

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006年度～2008年度
 課題番号：18590570
 研究課題名(和文) オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた有機スズ化合物の発達神経毒性の検討
 研究課題名(英文) The evaluation of neurotoxic effects of organotin compounds on the developing rats by using oligonucleotide microarray
 研究代表者
 角田 正史 (Tsunoda Masashi)
 北里大学・医学部・准教授
 研究者番号：00271221

研究成果の概要：妊娠ラットにTBTを0, 25, 50, 125ppm含む餌を摂取させて、生まれたオスのF1ラットを生後1、2、3週の時点で処理をした。更に餌を通常の餌に切り替え、6週の時点でも処理を行った。ラットの脳からRNA抽出を行い、RNAからアミノアシル基を導入したcDNAを合成し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイに適用した。対照群と曝露群の間で1.5倍以上の変化があった遺伝子に関し、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析した。F1ラットの中脳でのmRNA発現について、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体4におけるシトクロムc酸化酵素の発現上昇、複合体1に関する遺伝子の発現変化、活性酸素分解酵素の発現変化、神経伝達物質の貯蔵に関する遺伝子の発現上昇が観察された。以上より、TBTによるF1ラットの発達神経毒性は曝露後にも更に顕著になる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	660,000	4,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：トリブチルスズ、マイクロアレイ、発達神経毒性、神経伝達物質、免疫毒性

1. 研究開始当初の背景

船舶や漁網の防汚剤として使用されてきて、環境汚染物質として知られる有機スズ化合物、トリブチルスズ(TBT)の主要な毒性に神経毒性がある。有機スズの神経毒性について、研究代表者らは、TBTの亜急性経口投与を現実の曝露のモデルとし、脳各部位の神経

伝達物質及びそれらの代謝産物の濃度を指標として神経毒性を検討し、餌中125ppmの濃度で、TBTによる中脳部位でのドーパミン代謝への影響を観察した (Tsunoda, et al. 2004)。また同様に我々のグループの研究ではTBT亜急性経口投与によりTBT125ppm投与群では大脳から調製した膜画分のNMDAレ

セプターへのリガンドの結合の低下を観察している (Konno, et al., 2001)。

以上の研究で対照群に比べて有意な変化があった群が投与された餌中の 125ppm という濃度は実際の曝露と比較すると比較的高値である。近年、TBT について、発達毒性の評価や次世代に対する影響が注目されている。Kimura らは、妊娠マウスに TBT を飲料水に混ぜて投与し、生まれてきた仔マウスの免疫が、15ppm の TBT を与えた群で傷害されることを示唆した (Kimura, et al., 2004)。この研究から TBT が次世代に対して親の世代より低い濃度で影響を及ぼすことが示唆された。発達期の神経毒性に関しては、発達神経毒性に関わる適当な指標が確立していないこともあり、知見が乏しかったため、飲料水に TBT を混ぜ妊娠マウスに投与し、仔マウスへの影響を、生後 1 週目、2 週目、3 週目に神経伝達物質及びそれらの代謝産物、NMDA レセプターへのリガンドの結合を指標に評価した。妊娠時から離乳時まで母体の食餌を介した経口投与を通じ、胎盤及び母乳を通し次世代に曝露する、現実の曝露により近づけたモデル実験として行った。神経伝達物質においては TBT 50ppm 曝露群においてドーパミン代謝への影響が見られ (Tsunoda, et al., 2005)、NMDA レセプターへのリガンドの結合も生後 3 週目に 15ppm 及び 50ppm 曝露群で対照群に比べて低下が見られた。

以上の研究の流れで、遺伝子のどれを検討すべきか難しかったために、遺伝子の面からの検討は行ってこなかった。近年、遺伝子変化を網羅的に解析し、多種類の遺伝子の変化を鋭敏かつ正確に検出できるオリゴヌクレオチドマイクロアレイが開発された。本研究では、神経回路の構造素子であるシナプスに注目し、その形成と維持に関わる因子群に重点を置いたオリゴヌクレオチドマイクロア

レイを使用することとした。脳・神経系の機能は、遺伝子プログラムによって細胞が分化することによってのみ発揮されるのではなく、分化した神経細胞がシナプスを介して神経回路を形成して初めて機能し、更に神経活動に依存した回路の再編成を経て完成し、完成後も変化を続けて、それが記憶・学習といった高次機能の基盤となる。以上からシナプスの形成と維持に関わる因子を規定する遺伝子群の検討は有意義と言えた。

また従来、定量性の面では問題を含んでいた RT-PCR に代わり、理論的に定量性により優れたリアルタイム PCR を遺伝子変化の確認に使用できるようになったため、より確実な結果が期待できた。本研究は遺伝子変化の面から TBT の発達神経毒性をとらえるという位置づけにあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイの手法を用い、TBT の二世世代曝露（経胎盤及び母乳による曝露）による発達神経毒性について、遺伝子の変化を指標として明らかにすることを目的とした。オリゴヌクレオチドマイクロアレイで検出された遺伝子の変化は、更に定量性に優れたリアルタイム PCR の手法を用い、確認を行うこととした。

3. 研究の方法

オリゴヌクレオチドアレイの化学物質曝露への適用を十分に検討した上で以下の研究を行った。

初回妊娠した Wistar ラットに TBT chloride を餌中に混ぜ曝露した。曝露については、経胎盤及び経母乳の影響が発達後も残るか検討するため、出産後、乳離れの 3 週時点でいったん曝露を止め、通常餌で 6 週まで飼育した。妊娠ラットに TBT を 0, 25, 50, 125ppm 含む餌を摂取させて、雄の F1 ラットを生後 1

週、2週、3週、6週の時点で処理し、脳を摘出し、RNA抽出を行った。抽出したRNAからアミノアシル基を導入したcDNAを合成し、シナプスの形成と維持に関わる遺伝子を中心に広範囲に解析するオリゴヌクレオチドマイクロアレイに適用した。対照群と曝露群の間で1.5倍以上の変化があった遺伝子に関し、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析を行った。

更に、その発達神経毒性（遺伝子変化）を引き起こすレベルが、今までの他の神経毒性を表す指標を変化させるかについてと、免疫毒性を引き起こすかについて検討した。神経毒性の指標としては、今までの研究で使用されてきた、脳内各部位で濃度が異なる神経伝達物質を使用し、また神経伝達物質の代謝産物と合わせ検討することにより、神経活動の指標とした。このTBTによる神経伝達物質の変化を、遺伝子変化と組み合わせ（例えば、トランスポーターの遺伝子の変化等との組み合わせ）ことを試みた。

また、遺伝子変化を起こすレベルにおける、免疫への影響を検討することで、神経毒性と免疫毒性の関連を検討した。

その他、体内や環境中で分解や代謝されて、トリブチルスズはジブチルスズ（DBT）となるため、その毒性、特に神経毒性について知見を集積した。また他の有機スズ、トリフェニルスズについても神経毒性を検討した。また妊娠から出産、そして哺乳期間を曝露期間とするため、実際の環境から次世代が経胎盤及び母乳を介しての曝露を受けることになるため、実際に人間では母乳に有機スズが検出されるかについての定量も行った。

4. 研究成果

オリゴヌクレオチドマイクロアレイの方法の確立、特に化学物質曝露に対する適用に

ついてはテトロドトキシン、甲状腺ホルモン、PCBの研究で十分に検討した。環境汚染物質であるTBTの発達神経毒性を、二世世代曝露の後、主にオリゴヌクレオチドマイクロアレイによって遺伝子変化を検討した。F1ラットの中脳でのmRNA発現について、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体4におけるシトクロムc酸化酵素の発現上昇、複合体1に関する遺伝子の発現変化、活性酸素分解酵素の発現変化、神経伝達物質の貯蔵に関する遺伝子の発現上昇が観察された。以上より、TBTによるF1ラットの発達神経毒性は曝露後にも更に顕著になる可能性が示された。

神経伝達物質によるTBTの発達神経毒性評価については妊娠ラットにTBTを0, 25, 50, 125ppm含む餌を摂取させて、生まれたオスのF1ラットを生後1、2、3週の時点で処理をした。更に餌を通常の餌に切り替え、6週の時点でも処理を行った。ラットの脳を摘出し、神経伝達物質を部位別に抽出し、ECD付き高速液体クロマトグラフィーにより定量した。神経伝達物質では特に6週目の下垂体で神経伝達物質の変化が顕著に見られた。

免疫毒性については妊娠ラットにTBTを0, 25, 50, 125ppm含む餌を摂取させて、生まれたオスのF1ラットを生後1、2、3週の時点で処理をした。更に餌を通常の餌に切り替え、6週の時点でも処理を行った。脾臓を摘出し、脾細胞を分離し、ポピュレーションをフローサイトメトリーで検討した。脾細胞のポピュレーションの結果も、6週目でCD3/FITC(%)の変化が強く、曝露群で低下が見られた。TBTの母乳中定量については魚を習慣的に摂取している母親の乳中にDBTが0~9.5ng/mlの範囲で検出されたが、TBTの検出は見られなかった。

TBTの環境中や生体中の分解産物であるDBTについて、細胞毒性を検討し、また、

DBT を含む吸収性人工硬膜のモデル実験を行った。DBT の細胞毒性に関して TBT の研究があるマクロファージ系細胞、J774.1 細胞を用いて行った。DBT は 0.5 μ M の濃度から細胞の生存率の有意な低下をもたらした。サイトカインについては、tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-12 について産生低下を示し、その低下は細胞生存率の低下のみでは説明できないことが示唆された。IL-10 については産生の変化は DBT 曝露によって起こっていない。リアルタイム PCR による、それぞれのサイトカインの mRNA の発現では、群間に有意差がないため、遺伝子発現に影響がないことが示唆された。

別の有機スズ、トリフェニルスズについても成長期のマウスに関して神経伝達物質に対する影響についてまとめた。トリフェニルスズは TBT に比べて成長期の神経伝達物質の変化は少なかった。

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 7 件)

1. Takahashi, M., Negishi, T., Imamura, M., Sawano, E., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y. and Tashiro, T. (2009) Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain. *Toxicology*, 257, 17-24. (査読有)
2. Takahashi, M, Negishi, T. and Tashiro, T. (2008) Identification of gene meditating thyroid hormone action in the developing mouse cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, 104, 640-652. (査読有)
3. Mino, Y., Amano, F., Yoshioka, T. and Konishi, Y. (2008) Determination of organotins in human breast milk by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Health*

Sciences, 54(2), 224-228. (査読有)

4. Tsunoda, M., Yoshida, T., Tsuji, M, Zhang, Y., Sugaya, Y., Inoue, Y., Miki, T, Satoh, T. and Aizawa, Y. (2008) The effects of dibutyltin (DBT) dichloride on the viability and the productions of tumor necrosis factor α and interleukin-12 in murine macrophage cell line, J774.1. *Biomedical Research on Trace Elements*, 19(1), 67-71. (2008 年 4 月) (査読有)
 5. Tsunoda, M., Nakano, K., Konno, N. and Aizawa, Y. (2007) The effects of triphenyltin (TPT) chloride on regional brain neurotransmitters and spleen weight in mice after subacute oral exposure. *Kitasato Medical Journal*, 37(2), 102-111. (2007 年 12 月) (査読有)
 6. Kitamura, C., Takahashi, M, Kondoh, Y., Tashiro, H. and Tashiro, T. (2007) Identification of synaptic activity –dependent genes by exposure of cultured cortical neurons to tertodotxin followed by its withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 2385-2389. (査読有)
 7. Tsunoda, M., Yamamoto, K., Ito, K., Inoue, Y., Miki, T., Kudo, Y., Satoh, T. and Aizawa, Y. (2006) Dibutyltin (DBT) dichloride inhibits cytokine productions in murine macrophage cell line, J774.1. *Biomedical Research on Trace Elements*, 17(4), 417-424. (2006 年 12 月) (査読有)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 峽戸孝也、角田正史、浅川秀雄、細川まゆ子、菅谷ちえ美、井上葉子、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、相澤好治 (2009) トリブチルスズ化合物の亜慢性経口曝露による妊娠ラットへの行動への影響。日本衛生学雑誌、64(2), 609. (2009 年 3 月、東京)
 2. 角田正史、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄

- 一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2009) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究 (第3報) : 人工硬膜 (直径 8mm) 埋め込みラットに対する行動学試験. 日本衛生学雑誌、64(2), 464. (2009年3月、東京)
3. 辻雅善、井上葉子、菅谷ちえ美、角田正史、菅谷津貴子、高橋正身、柚場俊康、土屋利江、相澤好治 (2009) 人工硬膜の主成分であるポリ乳酸ラクチド及び触媒であるジブチルスズ、オクチル酸スズのアストロサイト系細胞にたいする毒性評価. 日本衛生学雑誌、64(2), 463. (2009年3月、東京)
4. 角田正史、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、若佐美佳、田代朋子、相澤好治 (2008) トリブチルスズ二世代曝露による仔ラットの脳内神経伝達物質への影響—6週令での評価. 日本職業・災害医学会誌、56 (臨時増刊)、第56回日本職業・災害医学会学術大会プログラム・抄録集、別157. (2008年11月、東京)
5. 角田正史、辻雅善、張瑩、木村幸子、工藤雄一朗、片桐裕史、若佐美佳、田代朋子、小西良子、相澤好治 (2008) トリブチルスズ二世代曝露による仔ラットの胸腺リンパ球への影響. 第15回日本免疫毒性学会学術大会・第52回日本産業衛生学会アレルギー・免疫毒性研究会 講演要旨集、49. (2008年9月、東京)
6. Wakasa, M., Imamura, M., Yoshioka, R., Takahashi, M., Negishi, T., Tsunoda, M., Aizawa, Y., Tashiro, H. and Tashiro, T. (2008) Toxicogenomic analysis of the effects of pre- and post-natal tributyltin exposure on the developing rat brain. 神経化学、47(2-3), 247. (2008年8月、富山)
7. 角田正史、辻雅善、木村幸子、張瑩、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2008) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究 : ポリ乳酸ラクチド膜埋め込みラットの神経伝達物質を用いた毒性評価. Biomedical Research on Trace Elements, 19(2), 195. (2008年7月、東京)
8. 角田正史、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、田代朋子、相澤好治 (2008) トリブチルスズ二世代曝露による仔ラットの脳内神経伝達物質への影響 (第2報) — 2週令での評価. 産業衛生学雑誌、第80回日本産業衛生学会講演集、50 (臨時増刊)、494. (2008年6月、札幌)
9. Tsunoda, M., Tsuji, M., Zhang, Y., Kimura, S., Sugaya, C., Inoue, Y., Kudo, Y., Satoh, T., Wakasa, M., Tashiro, T., Sugita-Konishi, Y. and Aizawa, Y. (2008) Immunotoxic effects of tributyltin on splenocytes in F1 rats after subacute administration. The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences, 102(1), 441. (2008年3月、米国ワシントン州シアトル市)
10. 角田正史、辻雅善、木村幸子、張瑩、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2008) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究 (第2報) : 人工硬膜埋め込みラットの行動学試験を用いた神経毒性評価. 日本衛生学雑誌、63(2), 457. (2008年3月、熊本)
11. 角田正史、吉田珠恵、辻雅善、張瑩、菅谷ちえ美、井上葉子、三木猛生、工藤雄一朗、佐藤敏彦、相澤好治 (2007) 低濃度 DBT 曝露によるマクロファージ系細胞の生存率の低下、サイトカイン産生に対する影響. Biomedical Research on Trace Elements, 18(2), 186. (2007年7月、福井)
12. 角田正史、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤

敏彦、相澤好治 (2007) トリブチルスズ二世代曝露による仔ラットの脳内神経伝達物質への影響. 産業衛生学雑誌、第 80 回日本産業衛生学会講演集、49 (臨時増刊)、817. (2007 年 4 月、大阪)

13. Tsunoda, M., Inoue, Y., Ito, K., Satoh, T., Katagiri, H., Akita, H., Saji, M., Yamada, T., Tsuchiya, T. and Aizawa, Y. (2007) The evaluation of neurotoxicity of an artificial dura mater containing dibutyltin in rats by the prepulse inhibition test and an open field test. *The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences*, 96(1), 308. (2007 年 3 月、米国ノースカロライナ州シャーロット市)

14. 角田正史、伊藤京子、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2007) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究：人工硬膜埋め込みラットの神経伝達物質を用いた神経毒性評価. *日本衛生学雑誌*、62(2), 443. (2007 年 3 月、大阪)

15. 田代朋子、高橋理貴、根岸隆之、角田正史、相沢好治、田代英夫 (2007) 脳神経学研究会企画シンポジウム 4 カスタム DNA マイクロアレイによる環境化学物質の発達神経毒性評価. *日本衛生学雑誌*、62(2), 298-299. (2007 年 3 月、大阪)

16. 角田正史、拝野貴之、伊藤京子、井上葉子、三木猛生、工藤雄一朗、佐藤敏彦、相澤好治、土屋利江 (2006) マウス小脳由来アストロサイト系細胞を用いてジブチルスズ、オクチル酸スズ、ポリ乳酸ラクチドの毒性評価. 第 13 回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集、66. (2006 年 9 月、倉敷)

17. Tashiro, T., Imamura, M., Takahashi, M., Ise, H., Amemiya, T., Tashiro, H., Ito, K., Inoue, Y., Tsunoda, M. and Aizawa, Y. (2006) Toxicogenomic analysis of the effects

of tributyltin exposure on the developing rat brain. 第 28 回日本生物学的精神医学会 第 36 回日本神経精神薬理学会 第 49 回日本神経化学会大会合同年会抄録集、313. (2006 年 9 月、横浜)

18. Tsunoda, M., Yamamoto, K., Ito, K., Inoue, Y., Miki, T., Kudo, Y., Satoh, T. and Aizawa, Y. (2006) Inhibitory effects of dibutyltin (DBT) dichloride on cytokine productions in murine macrophage cell line J774.1. *Biomedical Research on Trace Elements, Program and Abstracts of the 17th Annual Meeting*, 17(2), 190. (2006 年 7 月、静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 正史 (Tsunoda Masashi)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：00271221

(2) 研究分担者

田代 朋子 (Tashiro Tomoko)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号：50114541
小西 良子 (Konishi Yoshiko)
国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・研究員
研究者番号：10195761
佐藤 敏彦 (Satoh Toshihiko)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：10225972
工藤 雄一朗 (Kudo Yuichiro)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：60348505

(3) 連携研究者

なし