

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

幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発

研究分担者 産業医科大学 産業生態科学研究所 教授
上野 晋
研究協力者 産業医科大学 産業保健学部 講師
笛田 由紀子
研究協力者 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 講師
吉田 祥子

要旨

本研究班が提案してきた遅発性神経毒性試験手法の妥当性を調べる目的で、産業化学物質 1-ブロモプロパン (1BP) を検討した。1BP については生殖毒性や神経毒性などが報告されているが、発達神経毒性は未だ不明である。そこで妊娠ラットに対して 1BP の吸入曝露を行い、産まれた仔ラットの成長に伴う海馬神経回路機能の発達を検討した。その結果、1BP 胎生期曝露により神経回路機能の興奮性が授乳期に亢進すること、成長後にはその回路におけるフィードバック抑制機能が減弱することが判明した。特に前者については、神経細胞の入出力特性がロジスティック方程式を用いて総合的に評価できる可能性も見出した。これらの結果より、1BP が遅延性の神経毒性を有する可能性が示唆され、さらに産業化学物質についてもその遅延性神経毒性の評価指標として、生後早期の海馬神経回路機能評価が有用となる可能性が確認された。

A. 研究目的

我々はこれまでに胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指し、作用の異なる神経毒性物質(自閉症モデル動物作製に用いられるバルプロ酸、内分泌かく乱作用を示す有機スズ化合物、有機リン系農薬クロルピリホス)を用いて、海馬神経回路機能に対する影響を指標とした発達期の神経毒性評価を行ってきた。この知見をもとに、当分担研究班では発達神経毒性が不明な産業化学物質 1-ブロモプロパン (1BP) を妊娠ラットに吸入曝露させ、産まれた仔ラットから脳スライス標本を採取し、神経回路異常の有無について電気生理学的手法による検証を行った。

B. 研究方法

1. 1BP の吸入曝露 (研究協力者 笛田由紀子)

Wistar 系妊娠ラットに対して、曝露チャンパー内で 1BP を濃度 400、700 ppm で 1日 6 時間、妊娠 1~20 日目まで反復吸入曝露を行った。対照群には同様のチャンパーで新鮮空気を供与した。

2. 刺激応答性とフィードバック抑制の電気生理学的評価法 (研究協力者 笛田由紀子)

図 1 の実験プロトコルに示すように、反復吸入曝露を行った妊娠ラットより得られた雄性仔ラットの生後 2 週齢~13 週齢時に、深麻酔下断頭したのち速やかに海馬を取り出した。ティッシュチョッパー (McIlwain tissue chopper) を用いて、すべての日/週齢について厚さ 600 μm の海馬スライス標本を両側の背側海馬(海馬長軸の中央あたり)から作製した。

バルプロ酸投与実験と同様に、刺激電極と記録電極を海馬スライスに設置した後(図 2)、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位を、シナプス層から集合興奮性シナプス

後電位を記録して神経回路興奮性および興奮性シナプス強度を評価した (図 3)。

評価法は、10 μ A~600 μ A の電気刺激を与えた時の神経細胞の応答性の発達に伴う変化を、2 週齢 (13~15 日齢) については対照群と 400/700 ppm 曝露群の間で、5 週齢、8 週齢および 13 週齢については対照群と 700 ppm 曝露群との間で比較した。2 週齢の神経細胞の入出力特性とは、神経細胞への入力を集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope) とし、出力をその神経細胞群が発生する集合スパイク電位 (PS) の振幅とした。この入出力特性は、ES coupling と称されており、例えばシナプスの長期増強時には、ES coupling の亢進現象 (ES potentiation) が観察される。本研究でもこの ES coupling を定量的に評価するために、後述するロジスティック方程式で回帰曲線を求めた (図 4)。

遅延性発達毒性評価には、刺激応答性に加えて、2 連続刺激で誘発される誘発電位から計算されるフィードバック抑制系の機能評価を指標とした。このフィードバック抑制系が形成されていれば、2 回目の刺激に対する応答は 1 回目の刺激に対する応答よりも小さくなる。つまり、2 回目の応答の大きさを 1 回目の応答の大きさで除した比 (ペアパルス応答比) は 1 よりも小さい値となる。さらにペアパルス応答比が 1 よりも小さい場合には、この抑制系機能の強さをその比の大きさを定量的に評価できるという面もあり、簡便な評価指標ともいえる。そこで神経細胞層へのフィードバック抑制の強さを、2 回目の PS の振幅を 1 回目の PS の振幅で除して数値化して評価した。

3. ロジスティック方程式による ES coupling の解析

解析には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用い、5 パラメーターロジスティック式で非線形回帰を行った。最大値は 600 μ A 電気刺激における PS 振幅値が最大値の 90% と仮定し (Top)、最小値は PS 振幅値を 0 mV (Bottom) として固定した。この最大値の半分の値を示す fEPSP slope 値 (量反応曲線における EC₅₀ に相当する)、傾斜因子 (Hill Slope)、および非対称性を定量化するパラメータ S、の 5 種類のパラメータで解析をした。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、産業医科大学に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をした。

C. 研究結果

これまで検討してきたバルプロ酸の胎生期曝露による神経発達への影響と類似して、1BP の胎生期曝露でも濃度 400 ppm から興奮性シナプス強度の増強、ならびに神経回路の刺激応答性の亢進が生後 2 週齢、特に 14 日齢で認められた。またこの亢進現象を評価するに当たり、集合興奮性シナプス後電位と集合スパイク電位とから得られるロジスティック曲線が有用であること可能性を見出した (図 5)。ところが授乳期に観察された刺激応答性の亢進は 5 週齢以降には観察されず、1BP 曝露群は対照群と同程度の刺激応答性を示していた。

ペアパルス応答比によるフィードバック抑制機能の評価において、1BP 胎生期曝露により性成熟後にフィードバック抑制機能が減弱することも判明した (図 6、7)。

D. 考察

バルプロ酸胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した生後 2 週齢における海馬神経回路興奮性の亢進が、1BP の胎生期曝露ラットにおいても、曝露濃度 400 ppm から認められた。このことより、1BP も発達神経毒性を有する化学物質である可能性が示唆された。さらに、入出力特性の亢進は、ES coupling のデータをロジスティック曲線で回帰して得られるパラメータの比較によって定量化することができることが判明した。

性成熟後の海馬においては、刺激応答性が対照群と 1BP 曝露群とでは同程度であったが、フィードバック抑制機能が 1BP 曝露群で減弱していた。抑制系の減弱は中枢神経系の興奮性のバランスを不安定にすることから、てんかんのような中枢神経系の過剰興奮を病態とする疾患の素因となり得ることが動物やヒトでも報告されている。1BP の胎生期曝露により成熟後のフィードバック抑制系が減弱したことから、1BP が遅延性神経毒性を有する化学物質である可能性が示唆された。

成獣ラットを用いた 1BP の亜慢性曝露による中枢神経毒性の検討において、海馬神経回路のフィードバック抑制という指標についての NOAEL (無毒性量) は 200 ppm であり、LOAEL (最少毒性量) は 400 ppm であることが報告されている (Fueta et al, 2007)。これは成熟した脳に対しての NOAEL あるいは LOAEL ともいえる。一方、本研究は胎生期曝露という、化学物質曝露に対して一般的に脆弱であると考えられる時期での曝露を行っているが、今回得られた LOAEL は成熟脳と同程度の 400 ppm であった。ただし、亜慢性曝露の場合と胎生期曝露の場合とでは曝露期間が異なるため (前者は 6 時間/日、5 日/週、12 週間)、累積曝露量としては亜慢性曝露の場合が多いことが想定される。したがって、LOAEL が同程度であったとしても、1BP に対する感受性はやはり胎生期の脳が高いと考えられる。

1BP については、本邦で許容濃度 (0.5 ppm) がすでに日本産業衛生学会により勧告されているものの、その提案理由の中に発達神経毒性は考慮されていない。一方、米国における曝露限界値 (0.1 ppm) には、ヒトの事例は認められないものの動物実験データに基づく発達毒性が考慮されている (7th Edition *Documentation*, Product ID: 7DOC-730)。発達神経毒性が出現した 400 ppm を LOAEL とし、ヒトへの推定を試みると種差、個体差、LOAEL から NOAEL の推定等の不確実係数をすべて 10 として考慮した場合には 0.4 ppm となり、上記の基準値とは大きく矛盾しない。不確実係数の値には議論の余地があるものの、産業化学物質の発達神経毒性評価にも本研究で用いた評価手法が応用できれば、新規化学物質の許容濃度の提案の際の情報提供はもちろんのこと、1BP のようにすでに勧告された許容濃度に対して、発達神経毒性を考慮した場合の妥当性の検証などに有用となることが期待される。

今回の曝露条件については、1BP の産業現場における曝露様式が主に吸入曝露であることを想定し、また曝露濃度および曝露期間については、先行研究 (Fueta et al, 2007 ; Ishidao et al, 2016) を参考にした。バルプロ酸や有機スズ化合物の評価を行った時のように妊娠後期における単回曝露という様式でも産業化学物質が評価できるかどうかは今後の検討課題である。

また、授乳期の神経回路興奮性の亢進には抑制性神経伝達に関連している可能性があり、その分子メカニズムについては現在免疫組織化学的手法で検討中である。さらに、バルプロ酸の投与時期によって、授乳期の神経回路興奮性への影響が変化するののかも現在検討中である。

E. 結論

発達神経毒性の詳細が不明であった産業化学物質である 1BP について検討した結果、授乳期での神経回路興奮性に対して亢進作用を示したことから、1BP が発達神経毒性を有する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y., Ueno S. “Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus.” *NeuroToxicology* (2018) 65:1-8
- [2] Fueta Y., Ishidao T., Ueno S., Yoshida Y., Kanda Y., Hori H. “Prenatal exposure to 1-bromopropane causes delayed adverse effects on hippocampal neuronal excitability in the CA1 subfield of rat offspring.” *J Occup Health.* (2018) 60:74-79

2. 学会発表

- [1] 笛田由紀子、石田尾徹、吉田祥子、保利一、諫田泰成、上野晋：産業化学物質 1-ブロモプロパンの遅発性発達神経毒性評価、第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 横浜
- [2] Iwamoto S., Tomida T., Nakajima S., Fueta Y., Ueno S., Sekino Y., Maev R., Hozumi N., Yoshida S. : Maturation-dependent alteration of cerebellar structure in matured autistic model rat, 第 40 回日本神経科学大会、2017 千葉
- [3] 笛田由紀子、石田尾徹、吉田祥子、関野祐子、諫田泰成、保利一、上野晋：化学物質の胎生期曝露がもたらす発達神経毒性の評価－授乳期ラット海馬スライスを用いた神経細胞の応答特性の検討、第 6 回日本 DOHaD 学会学術集会、2017 東京
- [4] Ueno S., Fueta Y. : Developmental neurotoxicity evaluation: Studies on neural

- network activity at synaptogenic period, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 仙台
- [5] Miyamoto K., Mikami T., Fueta Y., Ueno S., Sekino Y., Kanda Y., Hozumi N., Yoshida S. : Alteration of GABA release in developing cerebellar cortex of VPA-administrated autistic model rat, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 仙台
- [6] Mikami T., Fueta Y., Ueno S., Sekino Y., Kanda Y., Hozumi N., Yoshida S. : Alteration of neurotransmitter release in cerebellar cortex of Valproate-administrated Autistic model rat, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 仙台
- [7] Sato S., Fueta Y., Ueno S., Sekino Y., Kanda Y., Yoshida S. : Alteration of neural circuit with autism-inducing drug administration in developing rat cerebellum, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 仙台
- [8] Ikai K., Nakajima S., Tomida T., Ueno S., Sekino Y., Kanda Y., Yoshida S. : Recovery effects from chemical-induced autistic degeneration with bumetanide or oxytocin in developing rat cerebellum, 第 60 回日本神経化学会大会、2017 仙台
- [9] Yoshida Y., Fueta Y., Ueno S., Hozumi N., Sekino Y., Kanda Y. : Structural and functional alteration of developing rat cerebellum by administration of autism-inducing drugs, 10th DOHaD world congress, 2017, Rotterdam
- [10] 笛田由紀子、石田尾徹、上野晋、吉田祥子、諫田泰成、保利一：1-ブロモプロパンのラット胎生期曝露は遅延性発達神経毒性をひきおこす、第 91 回日本産業衛生学会、2018 熊本（発表予定）。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

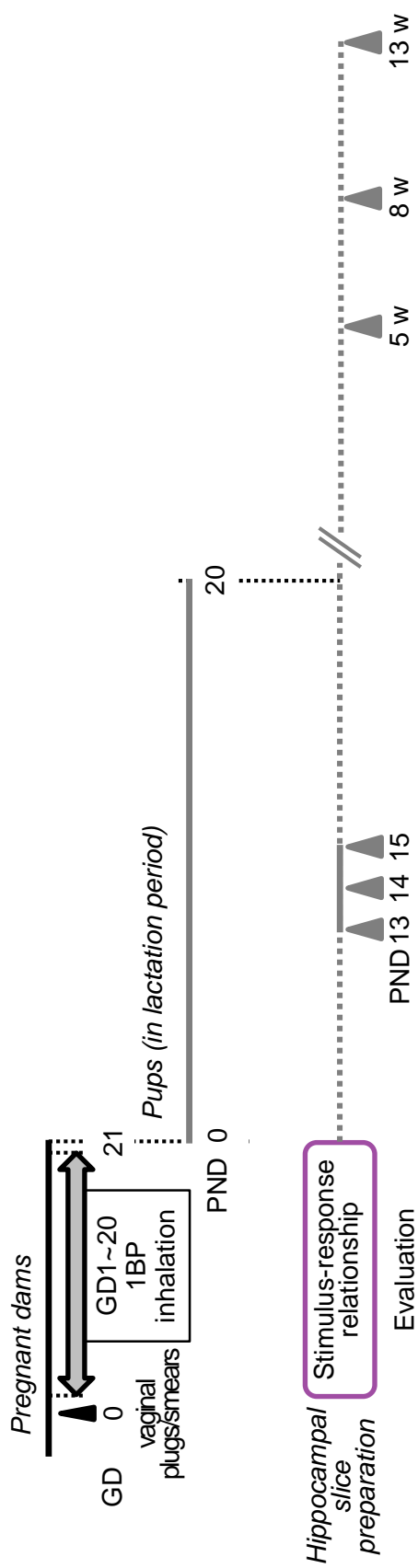
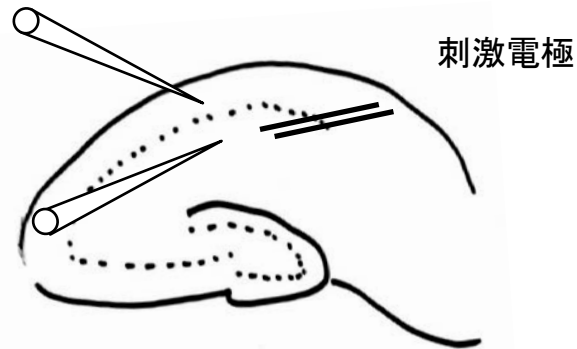


図1 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による発達神経毒性評価のためのプロトコル

ラットの妊娠1日目から20日目までの連続20日間、産業化学物質1BPの吸入曝露(400/700 ppm、6時間/日)を行った。開眼前の生後13、14日および開眼が始まる生後15日の3日間に、連続して海馬スライス標本を作製して発達神経毒性の評価を行った。さらに、成長後の影響を調べるために、離乳後の幼若期(5週齢)、性成熟後(8週齢)、成獣期(13週齢)の3点で遅延性の神経毒性の有無を調べた。

集合スパイク電位
Population spike
(PS)を記録する微小
電電極



集合興奮性シナプス後
電位(field excitatory
postsynaptic potential
(fEPSP)を記録する微
小電極

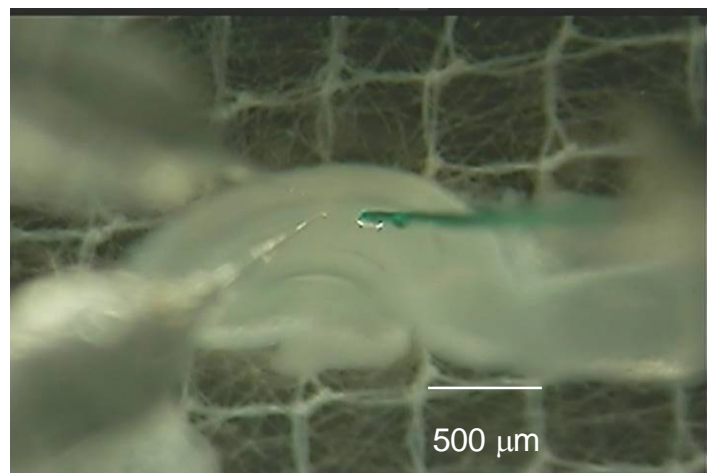
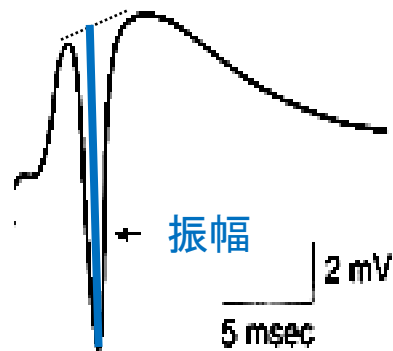


図2 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法

上図：海馬スライスにおける双極性電気刺激電極と2つの記録用ガラス微小電極の位置を示す。下図：実体顕微鏡下に撮影した生の海馬スライスと、刺激電極（左）および記録用ガラス微小電極（左）の配置。

集合スパイク電位
Population spike (PS)



集合興奮性シナプス後電位(集合EPSP)
(Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP))

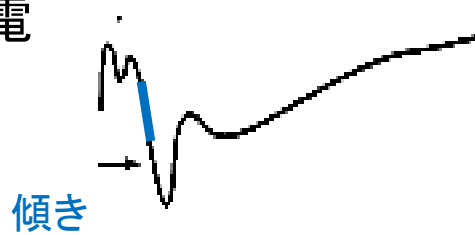


図 3 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き(fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

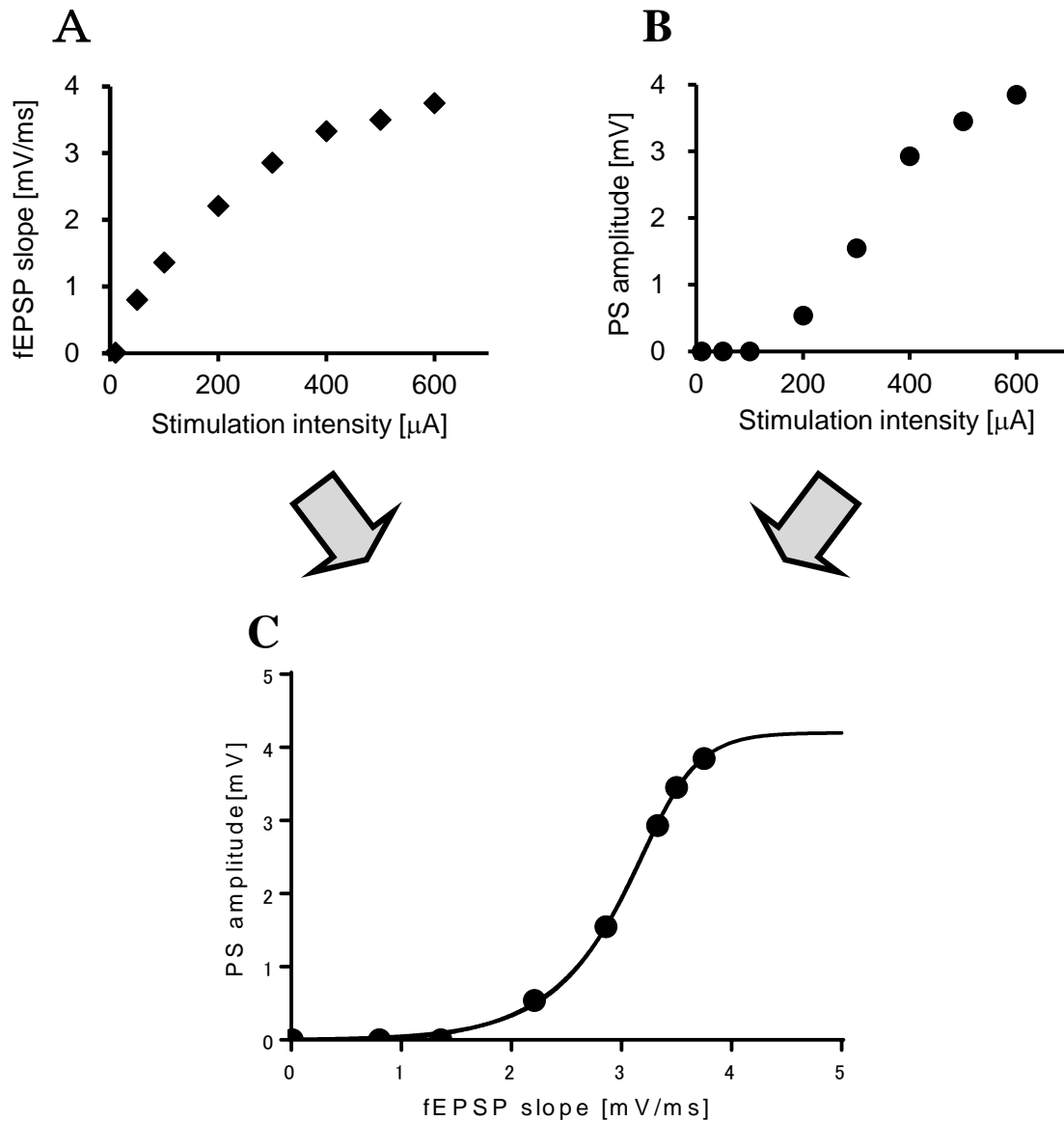


図4 fEPSP-spike (E-S) coupling と その非線形回帰モデル

A: 電気刺激の大きさに対する集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope)

B: 電気刺激の大きさに対する集合スパイク電位の振幅 (PS amplitude)

C: fEPSP-spike (E-S) coupling のグラフ。

集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope) に対する集合スパイク電位の振幅 (PS amplitude) の変化を示しており、スライス 1 枚ごとの神経細胞群の入出力特性を一つのグラフで表現できる。回帰曲線は 5 パラメータロジスティック回帰曲線である。データは 700 ppm 群の 1 例である。

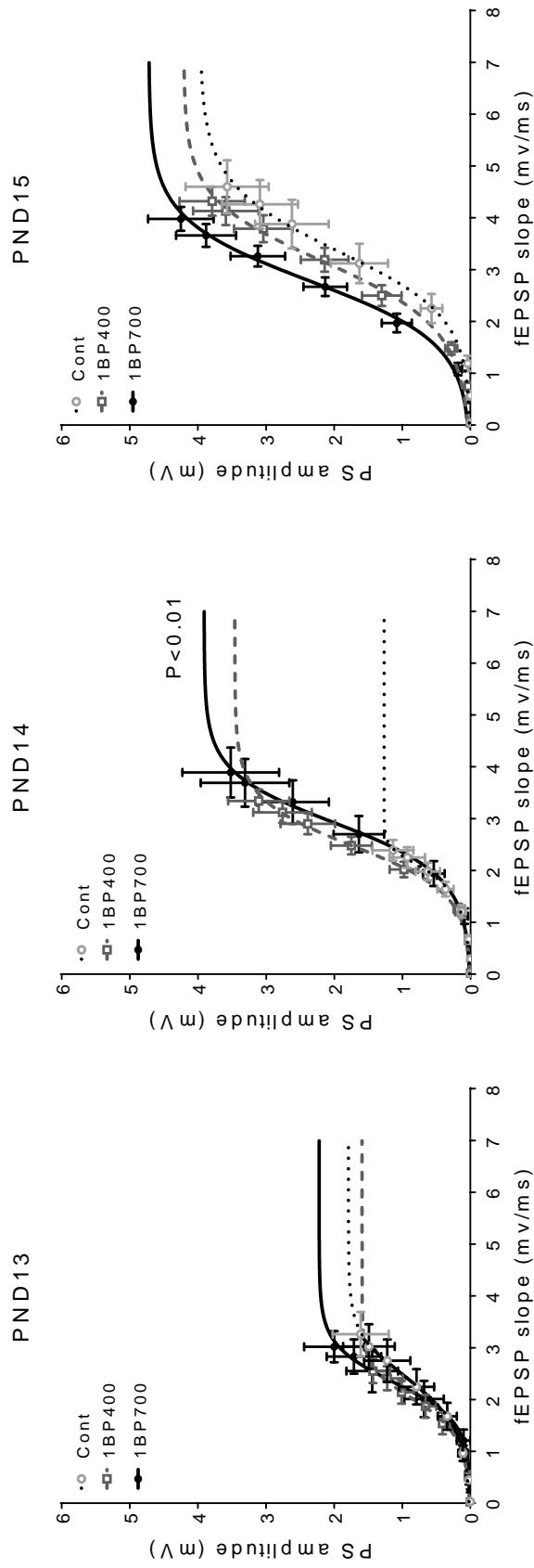


図5 1BP 胎生期曝露による海馬刺激応答性の ES coupling とロジスティック曲線

PS 最大値 (PSmax)、非線形回帰における 50%-PSmax 値の時の fEPSP slope 値、およびその座標における曲線の傾き (Hill 係数) において、PND14 では対照群と 1BP 曝露群 (400 および 700 ppm) との間に統計学的な有意差を認めた。

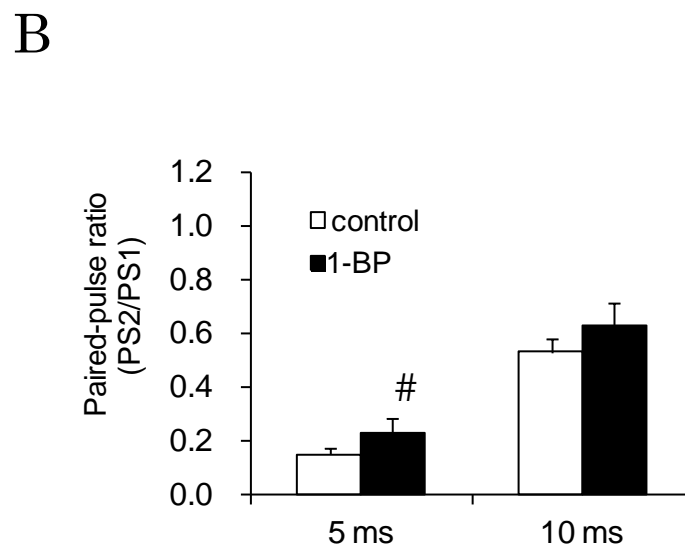
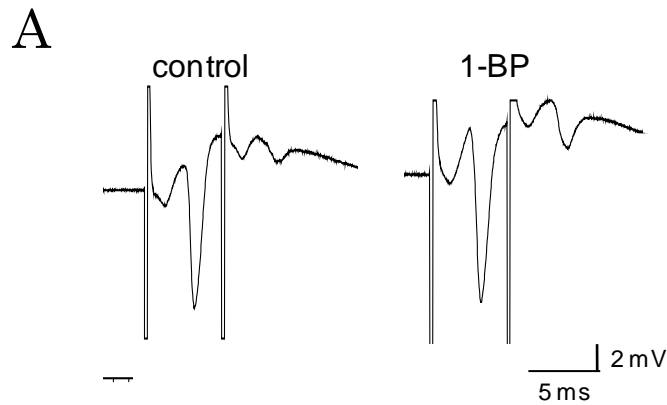
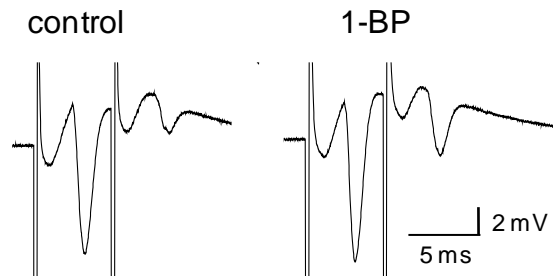


図6 1BP胎生期曝露ラット(8週齢)の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

刺激間隔 5 ms と 10 ms で誘発される PS1 と PS2 の振幅の比から、フィードバック抑制を評価した。A: 刺激間隔 5 ms において、対照群、1BP ともに、2 回目の刺激で誘発される PS 振幅は小さくなった。両群ともにフィードバック抑制が機能していることを示す。B: しかし、1BP 群では対照群と比較して、PS2/PS1 が有意に増加していることから (# $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test)、フィードバック抑制が減弱していることが判明した。

A



B

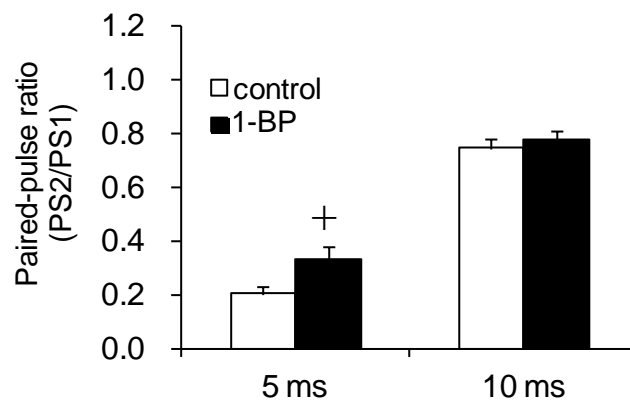


図7 1-BP 胎生期曝露ラット (13 週齢) の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

A: 8 週齢と同様に、刺激間隔 5 ms において、対照群、1BP ともに、2 回目の刺激で誘発される PS 振幅が小さくなったことから、両群ともにフィードバック抑制が機能していることを示す。B: しかし、対照群と比較して、1BP 群では PS2/PS1 が有意に増加していることから (# $p < 0.05$ by Welch's t -test)、8 週齢同様にフィードバック抑制の減弱が継続していることが示唆された。