

## 総括研究報告書

## 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

脳高次機能維持標本に関する研究では、海馬のスライス標本を神経連絡等の機能を維持した状態で培養した系を用いて検討を行なった。この海馬培養系におけるグルタミン酸誘発神経細胞死は $17\beta$ -エストラジオールおよびその類縁物質の処置により増悪された。この増悪作用は受容体遮断薬非感受性より核内エストロゲン受容体を介さないメカニズムによるものであると考えられた。分子生物学的手法によりヒト型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、ヒト型核内エストロゲン受容体の発現およびその活性化の確認に適したベクターを作製した。また、膜受容体であるヒト型アセチルコリン受容体を発現させ、この受容体がエストロゲン様化学物質の標的のとなることを示した。

## 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

## 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2年度にあたる本年度では、昨年度開発および基礎検討を行なった系を用いて、エストロゲン様化学物質のこれらの系に対する作用を調べることを主な目的とした。脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価に関するの研究では、培養海馬スライス標本におけるエストロゲン様化学物質のグルタミン酸毒性に対する影響を検討することを目的とした。分子生物学的手法によるヒト型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核内エストロゲン受容体発現およびその活性化の定量法、およびヒト型アセチルコリン受容体に対するエストロゲン様物質の影響を検討することを目的とした。

## 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、海馬スライスを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 $200\mu\text{m}$ 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、 $37^\circ\text{C}$ にて10日間培養した。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flurescein 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。

分子生物学的手法によるヒト型受容体異種細胞発現系に関する研究では、ヒト型受容体cDNAを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。核内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。ヒト型膜受容体としては代表的な神経伝達物質であるアセチルコリンのニコチン様受容体のcDNAを用い、上記と同様な方法によりRNA合成を行なった。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卵母細胞を除去した。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。 $18^\circ\text{C}$ 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匹の動物より多数の標本を作製すること

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

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では、培養海馬スライスを用いた初年度の検討において、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ている。このグルタミン酸曝露24時間前に $17\beta$ -エストラジオール (1 nM) を処置すると、誘発される神経細胞障害は増悪された。この増悪作用は類縁物質である $17\alpha$ -エチニルエストラジオール、ビスフェノールA、p-ノニルフェノール等 (1 nM) によっても観察された。この増悪作用は核内エストロゲン受容体遮断薬であるtamoxifenあるいはICI 182,780により阻害されなかった。

分子生物学的手法によるヒト型受容体異種細胞発現系に関する研究では、核内エストロゲン結合部位をP2X2受容体のcDNAの上流に組み込んだプラスミドを作製した。このプラスミドとヒト型核内エストロゲン受容体のcRNAを卵母細胞に注入し、 $17\beta$ -エストラジオール存在下で培養した場合、細胞外ATPの適用により内向き電流が惹起された。ヒト型アセチルコリン受容体を発現させた場合、この受容体を介するイオン電流は $17\beta$ -エストラジオール、ジエチルスチルベストール、ビスフェノールA等により抑制された。受容体のサブユニット構成を替えた場合、 $17\alpha$ -エチニルエストラジオールおよびp-ノニルフェノールの抑制作用に著明な変化が認められた。

### D. 考察

脳高次機能維持標本を用いた研究については、培養海馬スライスで観察される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を示すことが知られている。この神経細胞障害が低濃度の $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質で増悪されたことから、これらの化合物が生体内で同様の増悪作用を誘発する可能性が示唆された。また、この作用は核内エストロゲン受容体を介するも

のではないことが示された。現在、この増悪作用のメカニズムを明らかにするために、 $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質のグルタミン酸受容体あるいは神経細胞の形態に対する影響を検討中である。

分子生物学的手法によるヒト型受容体異種細胞発現系に関する研究については、 $17\beta$ -エストラジオール処置によりATP誘発電流が観察されたことから、アフリカツメガエル卵母細胞発現系はヒト型核内エストロゲン受容体を介する作用を評価する系として使用可能であることが示された。ヒト型アセチルコリン受容体については、この受容体に対してエストロゲン様物質の影響を受けたことから、このアセチルコリン受容体が近年注目されている細胞膜エストロゲン受容体の一種であることが示唆された。今後はサブユニット依存性等を検討することにより、人体のどの部位でこの影響が発現しうるか、という予測的考察等を加える予定である。

### E. 結論

本年度の研究により、本年度の研究により脳の生理的な高次機能を保持した系である培養海馬スライス標本において $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質が低濃度でグルタミン酸誘発神経細胞障害を増悪させること、およびアフリカツメガエル卵母細胞がヒト型核内エストロゲン受容体を介する作用を評価する系として利用可能であることが示された。また、ヒト型アセチルコリン受容体が細胞膜エストロゲン受容体の一種であることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K. Extracellular ATP reduces optically monitored electrical signals in hippocampal slices through metabolism to adenosine. *Eur. J. Pharmacol.* 399, 123-129 (2000)
- 2) K. Nakazawa, "Purinergic receptors", In: *Encyclopedia of Molecular Medicine* (T. Creighton ed.), John Wiley & Sons (in press)

3) 中澤憲一, “ATP受容体の構造と機能”,  
生体の科学52 (2) (印刷中)

4) K. Nakazawa, Y. Ohno, "EGFP-tagged P2X2  
receptor used for expression verification",  
European Journal of Pharmacology (submitted)

## 2. 学会発表

1) K. Sato, K. Nakazawa, N. Matsuki and Y. Ohno  
"The effect of estrogen and the related compounds  
on the neuronal survival in the organotypic  
hippocampal culture"  
30th Annual Meeting of Society for Neuroscience  
(2000) (北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄,  
“エストロゲン及びその類縁物質の中樞神経  
細胞生存に対する効果 - 培養海馬切片を用い  
た検討”  
第73回日本薬理学会年会 (2000)

3) 中澤憲一, 大野泰雄, “アフリカツメガエ  
ル卵母細胞発現系の毒性評価への応用”  
第14回日本動物実験代替法学会 (2000)

4) K. Nakazawa, Y. Ohno, R. A. North, A.  
Surprenant, "Amino acid substitutions which alter  
the calcium permeability of P2X2 receptors"  
Purines 2000: Biochemical, Pharmacological and  
Clinical Perspectives (2000)

## 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

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。この海馬培養系では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る。この神経細胞死は $17\beta$ -エストラジオールおよびその類縁物質の処置により増悪された。この増悪作用はエストロゲン受容体遮断薬により阻害されなかった。以上のことから、エストロゲン様化合物が核内エストロゲン受容体を介さないメカニズムで神経障害を増悪させる可能性が示された。

## 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2年度である本年度では、初年度で確立した海馬培養スライス標本を利用してエストロゲン様化合物の神経障害への影響を検討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 $200\mu\text{m}$ 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、 $37^\circ\text{C}$ にて10日間培養した。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

培養海馬スライスを用いた初年度の検討において、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ている。このグルタミン酸曝露24時間前に $17\beta$ -エストラジオー

ル( $1\text{nM}$ )を処置すると、誘発される神経細胞障害は増悪された。この増悪作用は類縁物質である $17\alpha$ -エチニルエストラジオール、ビスフェノールA、p-ニルフェノール等( $1\text{nM}$ )でも観察された。この増悪作用は核内エストロゲン受容体遮断薬である tamoxifen あるいは ICI 182,780 により阻害されなかった。

## D. 考察

培養海馬スライスで観察される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を示す。この神経細胞障害が低濃度の $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質で増悪されたことから、これらの化合物が生体内で同様の増悪作用を誘発する可能性が示唆された。また、この作用は核内エストロゲン受容体を介するものではないことが示された。現在、この増悪作用のメカニズムを明らかにするために、 $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質のグルタミン酸受容体あるいは神経細胞の形態に対する影響を検討中である。

## E. 結論

本年度の研究により脳の生理的な高次機能を保持した系である培養海馬スライス標本において $17\beta$ -エストラジオールおよび類縁物質が低濃度でグルタミン酸誘発神経細胞障害を増悪させることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K. Extracellular ATP reduces optically monitored electrical signals in hippocampal slices through metabolism to adenosine. Eur. J. Pharmacol. 399, 123-129 (2000)

### 2. 学会発表

1) K. Sato, K. Nakazawa, N. Matsuki and Y. Ohno  
"The effect of estrogen and the related compounds on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture"  
30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2000) (北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄,  
“エストロゲン及びその類縁物質の中樞神経細胞生存に対する効果 - 培養海馬切片を用いた検討”  
第73回日本薬理学会年会 (2000)

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## 分担研究報告書

## 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

各種エストロゲン様化学物質のヒトに対する影響を評価する目的で、ヒト型受容体を分子生物学的手法により異種細胞に発現させた系を用いた。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核内エストロゲン受容体発現に適したベクターの作製を行った。また、膜受容体であるヒト型アセチルコリン受容体を発現させ、この受容体がエストロゲン様化学物質の標的となることを示した。

## A. 研究目的

各種エストロゲン様化学物質のヒトへの影響を評価する系の開発を目的としヒト型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を加える。3年計画の2年度である本年度は、ヒト型核内エストロゲン受容体発現のためのベクターを作製し、さらにヒト型膜受容体がエストロゲン様物質の標的となる可能性を検索する。

## B. 研究方法

ヒト型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。核内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。ヒト型膜受容体としては代表的な神経伝達物質であるアセチルコリンのニコチン様受容体のcDNAを用い、上記と同様な方法によりRNA合成を行なった。

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)の標本を作製でき、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

核内エストロゲン結合部位をP2X2受容体のcDNAの上流に組み込み、さらにこれらの間に転写開始点となるTATAボックスを組み込んだ形のプラスミドを作製した。このプラスミドとヒト型核内エストロゲン受容体のcRNAを卵母細胞に注入し、17 $\beta$ -エストラジオール存在下で培養した場合、細胞外ATPの適用により内向き電流が惹起された。ヒト型アセチルコリン受容体を発現させた場合、この受容体を介するイオン電流は17 $\beta$ -エストラジオール、17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、ビスフェノールA、p-ニルフェノールにより抑制された。受容体のサブユニット構成を替えた場合、17 $\alpha$ -エチニルエストラジオールおよびp-ニルフェノールの抑制作用に著明な変化が認められた。

## D. 考察

17 $\beta$ -エストラジオールの処置によりATP誘発電流が観察されたことから、アフリカツメガエル卵母細胞発現系はヒト型核内エストロゲン受容体を介する作用を評価する系として使用可能であることが示された。この系の評価系としての有用性を高めるには、定量性

が今後の課題となると考えられる。定量性を高める方法のひとつとして光学的手法を現在検討中である。ヒト型アセチルコリン受容体については、この受容体に対してエストロゲン様物質の影響を受けたことから、このアセチルコリン受容体が近年注目されている細胞膜エストロゲン受容体の一種であることが示唆された。今後はサブユニット依存性等を検討することにより、人体のどの部位でこの影響が発現しうるか、という予測的考察を加える予定である。また、アセチルコリン受容体と相互作用を持つことが知られているヒト型細胞外ATP受容体への影響についての検討も計画している。

#### 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がヒト型核内エストロゲン受容体を介する作用を評価する系として利用可能であることが示され、ヒト型アセチルコリン受容体が細胞膜エストロゲン受容体の一種であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Nakazawa, "Purinergic receptors", In: Encyclopedia of Molecular Medicine (T. Creighton ed.), John Wiley & Sons (in press)
- 2) 中澤憲一, "ATP受容体の構造と機能", 生体の科学52 (2) (印刷中)
- 3) K. Nakazawa, Y. Ohno, "EGFP-tagged P2X2 receptor used for expression verification", European Journal of Pharmacology (submitted)

##### 2. 学会発表

- 1) 中澤憲一, 大野泰雄, "アフリカツメガエル卵母細胞発現系の毒性評価への応用" 第14回日本動物実験代替法学会 (2000)
- 2) K. Nakazawa, Y. Ohno, R. A. North, A. Surprenant, "Amino acid substitutions which

alter the calcium permeability of P2X2 receptors" Purines 2000: Biochemical, Pharmacological and Clinical Perspectives (2000)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

20000741

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「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」

**Extracellular ATP reduces optically monitored electrical signals in  
hippocampal slices through metabolism to adenosine.**

Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K.

Eur J Pharmacol 2000 Jul 7;399(2-3):123-9