

環境汚染物質の脳神経系に対する毒性の作用機構に関する研究

Studies on the mechanism of neurotoxicity of environmental pollutants

代表研究者	東京都神経科学総合研究所長 Director, Tokyo Metropol. Inst. for Neurosci. Masayasu SATO	佐藤昌康
協同研究者	東京都神経科学総合研究所病態生理, 副参事研究員 Research Scientist, Tokyo Metropol. Inst. for Neurosci. Nobufumi KAWAI	川合述史
	東京都神経科学総合研究所神経生化学, 副参事研究員 Research Scientist, Tokyo Metropol. Inst. for Neurosci. Yoichiro KURODA	黒田洋一郎

To clarify the mechanism of the toxic action of environmental pollutants on the nervous system, the following studies were made.

1) Screening of acute neurotoxicity of environmental pollutants with guinea pig olfactory cortex slices and testing of their chronic toxicity on cultured nerve cells.

Guinea pig olfactory cortex slices were used to screen acute neurotoxicity of environmental pollutants on synaptic transmission in the mammalian brain by recording evoked presynaptic fiber potential (FP) and postsynaptic potentials (PSP) from the surface of the slice. Typical environmental pollutants, methylmercury and DDT, caused slow and gradual decrease in the amplitude of PSP without producing a significant effect on FP, indicating that their primary site of action is the synapse. On the other hand, toluene and *n*-hexane decreased the amplitudes of both FP and PSP, suggesting that these organic solvents primarily inhibit propagation of impulses along the axon. Electrophysiological studies using brain slices thus can provide accurate dose-response relationships for environmental neurotoxicants as well as information regarding the site of their action.

Clioquinol, which is known to cause subacute myelo-optico neuropathy (SMON), and its related compounds inhibited synaptic transmission in the slice at the concentration of 100 μ M. To test chronic toxicity, the compounds were added to cell cultures of neuroblastoma originated from rat brain. Clioquinol at about 100 μ M did not change viability and morphology of cultured cells. The results indicate that the acute toxicity of clioquinol compounds on the synaptic transmission in brain slices does not originate from their cytotoxicity.

Rat cultured nerve cells were used to test chronic neurotoxicity of environmental pollutants on the mammalian brain. Chronic toxicity of neurotoxicants depended on culture conditions (cell density, growth phase and growth medium etc.) and the origin of cells.

2) Effects of insecticides and heavy metals on synaptic transmission was studied in crustacean and insect neuromuscular junctions. Three types of organophosphate insecticides were found to block neuromuscular transmission in the meal worm (*Tenebrio molitor*). Mode of action of the three, however, differed from each other; diethyl phosphate 4-nitro-*m*-cresol acts on both pre- and post-synaptic membranes, but diethylcyanophenol phosphate affects presynaptic axon whereas diethylphosphate-*p*-nitrophenol acts on the nerve terminal.

Ca spikes induced by quinidine in lobster muscle fibers were affected by various divalent cations. Ba²⁺ and Sr²⁺ enhanced Ca spikes, while Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Cd²⁺ suppressed them. Inhibitory effects of Co²⁺ and Mn²⁺ were also found on the neuromuscular transmission and on the action potential in insect muscles.

3) Inhibition of taste responses by heavy metal ions in mice

Preadaptation of the mouse tongue to various heavy metal salts produced inhibition of chorda tympani nerve responses to taste stimuli. Especially, CuCl_2 and ZnCl_2 at 10^{-6} – 10^{-4} M selectively inhibited taste nerve responses to sugars and Na saccharin without affecting those to other stimuli. No such selective inhibitory action on sweet responses was demonstrated by MnCl_2 , FeSO_4 , CoCl_2 and CdCl_2 . These salts at 1 mM, however, produced small inhibition of responses to sucrose, NaCl and quinine hydrochloride, although CdCl_2 at 1 mM inhibited responses to all the four taste stimuli to some extent. The inhibitory effectiveness of heavy metal ions is in the order of $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Mn}$.

Preference-rejection behavior in mice for heavy metal salts was studied with the two-bottle preference technique. Mice rejected ZnCl_2 , CuCl_2 , CdCl_2 and NiCl_2 , but preferred MnCl_2 and CoCl_2 at low concentrations, although they became to reject these salts at high concentrations. The rejection threshold for heavy metal salts was in the order, $\text{Zn} < \text{Cu} < \text{Cd} < \text{Ni} < \text{Co} < \text{Mn}$. This order is almost the reverse of that of the toxic effects of heavy metal ions on animals.

研究目的

農薬、重金属など種々の環境汚染物質は生体に取り込まれて、脳神経系を侵すことが知られているが、本研究においては、各神経組織についてこれら環境汚染物質および神経毒の作用量・効果関係を、神経生理学、神経生化学的実験方法を用いて測定し、これら神経毒の作用機構を明らかにすることを目的とした。以上の目的のために、1) 環境汚染物質の神経毒性スクリーニング系の開発および、2) 昆虫、甲殻類の神経筋シナプスに対する農薬および重金属の作用に関する研究を行なった。また、3) 各種重金属塩が動物に摂取される際の、味覚抑制効果および摂取行動についての研究も行なった。

研究の成果

1. 環境汚染物質の神経毒性スクリーニング系の開発

環境汚染物質や薬物による脳神経系の疾患・障害は水俣病、農薬中毒、スモンをはじめ近年増加し、大きな社会問題となっている。これら中毒性神経疾患の回復が一般に困難なことを考えても、問題の解決には化学物質の神経毒性をあらかじめ知り、その危険性に対して事前に対策をたてるのが基本である。しかしながら、問題の緊急性にもかかわらず、神経毒性の検出系の開発は、特にヒト、しかもその中枢神経系への毒物の作用を念頭においた場合、ほとんど手がついていない。現在行なわれている実験動物への *in vivo* 投与実験

は重要であり、得られる情報も多いが、莫大な設備と、長い時間多くの労力を要する。問題とすべき物質の数が非常に多く、一説に 10 万といわれる現状では、発ガン性、催奇性物質の一次スクリーニングに Ames test が行なわれ効果をあげているように、まず、*in vitro* 神経毒性検出系の開発による一次スクリーニングの可能性を追求するのが望ましいと考えられる。

in vitro の検出系には、①作用部位における直接の効果を観察でき、血管系への影響、体内での代謝による変化など二次効果を除外できる、②作用部位における投与量を正確にコントロールでき、より正確な用量-効果関係を迅速に得ることができる、③神経組織をとりまく環境を実験的に変化させることができ、また組織の固定が短時間のうちに行なえて、電気生理学、生化学実験が容易で、作用機作の解明が可能である、などの利点があると考えられる。

1) 脳切片を用いたシナプス伝達急性毒性検出系

環境汚染物質、薬物の脳神経系への毒作用は毒物の種類により、その作用点、作用機構とも多種多様であると予想される。しかしながら基本的な脳神経系の機能は、ニューロンからニューロンへ化学伝達物質を介して電気的情報 (インパルス) が伝わる、シナプス伝達によって成り立っている。ニューロンへの障害、脱髄なども最終的には機能障害として、症状と結びついており、まずシ

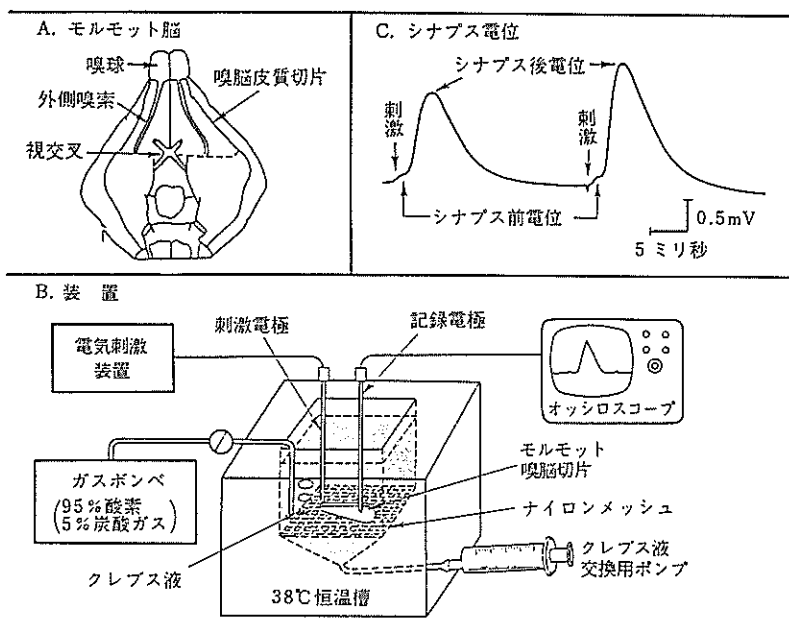


図 1. モルモット嗅脳皮質切片からのシナプス電位。

モルモットの嗅脳皮質部分 (A) を薄く (厚さ 0.2~0.4 mm) 切り出し、グルコースを含んだ生理塩溶液中で酸素を補給しながらインキュベートする (B)。外側嗅索の嗅球側の端を電気刺激すると、切片の表面においた記録電極から C のようなシナプス電位が観察できる。

ナプス伝達に対する影響を調べるのが、より広範な毒性が捕えられ適当であろう。シナプス伝達への影響を観察する *in vitro* の系としては、農薬の作用を知るために Narahashi らによってザリガニ腹部神経などが開発されている。ヒトへの影響を知ろうとする場合は動物種による差異が当然考えられ、哺乳動物の脳を使った系が最も信頼性が高くなる。

モルモットの嗅脳皮質切片は、山本らが世界で初めて“試験管の中の脳”でシナプス電位を記録した系である。外側嗅索を電気刺激すると、軸索の電気活動 (シナプス前電位) と、シナプス伝達の結果、多数のシナプス後ニューロンが興奮したため起こるシナプス後電位が切片の表面から記録できる (図 1)。外液に薬物を決められた濃度で添加して、これらの電位の大きさを同時に観察できる。細胞内記録と比較して、技術的に簡単で、より安定 (最大約 16 時間) である。アデノシンなどの内在性の神経調節因子、他の系でシナプス部位に作用することが知られている神経毒クラ

レ、カイニン酸、オクタルグアニジンなどは可逆的にシナプス後電位のみを阻害する。急性毒性検出系として再現性、定量性も良く薬物の浸透時間もほとんど無視できる (表 1, 図 2)。環境汚染物質として知られているいくつかの物質をテストしてみた。DDT (500 μM) はシナプス前電位に大きな影響を与えずに 1 時間ほどかかってシナプス後電位を阻害した。また、メチル水銀 (50 μM) もシナプス後電位を極めてゆっくりした時間経過で小さくした。これらの物質はシナプス部位に働くことによって、シナプス伝達を阻害していることが示唆された。

一方、トルエン (0.01% 懸濁液)、ヘキサン (2.0% 懸濁液) などはシナプス前、後電位を同時に阻害した。これらの物質は軸索をインパルスが伝導するのを阻害したために、シナプス伝達も起こらなくなったと考えられる。このようにモルモット脳切片はシナプス伝達に対する急性毒性が検出できるだけでなく、一義的な作用点がシナプス部位かどうかの決定も可能であることがわか

表 1. 哺乳動物脳切片の神経伝達に対する諸種毒物の毒性効果

図 1 に示したような実験により、種々の毒物の用量による急性毒性と作用部位を同定した。DDT などはシナプス部で神経伝達を阻害し、トルエンなどは軸索でのインパルス伝導を阻害する。

Agents	Concentration (μM)	Inhibition by 10 min incubation	
		Impulse propagation	Synaptic transmission
Octylguanidine	50	—	+
	200	—	+
<i>d</i> -Tubocurarine	100	—	+
	200	—	+
Kainic acid	1	—	+
	10	—	+
DDT	50	—	+
Methylmercury	20	—	—
	50	—	+
Lead acetate	100	—	—
	1000	—	—
Toluene	0.01% Suspension	+	—
	0.03%	+	—
Hexane	1.0% Suspension	—	—
	2.0%	+	—

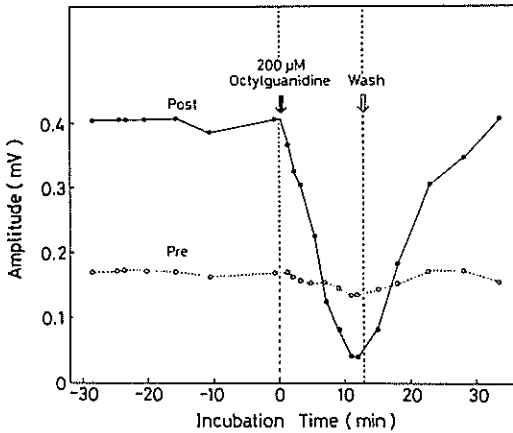


図 2. モルモット嗅脳皮質切片から記録されるシナプス電位に対するオクチルグアニジンの作用 (200 μM)。

シナプス前電位 (Pre; ○—○) の大きさはほとんど影響されないが、シナプス後電位 (Post; ●—●) の大きさは減少する。

った。

そこで神経毒性は知られているが、その作用機作が知られていない薬物の代表としてキノホルムの投与を行ない、この検出系の有効度を知ろうと試みた。キノホルムは特徴ある中毒性神経疾患・

表 2. 脳切片のシナプス伝達に対するキノホルム類の阻害作用

薬 物	阻害度
5-chloro, 7-iodo, 8-hydroxyquinoline (Cl·I·HQ)	40%
5,7-dichloro, 8-hydroxyquinoline (Cl·Cl·HQ)	38%
5-chloro, 8-hydroxyquinoline (Cl·HQ)	35%
8-hydroxyquinoline (HQ)	25%
8-hydroxyquinoline, 5-sulfonic acid (HQ·S)	14%

モルモット嗅脳皮質切片から外側嗅索の電気刺激によるシナプス後電位を記録し、薬物添加 20 分後の電位の大きさを対照と比較した。

スモン (SMON=Subacute Myelo-Optico Neuropathy) を引き起こすことが知られている。キノホルム剤の主成分である 5-chloro, 7-iodo, 8-hydroxy quinoline およびその類縁物質をモルモット嗅脳皮質切片に投与し、シナプス伝達に対する影響を電気生理学的に観察した。100 μM の 5-chloro, 7-iodo, 8-hydroxy quinoline (Cl·I·HQ) などは、シナプス伝達を有意に阻害した (表 2)。

2) 培養細胞に対する慢性神経毒性の検出
環境汚染物質による神経毒性の多くは、比較的

表 3. メチル水銀, キノホルムに対する各種培養細胞の感受性

細胞	由来組織	神経系/非神経系	膜の興奮性	生存率への ED ₅₀ (M)	
				メチル水銀	キノホルム
B 104	ラット脳腫瘍	神経系	+	1.6 × 10 ⁻⁶	0.73 × 10 ⁻⁵
NIE-115	マウス末梢神経腫瘍	神経系	+	1.8 × 10 ⁻⁶	0.87 × 10 ⁻⁵
B 82	ラット脳腫瘍	神経系	-	1.8 × 10 ⁻⁶	1.0 × 10 ⁻⁵
B 15	ラット脳腫瘍	神経系	-	2.2 × 10 ⁻⁶	1.3 × 10 ⁻⁵
PC 12	ラット副腎髄質腫瘍	(非神経系, ただし発生学的には神経系)	+	0.39 × 10 ⁻⁶	6.8 × 10 ⁻⁵
NRK	ラット正常腎細胞	非神経系	-	3.5 × 10 ⁻⁶	5.8 × 10 ⁻⁵

少量の毒物の慢性投与によるものであり, スモンも亜急性である。

モルモット嗅脳皮質切片を用いた, シナプス伝達に対する急性毒性検出系は, 通常数時間程度の観察しか行なえず, もし毒物が細胞内に浸透し, 代謝・蓄積したのち作用したりして, その毒性発現の時間経過が数時間を越えるようなものであれば, 急性の検出系ではその毒性を検出できないか, あるいは, 著しく低く評価してしまう可能性がある。したがって, 環境汚染物質の多くが持っている, より長時間を要して発現する毒性を検出するために, 培養神経細胞を用いる系を検討した。

慢性毒性を *in vitro* で検出し, 作用機序を研究するには, 神経系由来の神経腫瘍細胞を用いる研究が行なわれている。米国ソーキ研究所から供与されたラット脳由来の神経腫瘍細胞 (ニューロblastoma) を培養し, 上記キノホルムなどを添加し, 細胞の生存率および形態を継続的に観察した。Cl·I·HQ は添加 1 時間後では B 104 クローンははじめとする神経系細胞の生存率や形態に変化を与えなかった。しかし, 48 時間添加の観察では 1 μM 以上の Cl·I·HQ, 0.1 μM 以上の Cl·Cl·HQ は細胞の生存率を有意に低下させた。電気生理学的に観察されたシナプス伝達への急性毒性は, 神経細胞の生存率や形態に変化を与えるような一般細胞毒性によるものでないことが示唆された。また, μM 以下の低濃度でもキノホルム類は神経細胞に慢性毒性をもつことが明らかになった。

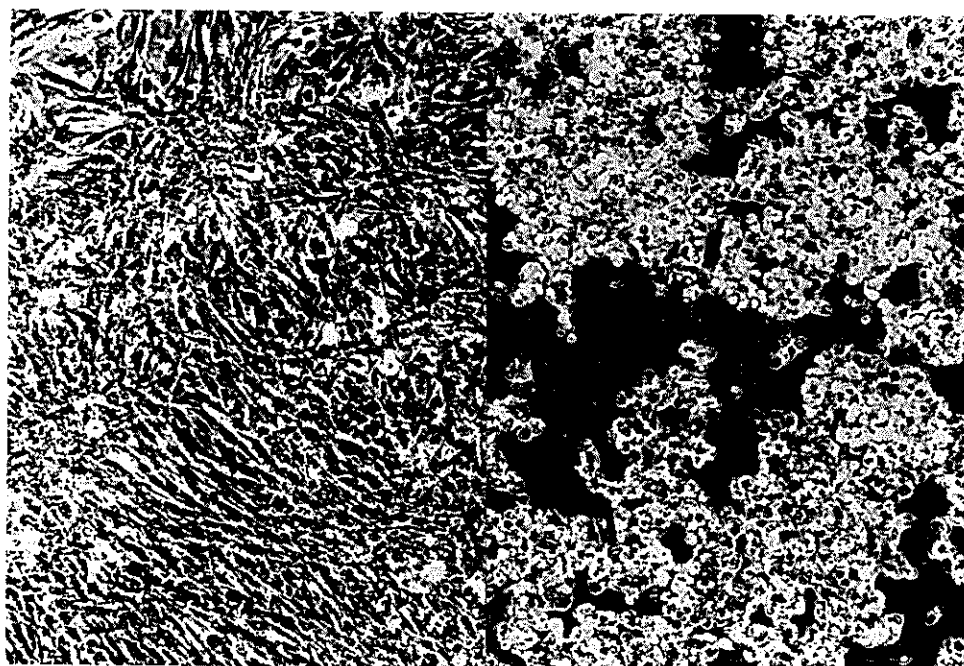
これまでの研究によって, キノホルム類に限ら

ず, 慢性神経毒性をもつ薬物が, モルモット脳でのシナプス伝達を阻害する有効濃度は一般的にかなり高いことがはっきりした。これらの高濃度での急性毒性と, より低濃度の慢性毒性の関係の有無が今後の問題点であろう。

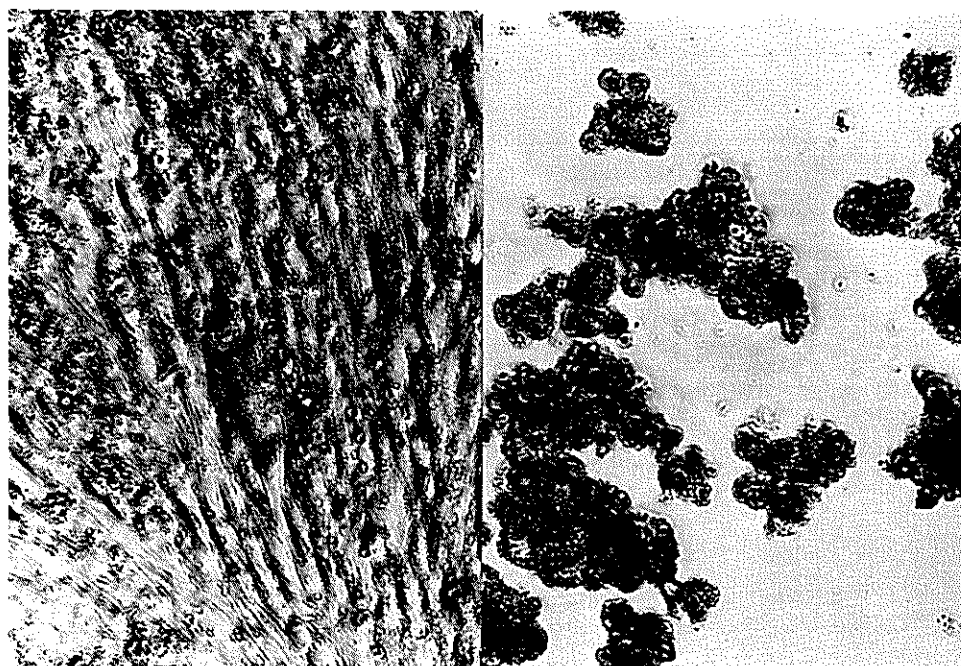
次に, 各種の培養細胞を用いて, 慢性細胞毒性 (*in vitro* の系では毒物が細胞内に作用点をもち, 細胞内への浸透・代謝・蓄積による毒性の発現に細胞分裂の 1 周期以上の時間を要するものと定義 *in situ* での経口投与実験などで要する標的細胞に至るまでのはるかに長い時間は, *in vitro* では細胞外液への直接投与により省略できる。) を神経組織由来の細胞と, 神経組織以外から由来した細胞と比較し, 神経細胞が他の細胞よりも感受性がより高い, “神経細胞毒性” といったものがあるのかどうかを検討した。

実験にはクローン化した細胞株を用い, ラット脳などの神経組織から由来したものを数種, 同じ条件下で培養した。各濃度の毒物を投与後, 光学顕微鏡下で観察を行ない, 一定時間後に全細胞数, さらにトリパンブルー染色法による生存率を測定した。この結果から, 生存率を指標として毒物の用量作用曲線を得て, ED₅₀ 値を計算し, 毒性を定量化した。

環境汚染物質のなかで神経毒性の強いものとして知られているメチル水銀の効果をみると表 3 に示すように, B 15, B 82, NIE-115, B 104 などの神経組織由来のものは, ラットの正常腎細胞 (非神経細胞) に比べて, メチル水銀に, より感受性が高かった。また, 発生学的に神経細胞と同じ由来をもち, 神経成長因子の添加培養で交感神経



3 A



2 B

図 3 A. ラット脳由来のニューロblastoma B 15 にキノホルム (10^{-4} M) を加えた場合の形態変化。左はコントロール。
 B. ラット脳由来のニューロblastoma B 104 にキノホルム (10^{-4} M) を加えた場合の形態変化。左はコントロール。

細胞に分化することが知られている PC 12 h 細胞は、腎細胞に比べて、1桁も感受性が高かった。

また、スモンの原因物質として知られる、キノホルムを用いても、B 15, B 82, B 104, NIE-115 など神経組織由来のものは、ラット腎細胞など非神経細胞に比べて、数倍も感受性が高かった (図 3 A, B)。これらの結果は、メチル水銀やキノホルム中毒が主として神経系の障害として現れた事実を説明できる。ここで注目されるのは、培養細胞間でのメチル水銀、キノホルムに対する感受性の強さの序列は、 $B 104 > NIE-115 \geq B 82 > B 85 > NRK$ であったことで、B 104, NIE-115 が特に膜の興奮性など神経細胞としての性質を強く持っていることを考え併わせると、神経細胞毒性を一般に検出しやすい細胞系というものが存在する可能性を示唆している。ただ例外は、ラット副腎髄質細胞腫 PC 12 h で、この細胞は腎細胞に比べて、メチル水銀に対しては非常に感受性が高いが、キノホルムに対しては腎細胞とほとんど同じ感受性しか持っていないことが注目される。

今後、毒物や培養細胞の種類を増やし、詳しく検討する必要がある。

2. 昆虫・甲かく類の神経筋シナプスに対する農薬および重金属の作用

昆虫や甲かく類の神経筋標本は、毒物・薬物の作用部位を、シナプス前線維、神経終末、シナプス後膜のいずれにあるかを明確に決めることができること、また支配神経を興奮性および抑制性の2種に分離することが容易で両者の反応の比較ができることなどの利点をもっている。本研究は上記の神経筋標本を用いて農薬および重金属の作用機構を調べたものである。

農薬は広範囲の地域に持続的に散布する必要上、環境汚染物質の中でも重要な項目の一つに挙げられている。農薬が害虫駆除を目的としているため、昆虫類の神経系に対する作用がその効果の重要な指標となる。従来の農薬の効果の検定は、ほとんどが行動の変化や殺虫効果 (LD_{50}) を調べたもので神経系への作用を単一細胞レベルで検索したものは少ない。本研究では昆虫のミールウ

ーム (*Tenebrio molitor*) の神経筋標本を用い、農薬の作用部位と作用機構について調べた。農薬としては現在の害虫駆除薬の主流を占める有機燐剤のうちから以下の3種を選び効果を比較した。(A) diethylphosphate 4-nitro-*m*-cresol (Sumithion 系), (B) diethyl cyanophenyl phosphate, (C) diethyl phosphate *p*-nitrophenol (Paraoxon 系) (図 4)。

ミールウームの腹壁筋から細胞内記録を行ない、腹部神経節刺激によって生ずるシナプス後電位と筋活動電位を観測、記録した (図 5)。

A を神経筋シナプスに投与すると、シナプス後膜の脱分極と筋の収縮が起こりシナプス伝達は停止する。その後、脱分極が減少し、膜電位がもとのレベルへ戻った後もシナプス後電位は回復しない (図 5 A)。B の投与後、シナプス後膜は軽度の脱分極を起こし、筋の活動電位の反復発射が起こり、シナプス伝達は停止する (図 5 B)。C の投与後、シナプス後電位および筋活動電位は徐々に減少しやがて完全に消失する。この際シナプス後膜コンダクタンスには、ほとんど変化が見られない (図 5 C)。

以上の結果から、上記3種の有機燐剤農薬はいずれも diethyl phosphate 基をもつ構造類似物質であり、昆虫の神経筋伝達を停止させる作用のあることがわかった。しかしその作用には特徴的な差がある。すなわち、A はシナプス前・後膜両方に作用する。B はシナプス前膜に作用し、脱分極によって反復発射を生ずる。C はシナプス前性に作用し、活動電位を停止させてシナプス伝達を止めると考えられる。有機燐剤は従来、抗コリンエステラーゼ作用によって殺虫効果があるといわれてきたが、昆虫の神経シナプスは非コリン作動性であり、抗コリンエステラーゼ作用では、伝達阻害効果を説明できない。一方、ハエなどを用いた殺虫効果 (LD_{50}) の研究で上記農薬の抗コリンエステラーゼ活性と、 LD_{50} 値とは平行しないことが認められている。今後類似化合物の効果比較や構造活性連関を調べる必要がある。

次に重金属イオンなどの各種二価金属イオンの毒作用について、昆虫および甲殻類、神経筋シ

COMPOUNDS	NEUROMUSCULAR BLOCK		LD ₅₀ in vivo 10 ⁻¹² mole
	PRESYNAPTIC	POSTSYNAPTIC	
A <chem>CCOP(=O)(O)Oc1ccc(C)cc1[N+](=O)[O-]</chem>	-	+	15.75
B <chem>CCOP(=O)(O)Oc1ccc(C#N)cc1</chem>	+	+	3.6
C <chem>CCOP(=O)(O)Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	+	-	0.38

A fenitrooxon (sumithion)
B diethylcyanophenol phosphate
C paraoxon (parathion)

図 4. 有機燐農薬の構造と昆虫の神経筋伝達に対する効果
 3種の有機燐剤の構造(上からA, B, Cの順)と, ミールウオームの神経筋伝達阻害の作用部位を示す。右欄の数字はハエに対する致死率を示す。

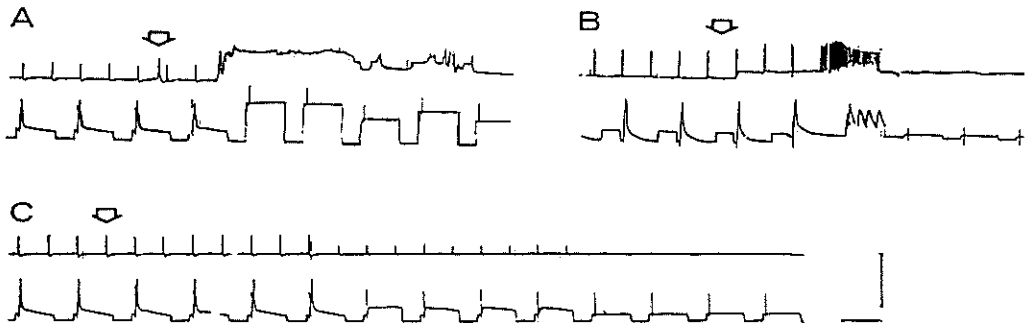


図 5. 昆虫神経筋伝達に対する農薬の作用
 各記録の上のトレースは, ミールウオーム神経筋シナプスに生じたシナプス後電位に対する農薬の作用の時間経過を示す。下段のトレースは上段の記録の時間軸を拡大して波形を示した。A, B, C, は図 5 に示した農薬を矢印の時点で与えた(濃度は 10⁻⁴ M)。較正は 40 mV, 10 秒(上トレース) 20 mV, 1 秒(下トレース)。

ナプスを用いた研究を行なった。一般に脊椎動物の神経・筋の活動電位は主として Na イオンの流入によるが, 昆虫・甲殻類の神経筋の活動電位は Ca イオンの関与が強く, 特に筋細胞は純粋な Ca スパイクを発生する。

イセエビ伸張筋に記録および通電用の 2 本の微小電極を刺入し, 外液に 0.1-1 mM のキニジン

(quinidine) を投与した。キニジンには Ca 依存性 K チャネルを阻害する効果があり, 細胞内に脱分極電流を加えることによって振幅 70~90 mV. 持続数 100 msec のスパイク電位を発生する(図 6 A, C)。この電位が純粋な Ca スパイクであることは以下の実験で分かった。1) 外液から Na を除いたり, あるいはフグ毒のテトロドトキ

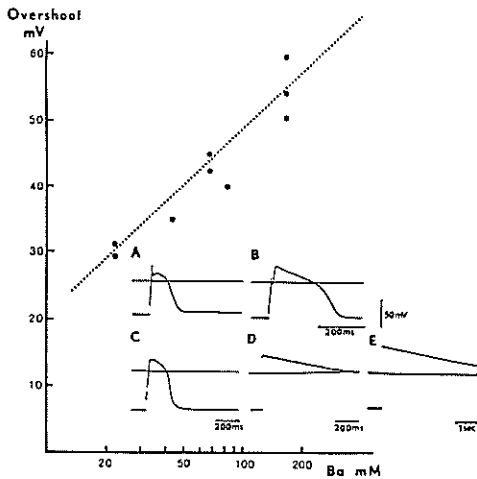


図 6. エビ筋細胞に発生した Ca^{2+} スパイクと Ba^{2+} の増強作用。
A. C. キニジン 1 mM 投与によって生じた Ca スパイク, B. 5 mM Ba^{2+} , D. 44 mM Ba^{2+} , E. 180 mM Ba^{2+} を加えた時の反応。グラフはスパイクの overshoot の振幅と Ba^{2+} 濃度の関係を示した。

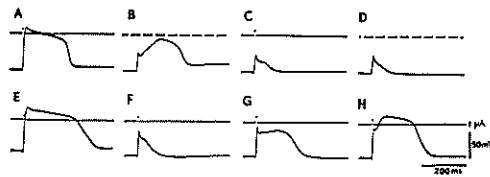


図 7. Ca^{2+} スパイクに対する Mn^{2+} の抑制作用。
A. コントロールの Ca^{2+} スパイク, B. 5 mM Mn^{2+} を投与 3 分後の記録, C. 5 分, D. 7 分後の記録, E. 標本を洗った後の回復, F. 10 mM Mn^{2+} を投与 3 分後の記録, G. A は洗った後の回復。

シンを加えてもスパイクは変化しない。2) 外液の Ca 濃度を増すとスパイクは増大し、振幅の陽性部 (overshoot 電位) は Ca 濃度を 10 倍増すごとに、29 mV ずつ増加する。このようにイセエビ筋に発生させた Ca スパイクに対して、種々の 2 価金属イオンの効果を調べた。 Ba^{2+} は、スパイクを振幅、持続ともに著しく増大させ、40 mM 以上の Ba^{2+} 液中では数 sec の持続をもった電位が発生した (図 6D, E)。 Sr^{2+} もほぼ同様の増強効果があった。これに対し、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} は Ca 電流を抑制する作用を持つ。図 7 に示す

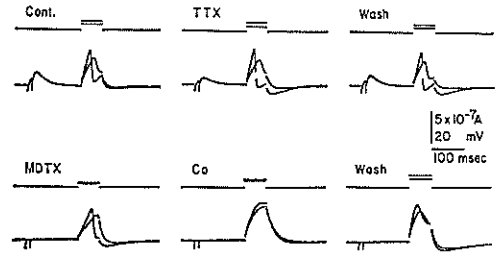


図 8. 昆虫神経筋伝達に対する重金属および神経毒の効果。

ミールウオーム腹壁筋細胞より記録し、神経の二発刺激によるシナプス後電位に続いて細胞内通電による活動電位を発生させた。テトロドトキシン (TTX) によりシナプス後電位はやや抑制されるが消失しない。ハチ毒 (MDTX) はシナプス後電位を消失させるが活動電位は保たれている。 Co^{2+} は活動電位も完全に消失させる。

ように 5~10 mM の Mn^{2+} は Ca スパイクを可逆的に阻害した。0.1~1 mM の Cd^{2+} は同様の抑制効果を示したが、この作用は非可逆的であった。 Ca 電流に対する 2 価金属イオンの作用をまとめると増強効果の順位は $\text{Ba} > \text{Sr}$ であり、抑制効果の順位は $\text{Mg} < \text{Mn} < \text{Co} < \text{Cd}$ である。

さらに昆虫の神経筋シナプスに対する金属イオンおよび神経毒の作用を調べた。ミールウオームの腹壁筋を用いた神経筋標本を作成し、腹部神経節刺激によるシナプス後電位を記録し、また細胞内通電による筋活動電位を同時記録した (図 8)。この電位に対する Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} などの金属イオンとテトロドトキシン (TTX)、スズメバチ毒 (MDTX) などの神経毒の作用を調べた。得られた結果は以下のとおりである。1) Ba^{2+} はシナプス後電位、および筋活動電位を増強した。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} は両方の電位をいずれも抑制した。この結果から昆虫筋も甲殻類筋と同じく Ca 依存性のスパイク電位を発生すること、また 2 価イオンの効果も類似していることが分かる。2) TTX 存在下で、シナプス後電位は減少するが完全に消失しない、しかしハチ毒 MDTX を与えるとシナプス後電位は消失する。TTX、MDTX とともに筋の活動電位を抑制しない。この結果から、ミールウオームのシナプス前神経の活動電位は通常の

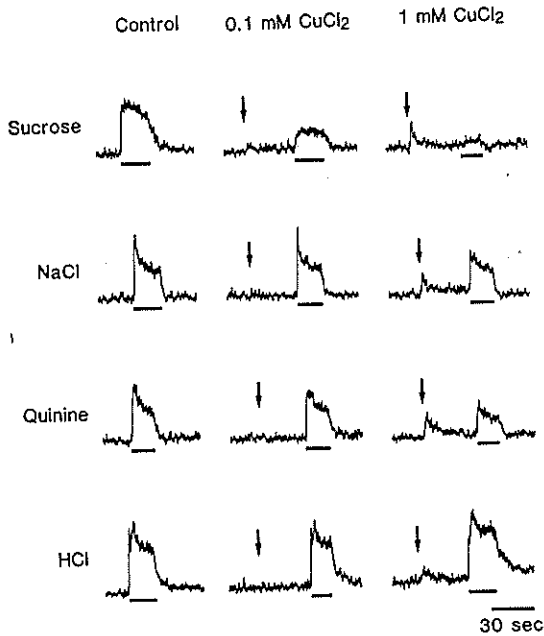


図 9. 4 種の基本味液刺激によるマウス鼓索神経応答と CuCl_2 による抑制。

刺激液は 0.5 M シュ糖, 0.1 M 食塩, 0.02 M 塩酸キニーネ, 0.01 M 塩酸。横線は刺激液を舌に流した期間を, 矢印は 0.1 mM または 1 mM CuCl_2 液を流した瞬間を示す。

Na 電流の他に TTX に耐性の Na 電流があり, これは MDTX によって遮断されることが分かった。

以上の知見は環境汚染物質としての重金属イオンが, 神経・筋肉細胞とくに幼若期の神経細胞に与える影響を調べる上で重要な手がかりとなると考えられる。

3. 重金属塩による味覚抑制効果と忌避行動

多くの重金属塩が生体, 特に神経系に毒作用をもつことは周知の事実である。これらの重金属塩は, 主として飲食物に混入して経口的に動物体内に摂取, 吸収されると考えられる。飲食物を摂取する際, 動物は味覚に基づいて摂取または拒否の選択をする。一般に有害, 有毒である苦味物質, 酸を拒否し, 食塩, 糖などを好んで摂取する。したがって重金属塩の毒作用と, 動物が味覚に基づいて表わす行動との間には一定の相関性が存在することが予測される。

他方, 生体内における銅, 亜鉛などの欠乏, 過

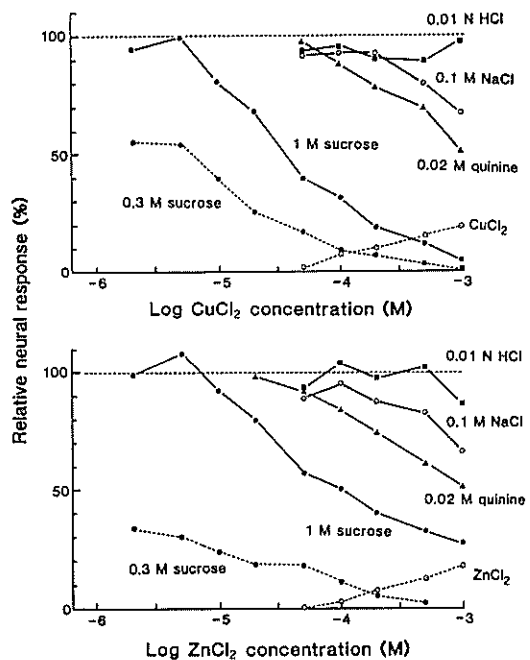


図 10. 各種濃度の CuCl_2 ZnCl_2 によるマウス鼓索神経応答の抑制。

白丸は, CuCl_2 ZnCl_2 を与えた時起こる神経応答の大きさを示す。

剰が異常味覚の原因となるという報告がある。たとえば味覚低下を示す患者では血清中の亜鉛, 銅濃度の低下がしばしばみられるが, この症状は硫酸亜鉛の投与によって回復する。また硫酸銅, 硫酸亜鉛をラットの舌表面に与えたあとでは, 甘味物質刺激に対する味覚神経応答が抑制されるとの報告がある。

本研究においては, マウスの味覚神経活動を記録するとともに, 二瓶選択法を用いてマウスの味溶液摂取・拒否行動を測定し, 重金属塩による味覚抑制効果とこれら塩溶液に対する拒否行動を研究した。

1) CuCl_2 , ZnCl_2 による味覚神経応答の抑制

甘, 塩, 苦, 酸味を起こすシュ糖, 食塩, 塩酸キニーネ, 塩酸の溶液をマウスの舌に流すと, 図 9 左端の記録に示すような応答が鼓索神経から記録される。0.1 mM CuCl_2 液をあらかじめ舌に流しておく (矢印), シュ糖応答は著明に小さくなるが, 他の味溶液刺激による応答はほとんど変り

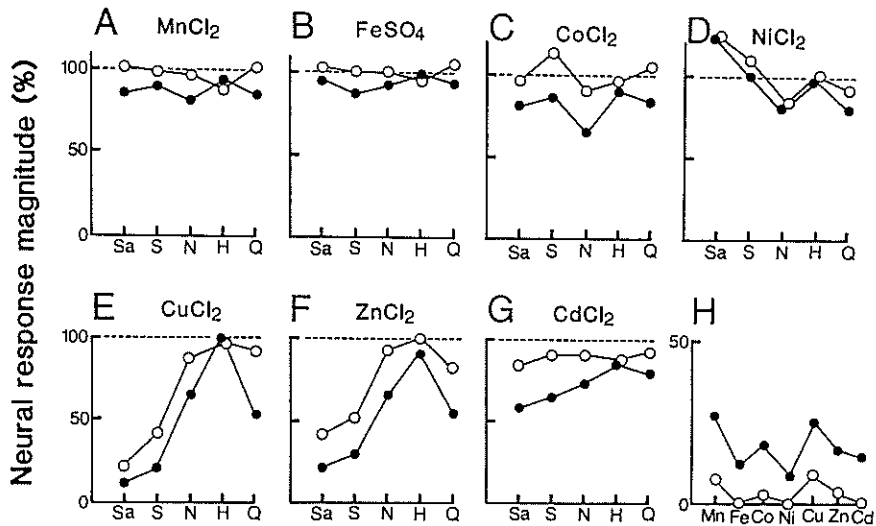


図 11. 7 種の重金属塩によるマウス鼓索神経応答の抑制効果。
各図の横軸は刺激として用いた味溶液、すなわち 0.5 M ショ糖 (S), 0.1 M 食塩 (N), 0.01 M 塩酸 (H), 0.02 M 塩酸キニーネ (Q), 0.01 M サッカリン (Sa) を示す。白丸は、0.1 mM, 黒丸は 1 mM の重金属塩の効果。図 H は、重金属塩による神経応答の大きさを表わす。

ない。1 mM CuCl_2 液では、ショ糖応答はきわめて小さくなる。また、食塩、キニーネによる応答もわずかに小さくなる。このことは CuCl_2 処理によって特に甘味の強さが弱くなることを示している。

図 10 は CuCl_2 および ZnCl_2 による味覚神経応答の抑制を定量的に示したもので、 10^{-5} M の重金属塩でショ糖応答は減少し始め、 10^{-4} M では正常値の半分以下になっている。しかし他の液に対する応答はほとんど影響されず、キニーネ応答がわずかに抑制されているだけである。 CuCl_2 , ZnCl_2 は 10^{-4} M の濃度から神経応答を起こす (図の白丸)。したがってこれら重金属塩は、それ自体で味覚を起こさない低い濃度でも糖による甘味を抑制する効果をもっていることがわかる。

2) 各種重金属塩による味覚神経応答の抑制

次に MnCl_2 , FeSO_4 , CoCl_2 , NiCl_2 および CdCl_2 の抑制効果を調べた。図 11 H は、7 種の重金属塩の刺激効果を示す図であるが、 MnCl_2 と CuCl_2 は刺激効果が強く、0.1 mM でも明らかに神経応答を起こしている (白丸)。 FeSO_4 , NiCl_2 が最も弱い。マウスは、0.1 mM あるいはそれ以下の濃度で重金属塩を検知することがわかる。

7 種の重金属塩による味覚神経応答の抑制効果をまとめると図 A-H になる。 CuCl_2 , ZnCl_2 はサッカリン、ショ糖に対する応答を著明に抑制する。 CdCl_2 もある程度の抑制効果を示している。しかしその他の塩の効果はきわめて小さい。甘味応答の抑制効果を 7 種の金属イオンについて比較すると、 $\text{Mn} \approx \text{Fe} < \text{Co} < \text{Cd} < \text{Zn} < \text{Cu}$ の順となる (Ni はわずかの増強作用を示している)。この順位は、重金属塩が有機リガンドと結合する程度を示す Irving-Williams の系列 ($\text{Mn} < \text{Fe} < \text{Co} < \text{Ni} < \text{Cu} < \text{Zn}$) とほぼ一致している。

甘味物質は、味覚受容膜の受容タンパク質と結合して甘味を起こすと考えられているが、Cu, Zn などのイオンは受容タンパク質と結合し、甘味物質と受容タンパク質との結合を妨げ、その結果、神経応答の抑制を起こすことが考えられる。

3) 重金属塩に対するマウスの拒否行動

2 瓶選択法を用いて 6 種の重金属塩に対する選好行動を調べた。各 6 匹からなる 6 群の ddy マウスについて、48 時間の試験液と水の摂取量を測定した。図 12 はその結果をまとめたものである。マウスは、意外なことに MnCl_2 , CoCl_2 を低い濃度で好んでいるが、高濃度になると拒否に転じて

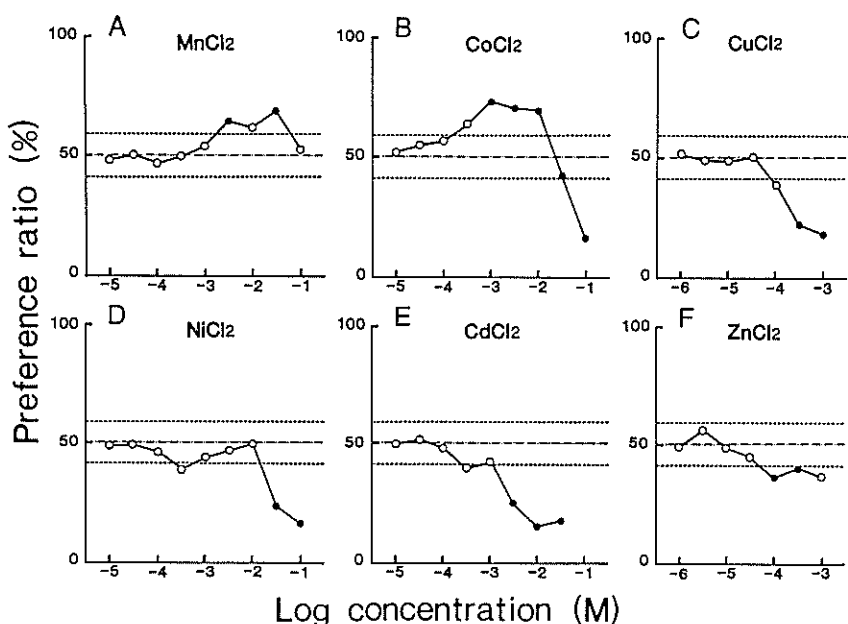


図 12. 6 種の重金属塩に対する ddY マウスの拒否行動。

縦軸は選好比 (試験液摂取量×100%/試験液と水の総摂取量) を示す。破線は、水のみを与えた時の平均対照値を、点線はその標準偏差を示している。黒丸は、選好比が対照値より有意に異なっていることを示している。

表 4. マウスが拒否する重金属塩の濃度閾値

重金属塩	閾値 (M)	閾値の順位
MnCl ₂	$> \times 10^{-1}$	6
CoCl ₂	3.2×10^{-2}	5
NiCl ₂	1.4×10^{-2}	4
CuCl ₂	7.7×10^{-5}	2
ZnCl ₂	5.0×10^{-5}	1
CdCl ₂	1.1×10^{-3}	3

いる。他の塩はすべて拒否している。表 4 は 6 種の塩を拒否する最低濃度 (閾値) を示したものである。閾値の順位は Mn > Co > Ni > Cd > Cu > Zn である。しかし図からわかるように、拒否の程度は Cu > Zn である。この順位も上述した Irving-Williams の系列とほぼ一致する。水棲動物に対する重金属塩の毒性を調べた報告によると、Co < Ni < Cr < Pb < Zn < Cd < Cu < Ag < Hg であるとされている。この毒性を示す系列と拒否の系列を比較してみると、毒性が強い重金属ほど低濃度で拒否されるということが出来る。

4) 重金属塩添加が動物の嗜好に及ぼす効果

一定濃度のショ糖またはサッカリンに CuCl₂, ZnCl₂ を種々の濃度で混合した時、ショ糖、サッカリンに対するマウスの嗜好がどのように変化するかを、2 瓶選択法を用いて調べた。図 13 に示すように、CuCl₂ 濃度が 10⁻⁴ M で嗜好がわずかに低下し、3 × 10⁻⁴ M では拒否する。ZnCl₂ でも 10⁻⁴ M 以上で嗜好の低下が起り始める。しかし ZnCl₂ 添加ではあまり強い拒否は起らない。このような Cu 塩、Zn 塩添加による嗜好の低下は、上述した甘味情報の抑制によるものであろう。

甘味を示すアミノ酸の一つであるグリシンに ZnCl₂ を添加する実験を行なったが、嗜好の強い低下はみられなかった。アミノ酸に対する味覚神経応答を、Zn, Cu 塩があまり強く抑制しないことと一致する。

考察と結論

本研究では、第 1 に、モルモット嗅脳スライスをアッセイ系として用い、各種環境汚染物質および神経毒の作用を電気生理学的方法で検討し、こ

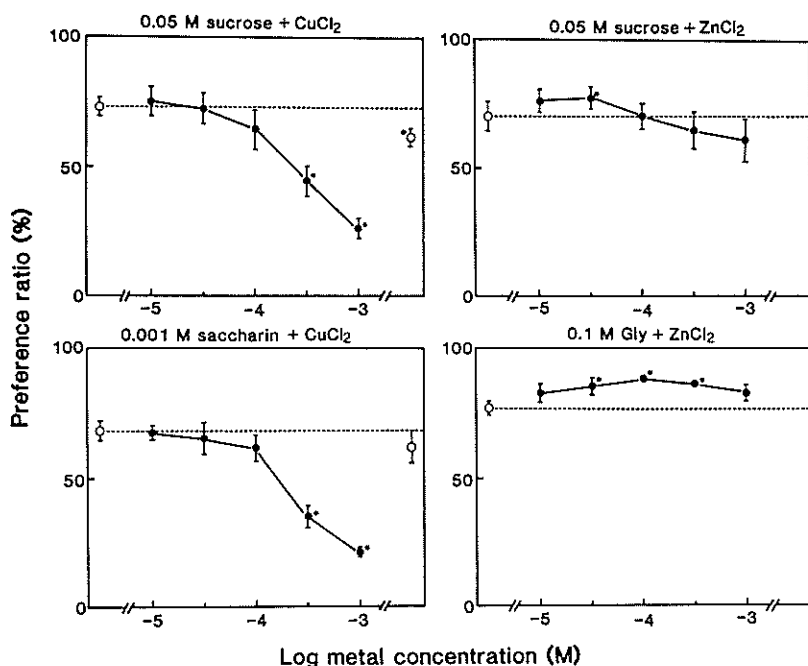


図 13. 甘味物質に CuCl_2 または ZnCl_2 を添加した場合の、選好行動の変化 (マウス)。

れら毒物の作用点、作用機構を容易に解析することが可能であることを示した。また神経毒などの慢性毒性の検出のために、神経細胞由来の培養細胞を材料として用い、その生存率および形態を継続的に観察することによって、神経毒の作用を定量的に測定することが可能であることを示した。また培養細胞が神経細胞由来のものか、非神経細胞由来のものかで感受性に差があり、神経毒性検出系として用いる場合、細胞の種類を選ぶ必要があることがわかった。

次に3種の有機燐剤の、昆虫神経筋シナプスに対する伝達阻害作用を調べ、農薬の種類によりシナプス前、後膜に対する作用が異なっていることを明らかにした。有機燐剤は従来、抗コリンエステラーゼ作用によって殺虫効果があるといわれてきたが、昆虫の神経筋シナプスは非コリン作動性であり、抗コリンエステラーゼ作用では伝達阻害効果を説明できない。また甲殻類および昆虫の神経筋シナプスに対する重金属塩の作用を調べ、Mg, Mn, Co, Cd などの塩の抑制作用を明らかにした。

第3の研究として、マウス味覚神経応答および

摂取行動に対する重金属塩の効果を調べ、Cu, Zn が甘味応答を特異的に抑制し、一般的に甘味応答の抑制効果は $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Co} \approx \text{Fe}$ であることを示した。これは有機リガンドと重金属塩が錯体を形成する能力を示す順位 (Irving-Williams 系列) とほぼ一致し、甘味受容タンパク質と重金属イオンの結合によって、甘味情報の抑制が起こることを示している。また6種の重金属塩に対するマウスの選択行動を調べ、これを拒否する閾値の順位が $\text{Zn} < \text{Cu} < \text{Cd} < \text{Ni} < \text{Co} < \text{Mn}$ であることを明らかにした。これは重金属イオンの毒性の順位と逆になっており、毒性が強ければ強いほど、低濃度で拒否されることを示している。

謝 辞

この研究は、神経科学総合研究所の三輪昭子、小林和夫、岩崎一生、大口嘉子、および都立府中病院の笠原哲三、理化学研究所の阿部岳の6氏の協力によるものである。

発表論文

- 1) Abe, T., Kawai, N., Niwa, A.: Purification and properties of a presynaptically active neurotoxin, Mandaratoxin, from hornet

- (*Vespa Mandarinia*), *Biochemistry*, **21**, 1693-1697 (1982).
- 2) Kawai, N., Niwa, A., Abe, T.: Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses, *Brain Res.*, **247**, 169-171 (1982).
 - 3) Kawai, N., Niwa, A., Abe, T.: Effect of a spider toxin on glutaminergic synapses in the mammalian, brain, *Biomed. Res.*, **3**, 353-355 (1982).
 - 4) Niwa, A. and Kawai, N.: Tetrodotoxin-resistant propagating action potential in pre-synaptic axon of the lobster, *J. Neurophysiol.*, **47**, 353-361 (1982).
 - 5) Abe, T., Kawai, N., Miwa, A., Fujimoto, Y., Tatsuno, Y. and Fukami, J.: Effects of paraoxon and fenitrooxon on crustacean muscle membrane, *Comp. Biochem. Physiol.*, **74C**, 249-253 (1983).
 - 6) Abe, T., Kawai, N. and Miwa, A.: Effects of a spider toxin on the glutaminergic synapse of lobster muscle, *J. Physiol.*, **339**, 243-225 (1983).
 - 7) Kawai, N., Miwa, A. and Abe, T.: Specific antagonism of the glutamate receptor by an extract from the venom of the spider *Aranus ventricosus*, *Toxicon*, **21**, 438-440, (1983).
 - 8) Kawai, N., Miwa, A. and Abe, T.: Block of glutamate receptors by a spider toxin. "Advances in Biochemical Psychopharmacology", P. Mandel and F. V. DeFeudis (eds), **37**, 221-227 (1983).
 - 9) Kawai, N., Yamagishi, S., Saito, M. and Furuya, K.: Blockade of synaptic transmission in the squid giant synapse by a spider toxin (JSTX), *Brain Res.*, **278**, 346-349 (1983).
 - 10) Kuroda, Y., Atchison, W. and Narahashi, T.: Detection of environmental pollutants and drugs in *in vitro* brain slices, *Jpn. J. Pharmacol.*, **32**, p 51 (1982).
 - 11) Kuroda, Y., Kobayashi, K., Atchison, W. and Narahashi, T.: Acute toxicity of environmental neurotoxicants: The site of action, *Eisei-Kagaku*, **29**, p 31 (1983).
 - 12) Kuroda, Y., Ohguchi, Y. and Kobayashi, K.: Detection of neurotoxicities of clioquinol by *in vitro* brain slices and cultured nerve cells, *Japn. J. Pharmacol.*, **33**, p 89 (1983).
 - 13) 黒田洋一郎, 小林和夫, 大口嘉子: 環境汚染物質および薬物の *in vitro* 神経毒性 screening 系の開発, *病態生理*, **2**, 757-759, (1983).
 - 14) 佐藤昌康, 岩崎一生, 笠原哲三: マウスのアミノ酸嗜好一ヒトとの比較. 第 17 回味と匂のシンポジウム論文集, 73-75 (1983).
 - 15) Iwasaki, K. and Sato, M.: Neural and behavioral responses to taste stimuli in the mouse, *Physiol. Behav.* (in press).
 - 16) Iwasaki, K. and Sato, M.: Inhibitory effects of some heavy metal ions on taste nerve responses in mice, *Jpn. J. Physiol.*, **34**, 909-918 (1984).