

日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日

武藤哲司、武藤正弘、古関庸子、古関明彦、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるNP95の役割。日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日

中島欽一：HDAC阻害剤を用いた神経幹細胞制御による損傷脊髄新規治療法。日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日（口頭）

中島欽一：移植神経幹細胞由来ニューロンによる脊髄損傷治療。神経組織の成長・再生・移植研究会 第25回学術集会、大阪市立大学、平成22年5月22日（口頭）

Berry, J., 辻村啓太、精松昌彦、神山淳、中島欽一：The role of histone acetylation on cortical development. 第8回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、平成22年5月13-15日

武藤哲司、中島欽一：Oxygen tension can control the DNA methylation status of GFAP promoter through Notch signaling and allows propagation and maturation of neuronal progenitor. 第8回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、平成22年5月13-15日

Kanno, J., Igarashi, K., Tanemura, K., Asano, H., Nakashima, K.: Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 第14回国際内分泌会議、国立京都国際会館、2010年3月29日（口頭）

辻村啓太、鈴木暁也、中島欽一：Rett症候群原因遺伝子産物MeCP2の機能解析。第4回神経発生討論会、岡崎コンファレンスセンター、2010年3月19-20日（口頭）

高木美智、滝沢琢己、笹岡寛敏、中島欽一：ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析。第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sasaoka, H., Takizawa, T., Kimura, H., Nakashima, K.: Analysis of chromatin modifications and transcriptional regulations of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Urayama, S., Takizawa, T., Hori, Y., Kohyama, J., Nakashima, K.: Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sanosaka, T., Inubushi, H., Kohyama, J., Takizawa, T., Nakashima, K.: A

source of astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K.: The Role of Histone Acetylation on Cortical Development. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

浅野弘嗣、青沼真、佐野坂司、神山淳、波平昌一、中島欽一：レチノイン酸誘導性ヒストンアセチル化による神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構。第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

畑田出穂、波平昌一、森田純代、堀居拓郎、木村美香、中島欽一：  
Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

中島欽一：脊髄損傷に対するエピジェネティック治療。第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日（シンポジウム、口頭）

精松昌彦、辻村啓太、山野真利子、斉藤美知子、河野憲二、神山淳、波平昌一、小宮節郎、中島欽一：移植神経幹細胞のエピジェネティック制御による損傷脊

髄再生治療。第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日

佐野坂司、波平昌一、神山淳、蟬克憲、田賀哲也、中島欽一：神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得を制御するエピジェネティクス機構。第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日（シンポジウム、口頭）

中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質による神経系細胞の分化・可塑性制御。神経化学会-GRT研究会連携オープンシンポジウム、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21日（シンポジウム、口頭）

滝沢琢己、中島欽一：アストロサイト特異的遺伝子GFAP発現制御に関するDNAメチル化と遺伝子座核内配置。第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日（シンポジウム、口頭）

中島欽一：神経幹細胞が生み出す細胞の順番付けの仕組み。第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日（シンポジウム、口頭）

滝沢琢己、Tom Misteli、中島欽一：アストロサイト特異的遺伝子GFAPの核内配置と転写活性。第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

辻村啓太、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質MeCP2によるニューロン分化誘導機構と

中枢神経系再生医療への応用. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

笹岡寛敏、滝沢琢己、中島欽一: ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

蟬克憲、波平昌一、神山淳、佐野坂司、中島欽一: 第7回幹細胞シンポジウム、Committed neuronal precursors confer astrocyte-differentiation potential on neural stem cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development. 泉ガーデンギャラリー、2009年5月15-16日 (シンポジウム、口頭)

中島欽一: 神経幹細胞制御における抗てんかん薬パルプロ酸の影響とその応用. 第5回宮崎サイエンスキャンプ フェニックス・シーガイア・リポート ワールドコンベンションセンターサミット、2009年2月20日-22日 (口頭)

中島欽一、精松昌彦: 神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の作用. 第5回NEFRE、フェニックス・シーガイア・リポート ワールドコンベンションセンターサミット、2008年9月19-20日 (口頭)

神山淳、高塚絵理子、佐野坂司、徳永暁憲、岡野栄之、中島欽一: REST/NRSFを介した骨形成因BMPによる新規ニューロン分化抑制機構. 第51回日本神経化

学会大会、富山国際会議場、2008年9月11-13日 (シンポジウム、口頭)

精松昌彦、Hsieh, J.、Gage F.H.、河野憲二、中島欽一: 神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の影響. 第35回トキシコロジー学会、国立オリンピック記念青少年総合センター、2008年6月26-28日 (シンポジウム、口頭)

中谷彩矢和、落合和、高原大志、貝沼雅彦、正岡実、波平昌一、中島欽一、小川正晴、宮田卓樹: “生まれたて” 娘細胞クローンに置ける非対称なNgn2-Tbr2カスケード起動. 第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

辻村啓太、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一: MeCP2による神経幹細胞分化制御機構の解析と中枢神経系再生医療への応用. 第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日 (口頭)

中島欽一、神山淳、波平昌一、Gage F.H.、岡野栄之、澤本知延: 神経系細胞分化を制御するエピジェネティクス機構. 第50回日本小児神経学会総会、ホテル日航東京、2008年5月28-31日 (口頭)

辻村啓太、瀬戸口廣貴、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一: メチル化DNA結合タンパク質MeCP2によるニューロン分化誘導機構の解明と中枢神経系再生医療応用への検討. 第6回幹細胞シンポ

ジウム、学術総合センター、2008年5月  
16-17日

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

脳発生一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

北嶋 聡、菅野 純

Percellome手法を用いた発生毒性に関  
わる遺伝子発現変動解析 [第49回日本  
先天異常学会学術集会] 2009年6月

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝  
秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司  
肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応  
答のPercellome解析 [薬学会第129年  
会] 2009年3月

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭  
夫、北嶋 聡

多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ  
欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の  
誘発

[第98回日本病理学会総会] 2009年5  
月

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 [第36回日本トキシコ  
ロジー学会学術年会] 2009年7月

高木篤也、北嶋 聡、五十嵐勝秀、相崎  
健一、菅野 純

Percellome手法によるマウスES細胞分  
化過程における遺伝子発現の経時デー  
タベースの構築と活用 [第32回日本分  
子生物学会年会]

2009年12月

北嶋 聡、菅野 純

トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008年6月

北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、高木 篤也、関田 清司、今井 清、菅野 純

Percellome手法を用いたフタル酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008年6月

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2. [第41回日本発生生物学会] 2008年5月

Takahashi Y, Kitajima S, Yasuhiko Y, Kanno J and Saga Y

Delta-like 3(Dl13) does not substitute for Delta-like 1 (Dl11) in somitogenesis in vivo but modulates Dl11/Notch signaling in the posterior PSM. [第41回日本発生生物学会] 2008年5月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会]2008年6月

高木 篤也、広瀬 明彦、西村 哲治、福森 信隆、小縣 昭夫、大橋 則雄、北嶋 聡、菅野 純

p53+/-マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について [第35回日本トキシコロジー学会学術年会]2008年6月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

エストロゲン受容体 ( $\alpha$ 型) ノックダウンマウスの神経行動解析 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会]2008年6月

今井 清、坪井 優、向井 大輔、山下 龍、関田 清司、高木 篤也、北嶋 聡、菅野 純

フタル酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの比較毒性学的研究 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008年6月

五十嵐 勝秀、小川 幸男、笠井 辰也、長野 嘉介、北嶋 聡、相崎 健一、菅野 純

シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome解析 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008年6月

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.

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Specific mode of inhibitory activity enables preferential transmission of theta oscillatory activity in area CA1 of rat hippocampal slices, 36<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), July 27-August 1, Kyoto, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Modulation of feed-forward inhibition on CA1 pyramidal cells by patterned synaptic input probed with voltage-sensitive dye imaging in rat hippocampal slices. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, September 16-18, Nagoya, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Layer dependent recruitment of feed-forward inhibition revealed by fast VSD-imaging in area CA1 of rat hippocampal slice preparation. Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, October 30-November 1, Tokushima, Japan

富永貴志、富永洋子. (2008) テタヌス様ガンマバンド刺激によって海馬スライス標本のCA1野で引き起こされる神経回路網応答, 第46回日本生物物理学会年会, 福岡

富永貴志、富永洋子. (2008) 海馬スライス標本CA1野の神経興奮伝達におけるフィードフォワード抑制の大きさの細胞内分布を膜電位感受性色素により計測した, 第31回日本神経科学大会 / Neuroscience2008、東京

田口綾香、小金澤紀子、富永貴志、大原慎也、筒井健一郎、Menno Witter、飯島敏夫. (2008) 感覚入力と情動性入力の海馬への情報伝達における嗅内皮質深層の役割

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

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

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. A plenary lecture on Kyushu Brain Days. 2009. 11. 8., Fukuoka.

Takamori S. VGLUTs: 'exciting' times  
for glutamatergic research?  
Symposium on the MESO-CONTROL of the  
cells, by the cells, for the cells.  
2009. 1. 27, Kyoto

高森茂雄 グルタミン酸のシナプス小  
胞への取込機構 生理研研究会 「新た  
なコンセプトでシナプス伝達機構を考  
える」 2008. 9. 19, 岡崎.

Takamori S. Mechanisms of glutamate  
transport into synaptic vesicles.  
Symposium on Molecular Physiology of  
Synaptic Function, Neuro2008,  
2008. 7. 11, Tokyo.

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 出願番号：特願2009-254108

出願日：平成21年11月5日

発明の名称：自己免疫疾患又はアレ  
ルギー治療剤とそのスクリーニ  
ング方法

発明者：熊ノ郷 淳

出願人：国立大学法人大阪大学

2) 新規超高速共焦点光学系

富永貴志・市川道教（出願予定）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 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、発生・発達期のモノアミン系神経シグナルの一時的なかく乱が成長後の認知・情動機能に与える影響について、マウスをモデル動物として検討を行った。その結果、発生・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によって、成長後のマウスの認知・情動機能に変化が生じることが明らかになった。

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、成長後の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。また、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、毒性学的あるいは神経科学的问题にとどまらず、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、セロトニンニューロンに焦点を当て、マウスをモデル動物として詳細な検討を行った。

B. 研究方法

乳児期（生後 14 日）の雄マウス（C57BL/6J 系統）に、各モデル化学物質（薬物のまとめ：表 1 を参照）を単回強制経口投与し（統制群は同量の溶媒を投与）、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。

包括的行動テストバッテリーは表2に示した通り、自発活動性・情動性（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）・情報処理機能（聴覚性驚愕反応とプレパルス抑制試験）・記憶機能（バーンズ迷路試験、恐怖条件付け試験）・認知機能（ホールボード試験）などによる構成とした（各年度によって採用した課題は若干異なる）。

薬物の用量は急性毒性を示さない容量とし、市販薬の用量、薬物情報（LD50 など）、および予備実験によって急性中枢毒性を示さない最大用量を基に決定した。

（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

### 1. 平成20年度の研究結果

#### 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（表2）。

#### 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）。

## 2. 平成21年度の研究結果

### 1) 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。

### 2) 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。

### 3. 平成 22 年度の研究成果

#### 1) 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。

#### 2) 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。

#### 3) 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。

#### 4) その他の研究成果

平成 22 年度は本研究全体の補足的研究も合わせて実施した。各実験の追試を行うとともに、平成 20 年度に完了できなかったクロミプラミン投与実験を実施した。クロミプラミン投与実験では、第 2 段階の解析によって、成長後に情動性の変化を示すことが明らかになった。

### D. 考察

平成 20 年度の研究成果は、発達期のセロトントランスポーター (SERT) の活動の異常が、部分的ではあるが成長後の個体の情動性に影響を及ぼすことを示している。また、パロキセチン投与マウスでは不安反応性の亢進が認められたのに対して、フルボキサミ

ン投与マウスでは不安反応性の亢進が認められるものの、これと相反する結果も得られており、不安反応性の変化については一貫していない。また、社会行動テストでは親和欲求の亢進が見られ、シュークロステストでは鬱傾向の亢進が認められるなど、情動性全般に影響を及ぼしていることが推察される。このように、同じカテゴリのセロトニン再取り込み阻害剤でも、その効果が異なる可能性が示唆された。これらの結果は、SSRIs の作用機序の解明にも示唆を与え得ると言える。

平成 21 年度の研究成果は、選択的に MAOA を阻害するクロルジリン処置マウスでは行動に対する遅発的影響が見られなかった一方、MAOA/MAOB を非選択的に阻害するトラニルシプロミン処置マウスでは行動の遅発性変化が認められた。MAOA がセロトニンおよびノルアドレナリンを標的とするのに対して、MAOB がドーパミンを標的としていることから、本研究で認められた行動変化がいずれの神経伝達系のかく乱によって生じたのか断定することはできない。しかし、認められた行動変化が選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRIs) による遅発性行動変化と類似であることから、本研究における行動変化もセロトニン系神経シグナル伝達のかく乱に依拠するものであることが推測される。この点については、更なる詳細な検討が必要であろう。

平成 20 年度に用いた SSRIs (パロキセチンおよびフルボキサミン) と同様に、平成 21 年度に用いたトラニルシプロミンは、既に医薬品として承認・処方されている薬品である (トラニルシプロミンは米国で承認)。これらの薬品が事故的用量とはいえ、発達期における単回の摂取のみで遅発性の中枢毒性を示し得ることは、既存の毒性学的研究からは予測されなかった結果であり、極めて重要と言える。また、平成 20 年度および平成 21 年度の研究成果から、一般的には MAOIs よりも

副作用が弱いと考えられているSSRIsの方が強い遅発的影響をもたらす可能性が示唆された。近年抗鬱薬は幼児にも処方されるケースが増加しつつあるので、乳幼児期投与の影響について、更なる詳細な検討が必要であろう。

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。平成21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平成22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、8-OH-DPAT投与実験において、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成年期にかけて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

本研究において、SSRIsの単回経口投与による、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、成長後の個体に不安反応性・情動性の変化など、ヒトにおける不適応症状に関連する変化を生じることが認められた。これらの結果から、発達期のSSRIs一時的な大量摂取は遅発性中枢毒性を示す危険性があると結論することができる。

一方、SSRIsと同様に米国で認可されているMAOIsはSSRIsと比較して情動・認知機能に対する遅発性影響が小さい傾向が見られた。これらの結果は抗鬱薬としての危険性と遅発性影響が必ずしも一貫したものではない可能性を示唆している。

更に、セロトニン1A受容体(5-HT<sub>1A</sub>)作動薬の単回経口投与が遅発性影響をほとんど示さなかったことは、SSRIsや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、5-HT<sub>1A</sub>のみならず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囲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。

このように、本研究は幼児期におけるセロトニン系薬物暴露が遅発性行動毒性を持つ可能性があるという毒性学的意義と同時に、これらの遅発性影響を受けた動物が神経発達および精神疾患発症メカニズム研究のための新たなモデル実験系として有効であるという神経科学的意義を持つものであると

結論できる。

## F. 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) 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*

#### 2) 雑誌

Y. Matsumoto, K. Katayama, T. Okamoto, K. Yamada, N. Takashima, S. Nagao, J. Aruga: 2011 Impaired Auditory-Vestibular Functions and Behavioral Abnormalities of Slitrk6-Deficient Mice. PLoS ONE, 6, e16497.

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.

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

S. Sakatani, K. Yamada\*, C. Homma, S. Munesue, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, H.

Hirase: 2009 Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice. *PLoS One*, 4(12): e8309. (\*: joint first author)

T. Maekawa, S. Kim, D. Nakail, C. Makino, T. Takagi, H. Ogura, K. Yamada, B. Chatton, S. Ishii: 2009 Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J*, 2009 Nov 5 (E-pub)

C. Homma, K. Yamada\*: 2009 Physical properties of bedding materials determine the marble burying behavior of mice (C57BL/6J). *TOBSJ*, 3, 34-39. (\*: corresponding author)

Y. Sano, V. G. Ornathanalai, K. Yamada, C. Homma, H. Suzuki, T. Suzuki, N. P. Murphy, S. Itohara: 2009 X11-Like Protein Deficiency Is Associated with Impaired Conflict Resolution in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 29(18), 5884-5896.

S. Endo, F. Shutoh, T.L. Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N. Hartell, K. Yamaguchi, S. Itohara, A. Narin, P. Greengard, S. Nagao, M. Ito: 2009 Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. *PNAS*, 106, 3235-3530.

K. Katayama, K. Yamada, VG Ornathanalai, T. Inoue, M. Ota, NP.

Murphy, J. Aruga: 2008 *Slitrk1*-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. *Molecular Psychiatry*, (E-pub)

N. Kojima, G. Borlikova, T. Sakamoto, K. Yamada, T. Ikeda, S. Itohara, H. Niki, S. E do: 2008 Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 28(25), pp. 6459-6472.

T. Kato, K. Yamada et al: 2008 Behavioral and gene expression analysis of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neuroscience Research*, 61, pp. 143-158.

M. Sakurai, M. Sekiguchi, K. Zushida, K. Yamada, S. Nagamine, T. Kubota, K. Wada: 2008 Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a pontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase *L1* gene. *European Journal of Neuroscience*, 27, pp. 691-701.

13. 山田一之: 2008 統合失調症とモノアミントランスポーター *Clinical Neuroscience* Vol. 26, No. 10, pp. 1143-1145, 中外医学社

## 2. 学会発表

### 1) 国際学会

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)

Y. Matsumoto, K.-I. Katayama, A. Zine, M. Ota, T. Inoue, B. Fritzsche, 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)

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)

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)

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)

Y. Sano, V.G. Orthanalai, K. Yamada, H. Suzuki, T. Suzuki, N.P. Murphy, S. Itohara: 2008 Deficits in conflict-resolution skills in mice lacking the adapter protein X11-like/Mint2. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience 38<sup>th</sup> Annual Meeting, (Washington, DC, November 15-19, 2008)

Y. Sano, V.G. Orthanalai, K. Yamada, C. Homma, H. Suzuki, T. Suzuki, N.P. Murphy, S. Itohara: 2008 X11-like protein deficiency is associated with emotional blunting traits in mice. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience 38<sup>th</sup> Annual Meeting, (Washington, DC, November 15-19, 2008)

## 2) 国内学会

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)

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)

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)

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 神戸ポートトアイランド)

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)

M. Ogawa, K. Yamada, V. G.

Ornathanalai, 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)

I. Ogiwara, S. Ito, K. Yamada, K. Yamakawa.: 2010 Scnla 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)

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)

小川実幸、山田一之、VG Ornathanalai、NP Murphy、片山圭一、有賀純: 2009 膜結合型ユビキチンRinesノックアウトマウスの行動解析および神経化学的解析 第32回日本分子生物学会年回 (12月9-12日 パシフィコ横浜)

山田一之: 2009 マウスにおける選択的注意の系統間比較 日本動物心理学会第69回大会 (9月25-27日 岐阜大学)  
11. 前川利男、金昇準、小倉博雄、山田一之、中井大助、石井俊輔 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32回日本神経科学学会 (9月16-18日 名古屋国際会議

場)

佐野良威、V.G. Ornathanalai、山田一之、本間千尋、鈴木瞳、鈴木利治、N.P. Murphy、糸原重美: 2009 X11L protein deficiency is associated with the selective impairment of motivational approach behavior and the withdrawn response to social conflict. 第32回日本神経科学学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

守村直子、太田真耶、安田浩樹、片山圭一、原直子、山田一之、山口和彦、有賀純: 2009 Lrfrn2/SALM1 a synaptic leucin-rich repeat transmembrane molecule is required for proper synapse maturation and brain function. 第32回日本神経科学学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

松本圭史、片山圭一、守村直子、山田一之、VG Ornathanalai、太田真耶、NP Murphy、有賀純: 2009 Slitrk5-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and serotonergic abnormalities. 第32回日本神経科学学会 (9月16-18日 名古屋国際会議場)

山田一之、本間千尋: 2009 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 (1) 日本心理学会第73回大会 (8月26日-28日 立命館大学)

守村直子、太田真耶、山田一之、原直子、片山圭一、有賀純: 2008 シナプス接着分子Lrfrn2/SALM1ノックアウトマウスにみられた統合失調症様行動異常 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本



生化学会大会合同大会 (12月9日-12日 神戸)

佐野良威、V.G. Ornthanalai、山田一之、本間千尋、鈴木瞳、鈴木利治、N.P. Murphy、糸原重美：2008 アダプタータンパク質X11-like/Mint2 欠損マウスの葛藤に対する消極的行動適応 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (12月9日-12日 神戸)

下畑充志、尾見裕子、山田一之、左合治彦、山川和弘：2007 ダウン症モデルマウス(Ts1Cje)に見られた活動更新と行動抑制障害 日本人類遺伝学会第52回大会 (9月19日-22日 川崎医療福祉大学)

山田一之、本間千尋：2008 Arc 欠損マウスの行動解析(2) 第68回日本動物心理学会大会 (9月13日-15日 常磐大学)

A. Shimohata, H. Omi, A.S. Ebrahim, K. Yamada, C.J. Epstein, H. Sago, K. Yamakawa: 2008 Behavioral phenotyping of the Ts1Cje, a model for Down syndrome. 第31回日本神経科学会(7月9日-11日 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

特筆すべきことなし

表1 研究に使用したモデル化学物質

年度	カテゴリ	化学物質	容量
平成20年度	SSRIs (選択的セロトニン再取り込み阻害薬)	マレイン酸フルボキサミン	250mg/kg
		塩酸パロキセチン	70mg/kg
		クロミプラミン塩酸塩	180mg/kg
平成21年度	MAOIs (モノアミン酸化酵素阻害剤)	クロルジリン塩酸塩	10mg/kg
		トラニルシプロミン塩酸塩	10mg/kg
平成22年度	5-HT agonist (セロトニン1A受容体作動薬) D1・D2 <sup>re1</sup> agonist(参考実験)	8-OH-DPAT <sup>re1</sup>	100mg/kg
		ブスピロン塩酸塩	30mg/kg
		塩酸アポモルフィン	25mg/kg

注) 1: 適当な和名なし(8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン)

2: ドーパミン受容体

表2 研究に使用した行動課題(テストバッテリー)

課題	年度									
	平成20年度		平成21年度		平成22年度					
	paro	flu	clo	tra	8-OH(11)	(34)	bus	apo	clom	
テストバッテリー1 (第1段階)										
体重測定	ns	ns	↑	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
自発活動性テスト	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
オープンフィールドテスト(移動距離)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑	ns	ns	
(中央進出率)	↓	ns	ns	ns	ns	ns	↓	ns	ns	
明暗往来テスト(明室移動率)	ns	↓	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
(明室滞在率)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
高架式十字迷路テスト	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
聴覚性驚愕反応とPPI測定	ns	ns	ns	↑(startle)	ns	ns	ns	ns	ns	
バーンズ迷路テスト	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	ns	
恐怖条件付けテスト(文脈テスト)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
(手掛かりテスト)	ns	ns	ns	ns	ns	↓	ns	ns	↓	
テストバッテリー2 (第2段階)										
高架式ゼロ迷路テスト(移動距離)	↓	↑	-	-	-	-	-	-	ns	
(開放部滞在率)	ns	↓	-	-	-	-	-	-	ns	
ステアケーステスト(潜時)	ns	↓	-	-	-	-	-	-	ns	
ガラスマーブル覆い隠しテスト	ns	ns	-	-	-	-	-	-	ns	
社会行動テスト(エンカウンター法)	ns	↑	-	-	-	-	-	-	↓	
テールフリックテスト	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	
ホットプレートテスト	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	
シュークロステスト	ns	↓	-	-	-	-	-	-	ns	
強制水泳テスト	ns	ns	-	-	-	-	-	-	↓	
尾懸垂テスト	ns	ns	-	-	-	-	-	-	↓	
ホールボードテスト(ヘッドディップ)	↓	ns	ns	↑	ns	ns	ns	-	ns	
(立ち上がり反応)	↑	ns	ns	↓	ns	ns	ns	-	ns	
ホームケージ内自発活動カテゴリ分析	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	
ストレス反応性テスト	↑	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	

注) paro : パロキセチン、flu : フルボキサミン、clo : クロリジリン、tra : トラニルシプロミン、8-OH : 8-OH-DPAT、

(11) : 11 週齢で行動実験を開始、(34) : 34 週齢で行動実験を開始、bus : ブスピロン、apo : アポモルフィン、clom : クロミプラミン、↓ : 減少、↑ : 増加、ns : 有意差なし、- : データなし

分担研究報告書

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

【研究要旨】

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影響解析を目的とし、モデル化学物質としてトリアゾラム（H20）、イボテン酸（H21）、グルホシネート、ゾルピデム、エチゾラム（H22）を選択し、成熟期、幼若期、胎生期のマウスに対して単回強制経口投与し、成長後の生後12～13週齢時に行動解析を行った。その結果、幼若期におけるトリアゾラム、イボテン酸、グルホシネート、エチゾラム投与によって遅発性の情動-認知行動異常が生じることが明らかとなった。また、行動異常に対応する神経科学的物証として、神経突起影響が認められた。

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した。

B. 研究方法

平成20年度

GABA受容体シグナルをかか乱するモデル化学物質として、睡眠導入剤の一つ、トリアゾラムを選択した。トリアゾラムは、ハルシオン、アサシオン、アスコマーナ等の製品で知られるベンゾジアゼピン系睡眠導入剤でGABA受容体のサブタイプに作用し、Cl<sup>-</sup>チャネルを開口させることで抑制性神経伝達効果を高めるとされている。胎生14.5日齢（胎生期投与）、生後2週齢（幼若期投与）、生後11週齢（成熟期投与）のマウスに対して、トリアゾラム（1mg/kg：成人における使用時の100倍濃度：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①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。また行動解析後の個体について②Percellome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)による網羅的遺伝子発現解析とIngenuity Pathways Analysisによるパスウェイ解析、及び③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を行った。

#### 平成21年度

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、Percellome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。

#### 平成22年度

① アミノ酸系神経シグナルをかく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週齢)、胎生期(胎生14.5日齢)のマウスに対して、グルホシネート(50mg/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)。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ハマイスリー)、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ハデパス)。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ハルシオン)である。

成熟期(生後11週齢)、幼若期(生後2週