

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

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、平成 28 年度と平成 29 年度に発達神経毒性が不明な産業化学物質 1-プロモプロパン（1BP）を検討した。そして、1BP 胎生期曝露により授乳期、すなわち神経回路発達期における回路機能の興奮性亢進現象が促進されること、成長後にはその回路興奮性に対する抑制系機能が減弱することを報告した。特に授乳期の変化については、神経細胞の入出力特性がロジスティック解析により総合的に評価できる可能性を見出した。平成 30 年度は、発達神経毒性の懸念があるバルプロ酸（VPA）とトリブチルスズ（TBT）を用いて、胎生期曝露の評価についても同様の解析法を用いて、VPA では回路興奮性の亢進現象が開眼前に出現することを定量的に評価できた。一方、TBT では回路興奮性の亢進現象が抑制されることが判明したが、これは *in vitro* 評価系による結果と相関するものであった。また、アクリルアミド（ACR）曝露による発達神経毒性の出現を評価する実験系を確立し、ACR の用量および投与時期と神経回路特性との関係性を解明することに活用できることが期待される。

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より、生後の遅発性神経毒性を脳スライスにより評価する方法の開発を目指し、作用の異なる神経毒性物質として、バルプロ酸（VPA）、有機スズ化合物（TBT）、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-プロモプロパン（1BP）について平成 28 年度と 29 年度に検討し、ロジスティック解析を用いて神経細胞の入出力特性を総合的に評価する手法が有効である可能性を示した。平成 30 年度は、VPA と TBT について 1BP 同様に、神経発達期における神経細胞機能の総合的な評価を試みた。また、アクリルアミド（ACR）については、母ラット自身への毒性が出現する可能性があることから、その影響を最小限に止めて胎生期曝露による影響を評価するための投与実験系

を確立し、発達神経毒性評価に適した条件を検討した。

B．研究方法

1．使用動物と化学物質の曝露

本学飼養保管飼育室にて交配により得られた Wistar 系妊娠ラット（13-19 週齢、初産）を用いた。VPA は 300mg/kg を生食に溶解し、妊娠 15 日目にイソフルラン吸入による軽麻酔下に経口投与した。対照群には生食のみを経口投与した。

TBT は 20 mg/kg を 50% ポリエチレングリコール水溶液に溶解し、対照群には 50% ポリエチレングリコール水溶液を同様に経口投与した。

ACR では、母ラットへの投与によるストレスが少なく、かつ継続的な投与が必要であることから飲水投与を選択した。濃度 20、50、100、200 ppm の ACR 水溶液を妊娠 6 日～19 日（胎生期曝露群）あるいは、妊娠 6 日～生後 21 日の離乳日（胎生授乳期曝露群）まで自由飲水で投与し、飲水量から投与量を計算した。対照群には通常

の精製水を自由飲水させた。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群の実験スケジュールを図1に示している。

## 2. 電気生理学的評価

VPA 胎生期曝露群とTBT 胎生期曝露群については、それぞれの対照群とともに生後2週齢前後の授乳期雄性仔ラットから海馬スライス標本を作製した。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領野の錐体細胞へのシナプス入力とその錐体細胞からの出力を記録し(図3)、海馬神経細胞の入出力特性についてロジスティック解析による定量的な評価を試みた(図4)。

## 3. 一般成長の観察：ACR 曝露実験

ACRには生殖毒性があることが知られている。そのため、母ラットに対する生殖毒性が結果に影響を及ぼす可能性を考慮すべきであることから、ACR曝露群については産仔数、性比、一般成長の一つとして開眼日の時期を検討した。

## 4. 体重、臓器重量の測定：ACR 曝露実験

母ラットへの毒性評価として行動観察を飼育中に行うとともに、定期的に体重測定を行った。出産後は、仔ラットの体重測定時に母ラットの体重測定も行った。

離乳後の生後21日目(PND21)に後述の行動試験を行い、その後に脳重量を測定した。生後体重の増加に対して影響が認められた場合には、その投与濃度群の生後23日目(PND23)において脳重量に加えて海馬重量、および肝重量を測定した。

## 5. Hindlimb landing foot-splay test

本研究では神経行動学的評価として、Sealeらの方法に従って、生後21日目の仔ラットを約15cm程度の高さから落下させた時の両後肢踵間を計測した(Seale et al, 2012)。

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

VPA 胎生期曝露では発達に伴う神経回路の刺激応答性亢進を促進させることが生後2週齢で認められた。一方、TBT 胎生期曝露では刺激応答性の亢進現象が抑制されることを見出した。これらの現象を数値化するために、ロジスティック解析を用いた(図5、6、7、8)。1BP(平成29年度に報告) VPAおよびTBT曝露実験で得られた電気生理学的結果に対してロジスティック解析を適用したところ、開眼前後の神経回路発達期における海馬神経細胞への入出力関係から、発達神経毒性の出現を評価できる可能性が示唆された。

ACRの総投与量はACR濃度に依存して増加したものの、各群の産仔数、性比、開眼日には有意な差は認められなかった。ACR投与による母ラットの体重への影響であるが、100ppm以上の濃度で認められた。また仔ラットの成長に伴う体重増加は濃度50ppm以上の投与で抑制された(図9)。さらにPND21における脳重量は、曝露濃度依存的に減少していた(図10)。また、濃度50ppmで胎生期曝露されたPND23の仔ラットでは、雌雄両方ともに海馬重量の増加が認められた(図11)。一方、肝重量には低下傾向が認められた(データ掲載せず)。

Hindlimb landing foot-splay testについては、雄性仔ラットでは、対照群と胎生授乳期曝露群50ppmで踵間距離の有意な減少が認められた(図12)。一方、雌性仔ラットでも減少傾向が認められたが有意な差には至らなかった。

## D. 考察

平成29年度に、1BP胎生期曝露によって海馬神経回路興奮性が促進することを、ロジスティック解析を用いて定量的に評価できることを報告した。濃度400ppmの1BP胎生期曝露の結果から、種差、個体差、LOAELの安全性係数を考慮すると、日本産業衛生学会が勧告する許容濃度0.5ppmとほぼ同程度の濃度(0.4ppm)が得られた。許容濃度0.5ppmの勧告理由には発達神経毒性は考慮されていないが、発達神経毒性を考慮しても現行の許容濃度は妥当な数値であると考えられる。

この知見をもとに、VPA胎生期曝露とTBT胎生期曝露についてもロジスティック解析により評価を行った。前者について

は、1BP 胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した海馬神経回路興奮性の促進が、VPA300 mg 投与群の生後 14 日齢 (PND14) と生後 15 日齢 (PND15) に認められた (図 6)。この神経回路興奮性の促進作用は、E.slope50 (ロジスティック解析において、出力 = 集合スパイク電位の最大値の 50% を誘導する時の入力 = 興奮性シナプス後電位の大きさ) の値も有意な差を伴っていることから (図 7) シナプス応答の出力側のみならず、入力側にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

一方、TBT は 1BP や VPA とは異なり、回路興奮性の亢進現象がむしろ抑制されることが判明したが (図 8) これは研究代表者の諫田らによる *in vitro* 評価系で見出された TBT による神経新生抑制作用と相関すると考えられる。また TBT は GABA 作動性抑制系に直接作用するという培養細胞を用いた報告もある (Yamada et al. Toxicol. Lett. 2010)。本研究は *ex vivo* 実験で、妊娠 15 日目に単回投与した TBT の影響を、投与後約 3 週間経過した生後 13 日齢から 18 日齢で評価したものである。したがって TBT が示す GABA 抑制系への直接作用とシナプス形成期に出現した回路興奮性に対する作用との関連や、そのメカニズムについては今後の検討課題である。

ACR については、母ラットへの毒性影響を考慮したうえで、発達毒性を示す濃度を解析した。成獣動物では ACR 曝露により末梢神経毒性が出現し、失調性歩行を呈することが報告されている。哺乳時に母ラットは一定の姿勢を保たなければならないため、末梢神経毒性とはいえ授乳への影響は無視できないことが考えられる。ACR の発達毒性の解釈については、母ラットの毒性影響の有無に注意が必要である。その結果、本実験条件において体重と脳重量を指標とした場合、20 ppm が無毒性量 (NOAEL)、50 ppm が最小毒性量 (LOAEL) となった。また 100 ppm 以上の濃度では母ラットに体重低下という影響が出現したことから (データ掲載せず)、発達毒性は判明したが、発達神経毒性に関しては、さらに他の指標を考慮することが必要となった。そこで、今後の電気生理学的指標評価で重要となる海馬についてもその重量を PND23 で測定したところ、雄性仔ラットで曝露濃度依存的に減少した PND21 での

脳重量は対照群と同程度までに回復していたにもかかわらず、海馬重量は有意に増加していた。Ogawa らは ACR 曝露した仔ラットの海馬では介在ニューロンの数が増加すること、歯状回顆粒細胞下帯でのアポトーシスが減少することを報告している

(Ogawa et al. Arch Toxicol. 2011)。この現象と本研究で認められた海馬重量の増加との関連については検討する必要がある。また、胎生期から授乳期まで ACR を連続曝露した例は他の論文でも見受けられるが、本研究では胎生授乳期曝露を行った母ラットで体重減少が認められていたため、仔ラットの神経行動試験の結果には、母ラットへの毒性が影響している可能性も現時点では否定できない。以上の結果から、発達神経毒性として、LOAEL の投与濃度 (50 ppm) や投与期間が決定された。1BP や TBT、VPA と曝露期間が異なることから、この場合での神経回路興奮性の評価時期についてはあらためて検討する必要がある。

授乳期の神経回路興奮性の亢進現象には、シナプス外 GABA が誘導する tonic inhibition が発達に伴い変化することと関連していることが示唆された。そこで海馬における GABA 系機能分子の分布を免疫組織化学的手法で検討したが、曝露による顕著な差は認められなかった。GABA 系機能分子の評価については生化学的手法を用いる別のアプローチを検討している。

## E. 結論

*in vitro* 系による評価との相関性が得られた化学物質もあったことから、生後早期の海馬神経回路機能の評価は、発達神経毒性の評価指標として有用である可能性が示唆された。またロジスティック解析を導入することによって、その定量性を総合的に評価できる可能性も示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

[1] KwongSoon TT, Nishikawa C, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Altered gut microbiota observed in valproate-administered autistic model rats. 第95回日本生理学会大会、2018年3月、高松。

[2] 笛田由紀子、石田尾徹、上野晋、吉田祥子、諫田泰成、保利一。1-プ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年5月、熊本

[3] 笛田由紀子、吉田祥子、石田尾徹、保利一、諫田泰成、上野晋。化学物質の発達神経毒性指標としての授乳期ラット神経細胞のE-S coupling。第45回日本毒性学会学術年会、2018年7月、大阪。

[4] Fueta Y, Ishidao T, Yoshida S, Hori H, Yamasaki D, Kanda Y, Ueno S. Electrophysiological evaluation of developmental neurotoxicity induced by the prenatal exposure to 1-bromopropane. EUROTOX 2018, 2018年9月, Brussels.

[5] Yoshida Y, Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Nomura Y, Kanda Y. The malformation of Purkinje cells becomes the sensing tool for developmental neurotoxicity; its potential and limitation. EUROTOX 2018, 2018年9月, Brussels.

[6] 笛田由紀子、吉田祥子、諫田泰成、保利一、上野晋。バルプロ酸やトリブチルスズによる発達神経毒性を授乳脳で評価するための電気生理学的指標。第36回産業医科大学学会、2018年10月、北九州。

[7] Fueta Y, Yoshida S, Sekino Y, Kanda Y, Ueno S. Electrophysiological and pharmacological evaluation of developmental neurotoxicity using brain slices obtained from juvenile rats prenatally exposed to chemicals. Society for Neuroscience 48<sup>th</sup> Annual Meeting, 2018年11月、San Diego.

[8] Nishikawa C, Sato K, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Autistic neuronal differentiation factors derived from astrocyte and microglia: Variant differentiation of cultured neurosphere in valproate-treated gliacultured medium. Society for Neuroscience 48<sup>th</sup> Annual Meeting, 2018年11月、San Diego.

G. 知的財産の出願・登録状況  
該当なし

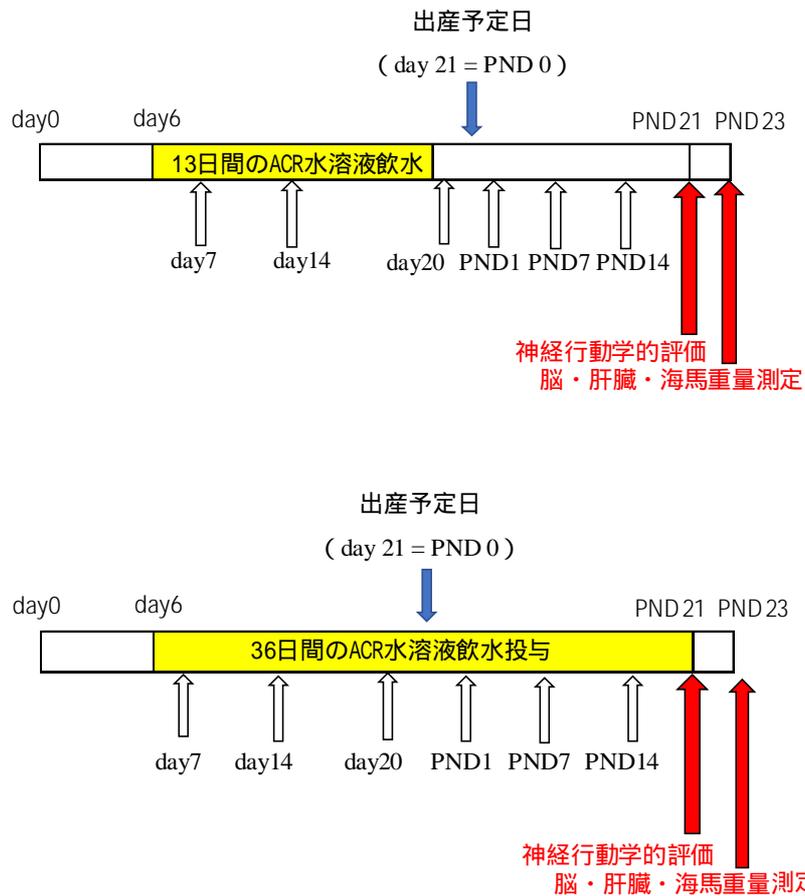


図1 ACR胎生期曝露群(上図)と胎生授乳期曝露群(下図)の実験スケジュール  
雌雄Wistarラットを同居させ、膣スメアに精子/プラグ等の存在が確認された日を妊娠初日day0と数えた。胎生期曝露群ではday6からday19までの13日間、胎生授乳期曝露群ではday6からPND21の離乳日まで36日間飲水投与した。白抜き矢印は体重測定の日を示す。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群は投与期間の違い以外は、同じ実験スケジュールで実施した。

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

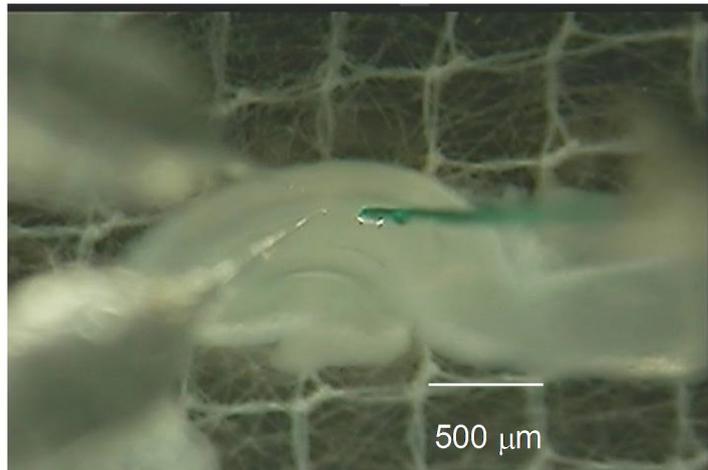
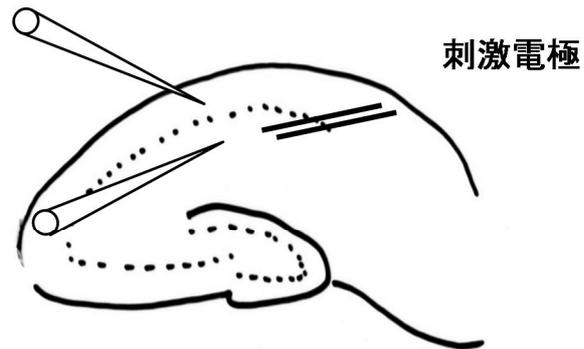
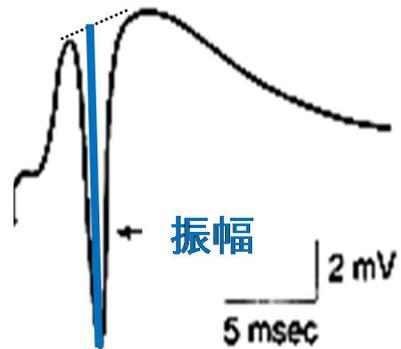


図2 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法  
上図：海馬スライスにおける双極性電気刺激電極と2つの記録用ガラス微小電極の位置を示す。下図：実体顕微鏡下に撮影した生の海馬スライスと、刺激電極（左）および記録用ガラス微小電極（左）の配置。

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)

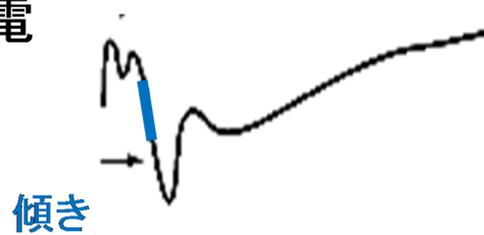


図 3 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

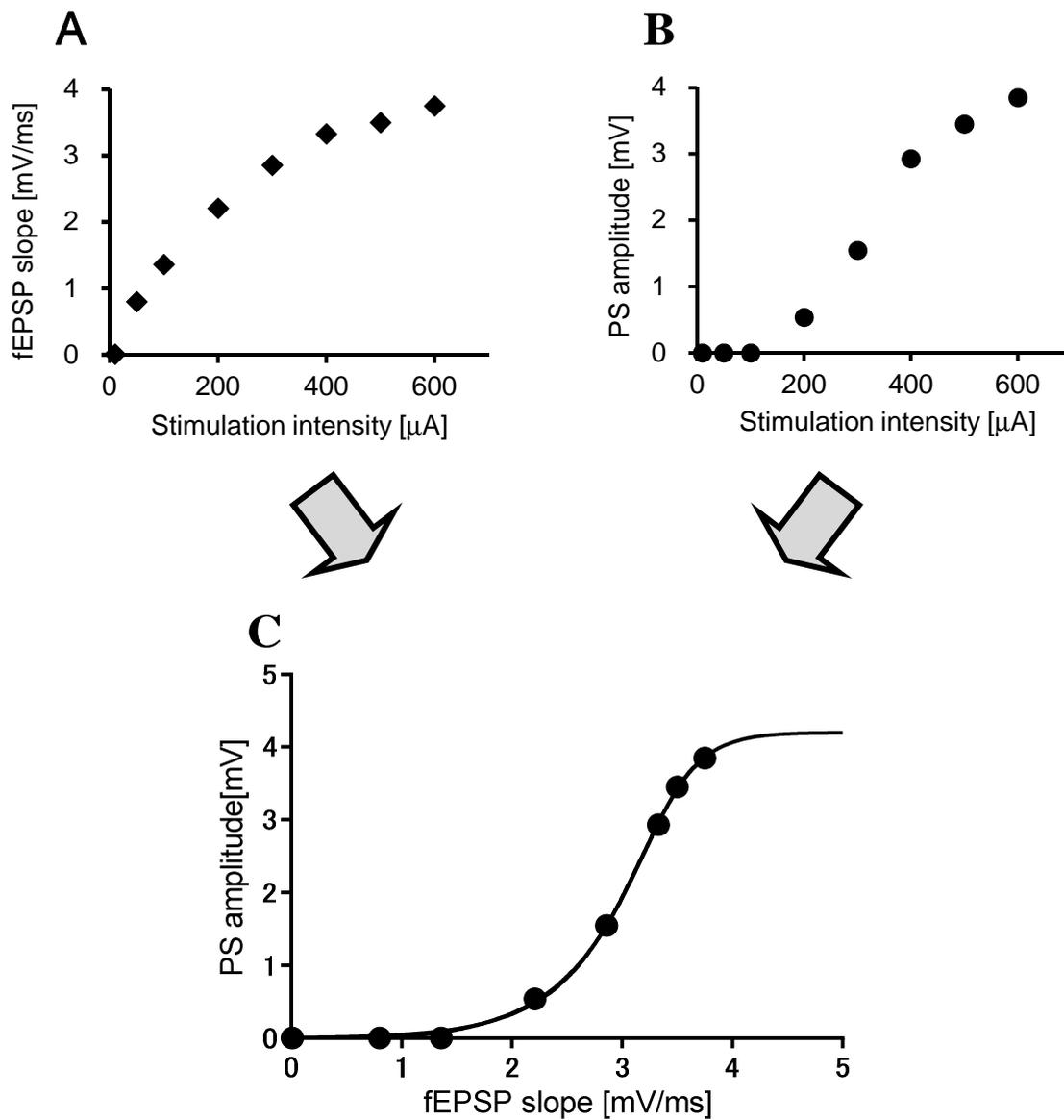


図4 fEPSP-spike (E-S) couplingと その非線形回帰モデル

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 1BP700 ppm 群の 1 例である。

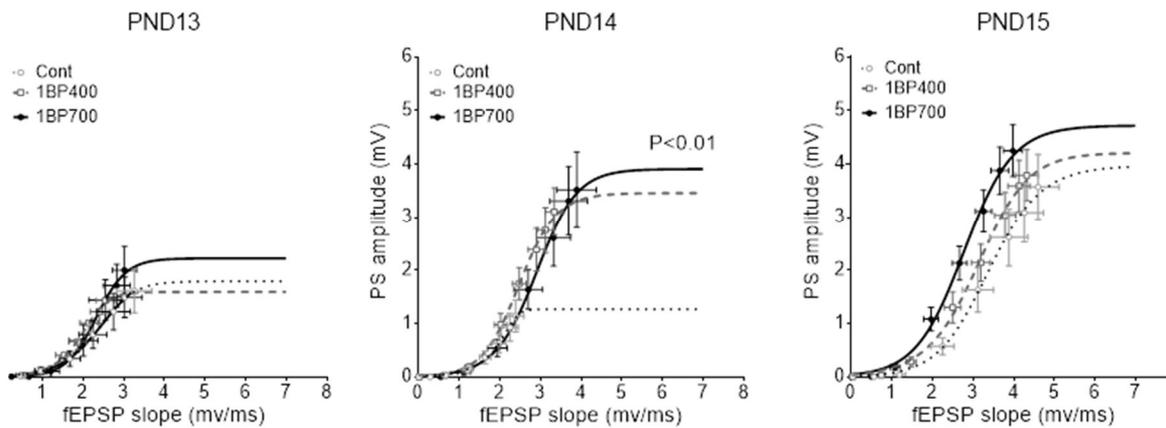


図5 1BP胎生期曝露による海馬刺激応答性のES couplingとロジスティック曲線(平成29年度に報告)

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700ppm)との間に統計学的な有意差を認めた。

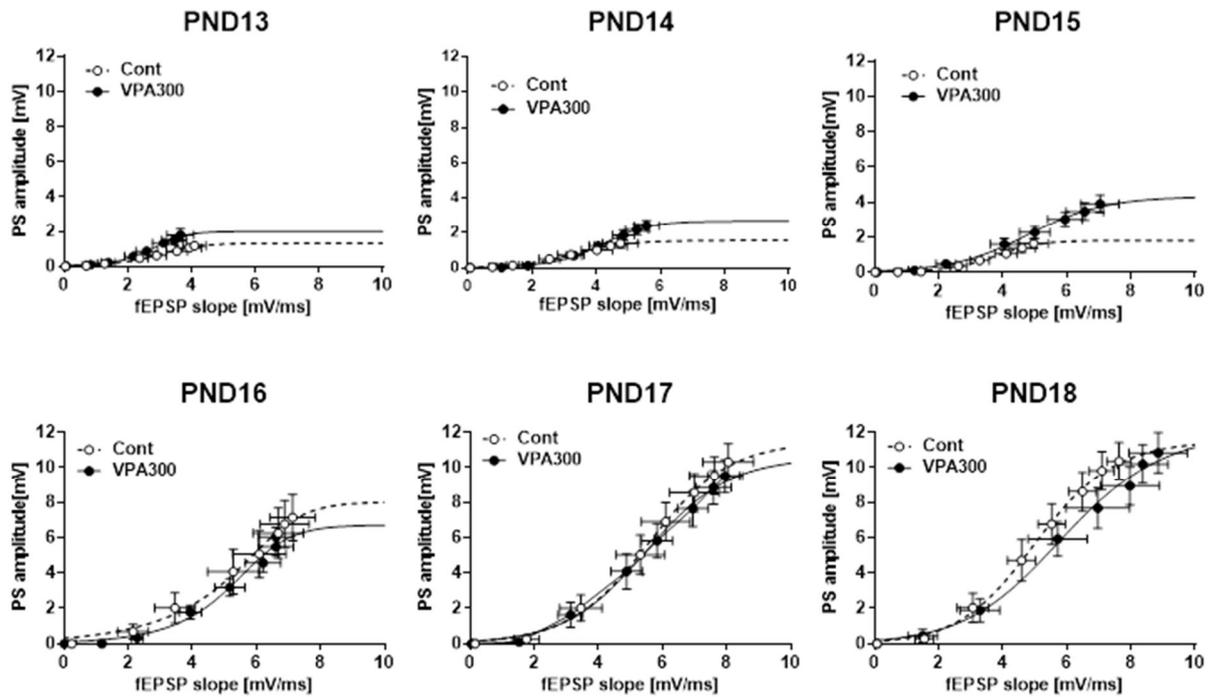


図6 VPA 300mg/kg (day15 に経口投与)による海馬刺激応答性の ES coupling シナプス形成期に関して、PND13-18 について行ったロジスティック解析の結果をまとめた。開眼前である、PND14 と 15 において VPA 群で ES coupling の亢進が認められた (矢印)。点線が対照群、実線が VPA 群を示す。

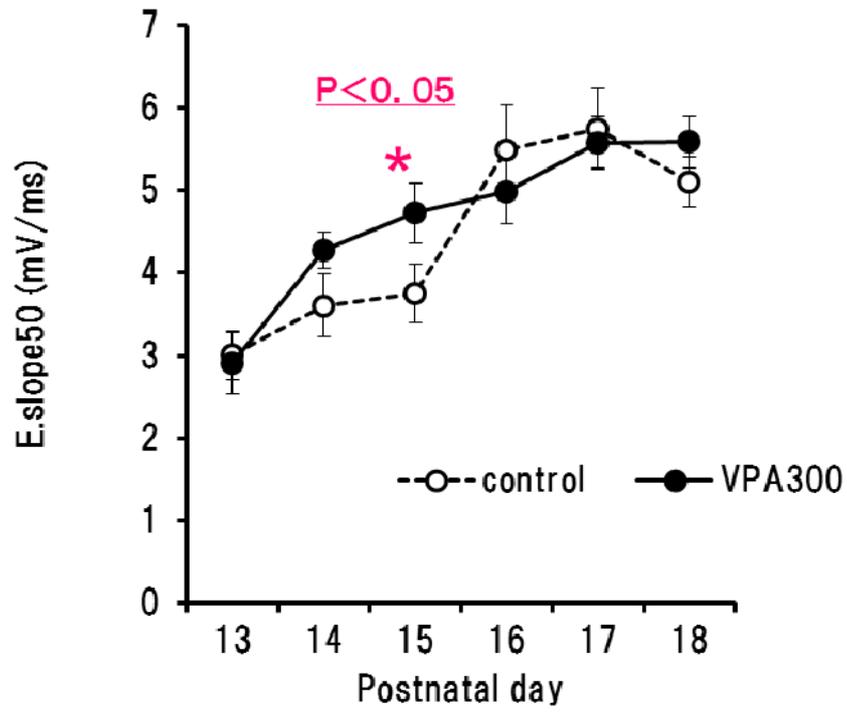


図7 ロジスティック解析によって求めた VPA 投与による E.slope50 の発達に伴う変化  
 開眼前の PND15 において、VPA 群では E.slope50 が増加した。開眼後 (PND16 以降) は対照群と  
 VPA 群の E.slope50 に差は認められなかった。

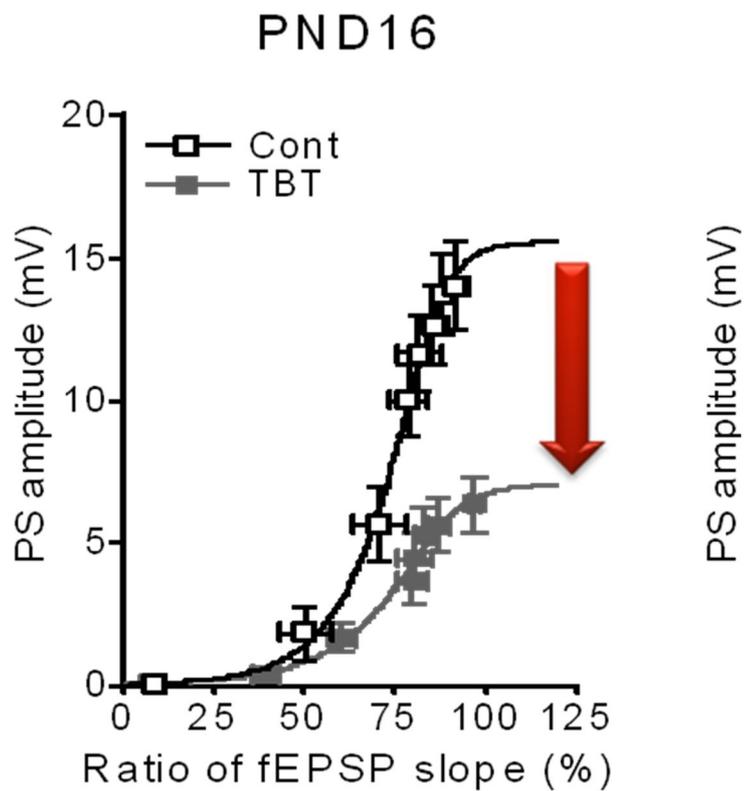


図8 TBT 投与群の PND16 における E-S coupling  
 1 BP や VPA の胎生期投与群の場合とは異なり、PND16 においてのみ E-S coupling の抑制が認められ、PND16 以外では対照群との差は認められなかった。E.slope50 の有意な減少 (not shown) が PS の生成抑制と関連していると思われる。

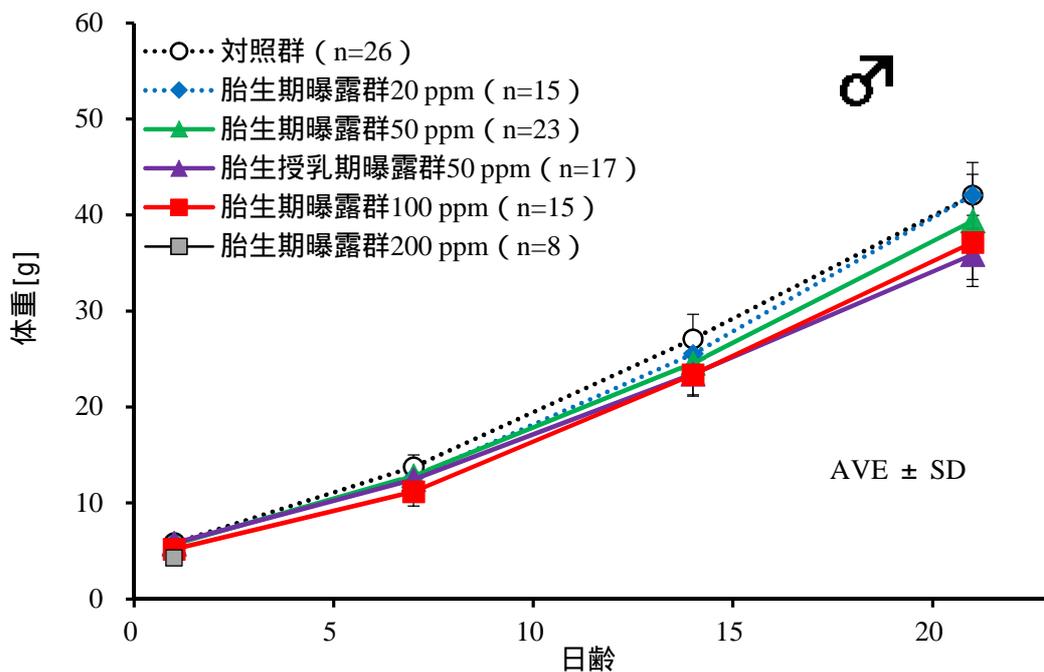


図9 雄性仔ラットの生後の体重増加へのACRの影響

雄性仔ラットでは胎生期曝露群 20 ppm では対照群と差はなく、胎生期曝露群濃度 50 ppm 以上で体重増加の抑制がみられた ( $p < 0.01$ , 繰り返しのある二元配置分散分析法, Scheffe's F test)。胎生期曝露群 200ppm 群の仔ラットは、PND1 における体重が低く、母ラットが出産後に死亡したため、PND1 の結果のみを記した。雌性仔ラットでも胎生期曝露群 20 ppm では対照群と差はなかった (not shown)。雄性仔ラットと同様に、胎生期曝露群濃度 50 ppm より濃度が高くなると (体重増加の顕著な抑制がみられた ( $p < 0.01$ , 繰り返しのある二元配置分散分析法, Scheffe's F test)、括弧内は仔ラットの数を示す。

♂

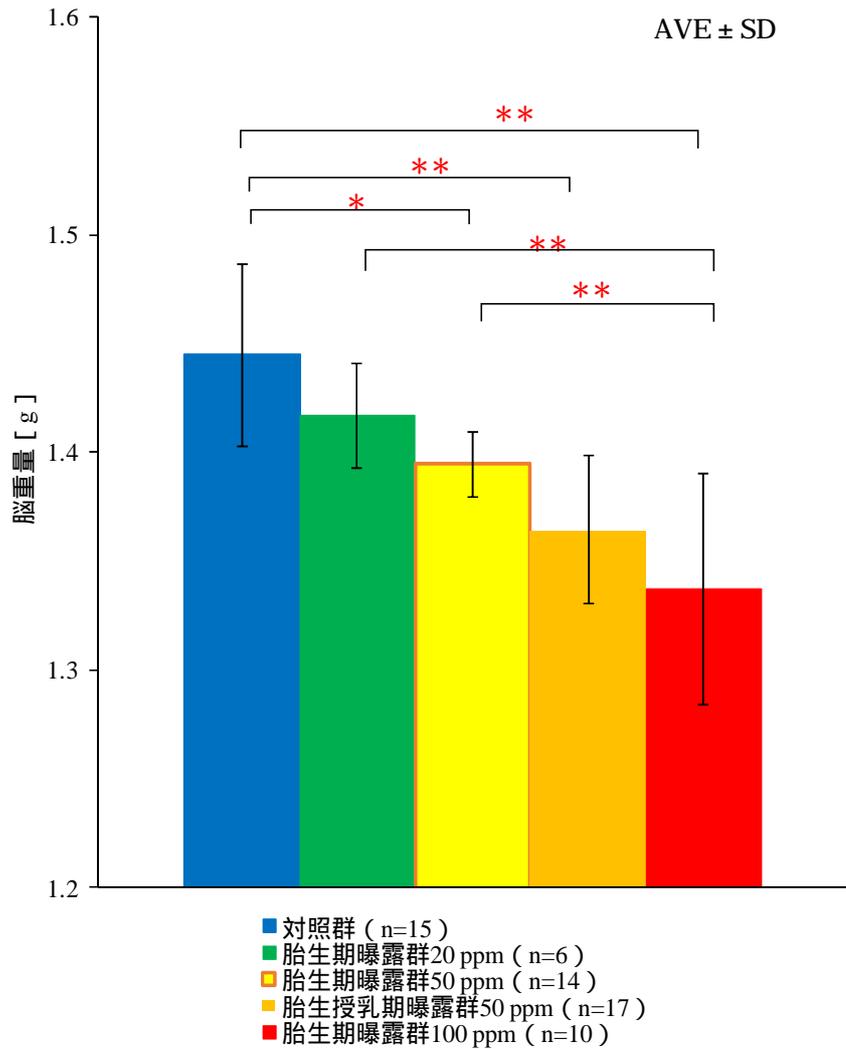


図 10 雄性仔ラットの PND21 における脳重量

ACR の濃度依存的に脳重量が減少した (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 一元配置分散分析法、Scheffe's F test)。この現象は、雌性仔ラットでも同様であった (not shown)。括弧内は仔ラットの数を示す。

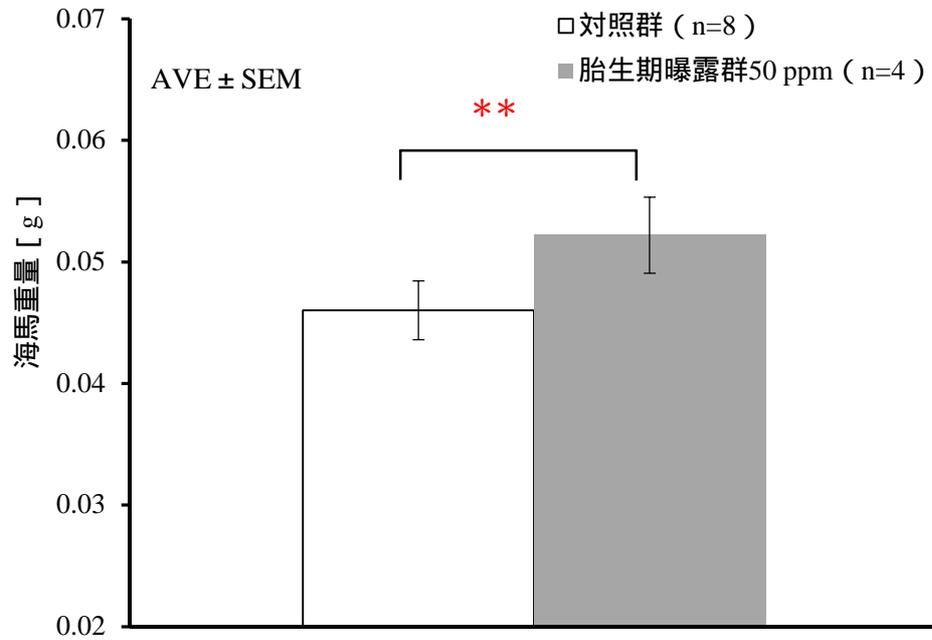


図 11 PND23 における海馬重量

胎生期曝露 50ppm 群の海馬重量は対照群より有意に増加した (\*\* $p < 0.01$ , Student's t test)。この現象は雌性仔ラットでも同様に観察された。括弧内は仔ラットの数を示す。

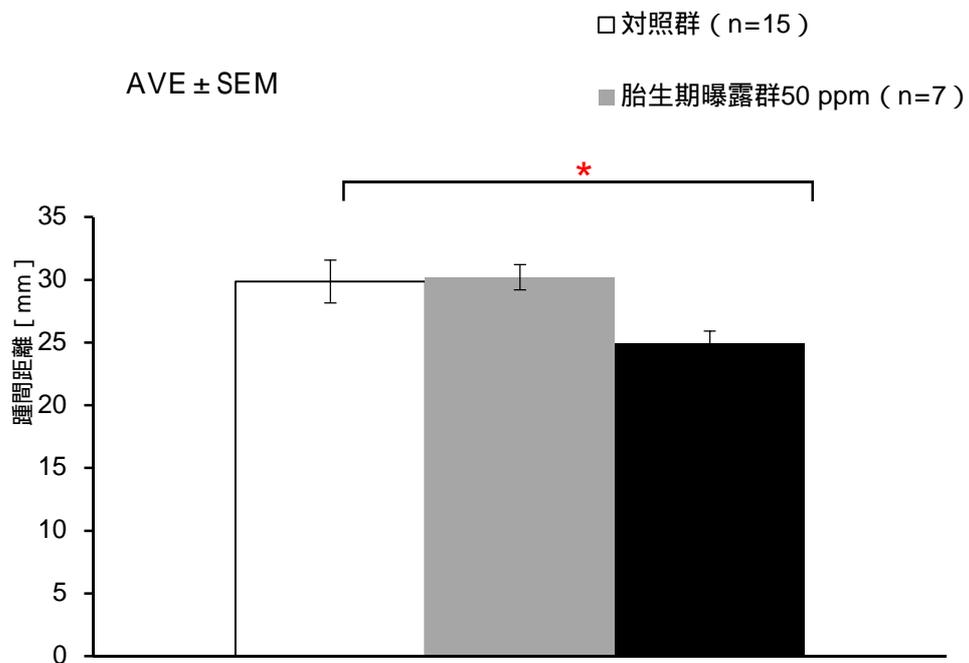


図 12 PND21 で実施した雄性仔ラットの Hindlimb landing foot-spray test 発達毒性 LOAEL である 50ppm について実施した。胎生期曝露群は対照群とは差がなく、胎生授乳期曝露群で踵間距離が減少した (\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Scheffe's F test)。雌性仔ラットではこの 3 群に差が認められなかった。括弧内は仔ラットの数を示す。