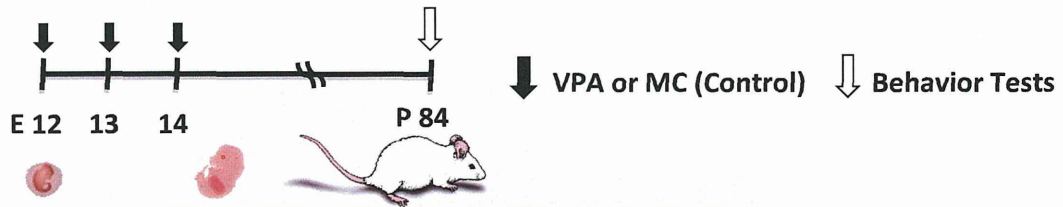


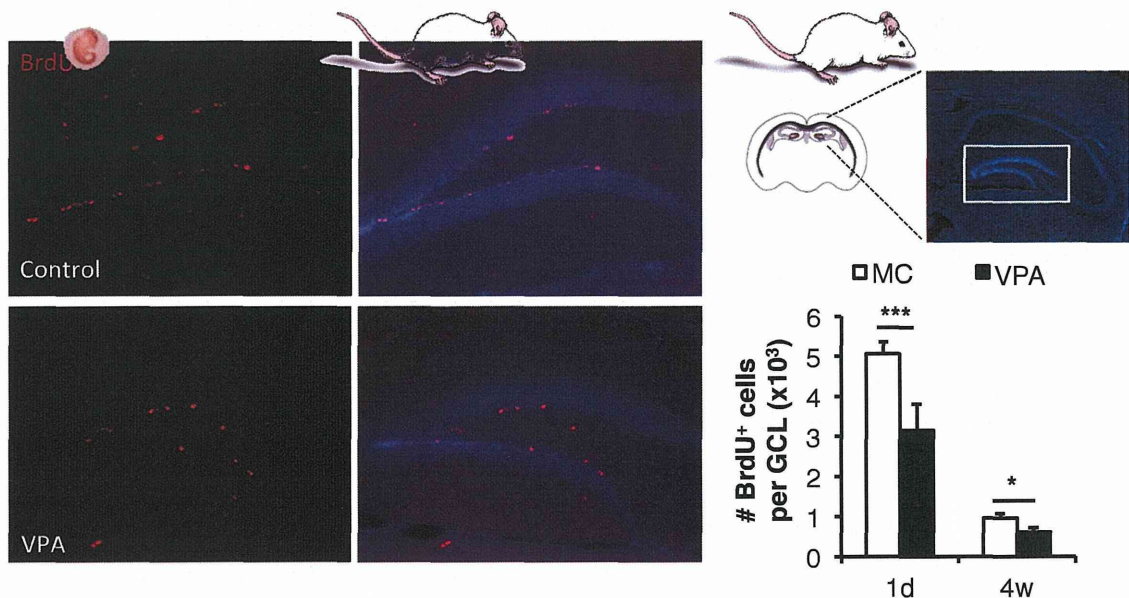
胎仔期バルプロ酸曝露により誘発される成体マウス記憶障害



Test Name	Behaviors Assessed	Results
Open Field	general activity level, gross locomotor activity, exploration habits	total distance, center time, move episode, distance per movement
Light/Dark Transition	anxiety-like	dark distance, dark time, transition, light distance, light time, latency to enter light
Elevated Plus Maze	anxiety-like	total distance, open time, close time, open entry, close entry, total entry
Pre-pulse Inhibition	sensorimotor gating	pre 90db/120db, pre 95db/120db, pre 100db/120db
Tail Suspension	depression	immobility time
Y-Maze Alternation	learning and memory	correct alternation
Contextual/Cued Fear Conditioning	learning and memory	conditioning, contextual, cued

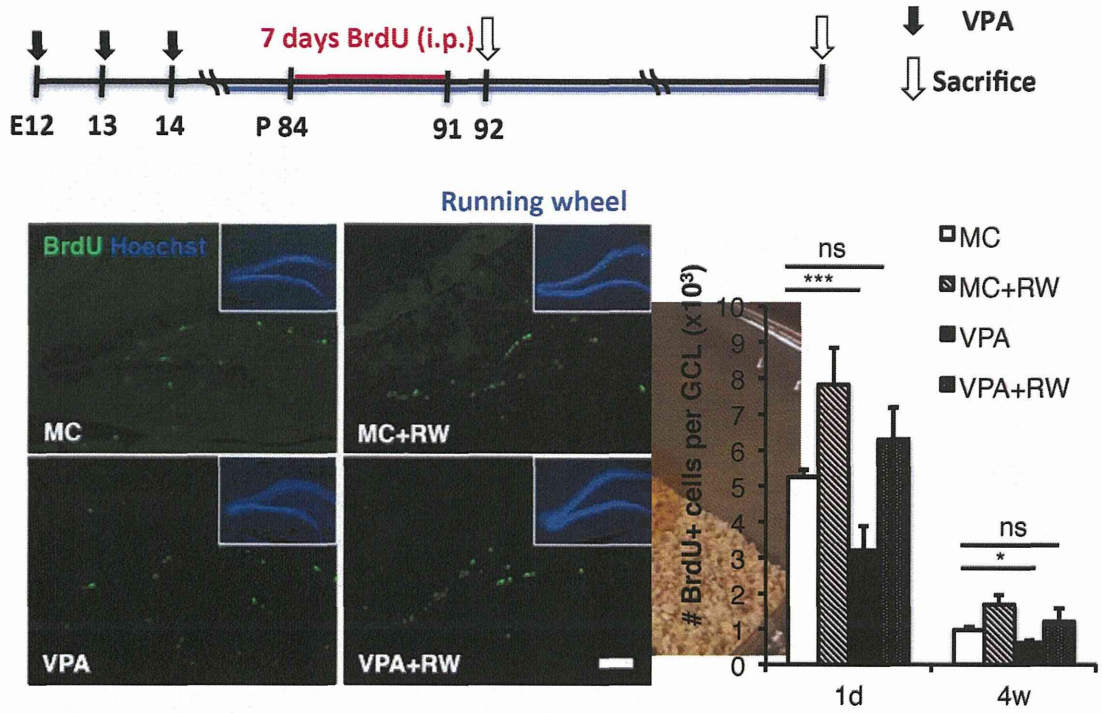
5

胎仔期バルプロ酸曝露による成体マウス海馬での神経幹細胞の増殖と新生細胞の生存の低下

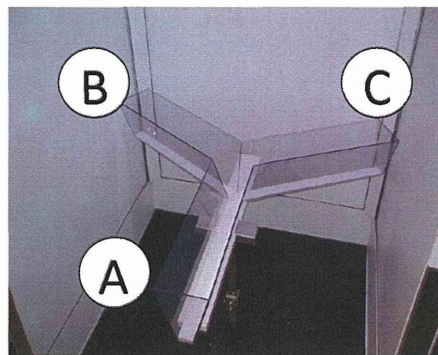


6

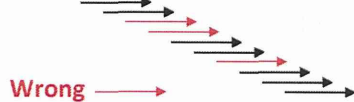
運動によるVPA曝露マウスのニューロン新生回復



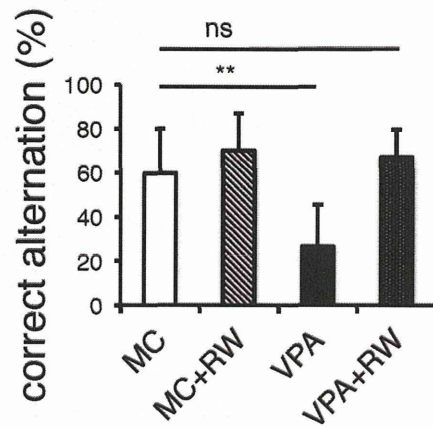
運動によるVPA胎仔期暴露マウスの学習記憶障害の改善



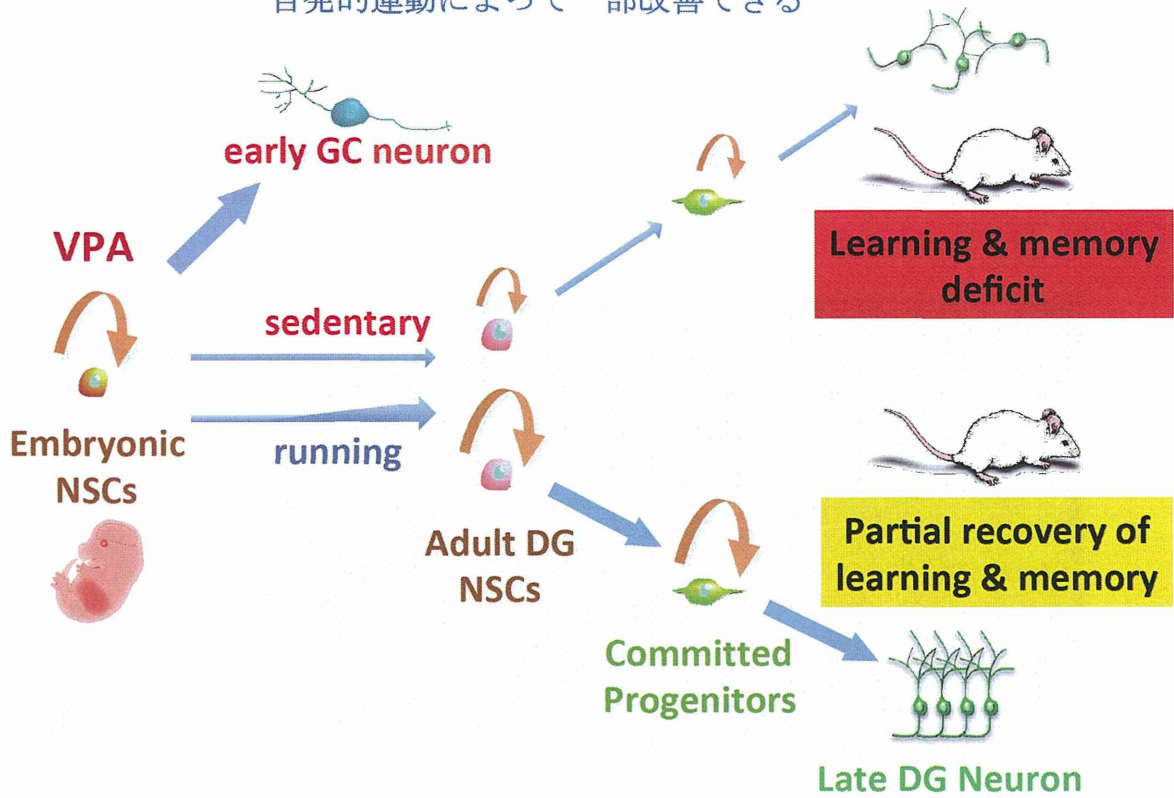
Exam 「A-B-C-A-C-A-B-C-B-A-C-B」



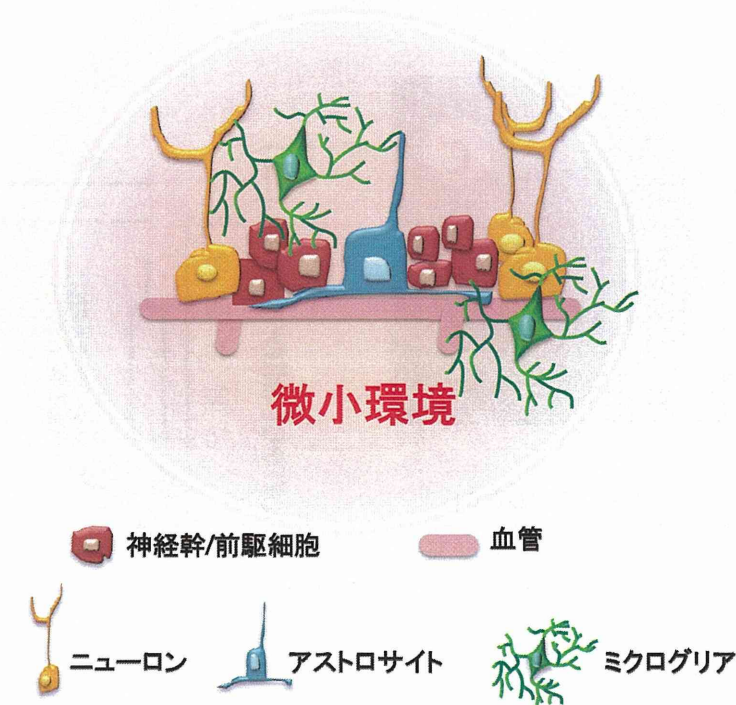
YM-Alternation = 70%



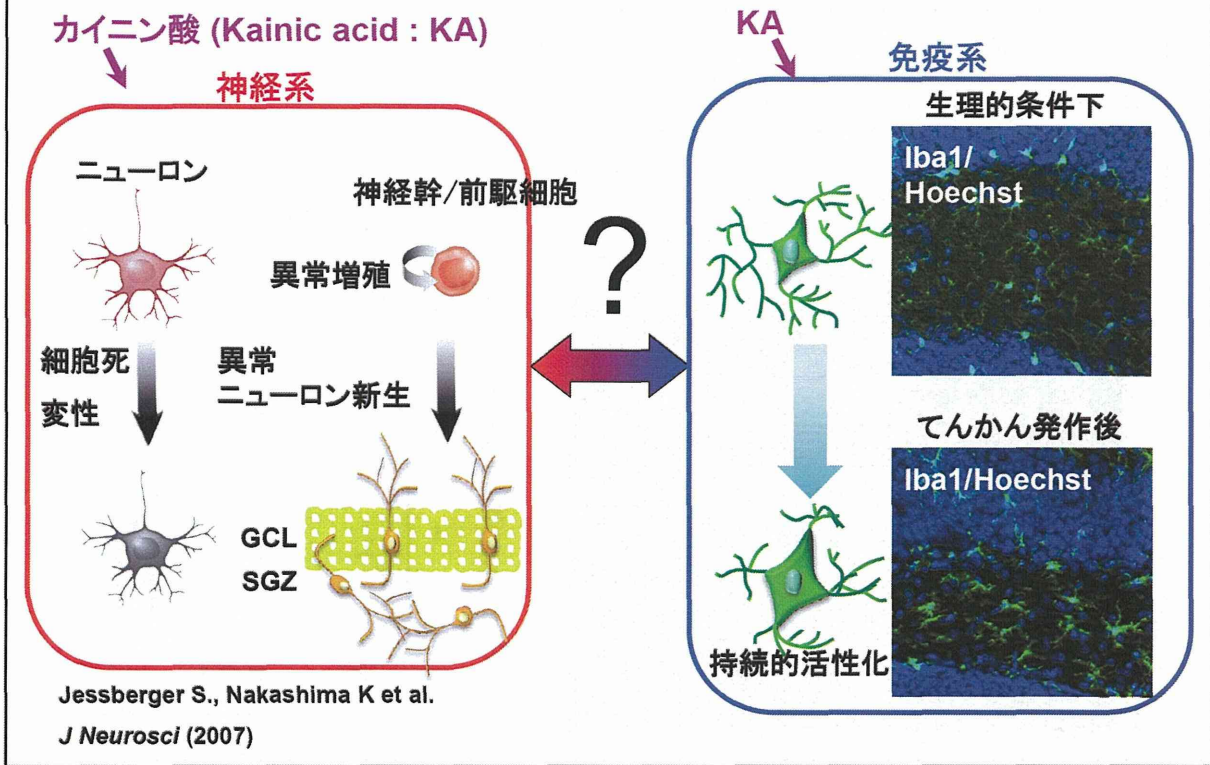
胎生期バルプロ酸曝露は記憶障害を引き起こすが、
自発的運動によって一部改善できる



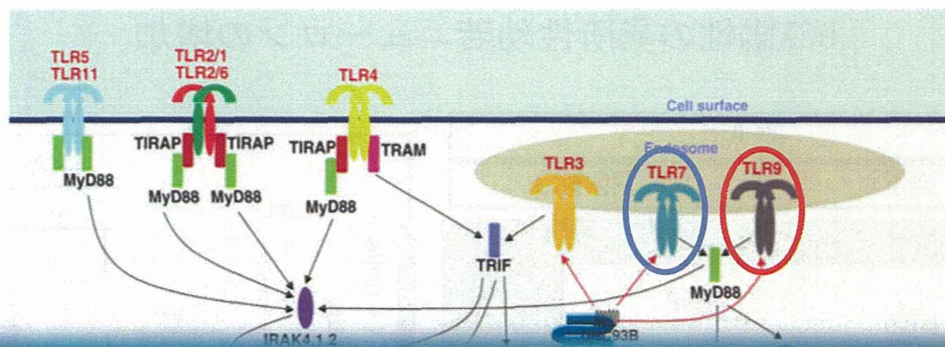
異なる条件下における海馬ニューロン新生の変化



てんかん発作後の異常ニューロン新生とミクログリア活性化



ミクログリアの活性化を誘導するTLRシグナル伝達機構

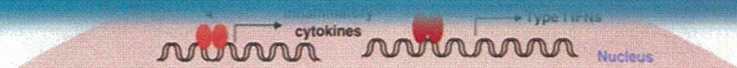


HMGB1はDNAと結合しTLR9の内因性リガンドとして作用する

• A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA.
Ivanov S et al. *Blood* (2007)

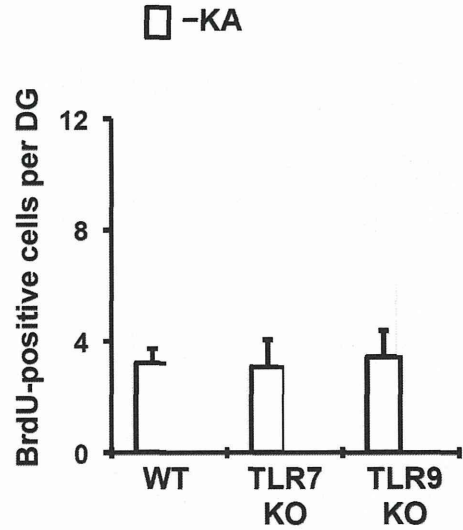
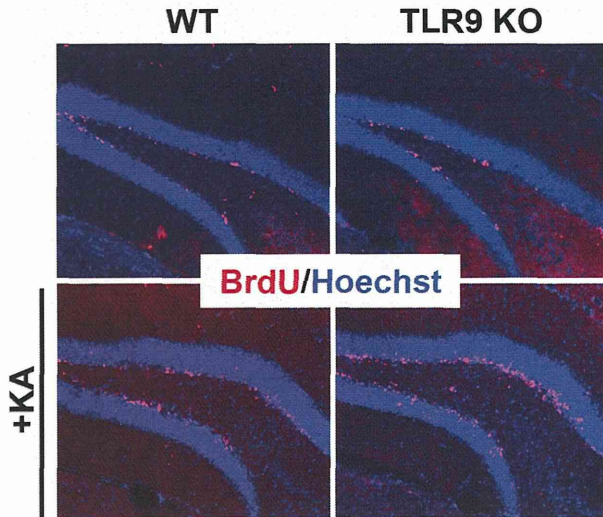
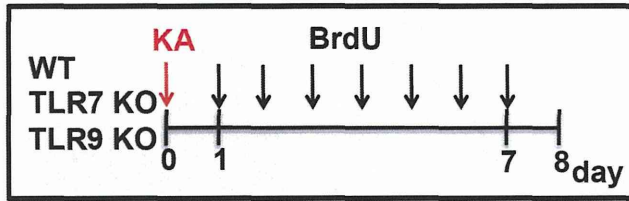
変性・死ニューロンからHMGB1が放出される

• HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain.
Kim JB et al. *J Neurosci.* (2006)

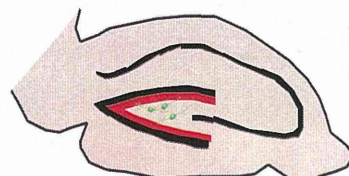
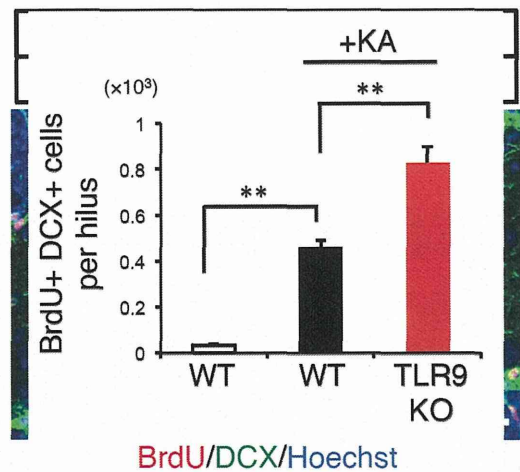
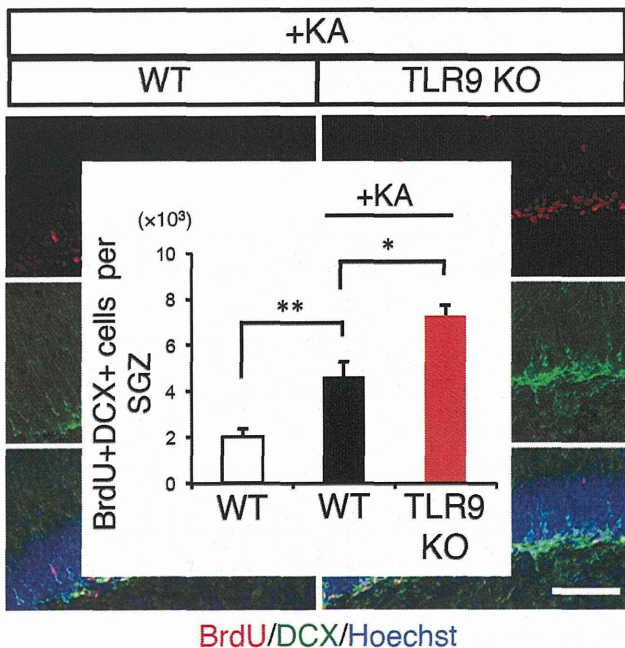


Kumar H et al. *J Mol Med* (2011)

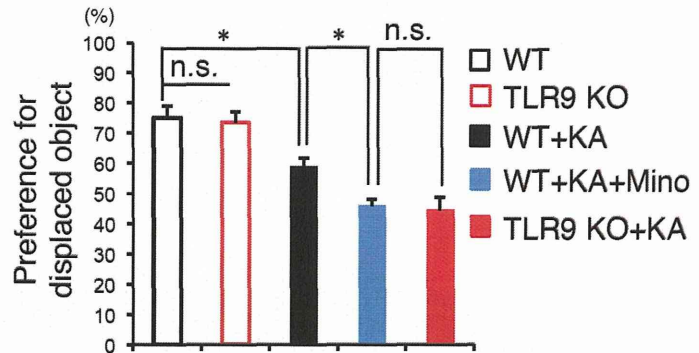
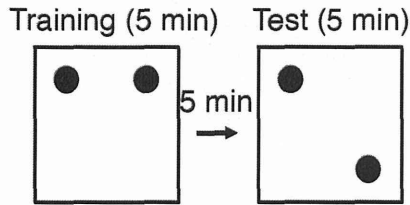
TLR9遺伝子欠損マウスにおけるてんかん発作後の BrdU陽性細胞の増加



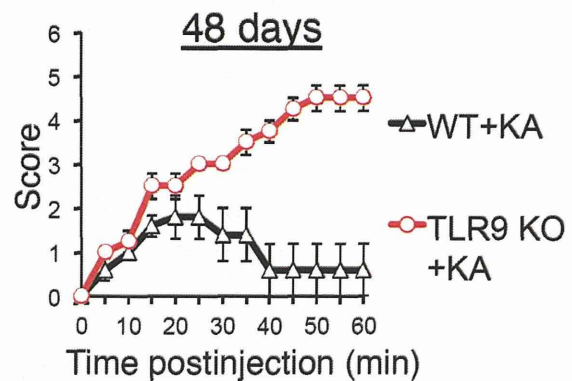
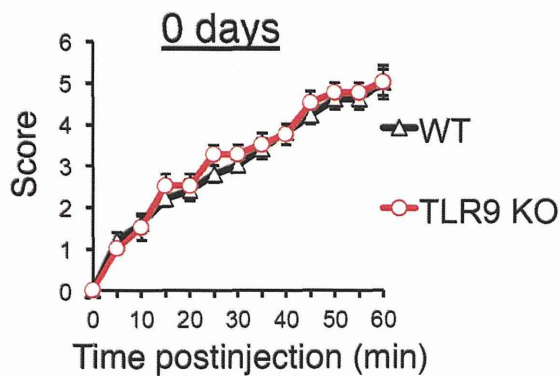
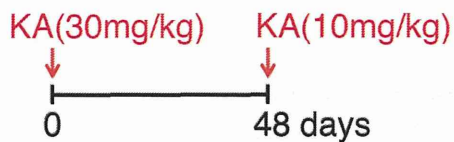
TLR9遺伝子欠損マウスにおけるてんかん発作後の DCX陽性の異所性幼若ニューロンの増加



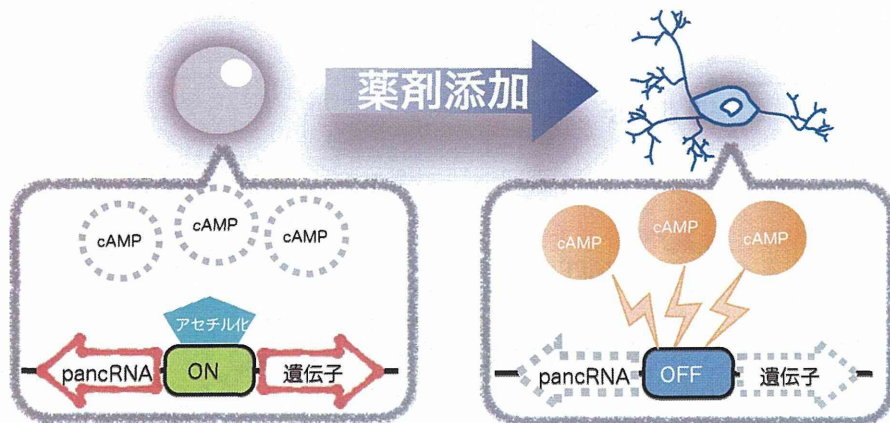
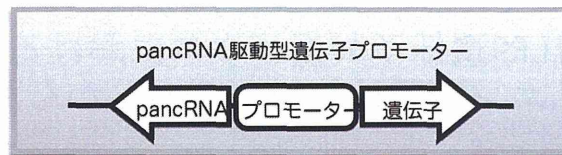
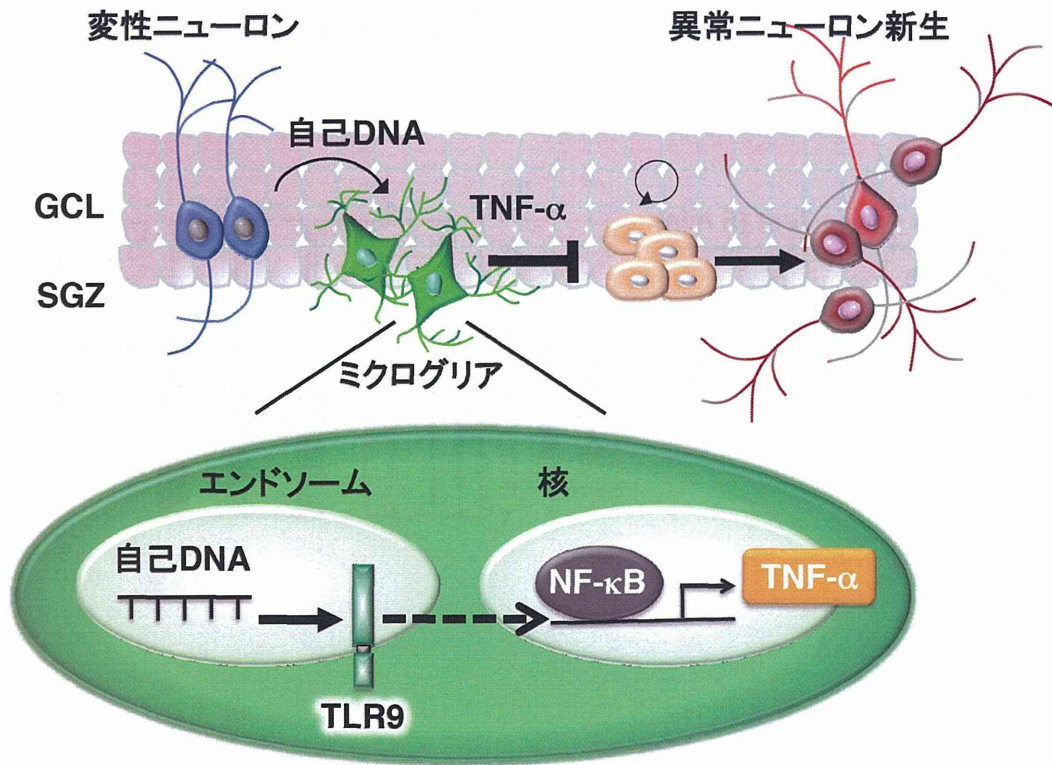
ミクログリア不活性化及びTLR9欠損によるてんかん発作後の物体位置認識記憶の低下



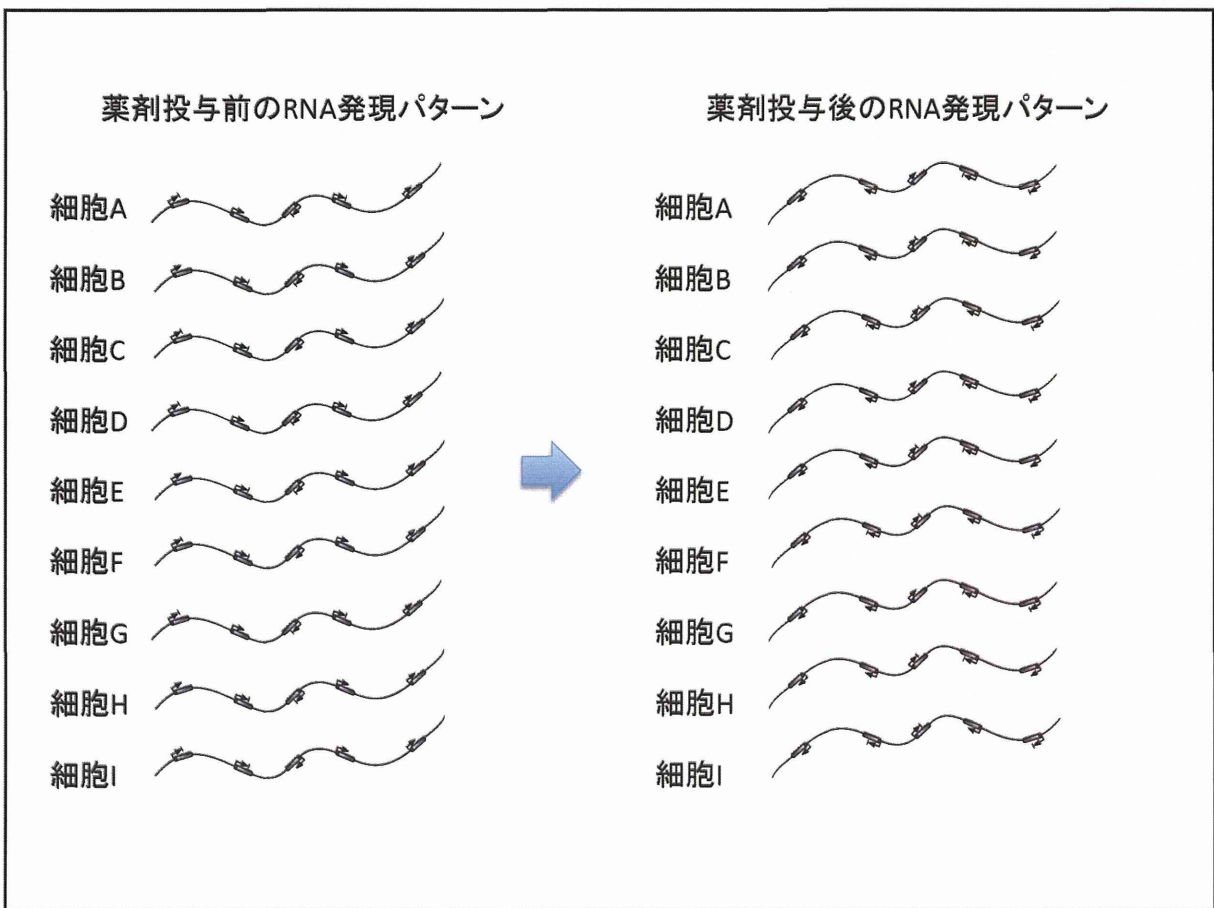
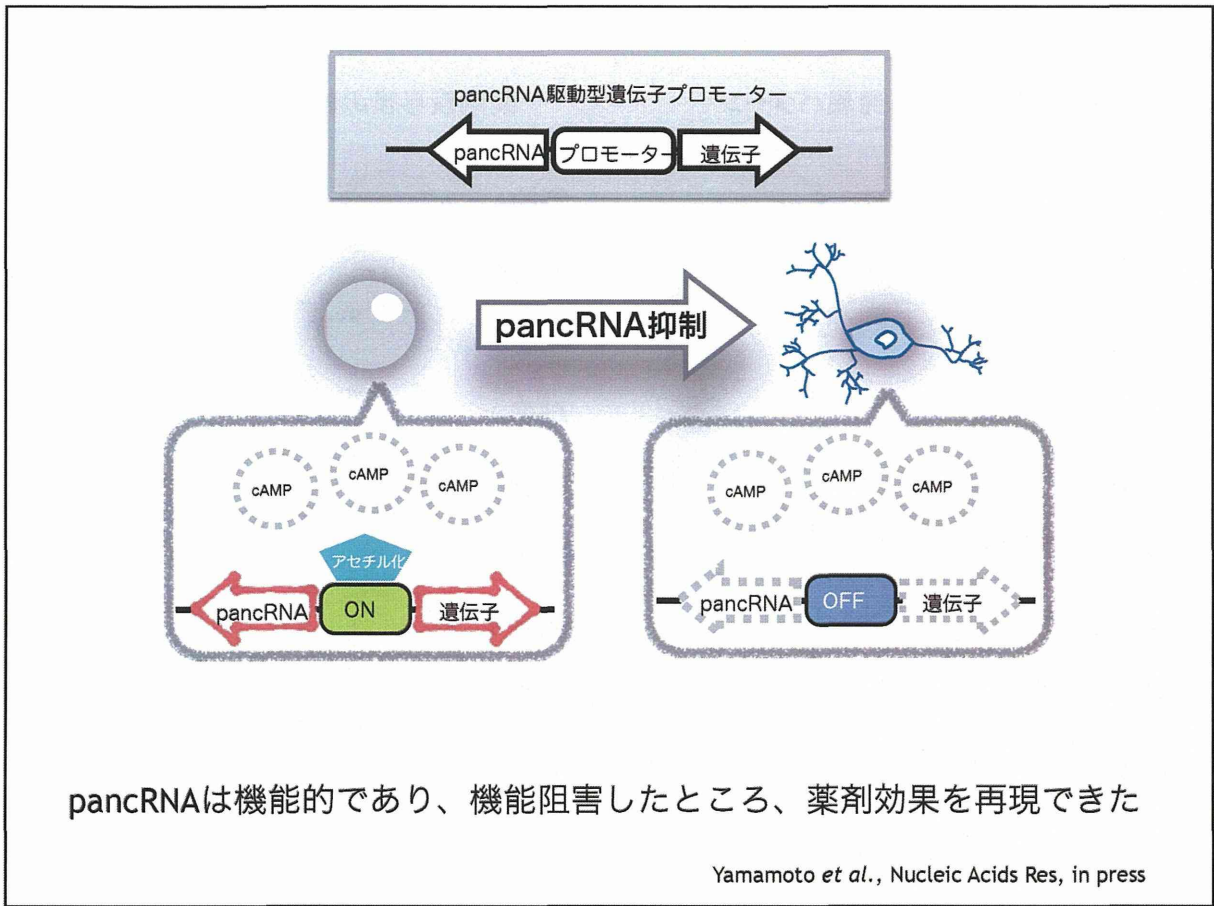
TLR9遺伝子欠損マウスにおける低濃度のカイニン酸再投与によるてんかん再発作の増悪



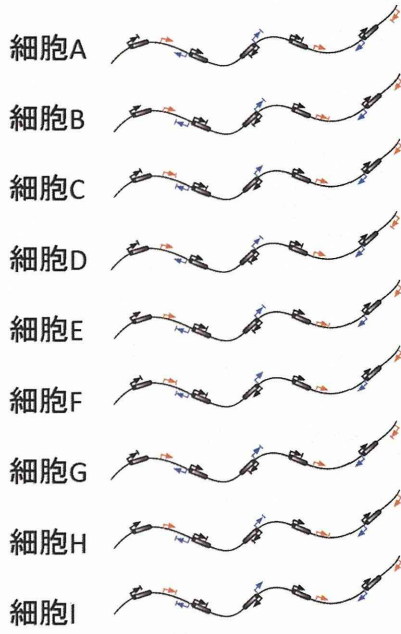
神経系-免疫系のクロストークによる
成体ニューロン新生恒常性保証のメカニズム



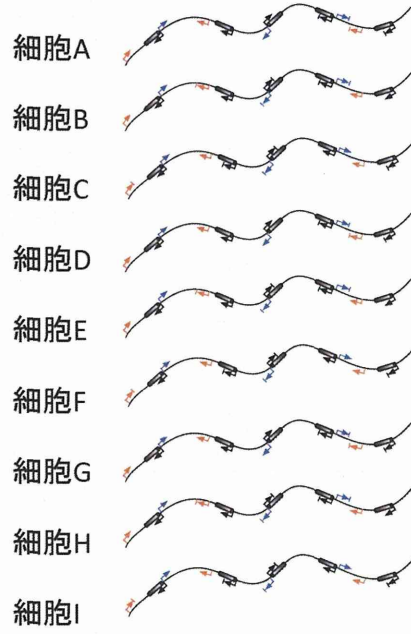
神経モデル細胞（ラットPC12細胞）において、pancRNAが発現変化を示す



薬剤投与前のRNA発現パターン



薬剤投与後のRNA発現パターン



H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、
その毒性学的評価系構築に資する研究
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

研究分担者 富永 貴志（徳島文理大学 准教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素 (VSD) を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでに発生初期の投与で異常を起こすバルプロ酸、ビスフェノール A 暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出しているが、その生理機構を明らかにし、毒性評価指標としての有用性が高い計測値を探索した。特に興奮/抑制バランス (E/I バランス) の変調を精度よく検出出来る可能性がある系として、GABA 受容体が関係する各種の長期・短期可塑性を詳細に検討した。また、新規共焦点顕微鏡を利用した *in vivo* 系での計測系の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の利用、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、大規模神経回路活動解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行なっている。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、*ex vivo* 実験系（スライス標本）でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行い、毒性評価上の指標を設定することを目的とする。

B. 研究方法

(1) バルプロ酸、ビスフェノール A 投与の発

達期投与による遅発毒性の検討（中島・種村らとの共同研究）

妊娠中の母マウスにバルプロ酸、ビスフェノール A を決められたプロトコルで投与し、生まれた仔について大人になった後に海馬神経回路の機能評価を行った。

(2) 海馬 CA1 野における GABA 受容体の関与する可塑性調節機構についての光計測による解析
マウス海馬 CA1 野の基本的な神経回路動作をリストアップするために、各種の刺激パターンに対する応答を計測し、GABA 受容体の関与について検討した。

(3) 各種光計測技術の開発-網羅的計測、遺伝子改変動物の利用、偏光などを使った新規の計測法を開発している。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、徳島文理大学における「徳

島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規程」にのっとり、あらかじめ実験計画書を同大学実験動物委員会、倫理委員会へ提出し、承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

(1) マウス海馬神経回路での基準となる基礎的な信号パターンの設定を行った。特に、発生-発達に関わる重要な指標である、興奮-抑制(E/I)バランスの変動を評価できる標準的な回路パターンの設定を行った。この一部は胎生期バルプロ酸投与で起きるエピジェネティックな回路機能の変化の検出に有効に用いることができた(Juliandi ら, Stem Cell Rep 2015)。これをさらに拡張したモデルを用いてビスフェノールの胎生期幼若暴露の遅発毒性発現系を解析し興奮性の閾値に関する知見を発見している。これら基準を毒性指標として用いるため、海馬神経回路で急性毒性での影響検出を行い、神経回路の変調を示す値の設定を検討中である。この際、シータ波等の回路固有の神経活動を利用することを想定している。

(2) 海馬 CA1 野での結果から、シータ周期で引き起こされる新規の GABA 依存性の短期可塑性を見出した。これは、高頻度刺激で引き起こされる短期可塑性と合せて、周期的な神経活動が抑制性の回路を介して回路演算を調節する機構と思われる。今後、バルプロ酸、ビスフェノールなどによってどのように変調が起こるのかについて調べる予定である。

一方、他の皮質回路(嗅内野、梨状皮質、傍梨状核、感覚野、運動野など)では、基準となる信号パターンが殆ど無いといって良い。このためこの系での基準パターンの設定に着手し、特に周期応答に着目して解析している。嗅内野-梨状皮質間、梨状皮質-傍梨状核間の特徴的な周期的神経活動を再現性よく観測することに成功しており、このパターンからのズレを定量的な指標にすることを検討している。この系も GABA 受容体阻害剤に対して非常に鋭敏に、またダイナミックに応答するので、興奮-抑制バランスの変化に対して鋭敏に反応する可能性がある。

(3) In vivo 系での神経回路計測系の開発、膜電位依存性蛋白の使用を含む新規イメージング法の開発を進めている。

D. 考察

バルプロ酸、ビスフェノールの遅発毒性においてはこれまで、興奮-抑制バランスの変化が見られている。これを再現性よく、鋭敏に測定するためには、興奮-抑制バランスによって回路動作が大幅に変わる神経回路指標を設定する必要がある。シータ周期のような周期的な神経活動の変調なども含め検討をすすめる。

E. 結論

今後とも光計測法を軸に、ビスフェノール A を始めとする神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは、重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Tominaga T and Tominaga Y Paired burst stimulation causes GABA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. Front. Cell. Neurosci. 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009 (2016)

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports: 5(6)996-1009. doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.012 (2015)

2. 学会発表

Tominaga T and Tominaga Y A spatio-temporal analysis of the GABA_A receptor-dependent and independent membrane potential response to a gamma-band burst stimulus in area CA1 of hippocampal slice: A VSDI study 758.05/B4 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience, 2015

富永貴志, 富永洋子, 五十嵐勝秀, 大塚まき, 古川佑介, 菅野純, 種村健太郎 Neural circuit functional assay with voltage-sensitive dye imaging in hippocampal slices; effect of maternal bisphenol A 「膜電位感受性色素による神経回路機能のアッセイ系の構築—海馬スライスとビスフェノールA」第53回日本生物物理学会年会 The 53rd Annual Meeting of the BSJ (金沢大学) 2015

富永貴志 内藤豊 Hodgkin-Huxely type analysis of voltage-dependent potassium currents in Paramecium 「ゾウリムシの電位感受性 K チャネルのホジキン—ハックスレー型の解析」日本動物学会 第86回 新潟大会 2015

富永貴志 富永洋子 VSD-imaging of 100 Hz stimulation induced GABA_A independent perisomatic membrane potential response in area CA1 of hippocampal slice 「海馬スライス標本で CA1 野で見られる 100Hz 刺激によって引き起こされる GABA_A 受容体以外の細胞体近傍での膜電位応答の可視化」第 38 回日本神経科学学会 (神戸) 2015

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。

光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

富永 貴志 (徳島文理大学・神経科学研究所)

平成27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)

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

-平成27年度班会議プログラム (案) -

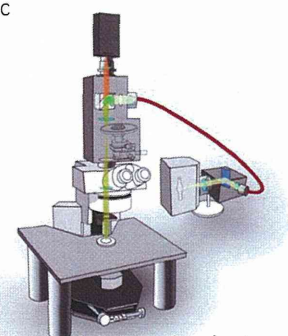
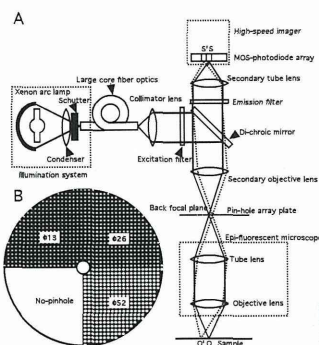
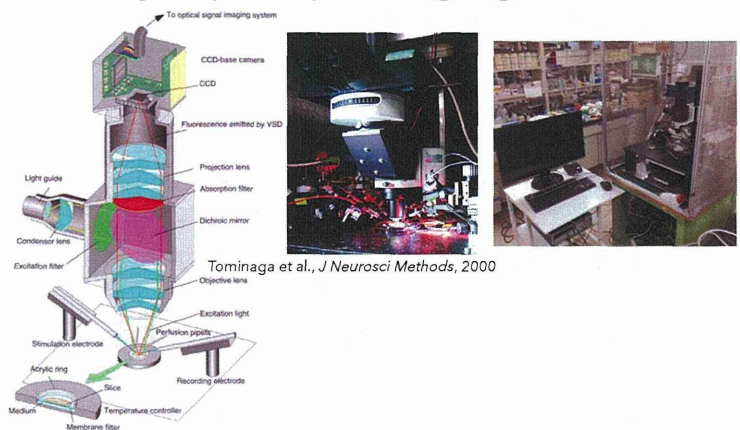
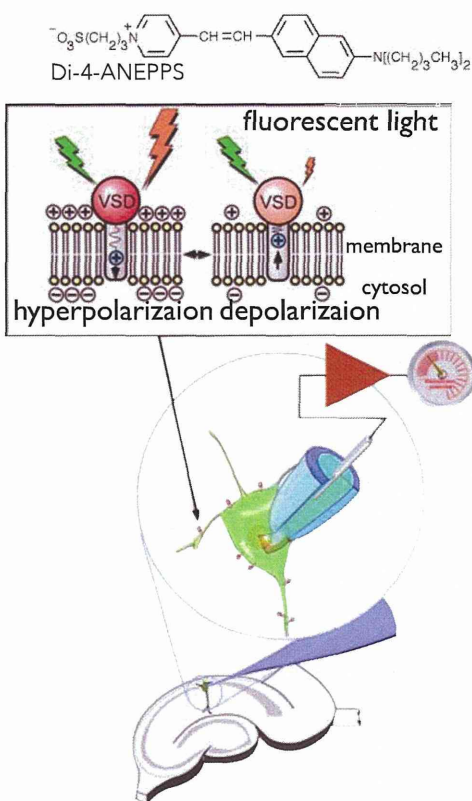
日時：平成28年 3月9日 (水) 13:45-16:40

場所：東京国際フォーラム会議室G604

〒100-0005 東京都千代田区丸の内3-5-1

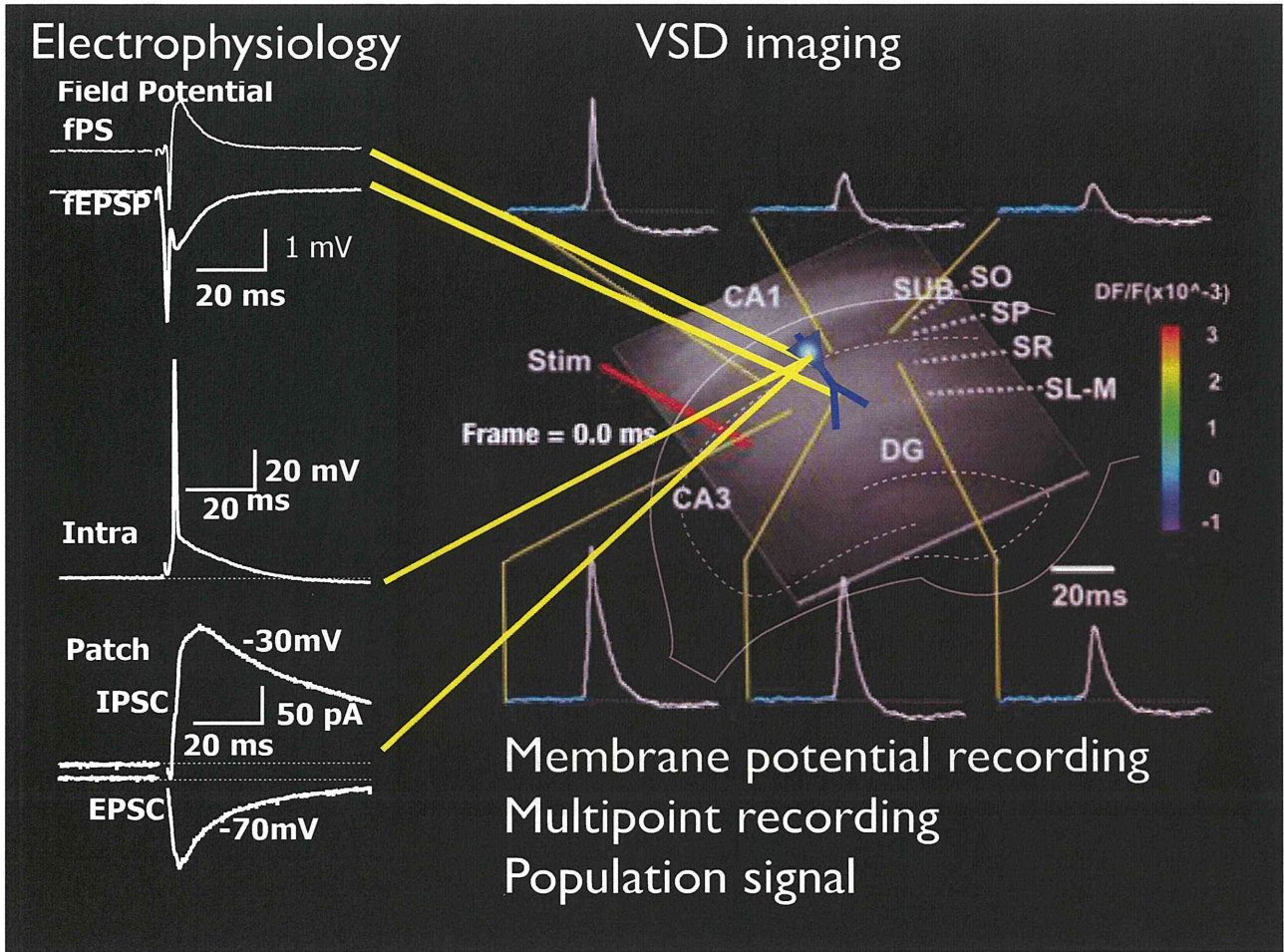
(電話03-5221-9040)

Voltage Sensitive Dye (VSD) imaging



New confocal microscope

Tominaga & Tominaga, *J Neurophysiol.*, 2013



評価指標としての神経回路応答

Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid

Berry Juliandi,^{1,2,9} Kentaro Tanemura,^{3,9} Katsuhide Igarashi,¹ Takashi Tominaga,⁵ Yusuke Furukawa,⁶ Maky Otsuka,⁴ Noriko Moriyama,⁶ Daigo Ikegami,⁷ Masahiko Abematsu,⁸ Tsukasa Santosaka,¹ Keita Tsujimura,¹ Minoru Narita,^{5,7} Jun Kanno,⁶ and Kinichi Nakashima^{1,8}

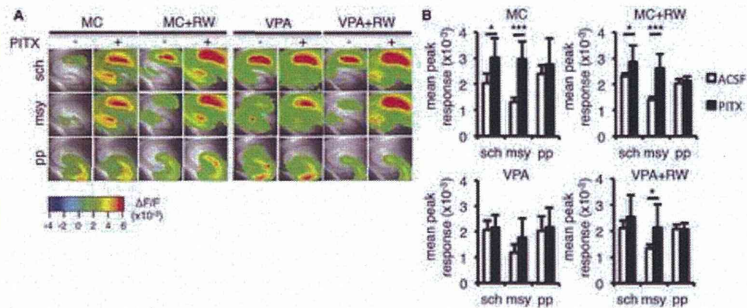
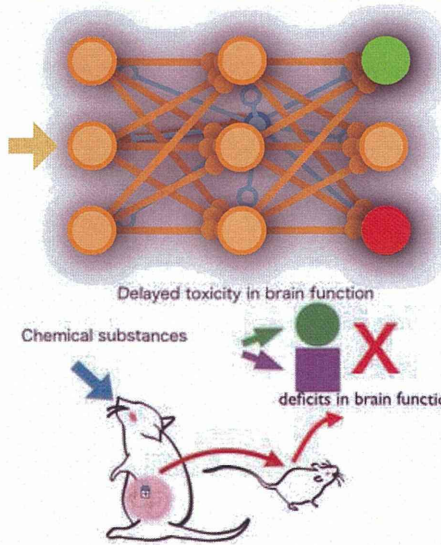
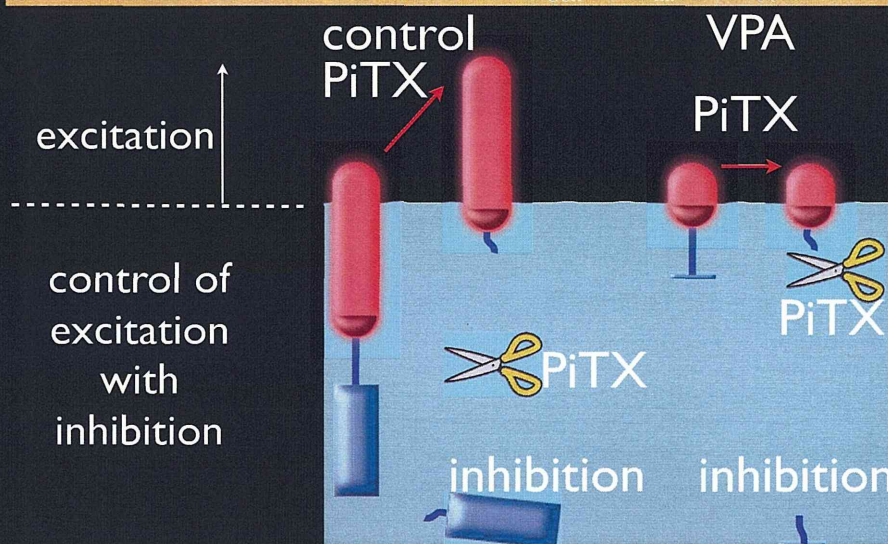
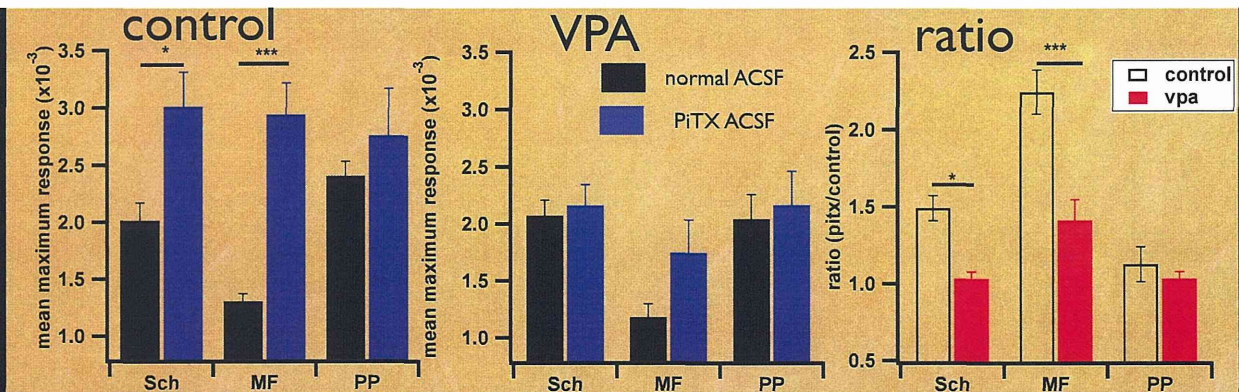
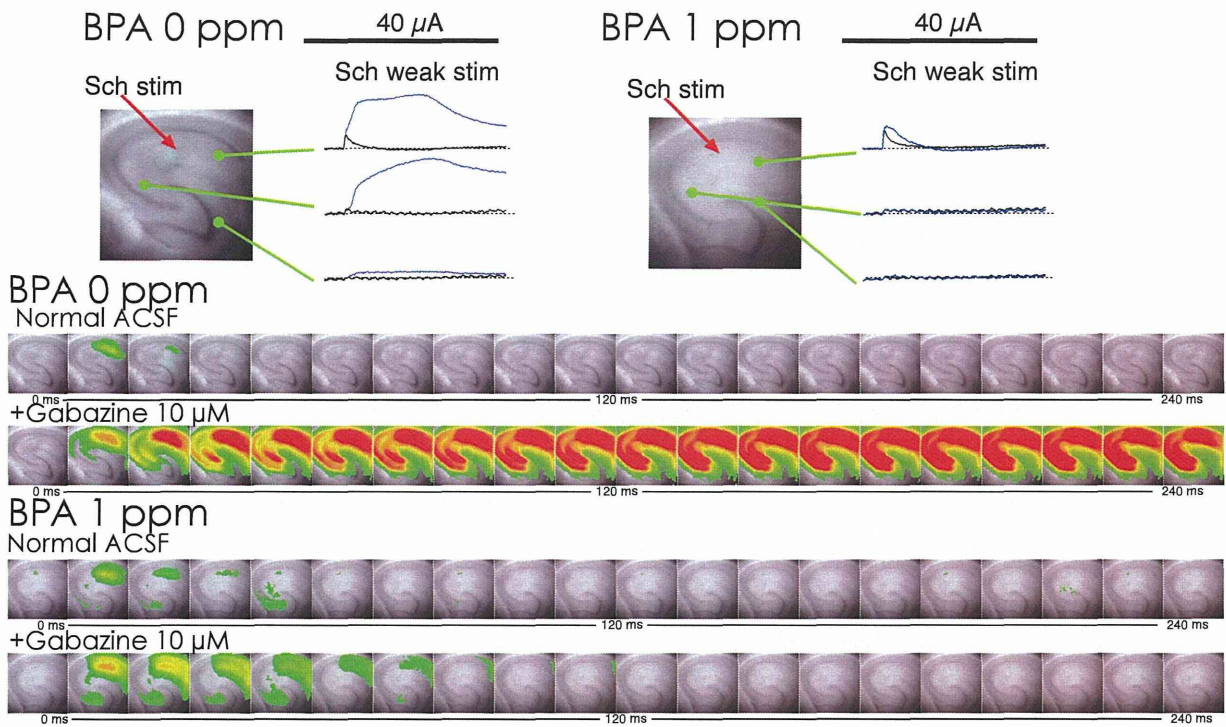


Figure 7. Voluntary Running Restores Neuronal Activity in VPA-Treated Mice

Representative pseudocolor activity map images of brain slices including the hippocampus show that voluntary running can only overcome the impairment of GABA_A receptor-mediated inhibition in the mossy fiber pathway (msy) of VPA-treated mice, after treatment with GABA_A receptor channel antagonist picrotoxin (PITX) (n = 6 for MC, n = 9 for MC + RW, n = 7 for VPA, n = 8 for VPA + RW). Electrical stimulation was applied to Schaffer collateral afferents at the CA3/CA1 border of CA1 (sch); to the granule cell layer to stimulate the mossy fiber pathway (msy); and to the molecular layer of the upper blade in the DG (pp). Quantification of the neural response in artificial cerebrospinal fluid (ACSEF), with (black bars) or without PITX (white bars; n = 6 for MC, n = 9 for MC + RW, n = 7 for VPA, n = 8 for VPA + RW). Note that although the augmentation of the neural response caused by GABA_A receptor-mediated inhibition with PITX application seen in sch and msy was abolished in VPA-treated mice, voluntary running could restore the augmentation only in the msy.

pre-natal methylcellulose (vehicle); MC + RW, pre-natal methylcellulose and postnatal running; VPA, prenatal valproic acid; VPA + RW, prenatal valproic acid and postnatal running. Data are represented as means. Error bars indicate the SD. *p < 0.05. ***p < 0.001, two-tailed t test.

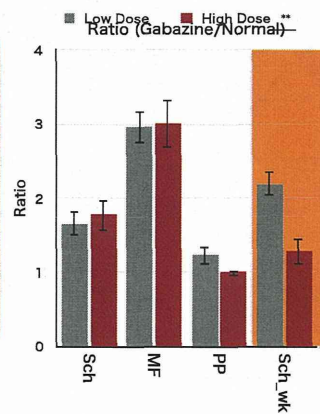
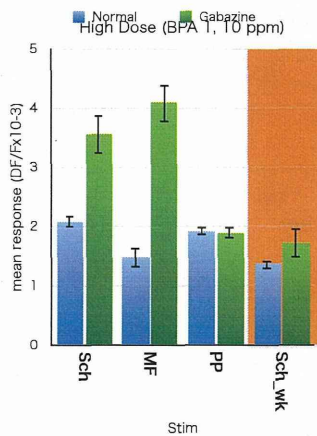
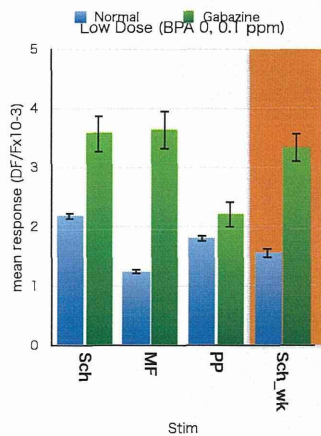




BPA 遅発影響

BPA Low Dose
(0, 0.1 ppm)

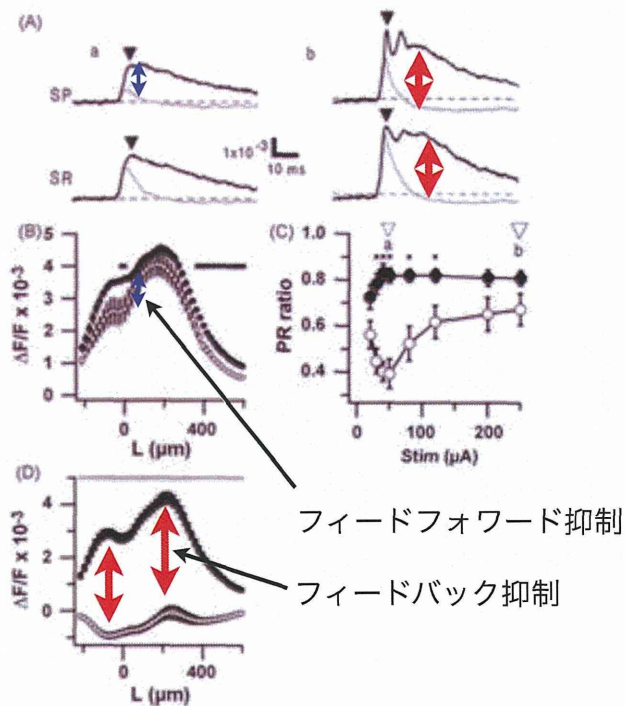
BPA High Dose
(1, 10 ppm)



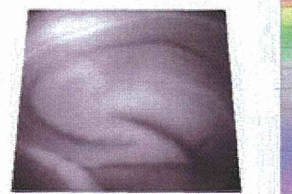
BPAの高用量群では、閾値付近の刺激強度の時にはGABA受容体の阻害をしても持続的な応答をおこすことができない。

E/I

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

わかりやすい(計測しやすい)活動は何か？

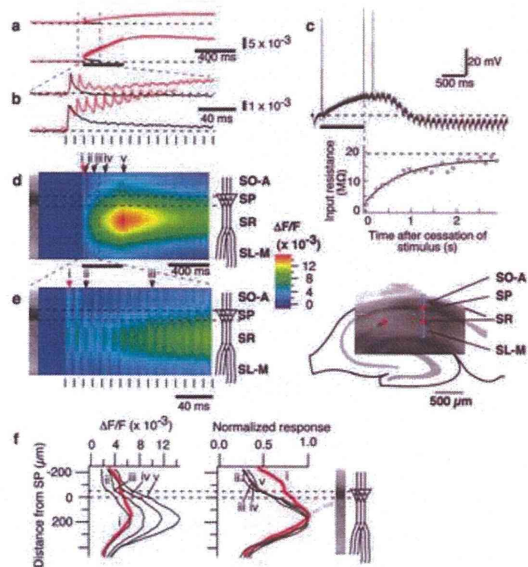
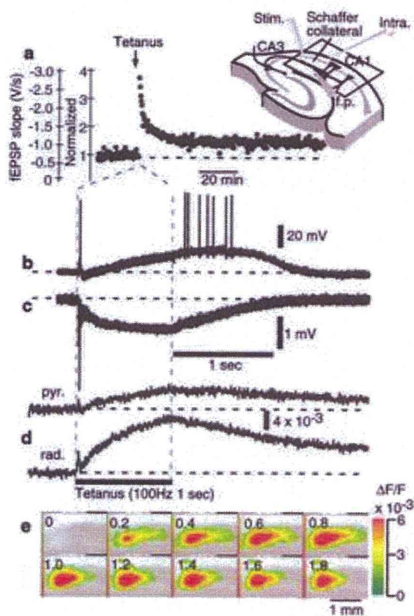
抑制による神経回路活動コントロール

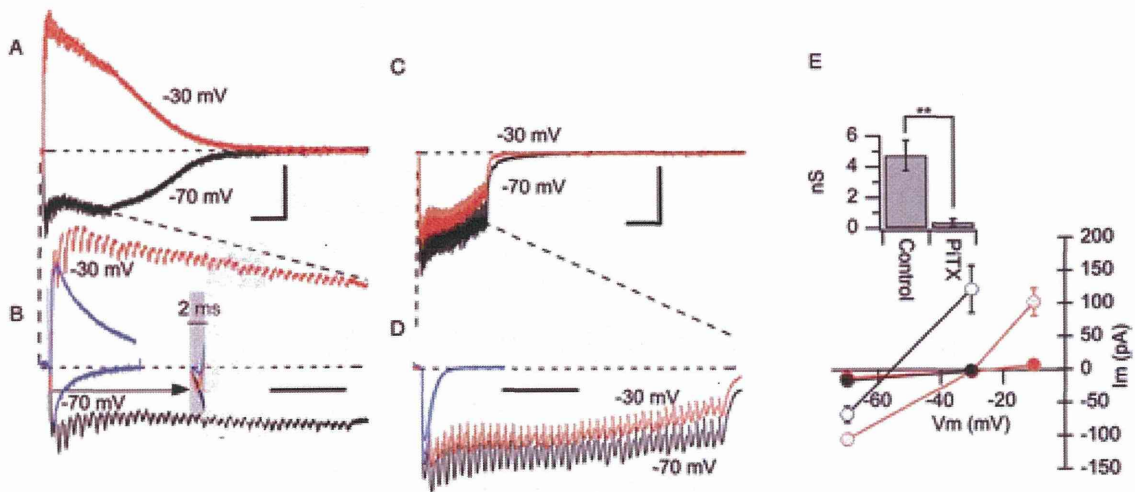
可塑性との関係

J Neurophysiol
98:3323-3332, 2007. 10.1152/jn.08754.2006.

Optical Imaging of Long-Lasting Depolarization on Burst Stimulation in Area CA1 of Rat Hippocampal Slices

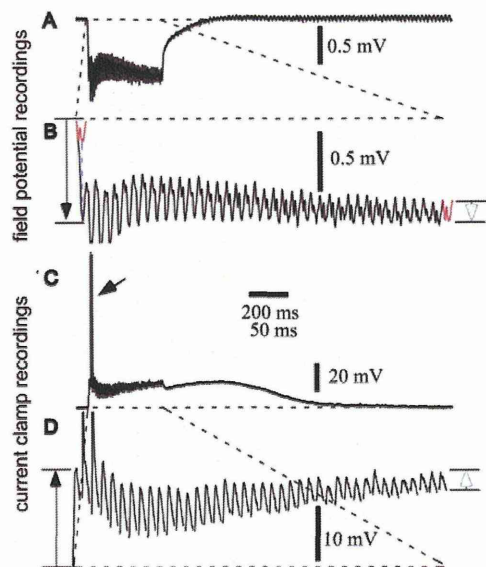
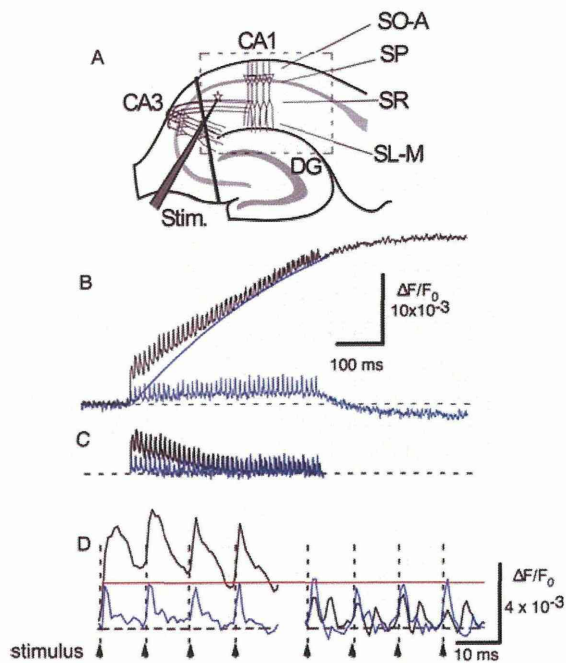
TAKASHI TOMINAGA, YOKO TOMINAGA, AND MICHINORI ICHIKAWA
Laboratory for Brain Operative Devices, The Institute of Physical and Chemical Research Brain Science Institute,
Wako, Saitama 351-0198, Japan

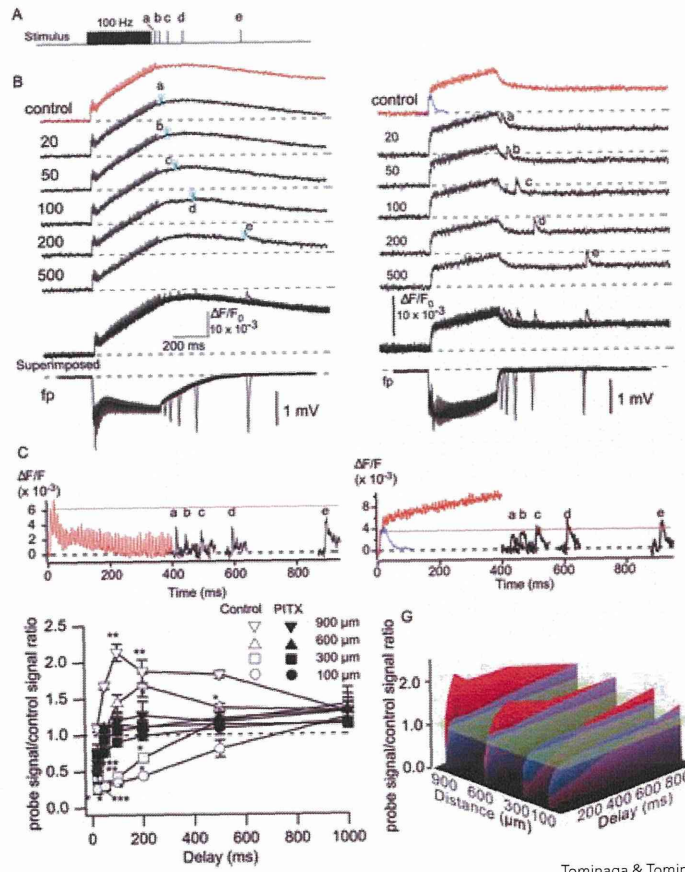




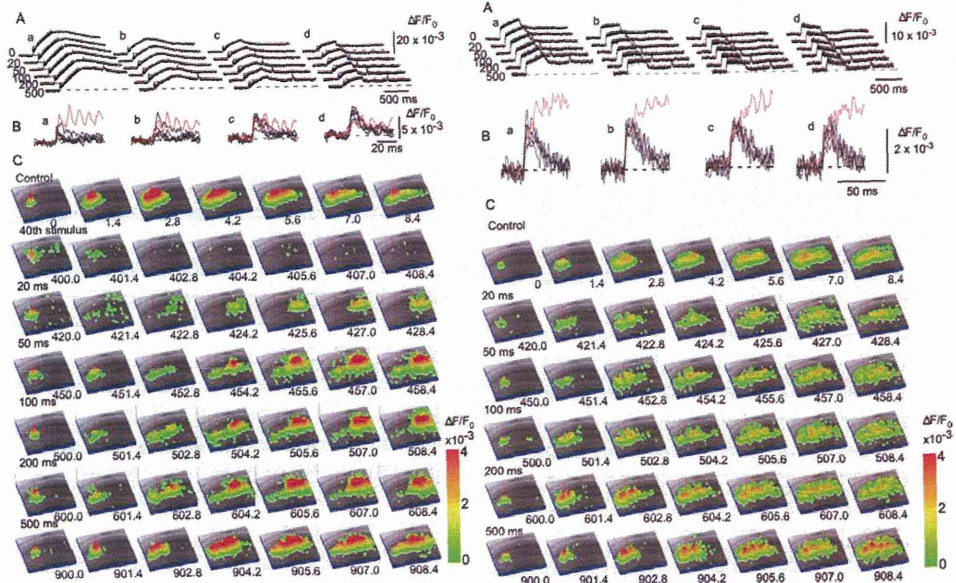
GABA_A receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices

Takashi Tominaga · Yoko Tominaga





Tominaga & Tominaga, *Pflügers Arch.*, 2010



Tominaga & Tominaga, *Pflügers Arch.*, 2010