

助成年度：平成4年度

[所属] 徳島大学総合科学部 日本システム学科生体情報学研究室

[役職] 助教授

[氏名] 小山 保夫

[課題]

環境汚染物資の生態系への影響の簡便かつ迅速な評価方法の開発

[内容]

商業的に入手可能な化学物質は約2万種類を越えており、我々は化学物質に囲まれて生活を営んでいると言っても過言ではない。この有益な化学物質も一度環境中に放出されると、予想外の経路から人間を含む生態系に重要な影響を及ぼす。しかしながら、化学物質の数は1000万種類を越え、それらに生態系に対する安全性（危険性）について個別の情報を得る事は、技術的にも時間的にも無理である。そこで、化学物質の人間を含む生態系への影響を簡便に評価する方法の開発は緊急の課題である。

本申請研究では、哺乳動物の臓器より単離した細胞や単細胞生物を用いて、細胞の多様な細胞動態を蛍光プローブとアルゴン・レーザーにて非侵襲的に測定し、環境汚染物質の細胞レベルでの影響を検討して、「化学物質の影響を簡便、迅速に評価できるか」を考察する。環境汚染物質の具体例として、海洋汚染を引き起こした有機錫およびメチル水銀を用いた。また、使用した実験機器のフローサイトメーターは数万単位の細胞を一個一個遊離した状態で細い管を通過させ、これにアルゴン・レーザーを照射して前方散乱で個々の細胞サイズ、側方散乱で細胞内密度を測定できる。加えて、蛍光プローブを用いる事で多様な細胞動態が測定できる。特に、細胞膜電位や細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞代謝レベル、細胞機能および細胞障害に密接に結び付いている事から、これらを細胞に対する化学物質の影響の指標にして検討を行った。

まず、細胞内 Ca^{2+} 濃度 (fluo-3 蛍光) を指標とした実験を行った。トリブチル錫やトリフェニル錫の有機錫が低濃度 (300nM 程度) から胸腺細胞や神経細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度を持続的に増大させた。これは①細胞膜の Ca^{2+} 透過性の亢進、②細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離、③細胞膜 Ca^{2+} ポンプの阻害によると考えられた。細胞内 Ca^{2+} は細胞の生理機能 (収縮、分泌、酵素活性など)、細胞内情報伝達と密接に結び付いている為に、正常濃度は 100nM 以下に維持されている。因って、この様な持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞の生理機能、情報伝達を阻害する事が考えられる。特に、胸腺細胞に於ける細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的な上昇はアポトーシス (自発的な細胞死) を起こす事が知られている。この様に、本研究の手法では比較的到低い濃度で環境汚染物質の影響を細胞レベルで観察する事が可能と考えられた。次に、細胞膜電位 (di-BA-C₄ 蛍光) に対する影響を指標とした研究を行った。メチル水銀では 300nM 以上の濃度で胸腺細胞に過分極 (di-BA-C₄ 蛍光強度の減弱) を起こさせる事を明らかにした。さらに 3 μM 以上の濃度では過分極に引き続く脱分極 (蛍光増強) が観測された。メチル水銀による過分極反応は Ca^{2+} 除去タイロード液中では著しく減弱し、キニーネの添加では完全に消失した。これらから、過分極には Ca^{2+} 依存性 K^{+} 透過性の関与が示唆された。 Ca^{2+} 除去液でも観察された軽度の過分極反応は A23187 の前処置で消失することから、メチル水銀が細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位にも作用する事が考えられた。これらからメチル水銀も細胞内 Ca^{2+} 恒常性を破壊することが示唆された。

この様に、膜電位や細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標とした細胞レベルの実験でも多くの有益な情報が得られ、本研究手法は有用であると考えられた。現在、本研究手法を環境中の単細胞生物に適用しているが、蛍光色素の染色条件が異なり実用化に至っていない。