

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860444

研究課題名(和文)鉛が発達過程の神経系に及ぼす影響とその性差に関する研究

研究課題名(英文)The effect of lead on the developmental process of the nervous system and its sexual difference

研究代表者

大森 由紀(Omori, Yuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30415971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット由来の海馬アストロサイトに鉛を暴露させた後、カルシウムイオン応答への影響を検討した。アストロサイトは、鉛濃度2.5  $\mu\text{M}$ 以上の低濃度曝露で濃度依存的にカルシウムイオン応答が低下する傾向が確認され、応答の速度がコントロールと比べて遅くなる傾向が見られた。また、細胞中のD,L-Serineが40  $\mu\text{M}$ の濃度で高くなる傾向が見られた。本研究より、鉛による神経毒性の経路の一つとしてアストロサイトの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the influence of calcium signaling in rat hippocampus astrocytes after exposure to lead. There was the tendency to decrease calcium ion influx into astrocytes with concentration-dependent lead exposure and to become slower than control. Moreover, we observed increase of D,L-Serine in 40  $\mu\text{M}$  lead exposure astrocytes. This study suggested that Astrocyte is possibly one of the pathway in the lead-induced neurotoxicity.

研究分野：衛生学

キーワード：鉛 神経毒性 アストロサイト カルシウム応答 D-Serine

## 1. 研究開始当初の背景

有害微量元素のひとつである鉛の毒性は多岐にわたるが、中枢・末梢神経への影響が広く知られている。鉛は加工しやすく安価なため世界消費量は10,577千トン(2012年)と多く、消費量は毎年増加している。先進国では主な鉛源であった加鉛ガソリンを規制することで環境からの鉛曝露を減少させているが、開発途上国では急速な産業発展に伴う環境汚染や、加鉛ガソリンの規制後にも塵埃中に残留する鉛による曝露<sup>1)</sup>や電気電子機器廃棄物の処理過程での曝露<sup>2)</sup>が問題となっている。近年、欧州や米国では玩具や装飾品からの鉛曝露がきっかけとなり、鉛の毒性が現在再認識され問題となっている。さらに近年、従来では問題がないとされてきた血中鉛濃度10 µg/dL以下であっても中枢・末梢神経への毒性があることが次第に明らかになってきた。小児の血中鉛濃度とIQとの間に負の相関があること<sup>3)</sup>や、3 µg/dLで小児の読書力のスコアに低下が見られ<sup>4)</sup>、低濃度域での中枢神経影響が明らかとなった。また、血中鉛が6~18 µg/dLの低濃度範囲においても聴力と負の相関を示し、500 Hzから4000 Hzの周波数領域のいずれにおいても2 dBの聴力の損失がある<sup>5)</sup>ことが示されている。末梢神経系への影響が成人でみられるのに対して、小児では中枢神経系への非可逆的な影響がみられる傾向がある<sup>6)</sup>。また、母親の臍帯血の鉛濃度と小児のその後の発達指標スコアとの間に、男児のみに有意な逆相関関係がみられること<sup>7)</sup>、妊娠12週の母体の血中鉛濃度と出生体重に男児のみ負の相関がみられたこと<sup>8)</sup>など性差が関与することも考えられる。

低濃度鉛による神経系への影響は、神経伝達物質を介しての機序あるいはカルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)チャネルの阻害による機序が考えられている。また、中枢神経系の障害はグリア細胞であるアストロサイトにおける関与が疑われる。アストロサイトは、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度分布の変化が神経伝達に関わり記憶や学習に直接関与していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。しかし、まだ鉛による毒性機序は明らかではない。本研究では、低濃度鉛曝露の神経毒性機序解明の第一段階としてグリア細胞で神経伝達物質Ca<sup>2+</sup>、L-serineやD-serine等を指標とし鉛のターゲットを特定する。さらに中枢・末梢神経への影響を検討する。

## 2. 研究の目的

低濃度鉛曝露の神経毒性機序を中枢・末梢およびグリア神経細胞で、神経伝達物質等の濃度や分布の変化を解析、動物実験で発達過程の神経機能低下と神経興奮因子を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞生存実験

ラット由来の海馬アストロサイト(ScienCell Research Laboratories)に酢酸鉛(和光純薬)を濃度0, 0.05, 0.14, 0.42, 1.3, 3.7, 11, 34, 100, 910 µM/培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% FBS)で曝露させた。24時間後、蛍光試薬(同仁化学研究所, Cell counting kit-F)を添加し、蛍光マイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific, Varioskan LUX)にて蛍光強度を測定した。また、顕微鏡(Nikon, TMS)にて形態を観察した。

### (2) カルシウム応答実験

ラット由来の海馬アストロサイトに酢酸鉛を濃度0, 0.5, 1, 2.5, 10, 50, 100 µM/培地で曝露させた。24時間曝露後、細胞を蛍光染色(AAT Bioquest, Cal-520)し、蛍光顕微鏡(Olympus, cat.IX71, Xeランプ95 W、励起波長帯~489 nm)で測定した。刺激薬は、100mM KCl(関東化学)を用いた。測定は、灌流下で行った。画像解析は、MetaMorph(Molecular Devices, version 7.5.5.0)を使用した。補正式は、蛍光測定値(F)、ベースライン(F0)として、 $F = (F - F0) / F0$ とした。

### (3) 細胞中のD,L-Serineの測定

ラット由来の海馬アストロサイトに酢酸鉛を濃度0, 2.5, 10, 40 µM/培地で24時間曝露させた。曝露後、培養液はフィルターで濾過し、細胞はPhosphate Buffered Saline(ナカライテスク)で洗浄後に採取した。細胞と培地中のD,L-Serine濃度は、二次元高速液体クロマトグラフィー(資生堂フロンティア事業部)<sup>10)</sup>にて測定した。

### (4) ラット投与実験

3週齢のWistarラット(日本クレア)に酢酸鉛を濃度0, 150, 750 ppmで各6匹/群、自由飲水にて投与した。雄雌各群に30日間投与した。投与期間中は、体重と飲水量を記録した。投与期間終了後、午前中に防音室にてプレパルスインヒビション試験(San Diego Instruments, SR-LAB)を行った。驚愕反応を誘発する感覚刺激として、音刺激120 dBを用い、プレパルス刺激は70, 75, 80 dBとした。順化時間は5分とした。その後、麻酔下で採血後に灌流し、解剖を行った。臓器(脳、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、子宮、精嚢、精巣)を採取した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞生存実験

細胞生存実験の結果、100 µM以下では有意な低下は認められなかった(図1)。また、

100  $\mu\text{M}$  以下では顕著な形態の変化は観察されなかった。

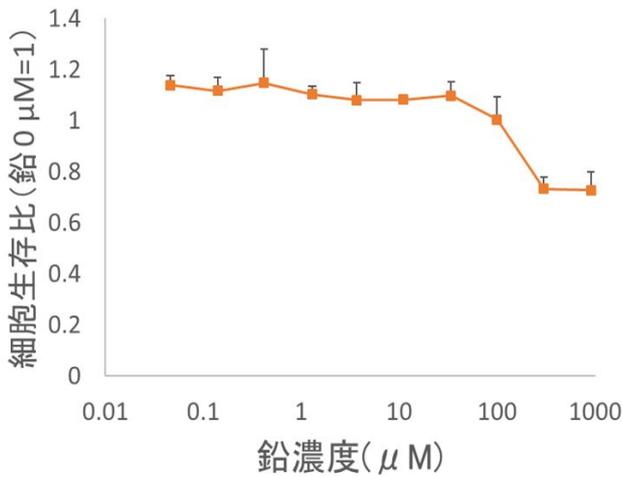


図1．細胞生存比

(2) カルシウム応答実験

図2より高濃度KCl刺激による強制的脱分極後の  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、コントロールと比較して鉛濃度 0.5 と 1.0  $\mu\text{M}$  は差が認められなかった。鉛濃度 2.5, 10 および 50  $\mu\text{M}$  ではコントロールに比べて顕著な低下が見られたが、100  $\mu\text{M}$  では  $\text{Ca}^{2+}$  応答自体が確認されなかった。鉛濃度 2.5  $\mu\text{M}$  以上では濃度依存的に  $\text{Ca}^{2+}$  応答が低下する傾向が確認され、応答の速度がコントロールと比べて遅くなる傾向が見られた。

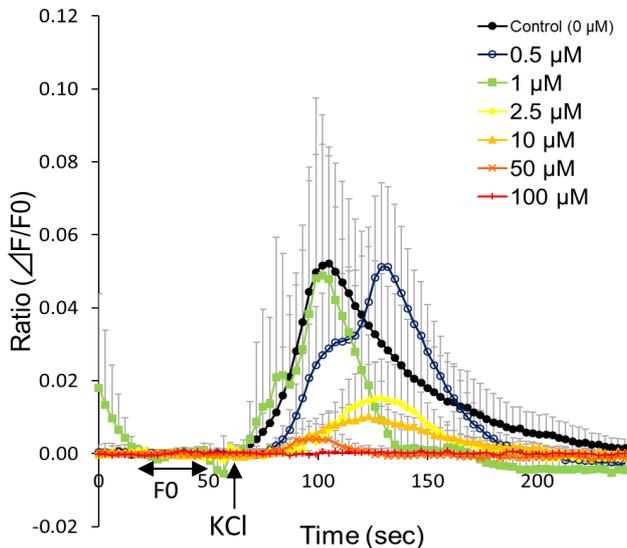


図2．カルシウム応答の時間変化

(3) 細胞中の D,L-Serine の測定

細胞中の D,L-Serine は、40  $\mu\text{M}$  の鉛濃度で高くなる傾向が見られた (図3、4)。

培養液中の D,L-Serine は、変化は認められなかった。しかし、今回の培養液は細胞に比して量が非常に多いため希釈されてしまった可能性があるため更なる検討が必要で

あると考える。

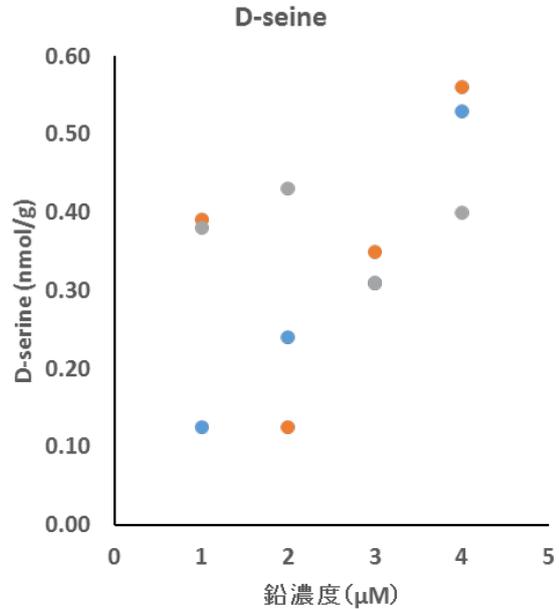


図3．細胞中の D-Serine 濃度

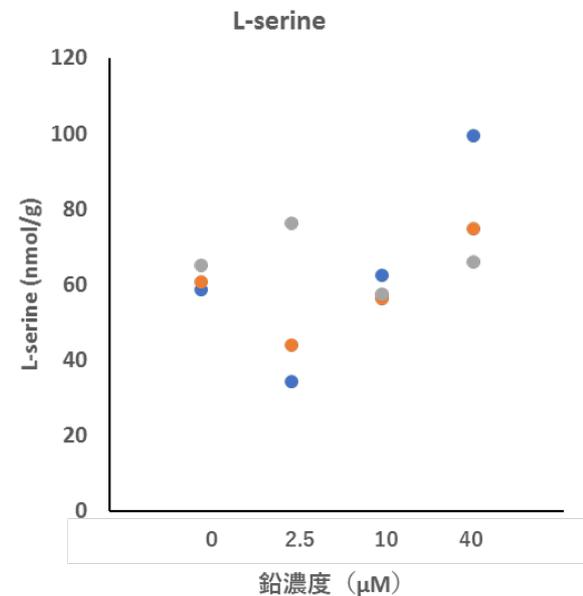


図4．細胞中の L-Serine 濃度

(4) ラット投与実験

雄雌ラットどちらも鉛濃度3群間の体重に差は認められなかった。他の項目に関しては、現在解析中である。

(5) まとめ

鉛がアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  応答を変化させることが示唆された。また、細胞中の D,L-Serine が高くなる傾向が見られた。

この変化を起こす機序を解明するため、鉛がアストロサイトのどの受容体に強く影響するか等、さらなる検討が必要である。

本研究より、鉛による神経毒性の経路の一つとしてアストロサイトの関与が示唆された。

〔引用文献〕

- 1) 横山和仁: 鉛 : 古くて新しい問題 (特集 鉛 : 古くて新しい問題). 保健の科学, 55, 4-6, 2013.
- 2) 大森由紀, 横山和仁: 有害金属の新たな問題. 産業医学ジャーナル, 38, 80-84, 2015.
- 3) Canfield RL, Henderson CR, Jr., Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP: Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med*, 348, 1517-1526, 2003.
- 4) Miranda ML, Kim D, Galeano MA, Paul CJ, Hull AP, Morgan SP: The relationship between early childhood blood lead levels and performance on end-of-grade tests. *Environ Health Perspect*, 115, 1242-1247, 2007.
- 5) Schwartz J, Otto D: Lead and minor hearing impairment. *Arch Environ Health*, 46, 300-305, 1991.
- 6) Bellinger DC: Lead. *Pediatrics*, 113, 1016-1022, 2004.
- 7) Jedrychowski W, Perera F, Jankowski J, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, Edwards S, Skarupa A, Lisowska-Miszczuk I: Gender specific differences in neurodevelopmental effects of prenatal exposure to very low-lead levels: the prospective cohort study in three-year olds. *Early Hum Dev*, 85, 503-510, 2009.
- 8) Nishioka E, Yokoyama K, Matsukawa T, Vigeh M, Hirayama S, Ueno T, Miida T, Makino S, Takeda S: Evidence that birth weight is decreased by maternal lead levels below 5µg/dl in male newborns. *Reprod Toxicol*, 47, 21-26, 2014.
- 9) Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K, Hirase H: Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci*, 31, 18155-18165, 2011.
- 10) Miyoshi Y, Hamase K, Tojo Y, Mita M, Konno R, Zaitu K: Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877, 2506-2512, 2009.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2件)

大森由紀, 上窪裕二, 松川岳久, 横山和仁, 堀口兵剛: 低濃度の鉛曝露によるアストロサイトのカルシウムイオンおよびD,L-Serine への影響. 第44回日本毒性学会学術年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 7/10-12, 2017.

大森由紀, 上窪裕二, 松川岳久, 横山和仁, 堀口兵剛: 低濃度の鉛によるアストロサイト内カルシウム応答への影響. 第87回日本衛生学会学術総会, フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県宮崎市), 3/26-28, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大森 由紀 (Omori, Yuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号 : 3 0 4 1 5 9 7 1