

(肝芽細胞の三次元培養(Spheroid 培養))

肝芽細胞の三次元培養には、WEを基本培地として、Insulin 10mg/L, EGF 50  $\mu$ g/L, Linoleic acid 50  $\mu$ g/L, 63mg/L penicillin, 100mg/L streptomycin など含む Hormone Defined Medium (HDM 培地)を用いた (Matsushita et al, 2003, 2006)。ヒト胎児肝細胞を HDM 培地に懸濁し、1mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径60mmの培養ディッシュ (IWAKI社製、浮遊細胞用)に、 $8 \times 10^5$  cells/dishの密度で播種した。播種後2日目に、1mM 酪酸ナトリウムを含んだ HDM 培地に交換し、さらに6日間培養を行った。培地交換は2日毎に行った。培養後、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、遠心によって回収した後、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、0.1%クリスタルバイオレット溶液を用いて核数計数法によって算出した。

(ヒト成人肝細胞の培養)

ヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC社よりヒト非凍結肝細胞 (12.5 cm<sup>2</sup> フラスコ接着、製品番号 HEP220-FL12) 3ロットを購入した(ロット番号: HEP220523、HEP220524、HEP220527)。各ロットの基本情報を以下に示す。

HEP220523

Age: 81

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

HEP220524

Age: 66

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatic metastases

HEP220527

Age: 62

Sex: Female

Ethnicity: Caucasian

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

細胞を受領後、培地を Incubation Medium (肝細胞培養用培地、製品番号 MIL214-100M) に交換し、3日間培養した。培地は毎日新鮮なものに交換した。培養3日目に細胞から解析用のサンプルを調製した。

## 2. メタボローム解析

代謝物質の測定はヒューマン・メタボロー

ム・テクノロジーズ社に委託した(委託試験名: CE-TOFMSによる培養細胞のメタボローム解析、報告書番号: NIHSF-HMT-003)。

その測定において検出された217の候補化合物について、その相対的存在量を胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の4群間もしくは胎児肝細胞由来の3群間で比較した。

統計検定は Oneway ANOVA ( $p < 0.05$ )により行い、検定を通過した化合物について階層的クラスタリングにより解析した。

階層的クラスタリング解析は、距離の定義に Pearson uncentered を用い、群平均距離法 (Average)により行った。

また、胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間の比較は t-検定 ( $p < 0.05$ )により行った。

## 3. 化合物暴露実験

1. サンプル調製法にある培養方法で培養した胎児肝細胞、肝芽細胞、肝芽細胞のスフェロイド培養について、培地中にアセトアミノフェンを 0.25 mM ~ 20 mM まで添加し、3日間培養した。その後、セルカウンティングキット-8 (同仁化学)を用いて、相対的細胞数を計測した。対照としてはホスホマイシンを同濃度で同時間暴露した。

## 4. ゲノミクス解析

サンプルより調製した RNA を定法に従い標識したのち、Affymetrix 社 HG-U133 チップを用いて、網羅的遺伝子発現データを得た。

(倫理面への配慮)

ヒト胎児肝細胞は、米国 ABI 社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DS ファーマバイオメディカル社より購入している。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

## C. 研究結果

### 1. サンプル調製

ヒト胎児肝細胞 (CS-ABI-3716) は、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入した。播種後6日間培養を行い、各サンプルの

調製をした。

同じヒト胎児肝細胞を 1mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で 8 日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った (Kiyota, 2007)。8 日間培養した細胞より各サンプルの調製をした。

肝芽細胞の三次元培養では、ヒト胎児肝細胞を 1mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径 60mm の培養ディッシュで 8 日間培養した。培養 2 日目から培地に 1mM 酪酸ナトリウムを添加し肝芽細胞へ誘導した。8 日間培養した細胞より各サンプルの調製をした。

ヒト成人肝細胞は、当所で受け入れ後、3 日間毎日培地を交換しつつ培養した。3 日目に、各サンプルの調製をした。

## 2. メタボローム解析

昨年度得られたメタボローム解析の結果に関して、更に詳細な検討を行った。

前回検出された 217 の候補化合物について、その相対的存在量を胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の 4 群間もしくは胎児肝細胞由来の 3 群間で比較した。統計検定は t-検定 ( $p < 0.05$ )、又は、Oneway ANOVA ( $p < 0.05$ )により行った。

まず、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の 4 群間の比較では、115 の化合物が Oneway ANOVA 検定を通過した。検定を通過した化合物について、階層的クラスタリングにより分類したところ、成人肝細胞は元の胎児肝細胞と類似性が高いことが示唆された。そこで各細胞間の階層的クラスタリング解析は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の 3 群間で行い、成人肝細胞の代謝産物については胎児肝細胞の単層培養とのみ比較することにした。

胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の 3 群間の Oneway ANOVA 検定では 119 の化合物が検定を通過し、階層的クラスタリング解析では化合物を各群間の変動により大きく 7 つのグループに分けることができた (図 1)。

グループ①は、胎児肝細胞の単層培養と比

較して肝芽細胞の単層培養で相対的存在量が増加する化合物で、分類された 26 の化合物のうち 6 種が「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」, 5 種が「その他の糖代謝」、4 種が「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」の各パスウェイに属していた。

グループ②は、肝芽細胞の単層培養からスフェロイド培養にかけて相対的存在量が増加する化合物で、38 の化合物のうち 7 種が「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」、6 種が「プリン代謝、ピリミジン代謝」、5 種が「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」の各パスウェイに属していた。

グループ③は、胎児肝細胞の単層培養および肝芽細胞の単層培養と比較して肝芽細胞のスフェロイド培養で相対的存在量が増加する化合物で、分類された 15 の化合物のうちそれぞれ 3 種の化合物が「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」と「その他の糖代謝」に重複して属していた。

グループ④は、胎児肝細胞の単層培養と比較して肝芽細胞の単層培養で相対的存在量が減少する化合物で、4 種の化合物が分類された。

グループ⑤は、胎児肝細胞の単層培養および肝芽細胞の単層培養と比較して肝芽細胞のスフェロイド培養で相対的存在量が減少する化合物で、分類された 13 の化合物のうち 6 種の化合物が「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」, 3 種が「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」の各パスウェイに属していた。

グループ⑥は、胎児肝細胞の単層培養と比較して肝芽細胞の単層培養および肝芽細胞のスフェロイド培養で相対的存在量が減少する化合物で、8 種の化合物が分類され、グループ⑦は、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養と分化が進むにつれて相対的存在量が減少する化合物で、15 種の化合物が分類された。

グループ⑥、グループ⑦では、短鎖、長鎖の脂肪酸や有機酸などの化合物が複数属していた。

胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間の代謝産物の相対的存在量の比較では、t-検定により 47 の化合物が有意差ありと判定され、そのうち 31 化合物が成人肝細胞で増加し、16 化合物が減少した。

変動率の大きかった上位十位までには、

Ornithine (46.9-fold), Urea (7.7-fold), Guanidoacetic acid (6.4-fold)の「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」に属する3化合物、Cys (22.2-fold), Glycerophosphocholine (13.1-fold), Glycerol 3-phosphate (13.1-fold)の「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」に属する3化合物が含まれていた。

また、下位十位までには、 $\beta$ -Ala (-31.1-fold), O-Acetylcarnitine (-9.5-fold), Carnitine (-5.2-fold)の「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」に属する3化合物が含まれていた。

胎児肝細胞由来の3細胞間の比較で胎児肝細胞の単層培養から肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養に向けて相対的存在量が増加する化合物は、「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」や「その他の糖代謝」、「プリン代謝、ピリミジン代謝」などのパスウェイに属し、エネルギーを産生し代謝が活発に行っていることを示唆する化合物が多く含まれていた。また、種々のアミノ酸代謝経路の化合物に注目した場合、タンパク合成に使用されるアミノ酸で相対的存在量が増加傾向にあった。

一方で、相対的存在量が減少する化合物は「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」に属する化合物が含まれ、脂肪酸の減少傾向と合わせ膜成分を合成する活性が亢進していることが示唆された。

### 3. 化合物暴露実験

昨年度のメタボロームの解析により、胎児肝細胞では、成人肝細胞に比べグルクロン酸量が少ない結果を得た。グルクロン酸は薬物代謝における第二相反応であるグルクロン酸抱合で用いられる化合物であり、胎児肝細胞では成人肝細胞よりグルクロン酸抱合による解毒作用が低いことが予測された。出生時における化学物質代謝の第二相反応については、出生時には硫酸抱合及びグリシン抱合は成人とほぼ同等の活性が認められるがグルクロン酸抱合能は低いことが知られている(調剤指針 日本薬剤師会編)。

そこで、肝臓で95%以上がグルクロン酸抱合を受け尿中に排泄されることが知られているアセトアミノフェンの胎児肝細胞並びにそれから誘導された肝芽細胞に対する細胞毒性の発現を測定した(図2)。

その結果、アセトアミノフェンの毒性発現には、肝芽細胞のスフェロイド培養で、胎児

肝細胞より高濃度を必要としていた。対照実験としては、肝臓ではほとんど代謝されず、腎臓で尿中に排泄されることが知られているホスホマイシンを用い、各細胞を同濃度、同時間処理したが、細胞数に変化は認められなかった(data not shown)。

### 4. ゲノミクス解析

メタボローム解析のサンプル調製と同時に細胞から回収したRNAサンプルを用いて、ゲノミクス解析を行った。データは、Affymetrix社HG-U133チップにより取得した。各サンプル間でt-検定( $p < 0.05$ )を行い、培養方法並びに細胞の違いにより発現が変化している遺伝子数を計数した。

成人肝細胞と胎児肝細胞では非常に多数の遺伝子で発現の変化が認められた(data not shown)。胎児肝細胞の培養法により発現が変化した遺伝子数を表1に示す。

上段は2倍以上の変化を示した遺伝子を計数した場合で、500前後の遺伝子で変化が認められた。そこで、4倍以上の変化を示した遺伝子を計測したところ、下段に示すように、なお50遺伝子前後で発現の変化が認められた。

### D. 考察

本年度は昨年度に引き続き、メタボローム解析を進めるとともに、昨年度の結果に基づき、化合物暴露実験を実施した。合わせて、ゲノミクス解析にも着手した。

メタボローム解析に関しては、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の4群間の比較では、成人肝細胞は元の胎児肝細胞と類似性が高いことが示唆された。そこで胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の3群間の比較を行ったところ、全体の傾向としては、胎児肝細胞の単層培養から肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養に向けて増加する化合物として「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」(11化合物)および「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」(11化合物)、「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」(9化合物)、「その他の糖代謝」(8化合物)、「プリン代謝、ピリミジン代謝」(8化合物)などのパスウェイに属

する化合物が分類され、逆に減少する化合物として「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」(8 化合物) および「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」(8 化合物) のパスウェイに属する化合物が分類された。

また、胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間で変化する化合物としては「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」、「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」、「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」、「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」の各代謝経路の化合物が 47 化合物中 6 化合物以上含まれていた。尿素回路の主な機能は尿素の産生で、その主要産物である Ornithine (46.9-fold), Urea (7.7-fold), Citrulline (4.8-fold) が成人肝細胞で高いのは成人肝細胞がアミノ酸代謝の過程で細胞内に産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているものと思われる。一方で、胎児肝細胞由来の 3 細胞はこれら 3 種の化合物の細胞内のレベルが成人肝細胞に比べ低く、細胞内で産生するアンモニアを別な経路で代謝していることが示唆される。このことは Arg 代謝の別経路である Creatine の合成経路の化合物が胎児肝細胞由来の細胞で分化誘導に伴い上昇し、成人肝細胞に比べ高いレベルを維持していることから示唆される。

昨年度と今年度を実施したメタボローム解析の結果をもとに、化合物暴露実験を行った。今までの解析より、胎児肝細胞では、成人肝細胞に比べグルクロン酸量が少ない結果を得ているので、肝臓で 95% 以上がグルクロン酸抱合を受け尿中に排泄されることが知られているアセトアミノフェンの胎児肝細胞並びにそれから誘導された肝芽細胞に対する細胞毒性の発現を測定した。その結果、アセトアミノフェンの毒性発現には、肝芽細胞のスフェロイド培養で、胎児肝細胞より高濃度を必要としていた。胎児肝細胞を酪酸ナトリウムで処理し肝芽細胞に誘導し、更にスフェロイド培養をすると、成人肝細胞に近い形質を獲得することが知られている (Kiyota, 2007)。より成人肝細胞に近い、肝芽細胞のスフェロイド培養においてアセトアミノフェンに対する毒性発現がより高濃度にシフトしていたことは、メタボローム解析並びに文献 (調剤指針 日本薬剤師会編) から示唆される胎児肝細胞より成人肝細胞でグルクロン酸抱合能が高いという予測と一致して

いた。

本年度はまた、ゲノミクス解析に着手した。定法に従い、各細胞から得た RNA サンプルを用いて、Affymetrix 社 HG-U133 チップにて網羅的発現解析を行った。その結果、胎児肝細胞の培養法の違いで、予想以上に多くの遺伝子で、発現に変化が認められた。遺伝子発現レベルでは、培養方法を変えることで、大きな変化が起きていると考えられ、今後、詳細を解析していくとともに、メタボローム解析の結果とも比較検討していくことが必要と考えられる。

## E. 結論

本年度は昨年度に引き続き、メタボローム解析を進めるとともに、昨年度の結果に基づき、化合物暴露実験を実施した。合わせて、ゲノミクス解析にも着手した。

メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では別な経路で代謝していることを示唆するデータを得た。また、メタボローム解析により示された胎児肝細胞より成人肝細胞でグルクロン酸抱合能が高いという予測と一致して、より成人肝細胞に近いと考えられる肝芽細胞のスフェロイド培養で、グルクロン酸抱合を受けるアセトアミノフェンに対する毒性がより高濃度にシフトするのが観察された。

遺伝子発現は胎児肝細胞の培養方法により大きく変化していることを示す結果を得た。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

- [1] 石田 誠一, 久保 崇, 黒田 幸恵, 関野 祐子, 三次元培養による肝癌由来培養細胞の機能調節. 日本薬学会 第 132 年会, 札幌, 2012.
- [2] 太田 庸介, 大野 彰子, 石田 誠一, 黒田 幸恵, 栗原 正明, 関野 祐子, 斎藤 嘉朗, 福原 潔, <sup>1</sup>H NMR を用いた HepG2 細胞のメタボロミクス: APAP の影響. 日本薬学会 第 132 年会札幌, 2012.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

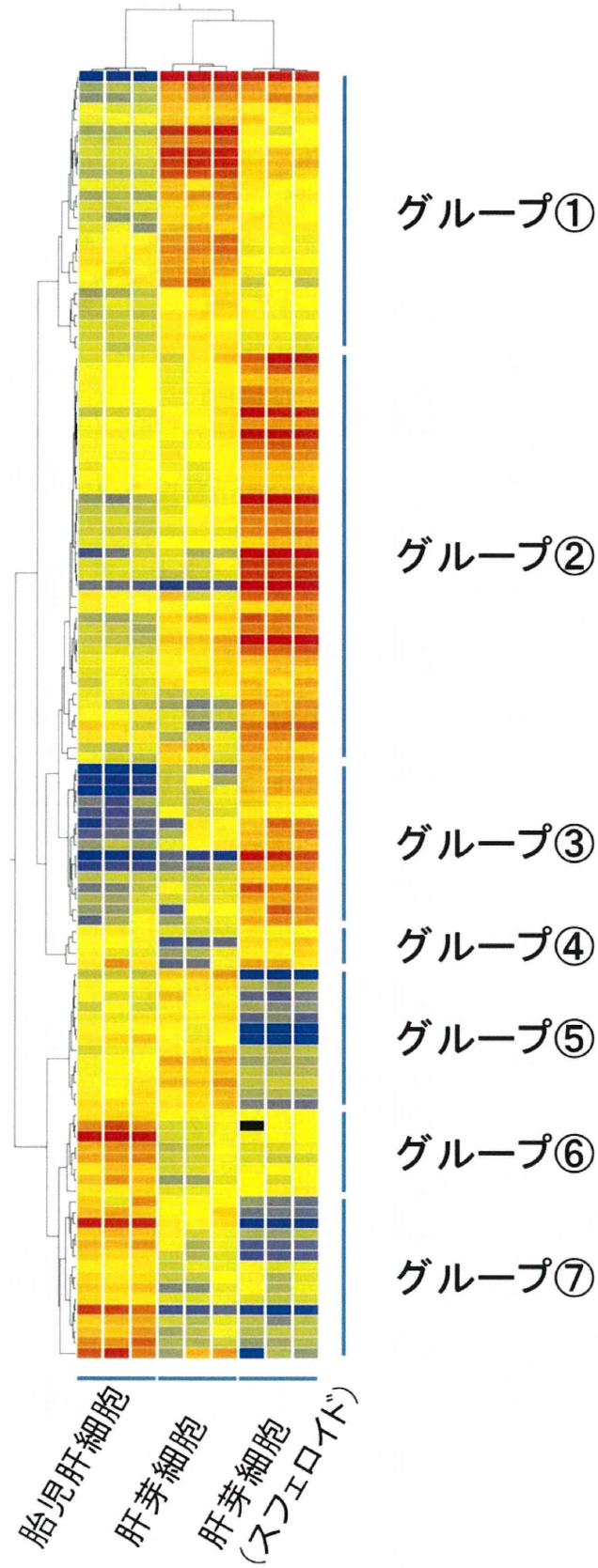


図1. メタボローム解析において胎児肝細胞、肝芽細胞（平面培養）、肝芽細胞（スフェロイド培養）で存在量に変化していた化合物の階層的クラスタリングによる分類

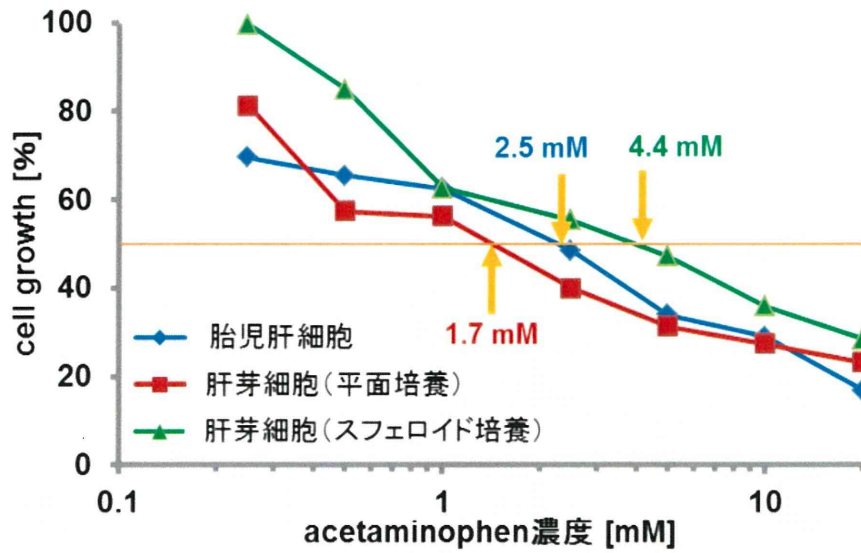


図 2. 胎児肝細胞由来細胞の増殖に対するアセトアミノフェンの効果

表 1. 胎児肝細胞の培養法により発現が変化した遺伝子数

<b>&gt;= 2 fold</b>	胎児肝細胞	肝芽細胞	スフェロイド培養
胎児肝細胞	---	424	587
肝芽細胞	424	---	504
スフェロイド培養	587	504	---

<b>&gt;= 4 fold</b>	胎児肝細胞	肝芽細胞	スフェロイド培養
胎児肝細胞	---	63	68
肝芽細胞	14	---	29
スフェロイド培養	31	52	---

周産期における薬物動態関連因子の発現解析

研究分担者	簾内 桃子	国立医薬品食品衛生研究所	薬理部	研究員
研究協力者	中澤 憲一	国立医薬品食品衛生研究所	薬理部	主任研究員
研究協力者	花尻 瑠璃	国立医薬品食品衛生研究所	生薬部	室長

研究要旨

幼若期におけるドナー由来肝細胞への尿素系除草剤リニュロンの曝露は、*CYP1A1*mRNA を極めて強く誘導し、次いで *CYP1B1*  $\geq$  *CYP1A2* mRNA の順に強い誘導作用を示した。これら *CYP1* mRNA 分子種における誘導剤の強さ、および、*in vitro* の転写活性化系においてリニュロンが AhR を経て *CYP1A1* の転写を活性化させる強さは、メチルコラントレン>リニュロン  $\geq$  オメプラゾールの順であった。新生児期および乳児期におけるヒト肝細胞の *CYP1* mRNA の発現は低いものの、化学物質の曝露による *CYP1* 分子種の誘導機構は充分備わっており、幼若期の肝細胞を用いた mRNA を指標とする *in vitro* 代謝評価系は、幼若期における化学物質の毒性評価に有用であることを示した。

A. 研究目的

妊娠母体あるいは幼若期に曝露された化学物質は、直接あるいは母乳を介して胎児や新生児、乳幼児の成長期の健康に、障害を引き起こすことがある。特に幼若期での影響が危惧されているのは、化学物質に対して、胎児期から新生児期、乳児期を含む成長期における感受性が成人に比べ強いと考えられているからである。

化学物質は脂肪組織に蓄積するところから、体内における長期曝露により、引き起こされた障害が不可逆となる可能性がある。そのため、成長期における化学物質が健康におよぼす影響を評価することは極めて重要である。

肝臓における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、標的臓器における化学物質の健康影響を評価するにあたり体内動態を決定する重要な因子であるのみならず、化学物質の代謝活性化に起因する毒性発現および代謝的解毒と密接に関連しており、その変動は胎児期および成長期の健康に影響を及ぼすことが知られている。

今までに当研究室では、ラット周産期において肝臓における薬物代謝活性は極めて低いものの、化学物質による薬物代謝酵素誘導能を十分に有していること (Sunouchi, M., et. Al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 59;540-7,

1981) (Sunouchi, M., et. Al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 73;457-63, 1984)、ラットにおける薬物代謝酵素の特性は、胎児期・新生児期と成熟期の間で異なること (Mizokami K, Inoue K, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107;6-11, 1982) (Mizokami K, Sunouchi M, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113;59-64, 1983) を示した。

一方、ヒトと実験動物との間には、肝臓で発現している CYP 酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で種差が認められることから、化学物質の曝露がヒト成長期に及ぼす健康影響を予測するためにはヒト肝細胞を用いた *in vitro* 曝露評価系が有用である。日本国内におけるヒト組織の入手は極めて困難であるが、市販のヒト肝細胞を海外から入手し、各成長期における薬物代謝酵素と薬物動態関連因子の特性、および化学物質曝露が薬物代謝系に与える影響を明らかにすることは、化学物質がヒト成長期におよぼす影響の評価に有用である。

そこで本研究では、今までに得られた知見を踏まえ、化学物質がヒト肝細胞における薬物代謝酵素ならびに薬物動態関連因子の特性について調べ、さらに化学物質がヒト成長期におよぼす影響を市販のヒト肝細胞を用い、mRNA および遺伝子レベルで明らかにする。



前年度は、成長期および成熟期ヒト肝細胞の薬物代謝酵素系の特性調査、成長期ヒト肝細胞収集と遺伝子解析サンプルの調製、さらに成長期における主要 CYP の変動について検討した。

今年度は、前年度に引き続き、とりわけ幼若期における化学物質の毒性発現に密接に関わる CYP1 ファミリーに焦点を当てた。ラットにおいて CYP1A2 誘導能を有することが知られている塩素を有するフェニルウレア系除草剤であるリニュロンの曝露が、ヒト肝薬物代謝誘導能に与える影響を mRNA および遺伝子レベルで検討した。現在リニュロンは、原体として年間 114,000~80,000 kg (平成 17 年~21 年) が輸入され使用されている。

## B. 研究方法

### 1. ヒト凍結肝細胞の収集

前年度に引き続き、ヒト成長期における凍結肝細胞を、Gibco Invitrogen Cell Cultures, BD Biosciences および SciKon Innovation Inc. から購入した。ヒトの成長期を以下の 4 期間に分類した。すなわち出生直後に観察された生理的体重減少が回復するまでの生後 7~10 日間 (新生児期)、新生児期以降 1 才までの期間 (乳児期)、1 才から 6 才までの期間 (幼児期)、6 才以降 12 才までの期間 (学童期) に分け、該当する肝細胞をドナーあたり 2~3 vial 以上の収集を試みた。誘導能評価に利用可能な接着型ヒト肝細胞を優先して収集した。

### 2. 使用薬物と薬物処理

肝細胞における毒性発現と密接にかかわる CYP1 ファミリーの標的誘導剤であるメチルコラントレン (3-MC ; 0.2, 0.5  $\mu$ M)、オメプラゾール (OPZ ; 5  $\mu$ M) およびリニュロン (LNR ; 5~75  $\mu$ M) を、5% CO<sub>2</sub>-Air インキュベーター下、初代培養ヒト肝細胞に 9 時間曝露した。3-MC と LNR はアセトニトリルに、OPZ はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。溶媒の培地中終濃度はいずれも 0.1% とした。

### 3. ヒト凍結肝細胞からのサンプル調製と標的遺伝子の相対的定量

ヒト肝細胞は、異なる供給元から入手したことから、実験に先立ち肝細胞を細胞精製キット (XenoTech's Percoll density gradient kits,

K2000) を用いて精製した。Viability は、trypan blue 漏出法にて測定した。また、Qiagen RNeasy Mini kit および High Capacity RNA-to-cDNA kit にて cDNA サンプルを調製した。qRT-PCR 法により以下の酵素、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP3A4、CYP3A5、UGT1A1 および GSTA2 の発現について調べた。標的遺伝子は比較 Ct 法にて相対的定量を行った。薬剤処理が標的遺伝子に与える影響は、溶媒対照の値を 1 とした場合の比率で示した。

## 4. レポーター遺伝子アッセイ

HeLa 細胞 (2.8 x 10<sup>4</sup> cells) に hAhR 発現プラスミド pcDNA 3.2-DEST hAhR(100 ng)、hArnt 発現プラスミド pcDNA 3.2-DEST hArnt(100 ng)、pGL3-hCYP1A1 プロモータープラスミド (30 ng) および内部コントロールとして phRL-TK プラスミド(10 ng)を共導入した。導入 4 時間後に DMSO、LNR (10, 100, 1000 nM)、3-MC(10, 100 nM)あるいは OPZ(200, 2,000 nM)を曝露し、48 時間培養した。細胞を PBS にて洗浄した後、dual luciferase reporter assay system (Promega)を用いて、転写活性を測定した。転写活性は対照群を 100 としたときのルシフェラーゼ比活性にて示した。

### (倫理面の配慮)

凍結ヒト肝細胞は、個人情報確実に連結不可能匿名化されている市販品で、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において審査「非該当」と判断されたものを使用した。

## C. 研究結果

### 1. ヒト凍結肝細胞の収集

前年度、新生児期から成長期の肝細胞は、統計解析に十分な細胞が入手できなかったことから、今年度も引き続き細胞の収集を行った。追加および新規合わせて 7 ドナー由来の肝細胞を入手した。学童期のドナー由来の肝細胞ロットが少なく入手が困難であった。また、接着タイプの細胞は全ロットの半分以下を占めるにとどまった。今後は、特に学童期のドナー由来の肝細胞ロットを補充しつつ、調製した全サンプルの cDNA を用いて成長期における CYP および薬物代謝関連因子の特性について検討する。

## 2. LNR が幼若期 CYP mRNA および薬物動態因子におよぼす誘導作用

LNR を 4 歳時ドナー由来の肝細胞に曝露したところ、*CYP1A1* の顕著な発現増加が認められた。5  $\mu$ M から 75  $\mu$ M 濃度範囲において、溶媒対照の 14~587 倍の濃度依存的な増加が認められた。25  $\mu$ M および 75  $\mu$ M 濃度において *CYP1B1* と *CYP1A2* では、各々 16~56 倍、20~39 倍の有意な発現の増加が見られた。*CYP1A1*、*CYP1B1*、*CYP1A2* 発現の増加は、3-MC で最も強く、ついで LNR と OPZ の順であった(3-MC  $\gg$  LNR  $\cong$  OPZ) (図 1、2)。

また、*CYP1* ファミリー以外の分子種でも LNR による発現増加が認められた。LNR 75  $\mu$ M 曝露においては、*CYP3A4* (18 倍)、*CYP3A5* (11 倍増加)、*CYP2B6* と *UGT1A1* も僅かであるがそれぞれ溶媒対照の約 4 倍と 2 倍の増加が認められた(図 2、3)。LNR による影響は、*CYP2A6* および *GSTA2* では認められなかった (図 3)

LNR による *CYP1A1* の顕著な発現増加と、核内受容体 hAhR および hArnt の関連性を確認するため、HeLa 細胞にこれらの核内受容体および *hCYP1A1* 等を共導入した細胞を用いて *CYP1A1* レポーターアッセイを行った。LNR は、10 nM から 1000nM までの範囲で、濃度依存的な *CYP1A1* 発現の増加 (4.5 倍) が認められた。同時に行った 3-MC と OPZ とも比較した場合、*CYP1A1* 発現は、対照群に比べ、3-MC 100 nM では 4.5 倍の、LNR 100 nM では 2.7 倍の増加を示した。OPZ 200 nM では *CYP1A1* 発現の増加は認められなかった(図 4)。

## D. 考察

ヒト肝において *CYP1A* および *CYP1B1* の酵素活性とタンパク、および mRNA の発現は極めて低いことが知られている。同様に幼若期のドナーに由来するヒト肝細胞においても *CYP1* 分子種の発現は低いものの、*CYP1* mRNA は LNR 曝露により強く誘導された。特に *CYP1A1* mRNA に対する誘導効果が顕著 (75  $\mu$ M で、587 倍) であることから、幼若期のヒト肝細胞は、*CYP1* 分子種特に *CYP1A1* を強く誘導する能力を有することが示された。一方、生体内基質の代謝に関与することが知られている *CYP1A2* も LNR により強く

誘導されている (*CYP1A1*  $>$  *CYP1B1*  $\cong$  *CYP1A2*)。LNR による *CYP1A1* および *CYP1B1* mRNA の誘導は、今回初めて報告する。

我々は、同時に実施した LNR (5~75  $\mu$ M) の 24 時間曝露試験により、*CYP1A1/2* 酵素活性 (7-エトキシレゾルフィン脱エトキシ活性) レベルが、対照群の 4 倍~76 倍に上昇したこと、また *CYP1A1/2* タンパクレベル (ウェスタンブロット分析) も 1.8 倍~120 に増加することを確認しており、LNR は遺伝子レベル、活性レベルおよびタンパクレベルで *CYP1A1/2* を強く誘導することを確認した。LNR は幼児期における肝 *CYP1A* 分子種を著しく誘導し、LNR の毒性発現ならびに生体内基質の代謝バランスに与える影響が大きい可能性が示めされた。このように、ヒト肝において *CYP1* ファミリーを誘導することで毒性を発現する化学物質は、成体に比べ幼児期では毒性が強く現れる可能性が示唆された。また、*in vitro* の転写活性化系を用いて検討した結果、LNR は AhR を経て *CYP1A1* の転写を活性化させること、またその強さは、3-MC と OPZ の中間程度で有ることを示した。

ヒト細胞での LNR 誘導度結果は以下の通りで有る。

*CYP1A1*  $\gg$  *CYP1B1*  $>$  *CYP1A2*  $>$  *CYP3A4*  $\cong$  *CYP3A5*  $>$  *CYP2B6*

## E. 結論

1) 新生児期および乳児期におけるヒト肝細胞の *CYP1* mRNA の発現は低いものの、化学物質の曝露による *CYP1* 分子種の誘導機構は充分備わっており、幼若期の肝細胞を用いた mRNA を指標とする *in vitro* 代謝評価系は、幼若期における化学物質の毒性評価に有用であることが示された。

2) 除草剤として年間 80,000kg (平成 21 年度) が輸入され使用されている LNR がヒト *CYP1A1* mRNA および *CYP1B1* mRNA を強く誘導することを初めて報告する。また、LNR による *CYP1A1* mRNA の誘導度は、典型的な *CYP1A* 誘導剤として知られる OPZ と同程度であることを示した。

3) 今後は、得られたヒト肝細胞と共に、ラットでの検討を行いヒトとの類似性あるいは差異について解析し、また、公的に提供される毒性 QSAR、および *CYP1* による代謝

予測ソフト (2012 NEDO による提供予定)  
を活用することで、化学物質の *in vitro* 毒性  
評価について検討する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- [1] R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 400 (2011) 153–155.
- [2] 簾内桃子, トキシコキネティクス, 代謝試験の実験手法. 最新 動物実験代替法の技法ノウハウ. 小島 肇監修 (2011) pp 262-270 (東京)

##### 2. 学会発表

- [1] M. Sunouchi, A. Miyajima-Tabata, R. Kikura-Hanajiri, S.-R. Kim, T. Kubo, S. Ishida, M. Usami, Y. Sekino. Inducibility of CYP1A by linuron in primary cultured human hepatocytes. The 47th Congress of the European Society of Toxicology, Paris, 2011.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

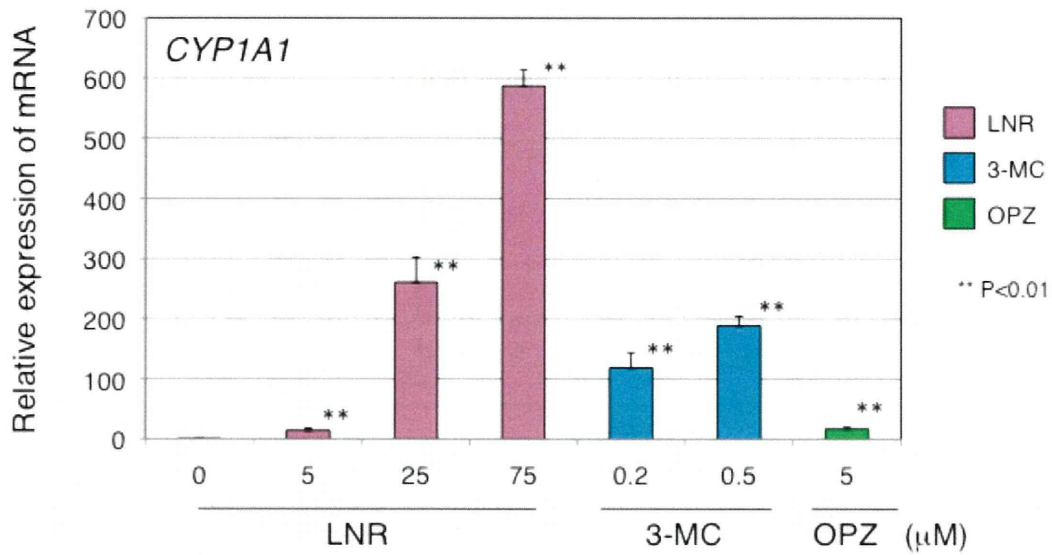


図1. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが *CYP1A1* mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP1A1* mRNA in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean  $\pm$  S.D. (n= 3).

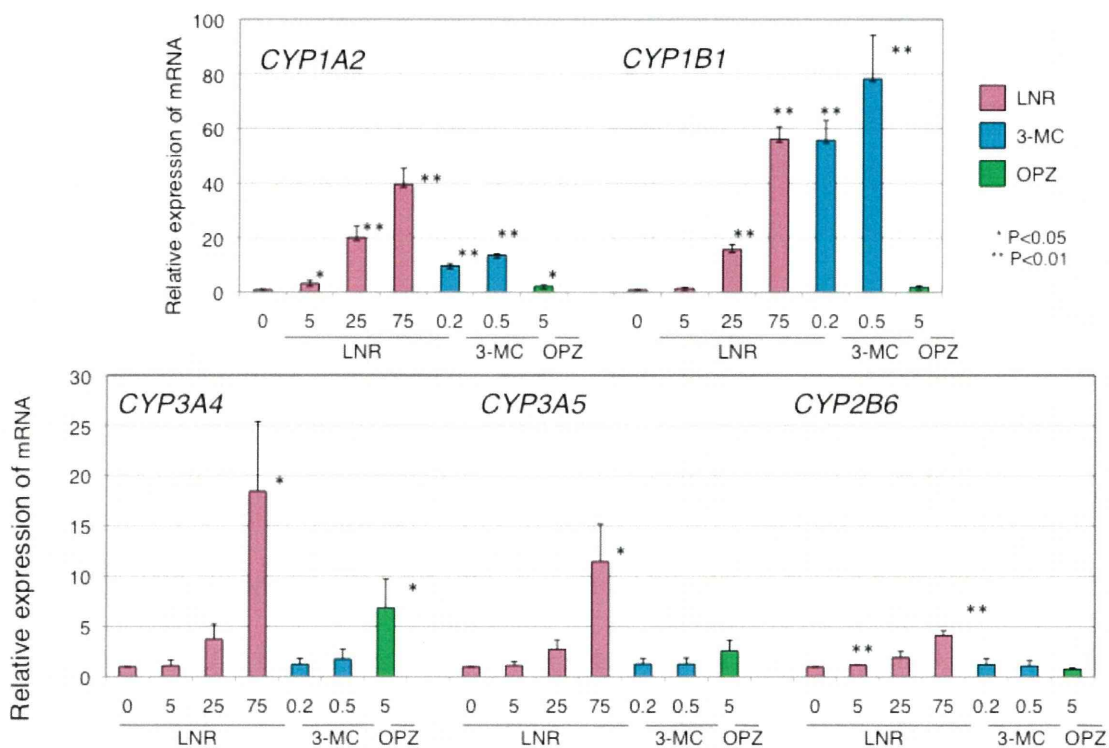


図2. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが種々の *CYP* mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5* and *CYP2B6* mRNAs in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean +/- S.D. (n= 3).

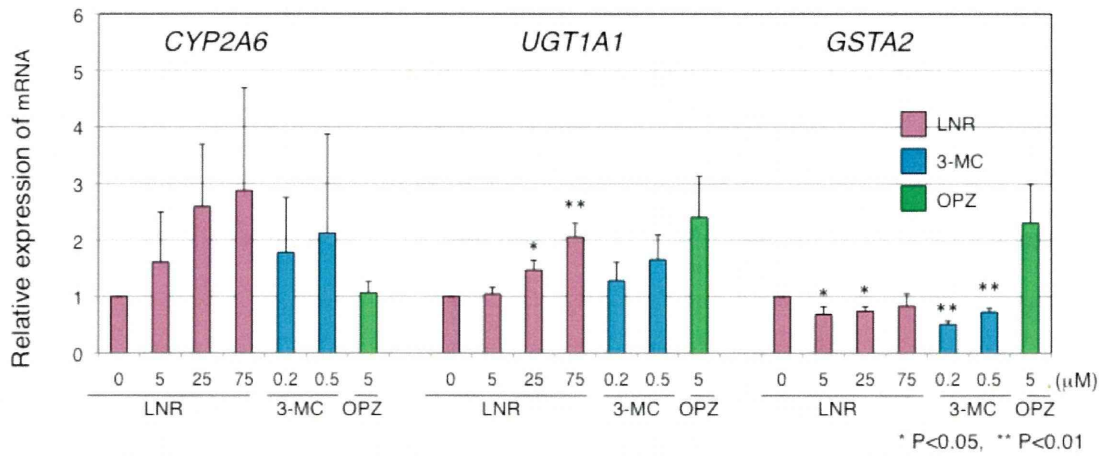


図3. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが *CYP2A6*、*UGT1A1* および *GSTA2* mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP2A6*, *UGT1A1* and *GSTA2* mRNAs in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean  $\pm$  S.D. (n= 3).

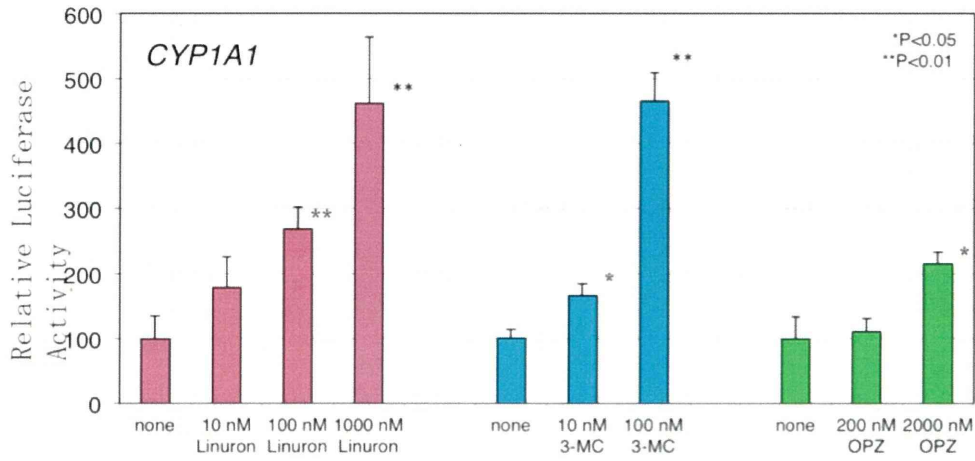


図4. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールによる *CYP1A1* 転写活性  
 HeLa cells were transfected with hAhR expression, hArnt expression, pGL3-*CYP1A1* reporter, and phRL-TK plasmids. The cells were cultured with vehicle (none), linuron, 3-MC and OPZ for 48 hours. Relative luciferase activity was shown as the activity of vehicle (set as 100). Columns represent the mean  $\pm$  S.D. (n= 3).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

成長期の脳辺縁系回路機能解析による評価法の開発

研究分担者 関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第 室長  
研究協力者 笛田 由紀子 産業医科大学 産業保健部 講師  
研究協力者 吉田 祥子 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 講師

研究要旨

発達神経毒性試験は、経済協力開発機構（OECD）の化学物質の毒性試験に関するガイドライン（TG426）として 2007 年に制定された。この毒性試験は日本国内では義務づけられた試験法ではないが、化学物質の子供への健康影響評価を行う上で重要な評価項目であり、化学物質が神経系に影響をもたらす懸念がある場合には、発達神経毒性を評価する必要があると考えられる。発達期の脳は柔軟性に富み、ある特定の一時期の経験が生涯にわたり影響を残すことはよく知られている。したがって、発達期の一時期に有害な化学物質に神経系がさらされた場合の影響は予想以上に大きいと考えられる。TG426 では母体（ラット）に化学物質を投与し、仔の成長期と成熟後にわたって行動観察実験と神経病理学的検査を行うこととなっている。この試験は時間がかかる上に、行動観察による行動異常の検出には実験者の熟練を要し、さらに実験結果の定量的判定が難しいという種々の難点がある。そこで、生後の比較的早い時期に成熟後の行動異常を予測させる発達指標を選定してインビトロ実験系で評価できる簡易な試験法を開発することが重要である。新たな試験法により試験期間が大幅に短縮され、使用動物数が大幅に削減されると予想され、その結果、脳神経機能の発達に有害な作用をもたらす化学物質から子供を守ることができる。成長期の脳の経験に対する感受性の高い時期である臨界期は $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）が関連する抑制性神経回路機能の発達により決定されている。そこで本研究では、発達期の脳組織での GABA による抑制機能を測定する種々のインビトロ実験手法が、化学物質の成長期における神経系への影響の評価系として利用可能であるかを検証した。対象とした脳部位は、情動を司る扁桃体、運動機能を司る小脳、記憶と学習を司る海馬である。細胞外に遊離される GABA を酵素で可視化する実験法では扁桃体と小脳の GABA の細胞外遊離の生後変化を観察し、海馬神経回路の反回抑制を電気生理学的に定量的に評価する実験法により、反回抑制の生後発達を追った。抑制性神経回路機能をインビトロ実験で調べるこれらの手法は、化学物質の成長期における神経系への影響の評価系として利用可能である。化学物質の安全性を評価する試験法は、新しい科学的知見により随時見直しされるべきであり、今後の試験法に GABA 抑制の生後発達を発達指標として取り入れることを提案する。

A. 研究目的

脳の成長に有害な化学物質から子供の健康を守るためには、2007 年に OECD 毒性試験に制定された発達神経毒性試験法（TG426）は重要な毒性試験法である。しかし、この試験法は日本国内では義務づけられていないため、化学物質の発達期の脳に対する安全性データの蓄積はない。TG426 では、母体（ラット）に化学物質を投与し、仔の成長期と成熟後にわたって行動観察実験と神経病理学的検査を行うこととなっている。この試験は時間がかかる上に、行動観察による行動異常の検出には実験者の熟練を要し、さ

らに実験結果の定量的判定が難しいという種々の難点がある。そこで、生後の比較的早い時期に成熟後の行動異常を予測させる発達指標を選定してインビトロ実験系で評価できる簡易な試験法を開発する必要がある。成長期の脳の経験に対する感受性の高い時期を臨界期というが、この臨界期は GABA が関連する抑制性回路機能の発達により決定されている。そこで本研究では、発達期の脳の脳組織での GABA の機能発達を測定する種々の手法が、化学物質の成長期における神経系への影響の評価系として利用可能であるかを検証した。



動物を用いた試験結果のヒトへの外挿性を担保するためには、ヒトでも動物でも共通の機能バイオマーカーを設定する必要がある。GABA は、ヒトでも動物でも成熟脳の抑制性神経機能を担う伝達物質である。したがって、GABA の機能を評価の対象とすることで、動物を使った試験結果をヒトに外挿することが可能となる。また、扁桃体が情動を司り、小脳が運動機能を司り、海馬が記憶と学習を司るということに関しても、動物とヒトで共通している。さらに、成長期の脳の経験により機能を獲得していく可塑性の高さを決定する臨界期は、動物でもヒトでも GABA の機能発達により決定されている。このように GABA の機能は、動物にもヒトに共通するメカニズムである。成長期の GABA の働きは、脳の発達において重要な鍵である。近年、自閉症、統合失調症、気分障害などの原因として GABA 機能の発達異常が示唆されている。

膜電位感受性色素による抑制性応答を可視化する実験法、細胞外に遊離される GABA を酵素で可視化する実験法、海馬神経回路の反回抑制を電気生理学的に定量的に評価する実験法、の3つのインビトロ実験法を比較検討した。

本年度の研究目的は、GABA 機能の生後発達のインビトロ評価系の確立にある。本年度の実績に基づき、来年度は抗てんかん薬であるバルプロ酸 (VPA) の発生神経毒性に関する検証をおこなう予定である。VPA には、催奇形性の報告もあり、子供の自閉症発症との関連も示唆されている。吉田らは、来年度に向けて、母体ラットに対する VPA の投与の仔ラットの生後発達に対する効果について予備実験を行っている。

## B. 研究方法

研究分担者関野祐子は、マウス扁桃体スライスを用いて、膜電位変化のイメージングをおこない、成熟した扁桃体の抑制性応答を観察した。実験は、国立医薬品食品衛生研究所薬理部にて行われた。また、扁桃体スライス標本からの GABA 放出分布の生後変化を観察した。この実験は、浜松医科大学生理学第一講座 福田敦夫教授の指導のもと、森島助教とともに、浜松医科大学にて行われた。

研究協力者の吉田祥子は、発達期小脳皮質での GABA 放出分布を観察する実験を行っ

た。

研究協力者の笛田由紀子は、海馬スライスを用いて、2回の連続した電気刺激 (ダブルパルス) に対する電氣的応答比を測定する実験を行った。応答比は GABA 性の反回抑制系の強さを示すものである。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、関係者が所属する研究機関に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をしながら研究を進めた。

## 脳スライス標本の作製

扁桃体スライス標本は、マウス脳より作成した。小脳スライス標本、海馬スライス標本はラット脳より作成した。

実験対象のラットまたはマウスをエーテルまたはハロセンで深麻酔したのち断頭し速やかに小脳、大脳を取り出した。McIlwain tissue chopper またはビブラトーム型スライサーを用いて、厚さ 400~450  $\mu\text{m}$  (2週齢ラットから海馬スライスを切り出す場合には厚さ 600  $\mu\text{m}$ ) の扁桃体、小脳、海馬スライス標本を作成した。

扁桃体スライス実験に用いた人工脳脊髄液の組成は NaCl 119; KCl 2.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1;  $\text{CaCl}_2$  2.5;  $\text{MgSO}_4$  1.3;  $\text{NaHCO}_3$  26; Glucose 11 (mM)であった。扁桃体スライス標本 (図 1A) は、遊離 GABA のイメージングに使う場合には、そのままリザーバーで1時間以上保存した後に実験に用いた。また、膜電位感受性色素による膜電位変化のイメージングを行う場合には、膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS (10  $\mu\text{M}$ ) (図 1B) で5分間染色したのちリザーバーに移動して1時間以上静置した後に実験に使用した。海馬スライス標本の作製時に用いた人工脳脊髄液の組成は、NaCl 124; KCl 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25;  $\text{MgSO}_4$  2;  $\text{NaHCO}_3$  26; glucose 10 (mM)、実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl 124; KCl 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25;  $\text{CaCl}_2$  2;  $\text{MgSO}_4$  2;  $\text{NaHCO}_3$  26; glucose 10 (mM)であった。スライスは Haas 型チャンバー内で記録開始まで約 2 時間静置した後に実験に用いた。

1. 膜電位感受性色素により膜電位変化をイメージングして GABA 機能を評価する方法 (研究分担者: 関野祐子)

成熟マウスの扁桃体の外側部を走行する

外包に同心円型刺激電極を挿入して電気刺激を行った(強さ;10~50  $\mu$ A、持続時間 200  $\mu$ 秒)。スライス内の神経細胞集団の応答は、落射式蛍光顕微鏡(MVX-10; オリンパス)と CMOS センサーを搭載した光量差分増幅カメラシステム(ULTIMA; ブレインビジョン)で撮影した(図 1C)。撮影は1ミリ秒ごとに行い、合計 1024 フレームを記録した。これを 20 秒ごとに 5 回行い、加算平均したものをデータとして用いた。神経応答による膜電位変化は光量変化として捉えた。記録開始時の蛍光量を 100%として、刺激等による蛍光量変化を単位%で測定し、疑似カラーで、脱分極方向の変化を緑色から赤色で表現し、過分極方向の変化を青色から紫色で表現した。

2. 脳組織から遊離される GABA を可視化して空間分布を解析する方法(研究分担者: 関野祐子(扁桃体)、研究協力者: 吉田祥子(小脳))

GABA 放出分布を測定するには、ガラス表面に固定化した GABA 分解酵素(GABase)を用いた蛍光測定法を使用した。GABase は GABA 転移酵素とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素の複合体で、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸(NADP+)存在下で GABA を異化し、コハク酸とグルタミン酸に分解する。このとき同時に、NADP+は NADPH になり、360 nm 近辺の励起光により、480 nm の蛍光を発する。この蛍光によって、GABA 放出を間接的に光学測定することができる(発表論文参照)。石英ガラスに分解酵素のアミノトランスフェレーズとコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素を担持する。種々の週令のラットまたはマウスの脳から作成した小脳と扁桃体スライスをのせて、脳スライス表面から遊離する GABA が  $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下で最終産物のコハク酸に分解される際に発生する NADPH の蛍光を高感度 CCD カメラで観察した。

3. ダブルパルス刺激により反回抑制を測定して GABA 機能を評価する方法(研究協力者: 笛田由紀子)

成獣ラットにおいてダブルパルスへの応答比は GABA 性の反回抑制(反回抑制ともいう)系の強さを表す。この評価系を発育期

の海馬に適用した。脳発育期のラットは母ラットへのストレスによってその発達が影響を受けるので、すべてのラットは産業医科大学産業保健学部吸入曝露実験室において妊娠ウィスターラットから出産させた対照群雄性ラットを今回用いた。

ラットをエーテルで深麻酔したのち断頭し速やかに大脳を取り出した。McIlwain tissue chopper で厚さ 450  $\mu$ m (2 週齢ラットは厚さ 600  $\mu$ m) の海馬スライス標本を作成した。ラット 1 匹あたり最大 6 枚のスライス標本を得ることができた。

刺激電極にはステンレスの双極電極(直径 50  $\mu$ m)を用い、CA3 領野から CA1 錐体細胞への入力線維が密集するシナプス層に置いた。記録電極にはガラス微小電極を用い(抵抗 1-2 M $\Omega$ )、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位を、シナプス層から集合シナプス後電位を記録した。刺激電極と記録電極の間隔はスライスごとに実体顕微鏡下に測定し 210-250  $\mu$ m になるようにした。

### C. 研究結果

#### 1. 膜電位変化のイメージングによる GABA 機能の評価方法

脳スライス内の神経活動を同時多点的に観察出来る膜電位変化の光イメージング法を用いると、神経回路内の興奮性神経活動と抑制性神経活動の時間的空間的伝播パターンを解析できる。本実験においてマウス冠状スライスにおける扁桃体への入力線維が走行する外包を電気刺激すると、扁桃体外側核(LA)領域全体に脱分極性応答が広がった後に、過分極性の応答が観察された(図 2A)。この過分極性の応答は持続時間が長く 600~800 ミリ秒持続した。この持続時間の長い過分極性応答が GABA による抑制性の応答であることを確認する目的で、GABA 受容体阻害薬により検証した。GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬を投与するとてんかん波が発生した。波形解析が困難となったため、GABA<sub>B</sub> 受容体阻害薬を用いたところ、持続時間の長い過分極成分が阻害された(図 2B)。従って、扁桃体スライスで外包を刺激した際に LA 内に観察される過分極に対応する光信号は、GABA に由来する抑制性の応答であることが判明した。

#### 2. 脳組織から遊離される GABA を可視化

して空間分布を解析する方法

## 扁桃体

マウス扁桃体スライスから放出される GABA を可視化する方法により、GABA 機能の生後発達を観察した (図 3A)。生後 14 日の扁桃体の各亜核から GABA の遊離は観察されなかった (図 3B) が、生後 36 日になると扁桃体内の LA と中心核 (Ce) では GABA 遊離は観察されないが、基底外側核 (BLA) での GABA の遊離が観察された (図 3C)。情動を司る扁桃体において、細胞外への GABA の遊離の空間パターンが生後に大きく変化することがわかった。

## 小脳

ラット小脳皮質では、GABA はゴルジ細胞・バスケット細胞・星状細胞から放出される。一方、神経細胞が未分化な生後一週間では、皮質内のグリア細胞から GABA が放出され、顆粒細胞の増殖と分化を促進している (吉田 学会発表 5)。

この方法で発達期小脳皮質の GABA 放出を観察すると、生後 3 日～7 日では、皮質上部にグリア細胞由来の GABA 放出が観察された (図 4A; P1 と P3) が、生後 8 日にはこれが消失し、神経細胞由来の GABA 放出に転換することがみられた (図 4A; P8) (吉田 学会発表 3)。これらの GABA 放出は、単離したグリア細胞からも観察された (吉田 学会発表 1)。

バルプロ酸 (VPA) による GABA 代謝の変化がこれらの発達期小脳皮質内の GABA 放出と小脳分化に与える影響を調べるために、妊娠 16 日から 19 日のラット腹腔内に 600 mg/kg の VPA を投与した (data not shown)。生まれたラットを生後 5 日 (P5)、P6、P8、P10、2 週間において小脳スライス標本作製し、GABA 放出分布を光学測定した。同時に、出生仔の体重変化を観察した。

VPA 投与ラットから生まれた仔ラットでは、生後 3 日から 14 日にかけて体重が有意に大きく、小脳では、発達が早まっている傾向が観察された。妊娠 16 日から 19 日に生理食塩水を腹腔内投与した対照群では、このような変化は見られなかった。

VPA 投与ラットでは、当初危惧された食殺、出産障害などはみられなかったが、生後 7 日ごろ突然死する場合があった。VPA による GABA 代謝の変化が、脳の発達に何らかの影響を及ぼしていることが推測される。

今後、VPA の濃度、投与方法を検討しながら、VPA 投与が小脳皮質での GABA 放出に与える影響を、光学測定を用いて検討する。

## 3. ダブルパルス刺激により反回抑制を測定して GABA 機能を評価する方法

実験はまず、集合スパイク電位の振幅 (PS amplitude) と集合シナプス後電位の傾き (slope) の刺激応答曲線を作成して、最大の集合スパイク電位が記録される電気刺激の大きさ (最大の電気刺激値) を求めた。その最大の電気刺激値でダブルパルス刺激を実施し神経細胞の応答を記録した。解析した比は次式で計算した。集合スパイクや集合シナプス後電位の記録部位、波形については図 5 に示した。

PS の比 = 2 回目の PS の振幅 / 1 回目の PS の振幅、Slope の比 = 2 回目の slope / 1 回目の slope

これらの比の大きさが 1 に近ければダブルパルスによって誘発された応答が独立した応答であることを意味する。すなわち反回抑制の効果は非常に小さいか無いに等しいと解釈される。比が 1 より小さいほど、2 回目の刺激で誘発された応答は 1 回目の応答と比較して小さく、反回抑制が強いという解釈が成り立つ。1 回目の刺激に対する応答に比べ 2 回目の刺激に対する応答が GABA 性の反回抑制により小さくなることを利用して、GABA 抑制の強さを定量的に評価した。

海馬 CA1 領域から記録した集合スパイク電位と集合シナプス後電位からそれぞれ比を求めた。また刺激間隔は GABA 系の効果がどのくらい続くかをみるために 20 ミリ秒まで調べた。その結果を図 6 にまとめた。CA1 領域の神経細胞への入力部位であるシナプス層で得られた集合シナプス後電位のペアパルス比は、脳発達期の 2 週齢でほかのどの週齢の値よりも大きかった。集合スパイク電位の比も脳発達期である 2 週齢で値が 2 を超えており、他の 3 群の値 (1 以下) よりも顕著に大きかった。

## D. 考察

GABA 機能の正常な発達には脳機能発達に重要な過程である。特に脳においては興奮性シナプスよりも抑制性シナプスの機能はそれに遅れて発達する。生後の脳の経験に対する特別な感受性の高さは GABA による抑制

系の発達とともに終了することが、近年神経科学により明らかにされた。したがって、GABA 機能の生後発達は、神経毒性評価において重要な指標である。化学物質の安全性を評価する試験法は、新しい科学的知見により随時見直しされるべきであり、今後の試験法に GABA 抑制の生後発達を発達指標として取り入れることを提案する。

本研究において、遊離 GABA を可視化する方法と、ダブルパルス刺激を用いて反回抑制を調べる方法により、GABA 機能の生後発達が簡便に再現性高く評価できることが判明した。一方、膜電位変化を可視化する方法では、本年度中に生後変化に関する実験が行えなかったために、その有用性を検証することはできなかった。

統合失調症や自閉症が興奮と抑制のアンバランスにより生ずることが近年明らかになり、GABA 機能の生後発達を検証することは、生後の比較的早い時期に成熟後の行動異常を予測するために重要な発達指標である。インビトロ評価系により、生後の早い時期に GABA 機能の生後発達の異常が検出できれば OECD (TG426) で提案されている発達神経毒性試験の実験項目と比較すると、試験期間が大幅に短縮され、使用動物数が大幅に削減されることが期待される。

発生神経毒性試験における発達指標として、生後の GABA 機能変化を定量的に捉えるインビトロ実験として、脳スライス標本を用いる複数の評価方法を比較検討し、簡便性、定量性、実験者ごとのデータの再現性について考察すると、以下ようになる。

関野らが行った膜電位変化を可視化する実験方法は簡便ではあるが、実験系が高価であることが多施設での実験によるバリデーションにおいて障害となる可能性がある。またその他の問題として、過分極応答のパターンが刺激の強さに依存するため、生後発達に伴う抑制応答の空間パターンの変化を比較する際に実験者ごとのデータのばらつきが大きくなる可能性がある。この方法により大脳辺縁系の抑制性回路の成熟を比較評価するためには、パラメータを決定するまでに今後いくつかの条件検討が必要である。たとえば、興奮/抑制バランスの比をとる、薬物に対する反応性を見るなど、多施設間の試験を可能とする定量化パラメータを検討することが優先的課題である。

吉田らが開発した、脳組織から遊離する GABA を可視化してその分布を調べる方法は、ガラスへの酵素の担持に熟練を要し、感度の良い CCD カメラを必要とするが膜電位変化のイメージング法に比べれば安価であり、すでに設備の整っている実験室も多いことから多施設間比較は可能である。実験そのものは非常に簡便であり再現性も高い。さらに、脳の成熟にともなって起こる遊離部位の変化は、扁桃体でも小脳でも非常に大きいため、遊離の空間パターン変化が各脳部位で起こる時期を調べることは、発達指標として非常に有望である。吉田らは、小脳スライスを用いて VPA を母体に投与する予備実験を行ったところ、小脳において GABA の機能発達が早まっていることが示唆されている。神経毒性の評価系としての有用性が期待できる。

笛田らが行っている海馬スライスのダブルパルスによる反回抑制を定量化する方法は、他の電気生理学的手法に比べると数段修得率の高い方法である。

笛田らの研究によると、反回抑制を評価する方法は簡便であり、生後発達変化が明確であり、かつ定量性が高いと言える。成熟した脳のネットワークで説明すると、例えば興奮性ニューロンのインパルスが抑制性ニューロンへのシナプスに伝わり、抑制性ニューロンが活性化することによってその軸索終末部から興奮性ニューロンへ GABA を放出するという回路である。つまり、興奮性ニューロンが自らの興奮によって周辺に存在する GABA ニューロンを活性化して、興奮性ニューロン自身の興奮が過剰にならないように自己制御するというニューロンが正常に機能して続けるための戦略的回路ともいえる。比の大きさが 1 に近ければダブルパルスによって誘発された応答が独立であることを意味する。すなわち反回抑制の効果は非常に小さいか無いに等しいと解釈される。比が 1 より小さいほど、2 回目の刺激で誘発された応答は 1 回目の応答と比較して小さく、反回抑制が強いという解釈が成り立つ。この応答の比に本当に GABA 系の活性化が関与しているかどうかは、GABA<sub>A</sub> 受容体の拮抗薬であるビククリンで比が大きくなること、逆に作用薬たとえばフェノバルビタールなどで比が小さくなることが観察される必要がある。今回の結果では、反回抑制が成長とともに