

○ 使用薬物

• Eagle's minimal essential medium (EMEM)	日水製薬株式会社
• penicillin G potassium	明治製菓株式会社
• streptomycin sulfate	明治製菓株式会社
• sodium pyruvate	Wako (和光特級)
• trypsin 250	Difco
• fetal bovine serum (FBS)	Gibco
• donor horse serum (gelding) (HS)	C-C Biotech Corporation
• leibovitz's L-15 medium (L-15)	Gibco
• 17 β -estradiol (E2)	SIGMA
• 17 α -ethynylestradiol (EE)	SIGMA
• diethylstilbestrol (DES)	SIGMA
• <i>p</i> -nonylphenol (PNP)	ナカライテクス株式会社
• bisphenol A (BPA)	ナカライテクス株式会社
• 17 α -estradiol (17 α)	SIGMA
• lactic acid (lithium salt)	SIGMA
• β -nicotinamide adenine dinucleotide (β NAD)	SIGMA
• glutamate dehydrogenase (GDH)	オリエンタル酵母工業株式会社
• 1-methoxy-5-methyl-phenazinium methyl sulfate (MPMS)	SIGMA
• 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA
• polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (Triton-X100)	Wako (化学用)
• tris [hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride (Tris-HCl)	SIGMA
• sodium dodecyl sulfate (SDS)	Wako (和光一級)
• <i>p</i> -formaldehyde (PFA)	Wako (組織固定用)
• カラッチ ヘマトキシリン 核染色用	武藤化学株式会社
• 5-bromo-2-deoxy uridine (BrdU)	Wako (生化学用)
• mouse anti-BrdU 抗体	Roche
• 過酸化水素	Wako (精密分析用・30%)
• Vectastain ABC kit (mouse IgG)	Vectastain
• 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB)	和光純薬工業株式会社／同仁化学研究所
• Block Ace	大日本製薬・雪印

- rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体
CHEMICON International
- alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG
Molecular Probes
- 2- [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)
和光純薬工業株式会社／同仁化学研究所
- ICI 182,780 (ICI)
TOCRIS

その他の試薬は全て市販の特級試薬を用いた。

第1章 目的

米国五大湖周辺で PCB 汚染魚を食料としている子供の知能指数の低下、メキシコで農薬に曝露された子供の運動協調性悪化や記憶障害が報告され、胎生期、新生期での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するが、中枢神経系においてエストロゲンが極めて多様な作用を持つことが明らかになってきている。すなわち、エストロゲン受容体 (ERs) に結合して遺伝子の発現を促すといういわゆる genomic なメカニズムを介して、また ERs 以外の新規のメカニズムを介して、神経細胞の形態変化、神経機能の調節をエストロゲンが担っていることがわかってきた。よって、内分泌攪乱物質も従来の予想を遥かに越え多様な影響を及ぼす可能性があるとして、中枢神経系に対する影響の解明が開始されている。

グリア細胞の一つであるアストロサイトは、神経細胞の環境を一定に保持するだけでなく、神経細胞の生存や神経伝達の調節に積極的に関わっていることが明らかになりつつある【13】。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を用いて L-glutamate (L-glu) 取り込み活性および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の検討を行った。本実験で使用したエストロゲンおよびその類縁物質は、 17β -estradiol (E2)、 17α -ethynylestradiol (EE)、diethylstilbestrol (DES)、*p*-nonylphenol (PNP)、bisphenol A (BPA)、 17α -estradiol (17α)である。EE は経口避妊薬、DES は 1940 年代から 1970 年代に流産防止の為に用いられた合成エストロゲンである。PNP は界面活性剤の分解性分で樹脂添加物として用いられている。BPA は樹脂の酸化防止剤、難燃剤の原料、歯科充填剤、塩化ビニル安定剤、缶詰のコーティング等に用いられている。いずれも身近な内分泌攪乱物質である。

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

方法

大脳皮質アストロサイトの単離と培養

氷冷麻酔下、新生2日齢の Wistar 系ラット（日本 SLC 社）の脳を無菌的に摘出した。氷冷した L-15 培地中（pH 7.4）、実体顕微鏡下で大脳皮質領域を切り取った。摘出した大脳皮質をメスで細断し、0.25%トリプシン（Difco）、0.01% DNase type I（Sigma）の酵素液とともに 37℃の恒温水槽内で40分間インキュベートし、酵素処理を行った。1 mL の fetal bovine serum (FBS) (Gibco)を加え 1200 rpm で5分間遠心して組織片を分離した。上清を除去した後、10% FBS 含有 modified Eagle's minimal essential medium (EMEM) を5 mL 加え、10 mL ピペットで20回ピペッティングして細胞を分散させ、2枚重ねのナイロンフィルター（40~45 μm ）で濾過して単離細胞浮遊液を得た。単離細胞浮遊液は10% FBS 含有 modified EMEM で20倍希釈し、底面積 75 cm^2 のプラスチックフラスコ（Corning）に播種して、37℃、5% CO_2 -95% air の条件下で培養した。播種1日後に10% FBS 含有 modified EMEM で全量培地交換を行い、以後3~4日毎に培地交換しアストロサイトが単層石垣状（confluent）になるまで10日から15日間培養を続けた。アストロサイトがフラスコ底面に confluent になった後、フラスコを振とうしアストロサイト以外の細胞を除去し、再び confluent になるまで培養した。リン酸緩衝液（PBS）に溶解した 0.1% trypsin-1 mM EDTA の酵素液（Gibco）2.5 mL で10分間、37℃でインキュベートし酵素処理を行うことによりアストロサイトを剥離し等量の10% FBS 含有 modified EMEM を加え、1200 rpm で5分間遠心して得た細胞分画に再び10% FBS 含有 modified EMEM を5 mL 加え、20回ピペッティングして細胞を分散させた。得られた単離細胞浮遊液は10% FBS 含有 modified EMEM で希釈し、96 well プレートに $4\sim6 \times 10^4$ cells/ cm^2 の密度で再播種し、37℃、5% CO_2 -95% air の条件下で培養した。再び confluent になった後、10% donor horse serum (gelding) (HS) (C-C Biotech Corporation) 含有 modified EMEM に交換し、7日間培養した。

なお、アストロサイト以外の細胞の混入がないことを確認するため、抗 GFAP 抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、95%以上の細胞が GFAP 陽性であった（図3）。

- modified EMEM の組成 (g/L) : Eagle's MEM 9.4, D-glucose 4.4, penicillin G potassium 0.054, streptomycin sulfate 0.090, L-glutamine 0.294, NaHCO_3 2.2, sodium pyruvate 0.110

化合物の投与法

各化合物は modified EMEM を用いて E2、EE、DES、PNP、17 α は 1 mM、BPA は 100 μM の stock solution を調整した。これらの stock solution を用時使用濃度に希釈し全量培地交換し、24時間インキュベートした。ERs 阻害薬である ICI182,780 (ICI) は ethanol を用いて 10 mM の

stock solution を調製し、用時 modified EMEM により使用濃度に希釈し E2 と共添加した。

L-glutamate 取り込み活性の測定

阿部らの方法に従い、アストロサイトの *L*-glu 取り込み活性を評価した【3】。各化合物で 24 時間処理し、*L*-glu を 100 μ M の濃度で添加し、37℃ 5% CO₂-95% air 条件下で 30 分、60 分、120 分、240 分間インキュベート後、各 well から 50 μ L の培地を 96 well プレートに分取した。分取した培地に 50 μ L の substrate mixture 1 を加え、37℃ 5% CO₂-95% air 条件下で 20 分間インキュベートし、stop solution 100 μ L を加え反応を終了した。96 well プレートはマイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad) で吸光度を測定した。入射光波長は 570 nm、測定波長は 670 nm とした。既知の濃度の *L*-glu 希釈系列により検量線を引き、細胞外 *L*-glu 濃度を算出した。この条件では *L*-glu の自然分解が起こらないことは既に確かめられている【3】。

- substrate mixture 1 の組成 : GDH 20U/mL、 β NAD 2.5mg/mL、Triton-X100 0.1%v/v、Tris-HCl 0.2M、MTT 0.25mg/mL、MPMS 100 μ M

実際には 0.1% triton X-100 含有 Tris buffer (pH 8.2) に 2.5mg/mL MTT stock solution 10% v/v、100 mM MPMS stock solution 0.1% v/v を加え、使用直前に GDH、 β NAD を加えた (反応液中の TritonX-100 は、MTT formazan の溶解性を高める)。

- MTT stock solution : 2.5mg/mL (6 mM) の濃度で PBS に溶解し、遮光して 4℃で保存した。
- MPMS stock solution : 100 mM の濃度で PBS に溶解し、遮光して 4℃で保存した。
- stop solution の組成 (g/L) : SDS 200、N,N-dimethylformamide 50 %v/v

Lactate dehydrogenase (LDH) release ・ MTT reduction 同時測定

細胞傷害を定量するために細胞膜より漏出した LDH 量、細胞活性を定量するために細胞の MTT reduction 活性を阿部らの方法に従って同時測定した【1, 2】。培地に MTT を 0.25 mg/mL の濃度で添加し、よく攪拌してからその上清 50 μ L を他の 96 well プレートに移した。これを LDH release 測定用プレートとした。50 μ L の substrate mixture 2 を加え、37℃、5%CO₂-95% air 条件下で 20 分間インキュベート後、stop solution を 100 μ L 加え反応を終了させマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。入射光波長は 570 nm、測定波長は 670 nm とした。データは 0.3% Triton-X100 で 4 時間処理した場合の漏出量を 100%として%表示した。LDH 用の培地を分取し終わった 96 well プレートを、37℃、5%CO₂-95% air 条件下で 30 分間インキュベート後 stop solution 50 μ L を加え遮光して 37℃、5%CO₂-95% air 条件下で 24 時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。入射光波長は 570 nm、測定波長は 670 nm とした。MTT reduction 活性は control 群の reduction 活性を 100%として%表示した。

- substrate mixture 2 の組成 : Lactate lithium salt 2.5mg/mL、 β NAD 2.5mg/mL、Triton-X100 0.1%、Tris-HCl 0.2M、100 μ M MPMS

実際には 0.1% triton X-100 含有 Tris buffer (pH 8.2) に MPMS stock solution 0.1% v/v を加

え、使用直前に Lactate lithium、 β NAD を加えた。

ヘマトキシリン染色

培地を 4% *p*-formaldehyde (PFA) 含有 0.1M PB に交換し 4℃で 30 分間固定した。PBS で 2 回洗浄後、ヘマトキシリン染色液を 100 μ L 添加し 20 分間室温放置し、DDW で洗浄した。

Na⁺ free 条件における検討

化合物処理 24 時間後に *Na*⁺をコリンで置換した *Na*⁺ free Hank's balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄後、*Na*⁺ free HBSS で 37℃、5%CO₂・95% air 条件下 で 30 分間のプレインキュベートし、L-glu 取り込み活性の測定を行った。

- ・ HBSS の組成 (g/L) : NaCl 8.0、NaHCO₃ 0.350、KCl 0.4、KH₂PO₄ 0.06、MgCl₂·6H₂O 0.10、MgSO₄·7H₂O 0.01、Na₂HPO₄·12H₂O 0.12、CaCl₂·2H₂O 0.185、D-glucose 0.36
- ・ *Na*⁺ free HBSS の組成 (g/L) : Choline·Cl 19.10、KHCO₃ 0.42、KCl 0.40、KH₂PO₄ 0.06、MgCl₂·6H₂O 0.10、MgSO₄·7H₂O 0.01、K₂HPO₄·12H₂O 0.04、CaCl₂·2H₂O 0.185、D-glucose 0.36

抗 GFAP 免疫染色

PBS で 5 分間洗浄し、4% PFA 含有 0.1M PB により 4℃で 30 分間固定し、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。室温で 0.3% Triton-X100 含有 PBS で 1 時間処理し、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、10% Block Ace 含有 PBS で 4℃、一晚処理した。ウサギ抗 GFAP 抗体 (CHEMICON International) (1:500, 10% Block Ace 含有 PBS にて希釈) と、4℃で 8 時間反応させた後、PBS で 5 分間、一晚、Mg-BSS で 5 分間、PBS で 5 分間の順で洗浄した。alexa fluoro 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) (1:200, 10% Block Ace 含有 PBS にて希釈) を加え、遮光し 4℃で 4 時間反応させた後、PBS で 5 分間、Mg-BSS で 5 分間、PBS で 5 分間の洗浄を行い、コンフォーカルレーザー走査システム (Radiance 2000, Bio-Rad) を用いてイメージングを行った。

- ・ Mg-BSS の組成 (g/L) : NaCl 7.6、KCl 0.4、CaCl₂ 0.2、D-glucose 0.10、HEPES 4.76、MgCl₂ 0.38

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

培養アストロサイトの L-glu 取り込み活性を細胞外 L-glu 濃度変化により定量した (図 5)。細

胞外に 100 μ M の濃度で添加した L-glu は 40~50 分後に半量が取り込まれた。240 分後には細胞外 L-glu は全量取り込まれた。

エストロゲンおよびその類縁物質により 24 時間処理したところ、E2、EE、DES はそれぞれ 60 分、30 分、120 分後以降から用量依存的に L-glu 取り込みを阻害した (図 6)。E2 の阻害作用は 1 μ M 以上の濃度で、EE の阻害作用は使用した全ての濃度で、DES の阻害作用は 1 μ M 以上の濃度で観察された。最大阻害率は control に対して E2 では 33.96% (100 μ M)、EE では 39.77% (100 μ M)、DES では 22.69% (1 μ M) であった。PNP、BPA (1 pM~1 μ M)、17 α は L-glu 取り込みに対して何ら影響を及ぼさなかった。ただし BPA は 100 μ M において L-glu 取り込みをほぼ 100%阻害した。

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

2-1 で観察された E2、EE、DES による L-glu 取り込みの阻害が生存細胞数の減少に由来していないことを確認するために化合物で 24 時間処理後、LDH release・MTT 同時測定を行った。また、化合物で 48 時間処理後、生存細胞数の計数を行った。LDH release 測定では、E2 (1 nM 以上) で僅かな上昇が見られたものの、他の全ての化合物は何ら影響を及ぼさなかった (図 7)。MTT reduction 測定では、E2 では 1 μ M 以上の濃度で、他の化合物では使用した全ての濃度で有意な上昇が観察された (図 8)。生存細胞数を光学顕微鏡下で計数したところ、control 群の細胞密度は約 1.3×10^4 cells/cm² であった。全ての化合物は生存細胞数に何ら影響を与えなかった (図 9)。

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

エストロゲンによる L-glu 取り込み阻害と ERs との関連を検討するため、ERs 阻害薬である ICI と E2 を共添加した。ICI 単独では 24 時間処理により L-glu 取り込みに何ら影響を与えなかった (データ省略)。

E2 1 μ M 24 時間処理によって L-glu 取り込みは有意に阻害されたが、ICI の共添加によって用量依存的に回復した (図 10)。ICI 1 μ M では control 群と等しいレベルまで回復した。

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

エストロゲンによる L-glu 取り込み阻害への L-glu transporter の関与を検討するため、細胞外 Na⁺ を除去して E2 の作用を再検討した。HBSS による 30 分間の pre-incubation は L-glu 取り込み活性には何ら影響を与えなかった (データ省略)。

Na⁺ free 条件では L-glu 取り込みは殆ど行われなかった (図 11)。この条件では、E2 100 μ M 24 時間処理による L-glu 取り込み阻害作用は完全に消失した。

考察

ほ乳類の中樞神経系において、L-glu は興奮性伝達物質としての働きを持つと同時に、その強い神経興奮性故の神経傷害作用をもつ。虚血やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などの慢性疾患や外傷時なども細胞外の過剰な L-glu の蓄積が神経細胞傷害を引き起こすことが明らかになっている。細胞外に分解活性を持たない L-glu は神経細胞やグリア細胞の L-glu transporter を介した細胞内への取り込みによって除去されるため、L-glu transporter は神経伝達や神経傷害において重要な役割を果たしていると言える。そこで本章では、エストロゲンおよびその類縁物質の L-glu 取り込みにおよぼす影響について検討した。

本研究では、図 4 で示した原理を応用して細胞外 L-glu 濃度測定、LDH release・MTT reduction 同時測定と多様な測定を行った【3】。従来、L-glu 取り込み活性は $[^3\text{H}]$ で標識した L-glu を細胞に取り込ませ細胞内の放射能測定を行うか、もしくは細胞外 L-glu 濃度をクロマトグラフィーで定量するという方法が一般的であった。また、MTT reduction 測定と LDH release 測定は最も汎用される細胞毒性評価法である。MTT reduction 測定法では生存細胞内で MTT が還元されることにより生成される MTT formazan を定量する事で細胞の生存を定量する。また、LDH release 測定では細胞膜の傷害に伴って漏出する LDH 量を測定することで細胞傷害を定量する。従来、LDH release 測定に用いられてきた色素は水溶性の高い tetrazolium 色素がほとんどであり、MTT reduction と LDH release は別の標本から測定するのが一般的であった。今回はこの tetrazolium 色素として MTT を適用することにより、細胞から MTT reduction、培地から LDH release と同じ標本を用いて同時に測定した。このように一連の反応に MTT を適用することにより、従来に比べ非常に簡便かつ経済的な実験を行うことが出来た。

今回、E2、EE、DES が用量依存的に L-glu 取り込みを阻害した。LDH release 測定では E2 でわずかながら release の上昇が認められたものの、EE、DES では作用が認められず、生存細胞数に対しても何ら影響がなかったことから、L-glu 取り込み阻害が生存細胞数の変化に由来していないことが確認された。E2 による LDH release のわずかな上昇の理由は明らかではないが、EE および DES でこのような作用が全く認められなかったことから今回の L-glu 取り込み阻害作用には寄与していないと考えられる。また、今回使用した全ての化合物において MTT reduction の上昇が観察された。慢性疾患や外傷時、アストロサイトは繊維状の形態変化を起こし、分裂能が上昇することが知られている【8】。このようなアストロサイトは活性化アストロサイトとよばれ、アストロサイトのマーカーである GFAP の顕著な発現上昇が起こる。データは載せていないが、図 8 と等しい実験条件で抗 GFAP 免疫染色を行ったところ、control 群と化合物投与群との間の GFAP 発現量に差がなかったことから、アストロサイトの活性化は起こっていないと思われる。個々のアストロサイトにおいて MTT reduction を担う酵素の発現量やその発現部位であるミトコンドリアの機能に何らかの変化が生じているのかもしれない。

今回使用した化合物の ERs との親和性は $\text{E2} \approx \text{EE} \approx \text{DES} > \text{PNP} > \text{BPA} \gg 17\alpha$ の順になっている【14】。E2 と BPA の K_d 値は ER の 2 つのアイソフォームのうちの 1 つ、ER α で 2000 倍、またもう一方の ER β で 300 倍の差がある【9】。17 α は ERs に対して全く結合活性を持たない。今回、L-glu 取り込み阻害は E2 と、ER との親和性が E2 とほぼ等しい EE、DES にのみ観察さ

れたことから、この作用が ER を介した作用であることが示唆された。ICI は ligand binding domain に結合して ER α 、ER β 両者とも阻害する強力な ERs 阻害薬である【10】。ICI を E2 と共添加したところ、E2 の作用は完全に抑制された。よって、化合物の作用が ERs を介した作用であることが示された。

中枢神経系において細胞外 L-glu 濃度は 1 μ M 以下に保たれている。一方、アストロサイト内では 0.1-5 mM であり、大きな濃度勾配が存在する。この濃度勾配に逆らった L-glu 取り込みは細胞膜を隔てた Na⁺、K⁺ のイオン勾配と膜電位によって駆動する。つまり、L-glu transporter の駆動には 2、3 個の Na⁺ の細胞内への輸送と K⁺、OH⁻ それぞれ 1 分子の流出が必須である。よって、細胞外 Na⁺ を除去した場合、L-glu transporter を止めることが出来る。本実験においても、細胞外 Na⁺ を除去した条件では、L-glu 取り込みは起こらなかった。よって、この実験系での L-glu 取り込みが確かに L-glu transporter を介していることが確認された。Na⁺ free 条件では E2 の作用は完全に消失した。よって、化合物の作用は L-glu transporter への影響によるものであることが示唆された。

中枢神経系ではこれまでに 5 種の L-glu transporter がみとめられている (EAAC1、GLT-1、GLAST、EAAT4、EAAT5)。アストロサイトでは GLT-1、GLAST が発現している。GLT-1、GLAST のノックアウトマウスでは神経細胞の脱落が観察されたのに対し【16】、神経細胞に発現する L-glu transporter のノックアウトマウスでは脱落が全く観察されなかったことから【15、16】、L-glu transporter の中でも、特にグリア型 L-glu transporter が細胞外 L-glu 取り込みに主要な役割を担っていることが示唆されている。阿部らは本実験に使用したアストロサイト培養系では GLAST が高レベルで発現しており、GLT-1 はほとんど発現していないことを確認している【1】。よって、今回観察された E2 の作用は GLAST への作用であることが予想される。

近年、L-glu transporter の調節機構が明らかになりつつある。L-glu transporter 阻害物質としては、arachidonic acid【18】、膜脂質の過酸化【6】、活性酸素【17】がよく知られている。最近では、protein kinase C (PKC) がリン酸化を介して GLAST を阻害することが報告された【7】。また、MCF7 細胞では、E2 による DNA 合成促進作用が ER $\rightarrow$ PKC という経路を介していることが示されている【11】。今回観察された E2 の L-glu 取り込み阻害作用も ER と PKC のクロストークにより GLAST が阻害されることにより引き起こされた可能性が考えられる。

本研究により E2、EE、DES が 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 への作用が強く示唆された。現在まで、エストロゲンによる L-glu transporter の調節については全く報告がなく、新規の作用と考えられる。ERs への親和性が E2 と同等で、かつ、E2 より脳内移行性の高い化合物の場合、より強い影響を与える可能性が考えられる。今後、血液脳関門・血液脳脊髄液関門やトランスポーター等を介した脳内移行性を視野に入れたリスク評価が必要であろう。

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

方法

大脳皮質アストロサイトの単離と培養

第2章の方法に従う。

抗 BrdU 免疫染色

48 well プレートに 1×10^4 cells/cm² の密度で再播種後、3 日目に化合物で 24 時間処理し、4 日目に BrdU を 10 μ M の濃度で添加した。24 時間後、PBS で 5 分間洗浄し、4% PFA 含有 0.1M PB により 4℃ で 30 分間固定し、PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した。2M HCl で 30 分間処理し、PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した。0.1M Tris-HCl で 5 分間処理し、PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した。2% HS 含有 PBS で 1 時間処理し、PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した。マウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (Roche) (1:500, PBS にて希釈) と、4℃ で一晩反応させ、PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。ABC 法 (Vectastain) により発色を行った。

ヘマトキシリン染色

BrdU 陰性細胞を可視化するため、抗 BrdU 免疫染色後、ヘマトキシリン染色を行った。ヘマトキシリン染色は第2章の方法に従った。

結果

典型的な BrdU 陽性アストロサイトの光学顕微鏡像を図 12 に示す。図中の矢印は BrdU 陽性細胞を示す。

図 13 に示す通り、Control 群の BrdU 陽性アストロサイト含有率は 10% に満たなかった。E2 および EE は BrdU 陽性アストロサイト含有率を用量依存的に上昇させる傾向を示した。また、BPA 100 μ M において含有率の有意な減少が観察された。他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。

考察

BrdU は、S 期の DNA 複製時に uridine と競合して DNA に組み込まれる。取り込まれた BrdU を免疫組織化学的に検出することで S 期にある細胞の割合を知り、また、その分布を視覚化できる。

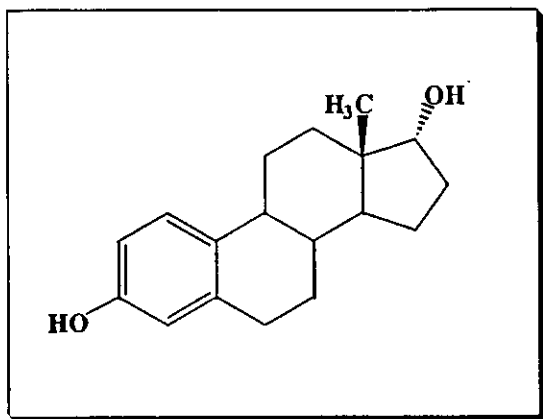
アストロサイトは、播種 3 日目から 6 日目までの間、S 期細胞含有率が最も高く、その後は急

速に減少することが知られている【5】。そこで再播種3日目に各化合物処理を行った。E2とEEは用量依存的に分裂活性促進の傾向を示したが、他の化合物では何ら影響は認められなかった。本実験では control 群の BrdU 陽性アストロサイト含有率が10%に満たず、各化合物の作用を検出することが困難であったと推察される。エストロゲンは mitogen であり、MCF7 細胞ではエストロゲン依存性の成長・分裂が起こる【12】。control 群のアストロサイトの分裂活性がより高い条件での検討に興味を持たれる。

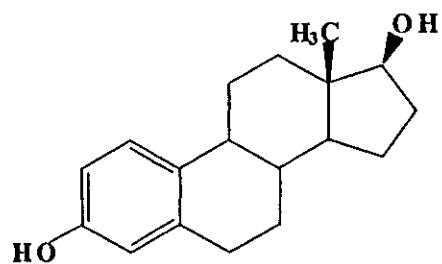
参考文献

1. Abe, K. and Kimura, H. (1996) Amyloid β toxicity consists of a Ca^{2+} -independent early phase and a Ca^{2+} -dependent late phase. *J. Neurochem.* 67, 2074-2078
2. Abe, K. and Matsuki, N. (2000) Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research.* 38, 325-329
3. Abe, K., Abe Y. and Saito H. (2000) Evaluation of L-glutamate clearance capacity of cultured rat cortical astrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 204-207
4. Abe, K. and Saito, H. (2001) Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 76, 217-223
5. Arantxa, T., Alberto, O., and Jose, M. M. (1996) Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry. *Neuroscience Research*, 24, 131-138
6. Blanc, E. M., Keller, J. N., Frenandez, S. and Mattson, M. P. (1998) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia*, 22, 149-160
7. Conradt, M. and Stoffel, W. (1997) Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* 68, 1244-1251
8. J. L. Ridet, S. K. Malhotra, A. Privat and F. H. Gage. (1997) Reactive astrocytes : cellular molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570-577
9. Kuiper, GGJM., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J-A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138, 863-870
10. Kuiper, GGJM., Lemmen, JG., Carlsson, B., Corton, JC., Safe, SH. and Saag, PT. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139, 4252-4263

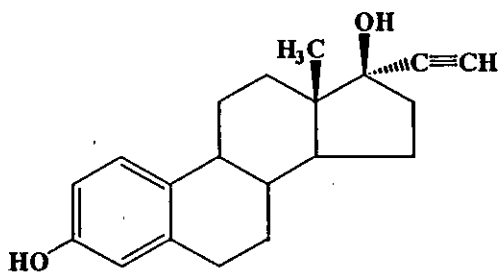
11. Marino M, Distefano E, Caporali S, Ceracchi G, Pallottini V and Trentalance A. (2001) beta-estradiol stimulation of DNA synthesis requires different PKC isoforms in HepG2 and MCF7 cells. *J. Cell Physiol.* 188, 170-177
12. Marquez, DC. and Pietras, RJ. (2001) Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene*, 20, 5420-5430
13. 松田 敏夫, 田熊 一徹, 李 英培, 馬場 明道 (1999) グリア細胞の障害と保護 *Folia Pharmacol. Jpn.* 114, 281-286
14. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, J., Matuso M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 154, 76-83
15. Peghini, P., Janzen, J. and Stoffel, W. (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J.* 16, 3822-3832
16. Rothstein, JD., Dykes-Hoberg, M., Pardo, CA., Bristol, LA., Jin, L., Kuncl, RW., Kanai, Y., Hediger, MA., Wang, Y., Schielke, JP. and Welty, DF. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role of astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 16, 675-686
17. Trotti, D., Danbolt, N. C. and Volterra, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable : a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration. *TIPS*. 19, 328-334
18. Zerangue, N., Arriza, J. L., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1995) Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J.Biol.Chem.* 270, 6433-6435



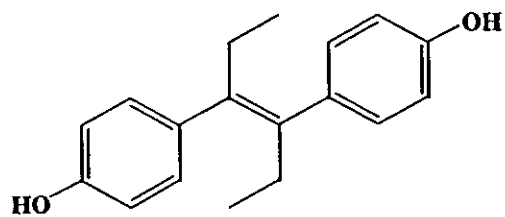
17β-estradiol



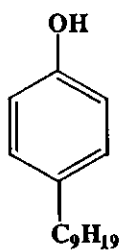
17α-estradiol



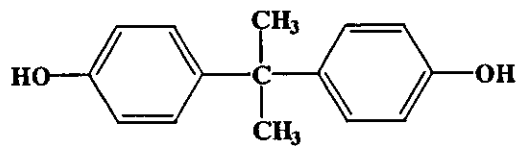
17α-ethynylestradiol



diethylstilbestrol



p-nonylphenol



bisphenol A

図1 エストロゲンおよびその類縁物質の構造式

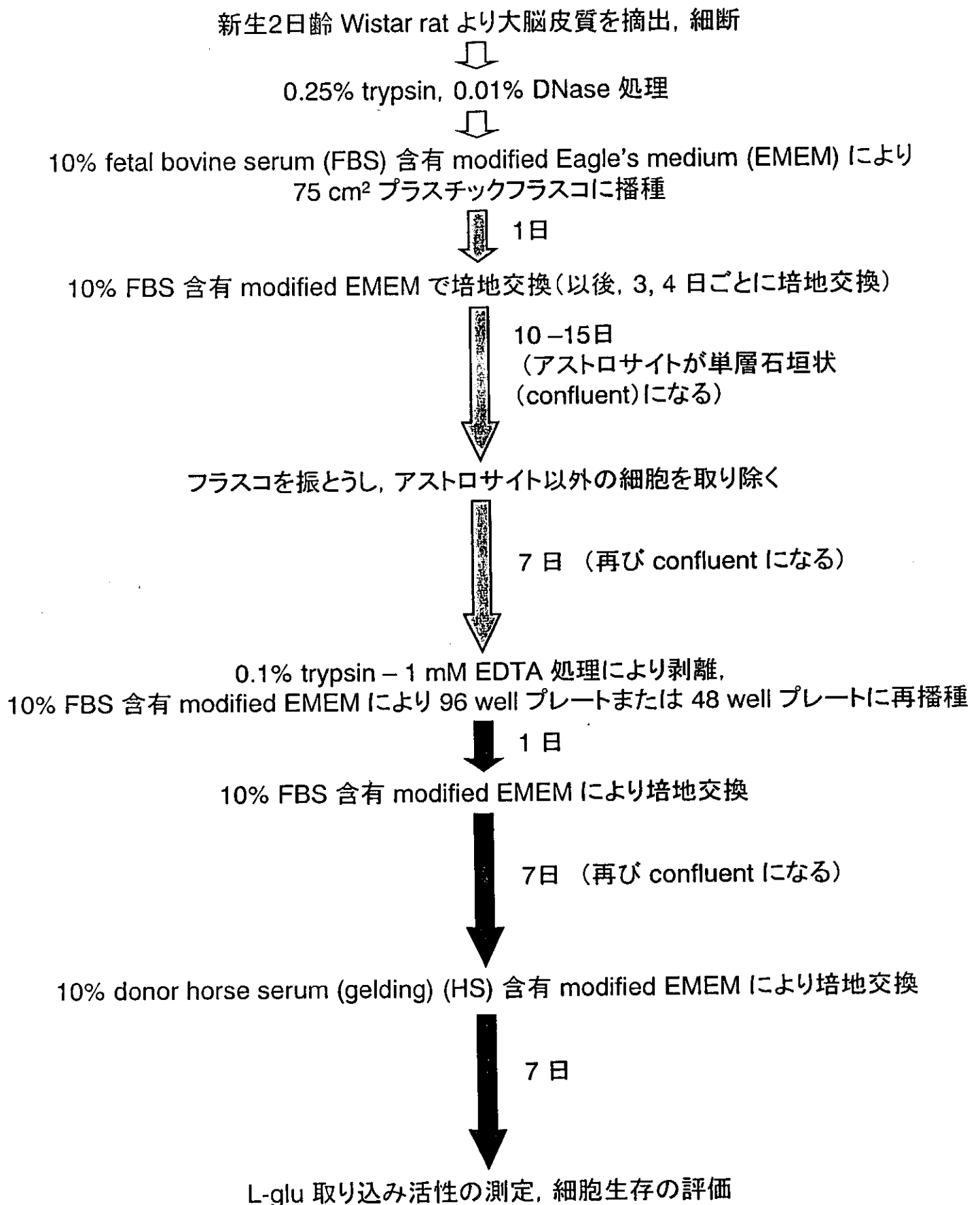
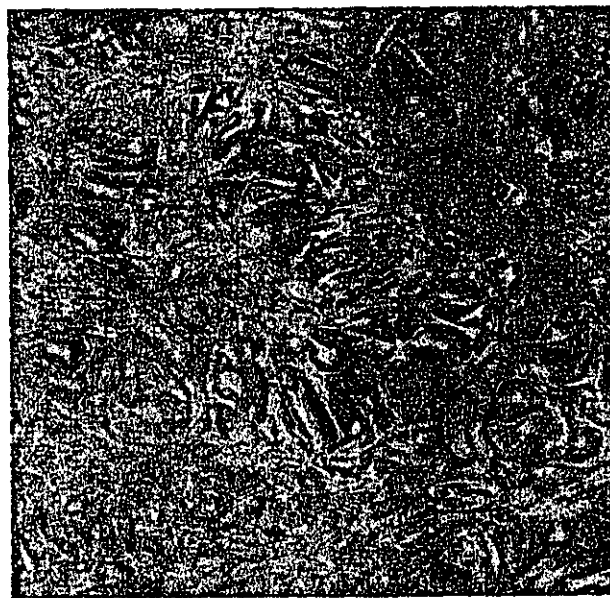


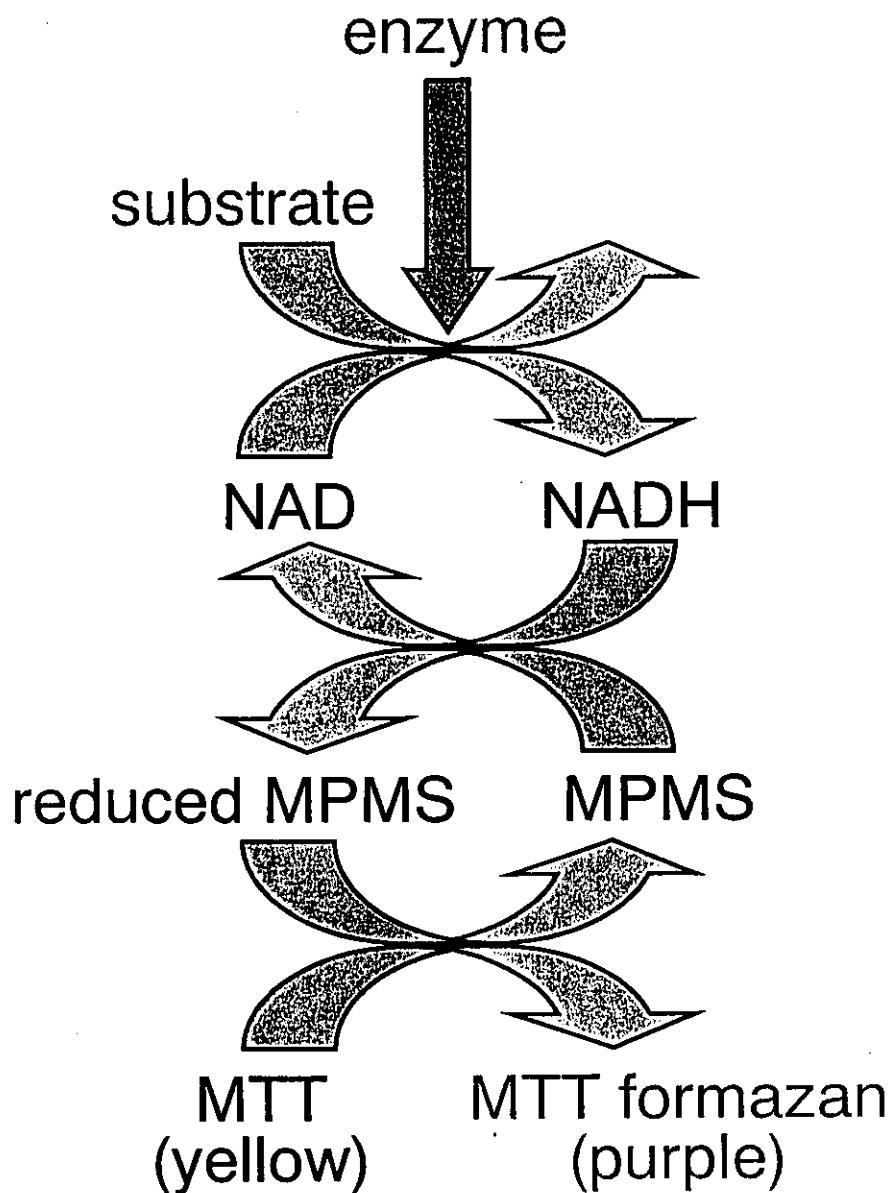
図2 実験スケジュール



20 μ m

図3 培養アストロサイトの抗 GFAP 免疫蛍光染色像

Confluent になったアストロサイトを抗 GFAP 抗体により免疫蛍光染色したところ、95% 以上の細胞が GFAP 陽性であった。



反応	基質	生成物	酵素	
L-glu uptake	L-glutamate	2-oxoglutarate	Glutamate dehydrogenase	基質の量を測定する.
LDH release assay	lactate	pyruvate	LDH	酵素の量を測定する

図4 本実験で用いた比色定量法の原理

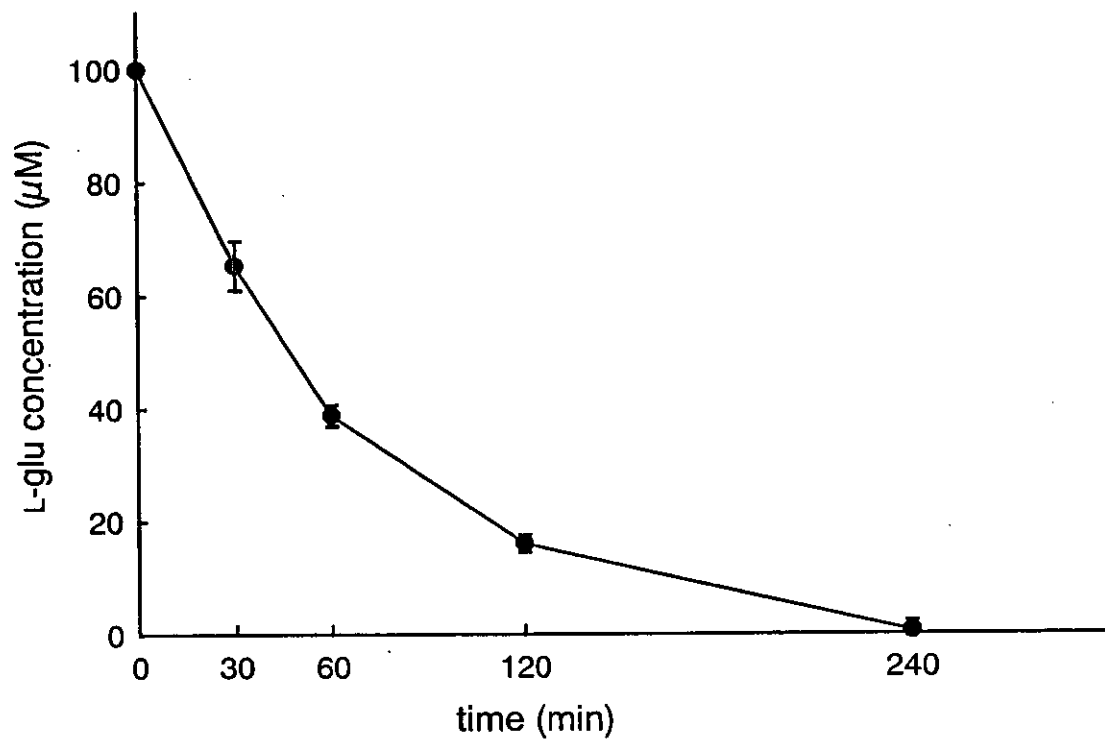
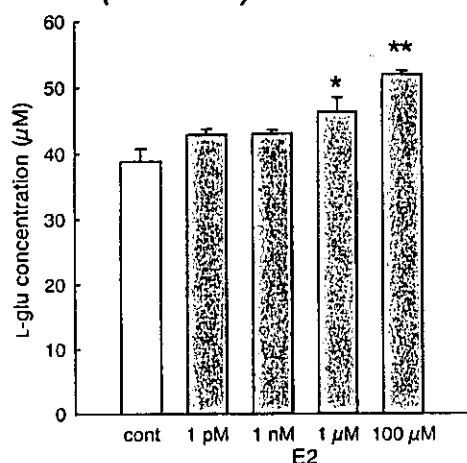


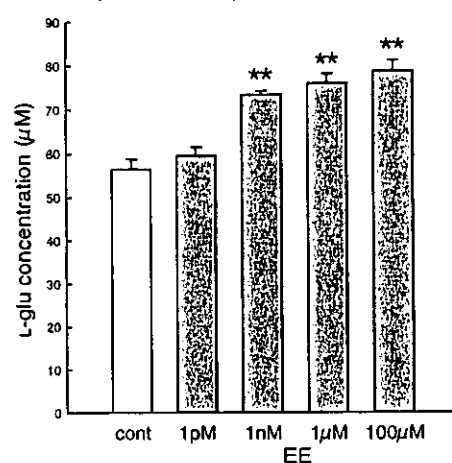
図5 培養アストロサイトの L-glutamate 取り込み活性

培地中に100 μM の濃度でL-glutamate を添加し30, 60, 120, 240 分後に細胞外のグルタミン酸濃度を測定した。240 分後に培地中のほぼ全ての L-glu が取り込まれた。

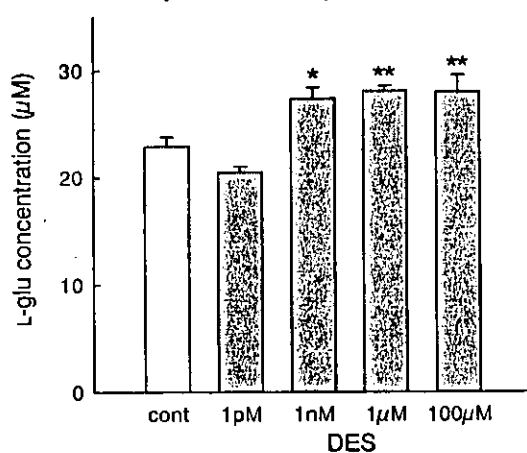
A. E2 (60 min)



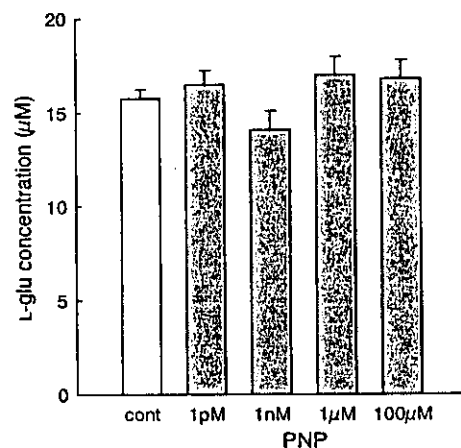
B. EE (30 min)



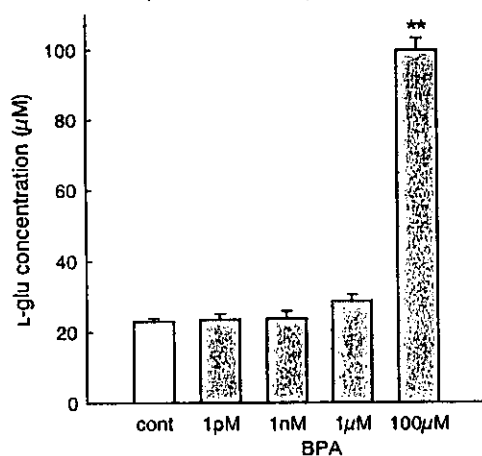
C. DES (120 min)



D. PNP (120 min)



E. BPA (120 min)



F. 17α (120 min)

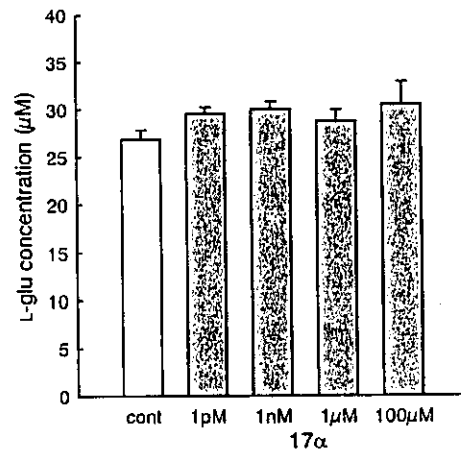
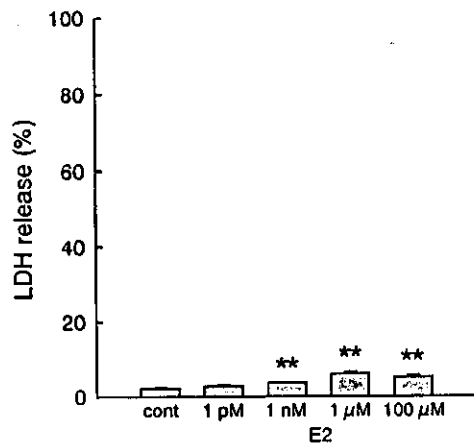


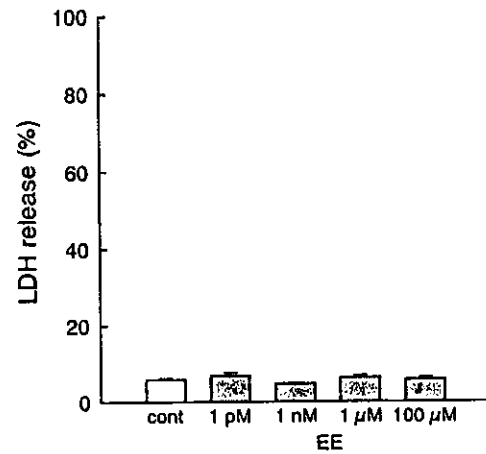
図6 培養アストロサイトの L-glutamate 取り込み に対する エストロゲンおよびその類縁物質 の作用

表示の濃度のE2, EE, DES, PNP, BPA, 17α で 24 時間処理後, 培地中に L-glu 100 μMを添加し, 30, 60, 120 分後に培地中の L-glu 濃度を測定した. E2, EE, DES は用量依存的に L-glu 取り込みを阻害した. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control group, $N=6$, Dunnett's test.)

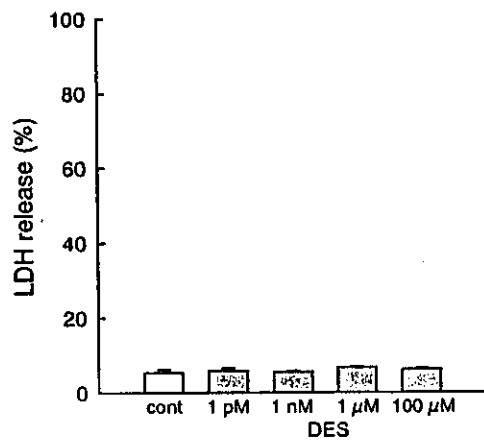
A. E2



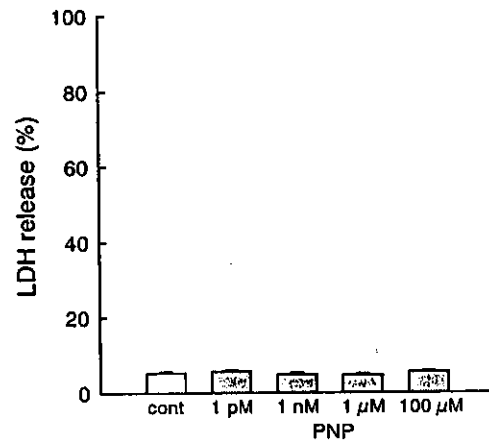
B. EE



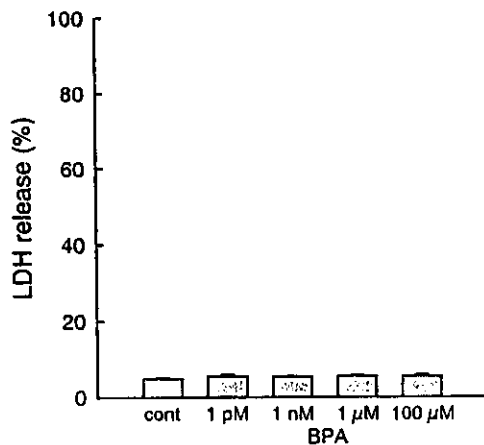
C. DES



D. PNP



E. BPA



F. 17α

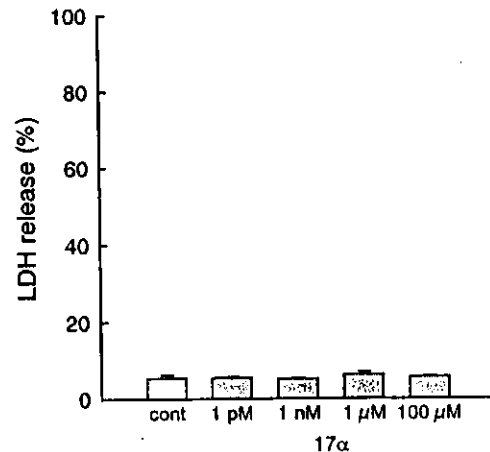


図7 培養アストロサイトの LDH release に対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用

表示の濃度のE2, EE, DES, PNP, BPA, 17αで24時間処理後, LDH release 測定を行った。E2によりわずかにLDH releaseの上昇が観察されたが, 他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。 (**: $p < 0.01$ vs. control group, $N=6$, Dunnett's test.)