

氏名(本籍)	中島幹夫(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第422号
学位授与年月日	平成21年2月23日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	インジウムの発生毒性に関する研究
論文審査委員	(主査) 有嶋和義 (副査) 山本雅子 浅利昌男 滝沢達也

論文内容の要旨

インジウムは周期律表のⅢbに属する金属で、産業的には金属の表面塗装、合金あるいはガラスの製造等に長期にわたって使用されてきた (Venugopal & Luckey, 1978) が、近年ではマイクロエレクトロニクス産業で多用されるようになり (Lewis, 1986)、レアメタルであることから液晶パネルの透明電導膜等からのリサイクル技術の開発が求められており、その詳細な安全性評価が必要である。インジウムを含む化合物は、実験動物において血液毒性、肺、肝臓、腎臓および心臓等に炎症性的変化や組織変性をきたすことが報告されている (McCord et al., 1942, Castronovo & Wagner, 1971)。しかしながら、インジウムの発生毒性に関する情報は極めて少なく、催奇形性の有無については明確でない。妊娠ハムスターにおいては、妊娠8日に硝酸インジウムを単回静脈内投与した場合、0.5 mg/kg以上の投与量において、胚・胎児死亡率および胎児の外表奇形発生率の増加が認められている (Ferm & Carpenter, 1970)。一方、妊娠マウスにおいては、妊娠6～15日に塩化インジウムを反復経口投与すると、150 mg/kg以上の投与量において、胚・胎児死亡率の増加が認められているが、催奇形性は報告されていない (Chapin et al., 1995)。ハムスターとマウスにおける実験結果の相違は、動物種差による感受性の違いによるものか、あるいは実験条件の違い (投与経路、投与期間および硝酸インジウムと塩化インジウムの違い) によるものか明らかではない。また、インジウムを含む化合物のラットに対する催奇形性に関する報告は、これまでにない。

そこで、本論文ではインジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について詳細に検討した。まず、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無をラットを用いて検討した。次に、ラット全胚培養実験およびトキシコキネティクス実験により、インジウムの曝露濃度、曝露時間と発生毒性発現との関連を調べた。次に、ラットおよびマウスを用いてインジウムの発生毒性、特に催奇形性の動物種差について検討した。さらに、母体へのインジウム投与により誘発されるラット胎児の骨格ならびに尾

部奇形の発現機序について検討した。なお、本論文ではインジウムとして塩化インジウム4水和物を使用した。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

第1章では、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠9日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠20日に胎子の発育ならびに形態を調べた。その結果、インジウムはラットに対して胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示した。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。静脈内単回投与により奇形を誘発するインジウムの投与量は0.4 mg/kgであり、主に尾部および指の外表奇形が認められた。一方、300 mg/kgを経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが、その数は僅か（低頻度）であった。すなわち、インジウムの経口投与は、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことが明らかとなった。

第2章では、ラット全胚培養実験系およびトキシコキネティクス実験系を用いて、インジウムの発生毒性について調べた。ラット全胚培養実験では、インジウムは25～50 μ Mの濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存して胚毒性（胚致死作用、胚発育抑制作用）を示した。トキシコキネティクス実験における母体血清中のインジウム濃度は、ラット全胚培養実験で毒性のみられた25～50 μ Mより300 mg/kgの経口投与では低く、0.4 mg/kgを静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は55 μ Mであった。すなわち、*in vitro*で明らかに発生毒性を示す濃度は、発生毒性を示す*in vivo*の母体血清中濃度とよく一致していた。以上のことから、インジウムの発生毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用であることが示唆された。総曝露量（曝露濃度×曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により依存すると判断された。すなわち、インジウムの胚毒性が曝露濃度により強く依存していることから、第1章において明らかにした静脈内投与時と経口投与時のインジウムにおける発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものであると推論された。

第3章では、ラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性に種差があるか否かについて検討した。ラットでは0.4 mg/kgのインジウムを妊娠9、10または11日に単回静脈内投与し、妊娠20日に胎子を観察した。マウスでは0.8および1.6 mg/kgのインジウムを妊娠7、8または9日に単回静脈内投与し、妊娠18日に胎子を観察した。その結果、ラットでは胚・胎子死亡が21.2～35.2%、外表奇形（主に尾の奇形）が60.9～99.0%出現し（対照群は4.1および0%）、第1章の実験結果が再現された。一方、マウスでは胚・胎子死亡が0.8 mg/kg投与で9.0～19.5%、1.6 mg/kg投与で36.9～100%出現し（対照群は4.8%）、インジウム投与量に依存して胚・胎子死亡が増加したが、胎子外表奇形は殆ど観察されなかった（0～1.5%）。以上の結果から、器官形成期に投与されたインジウムは、ラット及びマウスに対して胚・胎子毒性（胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用）を及ぼすことから、両者はイ

ンジウムに対して感受性を有するが、インジウムの催奇形性（胎子の外表奇形誘発作用）に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低いことが明らかになった。

第4章では、インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序を検討するために、妊娠10日のラットにインジウムを静脈内投与して、妊娠21日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。妊娠10日ラットへインジウム0.3 mg/kgを投与すると、胎子の骨および軟骨の著しい形態異常が誘発された。中軸骨格の奇形は軟骨の奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえ、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆された。

第5章では、*in vitro*および*in vivo*実験により、インジウムによるラット胎子尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo*実験では0.4 mg/kgのインジウムを妊娠10日のラットに静脈内投与し、妊娠11、12または13日に胚を観察した。*in vitro*実験では妊娠10日のラット胚を50 μ Mのインジウムを含むラット血清で24時間培養あるいは、その後インジウムを含まない血清でさらに24時間培養した。*in vivo*実験ではインジウム投与群において尾部の低形成が胎齢11日から認められ、また、胎齢11日胚において尾芽にニールブルー陽性細胞が認められた。この所見は*in vitro*実験で再現された。培養24時間後の胚（胎齢11日に相当）の尾部にアポトーシス（TUNEL陽性細胞）が確認され、48時間後（胎齢12日に相当）に尾部の発育阻害が認められた。従って、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された。

第6章では、妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠9日のラットに0.2 mg/kgあるいは0.4 mg/kgのインジウムを静脈内投与し、妊娠17および19日の胎子尾部におけるBMP-4（Bone Morphological Protein-4）mRNAの発現を調べた。胎齢17日においてBMP-4 mRNA発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、インジウム投与は、尾部におけるBMP-4 mRNA発現量を減少させたと考えられた。また、BMP-4 mRNA発現量は、対照群と0.2 mg/kg群との間では有意差はなく、0.2 mg/kg投与群と0.4 mg/kg投与群との間の発現量に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部のBMP-4 mRNA発現を阻害するインジウムの投与量は0.4 mg/kg以上であることが明らかとなった。しかし、胎齢19日の0.4 mg/kg群の胎子尾部におけるBMP-4 mRNA発現量は、対照群の値と比較して有意に増加していた。インジウム投与群の尾部のBMP-4 mRNA発現量が過剰になるということは、胎齢17日では抑制されていた骨形成が、胎齢19日ではBMP-4 mRNAの発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が示唆された。

以上の結果から、インジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について

- ・インジウムはラットにおいて、胚・胎児致死作用、胎児発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示す、
- ・インジウムの発生毒性は、受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用である、
- ・インジウムの胚致死作用および胚発育抑制作用は、曝露時間に比べて曝露濃度により依存することが示唆される、
- ・インジウムはマウスに対してもラットと同様な胚・胎児致死作用および胎児発育抑制作用を及ぼすが、催奇形性に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低い、
- ・インジウムにより誘発される胎児軟骨の形成異常がラット胎児骨格奇形発現の一因となっていることが示唆される、
- ・インジウムにより誘発されるラット胎児尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆される、
- ・妊娠9日ラットへ催奇形性量のインジウムを投与すると、胎齢17日の胎児尾部におけるBMP-4 mRNA発現が阻害されたことから、BMP-4 mRNAは尾部奇形発現に関連する因子である可能性が示唆される、

ことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

インジウムは周期律表のⅢbに属する金属で、産業的には金属の表面塗装、合金あるいはガラスの製造等に長期にわたって使用されてきた（Venugopal & Luckey, 1978）が、近年ではマイクロエレクトロニクス産業で多用されるようになり（Lewis, 1986）、レアメタルであることから液晶パネルの透明電導膜等からのリサイクル技術の開発が求められており、その詳細な安全性評価が必要である。インジウムを含む化合物は、実験動物において血液毒性、肺、肝臓、腎臓および心臓等に炎症性的変化や組織変性をきたすことが報告されている（McCord et al., 1942, Castronovo & Wagner, 1971）。しかしながら、インジウムの発生毒性に関する情報は極めて少なく、催奇形性の有無については明確でない。妊娠ハムスターにおいては、妊娠8日に硝酸インジウムを単回静脈内投与した場合、0.5 mg/kg以上の投与量において、胚・胎児死亡率および胎児の外表奇形発生率の増加が認められている（Ferm & Carpenter, 1970）。一方、妊娠マウスにおいては、妊娠6～15日に塩化インジウムを反復経口投与すると、150 mg/kg以上の投与量において、胚・胎児死亡率の増加が認められているが、催奇形性は報告されていない（Chapin et al., 1995）。ハムスターとマウスにおける実験結果の相違は、動物種差による感受性の違いによるものか、あるいは実験条件の違い（投与経路、投与期間および硝酸インジウムと塩化インジウムの違い）によるものか明らかではない。また、インジウムを含む化合物のラットに対する催奇形性に関する報告は、これまでにない。

そこで、本論文ではインジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について詳細に検討した。本

論文は6章からなっている。まず、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無をラットを用いて検討した。次に、ラット全胚培養実験およびトキシコキネティクス実験により、インジウムの曝露濃度、曝露時間と発生毒性発現との関連を調べた。次に、ラットおよびマウスを用いてインジウムの発生毒性、特に催奇形性の動物種差について検討した。さらに、母体へのインジウム投与により誘発されるラット胎子の骨格ならびに尾部奇形の発現機序について検討した。なお、本論文ではインジウムとして塩化インジウム4水和物を使用した。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

第1章では、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠9日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠20日に胎子の発育ならびに形態を調べた。その結果、インジウムはラットに対して胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示した。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。静脈内単回投与により奇形を誘発するインジウムの投与量は0.4 mg/kgであり、主に尾部および指の外表奇形が認められた。一方、300 mg/kgを経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが、その数は僅か（低頻度）であった。すなわち、インジウムの経口投与は、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことが明らかであるとしている。

第2章では、ラット全胚培養実験系およびトキシコキネティクス実験系を用いて、インジウムの発生毒性について調べた。ラット全胚培養実験では、インジウムは25～50 μ Mの濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存して胚毒性（胚致死作用、胚発育抑制作用）を示した。トキシコキネティクス実験における母体血清中のインジウム濃度は、ラット全胚培養実験で毒性のみられた25～50 μ Mより300 mg/kgの経口投与では低く、0.4 mg/kgを静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は55 μ Mであった。すなわち、*in vitro*で明らかに発生毒性を示す濃度は、発生毒性を示す*in vivo*の母体血清中濃度とよく一致していた。以上のことから、インジウムの発生毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用であることが示唆された。総曝露量（曝露濃度×曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により依存すると判断された。すなわち、インジウムの胚毒性が曝露濃度により強く依存していることから、第1章において明らかにした静脈内投与時と経口投与時のインジウムにおける発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものであると推論している。

第3章では、ラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性に種差があるか否かについて検討した。ラットでは0.4 mg/kgのインジウムを妊娠9、10または11日に単回静脈内投与し、妊娠20日に胎子を観察した。マウスでは0.8および1.6 mg/kgのインジウムを妊娠7、8または9日に単回静脈内投与し、妊娠18日に胎子を観察した。その結果、ラットでは胚・胎子死亡が21.2～35.2%、外表奇形

(主に尾の奇形)が60.9～99.0%出現し(対照群は4.1および0%)、第1章の実験結果が再現された。一方、マウスでは胚・胎子死亡が0.8 mg/kg投与で9.0～19.5%、1.6 mg/kg投与で36.9～100%出現し(対照群は4.8%)、インジウム投与量に依存して胚・胎子死亡が増加したが、胎子外表奇形は殆ど観察されなかった(0～1.5%)。以上の結果から、器官形成期に投与されたインジウムは、ラット及びマウスに対して胚・胎子毒性(胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用)を及ぼすことから、両者はインジウムに対して感受性を有するが、インジウムの催奇形性(胎子の外表奇形誘発作用)に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低いことが明らかになったとしている。

第4章では、インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序を検討するために、妊娠10日のラットにインジウムを静脈内投与して、妊娠21日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。妊娠10日ラットへインジウム0.3 mg/kgを投与すると、胎子の骨および軟骨の著しい形態異常が誘発された。中軸骨格の奇形は軟骨の奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえると、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆されたとしている。

第5章では、*in vitro*および*in vivo*実験により、インジウムによるラット胎子尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo*実験では0.4 mg/kgのインジウムを妊娠10日のラットに静脈内投与し、妊娠11、12または13日に胚を観察した。*in vitro*実験では妊娠10日のラット胚を50 μ Mのインジウムを含むラット血清で24時間培養あるいは、その後インジウムを含まない血清でさらに24時間培養した。*in vivo*実験ではインジウム投与群において尾部の低形成が胎齢11日から認められ、また、胎齢11日胚において尾芽にナイルブルー陽性細胞が認められた。この所見は*in vitro*実験で再現された。培養24時間後の胚(胎齢11日に相当)の尾部にアポトーシス(TUNEL陽性細胞)が確認され、48時間後(胎齢12日に相当)に尾部の発育阻害が認められた。従って、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形(曲尾、短尾、無尾)は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆されたとしている。

第6章では、妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠9日のラットに0.2 mg/kgあるいは0.4 mg/kgのインジウムを静脈内投与し、妊娠17および19日の胎子尾部におけるBMP-4(Bone Morphological Protein-4) mRNAの発現を調べた。胎齢17日においてBMP-4 mRNA発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、インジウム投与は、尾部におけるBMP-4 mRNA発現量を減少させたと考えられた。また、BMP-4 mRNA発現量は、対照群と0.2 mg/kg群との間では有意差はなく、0.2 mg/kg投与群と0.4 mg/kg投与群との間の発現量に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部の

BMP-4 mRNA発現を阻害するインジウムの投与量は0.4 mg/kg以上であることが明らかとなった。しかし、胎齢19日の0.4 mg/kg群の胎児尾部におけるBMP-4 mRNA発現量は、対照群の値と比較して有意に増加していた。インジウム投与群の尾部のBMP-4 mRNA発現量が過剰になるということは、胎齢17日では抑制されていた骨形成が、胎齢19日ではBMP-4 mRNAの発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が示唆されたとしている。

以上の結果から、インジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について

- ・インジウムはラットにおいて、胚・胎児致死作用、胎児発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示す、
- ・インジウムの発生毒性は、受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用である、
- ・インジウムの胚致死作用および胚発育抑制作用は、曝露時間に比べて曝露濃度により依存することが示唆される、
- ・インジウムはマウスに対してもラットと同様な胚・胎児致死作用および胎児発育抑制作用を及ぼすが、催奇形性に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低い、
- ・インジウムにより誘発される胎児軟骨の形成異常がラット胎児骨格奇形発現の一因となっていることが示唆される、
- ・インジウムにより誘発されるラット胎児尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆される、
- ・妊娠9日ラットへ催奇形性量のインジウムを投与すると、胎齢17日の胎児尾部におけるBMP-4 mRNA発現が阻害されたことから、BMP-4 mRNAは尾部奇形発現に関連する因子である可能性が示唆される、

ことが明かにした。

本研究で明らかとなった知見は、動物でのインジウムの発生毒性に関する基礎的なデータの蓄積に大きく貢献するものであり、博士（獣医学）を授与するのに相応しい業績であると判定した。