

Table 4. Effects of MMP on serological parameters of dams and offspring.

Methamidophos (ppm)	A/G ratio	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ChE (IU/L)	
Dam	0	1.50 ± 0.08	409.3 ± 274.8	146.5 ± 92.8	57.25 ± 5.91
	1	1.35 ± 0.06	375.3 ± 22.0	187.8 ± 42.6	55.00 ± 0.82
	5	1.43 ± 0.17	399.8 ± 152.1	212.0 ± 97.6	43.00 ± 3.56 **
	25 ^a	1.45 ± 0.13	190.0 ± 38.1	40.5 ± 9.3	24.50 ± 3.11 **
Female (PNW3)	0	1.50 ± 0.17	200.3 ± 66.5	31.0 ± 4.6	38.00 ± 3.00
	1	1.60 ± 0.10	162.3 ± 37.8	47.3 ± 30.1	36.00 ± 1.73
	5	1.53 ± 0.15	143.3 ± 15.5	27.0 ± 2.6	26.67 ± 1.15 **
	25	1.50 ± 0.28	204.5 ± 19.1	43.5 ± 17.7	21.00 ± 1.41 **
Male (PNW3)	0	1.40 ± 0.10	175.3 ± 35.7	54.3 ± 10.5	39.33 ± 2.52
	1	1.40 ± 0.17	210.7 ± 46.3	35.3 ± 5.5	36.67 ± 2.31
	5	1.43 ± 0.06	166.3 ± 30.9	38.7 ± 9.7	27.00 ± 2.65 **
	25	1.45 ± 0.21	229.5 ± 103.9	46.0 ± 22.6	23.50 ± 0.71 **
Female (PNW11)	0	1.50 ± 0.08	244.0 ± 65.2	58.3 ± 22.3	40.50 ± 1.73
	1	1.50 ± 0.14	225.8 ± 61.6	67.3 ± 9.9	42.75 ± 2.63
	5	1.48 ± 0.13	254.3 ± 50.0	54.0 ± 15.4	45.00 ± 2.94
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Male (PNW11)	0	1.33 ± 0.17	190.8 ± 17.8	41.0 ± 7.4	33.00 ± 2.83
	1	1.23 ± 0.15	289.8 ± 82.9	153.8 ± 209.5	37.25 ± 0.96 *
	5	1.25 ± 0.10	218.0 ± 48.5	58.8 ± 17.7	34.75 ± 1.71
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Pregnant BALB/c mice (and their offspring) were exposed to MMP (0, 1, 5, and 25ppm) in drinking water from gestational day 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased by weaning. At PNW3 and PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compound on serological parameters. ^aOne delivering and three non-delivering females were used. Values are mean ± SD (n = 4). *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

Table 5. Flow cytometry analysis of the effect of MMP on lymphocyte subpopulations

	Methamidophos (ppm)			
	0	1	5	25
Female				
PNW3				
^a Spl: CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.2	2.6 ± 0.5	2.1 ± 0.5 *
Thy: CD3 ⁺	7.43 ± 1.26	8.96 ± 0.60 *	8.02 ± 0.35	8.50 ± 0.62
Thy: CD8 ⁺	1.72 ± 0.24	2.19 ± 0.21 *	1.93 ± 0.27	2.20 ± 0.09 *
^b Thy: CD4 ⁺ /CD3 ⁺	64.7 ± 1.8	61.7 ± 2.1	60.2 ± 2.9 *	64.2 ± 2.3
PNW11				
Nothing significant	—	—	—	N.D.
Male				
PNW3				
^b Spl: CD4 ⁺ /CD3 ⁺	66.9 ± 2.5	68.4 ± 0.9	67.0 ± 1.9	71.7 ± 1.9 **
Spl: CD4 ⁺ IFN γ ⁺	0.17 ± 0.03	0.10 ± 0.03 **	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.01
Spl: CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.82 ± 0.10	0.63 ± 0.07 **	0.71 ± 0.05	0.90 ± 0.08
Spl: CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	0.39 ± 0.05	0.29 ± 0.02 *	0.31 ± 0.09	0.35 ± 0.03
PNW11				
Nothing significant	—	—	—	N.D.

Pregnant BALB/c mice (and their offspring) were exposed to MMP (0, 1, 5, and 25 ppm) in drinking water from gestational day 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased by weaning. At PNW3 and PNW11, mice were sacrificed to determine the effects of the compound on the relative population of lymphocyte subsets in the spleen (Spl) and thymus (Thy). The percentage of lymphocytes are shown (^apercent CD4 positive cells, ^bpercent CD3 positive cells). Values are mean ± SD. N.D., not determined. Only statistically significant changes are shown *p < 0.05, **p < 0.01 (Dunnett's test).

Table 6. CpG hyper- or hypo-methylated genes common in the thymus and spleen.

Hyper-methylated

GeneSymbol	Description	Ratio (Thy)	Ratio (Spl)	Chr. No	Region_info
Imp4	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	77.18	15.84	1	INSIDE
Ppp1r7	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	44.55	13.99	1	INSIDE
—	—	63.79	39.26	2	Unknown
Pax6	paired box gene 6	59.18	18.41	2	PROMOTER
Gtf2b	general transcription factor IIB	43.42	14.56	3	INSIDE
—	protein tyrosine phosphatase 4a2	50.14	12.07	4	Unknown
Gng7	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7 subunit	72.42	33.84	10	PROMOTER
Utp18	UTP18, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	44.06	31.34	11	INSIDE
Ppm1d	protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	43.36	39.85	11	PROMOTER
Wdr35	WD repeat domain 35	57.08	32.56	12	PROMOTER
Wdr35	WD repeat domain 35	20.13	48.71	12	PROMOTER
Ext1	exostoses (multiple) 1	14.42	55.56	15	INSIDE
Slc25a23-Crb3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	33.49	48.29	17	DIVERGENT_PROMOTER
Tmem109	transmembrane protein 109	42.70	31.40	19	PROMOTER
Dpf2	D4, zinc and double PHD fingers family 2	41.57	20.16	19	INSIDE

Hypo-methylated

GeneSymbol	Description	Ratio (Thy)	Ratio (Spl)	Chr. No	Region_info
Speg	SPEG complex locus	0.09786	0.04088	1	INSIDE
LOC545667	—	0.03769	0.04435	4	INSIDE
6330407J23Rik	RIKEN cDNA 6330407J23 gene	0.04495	0.04115	10	INSIDE
Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	0.06082	0.06016	10	INSIDE
Cdc42bpb	Cdc42 binding protein kinase beta	0.06177	0.05131	12	INSIDE
Pglyrp2	peptidoglycan recognition protein 2	0.01000	0.08583	17	INSIDE
Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2	0.01196	0.04570	17	INSIDE

Genes whose CpG methylation levels were hyper- or hypo-methylated more than 10 times both in the thymus and spleen after MMP exposure were selected. As up-regulated genes, only genes whose Normalized Ratio of CpG methylation exceeded 40 times in either tissue were listed. Chr. No, chromosome number. Region_info, information of the probing region of the interested genes.

Table 7. Effect of MMP on the CpG methylation of immune-related genes in thymus and spleen.**Thymus**

GeneSymbol	Description	Normalized ratio	Chr. No	Region_info
<Hyper-methylated>				
Edg3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	17.59	13	INSIDE
Hlxb9	homeobox gene HB9	12.25	5	INSIDE
Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	7.088	17	PROMOTER
<Hypo-methylated>				
Vav1	vav 1 oncogene	0.01545	17	PROMOTER
Sh2b2	SH2B adaptor protein 2	0.08780	5	INSIDE
Pglyrp2	peptidoglycan recognition protein 2	0.1028	17	INSIDE
Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)	0.1857	9	PROMOTER

Spleen

GeneSymbol	Description	Normalized ratio	Chr. No	Region_info
<Hyper-methylated>				
Psmb9-Tap1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	44.61	17	DIVERGENT_PROMOTER
Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	34.20	3	DOWNSTREAM
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3	30.68	7	INSIDE
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	27.94	4	INSIDE
Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b	20.17	16	INSIDE
Prok2	prokineticin 2	20.09	6	PROMOTER
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	18.91	7	INSIDE
Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10	14.93	3	PROMOTER
Tmem142a	transmembrane protein 142A	14.66	5	INSIDE
Arl6ip2	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2	12.51	17	INSIDE
Smad1	MAD homolog 1 (Drosophila)	10.71	8	PROMOTER
Vav1	vav 1 oncogene	8.085	17	PROMOTER
Hlxb9	homeobox gene HB9	6.765	5	PROMOTER
<Hypo-methylated>				
Cd14	CD14 antigen	0.01771	18	INSIDE
Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	0.03753	5	INSIDE
Pglyrp2	peptidoglycan recognition protein 2	0.06301	17	INSIDE

Among the genes whose CpG methylation level was hyper- or hypo-methylated more than four times after exposure to 25ppm MMP, entries which have immune-related* biological process in the Gene ontology were selected. If multiple probe IDs were hit for an identical gene, only one probe ID was selected by following priorities: 1) an entry whose Region_info is 'PROMOTER', 2) an entry whose fold change of the Normalized_ratio is the largest.

*GO:50776(regulation of immune response); GO:16064(immunoglobulin mediated immune response); GO:45087(innate immune response); GO:6959(humoral immune response); GO:6955(immune response); GO:42088(T-helper 1 type immune response); GO:2455(humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin); GO:6954(inflammatory response).

分担研究名 感染感受性評価

分担研究者 渡辺 渡 所属機関 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究要旨：メタミドフォスとクロルピリフォスを代表として化学物質の発達期曝露における胎児・新生児の免疫システムへの影響指標を見出すため、RS ウイルス感染マウスモデルでの感染初期免疫系への影響を検討した。メタミドフォス曝露仔マウスでは、BALF 中の炎症性サイトカイン（TNF- α と IL-6）レベルの変動とマイクロアレイ解析の結果から、標的細胞としてマクロファージ/単球系への影響が示唆された。一方、クロルピリフォスでは標的細胞を見いだせなかった。RS ウイルス感染および LPS 刺激培養マクロファージ細胞を用いて、メタミドフォスの *in vitro* での炎症性サイトカイン産生への反応性を検討したが、直接作用による影響は見いだせなかった。しかし、インフルエンザウイルスを用いた同様の実験では、両化合物ともに有意な TNF- α 産生誘導が認められた。なお、他系統の化学物質として、塩化マンガンをマウスモデルで評価したが、全く感染影響が認められなかった。

二種類の有機リン系農薬を対象とした発達期曝露による RS ウイルス感染感受性への影響評価では、メタミドフォスのウイルス感染免疫における間接的な有害標的細胞として単球/マクロファージを見出した。さらに、インフルエンザウイルスの様に異なった感染病態を引き起こすウイルスを利用することで、新たな感染初期免疫へのアプローチが行える可能性を見出すことができた。

A. 研究目的

メタミドフォスとクロルピリフォスを代表として化学物質の発達期曝露における胎児・新生児の免疫システムへの有害作用を感度良く評価するため、Respiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) 感染マウス実験モデルを用いて、感染免疫へ影響する標的細胞分子を明らかにする。今年度はマイクロアレイ解析ならびに炎症性サイトカインの産生影響を基に、培養マクロファージを用いた *in vitro* 試験から標的分子を同定することを最終目的とした。

B. 研究方法

化学物質の周産期曝露実験：メタミドフォスと塩化マンガンは、シグマアルドリッチより購入し、クロルピリフォスはダウケミカル日本(株)より提供を受けた。九動(株)より購入した BALB/c マウス (雄；8, 9 週齢、雌；6, 7 週齢) を感染実験室内飼育ケージにて一週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より 11 日後 (GD10) からクロルピリフォス (14, 70ppm) と塩化マンガン (32-800 ppm) を CRF-1 粉末餌で混餌により、メタミドフォス (30 ppm) は飲料水に溶解して自由飲水により出産後 21 日目

(PND21) まで曝露した。出産後 21 日目 (PND21) に離乳を行い、親・仔マウス共に通常飼育を行った。なお、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

RS ウイルス感染実験：Respiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) A2 株はヒト咽頭ガン HEp-2 細胞で増殖・取得した。4 週齢の仔マウスにキシラジン・

ケタミン混合麻酔液をマウス右大腿部に筋肉注射し、麻酔下で RS ウイルス 2×10^6 PFU を経鼻感染させた。感染実験対照マウスには PBS (-) を経鼻投与した。感染 1, 5 日後に、麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS(-) 0.8 -1.0 mL を注入し、肺洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。その後に肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析：BALF 取得を行わなかった仔マウスより肺を摘出し、RNA 安定液中で保存した。その後、RNAeasy (キアゲン) を用いて RNA を抽出し、北海道システムサイエンス(株)にてマイクロアレイ解析を実施した。解析はソフト Gene Spring にて行った。

マクロファージ培養実験：RAW264.7、J774.1 および P388D1 細胞を用い、予め化学物質と共に 24 時間培養後、RS ウイルス A2 株あるいは A 型インフルエンザウイルス PR-8 株を感染させ (MOI:1-5)、24-72 時間培養した。なお、LPS 刺激 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を行った際は、24 時間培養を実施した。

サイトカインの定量：BALF および培養上清中のサイトカインレベルは、それぞれ eBioscience 社製の Mouse Readyset-to-Go ELISA キットシリーズを用いて添付のプロトコールに準じて ELISA による定量を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規

則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

クロルピリフォスの感染影響 (in vivo)

クロルピリフォスを周産期曝露(70 ppm)した仔マウスに RS ウイルスを感染させ、感染 1 日後の肺組織における遺伝子発現変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した (図-1)。RS ウイルス感染時のみクロルピリフォス曝露で変動 (対照に対して 2 倍以上) した 1174 遺伝子を見出し、さらに Gene ontology データベースから免疫あるいは炎症に関与する遺伝子群を絞り込んだ (表-1)。TNF- α と IL-6 の誘導に関わる IL-17 およびそのレセプター遺伝子の発現上昇が認められたが、リアルタイム RT-PCR によりこれらの結果の確認が取れなかった (結果は示さず)。

メタミドフォスの感染影響 (in vitro)

メタミドフォス周産期曝露仔マウスにおいて、感染 1 日後では、感染初期のウイルス排除に関わる BALF 中の IL-6 レベルが用量に依存して有意に低下し、かつマイクロアレイ解析により肺組織での遺伝子発現抑制群の上位に IL-6 遺伝子を見出した (前年度報告済)。そこで、標的細胞としてマクロファージ/単球系への影響が示唆されたため、この化合物のマクロファージへの直接的な作用を確認するために、培養マクロファージ J774.1 細胞を用いて、in vitro での RS ウイルス感染応答への影響を検討した。100uM を最高濃度に設定して培養上清中の IL-6 量を測定したが、in vivo で認められた様な抑制効果は全くなかった (図-2)。次に RS ウイルスのマクロファージ/単球系細胞でのレセプターとして知られている Toll like receptor-4 のリガンドである LPS 刺激に対する影響について、RAW264.7 細胞を用いて検討した (図-3)。その結果、弱い IL-6 の産生抑制傾向が得られたが、濃度依存性がなく、in vitro での直接的な作用は確認できなかった。

インフルエンザウイルス感染マクロファージに対するクロルピリフォス・メタミドフォスの影響

P388D1 細胞を用いて、クロルピリフォス・メタミドフォスのインフルエンザウイルス感染への応答を検討した (図-4)。クロルピリフォスは難溶性のため、0.1% DMSO 存在下で感染培養を行った。両化合物ともに培養上清中の TNF- α レベルを有意 ($P<0.01$) に上昇させた。

塩化マンガンの感染影響評価

塩化マンガンを混餌投与により周産期曝露を行い、仔マウスの RS ウイルス感染への影響を検討した。感染病態の重要な指標である 5 日後の BALF 中の IFN- γ レベルは、800 ppm まで影響が認められなかつ

た (図-5)。同様に、1 日後の TNF- α レベルも明確な変化が見られなかった (結果は示さず)。

D. 考察

クロルピリフォスの周産期曝露により、仔マウスでの RS ウイルス感染初期 (感染 1 日後) に proinflammatory cytokine (TNF- α) の産生を抑制することを昨年度報告した。これを基に肺組織での網羅的な遺伝子発現影響を確認したが、結果は全く一致しなかった。一方で、メタミドフォスについては、IL-6 への影響が BALF 中のレベルと肺組織での遺伝子発現の面で確認され、マクロファージ/単球系がこの化合物の標的細胞であることが強く示唆された。このように、二種類の有機リン系農薬を対象とした発達期曝露による RS ウイルス感染感受性への影響評価を行ったが、化合物間の感染免疫における標的細胞・分子が全く異なることが明らかとなった。

メタミドフォスのマクロファージ/単球系細胞への直接的な作用について培養マクロファージ細胞を用いて検討した。Toll like receptor-4 を共通のレセプターとする RS ウイルスと LPS を用いて IL-6 を誘導したが、メタミドフォスはそれらの産生を抑制しなかった。この化合物がマウス体内で代謝を受けて初めて免疫系へ作用する、あるいは気道上皮など他の組織/細胞を介して作用することが強く示唆された。しかし、インフルエンザウイルスを感染させた P388D1 細胞では TNF- α の産生増強が見られることから、直接的な作用を完全には否定できない。今後、マウス腹腔からマクロファージを調製して影響を検討する予定である。

塩化マンガンの周産期曝露による RS ウイルス感染免疫への影響は確認できなかった。インフルエンザウイルスのように、異なった感染病態を引き起こすウイルスでの影響については、実施を検討していきたい。

E. 結論

メタミドフォスの周産期曝露は、仔マウスの RS ウイルス感染初期の免疫応答に間接的に作用し、マクロファージ/単球が標的細胞であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeda, S. Takeshita, M., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kawahara, S., Yoshida, H., Watanabe, W., Mugeruma, M., Kurokawa, M. Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products

against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. *Int. Immunopharmacol.* 11: 1976-1983, 2011.

Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kai, H., Sawamura, R., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, A., Park, Y.K., Yasukawa, K., Matsuno, K., Shiraki, K., Kurokawa, M. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of anti-herpetic efficacies. *Evid.-Based Compl. Alt. Med.* doi:10.1155/2011/976196 Article ID 976196, 9 pages, 2011.

Konno, K., Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., Kato, M., Yamamoto, R., Kurokawa, M. Antiviral activities of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum* against respiratory syncytial virus, poliovirus, measles virus and herpes simplex virus type 1 *in vitro*. *Nat. Prod. Commun.* 6: 1881-1884, 2011.

2. 学会発表

渡辺 渡: RS ウイルス感染マウスモデルを用いた臭素化難燃物質の発達期免疫毒性の評価, 試験法ワークショップ「発達期免疫毒性 (developmental immunotoxicity) の評価方法」, 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会, 千葉, 9 月, 2011

渡辺 渡, 吉田裕樹, 広瀬明彦, 紺野克彦, 山中沙代子, 黒木奈緒, 黒川昌彦: 酸化チタンナノ粒子のマクロファージおよびマウスモデルにおける RS ウイルス感染免疫応答における影響, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月, 2012

吉田裕樹, 渡辺 渡, 大曲宏幸, 鶴田瑛典, 仕田美紀子, 黒川昌彦: 脂肪細胞における TLRs 発現制御に対する柑橘類フラボノイドの影響, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月, 2012

黒川昌彦, 吉田裕樹, 渡辺 渡, 林 雅弘, 永友聖代: 単純ヘルペスウイルス経皮感染マウスモデルを用いた細胞性免疫賦活作用を有する海洋性バイオマスの検索, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月, 2012

黒川昌彦, 甲斐久博, 吉田裕樹, 堤 重敏, 安川 憲, 渡辺 渡, 松野康二, 白木公康: 単純ヘルペスウイルス 1 型感染症に対するブラジル産プロポリスの有効性とその評価, 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 金沢, 5 月, 2011

Watanabe, W., Yoshida, H., Hirose, A., Konno, K., Kurokawa, M: Effects of the nanoparticles of titanium

dioxide on the immune response to respiratory syncytial virus (RSV) infection in macrophages *in vitro* and mouse model *in vivo*. International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

図-1

GeneSpring®によるデータマイニング

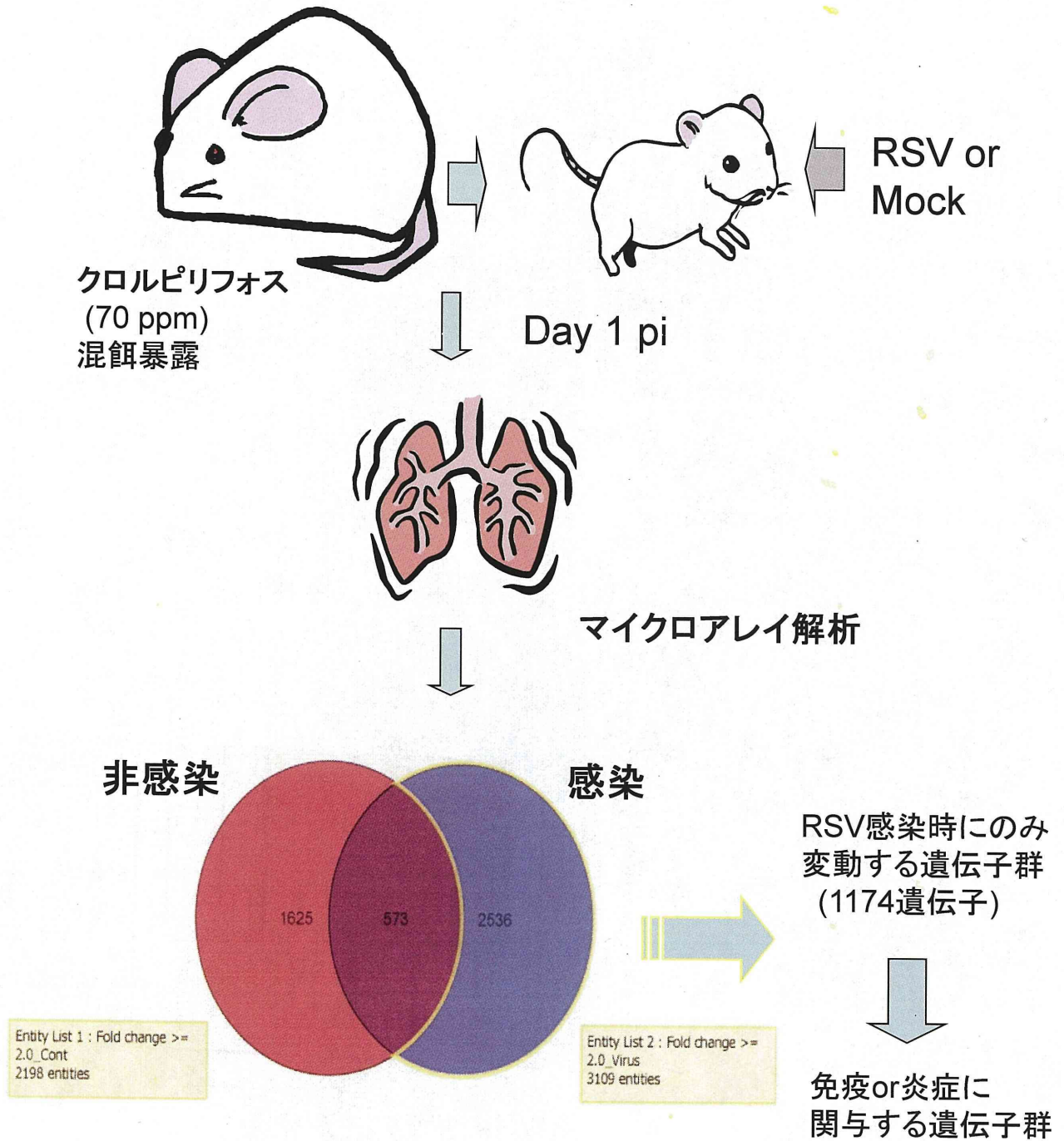


表-1

Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos (70 ppm) on the gene expression in the lung tissues of RSV-infected offspring mice by microarray analysis (Day 1pi)

Gene symbol	Fold change	Gene Name
Il1r2	3.4	IL-1 receptor type II
Il17f	2.9	IL-17f
Slurp1	2.1	Secreted Ly6/Plaur domain 1
Il17rb	2.0	IL-17 receptor B
Gm13271	0.5	-
Bmp8b	0.4	Bone morphogenetic protein 8b
Ccr4	0.1	Chemokine (C-C motif) receptor 4

图-2

Effects of treatment of methamidophos on IL-6 production from RSV-infected J774.1 cells

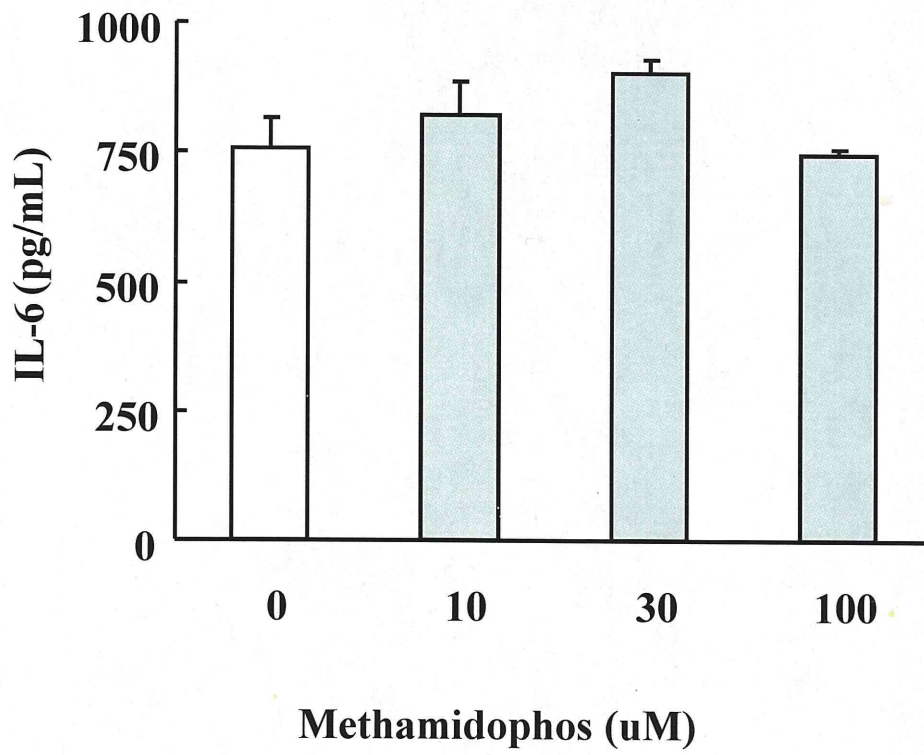


Figure 3

Effects of treatment of methamidophos on IL-6 production from LPS-stimulated RAW264.7 cells

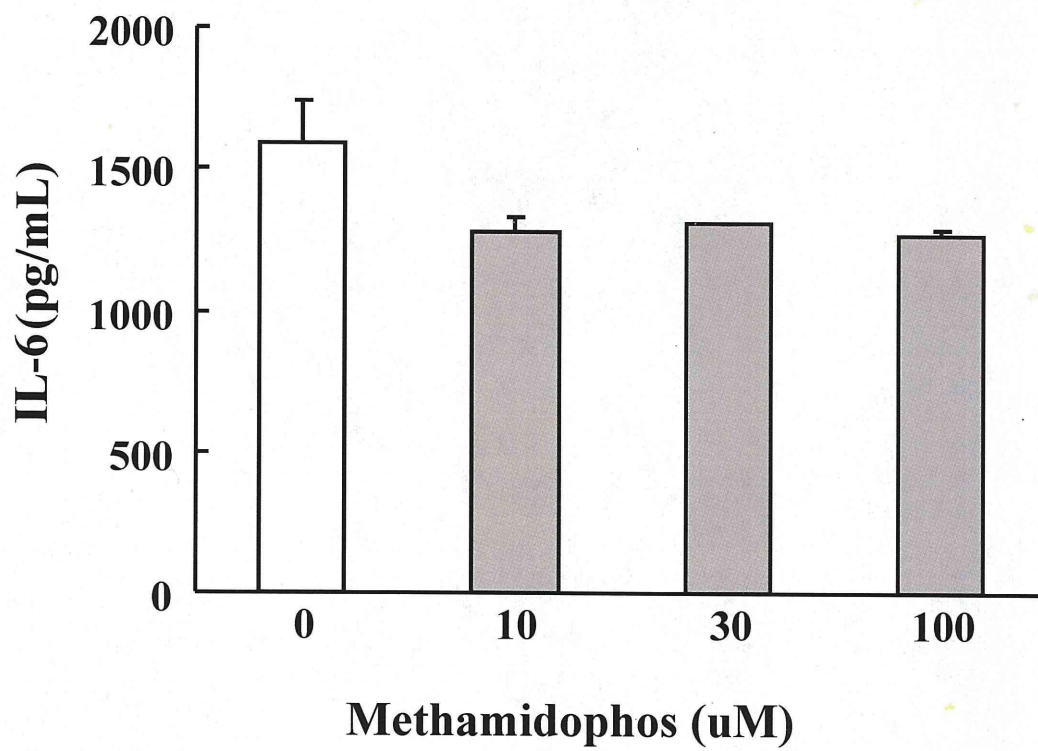


图-4

Effects of treatment of methamidophos or chlorpyrifos on TNF- α production from Fluv.A-infected P388D1 cells

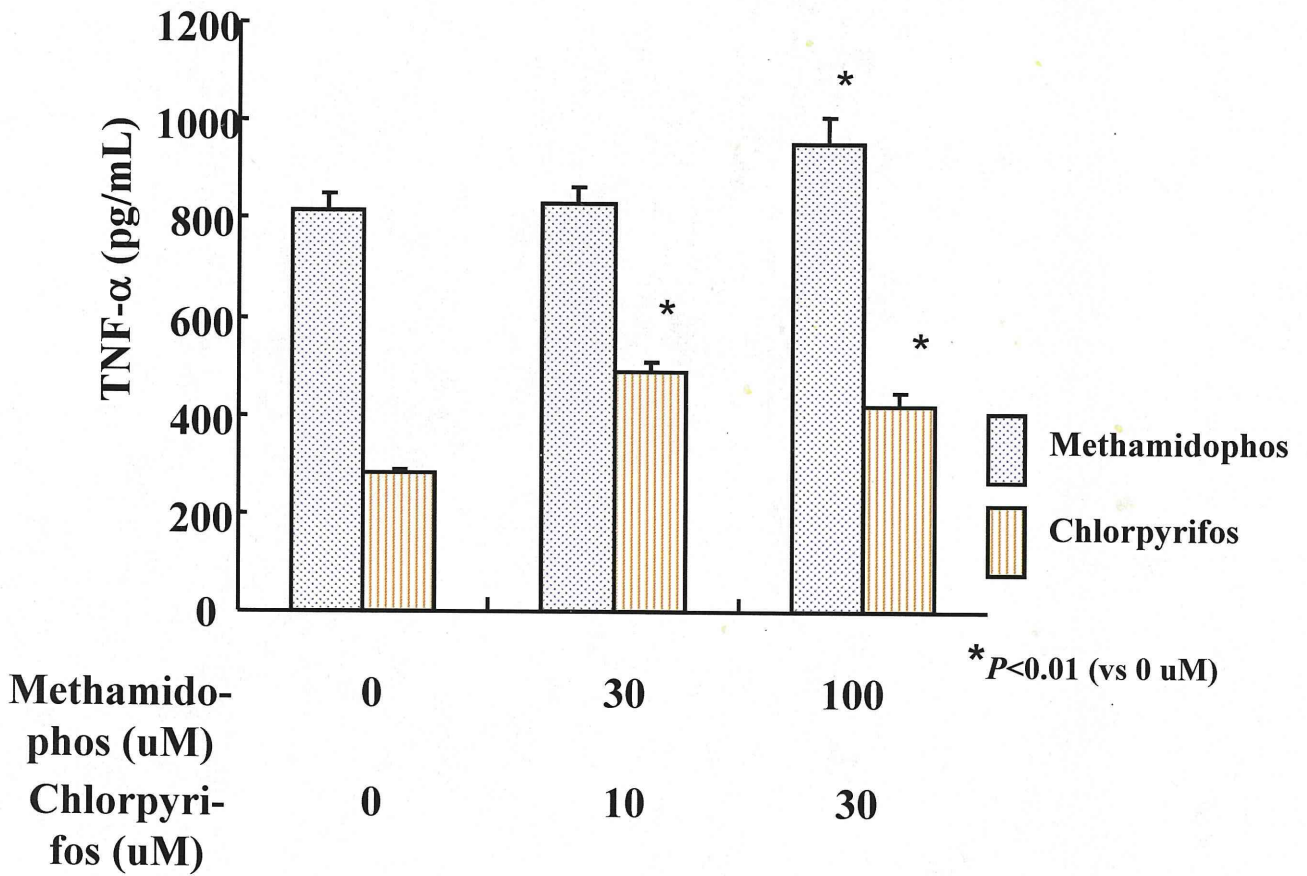
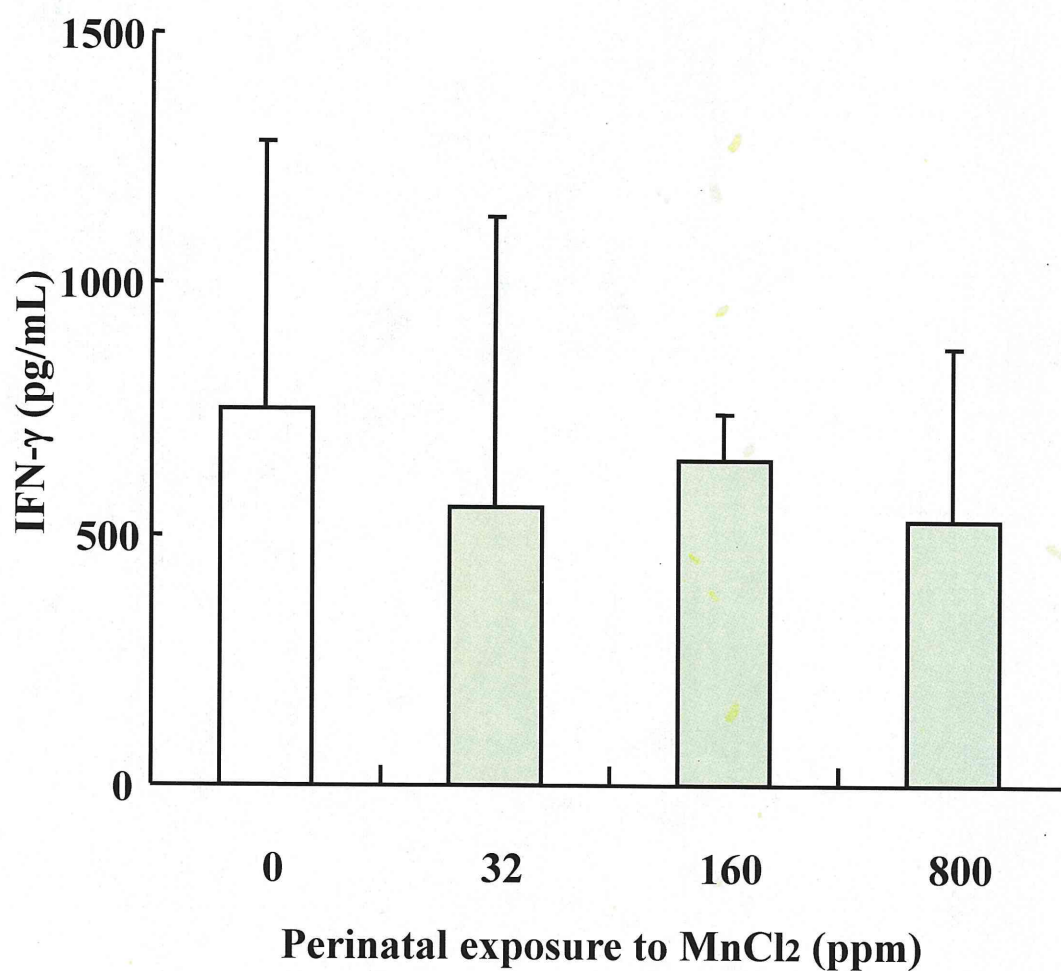


图-5

Effects of perinatal exposure to MnCl₂ on IFN- γ level in BALF from RSV-infected offspring on day 5 post-infection



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質暴露影響評価手法の確立に関する研究
（H21-化学-一般-006）
分担研究報告書（平成23年度）

発達期における発がん性評価手法に関する研究

研究分担者 西川 秋佳
国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター センター長

研究協力者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部部長
曹 永晩 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

研究要旨：ニコチンは強い神経毒性を示し、明らかな発癌性はないとされるものの発がん修飾作用が懸念される。本研究ではニコチンの発達期暴露による中枢神経系発がん修飾作用について *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより解析する。妊娠 17 日目の F344 雌ラットに ENU (20 mg/kg 体重) を一回静脈内投与し、分娩直後より母動物に酒石酸ニコチン二水和物を 0.002, 0.01 及び 0.05% 濃度で 2% サッカリン水に混ぜ、またプロパンスルトンを 0.04% 濃度で脱イオン水に混ぜ 3 週間飲水投与した。離乳後、仔動物にも各々同濃度の飲料水を投与した。25 週に屠殺解剖し、中枢神経系に発生した腫瘍性病変に関して病理組織学的に評価した。0.05% 群の親動物に飲水量減少、神経症状等による育児放棄がみられ、仔動物が全例死亡した。全投与群で実験期間を通して仔動物の飲水量及び体重増加抑制が認められた。本モデルは 25 週間という短期間で各々 50% (雄) 及び 57% (雌) の動物に中枢神経がんを誘発したことから中枢神経発がん修飾物質の検索に有用であると考えられた。いずれの投与群においても星状膠細胞腫、乏突起膠細胞腫、悪性星状膠細胞腫及び多形性膠芽腫等の中枢神経腫瘍が認められたが、その発生率には群間の差がないことからニコチンの幼若期暴露による中枢神経発がん修飾作用は認められなかった。またプロパンスルトンによる肺がん修飾作用は認められたものの飲水中の安定性が不良であることから投与方法を改める必要があると考えられた。

A. 研究目的

化学物質の発達期暴露は成熟期暴露に比べ発がん感受性が高いことが示唆されている (U. S. EPA, 1996)。しかし、それに関連して検討された物質の数は少なく、特に中枢神経発がんに関する情報は乏しいことから短期間で高感度に発がん修飾作用を示す化学物質をスクリーニング出来るモデルの開発が望まれている。中でも発達期に被験物質を暴露できる中枢神経系の発がんモデルはほとんど検討されていない。本研究では、ENU の経胎盤投与によるラット中枢神経発がんモデルを用いて、出生直後より神経標的性を持つ物質を中心として暴露しその発がん修飾作用を検討している。

マンガンは過剰に暴露されると急性影響としては記憶障害、精神症状などがみられ、慢性影響としては歩行障害、言語障害などパーキンソン病に類似したマンガン中毒の症状がみられる (Santamaria, *Indian. J. Med. Res.*, 128, 484-500, 2008)。マンガンのものはヒトでの発がん性がないと分類されており (U. S. EPA)、長期の動物実験でも発がん性を有するとのデータは知られていない (NTP)。マンガンは神経系を標的にしており、神経毒性のメカニズムが神経細胞に対する活性酸素による酸化ストレス (Aschner, *Manganese neurotoxicity and oxidative damage*, 77-93, 1997, Galvani et al., *Eur. J.*

Pharmacol., 377-383, 1995) とされることから感受性の高い発達期の暴露による神経系発がんへの影響が危惧される。実際、新生仔は成熟動物よりマンガンの脳内濃度増加やドーパミン濃度の変動による神経毒性のリスクが高く (Kontur et al., *Teratology*, 32, 1-11, 1995, Pappas et al., *Neurotoxicol. Teratol.*, 19, 17-25, 1997, Gianutsos et al., *Neurotoxicology*, 3, 75-81, 1982)、大脳皮質の菲薄化も報告されている (Pappas et al., *Neurotoxicol. Teratol.*, 19, 17-25, 1997)。

ニコチンは主に煙草の葉に含まれているアルカロイドの一種で即効性の非常に強い神経毒性を持つ。おもに中枢神経及び末梢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に作用することで心拍数上昇、毛細血管収縮、血圧上昇などの薬理作用を示す。中毒性があり、急性毒性で嘔吐、振戦、痙攣、死亡を起こす。ニコチンの変異原性及び発がん性は無いとされるが、近年、小核試験陽性 (Argentin, *Toxicol. Sci.*, 79, 75-81, 2004)、活性酸素種の産生 (Argentin, *Apoptosis*, 11, 1887-97, 2006)、apoptosis の抑制 (Wright, *FASEB J.*, 7, 1045-1051, 1993) などの報告もある。

今回、発達期に被験物質投与が可能なラット中枢神経系発がんモデルを用いて諸臓器に発がん促進作用の知られているニコチンを最高 0.05% 濃度で飲

水投与した際の発がん修飾作用を検討した。また、中枢神経発がん作用を示すプロパンスルトンを用いて本モデルにおける発がん修飾作用を検討した。また、前年に本モデルにおいて影響を示さなかった塩化マンガンについて仔動物への暴露を確認する為、授乳期の仔動物の胃内容物中のマンガン濃度を分析した。

B. 研究方法

分娩直後の3匹のF344雌ラットに塩化マンガン4水和物($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)を0.5%濃度で混餌投与した。生後1, 7, 14日目に仔動物の解剖を行い、胃内容物を採取し、ICP-MSを用いてマンガン濃度を測定し、マンガンの乳汁移行を検討した。この間基礎飼料のみを与えた4匹を対照とした。

妊娠17日目のF344雌ラットを各群6匹の5群に分け、ENU(20 mg/kg 体重)を1回尾静脈内投与し、分娩直後より離乳時まで、酒石酸ニコチン二水和物を0.002, 0.01及び0.05%濃度で2%サッカリン水に混ぜ、また、プロパンスルトンを0.04%濃度で脱イオン水に混ぜ、飲水投与した。投与開始1週間から0.05%を0.025%に濃度を変更して投与を行った。離乳後、各々の仔動物に母動物と同様の飲水投与を25週齢まで行った。この間、脱イオン水で作製した2%サッカリン水を与えた群を対照とした。投与期間中、毎日神経症状の有無など一般状態を観察し、週1回体重および摂餌量を測定した。投与期間終了後、解剖時に脳及び脊髄を摘出し、肉眼的に見られる結節の大きさを測定した後、大脳4切片、小脳2切片、延髄1切片、脊髄6切片(頸部、胸部及び腰部の各2切片)を切出し、パラフィン包埋切片、HE標本作製した。腫瘍性病変の種類、発生部位、サイズの測定を行った。発生した腫瘍性病変に関して病理組織学的に評価した。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

マンガンの乳汁移行を検討する実験について、親動物への投与開始1週間より乳汁中のマンガン濃度の有意な増加が認められた(Figure 1)。

ニコチンの中枢神経発がん修飾作用を検討する実験について、0.05%群の投与による親動物に飲水量及び体重減少、神経症状(緊張状態)等による育児放

棄がみられ、投与開始2週目に仔動物が全例死亡した。(Figure 2, Table 1 and 2)。全投与群で実験期間を通して仔動物の飲水量及び体重増加抑制が認められた(Figure 3)。また25週目までの生存率はニコチン投与による有意な変化はみられなかったが、プロパンスルトンによって有意に減少した(Figure 4)。臓器重量について、ニコチン0.01%群雌雄の脳、肺、膵臓、肝、腎の絶対重量、肝の相対重量の有意な減少及び脳の相対重量の増加が認められた(Table 4 and 5)。プロパンスルトン投与群では雌雄動物の脳及び肝の絶対重量の減少または減少傾向が認められた(Table 4 and 5)。

対照群では、ENUの経胎盤投与により25週において、各々50%(雄)及び57%(雌)の動物に星状膠細胞腫、乏突起膠細胞腫及び悪性星状膠細胞腫等の中枢神経腫瘍が認められた(Figure 5, Table 6)。しかし、ニコチン及びプロパンスルトンによる中枢神経腫瘍の種類、発生部位、発生率、発生数及び体積に対する影響は認められなかった(Figure 5 and 6, Table 6)。また、全群で三叉神経での神経鞘腫等の末梢神経腫瘍及び一部の群で肺がん等の非神経腫瘍が認められたが、いずれもニコチンによる発生率の変化は認められなかった(Figure 6, Table 6 and 7)。一方、プロパンスルトン投与によって肺がん発生率の有意な増加が、神経鞘腫等の末梢神経腫瘍発生率の増加傾向が認められた(Table 7)。

D. 考察

ENUを経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより、ニコチン及びプロパンスルトンの発達期暴露による発がん修飾作用について検討を行った。また、マンガンの乳汁移行についても確認を行った。

ニコチンに関しては親仔動物に酒石酸ニコチン二水和物を0.002, 0.01及び0.05%濃度で飲水投与する実験を実施したが、2%サッカリン水に混ぜて投与したにも関わらず飲水量が著しく減少したのはニコチンの苦味等による忌避と考えられた。0.05%ニコチン投与群ではニコチンに対する忌避に加えて緊張状態等の神経症状によって育児放棄に至ったと考えられる。0.01%ニコチン投与群(18.5mg/kg/day)でも体重及び臓器重量の減少が認められた。ニコチンは経胎盤及び経乳汁移行することが知られている(Svensson CK, Clin. Pharmacokinet., 12, 30-40, 1987)ことから仔動物にもニコチンは暴露されると考えられる。また、妊娠中のラットに0.008%飲水投与によっても飲水量及び体重の減少及び0.004%以上の投与によって体重増加抑制を含む発達障害の増加が報告されている(Schneider et al., Behavioural Pharmacology, 21, 206-216, 2010)ことから乳幼若期にニコチンに暴露されると発達に影

響を受ける可能性が考えられる。

18(雄)及び22(雌)週目より切迫屠殺解剖例及び死亡例が認められ、同程度の濃度のENUを経胎盤暴露し、同時期に死亡例を認めた報告(Perantoni et al., Pro. Natl. Acad. Sci., 84, 6317-6321, 1987)と一致する結果となった。しかし、仔動物の死亡率及び腫瘍性病変の発生率について、ニコチンの投与による明らかな影響は認めなかった。体重増加抑制による影響は否定できないが、脳の相対重量は有意に増加し、体重変化の影響は少ないと推察される。プロパンスルトンによる体重増加抑制は同様に観察されるものの重量変化が殆どみられなかった肺において明らかな発癌促進作用が認められたことから体重増加抑制が必ずしも全ての臓器の発がん抑制的に作用するとは考えにくい。

プロパンスルトンによる中枢神経発癌促進作用が認められなかったことについて、飲水中の安定性を調べたところ飲水中には室温4日間の保管後には、測定限界以下だったことから安定性の不良が原因で、十分な投与量に至らなかったことが明らかとなった。週2回の飲水交換による低い暴露濃度でも肺がん促進及び神経鞘腫の発生率増加傾向が認められており、投与方法を改め検討を行うことで中枢神経発がん修飾陽性対照として活用が期待できる。

マンガンを投与した母動物の授乳中の仔動物の胃内容物から有意なマンガン濃度の上昇が認められたことからマンガンが乳汁移行することを明らかにした。

E. 結論

ENUを経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルは25週間という短期間で50-60%の動物に中枢神経腫瘍を発生させることから中枢神経発がん修飾物質の検索に有用であると考えられた。しかし最高0.01%濃度で酒石酸ニコチン二水和物を飲水投与した際の中枢神経発がん修飾作用は認めなかった。また、プロパンスルトンについて、安定性が不良であることから明らかな中枢神経発がん修飾作用は示さなかったが、投与方法を改めた検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

Young-man Cho, Shigeaki Takami, Takeshi Toyoda,
Saeko Onami, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa:

Lack of modification of tumorigenesis in the central nervous system by early-life exposure to manganese(中枢神経発がんにおけるマンガンの幼若期暴露による発がん修飾の欠如), 第47回欧州毒性学会講演要旨集:P2256, p.193, 8月, 2011

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

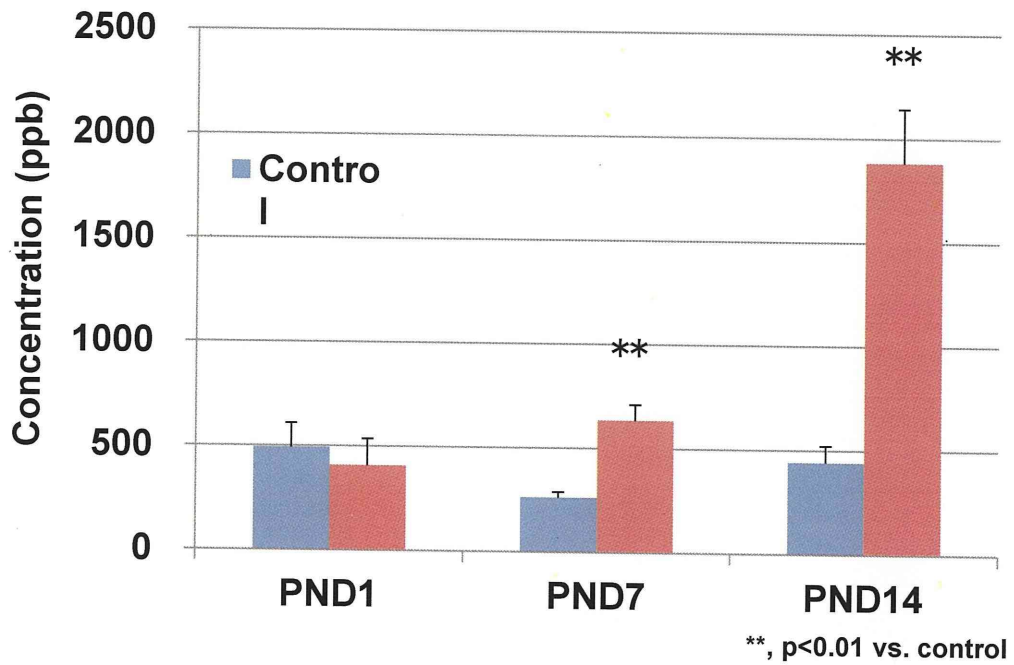


Fig. 1. Mn concentration in milk

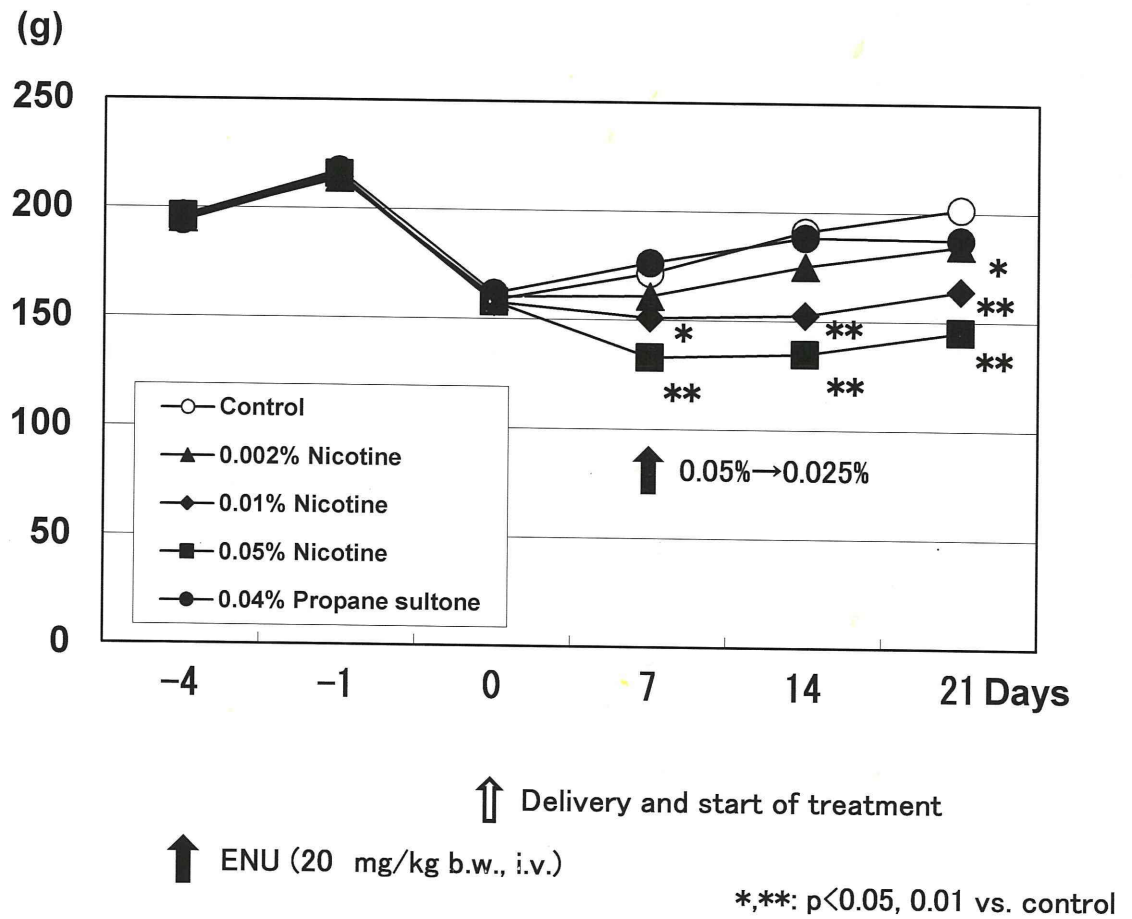


Fig. 2. Body weight curves of dams

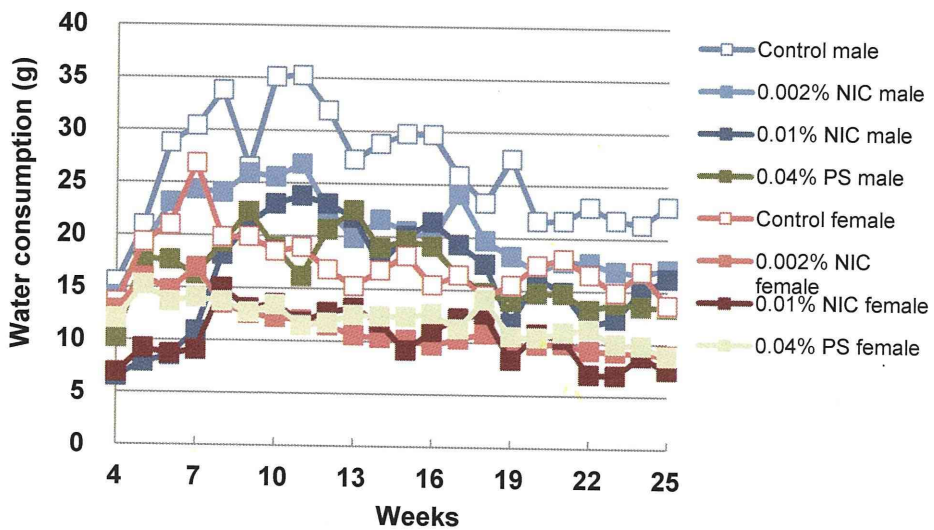
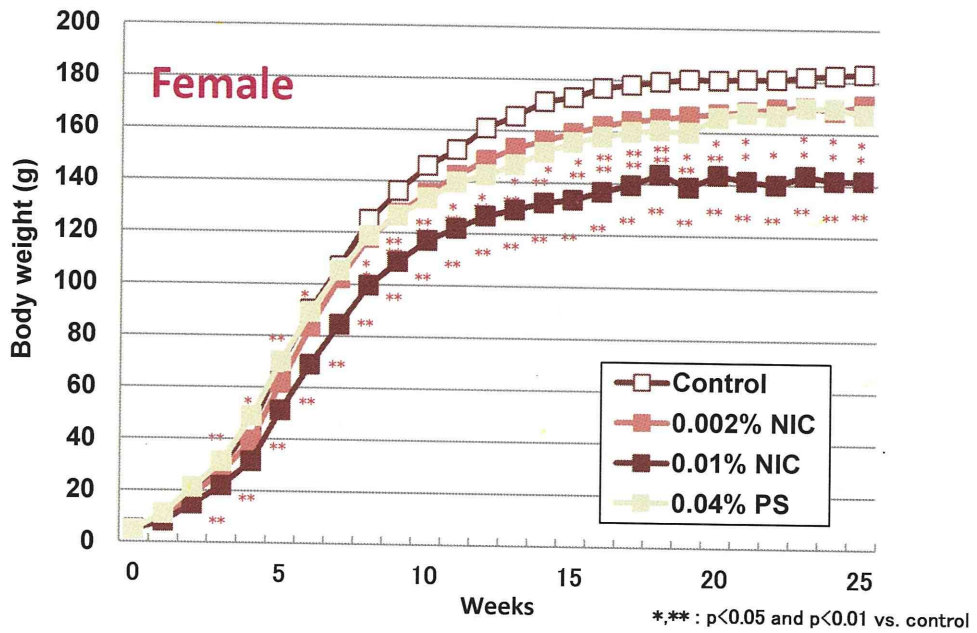
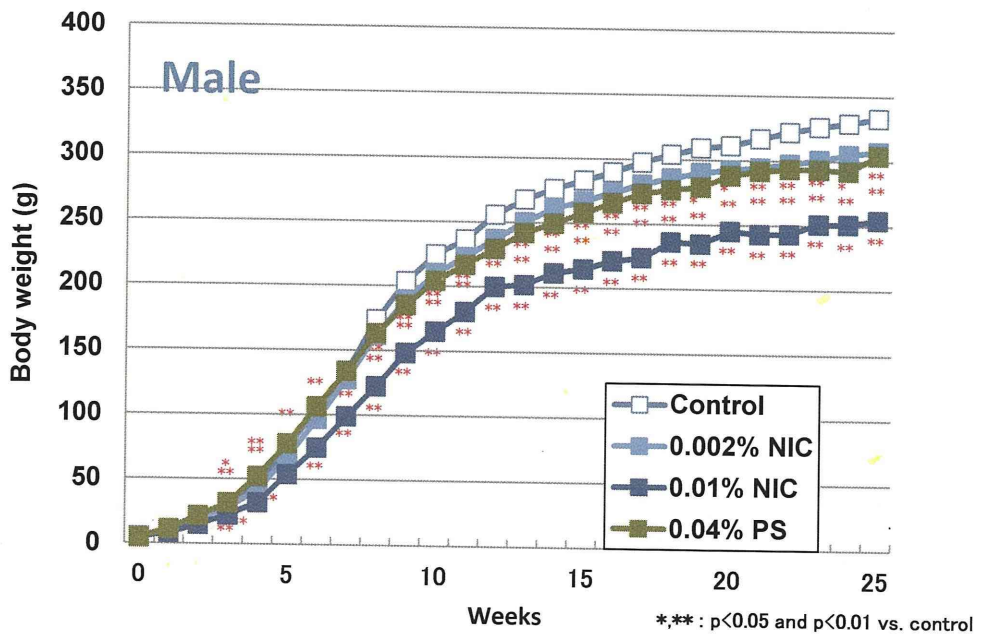


Fig. 3. Body weight curves and water consumption of offspring

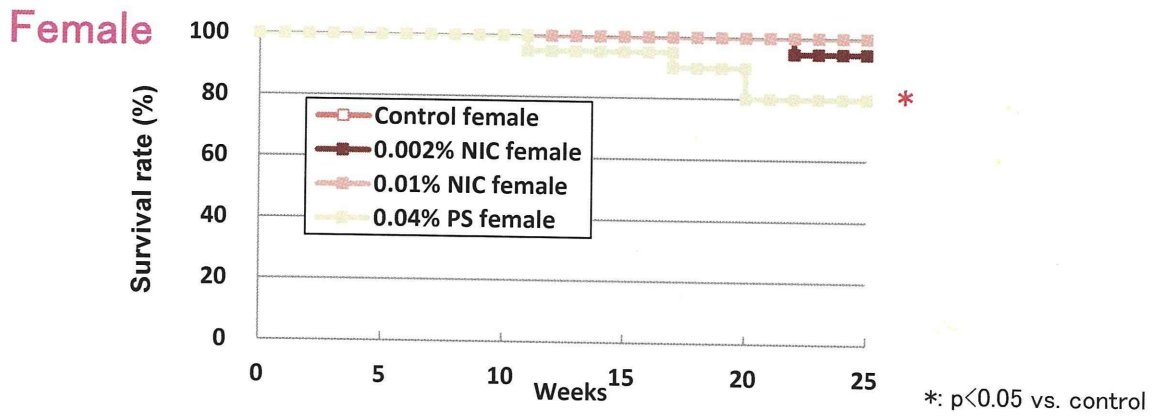
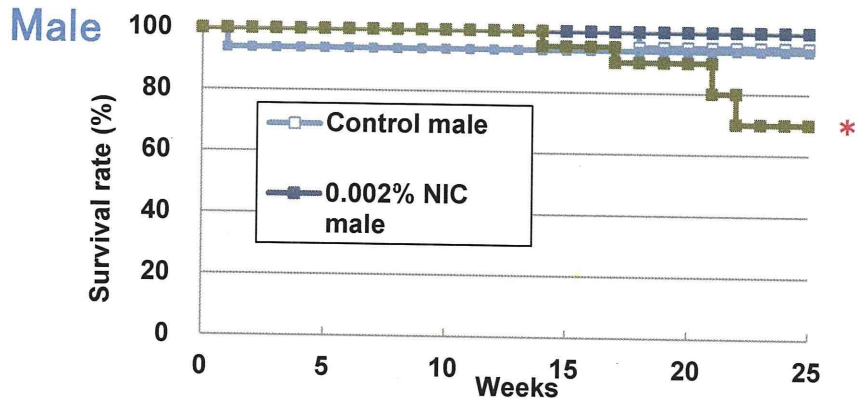


Fig. 4. Survival rate of offspring

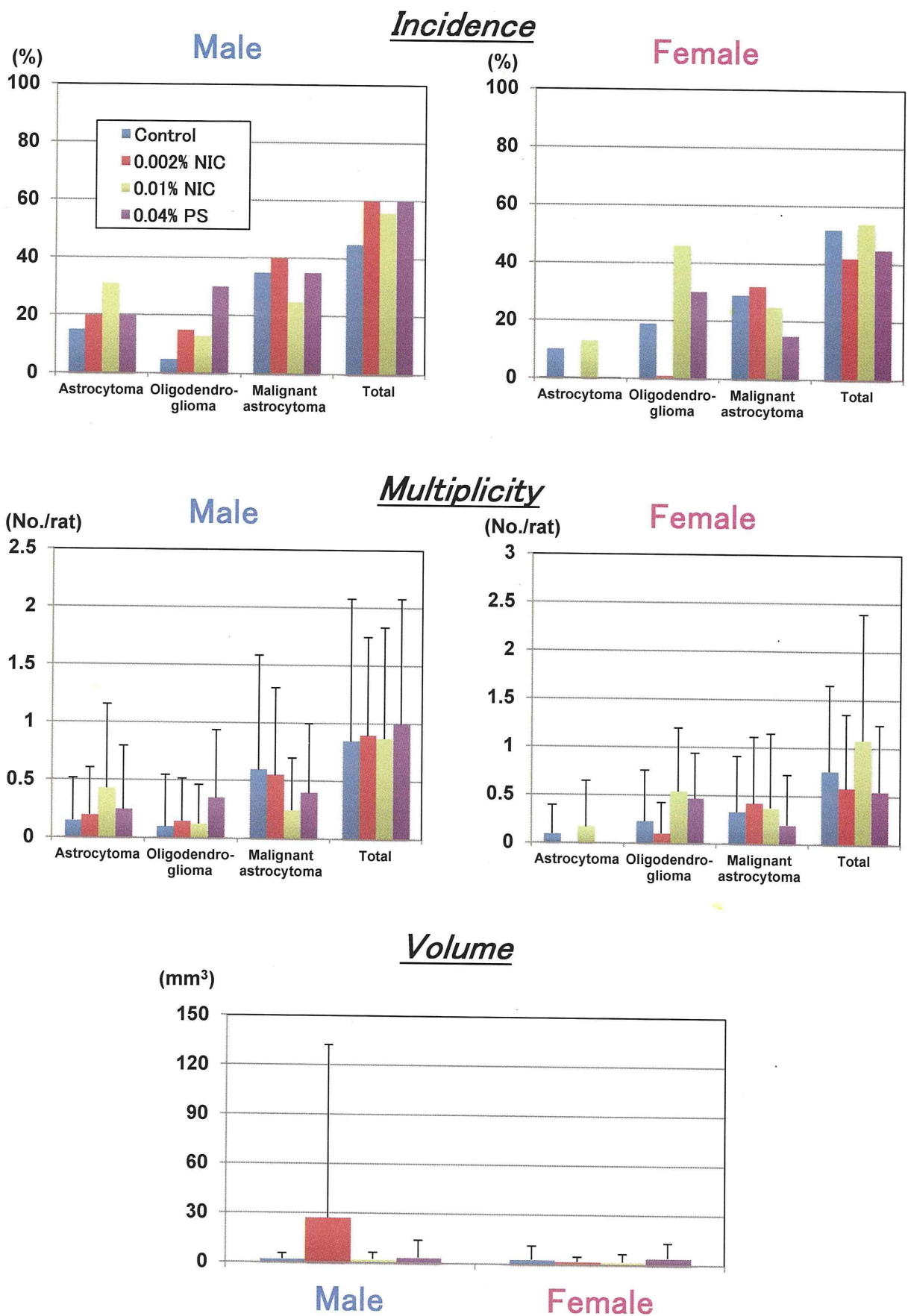


Fig. 5. Incidence, multiplicity and volume of neural tumors (Brain)