

H21 は、さらにチャンネルロドプシン (ChR2) による光刺激法の導入により、より選択性の高い貫通繊維刺激を導入しつつある。

H22 は、上記の研究結果を集約し出版に向けてデータを再構成しているところである。

(2) マウスへの化学物質の単回強制投与後の神経回路機能の評価

化学物質は、400cps のメチルセルロース溶液に溶解し、決まった週令 (11-12 週令) のマウス (C57BL/6J) に、強制単回投与で与え、あらかじめ決めた時間 (2 時間後から 96 時間後) に、断頭後、*ex vivo* 標本 (スライス標本) を作成した。スライス標本は、標準的な手順に従って作成したが、その後、膜電位感受性色素 (VSD; Di-4-ANNEPPS 0.2mM) で染色し、生理活性の回復を待って実験に供した。使用した化学物質は (i) バルプロ酸、(ii) アセフェートの 2 種類である。

(3) マウスへの化学物質の腹注投与後の神経回路機能の評価

化学物質 (記憶喪失性貝毒の一種、ドモイ酸、domoic acid) を生理塩溶液に希釈し、決まった週令 (11-12 週令) のマウス (C57BL/6J) に腹注にて投与し、予め決めた時間 (4 日後、5 日後) に断頭、*ex vivo* 標本 (スライス標本) を作成した。(2) と同様に光計測に供するとともに、LTP (長期増強) 誘導プロトコルにより LTP の誘導を行い、コントロールとの比較をおこなった。

(4) ラット海馬スライス標本を用いた VSD 光計測法の定量化

ラット (4 週令から 5 週令) より、通常の手順に従って海馬スライス標本を作成し、膜電位感受性色素 (VSD) で染色後、実験に供した。

(5) 光計測に用いる新規光学系の構築
これまでに、新規の超高速共焦点光学系と、デジタルミラーデバイスを用いた多点同時光刺激装置つき光計測光学系の開発を行った。

H21 で開発はほぼ当初の目標を達成して成功した。H22 は実際の標本を用いてこの顕微鏡のさらなる改良を加えより広い視野で効果的な光刺激を可能にした。

(6) 新規共焦点顕微鏡の開発。固定のピンホールアレイを用いた新規の共焦点顕微鏡の開発を行った。この顕微鏡では撮像装置 (BrainVision 社製 MiCAM-Ultima) の最高サンプリングレートでの画像取得を低ノイズ条件で可能とすることができる。H22 は膜電位感受性色素とカルシウム色素で性能を評価し設計上の性能が出ていることを確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、徳島文理大学における「徳島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規程」にのっとり、あらかじめ実験計画書を同大学実験動物委員会、倫理委員会へ提出し、承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子改変マウスの神経回路機能評価 (MIT 利根川研究室にて)

光計測により比較した結果、シナプス小胞遊離を阻害したマウスの貫通線維-CA1 間のシナプス伝達が有意におさえられていることが分かった。

ウイルスによるチャンネルロドプシンの発現系は有効に働き、チャンネルロドプシンとともに発現させた GFP の発現から貫通繊維に特異的な発現が確認できた。問題は、チャンネルロドプシン分子は発現しているものの、光刺激はまだ成功していない。光刺激法のさらなる改良が必要である。光刺激には様々な技術的な障壁があることが分かってきたので、当面は、現在の技術でデータを集積することに集中することにした。

(2) マウスへの化学物質の単回強制投与後の神経回路機能の評価

アセフェート (Acephate) は 70 mg/Kg の投与量になる様に調整し (70 mg/mL を 0.01 mL/体重 (g)) 強制単回投与し、4 日後 (96 時間後) にスライス標本を作成し光計測を行った。海馬神経回路の主な信号伝達経路 (Mossy-CA3, Schaffer-CA1, Perforant Path-CA1) の信号経路について電気刺激に対する応答を光計測で比較した。その内、最も定性的に差が見られそうであった Schaffer-CA1 の経路について、刺激応答関係を比較した。

H21 は H20 にラット海馬で確認できた神経興奮の定量的検定法を応用して、錐体細胞にそった神経興奮の程度を定量的に比較した。その結果、有意な差は

検出されなかった。H22 ではさらに詳細な定量解析を加えたが有意の差は検出されなかった。刺激法、解析領域も含め改めて再検討をしている。

(3) マウスへの化学物質の腹注投与後の神経回路機能の評価

ヒトでアルツハイマー型の記憶喪失を惹起する記憶喪失性の貝毒ドーモイ酸は 100 mg/Kg の投与量になるように調整し、腹腔へ注射して投与した。コントロールには同量の生食を投与した。投与 4 日後に、断頭して実験に供した。光計測の結果、CA1-CA3 シナプスで顕著な差がないことを見出したので、アルツハイマー型の病変として最もよく調べられているシナプスの長期増強現象について検定をおこなった。その結果、最大強度の刺激で誘導した場合、LTP の大きさはコントロールの方が、ドーモイ酸を投与した場合に比べ有意に大きいことがわかった。また、前シナプスのシナプス放出効率の指標である Paired pulse facilitation インデックス (PPF インデックス) でも、差が見られ、ドーモイ酸投与マウスの方が大きかった。一方、個々のシナプス伝達の大きさは、光計測の結果からも示唆されたように、違いはなかった。

(4) ラット海馬スライス標本を用いた VSD 光計測法の定量化

光計測にタイムラプスの計測を適用し、海馬全体の膜電位応答が層によらず均一に測定しうることが示された。また、フィードフォワードの抑制性入力 of 膜電位応答に対する影響を定量的に示す

方法が確立した。この定量化法を(2)のアセフェートの効果の検定に用いることにより、一定の評価が可能となった。また、記憶の細胞モデルとされる海馬CA1野の長期増強の誘導刺激である高頻度刺激に対して定量的な解析を加え、GABA(A)受容体に関与する膜電位応答であって、その後の興奮伝播の短期可塑性の調節にも同じ系が働くことを示した。

(5)光計測に用いる新規光学系の構築
新規の超高速共焦点光学系はほぼ計算通りの性能があることが確認できた。デジタルミラーデバイス(DMD)を用いた多点同時光刺激装置つき光計測光学系で光刺激と光計測が同時に行えることが確認できた。現在、そのソフトウェアを開発しながら、出力の調節などを行っている。

この装置は現在、紫外光を刺激光として用いるため、ケージド化合物による刺激を行うように設計されている。これを、可視光(488nm)の光源を用いることにより、(1)で導入技術を開発しているチャンネルロドプシン分子の活性化に用いることで、より適用の範囲の広い技術に成熟させる。

また、実際の標本で実験を行う中で、視野の広さなどの点で改良点が多く出てきたので、その点を改良している。

(6)新規共焦点顕微鏡の構築

実際に稼動して、性能評価をおこなった。VSDを用いたテストでは、照明系の光量不足などで改善点が出てきた。一方、カルシウム色素を用いたテストでは単一細胞のカルシウム信号を

5ms/frame という早い速度でスライス標本から検出することができた。

D. 考察

上記の(1)、(4)の結果から、適切な実験系を構築することにより光計測が妥当な定量性を有し得ることが示された。

(2)の結果は現状ではアセフェートによるCA3-CA1シナプスでの異常がないという結果を示している。これまでの文献上に示されているシナプス機能と認知機能の対応から考えると、アセフェートと遅発的に示されている行動異常と、今回の結果との間には乖離があり、より詳細な検討を必要としている。

(3)で示したドーモイ酸の腹注によるLTPの現象は、これまでに示されている行動異常とほぼ平行な関係にあり、*ex vivo* 標本の状態でドーモイ酸による遅発認知機能の異常を捉えられたということを示している。今後は、この機能異常の機構をより詳細に調べる。これは認知機能に異常があるモデル動物としても極めて興味深いものである。

さらに(5)(6)の光学系を組み合わせることにより詳細な神経機構の解明が期待される。

E. 結論

本年はドーモイ酸投与マウスの認知機能異常の検出に一定の成果を得た。また、アセフェート投与による異常に関しては、ネガティブデータながらCA3-CA1シナプスの関与があまりないと結果を得た。さらに、共焦点顕微

鏡を加えた新規光学系の調節はさらにすすみ、神経回路の機能検定への応用がより具体的に計画できるようになってきている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

Tominaga T. and Tominaga Y. (2010) GABA(A) receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices. *Pflugers Arch* 460: 875-889.

Tominaga T and Tominaga Y. Practice for the optical recording method of neuronal circuit analysis. *Seibutsu Butsuri 生物物理* (in press)

2. 学会発表（発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入）

Kajiwara R, Tominaga T. and Takashima I. Enhancement of neural activities in the olfactory network induced by repetitive inputs to the olfactory nerve as revealed by

voltage-sensitive dye imaging. Program No. 479.15. 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.

Tominaga T., and Tominaga Y. A new type of confocal microscope for a fast voltage-sensitive dye (VSD) and Ca²⁺ imaging. Program No. 816.16. 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.

Tominaga T and Tominaga Y. A new microscope to interface with neuronal tissue by simultaneous optical VSD imaging readout and spatially and temporally patterned photostimulation. In: 第33回日本神経科学大会 / Neuro2010. Kobe: 2010

Tominaga T and Tominaga Y. A new VSD imaging microscope for neural circuit analysis with a random-access-photo-stimulator using a digital-mirror (DMD) device. In: 48th Annual meeting of Japanese Biophysical society. 2010. Sendai.

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

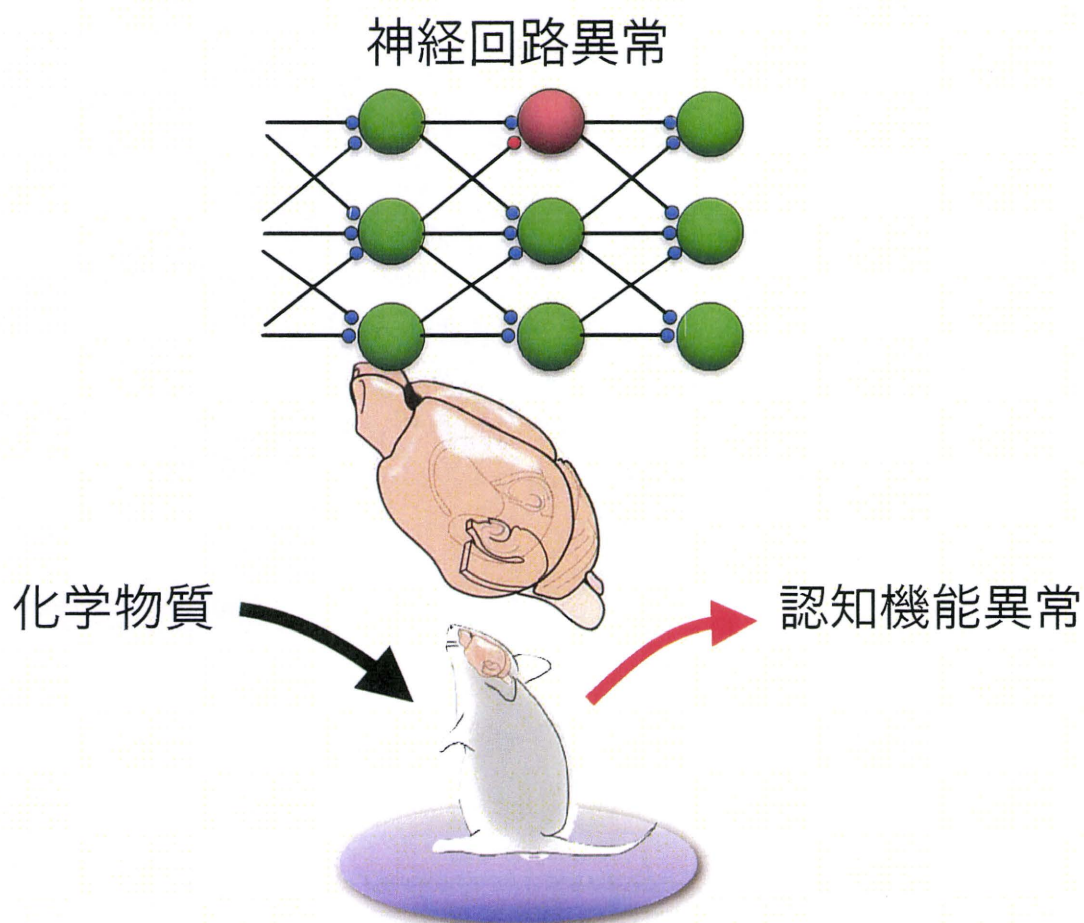
「新規超高速共焦点光学系」 富永貴志・市川道教（出願予定）

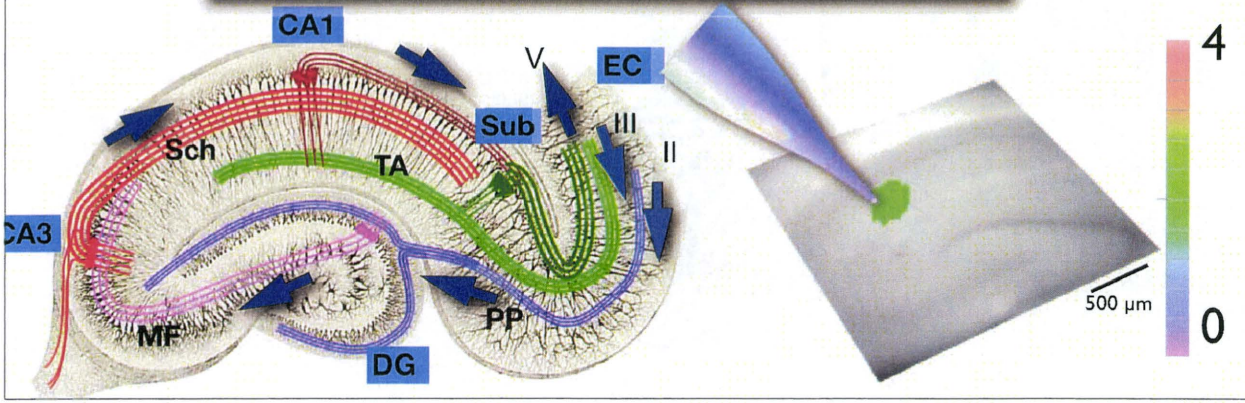
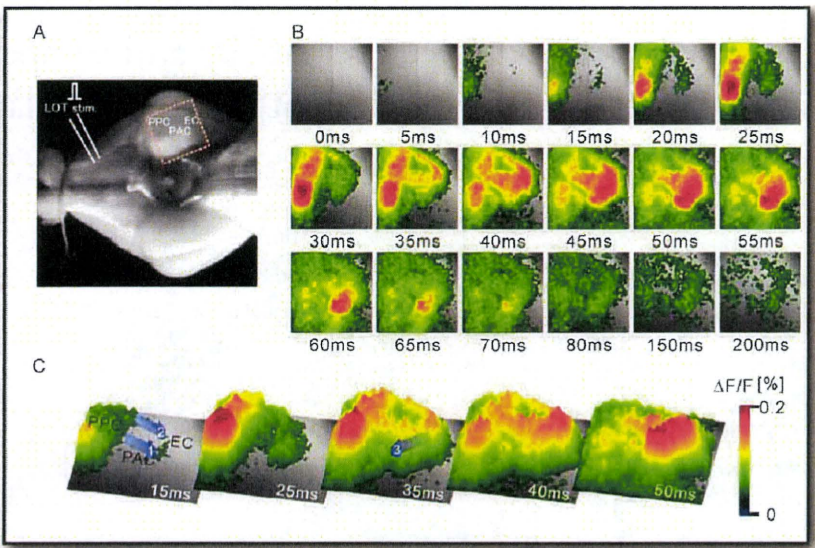
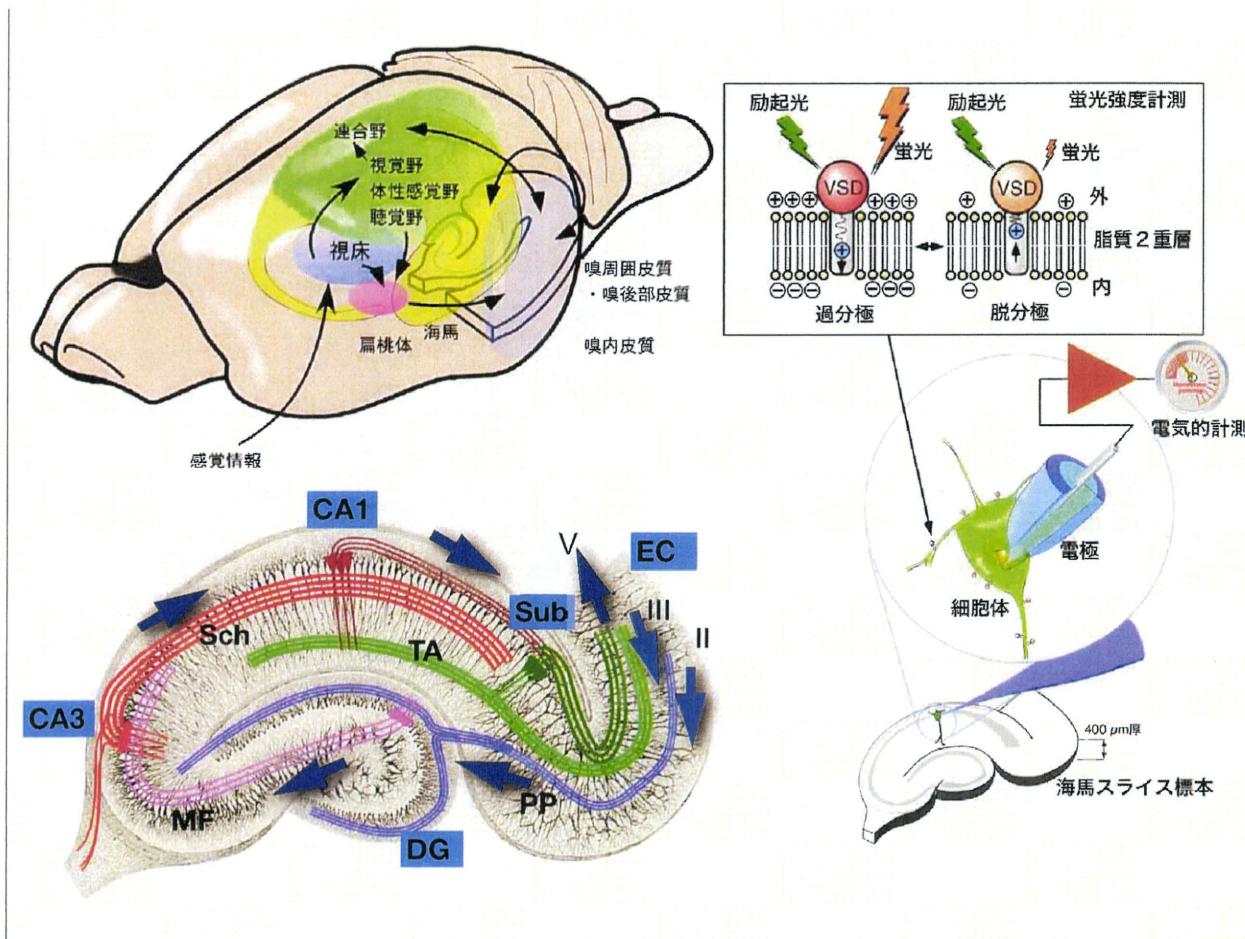
神経活動イメージングによる 中枢作動性物質の神経回路毒性解析

— 網羅性と精緻性 —

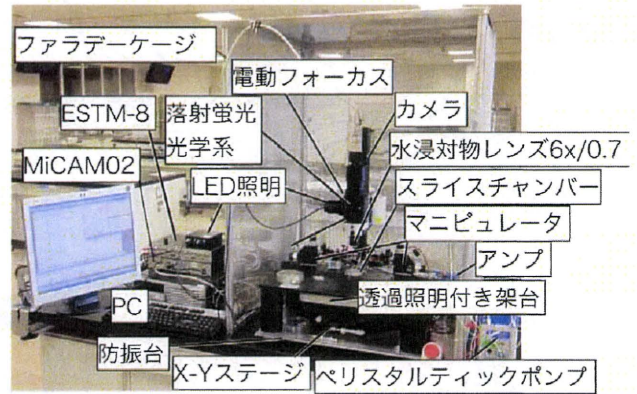
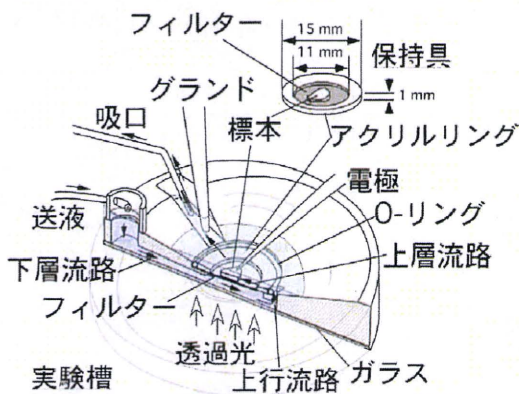
富永 貴志(徳島文理大学・香川薬学部)

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
特に避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)
北嶋神経行動毒性班・班会議 2011年2月22日 東京国際フォーラム





網羅性の高いVSD計測のために
スライス標本計測を容易に行うための装置開発

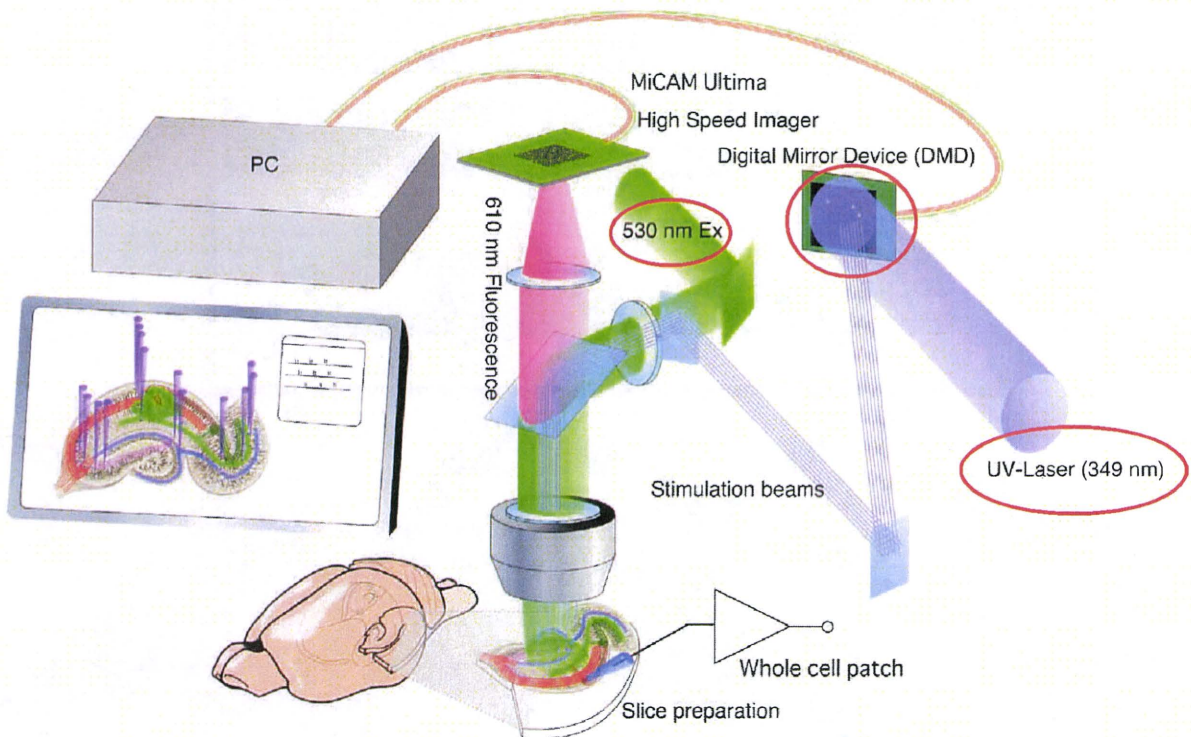


安定性の向上
装置の小型化
操作性の向上

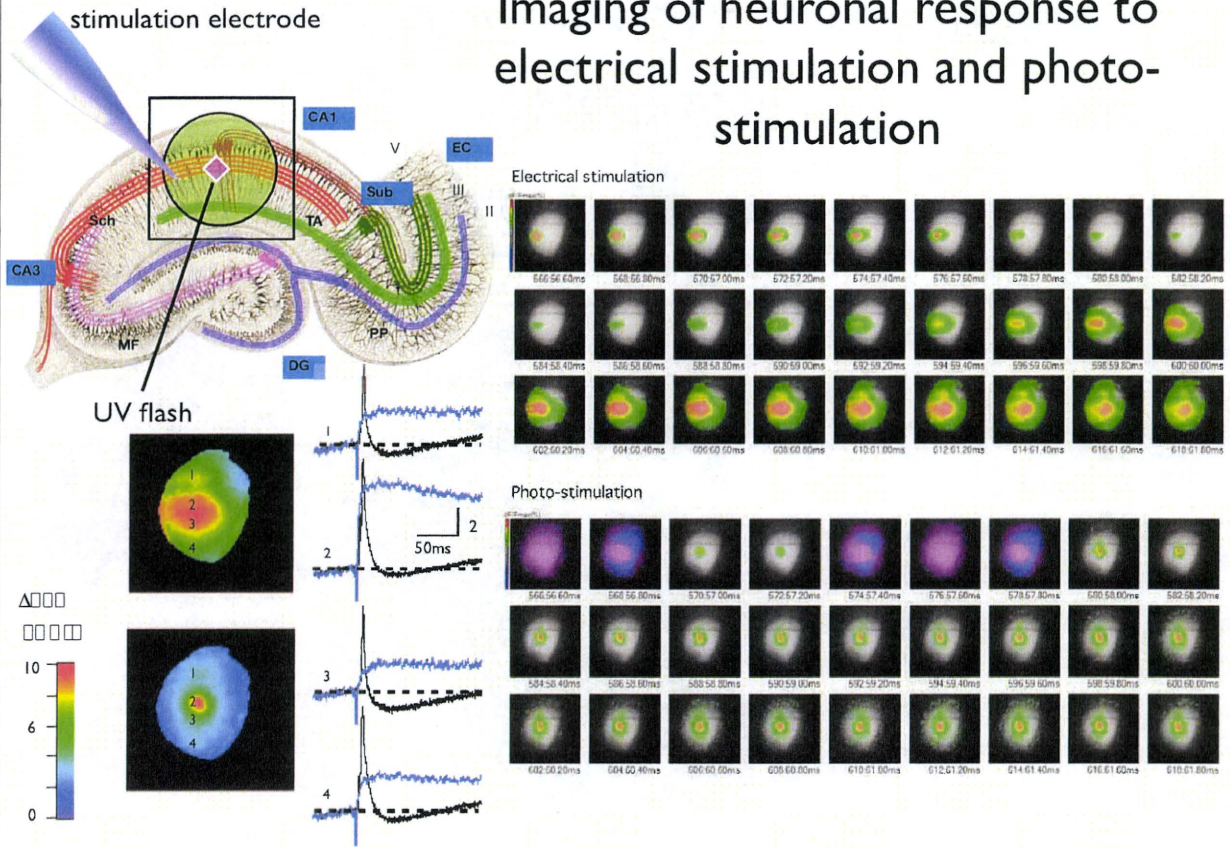
➔ 実習でも使用可能

VSD imaging

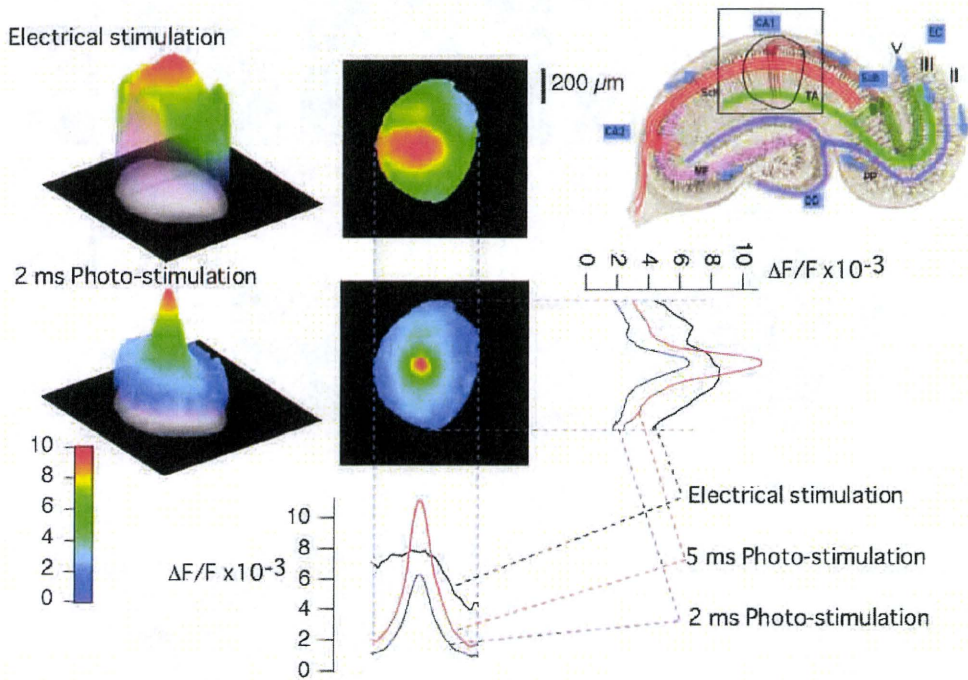
spatially and temporally
patterned stimulation



Imaging of neuronal response to electrical stimulation and photo-stimulation

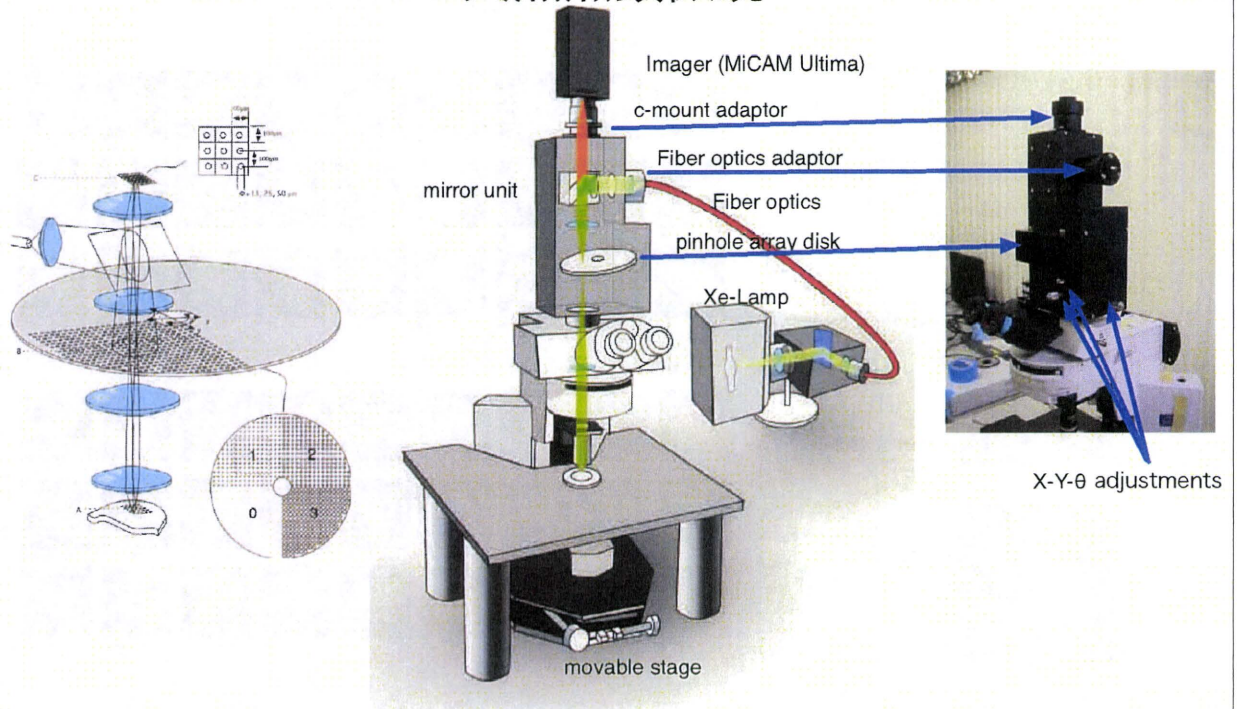


Focal activation of dendrite with photo-stimulation



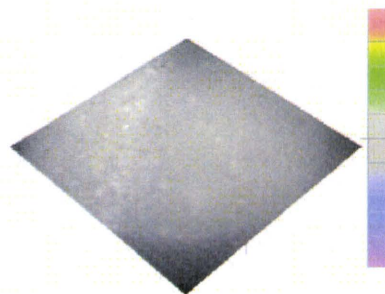
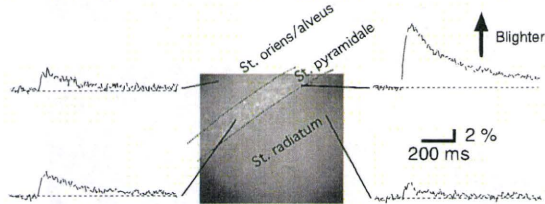
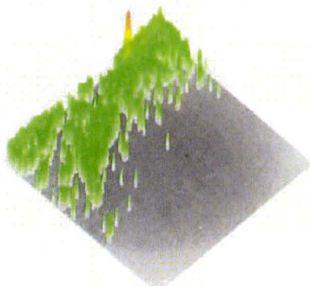
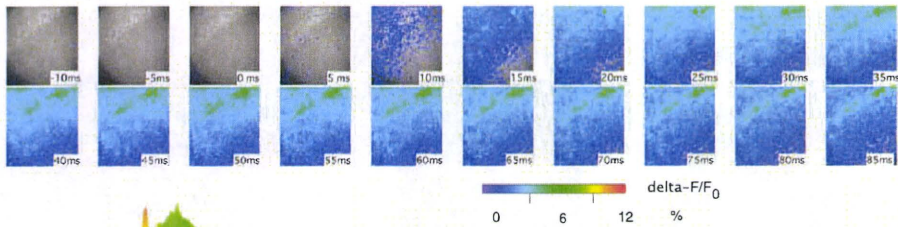
新規固定ディスクピンホールアレイ超高速

共焦点顕微鏡

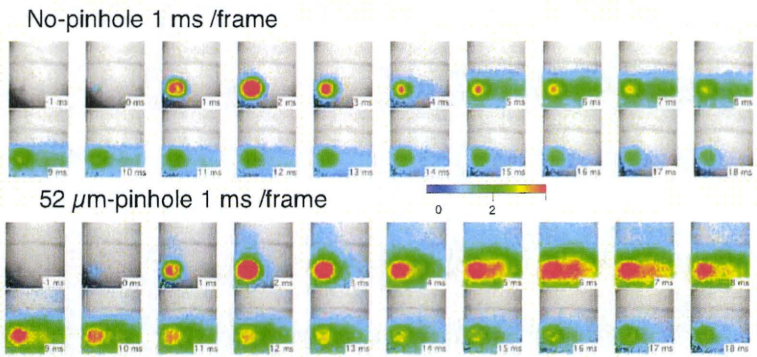
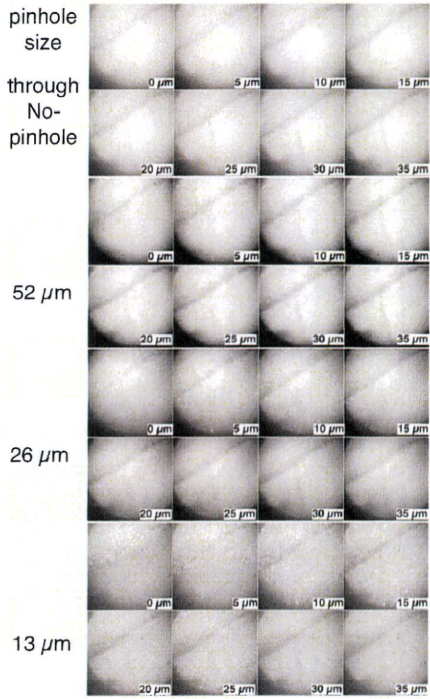


細胞レベル カルシウムイメージング

52 μm -pinhole 5 ms /frame



VSDイメージング

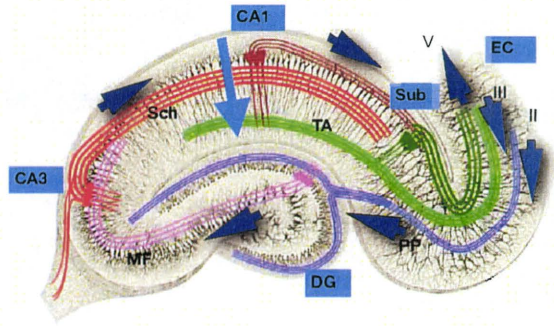
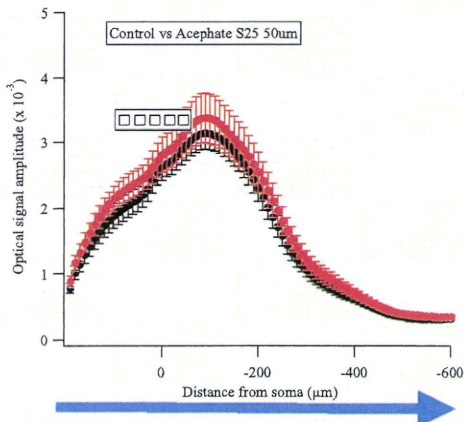
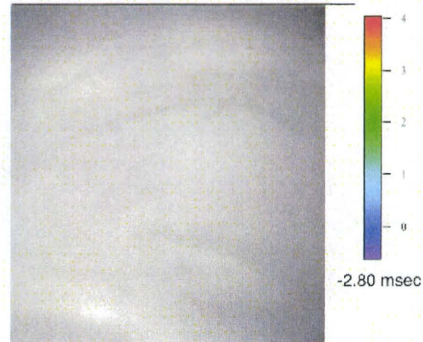
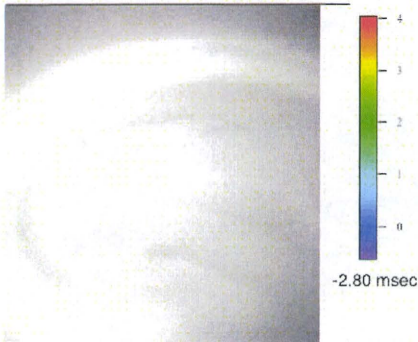


新規共焦点カメラによって
同じ質のデータがより精緻な
空間解像度で計測された

CA3-CA1 synapse

コントロール

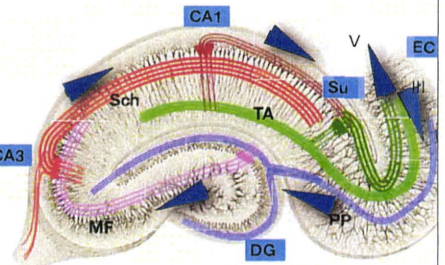
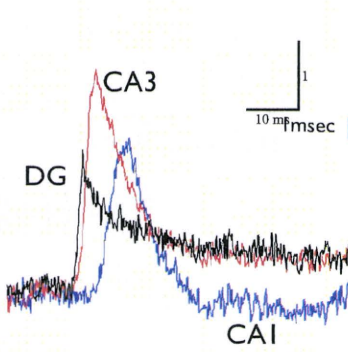
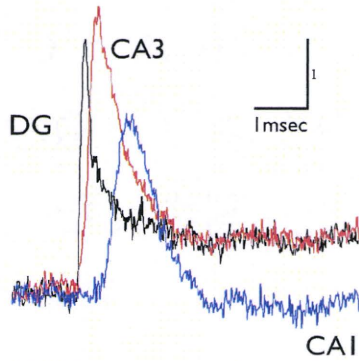
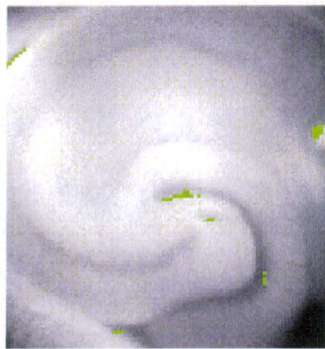
アセフェート



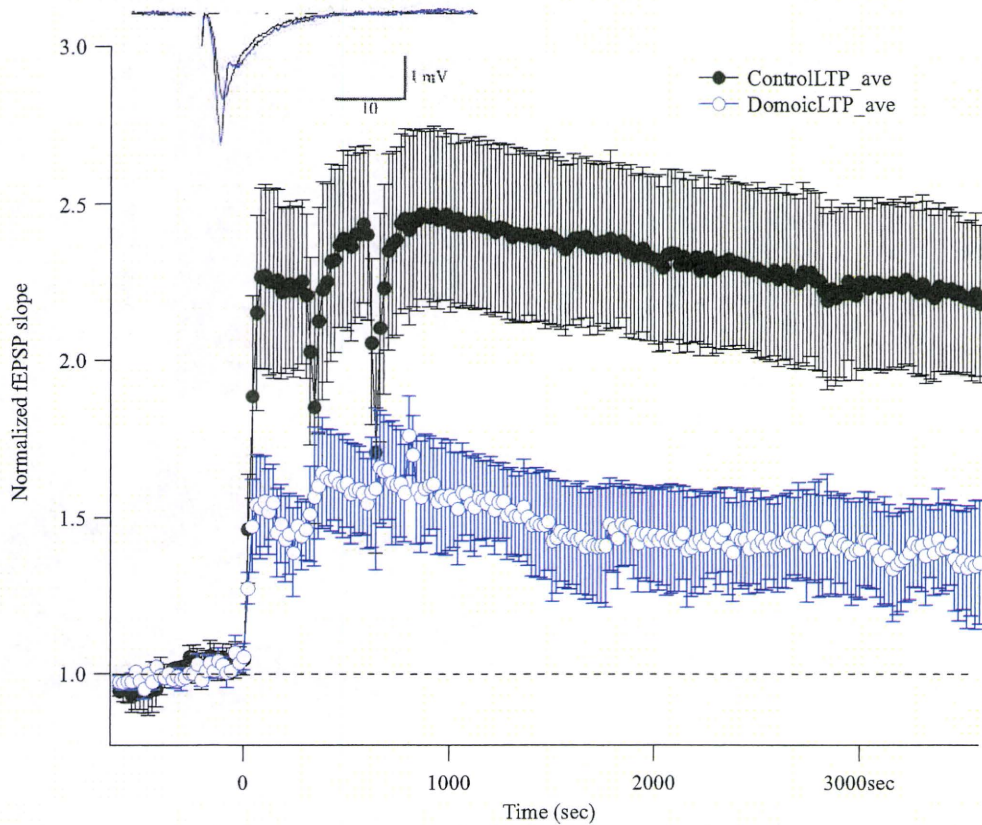
DG-CA3-CA

コントロール

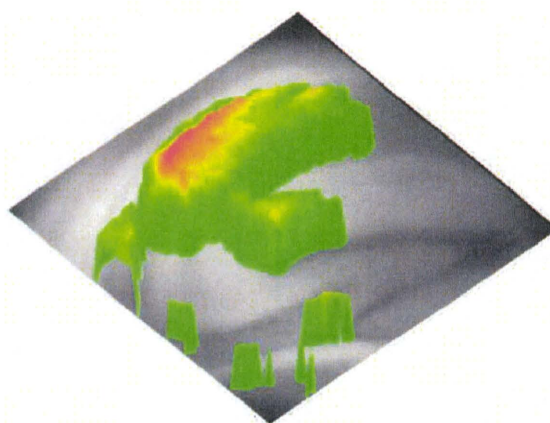
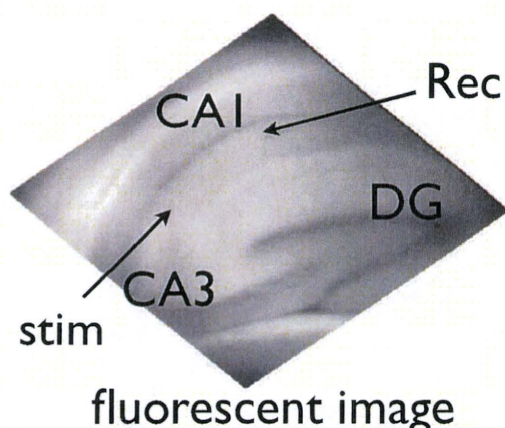
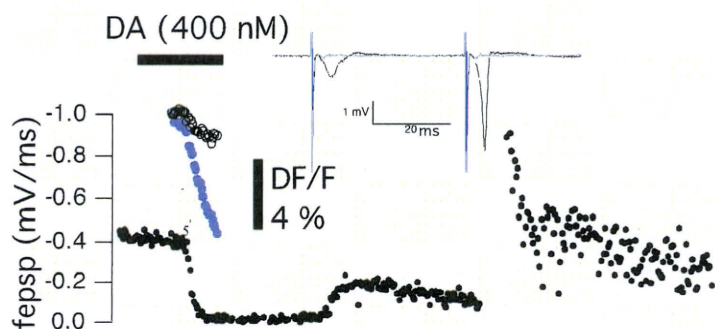
ドーモイ酸投与後3時間



ドーモイ酸の投与後4日でLTP誘導は阻害される



ドーモイ酸(400nM)投与による膜電位変化



膜電位感受性色素(VSD)

— 網羅性と精緻性 —

マクロ光学系と
ランダムアクセス光刺激

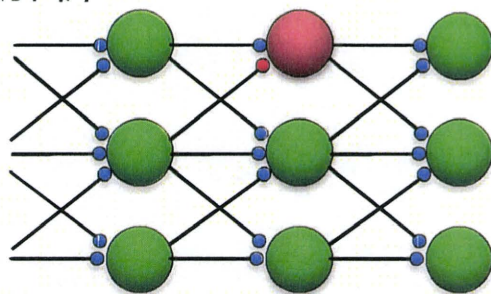


神経回路解析

超高速共焦点



細胞演算



神経回路毒性解析

分担研究報告書

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

分担研究者 高森 茂雄

同志社大学 教授

【研究要旨】

バルプロ酸は、抗てんかん薬として臨床的に有用な薬として知られているが、一方で、妊婦の服用では、生まれた子供に催奇形性・頭部各所の形態異常を誘発するなど、強い副作用も確認されている。また、実験動物への投与により、自閉症様の症状を呈することが知られている。本研究では、バルプロ酸暴露のシナプス形成に対する影響を検討した結果、神経初代培養細胞において抑制性シナプスの形成が選択的に抑制されることが判明した。

A. 研究目的

我々の脳内には、数百～数千億個の神経細胞が存在し、それらが複雑かつ秩序だったネットワークを形成し、細胞接合部であるシナプスを介してシグナルを伝達することにより、脳高次機能を発現する。神経回路網形成や局所的なシナプス活動の機能修飾が脳の機能発現に影響し、その破綻は精神疾患や神経変性疾患を惹起することが考えられるが、なかでも最近、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランスの破綻が、精神疾患の発現機序として注目を浴びている。本研究計画では、中枢神経作動薬の一つであり、抗てんかん薬として臨床的に用いられているバルプロ酸をモデル化学物質として取り上

げ、興奮性－抑制性バランス (Excitatory-Inhibitory balance, E/I バランス) の指標としてシナプス小胞型神経伝達物質トランスポーターをマーカータンパク質として用いることで、バルプロ酸が脳内 E/I バランスの破綻に与える影響を検証した。

B. 研究方法

生後 1 日目のラット大脳皮質由来の神経初代培養細胞に、DIV (days *in vitro*) 1~4 までの 3 日間、バルプロ酸 (0.3 mM, 1.0 mM) を加えた。DIV4 に培地を交換した後、DIV4 と DIV14 に全タンパク質を回収し、Western Blot 法により、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1)、小胞型 GABA トラン

スポーター (VGAT)、Synaptophysin、Synapsin の定量を行った。また、上記タンパク質の発現量変化のメカニズムを調べる為に、免疫蛍光染色法を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた実験動物は、同志社大学が定める「動物実験等の実施に関する規定」に従って行った。

C. 研究結果

既に昨年までの研究から、大脳皮質神経初代培養細胞の培養初期 (DIV1~4) にバルプロ酸を添加すると DIV14 における VGAT の含量が対照群に比べて有意に減少していることを明らかにしている。同様の処置では、興奮性シナプスマーカーである VGLUT1 や、シナプス小胞マーカーである Synaptophysin、Synapsin の発現量は変化しない。本年度は、バルプロ酸暴露による VGAT 発現低下が、抑制性細胞の死滅による細胞数の減少によるのか、個々の抑制性細胞が発現する VGAT 量の低下によるのか、それとも抑制性シナプスの形成不全に起因するのかを区別する為に、免疫蛍光染色法を行った。その結果、バルプロ酸暴露は興奮性シナプスの形成にはほとんど影響しないが、抑制性シナプスにおいては、顕著な軸索の伸長不全に伴う抑制性シナプスの減少を誘発していることが明らかになった。また、バルプロ酸は、GABA 転移酵素阻害に加えて、ヒストンジアセチラーゼ (HDAC) を阻害する活性を持つことが知られて

いるが、HDAC 阻害剤である TSA (30nM) 暴露によっても、バルプロ酸と同様の VGAT 発現低下と抑制性シナプス形成の阻害が見られた。

D. 考察

大脳皮質神経初代培養へのバルプロ酸暴露による VGAT の発現量低下はこれまで報告はなく、また、その作用機序は不明であった。本研究から得られた結果から、バルプロ酸は抑制性神経に選択的に働き、抑制性神経の軸索伸長やそれに引き続くシナプス形成を抑制していることが考えられた。抗てんかん薬としてのバルプロ酸の作用は、GABA 転移酵素の阻害による抑制性神経伝達の亢進であると考えられているが、一方で本研究の成果から、幼若期のバルプロ酸暴露は、抑制性神経伝達の抑制を惹起することが考えられた。また、この効果はバルプロ酸が持つ HDAC 活性阻害で起こることが明らかになり、バルプロ酸の持つ異なる薬理活性が、抑制性神経伝達に対して相反する作用をもたらす可能性が示唆された。

E. 結論

抗てんかん薬として臨床現場で用いられているバルプロ酸が、抑制性神経回路の抑制を伴う大脳皮質における E/I バランスの破綻を誘発する可能性が示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

高森茂雄. 塩化物イオンによる小胞型グルタミン酸輸送の制御, 医学のあゆみ, in press.

高森茂雄. シナプス小胞. 「トランスポートソームー膜輸送研究の源流から未来へ向けてー (仮称)」, in press.

Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y, Takamori S, Ebihara S, Uematsu M, Mishina M, Miyazaki J, Yokoyama M, Konishi S, Inoue K, Fukuda A, Fukumoto M, Nakamura K, Obata K, Yanagawa Y. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Mol Brain*, 3:40, 2010.

2. 学会発表

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. Symposium on 'Vesicle dynamics at presynaptic terminals'. 2010. 2010. 5. 19, Morioka.

Takamori S. A chloride conductance in

the vesicular glutamate transporters. Gordon Research Conference on Membrane Transport Proteins. 2010. 2010. 8. 18, Biddeford, ME, USA.

Takamori S. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride. Symposium on 'The chloride ion and cell signaling in neurobiology'. The 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry 2010. 2010. 10. 20, Phurket, Thailand.

Takamori S. Regulation of glutamate uptake into synaptic vesicles by chloride. Kyoto University GCOE symposium. 'Biomembrane and channels' 2010. 12. 10, Kyoto, Japan.

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

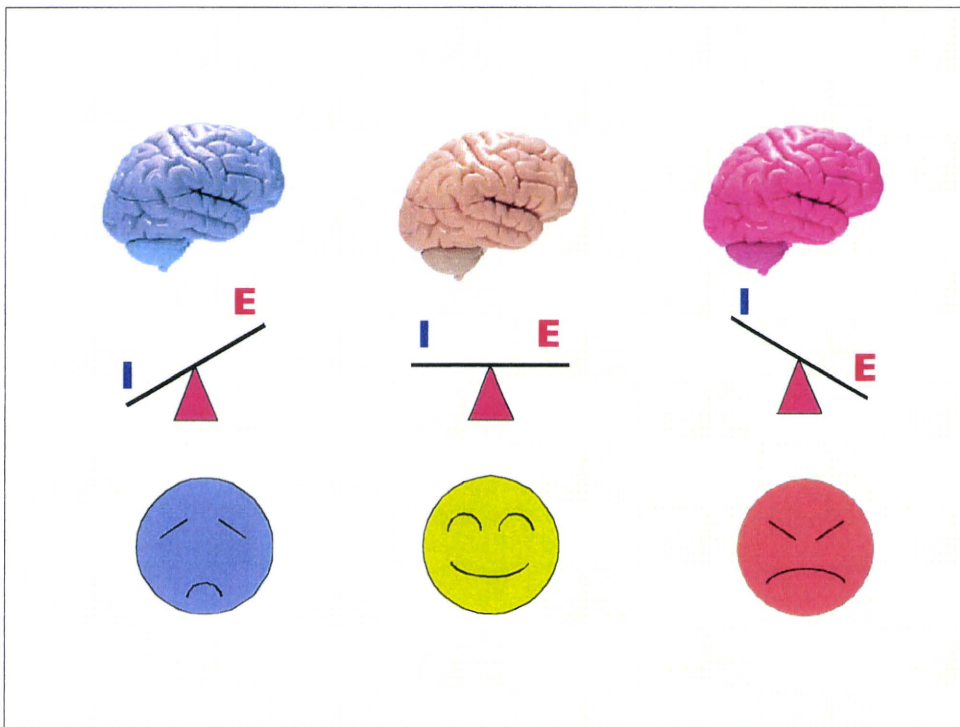
3. その他

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)

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

- 同志社大学 生命医科学部
- 分子神経生物学研究室
- 高森 茂雄



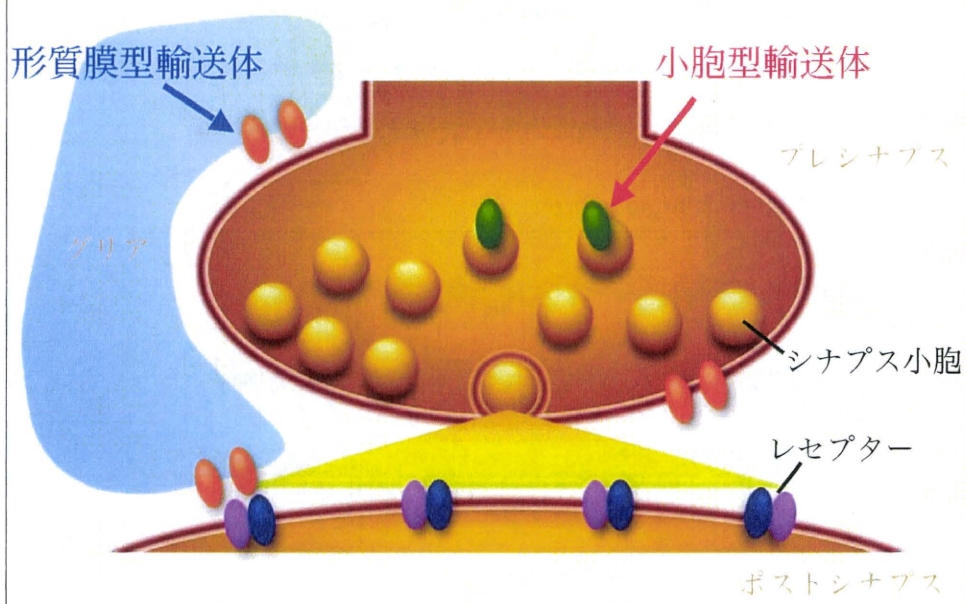
本研究の目的

化学物質の幼児期および成熟期の暴露による**遅発性情動・認知行動毒性発生時の**、**神経伝達物質輸送体の発現量や輸送活性の変化を評価することで**、**遅発性脳機能毒性発現機序の分子メカニズムの一端を解明する。**



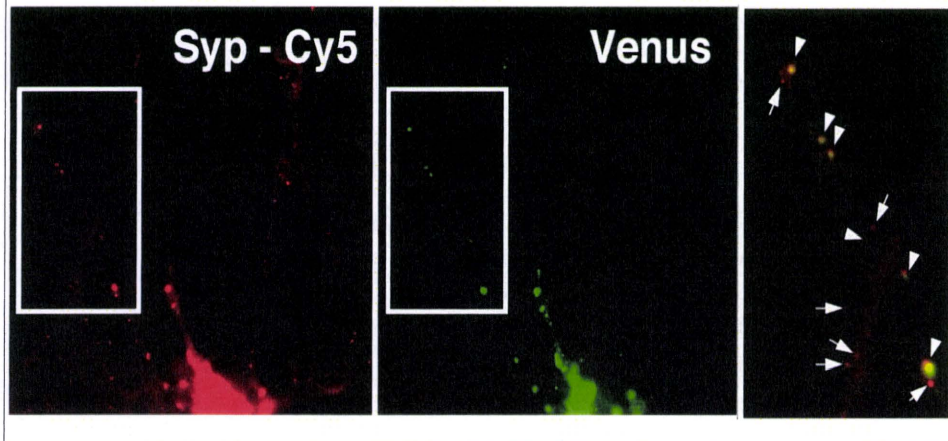
化学物質の暴露がE/Iバランスに与える影響を、**神経伝達物質輸送体 (VGLUTs/VGAT)の発現量を評価することで**、**脳機能毒性発現機序の分子メカニズムの一端を解明する。**

シナプス周囲の神経伝達物質輸送体

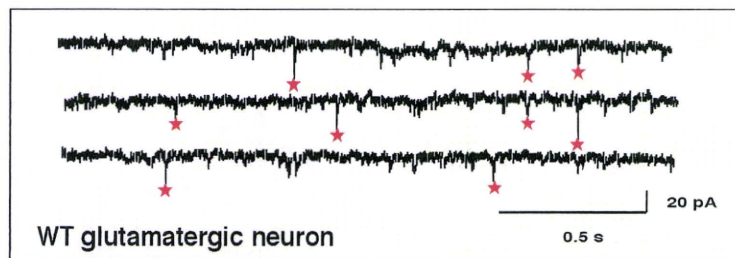


Presynaptic overexpression of VGLUT1 in autaptic glutamatergic neurons

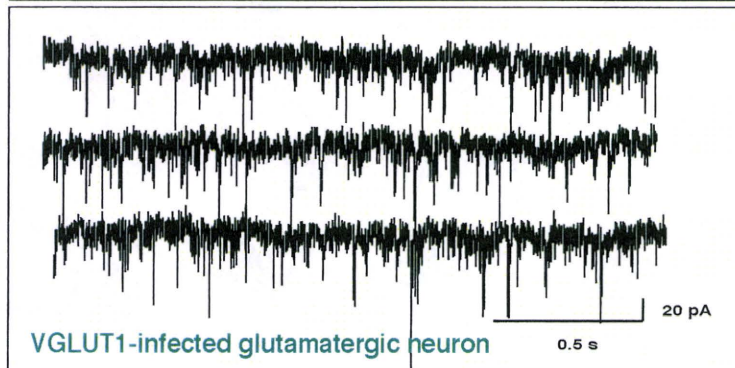
rat VGLUT1-ORF Venus



Miniature EPSC analysis

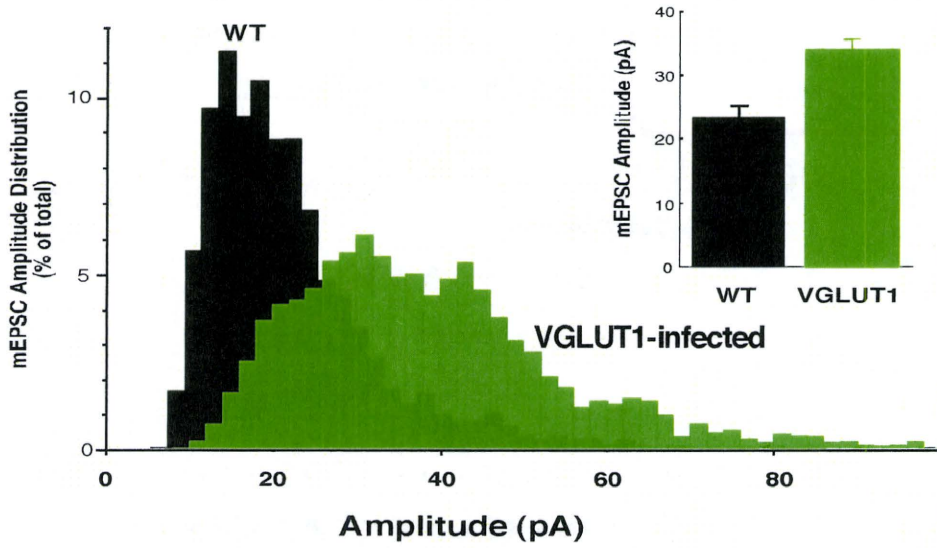


WT glutamatergic neuron

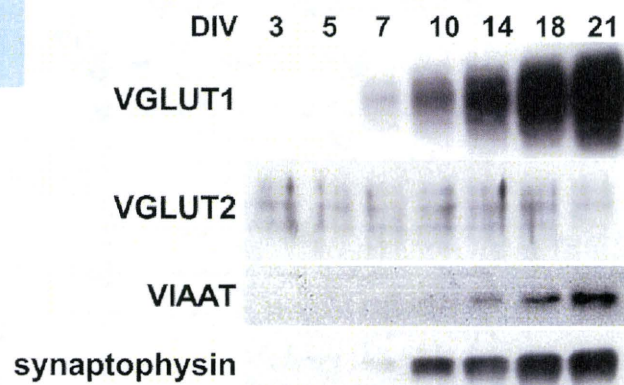


VGLUT1-infected glutamatergic neuron

mEPSC amplitude in VGLUT1-infected glutamatergic neurons

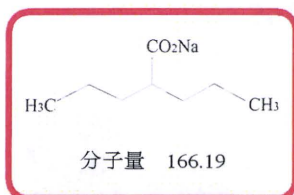


小胞型輸送体の発育期の発現変化



小胞型輸送体自身の発現変化
シナプス形成過程

Valproate: バルプロ酸ナトリウム



抗てんかん剤、躁病・躁状態治療薬
GABAトランスアミナーゼを阻害
→ 抑制性神経伝達の亢進

副作用

1. 劇症肝炎等の肝障害
2. 高アンモニア血症を伴う意識障害
3. 貧血
4. 急性膵炎
5. 腎炎
6. 脳の萎縮・痴呆様症状・パーキンソン様症状など
7. 催奇形性：妊婦に投与した場合子供に自閉症様症状

暴露・解析スケジュール

