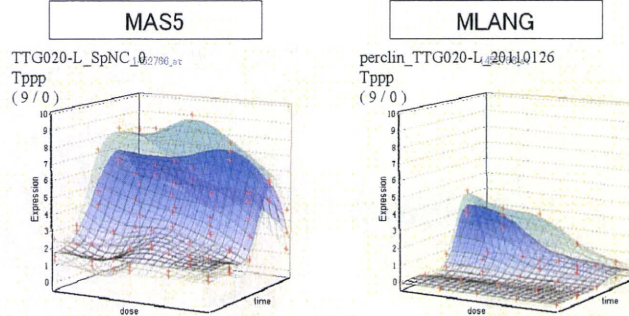


## 5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプローブセットの例 (1452766\_at: Tppp)

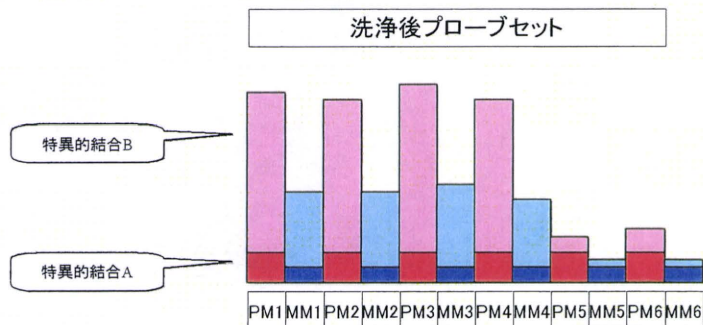


MAS5では、サーカディアンらしき変動をしているとみえる。MLANGでは、通常発現しておらず、化合物影響として8時間で発現しているとみえる。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

## 5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1456125\_a\_at: Dynll1 および 1452766\_at: Tppp の結果を導くと想定される現象



スプライシングバリエーションが存在する場合

MAS5では、プローブセット内でMedianを用いて発現値を計算するため、多くのプローブを占める発現値に近い値が推定値となる。図の場合には特異的結合Bによる蛍光値が中心である。MLANGでは、学習の結果どちらが中心となるか決定される。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

## 6.まとめ

### 高発現域

MAS5では、補正できていない飽和状態の遺伝子を補正できた

QPCRと比較し確認した。

### 低発現域

MAS5と発現パターンが異なる遺伝子が多く存在した

半特異的結合による説明が可能か確認した。

残念ながら、MLANGによる推定値とMAS5による推定値のどちらがより真の値に近いかをこれらの推定値だけから判定することは困難である。

### 今後の課題

真の値に近いならば、遺伝子の特性を示す値が豊富に得られるはずであると考え、多くの実験結果に対してMLANGによる補正を実施し、単に化合物の影響だけでなく、餌、季節、溶媒などの影響が実験結果から抽出可能か確認する。

## Ⅱ. 分担研究報告書

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

【研究要旨】

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、セロトニン 1A 受容体作動薬をモデル化学物質として用い、発達期におけるセロトニン系神経伝達の受容体レベルにおける一時的なかく乱が、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、単一受容体レベルの一時的なかく乱では成長後の情動・認知機能に及ぼす影響は限られていること、そして遅発性影響の発現時期も他の経路のかく乱による影響の発現時期と異なる可能性があることが示唆された。

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の影響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、解明が急務と考えられる。

そこで、本研究で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している。これまでの研究で、幼児期の一時的なセロトニントランスポーターの阻害およびセロトニン代謝の阻害が、成長後のマウスの情動・認知機能に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。そこで、本年度はセロトニン 1A 受容体作動薬をモデル化学物質として、自己受容体機能の一時的なかく乱の影響について検討した。また、一昨年・昨年の研究においては、遅発性影響の評価時期をヒトの青年期前期を想定して生後 11 週目から実施したが、本年度の研究では、青年期後期も想定して生後 34 週目から評価も合わせて行った。

B. 研究方法

乳児期（生後 14 日）の雄マウス（C57BL/6J 系統）に、セロトニン受容体 1A 作動薬（8-OH-DPAT (8-hydroxy-*N,N*-dipropyl-2-aminotetralin)：100mg/kg, 1ml/10g BW）、buspirone (30mg/kg, 1ml/10g BW) を単回強制経口投与し（統制群は同量の精製水を投与）、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（8-OH-DPAT 投与条件については、生後

11 週齢および 34 週齢)。包括的行動テストバッテリーで用いた課題は別表にまとめた通りである(表 1)。また、セロトニン 1A 受容体作動薬はドーパミン受容体にも影響を及ぼす可能性があるので、参考実験として、ドーパミン D1 および D2 受容体作動薬である apomorphine (25mg/kg)を用いた実験も合わせて実施した。

#### (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。8-OH-DPAT 投与群では、11 週齢から実験を行ったグループでは全ての行動課題において有意な差は認められなかった。一方、34 週齢から実験を行ったグループでは、恐怖条件付けの手掛かりテスト時にすくみ反応の有意な低下が見られた。しかし、それ以外の行動課題においては有意な変化は見いだされなかった。

buspirone 投与群では、オープンフィールドテストにおいてわずかに行動傾向の変化が見られたが、それ以外の行動テストにおいては、有意な変化は認められなかった。

更に、参考実験として行った apomorphine 投与群では、全ての行動テストにおいて有意な変化は認められなかった。

### 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や認知機能に及ぼす影響について、特にセロトニンに注目して研究を行ってきた。昨年度までの研究から、発達期のセロトニン系神経シグナル伝達の一時的なかく乱が、成長後の認知・情動機能に遅発的影響を及ぼすことを明らかにしてきた。セロトニントランスポーターによるセ

ロトニン再取り込み過程の阻害、およびモノアミン酸化酵素によるセロトニン代謝過程の阻害が遅発的な認知・情動変化をもたらすことから、シナプス間隙に残ったセロトニンが自己受容体によるセロトニン神経活動のフィードバック機構に異常をもたらし、その結果として遅発的行動変化が生じたと仮定して本年度の研究を実施した。しかし、結果に示される通り、代表的なセロトニン自己受容体であるセロトニン 1A 受容体作動薬の単回強制経口投与では、遅発性の情動・認知機能に大きな変化は認められなかった。これはセロトニン系神経シグナルの一時的かく乱が、単一受容体レベルではなく、多様な受容体を介して遅発性影響を及ぼすことを示唆している。

また、本研究では、8-OH-DPAT 投与条件において、11 週齢から行動解析を始めたグループでは全く変化が見られなかったのに対して、34 週齢から行動解析を始めたグループでは、恐怖条件付けの成績低下が認められた。この結果は、発達期における化学物質への一時的暴露の遅発性影響の発現時期が、ヒトにおける青年期前期から後期にかけた非常に広範囲にわたる可能性を示唆している。今後の研究では、遅発性影響の有無だけではなく、その発現時期の同定も重要な課題になると言える。

### E. 結論

本研究から得られた結果は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRIs)やモノアミン酸化酵素阻害剤(MAOIs)によるセロトニン系神経シグナル伝達の一時的かく乱が引き起こす遅発性情動・認知機能変化が、複数のセロトニン受容体を介した複合的な影響であることを示唆している。これらの複合経路を同定することは、医薬品の安全性の確保と同時に、毒性学的にも重要であると考えられる。

また、化学物質への一時的な暴露による遅発性影響の発現時期が広範にわたる可能性を示したことは、今後の研

究について重要な意味を持つと言える。

F. 健康危険情報

特筆すべき点はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

安藤清志、石口彰、高橋晃、浜村良久、藤井輝男、八木保樹、山田一之、渡辺正孝、重野純（著） 神経心理学 重野純（編）改訂版 キーワードコレクション心理学 新曜社 東京 2011 *in press*（新章として執筆）

2) 雑誌

1. K. Yamada: 2010 Strain differences of selective attention in mice: Effect of Kamin blocking on classical fear conditioning. *Behav Brain Res*, 213, 126-129.

2. S. Watanabe, S. Endo, E. Oshima, H. Higashi, K. Yamada, K. Tohyama, T Yamashita, Y. Hirabayashi: 2010 Glycosphingolipid synthesis in cerebellar purkinje neurons: roles in myelin formation and axonal homeostasis. *Glia*, 58, 1197-1207.

3. Y. Matsumoto, K. Katayama, T. Okamoto, K. Yamada, N. Takashima, S. Nagao, J. Aruga: 2010 Impaired Auditory-Vestibular Functions and Behavioral Abnormalities of Slitrk6-Deficient Mice. *PLoS ONE*, *in press*

2. 学会発表

1) 国際学会

1. K. Yamada, C. Homma, T. Ikeda, K. Tanemura, S. Itohara, Y. Nagaoka: 2010 Impaired long-term but intact short-term contextual fear memory in Arc/Arg3.1-deficient mice. The 15th Binnial Scientific Meeting of The International Society for Comparative Psychology, (Awaji, Hyogo, May 19-21, 2010)

2. J. Aruga, M. Hatayama, N. Takashima, K. Sakoori, Y. Nozaki, Y. S. Odaka, K. Yamada, A. Ishiguro: 2010 Zic2 hypomorphic mutant mice exhibit cognitive impairment and social behavior abnormalities with an altered distribution of basal forebrain cholinergic neurons. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> Annual Meeting, (San Diego, CA, November 13-17, 2010)

3. Y. Matsumoto, K.-I. Katayama, A. Zine, M. Ota, T. Inoue, B. Fritsch, K. Yamada, J. Aruga: 2010 Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> Annual Meeting, (San Diego, CA, November 13-17, 2010)

4. M. Kabayama, K. Yamada, V. Ornthanalai, N.P. Murphy, K.-I. Katayama, J. Aruga: 2010 A role of Rines, a neuronal

membrane-bounded ubiquitin ligase in higher brain function. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> Annual Meeting, (San Diego, CA, November 13-17, 2010)

5. D.C. Corbett, K.-I. Katayama, Y. Matsumoto, N. Morimura, K. Yamada, M. Ota, V.G. Ornthanalai, C. Homma, N.P. Murphy, J. Aruga: 2010 Characterisation of Slitrk2-deficient mice. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> Annual Meeting, (San Diego, CA, November 13-17, 2010)

## 2) 国内学会

1. 山田一之、本間千尋: 2010 胎児期のパロキセチン暴露がマウスの成長後の認知・情動機能に及ぼす影響 第70回日本動物心理学会大会 (8月27-29日 帝京大学)

2. 山田一之: 2010 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 (2) 日本心理学会第74回大会 (9月20-22日 大阪大学)

3. M. Ogawa, K. Yamada, V.G. Ornthanalai, N.P. Murphy, K.-I. Katayama, J. Aruga: 2010 A role of Rines, a neuronal membrane-bound ubiquitin ligase in higher brain function. 第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、

第20回日本神経回路学会大会 合同大会 (9月2-4日 神戸コンベンションセンター)

4. I. Ogiwara, S. Ito, K. Yamada, K. Yamakawa.: 2010 Scn1a mice exhibit hyperactivity, autism-like behavioral deficits and learning impairments. 第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回路学会大会 合同大会 (9月2-4日 神戸コンベンションセンター)

5. S. Fuke, M. Kametani, M. Kubota, T. Kasahara, K. Yamada, Y. Shigeyoshi, T. Kato: 2010 Enhanced accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brain and altered behavioral rhythm in heterozygous mitochondrial *PlogA* knock-in mice. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 一般口頭発表採択課題 (12月7-1日 神戸ポートトアイランド)

6. 前川利男、中井大助、金昇準、吉田圭介、小倉博雄、山田一之、石井俊輔: 2010 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33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回路学会大会合同大会 一般口頭発表採択課題 (9月2-4日 神戸コンベンションセンター)

7. 前川利男、中井大助、金昇準、吉田圭介、小倉博雄、山田一之、石井俊輔: 2010 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33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回路学会大会合同大会 ポスター発表 (9月2-4日 神戸コンベンションセンター)

8. S. Fuke, M. Kametani, M. Kubota, T. Kasahara, K. Yamada, Y. Shigeyoshi, T. Kato: 2010 Enhanced accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brain and altered behavioral rhythm in heterozygous

mitochondrial *PlogA* knock-in mice. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 ポスター発表 (12月7-1日 神戸ポートアイランド)

- H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)
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 / 薬物	8-OH-DPAT		buspirone	apomorphine
	from 11 wks	from 34 wks		
体重測定	ns	ns	ns	ns
自発活動性テスト	ns	ns	ns	ns
オープンフィールドテスト (distance)	ns	ns	↑* (only bin 2)	ns
(%center)	ns	ns	↓* (only bin 2)	ns
明暗往来テスト	ns	ns	ns	ns
高架式十字迷路テスト	ns	ns	ns	ns
聴覚性驚愕反応とPPI測定	ns	ns	ns	ns
ホールボードテスト (head dip)	ns	ns	ns	ns
(rearing)	ns	ns	ns	ns
恐怖条件付けテスト (context)	ns	ns	ns	ns
(cued)	ns	↓*	ns	ns
ストレス反応性テスト	ns	ns	ns	ns

Notes: \*: p<0.05

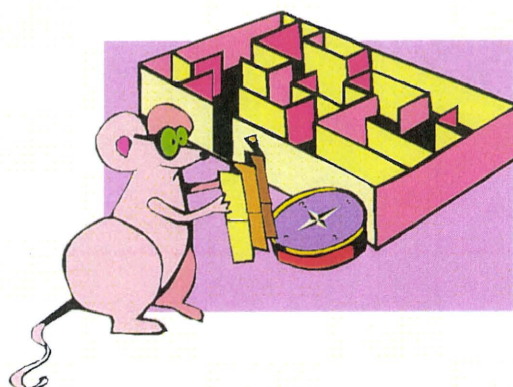


# 発生・発達期の モノアミン系神経シグナルかく乱による 遅発性中枢毒性発現の解明

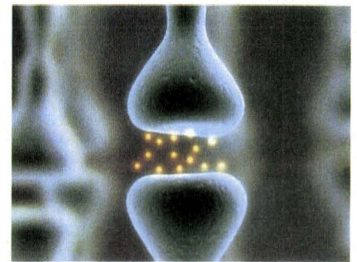
独立行政法人 理化学研究所  
脳科学総合研究センター  
山田 一之

## 目次

- 1.本研究の目的
- 2.平成22年度の研究手法
- 3.平成22年度の研究成果



# 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22年度の研究方法

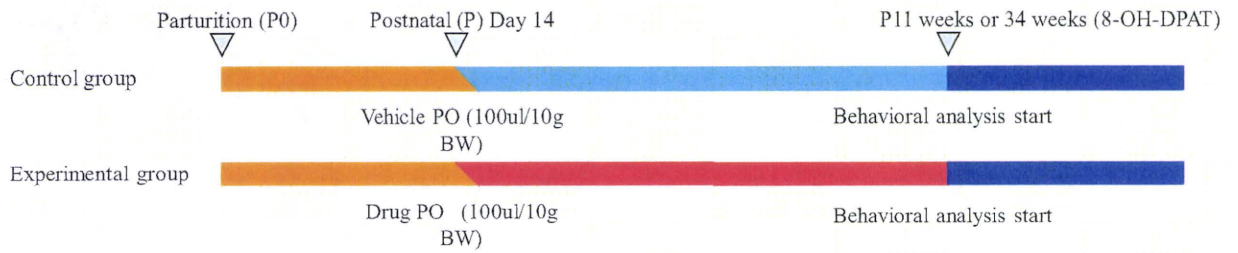
### *Procedure #1*

発生・発達期における、セロトニン1A受容体の一時的な機能かく乱の影響を検討するために、セロトニン1A受容体の作動薬である **8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin (8-OH-DPAT)**、および **buspirone**の単回強制経口投与(生後14日)の影響を行動学的に検討した。また、遅発性影響がドーパミン系シグナル伝達を介している可能性について、ドーパミンD1およびD2受容体の作動薬である **apomorphine**を用いて検討した。

### *Procedure #2*

乳児期のセロトニン1A受容体の過活動は、乳幼児突然死症候群の一因とも言われている。そこで、胎児期における低用量のセロトニン1A受容体作動薬の暴露の遅発的影響について、**8-OH-DPAT**を用いて検討した。

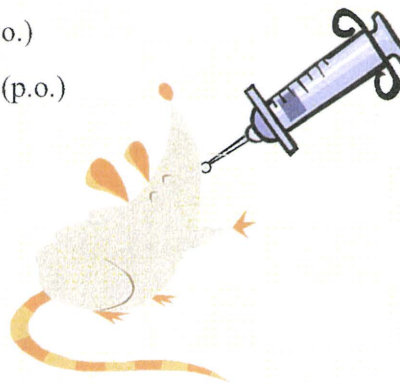
## Schema of experimental procedure #1 per os (PO)



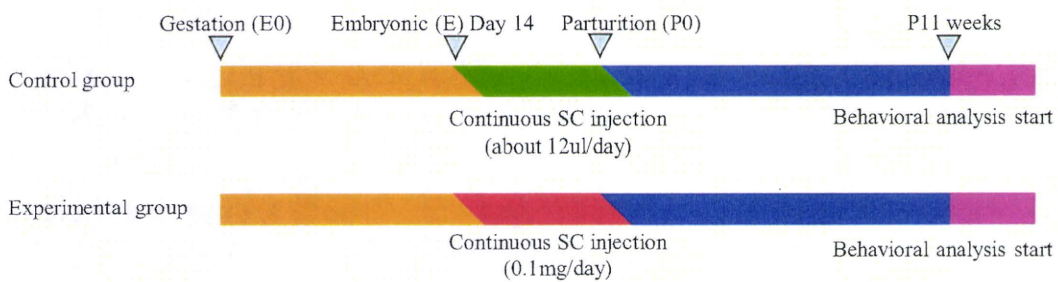
Drug: 8-OH-DPAT: 100 mg/kg (p.o.)

buspirone: 30 mg/kg (p.o.)

apomorphine: 25mg/kg (p.o.)



## Schema of experimental procedure #2 Transplacentally Administered (SC)



Drug: 8-OH-DPAT: 1 mg/100 $\mu$ l (continuous SC by alzet™ model 1007D)



alzet™ micro-osmotic pump filled with saline or paroxetine solution

## Procedure #1 Modified Behavioral Test Battery

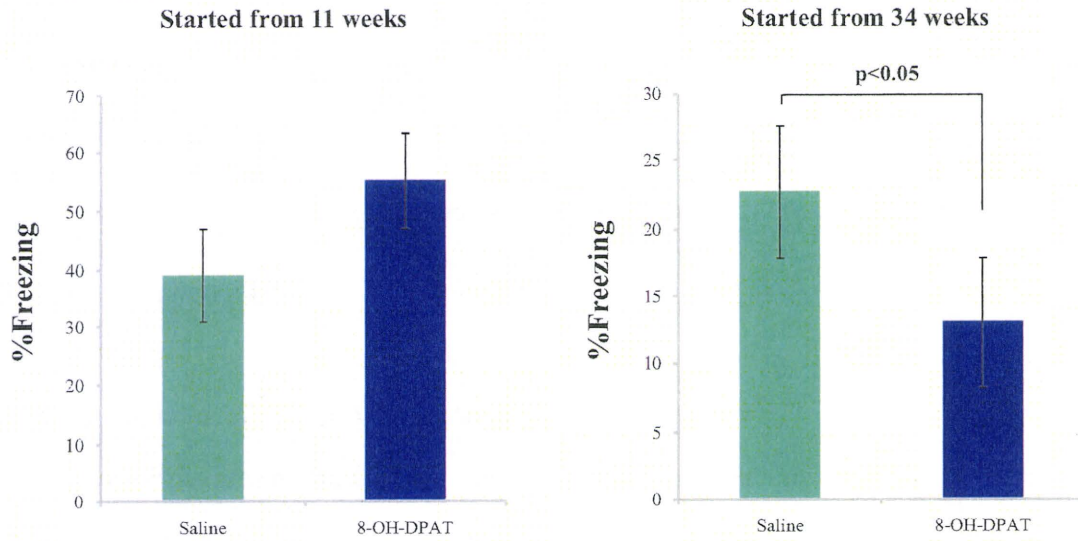
Test 1	<i>Body weight measurement</i> : assessment of physical development
Test 2	<i>Home cage activity measurement</i> (7 days): assessment of spontaneous activity
Test 3	<i>Open field test</i> (15 min): assessment of emotional response to the novel environment
Test 4	<i>Light-dark box test</i> (10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

### Summary of the behavioral analysis (procedure #1)

Task	8-OH-DPAT		buspirone	apomorphine
	11w	34w		
Body weight	ns	ns	ns	ns
Homecage activity	ns	ns	ns	ns
Open field test				
Distance	ns	ns	↑* (bin 2)	ns
%center	ns	ns	↓* (bin 3)	ns
Light-Dark box test				
Stay in light box	ns	ns	ns	ns
Distance in light box	ns	ns	ns	ns
Elevated plus maze test				
Stay in open arm	ns	ns	ns	ns
Distance in open arm	ns	ns	ns	ns
Auditory startle response & Prepulse inhibition				
Startle response	ns	ns	ns	ns
PPI	ns	ns	ns	ns
Hole board test				
Head dipping	ns	ns	ns	ns
Rearing	ns	ns	ns	ns
Classical fear conditioning				
context test	ns	ns	ns	ns
cued test	ns	↓*	ns	ns
Response to restraint stress	ns	ns	ns	ns



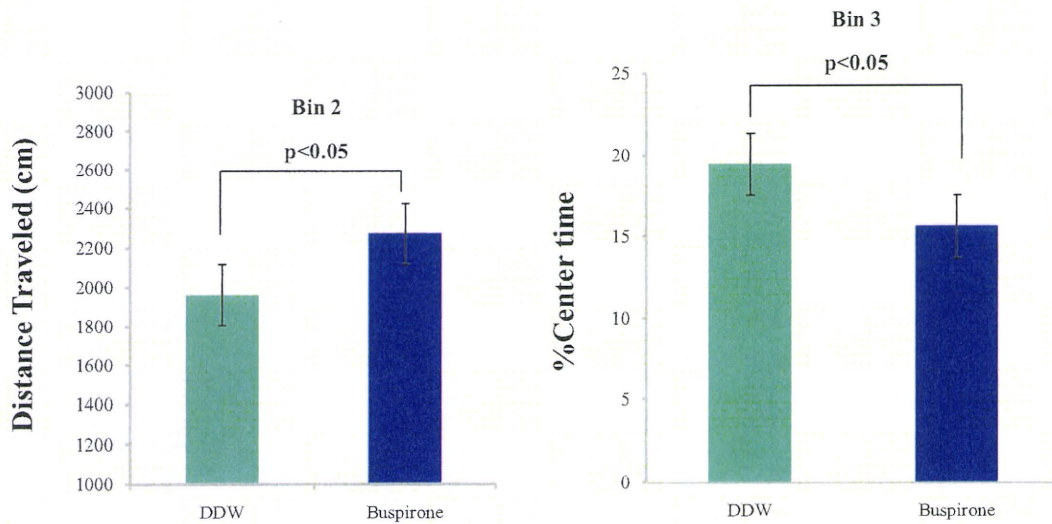
*Slightly impaired cued fear memory  
in 8-OH-DPAT-treated mice over 34 weeks of age*



Notes: Results of an auditory cued test in a classical fear conditioning. Data represent mean  $\pm$  SEM.



*Slightly increased locomotor activity and anxiety  
in buspirone-treated mice*



Notes: Results of a 15-min open field test. Each time bin represent 5-min sampling time. Data represent mean  $\pm$  SEM.



## Procedure #1 まとめと考察

1) 幼若期におけるセロトニン1A受容体作動薬の単回強制経口投与は、成長後のマウスにおいて、微細ではあるが、探索行動や情動記憶などの情動的・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、平成21年度のMAOAIs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、発生発達期におけるSSRIs暴露による遅発性影響がセロトニン1A受容体にとどまらず、多様な受容体を介してい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。

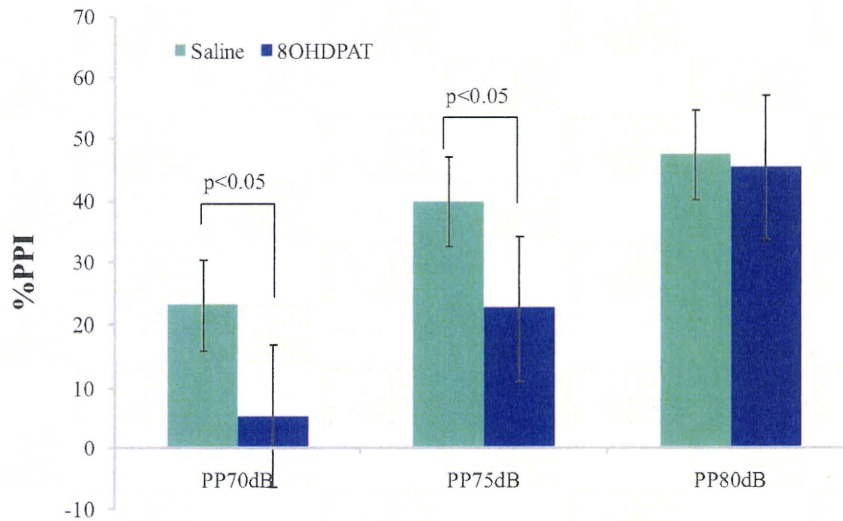
3) 本研究では、ドーパミン受容体作動薬の単回経口投与では、遅発性の行動変化が認められなかった。ドーパミン系神経シグナル伝達の一時的かく乱の影響については今後の重要な課題である。



### Summary of the behavioral analysis (procedure #2)

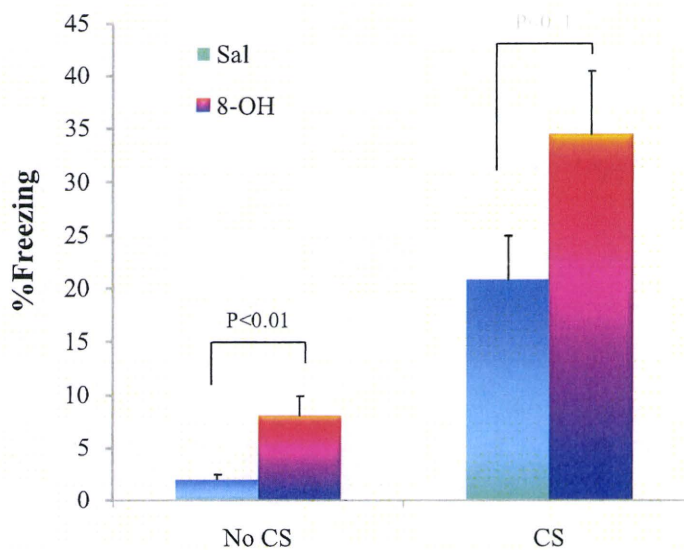
Task	saline	8-OH-DPAT
Body weight		ns
Homecage activity		ns
Open field test	Distance	ns
	%center	ns
Light-Dark box test	Stay in light box	ns
	Distance in light box	ns
Elevated plus maze test	Stay in open arm	ns
	Distance in open arm	ns
	Auditory startle response & Prepulse inhibition	
	Startle response	ns
	PPI	> (PP 70 & 79 dB)
Hole board test	Head dipping	ns
	Rearing	ns
Classical fear conditioning	context	ns
	cued	< (without cue)**

*Impaired prepulse inhibition of auditory startle response  
in 8-OH-DPAT-treated mice*



Notes: Results of PPI test. Data represent mean  $\pm$  SEM.

*Slightly increased generalized fear and cued fear memory  
in 8-OH-DPAT-treated mice*



Notes: Results of an auditory cued test in a classical fear conditioning. Data represent mean  $\pm$  SEM.

## Procedure #2 まとめと考察

1)胎児期におけるセロトニン1A受容体作動薬の持続的暴露が、成長後のマウスにおいて、情動記憶および聴覚性驚愕反応のプレパルス抑制を障害したことは、胎児期におけるセロトニン1A受容体作動薬の持続的暴露が、精神疾患の一因となる可能性を示唆している。

2)先行研究から、胎児期におけるセロトニン1A受容体作動薬の持続的暴露が、乳幼児突然死症候群の一因であると考えられているが、本研究においては、新生仔の死亡率に変化は見られなかった。死亡率の検討には相当数のサンプルが必要であり、今後の課題と言える。

3)セロトニン1A受容体作動薬および拮抗薬は各種開発されている。今後他剤の検討が必要である。



## Acknowledgements

本研究を支えてくださった、理化学研究所脳科学総合研究センター研究基盤センターの方々に深く感謝いたします。

本間千尋	行動実験・統計解析
八木友美	事務・会計
石川洋司 他	実験室管理・飼育管理

また、研究実施にあたり、いろいろなアドバイスをいただいた、国立医薬品食品衛生研究所毒性部種村健太郎先生にこの場をお借りしてお礼申し上げます。



分担研究報告書

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

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

【研究要旨】

① 成熟期、幼若期、胎生期のマウスに対して、グルホシネート（50mg/kg）を単回強制経口投与し、生後12～13週齢時に行動解析を行った。その結果、幼若期、胎生期のマウスに重篤な記憶異常が認められるとともに、海馬における神経細胞突起異常が認められた。

② 平成20年度に施行したトリアゾラムに加えて、成熟期、幼若期、胎生期のマウスに対してその結果、ゾルピデム（50mg/kg）、エチゾラム（6mg/kg）を単回強制経口投与し、生後12～13週齢時に行動解析を行った。その結果、ゾルピデムを投与した3群には行動逸脱は認められなかったが、幼若期エチゾラム投与群に、記憶行動異常が認められた。

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、成熟期個体の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、化学物質を用い、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かか乱し、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、成長後に顕在化する情動・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

① アミノ酸系神経シグナルをかか乱する可能性を持ったモデル化学物質として、除草剤成分であるグルホシネートを選択した。尚、グルホシネートはグルタミン合成酵素の拮抗的作用を持つとされており、化学構造的に有機リン系農薬同様の構造を持つとともに、グルタミン酸との構造的な類似性が指摘されている。

成熟期（生後11週齢）、幼若期（生後2週

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)。尚、用量設定の根拠として、農薬評価書(2010年2月)にて、一般薬理試験における最大無作用量と記載のあった50mg/kgとした。

② 特にGABA受容体シグナルへの影響評価を目的とし、ゾルピデム、エチゾラムを選択した。尚、ゾルピデムは非ベンゾジアゼピン系に分類される睡眠導入薬(日本での代表的な商品はマイスリー)、エチゾラムはチエノジアゼピン系に属する抗不安薬であるが、睡眠導入薬としても処方されるケースがある(日本での代表的な商品はデパス)。尚、H20年度に使用したエチゾラムはベンゾジアゼピン系に分類される睡眠導入薬(日本での代表的な商品はソレシオン)である。

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、ゾルピデム(50mg/kg:溶媒は0.5%メチルセルロース溶液)、エチゾラム(6mg/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週齢時に前項同様の行動解析を行った。尚、用量設定は安全係数から逆算し、成人の一日最大用量の100倍とした(上述のトリアゾラムも同様の用量設定を行っており1mg/kg:溶媒は0.5%メチルセルロース溶液にて使用した)。

#### C. 結果

① いずれの投与群についても、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、幼若期投与群、及び胎生期投与群における条件付け学習記憶試験における、場所-記憶連想記憶能及び、音-連想記憶能の低下が明らかとなった。尚、いずれの群においても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、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。

② ゾルピデム、エチゾラム、いずれの投与群についても、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、エチゾラム幼若期投与群における条件付け学習記憶試験における、場所-記憶連想記憶能及び、音-連想記憶能のすくみ率の異常上昇が明らかとなった。またエチゾラム胎生期投与群に明暗往来試験における明所滞在時間の減少が認められた。ゾルピデム投与に関しては、いずれの群においても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、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

#### D. 考察

① 本研究によって、幼若期及び胎生期におけるグルホシネート投与は、成熟期を用いた従来の試験法からは最大無作用量とされる用量であっても、予期できない遅発影響として記憶異常を引き起こすことが明らかとなった。この異常は、成熟期マウスへの投与影響解析から推測不能のものであると考えられ、小児や妊婦を対象とした新たな安全性試験の必要性を示すものと判断できる。

今後、用量を下げた詳細な解析とともに、記憶異常に至る機構解明が必要と考えられる。

② 本研究によって、特に幼若期におけるトリ

アゾラムに加えて、エチゾラムの投与は、遅発性の行動異常を引き起こす危険が示された。この結果は、トリアゾラム同様に、幼若期における GABA 受容体シグナルかく乱が、脳の発達に影響を及ぼした結果と推測される。

ゾルピデムの投与結果からは、行動異常が認められなかった為、非ベンゾジアゼピン系の睡眠導入薬については、他のモデル化学物質を加えて検討するとともに、異常を誘発したベンゾジアゼピン系（トリアゾラム；H20）、チエノジアゼピン系の化学物質による遅発影響について分子レベルでの比較検討が必須と考える。

#### E. 結論

① 本研究によって、幼若期及び胎生期におけるグルホシネート投与は、一般薬理試験からは成熟期を用いた従来の試験法からは最大無作用量とされる用量であっても、予期きでない遅発影響として記憶異常を引き起こすことが明らかとなった。

② 本研究によって、トリアゾラムに加えて、エチゾラムは、幼若期投与による遅発性の行動異常を引き起こす危険が示された。我が国では、いずれも小児を対象として、頻用されることは考えにくいだが、歯科治療や夜尿症対策として処方されるケースが考えられるため、より注意が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

なし

##### 2. 学会発表

「発達期における化学物質暴露による中枢影響とメカニズム解明」

種村健太郎、菅野 純

第 151 回日本獣医学会シンポジウム

(2011 年 3 月・東京)

「脳の発生一発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢毒性発現解析」

種村健太郎、菅野 純

第 70 回日本動物心理学会シンポジウム

(2010 年 8 月・東京)

#### G. 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。**

