

図3 胎児および成人肝細胞間での尿素回路とクレアチン経路の代謝産物の存在量の変化。A、存在量が有意 (t-test, $p < 0.05$) に変化する代謝産物のヒートマップ。B、尿素回路とクレアチン経路の代謝マップ。赤い上向きの矢印と青い下向きの矢印は、それぞれ胎児肝細胞と比較して成人肝細胞で相対的存在量が増加、または、減少した代謝産物を示す。

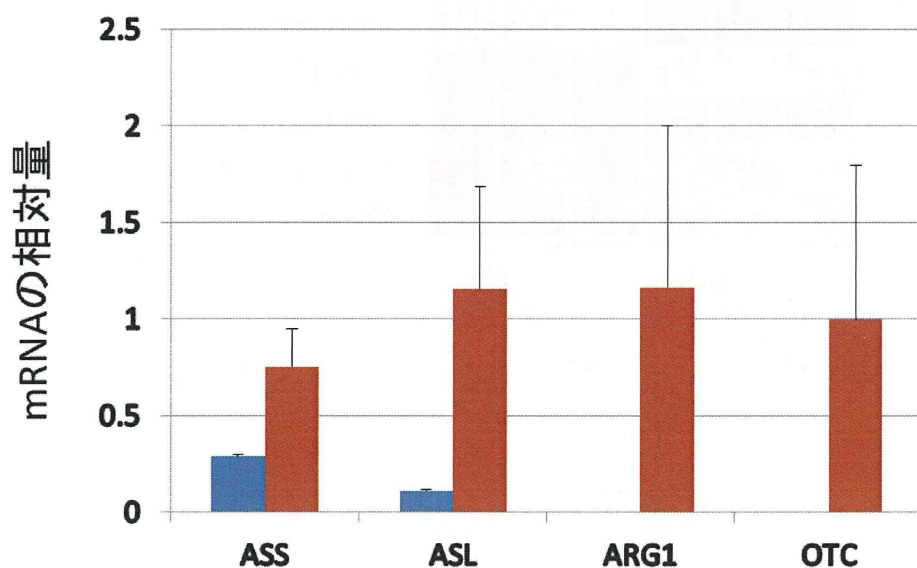


図4 リアルタイムPCR法による、胎児および成人肝細胞間での尿素回路の各遺伝子の発現量の比較。青い棒は胎児肝細胞を、赤い棒は成人肝細胞を表す。

ASS, argininosuccinate synthase 1; ASL, argininosuccinate lyase ; ARG1, arginase; OTC, ornithine transcarbamylase .

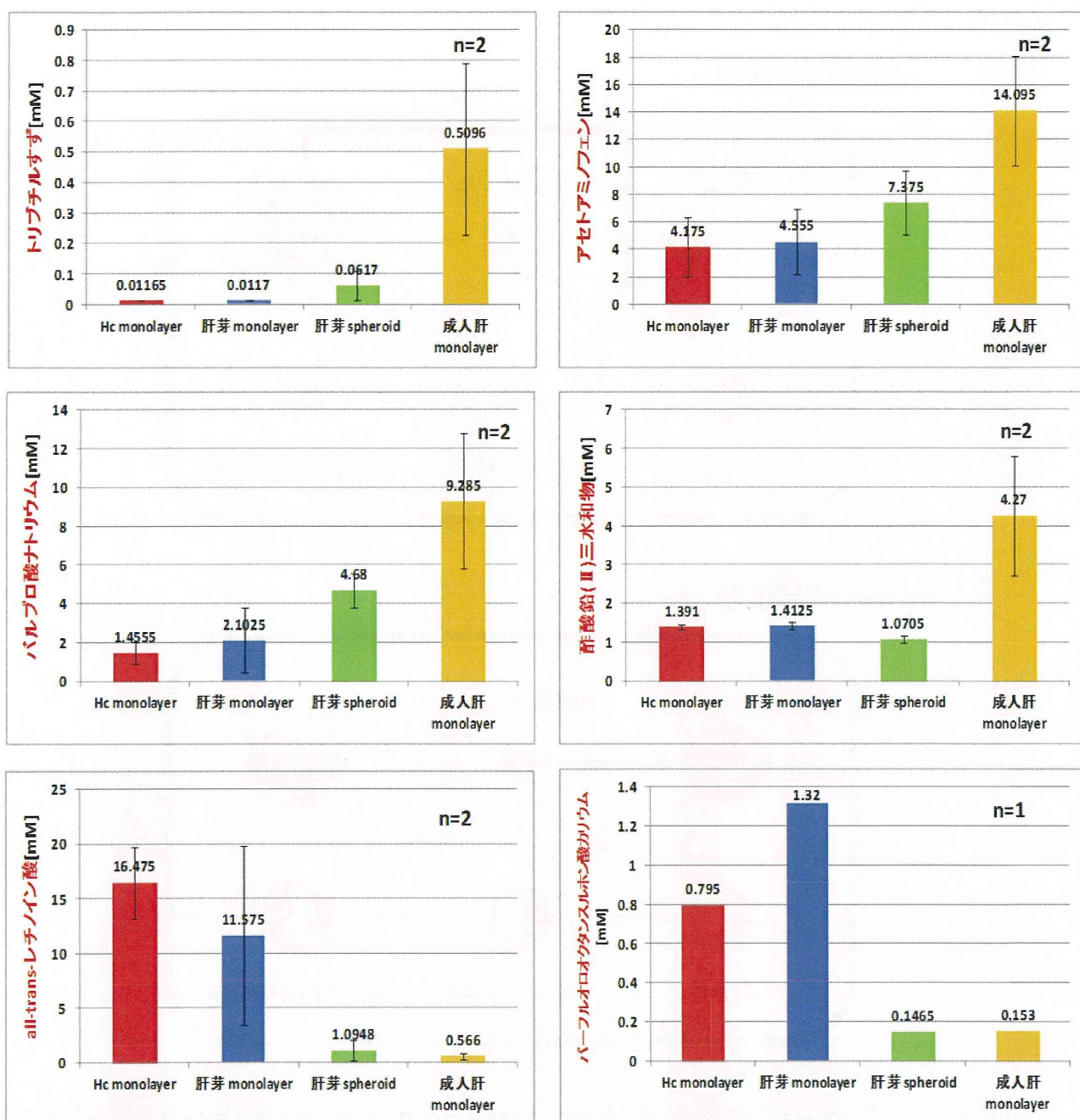
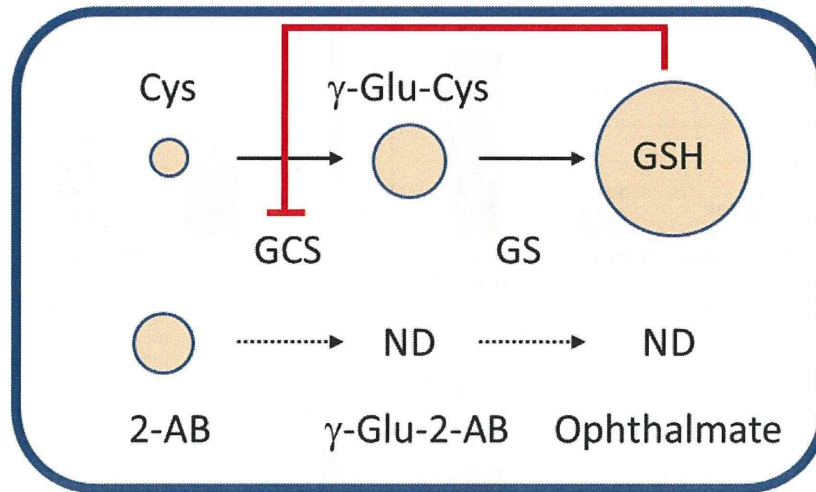


図5 各細胞の化学物質72時間暴露におけるIC₅₀値。
 縦軸に各化学物質の濃度、横軸は左から順に胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養を示す。

胎児肝細胞



成人肝細胞

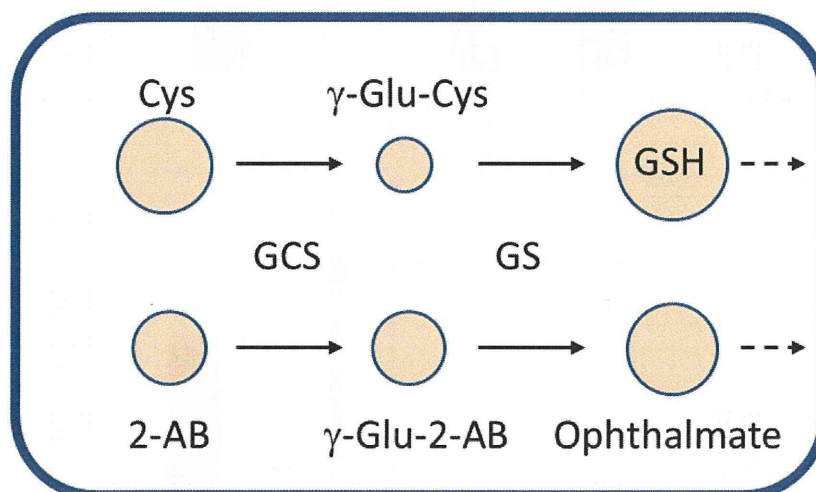


図6 胎児および成人肝細胞でのグルタチオン生合成経路の模式図。胎児肝細胞では生成したGSHによりGCSがフィードバック阻害を受け、同酵素の働きにより合成される γ -Glu-2-AB, Ophthalmateが検出されない。成人肝細胞では、GSHが消費されているためGCSは阻害を受けず、 γ -Glu-2-AB, Ophthalmateが生産される。GSH, glutathion; 2-AB, 2-aminobutyric acid; GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; GS, glutathione synthetase.

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

予想に反し出生直後の新生児肝細胞には、多くの薬物代謝関連遺伝子が発現していた。対応する酵素活性も決して低くはなかった。また、リニユロン(75 μ M)等の塩素置換型尿素系農薬により、溶媒対照の100倍と極めて高いCYP1A1誘導能が示され、幼若期の代謝能は低いという従来の評価とは異なる結果となった。新生児から成人までの動態関連遺伝子の発現には以下の4パターンが見られた。1)成人より新生児期に強く発現する遺伝子(CYP3A7, CYP1A1)、2)新生児期より成人において強く発現する遺伝子(CYP1A2)、3)年齢とは関係なく発現している遺伝子(CYP2D6, POR)。4)幼児期から思春期においてのみ発現が低い遺伝子(CYP3A)など、幼若期における薬物代謝能の特性について明らかにした。

A. 研究目的

成長期に曝露された化学物質は、成長期、および母乳を介して乳児期の健康に対して障害を引き起こす恐れがある。化学物質に対する胎児期および新生児期の感受性は成人に比べ強いと考えられていることから、新生児期等幼若期における健康被害が危惧されている。

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べ成長期の個体において強く、化学物質の曝露が長期間にわたる健康被害となる場合や、不可逆的な障害となる場合がある。そのため、化学物質による成長期における健康への影響を予測することは、新生児期および幼若期の健康に取り極めて重要となっている。

一方、個体の成長期は動物実験の結果をヒトへ外挿するには難しい時期であり、そのため毒性発現メカニズムに基づく評価法の確立が不可欠となっている。

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ために重要であるのみならず、化学物質の代謝活性化などの毒性発現、およびステロイドホルモン等生体内基質の生合成とも密接に関連しており、その変動は胎児期および成長期の内分泌機能に大きな影響をもた

らしている。

今までに当研究室では、ラット周産期において a) benzo(a)pyrene、aminopyrene および hexobarbital の代謝活性は極めて低いものの基質によっては胎齢16日目から活性が認められること、b)PCBの妊娠期曝露は、胎児期の benzo(a)pyrene 代謝酵素活性を強く誘導し、胎齢21日目の benzo(a)pyrene 代謝酵素活性は無処置胎児の169倍、無処置成熟ラットの約5倍高い活性レベルを示すことを報告している (Sunouchi, M., et. Al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 59;540-7, 1981) (Sunouchi, M., et. Al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 73;457-63, 1984)。

一方、実験動物とヒトの間には、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組織を利用した評価系の確立が必須である。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、成長期および成人ドナー由来の市販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与える影響を明らかにすることで、化学物質がヒト成長期に与える影響の予測に寄与する。

そこで本研究では、今までに得られた知見を踏まえ、化学物質の毒性発現に深く関わる

CYP1A 誘導能に焦点を当て、種々の年齢由来のヒト肝細胞を用いて薬物代謝酵素ならびに薬物動態関連因子の発現を mRNA レベルで明らかにし、成長期における化学物質の安全性評価法の確立に役立てたい。

なお、ここでは、新生児とは生後 0-28 日間 (4 週間) を、乳児期とは、生後 28 日~1 歳までを、幼児期とは、1 歳から 6 歳までを、幼若期は、0 歳から 6 歳までを、学童期とは、6 歳~12 歳 (小学生) を、思春期とは (12 歳~15 歳) までを、成人は 16 歳以降を意味することとする。

B. 研究方法

1. 薬物動態関連遺伝子の発現変化

薬物動態関連遺伝子は、QuantiGene Plex2.0 mRNA Assay Kit (Affimetrix) と Luminex technology による薬物動態関連遺伝子の発現を Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad, 171-000201JA) にて測定した。検討した 26 遺伝子 (mRNA) は、以下の通りである。薬物代謝第 1 相から CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、第 2 相から UGT1A1、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1、SULT2A1、SULT1B1 等の抱合酵素系を、他に電子伝達系酵素 POR (P450 oxidoreductase)、G6PC (Glucose -6-phosphatase)、CYP1A 誘導に関与する核内受容体 AHR、ARNT、ARNT2、PXRA、PPARA、PPARG 等である。試験に先立ち、本試験系に適した House keeping gene (GAPDH、ACTB、PGK1、HPRT1 および GUSB) について検討し、蛍光強度範囲が標的遺伝子に近い PGK1 (phosphoglycerate kinase 1) を housekeeping gene として選択した。

2. ヒト凍結肝細胞からの mRNA 測定用 Sample の調製

ヒト凍結肝細胞 (0.01 歳~47 歳) は BD Gentest、Celsis、GIBCO、および Tissue Transformation Technologies から購入した。Lysate Sample の調製には、融解後における肝細胞の viability が 75% 以上 (75%~96%) の 11 ドナーの肝細胞を用い、viability が 75% 以下の肝細胞は測定サンプルから除外した。

(表 1.)

3. 化学物質がヒト幼若期肝の薬物代謝酵素

誘導能に及ぼす影響

農薬として、現在我が国で使用されている塩素置換型尿素系除草剤、Linuron (LNR, 純度 99.0%以上, 和光純薬工業) および Diuron (DCMU, 純度 99% 関東化学工業) を、また Dr. Ehrenstorfer GmbH から購入した Monolinuron (純度 99.0%)、Monuron (純度 99.5%) および 1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-methylurea (DCP, 純度 97.5%) を加えた 5 物質を用いた。新鮮肝細胞 Lot 358 (2 Months/Male/Caucasian) を BD Gentest より購入し、培養 1 週間後にアセトニトリルに溶解した農薬 75uM を細胞に暴露した。同時に Dimethylsulfo-xide に溶解した 3-Methylcholanthrene (MC; 0.5 uM)、Beta-Naphthoflavone (BNF; 5 uM) および Omeprazole (OMP; 25 uM) を陽性対照物質として暴露し、9 時間後に Lysate Sample を調製した。昨年度の結果から LNR は、CYP1A 系に影響を与えることが明らかであることから、今回は標的遺伝子として CYP1A1、CYP1A2 を、細胞が乳児期の肝細胞であることから、CYP3A7、CYP3A4 および CYP3A5 について発現解析を行った。

4. 市販のヒト肝細胞添付情報による年齢と活性都の相関

2007 年から 2011 年の期間にヒト肝細胞供給元 A 社より市販された凍結ヒト肝細胞 54 ドナー (男性 23、女性 31、2~82 歳、Viability 73-91%) の細胞を選択し、公開されている代謝酵素活性情報により、特に年齢差が期待できる CYP1A2、CYP3A4 および UGT general の活性レベルと年齢間の相関性について調べた。

(倫理面の配慮)

凍結ヒト肝細胞は、個人情報 that 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. 薬物動態関連遺伝子発現における幼期の特性

新たに入手したヒト肝細胞を加え、薬物動態関連遺伝子の年齢依存的変化のパターンを調べ、以下の 4 グループに分類した (図

1-1、図 1-2)。

成人に比べ新生児期において発現が高いグループ;CYP3A7 および CYP1A1 はいずれも 0.8 歳までの発現が高く認められ、0.8 歳以降遺伝子の発現は低下した。特に CYP3A7 は 0.8 歳以降は殆ど発現していなかった。

乳児期までに比べ成人において発現が高いグループ;CYP1A2 は、新生児において発現は低い、年齢と共に増加した。

新生児期-成人間での変化が明確に認められず、ほぼ全年齢で発現しているグループ;CYP1B1、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、UGT1A1、UGT1A4、SULT2A1、SULT1B1、POR、G6PC、AHR、ARNT、ARNT2、PXRA、PPARA、PPARG

幼児期から思春期までの間の遺伝子発現が低いグループ;CYP3A4、CYP3A5、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1 (CYP2C8) では、新生児と成人において高い発現が認められたが、その間の時期における発現レベルは低かった。

2. 化学物質がヒト乳児期肝の薬物代謝酵素誘導能に及ぼす影響

新生児期由来の肝細胞を用いて検討を行った。用いた尿素系農薬の中では、LNR (75 μ M)による誘導効果が最も強く、溶媒対照の約 100 倍の CYP1A1 を発現していた。この誘導レベルは、BNF 5 μ M による誘導能よりやや低めであるが、OMP 25 μ M に匹敵するレベルであることが判明した。次いで DCMU では溶媒対照値の約 66 倍、DCP で 22 倍とそれぞれ強い誘導効果を示した。一方、CYP1A2 は CYP1A1 に比較して誘導は弱いものの、LNR で約 8 倍、DCMU でも 4 倍の誘導を示した。なお、LNR は溶媒対照の約 6 倍以上の CYP3A4 を誘導した。LNR は CYP3A7 を誘導したが、約 2 倍程度が見られたのみであった。これらの農薬が CYP3A5 に及ぼすこれら農薬の影響は認められなかった (図 2)。

3. 市販のヒト肝細胞に添付の活性値情報を利用して、酵素活性値と年齢との相関性について検討した。特に年齢に伴う変化が予測される CYP3A4、CYP1A2、および UGT general について検討したが、いずれの酵素においても年齢との間に相関性は認められなかった。ノンパラメトリック検定 (ウィルコクソンの

順位和検定) (2 標本検定;女性 n=17、男性 n=13)により性差について解析したところ、CYP1A2 においては、雌雄間で $P < 0.05$ と有意な差のあることが認められた。

D. 考察

一般的に CYP の発現は幼若期において低いと考えられているが、本実験では、新生児期と乳児期において予期した以上の薬物動態関連遺伝子が、新生児期と乳児期に発現している事を示す結果が得られた。本研究では、CYP3A7 は新生児や乳児期に強く発現し、年齢と共に減少することが認められたが、CYP3A7 については、よく知られていることであり、今までの知見を確認する形となった。また、CYP1A1 も新生児と乳児期において高い発現を示したが、年齢と共にその発現は低下し、CYP3A7 と同様なパターンを示した。ヒト肝において主要な CYP1A 分子種は CYP1A2 であることから、CYP3A7 と同様、CYP1A1 には分化過程において必要とされる役割があるかも知れない。因みに CYP1A1 はヒト肺の気管支および細気管支上皮に局在することが知られている。一方、ヒトでは環境汚染物質等により肝 CYP1A2 が誘導される事が多く、年齢に伴うその発現レベルに影響を及ぼしている可能性がある。新生児から乳児にとり重要と考えられる遺伝子、例えば解毒・ビリルビン排泄に関わる UGT 遺伝子類のうち、UGT1A1、UGT1A6 は、出生後すぐに強く発現していたが、UGT2B7 では出生直後の強い発現は認められていない。SULT は、新生児等幼若期において発現が高いとされているが、サブファミリーにより異なる様相を示した。また、生体内で電子供給系の 1 つとして作用している POR は年齢を問わず全ての時期において、一定のレベルで発現していることが確認された。

また、新生児期の薬物動態関連因子の発現は、出生直後から乳児期までの間にピークを迎え、以後思春期を過ぎ成人となるまで低い発現レベルを示すが、一部で、成人前に再び発現量が増加するパターンが認められた。つまり、乳児期と成人における遺伝子発現は、同様なレベルを示すが、幼児期から思春期までの遺伝子発現レベルは低いレベルのまま維持されていることである。CYP3A4 のような多くの遺伝子の発現もこのグループに属していると思われる。このことは、新生児期

と乳児期のみならず幼児期、学童期また、思春期における薬物による毒性発現や薬物治療にとり極めて重要な事象であることを提示している。この乳児期以降成人までにおける時期の薬物代謝および誘導能の特性を明らかにすることは、化学物質の毒性発現や医薬品による薬物相互作用の予測に有用である。

ヒト肝細胞を用いる薬物代謝能および誘導能試験系は、化学物質の安全性、創薬および薬物相互作用の予測に欠かすことの出来ない手法となっている。一方で、幼若期におけるヒト肝細胞の特性、また学童期から思春期にかけての時期においても不明な部分が多く残されている。

昨年度、報告したように LNR は、極めて強い CYP1A1 と CYP1A2 の誘導剤であることを報告したが、今回行った塩素置換型類縁化合物の中でもその誘導能は最も強いことが判明した。他の尿素系農薬も強い CYP1A 誘導能を示した。毒性の発現と関わりの強い CYP1A1 mRNA は、LNR 75 uM(18.7ug/mL) の 9 時間暴露で、溶媒対照の約 100 倍高いレベルにまで誘導され、オメプラゾール 25uM 暴露群とほぼ同レベルの誘導を示した。このように、LNR について DCMU, DCP も CYP1A1/2 誘導能が強く、尿素系農薬の年間輸入量あるいは国内生産量（原体合計、LNR;44,000kg、DCMU; 95,300kg 出典 農薬便覧 2011）を考慮すると塩素置換型尿素系農薬の使用に、また、その保管管理には充分気を付ける必要がある。

ヒトにおいて CYP1A1 分子種は肺の気管支や細気管支の粘膜上皮細胞（クララ細胞）に局在しており、CYP1A 誘導剤により誘導されることが知られている。

E. 結論

新生児期から成人の肝細胞を用い、薬物動態関連因子の発現について検討した。薬物動態関連遺伝子は新生児期の肝においてすでに発現していることを明らかにした。遺伝子によりその発現は、新生児期においてより強

く発現している遺伝子、成人においてより強く発現している遺伝子、年齢とはあまり関係なく発現している遺伝子、また、乳児期以降、思春期が終わるまで発現レベルが低下している遺伝子（新生児と成人での発現レベルは高い）などがあり、発現は多様であった。

幼児期、学童期および思春期における薬物代謝能については、新たな知見も得られてきたが、不明な点も少なからず残っている。今後の詳細な検討に期待したい。

また、乳児期のヒト肝細胞を用いて、尿素系農薬を用いた *in vitro* 誘導能試験を行った結果、乳児期における CYP1A1/2 の誘導能（活性レベル、mRNA レベル）評価は可能であることを示した。塩素置換型尿素系農薬では、LNR が最も強く CYP1A1(100 倍)および CYP1A2 を誘導することを明らかにした。

今後、Hess-DB（化学物質毒性データベース; NITE）および毒性 QSAR から予測された CYP1A1/2 誘導物質の検証、特に乳幼児への影響を検討する場合は、本研究で用いた系が有用であると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

[1] M. Sunouchi, K. Nakazawa, R. Kikura-Hanajiri, K. Kobayashi, H. Kojima, M. Usami, Age-dependent capability of drug metabolism in commercial available human hepatocytes. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 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。

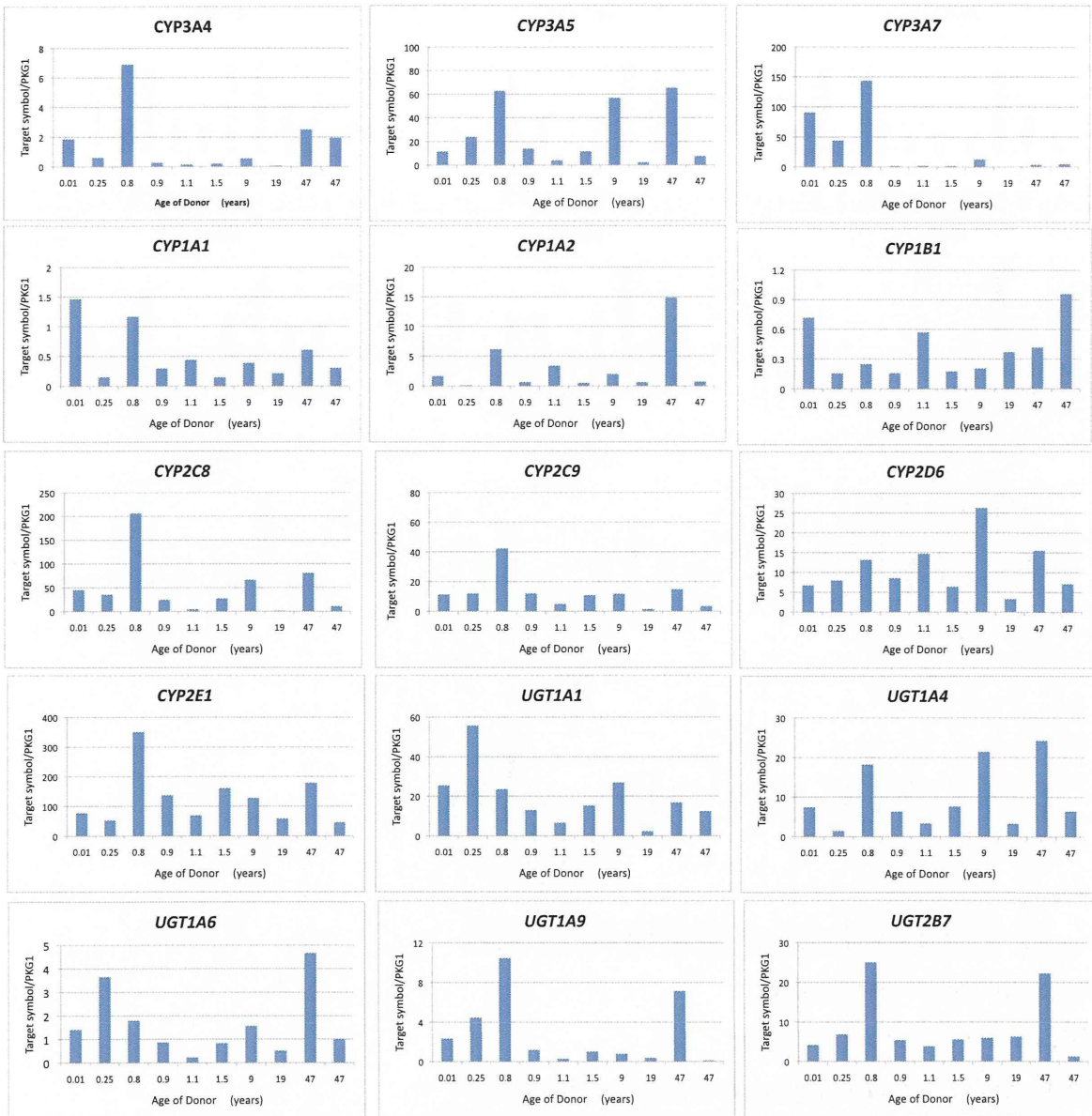


図 1-1. ヒト肝細胞における薬物代謝因子の発現
 UGT; UDP glycosyltransferase family

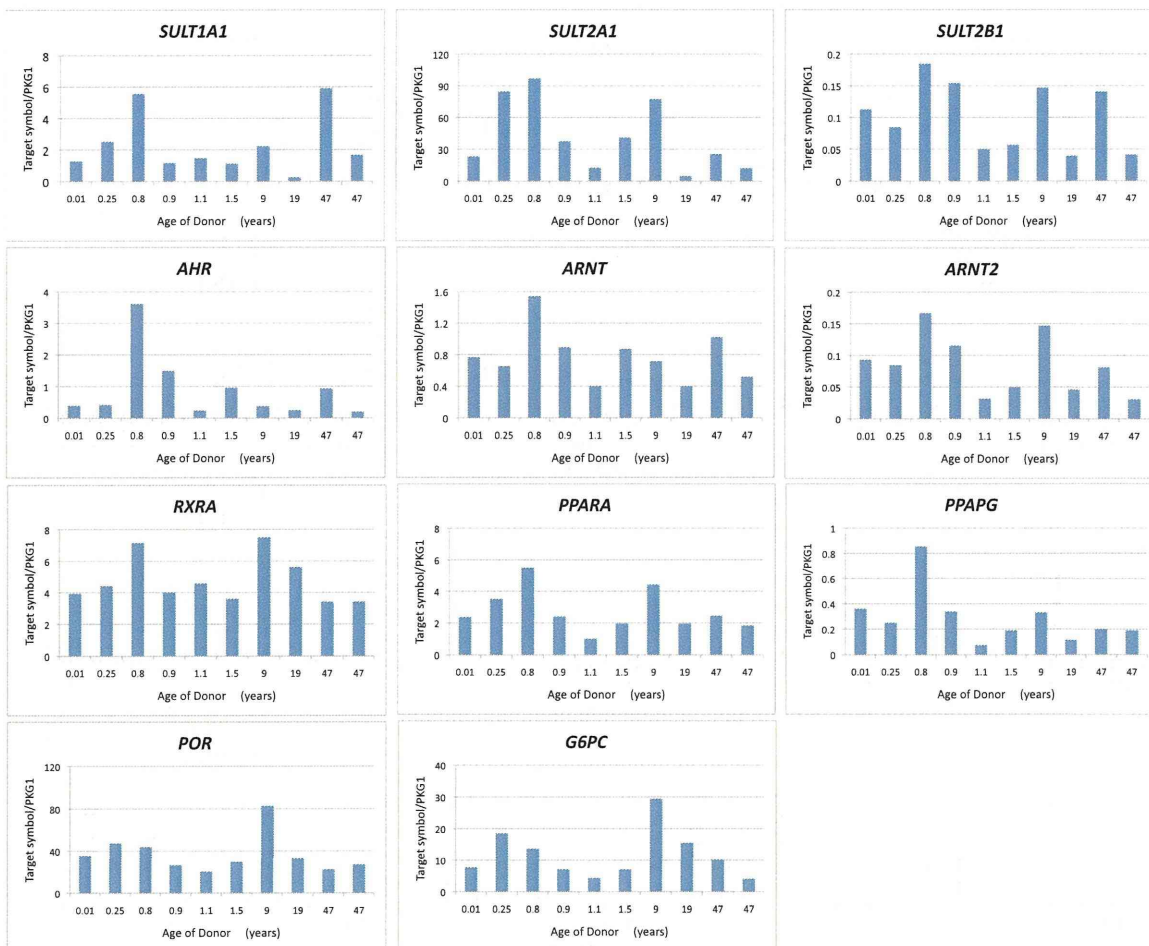


図 1-2. ヒト肝細胞における薬物代謝因子の発現

SUL; Sulfotransferase family

AHR; Arylhydrocarbon receptor

ARNT; Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator

RXRA; Retinoid X receptor, alpha

PPAPA/G; Peroxisome proliferative activated receptor, alpha/gamma

POR; Cytochrome P450 oxidoreductase

G6PC ; Glucose-6-Phosphatase

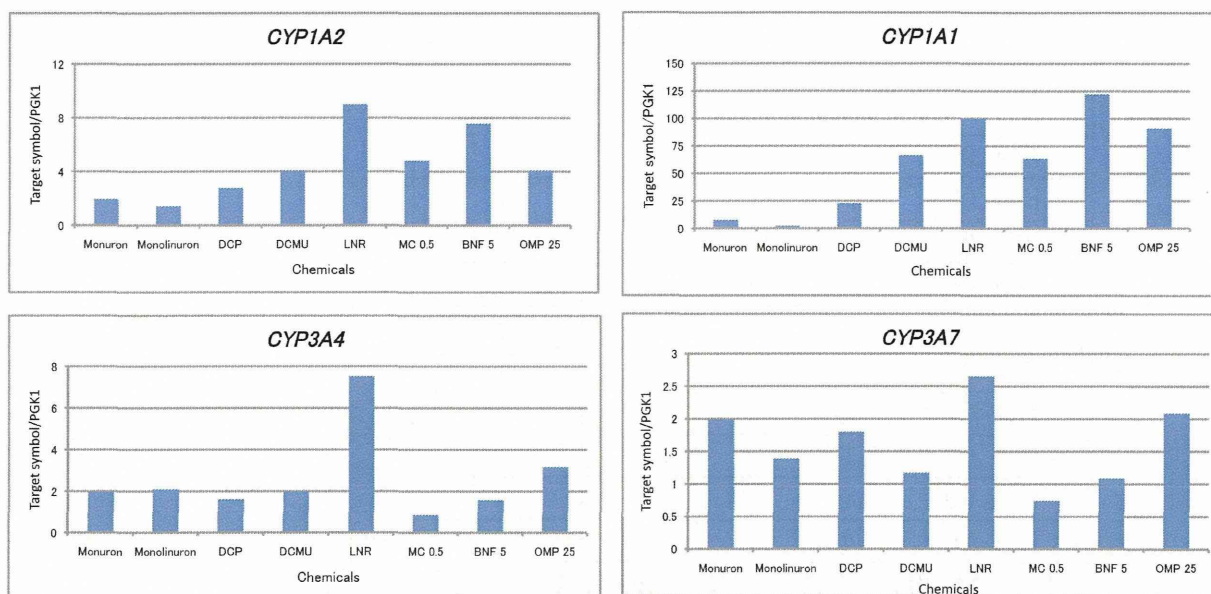


図2. 培養ヒト肝細胞に及ぼす尿素系農薬の影響

尿素系農薬 (Monuron、Monolinuron、DCP;1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-methylurea、DCMU;Diuron、LNR; Lnuron) 75uM

MC; Methylcholanthrene 0.5uM、BNF; β -naphthoflavone 5 uM、OMP; Omeprazole 25 uM

表 1. 薬物動態遺伝子解析に用いた凍結ヒト肝細胞情報

	年齢	性	人種
FNA 01	0.01	F	C
FNA 02	0.25	M	H
FNA 03	0.8	-	H
FNA 04	0.9	M	H
FNA 05	1.1	M	AAA
FNA 06	1.5	F	C
FNA 07	9	M	AA
FNA 08	19	M	C
FNA 09	47	F	I
FNA 10	47	F	I

F: 女、 M: 男、人種: C; Caucasian, H; Hispanic、
AA ; African Americans

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

成長期の大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 部長
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

本年度は平成 23 年度に確立した、細胞外に遊離するγ-アミノ酪酸（GABA）の可視化法と海馬反回抑制の電気生理学的評価法を用いて、抗てんかん薬であるバルプロ酸（VPA）の胎児期曝露が脳の生後発達にもたらす影響を調べた。VPA には、催奇形性の報告があるばかりでなく、また子供の自閉症発症との関連が示唆されている。胎児期に VPA に曝露されると、脳の成長期において海馬神経活動の亢進と小脳抑制性神経伝達物質の放出量の増加が認められた。抑制性神経回路の早熟化が示唆された。生後の早い段階の脳スライス標本を用いたこれらの解析が発達神経毒性評価に有用であることを示した。

キーワード：GABA、抑制性神経回路、小脳、海馬、脳スライス

A. 研究目的

化学物質の胎児期曝露が成熟後の脳機能にもたらす有害な影響を生後早期に予想する実験方法の開発の必要性

脳の発達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想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。

脳の生後発達の指標としての抑制性神経伝達物質 GABA と抑制性神経回路

成長期の脳の経験にたいする感受性の高い時期を臨界期というが、この臨界期は抑制性神経伝達物質である 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ことを検証した。

ヒトへの外挿性を考慮したバイオマーカーとしての GABA

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、ヒトと動物で共通している機能バイオマーカーを設定する必要がある。GABA は、哺乳動物において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にすることで、動物を用いた試験結果をヒトに外挿することを可能にする。また、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、ほ乳動物とヒトの脳で共通している。さらに、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、ほ乳動物でもヒトでも GABA を神経伝達物質とする抑制性神経細胞の機能発達により決定されている。このように生後の GABA 作動性神経細胞の機能発達の重要性は、生後の正常な脳機能発達にとって動物でもヒトでも共通している。GABA 作動性神経細胞の機能の発達異常が、自閉症、統合失調症、気分障害などの原因として示唆されており、GABA 作動性神経細胞の発達を評価する試験項目の設定により、化学物質に対する胎児期曝露が生後の脳機能発達にもたらす影響を感度良く検出することが可能になると考えられる。

今年度の研究目的

今年度は、抗てんかん薬であるバルプロ酸

(VPA)の胎児期曝露による発達神経毒性を、抑制性伝達物質 GABA の機能発達を指標として、脳発達期の脳スライス標本を用いて評価した。VPA には、催奇形性の報告もあり、さらに子供の自閉症発症との関連も示唆されている。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により評価した結果、どちらの実験方法に関しても GABA 機能の早熟化が観察された。

B. 研究方法

1. バルプロ酸への胎児期曝露

バルプロ酸 (VPA) 胎児期曝露は、ヒトでの曝露経路に合わせて経口投与とした。妊娠 15 日 (プラグ確認を 0 日とする) の妊娠ウイスターラットをイソフルラン麻酔下に VPA を 0 (対照群、生理食塩水のみ)、300、600 mg/kg 濃度で投与した。対照群、VPA300mg/kg 投与群 (以下 VPA300 群)、VPA600mg/kg 投与群 (以下 VPA600 群) で実験を行った。出生数は概して少なめだったが、食殺はなく生育した。一方、交配したものの出産に至らない、あるいは同腹に著しく小さい個体が存在するなどが観察された。

2. 脳スライス標本の作製

細胞外に遊離する GABA の可視化法については、仔ラット (PND5, 6, 8, 10, 14) から作成した小脳スライスを用いた。また、海馬反回抑制の電気生理学的評価法については仔ラット (PND13, 14, 15) から作成した海馬スライスを用いた。

仔ラット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または海馬を取り出した。ロータリースライサー (Dosaka EM)、ティッシュチョッパー (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 μ 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 μ m) の小脳または海馬スライス標本を作成した。

スライス時に用いた人工脳脊髄液の組成は、NaCl, 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1.25; MgSO_4 , 2; NaHCO_3 , 26; glucose, 10 (mM)、実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl, 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1.25; CaCl_2 , 2; MgSO_4 , 2; 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。

3. 細胞外に遊離する γ -アミノ酪酸 (GABA) の可視化法 (研究協力者 吉田祥子)

細胞外 GABA 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により可視化した。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。蛍光測定用に加工した石英ガラスに GABAase を担持し、灌流用アクリル枠を両面テープで貼り付けることにより、計測用チャンバーを用時に作成した。種々の日齢の仔ラット脳から作成した小脳スライスをのせて、脳スライス表面から遊離する GABA が α -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、小脳スライス表面の GABA 遊離の空間分布を可視化した。

この方法で発達期小脳皮質の GABA 放出を観察すると、生後 5 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る。そこでこの生後発達を指標として、VPA の胎児期曝露による生後脳発達への影響を評価した。

ラットが生まれた日を P (postnatal) 0 とし、対照群、VPA300 群、以下 VPA600 群、から生まれた仔ラットを P4、P5、P6、P7、P8、および P10、2 週間において小脳スライス標本を作製し、GABA 放出分布を光学測定した。あわせて免疫組織化学的染色による検討を行った。

4. 海馬反回抑制の電気生理学的評価法 (研究協力者 笛田由紀子)

ラット海馬スライス標本の CA1 領域へのダブルパルス刺激により惹起される生体電気信号を記録した。一発目の刺激に対する応答に比べ二発目の刺激に対する応答が反回抑制により小さくなることを利用して、抑制の強さを定量的に評価した。成獣ラットにおいてダブルパルスへの応答比は GABA 性の

フィードバック抑制（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ラット海馬に適用した。脳発達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。したがって、実験に用いた仔ラットは産業医科大学産業保健学部の実験動物飼養保管施設において妊娠ウイスターラットから出産させた仔ラットを用いた。

VPA 曝露の方法は、ヒトでの曝露経路に合わせて経口投与とし、day 15 の妊娠ウイスターラットをイソフルラン麻酔下に VPA を 0 (対照群、生理食塩水のみ)、300、600 mg/kg 濃度で投与した。対照群 6 腹、VPA300 群 5 腹、VPA600 群 5 腹から得られたデータをまとめた。VPA 600 mg/kg 投与群では、8 匹中 3 匹において、同居翌朝にスミアに精子の確認を認めたが出産には至らなかったため 5 匹となった。

ラットが生まれた日を PND 0 として、PND13、14、15 の雄性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 600 μ m の海馬スライス標本を両側海馬から作成した。ラット 1 匹あたり実験に使用可能な最大 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 μ 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 オーム）、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位 (PS) を、シナプス層から集合シナプス後電位 (fEPSP) を記録した。刺激電極と記録電極の間隔はスライスごとの実体顕微鏡下に測定し 210-250 μ m になるようにした。

抑制性 GABA 機能が発達する時期を興奮性機能が発達する時期と比較するために、まず、電気刺激への神経細胞の応答性を調べた。fEPSP の slope は AMPA 型 グルタミン酸受容体の活性の度合いを表す。また、PS の振幅は活動電位を発生した細胞の数を反映するといわれており、Na チャネルの活性の度合いを見ることができる。これらのグルタミン酸受容体と Na チャネルの活性の程度を指標として、興奮系機能の発達を調べた。抑制性 GABA 機能の指標として、前年度同様にフィードバック抑制を指標としたダブルパルス刺激への応答比を用いた。実験では、PS の振幅の比と fEPSP の比を解

析することによってフィードバック（反回）抑制の大きさを評価した。すなわち、比が 1 よりも小さいほど、2 回目の応答が反回抑制によって抑圧されていることを示す。比が 1 に近い時は、2 つの集合スパイク電位は独立の事象であることを示す。

具体的には、最大の PS 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、海馬 CA1 領域から記録した PS の振幅と fEPSP の下向きの傾き (slope) からそれぞれ比を求めた。

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

実験に用いた幼若ラットの匹数とスライス数を表 1 に示した。

（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。

C. 研究結果

1. 小脳皮質の生後発達に対するバルプロ酸胎児期曝露の影響

VPA 腹腔内投与ラットでは、出生数が少なく、特に 600mg/kg 投与動物では出生前に死亡することが多かった。生後 7 日ごろ突然死する場合もあった。そのため、実験はすべて、経口投与動物を用いて行った。

VPA 投与ラット小脳は、摘出時に肉眼的に観察したところ、やや発達が進んでいる様子が観察された。生後 4 日齢 (P4) から 7 日齢 (P7) の小脳を、矢状方向に薄切した小脳スライスを用いて、細胞外に遊離する GABA の分布の生後発達を観察した。図 1 には P4 と P6 の小脳皮質から遊離されている GABA イメージを疑似カラーで示した。対照群の P4 の小脳では、細胞外に遊離する GABA の量は少ないが、P6 の小脳では遊離する GABA が観察された。図 2 には、小脳皮質の部位別に蛍光強度を測定し、対照群、VPA300 mg/kg 群、VPA600mg/kg 群で P4 から P7 まで経時的に計測したグラフを示した。神経細胞発達に伴って P5 より GABA 放出量が増加し、徐々に減少することが観察される

が、VPA 暴露、ラットでは P4 で外顆粒層での GABA 放出が観察された。P4 の VPA 投与ラットの GABA 放出量は著しく高く、小脳皮質全域で観察された。P5 の対照群では、外顆粒層に特徴的な GABA 放出量の増加が見られるが、VPA300mg 投与動物では、外顆粒層の GABA 放出は減少する傾向が観察された。VPA600mg 投与動物ではその後も高い GABA 放出量が観察され、VPA 被曝ラットは通常より約 20%増加した。

更に免疫組織化学的観察より、対照群の P5 では顆粒細胞の分化が進んでおらず、GABA_A 受容体 α 6 は発現していないが、VPA 暴露したラットでは EGL から PL 付近で GABA_A 受容体 α 6 の発現が観察された(データ掲載せず)。またプルキンエ細胞の樹状突起が伸張していることも観察された(データ掲載せず)。

2. 大脳辺縁系の抑制性神経回路の生後発達に対するバルプロ酸胎児期曝露の影響

神経発達における抑制性 GABA 機能を評価する上で、GABA 神経回路機能の発達を興奮性機能の発達と比較することは重要である。よって、まず、PND13,14,15 日における興奮性(集合活動電位: PS およびシナプス応答: Slope)の発達を調べた(図 3)。VPA 曝露群のシナプス入力に対する応答性(Slope)は、PND13, 14 では、コントロール群と VPA 投与群の間に差はなかった。しかし、PND15 においては、VPA300 群と VPA600 群ともに対照群よりも刺激に対して大きなシナプス応答を示した($p=0.0386$, repeated measure ANOVA)。PND15 におけるシナプス応答の亢進は活動電位の発生増加をもたらすのではないかと考え、集合スパイク電位(PS)について刺激応答性を調べた。予測したように、PND15 において、VPA300 と 600 群ともに対照群よりも大きな集合スパイク電位を生じた($p=0.0006$, repeated measure ANOVA)。このように、興奮性機能に関して、VPA 曝露の影響が PND15 にのみ見られた。

この CA1 錐体細胞への VPA の影響が、興奮性シナプスの前神経細胞軸索末端におけるグルタミン酸放出機能の亢進によるものなのか、それとも、CA1 錐体細胞におけるシナプス入力統合されて活動電位発生までの何らかの内在的機能の亢進によるものな

のかを調べることにした。CA1 錐体細胞への興奮性入力 CA3 錐体細胞の軸索であるシャプファー側枝の末端である。その末端からの興奮性グルタミン酸放出機構について調べた。伝達物質の放出機構の機能を測る一つの方法として、通常、70-100 ms 間隔でダブルパルスを与え、2 回目のシナプス応答が大きくなることを確認する。いわゆるシナプス促進が起こる度合いを調べるのである。本実験では、シナプス促進を調べるために、通常用いられている刺激間隔 70、100、200 ms を用いた。集合シナプス後電位と集合スパイク電位についての刺激応答性に関して、VPA の投与量による影響の違いがなかったことから、以下の解析については、対照群と VPA300 群とで比較した。図 4 には 70 ms 刺激間隔で行った 3 日間の結果を示した。70 ms のみでなく、100、200 ms いずれの刺激間隔においてもシナプス促進への VPA 曝露の影響は見られなかった。

樹状突起における興奮性シナプスの応答と細胞体における活動電位生成の関係、すなわち神経細胞に内在する興奮性の性質を示す指標を EPSP/Spike potentiation (E/S potentiation)という。Slope と PS の関係性について対照群と VPA300 群について調べた。図 5 に示すように、E/S potentiation を示す曲線の傾きに顕著な変化は見られなかった。

つぎに GABA が関与する抑制性神経回路機能を調べた。前述したように、フィードバック抑制は 2 個のシナプスを介する応答であるため、刺激間隔は 5、10、20 ms と短くなる。GABA 系の効果がどのくらい続くかを見るために 20 ms まで調べた。3 日間の変化について、刺激間隔ごとに図 6 にまとめた(図では VPA300 群と対照群を示している)。PS 振幅の比は、VPA 曝露群で 3 日間とも小さい値となった。これは、この 3 日間においてフィードバック抑制が亢進していることを示す。図 6 をみると観察した PND13 からすでに PS の比が小さいことが分かる。すなわち、抑制性 GABA 機能は興奮系機能よりも早期に亢進していることが示唆された。成熟したラット CA1 領域の PS ペア比は 0.5 程度であることから、VPA 曝露は海馬の神経回路の反回抑制の発達を早めている可能性がある。

D. 考察

胎児期における化学物質への曝露が仔の

脳の成長にもたらす影響は、生後発達中の小脳皮質からの GABA の遊離量と、海馬の興奮性シナプスと反回抑制を調べることで予測できることが示唆された。化学物質の脳の発達への影響を調べるため、脳スライス標本を用いる、一匹の仔ラットから数枚の実験を行うことが出来る。化学物質の生後の脳の発達への影響を調べる実験において、成長期の仔の脳から作成するスライス標本をもちいて、GABA 機能を指標とした試験法を開発すると、①仔が成熟するまで待たずに試験が出来る。②1 個体から数例のデータが取得出来る。このように、本研究で示した実験法には、現行の発達神経毒性試験法 (TG426) の問題点を解決する可能性があることを示している。

本研究結果は、バルプロ酸の胎児期曝露が小脳と海馬において GABA 機能の早熟化をもたらしていることを示唆している。生後の早い時期に脳発達異常が検出されることは、化学物質の発達神経毒性の評価においては、非常に重要なことで、今後の試験法に組み込むべき価値のある発見である。また早熟化は、成熟した脳を用いても検出できないために、脳の成長期のこの時期に試験を行うことが重要である。

発達期の小脳皮質から遊離される GABA のイメージングによる化学物質の脳発達への影響評価

生後 4 日～6 日の発達期の小脳皮質から観察される GABA 遊離は、トランスポートタンパク質を介したグリア細胞由来である。生後 7 日にはこれが消失し、神経細胞由来の GABA 放出に転換する。脳の発達期にグリア細胞から遊離される GABA は、抑制性伝達物質としての機能よりも神経細胞の増殖と成熟に重要とされている。生体外からの GABA の投与、または GABA 受容体阻害剤による GABA 抑制が、神経細胞数の変化や神経回路の変成をもたらすことがすでに報告されている。さらにグリア細胞に由来する GABA 遊離は神経活動の開始によって減少し、発達期の小脳における GABA の役割が変化する。すなわち、生後 7 日以降に細胞外に遊離される GABA は抑制性神経伝達物質を産生する GABA 神経細胞の機能発達を反映している。幼若期の神経細胞、および障害を受けた神経細胞では GABA が興奮性伝達物質として働いて神経回路の形成と修復を

促すことが知られている。このように細胞外に遊離される GABA の濃度と機能変化は、興奮と抑制のバランスを取りながら、神経回路の形成のために綿密にプログラムされている。

今回の実験のように、外来性の薬物によって発達期の小脳における GABA 遊離パターンが変化することは、過興奮または過抑制をもたらすこと、小脳の神経回路の分化に影響をもたらすことは確実である。

発達期海馬のフィードバック抑制の電気生理学実験による化学物質の脳発達への影響評価

海馬に関しては、VPA 曝露の影響が PND15 にのみ興奮性機能への影響がみとめられた。CA1 領域は反回抑制を調べるのに適したシンプルな基本構築をしている (図 7)。CA1 領域には、主細胞である錐体細胞とその興奮をコントロールする GABA 性の抑制性神経細胞が存在する。CA1 錐体細胞の軸索は、大脳皮質に行くメインのルートのほか、近隣の GABA 性介在神経細胞に側枝を伸ばして興奮性シナプスを形成している。GABA 性介在神経細胞の軸索は、CA1 錐体細胞に抑制性シナプスを形成している。このような基本構築において、ひとたび錐体細胞に活動電位が発生すると、側枝を伝導した活動電位が軸索末端に到達し、グルタミンを放出することによって GABA 抑制性神経細胞の膜電位を浅くし、閾値を小さくする。GABA 抑制性神経細胞の膜電位が閾値に達して活動電位が発生すると、今度は錐体細胞軸索丘に向かって伸びた軸索を活動電位が伝導し、軸索末端から抑制性シナプス伝達物質 GABA を錐体細胞に放出する。錐体細胞軸索丘に存在する GABA 受容体が活性化すると、CA1 錐体細胞の膜電位を過分極によって深くし、その結果、興奮の閾値が相対的にあがり、錐体細胞が活動電位を発生しにくくなる。このようにして、CA1 領域の興奮性神経細胞は自分自身の過剰な興奮を防ぐため、フィードバック抑制を使うことによって制御しているのである。

興奮性機能に関して、VPA 曝露の影響が PND15 にのみ見られた。CA1 錐体細胞の興奮性は、CA3 錐体細胞の軸索末端の機能亢進ではなく、CA1 錐体細胞樹状突起に局在するグルタミン酸受容体の機能亢進、あるいは、活動電位発生機構である Na チャネルの機能

亢進の可能性が残った。このように興奮系機能にはPND15においてVPA投与による有意な亢進が認められた。この機能亢進がその後の発育で対照群レベルに回復するのか、あるいは亢進した状態で成長していくのかは不明である。海馬においては、抑制性 GABA 機能と興奮性機能ともに VPA によって機能が亢進し、対照群よりも adult-like により近づいた(発達が早まった)こと、抑制性 GABA 機能亢進のほうが興奮系の機能亢進よりも早期に見られたことなど、海馬スライスを用いたの簡便なダブルパルス刺激での応答解析は、神経発達毒性を評価する上で有用である可能性が示唆された。

今回用いたラットは3群各週齢で3-7匹である。1匹から6枚程度の海馬スライスを作成することができるので、実験群は計9群にもかかわらず動物数は合計39匹という結果となったことから、動物数の削減に効果的な手法であることも示すことができた。

授乳期(生後3週間以内)において観察される抑制機能発達の亢進は、産業化学物質である1-ブロモプロパンでも観察されている。この指標が他の化学物質に対しても有用であるかどうか、汎用性を調べる必要があると思われる。

E. 結論

胎児期に一回バルプロ酸に曝露されただけで、抑制性 GABA 機能が早期に成熟化することが明らかとなった。このことから、胎生期の化学物質への曝露の影響は、生後の抑制回路形成への影響評価で成長期の早い段階で評価できることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1]Kato, K, Shirao, T, Yamazaki H, Imamura K, Sekino, Y., Regulation of AMPA receptor recruitment by the action binding protein drebrin in cultured hippocampal neurons ,

J.Neurosci. Neuroengineer. 1 (2012) 153-160.

[2] Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., Sato K., L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation, Journal of Neuroinflammation, 9(2012)275

[3] Sato, K., Kuriwaki J., Takahashi, K., Saito Y., Oka J., Otani Y., Sha Y., Nakazawa K., Sekino Y., Ohwada T., Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors, ACS Chem Neurosci. 3 (2012) 105-113.

2. 学会発表(研究協力者との共著のみ)

[1] 田野崎 真、勝股 大樹、関野 祐子、福田 敦夫、吉田 祥子、過剰量の GABA は小脳発達に影響を及ぼす 第35回神経科学学会, 名古屋, 2012

[2] Muramoto, H., Sekino, Y., Hozumi, N. Yoshida, S. Developing transition of ATP release to glutamate stimulation in rat cerebellar slices using a new ATP imaging system. 42th Society for Neuroscience New Orleans, Oct.13-17,2012

[3] 笛田由紀子, 吉田祥子, 関野祐子, 自閉症モデルを用いた海馬の局所回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討. 第86回日本産業衛生学会, 松山, 2013.

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。

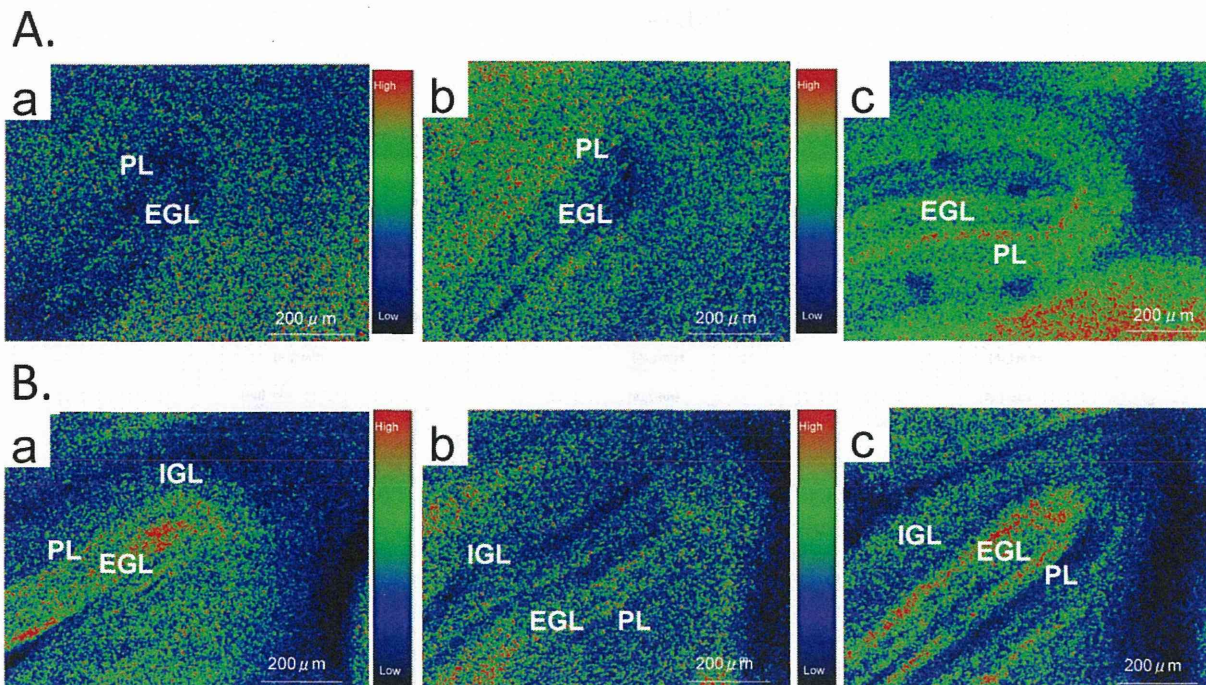


図 1. 小脳皮質からの GABA 遊離量の生後日齢による変化に及ぼすバルプロ酸経口投与の影響 A:生後 4 日齢の仔ラット小脳スライスからの GABA 遊離の可視化 B:生後 6 日齢の仔ラット小脳スライスからの GABA 遊離の可視化 対照群 (A.a.および B.a.) から作成した小脳スライスと比較して、300 mg/kg 群 (A.b.および B.b)、と 600 mg/kg 群 (A.c.および B.b) で強い GABA 遊離が観察される部位の広がり広範囲であることがわかる。

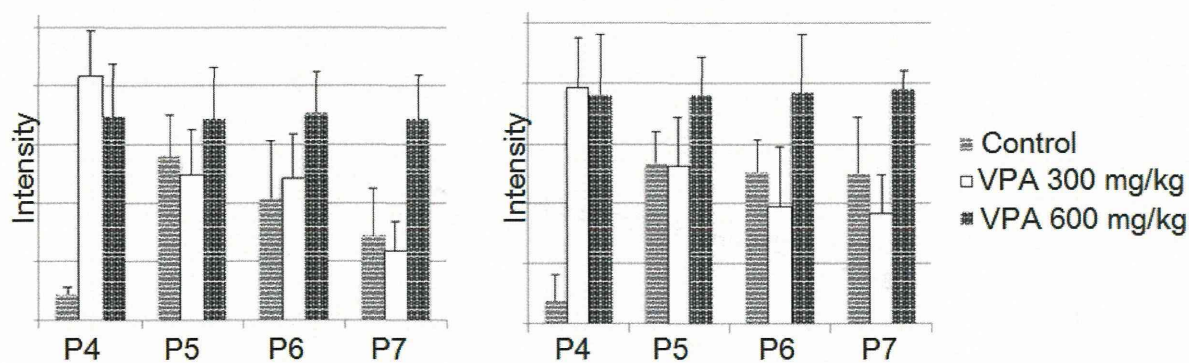


図 2. 小脳皮質からの GABA 遊離量の生後日齢による変化に及ぼすバルプロ酸経口投与の影響

生後のそれぞれの日齢で摘出した小脳から作成したスライス標本を用いて、GABA の細胞外遊離量を示す蛍光強度の日齢変化を測定した。コントロール群、300 mg/kg のバルプロ酸経口投与群、600 mg/kg のバルプロ酸経口投与群を比較している。

A:小脳スライスの外顆粒層 (EGL) における GABA 遊離量の生後日齢変化

B:小脳スライスの内顆粒層 (IGL) における GABA 遊離量の生後日齢変化

コントロール群では生後 5 日で GABA 遊離量が増加するが、バルプロ酸経口投与群では生後 4 日で既に高い GABA 放出量が観察された。その他の日齢ではコントロール群と 300 mg/kg 群との間に差はみられなかったが、600 mg/kg 群において生後 8 日において高い遊離レベルが観察された。

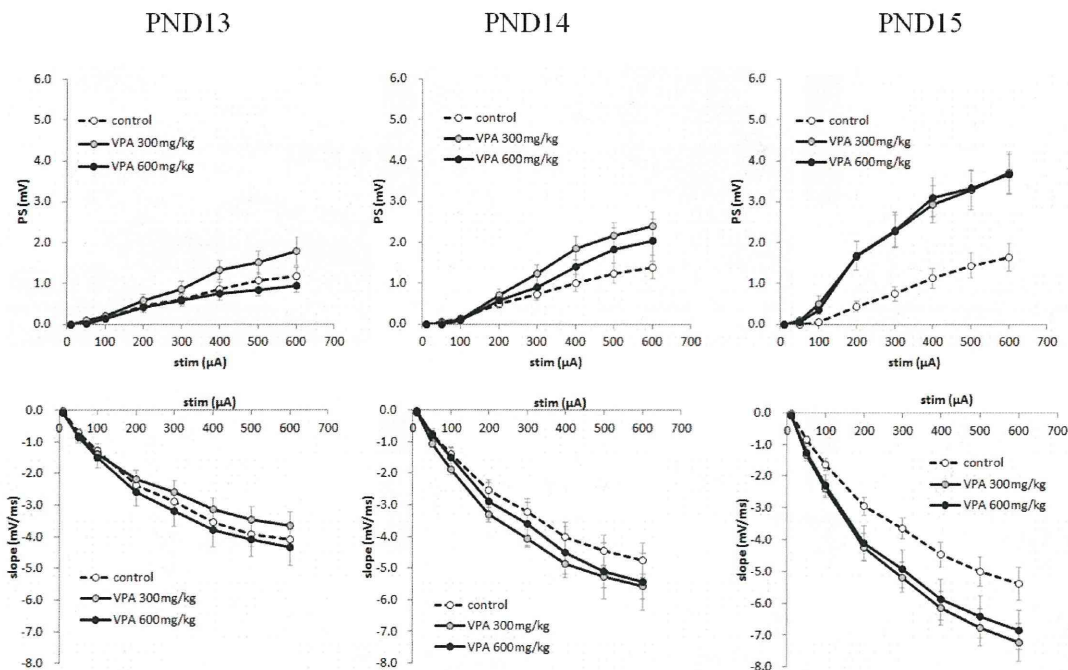


図3. PND13-15における海馬CA1領域の集合スパイク電位(population spike, PS)と集合シナプス後電位(field excitatory postsynaptic potential)の傾き(slope)についての刺激応答性

刺激電極と記録電極を *st. radiatum* に距離 210-250 μm で設置し、他方の記録電極を *st. pyramidale* に設置した。電気刺激の大きさを変えて PS の振幅 (上段) と slope (下段) についての刺激応答性を調べたところ、PND15において、2つのVPA曝露群で slope、PSともに刺激応答性が亢進した。誤差はSEMである。

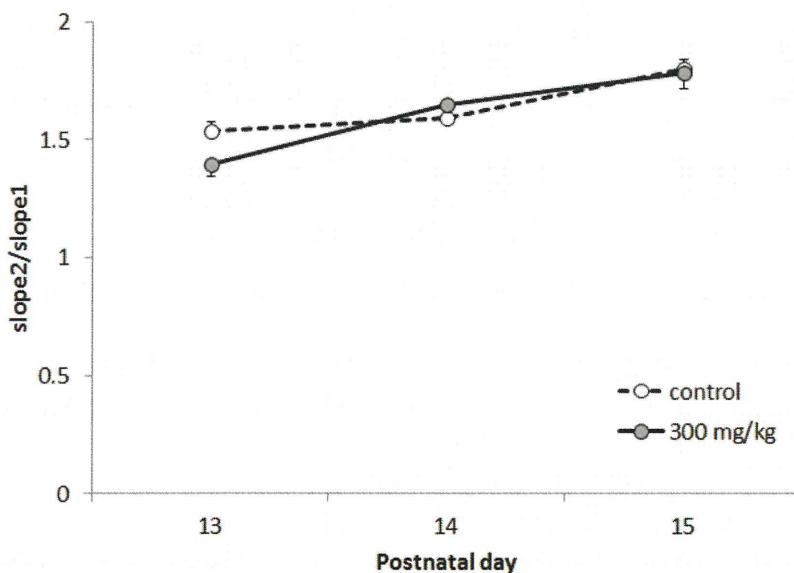


図4. ペアパルス促通へのVPA曝露の影響

slope 値が -1 mV/ms になるような、PS を誘発しない小さい電気刺激を用いて、PND13-15におけるグルタミン酸放出へのVPA曝露の影響を調べた。ペアパルス促通へのVPAの影響は見られなか