

は、立ち上がり回数や脱糞数が併せて上昇していないことから情動性の高進とは評価し難い。また、一般的に対照群ラットのごとく、新しい環境下での行動は探索行動、すなわち、置いた場所から動かずに周囲の観察をしてから新しいフィールド少しづつ距離を延ばしながら出ていく行動をとる。従って今回のヒ素曝露群の行動は、外部環境に対し恐怖感、警戒心を持たずに動き回っている状態で、人で例えるならば徘徊状態様の行動と考えられる。さらにこの成績は、1 ppm 群および 10ppm 群の雌雄ともに同様にみられたことを勘案すると妊娠前から曝露したヒ素の影響と考えられる。また、この成績は、森永ヒ素ミルク事件の追跡調査で鬱病や不安定神経症などの結果に一致するものである。

E. 結論

現在もなお飲料水として飲み続けられている井戸水中ヒ素濃度と同投与量を妊娠前から成熟までの生涯与えたラットに体重の増加抑制と自発行動の異常が確認された。よって、生活用水の飲用により、人においても発育成長や中枢神経系への影響が起りうる事が動物実験から推察された。

Table 1 Incidence time of devevelopmental signs
in male and female rats of THA strain.

No. of offspring	Control group (N=31)	1ppm group (N=27)	10ppm group (N=40)
Pinna detachment	2.0 $\pm$ 0	2.0 $\pm$ 0	2.03 $\pm$ 0.16
Incisor eruption	10.0 $\pm$ 0.46	10.4 $\pm$ 0.78	10.5 $\pm$ 1.21
Eye opening	14.1 $\pm$ 0.34	14.3 $\pm$ 0.47	14.2 $\pm$ 0.40 (day)

Values are means with SDs.

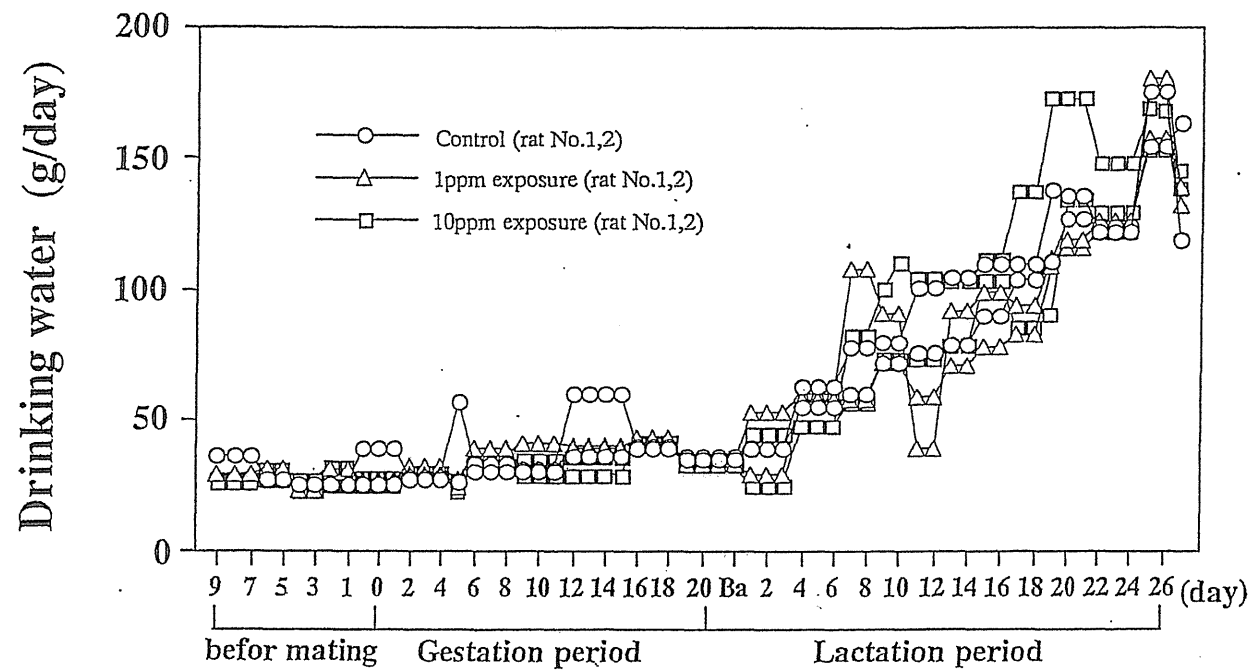


Fig.1 Water intake of control and As administered dams during before mating, gestation period and lactation period.

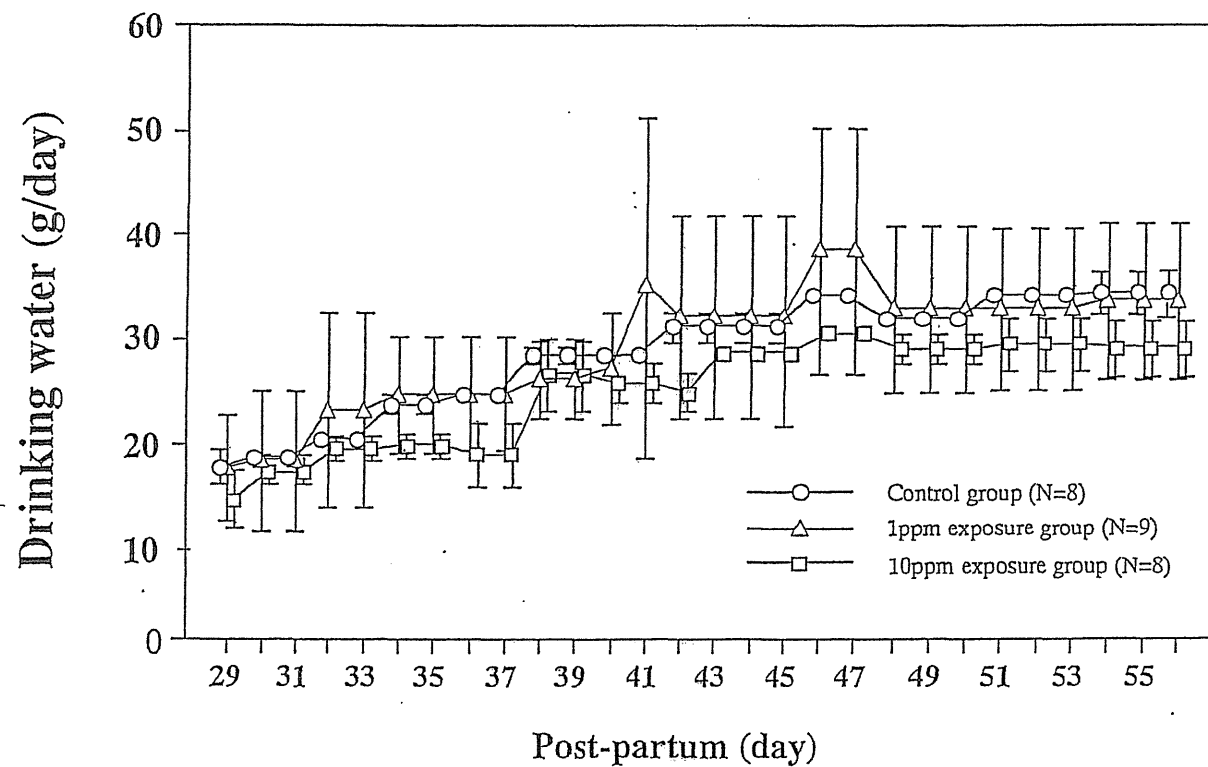


Fig. 2 Water intake of control and As administered male pups.
Values are means with SDs.

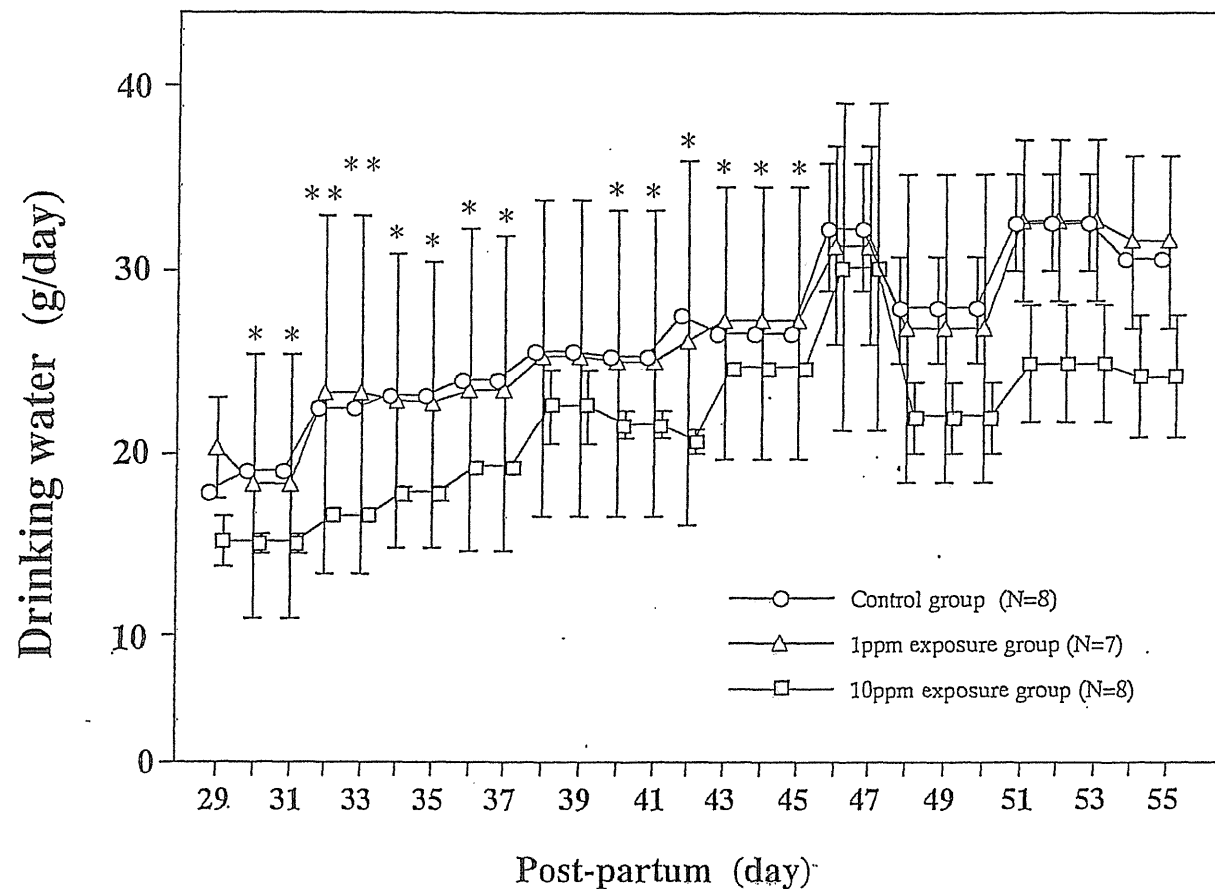


Fig. 3 Water intake of control and As administered female pups. Values are means with SDs.

*:Significant difference between control and 10ppm exposure ($p < 0.05$).

**:Significant difference between control and 10ppm exposure ($p < 0.01$).

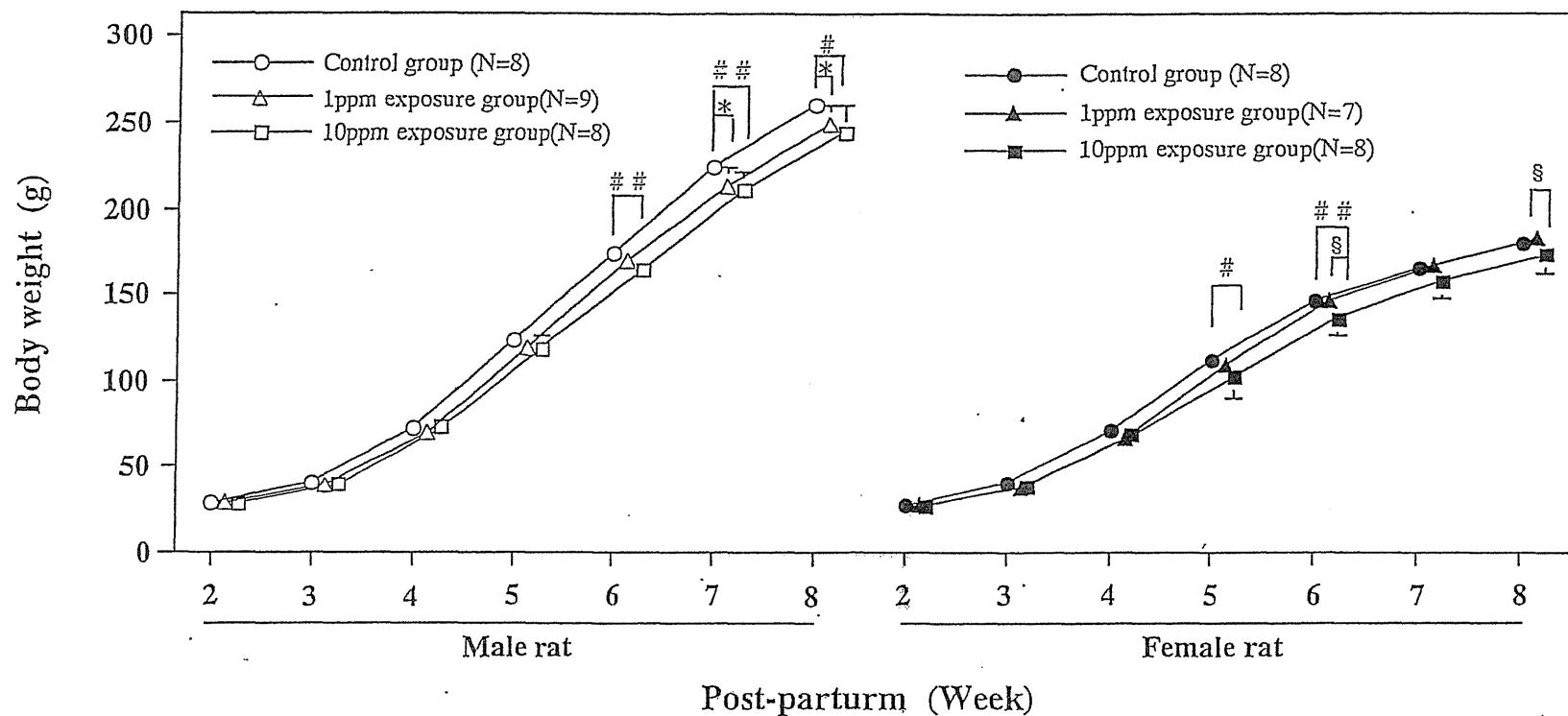


Fig. 4 Increase of body weight in male and female rats of THA strain during post-partum.

Values are means with SDs.

*:Significant difference between control and 1ppm exposure($p < 0.05$).

#:Significant difference between control and 10ppm exposure($p < 0.05$).

##:Significant difference between control and 10ppm exposure($p < 0.01$).

§ :Significant difference between 1ppm and 10ppm exposure($p < 0.05$).

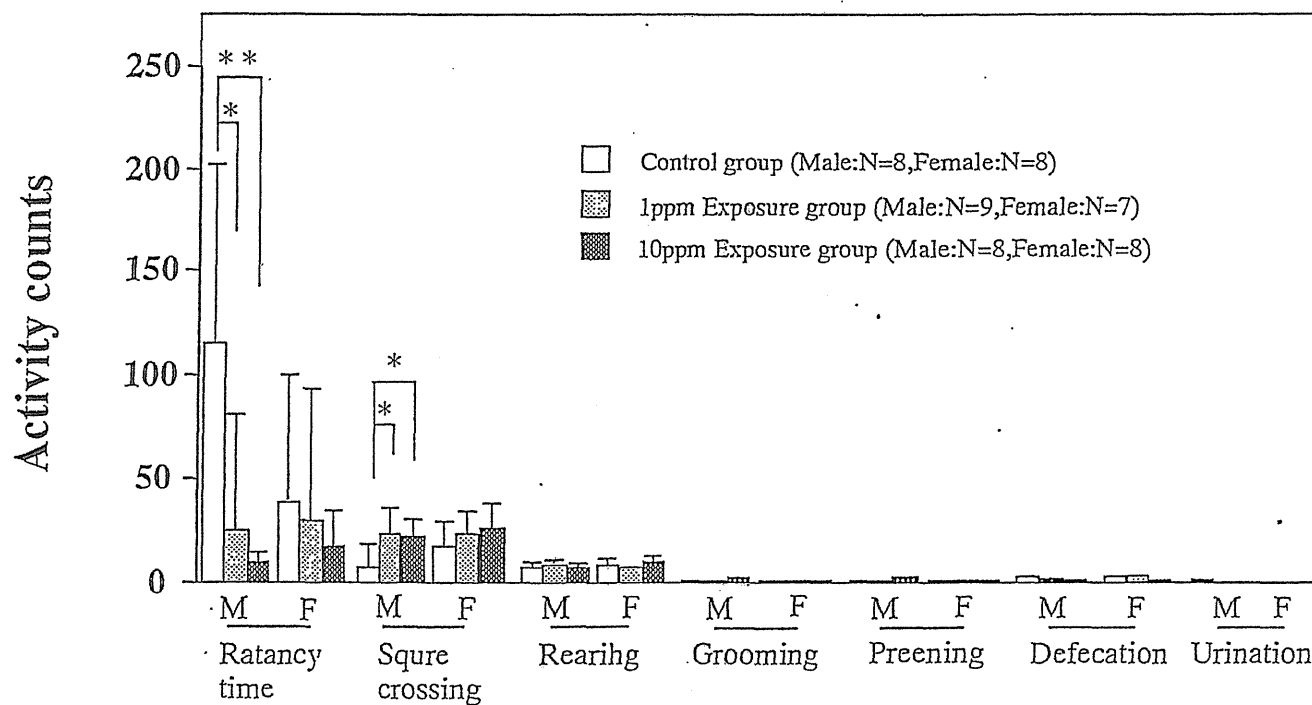


Fig. 5 Activity counts of male and female rats of THA strain in the open-field for 3 min.

Values are means with SDs.

*:Significant difference between control and 1ppm($p < 0.05$).

** :Significant difference between control and 10ppm($p < 0.01$).

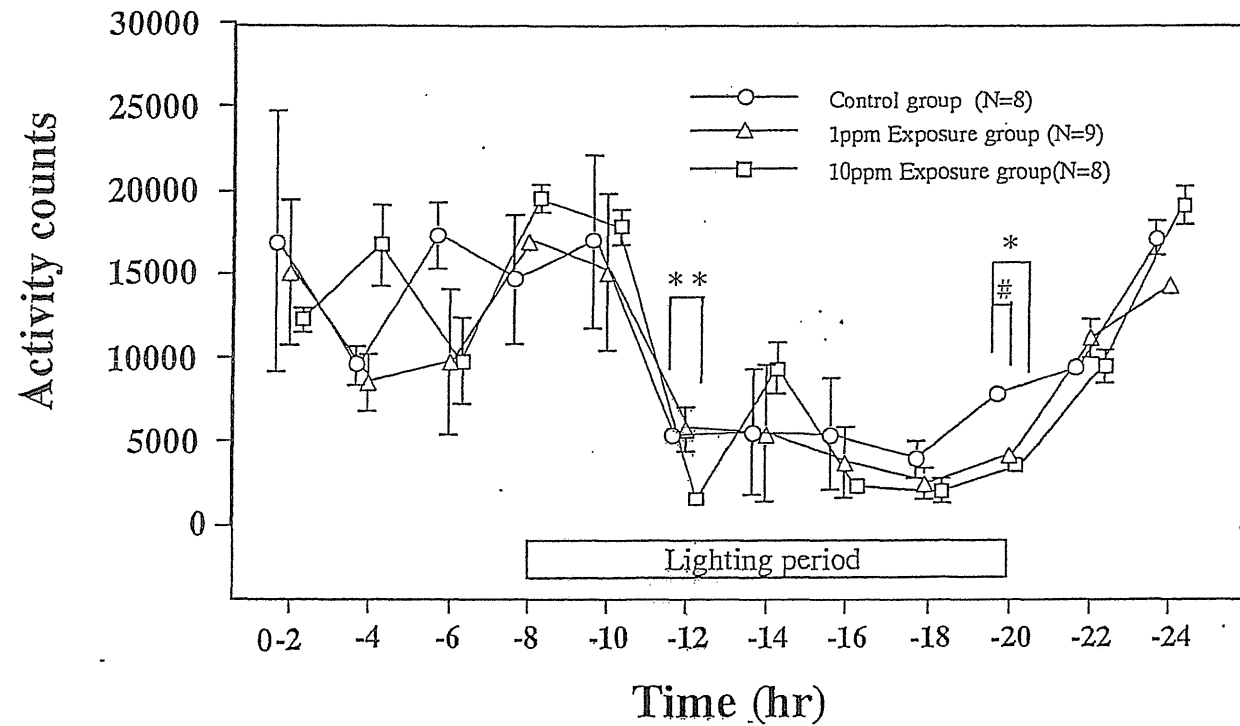


Fig. 6 Spontaneous motor activity counts in male rats of THA strain for 24 hr.

Values are means with SDs.

#: Significant difference between control and 1ppm ($p < 0.05$).

*: Significant difference between control and 10ppm ($p < 0.05$).

**: Significant difference between control and 10ppm ($p < 0.01$).

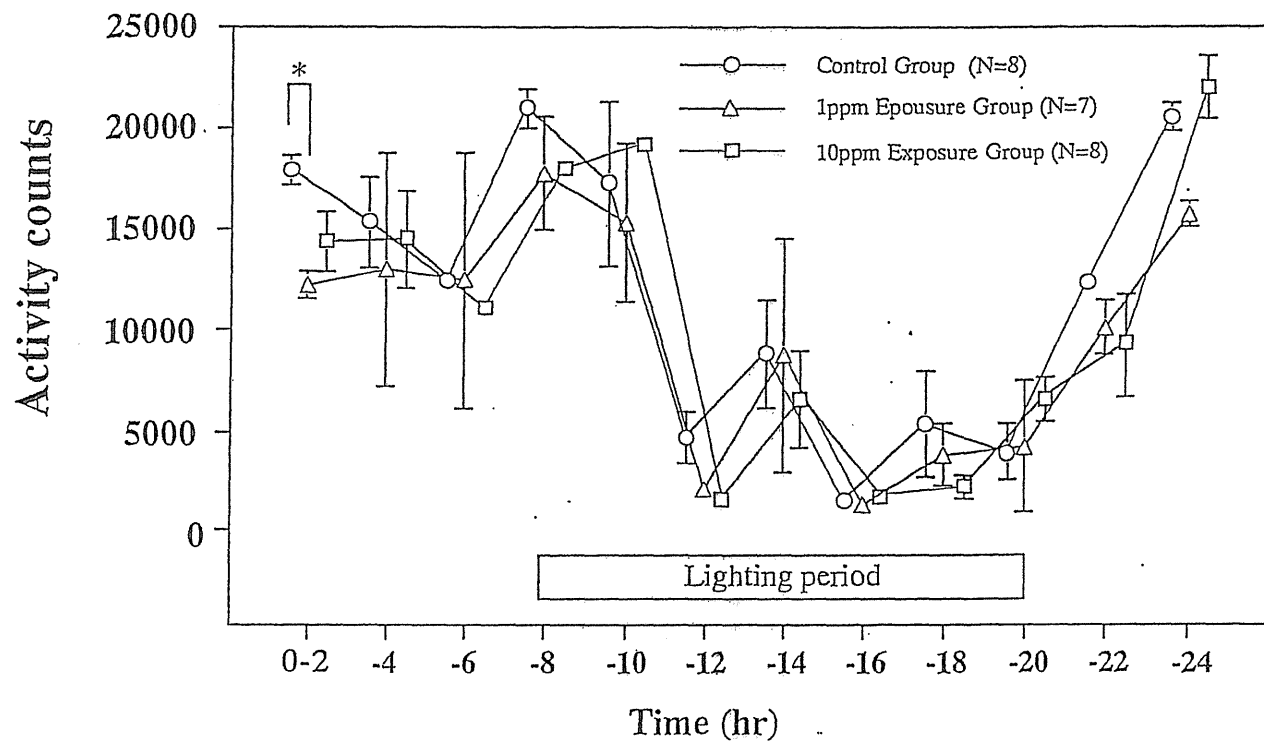


Fig. 7 Spontaneous motor activity counts in female rats of THA strain for 24 hr.

Values are means with SDs.

*:Significant difference between control and 1ppm($p < 0.05$).

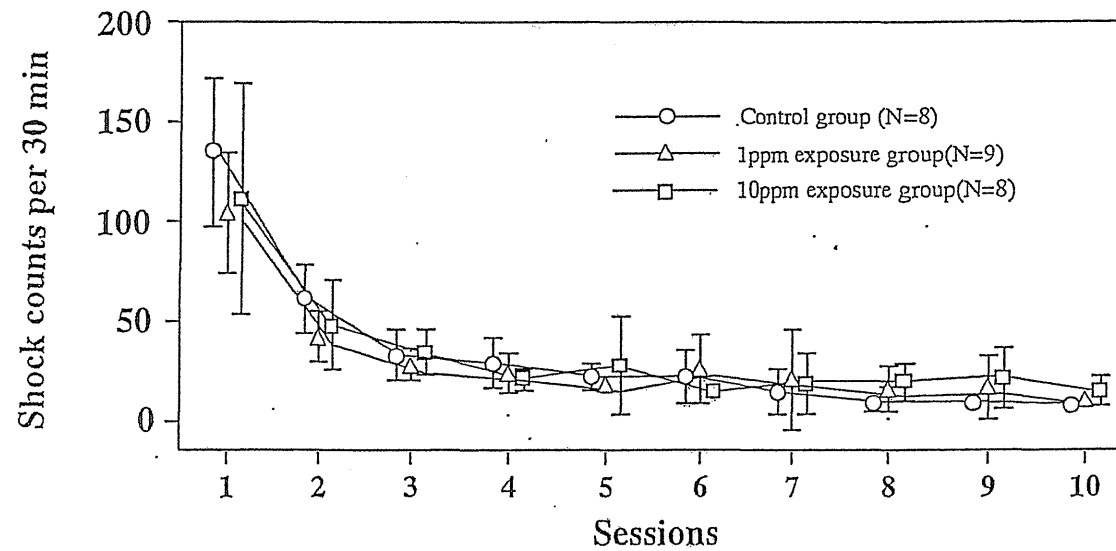


Fig. 8 Shock counts of control and As exposure male rats of THA strain during the first half of the 60 min test.
Values are means with SDs.

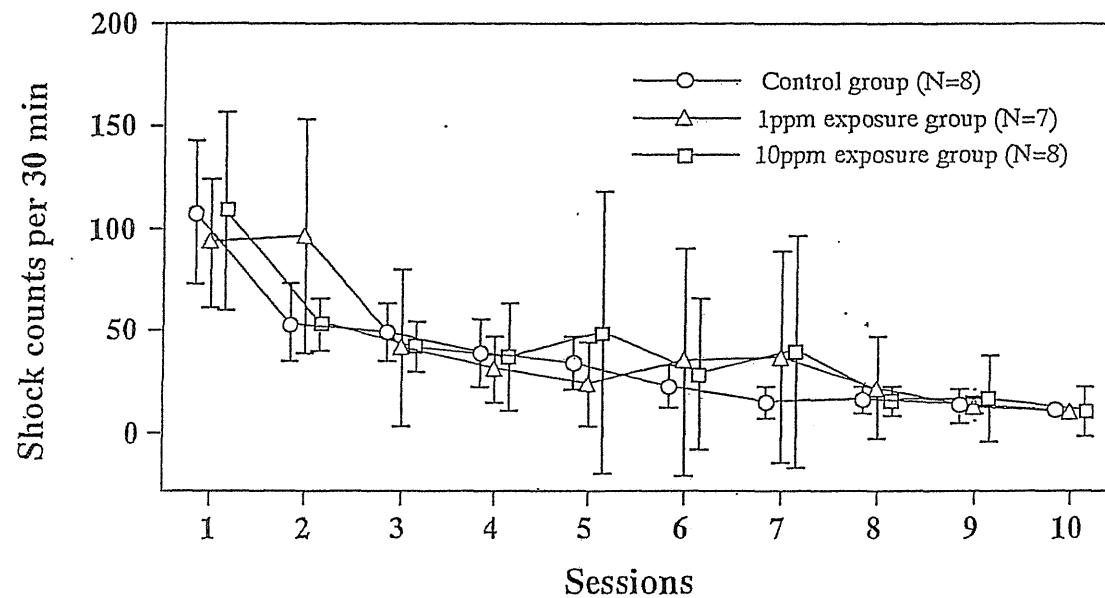


Fig. 9 Shock counts of control and As exposure female rats of THA strain during the first half of the 60 min test.
Values are means with SDs.

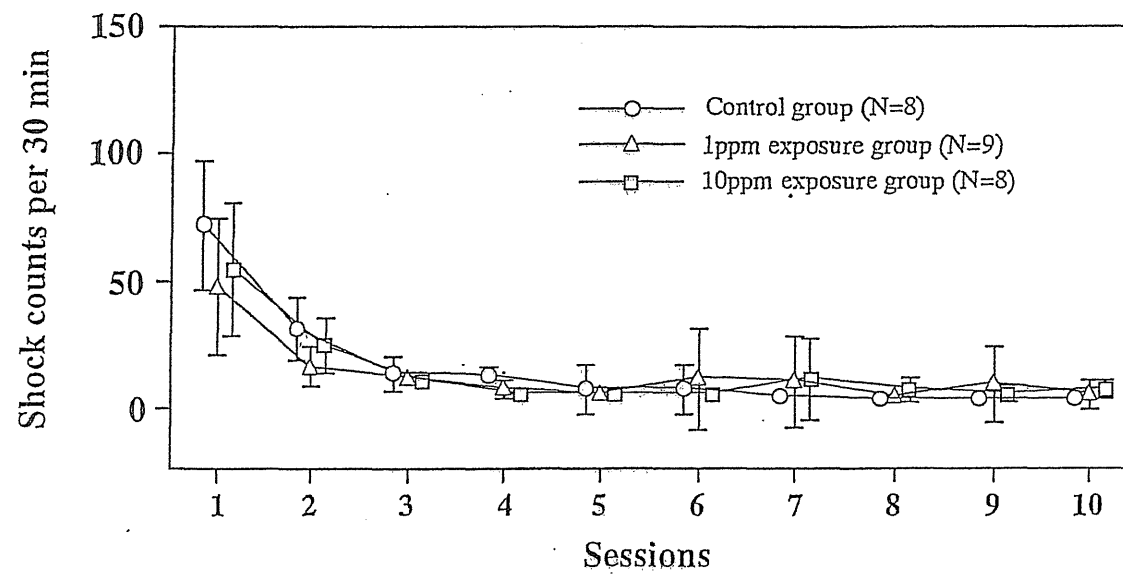


Fig. 10 Shock counts of control and As exposure male rats of THA strain during the latter half of the 60 min test.
Values are means with SDs.

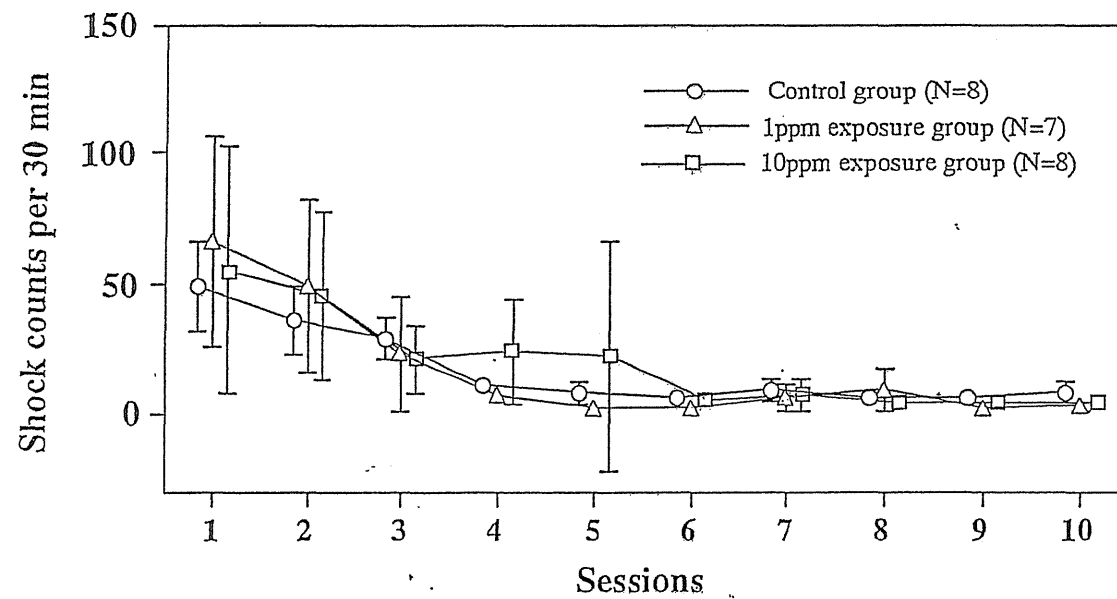


Fig. 11 Shock counts of control and As exposure female rats of THA strain during the latter half of the 60 min test.
Values are means with SDs.

厚生科学研究費補助金 （生活安全総合研究事業）

平成13年度 分担研究報告書

胎生期における砒素曝露と「神経系－免疫系」機能障害

－ 14-3-3 サブタイプの発現と関連させて－

分担研究者 坂部 貢 北里研究所・北里研究所病院・臨床環境医学センター部長

(北里大学大学院・医療系研究科・教授・兼任)

要旨

平成13年度は、胎生期の砒素曝露の影響とそのメカニズムを理解する上で、多彩な機能を有する14-3-3のサブタイプの発現に対する影響について詳細な情報を得ることが不可欠であるとの認識から、4種のサブタイプの発現について検討を加えた。その結果、胎生期における母体を介しての砒素曝露は、脳組織における14-3-3の θ サブタイプの抑制によるものと判明した。さらに、胎児胸腺組織においても14-3-3の発現の強い抑制が認められ、脳組織と同様、主として θ サブタイプが影響を受けることが判明した。

A. 研究目的

和歌山カレー事件における急性砒素中毒は記憶に新しいが、急性砒素中毒患者の中には妊婦も含まれていた。しかし、妊婦およびその胎児における急性砒素中毒の病態生理、特に免疫毒性・神経毒性についての情報はきわめて乏しい。

平成12年度の手担研究では、胎生期における砒素曝露と脳組織障害の過程を解明する糸口として、神経系発生のごく初期の段階から

発現する蛋白質キナーゼ調節因子である14-3-3の発現に対する影響について検討し、胎生期における母体を介しての砒素曝露が14-3-3 (Pan-14-3-3) の発現を抑制し、分化・成熟過程におけるニューロンの細胞情報伝達機構のごく初期のシグナルカスケードに影響を及ぼすことを示唆した。しかしながら、14-3-3のどのサブタイプの発現に強い影響を与えるかについては不明のままであった。しかしながら、胎生期の砒素曝露の影響を理解する上で、多彩な機能を有する14-3-3のサブタ

イプの発現に対する影響について詳細な情報を得ることは不可欠であり、本年度はそこに重点をおいて研究を遂行した。

B. 研究方法

a. 動物

妊娠ラットは、SPF/VAF ラット (Cri:Wistar: 日本チャールス・リバー社) をそれぞれの実験群で3匹使用した。棒物の飼育は、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明暗は12時間サイクルとし、動物室内にクリーンラック (日本クレア) を設置し、ラック内で飼育した。餌は CE-2 固形飼料 (日本クレア)、水は水道水を自由摂取とした。

b. 試薬と処置

妊娠ラットには、純度99%以上の三酸化二砒素 (シグマ社製) を使用した。三酸化二砒素は、少量の水酸化ナトリウム溶液で溶解し、その溶液を蒸留水で希釈、三酸化二砒素溶液として妊娠17日目に投与した。一回経口した三酸化二砒素の投与量は LD_{50} の1/4 量 (8.5mg/kg) とした。動物は、投与後12, 24, 48時間目に屠殺した。無処置コントロール群は、妊娠19日目に屠殺した。

c. 組織のサンプリング

妊娠ラットはハロセン麻酔後、母体胸腺を取り出し、妊娠子宮から胎仔を分離した。胎仔は冷 PBS で十分に洗浄の後、脳および胸腺領域を取り出した。取り出した母体胸腺、胎児

脳、胎児胸腺領域は、血液の汚染を除去するために再び冷 PBS で洗浄、新鮮凍結保存 (-80°C) およびパラフィン切片用として、ザンボニー溶液 (パラフォルムアルデヒド・ピクリン酸混合固定液) にて固定した。

d. 各種キナーゼ活性の測定

取り出した胸腺は、セルストレーナを用いてリンパ球分画を分離し、ただちに培養系に供した。10% AB血清加 RPMI1640 にラットサイトカイン (IL-2) を添加し72時間培養した。72時間の培養後、細胞を回収し、Cキナーゼ活性・ADR活性・p34cdc2キナーゼ活性発現量を測定した。

Cキナーゼ活性は、超音波破碎より得られたCキナーゼ分画とC1ペプチドを反応させ、C1ペプチドのリン酸化量を調べることにより検討した。ADR活性は、リンパ球より抽出したADR分画を、アフリカツメガエルの脾細胞と反応させ、脾細胞のTdr取り込み量を測定することにより検討した。p34cdc2キナーゼの発現量は、特異的モノクローナル抗体を用いて、常法通りのイムノブロット法により検討した。

e. リンパ球サブセット解析

胸腺Tリンパ球のサブセット解析は、抗ラットCD4、抗ラットCD8抗体を用いた、フローサイトメトリー法によった。

f. 組織細胞化学的解析

取り出した組織の半分は免疫組織化学的解析に供するため、パラフォルムアルデヒド(PFA)溶液に浸漬固定し、残り半分は超薄・電子顕微鏡的解析に供するために、グルタルアルデヒド(GA)溶液に浸漬固定した。PFA固定組織は、5～25%ショ糖緩衝液に順次浸漬させ、PFAを取り除いた後、OCTコンパウンドに包埋、液体窒素を用いて急速凍結した。凍結包埋した組織は、クリオスタットを用いて薄切し、シランコートスライドに貼り付けた。窒素ガスを用いて十分乾燥の後PBSにて切片を緩衝化し、アポトーシス初期シグナルの解析のために、7A6抗原の免疫組織化学に供した。

g. 14-3-3 の免疫ブロッティング

胎児脳組織・胸腺領域は、ソニケーター(超音波破砕器;ブランソン社)によって0.5%KClを含む緩衝液中でホモゲナイズ後、800Gで10分遠心した。KC 1を用いた理由は、全細胞抽出物(Whole Cell Extracts)を得るためである。遠心後の上清は、ブラッドフォード法を用いてタンパク質濃度を測定し、各サンプル間でタンパク質濃度を一定に調整した。タンパク調整したサンプルは液体窒素フリーザーミル(凍結乾燥振動装置)でパウダー処理し、ブロッティング用試料とした。試料は泳動用緩衝液にて溶解し、常法通りにSDS-PAGEを行った。膜転写の後、マウス 14-3-3 モノクローナル抗体(pan-14-3-3、14-3-3 α サブタイプ、

14-3-3 β サブタイプ、14-3-3 δ サブタイプ、14-3-3 θ サブタイプの4種)反応、ウサギ第二抗体(ニチレイ製)反応、引き続き酵素反応を行い、Western-Light にて増感処理し観察した。バンドの解析は、IBM-PC・アーガス10(浜松ホトニクス製)画像解析装置にて定量数値化した。

h. 14-3-3 の免疫組織化学

ザンボニー固定をおこなった各組織は脱水後、常法通りパラフィン(低温用パラプラスト)包埋し、薄切切片を作成した。切片は、シランコートスライド(松浪製)に貼り付け、キシロール系溶剤で脱パラフィン後、PBSで十分洗浄した。洗浄した切片は、イソベ法により内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、バックグラウンド染色の低減を図るために引き続きティッシュ・コンディショナー(ヒストファイン製)でタンパク質をブロッキングした。マウス pan-14-3-3 モノクローナル抗体(同上))を反応させ、高感度ABP法にて発色、局在を比較観察した。観察画像は一旦デジタル化し、IBM-PC・アーガス10(同上)画像解析装置にて定量数値化した。

i. 統計処理

データの解析は、Stanton Granz Biostatics Program を用いて Student t 検定を行い、有意水準を5%($P<0.05$)とした。

i. 倫理面への配慮

実験動物の屠殺に際しては、米国NIHの指針に従い倫理面に考慮した上で本研究を遂行した。

C. 研究成果

胎生期における母体を介しての砒素曝露は、脳組織における 14-3-3 の θ サブタイプの発現を特異的に抑制することがわかり(図1)、前年度における Pan-14-3-3 の発現の抑制は、主として θ サブタイプの抑制によるものと判明した。さらに、胸腺組織においても 14-3-3 の発現の強い抑制が認められ、脳組織と同様、主として θ サブタイプが影響を受けることが判明した(図2, 3)。

D. 結 論

以上の結果は、胎生期における母体を介した砒素曝露が、「神経系と免疫系」の機能軸の確立に致命的な障害を与える可能性を示唆するものであり、生後の神経系と免疫系のクロストークの遂行とそれに依存する恒常性維持機能に重大な欠陥が生じる可能性を示すものである。

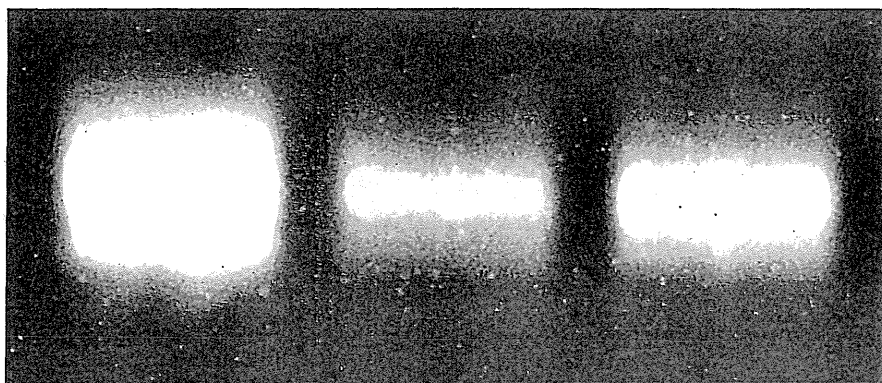
E. 参考文献

1. Nito, Y., Sakabe, K., Yamauchi, H. Et al.: Fetal brain damage induced by acute arsenic poisoning in pregnancy in rats. Biomed Res Trace Elements 11(3):300-305, 2000. (*In Japanese*)
2. Isobe, T. : Activation of protein kinase C by 14-3-3 proteins homologous with Exo1 protein that stimulates calcium-dependent exocytosis. FEBS 308:121-124, 1992.
3. Deckwerth, TL., Elliot, JL., Knudson, CM. et al.: Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. Neuron 17:401-411, 1996.
4. Reed, SJ.: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature 387:773-776, 1997.
5. Huang, C., Ma, WY., Li, J. et al.: Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. Cancer Res 59:3053-3058, 1999.

図-1

母体胸腺におけるCキナーゼ活性
(リン酸化C1ペプチド量として)

0時間後 12時間後 24時間後



1

2

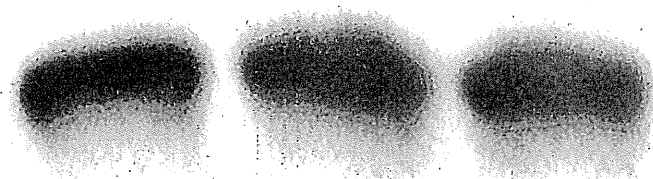
3

図-2

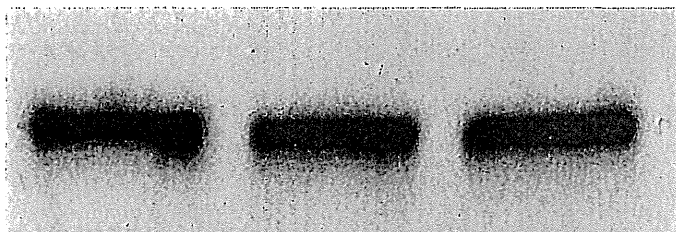
投与後の14-3-3 サブタイプの発 (脳)

0時間後 12時間後 24時間後

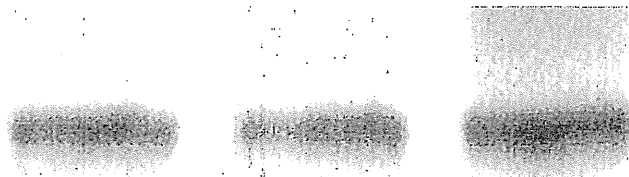
α



β



δ



θ

