

別添2

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する

実験的研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 畠中 寛

平成13（2001）年 4月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告書	
内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究	1
島中 寛	
II. 分担研究報告書	
1. 培養中枢ニューロンに対する評価	14
島中 寛	
2. 血液脳関門及びグリア細胞への影響の in vitro 評価	17
浅井清文	
3. 周産期曝露による影響の病理学的及び分子生物学的解析	22
渋谷 淳	
4. 視床下部機能の神経内分泌学的解析	28
西原真杉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書（平成12年度）

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究

主任研究者 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所 教授

研究要旨：内分泌かく乱化学物質(EDCs)の胎生期ないし乳幼児期曝露による内分泌機能中枢に与える影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの *in vivo* 評価研究と、神経中枢の個々の機能単位を解析する *in vitro* 評価研究を行った。12年度は、11年度に引き続き、エストロゲン化合物を陽性対照とした評価系の確立を継続すると共に、確立できた系ではEDCs候補物質の評価を開始した。

In vivo 評価研究は脳の性分化過程及び性成熟後の生殖機能に与える影響を主眼として、ラットを用いた視床下部・下垂体軸、生殖器系の機能と形態学的な評価を遂行している。投与実験は、想定されるEDCsのヒトへの曝露形態を考慮して母動物に混餌で与えて、経胎盤・経乳的に児動物に被検物質を曝露した。11年度より脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロゲンに反応する遺伝子群の発現解析を行っているが、12年度は実際にそれらを評価系に導入して性成熟後の評価パラメータとの比較を行った。具体的には、ethinylestradiol (EE)を妊娠ラットに経口投与した結果、新生ラットの体重及び性分化の異常が確認され、このような動物の視床下部ではグラニューリン遺伝子の発現増加を認め、性成熟後では雌ラットの性周期の回帰パターンの異常と雄ラットの性行動の異常を検出した。いずれも用量依存性で低用量域からの変化であり、EDCsの周産期曝露による内分泌中枢影響の検出指標としての可能性が示された。また、同様のEE周産期曝露を受けた児動物で、脳の性分化臨界期における視床下部性的二型核での、エストロゲン応答性遺伝子の発現レベルを検索した結果、ニューロン特異的なGABA transporter type-1の発現変動が、性成熟後の内分泌器官障害を予測する良い指標となることが示された。代表的な6種類のEDCs候補物質についても動物実験を行い、特にmethoxychlorの最高用量投与群(1200ppm)でEEと同様の内分泌影響が確認された。また新生ラットの視床下部で、雄ないし雌特異的に発現する遺伝子をDNA microarrayにより同定した。

In vitro 評価研究は、血液・脳関門(B-BB)、グリア及びニューロンに与える影響を検索した。まずB-BB評価系では、昨年度確立した不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)を用い *in vitro* B-BB modelを作製し、EDCsによる物質透過性への影響を検討した。その結果、示唆されているホルモン作用の違いを問わず、estradiolと多くのEDCsでL-glucoseの透過性を抑制することが判明した。但し、4-nonylphenolは透過性を亢進した。グリア評価系では、ラット初代培養グリア細胞でのestradiolによる遺伝子発現変化をDNA microarrayにより検討し、myelin basic protein, myelin proteolipid protein, cationic amino acid transporterの強い誘導が見い出され、EDCsの標的遺伝子としての可能性が示された。

ニューロン評価系では、生存、分化、シナプス可塑性に対する影響評価のため、ラット中枢ニューロンと神経幹細胞の培養系を確立し、estradiolの影響について解析を行った。まず生存に対する効果として、estradiolは胎仔期培養海馬ニューロンの血清除去による細胞死を抑制し、その過程でBDNF mRNA量が上昇することを見出した。一方、生後2週齢培養海馬ニューロンではNGF mRNAの発現が増加し、発達段階による応答性の違いを見出した。しかし、これらを評価系としてbisphenol Aと4-nonylphenolによる生存効果を検索した結果、いずれの神経栄養因子も誘導していない。分化及びシナプス可塑性への影響については、生後2日齢培養海馬ニューロンでestradiolによるグルタミンナーゼの発現上昇と神経伝達物質、グルタミン酸の放出促進効果を見出した。更に培養神経幹細胞でestradiolが神経細胞への分化促進効果を持つ可能性を見だし、それぞれEDCsに応用する予定である。

分担研究者

畠中 寛

大阪大学蛋白質研究所 教授

浅井清文

名古屋市立大学医学部分子医学研究所 助教授

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

西原真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

A. 研究目的

近年、我々の環境中に数多くの内分泌かく乱化学物質(EDCs)が見いだされ、生殖機能を含むそれらのヒトへの影響が世界的に懸念されるようになってきた。EDCsの生体への作用機構としてエストロゲン受容体(ER)を介した機序が考えられており、その極低用量曝露によっても生体に不可逆的影響を及ぼすことが懸念されている。中枢神経系においても、胎生期より視床下部・辺縁系を中心としてERを含む性ホルモン受容体が分布しており、当然、その一部を構成する生殖機能中枢も影響を受ける可能性が高い。特にホルモン依存的に脳の性分化を果たす周産期においてEDCの曝露を受けてそれが中枢神経系内に入り込んで作用した場合、脳の正常な性分化が障害され、生後の個体の内分泌機能を含む種々の機能が影響を受ける可能性がある。最近、ラットを用いた実験で、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロゲン化合物を投与すると、視床下部ニューロンのアポトーシスと生殖器に障害を起こすことが報告されている。また、bisphenol Aの胎生期曝露により、脳内アストロサイトの細胞骨格蛋白であるGFAPの遺伝子発現が、低用量から用量依存性に増加するとの報告もある。GFAP遺伝子はそのプロモーター領域にエストロゲンに反応する配列(ERE)を持ち、個体のエストロゲンレベルに呼応してその発現の増減することが知られている。従って、発達期でのEDCs曝露により、内分泌機能の神経中枢になんらかの障害を及ぼす可能性がある。

本班研究においては、個体レベルでのin vivo評価系と神経中枢の各構成要素に対する細胞レベルでのin vitro評価系を用いることにより、EDCsの神経中枢への影響の本態を明らかにすることを目標とする。また、検索化学物質を統一していくつかの代表的な物質について用量依存性の生物学的な作用強度を求めることにより、EDCsの低用量域での生体影響を総合的に評価することが可能となる。このことにより、EDCsに対する社会的不安を緩和することができ、また新たなEDCsのスクリーニングにも迅速に対応できる。

この班研究のin vivo評価系では、従来の内分泌機能及び病理形態の検索のみならず、脳の性分化の臨界時期の視床下部において、分担研究者らにより見いだされたgranulin (gm) 遺伝子を含む性分化誘導因子の網羅的発現解析の他、視床下部の性的に分化することが知られている性的二型核でのEREを持つ遺伝子の発現レベルの定量的解析を行う。この部位特異的な遺伝子発現解析にはバラフィン包埋切片を利用した検出系と、顕微鏡下で特定の細胞をレーザー光を利用して採取する方法を組み合わせることで検索を行う。そして、遺伝子発現の解析結果と性成熟後の生殖器障害の程度との関連性を比較・評価する。また、成熟動物の生殖機能は視床下部のGnRHパルスジェネレーターにより制御されているので、最近確立した神経活動モニターシステムを用いて、性成熟後の生殖機能の評価に充てる。In vitro評価系においては、血液・脳関門(B-BB)及びニューロン、グリア細胞の各々に与える影響を検索する。B-BBの評価系として、微量のEDCsの脳内移行を迅速に測定するための独自のin vitroモデルを開発した。また、グリア細胞への直接作用の評価系として、ラット胎児脳アストロサイトや不死化した培養アストロサイトを樹立し、GFAPなどのアストロサイトの機能遺伝子を解析する系を確立している。ニューロンの検索系として、ERが発現している脳領域を培養し、ニューロンの生存維持、機能分化あるいは可塑性へのEDCsの直接的な効果を検索する実験系を確立している。このような一種のスクリーニング系を応用したEDCsのニューロンないしはアストロサイトへの直接作用はまだ調べられていない。

B. 研究方法

In vivo 評価研究においては、EDCs 候補物質を妊娠・授乳期ラットに投与し、児動物への影響の評価を行った。曝露形態は、想定される EDCs のヒトへの曝露形態を考慮して、被検物質の混じった飼料を母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に曝露した。11 年度から脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロジェンに反応する遺伝子群の発現解析を行っているが、12 年度は実際にそれらを実験系に導入して性成熟後の評価パラメーターとの比較を行い、総合的に評価系確立に努めた。具体的には、まず、昨年度 Wistar 系ラットを用い ethinylestradiol (EE)等の陽性対照物質を母動物に経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎児あるいは新生児に移行させた際の、新生ラット視床下部における grn 遺伝子の発現への影響を検討したが、今年度はそれらの性成熟後の性周期回帰や性行動への影響を検討した。実験群として、EE を母ラットに 0.0025, 0.025 ppm の濃度で混餌投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎児あるいは新生児に移行させた群、出生 2 日齢のラットに estradiol benzoate (EB) を 25 µg 皮下投与した群、及び無処置対照群の 3 群を設けた。児動物のうち、雌ラットの生殖機能の検討としては、8 週齢の雌ラットの性周期の回帰を膣スミアー法により観察した。雄ラットについては雄性行動の観察を行った。発情雌ラット（去勢雌ラットにエストロジェン・プロゲステロン処置したもの）と雄ラットをアクリルケージに入れ、暗視野ビデオカメラにて 30 分間の雄性行動を観察した。マウント、挿入、射精の頻度と各パラメーターの初回行動までの時間、初回の射精後から再びマウントの発現する時間（射精後マウント潜時）を計測した。また、EDCs 曝露に対する視床下部影響を直接的に検出する目的で、新生期における脳の性分化関連遺伝子の網羅的探索を行った。すなわち、5 日齢の雌雄ラットより視床下部全体を含む組織ブロックを回収し、Atlas Rat cDNA Expression

Arrays 1.2 I 及び II（ラット 2,352 遺伝子）を用いて DNA microarray 解析を行った。

また、SD(IGS)ラットに妊娠 15 日から生後 9 日までの間、EE を 0.02, 0.1, 0.5 ppm の濃度で混じった標準飼料（CRF-1, オリエンタル酵母社製）を摂取させた。生後 9 日目に児動物の一部を屠殺し、昨年度開発した方法で視床下部の性的二型核(SDN-POA)領域での遺伝子発現を解析した。解析遺伝子は、プロモーター領域に ERE を有し、予備的な検討によりこの時期のラット視床下部で発現が確認された GABA transporter type-1 (GAT-1), bcl-xL, GFAP とした。採取した脳をメタカーン固定・パラフィン包埋した後、レーザー光を用いた microdissection 法により SDN-POA 領域を採取し、その部位の total RNA を調製し、competitive RT-PCR を行い、プレートハイブリダイゼーション法により標的遺伝子の mRNA コピー数を求めた。残りの児動物はその後無処置のまま飼育し、性成熟後の生後 11 週に SDN-POA のサイズ計測及び内分泌関連器官（下垂体、甲状腺、副腎、乳腺、精巣、精巣上部、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膣）の病理組織学的検索を行った。

SDN-POA のサイズ計測は、ホルマリン固定・パラフィン包埋した脳から 27 µm おきに 3 µm 厚の連続切片を作製し、各個体ごとに 3 枚の代表切片における SDN-POA の面積を合計したものを求めた。

次に、代表的な EDCs 候補物質である genistein, diisononylphthalate (DINP), 4-nonylphenol, methoxychlor, bisphenol A 及び tamoxifen についての実験を進めた。曝露用量は予備試験の結果を基に、原則として母動物の摂餌量及び体重増加量、児動物の出生時体重及び体重増加量が減少する用量を最高用量とし、その 1/5 及び 1/50 の用量をそれぞれ中間用量、低用量とした。ただし tamoxifen については母動物の妊娠維持及び哺育への著しい影響が認められたため、児動物を得ることが可能な最大量を最高用量とした。実際の用量は genistein を 20, 200, 1000 ppm, DINP を 400, 4000, 20000 ppm, 4-

nonylphenol を 60, 600, 3000 ppm, methoxychlor を 24, 240, 1200 ppm, bisphenol A を 60, 600, 3000 ppm, tamoxifen を 0.005, 0.05, 0.25 ppm と設定し、SD(IGS)ラットに妊娠 15 日から出生後 10 日までの間、各濃度の化合物を飼料に混じて摂取させた。標準飼料中に含まれる phytoestrogen の影響を除くため、飼料には大豆及びアルファルファ由来のタンパクを含まない特殊飼料（オリエンタル酵母社製）を用いた。生後 10 日目に新生児視床下部の SDN-POA 領域における遺伝子発現（GAT-1, bcl-xL, GFAP）を解析する目的で一部の児動物を屠殺した。残りの児動物はその後無処置のまま飼育し、一部の児動物を性成熟前の生後 3 週に、残りの児動物については春期発動期（雌では膈開口、雄では包皮分離が確認される日）及び性周期を検索し、性成熟後の生後 11 週に解剖した。生後 11 週の雌の解剖は発情間期に行った。生後 3 週の児動物の内分泌関連器官については、器官重量測定を行い、必要に応じて病理組織学的検索を行った。生後 11 週時には、視床下部の SDN-POA のサイズ計測及び内分泌関連器官の病理組織学的検索を行った。

In vitro 評価研究の B-BB 評価系では、昨年度までに樹立に成功した不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)を、10%胎児ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグル培地に G418 存在下で継代し、Snapwell (直径 12mm, Costar 社) に 5×10^5 細胞を播種し、3 日間培養したものを in vitro B-BB モデルに用いた。このモデルにおける物質透過性の測定は、Snapwell を拡散チャンパーに装着し、次いで内皮細胞側（血管内腔側に相当）に細胞間隙のみを通過する [14 C]-L-glucose を添加した。その後、反対側のチャンパー（脳実質側に相当）に透過してくる [14 C]-L-glucose の量を、経時的に培地を少量採取し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することにより定量した。EDCs 候補物質の作用を検討するために、L-glucose を添加すると同時に estradiol または各種 EDCs 候補物質を添加し、L-glucose の透過量が変化するかどうか検討した。検索した被検

物質は、estradiol, testosterone, 4-nonylphenol, diisononylphtalate, flutamide, bis(2-ethylhexyl)ester, vinclozolin, methoxychlor, tamoxifen, bisphenol A, p-hydroxybenzoic acid n-butyl ester とした。濃度は、すべて 10^{-9} M にて検討した。

グリア評価系においては、ラット妊娠 17 日目の胎児より初代培養したグリア細胞に estradiol 10^{-7} M を 24 時間作用させ、作用させていないものとの遺伝子発現の違いを Clontech 社, Atlas Array を用いて解析した。

ニューロンの評価系に関して、胎仔期あるいは生後 2 日ないしは 11 日齢ラット海馬脳を摘出しババイン法により分散培養を行った。培養後、各種抗体による染色、RT-PCR 法による mRNA 量の定量、MTT 法による生存率の測定、HPLC によりグルタミン酸放出量の測定を行った。

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は混餌投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はすべてネンブタール深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。ニューロンやグリア培養系等の初代培養に用いる実験動物は利用規程に従って用い、In vitro B-BB モデル培養系は不死化した細胞を用いたため、倫理面についての問題はない。

C. 研究結果

In vivo 評価系においてまず、周産期の EE 曝露による出生児の雌ラットの生殖機能の検討として、Wistar 系ラットを用いた実験で 8 週齢の時点での性周期の回帰パターンを検索した。対照群の性周期は、発情期、発情前期、発情休止期第 1 日、第 2 日の正常な 4 日周期が確認された。EE 群については、発情期の日が 2 日連続するという、性周期回帰パターンの異常が観察された。性周期の異常を示す個体数は、EE 0.025ppm で 13 匹中 7 匹 (53.8%)、EE 0.0025ppm で 12 匹中 8 匹 (66.7%) であった。EB 群については連続発情を示した。雄ラットの性行動に対する影響は、EE 曝露群では、挿入及び射精の頻度には影響は見られなかったが、マウント頻度は有

意に上昇した。更に初回までのマウント、挿入までの時間については、EE 曝露群において短くなる傾向が観察された。EB 処置群のマウント頻度は変化なかったが、挿入頻度は有意に減少した。更に EB 群は射精まで至る個体が無かった。また、ラット 2,352 遺伝子を対象にした DNA microarray により、5 日齢のラット視床下部において雄で発現の高い遺伝子が 38 個、雌で発現の高い遺伝子が 41 個単離された。

次に、SD 系ラットを用いて EE の周産期曝露を受けた児動物の生後 9 日目の時点での SDN-POA 領域におけるエストロゲン応答性遺伝子発現の解析を行った。GAT-1 は、雄では 0.5 ppm で、雌では 0.02 ppm より用量依存的に発現量の低下を認めた。GFAP は、雄では 0.5 ppm で発現量の増加、雌では 0.1 ppm より発現量の減少を認めた。bcl-xL の発現量には明らかな変動を認めなかった。

生後 11 週時の検査では、雌の 0.5 ppm 群で卵巣重量の低下と下垂体重量の増加が認められた。病理組織学的には、雄では 0.02 ppm 群より副腎皮質束状帯の石灰化、0.1 ppm 群より下垂体中間葉の石灰化、0.5 ppm 群で副腎皮質束状帯細胞過形成、前立腺（背側葉）の軽度な萎縮、乳腺の腺房増生が認められた。雌では 0.1 ppm 群より多卵胞嚢胞、子宮内膜上皮の増生、0.5 ppm 群で子宮内膜上皮の増生及び扁平上皮化生、副腎皮質束状帯細胞の過形成、乳腺の腺房増生が認められた。なお雌では雄の投与群で認められた副腎皮質束状帯及び下垂体の石灰化が対照群を含む各群で認められた。SDN-POA のサイズを計測した結果、対照群では過去の文献報告の通り雄が雌に比べて大きな値を示した。EE 曝露群では雄の 0.5 ppm で神経核のサイズの減少が認められた。雌では EE 曝露の影響は認められなかった。

各 EDCs 候補物質を用いた動物実験は終了し、現在遺伝子発現解析及び病理組織学的検索を進めている。tamoxifen を除く各物質の高用量群では曝露期間中の母動物の体重増加量及び摂餌量、児動物の出生時体重の減少及び体重増加量

の減少が認められた。tamoxifen では高用量群で出生児数の減少が認められた。出生時の性分化の指標とされる生殖器-肛門間距離(AGD)にはすべての化学物質で明らかな変動は認められず、曝露期間終了後（出生後 10 日以降）の児動物の体重増加量は、おおむね対照群と同程度であった。

Methoxychlor に関しては、1200 ppm 群において、児動物の内分泌・生殖系への強い影響が認められた。同群では、生後 3 週時に精巣及び卵巣重量の低下が認められ、春期発動期は、雌では体重は対照群に比べて低値を示したにも関わらず、対照群に比べて平均で 2 日早められた。一方雄では春期発動期は平均で 2 日遅延した。生後 8 週から 10 週にかけて行った性周期検査では、対照群は正常な 4-5 日の周期を示したのに対して、1200 ppm 群では発情期が 3 日持続する個体や発情間期が 4 日以上持続する個体が認められ、不規則な性周期を示した。生後 11 週時の剖検では、卵巣重量の低下と子宮重量の増加が認められた。病理組織学的検索では、多卵胞嚢胞、子宮内膜上皮の増生が認められた。しかし、この時期での SDN-POA サイズは、雌雄とも対照群と投与群との間に明らかな差を認めなかった。

その他の EDCs 候補物質については、DINP 及び bisphenol A の高用量群で曝露期間中の体重の低下を反映したと考えられる精巣重量の減少が生後 3 週時に認められたが、生後 11 週時には精巣重量は対照群と同程度の値を示した。病理検査の終了した DINP については、最高用量群において精巣の stage XIV の精細管での分裂精子細胞の変性とセルトリ細胞の空胞化を認めている。春期発動期において、DINP、4-nonylphenol、bisphenol A については体重は対照群と比べて低値を示したが、春期発動の認められた日は対照群との間に差は認められなかった。

生後 11 週の剖検では、genistein の 200 及び 1000 ppm 群の雄、4-nonylphenol の 3000 ppm の雌で副腎相対重量の高値が認められた。その

他の臓器の重量には影響は認められなかった。

In vitro 評価系においては、まず estradiol を in vitro B-BB モデルに作用させ、L-glucose の透過性が変化するか否か検討した。10⁻⁹Mとなるように estradiol を添加し、経時的に L-glucose の透過量を測定したところ、estradiol 添加直後から、細胞間隙を通過する L-glucose の透過性が低下した。次いで、in vitro B-BB モデルにおける物質透過性に対する EDCs の影響を検索する目的で、方法に述べた EDCs 候補物質及び testosterone について、L-glucose の透過性を同様に検討した。その結果、示唆されているホルモン作用に関わらず、ほぼ全ての化学物質で透過性の低下が観察された。但し、4-nonylphenol を作用させたときのみ透過性が亢進し、他の物質と異なる効果が観察された。

グリア評価系では、グリア細胞の遺伝子発現を estradiol の有無で比較したところ、2 倍以上の変化が検出された遺伝子を表 1 に示した。特に estradiol により、myelin basic protein : 15 倍、myelin proteolipid protein : 7 倍、cationic amino acid transporter : 9 倍、と強く誘導されることが判明した。

ニューロンの評価系においては、胎生 19 日齢ラット海馬ニューロンを分散培養し、血清存在下で 1 日培養後、血清除去した 48 時間目で約 70% の細胞が細胞死を起こす条件下において、エストロゲンとして estradiol を添加した結果、10 nM で細胞死を抑制した。また、この時変動するニューロトロフィン遺伝子を RT-PCR 法を用いて検索した。その結果、BDNF の mRNA が estradiol によって正の制御を受けたが、NT-3、NGF は制御を受けなかった。更に、bisphenol A、4-nonylphenol について解析を行った結果、0.001 ng/ml から 1 µg/ml の範囲において、BDNF 及び NT-3 mRNA 量に影響を与えなかった。

また、発生段階によって estradiol による応答性に違いがあるかを検討するため、生後 11 日齢ラット海馬ニューロンを用いて上記と同様の実験を行った。なお、この条件下においては細胞

死は起こらなかった。また、estradiol を各濃度で添加し、24 時間後のニューロトロフィン mRNA 量を RT-PCR 法により定量を行った。その結果、NGF の発現上昇が 0.1 nM-1.0 nM で認められた。一方、BDNF 及び NT-3 は変動しなかった。更に、bisphenol A、4-nonylphenol について解析を行った結果、NGF、BDNF、NT-3 の全てにおいて mRNA の有意な変動は認められなかった。以上の結果は、EDCs が、estradiol とは異なり、ニューロトロフィンの発現に影響を与えないことを示唆している。

次にシナプス可塑性に対する影響を調べるために、培養ニューロンを脱分極刺激し、その時放出される神経伝達物質、グルタミン酸の量を測定した。生後 2 日齢の海馬ニューロンを分散培養し、10 nM estradiol 存在下で 5 日間血清入り培地で培養を行った。その後、5mM 4AP (4-aminopyridine) で 1 分間刺激し放出されるグルタミン酸量を測定した。その結果、estradiol 添加群は、対照群と比べ約 3 倍量のグルタミン酸を放出した。次に、細胞内のグルタミン酸合成酵素であるグルタミナーゼに着目し、グルタミナーゼの免疫組織染色を行った。その結果、estradiol 添加群では、神経細胞総数 (MAP2 陽性細胞数) は変動しなかったが、グルタミナーゼ陽性細胞数は約 2 倍に上昇した。また、グルタミナーゼ陽性細胞は、estradiol 添加群においてより強く染色されることから、グルタミナーゼの発現が細胞あたりでも多いと考えられる。以上のことから、estradiol がグルタミナーゼの発現を誘導し、細胞内のグルタミン酸量を増加させた結果、脱分極刺激によるグルタミン酸放出を増大させた可能性が考えられる。

また、早い時期での分化に対する影響を調べるため、胎生 17 日齢ラット海馬部位を培養した。この時期はまだ神経幹細胞 (Musashi 1 陽性細胞) が多く存在し、ニューロン (MAP2 陽性細胞) と混在している。この時、estradiol 添加により神経細胞への分化の促進する傾向が観察された。そこで、この現象をより明確にするため、胎生 14 日齢ラットから神経幹細胞のみを培養し、

分化誘導を観察する系を確立した。今後、この培養神経幹細胞に対する、estradiol の影響を調べていく予定である。

D. 考察

11 年度は *in vivo* 及び *in vitro* の両評価研究ともエストロゲン化合物を陽性対照として評価系の確立に努め、12 年度は個々の評価パラメーターの細部の検討と共に、確立できた評価系においては EDCs 候補物質の評価を開始した。*In vivo* 評価研究は脳の性分化過程及び性成熟後の生殖機能に与える影響を主眼として、視床下部・下垂体軸、生殖器系の機能とそれらの形態学的な評価を遂行している。11 年度から脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロゲンに反応する遺伝子群の発現解析を行っているが、12 年度は実際にそれらを実験系に導入して性成熟後の評価パラメーターとの比較を行い、総合的に評価系の確立に努めた。その成果の一つとして、新生期における脳の性分化関連遺伝子の網羅的探索を雌雄ラットの視床下部を対象にした DNA microarray により行った。昨年度は、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニュリン (grn) が脳の性分化誘導因子であること、更には grn が EDCs の標的分子である可能性の高いことなどを示している。今回新たに同定された遺伝子群も、grn 遺伝子と同様に EDCs の標的分子である可能性が高い。

また性周期及び性行動の解析においては、新生期のエストロゲン処置により、成熟後の雌ラットの性周期の回帰パターンの異常が観察された。EB 処置群では連続発情を示したが、これは新生期の大量のエストロゲン曝露による脳の性分化の異常により、ゴナドトロピンサージが起こらなくなった結果によるものと考えられている。更に EE 周産期曝露群で、発情期の日が 2 日連続するという、性周期回帰パターンの異常が観察された。この異常についても脳の性分化に障害を受けている可能性が高い。

雄ラットの性行動については、EE の周産期曝

露によりマウント頻度の上昇、初回までのマウント、挿入までの時間の短縮が観察された。このことは、EE 曝露により性行動に対する動機付けが高まったと解釈できる結果であり、性ステロイドへの感受性の変化が起こっている可能性が考えられる。

エストロゲンに反応する遺伝子の脳の性分化完了時期における発現検索に関しては、周産期に EE を曝露された児動物では、脳の性分化がほぼ完了する生後 9 日に SDN-POA を含む領域でのエストロゲン応答遺伝子の発現に変動が認められた。神経細胞に特異的な GAT-1 の発現量は雄では 0.5 ppm で、雌では低用量の 0.01 ppm より減少した。GAT-1 は成熟雌ラットでは性周期とともに発現量が変動し、血中エストロゲン濃度の上昇とともに発現量の上昇することが報告されているが、本実験の結果はそれとは逆方向への変化であった。GAT-1 の減少は、その神経細胞特異的な発現を考慮すると、神経細胞数の減少あるいは神経細胞における ER の down-regulation など、EE の神経細胞への影響を反映した可能性であると考えられる。実際に生後 11 週時に行った SDN-POA のサイズ計測では雄の 0.5 ppm 群で神経核サイズの減少が認められ、神経細胞数の減少を裏付ける結果が得られている。しかしながら、より低用量から GAT-1 発現量の減少が認められた雌では神経核のサイズへの影響は検出されなかったことから、今後、脳の性分化時期における神経細胞死の検討あるいは ER 発現量の検討などを行うことにより、GAT-1 発現量の減少の原因を明らかにするとともに、EE の周産期曝露による神経細胞への影響を評価する必要があると考えられた。GFAP 発現量は雄では 0.5 ppm で増加、雌では 0.1 ppm より減少を示した。GFAP はアストロサイトに特異的に発現し、GAT-1 と同様に成熟雌ラットでは性周期に依存して発現量の変動することが知られている。本実験では雌雄で変化の方向性が異なるものの GFAP 発現量の変動が認められたことから、神経細胞に加えてアストロサイトの数、あるいは機能にも EE 曝露による影響が示

唆された。抗アポトーシス遺伝子である bcl-xL については雌雄ともに変動は認められなかった。

EE 投与例の生後 11 週の検査では雄では 0.5 ppm 群で前立腺、副腎、乳腺に軽微であるが明確な EE の影響が認められた。雌では 0.1 ppm 群より卵巣、子宮に、0.5 ppm では副腎、乳腺に組織変化が認められた。これらの変化は、エストロゲン作用を示す化合物により誘発されることが報告されているものであった。なお雄では低用量より副腎皮質束状帯及び下垂体に石灰化が認められたが、雌では同様の変化が対照群を含む各群で認められた。本実験で用いた系統のラットで自然発生性に石灰化が起こるといふ報告はないが、雌での発現状況を考慮すると、本変化が EE により誘発されたとは断定することはできない。本変化については今後再現性の確認及び引き続き行われる実験の対照群における発現状況から、曝露との関連性を明らかにする必要がある。SDN-POA のサイズは雄では 0.5 ppm で減少し、雌では影響は認められなかった。エストロゲン作用による SDN-POA サイズへの影響については、雌のサイズが大きくなるという報告と、雄のサイズが小さくなるという報告がされている。SDN-POA サイズの雌雄差の原因として、一般的にはエストロゲン作用による神経細胞のアポトーシスの抑制が考えられているが、最近の文献ではエストロゲンは ER β を介してアポトーシスを促進する可能性があることが報告されている。本研究で認められた雄の SDN-POA サイズの減少は、EE のアポトーシス促進作用を反映している可能性が考えられるため、今後 SDN-POA の性分化時期におけるアポトーシスへの影響を評価することが重要であると考えられる。

EE 投与実験で、新生児期の視床下部における遺伝子発現の変動が認められた用量と性成熟後に内分泌関連器官に組織変化が認められた用量を比較すると、雄では副腎・下垂体の石灰化を除外した場合、0.5 ppm 群で明確な変化が認められた。雌では組織変化が 0.1 ppm より認められたのに対して遺伝子発現は 0.02 ppm でも変

動しており、遺伝子発現解析により高感度に EE の影響を検出できる可能性が見いだされた。特に雌では遺伝子発現が低用量より変動したのに対して、神経核のサイズは高用量でも変動しなかったことから、遺伝子発現解析は発達期脳への影響を鋭敏に検出できるパラメーターである可能性が考えられる。

各種 EDCs を用いた実験では methoxychlor の 1200 ppm 群で内分泌・生殖系への明らかな影響が認められた。同群では出生時には AGD に変化は認められなかったが、生後 3 週時には精巣及び卵巣が低重量を示し、春期発動期は雌では早期化、雄では遅延を認めた。春期発動期は視床下部-下垂体軸の支配を強く受けることから、methoxychlor の周産期曝露により視床下部あるいは下垂体が影響を受けている可能性が高いと考えられる。methoxychlor の 1200 ppm 群では性成熟後にも性周期の不規則性及び卵巣、子宮に組織変化が認められ、周産期曝露により内分泌・生殖系に不可逆的な影響の生じることが示された。

Methoxychlor 以外の EDCs については、母動物に対する最大耐量と考えられる用量を高用量とし、その 1/50 までの用量範囲で曝露したが、EE や methoxychlor でみられたような明らかな内分泌・生殖系への影響は認められていない。DINP 及び BA の最高用量群では生後 3 週時に精巣重量の低下が認められたが、春期発動期や生後 11 週時の器官重量に変化が認められていない。この変化は DINP や bisphenol A の高用量曝露による非特異的な発育遅延を反映したものである可能性が示唆された。また春期発動が観察される時期には、DINP、4-nonylphenol、bisphenol A では対照群と比べて体重は低値を示すにも関わらず、春期発動期には対照群との差が認められなかったことから、性的発育を支配する視床下部-下垂体軸は正常に機能しているものと考えられる。ただし、軽微ながらも DINP の最高用量群で 11 週目に精巣の組織変化を認めたことは、精巣の発達遅延を示唆する変化なのか、あるいは内分泌障害として捉えるべきかに

ついて更なる検索が必要と考えられる。

この他に生後 11 週時に genistein 及び DINP 曝露群で副腎重量の増加が認められた。副腎重量の増加は内分泌系への作用、あるいはストレスに対する反応を反映している可能性が考えられる。このような副腎、精巣の変化とともに、他の臓器についても現在組織学的検索を実施中であり、その結果をもって各化学物質の内分泌・生殖系への影響の有無を判断する予定である。それに加えて新生児期の視床下部における遺伝子発現解析及び生後 11 週時の SDN-POA のサイズ計測も実施中であり、それらの結果から総合的に EDCs による周産期曝露の影響を評価する予定である。

In vitro 評価研究に用いたモデルとして、独自に開発・確立した in vitro B-BB モデル、アストロサイトモデル、ニューロンの各種初代培養系が挙げられ、エストロゲン化合物を用いての EDCs の評価指標を絞り込んできている。In vitro B-BB 評価系に関して、ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られた t-BBEC-117 は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており、in vitro B-BB モデルに利用することができ、estradiol 及び各種 EDCs 候補物質を作用させたとき、ほぼすべての薬物で、即時的に L-glucose の透過性が低下した。これは、これら薬物が細胞内受容体を介して作用しているだけでなく、細胞膜上にある受容体（ないし類似作用を持つ蛋白質）を介して作用している可能性を示唆するものと考えられ、どのようなメカニズムによるものか、今後の検討課題と考えられた。4-nonylphenol のみ L-glucose の透過性を亢進させ、このアッセイ系では他の EDCs 候補物質と異なる作用を持っていることが推測された。今回使用した in vitro B-BB モデルを利用し、EDCs そのものの中樞神経への透過性を検討することも可能であり、今後行う予定である。

グリア評価系において estradiol の作用により、グリア細胞の一部の遺伝子発現を大きく変化させることが判明した。特に myelin basic protein, myelin proteolipid protein は、オリゴデンドロサイトに特異的な遺伝子である。今回実験に使

用した初代培養グリア細胞はアストロサイトを主体とする混合細胞系であったが、オリゴデンドロサイト前駆細胞がより多く含まれる発生時期の細胞を用いれば、mRNA の回収率が上がりノーザンブロットなどの定量性の高い方法で発現変化が検討できる可能性がある。これらの遺伝子発現を指標として EDCs のスクリーニングに応用できるかどうかは更に検討を要する。

培養中枢ニューロンの EDCs 検索系では、胎仔及び生後 2 週齢ラット海馬ニューロンを用いたニューロトロフィン mRNA 量の測定による評価系は、bisphenol A 及び 4-nonylphenol による変動が見られず再検討の必要があると考えられる。また、可塑性に対する影響にとりて、脱分極刺激によるグルタミン酸の放出が、estradiol によって増加し、その原因として、グルタミンナーゼの発現上昇による細胞内のグルタミン酸合成促進が関与する可能性を示した。この系においては、estradiol による効果が大きく、神経伝達物質の放出に関わる蛋白質なども含めウエスタンブロット等で測定することにより、更に多くの変動が見られる可能性があることから、評価系として有用である可能性が高い。また、今回観察されたグルタミンナーゼの発現上昇は、estradiol によるニューロンの成熟分化の促進効果を示している可能性もあり、今後グルタミンナーゼを指標にしたニューロンの分化についても検討していく予定である。また、神経幹細胞を用いての estradiol の影響もこれからの課題である。

E. 結論

EDCs の胎生期ないし乳児期曝露による内分泌機能中枢に与える影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの in vivo 評価研究と、神経中枢の個々の細胞機能単位を対象とした in vitro 評価研究を継続している。平成 11 年度は in vivo 及び in vitro の評価系ともエストロゲン化合物を用いて、その曝露条件の検討と各種検出系の確立に努めた。12 年度は、in vitro 評価系では、検出系の確立に伴い多数の検体をスクリーニングする系としての実験系の整備を図っ

てきた。その中で、培養中枢ニューロンの検索系では、ラット胎仔及び生後 2 週齢海馬ニューロンを用いた評価システムを構築したが、現在のところ、EDCs により変動が見られる現象は得られておらず再考の必要があると考えられる。また、分化に対する評価系として、グルタミンアーゼ蛋白質の誘導を指標に用いた系、及び神経幹細胞を用いた系を検討中である。In vitro B-BB 評価系においては、estradiol 及び各種 EDCs 候補物質は、即時的に作用して L-glucose の透過性が低下させたが、そのメカニズムについては今後の検討課題である。グリア評価系においては、アストロサイトを主体とする初代培養系を用いてエストロゲン作用の指標遺伝子を DNA microarray 探索したにも拘らず、オリゴデンドロサイト特異的な遺伝子発現を検出した。EDCs のスクリーニングには、培養系を工夫してオリゴデンドロサイト由来の遺伝子発現を感度よく検出できる系の確立を図る必要がある。

In vivo 評価系では、脳の性分化の過程に関与する遺伝子ないしは性分化の結果として発現変動する遺伝子を指標として、脳の性分化に対する影響評価に盛り込んでいるが、本研究で得られたエストロゲン応答性遺伝子の発現低下は、アポトーシスの亢進ないしは関与する ER subtype の発現変動のいずれかを示唆している可能性が高く、これらの検索はエストロゲン作用を示す EDCs による脳性分化障害の直接的な指標になりうると考えられた。本研究での部位特異的な定量的遺伝子発現解析にかかる多大な労力を考慮すると、アポトーシス関連遺伝子産物ないし ER subtype の免疫組織化学的な検出が実際的な方法として考慮すべきであると考えられた。また、エストロゲン作用による性成熟後の影響として性周期の異常が極低用量域から検出できたことは特記すべきことである。

現在、in vitro 及び in vivo 評価研究とも社会的な重要性をもとに代表的な化学物質を選定して検索を進めているが、最終年度は、検索を継続すると共に、得られた結果を総合的に解析し、EDCs の神経中枢での標的性と用いた検索法のスクリー

ニング系としての検出力を検証する。更に、in vivo 評価系で得られた結果をもとに、既に設定されている NOEL と内分泌中枢かく乱作用の NOEL を比較・検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamagishi, S., Yamada, M., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Ikeuchi, T., Hatanaka, H.: p38 Mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 276: 5129-5133 (2001)

Ishikawa, Y., Ikeuchi, T., Hatanaka, H.: Brain-derived neurotrophic factor accelerates nitric oxide donor-induced apoptosis of cultured cortical neurons. *J Neurochem* 75: 494-502 (2000)

Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo, K., Nakatsuka, D., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Miura, M., Tanaka, S., Koike, T., Hatanaka, H., Ikuta, K., Suzuki, M., Watanabe, Y.: Facilitatory roles of novel compounds designed from cyclopentenone prostaglandins on neurite outgrowth-promoting activities of nerve growth factor. *J Neurochem* 75: 1092-1102 (2000)

Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Hatanaka, H.: BIT/SHPS-1 enhances BDNF-promoted neuronal survival in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 75: 1502-1510 (2000)

Nishio, C., Yoshida, K., Nishiyama, K., Hatanaka, H., Yamada, M.: Involvement of cystatin C in oxidative stress-induced apoptosis of cultured rat CNS neurons. *Brain Res* 873: 252-262 (2000)

Yoneda, N., Yamamoto, M., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K.,

- Nakanishi, M., Tada, T., Miura, Y. and Kato, T.: Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. *Mol Brain Res* (in press).
- Yamamoto, M., Yoneda, N., Asai, K., Sobue, K., Tada, T., Fujita, Y., Katsuya, H., Fujita, M., Aihara, N., Mase, M., Yamada, K., Miura, Y. and T., K.: Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Mol Brain Res* (in press).
- Morikawa, M., Asai, K., Kokubo, M., Fujita, K., Yoneda, N., Yamamoto, N., Inoue, Y., Iida, J., Kishimoto, T., Kato, T.: Isolation and characterization of a new immortal rat astrocyte with a high expression of NGF mRNA. *Neurosci Res* 39: 205-212 (2001)
- Miyachi, T., Asai, K., Tsuiki, H., Mizuno, H., Yamamoto, N., Yokoi, T., Aoyama, M., Togari, H., Wada, Y., Miura, Y., Kato, T. Interleukin-1 β induces the expression of lipocortin 1 mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res* (in press).
- Kataoka, H., Miura, Y., Joh, T., Seno, K., Tada, T., Tamaoki, T., Nakabayashi, H., Kawaguchi, M., Asai, K., Kato, T. and Ito, M.: Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATF1. *Oncogene* 20: 869-873 (2001)
- Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., Asai, K., Kato, T.: Cyclic ADP-ribose as a potential second messenger for neuronal Ca²⁺ signaling. *J Neurochem* 76: 321-331 (2001)
- Fujita, M., Aihara, N., Yamamoto, M., Ueki, T., Asai, K., Tada, T., Kato, T., Yamada, K.: Regulation of rat hippocampal neural cadherin in the kainic acid induced seizures. *Neurosci Lett* 297: 13-16 (2001)
- Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T., Nakagawara, A.: Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett* 164: 51-60 (2001)
- Tsuiki, H., Asai, K., Yamamoto, M., Fujita, K., Inoue, Y., Kawai, Y., Tada, T., Moriyama, A., Wada, Y., Kato, T.: Cloning of a rat glia maturation factor-gamma (rGMFG) cDNA and expression of its mRNA and protein in rat organs. *J Biochem* 127: 517-523 (2000)
- Hotta, T., Asai, K., Fujita, K., Kato, T., Higashida, H.: Membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in rat cortical astrocytes in culture. *J Neurochem* 74: 669-675 (2000)
- Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M.: Methacarn fixation, a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab Invest* 80: 199-208 (2000)
- Uneyama, C., Shibutani, M., Nakagawa, K., Masutomi, N., Hirose, M.: Methacarn, a fixation tool for multipurpose gene expression analysis from paraffin-embedded tissue materials. *Current Topics in Biochem Res* (in press)
- Suzuki, M., Nishihara, M., et al.: Induction of granulin precursor gene expression by estrogen treatment in neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 297: 199-202 (2001)
- 鈴木正寿, 西原真杉ら: 脳の性分化誘導機構に関する分子生物学的解析-グラニューリン遺伝子の単

離とその機能-J Reprod Develop 46: j51-j57 (2001)

Suzuki, M., Nishihara, M., et al. : Granulin is a sex-steroid inducible gene in the hypothalamus and involved in sexual differentiation of the rat brain. J Reprod Develop 46 (sup): 51-52 (2000)

Suzuki, M., Nishihara, M., et al.: Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. Physiol Behav 68: 707-713 (2000)

西原真杉: 哺乳動物における脳の性分化誘導機構の分子生物学的解析-グラニューリン遺伝子の単離とその機能- 比較内分泌学会ニュース, 98: 25-29 (2000)

2. 学会発表

加藤康二郎, 間瀬光人, 相原徳孝, 真砂敦夫, 山田和雄, 山本直樹, 浅井清文, 加藤泰治: ラット脳凍結損傷モデルにおける, 脳浮腫と水チャンネル Aquaporin-4 の発現について, 第 3 回脳浮腫頭蓋内圧研究会 2000. 6. 24 東京

祖父江和哉, 山本直樹, 米田和広, 藤田義人, 稲垣雅昭, 津田喬子, 三浦 裕, 浅井清文, 勝屋弘忠, 加藤泰治: 血液脳関門における Aquaporin-4 の発現とウシ Aquaporin-4 cDNA のクローニング, 第 43 回日本神経化学学会大会 2000. 10. 18-20 金沢

山本直樹, 米田和広, 祖父江和哉, 藤田義人, 稲垣雅昭, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治: アストロサイトにおける Aquaporin-4 発現調節機構, 第 43 回日本神経化学学会大会 2000. 10. 18-20 金沢

間瀬光人, 山田和雄, 相原徳孝, 藤田政隆, 加藤

康二郎, 祖父江和哉, 藤田義人, 山本直樹, 浅井清文, 加藤泰治: 中枢神経系における水チャンネル (aquaporins) の機能: 脳浮腫治療への新しいアプローチの可能性, 第 59 回日本脳神経外科学会総会 2000. 10. 24-26 福岡

藤田政隆, 相原徳孝, 山本愛美, 浅井清文, 多田豊曠, 加藤泰治, 山田和雄: ラットカイニン酸誘発てんかんモデルでの海馬内における N-カドヘリンの動向, 第 59 回日本脳神経外科学会総会 2000. 10. 24-26 福岡

Asai, K., Hotta, T., Fujita, K., Kato, T., Higashida, H.: Membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in cultured rat cortical astrocytes. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting 2000.11.4-9. New Orleans, Louisiana, U.S.A.

山本直樹, 祖父江和哉, 米田和広, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治: 血液脳関門 (B-BB) における Aquaporin-4 発現調節機構, 第 23 回日本分子生物学会年会 2000.12.13-16 神戸

畝山智香子, 渋谷淳, 高橋則行, 豊田和弘, 仁保直子, 榎富直哉, 広瀬雅雄: メタカン固定パラフィン包埋組織切片からの遺伝子発現解析 (続報), 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 第 59 回日本癌学会総会記事: p 508 (3427), 10月, 2000

榎富直哉, 渋谷淳, 畝山智香子, 中川恵子, 阿部直子, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: エストラジオール周産期曝露による新生仔視床下部における遺伝子発現の変化及び性成熟後の内分泌関連器官への影響について, 第 17 回日本毒性病理学会, 淡路, 第 17 回日本毒性病理学会講演要旨集: p 23 (15), 1月, 2001

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

渋谷淳, 阿部直子, 畝山智香子, 中川恵子, 榎富直哉, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: メタカーン固定材料を用いた遺伝子産物の定量的発現解析及び遺伝子配列解析について, 第17回日本毒性病理学会, 淡路, 第17回日本毒性病理学会講演要旨集: p23(16), 1月, 2001

Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Abe, N., Takahashi, N., Nakagawa, K., Hirose, M.: Dose-response study of perinatally exposed ethinylestradiol on the expression of ERE-containing genes in the SDN-POA of neonatal rats. 40th Annual Meeting of Society of Toxicology (2001. 3)

Uneyama, C., Shibutani, M., Nakagawa, K., Masutomi, N., Takahashi, M., Hirose, M.: Methacarn, a fixation tool for multipurpose gene expression analysis from paraffin-embedded tissues. 40th Annual Meeting of Society of Toxicology (2001. 3)

鈴木正寿, 西原真杉ら: 新生ラット視床下部におけるグラニューリン前駆体遺伝子のエストロジェン処置による発現誘導, 第23回日本神経科学大会, 2000年9月, 横浜

鈴木正寿, 西原真杉ら: 脳の性分化誘導機構に関する分子生物学的解析-グラニューリン遺伝子の単離とその機能-, 第93回日本繁殖生物学会シンポジウム, 2000年10月, 神戸

鈴木正寿, 西原真杉ら: 新生ラット視床下部におけるグラニューリン前駆体遺伝子の性ステロイドによる発現誘導-内分泌かく乱化学物質の標的因子としての可能性-, 第3回日本内分泌攪乱化学物質学会, 2000年12月, 横浜

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
—培養中枢ニューロンに対する評価—

分担研究者 畠中 寛 大阪大学蛋白質研究所教授

研究要旨 内分泌攪乱化学物質の中枢神経系への作用を評価する目的で、ラット中枢ニューロンおよび神経幹細胞の培養系を確立した。これらの系を用いて、まず、コントロールとなるエストロゲンの影響について解析を行った。その結果、エストロゲンが胎仔期培養海馬ニューロンの血清除去による細胞死を抑制すること、そしてこの時、BDNF の mRNA 量を正に制御することを見いだした。一方、生後2週齢培養海馬ニューロンにおいては、NGF の mRNA 量を増大させることを観察した。さらにこの評価系を用い、内分泌攪乱化学物質の候補である Bisphenol A および 4-Nonylphenol について解析を行った結果、両物質とも BDNF および NGF mRNA 量に影響を与えなかった。また、我々は、シナプス可塑性および分化に対する影響を解析する系として、生後2日齢培養海馬ニューロンにおける、エストロゲンによるグルタミンナーゼの発現上昇、および神経伝達物質、グルタミン酸の放出促進効果を見いだした。さらに、培養神経幹細胞においては、エストロゲンが神経細胞への分化促進効果を持つ可能性を見いだした。

A. 研究目的

ラット胎仔および生後海馬培養ニューロンを用いて生存維持作用および遺伝子発現を指標とした内分泌攪乱化学物質の評価系を確立する。神経分化に対する影響を調べるための評価系として神経幹細胞の培養系を確立する。シナプス可塑性に対しての評価系として培養海馬ニューロンにおける神経伝達物質、グルタミン酸の放出測定系を確立する。

B. 研究方法

胎仔期あるいは生後2日ないしは11日齢ラット海馬脳を摘出しパピイン法により分散培養を行った。培養後、各種抗体による染色、RT-PCR 法による mRNA 量の定量、MTT 法による生存率の測定、HPLC によりグルタミン酸放出量の測定を行った。

（倫理面への配慮）

初代培養に用いる実験動物、ならびにその飼育等については実験動物使用規定に従って行っているため、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

胎生19日齢ラット海馬ニューロンを分散培養し、血清存在下で1日培養後、無血清培地に交換する。この血清除去後48時間において、約70%の細胞は細胞死を起した。この条件下において、エストロゲンとしてエストラジ

オールを添加した結果、10 nM で細胞死を抑制した。また、この時変動するニューロトロフィン遺伝子を RT-PCR 法を用いて検索を行った。その結果、BDNF の mRNA がエストラジオールによって正の制御を受けたが、NT-3、NGF は制御を受けなかった。さらに、Bisphenol A、4-Nonylphenol について解析を行った結果、0.001 ng/ml から 1 μg/ml の範囲において、BDNF および NT-3 mRNA 量に影響を与えなかった（図1）。

また、発生段階によってエストラジオールによる応答性に違いがあるかを検討するため、生後11日齢ラット海馬ニューロンを用いて上記と同様の実験を行った。なお、この条件下においては細胞死は起こらなかった。また、エストラジオールを各濃度で添加し、24時間後のニューロトロフィン mRNA 量を RT-PCR 法により定量を行った。その結果、NGF の発現上昇が 0.1 nM-1.0 nM で認められた。一方、BDNF および NT-3 においては変動は認められなかった。さらに、Bisphenol A、4-Nonylphenol について解析を行った結果、NGF、BDNF、NT-3 の全てにおいて mRNA の有意な変動は認められなかった（図2）。以上の結果は、内分泌攪乱化学物質が、エストラジオールとは異なり、ニューロトロフィンの発現に影響を与えないことを示唆している。

次にシナプス可塑性に対する影響を調べる

ために、培養ニューロンを脱分極刺激し、その時放出される神経伝達物質、グルタミン酸の量を測定した。生後 2 日齢の海馬ニューロンを分散培養し、10 nM エストラジオール存在下で 5 日間血清入り培地で培養を行った。その後、5mM 4AP (4-aminopyridine)で 1 分間刺激し放出されるグルタミン酸量を測定した。その結果、エストラジオール添加群は、対照群と比べ約 3 倍量のグルタミン酸を放出した (図 3)。次に、細胞内のグルタミン酸合成酵素であるグルタミナーゼに着目し、グルタミナーゼの免疫組織染色を行った。その結果、エストラジオール添加群では、神経細胞総数 (MAP2 陽性細胞数) は変動しなかったが、グルタミナーゼ陽性細胞数は約 2 倍に上昇した。また、グルタミナーゼ陽性細胞は、エストラジオール添加群においてより強く染色されることから、グルタミナーゼの発現が細胞あたりでも多いと考えられる (図 4)。以上のことから、エストラジオールがグルタミナーゼの発現を誘導し、細胞内のグルタミン酸量を増加させた結果、脱分極刺激によるグルタミン酸放出を増大させた可能性が考えられる。

また、早い時期での分化に対する影響を調べるため、胎生 17 日齢ラット海馬部位を培養した。この時期はまだ神経幹細胞 (Musashi 1 陽性細胞) が多く存在し、ニューロン (MAP2 陽性細胞) と混在している。この時、エストラジオール添加により神経細胞への分化が促進する傾向が観察された。そこで、この現象をより明確にするため、胎生 14 日齢ラットから神経幹細胞のみを培養し、分化誘導を観察する系を確立した。今後、この培養神経幹細胞に対する、エストラジオールの影響を調べていく予定である。

D. 考察

内分泌攪乱化学物質の中樞ニューロンに対する評価系を確立することは、緊急の課題であるが、国内外の研究者によってそのパラメーターを模索しているところである。今回我々が示した胎仔および生後 2 週齢ラット海馬ニューロンを用いたニューロトロフィン mRNA 量の測定による評価系は、内分泌攪乱化学物質による変動が見られず再検討の必要があると考えられる。また、可塑性に対する影響性として、脱分極刺激によるグルタミン酸の放出が、エストラジオールによって増加し、その原因として、グルタミナーゼの発現上昇による細胞内のグルタミン酸合成促進が関与す

る可能性を示した。この系においては、エストラジオールによる効果が大きく、神経伝達物質の放出に関わる蛋白質なども含めウエストンブロット等で測定することにより、さらに多くの変動が見られる可能性があることから、評価系として有用である可能性が高い。また、今回観察されたグルタミナーゼの発現上昇は、エストラジオールによるニューロンの成熟分化の促進効果を示している可能性もあり、今後グルタミナーゼを指標にしたニューロンの分化についても検討していく予定である。また、神経幹細胞を用いてのエストラジオールの影響もこれからの課題である。

E. 結論

ラット胎仔および生後 2 週齢海馬ニューロンを用いた評価系を示した。しかし現在のところ、内分泌攪乱化学物質により変動が見られる現象は得られておらず再考の必要があると考えられる。また、分化に対する評価系として、グルタミナーゼ蛋白質の誘導を指標に用いた系、および神経幹細胞を用いての系を検討中である。

F. 研究発表

1. S. Yamagishi, M. Yamada, Y. Ishikawa, T. Matsumoto, T. Ikeuchi, and H. Hatanaka, (2001) p38 Mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.*, 276, 5129-5133.
2. Y. Ishikawa, T. Ikeuchi, and H. Hatanaka (2000) Brain-derived neurotrophic factor accelerates nitric oxide donor-induced apoptosis of cultured cortical neurons. *J. Neurochem.*, 75, 494-502.
3. T. Satoh, K. Furuta, K. Tomokiyo, D. Nakatsuka, M. Tanikawa, M. Nakanishi, M. Miura, S. Tanaka, T. Koike, H. Hatanaka, K. Ikuta, M. Suzuki, and Y. Watanabe (2000) Facilitatory roles of novel compounds designed from cyclopentenone prostaglandins on neurite outgrowth-promoting activities of nerve growth factor. *J. Neurochem.*, 75, 1092-1102.
4. T. Araki, M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, and H. Hatanaka (2000) BIT/SHPS-1 enhances BDNF-promoted neuronal survival in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 75, 1502-1510.
5. C. Nishio, K. Yoshida, K. Nishiyama, H. Hatanaka, and M. Yamada (2000) Involvement of cystatin C in oxidative stress-induced apoptosis of cultured rat CNS neurons. *Brain*

Res., 873, 252-262

図 1

E19 ラット培養海馬ニューロンにおける ニューロトロフィン mRNA 量の変動

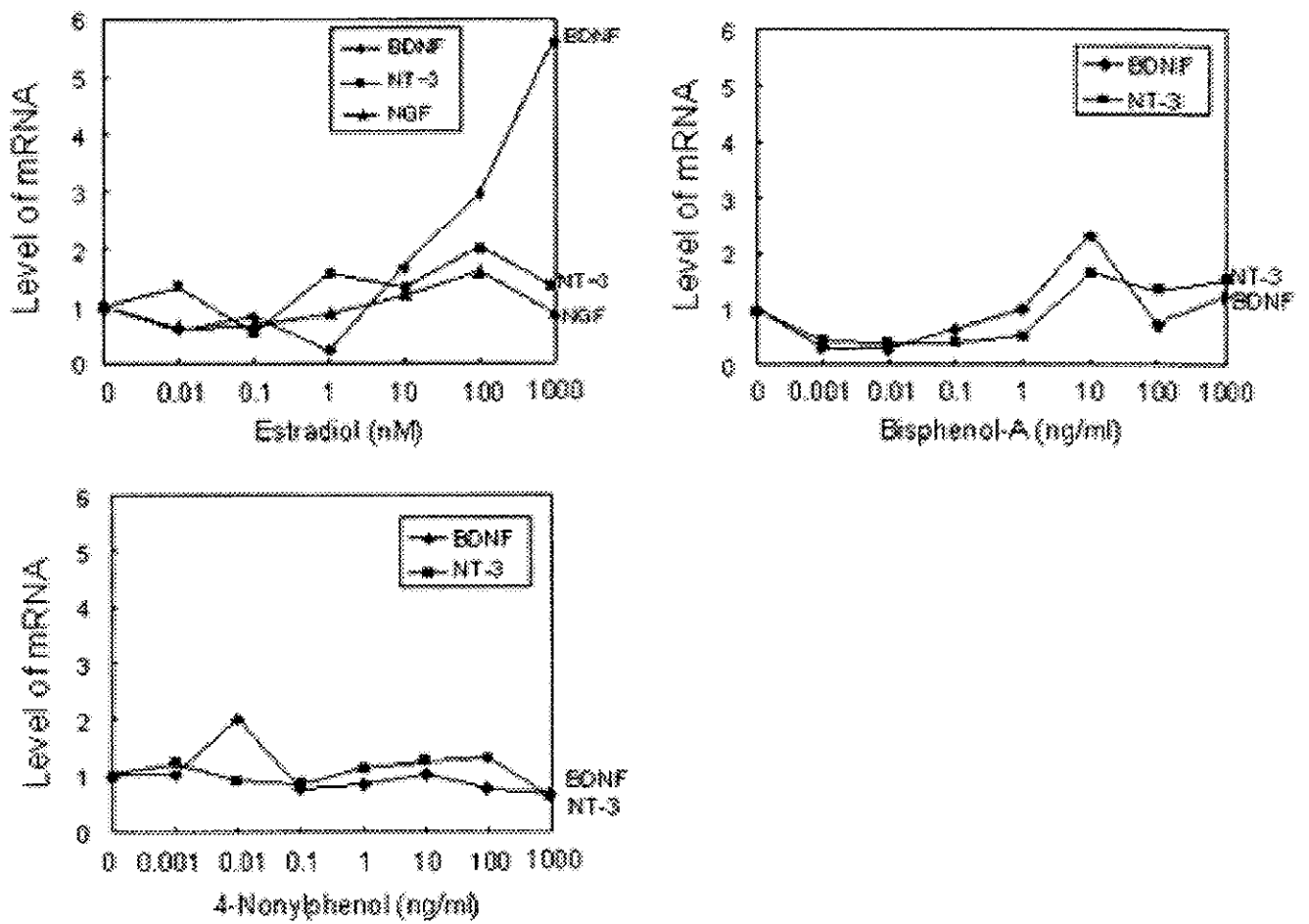


図 2

P11 ラット培養海馬ニューロンにおける ニューロトロフィン mRNA 量の変動

