

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月3日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390198

研究課題名（和文） 環境化学物質の高次機能毒性評価における感受性マウス系統の有用性解析

研究課題名（英文） Analysis of usefulness of the susceptible mouse strain in higher functional toxicity evaluation of environmental chemicals

研究代表者

藤巻 秀和 (FUJIMAKI HIDEKAZU)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主席研究員

研究者番号：00124355

研究成果の概要（和文）：

揮発性有機化合物の曝露研究で開発した動物モデルの有用性についてこれまでとは異なる化学物質の曝露による高次機能における炎症反応の誘導を比較することで、過敏症の解明にとっての有用性を検証し、新たなバイオマーカーを探索することを目的とした。その結果、トルエン曝露の結果と同様に、乳仔期の低濃度ダイアジノン曝露は成長後の神経機能や免疫機能に影響を与えることが明らかとなった。さらに、ダイアジノン乳仔期曝露では、高次機能により影響出現時期に違いがみられるという新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Using the animal model developed by exposure research of volatile organic compounds, the effects of different chemical on inflammatory response in higher functions were investigated and compared to toluene for verification the usefulness of elucidation of hypersensitivity and searching new biomarkers. It was the same as that of the result of toluene exposure, diazinon exposure during neonatal period affects the nervous and immune functions in later life. Furthermore, the present study showed a new finding indicating that a different pattern of higher functions was found in neonatal diazinon exposure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：産業衛生

1. 研究開始当初の背景

われわれは、これまでの研究で揮発性有

機化合物に感受性なマウスの系統について、学習・記憶低下と関係する脳・神経や免疫分

野における炎症反応への影響を指標に検索した。その結果、室内環境の指針値や労働安全衛生法の管理濃度に近い値で過敏な反応を示したマウスの系統を検出した。室内の揮発性有機化合物などに曝露されることがその発症に関わると考えられている「シックハウス症候群」や「本態性多種化学物質過敏症(MCS)」の発症機構解明のために、ホルムアルデヒドとトルエンの低濃度曝露に対して過敏に反応する有用な動物モデルと考えられる。そこで、次に、その有用性や特性を明らかにして、ヒト集団での疾患の解明につなげ、予防することを目標にした。

2. 研究の目的

開発した動物モデルの有用性についてこれまでとは異なる化学物質の曝露による高次機能における炎症反応の誘導を比較することで、過敏症の解明にとっての有用性を検証し、新たなバイオマーカーを探索することを目的としている。具体的には、(1) 従来の毒性学で扱う濃度域より低いレベル(ホルムアルデヒドでは 80ppb, 400ppb; トルエンでは 5ppm, 50ppm)での曝露で影響が見られた感受性系統のマウスを用いて、室内汚染物質として殺虫剤などに用いられている農薬で脳・神経—免疫軸がかかわる神経性炎症反応およびアレルギー性炎症反応の変動を探索し、これまでの揮発性有機化合物の結果と感受性について比較検討する。(2) 高次機能をつかさどる脳・神経系と免疫系において低濃度の揮発性有機化合物、農薬の曝露により発現の亢進や増強が見られた感受性指標についてその影響機構の解明、ヒト集団へのバイオマーカーとしての有用性・応用について検討する。

3. 研究の方法

成体へのダイアジノン投与は、C3H/HeN マウスを用いて、0, 0.05mg/kg, 0.5mg/kg, 5.0mg/kg 体重の濃度で、週1回の腹腔内投与を3—5回行って、影響を解析する。一部、TLR4 関与を探るため C3H/HeJ マウスを使用する。

発達期投与は、0, 0.5mg/kg, 5.0mg/kg 体重の濃度で、出生8日—11日の毎日1回皮下へ、4回連続投与を行って影響を解析する。神経系炎症反応の解析グループでは、ダイアジノン曝露終了後、嗅球と海馬の mRNA とタンパクレベルでの解析用の試料は、マウスを麻酔し採血後直ちに液体窒素で凍結する。定量的 real-time PCR は、まず試料より BioRobot EZ-1 を用いて総 RNA を抽出し、

総 RNA からの first-strand cDNA の作成は、Invitrogen 社の SuperScript Rnase H-reverse Transcriptase を用いた方法で行なう。各サイトカイン mRNA の発現は、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc.)を用いて行う。サイトカイン・ケモカイン蛋白については、ELISA 法により測定する。

ダイアジノン感受性が高い乳仔期の仔マウスに投与後、8週齢の成長期における海馬機能への影響について新オブジェクト認知(NOR)テストで学習行動への影響を確認するとともに遺伝子、タンパクレベルで解析する。また、トルエンの乳仔期曝露で海馬において鋭敏な反応のみられた神経栄養因子や自然免疫で重要なトール様受容体経路についてもダイアジノンの影響を調べ比較検討する。

免疫系炎症反応の解析グループでは、肺組織を採取し、炎症性細胞の集積や炎症性サイトカイン産生について免疫組織学的、あるいは ELISA 法を用いて検討する。また、脾臓や頸部リンパ節におけるサイトカイン、および転写因子 mRNA の発現については、定量的 real-time PCR で検索する。他方、神経由来の伝達物質は免疫系の組織でも調節、制御作用を示し、その産生がみられることから、肺や脾臓における NGF、BDNF、Trk A と Trk B の発現、及びサブスタンス P 産生についても real-time PCR と ELISA 法で検討する。ダイアジノン感受性が高い乳仔期の仔マウスに投与後、8及び12週齢の成長期に肺や脾臓における影響を炎症性細胞の集積や炎症性サイトカイン産生について遺伝子、タンパクレベルで検討する。また、トルエンの乳仔期曝露で鋭敏な反応のみられた神経栄養因子やトール様受容体についても免疫臓器におけるダイアジノンの影響を調べ比較検討する。

4. 研究成果

神経系炎症反応の解析結果

4-1 VOC の研究で高い感受性を示した C3H/HeN マウスを用い、成体への低濃度のダイアジノン投与を行い、神経—免疫軸での炎症反応の誘導について検討した。その結果、海馬における記憶情報の伝達系や神経栄養因子の関連する情報伝達系ではダイアジノン投与の影響はみられなかった。

4-2 VOC の研究で高い感受性を示した C3H/HeN マウスを用い、発達期に低濃度のダイアジノン投与を行い、成長期に神経機能

について検討した。その結果、8週齢時に行った海馬機能に関連する新オブジェクト認知(NOR)テストでは、ダイアジノン曝露群で対照群に比べ新規認知機能の有意な低下が認められた(図 1)。移動速度には差は見られなかった。NMDA 受容体の mRNA 発現では有意な差はみられていない。

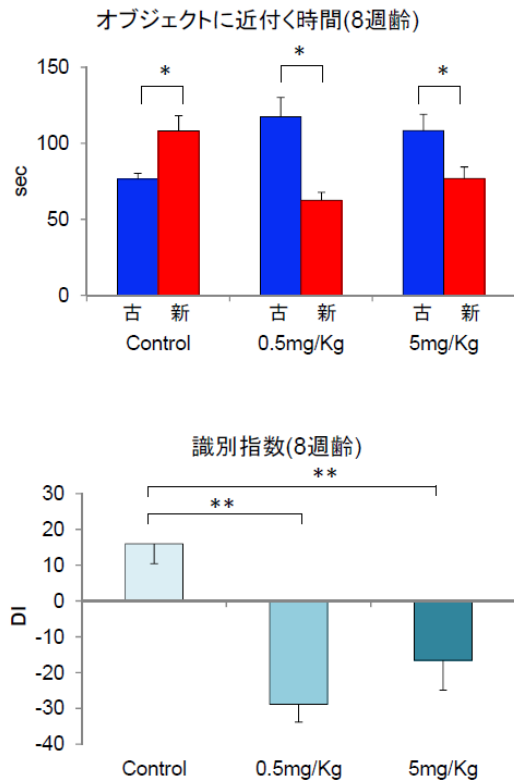


図 1. 新オブジェクト認知(NOR)テストの結果 (8 週齢) (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

上図は、古いオブジェクトと新しいオブジェクトでの時間；下図は全体の時間の中で新しいオブジェクトでの時間の割合

4-3 ダイアジノンを受容性が高い乳仔期の仔マウスに投与後、成長期における海馬機能への影響について新オブジェクト認知(NOR)テストを用いて学習行動への影響および関連する遺伝子レベルでの影響をさらに詳しく解析した。その結果、乳仔期曝露後、12週齢の時期にも NOR テストによる認知能力の低下が認められた(図 2)。遺伝子レベルの検索では、8週齢時に CaMKIV, CREB1、神経栄養因子 NGF の発現低下が認められたが、12週齢時には NGF 以外の指標では影響がみられなくなり、回復が認められた。

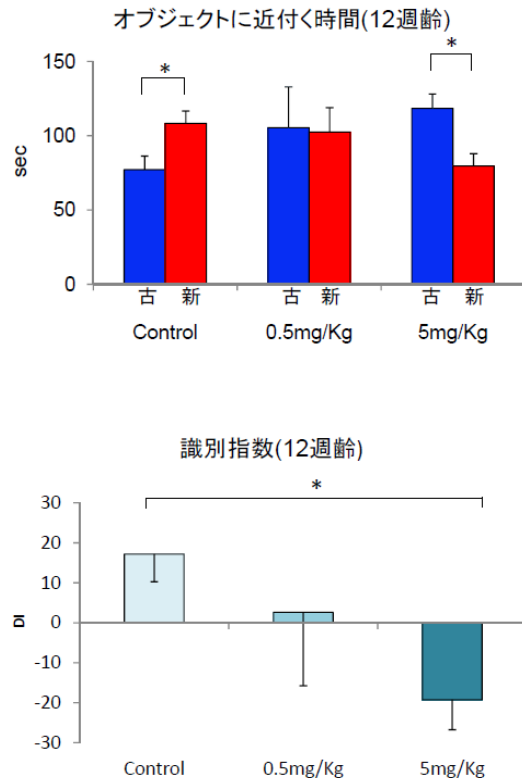


図 2. 新オブジェクト認知(NOR)テストの結果 (12 週齢) (* $P < 0.05$).

免疫系炎症反応の解析結果

4-4 成体へのダイアジノン投与では、肺における炎症反応の誘導は認めなかった。しかしながら、脾臓において Th1/Th2 バランスに重要な転写因子のうち Foxp3 と GATA3 などの転写因子の発現抑制がダイアジノン投与群で認められた。FACS によるリンパ球亜集団の解析では、ダイアジノン投与の有意な影響はみられなかった。さらに、トール様受容体 TLR4 の発現が正常な C3H/HeN マウスと TLR4 欠陥を示す C3H/HeJ マウスとの影響比較で、ダイアジノンに対する転写因子発現の応答性が異なることが明らかとなった。

4-5 発達期のダイアジノン投与による脾臓における炎症反応の誘導では、3週齢時に、脾臓、胸腺重量に変化はみられなかったが、サイトカイン産生では、IL-4, TNF- α , GM-CSF で有意な抑制が認められた。ところが、8週齢時になると、脾臓、及び胸腺重量の増加が認められ、転写因子の GATA3 の発現増加がダイアジノン投与群で認められた。肺における TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインでは差はみられなかった。これらの結果は、発達期の特定の短い時期でのダイアジノン曝露が、成長後の免疫系機能

に何らかの障害作用を生じていることを示している。

4-6 発達期の中の乳仔期のダイアジノン投与による免疫系への影響のさらなる解析では、投与後、12 週齢時には脾臓重量、GATA3mRNA、及び TIgG1 の有意な増加が認められた。TIgG2a には差はみられていない。肺においては、ダイアジノン投与群で TNF α , TGF β などのサイトカイン遺伝子の有意な増加が認められた。神経栄養因子については、有意な影響がみられなかった。

以上、トルエン曝露の結果と同様に、乳仔期のダイアジノン曝露は成長後の神経機能や免疫機能に影響を与えることが明らかとなり、低濃度化学物質の曝露に対する感受性期を考慮するとき、本動物モデルでの乳仔期は感受性の鋭敏な時期と考えられる。

まとめると、ダイアジノン乳仔期曝露では、神経系への影響は 8 週齢時に強い反応を示したが、免疫機能では 12 週齢時の方がより強い影響を示し、高次機能により影響出現時期に違いがみられるという新たな知見が得られた。神経系バイオマーカー候補としては、海馬における情報伝達系の因子、神経栄養因子が挙げられ、免疫系では IgG1 抗体、Th2 タイプの転写因子が挙げられる。

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 9 件)

- ① Fujimaki H, Win-Shwe TT, Yamamoto S, Nakajima D, Goto S, Role of CD4(+) T cells in the modulation of neurotrophin production in mice exposed to low-level toluene, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 査読有、Vol.31, No.1, 2009, pp.146-149.
- ② Fujimaki H, Win-Shwe TT, Yamamoto S, Nakajima D, Goto S, The expression of nerve growth factor in mice lung following low-level toluene exposure, *Toxicology Letters*, 査読有、Vol.191, No.1-3, 2009, pp.240-245.
- ③ Win-Shwe TT, Kunugita N, Yamamoto S, Arashidani K, Fujimaki H, Strain differences influence N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene expression in the olfactory bulb of an allergic mouse model following toluene exposure,

Neuroimmunomodulation, 査読有、Vol.17, No.5, 2010, pp.340-347.

- ④ Win-Shwe TT, Fujimaki H, Neurotoxicity of toluene, *Toxicology Letters*, 査読有、Vol.198, No.2, 2010, pp.93-99.
- ⑤ Win-Shwe TT, Yoshida Y, Kunugita N, Tsukahara S, Fujimaki H, Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus?, *Neurotoxicology*, 査読有、Vol.31, No.6, 2010, pp.647-653.
- ⑥ Fujimaki H, Win-Shwe TT, Yamamoto S, Kunugita N, Yoshida Y, Arashidani K, Different sensitivity in expression of transcription factor mRNAs in congenic mice following exposure to low-level toluene, *Inhalation Toxicology*, 査読有、Vol.22, No.11, 2010, pp.903-909.
- ⑦ Win-Shwe TT, Nakajima D, Fujimaki H, Involvement of TLR4 in diazinon-induced neurotoxicity in mice, *J UOEH*, 査読有、Vol.34, No.1, 2012, pp.1-13.
- ⑧ Win-Shwe TT, Kunugita N, Nakajima D, Yoshida Y, Fujimaki H, Developmental stage-specific changes in immunological biomarkers in male C3H/HeN mice after early life toluene exposure, *Toxicology Letters*, 査読有、Vol.208, No.2, 2012, pp.133-141.
- ⑨ Fujimaki H, Win-Shwe TT, Yoshida Y, Kunugita N, Arashidani K, Dysregulation of immune responses in an allergic mouse model following low-level toluene exposure, *Toxicology*, 査読有、Vol.286, No.1-3, 2011, pp.28-35.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 藤巻 秀和, 健康影響と感受性、第 50 回大気環境学会年会、2009, 9, 16, 横浜。
- ② 樺田 尚樹ら、マウス系統差で探るトルエン曝露にたいする免疫系感受性要因、第 50 回大気環境学会年会、2009, 9, 16, 横浜。
- ③ Win-Shwe TT et al., Developmental toluene exposure alters neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice, XII International Congress of Toxicology, 2010, 7, 21, Barcelona, Spain.
- ④ Fujimaki et al., Modulation of the expression of transcription factors

mRNAs in spleen from the mice following organophosphate pesticide exposure, 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 2010, 11, 8, Singapore, Singapore.

- ⑤ Win-Shwe TT et al., Toll-like receptor 4 mediated neurotrophins, their receptor and signaling pathways in the neuroinflammation of organophosphate pesticide, 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 2010, 11, 8, Singapore, Singapore.
- ⑥ Win-Shwe TT & Fujimaki H, Developmental exposure to diazinon impairs novel object recognition in later life in a mouse model, 8th International Brain Research Organization World Congress of Neuroscience, 2011, 7, 14, Florence, Italy.
- ⑦ Fujimaki H & Win-Shwe TT, Developmental diazinon exposure induces immune dysfunction in adult mice, 47th Congress of the European Society of Toxicology, 2011, 8, 29, Paris, France.
- ⑧ Fujimaki H & Win-Shwe TT, Effect of diazinon injection during developmental stage on immune response in mice, 52nd Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment, 2011, 9, 14, Nagasaki.
- ⑨ Win-Shwe TT & Fujimaki H, Impact of toll-like receptor (TLR)4 on hippocampus-dependent object recognition in early life diazinon exposure, 2011, 11, 13, Washington DC, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤巻 秀和 (FUJIMAKI HIDEKAZU)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主席研究員
研究者番号：00124355

(2) 研究分担者

ティン・ティン ウィン・シュエイ (TIN-TIN WIN-SHWE)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研
究センター・研究員
研究者番号：00391128

(3) 連携研究者

該当なし