

研究課題名

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）

研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

本研究は、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。

平成 27 年度は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを生後 2 週齢および生後 10 週齢のマウスに投与し、生後 12-13 週齢に情動認知行動解析を行った。その結果、幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。これまでにを行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を開始した。さらに、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置を開発に着手し、毒性評価への応用について検討を開始した。

妊娠マウスへのバルプロ酸により得られた産仔マウスが成体期における学習記憶異常を示すことを明らかにするとともに、それに伴って海馬神経新生が減少すること、さらに成体期マウスへのカイニン酸投与で異所性かつ形態異常な海馬神経新生が生じることを見いだした。同時にこれらの表現系が毒性指標となりうるかの検討を開始した。また膜電位感受性色素を用いたイメージングで、バルプロ酸、ビスフェノール類の胎生期投与による遅発毒性の発現パターンを計測した。これを拡張し、海馬・皮質神経回路で回路の機能変調を示す毒性値の設定を検討中である。

特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 遺伝子改変マウス（エストロゲン受容体 の発現量が約 1/5 であり、学習記憶異常が生じることを突き止めている）の脳、海馬、脳幹について、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、特に海馬にて、野生型マウスと比較して遺伝子発現が上昇している遺伝子が多いことを突き止めた。現在、パスウェイ解析を進めている。

また、第 5 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（於 OECD）に参加し、内分泌かく乱化学物質の評価のための AOP（Adverse Outcome Pathway）に関して討議を行った。その成果は、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案に貢献するものである。

## 【研究組織】

代表：種村 健太郎

東北大学大学院農学研究科

動物生殖科学分野・教授

研究総括、情動認知行動解析と毒性基準値の設定、  
神経突起解析、遺伝子発現パスウェイ解析を担当。

分担：掛山 正心

早稲田大学人間科学学術院

応用生理学研究室・教授

情動認知行動解析と毒性基準値の設定を担当。

分担：北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・

安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定を担当。

分担：中島 欽一

九州大学大学院医学研究院

基盤幹細胞学分野・教授

神経幹細胞動態解析および大脳層構造形態解析と  
異常基準値の設定、新規毒性マーカー探索を担当。

分担：富永 貴志

徳島文理大学・神経科学研究所・准教授

神経回路機能解析と異常基準値の設定を担当。

分担：菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター・毒性部・部長

国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探  
索を担当。

## A. 研究目的

先行研究 (H20-化学-一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学-一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性

学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECDへの提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

## B. 研究方法

本研究では、二つの先行研究 (H20-化学-一般-009)および (H23-化学-一般-004)の成果を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、客観性、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を3年計画で作出する。

### 【マウス情動認知行動異常の基準値設定】

発生発達期暴露により成熟期に情動認知行動異常を誘発することを確認済みのドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬等を、野生型マウスに暴露し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、及び、条件付け学習記憶試験（行動解析バッテリー試験）を実施する。その成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常であると認定される最小値を、その項目の基準値として「毒性基準値」と定義する。その際に、溶媒対照とは別に、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体 および 遺伝子欠損マウス、および精神神経疾患モデルマウスとして報告されているマウスの行動様式を包括した情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種（国立医薬品食品衛生研究所毒

性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いることで、国際的なバリデーション展開時に利用できる異常値を複数点用意するとともに、国内3カ所で同一規格の機器を用いた行動解析バッテリー試験を施行し、バリデーションを見据えた頑強性を確認しつつ最適化を図る(種村、掛山、北嶋)。

#### 【マウス情動認知行動異常誘発メカニズムの解明と神経科学的な異常の基準値設定】

これまでの研究に於いて、情動認知行動異常を呈するマウス脳から通常の光学顕微鏡的な病理所見は得られない場合が多いが、分子マーカーを用いての神経新生異常、大脳層構造異常、神経突起異常、および膜電位感受性色素を利用した光計測から神経回路機能異常を情動認知行動異常と対応した異常所見として検出してきた。さらに、それらは遺伝子発現プロファイリングによって裏付けられるものであった。そこで、野生型マウス(暴露)及び遺伝子改変マウス(非暴露)について神経幹細胞動態解析、大脳層構造形態解析(中島)、神経突起解析(種村)、神経回路機能解析(富永)、遺伝子発現プロファイリング(北嶋)を行い異常行動誘発メカニズムの解明を推し進めるとともに、それらの項目ごとに定量化手法を確定し、対応する神経科学的な異常の基準値として設定する。その際、遺伝子発現プロファイリングに関しては、機知のパスウェイへの関与を明らかにする(種村)。

#### 【発生-発達期における低用量化学物質暴露による成熟後の中枢行動毒性検定】

モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類、を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、上記の情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定する。用量は、一日摂取許容量、急性参照用量を元に設定する(全員)。これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させる。本研究成果については、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてOECDへの提案を行う(菅野)。

#### 【新規毒性マーカーの探索】

これまでの成果の一部として、情動認知行動異常を示したマウスにエピゲノム変化が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかを検討する。近年、生物学的意義が明らかになりつつあるノン・コーディング RNA の変動についても、新規毒性判断指標としての妥当性を検討する(菅野、中島)。

### C. 研究結果

平成27年度は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを生後2週齢および生後10週齢のマウスに投与し、生後12-13週齢にオープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、ブレパルス驚愕反応抑制試験から成るバッテリー式の情動認知行動解析を行った。その結果、高架式十字迷路試験において、アセタミプリドの幼若期投与による不安関連行動の逸脱が認められるとともに条件付け学習記憶試験において、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。さらに、神経新生マーカーを用いた免疫組織化学から、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与群の海馬において神経新生能低下が示された。現在、特に海馬について網羅的遺伝子発現解析を行っている。

これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を開始した。現在、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 遺伝子改変マウスの行動解析結果との比較を行っている。尚、本マウスは、エストロゲン(ER) 遺伝子座に、ER cDNA と牛成長ホルモン由来の3'-UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER 受容体遺伝子改変マウス(以降、ER KI と記載)であり、ER KI マウスのホモ型におけるER の発現は野生型の20-25%であり、したがってER KI マウスはER ノックダウンマウスと考える事ができる。また、

先行研究から ER KI マウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。(種村)

さらに、認知機能ならびに情動機能の評価手法について検討するため、本年度はマウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。行動柔軟性課題については先行研究(H20-化学-一般-010)において作成したものをを用いた。これまでにダイオキシン等の暴露実験により、他の毒性指標よりも低用量の周産期曝露により行動柔軟性が低下することを明らかにしてきたが、今回は同試験法を無機ヒ素の暴露実験に適用し、その試験法の妥当性検証と修正を行った。無機ヒ素は比較的低濃度曝露であっても IQ 低下、認知機能低下、情動異常等、様々な高次脳機能異常を引き起こすことが疫学調査により報告されているためである。飲水中に無機ヒ素を加えた母体から生まれた仔マウスが成熟後に行動柔軟性試験を行った結果、通常の空間認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて、行動柔軟性課題における有意な適応力低下を認めた。以上の結果から、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。また、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置を開発に着手し、毒性評価への応用について検討を開始した(掛山)。

特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 遺伝子改変マウス(前記の ER KI マウス)の脳、海馬、脳幹について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

成熟期の雄性 ER KI マウスの脳 3 部位(大脳皮質、海馬、脳幹)のサンプルについて、網羅的に遺伝子発現変動を解析し、脳各部位について、野生型と比較し、ER KI マウスの場合に、発現が有意に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。その結果、大脳皮質: 192 ps (増加)、122 ps (減少)、海馬: 950 ps (増加)、68 ps (減少)、脳幹: 243 ps (増加)、30 ps (減少)が抽出された。また、3 部位に共通して増加した遺伝子として 5 つ、減少した遺伝子として 2 つが得られた。

各部位における解析の結果、ER KI マウスの大脳皮質では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められないが、多くの Slc トランスポーターの発現変動が認められ、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していること、また発現増加遺伝子のプロモーター解析(*in silico*)の結果、Esr1 が上位にリストアップされたことから、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。海馬では、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現が増加し、K<sup>+</sup>チャンネルと Ca<sup>2+</sup>チャンネル遺伝子の発現が増加することから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していること、また大脳皮質と同様に、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。一方、脳幹では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められなかった(北嶋)。

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を設定を行った。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を設定を行った。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。これをさらに拡張したモデルを用いてビスフェノール類の胎生期幼若曝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。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。その他、*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。(冨永)

バルプロ酸胎仔期曝露マウスにおいては、成体海馬の増殖性神経幹細胞が 2/3 にまで減少するこ

とがわかった。また、その結果新生ニューロンの数も約 2/3 にまで減少していた。またこれらの減少が、自発的運動（回し車によるランニング）により、コントロールマウスと同程度まで回復することも明らかとなった。続いて成体期のカイニン酸投与により、ニューロン新生が約 2 倍にまで増加することがわかった。さらにこれらの中には通常あまりに見られない海馬歯状回門に局在する、異所性の新生ニューロンが約 10 倍増加していることもわかった。加えて、この異所性ニューロン新生は、自然免疫受容体である TLR9 の欠損や、ミクログリアの不活性化によりさらに増大することも明らかとなった（中島）。

第 5 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（2015.10.8-9、於 OECD）に参加し、内分泌かく乱化学物質の評価のための AOP（Adverse Outcome Pathway）即ち、化学物質の放出（放出源の確定）、それによる環境汚染（環境濃度）、暴露（暴露濃度）、体内に入り、細胞内の受容体等への結合、細胞の応答、個体の応答、集団への影響、動物社会への影響について、物質の暴露から毒性影響が表れるまでの過程に関して討議を行った。（菅野）

#### D. 考察

ネオニコチノイド系農薬や、無機ヒ素、ビスフェノール類、バルプロ酸を用いた発生-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異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功していると考えられた。また、今後、情動認知行動異常の基準値設定や、神経新生能、神経回路機能、神経突起動態等の神経科学的な異常の基準値設定を進める上で、「指標」の選定が非常に重要であると考えられるとともに、その為に用いる、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体遺伝子改変マウスの導入は非常に有望であると考えられた。また、本研究課題の成果は、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法として、OECD の AOP 開発プログラムへの提案に貢献するものであると考えられた。

#### E. 結論

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異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功している。今後、情動認知行動異常の基準値設定、神経科学的な異常の基準値設定によって毒性学的な意味づけを明確にできる評価系の作出に資することが期待できる。

#### F. 健康危険情報

とくになし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

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*. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

Yabusaki R, Iwano H, Tsushima S, Koike N, Ohtani N, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Weak activity of UDP-glucuronosyltransferase toward Bisphenol analogs in mouse perinatal development. *J Vet Med Sci*. 2015 Dec 1;77(11):1479-84.

Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K. Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections. *J Reprod Dev*. 2015 Oct 21;61(5):375-81.

- Nakano K, Nishio M, Kobayashi N, Hiradate Y, Hoshino Y, Sato E, Tanemura K. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote*. 2015 Apr 30:1-9.
- Ishikawa S, Hiraga K, Hiradate Y, Tanemura K. The effects analysis of two neonicotinoid insecticides on in vitro maturation of porcine oocytes using hanging drop monoculture method. *J Vet Med Sci*. 2015 Jun;77(6):725-8.
- Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. *Mol Reprod Dev*. 2015 Mar;82(3):218-31.
- Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Kakeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, Maekawa F. Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience* 10, 137(eCollection), 2016.
- Murao N., Noguchi H. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult. *Neuroepigenetics* in press.
- Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., Egashira Y., Fukao Y., Fujiwara M., Itoh M., Uesaka M., Imamura T., Nakahata Y., Yamashita Y., Abe T., Takamori S. & Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports* 12, 1887-1901 (2015).
- Noguchi H., Kimura A., Murao N., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res* 95, 1-11 (2015).
- Nakamura A., Funaya H., Uezono N., Nakashima K., Ishida Y., Suzuki T., Wakana S. & Shibata T. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor. *Neurosci Res* 100, 55-62 (2015).
- Matsuda T., Murao N., Katano Y., Juliandi B., Kohyama J., Akira S., Kawai T. & Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature communications* 6, 6514 (2015).
- Hamazaki N., Uesaka M., Nakashima K., Agata K. & Imamura T. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. *Development* 142, 910-920 (2015).
- Andoh-Noda T., Akamatsu W., Miyake K., Matsumoto T., Yamaguchi R., Sanosaka T., Okada Y., Kobayashi T., Ohyama M., Nakashima K., Kurosawa H., Kubota T. & Okano H. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. *Mol Brain* 8, 31 (2015).
- Abdulhaleem M.F., Song X., Kawano R., Uezono N., Ito A., Ahmed G., Hossain M., Nakashima K., Tanaka H. & Ohta K. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord. *Developmental neurobiology* 75, 494-504 (2015).
- Tominaga T and Tominaga Y Paired burst stimulation causes GABAA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. *Front. Cell. Neurosci.* 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009 (2016)

Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F. (2015) Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep.*;5:12281

Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* :16(2):192-201

## 2. 学会発表

北嶋聡、種村健太郎、菅野純「医療現場への還元に向けた PerCellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究」第 42 回日本毒性学会学術集会、2015 年 6 月（金沢市）

菅野純、種村健太郎「ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか-有機リン剤等暴露後の遅発性毒性の発現実験より-」第 37 回日本中毒学会学術集会、2015 年 7 月（和歌山市）

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「フローサイトメトリー分離によるウシ精子のレクチン結合様式への影響」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平舘裕樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「バルブロ酸の利用によるマウス精子エピゲノム改変誘導の試み」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

内藤秋、記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「受精能獲得に伴うブタ精子のヒストン H4 修飾様式の変化」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

小林記緒、白形芳樹、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「マウス精子における MeCP2 タンパクの発現解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

斉藤洋克、井上弘貴、小林記緒、白形芳樹、岡江弘明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「ビタミン E 欠乏給餌におけるマウス雄性生殖機能影響解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

内藤秋、白形芳樹、小林記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子におけるヒストン H4 の修飾動態解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子におけるレクチン結合様式」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平舘裕希、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「生体内におけるマウス精子エピゲノム改変の化学的誘導」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

原健士朗、種村健太郎、吉田松生「精細管基底区画における分化軸に沿った精原細胞の局在変化」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

平舘裕樹、井上弘貴、小倉淳郎、種村健太郎「マウス卵成熟過程における Tau の発現とリン酸化パターンの解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

井上弘貴、種村健太郎、小倉淳郎「H2B-eGFP+H2B-mCherry ダブル T G マウスを用いた FRET 法の開発およびその初期胚クロマチン動態解析への試み」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

小林記緒、白形芳樹、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「社会的生育環境要因が惹起する雄性生殖細胞系列および次世代へのエピジェネティック影響」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

白形芳樹、小林記緒、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「低用量ビスフェノール類慢性暴露によるマウス雄性生殖細胞エピジェネティック修飾への影響解析」第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月(宮崎市)

猪股大貢、原健士朗、種村健太郎「Hanging Drop法を用いた体外成熟単培養系におけるマウス卵母細胞へのネオニコチノイド類暴露影響解析」第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月(宮崎市)

斉藤洋克、植松未知、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎「幼若期雄マウスへのペルメトリン投与による成熟期生殖機能影響解析」第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月(宮崎市)

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、原健士朗、北嶋聡、菅野純「幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬投与による神経行動毒性発現」第18回環境ホルモン学会、2015年12月(下総市)

掛山正心、「マウスを用いた前頭野依存性行動モデル：高次学習から実行機能へ」第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会シンポジウム2015/09、東京。

Maekawa F, Htet Aung K, Sano K, Nakamura S, Tanoue A, Kakeyama M., Tohyama C., Nohara K, Tsukahara S. Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of cortex in mice. 9th World Congress International Brain Research Organization. 2015/07, Rio de Janeiro, Brazil.

掛山正心、「環境と脳：ダイオキシン毒性実験からみた高次脳機能発達」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会2015/09、仙台

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology

(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

医療現場への還元に向けた Percellome

Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究

第42回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析 第42回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用 第42回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

中島欽一：miR-199aはMeCP2とmTORシグナルをリンクレット症候群発症に關与する、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪府、大阪大学蛋白質研究所、2015年12月11日-12日(11日)

堅田明子、中島欽一：中枢神経系の発生・発達から老化までをも制御する組織としての脈絡叢、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(4日)(口頭)

河村陽一郎、野口浩史、堅田明子、中島欽一：胎生期マウス終脳におけるアストロサイト分化誘導因子産生細胞の同定、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)



松田泰斗、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一：ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)

亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：マウス胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおけるPost-Bisulfite Adapter-Tagging法を用いた神経活動依存的DNAメチローム変動解析、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)

安井徹郎、上園直弘、野口浩史、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一：ヒト神経幹細胞の発生進行に伴った性質変化には低酸素条件が重要である、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(1日)(口頭)(ポスター)

中島欽一：神経幹細胞のエピジェネティック制御とその作用、第6回神経科学と構造生物学の融合研究会、愛知県、岡崎コンファレンスセンター、2015年11月26日-27日(26日)

松田泰斗、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一：ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日(口演)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日(ポスター)

中島欽一：幹細胞って何？神経幹細胞を中心とした病気や再生医療に関する話題、第8回形態科学シンポジウム、福岡県、九州大学コラボレーションI、2015年10月24日(講演)

中島欽一：The microRNA, linking MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation cause Rett syndrome phenotypes、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレセガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(17日)(招待)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：Epigenetic regulator Np95/Uhrf1 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレセガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(17日)(ポスター)

野口浩史、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中嶋秀行、中島欽一：Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 contributes to the fate regulation of neural stem cells through DNA methylation-dependent and-independent manners during cortical development、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレセガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(16日)(ポスター)

中島欽一：エピジェネティックな神経幹細胞制御、第16回運動器科学研究会、鹿児島県、みなみホール、2015年9月11日-12日(11日)(招待)(セミナー)

松田泰斗、村尾直哉、片野友貴、Juliandi Berry、審良静男、神山 淳、河合太郎、中島欽一：TLR9 signaling in microglia ensures homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(28日)(口頭)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(29日)(口頭)

中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一：  
Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome  
responsible factor, mediated by microRNA in  
neural stem cells fate specification、第38回  
日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンション  
センター、2015年7月28日- 31日(28日)(口頭)

入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽  
一：Analysis of the molecular mechanism of  
dendritic formation by MeCP2 through miR-199a  
processing、第38回日本神経科学大会、兵庫県、  
神戸コンベンションセンター、2015年7月28日- 31  
日(28日)(ポスター)

中島欽一：胎生期HDAC阻害剤曝露による遅発性学  
習記憶障害とその発症機序、第42回日本毒性学  
会学術年会、ホテル日航金沢、2015年6月29日-7  
月1日(7月1日)(シホジウム)

浜崎伸彦、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村  
拓也：Gene activation-associated long  
noncoding RNAs function in mouse  
preimplantation developmen、第48回日本発生  
生物学会年会、茨城県、つくば国際会議場、2015  
年6月2日-5日(4日)(口頭)

上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也：  
Species-specific repertoires of  
promoter-associated non-coding RNAs may  
contribute to the diversification of gene  
expression profile、第48回日本発生生物学会  
年会、茨城県、つくば国際会議場、2015年6月2日  
-5日(3日)(ポスター)

浜崎伸彦、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村  
拓也：長鎖ノンコーディングRNAによるマウス  
胚性遺伝子活性化機構、第9回日本エピジェネテ  
ィクス研究会年会、東京都、学術総合センター  
橋講堂、2015年5月25日-26日(26日)(ポスター)

山本直樹、上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村  
拓也：Bidirectional promoter-derived antisense  
noncoding RNA epigenetically regulates  
irreversible differentiation of PC12 cells、  
第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京

都、学術総合センター橋講堂、2015年5月25日-26  
日(26日)(ポスター)

上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也：  
Species-specific repertoires of  
promoter-associated non-coding RNAs may  
contribute to the diversification of gene  
expression profile、第9回日本エピジェネティ  
クス研究会年会、東京都、学術総合センター橋  
講堂、2015年5月25日-26日(25日)(ポスター)

今村拓也、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島  
欽一：雌性発生胚を活用したPost-Bisulfite  
Adapter-Tagging法によるマウスDNAメチロー  
ム解析、第9回日本エピジェネティクス研究会年  
会、東京都、学術総合センター橋講堂、2015年5  
月25日-26日(25日)(ポスター)

Tominaga T and Tominaga Y A spatio-temporal  
analysis of the GABA<sub>A</sub> 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

Tominaga T and Naitoh Y Hodgkin-Huxely type  
analysis of voltage-dependent potassium  
currents in Paramecium 日本動物学会第86回大  
会 新潟 2015

Y. TOMINAGA, K. IGARASHI, M. I. OTSUKA, Y.  
FURUKAWA, J. KANNO, K. TANEMURA, T. TOMINAGA  
Neural circuit functional assay with  
voltage-sensitive dye imaging in hippocampal  
slices; effect of maternal bisphenol A 第53  
回日本生物物理学会年会 金沢 2015

Tominaga T and Tominaga Y VSD-imaging of 100  
Hz stimulation induced GABA<sub>A</sub> independent  
perisomatic membrane potential response in  
area CA1 of hippocampal slice 第38回日本神  
経科学大会 神戸 2015

Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 - 毒性学的観点からの考察-(2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演

菅野 純、OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み(2015.12.11)、環境ホルモン学会第 18 回研究発表会、栃木、シンポジウム

Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and

Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies (2015.10.21), 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), South Africa, Symposium

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study(2015.9.15), 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015), Porto, Portugal, poster

菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について(2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)、東京、セミナー

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、小川幸男、広瀬明彦、石丸 直澄、今井田克己、Taquann 直噴全身暴露吸入法によるナノマテリアル有害性評価(2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

津田洋幸、徐結苟、酒々井真澄、二口 充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野 純、多種のカーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案(2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

Jun Kanno, Construction of “ Dynamic Biomarkers ” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “ Signal Toxicity ” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX 2015) (2015.6.25) Jeju, Korea, 特別講演

Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, 2, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masumi Suzui, Jun Kanno, Akihiko Hirose. Involvement of macrophage in inducing proliferative and neoplastic lesion development of the pleura of rats intrapulmonary treated with multi-walled carbon nanotubes, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Development of High Dispersion-Small Scale Whole Body Inhalation System for Nanomaterials (Taquann System): Application to Multi-wall Carbon Nanotube, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

Jun Kanno, “ Taquann ” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster

Katada,S., Honda,M., Nakashima, K.: Oxygen regulates fate specification of neural stem cell during cortical development. KEYSTONE SYMPOSIA, Santa Fe, February 22-26, 2015

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

