

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

分担研究課題名

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
～低用量化学物質の周産期暴露による成熟後マウスの行動様式への影響～

研究分担者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究所・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量ばく露による遅発性の中枢神経系への影響を検討するが、平成 31/令和元年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール類を取り上げ、具体的には、ビスフェノール類として、ビスフェノール A とゴム老化防止剤である BBMTBP（4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)）および MBMTBP（2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)）を、いずれも 5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを用いて生後 12-13 週齢時に行動解析を行った。その結果、いずれの投与群においても不安関連行動異常が疑われたが、先行して解析した塩化トリブチルスズの発生-発達期低用量長期飲水投与による行動影響と比較し、その影響は軽微なものであることが推察され、今後、対応する神経科学的物証による検証が重要と考えられた。

発生-発達期（周産期を含む）を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために、引き続きデータを収集するとともに、行動異常の顕在化/脳高次機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

A. 研究目的

家庭用品は、それに求められる機能が多様であり、従来の毒性試験によって比較的安全であると評価された成分からなるものから、特定の効能と毒性が明らかな成分を含むものまで、その毒性の程度と内容はさまざまである。前者の安全な範疇にあっても、フタル酸やビスフェノールAといった低分子化学物質に代表される物質、後者の範疇にあつては農薬と同等の物質など、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが明らかな物質が含まれている。このような特性を有する物質は、申請者らの今までの研究から、周産期にある動物の中枢神経系にシグナル異常を引き起こし、成熟後に遅発性の有害影響を誘発することが強く示唆されるものである。世代や性別を問わず、妊婦（胎児）や小児を含む国民が広く日常的に長期に渡って接する家庭用品に関しては、この観点からの有害性評価の確立には大きな意義があると考えられる。

本研究は、先行研究(H20-化学一般-009、H23-化学一般-004、H27-化学一般-007)にて開発した評価系による独自の知見を応用することで、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を上記の様なシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量ばく露による遅発性の中枢神経系への影響を検討する。具体的には、近年の使用量が増加傾向にある物質や中枢神経系の発生-発達に関わる受容体に対して標的性があることが知られている物質について、周産期マウスへの経胎盤投与や経乳投与を行い、産仔が成熟後に行動様式および対応する神経科学的物証を実験的に捉えることによって、生活環境レベルでの低用量ばく露による遅発性の中枢神経系への影響に関するデータを収集する。具体的な毒性評価指標は、先行研究において遅発性毒性が明らかとなった既知化学物質の結果を基準として、定量的に評価する。平成31(令和元)年度の研究では、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール類を取り上げ、ビスフェノールA(BPA)とゴム

老化防止剤である BBMTBP (4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)) および、MBMTBP (2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)) を選択する。

B. 研究方法

マウス、被検物質および投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー)を用いた。

被験物質は、ビスフェノールA (BPA, Cas No. 80-05-7, 分子量: 228.29, カタログ No. 04225-10, 純度: >98.0%, 関東化学株式会社) およびゴム製品老化防止剤 (2種)、4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール) (BBMTBP, Cas No. 85-60-9, 分子量: 382.59, カタログ No. B0724, 純度: >97.0%, 東京化成工業株式会社)、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール) (MBMTBP, Cas No. 119-47-1, 分子量: 340.51, カタログ No. M0217, 純度: >99.0%, 東京化成工業株式会社) を使用した。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水(水道水)に添加し(エタノールの最終濃度は0.0001%)、5ppmに調整した(BPAのTDI値を元に、安全係数として10を用いて算出した)。妊娠11.5日齢の雌マウスに調整したビスフェノール類の飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。対照群には、0.0001%エタノールを含む水道水を摂取させた。解析には産仔雄マウスについてのみ用いることとし、生後4週齢時に離乳、以後は通常飲水に切り替えた。いずれのマウスも離乳後、4匹/ケージにて飼育した。12-13週齢時にオープンフィールド試験(検定項目として、総移動距離、中央部滞在時間、移動回数)、明暗往来試験(検定項目として、明室滞在時間、明暗往来数、暗室待機時間)、高架式十字迷路試験(検定項目として、総移動距離、開放部滞在時間、総アーム選択回数)、条件付け学習記憶試験(検定項目とし

て、学習度、空間-連想記憶、音-連想記憶)、プレパルス驚愕反応抑制試験(検定項目として、120dB に対する 95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制率) からのバッテリー式の情動認知行動解析を行った(n=8-9)。

倫理面への配慮: 動物実験については、その計画及び実施に際して、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、東北大学、国立医薬品食品衛生研究所が定める動物実験に関する規定・指針を遵守した。

C. 研究結果

発生-発達期にかけてのビスフェノール類の低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析: 生後 12-13 週齢時にバッテリー式の行動解析(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)を行った結果、BPA 投与群において、対照群と比較して明暗往来試験での明室滞在時間および明暗往来数の有意な減少、BBMTBP 投与群において、対照群と比較してオープンフィールド試験での総移動回数の有意な減少が認められた。また、MBMTBP 投与群において、対照群と比較してオープンフィールド試験での総移動距離の有意な減少および明暗往来試験での明暗往来数の有意な減少が認められた(北嶋との共同研究)。

D. 考察

(発生-発達期にかけてのビスフェノール類の低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析): 3 種のビスフェノール類の発生-発達期低用量長期飲水投与群の行動解析結果から、いずれの投与群においてもオープンフィールド試験あるいは明暗往来試験での、不安関連行動の指標となる項目に有意な減少が認められ、各投与群にお

いて、対照群と比較して不安の亢進が疑われた。その中でも、BPA 投与群が最も影響を受けていると考えられた。しかし、先行して解析した塩化トリブチルスズの発生-発達期低用量長期飲水投与による行動影響と比較して、いずれのビスフェノール類においても、多くの項目で対照群との間に顕著な差は認められず、その影響は軽微なものであることが推察された。また、共同で行った行動解析後のマウスについての percellome 法による網羅的遺伝子発現解析(海馬)の結果およびそれに基づくパスウェイ解析の結果から、いずれの投与群においても、この投与用量、投与期間といった条件では、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられた。すなわち、今回の行動解析において顕著な情動認知行動影響、特に、海馬を主な責任部位とする学習記憶に関連する行動影響が認められなかった結果とも一致することが示された。

E. 結論

平成 31(令和元)年度は、ビスフェノール類である BPA とゴム老化防止剤である BBMTBP および MBMTBP を選択し、周産期マウス(胎生 11.5 日~離乳生後 4 週齢)に各 0.5 mg/kg/day を飲水投与後(BPA の TDI 値を元に、安全係数として 10 を用いて算出した)、産仔が成熟後 12-13 週齢時に情動認知行動解析を実施した。その結果、軽微なものではあるが、規制値レベルの低用量であっても発生-発達期(周産期を含む)の長期に及ぶ化学物質暴露によって成熟後の中枢神経系に行動様式異常という形で機能的な影響を及ぼすことが明らかとなった。また、発生-発達期(周産期を含む)を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために引き続きデータを収集、解析結果を精査するとともに、行動影響や脳機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662. doi: 10.1002/jat.3882. Epub 2019 Aug 15. PubMed PMID: 31415104

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primer repair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *J Reprod Dev.* 2019 Nov 24. doi: 10.1262/jrd.2019-088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31761839.

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254. doi: 10.1017/S0967199418000370. Epub 2019 Aug 9. PubMed PMID: 31397238.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. eCollection 2019 Jul. Review. PubMed PMID: 31312103; PubMed Central PMCID: PMC6613016.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334. doi: 10.1262/jrd.2019-008. Epub 2019 Jun 10. PubMed PMID: 31178551; PubMed Central PMCID: PMC6708848.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153. doi: 10.1262/jrd.2018-147. Epub 2019 Jan 19. PubMed PMID: 30662011; PubMed Central PMCID: PMC6473113.

2. 学会発表

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020. 3. 25-28)、京都府

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巣毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019. 12. 3-6)、博多市

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第 126 回日本畜産学会大会 (2019. 9. 17-20)、盛岡市

牧野優誠、平舘裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019. 9. 2-5) 札幌市

倉田笙平、平舘裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 γ -アミノ酪酸 (GABA) を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019. 9. 2-5) 札幌市

矢内凜、平舘裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019. 9. 2-5) 札幌市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019. 9. 2-5) 札幌市

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」 the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019. 7. 15-18) ホノルル

種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第38回日本アンドロロジー学会学術大会（2019. 6. 21-22）大阪府

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会（2019. 6. 26-28）徳島市

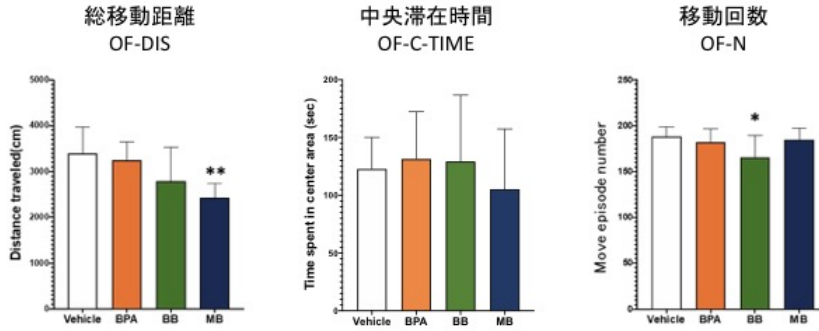
種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第46回日本毒性学会学術年会（2019. 6. 26-28）徳島市

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

Open field test(OF)

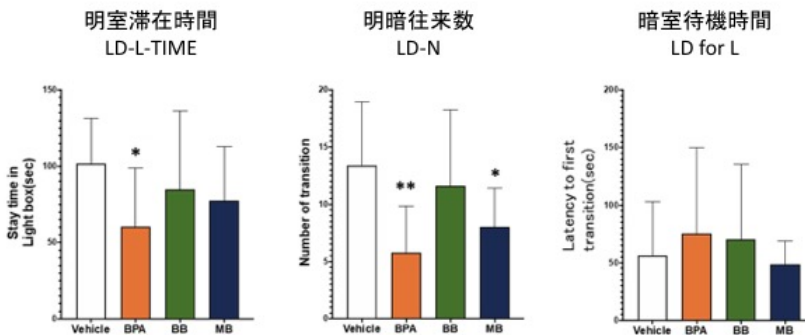
- Vehicle control (Vehicle:0.0001%EtOH in 水道水)
- BPA 0.5mg/kg/day
- BB 0.5mg/kg/day
- MB 0.5mg/kg/day



Mean \pm S.D., P value (Student's t-test)
p<0.05*; p<0.01** vs Vehicle control

Light/Dark transition test(LD)

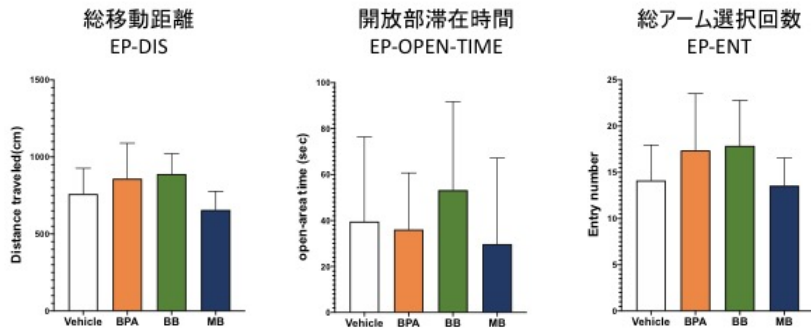
- Vehicle control (Vehicle:0.0001%EtOH in 水道水)
- BPA 0.5mg/kg/day
- BB 0.5mg/kg/day
- MB 0.5mg/kg/day



Mean \pm S.D., P value (Student's t-test)
p<0.05*; p<0.01** vs Vehicle control

Elevated plusmaze test(EP)

- Vehicle control (Vehicle:0.0001%EtOH in 水道水)
- BPA 0.5mg/kg/day
- BB 0.5mg/kg/day
- MB 0.5mg/kg/day

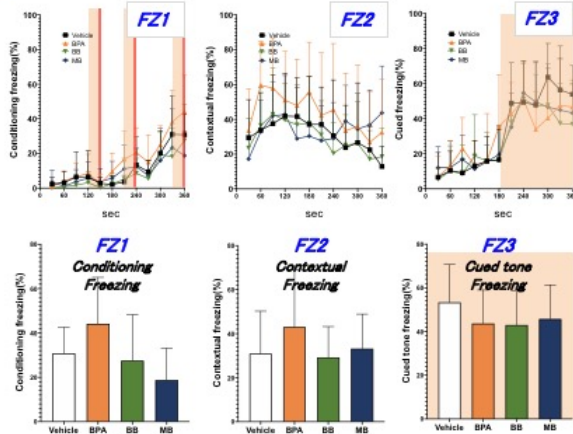


Mean ± S.D., P value (Student's t-test)
 p<0.05*; p<0.01** vs Vehicle control

Fear conditioning test(FZ)

- Vehicle control (Vehicle:0.0001%EtOH in 水道水)
- BPA 0.5mg/kg/day
- BB 0.5mg/kg/day
- MB 0.5mg/kg/day

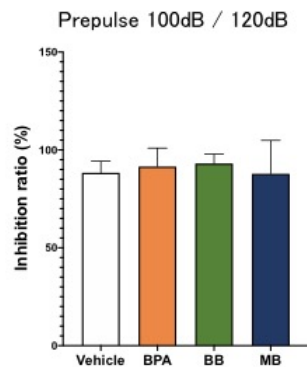
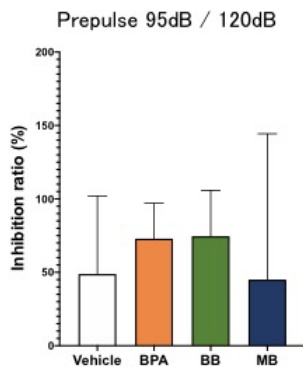
■ :Tone (10kHz) | :Shock (0.1mA)



Mean ± S.D., P value (Student's t-test)
 p<0.05*; p<0.01** vs Vehicle control

Prepulse inhibition test(PPI)

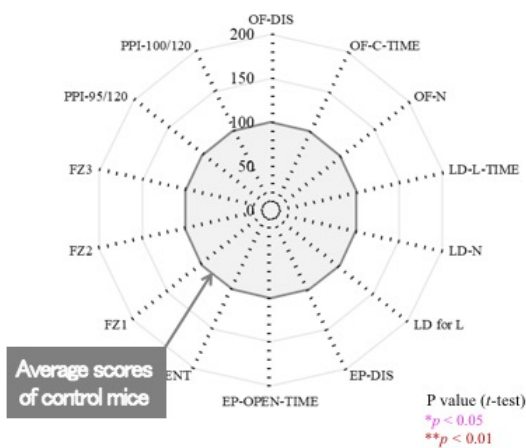
- Vehicle control (Vehicle:0.0001%EtOH in 水道水)
- BPA 0.5mg/kg/day
- BB 0.5mg/kg/day
- MB 0.5mg/kg/day



Mean \pm S.D., P value (Student's t-test)
 $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ vs Vehicle control

Radial Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

Radial Chart (Average scores of control mice = 100%)

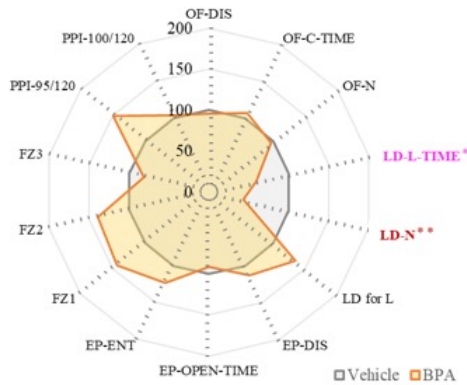


- OF: オープンフィールド試験-10min
- OF-DIS: 総移動距離
- OF-C-TIME: 中央滞在時間
- OF-N: 移動回数
- LD: 明暗往来試験-5min
- LD-L-TIME: 明室滞在時間
- LD-N: 明暗往来数
- LD for L: 暗室待機時間
- EP: 高架式十字迷路試験-5min
- EP-DIS: 総移動距離
- EP-OPEN-TIME: 開放部滞在時間
- EP-ENT: 総アーム選択回数
- FZ: 条件付け学習記憶試験-6min
- FZ1: 条件付け (短期記憶形成度)
- FZ2: 空間-連想記憶
- FZ3: 音-連想記憶
- PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min
- PPI-95/120: プレパルス 95dB/120dB
- PPI-100/120: プレパルス 100dB/120dB

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

BPA (0.5mg/kg/day (5ppm))

Radar Chart (Average scores of control mice = 100%)



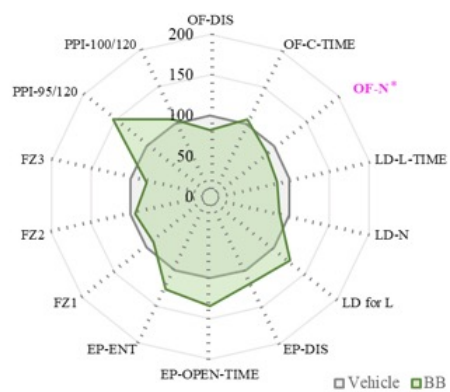
OF: オープンフィールド試験-10min
 OF-DIS: 総移動距離
 OF-C-TIME: 中央滞在時間
 OF-N: 移動回数
 LD: 明暗往来試験-5min
 LD-L-TIME: 明室滞在時間
 LD-N: 明暗往来数
 LD for L: 暗室待機時間
 EP: 高架式十字迷路試験-5min
 EP-DIS: 総移動距離
 EP-OPEN-TIME: 開放部滞在時間
 EP-ENT: 総アーム選択回数
 FZ: 条件付け学習記憶試験-6min
 FZ1: 条件付け (短期記憶形成度)
 FZ2: 空間-連想記憶
 FZ3: 音-連想記憶
 PPI: プレバリス驚愕反応抑制試験-30min
 PPI-95/120: プレバリス 95dB/120dB
 PPI-100/120: プレバリス 100dB/120dB

P value (t-test)
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

BBMTBP (BB) (0.5mg/kg/day (5ppm))

Radar Chart (Average scores of control mice = 100%)



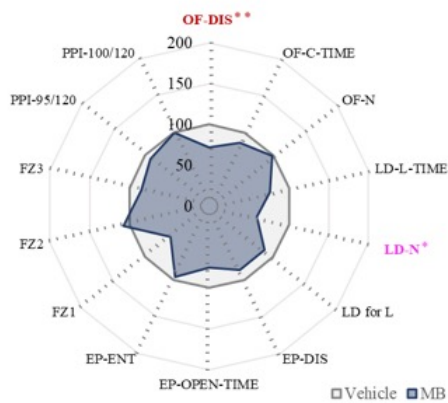
OF: オープンフィールド試験-10min
 OF-DIS: 総移動距離
 OF-C-TIME: 中央滞在時間
 OF-N: 移動回数
 LD: 明暗往来試験-5min
 LD-L-TIME: 明室滞在時間
 LD-N: 明暗往来数
 LD for L: 暗室待機時間
 EP: 高架式十字迷路試験-5min
 EP-DIS: 総移動距離
 EP-OPEN-TIME: 開放部滞在時間
 EP-ENT: 総アーム選択回数
 FZ: 条件付け学習記憶試験-6min
 FZ1: 条件付け (短期記憶形成度)
 FZ2: 空間-連想記憶
 FZ3: 音-連想記憶
 PPI: プレバリス驚愕反応抑制試験-30min
 PPI-95/120: プレバリス 95dB/120dB
 PPI-100/120: プレバリス 100dB/120dB

P value (t-test)
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

MBMTBP (MB) (0.5mg/kg/day (5ppm))

Radar Chart (Average scores of control mice = 100%)



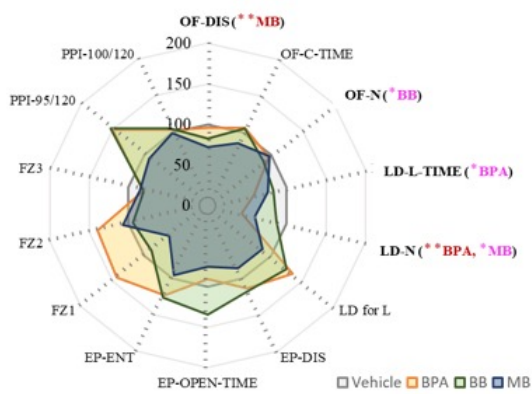
OF: オープンフィールド試験-10min
 OF-DIS: 総移動距離
 OF-C-TIME: 中央滞在時間
 OF-N: 移動回数
 LD: 明暗往来試験-5min
 LD-L-TIME: 明室滞在時間
 LD-N: 明暗往来数
 LD for L: 暗室待機時間
 EP: 高架式十字迷路試験-5min
 EP-DIS: 総移動距離
 EP-OPEN-TIME: 開放部滞在時間
 EP-ENT: 総アーム選択回数
 FZ: 条件付け学習記憶試験-6min
 FZ1: 条件付け (短期記憶形成度)
 FZ2: 空間-連想記憶
 FZ3: 音-連想記憶
 PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min
 PPI-95/120: プレパルス 95dB/120dB
 PPI-100/120: プレパルス 100dB/120dB

P value (t-test)
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

MIX

Radar Chart (Average scores of control mice = 100%)



OF: オープンフィールド試験-10min
 OF-DIS: 総移動距離
 OF-C-TIME: 中央滞在時間
 OF-N: 移動回数
 LD: 明暗往来試験-5min
 LD-L-TIME: 明室滞在時間
 LD-N: 明暗往来数
 LD for L: 暗室待機時間
 EP: 高架式十字迷路試験-5min
 EP-DIS: 総移動距離
 EP-OPEN-TIME: 開放部滞在時間
 EP-ENT: 総アーム選択回数
 FZ: 条件付け学習記憶試験-6min
 FZ1: 条件付け (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-95/120: プレパルス 95dB/120dB
 PPI-100/120: プレパルス 100dB/120dB

P value (t-test)
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「液性因子影響（神経内分泌）に関わる脳内分子の定量解析」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・予防医科学・応用生理学研究室・教授）

【研究要旨】

家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することを目的として、本研究では液性因子影響（神経内分泌）に関わる脳内分子の定量解析を進めている。本年度は、血液・唾液中の小分子RNAの抽出解析技術の構築を行い、その適用を開始した。

A. 研究目的

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することを目指している。本年度は、血液・唾液中の小分子 RNA の抽出解析技術を構築することを目的として研究を進めた。

低分子 RNA (small RNA) は、miRNA を含む 25 塩基前後のタンパク質へ翻訳されない RNA の総称である。他の RNA の転写や翻訳などに関わるなど生体機能に関わるものがあることがわかってきた。有名な miRNA の場合、ヒトでは約 2600 個が同定されており、1 個あたり平均 200 個の mRNA を標的にしている、すなわち 5 割以上のヒト遺伝子の働きを調整・制御しているとされている。がんや心臓疾患など疾患発症に関わるものも見出され、核酸医薬として臨床応用の検討が進んでいる。

加えて、バイオマーカーとしての意義も期待が高い。通常 RNA は細胞内で作用し細胞外では速やかに分解されるが、低分子 RNA はエクソソームに保護された状態で細胞が能動的に分泌しており、別の細胞に作用することもわかっている。よって血液や唾液中には全身の細胞由来の低分子 RNA が存在する可能性があり、細胞の特徴的な活動や異常のバイオマーカーとなる可能性がある。例えばがん細胞だけが発現する低分子 RNA は、血液検査でがんの有無を特定するバイオマーカーとなる。

B. 研究方法

本年度は、同定済の miRNA を対象として、モデルマウスの唾液および血液試料を用い、モデルマウスと野生型対照マウスとの比較、血液試料と唾液資料の比較を行った。

動物実験は早稲田大学所沢キャンパスにて行っ

た。動物飼育・実験は温度管理された動物飼育・実験室で行った。自由に餌と水を得られる状態で飼育した(室温 22 ± 3 °C、湿度 40~70 %、明暗周期 12 時間(明期 8:00~20:00))。全ての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導と機関長承認(総長:田中愛治)のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。

使用したマウスは雄 BTBR T+ Itpr3tf/J (BTBR, Jackson Stock Number:002282) マウスおよびその対照として雄性 C57BL/6J マウス各群 7 匹を用いた。

唾液は綿球により採取し遠心分離にて 0.5 μl を回収し、尾静脈より末梢血 1 μl を採取した。H20 本研究事業 (201035010B) において開発したワンチューブ法を用いて miRNA を精製、cDNA を作成した。qPCR で複製、蛍光法により CP 値を求め元となったサンプルに含まれていた miRNA の発現量を定量した。miR-191 の発現量と比較することでサンプルごとに各 miRNA の相対的発現量として算出した。昨年度のデータから関連する小分子 RNA を抽出し、miR-320d_2, miR-1184_2, miR-1236_1, miR-642a_1, miR-652_3, miR-221_1, miR-1280_1, miR-196a_2, miR-29c_1 の測定を行った。

C. 研究結果

28 検体 (7 匹 × 2 群 × 唾液と血液) × 9 遺伝子の計 252 試料の定量データを表 1 に示す。2 検体 (個体番号 11 番の唾液試料における miR642a_1、個体 13 番の血液試料における miR642a_1) において発現を認めなかったが、同試料から他の遺伝子測定は行うことができていることから、欠損データとせず「0」として集計した (表 1)。

群別試料別に比較すると、miR1184_2、miR1236_1、miR1280_1、miR196a_2、miR221_1、miR29c_1、miR320d_2 の 7 遺伝子が、BTBR 群は対照群に比して低い発現量であることがわかった (表

2)。miR1184_2 は血液試料において 70.15%の低下であり、唾液試料において 70.33%の低下だった。miR1236_1 は血液試料において 68.37%の低下であり、唾液試料において 70.67%の低下であった。miR1280_1 は血液試料において 71.26%の低下であり、唾液試料において 71.39%の低下であった。miR196a_2 は血液試料において 72.07%の低下であり、唾液試料において 76.15%の低下であった。miR221_1 は血液試料において 71.09 %の低下であり、唾液試料において 68.85%の低下であった。miR29c_1 は血液試料において 80.40 %の低下であり、唾液試料において 77.99%の低下であった。miR320d_2 は血液試料において 81.48%の低下であり、唾液試料において 86.36%であった。

miR642a_1 は BTBR 群のほうが高く、miR652_3 は群間に違いはなかった。

唾液試料と血液試料との違いはみられなかった (表 2)。

D. 考察

本研究では、昨年度得られた知見をもとに関連遺伝子のイントロン上に存在するか、関連遺伝子と相互作用が報告されている遺伝子を約 100 個抽出し、家庭用品に含まれる化学物質の、想定される健康影響との関連についての文献調査を踏まえて、miR1184_2、miR1236_1、miR1280_1、miR196a_2、miR221_1、miR29c_1、miR320d_2、miR642a_1、miR652_3 遺伝子を対象とした。

今回の実験結果から、このうち 7 遺伝子について、モデルマウスと野生型マウスで発現量が異なること、唾液と血液中発現量には大きな違いがないことが新たに明らかとなった。すなわち、これらの遺伝子群は新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後は、実際に化学物質暴露動物での検証を進めることが目下の課題であり、本研究班において遂行予定である。

そして、少なくともこれら遺伝子群において、そして少なくともマウスにおいて、血液中の発現量と唾液中の発現量に相関が極めて高い可能性が示唆された。唾液試料であれば、ヒトとくに乳幼児からの採取も容易であり、コホート調査研究にも適用できる可能性を秘めていると言えよう。

今後動物実験により、脳組織中の小分子 RNA 発現量を測定し比較することで、中枢神経系の変化をヒト乳幼児の唾液試料で測定可能なバイオマーカーとなる可能性も見えてきた。小分子 RNA のリーズナブルな選定方法の開発、そして動物実験による脳内発現量との比較検証が必要である。

E. 結論

家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資するバイオマーカー候補を見出すことができた。曝露動物での検証を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

掛山正心・藤原昌也, マウスの集団内社会行動の客観定量分析, 日本生物学的精神医学会誌. 2019, 30:182-186. doi: 10.11249/jsbpjpp.30.4_182.

2. 学会発表

鈴木健、城宝大輔、掛山正心「マウスにおける意思決定の客観的及び定量的解析」第 49 回日本神経精神薬理学会 (2019. 10. 12-13) 福岡市。

城宝大輔、鈴木健、藤原昌也、斉藤貴志、西道隆臣、掛山 正心「App ノックインマウスにおける認知機能の時系列変化の評価」第 49 回日本神経精神薬理学会 (2019. 10. 12-13) 福岡市。

Suzuki T, Joho D, Kakeyama M .Establishment of a decision-making task in mice. 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (2019. 10. 11-13) 福岡市。

Joho D, Suzuki T, Fujiwara , Saito T, Saido D, Kakeyama M. The assessment of temporal changes in cognitive functions in App knock-in mouse models. 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (2019.10.11-13) 福岡市.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1. BTBRマウスの各個体ごとの血液および唾液中の小分子RNA発現量

Mouse ID	Group	Sample	miR1184_2	miR1236_1	miR1280_1	miR196a_2	miR221_1	miR29c_1	miR320d_2	miR642a_1	miR652_3
1	BRBR	Blood	73.240977	93.9372949	60.2005104	75.0783813	71.0462997	81.1957711	81.3124316	126.941305	111.374408
2	BRBR	Blood	69.3015521	87.0990392	58.488544	76.0273466	69.7154472	78.1966001	76.8070953	127.457502	106.023651
3	BRBR	Blood	66.8275608	79.1046426	56.7170228	74.2815033	69.3809875	79.17465	80.5305822	122.181282	109.469418
4	BRBR	Blood	72.0045215	86.985682	59.2388847	75.5388093	69.5779955	77.3474002	79.4875659	125.885456	108.929917
5	BRBR	Blood	66.2026144	81.7124183	57.0522876	67.3006536	69.8398693	79.9215686	72	109.771242	109.117647
6	BRBR	Blood	69.2022059	76.3051471	58.0588235	74.1691176	68.8933824	79.0882353	74.7647059	122.169118	112.205882
7	BRBR	Blood	73.0565302	79.9883041	58.2651072	78.7602339	64.5692008	75.2904483	82.6822612	126.705653	111.890838
1	BRBR	Saliva	71.5041783	92.367688	59.9164345	80.0835655	70.362117	79.2678074	83.1516116	128.611222	109.789097
2	BRBR	Saliva	76.8139171	89.2650508	56.7279124	81.1376075	67.7286943	76.96638	83.9093041	137.412041	107.114934
3	BRBR	Saliva	63.0170836	78.0933496	54.966443	63.2946919	66.0280659	75.2165955	67.9194631	107.687614	97.071385
4	BRBR	Saliva	71.8386977	82.3788383	57.7765446	76.1376249	66.8146504	77.1291158	79.5856456	125.4532	109.285979
5	BRBR	Saliva	68.5980663	84.2610497	57.406768	71.160221	64.4406077	74.3922652	74.3093923	129.661602	102.417127
6	BRBR	Saliva	67.8290469	80.0605144	57.1066566	78.3396369	71.429652	79.667171	81.0287443	126.626324	103.744327
7	BRBR	Saliva	68.0623782	89.3216374	60.5847953	80.8070175	68.0077973	76.5068226	85.957115	130.877193	116.842105
8	WT	Blood	102.160057	119.086402	83.1444759	105.878187	97.6983003	97.1671388	98.2648725	124.610482	109.454674
9	WT	Blood	98.7369985	122.882615	82.8380386	106.53789	97.8454681	98.1054978	100.111441	121.805349	108.395245
10	WT	Blood	99.0321466	120.152091	83.8575873	102.627031	97.5458002	98.5482198	95.3335638	119.910128	106.36018
11	WT	Blood	99.7987928	119.34943	81.3547954	100.067069	99.9664655	98.2226693	93.42723	112.240107	108.685446
12	WT	Blood	90.1280323	117.890836	79.1105121	98.1132075	92.6212938	95.2493261	89.0498652	111.859838	100.37062
13	WT	Blood	110.245747	134.328922	83.8941399	112.098299	101.20983	98.6767486	105.63327	0	111.039698
14	WT	Blood	98.2161235	122.19554	78.3876501	97.8044597	92.5557461	98.3533448	90.1886792	114.57976	114.957118
8	WT	Saliva	93.7971776	117.591073	77.2563177	94.88021	91.2372826	100.656383	86.3144076	113.39022	100.426649
9	WT	Saliva	104.196597	122.155009	81.3610586	105.784499	101.550095	97.6559546	94.3289225	131.266541	108.733459
10	WT	Saliva	104.894605	123.329761	81.5291175	106.037871	102.929618	97.3919257	93.4619507	117.541979	114.112183
11	WT	Saliva	99.5182381	119.717825	85.065382	98.7955953	101.823813	98.4858913	92.6703372	0	107.777013
12	WT	Saliva	95.8875942	118.197395	81.5284441	99.0404387	98.6634681	98.2522276	93.591501	118.711446	105.209047
13	WT	Saliva	95.5258765	122.537563	78.3305509	98.2971619	93.2220367	101.96995	89.2153589	116.126878	99.1652755
14	WT	Saliva	99.5456134	119.433764	81.5099616	94.4425026	100.24467	96.8542468	94.0580217	130.548759	106.71094

表2. 候補小分子RNAの唾液および血液中発現量

Group	Sample	miR1184_2	miR1236_1	miR1280_1	miR196a_2	miR221_1	miR29c_1	miR320d_2	miR642a_1	miR652_3
BRBR	Blood	69.98 ± 1.17	83.59 ± 2.48	58.29 ± 0.49	74.45 ± 1.43	69.00 ± 0.84	78.60 ± 0.78	78.23 ± 1.57	123.02 ± 2.55	109.86 ± 0.89
BRBR	Saliva	69.67 ± 1.75	85.11 ± 2.18	57.78 ± 0.78	75.85 ± 2.67	67.83 ± 0.99	77.02 ± 0.79	79.41 ± 2.57	126.62 ± 3.76	106.61 ± 2.58
WT	Blood	99.76 ± 2.43	122.27 ± 2.29	81.80 ± 0.92	103.30 ± 2.12	97.06 ± 1.36	97.76 ± 0.49	96.00 ± 2.38	100.72 ± 18.24	108.47 ± 1.82
WT	Saliva	99.05 ± 1.76	120.42 ± 0.92	80.94 ± 1.04	99.61 ± 1.91	98.52 ± 1.85	98.75 ± 0.76	91.95 ± 1.23	103.94 ± 18.93	106.02 ± 2.08

*n=7 in each group

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「脳神経回路イメージング解析」

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。これまでの先行研究（H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007）で既に示したように膜電位感受性色素による回路測定は網羅的でありかつ検出感度が高いことがわかっている。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、農薬類（ネオニコチノイド等）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、これまでに検出系の改良に取り組み、長時間の連続的な測定を可能なことを立証するため、よく知られた海馬回路シナプスの長期増強が光学的に連続的に検出可能であることを示した。また、さらに大規模な神経回路として嗅内野とその周辺皮質の信号伝達の長期可塑性について検出できることを示した。この手法で化学物質の回路機能への影響を検出する系を確立するため、TBT、ビスフェノール、ビスフェノール代替物質（BBMTBP、MBMTBP）の急性影響について、異なる発達段階（2週齢、8週齢）の海馬回路において検討し、それぞれ影響が検出可能であることを示した。またこの解析のソフトウェアを開発し、迅速に網羅的な解析を可能にした。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。また、無染色組織からの光信号の検出と解析を行っている。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を担保するものである。

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

マウスをモデル動物とした。マウスより、標準的な方法でスライス標本を作成し膜電位感受性色素 (VSD) で染色した。このスライス標本を独自のチャンバーシステム内に置き、専用の光学系下で電気刺激を加え応答を超高速度カメラシステムで撮像し解析した。

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
海馬スライス標本を作成し、膜電位感受性色素で染色後、専用のチャンバーにて ACSF で還流しながら 30 秒—1 分に 1 回のシャープ側枝に対する電子刺激に対する応答を、光計測ならびに電気生理学的手法で計測した。
適切なベースラインの測定後に 100Hz 1 秒のいわゆるテタヌス刺激かシータバースト様刺激を加え長期増強を起こし計測を継続した。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的变化の観察系の確立
上と同様のプロトコルで、より視野の広い特殊な光学系を用いて嗅内野を含む大きな回路での信号伝達を計測した。嗅内野と嗅周囲皮質の境界に着目し、その間の信号伝達を光計測法によって 1 分に 1 回の頻度で長い時間にわたって計測した。
- 3) 前帯状皮質 (ACC) を含む大きな皮質組織で

の光学計測解析法の確立

マウス脳から coronal なスライス標本を作成し、視野の大きな光学系で光計測した。

- 4) トリブチルスズ TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
トリブチルスズ 40pM を海馬 CA1 でのシャープ側枝電気刺激に対する応答を 30 秒に 1 回ずつ計測しながら還流した。
- 5) ビスフェノール代替物質 (BBMTBP、MBMTBP) の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
週齢の異なるマウス (オス) から海馬スライス標本を標準的な手法で作成し、ビスフェノール A (BPA) , 4,4'-Butylidene-bis(6-tert-butyl-m-cresol) (BBMTBP) , 2,2'-Methylene-bis(4-methyl-6-tert-butylphenol) (MBMTBP) 5ppm を還流した。CA1, CA3, DG 野に入力する入力繊維を 2 段階の刺激強度で刺激し、応答を記録した。また、同じスライス標本で GABAA 受容体阻害薬の GABAZINE (10μM) を追加的に灌流しに応答を計測した。

C. 研究結果

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
専用のチャンバー内での計測は非常に安定で 12 時間以上もスライスの応答は良好に保たれた。また、光計測によるシナプス長期増強の観察に 12 時間以上にわたって成功した。この結果、CA1 回路の応答の変化を長期にわたって網羅的に解析することが可能になった。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的变化の観察系の確立
長時間の計測の結果、嗅周囲皮質から嗅内野への投射が、刺激のパターンによって可塑的に変化し長い時間保持されることがわかった。
- 3) 前帯状皮質 (ACC) を含む大きな皮質組織での光学計測解析法の確立
光学系の最適化によって 1cm 角にせまる視野で安定な光学計測が可能になり、ACC での発振や ACC を介した脳半球間の情報伝達の観察が可能となった。

4) TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測

トリブチルスズ 40pM で生後 14 日のマウスから作成したスライスではわずかな応答の上昇が見られた。一方、生後 9—10 週のマウスではほとんど影響がみられなかった。その後、ドーズを増したところ応答に一貫性がなくなり TBT の実験系への吸着が疑われたので一旦急性投与実験を中断した。

5) ビスフェノール、ビスフェノール代替物質の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測の解析結果を図 1 に示した。図 1 は 2 週齢、8 週齢の動物群から作成した海馬スライス標本の CA1、CA3、DG の各領野の入力繊維 (Schaffer collateral, Mossy fiber, Perforant path) に 2 種類の異なる刺激強度で刺激を加えた時の VSD 信号で捉えた応答の最大強度を各画素に投射して示した図である。それぞれ、コントロールの ACSF に対して 5ppm の BPA、BBMTBP、MBMTBP を負荷した時の応答を示しており、左側は GABAA 受容体阻害薬を含まない時、右側 (Gabazine) は含む時を示している。

Gabazine を付加すると応答の大きさは大きくなるがその大きくなり方は、部位ごと、刺激強度条件によって異なり、コントロール条件に比べ明らかに変わっているものが見られる。図 2 は同じデータで、VSD 信号の時間積分値を投射した図である。これらのイメージデータはそれぞれ 5-6 スライスからの平均値を示している。

これらの値を、各領野ごとの代表値で棒グラフにしたものが図 3、4 である。それぞれコントロールに対して、有意に差が見られた実験群に (*) をつけた。これで見ると、Gabazine を負荷した場合には多くの群で有意な差が現れること、2 週齢の動物よりは 8 週齢の動物の方が若干大きな差が見られることがわかる。また、BPA よりも BBMTBP、MBMTBP の方が影響が大きいことが明らかである。

D. 考察

本年度の計測法の確立によって、海馬や他の神経回路組織の神経興奮の伝播の解析が長時間、網羅的に行えることを示した。これは通常の電気生理学的解析に匹敵するもので、同じ様な計測がはるかに多くの計測点で行えることで、より鋭敏に化学物質による神経回路動作の変調を捉えること

が可能になったと言える。今後、さまざまな化学物質の影響について調べていく。最後のビスフェノール群の検定で見たように海馬での影響が異なる Age 群で網羅的に示されたことはこの手法の有用性を示している。

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. *Tominaga, T., *Kuhn, B. (2020).

Cutting-edge brain research from a biophysical perspective: symposium synopsis of Session 1SCP at BSJ2019 in Miyazaki, Kyushu, Japan Biophysical Reviews

<https://dx.doi.org/10.1007/s12551-020-00637-0>

3. Saito, H., Hara, K., Tominaga, T., Nakashima, K., *Tanemura, K. (2019). Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice Journal of Applied Toxicology
<https://dx.doi.org/10.1002/jat.3882>

4. Tominaga, Y., Taketoshi, M., Maeda, N., *Tominaga, T. Wide-field Single-photon Optical Recording in Brain Slices Using Voltage-sensitive Dye. J. Vis. Exp. (148), e59692, doi:10.3791/59692 (2019).

5. Kajiwara R, Tominaga Y, Tominaga T (2019) Network plasticity involved in the spread of neural activity within the rhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices Front. Cell. Neurosci. doi: 10.3389/fncel.2019.00020

2. 学会発表
1. Yoko TOMINAGA, Maki KOIKE-TANI, Tomomi TANI, *Takashi TOMINAGA A fast intrinsic optical signal (fios) from unstained hippocampal slice is a novel kind of optical signal: comparison with the voltage-sensitive dye signal Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience 20191019 Chicago McCormic Place
 2. Yoko Tominaga, Makiko Taketoshi, Kentaro Tanemura, Takashi Tominaga Optical Recording Methods with Voltage-Sensitive Dye (VSD) Is Useful to Evaluate the Impact of Chemicals on Brain Activities in Acute and Late Effects. IUTOX 15th International Congress of Toxicology July 15-18, 2019 | Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
 3. Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura. Early-Life Exposure to Low Levels of Permethrin Exerts Impairments in Learning and Memory Associated with Glial Cell Disturbance in Adult Male Mice. Hirokatsu Saito¹, Kenshiro Haral, Takashi Tominaga², Kinichi Nakashima³, Kentaro Tanemura¹. IUTOX 15th International Congress of Toxicology July 15-18, 2019 | Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
 4. *Machida Y, Yamada Y, Mizunuma S, Tominaga T, Kajiwarara R: Time-lapse optical imaging system for monitoring the resting membrane potential change of neurons in a mouse brain slice. Proc of Life Eng Symp 2019, 139-142, 2019 / ISSN: 2187-9605
 5. 富永貴志「脳神経回路膜電位イメージングの技術支援」新学術領域「個性」創発脳 第4回若手の会・技術支援講習会 2019年11月14日～15日会場:自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 中会議室
 6. 富永 貴志, 富永 洋子 「光信号で「見る」神経回路のはたらき-膜電位感受性色素(VSD)を中心に」シンポジウム 1SCP 生物物理で見る脳神経回路 (オーガナイザー:富永貴志、Bernd Kuhn) 第57回日本生物物理学会年会、宮崎県シーガイアコンベンションセンター 2019年9月24日-26日 9月24日 (招待公演)
 7. 富永貴志 「脳神経回路膜電位イメージングの技術支援」新学術領域「個性」創発脳 第4回若手の会・技術支援講習会 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 中会議室 2019年11月14日～15日
 8. 富永貴志・富永洋子・竹歳麻紀子 「脳の「個性」創発の神経機構を測る計測技術-膜電位感受性色素による回路動態計測 新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月2日招待講演
 9. 齊藤 洋克¹、後藤 萌¹、原 唯香¹、富永 貴志²、種村 健太郎 「マウス行動様式と海馬神経回路機能~系統間差と交雑影響~」新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月1日
 10. 原唯香、齊藤洋克、富永貴志、種村健太郎 「成熟マウスにおける条件付け学習記憶の形成・維持・想起・消去の性差」新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月1日
 11. 富永貴志, 富永洋子「神経回路ダイナミクスのリアルタイム光学計測:膜電位感受性色素(VSD)と早い内因性信号(FIOS) Optical recording of the real-time in vitro neural circuit dynamics: the voltage-sensitive dye (VSD) imaging and the fast intrinsic optical signal (FIOS)」(シンポジウム 2S06 膜電位イメージング:新展開 Voltage Imaging: What's New?, Bernd Kuhn, 富永貴志オーガナイズ) 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日(金) 朱鷺メッセ(新潟市)
 12. 富永 洋子 / Yoko Tominaga:1 竹歳 麻紀子 / Makiko Taketoshi:1 富永 貴志 / Takashi Tominaga:1 マウス海馬長期増強(LTP)の光学測定 Optical evaluation of the long-term potentiation (LTP) of the mouse hippocampal slices 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日(金) 朱鷺メッセ(新潟市)

- 13.
14. 山本 融 / Tohru Yamamoto:1 尾嶋 大喜 / Daiki Ojima:1 Hossain MD Razib / MD Razib Hossain:1 多田 篤史 / Atsushi Tada:1,2 黒川 直弘 / Naohiro Kurokawa:2 長澤 研 / Ken Nagasawa:2 琢磨 和晃 / Kazuaki Takuma:2 中井 雄規 / Yuhki Nakai:3 高橋 弘雄 / Hiroo Takahashi:1 富永 貴志 / Takashi Tominaga:3 岸本 泰司 / Yasushi Kishimoto:2 シナプス形成抑制因子 MDGA ファミリー分子群の欠失が引き起こす E/I バランス偏移をもたらす認知・行動異常 Cognitive and behavioral impairments caused by E/I imbalance in MDGA1/2 synaptic suppressor deficient mice. 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日(金) 朱鷺メッセ(新潟市)
15. 梶原 利一 / Riichi Kajiwara:1 富永 洋子 / Yoko Tominaga:2 富永 貴志 / Takashi Tominaga:2 嗅周囲皮質/嗅内皮質ネットワーク可塑性への遅延性不活性化カリウム電流の関与: マウス脳スライスの膜電位イメージング D-current related plasticity in the perirhinal-entorhinal network: a voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日(金) 朱鷺メッセ(新潟市)
16. 富永 貴志 「低用量化学物質ばく露が誘発する脳回路機能変調を検出する膜電位イメージング解析」シンポジウム 26 第46回日本毒性学会学術年会 2019 2019年7月28日(金曜) アスティとくしま 「幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状」
17. 石原 康宏 1, 本田 達也 1, 富永 貴志 2, 伊藤 康一 3, 山崎 岳 「胎児期バルプロ酸曝露のミクログリア活性と神経回路機能に及ぼす影響」第46回日本毒性学会学術年会 2019 2019年7月28日(金曜) アスティとくしま
18. 高橋和可子, 竹歳麻紀子, 富永洋子, 石原康宏, 富永貴志 「バルプロ酸とミノサイクリンの周産期投与による遅発性の海馬回路機能変化の膜電位感受性色素による可視化解析」11回日本生物物理学会 中国四国支部大会 (広島県民文化センター) 2019年5月11日
19. 中井雄規, 尾嶋大喜, 山本融, 富永貴志 「海馬神経回路の興奮/抑制 (E/I) バランスを欠く MDGA1 欠損マウスにおける歯状回長期増強への影響」11 回日本生物物理学会 中国四国支部大会 (広島県民文化センター) 2019年5月11日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

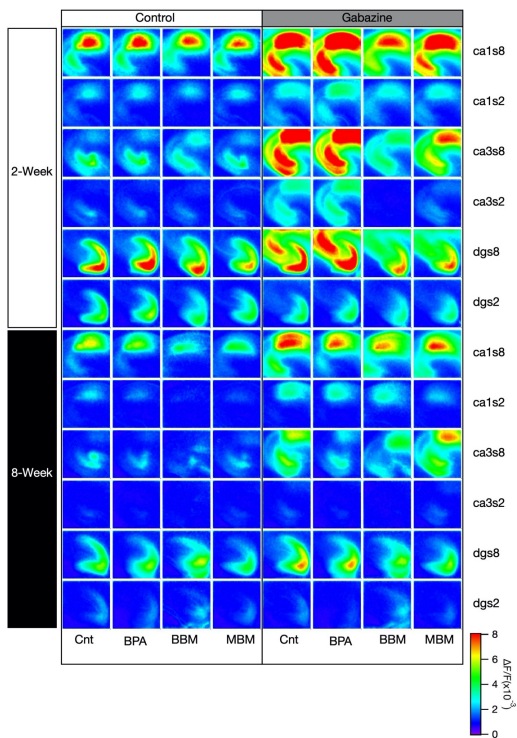


図 1 VSD 信号の最大値の投射図 動物は 2 週齢と 8 週齢で、CA1、CA3、DG のそれぞれの入力繊維に異なる刺激強度で刺激を加えた時の結果。それぞれ、通常の ACSF 溶液と GABAA 受容体阻害薬 (gabazine 10 μ M) を加えた時の応答の 5-6 スライスの応答の平均値を示している。

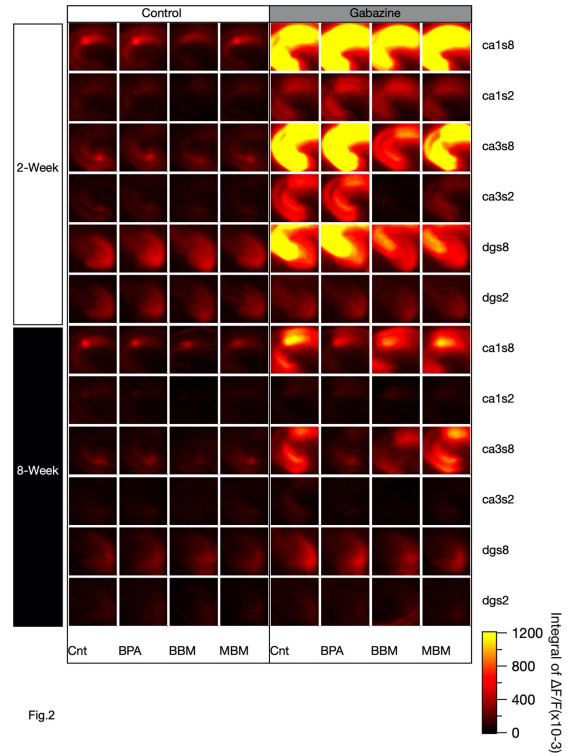


Fig.2

図 2 VSD 信号の積分値の投射図 動物は 2 週齢と 8 週齢で、CA1、CA3、DG のそれぞれの入力繊維に異なる刺激強度で刺激を加えた時の結果。それぞれ、通常の ACSF 溶液と GABAA 受容体阻害薬 (gabazine 10 μ M) を加えた時の応答の 5-6 スライスの応答の平均値を示している。

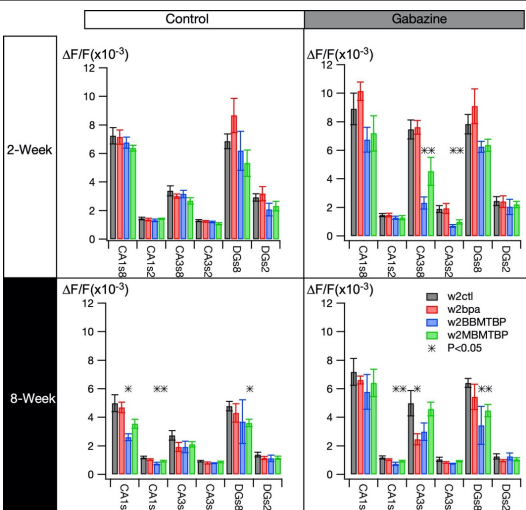


図 3 VSD 信号の最大値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

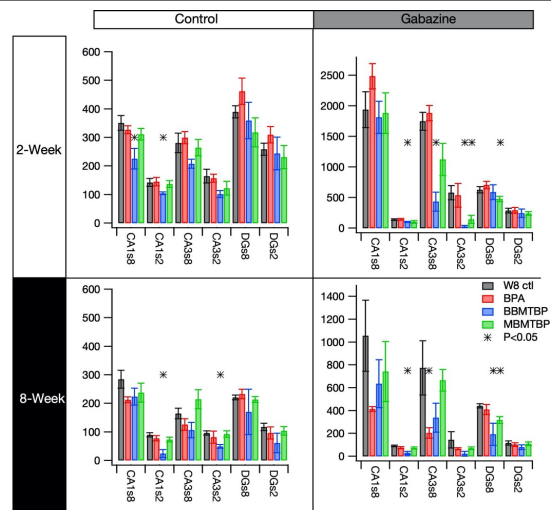


図 3 VSD 信号の積分値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露による神経幹細胞動態解析」

研究分担者

中島 欽一（九州大学大学院医学研究院・基盤幹細胞学分野・教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系、特に神経幹細胞は様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼすと考えている。本年度は、胎生11日から生後28日までトリブチルスズを、低用量（ $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）、中用量（ $25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）、高用量（ $250 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）で飲水投与し、産仔マウスが成体になるまで待ち、13週齢で海馬神経幹/前駆細胞の増殖を調べたところ、いずれの投与条件においてもコントロールと比べて、低下傾向にあることがわかった。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多く、また種々の化学物質によりこれらが受ける影響を数値化し、定量的に解析する方法も乏しい。そこで本分担者は、化学物質として、トリブチルスズ (TBTC) を選択し、周産期暴露が成体海馬のニューロン新生に及ぼす影響を解析するとともに数値化することを目的とした。

B. 研究方法

本年度は、Vehicle (V) (飲水+0.0001%溶媒エタノール)、TBTC 耐用 1 日摂取量 (TDI) 0.25 μ g/kg/day の 10 倍量である 2.5 μ g/kg/day (TBTC-L)、25 μ g/kg/day (TBTC-M)、250 μ g/kg/day (TBTC-H) を胎生 11 日から生後 28 日まで飲水投与を行った。その後生後 91 日から 95 日まで、BrdU を 50 mg/kg/day で腹腔内投与 (増殖細胞のラベリング) し、生後 96 で脳を固定した。その脳を用いて切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織染色を行い、各陽性細胞を測定した。

C. 研究結果

最終ページに掲載した図から示されるように、TBTC-L、TBTC-M 及び TBTC-H のいずれの群においても V と比較して、神経幹/前駆細胞の増殖が低下傾向を示すことがわかった。つまり、脳形成過程における TBTC への暴露は、成体になってから海馬での神経幹/前駆細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。

D. 考察

本研究において、脳形成期に低用量であっても TBTC に暴露されると、成長後の成体海馬神経幹/前駆細胞の増殖に影響が及ぼされる可能性が示唆された。今後は n 数を増やし少なくとも統計学的に優位な差であることを示すと同時に、ニューロンマーカーとも共染色により、ニューロン新生自体が影響を受けているかどうかを調べる必要がある。

E. 結論

今回の結果から、化学物質による生体への影響に関し、少なくとも成体海馬神経幹/前駆細胞増殖を数値化し、評価できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Mishima Y, Brueckner L, Takahashi S, Kawakami T, Otani J, Shinohara A, Takeshita K, Garvilles RG, Watanabe M, Sakai N, et al.: Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3. *Genes Cells* 2020, 25:22-32. PMID: 31680384 DOI: 10.1111/gtc.12732
 2. Yoshikawa Y, Ago T, Kuroda J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, Shibahara T, Nakashima H, Nakashima K, Kitazono T: Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury. *Neuroscience* 2019, 398:193-205. PMID: 30528855 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.046
 3. Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K: Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol* 2019, 39:1651-1662. PMID: 31415104 DOI: 10.1002/jat.3882
 4. Noguchi H, Castillo JG, Nakashima K, Pleasure SJ: Suppressor of fused controls perinatal expansion and quiescence of future dentate adult neural stem cells. *Elife* 2019, 8. PMID: 30973324 PMCID: PMC6459675 DOI: 10.7554/eLife.42918
 5. Nakajo M, Uezono N, Nakashima H, Wake H, Komiya S, Nishibori M, Nakashima K: Therapeutic time window of anti-high mobility group box-1 antibody administration in mouse model of spinal cord injury. *Neurosci Res* 2019, 141:63-70. PMID: 29604317 DOI: 10.1016/j.neures.2018.03.004
- ## 2. 学会発表
- <国内>
1. 中島欽一[○]: Artificial generation of new neurons in adult central nervous systems、第42回日本分子生物学会年会、福岡県、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2019年12月3-12月6日(3日)(シンポジウム)
 2. 中島欽一[○]: Artificial Production of New Neurons in the Adult Central Nervous System、Cell&Gene Therapy Asia2019、神戸市、Sheraton Kobe Bay Hotel & Towers、2019年11月11日-12日(12日)
 3. 中島欽一[○]: Prior inhibition of HMGB1enhances human neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury、9th International DAMPs and Alarmins Symposium、岡山県、岡山大学Junko Fukutake Hall、2019年11月6日-8日(6日)(招待)

- 4.
5. 中島欽一[○]:転写因子NeuroD1によるミクログリアからニューロンへのダイレトリプログラミングのメカニズム、第91回日本遺伝学会、福井県、福井大学文京キャンパス、2019年9月11日-14日(13日)(ワークショップ)
6. 中島欽一[○]:生体神経組織における人為的ニューロン新生とその作用、第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、福岡県、国民宿舎マリンテラスあしや、2019年9月5日-7日(5日)(招待講演)
7. 中島欽一[○]:胎生期バルプロ酸曝露によるけいれん感受性増大のメカニズムとその改善法、第46回日本毒性学会学術年会、徳島県、アスティとくしま、2019年6月26日-28日(28日)(シンポジウム)
8. 中島欽一[○]:転写因子ND1によるミクログリアからニューロンへのダイレトリプログラミングの分子基盤、第46回日本毒性学会学術年会、徳島県、アスティとくしま、2019年6月26日-28日(27日)(シンポジウム)

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 特になし |

<国際>

1. Nakashima, K.: Artificial neurogenesis in the adult central nervous system and its effect on functional recovery after injury, 2nd Neuroepigenetics & Neuroepitranscriptomics, Nassau, Bahamas, March 3-6, 202

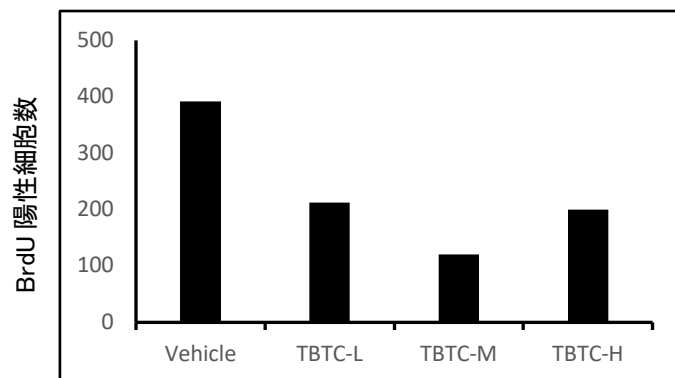
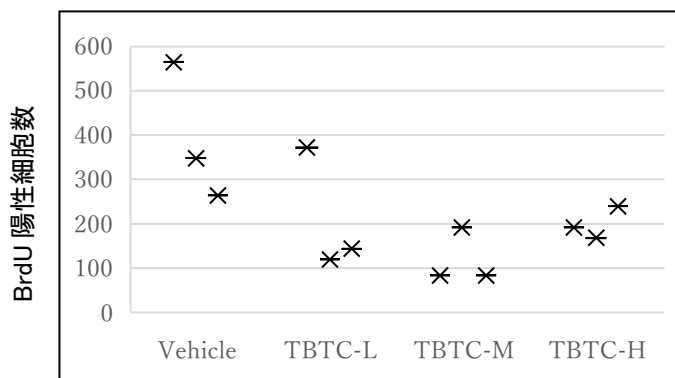


図. TBTC の周産期暴露が成体海馬神経幹/前駆細胞の増殖に及ぼす影響：(上図) 各マウス個体海馬における BrdU 陽性細胞数。(下図) 各群 3 匹ずつの海馬における BrdU 陽性細胞の平均値。

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題

「網羅的遺伝子発現解析」

ビスフェノールAとゴム老化防止剤であるMBMTBTおよびBBMTBTを周産期マウスに慢性飲水投与後、13週齢時の海馬における遺伝子発現プロファイル

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
研究協力者	相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
	森山紀子	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量ばく露による遅発性の中枢神経系への影響を検討するが、本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、周産期マウスに慢性飲水投与後、13週齢時の行動解析バッテリー試験後のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的とする。

平成31(令和元)年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール類を取り上げ、具体的には、ビスフェノールA(BPA)とゴム老化防止剤であるBBMTBT (4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)) およびMBMTBT (2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)) を、周産期マウス (胎生11日～離乳生後4週齢) に、いずれも0.5 mg/kg/日を周産期飲水投与後、得られた産仔雄マウスを用いて成熟後13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。投与用量 (0.5 mg/kg/日) は、BPAの耐容一日摂取量 (TDI) (0.05 mg/kg/day; EFSA) を参考に、その10倍量程度の用量を設定した (BPAのTDI値を元に、安全係数として10を用いて算出した)。対照群には、溶媒と同じく、0.0001 %エタノールを含む水道水を摂取させた。解析の結果、A) BPAを0.5 mg/kg/日 (TDIの1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。B) BBMTBTを0.5 mg/kg/日の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。C) MBMTBTを0.5 mg/kg/日の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。このように、ビスフェノール類BPA、BBMTBT及びMBMTBTを、0.5 mg/kg/日の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられ、このことから、いずれの場合でも、顕著な情動認知行動影響は認められないことが示唆された。

A. 研究目的

本研究全体の目的は、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、対象とし、生活環境レベルでの低用量ばく露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することである。家庭用品は、それに求められる機能が多様であり、この中には、フタル酸エステルやビスフェノールAといった、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが明らかな物質が含まれている。被験物質として、従来型の毒性試験法による毒性情報が利用可能で、周産期ばく露による中枢神経毒性に関する情報がなく、かつ、中枢神経系に発現している各種受容体に対して親和性がある家庭用品化学物質を選択した。具体的には、塗料剤、ゴム製品老化防止剤、防虫加工剤を選択する。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、周産期に飲水投与後、成熟後13週齢時のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的としている。被験物質として、平成30年度はネオニコチノイド系農薬アセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質ニコチンを、平成31年度（今年度）は、ビスフェノール類であるビスフェノールA(BPA)とゴム老化防止剤であるBBMTBT(4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール))及び、MBMTBT(2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール))を選択した。

B. 研究方法

マウス、被験物質及び投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc（日本エスエルシー）を用いた。

被験物質は、ビスフェノールA(BPA, Cas No. 80-05-7, 分子量:228.29, カタログ No. 04225-10, 純度:>98.0%, 関東化学株式会社)およびゴム製品老化防止剤(2種)、4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(BBMTBP, Cas No. 85-60-9, 分子量:382.59, カタログ No. B0724, 純度:>97.0%, 東京化成工業株式会社)、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)(MBMTBP, Cas No. 119-47-1, 分子量:340.51, カタログ No. M0217, 純度:>99.0%, 東京化成工業株式会社)を使用した。以上3物質の構造式を図1に示す。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水(水道水)に添加し(エタノールの最終濃度は0.0001%)、一日投与量として、0.5 mg/kg/日を胎生11日から離乳4週齢までの周産期マウスに慢性飲水投与した。投与用量(0.5 mg/kg/日)は、BPAの耐容一日摂取量(TDI)(0.05 mg/kg/day; EFSA)を参考に、その10倍量程度の用量を設定した。対照群には、0.0001%エタノールを含む水道水を摂取させた。飲水投与後、12週齢時に情動認知行動解析を行い(n=8-9)、その後、13週齢時の海馬(n=3; 8-9例から3例をランダムに選択)について網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

遺伝子発現変動解析

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳(海馬)(各群 n=3)について、Percellome法(遺伝子発現値の絶対化手法)(Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006)

による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。マウス海馬は、氷冷下にて左脳から、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の4部位に分割することにより得た。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIzol により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得られた cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 cDNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ピオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウ

ス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: BPA の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、0.5 mg/kg/日の BPA を 産産期 に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps)

数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

315 ps (増加)、 130 ps (減少)

増加分 315 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は、転写因子として TCF7L2、Sox2 及び REL が、サイトカインとして TNF が抽出されてきたが、神経系の有害事象との関連は見出せなかった (>E-4)。

一方、減少分 130 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は、転写因子として MDM2 が抽出されてきたが、神経系の有害事象との関連は見出せなかった (>E-4)。

なお増加・減少の場合共に、アポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

以上の通り、BPA を 0.5 mg/kg/日 (TDI の 10 倍程度の用量 : BPA の TDI 値を元に、安全係数として 10 を用いて算出した) の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬

における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。

C-2 : BBMTB の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、0.5 mg/kg/日の BBMTBT を 周産期 に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット : ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

236 ps (増加)、 102 ps (減少)

増加分 236 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因

子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

一方、減少分 102 ps について検討した結果でも、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、サイトカインとして IGF-1 が抽出されてきたが、神経系の有害事象との関連は見出せなかった (>E-4)。

なお増加・減少の場合共に、アポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

以上の通り、BBMTBT を 0.5 mg/kg/日の投与用量(BPA の場合と同一用量)で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。

C-3 : MBMTB の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、0.5 mg/kg/日の MBMTB を周産期に投与した場合に、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

852 ps (増加)、69 ps (減少)

増加分 852 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

一方、減少分 69 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、IPA による Canonical pathway による検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、転写因子として HIF1A、TRIM28 及び HTT、サイトカインとして TGF-B1 が抽出されてきたが、神経系の有害事象との関連は見出せなかった (>E-4)。

なお増加・減少の場合共に、アポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認

められなかった。

以上の通り、MBMTBを0.5 mg/kg/day (BPAの場合と同一用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1)各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2)神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかったことから、重篤な神経系の有害事象は観察されない可能性が示唆された。

このように、ビスフェノール類 BPA、BBMTBT 及び MBMTBT を 0.5 mg/kg/日 (BPA の TDI の 10 倍程度の用量：BPA の TDI 値を元に、安全係数として 10 を用いて算出した)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、投与群では、いずれも 1)各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2)神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。したがって、この投与用量、投与期間といった条件では、これらの物質により、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられた。

次いで、発現が増加あるいは減少した遺伝子について、各 3 化合物間の集合関係を検討した。この集合関係を図 2 (最終ページ参照)としてベン図に示す。3 化合物で共通して発現が増加した遺伝子数は 11ps であったが、3 化合物に共通して発現が減少した遺伝子はなかった。この共通して増加した 11 ps につき Common Name で以下に記載す

ると、Lipt1、Ctbs、E130309D02Rik、6530403M18Rik、C030013D06Rik、Zbtb1、Galnt13、Inpp4b、Csmd1、Mett114 及び Nup54 であった。この遺伝子リストからは特定のシグナルネットワークを見いだすことはできなかった。

D. 結論

平成 31 年度 (今年度) は、ビスフェノール類である BPA とゴム老化防止剤である BBMTBT 及び MBMTBT を選択し、周産期マウス (胎生 11 日～離乳生後 4 週齢) に各 0.5 mg/kg/day を周産期飲水投与後、成熟後 13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、この投与用量、投与期間といった条件では、いずれの場合でも、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられ、このことから、いずれの場合でも、顕著な情動認知行動影響は認められないことが示唆された。

令和 2 年度 (来年度) は、本研究班全体の目的に則り、家庭用品に含まれる別の化学物質について、周産期に飲水投与後、13 週齢時のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019.

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

北嶋 聡、エディトリアル：ドーピングの中
毒学・毒性学-序文-、中毒研究(Jpn. J. Clin.
Toxicol.) 32: 373-374. 2019.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策
に関する研究-シックハウス症候群レベル
の室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の
海馬 Percellome トキシコゲノミクスによ
る中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会
(2019.9.13.)名古屋

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食
品の現状と課題、日本食品化学学会 第3
5回食品化学シンポジウム(2019.11.8.)東
京

登田 美桜、北嶋 聡、フグ毒として知られる
テトロドトキシンのリスク評価に関する国
際的動向-マウスユニットと急性参照用量
-、第46回日本毒性学会学術年会
(2019.6.26.)徳島

種村 健太郎、北嶋 聡、菅野 純、発生期マ
ウスへの神経シグナル異常による成熟後の
神経行動毒性発現~海産毒による異常誘発
モデルとしての検討~、第46回日本毒性学
会学術年会(2019.6.26.)徳島

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、
Percellome プロジェクトから見えてきたエ
ピジェネティクス影響、第46回日本毒性学
会学術年会(2019.6.26.)徳島

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、
Percellome トキシコゲノミクスのエピジェ
ネティクス基盤 -「新型」反復曝露試験の
解析-、第46回日本毒性学会学術年会
(2019.6.28.)徳島

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik
GOSH, 北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、
Garuda プラットフォームによる多角的毒性
予測、第46回日本毒性学会学術年会
(2019.6.28.)徳島

種村 健太郎, 北嶋 聡, 菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 28.) 徳島

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano , Kenji Mizuguchi, Jun Kanno 、 Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid 、 IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019. 7. 16.) ハワイ

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi、Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019. 7. 17.) ハワイ

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura 、The Concept of “ Signal Toxicity ” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 、 IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019. 7. 17.) ハワイ

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

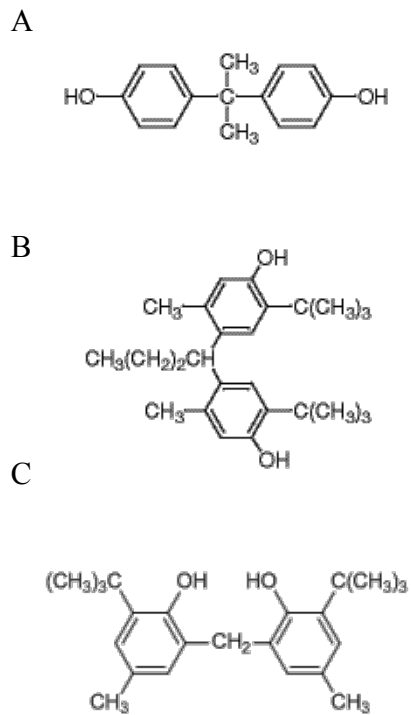


図1 BPA(A)とBBMTBT(B)及びMBMTBT(C)の化学構造式

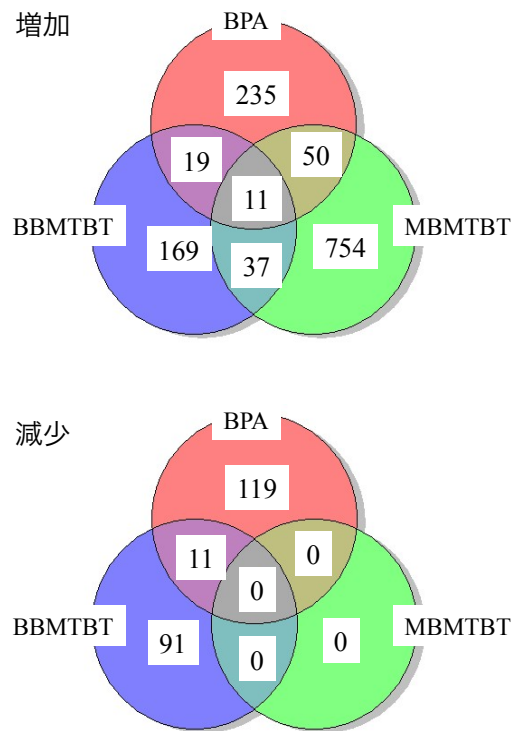


図2 周産期飲水投与後、13週齢時の海馬において、発現が有意に減少する遺伝子の内、BPA、BBMTBTあるいはMBMTBT投与の場合の集合関係(上:発現増加の場合、下:発現減少の場合)

ベン図で表記した

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み

研究分担者

菅野 純（独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター）

【研究要旨】

先行研究及び本研究において得られた成果から、神経行動毒性試験バッテリーを体系化し、その汎用性・網羅性・迅速性について、国際的会合に出席して情報発信した結果、このような試験による高次脳機能に関する情報の必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その活用方法の検討を積み重ねようとしていることが判明した。本年度は、昨年度に経済開発協力機構（OECD）の、内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に提出したOECD TG426（齧歯類発達期神経毒性試験ガイドライン）を補強するものとしてこの試験バッテリーに関する標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）の一次審査の結果を受け、OECD Developmental Neurotoxicity (DNT)との調整を進めた。本活動についてJaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）の発達神経毒性試験資料編纂委員会からの推奨を得た。加えて、発達神経毒性の情報のデータベース化計画を開始した。

A. 研究目的

先行研究及び本研究において得られた成果から試験法ガイドラインとして提案可能なプロトコールに体系化した「神経行動毒性試験バッテリー」について、その汎用性・網羅性・迅速性といった実用性の高さをもって、既存の OECD-TG426（齧歯類発達期神経毒性試験ガイドライン）を補強する事を目的とし、経済開発協力機構（OECD）の、内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に対し、標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）を作成し提出する。本年度は、一次審査を受け OECD Developmental Neurotoxicity (DNT)においてこの取り扱いを協議する事とされ、そのための調整を行う。加えて、本研究の成果を取りまとめた発達神経毒性の情報のデータベース化を進める。

B. 研究方法

B-1「神経行動毒性試験バッテリー」の Standard Project Submission Form (SPSF)の作成と提出：

情動行動（不安関連行動）への影響、および学習記憶行動への影響を評価するバッテリー式のマウス行動評価系プロトコール（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、及び、プレパルス驚愕反応抑制試験からなる）の標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）を作成し、参考資料（説明スライドを添付）と共に、経済開発協力機構（OECD）の内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に提出し、審議を受けた。JaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）の発達神経毒性試験資料編纂委員会において経過説明を行った。

B-2「神経行動毒性試験バッテリー」結果のデータベース化：

本研究の成果を取りまとめた発達神経毒性の情報のデータベース化に向けた情報整理を開始した。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定

める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1「神経行動毒性試験バッテリー」の Standard Project Submission Form (SPSF)の作成と提出：

2019年4月9日に開催された第31回国際コーディネータによる試験法ワーキンググループ（Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)）において、当研究班として提案した「神経行動毒性試験バッテリー」が審議された。この提案を強く支持する、あるいは容認する代表が多数であったが、EUのみが承認しなかった。その理由は、OECDが欧州食品安全期間（EFSA）と主導している「in vitro 及び代替手法による発達神経毒性（Developmental Neurotoxicity: DNT）」において進められている内容との整合性が問題とされたことによる。OECDは全会一致が要求されるため、継続審議となり、2019年6月7日に行われたDNTの専門家会合（Web会合）において当分担研究者が説明を行った（発表ppt 図1～17）。

提案した「神経行動毒性試験バッテリー」を構成するオープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、及び、プレパルス驚愕反応抑制試験は、情動、記憶、情報処理機能をカバーする。一群8匹でも十分な検出力を得られる条件を詳細に、使用する機具の標準化を含めて、整備したこと、同一動物をストレスの弱い試験から順に4試験に供するプロトコールとし、従来提案されている試験よりも必要動物数を著しく減らしたこと、測定器具を2機ずつ用意した場合の雄8匹/群、4群の規模の試験の所要期間を6日間に抑えたこと、が特徴である。雄雌を対象とする場合は、装置の規模を倍にするか、あるいは一週間ずらすことで、1乃至2週間で完了する事が可能であることを説明した。

提案した「神経行動毒性試験バッテリー」は、毒性分野のみに閉じることによる性能低下を回避する目的を含み、マウスを用い、陽性対照として、種々の情動認知行動異常を發揮する事が知られている遺伝子変異マウス（情動認知行動異常モデルマウス）を用いることを提案した点も一つの特徴である。勿論、試験バッテリー自体はラットでの実施も可能である（ラット用の機具により）ことも、説明した。その結果、TG426の改定の必要性和日本提案のそこに含まれるか否の判断がOECDのDNTに託されることとなった。2019年8月21

日に開催された DNT 会合 (Web 会合) において、判断の要件となる TG426 の「不確実性調査書」の作成が遅れていることから、同年 12 月 13 日の DNT 会合 (Web 会合) まで、判断が延期された。12 月の会合では「不確実性調査書」が説明され、DNT が進める In vitro 試験法の提案との同調は出来ないとの判断がなされ上部会議である WNT へ提示する判断がなされた。2020 年 2 月 4 日に JaCVAM (日本動物実験代替法評価センター) の第 2 回発達神経毒性試験資料編纂委員会において本提案が論議され、2020 年 4 月の WNT 会議にて、今一度、日本からガイダンス作成の協力を求め、賛同を得られない場合でも、引き続き、国内でのガイダンス作成を目指すことが本委員会として推奨するとされた。

C-2「神経行動毒性試験バッテリー」結果のデータベース化：

発達神経毒性の情報のデータベース化計画を開始した。向中枢作用を有する化学物質、ドーモイ酸、アセフェート、トリアゾラム、イボテン酸、アセタミプリド、イミダクロプリド、イミダクロプリド、ニコチン、及びビスフェノール類 3 種について、胎生期単回、幼若期単回、成熟期単回、及び周産期反復曝露のいずれかの曝露後の情動認知行動試験結果、及び、海馬の遺伝子発現情報 (マイクロアレイ解析) のデータベース化に向けた整理を進める。

D. 考察

先行研究、及び、本研究班において得られた分子生物学的な成果を取り入れた「神経行動毒性試験バッテリー」は、OECD EDTA-AG において、現実の場面で化学物質の評価に携わる研究者からの賛同を得ていることは、当研究班の成果が国内外においても評価される内容であること、研究の方向性について妥当性と新規性があることが確認された。しかし、同時に OECD の場においては、in vitro や代替法による評価法を目指すグループによる発達神経毒性プロジェクトの計画が進んでおり、もともと、動物試験を排除する事が前提にある事から、調整が難航した。本試験バッテリーが生成する試験結果は、代替評価法の開発にとって有益であるとの側面についても、その様な論議が開始されるのは実際に in vitro のデータが集積した後になる事が、やり取りの中から想定された。また、ラットによる GLP 試験との連関を取りつつ、情動認知行動異常モデルマウスを用いた陽性対照動物の標準化と、それらの分子メカニズム解析結果の

蓄積によるヒトへの外挿性の向上を同時進行させる利点については、DNT の in vitro 主体の計画では、ヒト由来培養細胞を用いる事で対応する事としており、in vitro と in vivo の連関性を含む論議が深化しなかった点が残念であった。本研究の最終年度に向け、今一度、日本からガイダンス作成の協力を OECD 諸メンバーに求め、賛同を得られない場合でも、引き続き、国内でのガイダンス作成を目指す。

E. 結論

当研究班の研究計画、成果ともに毒性評価に携わる研究者には国際的にも評価を得たが、OECD 全体としての in vitro 指向との調整が難航した。今後、少なくとも現状及び近未来的には当該試験法バッテリーの標準化の重要性、及び、その今までの成果の発信を継続的に説明して行く必要があると結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 書籍 なし
- 2) 雑誌

1. Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. Mol Pharmacol, 96(5): 600-608, 2019.
2. Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. (2019) Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol. 2019 Feb 8;2:57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

2. 学会発表

1. J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), Anaheim, USA, ePoster.
 2. R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019 (55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster
 3. Jun Kanno, Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed repeated dose study - progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster
 4. Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster
 5. Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster
 6. 菅野 純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学:シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
 7. 種村健太郎, 北嶋 聡, 菅野 純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学:シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
 8. 菅野 純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 -「新型」反復曝露試験の解析-. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
 9. 種村健太郎, 北嶋 聡, 菅野 純, 日本中毒学会合同シンポジウム:海産毒 リビジテッド 発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
特になし。

NeuroBehavioral Test Battery

Kentaro Tanemura¹, Yusuke Furukawa², Ken-ichi Aisaki², Satoshi Kitajima², Eimei Sato¹ and Jun Kanno^{2,3}

¹Laboratory of Animal Reproduction, Tohoku University,

²Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences

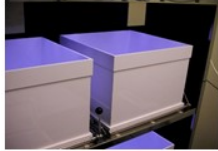

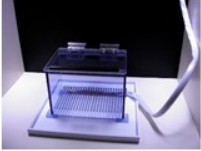
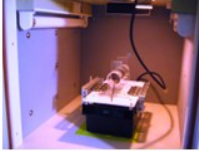
³Japan Bioassay Research Center, Japan Organization of Occupational Health and Safety

(Supported by MHLW Health Sciences Research Grants 2008, 2011, 2014 and 2018)

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

1

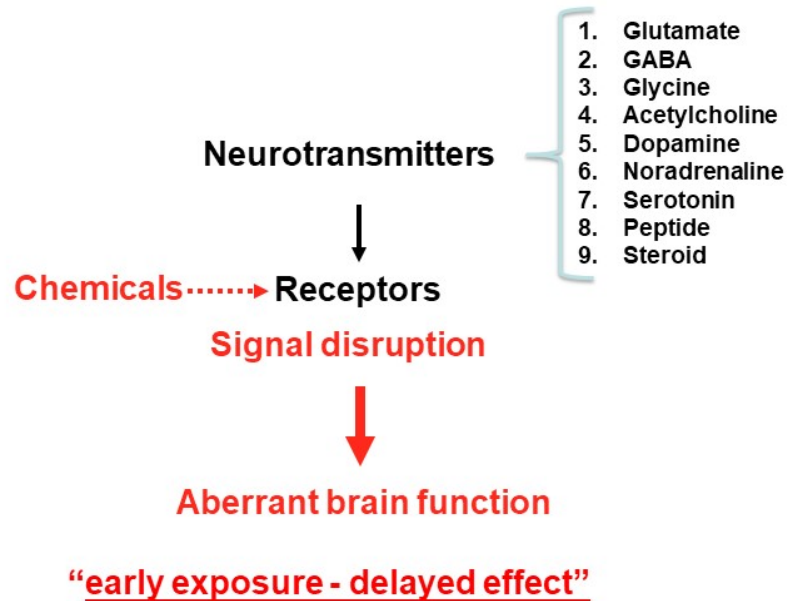
- Behavioral test battery -

Emotion		Memory	Information processing
<u>OF</u>	<u>LD</u>	<u>CCC</u>	<u>PPI</u>
			
Open Field Test 10 min.	Light-Dark Transition Test 5 min.	Contextual and Cued Conditioning Test 6min. x 3days	PrePulse Inhibition Test 30min.
<u>Measurement</u> Total distance Center-time Number of movements	<u>Measurement</u> Light time Number of transition Latency to enter light	<u>Measurement</u> Conditioning (1 st day) Contextual (2 nd day) Cued (3 rd day)	<u>Measurement</u> Prepulse inhibition (105db:120db)

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

3

Neurotransmitter and developing brain



DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

2

TABLE 2		Proposed Test Battery			
Tests for Associative learning and memory	Measurement(s)	Criteria	Time per Animal	Total days needed for n=8 x 4 dose levels, one sex (pls double for both sex)	Corresponding Anatomy
Open Field test	distance/moving times/time spent at center area	exploratory behavior (against novel environment)	10 min	1 day	frontal cortex/ cerebral cortex
Light dark transistion	time spent at light area/number of transition/latency time at dark area	anxiety behavior	6 min	1 day	frontal cortex
Contextual and Cued conditioning test	duration of freezing	formation of short-term memory (CCC1), contextual memory (CCC2), cued memory (CCC3)	6 min - 3days	3 days	hippocampus/ amygdala
Prepulse inhibition	ratio of prepulse inhibition	sensorimotor gating	20 min	1 day	frontal cortex/ thalamus

Recommended n=8, able to use same animals to the next tests in sequence.

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

4

TABLE 1	Test listed in TG426				
Tests for Associative learning and memory	Measurement(s)	Criteria	Time per Animal	Estimated Total days needed for n=8 x 4 dose levels, one sex (pls double for both sex)	Corresponding Anatomy
passive avoidance	latency(sec) to dark box	working memory	5 min x 2 days	2 days	obscure/ undetermined
delayed-matching-to-position	correct response	working memory	30 - 60 min x 5 - 20 days	40 days	hippocampus/ cerebral cortex
olfactory conditioning	correct response	working memory	30 - 60 min x 5 - 20 days	40 days	hippocampus/ amygdala
Morris water maze	training : latency to goal	spatial memory	1 min x 4 trials x 5-7 days	20-28 days	hippocampus/ prefrontal cortex
Biel or Cincinnati maze	latency to goal, number of error	working memory	10- 20 min x 5 - 10 days	20 days	obscure/ undetermined
Eight-arm radial maze	working memory task : working memory error	working memory	10- 20 min x 10 - 15 days	30 days	hippocampus/ prefrontal cortex
	reference memory task : reference memory error	reference memory	10- 20 min x 10 - 30 days	60 days	hippocampus/ prefrontal cortex
T-maze	forced alternation task (working memory task) : working memory error	working memory	10 - 30 min x 5 - 7 days	14 days	hippocampus/ prefrontal cortex
	discrimination task (reference memory task) : reference memory error	reference memory	10 - 30 min x 5 - 15 days	30 days	hippocampus/ prefrontal cortex
acquisition and retention of schedule-controlled behavior	number of response and correct response	schedule-controlled behavior	30 - 60 min x 5 - 20 days	40 days	striatum/ prefrontal cortex

Recommended n=20, difficult to use same animals to next test.

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

5

The Journal of Toxicological Sciences (J. Toxicol. Sci.)
Vol.34, Special Issue II, SP279-SP286, 2009

SP279

Intrauterine environment-genome interaction and Children's development (2):

Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams

Kentaro Tanemura, Katsuhide Igarashi, Toshiko-R Matsugami, Ken-ichi Aisaki,
Satoshi Kitajima and Jun Kanno

Division of Cellular & Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

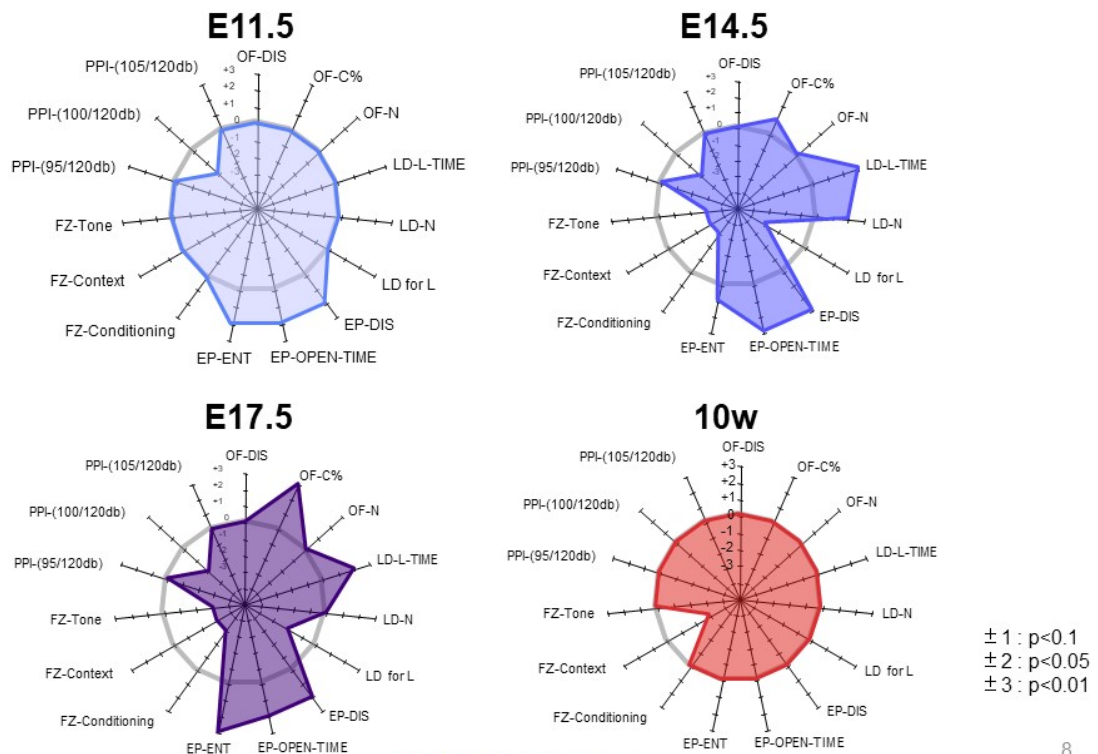
(Received February 17, 2009)

Glutamnergic agonist/ kainic acid analog

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

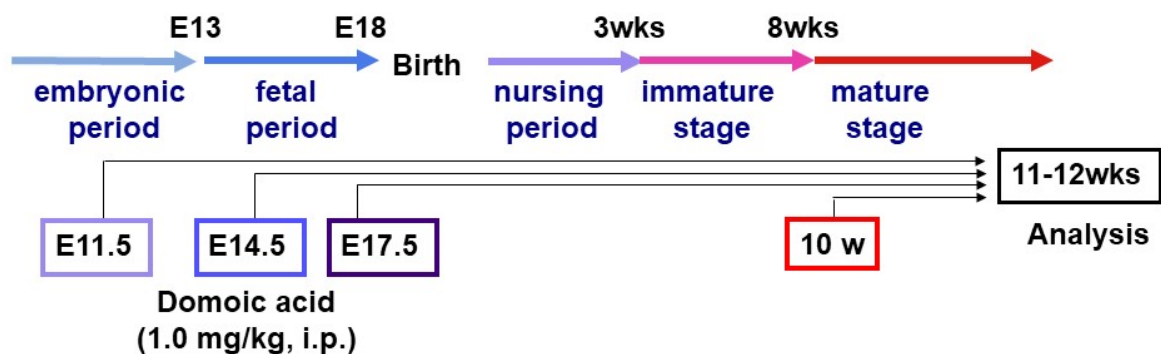
6

Summary of behavioral analysis



DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

Delayed effects on brain function induced by prenatal exposure of domoic acid



Neural Stem Cell Maturation takes place between E11.5 and E14.5 in mice

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura



Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period

Yusuke Furukawa^{1,2}, Kentaro Tanemura^{3*}, Katsuhide Igarashi⁴, Maky Ideta-Otsuka⁴, Ken-Ichi Aisaki¹, Satoshi Kitajima¹, Masanobu Kitagawa² and Jun Kanno^{1,5}

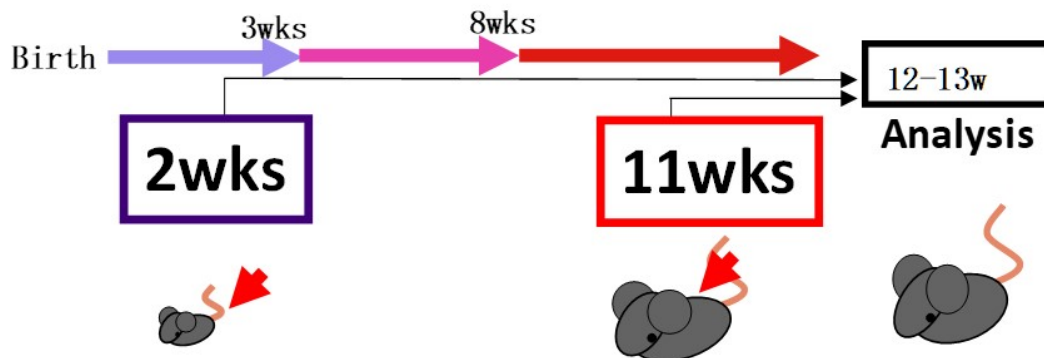
¹ Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, ² Department of Comprehensive Pathology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, ³ Laboratory of Animal Reproduction and Development, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Japan, ⁴ Life Science Tokyo Advanced Research Center, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan, ⁵ Japan Bioassay Research Center, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Hadano, Japan

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

9

GABA agonist single oral exposure Behavioral Battery Test and molecular analysis-

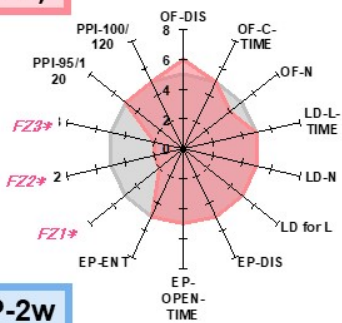
Triazolam (TZ) 1mg/kg, p.o.
Zolpidem (ZP) 50mg/kg, p.o.



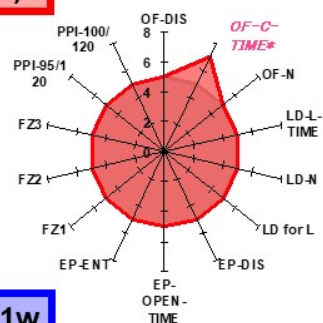
DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

10

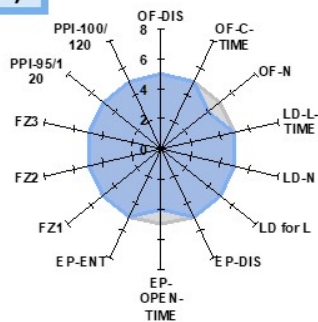
**TZ-2w
(n=8)**



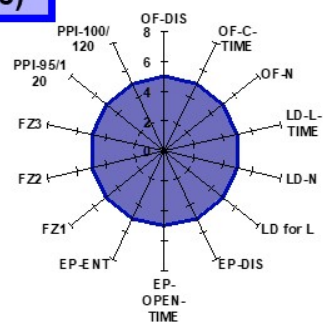
**TZ-11w
(n=8)**



**ZP-2w
(n=8)**



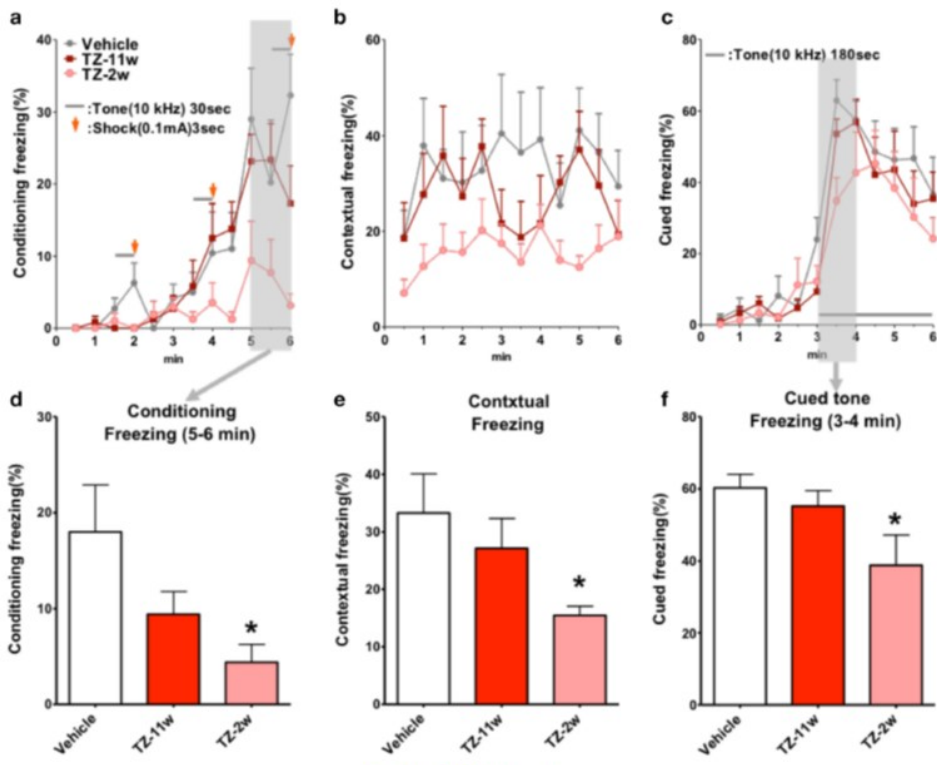
**ZP-11w
(n=8)**



P value (t-test)
 $P < 0.001$ ***
 $p < 0.01$ **
 $p < 0.05$ *
 $p < 0.1$
 $p > 0.1$

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

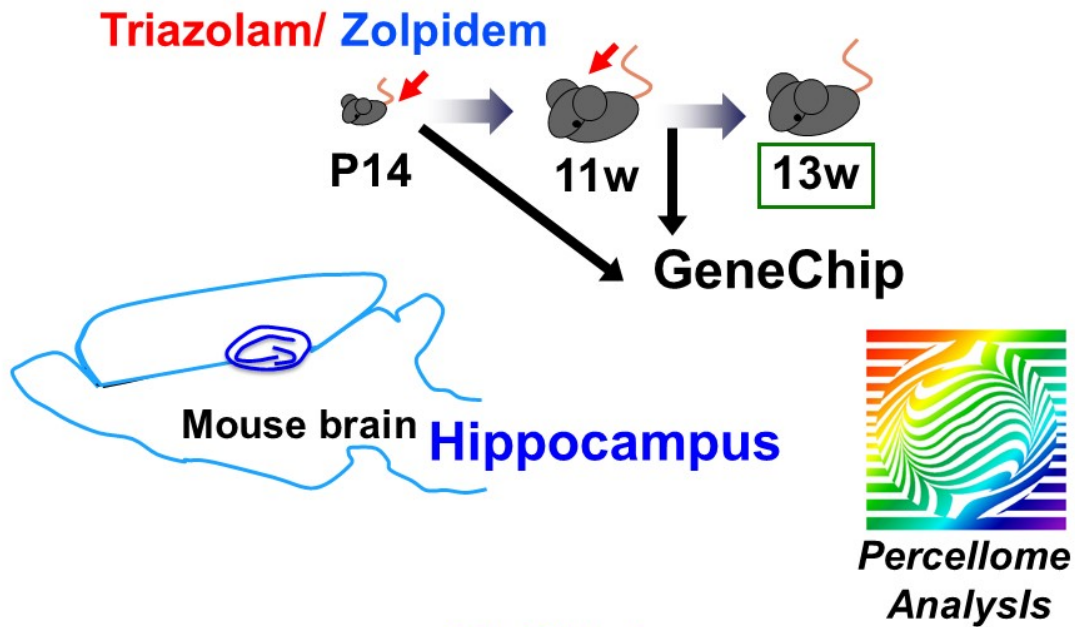
A



DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

- mRNA

Gene expression analysis



DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

13

Immediate early response genes

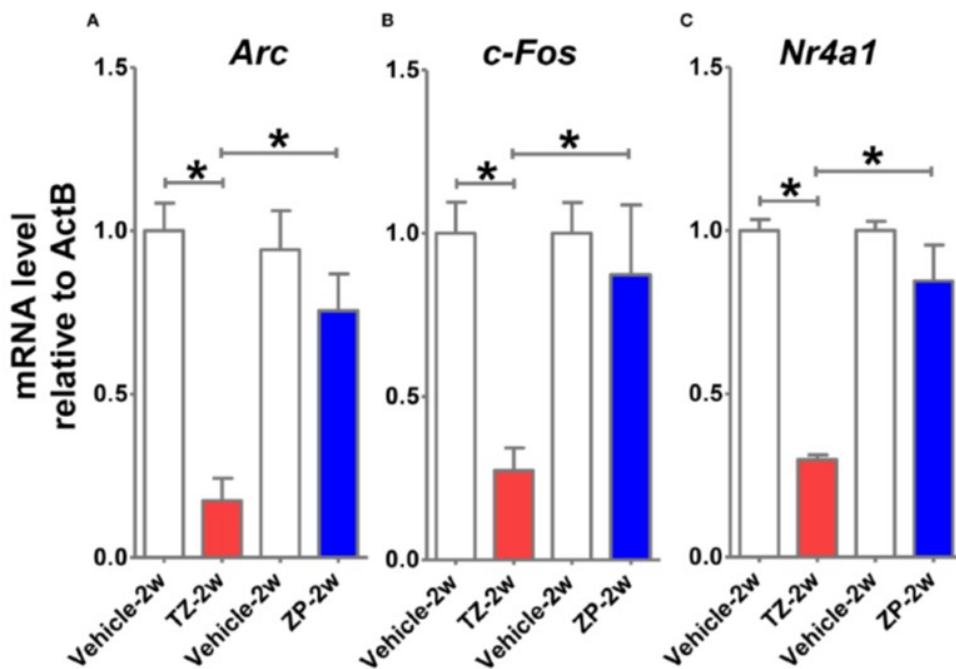
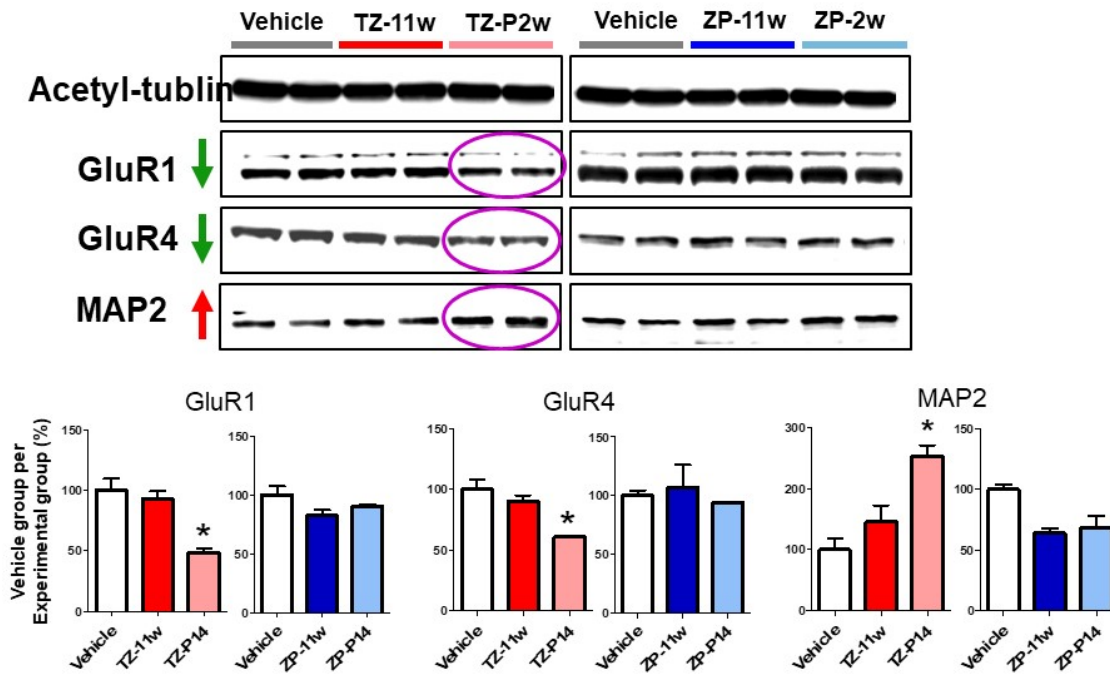


FIGURE 8 | Comparisons of immediate early response gene (IEG) mRNA expression levels in the hippocampus shortly after TZ or ZP exposure. Eight hours after TZ or ZP administration to juvenile (2-week-old) mice, we examined the mRNA expression levels of multiple IEGs in the hippocampus. Significant

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

14

Triazolam affects neuronal protein expression



DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

15

Gene Modified (GM) mice for positive control of this test battery

Conditions to select GM mice

1. GM mice that shows obesity or emaciation should be avoided because the results of some of the tests are affected by increase or decrease in body weight.
2. Easy to breed

Candidate GM mice includes ER alpha knock-down mouse (Tanemura et al., paper in preparation) and ER beta knock-in mice that shows variety of anomalies in test battery.

DNT June 7, 2019 Kanno/Tanemura

16

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「化学物質の周産期暴露による中枢神経系 DNA メチル化影響解析」

研究分担者

五十嵐 勝秀（星薬科大学創薬科学科・生命機能創成科学研究室・教授）

【研究要旨】

家庭用品化学物質の周産期ばく露において、それがエピジェネティックな影響を及ぼした場合には、将来持続する遅発性毒性が生じる可能性がある。本分担研究ではエピジェネティックな影響のうち、より可逆性が低く毒性影響として重要性が高いDNAメチル化に焦点を絞る。家庭用品化学物質がDNAメチル化に影響を与えるかを判定する細胞システムを導入し、影響の有無に関するデータを取得し、遅発性毒性のメカニズム解明の一助とするとともに、DNAメチル化変化を毒性マーカーとして活用することも考慮し研究を進める。

A. 研究目的

家庭用品化学物質の周産期ばく露において、それがエピジェネティックな影響を及ぼした場合には、将来持続する遅発性毒性が生じる可能性がある。本分担研究ではエピジェネティックな影響のうち、より可逆性が低い DNA メチル化に焦点を絞る。家庭用品化学物質が DNA メチル化に影響を与えるかを判定する細胞システムを導入し、影響の有無に関するデータを取得し、遅発性毒性のメカニズム解明の一助とするとともに、DNA メチル化変化の毒性マーカーとしての活用も目指した研究を進める。

B. 研究方法

化学物質による DNA メチル化影響を調べるには、ゲノム上の遺伝子の発現制御領域であるプロモーター領域等の DNA におけるメチル化状態を調べる必要がある。しかし、通常それは、細胞や組織からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理等の生化学的過程を経ないと解析出来ず、手間がかかることから多数のサンプルの解析に向かず、研究が進まない一因となっている。

そこで本研究では、生化学的手法を経ずに DNA メチル化影響の有無に関する予備情報を取得可能な手法として我々が開発を進めている、細胞システムを導入し、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響の有無に関するデータを効率的に得るための実験系を構築することとした。導入を検討した細胞システムは次の通りである。

細胞：HEK293T、レポーター：Agouti IAP promoter-TdTomato または Dazl promoter-TdTomato。HEK293T 細胞に、Agouti レポーターまたは Dazl レポーターを PiggyBac トランスポゾン system を用いたゲノム組み込みによって導入した。この細胞では、Agouti または Dazl の promoter 領域における DNA メチル化状態に応じ、TdTomato が発現する。よって、TdTomato の蛍光強度により、DNA メチル化状態の定性または定量的な解析が行えると期待される。

C. 研究結果

HEK293T 細胞に、Agouti レポーターまたは Dazl レポーターを PiggyBac トランスポゾン system を用いたゲノム組み込みによって導入した。DNA メチル化程度は Agouti は中間、Dazl は高いことが予想される。すなわち、それに応じた TdTomato の発現は、Agouti で高い傾向、Dazl は低い傾向となると予想される。実際、レポーターを導入した細

胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、予想通りの結果が得られ、定性的な解析が可能であると結論した。

定性的なレポーター応答を確認できたので、定量的な解析が可能か検討した。化学物質を曝露させていない細胞を溶解し、蛍光プレートリーダーで定量測定した。播種する細胞数を振って、細胞数と蛍光値に相関が見られるか検討したところ、相関は得られなかった。この結果は、TdTomato の蛍光値が低く、バックグラウンドとの差がほとんど得られないため、すなわちレポーターとしての感度が低いためであると考えられた。

この結果から、今回導入した TdTomato 蛍光タンパク質が、レポーターとして定性的解析には適するが、定量的解析には向かないことが分かった。よって、TdTomato は動物組織内での局在を検討するなどの定性的解析に用いることは可能であるが、本研究における定量的解析には向かず、そのためにはより感度の高いレポーターを導入する必要があると考えられた。

そこでレポーターを、顕微鏡での観察が困難で定性的解析には向かないが、感度が高く、定量的解析に向くルシフェラーゼに変えることを検討した。具体的には、レポーターをルシフェラーゼの中でも現在最も感度が高いとされる NanoLuc に変えたレポーターベクターを Agouti, Dazl とともに作製し、HEK293T に導入し、レポーター感度と定量性を検討した。

その結果、標準化後のルシフェラーゼ活性値が、一定の細胞数の範囲で一定値を示し (Fig. 1)、レポーターを NanoLuc に変えたことで定量的解析を実施可能となった。

D. 考察

今年度の解析により、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響の有無について、迅速にデータを取得するための細胞システムを導入できた。今後、本システムを用い、本研究で検討する家庭用品化学物質について、DNA メチル化影響の有無に関するデータを取得する。それにより、周産期ばく露を受けた個体の中枢神経系における DNA メチル化変化の有無を判断する。

E. 結論

NanoLuc をレポーターとする細胞システムにより、化学物質の DNA メチル化影響の有無を迅速にデータ化する目途がついた。今後は、本システムによるデータの蓄積を行いつつ、必要に応じてすでに検討済みの全ゲノムを対象に精度高く解析す

る手法を用い、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響を総合的に評価し、影響メカニズム解明、バイオマーカーとしての活用に踏み込むことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Ikarashi S, Tsuchiya A, Kawata Y, Kojima Y, Watanabe T, Takeuchi S, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Oki K, Takamura M, Terai S. Effects of Human Adipose Tissue-Derived and Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Dextran Sulfate Sodium-Induced Mouse Model. *Biores Open Access*. 2019 Nov 11;8(1):185-199. doi: 10.1089/biores.2019.0022. eCollection 2019. PubMed PMID:31720090; PubMed Central PMCID: PMC6844129.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*. 2019 Nov;96(5):600-608. doi: 10.1124/mol.119.117333. Epub 2019 Aug 27. PubMed PMID:31455676.

Kuzumaki N, Suda Y, Iwasawa C, Narita M, Sone T, Watanabe M, Maekawa A, Matsumoto T, Akamatsu W, Igarashi K, Tamura H, Takeshima H, Tawfik VL, Ushijima T, Hattori N, Okano H, Narita M. Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. *Brain*. 2019 Jun 1;142(6):1675-1689. doi: 10.1093/brain/awz084. PubMed PMID: 31135049.

Han C, Kawata M, Hamada Y, Kondo T, Wada J, Asano K, Makabe H, Igarashi K, Kuzumaki N, Narita M, Kobayashi H, Narita M. Analyses of the possible anti-tumor effect of yokukansan. *J Nat Med*. 2019 Jun;73(3):468-479. doi:10.1007/s11418-019-01283-x. Epub 2019 Feb 9. PubMed PMID: 30739283.

2. 学会発表

大久保佑亮、大竹史明、五十嵐勝秀、安彦行人、平林容子、相賀裕美子、菅野純「双方向性の Notch-Delta シグナルによる側方抑制を介した神経発生の調節」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019. 12. 3-6)、福岡市

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

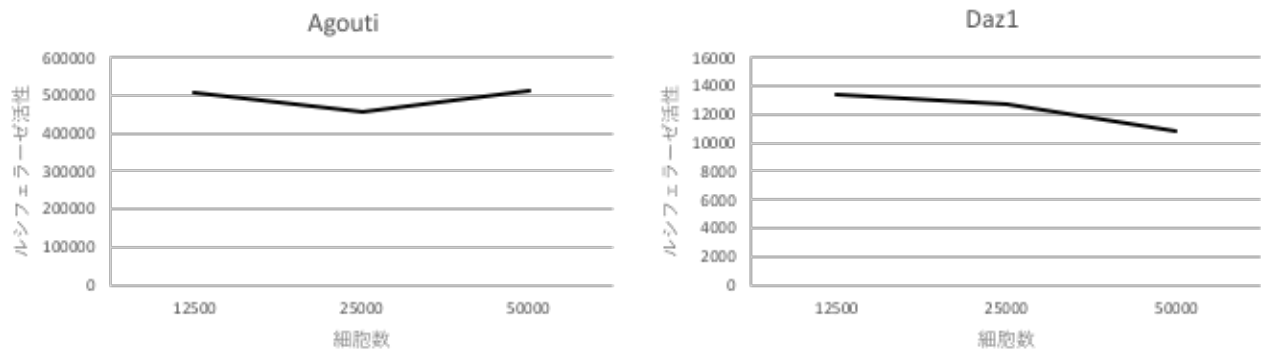


Fig. 1 NanoLuc レポーターによる Agouti, Daz1 プロモーター活性定量性の検討

HEK293T 細胞に対し、Agouti または Daz1 プロモーターを上流域に持ち、レポーターとして NanoLuc を有するベクターを PiggyBac トランスポゾンシステムによってゲノムに挿入した。コントロールとして、CMV プロモーター下流にホタルルシフェラーゼをレポーターとして持つベクターを導入し、その値で NanoLuc 活性を標準化した。その結果、一定の細胞数の範囲で標準化後のルシフェラーゼ活性の値が一定の値を示すことが示され、本システムが定量性を有することが確認された。

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露を感知する新規脳 RNA マーカーの探索」

研究分担者

今村 拓也（九州大学大学院医学研究院・統合的組織修復医学分野・准教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系が様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になってエピゲノム変化を介して晩発性に影響を及ぼすと考えて、化学物質暴露に鋭敏な新規脳RNAマーカーの検出系の確立を目指す。本年度は、昨年度に得たマウス胎仔脳および脳オルガノイドをシングルセルRNA-seqデータを参考に、胎生後期由来のニューロンを用いて、化学物質暴露によりエピゲノム変化を介して特定RNA発現に影響することで機能的脳形成が乱されるのか、を検討し、良績を得た。本解析モデルを基礎にすることで、周産期家庭用品化学物質暴露の影響を鋭敏に検出するRNAマーカーが整備できるだけでなく、最終年度である次年度に向けて、家庭用品化学物質暴露影響を仲介する機能RNAのデータベース化を律速化できる。

A. 研究目的

周産期家庭用品化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼす際、多岐に渡るゲノム変異がリスク要因として潜在するはずである。一般に、疾患のゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study ; GWAS) の結果として、大多数の一塩基多型 (SNP) はタンパク質変異を伴わず、遺伝子をコードする領域の外にマップされる。毒性の作用点となるゲノム領域も、その例に漏れないことから、発症の原因となる SNP がタンパクをコードせずに、いわゆるノンコーディング RNA の発現を介して寄与しているものが相当数あることが考えられる。そこで、本研究では、遺伝子にとらわれずに、RNA を毒性評価対象とし、周産期家庭用品化学物質暴露の影響を鋭敏に検出する RNA マーカー整備を行う。

B. 研究方法

[1] シングルセル RNA シーケンシング技術による機能ノンコーディング RNA データベースの大幅な拡張と海馬を構成する重要細胞群の同定

今村は近5年に次世代シーケンサー解析論文を責任著者として5本出版した。バルクレベルトランスクリプトーム解析および10x GENOMICS社のChromiumを用いたシングルセルレベル解析から、様々なバイオインフォマティクスを担当する。

[2] ノンコーディング RNA 発現改変による新規分子マーカーの重要度評価系の確立

種村、中島と連携して、化学薬品投与モデル動物を用いた行動パラメーターおよび神経幹細胞動態の定量情報と対応する、あるいは予見する RNA マーカーを、項目[1]のパイプラインにより取得し、得られたマーカーからさらに機能 RNA 候補を選択し、発現改変を5つ研究期間内に行っていく。

C. 研究結果

昨年度は、項目[1]を進行し、胎仔期大脳シングルセル解析から胎仔期大脳における細胞構成の変遷が RNA 動態から精密にモニターできることを示した。現在、種村と中島と連携しながら行っている家庭用品化学物質の毒性検定の予備実験において、表現型が想像以上に低い濃度でもみられてきていることから、本年度は、さらに低値での効果を検定する実験を開始した。また、

項目[2]に注力し、来年度に RNA 発現改変効果を効率的に行うための準備として、胎仔期ニューロンに絞って、興奮性シナプス形成が誘導されるピククリン/4-アミノピリジン(Bic/4AP)処理モデルを用いることで、化学物質によるエピゲノム改変、特にDNAメチル化がゲノムのどのような場所に起こるのかを検討し、さらに、その効果がRNA発現を介して確かに表現型に繋がるのかを調べた。今回、826の新規DNAメチル化領域(G-DMR)同定し、その多くはH3K4me1の集積するエンハンサーと考えられたため、CpGフリーベクターにメチル化G-DMRを結合したコンストラクトを作製し、実際に、G-DMRのメチル化がエンハンサー活性に影響するのカルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Bic/4AP依存性なG-DMRのメチル化はエンハンサー活性を負に制御しうることが明らかとなった。また、このような新規DNAメチル化が起こらないように、DNAメチル化阻害剤RG108の処理、またはDNAメチル化転移酵素Dnmt1およびDnmt3aのノックダウンを行ったところ、Bic/4AP依存性な興奮性シナプス形成を緩和できることを見出した。さらに、同様な表現型の緩和を、G-DMR近傍に発現するRNAであるWwc1の過剰発現(Wwc1 OE)により模倣できるか調べたところ、確かにBic/4AP依存性なVGLUT1陽性シナプスの形成が阻害された(図)。以上より、DNMT1およびDNMT3aによるエンハンサーのメチル化が、RNA発現抑制を引き起こすことで、化学物質による興奮性シナプス変化を引き起こされているのであり、RNA発現抑制が起こらないようにできれば表現型を抑制できることが明らかとなった。

D. 考察

化学物質投与に端を発し、DNAメチル化変化→機能RNA発現変化→表現型変化、と進んでしまう晩発影響の機能軸が存在することを明確に示すことができた。最終年度である次年度に向けて、in vivo化学薬品投与モデルおよびin vitro脳オルガノイドモデルを活用し、以下の項目を進めていくことが可能となった。

1. 化学薬品投与モデル動物への影響を予見する RNA マーカーデータを当初の期待通りに拡充する
2. 機能 RNA データベース化を飛躍的に拡充する。
3. 上記1,2を基礎に、家庭用品化学物質暴露の晩発影響を規定する遺伝子ネットワークのコアをバイオインフォマティクスにより推定する。

E. 結論

種村、中島と連携して、化学薬品投与モデル動物を用いた行動パラメーターおよび神経幹細胞動態の定量情報と対応する、あるいは予見しうる RNA マーカーを、家庭用品化学物質暴露晩発効果解析に供与できるパイプラインが整った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

遺伝子近傍の DNA メチル化レベルを可視化する 佐野坂司・今村拓也(分担)「次世代シーケンサー DRY 解析教本」清水厚志・坊農秀雅(編集) ISBN978-4-7809-0983-8 pp. 364-365, 秀潤社 (2019)

2) 雑誌

1. Minabe S, Nakamura S, Fukushima E, Sato M, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Tomikawa J, Imamura T, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Matsuda F. Inducible Kiss1 knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice. *J Reprod Dev.* 2020 Apr 26. doi: 10.1262/jrd.2019-164. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32336702

2. Kitajima R, Nakai R, Imamura T, Kameda T, Kozuka D, Hirai H, Ito H, Imai H, Imamura M. Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2020 Feb 28;44:101749. doi: 10.1016/j.scr.2020.101749. [Epub ahead of print] PMID: 32151953

2. 学会発表

<国内学会>

1. 今村拓也○: IL17D による病態発症制御、第三回ストレスと幹細胞研究会、長崎市、アイランドナガサキ、2020年1月31日-2月1日(口頭発表)

2. 亀田朋典○、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一: ニューロンは神経活性化により新規

DNA メチル化を介してエンハンサー活性を調節し、興奮性シナプス形成に影響する、第 42 回日本分子生物学会年会、福岡市、福岡国際会議場、2019年12月3-6日(ポスター発表)

3. 藤本雄一○、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也: 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカイン IL17D により緩和できる、福岡市、福岡国際会議場、2019年12月3-6日(ポスター発表)

4. 藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也○: 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカイン IL17D により緩和できる、第 162 回日本獣医学会学術集会、茨城県、つくば国際会議場、2019年9月10日-12日(口頭発表)

5. 藤本雄一○、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也: 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカイン IL17D により緩和できる、第 112 回日本繁殖生物学会大会、北海道、北海道大学高等教育推進機構、2019年9月2日-5日(ポスター発表)

6. 今村拓也○、中嶋秀行、中島欽一: Mecp2 ノックアウトマウス新生仔海馬のシングルセル RNA-seq 解析、第 13 回エピジェネティクス研究会年会、神奈川県、神奈川県民ホール、2019年5月28-29日(ポスター発表)

7. 中嶋秀行○、入江浩一郎、辻村啓太、今村拓也、石津正崇、潘森、中島欽一: unctional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第 17 回幹細胞シンポジウム、兵庫県、淡路夢舞台国際会議場、2019年5月24-25日(ポスター発表)

8. 中川拓海○、今村拓也、堅田明子、中島欽一: Trim28 participates in neuro-gliogenic potential change of neural stem cells、第 17 回幹細胞シンポジウム、兵庫県、淡路夢舞台国際会議場、2019年5月24-25日(ポスター発表)

<国際学会>

1. Tomonori Kameda○, Takuya Imamura, Takumi Takizawa, Fumihito Miura, Takashi Ito, Kinichi Nakashima
Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation
ISSCR/KSSCR International Symposium, 韓国, ポスター発表

2019年9月26日

2. Tomonori Kameda○, Takuya Imamura, Takumi Takizawa, Fumihito Miura, Takashi Ito, Kinichi Nakashima

Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation

The 10th IBRO World Congress of Neuroscience, 韓国, ポスター発表

2019年9月22日

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

