

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。

#### C-2-2-B: イボテン酸を幼若期マウス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 (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma) (投与 2 時間後、高用量；投与 4 時間後、中・高用量)、Ddit4 (DNA-damage-inducible transcript 4) (投与 2 時間後、中・高用量)、Trp53inp1 (transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1) (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 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 6) (投与 2・24 時間後、高用量)、Kcne11 (potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1-like) (投与 2 時間後、中・高用量)、Kcna1 (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1) (投与 4 時間後、高用量)、Kcna5 (potassium voltage-gated channel, shaker-related

subfamily, member 5) (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 (solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1) (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 (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (投与 2・4 時間後、高用量)およびその標的遺伝子 Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) (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 (G protein-coupled receptor 1) (投与 24 時間後、高用量)および Gpr146 (G protein-coupled receptor 146) (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 (gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 4) (投与 2・8 時間後、高用量; 投与 4 時間後、中・高用量)、Gabra2 (gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2) (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 Npylr (neuropeptide Y receptor Y1) (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 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) (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 Nrpl (neuropilin 1) (投与 2 時間後、中・高用量)、Sema6a (sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A) (投与 4 時間後、高用量; 投与 8 時間後、中・高用量)、Sema6d (sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D) (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 (neuronal PAS domain protein 4) (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 (brain derived neurotrophic factor) (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。

#### C-2-2-C: イボテン酸を成熟期および幼若期に単回経口投与した際の海馬における遺伝子発現プロファイルの比較:

成熟期および幼若期にイボテン酸を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、成熟期および幼若期投与時のものを比較・検討した。その結果、発現増加および減少、双方共に、成熟期および幼若期投与群の間に共通の遺伝子が認められないことが明らかとなり、両者の間で発現変動を示す遺伝子プロファイルがかなり異なることが明らかとなった。加えて、減少した遺伝子数は、幼若期投与群 (137 ps) は成熟期投与群 (4 ps) と比較し、約 35 倍ほど多

いことが明らかとなった。以下に、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図2に示す。

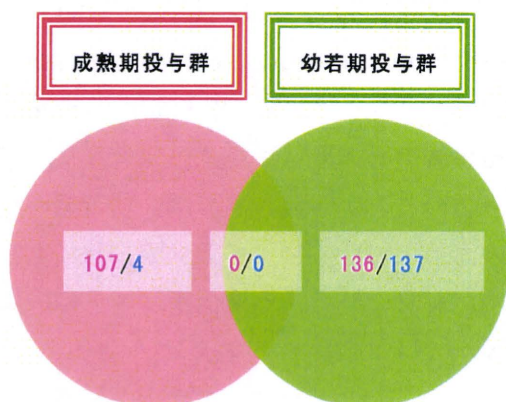


図2 イボテン酸を成熟期および幼若期に単回経口投与した際の海馬において、発現が増加および減少した遺伝子数の比較。朱書きは増加を青字は減少を示す。

C-3: トリアゾラ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：

C-3-1: トリアゾラムを成熟期、幼若期および胎生期マウスに単回投与した際の、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-3-2: 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的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)、Kcnal (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 3)。

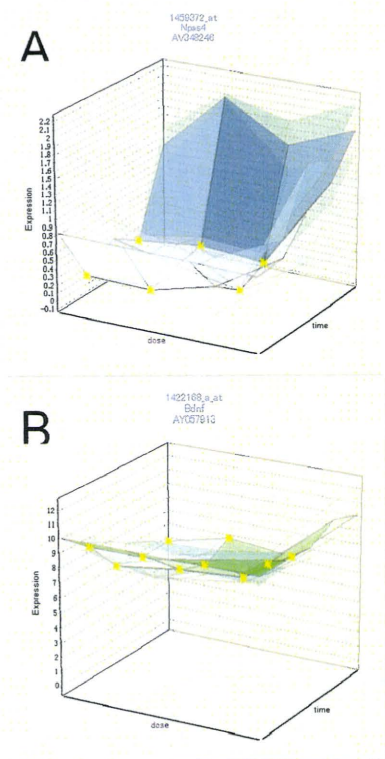
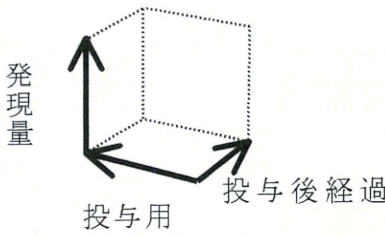


図 3 幼若期マウスの海馬において、トリアゾラム投与により発現が顕著に減少した Npas4 (A) および Bdnf 遺伝子 (B) 遺伝子の発現変動

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。

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。

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-3-3: トリアゾラム及びイボテン酸を幼若期マウスに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、平成 22 年度の検討化学物質であるトリアゾラム及び、平成 21 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 4 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。

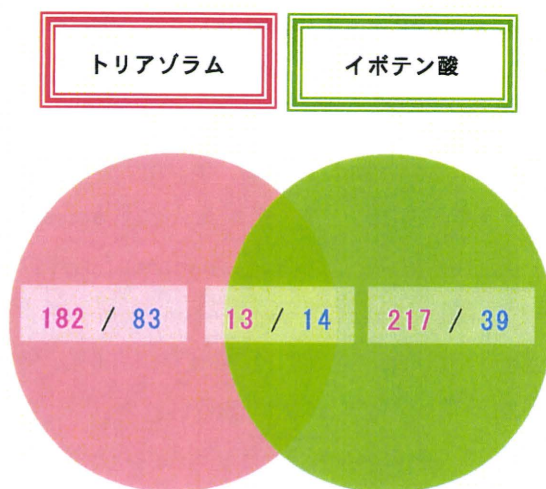


図 4 幼若期のマウスに、トリアゾラム及びイボテン酸を単回経口投与した際に、海馬において変動した遺伝子数の比較。朱書きの字は増加を、青字は減少を示す。

Npas4 遺伝子は平成 21 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

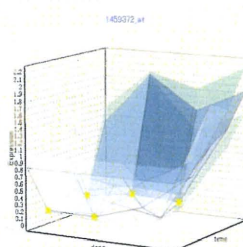


子リストである可能性が考えられた。そこで共通して発現減少が認められた 14 ps のパターンを両化合物投与間で比較した。なお投与用量はトリアゾラム、イボテン酸共に同一の 3 用量(0、0.1、0.3 及び 1 mg/kg)であった。Npas4 は、トリアゾラム投与の際には低用量から用量依存的に、また投与 2 から 8 時間後まで持続して発現減少が認められる(投与 2 時間後、中・高用量; 投与 4 時間後、低用量; 投与 8 時間後、低・中・高用量)。他方、イボテン酸投与の際には、は中用量より影響が認められ、また投与 2 から 4 時間後までと、より短い時間、発現減少が認められた(投与 2 時間後、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 5A に示す。

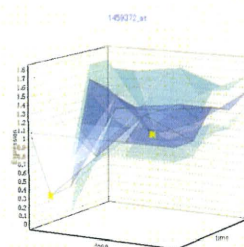
共通して発現減少が認められた 14 ps のパターンを両化合物投与間で比較したところ、興味深い事に、Npas4 遺伝子及びその標的遺伝子 Bdnf を含む少なくとも 12 ps について、Npas4 遺伝子の場合と同様な発現パターンを示した。この 12 ps のうち、Dusp6 (dual specificity phosphatase 6)、Nr4a1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1)、Egr4 (early growth response 4)、Bdnf 及び Arc (activity regulated cytoskeletal-associated protein) 遺伝子について、その発現変動を比較したものを図 5 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係することが報告されている。

A: Npas4

### トリアゾラム

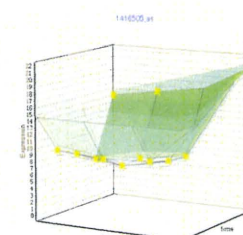


### イボテン酸

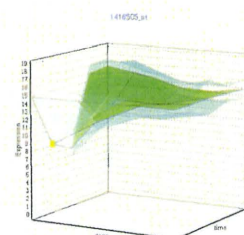


B: Dusp6

### トリアゾラム

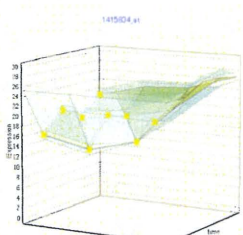


### イボテン酸

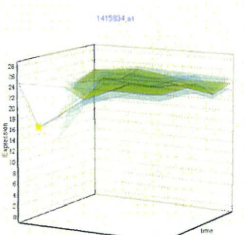


C: Nr4a1

### トリアゾラム

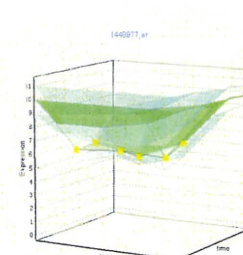


### イボテン酸

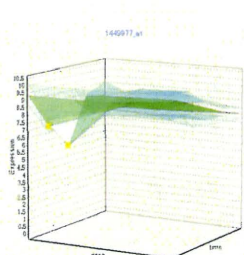


D: Egr4

### トリアゾラム



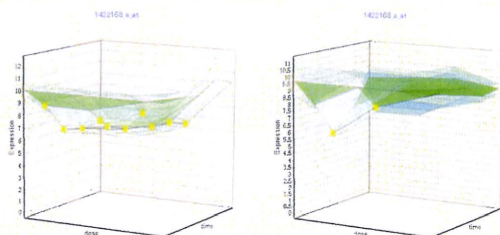
### イボテン酸



E: Bdnf

トリアゾラム

イボテン酸



F: Arc

トリアゾラム

イボテン酸

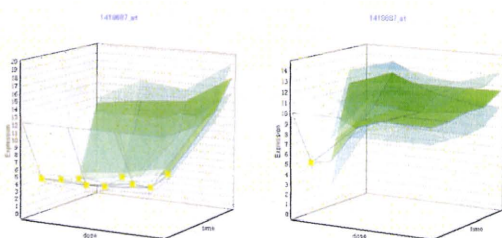


図 5 幼若期マウスの海馬において、有意な発現減少が、トリアゾラム（左）及びイボテン酸（右）経口投与の際に共通して認められた遺伝子のうち、Npas4 (A)、Dusp6 (B)、Nr4a1 (C)、Egr4 (D)、Bdnf (E) 及び Arc (F) 遺伝子の発現変動の比較

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ことから、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-3-4: 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\$EGFR、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 であつた。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\$EGFR が最も多く 18 個であり、次いで V\$ZF02 の 12 個、V\$ETSF の 9 個の順であつた。

#### D. 考察

以上の結果から、以下の事が明らかとなった。すなわち、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、以上である。

したがって、イボテン酸とトリアゾラム投与実験に共通する事象として、幼若期投与群において遅発性の情動認知行動異常が認められ、海馬において Npas4 及びこの関連分子の発現減少が認められる、という事となる。

バルプロ酸ナトリウム投与実験に関しては、成熟期マウスに単回投与した際、情動・認知障害という毒性発現が認められなかったが、潜在的に、海馬におけるアポトーシスが誘発されることが示唆され、反復投与によりこの障害が顕在化する可能性が考えられた。

イボテン酸投与実験に関しては、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る

ことが明らかとなったが、成熟期および幼若期投与群の間で、海馬において変動した遺伝子プロファイルと比較検討したところ、共通して変動する遺伝子は見いだせず、両者の遺伝子プロファイルがかなり異なることが明らかとなった。加えて、幼若期投与群(137 ps)において減少する遺伝子数が、成熟期投与群(4 ps)と比較し、約 35 倍多いことが明らかとなった。この幼若期投与群において減少した遺伝子の中には、神経ガイダンスや 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に関わる遺伝子等が見いだした。

イボテン酸(1 mg/kg)の経口投与により、幼若期投与群において認められた遅発性の情動認知行動異常を誘発する原因となるシグナルネットワークは、幼若期投与群のみにて変動し細胞障害に関わる遺伝子に関わる可能性が高いものと考えられる。したがって本実験結果から、遅発性の行動異常に関連するシグナルとして、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および、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、が挙げられる。特に、Npas4 分子は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遺伝子であると近年報告され、これまで、化学物質による遅発性神経毒性との関連は示唆されていないため、本実験によりこの分子を遅発性影響誘発に関与する候補遺伝子として見いだしたことは新規性の高い発見と考えられる。

トリアゾラム投与実験に関しては、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ることが明らかとなったが、幼若期投与群の海馬において変動した遺伝子プロファイルを検討したところ、発現が増加した遺伝子リストについては現時点で、アポトーシスや酸化的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、発現が減少した遺伝子リストの中には、神経伝達に関連する遺伝子として、GABA-A 受容体、BDNF 受容体、K チャネル等が見いだされたが、その他に、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、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可能性が示唆され、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。

## E. 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、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としつつ、「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、イボテン酸（1 mg/kg）及びトリアゾラム（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ることが明らかとなった。そこで、遅発性の情動認知行動異常の誘発分子機序の探索の為に、幼若期に投与した際の海馬において、両化合物に共通して発現減少が認められる遺伝子を抽出したところ、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 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、従来、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1-1) 書籍

北嶋 聡

##### 3) 「情動・認知に関する化学物質」

平成 20 年度 化学物質リスク研究シンポジウム「健康と化学物質—化学物質と幼児行動—」講演集 CD」 社団法人 日本食品衛生協会、東京、2009 年 10 月

北嶋 聡

##### 5.3 食品、食品添加物、食品汚染物質、飼料添加物

「新版トキシコロジー」編集委員：上野光一ら、朝倉書店、東京、2009 年 7 月

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司

「第 3 節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析」編集委員：野村護、堀井郁夫、吉田武美、「非臨床試験—ガイドラインへの対応と新しい試み—」株式会社 エル・アイ・シー、東京、2008 年

#### 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.

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S and Kanno J, Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. J Toxicol Sci 34: SP279-SP286, 2009.

Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A, Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction

J Exp Med, 205: :295-303, 2008.

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S and Kanno J, Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube.

J Toxicol Sci. 33: 105-116, 2008.

David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R and Franz WM, MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated

blockage of wnt-signalling.

Nat Cell Biol, 10: 338-345, 2008.

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. Development 135: 3511-3519, 2008.

## 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と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

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

北嶋 聡、菅野 純

Percellome Toxicogenomics Project toward Informatics Stage for Predictive Toxicology

[the symposium of ICT-TIES 2009, the Joint Symposium of 5th International Conference on Toxicogenomics (ICT) and



2nd Toxicogenomics Integrated  
Environmental Science (TIES2009)]  
Plenary and Keynote Speaker (PLENARY  
LECTURE III) 2009 年 9 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  
脳発生と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と幼若期雄マウスへ  
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

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose,  
Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori,  
Akio Ogata, Norio Ohashi, and Satoshi  
Kitajima  
Induction of mesothelioma in p53+/-  
mouse by intraperitoneal application of  
multi-wall carbon nanotube. [The 5th  
International Congress of Asian Society  
of Toxicology (ASIATOX V)]2009 年 9 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、<br><u>北嶋 聡</u> 、菅野 純                                      | 1. 特許取得<br>なし   |
| 発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細<br>構造異常と情動-認知行動障害 [第 35 回日<br>本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6<br>月 | 2. 実用新案登録<br>なし |
|  | 3. その他<br>なし    |

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

G. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予  
定も含む)

分担研究報告書

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

研究分担者 熊ノ郷 淳  
大阪大学微生物病研究所 教授

【研究要旨】

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。

A. 研究目的

セマフォリンの有する神経ガイダンスや神経保護作用が種々の要因でかく乱された際の遅発性中枢毒性発現機序を解明することを目的としている。

B. 研究方法

免疫・神経クロストークを担う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中枢作動性物質の影響と遅発性中枢毒性発現機序をセマフォリン遺伝子欠損マウスを用いて解析した。ミトコンドリア毒としては 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6

-tetrahydropyridine (MPTP) 及びドーパミン神経障害で農薬でもある rotenone を用い、in vitro と in vivo 双方の系でドーパミン作動ニューロンへのこれら薬剤の影響を検討した。また Sema4D の欠損下及び Sema4A の欠損下での神経学的行動解析を行った。動物実験は施設内の動物取り扱い指針に従って行った。

C. 研究結果

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。

D. E. 考察及び結論

神経ガイダンス因子の神経保護作用と発達期における行動様式における役割が明ら



かになった。今後神経細胞に対する作用メカニズムを詳細に検討していく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nogi T, Yasui N, Mihara E, Matsunaga Y, Noda M, Yamashita N, Toyofuku T, Uchiyama S, Goshima Y, Kumanogoh A, Takagi J. Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*. 467:1123-7. 2010.

Viola Maier, Christine Jolicoeur, Helen Rayburn, Noriko Takegahara, Atsushi Kumanogoh, Hitoshi Kikutani, Marc Tessier-Lavigne, Wolfgang Wurst, and Roland H. Friedel. Semaphorin 4C and 4G are ligands of Plexin-B2 required in cerebellar development. *Molecular and Cellular Neuroscience*. (in press).

Ishii H, Kubo T, Kumanogoh A, Yamashita T. Th1 cells promote neurite outgrowth from cortical neurons via a mechanism dependent on semaphorins. *Biochem Biophys Res Commun*. 402:168-72. 2010.

Ch'ng ES, Kumanogoh A. Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression. *Mol Cancer*. 9:251. 2010

Wannemacher KM, Zhu L, Jiang H, Fong KP, Stalker TJ, Lee D, Tran AN, Neeves KB, Maloney S, Kumanogoh A, Kikutani H, Hammer DA, Diamond SL, Brass LF. Diminished contact-dependent reinforcement of Syk

activation underlies impaired thrombus growth in mice lacking Semaphorin 4D.

*Blood*. 116:5707-5715. 2010.

Takegahara N, Kang S, Nojima S, Takamatsu H, Okuno T, Kikutani H, Toyofuku T, Kumanogoh A. Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements.

*FASEB J*. 24:4782-4792. 2010.

Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins and their receptors: novel features of neural guidance molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 86:611-20. 2010.

Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol*. 11: 594-600, 2010.

Yukawa K, Tanaka T, Kishino M, Yoshida K, Takeuchi N, Ito T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A. Deletion of Sema4D gene reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein

E-deficient mice. *Int J Mol Med*. 26:39-44. 2010.

Kumanogoh A, Ogata M. The study of cytokines by Japanese researchers: a historical perspective. *Int Immunol*. 22:341-5. 2010.

Kinoshita M., Y. Nakatsuji, T. Kimura, M. Moriya, K. Takata, T. Okuno, A. Kumanogoh, K. Kajiyama, H. Yoshikawa, S. Sakoda Anti-aquaporin-4 antibody induces astrocytic cytotoxicity in the absence of CNS antigen-specific T cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 394:205-10. 2010.

Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozonl M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzidl K, and Castellani V. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Gen Dev*. 24:396-410, 2010.

Takamatsu H, Okuno T, and Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cell Mol Immunol*. 7:83-8. 2010.

Kataoka T, Kumanogoh A, Bandara G, Metcalfe D, and Gilfillan A. CD72 negatively regulates KIT-mediated responses in human mast cells. *J. Immunol*. 184:2468-2475. 2010.

Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, Toyofuku T,

Nakagawa Y, Sujin Kang, Friedel RH, Sakoda S, Kikutani K and Kumanogoh A. Involvement of Sema4D-Plexin-B1 interactions in the CNS for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 184: 1499-1506, 2010. .

Yukawa K, Tanaka T, Yoshida K, Takeuchi N, Ito T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A. Sema4A induces cell morphological changes through B-type plexin-mediated signaling. *Int J Mol Med*. 25:225-30. 2010.

Li M, O'Sullivan KM, Jones LK, Lo C, Semple T, Kumanogoh A, Kikutani H, Holdsworth SR, Kitching R. Endogenous CD100 promotes glomerular injury and macrophage recruitment in experimental crescentic glomerulonephritis. *Immunology*. 128:114-22. 2009.

Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, Kumanogoh A, Kajiyama K, Yoshikawa H, Sakoda S. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 386:623-7. 2009.

Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Iso H, Li L, Kohsaka A, Waki H, Miyajima M, Maeda M, Kikutani H, Kumanogoh A. Sema4D/CD100 deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. *Can J Neurol Sci*. 36:349-55. 2009.

Inui M, Kikuchi Y, Aoki N, Endo S, Maeda T, Sugahara-Tobinai A, Fujimura S, Nakamura A, Kumanogoh A, Colonna M, Takai

T. Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4816-21. 2009.

Mizui M, Kumanogoh A, Kikutani H. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J Clin Immunol*. 29:1-11. 2009.

Kinoshita M, Nakatsuji Y, Moriya M, Okuno T, Kumanogoh A, Nakano M, Takahashi T, Fujihara K, Tanaka K, Sakoda S. Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum. *Neuroreport*. 20:508-12. 2009.

Schwarz Q, Waimey KE, Golding M, Takamatsu H, Kumanogoh A, Fujisawa H, Cheng HJ, Ruhrberg C. Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Dev Biol*. 324:1-9. 2008.

Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, Nojima S, Hori M, Kikutani H, Kumanogoh A. Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. *FEBS Lett*. 582:3935-40. 2008.

Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Yamamoto M, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, Suto F, Hori M, Fujisawa H,

Kumanogoh A>(\*corresponding author), Kikutani H. Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Dev Biol*. 321:251-62. 2008.

Moriya M, Nakatsuji Y, Miyamoto K, Okuno T, Kinoshita M, Kumanogoh A, Kusunoki S, Sakoda S. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett*. 440:323-6. 2008.

Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, Piacibello W, Kumanogoh A, Kikutani H, Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med*. 205:1673-85, 2008.

Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol*. 9:17-23, 2008.

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

なし



分担研究報告書

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

研究分担者 富永 貴志  
徳島文理大学香川薬学部 准教授

【研究要旨】

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。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、*ex vivo*実験系（スライス標本）でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(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：H20）  
初めにスライス標本作成手段の標準化の検討を行い、スライス標本作製手段（角度、位置、厚みなど）を決定し、以降の実験で使用した。  
内側嗅内野からCA1野へ投射する貫通線維のシナプスで細胞特異的にテタヌス毒（TetX）を発現させた遺伝子改変マウスを用い、その貫通線維に電子刺激を加えた時の応答を光計測法により定量的に比較した。  
H21は、さらにチャネルロドプシン（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(H20)

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(H21-)

化学物質(記憶喪失性貝毒の一種、ドーモイ酸、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(H20-)

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。