

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

黒田 洋一郎

(財)東京都医学研究機構、神経科学総合研究所 参事研究員)

「内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と 毒性メカニズム」

1. 研究実施の概要

「研究のねらい」

内分泌攪乱物質の脳神経系の機能発達への影響を、学習障害(LD)注意欠陥多動障害(ADHD)の一因である可能性を考慮しつつ、神経科学の最先端の知識・研究手法を駆使して、分子・細胞レベルで実験的研究を行い、緊急な社会的ニーズとなっているリスク評価のための簡便な機能スクリーニング系を開発するねらいをもつ。

「これまでの研究の概要、成果、今後の見通し」

培養脳細胞を用いた機能スクリーニング系開発

これまでに、培養大脳皮質細胞を用いた機能神経回路形成系の開発に成功し、シナプスの形成・分子メカニズムを研究してきた。初年度は、この実験系を用い、まず既にクレチン症・ADHDとの関係が臨床的に明らかにされている甲状腺ホルモンの機能神経回路形成に対する影響を検討し、甲状腺ホルモンが神経回路の形成とその活動の発現を促進していることをin vitroで世界で初めて発見し、この実験系の今後の有用性が明らかになった。さらに、多くの系で基礎的実験を行い、第2年度から始まる本格的な細胞レベルの研究のための基本データとした。

遺伝子発現への影響を指標にした機能スクリーニング系の開発

BDNF、c-fosなど脳の機能発達に関連していると考えられている遺伝子の発現がピレスロイドなどの環境化学物質によって影響をうけることを詳細に検討し実験的に確立した。今後、DNAチップなどを用いた、このアプローチからの研究の重要性が強く示唆された。

2. 研究実施内容

I. 培養脳細胞を用いた機能スクリーニング系開発

(1) 大脳皮質初代神経細胞を用いた実験

[研究目的]

これまで記憶・学習機能に基礎研究のために、培養大脳皮質細胞を用いた機能神経回路形成系の開発に成功し、神経細胞同士の情報交換の要であるシナプスの形成・分子メカニズムを研究していた。本年度は、まず既に精神遅滞を伴うクレチン症・ADHDとの関係が臨床的に明らかにされている甲状腺ホルモン機能神経回路形成に対する影響を検討した。甲状腺ホルモンの脳機能発達についての研究がことに細胞レベル、シナプス・レベルでほとんどないため、まず基礎的な研究から始める必要があったためである。

[研究方法]

さまざまな濃度の甲状腺ホルモン（T3およびT4）を培養開始からシナプス形成系に加え、細胞内カルシウム濃度のモニターにより、形成された神経細胞の同期発火活動を観察した。

[結果]

甲状腺ホルモン、ことにT3が、低濃度から神経回路の形成とその活動の発現を濃度依存的に促進していることが明らかになった。ホルモン作用のないリバースT3ではこのような作用はなかった。また、血清中には一定量の甲状腺ホルモンが存在しているので、この種の実験には無血清培地を用いる必要があることもわかった。甲状腺ホルモンの脳の機能発達における重要性をin vitroで証明した、世界初の研究成果と思われる。

(2) クローン化した神経細胞を用いた実験

[研究目的]

GT1-7細胞は視床下部神経細胞由来の細胞株で、in vitroでの神経内分泌系の研究に有利であると考えられる。estrogen類似作用を報告されている種々の化学物質がGT1-7細胞の生存維持や分化に及ぼす影響を検討した。

[研究方法]

GT1-7細胞は常法により培養し、実験を行った。GT1-7細胞はこの培養条件下でMAP2陽性の突起を伸展させ神経細胞様に分化することを確認した。

培養液にbisphenolA (BPA)、diethyl stylobestrol (DES)、nonylphenol (NP)、17-estradiol (17)等を10~500ppbの濃度で添加し、48時間後、細胞の生存率をミトコンドリア酵素活性を指標とするWST-1法により測定した。

[結果]

GT1-7細胞の生存率は10~100ppbの低濃度のDESの添加によって増大した

が、200～500ppbの高濃度では減少した。一方、17 では同濃度で生存維持効果は見られたが、毒性は観察されなかった。また、BPA、NPでは弱い生存維持作用が認められたが、200ppb以上のNPによってほとんどすべてのGT1-7細胞は細胞死を起こし、これらの化学物質がGT1-7細胞の生存維持に関して二相性の作用を有することが示唆された。また、抗estrogen作用を持つtamoxifenは濃度依存的にGT1-7細胞の細胞死を起こした。以上の結果から、GT1-7細胞は神経内分泌系に及ぼす内分泌攪乱物質の作用を観察する良いモデル系に成り得ると考えられた。

(3) 小脳神経細胞を用いた実験

[研究目的]

小脳顆粒細胞は脳内で非常に多数存在し、しかも部域差の少ない比較的均質なニューロンであり、内分泌かく乱物質など化学物質の影響を調べ易いと考え、予備実験を行った。

[研究方法]

マウスの生後小脳から採取した甲状腺ホルモンを含まない無血清培地の中で微小组織片を培養し、顆粒細胞ニューロンの前駆細胞の増殖、神経芽細胞の移動、分化など小脳内と同じような顆粒細胞の細胞挙動を観察し、まず細胞毒性を示す濃度を検討した。

[結果]

DESとdibutylphthalateは1ppm以上で強い細胞毒性が見られた。いずれも10ppb以下では移動には影響が無く、低濃度ではやや促進傾向が見られ、第2年度から始まる本格的な細胞レベルの実験のための基本データとした。

II . 遺伝子発現への影響を指標にした機能スクリーニング系の開発

[研究目的]

哺乳類の生後の脳神経系の発達には、神経細胞が電氣的活動を起こすことによって進行する、活動依存的な過程が存在する。ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンやDDTなどは、Na⁺チャンネルに作用して神経細胞の電氣的活動に影響を与える。

一方、脳・神経系発達に重要な役割を果たしている脳由来神経栄養因子(BDNF)などの遺伝子発現は、神経細胞の電氣的活動によって活性化される。

したがって、ペルメトリンなどの殺虫剤は乳児脳へ移行して、BDNF遺伝子などの活動依存的な遺伝子の発現に影響を与えて乳児脳発達に影響を及ぼすことが危惧される。そこで、初代神経細胞培養系などを用いて、これら殺虫剤のBDNFやc-fos遺伝子の発現に与える影響を検討した。

[研究方法]

マウス小脳顆粒細胞の初代培養系で、Na⁺チャンネル活性化剤であるベラトリジン投与してc-fos、BDNF遺伝子の発現を誘導した。この培養系にcis-, trans-ペルメトリンを加えた。また、飲水によって母マウスにDDTあるいはペルメトリンを与え、母乳により仔マウスに殺虫剤を摂取させた。経時的に小脳を摘出して、c-fos、BDNFmRNAの発現量を調べた。

[結果]

マウス小脳顆粒細胞の初代培養系で、ペルメトリン、DDTは膜の脱分極で誘起される、細胞内へのカルシウム (Ca²⁺) 流入及びc-fosやBDNF遺伝子の発現を抑制した。母乳によってペルメトリン、DDTを乳児に与えた所、生後の脳発達に認められるc-fos遺伝子の発現上昇が抑制された。DESやビスフェノールAなども、Ca²⁺流入と遺伝子発現を抑制した。これら脂溶性物質は、神経細胞の膜レベルに作用してイオンチャンネルに影響を与えていることが予想された。この事実は、ニューロステロイドの作用を攪乱する可能性を示すものとして注目される。また同時に、環境ホルモンの神経活動攪乱作用を示唆している。BDNF遺伝子の転写制御機構の解析の結果、BDNF遺伝子プロモーターIがCa²⁺シグナルに対して顕著に応答することが明らかとなった。

Ⅲ . サルなどを用いた行動学的観察

第2年度から行う、次世代行動実験のために行動観察装置を発注し、母親ラット・サルへの投与方法などを検討・準備した。サルの神経細胞培養については、大脳皮質のみでなく海馬など他の部分の培養を試み、かつ凍結組織を準備した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

無し