFAP 免疫染色

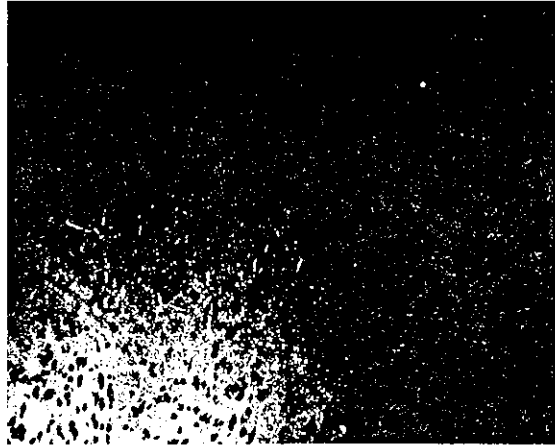


MT KO、曝露群、GFAP 免疫染色

図 3. HE 染色の結果



MT wild、対照群、HE 染色



MT wild、曝露群、HE 染色

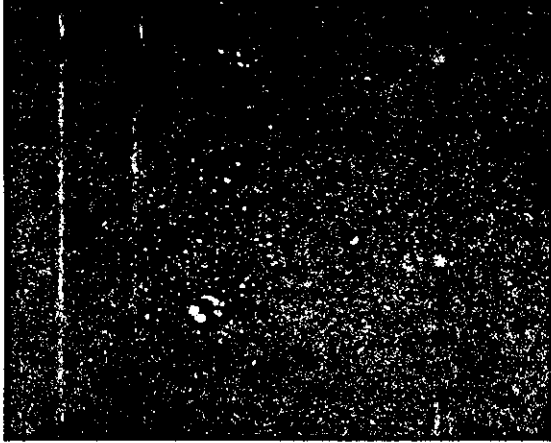


MT KO、対照群、HE 染色

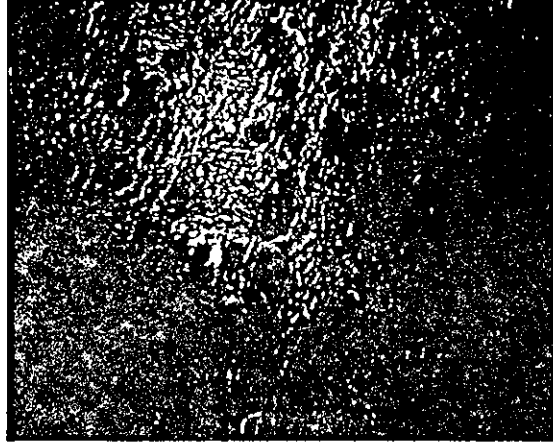


MT KO、曝露群、HE 染色

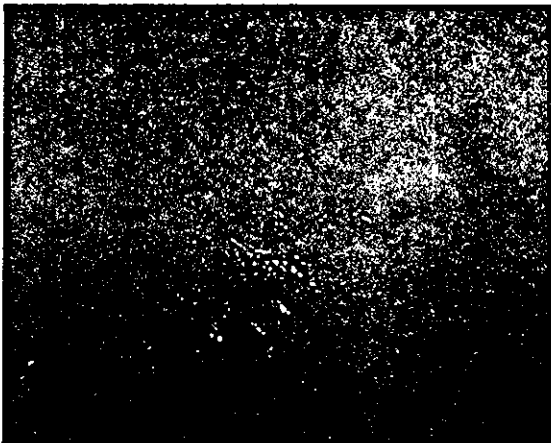
図4. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出



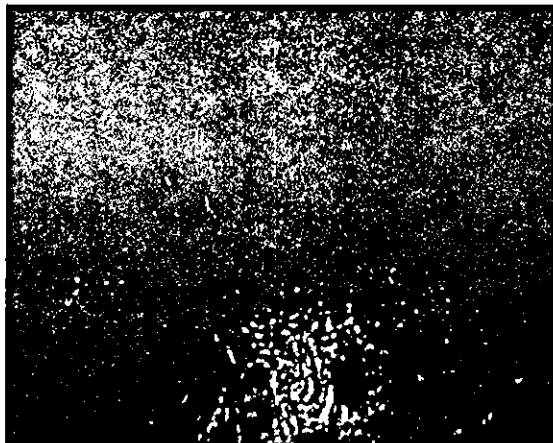
MT wild、対照群、TUNEL 法



MT wild、曝露群、TUNEL 法



MT KO、対照群、TUNEL 法



MT KO、曝露群、TUNEL 法

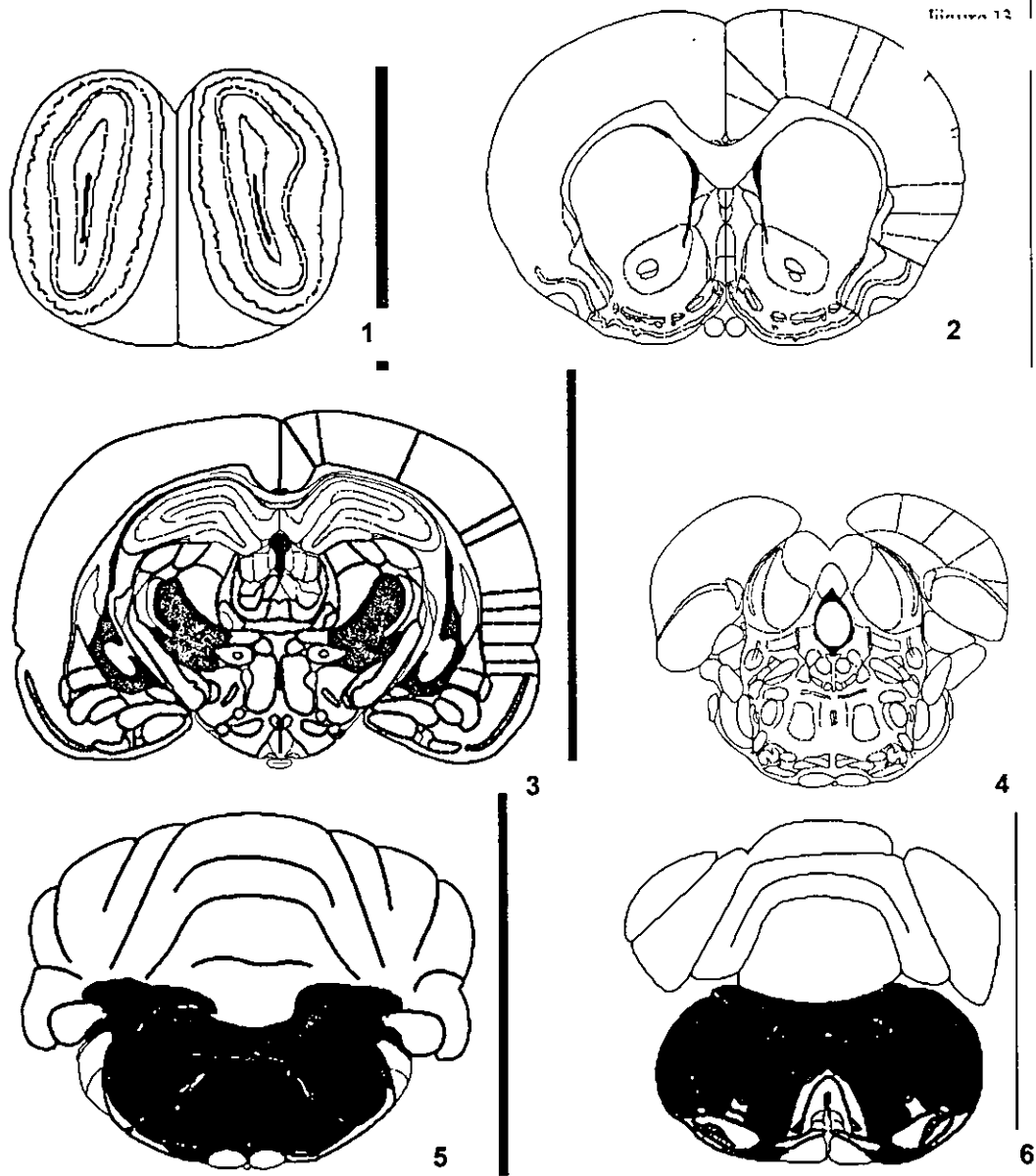
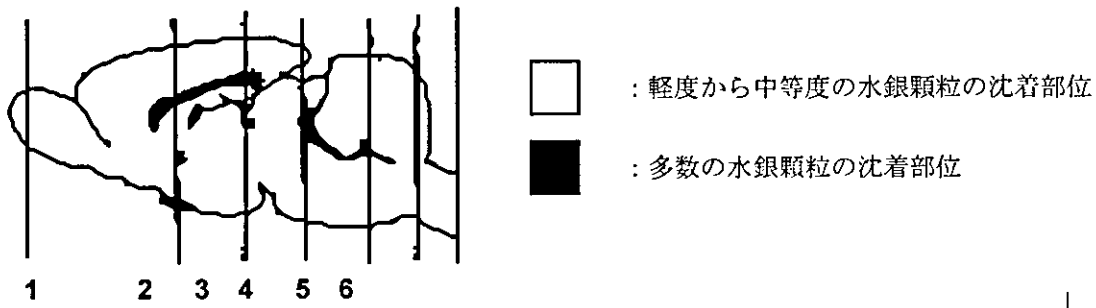


図5. MT *wild* マウスの脳における水銀顆粒の沈着の分布

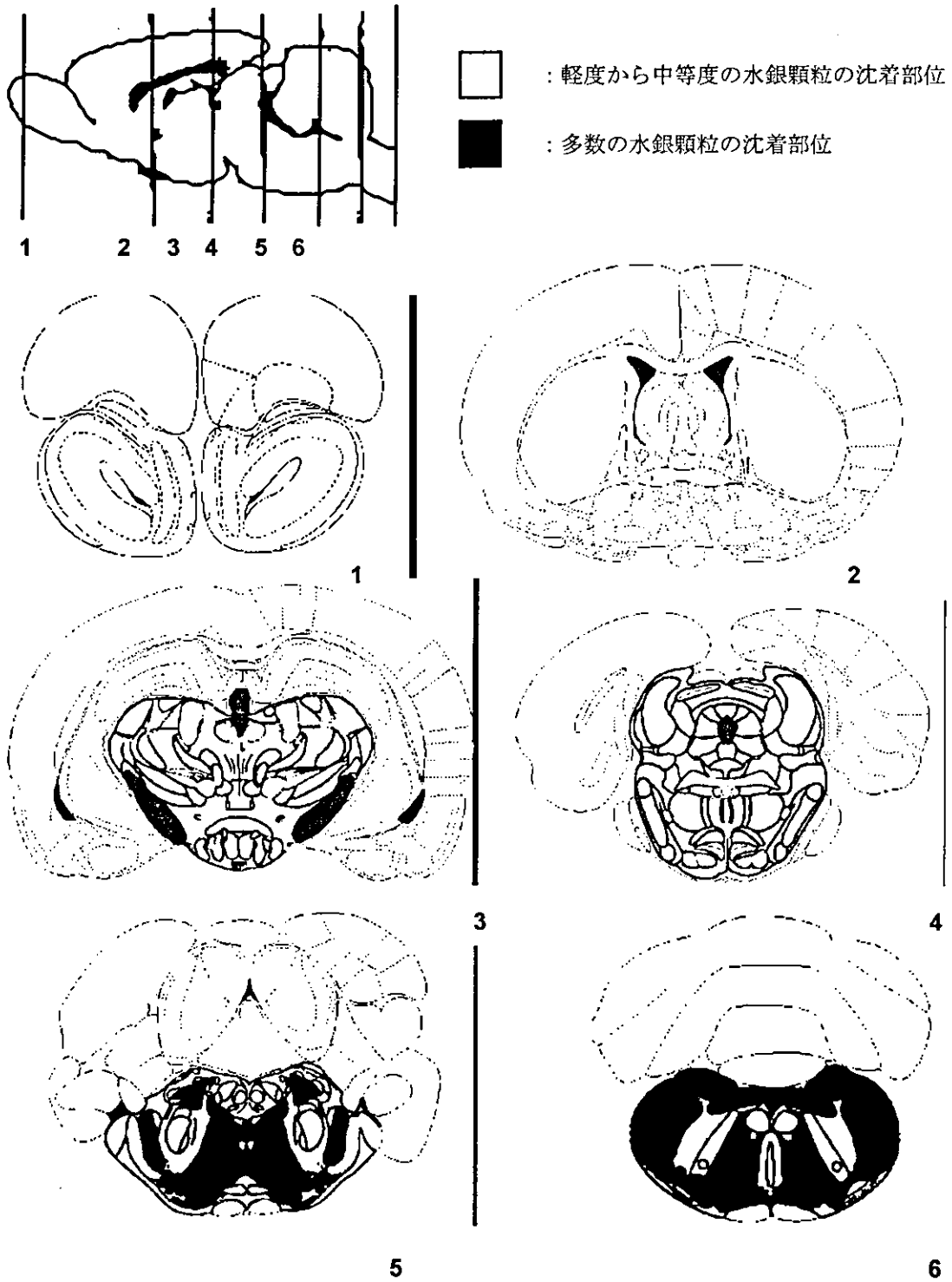


図6. MT 欠損 マウスの脳における水銀顆粒の沈着の分布

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

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：低用量のカドミウムならびにメチル水銀への周生期曝露が、発達中の神経系に及ぼす影響を、組織学的に検索した。50ppm の Cd への妊娠期曝露では発育不良を認めたが、組織学的異常は見いだされなかった。Cd の胎仔移行は極めて微量であるために、Cd を組織学的手法で可視化することはできなかった。50ppmCd に妊娠期～授乳期を通じて曝露した場合、新生仔肝に空胞変性を認めた。脳には組織学的病変を見いださなかった。したがって、行動異常との関連を知るためには機能的な異常を検索できる方法を用いることが重要であると考えられた。10ppmCd への 180 日間に渡る曝露では、母体に組織学的異常は検出されなかった。

5ppm のメチル水銀を含む餌に妊娠期及び授乳期に曝露した新生仔で、視床下部の神経細胞および星状膠細胞の数的変化は検出されなかった。行動異常が観察されていることから、より機能的な異常の検索を行うため、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が必要であることが示唆された。

（1）. 妊娠期低用量カドミウム経口曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウス胎仔における組織学的検索

A. 研究目的

カドミウムは実験動物における催奇物質として知られている。例えば妊娠 8 日目のハムスターにカドミウムを投与した場合、口蓋裂、無眼球症などの奇形が生じる。また、マウスにおいては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。

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。

そこで、本研究では胎生期にカドミウム経口曝露を行い、メタロチオネインが胎仔に及ぼす影響を、メタロチオネイン欠損マウスを用いて病理組織学的に検索した。

B. 材料および方法

メタロチオネイン欠損マウスおよび野生型マウスに対して、妊娠 1 日目から自由飲水にて 50 ppm カドミウムを含む飲水を自由に与えた。妊娠 19 日目に妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、胎盤および胎仔を摘出した。摘出した胎盤および胎仔を肉眼的に観察後、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：メタロチオネイン欠損マウスの胎仔において、1 例の発育不良胎仔が認められた（図 1、2）。その他のメタロチオネイン欠損マウスおよび野生型マウスの胎仔には肉眼的に異常は認められなかった。

組織学的所見：発育不良胎仔は胎齢 19 日であったが、組織学的には心臓、消化管および肺（図 3、4、5）等の主要臓器の発達は胎齢 16 日程度であった。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。

D. 考察

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枢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。

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。今回の実験により、メタロチオネイン欠損マウスにおいてのみ、発育不良個体が観察されたことから、メタロチオネイン欠損とカドミウム曝露が重複した場合、何らかの影響を与えることが示唆された。

(2). 妊娠期低用量カドミウム経口曝露によるメタロチオネイン欠損、ヘテロおよび野生型マウス胎仔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

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。しかしながら、母体および胎仔の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は分かっていない。そこで、母体および胎仔の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が明らかにする目的とし、その影響をメタロチオネインヘテロマウスを用いて検討する。

B. 材料および方法

下記 (A~C) の遺伝子型の雌雄で交配を行った。

A: ♀メタロチオネイン (MT) (-/-) × ♂MT (+/-)

B: ♀MT (+/-) × ♂MT (-/-)

C: ♀MT (+/-) × ♂MT (+/-)

メタロチオネイン欠損、ヘテロ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)、カドミウムを含む飲料水 (50 ppm) を自由飲水にて与えた。妊娠 19 日目に妊娠マウスをエーテル麻酔下で心採血し、胎盤および胎仔を摘出した。また、母マウスの脳、肝臓、腎臓および胃を摘出した。摘出した胎盤、胎仔および母マウスの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。

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し、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