

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006-2008

課題番号：18510064

研究課題名（和文） 次世代にわたるガス状化学物質による脳への毒性影響の評価
-リスク評価をめざして

研究課題名（英文） Evaluation of neurotoxic effects induced by gaseous chemical substances on the CNS of the next generation

研究代表者

菅田由紀子 (FUETA YUKIKO)

産業医科大学・産業保健学部・助教

研究者番号：10132482

研究成果の概要：有害化学物質が子や孫の健康にどのような影響を及ぼすか不明な点が多い。本研究では、生まれる前に化学物質に曝露された場合に、その影響が生後の脳機能発達にどのような影響を及ぼしうるのかを動物モデルで調べた。その結果、幼若期から成熟後におよぶ長期にわたって脳への種々の影響が認められた。本実験手法を用いて、種々の産業化学物質について次世代影響を精査する必要性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

産業現場で多量に使用され、また一般室内環境で建築材料・室内装飾材料から揮発して測定されるガス状・揮発性化学物質（常温で容易に揮発しガスあるいは蒸気として環境中に存在する混合有機溶剤、以下ガス状化学物質と記載）には中枢神経作用が懸念されるものが少なくない。しかし、末梢神経の影響と比べて中枢神経系への影響は客観的な評価がきわめて難しく、化学物質が原因と思われる場合でも、その化学物質が神経細胞のどこに作用してどのように毒性を生じるのかという毒性機序を説明するには至っていない。さらに、化学物質への感受性が高いと

される子供や胎児期の脳への影響については神経発達そのものがブラックボックスということもあり毒性機序の研究は進展しているとはいえない。神経発達時の化学物質による影響は脳成熟後に顕在化する懸念がありケアも難しく、また脳成熟期においても不定愁訴というかたちで現れる可能性があり原因との因果関係の解明が難しくなおりにされる可能性がある。このような状況を鑑み、ガス状化学物質の中枢毒性について科学的基礎実験データが乏しかった、「ガス状化学物質曝露による中枢神経系における毒性機序の解明、とくに次世代にわたる脳機能障害リスク評価の確立」を全体の構想とし、大

人・子供・胎児期に曝露されたときの脳機能への障害リスクを評価することをめざす。

2. 研究の目的

本研究課題では3ヶ年計画で、「ガス状化学物質による脳の次世代にわたる影響を明らかにし、脳障害リスク評価の基礎的データを得る」ことを目的とする。1-ブロモプロパンの毒性影響を調べる研究で獲得してきた研究技術を活かして、成獣曝露・胎児曝露モデルを作成して毒性の解析を行う。次世代への中枢毒性影響を調べるには、ガス状化学物質の生物内作用点ともいえる脳内標的蛋白のスクリーニングを行うこと、成獣での亜急性曝露・慢性曝露による中枢神経毒性に関する科学的根拠に基づくデータを取得することが不可欠であり、下記のように段階的研究を計画した。

平成18年度は、次世代脳への影響評価を確立する目的で、1-ブロモプロパン(1-BP)を胎児曝露された仔ラット幼若脳を電気生理学的に調べた。また、中枢神経への影響が懸念されつつも毒性情報がほとんどなく、トルエンにならって許容濃度が50ppmに定められたエチルベンゼン(EB)について亜慢性曝露をマウスに実施し脳への影響を調べる実験を開始した。平成19年度は、1-BPの胎児期曝露によって変化した興奮性に授乳の影響がどのくらいあるのか調べる目的で、cross-fosteringを行い授乳の影響を検討した。平成20年度は、この興奮性発達時期の変化の毒性学的意義を検討し、関与する脳内分子の検索するとともに幼若期の行動への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EB 亜慢性曝露の中枢神経作用

ACGIHの定める100ppmの10倍濃度である1000ppmと500、250ppmで亜慢性曝露をマウスに実施した。雄性BALB/Cマウス(5週令)に濃度1000ppmで4週間(3時間/日、5日/週)吸入曝露した。4週曝露による体重増加、摂食量、摂水量への影響、行動の変化、血液生化学を調べ、神経毒性については脳内海馬スライス標本で刺激応答性、抑制系、LTPへの影響を解析した。

(2) 1-BPの次世代影響：妊娠ラットのday1-20の20日間1-BP(400、700ppm)をステンレス製の曝露チャンバー内で曝露し生まれた仔ラットを曝露群とした。対照群には同型チャンバー内で新鮮空気を与えた。PND1で産仔数を8-10匹に揃えた。Cross-fosteringでは、PND1において対照群と曝露群の仔を入れ替えて哺育させた(Cross-fostering、図1)。曝露指標として脳・乳汁・肝臓のBr濃度を生後1週間にわたり測定し、1-コンパートメントモデルで

脳内Br濃度への授乳曝露影響を解析した。影響指標としては、体重や一般的な成長指標(耳介展開、開眼、精巣下降、膣開口など)など加えて、脳スライス標本を用いた電気生理学的指標(刺激応答性、ペアパルス比)、薬物応答性、行動を評価した。幼若期と成熟後に行動試験を実施した。

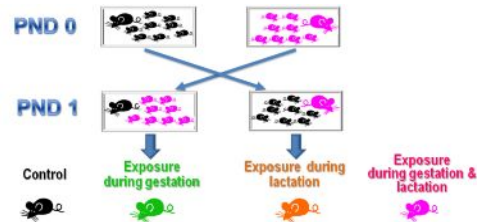


図1 Cross-fostering 実験群

4. 研究成果

(1) EBの亜慢性曝露の中枢神経影響
ACGIHの定める100ppmの10倍濃度である1000ppmと500、250ppmで亜慢性曝露をマウスに実施した。濃度1000ppmでは曝露初日にBALB/Cマウス64匹中5匹に失調性歩行が観察されたが、C57BL/Cマウスには見られなかったことから影響には系統差があることが判明した。白血球数の低下が両系統に見られたが、500ppmでは失調性歩行や白血球数の変化などの影響は見られなかった。EBはNMDA受容体機能を抑制することが報告されているが、1000ppmでの亜慢性曝露において、刺激応答性・フィードバック抑制・LTP増強度(図2)は変化しなかった。血中EBの半減期は約30分だったことから、誘導酵素による代謝が速いことが予想された。我々が調べた範囲では神経毒性に関してNOAELは500ppm

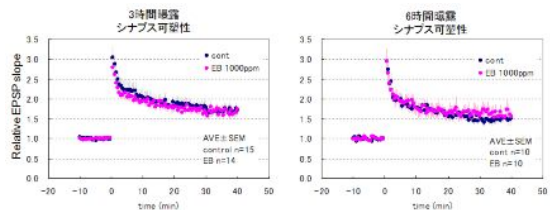


図2 長期増強へのエチルベンゼンの影響

であった。

(2) 1-BP胎児期曝露による次世代脳への影響評価

①1-ブロモプロパン胎児曝露群では、生後14日目にシナプス伝達と集合スパイク電位の応答性の亢進が見られた(図3)。これら電位生理学的に変化が認められた指標について、遺伝子発現量を調べたところ、集合スパイク電位の発生機構であるNaチャンネルやシナプス伝達効率の背景機構であるGluR1の発現量増加を伴っていた(図4)。

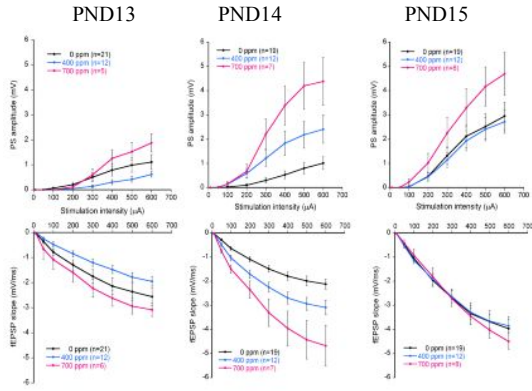


図3 生後 13, 14, 15 日めの刺激応答性

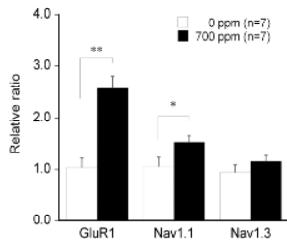


図4 生後 14 日での遺伝子発現量

さらに曝露群 (400, 700 ppm) では、スパイク電位の応答比 (PS2/PS1) が低下していた (図 5)。

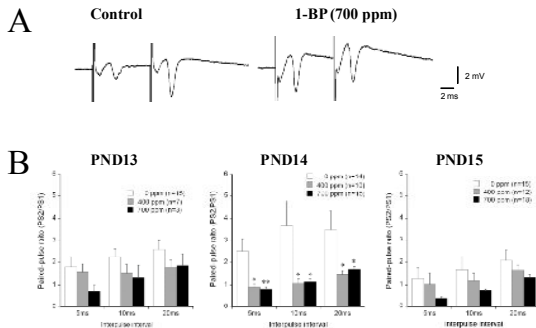


図5 生後 13, 14 および 15 日でのペアパルス応答比

これら PND14 で電気生理学的に観察された影響は、成長後 12-14 週令では刺激応答性の更新は消失し、応答比は逆に曝露群で増加しあきらかな脱抑制となった (図 6)。とくに雌ラットのほうで脱抑制は 20ms まで広がった。

このように胎児期曝露によって、刺激応答性については幼若期の亢進→成長後消失したり、応答比が幼若期の減少→成長後には増加したり、発育とともに脳の興奮性は攪乱されることが判明した。

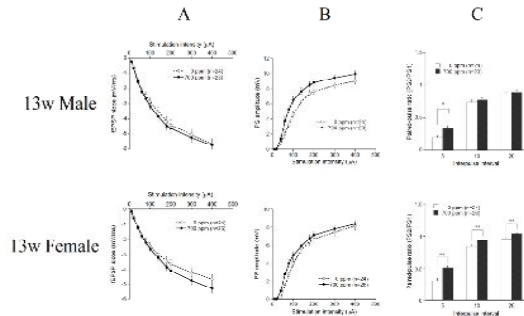


図6 成長後の刺激応答性とペアパルス応答比

②生後 14 日の両群の仔ラットにペンチレンテトラゾール (60mg/kg) を投与したところ、ミオクローヌスを呈した個体の割合と潜時は両群で差はなかったが、曝露群では 15 分の観察時間内では全般化発作はなかった (表 1)。薬物への反応性が胎児曝露によって修飾された可能性が高くなることは留意すべきことである。

Table 1 Behavioral changes after pentylenetetrazol injection in the control and prenatally 1-BP exposed pups

Group	Myoclonic jerks	Latency of myoclonic Jerks [sec]	Generalization to wild running and tonic-clonic convulsion	Latency of wild running [sec]	Latency of tonic convulsion [sec]
control	14/20 (70%)	166 ± 90	10/14 (71%)	214 ± 133	225 ± 129
1-BP (700 ppm)	14/20 (70%)	130 ± 27	0/14 (0%)	No seizure	No seizure

③高架十字迷路を 5 週令と 13 週令に行ったが、胎児曝露の影響はみられなかった。オープンフィールド試験では、4 週令では活動性の増加傾向が見られたが顕著な差は見られなかった。しかし、12 週令では、対照群に比べて活動運動量の著しい低下がみられた。成長後に胎児曝露の影響が顕著に現れる行動指標があることが判明した。

Open-field test in male offspring at 4 weeks of age

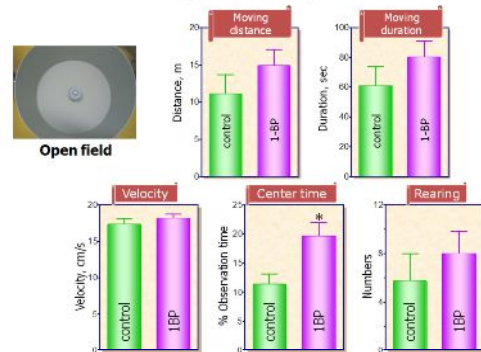


図7 4 週齢雄性仔ラットのオープンフィールド試験

④出生直前と生後 2 日における血中テストステロン濃度には両群で差はなかった。よって、

観察された上記の影響は、性ホルモンを介した発達の変化というよりも、中枢神経系の発達そのものへの影響と解釈された。

⑤従来の曝露群と対照群に加えて、胎児期のみ曝露された『胎児期曝露群』と曝露された母ラットから授乳された『授乳曝露群』を作成した。胎児期曝露群と授乳曝露群は、いずれもPDN14で興奮性発達が亢進する傾向を示しつつも対照群との有意な差には至らなかった(図8)。つまり、胎児期と授乳期連続して代謝産物等などに曝露されるということが、海馬における興奮性発達時期をずらしたものと考えられる。脳の神経発達の重要な時期は出生前後1週間くらいと考えられており、本結果はこの仮説に矛盾しないと考えられた。

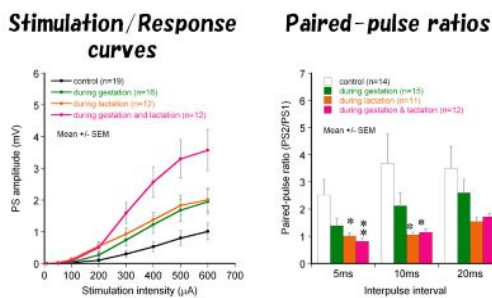


図8 胎児期の曝露と授乳による曝露が刺激応答性とペアパルス応答比に及ぼす影響

⑥曝露指標として脳内BR濃度を測定し、母ラットより高濃度で胎児脳に移行すること、曝露群の濃度は胎児期曝露群と授乳曝露群の脳内濃度を加算した量になること、半減期は約2.3日で成獣ラットの約7日より早いことが判明した。代謝が成獣より早いこと、容積の増加(体重増加)が大きいことが原因と考えられた。

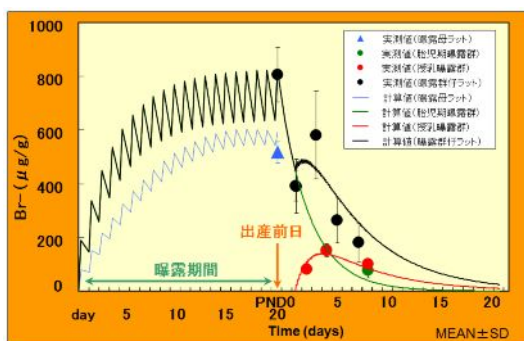


図9 脳内臭素イオン濃度の変化とコンパートメントモデルによる解析

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 3 件)

- ① Y Fueta, T Ishidao, S Ueno, Y Yoshida, N Kunugita, H Hori. New approach to risk assessment of central neurotoxicity induced by 1-bromopropane using animal models. *Neurotoxicol* 28 (2007) 270-273、査読あり
- ② Y Yoshida, J Q Liu, Y Nakano, S Ueno, S Ohmori, Y Fueta, T Ishidao, N Kunugita, U Yamashita, H Hori. 1-BP inhibits NF- κ B activity and Bcl-xL expression in astrocytes *in vitro* and reduces Bcl-xL expression in the brains of rats *in vivo*. *Neurotoxicol* 28 (2007) 381-386、査読あり
- ③ S Ueno, Y Yoshida, Y Fueta, T Ishidao, J Liub, N Kunugita, N Yanagiharaa, H Hori. Changes in the function of the inhibitory neurotransmitter system in the rat brain following subchronic inhalation exposure to 1-bromopropane. *Neurotoxicol* 28 (2007) 415-420、査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① Y Fueta, S Ueno, T Ishidao, T Yuhi, Y Yoshida, H Hori. Effects of prenatal exposure to 1-bromopropane on development of hippocampal excitability in rats. *Neurotox25*, 平成20年10月13日、ロチェスター市
- ② Y Fueta, T Ishidao, S Ueno, Y Yoshida, H Hori. Effects of prenatal exposure to 1-bromopropane on neuronal excitability in the hippocampus of offspring. *Society of Toxicology*, 平成20年3月19日、シアトル市
- ③ Y Fueta, S Ueno, Y Yoshida, T Ishidao, H Hori. Effects of 1-bromopropane on neurotransmitter receptors, intracellular signalings and feedback inhibition in the CNS. 第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会の合同学会、平成19年9月12日、横浜市
- ④ Y Fueta, S Ueno, Y Yoshida, T Ishidao, H Hori. Approach to the central neurotoxicity of 1-bromopropane using animal models. 第77回日本衛生学会、「オゾン層破壊化学物質代替物 1-ブロプロパンの神経毒性解明のための国際シンポジウム」平成19年3月26日、大阪市
- ⑤ Y Fueta, S Ueno, T Ishidao, Y Yoshida, H Hori. Central neurotoxicity induced by 1-bromopropane, a substitute for

specific chlorofluorocarbons. 第83回
日本生理学会大会、
Symposium ” Physiological studies on
environmetal health-vulnerability of
biological functions to xenobiotic
chemicals” , 平成18年3月28日、前橋
市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笛田由紀子 (FUETA YUKIKO)

産業医科大学・産業保健学部・助教

研究者番号：10132482

(2) 研究分担者

保利 一 (HORI HAJIME)

産業医科大学・産業保健学部・教授

研究者番号：70140902

上野 晋 (UENO SUSUMU)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00279324

吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

(3) 連携研究者

なし