

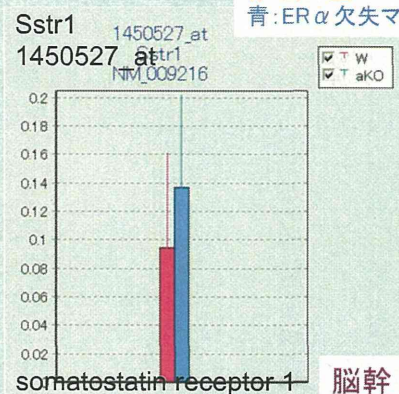
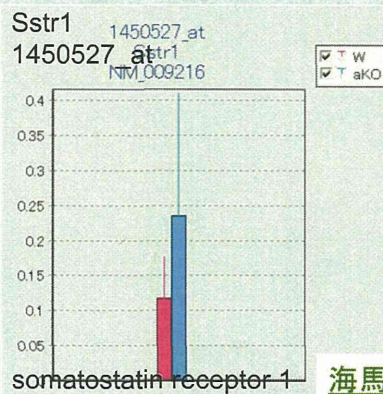
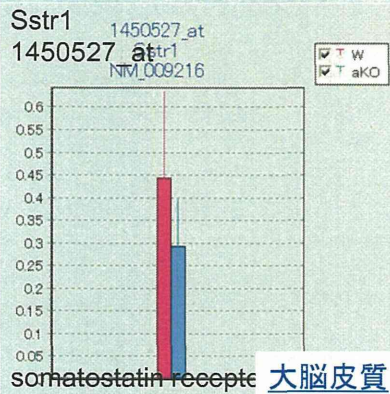
## Sstr1 のUpstream analysis (IPA)

© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Upstream Regulator	Other	Molecule Type	Predicted A	Activation z	p-value of c	Target molecules in dataset
pasireotide		biologic drug	8.87E-05			SSTR1
SLC22A1		transporter	3.11E-04			SSTR1
POU3F1		transcription regulator	6.66E-04			SSTR1
GHRH		other	9.32E-04			SSTR1
SST		other	1.73E-03			SSTR1
levothyroxine		chemical - endogenous mammalian	2.26E-03			SSTR1
IFI16		transcription regulator	2.75E-03			SSTR1
CYP19A1		enzyme	2.93E-03			SSTR1
okadaic acid		chemical toxicant	3.77E-03			SSTR1
INS		other	4.88E-03			SSTR1
GH1		growth factor	9.18E-03			SSTR1
estrogen		chemical drug	1.21E-02			SSTR1
testosterone		chemical - endogenous mammalian	1.44E-02			SSTR1
Vegf		group	1.79E-02			SSTR1
HNF1A		transcription regulator	1.92E-02			SSTR1
HGF		growth factor	2.15E-02			SSTR1
progesterone		chemical - endogenous mammalian	2.24E-02			SSTR1
forskolin		chemical toxicant	2.58E-02			SSTR1

ER $\alpha$  欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)ではSstr1の発現変動は認められない

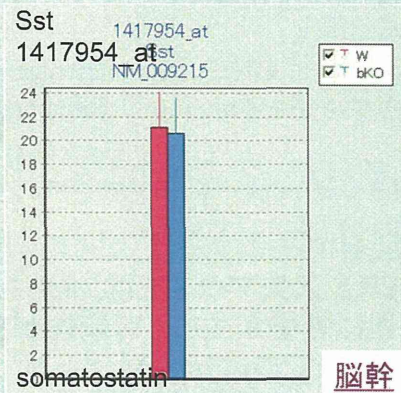
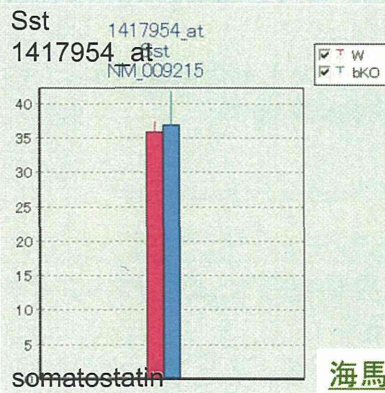
赤:野生型  
青:ER $\alpha$  欠失マウス



エストロゲンは、脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)ではER $\alpha$ ではなく、ER $\beta$ を介してSstr1の発現制御することが示唆された

ソマトスタチン遺伝子の発現は、野生型とER $\beta$  欠失マウスとの間に有意差なし:  
ER $\beta$  欠失マウスにてSstr1の発現が減少している、ソマトスタチンの機能に変化はない可能性がある

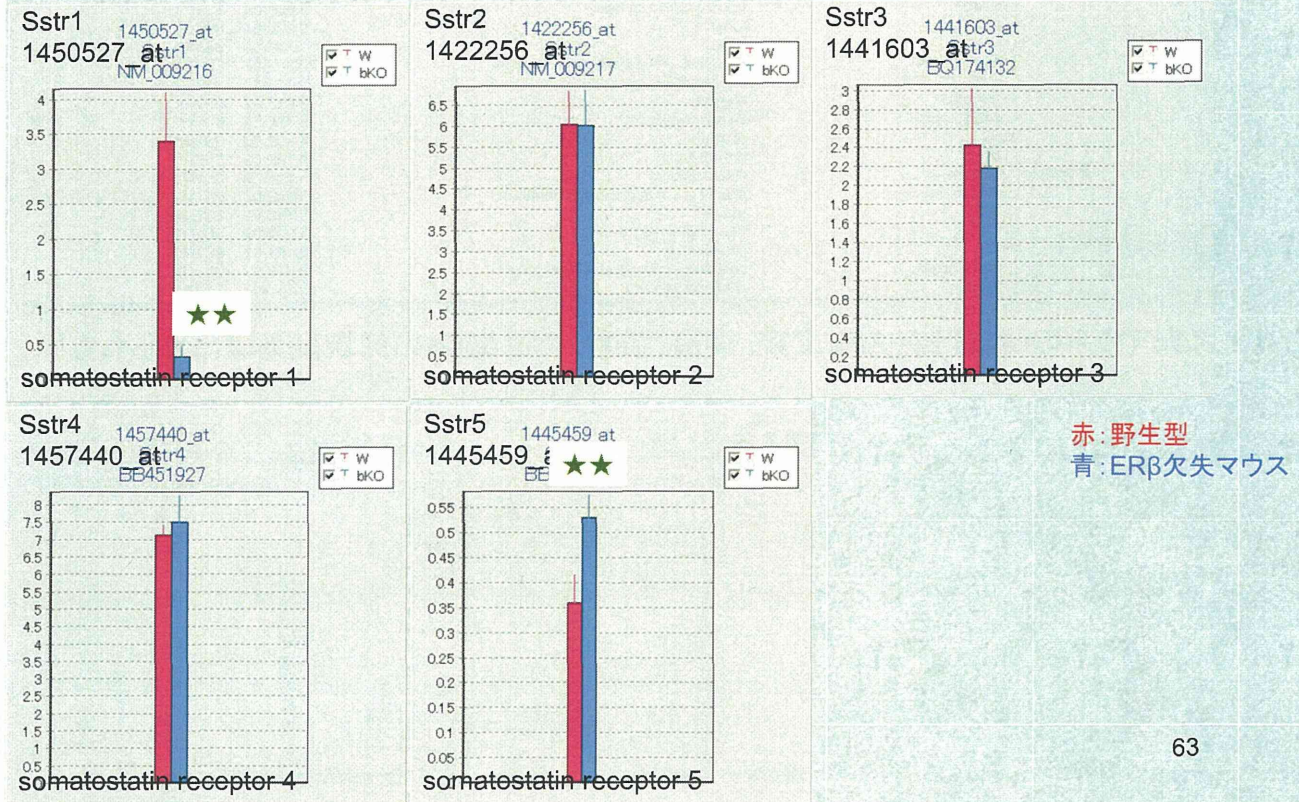
赤:野生型  
青:ER $\beta$  欠失マウス





ERβ 欠失マウスにおけるSstrサブタイプの発現変動

大脳皮質



Sstr1欠失マウスの報告: 詳細な表現型は未報告  
アゴニスト適用時にGH遊離反応が起きない事のみ

FEBs Letters 462 (1999) 464-466  
FEBs 23013  
Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs  
Hans-Jürgen Kreienkamp<sup>a</sup>, Ercan Akgün<sup>a</sup>, Hans Baumeister<sup>b</sup>, Wolfgang Meyerhof<sup>b</sup>, Dietmar Richter<sup>a,\*</sup>

ソマトスタチンがSstr1を介してシナプス伝達を抑制する(海馬スライス、Sstr1欠失マウス利用)

JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY | 2009 | 111 | 1466-1477  
doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.01471.x  
Functional effects of somatostatin receptor 1 activation on synaptic transmission in the mouse hippocampus  
Maurizio Cammalleri,<sup>\*,1</sup> Davide Martini,<sup>\*,1</sup> Anna Maria Timperio† and Paola Bagnoli\*

→ERβ 欠失マウスでは、Sstr1の発現低下によりソマトスタチンの機能が抑制され、シナプス伝達に影響が生じる可能性がある:

脳3部位での遺伝子発現解析では、海馬・脳幹でシナプス伝達への影響を示唆する遺伝子発現変動は認められず、この可能性は低いと考える。



**まとめ:** 成熟期の雄性ERβ欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)サンプルの網羅的に遺伝子発現変動解析→野生型のものと比較・検討

・**大脳皮質** (>細胞一個あたり1.0コピー)

ERβ欠失マウス: 752 (増加:728、減少:24) psの有意な発現変動

神経活動が低下(過分極)、概日リズムが乱れる可能性が示唆された

(カリウムチャンネル、神経伝達物質受容体(アドレナリン受容体、セロトニン受容体、GABA-A受容体、ニューロペプチドY受容体)、軸索ガイダンス因子(エフリン、セマフォリン)、概日リズム関連遺伝子(Dbp、Nr1d2、Per3)、Gper (Gpr30)遺伝子

・**海馬** (>細胞一個あたり0.7コピー)

ERβ欠失マウス: 315 (増加:162、減少:153) psの有意な発現変動

野生型マウスとERβ欠失マウスとの間に有害事象に関わる違いは認められない

・**脳幹** (>細胞一個あたり0.8コピー)

ERβ欠失マウス: 27 (増加:11、減少:16) psの有意な発現変動

野生型マウスとERβ欠失マウスとの間に有害事象に関わる違いは認められない

・**大脳皮質海馬脳幹3部位に共通して増加:** Snpc1 (snRNA-activating protein complex subunit 1)  
**減少:** Esr2とSstr1 (SOMATOSTATIN RECEPTOR 1)

65

先行研究(平成24年度)

成熟期の雄性ERα欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)⇒野生型

・**大脳皮質**

RARシグナル伝達が低下

神経活動の活性化

概日リズムが乱れる

(RAR関連遺伝子、カリウムチャンネル、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体、概日リズム関連遺伝子、アンドロゲン受容体、メチルCpG結合タンパク(MBD)関連遺伝子)

・**脳幹**

概日リズムが乱れる

神経活動が活性化

(概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体、カリウムチャンネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、アンドロゲン受容体)

平成25年度

成熟期の雄性ERβ欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)⇒野生型

・**大脳皮質**

神経活動が低下(過分極)

概日リズムが乱れる

(カリウムチャンネル、神経伝達物質受容体(アドレナリン受容体、セロトニン受容体、GABA-A受容体、ニューロペプチドY受容体)、軸索ガイダンス因子(エフリン、セマフォリン)、概日リズム関連遺伝子(Dbp、Nr1d2、Per3)、Gper (Gpr30)遺伝子

今後、エストロゲンと概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

66

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担報告書

発生-発達期ビスフェノール類の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】

化学物質の早期暴露による遅発中枢影響をスコア化する目的でエストロゲン受容体遺伝子改変マウスの行動様式を解析した。その結果、異常の基準値設定としての有用性を見いだした。また発生-発達期におけるビスフェノール AF 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、GABA 受容体シグナル影響が推測された。

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の呈する行動様式を基準点とし、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）を主たるモデル化学物質として取り上げる。本年度は、①

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスを用いた行動解析を行うとともに、②その中枢への安全性に関して注意喚起されているネオニコチノイド系農薬、アセタミプリドについての幼若期暴露による遅発中枢影響解析を行う。

## B. 研究方法

① エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスとして、雄 ER $\alpha$  改変マウス、及び雄 ER $\beta$  改変マウスを用いた。いずれも国立医薬品食品衛生研究所にて独自に作出されたマウスであり、受容体シグナル異常が想定される。生後 12 週齢から 13 週齢(約生後 3 ヶ月齢)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い、同腹の野生型雄マウスの示す行動様式からの逸脱度は t-test によって検定した。

② 雌雄の C57BL/6NCrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた。アセタミプリド (50mg/kg) を生後 2 週齢、4 週齢、8 週齢時にゾンデを用いて単回強制経口投与し、12 週齢時にオープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験を行った。

(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

① エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスの行動解析の結果、雄 ER $\alpha$  改変マウスに条件付け学習記憶試験における学習記憶異常が認められた。また、雄 ER $\beta$  改変マウスに明暗往来試験における明所滞在時間及び明暗往来数の減少と暗所潜在

時間の増加、高架式十字迷路試験における開放部滞在時間の減少とともに、条件付け学習記憶試験における学習記憶異常、プレパルス驚愕反応抑制試験における抑制率の低下が認められた。

② アセタミプリド暴露マウスの行動解析の結果、雌雄ともに、明暗往来試験における明所行動量の低下が認められた。しかしながら、恐怖条件付け学習記憶試験からは、雄に記憶異常が認められたものの、雌には異常が認められなかった。投与時期による影響差を考慮しても上記の傾向が認められた。

## D. 考察

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスとして用いた雄 ER $\alpha$  改変マウス、及び雄 ER $\beta$  改変マウスの行動様式は、それぞれ「記憶異常モデル」、「統合失調症モデル」マウスの行動様式を包括するものと考えられ、神経作動性化学物質による遅発性の行動異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法として、遺伝子改変マウスの利用が有効であることが示された。今後、遺伝子改変マウスのみならず、行動異常誘発化学物質の利用によって、基準点を増やすことによって、「スコア」としての頑強性の向上が望まれる。

アセタミプリド暴露による遅発性の行動解析結果から、遅発神経行動毒性発現に性差が存在することが示された。

## E. 結論

行動異常を呈する遺伝子改変マウスの利用によって、神経作動性化学物質による遅発性の行動異常を客観的に記述し評価する際の頑強性が示された。また、遅発神経行動毒性発現に性差が存在することが示された。

## 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

1: Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K, Wakayama T.

Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One*. 2013 Oct 24;8(10):e78380.

2: Lee S, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Quantitative analysis in LC3-II protein in vitro maturation of porcine oocyte. *Zygote*. 2013 Jun 12:1-7.

3: Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J*. 2013 May;84(5):395-402.

4: Hiraga K, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Selection of in vitro-matured porcine oocytes based on localization patterns of lipid droplets to evaluate developmental competence. *J Reprod Dev*. 2013;59(4):405-408. (表紙掲載)

5: Kogasaka Y, Hoshino Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sato E. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Mol Reprod Dev*. 2013 Apr;80(4):334-348.

### 2. 学会発表

1: 「認知症モデルマウスの開発と利用」  
種村健太郎  
第156回日本獣医解剖学会サテライトフォーラム  
(2013年9月・岐阜)

2: 「Late-effects on CNS induced by disturbance of neural activity during development.

-Behavioral impairment in male adult mice induced by postnatal oral intake of acephate -」

Kentaro Tanemura

XIII International Congress of Toxicology 2013  
(ICT 2013) (2013年7月、ソウル)

## 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

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-発達期のビスフェノール A 等暴露による神経回路応答改変の機能解析

研究分担者 富永 貴志 徳島文理大学 准教授

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詳細に検証した。ビスフェノール A は急性効果が見られないことからバルプロ酸の場合と同様に発達後の行動異常を手がかりに機構解析をする必要が考えられた。網羅的機能探索のための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、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、大規模神経回路活動解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行なっている。

### 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) 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 (MF)、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。また、ランニングホイールを使って形質がレスキュー出来るかどうかについても検討した。

(2) ビスフェノール A 投与による神経回路の急性

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。

(3) 発達期ビスフェノール A 投与の遅発毒性の検討 (種村、五十嵐らとの共同研究)

発生発達期におけるビスフェノール A 暴露による遅発毒性の影響を調べるために妊娠マウスに 0, 0.1, 1, 10 ppm の 4 つの異なる用量でビスフェノール A を与え、マウスを作成した。このマウスを生後 7 週齢以降、順次スライス標本の作成に用いて、バルプロ酸で試したのと同様のテストで検定した。

(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 (トーマスクヌッフエル Imperial College London との共同研究)

トーマス・クヌッフエル (Imperial College London) 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。また、遺伝子導入によりこの蛋白



質を発現させた動物での実験について準備を行なっている。

(4)-4 広視野神経回路機能計測による大脳皮質、領野間情報伝達の機能解析(産総研 梶原、徳島大 吉村らとの共同研究) 広視野の光学系での光計測を行って、大規模神経回路の機能計測を行った。測定野は島皮質から運動野を含む領域や、嗅周囲皮質から嗅内皮質、海馬を含むような大規模なものである。

(4)-5 偏光など膜電位感受性以外の光情報による細胞活動の記録(ウッズホール海洋生物学研究所 谷との共同研究) 染色の必要のない光学信号として光の偏光をつかいた脳組織の電位情報の読み出しについて予備的な実験を開始した。

(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) 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(MF)、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, MF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あ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。

さらにランニングホイールで運動が、上記の神経回路活動の改変を抑制することを明らかにした。このような抑制性神経回路の改変を示すするには、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。

(2) 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の効果を、10 $\mu$ M, 100 $\mu$ 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 $\mu$ Mでは僅かな減弱、10 $\mu$ 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。

そこで、妊娠マウスにビスフェノールを飲ませ、その遅発毒性を検定した。バルプロ酸で行った解析とほぼ同じ解析を行ったところ、刺激強度が十分に高い条件のときはどの用量でも差が出なかった。一方、刺激強度をごく弱くして検定を行ったところ海馬CA1野のシャーファー側枝刺激で、BPA用量が低い実験群(0, 0.1ppm)と比較的高い実験群(1, 10ppm)の2群に分けて比較すると、低用量群ではGABA阻害剤の効果が大きく見え、高用量群ではGABA阻害剤の効果が小さかった(つまりGABA阻害剤を与えても反応は大きくならなかつ



た)。

CA3での再帰回路の応答GABA阻害剤の効果を左右しているようにみえることから、この応答の閾値に影響が出ている可能性を示唆する。

#### (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し、論文として掲載された。

##### (4)-2 新規パターン刺激イメージング顕微鏡

昨年と同様、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 (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。子宮内電位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ズを選び、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。

現在、共同研究者のところで、この蛋白質を部位特異的に発現させられる遺伝子改変マウスを作成中であり、これが作成された際にはin vivoの標本での計測を進める。

(4)-4 広視野神経回路機能計測による大脳皮質、領野間情報伝達の機能解析(産総研 梶原、徳島大 吉村らとの共同研究) 広視野の光学系での光計測を行って、島皮質から運動野にいたる大規模な神経回路での神経伝達の安定な計測に成功した。また、嗅内野では4-AP誘導の安定な大規模神経回路活動を計測できた。

(4)-5 偏光など膜電位感受性以外の光情報による細胞活動の記録(ウズホール海洋生物学研究所 谷との共同研究) 染色の必要のない光学信号として光の偏光をつかった脳組織の電位情報として、複屈折の変化による成分の検出に成功した。これはシナプス伝達によることを確かめた。

## D. 考察

光計測法による神経回路機構解析の有効性は(1)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、(2)ビスフェノールAの遅発効果についての影響から、検出系としての機能をはたすことが確かめられた。

検出された異常の解釈として、バルプロ酸の影響については抑制系と興奮系のバランスの違いで説明が可能かと思われる。一方、ビスフェノールの影響については神経興奮の閾値のようなものが関連すると思われるが、さらに詳細なメカニズムを確かめる必要がある。

その他の光計測の新たな試みで見られるような(1)海馬以外の異なる領野での計測、(2)違う手法による検証(VSFP, 複屈折)などが今後この手法による検出感度を上げることに資すると期待している。

## 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

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 2. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

© Tominaga T., Kajiwara R., and Tominaga Y. VSD imaging method of ex vivo brain preparation *Journal of Neuroscience and Neuroengineering*, 2013, 2, 211-219 [Selected as a Featured Article]

© Tominaga T & Tominaga Y. A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca<sup>2+</sup> imaging of neuronal circuit activity *Journal of Neurophysiology*, 2013, 110, 553-561 [Also featured as a Key Scientific Articles on Global Medical Discovery(GMD)]

### 2. 学会発表

TOMINAGA T., TOMINAGA Y., JULIANDI B., IGARASHI K., TANEMURA K., KANNO J., NAKASHIMA K. Attenuation of inhibitory synaptic input of hippocampal neural activity following exposure to valproic acid: A voltage-sensitive dye imaging study,; 244.02/S16 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for

Neuroscience, 2013

Tominaga T., Tominaga Y., Kajiwara R. (2013) Slowly inactivating potassium conductance controls transmission at area 35 of perichinal cortex: VSD imaging study (緩徐不活性化カリウムコンダクタンスが嗅周囲野 35 野の情報伝達を制御する) 第 51 回日本生物物理学会年会(京都国際会館)10 月 28 日から 30 日

五十嵐 勝秀 富永 貴志 古川 佑介 大塚 まき 森山 紀子 菅野 純 種村 健太郎 (2013) Chemical induced reorganization of neural circuit during development - from behavior to epigenetics Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6 月 京都国際会館 (口頭発表)

富永 貴志 富永 洋子 五十嵐 勝秀 種村 健太郎 菅野 純 中島 欽一 (2013) Optical assay of abnormal neuronal circuit dynamics: Effect of prenatal exposure to valproic acid. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6 月 京都国際会館 (口頭発表)

梶原 利一 高島 一郎 富永 貴志 (2013) Whole-scale voltage imaging of limbic network using isolated brain preparation. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6 月 京都国際会館 (口頭発表)

富永 洋子 五十嵐 勝秀 種村 健太郎 菅野 純 中島 欽一 富永 貴志 (2013) Disruption of the excitatory/inhibitory balance of hippocampal neural activity by prenatal valproic acid application: A voltage-sensitive dye imaging study. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) 6 月 京都国際会館

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- ①特許取得
- ②実用新案登録
- ③その他



厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

研究課題名

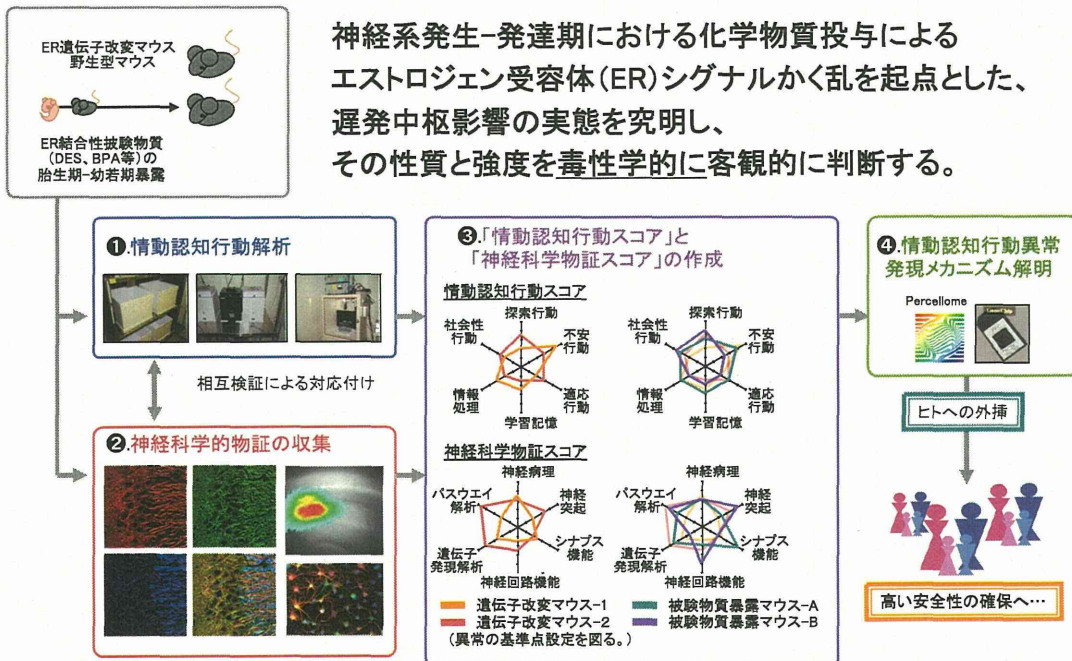
神経系発生-発達期の化学物質暴露による  
遅発中枢影響解析に基づく  
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究

研究代表者

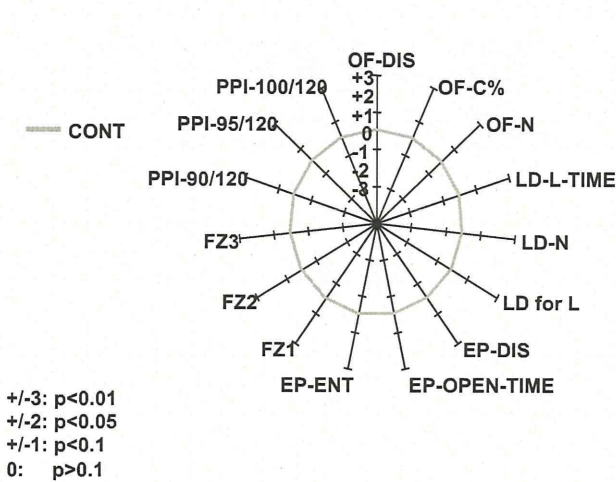
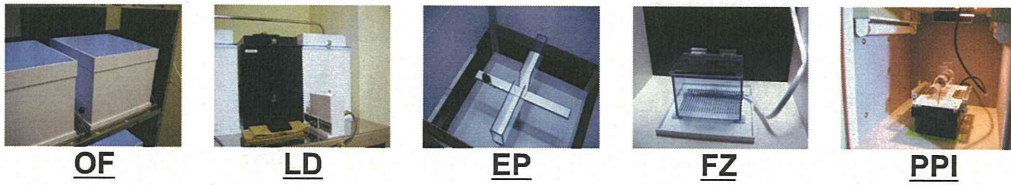
東北大学大学院  
動物生殖科学分野  
種村健太郎

1

本研究遂行における指針



2



OF-DIS : distance traveled  
 OF-C% : stay at center area  
 OF-N : moving episode

LD-L-TIME : time spent in light zone  
 LD-N : number of transition  
 LD for L : time spent for 1st transit

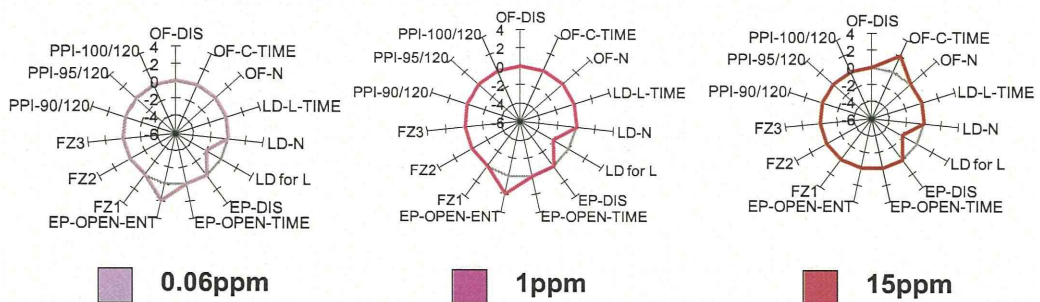
EP-DIS : distance traveled  
 EP-OPEN-TIME : time spent in open arm area  
 EP-ENT : number of entry in arms

FZ1 : conditioning (short-term memory)  
 FZ2 : contextual freezing  
 FZ3 : cued freezing

PPI-90/120 : prepulse 90db/120db  
 PPI-95/120 : prepulse 95db/120db  
 PPI-100/120 : prepulse 100db/120db

3

## 周産期BPA暴露マウスの行動解析



周産期におけるBPA暴露の結果、  
 不安関連行動異常が誘発される。

4

ビスフェノールAのような、評価が難しいとされてきた化学物質についても、  
**早期暴露による遅発影響の検出が可能であり、  
 そのメカニズムについても説明が期待できる。**

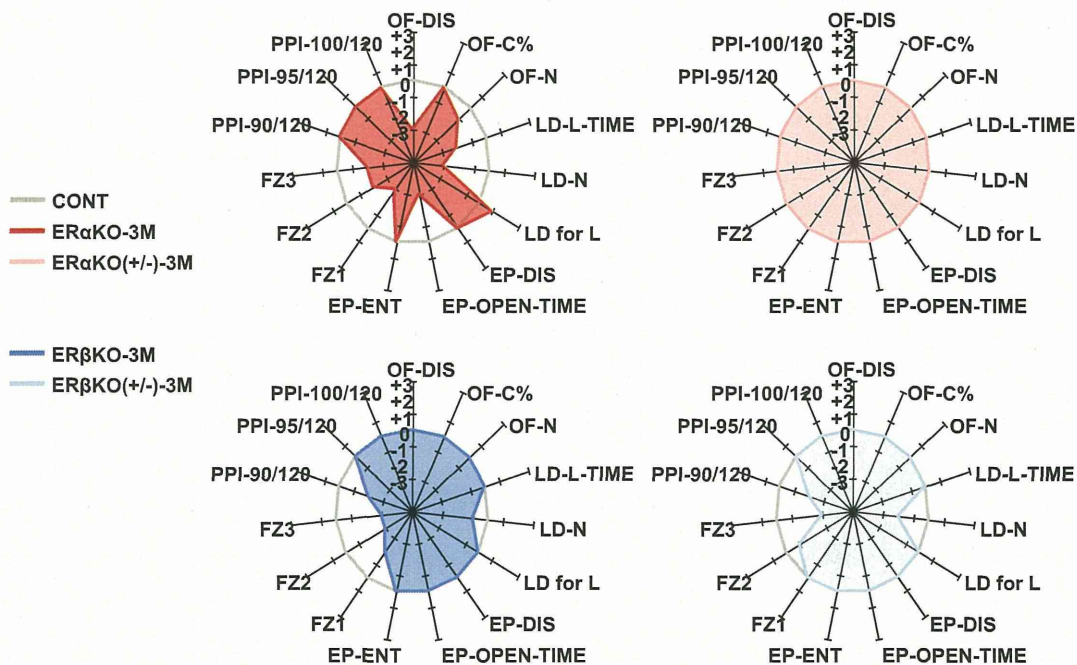
それでは、こうした早期暴露による遅発影響が  
 毒性学的に、どのような位置づけになるのか？



**客観的な指標を設定する為の  
 異常の基準点として、  
 ER遺伝子改変マウスを使用する。**

5

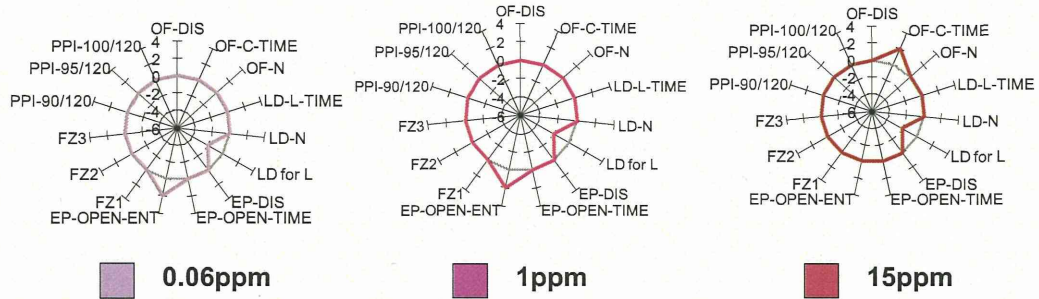
### ER遺伝子改変マウスの行動解析



6



## 周産期BPA暴露マウスの行動解析

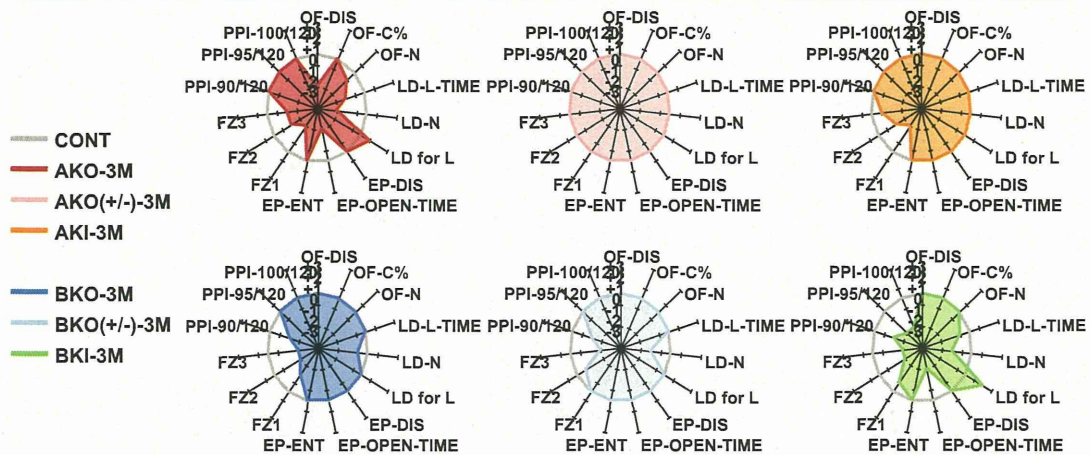


周産期におけるBPA暴露の結果、  
不安関連行動異常が誘発される。  
認知行動については、ER遺伝子改変マウスに比べ、  
逸脱レベルは小さい。

7

体重増加が混交要因になる？

学習記憶異常モデル  
(認知症モデル)

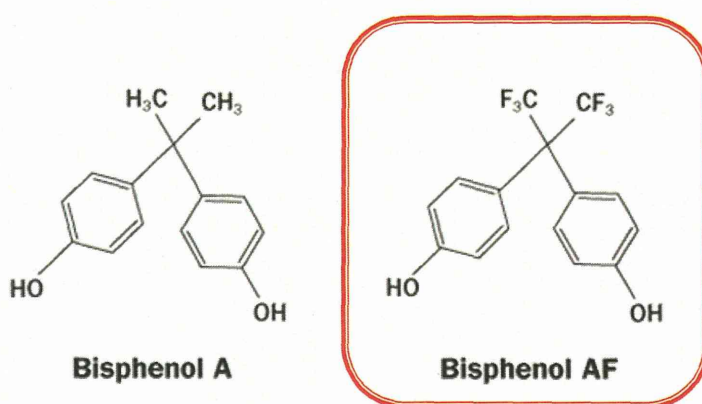


認知機能異常の基準設定  
に資する可能性がある

情動認知異常モデル  
(統合失調症モデル)

## 発生-発達期ビスフェノール類暴露による 遅発行動影響と中枢解析

9



**ビスフェノールAF (BPAF)、**  
**0ppm、10ppm、100ppm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、  
遅発中枢影響を検討した。

10

## 行動解析



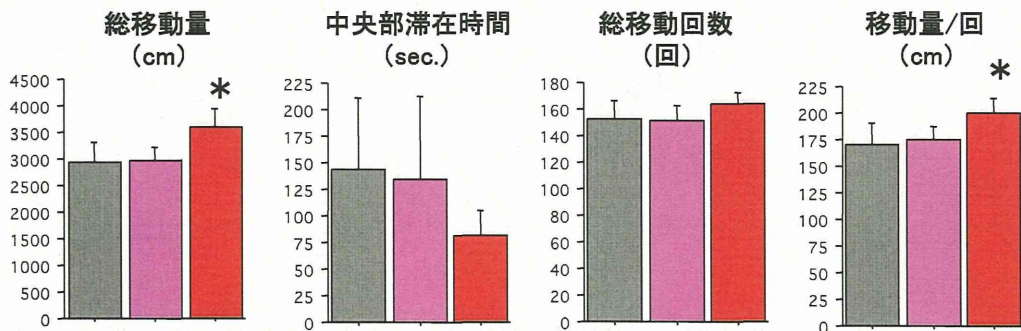
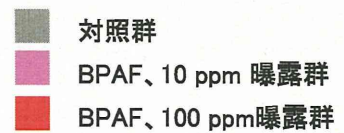
条件付け学習記憶試験については、  
BPA暴露実験時に準じて、  
電気ショックを弱め、ショック回数を増やした。



特に短期記憶形成過程への影響評価の  
高度化を期待できる。

11

## オープンフィールド試験 (15 lx、360 sec.)

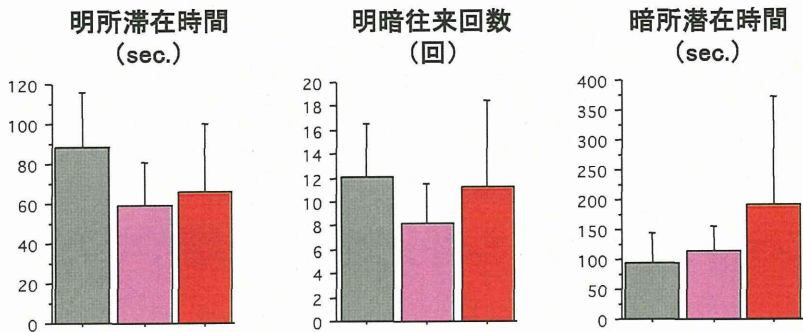


\* p<0.05

12



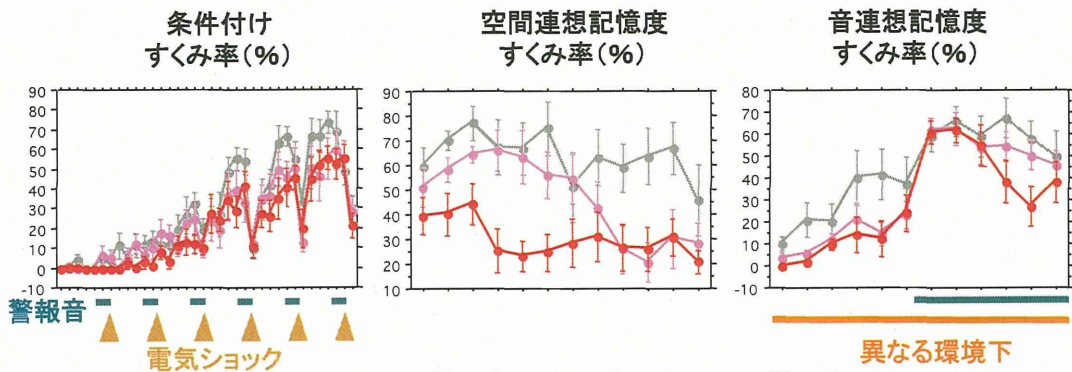
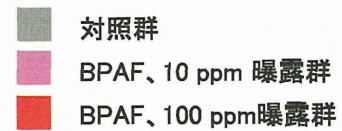
## 明暗往来試験(360 sec.) (60 sec.暗所待機スタート)



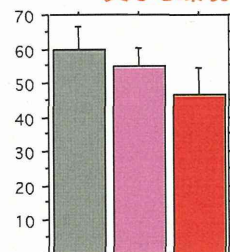
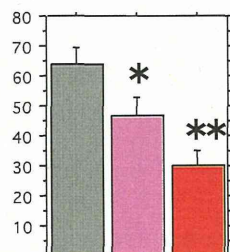
\* p<0.05

13

## 条件付け学習記憶試験(360 sec.) (60 sec.暗所待機スタート)



\* p<0.05  
\*\* p<0.01



14

周産期におけるBPAF暴露の結果、  
成熟後の雄マウスに、  
不安関連行動の逸脱を伴う、  
学習記憶異常が認められた。

**不安亢進と  
短期記憶形成能の低下  
が疑われる。**

15

周産期におけるBPAF暴露の結果、  
異常行動を呈した成熟後の雄マウスの  
大脳皮質、および海馬の網羅的遺伝子発現解析



大脳皮質  
遺伝子発現  
増加/抑制  
( $p < 0.01$ , ratio  $> 1.1$ )

海馬  
遺伝子発現  
増加/抑制  
( $p < 0.01$ , ratio  $> 1.1$ )

10 ppm  
曝露群 181/54

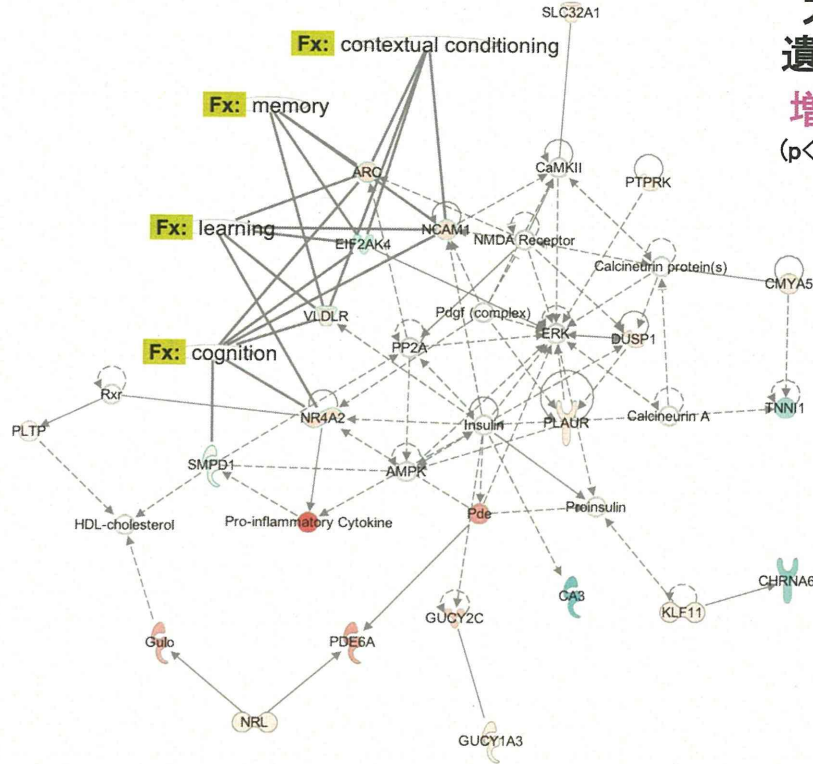
100 ppm  
曝露群 139/68

10 ppm  
曝露群 66/172

100 ppm  
曝露群 177/136

16

# 大腦皮質 遺伝子発現 増加/抑制 ( $p < 0.01$ , ratio $> 1.1$ )



# 大腦皮質 遺伝子発現 増加/抑制 ( $p < 0.01$ , ratio $> 1.1$ )

