

有機錫誘導 - 嗅覚障害の発症抑制

荒川 泰昭¹⁾, 武内 孝之²⁾, 中野 幸広²⁾, 松田 芳和³⁾,
山口 雅子³⁾, 高谷 英子³⁾, 柴田 幸雄³⁾, 仲佐 輝子⁴⁾,
沖中 靖⁴⁾, 阿部 皓一⁵⁾, 宮澤 陽夫⁶⁾

(¹⁾ 静岡県立大学・食品栄養・公衆衛生*, (²⁾ 京都大学原子炉実験所**,
³⁾ 日本クリニック(株)・中研***, (⁴⁾ 同志社女子大・生活科学****,
⁵⁾ エーザイ(株)・ビタミンE技術室*****, (⁶⁾ 東北大・院・農・機能分子解析*****)

Organotin-Induced Olfactory Lesions and Its Suppression

Y. ARAKAWA¹⁾, T. TAKEUCHI²⁾, Y. NAKANO²⁾, Y. MATSUDA³⁾, M. YAMAGUCHI³⁾, H. TAKAYA³⁾,
Y. SHIBATA³⁾, T. NAKASA⁴⁾, Y. OKINAKA⁴⁾, K. ABE⁵⁾, T. MIYAZAWA⁶⁾

¹⁾ *Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Sciences,
The University of Shizuoka,*
²⁾ *Research Reactor Institute, Kyoto University,* ³⁾ *Nihon Clinic,* ⁴⁾ *Dhoshisha Woman University,*
⁵⁾ *Eisai Co.ltd,* ⁶⁾ *Tohoku University*

Organotin exposure induced severe olfactory lesions. The mechanism was kinetically analyzed from the viewpoints of the movement of trace elements, an inhibition of signal transduction and toxic cell death (necrosis or apoptosis) in the olfactory system. Organotin exposure induced excessive accumulation of calcium in the olfactory system such as olfactory epithelium and olfactory bulb. This calcium localization depended upon the number and species of ligand of organotin compounds and also was found to be due to the processes such as the activation of adenylyclase by an excessive increase of PTH in the special regions of the brain, excessive increase in the formation of cAMP by the activation

*所在地：静岡市谷田52-1 (〒422-8526)

**所在地：大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-04)

***所在地：京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

****所在地：京都市上京区今出川通寺町西入玄武町602 (〒602-0893)

*****所在地：東京都文京区小石川4-6-10 (〒112-88)

*****所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (〒981-8555)

of adenylyclase, disorder of cAMP-activated channels by the excessive increase of cAMP, and an excessive influx of extracellular Ca^{2+} by the disorder of the channels. Moreover, this rapid and excessive increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} seems to inhibit CaM kinase II functions followed by leading to necrosis or apoptosis in vivo or toxic cell death in vitro. On the other hand, this excessive accumulation of calcium was suppressed by feeding oyster (*Crassostrea gigas*) extract and vitamin E (α -Tocopherol). This mechanism was suggested to include the association of beyond antioxidant function from the studies on trace element-mediated oxidative stress or peroxide scavenger systems.

海洋汚染の代表的な物質として、また最近では環境ホルモン（内分泌攪乱化学物質）として注目されているトリアルキル錫は、強力な中枢神経毒性を有し、行動障害や記憶・学習障害ばかりでなく、重篤な嗅覚障害を誘発する¹⁾⁻⁶⁾ 有機錫の脳内暴露に伴って、脳内各組織における微量元素バランスは著しく変動するが、嗅覚系ではとくにカルシウムの嗅球や嗅上皮への集積が顕著であり、有意かつ選択的である。生化学的所見からこのカルシウムの過剰集積が嗅覚系部位の細胞毒性や機能障害を誘発し、嗅覚障害すなわち嗅覚情報伝達系や嗅覚ニューロンの細胞死を誘発しているものと考えられる。実際に組織病理学的所見でも、嗅球ならびに嗅上皮において神経細胞、特に顆粒ニューロンの著しい破壊（神経細胞の死）がみられ、形態学的にはネクローシスならびにアポトーシスの両方が観察される。今後、この嗅覚系神経細胞の死のメカニズムを解析する上で、微量元素介在の酸化ストレスの系あるいは活性酸素消去システムの介在についての検討が必要と考えられ、とくに、抗酸化剤などを用いた検討がクリアな結果を提供してくれることが予想される。

従って、本実験ではこの有機錫暴露による嗅覚障害の発症機序をカルシウム過剰集積と嗅覚情報伝達系障害や嗅覚ニューロンの細胞死との観点から考察するために、本症を一つのモデル実験系として利用し、すなわち、有機錫の中で最も障害活性の強いトリブチル錫の腹腔内への1回投与による暴露実験で嗅覚異常を発症させ、この発症に対する抑制効果をビタミンEや抗酸化等の作用効果が議論されているかき肉エキスについて、嗅球中の 1) 微量元素（特に異常増大するカルシウムをマーカーとして）の動態や 2) 活性酸素の動態、3) ビタミンEの動態、4) 組織病理所見などの面から検討した。

実 験 方 法

1. 動物実験

1) ビタミンE摂取実験

6週齢の雄性Wistar系ラットを使用し、1シリーズの実験においてコントロール群ならびに有機錫投与群をそれぞれビタミンE添加群とビタミンE無添加群とに分け、計4群（各群10匹ずつ）とする。ビタミンE添加群とビタミンE無添加群にはそれぞれビタミンE添加飼料（450mg/kg）およびビタミンE無添加飼料（コントロール飼料）を有機錫投与の10-14日前より自由摂取させておく。そして、コントロール群にはコーンオイルのみを、トリブチル錫暴露群にはコーンオイル溶解のトリブチル錫クロリド（ Bu_3SnCl ）溶液をそれぞれ0.4ml（2.0mg/kg body weight）ずつ腹腔内投与し、嗅球カルシウム濃度が

最高に異常増大する2日後に断頭し、嗅球を摘出する。

2) かき肉エキス摂取実験

6週齢の雄性 Wistar 系ラットを使用し、1シリーズの実験においてコントロール群ならびに有機錫投与群をそれぞれかき肉エキス添加群とかき肉エキス無添加群とに分け、計4群（各群10匹ずつ）とする。かき肉エキス添加群とかき肉エキス無添加群にはそれぞれかき肉エキス添加飼料（450mg/kg）およびかき肉エキス無添加飼料（コントロール飼料）を有機錫投与の10-14日前より自由摂取させておく。そして、コントロール群にはコーンオイルのみを、トリブチル錫暴露群にはコーンオイル溶解のトリブチル錫クロリド (Bu_3SnCl) 溶液をそれぞれ0.4ml (2.0mg/kg body weight) ずつ腹腔内投与し、嗅球カルシウム濃度が最高に異常増大する2日後に断頭し、嗅球を摘出する。

2. 放射化分析

有機錫暴露実験で得た飼料を、照射カプセルに封入し、京都大学原子炉実験所において圧気輸送管 (KUR-Pn-1) を用いて炉心部に送り、30秒間ならびに60分間、熱中性子束を照射し、これを適時冷却後、高分解能Ge半導体検出器を装着した波高分析器 (Pulse height analyzer, PHA) を用いてγ線スペクトロメトリーによる多元素分析を行なう。

3. 活性酸素測定

嗅球中の総脂質から純相シリカゲルHPLCでリン脂質を分離し、リン脂質過酸化水素を過酸化水素とチトクロームC-ヘムとのルミノール酸化反応により生成する過酸化水素-依存性化学発光をポスト-カラム検知法により定量する⁷⁾。

4. 血中ビタミンE測定

血漿を除タンパク後、血漿中ビタミンEをHPLCで分離定量する⁸⁾。

結果ならびに考察

結果

1) 有機錫によるカルシウムの嗅球への異常集積がビタミンE (Fig. 1) やかき肉エキ (Fig. 2) の摂取によってドラマチックに抑制された。ビタミンE摂取の場合、他の微量元素に対しては 2) マグネシウムでやや増加させる傾向を示し、銅でわずかに減少させる傾向を示した (Table 1)。3) アルミニウム、ナトリウム、亜鉛等では有意の影響はみられなかった。活性酸素に対しては当然のことながら 4) 嗅球

Table 1. Changes in the concentration of trace elements in the olfactory bulb

	Trace elements ($\mu\text{g/g}$ wet tissue)					
	Ca	Mg	Cu	Al	Na	Zn
Control	59.7 ± 38.1	201.3 ± 40.5	32.9 ± 2.1	9.9 ± 0.7	469.7 ± 1.4	8.1 ± 0.1
Bu_3SnCl	312.4 ± 52.6 ***	208.0 ± 43.0	33.0 ± 2.1	10.5 ± 1.2	526.9 ± 15.5	11.1 ± 1.0
Vitamin E	48.3 ± 33.2	217.1 ± 42.9 *	31.0 ± 2.7 *	10.9 ± 0.9	503.6 ± 12.1	10.1 ± 1.4
Vitamin E + Bu_3SnCl	64.8 ± 33.7	232.0 ± 33.7 *	29.5 ± 1.9 *	10.7 ± 1.1	504.8 ± 3.0	9.5 ± 0.2

中のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンの過酸化水素の量を低下させたが、有機錫暴露下での効果はみられなかった (Fig. 3)。逆に、5) 有機錫の暴露は血漿中の α -トコフェロール量を低下させ、かつビタミンEと同様に嗅球中の活性酸素の量を低下させたが、ビタミンEのスカベンジャー作用を抑制した (Fig. 4)。

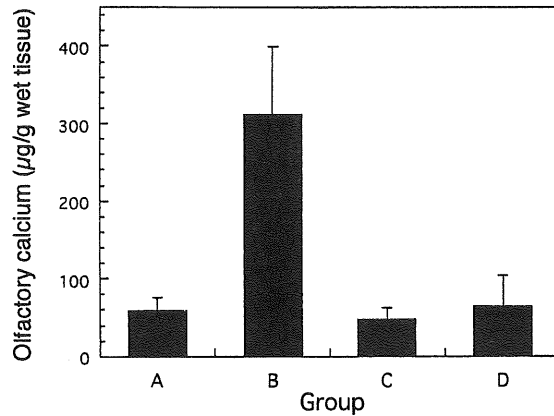


Fig. 1 Effects of vitamin E (α -tocopherol) on the organotin-induced excessive accumulation of olfactory calcium.

Tributyltin chloride (2.0mg/kg body weight) was injected i.p. into Wistar-derived rats (males, 40-45g) fed independently vitamin E (dl- α -tocopheryl acetate) -supplement (500mg/kg) or -unsupplied diet for 7 days. Vertical bars denote the SE of the mean for ten determinations.

A : control, B : tributyltin alone, C : vitamin E alone, D : vitamin E+tributyltin.

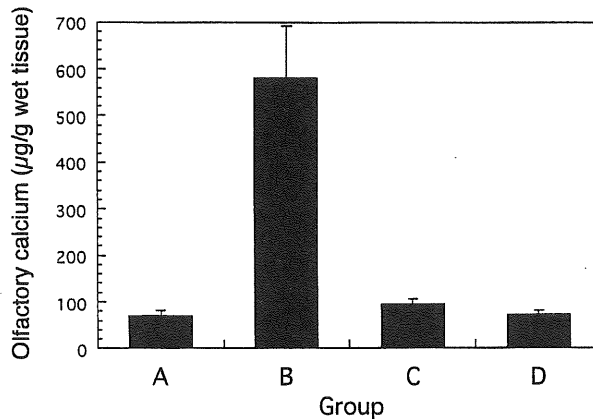


Fig. 2 Effects of oyster (*Crassostrea gigas*) extract on the organotin-induced excessive accumulation of olfactory calcium.

Tributyltin chloride (2.0mg/kg body weight) was injected i.p. into Wistar-derived rats (males, 40-45g) fed independently oyster extract-supplement (500mg/kg) or -unsupplied diet for 7 days. Vertical bars denote the SE of the mean for ten determinations.

A : control, B : tributyltin alone, C : oyster extract alone, D : oyster extract+tributyltin.

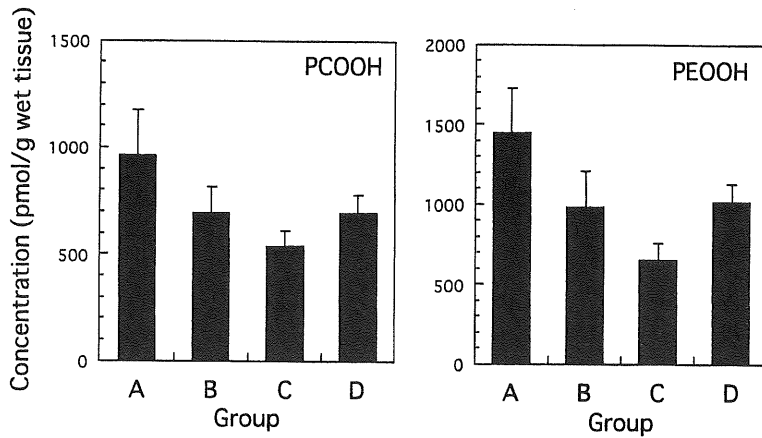


Fig. 3 Concentration of lipid peroxide in the olfactory bulb of rats fed vitamin E-supplement (500mg/kg) or -unsupplied diet for 7 days and after that period given a single intraperitoneal injection of tributyltin chloride (2.0mg/kg body weight).

Vertical bars denote the SE of the mean for ten determinations.

PCOOH : phosphatidylcholine hydroperoxide, PEOOH : phosphatidylethanolamine hydroperoxide.

A : control, B : tributyltin alone, C : vitamin E alone, D : vitamin E+tributyltin.

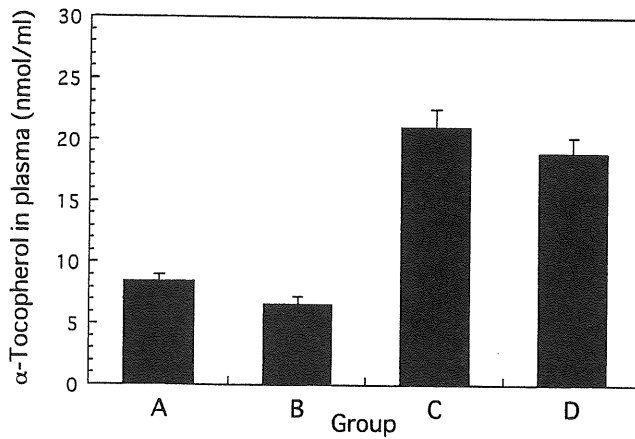


Fig. 4 Concentration of α -tocopherol in the plasma of rats fed vitamin E-supplement (500mg/kg) or -unsupplied diet for 7 days and after that period given a single intraperitoneal injection of tributyltin chloride (2.0mg/kg body weight).

Vertical bars denote the SE of the mean for ten determinations.

A : control, B : tributyltin alone, C : vitamin E alone, D : vitamin E+tributyltin.

考 察

当初の予測どおり、ビタミンEの摂取によって嗅球カルシウムの局在化は顕著に抑制された。しかし、この抑制は活性酸素の量とは相関しなかった。逆に、有機錫の暴露は血漿ビタミンE量を低下させ、かつビタミンEと類似の抗酸化結果を導いた。しかも、ビタミンEのスキャベンジャー作用が有機錫の暴露によって抑制されていることから、有機錫とビタミンEとはそれぞれ別の系で独立して、またある系では互いに拮抗して、微量元素介在の酸化ストレスの系あるいは活性酸素消去システムの系へ関与しているのかもしれない。いずれにせよ、ビタミンEによる嗅球カルシウムの局在化の抑制は単なる抗酸化作用ではなく、いわゆる beyond antioxidant function の介在の可能性が高い。事実、細胞生化学的所見から有機錫は暴露後、核周辺のゴルジ体や小胞体 (ER) に集積し、ゴルジ体や小胞体 (ER) の構造や機能を破壊することによって細胞内リン脂質の輸送系を障害し、最終的にはリン脂質の合成阻害やホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転の阻害などリン脂質代謝系を阻害することが解っている。また、とくに嗅覚系での嗅上皮や嗅球へのカルシウムの過剰集積 (局在化) は、脳内特定部位でのPTHの著増によるアデニルシクラーゼの活性化とそれに伴うcAMP過剰産生、そしてこのcAMPの過剰増大によるcAMP依存性カルシウムチャンネルの調節異常、そしてこのチャンネルの調節異常による細胞外カルシウムの過剰流入といった一連のプロセスに因ることが確かめられつつあり、このとき細胞内カルシウム濃度増大に伴って作動するCaMキナーゼII活性はカルシウムの過剰蓄積により急激に失活するが、こうしたCaMキナーゼIIの作用の異常が細胞死を誘発する要因の一つであろうと考えられる。従って、本実験で証明されたビタミンEによる抑制効果も以上のようないずれかの系に関与している可能性が考えられる。

ビタミンEと全く同様に、カキ肉エキスもこの有機錫誘導-嗅覚障害をドラマチックに抑制するが、その抑制機序についても合わせて目下検討中である。

文 献

- 1) Arakawa, Y. (1998) : Chapter 10, Recent studies on the mode of biological action of the di- and tri-alkyltin compounds. in Chemistry of tin, ed. by Smith P.J. Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, Glasgow, UK : pp.388-428
- 2) Arakawa, Y. and O. Wada (1993) : Chapter 4, Biological properties of alkyltin compounds. in Metal Ions in Biological Systems, Volume 29 Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives, ed. by Sigel H. Marcel Dekker Inc., New York, USA : pp.101-136
- 3) Arakawa, Y. (1995) Tin and Immunity-Review-, Biomed. Res. Trace Elements, 6 (2) : 1-34
- 4) Arakawa, Y. and O. Wada (1988) : Chapter 9, Suppression of cell proliferation by certain organotin compounds. in Tin and Malignant Cell Growth, ed. by Zuckerman J.J. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA : pp.83-106
- 5) Arakawa, Y. (1992) : Chapter 23, Antitumor activity of organotin compounds and inhibition of membrane signal transduction. in Chemistry and Technology of Silicon and Tin, ed. by KumarDas

VG. and Gielen M. Oxford University Press, Oxford, UK : pp.319-333

- 6) Arakawa, Y. (1996) : Cellular and biochemical aspects of antitumor activity of organotin compounds. in Main Group Elements and Their Compounds, ed. by Kumar Das V.G. Narosa Publishing House, New Dehli, India, pp.422-445
- 7) Miyazawa, T., K. Fujimoto and S. Oikawa (1990) Biomedical Chromatography 4 (3) : 131-134
- 8) Abe, K. and A. Matsumoto (1993) : Vitamin E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases, ed. by Mino M et al. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/S. Karger, Basel, pp.13-19