

Project #2 まとめと考察

1) 幼若期におけるMAOIsの単回強制経口投与は、成長後のマウスにおいて、体重増加のような身体的変化や驚愕反応・探索行動などの情動的・認知的行動に影響を及ぼし得ることが示された。

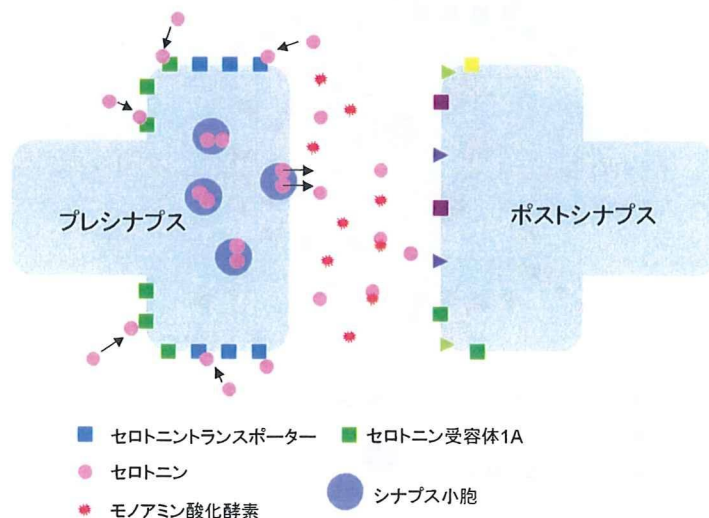
2) また、これらの情動的・認知的変化は平成20年度のSSRIsを用いた研究と類似したものであったが、SSRIsよりも影響が小さい傾向が見られた。この結果は、乳幼児・小児と成人では、SSRIsとMAOIsの副作用が異なる可能性を示唆している。より詳細な検討が必要と考えられる。

3) MAOIs、SSRIsともに、通常考えにくい投与量とはいえ、単回の服用エピソードで成長後に脳機能に遅発的影響を及ぼす可能性のあることは、小児に対する抗鬱薬の処方について、一定の考慮が必要であることを示唆している。

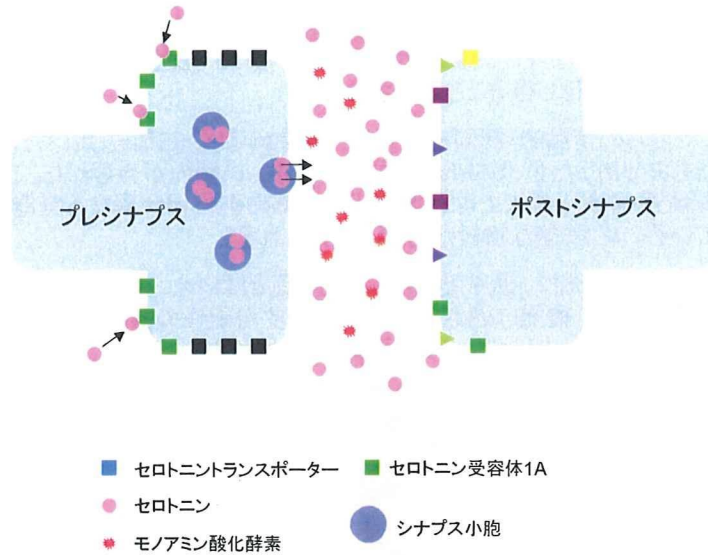


4. 今後の研究の展開

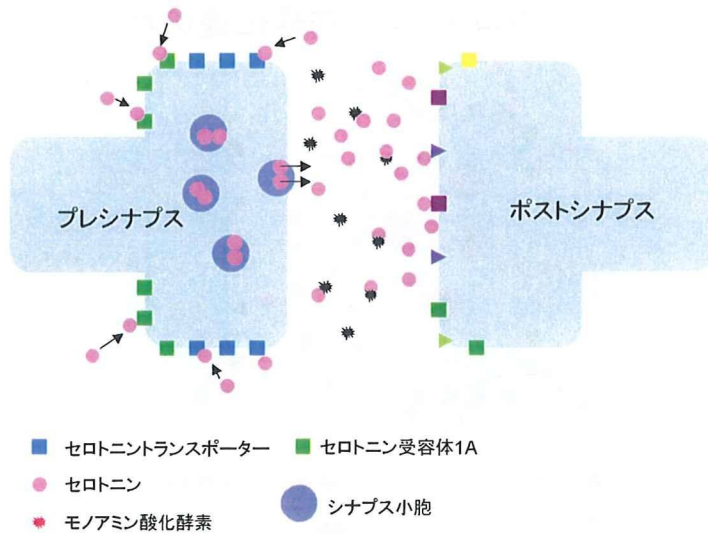
セロトニン系神経伝達の概略



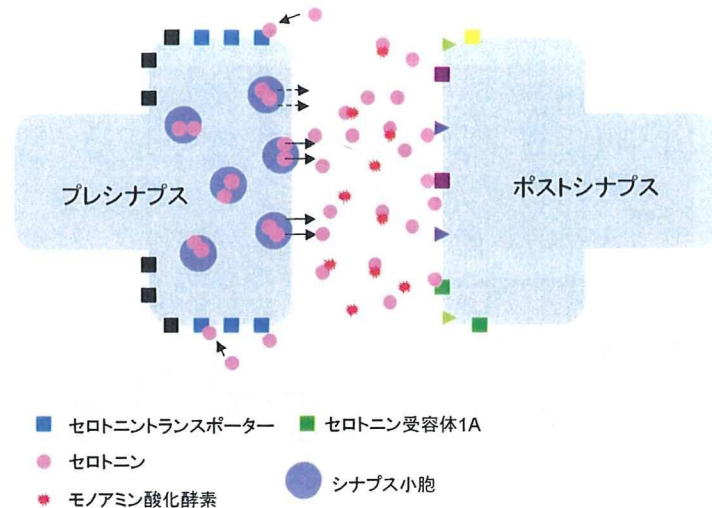
平成20年度:SSRIsによるかく乱(黒) → 遅発性行動変化



平成21年度:MAOIsによるかく乱(黒) → 遅発性行動変化

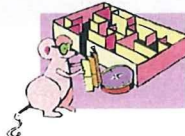


平成22年度:5-HT1Aアゴニストによるかく乱(黒) → ?



なぜ、5-HT1Aなのか？

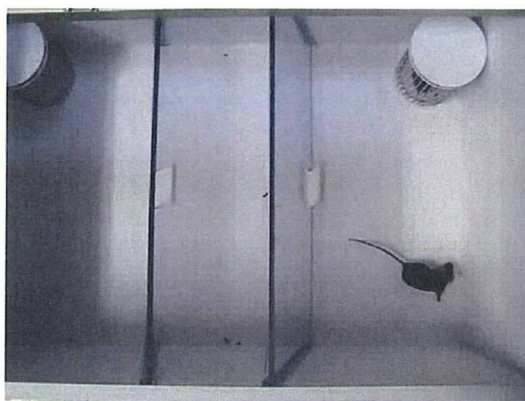
1. 5-HT1Aは自己受容体であり、セロトニンニューロン活動を抑制する。SSRIs、MAOIsの投与はシナプス間隙におけるセロトニン残量を増加させるため、結果として5-HT1A受容体の活動も増加している可能性がある。
2. セロトンは未発達な脳内で神経成長因子としての役割を果たしている可能性がある(Bonnin et al., 2007; Nakatani et al., 2009; Riccio et al., 2009)。従って、5-HT1Aの活動が神経成長に関与している可能性がある。
3. もし5-HT1Aの活動が神経成長に関与しているなら、胎児期・乳幼児期の5-HT1Aの過活動(セロトニンニューロン活動のかく乱)は、神経構築を障害し、成長後の行動異常を起こすかもしれない。
4. 目下8-OH-DPADをモデル化学物質として、予備実験を実施中。



5.補足

平成21年度 新規に構築した実験課題・装置

#1 3-chambered social interaction system



This system provide two kinds of social tests: sociability and preference for social novelty.

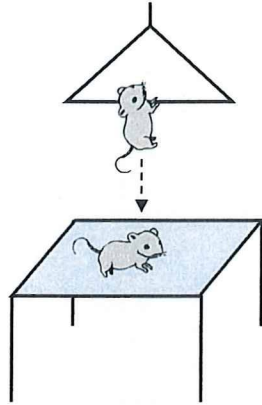
#2 Quick screening system



SCANET™ based multitask behavioral analyzing system (photo: light-dark box test). Now, we can conduct open field (arena) test, L-D box test, conditioned place preference/avoidance test, forced swimming test, and something in this only one system.

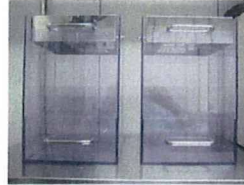
#3 Hanging behavior analysis box

Original type of wire-hanging test



In the original type of wire-hanging test mainly assesses the strength of forepaw. However, modified hanging test assesses mice's patience or endurance.

Modified hanging test



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

研究分担者 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

成熟期（生後 10 週齢）、幼若期（生後 2 週齢）、胎生期（胎生 XX 日）のマウスに対して、イボテン酸（1mg/kg）を単回強制経口投与したところ、生後 12~13 週齢時の行動解析において、幼若期投与群に、不安関連行動の逸脱、記憶能の低下、及び脳内情報処理の異常が認められた。Percellome 法による海馬の網羅的初期遺伝子発現変動解析の結果、幼若期投与群では、神経系発達に関与するシグナルカスケード群への影響が抽出された。本結果は海馬のイボテン酸に対する感受性が幼若期に高いことを示し、また、その遺伝子発現変動プロファイルは成熟期中枢神経行動毒性発現の分子メカニズム解明の端緒となる情報を含んでいた。

A. 研究目的

個体の胎生期から幼若期は、脳の発生期から発達期に相当し、脳の基本構造の形成とともに、神経伝達物質とその受容体を介した神経シグナルの適切な伝播によって脳の神経回路が構築される時期である。従って、この時期における個体への化学物質暴露による神経シグナルのかく乱は、脳の神経回路の構築異常を誘発し、成熟期に異常行動として顕在化する脳の高次機能障害を惹起する蓋然性がある。また、該当時期のヒト（胎児期から小児期のヒト）への化学物質暴露は、自閉を主症状とする発達障害、注意欠陥多動障害、学習障害、鬱症等の精神神経疾患のリスクを高めることが疑われている。実際に、我々はこうした早期暴露による遅発性中枢神経影響は、従来の成熟個体を対象とした神経毒性試験では包括しきれないことを経験している。そこで、本研究では、マウス胎生期から幼若期におけるアミノ酸系の神経シグナルを化学物質を用いてかく乱し、それによって引き

起こされる不可逆性の神経ネットワークの構築異常と、成熟期に顕在化する情動・認知行動異常を解析し、その基幹メカニズムの解明を目的とする。

B. 研究方法

アミノ酸系神経シグナルをかく乱するモデル化学物質として、キノコ毒の一つであるイボテン酸を選択した。尚、イボテン酸は興奮性アミノ酸系神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体に対するアゴニストであるとともに、経口摂取された場合は、その大部分が体内で脱炭酸されることで、抑制性アミノ酸系神経伝達物質である GABA の受容体に対するアゴニストであるムシモールに変化するとされている。

成熟期（生後 11 週齢）、幼若期（生後 2 週齢）、胎生期（胎生 14.5 日齢）のマウスに対して、イボテン酸（1mg/kg；溶媒は 0.5%メチルセルロース溶液）を強制経口投与（胎生期投与は妊娠マウスへの強制経口投与による経胎盤暴露による）し、生

後 12-13 週齢時に、雄マウスについて、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、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験を組み合わせた情動-認知行動バッテリー解析を行った（いずれの装置も小原医科産業製）。幼若期及び静寂期の雄マウスに対して、イボテン酸（1mg/kg：溶媒は0.5%メチルセルロース溶液）単回強制経口投与後 2、4、8、24 時間後の海馬について、Percollome 法（細胞 1 個当たりの mRNA 発現コピー数として mRNA 発現絶対量を得る手法）による遺伝子発現変動解析を行った。

実験実施に際しては、「国立医薬品食品衛生研究所：動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守し、科学的及び動物愛護的配慮を十分に行い施行した。

C. 研究結果

イボテン酸投与による急性影響として、投与 2、4 時間後の幼若期投与群に末梢神経症状が観察されたが、投与 8 時間後には回復し、その後、成長にともなう体重増加に異常はなく、また一般飼育環境下においても、胎生期投与群、成熟期投与群同様に、異常行動は観察されなかった。雄マウスを用いた行動解析の結果、対象群と比較して、幼若期投与群に、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の増加（約 160%：t-test, $p<0.05$ ）、明暗往来試験における明暗往来数の減少（約 70%：t-test, $p<0.05$ ）と明所への初移動に要する時間（暗所滞在時間）の延長（約 230%：t-test, $p<0.05$ ）が認められた。また幼若期投与群に、条件付け学習記憶試験における、音-連想記憶能の低下（約 65%：t-test, $p<0.05$ ）が確認された。さらに、幼若期投与群に、プレパルス驚愕反応抑制試験において、70dB の背景音の下、120dB の刺激に対する

85、90、95dB のプレパルス刺激による重篤な驚愕反応抑制不全が認められた（順に 0.4%、4%、22%：いずれも t-test, $p<0.05$ ）。胎生期投与群、並びに成熟期投与群に関しては、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、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験において、行動様式の異常や逸脱は認められなかった（表 1）。

表 1 行動解析結果

イボテン酸投与時期	成熟期	幼若期	胎生期
オープンフィールド試験			
総移動量	NS	NS	NS
中央部滞在時間	NS	↑ ($p<0.05$)	NS
総移動回数	NS	NS	NS
明暗往来試験			
明所滞在時間	NS	NS	NS
総移動回数	NS	↓ ($p<0.05$)	NS
暗所滞在時間	NS	↑ ($p<0.05$)	NS
高架式十字迷路試験			
総移動量	NS	NS	NS
開放アーム滞在時間	NS	NS	NS
総アーム選択数	NS	NS	NS
条件付け学習記憶試験			
場所-連想記憶度	NS	NS	NS
音-連想記憶度	NS	↓ ($p<0.05$)	NS
プレパルス驚愕反応抑制試験			
驚愕反応抑制率	NS	↓ ($p<0.05$)	NS

↑：増加上昇、↓：減少低下、NS：有意差なし

成熟期投与群、及び幼若期投与群の Percellome 法による海馬の遺伝子発現変動解析から、それぞれの同週齢対象群の海馬における発現コピー数が 1 以上の遺伝子群の中で、ratio>1.2 で有意 (t-test, $p<0.01$) に遺伝子発現変動【増加・減少】していた遺伝子プローブセット (PS) 数は、成熟期投与群にて、投与 2 時間後で【84・9】、投与 4 時間後で【119・29】、投与 8 時間後で【7・49】、投与 24 時間後で【12・88】であり、投与 4 時間までに遺伝子発現誘導が生じるとともに、投与 8 時間移行に遺伝子発現抑制が顕著になるという傾向を示した。一方、幼若期投与群では、投与 2 時間後で【14・96】、投与 4 時間後で【46・117】、投与 8 時間後で【20・13】、投与 24 時間後で【33・9】であり、投与 4 時間までに顕著な遺伝子発現抑制が認められた。両群に共通する遺伝子プローブセットは、投与 2 時間後で【1・1】、投与 4 時間後で【6・1】、投与 8 時間後で【0・0】、投与 24 時間後で【0・0】であった。

特に、成熟期に情動・認知行動異常を呈した幼若期投与群に焦点を合わせ、Percellome 法により抽出された発現変動遺伝子を Ingenuity Pathways Analysis に投入し、パスウェイ解析を行った結果、細胞免疫応答シグナル群、細胞死シグナル群、細胞障害応答シグナル群への影響とともに、神経系関連シグナルとして、軸索誘導シグナル、エフェリン受容体シグナル、神経栄養因子シグナルへの影響が生じていることが示された。

D. 考察

本研究によって、幼若期マウスへのイボテン酸の単回強制経口投与の結果、その成熟期に行動異常が誘発されることを示した。この行動異常は、成熟期マウスへの投与による影響、及びその解析

からは推測不能のものであり、幼若期の個体を対象とした新たな毒性試験の必要性を示すものと判断される。

行動異常の特徴としては、不安関連行動の逸脱 (オープンフィールド試験及び明暗往来試験)、記憶異常 (条件付け学習記憶試験)、及び極めて重篤な脳内情報処理能低下 (プレパルス驚愕反応抑制試験) である。特に、プレパルス驚愕反応抑制不全は、統合失調症において報告されている数少ない異常反応であり、近年では同症の動物モデルの評価法として多用されるものである。本マウスの特徴は、多くの統合失調症関連遺伝子改変マウスの示す表現型を包括するものであり、同疾患との関連が考慮される。

尚、成熟期投与群、及び、胎生期投与群では行動異常の検出に至らなかった。この理由は現時点では不明であるが、イボテン酸、及び、その脱炭酸化産物であるムシモールの標的となる受容体の発現パターンの変異による可能性が想定される。

Percellome 法による海馬の遺伝子発現変動解析から、幼若期マウス海馬の示す遺伝子応答パターンは、成熟期マウス海馬のものと同様をもち、大きく異なるとともに、細胞免疫応答シグナル群、細胞死シグナル群、細胞障害応答シグナル群への影響が大きい特徴を示した。これは、幼若期マウス海馬の感受性がイボテン酸に対して高いことを示唆する。また、神経系関連シグナルとして、軸索誘導シグナル、エフェリン受容体シグナル、神経栄養因子シグナルへの影響が抽出されたことは、幼若期におけるイボテン酸投与の結果、神経突起伸張に障害が起きていることを示唆する。即ち、脳の発生-発達期の神経回路形成過程に必要な、適切な神経細胞分化・移動・配置、適切な神経突起 (軸索、樹状突起) の伸長、シナプス形成、神経回路の選択 (軸索側枝の除去・軸索剪定・シ

ナプス淘汰等)における神経突起の伸長に影響が生じていることを示唆し、神経回路形成時における不可逆的な微細構造の構築異常の誘発が疑われるとともに、成熟後の中枢神経行動毒性の分子メカニズムの端緒であることが推測された。

E. 結論

本研究により、ヒトとマウスの受容体感受性に共通性が認められれば、ヒトにおいても、幼若期におけるイボテン酸の暴露によって、脳の発達過程における神経回路形成が不可逆的に障害され、遅発性の行動異常を誘発することが科学的に示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし。

2) 雑誌

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Brain structure impairment and Behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams., J Toxicol Sci. 2009; 34 Suppl 2:SP279-286.

Sekiyama K, Hashimoto O, Ushiro Y, Adachi C,

Kikusui T, Tanemura K, Hasegawa Y, Abnormalities in aggression and anxiety in Tg mice overexpressing activin E., Biochem Biophys Res Commun. 2009; 385(3):319-323.

2. 学会発表

種村 健太郎、松上 稔子、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について-
2009年7月：第36回日本トキシコロジー学会・岩手

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、菅野 純
社会共生系形成過程における個の適応と連鎖に関する研究
2010年3月：第149回日本獣医学会・東京

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

なし。

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)

【分担研究課題】

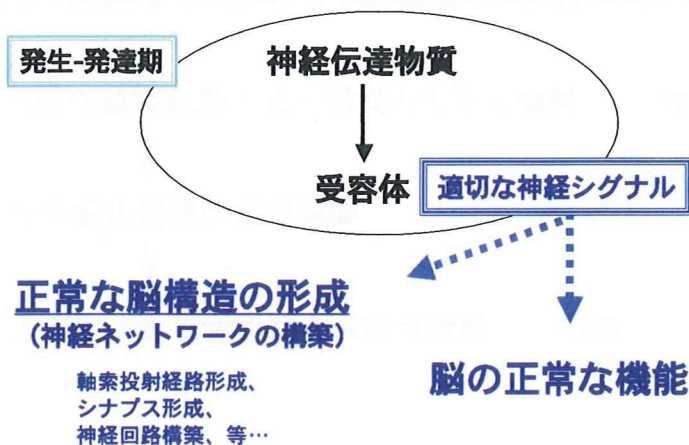
発生-発達期のアミノ酸系神経シグナルかく乱による
遅発性中枢毒性発現の解明

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

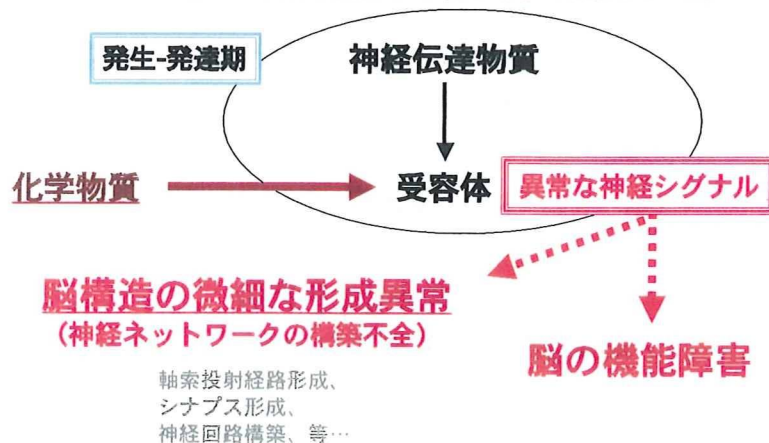
【神経系発生-発達期の神経シグナル】

適切な神経シグナルは、
発生-発達期の脳構造の形成に深く関わっている。

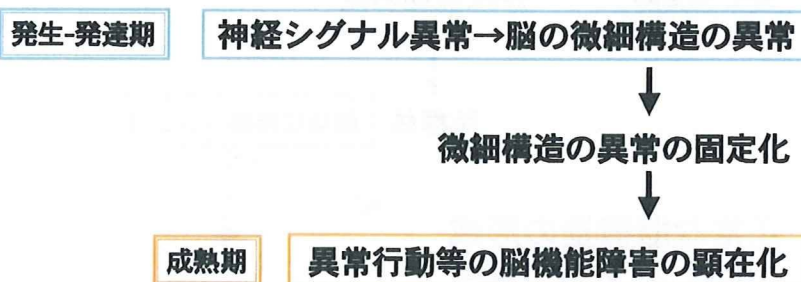


【神経系発生-発達期の神経シグナル】

神経シグナルのかく乱は脳の機能障害のみならず、
脳構造の微細な形成異常を誘発する。



発生-発達期の脳において神経シグナルがかく乱されると、
脳の微細構造の異常が引き起こされ、その異常が固定されると
成長後に異常行動等の脳機能異常として顕在化する可能性がある。



興奮性神経伝達物質：グルタミン酸

抑制性神経伝達物質：GABA

GABA受容体シグナルと脳の発生・発達

In vitro

神経細胞増殖、神経細胞分化、
神経突起伸張、シナプス形成に貢献する。

In vivo

受容体遺伝子欠損マウス神経発生に
重篤な障害の報告はない。

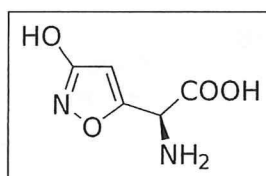
イオントランスポーターが未発達である為、
脳の発生・発達期のGABA受容体は成熟期とは機能的に異なる。

神経系、発生・発達・成熟期マウスへのイボテン酸の
単回強制経口投与による遅発性の中樞神経影響

イボテン酸

Ibotenic acid

[CAS:2552-55-8]



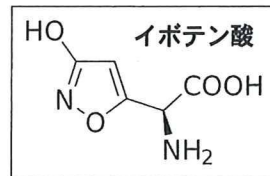
イボテングダケ

毒キノコ（テングダケ類）に含まれるアミノ酸で、
グルタミン酸受容体のアゴニストである。

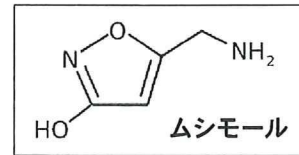
脱炭酸化され、GABA受容体のアゴニストであるムシモールに変化する。

マウスへの経口投与によるLD50は38mg/kgである。

神経系、発生-発達-成熟期マウスへのイボテン酸の
単回強制経口投与による遅発性の中樞神経影響



脱炭酸化



グルタミン酸受容体シグナルをかく乱
興奮性シグナル

GABA受容体シグナルをかく乱
抑制性シグナル

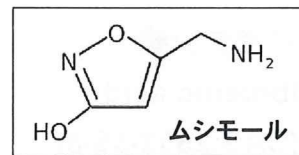
【ヒト（成人）のテングダケ類中毒情報】

興奮と抑制が同時に起こる複雑な中毒症状が発現するとされ、
錯乱、譫妄、躁鬱、希に幻覚の後、眠りに落ちるが、
半日から一日ほどで回復すると言われている。

神経系、発生-発達-成熟期マウスへのイボテン酸の
単回強制経口投与による遅発性の中樞神経影響



脱炭酸化



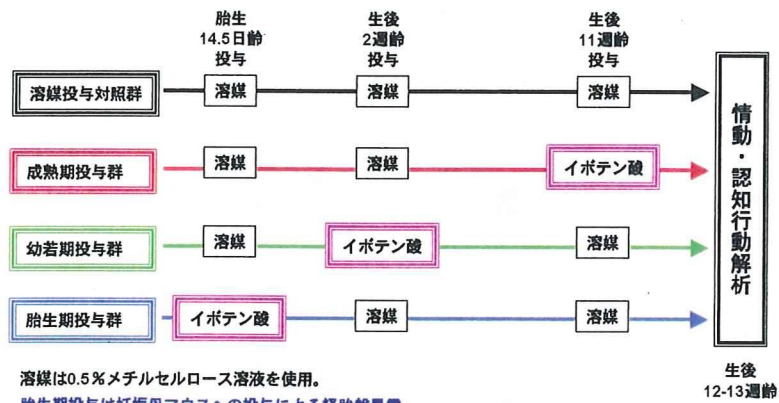
グルタミン酸受容体シグナルをかく乱
興奮性シグナル

GABA受容体シグナルをかく乱
抑制性シグナル

神経系、発生-発達期への中樞神経影響は不明である。

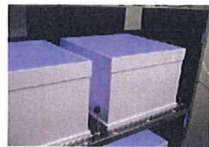
イボテン酸 (1 mg/kg) 単回強制経口投与-解析スケジュール

TOCRIS: Cat. No. 0285



行動解析

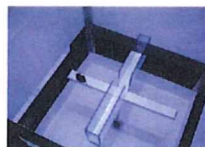
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



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

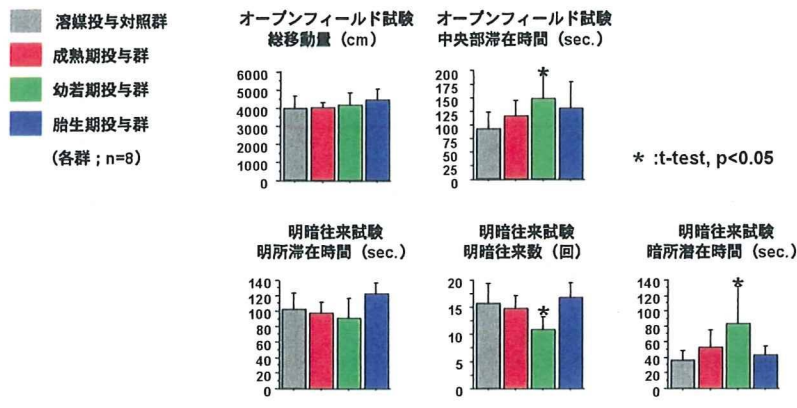
脳内情報処理

情報の受理・整理・対応

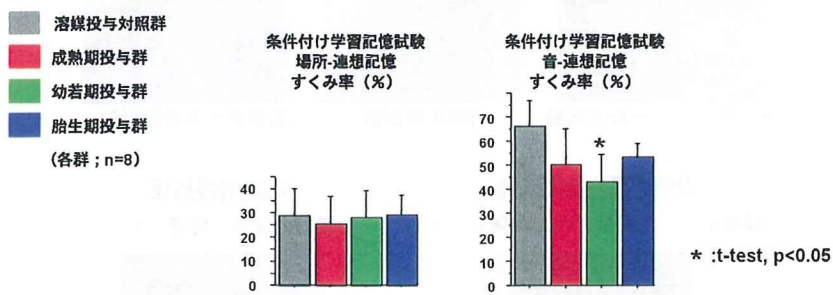


プレパルス驚愕反応抑制試験

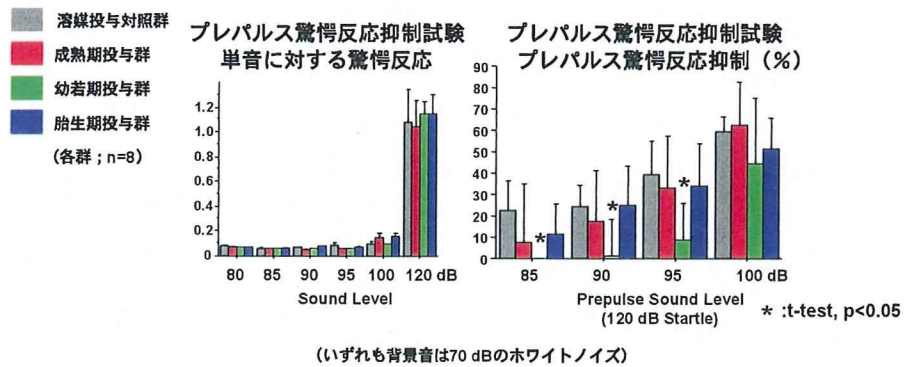
**幼若期雄マウスへのイボテン酸 (1mg/kg) 投与の結果、
成熟後に、不安関連行動の逸脱が認められた。**



**幼若期雄マウスへのイボテン酸 (1mg/kg) 投与の結果、
成熟後に、記憶異常が疑われた。**



**幼若期雄マウスへのイボテン酸（1mg/kg）投与の結果、
成熟後に、脳内情報処理不全が疑われた。**



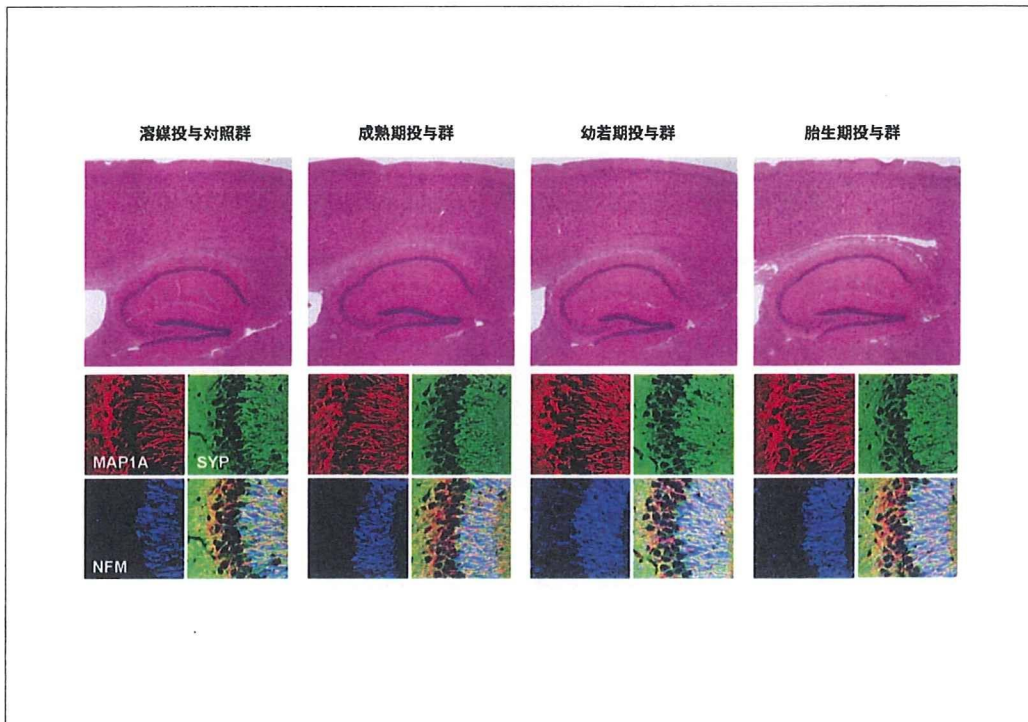
**幼若期イボテン酸投与マウス (♂) は
成熟後に異常行動が認められた。**

(不安関連行動の逸脱、記憶異常、脳内情報処理不全)

幼若期イボテン酸投与による脳高次機能障害 (毒性発現)

成熟期イボテン酸投与マウスに、
亜急性～遅発性の行動異常は認められなかった。

胎生期イボテン酸投与マウス (経胎盤暴露) に、
成熟後の行動異常は認められなかった。



網羅的遺伝子発現変動解析による毒性発現メカニズム解明



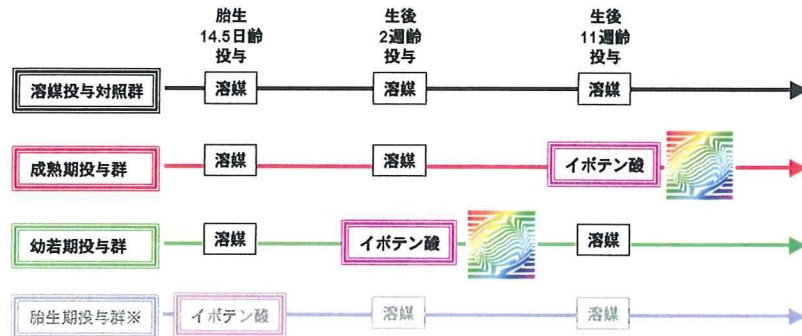
PerceLome 法：サンプルのDNA濃度を精密に計測し、
 添加した外部標準mRNA（スパイクRNA）の測定値を基準として、
 サンプルの測定値を細胞1個当たりのmRNA発現コピー数に
 換算することでmRNA発現絶対量を得ることができる。



化学物質による遅発中枢影響について
 分子レベルで見落としなく解析することができる。

網羅的遺伝子発現変動解析による毒性発現メカニズム解明

成熟期（生後11週齢）及び幼若期（生後2週齢）雄マウスにイボテン酸、0.1、0.3、及び1mg/kg、単回強制経口投与し、2、4、8、24時間後にPercollome法による網羅的遺伝子発現解析を行った（溶媒は0.5%メチルセルロース溶液）。

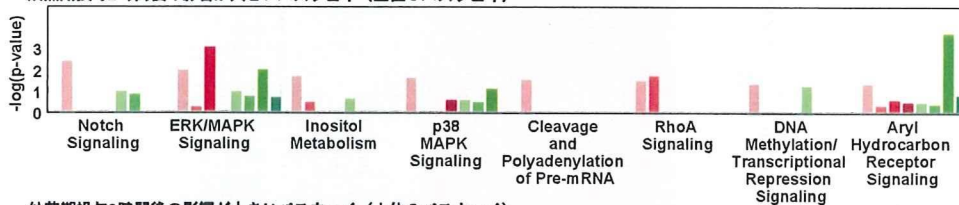


Percollome法により抽出された ($p < 0.01$, $ratio > 1.5$) 遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。

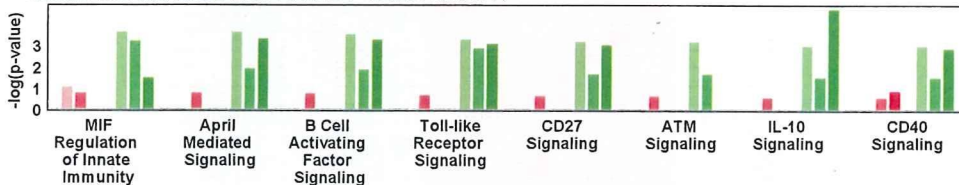
成熟期投与2、4、8、24時間後、幼若期投与2、4、8、24時間後

イボテン酸の投与時期によって影響を受けるパスウェイは大きく異なる。

成熟期投与2時間後の影響が大きいパスウェイ (上位8パスウェイ)

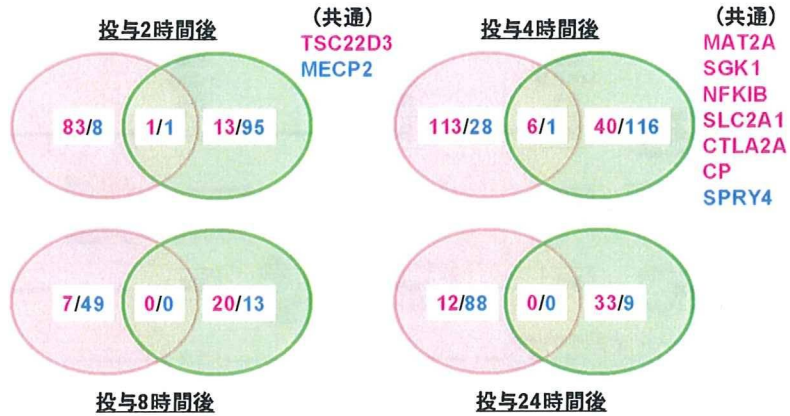


幼若期投与2時間後の影響が大きいパスウェイ (上位8パスウェイ)



イボテン酸(1mg/kg)投与により、海馬において発現増加/減少を示す遺伝子プロファイルは、**成熟期投与群**と**幼若期投与群**で異なる。

【発現が増加/減少 (copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2) した遺伝子(プローブセット: PS)数】



幼若期投与群、海馬における発現減少遺伝子 (投与4時間後)

Symbol	成熟期2h	成熟期4h	成熟期8h	成熟期24h	幼若期2h	幼若期4h	幼若期8h	幼若期24h
CZORF43					-1.057	-6.569		
RREB1		1.258				-4.174		
PAPOLB						-3.377		
SMPD2						-3.04		
LDLR						-2.73	-1.257	1.124
MYO7B						-2.69		
EGR1					-1.597	-2.653	1.203	
SPRY4		-2.852				-2.499		
HS2ST1						-2.18		
FOS					-1.73	-2.108	1.551	
JHDM1D				-1.137		-2.045		
CTTNBP2					-1.442	-1.941		
MFAP3		1.169			-1.426	-1.934		
GNAT2						-1.907		
GAS7						-1.905		
BDNF						-1.827		
PTGS2						-1.773		
CXCL12					-1.253	-1.77		
CRKRS						-1.71		
DIUSP4					-1.315	-1.696		
HTR4						-1.684		
GNB2L1	1.434			-1.125		-1.677		
PER2						-1.673		
SARDH						-1.665	1.498	1.482
PBX2						-1.66		
COL4A3BP						-1.658		
EF5A2						-1.649		
NR4A3					-1.205	-1.64		
CAMKK2						-1.634	-1.174	
EPHB3					-1.828	-1.625		

n: n倍
-n: 1/n倍

幼若期投与群、海馬における発現減少遺伝子（投与4時間後）

Symbol	成熟期2h	成熟期4h	成熟期8h	成熟期24h	幼若期2h	幼若期4h	幼若期8h	幼若期24h
CZORF43					-1.057	-5.589		
RREB1		1.258				-4.174		
PAPOLB						-3.377		
SMPD2						-3.04		
LDLR						-2.73	-1.257	1.124
PTGS2						-2.69		
EGR1					-1.597	-2.653	1.203	
SPRY4		-2.852				-2.499		
HS2ST1						-2.18		
FOS					-1.73	-2.108	1.551	
JHDM1D				-1.137		-2.045		
CTNBP2					-1.442	-1.941		
MFAP3		1.169			-1.426	-1.934		
GNAT2						-1.907		
GAS7						-1.905		
BDNF						-1.827		
PTGS2						-1.773		
CXCL12					-1.253	-1.77		
CRKRS						-1.71		
DUSP4					-1.315	-1.696		
HTR4						-1.684		
GNB2L1	1.434			-1.125		-1.677		
PER2						-1.673		
SARDH						-1.665	1.498	1.482
PBX2						-1.66		
COL4A3BP						-1.658		
EIF5A2						-1.649		
NR4A3					-1.206	-1.64		
CAMKK2						-1.634	-1.174	
SMPD2					-1.828	-1.625		

n: n倍
-n: 1/n倍

