

哺乳動物培養胚を用いた内分泌かく乱物質の中枢神経および生殖細胞に及ぼす影響の検討

分担研究者 渡辺 敏明 山形大学医学部衛生学教室

研究要旨：

哺乳動物培養法を利用して、内分泌かく乱物質の胎児の中枢神経および生殖細胞への影響を検討する。本年度は、現在広く使用されている除草剤バスタの主成分であるグルホシネートの中枢神経に及ぼす影響を調べた。グルホシネートを暴露した培養胚において、神経上皮細胞にアポトーシスが誘発されることを病理組織学および生化学的に明らかにした。また、グルホシネートの神経細胞におけるエストロゲンレセプターの発現への影響を調べ、内分泌かく乱物質としての作用を検討している。

A. 研究目的

哺乳動物全胚培養法を利用して、内分泌かく乱作用が危惧されている生活環境化学物質の中枢神経および生殖細胞への影響を検討し、内分泌かく乱物質の試験法を確立する。

本研究においては、とくに現在使用されている農薬およびこれまでに広く使用され、土壌や河川などに残留している農薬について、内分泌かく乱物質としての作用を客観的に評価する。

「バスタ」は、含リンアミノ酸系の除草剤で、その主成分はグルホシネートおよび界面活性剤などである。グルホシネートは神経伝達物質であるグルタミン酸と化学的に類似した構造をしている。グルホシネートはグルタミン合成酵素を特異的に阻害するため、植物では体内にグルタミン酸やアンモニアが蓄積し、枯死する。この性質を利用して、近年グルホシネートが除草剤として開発され、利用されている。

グルホシネートは、哺乳動物においては、毒性および生体影響が低いと考えられており、「バスタ」は現在もっとも広く使用されてい

る。しかし、ヒトに対する健康影響は必ずしも十分に検討されているとはいえない。最近我々が経験したバスタ中毒の症例では、グルホシネート暴露直後から意識障害、痙攣、および呼吸障害などの神経症状が特異的にみられている。そこで、本研究においては、まず哺乳動物全胚培養法を利用して、グルホシネートの中枢神経に及ぼす影響を検討する。とくに、グルホシネートの内分泌かく乱作用の可能性を明らかにするために、PCB やエストラジオールなど既知の内分泌かく乱物質を用いて、比較検討を試みる。また、哺乳動物培養胚の中枢神経および生殖細胞を用いた試験法が、内分泌かく乱物質の評価法としての有用性についても、種々の農薬を対象にして検討する。

B. 研究方法

平成 10 年度：グルホシネートが中枢神経に影響を及ぼしていることを、マウスおよびラット培養胚を用いて、形態学および病理組織学的に検討する。中枢神経におけるアポトーシスの有無は TUNEL 法および透過型

電子顕微鏡によって検討する。またグルホシネートを暴露した培養胚から得た神経上皮細胞層を用いて、アポトーシスの出現の様子を免疫化学的および生化学的に明らかにする。本試験法を確立することによって、内分泌かく乱物質の次世代での影響を胚細胞を用いて検出することが可能である。

C. 研究結果

本年度においては、現在広く使用されている除草剤バスタの生体影響について、哺乳動物培養胚を利用して、組織病理学および免疫組織学的に分析した。その結果、バスタの主成分であるグルホシネートによって、培養胚の神経細胞に特異的にアポトーシスが誘発され、次世代において生殖毒性作用のあることが示唆された。現在培養胚の神経細胞におけるアポトーシスの誘発とエストロゲンレセプターの発現との関連を明らかにするために、既知の内分泌かく乱物質である PCB やエストラジオールなどを用いて、培養胚の神経細胞を利用した試験法の有用性について、検討を進めている。

D. 考察

今回、全胚培養法により試験管内で、妊娠 8 および 10 日のマウス胎児にグルホシネートを作用させると、神経上皮層にアポトーシスが惹起されることを明らかにしたが、その作用機序は不明であった。グルホシネートは、グルタメートのグルタミンへの代謝を阻害して、細胞外のグルタメートおよびアンモニアが増加することが明らかにされており、グルタメートを作用させると脳内で excitotoxic な機序により細胞壊死が起こるが、この反応は、グルタメート受容体を介した細胞内カルシウ

ム調節機構の障害が原因と考えられている。さらに、胎児では、血液脳関門などの防御機構が不完全であり、グルホシネートを作用させた胎児では、容易にグルホシネートが神経細胞に到達し、神経上皮層のアポトーシス、頭部の水疱形成などの神経毒性が惹起されたものとする。一方、アポトーシスに特徴的な形態変化は、bcl-2, c-myc などの細胞死関連遺伝子によって調整されてるが、グルホシネートによる神経上皮層のアポトーシスにこれらの遺伝子が、関与しているか否かは、今回の実験からは明らかにされなかった

E. 結論

グルホシネートによって、培養胚の神経細胞に特異的にアポトーシスが誘発され、次世代において生殖毒性作用のあることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toshiaki Watanabe and Takayuki Iwase: Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture, Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 16, 287-299, 1996

Toshiaki Watanabe: Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture, Neuroscience Letters, 222, 17-20, 1997

Toshiaki Watanabe and Takuya Sano: Neurological effects of glufosinate

poisoning with a brief review, Human and Experimental Toxicology, 17, 35-39, 1998