

B-51 幼児の鉛神経毒性における血液脳関門の影響に関する幼若ラット及び成熟ラットを用いた検討

○松尾 典義^{1*}・Cesar Ortinero¹・中山 亜紀¹・米田 稔¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂)

* E-mail: nmatsuo@risk.env.kyoto-u.ac.jp

1. 序論

鉛は加工が容易で耐腐食性があり、かつ比較的安価な金属として、蓄電池、放放射線用の遮蔽材、はんだ、給水管等の様々な製品に利用されている。一方で鉛には重大な毒性があることも広く知られている。

高濃度の鉛に曝露した際には、貧血、食欲不振、尿量減少、また鉛脳症と呼ばれる精神面における不安定、中枢神経系への影響の結果死亡といった中毒症状が生じる¹⁾。しかし現在の日本ではこうした鉛による中毒症状が見られることはなくなった。これは労働環境の改善、排出基準値の設定、工業製品の無鉛化といった努力が功を奏したためである。

しかし鉛は低濃度の曝露であってもそれが長期間に及べば種々の障害が発生することも知られている。特に小児の鉛による不顕性毒性が近年注目されている。不顕性毒性とは臨床的診断法では症状が見られず、神経心理学的な行動評価によってのみ検出可能な症状のことである¹⁾。このような影響が生じる背景には、小児は成人と比べ、鉛への感受性が高いことが挙げられる。ヒトが比較的高濃度の鉛に曝露された場合に生じる神経系・造血系への影響は、成人よりも小児の方がより低い血中鉛濃度で発生することが知られている¹⁾。このことから、低濃度の鉛に長期間曝露された場合にも小児の方が影響を受けやすいと考えられる。

神経毒性に年齢で違いが生じるのは、小児の血液脳関門が未発達であることが原因と考えられている。血液脳関門とは脳脊の中枢神経系の組織液と血液間の物質交換を制限する機構であるが、鉛はこの血液脳関門を通過することが実験的に示されている²⁾。しかし血液脳関門の未成熟性が鉛の脳への移行に及ぼしている影響は未知の部分が多い。

そこで本研究では鉛を投与した幼若ラット及び成熟ラットの血中及び脳中鉛濃度を測定し、鉛の脳への移行に

関する差を比較検討することを目的とする。しかしこの研究目的を達成するためには、摘出した脳内の血管内に残留する血液の存在が大きな課題として挙げられる。

鉛を投与したラットの血液中には通常よりも多く鉛が存在するため、採血の後脳内に残留する血液が、脳中鉛濃度の測定値に影響を及ぼす可能性がある。生理食塩水の灌流により血液を洗い出す方法も考えられるが、灌流によって脳組織中の鉛が洗い出される恐れがある。そこで本研究では、摘出した脳中に含まれるヘモグロビン量を測定し、この測定値から間接的に残留血液量を求め、血液による脳中鉛濃度への影響を差し引く手法を試みた。

以下に本研究の目的をまとめる。

1. ラットの脳試料中に含まれるヘモグロビン量を測定し、脳内血管に残留した血液量を算出する。続いて鉛を投与した幼若及び成熟ラットの血中及び脳中鉛濃度をICP-MS測定法によって測定し、正味の脳組織に含まれる鉛の濃度を求める。
2. 血中鉛濃度、並びに脳内残留血液による寄与を除いた脳中鉛濃度より、週齢による移行量の差について検討する。

2. 実験手法

(1) 試薬および実験装置

誘導結合プラズマ質量分析装置(以下ICP-MS)は横河アナリティカルシステムズ株式会社(東京)のICP質量分析装置HP4500を使用した。脳の破碎にはトッケン株式会社(千葉)の凍結破碎器具クールミルを、0.45 μ mフィルターはアドバンテック東洋株式会社(東京)のものを使用した。脳に含まれるヘモグロビン量の測定には和光純薬工業株式会社のヘモグロビンB-テストワコー、Bio-Rad Laboratories社(米国、カリフォルニア)のマイクロプレートリーダーModel550を使用した。その他化学薬品は和光純薬工業株式会社(大阪)の製品を使用した。

(2) ラットへの鉛の投与

ラットへの鉛の投与及び血液・脳の採取は清水実験材料株式会社 に依頼した。幼若ラットとしてはSprague-Dawleyラットの3週齢(飼育開始時)雄を13匹、成熟ラットとしては22週齢(サンプル採取時)雄を13匹使用した。飼料はオリエンタル酵母製飼育用飼料を用いた。飼育開始より3日間は馴化期間とし、その後の5日間は同時刻に経口ゾンデを食道に挿管し酢酸鉛溶液を投与した。酢酸鉛の投与量は1日体重1kg当たり0, 1, 10, 100mgであり、各投与群の動物数は3 (0, 1, 10mg/kgBW/day)ないし4 (100mg/kgBW/day)とした。投与後5日間通常飼育を継続した。なお以上の飼育環境、鉛投与条件はTimchalkらの報告を参考に決定した³⁾。

飼育期間終了後ペントバルビタールを腹腔内に投与して麻酔を行い、頸椎脱臼により安楽死させ、腹大動脈からの採血及び脳の摘出を行った。血液は冷蔵、脳は液体窒素で冷凍したのち冷凍保存した。

なお本実験の実施にあたっては、京都大学動物実験委員会より実験計画の承認を受け、同委員会の定める規定に従って適切な作業を行った。

(3) 脳中鉛濃度測定のための前処理方法

Ginkelらは濃硝酸を用いた温浸抽出により脳中のアルミニウムを抽出し、1N硝酸をマトリクスとして利用する方法を報告している⁴⁾。本研究ではこの方法を脳中の鉛濃度を測定するための前処理に用いた。

採取後-80℃で冷凍保存していた脳をクールミルで凍結粉砕した。粉砕した脳試料から約0.5gを採取し、重量を測定した。これに60%硝酸を1mL加え、40℃で一晩、70℃で2時間温浴し、更に105℃で1時間乾熱した。その後1N硝酸で6mLにメスアップし、0.45µmのフィルターで濾過して最終容量を5mLとした。1000ppm鉛標準液を1N硝酸で希釈し標準液を調製した。最後に1000ppmタリウム標準液を1N硝酸で10ppmに希釈し100µLを内標準物質として添加し、ICP-MS測定法による測定を行った。なお1N硝酸は60%硝酸を超純水で希釈して調製した。

以下この手法を硝酸温浸(法)と呼ぶこととする。

(4) 血中鉛濃度測定のための前処理方法

本研究は血中鉛濃度及び脳中鉛濃度の関係に着目するものであり、両者を極力同じ条件で比較することが望ましい。よって血中鉛濃度の測定にも硝酸温浸法を用いた。手順は2(3)と同様である。ただし血液は500µL使用し、1N硝酸によるメスアップは11mL、濾過後の最終容量は10mLとした。

(5) ヘモグロビン量測定による脳内残存血液量の算出

幼若ラット3匹、成熟ラット2匹から採血後摘出した脳に含まれるヘモグロビンの濃度を測定し、血中ヘモグロビン濃度の文献値を利用して残留血液量を算出した。

飼育等は清水実験材料株式会社 に依頼した。酢酸鉛の投与がないことを除き飼育条件等は2(2)に準ずる。

ラウリル硫酸ナトリウム(以下SLS)は赤血球の膜を溶解しヘモグロビンと赤色の複合体を形成する。この複合体の吸光度からヘモグロビン濃度を求める方法は、SLSヘモグロビン法として知られている⁵⁾。Majimaらは肉芽腫組織内のヘモグロビン濃度を測定する手法を報告しているが⁶⁾、本研究ではMajimaらの報告に既往の研究による修正を加え、脳中のヘモグロビン濃度を測定した。

採取した脳はクールミルで凍結粉砕した。ここから適量を小遠沈管に移し計量した。重量の4倍の超純水を加えて小乳棒ですり潰し⁶⁾、13000回転分で30分間遠心した⁷⁾。その上澄み液にヘモグロビン測定キットの発色試薬を十分量加え⁸⁾、ヘモグロビン標準液列と共にマイクロプレートリーダーで吸光度の測定を行った。

血中ヘモグロビン濃度はAlemanらの報告を元に14.19g/dLとした⁹⁾。

3. 結果及び考察

(1) 脳中残存血液量及びその脳中鉛濃度への寄与に関する考察

表-1に脳中ヘモグロビン濃度及びこれを元に求めた幼若及び成熟ラットの脳中残存血液量の結果を示す。

また表-2では成熟ラットの脳を硝酸温浸して得られた脳中鉛濃度と、そこから残存血液由来の鉛の寄与を除いた脳中鉛濃度(以下正味脳中鉛濃度)を比較した。両者に大きな差はないものの、ヘモグロビンが検出されたことから脳内に血液は残存しており、正味脳中鉛濃度の方が神経毒性を評価する上でより正確な値と言える。以下単に脳中鉛濃度と言った場合にはこちらの正味脳中鉛濃度を表すこととする。

(2) 幼若及び成熟ラットの血中・脳中鉛濃度及び考察

幼若・成熟ラットの血中、脳中鉛濃度の測定結果を表-3、表-4に示す。幼若ラットのコントロール群は検出限界を下回ったためN.D.とした。また1mg/kgBW/dayの酢酸鉛を投与した幼若ラットのうち1匹の脳中鉛濃度が検出限界を下回ったため残り2匹で平均値をとった。Tukey-Kramer法による解析の結果、 $p<0.05$ で他群全てと有意差の見られたものは、週齢、血中、脳中鉛濃度を問わず酢酸鉛100mg/kgBW/dayを投与した群のみであった。

ラットの週齢に依らず血中・脳中鉛濃度の鉛投与量依存的な上昇傾向を確認することができた。また幼若ラッ

表-1 幼若及び成熟ラットの脳中血液量

	幼若ラット	成熟ラット
脳中ヘモグロビン濃度(μg/mg)	1.59	1.84
血中ヘモグロビン濃度(g/dL)	14.19	14.19
脳中残存血液量(μL/mg)	0.0130	0.0112

表-3 幼若ラットの血中、脳中鉛濃度及び移行率

酢酸鉛投与量 (mg/kgBW/day)	血中鉛濃度(μg/dL)		脳中鉛濃度(μg/g)		移行率	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
0	N.D.		N.D.			
1	0.85	0.56	0.004	0.003	0.0032	0.0010
10	4.03	1.91	0.018	0.011	0.0043	0.0016
100	22.84	4.41	0.210	0.028	0.0094	0.0018

トの方が成熟ラットよりも血中・脳中鉛濃度共に高い値となった。血中鉛濃度が高いことは、既存のラットの経口曝露実験において、鉛の吸収率が成長と共に低下するという報告とも合致する¹⁰。血中鉛濃度が成熟ラットよりも高濃度となったことにより、脳中鉛濃度も高濃度になったと考えられる。

表-3、表-4では脳中鉛濃度を血中鉛濃度で除した値を移行率として記載している。移行率を鉛の投与量1, 10, 100mg/kgBW/dayごとに幼若・成熟ラット間でt検定により比較した結果、いずれの場合もp値は0.05を上回り有意差は見られなかった。このことより週齢に起因する鉛の移行性には、血中・脳中鉛濃度の比較では差が見られないという結果が得られた。

しかし既存の研究では、小児の方が成人と比べてより低血中鉛濃度であっても中枢神経系に影響が生じる、ないしは同じ血中鉛濃度であっても小児の方がより重篤な症状に至ることが報告されている。本研究はこの原因として血液脳関門の幼若性による寄与が大きいという仮定に基づいて行ったが、むしろ鉛に対する脳組織の感受性の差に起因する可能性が考えられる。

4. 結論

本研究で得られた結論を以下にまとめる。

ラットに鉛を投与し、採血の後摘出した脳に残存している血液による脳中鉛濃度への影響を、脳中に含まれるヘモグロビン量を測定することで間接的に除く手法を試みた。結果脳からヘモグロビンが検出されたものの、残存血液に由来する鉛の影響は、ICP-MS測定法により得られた脳中鉛濃度の測定値と比べて非常に小さいことが分かった。

鉛を投与した幼若及び成熟ラットの血中・脳中鉛濃度で投与量依存的な上昇が確認できた。また同じ投与量で比較すると、幼若ラットの方が成熟ラットと比べ高濃度になることが分かった。一方で鉛の血液から脳への移行率については、週齢による差が見られなかった。このことより、小児における神経毒性の重篤性の主な原因は、

表-2 成熟ラットの血中、脳中、正味脳中鉛濃度

酢酸鉛投与量 (mg/kgBW/day)	血中鉛濃度 (μg/dL)	脳中鉛濃度 (μg/g)	正味脳中鉛濃度 (μg/g)
0	0.04	0.003	0.003
1	0.61	0.003	0.003
10	3.00	0.014	0.013
100	14.26	0.165	0.164

表-4 成熟ラットの血中、脳中鉛濃度及び移行率

酢酸鉛投与量 (mg/kgBW/day)	血中鉛濃度(μg/dL)		脳中鉛濃度(μg/g)		移行率	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
0	0.04	0.04	0.003	0.003	0.3341	0.5154
1	0.61	0.13	0.003	0.001	0.0048	0.0017
10	3.00	1.02	0.013	0.009	0.0042	0.0012
100	14.26	3.16	0.164	0.044	0.0114	0.0010

血液脳関門の幼若性よりも、中枢神経系における年齢依存的な感受性の差が主な要因である可能性が考えられる。

参考文献

- 1)中西準子、小林憲弘、内藤航：詳細リスク評価書シリーズ 鉛、丸善株式会社、2006
- 2)Shusuke Tani, Aki Nakayama, Minoru Yoneda, Shinsuke Morisawa: Study on the permeability of lead compounds through the blood-brain barrier and their neurotoxic effect, Environmental Risk Assessment and Management in Japan and Malaysia, Potential tools for better environmental protection, pp.107-114, 2010.
- 3)C.Timchalk, Y.Lin, K.K.Weitz, H.Wu, R.A.Gies, D.A.Moore, W.Yantasec: Disposition of lead (Pb) in saliva and blood of Sprague-dawley rats following a single or repeated oral exposure to Pb-acetate, Toxicology, 222, pp.86-94, 2006
- 4)Michiel F. van Ginkel, Gijbert B. van der Voet and Frederik A. de Wolff: Improved method of analysis for aluminum in brain tissue, Clin. Chem, 36, pp.658-661, 1990
- 5)柴田進、佐々木匡秀: 日常臨床化学-超微量定量法, pp173-178, 金芳堂, 1966
- 6)Majima M, Isono M, Ikeda Y, Hayashi I, Hatanaka K, Harada Y, Katsumata O, Yamashina S, Katori M, Yamamoto S.: Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis in rat sponge implants, Jpn. J. Pharmacol. 75, pp.105-14, 1997
- 7)Tanvir F. Choudhri, Brian L. Hoh, Robert A. Solomon, E. Sander Connolly, Jr, David J. Pinsky.: Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice, Stroke, 28, pp.2296-2302., 1997
- 8)Oshiro I, Takenaka T, Maeda J.: New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS), Clin Biochem. 15(1), 83-8. 1982
- 9)C. L. Aleman, R. M. Mas, I. Rodeiro, M. Noa, C. Hernandez, R. Menéndez and R. Gamez: Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months, Laboratory animals, 32, pp.457-466, 1988
- 10)Forbes VE, Calow P: Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Part B, 357, pp.1299-1306