

図1 有機錫投与ラット脳の海馬におけるTUNEL陽性細胞

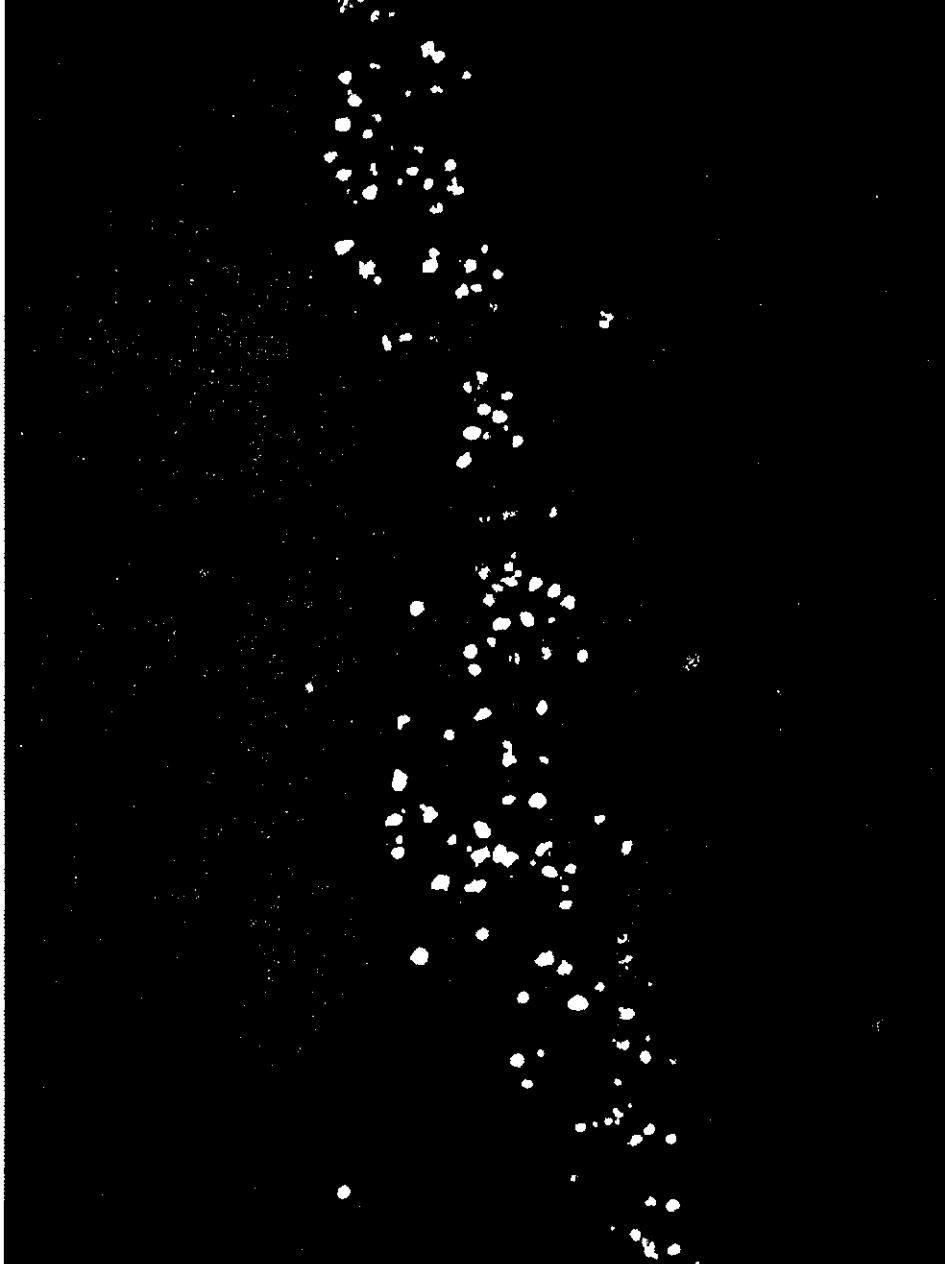


図2 海馬齒状回の拡大

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かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理プロジェクト主任研究員

A. 研究目的

外来の化学物質に曝露することによりヒトの脳・神経系の発達が影響を受けることを示唆する事例がいくつか報告されている。セベソでの工場爆発事故の後に周辺住民の子供の行動に変化がみられたことや、あるいはミシガン湖周辺のコホート調査による胎児期PCB類曝露レベルとIQ値との間に負の相関がみられたことなどがその例である。脳・神経系の発達に内分泌因子が重要な役割を果たしているが、ダイオキシン類とPCB類とはいずれも内分泌系をかく乱させることが知られており、上記現象への関与が予想される。一方自然界に存在する水銀はより有毒なメチル水銀に変換され、食物連鎖の上位に位置するマグロ、カジキあるいはクジラの肉に高濃度に蓄積している。メチル水銀は、成人に影響を及ぼさない用量でも胎児の脳・神経系への発達に影響を及ぼすことが知られている。これらのことから厚生労働省薬事・食品衛生審議会では、日本人の摂取量と曝露量とを勘案してサメ、メカジキ、キンメダイ、ツチクジラ、バンドウイルカ、コビレゴンドウ及びマッコウクジ

ラの7種については妊婦に対して食べる頻度を週2回以下に制限するよう呼びかけている。

平成16年度は胎生期のメチル水銀曝露による脳神経毒性発現が、内分泌器官の一つである副腎皮質を切除した場合にいかなる影響を受けるかを検討した。特に母体に副腎切除術を施して低グルココルチコイド状態にし、かつメチル水銀に曝露した場合にのみ水頭症の所見の見られる仔が少数ながら生まれてきたので、本報告ではこれについて詳細に報告する。

B. 研究方法

C57/BLマウス（雌）に副腎切除術を施し（ADXマウス）、1週間経過後に無手術雄マウスと交配させた。プラグ確認後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染色に供した。副腎切除を施し、かつメチル水銀曝露した母マウスは16匹であり、これらから生まれた65匹のうち少なくとも2匹は水頭症の所見を示している（現在病理組織学的検索を実施中であり、この数字は大きくなる可能性がある。

C. 研究結果

図1に無処置の母親から生まれたマウス（左）とADXマウスから生まれたマウス（右）の脳のクレシルバイオレット染色を示す。いずれの母マウスもメチル水銀は曝露されている。ADXマウスから生まれたマウスの脳の右側が明らかに変形している。皮質内側に褐色色素を有するマクロファージが出現しており（図2）、側脳室も拡大している（図3）。髄液の膨張により水頭症が生じたものと思われる。また神経傷害の指標でもあるアストログリアが活性化している（図4）。拡張した側脳室の付近にはTUNEL陽性細胞が多数見ら

れ、アポトーシスが生じていることを示している（図5）

D. 考察及び今後の展望

母体のグルココルチコイドはそのレベルが適量より多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にするとともにさらにメチル水銀曝露も行っているが、このデザインの実験は従来にないものである。低グルココルチコイド状態と水銀曝露が交互作用としてより脳神経系の発達障害が増強されるものと考えられる。ただ片側のみ得水頭症所見は極めて不自然（脳脊髄液の循環障害では一般に左右対称性）であるため、より詳細な脳組織の変性変化の確認が必要であると思われる。なお、水頭症の所見を示したもう1匹の例では肉眼的には両側性であると思われる（切片を作成中）。今後は他のマウス切片についても脳組織の変性変化の詳細（組織像、原因、病理発生）をHE染色などによって確認する予定である。

図1

無処置の母親から生まれたマウス（左）とADXマウスから生まれたマウス（右）の脳のクレシルバイオレット染色

（いずれの母マウスもメチル水銀は曝露されている）

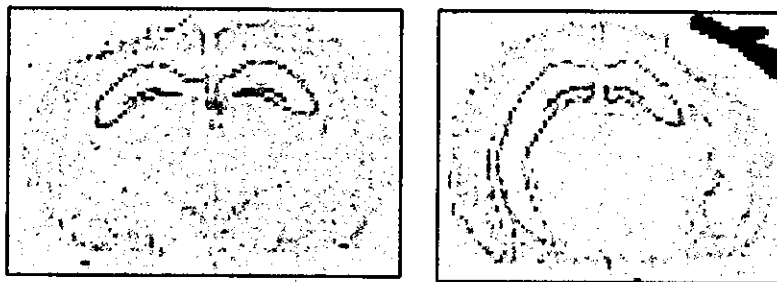


図2

右側の一部の拡大図。褐色色素を含有したマクロファージの出現（矢印）がわかる。

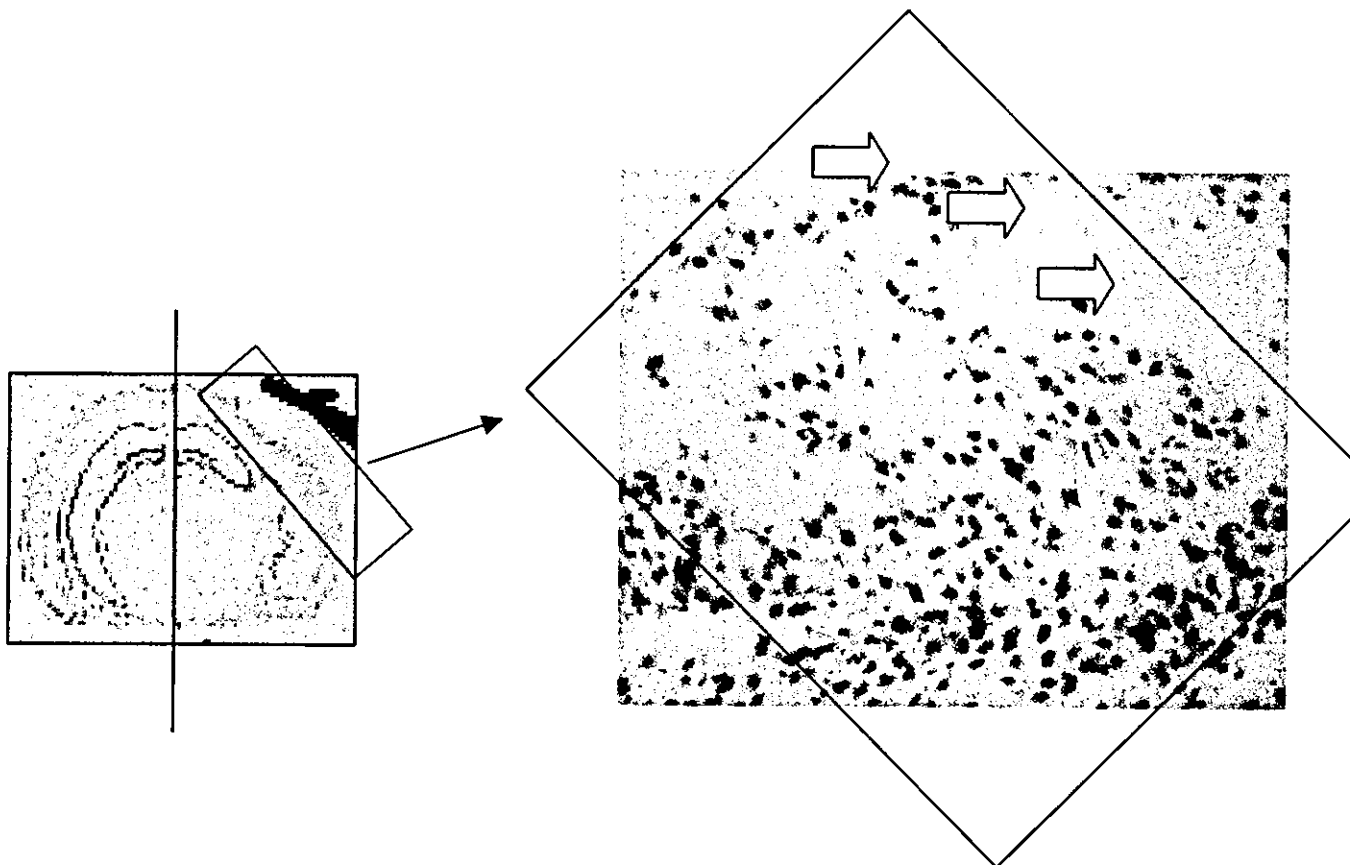


図3

側脳室部分の拡大。片側の側脳室が拡張している。

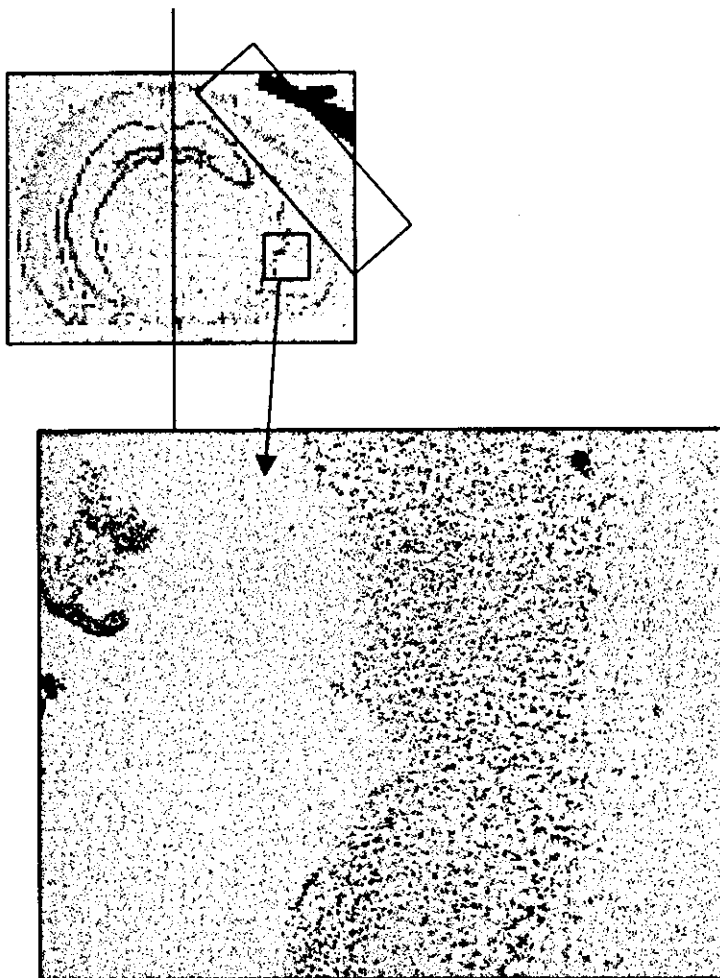


図4
アストログリア細胞の出現（矢印）

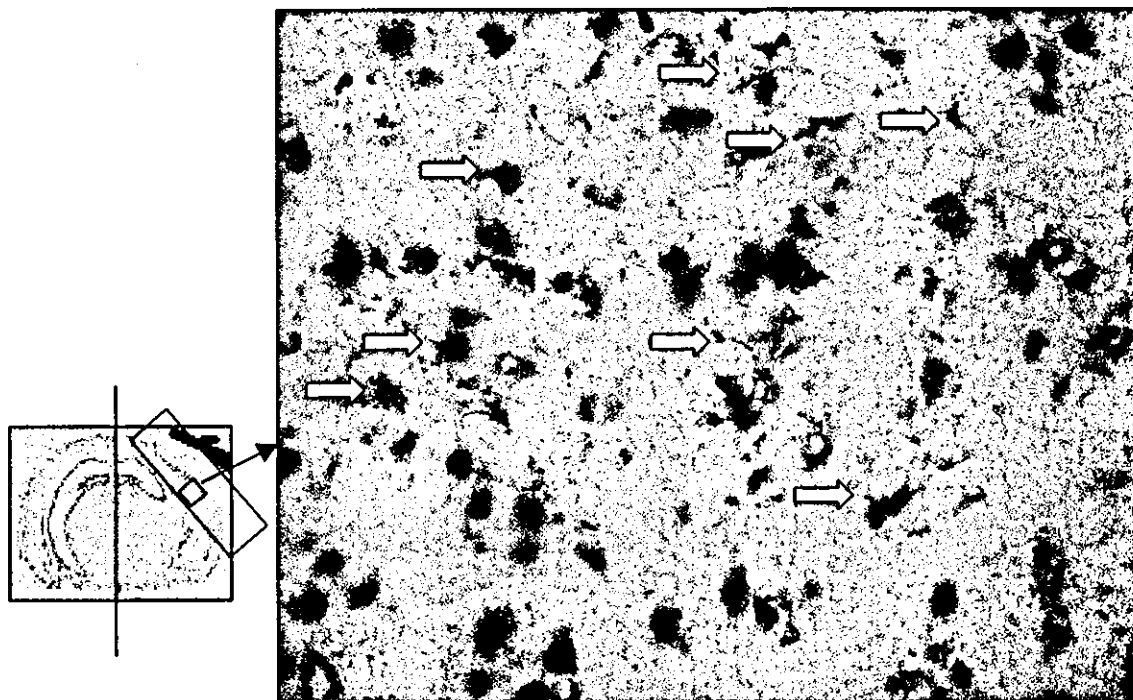
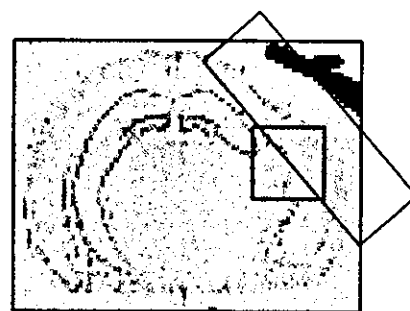


図5

側脳室付近のTUNEL染色。多数の陽性細胞が見える。



まとめと展望

まとめと展望

とりあげた2種類の重金属は、いずれも日本人にとっての化学物質による健康リスクを考える上で重要な金属種である。このうちメチル水銀の発達毒性はよく知られている一方で、カドミウムの発達毒性については知見に乏しかった。本研究において、多角的にカドミウムの発達毒性を検討した結果として、カドミウムにも発達毒性があること、胎仔期～新生仔期の甲状腺機能あるいは甲状腺ホルモンの代謝と何らかの関連があることを示唆することができたと考えられる。また、メチル水銀の発達毒性に関しては、メタロチオネイン欠損（遺伝的要因）および加齢（生理的要因）のいずれもが毒性を助長する要因となり得ることが示された。これらは後述するように、いずれもヒトにおけるメチル水銀の発達毒性を考える上で現実的な意味をもつ要因であると考えられ、今後、さらに定量的な精度をあげる、あるいはヒト集団において健康リスク評価を行う際に考慮する、という形での検討が望まれる。

Cdの発達毒性：

Cdの発達毒性については、疫学的にはほとんど報告がなく、実験的な検討でも現在問題となっているような微量・長期曝露についての知見が限られていて、評価が定まっていない。最近になって微量のCdがエストロゲン様作用を有するという報告がNature Medicine誌に発表（Johnsonら、2003）されている。本研究では、Cdの発達毒性について、できるだけ多角的な検討を行うことで、発達毒性の有無を判断するというアプローチをとった。

発達毒性の試験としては、母体に明らかな毒性が発現しないような用量で実施されるべきである。10mgCd/Lという用量では母体には特に影響は認められなかった。この用量は、経口摂取量としては2mg/kg/日、腸管吸収率を約1%とすると腹腔投与では20 μ g/kg/日に相当し、JECFAの定める（経口）暫定許容摂取量7 μ g/kg/

週よりはかなり高いが、最近、Johnson らがエストロゲン様作用を報告した中で用いた 0.5~5 μ g/kg/日 (iv ; ただしこの場合はラットで妊娠期間中 2 回のみ)、太田ら(2003) が“ヒトの摂取レベル”とした 1mg/kg/day (経口) に近い。母獣の腎中 Cd は 5 μ g/g 組織重量未満であり、ヒト腎 Cd での実測値 (10~50 μ g/g) よりはかなり低値である。動物実験からリスクを外挿する際、通常 100 の安全係数を見込むことを考えると、発達毒性試験の用量としては妥当なものと考えられる。

8-9 週齢における行動毒性の評価では、異なる曝露コホートをを用い再現性を検討した。2 回目に認めた PA 訓練試行の潜時と OPF 活動性との逆相関は、陽性対照実験 (Tanaka ら, 2003) でも得られていて、整合性がある結果といえる。PA 保持試行についての結果は再現されなかったが、曝露による影響が早にのみ認められる点は一貫していた。また、MT-null が Cd 毒性の感受性要因となる (PA 初回ならびに空間学習) ことは、行動以外の Cd 毒性に関する報告と整合性があり、MT が Cd の発達毒性についても防御因子となる可能性が示唆される。空間学習試験では、学習課題の難易度を順次変化させるというプロトコルを用いたが、このように課題のパラメタを変化させることで化学物質の影響の検出感度が上がることは複数の報告で示されており、重金属に限らず、さまざまな有害性要因が神経・行動機能に及ぼす影響を評価するうえで、有用というよりはむしろ必須の手法とすべきであると考えられる。こうした現象は、行動・神経機能の可塑性の欠如ともとらえられるが、シナプスの可塑性などをを含め、どのような物理的なベースが対応しているのかを探索することは、毒性メカニズムの解明という点からも重要であろう。

Cd が甲状腺機能に及ぼす影響について、本研究ではこれをエンドポイントとして取り上げたが、甲状腺ホルモンの周生期における攪乱は、脳の発達に影響を及ぼし、齧歯類では生後 1~2 週目はその臨界期であることから、甲状腺機能の攪乱が Cd 発達毒性のメカニズムのひとつである可能性が示唆される。脳内の T3 定量などを含め検証すべき点である。現象からみると、疫学的にはドイツの学童で血中 Cd が TSH, T4 とそれぞれ負・正に相関したという報告 (Osius, 1999) があり、また (周生期

曝露ではないが) イタイイタイ病患者の甲状腺には、対照者と比較して数倍のレベルで Cd が検出されたという報告もあり、甲状腺が Cd 毒性の標的器官となっている可能性は否定できない。一方で、低用量 Cd の甲状腺毒性に関する実験的研究はほとんどなく、将来的な展開が期待される領域であると言える。本研究で観察された脳の脱ヨード酵素活性の変動は、血清 T4 の抑制への反応と解釈でき、後者が primary な反応と考えられる。母親では T4 に変動が認められず、何らかの理由で仔の方が感受性が高い（あるいは仔に特異的なプロセスへの影響である）と思われるが、この点も将来的な検討課題である。

甲状腺ホルモン以外には、Johnson が報告したエストロゲン環境の攪乱も発達毒性の原因でありえる。本報告の範囲外であるが、我々の予備的検討では極めて低濃度の Cd が培養神経細胞へ直接作用する可能性が示唆されている。興味深い点は、これらの低用量 Cd による行動影響、神経細胞への影響、性成熟への影響などは、それぞれ同じあるいは類似の系において、エストロゲンあるいはエストロゲン様化学物質が示す作用とは、様相（影響の方向など）が全く異なっていたことであり、低用量 Cd の作用が、エストロゲンよりも甲状腺ホルモンを介している可能性を示唆している。甲状腺ホルモンに関して、もう一つ考えるべき問題は、甲状腺機能が様々な原因により低下している状況で、Cd の発達毒性と相互作用をする可能性である。甲状腺機能を低下させる原因は数多いが、多くの化学物質が甲状腺機能に影響することは重要である。最終年度に実施した甲状腺機能低下モデルの導入は、この検証に向けての最初のステップである。なお、一般的な組織病理検索では、新生仔脳に何の異常も検出しなかった。脳に移行する Cd の量が極めて微量であることを考えるとある意味で当然かもしれないが、gross なレベルで異常を観察し得ないという点を確認することは重要である。

Cd 曝露による成長阻害は、発達毒性を考える上で留意すべき影響である。体重増加の抑制を経時的に見ると、出生体重については曝露の有無で差がないことから、Cd は授乳期に特異的なプロセスに作用している可能性がある。4ヶ月齢の行動試験実

施時においても、体重には有意差があったが、差としては小さく、行動評価に影響をおよぼすものとは考えにくい。MeHg で検討したような甲状腺ホルモン依存的な成長ホルモン産生への影響を介しているのかもしれないが、in vivo ではT4低下に対し、DI2活性が正常に反応しているので、実際に新生仔脳でT3の不足が起きているかどうかは定かではない。

Cdの示す発達毒性のメカニズムは、ここまで述べてきた甲状腺機能あるいは甲状腺ホルモンの代謝への影響を除くと明らかではない。これまでに指摘されてきたもので、微量元素（特にCuとZn）への影響があり、最終年度の検討でも軽度の変動を認めているが、その毒性学的意義は不明である。一方遺伝子発現の変動を検討した結果、マイクロアレイ、リアルタイムRT-PCRいずれにおいても曝露群ではトランスフェリン受容体の発現促進が観察された。CdとFeに関しては、吸収をめぐる相互作用が注目されているが、脳において見つかったこのような変化が毒性発現に関連するものか否か、これからの課題である。

メチル水銀 (MeHg) の発達毒性：

Cdとは異なりMeHgが発達毒性を有していることは明らかであり、本研究では感受性要因の検討に焦点があった。研究期間内に、MT-I,II欠損を用いた遺伝的要因、加齢・HPAaxisという生理的要因、リスク要因としてのHg0への複合曝露については検討をおこなうことができたが、甲状腺機能低下については低下モデルの検討にとどまった。CdとMeHgが甲状腺ホルモンレベルとその代謝酵素に及ぼす影響は異なっているので、甲状腺機能低下による毒性修飾の様相も異なることが予想される。

本研究で用いたMeHgの曝露レベルは試算では1mg/kg/日（経口）で、最近の実験的諸研究の中でも低いレベルで実施された実験のひとつである。脳Hg濃度は10日齢で $\sim 0.5 \mu\text{g/g}$ であるが、ラットにおける類似の曝露実験データをもとに推定すると、本研究の曝露個体脳におけるHg濃度のピークは約 $2 \mu\text{g/g}$ 程度と思われる。

これは魚を多食するヒト集団の胎児脳で観察された濃度の 10 倍程度であり、動物を用いた発達毒性の評価レベルとしては高すぎないものと思われる。病理学的検索においても異常所見を見いだし得ないことが確認されている通り、著しい細胞毒性を発揮する量ではない。

本報告概要では省略したが、MT 欠損の影響は Hg^0 の神経毒性については顕著に現れる。これに対して MeHg の毒性について、12 週齢の検討ではそれほど顕著な影響を与えなかった。52 週齢では、曝露群と対照群との差がより顕著になるだけでなく、MT 欠損の影響がより顕著に現れた点が特徴的である。これらの結果は、MT 欠損と加齢は、それぞれが感受性要因になるだけでなく、両方が相加・相乗的に修飾する可能性を示唆している。MT が MeHg の毒性を修飾する機序については、酸化ストレスとの関連などが指摘されているが詳細は明らかでない。

MeHg も Cd と同様に新生仔脳の DI 活性を修飾したが、影響の様相は Cd とは異なっていた。すなわち、血清 T4、脳 DI2 活性には影響せず、脳 DI3 活性を系統にかかわらず抑制した。これらの結果は、高用量で短期的に MeHg 投与を行った我々の既報と矛盾しておらず、比較的低用量の MeHg が周生期に甲状腺ホルモン環境に影響を与える可能性は高いと思われる。T4 に変化はないので、脳内に達した MeHg が直接作用した可能性がある。

in vitro において MeHg は DI2 活性を強く抑制した。NB41A3 細胞における $10^{-8}M$ での影響は MeHg 毒性のエンドポイントとして最も敏感なものの一つと思われる。DTT を添加する実験により、抑制は-SH 基への作用と考えられた。一方で、GH3 細胞を用いた検討により、MeHg による DI2 活性の抑制が機能的に意味を持つことが示唆された。甲状腺機能を操作する実験では drastic な条件を用いるものが多く、軽度の機能低下の影響が解明されていない。GH3 の系は、こうした定量的検討にも有用と考えられる。ただし、これら *in vitro* の系で得られた結果は、上述の *in vivo* の結果とは全く異なっていた。両者の違いの原因を追及することは、発達毒性機序の解明の上でも重要であろう。

メチル水銀曝露と副腎摘出を組み合わせたモデルは、生理的要因による修飾を評価するモデルとしてはやや drastic であったが、ここで散見された水頭症の発症については、さらに例数を重ねて確立する必要がある。さらに高いレベルのメチル水銀曝露で水頭症の発症を報告している例があることを考えると、副腎摘出がメチル水銀の毒性を増強する可能性はあると思われる。

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の評価：

用いた低用量の重金属曝露で、生後 10 日目に変動が確認された遺伝子の数は MeHg については変動の大きさは小さいものの、TIMP4 はリアルタイム RT-PCR でも変動が確認された。しかし、タンパク質のレベルを組織学的方法で検討したところでは、曝露の影響を検出することはできなかった。Cd については、既にのべたようにトランスフェリン受容体の発現促進が確認された。今後、タンパク質レベルでの確認、機能と毒性機序への関与の検討へと進みたい。初回のマイクロアレイによる検討で発現変動を認めたセロトニン受容体について、リアルタイム RT-PCR の結果は陰性であったものの、既報で Cd によるセロトニン代謝への影響が複数報告されていること、当該受容体の発現が発達のステージに強く依存していることを考えると、さらに詳細な検討をおこなう価値はあるものと思われる。

発達毒性における脳のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析については定まったプロトコルが存在しているわけではなく、検討課題も多い。本研究では、脳全域で起こるような変動を期待した実験を行ったため、それに対応した遺伝子のみが検出されている可能性がある。周生期には時期・部位特異的に発現する遺伝子が重要な役割を果たしていることが考えられるので、このような要素を考慮した解析のストラテジーも開発していく必要がある。また、マイクロアレイにおいては変動の大きさとして 2 倍（あるいは 1/2 倍）をカットオフとしたが、既報と比べてやや厳しい基準であったかも知れないし、データの安定性という観点から、シグナルの絶対

値が低いものは全てカットしてしまったための見逃しが起きているかもしれない。
n数の選び方も何が最も妥当であるか、統計的な側面からの検討が必要であろう。
本来探索的であるマイクロレイという手法を、発達期の脳という時間的・空間的
な多様性に富む材料に適用するのに、どのようなストラテジーが有効なのか、それ
自体が大きな課題である。

結論

・Cd が発達毒性を有する可能性が示唆された。機序は不明であるが甲状腺ホルモン環境に影響を及ぼすことが明らかになり、脳の発達との関連が注目される。MT 欠損により Cd の発達毒性が顕著になった。

・MeHg の発達毒性は、MT および加齢の両要因に修飾された。また両者には相互作用があると思われる。日本人に MT 誘導反応の弱い集団がいることおよび MT の遺伝子多型が存在することが最近報告されており、こうした MT による発達毒性の修飾には現実的な意味が大きいと思われる。MeHg も新生仔甲状腺代謝に影響を及ぼすが、その作用は Cd とは全く異なると思われる。

・DNA マイクロアレイを用いて Cd あるいは MeHg で発現変動する遺伝子を少数ながら同定することができたが、タンパク質レベルへの影響、毒性機序との関連の解明はこれからの課題である。

謝辞

本研究を3年間に渡ってサポートしていただいた厚生労働省ならびに関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

Tanaka M et al. Low-dose perinatal diethylstilbestrol exposure affected behaviors and hypothalamic estrogen receptor- α -positive cells in the mouse. *Neurotoxicol Teratol* 26, 261-9, 2004.

Watanabe C. Modification of mercury toxicity by selenium. *Tohoku J Exp Med* 196, 71-77, 2002.

Yoshida M. et al. Neurobehavioral changes in metallothionein-null mice prenatally exposed to mercury vapor. *Toxicol Lett*, (in press)

Yoshida M. et al. Susceptibility of metallothionein-null mice to the behavioral alterations caused by exposure to mercury vapor at human-relevant concentration. *Toxicol Sci* (2004)

Takahashi Y. et al. Placental transfer of mercury in pregnant rats received dental amalgam restorations. *Toxicology*, 185:23 – 33, 2003

Mori K et al. Methylmercury inhibits type II 5'-deiodinase activity in NB41A3 neuroblastoma cells. *Brain Res* (submitted)

Mori K et al. Cadmium induces fetal hypothyroidism in metallothionein knockout mice. (in preparation)

Shimada A et al. Ultrastructural Demonstration of Mercury Granules in Placenta of Metallothionein-Null Pregnant Mice after Exposure to Mercury Vapor. *Toxicol. Pathol.* 32: 1-8. 2004.

(書籍)

渡辺知保, 大谷一金子律子, 田中美加. 周生期におけるジエチルスチルベストール曝露の行動影響 井上達・井口泰泉 (編)『生体統御システムと内分泌攪乱』(2005 ; 印刷中)

学会発表 (国際)

Watanabe, C., Watanabe, A., Satoh, M., Yoshida K., Mori K., Ishitobi H., Honda A. Behavioral alterations of C57BL and metallothionein knock-out mice perinatally exposed to low level of cadmium. Society of Toxicology, 44th Annual Meeting, 2005.3, New Orleans (USA).

Yoshida, M, Watanabe C., Horie K., Satoh M., Sawada M, and Shimada A.: Neurobehavioral changes in metallothionein-null mice prenatally exposed to mercury vapor. Society of Toxicology, 44th Annual Meeting, 2005.3, New Orleans (USA).

Mori K et al. Inhibition of type II 5'-deiodinase activity by methylmercury in NB41A3 mouse euroblastoma cells. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, 2004

Sawada M. Shimada A, et al. Effect of mercury vapor exposure on murine thymus 7th Int'l Conference on Mercury as a Global Pollutant 2004

Ohtani-Kaneko, R., Iwafuchi M., Yokosuka M., Hirata K., Watanabe C.: Estradiol-17beta affects the localization of synapsin-I through non-genomic mechanism. 16th International Congress of the IFAA, 2004.8, Kyoto.