

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書（分担5）

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

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 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、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。回路の発生初期の急性影響と成長後の遅発毒性について検討した。その結果、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受容体に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 (図 1) 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, ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (中島・種村らとの共同研究) バルプロ酸, ビスフェノール A, ネオニコチノイドの, 幼若期の急性影響と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。遅発毒性の検討を行うためには, 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, シヤーフアー側枝を 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) バルプロ酸, ビスフェノール A, ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (中島・種村らとの共同研究)

急性効果: 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。(図 4) 遅発毒性: 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, 通常伝播パターンと GABA 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。バルプロ酸の遅発毒性に関しては, 回路の E/I バランスの破綻を示唆する知見が得られている Juliandi ら, Stem Cell Rep 2015) (図 2)。またビスフェノール A では, とくに刺激強度が弱い領域での GABA 抑制条件での応答の違いが顕著に現れた (図 3)。

ネオニコチノイド類では, 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 (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 (図 5)。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, 化学物質による改変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

光計測法によってバルプロ酸, 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。

一方, 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

Yoshimura H, Sugai T, Kato N, Tominaga T, Tominaga Y, Hasegawa T, Yao C, Akamatsu T. Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during oscillatory wave propagation: Analyses of caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats. *Neural Netw.* 2016 Jul;79:141-9. doi:10.1016/j.neunet.2016.03.012. PubMed PMID: 27136667.

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)

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* 2015 Reports:1-14

doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.012

## 2. 学会発表

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

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

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 パシフィコ横浜

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

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）

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

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」（オーガナイザー 富永貴志，堀学，石田正樹）日本動物学会 2017.09.21（富山大学）

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

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

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

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関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

- 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
- 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
- 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ー海馬を中心として」第37回 Neuroscience Seminar Tokushima 徳島大学病院 2017.03.06 招待講演
- 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
- Tominaga T and Tominaga Y. Activation of GABAA-receptors by high-frequency stimuli causes paired burst facilitations in area CA1 of the hippocampal slice 504.19 / L2 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
- M. Koike-Tani, S. Mehta, T. Tominaga, R. Oldenbourg, T. Tani Imaging of polarized light signal changes associated with neuronal activity in mouse hippocampus 300.03 / E7 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
- R. Kajiwara, Y. Wakayama, Y. Tominaga, T. Tominaga Network plasticity facilitating the neural excitation propagation between the perirhinal and entorhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging 302.14 / F15 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
- T. Luyben, J. Borovac, M. Valencia, M. Khan, T. Tominaga, K. Okamoto Rapid postsynaptic cAMP signaling regulates structural and functional potentiation underlying learning and memory 505.07 / L10 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
- 富永 貴志, 富永 洋子「使える」膜電位感受性色素による神経回路解析法 “Conventional” voltage sensitive dye imaging of neural circuit activity 第54回日本生物物理学会年会 (つくば国際会議場) 「神経活動イメージングの最先端:新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアンクン (沖縄科学技術大), 富永 貴志 (徳島文理大) 2016 年 11 月 25 日
- 小池(谷) 真紀, Mehta Shalin, Oldenbourg Rudolf, 富永貴志, 谷 知己 新規偏光顕微鏡を用いたマウス海馬スライスにおけるシナプス活動の非侵襲的計測 Imaging of neuronal activity in mice hippocampal slices by instantaneous polarized light microscopy 第54回日本生物物理学会年会 (つくば国際会議場) 「神経活動イメージングの最先端:新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアンクン (沖縄科学技術大), 富永 貴志 (徳島文理大) 2016 年 11 月 25 日
- 富永貴志 富永洋子 (2016) GABA 依存のペアードバースト促進は海馬 CA1 における新規の NMDA 非依存的な短期可塑性である GABA dependent paired burst facilitation (PBF) is a new class of NMDA-independent short-term plasticity in area CA1 of the hippocampal slice. A voltage-sensitive dye study 第39回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月20-22日 O2-J-2-3
- 吉村弘, 富永洋子, 富永貴志 (2016) ラット傍梨状核において大脳皮質脱抑制下で生じるエコー波 Cortical disinhibition-induced echo wave in the EPN of rat 第39回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月20-22日 P2-058
- 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

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 Hodgkin-Huxley 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<sub>A</sub> 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<sub>A</sub> 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

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

図表はここからお願いします。

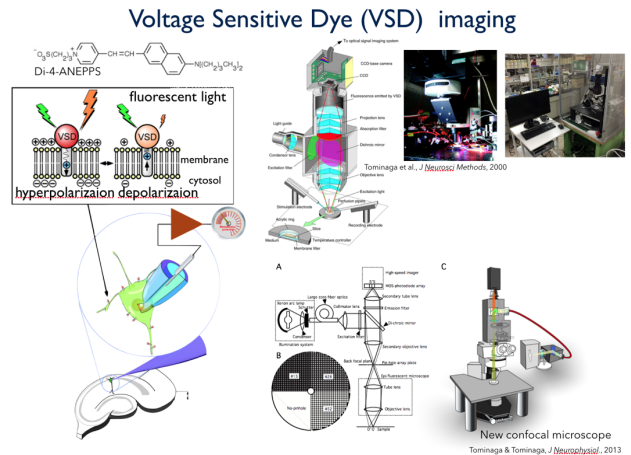


図1 光計測法の概要

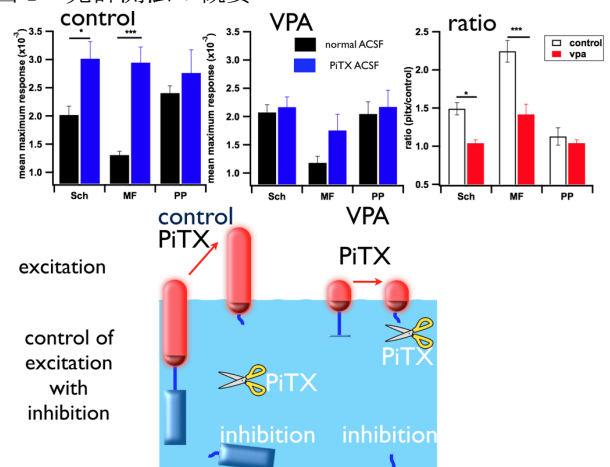


図2 バルプロ酸の遅発毒性

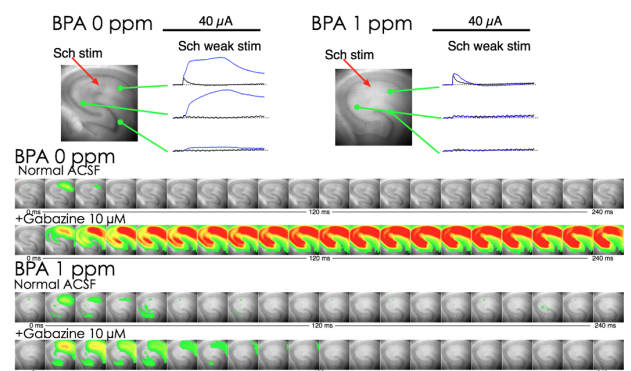


図3 ビスフェノールの遅発毒性

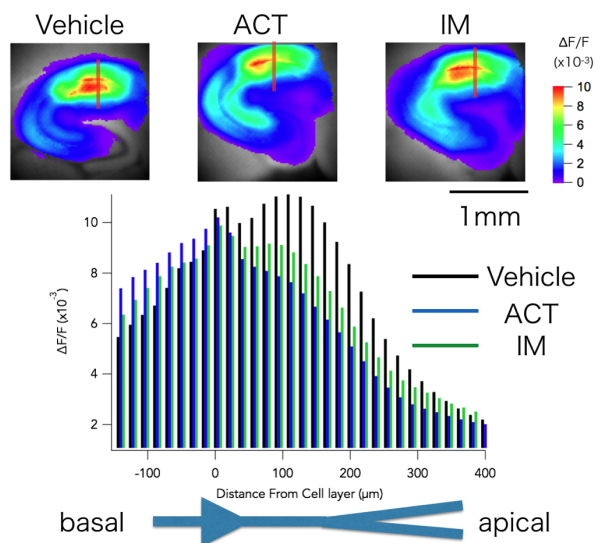


図4 ネオニコチノイドの急性影響

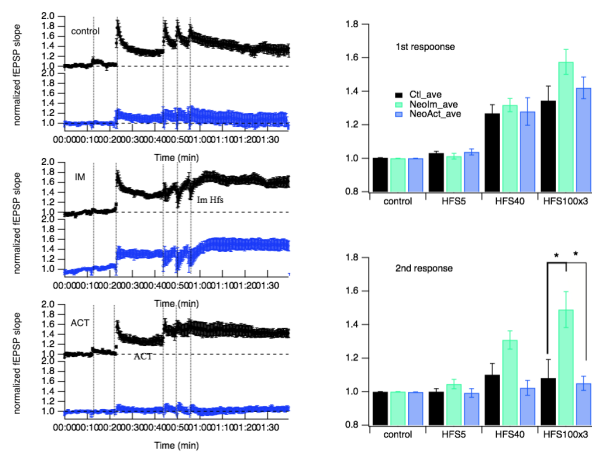


図5 ネオニコチノイドのシナプスへの影響