

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

本研究は、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ものであり、発生過程の神経組織を用いての評価法が、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目的とした。研究期間の3年間に検討した化学物質は、抗てんかん薬バルプロ酸（VPA）、内分泌かく乱作用を示すとされるトリブチルスズ（TBT）および有機リン系の農薬であるクロルピリホス（CP）である。妊娠15日の胎生期にこれらの化学物質を投与した仔ラットについて、日齢13日から18日における海馬の興奮系神経回路機能および γ -アミノ酪酸（GABA）作動性抑制系神経回路機能を検討した。

その結果、VPAを胎生期に投与した仔ラットでは開眼前期となる生後14～15日齢で興奮系、抑制系回路ともにその機能が亢進することが認められた。一方、TBTを胎生期に投与した仔ラットでは、生後早期の海馬神経回路機能に対してむしろ回路機能を抑制することが見出され、TBTの胎生期曝露は海馬神経回路機能の発達遅延を生じる可能性が示唆された。CPを胎生期に投与した仔ラットでは、VPAやTBTの場合とは異なり、興奮性の亢進傾向が認められるにとどまった。

さらにGABA_A受容体拮抗薬ピククリンに対する反応性について検討したところ、生後発達に伴い反応性に差が出現すること、さらにその反応性の差にVPA胎生期曝露が影響を及ぼすことが認められ、VPAの胎生期曝露がGABA作動性神経系の生後発達に影響を及ぼす可能性が示唆された。このように、作用メカニズムの異なる化学物質について、胎生期曝露の影響を検出できたことから、授乳期内の特定の時期に当た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。

また、日齢5日から7日までの不随意運動を観察し、定量的解析を行った結果、対照群では3日間で不随意運動量が次第に減少したが、TBT曝露群では3日間の不随意運動の出現に差が認められなかった。この不随意運動は脳神経系に由来すると考えられるので、胎生期の化学物質への曝露がこの時期の神経機能にも何らかの影響を与えており、それを反映する指標となる可能性が示唆された。したがってOECDのガイドラインに示されているような、動物の成長、すなわち離乳後を待って複数の行動試験バッテリーを組まずとも、これらの指標が授乳期間中の仔動物を用いた発達神経毒性評価の指標となる可能性があると考えている。

A. 研究目的

本研究は、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ものであり、発生過程の神経組織を用いての評価法が、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。そこで発達神経毒性が報告されている化学物質の中でも、作用機序が異なる3種の化学物質を選択した。すなわち、抗てんかん薬として臨床適用されている一方で自閉症スペクトラム障害のモデル動物作製にも使用されているバルプロ酸 (valproic acid, VPA)、内分泌かく乱作用が報告されている有機スズ (トリブチルスズ; tributyltin, TBT)、および農薬や駆除剤として用いられている有機リン化合物のクロルピリホス (chlorpyrifos, CP) である。

発達神経毒性の評価指標として本研究で着目したのは、特に γ -アミノ酪酸 (GABA) が関連する抑制系神経回路である。脳には経験などによって変化しやすい『臨界期』と呼ばれる発達段階があり、この臨界期が GABA 作動性抑制系回路の発達により決定されていることが考えられている。動物を用いた試験結果のヒトへの外挿性を担保するためには、毒性評価の指標としてヒトと動物とに共通した物質であることが求められる。GABA はヒトでも動物でも成熟脳の抑制性神経回路機能を担う伝達物質であり、前述した臨界期についても GABA の機能発達により決定されていると考えられる。さらに近年、自閉症、統合失調症、気分障害などの原因の一つとして GABA の機能発達異常が示唆されていることから GABA 抑制系を含めた神経回路機能の評価が有用である可能性が考えられた。そこで当分担研究班では、すでに発達神経毒性が報告されている前述した3種類の化学物質を胎生期に投与し、その仔ラットの授乳期に脳スライス標本作製して神経回路機能の発達を電気生理学的・薬理的に解析するという *ex vivo* の手法を用いて検証した。また、TBT の胎生期曝露の実験においては、内分泌かく乱作用は認められないとされる無機スズ (酢酸スズ; tin acetate, TA) についても本研究の評価手法で検討することにしたことから、実際に評価している化学物質は4種類となる。

B. 研究方法

1. VPA、TBT、TA ならびに CP の胎生期曝露モデルラットの作製 (研究協力者 笛田由紀子、吉田祥子)

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、イソフルラン麻酔下に化学物質を経口投与した。投与量については、VPA は 300 mg/kg (以下 VPA300 群)、TBT は 20 mg/kg (以下 TBT20 群) TA は TBT 投与におけるスズの投与量を等しくするために 15 mg/kg (以下 TA15 群)、CP は 10 mg/kg (以下 CP10 群) とした。対照群として、生理食塩水 (VPA300 群に対する対照群)、50% ポリエチレングリコール (TBT20 および TA15 群に対する対照群) あるいは 0.1% ジメチルスルホキシド (CP10 群に対する対照群) を投与したラットを用いた。

2. 体重増加と一般成長 (産仔数、開眼日、性比) への化学物質の影響 (研究協力者 笛田由紀子)

胎生期投与した有害な化学物質によって、生まれた仔ラットの産仔数や一般成長が影響を受ける場合がある。また体重は毒性実験における一般生体影響を評価する重要な指標となるため、従来通りに当分担研究の実験方法に含めた。産まれた次の日に産仔数を数えて体重測定を実施し、次いで7日目、14日目および離乳日である日齢 21 日に体重を測定した。

3. 出生後間もない時期に出現する不随意運動を指標とする試験法と解析法 (研究協力者 笛田由紀子、吉田祥子)

後述するが、本研究を実施していく中で、生後 1 週目の TBT 曝露群仔ラットにおいて、持続性は短いものの痙攣用の不随意運動がしばしば観察された。この不随意運動に着目したところ、対照群の仔ラットでも観察されたことから生後間もない時期の仔ラットに本来出現する行動であることが考えられた。この不随意運動は、ヒトにおいても乳幼児に観察されてんかんと間違われやすいが、発達に伴って消失する運動であることが臨床的にも知られている。正常な発達で観察される不随意運動の頻度が化学物質によって変化するのではないかと考えて、本研究ではその頻度を定量することにした。具体的には母ラ

ットから離れた仔ラットを、約 32°C に保温された箱に入れて体温の低下を防ぎながら 3 分間行動を観察するとともにビデオに記録した。この運動の定量的解析については、計測の個人差が出ることを考慮し validation を検討するために 2 名の計測者を決め、ビデオ再生下で 1 秒ごとに不随意運動の有無を独立して計測し、3 分間の観察時間中に生じた不随意運動の合計量を秒数で表記した。すべてのビデオについて計測した後、2 名の計測者による結果の差を検討した。

4. 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 笹田由紀子)

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 μm 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。

スライス作製時に用いた人工脳脊髄液の組成 (mM) は、NaCl, 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1.25; MgSO_4 , 2; NaHCO_3 , 26; glucose, 10 であるが、切片作製時には切断による Ca^{2+} の細胞内流入を防ぐために Ca^{2+} を除外したものをを用いた。実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl, 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1.25; CaCl_2 , 2; MgSO_4 , 2; NaHCO_3 , 26; glucose, 10 という従来の組成でかつ Ca^{2+} を含むものとした。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 (O_2/CO_2 :95%/5%) で飽和し 3.5 - 4°C に冷やした人工脳脊髄液中ですばやく行った。作製したスライスは、Haas 型チャンバー内 (32.0 \pm 0.1°C) に静置し、記録開始まで約 2 時間回復させた後に実験に用いた。

5. 刺激応答性についての電気生理学的評価法 (研究協力者 笹田由紀子)

刺激電極にステンレスの双極電極 (直径 50 μm) 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 Ω)、CA1 領野の錐体細胞層と白板との中間領域から集合スパイク電位 (PS) を記録した。成獣ラットの海馬スラ

イスでは、錐体細胞層外側 (背側) 近傍から PS が記録されるが、発達期の海馬スライスでは、PS と明らかに判別されうる電場電位は成熟ラットの時よりもさらに外側 (錐体細胞と白板のほぼ中間) から記録された。同じスライスにおいて、錐体細胞よりも内側 (腹側) に位置するシナプス層から、興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) を PS と同時に記録して『興奮系』神経回路の機能を評価した。図 4 に、海馬 CA1 領野から記録される PS と fEPSP の典型例、およびその解析部位を示している。PS の振幅は、神経細胞の活動電位の数を反映すると考えられており、おもにナトリウムチャネルの活性化によるナトリウムイオンの細胞内流入量の総和を反映している。また fEPSP の傾きは、シナプス後膜に局在する AMPA 型グルタミン酸受容体の活性化を反映すると考えられている。

電気刺激の強さは、10 μA から 600 μA まで増加させ、電気刺激と電位応答の大きさとの関係を『刺激応答性の評価指標』とした。また、発達に伴う変化を評価する目的で、刺激応答性の結果の中から 300 μA 電気刺激に対する結果を抽出し、日齢との関係性を『興奮系発達の評価指標』として表すこととした。

6. 興奮系発達における GABA_A 受容体拮抗薬 (ビククリン、BMI) の関与 (研究協力者 笹田由紀子)

前述したように、GABA 抑制系は神経発達において重要な役割を果たすことから、胎生期における化学物質投与によって GABA 抑制系の機能が変化すれば、神経発達にも何らかの影響を与えることは容易に予測される。そこで GABA 抑制系の変化を調べるために、興奮系発達の評価指標で違いが認められた日齢 (=PS 振幅の大きさが明らかに変化する日齢) での海馬スライス標本を用い、最大刺激電流値である 600 μA の単回刺激による PS 振幅と fEPSP の傾きの大きさを BMI (1 μM) 存在下、および非存在下で比較し、その変化率を検討した。

(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

らそれぞれの研究が進められた。

C. 研究結果

1. 神経回路機能の生後発達、および興奮系の生後発達への GABA 抑制系の関与に対する VPA 胎生期曝露の影響

平成 25 年度に実施した VPA 胎生期曝露実験により、VPA300 群仔ラットは対照群と比べても、雌雄ともに成長に伴う体重増加は変わらないことを確認した (図 1)。また、産仔数と性比についても VPA 胎生期投与の影響は認められなかった (表 1、性比についてはデータ割愛)。これらの結果より VPA300 群については、外見上は対照群と同程度の発達が予測された。

一方、興奮系の刺激応答性および発達指標の解析により、対照群では PND15 から PND16 にかけて fEPSP の傾き、PS 振幅いずれの刺激応答性も大きく亢進することが判明した (図 5&6、上段)。しかしながら VPA300 群では PND14 から PND15 の時期ですでに刺激応答性の亢進が出現し始めた (図 5&6、下段)。

対照群の開眼時期は PND16~17 であり、刺激応答性の変化がこの時期に観察されたことから、開眼前期 (PND14-15) と開眼期 (PND16-17) として分類した。その上で単回刺激 (600 μ A) により誘発される PS 振幅に対する BMI の効果について検討した。その結果、対照群では開眼前期において BMI 存在下で PS 振幅の著増 (80 \pm 17%) が認められたものの開眼期ではわずかな増加 (14 \pm 4.5%) しか認められず、発達に伴う GABA 作動性抑制系の関与が異なることが見出された (図 7)。一方 VPA300 群では、開眼前期の時点ですでに PS 振幅の増加率が対照群の開眼期で認められたものに近く (34 \pm 14%)、開眼期は対照群とほぼ同程度 (14 \pm 5.1%) となった。fEPSP の傾きの大きさは BMI の灌流投与によって変化しなかった (データ割愛)。

さらに個々のスライス標本から得られた PS 振幅の BMI による増加率について、そのデータとしての分布をヒストグラムと近似曲線により比較した。対照群では、開眼前期と開眼期、すなわち発達に伴って分布が明らかに異なることが判明した (図 8)。ところが VPA300 群においては開眼前期と開眼期の分布がほぼ一致する、すなわち発達に伴う

変化が認められないことが見出された (図 9)。さらに興味あることに、VPA300 群から得られた 2 種類の近似曲線は対照群の開眼期の近似曲線ともほぼ一致するものであった。このことは、対照群で見られたような発達に伴う変化が消失したというよりも、むしろ VPA300 群の GABA 抑制系神経回路は開眼前期の時点で、通常なら開眼期で形成される性質を示す GABA 抑制系へと発達が亢進している可能性を示唆するものである。

2. 神経回路機能の生後発達、および興奮系の生後発達への GABA 抑制系の関与に対する TBT 胎生期曝露の影響

TBT20 群と TA15 群仔ラットは VPA 胎生期曝露と同様の手法で作製された。今回用いた対照群ラットの妊娠期間は 11 匹中 10 匹が 21 日間であったが、TBT20 群と TA15 群については妊娠期間が 1 日長く 22 日間になる場合が多かった。PND 1 (出産日の翌日) の仔ラットの体重は対照群、TBT20 群、TA15 群の間で有意差はなく、その後の体重増加についても対照群と比べて明らかな差は認められなかった。開眼時期 (表 1) については TBT20 群が対照群 (PND17) より 1 日早い PND16 であった ($p < 0.01$)。ただこの開眼日の遅れは上述した出産日の遅れが関与している可能性があると考えられる。

単回刺激で誘発される PS の振幅について PND13 から PND18 までの期間で検討したところ、TBT20 群では開眼時期であるにもかかわらず、PND16 における PS 振幅の発達に伴う増加が対照群と比べ有意に小さいことが認められた (図 10)。しかしながら、開眼後の PND17 においては対照群、TBT20 群との間で PS 振幅の大きさに有意差は認められなくなった。興味あることに、TA15 群における刺激応答性の日齢に伴う変化を見ると、PND16 では TBT20 群と対照群の間の値となった (データ割愛)。さらに検討が必要ではあるが、無機スズについては胎生期曝露により生後の神経発達に何らかの影響を及ぼしている可能性が今のところ否定できない。

この TBT 胎生期曝露についても、開眼前期 (PND14) と開眼期 (PND16) として分類し、単回刺激 (600 μ A) で誘発される PS 振幅に対する BMI 反応性について VPA 胎生期曝露と同様に検討した (図 11)。TBT 対照

群では BMI 存在下で開眼前期において PS 振幅は著増した ($52\pm 9.6\%$) もの開眼期ではその増加はわずかなものとなり ($9.8\pm 3.0\%$)、VPA 対照群と同様 GABA 作動性抑制系の関与が発達に伴い異なることが示唆された。一方、TBT20 群については、PND14 では BMI 存在下での PS 振幅の増加は、対照群の同時期で認められたものと同様 ($42\pm 5.2\%$) であった。しかし PND16 になっても増加は認められていた ($37\pm 8.3\%$)。増加率の分布の近似曲線からも、PND14 では対照群と TBT20 群とではその分布はほぼ等しかったが (図 12)、PND16 では対照群と比べ TBT20 群の分布近似曲線が軽度ではあるが右方移動していることが判明した (図 13)。言い換えると、対照群で見られるように本来は発達 (PND14 から PND16) に伴い分布近似曲線が左方移動するところが、TBT 胎生期曝露によって左方への移動が軽度ではあるが抑制されているとも言える。以上のことから、開眼期に認められる GABA 作動性抑制系の関与に対しても TBT の胎生期曝露は影響を与えていることが判明した。

3. 不随意運動の出現、ならびにこれに対する TBT、TA 胎生期曝露の影響

不随意運動量を PND 5 - 7 の 3 日間で解析した結果、対照群では運動量 (総秒数) が日齢を経るとともに有意に減少していることが判明した (図 14、 $p < 0.05$)。ところが、TBT20 群と TA15 群については、3 日間の不随意運動量には変化が認められなかった。また PND 5 における不随意運動量については 3 群間に有意差はなかったが、PND 7 においては対照群と TBT 群との間に有意な差が認められた。一方、授乳期の後半になるとこの不随意運動は 3 群ともに認められなくなった (データ割愛)。このことから、今回着目したこの不随意運動は授乳期早期に出現し発達とともに減少するものであること、さらに TBT の胎生期投与はこの運動が減少する時期に影響を与えている可能性があることが考えられた。したがってこの不随意運動の発現および発達に伴う変化の背景にも、何らかの神経発達に関与している可能性が考えられる。

4. 神経回路の生後発達に対する CP 胎生期曝露の影響

CP 胎生期曝露に関しては現在も実験中であるため、あくまで暫定的な結果として述べることにする。CP 胎生期曝露の対照群は他の 2 種類の対照群と比較しても、開眼日や産仔数に有意差はなかった。さらに CP 胎生期曝露の影響も認められず (表 1)、PS 振幅の刺激応答性 (図 15) と日齢に伴う変化 (図 16) についても顕著な変化は認められなかった。不随意運動については現在データを集積中である。

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。その結果として平成 25 年度は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。そこで平成 26 年度はこのメカニズムの解明する目的で、GABA 作動性抑制系に着目して解析を進めるとともに、第 2 の化学物質として TBT および TA の胎生期曝露を並行して実験した。平成 27 年度には、VPA 胎生期曝露の結果を参考にして、TBT 胎生期曝露が GABA 作動性抑制系に及ぼす影響を検討し、さらに第 3 の化学物質として CP 胎生期曝露も開始した。

GABA 作動性抑制系の生後発達は脳機能に重要な役割を果たしていることが明らかとされている。そこで、GABA_A 受容体拮抗薬 (BMI) を用いた薬理的なアプローチにより、本研究で指標としている刺激応答性の生後発達における GABA 作動性抑制系の関与、ならびにこれに対する VPA 胎生期曝露の影響を検討した。その結果、まず開眼前期においては対照群で BMI 投与により単回刺激による刺激応答性が増強された。このことから、この開眼前期においては GABA_A 受容体を介した抑制が、しかも持続的に存在している可能性が示唆される。さらに興味あることに、開眼期以降においてはこの BMI による刺激応答性の増強作用がほとんど認められなくなっていた。一方、VPA 胎生期曝露群では開眼前期の時点で BMI による刺激応答性の増強作用はほとんど認められず、開眼期も同様の反応であった。

これらの結果から、1) 開眼前期では刺激応答性を抑制するように GABA_A 受容体を

介した持続的な抑制が存在している、2) この持続的な抑制は開眼期となる生後発達の過程でむしろ減弱する、ということが示唆され、本研究で指標としている刺激応答性の生後発達の過程において、GABA_A受容体を介した持続的な抑制系回路(おそらくはシナプス外 GABA_A受容体を介した経路)の変化が存在していることが考えられる。さらに VPA 胎生期曝露によって、開眼前期ですでに持続的抑制が減弱し、開眼期とほぼ同程度になったことは、神経回路機能の生後発達の亢進を示しているとも考えられ、平成 25 年度に得られた結果と一致する。単回刺激による刺激応答性を検討するとともにその BMI に対する反応性についても併せて検討することにより、発達神経毒性を評価する指標としてより信頼性と有用性が高まる可能性が考えられる。

そこでこの電気生理学的評価手法を他の化学物質の毒性評価にも応用すべく、平成 26 年度から TBT の胎生期曝露による影響について検討を始めた。TBT は内分泌かく乱作用を示す化学物質の一つと疑われており、先行研究では妊娠期間中～授乳期の長期にわたる期間の曝露モデル動物を用いたり、その毒性評価指標として胎仔死亡率や奇形発生率に焦点を置いたりしており、発達神経毒性に焦点を置いたものは少ないのが現状である。本研究では我々の用いている評価方法の有用性を検討することが目的であったことから、VPA 胎生期曝露モデルラットの作製方法に順じて TBT および TA 胎生期曝露モデルを作製した。

得られた仔ラット、すなわち対照群と TBT20 群とでは生後の体重増加に有意差は認められなかった。開眼時期については、TBT 胎生期曝露群が対照群と比べて 1 日早い PND16 であった。このことは、開眼時期を確認することが発達神経毒性の評価において、比較的容易に実行できる有効な補助的指標となるかもしれない。しかし、出産が 1 日遅れたことが関連している可能性もあり、解釈には注意を要する。

海馬 CA1 領域における単回刺激での刺激応答性について PND13 から PND18 までで検討したところ、PND16、すなわちほぼ開眼日前日にあたる日齢で、VPA 胎生期曝露モデルの対照群でも認められたような刺激

応答性の亢進がここでも出現した。しかしながら、TBT20 群では PND16 においても刺激応答性が亢進するような現象が認められず、PND17 においてようやく対照群と同程度に亢進してくることが判明した。また in vitro 評価系(研究代表者・諫田)では TBT の無機金属対照として無機スズを使用して対照群(vehicle 群)と同様な結果を得ているが、本研究すなわち in vivo 評価系においては、TA15 群で対照群に特有な PND16 での刺激応答性の亢進現象が認められなかった。このことはむしろ本研究での手法を用いた発達神経毒性の評価という観点からは、無機スズもまた影響を及ぼす可能性があるということを示した新しい知見であるといえる。

以上の結果から、TBT 胎生期曝露では VPA 胎生期曝露とは逆に、刺激応答性の亢進が遅れて出現することが判明し、この『遅れ』を指標とすることで、海馬スライス標本を用いた神経回路機能の解析が TBT の発達神経毒性に対しても早期に評価できる可能性が示唆された。興味あることに、ヒト多能性幹細胞、胎児期の神経堤細胞、生後初期の神経・グリア細胞を用いた神経新生を指標とする in vitro 評価系において、TBT については神経細胞新生に対していずれの段階でも抑制を示す結果が得られている(研究代表者・諫田、研究分担者・宇佐見、研究分担者・佐藤の報告内容を参照)。本研究で得られた結果はこの in vitro 評価系の結果と同じ方向性であると考えられる。

不随意運動の発現機序については現時点では不明であり、そもそも『不随意運動』という言葉が適切であるかどうか不明である。本研究では研究者間でイメージが共有しやすかったことから不随意運動という言葉で統一しているが、平成 27 年度の日本毒性学会において同様の現象に対して『振戦』あるいは『けいれん様行動』といった表現を用いた報告も見られた。この不随意運動が対照群においては観察した 3 日間(PND5-7)の中で減少することが認められ、TBT20 群ならびに TA15 群においては認められず、不随意運動の『発達に伴う減少』が遅れて出現する可能性があることが判明した。前述した神経回路機能の評価を合わせると、この不随意運動もまた生後の神経発達と関連してい

る可能性が考えられる。さらに今回は、同一の行動試験ビデオを2名の解析者が独立して計測して調べるという validation についての検討も行い、TBT20 群と対照群で同様の結果を示したことから、観察者が変わっても有効である指標となることが期待される。最終年度（平成27年度）における候補化学物質であるCPの胎生期曝露モデルでもこの不随意運動についての評価を始めている。また関野・吉田らの分担班では、やはり発達神経毒性が疑われている種々のHDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）阻害剤の胎生期曝露モデルを用いて、我々と同様の方法で不随意運動を解析しているが、対照群では不随意運動の消失が観察されるものの、化学物質曝露群では同じ観察期間では消失しないという結果を得ている。したがってこの不随意運動量の変化は化学物質の発達神経毒性の一面を反映している可能性が考えられる。

さらにこの不随意運動は飼育環境の変化にほとんど左右されることなく観察できる指標であり、観察後の仔ラットから数日後に海馬スライス標本を作製することも可能であることから、実験に使用する動物数が削減できるという利点をもった評価指標となることが期待できる。

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、VPAの胎生期曝露ラットばかりでなく、内分泌かく乱物質として疑われているTBT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。その結果、VPA胎生期曝露ラットでは興奮系・抑制系機能の早熟化を、TBT胎生期曝露ラットでは興奮系・抑制系機能の発達遅延を見出し、神経毒性の早期スクリーニング手法として、授乳期の海馬神経回路発達の評価が有用である可能性が考えられた。さらに正常の神経発達で観察される不随意運動の減少を調べる試験系は、スライス標本を用いる *ex vivo* 実験系との併用が可能であるため、OECDガイドラインにある、成獣を用いた行動試験バッテリーよりも簡便であり、使用する動物数の削減にも繋がる事が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Ishidao T, Fueta Y, Ueno S, Yoshida Y, Hori H. A cross-fostering analysis of bromine ion concentration in rats that that inhaled 1-bromopropane vapor. *J. Occup. Health*, in press.
- [2] Fueta Y, Kanemitsu M, Egawa S, Ishidao T, Ueno S, Hori H. Prenatal exposure to 1-bromopropane suppresses kainate-induced wet dog shakes in immature rats. *J UOEH*. 37:255-261 (2015).
- [3] Li X, Toyohira Y, Horisita T, Satoh N, Takahashi K, Zhang H, Inuma M, Yoshinaga Y, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Ikarisoid A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 388:1259-1269 (2015).
- [4] Okura D, Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Minami T, Kawasaki T, Sata T. Lidocaine preferentially inhibits the function of purinergic P2X7 receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *Anesth Analg*. 120:597-605 (2015).
- [5] Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J., Igarashi T, Ueno S, Matsushita M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y, Yanagihara N., Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M. Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3 nephrectomized triple nitric oxide synthases-deficient mouse. *J Mol Cell Cardiol*. 77C:29-41 (2014).
- [6] Horishita T, Yanagihara N, Ueno S, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Minami T, Kawasaki T, Sata T. Neurosteroids allopregnanolone sulfate and pregnanolone sulfate have diverse effect on the α subunit of the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology*. 121:620-31 (2014).
- [7] 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).
- [8] 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)
- [9] 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).
- [10] 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).
- [11] 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).
- [12] 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年11月、USA
- [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年3月、USA
- [7] 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
- [8] 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
- [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
- [10] Yoshida S, Hozumi N, Katsumata D, Abe T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Alteration of GABA release dynamics in autistic-like anomalous developing cerebellum. GABAergic Signaling in Health and Disease: 24th Neuropharmacology Conference. 2014年11月、USA
- [11] Yoshida S, Muramoto H, Tanozaki M, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Fetal application of HDAC inhibitors facilitates the elongation of Purkinje cell dendrites and the network formation in rat cerebellar cortex. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2014年11月、USA
- [12] 上野 晋、笛田由紀子、関野祐子. バルプロ酸の胎生期曝露がもたらす授乳

- 期ラットの海馬局所神経回路機能への影響. 第 67 回日本薬理学会西南部会、2014 年 11 月、北九州
- [13] 笹田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野 晋. 発達神経毒性評価の ex vivo 評価系をめざして—女性研究者ネットワークで紡ぐ共同研究体制. 日本女性科学者の会 第 10 回学術大会、2015 年 1 月、福岡
- [14] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. GABAergic involvement in the hippocampal development of the basic excitability and feedback inhibition in juvenile rats prenatally exposed to valproic acid. 54th Annual Meeting of Society for Toxicology. 2015 年 3 月、USA
- [15] 笹田由紀子、上野 晋. 自閉症モデルラットをもちいた早期の発達神経毒性評価—GABA 抑制系の関与. 第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月、大阪
- [16] Tomida T, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Yoshida S. The effects of HDAC inhibitors on developing cerebellar astrocytes. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [17] Waranabe K, Abe T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Hozumi N, Yoshida S. Alteration of neurotransmitter release in cerebellar cortex of valproate-administered rat using the enzyme-linked photo assay system. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [18] Nakajima S, Katsumata D, Abe T, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Yoshida S. Alteration of neuronal development and behavioral anomaly in autistic-like anomalous developing cerebellum. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [19] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Prenatal administration of valproic acid or tributyltin alters developmental transient of hippocampal excitability in juvenile rats. 第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月、大宮
- [20] Yoshida S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Prenatal administration of valproic acid or SAHA alters the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellum. 第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月、大宮
- [21] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Prenatal single administration of tributyltin alters developmental transient of spontaneous behaviors and basic excitability in the hippocampal slices of immature rats. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology. 2016 年 3 月、USA (発表予定)
- [22] Yoshida Y, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Prenatal administration of valproic acid alters both the Purkinje cell dendrites and the granule cell proliferation in rat developing cerebellum. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology. 2016 年 3 月、USA (発表予定)
- [23] 胎生期トリブチルスズあるいは酢酸スズ単回投与による授乳期ラットの行動と興奮・抑制系の変化. 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月、名古屋 (発表予定)

G. 知的財産の出願・登録状況
(該当なし)

	産仔数	腹数	開眼日	観察匹数
VPA control	11 ± 3	6	16.5 ± 0.6	67
VPA 150 mg/kg	11 ± 2	6	16.8 ± 0.6	34
VPA 300 mg/kg	12 ± 2	7	17.3 ± 0.7*	77
VPA 600 mg/kg	11 ± 3	5	17.2 ± 0.6*	36
TBT control	13 ± 2	9	16.7 ± 0.5	75
TBT 20 mg/kg	11 ± 3	10	16.3 ± 0.6 ⁺⁺	60
TA 15 mg/kg	9 ± 2 ⁺⁺	7	16.5 ± 0.6	58
CP control	11 ± 3	5	16.8 ± 0.6	32
CP 10 mg/kg	9 ± 2	5	16.9 ± 0.6	26

Mean ± SD

*p<0.05, vs control using the Kruskal-Wallis test

++p<0.01, vs control using the Mann-Whitney U test

表 1. 本研究で対象とした化学物質ならびにその溶媒を妊娠 15 日目のラットに投与して産まれた仔ラット数と開眼日

		腹数	ラット数
control	PND5	6	59
	PND6	8	79
	PND7	9	89
TBT20	PND5	5	47
	PND6	6	56
	PND7	6	56
TA15	PND5	7	60
	PND6	7	60
	PND7	7	60

表 2. 不随意運動評価に用いた仔ラット数

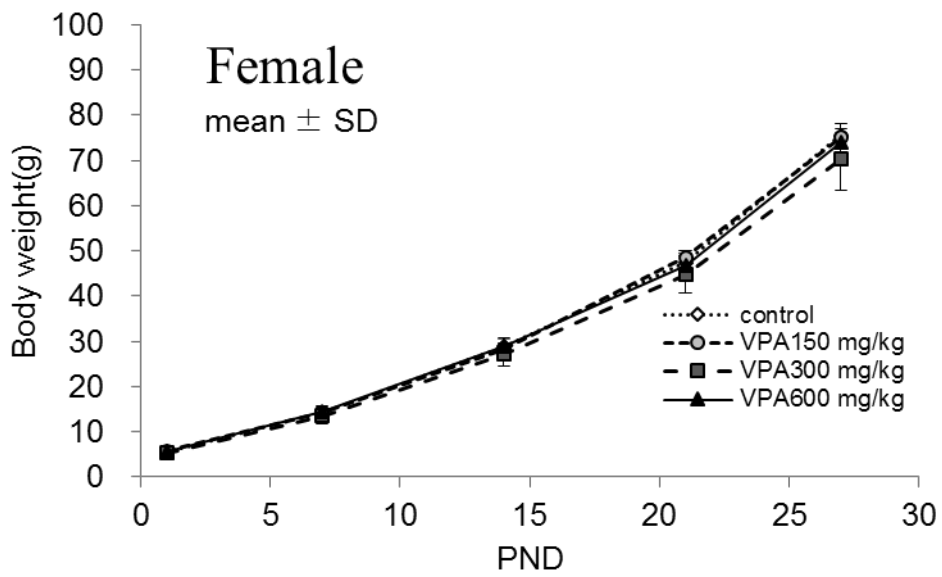
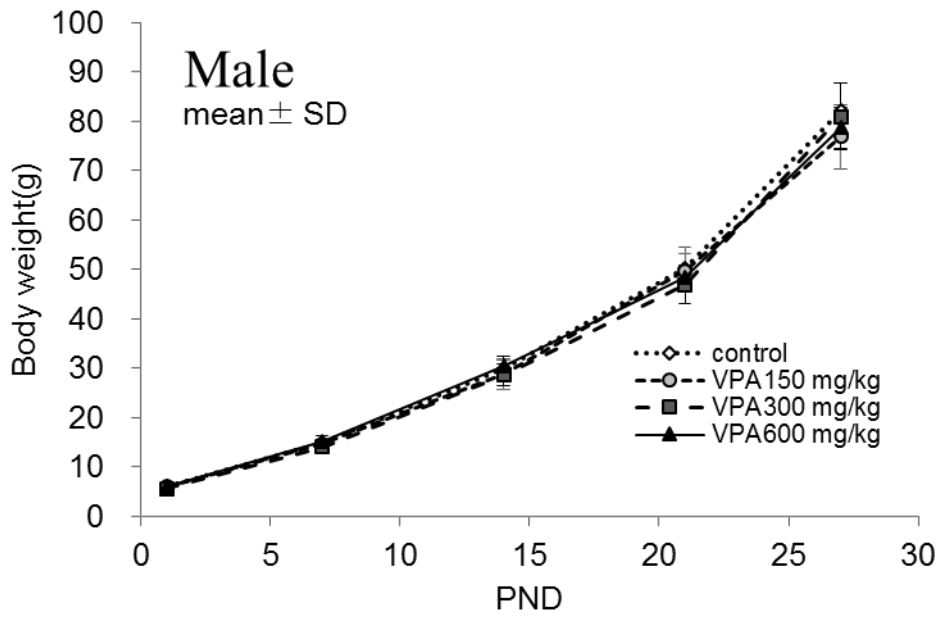


図 1. VPA を胎生期に投与して得られた仔ラットの生後発達に伴う体重増加

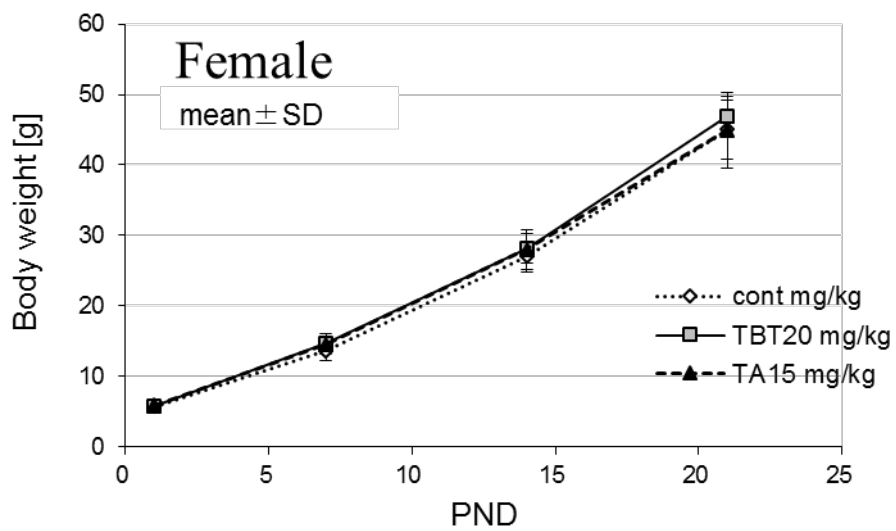
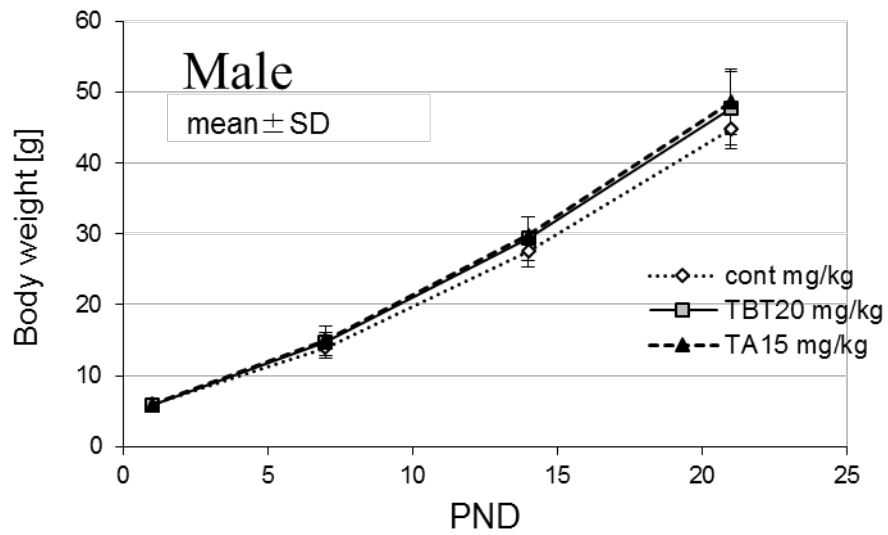


図 2. TBT、TA を胎生期に投与して得られた仔ラットの生後発達に伴う体重増加

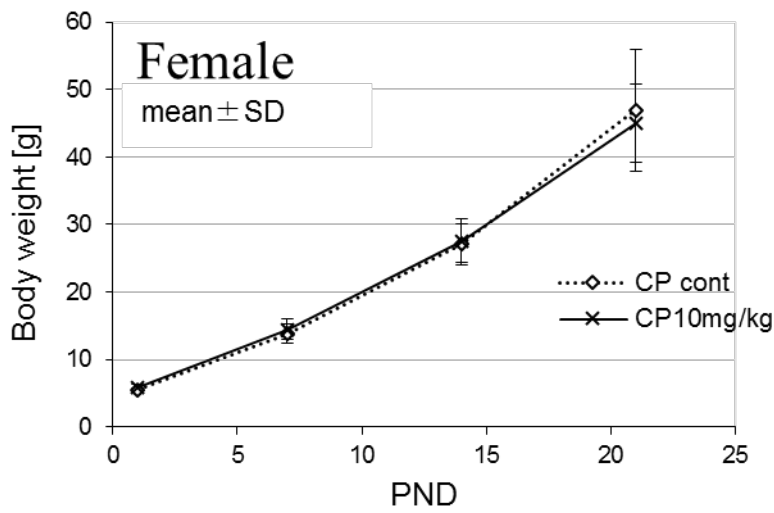
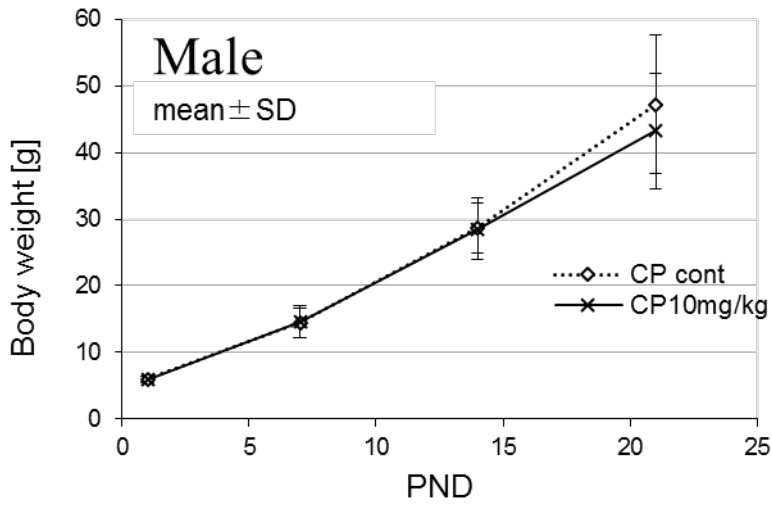
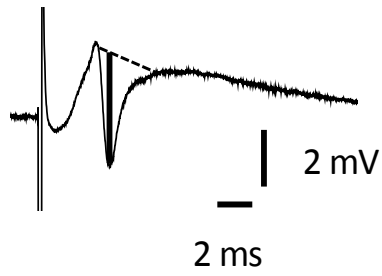


図 3. CP を胎生期に投与して得られた仔ラットの発達に伴う体重変化

PS amplitude



fEPSP slope

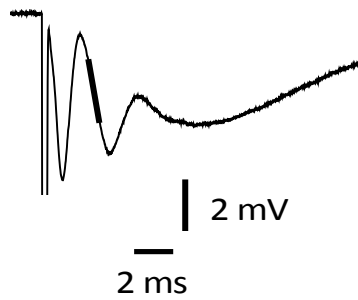


図 4. 海馬 CA1 領野から記録される集合スパイク電位 (PS) と興奮性シナプス後場電位 (fEPSP)

計測した PS の振幅と fEPSP slope をそれぞれ線で示してある。

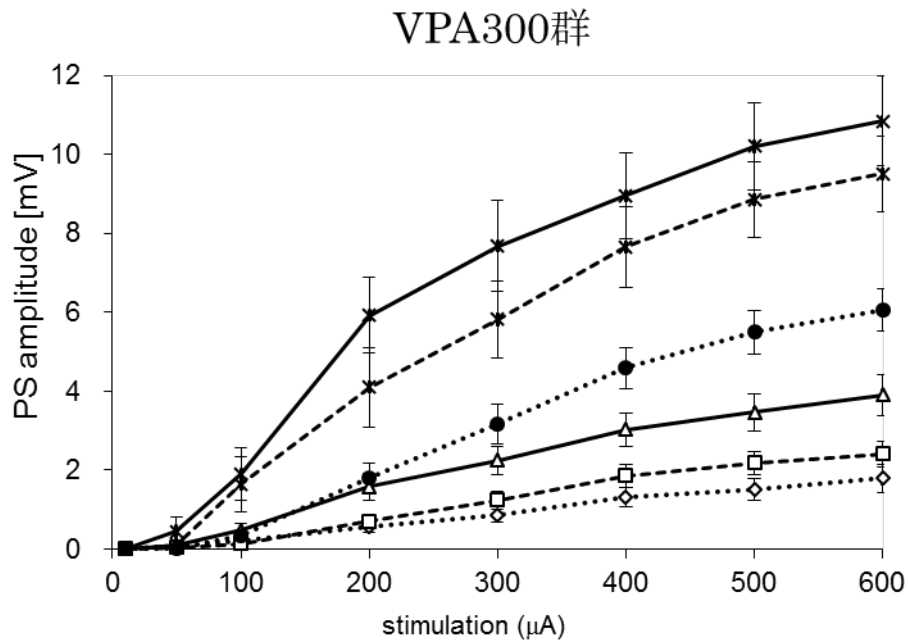
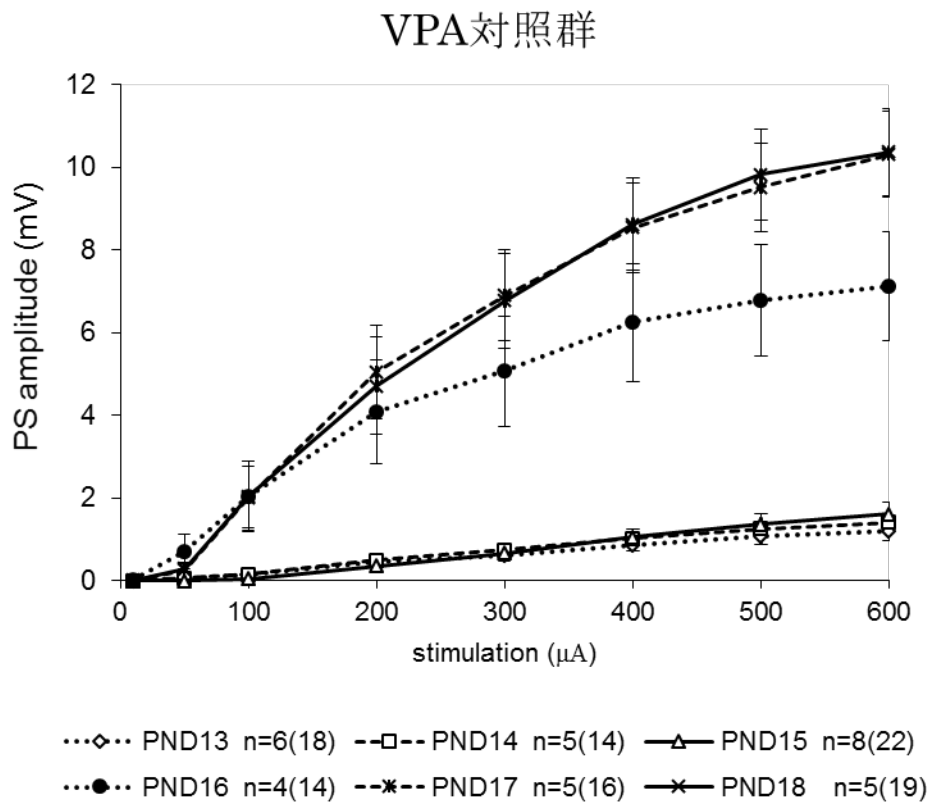


図5. 集合スパイク電位 (PS) の振幅を指標とする刺激応答性
 VPA (300 mg/kg) を胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた集合スパイク電位 (PS) の振幅を指標とする刺激応答性を示した

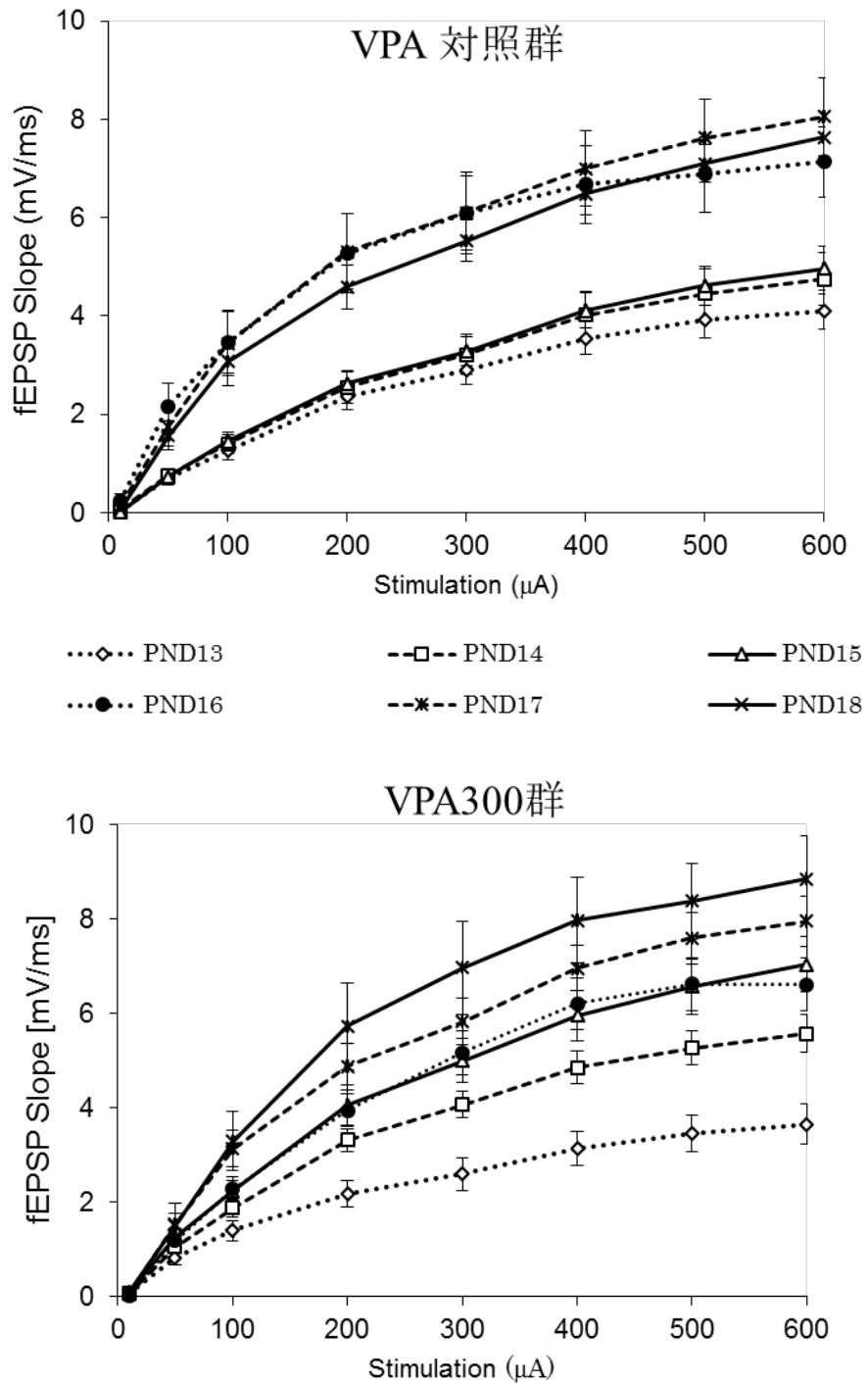


図 6. 興奮性シナプス後場電位の傾き (fEPSP slope) を指標とする刺激応答性 VPA (300 mg/kg) を胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた興奮性シナプス後場電位の傾き (fEPSP slope) を指標とする刺激応答性を示した。

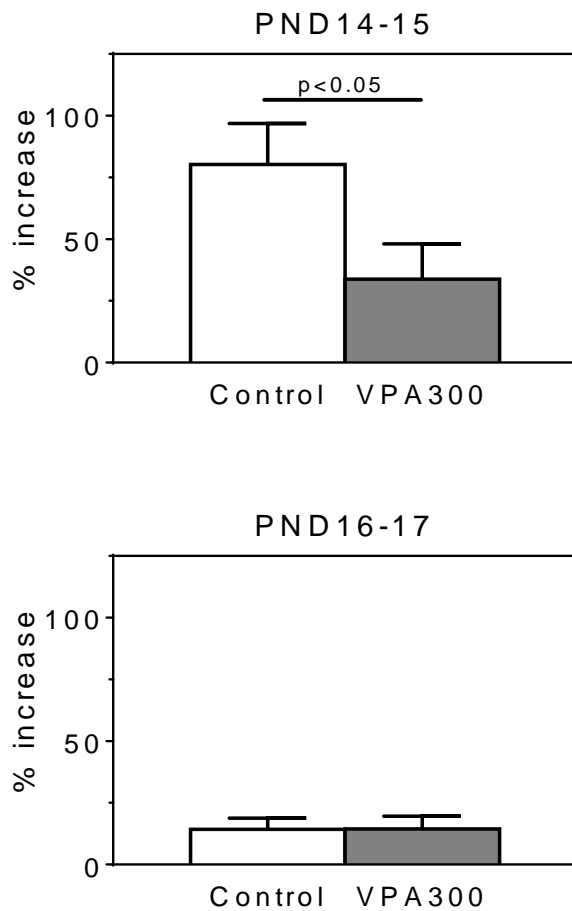


図7. 集合スパイク電位 (PS) 振幅に対する $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリンの増強作用

開眼前期 (PND14-15) および開眼期 (PND16-17) における集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$) に対する $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) の増強作用とこれに対する VPA 胎生期曝露の影響。変化率 (%increase) は次式で求められている。

$$\%increase = (\text{BMI 存在下の応答} / \text{非存在下の応答} - 1) \times 100$$

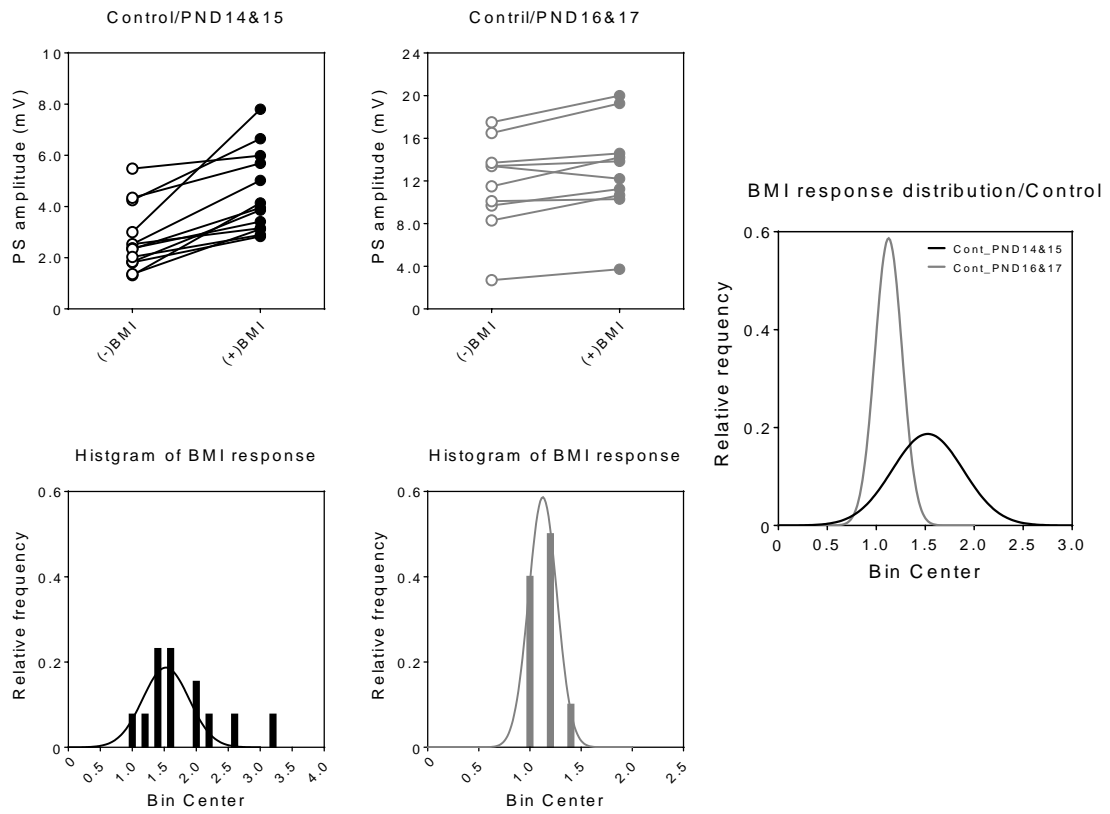


図 8. 開眼前期 (PND14-15) および開眼期 (PND16-17) における VPA 対照群から得られた $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) 存在下、非存在下での集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$)、および BMI による増強率の分布近似曲線。

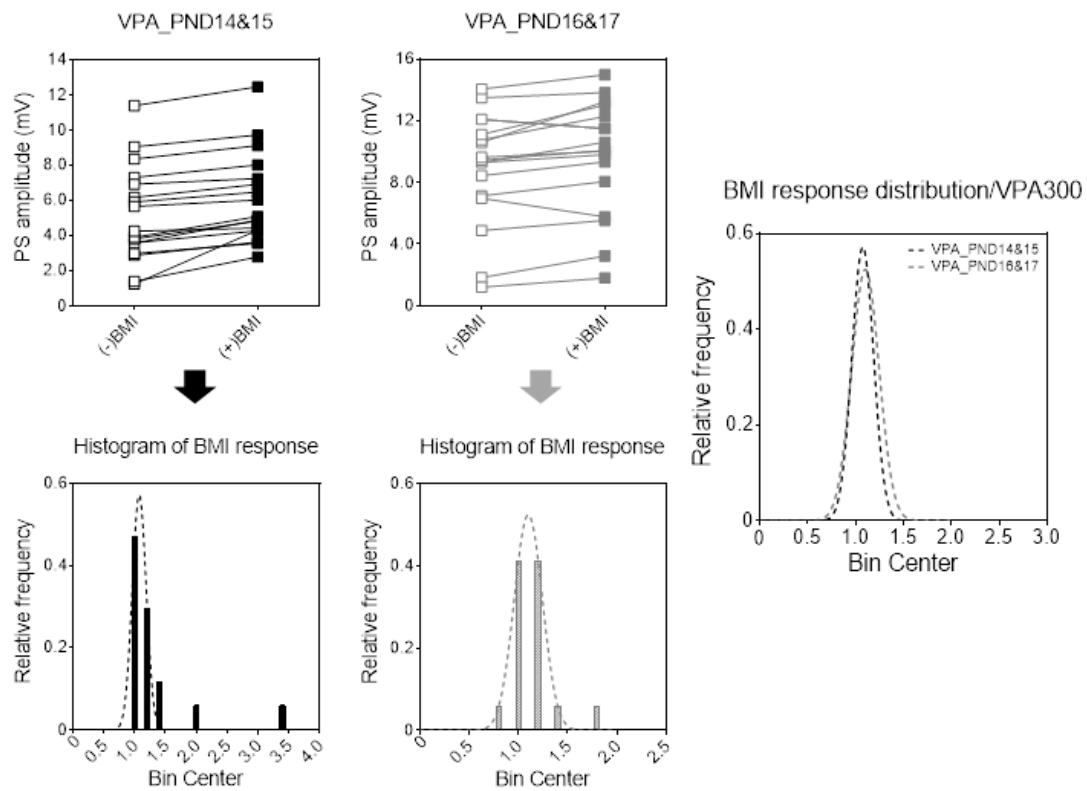


図 9. 開眼前期 (PND14-15) および開眼期 (PND16-17) における VPA300 群から得られた $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) 存在下、非存在下での集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$)、および BMI による増強率の分布近似曲線

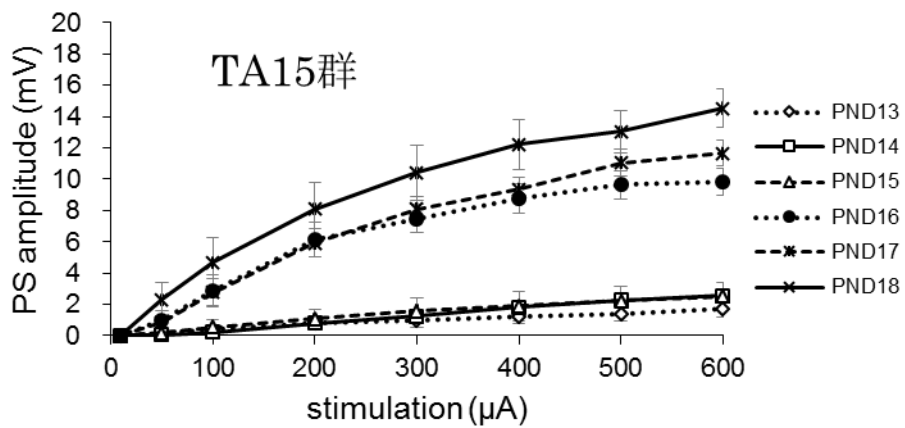
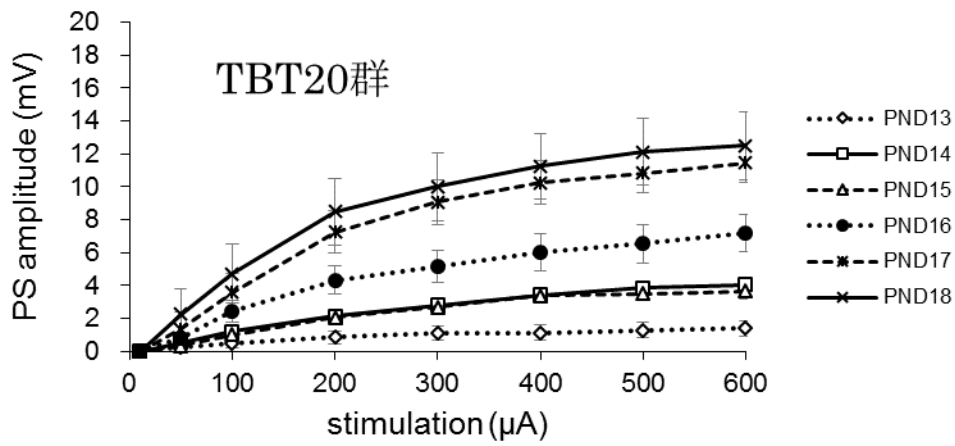
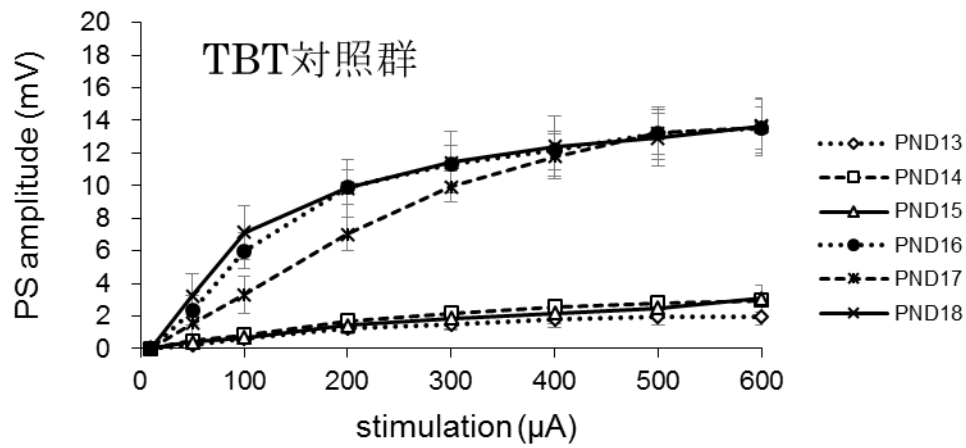


図 10. TBT (20 mg/kg)、TA (15 mg/kg) を胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた集合スパイク電位 (PS) の刺激応答性。

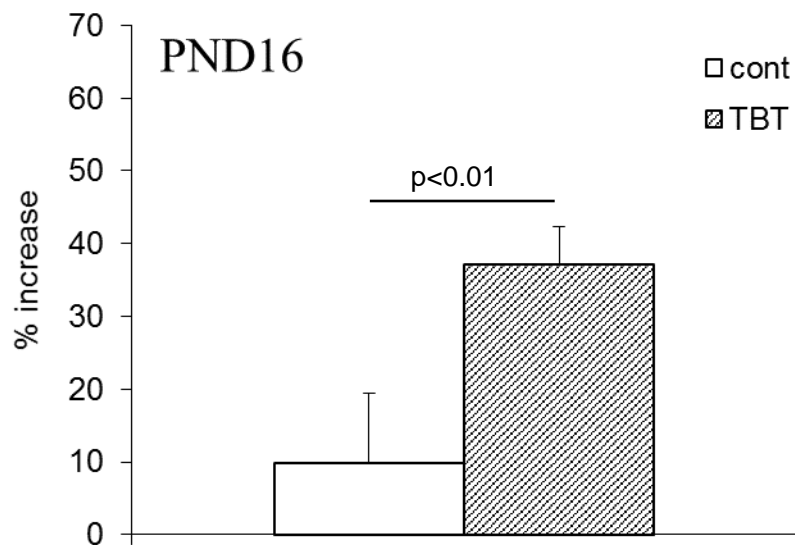
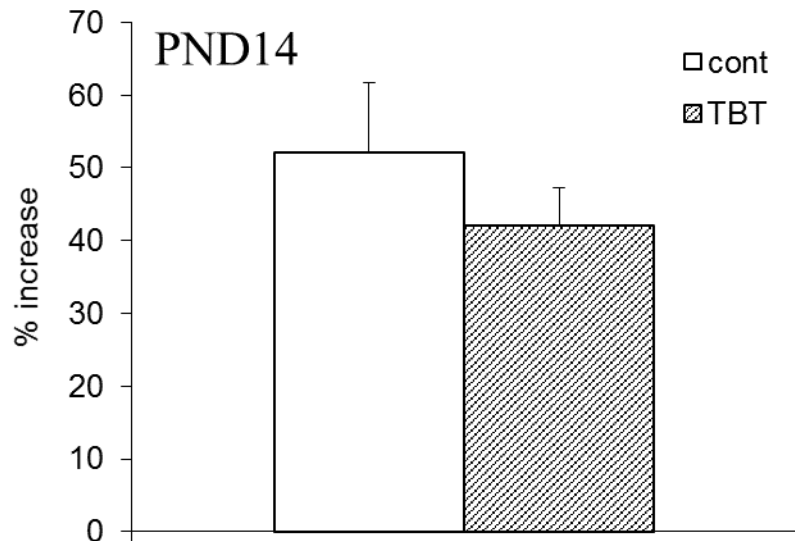


図 11. PND14 および PND16 における集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$) に対する $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) の増強作用とこれに対する TBT 胎生期曝露の影響。変化率 (%increase) は次式で求められている。
 $\%increase = (BMI \text{ 存在下の応答} / \text{非存在下の応答} - 1) \times 100$

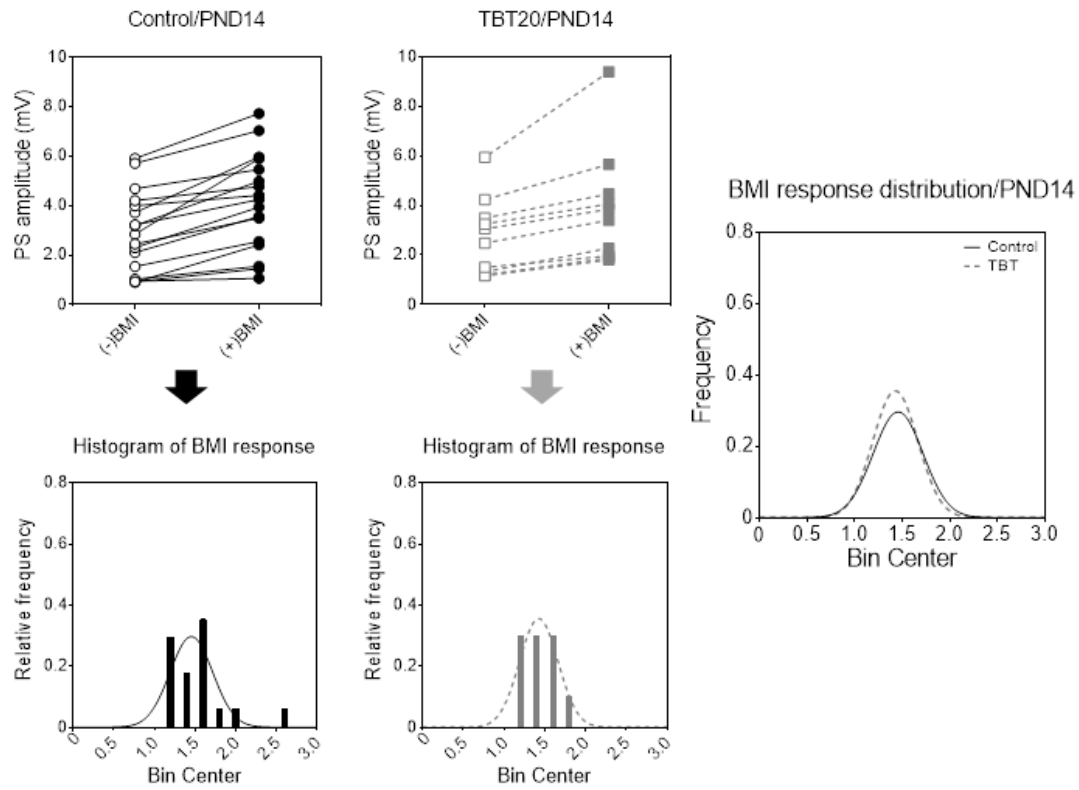


図 12. 生後 14 日齢における対照群と TBT20 群から得られた $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) 存在下、非存在下での集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$)、および BMI による増強率の分布近似曲線。

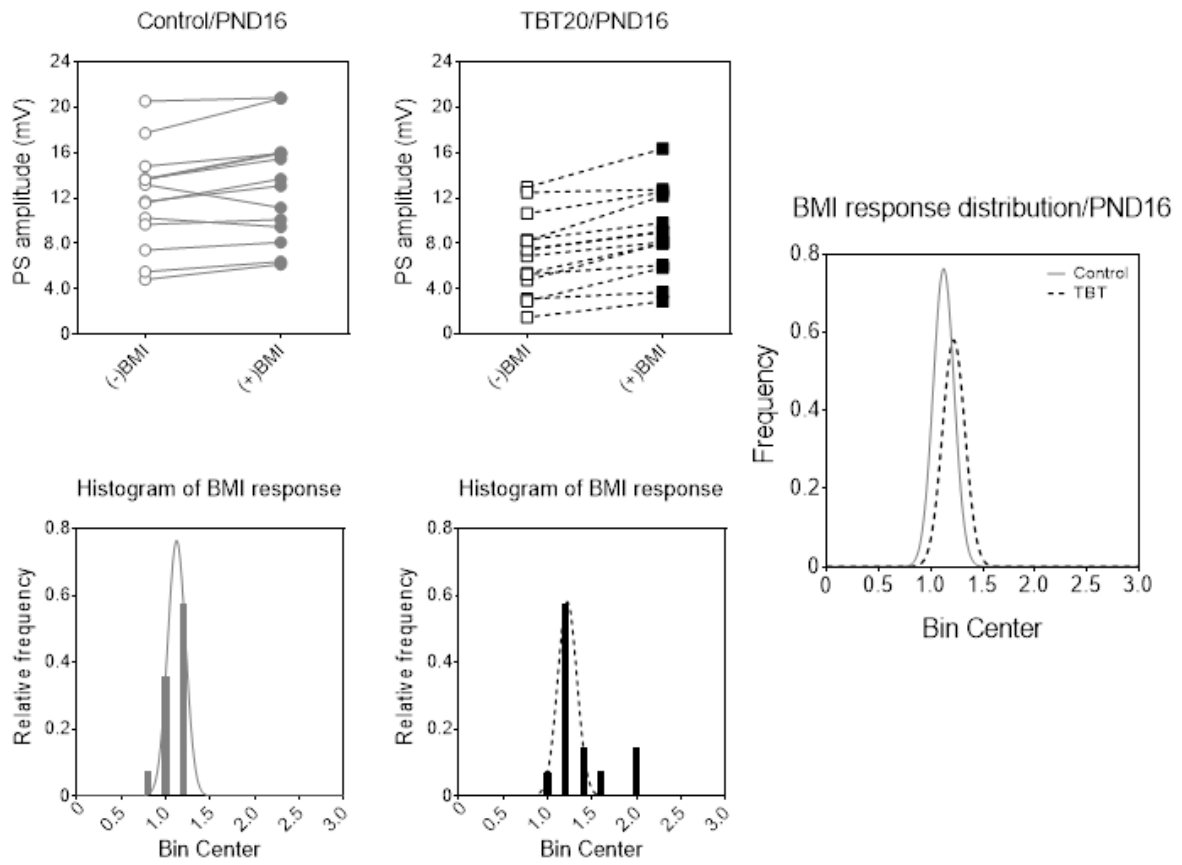


図 13. 生後 16 日齢における対照群と TBT20 群から得られた $GABA_A$ 受容体拮抗薬ピククリン (BMI) 存在下、非存在下での集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$)、および BMI による増強率の分布近似曲線。

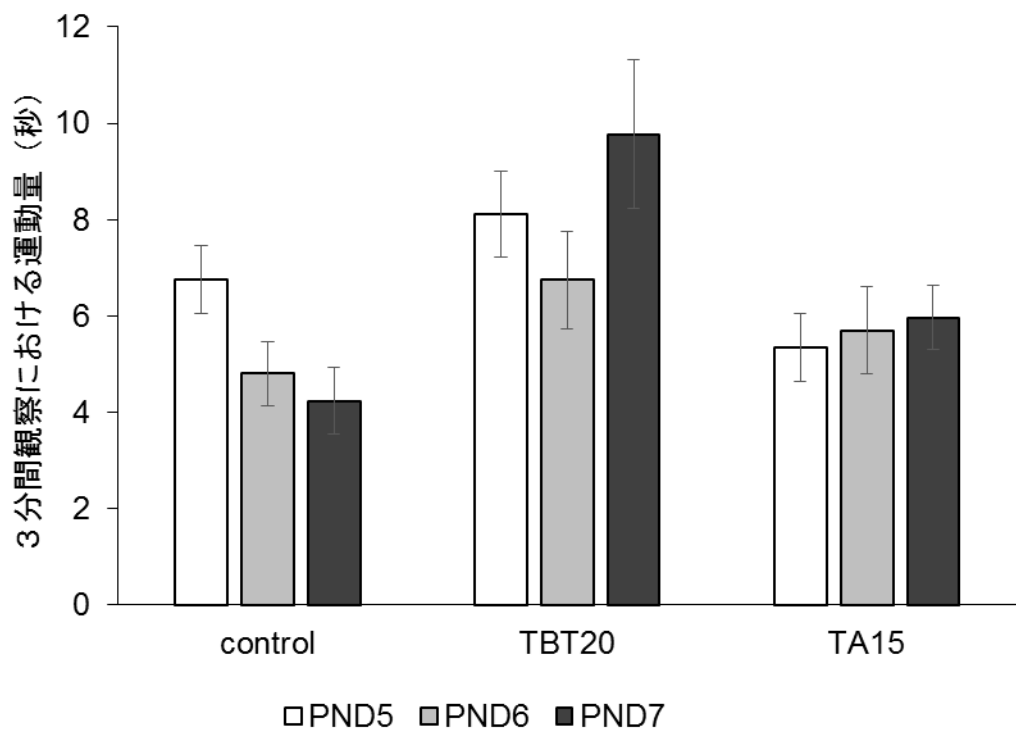


図 14. TBT、TA を胎生期に曝露された仔ラットの PND 5 から PND 7 までの間の不随意運動量の変化。不随意運動は 3 分間における運動量を秒数で示した (mean±SEM)。

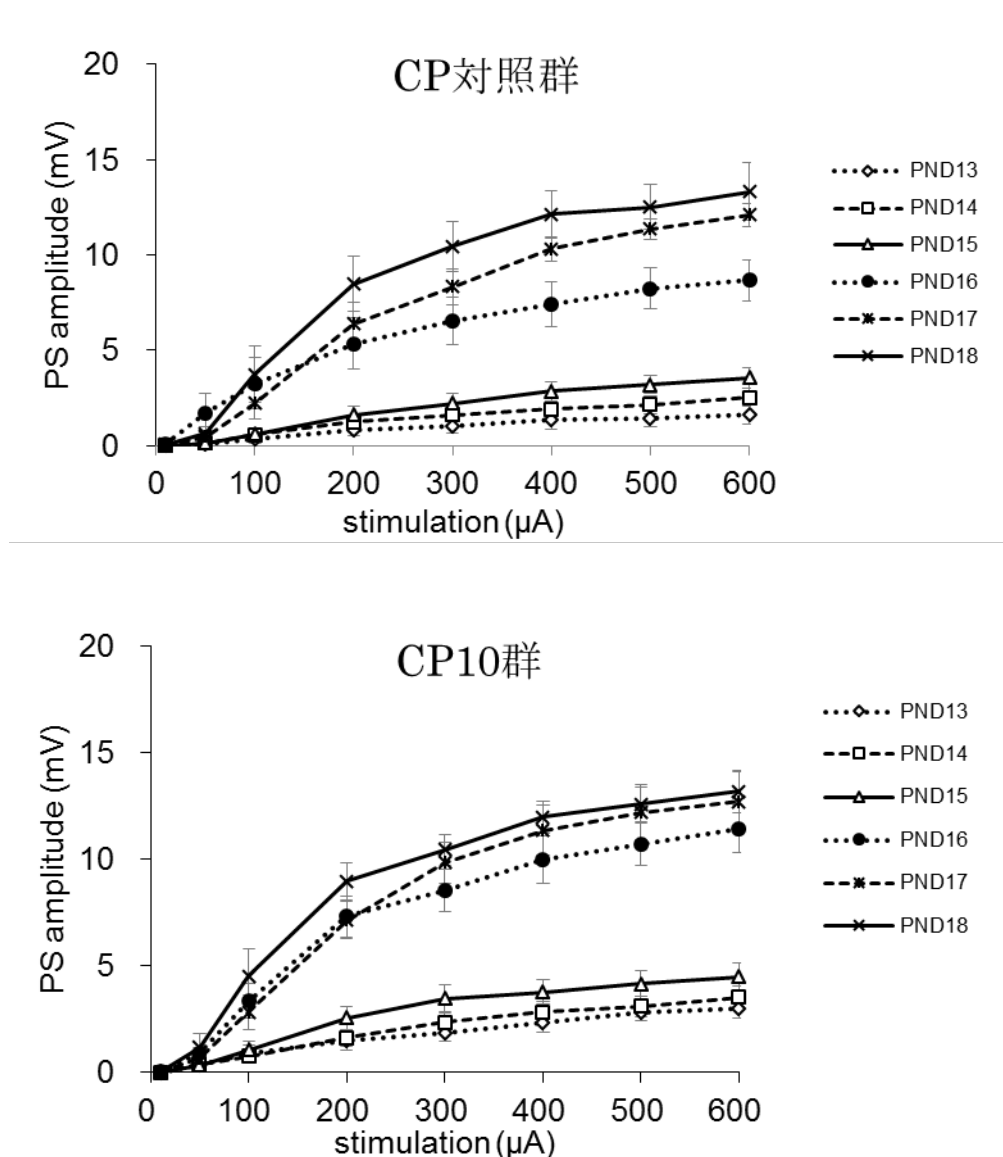


図 15. CP (10 mg/kg) を胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた集合スパイク電位 (PS) の刺激応答性。

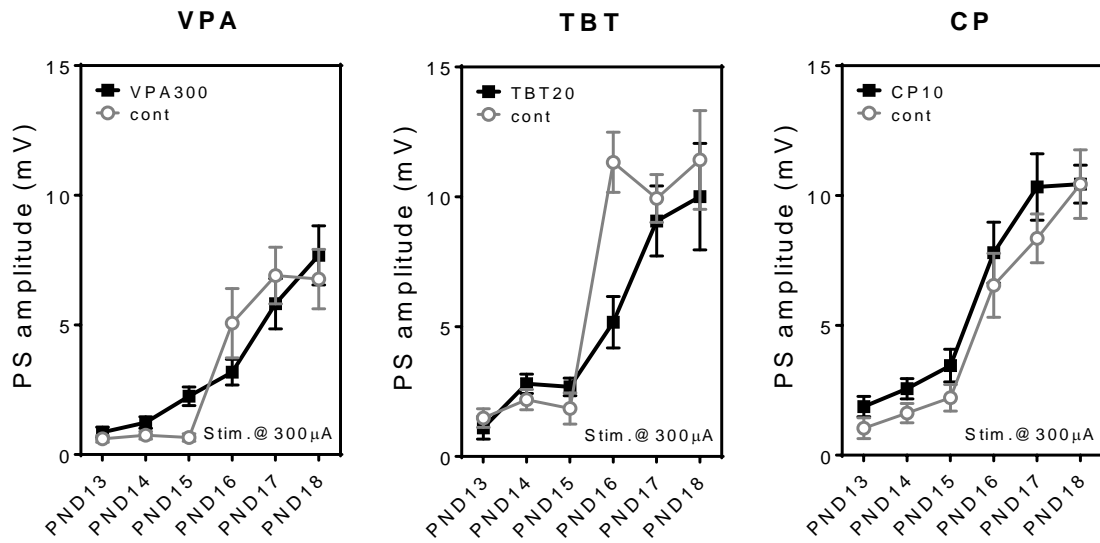


図 16. VPA、TBT、および CP を胎生期に投与された仔ラットから得られた集合スパイク電位 (PS) の振幅と生後発達との関連性。
刺激電流値 300 μ A で誘発された PS を各対照群と比較した。