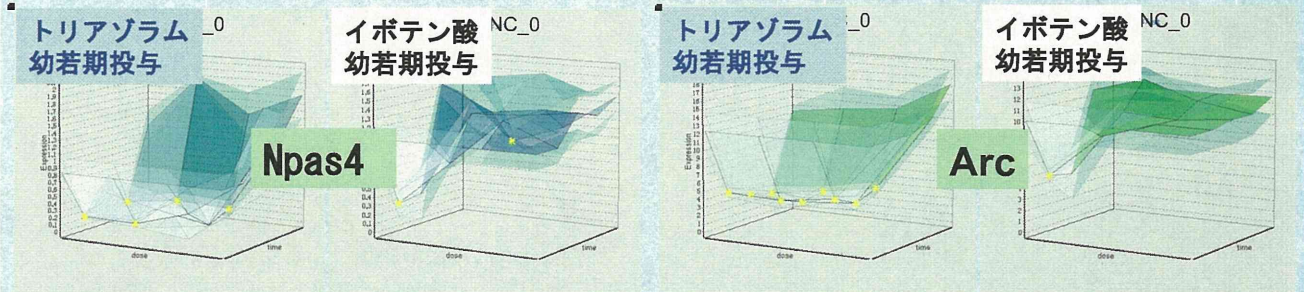


両化学物質を幼若期投与した際に、共通して発現**減少**が認められたNpas4、Bdnfを含む遺伝子リスト =

「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性が高い



14 ps [13遺伝子]のほとんどが「トリアゾラム」、「イブuprofen」共に、Npas4の場合と同様な発現パターンを示した
 ⇒ Npas4と同じ局所シグナルネットワークである可能性が高い [発見]
 = 「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性がある

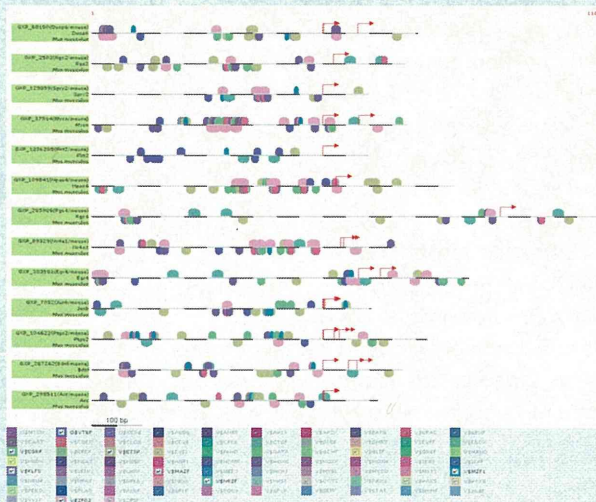
海馬

by Dr Igarashi, K

一幼若期に「トリアゾラム」「イブuprofen」を投与した際に共通して発現減少したNpas4遺伝子を含む13遺伝子について—

遺伝子リスト14 probe sets = 13遺伝子

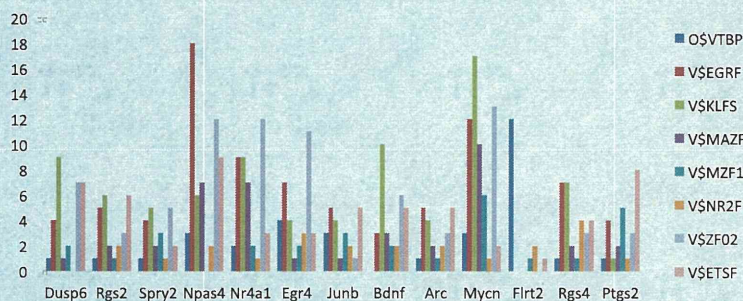
Genomatix



- 13遺伝子全てのプロモーターに共通する転写因子結合配列はV\$ETSFであった。
- 12遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列は8種、Q\$VTBP、V\$EGRF、V\$KLFS、V\$MAZF、V\$MZF1、V\$NR2F、V\$ZF02、V\$ETSFであった。

各プロモーターにおける転写因子結合モチーフ数

	Dusp6	Rgs2	Spry2	Npas4	Nr4a1	Egr4	Junb	Bdnf	Arc	Mycn	Firt2	Rgs4	Ptgs2
O\$VTBP	1	1	1	3	2	4	3	0	1	3	12	1	1
V\$EGRF	4	5	4	18	9	7	5	3	5	12	0	7	4
V\$KLFS	9	6	5	6	9	4	4	10	4	17	0	7	1
V\$MAZF	1	2	2	7	7	1	1	3	2	10	0	2	2
V\$MZF1	2	1	3	0	2	2	3	2	1	6	1	1	5
V\$NR2F	0	2	1	2	1	3	2	2	2	1	2	4	1
V\$ZF02	7	3	5	12	12	11	1	6	3	13	0	3	3
V\$TSEF	7	6	2	9	3	3	5	5	5	2	1	4	8



V\$EGRF及び V\$ZF02は、
Npas4遺伝子のプロモーター
上に結合モチーフ数が多い

81

Npas4に著者らが着目した経緯

Npas4 is regulated by neuronal activity

The formation of inhibitory synapses onto excitatory neurons is regulated by neuronal activity, takes place over several days, and is a cell-wide process that results in the formation of synapses onto both the cell body and dendrites. These features led us to hypothesize that activity-dependent development of inhibitory synapses might be controlled postsynaptically by one or more activity-regulated genes. To test this hypothesis, we used DNA microarrays to identify genes that are induced by membrane depolarization in mouse cortical neurons at the time when inhibitory synapses are developing.

We identified more than 300 genes whose expression levels were altered upon membrane depolarization (Gene Expression Omnibus accession number GSE11256), a third of which were novel activity-regulated genes not seen in previous screens. We looked for genes predicted to encode transcription factors, reasoning that, through genome-wide characterization of the targets of an activity-regulated transcription factor that controls inhibitory synapse number, we could gain insight into the biological program that is important for inhibitory synapse development. Among the approximately 20 known or putative transcription factors identified, we focused on genes that are selectively induced by Ca²⁺ influx in neurons but not other cell types, that are transcribed in response to excitatory synaptic activity, and that are expressed coincidentally with the development of inhibitory synapses. One transcription factor, the bHLH-PAS family member Npas4, fulfilled all these criteria (Fig. 1) and was investigated further. Unlike other activity-dependent transcription factors such as CREB and c-fos, Npas4 expression in neurons is selectively induced by Ca²⁺ influx but not by several neurotrophic factors, growth factors or forskolin, an activator of protein kinase A (Fig. 1b). Npas4 is induced in cultured neurons by the GABAA-receptor antagonist bicuculline,

Npas4のノックダウンにより変動した遺伝子 [海馬の初代培養神経細胞を利用]

Supplemental List

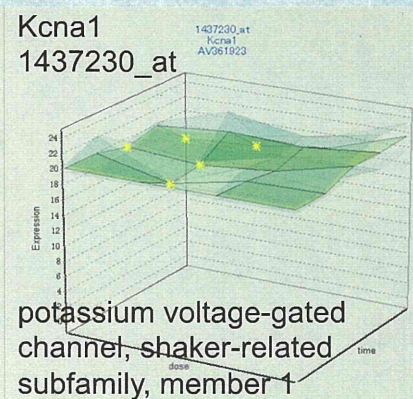
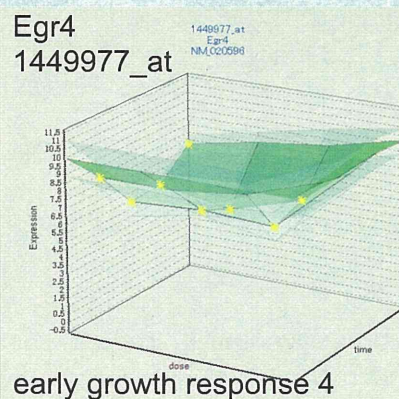
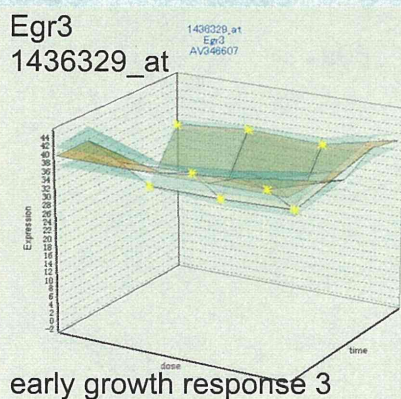
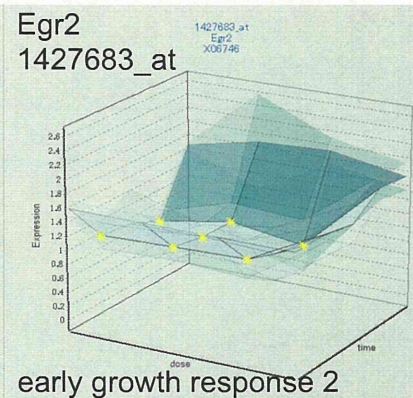
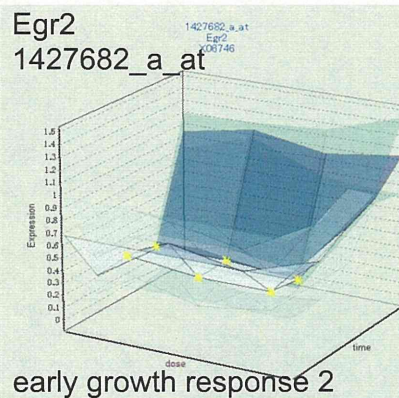
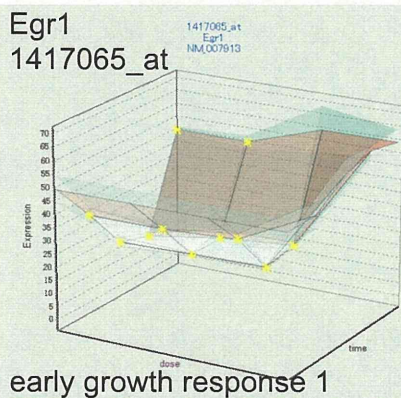
To uncover the program of gene expression controlled by Npas4, we acutely knocked down Npas4 expression in a high percentage of wild-type neurons using a lentivirus expressing Npas4-RNAi and performed a second DNA microarray experiment to identify activity-regulated genes that are misregulated in the absence of Npas4. The expression levels of 327 microarray probe sets representing 270 unique genes were significantly different in cultures...

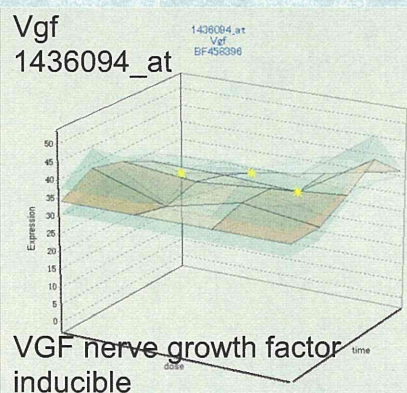
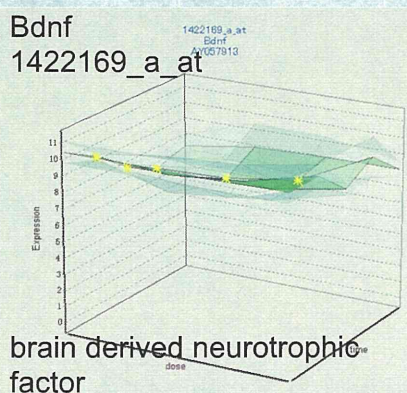
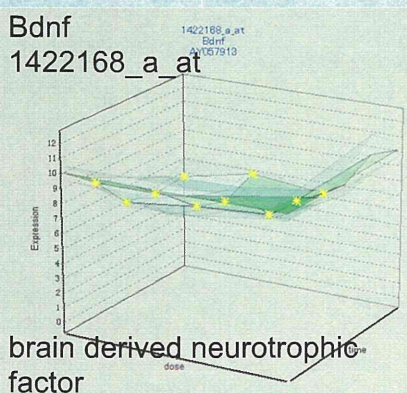
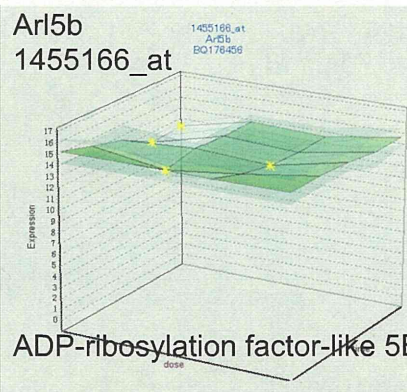
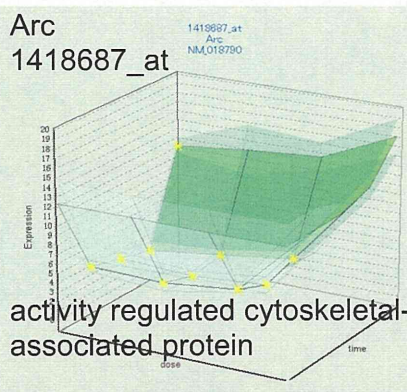
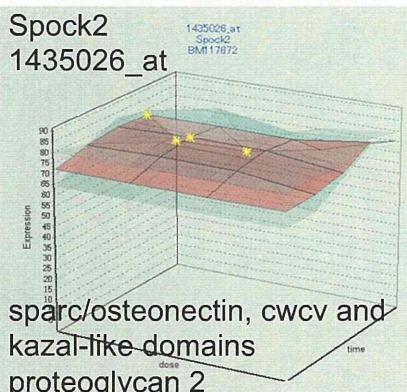
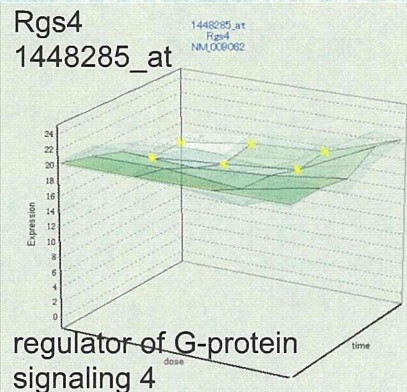
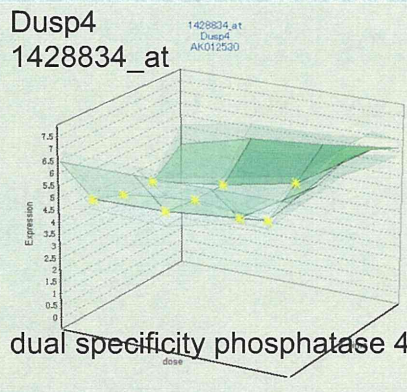
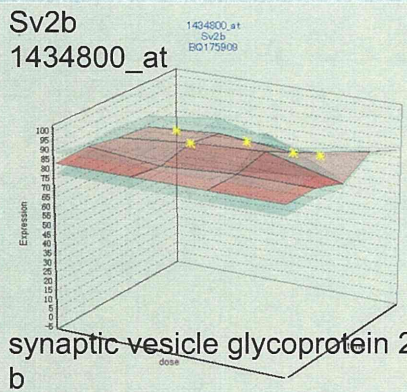
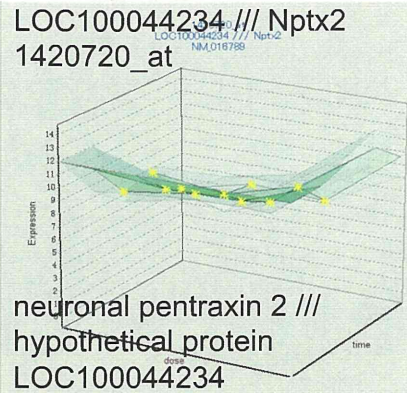
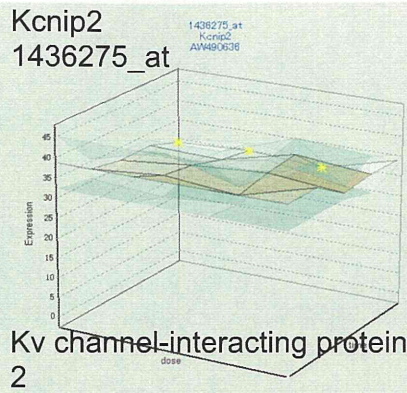
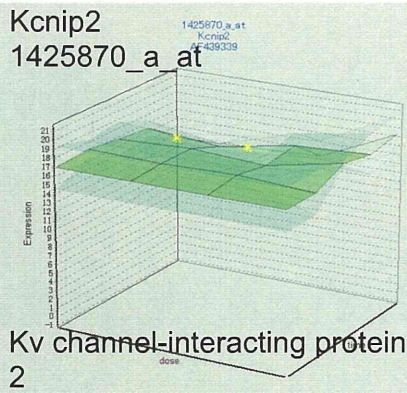
Npas4のノックダウン：

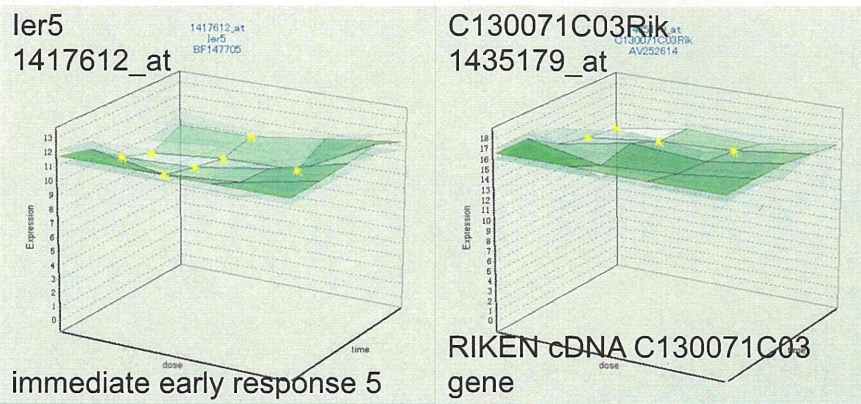
Down: 92 ps ⇒ 我々の実験結果では、このうち20 psが減少
Bdnf, Arc, Dusp4, Egr4, Rgs4, Kcna1が含まれていた

Up: 235 ps ⇒ 我々の実験結果では、顕著に増加するものなし

83







87

Npas4のノックダウン：

Down: 92 ps ⇒ 我々の実験結果では、このうち20 psが減少
Bdnf, Arc, Dusp4, Egr4, Rgs4, Kcna1が含まれていた

Junb (Jun-B oncogene)、**Nr4a1** (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1= nerve Growth factor IB (NGFIB)) は、論文でのSupplement List 中 (増加、減少共に) に存在せず、これらの遺伝子とNpas4遺伝子との関連には新規性がある。

88

**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**

発生-発達期ビスフェノールA 暴露による遅発行動影響と中枢解析

研究代表者 種村健太郎

東北大学大学院農学研究科 准教授

【研究要旨】

発生-発達期におけるビスフェノールA 暴露による遅発中枢影響を明らかにする目的で、マウスに交配から離乳期まで飲水投与（妊娠期は経胎盤暴露、授乳期は経母乳暴露）し、成熟後に行動解析、遺伝子発現解析、形態解析を行った。その結果、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。また網羅的遺伝子発現解析から、タウの生化学正常影響による軸索機能不全が疑われた。さらに形態解析より、神経突起形成・剪定不全による神経回路影響が推測された。

A. 研究目的

先行研究において、胎生期及び幼若期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の成熟マウスへの投与による神経毒性試験法（所謂、FOB:機能観察総合評価）からは想定困難な遅発性の情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、加えて対応する神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。

この神経系の発生-発達期における神経伝達物質受容体を介した神経シグナルかく乱について特筆されるのは、直接的な細胞障害を惹起しないレベルの神経作動性化学物質暴露が、微細な脳構造形成不全や神経回路構築異常を誘発し、成長後に情動認知行動異常として顕在化する事である。

そこで本研究では、上記の遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコールの確立、及

び客観的評価指標の提案を目指す。

そのため、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等を普遍的な基準点と位置付け、情動認知行動及びこれに対応する神経科学的物証項目（微細形態、タンパク発現・遺伝子発現、神経回路機能等）の異常所見をスコア化し、神経作動性化学物質による異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法の提案を目的とする。

具体的には、複数のエストロゲン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスを基準点とし、NACs としては、ER 結合性化学物質として理解されているジエチルスチルベストロール（DES）、ビスフェノールA（BPA）、及びビスフェノールAF（BPAF）を取り上げる。本年度は、特にBPA についての解析を行う。

B. 研究方法

C57BL/6NCrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた。BPA の投与は、交配から離乳時(4週齢時)まで飲水投与とし、遮光プラスチック製給水ビン(BPAの溶出が検出感度以下であることを確認してある)を使用した。給水ビンは週2回(月木または火金曜日)交換した。BPA 投与液の作製にあたっては、まずBPAのエタノール溶解液を作製し、これを水道水中にエタノールの最終濃度が0.01%となるように添加した。BPAの用量設定は、BPAの耐容一日摂取量(TDI)である50 ug/kg/日を鑑み、0、0.06(低用量)、1(中用量)、15ppm(高用量)に設定した。離乳時に雄のみをランダムに選別し、1ケージに4匹ずつ群飼いと、生後12週齢から13週齢にかけて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十時迷路試験、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バッテリー式行動解析を行った。さらに生後14週齢にかけて、ホールボード試験、追加的に条件付け学習記憶試験を行った。生後15週齢時に、マウス海馬について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析(パーセローム法による)を行い、Ingenuity Pathway Analysisによるパスウェイ解析を行った。また、特に神経細胞突起について形態解析を行った

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

行動解析の結果、①高用量暴露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が、②低、中、高用量暴露群のすべてに明暗往来試験における暗所潜在時間の減少が、③低、中用量暴露群に、高架式十時迷路試験における開放アーム選択数の増加がみとめられた(t-test、 $p < 0.05$)。④条件付け学習

試験では異常の検出に至らなかったが、試験直後に興奮状態の持続が観察された。また⑤プレパルス驚愕反応抑制試験についても異常は認められなかった。⑥ホールボード試験では、低、中、高用量暴露群のすべてに覗き回数および時間の増加が認められた。⑦てがかり音の変更、条件付けボックス内壁の変更、フットショックの強度および回数を変更し、追加的に行った条件付け学習記憶試験から、中、高用量暴露群に場所-連想記憶異常が認められた。⑧網羅的遺伝子発現解析から、用量依存的に遺伝子発現抑制傾向($p < 0.01$, ratio > 1.2)が認められるとともに、神経細胞の細胞内骨格タンパクのひとつであるタウの修飾影響を示唆するパスウェイが抽出された。⑨免疫組織化学解析から、海馬において樹上突起マーカーのひとつであるMAP1Aの増加傾向、軸索マーカーのひとつであるニューロフィラメントの減少傾向が用量依存的に認められた。

D. 考察

行動解析結果から、BPA暴露による遅発神経影響として、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。特にホールボード試験結果から、GABAシグナル、またはセロトニンシグナルへの影響が疑われた。また網羅的遺伝子発現解析から、タウの生化学正常影響による軸索機能不全が疑われた。さらに形態解析より、神経突起形成・剪定不全による神経回路影響が推測された。

E. 結論

BPAの発生-発達期暴露による遅発神経影響の実体として行動異常とそれに伴う神経科学的物証を捉えることに成功した。今後、その異常度を検討し、毒性学的な位置づけを明瞭化する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし。

2) 雑誌

Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. Cell Tissue Res. 347(2):457-465, 2012.

Adrenomedullin: a possible regulator of germinal vesicle breakdown. Hiradate Y, Ohtake J, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Biochem Biophys Res Commun 415(4):691-695, 2011.

Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes. Ohashi Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Animal Science Journal, in press

2. 学会発表

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、佐藤 英明、菅野 純
発生・発達期のビスフェノール A 暴露による遅発中
枢影響解析 [第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー]
2011 年 7 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、
菅野 純
中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱
による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのア
セフェートによる成熟後の脳高次機能障害について
- [第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会]2011
年 7 月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし。

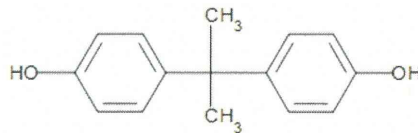
2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

発生-発達期ビスフェノールA暴露による 遅発行動影響と中枢解析



BPAを 0ppm、0.06ppm、1ppm、15ppmの濃度にて、
交配から、産仔マウスの離乳まで飲水に混合投与し、
成長後(12-14週齢)の雄産仔マウスについて、
遅発中枢影響の有無を検討した。

仮に体重の約1/10を一日の飲水量とすると、

0.06 ppm →0.006mg/kg/day

1 ppm →0.1mg/kg/day

15 ppm →1.5mg/kg/day

【BPAのADI :0.05mg/kg/day】

行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、
比較的短時間で、判りやすい結果が得られる。

→化学物質による行動影響があるか？

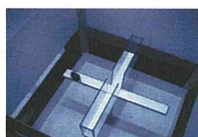
→毒性発現と呼べる異常行動か？



オープンフィールド
試験



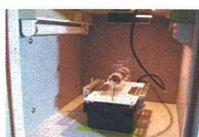
明暗
往来試験



高架式十字
迷路試験



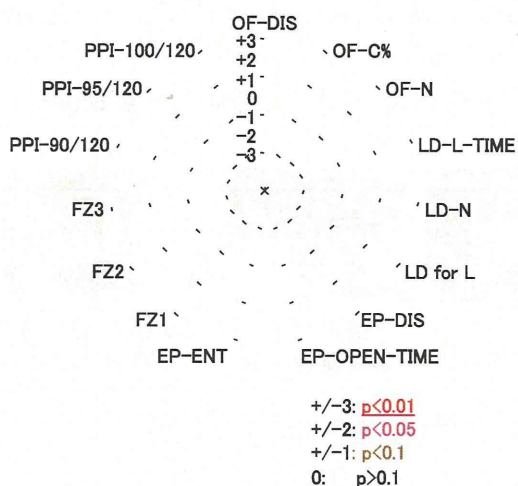
条件付け
学習記憶試験



プレパルス驚愕反応
抑制試験

遅発性情動-認知行動解析を元に

行動様式逸脱(t -検定)レベルを示す為のレーダー図



OF: オープンフィールド試験-10min

OF-DIS: 総移動量

OF-C%: 中央滞在率

OF-N: 移動回数

LD: 明暗往来試験-5min

LD-L-TIME: 明所滞在時間

LD-N: 明暗往来数

LD for L: 初移動までの時間

EP: 高架式十字迷路試験-10min

EP-DIS: 高所総移動量

EP-OPEN-TIME: 柵無しアーム部滞在時間

EP-ENT: number of entry in arms

FZ: 条件付け学習記憶試験-6min

FZ1: 学習度(短期記憶形成度)

FZ2: 空間-連想記憶

FZ3: 音-連想記憶

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min

PPI-90/120: プレパルス 90db/120db

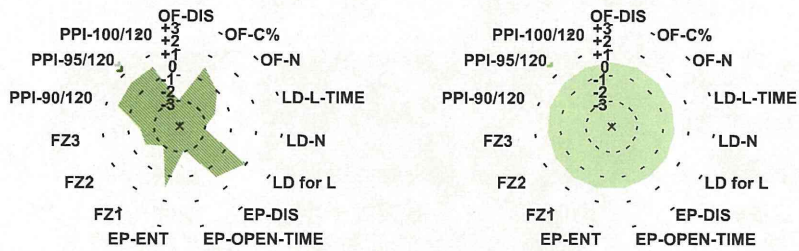
PPI-95/120: プレパルス 95db/120db

PPI-100/120: プレパルス 100db/120db

**ER遺伝子改変マウスの
行動様式逸脱(t-検定)レベルを示す為のレーダー図
～ERαKOマウス～**

～ERαKO(-/-)～

～ERαKO(+/-)～

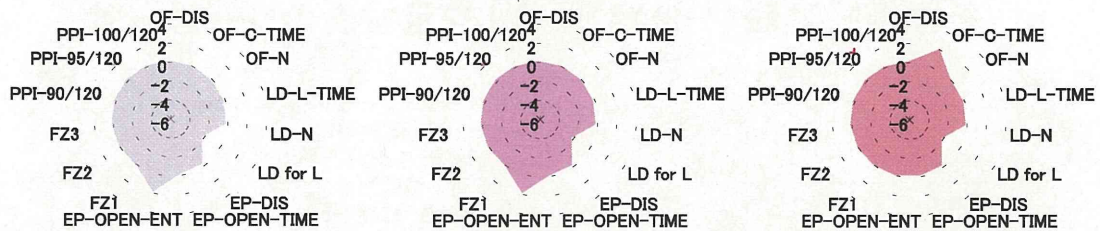


+/-3: $p < 0.01$
 +/-2: $p < 0.05$
 +/-1: $p < 0.1$
 0: $p > 0.1$

0.06 ppm 曝露群

1 ppm 曝露群

15 ppm 曝露群



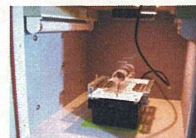
OF

LD

EP

FZ

PPI



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

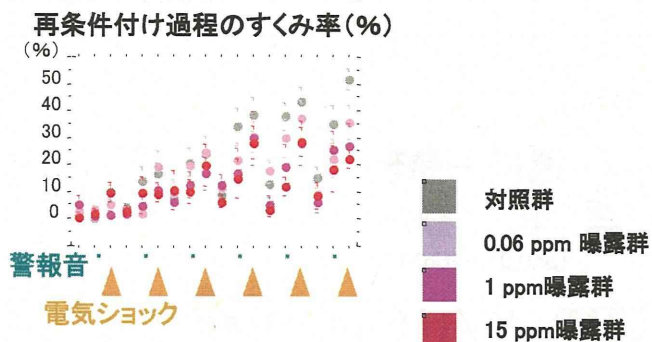
プレパルス驚愕反応
抑制試験

発生-発達期BPA暴露による遅発性中枢影響として、
不安関連行動(情動行動)の逸脱が生じている。

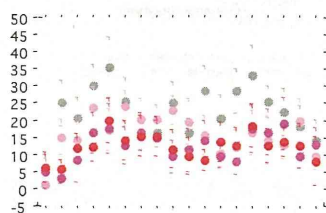
条件付け学習記憶試験(追加)



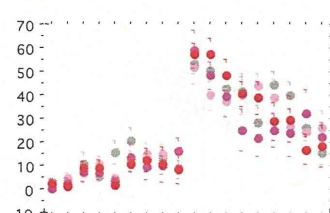
目印を設置し、警報音質と電気ショック回数・強度を変更した。



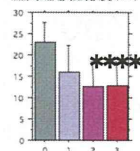
空間連想記憶度(%)



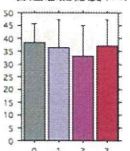
音連想記憶度(%)



空間連想記憶度(%)



音連想記憶度(%)

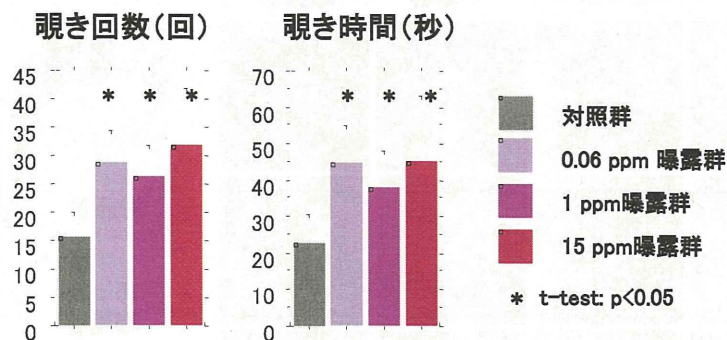


警報音

** t-test: $p < 0.01$

ホールボード試験:

床面に穴の空いた新奇場面における穴を覗き込む行動を測定
→不安関連行動を評価できるとされる。



発生-発達期BPA暴露による遅発性中枢影響として、**GABAシグナルの異常**、または**セロトニンシグナルの異常**が推測される。

遺伝子発現解析

行動解析後の15週齢時に海馬の遺伝子発現様式を検討した。

Percellome



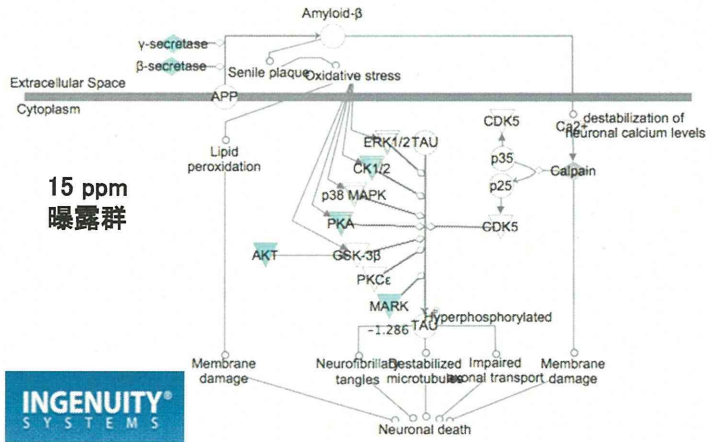
遺伝子発現
増加/抑制
($p < 0.01$, ratio > 1.2)

0.06 ppm 曝露群 46/116

1 ppm 曝露群 53/166

15 ppm 曝露群 28/507

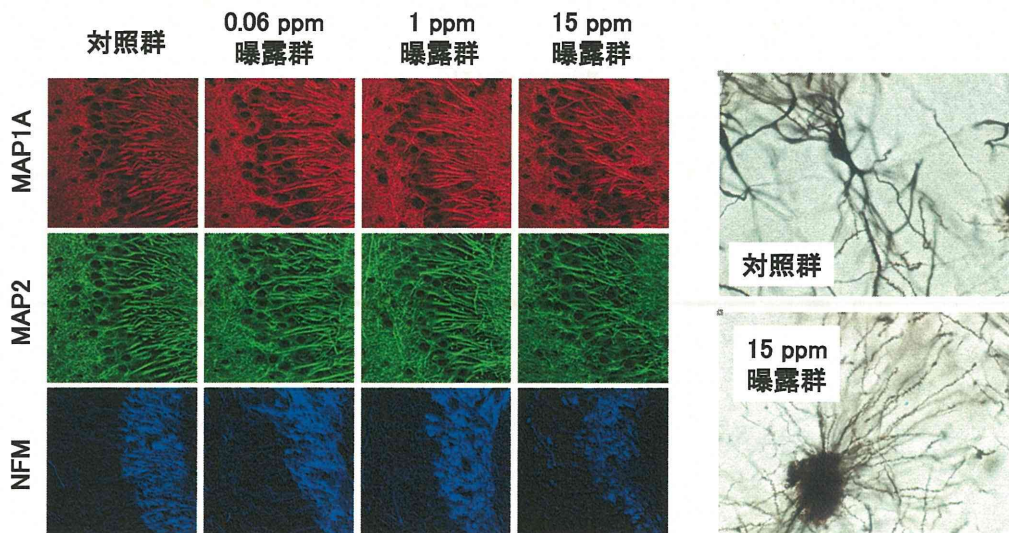
遺伝子発現抑制
が認められた。



神経軸索機能不全が疑われた。

形態解析

行動解析後の15週齢時に海馬の形態解析を行った。



神経突起形成異常が疑われた。

発生-発達期BPA暴露による遅発中枢影響

- 1) 不安関連行動異常を伴う学習記憶能低下が生じた。
GABAシグナル、セロトニンシグナルの異常が推測される。
- 2) 遺伝子発現解析から神経機能異常が疑われた。
微小管安定構造への干渉から軸索機能不全が推測される。
- 3) 神経突起形成異常による神経回路不全が疑われた。
神経突起の剪定不全が推測される。

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

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 発生-発達期ビスフェノールA暴露による神経回路急性応答の機能解析

研究分担者 富永 貴志

徳島文理大学 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。ビスフェノールA暴露の影響を調べることを目的とするが、はじめに行動実験において明確な結果の得られているバルプロ酸の遅発毒性の神経回路機構を検証した。引き続き、ビスフェノールA暴露の効果を検証するため、まず、急性効果を検討した。この間、新規共焦点顕微鏡の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の開発を継続する他、遺伝子導入マウスの解析、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析など新規の解析手法の開発に務めた。

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

川研究室との共同研究)

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。

(2) バルプロ酸による遅発性神経回路改変 (中島、種村、五十嵐らとの共同研究)

海馬中の代表的な神経回路としてシャーファー側枝刺激に対応する回路 (Sch)、苔状線維刺激に対応する回路 (Msy)、貫通線維刺激 (PP) に対応する回路の3つに分けて光計測を行った。

(3) ビスフェノール A 投与による神経回路の急性応答

上記の3つの神経回路の応答について、ビスフェノールAを還流時の応答を検討した。

(4) より鋭敏な光計測装置開発

(4)-1 新規共焦点顕微鏡の開発

結果に記載

(4)-2 新規パターン刺激イメージング顕微鏡

結果に記載

(4)-3 膜電位感受性蛍光タンパク質 (voltage sensitive fluorescent protein; VSFP) による神経回路解析 (理研トーマスクヌッフエルとの共同研究)

理化学研究所脳科学総合研究センタートーマス・クヌッフエルの研究室にて、子宮内エレクトロポレーションにより膜電位感受性蛍光タンパク質を導入し、2-4週令まで育ったマウスを徳島文理大学に搬入し、1日以内にスライス標本を作成し、光計測に供した。

(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 利根川研究室との共同研究)

内側嗅内野第3層(MECIII)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。

光計測法を用いることにより、通常は刺激部位の同定などが困難な海馬CA1野への側頭葉-アンモン角経路(temporal ammonic pathway; TA経路)での神経伝達が遺伝子改変マウスでは有効に阻害されることが示された。

このマウスでは、事象の前後関係を結びつける学習行動に異常があることが示され、エピソード記憶の神経回路機構として、光計測で示された神経活動が

必須であることが示された。

(2) バルプロ酸による遅発性神経回路改変(中島、種村、五十嵐らとの共同研究)

行動実験、遺伝子発現、組織学的な遅発性異常が確認されているバルプロ酸投与マウスに関して光計測による機能的神経回路改変の検証を行った。

バルプロ酸の薬理作用から考えて抑制性神経系への効果が最も疑われたので、抑制性神経回路の作用を抽出することにした。また、海馬中の代表的な神経回路としてシャーファー側枝刺激に対応する回路(Sch)、苔状線維刺激に対応する回路(Msy)、貫通線維刺激(PP)に対応する回路の3つに分けて検定を行うこととした。

その結果、どの神経回路でもコントロール条件での反応は、コントロールマウスとバルプロ酸投与マウスで差が見られなかった。一方、GABAA受容体の阻害剤であるピクロトキシンを還流すると、コントロールマウスのSch, Msy回路で顕著な反応の増大が見られる一方、バルプロ酸投与マウスでは増大が見られなかった。つまり、コントロールマウスでは通常は抑制性の神経回路で神経回路が調節される一定の活動を示しているのに対して、バルプロ酸投与マウスでは神経回路はいつでも抑制による調節の余地なく目一杯に働いていると考えられる。別の言い方をすると、バルプロ酸の投与によって神経回路の活動の修飾の余地がなくなってしまったといえる。

このような抑制性神経回路の改変を示すのには、膜電位感受性色素によるイメージングは極めて有効であるといえる。

(3) ビスフェノールA投与による神経回路の急性応答

ビスフェノールAに関して、海馬の神経回路応答では、LTP、LTDなどの神経可塑性への影響は指摘されているものの、最も基本的な急性応答に関して不明であったので、まず、急性応答を試した。

バルプロ酸で、すでに試した3つの神経回路応答に対するビスフェノールAの効果を、10 μ M, 100 μ M, 1mM

まで濃度を変えて検定したところ、1mM では神経応答がほぼ完全に消失する一方、100 μ M では僅かな減弱、10 μ M ではほぼ影響が見られなかった。CA1 野ではペアドパルスでも調べたがシナプス伝達への影響は見られなかった。

このことから、ビスフェノール A への急性応答はほぼないものと考えて良いと思われた。

(4) より鋭敏な光計測装置開発

(4)-1 新規共焦点顕微鏡の開発

ピンホール板を固定して、ノイズの少ない共焦点顕微鏡を開発するというアイデアで開発を行った。既存の正立落射蛍光顕微鏡(オリンパス BX-51WI)で 20 倍の対物レンズをつけた時の共焦点顕微鏡に関しては完成を見て、性能検定を詳細に行い、共焦点性を確認した。一方、この光学系をより低倍の光学系へ応用する顕微鏡の設計と試作を行い、性能検定を進めている。

(4)-2 新規パターン刺激イメージング顕微鏡

落射蛍光顕微鏡の投光管の光学的共役面に微小なミラーを集積したデジタルミラーデバイスを設置し、観察面に好きなパターンで紫外光による光を照射しケージド化合物による刺激を行いつつ、その神経応答を光計測する顕微鏡を開発している。光学系の微調整を終え、GABA 系の刺激への応用を考えている。

(4)-3 膜電位感受性蛍光タンパク質 (voltage sensitive fluorescent protein; VSFP) による神経回路解析 (理研トーマスクヌッフエルとの共同研究)

人工的な膜電位感受性分子の代わりに、細胞膜にもともと存在し得る膜電位感受性タンパク質(チャンネル部分が不活性な電位感受性チャンネル)に蛍光タンパク(YFP)をくっつけ神経回路の構成要素に特異的に膜電位感受性の蛍光リポーターを発現させる系を理研のトーマスクヌッフエルのグループが作成している。海馬の錐体細胞特異的に発現する VSFP についてその有効性をテストした。

子宮内エレクトロポレーションの手法で発現させた

タンパクについて、発現量の多いスライスを選び、電気刺激に対する応答を調べたところ、最大 0.5 ミリ秒/frame の撮像速度で撮像できた。タンパクの作動速度からいって 2 ミリ秒/frame の撮像速度でのイメージングで最も有効な結果が得られることがわかった。今後、錐体細胞の電気活動だけを有効に計測する上で強力な武器になると考えられる。

D. 考察

光計測法による神経回路機構解析の有効性は(1) 遺伝子改変マウスにおける解析によってエピソード記憶の神経回路機構の解明に用いられた点、(2) バルプロ酸の遅発毒性の解析において、抑制性神経回路の発達に影響があることを明瞭に示した点、から明らかである。

一方、ビスフェノール A の急性効果については影響が見られていないが、これはビスフェノール A の急性効果が通常の解析では見られない性質のものであることを示している。今後、バルプロ酸で行ったような解析を行うか、詳細に検討を要する。

新規の光計測の手法開発は急速に進んでおり、新規の共焦点光学系、パターン刺激の応用については既に実用をまっている段階である。一方、今後遺伝子導入による VSFP の応用を進めることは重要である。

E. 結論

今後とも光計測法を軸に、ビスフェノール A を始めとする神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは、重要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (本研究に関わる主なもの 3 編に◎を付けてください)

1) 書籍

なし

2) 雑誌

© Suh, J., Rivest, A. J., Nakashiba, T., Tominaga, T., and Tonegawa, S. (2011). Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science* 334, 1415-1420.

2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

Tominaga T and Tominaga Y (2011) Non-scanning type of confocal microscope for a fast functional imaging of neuronal circuit, *Neuroscience 2010, 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, September 17, Yokohama, Japan. (口頭発表、座長)

Kajiwara R, Tominaga T and Takashima I (2011) Repetitive olfactory nerve stimulation induced enhancement of neural activities in the amygdaloid cortex of guinea pig isolated whole brain. *Neuroscience 2010, 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, September 17, Yokohama, Japan.

Tominaga T and Tominaga Y (2011) GABA(A) receptor-mediated enhancement of action potential firing upon a theta burst stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. Program No. 766.01 2011 *Neuroscience Meeting Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

3. その他

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

発生-発達期ビスフェノール A 暴露による神経回路 急性応答の機能解析

富永 貴志(徳島文理大学・香川薬学部)

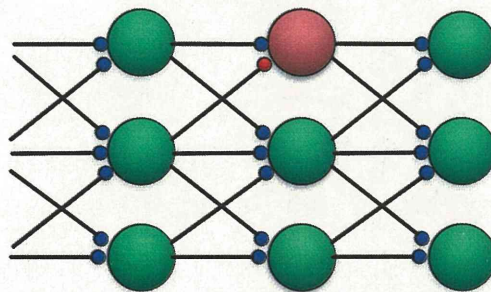
平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学-一般-004) -班会議

日時:平成 24 年 3 月 19 日(月)13:30-17:00

場所:東京国際フォーラム G601

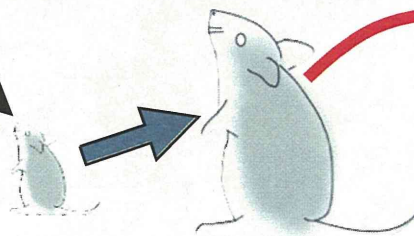
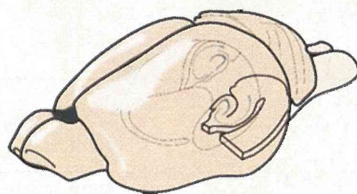
神経回路異常



発生-発達期

化学物質

ビスフェノールA



認知機能異常

情動認知行動毒性評価系確立のための 神経回路異常の機能解析と光計測

1. 情動認知の神経回路
2. トランスジェニックマウスによる記憶—学習に関わる神経回路の改変
3. バルプロ酸の発生—発達期投与による神経回路改変
4. BPAの急性効果
5. 光計測の新規の試み

I. 記憶情動系—海馬の位置づけ

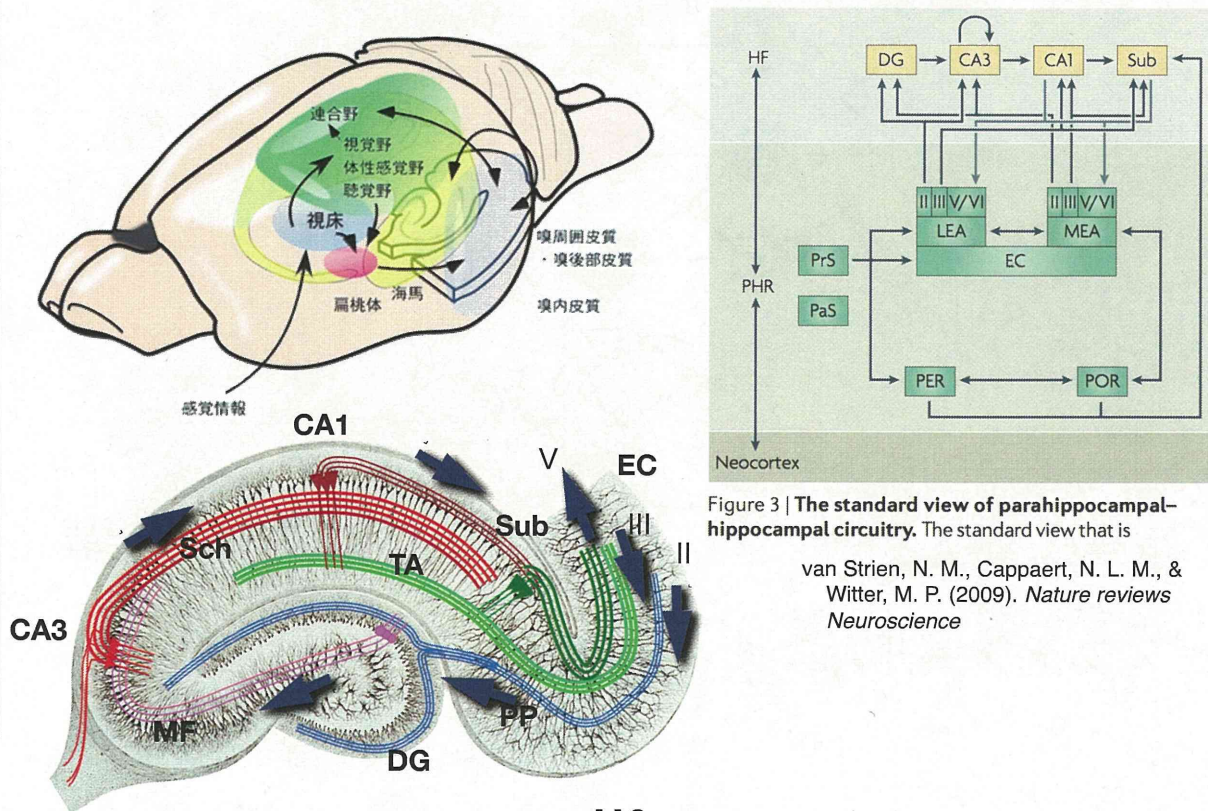


Figure 3 | The standard view of parahippocampal-hippocampal circuitry. The standard view that is

van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). *Nature reviews Neuroscience*