

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

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

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成 14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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	----- 1
大野泰雄	

II. 分担研究報告

1. 脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究	----- 7
佐藤薫, 中澤憲一	

(資料 1) 部内研究報告	----- 11
(資料 2) 実習生研究報告	----- 16
(資料 3) 投稿中論文原稿	----- 46

2. 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	----- 81
---	----------

中澤憲一

(資料 1) 投稿中論文原稿	----- 85
(資料 2) 実習生研究報告	----- 99

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 134
---------------------	-----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

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、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。グルタミン酸による部位特異的な神経細胞死は 17β -エストラジオールおよびその類縁物質の処置により、エストロゲン受容体を介さない機序で増悪されるが、今回の研究で、この増悪作用がシナプス後神経のスパイン増加および NMDA 型グルタミン酸受容体の増加、およびシナプス前神経終末の数の増加によることが示された。また、 17β -エストラジオールは神経細胞だけではなく、脳内のグリア細胞にも影響し、グルタミン酸の取り込み阻害および分裂活性の増大を引き起こした。以上のことから、エストロゲン様化合物が神経終末を増加させることにより神経障害を増悪させる可能性、グリア細胞の活性に影響を与える可能性が示された。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、エストロゲン様化学物質の標的であるヒト型ニコチン様アセチルコリン受容体をアフリカツメガエル卵母細胞を発現させ、エストロゲン様化学物質の作用の特性を検討した。その結果、作用は受容体を構成するサブユニットに依存し、抑制が主作用であるが抑制／増強の両者が現われる場合があること、その作用はアセチルコリンの結合に対する競合的なものではないこと等が判明した。また、ヒト型 ATP 受容体で同様の試験を行ない、この受容体もエストロゲン様化学物質の標的となりうることを示した。

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3年度にあたる本年度では、昨年度見い出したエストロゲン様化学物質のこれらの系に対する作用の作用機序を調べるとともに、他の細胞あるいは機能分子に対する作用の比較検討を行ない、系の有用性を確認す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増悪作用の作用機序を検討し、さらにこれらの化学物質のグリア細胞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の作用機序を検討し、さらにこれらの物質のヒト型 ATP 受容体に対する影響を検討することを目的とした。

B. 研究方法

海馬スライスはい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 300 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℃にて 12 日間培養した。17 β -エストラジオールおよび類縁物質を 24 時間処置した後、シナプス前神経の形状を 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-

tetramethylindocarbocyanine perchlorate

(DiI) 染色、シナプス前神経終末の定量を亜鉛の N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide (TSQ) キレートによる発蛍光、NMDA 受容体を免疫組織化学により観察、定量化した。グリア細胞に対する作用を調べる実験では大脳皮質より得たアストロサイト初代培養を 17 β -エストラジオールおよび類縁物質で 24 時間処置した後、グルタミン酸取り込み能を調べた。さらに、細胞の生存を乳酸デヒドロゲナーゼ放出量、MTT 還元法、ヘマトキシリン染色により定量、分裂活性に対する作用を臭化デ

オキシウラシル取り込みに対する免疫染色により検討した。

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、ヒト型受容体を発現させる細胞として初年度に系を確立した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。ヒト型受容体としては古典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、および近年新たに神経伝達物質であることが広く認知された細胞外 ATP の P2X7 受容体を用いた。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 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に対する各種化合物の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

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。

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、昨年度までに培養海馬スライスにおける内因性活性物質グルタミン酸による部位選択的神経細胞障害を 17 β -エストラジオール (E2), 17 α -エチニルエストラジオール (EE), ジエチルスチルスベロール (DES), ビスフェノール A (BPA), p-ノニルフェノール (pNP; いずれも 1 nM) が増悪させることを示した。今年度の研究でこれらの化合物を同様の条件で培養海馬に処置したところ、後シナプス部の突起状の構造であるスパインの増加および NMDA 受容体の増加が認められた。また、前シナプスの指標である TSQ による蛍光の増加も認められた。初代培養アストロサイトを用いた実験では、E2, EE, DES により濃度依存的なグルタミン酸の取り込み阻害が認められた。MTT 法を始めとする 3 種類の方法を試みた結果、この取り込み阻害に際して生細胞数の減少は起こっていないことが確認された。E2 による取り込み阻害はエストロゲン受容体遮断薬である ICI182.781, および外液のナトリウムを除去することにより消失した。

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、ヒト型アセチルコリン受容体を

$\alpha 3 + \beta 4$ というサブユニットの組み合わせで発現させた場合、この受容体を介するイオン電流は E2, EE, DES, pNP17, 17α -エストラジオール (α E2), p-オクチルフェノール (pOP) により抑制された。受容体のサブユニット構成を $\alpha 4 + \beta 2$ に替えた場合、DES, BPA, pNP, pOP は抑制作用を示したが、E2, α E2 は抑制を示さなかった。また、このサブユニットの組み合わせにおいて EE は低濃度で抑制、高濃度で増強という 2 相性の作用を示した。抑制、増強のいずれの場合でもアセチルコリン受容体の濃度-作用曲線は平行移動せず最大値が変化した。サブユニットの組み合わせで作用が大きく変化した化合物についてサブユニット交換 ($\alpha 3 + \beta 2$, $\alpha 4 + \beta 4$) の影響を調べた結果、作用を決定するのは単独のサブユニットではないことが判明した。ヒト型 ATP 受容体 (P2X7) を発現させた場合、これを介するイオン電流は 17β -エストラジオールおよびビスフェノール A で抑制されたが、抑制の程度はアセチルコリン受容体で認められたものに比べて顕著ではなかった。

D. 考察

脳高次機能維持標本を用いた研究については、低濃度の 17β -エストラジオールおよび類縁物質が培養海馬

スライスのシナプス後神経のスパインおよび NMDA 受容体を増加させること、シナプス前神経終末を増加させることが示された。これらの変化はいずれも昨年度までに示された 17β -エストラジオールなどの化合物によるグルタミン酸誘発神経細胞障害増悪の機序となりうる。すなわち、これらの内分泌かく乱化学物質は海馬神経に形態変化を生じ、生体内の機能タンパク質の生合成／代謝に影響を与え、その結果障害を増悪させるという一連の機序が明らかにされたといえる。一方、グリア細胞である培養アストロサイトについてはエストロゲンのみがグルタミン酸取り込みを阻害した。この取り込み阻害は外液ナトリウムを除去すると認められなくなったことから、グルタミン酸トランスポーターに対する選択的な作用と考えられた。また、エストロゲン受容体遮断薬である ICI182.781 が阻害を抑制し、ゼノエストロゲンは阻害を示さない、という上記の神経細胞に対する影響とは異なった性質が見いだされた。このことは同じ脳内であっても神経細胞とグリア細胞に対しては内分泌かく乱物質の作用態度に差があることを示している。

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

については、エストロゲン様物質のヒト型アセチルコリン受容体に対する作用は受容体を構成するサブユニットに依存するが、これは単独のサブユニットに帰するものではなくサブユニットにより受容体が構成された後に現われる性質であると考えられた。作用態度は非競合的であり、アセチルコリンの結合に対して直接的に影響するものではないと推察される。ヒト型 ATP 受容体に対しては影響が認められたものの、アセチルコリン受容体に比べると顕著ではなかった。このことはエストロゲン様物質の作用はアセチルコリン受容体に対して選択的であることを示している。ATP 受容体がアセチルコリン受容体と構造が大きく異なることを考慮すると、アセチルコリン受容体と類似した構造を有する他の受容体（例えばグルタミン酸受容体、 γ -アミノ酪酸受容体）に対する影響の可能性も考えらる。

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低濃度の 17β -エストラジオールおよび類縁物質が惹起するグルタミン酸誘発神経細胞障害増悪がシナプス前後の両神経の形態変化および受容体タンパク質

の生合成／代謝への影響に起因すること、また、同じ脳内であってもグリア細胞に対する影響は神経細胞に対するものとは異なることが示された。また、ヒト型アセチルコリン受容体に対してエストロゲン様物質が非競合的抑制あるいは増強を惹起すること、この作用は ATP 受容体に対する作用に比べ選択的であることが示され、研究を通じてアフリカツメガエル卵母細胞がヒトに対する作用を予見するのに有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., A 72 kilodalton-heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in hippocampus. *Neuroscience* 109, 745-756 (2002)

2) Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K., Effects of 17β -estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology* (submitted).

3) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Modulation by estrogens and xenoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 430, 175-183 (2001)

4) 中澤憲一, “ATP 受容体の構造と機能”, *生体の科学* 52: 152-157 (2001)

5) Nakazawa, K. ATP receptors. In: "Encyclopedia of Molecular Medicine" (T. Creighton ed.), pp. 282-284, John Wiley & Sons (2001)

6) Nakazawa, K. Purinergic receptors. In: "Encyclopedia of Molecular Medicine" (T. Creighton ed.), pp. 2693-2695, John Wiley & Sons (2001)

7) Nakazawa, K., Ojima, H. and Ohno, Y. A Highly Conserved Tryptophane Residue Indispensable for Cloned Rat Neuronal P2X Receptor Activation. *Neurosci. Lett.* (2002), in press

8) Nakazawa, K., Sawa, H., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Yasuo Ohno. Size of Side-Chain at Channel Pore Mouth Affects Ca^{2+} Block of P2X2 Receptor. *Eur. J. Pharmacol.* (submitted)

2. 学会発表

1) 佐藤薫, 松木則夫, 中澤憲一, 大野泰雄, “培養アストロサイトのグルタミン酸取り込みに対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用”

第 75 回日本薬理学会年会 (2002.3)

2) 澤英明, 中澤憲一, 野沢玲子, 竹内幸一, 大野泰雄 “ATP 受容体チャネルの多価カチオン感受性” 第 75 回日本薬理学会総会 (2002. 3)

3) Nakazawa, K., Sawa, H., Ojima, H., and Y. Ohno, “Effects of amino acid substitution at external channel pore mouth on multivalent cation block of P2X2 receptor”

Purines 2000: Biochemical, Pharmacological and Clinical Perspectives (2002. 5)

4) 中澤憲一, 大野泰雄 “エストロゲン様物質のヒト型ニコチン様アセチルコリン受容体への影響” 第 106 回日本薬理学会関東部会 (発表予定)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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 17β -エストラジオールおよびその類縁物質の処置によりエストロゲン受容体を介さない機序で増悪される。今回の研究では、この増悪作用がシナプス後神経のスパイン増加および NMDA 型グルタミン酸受容体の増加、およびシナプス前神経終末の数の増加によることが示された。また、 17β -エストラジオールは神経細胞だけではなく、脳内のグリア細胞にも影響し、グルタミン酸の取り込み阻害および分裂活性の増大を引き起こした。これらの作用はビスフェノール A などのいわゆるゼノエストロゲン（xenoestrogen）には認められなかった。以上のことから、エストロゲン様化合物が神経終末を増加させることにより神経障害を増悪させる可能性、グリア細胞の活性に影響を与える可能性、神経細胞とグリア細胞に対する影響がエストロゲンとゼノエストロゲンとでは異な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3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2年度に見い出したエストロゲン様化合

物の神経障害への影響について作用機序を検討し、さらにグリア細胞に対する影響を検討した。

B. 研究方法

海馬スライスはい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 $300\mu\text{m}$ 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℃にて 12 日間培養した。17 β -エストラジオールおよび類縁物質を 24 時間処置した後、シナプス前神経の形状観察を 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-

tetramethylindocarbocyanine perchlorate

(DiI) 染色により行なった。シナプス前神経終末についてはこの部位に存在する亜鉛を N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide (TSQ) によりキレートし、その際に観察される蛍光を測定することにより数を定量化した。NMDA 受容体の免疫組織化学観察では、NR1 サブユニットのウサギ抗体を一次抗体とし、フルオロセイン標識した二次抗体で検出した。グリア細胞に対する作用を調べる実験ではグリア細胞の一種であるアストロサイトを脳皮質より取り出し、初代培養を行なった。この初代培養アストロサイトを 17 β -エストラジオールおよび類縁物質で 24 時間処置した後、培地にグルタミン酸を添加し、細胞外グルタミン酸の減少を経時的に測定した。また、細胞の生存を乳酸デヒドロゲナーゼ放出量、MTT 還元法、ヘマトキシリン染色により定量化した。分裂活性に対する作用は臭化デオキシウラシル (BrdU) で 24 時間処置後、抗 BrdU 抗体による免疫染色により検討した。

(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、グリア細胞の初代培養の調製では容量を小さくすることにより標本数を増やし使用動物数の減少に努めた。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。また、2 年度の検討において、このグルタミン酸曝露 24 時間前に 17 β -エストラジオール (E2)、17 α -エチニルエストラジオール (EE)、ジエチルスチルスベロール (DES)、ビスフェノール A (BPA)、p-ノニルフェノール (pNP; いずれも 1 nM) を処置すると細胞障害が増悪し、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 により阻害されないことを示している。これらの化合物を同様の条件で培養海馬に処置したところ、後シナプス部の突起状の構造であるスパインの増加および NMDA 受容体の増加

が認められた。また、TSQ による蛍光の増加が認められ、この蛍光は亜鉛のキレート剤である dithizone あるいは TPEN 処置により消失したことから、内在性の亜鉛を反映したものであることが示された。初代培養アストロサイトを用いた実験では、E2、EE、DES により濃度依存的なグルタミン酸の取り込み阻害が認められた。MTT 法を始めとする 3 種類の方法を試みた結果、この取り込み阻害に際して生細胞数の減少は起こっていないことが確認された。E2 による取り込み阻害はエストロゲン受容体遮断薬である ICI182.781、および外液のナトリウムを除去することにより消失した。

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 17β -エストラジオールおよび類縁物質で増悪することは、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を示唆している。今回の研究ではこれらの化合物が培養海馬スライスのシナプス後神経のスパインおよび NMDA 受容体を増加させること、シナプス前神経終末を

増加させることが示された。これらの変化はいずれも昨年度までに示された 17β -エストラジオールなどの化合物によるグルタミン酸誘発神経細胞障害増悪の機序となりうる。すなわち、これらの内分泌かく乱化学物質は海馬神経に形態変化を生じ、生体内の機能タンパク質の生合成／代謝に影響を与え、その結果障害を増悪させるという一連の機序が明らかにされたといえる。一方、グリア細胞である培養アストロサイトについてはエストロゲンのみがグルタミン酸取り込みを阻害した。この取り込み阻害は外液ナトリウムを除去すると認められなくなったことから、グルタミン酸トランスポーターに対する選択的な作用と考えられた。また、エストロゲン受容体遮断薬である ICI182.781 が阻害を抑制し、ゼノエストロゲンは阻害を示さない、という上記の神経細胞に対する影響とは異なった性質が見い出された。このことは同じ脳内であっても神経細胞とグリア細胞に対しては内分泌かく乱物質の作用態度に差があることを示している。このような細胞種の違いに着目して包括的に行なわれた研究はこれまでになく、脳への悪影響を考える上で重要な情報と考えられる。

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低濃度の 17 β -エストラジオールおよび類縁物質が惹起するグルタミン酸誘発神経細胞障害増悪がシナプス前後の両神経の形態変化および受容体タンパク質の生合成／代謝への影響に起因すること、また、同じ脳内であってもグリア細胞に対する影響は神経細胞に対するものとは異なることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., A 72 kilodalton-heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is

essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in hippocampus. Neuroscience 109, 745-756 (2002).

2) Sato, K., Norio Matsuki, Yasuo Ohno and Ken Nakazawa., Effects of 17 β -estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture. Neuroendocrinology (submitted).

2. 学会発表

1) 佐藤薫, 松木則夫, 中澤憲一, 大野泰雄, “培養アストロサイトのグルタミン酸取り込みに対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用”
第 75 回日本薬理学会年会 (2002.3)

G. 知的所有権の取得状況
なし

脳標本を利用した内分泌攪乱化学物質の

複合作用評価系に関する研究

—エストロゲン及びその関連物質の中枢神経系に及ぼす作用

1. エストロゲン及びその類縁物質の若上線維-CA3 錐体細胞シナプスに対する作用—培養海馬切片を用いた検討

<Introduction>

内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の中にはエストロゲン受容体（ERs）と相互作用するものが数多く存在しているが、中枢神経系に対するこれらの物質の作用はほとんどわかっていない。そこで、培養海馬切片を用いてエストロゲンとその類縁物質の中枢神経細胞に対する作用を比較検討したところ、グルタミン酸によって引き起こされる神経傷害のうち、CA3 野錐体細胞の傷害を ERs 以外のメカニズムを介して選択的に増悪することを見出した。そこで、CA3 野の入力系である若上線維（DG より投射）と CA3 野錐体細胞により形成されるシナプスに注目し、17 β -estradiol (E2) および bisphenol A (BPA) が後シナプス部位である CA3 野錐体細胞の spine density, NMDA 受容体の発現および前シナプス部位である若上線維の sprouting におよぼす影響について検討した。

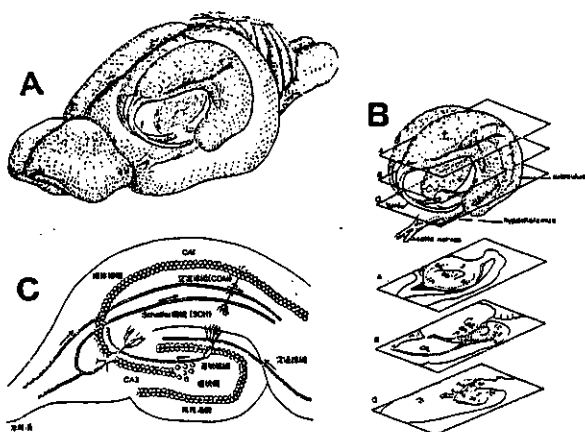
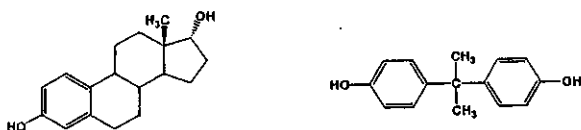


Fig. 1 海馬の位置 (A) と構造 (B)、神経回路 (C)

s: 海馬中隔端、t: 海馬側頭端、Cpu: 尾状核被殻、DG: 齒状回、S: 海馬支脚、f: 海馬果、EC: 嗅内皮質

Fig. 2 17 β -estradiol および bisphenol A の構造式

<Methods>

海馬切片培養

9 日令 Wistar 系ラット (日本 SLC) より全脳を素早く摘出し、95% O₂+5% CO₂ 混合ガスで飽和させた氷冷 Gey's balanced salt solution (GBSS) 中に約 3 分間静置した。充分脳を氷冷し、ステージに瞬間接着剤により正中面で固定し、マイクロスライサー (DTK 1500, 堂阪 EM) を用いて厚さ 300 μ m の嗅内皮質—海馬切片を作成した。ステージは混合ガスで通気した GBSS を満たし、周囲を氷水により氷冷した。スライシングには剃刀の刃 (フェザー剃刀 S 両刃) を用いた。作成したスライスは多孔テフロン膜 (millipore) (Millicell-CM) 上に静置し、それを培養用 6 穴プレート (Falcon) 内におき下部を培養液で満たした。5% CO₂ インキュベーター (37°C) で 1-2 週間培養し以後の実験に使用した。培養液の組成は Hank's balanced salt solution (HBSS): minimal essential medium (MEM, Gibco): donor horse serum (HS, ICN) = 1:2:1 の混合液とし、d-glucose 濃度を 6.5 mg/ml に増量し、antibiotics を添加して用いた。培養液の交換は 1 日ごとに行った。

培養に用いた試薬の組成は以下の通りである。

- GBSS (g/l)
 - NaCl 8.00, NaHCO₃ 0.35, KCl 0.40, KH₂PO₄ 0.06, MgCl₂·6H₂O 0.10, MgSO₄·7H₂O 0.1, NaH₂PO₄·12H₂O 0.12, CaCl₂·2H₂O 0.185
- HBSS (g/l)
 - NaCl 7.0, NaHCO₃ 2.27, d-glucose 6.5, KCl 0.37, KH₂PO₄, MgCl₂ 0.098, MgSO₄·7H₂O 0.14, Na₂HPO₄·12H₂O 0.286, CaCl₂·2H₂O 0.22

- MEM d-glucose を 12.0 g/l 添加
- HS 非動化して使用
- Antibiotics penicillin G 50 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml

E2, BPA 添加

培養 10 日目に E2 (Sigma) または BPA (ナカライ) を 1 nM 含む培地に交換し 37°C で 24 時間インキュベートした。

DiI 染色

形態学的観察のため、carbocyanin 系化合物である 1,1'-diodecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI/DiI C18 (3)) (Fig. 3) を用いて神経細胞を染色した。Carbocyanin 系化合物は carbocyanin 骨格を有する蛍光色素であり、細胞膜に挿入され膜の流動性に依存して細胞表面を受動拡散する両親媒性物質である。培養海馬切片の錐体細胞層内部に DiI 結晶を埋め込み、24 時間以上の拡散時間において共焦点レーザー走査システム (μ -radianse, BioRad) を用いて組織像を得、錐体細胞 apical dendrite と basal dendrite の proximal site の spine 数を計数し、spine density を算出した。

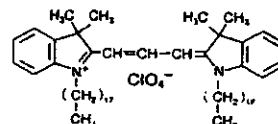


Fig. 3 DiI の構造式

免疫組織化学

培養 10 日目の海馬切片を 2ml の PBS で 5 分ごと 3 回洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB) 30 分処理により固定した。PBS で洗浄後、0.3% TritonX-100 in PBS 60 分処理を行い、10% HS in PBS で overnight blocking を行った。Rabbit polyclonal IgG to the C-terminus of NR1 (Upstate Biotechnology) (1:100 in PBS containing 10% Block Ace (大日本製薬)) で 8 時間インキュベートし、PBS 洗浄後、fluorescein-linked anti-rabbit IgG (1:50 in PBS containing 10% Block Ace) で 4 時間インキュベート後、共焦点レーザー走査システムを用いて組織像を得た。DiI との二重染色では抗体による染色後、DiI 結晶を埋め込み、共焦点レーザー走査システムを用いて組織像を得た。蛍光強度の測定は以下に行った。神経細胞層内に 10,000 μ m² の囲みを 5ヶ所もうけ蛍光強度を測定し、各蛍光強度からバックグラウンドを差し引き平均し、さらに 4 切片について平均した値を蛍光強度 (averaged pixel intensity) とした。

TSQ 染色

N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide (TSQ) は Zn²⁺ に対して 2:1 でキレートし、錯体の蛍光特性は励起波長 334 nm、蛍光波長 385 nm である。染色は Frederickson (1987) らの方法に若干の変更を加えて行った。培養 12 日目に海馬切片を 2 ml の HBSS で 1 回洗浄した。以後の操作はガラスシャーレ内で行った。8 ml の MeOH をテフロン膜の上下に加え室温で 10 分間処理した後、8 ml の acetone で 3 分間処理し、8 ml の PBS で 5 分ごと 3 回洗浄した (1 回目の洗浄時にテフロン膜を裏返した)。TSQ 溶液を 8 ml 加え、室温で 5 分間処理し、PBS で 5 分ごと 3 回洗浄後、テフロン膜から培養海馬切片を傷つけないように剥離した。染色像のイメージングには argus 50 (浜松ホトニクス) (Xenon lamp 装着) を用いた。なお、TSQ 溶液添加後の操作は遮光して行った。蛍光強度の測定は以下のように行った。イメージングソフト (Photoshop) (Adobe) を用いて stratum lucidum 上に 2500 μ m² の囲みを 3 カ所もうけ蛍光強度を測定し、各蛍光強度からバックグラウンドを差し引き平均し、さらに 5-15 切片について平均した値を蛍光強度 (averaged pixel intensity) とした。実験に使用した溶液は以下のように調整した。

- Barbital buffer (g/l)
 - CH₃COONa·3H₂O 19, barbital 29, (pH 10)
- TSQ 溶液 (92 μ M)
 - 沸騰させた EtOH 2 ml に TSQ 3.03 mg を溶かし、これを barbital buffer 100 ml に加えることで 92 μ M に用時調整した。

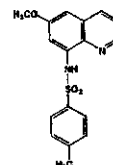


Fig. 4 TSQ の構造式

TSQ の Zn²⁺ 特異性の確認

培養 12 日目に海馬切片を 2 ml の HBSS で 1 回洗浄した。以後の操作はガラスシャーレ内で行った。10 μ M, 100 μ M, 1 mM の 1,5-diphenylthiocarbazon (dithizone) 溶液、及び N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethylenediamine (TPEN) 溶液を 8 ml, テフロン膜の上下に加え、室温で 30 分間処理した後、TSQ 染色を行った。

- dithizone 溶液
用時 MeOH で調整した。
- TPEN 溶液
dimethyl sulfoxide (DMSO) により 50 mM ストックを調整し、HBSS で希釈して使用した。

<Results>

1-1. 17 β -estradiol および bisphenol A の CA3 神経細胞 spine density に対する作用

spine は樹状突起上に後シナプス部として存在する突起状の構造物で 0.04-2 μ m 直径の head と 0.1-2 μ m の stem より構成されており、環境の変化によりダイナミックに数や形態が変化し、シナプス伝達や LTP, LTD といった神経活動依存的な過程で重要な役割を果たしている。そこで、

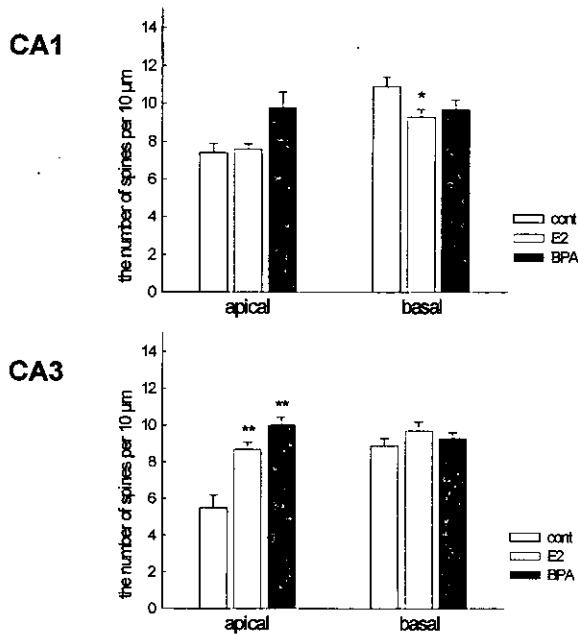


Fig. 5 17 β -estradiol and bisphenol A increased the spine density of the apical dendrites of CA3 pyramidal neurons
The number of Dil-labeled spines of the pyramidal neurons in cultured hippocampal slices were counted after the 24 hr-exposure to E2 (1 nM) and BPA (1 nM). These compounds specifically increased the spine density of apical dendrites of CA3 pyramidal neurons. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, N=8-16, Dunnett's test)

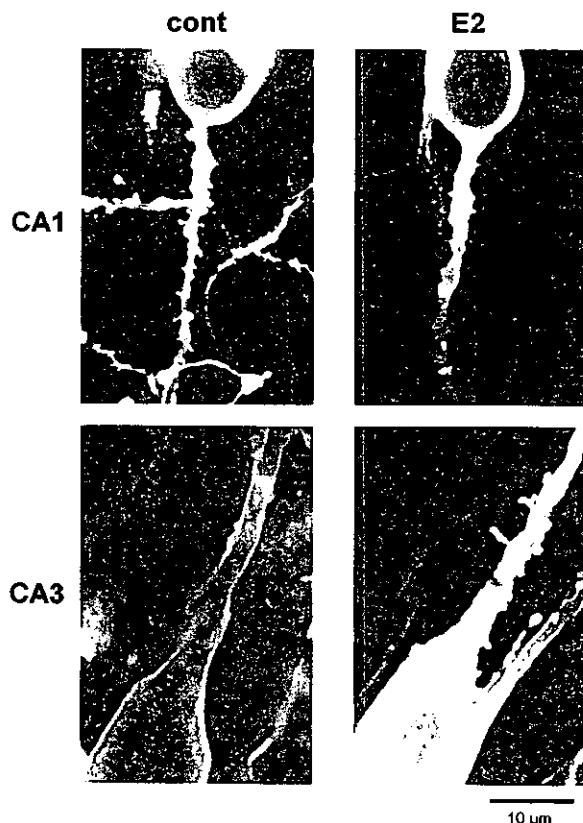


Fig. 6 Typical morphology of the apical dendrites of CA3 and CA1.

CA1 野, CA3 野の apical dendrite, basal dendrite の spine density に対する E2 および BPA の作用を定量し比較検討した。両薬物 (1 nM, 24 hr) により CA3 野錐体細胞 apical dendrite の spine density は選択的かつ有意に増加した (Fig. 5)。CA1 野, CA3 野の apical dendrite の典型的な spine を Fig. 6 に示す。

1-2. 17 β -estradiol および bisphenol A の NMDA 受容体発現に対する作用

NMDA 受容体はグルタミン酸毒性に深く関与する受容体であるが、最近、CA3 野の striatum lucidum には NMDA 受容体がほとんど発現していないことが報告された。そこで、NMDA 受容体のイオンチャンネル機能に必須といわれる NR1 subunit に対する抗体染色および抗体染色と Dil 染色の 2 重染色を用いて、CA3 野の NMDA 受容体発現に対する E2, BPA の作用について検討した。

Fig.7B に示すとおり、コントロール群では NMDAR1 の発現は全ての神経細胞層で観察され、CA1 野においてもっとも強いシグナルが観察された。E2 (1 nM, 24 hr) は CA3 野の NMDAR1 の発現を有意に上昇させた (152% of control, Fig. 7A and B)。CA1 野および DG においても有意な上昇が観察されたが CA3 野に比較してその差はわずかであった。さらに抗体と Dil による二重染色を行い CA1 野錐体細胞と CA3 野錐体細胞 apical dendrite における NMDAR1 の発現を検討したところ、E2 は確かに CA3 野錐体細胞 apical dendrite に NMDAR1 を誘導したことを確認した (Fig. 7C)。BPA 処理 (1 nM, 24 hr) によっても、同様の NMDAR1 の発現上昇が観察された (Fig. 5A)。

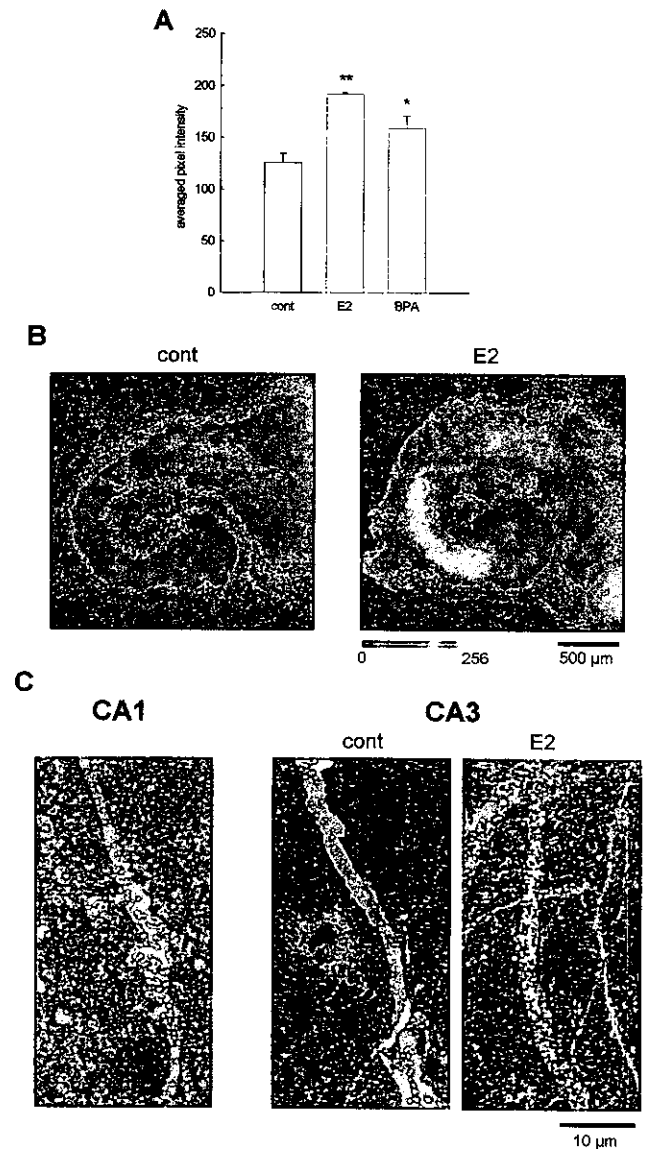


Fig. 7 17 β -estradiol and bisphenol A induced the expression of NMDA receptor in CA3 pyramidal neurons
The expression of NR1 in control slices and slices exposed to E2 (1 nM, 24hr) and BPA (1 nM, 24hr) was examined by immunostaining with NR1 specific polyclonal antibody.
A: These compounds significantly increased the expression of NR1 in CA3.
B: Typical fluorescent images of control slices and the slices exposed to E2.
C: E2 induced NR1 in the apical dendrites of CA3.
(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, N=4, Dunnett's test.)

1-3. 17 β -estradiol および bisphenol A の苔上線維終末に対する作用

今まで E2 および BPA の後シナプス部位に対する作用について検討してきたが、ここでは前シナプス部位に着目し、苔状線維終末に対する両薬物の作用について比較検討した。神経細胞内のフリーの Zn^{2+} 濃度は 1-50 nM であるのに対し、苔状線維終末のシナプス小胞は高濃度の Zn^{2+} を含んでいる(>1 mM)。そこで、 Zn^{2+} にキレートすると UV 励起により蛍光を発する Zn^{2+} キレーター、TSQ (Fig. 4) を用いて培養海馬切片における苔状線維終末の可視化法を確立し、苔上線維終末の sprouting に対する E2 および BPA の作用について比較検討した。

1-3-1. TSQ の亜鉛特異性の確認

蛍光を発しない Zn^{2+} キレーターである dithizone, TPEN により、内在性の Zn^{2+} をマスクした後に TSQ 染色を行い、TSQ の Zn^{2+} 特異性を確認した。Dithizone (1 mM), TPEN (1 mM) により TSQ 蛍光はほぼ消失した (Fig. 8)。両薬物処理後の典型的な TSQ 染色像もあわせて示す。

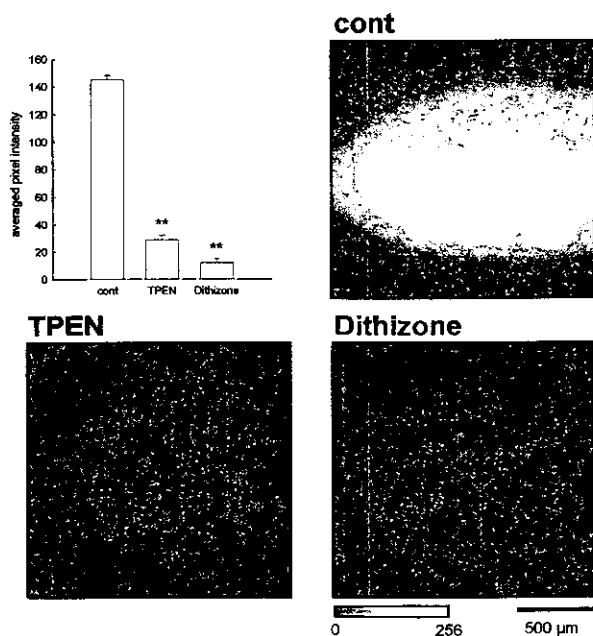


Fig. 8 TSQ emitted fluorescence by binding to Zn^{2+} in stratum lucidum of CA3 and hilus of DG
Treatment of slices with dithizone (1 mM) and TPEN (1 mM), another strong Zn^{2+} chelators, completely abolished the TSQ fluorescence. Typical images of the slices exposed to these compounds are also shown.

1-3-2. TSQ の苔上線維終末局在の確認

切片作成時に歯状回を切除して苔状線維を脱落させた培養海馬切片を用いて、TSQ 蛍光が苔状線維終末に局在しているかどうかについて確認した。control 群で観察された部位特異的な TSQ 蛍光は DG 切除切片では有意に減少した (Fig. 9A and B)。DG 切除が CA3 野錐体細胞の生存、形態に対し何ら影響を及ぼさないことを NeuroTrace 蛍光 Nissl 染色 (Fig. 9C), PI 染色 (data not shown) により確認した。

1-3-3. E2 および BPA の苔上線維終末に対する作用

E2 および BPA の苔状線維終末に対する作用を検討した。両薬物 (1 nM, 24hr) は苔状線維終末に特異的な TSQ 蛍光を有意に増強した (Fig. 10)。

<Discussion>

はじめに苔上線維—CA3 錐体細胞シナプスの後シナプス部位に対する E2 および BPA の作用を検討した。両薬物は 1 nM の濃度で CA3 野錐体細胞 apical dendrite の spine density を有意かつ領域特異的に増加させた。同じ実験条件下で両薬物は stratum lucidum を含む CA3 野に NMDA 受容体の発現を誘導した。また、前シナプス部位である苔上線維終末に対する両薬物の作用を検討するため、TSQ により培養海馬切片の苔上線維終末を可視化する系を確立した。TSQ 蛍光は dithizone, TPEN 前処置および DG 切除により消失したことから stratum lucidum に観察された蛍光は苔上線維終末の Zn^{2+} にキレートした TSQ が発していることが確認された。E2 および BPA は stratum lucidum の TSQ 蛍光強度を有意に増加した。この結果は両薬物が苔上線維終末の sprouting を促進したことを示している。BPA の ERs に対する affinity は E2 の約 1/1000 である。これまでの結果で E2, BPA の作用強度がほぼ等しかったことは、両薬物の作用トリガーが ERs ではない可能性を強く示唆している。TSQ 蛍光の増加が DG hilus においても観察されたことから、両薬物のターゲットが DG 顆粒細胞である可能性も考えられる。adult ラットにおいては E2 により CA1 野の spine density が増加するという報告が多い。今回の実験で E2 は CA1 野の spine density に何ら影響を与えなかった。生後数週間のラットでは E2

biding protein の E2 に対する affinity が adult よりも高く血液中の E2 濃度が非常に低く押さえられていること、今回実験に用いた切片は生後 9 日

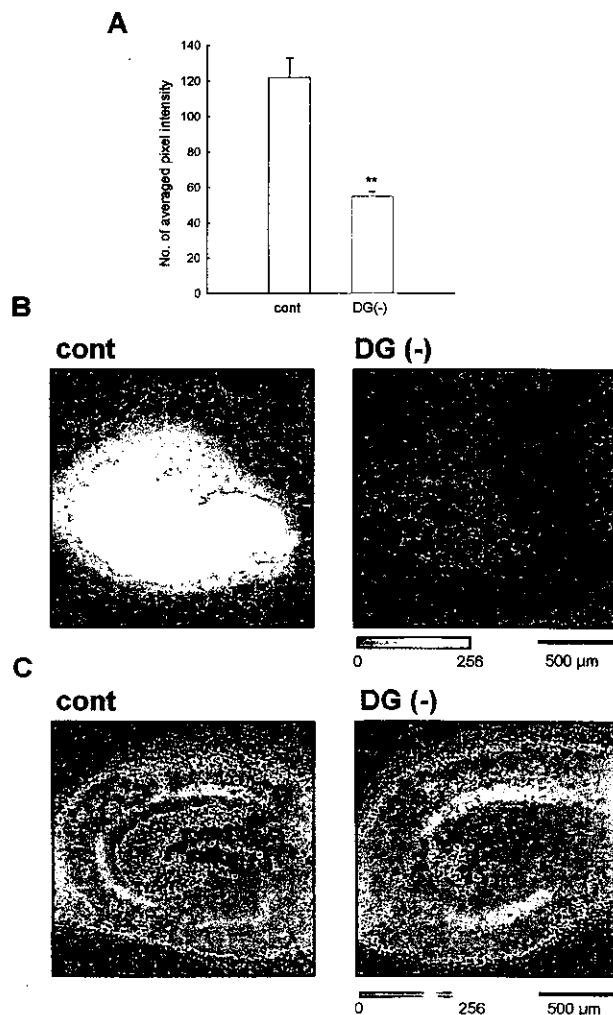


Fig. 9 Zn^{2+} -TSQ fluorescence in stratum lucidum of CA3 was located in the mossy fiber terminals

A: Region-specific Zn^{2+} -TSQ fluorescence disappeared in the slices cultured without DG.
B: Typical fluorescent images of the slices cultured without DG.
C: Dissection of DG had no effect on the survival of CA3 pyramidal neurons as shown by Fluorescent Nissl stain.
(**; $p < 0.01$ vs. control, $N=8$, Dunnett's test.)

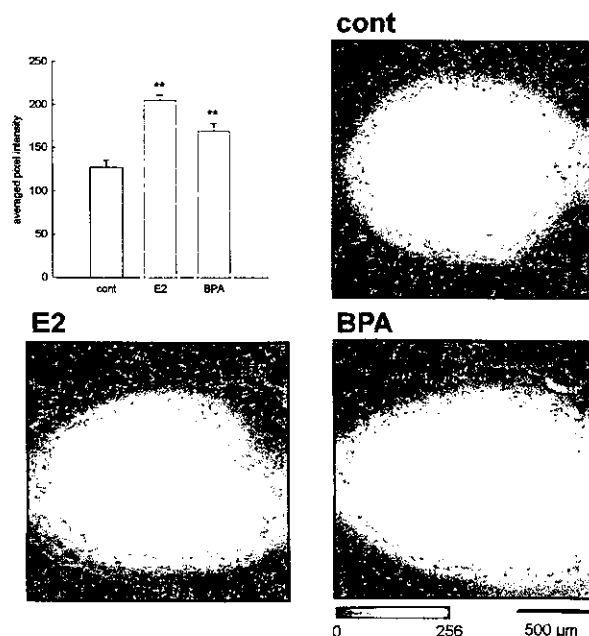


Fig. 10 17 β -estradiol and bisphenol A increased the region-specific Zn^{2+} -TSQ fluorescence.
E2 (1 nM) and BPA (1 nM) significantly increased Zn^{2+} -TSQ fluorescence in stratum lucidum of CA3 and hilus of DG. Typical images of the slices exposed to these compounds are also shown.

令ラットより作成したこと、培養に使用した血清にほとんど E2 が含まれていないことを考え合わせると、今回の結果は生後の脳発達時における作用と解釈できる。生後数週間の脳発達時と adult ではエストロゲンおよびその類縁物質が中枢神経に異なる影響を及ぼす可能性が考えられる。

2. 歯状回顆粒細胞およびアンモン角神経細胞の単離細胞を用いた検討

<Introduction>

1 ではエストロゲンおよびその類縁物質が苔状繊維—CA3 野錐体細胞シナプスに対し構造的な変化を引き起こす可能性が示された。切片培養系は *in vivo* を反映する良い実験モデルであるが、グリア細胞を多く含有している、培養液中の血清濃度が高い、等の問題により薬物のターゲットおよびメカニズムの解明といった詳細な検討は困難である。海馬内の神経細胞構築は周産期に形成される。そこで、海馬の神経構築が完成された生後ラットの歯状回顆粒細胞、およびアンモン角神経細胞（主に錐体細胞）の単離培養系をたちあげ、これらの培養神経細胞間で形成された機能的シナプスを FM1-43 で可視化することにより E2, BPA のシナプス形成に対する作用について検討した。

<Methods>

生後海馬神経の単離培養

3 日令 Wistar 系ラットを氷冷麻酔後、迅速に全脳を摘出し、95% O₂+5% CO₂ 混合ガスで飽和させた氷冷 GBSS 中で海馬体を摘出した。さらに海馬支脚複合体を切除し、アンモン角及び歯状回を慎重に摘出した (Fig. 11)。組織片をメスで粉砕し、0.25% trypsin (Difco), 0.01% deoxyribonuclease 1 (Sigma), 0.5% glucose を含有する PBS 2.1ml 中で 37°C 30 分間の酵素処理を行った。馬血清 (ICN biomedical) 1 ml を添加した後、1200 rpm で 5 分間遠心し上清を除去した。組織片を再び培養液 2 ml で満たし、内径 850 μm のプラスチック製チップで数回ピペティングし細胞を単離した。2 重のナイロン膜 (25 μm 径) で濾過し組織塊を除去した後、あらかじめ poly-L-lysine でコーティングした 48 穴プレート (Costar) に 50,000 cells/cm² の密度で播種した。培養液は播種より 24 時間は L-glutamine 73 μg/ml および 2% B-27 supplement (Life Technologies) を含有する Neurobasal (Life Technologies):astrocyte-conditioned medium (ACM)=1:1 を用い、それ以後は ACM を含まない同組成の Neurobasal に cytosine β-D-arabino-furanoside (AraC) (Sigma) を 2 μM の濃度で添加して使用した。

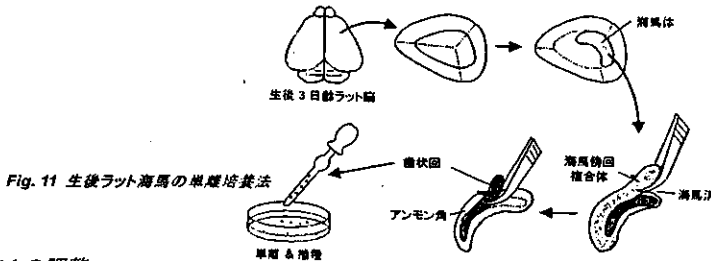


Fig. 11 生後ラット海馬の単離培養法

ACM の調整

3 日令 Wistar 系ラットより大脳皮質を摘出し、上記と同様の手法で細胞を単離した。75 ml 培養フラスコ (Costar) に 1,500,000 cells/cm² の密度で細胞を播種した。24 時間後培地交換し、培養 7 日目に培養フラスコを激しく振とうし、I 型アストロサイト以外の細胞を剥離した。さらにアストロサイトが石垣状になったことを確認してから 3 日間使用した培養液を 0.22 μm 径のフィルターで濾過し ACM を得た。なお、培養液は glucose 30 mM, glutamine 2 mM を含有した E-MEM (ニッスイ): FBS=9:1 を用いた。

E2, BPA 添加

培養 7 日目に E2 または BPA を含む培地に交換し 37°C で 24 時間インキュベートした。

FM1-43 蛍光染色

N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium dibromide (FM1-43) (Molecular Probe) (Fig. 12) はシナプス小胞のエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ蛍光を発する色素で、機能的シナプスを染色するために広く用いられている。培養 8 日目に培養液を HBSS 0.2 ml に置換し 1 時間安定化した後、さらに FM1-43 20 μM および KCl 40 ml を含有する HBSS 0.2 ml を加え 2 分間処理し、HBSS で 1 分間、β-cyclodextrin sulfobutyl ether 7 (ADVASEP-7) (CyDex) 1 mM を含む HBSS で 1 分間洗浄し、TTX 1 μM を含む HBSS 中で 37°C 30 分間インキュベート後、共焦点レーザー走査システム (μ-radiance, BioRad) を用いてイメージングを行った。得られた画像中の FM1-43 に由来する赤い蛍光斑点のうち、KCl 40 ml への曝露により消失するものを機能的シナプスと判断し、KCl 添加前と添加後の画像を画像処理ソフト (Photoshop, Adobe) を用いて減算し、これと透過像を重ね合わせた。1 群につき 8-16 視野を任意に選択し、領域内の蛍光斑点数および細胞数を計数し、1 神経細胞あたりの

機能的シナプス数を算出した。

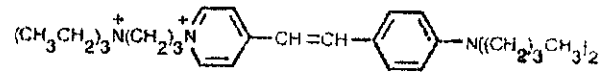


Fig. 12 FM1-43 の構造式

2 Br⁻

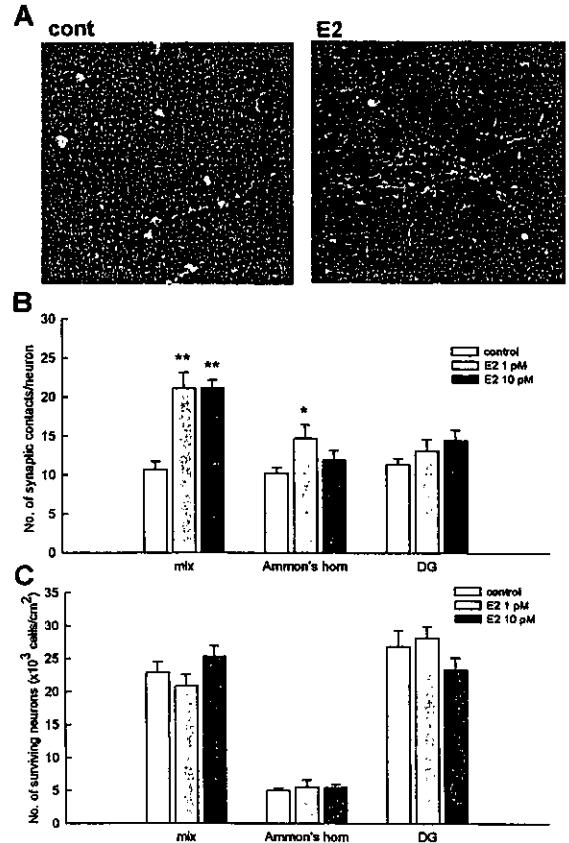


Fig. 13 Effects of 17β-estradiol on the synptogenesis and the survival of the hippocampal neurons.

The numbers of FM1-43-labeled synaptic contacts and the number of surviving cells were counted after the 24 hr-exposure to E2.

A: Typical images of FM1-43-labeled neurons of mixed neuron culture (left: control group, right: the group exposed to E2 (1 pM)).

B: E2 significantly increased the number of synaptic contacts in mixed neuron culture and Ammon's horn culture. The effect was stronger in mixed neuron culture than in Ammon's horn culture.

C: E2 did not affect the number of surviving cells in the three types of cultures.

(*: p<0.05, **: p<0.01 vs. control, N=8-16, Dunnet's test.)

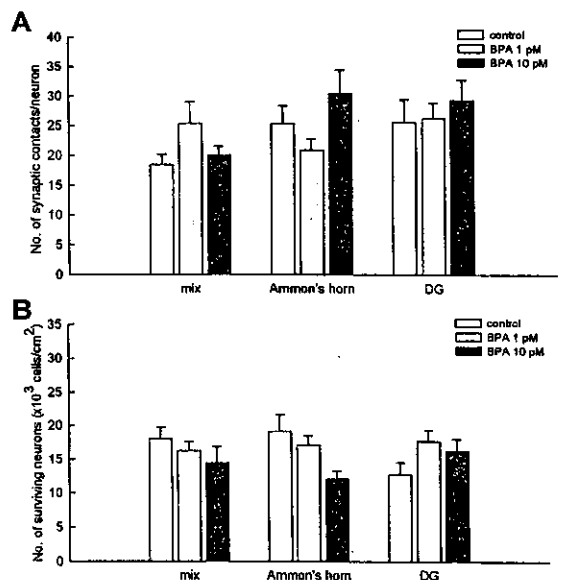


Fig. 14 Effects of bisphenol A on the synptogenesis and the survival of the hippocampal neurons.

The numbers of FM1-43-labeled synaptic contacts and the number of surviving cells were counted after the 24 hr-exposure to E2.

A: BPA tended to increase the number of synaptic contacts in mixed neuron culture and Ammon's horn culture.

B: E2 did not affect the number of surviving cells in three cultures.

<Results and discussion>

歯状回顆粒細胞、アンモン角神経細胞（錐体細胞）の混合培養 (mixed neuron culture) において、E2 1, 10 pM 24 時間処理によりシナプス形成が有意に促進された。アンモン角神経細胞のシナプス形成も促進されたが作用は 1pM でのみ観察され、混合培養よりも弱い作用であった。歯状回顆粒細胞のシナプス形成に対しては何ら作用を示さなかった (Fig. 13B)。この実験条件において、E2 は混合培養細胞、錐体細胞、歯状回顆粒細胞の生存細胞数には何ら影響を与えなかった (Fig. 13C)。混合培養の control 群、E2 1pM 投与群の典型的な FM1-43 染色像を Fig. 12A に示す。同様の実験を BPA についても行ったところ (1, 10 pM 24 時間処理)、1 pM の BPA は混合培養細胞のシナプス形成を促進する傾向が認められた (Fig. 14A)。この実験条件で生存細胞数には影響を与えなかった (Fig. 14B)。E2 と BPA が混合培養においてシナプス形成促進の方向に働くという切片培養と一致した結果が出ており、この実験系が薬物のターゲット、作用メカニズムの解明に有効であることが示された。また、E2 の作用が混合培養細胞においてもっとも強く、錐体細胞で弱い作用が観察され、歯状回顆粒細胞で全く作用が観察されなかったという今回の結果は錐体細胞由来のシナプス形成促進因子が放出されている可能性を強く示唆するものである。ただし、この培養系におけるアストロサイト含有率は未確認のため、アストロサイトの関与も今のところ否定できないので今後の課題としたい。BPA も混合培養細胞、錐体細胞に対してシナプス形成促進の傾向を示したが、ばらつきが大きかったので例数を上げる等の再検討が必要である。

(資料2)
謹呈 中澤 憲一先生

平成十三年度 卒業論文

エストロゲンおよびその類縁物質の脳皮質アストロサイトに対する作用

講座名	薬理学講座
担当教員	川島 紘一郎 教授
指導教員	大野 泰雄 先生 佐藤 薫 先生 (国立医薬品食品衛生研究所)

薬学科 B1998178 堀川 絵里

目次

要旨	3
使用薬物	4
第1章 目的	6
第2章 アストロサイトの L-glutamate 取り込み活性に対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用	7
実験方法	7
結果： 2-1 培養アストロサイトの L-glutamate 取り込み活性に対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用	9
2-2 エストロゲンおよびその類縁物質の培養アストロサイトの生存に対する作用	10
2-3 エストロゲンによる L-glutamate 取り込み阻害へのエストロゲン受容体の関与	10
2-4 エストロゲンによる L-glutamate 取り込み阻害への L-glutamate transporter の関与	10
考察	10
第3章 アストロサイトの分裂活性に対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用	13
実験方法	13
結果	13
考察	13
参考文献	15
図表	17
謝辞	30

要旨

<タイトル> エストロゲン及びその類縁物質の脳皮質アストロサイトに対する作用

<研究室名> 共立薬科大学薬理学講座 (外研先: 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部第2室)

<氏名> B1998178 堀川 絵里

<目的>

胎生期、新生期における内分泌攪乱物質への曝露が中枢神経系に深刻な悪影響を及ぼす可能性が危惧されている。内分泌攪乱物質の中にはエストロゲン様作用を示すものが数多く存在しており、エストロゲン及び内分泌攪乱物質の中枢神経に対する作用の解明が進んでいる。近年、グリア細胞の一つであるアストロサイトが、神経細胞の環境を一定に保持するだけでなく、神経細胞の生存維持や神経伝達に積極的に関わっていることが明らかになりつつある。しかし、現在までアストロサイトに対する内分泌攪乱物質の作用に注目した研究は行われていない。そこで本研究では、培養アストロサイトの L-glutamate (L-glu) 取り込み活性、および分裂活性に対する 17 β -estradiol (E2)、17 α -ethynylestradiol (EE)、diethylstilbestrol (DES)、*p*-nonylphenol (PNP)、bisphenol A (BPA)、17 α -estradiol (17 α) の作用を検討した。

<方法>

- ① L-glu 取り込み活性に対する作用: 単層石垣状になった初代培養アストロサイトを化合物で 24 時間処理後、培地に L-glu を 100 μ M の濃度で添加し、細胞外 L-glu 濃度を経時的に測定した。また Lactate dehydrogenase (LDH) release・MTT reduction 同時測定、ヘマトキシリン染色により細胞の生存を定量した。ERs 阻害薬 ICI182,780 (ICI) 存在下あるいは Na⁺ free 条件で L-glu 取り込みに対する E2 の作用を検討した。
- ② 分裂活性に対する作用: 再播種 3 日目に化合物で 24 時間処理、4 日目に BrdU 10 μ M で 24 時間処理し、抗 BrdU 免疫染色を行った。

<結果>

- ① E2、EE、DES は L-glu 取り込み活性を用量依存的に阻害した。他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。この時、細胞傷害や細胞数の減少が起こっていないことを LDH release、MTT reduction、生存細胞数測定により確認した。E2 による L-glu の取り込み阻害は ICI により完全に抑制された。Na⁺ free 条件で L-glu transporter を止めると E2 の作用は完全に消失した。
- ② E2 と EE は BrdU 陽性細胞の含有率を上昇させる傾向を示したが、他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。

<考察>

本研究により E2、EE、DES がアストロサイトの L-glu 取り込み活性を阻害すること、また、そのメカニズムとして ERs を介した L-glu transporter の阻害が関与することが示唆された。現在までエストロゲンによる L-glu transporter の調節については報告がなく、新規の作用と考えられる。分裂活性の検討では control 群の BrdU 陽性細胞含有率が 10%に満たず、各化合物の作用の検出が困難であったと推察される。