

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

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し、基礎検討を行なった。脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では、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培養を行なった。この海馬培養系は、生理的な神経回路を保持しており、神経細胞死等の脳への悪影響を評価するの適した系であることが示された。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では、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エストロゲン受容体発現に適したベクターの作製、および発現を確認するためのレポーター遺伝子種の比較検討を行なった。

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

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ではcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、そのまま、あるいは、これを鋳型としたRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。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・チャネル形成型受容体であるP2X2受容体を用いた。卵母細胞は18℃で2-5日間培養し、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。

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年計画の初年度にあたる本年度では、系の開発のための基礎検討を行なうことを目的とした。脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究では脳内で記憶を司る海馬の培養スライス標本を作製し、評価系としての有用性を確認することを目的とした。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では、アフリカツメガエル卵母細胞におけるヒト型エストロゲン受容体発現のための条件検索を行なうことを目的とした。

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、ラットより脳を摘出し、厚さ200 μ mの海馬スライスを作製し37℃にて10日間培養した。神経細胞膜電位の光学的測定では、培養した海馬スライスを膜電位感受性色素で染色した。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・死細胞を2種類の色素で別々に染色し、両者の結果を比較して障害性を決定した。

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のうち、膜電位感受性色素を用いた実験では、神経回路に沿った膜電位変化が記録され、また、この応答を修飾する機構が機能していることも確認された。神経細胞障害性を調べる実験では、神経細胞死を誘発することが知られている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、この障害性はCA1領域で最も顕著であった。

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では、P2X2受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込んで卵母細胞に注入した場合に受容体が発現することが電気生理学的手法により確認された。SV40プロモーター・ベクターにエストロゲン受容体結合部位とP2X2受容体のcDNAを組み込んだプラスミドを作製し、エストロゲン受容体のRNAまたはcDNAとともに卵母細胞に注入した場合、エストロゲンの有無に関わらずATP誘発電流が観察された。

D. 考察

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究については、膜電位応答の結果より、この海馬標本が生理的な機能を保持していることが、また、グルタミン酸による神経細胞障害が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が認められたこのことから、この標本が神経に対する悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

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については、P2X2受容体の遺伝子がアフリカツメガエル卵母細胞においてエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であることが確認された。また、SV40プロモーターを含むベクターはエストロゲン受容体のレポーター・プラスミドに用いることができないことが判明した。今後は、利用可能なレポーター・プラスミドの検索を続ける予定である。

E. 結論

本年度の研究により、1) 培養海馬スライス標本は脳の生理的な高次機能を保持した系であることが確認され、また、この標本は神経細胞障害等の脳への悪影響を検討するのに適した系であること、2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系においてP2X2受容体がエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であること、が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Nakazawa, Y. Ohno, "Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic receptors", *European Journal of Pharmacology*, Vol. 374, pp. 293-299 (1999)

2. 学会発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., "HSP70 protects pyramidal neurons in the hippocampus and may modulate region-dependent vulnerability"
29th Annual Meeting of Society for Neuroscience (1999)
(北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄, "培養海馬切片における電気的興奮伝播に対するATPの作用の光生理学的解析"
第72回日本薬理学会年会 (1999)

3) 中澤憲一, 大野泰雄, "P2X2受容体に存在する隣接したグリシン残基の受容体チャネル機能における役割"
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし