

図3 ATPの放出分布の可視化方法

ATPを基質とするグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いてATPの放出分布を可視化した

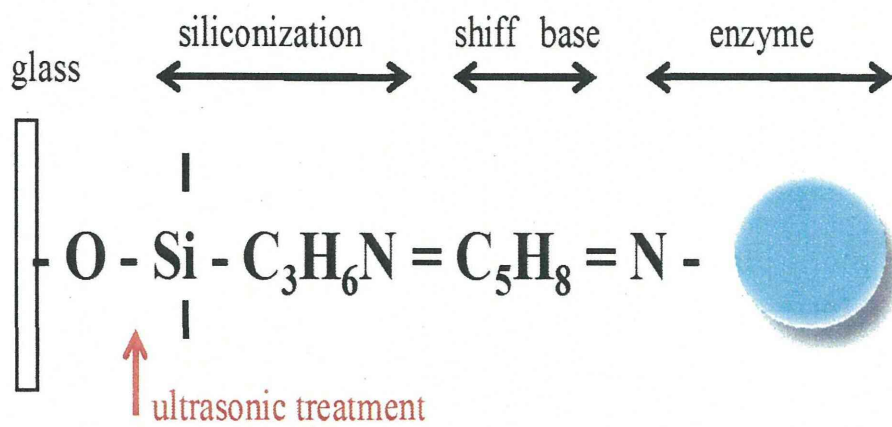
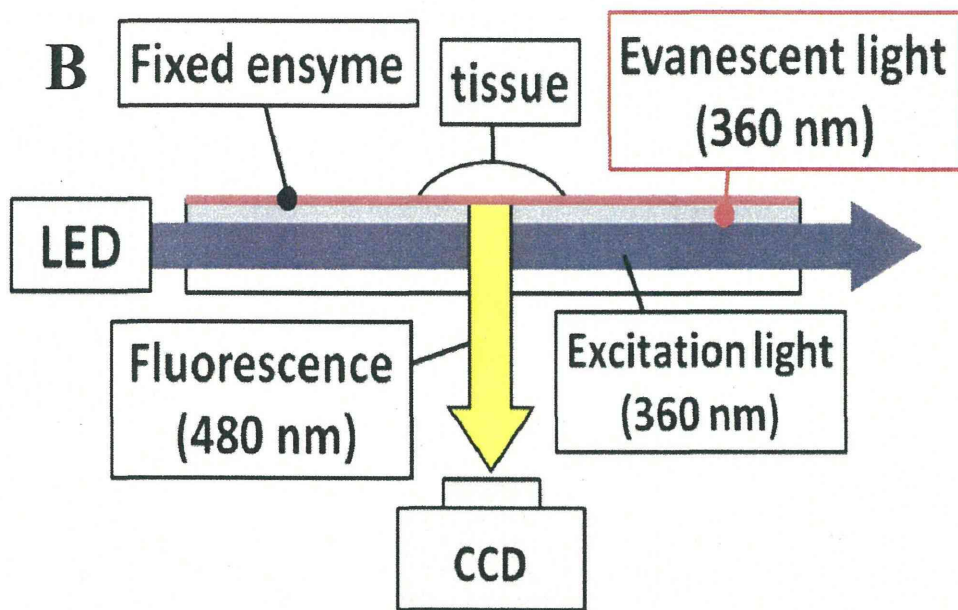
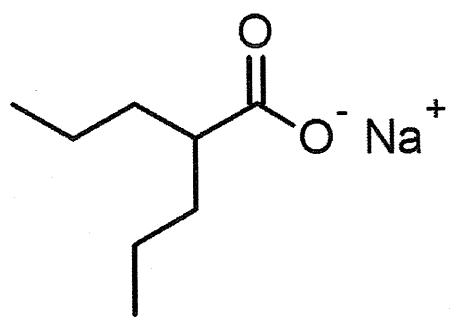
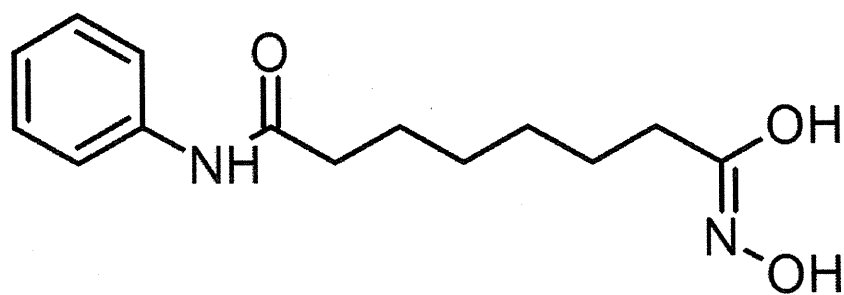


図4 伝達物質の可視化  
 ガラス導波路表面に固定化した酵素の光反応を用いて行った。



バルプロ酸ナトリウム (VPA)



ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド (SAHA)

図 5 本研究で使用した化合物の構造

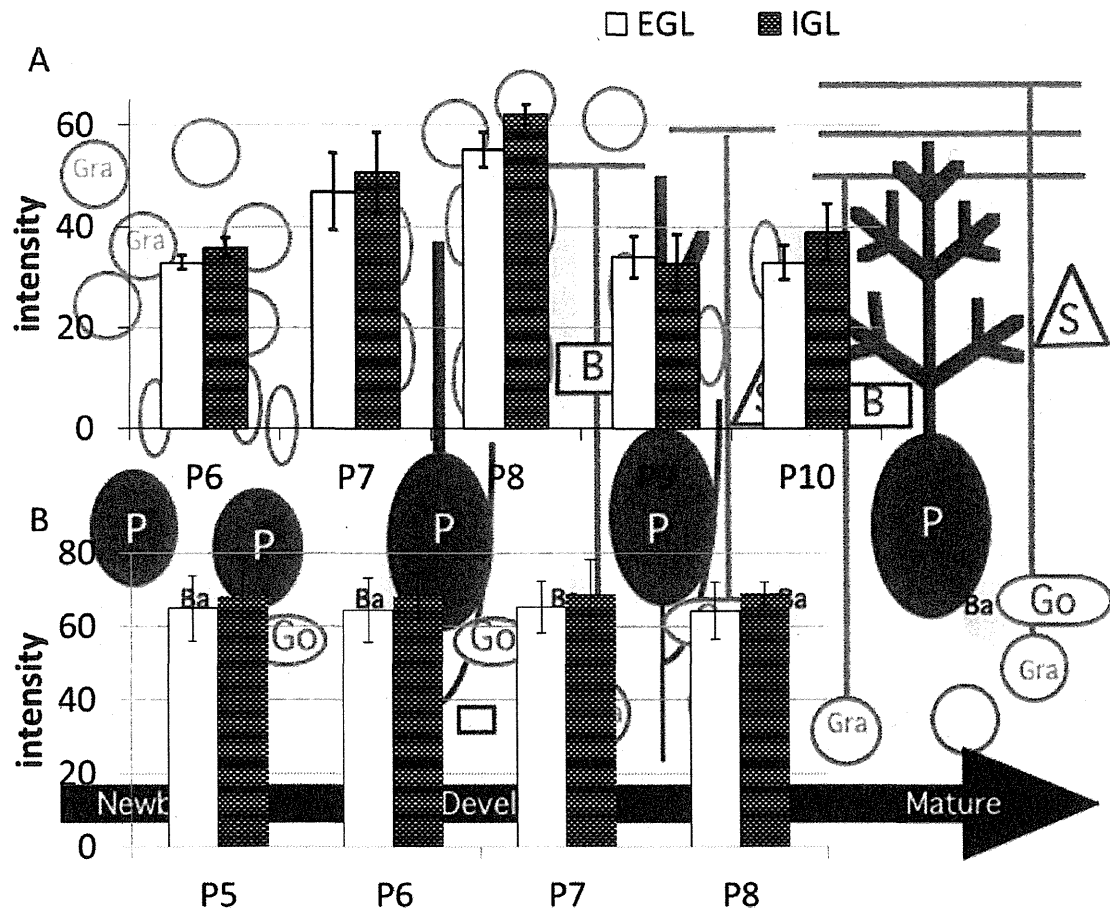


図6 ラット発達期小脳からのGABA放出に対するVPAの影響

A) VPA投与動物ラット発達期小脳からのGABA放出は、生後1週間で最大値に達した後減少し、また増加した。B) VPA投与ラットでは、対照動物と比べGABAが小脳皮質全体から放出され続けることが観察された

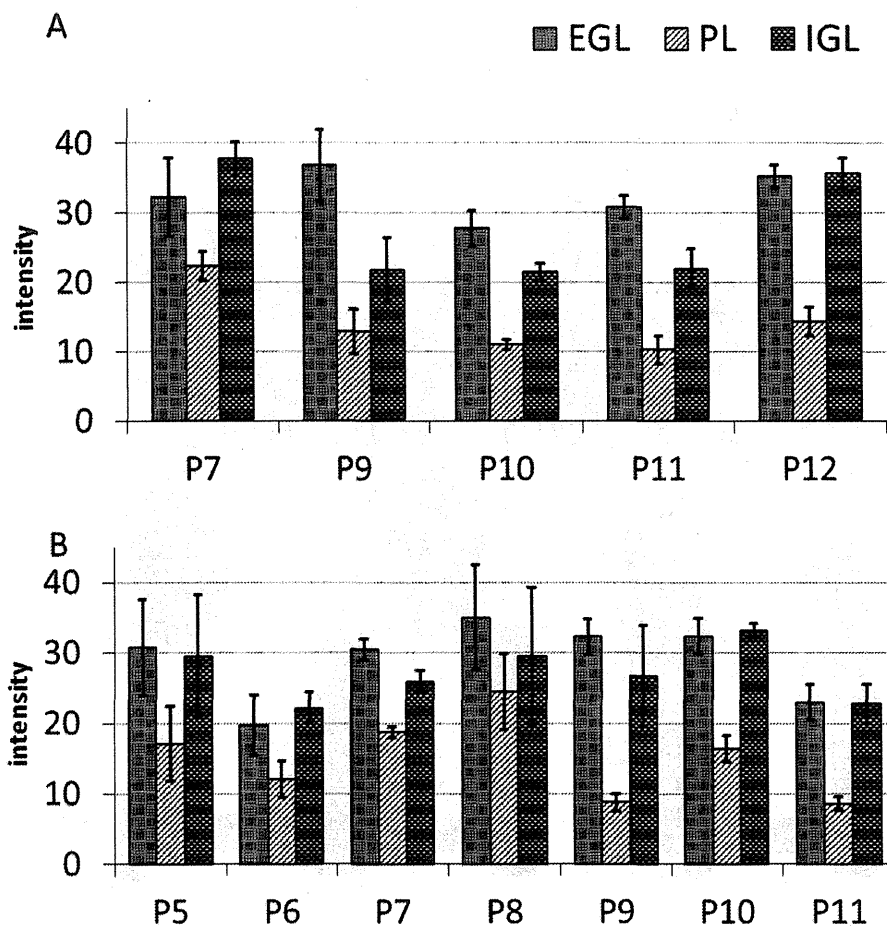
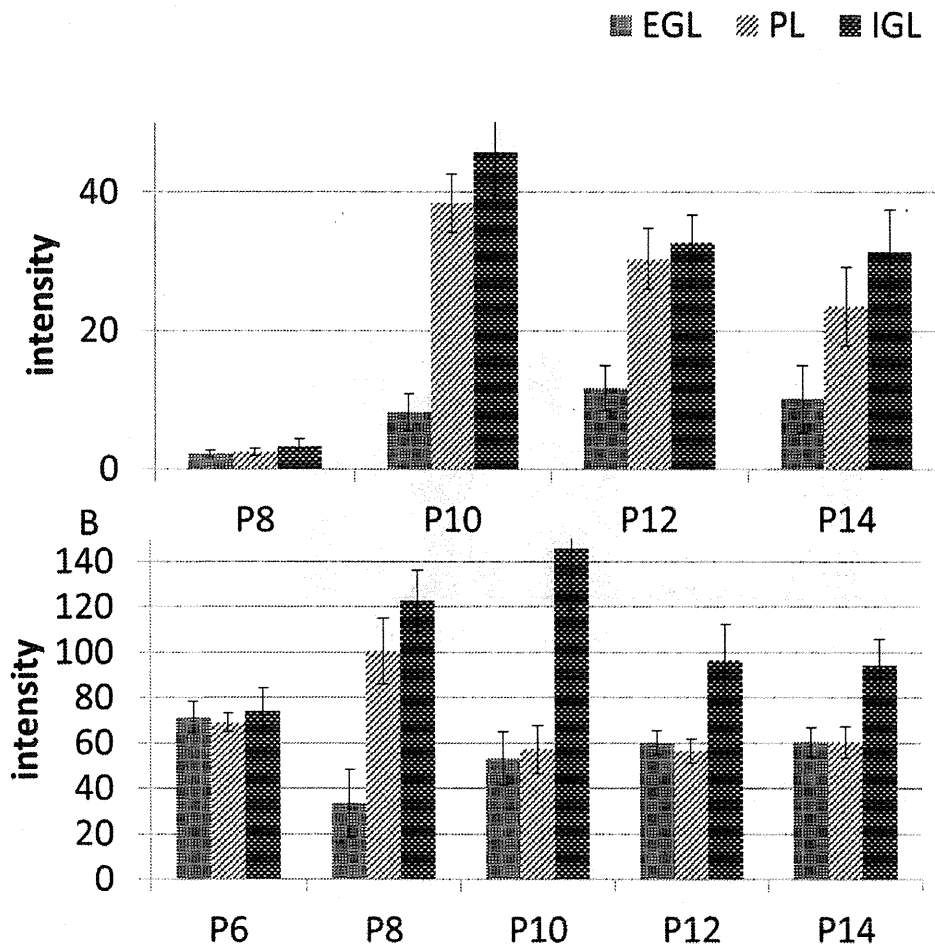


図7 グルタミン酸放出に対するVPAの影響

グルタミン酸放出においては、コントロール群（A）とVPA投与群（B）で大きな差異は観察されなかった。



vs B

図8 グルタミン酸刺激性ATP放出に対するVPAの影響

- A) 対照動物では生後10日頃ATP放出が急激に増加する
- B) VPA投与動物では生後6日ごろからATP放出が始まり、特に内顆粒層で大きく増加することが観察された。

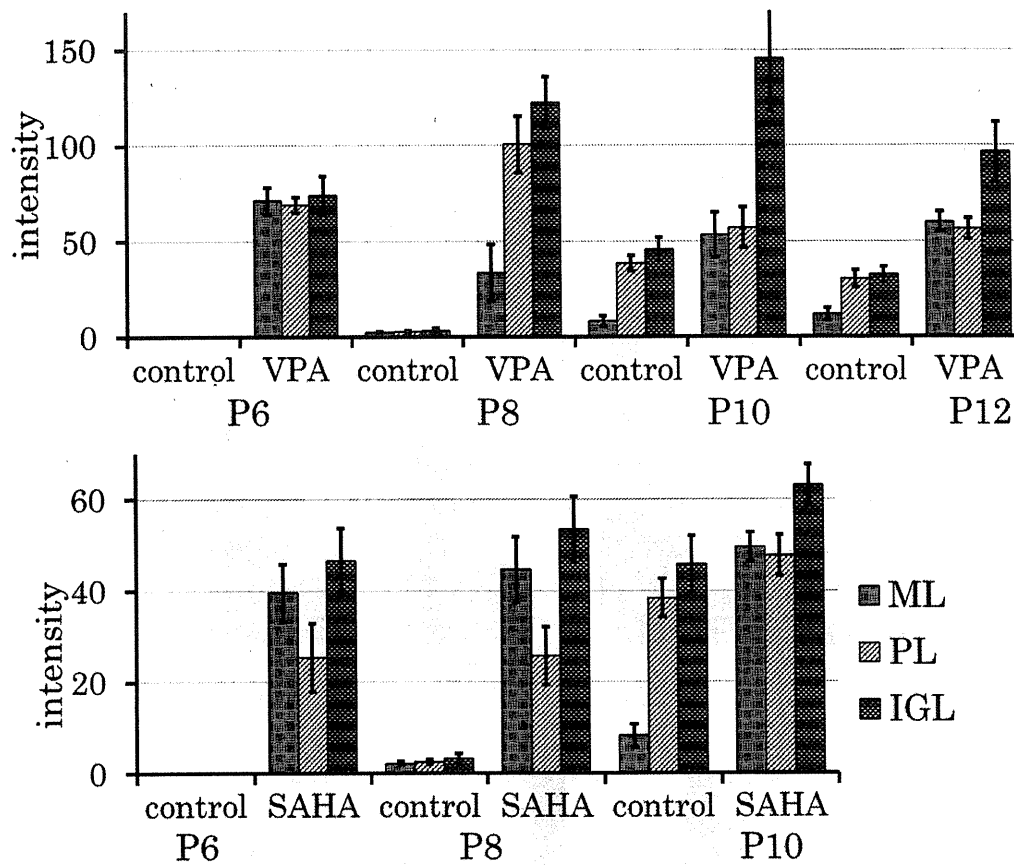


図9 グルタミン酸刺激性ATP放出に対するSAHAの影響

VPA投与群(A)と同じく, SAHA投与群(B)においても生後6日からATPの放出が観察された。放出量はVPA投与群より少なく, 内顆粒層での著しい放出は見られなかった



表10 プルキンエ細胞樹状突起発達に対するSAHAおよびVPAの影響

	control	SAHA被曝	VPA被曝
樹状突起長さ [μm]	61.9 ± 7.4	113.4 ± 22.8	119.8 ± 22.5

\*

カルベジンD-28抗体を用いて小脳プルキンエ細胞の形態変化を観察した。生後12日において、対照動物61.9 ± 7.4 μmに対し、VPA投与動物119.8 ± 22.5 μm、SAHA投与動物113.4 ± 22.8 μmと、著しい樹状突起伸長を示し神経回路の早期発達が進んでいることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価

研究分担者 産業医科大学 産業生態科学研究所 教授 上野 晋  
研究協力者 産業医科大学 産業保健学部 講師 笛田由紀子  
研究協力者 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 講師 吉田祥子

要旨

初年度である平成 25 年度は、胎生期化学物質曝露がもたらす遅発性神経回路異常による毒性評価法（厚生労働科学研究費化学物質リスク事業、H22-24）を応用し、自閉症モデルラットの作製法として確立されている抗てんかん薬バルプロ酸（VPA）の胎生期投与により生後授乳期に出現する神経回路異常について、仔ラットの日齢 13 日から 18 日まで対象範囲を広げ、神経回路の発達とともに回路機能を解析した。海馬スライス標本を用いて、生後 13 - 18 日における海馬の興奮系神経回路機能および GABA 作動性抑制系回路機能を検討した結果、VPA 胎生期曝露により抑制系・興奮系ともに亢進することが認められた。一方、生後 16 - 18 日には神経回路の発達に伴い、対照群の回路機能も発達して VPA 胎生期曝露群とほぼ同程度の回路機能を示した。このことから、胎生期における VPA 曝露が神経発達の一時期に神経回路の早熟化をもたらすことが示唆された。対照群の開眼時期は平均して生後 16 日であり、開眼による視覚情報入力によって脳の神経回路発達が促進されることを考えると、胎生期の VPA 曝露は環境からの視覚情報なしで自律的に回路網を形成している可能性があると考えられる。授乳期内の特定の時期にある仔ラットから作製される海馬スライス標本、ならびにこれを用いた神経回路機能の解析が発達神経毒性評価法として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

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、その原因として脳発達期における化学物質曝露の関与が示唆されている。その理由として発達期の神経系は成熟期に比べ感受性が高く、柔軟性に富み、ある特定の時期に受けた影響が後の生涯にわたり残存することが知られている、といったことが挙げられる。このように発達期における化学物質曝露の影響については、曝露された時期よりも健康被害が遅れて発現する、また健康被害が一端発現すると長期間にわ

たる、といったことが考えられることから、このような影響をもたらす化学物質の評価、すなわち化学物質の発達神経毒性の評価することは、子供の健康影響評価にも繋がるものであり、その評価法を体系的に確立することが望まれている。

しかしながら、現行の発達神経毒性試験ガイドラインに示された試験方法は複雑であり、試験期間は 1 年以上、必要な動物数は 720 匹に上る。加えて、現行の試験法(TG426)では母体(ラット)に化学物質を投与し、仔の成長期と成熟期にわたって動物の行動観

察試験と神経病理学的検査とを行うことになっている。そのため試験結果や定量的判定に再現性が得られるようにするには、高度に熟練した実験者を養成することも必要となる。そこでこのような現行ガイドラインに比べてより簡便で低コストとなる代替試験法の開発に着手してきた。

本研究課題には、平成 22 - 24 年度の厚生労働科研費化学物質リスク事業の一つとして採択された、『胎生期曝露がもたらす遅発性の神経回路異常による毒性評価法』の基盤の開発に携わった研究者が参画している(後述)。そこで本研究では、胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指すこととし、発生過程の神経組織を用いて様々な化学物質の発達神経毒性評価へ応用できるか否かを検証していくことを 3 年間の目的とした。

初年度の目標である『化学物質の曝露時期と遅発性毒性の比較検討』において、当分担研究班では、すでに発達神経毒性が報告されている化学物質の中から、自閉症モデルラットの作製手法として確立されている抗てんかん薬バルプロ酸 (VPA) を用いることとした。この VPA を胎生期に曝露された仔ラットの脳スライス標本を用い、授乳期の神経発達を電気生理学的手法によって解析していくという *ex vivo* の手法を用いて検証した。

本研究報告は、厚生労働省科学研究費補助金の助成による研究課題『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 - 化学一般 - 004、研究代表者 宇佐見誠) 中の分担研究、『成長期の脳辺縁系回路機能解析による評価法の開発』(研究分担者 関野祐子) から得られた成果を展開した内容である。継続内容を示すために、前回の研究課題における内容についての記載は、以下の文章では『前研究課題』として区別した。

## B. 研究方法

### 1. VPA の胎生期曝露 (研究協力者 笛田由紀子)

本研究課題では、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、動物業者から購入した雌雄の Wistar 系ラットを交配させ、得られた仔ラットを使用した。ただ

し、後述する「細胞外に遊離するγ-アミノ酪酸 (GABA) の可視化法」に関しては、実験協力者である吉田祥子が管理する豊橋技術科学大学の動物飼育施設において、同系統の雌雄ラットを交配させ得られた仔ラットを用いた。

妊娠 15 日目 (プラグ確認を第 0 日とする) の雌性 Wistar 系ラットに対して、ヒトでの曝露経路に合わせてイソフルラン麻酔下に VPA を経口投与した。投与量については、前研究課題 (前述) では、300 および 600 mg/kg の投与量であったが、いずれの投与量でも類似した影響が得られたため、今回は 300 mg/kg を中心に対照群 (生理食塩水投与) 10 腹、ならびに VPA 300 mg/kg 投与群 (以下 VPA300 群) 10 腹で実験を行った。産仔数、体重増加 (群として) については対照群と比較して有意差がないことが観察されており、今回の使用した VPA 投与量では 0 腹中 3 腹で生後 1~2 日目の早期に 1~2 匹の仔ラットの死亡が確認された。

### 2. 電気生理学的評価のための脳スライス標本の作製 (研究協力者 笛田由紀子)

神経細胞のネットワークはシナプスを介して行われている。このシナプスによる情報伝達機能を解析する電気生理学的手法として、神経細胞 1 個の機能を調べる whole-cell 法から、神経細胞の群としての機能を解析する細胞外記録法など、目的に応じて複数ある。本研究では、より簡便な毒性評価法の開発を目指していることから細胞外記録法を選択した。

調べる部位として、前研究課題に引き続き、記憶・学習に重要な役割をする海馬を選択した。この部位は脳辺縁系を構成し、神経細胞の自発活動や環境要因から受ける影響によってシナプスが非常に高い可塑性を示し、発達障害に付随する知的障害の可能性を検討するのに最も適した部位であると考えたからである。海馬の細胞構築は図 1 に示すように層構造が明確になっており、電極の設置位置が実体顕微鏡下にわかりやすく、また誘導される電場電位についても生理学的な解釈が確立している。

実験に用いたのは PND (postnatal day の略、ラットが生まれた日を PND 0 としている) 13 - 18 の雄性仔ラットである。雄性を用いたのは、自閉症罹患率は男子が女子の 4 倍であるという報告を考慮したことによる。これ

ら日齢の仔ラットをエーテルで深麻酔したのち断頭し、速やかに海馬を取り出した。ティッシュチョッパー (McIlwain tissue chopper) を用いて、すべての日齢について厚さ 600  $\mu\text{m}$  の海馬スライス標本を両側の背側海馬 (海馬長軸の中央あたり) から作製した。日齢にもよるが、仔ラット 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可能であった。

スライス時に用いた人工脳脊髄液の組成 (mM) は、NaCl, 124; KCl, 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.25;  $\text{MgSO}_4$ , 2;  $\text{NaHCO}_3$ , 26; glucose, 10、実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl, 124; KCl, 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.25;  $\text{CaCl}_2$ , 2;  $\text{MgSO}_4$ , 2;  $\text{NaHCO}_3$ , 26; glucose, 10 という組成とした。脳の取り出しからスライス作製までのすべての過程は、混合ガス ( $\text{O}_2/\text{CO}_2$ :95%/5%) で飽和した人工脳脊髄液を 3.5 - 4°C に冷やしながらすばやく行った。スライスは Haas 型チャンバー内 (32.0 $\pm$ 0.1°C) で記録開始まで約 2 時間静置した後実験に用いた。

### 3. 刺激応答性とフィードバック抑制の電気生理学的評価法 (研究協力者 笛田由紀子)

興奮系神経回路の機能の評価については、仔ラットの海馬スライス標本の CA1 領域への単回刺激によって惹起される誘発電位を記録し、刺激応答性、すなわち刺激電流値の増大に伴う誘発電位の増大について記録した。

刺激電極にはステンレスの双極電極 (直径 50  $\mu\text{m}$ ) 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 $\Omega$ )、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に実体顕微鏡下に測定し約 250  $\mu\text{m}$  程度になるように調整した。

fEPSP の slope (傾き) は興奮性シナプス伝達を担う AMPA ( $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸) 型グルタミン酸受容体の活性化の程度を反映している。また、PS の振幅は活動電位を発生した神経細胞の数を反映するといわれており、電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルの活性化の程度の指標となる。興奮系神経回路機能の発達について、これらのグルタミン酸受容体

と  $\text{Na}^+$  チャンネルの活性化の程度を指標として、単一電気刺激への神経細胞の応答性を検討した。シナプスにおけるグルタミン酸受容体の活性化が大きくなれば、閾値が相対的に下がることにより活動電位が発生しやすくなる。つまり fEPSP slope が大きければ PS の振幅も大きくなるというのが生理学的に正常な現象である。

一方、抑制性神経回路機能の評価にはフィードバック抑制 (反回抑制ともいう) を指標とした。このフィードバック抑制は最も単純な神経回路であり、神経細胞が何らかの原因で過剰な興奮に陥らないように安全弁として働くものである。このフィードバック抑制を調べるのに海馬 CA1 領域は適した基本構築をしている (図 2)。CA1 領域には、主細胞である錐体細胞とその興奮を制御する GABA 作動性の抑制性神経細胞が存在する。CA1 錐体細胞の軸索は、大脳皮質に投射する主要な経路の他に、近隣の GABA 作動性介在神経細胞に側枝を伸ばして興奮性シナプスを形成している。一方で GABA 作動性介在神経細胞の軸索は、CA1 錐体細胞に対して抑制性シナプスを形成している。このような基本構築において、一度錐体細胞に活動電位が発生すると、側枝を伝導した活動電位が軸索末端に到達し、グルタミン酸を放出することによって GABA 作動性神経細胞の膜電位が浅くなり閾値に達して活動電位を発生する。すると今度は錐体細胞軸索丘に向かって伸びた軸索を活動電位が伝導し、軸索末端から抑制性シナプス伝達物質 GABA を錐体細胞に放出する。錐体細胞軸索丘に存在する GABA 受容体が活性化すると、CA1 錐体細胞の膜電位が過分極となり、その結果、興奮の閾値が相対的に上昇して錐体細胞が活動電位を発生しにくくなる。このようにして、CA1 領域の興奮性神経細胞は自分自身の過剰な興奮を防ぐため、フィードバック抑制を使うことによって制御しているのである。

フィードバック抑制機能の評価についてはダブルパルス刺激により惹起される誘発電位記録を用いた。1 回目の電気刺激に対する応答に比べ 2 回目の電気刺激に対する応答がフィードバック抑制により小さくなることを利用して、1 回目の応答に対する 2 回目の応答比をもってフィードバック抑制の強度を定量的に評価した。これには、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)で刺激する必要がある。先の刺激応答性で最大の電気刺激値を求め、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 slope の大きさからそれぞれ応答比を求めた。

神経細胞層へのフィードバック抑制の強さは

$$\text{PS の比} = \frac{\text{2 回目の PS の振幅}}{\text{1 回目の PS の振幅}}$$

によって求め、シナプス層へのフィードバック抑制の強さは

$$\text{fEPSP slope の比} = \frac{\text{2 回目の slope}}{\text{1 回目の slope}}$$

で計算される。

すなわち、応答比が 1.0 よりも小さいほど、2 回目の応答がフィードバックによって抑制されていることを示し、応答比が 1.0 に近い時は、2 つの刺激応答が独立した事象であることを示す。

実験に用いた幼若ラットの匹数とスライス数を表 1 に示した。対象とした仔ラットの日齢を PND13-18 としたことについては、前研究課題で VPA 胎生期曝露仔ラットの PND13 から PND15 を対象として海馬スライスを作製しており、刺激応答性については VPA 曝露群の PND15 において興奮系回路機能に亢進が認められ、抑制系回路機能には PND13-15 を通して亢進が認められた。この結果を踏まえ、本研究では興奮系/抑制系回路への曝露の影響が PND15 以降も引き続き認められるかどうかを検討する必要もあり、実験対象を PND13 から PND18 まで含めることとした。

#### 4. 細胞外に遊離する GABA の可視化法(研究協力者 吉田祥子、笛田由紀子)

電気生理学的解析は、電気信号として捉えられた現象により神経回路の機能を解析する手法である。言い換えれば、生体分子あるいはイオンが動いた影(トレース)を見ているわけである。そこで、そのトレースの本体(分子)の動きを評価すること、すなわち興奮系回路に参与するグルタミン酸、抑制系回

路に参与する GABA の 2 つの分子の動きと分布を可視化することを考えた。そこで、吉田が研究分担者の関野とともにやっている、小脳における発達神経毒性を評価する実験と同様の手法を海馬にも導入できるかどうかを検討することとした。今年度は予備実験の段階でもあることから、まず豊橋技術科学大学の吉田研究室に赴き実験を行った。使用した仔ラットは電気生理学的解析に用いたラットと同じ動物業者から購入した Wistar 系ラットであるが、豊橋技術科学大学の動物飼養管理施設で飼育されているものである。

実験の原理は、本研究課題の関野研究分担者の報告書に詳細が書かれているので、ここでは簡単に記載する。細胞外 GABA は、ガラス表面に固定化した GABA 分解酵素(GABAase)を用いた蛍光測定法により可視化した。GABAase 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、この NADPH が 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、計測用チェンバーを工事作成した。対象となる日齢の仔ラット脳から作成した海馬スライスをチェンバーに置き、脳スライス表面から遊離する GABA が  $\alpha$ -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、海馬スライス表面の GABA 遊離の空間分布を可視化した。

日齢の表現については、電気生理学的評価法の場合と同様に、仔ラットが生まれた日を PND0 としている。今回の予備実験では吉田らが試行している小脳での実験条件に従い、対照群および VPA600 群(VPA 600 mg/kg 投与群)から生まれた仔ラットから海馬スライス標本作製した。スライス標本の作製法、観察の手法は吉田らの小脳のスライス標本で実施した方法に準じた(関野らの報告を参照のこと)。

(倫理面への配慮)



本研究の遂行にあたっては、産業医科大学および豊橋技術科学大学に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をしながらそれぞれの研究が進められた。

### C. 研究結果

#### 1. 海馬の興奮系および抑制系神経回路の生後発達に対する VPA 胎生期曝露の影響

単回刺激による興奮系の刺激応答性については、対照群では PND15 から PND16 にかけて大きく亢進した。対照群の平均開眼時期が PND16 であり、刺激応答性の変化がこの開眼時期を境に観察されたことから、この結果を PND13 - 15 のグループと PND16 - 18 のグループに分けて図示した (図 3)。PND13 - 15 の時期において、対照群と比較して VA300 群ではシナプス入力に対する応答を反映する fEPSP slope に亢進が見られ ( $p < 0.01$ , repeated measure ANOVA)、細胞体の興奮性指標である PS の振幅も増強した ( $p < 0.01$ , repeated measure ANOVA)。ところが PND16 - 18 においては、fEPSP slope、PS 振幅とも対照群との有意差が認められなかった。

次に GABA が関与する抑制系回路機能を検討した。図 2 に示しているように、フィードバック抑制は 2 個のシナプスを介する応答であるため、誘発するためのダブルパルスの刺激間隔は通常 5~10 ms の範囲であるが、前研究課題の結果から GABA 抑制系が増強されることが想定されるため、今回は刺激間隔 20 ms についても検討した。このフィードバック抑制についても単回刺激応答性の結果と同様に PND13 - 15 と PND16 - 18 のグループに分けて示している (図 4)。PND13 - 15 を見ると、対照群では 5 および 10 ms における fEPSP slope 比は 1.0 以下であるが、PS 比が 1.0 以下になっておらず、神経細胞体付近でのフィードバック抑制が形成されていないことを示唆する。しかし開眼日齢 (PND16) を過ぎると PS 応答比が 1.0 以下になっており、この抑制機能が顕在化してきたことが分かる。一方、VPA300 群では PND13 - 15、すなわち開眼時期よりも早い段階で PS 比が 1.0 より小さくなっており、フィードバック抑制が早期に出現することが判明した ( $p < 0.01$ , repeated measure ANOVA)。また PND16 - 18 においても、対照群と比べ VPA300 群でフィードバック抑制は有意に亢

進していた ( $p < 0.01$ , repeated measure ANOVA)。

以上の結果より、胎生期の VPA 曝露により、海馬神経回路機能は興奮系、抑制系いずれも対照群よりも早期に発達しており (早熟化)、特に抑制系、すなわち GABA 作動性の回路機能は興奮系機能よりも早期に亢進していることが示唆された。

#### 2. 海馬における細胞外 GABA の分布の可視化とこれに対する VPA 胎生期曝露の影響

図 1 に対照群の PND15 の海馬の冠状断 (前額断) のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織像を示している。背側から上昇層、錐体細胞層、放線層と層構造が明瞭であることが確認できる。VPA の胎生期曝露については、反復投与を行うことによって海馬神経細胞の構築に異常が出現したという報告があるが、本研究における VPA 曝露については、影響が出現した PND15 について HE 染色による組織学的検討を行ったが、対照群と比べて層構造に顕著な変化は認められなかった。

次に電気生理学的実験の結果を踏まえ、開眼前となる PND14 の対照群、ならびに PND13 の VPA600 群の海馬 CA1 領域の光学測定を行った。GABA の細胞外放出の誘発刺激には、グルタミン酸受容体アゴニストである AMPA を用い、AMPA 添加して 45 秒後の蛍光画像を記録した。今回は定性的に比較することに目的として、放出された GABA の分布は、AMPA 誘発前後の擬似カラーの輝度の差で判断した。

図 5 は対照群・PND14 の海馬である。AMPA による誘発刺激後にわずかな GABA の分布が上昇層に認められた。一方、図 6 に示す VPA600 群・PND13 の海馬では、AMPA 誘発後の GABA の分布は、錐体細胞層の腹側端に局在する形で認められた。前研究課題の結果から、この VPA600 群・PND13 では GABA 作動性フィードバック抑制が亢進していたので、対照群との分布の違いは GABA 作動性抑制系の変化を反映しているかもしれない。しかしながら電気生理学的手法で観察した現象とは時間のスケールが 4,500~9,000 倍ほど異なるので、分布が異なる機序については今後さらに検討していく必要がある。また電気生理学的解析でも行ったように、数日

間の日齢にわたりその再現性を見ることも必要であると考えている。

#### D. 考察

本研究では、海馬スライス標本を用いた電気生理学的評価手法により胎生期の VPA 曝露による発達神経毒性評価を生後早期で行った。その結果、海馬神経回路の興奮性シナプス機能と抑制性シナプス機能が VPA 胎生期曝露により亢進していることを見出した。さらに、それらの亢進の時期は同時期（同日齢）に出現するものではなく、抑制系の亢進が興奮系よりも早期に出現しており、このことから海馬における神経回路形成に対して、VPA による発達神経毒性に対する感受性が異なることが示唆された。したがってラット海馬スライス標本を発達神経毒性評価に使用する場合、少なくとも 13 日齢から 15 日齢の幅を持ってその影響を調べる必要があることを示唆する。

さらに単回刺激でシナプスの興奮性を、ダブルパルス刺激を用いてフィードバック抑制を調べるといふ、比較的簡便な実験プロトコルと解析方法を用いることで、抑制系の生後発達について再現性をもって評価できたことから、次年度は神経発達への有害性がヒトで明らかになっている化学物質を標的として、今回の評価法の汎用性を検討する。また、生後発達の異常について海馬を用いて評価できることから、電気生理学的手法に加えて、形態学的変化あるいは分子レベルの変化など、異常が出現するメカニズムを解明するための情報の獲得するための実験手法についても評価法のバリデーションという立場から検討をしたいと考えている。

今年度に予備実験として検討を始めた海馬 CA1 領域の GABA の放出分布を可視化する評価法は吉田らがすでに小脳で確立した独自の評価法である。吉田らは生後約第 1 週程度の小脳スライス試料を用いて、GABA の放出分布の変化が発達に重要な役割をしていることを見出している。同じ方法を用いて海馬の GABA 放出分布に対する VPA の影響については今後検討を続けていく予定であるが、そのためには以下のような検討すべき課題があることが考えられる。

まず吉田らの手法では分布の観察に 45 秒間の時間を設定しており、電気生理学的手法で見出された 5~10 ms という時間軸での

GABA 作動性抑制系の変化と比べ、4,500~9,000 倍異なるタイムスケールでの現象である。したがって、これら 2 つの現象は、その背景にある機序が異なる可能性も考えられる。今後、その整合性について検証する必要があるが、仮に実験データを重ねた結果、整合性を図ることが困難であったとしても、吉田らの評価法を海馬に応用することは、海馬における GABA 作動性抑制系に関するもう一つの評価法となる可能性がある。海馬を実験試料とした複数のアプローチによる発達神経毒性評価法の確立につながるようになる。

電気生理学的手法で見出された VPA 胎生期曝露による GABA 作動性抑制系の異常は、生後 13 から 18 日という第 2 週以降の神経発達期にあるラット海馬から観察されたものである。吉田らが対象としているのは生後約 1 週のラット小脳であり、この時期のラット小脳は PND13-15 のラット海馬に比べ水分を多く含んでおり柔らかい状態にある。このような組織から吉田らはロータリーチョッパーを用いてスライス標本を作製している。一方、海馬スライス標本の作製には慣例的に McIlwain tissue chopper を使用しており、ある程度固さのある組織が対象となる。したがって、今後ロータリーチョッパーを使用して作製された海馬スライス標本を用いてフィードバック抑制を評価することができれば、PND13 以前の時期を対象に VPA 胎生期曝露の影響が出現しているか否かを検討することができる。このように海馬採取法やスライス作製法などに関する技術面を検討することによっても、本研究の対象であった授乳期中の PND13-18 という期間の幅よりもさらに長い期間を対象に発達神経毒性評価が可能となり、発育・授乳環境を全く等しくする 1 腹の動物を有効に使えることとなる。スライス法は 1 匹から 6 枚前後のスライス標本を得ることができるため、飼養する動物の数の減少に貢献することを前研究課題で報告したが、本研究は今後 1 腹の 8~10 匹の仔ラットを対象として、授乳期の発達に伴った様々な日齢で、異なる脳部位を用い、異なるアプローチによる化学物質の発達神経毒性評価を可能とする新しい手法を開発することにつながるものであると考えている。その長所として①仔が成熟するまで待たずに試験が出来る、②1 個体から数例のデータが取

得出来ることが考えられ、現行の発達神経毒性試験法 (TG426) の問題点を解決する可能性が示唆される。

脳には経験に対して特別な感受性の高さを示す時期があり、その時期は GABA による抑制系の発達とともに終了することが明らかにされており、GABA 性抑制系の生後発達が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。本研究においても、GABA 抑制系に対して VPA 胎生期曝露の影響が認められたことから、発達神経毒性評価においても GABA 性抑制系の生後発達が重要な指標になり得ることが示唆されている。

また本研究結果は、VPA の胎生期曝露が海馬において GABA 性抑制系の早熟化をもたらしていることを示唆している。生後の早い時期に脳発達の異常が検出されることは、化学物質の発達神経毒性の評価においては、非常に重要なことであり、今後の試験法に応用する価値があると考えている。しかも早熟化は、成熟した脳を用いても検出できないことから、脳の成長期に相当する時期に評価を行うことが重要である。特記すべきこととして、仔ラットの開眼時期を境にして VPA 胎生期曝露の影響が減弱することが判明した。この解釈については現在のところ仮説の域を出ないが、開眼によって脳に入ってくる視覚情報が海馬の神経回路の成熟化を進める、という通常の神経発達に対して、VPA 胎生期曝露により開眼日齢 (平均 PND17) よりも早く海馬神経回路の成熟化が生じていると考えられないだろうか。つまり VPA は神経回路発達のタイムスケジュールを、視覚情報の入力という環境要因なくして早める効果があるのではないかと考えられないだろうか。興味あることにこの『海馬神経回路の早熟化』という仮説は、関野班が報告した、VPA 胎生期曝露による小脳での発達の早熟化と考えられる現象と類似している。

VPA は様々な機能性蛋白質に作用すると考えられているが、その一つに GABA 転移酵素阻害剤として GABA の分解を抑制し、GABA 作動性抑制系を増強する作用がある。一方、GABA 受容体阻害剤であるビククリンを胎生期に投与する、あるいは培養細胞に添加すると神経細胞の発達が阻害されるという報告がある。このように GABA 受容体が脳の発達に重要な役割をしていることは広

く受け入れられているが、神経回路の早熟化に関しては未だ不明な点が多い。

興味あることに、VPA にはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害する作用がある。この作用により、VPA が神経細胞周期に影響を及ぼした可能性も考えられる。実際、吉田は HDAC 阻害剤として知られる抗がん剤スベロイラニリド・ハイドロザミック酸 (SAHA) を胎生期に投与し、VPA による小脳発達の早熟化に類似した影響を見出している (班会議で関野班として報告済み)。本研究でも VPA が持つ HDAC 阻害作用が海馬神経回路の早熟化を進めている可能性も考えられ、HDAC 阻害作用のない VPA アナログ体であるバルプロミドを用いて、HDAC 阻害作用の早熟化への関与を検討することも考えている。

本研究課題の最終年度の目的は体系的な評価法の確立であることを考えると、次年度以降は VPA による海馬神経回路の早熟化のメカニズムを解明すること、あるいは海馬の興奮系・抑制系神経回路機能の評価法の汎用性を検証することが方向性として考えられる。前者の場合は前述したようにバルプロミドの胎生期投与ラットを用いて、今回と同様の電気生理学的評価を行い、GABA 性抑制系機能の亢進の有無を確認する、後者の場合は VPA 以外の化学物質の胎生期曝露ラットを作製してやはり同様の電気生理学的評価を行う。VPA 以外の化学物質としてはすでに吉田が手掛けている SAHA あるいは HDAC 阻害作用を持つ薬物が候補となるだろう。いずれの方向性にとっても、GABA を含む放出分子の可視化実験が必要であると考えている。引き続き研究課題各分担班の実験結果をもとに研究班全体で議論を進めたいと考えている。

当分担研究班は 2013 年、2014 年と米国毒性学会 (SOT) で化学物質胎生期曝露による脳神経系の発達異常についてポスター発表を行った。その際に、米国では脳の発達時期 (子供を含む) に農薬に曝露されることによる遅発性の神経学的影響を問題視する発表が多かったこと、また発達時期に地下水や大気中などに含まれる金属等に曝露されることが老齢期における疾病 (アルツハイマー病やパーキンソン病など) への罹患率を上げるのではないかとという観点で多くのシンポジウムが組まれていたことなどを情報として



知ることができたのは収穫であった。日本においても発達期の化学物質曝露に関する問題を提起する、ならびにその評価法についての議論を進めることが重要であることを痛感している。

また2014年のSOTでは『Adverse Outcome Pathways: 21世紀のリスクアセスメント』というワークショップが開催され、外来性化学分子の生体内作用部位から細胞毒性、組織毒性、器官毒性から個体の死に至る一連のメカニズムを考えた毒性学を構築するという方向性を示していた。このような状況を踏まえると、OECDのテストガイドラインの見直しに関しては研究情報が世界中から集約され、国際的に進められる可能性も考えられる。しかしながら本研究課題で目標としている体系的な発達神経毒性評価法の報告はまだ見当たらず、個々の研究者の情報が分散しているという印象がある。本研究課題3年目の最終目的である『体系的な発達神経毒性評価法による予測性の向上』は、米国のAdverse Outcome Pathwaysというリスクアセスメントのコンセプトに近く、その成果は上述した世界の動向を考えても極めて重要な情報であると考える。

## E. 結論

発達神経毒性を早期にスクリーニングできる *ex vivo* の系の確立を目指しており、平成25年度は自閉症モデルとして確立されたVPAの胎生期曝露ラットを用い、授乳期の海馬神経回路の発達を検討した。対照群では生後15~16日の間で興奮系回路の刺激応答が発達する一方で抑制系回路であるフィードバック抑制は生後15日まで認められなかった。一方、胎生期曝露ラットでは早期からの興奮系回路機能の亢進とフィードバック抑制の出現が認められ、これらの現象が発達神経毒性の早期スクリーニング指標となる可能性が考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[1] Okura D., Horishita T., Ueno S., Yanagihara N., Sudo Y., Uezono Y., Sata T. The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7 and Nav1.8 in *Xenopus* oocytes. *Anesth. Analg.* 118:554-62 (2014).

[2] Yanagihara N, Zhang H, Toyohira Y,

Takahashi K, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K. New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids in the catecholamine system. *J Pharmacol Sci.* 124:123-8 (2014)

[3] Inagaki H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Obara G, Kawagoe T, Tsutsui M, Hachisuga T, Yanagihara N. Effects of selective estrogen receptor modulators on plasma membrane estrogen receptors and catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci.* 124:66-75 (2014).

[4] 上野 晋 化学物質(金属・有機溶剤)の毒性学と産業医としての対応 産業医科大学雑誌 第35巻特集号:91-6 (2013).

[5] Park EK, Wilson D, Choi HJ, Wilson CT, Ueno S. Hazardous metal pollution in the republic of Fiji and the need to elicit human exposure. *Environ Health Toxicol.* doi: 10.5620/eht.2013.28.e2013017 (2013).

[6] Obara G., Toyohira Y., Inagaki H., Takahashi K., Horishita T., Kawasaki T., Ueno S., Tsutsui M., Sata T., Yanagihara N. Pentazocine inhibits norepinephrine transporter function by reducing its surface expression in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci.* 121:138-47 (2013).

### 2. 学会発表

[1] 笛田由紀子、吉田祥子、関野祐子. 海馬局所回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討. 第86回日本産業衛生学会、2013年5月、松山

[2] 笛田由紀子、関野祐子、石田尾 徹、保利一、上野 晋. 授乳期の海馬CA1領野回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討. 第31回産業医科大学学会総会、2013年10月、北九州

[3] 松野瑞希、笛田由紀子、石田尾 徹、石松維世、樋上光雄、柘野幸生、保利 一. 臭化ナトリウムを子宮内曝露した胎児ラットの脳内臭素イオンの測定第31回産業医科大学学会総会、2013年10月、北九州

[4] 松野瑞希、笛田由紀子、石田尾 徹、石松維世、樋上光雄、保利 一. 臭素イオン胎生期曝露における仔ラットへの生体影響. 第41回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2013年10月、大阪

[5] Yoshida S., Muramoto H., Tanozaki M., Hozumi N., Fueta Y., Sekino Y. Valproate application to rat fetus encourages the development of Purkinje cell dendrites and

network formation in cerebellar development.  
Society for Neuroscience, 2013 Nov, San Diego

[6] Fueta Y., Sekino Y., Ueno S. Alterations of postnatal development of feedback inhibition and basic excitability in the hippocampus of rats prenatally exposed to valproic acid. Society of Toxicology, 2014 Mar, Phoenix

[7] 上野 晋、笛田由紀子. 授乳期モデルラットの脳神経回路解析による発達神経毒性評価法とその応用. 第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月、岡山、発表予定

[8] 笛田由紀子、松野瑞希、石田尾 徹、石松維世、樋上光雄、上野 晋、保利 一. 1-ブロモプロパンの発達神経毒性：臭素イオンの関与. 第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月、岡山、発表予定

[9] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野 晋. 胎生期バルプロ酸単回投与による授乳期ラット海馬の局所回路機能変化. 第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸、発表予定

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

とくになし

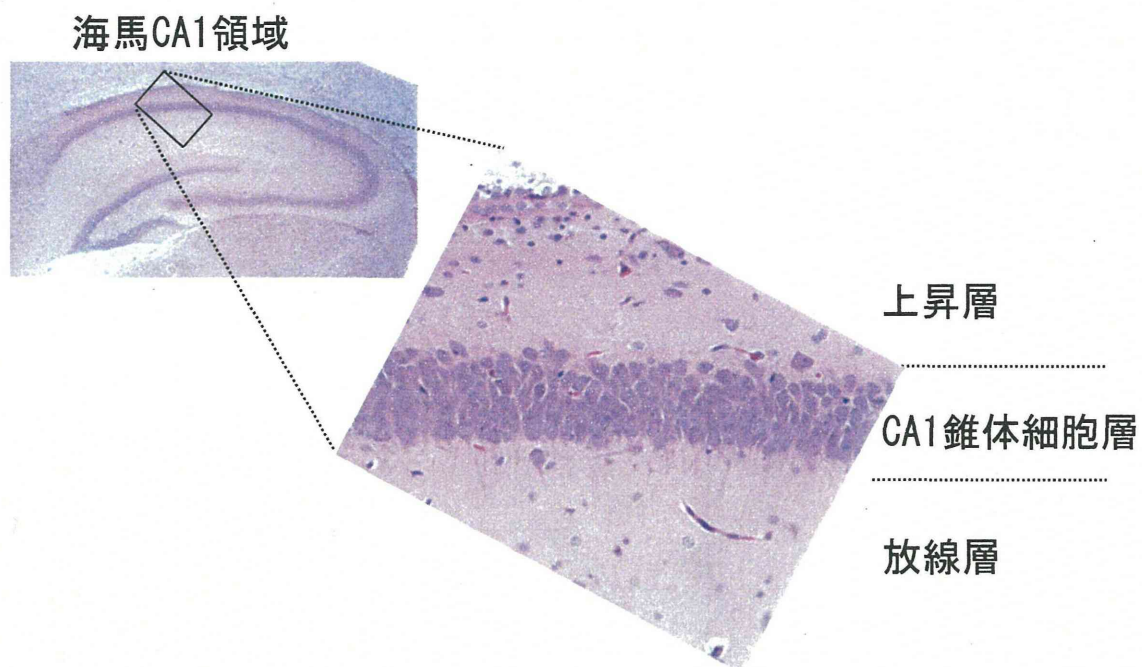


図1 対照群 (PND15) の海馬の層構造 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

PND15の対照群の脳を海馬スライス標本の切り方に合わせて斜め冠状断薄切した光顕像である(左上図・弱拡大像)。電気生理学的評価法においては、海馬CA1領野に記録電極を設置した(実線の四角の部分)。拡大すると海馬CA1の構築が、背側から上昇層、錐体細胞層、放線層を分かれているのが観察できる。CA3領野の錐体細胞の軸索であるシャップアー側枝は放線層においてCA1錐体細胞の先端樹状突起とシナプスを形成する。CA1錐体細胞の出力である軸索は上昇層を左右に伸びて、上昇層にあるGABA介在ニューロンとシナプスを形成する。

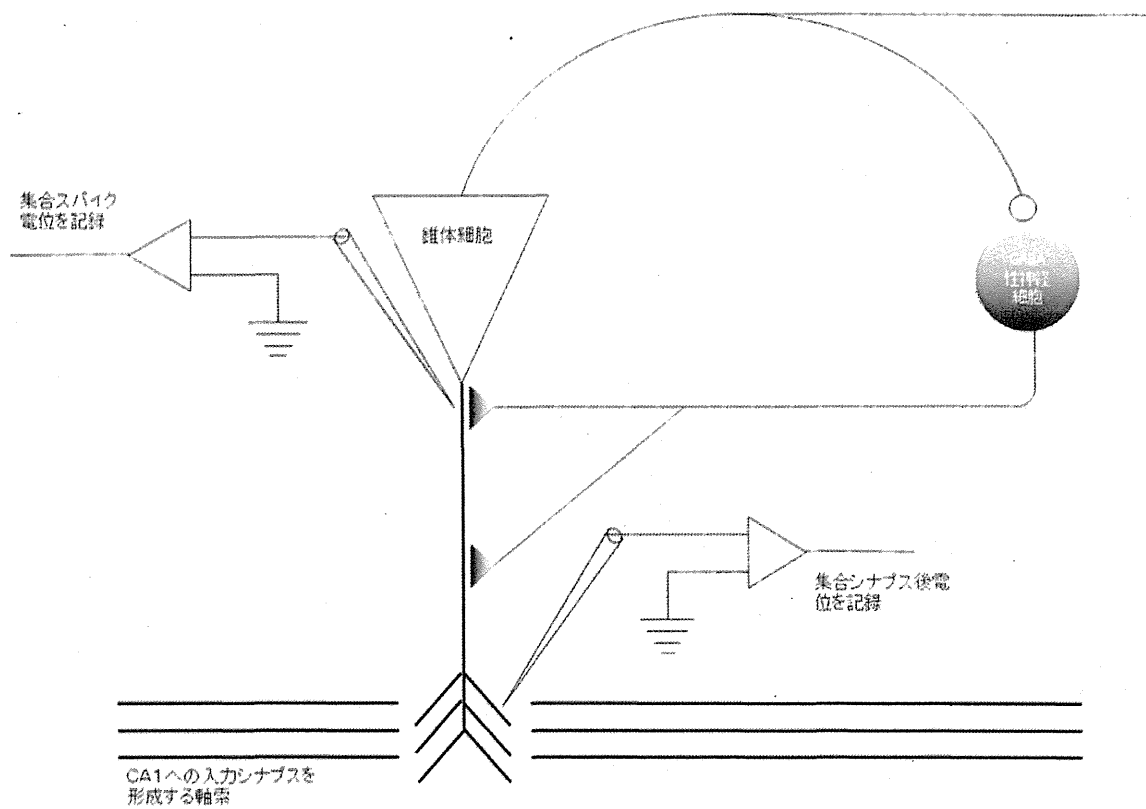


図2 海馬 CA1 領域における神経回路模式図

フィードバック抑制に寄与する GABA 性神経細胞と錐体細胞の神経回路図を示す。錐体細胞の先端樹状突起にあるシナプス層から集合シナプス後電位 (fEPSP) を記録し、同時に錐体細胞層から集合スパイク電位 (PS) を記録した。図の下部の 3 本の線は CA3 錐体細胞の軸索であるシャッファー側枝を示している。回路の詳細な説明は本文を参照のこと。