

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)

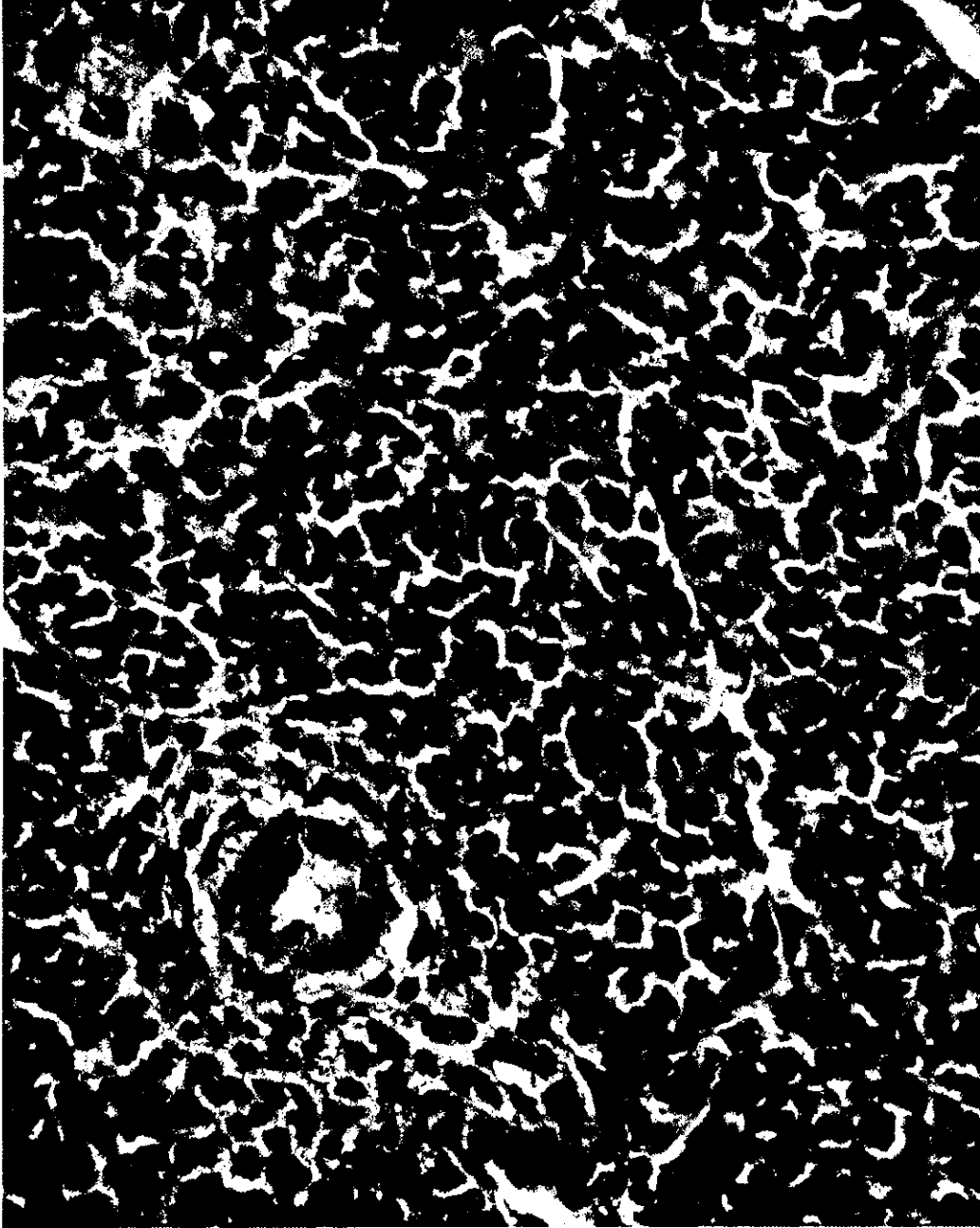


図48. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型  
マウスの脾臓 (HE 染色)

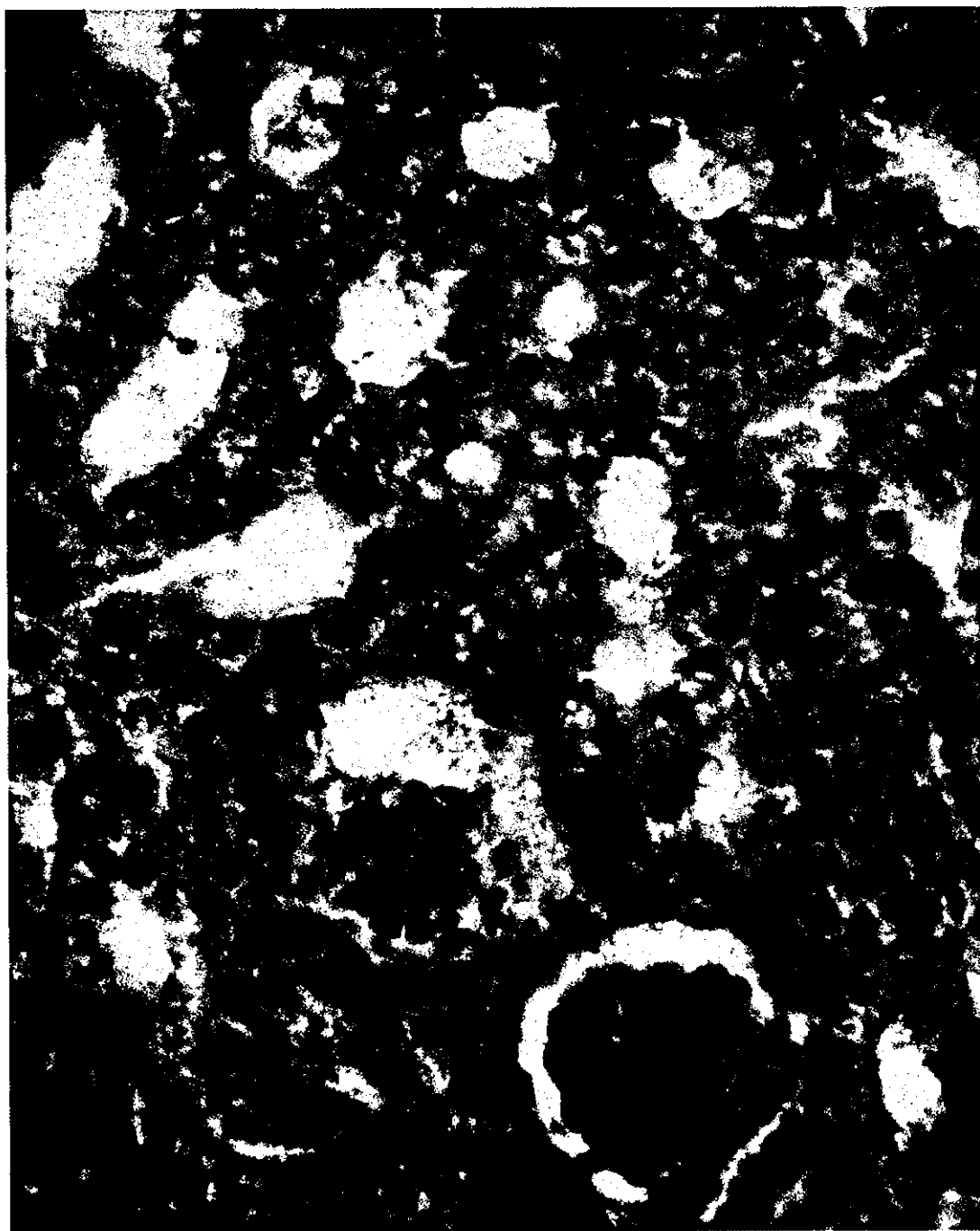


図49. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型  
マウスの腎臓 (HE 染色)



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)

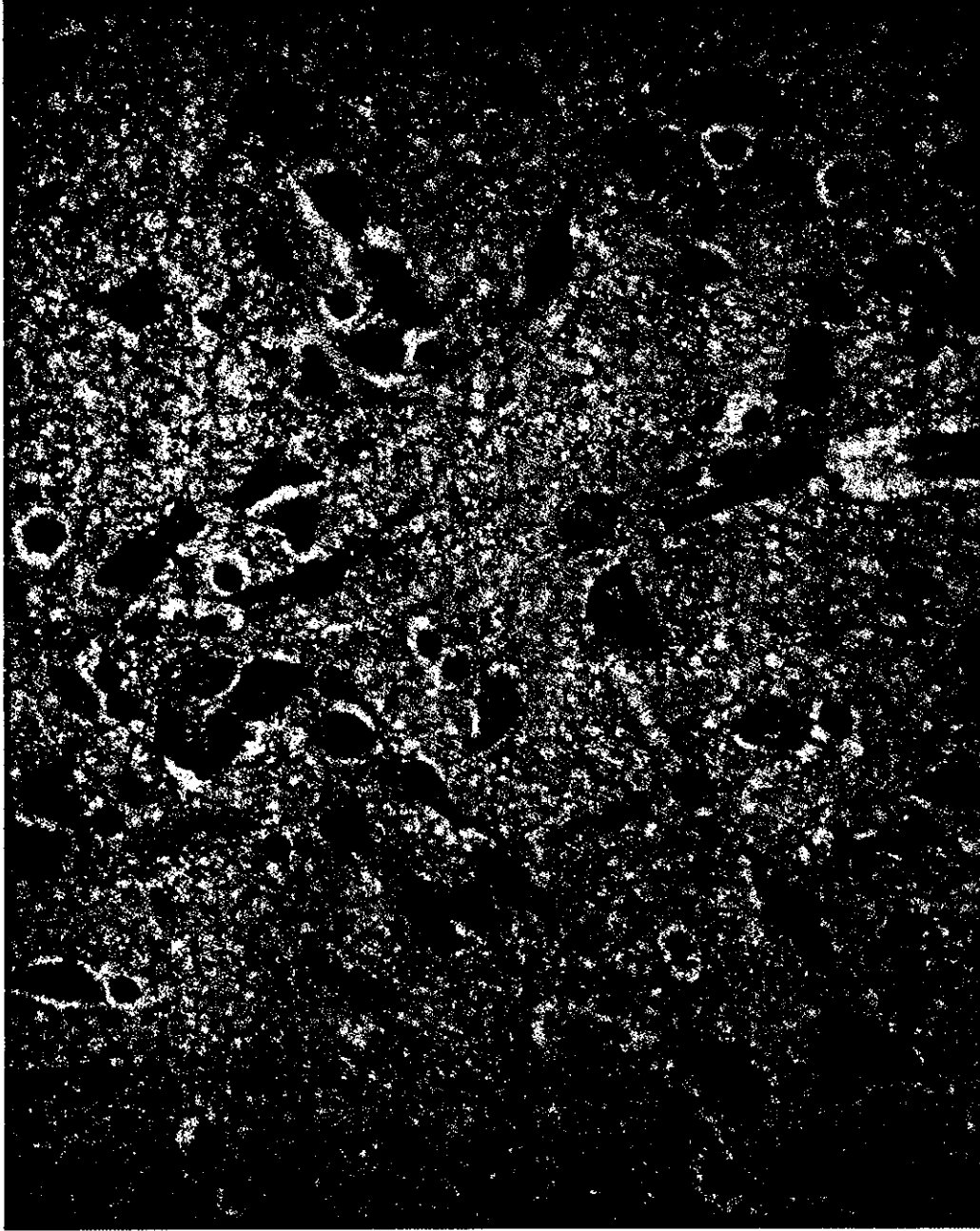


図51. メタロチオネイン欠損マウスの視床下部  
(HE 染色)

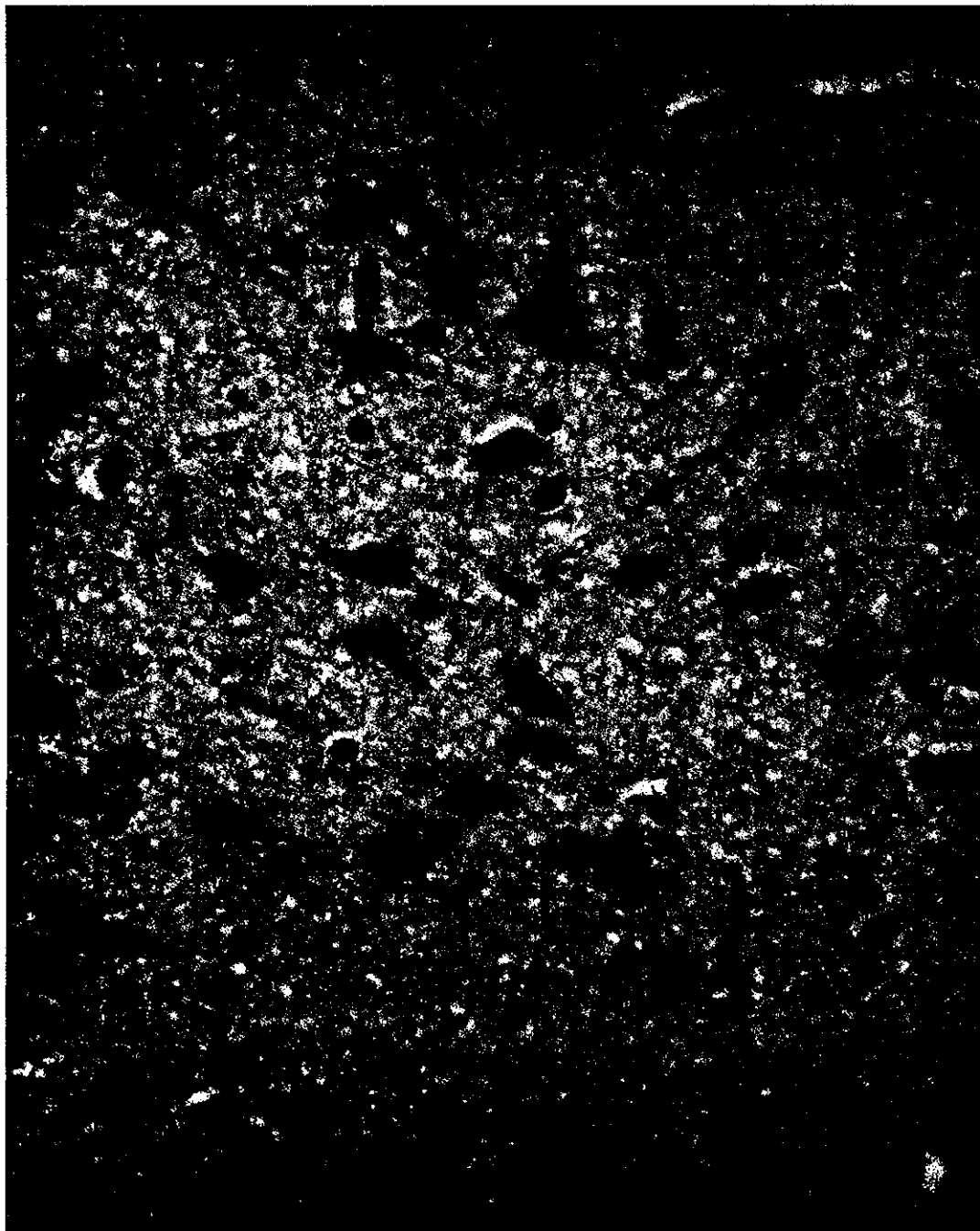


図52. メチル水銀曝露メタロチオネイン欠損  
マウスの視床下部 (HE 染色)

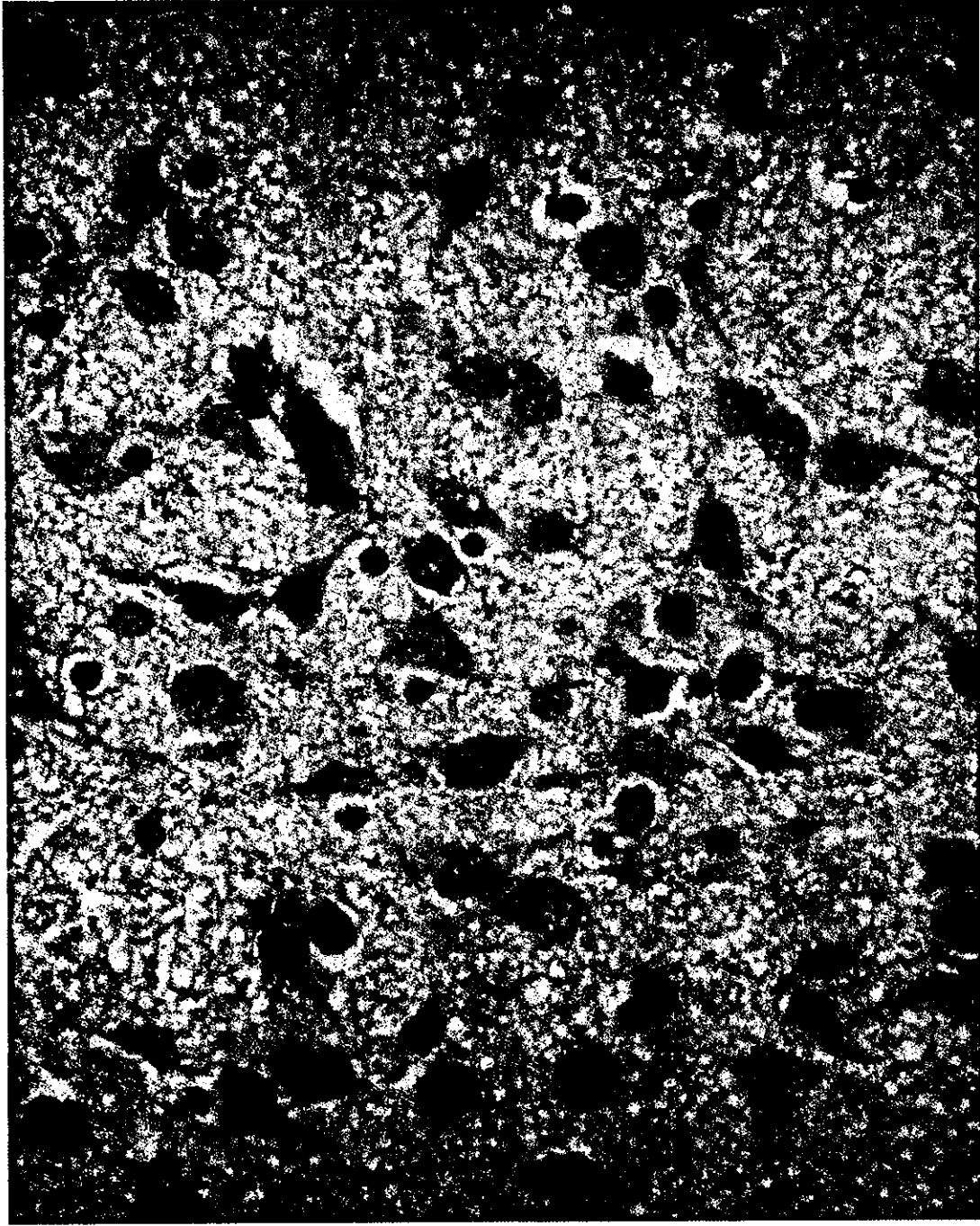


図53. メタロチオネイン野生型マウスの視床下部  
(HE 染色)

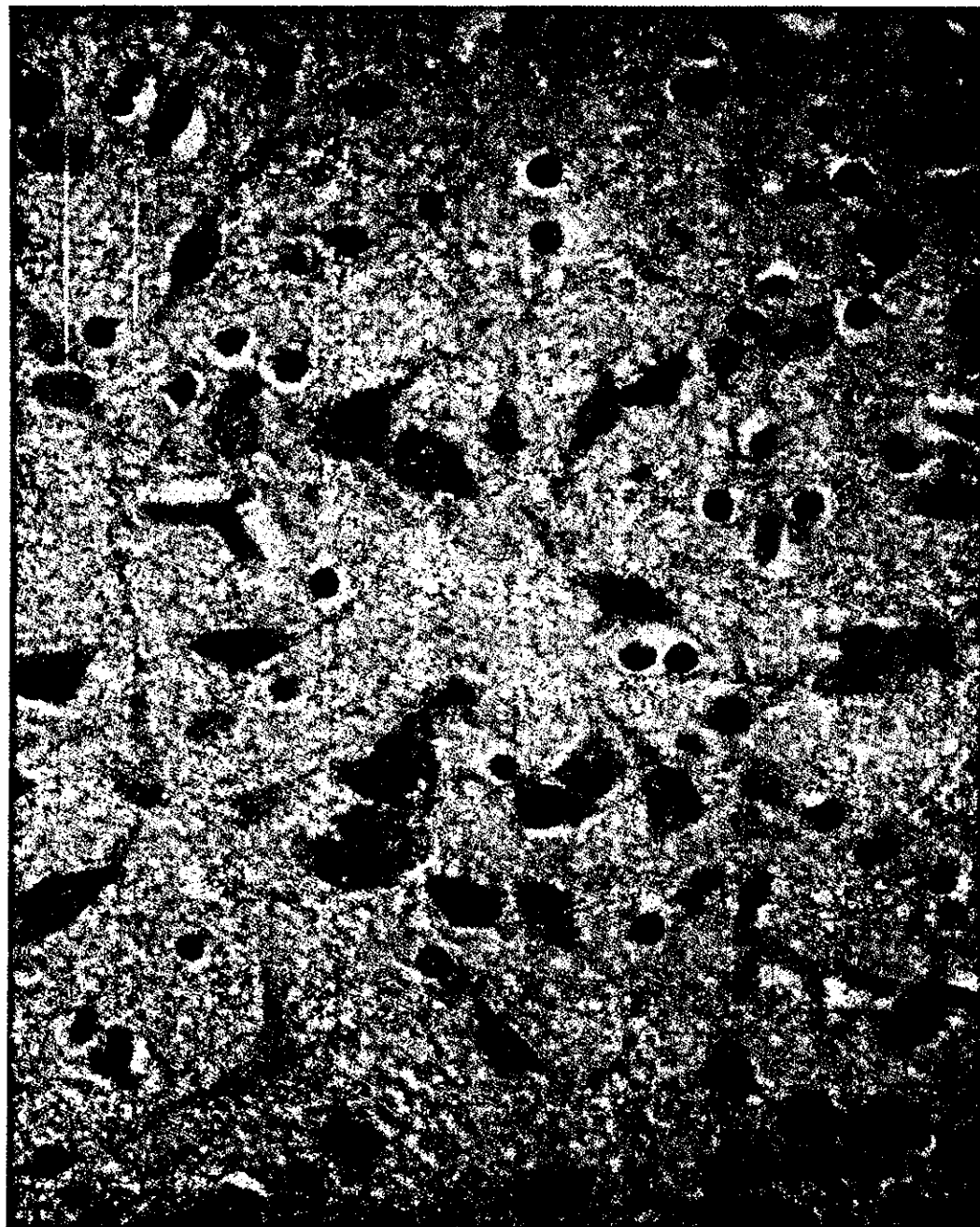


図54. メチル水銀曝露メタロチオネイン野生型  
マウスの視床下部 (HE 染色)



# 視床下部における神経細胞数

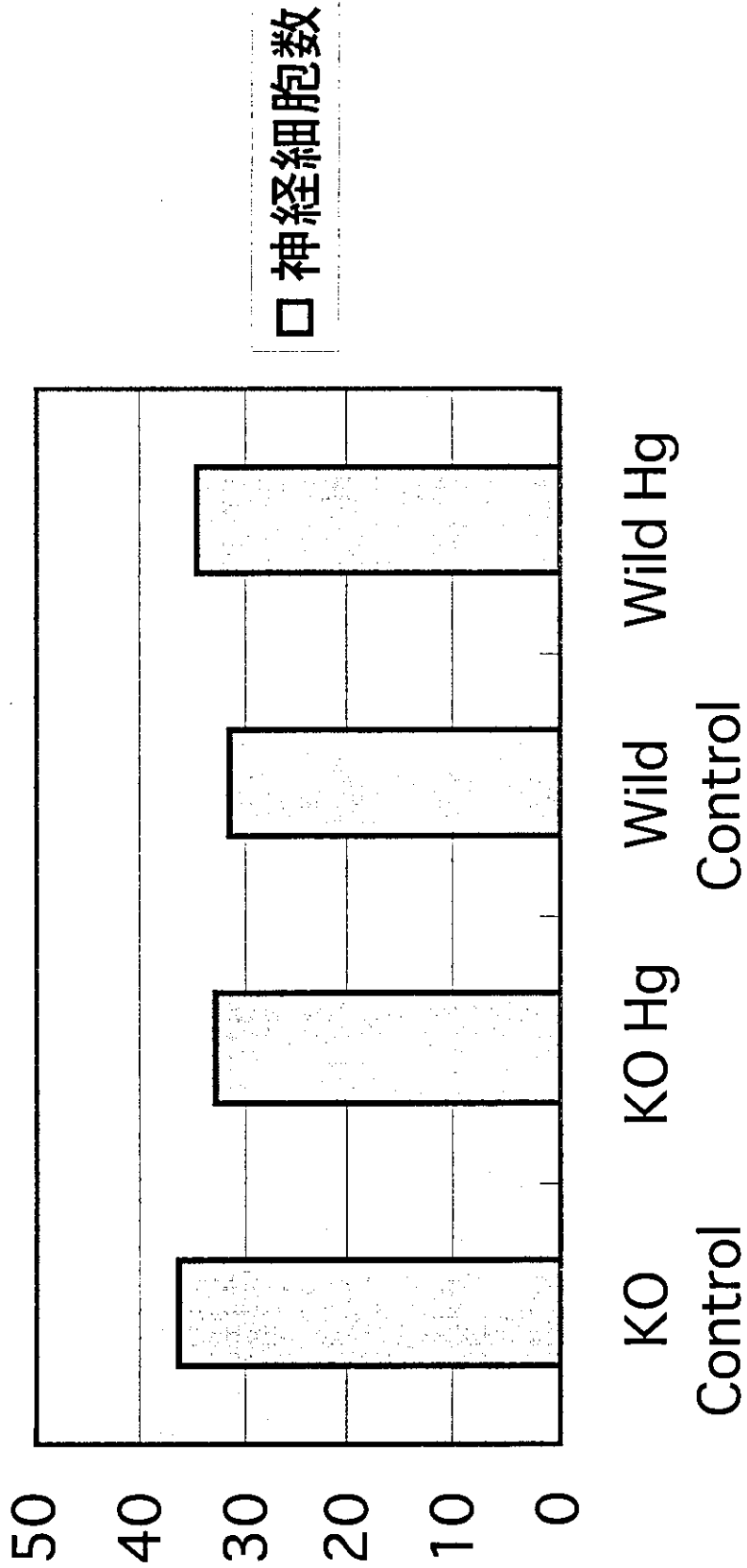


図55. 視床下部における神経細胞数

視床下部における星状膠細胞数

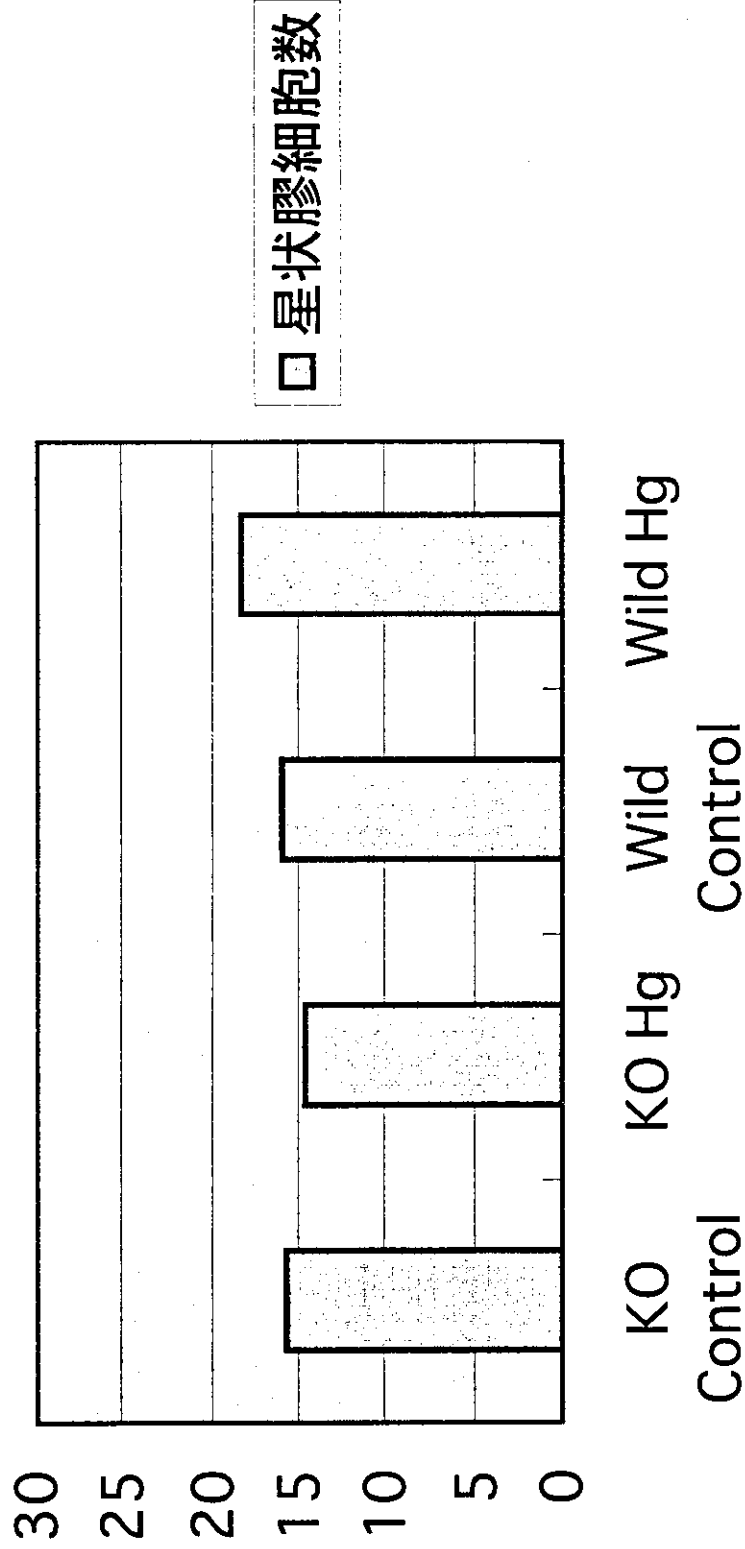


図56. 視床下部における星状膠細胞数

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

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

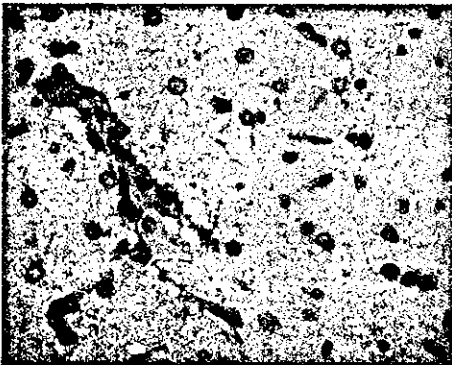
1. 間脳レベルの横断大脳の薄切切片（組織 3  $\mu$ m）を脱パラフィン処理し、水道水および蒸留水で洗浄した。
2. マイクロウェーブ処理により抗原の不活化を行った。
3. 内因性ペルオキシダーゼ阻害のため、3% 過酸化水素水に室温で 15 分間浸漬した。
4. 蒸留水で洗浄後、非特異的結合を防ぐため、10% Normal Goat serum を切片にマウントし、マイクロウェーブ処理下で 5 分反応させた。
5. 抗 TIMP-4 ウサギ抗体（T8312, SIGMA 社、USA）を 0.01M PBS で希釈（300 倍）し、切片上にマウントして、マイクロウェーブ処理下で 20 分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

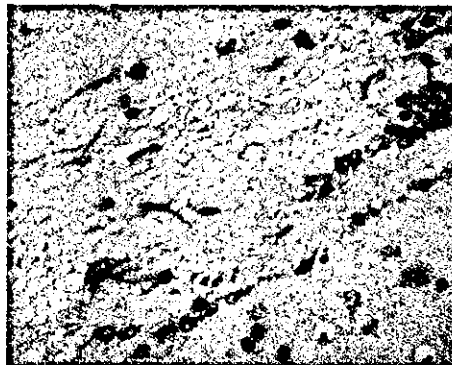
・結果

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。

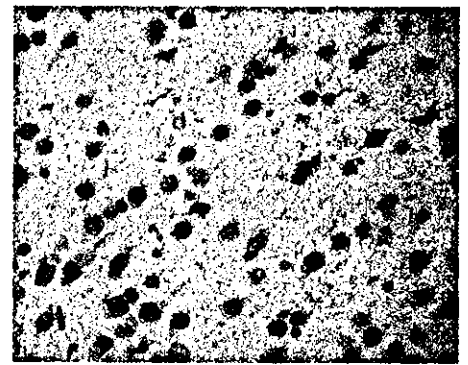
MT - 群



海馬

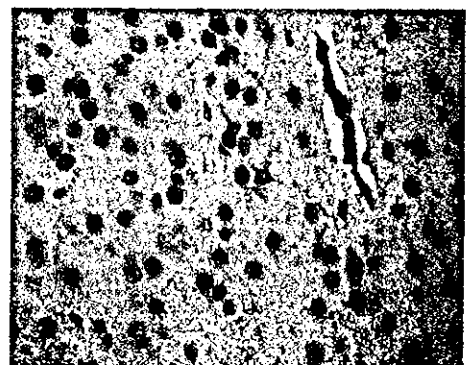
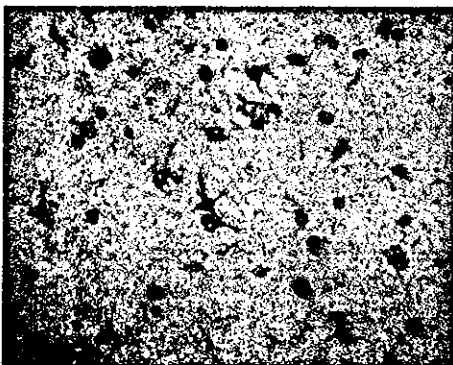


大脳白質



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（化学物質リスク研究事業）

## 分担研究報告

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）

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

メチル水銀毒性の修飾要因と想定した水銀蒸気との複合曝露が行動にもたらす影響については、別項で吉田氏が報告したが、用いた検討条件に関する限り、複合曝露の場合に毒性が増強するとは言えず、各単独曝露の場合と同様の行動影響が検出された。本研究では、複合曝露の影響を病理学的に評価し、各単独曝露の場合と比較した。評価方法としては、HE染色、GFAP免疫染色、および水銀沈着の組織学的検出を試みたが、単独曝露・複合曝露を問わず、病理的な陽性所見は得られなかった。また、水銀沈着の程度についても、系統差は認められなかった。したがって、行動学的に検出された異常に対応するような病理所見を発見することはできなかった。

#### ・はじめに

本プロジェクトでは、メチル水銀毒性の修飾要因の一つとして、水銀蒸気を考え、両者の複合曝露がもたらす影響を、単独曝露の場合と比較した。行動影響については、別項で吉田氏が報告した通りで、用いた検討条件において、両者の著しい毒性増強を見ることはなかった。本研究では、複合曝露の影響を病理学的に検索することによって、両者の相互作用を検証することを目的とした。

#### ・病理解析の方法（観察項目）：間脳レベル（海馬含む）および小脳

##### 1. HE染色

器質的変化の有無（神経細胞の変性・脱落、グリオシス、加齢性変化（リポフスチン

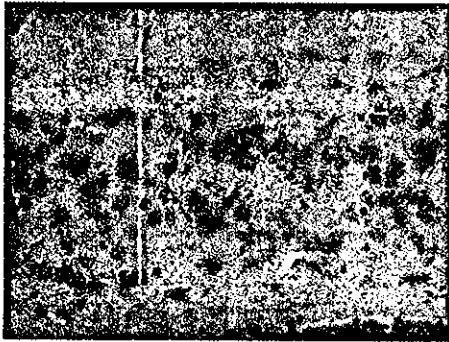
沈着など))

2. オートメタログラフィー：水銀顆粒沈着の有無
3. 免疫組織化学：GFAP（星状膠細胞の反応性変化、グリオシス）

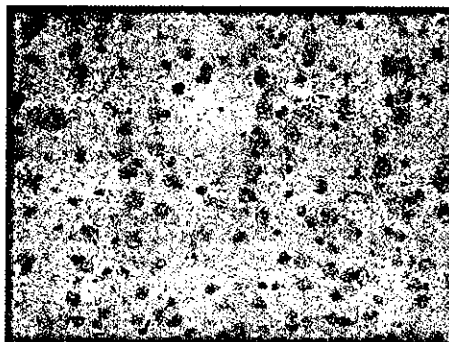
【実験 1】 加齢マウス（胎生期から出産 10 日までメチル水銀投与）

(1) HE 染色

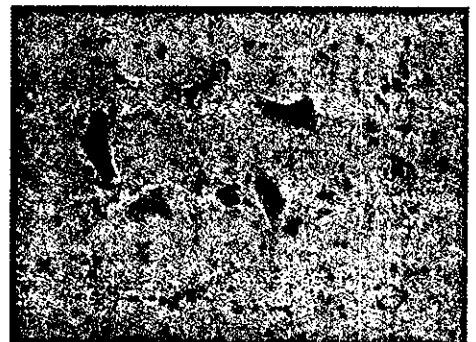
MT+群



海馬

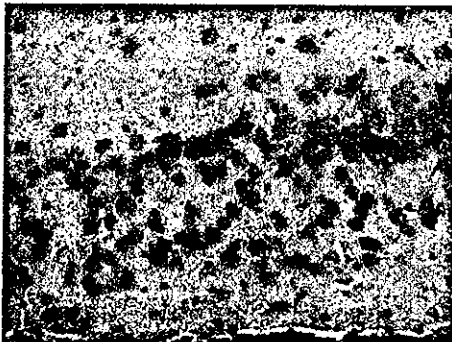


大脳皮質

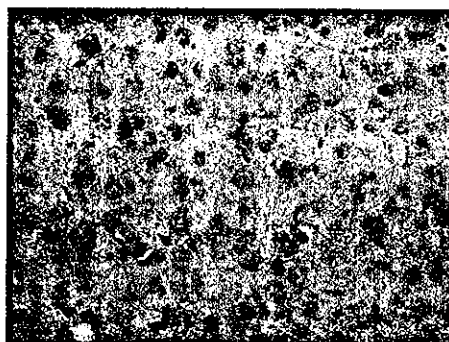


延髄

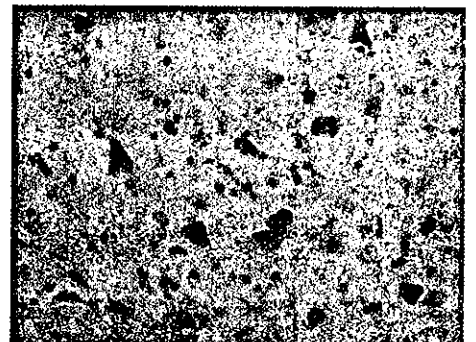
MT-群



海馬



大脳皮質

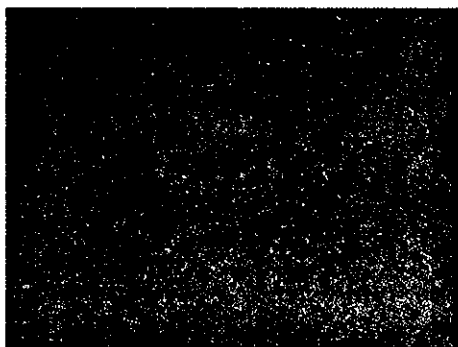


延髄

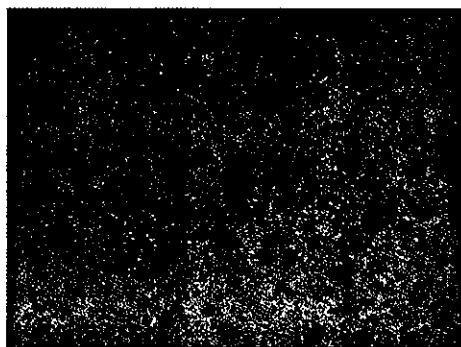


(2) オートメタログラフィー (水銀染色)

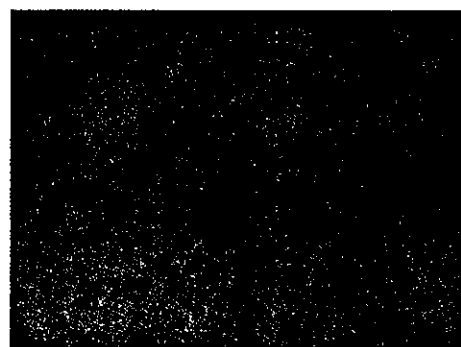
MT+群



海馬

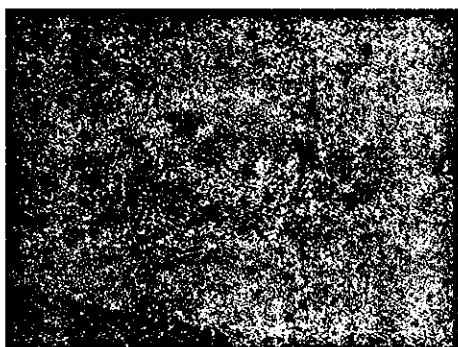


大脳皮質

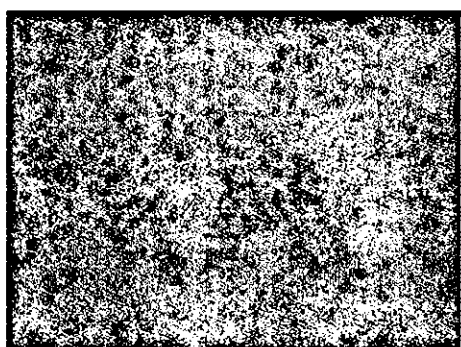


延髄

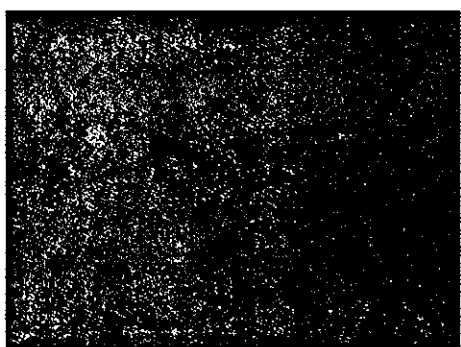
MT-群



海馬



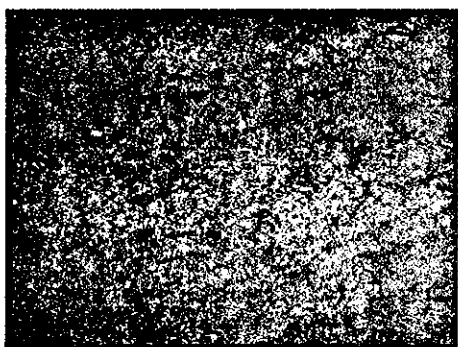
大脳皮質



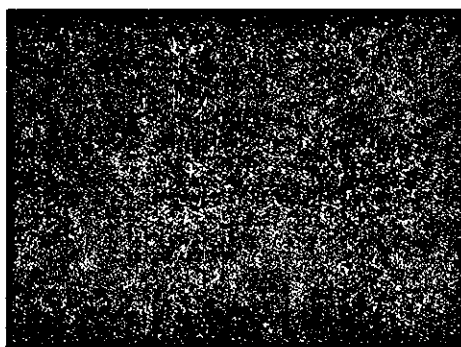
延髄

(3) GFAP 免疫染色

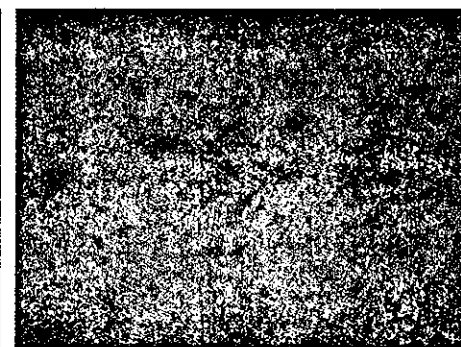
MT+群



海馬



大脳皮質



延髄

## MT-群



海馬

大脳皮質

延髄

### ・結果のまとめ（上の図参照）

HE 染色で、メタロチオネイン欠損および野生型マウスいずれにおいても、海馬、大脳皮質、大脳白質、小脳および延髄において著変は認められなかった。GFAP 免疫染色においても星状膠細胞の反応に両群に差は認められなかった。水銀染色では両群の延髄の神経核に神経細胞細胞質に陽性像が認められた。水銀顆粒陽性像の程度に関して、両群に差は認められなかった。

### ・考察

行動解析により、野生型マウス（雌雄）において探索行動の低下が、雌性メタロチオネイン欠損マウスにおいて回避反応の低下および学習獲得能力の低下が認められているが、それらを裏付ける病理形態学的所見は認められなかった。また、メタロチオネイン欠損マウス、野生型マウス両群に水銀沈着の程度に差は認められず（延髄神経核）、メタロチオネインの有無と水銀沈着との関連を示唆する所見を得ることはできなかった。

### 【実験2】若齢マウス

単独曝露（蒸気水銀、メチル水銀）

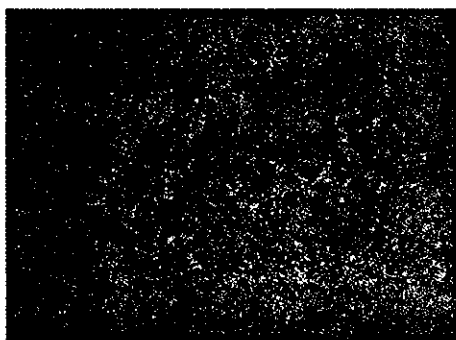
複合曝露（蒸気水銀＋メチル水銀）

### ・結果のまとめ

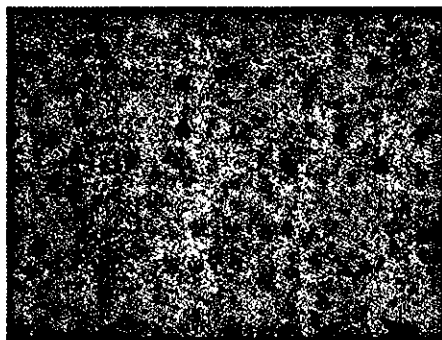
単独曝露群、複合曝露群において、HE 染色および GFAP 免疫染色で特に著変は認められなかった。また、全ての実験群において水銀沈着の程度（延髄神経核）に差は認められなかった（次頁の図参照）。

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）

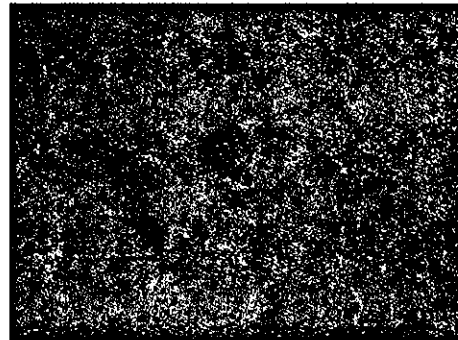
MT+群



海馬

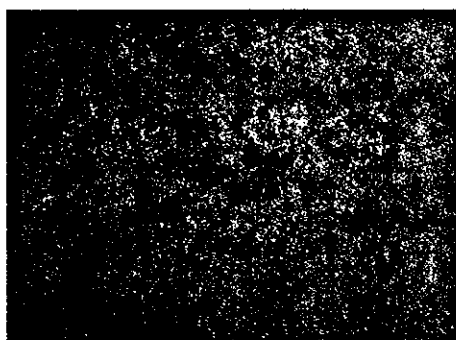


大脳皮質

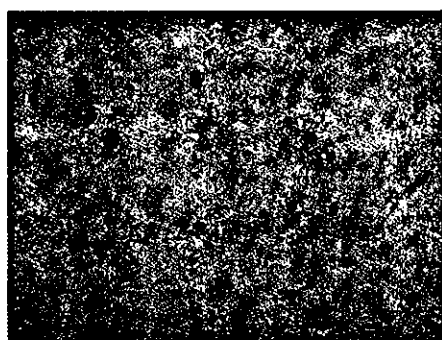


延髄

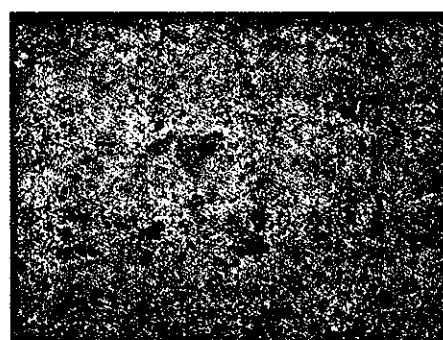
MT-群



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

Time dependent changes of mercury distribution in the murine spinal cord after exposure to low concentration mercury vapor

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

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

本プロジェクトでは水銀蒸気曝露を、メチル水銀毒性の修飾要因ととらえ、その影響を検討してきたが、その過程において水銀蒸気の神経系における輸送にこれまで知られていない経路が関与している可能性を指摘した。本研究では、この点について低濃度（0.04–0.1mg/m<sup>3</sup>）水銀蒸気曝露における脊髄への水銀分布を4週間にわたり経時的に追跡することによって検討した。その結果、脊髄への侵入には逆行性軸索輸送が使われていること、脊髄内の移動には transneuronal な（神経細胞から神経細胞への）経路も使用されていることが示唆された。

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is the critical organ for elemental (metallic) mercury (Hg<sup>0</sup>) exposure. Over-exposure to mercury vapor gives rise to neurological effects and neurobehavioral impairment. Until now, there are