

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）

分担研究課題名

「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・神経科学研究所 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ネオニコチノイド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、今年度は特に遅発毒性について検討した。海馬神経回路でのGABA系の働きの変調と、シナプス可塑性の変調を見出した。また、ネオニコチノイド、バルプロ酸、ビスフェノールなどの遅発神経毒性に関わる物質による興奮/抑制バランス（E/Iバランス）の変調を精度よく検出でき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、平行して大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索し前帯状皮質（ACC）、傍梨状核（EPN）などのイメージング解析を行いその信号伝播パターンを明らかにした。これに、新規共焦点顕微鏡を利用したin vivo系での計測系、新規パターン刺激イメージング顕微鏡、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた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い、特に無染色組織からの光信号の検出に成功した。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を示している。

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) ネオニコチノイド系物質の幼若期投与（種村らとの共同研究）ネオニコチノイド系の農薬の幼若期暴露によって遅発性の情動・認知行動が生じることが明らかとなっている。この遅発性の情動・認知行動には神経新生への影響が示唆されている。この遅発影響の初期応答を神経回路異常

として捉えることを目的としてネオニコチノイド系の農薬を幼若マウスに経口投与し、神経回路の異常の検出を試みた。ネオニコチノイド系の農薬としてアセタミプリド (ACT) とイミダクロプリド (IM) を用いた。昨年度はマウス 2 週齢 (幼若期) に強制経口投与し、強制投与後の 2, 12, 24 時間後の神経回路応答を網羅的な神経回路応答検出能力に優れた膜電位感受性色素を用いた神経回路活動検出系で海馬神経回路を中心に検証し、細胞の興奮性に関する異常を検出した。今年度は、遅発毒性の検討を行うために、同様の投与の後、13 週令以降の動物での神経興奮伝播における神経回路異常の検討と、可塑性発現の検証を行なった。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

低倍率の光計測系を改良し、海馬以外の神経回路についてもより網羅的な検証を行えるようにし、特に前帯状皮質 (ACC)、体性感覚野、運動野をまたいで傍梨状核 (EPN) までの広範な神経回路の定量的イメージングをおこなった (徳島大学歯学部吉村との共同研究)。また、ACC での脳両側への信号伝播について検討した。

(3) 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。この中で、シャーフアー側枝を 2 群に分割する手法を開発し、より自然な情報伝達での役割について検討した。

(4) 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。

C. 研究結果

(1) ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (種村らとの共同研究) 昨年度ネオニコチノイド系物質の強制投与後、2 時間後には細胞体での興奮性が著しく亢進している様子が検出した。今年度は遅発毒性について検討した。海馬の 3 シナプス回路につ

いて、3 種類の刺激強度で刺激を加えた時の信号伝達について、通常の伝播パターンと GABAA 受容体阻害剤 (SR-95531, Gabazine) を加えた時の応答について、イメージング解析を適用した。ACT の投与群において、貫通繊維の刺激で歯状回 (DG) の過興奮がみられる個体があった。一方、CA1 ではバルプロ酸、ビスフェノールのような一貫性のある違い (Juliandi ら, Stem Cell Rep 2015) が見出せなかった。そこで、海馬 CA1 野でのシナプス可塑性に対する影響をさらに調べたところ、長期増強 (LTP) の誘導について IM, ACT の投与でそれぞれ異なる遅発影響が現れていることがわかった。今後、この神経回路機構を検証する必要がある。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

海馬以外の神経回路で、化学物質による変化を示すことが容易な神経回路を選ぶために、探索的に他の神経回路の応答を検討している。今年度は、引き続き皮質系の回路として、傍梨状核 (EPN)、体性感覚野、前帯状皮質 (ACC) を 1 つのスライス標本に含む回路の発振現象が起こることを見出し、EPN, ACC が発振を起こす回路となっていることを明らかにした。

また、ACC に関しては海馬との信号伝達において重要な役割を果たしていること、脳両側の信号伝達で重要な役割を果たしていることからさらに解析を進め、その深層からの信号が両側の信号伝達に重要であることを明らかにした。

(3) 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考えた。さらに脳情報処理における意義を明らかにするため、複数入力に対する応答を検討した。その結果、GABA 受容体の働き方として、フィードフォワードとフィードバックでそれぞれ異なる働き方をすることを明らかにした。これを遅発毒性検出に使えるかどうか、さらに可塑性との関連について検討を始めた。

(4) 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。今年度は特に無染色のスライス標本での計測を行いこれまで報告されていない哺乳類脳組織での光散乱による膜電位応答の光学計測に成功した。

D. 考察

ネオニコチノイド類の遅発毒性の検討でACTとIMで、海馬神経回路の信号伝達において異なる影響が見出された。また、可塑性への影響も異なっていた。この違いの背景にある神経回路機構を明らかにする必要がある。

これとともに、昨年度以前に見出しているバルプロ酸、ビスフェノールの遅発毒性における興奮-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。また、無染色標本での計測は評価系として有用だと思われるのでさらに計測法を確立する。

E. 結論

光計測法を使うことによって、海馬神経回路の変調を効率よく、定量的に検出する系が確立できた。この手法は幼若期から成長に伴ったどの成長段階の標本でも同じように適用できる上、電気生理学的な知見と密接な関係があり相補的に解釈することで神経機構の解明に重要な意義を持つ。今後とも光計測法を軸に、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. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

2. 学会発表

1. Tominaga T and Tominaga Y. Voltage-sensitive dye imaging

study of the input-dependent GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of the hippocampus 471.13/G4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017

2. WAKAYAMA Y, KAMADA S, YAMADA Y, TOMINAGA T, KAJIWARA R Voltage-sensitive dye signal analysis of inhibitory components in mouse perirhinal-entorhinal cortical slices 378.05/H4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017
3. 平島 寛司、富永 貴志、富永 洋子、岳 鳳鳴、滝澤 佐季子、横山 忠幸、松本 健、友常 大八郎、佐々木 克典 「膜電位感受性色素(VSD)を用いた光計測技術によるリプログラミングがん細胞膜電位計測法」第17回日本再生医療学会総会 2018.3.21 口頭発表 パンフィコ横浜
4. 富永貴志 「イントロダクション」ワークショップ「個性」創発神経基盤の統合的理解に向けた階層横断的解析(オーガナイザー富永貴志, 郷康広) 2017.12.06 生命科学系合同年次大会 ConBio2017 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場
5. 富永貴志 「膜電位イメージングの技術支援: 実施例から」新学術領域「個性」創発脳の第2回若手の会・技術講習会 2017.11.21 京都大学 楽友会館 2F 会議・講演室 (招待講演)
6. 河野 睦, 世戸 彩華, 石田 正樹, 富永 貴志, 堀 学 ゾウリムシの逃走反応におけるストマチン様タンパク質の役割, 2017/11/18, 第50回日本原生生物学会大会と第1回日本共生生物学会大会 つくば
7. 富永貴志 「ゾウリムシと電気生理学」シンポジウム「ゾウリムシ

- 研究の新潮流」(オーガナイザ 富永貴志, 掘学, 石田正樹) 日本動物学会 2017.09.21 (富山大学)
8. 富永貴志, 富永洋子 「海馬 CA1 野のペアドバーストファシリテーション (PBF) の GABAergic なフィードフォワード, フィードバック調節: 膜電位感受性色素による研究」 (Feedforward- and feedback- GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of hippocampus: A voltage-sensitive dye study Takashi Tominaga, Yoko Tominaga) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.20 口頭発表
 9. 吉村 弘, 須貝 外喜夫, 加藤 伸郎, 富永 貴志, 富永 洋子, 長谷川敬展, 姚 陳娟, 赤松 徹也 カフェイン投与により誘発されるラット視覚野オシレーションにおける non-NMDA 受容体と NMDA 受容体の相互交錯的関与 (Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
 10. 和歌山 ゆうか, 鎌田 翔仁, 山田悠太, 富永 貴志, 梶原 利一 膜電位イメージングによる嗅周囲皮質の抑制性/興奮性神経活動の層分布解析 (Layer Distribution Analysis of Inhibitory and Excitatory Activity Components in Perirhinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Imaging) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
 11. 梶原 利一, 和歌山 ゆうか, 富永洋子, 富永 貴志 神経興奮伝播の促進に關与するマウス嗅皮質神経回路可塑性の膜電位イメージング (Voltage-sensitive dye imaging of the network plasticity facilitating the neural excitation propagation in mouse rhinal cortices) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
 12. 富永貴志, 富永洋子 「情動認知行動影響の毒性評価における神経回路機能イメージング法を用いた神経基盤解析」 第44回日本毒性学会学術年会 パシフィコ横浜 2017.07.12 シンポジウム招待講演
 13. 富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第2回領域会議 「個性」創発の神経基盤解析のための神経回路イメージング法と行動様式プロファイリング 御殿場 2017.0708
 14. 富永貴志 「膜電位感受性色素を使った光計測法により神経回路機構を探る—海馬を中心として」 第37回 Neuroscience Seminar Tokushima 徳島大学病院 2017.03.06 招待講演
 15. Takashi Tominaga Cellular electrophysiology to VSD imaging, International Symposium on Future of Brain Science 2017.03.03 東北大学 招待講演
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

成果報告 5
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29年度班会議

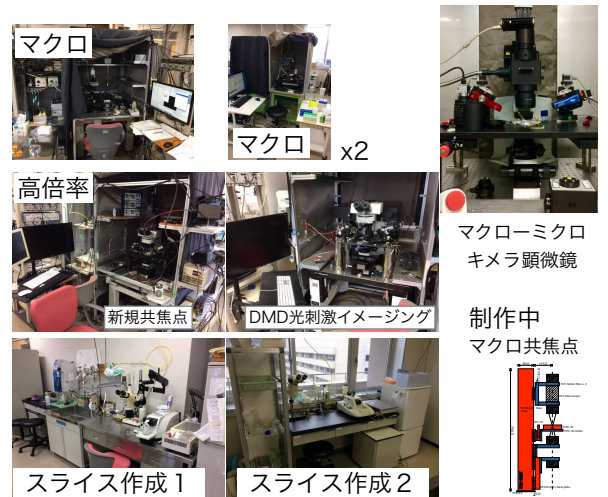
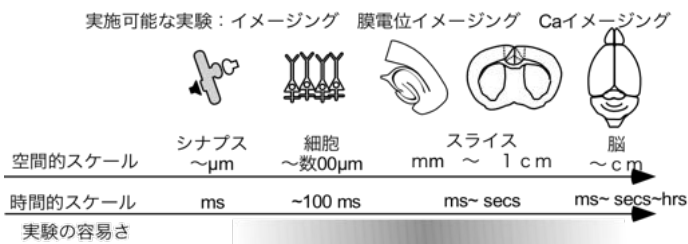
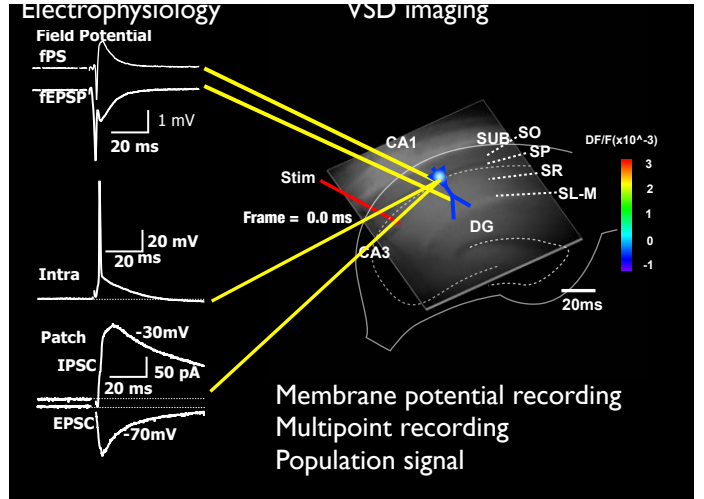
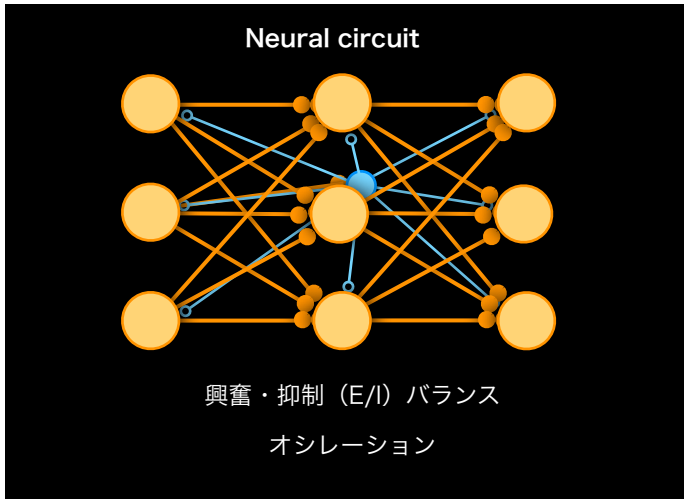
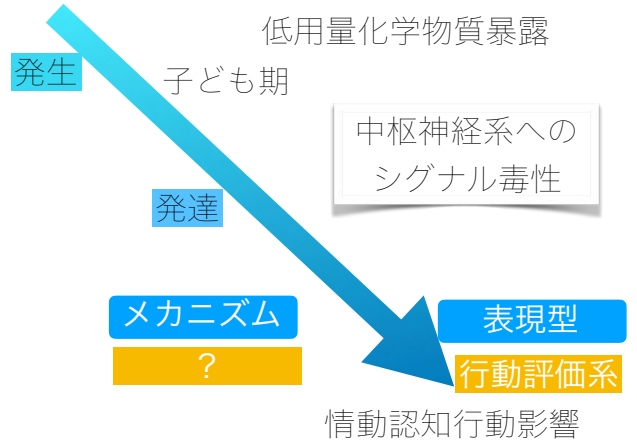
平成29年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

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)

日時: 平成30年 2月22日 (木) 13:30-16:40

場所: 東京国際フォーラム会議室 G401

〒100-0005 東京都千代田区丸の内3-5-1 (電話03-5221-9040)

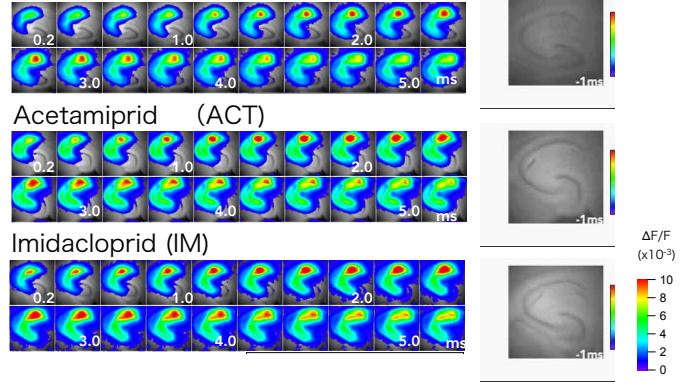


neonicotinoid

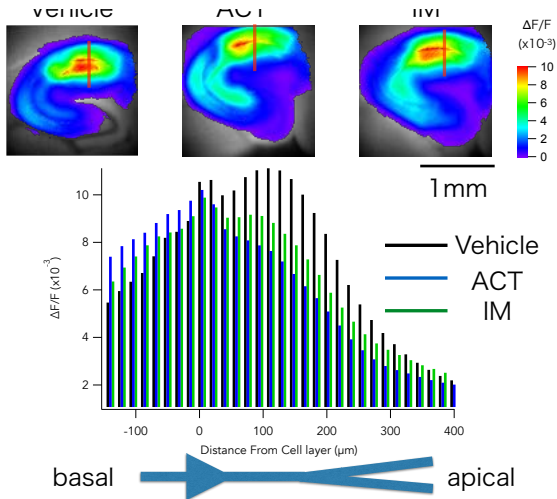


7

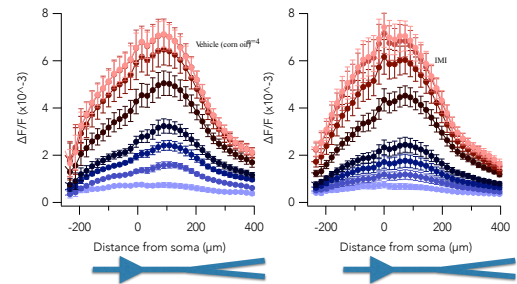
Control



8



9



10

Stem Cell Reports

Article



OPEN ACCESS

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

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

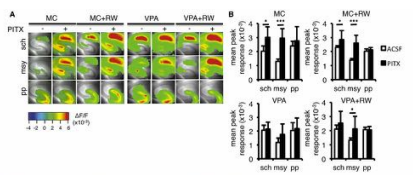
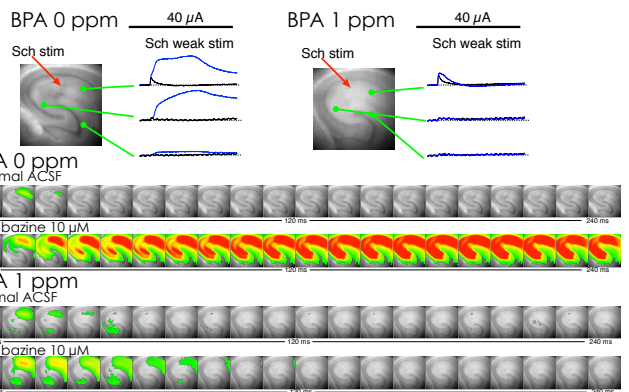


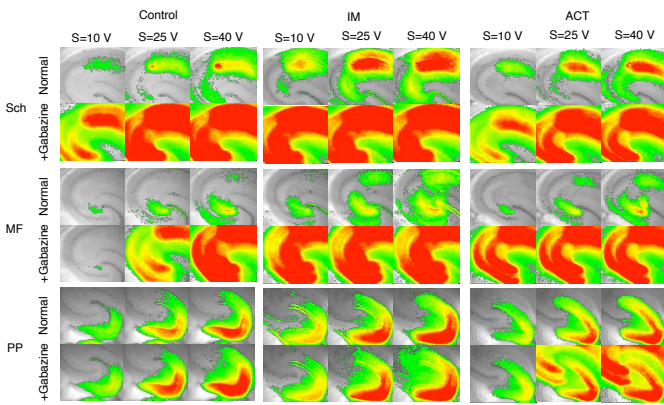
Figure 7. Voluntary Running Restores Neuronal Activity in VPA-Treated Mice
 (A) Representative pseudocolor activity maps of brain slices including the hippocampus show that voluntary running can only recover the impairment of GABA_A receptor-mediated inhibition in the mossy fiber pathway (mfj) of VPA-treated mice, after treatment with the GABA_A receptor channel antagonist picrotoxin (PDX) (n = 4 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 CA1/CA3 border of CA1 (sch) to the granule cell layer to stimulate the mossy fiber pathway (mfj) and to the molecular layer of the upper blade in the DG (dg).
 (B) Quantification of the neural response to artificial cerebrospinal fluid (ACSF) with (black bars) or without PDX (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 PDX application seen in sch and mfj was abolished in VPA-treated mice, voluntary running could restore the augmentation only in the mfj.
 MC, prenatal methylcellulose (vehicle); MC + RW, prenatal 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.

11

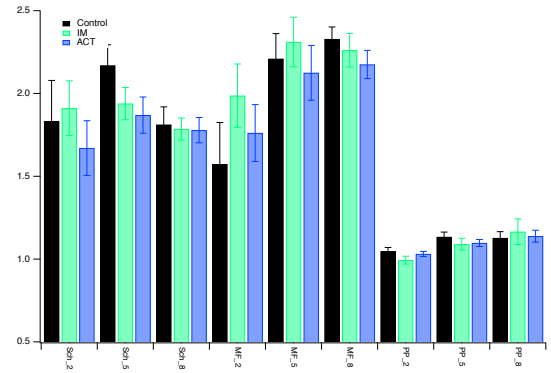


12

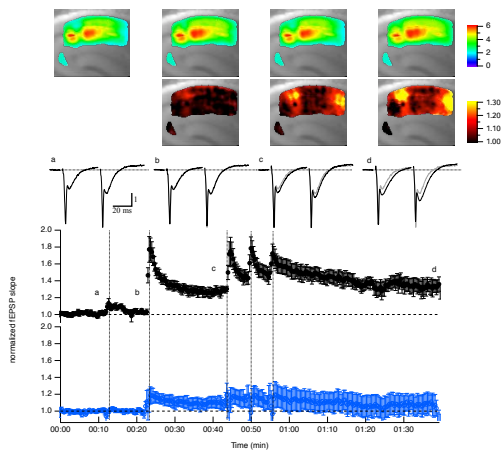
Tanemura & Tominaga, unpublished



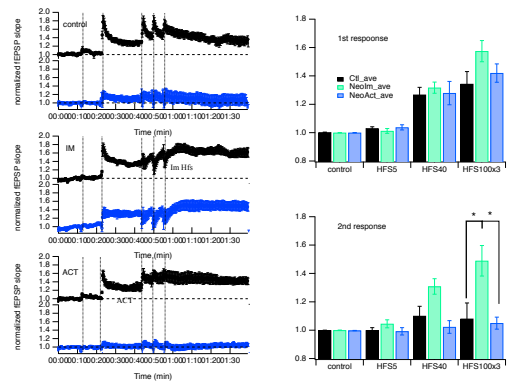
13



14

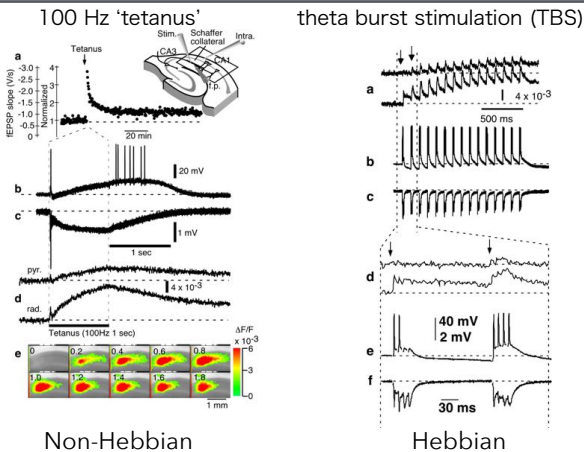


15



16

LTP induction stimulus



Non-Hebbian

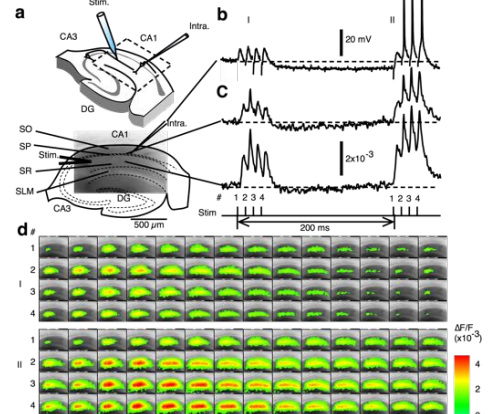
Hebbian

17

T. Tominaga et al., *J Neurophysiol.*, 2012

The first pair of the burst stimulation induced the facilitation

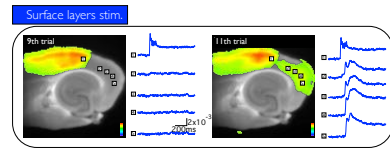
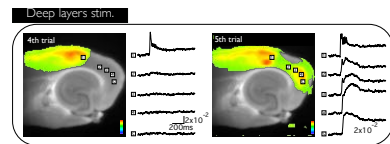
Paired burst facilitation (PBF)



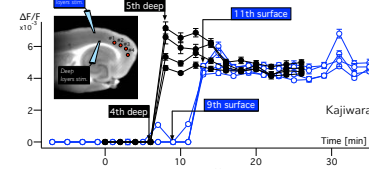
Tominaga & Tominaga, *Front Cell Neurosci.*, 2016

18

海馬以外はどうか？

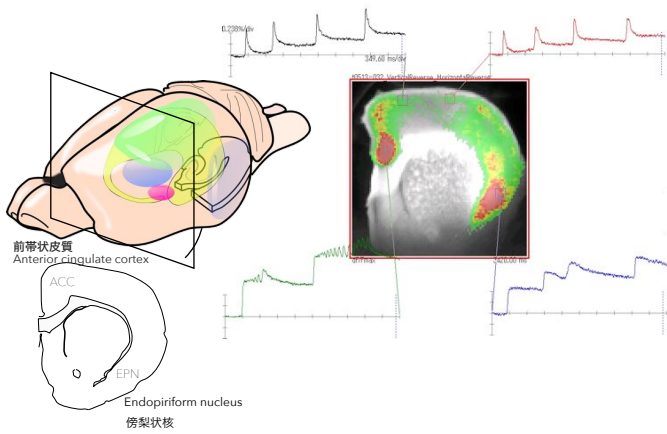


B Averaged maximum amplitude plot of the EC response at ROI #1-#4 in the picture.



Kajiwara, Tominaga, SFN2016, SanDiego

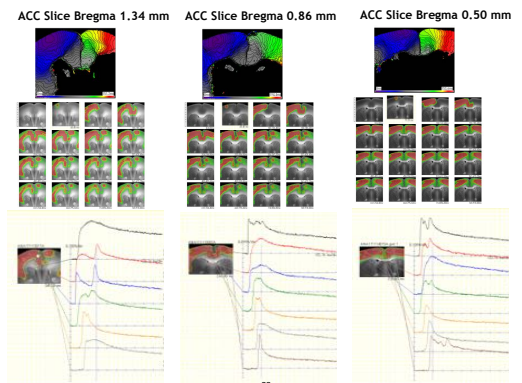
Cortical oscillation



徳島大学 吉村先生のグループとの共同研究

ANTERIOR CINGULATE CORTIX (ACC)

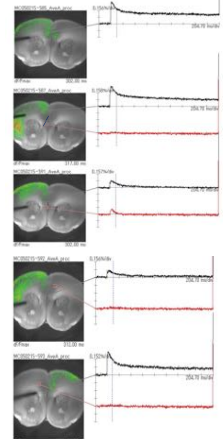
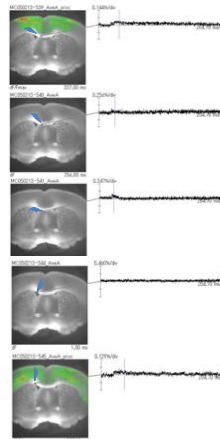
The anterior cingulate cortex (ACC) lies in a unique position in the brain, with connections to both the "emotional" limbic system and the "cognitive" prefrontal cortex. Thus, the ACC likely has an important role in integration of neuronal circuitry for affect regulation and can be identified as a distinctive region in understanding psychopathology. To acquire the broad swath of the neural activity, we employed a specially designed wide-field imaging system with a high-speed and high-resolution imaging system with a large imager (MICAM05, BrainVision, Inc.)



ANTERIOR CINGULATE CORTIX (ACC)

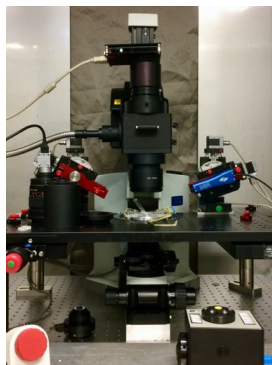
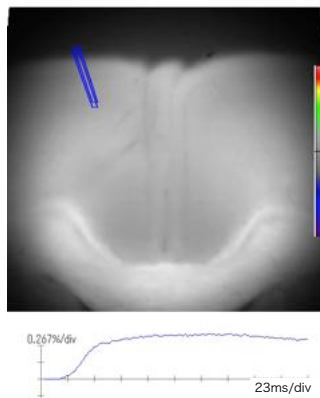
Different Stimulation Points (no

Stimulation After Cutting

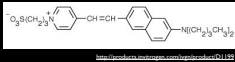


Before Cut

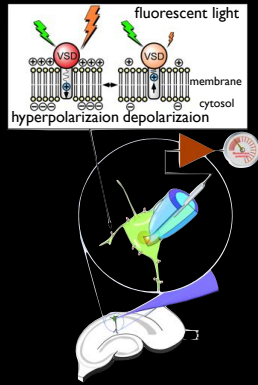
After Cut



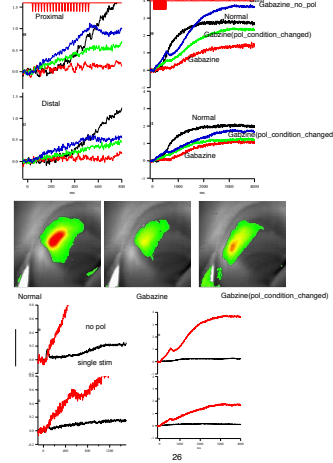
Voltage Sensitive Dye (VSD) imaging



- 1902 Bernstein, The membrane theory of nervous conduction
- 1934 Kamada, First intracellular recording with a microelectrode from an animal cell
- 1939 Hodgkin & Huxley, Squid axon intracellular recording
- 1942 Curtis & Cole, Squid axon intracellular recording
- 1949 Hill DK & Keynes RD, Optical recording
- 1952 Hodgkin & Huxley, Voltage Clamp
- 1968 Tasaki I et al., Voltage sensitive fluorescent dye
- 1972 Cohen LB et al., Voltage sensitive dye
- 1981 Patch clamp recording



Fastest recording of intrinsic signal !



光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

計測できた遅発性神経毒性

1. バルプロ酸による興奮/抑制バランスの改変を示した
2. BPAによる神経の過興奮の閾値の変化を示した
3. ネオニコチノイドの幼若期投与でCA1の興奮性の亢進が認められた



指標としてわかりやすい(計測しやすい)活動はどれか？

抑制系の関与する短期可塑性 E/I

シータリズムなど特定の周期活動に依存した可塑性

海馬以外のモデルとなる神経回路の設定

発生時期ごとの応答の計測