

40. 殺虫剤の二次標的を経た注意欠陥・多動性障害発症の可能性の解明

伊藤 由起

Key words : 殺虫剤, 注意欠陥・多動性障害

*名古屋市立大学 大学院医学研究科
環境保健学

緒 言

化学物質に感受性の高い胎児期, 乳児期に有機リン系 (OP) 化合物に過剰に曝露すると, 脳機能発達プロセスに影響を及ぼし, 注意欠陥・多動性障害 (ADHD) を発症する可能性があると考えられている。

米国において 1,139 人の子どもの対象に OP 農薬と ADHD との関連を調査した研究が行われており, ADHD と診断される子どもの方が尿中の OP 農薬化合物の代謝物濃度が高い人が多かったという報告がされている¹⁾。他にも近年, OP 農薬と ADHD との関連が多くの研究で指摘されているが, OP 化合物曝露と ADHD 発症の過程や因果関係はいまだ不明である。そこで, ラットを用いて OP 化合物曝露と ADHD 発症の因果関係を明らかにすること, さらに, それがどのような機序によって生じるのかを推察することを本研究の目的とした。

OP 化合物は主にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) という活性中心にセリン残基を有する酵素をリン酸化し, 神経毒性を誘発する。しかし, 近年 AChE 以外のセリン加水分解酵素に対しても OP 化合物はリン酸化を引き起こすことが報告されており, 今回は ADHD との関連が示されている脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) やモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) といったエンドカンナビノイド系 (EC) に着目した。OP 化合物がこの EC 系のセリン加水分解酵素の活性を阻害し, 基質の EC を蓄積させ, カンナビノイドレセプター 1 (CB1R) への刺激が増幅することで ADHD の発症を誘発するという仮説を立てた。

方 法

生後 3 週齢の雄性 Wistar ラットをチャールズリバー社から購入し, 1 週間環境への馴化と高架式十字迷路のトレーニングを行った。その後, ラットは, vehicle (DMSO) 投与群, OP 化合物 (EOPF) 1, 2, 3 mg/kg 投与群, さらに EOPF と CB1R のアンタゴニスト (SLV-319) の併用投与群に分け, 単回腹腔内投与を行った。薬剤投与から 30 分, 5, 24, 30 時間後の 4 時点で, 3 分間の行動観察を行った。高架式十字迷路は 4 ルクス程度の明るさの部屋で行い, ビデオ録画をした。行動解析は盲検で行い, 高架式十字迷路の壁のないオープンアームへの進入回数とその滞在時間, 壁のあるクローズドアームへの進入回数, 中心部滞在時間を測定した。

また, 一部のラットは行動観察と同じ時点で解剖し, 血液と脳を採取し, 使用時まで -80°C で保存した。摘出した脳は, ホモジネートを作製後, 活性基盤プロテインプロファイリング (ABPP) による脳内におけるセリン加水分解酵素の測定や 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 法による OP 化合物投与後の脳内の AChE 活性の測定に供した。ABPP には OP に似た構造を持つ反応基と発色基を持つ FP-TAMRA というケミカルプローブを用い²⁾ (図 1), 蛍光スキャナーで測定した。OP 殺虫剤 (クロルピリホス 10, 20 mg/kg) の影響についても EOPF 同様の方法で検証した。

結果は対数変換した後, 一元配置分散分析と Dunnett または Tukey の多重比較を行った。p < 0.05 を有意差ありとした。

*現所属 : 名古屋市立大学 大学院医学研究科 環境労働衛生学

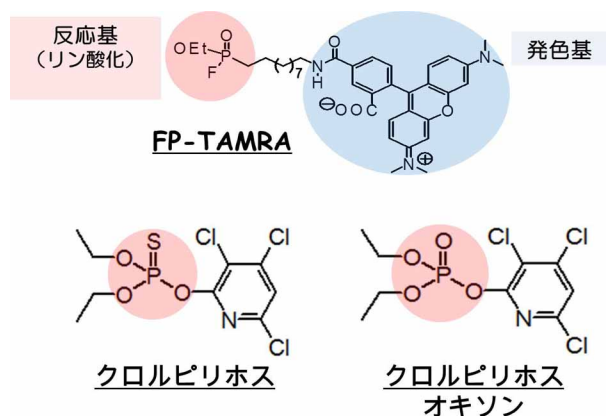


図1. FP-TAMRA とクロルピリホス.

FP-TAMRA とクロルピリホスならびにクロルピリホスの活性代謝物であるクロルピリホスオキシソンの構造式を示す。ピンク色の部分が反応基であり，FP-TAMRA は OP 化合物と類似構造を示すため，反応が競合する。

結果および考察

高架式十字迷路試験の結果，薬剤投与から 30 分，5，24 時間経過時には EOPF 群と vehicle 群の間にオープンアーム進入回数及びその滞在時間，クローズドアームへの進入回数，中心部滞在時間の有意な差は見られなかった。一方，30 時間後には EOPF の濃度依存的にオープンアームへの進入回数，オープンアームへの滞在時間が増加し，進入回数は 3 mg/kg 群で，滞在時間は 2 mg/kg と 3 mg/kg 群で vehicle 群に比べ有意に増加した（図 2）。

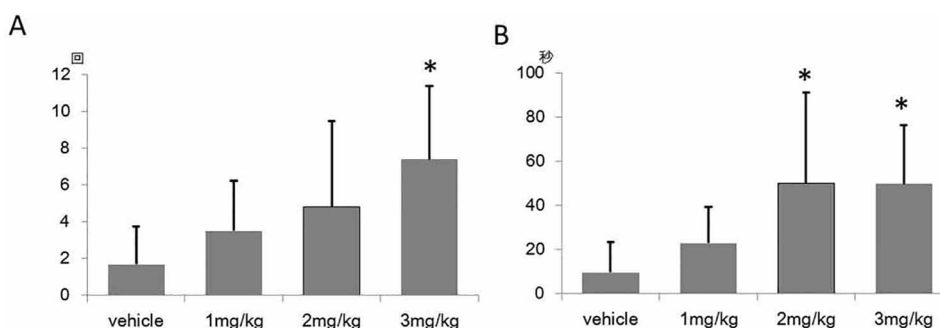


図2. EOPF 投与 30 時間後のオープンアーム進入回数およびその滞在時間への影響

EOPF 投与 30 時間後のラットのオープンアーム進入回数 (A) とその滞在時間 (B)。グラフは平均±標準偏差で示す。統計解析は，対数変換した後，一元配置分散分析と Dunnett の多重比較を行った。*vehicle 群に対して $p < 0.05$ 。

また，オープンアームとクローズドアームの進入回数の和も EOPF 3 mg/kg で増加した。したがって，EOPF 投与により，注意欠陥症状，多動性を有する個体が増えたと考えられた。これらの影響は，CB1R アンタゴニストである SLV-319 の併用投与により抑制された（図 3）。

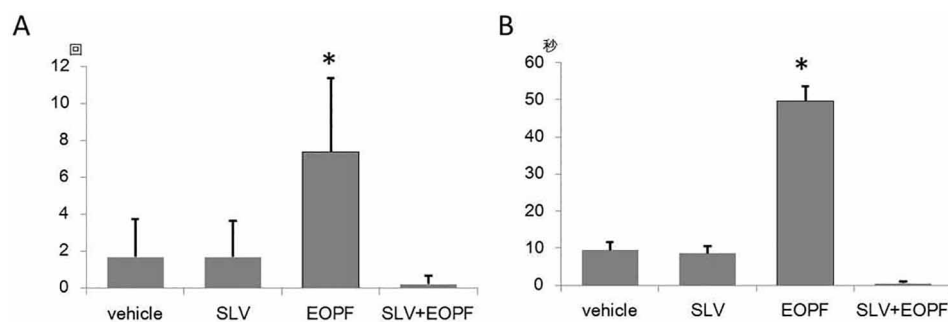


図3. SLV-319 併用によるオープンアーム進入回数, 滞在時間への影響.

vehicle 群, SLV-319 群, EOPF 3 mg/kg 群, EOPF 3 mg/kg と SLV-319 の併用群におけるオープンアーム進入回数 (A) およびその滞在時間 (B). グラフは平均値 ± 標準偏差で示した. 統計解析は, 対数変換した後, 一元配置分散分析と Tukey の多重比較を行った. *EOPF 3 mg/kg 群は, vehicle 群, SLV-319 群, EOPF 3 mg/kg と SLV-319 の併用群との間に有意差あり. $p < 0.05$.

一方, EOPF 投与後のラットの脳における AChE の活性に有意な差は見られなかった.

脳ホモジネートに EOPF を *in vitro* で反応させた ABPP の結果から, OP により EC 系酵素の MAGL が阻害されていることが明らかとなった. 同様に, クロルピリホスの代謝活性物質であるクロルピリホスオキソン (CPO) を *in vitro* で脳ホモジネートと反応させた ABPP の結果においては MAGL に加えて, FAAH も阻害されることが示されたが (図4), EOPF やクロルピリホスを投与したラットの脳を用いた *ex vivo* の ABPP の結果では, これらの阻害をとらえることはできなかった. また, クロルピリホス投与後 30 分, 5, 24 時間経過時には注意欠陥性, 多動性症状の有意な上昇は見られなかった.

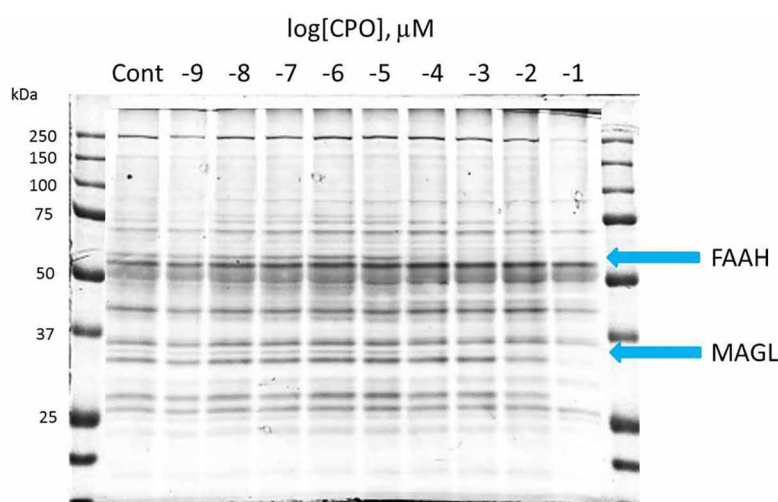


図4. 脳セリン加水分解酵素に対する CPO の影響.

脳ホモジネートに CPO を加え室温で反応させた後, FP-TAMRA でラベルした ABPP の結果を示す.

以上より, OP 化合物は CB1R を介してラットに注意欠陥性, 多動性症状を誘発する可能性が示唆された. しかし, 今回用いた OP 化合物は EC 系に作用する薬剤として合成したものであり, 今回の研究の範囲では市販の OP 殺虫剤であるクロルピリホス投与は ADHD 症状を引き起こさなかった. OP 殺虫剤が ADHD 症状を引き起こす可能性があるかどうかは ADHD のモデル動物である SH ラット等を用いて今後引き続き検討する予定である.

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科の富澤元博および鈴木智典、名古屋市立大学大学院医学研究科環境労働衛生学の上島通浩および鈴木日美子、名城大学薬学部地域医療薬局学講座の鍋島俊隆である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Bouchard, M. F., Bellinger, D. C., Wright, R. O. & Weisskopf, M. G. : Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics*, **125** : e1270-1277, 2010.
- 2) Long, J. Z. & Cravatt, B. F. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem. Rev.*, **111** : 6022-6063, 2011.