

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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591121

研究課題名（和文）高学習能を有するラットを用いた化学物質の次世代影響に関する研究

研究課題名（英文）Effects of environmental chemicals on neural development in Tokai High-Avoider (THA) rats

研究代表者

吉井 文均（YOSHII FUMIHITO）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90129726

研究成果の概要（和文）：農薬として広く使われるフェントロチオンの1日の通常可食量およびその10倍量を、妊娠9日目から離乳期の28日齢まで母ラット持続的に注入した。仔ラットのシドマン型電撃回避試験及び水迷路試験では、コントロール群と曝露群との間に学習能の差はみられなかった。平衡感覚試験では、高濃度曝露群で有意に低下がみられた。Open field試験では、低濃度、高濃度曝露群ともコントロール群に比べ情動面で不安定であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The same and ten times the amount in a typical diet of Fenitrothion was injected under the skin of THA rats from 9th gestation to the postnatal 28th day. The offspring of these rats were subjected to the learning ability and behavior tests. There was not significant difference in learning ability. However, open-field test indicated that the offspring of Fenitrothion treated rats had an emotional instability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に発育期にある中枢神経系は、その形成過程の複雑さゆえに有害因子に対する感受性が高く、中枢神経発育期における有害因子の曝露は、成長後に学習・記憶などの高次脳機能障害として残存する可能性が高い。特に壮年期～初老期に発症する種々の認知症などに胎生期や小児期からの環境要因の関与は

十分考えられるが、これまでそれを検出するのは不可能であった。現在環境因子は、急性曝露よりも低濃度長期曝露による次世代への生体影響評価が急務である。

近年、成人病の発症基盤が受胎前後、胎芽期、あるいは出生後の周産期環境と関連することを示す疫学、動物実験の報告がされており、成人病胎児期発症説（Fetal Origins of Adult

Disease (FOAD)が提案されている。最近ではさらに成人病以外の慢性疾患についても周産期環境と関連することが考えられ、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)と呼ばれ注目されている。胎児期における微量なダイオキシンや PCB の曝露と注意欠陥多動症候群との関連や、アルツハイマー病、Parkinson 病のような神経変性疾患についても胎児期の微量な鉛や水銀曝露との関連を示唆する論文も報告されている。

(2) 胎児・小児等高感受性集団に対する化学物質の影響を、学習行動の面より鋭敏にとらえるには、個体差が少なく、生得的に一定レベルの学習能力を有し、さらに外的要因(ストレス等)の影響を受けにくい動物が必須である。我々はこれまで Wistar 系ラットを母系とし、80 世代にわたり兄妹自然交配と Sidman 型電撃回避学習試験の繰り返しにより、同学習試験において生得的に高回避成績を有しかつ個体差の少ない近交系の Tokai High Avider (THA) ラットを確立した (Shigeta et al, Jpn J Psychopharmacol, 9:217-224, 1989)。この THA ラットを用い、通常のラットでは検出が困難である化学物質の微量曝露による次世代の学習能力の低下を検出することが可能であることを明らかにした。THA ラットは Sidman 型電撃回避学習試験以外の学習試験においても高学習能を有するので、学習能に影響を及ぼす化学物質の検出には有用である。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、妊娠THAラットに化学物質を曝露し、生まれた仔ラットの学習行動試験とともに、Open field試験を行い、化学物質の次世代影響を神経行動学的に解析することにより、THA ラットを用いた化学物質の中枢神経系発育に及ぼす影響の高感度検出法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 化学物質曝露：化学物質として現在我が国で使用されており、残留農薬として基準値が定められているフェニトロチオンの曝露実験を行った。フェニトロチオンの1日の通常可食量(0.007mg/kg/day)およびその10倍量を、妊娠9日目から離乳期の28日齢まで母ラットの背部に mini-osmotic pump を用いて注入した。コントロールに

は、溶媒であるエタノールのみを注入した。これにより仔ラットは、妊娠中は胎盤経由で、授乳中は母乳や母ラットの呼気よりフェニトロチオンに曝露される。

(2) 神経行動学的解析：学習能の解析は Sidman 型電撃回避試験で行った。反射試験として自由落下反射を、自発行動検査として Open field 試験を、立体認知能試験として遊泳試験を行った。

(3) 組織学的検討：フェニトロチオンのホルモン作用としての影響をみるため、仔ラットの子宮及び卵巣を検索した。

4. 研究成果

(1) THA ラット世代間の学習能の比較

THA ラットは、現在まで30年以上、90世代にわたり維持されている。そこで、現在のTHA ラットは高学習能を維持しているか否かを Sidman 型電撃回避試験を行い、過去のデータと比較した。図1に示すように、高学習能は92世代目のTHA ラットでも個体差なく維持されていた。

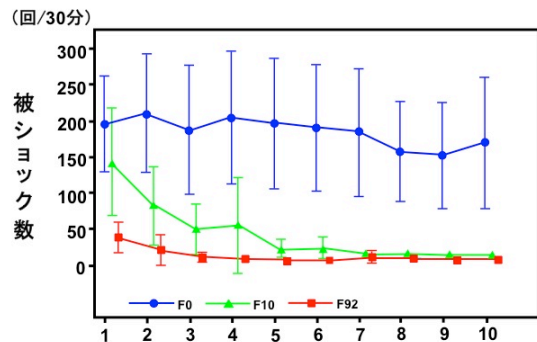


図1 世代間の学習能の比較

(2) フェニトロチオンの仔ラット成長に及ぼす影響の検討

フェニトロチオン曝露による仔ラットの成長

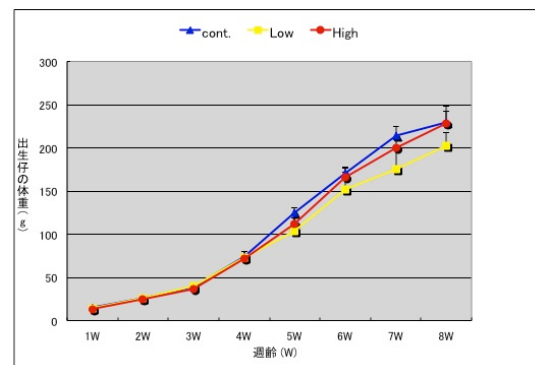


図2 出生仔ラットの体重の推移 (雄)

(体重増加)は、雄、雌ともコントロールと差は見られなかった(図2)。また、耳介展開、歯牙萌出、眼瞼開裂の日数もコントロール、低濃度、高濃度曝露群で差はなかった(表1)。

表1 フェニトロチオンの発育分化への影響

	cont.	Low	High
耳介展開	2.6±0.4	2.7±0.3	2.7±0.4
歯牙萌出	10.4±0.7	10.5±0.7	10.5±0.7
眼瞼回裂	14.7±0.4	14.3±0.4	14.8±0.6

(3) 自発行動に及ぼす影響

仔ラットの5週齢より自発行動試験を行った。洗顔回数と毛繕い回数は、コントロールと比べフェニトロチオン曝露群では有意に少なかった。脱糞数、排尿回数、潜時、行動量には差がなかった(図3-1)。雌のデータも同様であった。

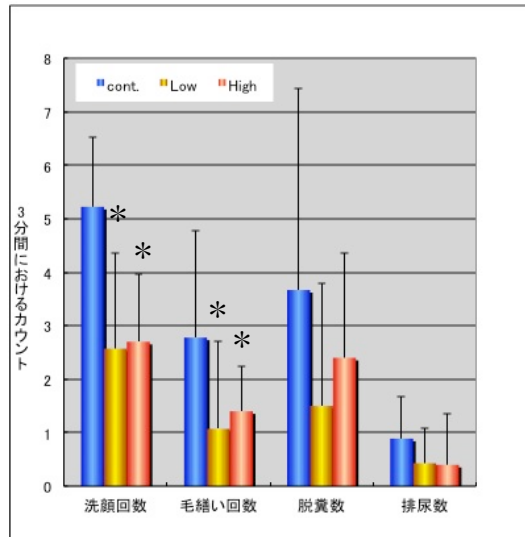


図3-1 雄ラットにおける自発行動

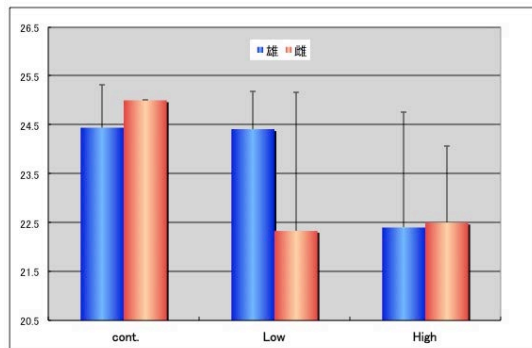


図3-2 宙返り試験

宙返り試験(自由落下試験)では、コントロールに比べ、雄では高濃度曝露群で、雌では

低濃度、高濃度曝露群とも成績が悪かった(図3-2)。

(4) 学習試験

Sidman型電撃回避試験を7週齢のラットで行った。試験は、1回1時間で10回(10日間)施行した。図4に雄ラットの後半30分間の非ショック数を示すが、コントロール、低濃度、高濃度曝露群間で、学習能に差はみられなかった。雌ラットにおいても同様に差はみられなかった。また、水迷路試験においてもコントロール群とフェニトロチオン曝露群間で差はみられなかった。

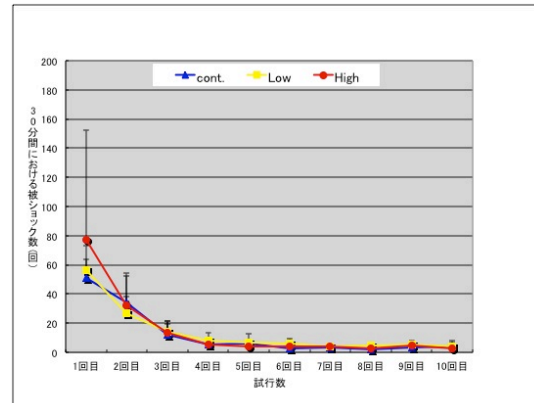


図4 後半30分間の被ショック数

(5) 生殖器に対する影響

フェニトロチオンの内分泌攪乱物質作用を検討するため、コントロール群及び曝露群の解剖時に子宮及び精巣を摘出し、検討した。雌の卵巣は、濃度依存性に重量が増していた(図5-1)。組織学的には、コントロールと比べ、曝露群では子宮粘膜上皮の発達がよく、細胞分裂像並びに胞体の明るい分泌細胞がよく観察された(図5-2)。

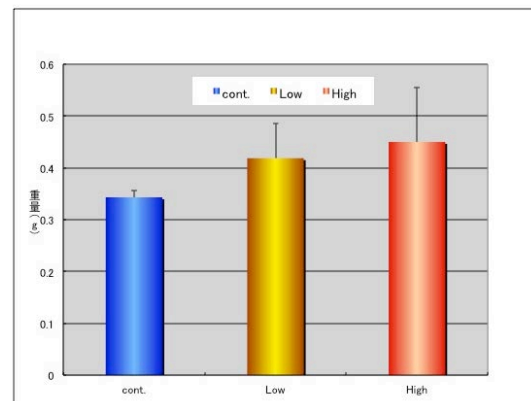


図5-1 子宮重量

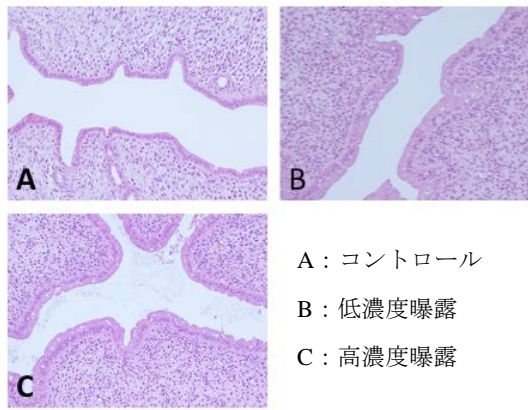


図 5-2 子宮組織像 (HE 染色)

一方、雄の精巣に関しては、コントロール群と比べ、曝露群では濃度依存性に重量が減少した。組織像では、コントロール群と比べて、低濃度群、高濃度曝露群共に、第一減数分裂像を示す精母細胞がよく観察され、その程度は、コントロール群→低濃度群→高濃度群の順であった。精粗細胞、セルトリ細胞の形態

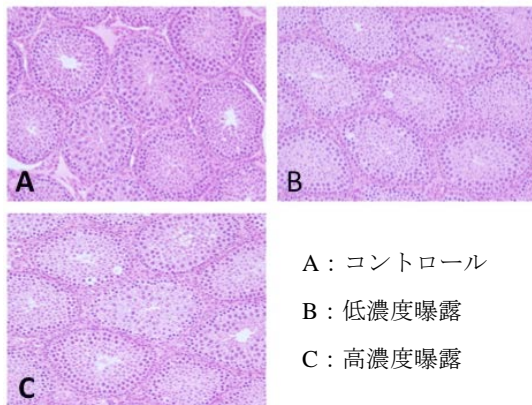


図 6 精巣の組織像 (HE 染色)

には、群間での差はみられなかった。また間質にも、組織学的差異は認めなかった(図6)。

THA ラットは、Wistar ラットを母系として、Sidman 型電撃回避試験による選別を繰り返し、高学習能を有する型として樹立された。これまで THA ラットを用いて、鉛、スズ、トルエン、キシレン、ホルムアルデヒドなどの化学物質の低濃度曝露による次世代の中枢神経発育に及ぼす影響を、神経行動学的に高感度で検出することが可能であった。これは、生まれる仔ラットが一樣にばらつきなく高学習能を有することによる。現在飼育している THA ラット (90 世代以降) も高学習能を保持しており、また、5 週齢でも高学習能を有することより、高感度で化学物質による中枢神経発育に及ぼす影響を検出可能と考えられる。

今回の研究では、残留農薬フェニトロチオ

ンの通常可食量及びその 10 倍量では仔ラットの学習能に影響は及ぼさなかった。曝露実験は 3 回行っており、全て同じ結果であったことより、研究の信頼性は高いと考えられる。しかし、自発行動観察より、毛繕いや洗顔回数が有意に減少していたことより、情動面が不安定であることが示唆された。また、平衡感覚試験 (宙返り試験) でもフェニトロチオン曝露群で成績が悪く、学習能以外の中枢神経への影響があると考えられる。

フェニトロチオンにはホルモン作用があることが報告されているので、今回仔ラットの子宮、および精巣を検索した。今回の研究で、雌の子宮重量が濃度依存性に増加し、雄の精巣重量が濃度依存性に減少していた。さらに子宮の組織像で、粘膜上皮の肥厚とともに分泌細胞が増加していたことより、内分泌攪乱物質としての作用を有することが強く示唆された。これに関しては、今後さらに検討する必要がある。

今回の研究により、THA ラットは化学物質の次世代影響、特に中枢神経系の発育に及ぼす影響を高感度で検出するのに最適な動物であると考えられ、今後広く用いられることが期待される。

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 12 件)

- ① Yoshii F, Motoyama and Lead-PD study group: Efficacy and safety of long and high-dose treatment with ropinirole (ROP) in Japanese patients with Parkinson's disease. Ther Res, 査読有、32:1033-1046, 2011
- ② Tanaka K, Kanno T, Yanagisawa Y, Yasutake K, Hadano S, Yoshii F, Ikeda J. Bromocriptine methylate suppresses glial inflammation and moderates disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol, 査読有、232:41-52, 2011
- ③ Kondo Y, Kuwahira I, Shimizu M, Nagai A, Iwamoto T, Kato S, Hayama N, Aoki T, Urano T, Yoshii F, Kobayashi H, Abe T. Significant Relationship between Platelet Activation and Apnea-hypopnea Index in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Tokai J Exp Clin Med, 査読有、36:79-83, 2011
- ④ Morita A, Okuma Y, Kamei S, Yoshii F, Yamamoto T, Hashimoto S, Utsumi H, Hatano, Hattori N, Matsumura M, Takahashi K, Nogawa S, Watanabe Y, Miyamoto T,

- Miyamoto M, Hirata K. Pramipexole reduces the prevalence of fatigue in patients with Parkinson's disease. Intern Med, 査読有、50:2163-2168. Epub 2011 Oct 1, 2011
- ⑤ Hitoshi Endo, Maki Niioka, Yoshihiko Sugioka, Johbu Itoh, Kaori Kameyama, Isao Okazaki, Risto Ala-Aho, Veli-Matti Kähäri, Tetsu Watanabe. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. Pathobiology, 査読有、78: 239-252, 2011
- ⑥ Tatehiro Kagawa, Jun Koizumi, Sei-ichiro Kojima, Naruhiko Nagata, Makoto Numata, Norihito Watanabe, Tetsu Watanabe, Tetsuya Mine. Transcatheter arterial chemoembolization plus radiofrequency ablation therapy for early stage hepatocellular carcinoma. Cancer, 査読有、116: 3638-44, 2010
- ⑦ Isao Okazaki, Minoru Sugita, Hideaki Matsuki, Syed Muhammad Baqui Billah, Tetsu Watanabe. Additional candidates to conventional genes susceptible for lung cancer and changing trend in Japan (Review). Oncology Reports, 査読有、23: 1493-1500, 2010
- ⑧ Junichi Saito, Yasutada Imamura, Joji Itoh, Shigeo Matsuyama, Akie Maruta, Toshihiko Hayashi, Ataru Sato, Norihito Wada, Kazuo Kashiwazaki, Yutaka Inagaki, Tetsu Watanabe, Yuko Kitagawa, Isao Okazaki. ELISA measurement for urinary 3-Hydroxyproline-containing peptides and its preliminary application to healthy persons and cancer patients. Anticancer Research, 査読有、30: 1007-1014, 2010
- ⑨ Okuma Y, Kamei S, Morita A, Yoshii F, Yamamoto T, Hashimoto S, Utsumi H, Hatano T, Hattori N, Matsumura M, Takahashi K, Nogawa S, Watanabe Y, Miyamoto T, Miyamoto M, Hirata K. Fatigue in Japanese patients with Parkinson's disease. A study using Parkinson fatigue Scale. Mov Disord, 査読有、24:1977-1983, 2009
- ⑩ Suzuki K, Miyamoto M, Miyamoto T, Okuma Y, Hattori N, Kamei S, Yoshii F, Utsumi H, Iwasaki Y, Iijima M, Hirata K : Correlation between depressive symptoms and nocturnal disturbances in Japanese patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, 査読有、15:15-19, 2009
- ⑪ Endo H, Watanabe T, Sugioka Y, Niioka M, Inagaki Y, Okazaki I. Activation of two distinct MAPK pathways governs constitutive expression of matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic cancer cell lines. Int J Oncology, 査読有、35: 1237-1245, 2009
- ⑫ Furuya H, Nagamine M, Watanabe T. Use of mathematical model to estimate tuberculosis transmission risk in an Internet café. Environmental Health and Preventive Medicine, 査読有、14: 96-102, 2009
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 吉井 文均 (YOSHII FUMIHITO)
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号 : 90129726
- (2) 研究分担者
 渡辺 哲 (WATANABE TETSU)
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号 : 10129744