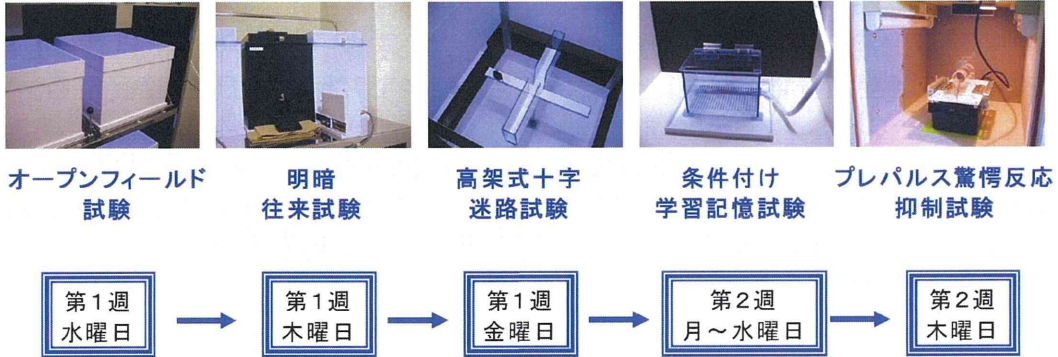


行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、
比較的短時間で、判りやすい結果が得られる。

→化学物質による行動影響があるか？

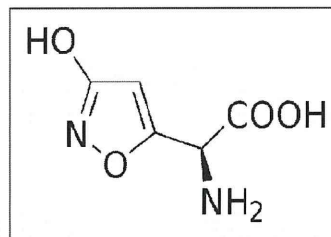
→毒性発現と呼べる異常行動か？



イボテン酸

Ibotenic acid

[CAS:2552-55-8]



イボテングダケ



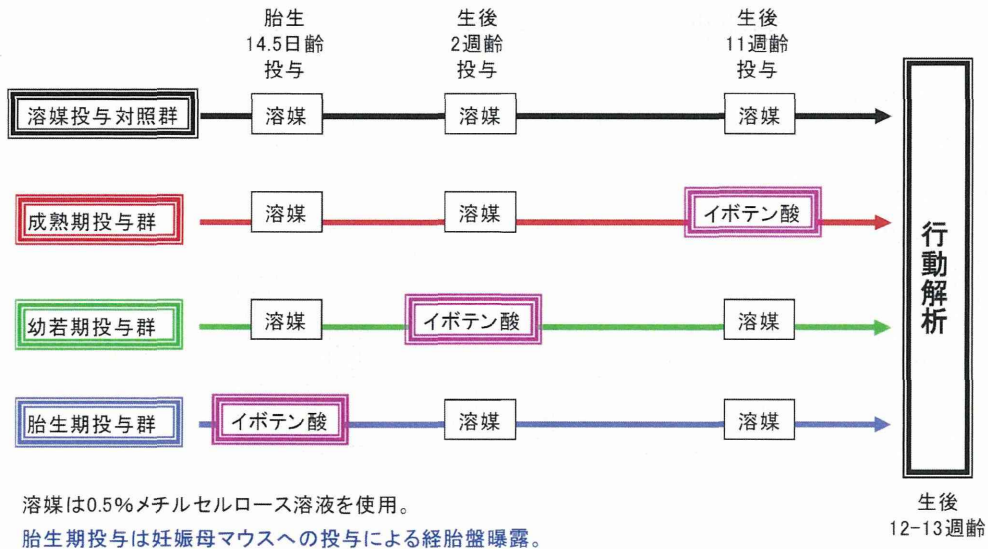
毒キノコ(テングダケ類)に含まれるアミノ酸で、
グルタミン酸受容体のアゴニストである。

脱炭酸化され、GABA受容体のアゴニストであるムシモールに変化する。

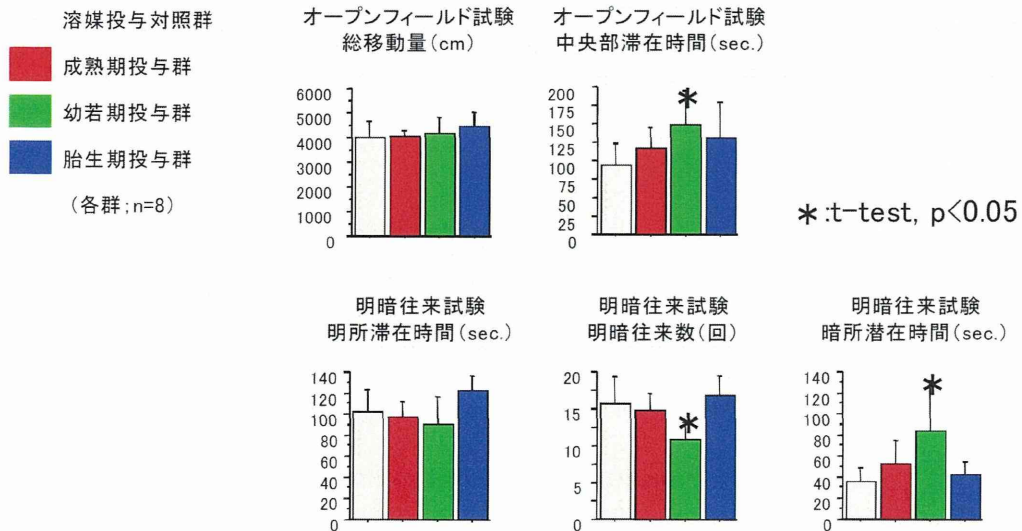
マウスへの経口投与によるLD50は38mg/kgである。

イボテン酸(1mg/kg)単回強制経口投与-解析スケジュール

TOCRIS: Cat. No. 0285



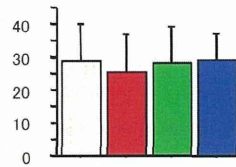
幼若期雄マウスへのイボテン酸(1mg/kg)投与の結果、 成熟後に、不安関連行動の逸脱が認められた。



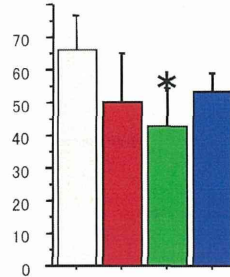
幼若期雄マウスへのイボテン酸(1mg/kg)投与の結果、
成熟後に、記憶異常が疑われた。

溶媒投与対照群
 ■ 成熟期投与群
 ■ 幼若期投与群
 ■ 胎生期投与群
 (各群;n=8)

条件付け学習記憶試験
場所-連想記憶
すくみ率(%)



条件付け学習記憶試験
音-連想記憶
すくみ率(%)

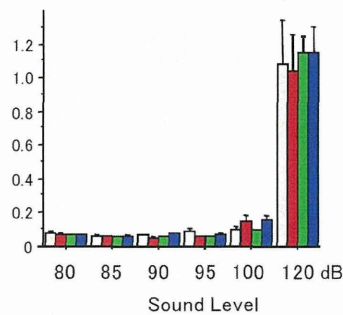


* t-test, p<0.05

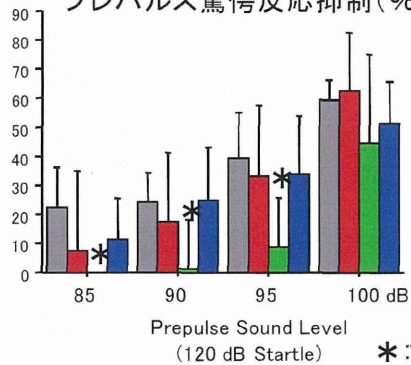
幼若期雄マウスへのイボテン酸(1mg/kg)投与の結果、
成熟後に、脳内情報処理不全が疑われた。

溶媒投与対照群
 ■ 成熟期投与群
 ■ 幼若期投与群
 ■ 胎生期投与群
 (各群;n=8)

プレパルス驚愕反応抑制試験
単音に対する驚愕反応



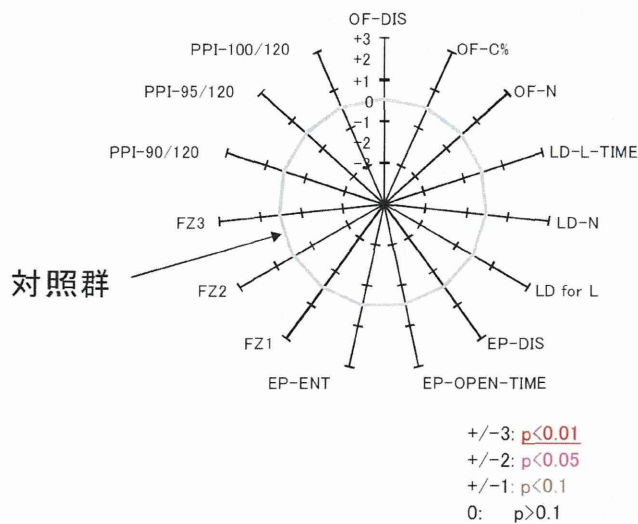
プレパルス驚愕反応抑制試験
プレパルス驚愕反応抑制(%)



* t-test, p<0.05

(いずれも背景音は70 dBのホワイトノイズ)

【行動の逸脱レベルを示すレーダー図】



OF: オープンフィールド試験-10min

OF-DIS: 総移動量
OF-C%: 中央滞在率
OF-N: 移動回数

LD: 明暗往来試験-5min

LD-L-TIME: 明所滞在時間
LD-N: 明暗往来数
LD for L: 初移動までの時間

EP: 高架式十字迷路試験-10min

EP-DIS: 高所総移動量
EP-OPEN-TIME: 柵無しアーム部滞在時間
EP-ENT: number of entry in arms

FZ: 条件付け学習記憶試験-6min

FZ1: 学習度(短期記憶形成度)
FZ2: 空間-連想記憶
FZ3: 音-連想記憶

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min

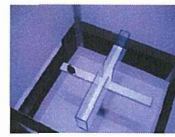
PPI-90/120: プレパルス 90db/120db
PPI-95/120: プレパルス95db/120db
PPI-100/120: プレパルス100db/120db



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



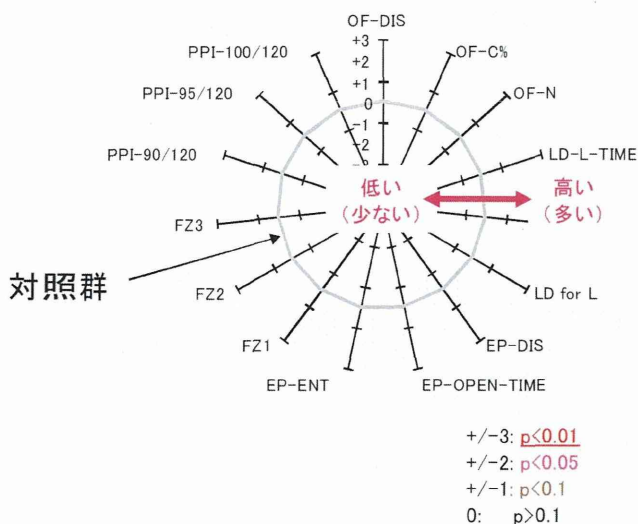
条件付け学習記憶試験



プレパルス驚愕反応抑制試験

17

【行動の逸脱レベルを示すレーダー図】



OF: オープンフィールド試験-10min

OF-DIS: 総移動量
OF-C%: 中央滞在率
OF-N: 移動回数

LD: 明暗往来試験-5min

LD-L-TIME: 明所滞在時間
LD-N: 明暗往来数
LD for L: 初移動までの時間

EP: 高架式十字迷路試験-10min

EP-DIS: 高所総移動量
EP-OPEN-TIME: 柵無しアーム部滞在時間
EP-ENT: number of entry in arms

FZ: 条件付け学習記憶試験-6min

FZ1: 学習度(短期記憶形成度)
FZ2: 空間-連想記憶
FZ3: 音-連想記憶

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min

PPI-90/120: プレパルス 90db/120db
PPI-95/120: プレパルス95db/120db
PPI-100/120: プレパルス100db/120db



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

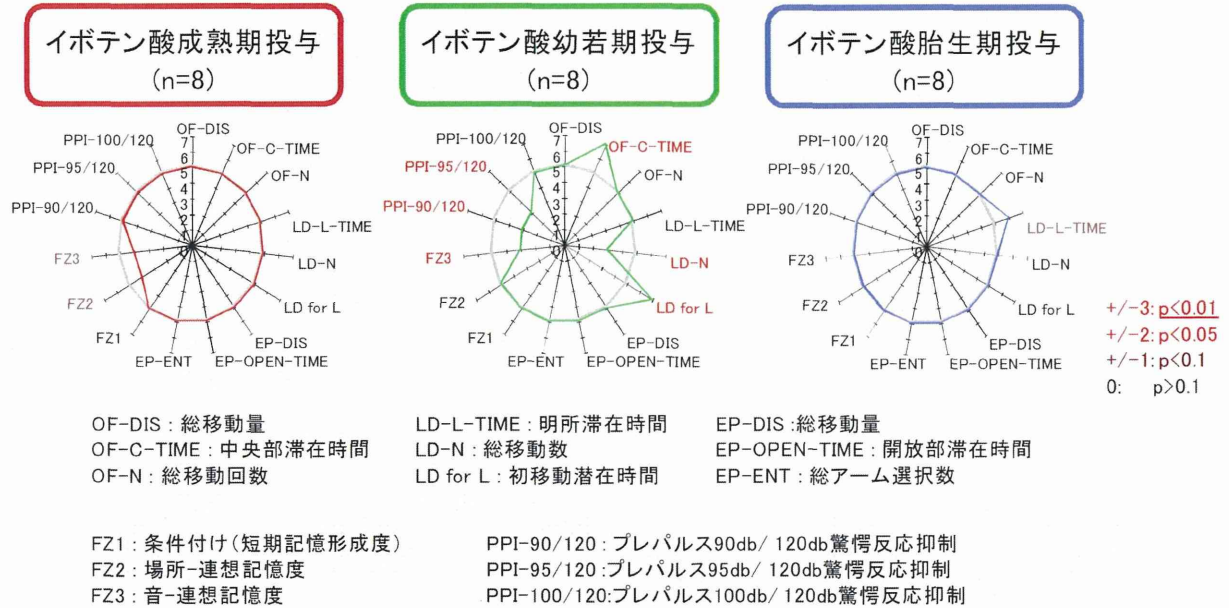


プレパルス驚愕反応抑制試験

18

イボテン酸投与時期による行動逸脱レベルの比較

イボテン酸：キノコ毒の成分、NMDA型グルタミン酸受容体のアゴニスト
1mg/kg、強制経口投与（溶媒は0.5%メチルセルロース溶液）



19

人工授精時MEHP曝露による産仔マウスの情動認知行動解析

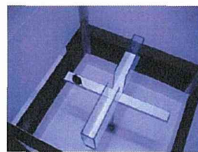
生後4週齢時に離乳し、生後12週齢時に情動認知行動解析を行う。
(2016年2月中旬に施行予定)



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



プレパルス驚愕反応
抑制試験

20

分担する研究項目

1) 情動認知行動評価技術を用いた *in vivo* 影響解析研究

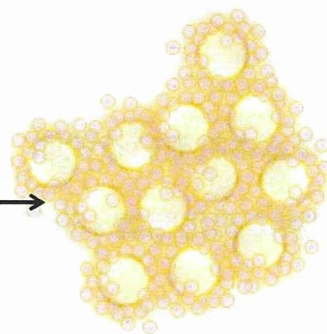
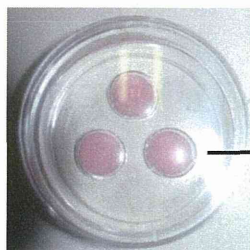
2) 生殖工学技術を用いた *in vitro* 影響解析研究

21

IVM (*in vitro* maturation)

卵巣から採取した受精能を持たない未成熟卵母細胞を体外で培養することで成熟を促し、受精可能な状態にする。

培養シャーレ上の培養液滴内における、
複数の「卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COC)」の共培養が、
広く用いられている。



Culture Drop(CD)法

22

体外成熟 - 体外受精 - 体外培養 (in vitro Maturation - in vitro Fertilization - in vitro Culture; IVM - IVF - IVC)

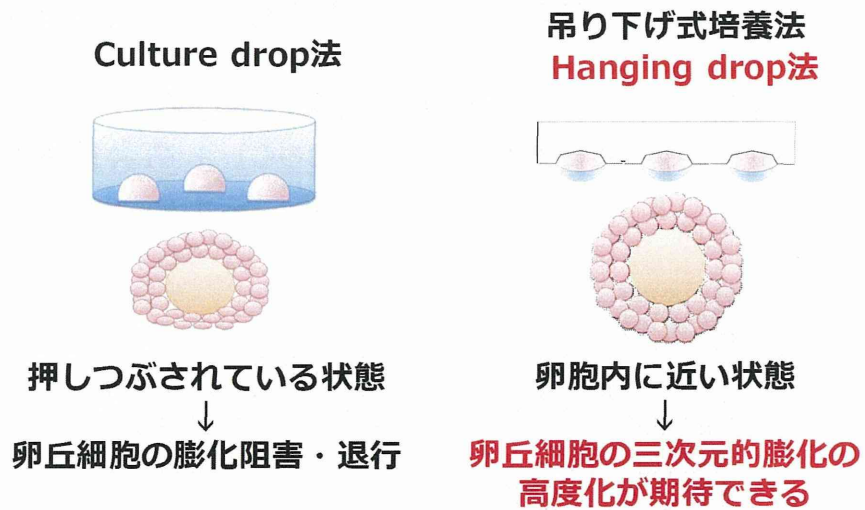
卵巣内の未成熟卵母細胞 (GV期) を採取し、体外培養にて得られた成熟卵子 (MII期) に受精、培養を行う



ウシやブタなどの家畜
 食肉処理場由来卵巣内にある、多数の未成熟卵母細胞を利用することにより、**より効率的な生産が可能**

ヒト
 1991年 chaらにより、初の妊娠出産成功例の報告
 ゴナドトロピン注射により体内成熟卵子を用いる従来の治療法と比較し、ゴナドトロピン注射を軽減できることで、**副作用発症 (卵巣過剰刺激症候群) の回避**が可能な治療法

**「卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COC)」
 単独培養の高度化**



本研究班においては、
フタル酸類による成熟率影響評価とともに、

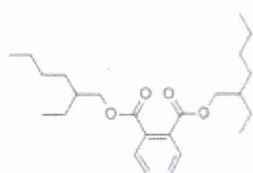
1) 卵成熟過程に生じる、染色体分配影響に関わる、
関連タンパクの動態を解析する。

2) 人工授精後の発生影響との関連を検討する。

25

培養液へのDEHP・MEHP添加によるマウス卵子体外培養系への影響

①物質名: フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(DEHP)



CAS No.: 117-81-7

分子式・分子量: $C_{24}H_{38}O_4=390.56$

性状: 液体 比重: 0.986

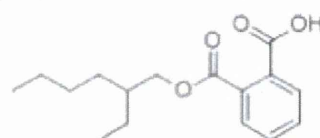
純度: 98%

メーカー: 東京化成工業

カタログ No.: P0297 Lot No.: JH45M-DF

高用量(H)→20 μ M飲水投与
低用量(L)→2 μ M飲水投与

②物質名: フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)



CAS No.: 4376-20-9

分子式・分子量: $C_{16}H_{22}O_4=278.37$

性状: 液体 比重: 1.07

純度: 96%

メーカー: 和光純薬株式会社

カタログ No.: 323-65643 Lot No.:

高用量(H)→50 μ M飲水投与
低用量(L)→5 μ M飲水投与

26

卵母細胞の採取方法

PMSG(5IU)をC57/B6マウス(4週齢)に腹腔内投与後、46時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、卵巣を採取した。37°Cの操作培地(0.1%polyvinyl alcohol,4mM hypoxanthineを含むLibovitz's L-15培地)内で、26G針付きシリンジで卵胞を裂き、卵丘細胞-卵母細胞複合体(COC)を採取した。

吊り下げ式培養の方法

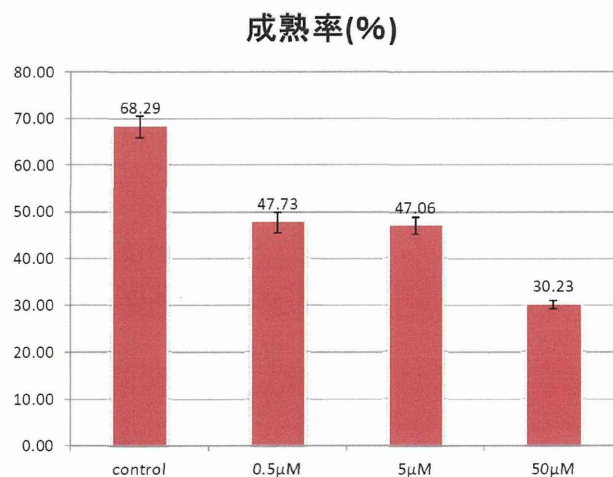
採取したCOCを、成熟培地のドロップ(100 μ l)に移した。ドロップは、各群(control,0.5 μ M,5 μ M,50 μ M)とし、COCを洗浄後、成熟培地(10 μ l)で吊り下げ式培養を行った。

紡錘体形成異常の検出方法

培養後、保存した卵母細胞(卵丘細胞は除去した)を、 α -Tubulin、核染色を行った。その後共焦点レーザー顕微鏡を用い、紡錘体、染色体(核)の様子を観察した。

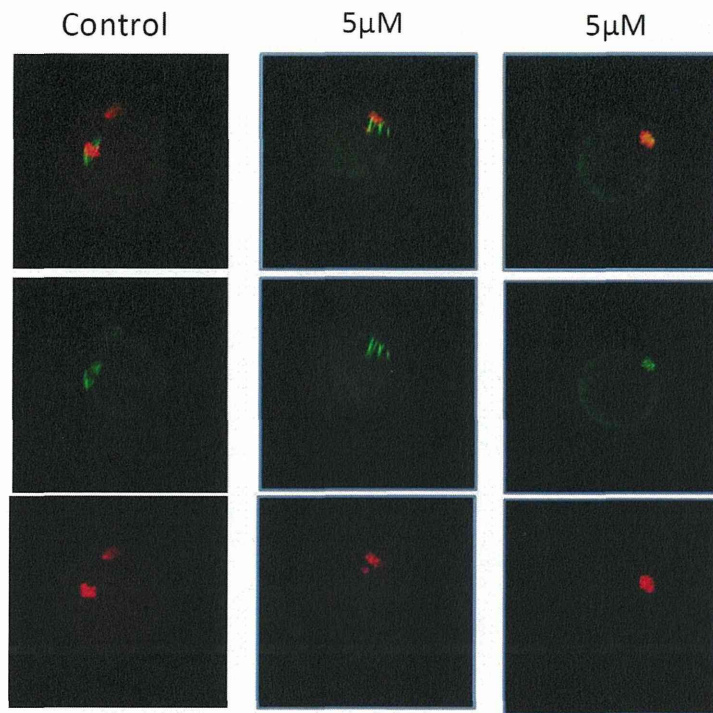
27

培養液へのMEHP添加によるマウス卵子体外培養系への影響

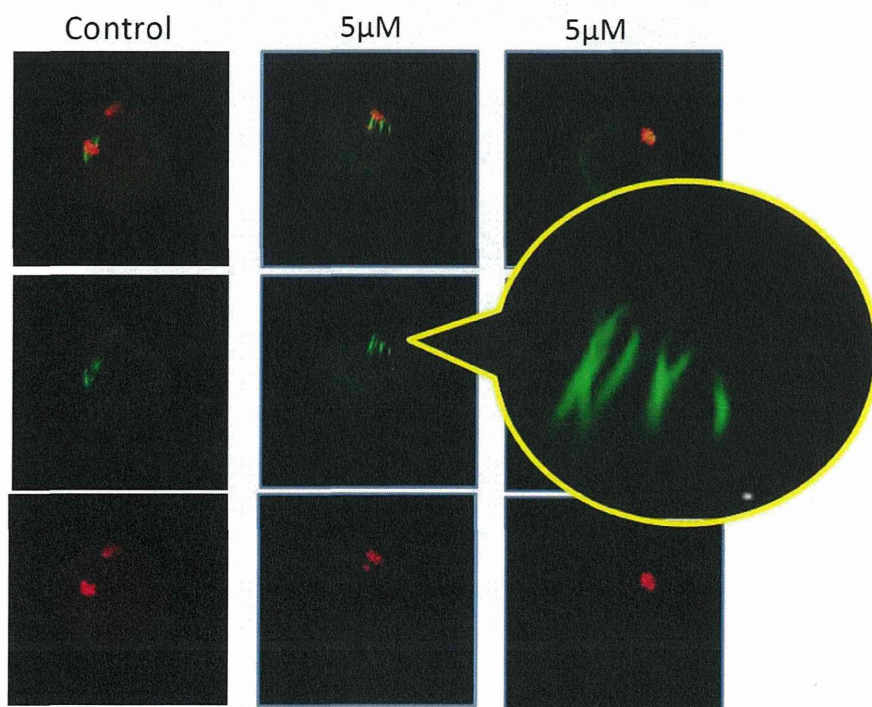


バーは標準偏差

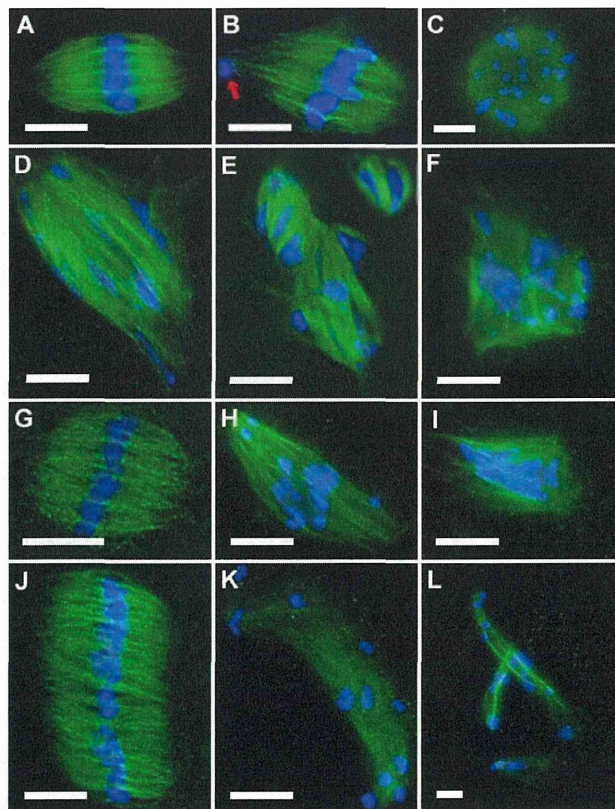
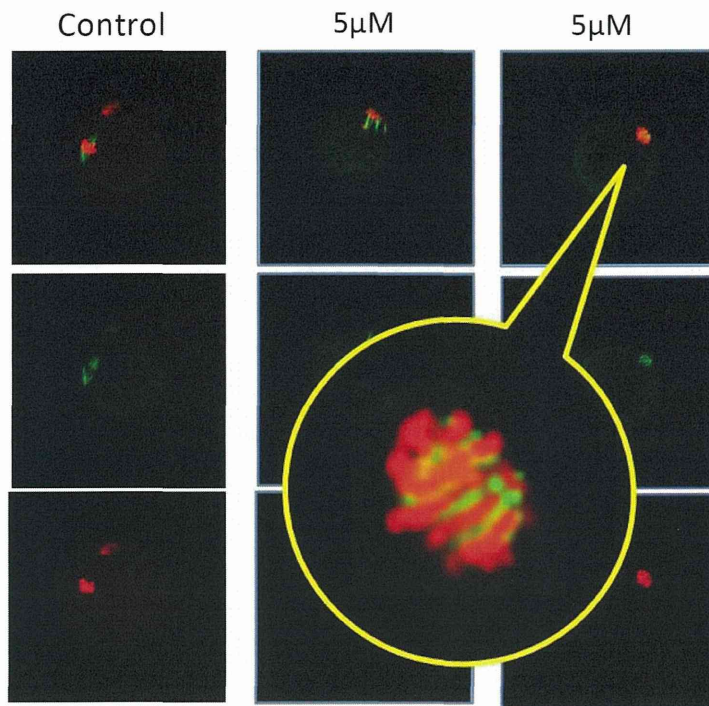
培養液へのMEHP添加によるマウス卵子体外培養系への影響



培養液へのMEHP添加によるマウス卵子体外培養系への影響

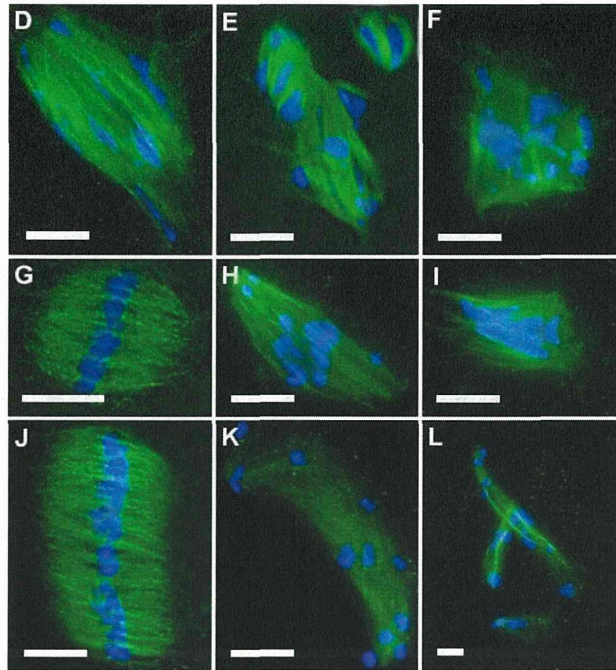


培養液へのMEHP添加によるマウス卵子体外培養系への影響



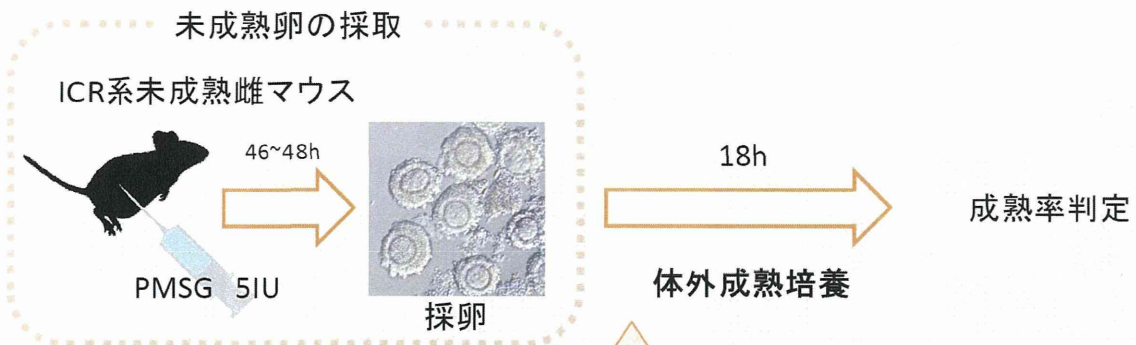
Maria Teresa Zenzes and Ryszard Bielecki (2004)

ニコチン曝露影響



Maria Teresa Zenzes and Ryszard Bielecki (2004)

33



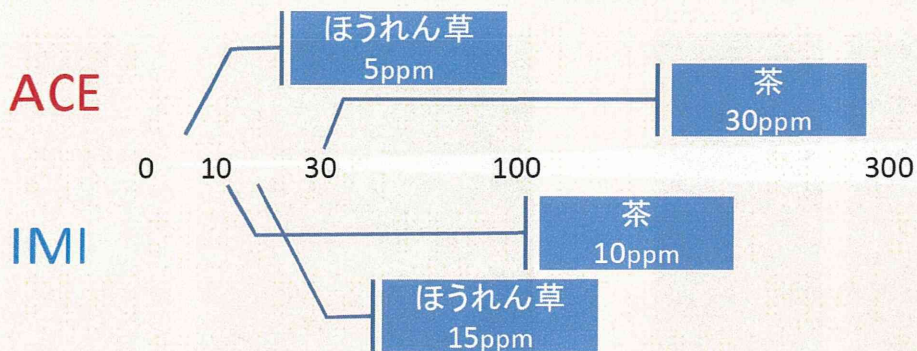
培養条件

Control区

培養液 + 0.1%DMSO

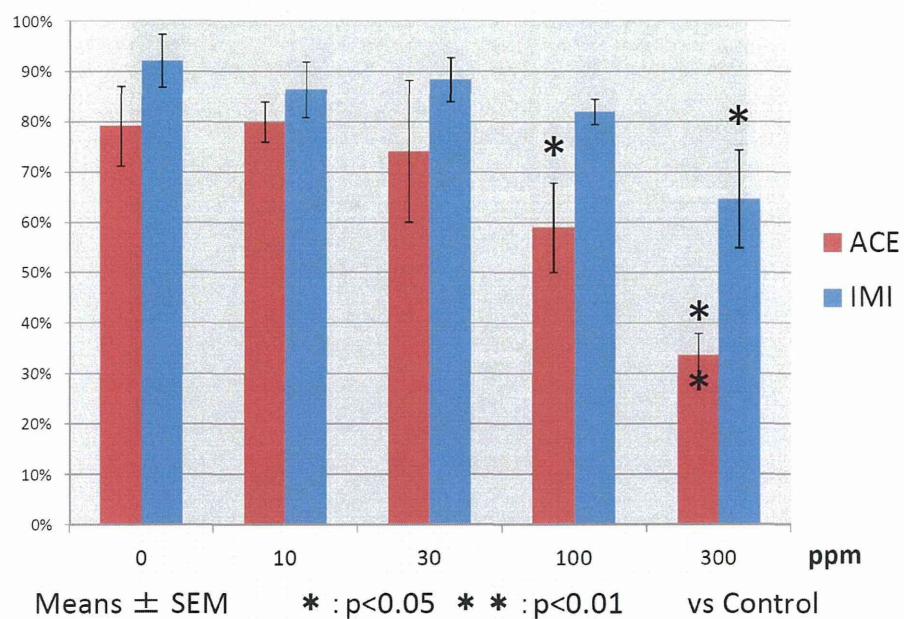
ネオニコチノイド曝露区

培養液 + ACE 10, 30, 100, 300 ppm + <0.1%DMSO培養液
+ IMI 10, 30, 100, 300 ppm + <0.1%DMSO



34

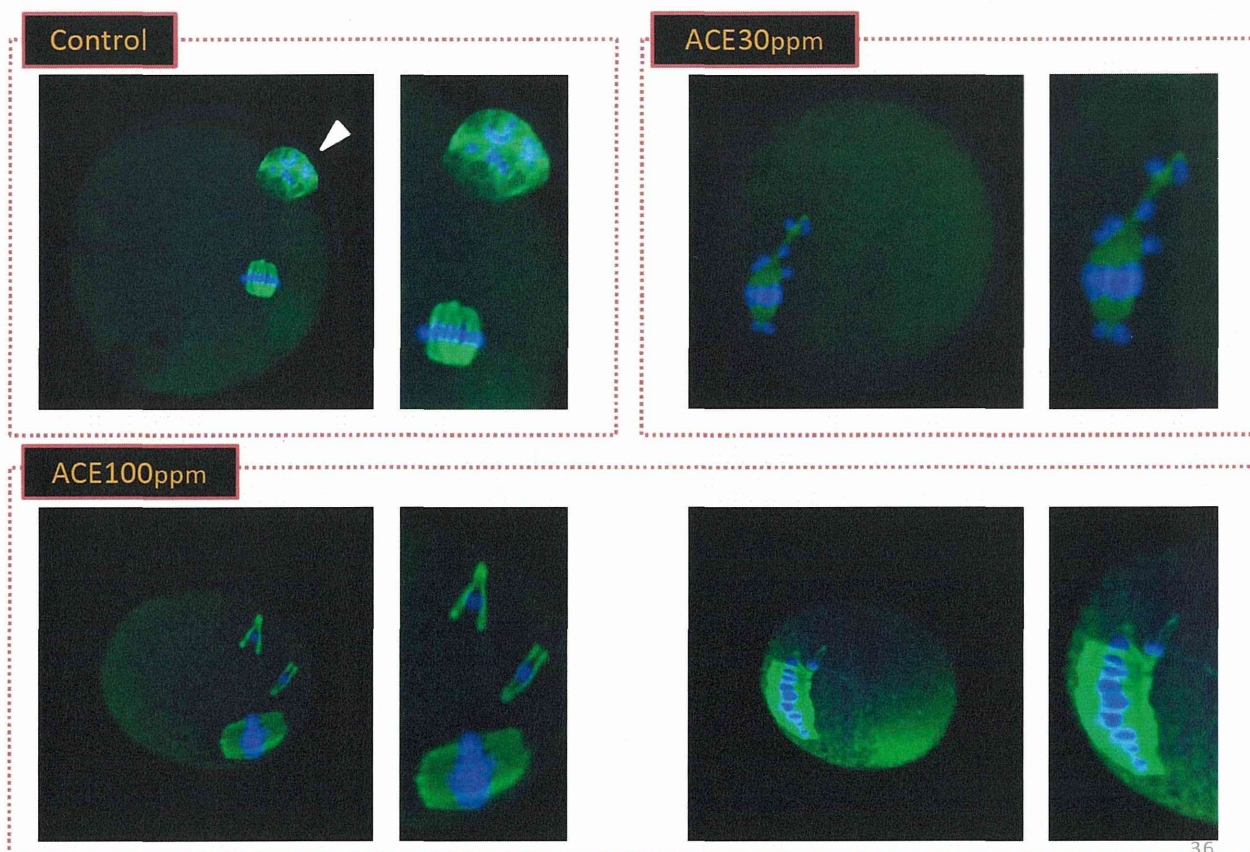
ネオニコチノイド類曝露用量と成熟率



35

ネオニコチノイド類曝露による異常卵子

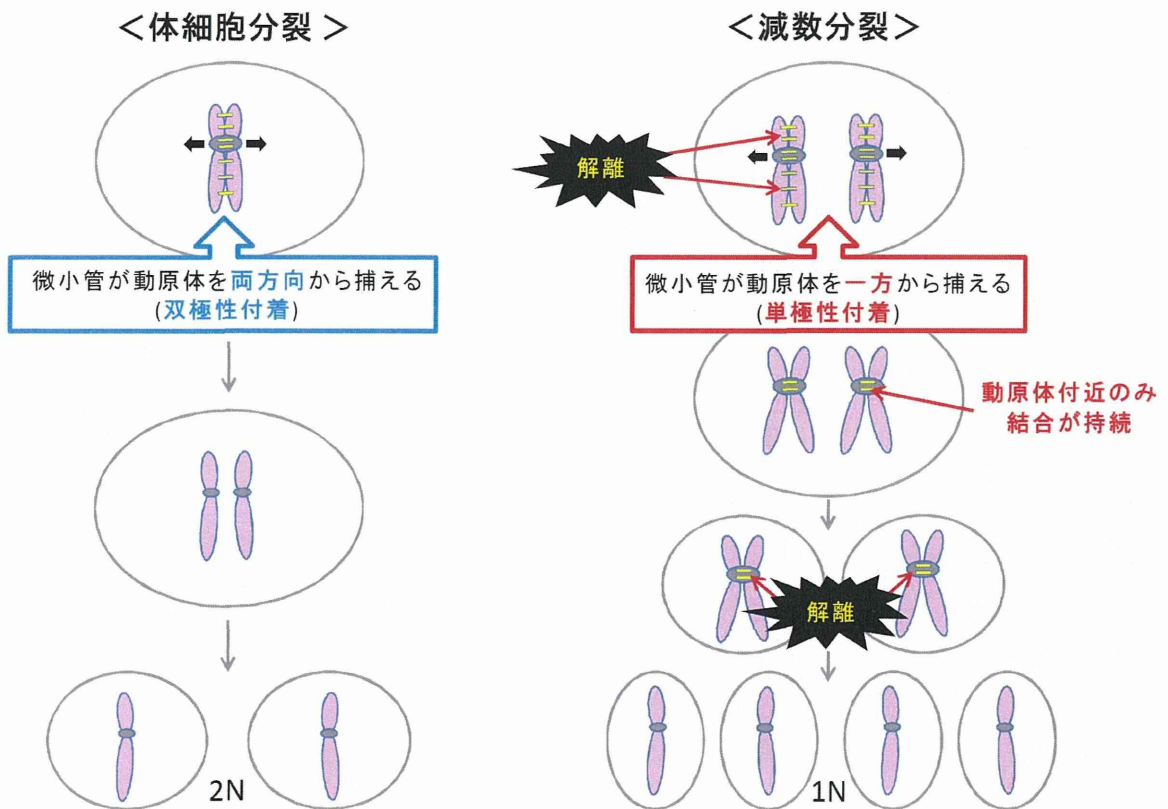
— 緑: α -Tubulin
— 青: 染色体



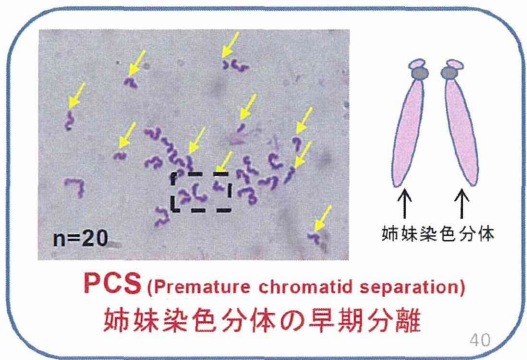
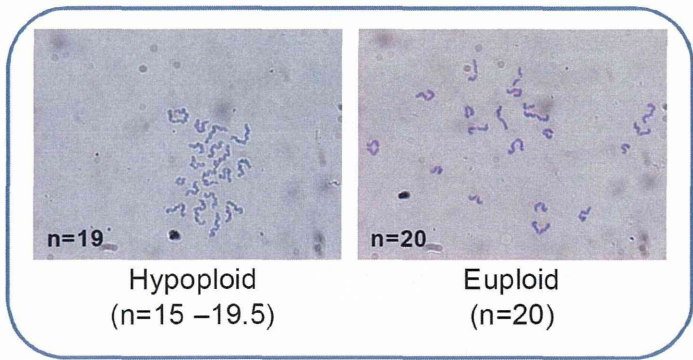
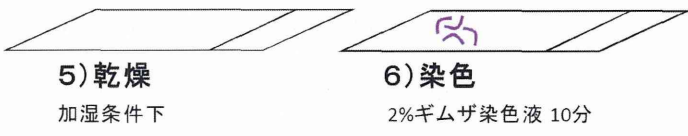
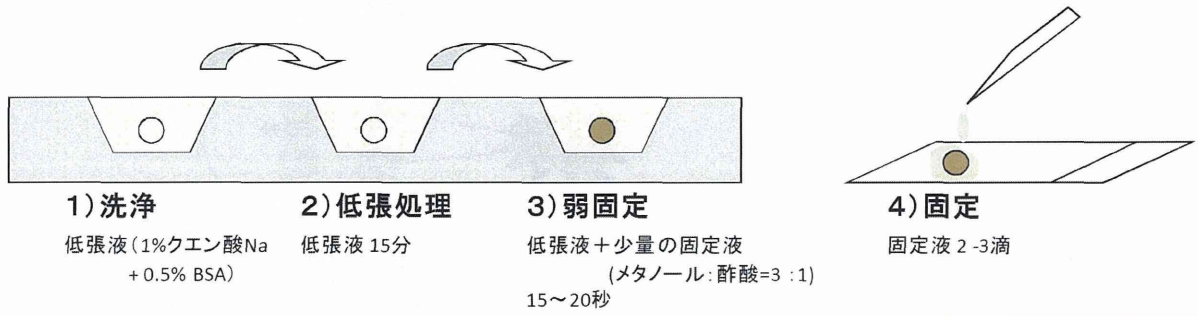
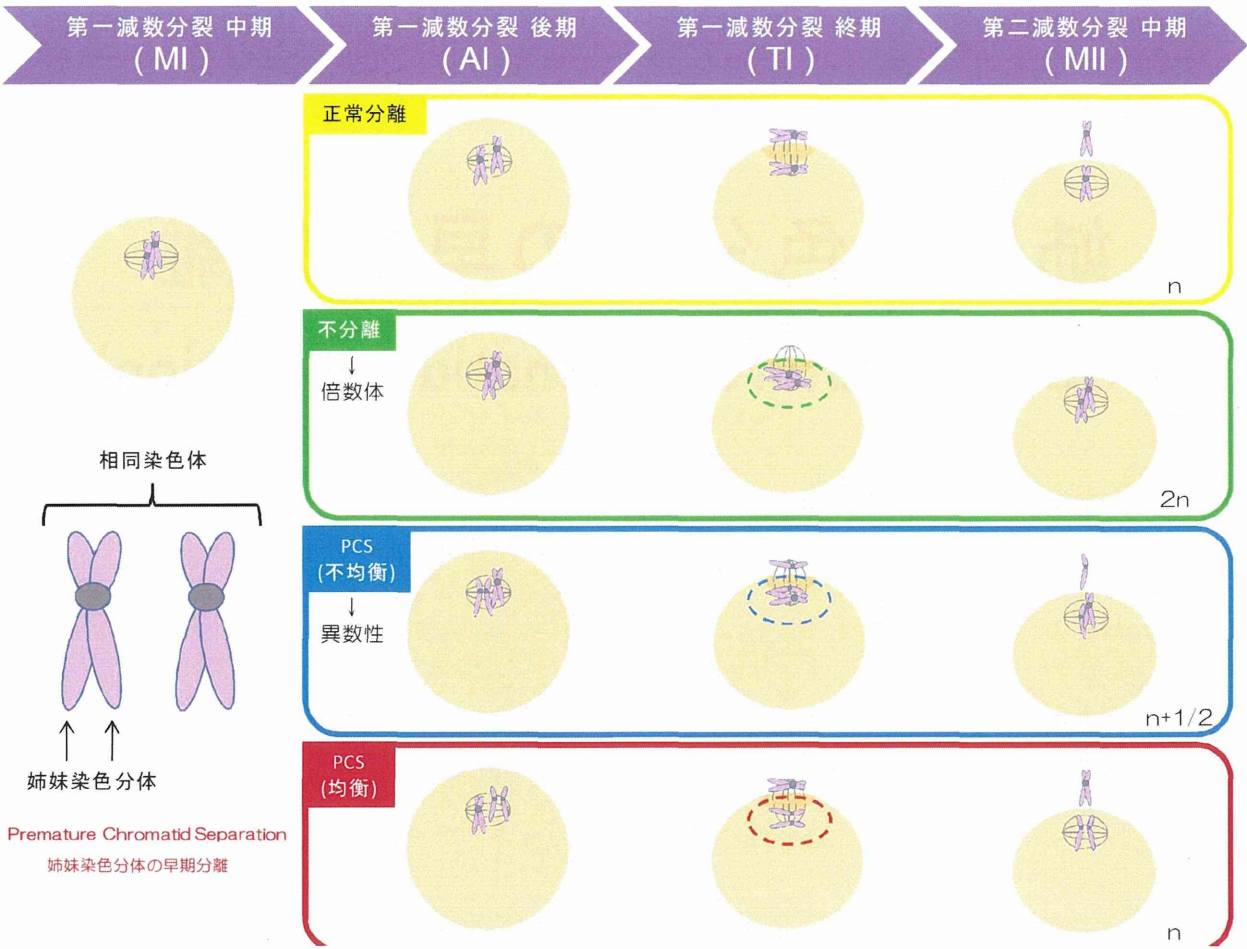
姉妹染色分体の早期分離

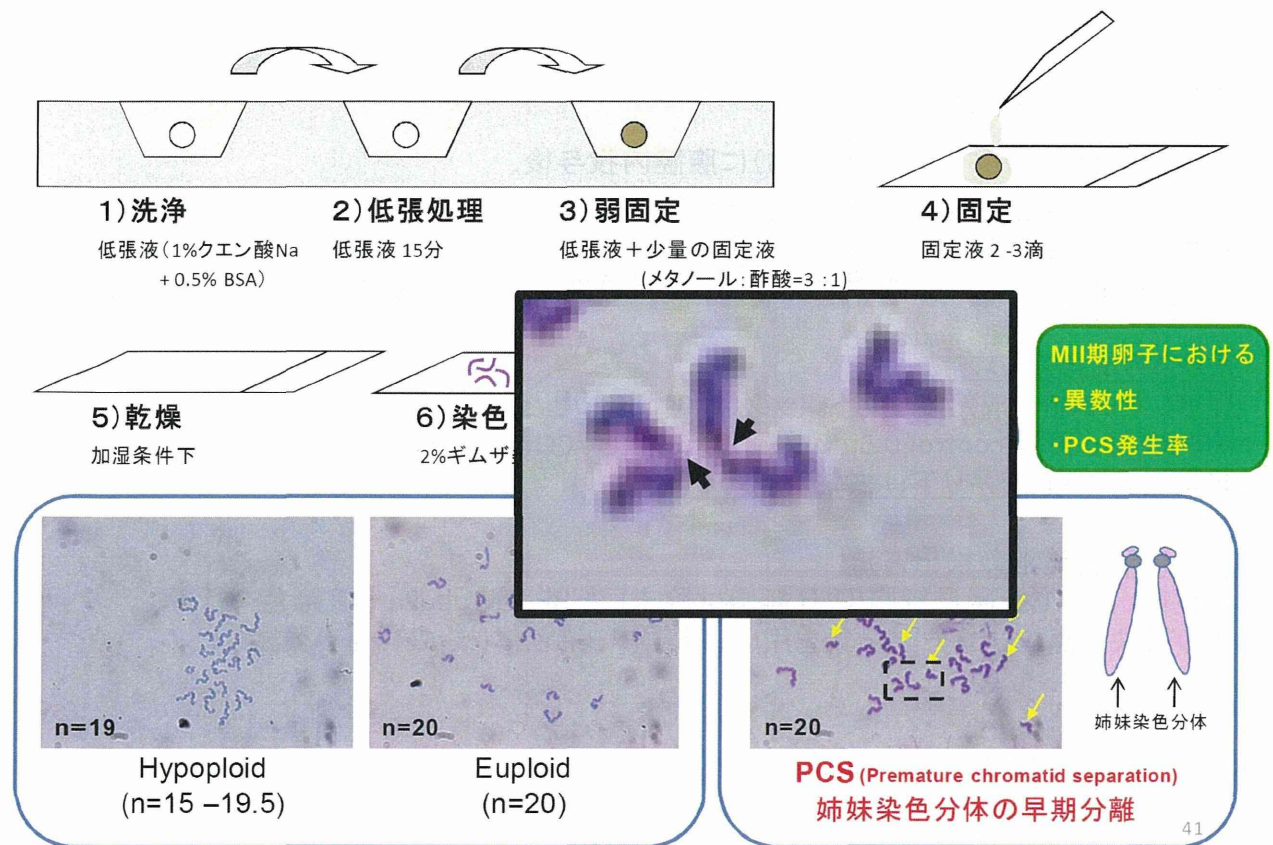
PCS (Premature chromatid separation)

37



38





卵母細胞の採取方法

PMSG(5IU)をC57/B6マウス(4週齢)に腹腔内投与後、46時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、卵巣を採取した。37°Cの操作培地(0.1%polyvinyl alcohol,4mM hypoxanthineを含むLibovitz's L-15培地)内で、26G針付きシリンジで卵胞を裂き、卵丘細胞-卵母細胞複合体(COC)を採取した。

吊り下げ式培養の方法

採取したCOCを、成熟培地のドロップ(100μl)に移した。ドロップは、各群(control,0.5μM,5μM,50μM)とし、COCを洗浄後、成熟培地(10μl)で吊り下げ式培養を行った。

紡錘体形成異常の検出方法

培養後、保存した卵母細胞(卵丘細胞は除去した)を、α-Tubulin、核染色を行った。その後共焦点レーザー顕微鏡を用い、紡錘体、染色体(核)の様子を観察した。

より高精度にフタル酸曝露影響を捉えることが期待できる。

卵母細胞の採取方法

PMSG(5IU)をC57/B6マウス(8週齢)に腹腔内投与後、46時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、卵巣を採取した。37°Cの操作培地(0.1%polyvinyl alcohol,4mM hypoxanthineを含むLibovitz's L-15培地)内で、26G針付きシリンジで卵胞を裂き、卵丘細胞-卵母細胞複合体(COC)を採取した。

吊り下げ式培養の方法

採取したCOCを、成熟培地のドロップ(100 μ l)に移した。ドロップは、各群(control,0.5 μ M,5 μ M,50 μ M)とし、COCを洗浄後、成熟培地(10 μ l)で吊り下げ式培養を行った。

紡錘体形成異常の検出方法

培養後、保存した卵母細胞(卵丘細胞は除去した)を、 α -Tubulin、核染色を行った。その後共焦点レーザー顕微鏡を用い、紡錘体、染色体(核)の様子を観察した。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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	2015
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.	77 (11)	1479 - 1484	2015
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.	61 (5)	375 - 381	2015
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.	30	1 - 9	2015
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.	77 (6)	725 - 728	2015

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.	82 (3)	218 - 231	2015
-----------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------	-----------	-----------------	------