

201035009B

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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)

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 23(2011)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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)

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 23(2011)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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)

平成 22 年度 総合研究報告書  
研究代表者 北嶋 聡

平成 23 (2011) 年 5 月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

研究の総括

北嶋 聡

..... 1

### II. 分担研究報告書

1. 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

山田 一之

..... 43

2. 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

..... 53

3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究

中島 欽一

..... 61

4. 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

..... 71

5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の  
解明に関する研究

熊ノ郷 淳

..... 89

6. 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

富永 貴志

..... 93

7. 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

高森 茂雄

..... 99

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 105

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 113

# I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

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—

研究代表者

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】**

本研究では、従来の急性・末梢性神経毒性試験法を補うものとして、情動・認知行動の症候学に脳神経科学の最先端解析手法及びトキシコゲノミクス手法を組み合わせたメカニズム解明により、客観的な毒性評価手法として「遅発性影響としての情動・認知行動毒性」の評価体系を確立することを目的とし、また、脳の発生、発達との関係から、子どもの特性に配慮したものとする為に、暴露時期に成熟期と発生・発達期を、方法に *in vivo*、*in vitro* 或いは *ex vivo* 系を設定し、マウスを用いて、1. 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（山田）、2. 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）、3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明（中島）、4. 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）、5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明（熊ノ郷）、6. 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（富永）、7. 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（高森）の研究を進め、遅発性の情動・認知毒性発現の本質究明を目指すものである。本研究により従来の毒性評価では検出困難であった遅発性の情動・認知行動毒性の評価系を確立すること、及び分子メカニズム解明により、ヒトへの外挿を含む高精度のリスク評価が可能となることが期待される。特に子どもに対する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となることで、現在注目される注意欠陥多動障害、学習障害等への具体的対応策提示が期待される。

研究課題1「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（山田）」として、生後2週齢の幼若期マウスへのセロトニン受容体作動薬投与による、成熟後の行動影響評価を行った。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。また研究課題2「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）」として、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、胎生期投与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。また、平成20年度に施行したトリアゾラムに加えて、ゾルピデム（50mg/kg）、或いはエチゾラム（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、幼若期エチゾラム投与群に、記憶行動異常が認められた。研究課題3「神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明（中島）」では、胎生期マウスへ抗てんかん剤（バルプロ酸ナトリウム）を経胎盤投与（妊娠12.5、13.5、14.5日雌マウスへの経口投与）によって成熟後に記憶異常が引き起こされることが明らかになるとともに、この記憶異常は、ランニングホイールを用いた自発的運動によって改善されることがわかった。研究課題4「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）」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、モデル中枢作動性物質として平成20年度は抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウム、平成21年度はキノコ毒のイボテン酸、平成22年度は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、「成熟期」・「幼若期」・「胎生期」暴露時の情動認知行動解析の結果を参照しつつ、「幼若期」あるいは「成熟期」マウスに単回経口投与した際の、経時的（2、4、8及び24時間後）に採取した海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、1）バルプロ酸ナトリウムの胎生期、幼若期、成熟期投与群共に、顕著な情動認知行動異常が認められないにも関わらず、成熟期投与群の海馬ではアポトーシス関連遺伝子の発現増加が認められる事、2）イボテン酸（1 mg/kg）の幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり情動認知行動異常が誘発されたが、幼若期投与群の

みに発現変動が認められたシグナルネットワークとして、アポトーシス、膜の過分極、糖質コルチコイド、GABA-A受容体を介したシグナル、neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンスならびに、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司るNpas4分子を介したシグナル、等が認められる事、3) トリアゾラム(1 mg/kg)の幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり情動認知行動異常が誘発されたが、幼若期投与群にて発現が減少した遺伝子リスト中にNpas4分子を介したシグナルが認められる事、以上の事が明らかとなった。トリアゾラムとイボテン酸の幼若期投与群では、両化合物共に遅発性の情動認知行動異常が認められたため、この誘発分子機序の探索の為に、両化合物をそれぞれ幼若期に投与した際の海馬において、共通して発現減少を示す遺伝子を抽出したところ、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異常の誘発に関与する候補遺伝子であることを示唆しており、またこれらの遺伝子は、遅発性の情動認知行動影響との関連が示唆されていないため新規性の高い発見と考えられる。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、遅発性の情動認知行動異常の誘発分子機序に迫れるものとする。また、これまでにマイクロアレイ特有のクロスハイブリダイゼーションに起因する誤差を補正する技術(MLANGおよび特願2010-294175「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」)の開発に成功し、網羅的遺伝子発現解析の一層の高精度化の目処が立っていた。しかしMLANGの初期開発は、肝のトランスクリプトームを対象として進められたため、肝で発現していない遺伝子についての補正性能が不十分であり、本研究班で対象とする脳神経系等、肝以外の臓器における解析に適用するには一層の補正係数最適化が必要と予見されていた。そこでMLANG技術の共同開発に携わったIT企業(株)NTTデータに、肝以外の臓器のトランスクリプトームデータやコントロール用RNAのみを用いた標準データを提供し、これらを用いた補正係数の最適化研究業務を委託した。その結果、多くのプローブに於いて計測精度が向上した事に加え、従来、推測の域を出なかったマイクロアレイにおけるハイブリダイゼーション関連の諸問題の同定に成功した。これにより、本研究班の主要標的である脳神経系の網羅的遺伝子発現解析の精度向上が格段に進み、より微弱だが重要な遺伝子発現変動の検出・解析が進むものと期待



される。また、研究課題5「神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究（熊ノ郷）」では、ドーパミンニューロンの障害は情動、認知行動も含めた重大な発達障害をもたらすことが知られているが、免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群に属するSema4Dタンパク添加がドーパミンニューロンに対する神経保護作用を有することを見出した。またSema4D欠損マウスを用いたSema4D欠損下のmotor behaviorの亢進異常を見出し、発達期におけるクラス4型セマフォリンの重要性も明らかにしている。研究課題6「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（富永）」では、神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用いて網羅的な評価を可能にする手法を開発する。初年度（H20）はアセフェートを用いて主に技術開発を行い、H21、H22は、さらに記憶機能に障害を起し得る記憶喪失性貝毒の原因物質であるドーモイ酸の海馬機能への影響の解析を主題とし、*ex vivo*標本でシナプス長期増強の異常を解析した。この間、新規顕微鏡によるランダムアクセス型の光刺激・計測による解析と改良、さらに新規共焦点顕微鏡を完成させ性能評価を行った。これでカルシウム信号の導出についても解析に加える準備ができた。また、研究課題7「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（高森）」では、GABA分解酵素阻害効果をもつバルプロ酸は、抗てんかん薬として臨床的に有用な薬である一方で、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と神経回路の興奮性-抑制性バランスに対する影響を検討した結果、大脳皮質神経初代培養細胞のバルプロ酸暴露が抑制性シナプスの形成を選択的に阻害することが判明した。この効果は、バルプロ酸が有するヒストン脱アセチル化酵素阻害活性によって惹起されることがわかった。

本研究の成果は、化学物質の中枢神経系に対する影響を科学的に明らかにするものである。特に、発生期-発達期の脳に対する化学物質暴露が誘発する遅発影響の解析は、従来の毒性評価では検出が困難であった遅発性の情動・認知行動毒性を主な対象にしており、それを科学的物証とともに解明する糸口となると考えられた。特に、遅発性影響誘発に関与する候補遺伝子を見いだしたことは新規性の高い発見

と考えられ、今後、この分子に着目した検討により、遅発性神経毒性誘発の分子機序に迫れるものとする。更に基礎研究を重ね、毒性発現の分子メカニズムを基礎とした、化学物質暴露による遅発性の情動・認知行動毒性の評価系の確立を目指す必要があると考えられる。

研究代表者

富永貴志  
徳島文理大学香川薬学部・  
病態生理学講座・准教授

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

高森茂雄  
同志社大学・生命医科学部・  
医生命システム学科・教授

研究分担者

A. 研究目的

山田一之

理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・  
リサーチリソースセンター・  
専門職研究員

本研究は、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。その為に、マウスを用いて、情動・認知行動解析と中枢神経系の先端的な形態機能解析、神経幹細胞分化能解析、神経回路機能解析、シナプス伝達活性解析、網羅的遺伝子発現解析等を組み合わせ、毒性メカニズム解明研究を行う。その際、胎児期～小児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。これにより、遅発性の情動・認知行動毒性の評価法を確立し、今までに評価法が定まらず看過されてきた既知の神経毒性物質のみならず、一般的な化学物質が誘発し得る「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の解明を進める。

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

中島欽一

奈良先端科学技術大学院大学・  
バイオサイエンス研究科・  
動物代謝調節学講座・  
分子神経分化制御学分野・教授

熊ノ郷淳

大阪大学微生物病研究所・感染病態分野・  
国際研究拠点大阪大学免疫学  
フロンティア研究センター・教授

## B. 研究方法

中枢作動性物質の暴露を、発生・発達期（胎児～小児期）及び成熟期に設定し、その後の遅発影響を情動・認知行動毒性として、症候学的に正確に捉えると共に、経時的脳トキシコゲノミクス解析、遅延性毒性発現時の形態機能解析、神経回路機能解析、シナプス伝達機能解析、神経幹細胞分化能解析等の脳神経科学先端研究手法によって、1. 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（山田）、2. 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）、3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明（中島）、4. 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）、5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明（熊ノ郷）、6. 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（富永）、7. 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（高森）、の7研究課題を推し進め、メカニズム解明を以って、その本質を究明する。尚、動物実験は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属研究機関が定める規定、指針を遵守する。情動・認知行動解析は高度に管理された条件下で、不必要な苦痛を与えずに実施する。

1. 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

セロトニン再取り込み阻害剤、モノアミン酸化酵素阻害剤等を使用し、マウス胎児期～小児期におけるモノアミン系神経シグナルかく乱による成熟期マウスの神経細胞機能障害、特にストレス応答性不全に着目し、成熟期の情動・認知行動毒性を解析する。

2. 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

GABA 類似中枢作動性物質、グルタミン類似中枢作動性物質等を使用し、マウス胎児期～小児期におけるアミノ酸系神経シグナルかく乱による成熟期マウスの脳構造形成不全及び神経細胞機能障害の解析と、成熟期の情動・認知行動毒性を解析する。

3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明

バルプロ酸ナトリウムを使用し、胎児期～小児期に相当するマウス由来の神経幹細胞分化様式に対する中枢作動性物質の影響を検討する。また神経幹細胞分化様式かく乱モデル化合物を用いての胎児期～小児期暴露マウスの成熟期毒性発現解析を行う。

4. 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

神経伝達物質類似構造を持つ中枢作動性物質による遅発性の情動・認知行動解析とともに、暴露後の脳トキシコゲノミクス（Percellome 法）による網

羅的遺伝子発現解析から、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤解明を行う。

#### 5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明

中枢作動性物質によるセマフォリン分子群の神経ガイダンス及び神経保護作用への影響と、遅発性中枢毒性発現についてセマフォリン遺伝子改変マウスを用いて解析する。

#### 6. 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

脳スライス標本での膜電位感受性色素による可視化により、情動・認知行動毒性発生時の海馬-嗅内野-扁桃核を中心とする記憶情動回路の神経活動を解析し、特有の神経回路異常を明らかにする。

#### 7. 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

中枢作動性物質暴露後に生じるシナプス伝達機能変化を、神経細胞神経伝達物質計測から解析し、情動・認知行動毒性発生時のシナプス伝達機能異常を明らかにする。

### C. 結果

#### 1. 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パロキセチン投与実験

第1段階の行動解析では、オープン

フィールドテストにおいて中央領域への進出率が統制群と比較して有意に低かった。この結果は、パロキセチン投与マウスにおいて、不安反応性が亢進している可能性を示唆している。そこで、第2段階の行動テストバッテリーとして、不安・鬱スクリーニングを行った。その結果、パロキセチン投与マウスの高架式ゼロ迷路テストにおける移動量が有意に低下していること、ホールボードテストにおけるパロキセチン投与マウスの移動量が有意に低下し、またヘッドディッピング潜時が有意に伸張していることが示された。

##### ②フルボキサミン投与実験

第1段階の行動解析では、明暗箱テストにおける移動距離が有意に短かった。この結果は、フルボキサミン投与マウスにおいて情動性が変化している可能性を示唆している。そこで、第2段階の行動テストバッテリーとして、不安・鬱スクリーニングを行った。その結果、高架式ゼロ迷路テストにおける移動距離が有意に亢進した一方、開放通路への侵入時間が短縮する傾向が認められた ( $p < 0.06$ )。またステアケーステストにおいては、移動潜時が大幅に短縮し、ステップ数および立ち上がり反応が有意に増加していた。更に、社会行動テストにおいては、他個体に接触している時間の増加傾向が見られ、シュークロステストにおいては、シュークロスの選択率が有意に低下していた (表2)。

##### ③クロルジリン投与実験

第1段階の行動解析では、11週齢時において有意な体重増加が観察された

ものの、行動課題では有意な差は認められなかった。従って第 2 段階の解析は実施しなかった。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、体重増加という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。

#### ④ トラニルシプロミン投与実験

第 1 段階の行動解析では、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。第 1 段階の行動解析において、精神疾患、特に鬱病およびストレス障害に関連する行動変化が認められなかったため、第 2 段階の解析は実施しなかった。

#### ⑤ 8-OH-DPAT 投与実験

第 1 段階の行動解析では、11 週齢から実験を行ったグループにおいて全ての行動課題において有意な差は認められなかった。そこで別群のマウスを用いて生後 34 週齢から実験を行ったところ、この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が見

いだされなかったため、第 2 段階の解析は実施しなかった。

#### ⑥ ブスピロン投与実験

第 1 段階の行動解析は、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。そこで、8-OH-DPAT 投与実験と同様に第 2 段階の解析は行わなかった。

#### ⑦ アポモルフィン投与実験

第 1 段階の行動解析において、全ての課題で有意差が認められなかったため、第 2 段階の解析は行わなかった。

## 2. 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

### ① トリアゾラム投与実験

トリアゾラム投与に関する各群マウスとも、成長にとま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異常行動は観察されなかった。オープンフィールド試験の結果、胎生期投与群に総移動量増加 ( $P < 0.05$ )、成熟期投与群に中央部滞在時間増加 ( $P < 0.05$ ) が認められた。また条件付け学習記憶試験から幼若期投与群に重篤な短期記憶形成能の低下 ( $P < 0.01$ ) と海馬依存性が高いとされる場所-連想記憶能の低下 ( $P < 0.05$ ) が確認された。尚、いずれの実験群においても明暗往來試験、高架式十字迷路試験、プレパルス驚愕反応抑制試験における行動逸脱は認められなかった。

Percellome 法による海馬遺伝子発現解析から、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、有意 ( $P < 0.01$ ) に遺伝子発現変動していたものは、成熟期投与群にて209個、幼若期投与群にて1683個、胎生期投与群で636個であった。また成熟期投与群においては遺伝子発現誘導傾向が高いのに対して、幼若期および胎生期投与群では遺伝子発現抑制傾向が顕著であった。Percellome法により抽出された遺伝子群のIngenuity Pathways Analysisによるパスウェイ解析から、幼若期および胎生期投与群の海馬にカルシウム伝達、およびグルタミン酸受容体シグナルカスケードへの影響が生じていることが示された。特に幼若期投与群では、NMDA型、AMPA型、KINATE型のグルタミン酸受容体遺伝子発現抑制が確認された。

抗体を用いた免疫組織化学を施した脳組織切片の共焦点レーザー顕微鏡による形態解析から、幼若期投与群の海馬 (CA1) に神経細胞突起のMAP2反応性増強が認められた。

## ②イボテン酸投与と実験

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 (暗所潜在時間) 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。

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、成熟後の情動・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。

### ③グルホシネート投与実験

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。

### ④ゾルピデム投与実験

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、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

### ⑤エチゾラム投与実験

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。

## 3. 神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明

胎生 15.5 日目脳ではバルプロ酸投与によるニューロン分化促進が観察された。また、生後 12 週から 5 日間、1 日 1 回 BrdU を腹腔内に投与し、増殖細胞をラベルした。投与終了翌日に海馬における増殖細胞を抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色により検出したところ、胎生期バルプロ酸曝露による顕著な減少が見られた。さらに BrdU 投与終了 4 週後に分化傾向を観察したところ、バルプロ酸曝露による海馬ニューロン新生が減少していることもわかった。並行して生後 12 週マウスの行動様式も解析し

た（種村との共同研究）。その結果、胎生期バルプロ酸曝露マウスにおいては動き（移動量）に若干の減少が見られたものの、不安関連行動に大きな影響は見られなかった。しかしさらに解析を加えたところ、胎生期バルプロ酸曝露マウスでは記憶学習障害が観察された。さらにこの記憶障害は、回し車を使った自発的運動により、ある程度改善されることがわかった。

#### 4. 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

①バルプロ酸ナトリウムを単回経口投与した際の、情動・認知行動解析及び、網羅的遺伝子発現変動解析：

情動・認知行動解析の結果、150 mg/kg バルプロ酸ナトリウムの幼若期ならびに成熟期投与群共に有意な変化は認められず、行動異常は認められなかった。500 mg/kg バルプロ酸ナトリウムの胎生期投与群ならびに成熟期投与群では、溶媒対照群と比較し、成熟期投与群では有意な変化が認められず、他方、胎生期投与群では、不安関連行動と考えられるオープンフィールド試験での中央部滞在時間の増加と、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能低下が認められたものの、顕著な情動・認知障害は認められなかった。

成熟期投与群での遺伝子発現変動解析では、発現が、有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,636 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560 psが見いだされた。IPAによる検討の

結果、シグナルパスウェイとして、apoptosis signalingが抽出され、アポトーシスに関連する遺伝子、例えばCaspase 3、Caspase 9やBidなど（いずれも投与2及び4時間後）の発現上昇が認められた。また、GABAの作用に関係するクロライドチャンネル(Clcn 2)遺伝子の発現上昇が認められた。

②イボテン酸を単回経口投与した際の網羅的遺伝子発現変動解析：

成熟期投与群での遺伝子発現変動解析では、海馬において発現が有意に増加するものとして1,708 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107 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。また酸化的ストレス、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。神経伝達関連遺伝子では、Epha6（投与4時間後、中・高用量）遺伝子の発現増加が認められた。投与初期（2時間後）に顕著に発現が増加した遺伝子として、海馬あるいは神経系における機能は不明であるが、Aldh16a1（投与2時間後、高用量）、Gpr137b（投与2時間後、中・高用量）遺伝子が認められた。Aldhは一般的に、アセトアルデヒドをカルボン酸に変換する酵素であることからAldh16a1はイボテン酸の代謝に関係する可能性が示唆された。なお、増加が認められた遺伝子のほとんどが、神経系での機能が不明であった。

成熟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260 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 4 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。

したがって現時点では、イボテン酸投与により、成熟期マウスの海馬において、発現が有意に増加あるいは減少する遺伝子リストの中に、細胞障害に関係するシグナルネットワークは抽出されてこなかった。

幼若期投与群での遺伝子発現変動解析では、海馬において発現が有意に増加するものとして 511 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 136 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。

アポトーシスに関係する遺伝子として、Gadd45g (投与 2 時間後、高用量；投与 4 時間後、中・高用量)、Ddit4 (投与 2 時間後、中・高用量)、Trp53inp1 (投与 4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。酸化ストレス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動は認められなかった。他方、膜電位に影響を与える多くの K チャネル遺伝子、具体的には Kcnk6 (投与 2・24 時間後、高用量)、Kcne11 (投与 2 時間後、中・高用量)、Kcna1 (投与 4 時間後、高用量)、Kcna5 (投与 2・4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。K チャネル遺伝子の発現増加は、K チャネルの活性化の可能性が考えられ、この活性化は膜の過分極を引き起こすことから、

神経における興奮伝達の抑制が引き起されている可能性が示唆された。また、インスリン非依存性にブドウ糖の取り込みを担う糖輸送担体 (GLUT1) である Slc2a1 (投与 2 時間後、高用量；投与 4 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。加えて、ストレスに関連する糖質コルチコイドの関連遺伝子 Nfkb1a (投与 2・4 時間後、高用量) およびその標的遺伝子 Sgk1 (投与 2・4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。その他、海馬あるいは神経系における機能は不明であるが、G タンパク質共役受容体である Gpr1 (投与 24 時間後、高用量) および Gpr146 (投与 2 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。

以上のことから現時点では、幼若期マウスの海馬において、イボテン酸投与により発現が有意に増加する遺伝子リストの中に、細胞障害に関係するシグナルとして、アポトーシス、膜の過分極を通じた神経伝達の抑制および糖質コルチコイドを介した細胞障害が引き起される可能性が示唆された。

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 1,240 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 137 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 Gabra4 (投与 2・8 時間後、高用量；投与 4 時間後、

中・高用量)、Gabra2 (投与 2 時間後、高用量; 投与 4 時間後、低・中・高用量) 遺伝子および、ニューロペプチド Y 受容体である Npy1r (投与 2 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現減少が認められた。また糖質コルチコイド受容体である Nr3c1 (投与 4 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現減少が認められた。加えて神経ガイダンスに関与すると考えられる Nrp1 (投与 2 時間後、中・高用量)、Sema6a (投与 4 時間後、高用量; 投与 8 時間後、中・高用量)、Sema6d (投与 4 時間後、高用量) 遺伝子の発現減少が認められた。

さらに、興味深いことに近年、GABA 介在性シナプスの数を制御しシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」として機能する転写因子と報告された (Lin Y et al., Nature 455: 1198-1204, 2008)、Npas4 (投与 2 時間後、中・高用量; 投与 4 時間後、高用量) 遺伝子の顕著な発現減少が認められた。またこの標的遺伝子である Bdnf (投与 2・8 時間後、高用量、投与 4 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現減少も認められた。

以上のことから現時点では、幼若期マウスの海馬において、イボテン酸投与により発現が有意に減少する遺伝子リストの中に、細胞障害に関係するシグナルとして、GABA-A およびニューロペプチド Y 受容体を介した神経伝達、neuropilin・semaphorin 分子を介する神経ガイダンス、ならびに Npas4 分子を介するシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持、以上が抑制されることが示唆された。

③ トリアゾラムを幼若期に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

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 (投与 24 時間後、低・中・高用量)、BDNF 受容体である Ntrk2 (投与 8・24 時間後、低・中・高用量)、K チャネルである Kcnn1 (投与 24 時間後、低・中・高用量)、Kcnn2 (投与 8・24 時間後、中・高用量) 及び Kcnn3 (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 (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 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)。

#### 5. 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明

MPTP のドーパミン神経障害を観察する培養系を確立するとともに、免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群に属する Sema4D タンパク添加がドーパミンニューロンに対する神経保護作用を有することを確認した。また Sema4D の発達期における行動様式決定における重要性を明らかにした。また Sema4D と同じくセマフォリンクラス 4 型に分類される Sema4A の遺伝子欠損マウスを用いた行動解析をする中で、Sema4A 欠損下では、レチノイド結合タンパクの輸送障害により網膜の光感受性が亢進して、網膜の脱落を来すことを新たに見出した。またこれら解析を進めて行く上での物質的基盤となるセマフォリン及びセマフォリン受容体の立体構造も明らかにしている。

#### 6. 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

#### 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の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)受容体が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。

## 7. 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