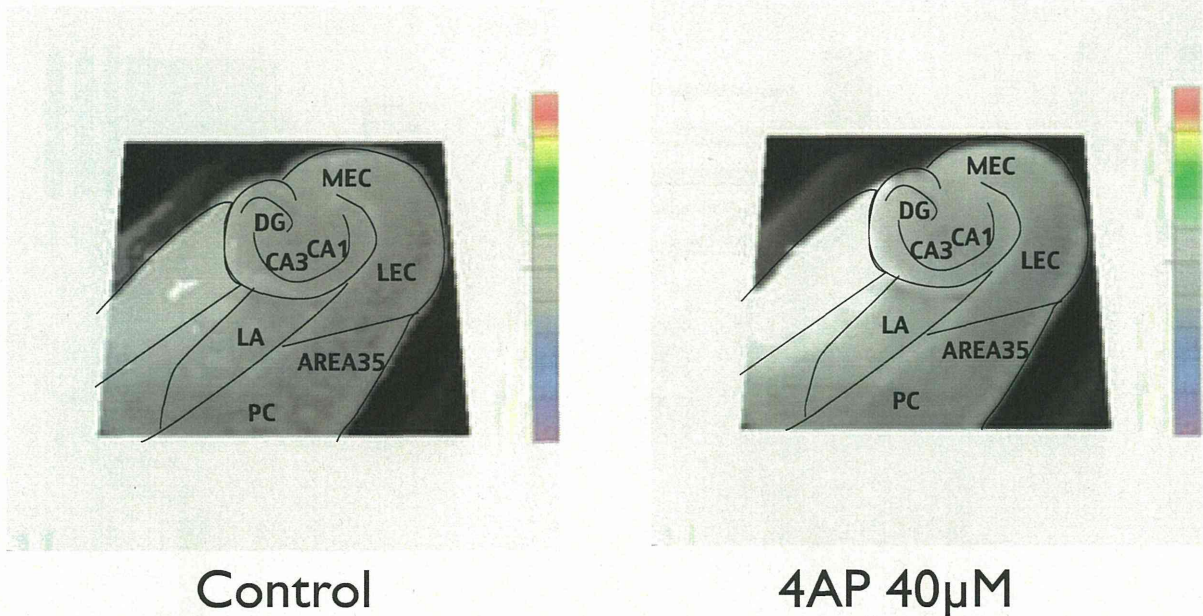
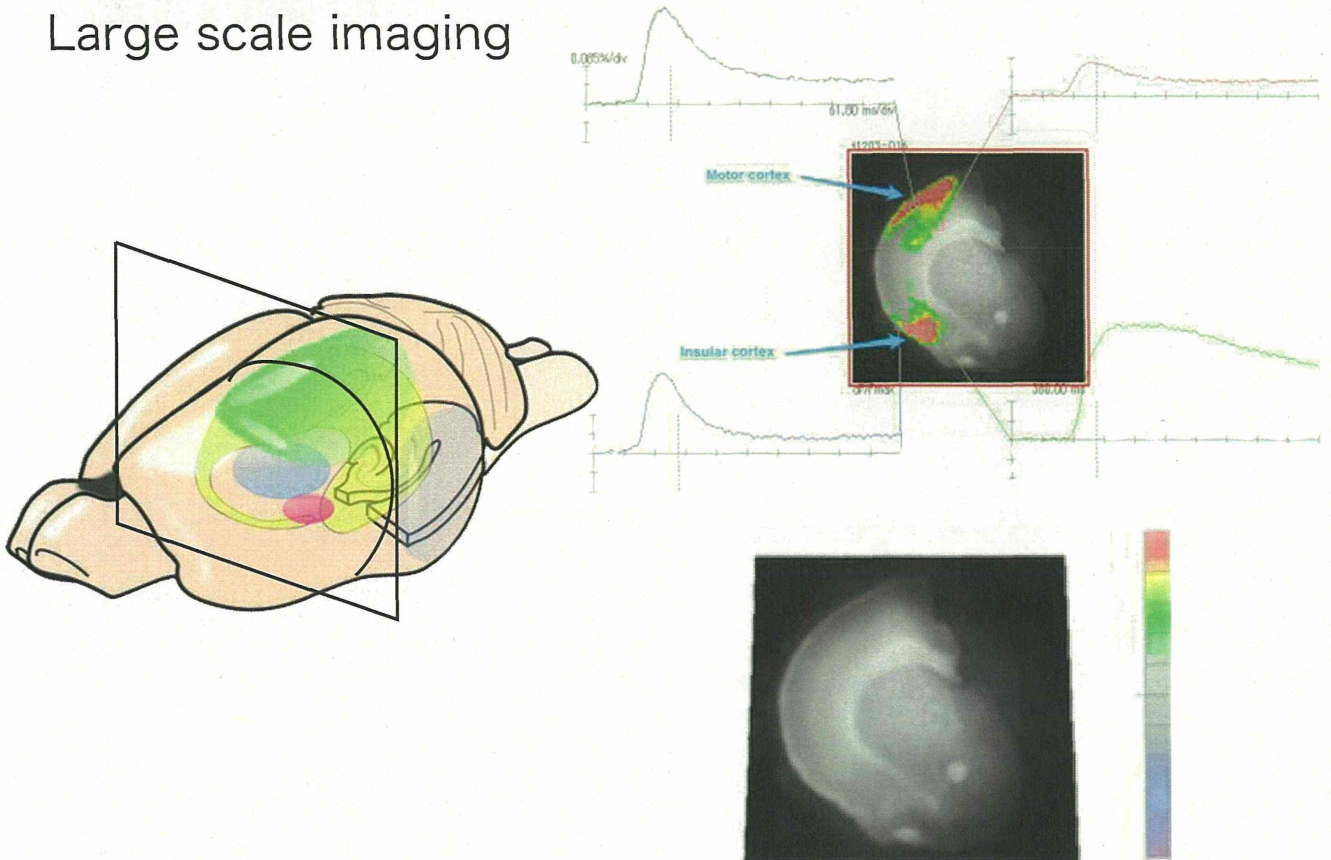


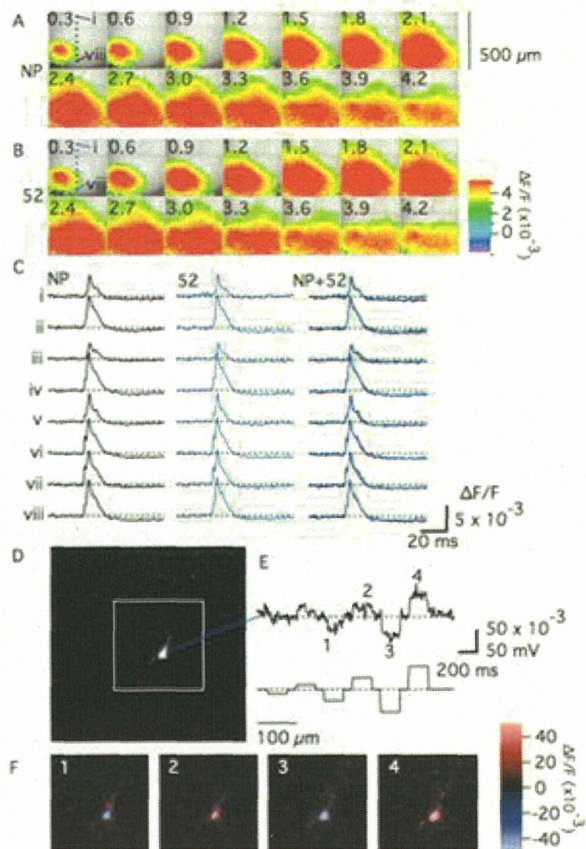
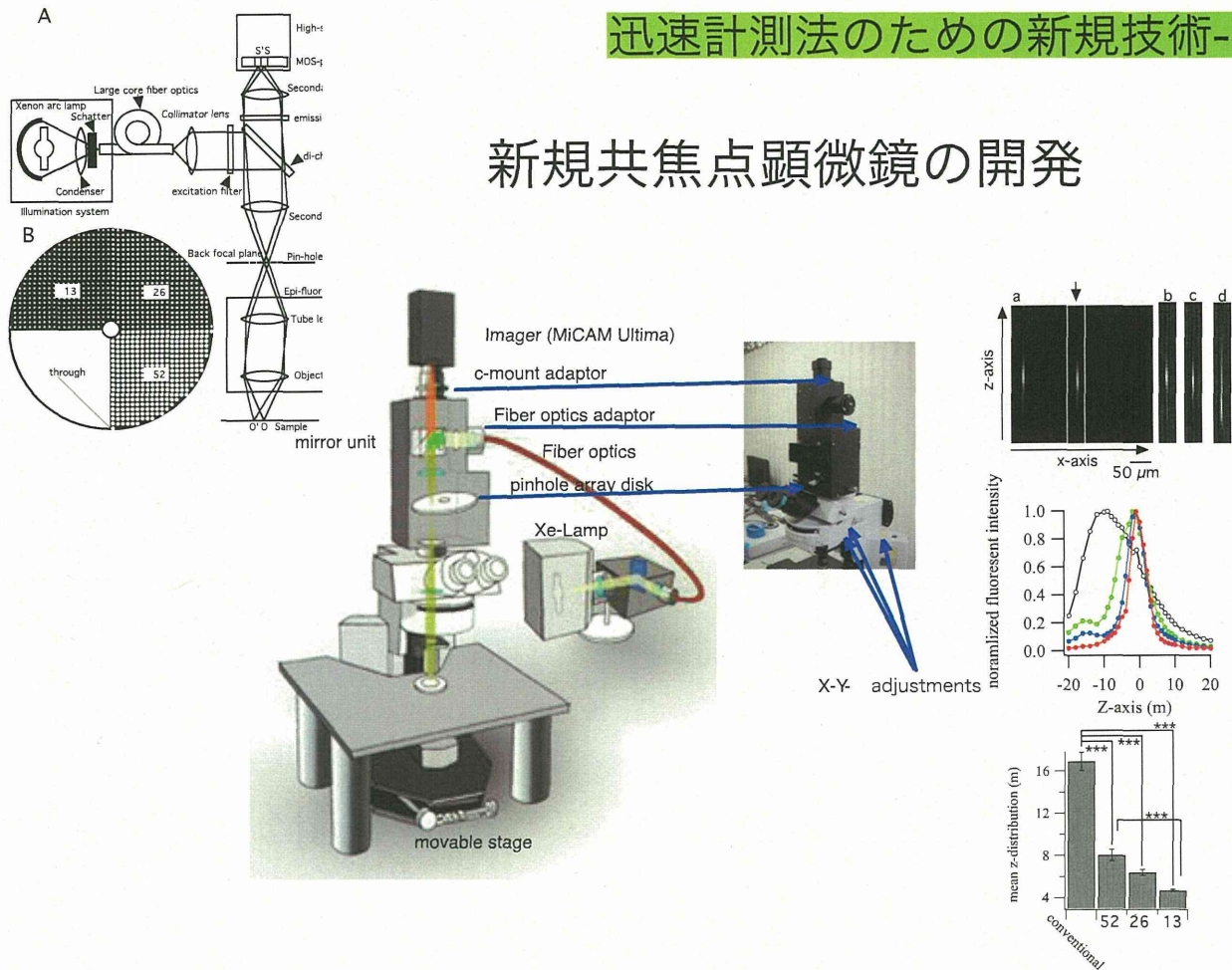
海馬周囲皮質(嗅内皮質、嗅周囲皮質) の神経回路機構解析

梶原と富永
unpublished

Large scale imaging



新規共焦点顕微鏡の開発



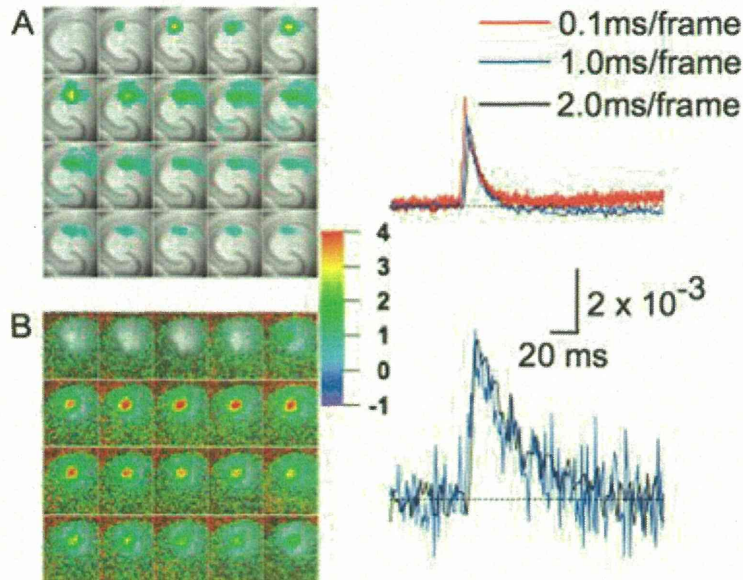
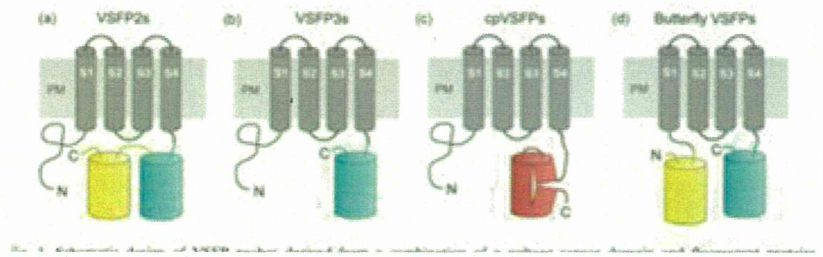
CHAPTER 4

Genetically encoded probes for optical imaging of brain electrical activity

Amélie Perron, Walther Akemann, Hiroki Mutoh and Thomas Knöpfel*

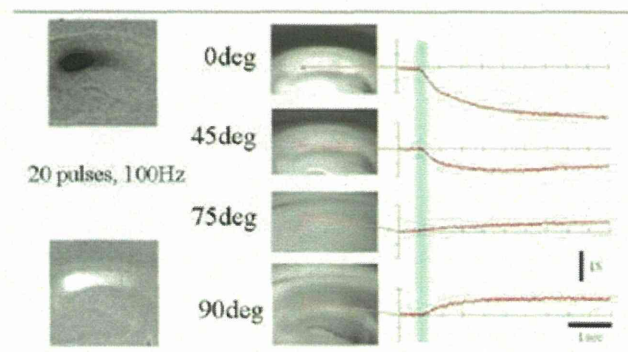
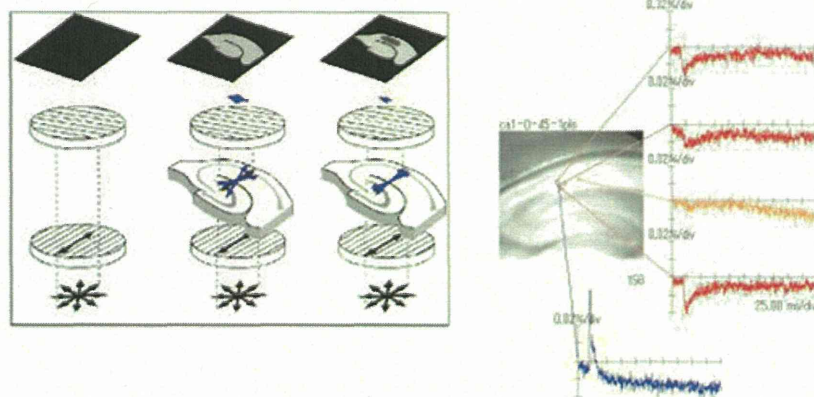
RIKEN Brain Science Institute, Hirosawa, Wako City, Saitama, Japan

迅速計測法のための新規技術-2



迅速計測法のための新規技術-3

無染色標本での複屈折性変化による膜電位計測



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

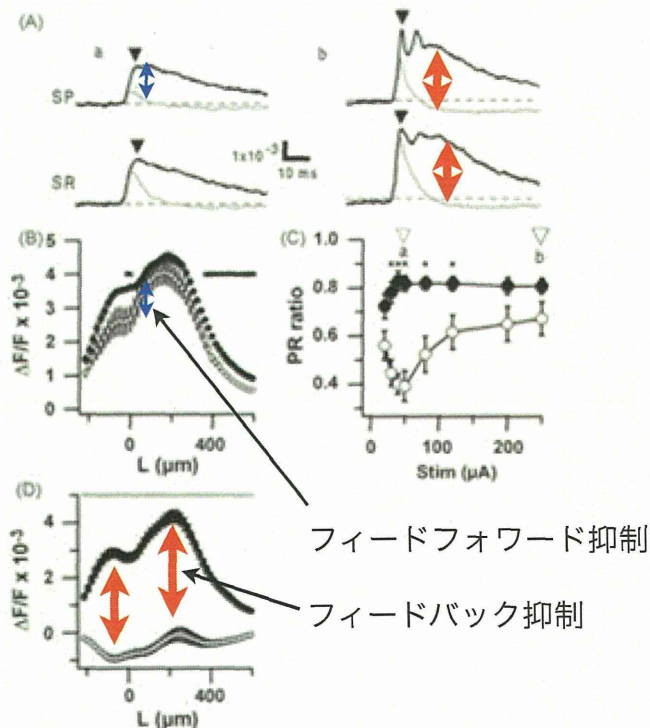
海馬神経回路で抑制系の阻害剤の利用によって

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

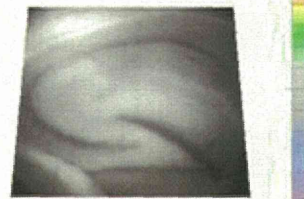
この系のさらなる確立に向けて

1. より広範囲の神経回路での標準的な試験法の確立
2. より鋭敏な検出系(共焦点光学系)
3. オプトジェネティック技術 — VSFP
4. 複屈折性の変化を利用した無染色標本での計測

抑制系の検出



normal solution



+ PITX



Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA_A-mediated feed-forward inhibition in signal propagation

Yoko Tominaga^{a,c}, Michinori Ichikawa^{c,1}, Takashi Tominaga^{a,b,c,*}

Neuroscience Research 64 (2009) 152–161

発生-発達期ビスフェノール A 暴露による脳構築異常解析
研究分担者 中島 欽一 九州大学大学院医学研究院 教授

本年度の研究では、膣栓確認直後から離乳時（生後 28 日）にかけ、マウスにビスフェノール A（BPA）を飲料水により投与し、28 日目の産仔マウス脳切片の免疫染色による解析を行った。その結果、大脳皮質、特に脳梁におけるアストロサイト数の減少とオリゴデンドロサイト数の増加が観察された。この BPA の作用は *in vitro* 培養系でも確認されたが、その分子メカニズムは依然不明である。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な 3 つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでに重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多い。本分担者はこれまで、遺伝子配列変換を伴わずに遺伝子発現を制御する「エピジェネティクス」機構が、神経幹細胞の運命決定に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。そこで本研究では、細胞に対し DNA メチル化変化などを誘導することが知られる環境化学物質ビスフェノール A（BPA）に着目し、発生-発達期ビスフェノール A 暴露による脳構築異常の解析とその原因を幹細胞制御の観点から明らかにする。

B. 研究方法

本年度の研究では、膣栓確認直後から離乳時（生後 28 日）にかけ、飲料水（15 ppm）にて BPA をマウスへ与えた。また増殖性細胞をラベルするため、BrdU（100 mg/kg）を妊娠 14 日目マウスへ投与、生後 28 日目に脳を取り出し固定した。40 mm の切片を作成後、増殖細胞カーマー（BrdU）、ニューロンマーカー（NeuN）、アストロサイトマーカー

（GFAP、S100b）、に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、胎生 14 日目神経幹細胞を取りだし、BPA 存在下に *in vitro* で培養し、その分化への影響も解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学の動物倫理委員会の規定に基づき行った。

C. 研究結果

昨年報告したように、妊娠 6 日目から 15 日目まで BPA に暴露されたマウス胎仔脳では、コントロールマウス脳には、明らかな差は認められなかったものの、膣栓確認直後から BPA を投与した場合、次のような異常がみられた。1) 胎生 14 日目に増殖しておりその後ニューロンへと分化した細胞は BPA 曝露により減少し、皮質内での局在はより分散していた。アストロサイトについては、特に脳梁において、その数の減少が見られた。*In vitro* 培養系においても、BPA のアストロサイト分化抑制作用、及びオリゴデンドロサイト分化促進作用が確認されたが、その分子メカニズム解明には至らなかった。

D. 考察

In vivo 及び *in vitro* の解析において、BPA によるアストロサイト分化抑制作用が見られたが、アストロサイト分化に重要な転写因子 STAT3 の活性化や、アストロサイト特異的遺伝子 GAPA のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイで

はBPAの影響は見られなかった。そのためこれらのBPAの直接の標的ではないと考えられた。また、やはり in vivo 及び in vitro の解析において、BPAのオリゴデンドロサイト分化促進作用が観察された。これまでオリゴデンドロサイト分化に重要な転写因子 Olig2 の発現は、Erk キナーゼの活性化が必要であるとの報告があったため、Erk キナーゼの活性化状態を検討したが、BPAによる影響は見られなかった。そのためBPAによるオリゴデンドロサイト分化促進作用はErk キナーゼ非依存的に発揮されるものと思われた。

E. 結論

BPAには神経幹細胞分化を攪乱する作用があることが明らかになった。しかし、その分子メカニズムは依然不明である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

3. 論文発表

<原著論文>

1. Yi S.H., He X.B., Rhee Y.H., Park C.H., Takizawa T., Nakashima K. & Lee S.H. Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurrl-induced DA phenotype via epigenetic regulation. *Development* 141, 761-772 (2014).
2. Uesaka M., Nishimura O., Go Y., Nakashima K., Agata K. & Imamura T. Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. *BMC Genomics* 15, 35 (2014).
3. Yuniarti N., Juliandi B., Muhchy C., Noguchi H., Sanosaka T. & Nakashima K. Prenatal exposure to suberoylanilide hydroxamic acid perturbs corticogenesis.

Neurosci Res 77, 42-49 (2013).

4. Urayama S., Semi K., Sanosaka T., Hori Y., Namihira M., Kohyama J., Takizawa T. & Nakashima K. Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation. *Cell Struct Funct* 38, 55-66 (2013).

<総説>

1. Namihira M. & Nakashima K. Mechanisms of astrogliogenesis in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 23, 921-927 (2013)
2. MuhChyi C., Juliandi B., Matsuda T. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *Int J Dev Neurosci* 31, 424-433 (2013)

2. 学会発表

<国内学会>

1. 中島欽一[○]: 抗てんかん薬バルプロ酸による神経幹細胞制御とその作用、第164回耳鼻咽喉科・頭頸部外科学術講演会、九州大学医学部百年講堂、2013年12月7日（特別講演）
2. 中島欽一[○]: DNAメチル化による発生段階依存的神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日～6日（4日）（口頭）
3. Chai Muh Chyi[○]、佐野坂 司、Juliandi Berry、種村健太郎、五十嵐勝秀、中島欽一 : Developmental exposure of bisphenol A (BPA) causes brain region-specific abnormalities in mouse brain、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日～6日（4日）（ポスター）
4. 松田泰斗[○]、片野友貴、村尾直哉、Juliandi Berry、河合太郎、審良静男、中島欽一 : 自然免疫関連分子Toll様受容体を介したてんか

- ん誘導性異常ニューロン新生抑制機構、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日～6日(3日)(ポスター)
5. 中島欽一[○]: Effects of an HDAC inhibitor valproic acid on the development and regeneration in the central nervous system、The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium、九州大学総合研究棟、2013年11月4日～6日(5日)(シンポジウム)
 6. 中島欽一[○]: DNAメチル化酵素を介した発生段階依存的な神経幹細胞の分化制御機構、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学蛋白質研究所、2013年11月1-2日(2日)(セミナー)
 7. 辻村啓太[○]、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一: The Rett syndrome-associated protein MeCP2 regulates microRNA processing、2013年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋国際会議場、2013年8月29日-9月1日(8月31日)(ポスター)
 8. 辻村啓太[○]、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一: Rett症候群原因因子 MeCP2によるmicroRNAプロセッシングを介した神経機能制御、第5回日本RNAi研究会、グランドプリンスホテル広島、2013年8月29日-31日(30日)(口頭)
 9. 入江浩一郎[○]、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽二: MeCP2はmiR-199aのプロセッシングを介して軸索伸展を制御する、MeCP2 regulates axon outgrowth through processing of miR-199a、第5回日本RNAi研究会、広島県、グランドプリンスホテル広島、2013年8月29-31日(30日)(ポスター)
 10. 中嶋秀行[○]、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽二: Rett症候群原因遺伝子MeCP2による神経幹細胞分化制御機構の解明、Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells、第5回日本RNAi研究会、広島県 グランドプリンスホテル広島、2013年8月29-31日(ポスター)
 11. 中島欽一[○]: 抗てんかん薬バルプロ酸による神経幹細胞制御とその影響、第60回毒素シンポジウム、兵庫県 楓香荘、2013年7月17-19日(18日)(招待、口頭、特別講演)
 12. Juliandi Berry[○]、種村健太郎、五十嵐勝秀、古川佑介、大塚まき、富永貴志、あべ松昌彦、佐野坂司、辻村啓太、菅野純、中島欽一: Reduced adult neurogenesis and neuronal abnormalities in the hippocampus underlie cognitive deficiency following prenatal administration of the antiepileptic drug valproic acid、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)
 13. 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: バルプロ酸妊娠期投与による海馬神経回路の興奮-抑制バランスの破綻とVSD可視化解析、Disruption of the excitatory/inhibitory balance of hippocampal neural activity by prenatal valproic acid application: A govtage-sensitive dye imaging study、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(ポスター)
 14. 堅田明子[○]、佐野坂司、武藤哲司、中島欽一: 神経幹細胞分化における発生期酸素濃度の影響とその分子機構、Impact of oxygen levels on fate switching of neural stem cells during corticogenesis、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)
 15. 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: 神経回路動作の網羅的定量化解析-バルプロ酸による神経回路動作変容の解明、Optical assay of abnormal

- neural circuit dynamics: Effect of prenatal exposure to valproic acid, Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日 (22日) (口頭)
16. 中島欽一[○]: 抗てんかん薬バルプロ酸の神経系細胞分化及び再生に及ぼす影響、Effects of an antiepileptic valproic acid on the development and regeneration in the central nervous system, Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日 (22日) (口頭)
17. 中島欽一[○]: 神経発達における化学物質誘発エピジェネティック障害とその改善法、第40回日本毒性学会学術年会、幕張メッセ、2013年6月17-19日 (17日) (招待、口頭)
18. 中島欽一[○]: 脳・神経系の機能を制御するエピジェネティクスとその作用機序、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、2013年6月6-8日 (8日) (招待、口頭)
19. 入江浩一郎[○]、中嶋秀行、辻村啓太、中島欽一: MeCP2標的miRNAによる神経幹細胞の分化制御機構の解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、31日)
20. 浜崎伸彦[○]、阿形清和、中島欽一、今村拓也: プロモーターノンコーディングRNAによるマウス初期胚エピゲノム改変、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、31日)
21. 上坂将弘[○]、西村理、中島欽一、阿形清和、今村拓也: プロモーターノンコーディングRNAによるほ乳類エピゲノム形成、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、31日)
22. 辻村啓太[○]、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、高森茂雄、中島欽一: レット症候群原因遺伝子産物MeCP2によるmicroRNAプロセッシング制御、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、31日)
23. 五十嵐勝秀[○]、大塚まき、古川佑介、森山紀子、中島欽一 種村健太郎、菅野純: 発生-発達期ビスフェノールA曝露に伴う成長後のマウス脳DNAメチル化変化の網羅的解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
24. 村尾直哉[○]、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一: ヘミメチル化DNA認識因子NP95/Uhrf1による成体海馬ニューロン新生制御メカニズムの解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
25. 中嶋秀行[○]、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一: レット症候群原因因子MeCP2による神経幹細胞の分化制御機構の解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
26. 佐野坂司[○]、三浦史仁、五十嵐勝秀、藤井信之、森山紀子、菅野純、池尾一穂、伊藤隆司、中島欽一: 発生進行に伴う神経幹細胞のDNAメチル化変動と遺伝子発現解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
27. 野口浩史[○]、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中島欽一: 神経幹細胞におけるDNAメチル化酵素DNMT1の機能解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
28. 木村文香[○]、波平昌一、中島欽一: Dnmt1コンディショナルノックアウトマウスを用いた神経疾患との関連解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30, 31日 (ポスター、30日)
29. 中島欽一[○]: レット症候群原因因子MeCP2の新規作用とその神経系細胞における役割、第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日

-17日 (16日) (招待、口頭)、つくば国際会議場

30.

<国際学会>

1. Chai, M., Juliandi, B., Sanosaka, T., Tanemura, K., Igarashi, K., Nakashima, K.: Brain-region specific developmental alterations in mouse prenatally and postnatally exposed to bisphenol A (BPA). NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
2. Murao, N., Matsuda, T., Koseki, H., Namihiro, M., Nakashima, K.: Analysis of mechanisms underlying neurogenesis in the adult hippocampus regulated by hemimethylated DNA recognition factor, Np95/Uhrf1. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
3. Nakashima, H., Tsujimura, K., Irie, K., Nakashima, K.: Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
4. Noguchi, H., Namihiro, M., Sanosaka, T., Tsujimura, K., Fukao, Y., Igarashi, K., Kimura, A., Nakashima, K.: Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 controls neuronal differentiation of late-gestational neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
5. Matsuda, T., Katano, Y., Adefuin, M., A., Murao, N., Juliandi, B., Kawai, T., Akira, S., Nakashima, K.: TLR9

signaling in microglia suppresses epilepsy-triggered aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

6. Nakashima, K.: Treatment of spinal cord injury by transplantation of neural stem cells. 2nd International spinal cord repair meeting, Barcelona, April 26-27, 2013 (oral)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

①特許取得

なし。

②実用新案登録

なし。

③その他

特になし。

発生-発達期ビスフェノール A 暴露の行動発達に対する影響解析
研究分担者 山田一之 独立行政法人理化学研究所 研究員

研究要旨 胎生期から離乳期にかけた母体経由のビスフェノール A(BPA)暴露が、仔の乳幼児期の認知・情動行動発達に与える影響について、離乳期の社会性に焦点を当てて解析を試みた。新奇環境下に導入した複数の仔が集団を形成する時間および場所について解析したが、BPA 暴露群と統制群の間に変化は認められなかった。また、先行研究の成果に多変量解析を適用して、BPA 暴露による認知・情動行動変化の効率的な評価に適した行動課題の選定を試みた。その結果、新奇環境に対する反応性の評価と認知課題の組み合わせが有効であることが示唆された。

A. 研究目的

胎児期・乳児期に母体経由で暴露されたビスフェノール A（以下 BPA と略す）の影響については、様々な研究が行われてきたが、必ずしも一貫した結果が得られているわけではない。特に行動および精神機能に及ぼす影響については小児期から成熟期を対象とした断片的な知見が得られているに過ぎず、生涯発達の視野における研究は皆無といえる。そこで本研究では、マウスをモデル動物とした新規行動解析実験系を構築し、発生-発達期における BPA 暴露の行動発達に対する影響について横断的および縦断的な解析を可能とする方法論を確立することを目的としている。

平成 23 年度の研究においては、遺伝子改変マウスに用いられている汎用の包括的行動テストバッテリーを適用することによって、発生・発達期における母体経由の BPA 暴露に起因すると考えられる重要な行動変化を見いだすことができた。この結果を基に、平成 24 年度の研究においては、主として情動性の変化について新規行動実験系を立ち上げて詳細な解析を実施し、BPA 暴露群において、乳児期における衝動性が有意に低下していること、また成長期以降の成体の環境刺激に対する反応性に鈍化傾向があることを見いだすことができた。平成 23・24 年度の研究から、BPA 暴露マウスが高強度の刺激（電気ショックや新奇物体）に対する反応性の亢進とともに、低強度の刺激に対する反応性の低下を示すことが明らかになった。しかし、このような BPA 暴露マウス

における認知-情動性変化がどのような神経メカニズムによって生じているかは未だ不明である。そこで、本年度は BPA 暴露マウスにおける認知-情動性変化の生理学的メカニズムについて詳細な解析を可能にするために、伝統的なオペラント条件付けの手法に電気生理学的な手法を合わせた実験系の構築を目指すことを第一の目的とした。また、個体の衝動性や環境に対する反応性の発達と社会性・および社会性の発達は密接に関連していると考えられるので、BPA 暴露が乳幼児乳期の社会性に及ぼす影響について確認することを第二の目的とした。更に本年度は本研究班の最終年度であることから、これまでの研究のまとめとして、BPA 暴露による認知・情動行動変化について、効率的かつ妥当性をもって評価できる評価系を提案することを第三の目的とした。

B. 研究方法

被験体・処置: C57BL/6J 系統のマウス（日本 SLC：7 週齢）を購入後、1 週間の馴致期間において、交配を行った（10 日間）。交配はマウスをランダムに 2 群に分け、一方には飲用水中にビスフェノール A（以下 BPA：1 ppm）、他方には溶媒として 0.01%エタノール（以下 Veh）を添加した。BPA および Veh の添加は離乳時（4 週齢）まで行った。妊娠確認後は毎朝妊娠マウスの状態を確認し、出産が認められた日を生後 0 日（PD 0）とした。

電気生理学測定用オペラント実験装置の開発: ベースブロックの金属加工は大和理研（株）に依頼

した。その他の部品（レバー・給水器など）・インターフェイスおよび測定用ソフトウェアは自作した。マウスには外科的手術によって金属製のヘッドプレートを装着し、ベースブロックに固定した。前肢はレバー押しおよび給水ノズルを押さえられるよう自由としたが、後肢は両面テープで固定台に固定した。マウスは1週間のハンドリングの後、イソフルランの吸気麻酔下でヘッドプレート装着手術を行い、更に1週間の回復期間において、トレーニングを開始した。トレーニングは給水制限下で行い（1日当たり体重の5%程度）、マウスの体重は給水制限開始時の88-90%になるように調整した。トレーニング開始時にレバー押しのアシストによるシェイピングを行い、2あるいは3日目から連続強化によるトレーニングを行った。その後マウスの学習水準に合わせて間欠強化(FR)スケジュールに移行した。

乳幼児期における社会性評価：PD2 からオープンフィールドの床面と同じ材質のプラスチック版上でマウスの正向反射および移動機能の発達について観察を行い、両機能が正常に発達することを確認した。また、マウスは性別が確認出来るようになった時点(PD6-8)で一腹6匹に統一した。実験はPD17に行った。プラスチック製オープンフィールド(30 x 30 x 30 (H) cm)に一腹のマウス（6匹）を離して入れ、2つ以内の集団にまとまるまでの行動を2分間観察・記録した。

BPA の行動影響評価系の選定：文献データベースとして PubMed を利用した。3つの検索キーワード (bisphenol A・mouse・behavior) を指定し、1998年～2013年（12月末時点）の間に出版された論文から基礎資料を作製した。60本の文献から、1）上記文献から総説および英語以外の言語で執筆された論文を除外し、2）更に方法および結果が明瞭に記載されていない論文を除外し、最終的に30本の論文を分析対象とした（添付資料参照）。各論文から①用いられた行動課題と、②結果（有意差の有無）を抽出し、データ系列を作製した。データはカテゴリ化し、採用項目（論文で用いら

れていたか否か：数量化 III 類のみ）と検出項目（有意差を得られたか否か：クラスター分析および数量化 III 類）に分けて分析を行った。統計ソフトはエクセル官能評価 ver. 1.0（エスミ）を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験における3Rの原則に従い、使用動物数を最小限に留めるよう努力した。なお、本研究における動物実験は、独立行政法人理化学研究所実験動物委員会の承認を得て、同動物実験倫理規定を遵守して行われた。

C. 研究結果

電気生理学測定用オペラント実験装置の開発：

装置の外観を添付資料（6枚目写真）に示す。本装置では可動式レバー（retractable lever）に加えて、昇降式給水ノズルを採用することによって、マウスの反応と報酬提示のタイミングを正確に制御することを可能にした。諸般の事情によって当初の予定よりも開発が遅延し、BPA 暴露マウスの解析には至らなかったが、C57BL/6 マウスによる性能チェックを終了することができた。

乳幼児期における社会性評価：グループ化にかかる時間について、BPA 暴露群と統制群の間に有意な差は認められなかった（添付資料7枚目）。また、他のマウスと著しく活動性の異なる個体数についても、BPA 暴露群と統制群の間に有意な差は認められなかった。

BPA 暴露マウスの行動影響評価系の選定：まず各文献で採用されていた行動分析課題について、数量化 III 類を用いて分析を行ったところ、オープンフィールド試験、新奇性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が一般的な情動・認知行動課題として採用されていることが再確認された。これは、遺伝子改変マウスの初期行動解析とほぼ同様の内容である。また、各文献において行動変化が報告されていた課題について、数量化 III 類を用いて分析したところ、採用項目と同様にオープンフィールド試験、新奇

性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が性衝動や動因水準に影響を受けにくい試験項目であることが確認された（添付資料 11-12 枚目）。

D. 考察

本年度は、電気生理学測定用オペラント実験装置の開発、BPA 暴露が乳幼児期における社会性を与える影響の評価、および BPA の行動影響評価系の提案の 3 点を目標として研究を展開した。

電気生理学測定用オペラント実験装置の開発については、開発が当初の予定よりも遅れたために、BPA 暴露マウスのオペラント条件付けおよびオペラント行動時の生理学的測定には至れなかった。しかし、C57BL/6J マウスによる評価試行では、マウスを本装置上に固定した場合でも、スキナー箱における自由行動下のオペラント条件付けと同様の学習が可能であることが明らかにできた。本装置では、可動式反応レバーに加えて昇降式給水ノズルを採用することによって、マウスのレバー押し反応と飲水反応をミリ秒単位で正確に制御しており、行動データと電気生理学的データをほぼ同じ時間軸上で評価することが可能である。行動データと生理学的データを同時に評価できる本技術は、化学物質の行動影響評価に広く応用出来るものと言える。今後更なるバリデーションを行い、知的財産権の確保・製品化を目指す予定である。

次に、BPA 暴露が乳幼児期における社会性を与える影響の評価については、複数のマウスを同時にオープンフィールドに入れ、グループ化の過程を観察する方法を考案した。この方法は極めて簡便でありながら、乳幼児の社会性（特に愛着や親和性に関する情動的な側面）や個体の集団内で示す逸脱的行動（多動など）が高い精度で検出可能である。本研究では BPA 暴露の影響を認めることができなかったが、試験の実施タイミングや観察環境を変化させることによって更なる検出力の向上が期待できる。社会性評価の試験課題は手

続きが煩雑なものが多く、乳幼児に適用できるものが少ない。手続きが簡便な本課題は、小児毒性の行動モデルとして標準化が望まれる。

上記の実験的研究に加えて、本年度は BPA 暴露マウスの行動影響評価系の選定を試みた。行動課題の種類は非常に多く、これらを網羅的に検討することは現実的ではない。そこで本研究では、BPA 暴露の行動影響について報告している先行研究の結果を多変量解析によって評価・分類を行うことによって、BPA 暴露の認知・情動行動に対する影響評価を効率的に行うことができる行動試験バッテリーを提案することを目指した。分析対象とした資料で用いられた行動試験は 27 種類・カテゴリに達し、マウス行動解析課題のほぼ全般に渡っていた。しかし、最終的に評価項目（カテゴリ）として有効と考えられた試験は 8 課題（カテゴリ）であった（添付資料参照）。更にこの 8 課題（カテゴリ）の中で、性衝動や動因水準の影響を受けやすい試験課題（非攻撃性社会行動: non-aggressive social behavior、性行動: inter-sexual behavior）およびその他本研究においては採用頻度が低くカテゴリ化が困難であった試験課題（other behavior: rota rod, mirror maze, etc）を除外すると、オープンフィールド・明暗箱試験・高架式十字迷路試験・新奇性試験および空間記憶学習試験の 5 試験課題がグループ化された。この結果はこれらの試験課題が BPA 暴露による認知情動行動影響を適正に評価し得る試験課題群であることを示すものと言える。本研究班の研究においても、上記 5 課題で BPA 暴露の影響が認められていることから、化学物質暴露による認知情動行動影響の評価には、これらの試験課題を含めることが望ましいと考えられる。

E. 結論

本年度の研究では、行動と生理学的評価を同時に行える実験系を開発し、また乳幼児における社会行動の評価系を考案した。標準化のために今後更なる試験の信頼性と妥当性の検討が必要である。

また、先行研究および本研究班の研究から、化学物質暴露の認知情動行動影響の評価系にはオープンフィールド・明暗箱試験・高架式十字迷路試験・新奇性試験および空間記憶学習試験を含めることが望ましいことが示された。

F.健康危険情報

特になし

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) K. Nose-Ishibashi, J. Watahiki, K. Yamada, M. Maekawa, A. Watanabe, G. Yamamoto, A. Enomoto, Y. Matsuba, T. Nampo, T. Taguchi, Y. Ichikawa, T. C. Saido, K. Mishima, Y. Yamaguchi, T. Yoshikawa, K. Maki. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience*, 263: 2014: 257-268.
- 2) S. Ito, I. Ogiwara, K. Yamada, H. Miyamoto, T. K. Hensch, M. Osawa, K. Yamakawa. Mouse with Nal.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol. Disease*, 49: 2013: 29-40.
- 3) M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. *J. Neurosci.* 33: 2013: 12940-12953.

2.学会発表

国際学会：

M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. *Neuroscience* 2013, the Society for Neuroscience 43th Annual Meeting (San Diego, CA, November 9-13)

国内学会：

- 1) 山田一之. 私論：マウス行動解析の昨今-何故、多くの心理学者達が去って行ったのか？- 2013, 薬物・精神・行動の会（招待）（4月26日 慈恵医科大学）
- 2) N. Tomioka, H. Miyamoto, M. Hatayama, N. Morimura, Y. Matsumoto, T. Suzuki, M. Odagawa, Y. Odaka, Y. Iwayama, K. Yamada, T. Yoshikawa, K. Yamakawa, J. Aruga. Role of Elfn1 in hippocampal inhibitory neural circuits containing somatostatin-positive neurons. 2013, 第36回日本神経科学大会（6月20-23日 京都国際会議場）
- 3) M. Kinoshita, T. Sano, E. Ooshima, C. Shimizu, H. Hama, K. Tohyama, T. Tachikawa, D. T. Le, T. Suzuki, K. Yamada, A. Miyawaki, S. Sagao, Y. Hirabayashi. GPCR5B KO mice are induced axon degeneration in cerebellar Purkinje neurons, resulting in impaired motor coordination and learning. 2013, 第36回日本神経科学大会（6月20-23日 京都国際会議場）
- 4) M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Odagawa, N. Morimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates emotional behaviors by altering the monoamine dynamics in prefrontal cortex. 2013, 第36回日本神経科学大会（6月20-23日 京都国際会議場）
- 5) S. Manita, T. Suzuki, T. Matsumoto, C. Homma, K. Yamada, K. Ota, M. Odagawa, C. Matsubara, M. Ohkura, M. Sato, J. Nakai, Y. Hayashi, M. E. Larkum, M. Murayama. Top-down motor signals modulate sensory perception. 2013, 第36回日本神経科学大会（6月20-23日 京都国際会議場）
- 6) C. Homma, A. Kamoshida, K. Yamada, M. Oda, H. Yamakawa, M. Murayama. New behavior training system combined with tactile stimulation device in virtual world. 2013, 第36

回日本神経科学大会（6 月 20-23 日 京都国際会議場）

7) Y. Matsumoto, H. Miya, K. Katayama, K. Yamada, M. Odagawa, Y. Nozaki, Y. Yanagawa, J. Aruga. An essential role of Slitrk4 in the establishment of fear memory controlling neural circuit in amygdala. 2013, 第 36 回日本神経科学大会（6 月 20-23 日 京都国際会議場）

8) 本間千尋、鴨志田敦史、山田一之、鈴木崇之、織田充、山川宏、村山正宜. 体性感覚刺激の弁別学習が可能なマウス用行動トレーニングシステムの確立. 2013, 電気学会 電子・情報・システム部門大会（9 月 4-7 日 北見工業大学）

9) 山田一之、種村健太郎. 発生-発達期ビスフェノール A 暴露の行動発達に対する影響解析 2013, 第 73 回日本動物心理学会大会（9 月 14-16 日 筑波大学）

10) 山田一之. 次世代の行動評定法の開発を目指して 第 73 回日本動物心理学会大会 ワークショップ（招待）（9 月 14-16 日 筑波大学）

11) 樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純. ユビキチンリカーゼ Rines によるモノアミンオキシターゼ (MAO-A) 分解を介した情動行動制御機構. 2013, 第 156 回 日本獣医学会学術集会（9 月 20-20 日 岐阜大学）

12) 樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川 摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純. ユビキチンリカーゼ Rines による、モノアミンオキシターゼ (MAO-A) 蛋白質分解制御を介した情動行動制御機構. 2013, 第 36 回日本分子生物学会（12 月 3 日-6 日 神戸ポートアイランド）

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

なし

②実用新案登録

なし

③その他

なし

発生-発達期ビスフェノールA暴露の 行動発達に対する影響解析

独立行政法人理化学研究所 脳化学総合研究センター

山田 一之

1. 本研究の目的

マウスをモデル動物とした新規行動解析試験系を構築し、発生-発達期におけるビスフェノールA(以下BPA)暴露の認知・情動行動発達に対する影響について、横断的および縦断的な解析を可能とする方法論を確立すること。

これまでの経過

- 1) 平成23年度: 遺伝子改変マウスに用いられている汎用の包括的行動テストバッテリーを適用することによって、発生・発達期における母体経路のBPA暴露に起因すると考えられる重要な行動変化を見いだした。
- 2) 平成24年度: 主として情動性の変化について新規行動試験系を立ち上げて詳細な解析を実施した。その結果、BPA暴露群では乳児期における衝動性が有意に低下していること、また成長期以降の成体の環境刺激に対する反応性に鈍化傾向があることを見いだした。



BPA暴露マウスにおいて認知-情動性変化が生じていると考えられるが、
その神経メカニズムは未だ不明

3) 平成25年度の目的:

- ① BPA暴露マウスにおける認知・情動性変化の生理学的メカニズムについて詳細な解析を可能にするために、伝統的なオペラント条件付けの手法に電気生理学的な手法を合わせた実験系の構築を目指す
 - ② 個体の衝動性や環境に対する反応性の発達と社会性・および社会性の発達は密接に関連していると考えられるので、BPA暴露が乳幼児期の社会性に及ぼす影響について確認すること
 - ③ 更に平成25年度は本研究班の最終年度であることから、これまでの研究の総括として、BPA暴露による認知・情動行動変化について、効率的かつ妥当性をもって評価できる評価系を提案すること
- (上記に加えて、研究をまとめるための補足作業(結果のバリデーションやデータの追加などを行った。)

2. 研究方法

被験体・処置:

被験体: C57BL/6Jマウス(日本SLC: 7週齢)。飼育室で1週間馴致後交配(10日間)。妊娠確認後は毎朝妊娠マウスの状態を確認し、出産が認められた日を生後0日(PD 0)とした。

BPA暴露法: マウスをランダムに2群に分け、一方には飲用水中にBPA(1 ppm)、他方には溶媒として0.01%エタノール(以下Veh)を添加(離乳時: 4週齢まで)。

電気生理学測定用オペラント実験装置の開発:

装置: ベースブロックの金属加工は大和理研(株)に依頼した。その他の部品(リトラクタブルレバー・昇降式給水器など)・インターフェイスおよび測定用ソフトウェアは自作。

実験方法:

- ・マウスは1週間のハンドリングの後、イソフルランの吸気麻酔下でヘッドプレート装着手術を行い、更に1週間の回復期間をおいて、トレーニングを開始した。
- ・トレーニングは給水制限下で行い(1日当たり体重の5%程度)、マウスの体重は給水制限開始時の88-90%になるように調整した。
- ・トレーニング開始時にレバー押しのアシストによるシェイピングを行い、2日目あるいは3日目から連続強化によるトレーニングを行った。その後マウスの学習水準に合わせて間欠強化(FR)スケジュールに移行した。

乳幼児期における社会性評価: PD2からオープンフィールドの床面と同じ材質のプラスチック版上でマウスの正向反射および移動機能の発達について観察を行い、両機能が正常に発達することを確認した。また、マウスは性別が確認出来るようになった時点(PD6-8)で一腹6匹に統一した。実験はPD17に行った。プラスチック製オープンフィールド(30 x 30 x 30 (H) cm)に一腹のマウス(6匹)を離して入れ二つ以内の集団にまとまるまでの行動を2分間観察・記録した。

BPAの行動影響評価系の選定: 文献データベースとしてPubMedを利用した。3つの検索キーワード(bisphenol A・mouse・behavior)を指定し、1998年～2013年(12月末時点)の間に出版された論文から基礎資料を作製した(文献60本)。そして、

- 1) 上記文献から総説および英語以外の言語で執筆された論文を除外し、
 - 2) 方法および結果が明瞭に記載されていない論文を除外し、
- 最終的に30本の論文を分析対象とした。

各論文から①用いられた行動課題と、②結果(有意差の有無)を抽出し、データ系列を作製した。データは有意差が認められたか否かでカテゴリ化し、クラスター分析および数量化Ⅲ類によって分析を行った。統計ソフトはエクセル官能評価ver. 1.0(エスミ)を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験における3Rの原則に従い、使用動物数を最小限に留めるよう努力した。なお、本研究における動物実験は、独立行政法人理化学研究所実験動物委員会の承認を得て、同動物実験倫理規定を遵守して行われた。

3. 研究結果

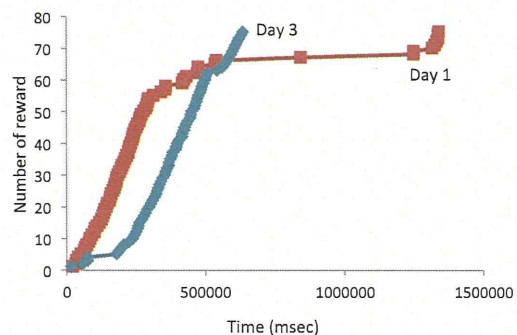
電気生理学測定用オペラント実験装置の開発:

装置の外観を下図に左に示す。本装置では可動式レバー(retractable lever)に加えて、昇降式給水ノズルを採用することによって、マウスの反応と報酬提示のタイミングをミリ秒単位で正確に制御することを可能にした。諸般の事情によって当初の予定よりも開発が遅延し、BPA暴露マウスの解析には至らなかったが、C57BL/6マウスによる性能チェックを終了することができた(下図右に例を示す)。

昇降式給水ノズル リトラクタブルレバー



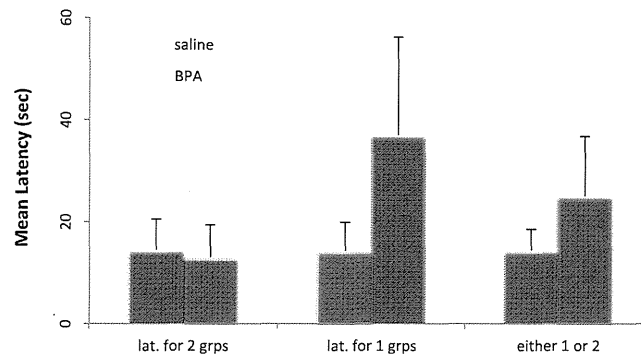
装置とオペラント実験の様子



訓練例(C57BL/6J male)

乳幼児期における社会性評価:

グループ化にかかる時間について、BPA暴露群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。また、他のマウスと著しく活動性の異なる個体数についても、BPA暴露群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。



BPA群とVeh群(各5腹; 6匹/腹)のグループ化
所要時間の比較

BPA暴露マウスの行動影響評価系の選定:

まず各文献で採用されていた行動分析課題について、数量化Ⅲ類を用いて分析を行ったところ、オープンフィールド試験、新奇性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が一般的な情動・認知行動課題として採用されていることが再確認された。これは、遺伝子改変マウスの初期行動解析とほぼ同様の内容である。また、各文献において行動変化が報告されていた課題について、数量化Ⅲ類を用いて分析したところ、採用項目と同様にオープンフィールド試験、新奇性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が性衝動や動因水準に影響を受けにくい試験項目であることが確認された。

データ行列の作製 (初期段階)

*key word: upper column = open field, lower column = bisphenol A, mouse, behavior

Authors	Year	Journal	Volume & page	behavioral indices						
				open field	water maze	step-down PA	novelty test	EPM	LD box	
Wolstenholme JT, Goldsby JA, Risman EF	2013	Horm Behav	65: 833-9	(activity)						
Xu X, Liu X, Zhang Q, Zhang G, Lu Y, Ruan G, Dong F, Yang Y	2013	Horm Behav	63: 766-75	+ (rearing, center)	+ (distance)	impaired				
Gioiosa L, Parmigiani S, Vom Saal FS, Palanza P	2013	Horm Behav	63: 598-605	anxiety +			less prone	anxiety +		
Xu X, Hong X, Li T, Yang Y, Zhang Q, Zhang G, Liu X	2012	Horm Behav	62: 480-90	anxiety +				anxiety +		anxiety +
Matsuda S, Matsuda D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C et al	2012	Prog Neuropsychopharmacol	35: 273-9	anxiety + (center -)						
Xu X, Tian D, Hong X, Chen X, Xie L	2011	Neuropharmacology	61: 565-73	sexual diff abolished+	(distance)	impaired		anxiety +		
Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, Kato S et al	2012	Brain Dev	34: 57-63	dist -	no effect			dist -		
Tian YH, Beak JH, Lee SY, Jang GG	2010	Synapse	64: 432-9	center +				time open +		
Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S	2008	Environ Res	108: 150-7	affected			affected	affected		
Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P	2007	Horm Behav	52: 307-16	sexual diff abolished			sexual diff abolished	sexual diff abolished		
RubinBS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN et al	2008	Endocrinology	147: 3881-91	sexual diff abolished						
Pioot M, Maule L, Marie-Luce G, Martini M et al	2013	Endocrinology	153: 3828-38	a-pub ahead						
Luo G, Wei R, Niu R, Wang C, Wang J	2013	Food Chem Toxicol	60: 177-80					anxiety +		anxiety +
Ogi H, Itoh K, Fushiki S	2013	Brain Behav	3: 223-8							
Kundakovic M, Gudanuk K, Franks B, Madrid J et al	2013	PNAS	110: 9958-61	male: dist +, female dist -						
Decatzenaro D, Berger RG, Guzzo AG, Thorpe JB, Khan A	2013	Food Chem Toxicol	55: 164-71							
Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SR et al	2012	Endocrinology	153: 3828-38					no effect		
Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, et al	2011	Proc ONI	425448							
Wang H, Fredriksson A, Burakov S, Eriksson P	2011	Toxicology	280: 187-94		no effect			no effect		
Yu G, Tai F, Wu R, Zhang X, He F	2011	Environ Toxicol Pharmacol	31: 88-99	altered				altered		
Jazarevic E, Siell PT, Twilman EE, Welsh TH Jr et al	2011	PNAS	108: 11715-20					anxiety +		
Gox KH, Gatewood JD, Howeth G, Risman EF	2010	Horm Behav	58: 754-61					anxiety +		
Martini M, Miceli D, Gotti S et al	2010	J Neuroendocrinol	22: 1004-12							
Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QG	2010	Horm Behav	58: 328-33		impaired probe test	impaired				
Myagawa K, Narita M, Narita M, Akama H, Suzuki T	2007	Neurosci Lett	418: 236-41			impaired (step-through)		anxiety +		anxiety +
Ryan BC, Vandenberg JG	2006	Horm Behav	50: 85-93					anxiety +		anxiety +
Laviola G, Gioiosa L, Adriani W, Palanza P	2005	Brain Res Bull	65: 235-40							
Mizuko K, Narita M, Myagawa K, Narita M, Okuno E, Suzuki T	2004	Neurosci Lett	358: 95-98							
Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takai M, Kubo C	2003	Environ Health Perspect	111: 175-8							
Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS	2002	Environ Health Perspect	110: 415-22							
n = 30					13	5	4	3	15	4

注) 本研究ではBPA研究において有意差を得られた課題について検討しているため、詳細な実験条件・手続きの差異について区別していない。これらを厳密に分類するとカテゴリ化が不可能である。

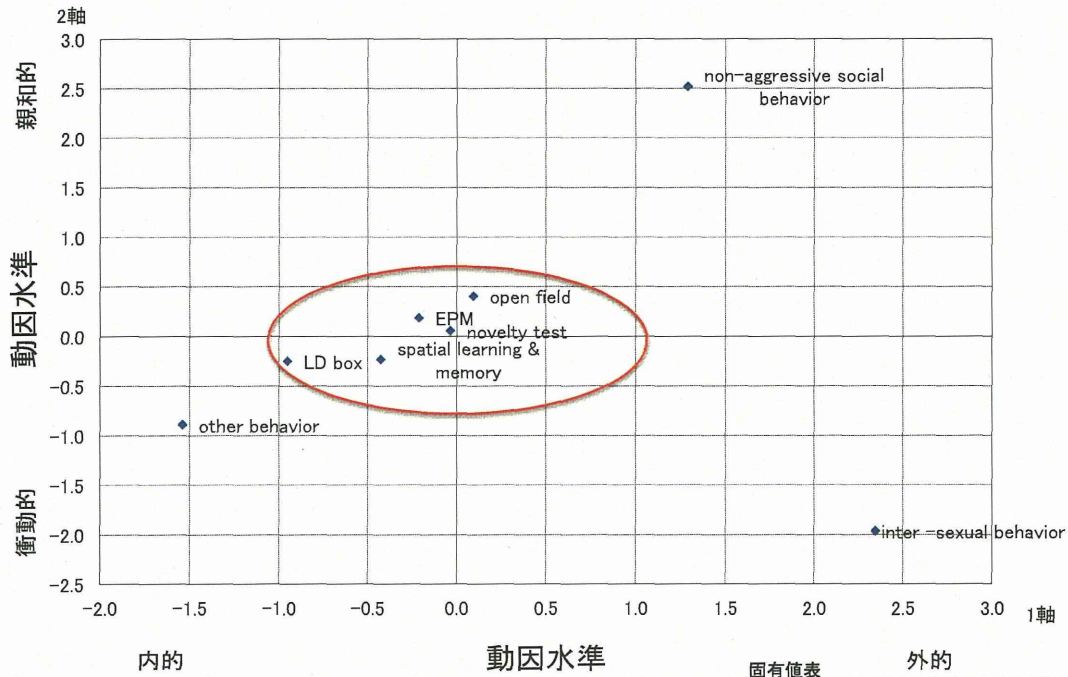
データ行列の作製

behavioral indices (0: not conducted or no change; 1: significant change) 有意差のあったもの

	EPM	open field	water maze	step-down PA	LD box	novelty test	mating (sexual behav)	social interaction	social preference	male-female social interaction	Barnes maze	social recognition	dishabituation to novel female	olfactory discrimination
ref_01		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ref_02		0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_03		1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_04		1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_05		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_06		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_07		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_08		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_09		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_11		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_12		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ref_13		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_14		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_15		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_16		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ref_17		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
ref_18		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ref_19		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_20		1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ref_21		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ref_22		1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
ref_23		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ref_24		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_25		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_26		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_27		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_28		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_29		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ref_30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		11	11	3	4	4	1	3	2	2	2	0	1	1

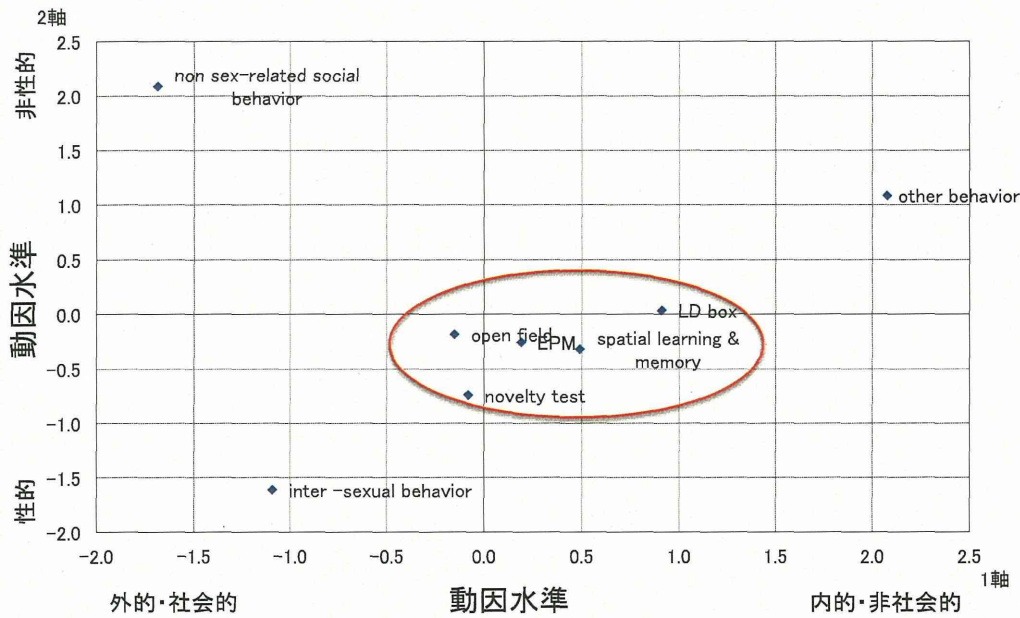
注) 本研究ではBPA研究において有意差を得られた課題について検討しているため、詳細な実験条件・手続きの差異について区別していない。これらを厳密に分類するとカテゴリ化が不可能である。

採用項目分析



固有値表	寄与率		相関係数
	固有値	(%)	累積(%)
軸No.			
1	0.6679	25.7%	25.7%
2	0.5570	21.4%	47.1%

検出項目分析



固有値表	寄与率		相関係数
	固有値	(%)	累積(%)
軸No.			
1	0.7612	24.7%	24.7%
2	0.6577	21.4%	46.1%