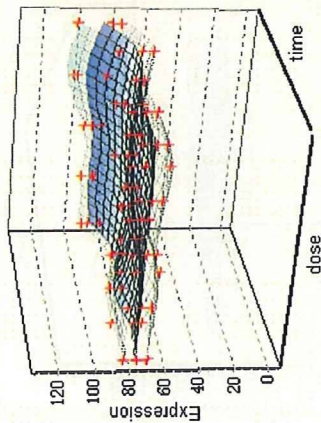
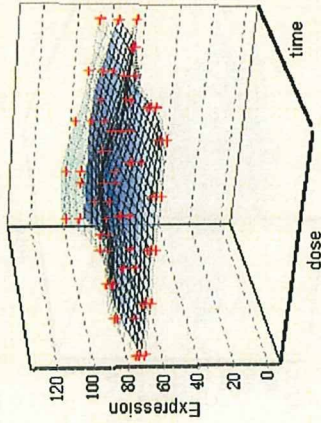


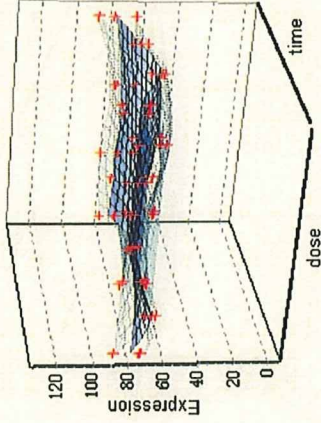
TTG020 - TCDD
corn oil - 2003/10/16



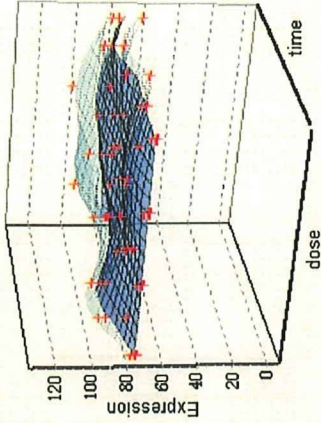
TTG026 - TCDF
corn oil - 2003/11/13



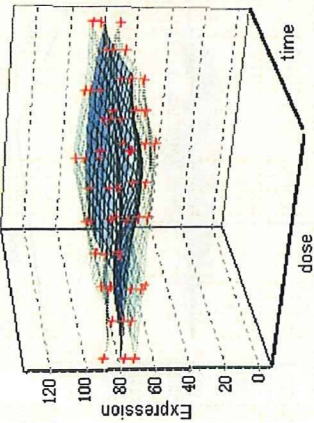
TTG030 - N-Methylamine
MC - 2003/12/18



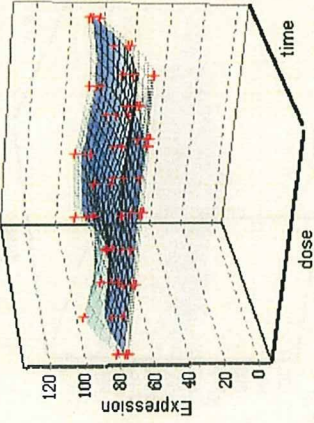
TTG040 - cisplatin
corn oil+10%DMSO - 2004/3/18



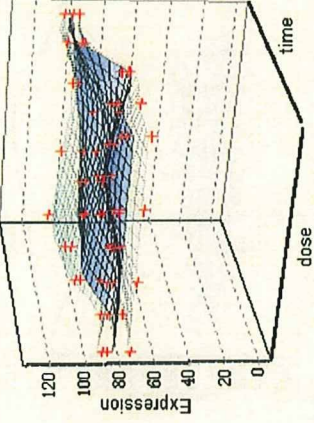
TTG042 - Ethynyl Estradiol
MC+0.1%DMSO - 2004/4/22



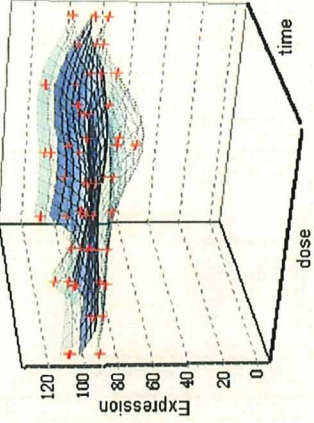
TTG044 - Clofibrate
MC+0.1%DMSO - 2004/5/13



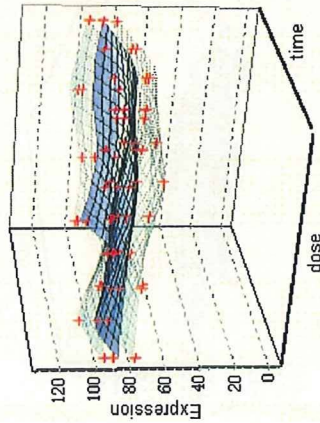
TTG047 - Bisphenol A
MC+0.1%DMSO - 2004/6/17



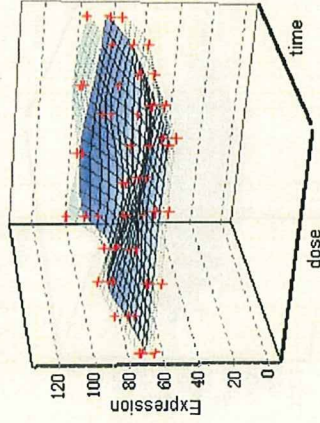
TTG048 - Genistein
MC+0.1%DMSO - 2004/7/1



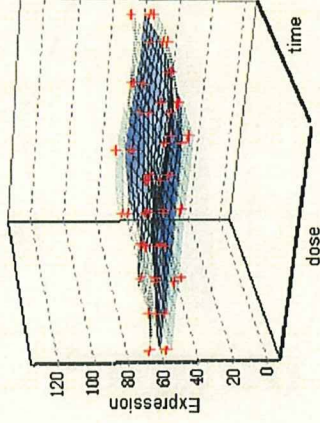
TTG055 - N-ethyl-N-nitrosourea MC
MC - 2004/7/15



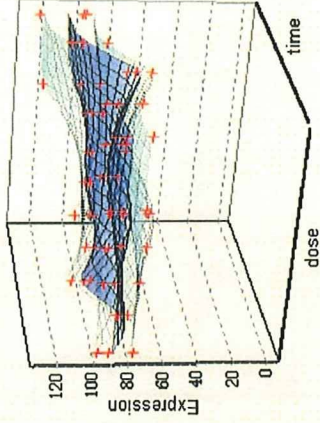
TTG052 - all trans retinoic acid
MC - 2004/9/9



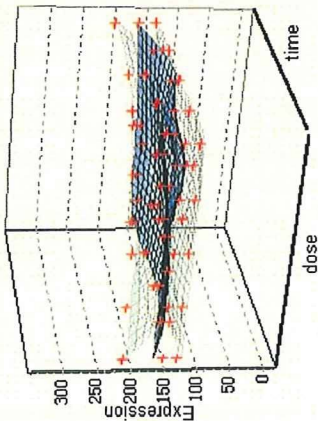
TTG057 - indigo
MC - 2004/9/30



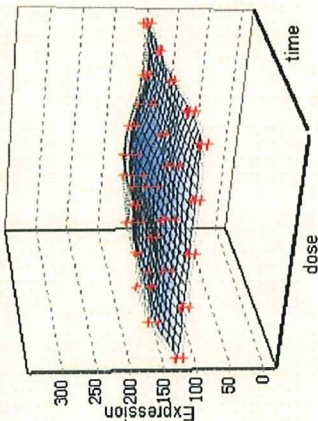
TTG061 - Paraquat 2nd
MC - 2005/2/2



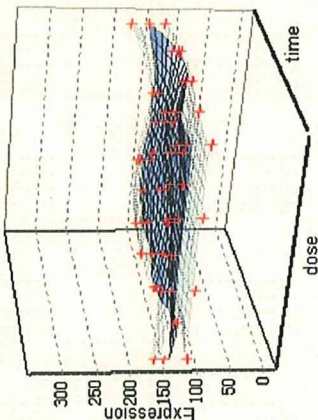
TTG020 - ICDD
corn oil - 2003/10/16



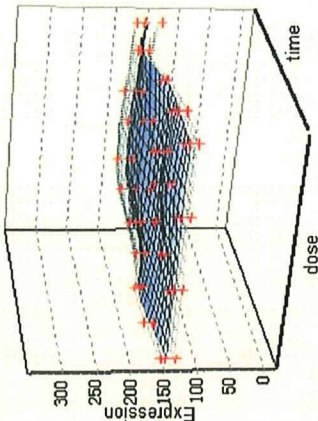
TTG026 - TCDF
corn oil - 2003/11/13



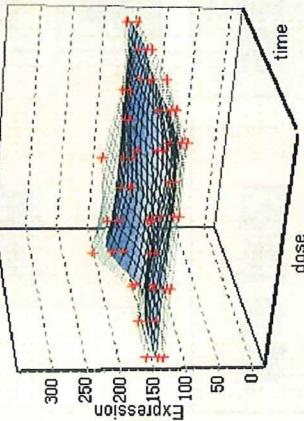
TTG030 - N-Methylamine
MC - 2003/12/18



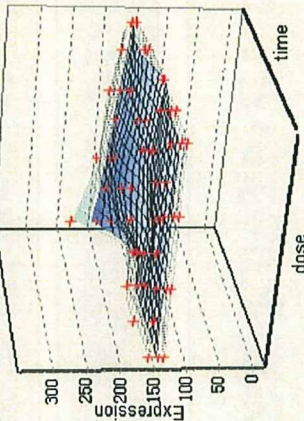
TTG040 - cisplatin
corn oil+10%DMSO - 2004/3/18



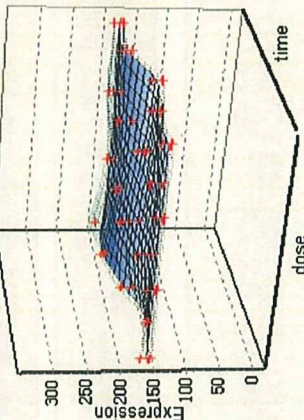
TTG042 - Ethynyl Estradiol
MC+0.1%DMSO - 2004/4/22



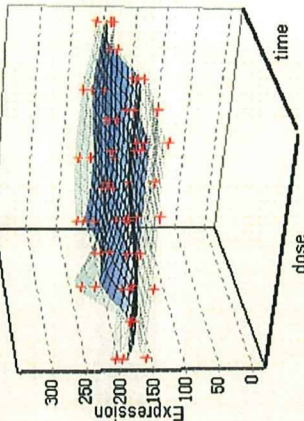
TTG044 - Clofibrate
MC+0.1%DMSO - 2004/5/13



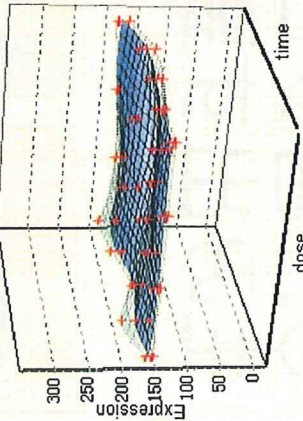
TTG047 - Bisphenol A
MC+0.1DMSO - 2004/6/17



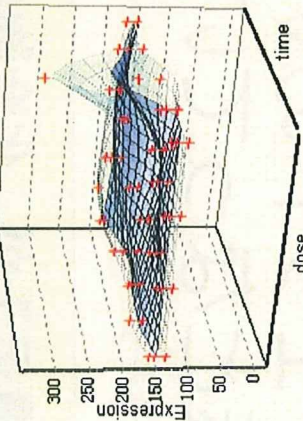
TTG048 - Genistein
MC+0.1%DMSO - 2004/7/1



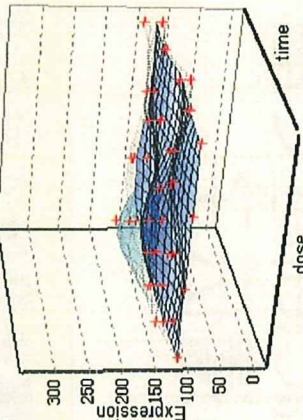
TTG055 - N-ethyl-N-nitrosourea MC
MC - 2004/7/15



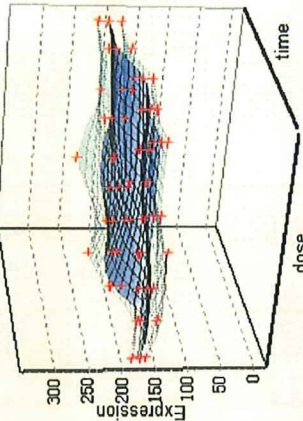
TTG052 - all trans retinoic acid
MC - 2004/9/9



TTG057 - indigo
MC - 2004/9/30



TTG061 - Paraquat 2nd
MC - 2005/2/2



6. 各プロシエクトのVehicle間で最も距離を生み出す要素となっている遺伝子

結果	多くの遺伝子が、化合物の影響を受けておらず、常に発現していた。
想定原因	発現量の変化がないと、MLANGの係数学習ができない。
対策	<p>様々な臓器由来のサンプルデータを用いた係数学習を実施する。</p> <p>MLANG適用時における濃度の初期値を臓器ごとに与える遺伝子を作成する。</p>

Ⅱ. 分担研究報告書

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

研究分担者 山田 一之

独立行政法人理化学研究所 専門職研究員

モノアミン系神経シグナル伝達はヒト及び動物の高次脳機能に重要な役割を果たしており、このシステムの障害は情動性や認知機能に重大な影響を及ぼし、精神疾患の一因とも考えられている。そこで、本研究では、モノアミン酸化酵素阻害剤をモデル化学物質として用い、発達期におけるモノアミン代謝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マウスを用いて検討した。その結果、本研究においては、発達期のモノアミン代謝の一時的なかく乱が成長後の情動反応性および認知機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

モノアミン系神経シグナル伝達は、ヒトの情動性の制御や認知機能に大きな役割を果たしている。例えば、モノアミンの代表であるドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン系神経シグナル伝達の変調は、古くから統合失調症や鬱病など精神疾患の発症因の一つとみなされてきた。精神疾患をもたらす神経シグナル伝達系の変調が何時いかなるメカニズムで生じるのかは未解決の問題であるが、遺伝学的あるいは環境因子との相互作用による変異の蓄積によって、疾患という表現型を呈するものと考えられる。近年、発生・発達期におけるストレス負荷が成長後のストレス耐性や情動性、さらに認知機能にも影響を与えることが明らかにされて来ており、これらの点からも、外的要因による脳内モノアミン系神経シグナル伝達のかく乱が個体の情動機能および認知機能に重大な影響を及ぼすことが推察される。特に、神経シグナル伝達のかく乱に脆弱な発生・発達期における影響は、青少年の問題行動など重要な社会問題とも関連するため、そのメカニズムの解明が急務と考えられる。平成20年度の研究から、発達期のモノアミン系神経シグナル伝達、特にセロトニントランス

ポーター機能の一時的なかく乱が、成長後の個体の情動性および認知機能に影響を及ぼすことが示された。そこで、平成21年度は、発達期のモノアミン代謝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検討を加えた。モノアミン酸化酵素(MAO)は、セロトニンおよびノルアドレナリン標的としたMAOAとドーパミンを標的としたMAOBが知られているが、本研究では平成20年度の研究との関連から、セロトニン系神経シグナル伝達に関与することが予想されるMAOAの阻害剤(MAOAIs)をモデル化学物質として、マウスを用いた行動学的解析を行った。

B. 研究方法

乳児期(生後14日)の雄マウス(C57BL/6J系統)に、MAOA阻害剤であるクロルジリン(10mg/kg)および、MAOA/MAOB阻害剤であるトラニルシプロミン(10mg/kg)を単回強制経口投与し(対照群は同量の生理食塩水を投与)、生後11週齢から情動機能および認知機能について、包括的行動テストバッテリーを用いて行動学的に解析した。包括的行動テストバッテリーは表1に示した通り、自発活動性・情動性(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)・情報処理機能(聴

覚性驚愕反応とプレパルス抑制試験)・記憶機能(バーンズ迷路試験、恐怖条件付け試験)・認知機能(ホールボード試験)の構成とした。薬物の用量は急性毒性を示さない容量とし、トラニルシプロミンについては市販薬(パルネート)の成人1回用量(10mg)から決定した。クロルジリンについては医薬品として市販されていないため、トラニルシプロミンと同用量とした。予備実験から両薬物とも本実験に用いた用量において急性中枢毒性は認められなかった。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた全ての動物実験は、独立行政法人理化学研究所の動物実験倫理規定を遵守し、当施設の動物実験管理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

研究結果を表1に示す。クロルジリン投与群では、11週齢時において有意な体重増加が観察されたが、行動課題では有意な差は認められなかった。クロルジリンの大量経口投与については、特許情報等においても体重増加作用は報告されていないので、遅発性中枢毒性との直接的な関連は薄いものの、この結果がクロルジリンの未知の薬効であるか否か、更なる詳細な検討が必要であろう。

一方、トラニルシプロミン投与群では、成長後にホールボード試験におけるヘッドディッピング行動(床の穴を覗き込む行動で好奇心などを示すものと解釈される)の亢進と立ち上がり行動の減少が観察された。ホールボード試験における上記2種の行動は、マウスの探索動因を反映していると考えられるため、これらの行動の変化はトラニルシプロミン処置マウスにおいて情動機能および認知機能の変化が生じている可能性を示唆している。

D. 考察

本研究では、発達期のモノアミン系神経シグナル伝達の一時的なかく乱が、成長後のマウスの情動性・認知活動に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、発達期におけるMAOIsの単回強制経口投与によって、クロルジリン処置においては成長後の体重増加を、トラニルシプロミン処置においては成長後に探索行動の変化が生じることを示した。

本研究では、選択的にMAOAを阻害するクロルジリン処置マウスでは行動に対する遅発的影響が見られなかった一方、MAOA/MAOBを非選択的に阻害するトラニルシプロミン処置マウスでは行動の遅発性変化が認められた。MAOAがセロトニンおよびノルアドレナリンを標的とするのに対して、MAOBがドーパミンを標的としていることから、本研究で認められた行動変化がいずれの神経伝達系のかく乱によって生じたのか断定することはできない。しかし、認められた行動変化が選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRIs)による遅発性行動変化と類似であることから、本研究における行動変化もセロトニン系神経シグナル伝達のかく乱に依拠するものであることが推測される。この点については、更なる詳細な検討が必要であろう。

平成20年度に用いたSSRIs(パロキセチンおよびフルボキサミン)と同様に、本研究で用いたトラニルシプロミンは、既に医薬品として承認・処方されている薬品である(トラニルシプロミンは米国で承認)。これらの薬品が事故的用量とはいえ、発達期における単回の摂取のみで遅発性の中枢毒性を示し得ることは、既存の毒性学的研究からは予測されなかった結果であり、極めて重要であると言える。

また、平成20年度および本年度の研究結果から、一般的にはMAOIsよりも副作用が弱いと考えられているSSRIsの方が、幼若期投与の場合強い遅発的影響をもたらす可能性が示唆された。近年抗鬱薬は幼児にも処方されるケースが増加しつつあ

るので、乳幼児期投与の影響について、更なる詳細な検討が必要であろう。

E. 結論

本研究において、発達期におけるモノアミン代謝の一時的なかく乱が、成長後の情動性および認知機能に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。本研究から得られた結果は、発達期の機能的脳・神経系形成にモノアミン代謝が深く関わっているという神経科学的な意義のみならず、モノアミン代謝かく乱物質が遅発性中枢毒性を有する危険性を示唆するものとして、毒性学的意義も併せ持つものと言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Y. Sano, V. G. Ornthanalai, K. Yamada, C. Homma, H. Suzuki, T. Suzuki, N. P. Murphy, S. Itohara: 2009 X11-Like Protein Deficiency Is Associated with Impaired Conflict Resolution in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 29(18), pp. 5884-5896.

2. C. Homma, K. Yamada*: 2009 Physical properties of bedding materials determine the marble burying behavior of mice (C57BL/6J). *TOBSJ*, 3, 34-39. (*: corresponding author)

3. T. Maekawa, S. Kim, D. Nakai, C. Makino, T. Takagi, H. Ogura, K. Yamada, B. Chatton, S. Ishii: 2009 Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J*, 2009 Nov 5 (E-pub)

4. S. Sakatani, K. Yamada*, C. Homma, S. Munesue, Y.

Yamamoto, H. Yamamoto, H. Hirase: 2009 Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice. *PLoS One*, 4(12): e8309. (*:joint first author)

2. 学会発表

1. 山田一之、本間千尋: 2009 マウスを用いた発生・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 (1) 日本心理学会第73回大会 (8月26日-28日 立命館大学)

2. 佐野良威、V.G. Ornthanalai、山田一之、本間千尋、鈴木瞳、鈴木利治、N.P. Murphy、糸原重美: 2009 X11L protein deficiency is associated with the selective impairment of motivational approach behavior and the withdrawn response to social conflict. 第32回日本神経科学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

3. 守村直子、太田真耶、安田浩樹、片山圭一、原直子、山田一之、山口和彦、有賀純: 2009 Lrln2/SALM1 a synaptic leucine-rich repeat transmembrane molecule is required for proper synapse maturation and brain function. 第32回日本神経科学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

4. 松本圭史、片山圭一、守村直子、山田一之、VG Ornthanalai、太田真耶、NP Murphy、有賀純: 2009 Slitrk5-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and serotonergic abnormalities. 第32回日本神経科学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

5. 山田一之: 2009 マウスにおける選択的注意の系統間比較 日本動物心理学会第69回大会 (9月25-27日 岐阜大学)

6. 前川利男、金昇準、小倉博雄、山田一之、中井大助、石井俊輔 ATF-7 依存的なヒストンH3メ

チル化を介したストレスによる転写制御 第 32 回日本神経科学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

7. 小川実幸、山田一之、VG Orphanalai、NP Murphy、片山圭一、有賀純：2009 膜結合型ユビキチン Rines ノックアウトマウスの行動解析および神経化学的解析 第32回日本分子生物学会年回 (12月9-12日 パシフィコ横浜)

HG. 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

特になし

表1 行動課題と結果のまとめ

課題	クロルジリン	トラニルシプロミン
体重測定	↑	ns
自発活動性	ns	ns
オープンフィールド	ns	ns
明暗往来テスト	ns	ns
高架式十字迷路テスト	ns	ns
聴覚性驚愕反応とPPI	ns	(startle) ↑*
バーンス迷路	ns	ns
恐怖条件付け	ns	ns
ホールボードテスト	ns	(head dip) ↑** (rearing) ↓

Notes: *: on the 120 dB trials; **: partially

表2 本研究において構築した新規実験システム

課題	現在の状況
3部屋式社会行動テスト	プロトコルの開発中
集約的情動性評価システム	動作確認中
運動機能および動機付け評価テスト	動作確認中

集約的情動性評価システム：

1台で移動運動、明暗往来、条件性場所選好<嫌悪>、強制水泳の複数課題が出来るシステム

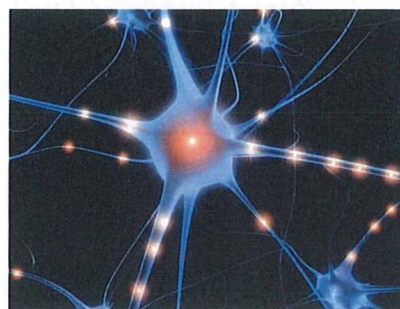
発生・発達期の モノアミン系神経シグナルかく乱による 遅発性中枢毒性発現の解明

独立行政法人 理化学研究所
脳科学総合研究センター

山田 一之

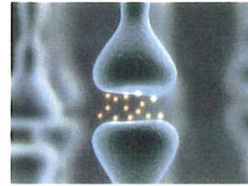
目次

- 1.本研究の目的
- 2.平成21年度の研究方法
- 3.平成21年度の研究成果
- 4.今後の研究展開
- 5.補足



1.本研究の目的

脳内モノアミン系神経シグナル伝達



主要な神経伝達物質	シグナル伝達に主要な分子
・セロトニン(5-HT)	5-HT receptors, 5-HT transporter
・ドーパミン(DA)	DA receptors, DA transporter
・ノルアドレナリン(NA)	NA receptors, NA transporter

- ・ヒトや動物の高次脳機能に重要な役割
- ・このシステムの障害は情動性や認知機能に重大な影響

⇒発生・発達期におけるモノアミン系神経シグナル伝達の一時的なかく乱が、成長後の情動性および認知機能に及ぼす影響について、行動学的に明らかにすること

2.平成21年度の研究方法

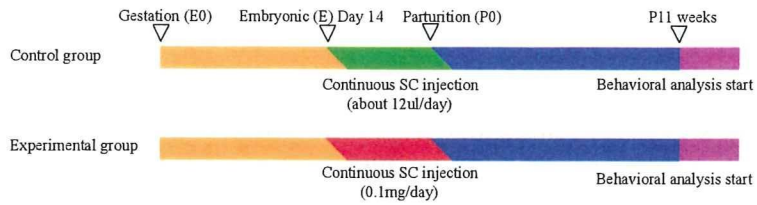
Procedure #1

平成20年度の研究で、発達期(生後14日)におけるSSRIsの単回強制経口投与によって、成長後のマウスの行動に変化が生じることが分かった。そこで、平成21年度は単回強制経口投与の効果が大きかったSSRI(パロキセチン)の経胎盤投与の影響を検討した。

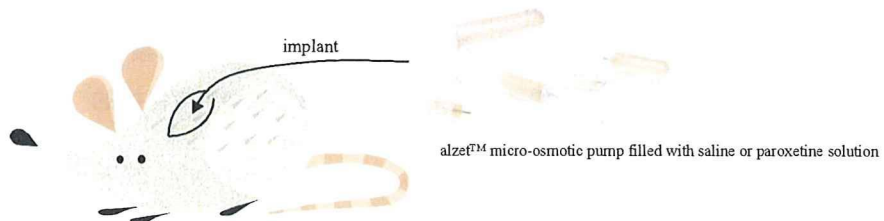
Procedure #2

次に、より広範なモノアミンシステムのかく乱の影響を検討するために、発達期におけるモノアミン酸化酵素阻害剤(MAOIs)投与によるセロトニン系およびドーパミン系神経シグナル伝達の一時的かく乱の遅発的影響を検討した。本研究では、非選択的MAOA/BIとしてtranylcypromin(トラニルシプロミン:抗鬱薬としてアメリカで市販されている)、選択的MAOAIとしてclorgyline(クロルジリン:未承認)を用い、発達期(生後14日)における単回強制経口投与の遅発的影響について検討した。

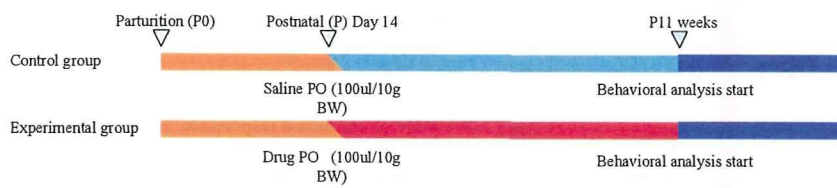
Schema of experimental procedure #1 Transplacentally Administered (SC)



Drug: paroxetine: 0.7 mg/100µl (continuous SC by alzet™ model 1007D)



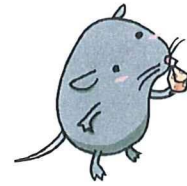
Schema of experimental procedure #2 per os (PO)



Drug: clorgyline: 10 mg/kg (p.o.)
 tranylcypromin: 10 mg/kg (p.o.)



3.平成21年度の研究成果



平成21年度は、

〈プロジェクト #1〉

- ・胎児期のマウスにSSRI (paroxetine)を経胎盤投与し、
- ・成長後のマウスの全般的な行動に与える影響について包括的行動テストバッテリーを用いて解析し、またストレス反応性について簡易生化学検査(グルコーステスト)を行った。

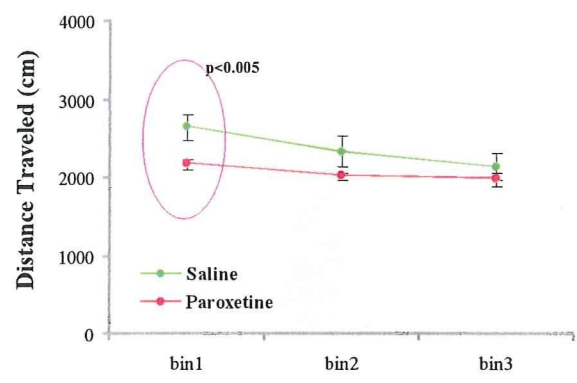
〈プロジェクト #2〉

- ・モデル化学物質としてモノアミン酸化酵素阻害剤(MAOIs)である clorgylineとtranylcyprominを用い、
- ・神経系の発達時期である生後14日齢時に強制単回経口投与し、
- ・成長後のマウスの全般的な行動に与える影響について包括的行動テストバッテリーを用いて解析した。

Project #1 Modified Behavioral Test Battery

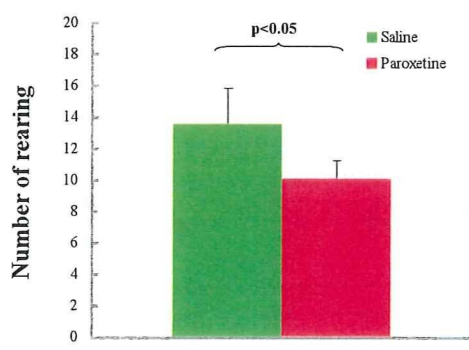
Test 1	<i>Body weight measurement: assessment of physical development</i>
Test 2	<i>Home cage activity measurement (7 days): assessment of spontaneous activity</i>
Test 3	<i>Open field test (15 min): assessment of emotional response to the novel environment</i>
Test 4	<i>Light-dark box test (10 min): assessment of anxiety property</i>
Test 5	<i>Elevated plus maze test (5 min): assessment of anxiety property</i>
Test 6	<i>Auditory startle response test:</i> assessment of sensory-motor gating and information processing
Test 7	<i>Hole board test (5 min): assessment of exploration (in case, curiosity)</i>
Test 8	<i>Social inter action test (6 hrs): assessment of sociality)</i>
Test 9	<i>Tail suspension test (10 min): behavioral despair)</i>
Test 10	<i>Classical fear conditioning test (3 days): assessment of contextual and cued memory</i>

Decreased locomotor activity in paroxetine-treated mice



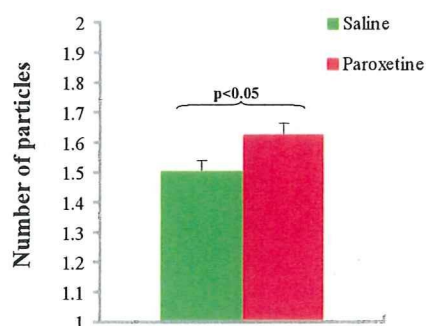
Notes: bin1, bin2, and bin3 represent 5-min sampling time. Bars represent SEM.
(Total: $f(1,18)=6.24, p<0.05$)

Decreased rearing in the hole board test in paroxetine-treated mice



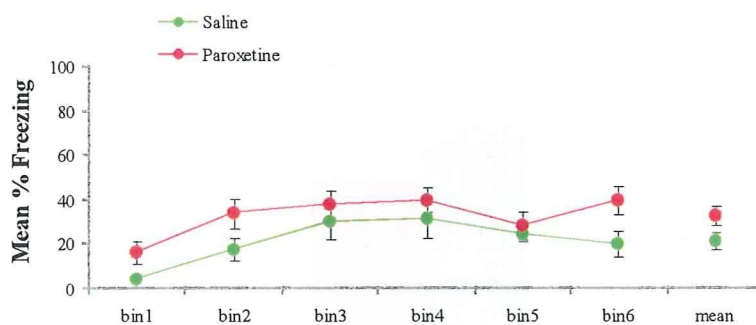
Rearing behavior of mice in the hole board test means different exploration. This behavior does not change equally to head-dipping behavior ($t=2.45, p<0.05$).

Decreased social interaction in paroxetine-treated mice



If two mice are contacted, the particle is one. On the other hand, if two mice are apart from each other, the particle is two. Thus, the higher the number of the particle is, the lower sociality may be assumed ($U=22$, $p<0.05$)

Enhanced but not yield to the statistical significance overall context-fear memory in paroxetine-treated mice



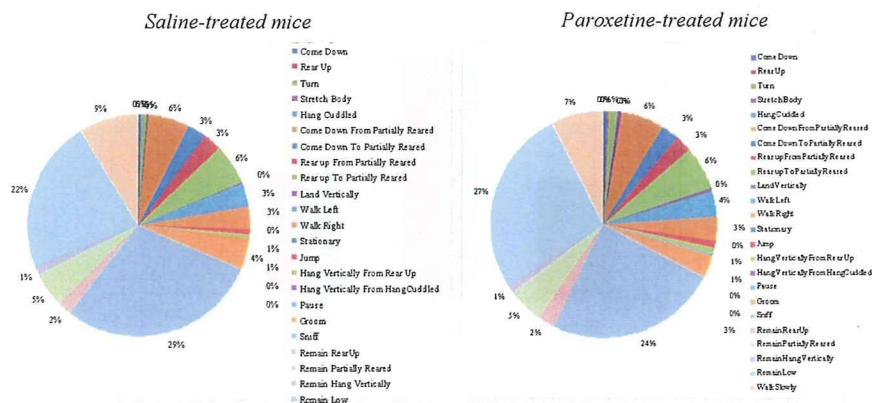
Notes; Each time bin represents 30-sec sampling time. Bars represent SEM. Two-way ANOVA revealed significant main effect of drug treatment ($F(1,18)=3.44$, $p<0.88$).

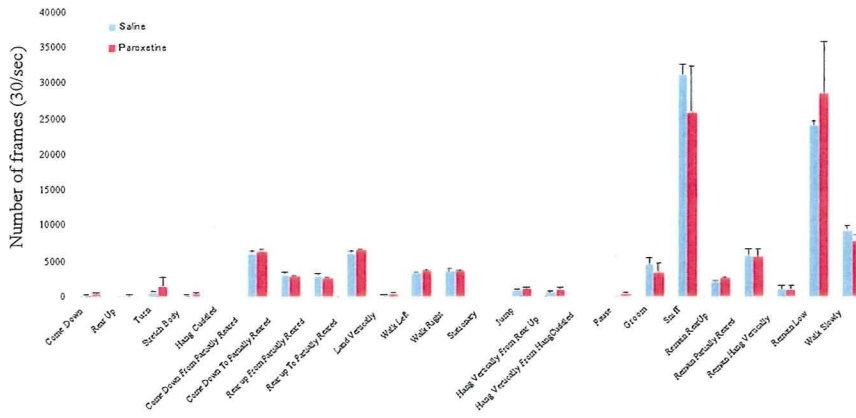
Summary of the behavioral analysis in project #1

Task	saline	paroxetine
Body weight		ns
Homecage activity		ns
Open field test	Distance	> (partially)
	%center	ns
Light-Dark box test	Stay in light box	ns
	Distance in light box	ns
Elevated plus maze test	Stay in open arm	ns
	Distance in open arm	ns
Auditory startle response & Prepulse inhibition	Startle response	ns
	PPI	ns
Hole board test	Head dipping	ns
	Rearing	> (partially)
Social inter action test		> (late phase)
Tails suspension test		ns
Classical fear conditioning		< (context test)*

Note; *: trend (0.05<p<0.10)

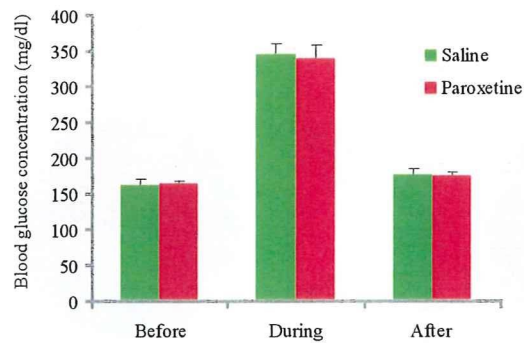
Detailed analysis of home cage behavior and Response to the restraint stress in female paroxetine-treated mice





There were no specific differences in the short-term (60 min) home cage activity profile between saline- and paroxetine-treated mice (female). Now we are developing a multi-analysis system of this behavior profiling.

*Response to the restraint stress in female paroxetine-treated mice
-blood glucose test-*



There were no significant differences between saline- and paroxetine-treated mice (female) in blood glucose concentration during restraint stress administration.

Project #1 まとめと考察

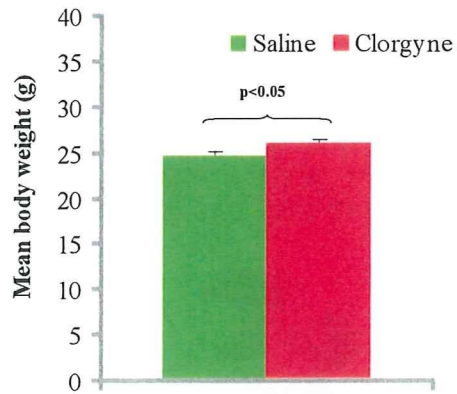
- 1) 胎生期(胎生14日~21日)における持続的なパロキセチンの経胎盤投与は、仔の成長後の行動、特に情動的側面に影響を及ぼすことが示された。
- 2) 本研究の結果は、周産期における母体へのSSRIの連続投与が成人期における情動異常のリスクファクターの一つになり得ることを示唆している。
- 3) パロキセチンについては、すでに医薬品情報にも記載されているが、平成20年度の研究結果とあわせて、妊婦および発達期の乳幼児・小児に対する処方には更に慎重を期するべきであることが改めて示されたといえよう。



Project #2 Modified Behavioral Test Battery

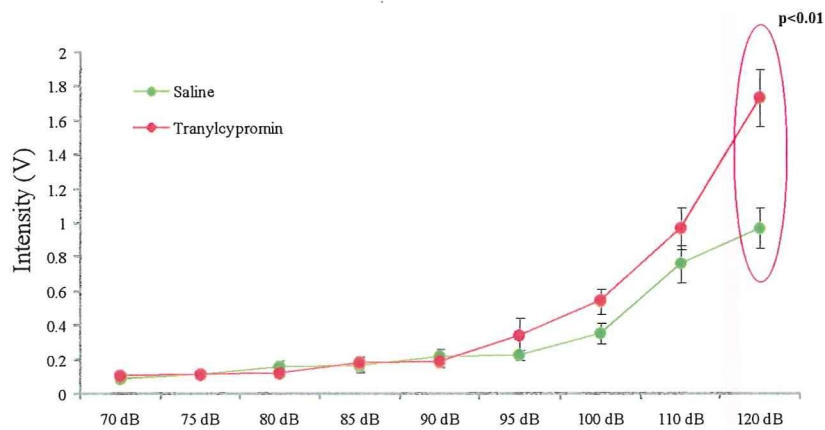
- | | |
|--------|---|
| Test 1 | <i>Body weight measurement:</i> assessment of physical development |
| Test 2 | <i>Home cage activity measurement (7 days):</i> assessment of spontaneous activity |
| Test 3 | <i>Open field test (15 min):</i> assessment of emotional response to the novel environment |
| Test 4 | <i>Light-dark box test (10 min):</i> assessment of anxiety property |
| Test 5 | <i>Elevated plus maze test (5 min):</i> assessment of anxiety property |
| Test 6 | <i>Auditory startle response test:</i>
assessment of sensory-motor gating and information processing |
| Test 7 | <i>Barnes maze test (6 days):</i> assessment of spatial learning and memory |
| Test 8 | <i>Hole board test (5 min):</i> assessment of exploration (in case, curiosity) |
| Test 9 | <i>Classical fear conditioning test (3 days):</i> assessment of contextual and cued memory |

*Increased body weight in clorgyline-treated mice
in 11 weeks of age*



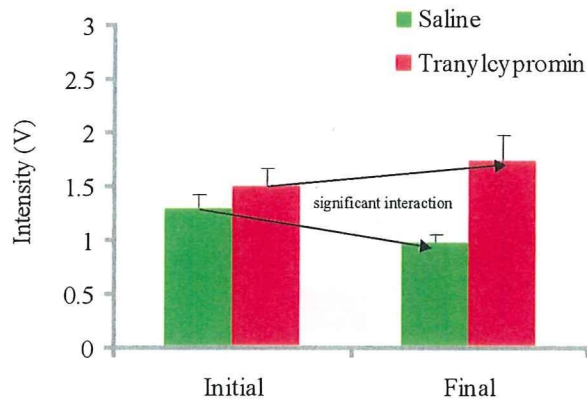
There are no literatures reporting that clorgyline-treatment could increase body weight gain. It is necessary to determine whether our data is an artifact or unknown side-effect of this drug ($t=2.509, p<0.05$).

Increased startle response in tranylcypromin-treated mice (1)



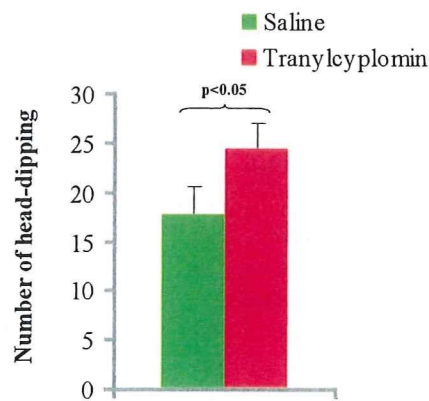
There is a statistical difference at 120dB intensity ($t=3.75, p<0.01$).

Increased startle response in tranylcypromin-treated mice (2)



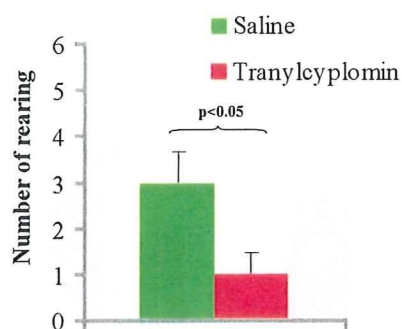
A two-way ANOVA revealed significant main effect of drug treatment ($F(1,18)$, $p < 0.05$) and drug x repeat interaction ($F(1,18)=04.2$, $p < 0.002$).

Increased head-dipping in tranylcypromin-treated mice



Head-dipping in the hole board test has two means; one is the escaping response when the experimental environment is aversive (e.g. high lit), the other is the exploration (curiosity) when the experimental environment is less aversive (e.g. dim lit). Our experiment was conducted less aversive environment, thus the difference may not be escaping. However, it reminds unknown whether the increment of head-dipping in tranylcypromin-treated mice means increased curiosity or not ($t=2.25$, $p < 0.05$).

Decreased rearing in tranylcyplomin-treated mice



In the rearing behavior, tranylcyplomin-treated mice showed overall decrement in both number and duration (number: $F(1,18)=6.0$, $p<0.05$; duration: $F(1,18)=5.76$, $p<0.05$, respectively). This graph represent total number of rearing ($t=2.40$, $p<0.05$)

Summary of the behavioral analysis

Task		Clorgyline	Tranlycypromin
Body weight		↑	ns
Homecage activity		ns	ns
Open field test	Distance	ns	ns
	%center	ns	ns
Light-Dark box test	Stay in light box	ns	ns
	Distance in light box	ns	ns
Elevated plus maze test	Stay in open arm	ns	ns
	Distance in open arm	ns	ns
Auditory startle response & Prepulse inhibition	Startle response	ns	↑
	PPI	ns	ns
Barnes maze	ns	ns	
Hole board test	Head dipping	ns	↑
	Rearing	ns	↓
Classical fear conditioning		ns	ns

Note: Arrows indicate significant difference between control (saline-treated) and experimental (drug-treated) mice.