

機関番号：32409
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710069
 研究課題名(和文) 有機リン系農薬の生殖毒性及び内分泌系臓器におけるターゲット分子の同定
 研究課題名(英文) Investigation on toxic effects of organophosphate pesticide to endocrine organs related to reproductive system, and identification of target molecules of the chemicals in these organs.
 研究代表者
 廣澤 成美(HIROSAWA NARUMI)
 埼玉医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40327060

研究成果の概要(和文): 本研究ではフェニトロチオンが内分泌臓器に及ぼす影響を調査するために雄若齢ラットを用いて曝露実験を行った。その結果、フェニトロチオン 30mg/kg/day 投与群の副腎と脳下垂体重量の増加がみられた。またフェニトロチオン投与群ではテストステロン及び ACTH の血中濃度が高くなることが示された。脳下垂体と副腎におけるプロテオーム解析を遂行し、コントロール群と比較し投与群において発現量が増減した蛋白を同定することができた。

研究成果の概要(英文): I carried out exposure experiments to the mature male rats in order to investigate the effects of the fenitrothion on endocrine organs. As the result, in the 30 mg/kg/day administrated group, adrenal and pituitary glands showed the increase in the weight. In addition, testosterone and ACTH blood concentration were increased by the administration of fenitrothion. I quantitatively compared the expressed proteins on the each glands of administrated with control groups and performed identifications of the interest proteins based on the proteomic method.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：機能生化学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：有機リン系農薬、生殖毒性、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

本研究申請時において、申請者はポリ塩化ビフェニルの可塑剤に使用される DEHP が雌ラット性周期やその関連ホルモン分泌量に及ぼす影響を調査し、脳下垂体のプロテオーム解析結果から DEHP 投与群において複数の蛋白が Gonadotrophin における LH、FSH の合成

または放出の抑制に関与し雌ラットの性周期の変動とホルモン分泌に影響を及ぼしていることを報告した。これに対して有機リン系農薬であるフェニトロチオンは、近年抗アンドロゲン作用が指摘され、そのアンドロゲン受容体への結合阻害の強さは前立腺ガン治療薬として使われているフルタミドに匹敵すると

いう報告がある。このことから、フェニトロチオンの内分泌臓器に及ぼす影響や体内における動態を調査するために、フェニトロチオンを投与した雄ラットの血中代謝濃度の変化や、その代謝産物の解析を行い学会等で報告した。

2. 研究の目的

本研究では、有機リン系農薬として広く使用されているフェニトロチオンについて、雄若齢ラットを用いた曝露実験を行い、視床下部 下垂体 生殖腺 (HPG) 系に対する作用を解明するための基礎的研究を目的とし、フェニトロチオン曝露による血中の内分泌ホルモン濃度変動と内分泌系臓器である下垂体と副腎に注目しプロテオーム解析によりそのターゲット分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

雄ラット Wistar-Imamichi 3 週齢を用いてフェニトロチオン投与実験を行った。ラットを 5 群に分け、コントロール群にはゴマ油のみ投与し、投与群 (4 群) にはフェニトロチオンをゴマ油に混合し 0.1mg, 1mg, 10mg, 30mg/kg/day の異なる 4 段階の濃度に調製し各群 10 匹、5 週間 (計 25 回) の投与を行った。この投与実験は再現性を確認する為に同様の実験を 2 回行った。

投与期間後ラットを解剖し、臓器重量 (肝臓、脾臓、副腎、脳、下垂体、精巣) を測定した。内分泌系に関連する血清中ホルモン濃度 (FSH、テストステロン、プロゲステロン、ACTH、) は ELISA kit を用いて測定した。また摘出した脳下垂体及び副腎から可溶性蛋白を抽出しプロテオーム解析を行った。

プロテオーム解析の方法及び条件

(1) 二次元電気泳動

サンプル前処理

抽出 Buffer: 7M urea, 2M thiourea, 30mM Tris, 4% CHAPS

蛋白量: 1mg/Strip

電気泳動条件

等電点電気泳動: Immobiline DryStrip pH3-11NL, pH3-10NL 24cm (GE 社製)
泳動装置 Multiphor (GE 社製)

SDS 電気泳動: ExcelGel SDS XL Gradient 12-14% ゲル 24.5×18.0cm (GE 社製)
泳動装置 Multiphor (GE 社製)

染色方法: CBB G-250 染色

画像解析: GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD 社製)

解析ソフト: PDQuest (BIO-RAD 社製)

(2) スポットピッキング及びインゲル消化

Ettan Spot Picker (GE 社製)

EXCISE (島津製作所社製)

(3) MALDI-MS、MALDI-MS/MS 解析

AXIMA-CFR、AXIMA-QIT (島津製作所社製)

4. 研究成果

フェニトロチオン投与期間中のラットの体重変化を観察した。0.1~10mg/kg/day 投与群のラットの体重増加はコントロール群と比較して差が見られず、成長に伴い順調に体重は増加した。しかし 30mg/kg/day 投与群においては明らかに体重増加量の低下が観察された (図 1)。

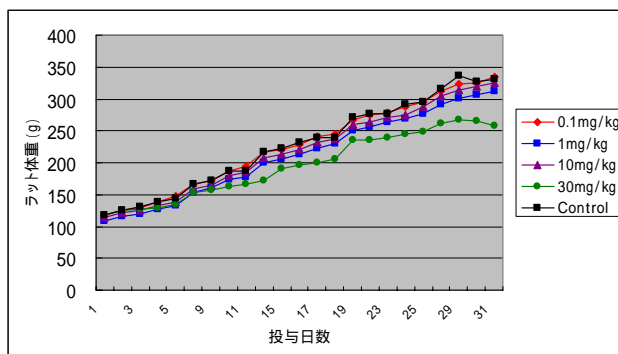


図 1. 投与期間におけるラットの体重変化

この結果から、フェニトロチオン 30mg/kg/day 投与はラット体重増加に影響を及ぼすことが示唆された。

5 週間の投与終了後にラットの解剖を行った。臓器重量を測定した結果、副腎重量は、コントロール群と比較してフェニトロチオン 0.1~10mg/kg/day 投与群においては減少傾向を示したが、30mg/kg/day 投与群においては副腎と脳下垂体重量の増加がみられた (表 1)。肝臓、脾臓、脳、精巣の重量測定も同様に行ったがコントロール群と比較し投与群では差が見られなかった。

表 1. 投与群別のラット副腎、下垂体重量

| | Adrenal-R (mg) | Adrenal-L (mg) | Pituitary (mg) |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Control | 6.74 ± 0.63 | 7.71 ± 0.89 | 2.70 ± 0.19 |
| 0.1mg/kg | 6.89 ± 0.59 | 7.48 ± 0.82 | 2.72 ± 0.24 |
| 1mg/kg | 6.71 ± 0.79 | 7.42 ± 0.64 | 2.67 ± 0.18 |
| 10mg/kg | 6.52 ± 0.58 | 7.18 ± 0.90 | 2.75 ± 0.21 |
| 30mg/kg | 8.41 ± 1.02 | 10.54 ± 1.05 | 2.83 ± 0.16 |

* ラット体重 100g 当りの臓器重量

** ラット数 (n= 20)

ラットでは雌雄により脳下垂体及び副腎の重量に差があり、雌の方が重くなることが知られている。また副腎はストレスが加わることで肥大し重量が重くなる。このことから

今回の投与実験結果においてフェニトロチオン投与が雄ラットの脳下垂体 副腎機能系に何らかの影響を及ぼしている可能性が示された。各群の血中内分泌ホルモン濃度変動を測定した。その結果、FSH、プロゲステロン、テストステロン、ACTHの血中濃度においてコントロール群と投与群の間に差がみられた(図2.3.4.5)。

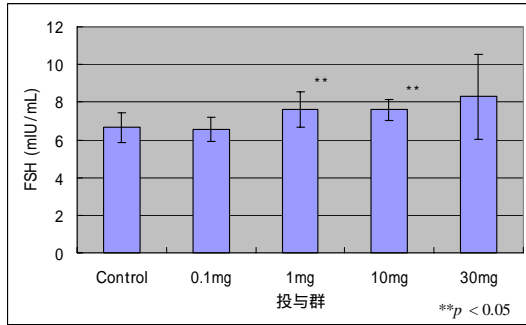


図2. 血清中のFSH濃度

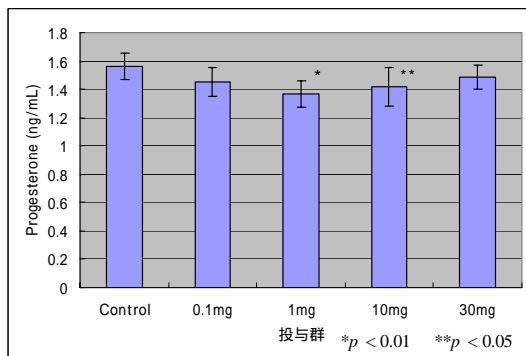


図3. 血清中のプロゲステロン濃度

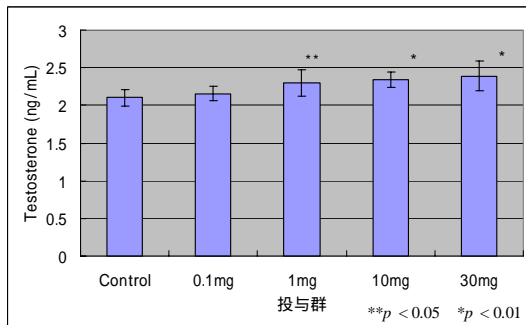


図4. 血清中のテストステロン濃度

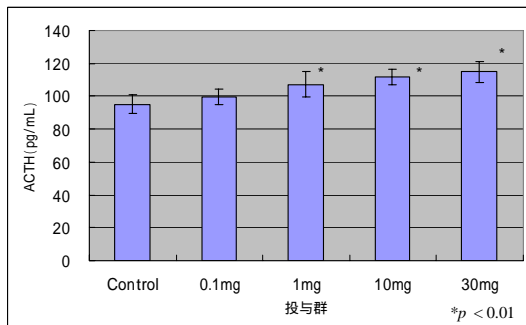


図5. 血清中のACTH濃度

特にこの結果から、フェニトロチオン投与量が1mg~30mg/kg/dayと多くなるに伴いテストステロン及びACTHの血中濃度が高くなること示された(図4.5)。これは、フェニトロチオンを投与したことによる内分泌ホルモンへの影響を表していると考えられた。

これらの結果から、脳下垂体と副腎から可溶性蛋白を抽出しプロテオーム解析を遂行した。二次元電気泳動の結果、副腎、脳下垂体の良好な泳動画像が得られた。(図6.7)

得られた各群(5群)画像5~6枚から3枚のゲルを選定し、画像解析ソフト(PDQuest)を用いてスポット解析を行った。副腎では約1,500のスポット、脳下垂体では約1,200のスポットについてマッチングを行うことができた。定量解析の結果、コントロール群と比較し各濃度の投与群において発現量が増減した蛋白スポットを複数発見し同定することができた。(図6.7.8.9)

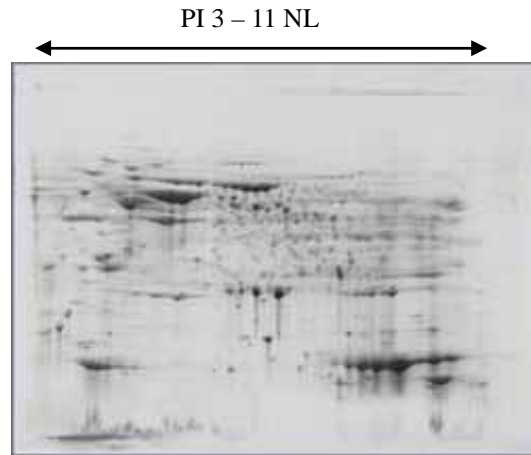


図6. 二次元電気泳動画像 (Control群:副腎)

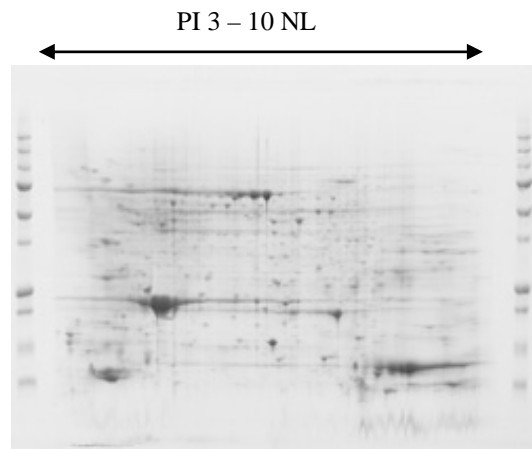


図7. 二次元電気泳動画像 (Control群:脳下垂体)

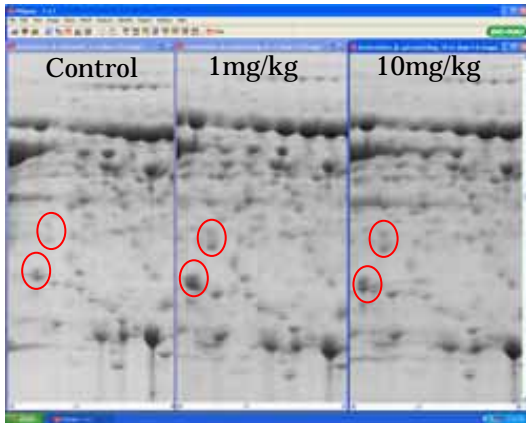


図8．蛋白スポット解析結果1
(赤で囲われたスポットはコントロールと比較し投与群で発現量が増加している)

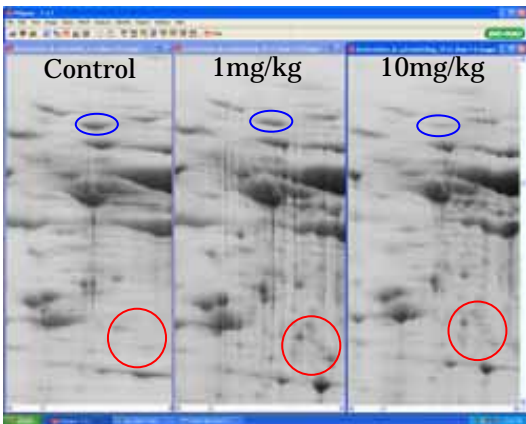


図9．蛋白スポット解析結果2
(青で囲われたスポットはコントロール群と比較し発現量が減少している。赤で囲われたスポットはコントロール群と比較し投与群で発現量が増加している)

フェニトロチオンのラット長期実験における無害毒性 (NOEL) は 10mg/kg 食餌とされているが、プロテオーム解析の結果、1mg/kg/day 投与量の雄若齢ラットへの長期暴露により、内分泌系臓器である副腎や脳下垂体の蛋白発現量に影響を与えることが示された。これは、我が国の農産物の残留基準値において、小麦 10ppm、小麦粉 (全粒粉を除く) 1ppm とされているが、生殖毒性の影響も懸念されることから、未熟で発達中の幼児に対してはフェニトロチオンの暴露を避ける事が望ましいと考えられた。

これらの研究結果については国内学会等で報告を行った。現在さらに解析を行い、フェニトロチオンの作用機序について詳細な検討を重ね、欧文雑誌への論文投稿の準備をしている。今後は、フェニトロチオンと同様に内分泌系に影響を及ぼすと考えられてい

る他の有機リン系農薬について、同様のアプローチで解析を行いその作用機序等の比較をしたい。

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)

Guo H, Liu T, Uemura Y, Jiao S, Wang D, Lin Z, Narita Y, Suzuki M, Hirosawa N, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Senju S, Zhang Q, Ling F. Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(3):227-34. (査読有)

坂本安、米谷新、廣澤成美 環境有機リン暴露の加齢、視機能に及ぼす影響 埼玉医科大学雑誌 2009年 第36巻 第1号 85-86. (査読無)

Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Nakatsuka R, Araki T, Matsumoto M, Iwai LK, Hirosawa N, Matsuoka Y, Murakami M, Kimura T, Hase M, Kohno H, Sasaki Y, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Jiao SC, Senju S, Sonoda Y. Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells. *J Immunol.* 2009;183(1):201-8. (査読有)

[学会発表](計2件)

フェニトロチオンとその代謝産物の生体への影響調査 坂本安 2010年9月9日(木)~10日(金) 東京 フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー

Modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells 鈴木元晴 2009年10月1(木)-3(土) 横浜 第68回 日本癌学会学術総会

6．研究組織

(1)研究代表者

廣澤 成美 (HIROSAWA NARUMI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：40327060