

**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:** Snapc1 (snRNA-activating protein complex subunit 1)  
**減少:** Esr2とSstr1 (SOMATOSTATIN RECEPTOR 1)

**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。

## 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stil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、及び雌 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、及び雌 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



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

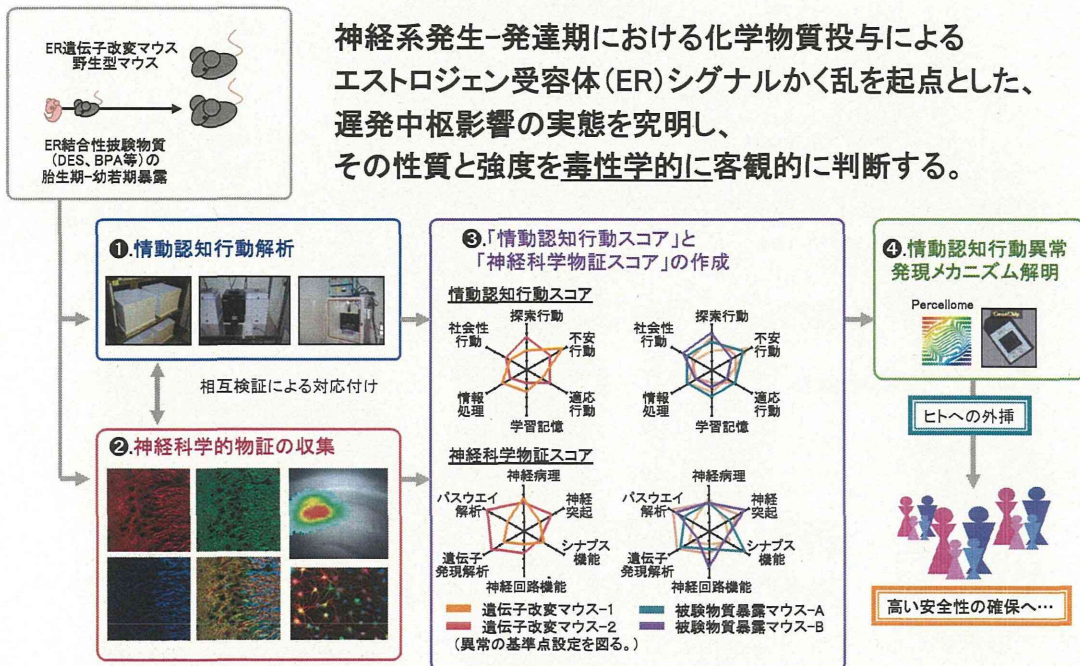
神経系発生-発達期の化学物質暴露による  
遅発中枢影響解析に基づく  
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究

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



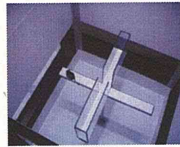
2



OF



LD



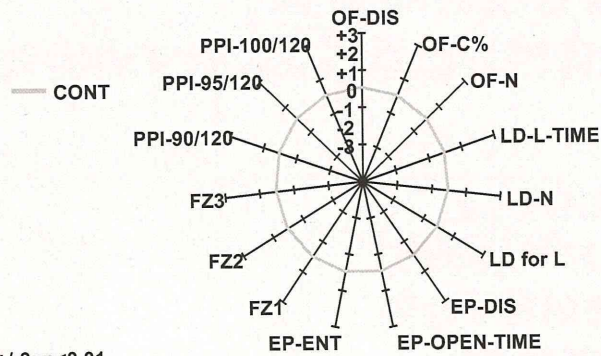
EP



FZ



PPI



+/-3: p<0.01  
 +/-2: p<0.05  
 +/-1: p<0.1  
 0: p>0.1

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

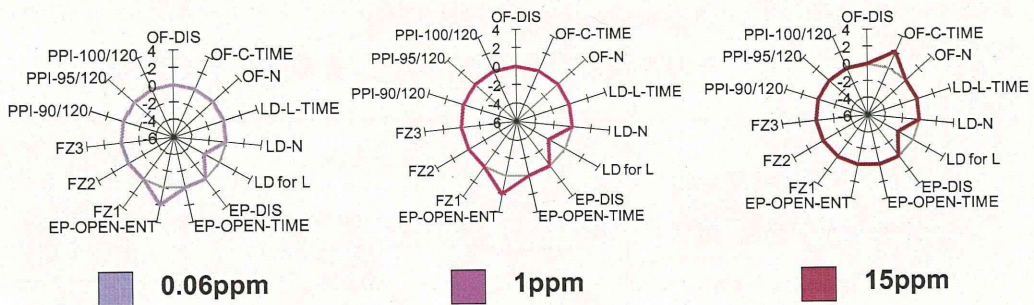
LD-L-TIME : time spent in light zone  
 LD-N : number of transition  
 LD for L : time spent for 1st transit

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

## 周産期BPA暴露マウスの行動解析



0.06ppm

1ppm

15ppm

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。



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。**

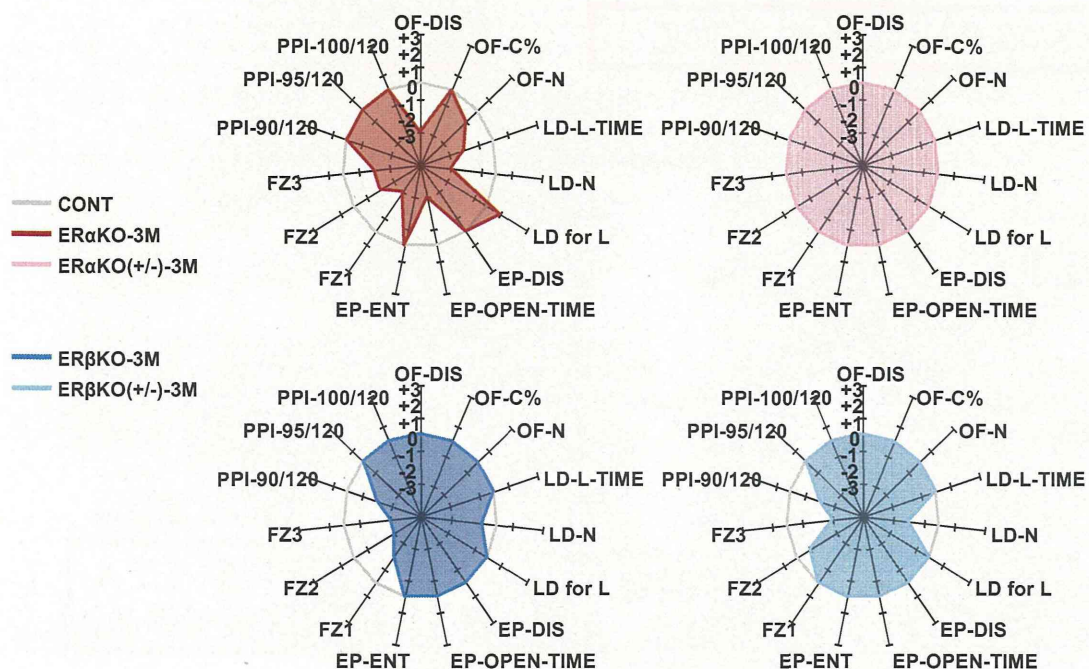
それでは、こうした早期暴露による遅発影響が  
 毒性学的に、どのような位置づけになるのか？



**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

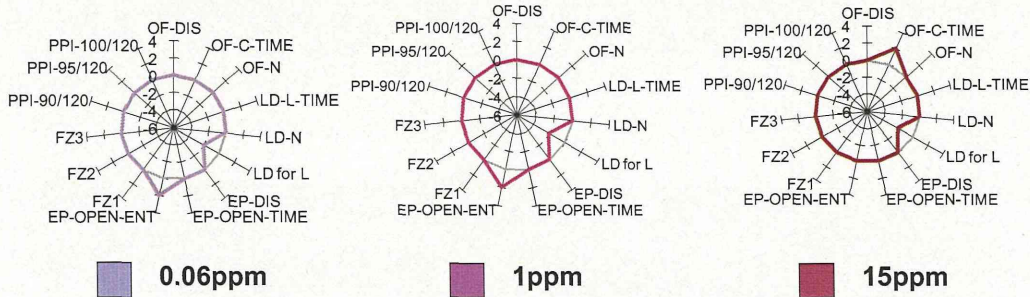
### ER遺伝子改変マウスの行動解析



6



## 周産期BPA暴露マウスの行動解析

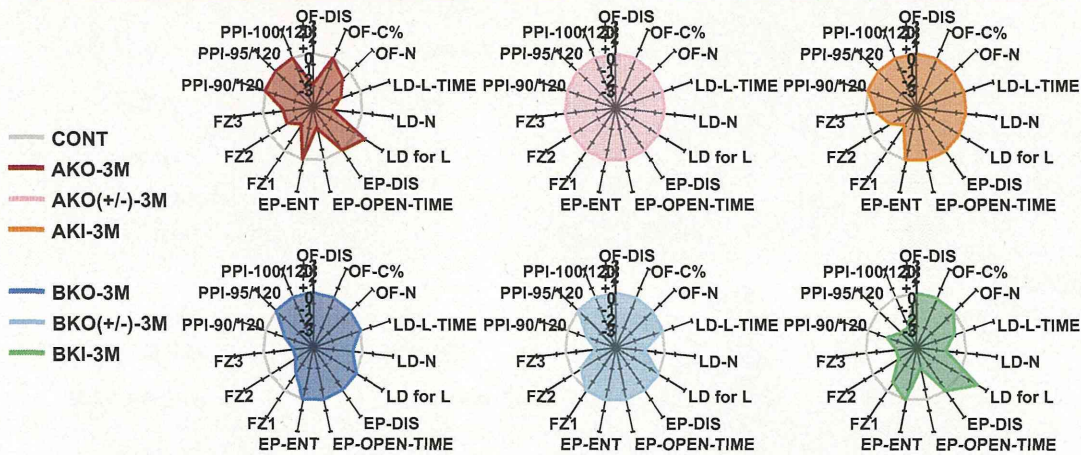


周産期におけるBPA暴露の結果、  
不安関連行動異常が誘発される。  
認知行動については、ER遺伝子改変マウスに比べ、  
逸脱レベルは小さい。

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)

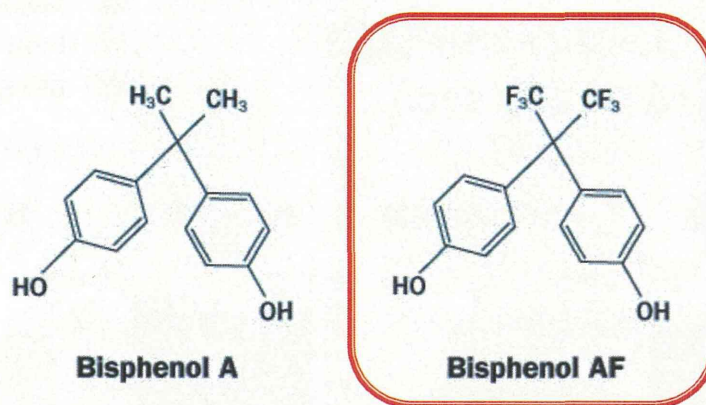


認知機能異常の基準設定  
に資する可能性がある

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

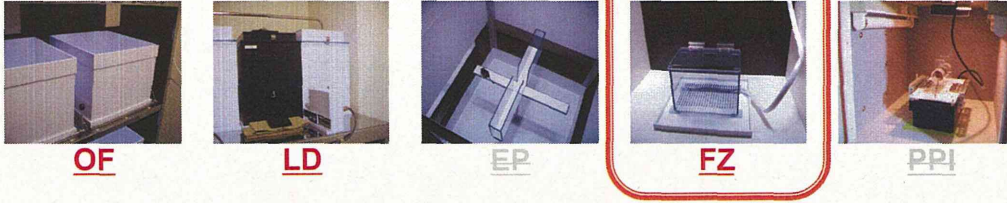


ビスフェノールAF (BPAF)、  
0ppm、10ppm、100ppmの濃度にて、  
交配から、産仔マウスの離乳まで飲水に混合投与し、  
成長後(12-14週齢)の雄産仔マウスについて、  
遅発中枢影響を検討した。

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。

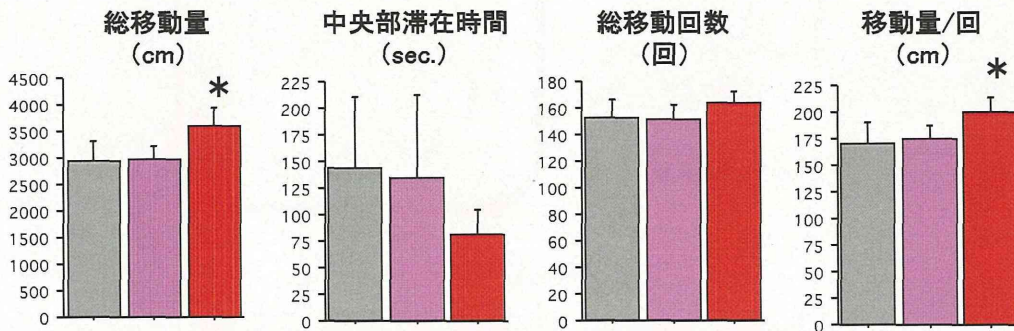


特に短期記憶形成過程への影響評価の  
高度化を期待できる。

11

## オープンフィールド試験 (15 lx、360 sec.)

■ 対照群  
■ BPAF、10 ppm 曝露群  
■ BPAF、100 ppm 曝露群

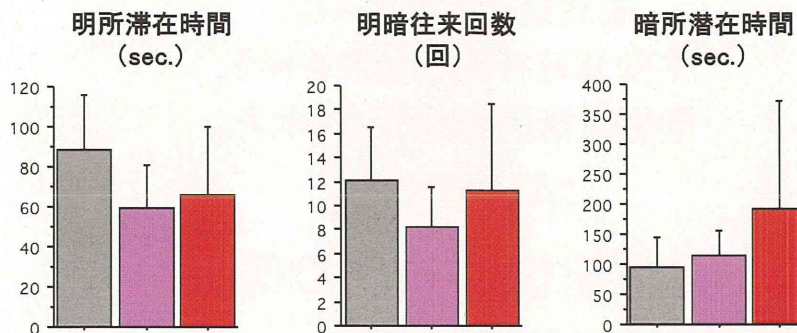
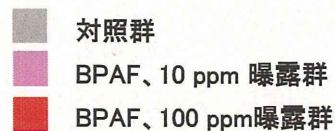


\* p<0.05

12



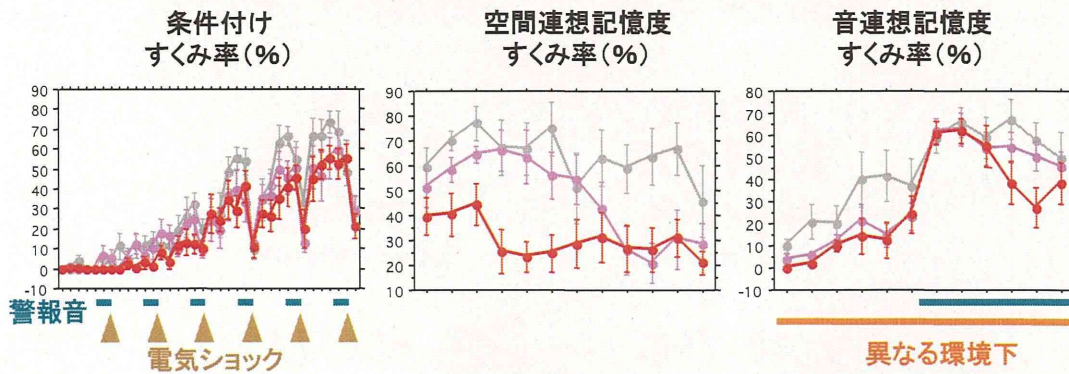
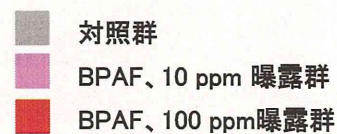
## 明暗往来試験(360 sec.) (60 sec.暗所待機スタート)



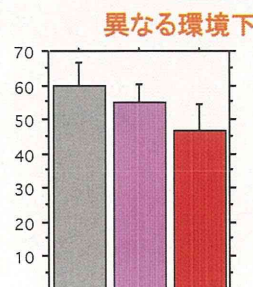
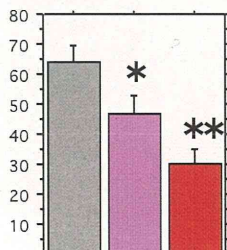
\* p<0.05

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**

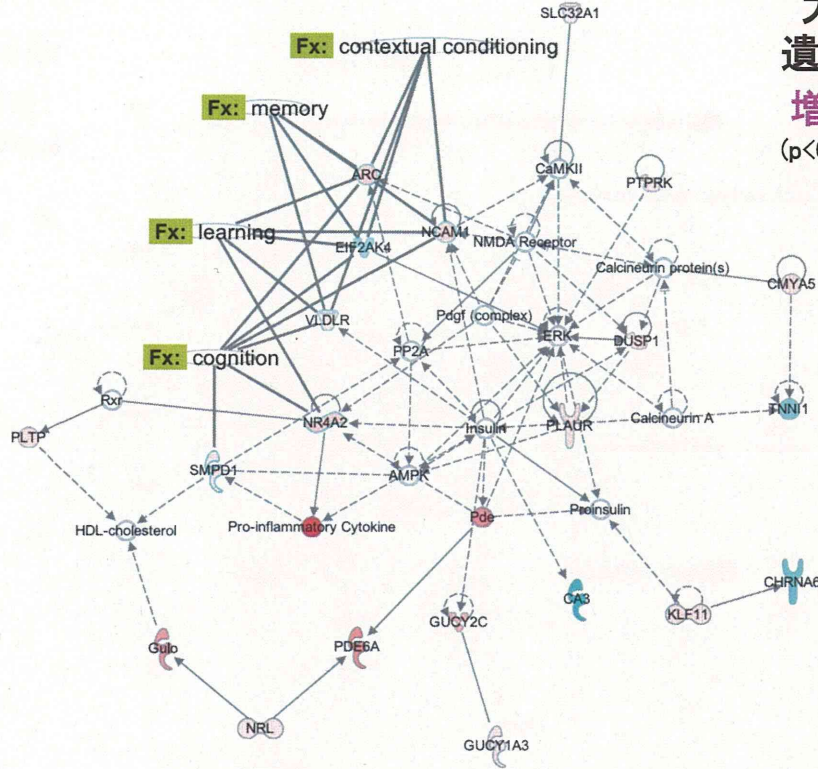
10 ppm  
曝露群 **66/172**

100 ppm  
曝露群 **177/136**

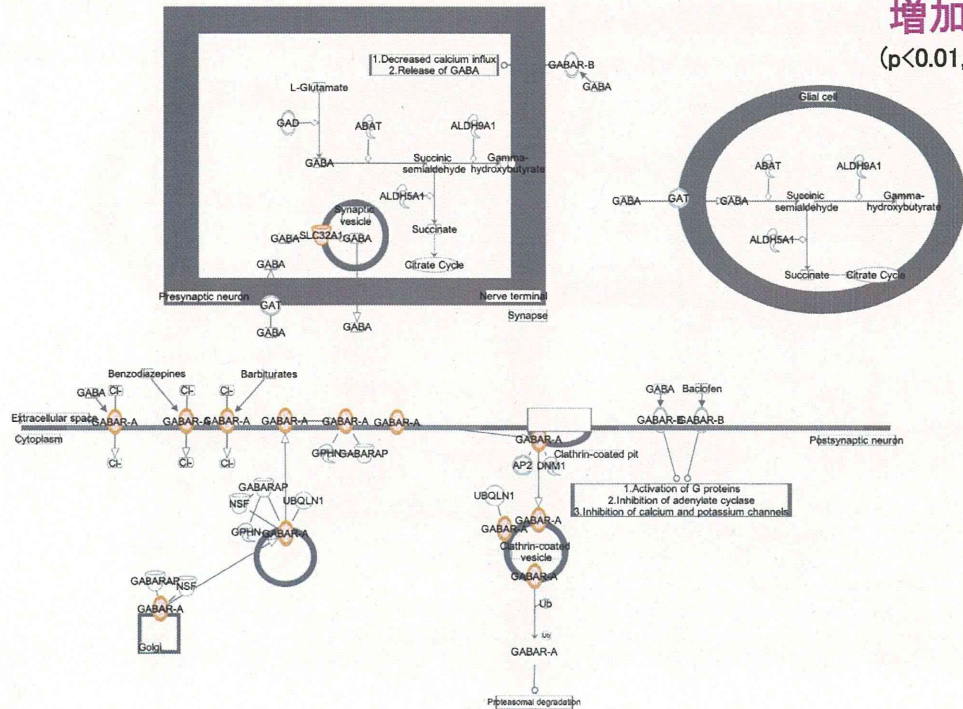
16



大腦皮質  
遺傳子發現  
增加/抑制  
( $p < 0.01$ , ratio  $> 1.1$ )

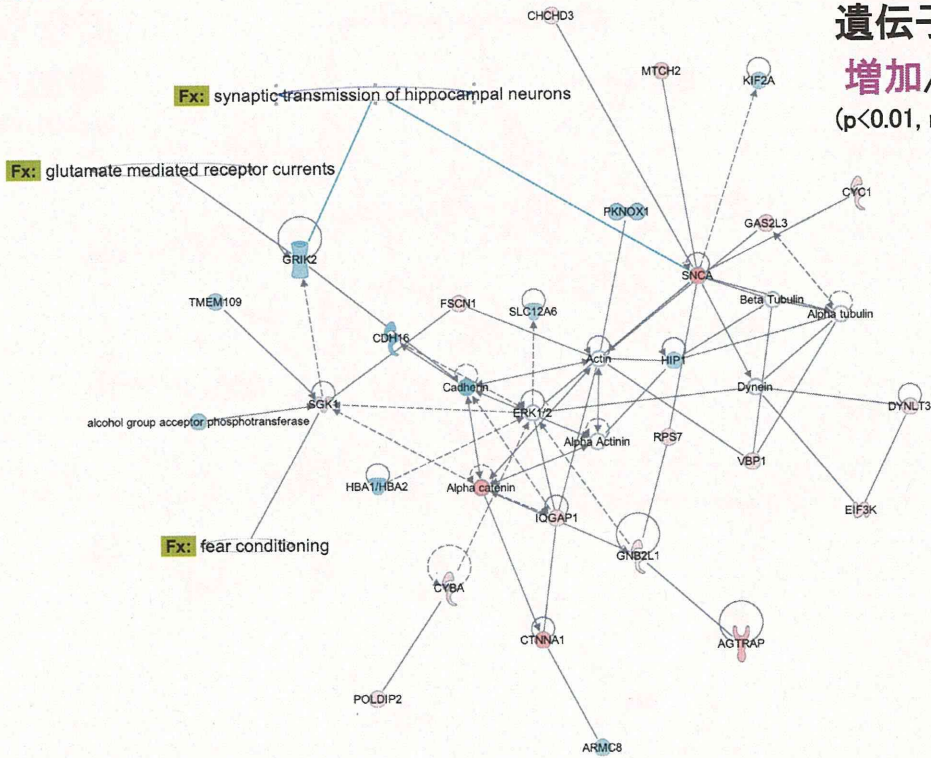


大腦皮質  
遺傳子發現  
增加/抑制  
( $p < 0.01$ , ratio  $> 1.1$ )

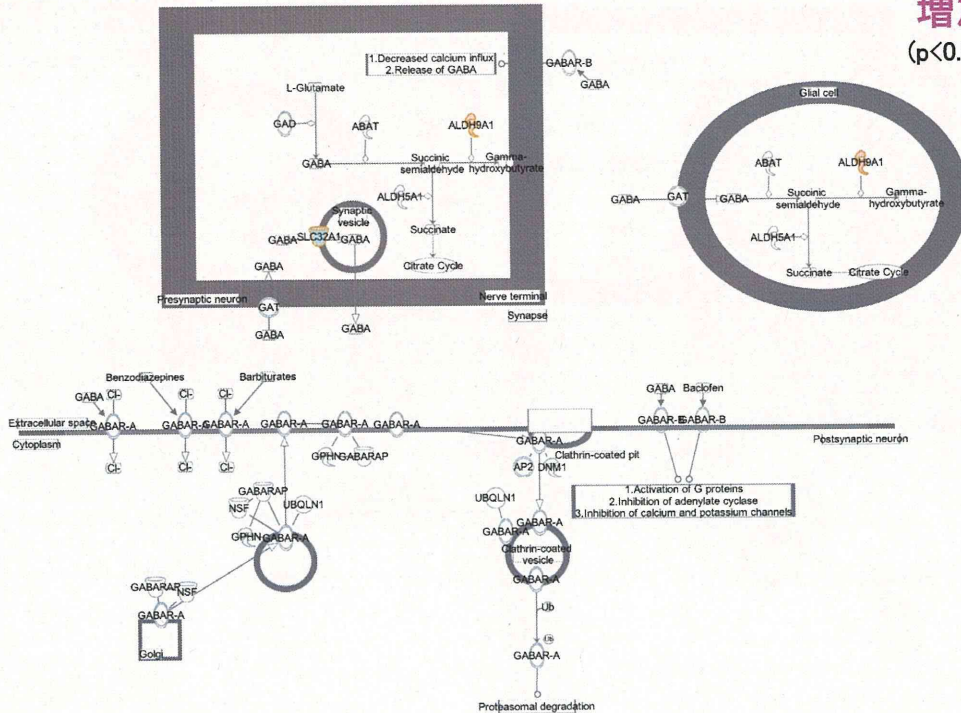


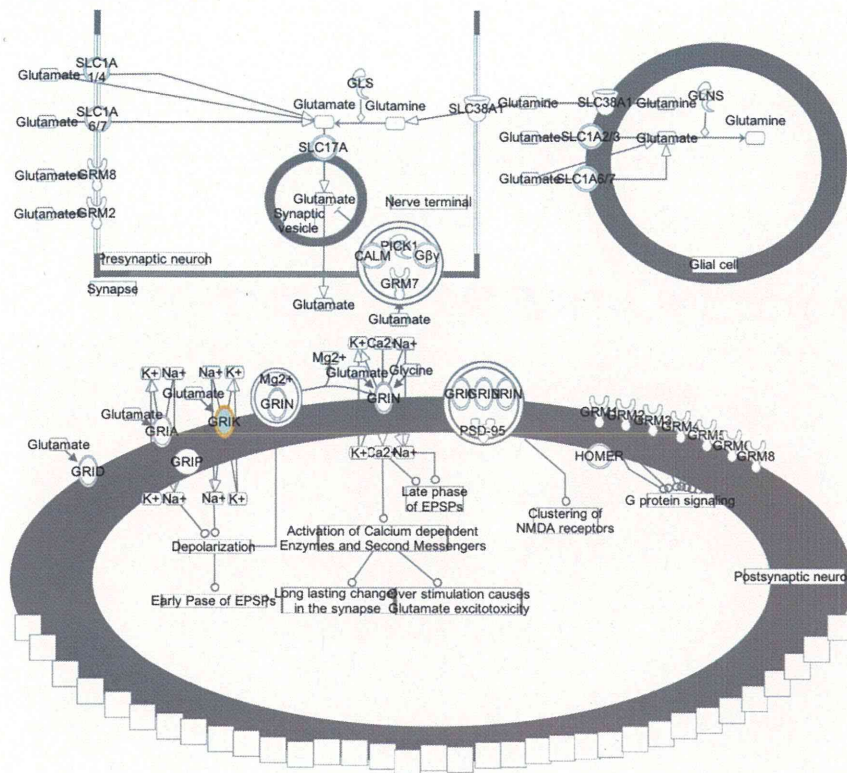


# 海馬 遺伝子発現 増加/抑制 ( $p < 0.01$ , ratio $> 1.1$ )



# 海馬 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  $> 1.1$ )

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。

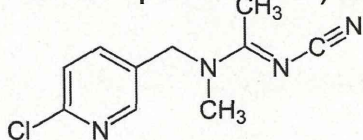
行動様式逸脱と対応するものと考えられ、  
特に、アミノ酸系神経伝達物質受容体シグナル系  
に異常が生じている可能性が示された。



## 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持ち、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

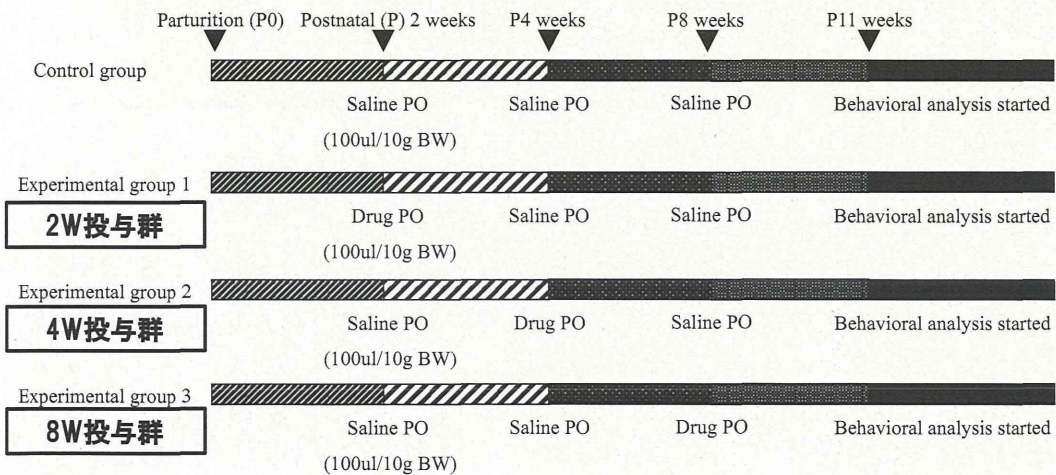
○供試動物  
(C57BL/6)



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.)



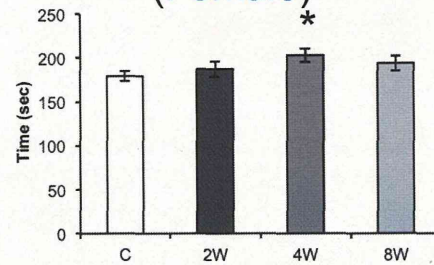
# Open field test (OF)



## Locomotor activity

- 総移動距離
- 総移動時間
- 移動回数

## Total movement duration (Female)



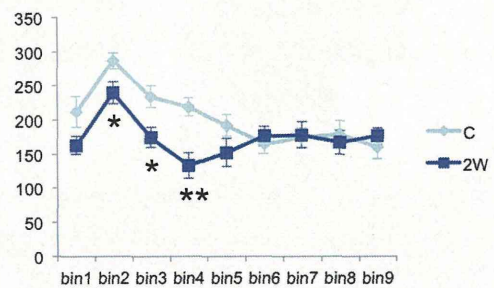
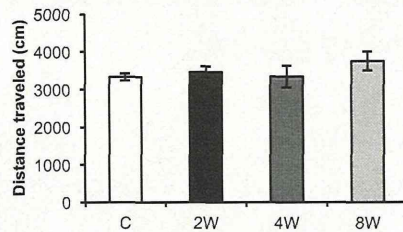
雌の4W投与群で移動時間の有意な増加がみられたが、

雌雄ともに大きな逸脱はみられなかった。

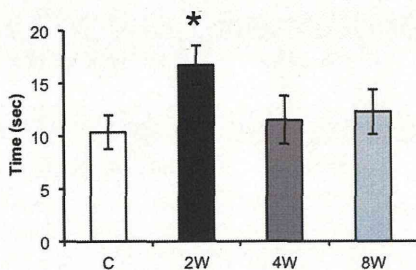
# Open field test (OF)



## 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。

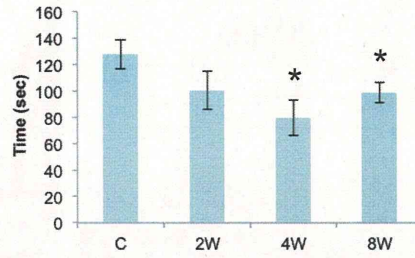
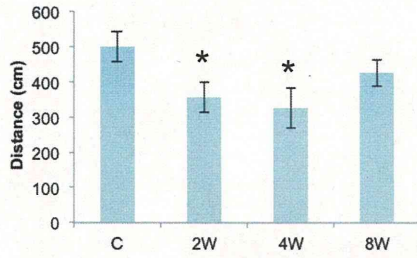


# Light/dark transition test (LD)

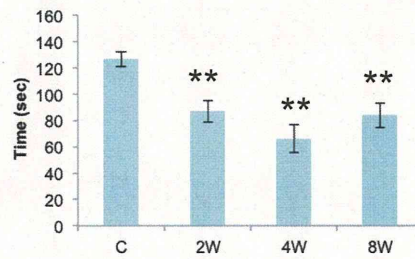
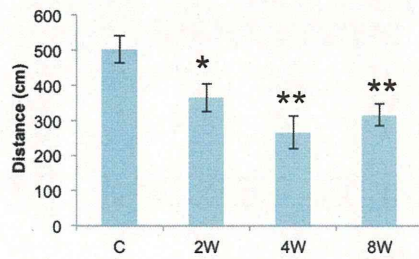
## Light-Distance

## Light-Time

**Male**



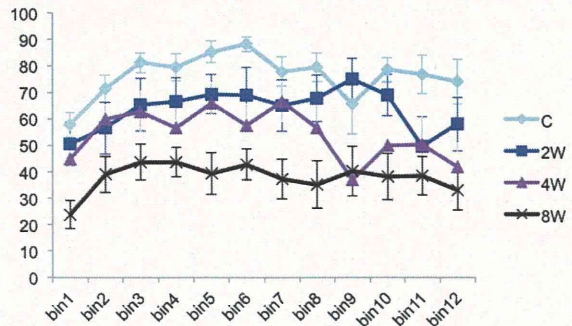
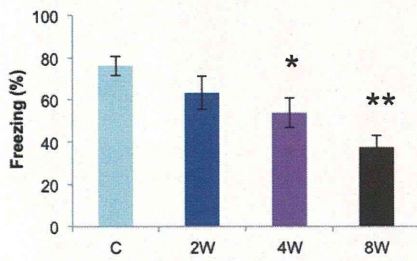
**Female**



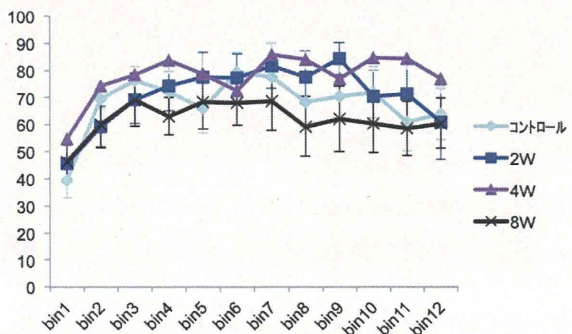
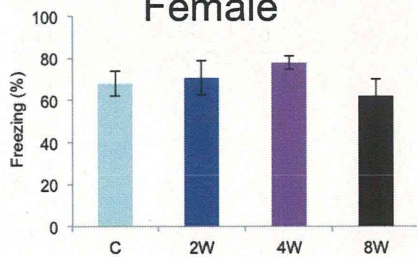
# Contextual/cued fear conditioning test (FZ)

## Context

**Male**

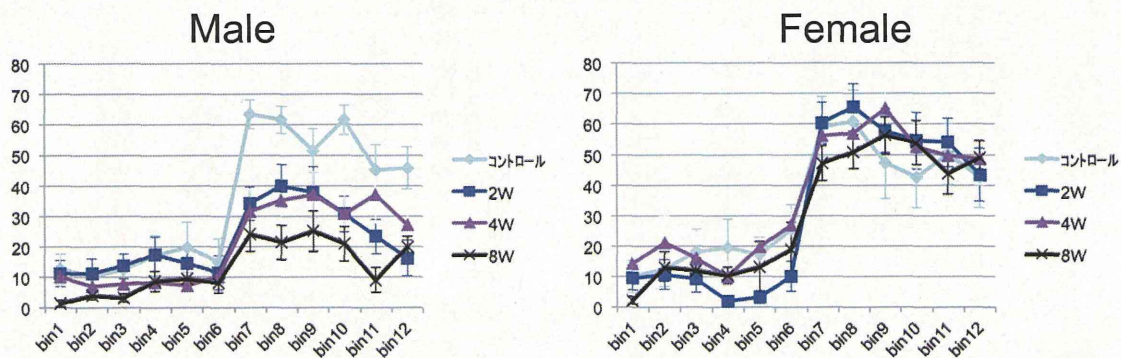


**Female**



## 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
<b>Open field test</b>						
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
<b>Light-dark box test</b>						
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	↑
<b>Classical fear conditioning</b>						
conditioning	ns	ns	ns	ns	ns	ns
context test	ns	↓	↓↓	ns	ns	ns
cued test	↓↓	↓↓	↓↓	ns	ns	ns

↑ : P < 0.05, ↑↑ : P < 0.01