



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	乙第 号
学位記番号	論 第1628号
氏 名	鈴木 日美子
授与年月日	平成 26 年 7 月 29 日
学位論文の題名	<p>A potential target for organophosphate insecticides leading to spermatotoxicity (有機リン殺虫剤による精子毒性の分子標的同定)</p> <p>Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 9961-9965, 2013</p>
論文審査担当者	<p>主査： 酒々井 眞澄</p> <p>副査： 杉浦 真弓, 上島 通浩</p>

論文内容の要旨

【目的】

衛生害虫防除に汎用されている有機リン系 (OP) 殺虫剤は、神経系のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害により効果を発揮するが、多様なセリン加水分解酵素群に対しても二次標的として作用する可能性が示唆されている。神経系への影響以外にも、OP 殺虫剤散布作業者を対象とした疫学調査で、精子染色体異数性、精子クロマチン変性、精子 DNA 損傷、精子濃度低下等が注目されてきた。動物実験においても OP 殺虫剤が精子運動能低下や精子奇形の原因となることが報告されている。しかし、OP 殺虫剤の雄性生殖器における分子標的は明らかにされていない。そこで本研究では、汎用 OP 殺虫剤フェニトロチオン (FNT) を用い、精子毒性に関する分子標的の同定を目的として実験を行った。

【方法】

活性基盤タンパク質プロファイリング (ABPP)：未処置のマウス精巣膜タンパクに FNT 活性代謝物であるオキシソニン体 (FNTO) 0.1~1000 μM とセリン加水分解酵素を網羅的に標識する蛍光プローブ (FP-TAMRA) を競合反応させ、SDS-PAGE 後スキャナーにより蛍光強度を分析し、分子標的スクリーニングを行った。

動物実験：10 週齢 ICR 雄マウスを 3 群 (各群 $n=6-7$) に分け、FNT 0 (コーン油), 50, 100 mg/kg を 10 日間連続経口投与した。最終投与翌日に断頭し、精巣、精巣上体尾部、脳を採取した。

酵素活性：精巣及び精巣上体尾部中の脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) 及びモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) 活性を測定した。ホモジネートにそれぞれ [^{14}C] アナンダミド (AEA) と [^{14}C] モノオレイルグリセロールを基質として加え 37°C で 30 分反応させた後、液体シンチレーションカウンターで加水分解産物量を測定した。また、未処置マウスの精巣及び精巣上体の FAAH 及び MAGL に関しては、FNTO がこれらの酵素活性を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) も測定した。脳 AChE 活性は、DTNB 法により測定した。

LC-MS：精巣ホモジネートに内部標準物質 (AEA-d₄) を加え、トルエン抽出後窒素乾固させ、水メタノールで再溶解した後、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) により AEA 量を測定した。

【結果】

ABPP 法の結果、いくつかのセリン加水分解酵素の阻害が確認された。その中でも生殖機能との関係が示唆されているエンカンナビノイドシステム (ECS) のセリン加水分解酵素に着目すると、FAAH は、FNTO により 100 μM 以上の濃度で選択的に強く阻害されていた。一方、もう一つの ECS セリン加水分解酵素である MAGL に対しては明らかな阻害が見られなかった。精巣の FAAH と MAGL 活性の IC₅₀ は、それぞれ 5.6 および 65 μM であった。

動物実験では、FNT 10 日間投与後の体重、精巣及び精巣上体の重量は、各群間に差がなかった。精巣中の FAAH 活性は、対照群と比べ FNT 50 mg/kg 群では 50%、100 mg/kg 群では 44% に低下しており、精巣上体においては、FNT 50 mg/kg 群では 78%、100 mg/kg 群では 63% に低下していた。MAGL 活性は、精巣及び精巣上体では対照群と比べ有意差はなかった。また ABPP 法でも、精巣中の FAAH 活性の明らかな阻害が確認されたが、MAGL 活性の阻害は明らかなではなかった。FNT 投与群マウスに神経症状は観察されなかったが、脳 AChE 活性は、FNT 50 mg/kg 群では対照群の 47%、100 mg/kg 群では 44% に低下していた。ECS の基質である AEA 量には変化が見られなかった。

【考察】

本研究により、OP 殺虫剤 FNT はマウス精巣及び精巣上体の FAAH 活性を阻害することが明らかになった。

ECS は、精子形成や精子運動能獲得に重要な役割を果たすとされており、精漿、ライデッヒ細胞、セルトリ細胞、生殖細胞等に存在している。また、AEA は、精子細胞の発達に必要な栄養分やホルモンシグナルを提供する精巣セルトリ細胞のアポトーシスを誘導することや、精巣上体ではエンドカンナビノイド (EC) 受容体 (CB1R) 依存的に精子運動性を阻害することが報告されている。一方、CB1R 拮抗薬は精子の運動性や生存性を顕著に増加させると報告されている。このように、CB1R の活性化により精子は運動能低下等の影響を受けることが示唆されており、本研究においても OP 殺虫剤による FAAH の阻害が EC 量を増加させ、CB1R の過亢進による ECS の攪乱が精子毒性に関与している可能性が示唆された。

従って、FAAH が OP 殺虫剤により誘発される精子毒性の分子標的である可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

【目的】

有機リン系殺虫剤(OP)は駆虫あるいは疾病伝搬防止目的で汎用されるが、OP の精子形成への毒性(DNA 障害、運動能低下等)が報告されている。現状では OP の精子毒性にかかわる分子標的は解明されていない。よって本研究では代表的な OP であるフェントロチオン(FNT)および活性形 FNT である FNT oxon(P=S が P=O に置換した化合物)を材料に標的候補スクリーニングと動物試験での検証を行うことでその分子標的を明らかにした。

【材料と方法】(実験 1)無処置マウス精巣タンパクを 0.1~1,000 μ M FNT oxon で処理(25°C, 30min)し、セリン加水分解酵素をすべて標識するプローブとの反応後 SDS-PAGE にてタンパク発現量の減少をみることで標的候補分子をスクリーニングした。(実験 2)スクリーニングで発現量が低下した脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) に着目し以下の実験を行った。10 週齢雄 ICR マウスに FNT 50, 100 mg/kg を 10 日間連続強制経口投与し精巣組織での FAAH 活性を測定した。同サンプルにて anandamide (AEA) 量を測定した(LC-MS/MS)。さらに、無処置マウス精巣タンパクでの FNT oxon による IC₅₀ 値および脳組織中の AChE 活性を測定した。

【結果】(実験 1)複数の候補分子のうち生殖機能との関係が示唆されている FAAH の発現量が減少し、FNT oxon はその活性を阻害することがわかった。精巣組織において FAAH 活性が 50%になったときの FNT の濃度は 5.6 μ M(IC₅₀ 値)であった。(実験 2)精巣組織の FAAH 活性は FNT 投与群では対照群と比べ 44~50%に低下しており($P<0.01$)、精巣上体組織では 63~78%に低下していた($P<0.01$)。脳組織での AChE 活性は FNT 群では対照群と比べて 44~47%に低下していた。マウス各群間での体重、精巣および精巣上体の重量について有意差は認めず、どの群にも神経症状は観察されなかった。マウス各群間精巣組織での AEA 量に差はみられなかった。

【結論】FAAH は有機リン系殺虫剤による精子毒性の分子標的であると考えられた。

【審査内容】主査の酒々井から動物試験立案、スクリーニング結果の解釈、フェントロチオンによる精子形成障害を確認する実験システムなど 25 項目、第一副査の杉浦教授からはフェントロチオンの男性不妊への影響、ばく露の評価法、動物試験結果のヒトへの外挿など 18 項目、さらに第二副査の上島教授からは化学物質のヒト健康障害予防と職業ばく露予防への方策などの専門分野についての質問があった。申請者は質問に対して適切に回答し学位論文の内容を十分に理解していると判断された。よって、本論文の筆頭著者には博士(医学)の学位を授与するにふさわしいと判定した。

論文審査担当者 主査 酒々井眞澄 副査 杉浦真弓 上島通浩