

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20760361

研究課題名 (和文) 幼児を対象とした環境汚染物質の神経毒性リスク評価方法の開発

研究課題名 (英文) Development of neurotoxicity risk assessment of environmental pollutant for young children

研究代表者

中山 亜紀 (Nakayama Aki)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10335200

研究成果の概要 (和文)：

3 週齢の幼若ラットに経口摂取で鉛を投与し、採取した血液と脳に含まれる鉛を定量し、血中鉛濃度と脳内鉛濃度がほぼ同程度であることを確認した。0-1.0 microM の範囲で酢酸鉛をモデル神経細胞 PC12 に曝露し、タンパク質の発現変動を調べたところ、脳において発現量の多い heme oxygenase 2 (HO-2) について、0.5 microM 以上で発現量が減少することを確認した。HO-2 は鉛の神経毒性の分子ターゲットであり、またこれを指標としてリスク評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The concentrations of Pb in blood and brain following oral doses were examined and it was found that the both concentrations were almost the same. Neuronal model cells, PC12, were exposed to lead acetate, and the protein expression patterns were examined. It was found that the expression of HO-2 (heme oxygenase 2) was decreased at the concentration more than 0.5 microM. The expression of HO-2 is possibly more sensitive biomarker to Pb and could be useful for risk assessment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境リスク工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：幼児・鉛・神経毒性・神経細胞・タンパク質発現変動・HO-2

1. 研究開始当初の背景

鉛は中枢神経系に有害で、精神遅滞や学習障害を引き起こすことが知られている。成人の場合、血中の鉛濃度が 40–60ug/dL で神経症状が報告されており、また 30–40ug/dL で末梢神経における神経伝達速度の減少が報告されている。小児については、10–30ug/dL またはそれ以下で聴覚障害を生じる可能性があると考えられる。また血中濃度と IQ の低下には強い相関が見られる。しかし U.S. EPA は、鉛は骨組織への蓄積といった特徴があり、年齢による体内動態のため、従来のリスク評価手法では、リスク値を正当に評価できないとして、リスク値や RfD (参照用量) を公表していない。また神経毒性については、リスク評価手法が未だ確立されていない。

中枢神経系には血液脳関門という防御システムが存在するが、胎児・幼児は成人と比べ、この血液脳関門が未発達であるとされている。また神経系は胎児・幼児期に発達するため、この時期に毒性物質に曝露された場合、神経活動への影響や脳障害などに発展する可能性が高い。研究では、特に幼児に着目して、鉛をはじめとする環境汚染物質の神経毒性発現のリスク評価方法の開発に取り組む。

2. 研究の目的

本研究は、胎児を対象として、リスク評価を行うことを目的とする。具体的には、以下の4点を具体的な研究目的に設定する。

(1) 脳組織への鉛移行量評価

幼若ラットを用い、鉛を投与した後、血中鉛濃度および脳組織中鉛濃度を測定する。

(2) 神経細胞を用いた毒性評価

・培養細胞を用いて、鉛による神経細胞死を標とした場合の用量反応関係を把握する。神経分化のモデル細胞である PC12 細胞を用いて、鉛が神経分化、突起伸長に与える影響を定量的に評価する。

(3) 神経細胞を用いたバイオマーカーの探索

(4) 用量反応関係の精査による候補タンパク質の絞り込み

鉛を曝露した神経細胞 PC12 について、そのタンパク質の発現変動を解析し、リスク評価に有効なバイオマーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 脳組織への鉛移行量評価

鉛の投与および血液・脳の採取を清水実験材料株式会社に依頼した。ラットは日本エスエルシー株式会社 (静岡) の Sprague-Dawley ラット 3 週齢雄を 13 匹使用した。飼料はオリエンタル酵母製のマウス・ラット・ハムスター用飼料飼育用 (以下 MF) を用いた。飼育開始から 3 日間は通常の MF を与え馴化させた。

その後 5 日間同時刻に経口ゾンデを食道に挿入し酢酸鉛溶液を投与した。酢酸鉛の投与量は 1 日体重 1kg 当たり 0, 1, 10, 100mg である。各投与群の動物数は、3 (1 日体重 1kg 当たり 0, 1, 10mg) ないし 4 (1 日体重 1kg 当たり 100mg) である。投与した酢酸鉛は和光純薬工業株式会社のもを使用した。その後は通常の MF を 5 日間与え、安楽死させた後に採血及び脳摘出を行い液体窒素で冷凍した。

血液は、500 μ L に 60% 硝酸を 1mL 加え、40°C で一晩温浴、続いて 70°C で 2 時間温浴し、さらに 105°C で 1 時間乾熱後 1N 硝酸で 11mL にメスアップし、0.45 μ m のフィルターで濾過して 10mL とした。最後に希釈した 10ppm タリウム標準液水溶液を 100 μ L 内標準として添加したものを試料として ICP-MS を用いて定量分析を行った。

脳は、液体窒素を用いて凍結粉碎し、粉碎した試料から約 0.5g を採取し重量を測定した上で同様に濃硝酸による温浸法により鉛を抽出、測定試料とした。ただし 1N 硝酸によるメスアップは 6mL とし、濾過後の最終容量は 5mL とした。

(2) 神経細胞を用いた毒性評価

PC-12 細胞は、平方センチメートル当たり 8600 細胞の密度でポリ-D-リジン被覆料理 (077-543-6116) 100 mm の上に播種した。50 ng/mL の神経成長因子 (NGF, BTI の) を含む培地中で 72 時間酢酸鉛に曝露した。曝露終了後、位相差顕微鏡を用いてランダムに選択した位置 (濃度あたり 10 地点) において神経細胞を観察、デジタルカメラで記録した後、細胞当たり最長の神経突起の長さを測定した。測定には NeuronJ というソフトウェアを使用していた。測定データは、ANOVA 片側検定により有意差を検定した。

(3) 特異的神経毒性マーカーの探索

PC12 細胞に対して神経成長因子 NGF を 50ng/ml 添加し、酢酸鉛 0 μ M、0.3 μ M、0.6 μ M、1.0 μ M の 4 段階の曝露濃度にて 72 時間処理を行った各サンプルから膜タンパク質を抽出し、二次元電気泳動を用いてタンパク質プロファイルの変動を解析した。解析対象には上記 4 条件の内、0.6 μ M 曝露については 2 枚、その他 3 条件については 3 枚ずつの、合計 11 枚の泳動像を用いた。

各濃度間における発現量の比較を行った。この比較には、同一ゲル 3 枚 (0.6 μ M については 2 枚) の発現量の平均値を用いた。その結果、酢酸鉛曝露によって発現量の増加、減少する傾向が見られるスポットや 1.0 μ M で特異的に発現量の変化するスポットが 28 点確認された。この中で分離が可能なスポット 8 点のタンパク質について MALDI-TOF/MS 法を

用いて同定を行った。

(4) 用量反応関係の精査による候補タンパク質の絞り込み

膜タンパク質試料は SDS - PAGE クリーンアップキット (GE ヘルスケア) で精製した。SDS - PAGE 法でタンパク質を分離した。SDS - PAGE で分離したタンパク質はニトロセルロースまたは PVDF 膜に転写し、膜状のタンパク質は Reversible Protein Stain Kit (Invitrogen) で可視化した。

可視化したタンパク質を再度脱色し、免疫検出を行った。一次抗体および二次抗体はサンタクルスバイオテクノロジーのものを用いた。

免疫染色されたタンパク質のイメージは LAS - 4000mini (富士フイルム) を用いて取得し、検出したバンドの密度測定は ImageJ (米国国立衛生研究所) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 脳組織への鉛移行量評価

硝酸温浸法による血中および脳中鉛測定結果を Table 1 に示す。また Figure 1 には血中鉛濃度と脳中鉛濃度との相関関係を示す。

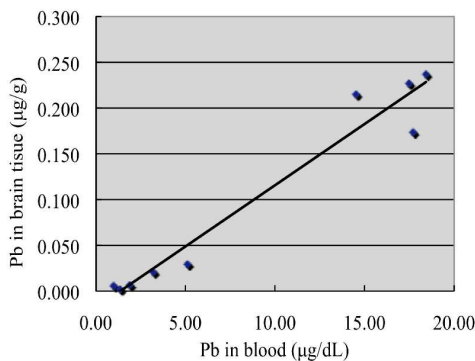


Figure 1 Relationships of Pb in brain and blood

	Amount of oral administration(mg/kg BW)			
	0	1	10	100
Pb in blood±S.D.(µg/dL)	N.D.	0.85±0.56	4.03±1.91	20.95±4.41
Pb in brain±S.D.(µg/dL)	N.D.	0.004±0.003	0.019±0.012	0.213±0.028

1991 年から 2006 年にかけて欧州諸国で調査された子どもの血中鉛濃度は、ブルガリアで最も高く、25 µg/dL を越えることが報告されている。我が国においては、1993 年に静岡県の小児病院を受診した子ども達の血中鉛濃度を測定したもので、1 歳未満で平均 1.83 (0.47 ~ 3.40) µg/dL、1 ~ 15 歳で平均 3.16 (0.80 ~ 9.51) µg/dL である。ラットとヒトにおける鉛の体内動態の差異については詳細に検討する必要があるが、血

中鉛濃度 20.95 µg/dL という値は、現実的にありえるレベルであると考えられる。

また、ここで脳の密度は約 1 であるので、0.213 µg Pb/g brain はおよそ鉛 1 µM (207 µg/L=0.207 µg/g) に相当する。脳組織において鉛の特徴的な局在はなく、一様に分布していると報告されていることから、脳における神経細胞も同程度の鉛の曝露を受けていると推察される。

(2) 神経細胞を用いた毒性評価

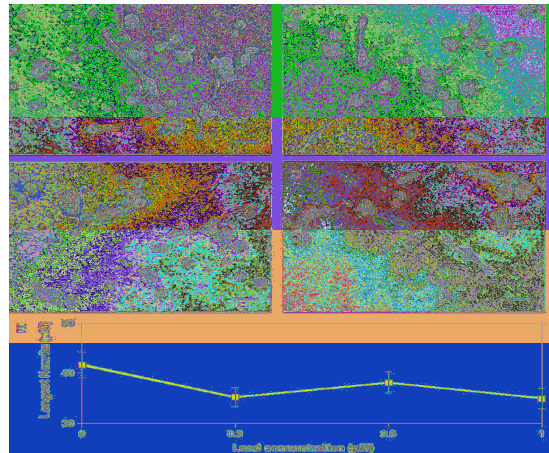


Figure 2. Effect of lead on neurite outgrowth.

鉛に曝露した PC12 神経細胞について、神経細胞の分化指標として個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定した。無処理の PC- 12 細胞の平均神経突起長 (±標準偏差) は 41.65 (±37.36)、0.3 µM、0.6、1.0 µM の酢酸鉛で処理した平均神経突起長はそれぞれ 35.22 (±27.31)、38.11 (±27.9)、および 34.94 (±25.63) であった。1.0 µM までの曝露範囲では、鉛は神経の分化等に影響明らかな毒性を引き起こさないことが示された。また生存率についても大きな減少は確認できなかった。

(3) 特異的神経毒性マーカーの探索

ディフュゼンシャルディスプレイにより発現量に濃度依存的減少傾向が見られたスポットのうち同定スポットできたものを Figure 3 および Table 2 に示す。

(4) 用量反応関係の精査による候補タンパク質の絞り込み

(3) で同定されたタンパク質のうち CYB5, PGRMC2, RAB1B, HMOX2 (H0-2) についてウェスタンブロットを行い、用量反応関係を調べたところ、とくに H0-2 において顕著な減少が確認された。H0-2 は学習能力に関係するとされるタンパク質であり、鉛による学習障害の指標となると考えられる。

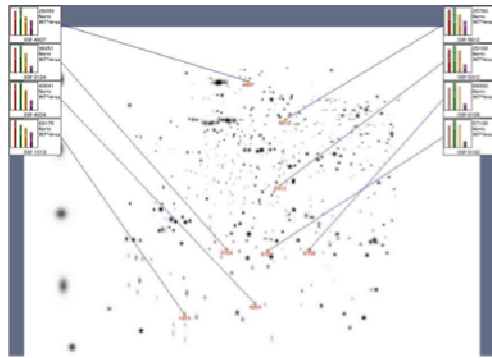


Figure 3 Representative 2-DE maps of membrane proteins from neuronal PC12-cells

Table 2
Differentially expressed proteins in lead-treated neuronal PC-12 cells.

Spot	Mr	pI	Accession ID	Protein name
1	17.22	4.78	gi 231928 gi 8188307	cytochrome b5 (main component) MORF4 family-associated protein 1 (minor component)
2	24.6	5.22	gi 62900631	membrane-associated progesterone receptor
3	18.25	5.51	gi 48474727	retinoid-inducible serine carboxypeptidase
4	94.13	5.44	gi 149056390	inner membrane protein, mitochondrial
5	24.39	5.64	gi 131803 gi 51338716	Ras-related protein Rab-1B (main component) Ras-related protein Rab-1A (minor component)
6	35.84	5.77	gi 123449	heme oxygenase 2
7	58.25	5.82	gi 38304001	karyopherin (importin) alpha 2
8	24.54	6.07	gi 51338716	Ras-related protein Rab-1A

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 Cesar Ortinero, Aki Nakayama, Chiharu Tomomatsu, Katsuya Okawa, Shinsuke Morisawa, Minoru Yoneda, Changes in Expression Level of Heme Oxygenase-2 in Lead- Exposed Neuronal PC-12 Cells, 査読有 International Journal of Arts and Sciences (2010) pp. 1-12
- ② 谷 修祐, 中山亜紀, 米田稔, 森澤眞輔, 神経影響に着目した鉛化合物のヒト健康リスク評価に関する研究, 日本リスク研究学会研究発表会講演論文集, 査読無, 日本リスク研究学会研究発表会講演論文集 (2010) vol. 22 pp. 61-66
- ③ 谷修祐, 中山亜紀, 米田稔, 神経毒性に着目した鉛のヒト健康リスク評価に関する研究, 環境衛生工学研究, 環境衛生工学研究, 査読無, 環境衛生工学研究 (2010) vol. 24 (3) pp. 78-81

[学会発表] (計 5 件)

- ① Cesar Ortinero, Aki Nakayama, Shinsuke Morisawa, Minoru Yoneda, Expression of Ras-related Rab-1B protein in lead-treated neuronal PC-12 cells, 6th Asian Pacific Organization for Cell Biology Congress, Manila, Philippines, 2011 February 25-28.
- ② Cesar Ortinero, Maiko Ikegami, Aki Nakayama, Shinsuke Morisawa, Minoru Yoneda, Exposure of preschool children to lead in playgrounds in Metro Manila, Philippines, International Conference on the Environment and Natural Resources, Mahidol University, Salaya, Thailand, 2010 November 10-12.
- ③ Cesar Ortinero, Aki Nakayama, Shinsuke Morisawa, Minoru Yoneda, Changes in expression of heme oxygenase-2 in lead-exposed neuronal PC-12 cells Mediterranean Conference for Academic Disciplines of the International Journal of Arts and Sciences, University of Malta Gozo Campus, Malta, 2010 February 15-18.
- ④ 谷 修祐, 中山亜紀, 米田稔, 森澤眞輔, 神経影響に着目した鉛化合物のヒト健康リスク評価に関する研究, 日本リスク研究学会研究発表会講演論文集, vol. 22 pp. 61-66, 11月27日, 2010, 東京
- ⑤ 谷修祐, 中山亜紀, 米田稔, 神経毒性に着目した鉛のヒト健康リスク評価に関する研究, 環境衛生工学研究, 環境衛生工学研究 vol. 24 (3) pp. 78-81, 7月31日, 2010, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山亜紀 (NAKAYAMA Aki)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 10335200