

内分泌かく乱物質のヒトへの影響評価を指向した試験系の開発

主任研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長

研究要旨

内分泌かく乱物質のヒトへの影響評価を指向した試験系の開発を目的とし、基礎検討を行なった。脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では、脳内で記憶を司ることが知られている海馬のスライス標本作製し培養を行なった。この海馬培養系は、生理的な神経回路を保持しており、神経細胞死等の脳への悪影響を評価するの適した系であることが示された。分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系とし、この細胞におけるヒト型エストロゲン受容体発現に適したベクターの作製、および発現を確認するためのレポーター遺伝子種の比較検討を行なった。

分担研究者

中澤 憲一
国立医薬品食品衛生研究所
薬理部第2室室長

佐藤 薫
国立医薬品食品衛生研究所
薬理部・研究員

分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究ではcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、そのまま、あるいは、これを鋳型としたRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。エストロゲン受容体の発現を確認するためのレポーターとしては、細胞外ATPのイオン・チャンネル形成型受容体であるP2X2受容体を用いた。卵母細胞は18℃で2-5日間培養し、電気生理学的手法により受容体の発現の有無を確認した。（倫理面への配慮）

A. 研究目的

本研究は内分泌かく乱物質のヒトへの影響評価を指向した試験系の開発を目的とする。3年計画の初年度にあたる本年度では、系の開発のための基礎検討を行なうことを目的とした。脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では脳内で記憶を司る海馬の培養スライス標本作製し、評価系としての有用性を確認することを目的とした。分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究では、アフリカツメガエル卵母細胞におけるヒト型エストロゲン受容体発現のための条件検索を行なうことを目的とした。

1匹の動物より多数の標本作製することにより使用する動物の数を抑えた。また、動物を死亡させる際には当研究所の実験動物倫理委員会の規定に従い、与える苦痛が最小限となる方法を用いた。

B. 研究方法

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では、ラットより脳を摘出し、厚さ200 μ mの海馬スライスを作製し37℃にて10日間培養した。神経細胞膜電位の光学的測定では、培養した海馬スライスを膜電位感受性色素で染色した。神経細胞障害の光学的測定では、培養した海馬スライスを染色し、共焦点顕微鏡を用いた観察により細胞の障害性を検討した。生細胞・死細胞を2種類の色素で別々に染色し、両者の結果を比較して障害性を決定した。

C. 研究結果

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究のうち、膜電位感受性色素を用いた実験では、神経回路に沿った膜電位変化が記録され、また、この応答を修飾する機構が機能していることも確認された。神経細胞障害性を調べる実験では、神経細胞死を誘発することが知られているグルタミン酸により生細胞の減少、死細胞の増加が観察され、この障害性はCA1領域で最も顕著であった。

分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究では、P2X2受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込んで卵母細胞に注入した場合に受容体が発現することが電気生理学的手法により確認された。SV40プロモーター・ベクターにエストロゲン受容体結合部位とP2X2受容体のcDNAを組み込んだプラスミドを作製し、エストロゲン受容体のRNAまたはcDNAとともに卵母細胞に注入した場合、エストロジオールの有無に関わらずATP誘発電流が観察された。

D. 考察

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究については、膜電位応答の結果より、この海馬標本が生理的な機能を保持していることが、また、グルタミン酸による神経細胞障害がCA1領域に選択的であり、生体内での虚血に伴う部位選択的障害と同様の傾向が認められたこのことから、この標本が神経に対する悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究については、P2X2受容体の遺伝子がアフリカツメガエル卵母細胞においてエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であることが確認された。また、SV40プロモーターを含むベクターはエストロゲン受容体のレポーター・プラスミドに用いることができないことが判明した。今後は、利用可能なレポーター・プラスミドの検索を続ける予定である。

E. 結論

本年度の研究により、1) 培養海馬スライス標本は脳の生理的な高次機能を保持した系であることが確認され、また、この標本は神経細胞障害等の脳への悪影響を検討するのに適した系であること、2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系においてP2X2受容体がエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であること、が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Nakazawa, Y. Ohno, "Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic receptors", *European Journal of Pharmacology*, Vol. 374, pp. 293-299 (1999)

2. 学会発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., "HSP70 protects pyramidal neurons in the hippocampus and may modulate region-dependent vulnerability"
29th Annual Meeting of Society for Neuroscience (1999)
(北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄, "培養海馬切片における電氣的興奮伝播に対するATPの作用の光生理学的解析"
第72回日本薬理学会年会 (1999)

3) 中澤憲一, 大野泰雄, "P2X2受容体に存在する隣接したグリシン残基の受容体チャネル機能における役割"
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究

分担研究者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・研究員
分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第2室室長

研究要旨

脳内で記憶を司ることが知られている海馬のスライス標本を作製し、神経連絡等の機能を維持した状態で培養を行なった。この海馬培養系は外部からの電気刺激に応答し、生理的な神経回路に沿った興奮の伝播が観察された。また、グルタミン酸を適用することにより、虚血時に観察されるような部位特異的な神経細胞死が観察された。このことから、この海馬スライス標本は脳の情報処理機能を保持しており、また、神経障害等の悪影響の評価に適した標本であることが示された。

A. 研究目的

神経間連絡等の生理的機能を維持した状態の脳標本を作製し、内分泌攪乱物質のヒトをはじめとする高等動物の脳機能への影響を評価できる系を確立する。3年計画の初年度である本年度では、脳内で記憶を司る海馬の培養スライス標本を作製し、評価系としての有用性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

海馬スライスはインターフェイス法により培養した。ラットより脳を摘出し、厚さ200 μ mの海馬スライスを作製した。海馬スライスを膜上に置き、培養液中、37 $^{\circ}$ Cにて10日間培養した。神経細胞膜電位の光学的測定では、培養した海馬スライスを膜電位感受性色素で染色した。dentate gyrusを電気刺激し、CA3, CA1に至る神経回路を介する膜電位の変化を記録した。神経細胞障害の光学的測定では、培養した海馬スライスを染色し、共焦点顕微鏡を用いた観察により細胞の障害性を検討した。生細胞はflurecein diacetate, 死細胞はpropidium iodideにより染色し、両者の結果を比較して障害性を決定した。

(倫理面への配慮)

1匹のラットより多数（通常12枚）のスライスを作製することにより、使用する動物の数を抑えた。また、動物を死亡させる際には当研究所の実験動物倫理委員会の規定に従い、与える苦痛が最小限となる方法を用いた。

C. 研究結果

膜電位感受性色素を用いた実験では、神経回路に沿った膜電位変化が記録された。膜電位変化には早い成分と遅い成分が認められた。神経伝達を

抑制することが知られている内因性活性物質であるアデノシンはこの膜電位変化の振幅を低下させた。同様の抑制は、ATP, ADP, AMPによっても観察され、また、これらの物質の作用はアデノシンへの代謝を介することが確認された。神経細胞障害性を調べる実験では、神経細胞死を誘発することが知られている内因性活性物質であるグルタミン酸により生細胞の減少、死細胞の増加が観察された。また、このグルタミン酸による障害性はCA1領域で最も強く認められた。

D. 考察

膜電位感受性色素により検出された膜電位変化は神経興奮の伝導・伝達を反映しており、この標本が生理的な機能を保持していることを示している。また、アデノシンおよびATP等の関連化合物による抑制が観察されたことから、神経興奮の修飾およびアデノシンへの代謝という脳内で必須な機能をもこの系は維持していることが確認された。グルタミン酸による神経細胞障害はCA1領域に選択的であり、生体内での虚血に伴う部位選択的障害と同様の傾向が認められた。このことから、この標本が神経に対する悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

E. 結論

本年度の研究により培養海馬スライス標本は脳の生理的な高次機能を保持した系であることが確認され、また、この標本は神経細胞障害等の脳への悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., "HSP70 protects pyramidal neurons in the hippocampus and may modulate region-dependent vulnerability"
29th Annual Meeting of Society for Neuroscience
(1999) (北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄,
“培養海馬切片における電氣的興奮伝播に対するATPの作用の光生理学的解析”
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究

分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部第2室室長

研究要旨

ヒト型エストロゲン受容体に対する各種化学物質の影響を評価する系の開発を目的とし、この受容体を分子生物学的手法により異種細胞に発現させる方法について検討した。アフリカツメガエル卵母細胞を発現系とし、この細胞におけるヒト型エストロゲン受容体発現に適したベクターの作製、および発現を確認するためのレポーター遺伝子種の比較検討を行なった。

A. 研究目的

ヒト型エストロゲン受容体に対する各種化学物質の影響を評価する系の開発を目的とし、この受容体を分子生物学的手法により異種細胞に発現させる方法について検討する。3年計画の初年度である本年度は、ヒト型エストロゲン受容体発現のための条件検索を行なった。

B. 研究方法

ヒト型エストロゲン受容体を発現させる細胞としては、大きく、扱いやすく、安価であるアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。

ヒト型エストロゲン受容体cDNAは哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、大腸菌を用いて増幅させた。これを鋳型としてRNAをin vitro転写により合成した。エストロゲン受容体の発現を確認するためのレポーターとしては、細胞外ATPのイオン・チャンネル形成型受容体であるP2X2受容体を用いた。具体的には、P2X2受容体のcDNAをエストロゲン受容体結合配列の下流に組み込んだプラスミドを作製した。これとは別に、P2X2受容体、ニコチン様アセチルコリン受容体あるいはセロトニン5-HT3受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、陽性対照とした。

アフリカツメガエルより卵母細胞を摘出し、コラゲナーゼ処理によりろ胞細胞を除去した。第IV、V期の卵母細胞を実体顕微鏡下で選別しこれにプラスミドあるいは転写したRNAを注入した。18℃で2-5日間の培養後、電気生理学的手法により受容体の発現の有無を確認した。

（倫理面への配慮）

1回に作製する卵母細胞標本の数は通常20個以上であり、また、同一のアフリカツメガエルより5回程度の卵母細胞の摘出が可能である。よって、1匹のアフリカツメガエルより多数（100以上）の標本作製でき、使用する動物の数を大幅に制限できる。動物を死亡させる際には当研究所の実験動物倫理委員会の規定に従い、与える苦痛が最小限となる方法を用いた。

C. 研究結果

P2X2受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込んで卵母細胞に注入した場合、細胞外ATPの卵母細胞の適用により内向き電流が惹起され、受容体が発現していることが確認された。ニコチン様アセチルコリン受容体、5-HT3受容体についても哺乳動物発現型プラスミドからの発現が認められた。P2X2受容体のcDNAをSV40プロモーター・ベクターに組み込み、さらにエストロゲン受容体結合部位（ERE）をSV40プロモーターの直前に組み込んだプラスミドを作製した。これをエストロゲン受容体のRNAまたはcDNAとともに卵母細胞に注入した場合、エストロジオールの有無に関わらずATP誘発電流が観察された。

D. 考察

P2X2受容体、ニコチン様アセチルコリン受容体、5-HT3受容体はいずれも哺乳動物発現型プラスミドからの発現が認められた。このことから、これらの受容体遺伝子はアフリカツメガエル卵母細胞においてエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であることが確認された。SV40プロモーターとEREを組み込んだベクターではP2X2受容体がエストロジオールの有無に関わらず発現した。このことは、SV40プロモーターが単独で転写活性化を行なうことを意味している。今後は、他のベクターとEREを組み合わせることにより、エストロゲン受容体によるオン/オフが可能となる条件を検索する予定である。

E. 結論

本年度の研究により、アフリカツメガエル卵母細胞におけるエストロゲン受容体発現のレポーターに利用可能な受容体遺伝子種が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Nakazawa, Y. Ohno, "Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic

receptors", European Journal of Pharmacology, Vol.
374, pp. 293-299 (1999)

2. 学会発表

- 1) 中澤憲一, 大野泰雄, “P2X2受容体に存在する隣接したグリシン残基の受容体チャネル機能における役割”
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

19990690

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので以下の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Nakazawa K, Kawashima N, Akai M, Yano H. On the reflex co-activation of ankle flexor and extensor muscles induced by a sudden drop of support surface during walking in humans. J Appl Physiol. 2003 ;1999:293-299