

200829023A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的
評価法に関する研究
—特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立—
(H20-化学-一般-009)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 21(2009)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的
評価法に関する研究
—特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立—
(H20-化学-一般-009)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 21(2009)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的
評価法に関する研究

—特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立—

(H20-化学-一般-009)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
研究の総括	
北嶋 聡 1
II. 分担研究報告書	
1. 発生・発達期のモノアミン系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明	
山田 一之 17
2. 発生・発達期のアミノ系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明	
種村 健太郎 29
3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究	
中島 欽一 45
4. 中枢作動性物質による遅発性の情動・認知毒性発現の分子メカニズムの解明	
北嶋 聡 57
5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究	
熊ノ郷 淳 87
6. 神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析	
富永 貴志 95
7. 神経伝達物質輸送活性計測による中枢作動性物質のシナプス伝達機能毒性解析に関する研究	
高森 茂雄 107
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 117
IV. 研究成果の刊行物・別刷 121

I . 総括研究報告書

平成20年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究
—特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立—

研究代表者

北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究要旨

情動・認知行動試験は心理学では繁用されるが、主観的判定に傾きやすく、物証に裏付けられた毒性評価としての利用は限定的である。本研究は、それに脳神経科学の最先端解析手法及びトキシコゲノミクス手法を組み合わせることでメカニズム解明を行うことにより、客観的な毒性評価手法としての「遅情動・認知行動毒性」、特に、発生発達期暴露の遅発影響の評価体系を確立することを目的とした。その際、胎生～幼若期にあって、発生～発達段階にある脳の特性に配慮し、研究班を【発生・発達期暴露 *in vivo* 解析】、【発生・発達期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】、【成熟期暴露 *in vivo* 解析】及び【成熟期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】に分けて研究を進めた。

【発生・発達期暴露 *in vivo* 解析】については、幼若期マウスへの選択的セロトニン再取り込み阻害剤(パロセキチン及びフルボキサミン)投与によって、成長後の不安反応性に異常が生じること(山田)、幼若期マウスへの睡眠導入剤(トリアゾラム)投与によって、成長後に学習記憶異常が生じるとともに、対応する科学的物証として Percellome 網羅的遺伝子発現解析から、海馬でのポストシナプス機能低下を示すグルタミン酸受容体遺伝子群の発現抑制が生じること(種村)、を示した。

【発生・発達期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】については、胎生期マウスへの抗てんかん剤(バルプロ酸ナトリウム)の経胎盤投与によって、神経幹細胞の増殖阻害とニューロンへの分化促進が認められるとともに、生後マウスの脳サイズが減少することを明らかにした(中島)。

【成熟期暴露 *in vivo* 解析】については、成熟期マウスへのバルプロ酸ナトリウム投与は遅発性の行動異常は誘発しないものの、Percellome 網羅的遺伝子発現変動解析によって、アポトーシス関連遺伝子の発現誘導が生じること(北嶋)を示した。さらに、セマフォリン 4D のドーパミン作動性ニューロン保護

作用を明らかにした(熊ノ郷)。

【成熟期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】については、膜電位感受性色素(VSD)を用いた神経活動イメージング法を導入して、有機リン系農薬暴露による中枢影響評価として、海馬の神経回路活動の定量を行った(富永)。また、胎生期マウスへの抗てんかん剤(バルプロ酸ナトリウム)の経胎盤投与によって、成熟後のマウス海馬にシナプス形成と、その成熟が阻害される可能性を示した(高森)。

研究分担者

山田一之 理化学研究所・脳科学総合研究センター・リサーチリソースセンター・専門職研究員

種村健太郎 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

中島欽一 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・動物代謝調節学講座・分子神経分化制御学分野・教授

熊ノ郷淳 大阪大学微生物病研究所・感染症態分野、国際研究拠点大阪大学免疫学フロンティア研究センター・教授

富永貴志 徳島文理大学香川薬学部・病態生理学講座・准教授

高森茂雄 東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

A. 研究目的

本研究は、化学物質の中枢神経系に対する遅発性の影響を科学的に明らかにし、特に子どもの特性に配慮した毒性評価法を確立することを目的とする。その為に、マウスを用いて情動・認知行動解析と中枢神経系の先端的な形態機能解析、神経幹細胞分化能解析、神経回路機能解析、シナプス伝達活性

解析、網羅的遺伝子発現解析等を組み合わせ、毒性メカニズム解明研究を行う。その際、胎児期～小児期暴露と成熟期暴露との毒性の差異について、脳の発生、発達、及び成熟との関係をも明らかにする。これにより、遅発性の情動・認知行動毒性評価法を確立し、今までに評価法が定まらず看過されてきた化学物質も含めた「遅発性」・「中枢性」神経毒性の同定と、高感受性集団としての子どもの反応特性を解明する。

B. 方法

中枢作動性物質の暴露を、発生・発達期(胎児～小児期)及び成熟期に設定し、その後の遅発影響を情動・認知行動毒性として捉えると共に、経時的脳トキシコゲノミクス解析、遅延性毒性発現時の形態機能解析、神経回路機能解析、シナプス伝達機能解析、神経幹細胞分化能解析等の脳神経科学先端研究手法による以下の7研究課題を推し進め、メカニズム解明を以って遅発性の情動・認知毒性発現の本質を究明する。

【発生・発達期暴露 *in vivo* 解析】

1. 発生・発達期のモノアミン系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明(山田)

マウス胎児期～小児期におけるモノアミン系神経シグナルかく乱による神経細胞機能障害、

特にストレス応答性不全に着目し、成熟期の情動・認知行動毒性を解析する。

セロトニン再取り込み阻害剤(H20)、モノアミン酸化酵素阻害剤(H21)、セロトニン類似中枢作動性物質(H22)を使用して、胎児期～小児期暴露マウスの成熟期毒性発現解析を行う。

2. 発生・発達期のアミノ酸系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明(種村)

マウス胎児期～小児期におけるアミノ酸系神経シグナルかく乱による脳構造形成不全及び神経細胞機能障害の解析と、成熟期の情動・認知行動毒性を解析する。

GABA 類似中枢作動性物質(H20)、グルタミン類似中枢作動性物質(H21)、アミノ酸トランスポーター阻害剤(H22)を使用し、胎児期～小児期暴露マウスの成熟期毒性発現解析を行う。

【発生・発達期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】

3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明(中島)

胎児期～小児期に相当するマウス由来の神経幹細胞分化様式に対する中枢作動性物質の影響を検討する。

バルプロ酸ナトリウム(H20)、GABA 類似中枢作動性物質(H21)を使用して、神経幹細胞培養系における分化様式への影響を解析する。また神経幹細胞分化様式かく乱モデル化合物を用いての胎児期～小児期暴露マウスの成熟期毒性発現解析を行う(H22)。

【成熟期暴露 *in vivo* 解析】

4. 中枢作動性物質による遅発性の情動・認知毒性発現の分子メカニズムの解明(北嶋)

神経伝達物質類似構造を持つ中枢作動性物質による遅発性の情動・認知行動解析とともに、暴露後の脳トキシコゲノミクス(Percellome 法)に

よる網羅的遺伝子発現解析から、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤解明を行う。

GABA の類似中枢作動性物質を使用し、GABA 作用過剰による遅発性記憶障害について解析する(H20)。グルタミン類似中枢作動性物質(H21)、セロトニン再取り込み阻害剤、モノアミン酸化酵素阻害剤(H22)を使用する。

5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明(熊ノ郷)

中枢作動性物質によるセマフォリン分子群の神経ガイダンス及び神経保護作用への影響と、遅発性中枢毒性発現についてセマフォリン遺伝子改変マウスを用いて解析する。

MPTP(H20)、ドーパミン類似中枢作動物質(H21)、モノアミン酸化酵素阻害剤(H22)を使用する。

【成熟期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】

6. 神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析(冨永)

脳スライス標本での膜電位感受性色素による可視化により、情動・認知行動毒性発生時の海馬-嗅内野-扁桃核を中心とする記憶情動回路の神経活動を解析し、特有の神経回路異常を明らかにする。

アセフェートを遅発性記憶毒性誘発モデル物質として(H20)、また GABA の類似中枢作動性物質(H21)、セロトニン再取り込み阻害剤(H22)を使用する。

7. 神経伝達物質輸送活性計測による中枢作動性物質のシナプス伝達機能毒性解析(高森)

中枢作動性物質暴露後に生じるシナプス伝達機能変化を、神経細胞神経伝達物質計測から解析し、情動・認知行動毒性発生時のシナプス伝達機能異常を明らかにする。

バルプロ酸ナトリウムモデル物質として(H20)、

またグルタミン類似中枢作動性物質(H21)、グルタミン酸トランスポーター阻害剤(H22)を使用する。

C. 結果

【発生・発達期暴露 *in vivo* 解析】

1. 発生・発達期のモノアミン系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明

発達期のセロトニン系神経伝達の一時的なかく乱が、成長後に及ぼす情動的・認知的影響について生後 2 週齢マウスへの選択的セロトニン再取り込み阻害剤(パロセキチン及びフルボキサミン)を用いて検討した。その結果、発達期のセロトニン系神経伝達の一時的なかく乱によって、成熟後マウス(生後 12-13 週齢)の不安反応性に異常が生じる可能性が行動学的に示された(山田)。

2. 発生・発達期のアミノ酸系神経シグナルかく乱による遅発性中枢毒性発現の解明

発生期、発達期の GABA 受容体シグナルかく乱を目的として、胎生期(胎生 14.5 日齢)、幼若期(生後 2 週齢)、成熟期(生後 11 週齢)のマウスに対して、トリアゾラムを強制経口投与(胎生期は妊娠マウスへの投与による経胎盤暴露)した結果、成熟後(生後 12-13 週齢)の幼若期投与群マウスに短期記憶形成能と場所-連想記憶能の低下が認められた。更に Percellome 法による網羅的遺伝子発現解析から、同群の海馬でグルタミン酸受容体遺伝子の発現抑制が示された。これは学習記憶障害を裏付ける神経科学的物証であり、ポストシナプス機能低下が推察された(種村)。

【発生・発達期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】

3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明

化学物質による神経幹細胞分化様式かく乱と脳形態形成への影響を検討する目的で、胎生期マウスへ抗てんかん剤(バルプロ酸ナトリウム)を経胎盤投与(妊娠 12.5、13.5、14.5 日雌マウスへの経口投与)した。その結果、神経幹細胞の増殖阻害とニューロンへの分化促進が認められるとともに、生後マウスの脳サイズが減少することを示した(中島)。

【成熟期暴露 *in vivo* 解析】

4. 中枢作動性物質による遅発性の情動・認知毒性発現の分子メカニズムの解明

化学物質による遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることを目的として、モデル中枢作動性物質としてバルプロ酸ナトリウム(VPA)を選択し、「成熟期」・「幼若期」・「胎生期」単回暴露時の情動・認知行動解析ならびに「成熟期」暴露時の網羅的遺伝子発現変動解析を比較検討した結果、1) VPA の急性毒性は、成熟期よりも幼若期の方が強く誘発されること、2) VPA の胎生期投与群に軽度の記憶障害が認められるが、幼若期、成熟期投与群には、顕著な情動・認知障害が認められないこと、3) 成熟期投与における海馬ではアポトーシス関連遺伝子の発現上昇が認められること、が明らかとなった。したがって、成熟期における VPA 単回投与時、情動・認知障害という毒性発現が認められなくとも、潜在的に、海馬におけるアポトーシスが誘発される可能性が示唆された(北嶋)。

5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究

MPTP のドーパミン神経障害を観察する培養系を確立するとともに、免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群に属する Sema4D タンパ

ク添加がドーパミンニューロンに対する神経保護作用を有することを確認した(熊ノ郷)。

【成熟期暴露 *ex vivo*・*in vitro* 解析】

6. 神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析

成熟期マウスへのバルプロ酸ナトリウム投与の結果、海馬における神経回路異常の検出には至らなかったが、成熟期マウスへのアセフェート投与の結果、海馬 Schaffer-CA1 回路について電気刺激に対する応答性低下を見いだした(富永)。

7. 神経伝達物質輸送活性計測による中枢作動性物質のシナプス伝達機能毒性

先行研究から、成熟期マウスへのバルプロ酸ナトリウム投与によるシナプス機能への影響は少ないと判断されたため、胎生期マウスへの経胎盤投与(妊娠 12.5、13.5、14.5 日雌マウスへの経口投与)によるシナプス機能影響について検討した結果、成熟後のマウス海馬に、シナプス小胞マーカータンパクの発現低下を認め、シナプス形成と成熟過程が阻害されている可能性を示した(高森)。

D. 考察

本研究の成果は、化学物質の中枢神経系に対する影響を科学的に明らかにするものである。特に、発生期～発達期の脳に対する化学物質暴露が誘発する遅発影響の解析は、従来の毒性評価では検出が困難であった遅発性の情動・認知行動毒性を、科学的物証とともに解明する糸口となると考えられた。更に基礎研究を重ね、毒性発現の分子メカニズムを基礎とした、化学物質暴露による遅発性の情動・認知行動毒性の評価系の確立を目指す。この成果を足がかりとして、妊婦や子どもに対する化学物質暴露による遅発性の情動・認知行動毒性の予

測を可能とすることが期待できるとともに、現在注目される注意欠陥多動障害、学習障害等への具体的対応策の提示にも貢献する可能性を有している。

E. 結論

本研究の目標は、化学物質の中枢神経系に対する遅発性の影響を科学的に明らかにし、特に子どもの特性に配慮した毒性評価法を確立することである。本研究から、動物モデルを用いた化学物質による神経影響評価の際に、複数の行動試験を組み合わせたバッテリー解析によって、従来の毒性試験法では検出が困難であった情動・認知行動異常の解析が可能であることが示された。さらに、動物モデルへの試験化学物質の投与時期を変えることによって、妊婦や子どもに対する化学物質暴露による遅発性の中枢神経影響評価に資する研究成果を得た。また、**Percellome** 法による網羅的初期遺伝子発現変動解析によって、化学物質による遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤解明が期待され、今後、更に研究を続けることによって、知見を集積する必要がある。

子どもへの健康影響リスク評価に役立つ基礎的知見を得るため、発生成長段階検討、脳神経系、免疫系、内分泌系、外挿問題解析の各テーマについて基礎研究を推進した結果、各々のテーマについて「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎となる知見が得られた。特に自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達するという、従来の常識を覆す知見は特筆すべき結果であった。「子どものリスク評価」を科学的に検討するためには、更に基礎研究を続け、その基礎となる知見を集積する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍等

山田一之: 2008 統合失調症とモノアミントランスporter Clinical Neuroscience Vol.26, No.10, pp.1143-1145, 中外医学社

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司、「第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析」編集委員: 野村護、堀井郁夫、吉田武美、「非臨床試験ーガイドラインへの対応と新しい試みー」、株式会社 エル・アイ・シー、東京、2008 年

Allen, R.D., Tominaga, T. and Naitoh, Y. (2008) The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa In: Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals. CRC Press, David H. Evans ed. USA pp. 69 - 106.

富永貴志 「"細胞内小器官 収縮胞の動きと機能"」、動物の「動き」の秘密にせまる: 運動系の比較生物学 (吉村健二郎編) 動物の多様な生き方 共立出版社 (印刷中)

2) 原著論文

M. Sakurai, M. Sekiguchi, K. Zushida, K. Yamada, S. Nagamine, T. Kubota, K. Wada: 2008 Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a pontaneous

deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. European Journal of Neuroscience, 27, pp. 691-701.

T. Kato, K. Yamada et al: 2008 Behavioral and gene expression analysis of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. Neuroscience Research, 61, pp. 143-158.

N. Kojima, G. Borlikova, T. Sakamoto, K. Yamada, T. Ikeda, S. Itohara, H. Niki, S. Endo: 2008 Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. The Journal of Neuroscience, 28(25), pp. 6459-6472.

K. Katayama, K. Yamada, VG Ornthanalai, T. Inoue, M. Ota, NP. Murphy, J. Aruga.: 2008 *Slitrk1*-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. Molecular Psychiatry, (E-pub)

S. Endo, F. Shutoh, T.L. Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N. Hartell, K. Yamaguchi, S. Itohara, A. Narin, P. Greengard, S. Nagao, M. Ito: 2009 Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. PNAS, *in press*

Namihira M., Kohyama J., Semi K., Sanosaka T., Deneen B., Taga T., Nakashima K. Committed Neuronal Precursors Confer

Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev Cell* 16, 245-255 (2009).

Ochiai W., Nakatani S., Takahara T., Kainuma M., Masaoka M., Minobe S., Namihira M., Nakashima K., Sakakibara A., Ogawa M., Miyata T. Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells. *Mol Cell Neurosci* 40, 225-233 (2009).

Kohyama J., Kojima T., Takatsuka E., Yamashita T., Namiki J., Hsieh J., Gage F.H., Namihira M., Okano H., Sawamoto K., Nakashima K. Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18012-18017 (2008).

Sanosaka T., Namihira M., Asano H., Kohyama J., Aisaki K., Igarashi K., Kanno J., Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. *Neuroscience* 155, 780-788 (2008).

Namihira M., Kohyama J., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2099-2109 (2008).

Hatada I., Namihira M., Morita S., Kimura M., Horii T., Nakashima K.

Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. *PLoS ONE* 3, e3189 (2008).

Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S. Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A, Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction, *J Exp Med*, 205: 295-303, 2008.

David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S. Lickert H, Rupp R and Franz WM, MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling., *Nat Cell Biol*, 10: 338-345, 2008.

Yasuhiko Y, Kitajima S. Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. *Development* 135: 3511-3519, 2008.

Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, Nojima S, Hori M, Kikutani H, Kumanogoh A. Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. *FEBS Lett.* 582:3935-40, 2008.

Schwarz Q, Waimey KE, Golding M, Takamatsu H, Kumanogoh A. Fujisawa H,

Cheng HJ, Ruhrberg C. Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Dev Biol.* 324:1-9, 2008.

Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Yamamoto M, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, Suto F, Hori M, Fujisawa H, Kumanogoh A(*corresponding author), Kikutani H. Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Dev Biol.* 321:251-62. 2008.

Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, Piacibello W, Kumanogoh A, Kikutani H, Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Semaphorin 4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med.* 205:1673-85, 2008.

Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol.* 9:17-23, 2008.

Tominaga Y, Ichikawa M, and Tominaga T. Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA_A-mediated feed-forward inhibition in signal propagation. *Neurosci Res* (in press).

Koganezawa N, Taguchi A, Tominaga T,

Ohara S, Tsutsui K, Witter M.P, and Iijima T. (2008). Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. *Neurosci Res* 61, 172-181.

2. 学会発表

Y. Sano, V.G. Orphanalari, K. Yamada, H. Suzuki, T. Suzuki, N.P. Murphy, S. Itohara: 2008 Deficits in conflict-resolution skills in mice lacking the adapter protein X11-like/Mint2. *Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience 38th Annual Meeting*, Washington, DC, November 15-19, 2008

Y. Sano, V.G. Orphanalari, K. Yamada, C. Homma, H. Suzuki, T. Suzuki, N.P. Murphy, S. Itohara: 2008 X11-like protein deficiency is associated with emotional blunting traits in mice. *Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience 38th Annual Meeting*, Washington, DC, November 15-19, 2008

A. Shimohata, H. Omi, A.S. Ebrahim, K. Yamada, C.J. Epstein, H. Sago, K. Yamakawa: 2008 Behavioral phenotyping of the Ts1Cje, a model for Down syndrome. 第31回日本神経科学会、7月9日-11日 東京

下畑充志、尾見裕子、山田一之、左合治彦、山川和弘：2007 ダウン症モデルマウス (Ts1Cje)に見られた活動更新と行動抑制障害 日本人類遺伝学会第52回大会、9月19日-22日 川崎医療福祉大学

山田一之、本間千尋:2008 Arc 欠損マウスの行動解析(2) 第 68 回日本動物心理学大会、9月13日-15日 常磐大学

守村直子、太田摩耶、山田一之、原直子、片山圭一、有賀純:2008 シナプス接着分子 *Lrfrn2/SALM1* ノックアウトマウスにみられた統合失調症様行動異常 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、12月9日-12日 神戸

佐野良威、V.G. *Ornthalalai*、山田一之、本間千尋、鈴木瞳、鈴木利治、N.P. *Murphy*、糸原重美、アダプタータンパク質 *X11-like/Mint2* 欠損マウスの葛藤に対する消極的行動適応、2008

種村 健太郎、菅野 純、受容体原性毒性モデルとしての ER ノックダウンマウスの中枢神経症状、及び神経伝達かく乱による遅発影響の解析、2009年2月:第20回環境ホルモン学会講演会・東京

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害、2008年6月:第35回日本トキシコロジー学会・東京

中島欽一、神経幹細胞制御における抗てんかん薬パルプロ酸の影響とその応用、第5回宮崎サイエンスキャンプ フェニックス・シーガイア・リポート ワールドコンベンションセンターサミット、2009年2月20日-22日

Kinichi, Nakashima, *Epigenetic Mechanisms*

regulation Neural Cell Differentiation and Plasticity. THE 23rd NAITO CONFERENCE ON Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells III. 湘南国際村センター、2008年11月11-14日

中島欽一、あべ松昌彦:神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の作用、第5回NEFRE、フェニックス・シーガイア・リポート ワールドコンベンションセンターサミット、2008年9月19-20日

神山淳、高塚絵理子、佐野坂司、徳永暁憲、岡野栄之、中島欽一、REST/NRSFを介した骨形成因BMPによる新規ニューロン分化抑制機構。第51回日本神経化学会大会、富山国際会議場、2008年9月11-13日。

あべ松昌彦、Hsieh, J.、Gage F.H.、河野憲二、中島欽一、神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の影響。第35回トキシコロジー学会、国立オリンピック記念青少年総合センター、2008年6月26日-28日。

中谷彩矢和、落合和、高原大志、貝沼雅彦、正岡実、波平昌一、中島欽一、小川正晴、宮田卓樹:“生まれたて”娘細胞クローンに置ける非対称な *Ngn2-Tbr2*カスケード起動。Neuroscience2008、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

辻村啓太、あべ松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一: *MeCP2*による神経幹細胞分化制御機構の解析と中枢神経系再生医療への応用。Neuroscience2008、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

中島 欽一、神山 淳、波平 昌一、Gage F.H、岡野 栄之、澤本 知延:神経系細胞分化を制御するエピジェネティクス機構。第50回日本小児神経学会総会、ホテル日航東京、2008年5月28-31日

辻村 啓太、瀬戸口 廣貴、あべ 松昌彦、神山 淳、波平 昌一、中島 欽一:メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2によるニューロン分化誘導機構の解明と中枢神経系再生医療応用への検討。第6回幹細胞シンポジウム、学術総合センター、2008年5月16-17日

Nakashima K., Epigenetic regulation of neural stem cells and its therapeutic application. KRIBB-KU-NAIST joint Symposium, Seoul, February 26-28, 2009

Nakashima. K., pigenetic regulations for neural cell differentiation and plasticity. NAIST-Medicon Valley-Lund university seminar. Lund, December 17, 2008

Nakashima, K., Differentiating neurons confer astrocyte potential on neural precursor cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development. International Joint Symposium Frontier In Biomedical Science : From Genes to Applicarions. Faculti of Medicine, Gadjah Mada University. Yogyakarta. November 24-25, 2008

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008 年 6 月

北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、高木 篤也、関田 清司、今井 清、菅野 純、Percellome 手法を用いたフタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008 年 6 月

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance and evolutional conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2. [第 41 回日本発生生物学学会] 2008 年 5 月

Takahashi Y, Kitajima S, Yasuhiko Y, Kanno J and Saga Y, Delta-like 3(Dll3) does not substitute for Delta-like 1 (Dll1) in somitogenesis in vivo but modulates Dll1/Notch signaling in the posterior PSM. [第 41 回日本発生生物学学会] 2008 年 5 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体(α 型)ノックダウンマウスの神経行動解析 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6 月

今井 清、坪井 優、向井 大輔、山下 龍、

関田 清司、高木 篤也、北嶋 聡、菅野 純、フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性的研究[第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008 年 6 月

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2008) The impact of GABAA-mediated inhibition in signal propagation of rat hippocampal slices examined with membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells with voltage-sensitive dye optical imaging. Program No. 136.7. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

Taguchi, A., Koganezawa, N., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K.-I., Witter, MP, Iijima, T. (2008) Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. Program No. 738.12. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

冨永貴志、冨永洋子. (2008) テタヌス様ガンマバンド刺激によって海馬スライス標本の CA1 野で引き起こされる神経回路網応答, 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡

冨永貴志、冨永洋子. (2008) 海馬スライス標本 CA1 野の神経興奮伝達におけるフィードフォワード抑制の大きさの細胞内分布を膜電位感受性色素により計測した, 第 31 回日本神経科学大会 / Neuroscience2008, 東京

田口綾香、小金澤紀子、冨永貴志、大原慎也、筒井健一郎、Menno Witter、飯島敏夫. (2008) 感覚入力と情動性入力の海馬への情報伝達における嗅内皮質深層の役割

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

本研究班全体の目的

「遅発性影響としての情動認知行動毒性」の評価体系の開発

必要性と期待される成果

1. ドーモイ酸や農薬など、周産期暴露の影響が、「遅発性」・「中枢神経性」として、情動・認知行動異常として現れることが判明。
→ 従来のFOBでは検出が困難である。
2. 受容体過剰刺激等による mRNA、タンパク、細胞・ネットワーク構築異常がその分子背景として定量的に測定可能である。
3. 従来の情動・認知行動試験は、心理学的考察の域に留まり、毒性学的評価に耐えないことが多い。
→ 分子背景を基盤とした高精度化と半定量化が可能。
→ 試験器具、試験方法の標準化により、再現性の確保が可能。

改良行動試験バッテリーと分子解析を組み合わせた
遅発性中枢神経毒性評価法の確立

遅発性影響としての情動認知行動毒性評価法の確立

期待される成果

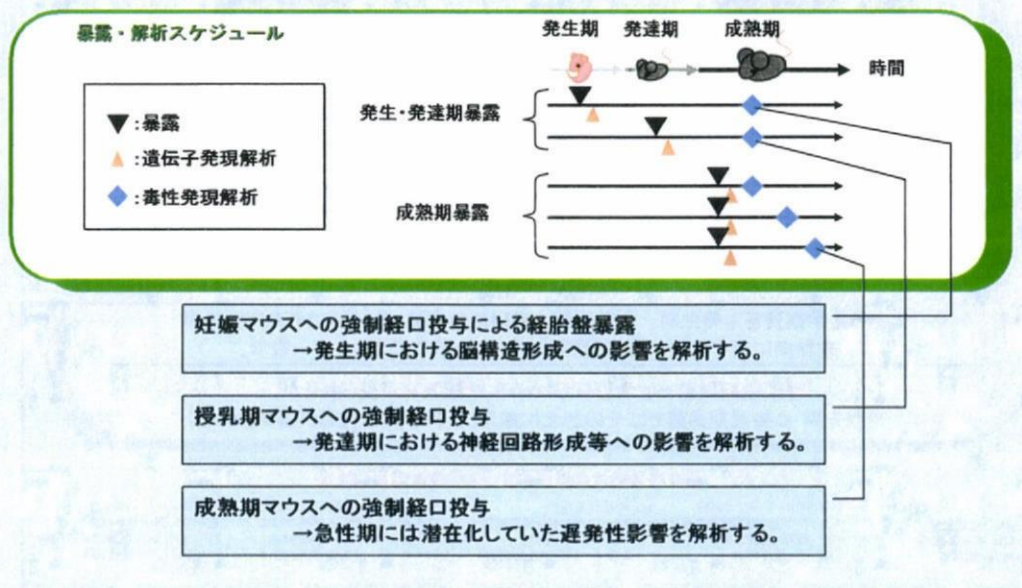
- 1) 化学物質暴露に起因し遅発的に顕在化する「情動・認知行動毒性」に関する体系的ガイドラインの作成に貢献(化学物質のスクリーニング系を含む)
- 2) 子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動・認知行動毒性の予測が可能
- 3) 注意欠陥多動障害、学習障害等への具体的対応策の提示ができることが期待される

方法

暴露スケジュール、情動・認知行動試験バッテリー、及び神経科学的物証の収集項目の最適化を実施

1. 暴露スケジュール及び解析時期の最適化
 - ・発生発達期暴露と成熟期暴露の双方をカバー
 - ・急性影響と遅発性影響の双方をカバー
2. 情動・認知行動試験バッテリーの最適化
 - ・個々の試験の安定性・再現性の吟味と取捨選択基準の策定、検知対象の重複の排除、時間効率・スループット性、等による複数試験の組み合わせの最適化
3. 神経科学的物証の収集項目の最適化
 - ・行動試験に供した動物の脳組織を対象とした形態解析、組織化学解析、神経回路活動解析、mRNA、タンパク発現・修飾解析の実施と最適化
 - ・培養神経細胞を対象とした、神経幹細胞分化能解析、シナプス機能解析による毒性メカニズム解析による、最適化の支援

1. 暴露スケジュール及び解析時期の最適化



情動・認知行動解析

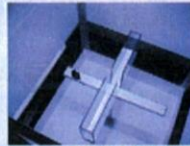
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験

認知行動-学習記憶

経験によって蓄積された意識の再生



条件付け学習記憶試験

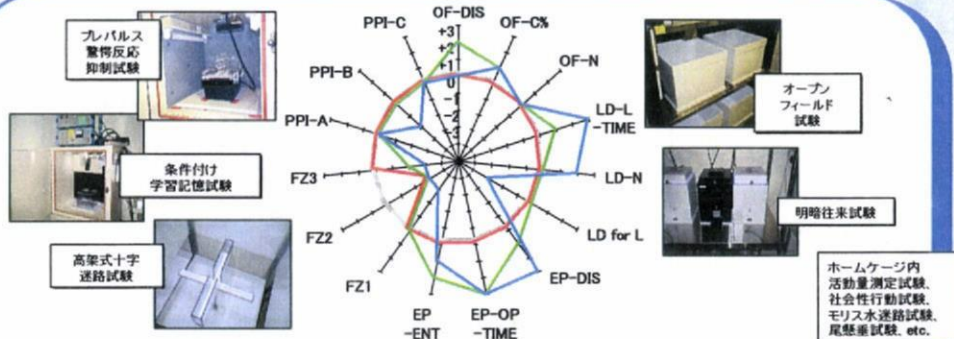
認知行動-情報処理

情報の受理・整理・対応



プレパルス驚愕反応抑制試験

2. 情動・認知行動試験バッテリーの最適化



ある化学物質を ■ 発生期、■ 発達期、或いは ■ 成熟期に投与されたマウスが成熟期に示す行動の異常(逸脱レベル)をp値に基づきレーダー表示。

■ 成熟期暴露では学習記憶のみに成績低下が見られるが、
■ 発生期 ■ 発達期暴露ではその悪化に加え、多彩な異常行動が誘発される。

既存の神経疾患モデルマウスへの対応性も考慮

OF: オープンフィールド試験
OF-DIS: 総移動量
OF-C%: 中央滞在率
OF-N: 移動回数

FZ: 条件付け学習記憶試験
FZ1: 学習度(短期記憶形成度)
FZ2: 空間-連想記憶
FZ3: 音-連想記憶

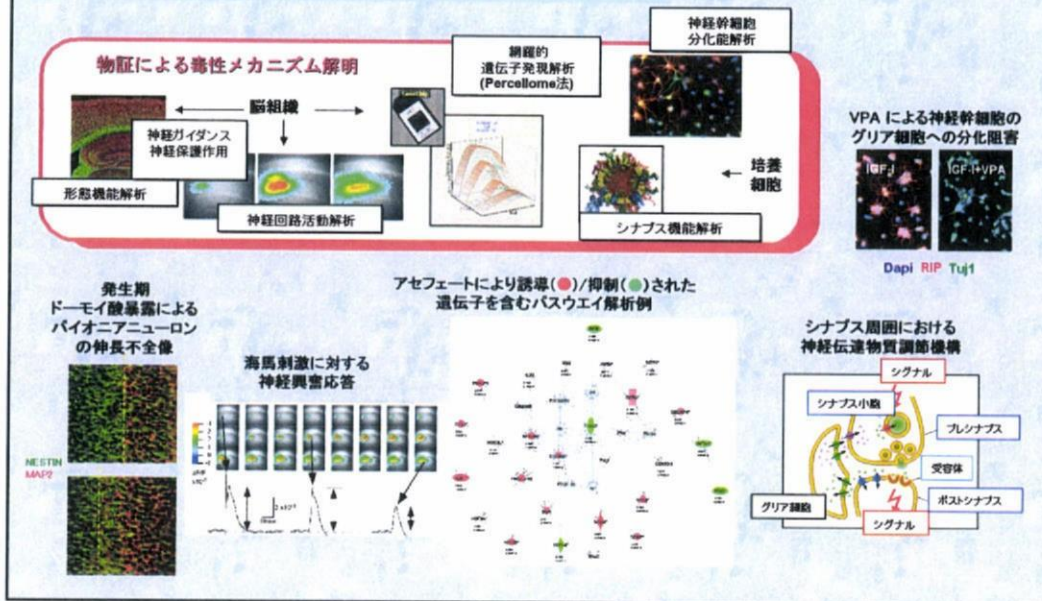
LD: 明暗往来試験
LD-L-TIME: 明所滞在時間
LD-N: 明暗往来数
LD for L: 初移動までの時間

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験
PPI-A: プレパルス90db/120db
PPI-B: プレパルス95db/120db
PPI-C: プレパルス100db/120db

EP: 高架式十字迷路試験
EP-DIS: 高所総移動量
EP-OP-TIME: 開放部滞在時間
EP-ENT: アーム選択数

3. 神経科学的物証の収集項目の最適化

- 1) 行動試験に供した動物の脳組織
- 2) 培養神経細胞



科学的物証によって裏付けられた情動・認知行動毒性の解明により、
ヒトへの外挿を含む高精度のリスク評価を目指す

