

生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究

2013.8.23 豊橋技術科学大学 吉田祥子

研究目的

胎生期・神経発生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*試験法の開発と予測性の検証

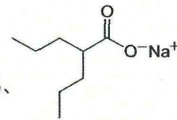
評価方法

新生期・成熟期の仔脳切片標本によるシナプス機能影響評価

- ・生後1週間での、小脳皮質からのGABA放出分布と放出量の変化を光学測定
神経細胞の増殖と分化を誘導
- ・生後2週間での、小脳皮質からのATP放出分布と放出量の変化を光学測定
シナプス形成を誘導

投与試料

胎児期の被曝によって自閉症・神経回路異常が報告されている、
抗てんかん薬 パルプロ酸を妊娠ラットに投与



投与時期

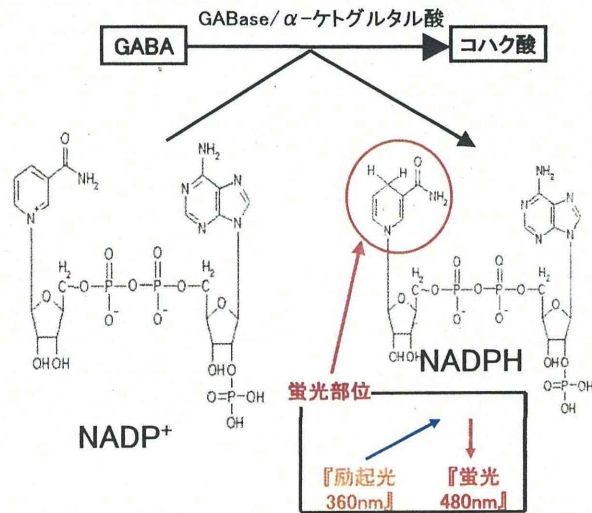
文献より、胎生期後期に単回投与
E16, E17, E19の妊娠ラットに投与、安定した効果が見られたE16投与とした

投与方法

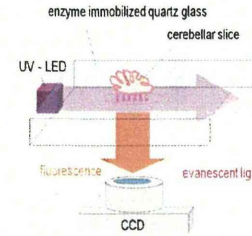
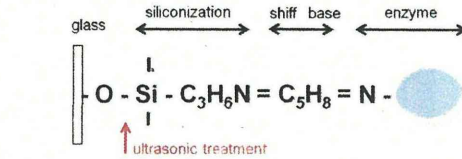
文献より、腹腔内投与およびソルデを用いた経口投与を試行し、
死産率の低い経口投与を用いた。

発達期小脳皮質からのGABA放出

酵素光学法によるGABA光反応



酵素担持法と光学測定法



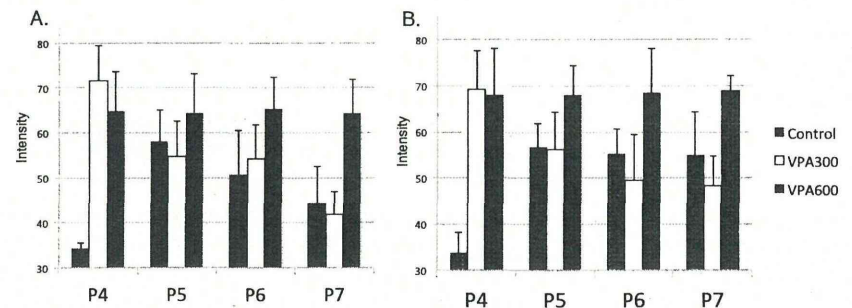
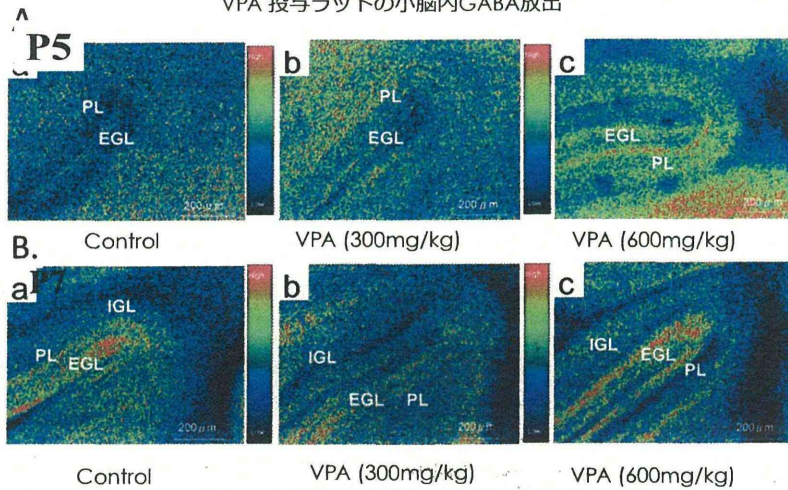
・装置

ガラス: 石英ガラス

光源: UV-LED波長360nm

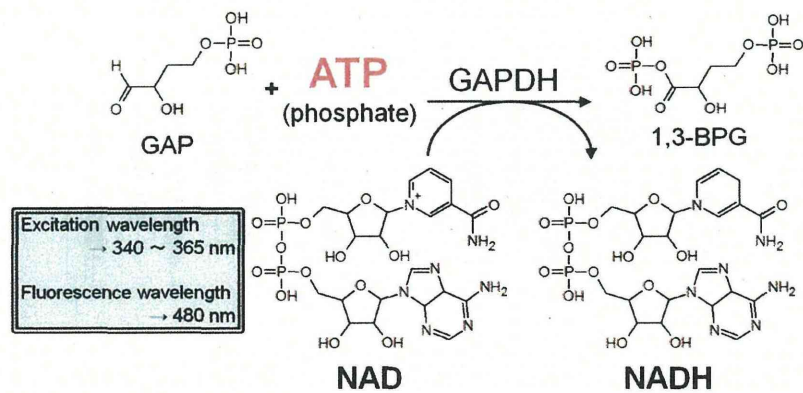
試料: 400μmラット小脳スライスまたは培養細胞

VPA 投与ラットの脳内GABA放出

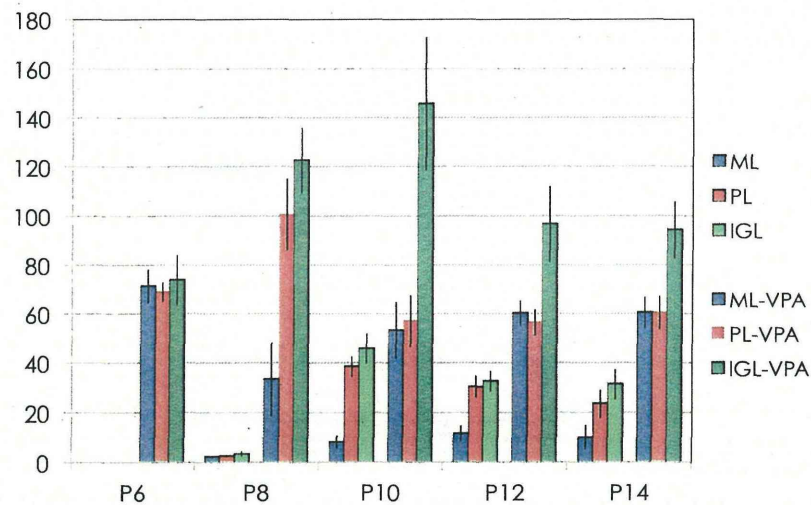
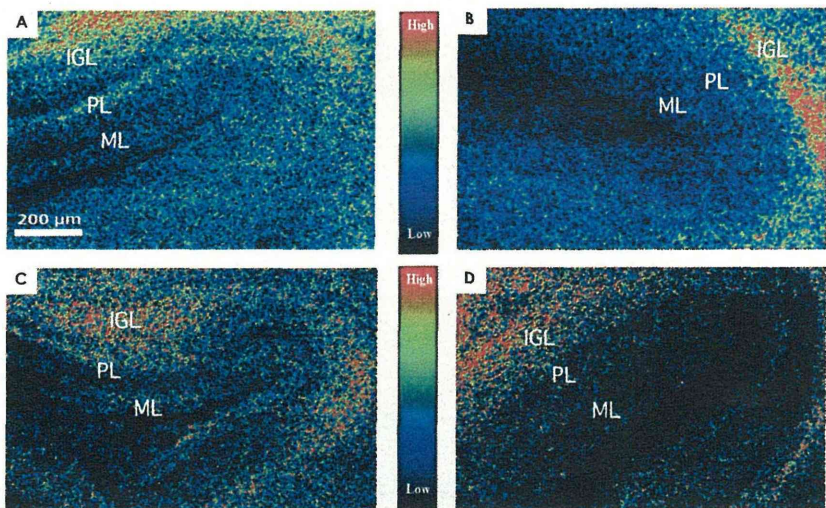


発達期小脳皮質からのATP放出

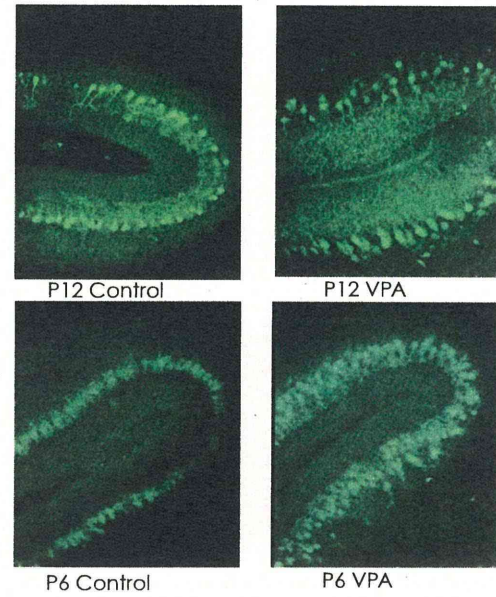
酵素光学法によるATP光反応



-196-

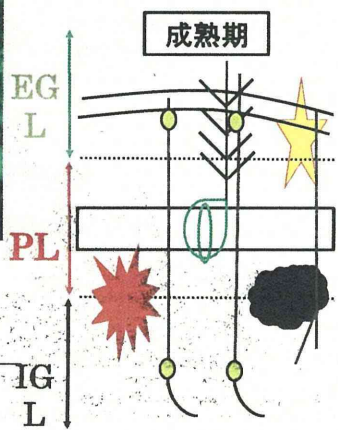
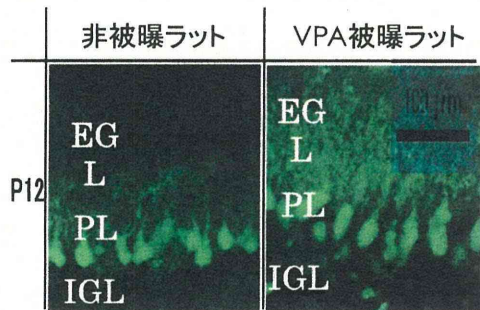


神経細胞・制御タンパク質の分化



Calbindin D-28k抗体染色

プルキンエ細胞の分化



	VPA 被曝	非被曝
樹状突起の長さ(μm)	165	85

HDAC阻害剤への展開

VPAはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤として働く

HDACはSoxの導入を行う。
HDAC阻害剤によって遺伝子転写が活性化される

[神経分化への影響]

神経管の神経幹細胞に対し、VPAによってG2/M期停止がかかる
(奈良先端大 中島)
Birthdate効果による神経細胞の早期分化を引き起こす？

小脳では、出生後約一週間、
グリア細胞性のGABAによって顆粒細胞の二次的な分裂が誘導され、
最終分裂を迎えた顆粒細胞がグルタミン酸を放出し神経細胞移動が開始される。
しかしVPA投与動物では、生後一週間の顆粒細胞に分化型の受容体発現が見られ、
グリア細胞性のGABA放出が強く抑制されている。
同時に顆粒細胞の影響を受けるプルキンエ細胞の単層化が抑制される。

生後12日にはプルキンエ細胞のアピカル樹上突起の発達が開始されるが、
VPA投与動物ではアピカル樹上突起の発達が悪く、
一方樹上突起は分子層全体に発達し、分化が促進された状況を呈している。

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤

- ・N-(フェルロイル)セロトニン
メラニン生成阻害効果
- ・スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)
腫瘍細胞増殖阻害
- ・酪酸、酪酸ナトリウム
細胞増殖抑制効果
- ・ピロキサミド
抗がん剤
- ・トリコスタチンA
抗真菌抗生物質 細胞周期G1、G2阻害、グリオーマ阻害
- ・オキサムフラチン ヒドロキサム酸系
ES細胞からの胚細胞樹立
- ・バルプロ酸
抗てんかん薬、iPS細胞の生成、抗がん薬
- ・アピシジン 環状ペプチド
腫瘍壊死因子、抗がん剤

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤

- ・N-(フェルロイル)セロトニン
メラニン生成阻害効果
- ・スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)
腫瘍細胞増殖阻害
- ・酪酸、酪酸ナトリウム
細胞増殖抑制効果
- ・ピロキサミド
抗がん剤
- ・トリコスタチンA
抗真菌抗生物質 細胞周期G1、G2阻害、グリオーマ阻害
- ・オキサムフラチン ヒドロキサム酸系
ES細胞からの胚細胞樹立
- ・バルプロ酸
抗てんかん薬、iPS細胞の生成、抗がん薬
- ・アピシジン 環状ペプチド
腫瘍壊死因子、抗がん剤

厚生労働科学研究助成金 化学物質リスク研究事業

VPA胎生期単回投与ラットの授乳期における
海馬CA1領域の電気生理学的検討
— IN VIVO 評価系 —

笹田由紀子¹, 上野 晋²

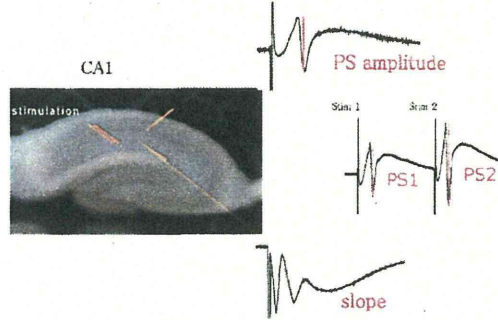
¹産業医科大学 産業保健学部

環境マネジメント学科 作業環境計測制御学講座

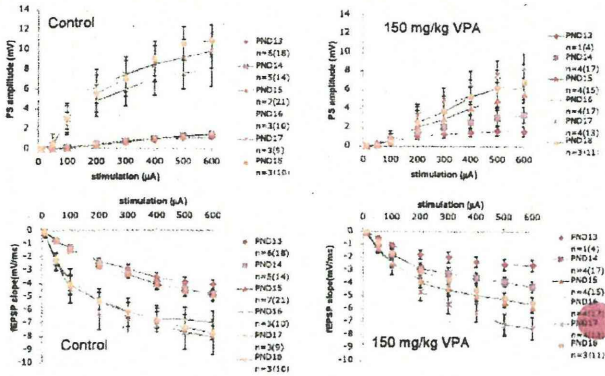
²産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性中毒学研究室

電気生理学的手法

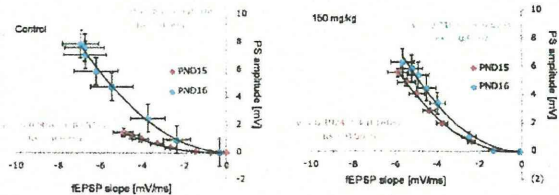
- PS amplitude: 活動電位を発生した細胞の数を反映
- Slope: 興奮性シナプスの活動
- ペアパルス比(PS2/PS1): 比が小さいほど抑制が強い



結果 PND13-18における
CONTROL群と150MG/KG群の刺激応答性の発達

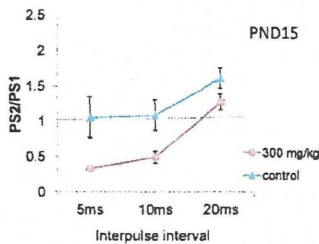


結果 PND15とPND16のPS/EPSP関係



- Control群のPND15と16では、PS/EPSP relationshipが異なる。
- 150 mg/kg群のPND15と16のPS/EPSP relationshipはほぼ同じ。

結果 VPA投与で抑制系の発達が亢進



対照群ではこの時期にはまだ抑制系の発達が見られない、しかし300mg/kg投与群では抑制系の発達が亢進していた。

平成25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)

個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規
in vitro発達神経毒性評価法に関する研究
(H25-化学-一般-002)

研究分担者班会議～in vivo研究グループ

関野祐子(国衛研)、吉田祥子(豊橋技科大)

笛田由紀子(産業医大)、上野 晋(産業医大)

2014年2月6日～2月7日 於 産業医科大学

豊橋技科大・吉田研究室における
光学測定の実験結果報告

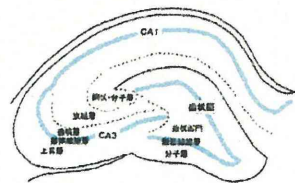
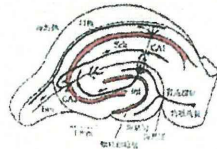
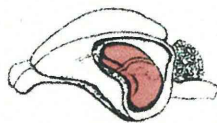
2014年1月31日～2月1日

報告者 笛田由紀子

・ 実験動物

- ・ VPA600 mg/kg 曝露群の仔ラット
- ・ 1月31日：1月15日生まれ 実験当日PND16
- ・ 2月1日：1月18日生まれ 実験当日PND14
- ・ スライス等実験協力者
- ・ 吉田研究室 M2/村本氏

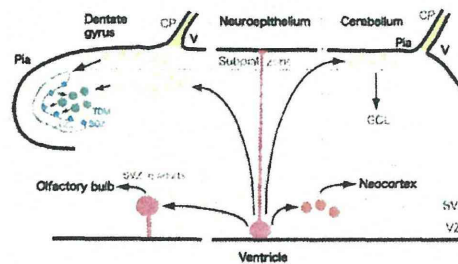
海馬スライス：
細胞層の位置関係



PND15対照群

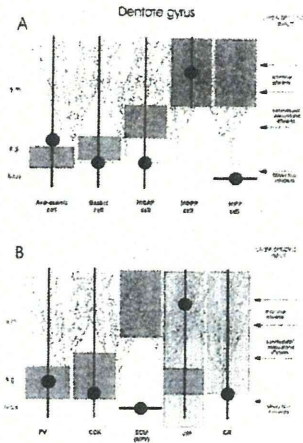


PND15 300 mg/kg曝露群



大脳新皮質、側脳室下帯(嗅球のニューロンを新生)、海馬歯状回、小脳のニューロン新生様式の比較
 CP, 脈絡叢 choroid plexus; EGL, 外果粒層 external granular layer; IP, 中間神経前駆細胞 intermediate progenitors; GCL, 顆粒細胞層 granule cell layer; SDM, 2次歯状回マトリックス secondary dentate matrix; SGZ, 顆粒細胞層下帯 subgranular zone; SVZ, 脳室下帯 subventricular zone; TDM, 3次歯状回マトリックス tertiary dentate matrix; VZ, 脳室層 ventricular zone

(石 龍徳 東医大誌 69: 433-49, 2011)



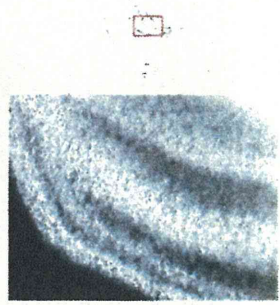
Hilusのネットワーク??

"The rat nervous system"
3rd ed, Edited by G Paxinos
Elsevier Academic Press, p642



1月31日スライス1枚目:PND

- Spon GABA(GABA1)



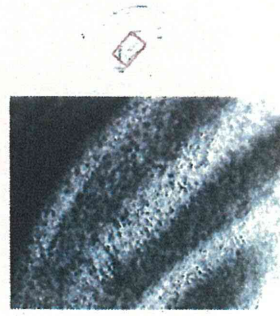
1月31日スライス2枚目

- Spon Glu(Glu1)



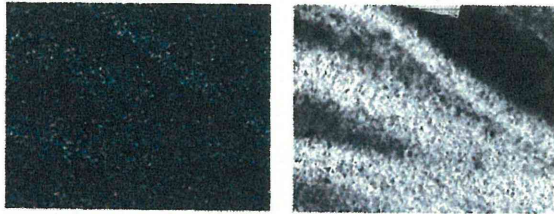
1月31日スライス3枚目

- Spon GABA(GABA2)

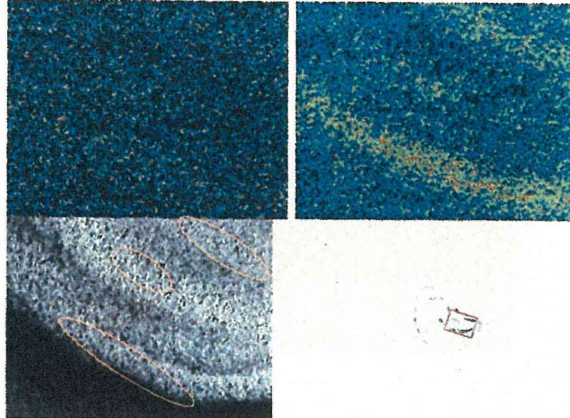


1月31日スライス4枚目

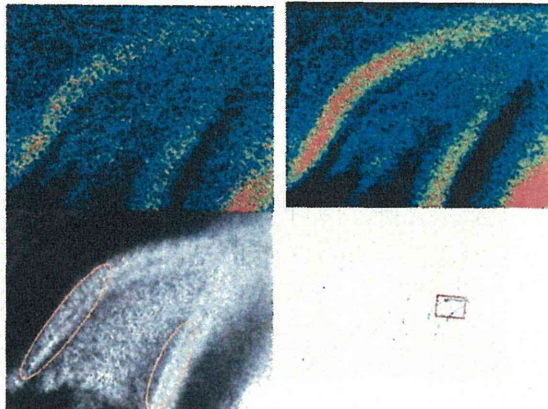
- Spon Glu(Glu2)



2月1日スライス1枚目:AMPA-induced Glu



2月1日スライス2枚目:AMPA-induced GABA



2月1日スライス3枚目:AMPA-induced Glu

