

13. Juan, V., Rocio, M., Auxiliadora, A. and Damaso, C. 1999. Accumulation of mercury in neurosecretory neurons of mice after long-term exposure to oral mercuric chloride. *Neuroscience Letters*. 271: 93-96
14. Kimura N. 1971. Electron microscopic studies on the rat cerebellum in experimental inorganic mercury poisoning. *Psychiatria et neurologia Japonica*. 74(4): 312-325
15. Kristensson K. 1978. Retrograde transport of macromolecules in axons. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 97-110
16. Lindstedt, G. and Stkerfving, S. 1972. Method of analysis. Pp. 3-13. In *Mercury in the Environment*. (Fridberg, L. and Vostal, J ed.), CRC press, Cleaveland, OH.
17. Magos, L., Halbach, S., Clarkson, T.W. 1977. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochem. Pharmacol.* 27: 1373-1377
18. Morgan, D. L., Chanada, S. M., Price, H. C., Liu, J., Brambila, E., O'Connor, R. W. and Barone, S. Jr. 2002. Disposition of inhaled mercury vapor in pregnant rats: maternal toxicity and effects on developmental outcome. *Toxicol. Sci.* 66: 261-273.
19. Möller-Madsen, B. 1992. Localization of mercury in CNS of the rat. V. Inhalation exposure to metallic mercury. *Arch. Toxicol.* 66: 79-89
20. Nordlind, K. 1990. Biological effects of mercuric chloride, nichel sulphate, and nichel chloride. In: G.P. Ellis and G.B. West, (Eds), *Progress in Medical Chemistry*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, vol. 27. 190
21. Roger Kevin Stankovic, Victor Lee, Murat Kevic and Clive Harper 2003. The expression and significance of metallothioneins in murine organs and tissues following mercury vapour exposure. *Toxicol. Pathol.* 31: 514-523
22. Pamphlett, R. and Coote P. 1998. Entry of low doses of mercury vapor into the nervous system. *Neurotoxicology* 19: 39-47
23. Pamphlett, R. and Kum-Jew, S. 2000. Mercury vapor uptake into the nervous system of developing mice. *Neurotoxicol. and Teratology* 23: 191-196
24. Pamphlett, R. and Waley, P. 1996. Motor neuron uptake of low dose inorganic mercury. *Journal of the Neurological Sciences*. 135: 63-67
25. Porth, C. M. 2002. *Pathophysiology- concepts of altered health states*, sixth edition

26. Schiønning, J. D. and Møller-Madsen, B. 1991. Autometallographic mapping of mercury deposits in the spinal cord of rats treated with inorganic mercury. *Acta Neuropathol.* 81: 434
27. Schiønning, J. D. 1993. Retrograde axonal transport. In: A. Lajtha, (Ed), *Handbook of Neurochemistry*, vol. 5, Plenum, New York, pp. 381-404
28. Schiønning, J. D. 1993. Retrograde axonal transport of mercury in rat sciatic nerve. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 43-49
29. Schiønning, J. D., Rune Eide, Möller-Madsen B., and Erik Ernst. 1993. Detection of Mercury in Rat Spinal cord and Dorsal Root Ganglia after Exposure to Mercury Vapor. *Experimental and Molecular Pathology* 58: 215-228
30. Schiønning, J. D. and Danscher Gorm 1999. Autometallographic mercury correlates with degenerative changes in dorsal root ganglia of rats intoxicated with organic mercury. *APMIS* 107: 303-310
31. Schwab M., Thoenen H. 1983. Retrograde axonal transport. In: A. Lajtha, (Ed), *Handbook of Neurochemistry*, vol. 5, Plenum, New York, pp. 381-404
32. Warfvinge, K., Hua, J., and Berlin, M. 1992. Mercury distribution in the rat brain after mercury vapor exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117: 46-52
33. Warfvinge Kalin and Bruun Anitha 2000. Mercury distribution in the squirrel monkey retina after *in utero* exposure to mercury vapor. *Environmental Res. Section A* 83: 102-109

II. 分担研究報告

4. 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 （吉田克巳）

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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

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

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 吉田克己 東北大学大学院医学系研究科内分泌学助教授

研究要旨：甲状腺ホルモンは、発達期の脳に必須のホルモンにあり、その制御が障害されると脳の分化・成熟に重大な影響を及ぼすため、甲状腺ホルモンの制御が不全な場合、胎生期重金属の神経毒性に感受性になる可能性がある。一方で甲状腺ホルモンの代謝に重要な役割を持つ、ヨードチロニン脱ヨード酵素は重金属と相互作用することが知られるセレンを含むタンパク質であり、水銀やカドミウムは、この酵素への影響を介して、甲状腺ホルモン環境に影響を与える可能性がある。これらの可能性を検討するのが本研究の目的であり、本年度は上記の酵素の胎仔から新生仔期にかけての変化と、新生仔期脳の酵素活性にこれらの金属が及ぼす *in vitro* での影響を検討した。

A. 研究目的

甲状腺ホルモンは、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、その分化などを制御する重要な因子であることが明らかになってきている。したがって、発達期にある脳に化学物質が与える影響を考える場合、甲状腺ホルモン系は、化学物質のターゲットとして、あるいは化学物質への感受性を修飾する要因として重要であると考えられる。

発達期にある脳は、循環血流からチロキシン (T4)を取り込み、組織で局所的にトリヨードチロニン (T3) を産生している。また、胎児期の甲状腺が未発達な段階においては、胎児は母体の甲状腺ホルモンに依存しており、母体側循環から胎児側循環への甲状腺ホルモンの移行は、胎盤において制御されている。これらのプロセスにはヨードチロニン脱ヨード酵素 (iodothyronine deiodinases) と呼ばれる酵素が関与しているが、この脱ヨード酵素には、タイプ1, 2, 3と

いう3種類のアイソザイムが知られており、それぞれ、基質特異性、組織局在、触媒反応に違いがある。タイプ1はトリヨードチロニンの5位、5'位のどちらの位置にあるヨードも遊離することができるが、主要な作用は5'位からの脱ヨード反応であり、これによって、例えばT4を基質とする場合、活性型のホルモンであるT3を生ずる。タイプ1は、肝・腎・甲状腺などをはじめ、多くの組織に分布している。発達期の脳を考える場合、母体循環血流中の甲状腺ホルモンのレベルを決める酵素として関連している。発達期の脳により直接に関連するのは、タイプ2とタイプ3である。タイプ2は5'位のみで脱ヨード反応を触媒し、脳・下垂体・褐色脂肪細胞(BAT)に局在が見られる。血流中のT4を取り込み、局所的にT3を産生するのがその役割である。脳は血流中からT3を取り込むのではなく、こうして局所的に産生されたT3に依存している。タイプ3は、タイプ2とは逆に5位のみで脱ヨード反応を起こすため、T4に作用した場合は、非活性型のreverseT3を生ずる。タイプ3は、胎児(胎仔)の各組織ならびに胎盤に発現している。発達中の組織にT3は必須であるものの、その量は厳密に制御されている必要があり、タイプ3の酵素は、胎児組織を過剰のT3から保護する作用を持つものと考えられている。

1990年代に入ってから、これらの酵素がいずれもセレン(selenium)を含むセレン酵素であることが明らかにされた。セレンは生体にとっての必須微量元素の一つであり、多くの生理作用を有するが、一方で重金属と相互作用し、その毒性を軽減する場合があることも知られている。例えば水銀については、過剰のセレンがその毒性を軽減し、逆にセレン欠乏状態では、無機水銀・有機水銀ともに毒性が増強されることが報告されている。こうした相互作用のメカニズムについて、無機水銀の場合、セレン-水銀が直接結合して毒性のない複合体を形成することが知られているが、有機水銀の場合にどのようなメカニズムで相互作用がおこるかは、明らかにはなっていない。我々は、水銀が代表的なセレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの活性を低下させることから、同じセレン酵素であるヨードチロニン脱ヨード酵素でもこうした活性阻害が起こることを考え、妊娠期のマウスについてメチル水銀を投与し、胎仔・胎盤におけるこれらの酵素活性を調べ、胎仔脳でのT3過剰が起こる可能性を指摘した[Watanabe et al. 1999]。逆に胎児期の甲状腺ホルモン環境が何らかの原因で正常レベルから外れるか、あるいはその境界値にあった場合、メチル水銀による脱ヨード酵素活性への影響が加わることにより、脳の発達に異常が起

こる可能性がある。

カドミウムもまたセレンと相互作用することが古くから知られているが、そのメカニズムはよくわかっていない。しかし、カドミウムが発達期の脳に何らかの影響を与えるならば、甲状腺ホルモン環境への影響は無視できない。

マウス、ラットでは、脳の発育は人間よりも遅い時期に critical point を迎え、妊娠後期から新生児期が最も重要とされている。この中で、最も甲状腺ホルモンが必要とされる時期は生後 2 週目ぐらいである。例えば小脳は層状構造を作っているが、新生児期、特に生後 1 週から 2 週にかけて十分量の甲状腺ホルモンが供給されないと、各層を構成する細胞の適正な位置への移動が起こらないまま小脳の発育が止まってしまうことが報告されている。従ってこの頃までに必要量の T3 が脳に供給されるメカニズムが確立されている必要がある。こうしたメカニズムの中で最も重要なものがタイプ 2 の脱ヨード酵素であり、このタイプ 2 活性は新生児期にピークを迎えたとされている。

一方胎児期においては、甲状腺ホルモンの需要は低く抑えられており、必要量以上の甲状腺ホルモンの供給はかえって有害と考えられている。胎児期および新生児期のはじめは甲状腺ホルモンの不活性化反応を触媒するタイプ 3 型酵素の活性が高く、生後 1 ヶ月くらいで adult のレベルまで活性が低下するとされている。

本研究では、こうした胎仔・新生仔期における甲状腺ホルモン環境の修飾がこれら重金属の毒性に及ぼす影響を調べる一方で、甲状腺ホルモン環境を制御するこれらセレン酵素への影響を調べるのが最終的な目的であるが、初年度は発達に伴うこれら酵素活性の変化を in vivo で確認するとともに、各金属による in vitro における酵素活性への影響を検討した。

B. 研究方法

in vivo: 妊娠 10 日目の C57BL/6J マウスを購入し、在胎 14-17 日および出生後 2-4 日（出生の確認された初日を 1 日と数える）において胎仔・新生仔を解剖、脳を摘出し、タイプ 2、タイプ 3 酵素のアッセイを行なった。タイプ 2 アッセイ（脳組織の場合は、外環-outer-ring からの脱ヨード活性に等しい）は、組織から超遠心によって得られたミトコンドリア/ミクロソ

ーム分画を、ヨード（外環）を放射標識した T4 およびジチオスレイトールの共在下で一定時間インキュベートして、遊離する放射 I を定量した。タイプ 3 アッセイ（内環からの脱ヨード活性）は、分画を、非標識 T4 およびジチオスレイトールの共在下でインキュベートし、生ずる reverse T3 をラジオイミノアッセイで定量した。

in vitro: 出生後 1-3 日の新生仔から摘出した脳組織から調整したミトコンドリア/ミクロソーム分画について、様々な濃度の金属類（メチル水銀、カドミウムに加え、砒素についても実験を行なっている）を添加し、酵素活性をこれらの金属類が直接阻害するか否かを調べた。また、ジチオスレイトールの濃度を変化させて、その影響も検討した。

C. 研究結果

図 1 は、胎仔期～新生仔期にかけての脳におけるタイプ 2 脱ヨード酵素活性の経時的変化を示している。一方、図 2 は同時期の脳におけるタイプ 3 活性の変化を示している。これらの図が示すとおり、タイプ 2 活性は胎児期には低く、新生仔期にはいと急速に高くなることが確認された。一方で、タイプ 3 活性については、胎仔期には低く、出生後 2~3 日目で活性が高くなり、これもラットなどにおける既知のパターンと一致するものであったといえる。

図 3~5 は in vitro での金属添加実験の結果を示す。図 3 に示すとおりタイプ 2 酵素活性は、100 μ M のメチル水銀によって 60 % ほどに低下した。メチル水銀による活性抑制は、ジチオスレイトールの濃度依存的であり、ジチオスレイトールが高濃度に共存する場合、抑制作用が軽減された（図 4）。ここには示さなかったが、1~100 nM のヒ素および 0.1~10 nM のカドミウムでは何ら活性の変化は認められなかった。一方、タイプ 3 酵素活性については、濃度依存的な変化が得られず、さらに検討の必要があるように思われる。

D. 考察

in vivo における酵素活性の経時的変化は、これまでの知見を確認するものである。今回の結果から、1. タイプ 3 活性は胎児期には低いので、金属によって活性が低下するのを見るのならば、新生児期のマウスの方が変化を見やすいと思われる。2. タイプ 3 活性の場合は胎

児期も新生児期も adult よりも活性が高く、この間大きく変化はしないようなので、どの時期でも変化はとらえられると思われる。C57BL/6J マウスに関して、特に脱ヨードで特徴的なものは報告されていない。

in vitro の添加実験に関して、タイプ2の抑制は、以前の in vivo における結果 [Watanabe et al., 1999], ならびに in vitro 水銀添加の結果(未公表) と一致するものであった。タイプ3活性については、上記の in vivo 実験では、胎仔脳で抑制、胎盤で促進という結果が、胎仔脳を用いた in vitro 添加実験では in vivo に相当する濃度領域での抑制がそれぞれ確認されていた。今回のような in vitro における活性促進はこれらのいずれとも異なったものであった。このように、組織あるいは系によって結果が異なるメカニズムは現在のところ不明であるが、co-factor への影響を介する可能性あるいは、酵素との直接作用ではなく生合成などの過程に影響する可能性なども含めた検討が必要であろうと思われる。

なお、in vitro でのカドミウムの結果は、今回の佐藤班の結果を見ると 2nM 前後であり、添加実験に用いた濃度範囲に収まっているので、直接の阻害・促進作用はないように思われる。ヒ素については、同じセレン酵素の一つであるチオレドキシシンレダクターゼを in vitro において、非常に低い濃度で阻害することが報告されている [Styblo et al., 2001]。これは、今回得られた脱ヨード酵素とは異なる結果であり、タイプ3の活性亢進をあわせて考えると、同じセレンノール基を持つセレンタンパク質であっても、相互作用がかなり異なることがわかる。

E. 結論

初年度の目標としていたヨードチロニン脱ヨード酵素アッセイ系の確立と基本条件の検討を行ない、その結果に基づいて、発達に伴う脱ヨード活性の経時的変化、in vitro での添加試験を行なった。その結果、脳に発現する2つのタイプの脱ヨード酵素のうち、タイプ2は、在胎期終盤から出生後にかけて急速に活性があがってくること、一方でタイプ3は出生後 2-3 日に高値を示すという、ラットで知られているパターンとよく一致した。

In vitro での添加実験の結果から、メチル水銀は神経組織に対する直接的な毒性に加え、タイプ2脱ヨード酵素活性を抑制することにより脳の発育を妨げる可能性が示唆された。しかし、

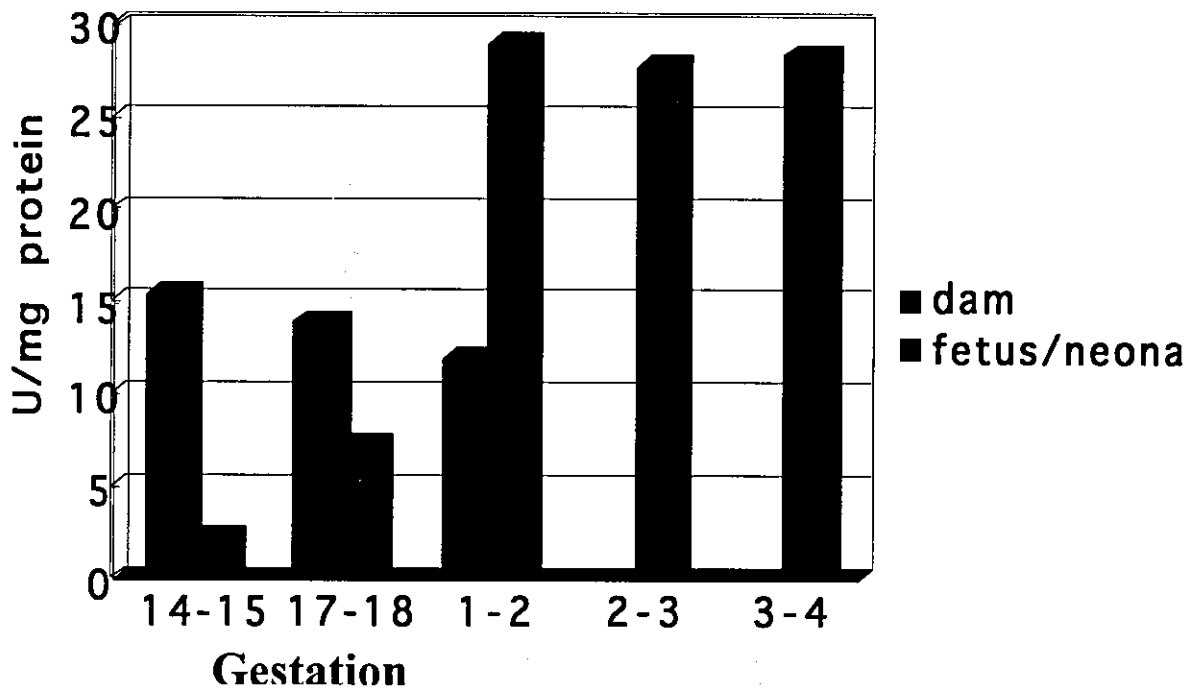
一方では in vivo と in vitro の結果が必ずしも一致しないことから、今後 in vivo の実験で、胎仔期と新生仔期との違いにも留意しつつ検討する必要があるものと思われた。また、このような酵素活性の抑制が、組織の T3 濃度にどの程度反映されてくるかについても検討が必要であろうと思われる。

以上の結果より、発達期にある脳の脱ヨード酵素系は、メチル水銀のターゲットとなる可能性があること、したがって、脱ヨード酵素系あるいは甲状腺ホルモン環境を修飾することにより、メチル水銀への感受性が修飾される可能性があることが示唆されたと考える。

参考文献

- Watanabe C, Yoshida K, Kasanuma Y, Kun Y, and Satoh H (1999) In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. *Environmental Research Section A*, 80, 208-214.
- Mori K., Yoshida K., Kaise K., Kaise N., Fukuzawa H., Kikuchi K/, Abe K., and Yoshinaga K (1993) Inhibition of placental thyroxine 5-deiodinase activity decreases amniotic fluid concentration of 3, 3', 5'-triiodothyronine in rat. *Endocrin J.*, 40, 405-412.
- Friedrichsen S, Christ S, Heuer H et al., (2003) Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8-/- mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, 144, 777-784.

図 1. The ontogeny of type II deiodinase activity in the brain of C57BL/6J mice



1-2 は、出生が確認された日を出生後1日目と数える場合には、出生後2日を意味する。

出生後における活性の急速な増加が特徴的である。在胎期においても出生が近づくにつれ、急に活性が上昇している様子がわかる。

图 2. The ontogeny of type III deiodinase activity in the brain of C57BL/6J mice

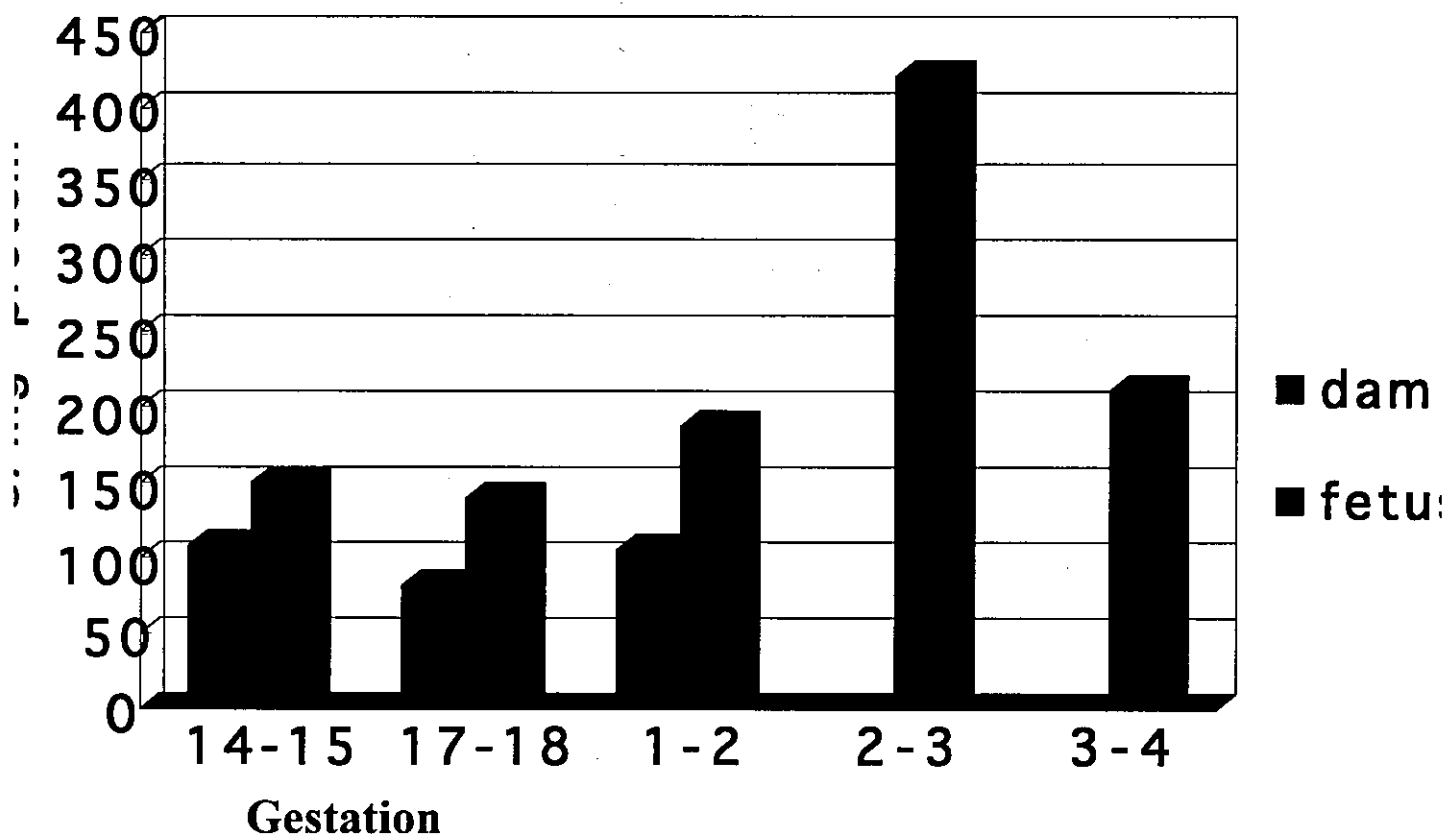
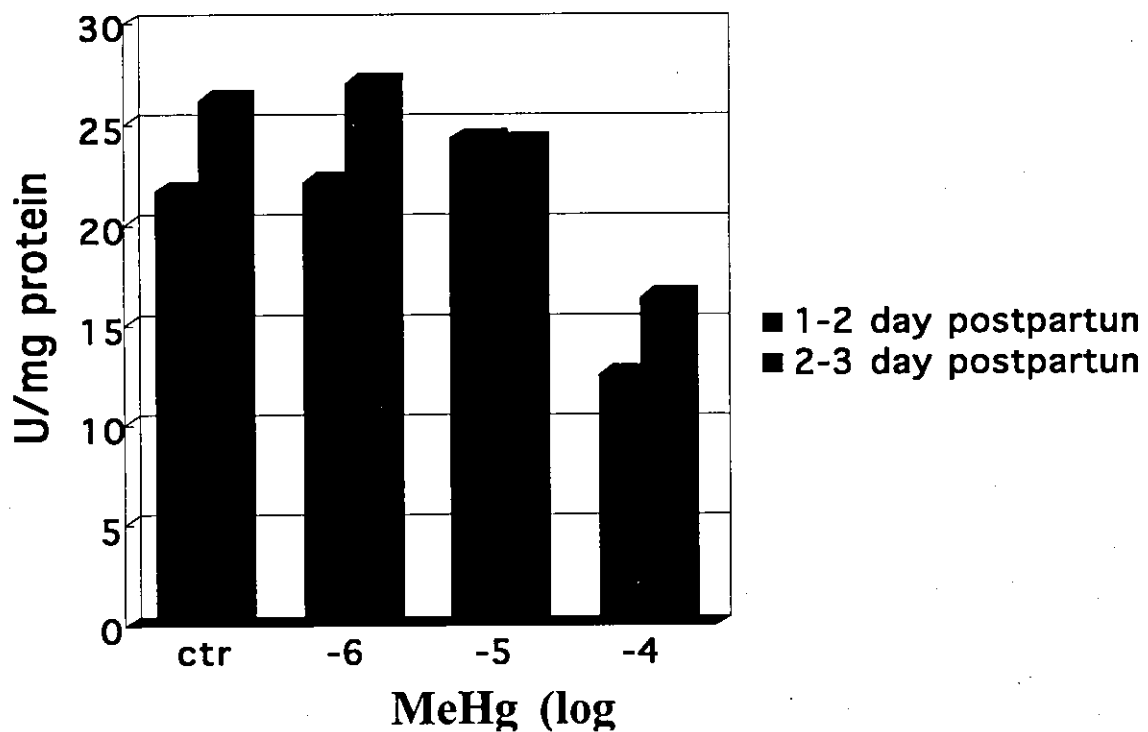
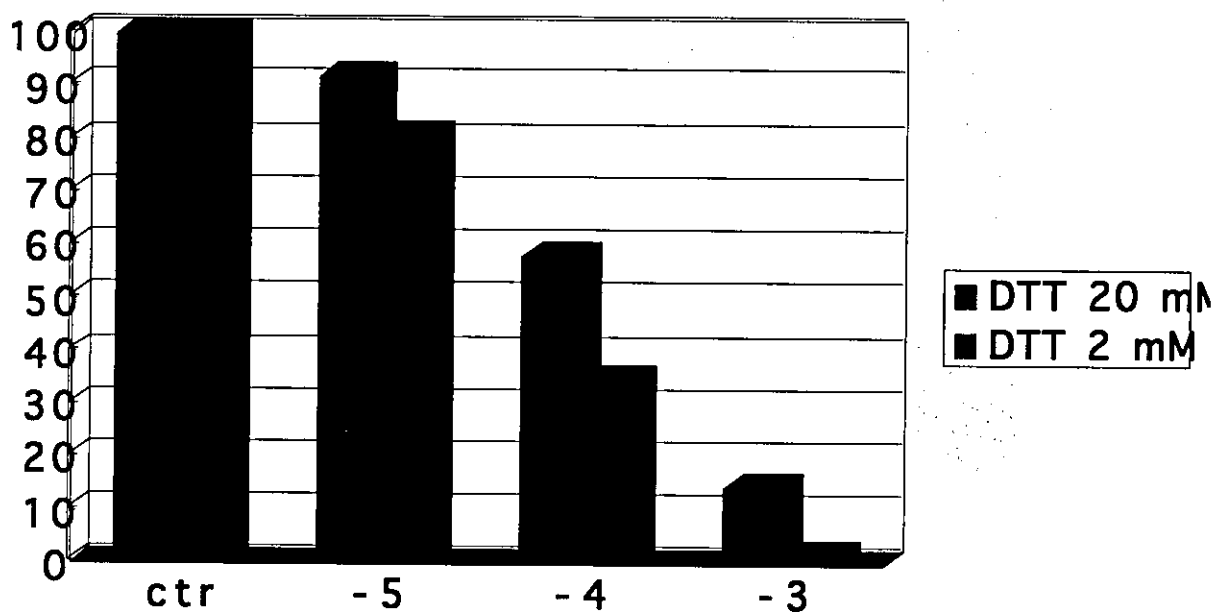


図 3. Effect of methylmercury on type II deiodinase activity in the neonatal mouse brain



In vitro で新生仔脳組織の抽出分画にメチル水銀を添加した場合の、タイプ2活性への影響。濃度依存的な抑制が認められる。

图 4 . Effect of co-existing DTT on the inhibition of D2 by methylmercury



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 吉田克己 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

研究要旨：甲状腺ホルモンは、発達期の脳に必須のホルモンであり、その制御が障害されると脳の分化・成熟に重大な影響を及ぼすため、甲状腺ホルモンの制御が不全な場合、胎生期重金属の神経毒性に感受性になる可能性がある。一方で甲状腺ホルモンの代謝に重要な役割を持つ、ヨードチロニン脱ヨード酵素（3種類のアイソザイムが存在）はいずれも重金属と相互作用することが知られるセレンを含むタンパク質であり、水銀やカドミウムは、これらの酵素への影響を介して、甲状腺ホルモン環境に影響を与える可能性がある。本年度は、*in vivo* ならびに *in vitro* の系を用いて、金属とこれら酵素の活性ならびに甲状腺ホルモンレベルの関連を探った。*in vitro*：神経芽細胞腫由来の NB41A3 細胞（神経細胞における甲状腺ホルモン作用・代謝の研究モデルとして用いられている）をメチル水銀に曝露し、脳における甲状腺ホルモン活性化において最も重要な 2 型の脱ヨード酵素活性を検討したところ、30nM という低濃度において有意な活性抑制を見いだした。*in vivo*：胎生期 MeHg 曝露群および Cd 曝露群を生後 10 日齢で解剖し、肝（1 型）、脳（2 および 3 型）の脱ヨード酵素活性、および血清中 T4 を測定した。その結果、MeHg 曝露は T4 濃度には大きな影響を及ぼさないが、脳の 3 型酵素活性を系統にかかわらず抑制する結果を得た。中等度の少数回投与に

において得られた結果とほぼ一致していた。一方でCd曝露により、血清T4は系統にかかわらず有意に低値となり、脳の2型活性はこれを補償する方向に変化を示した。特にMTnullにおいてこの傾向は強く現れた。以上のように、新生仔脳の甲状腺ホルモン環境は、周生期におけるこれらの重金属曝露に対して敏感に反応することが見いだされた。これらの変化がいかなるメカニズムによるものなのか、また、別項で述べられるような行動影響に関連しているのかは今後の課題である。一方で、これらの結果は、甲状腺ホルモン代謝に異常があるような個体がCd、MeHgに対して感受性が高い可能性を示唆しているとも考えられた。

A. 研究目的

甲状腺ホルモンが発達期の脳においては、その分化などを制御する重要な因子であること、発達期にある脳に化学物質が与える影響を考える場合、甲状腺ホルモン系は、化学物質のターゲットとして、あるいは化学物質への感受性を修飾する要因として重要であると考えられること、は前年度の報告書に詳しく述べた。

胎仔・新生仔期における甲状腺ホルモン環境の修飾と重金属毒性との関連を明らかにし、甲状腺ホルモン環境を実験的に操作した場合の重金属毒性への感受性の変化を検討することが本研究の最終的な目的である。特に、発達期の脳の甲状腺ホルモンレベルの制御の上で重要なヨードチロニン脱ヨード酵素 (iodothyronine deiodinases) に注目し、周生期の重金属曝露がこれらのこの脱ヨード酵素に及ぼす影響に焦点をあてて解析している。脱ヨード酵素は、いずれもセレンを含む酵素で、タイプ1、2、3という基質特異性、組織局在、触媒反応の異なる3種類のアイソザイムが知られている。

前年度は、周生期のマウス脳におけるタイプ2、3の活性のontogenyについて検討し、マウスがラットに似通った経時的パターンを示すこと、新生仔脳の抽出液にメチル水銀を添加した場合の影響を検討し、タイプ2の活性が比較的高濃度のメチル水銀で抑制され、タイプ3の活性は明確な影響を受けないことを報告した。今年度は、in vivo, in vitro にまたがっ

て3つの実験を行った。

1) *in vivo* では、周生期CdまたはMeHg曝露マウスの生後10日における甲状腺ホルモン代謝：曝露マウスを出生後10日目（曝露が続いている状態）で解剖し、脳および肝の脱ヨード酵素活性ならびに血清甲状腺ホルモン濃度を測定した。

2) *in vitro* NB41A3マウス神経芽細胞腫細胞の脱ヨード酵素活性に対するメチル水銀（MeHg）の影響：マウス脊髄腫瘍（C1300 Jackson tumor）由来の細胞を用いて、タイプ2脱ヨード酵素の活性にメチル水銀が及ぼす影響について検討した。この細胞の特徴としては、

- ・アドレナリン及びコリン作動性ニューロンの特徴を有する

また、特に甲状腺ホルモン作用と代謝とに関連する特徴として、

- ・タイプ II 脱ヨード酵素の存在（T3の供給）

- ・核内甲状腺ホルモンレセプター（TR）の存在

- ・カテコールアミン代謝系酵素（TH, MAOなど）活性化に関与

などが挙げられ、ニューロンにおける甲状腺ホルモン作用・代謝の研究モデルとして用いられている。

B. 研究方法

1) *in vivo* : 周生期 Cd および MeHg 曝露を行い、出生後 10 日齢で解剖した C57BL/6 の新生仔脳および肝は、それぞれ佐藤氏（岐阜大）および吉田稔氏（聖マリアンナ医大）から提供を受けたものである。アッセイ方法は前年度報告書と同様で、radioimmunoassay を用いた (Watanabe et al., 1999; Mori et al. , 1993)。

2) *in vitro* :

1. NB41A3細胞は5%FBS添加RPMI1640培地で培養した。

2. D2活性を誘導するため、細胞回収前24時間は無血清とし、また 1mM Bu2cAMP 添加18時間後に細胞を回収した。

3. 各種濃度のMeHgを培地に添加し、タイプII5'-deiodinase (D2) 活性を測定した。

C. 研究結果

1) in vivo

Cd…… 系統にかかわらず Cd 投与群では新生仔血清中 T 4 の濃度が非投与群に比べて低い値をしめした, 図 1 に見るように, 特に MT-null において投与の影響が強いことがわかれた. 新生仔肝のタイプ 1 の脱ヨード酵素活性については, Cd は影響を与えなかった(図 2). 新生仔脳の種類 2 脱ヨード酵素活性については, 2 元配置分散分析において Cd 投与の効果が有意であり, 投与によって活性が高くなっていたことを反映していた. 群間比較でみると, MT-null でのみ, 投与群と非投与群との間に有意差を認めた (図 3). タイプ 3 活性は, 特に MT-null においてはタイプ 2 への影響の mirror image のようにも見えるが, 有意差には至らなかった (図 4).

MeHg…… 血清 T4 については, 全体として 2 元配置では系統差が認められ, MT-null が高値であった. MeHg の効果は有意ではなかった (図 5). 肝のタイプ 1 には影響が認められなかった (図 6). 脳ではタイプ 3 で MeHg の効果が有意であり, 投与によって活性が抑制された. 群間比較では, 野生型のみで投与群 < 非投与群という差が有意だった (図 7). タイプ 2 では系統・曝露ともに効果は有意ではなかった (図 8).

2) in vitro

MeHg を培養液に添加すると, 濃度依存的にタイプ 2 脱ヨード酵素活性の抑制が認められた. 対照群と比較した場合, 30nM 以上で有意な抑制であった (図 9). 100nM の添加条件において, 経時的変化を観察したところ, 曝露時間が長いほど抑制の程度が強くなった (図 10). チオール保護剤である DTT を共存させると MeHg による活性抑制はほとんど認められなくなった (図 11). LB プロットにより, 活性抑制のキネティクスを検討した結果, MeHg による

活性抑制は競合阻害であることが示された (図 12)。

D. 考察

胎生期の重金属曝露によって、甲状腺ホルモン環境がどのような影響を受けるかについて検討した報告は少ないと思われる。我々は妊娠マウスの妊娠中期に 3mgHg/kg/day という比較的高い用量のメチル水銀を3日間投与し、胎生期の17日目に解剖して、同様の検討を行った (Watanabe et al., 1999)。その結果、胎仔脳においてタイプ3が抑制され、タイプ2は促進された。今回の結果においても、タイプ3は抑制され、タイプ2は(野生型において)有意ではないが、わずかに促進される傾向が示されていて、基本的に両者の結果は矛盾しないと言える。また、血清T4レベルについてはMeHgの効果はなく、この点でも一致を見ている。前報において胎仔脳内の水銀濃度は10ppmを超えており、本実験とは10倍以上の開きがある(吉田稔氏による項を参照)。このような低いレベルの脳内濃度でも同様の結果が得られたことから、これらの酵素系がMeHgのターゲットとなっている可能性が示唆される。脳はそれ自身が必要とするT3を局所的に産生していて、循環血流中のT3には依存しない。脳の甲状腺ホルモン環境にとっては、むしろ循環血流中のT4のレベルが重要である。このT4レベルに大きな変化がないにもかかわらず、脱ヨード酵素活性が変化することから、脳内に達したMeHgが直接酵素活性に影響を及ぼしている可能性も示唆される。活性変化のメカニズムとともに重要なのが、活性変化による脳組織内でのT3レベルの変化である。単純に考えて、得られた変化は(前報と共通して)T3の過剰をもたらす側へのシフトであるが、果たして実際にT3レベルの上昇が認められるのか、将来の課題である。

メチル水銀による酵素活性の修飾についての *in vitro* の結果は、*in vivo* の結果と一致していない。DTTの添加 (live cellおよびcell extract) 実験より、おそらくMeHgはタイプ2の活性中心に非可逆的に結合し、活性を阻害すると考えられる。この活性中心はDTTにより速やかに保護されるため、cell extractにMeHgを添加する場合かなり高い濃度のMeHgが活性阻害に必要なが、live cellに添加する場合はかなり低濃度のMeHgで活性は阻害される。

また live cell では MeHg の細胞内への輸送が DTT より遅いため、DTT 存在下で培養すると MeHg によるタイプ 2 活性阻害は生じない。

in vivo で測定された脳内濃度はおよそ 2 microM であり、vitro での添加濃度（細胞内濃度は不明であるが）より遙かに高い。これより高い濃度領域で組織抽出液を用いて添加実験を行っても同様の結果が得られ、タイプ 2 については添加実験を行う限りは活性抑制しか観察されていない。現在のところ、この実験系による食い違いが何に由来するものかは明らかでない。既に述べた妊娠期中期における中等度投与の影響を検討した結果では、タイプ 3 について、胎仔脳では若干の抑制が認められたのに対し、胎盤では活性の亢進が認められている。両組織において MeHg の濃度は同程度であったことから、母体循環のホルモンレベルの影響の可能性はあるものの、組織特異的な因子と MeHg との相互作用という可能性も考えておく必要がある。

Cd が甲状腺ホルモンに対して影響を及ぼすという今回の結果は全く予想外であったが、脱ヨード酵素の活性への影響自体は、血清中 T4 レベルの変化への反応と解釈できる。すなわち、Cd 曝露によって血清 T4 が低下するため、これに対して補償的にタイプ 2 の活性があがっていると考えられる。T4 レベルの低下が、MT-null でより強く認められた点も注目しておくべきであろう。これに対応して群間比較では MT-null のみで曝露群と非曝露群とにタイプ 2 活性の有意差があり、タイプ 3 の活性も有意差には至らないものの、曝露群がやや低値を示している。MT-null において Cd 毒性が増強されるという結果は、様々なエンドポイントについて示されているが、仔の甲状腺ホルモンに関連するシステムにも当てはまるといってよいと思われる。

げっ歯類では胎生期の後半から胎仔の甲状腺が機能を果たし始めており、授乳期の仔は自身の甲状腺に依存していると考えてよい。T4 の低下が新生仔の甲状腺機能の低下によるものなのか否かについての検討が必要であろう。Cd が甲状腺ホルモンに及ぼす影響についての知見は極めて限られている。最近、ドイツで産業廃棄物焼却場周辺に居住する 7-10 才の小児を対象に実施された疫学調査において、血中の Cd と free T4 が負に相関する一方で、TSH

が正に相関するという結果が得られている (Osius et al., 1999). また, 妊娠ラットにおいて Cd の投与によって血清中 T4, T3 のレベルが低下したとの報告がある. これらの報告と今回得られた結果とは影響の方向という点で矛盾しない.

E. 結論

比較的低濃度の Cd および MeHg に周生期に曝露された場合, 脳の甲状腺ホルモン環境に影響が検出された. 影響は Cd と MeHg では異なっており, Cd については血清中の T4 の低下が脳内の脱ヨード酵素活性の変化を惹き起こしたものと思われ, 循環中 T4 の低下の機構を解明する必要がある. MeHg の影響は T4 の変化を起こさずに脳内脱ヨード酵素活性に T3 産生を増加する方向の変化を誘導するものであり, 脳内に分布した MeHg が直接作用している可能性が示唆される. しかし, *in vitro* で認められたタイプ 2 の抑制という観察とは相容れなかった. 組織特異的な因子との相互作用という可能性も含めた検討が必要であろう. これは別に, *in vitro* におけるタイプ 2 への影響は極めて低い濃度で認められており, この系が MeHg に極めて敏感であることが示された.

今後の課題として, 重金属曝露マウス脳組織中の T3 濃度の定量, T3 応答性遺伝子の発現解析, 培養細胞系におけるタイプ 2 活性阻害機序の解明などがあげられよう. Cd については, 最近エストロゲン様の作用も確認されており, 甲状腺ホルモン系への作用も注目するべきであると思われる. また, 本研究の中心課題である感受性の修飾要因として, 甲状腺機能を含めた甲状腺ホルモンの制御の不全が関与する可能性も示唆されたと考えられる.

参考文献

Watanabe C, Yoshida K, Kasanuma Y, Kun Y, and Satoh H (1999) In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. *Environmental*