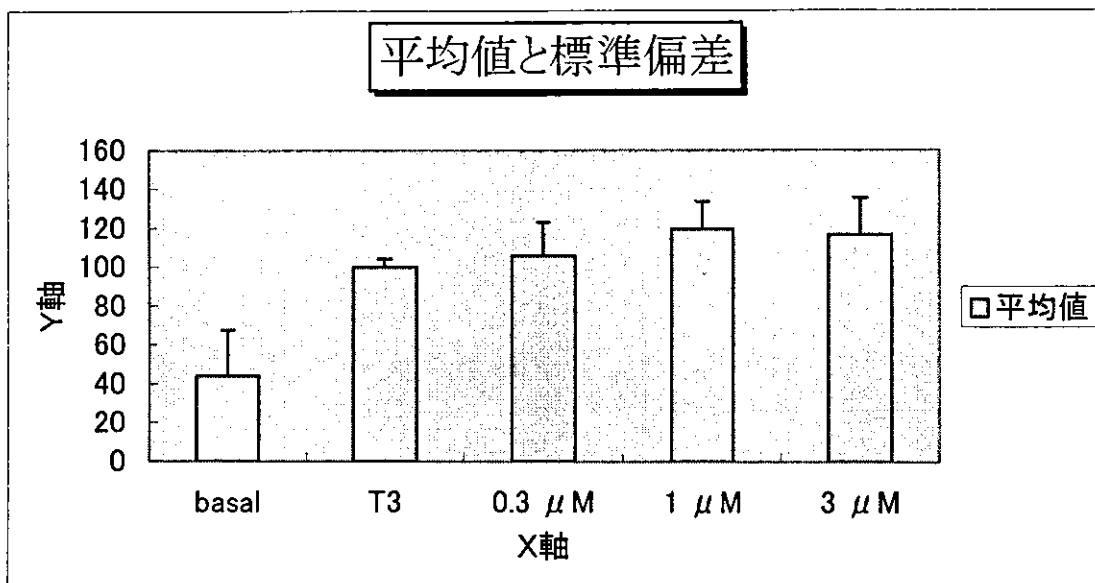
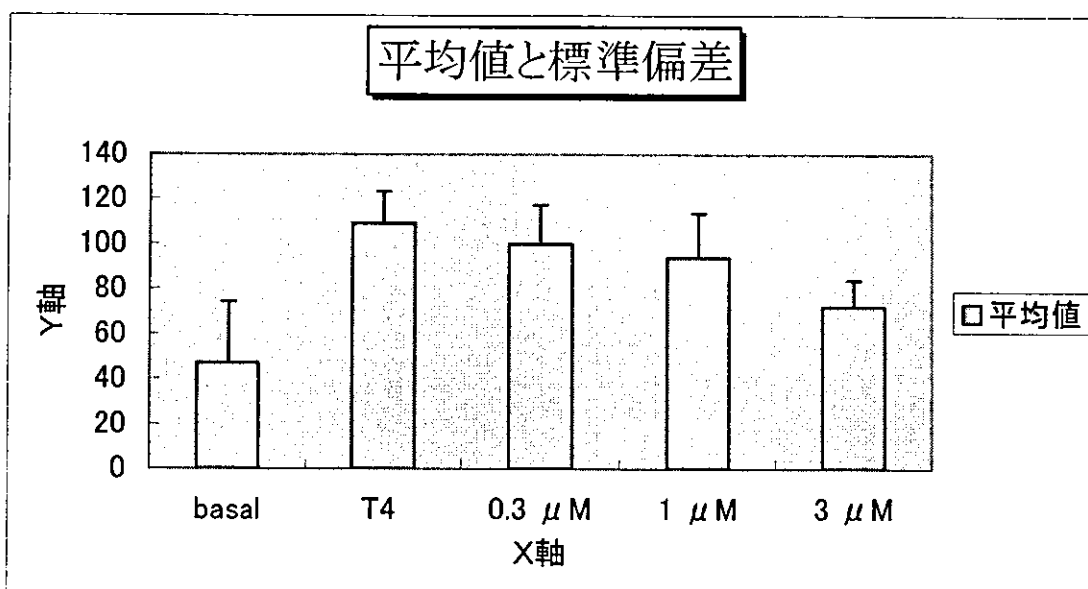


図3 MeHgのT3誘導性GH分泌に対する影響



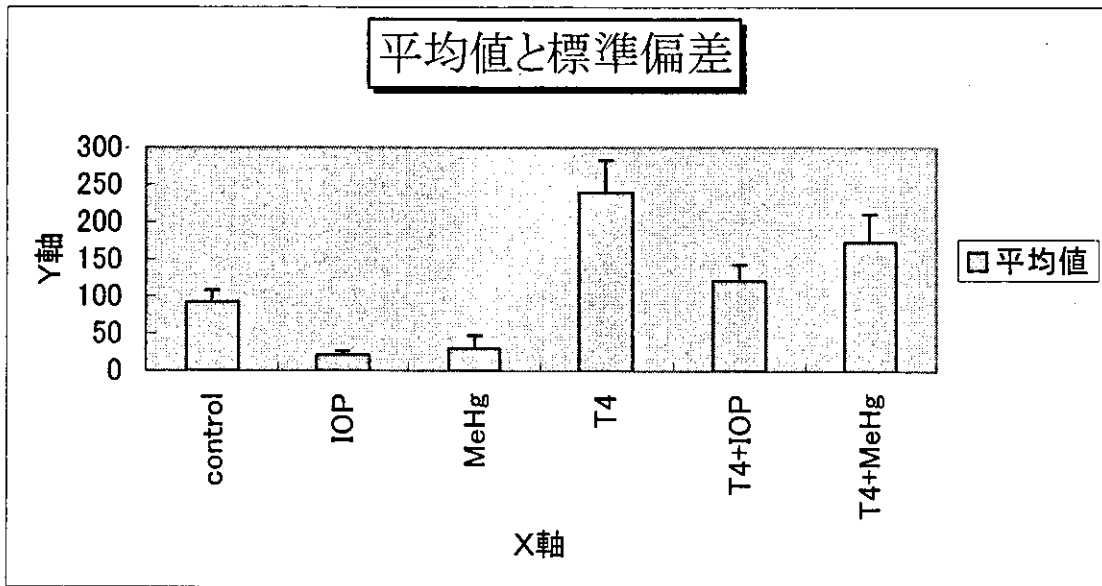
(濃度はMeHgのもの、T3 1 nM)

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

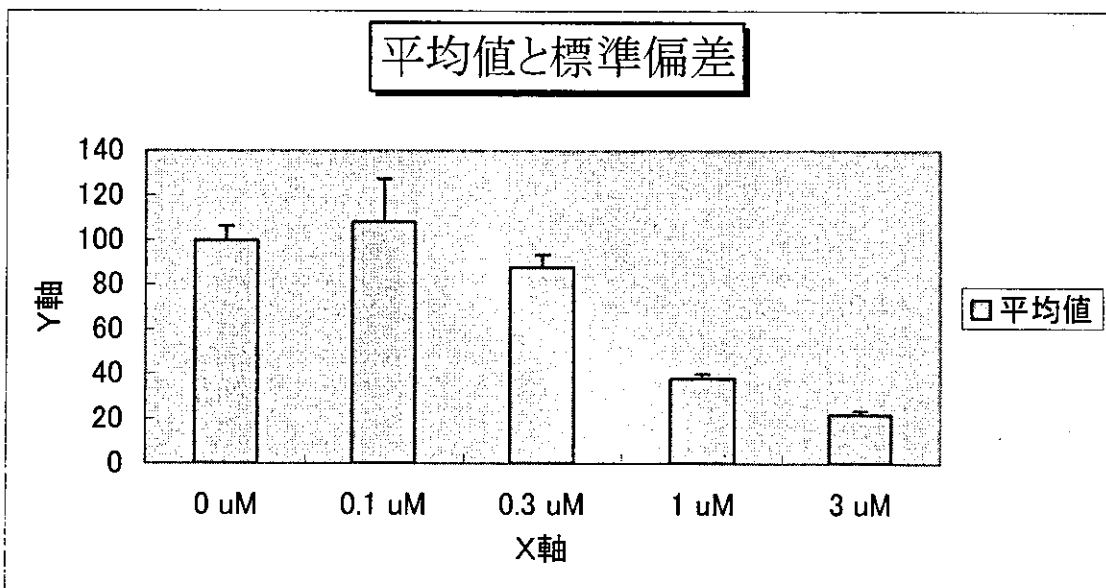


図7 T4によるD2活性の抑制

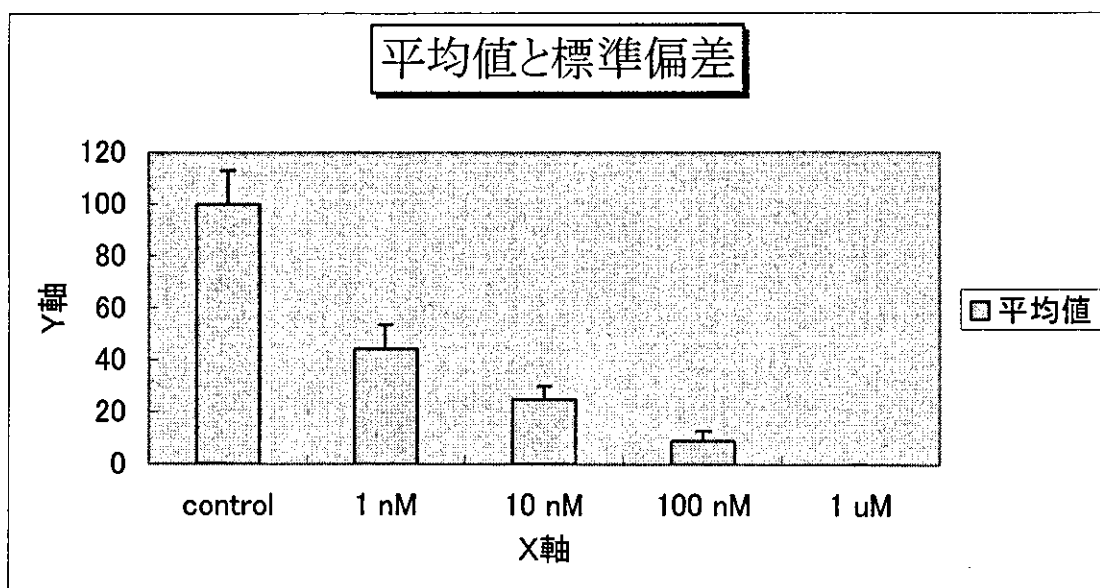


図8 T3のD2活性に及ぼす影響

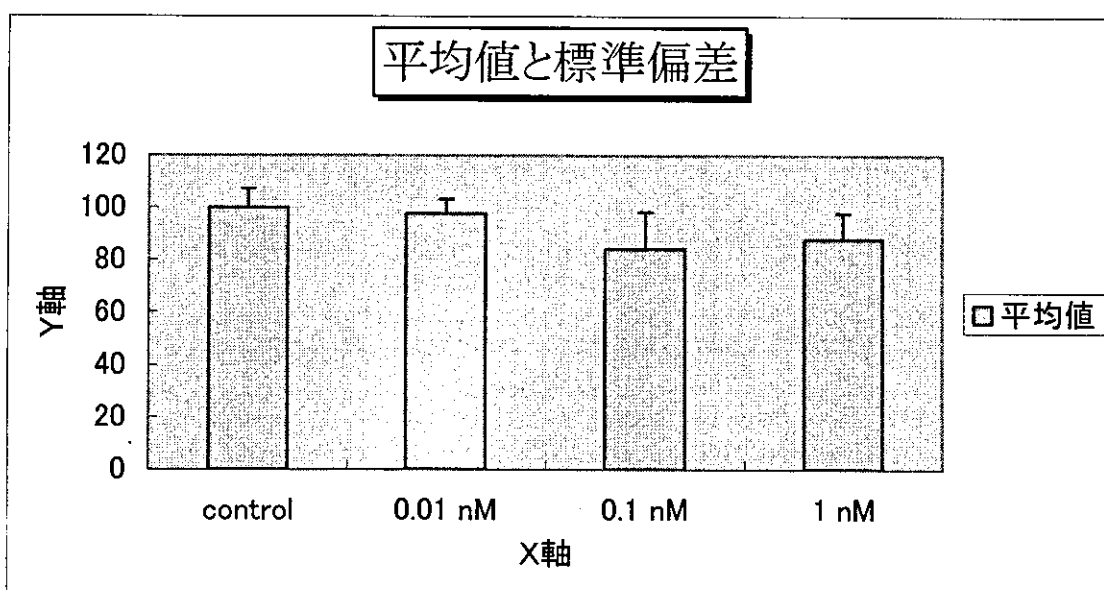
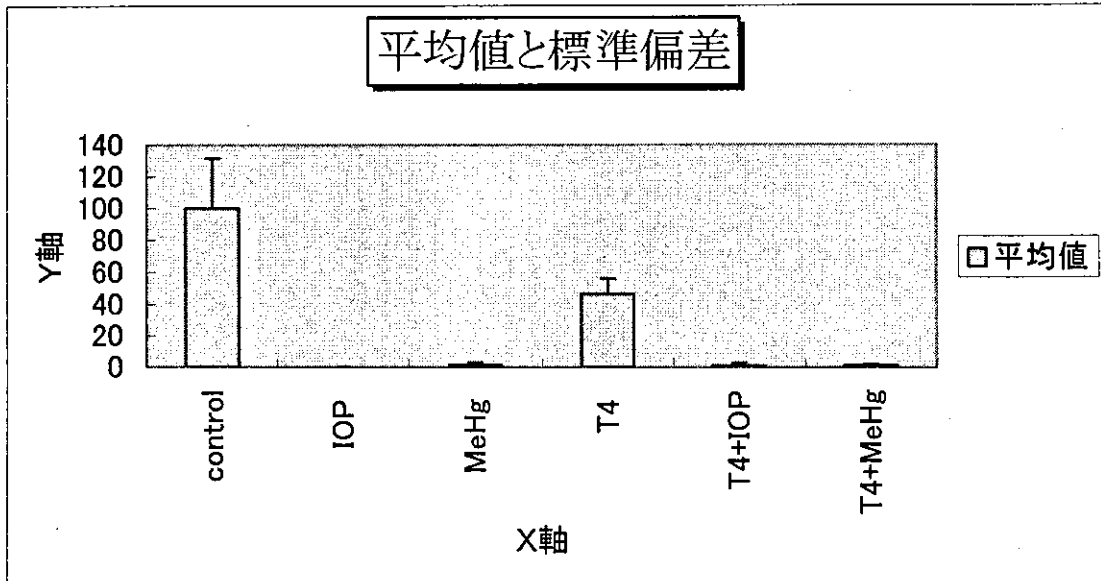
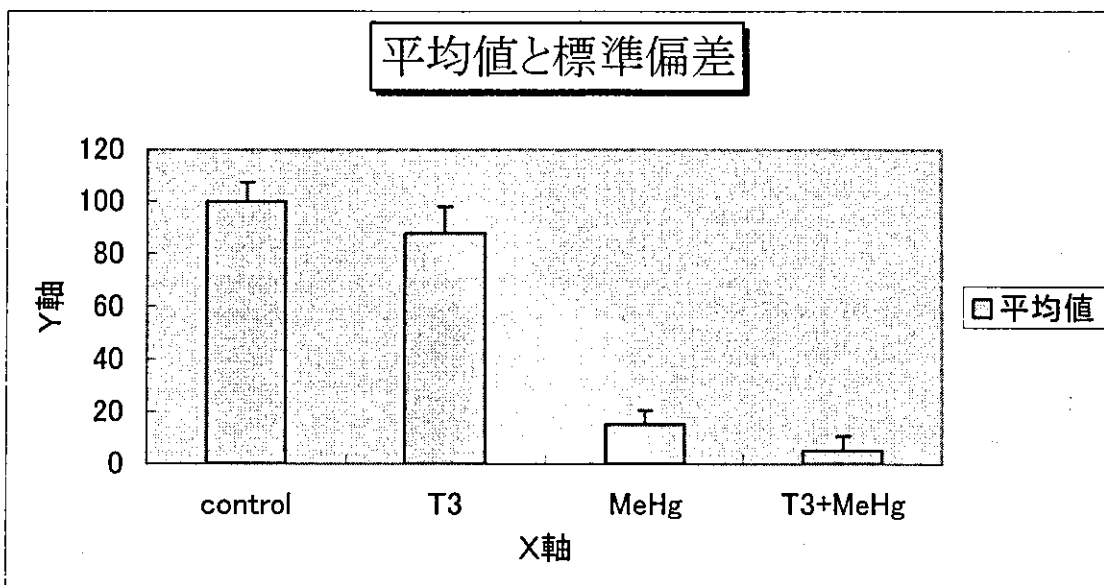


図9 MeHg および IOP の T4 処理細胞 D2 活性に及ぼす影響



(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)

II. 分担研究報告

5. 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 （今井秀樹）

- (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（視床下部－下垂体－副腎系）に関する研究
- (2) 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
- (3) 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

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（視床下部－下垂体－副腎系）に関する研究

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攪乱・ダイオキシンリスク評価プロジェクト主任研究員

研究要旨： 有害金属を用いた海馬傷害モデルにおいて、異なるサブタイプのグルココルチコイド受容体が全く正反対の役割を果たすことを見いだした。水銀・カドミウム毒性の修飾にこのモデルを応用できるか否か検討中である。

A. 研究目的

本研究の目的は、視床下部－下垂体－副腎系（HPAaxis 系）の機能あるいはその発達に対し、胎生期の水銀あるいはカドミウム曝露が及ぼす影響を検討する一方で、HPAaxis 系の修飾がこれら重金属の毒性に及ぼす影響について検討することにより、感受性要因としての HPAaxis 系の重要性を評価することである。先行研究において、水銀が HPA 系に抑制的な影響を及ぼしたことが報告されている。Cd についてはグルココルチコイド受容体への影響を含め、グルココルチコイドの代謝などへの影響について比較的多くの報告がなされている。しかし、発達期に焦点をあてた解析は行なわれていない。

生体がストレスを受けて視床下部－下垂体－副腎皮質(HPA)系が賦活化されると副腎皮質ステロイドホルモン（ヒトではコルチゾール、マウス・ラットではコルチコステロン）の血液中濃度が上昇する。虚血(1)あるいは加齢(2)の際に海馬の神経細胞が傷害される原因のひとつがこの副腎皮質ステロイドホルモンレベル上昇であると考えられている。この副腎皮質ステロイドホルモンが生体内でその能力を発揮するには受容体と結合する必要がある。副腎皮質ステロイドホルモン受容体にはタイプⅠとタイプⅡとの2種類がある。前者は生体がストレスを受けていない

状態、すなわち副腎皮質ステロイドホルモンが定常レベルの際にほとんどがリガンドと結合しているが、後者は生体がストレスを受けて HPA 系が賦活化されて血液中の副腎皮質ステロイドホルモン濃度が高くなった状態でその大部分がリガンドと結合する。副腎皮質ステロイドホルモンによる神経傷害にはこのタイプ II 受容体が重要な役割を果たしていると考えられてきた(3)。有機錫化合物のひとつであるトリメチル錫(trimethyl tin: TMT)をラットに経口投与するとストレス暴露と同様に海馬の錐体細胞層の神経細胞が脱落することが知られている。我々はこの神経細胞が脱落する以前、すなわち TMT 投与 3 ないし 4 日後にラットの血液中コルチコステロン濃度が上昇することを見いだしている(4)。本年度はこの有機錫化合物投与ラットの神経細胞傷害における副腎皮質ステロイドホルモン受容体の役割を検討した。

B. 研究方法

副腎皮質ステロイドホルモン受容体の受容体アゴニストであるコルチコステロン(CORT)を含むペレットあるいはタイプ II 受容体の特異的なアゴニストのデキサメタゾン(DEX)を含むオスモティックポンプをラット (Sprague-Dawley 系雄、5 週齢) の皮下に副腎切除術(ADX)を施すと同時に埋め込んだ。ADX の 7 日後、TMT を 8mg/kg の用量で 1 回ラットに経口投与した。TMT 投与 14 日後に脳を取り出して切片を作成しクレシルバイオレット染色を施し、さらに神経傷害の指標としてグリオーシスのマーカーであるビメンチンおよびグリア繊維性酸性タンパク(GFAP)の増加を免疫組織染色法により観察した。また錐体細胞層の生存細胞を領域ごと (図 1) に光学顕微鏡下でカウントした。

C. 研究結果

クレシルバイオレット染色の結果から、TMT 投与により CA3b-c 領域に顕著に細胞脱落が生じ (図 2b-3, 2b-4)、ADX によりその脱落が CA3 領域全体さらには CA1 領域にまで拡大することが示された (図 2c)。図 2d および 2e は CORT あるいは DEX の慢性投与が錐体細胞に対して保護的に働いていることを示す。TMT 投与ラットの CA3a-c 領域における生存細胞数は対照群のそれに比較して有意に減少した (図 3)。ADX により CA1 領域においてもこの

数は対照群および TMT 投与群に比較して有意に少なくなった。CORT あるいは DEX の慢性投与は CA3a 領域および CA1 領域における細胞脱落数を減少させたが、CA3b 領域ではその効果は減弱し、CA3c 領域に至っては全く効果がみられなかった。図 4a-1 から e-1 および a-2 から e-2 は各群のビメンチン免疫染色、a-3 から e-3 は GFAP 免疫染色の写真である。TMT 投与によって海馬の CA3a 領域から CA3c 領域にかけて生じたグリオシスが ADX によって CA1 領域にまで拡大した)。ここに CORT あるいは DEX を慢性投与するとグリオシスの範囲は TMT 投与単独によるものよりも縮小した。

従来タイプ I 受容体は海馬歯状回においては神経細胞に対して保護的効果を発揮し、一方タイプ II 受容体は神経傷害を増悪する方向に働くとされてきた。この実験にタイプ I 受容体のアゴニストであるアルドステロンを慢性投与した群も設定したのだが TMT 投与後 1 週間以内に死亡してしまったため、脳切片のサンプルは得ることができなかった。

D. 考察

一見従来の知見と矛盾した結果ではあるが、錐体細胞層に関してはタイプ II 受容体が TMT 由来の神経傷害を軽減していることは確かのようにである。Sapolsky らはタイプ I 受容体には permissive action、タイプ II 受容体には suppressive action と呼べる役割がありそれらを次のように説明している(4)。ストレスに対するタイプ I 受容体の permissive action、すなわちカテコールアミンやコルチコステロン放出ホルモンの分泌を促す効果は戦場で敵の攻撃を受けた際の最初の反撃に、一方タイプ II 受容体の免疫系を抑制するなどの suppressive action は過剰な反撃行動による味方に対する誤射などを抑制することになぞらえられる。副腎皮質ステロイドホルモンの働きはこのように神経細胞に対して二面性を呈する。同ホルモンの産生調節には内分泌系のみならずサイトカインなどの免疫系因子も深く関わっていることが明らかになりつつある。

E. 結論

HPAaxis を修飾することが明らかになっている金属化合物である TMT を in vivo で投与す

ると脳，特に海馬に神経細胞死が起こる．この神経傷害は，副腎切除により増悪し，グルココルチコイド投与により軽減することを見出した．この結果により，HPAaxis の修飾が，ある種の神経傷害を修飾し得ることが示された．HPAaxis を胎生期に修飾したマウスにおいて，出生後の脳を *ex vivo* でメチル水銀曝露した場合におこるアポトーシスが増悪されるという観察がある．このように，HPAaxis の胎生期における修飾は，金属毒性への感受性を変化させる可能性もある．このような知見を踏まえ，来年度は水銀あるいはカドミウム毒性の修飾に HPAaxis がおよぼす影響を検討する予定である．

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

なし

参考文献

- 1) Kirino, T. :Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239: 57-69, 1982.
- 2) Sapolsky, R.M. :Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *J. Neurosci.*, 9: 1222-1227, 1985.
- 3) de Kloet E. R. et al.: Feedback action and tonic influences of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psyconeuroendocrinology* 12: 83-105, 1987.
- 4) Imai, H. et al. :Interleukin-1 receptor antagonist inhibits transient increase of plasma corticosterone in the initial phase of trimethyltin-induced hippocampal necrosis. *Neurotoxicol.* 19: 163-166., 1998.
- 5) Sapolsky et al.: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev.* 21:

55-89, 2000.

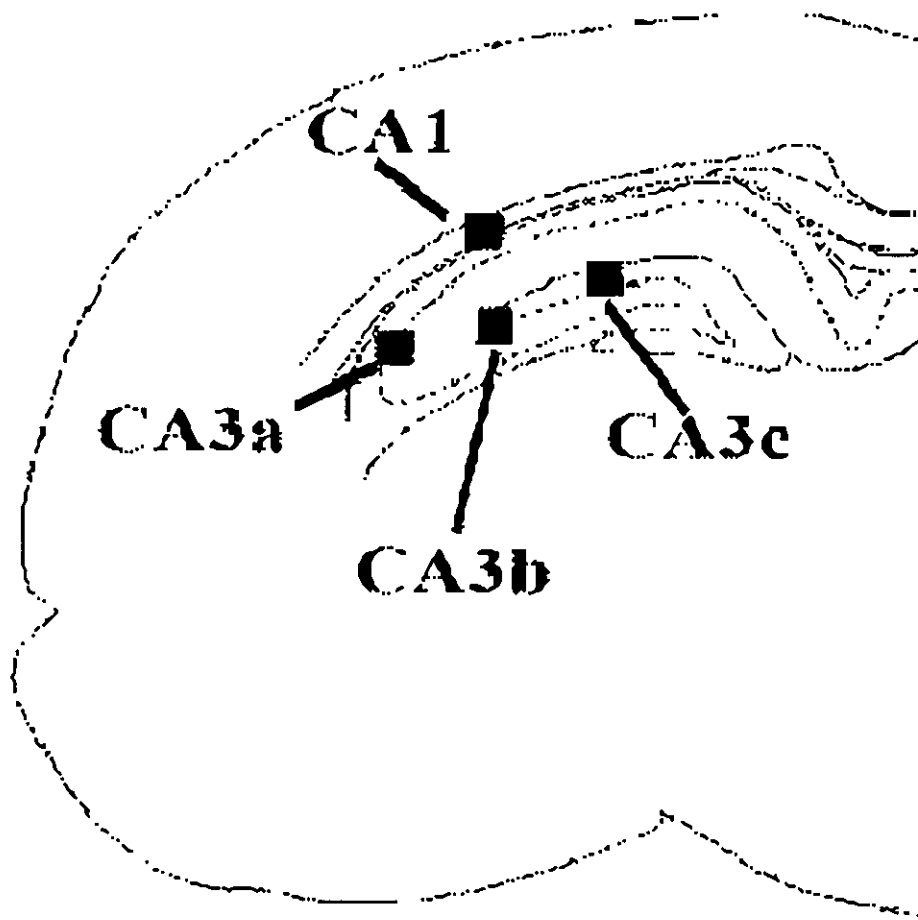


図1. 錐体細胞層において細胞数の計測を行った領域

図2. 海馬領域における神経細胞の脱落と、グルココルチコイドによるその修飾（クレシルバイオレット染色による）

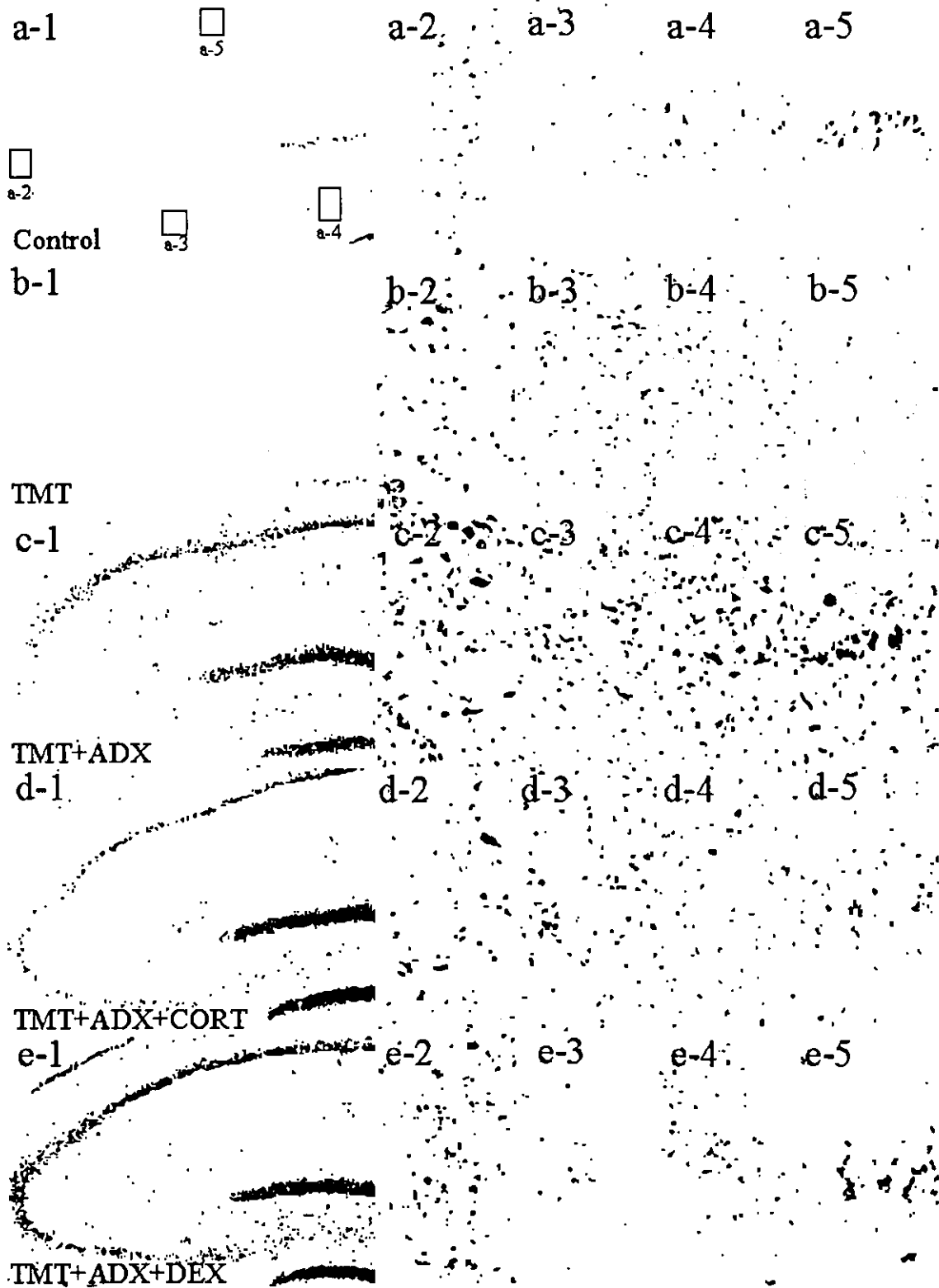


図3. TMT 投与ラットにおける海馬各領域の神経細胞数への影響とその
グルココルチコイドによる修飾

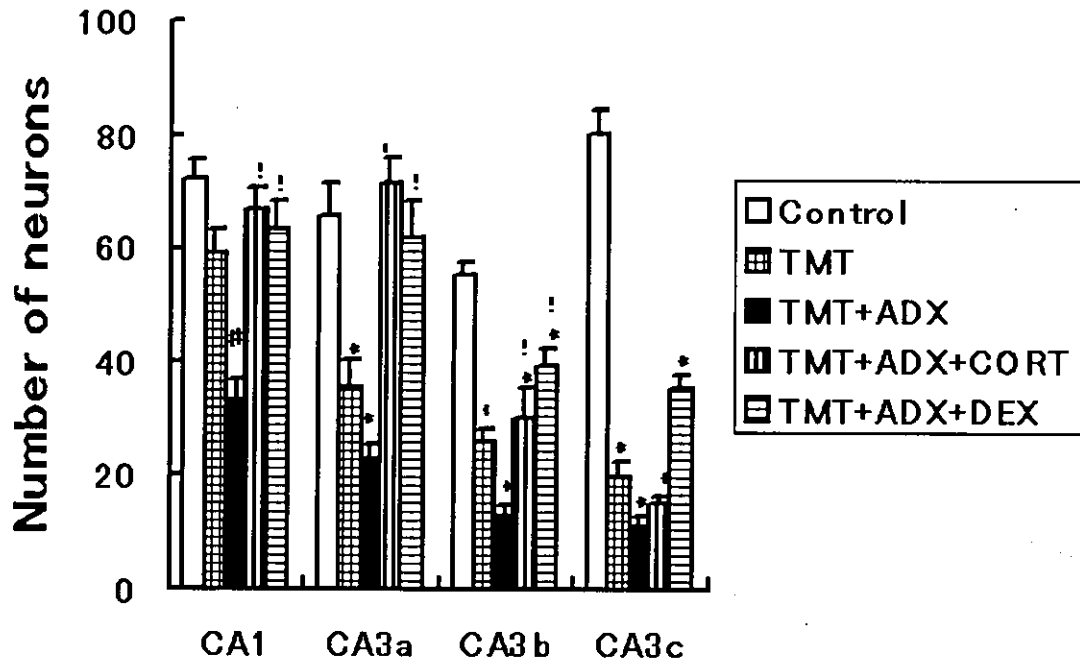




図4 a, b TMT 投与に対する海馬領域におけるグリア細胞の反応 (1, 2は
ビメンチン染色, 3はGFAP 染色)

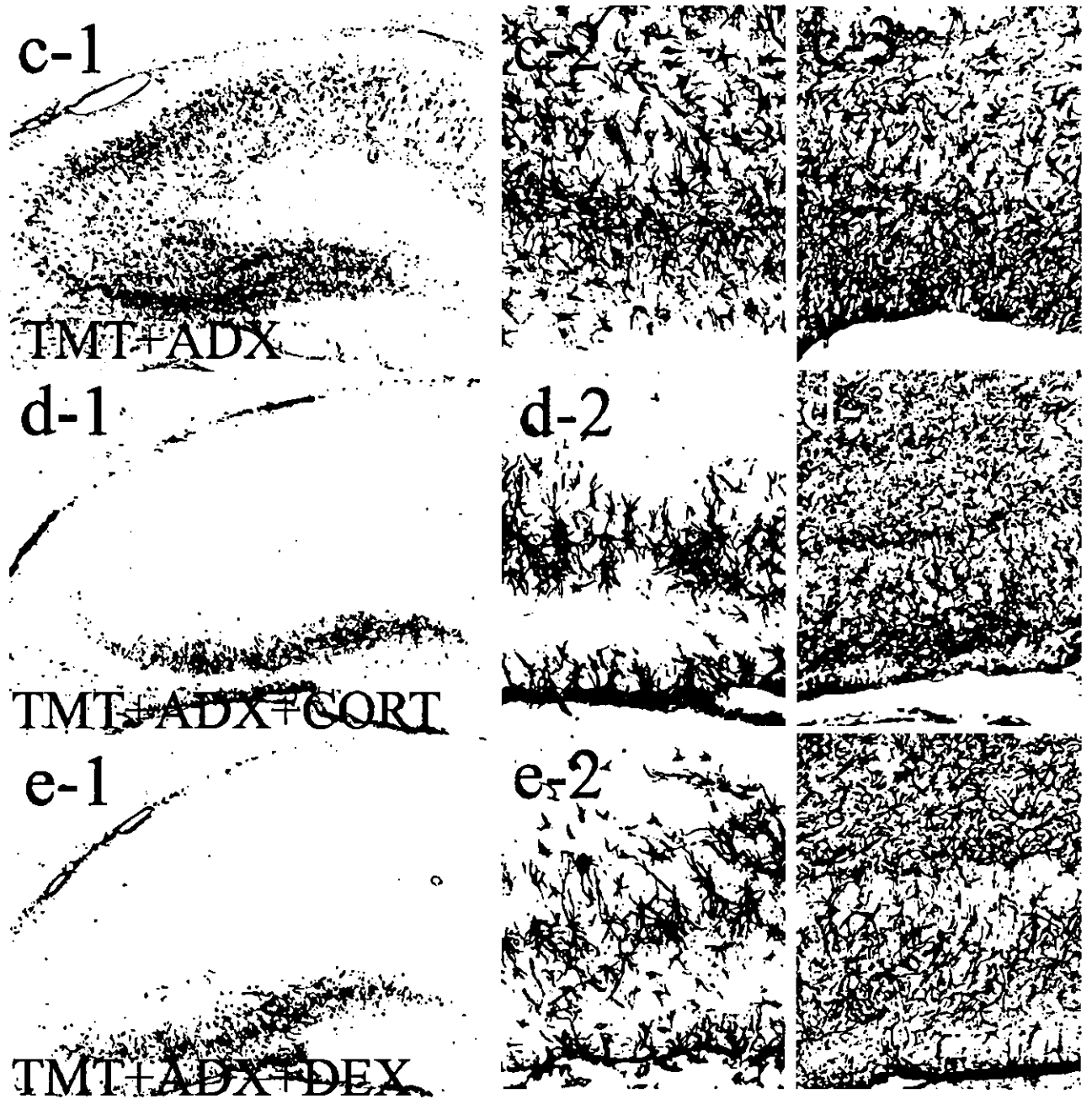


図4. 海馬各領域における TMT 投与に対するグリア細胞の反応と、グルココルチコイドを変化させた場合 (ADX あるいは DEX 投与による) における反応の修飾 (1, 2 はビメンチン染色, 3 は GFAP 染色)

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攪乱・ダイオキシンリスク評価プロジェクト主任研究員

A. 研究目的

脳神経系は出生前後の極めて短い期間に発達し、この期間における内分泌系の支配を大きく受ける。たとえば生殖に関連するといわれているバゾプレシン陽性ニューロンは出生前後のテストステロンレベルにより高密度に発達するし、低周波領域の聴神経は出生前の母体の甲状腺ホルモンレベルにより発達の度合いが左右される。したがって胎生期に母体が曝露する化学物質によって生じる脳神経系発達への影響は、母体内分泌系の状態によりその度合いが変化することが考えられ、このことは成長後に顕在化する行動異常においても同様当てはまるであろうことは容易に考えられる。

昨年度（平成14年度）は副腎皮質系を操作（副腎切除術(ADX)とグルココルチコイドの慢性投与）したラットに有機錫を投与し、脳内海馬領域のグリア細胞の活性化を指標として神経細胞傷害を観察した。

平成15年度はこの有機錫投与動物を使用して神経細胞傷害のメカニズムをより詳細に検討するためプログラム細胞死（細胞が自らのDNAや細胞膜を破壊して積極的に死ぬこと。apoptosis（アポトーシス）ともいわれ、外因的作用のみで死ぬ細胞壊死とは区別される）を観察した。さらに、これらの方法論を胎生期の水銀曝露による新生仔の神経細胞傷害に対するグルココルチコイドの影響に応用することを試みた。

B. 研究方法

apoptosisの検出はTUNEL法によった。また、以下の方法により胎生期の水銀曝露による新生仔の神経細胞傷害に対するグルココルチコイドの影響についてメタロチオネインノックアウトマウスを用いて検討した。C57/BLマウス（雌）及び同系のメタロチオネイン遺伝子ノックアウトマウス（以下KOマウス）（雌）にADXを生後6週齢以降に施し1週間後に無施術雄マウス（C57/BL）と交配させた。プラグ確認後から直ちに、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染色に供する予定である。

C. 研究結果

図1は有機錫を投与して5日目のラット脳内の海馬領域におけるTUNEL陽性細胞である。海馬のCA1領域からCA3領域および歯状回の上下両方のブレードにおいて広範囲にapoptosisの生じているのがわかる（図2は歯状回上ブレードの拡大）。

これまでに（平成16年3月末）得られているADXを施した母マウスから生まれた仔のサンプルは、MT-null系統の水銀非曝露群が2匹（いずれも雌）、野生型マウスの水銀曝露群が23匹（雄14匹、雌9匹）、野生型マウスの水銀非曝露群が9匹（雄4匹雌5匹）である。なおMT-null系統の水銀曝露群については、これまで妊娠したマウスはあるものの、出産後新生仔を直ちに食殺したため脳サンプルは得られていない（3月末に漸く3腹分の新生仔が無事出産し、その後順調に生育しているのもので4月下旬には脳サンプルが得られる予定である）。

D. 考察および来年度の展望

母体のグルココルチコイドはそのレベルが適量より大き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としたところで、メチル水銀曝露を実施したが、このような複合的な条

件を用いた実験は従来にないものと思われる。これとは逆のグルココルチコイド過剰の条件については、Ahlbomら（2000）が検討を行った。彼らによると、ラットに妊娠14日目から合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンを投与しておき、1週齢の仔ラットから小脳の細胞を取り出し、これを培養して、メチル水銀を添加、これによるアポトーシスの誘導を見たところ、デキサメタゾン投与群由来の小脳細胞では、非投与群のものとは比べて、アポトーシスの誘導が有意に亢進していた。低グルココルチコイド状態でもメチル水銀曝露による脳神経系の傷害が増強されるものであれば、このAhlbomらと類似したことが得られるものと予想される。

無論、これらの事象をメタロチオネイン遺伝子欠損動物を用いて検討した報告はない。上述のAhlbomらの報告では、アポトーシスの誘導に酸化ストレスが関与していたことが示されている。メタロチオネインには、ラジカル消去作用も報告されていることを考えると、低グルココルチコイド状態という厳しい状況では、MT-nullは水銀による脳神経細胞傷害により敏感な可能性がある。実際にメタロチオネインの存在によりメチル水銀毒性軽減されることが確認されれば、水銀のリスク評価に有用な知見となることが期待される。MT-nullのHg曝露群で喰殺が見られたことは、この可能性を支持しているかも知れない。

なお、エリチェ会議(1995)、先進国環境担当閣僚会議(1997)及びOECD内分泌かく乱化学物質の試験及びアセスメントに関する試験法開発に関する各国調整官及びリスク

アセスメント専門家合同会議(1997)において外因性化学物質の胎児・小児への曝露がその後の中枢神経系発達に及ぼす影響が指摘され、国際的には同影響に関する研究推進の重要性が広く認識されていることをつけ加えておきたい。

E. 参考文献

Ahlbom E, Gogvadze, V., Chen, N., Celsl, G., and Ceccatelli, S. (2000) Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. PNAS 97, 14726-30.