

## RF-085 やんばる生態系をモデルとした水銀の生物蓄積に関する研究

## (2) 野生動物の初代肝細胞培養系の確立

琉球大学 医学部 地域環境医科学講座 医科遺伝学分野 柳 久美子

## ＜研究協力者＞

環境省 那覇自然環境事務所 野生生物課 阿部慎太郎

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 宝来佐和子

琉球大学 医学部 地域環境医科学講座 医科遺伝学分野 要 匡

琉球大学 農学部 生産環境学科 亜熱帯動物学講座 小倉 剛

平成20年度合計予算額 2,600千円

※上記の予算額は、間接経費600千円を含む

[要旨] マングース肝組織から、肝細胞の分離法、培養の至適条件を決め、初代肝細胞培養技術を確立した。マングース初代肝細胞の至適培地はWilliams' medium E培地であった。マングース肝細胞の初代培養に成功したのは我々をおいて他にない。培養された初代肝細胞は形態学的に生体内肝細胞と類似していることが確認され、本技術は水銀代謝機構を実験的に検証する上で重要かつ強力なツールとなりうる。

マングース主要臓器（肺、肝、腎、副腎、脾、リンパ節、唾液腺）の詳細な病理組織学的検索を行うために、ヘマトキシリン-エオジン染色、コッサ渡銀染色、ベルリンブルー染色、PAS染色標本を作製し顕微鏡にて観察した。本解析により、複数個体の肝（小葉内、小葉間結合組織）、腎（腎盂粘膜、近位尿細管）に組織障害を伴う炎症性変化がみられることが判明した。さらに、水銀の局在を組織学的に検出する方法としてAMG (Autometallography)法を用いたプロトコールを確立し、マングース主要組織での水銀検出に成功した。これらの結果は臓器ホモジネートを用いた微量元素分析結果と照合して妥当な結果であった。水銀の局在は、肝臓では血液の流れに沿って蓄積していく傾向（小葉中心性）が顕らかであり、腎では物質の再吸収に関与する近位尿細管に認められた。これらの結果は水銀代謝が行われているまさに“現場”を捉えたものであり、水銀蓄積・代謝機構解明へのストラテジー立案に貢献するものである。また、AMG法は検索対象の種を問わない。則ち、本手法はマングースに限ったものではなく、水銀の高濃度蓄積が報告されている他の動物（海鳥類、クジラ等）などでも水銀の組織内局在を検出することが可能であり、他分野の研究への応用が期待できる。

[キーワード] マングース, 初代細胞培養技術, 肝細胞, 水銀, 組織学的検索

## 1. はじめに

これまで海鳥類やクジラ類で認められている水銀の高濃度蓄積および解毒機構（代謝）解明は半世紀近く未解明のままだった。その理由のひとつとして、海鳥類やクジラ類では再現性のある実験的検証が困難なことがあげられる。近年、研究代表者らはマンダースに水銀の高濃度蓄積を見いだした<sup>1, 2)</sup>。マンダースは陸生哺乳類であり、海鳥類やクジラ類に比較して捕獲しやすいことから水銀蓄積および代謝機構を解明するモデルになりうると考えた。

マンダースを実験モデル動物として扱うには、少なくとも *in vivo* 実験が可能であるとともに、培養細胞を用いた再現性のある *in vitro* 実験が可能であることが望まれる。マウスやラットは実験動物としての歴史が古く、様々な実験手法が確立されているが<sup>3)</sup>、本研究ではこれらの手法をマンダースに応用し、水銀蓄積および代謝メカニズムの解明を目指した *in vitro* 実験系の確立が可能か否か、その可能性を検証することから始める。

マンダースでの病理組織像に関する論文は皆無である。組織学的検索を行う上で、現在は抗体を使った手法が主流であるが、マンダースに対する抗体は市販されていない。作製も可能ではあるが時間と労力、費用がかかる。そこで、我々は組織化学的手法を駆使し、マンダース主要臓器での病理組織学的検索を行うことにした。組織化学は検出原理が化学反応に基づいているので検索対象の種を問わない。また簡便、安価であり、得られた結果に対する信頼度も大きい。

水銀の組織内局在にいたっては検出法に関する論文はあるものの、野生動物での検出に応用した例は報告がない。水銀蓄積・代謝の現場を組織学的に検索して得られる情報は、そのメカニズムを検証する手段を考案するうえで重要な知見となる。我々は *in vitro* 実験系の確立を試みるのと並行して、マンダース主要臓器での病理組織学的検索、水銀検出を試みる。

マンダースをモデルとして水銀蓄積・代謝機構解明の実験的手法、とりわけ検索対象の種を問わない手法を確立することは、水銀の高濃度蓄積が報告されている他の動物（海鳥類、クジラ等）などへの応用範囲も広い。近年重大な関心をもたれている水銀蓄積をキーワードとする他分野の研究へも大きく貢献すると考えられる。

## 2. 研究目的

本研究の目的は以下の3点である。

- (1) マンダース肝細胞の初代細胞培養技術を確立する。
- (2) マンダース主要臓器の病理組織学的検索を行う。
- (3) マンダース主要臓器での水銀の組織局在を明らかにする。

### 3. 研究方法

#### (1) マングース肝臓からの肝細胞分離法の検討

ラットで報告された肝臓からの肝細胞を分離する方法<sup>3)</sup>を参考に、マングース肝臓から肝細胞の分離を試みた。

##### 1) 準備

- ソムノペンチル（麻酔用注射液，動物用）（共立製薬）
- 5%ヒビテン液（大日本住友製薬）
- ツベルクリン用注射針付きシリンジ（26Gx1/2”，1ml）（テルモ）
- 翼状針（21G，19G）（テルモ）
- 注射針（18G）（テルモ）
- シリンジ（50ml）（テルモ）
- 解剖用具一式（ハサミ，解剖台，鉗子など）
- 0.4%トリパンプルー液（GIBCO）
- コニカルチューブ（50ml）（イワキ）

##### 2) 緩衝液および灌流液の調製

0.5%ヒビテン液；5%ヒビテン液を水にて希釈する。

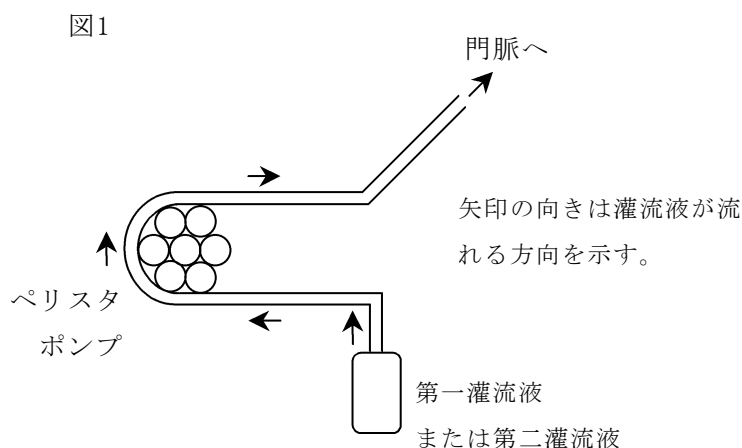
Hanks緩衝液；NaCl（120 g/L）、KCl（6 g/L）、 $2\text{H}_2\text{O}\cdot\text{NaH}_2\text{PO}_4$ （1.168 g/L）、 $7\text{H}_2\text{O}\cdot\text{Na}_2\text{HPO}_4$ （2.265 g/L）、記載濃度になるよう調製し、オートクレーブ滅菌する。

第一灌流液；HEPES（2.38 g/L）、EGTA（0.19 g/L）、 $\text{NaHCO}_3$ （2.1 g/L）、グルコース（0.9 g/L）、Hanks緩衝液（67 mL/L）、記載濃度になるよう調製し、0.22  $\mu\text{m}$ フィルターにて濾過滅菌をする。

第二灌流液；1M  $\text{CaCl}_2$ （11.2 mL/L）、HEPES（2.38 g/L）、コラゲナーゼ タイプI（0.5 g/L：WAKO #034-10533）、トリプシンインヒビター（0.5 g/L：Sigma #T-6522）、 $\text{NaHCO}_3$ （2.1 g/L）、Hanks緩衝液（67 mL/L）、記載濃度になるよう調製し、0.22  $\mu\text{m}$ フィルターにて濾過滅菌をする。

##### 3) 灌流装置の設定

灌流液、ペリスタポンプを以下に示す図1のように設定する。



## 4) 手順

ジャワマングースの全身麻酔

↓ソムノペンチルをツベルクリン用注射針付きリンジで腹腔内に投与する (35 mg/kg)。

↓麻酔効果の確認、体長、体重、尾長、歯列状態の計測、観察を行う。

消毒

↓0.5%ヒビテン液にマングースを浸漬、解剖台に固定する。

↓ハサミで腹壁を切開し、門脈（肝臓にはいる静脈）を明示する。

↓門脈に翼状針（21Gまたは19G）を挿入し鉗子にて固定する。

灌流

↓翼状針（チューブ側）を灌流装置に接続し、40℃に温めた第一灌流液を流す（10 mL/分）。

↓肝臓の色調に注意して、灌流されているかどうか確認する。灌流されていれば、肝臓から血液が抜けて白っぽくなってくる。

↓灌流確認後、下大静脈を切断し、さらに約10分間第一灌流液を灌流する。

↓ペリスタポンプを一旦停止させ、40℃に温めた第二灌流液（10 mL/分）に交換し、10～15分間灌流する。

肝臓の摘出

↓肝臓をハサミで切り離し、50 mLコニカルチューブに移す。

肝細胞の分離

↓第二灌流液、10 mLを加え、18G注射針を付けた50 mLシリンジ用いて肝臓をホモジナイズした後、遠沈を行う（50g、2分、4℃）。

↓上清を除去し、Hanks緩衝液（4℃）10 mLを加え、攪拌した後に再び遠沈を行う。

↓ホモジナイズと遠沈の操作をさらに2回繰り返す

細胞数計測

：0.4%トリパンブルー液で回収細胞の一部を染色、回収細胞数を計測し、細胞の viabilityを観察する。

## (2) 初代培養肝細胞の至適培地の検討

## 1) 準備

10 cmコラーゲンコートディッシュ（イワキ、#4020-010）

CO<sub>2</sub>インキュベータ

## 2) 細胞培地とその調製

DMEM(SIGMA, #D5796)

RPMI1640(SIGMA, #R8758)

Williams' medium E(SIGMA, #W4128)

上記3種類の細胞培地に以下の試薬を記載濃度になるように加える。

胎児牛血清（10%：GIBCO #12483-020 Lot 356833）、インスリン（1 μM: Sigma

#16634)、デキサメタゾン (1  $\mu$ M: Sigma #D4902)、カナマイシン (100  $\mu$ g/mL: Sigma #K1876) ファンギゾン (0.5  $\mu$ g/mL: GIBCO #15290-018)

### 3) 手順

肝臓より分離した細胞、 $2.5 \times 10^6$ 個を10 cmコラーゲンコートディッシュに播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で3日間培養した。1日毎に顕微鏡下にて細胞形態、細胞のviabilityを観察し、3種類の培地のうちで至適なものを決定した。

### (3) マングース主要臓器の病理組織学的検索

マングースの主要臓器 (肺、肝、腎、副腎、脾、リンパ節、唾液腺) について、ヘマトキシリン-エオジン染色、PAS染色、コッサ渡銀染色、ベルリンブルー染色標本を作製、病理組織学的観察を行った。

#### 1) 準備

20%マイルドホルム (組織固定液) (和光#136-10041)  
 エタノール (特級) (和光#057-00451)  
 キシレン (Nacarai#36612-93)  
 パラフィン (MERK)  
 ミクロトーム (SAKURA)  
 ガラススライド (MATSUNAMI#S-2215)  
 カバーガラス (マツナミ)  
 エンテランニュー (封入材) (MERCK#1.07961.0100)  
 マイヤーヘマトキシリン液 (武藤化学#3000)  
 エオシナルコール1%液 (武藤化学#3202)  
 1%過ヨード酸液 (武藤化学#4091)  
 シッフ試薬 (武藤化学#4092)  
 亜硫酸水 (武藤化学#4094)  
 5%硝酸銀水 (武藤化学#ツツツX)  
 5%チオ硫酸ナトリウム (武藤化学#4039)  
 ケルンエヒトロート (武藤化学#4087)  
 ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム (和光#161-03742)  
 塩酸 (和光#080-01066)

#### 2) 試薬の調製

上昇系エタノール (組織用) ; エタノール (特級) を蒸留水にて希釈、各濃度のエタノール溶液を各500 mL調製する。

上昇系エタノール (脱パラ用) ; エタノール (特級) を蒸留水にて希釈、各濃度のエタノール溶液を各50 mL調製する。

下降系エタノール ; エタノール (特級) を蒸留水にて希釈、各濃度のエタノール溶液を各50 mL調製する。

1%塩酸アルコール；70% EtOH 50 mLと濃塩酸0.5 mLを混合する。

10%フェロシアン化/カリウム20%HCl等量混合液

；ヘキサシアノ鉄（II）酸カリウム、HCl、蒸留水にて調製する。

### 3) 薄切標本の作製手順

↓ マンゲース主要臓器（肺、肝、腎、副腎、脾、リンパ節、唾液腺）を摘出する。

↓ 20%マイルドホルムにて組織を固定（室温、一晚）する。

↓ アルコール上昇系（70% $\times$ 1回、80% $\times$ 1回、90% $\times$ 1回、100% $\times$ 3回、各2時間震盪）にて脱水を行う。

↓ キシレン透徹（キシレン $\times$ 3回、キシレン/パラフィン $\times$ 1回、パラフィン $\times$ 2回、各2時間震盪）を行う。

↓ パラフィンに包埋する。

↓ ミクロトームを用いて厚さ4~6  $\mu$ mの薄切標本をガラススライドに伸展させ、乾燥する。

染色（以下に記した各々のプロトコールに従う）

### 4) 染色（共通過程）

#### a. 染色前過程

脱パラおよび水和

↓ ガラススライドに伸展させたパラフィン薄切標本をキシレンに通し（キシレン $\times$ 3回、各5分）、パラフィンを溶解する。

↓ アルコール下降系（100% $\times$ 2回、90% $\times$ 1回、80% $\times$ 1回、70% $\times$ 1回、各5分）にて水和する。

↓ 各染色過程へ

#### b. 染色後過程

脱水およびキシレン透徹

↓ アルコール上昇系（70% $\times$ 1回、80% $\times$ 1回、90% $\times$ 1回、100% $\times$ 2回、各5分）にて脱水

↓ キシレン透徹（キシレン $\times$ 3回、各5分）

エンテランニューにて封入する。

### 5) 各種染色

#### a. ヘマトキシリン-エオジン染色

脱パラ

↓ 水洗（軽く）

↓ ヘマトキシリン液（30分）

↓ 水洗（軽く）

↓ 1%塩酸アルコール（分別）

↓ 流水水洗（20分）

↓ 0.5%エオジン液（5分）

↓ 流水水洗（軽く）

脱水、透徹、封入

## b. PAS染色

脱パラ  
↓蒸留水（素早く）  
↓1%過ヨード酸液（10分）  
↓流水水洗（1分）  
↓蒸留水 I（素早く）  
↓蒸留水 II（素早く）  
↓シッフ試薬（15分）  
↓亜硫酸水 I（2分）  
↓亜硫酸水 II（2分）  
↓亜硫酸水 III（2分）  
↓流水（5分）  
↓蒸留水（軽く）  
↓ヘマトキシリン液（4分）  
↓流水水洗（5分）  
脱水、透徹、封入

## c. コッサ渡銀染色

脱パラ  
↓流水水洗（5分）  
↓蒸留水（軽く）  
↓5%硝酸銀水（間接/直射日光）10分-1時間  
↓蒸留水（軽く）  
↓5%チオ硫酸ナトリウム（3分）  
↓水洗（5分）  
↓ケルンエヒトロート（2-3分）  
↓蒸留水（軽く）  
↓蒸留水（軽く）  
脱水、透徹、封入

## d. ベルリンブルー染色（Gomori法）

脱パラ  
↓蒸留水（軽く）  
↓蒸留水（軽く）  
↓10%フェロシアン化カリウム（15-30分）  
↓蒸留水（軽く）  
↓蒸留水（軽く）  
↓ケルンエヒトロート（2-3分）  
↓蒸留水（軽く）

↓蒸留水（軽く）  
脱水、透徹、封入

#### （４）生体内水銀の組織内局在の証明

水銀の局在を組織学的に検出する方法としてAMG（Autometallography）法<sup>4)</sup>を用いたプロトコールを確立し、マングース主要臓器での組織学的な水銀検出を行った。

##### 1) 準備

PLL, 0.01% solution (poly-L lysine, SIGMA #P4707)  
滅菌水 (SIGMA #W3500)  
Sodium thiosulphate (WAKO #197-03605)  
Potassium ferricyanide (Nacarai #28605-85)  
Potassium cyanide (Nacarai #28529-82)  
1.0 N HCl (Nacaeai#373-14)  
Silver acetate (Nacarai #31004-42)  
Citric acid 1・H<sub>2</sub>O (Nacarai #09106-15)  
Trisodium citrate 2・H<sub>2</sub>O (Nacarai #191-01785)  
Hydroquinone (Nacarai #18415-72)  
Gelatin (SIGMA #1890, 100g)  
20% Mildform (WAKO #136-10041)  
ケルンエヒトロート (武藤化学#4087)  
ソムノペンチル (麻酔用注射液, 動物用) (共立製薬)  
ツベルクリン用注射針付きシリンジ (26Gx1/2", 1 ml) (テルモ)  
19G注射針/50 mlシリンジ (テルモ)  
ガラスコップリンジャー  
スライドガラスホルダー  
解剖用具一式

##### 2) PLLスライドコーティング

0.001%PLL液 (0.01% PLLを滅菌水にて10倍希釈したもの)  
↓洗浄・乾燥させたスライドガラスをガラスコップリンジャーに入れオートクレーブ滅菌・乾燥  
(以下、クリーンベンチ内で滅菌操作)  
↓スライドガラスが入ったコップリンジャーに0.001%PLL液を容れる (〜35 mL)  
↓37℃、6-12時間  
↓スライドガラスを取り出し、滅菌水 (コップリンジャー使用) で2回、洗う。  
滅菌水 I : 2-3回上下する  
滅菌水 I : 2-3回上下する  
↓スライドガラスホルダーに立てて乾燥  
新しい滅菌ガラスコップリンジャーに移し4℃保存



## 3) 試薬の調製

10% Farmer液 (ガラス製品洗浄用)

; 10% Sodium thiosulphateと10% Potassium ferricyanideを9:1に混合

1% Farmer液(I) (薄切標本洗浄用)

; 10% Sodium thiosulphate及び10% Potassium ferricyanide、DDWを9:1:90に混合

1% Farmer液(II) (後処理用)

; DDW及び10% Sodium thiosulphate、10% potassium ferricyanideを90:9:1に混合

0.5% gelatin液 (薄切標本コーティング用)

; gelatin (0.5g)を滅菌水に溶解しフィルター(0.8 $\mu$ m)に通す

KCN水溶液 (2%、1%、0.5%)

0.1N HCl水溶液

Solution A (用事調製)

100 mg Silver acetate

50 mL 蒸留水

-----  
→フィルター(0.8  $\mu$ m)に通す

Citrate buffer、pH3.8 (4°Cで2-3週間保存可)

25.5 g Citric acid  $\cdot$  H<sub>2</sub>O

23.5 g Trisodium citrate  $\cdot$  2H<sub>2</sub>O

-----  
→citrate acid でpHを3.8に調整し、蒸留水で100 mLにメスアップする

Solution B ; 250 mg Hydroquinoneを50 mL citrate bufferに溶解する

Silver acetate developer ; solution A と solution Bを使用直前に等量混合する。

定着液 (再利用可) ; 5% sodium thiosulphate水溶液

## 4) Autometallography (AMG) 染色法

全身麻酔 (ソムノペンチルを腹腔内注射 (35 mg/kg) )

↓ 麻酔効果を確認した後、腹壁を切開

↓ 下大静脈より19G注射針/50 mLシリンジにて脱血

組織の固定 (20%マイルドホルム、1晩)

↓ パラフィン包埋

↓ 薄切標本作製 (5-6  $\mu$ m)

PLLコーティング済みガラススライドに薄切標本を伸展させる。

AMG染色前処理

↓ ガラススライドに伸展させた薄切標本を1%Farmer液(I)に浸す (10秒)

↓ 蒸留水I (軽く)

↓ 蒸留水II (軽く)

↓ さらに 0.5 % gelatinに浸す (10秒)

↓ 乾燥(42°C、一晩)

- ↓  
 脱パラ  
 ↓蒸留水（軽く）  
 分別用KCN または HCl処理（表1参照）  
 ↓蒸留水（軽く）  
 ↓銀反応（AMG development）  
 ↓26℃に温めたSilver acetate developerに前処理後の標本を浸け、暗室に静置  
 ↓26℃、50-53分  
 AMG染色後処理  
 ↓5% sodium thiosulphate水溶液に10分反応させる  
 ↓1% Farmer液(II)に浸す（10秒）  
 ↓流水水洗（3分）  
 ↓ケルンエヒトロートにて核染（2-3分）  
 ↓蒸留水（軽く）  
 ↓蒸留水（軽く）  
 脱水、透徹、封入

表1 重金属分別染色の至適条件

Metal	Reagents	Concentration	Exposure time
ZnS	HCl	0.1N	10min
ZnSe	KCN	1%	10 sec (dip 5 times)
Au	KCN	0.5%	1 min
BiS	KCN	1%	10 min
BiSe	KCN	can not be dissolved	
AgS	KCN	1%	30 min
AgSe	KCN	2%	30 min
HgS	KCN	can not be dissolved	
HgSe	KCN	can not be dissolved	

## 4. 結果・考察

### (1) マングース肝細胞分離法の検討

マウスやラットでは肝臓からの肝細胞分離方法がすでに報告されている<sup>3)</sup>。これらの報告をもとにマングース肝臓から肝細胞の分離を試みた。

マングースはラットよりも体の大きさに比して門脈が太かった。また捕獲マングースを実験にもちいているため、門脈の太さにばらつきが認められた。そこで、門脈に挿入する翼状針の太さをラットで用いられている23Gよりも太い、21Gおよび19Gを準備し、個体により選択して用いることで、灌流液の漏れを最小限に抑え、灌流効率を上げることができた(図2)。

灌流時間は肝臓の色調の変化、固さの変化を注意深く観察することが目安となった。灌流時間が短いと細胞回収効率は下がり、長くすると細胞のviabilityが落ちることが判明した。また、灌流が不十分の場合には、肝細胞に大量の赤血球の混入が認められることが分かった。

灌流効率は細胞回収率および細胞のviabilityを左右する重要な要因であり、迅速かつ正確に行わなければならないことが明らかとなった。

今後の課題として、赤血球の混入がなく毎回一定のviabilityをもった肝細胞を回収するため、技術の習熟が必要と考えられる。

### (2) 初代培養肝細胞の至適培地の検討

これまでに報告されている初代肝細胞の至適培地は、ラットではWilliams' medium E、マウスではDMEMであり、至適培地の選択には種特異性を考慮しなければならない。そこで、マングース初代肝細胞での至適培地を検討するにあたり、Williams' medium E、DMEMおよび、比較的多くの細胞に汎用されているRPMI1640を加えた3種類の培地でマングース初代肝細胞の細胞形態、細胞のviabilityを観察した。

回収した肝細胞 $2.5 \times 10^6$ 個を10 cmコラーゲンコートディッシュに播種し、1日目、2日目、3日目に顕微鏡下で観察した細胞の状態を表2にまとめる。播種後1日目、Williams' medium EおよびRPMI1640で培養した初代肝細胞のコラーゲンコートディッシュへの接着は良好であった。2日目、3日目になってもWilliams' medium Eで培養した初代肝細胞は大型で多角形を呈し、明瞭な核小体を有する円形の核が観察された。核は時に多核であり、生体内の肝細胞の形態に非常に良く似ていた。RPMI1640で培養した初代肝細胞は、2日目、3日目になるに従って細胞胞体が多角形から紡錘形に変化する傾向が顕著であった。また、一度接着した細胞のviabilityの低下が著しく、剥離するものも認められた。DMEMで培養した初代肝細胞は播種後1日目のコラーゲンコートディッシュへの接着は不良であり、細胞辺縁は丸みを帯びていた。接着性は2日目に増す傾向にあったが、3日目では細胞胞体が多角形から紡錘形に変化する傾向が顕著であった(表2、図3)。

以上の観察結果より、William's E培地で培養したマングース初代肝細胞が生体内の肝細胞の形態を非常に良く維持していることから、至適培地に決定した。

### (3) マングース主要臓器の病理組織学的検索

マングース主要臓器(肺、肝、腎、副腎、脾、リンパ節、唾液腺)を病理組織学的な見地から観察した。ヘマトキシリン-エオジン染色は全般的な組織観察に適した染色法である。また、PAS

染色はグリコーゲン顆粒を染色する方法で、グリコーゲン顆粒を胞体内に豊富に保有する肝細胞はPAS染色を施すことにより強い赤紫色を呈する。コッサ渡銀染色はカルシウムの沈着の部位を黒褐色に染色し、ベルリンブルー染色は鉄の沈着があれば青色に染色する。

ヘマトキシリン-エオジン染色による観察では、肝および腎に中等度の単核球浸潤、組織障害をともなった炎症性変化が認められた（図4A-D）。ヒトでは加齢に伴う変化として観察される、色素沈着と石灰沈着がそれぞれマンダースの肝と腎（図4E）で観察された。肝および肺、脾で鉄の沈着がみられた（図4F、G）。

研究代表者らにより、高濃度の水銀がマンダース肝および腎に蓄積していることが判明している<sup>1, 2)</sup>。水銀蓄積による肝および腎の組織変化についての報告（記載）は文献的に脳・神経組織以外ではほとんどなく、本解析で認められた炎症性変化と水銀の関連は明らかではないが、今後の検討課題である。

これらの染色法は組織化学に原理に基づく手法であり、とりわけPAS染色は肝細胞を証明するに足りる染色法である。結果（1）および（2）では細胞分離方法の原理と分離、培養された細胞の形態から初代培養細胞が肝細胞であると判定したが、今後さらにPAS染色により確認する予定である。

#### （4）生体内水銀の組織内局在の証明

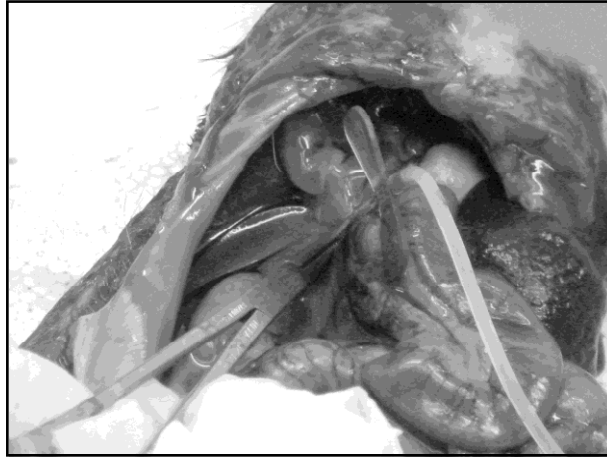
AMG (Autometallography)法は微量重金属の細胞内局在を組織学的に証明する方法として Danscherらにより改良が加えられてきた<sup>4)</sup>。彼らの論文を参考に、入手可能な試薬を用いたプロトコルを確立、染色条件を決定し、マンダース主要臓器（肺、肝、腎、脾）での検出を行った。

マンダース主要臓器でAMGを行ったところ、水銀蓄積は肝では小葉中心性（図5A-C）、腎では近位尿細管上皮内（図5D）に認められた。組織内での水銀分布は肝臓では血液の流れに沿って蓄積していく傾向（小葉中心性）が顕著であり、腎近位尿細管は物質の再吸収という機能を有することから、これらの知見は水銀代謝機構を考察する上で、重要な手がかりになると考えられた。また、マンダース肺および脾では組織学的に水銀の蓄積が認められておらず、これらの結果は研究協力者である宝来研究員による微量元素分析結果と照合して妥当な結果と考えられる<sup>1, 2)</sup>。

表2.初代培養肝細胞の至適培地の検討：細胞形態の経時的変化

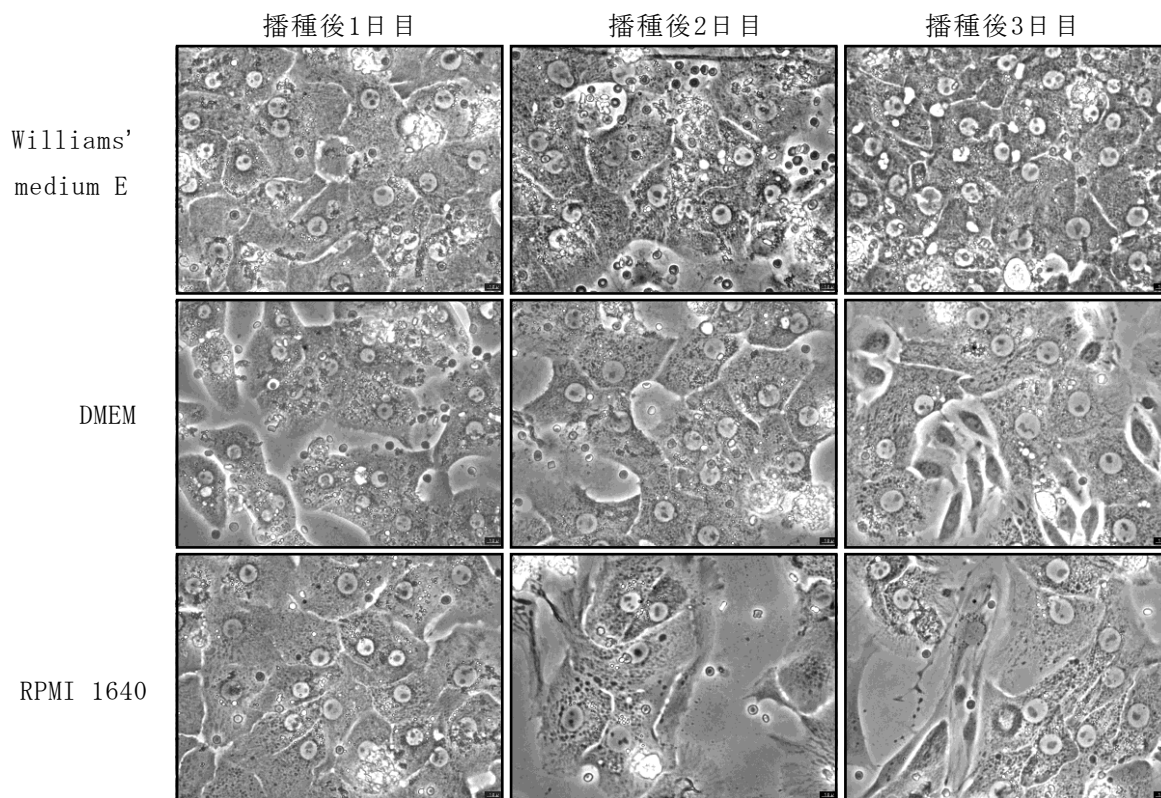
培地	播種後1日目 細胞接着性	播種後2日目 細胞生存/細胞形態	播種後3日目 細胞生存/細胞形態
Williams' medium E	良好	良好/多角形	良好/多角形
DMEM	やや不良	良好/多角形	不良/紡錘形に変化
RPMI1640	良好	不良/紡錘形に変化	不良/紡錘形に変化

図2 灌流



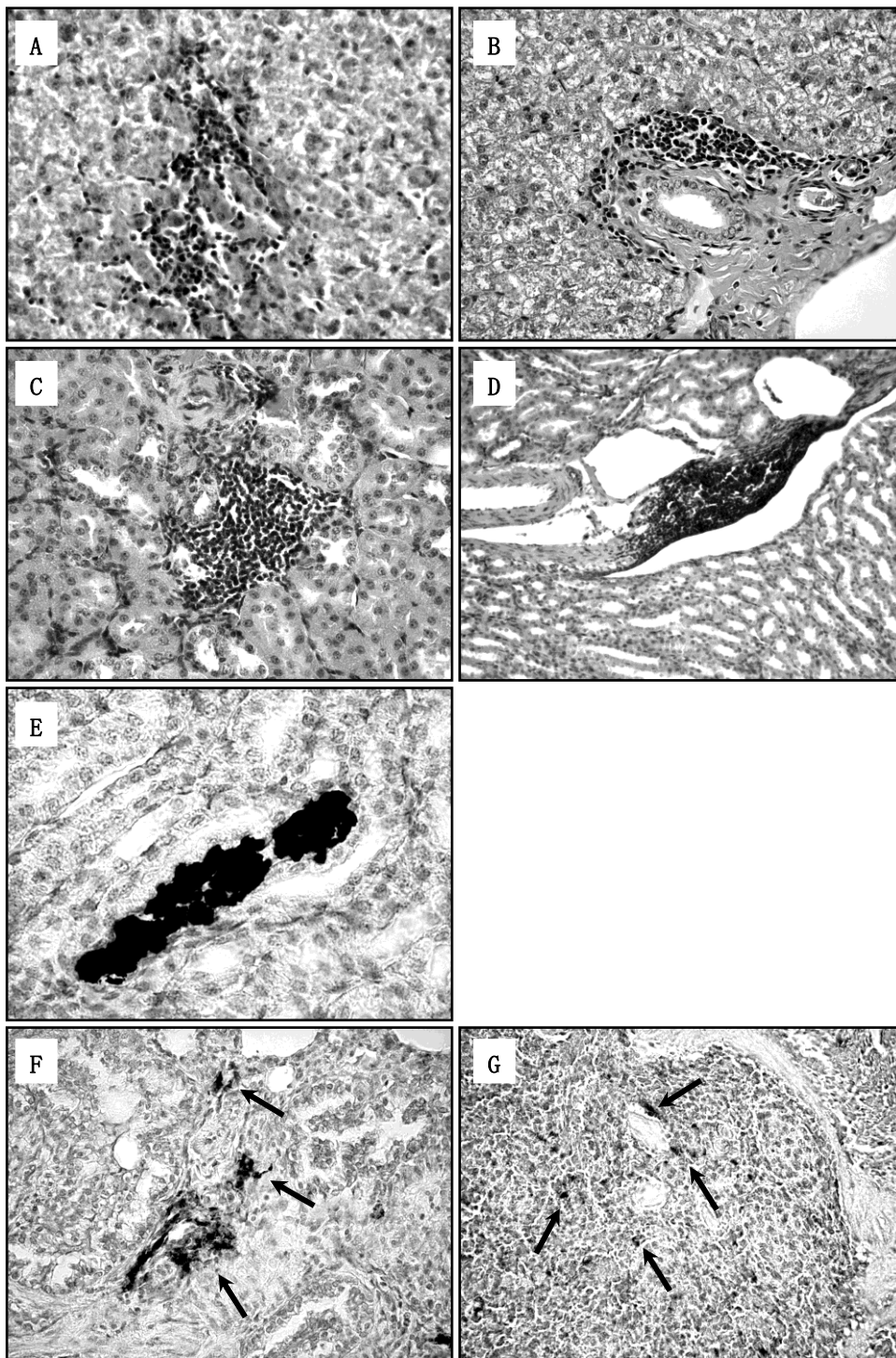
麻酔下のマングースを開腹、門脈に挿入した翼状針を鉗子で固定、灌流液を流している状態を示す。

図3 マンブース初代肝細胞培養：至適培地の検討



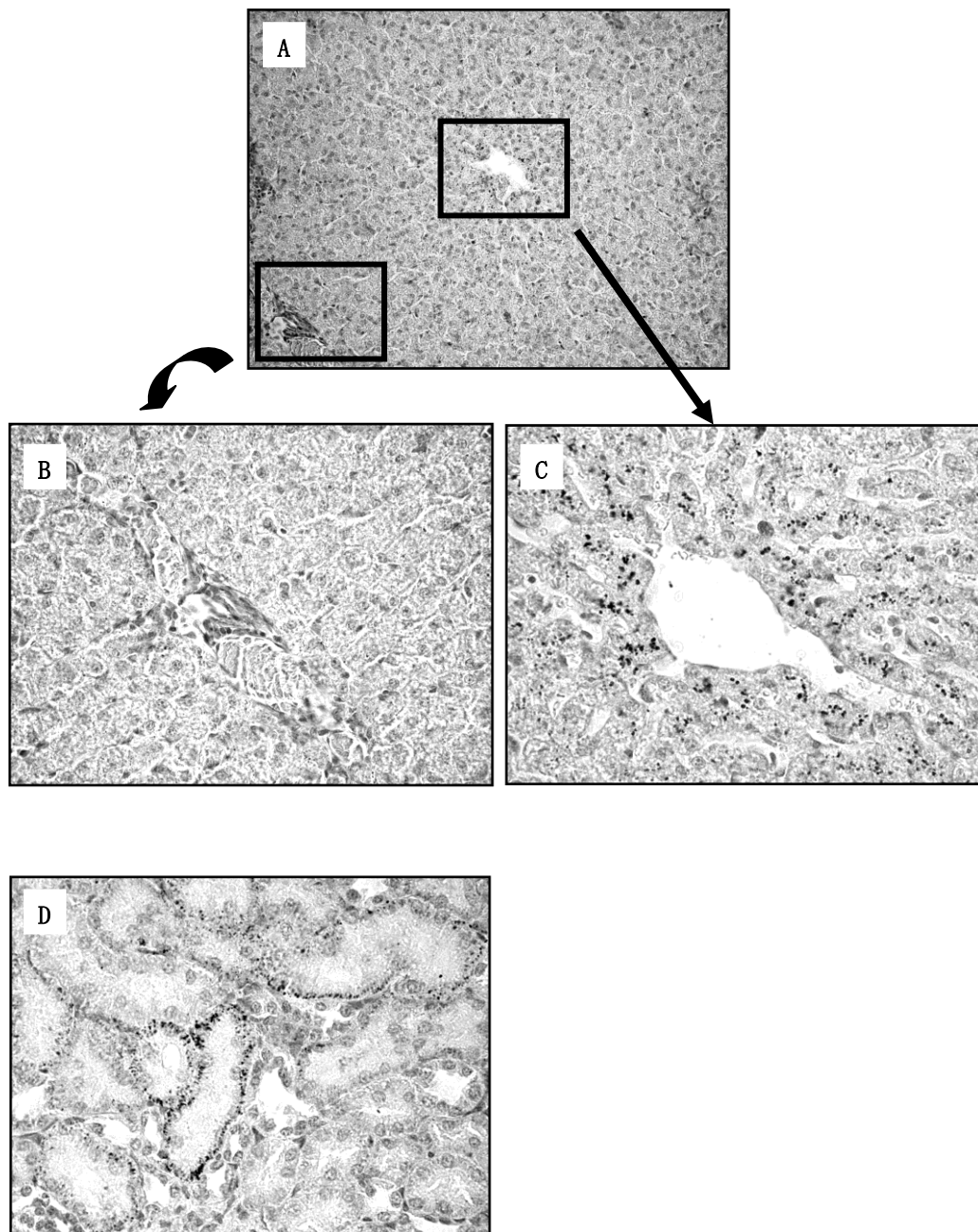
肝臓より肝細胞を分離、10 cmコラーゲンコートディッシュに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で3日間培養した時の顕微鏡写真（400倍で観察）を示す。Williams' medium Eで培養した初代肝細胞が、播種後1日目から細胞接着が良好で、播種後2日目、3日目での細胞形態は最も生体内の肝細胞を反映し、且つviabilityも高かった。

図4 マンゲース主要臓器の病理組織学的検索



マンゲース主要臓器の病理組織像を示す。(A、B)肝、および(C、D)腎における組織障害をともなった炎症性変化(ヘマトキシリン-エオジン染色)。組織内に黒い円形細胞(炎症性細胞)の集簇が認められる。(E)腎における石灰沈着(コッサ渡銀染色)。黒色に染色されている。(F)肺、および(G)脾における鉄の沈着(ベルリンブルー染色)。白黒画像では黒色に見える(矢印先端部)。

図5 生体内水銀の組織内局在 (AMG法)



(A) 肝小葉全体を示す (100倍で観察)。 (B) 小葉周辺部の拡大 (400倍で観察)。水銀の蓄積を認めない。 (C) 小葉中心部の拡大 (400倍で観察)。肝細胞内に水銀の蓄積を示す黒い顆粒状の物質が認められる。 (D) 物質の再吸収に関与する腎近位尿細管上皮内に水銀の蓄積を認める。



## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

捕獲動物の水銀蓄積量を測定するだけでは得られる知見は限られる。本研究により、水銀が高濃度に蓄積しているマングース肝細胞の培養が可能になったことで、水銀蓄積・代謝メカニズムに関する実験的な検証ができるようになった。また、実際に水銀が蓄積している組織の状態を把握し、組織内局在（標的細胞）を明らかにできたことで、標的細胞の有する生物学的、生理学的な機能に基づいた水銀蓄積・代謝機序解析が可能となった。さらに、本研究で使用した組織化学およびAMG法は検索対象の種を問わないため、世界各地で問題となっている多種の動物における水銀検出に応用することができる。

### (2) 地球環境政策への貢献

インド原産のジャワマングースは、ハブ退治を目的として沖縄本島および奄美大島導入されたが、実際はルリカケスやアマミノクロウサギ、ヤンバルクイナなどの島固有の希少種を捕食する“侵略的”外来生物と位置づけられる。危機的状況にある希少種の存続のため、ジャワマングース駆除に向けて様々な対策がなされてきたが十分な状況とはいえず、種特異的な駆除法の開発が望まれている。ジャワマングースに高濃度の水銀が蓄積・代謝する機構を明らかにすることで、水銀を利用したジャワマングース特異的、且つ効率的な駆除法の開発につながると考える。

一方、海生動物には比較的高濃度の水銀が含まれること、とりわけ高次栄養段階である鯨類や鰐脚類の中には極めて高濃度の水銀を蓄積する種が存在することは周知の事実であり、食物連鎖の頂点にある我々“ヒト”の“食の安全”も脅かされている。しかしながら、これら水銀を高蓄積する海生動物がどのような機序で水銀を蓄積していくのか依然不明な点が多い。ジャワマングースで得られる実験的検証に立脚した知見は、海生動物を含め高濃度の水銀を蓄積する動物が有する水銀代謝機構を解明する突破口になると考えられる。さらに水銀蓄積・代謝経路が判明すれば、生態系におけるハイリスクアニマルの特定と水銀に対する防御対策に有用な知見がもたらされ、生態系の保全に貢献することが期待される。

## 6. 引用文献

- 1) S. Horai, M. Minagawa, H. Ozaki, I. Watanabe, Y. Takeda, K. Yamada, T. Ando, S. Akiba, S. Abe and K. Kuno (2006) Accumulation of Hg and other heavy metals in the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) captured on Amamioshima Island, Japan. *Chemosphere* 65:657-665
- 2) S. Horai, T. Furukawa, T. Ando, S. Akiba, Y. Takeda, K. Yamada, K. Kuno, S. Abe and I. Watanabe (2008) Subcellular distribution and potential detoxification mechanisms of mercury in the liver of the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) in Amamioshima Island, Japan. *Environ Toxicol Chem* 27:1354-1360
- 3) MN. Berry and DS. Friend (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43:506-520.
- 4) G. Danscher and M. Stoltenberg (2006) Silver enhancement of quantum dots resulting from

(1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur / zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 41:57-139

## 7. 国際共同研究等の状況

なし

## 8. 研究成果の発表等

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

なし

<その他誌上発表（査読なし）>

なし

### (2) 口頭発表（学会）

1) S. Horai, T. Furukawa, T. Kaname, K. Yanagi, M. Yamamoto, G. Ogura, I. Watanabe, S. Abe and S. Tanabe: CSIAM 2008 International Symposium on Control Strategy of Invasive Alien Mammals, Okinawa, Japan, 2008, “Is specific mercury accumulation features useful to fine a measure for controlling the population of Javan mongoose?”

### (3) 出願特許

なし

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

### (5) マスコミ等への公表・報道等

なし

### (6) その他

なし