

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670175

研究課題名(和文)イタイイタイ病理組織中のカドミウム局在の可視化と周囲微小環境の病理学的解明

研究課題名(英文)Pathological analysis of cadmium and its microenvironment in patients with itai-itai disease

研究代表者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10293341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イタイイタイ病(イ病)は慢性カドミウム(Cd)中毒の極型と考えられるが、患者生体内のCd動態は不明な点が多く、どの細胞に蓄積し、周囲にどのような反応が起こるのかは不明である。我々はX線マイクロアナライザーを生体組織に応用し、富山大学に保存されているイ病患者の臓器を用いて、Cdの組織内局在を解析した。その結果、肝臓では門脈域周囲の肝細胞や、門脈域の結合織の一部に、腎臓では残存する近位尿細管や間質の一部に蓄積が見られた。膵臓ではランゲルハンス島に選択的に蓄積しており、それらはインスリン陽性の細胞が著減し、ほぼグルカゴン陽性の細胞で構成されており、Cd曝露による糖尿病発症が推測された。

研究成果の概要(英文)：Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal, which is widely dispersed in the environment. Itai-itai disease is well known as the most severe form of chronic Cd poisoning. We have examined the pathological findings of human samples in itai-itai disease, and reported the mechanism of kidney and bone failure. However it is not easy to detect cadmium localization on the tissue specimen. In present study, we performed EPMA (Electron Probe MicroAnalyser) analysis and succeeded to make clarify the cadmium toxicity in cellular level. Cadmium was accumulated in the hepatocytes, portal connective tissue in the liver, and residual proximal tubules and connective tissue in the kidney. In addition, cadmium was accumulated selectively in Langerhans islets of pancreas, surprisingly. Double immunostaining of insulin and glucagon suggested that marked deletion of beta cells in patients of itai-itai disease. we hypothesized that high dose cadmium exposure may be a risk of diabetes.

研究分野：実験病理学

キーワード：重金属 カドミウム X線マイクロアナライザー イタイイタイ病 病理標本

1. 研究開始当初の背景

イタイイタイ病(イ病)は鉱山から流出しカドミウム(Cd)を、神通川を通じて生活用水として密に取り入れていた流域住民を蝕んだ公害病である。腎や肝など諸臓器へのCd蓄積を端緒とし、腎近位尿細管の萎縮や脱落を経て、骨軟化症、骨粗鬆症に至ると考えられている。現在、認定患者、要観察患者は数人を数えるのみとなり、汚染土壌の回復事業も終了し、この地域における公害病は過去のものとなった。一方で、世界に目を転ずれば、公害病は現在進行形の環境問題である。過去に公害病を経験し、克服の努力を重ねてきた我が国には、公害病の経験を風化させず、次世代に伝えていく責務がある。イ病患者は、全症例が解剖時に採取された新鮮臓器を用いて含有Cd量が定量化されている。しかし、この方法では臓器中のどの細胞にどの程度のCdかが蓄積しているかという二次元情報は得られず、ヒト生体におけるCd蓄積と、周囲微小環境における組織・細胞レベルでの生体反応の解明は依然として十分には進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

イ病は腎障害と引き続く骨病変かが特徴であり、慢性Cd中毒の極型と考えられるが、患者生体内のCd動態は不明な点が多く、どの細胞に蓄積し、周囲にどのような反応が起こるのかは不明である。最近、X線マイクロアナライザーを生体組織に応用する新技術が確立され、ホルマリン固定標本中を用い細胞レベルでCdの局在を可視化することが可能となった。本研究では、富山大学に保存されている、80例を超えるイ病患者の病理解剖例を再検討し、Cd蓄積細胞の同定と、それとコンタクトする周囲微小環境を組織・細胞レベルで病理学的に検証し、ヒトにおける慢性Cd中毒の発症機序の解明や予防、治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

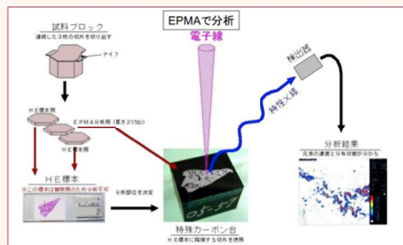
富山大学には、80例以上のイ病病理解剖標本がホルマリン固定パラフィン包埋標本や骨研磨標本として保存されており、そのほとんどの症例において、病理解剖時に採取された新鮮臓器を用いて、臓器中のCd濃度が測定されている。また、7例においては、患者臓器の一部が凍結保存されている。これらのパラフィン包埋標本や、凍結標本を用いて、組織標本中でCdの局在解析を行う。対照としては、イ病と同年齢で病理解剖を施行された患者臓器で、基礎疾患による変化が少ない臓器を抽出して用いる。

Cdの局在解析は、新潟大学機器分析センターEPMA室の渡邊、小林らが開発した解析手法を用いる。X線マイクロアナライザー(EPMA)は、工学材料の元素分析等に広く用いられている技術であるが、燃えやすい生体材料の解析にはほとんど利用されてこなかった。渡邊、小林らは、特殊なカーボン台で熱を吸収することで、動植物など生体

組織でもEPMA解析を可能とする独自の方法を開発した。我々は渡邊・小林らと共同で既存のイ病標本数例を用いて予備検討を行い、組織標本中でCdの蓄積部位を可視化することに成功した。

X線マイクロアナライザーによる生体組織のイメージング(EPMA)

従来は金属などの元素分析に使われている技術。新潟大学のグループが特殊なカーボン台で熱を吸収することで、パラフィン切片でのEPMA解析を可能にする技術を開発

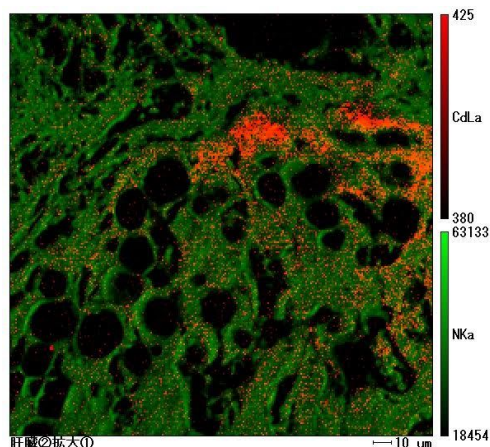


この方法は、パラフィン包埋標本を用いるため、連続する薄切標本の作製が可能である。これらを用いて、HE染色や特殊染色、免疫染色を行うことで、Cd高濃度蓄積細胞の同定や、周囲微小環境を形成する種々の細胞、細胞外基質等のprofileを明らかにする

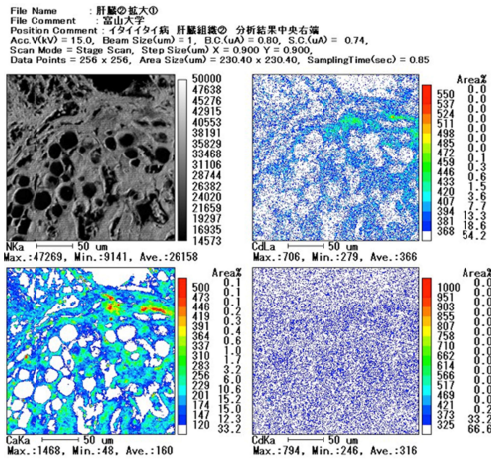
4. 研究成果

保存されているパラフィン包埋標本を用いてEPMA解析をおこなったところ、新鮮臓器の計測で高いCd濃度が確認されている臓器においても、Cdの検出が不可能な症例が多数認められた。文献的に、Cdは水溶性でホルマリンに長期間浸漬すると、細胞から溶出してホルマリン固定液中に流れ出している可能性が指摘された。そこで、EPMA解析は、新鮮凍結臓器標本が保存されている7症例を対照とし、アセトンによる超短時間固定後にパラフィン包埋標本を新たに作成して行うこととした。なお、対照症例も同じく、新鮮凍結臓器標本を使用可能な3症例から新たに作成したパラフィン包埋標本を用いた。解析の結果、以下の所見が得られた。

(1) 肝臓

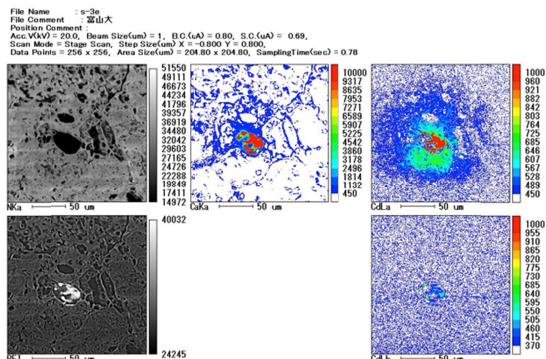


肝臓の拡大①



肝臓は新鮮臓器を用いた Cd 濃度解析でもっとも Cd 蓄積が高度な臓器である。その一方で、高度の Cd 蓄積に比して肝障害の程度が軽く、産生されるメタロチオネインが Cd の毒性を中和している可能性が指摘されている。EPMA 解析の結果、Cd は門脈域周囲の肝細胞により強く蓄積しているほか、症例によっては門脈域の結合組織にも蓄積が認められた。しかしながら、Cd 蓄積が認められる肝細胞に変性像や壊死障害像などは確認できず、周囲に炎症細胞浸潤なども認められなかった。門脈域に Cd 蓄積がある症例でも、門脈域に炎症細胞浸潤や胆管障害像、血管障害像などは認められなかった。当初の予想では Kupffer 細胞など貪食細胞内に Cd 蓄積が考えられたが、検索した限りではマクロファージなどの単核細胞中への Cd 蓄積は認められなかった。以前の検討で、Cd 蓄積が高度な肝臓ではメタロチオネインの肝細胞での発現が亢進していたことから、Cd の蓄積部位にメタロチオネイン発現があるかどうかを連続切片の免疫染色で確認した。メタロチオネインは Cd 蓄積の有無にかかわらずに高発現しており、Cd 蓄積の病的意義は不明であった。

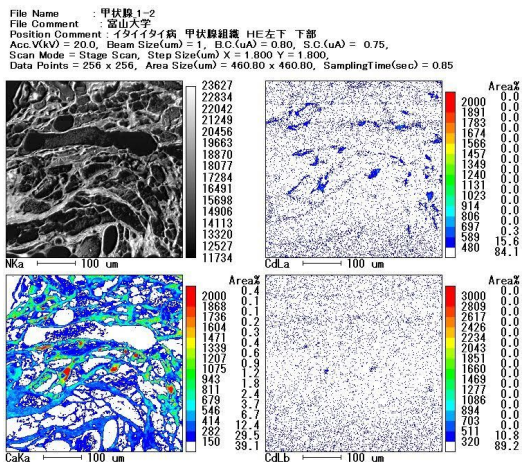
(2) 腎臓



腎臓の近位尿細管はイ病患者がもっとも早期から重篤に障害される部位であり、種々の動物実験からも Cd はまず近位尿細管に蓄積すると推測されている。その一方で、イ病

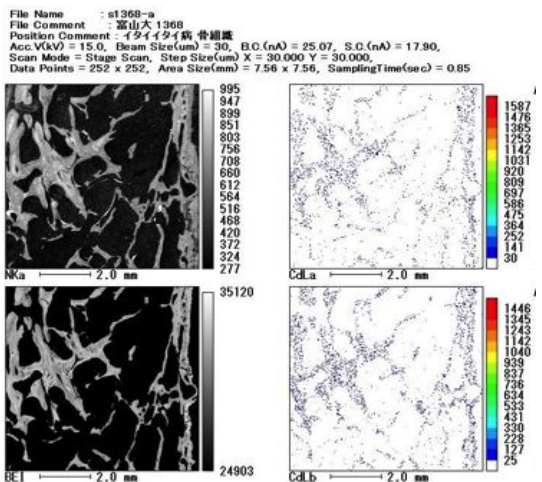
患者の新鮮臓器を用いた解析では腎臓中の Cd 濃度は健常人よりも低値となっている。その理由としては、Cd が蓄積した近位尿細管が破壊され、蓄積していた Cd が尿中に排泄されていると推測されている。EPMA 解析では、Cd は残存する近位尿細管の一部や間質結合組織の一部に蓄積していた。Cd 蓄積がある近位尿細管は上皮の泡沫化や変性、再生像、内腔の不整などが認められたが、イ病患者の近位尿細管は残存するものもほとんどがなんらかの変性所見を呈していることから、Cd 蓄積と変性との関連性は不明であった。また、1 症例でシュウ酸カルシウム結石中にも Cd 蓄積が認められた。Cd は 2 価のイオンであり、カルシウムと同様に取り込まれた可能性も推測されたが、1 例のみであり、詳細は不明であった。

(3) 甲状腺



甲状腺の濾胞上皮にも、少量ながら Cd の蓄積が認められた。周囲にはカルシウムの沈着も見られたが、Cd とカルシウムは別の部位に沈着していた。甲状腺は目立った組織変化がなく、病的意義は不明であった。

(4) 骨



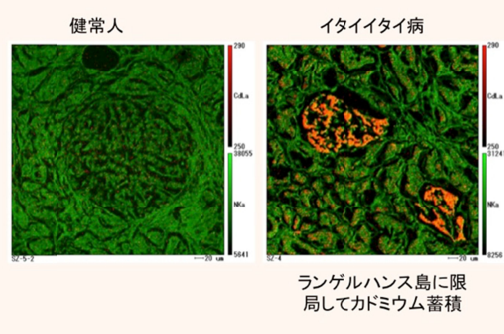
凍結標本がなく、樹脂包埋されていた骨組織で EPMA を施行したが、有意なシグナルは

得られなかった。

(5) 膵臓

膵臓は新鮮臓器での Cd 濃度解析では健常人とほとんど差がなく、従来は Cd による影響はほとんど注目されてこなかった臓器である。しかしながら、EPMA 解析では、Cd がランゲルハンス島に選択的に蓄積しているという驚くべき結果が得られた。Cd は膵外分泌腺には殆ど含まれていないため、量的に少ないランゲルハンス島への蓄積が全体で見た時には過小に評価されていたものと推測され、Cd の局在解析の有用性が強調される結果となった。

EPMAを用いた膵ランゲルハンス島の解析

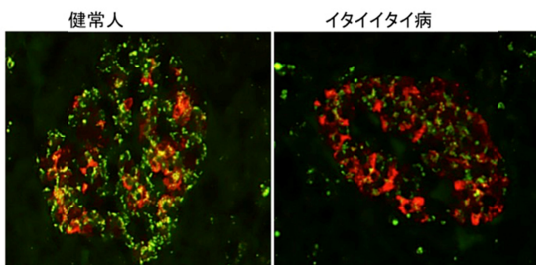


Cd 蓄積があるランゲルハンス島は、形態がいびつで、対照に比して小さくなっていた。そこで、構成細胞の比率を検討するために、インスリンとグルカゴンの二重免疫染色を行った。

対照のランゲルハンス島ではインスリン陽性のベータ細胞が主体であり、グルカゴン陽性のアルファ細胞は少数であったが、イタイイタイ病では殆どがグルカゴン陽性のアルファ細胞からなり、ベータ細胞は少数であった。この傾向をさらに確認するため、ホルマリン固定標本として保存されているイ病標本 30 例と、対照例 30 例で、膵臓の二重免疫染色（インスリンとグルカゴン）を追加した。その結果、イ病では程度の差こそあれ、ランゲルハンス島が小さくいびつであり、グルカゴン優位になっていることがわかった。

二重免疫染色による膵ランゲルハンス島の解析

α,β細胞の免疫染色



緑:インスリン陽性細胞(β細胞)
赤:グルカゴン陽性細胞(α細胞)

イタイイタイ病でβ細胞が減少

この機序を説明するために、文献検索を行ったところ、Cd はベータ細胞の有する亜鉛トランスポーターを介して取り込まれている可能性が推測された。そこで、富山県で長年神通川流域の住民を対象に行われている健康調査を参照したところ、疫学的にも糖尿病患者に糖尿病罹患が多い傾向が指摘された。本研究から、Cd 曝露は、従来知られていた腎障害、骨障害に加え、ベータ細胞障害を惹起し、糖尿病発症や病態促進に寛容している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 89 件)

1: Gao F, Yokoyama S, Fujimoto M, Tsuneyama K, Saiki I, Shimada Y, Hayakawa Y. Effect of keishibukuryogan on genetic and dietary obesity models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:801291. doi: 10.1155/2015/801291. (査読有)

2: Tanaka H, Yang GX, Tomiyama T, Tsuneyama K, Zhang W, Leung PS, Coppel RL, Joh T, Nadler SG, Ansari AA, Bowlus C, Gershwin ME. Immunological potential of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol*. 2015 Jun;180(3):371-382. doi: 10.1111/cei.12581. (査読有)

3: Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Sakoda H, Shimizu T, Tsukamoto K, Ikeda H, Yatomi Y. Induction of insulin secretion by apolipoprotein M, a carrier for sphingosine 1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1841(9):1217-1226. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.05.002. (査読有)

4: Tsuneyama K, Nishida T, Baba H, Taira S, Fujimoto M, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Sutoh M, Oda E, Hokao R, Imura J. Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Sep;29(9):1736-1743. doi: 10.1111/jgh.12610. (査読有)

5: Cui ZG, Piao JL, Kondo T, Ogawa R, Tsuneyama K, Zhao QL, Feril LB Jr, Inadera H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy. *Chem Biol Interact*. 2014 May 25;215:46-53. doi: 10.1016/j.cbi.2014.03.005. (査読有)

6: Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsuneyama K, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Takasaki I, Inujima A, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai

H, Saiki I, Koizumi K. CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer by promoting TNF- α -induced apoptosis by tumor-associated macrophages. BMC Cancer. 2014 Dec 15;14:949. doi: 10.1186/1471-2407-14-949. (査読有)

7: Sasaki E, Iwamura A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Kume T, Yokoi T. Role of cytochrome P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury. Toxicol Lett. 2014 Oct 18;232(1):79-88. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.012. (査読有)

8: Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M, Hirai Y, Muraguchi A, Takatsu K. Isoliquritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. J Leukoc Biol. 2014 Dec;96(6):1087-1100. doi: 10.1189/jlb.3A0114-005RR. (査読有)

9: Baba H, Tsuneyama K, Kumada T, Aoshima K, Imura J. Histopathological analysis for osteomalacia and tubulopathy in itai-itai disease. J Toxicol Sci. 2014 Feb;39(1):91-96. (査読有)

10: Kikuchi K, Tsuneyama K, Yamada H, Kajiyama Y, Matsumoto K, Tsunashima H, Yamashita R, Takai A, Negishi M, Hara M, Moritoki Y, Miyakawa H. Splenic lymph follicles generate immunoglobulin M-producing B cells in primary biliary cirrhosis. Hepatol Res. 2014 Oct;44(10):E253-E256. doi: 10.1111/hepr.12231. (査読有)

11: Sasaki E, Matsuo K, Iida A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. Toxicol Sci. 2013 Nov;136(1):250-263. doi: 10.1093/toxsci/kft184. (査読有)

12: Deng YR, Ma HD, Tsuneyama K, Yang W, Wang YH, Lu FT, Liu CH, Liu P, He XS, Diehl AM, Gershwin ME, Lian ZX. STAT3-mediated attenuation of CCl4-induced mouse liver fibrosis by the protein kinase inhibitor sorafenib. J Autoimmun. 2013 Oct;46:25-34. doi: 10.1016/j.jaut.2013.07.008. (査読有)

13: Tsuneyama K, Baba H, Kikuchi K, Nishida T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Nakanishi Y, Masuda S, Terada M, Imura J, Selmi C. Autoimmune features in metabolic liver disease: a single-center experience and review of the literature. Clin Rev Allergy Immunol. 2013

Aug;45(1):143-148.

doi:10.1007/s12016-013-8383-x. (査読有)

14: Watanabe S, Tsuneyama K. Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate-supplemented high-fat diet. J Toxicol Sci. 2013;38(3):379-390. (査読有)

15: Baba H, Tsuneyama K, Yazaki M, Nagata K, Minamisaka T, Tsuda T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Nakanishi Y, Aoshima K, Imura J. The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. Mod Pathol. 2013 Sep;26(9):1228-1234. doi:10.1038/modpathol.2013.62. (査読有)

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 常山幸一. 見えないものをみる技術～メタボリックシンドロームからイタイイタイ病まで～. 徳島臨床細胞学会総会 2015.3.5. とくしま未来健康づくり機構 (徳島県・徳島市)
2. Tsuneyama K, et al. Establishment of repeated liver biopsy technique in experimental mice. 65th Annual meeting of AASLD, 2014.11.7-2014.11.11, Boston, USA
3. 数見友里恵、常山幸一、他. イタイイタイ病における人病変の新たな病理学的検討. 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-2014.4.26、広島国際会議場 (広島県・広島市)
4. 皆川千尋、常山幸一、他. イタイイタイ病では骨軟化症とともに骨粗鬆症も高度に生じている. 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-2014.4.26、広島国際会議場 (広島県・広島市)

5.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授
研究者番号：10293341

(2) 研究分担者

井村 穰二 (IMURA, Johji)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号：80316554

(3) 連携研究者

小林 正義 (KOBAYASHI, Masayoshi)
新潟大学・機器分析センター・技術専門員
研究者番号：60377215