

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

周産期におけるBPAF暴露の結果、
成熟後の雄マウスの大脳皮質、海馬の
遺伝子発現様式に変化が生じていることを見いだした。

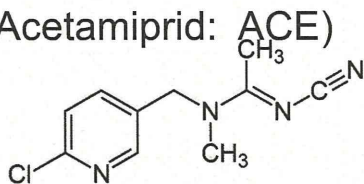
行動様式逸脱と対応するものと考えられ、
特に、アミノ酸系神経伝達物質受容体シグナル系
に異常が生じている可能性が示された。

ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド

投与化学物質

アセタミプリド

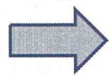
(Acetamiprid: ACE)



商品名：モスピラン（日本曹達）

ネオニコチノイド系殺虫剤

昆虫神経のシナプス後膜のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に選択的に結合し、神経の興奮とシナプス伝達の遮断を引き起こすことで殺虫活性を示す。



昆虫のnAChRsに選択的結合親和性をもち、高い毒性を示すが、哺乳類には安全（ヒトを含む哺乳類に対する毒性は低いとされている）。

ネオニコチノイドが脊椎動物の神経システムにおいて 毒性を誘発する可能性

報告があるネオニコチノイド系農薬

- イミダクロプリド
- チアメキサム
- クロチアニジン

ラットの子宮におけるイミダクロプリド曝露は、新生仔の運動皮質と海馬において感覚運動のパフォーマンス低下とグリア細胞繊維性酸性タンパク質 (GFAP) の発現増加を誘導する。Abou-Donia et al., J Toxicol Environ Health A (2008).

チアメキサムとクロチアニジンはnAChRsを介してラットの線条体においてドーパミン放出を誘導する。Oliveira et al., Toxicol Lett (2010).

チアメキサムはラットのコリン作動性システムに関連する行動と生化学プロセスを改変する。Rodrigues et al., Ecotoxicol Environ Saf (2010).

イミダクロプリドとクロチアニジンはヒト nAChR のサブタイプ $\alpha 4\beta 2$ を刺激する。Li et al., J Neurosci Res (2011).

投与スケジュール

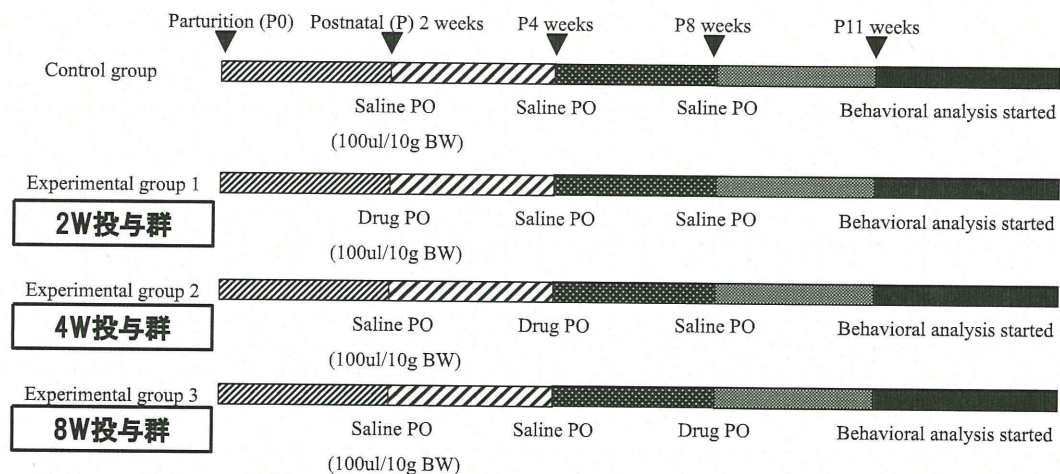
○供試動物
(C57BL/6)



投与化学物質: アセタミプリド (Acetamiprid: ATP)

Toxicity Data : PO - MUS LD50 : 198 mg/kg

Drug: 50 mg/kg (p.o.)



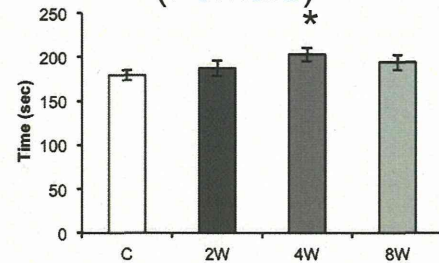
Open field test (OF)



Locomotor activity

- 総移動距離
- 総移動時間
- 移動回数

Total movement duration (Female)



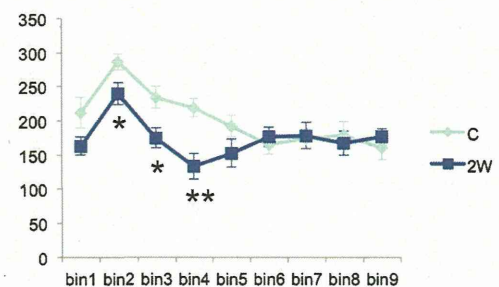
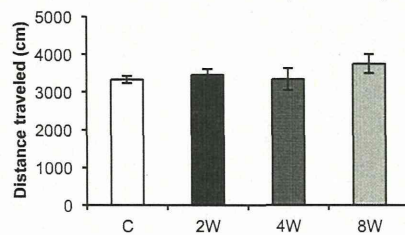
雌の4W投与群で移動時間の有意な増加がみられたが、

雌雄ともに大きな逸脱はみられなかった。

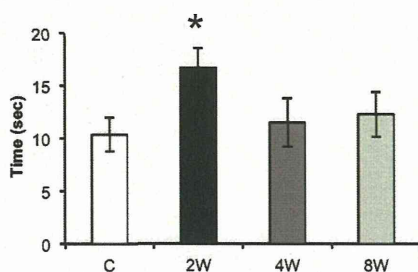
Open field test (OF)



Total distance (male)

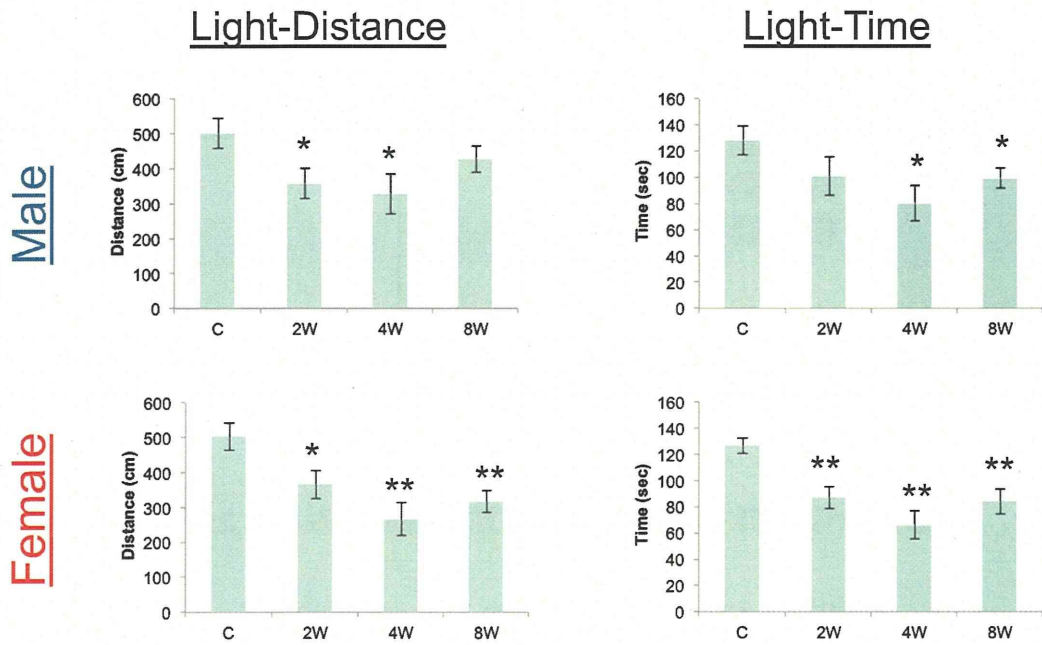


試験開始直後 (30sec)における中央滞在時間



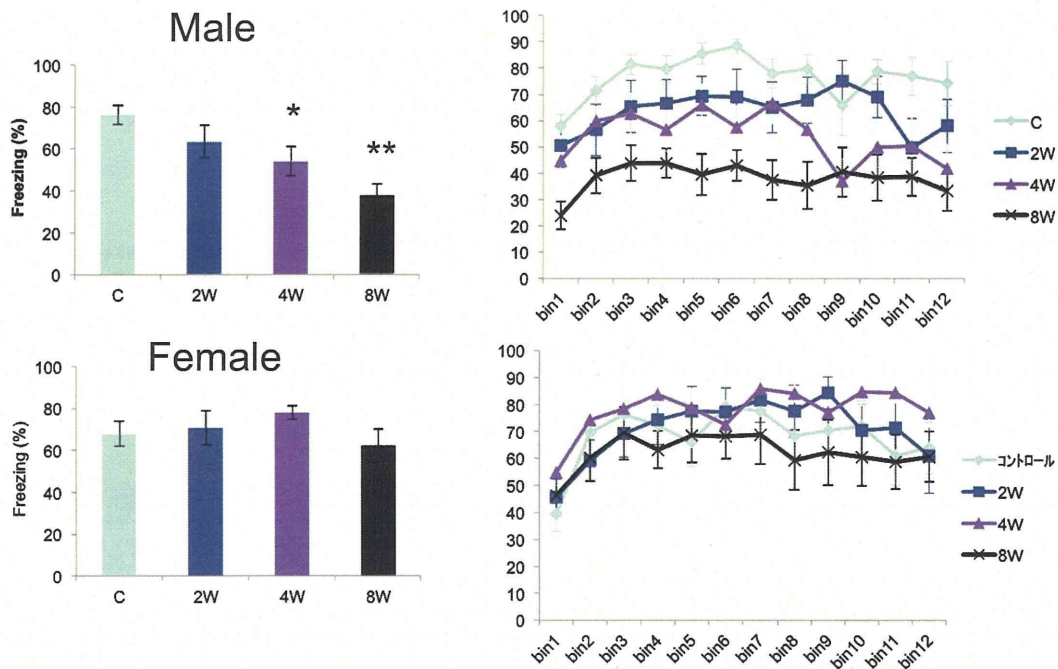
2W投与雄マウスで新奇環境への適応の遅れが示唆された。

Light/dark transition test (LD)



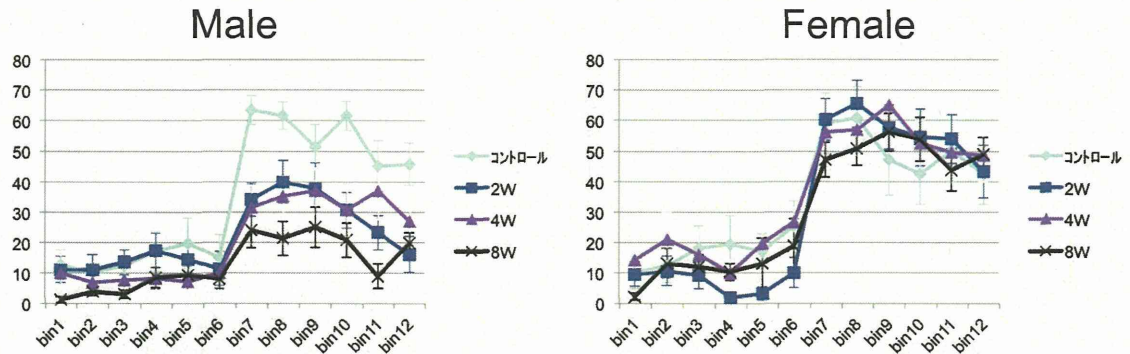
Contextual/cued fear conditioning test (FZ)

Context



Contextual/cued fear conditioning test (FZ)

Cued



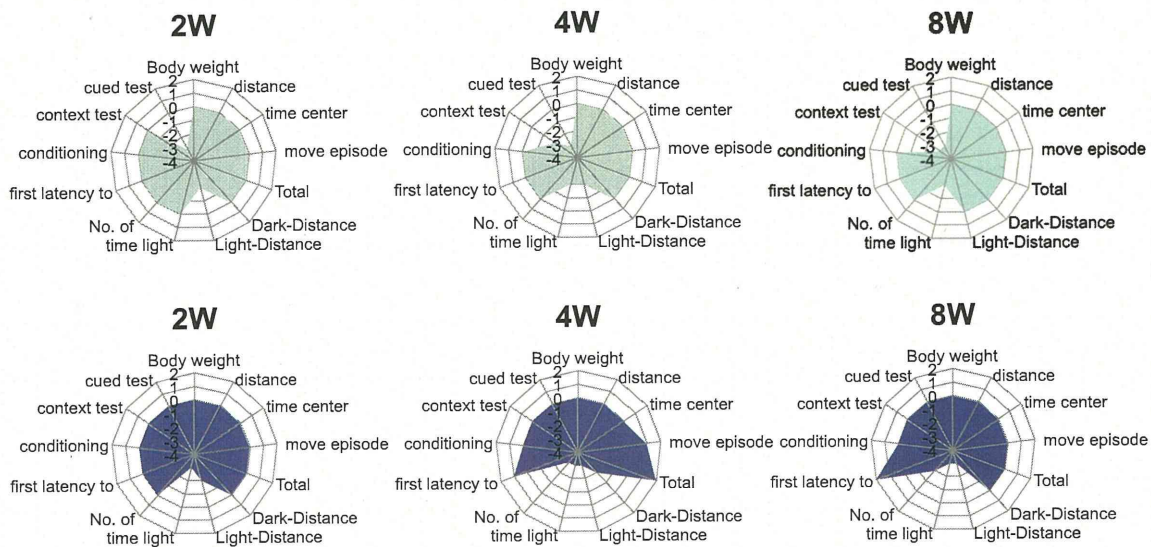
雄の全ての投与群が対象群と比較して有意に低下。

Summary of results

| Behavioral task/Indices | Male | | | Female | | |
|-----------------------------|------|-----|-----|--------|-----|-----|
| | 2W | 4W | 8W | 2W | 4W | 8W |
| Body weight | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Open field test | | | | | | |
| distance traveled | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| time center | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| move episode N | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Total movement duration | ns | ns | ns | ns | ↑ | ns |
| Light-dark box test | | | | | | |
| Dark distance | ns | ns | ns | ns | ↓ | ns |
| Light distance | ↓ | ↓ | ns | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| time light | ns | ↓ | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ |
| No. of transition | ns | ns | ns | ns | ↓↓ | ↓ |
| first latency to enter dark | ns | ns | ns | ns | ns | ↑ |
| Classical fear conditioning | | | | | | |
| conditioning | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| context test | ns | ↓ | ↓↓ | ns | ns | ns |
| cued test | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ns | ns | ns |

↑ : P < 0.05, ↑↑ : P < 0.01

行動解析結果 (male / female)



±1 : (p < 0.1); ±2: (p < 0.05); ±3 (p < 0.01)

ネオニコチノイドは哺乳類の中樞神経系においてニコチン様作用を示す。
Kuroda et al., PLoS ONE (2012).

ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド曝露 (50mg/kg)は
情動認知機能に大きな影響を与えた。

↓
より低用量を検討する必要があるが、
曝露時期による影響差は小さいものであった。
(標的となる受容体の問題か?)

アセタミプリド曝露による行動影響には**雌雄差**が存在した。

↓
今後、影響の雌雄差も検討する必要がある。

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ア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。

(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ほぼ同じテストで検定した。

(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週齢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っ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の効果をも、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。

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った)。

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。

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域での計測、(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)

1. 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 Ca²⁺ 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
-

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等暴露による
神経回路応答改変の迅速検出系の確立にむけて

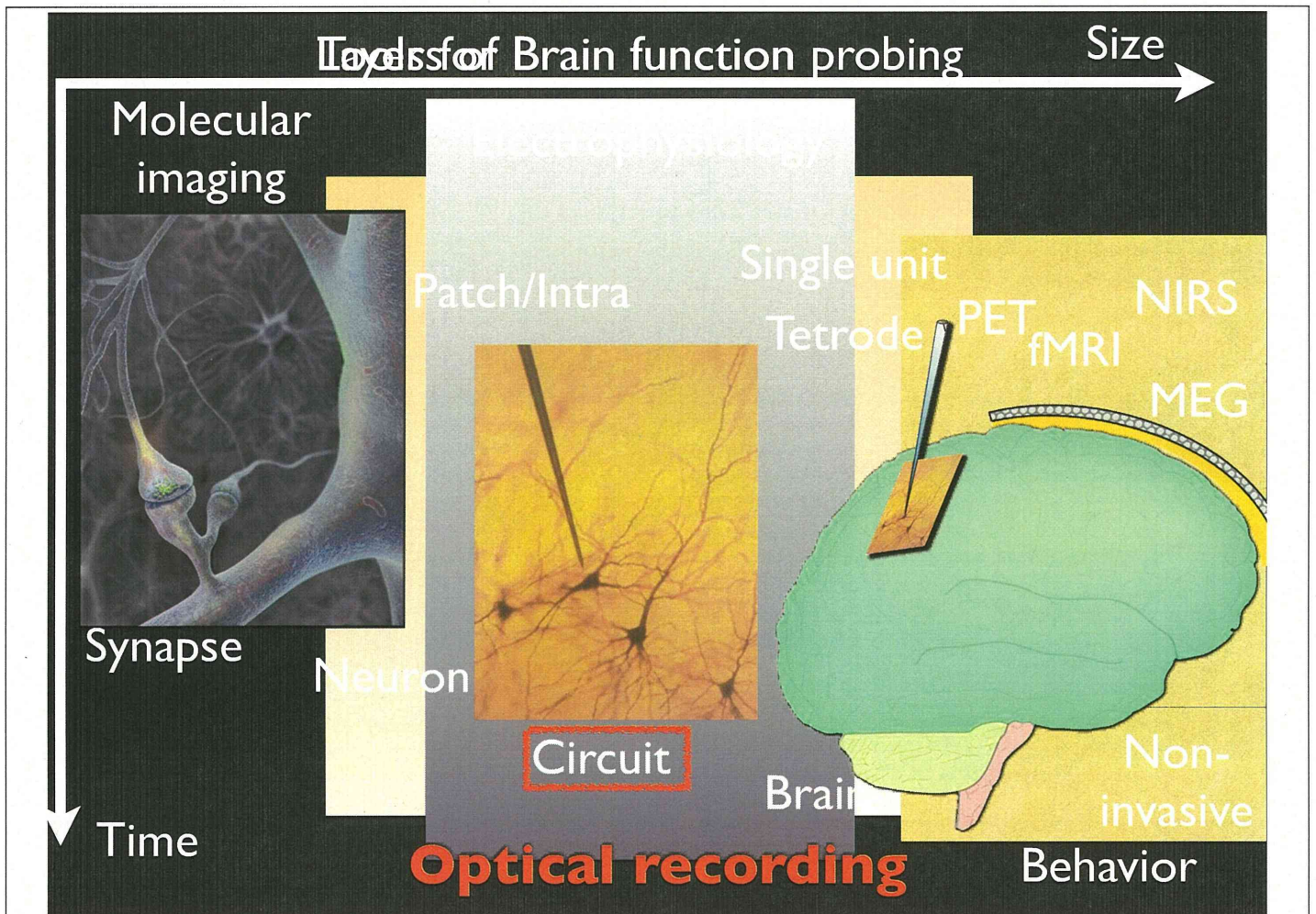
富永 貴志(徳島文理大学 神経科学研究所)

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)

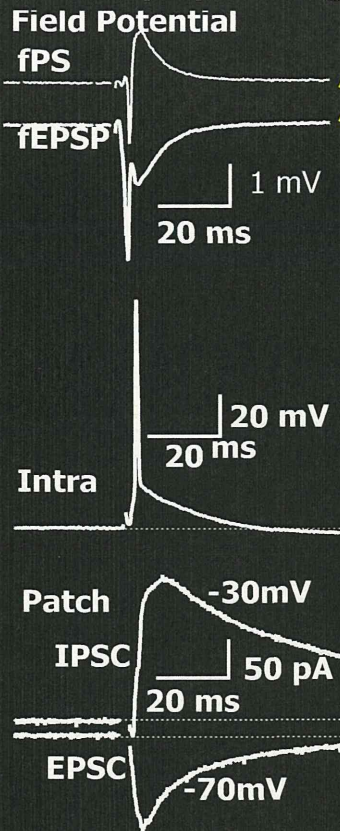
神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学-一般-004) -班会議

日時:平成 26 年 3 月 10 日(月)13:30-17:00

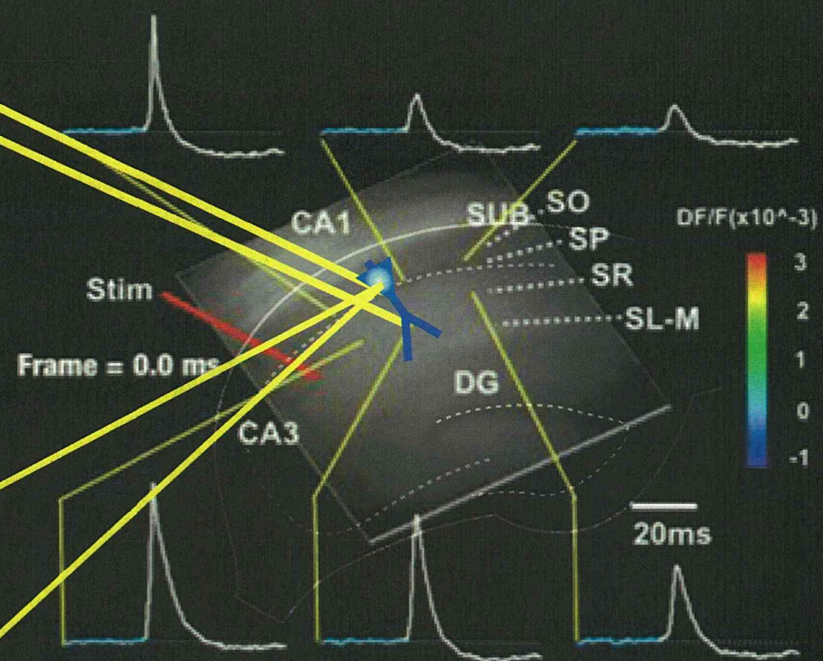
場所:国立医薬品食品衛生研究所 会議室



Electrophysiology



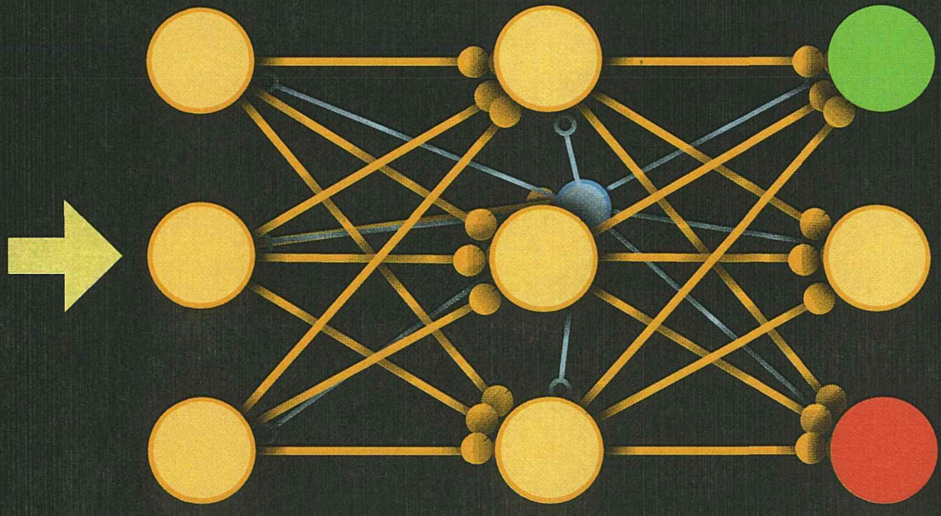
VSD imaging



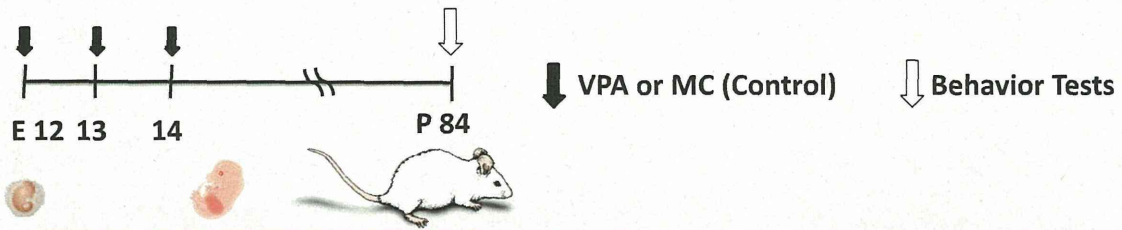
Membrane potential recording
Multipoint recording
Population signal

neural circuit

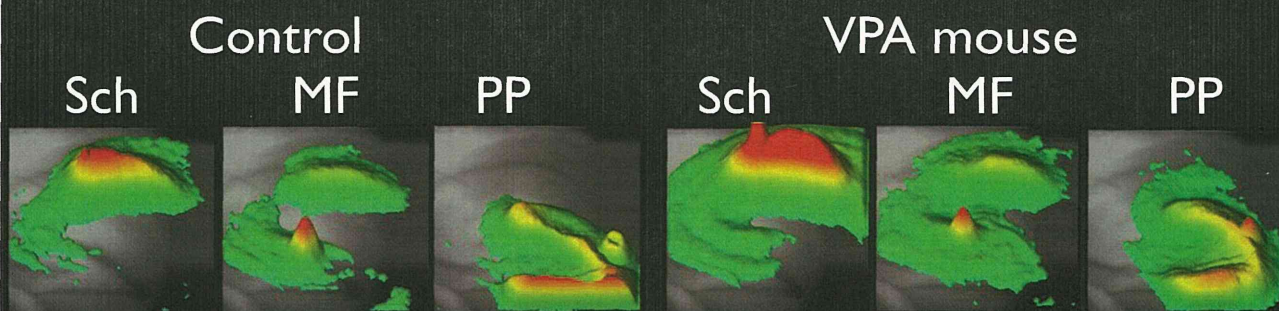
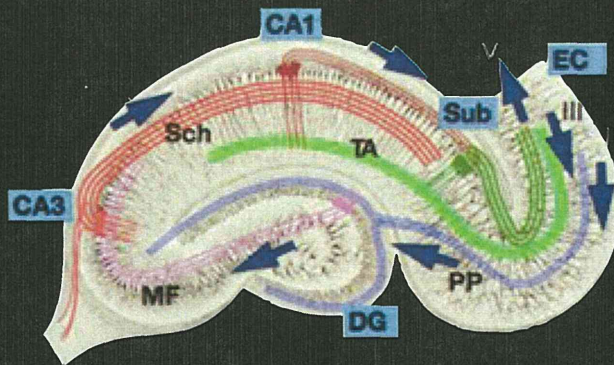
wrong signal during development



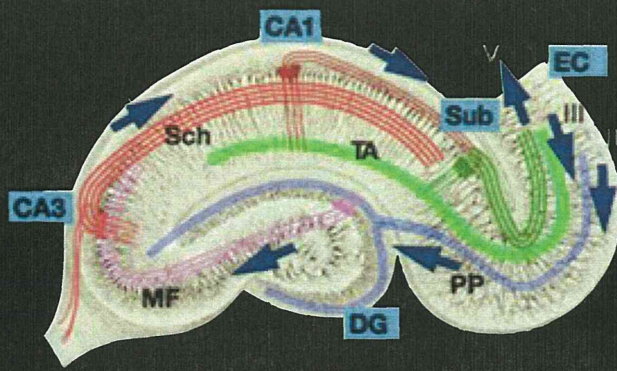
alteration of function
circuit disease



| Test Name | Behaviors Assessed | Results |
|-----------------------------------|--|--|
| Open Field | general activity level, gross locomotor activity, exploration habits | total distance, center time, move episode, distance per movement |
| Light/Dark Transition | anxiety-like | dark distance, dark time, transition, light distance, light time, latency to enter light |
| Elevated Plus Maze | anxiety-like | total distance, open time, close time, open entry, close entry, total entry |
| Pre-pulse Inhibition | sensorimotor gating | pre 90db/120db, pre 95db/120db, pre 100db/120db |
| Tail Suspension | depression | immobility time |
| Contextual/Cued Fear Conditioning | learning and memory | conditioning, contextual, cued |
| Y-Maze Alternation | learning and memory | correct alternation |



No difference in normal neural activity propagation



Control

VPA mouse

Sch

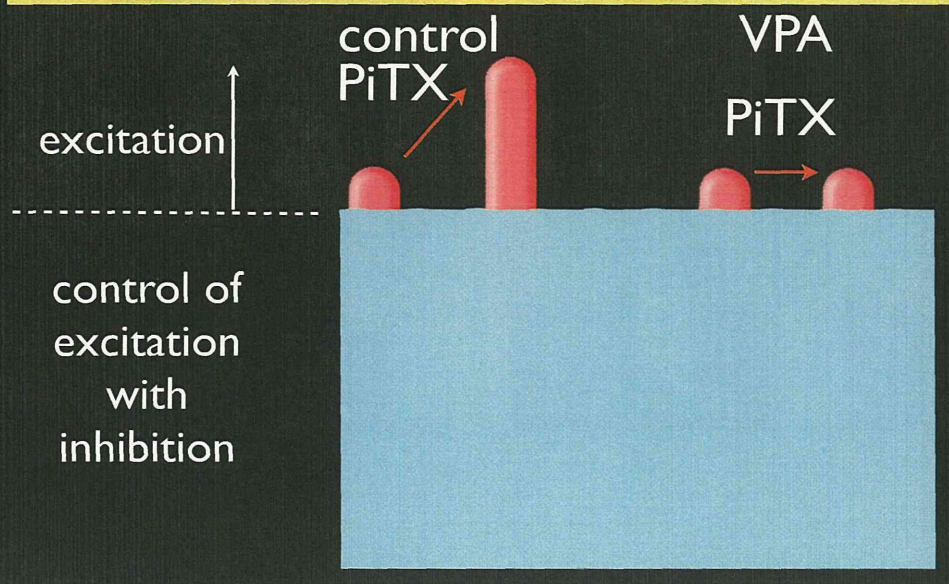
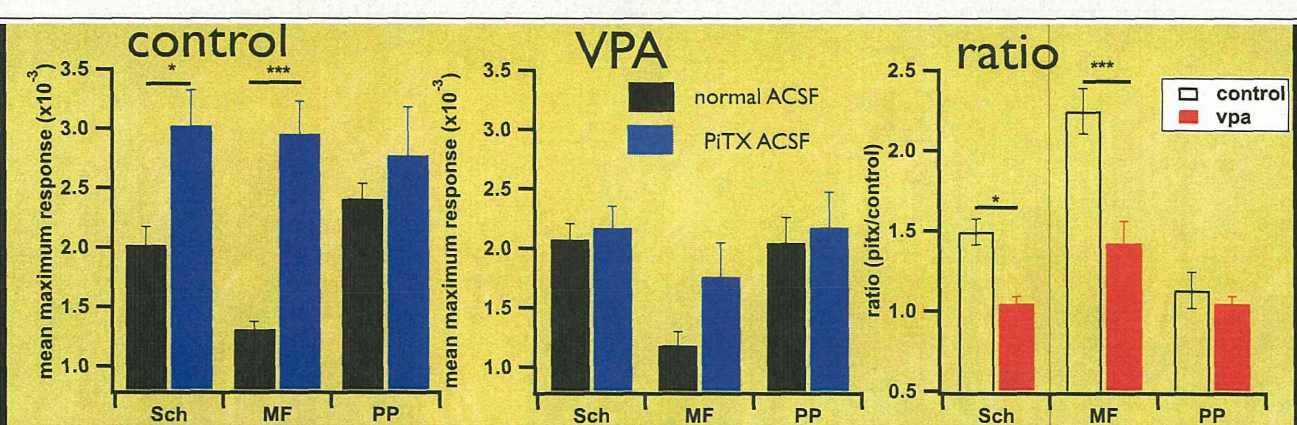
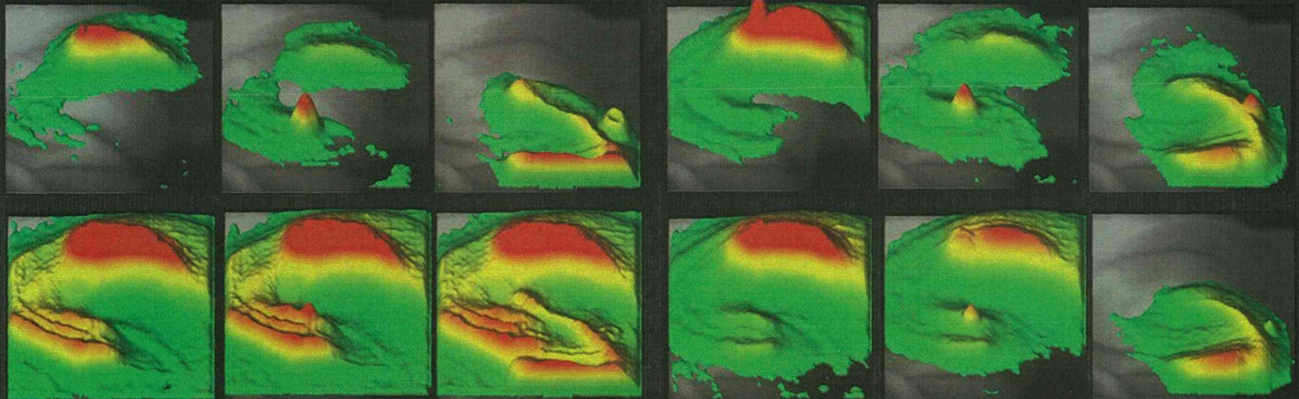
MF

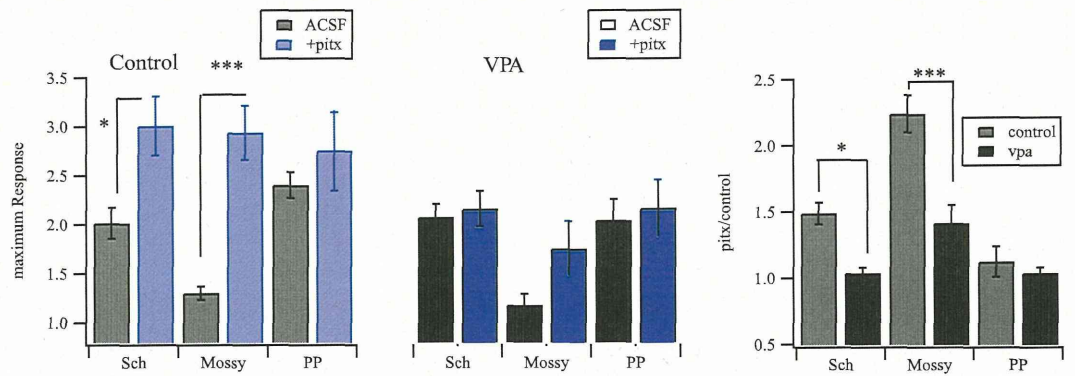
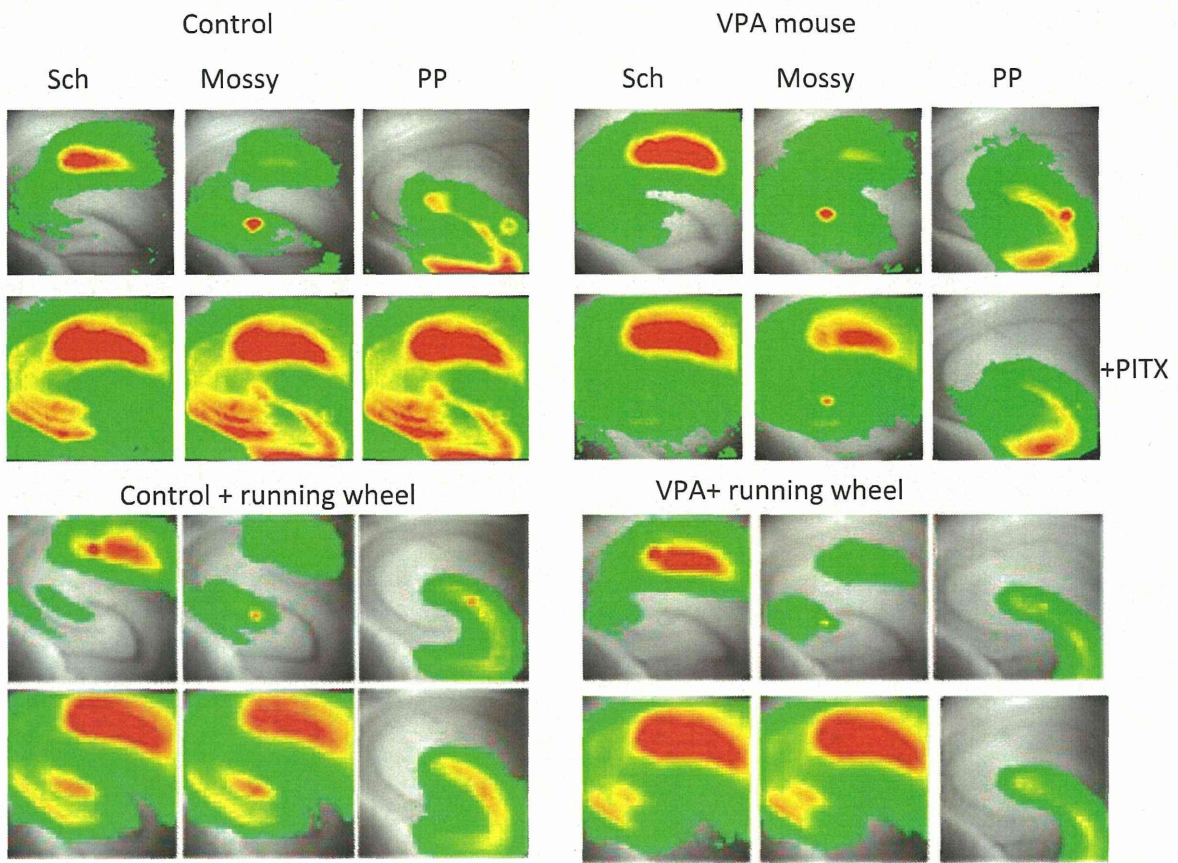
PP

Sch

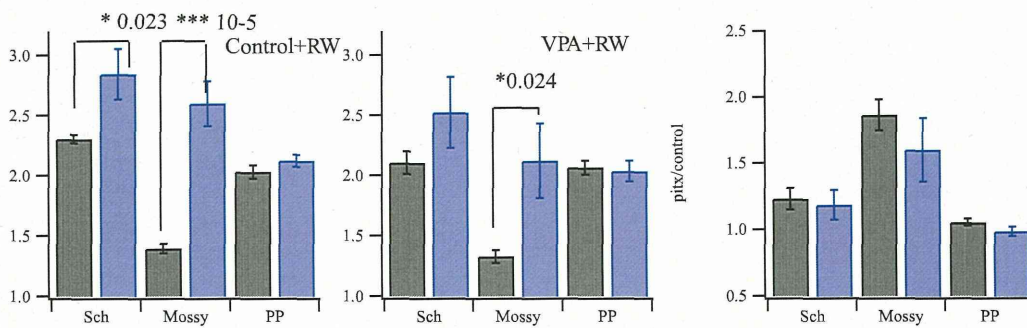
MF

PP





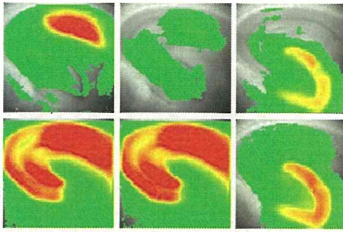
+running wheel



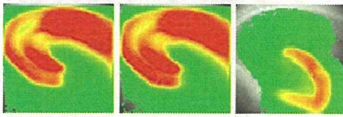
BPA 遅発影響

BPA0

Control

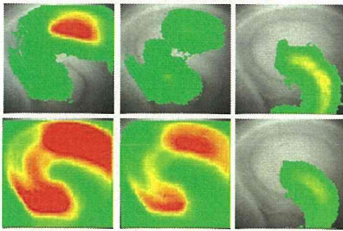


Gabazine

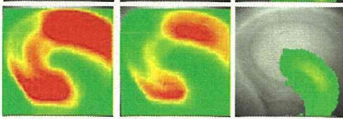


BPA1

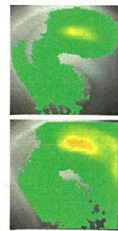
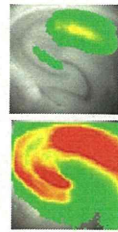
Control



Gabazine



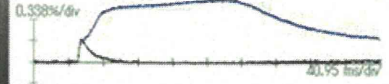
Sch MF PP



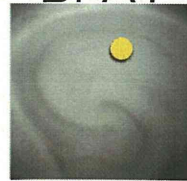
Sch

weak stim

BPA0 Sch weak stim

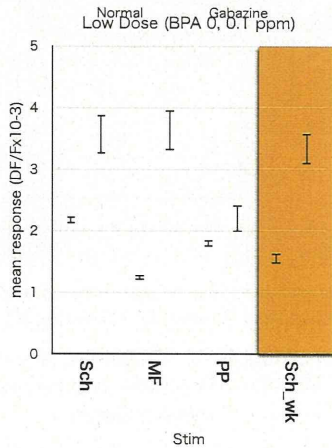


BPA1 Sch weak stim

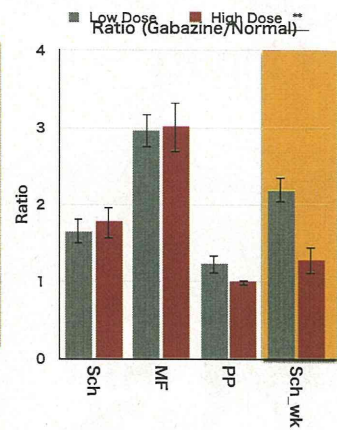
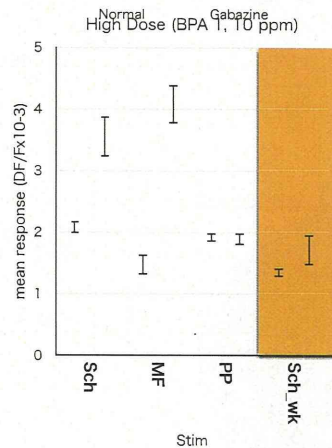


BPA 遅発影響

BPA Low Dose
(0, 0.1 ppm)



BPA High Dose
(1, 10 ppm)



BPAの高用量群では、閾値付近の刺激強度の時にはGABA受容体の阻害をしても持続的な応答をおこすことができない。

情動認知行動毒性評価系

発生-発達期ビスフェノール等暴露による神経回路応答改変の
迅速検出系の確立にむけて

海馬神経回路で抑制系の阻害剤の利用によって

1. バルプロ酸による興奮/抑制バランスの改変を示した
2. BPAによる神経の過興奮の閾値の変化を示した

Memory system

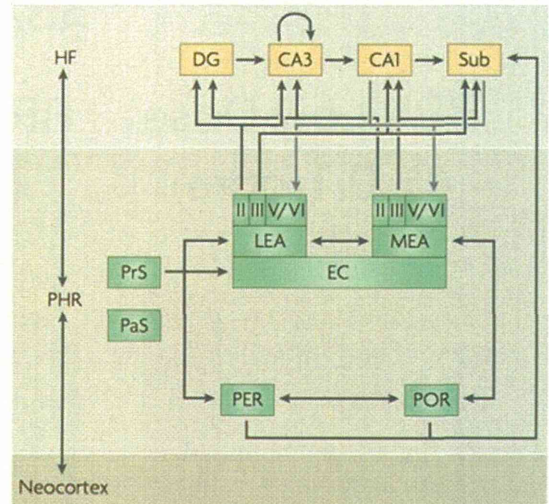
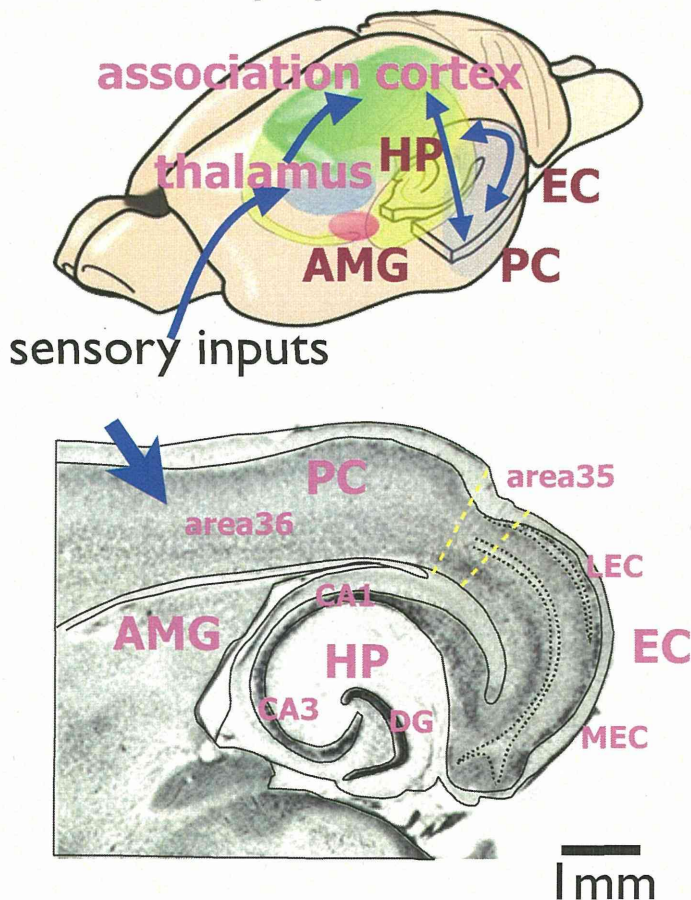


Figure 3 | The standard view of parahippocampal-hippocampal circuitry. The standard view that is

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