

# 有機水銀による小脳顆粒細胞障害機序の解明

古 林 与志安

獣医学科家畜病理学助手

## 1. 目 的

有機水銀中毒では、中枢神経系を含め多くの臓器・組織が傷害されることが知られている。中でも小脳顆粒細胞の選択的脱落は特徴病変の1つに挙げられ、その顆粒細胞の細胞死がアポトーシスであることが証明されている。そこで、多くのアポトーシスの細胞内情報伝達に関与していると考えられている Interleukin 1- $\beta$  converting enzyme (ICE) が、メチル水銀による小脳顆粒細胞傷害に関与しているか否かを検討し、さらに ICE の発現が up regulate されていた場合、いかなるシグナルを介して ICE の発現が up regulate されるのかを併せて検討し、最終的に有機水銀による小脳顆粒細胞の傷害機序を解明することを目的とした。

## 2. 方 法

### (1) 実験動物

Wistar 系ラット、生後8週齢、平均体重 250 g を用いた。

### (2) 投与方法

Methylmercury chloride (MMC) を飲料水中に混ぜ、投与量が 5 mg/kg/day となるようにした。MMC 投与ラットは、後肢麻痺の症状が発現した投与後 19 日目を MMC-1 群(5 匹)、更に 1 週間投与を続け(投与後 26 日)症状が顕著となった MMC-2 群(6 匹)に分けて検索に供した。また、検索に際しては、同系のラット 5 匹を対照群として用いた。

### (3) 病理学的検索

麻酔殺したラットの心臓よりヘパリン加 PBS を灌流し、肝臓、腎臓、大脳および小脳を採材した。小脳は採材後、直ちに虫部矢状断スライスを作製し、定法に従ってパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。また、アポトーシスに陥った細胞を検出するため全例の小脳パラフィン包埋切片に対して TUNEL 法を実施した。また、一部の症例に対して抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP)、抗 ED 1、抗 bNOS 抗体を用いて SAB-PO 法による免疫染色を行った。

### (4) アポトーシス関連蛋白/遺伝子の解析

ラットの小脳残存部より、TRIzol (Gibco BRL) を用いて、RNA および蛋白を抽出した。

#### a) Interleukin 1- $\beta$ converting enzyme (ICE) mRNA の発現状態の検討

抽出した total RNA 20  $\mu$ g をホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、別途ラットの脾臓を用いて作製した rat ICE cDNA プローブを用いて Northern hybridization を行った。発現量の比較は Imaging Densitometer (Bio-Rad) を用いて OD を測定して行った。

### b) ICE および数種のアポトーシス関連蛋白の発現状態の検討

抽出した蛋白 15  $\mu$ g を SDS-PAGE にて電気泳動し、PVDF 膜に転写後、イムノブロッティングを実施した。一次抗体としては、抗 ICE (Santa Cruz, Germany), 抗 Fas (Transduction Lab., USA), 抗 TrkB (Transduction Lab., USA), 抗 brain derived neurotropic factor (BDNF: Chemicon, USA) および抗 bNOS (Transduction Lab., USA) 抗体を用いた。

## 3. 結 果

### (1) 病理組織学的所見

神経症状が軽度であった MMC-1 群では、TUNEL 法でごく少数の顆粒細胞が散在性に染色されただけであったが、神経症状が重篤化した MMC-2 群では、HE 染色で観察される核濃縮、顆粒細胞層の粗鬆化領域に一致して多数の陽性細胞が観察された (Fig. 1 a & b)。また、MMC-2 群では、障害部位は GFAP 陽性アストロサイトが増数していたが、ミクログリア/マクロファージ反応は、ごく軽度であった。

また、虚血等による脳障害時に活性亢進が起こるとされている神経型 NOS の染色パターンは MMC 投与群と対照群の間に差はみられず、かご細胞と考えられる細胞において陽性像が観察された。なお、対照群では著変は観察されなかった。

### (2) アポトーシス関連蛋白/遺伝子の解析 (表 1)

すべてのアポトーシス現象において活性化が起こるとされている ICE は、MMC-2 群において蛋白質および mRNA レベルで発現が増加していた (表 1 & Fig. 2)。

そこで、どのような経路を介して ICE の活性化が起こっているのかを検討を加えた。小脳で重要な役割を果たしていると考えられている神経栄養因子である BDNF およびその細胞レセプターであ

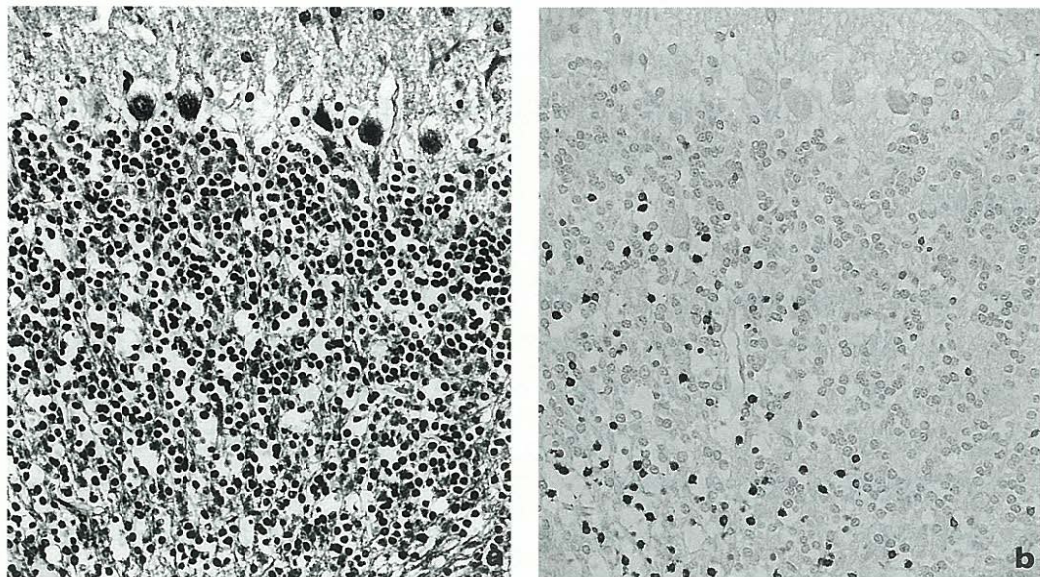


Fig. 1. MMC-2 群小脳虫部

- a) 核濃縮に陥った顆粒細胞が顆粒層内で認められる。HE 染色。×240  
b) 顆粒細胞の核はアポトーシスを示す。TUNEL 染色。×240

表1. Western blot法による種々のアポトーシス関連蛋白の発現量

		対照群	MMC-1群	MMC-2群
ICE	20 kDa	-	-	++
Fas	45 kDa	-	-	-
bNOS	155 kDa	++	++	++
BDNF	27 kDa	+	+	++
TrkB	145 kDa	+	+	++
	95 kDa	++	+++	++

-: 検出できず, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 高度

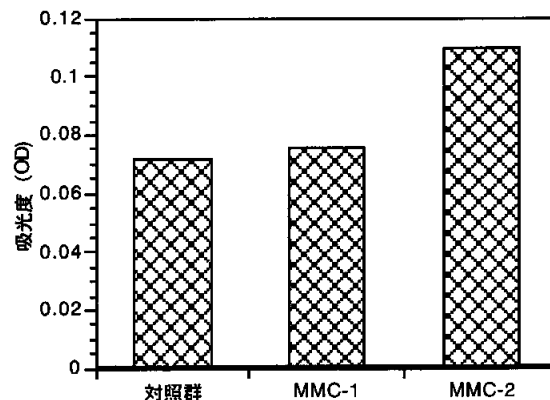


Fig. 2. Northern blot法による小脳ICE mRNA発現量の検討

るチロシンキナーゼドメインを持つ145 kDaのtrkB蛋白はMMC-2群で過剰に発現していた。一方、チロシンキナーゼドメインを持たない95 kDaのtrkB蛋白についてはMMC-1群で発現が増加していた。また、アポトーシスを誘導するシグナルとなるFas, bNOS (nNOS) についても検索したが、対照群との間に有為な差は認められなかった。

#### 4. 考 察

今回の検索によって、MMC投与ラットの脳顆粒細胞アポトーシスでは、Interleukin 1- $\beta$  converting enzyme (ICE) がmRNAレベルおよび蛋白質レベルでup-regulateされていることが明らかとなった。ICEはすべてのアポトーシスに関与しているとされているものの、中枢神経系における発現については未だ定説がなく、明らかにされていない。従って、MMCによる脳顆粒細胞のアポトーシスにおいてもICEのup-regulateが確認されたことは、中枢神経系においてもICEがアポトーシスに関与していることを示唆するものと考えられた。

アポトーシスを誘導するシグナルとしては、Fas/Fasリガンドを介するもの、栄養因子(欠乏)とそのレセプターを介するもの、一酸化窒素によるものなどがある。今回これらの系についても、蛋白質レベルでの発現を検討したが、いずれも原因として特定することができなかった。脳顆粒細胞のアポトーシスにおいては、癌抑制遺伝子であり生体内のゲノムを安定化するp53蛋白の関与する系とそうでない系があることが分かっている。今後、p53も含めたアポトーシス誘導因子の検索を行い、有機水銀によるアポトーシス誘導機構を解明することが必要と思われる。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたってご援助いただきました帯広畜産大学後援会に厚くお礼申し上げます。