

Research Section A, 80, 208-214.

Mori K., Yoshida K., Kaise K., Kaise N., Fukuzawa H., Kikuchi K/, Abe K., and Yoshinaga K (1993)

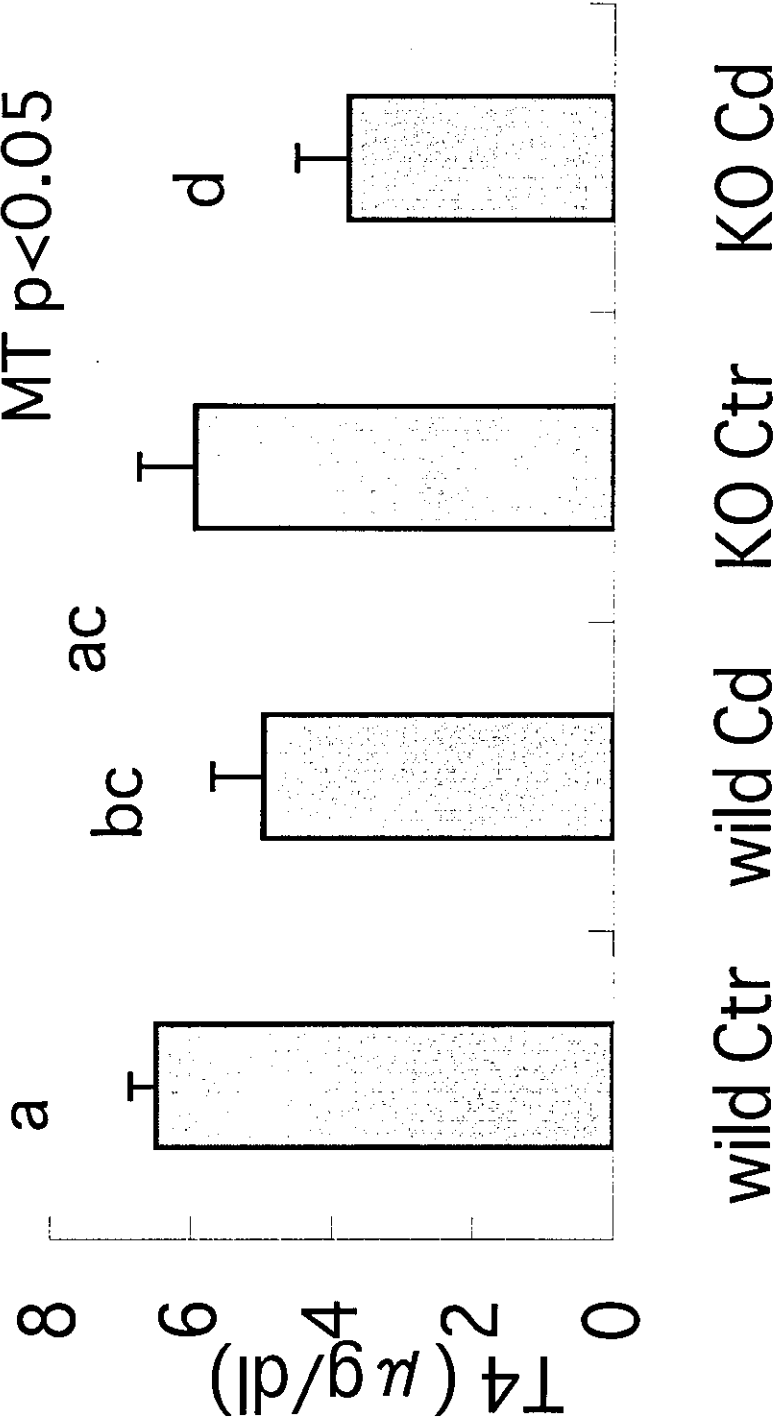
Inhibition of placental thyroxine 5-deiodinase activity decreases amniotic fluid concentration of 3, 3', 5'-triiodothyronine in rat. *Endocrin J.*, 40, 405-412.

Osius N, Karmaus W, Kruse H., and Witten J (1999) Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in Children. *Environmental Health Perspectives*, 107, 843-849.

Fig1

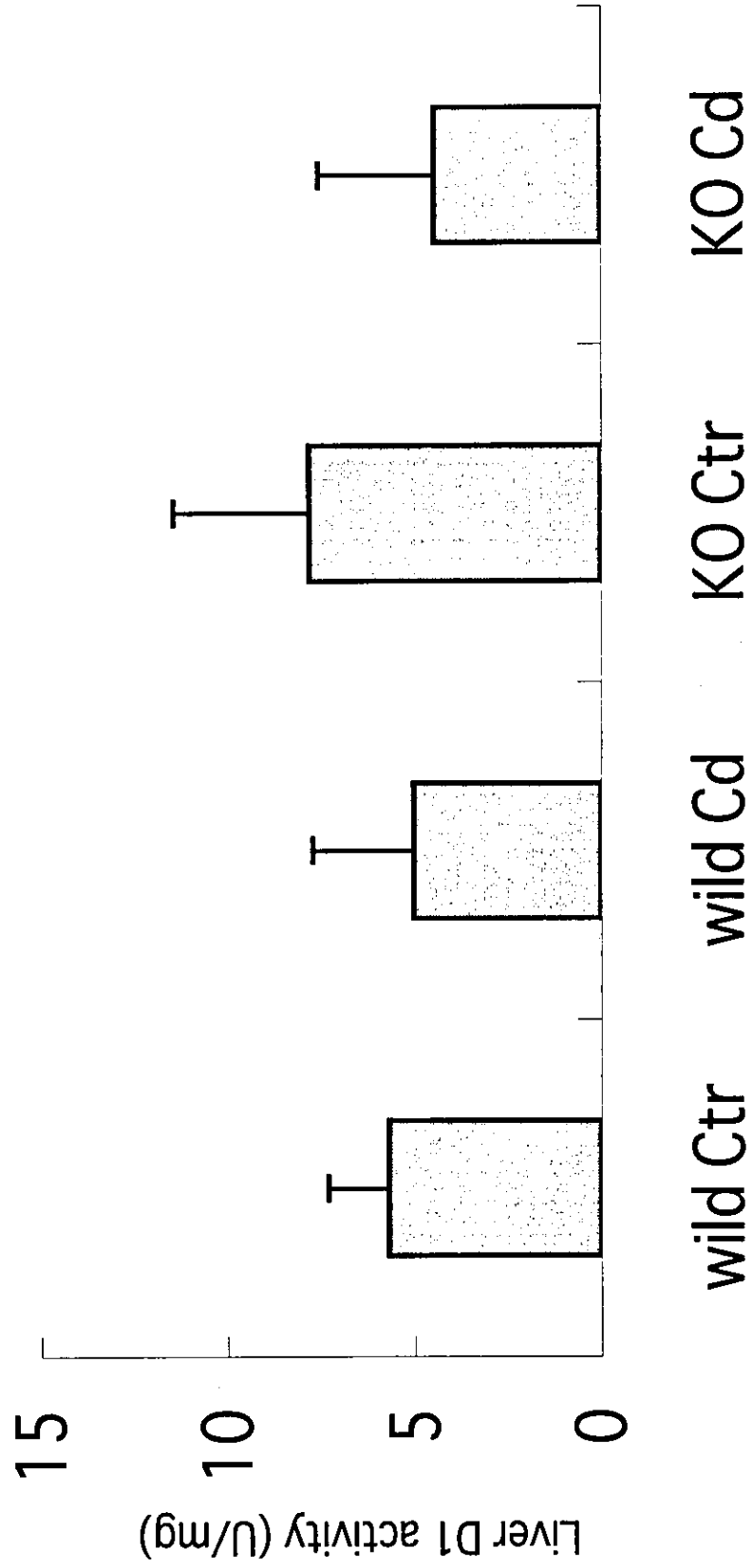
Effect of Cd on T4 [microg/dL]

Cd p<0.001
MT p<0.05



Effect of Cd on liver D1 [U/mg]

Fig2



Effect of Cd on brain D2 [U/mg]

Fig3

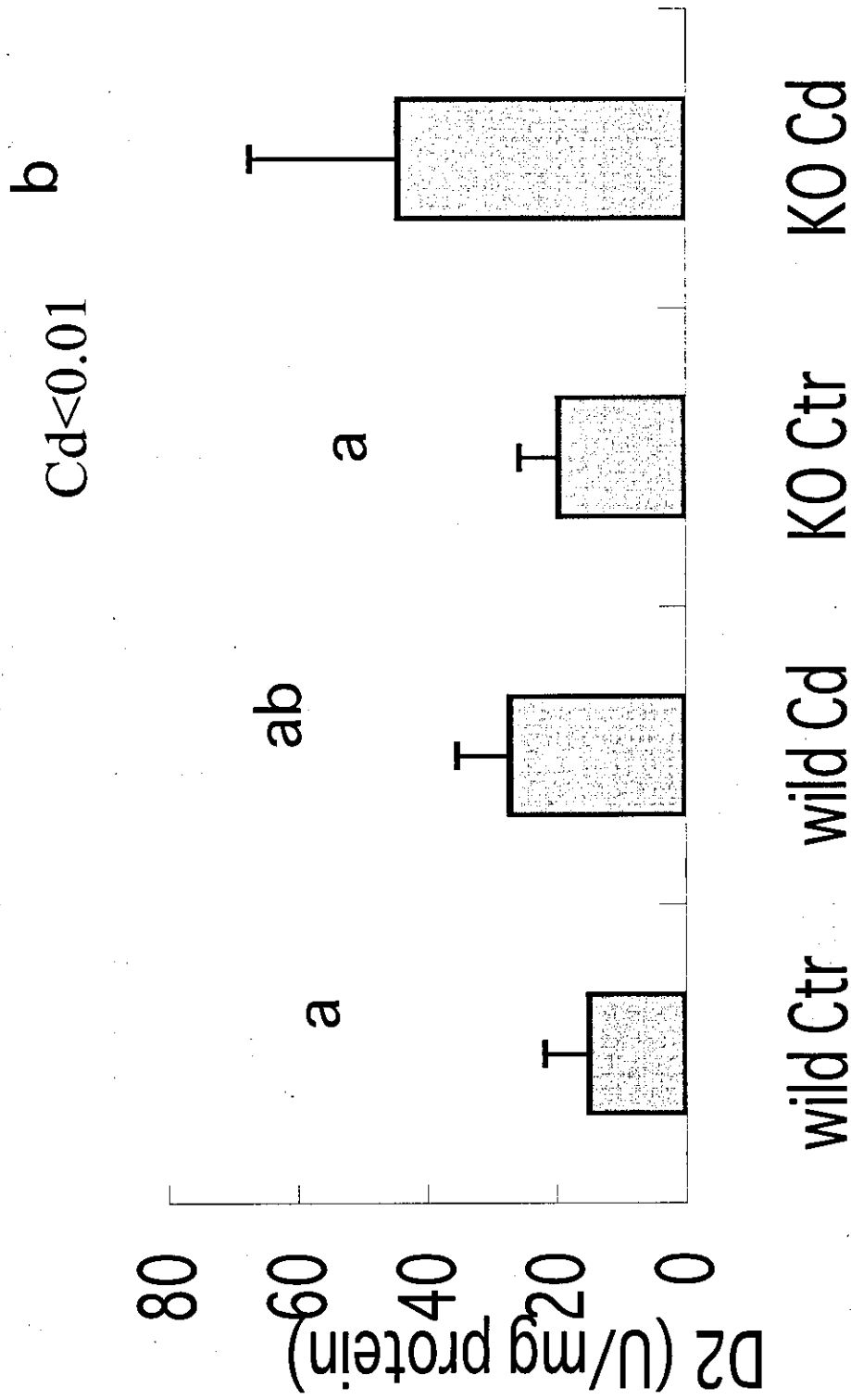


Fig4 Effect of Cd on brain D3

[U/mg]

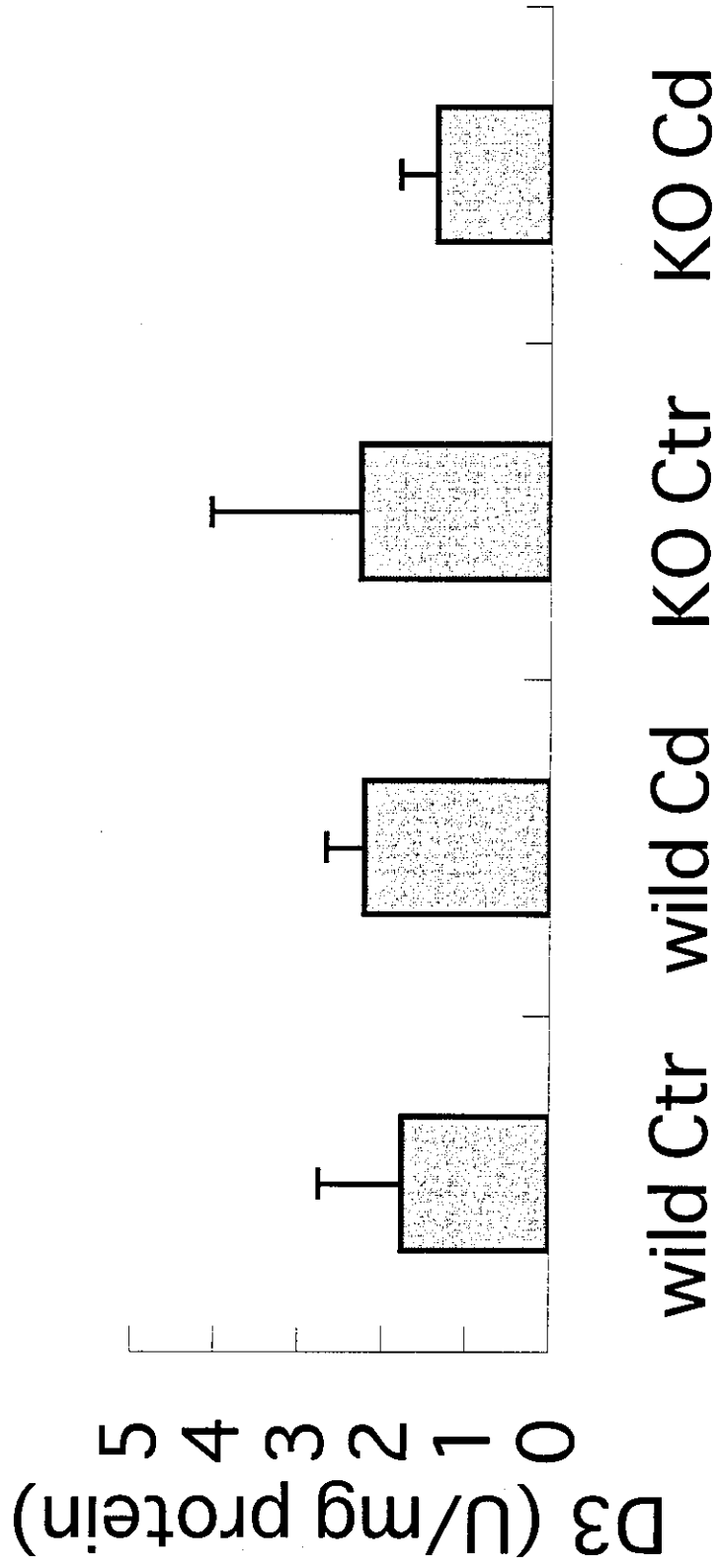


Fig5

effect of MeHg on serum T4

[microg/dL]

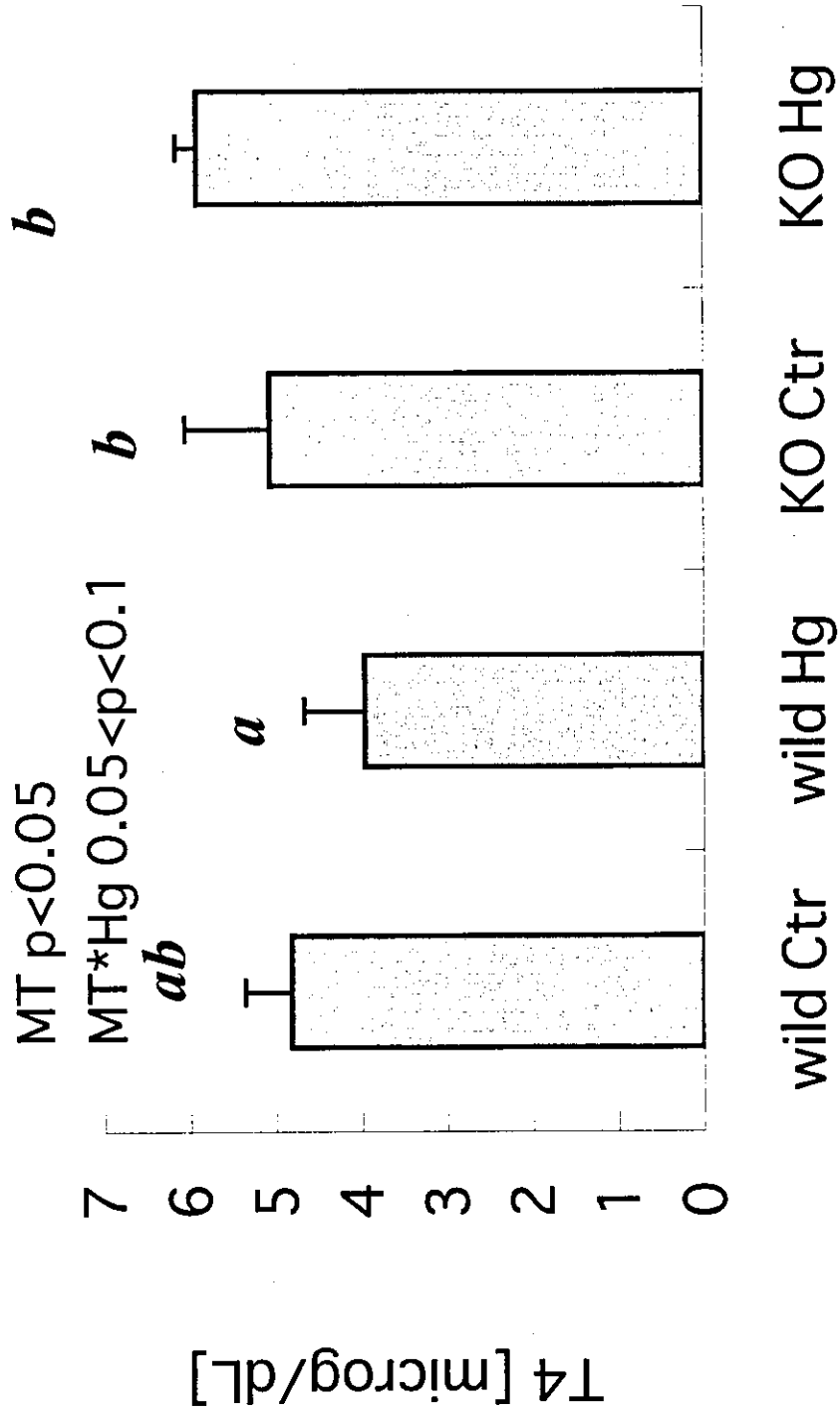


Fig6

Effect of MeHg on liver D1

[U/mg]

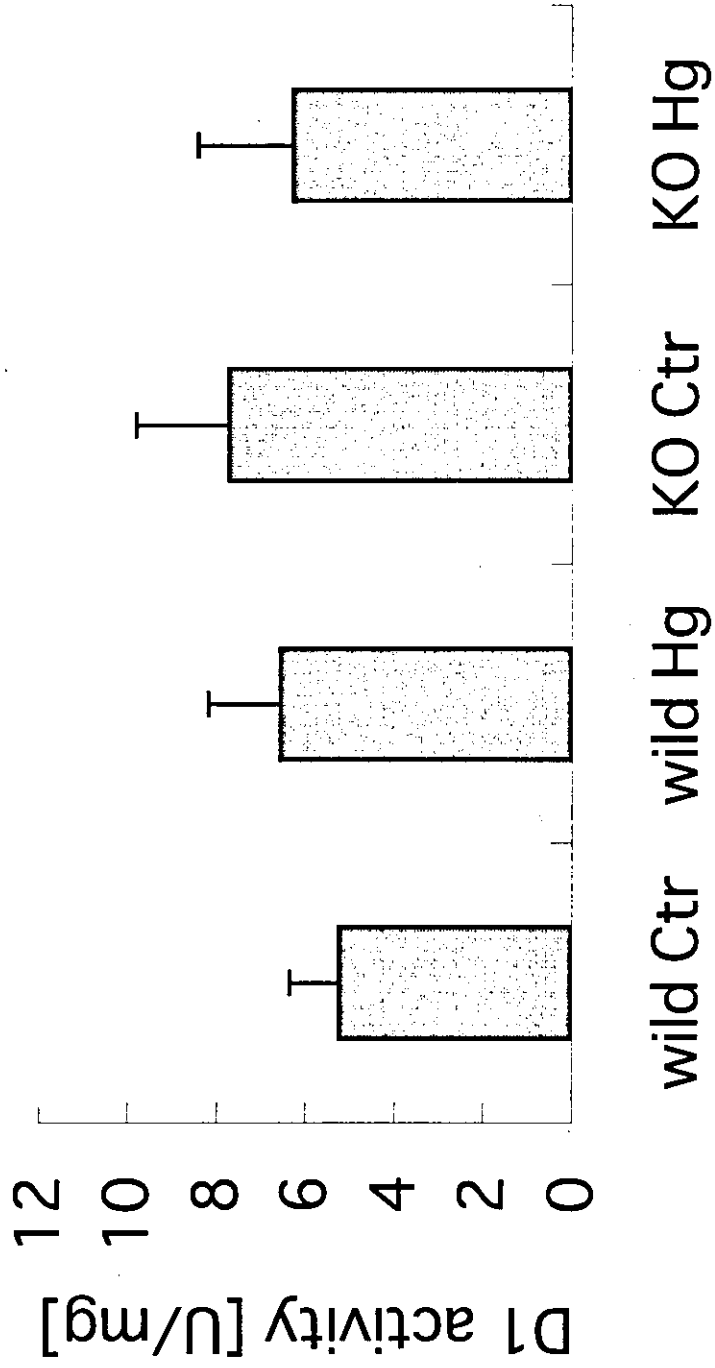


Fig7

Effect of MeHg on Brain D2

[U/mg]

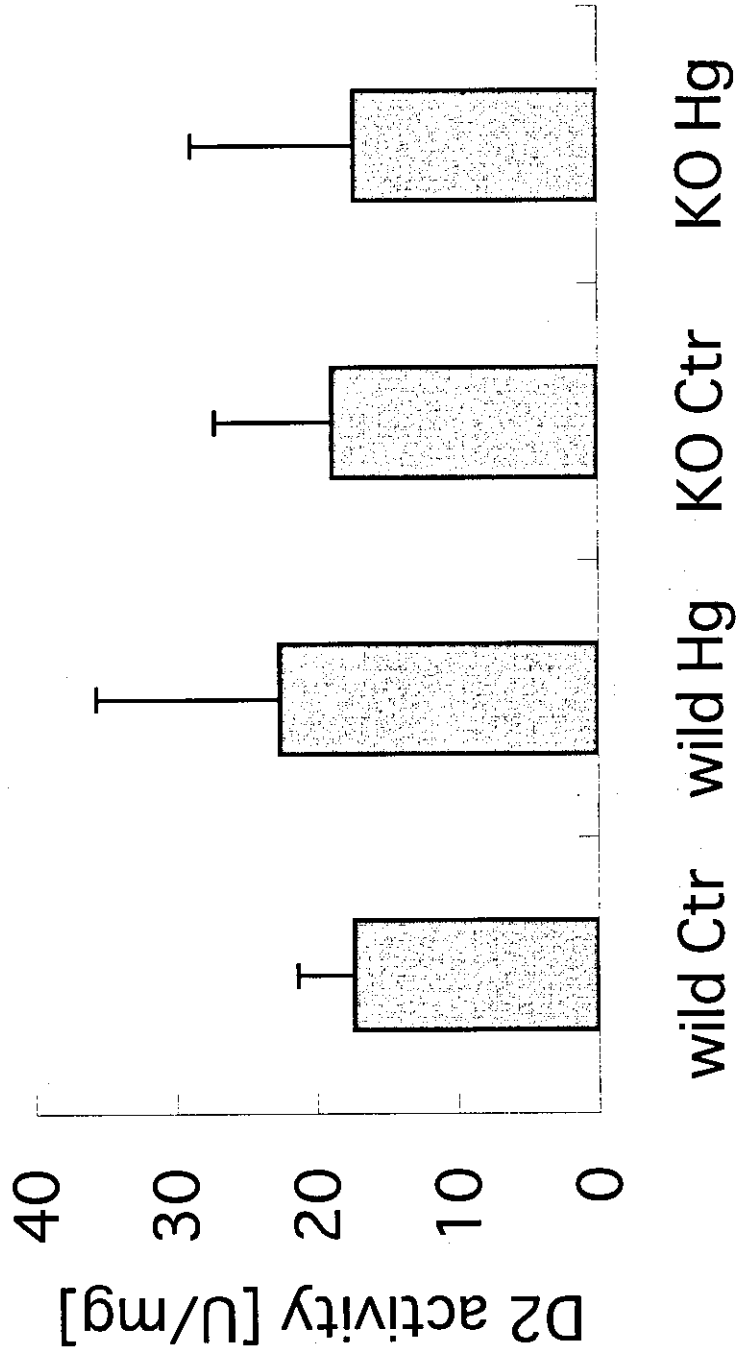
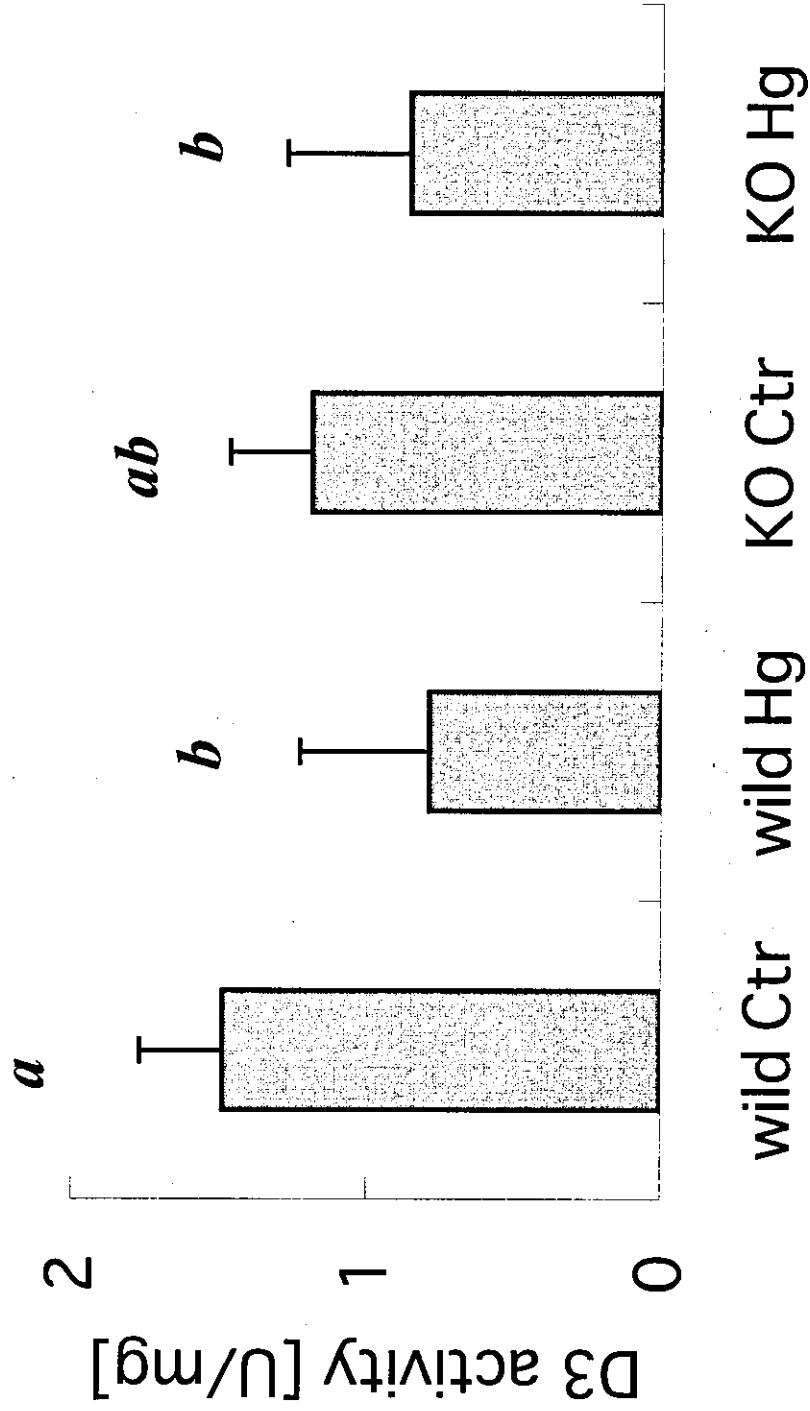


Fig8

Effect of MeHg on Brain D3

[U/mg]

Hg < 0.05



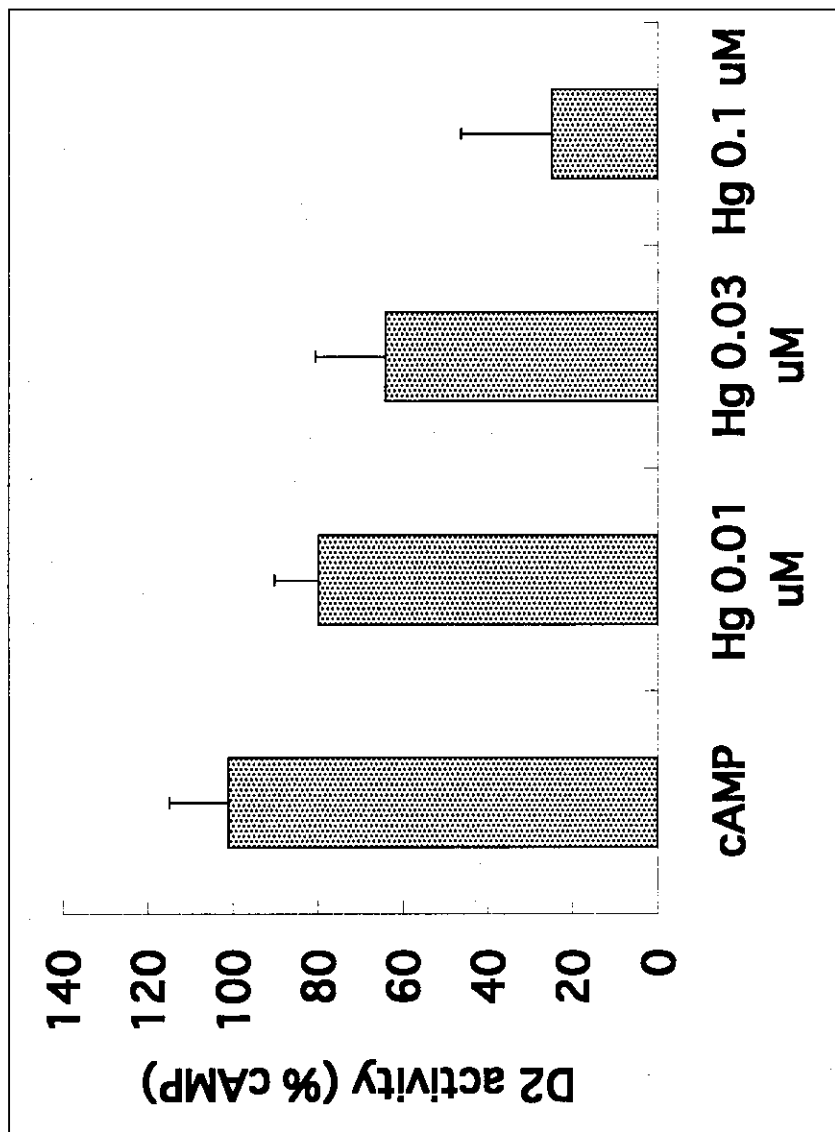


図9. 各種濃度のMeHgによるD2活性の抑制
(MeHg添加2日後にD2活性を測定)

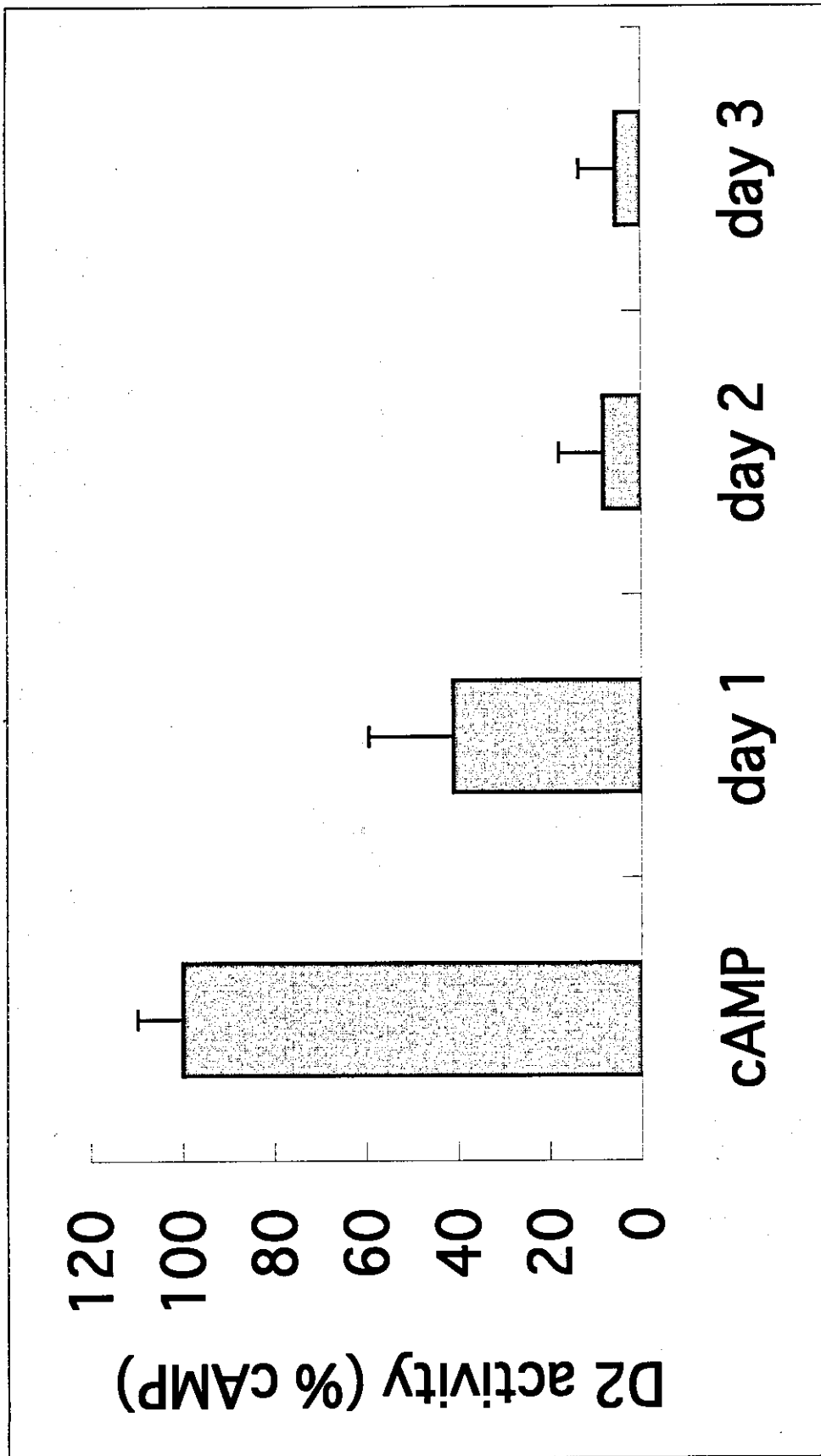


図10. 0.1 μ M MeHgによるD2活性の抑制
(time course study)

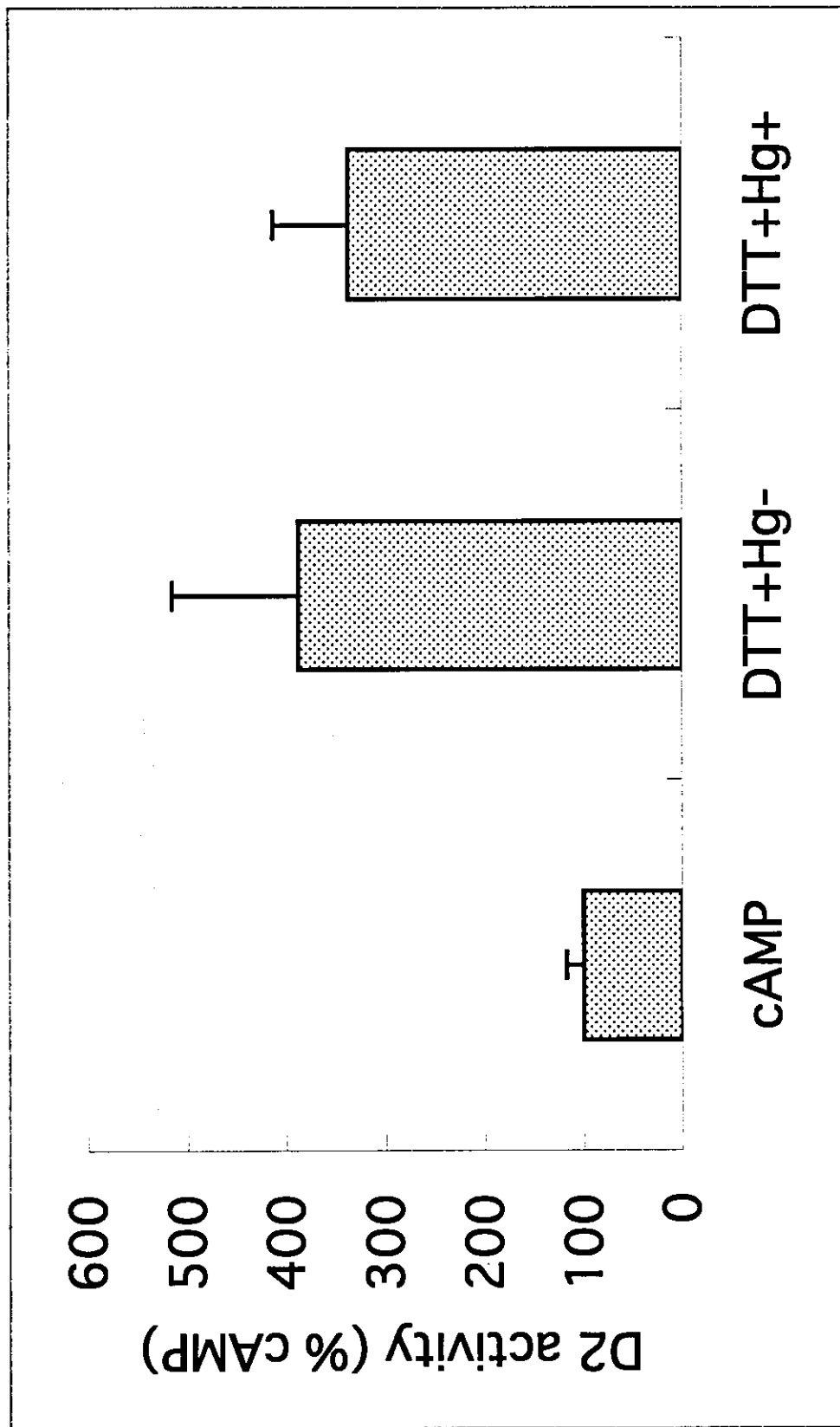


図11. DTT添加の影響
 (DTTとMeHgは同時に添加し2日後にD2活性を測定)

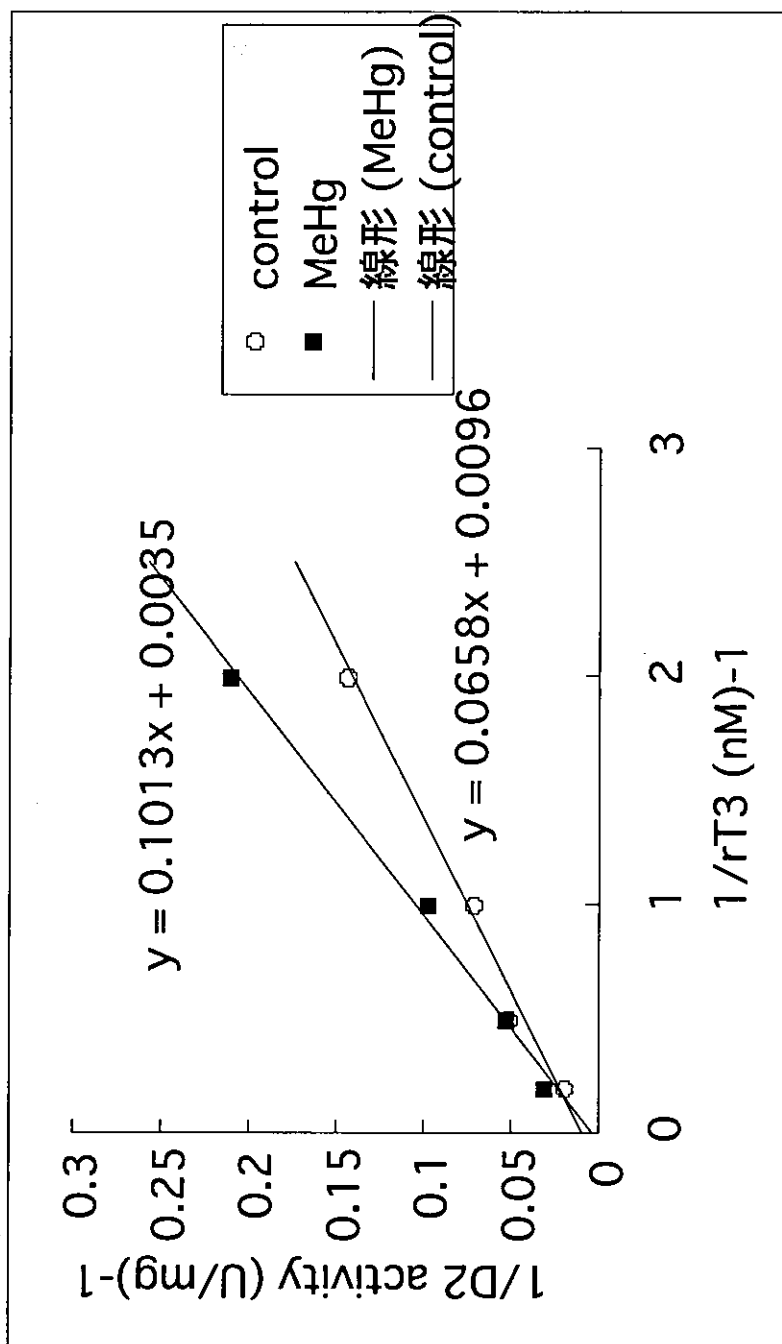


図12. Lineweaver-Burk plot : competitive inhibitionであった
(0.1 μM MeHg添加 1 日後にD2活性を測定)

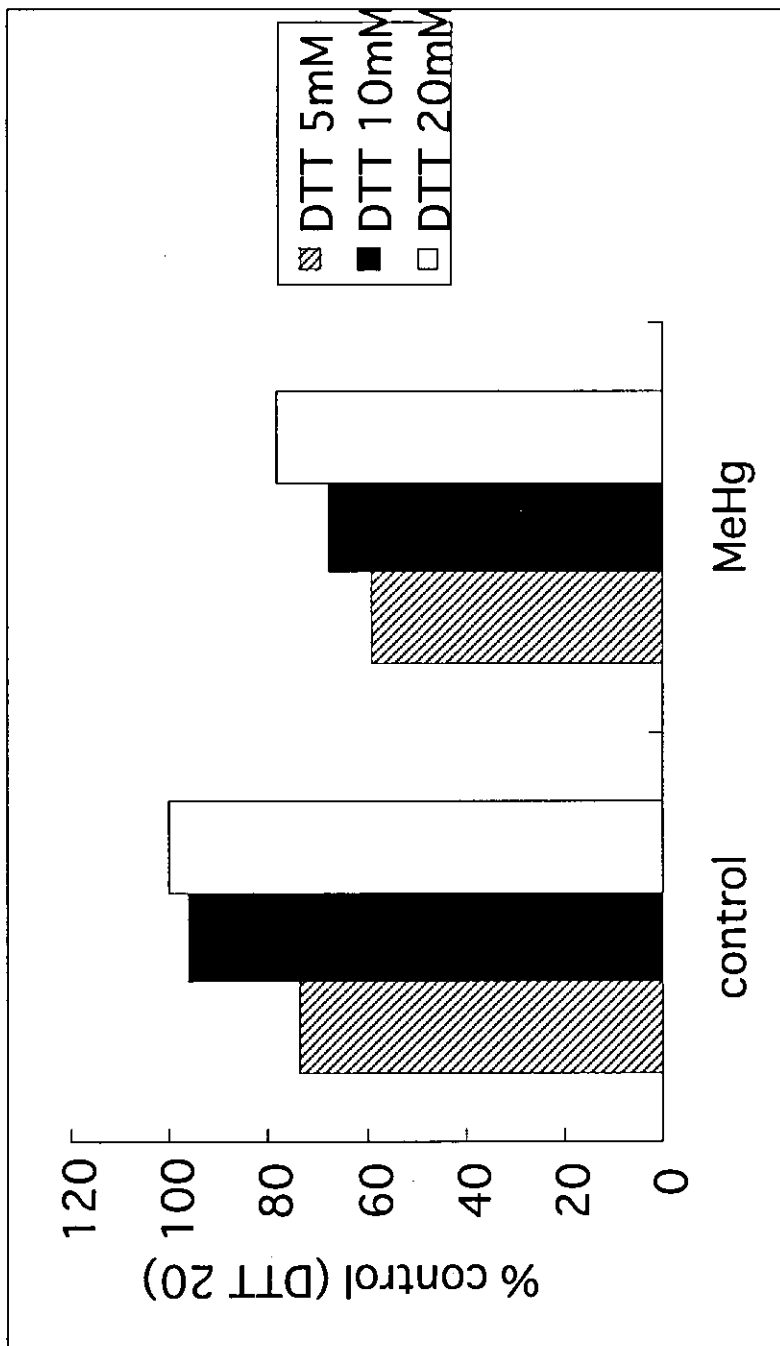


図13. D2活性測定時のreaction mixture内のDTT濃度の影響
(MeHg添加1日後に活性測定)

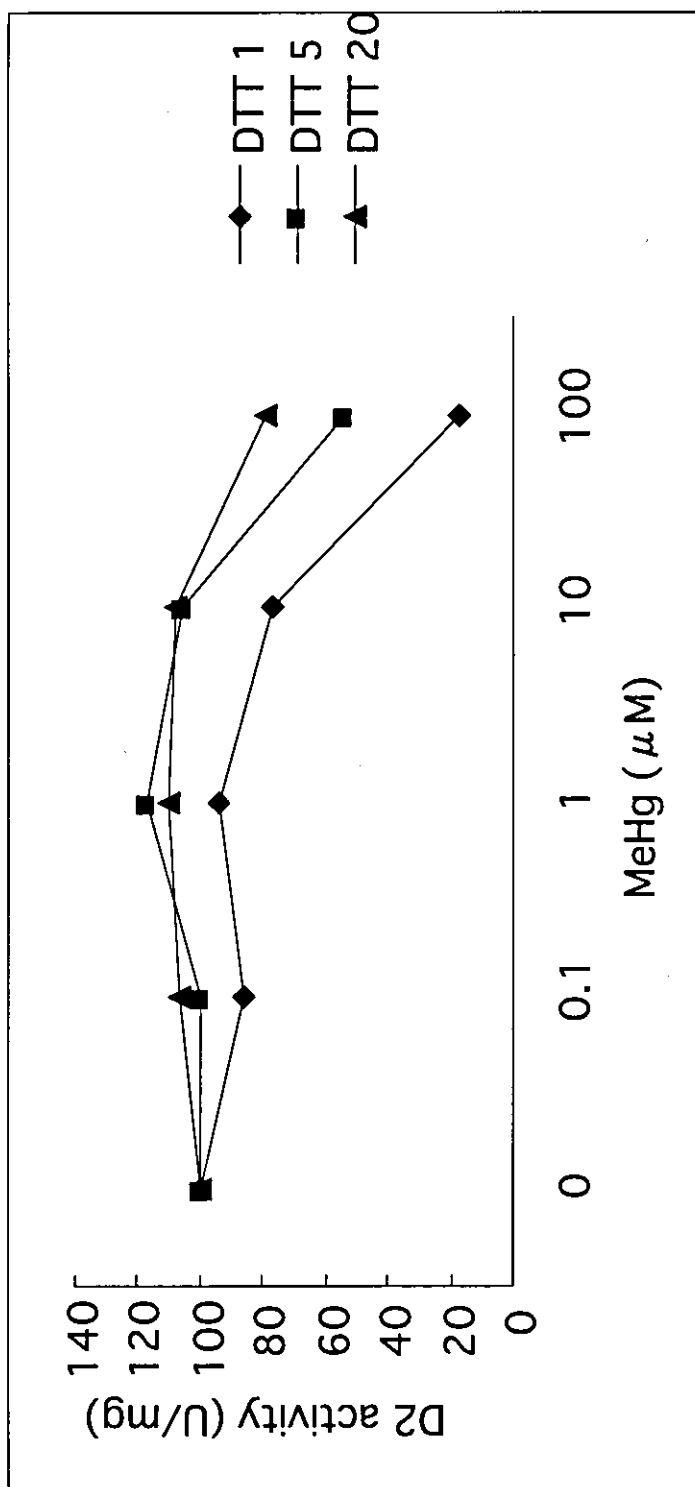


図14. D2活性測定時のreaction mixture内のDTT及びMeHg濃度の酵素活性に及ぼす影響 (無処理細胞のcell extractを使用)

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

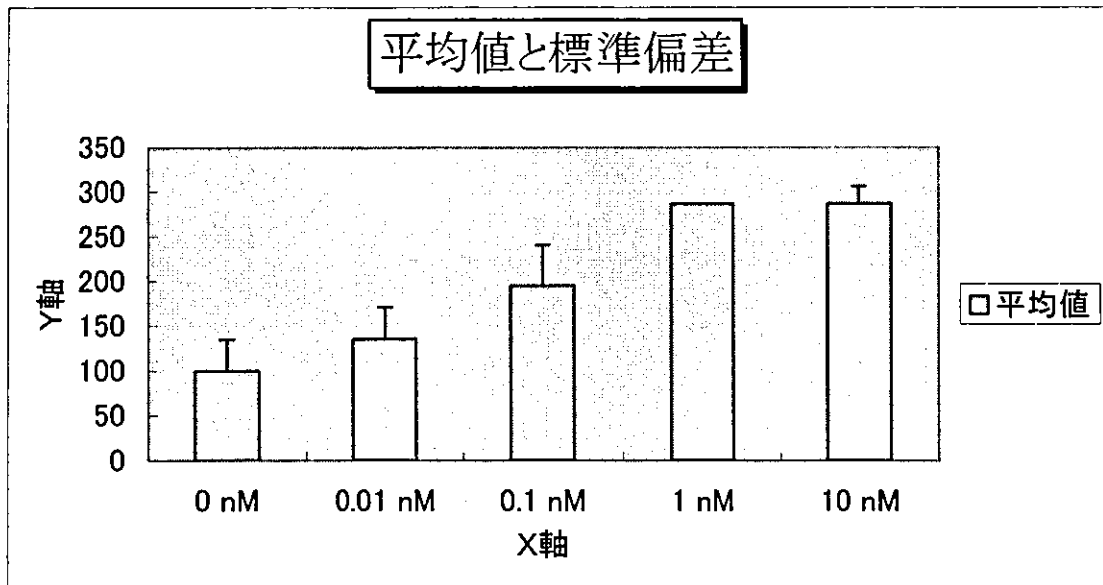


図2 T4によるGH分泌刺激

