

## 有機スズ暴露による嗅覚系カルシウムの過剰蓄積とアポトーシス誘導メカニズムの解析

佐山友里江\*<sup>1)</sup>，富山健一<sup>1)</sup>，山口明子<sup>1)</sup>，牛田素子<sup>1)</sup>，栗山孝雄<sup>1)</sup>  
中島晴信<sup>2)</sup>，松田芳和<sup>3)</sup>，荒川泰昭<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 静岡県立大学生体衛生学，<sup>2)</sup> 大阪府立公衆衛生研究所，<sup>3)</sup> 日本クリニック（株）中央研究所）

【目的】有機スズ暴露による嗅覚障害が労働災害としても知られている。当研究室では、有機スズの毒性発現のメカニズムを解析する過程で、有機スズの脳内暴露に伴い、脳内各組織中の微量元素バランスが著しく変動し、嗅覚系では嗅球や嗅上皮においてカルシウムが過剰かつ選択的に蓄積することを見出している。またこの時、病理組織所見では、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が観察される。この事実がカルシウム過剰蓄積による細胞死さらには嗅覚障害の誘発を示唆した。そこで、本研究では、嗅球より神経細胞を単離し、これを用いて有機スズ暴露後の細胞内カルシウムの動態や局在を明らかにした。そして、カルシウム過剰蓄積と細胞死との関係について検討した。

【方法】ラット（Wistar 系，雄性，3 週齢）を断頭し脳を摘出し嗅球を分離した。さらにパピインを用いて嗅球から細胞単離をおこなった。回収した嗅球細胞はポリエチレンイミンでコートしておいたディッシュに DMEM 培地に FCS10 % 及び Cytosine -D-arabino furanoside を加えた培養液中で 5.0 % CO<sub>2</sub>・37 °C にて 14 日間培養した。この初代培養の細胞内 Ca<sup>2+</sup> を Fluo-3AM で蛍光ラベルし、トリブチルスズ暴露における嗅神経細胞内の Ca<sup>2+</sup> の動態を経時的に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。またトリブチルスズ暴露時の嗅球中カルシウム濃度は正常時と比べて最大で 5 倍ほどの上昇を見せたことから、培養液中のカルシウム濃度の約 5 倍として最終濃度 10 mM カルシウム溶液を添加し共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。またこのときの培養神経細胞より DNA を経時的に抽出しアガロース電気泳動にて DNA の断片化を検出した。

【結果および考察】トリブチルスズ暴露における嗅神経細胞内のカルシウム動態を経時的に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、正常神経細胞では細胞質中に均一に分布しているカルシウムがトリブチルスズ暴露によって速やかに核に移行することが確認された。また、カルシウムを過剰に暴露してもカルシウムは細胞質内全域に高濃度に分布するのみで、カルシウムの核への移行は観察されなかった。またこのとき神経細胞中の DNA は断片化を引き起こしていることが観察された。これらの結果から、トリブチルスズ暴露によって、カルシウムホメオスタシスが攪乱され、カルシウムの過剰蓄積が引き起こされ、カルシウムの核への移行が起こり、さらにカルシウムの核移行に伴ってカルシウム依存型のエンドヌクレアーゼが核に移行している可能性が示唆された。すなわち、このカルシウムの核への過剰移行がエンドヌクレアーゼの活性化に連動し、嗅神経細胞のアポトーシスを誘導しているものと思われる。