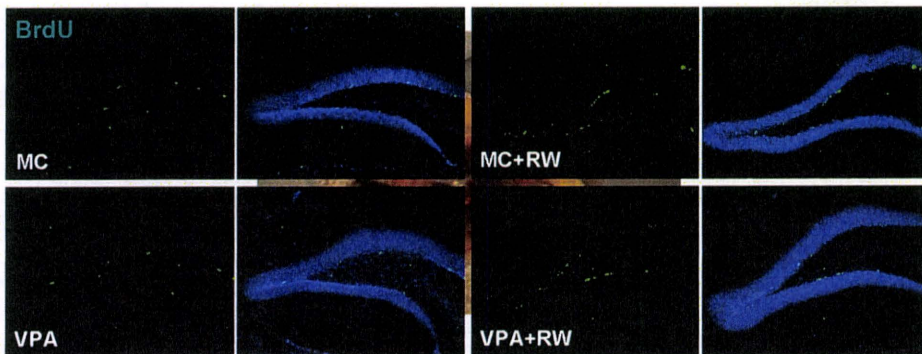
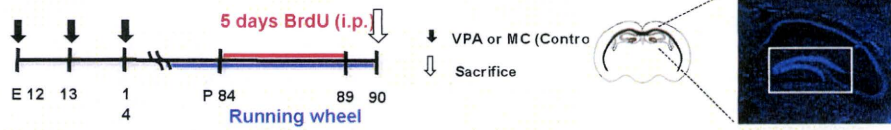
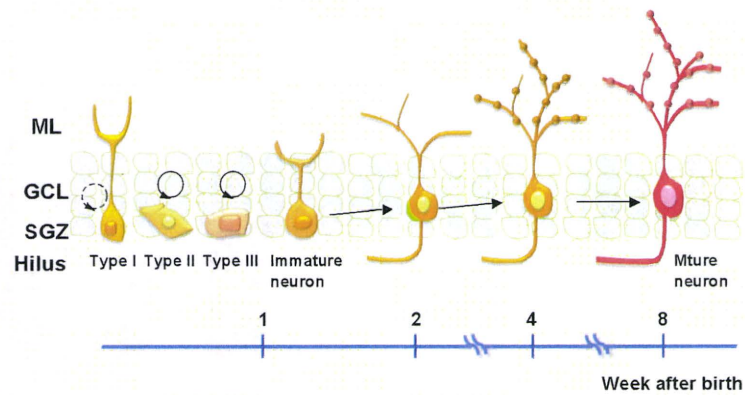


運動による海馬神経幹細胞の増殖促進

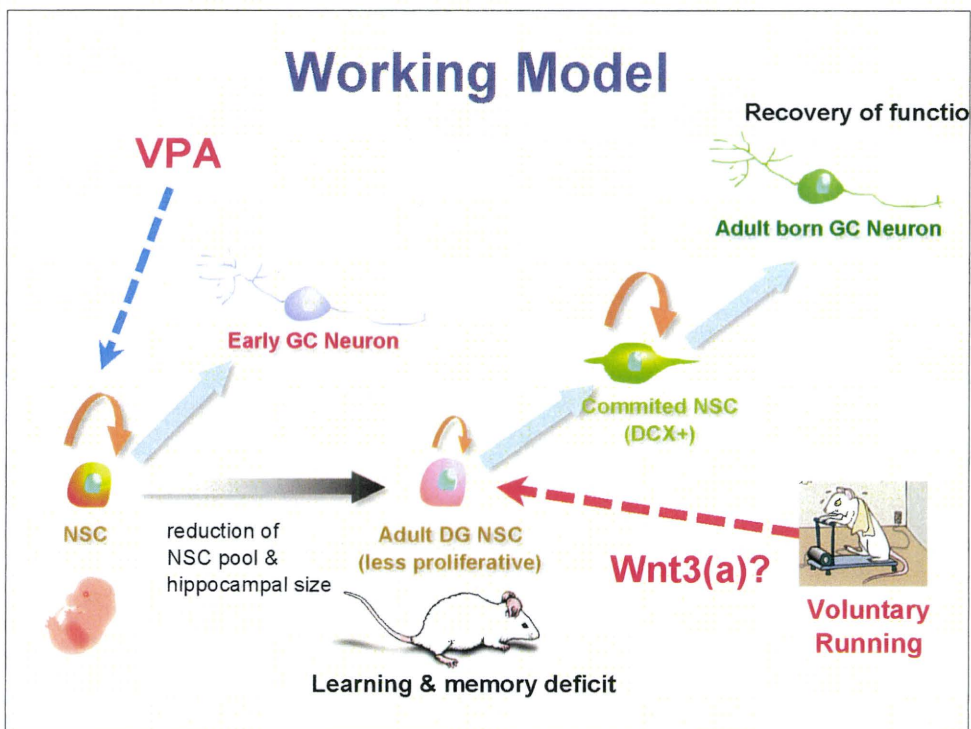
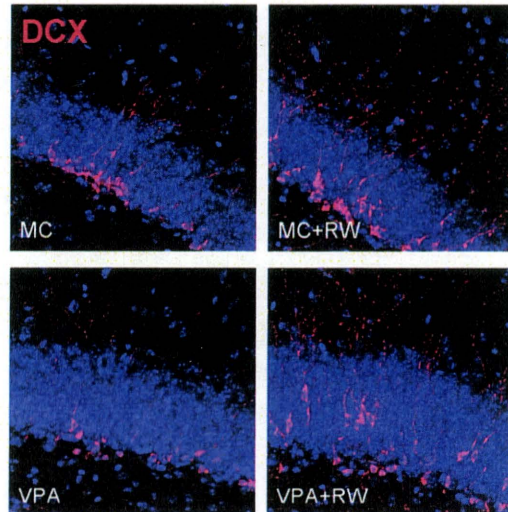


成体海馬ニューロンの新生と成熟過程



Adapted from: Duan X et al., *Curr Opin Neurobiol* 18, 108-115 (2008)

運動による海馬顆粒細胞の異常形態の回復



平成22年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H20-化学一般-009）
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-
分担研究報告書

分担研究課題：「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」

研究分担者 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】

本分担研究では、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、今年度はモデル中枢作動性物質としてベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム（商品名：ハルシオン等）を選択し、「幼若期」暴露時のマウスでの情動・認知行動解析ならびに網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、1) トリアゾラム(1 mg/kg)経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、遅発性の学習記憶障害が生じる事が明らかとなった。2) この遅発性の情動認知行動影響の分子メカニズムを探索するために、投与後経時的(2、4、8及び24時間後)に採取した幼若期(生後2週齢)の海馬サンプルを用いて、Percellome法による網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、発現が減少した遺伝子リストの中に、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る遺伝子であるNpas4分子とその関連遺伝子を見出す事が出来た。このNpas4遺伝子の発現減少は、昨年度の本分担研究にて、遅発性の学習記憶障害を誘発することを見いだしたイボテン酸を幼若期に投与した際の海馬においても認められた。そこで、3) トリアゾラムとイボテン酸それぞれを、幼若期に投与した際の海馬における遺伝子発現プロファイルを比較・検討したところ、発現が共通して減少した遺伝子リストに、Npas4とその関連遺伝子Bdnf、Egr4及びスパン形成に関係するArc遺伝子を含む13遺伝子が見いだされた。このことは、少なくともこの13遺伝子は、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関与する候補遺伝子である可能性を示唆しており、また従来、遅発性の情動認知行動影響との関連は示唆されていないため新規性の高い発見と考えられる。*In silico*でのプロモーター解析により、この13遺伝子のうち12遺伝子の転写開始点上流に、8種類の共通した結合配列が見いだされた。今後、特にこのNpas4分子が関係するシグナルネットワークに着目した検討により、遅発性神経毒性の誘発分子機序に迫れるものとする。

A. 研究目的

本研究班では、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。この確立を通して、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。その際、胎児期、幼若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。

「本分担研究の目的」は、モデル中枢作動性物質を用いて、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である。今年度は、モデル中枢作動性物質としてベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム（商品名：ハルシオン等） $[C_{17}H_{12}Cl_2N_4]$ 、分子量：343.2、CAS No.：28911-01-5、Lot No.：059H0832（WAKO社）を選択した。トリアゾラムは、GABA受容体に作用しCl⁻チャネルを開口させCl⁻の透過性を亢進させることで過分極を発生させ、活動電位の発生を抑制することにより催眠作用を発現するものと考えられている。トリアゾラムの文献上の半数致死量（マウス、経口）は1,080 mg/kgである。

トリアゾラムを選択した理由は、アミノ酸系神経伝達物質受容体に作用し、発達期での情動・認知障害を引き起こす可能性が示唆されるためであるが、これとは別に、すでに種村研究分担者との共同研究により、成熟期、幼若期、胎生期（経胎盤投与）のマウスに同一用量（1 mg/kg）のトリアゾラムを単回経口投与し、それぞれ成熟後のマ

ウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期においてのみ認められたという情報を得たためである。

下記にトリアゾラムの構造式を記載する。

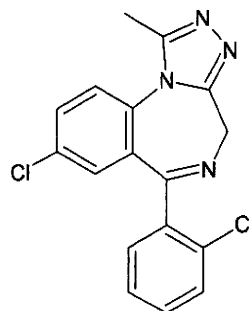


図1 トリアゾラムの構造式

B. 研究方法

妊娠マウスを含め C57BL/6CrSlc マウス（日本エスエルシー）を実験に用いた。トリアゾラムの投与経路は経口投与、投与容量は10 (ml/kg)、溶媒は0.5%メチルセルロース（WAKO）とし、メノウ鉢を用いて懸濁液を作製し用事調整にて投与液を作製した。

用量設定実験の結果ならびに、同一用量のトリアゾラムを投与した際の成熟期、胎生期および幼若期の各投与群間の比較・検討を考慮し、トリアゾラムの最高用量を1 mg/kg と設定した。

遺伝子発現変動解析に際しては幼若期（生後2週齢）の雄性マウスに3用量のトリアゾラム（0、0.1、0.3及び1 mg/kg）を単回強制経口投与し、投与後2、4、8、24時間後に海馬をサンプリングし、Percellome法による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。解析に際し、

我々が独自に開発した「RSort」を用いて網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルネットワークの探索は、市販のソフトである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて検討した。

情動・認知行動解析では、胎生期 (妊娠14.5日)、幼若期 (生後2週齢)、成熟期 (生後11週齢)のマウスに1用量のイボテン酸 (0及び1 mg/kg)を単回強制経口投与し、生後12-13週齢時に、各群8匹について、オープンフィールド試験、明暗往來試験、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。胎生期投与は妊娠マウスへの経胎盤暴露である。

有意差の検定は、Studentのt検定によりおこない、P値が0.05未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD)にて示した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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程 (平成19年4月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 成熟期、幼若期および胎生期にトリアゾラムを単回経口投与した際の、成熟後の情動・認知行動の比較解析:

情動・認知行動解析では、トリアゾラム (1 mg/kg)を成熟期、幼若期、胎生期に単回経口投与し、各投与群につき、生後12-13週齢のマウスにつき検討したところ (n=8)、幼若期投与群では、溶媒対照群と比較し有意な変化が認められ、行動異常の誘発が示唆されたが、成熟期ならびに胎生期投与群では有意な変化が認められなかった。有意な変化が認められた検索項目は、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成度の低下及び空間-連想記憶度の低下、であった。

これらの結果から、トリアゾラム (1 mg/kg)の単回経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、学習記憶障害が誘発されたものと考えられた。

C-2: 幼若期にトリアゾラムを単回経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析の比較

次いで、この幼若期投与群のみで誘発されたトリアゾラム投与による遅発性行動影響の分子メカニズムを明らかにする目的で、幼若期投与の際の海馬サンプルについて、Percellome法 (遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006)による網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。

幼若期マウスの海馬において、発現が有意に増加するものとして2,062 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして194 psが見いだされ

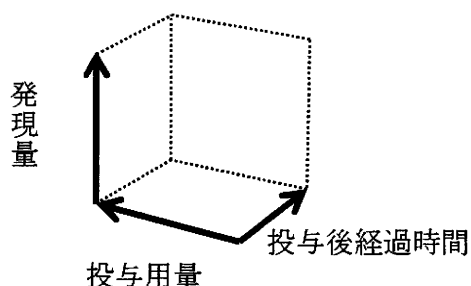
た。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。ミエリン鞘の維持に関与する *Ndr1* 遺伝子の発現増加(投与 8・24 時間後、中・高用量)が認められたが、この関連遺伝子の変動は認められなかった。また現時点で、アポトーシスや酸化ストレスを含め有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだすことはできなかった。

他方、幼若期マウスの海馬において、発現が有意に減少するものとして 5,635 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 97 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また酸化ストレス、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動も認められなかった。神経伝達に関連する遺伝子として、GABA-A 受容体である *Gabrb3* (gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 3) (投与 24 時間後、低・中・高用量)、BDNF 受容体である *Ntrk2* (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2) (投与 8・24 時間後、低・中・高用量)、K チャネルである *Kcnv1* (potassium channel, subfamily V, member 1) (投与 24 時間後、低・中・高用量)、*Kcna1* (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1) (投与 8・24 時間後、中・高用量) 及び *Kcnn2* (potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2) (投与 4・8 時間後、中・高用量) の発現減少が認められた。

加えて、興味深いことに近年、シナプス

の興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る「マスタースイッチ」として機能する転写因子であると報告された (Lin Y et al., *Nature* 455: 1198-1204, 2008)、*Npas4* (neuronal PAS domain protein 4) 遺伝子の顕著な発現減少が認められた(投与 2 時間後、中・高用量; 投与 4 時間後、低用量; 投与 8 時間後、低・中・高用量)。またこの標的遺伝子と報告される *Bdnf* (brain derived neurotrophic factor) 遺伝子の顕著な発現減少も認められた(投与 2 時間後、高用量、投与 4・8・24 時間後、低・中・高用量)。これら *Npas4* および *Bdnf* 遺伝子の発現変動を図に示す (図 2)。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。

なお、発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子の多くが、神経系での機能が不明であることから、神経系における遺伝子機能の基礎研究をさらに推進する必要があるものと考えられた。



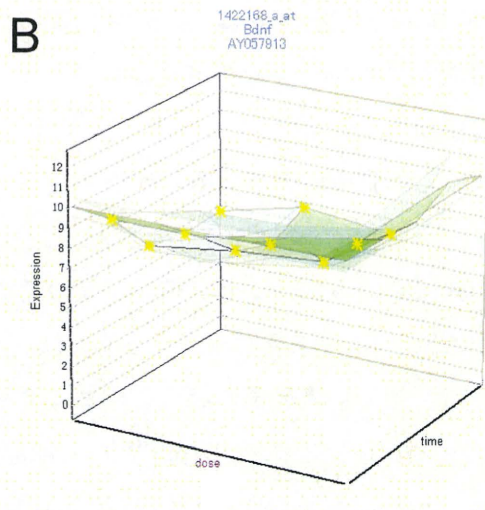
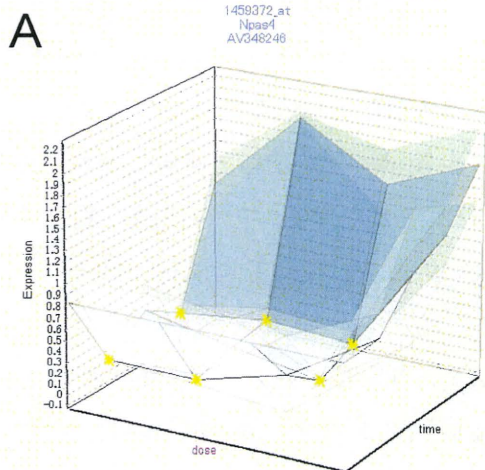


図 2 幼若期マウスの海馬において、トリアゾラム投与により発現が顕著に減少した Npas4 (A) および Bdnf 遺伝子 (B) 遺伝子の発現変動

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に * を付した。

これら Npas4 及び Bdnf 遺伝子の発現減少は、昨年度に本分担研究にて、毒キノコ (テングダケ類) に含まれるアミノ酸であり、

グルタミン酸受容体のアゴニストであるイボテン酸を、幼若期投与した際の海馬においても認められた。加えてイボテン酸 (1 mg/kg) の幼若期投与群では、トリアゾラム投与時と同様に遅発性の学習記憶障害が生じる事も明らかにした。そこで次に、トリアゾラムとイボテン酸それぞれを、幼若期に投与した際の海馬における遺伝子発現プロファイルを比較・検討することとした。

C-3 : 幼若期マウスに、トリアゾラム及びイボテン酸を単回経口投与した際の、海馬における変動した遺伝子数の比較 :

幼若期のマウスに、今年度の検討化学物質であるトリアゾラム及び、昨年度の検討化学物質であるイボテン酸を、それぞれ単回経口投与した際の、海馬における遺伝子発現変動の解析により得られた遺伝子リストについて、両者を比較・検討した。その結果、発現増加および減少、双方共に、両化合物投与群の間に共通して含まれる遺伝子が認められる (増加分 : 13 ps; 減少分 : 14 ps) ことが明らかとなった。この共通して減少したリストの中に、Npas4 及び Bdnf 遺伝子が含まれていた。以下に図 3 として、それぞれの投与群において、発現が増加あるいは減少した遺伝子数についてベン図として示す。

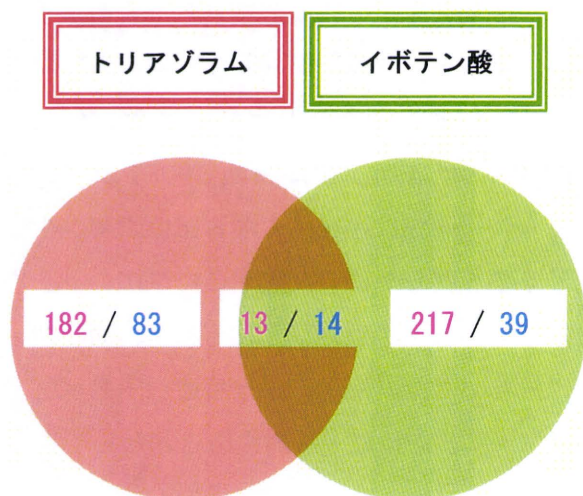


図 3 幼若期のマウスに、トリアゾラム及びイボテン酸を単回経口投与した際に、海馬において変動した遺伝子数の比較。朱書きの字は増加を、青字は減少を示す。

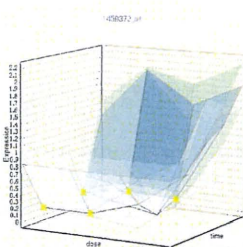
Npas4 遺伝子は昨年度の本分担研究にて、遅発性の学習記憶障害を生じさせるイボテン酸を、幼若期投与した際の海馬において発現が減少しており、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関与する候補遺伝子と考察した分子である。トリアゾラム幼若期投与の際もイボテン酸幼若期投与時と同様に、遅発性の学習記憶障害が認められ、また Npas4 遺伝子の発現減少が認められたことから、両化合物投与により共通して発現減少が認められた遺伝子リストは、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関与する遺伝子リストである可能性が考えられた。そこで共通して発現減少が認められた 14 ps のパターンを両化合物投与間で比較した。なお投

与用量はトリアゾラム、イボテン酸共に同一の 3 用量(0、0.1、0.3 及び 1 mg/kg)であった。Npas4 は、トリアゾラム投与の際には低用量から用量依存的に、また投与 2 から 8 時間後まで持続して発現減少が認められる(投与 2 時間後、中・高用量;投与 4 時間後、低用量;投与 8 時間後、低・中・高用量)。他方、イボテン酸投与の際には、は中用量より影響が認められ、また投与 2 から 4 時間後までと、より短い時間、発現減少が認められた(投与 2 時間後、中・高用量;投与 4 時間後、高用量;投与 24 時間後、中用量)。この両化合物投与の際の Npas4 の発現変動の比較を図 4A に示す。

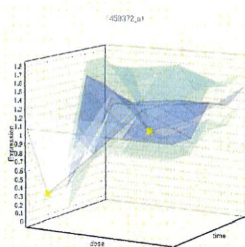
共通して発現減少が認められた 14 ps のパターンを両化合物投与間で比較したところ、興味深い事に、Npas4 遺伝子及びその標的遺伝子 Bdnf を含む少なくとも 12 ps について、Npas4 遺伝子の場合と同様な発現パターンを示した。この 12 ps のうち、Dusp6 (dual specificity phosphatase 6)、Nr4a1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1)、Egr4 (early growth response 4)、Bdnf 及び Arc (activity regulated cytoskeletal-associated protein) 遺伝子について、その発現変動を比較したものを図 4 に示す。このうち、Egr4 遺伝子は Bdnf により発現が誘導されることが、また Arc 遺伝子はスパイン形成に関与することが報告されている。

A: Npas4

トリアゾラム

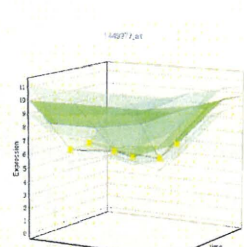


イボテン酸

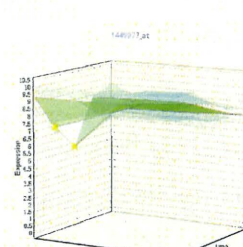


D: Egr4

トリアゾラム

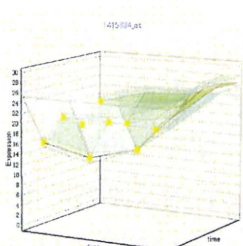


イボテン酸

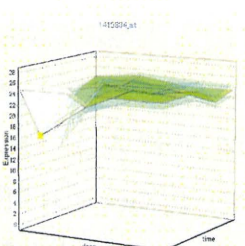


B: Dusp6

トリアゾラム

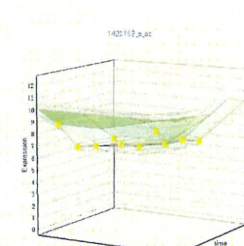


イボテン酸

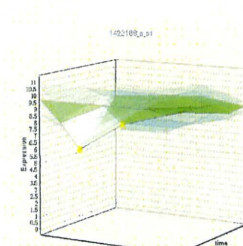


E: Bdnf

トリアゾラム

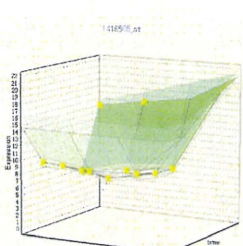


イボテン酸

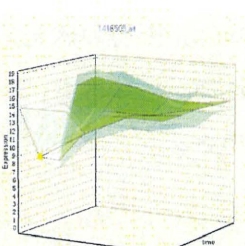


C: Nr4a1

トリアゾラム

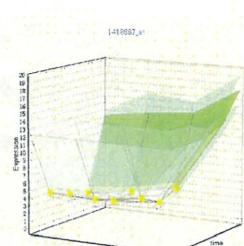


イボテン酸



F: Arc

トリアゾラム



イボテン酸

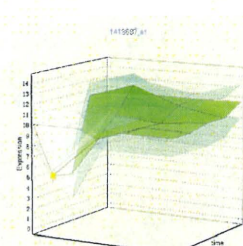


図 4 幼若期マウスの海馬において、有意な発現減少が、トリアゾラム（左）及びイボテン酸（右）経口投与の際に共通して認められた遺伝子のうち、Npas4 (A)、Dusp6 (B)、Nr4a1 (C)、Egr4 (D)、Bdnf (E)及びArc(F)遺伝子の発現変動の比較

各遺伝子は、トリアゾラム及びイボテン酸投与時、双方共に、Npas4 遺伝子の場合と同様な発現パターンを示した。

これらの遺伝子が Npas4 遺伝子と経時的、濃度依存的に同様な発現パターンを示した事から、これらの遺伝子は、Npas4 遺伝子と同じシグナルネットワークに含まれる可能性が示唆された。そこで、各遺伝子の転写開始点上流での共通した結合配列の有無を検討する事とした。

C-4: トリアゾラム及びイボテン酸、それぞれの投与の際に、発現減少が共通して認められた遺伝子リストについての、*in silico* でのプロモーター解析:

このトリアゾラム及びイボテン酸、それぞれの投与の際に、有意な発現減少が共通して認められた、Npas4 遺伝子を含む遺伝子が、同じシグナルネットワークを共有しているか否かを検討する為に、各遺伝子の転写開始点上流における共通する結合配列の有無を、*in silico* でのプロモーター解析により検討した（市販のソフト：Genomatix を使用）。

その結果、14 ps (13 遺伝子) 中 12 遺伝子のプロモーターに共通する 8 種類の転写因子結合配列 (O\$VTBP、V\$EGRF、V\$KLFS、V\$MAZF、V\$MZF1、V\$NR2F、V\$ZF02、V\$ETSF) を見いだす事ができた。結合する転写因子はそれぞれ、Vertebrate TATA binding protein factor、EGR/nerve growth factor

induced protein C & related factors、Krueppel like transcription factors、Myc associated zinc finger、Nuclear receptor subfamily 2 factors、C2H2 zinc finger transcription factors 2、Human and murine ETS1 factors であった。プロモーターにおける各転写因子結合モチーフ数は、Npas4 遺伝子に着目すると、V\$EGRF が最も多く 18 個であり、次いで V\$ZF02 の 12 個、V\$ETSF の 9 個の順であった。

したがって、幼若期マウスへの経口投与により遅発性の学習記憶障害が認められたトリアゾラム及びイボテン酸、それぞれの投与の際に、共通して有意な発現減少が認められた、Npas4 遺伝子を含む 12 個の遺伝子には、共通する結合配列が見いだされた事から、これらの遺伝子が Npas4 遺伝子関連シグナルネットワークと同一のネットワークを利用している事が示唆された。このシグナルネットワークが、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関連することが示唆されたが、今後も、より詳細に検討する予定である。

D. 結論

本分担研究では、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、今年度はモデル中枢作動性物質としてベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム（商品名：ハルシオン等）を選択し、「幼若期」暴露時のマウスでの情動・認知行動解析ならびに網羅的遺

伝子発現変動解析を検討した。その結果、1) トリアゾラム (1 mg/kg) 経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、遅発性の学習記憶障害が生じる事が明らかとなった。2) この遅発性の情動認知行動影響の分子メカニズムを探索するために、投与後経時的 (2、4、8 及び 24 時間後) に採取した幼若期 (生後 2 週齢) の海馬サンプルを用いて、Percellome 法による網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、発現が減少した遺伝子リストの中に、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る遺伝子である Npas4 分子とその関連遺伝子を見出す事が出来た。この Npas4 遺伝子の発現減少は、昨年度の本分担研究にて、遅発性の学習記憶障害を誘発することを見いだしたイボテン酸を幼若期に投与した際の海馬においても認められた。そこで、3) トリアゾラムとイボテン酸それぞれを、幼若期に投与した際の海馬における遺伝子発現プロファイルを比較・検討したところ、発現が共通して減少した遺伝子リストに、Npas4 とその関連遺伝子 Bdnf、Egr4 及びスパイン形成に関係する Arc 遺伝子を含む 13 遺伝子が見いだされた。このことは、少なくともこの 13 遺伝子は、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関与する候補遺伝子である可能性を示唆しており、また従来、遅発性の情動認知行動影響との関連は示唆されていないため新規性の高い発見と考えられる。In silico でのプロモーター解析により、この 13 遺伝子のうち 12 遺

伝子の転写開始点上流に、8 種類の共通した結合配列が見いだされた。このことから、これらの遺伝子が Npas4 遺伝子関連シグナルネットワークと同一のネットワークを利用している事が示唆された。このシグナルネットワークが、遅発性の情動認知行動影響の誘発に関連することが示唆されたが、今後も、より詳細に検討する予定である。特にこの Npas4 分子が関係するシグナルネットワークに着目した検討により、遅発性神経毒性の誘発分子機序に迫れるものと考えられ、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が明らかになることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍

なし

1-2) 学術雑誌

T Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A and Saga Y, The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.

Development 137: 1515-1522, 2010.

2. 学会発表

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、菅野 純

Percellome 発生トキシコゲノミクスの進捗 [第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2010 年 6 月

菅野 純、北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一
インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用 [第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2010 年 6 月

種村健太郎、五十嵐 勝秀、松上稔子、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に幼若期雄マウスへのイボテン酸投与による脳高次機能障害について [第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2010 年 6 月

高木篤也、北嶋 聡、五十嵐 勝秀、相崎 健一、江馬 眞、菅野 純
Percellome 手法を用いた TCDD 投与マウスの胎児口蓋の遺伝子発現解析(3) [第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会]2010 年 6 月

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi and Satoshi Kitajima
Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to study anticancer agents [第 69 回日本癌学会学術総会] 2010 年 9 月

Polouliakh N, Kanno J, Matsuoka Y, Aisaki K, Nock R, Nielsen F, Oka K, Ghosh S, Kitajima S, Kitano H
Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin

(TCDD) and
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran
(TCDF) chemicals. [The 11th
International Conference on Systems
Biology] October. 10-16, 2010,
Edinburgh, England

G. 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
なし

平成22年度厚生労働科学研究費
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-

分担研究課題名

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

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

1

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. 従来之情動・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

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

3

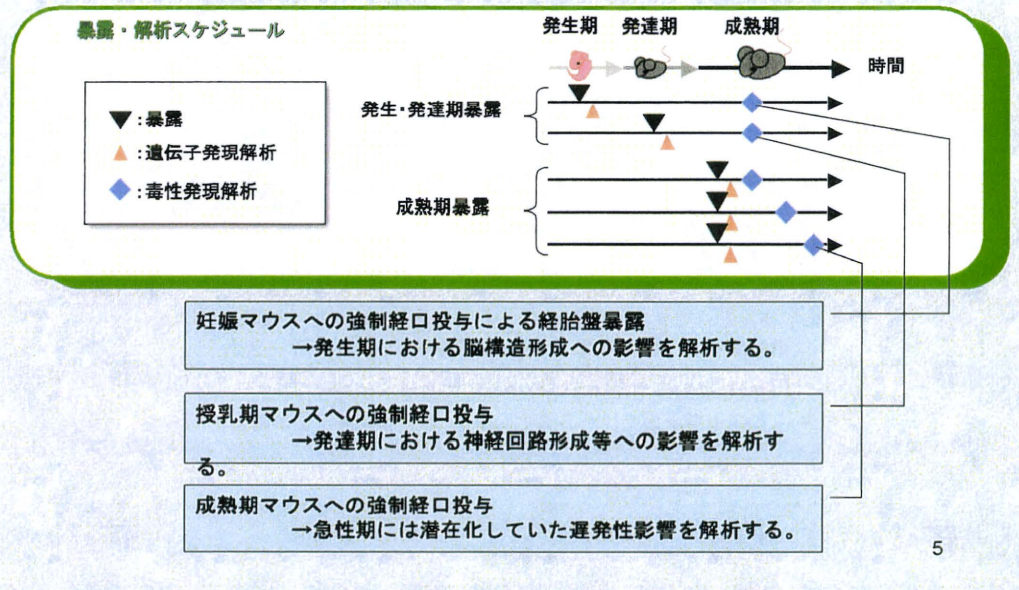
方法

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

4

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

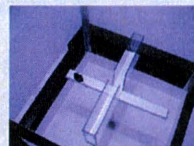
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



オープンフィールド試験



明暗往來試験



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

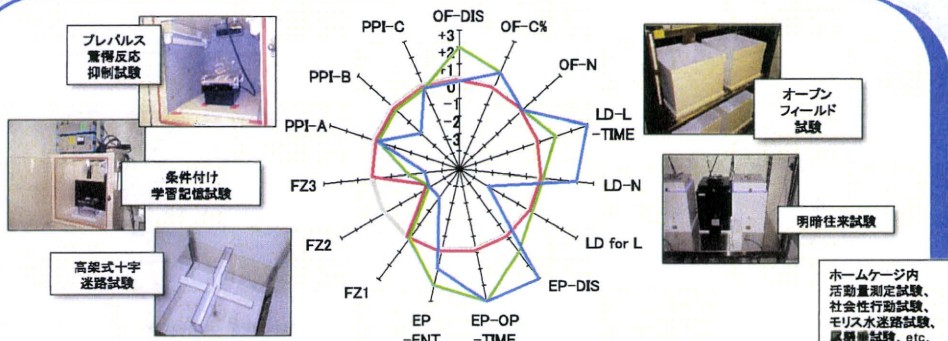
認知行動-情報処理

情報の受理・整理・対応



プレバ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。

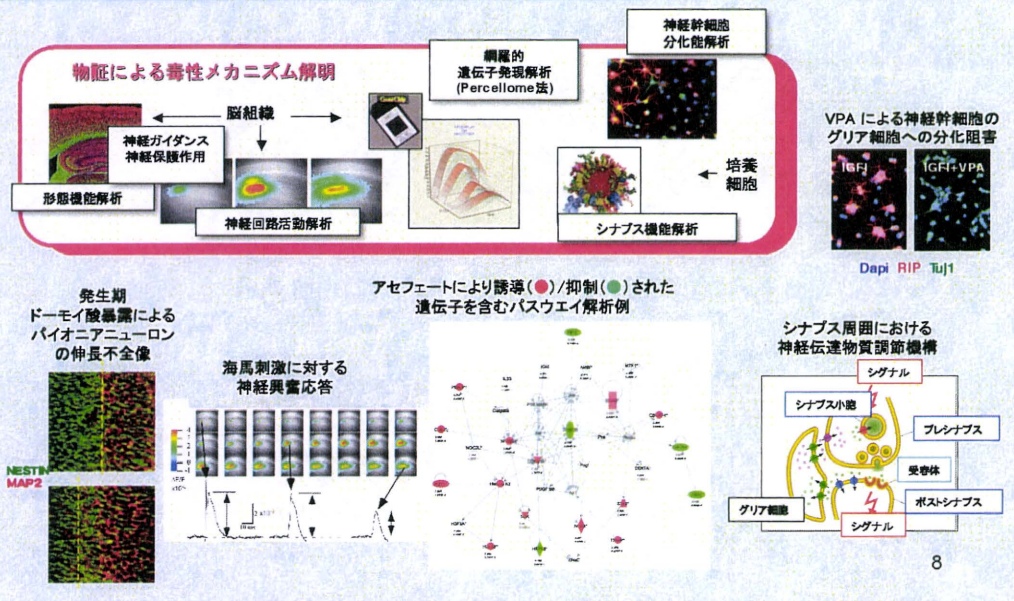
- 成熟期暴露では学習記憶のみに成績低下が見られるが、
- 発生期 ■発達期暴露ではその悪化に加え、多彩な異常行動が誘発される。

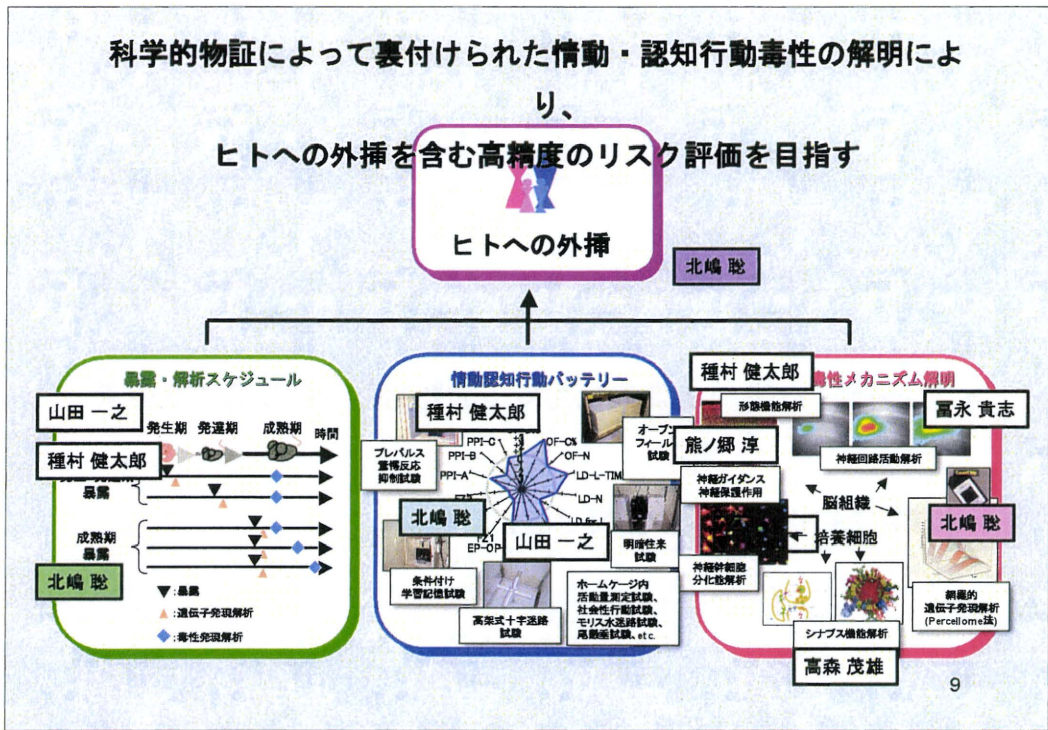
既存の神経疾患モデルマウスへの対応性も考慮

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-運搬記憶 FZ3: 音-運搬記憶	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: プレハルス驚愕反応抑制試験 PPI-A: プレハルス 90db/120db PPI-B: プレハルス 95db/120db PPI-C: プレハルス 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





分担研究課題名

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

本分担研究の目的

モデル中枢作動性物質を暴露した際の、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

- ・ Percellome法による網羅的遺伝子発現変動解析
- ・ 本研究班における、胎生・幼若・成熟期マウスに暴露した際の、情動・認知行動解析を含む各解析結果との比較・検討
- ・ 従来の神経毒性評価手法を補う←成熟期動物の末梢神経系への急性影響を対象

平成22年度本分担研究

モデル中枢作動性物質：

ベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム（商品名：ハルシオン等）

⇒ 「幼若期」暴露時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析

⇐ 情動・認知行動解析の結果との比較検討

11

ベンゾジアゼピン系睡眠薬 トリアゾラムの選択理由

1: 昨年度検討したイボテン酸同様、アミノ酸系神経伝達物質受容体[GABA受容体]に作用するため、発達期での情動・認知障害を誘発する可能性が示唆された

2: 種村研究分担者により、成熟期、幼若期、胎生期（経胎盤投与）のマウスに、同一用量のトリアゾラムを単回経口投与し、各群ともに成熟後のマウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期において強く認められたという情報を得た

トリアゾラムは、GABA受容体に作用しCl⁻チャンネルを開口させCl⁻の透過性を亢進させることで過分極を発生させ、活動電位の発生を抑制することにより催眠作用を発現

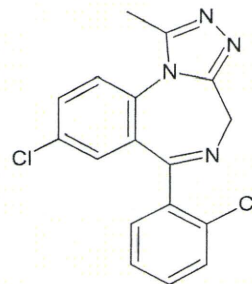
商品名：ハルシオン等

$C_{17}H_{12}Cl_2N_4$

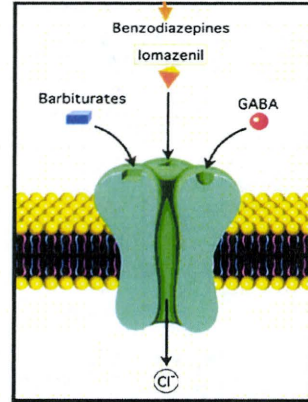
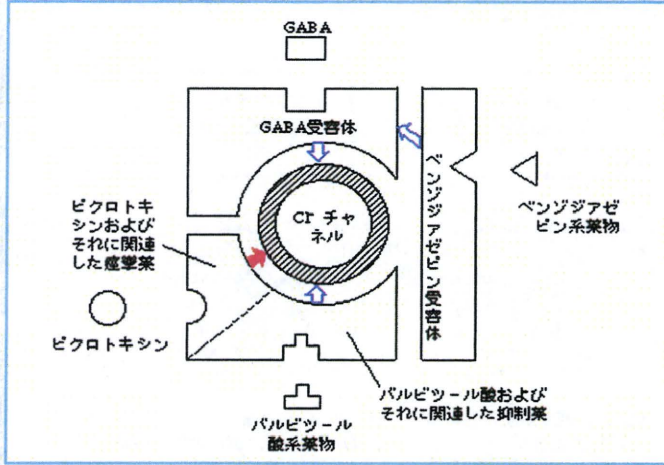
分子量：343.2

CAS No：28911-01-5,

LD₅₀: 1,080 mg/kg
(oral, mouse)



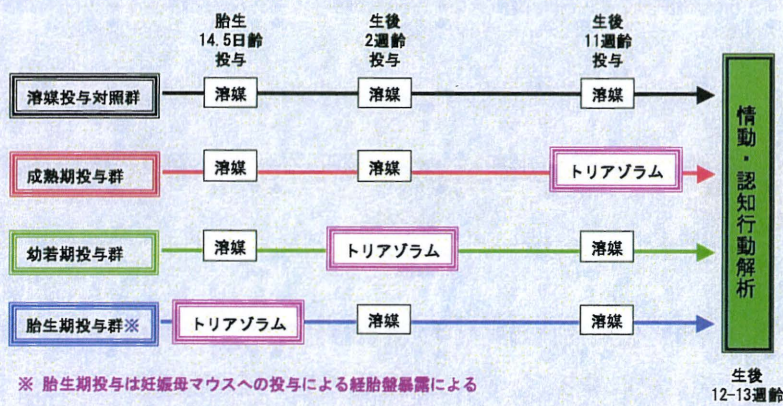
Cl⁻ チャンネルに GABA 受容体とベンゾジアゼピン受容体、さらにピクロトキシン、バルビツール酸受容体が共役しているモデル



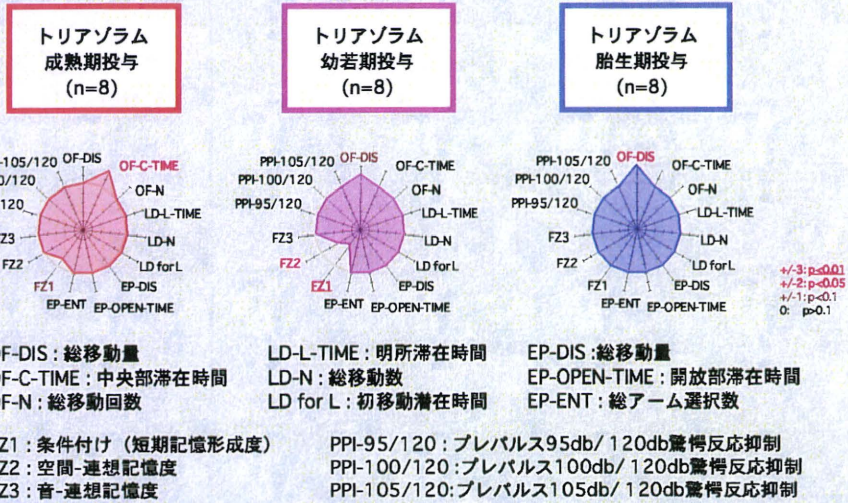
- ・ベンゾジアゼピン受容体にベンゾジアゼピン類が結合すると、GABA 受容体が活性化され、GABA に対する親和性が増加する。
- ・GABA 受容体に GABA が結合すると、Cl⁻ チャンネルは開口し、Cl⁻ イオンの透過性は亢進する。
- ・バルビツール酸系薬物はCl⁻ チャンネルを直接開く作用がある。
- ・ピクロトキシンは直接 Cl⁻ チャンネルに結合しチャンネルを閉じる。

by Dr Tanemura

トリアゾラム（1 mg/kg）単回強制経口投与-解析スケジュール

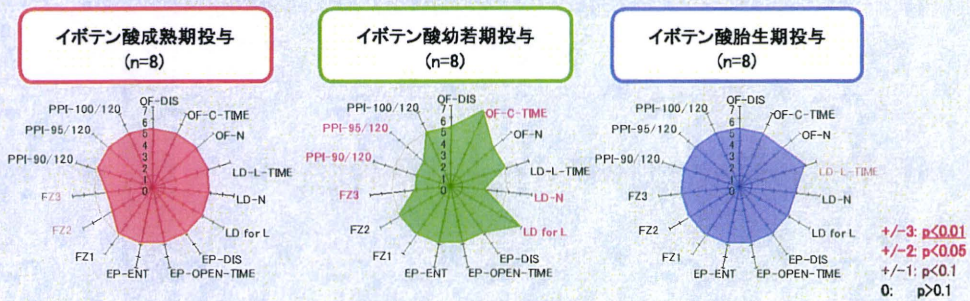


幼若期トリアゾラム投与の結果、遅発性の学習記憶障害が生じた



イボテン酸投与時期による行動逸脱レベルの比較

イボテン酸: キノコ毒の成分、NMDA型グルタミン酸受容体のアゴニスト
 1mg/kg、強制経口投与 (溶媒は0.5%メチルセルロース溶液)



イボテン酸 (1mg/kg) を生後2週齢の幼若期雄マウスに

強制経口投与した結果、成熟後の12-13週齢時に、

①不安関連行動逸脱と②記憶異常及び③情報処理能低下が生じた。