

201236004B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究
(H22-化学-一般-004)

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成24(2013)年5月

目 次

I. 総合研究報告

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による

化学物質の健康影響評価法に関する研究 ----- 1

宇佐見 誠

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----85

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----87

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究

研究代表者 宇佐見 誠 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長

研究要旨

本研究は、神経系および肝臓系の細胞を用いた、発生・発達・再生過程の神経系において、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の確立を目的とする。初年度は、実験系の確立として、神経堤細胞の機能解析法、発達成長期の脳神経系におけるニューロン・グリア新生評価実験法、神経幹/前駆細胞の培養法、及び胎児肝細胞の培養を確立する他、胎児・新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析を行った。二年度は、確立した実験系を用いて、毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性について調べた。最終年度は、共通の化学物質を被験物質として用いることにより、これらの実験系の特徴および有用性を検討し、化学物質の健康影響評価法として確立することを目的とした。

①ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす化学物質の影響を調べるための簡便な実験法を確立した。Rho シグナルパスウェイのキナーゼである ROCK の、阻害剤による遊走促進および活性化剤による遊走抑制を明らかにした。この結果から、Rho シグナルパスウェイにより制御される、アクチン結合タンパクのリン酸化を介した神経堤細胞の遊走に及ぼす化学物質の影響を解析することが可能であると考えられた。一方、モデル化学物質として用いたレチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は、ROCK の活性化に依存しない可能性が高いと考えられた。

②新生ラット前脳矢状面切片培養系において、生後初期のオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響について薬理的に検討可能な *in vitro* 評価系を確立した。この評価系においてオリゴデンドロサイト分化および遊走に対する化学物質の正負両作用を検出することが可能であることを確認した。さらに、この実験系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として、fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1、platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α を見いだした。また、本実験系を用いて、鉛、およびサリチル酸の影響評価を行い、両化学物質が生後初期オリゴデンドロサイトの分化、遊走を阻害することを明らかとした。

③ヒト胎児性癌細胞を用いて、発達神経毒性が懸念される化学物質（有機スズ、鉛、銅）の影響を検討した。その結果、いずれもミトコンドリアにおいて酸素消費量を低下させることを明らかにした。従って、酸素消費量は毒性評価に応用できる可能性が示唆された。

④メタボローム解析では、胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的とする。そこで、ヒト胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より分化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、および、成人肝細胞の単層培養の4種の *in vitro* 培養系について、メタボローム解析を行い、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を明らかにした。特に、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尿素回路が機能していないことを明らかにし、同回路を構成する酵素遺伝子の発現解析によっても同様な結論を得た。また、エネルギー代謝や化学物質代謝の第II相反応においても、胎児および成人肝細胞間で差異があることを明らかにした。化合物暴露実験では、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことを明らかにした。

⑤幼若期ヒト肝細胞においては、尿素系除草剤リニュロン並びに CYP1 ファミリーの誘導剤であるメチルコラントレンおよびオメプラゾールにより、薬物代謝酵素の CYP1 ファミリーが強く発現誘導されることを示した。リニュロンによる発現誘導は、CYP3A4、CYP3A5 および UGT1A1 においても認められた。これらの結果から、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝酵の誘導を考慮する必要があると考えられた。

⑥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。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。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。

以上のように、各実験系の特徴および有用性を検討し、成長期の個体における各発達段階において、遊走、分化、増殖、神経回路形成、神経応答および薬物動態を指標とすることによって体系的に発達段階特異的な毒性を評価できる健康影響評価法を確立した。この評価法は、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団の特定、および感受性の高い個体についても安全を確保できる安全係数の実験データに基づく決定法の確立、等に寄与することが期待される。

究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名	
佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長
諫田 泰成	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長
石田 誠一	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長
簾内 桃子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部研究員
関野 祐子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

機能に影響を与える神経幹/前駆細胞を用いた方法、(4)成体における代謝データを利用可能な新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立する。神経系および肝臓系の細胞を組み合わせることにより、発生・発達・再生過程の神経系においての、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、化学物質の健康影響評価法の確立を目指す。

本研究では、化学物質の安全対策の観点から、国民の健康と生活環境の維持・向上に資する成果が期待される。すなわち、成長期等の化学物質に対する感受性の高い個体を対象とする、メカニズムのみならず薬物動態を考慮した実験データのヒトへのより確かな外挿を可能とする化学物質の健康影響評価により、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団を特定し、健康被害を予防することが期待される。また、成体での実験結果から経験的に決められている、化学物質の暴露許容量を設定するための安全係数について、感受性の高い個体についても安全を確保できるような、実験データに基づく決定法の確立に寄与することが期待される。

化学物質による健康被害が生じた場合には、被害の軽減および治療法の開発に資すると考えられる。さらに、細胞系を利用した迅速かつ簡便な化学物質のリスク評価という

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は、長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

そこで本研究では、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的として、(1)神経堤細胞の遊走等機能解析法、(2)発達成長期脳神経系ニューロン・グリア新生評価法、(3)学習などの高次

特色により、グローバルな化学物質管理のための、化学物質の効率的な評価手法として活用されることが期待される。複合的な化学物質の影響評価に応用し、体系的・総合的な評価手法として発展させることにより、新たな毒性学的概念の確立に資する。

初年度は、実験系の確立として、神経堤細胞の機能解析法、発達成長期の脳神経系におけるニューロン・グリア新生評価実験法、神経幹/前駆細胞の培養法、及び胎児肝細胞の培養を確立する他、胎児・新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析を行った。

二年度は、確立した実験系を用いて、毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性について調べた。

最終年度は、共通の化学物質を被験物質として用いることにより、これらの実験系の特徴および有用性を検討し、化学物質の健康影響評価法として確立することを目的とした。

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後、末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

そこで本研究では、神経堤細胞の機能解析による評価法の開発として、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。

初年度は、神経堤細胞実験法として、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞遊走実験法を確立した。二年度は、神経堤細胞の遊走を制御するシグナルパスウェイの一つである Rho シグナルパスウェイの、本実験法の神経堤細胞遊走における意義を調べると共に、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響との関連を調べた。得られた結果に基づいて、神経堤細胞遊走に及

ぼす化学物質の影響のメカニズムおよびそれを利用した健康影響評価法について検討した。最終年度は、発生毒性を有する種々の化学物質による神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べ、得られた結果に基づいて、神経堤細胞遊走に及ぼす化学物質の影響のメカニズムおよびそれを利用した健康影響評価法について検討した。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

本研究は、脳神経系形成の基礎過程であるニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響について評価するための新たな評価手法を確立することを目的とする。ラット脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) では新生〜一週間ほどの間、神経幹細胞からニューロン新生およびグリア新生の両者が活発に起こっている。この時期の新生ニューロンは、吻側移動経路 (rostral migratory stream: RMS) を通り嗅球の介在性神経に、新生グリアは放射状に遊走しオリゴデンドロサイト及びアストロサイトに分化することが知られている (J Comp Neurol 519(4) 690-713, 2011; J Neurosci 29(36) 11172-81, 2009)。特に、オリゴデンドロサイトはこの時期以降、ほとんど新生が起これないため、この時期の異常が重篤な悪影響を及ぼす可能性が高い。実際に、これらのリスクを回避するために、小児に対しては抗がん剤の使用が禁忌とされている。そこで、生後初期の SVZ に含まれる神経幹細胞及び前駆細胞を緑色蛍光蛋白質 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) で標識した後に、前脳まるごとの矢状面切片を作成、培養し、薬理的検討、免疫組織学的検討を行うことにより、オリゴデンドロサイト新生に対する化学物質の影響評価を可能にする *in vitro* 評価系を確立する。一般的に化学物質リスクは毒性作用に準じる、負の作用が注目されるが、正の作用 (異常な増殖や遊走) も大きなリスクとなりうる。そこで、本評価系において正負両作用が検出可能であるかどうかについても検討する。また、この研究班の大きな目標として、ラット前脳矢状面切片培養系において得られた結果をヒトへ外挿するため、バイオマーカーを探索することがある。そこで、オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、ヒトと齧歯類で共通の生理的機能を担っている分子からバイオマーカー候補分子を抽出し、その妥当性についても検討する。

さらに、本評価系を用いて実際の化学物質の影響評価を試行する。

3. ヒト神経幹／前駆細胞培養実験法

私たちは環境中の様々な化学物質に曝露されている。近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている(Environ Health Perspect, 2012, 120: a258-a260)。発達期の胎児、小児期においては中枢神経系が脆弱で未完成であるため、化学物質により長期間あるいは遅発性に有害作用が出る危険性が懸念されている。このように子どもの安全を確保できるようなリスク評価法の整備が強く求められている。

現在までの化学物質のリスク評価は主として実験動物の行動実験などの結果に基づいている。しかしながら、多数の動物とコスト、時間がかかるのが問題である。ヒトとげっ歯類の種差の問題に加えて、動物愛護の観点からも *in vitro* 毒性評価系が必要である。さらに、評価すべき化学物質は多数あり、簡便、低コスト、スループット性の高い評価手法でなければならない。化学物質の毒性発現メカニズムに基づいた評価系を構築すれば、環境中の化学物質がヒト健康に及ぼす影響の体系的、包括的な予測が可能になることが期待される。

神経幹／前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られており、発達期に化学物質に暴露されて神経幹／前駆細胞に影響が出ると長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性が考えられる。従って、ヒト神経幹／前駆細胞は毒性評価系の構築に有用なソースとなりえる。

本研究では、発達神経毒性が懸念される化学物質として、有機スズ、鉛、銅の金属を選択し、これらの化学物質に共通の毒性発現メカニズムの探索を行うこととした。

有機スズ化合物は船底などの防汚塗料として使用され、海洋汚染や魚介類への残留が問題となっている。我が国においては、1990年より「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)の第二種特定化学物質に指定された。有機スズ化合物の1種であるトリブチルスズ(TBT)を投与された妊娠ラットから生まれた子供に行動異常が報告さ

れている(Toxicol Lett, 1991, 55, 109-115)。現在、TBTは使用が制限されているが、船舶などに大量に使用されたため環境に大量に残存しており、ヒト血中にも数十から数百 nM 存在している(Environ Res, 1999, 81, 108-116)。

鉛も発達毒性の可能性が指摘されており、ヒトにおける疫学研究によれば、血中鉛濃度 15 μ g/dL 以上で早産及び胎児の成育異常が報告されている(WHO Food Additive Series: 44)。

銅に関しては、動物実験の結果であるが、高投与量群(>80 mg Cu/kg 体重/日)では胎児毒性と奇形が報告されている(Environmental Health Criteria No.200)。

上述の化学物質の情報をもとに、我々は、神経幹／前駆細胞のマーカーNestinを発現しているヒト未分化細胞を用いて、エネルギー代謝の観点から化学物質曝露による毒性発現メカニズムを検討した。その結果、有機スズ、鉛、銅はいずれも酸素消費量を低下させることを明らかにした。一方、生細胞数や糖輸送は毒性との相関が低く、毒性評価の指標に適さないと考えられた。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

個体の成長期である胎児・新生児においても、肝臓は重要な外来性化学物質の代謝器官であると共に、その毒性発現の標的器官でもある。また、胎児・新生児の肝臓は、成体と比べて、化学物質に対する感受性および代謝能などの機能に差異がある。そのため、個体の成長期における化学物質の健康影響評価においては、成長期の肝臓の感受性および機能の評価できる実験法が必要である。

本研究では、胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、これまでに我々が実施してきた細胞機能の研究の成果を基礎にして、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的とする。そこで、ヒト胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より分化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、および、成人肝細胞の単層培養の4種の *in vitro* 培養系について、メタボローム解析を行い、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を明らかにした。また、胎児肝細

胞に由来する3種の細胞間での分化度の違いによる代謝機能の変化を確認した。化合物暴露実験では、化学物質に対する感受性が胎児と成人肝細胞との間で異なることを明らかにした。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝臓の薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、化学物質の健康影響評価において体内動態に關与する重要な因子であるだけでなく、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密接に關連している。そのため、その発現変動は個体の成長に大きな影響を及ぼす可能性がある。

しかし、実験動物とヒトとの間には、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、化学物質の暴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検討が必要である。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および薬物動態関連因子の特性、および化学物質暴露によ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貢献できると考えられる。

本研究では、成長期のヒト肝細胞における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の発現の特性およびそれらの化学物質への暴露による影響を、遺伝子レベルで調べた。二年度は、とりわけ幼若期における化学物質の毒性発現に密接に關わる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ネクロンの曝露が、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。また、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た。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

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が關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。

平成23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。平成24年度は、抗てんかん薬であるバルブ

ロ酸 (VPA) を妊娠ラットに経口投与した場合に仔に現れる神経発達毒性を、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手法により、生後発達期の段階で予測可能であるかを評価した。

B. 研究方法

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

ウィスター系ラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) の妊娠 10.5 日胚から、タングステン針を用いて、物理的に菱脳部神経管を取り出した。取り出した菱脳部神経管を、培養シャーレ、培養マルチプレート又は培養用スライドチャンバー (Becton, Dickinson and Company) に培養液(10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO)と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO₂、37°Cにて培養した。培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への遊走細胞の広がりを観察した。細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールで繋いでできる図形を円とみなして、その面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。培養 48 時間に培養底面から神経管を掻き取り、培養器底面に残った神経堤細胞として回収してウェスタンブロッティングを行い、リン酸化アクチン結合タンパクを検出した。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系の確立

生後 1-3 日齢ラットの前脳矢状面切片標本を作成し (150 µm) トランスメンブレン (Millipore) 上に静置し、各種培地で 1 週間培養し細胞の生死、大脳皮質層構造の変化をニッスル染色により確認した。

レトロウイルスを用いた SVZ の神経幹細胞および前駆細胞の可視化

まるごとの生後 1-3 日齢ラット脳 SVZ に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス (NIT-eGFP; J Neurosci 19(19) 8487-97, 1999) を 500 nl 注入することにより神経幹細胞

および前駆細胞を標識した。1-7 日後に環流固定し前脳矢状面切片標本 (150 µm) を作成し eGFP 標識細胞の遊走経路を確認した。培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の遊走の検討

生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片 (150 µm) を作成し、NIT-eGFP を SVZ に 30 nl 滴下し、6 日間培養後に固定、観察した。

丸ごと動物と培養前脳矢状面切片における SVZ 神経幹細胞および前駆細胞のグリア細胞分化マーカー発現の比較

上記まるごと動物と培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞のグリア細胞分化マーカー蛋白質 (A2B5, O4, GFAP) 発現について免疫組織化学的に比較した。比較項目としては各マーカー陽性 eGFP 標識細胞の遊走範囲およびオリゴデンドロサイト出現率を検討した。

eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイトに対する正負両作用の検出

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片をシタラビン (cytosine arabinoside: AraC) で 3 日間処理し (1.5 µM)、オリゴデンドロサイト新生に対する影響について薬理的検討を試みた。同様にプロラクチン (prolactin: Prl) (10, 100 nM) の作用についても検討した。ヒトへの外挿に応用可能なバイオマーカーの探索

オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、齧歯類とヒトとで共通の生理機能を担っている分子について文献調査した。AraC 適用下での候補となる分子 (fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1、platelet derived growth factor receptor (PDGFR)α) と O1 の発現について検討した。

オリゴデンドロサイト新生に対する化学物質の影響評価の試行 (鉛、サリチル酸)

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を酢酸鉛 (3, 10 µM) 存在下で 3 日間培養し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と遊走に対する作用を検討した。遊走は eGFP(+)O1(+) 細胞を線で結んだ際の最大面積をパラメーターとして定量した。同様に、サリチル酸 ナトリウム (1, 3 µM) の作用についても検討した。

3. ヒト神経幹／前駆細胞培養実験法

細胞培養

ヒト胎児性癌細胞 NT2/D1 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Ashrat, Israel)、100U/ml penicillin (Gibco BRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL) を加えた培地にて培養した。

細胞増殖

細胞を 10^4 cells/dish の割合で 96 穴プレート (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。細胞増殖は、MTS (Promega) を加えて 1 時間培養し、595nm における吸光度の変化により解析した。

糖輸送活性

糖輸送活性は、2-デオキシグルコース (2-DG) の蛍光アナログである 2-NBDG の取り込みによって測定した。

酸素消費量

酸素消費量は、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience 社) を用いて、酸素消費速度 OCR (Oxygen Consumption Rate) により解析した。専用の 96 穴プレートに細胞を播種後、化学物質を添加し、24 時間後に OCR の測定を行った。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞の培養

(ヒト胎児肝細胞の単層培養)

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。この細胞は、正常胎児肝臓 6 ドナー (妊娠週齢 13 週以降) に由来する。培養には、同社より購入した CSC Complete Medium (10% FBS 含有、同一ロット) に、63 mg/L penicillin と 100 mg/L streptomycin を加えたものを用いた。ヒト胎児肝細胞の単層培養には、直径 60 mm の培養ディッシュ (FALCON 社製、付着細胞用) を用い、5% CO₂ を含む気相下 37°C で、6 日間培養を行った (Matsushita et al, 2003)。継代数は、6 継代の細胞を使用し、播種密度は 1×10^5 cells/dish、培地交換は 2 日毎に行った。6 日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

(胎児肝細胞から肝芽細胞の誘導と単層培養)

上記と同じ条件でヒト胎児肝細胞の播種後、培養 4 時間後に培地交換を行い、1 mM 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)。その間、培地交換は、5 日目までは 2 日毎に行い、それ以降は毎日行った。アルブミンとサイトケラチン 19 をマーカーとするフローサイトメーターでの解析では、1 mM 酪酸ナトリウムでの肝芽細胞の誘導効率は約 30% である。8 日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

(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、William's E を基本培地として、Insulin 10 mg/L, EGF 50 µg/L, Linoleic acid 50 µg/L, 63 mg/L penicillin, 100 mg/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、1 mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径 60 mm の培養ディッシュ (IWAKI 社製、浮遊細胞用) に、 8×10^5 cells/dish の密度で播種した。播種後 2 日目に、1 mM 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。

CYP3A4 の誘導および活性測定

ヒト胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より分化誘導された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の CYP3A4 の誘導は、10 µM rifampicin を含む培地で 4 日間培養することにより行った。活性測定には、20 µM benzyloxyresorufin を基質として用い、脱アルキル活性の測定により行った (BROD 法)。

ヒト成人肝細胞の培養

メタボローム解析に用いたヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社より購入したヒト非凍結肝細胞 (12.5 cm² フラスコ接着、製品番号

HEP220-FL12) 3 ロットを使用した (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。

化合物暴露実験には、BIOPREDIC 社より購入したヒト凍結肝細胞(HEP187219)を使用した。この細胞は、52 歳女性の肝臓正常部位に由来する。細胞を BIOPREDIC 社の Basal hepatic cell medium (MIL600)に Additives for hepatocyte seeding medium (ADD221)を加えたものを用い、 0.5×10^4 cells/mL の密度で播種した。播種 24 時間後には培地を Basal hepatic cell medium に Additives for hepatocyte culture medium (ADD222)を加えたものに交換し、4 日間培養した。

メタボローム解析

メタボローム解析のサンプルは、細胞を 5% mannitol 溶液で 2 回洗浄後、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT) 社より提供された内部標準物質を含むメタノール (WAKO, infinity pure grade) で処理することにより調製し、 -80°C で保存した。

代謝物質の測定は HMT 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)。

ヒト胎児および成人肝細胞から回収された代謝物質サンプル (n=3) は、 -80°C の条件下で HMT 社に送付された。測定は、各サンプルとも約 2×10^6 個の細胞から回収した代謝物質について、CE-TOFMS (キャピラリー

電気泳動—飛行時間型質量分析計) により行った。

HMT 社の有するデータベースをもとに、測定結果より代謝物質を同定し、その相対的存在量を算出した。

測定により検出された 217 の候補化合物 (カチオン 99、アニオン 118) について、その相対的存在量を主成分分析により解析した。

胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間の比較は、t-検定 ($p < 0.05$) により行い、統計学的に有意な変動がみられた 47 化合物について、階層的クラスタリング解析を行った。

また、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 群間の比較は、Oneway ANOVA 検定 ($p < 0.05$)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解析を行った。

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。

尿素回路を構成する酵素遺伝子の発現解析

(細胞からの RNA の調製)

細胞の全 RNA は、RNeasy mini Kit (Qiagen) により調製し、RNA 量および純度は、Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech)により測定した。

(リアルタイム PCR による酵素遺伝子の発現解析)

各 RNA サンプルに由来する cDNA は、ランダムプライマー用いた High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)により合成した。リアルタイム PCR 解析は、ABI7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems)により行った。各遺伝子のプライマー/プローブセット (TaqMan Gene Expression Assay) は、それぞれ ASS1 (argininosuccinate synthase 1, Hs01597989_g1)、ASL (argininosuccinate lyase, Hs00902699_m1)、ARG1 (Arginase, Hs00968979_m1)、OTC (Ornithine transcarbamylase, Hs00166892_m1)を使用した。

化合物暴露実験

トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛 (II) 三水和物、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの 6 種の化合物について、胎児および成人肝細胞に対する暴露実

験を行い、各化合物の IC₅₀ 値を算出した。

細胞は、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およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養を用いた。各細胞について、培地中に各化合物を様々な濃度で添加し、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。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

市販凍結ヒト肝細胞選択時の添付代謝データから、各薬物代謝酵素のデータと年齢との相関について調べた。ヒト成長期における凍結ヒト肝細胞を、Gibco Invitrogen Cell Cultures 社、BD Biosciences 社、XenoTech 社、Celsis 社および Tissue Transformation Technologies 社から購入した。ヒトの成長期を以下の 4 期間に分類した。すなわち、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 バイアル以上の収集を開始した。また、可能な限り誘導能評価に利用できる接着型ヒト肝細胞を優先して収集した。

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 μM)、オメプラゾール (OPZ ; 5 μM) およびリニユロン (LNR ; 5~75 μM) を、5% CO₂-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。

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。

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 μM)、オメプラゾール (OPZ ; 5 μM) およびリニユロン (LNR ; 5~75 μM) を、5% CO₂-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。

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。

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。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。

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。

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。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

マウス扁桃スライスを用いて、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する実験は研究分担

者関野祐子らにより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。発達期小脳皮質での GABA 放出分布を観察する実験は協力研究者の吉田祥子らにより、豊橋技術科学大学で行われた。海馬スライスを用いた、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は協力研究者の笛田由紀子らにより、産業医科大学で行われた。

B-1. 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。

B-2. 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 μ A、持続時間 200 μ 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。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。

B-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 として、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。

B-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、同居翌朝にスメ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、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 μm 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 μm ）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 μm 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出来る。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

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。

ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

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(株)より購入した。

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た。

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. ラット神経堤細胞遊走実験法

ラット神経堤細胞は、妊娠 10.5 日頃の胚から摘出した神経管を、フィブロネクチンでコートした培養容器に付着させて培養することにより、培養容器底面に遊出し、放射状に広がるように遊走する。そこで、培養液に被験化学物質を添加し神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べる実験法を検討した(図 1)。

胚の摘出時期、神経管の摘出法、培養容器、などを検討した結果、ラット妊娠 10.5 日胚の菱脳部神経管を、周囲組織を物理的に除去した後に、化学的表面処理としてプライマリア®処理された培養容器で培養すると、神経堤細胞の良好な遊出および遊走が認められた。培養 24 および 48 時間における細胞の広がりや円と見なして、それらの面積から求められる半径の比を遊走距離とすると、簡便で定量的にバラツキを小さくして解析することが出来た(図 2, 表 1)。また、培養終了後の細胞は、二次元電気泳動法および免疫組織化学的方法などによる、タンパク発現解析に用いることが出来た。

陽性対照物質として、胚の過剰暴露により神経堤症に似た症状を誘発することおよび神経堤細胞遊走に対する阻害作用が報告されている、オールトランス-レチノイン酸を用いて、本研究で確立したラット神経堤細胞遊走実験法の有用性について検討した結果、ラット全胚培養法において、胚の形態異常および発育抑制を示す濃度である 10 μM のオールトランス-レチノイン酸の存在下で、対照群と比較して、約 10%の有意な遊走阻害作用が認められた(図 3)。以上のことから、本実験法は神経堤細胞遊走実験法として有用であると考えられた。

Rho シグナルパスウェイのキナーゼである ROCK の阻害剤を培養液に添加して、神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた結果、ROCK 阻害剤の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に促進された(図 4 A)。ウエスタンブロッティング法により、回収した神経堤細胞におけるリン酸化アクチン結合タンパクを調べたところ、タンパク量の減少が認められた(図 4 B)。これは Rho シグナルパスウェイの阻害効果と一致する。一方、ROCK 活性化剤を培養液に添加した場合に

は、神経堤細胞の遊走は抑制された(図 4 C)。これらの結果により、Rho シグナルパスウェイによるアクチン結合タンパクのリン酸化制御により、神経堤細胞の遊走が制御されていると考えられた。

神経堤細胞遊走阻害作用を示したレチノイン酸存在下で培養した神経堤細胞におけるアクチン結合タンパクのリン酸化を調べたところ、リン酸化タンパクの増加が認められ(図 5 A)、ROCK 阻害剤による遊走促進およびリン酸化タンパクの減少とは、逆の現象が起きていると考えられた。

この結果および上記の ROCK 活性化剤の結果から、レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害作用において、Rho シグナルパスウェイの関与が予想されたので、ROCK 阻害剤を同時に培養液に添加して、レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害に及ぼす影響を調べた。その結果、ROCK 阻害剤により、遊走が促進された神経堤細胞においてもレチノイン酸による遊走阻害作用が、レチノイン酸単独と同様の比率で観察され、遊走阻害の ROCK 阻害剤による抑制は認められなかった(図 5 B)。この結果から、レチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は、ROCK の活性化に依存しない可能性が高いと考えられた。

発生毒性を有する 13 種類の化学物質を、ラット全胚培養において胚毒性を示す濃度又は、文献における発生毒性を起こす血中濃度を参考にして、培養液に添加して、神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。その結果、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛、サリチル酸およびセレン酸の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に阻害された(図 6)。

神経堤細胞の遊走を阻害した化学物質について、ウエスタンブロッティング法により、回収した神経堤細胞におけるリン酸化アクチン結合タンパクを調べた。その結果、セレン酸においてタンパク量の減少が認められた(図 7)。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系の確立

前脳矢状面切片を表 2 で示す培地で培養し、細胞の生死、大脳皮質層構造を比較検討したところ、#6 の培地で培養したときに最も層構造が保持され、*in vivo* に近い状態となった。そこで今後、前脳矢状面培養には

#6 の培地を用いることとした。

レトロウィルスを用いた丸ごと動物 SVZ と培養前脳矢状面切片 SVZ の神経幹細胞および前駆細胞の可視化と分化、遊走の比較

まるごと動物では、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (図 8)。培養前脳矢状面切片でも同様に、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた。以上のことから、培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* とほぼ同じ経路を遊走することが確認できた。まるごと動物、培養前脳矢状面切片ともに、SVZ 神経幹細胞および前駆細胞は以下に示す同様の分化パターンを示した (図 9)。グリア前駆細胞マーカー A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で陽性細胞を確認した。アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。以上の結果は培養前脳矢状面切片において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様に分化することを示している。特に eGFP 標識細胞のオリゴデンドロサイト分化について定量すると、培養前脳矢状面切片では $14.28 \pm 1.439\%$ 、まるごと動物では $13.13 \pm 1.114\%$ の細胞が O1 (+) 細胞となり (図 10)、両標本ともにオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ確立で起こっていることが確認された。

eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイトに対する正負両作用の検出

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を AraC 処理 ($1, 5 \mu\text{M}$, 3 d) したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲は明らかに狭くなっていた (図 11 A)。eGFP 標識細胞数を計測したところ、有意に減少していた (図 11 B)。また、eGFP 標識細胞中の O1 (+) 細胞の出現率も有意に減少していた (図 11 C)。同様に Prl ($10, 100 \text{ nM}$) についても検討した。図 12 の eGFP (+) 細胞数が示すように、Prl は神経幹細胞および前駆細胞の増殖を抑制する傾向を示したが、有意な差には至らなかった。しかし一方、GFP (+) 細胞の遊走に対しては促進的に作用した (図 12 A)。また、eGFP (+)

O1 (+) 細胞数は Prl の用量依存的に増加した (図 12 B)。eGFP (+) 細胞中の O1 (+) 細胞が占める割合を算出したところ、Prl の用量依存的に O1 (+) 細胞の比率が上がっていくことが明らかとなった (図 12 C)。Prl 100 nM においてはその差は有意となっていた。以上の結果は Prl によってオリゴデンドロサイトの分化および遊走が促進されたことを示している。

ヒトへの外挿に応用可能なバイオマーカーの探索

オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、ヒトと齧歯類で共通の生理機能を担っている分子を文献検索した。O1 はヒトの脳発達においてもオリゴデンドロサイト前駆細胞に必ず発現する分子であった。(J Comp Neurol 501 (6) 879-90, 2007; Int J Neurosci 120 (4) 305-13, 2010)。従って、培養ラット前脳矢状面切片における O1 の発現を検討することで、ヒトにおけるオリゴデンドロサイト分化への影響を予測できる。さらに、fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1 (J Neurosci 31(42) 14899-14909, 2011) および (Nat Biotechnol 29(10) 34-942, 2011) がヒト脳において遊走が活発なオリゴデンドロサイト前駆細胞に高発現しているという報告を見いだした。そこで、AraC を適用した培養前脳矢状面切片において O1-FGFR1, O1-PDGFR α の二重染色を行った。AraC によるオリゴデンドロサイト前駆細胞増殖に対する負の作用は濃度依存的であったが、遊走に対する負の作用は $1 \mu\text{M}$ において頭打ちとなった。AraC による FGFR1(+)/O1(+) 細胞数の減少曲線は濃度依存的であった。一方、O1(+)/PDGF α (+) 細胞の減少曲線は $1 \mu\text{M}$ で頭打ちとなった。

オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・遊走に対する鉛およびサリチル酸の影響

酢酸鉛 ($3, 10 \mu\text{M}$) により eGFP (+) 細胞数は濃度依存的に減少した (図 13 A)。また、eGFP (+)/O1 (+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP (+) 細胞における O1 (+) 細胞の割合は $3, 10 \mu\text{M}$ ともに同程度減少していた (図 13 B)。さらに、NIT-eGFP (+)/O1 (+) 細胞の遊走も濃度依存的に阻害された (図 14)。酢酸鉛 $10 \mu\text{M}$ においてその差は有意であった。コントロール群および酢酸鉛 $10 \mu\text{M}$ 適用群の典型的な蛍光免疫組織化学染色像を図 15 に示す。

サリチル酸 (1, 3 μM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した(図 1 6 A)。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少し、3 μM ではほぼ 0 となった。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3 μM の濃度で有意に減少した(図 1 6 B)。NIT-eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走は濃度依存的に阻害される傾向が見受けられた(図 1 7)。コントロール群およびサリチル酸 3 μM 適用群の典型的な蛍光免疫組織化学染色像を図 1 8 に示す。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法 細胞数に対する金属曝露の影響

ヒト未分化細胞の生存率に対する各種金属曝露の影響を検討した。その結果、図 1 9 に示すように、有機スズ化合物であるトリブチルスズ (TBT) の低濃度曝露によって生細胞数の減少が認められた。一方、鉛 (10 μM) や銅 (10 μM) の曝露によっては生細胞数の減少が認められなかった。従って、生細胞数は毒性の指標とならないことが示唆された。糖輸送に対する金属曝露の影響

TBT の生細胞数減少のメカニズムとしてエネルギー代謝の観点から、解糖系の最初のステップである糖輸送を検討した。その結果、低濃度 (100nM) の TBT 曝露により有意な糖取込の低下が認められた。銅 (10 μM) の添加によっても低下したが、鉛 (10 μM) はほとんど影響を示さなかった(図 2 0)。

酸素消費量に対する金属曝露の影響

解糖系とは別のエネルギー代謝としてミトコンドリア機能に着目し、酸素消費量の解析を行った。その結果、TBT 曝露によって酸素消費量の低下が認められた。鉛 (10 μM)、銅 (10 μM) の添加によっても低下した(図 2 1 A)。また、cAMP アナログや cGMP アナログは酸素消費量を上昇させることが知られており本アッセイ系において陽性対照物質として使用したところ、既知の作用が検出できることを確認した(図 2 1 B)。従って、酸素消費量は毒性評価のいいマーカーになることが示唆された。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞の培養

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 細胞の回収直前の位相差顕微鏡写真を図 2 2 から図 2 4 に示した。

ヒト胎児肝細胞は、ほぼコンフルエントに増殖しているが、肝実質細胞様の細胞はほとんど見当たらない(図 2 2)。

1 mM 酪酸ナトリウムによって、肝芽細胞に誘導した細胞(単層培養)では、ところどころに明瞭な核を有する肝実質細胞様の細胞が散見されるが、形態は不定形で、一部が敷石状の特徴的な形態をとる(図 2 3)。

肝芽細胞の三次元培養(スフェロイド培養)では、細胞が poly-L-glutamic acid 被覆ディッシュの上で、自発的に三次元的な擬集塊を形成している状態がみられる(図 2 4)。

CYP3A4 の誘導および活性測定

10 μM rifampicin を含む培地で 4 日間培養することにより誘導した、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 CYP3A4 活性を BROD 法により測定した(図 2 5)。その結果、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順に CYP3A4 活性が徐々に増大していた。

ヒト成人肝細胞の培養

メタボローム解析に用いたヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社により非凍結の状態で輸送されたものを用いた。本細胞は肝組織から肝細胞を単離後、凍結融解の操作を経ずに納品されるもので、新鮮肝細胞に近い性質を有していると考えられる。

受け入れ時に各ロットとも顕微鏡下で細胞の形態を観察するとともに、細胞数を計測した。顕微鏡像を図 2 6 に示す。各細胞とも、正常な初代肝細胞に近い像を示していた。また、細胞数も各フラスコとも 2×10^6 個以上あり、BIOPREDIC 社添付のデータと相違なかった。以上により、輸送の過程で細胞は大きなダメージを受けていないと考えられた。

メタボローム解析

ヒト胎児および成人肝細胞から回収された代謝物質サンプル (n=3) を -80 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で HMT 社に送付した。測定は、HMT 社にて各サンプルとも約 2×10^6 個の細胞から回収した代謝物質について、CE-TOFMS により行った。試料の情報を表 3 に示す。

HMT 社によるメタボローム解析は、同社が有する約 900 の代謝物質の精密質量と移動時間が登録された代謝物質ライブラリを

使用し、試料中から検出されたピークのうち、ライブラリサーチによりアノテーションがついた代謝物質を解析対象とする。そのため、一度の測定で最大約 900 の代謝物質が存在量とともに同定できる。代謝物質ライブラリは主要代謝経路の代謝物質の大部分を網羅しているため、各代謝物質の存在量だけでなく、代謝マップに基づく解析が可能である。

送付された培養細胞 12 検体について CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。測定結果について、HMT 社の代謝物質データベースに登録された物質を対象として解析を行った結果、217 (カチオン 99、アニオン 118) のピークが検出された。測定結果を代謝経路に従いマップした結果を図 27 に示す。

検出された 217 の化合物について主成分分析により解析したところ、第 1 主成分による群分けで、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各レプリカサンプルが非常に近傍にプロットされた (data not shown)。また、成人肝細胞由来のサンプルはサンプル間でばらつきが大きく、由来するドナーの個人差を反映すると考えられた (data not shown)。

次に、検出された 217 の化合物について、胎児肝細胞と成人肝細胞間の比較を t-検定 ($p < 0.05$) により行うとともに、階層的クラスタリングにより解析した。その結果、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 (図 28 および表 4)。

変動率の大きかった上位十位までには、ornithine (46.9-fold, $p=0.001$), Cys (22.2-fold, $p=0.0004$), glycerophosphocholine (13.1-fold, $p=0.01$), glycerol 3-phosphate (13.1-fold, $p=0.0004$), urea (7.7-fold, $p=0.029$), guanidoacetic acid (6.4-fold, $p=0.0007$) などの化合物が含まれていた。

また、下位十位までには、 β -Ala (0.03-fold, $p=0.008$), O-acetylcarnitine (0.11-fold, $p=0.021$), carnitine (0.19-fold, $p=0.029$) などの化合物が含まれていた。

各代謝経路別にみると、まず、尿素回路とその周辺の代謝産物に胎児肝細胞と成人肝細胞間で変化が見られた。成人肝細胞では胎児肝細胞に比べ、ornithine (46.99-fold, $p=0.001$), urea (7.70-fold, $p=0.029$), guanidoacetic acid (6.39-fold, $p=0.0007$),

citruline (4.82-fold, $p=0.034$) などの代謝産物が増加する一方で、クレアチン経路の代謝産物である creatine (0.44-fold, $p=0.02$), phosphocreatine (0.11-fold, $p=0.035$) が減少していた (図 29)。

エネルギー代謝に関連する代謝物では、解糖系/糖新生の中間代謝物である glucose 6-phosphate (2.48-fold, $p=0.042$) が、TCA 回路の中間代謝物である、fumaric acid (4.03-fold, $p=0.014$), 2-oxoglutaric acid (3.36-fold, $p=0.02$), malic acid (2.89-fold, $p=0.034$), succinic acid (2.56-fold, $p=0.034$) などが増加していた。

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 30)。

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。

尿素回路を構成する酵素遺伝子の発現解析

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、成人肝細胞において代謝物の相対的存在量の増加がみられた尿素回路について、各酵素遺伝子の発現量を Real-Time PCR により測定し、胎児肝細胞と成人肝細胞間で比較した。その結果、argininosuccinate synthase 1 (ASS1, 2.59-fold, $p=0.01$), argininosuccinate lyase (ASL, 9.89-fold, $p=0.026$)の2遺伝子で胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で発現量が高く、残りの2種の遺伝子 arginase (ARG1), ornithine transcarbamylase (OTC)は、胎児肝細胞ではほとんど発現しておらず、成人肝細胞でのみ発現が確認された (図3 1および3 2)。

化合物暴露実験

上記のメタボローム解析の結果を踏まえ、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察される化合物による暴露実験を行った。細胞は、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およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の4種を用いた。胎児肝細胞由来の3種の細胞は、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と分化させるにしたがって、成人肝細胞に機能的に近づくことが報告されている (Kiyota et al, 2007, Matsushita et al, 2003)。そこで、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察されるトリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛 (II) 三水合物、*all-trans*-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの6種の化合物 (図3 3および表5) について暴露実験を行い、各化合物の IC_{50} 値を算出した (図3 4)。その結果、トリブチルスズ、アセトアミノフ

エン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物は、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、成人肝細胞の単層培養の順に、 IC_{50} 値が上昇し、成人肝細胞から胎児肝細胞に向けて化合物に対する感受性が高くなることが示された。酢酸鉛 (II) 三水合物では、胎児肝細胞由来の3細胞間で変化はなく、成人肝細胞に比べ感受性が高くなった。*all-trans*-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムは、他の4種の化合物とは逆に成人肝細胞で最も感受性が高かった。また、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞のスフェロイド培養は、他の胎児肝細胞由来の細胞と異なり成人肝細胞と同程度の感受性を示した。以上の結果から、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物が胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝細胞購入時に添付のヒト肝細胞 CYP 代謝活性と抱合酵素活性データにおける年齢依存性の変化について検討した。CYP 代謝活性は、活性レベルの高い CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9 と活性レベルの低い CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 の2つに分類された。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 群では年齢依存的な変化は認められなかった。また、CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9 でのバラツキは特に大きく、同様に年齢依存的な変化も認められなかった。また、性および人種に起因するいずれの変動も認められなかった。

ヒト凍結肝細胞は、新生児期2ロット、乳児期は5ロットを、幼児期4ロットおよび学童期は1ロットの肝細胞を入手した。

凍結ヒト新生児肝細胞の融解法の確認、および細胞が新生児期に特徴的な特性を保持しているか否かについて予備的検討を行った結果、胎児期および乳児期に多く発現することが知られている CYP3A7 の発現を検出できた。

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 μ M から 75 μ 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 μ M および 75 μ 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) LNR \geq OPZ) (図 3 5 および 3 6)。

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 μ 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 3 6 および 3 7)。LNR による影響は、*CYP2A6* および *GSTA2* では認められなかった (図 3 7)

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 3 8 および 3 9)。①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*。②新生児に比べ成人において発現が高いグループ；*CYP1A2*。③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*。④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*)。

年齢に伴う変化が予測される *CYP3A4*、*CYP1A2*、および *UGT general* について、酵素活性値と年齢との相関性について検討したが、相関性は認められなかった。性差について解析したところ、*CYP1A2* においては、雌雄間で有意な差が認められた。

6. 成長期の大脳辺縁系回路機能解析

C-1. 平成 23 年度研究結果

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 (図 4 0)。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 4 1 A)。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_A 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_B 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 4 1 B)。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。

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 4 2 A)。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 4 2 B) 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 4 2 C)。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。

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 4 3 A; 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 4 3 A; P8)

ダブルパルス刺激により反回抑制を測定して GABA 機能の評価する方法

海馬スライス CA1 領域の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 4 4 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 4 5 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。

C-2. 平成 24 年度研究結果

生後脳発達に対するバルプロ酸胎児期曝露の影響

小脳

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 4 6 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 4 7 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、GABAA 受容体 $\alpha 6$ 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 GABAA 受容体 $\alpha 6$ 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)。

海馬

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 4 8)。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