

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による  
成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 種村 健太郎

平成 30 (2018) 年 5 月

目 次

**I. 総括研究報告書**

研究の総括 (種村 健太郎) P9

**II. 分担研究報告書**

1. 周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、  
およびエストロジェン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み  
(種村 健太郎) P21

2. 行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用  
(掛山 正心) P35

3. エストロジェン受容体遺伝子改変マウスの解析遺伝子発現解析と異常基準値の設定  
(北嶋 聡) P45

4. 学習異常を伴う海馬神経新生異常を指標にした神経毒性評価  
(中島 欽一) P55

5. 光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用  
(富永 貴志) P61

6. 国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探索に関する研究  
(菅野 純) P71

**III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P75**

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学-一般-007）

研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

胎生期から幼若期にかけての経母体暴露のモデルとして、妊娠/泌乳期雌マウスに、ADI（一日許容摂取量）を想定した低用量のアセタミプリドとイミダクロプリドを、また併行して類似構造化合物としてニコチンを飲水投与（0.01、0.1mg/kg/day）し、得られた雄産仔マウスについて成熟期の情動認知行動解析を進めた。その結果、0.1mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド投与群に不安関連行動異常を伴う学習記憶異常を検出した。併行して行ったニコチン投与群と比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、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における各検定項目の「情動認知行動異常」の程度を検討した。

統合失調症や発達障害において問題とされている行動様式の柔軟性欠如に相当する行動異常検出への対応を目的として、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置の毒性評価への応用について検討を進めた結果、良好な結果が得られた。

化学物質投与により海馬神経新生が減少するケースと、形態異常な海馬神経新生が生じるケースを見いだしており、これらの所見が毒性指標となりうるか、他の暴露モデル（アセタミプリドおよびイミダクロプリド）を用いて検討を重ねた結果、海馬神経新生への影響が評価指標として有用である可能性が示された。また膜電位感受性色素を用いたイメージングで、バルプロ酸、ビスフェノール類の胎生期投与による成熟期の機能変調パターンについて、海馬・皮質神経回路で回路の機能変調を示す毒性値の設定を目的として、用量相関性について検討を進めるとともに、幼若期マウスへの化学物質投与直後の海馬における機能変調パターンの検出系の開発に着手しアセタミプリドおよびイミダクロプリドの海馬スライス培養への添加による影響を捉えることに成功している。

アセタミプリド 10 mg/kg とイミダクロプリドを 8 mg/kg、2 週齢或いは 11 週齢のマウスに単回経口投与後、13 週齢時の海馬について、網羅的遺伝子発現解析を行い、パスウェイ解析を進めるとともに、上記の低用量化学物質暴露による行動影響との比較に用いることを試みた。その結果、行動様式の異常基準値設定に有用であると考えられた。

また、第 5 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（於 OECD）における内分泌かく乱化学物質の評価のための AOP（Adverse Outcome Pathway）に関しての討議に対応すべく国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案に向けた取り組みを進めている。

## 【研究組織】

代表：種村 健太郎

東北大学大学院農学研究科

動物生殖科学分野・教授

研究総括、情動認知行動解析と毒性基準値の設定、  
神経突起解析、遺伝子発現パスイ解析を担当。

分担：掛山 正心

早稲田大学人間科学学術院

応用生理学研究室・教授

情動認知行動解析と毒性基準値の設定を担当。

分担：北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・

安全性生物試験研究センター・毒性部・室長  
エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定を担当。

分担：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

神経幹細胞動態解析および大脳層構造形態解析と  
異常基準値の設定、新規毒性マーカー探索を担当。

分担：富永 貴志

徳島文理大学・神経科学研究所・准教授

神経回路機能解析と異常基準値の設定を担当。

分担：菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター・毒性部・

客員研究員

国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探  
索を担当。

## A. 研究目的

先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性

学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECDへの提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

## B. 研究方法

本研究では、二つの先行研究 (H20-化学一般-009)および (H23-化学一般-004)の成果を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、客観性、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を3年計画で作出する。

### 【マウス情動認知行動異常の基準値設定】

発生発達期暴露により成熟期に情動認知行動異常を誘発することを確認済みのドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬等を、野生型マウスに暴露し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、及び、条件付け学習記憶試験(行動解析バッテリー試験)を実施する。その成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常であると認定される最小値を、その項目の基準値として「毒性基準値」と定義する。その際に、溶媒対照とは別に、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体 $\alpha$ および $\beta$ 遺伝子欠損マウス、および精神神経疾患モデルマウスとして報告されているマウスの行動様式を包括した情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に

作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いることで、国際的なバリデーション展開時に利用できる異常値を複数点用意するとともに、国内3カ所所で同一規格の機器を用いた行動解析バッテリー試験を施行し、バリデーションを見据えた頑強性を確認しつつ最適化を図る(種村、掛山、北嶋)。

#### 【マウス情動認知行動異常誘発メカニズムの解明と神経科学的な異常の基準値設定】

これまでの研究に於いて、情動認知行動異常を呈するマウス脳から通常の光学顕微鏡的な病理所見は得られない場合が多いが、分子マーカーを用いての神経新生異常、大脳層構造異常、神経突起異常、および膜電位感受性色素を利用した光計測から神経回路機能異常を情動認知行動異常と対応した異常所見として検出してきた。さらに、それらは遺伝子発現プロファイリングによって裏付けられるものであった。そこで、野生型マウス(暴露)及び遺伝子改変マウス(非暴露)について神経幹細胞動態解析、大脳層構造形態解析(中嶋)、神経突起解析(種村)、神経回路機能解析(富永)、遺伝子発現プロファイリング(北嶋)を行い異常行動誘発メカニズムの解明を推し進めるとともに、それらの項目ごとに定量化手法を確定し、対応する神経科学的な異常の基準値として設定する。その際、遺伝子発現プロファイリングに関しては、機知のパスウェイへの関与を明らかにする(種村)。

#### 【発生-発達期における低用量化学物質暴露による成熟後の中枢行動毒性検定】

モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類、を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、上記の情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定する。用量は、一日摂取許容量、急性参照用量を元に設定する(全員)。これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させる。本研究成果については、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてOECDへの提案を行う(菅野)。

#### 【新規毒性マーカーの探索】

これまでの成果の一部として、情動認知行動異常を示したマウスにエピゲノム変化が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかを検討する。近年、生物学的意義が明らかになりつつあるノン・コーディングRNAの変動についても、新規毒性判断指標としての妥当性を検討する(菅野、中嶋)。

#### C. 研究結果

平成29年度は、前年度にネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを妊娠11.5日齢の妊娠雌マウスに低用量(0.01mg/kg/day、0.1mg/kg/day)にて、また併行して類似構造化合物としてニコチンを用いて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行い、生後12-13週齢にオープンフィールド試験、明暗往來試験、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から成るバッテリー式の情動認知行動解析を行った。その結果、アセタミプリド飲水投与による顕著な不安関連行動異常の誘発と、イミダクロプリド飲水投与による顕著な不安関連行動異常並びに学習記憶異常が認められた(0.1mg/kg/day投与群)。しかしながら併行して行ったニコチン投与群に比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/dayアセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

統合失調症や発達障害において問題とされている行動様式の柔軟性欠如に相当する行動異常検出への対応を目的として、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置の毒性評価への応用について検討を進めた。その結果、Go/NoGo課題については、基本プロトコールの設定が可能となり、さらに改良する必要があるものの、評価に要する期間の短縮に成功した。

生後単回投与群において、1週間後に発現上昇してくる遺伝子群には、細胞増殖関連のものと細胞移動関連のものが認められた。例えば、イミダクロプリド投与群の場合、ジーンオントロジー(GO)タームに属する遺伝子として、MITOTIC CYTOKINESISやMYOSHIN II COMPLEX関連の遺伝子が総じて発現上昇していた。したがって、神経幹細胞の増殖が異常に促進され、細胞移動を開始し、

ニューロンに早期分化してしまうと考えられた。一方で、成体期に発現減少する遺伝子のプロファイリングから、ニューロンの質の低下あるいは量の減少が晩発性の影響として起こってしまうことも分かってきた。例えば、イミダクロプロド及びアセタミプリドいずれの投与群においても、G0タームに属する遺伝子として、NEURON SPINE 関連の遺伝子が総じて発現減少していた。

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプロドを、2週齢或いは11週齢のマウスに投与後、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、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化していることが示唆された。プロモーター解析(in silico)の結果から、この活性化に、PSEN1、APP や MAPT 分子が関与している事が示唆された。

神経回路解析の神経毒性評価への応用研究としては、まず、ネオニコチノイド系物質の幼若期投与(種村らとの共同研究)ネオニコチノイド系物質の強制投与後、2時間後には細胞体での興奮性が著しく亢進している様子が検出された。今後、この初期応答が遅発影響とどのような相関関係があるかをこの農薬で検証する予定である。また、海馬以外の神経回路で、化学物質による改変を示すことが容易な神経回路を選ぶために、探索的に他の神経回路の応答を検討した。今年度は、皮質系の回路として、視覚野、傍梨状核、嗅内野、嗅周囲皮質など様々な神経回路において、主に興奮抑制のバランスの変更が起こす現象を検討した。

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

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

複数の国際的会合に出席し、本研究班の成果の一部を情報発信した。本研究班において得られた神経行動学的所見、神経科学的所見、分子生物学的所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法

は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられ、高評価を得た。国際的に、これらの様な情報を基にしたリスク評価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、その方法論の検討を積み重ねようとしていることが判明した。さらに、自らデータを作成しない方針の国や組織も、分子毒性学的情報の有用性を認識し、評価へ取り込む方法の開発と標準化に力を入れていることが明らかとなった。さらに、本研究班において得られた神経行動毒性所見、神経科学的所見ならびに分子生物学的な所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法について、国際的会合に出席し、情報発信した。その内容は、興味深く受け入れられた。国際的に、この様な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。

#### D. 考察

ネオニコチノイド系農薬や、無機ヒ素、ビスフェノール類、バルプロ酸を用いた発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功していると考えられた。特に、ADI を想定した低用量の長期暴露による影響についても実験的に捉えることができたことから、本系の目的である評価系の作出に資することができると考えられる。情動認知行動異常の基準値設定や、神経新生能、神経回路機能、神経突起動態等の神経科学的な異常の基準値設定を進める上で、「指標」の検証が非常に重要であると考えられるとともに、その為用いる特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いる2種のエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子改変マウス (ER $\alpha$ KI および ER $\beta$ KI マウス) の導入は非常に有望であると考えられた。また、本研究課題の成果は、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法として、OECD の AOP 開発プログラムへの提案に貢献するものであると考えられた。

## E. 結論

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功している。今後、情動認知行動異常の基準値設定、神経科学的な異常の基準値設定によって毒性学的な意味づけを明確にできる評価系の作出に資することが期待できる。

## F. 健康危険情報

とくになし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Apr 6;498(3):674-679.

Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci.* 2018 Mar 30;80(3):536-543.

Saito H, Hara K, Tanemura K. Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. *Reprod Toxicol.* 2017 Dec;74:108-115.

Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. *Sci Rep.* 2017 Jul 28;7(1):6815.

Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Effects on glycoalkaloid structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation. *J Reprod Dev.* 2017 Oct 18;63(5):473-480.

K, Kakeyama M, Tohyama C. Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse. *PLoS One.* 2017 Aug 18;12(8):e0183497. doi: 10.1371/journal.pone.0183497. eCollection 2017.

Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight.* 2017 May 18;2(10). pii: 88609. doi: 10.1172/jci.insight.88609.

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J Toxicol Sci.* 2017;42(1):25-30. doi: 10.2131/jts.42.25.

Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2018 Jan 31. doi: 10.1007/s10565-017-9420-y. [Epub ahead of print] Review. PMID:29383547.

Kawamura Y, Katada S, Noguchi H, Yamamoto H, Sanosaka T, Iihara K, Nakashima K. Synergistic induction of astrocytic differentiation by factors secreted from meninges in the mouse developing brain. *FEBS Lett.* 2017 Nov;591(22):3709-3720. doi: 10.1002/1873-3468.12881. PMID: 29029363.

Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M,

Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K. DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell Rep.* 2017 Sep 19;20(12):2992-3003. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.086. PMID: 28930691.

Kimura A, Matsuda T, Sakai A, Murao N, Nakashima K. HMGB2 expression is associated with transition from a quiescent to an activated state of adult neural stem cells. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):229-238. doi: 10.1002/dvdy.24559. PMID: 28771884.

Zhu Y, Uezono N, Yasui T, Nakashima K. Neural stem cell therapy aiming at better functional recovery after spinal cord injury. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):75-84. doi: 10.1002/dvdy.24558. Review. PMID: 28766845.

Honda M, Nakashima K, Katada S. PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells. *J Neurochem.* 2017 Jul;142:901-907. doi: 10.1111/jnc.14123. [Epub ahead of print] PMID: 28695568.

Kameda T, Imamura T, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. *Cell Tissue Res.* 2018 Jan;371(1):189-199. doi: 10.1007/s00441-017-2656-2. Epub 2017 Jul 10. Review. PMID: 28695279.

Yasui T, Uezono N, Nakashima H, Noguchi H, Matsuda T, Noda-Andoh T, Okano H, Nakashima K. Hypoxia Epigenetically Confers Astrocytic Differentiation Potential on Human Pluripotent Cell-Derived Neural Precursor Cells. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1743-1756. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.001. PMID: 28591654.

Brulet R, Matsuda T, Zhang L, Miranda C, Giacca M, Kaspar BK, Nakashima K, Hsieh J. NEUROD1 Instructs Neuronal Conversion in Non-Reactive Astrocytes. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1506-1515. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.013. Epub 2017 May

11. PMID: 28506534.

Uesaka M, Agata K, Oishi T, Nakashima K, Imamura T. Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals. *BMC Genomics.* 2017 Apr 7;18(1):285. doi: 10.1186/s12864-017-3662-1. PMID: 28388877.

Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A., (2017) Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. *Regul Toxicol Pharmacol.*

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takano K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. *J Toxicol Sci.* 2017;42(2):121-128

## 2. 学会発表

掛山正心. 子どもへの低用量化学物質ばく露評価のための新たなマウス情動認知行動毒性試験装置の開発. 第44回日本毒性学会学術年会(シンポジウム子ども期への低用量化学物質ばく露が誘発する情動認知行動影響の定量的解析法の開発状況と評価法確立への未来)、2017年7月、横浜.

掛山正心、マウスにおける早期環境要因操作による自閉スペクトラム表現型発現の検討. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム 2017/09、札幌.

掛山正心、集団生活下のマウス個体識別と行動計測. 日本動物行動関連学会 2017 (Koudou2017) (5学会・研究会合同シンポジウム) 2017/09、東京.

Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period induced by neonicotinoid pesticides



exposure at juvenile period of male mice. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki  
Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, Double Strand Break Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Leading-Edge Technology, (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA, poster

Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi, An emerging new possible risk of genome editing for human gene therapy, (2018.1.31) Keystone Symposia Conference / Precision Genome Editing with Programmable Nuclease, Colorado, USA, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

北嶋 聡、シックハウス症候群レベルの極低濃度ばく露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性の情動認知行動影響解析、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7.12.)

相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、菅野 純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7.11.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by

Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017.9.13) poster

中島 欽一<sup>○</sup>：胎生期エピジェネティック攪乱による遅発性学習記憶障害とてんかん感受性増加のメカニズム、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、2017年9月30-10月1日(30日)(特別講演)

今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島 欽一：DNA methylomes identify transcription factor-based epigenomic signatures for timed acquisition of differentiation competence in neural stem/progenitor cells towards neuronal and glia lineages、4<sup>th</sup> World Congress of Reproductive Biology、沖縄県、沖縄コンベンションセンター、2017年9月27-29日(29日)(ポスター)

吉川容司<sup>○</sup>、吾郷哲郎、立花正輝、古森元浩、芝原友也、脇坂義信、黒田淳哉、中嶋秀行、中島 欽一、北園孝成：海馬歯状回における傷害反応性神経幹細胞増殖と神経新生における活性酸素種産生酵素Nox4の役割、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、2017年9月30-10月1日(30日)(一般口演)

中島 欽一<sup>○</sup>：Hypoxia epigenetically confers astrocytic differentiation potential on human pluripotent cell-derived neural precursor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13日)(口頭)

今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島 欽一：DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multi-lineage competence in neural stem/progenitor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)

本田瑞季<sup>○</sup>、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一：Mechanism underlying developmental stage dependent changes in neural stem cells responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日) (ポスター)

亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：Neuronal activity-dependent DNA methylation changes in the naïve hippocampal neurons accelerate gene expression responses to the following stimuli、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日) (ポスター)

今村拓也<sup>○</sup>、山本直樹、阿形清和、中島欽一：Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells、第43回内藤コンファレンス、北海道、シャトレゼガトキョウダムサポロ、2017年8月27日-30日(29日) (ポスター)

中嶋秀行<sup>○</sup>、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一：Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20日-23日(22日) (口頭)

中島欽一<sup>○</sup>：DNA Methylation Resulting Neuron-Glia Fate Switching of Neural Stem Cells、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20-23日(21日) (シンポジウム)

今村拓也<sup>○</sup>：長鎖ノンコーディングRNAによるほ乳類エピゲノム制御、第2回次世代生命科学の研究会、福岡県、九州大学コラボレーションI、2017年7月13-14日(14日) (口頭)

今村拓也<sup>○</sup>：ニューロンにおけるエピゲノム制御とその破綻、第44回日本毒性学会学術年会、神奈川県、パシフィコ横浜、2017年7月10-12日(12日) (シンポジウム)

亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：マウス海馬ニューロンは神経活動依存的にDNAメチロームを変動し、脱メチル化を介して遺伝子発現応答を高速化する、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日(23日) (ポスター)

松田泰斗<sup>○</sup>、入江剛史、アデフィンアリア、中島欽一：エピゲノム変換を介したミクログリアからニューロンへの直接分化転換機構の解明、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日(22日) (ポスター)

Imamura, T., Yamamoto, N., Agata, K., Nakashima, K.: Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells, France · Japan EPIGENETICS Workshop 2017, Paris-Diderot University, November 6-8, 2017

Katada, S., Honda, M., Takouda, J., Igarashi, K., and Nakashima, K.: Developmental stage-dependent change of SMAD target genes defines the direction of neural stem cell differentiation induced by bone morphogenetic proteins, EMBO Conference 'Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions', San Juan de Alicante, Spain, September 7-10, 2017

Tominaga T and Tominaga Y. Voltage-sensitive dye imaging study of the input-dependent GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of the hippocampus 471.13/G4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017

WAKAYAMA Y, KAMADA S, YAMADA Y, TOMINAGA T, KAJIWARA R Voltage-sensitive dye signal analysis of inhibitory components in mouse perirhinal-entorhinal cortical slices 378.05/H4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017

平島 寛司、富永 貴志、富永 洋子、岳 鳳鳴、滝澤 佐季子、横山 忠幸、松本 健、友常 大八郎、佐々木 克典 「膜電位感受性色素(VSD)を用

いた光計測技術によるリプログラミングがん細胞膜電位計測法」第17回日本再生医療学会総会 2018.3.21 口頭発表 パシフィコ横浜

富永貴志 「イントロダクション」ワークショップ「個性」創発神経基盤の統合的理解に向けた階層横断的解析(オーガナイザー富永貴志, 郷康広) 2017.12.06 生命科学系合同年次大会 ConBio2017 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場

富永貴志 「膜電位イメージングの技術支援: 実施例から」新学術領域「個性」創発脳の第2回若手の会・技術講習会 2017.11.21 京都大学 楽友会館 2F 会議・講演室 (招待講演)

河野 睦, 世戸 彩華, 石田 正樹, 富永 貴志, 堀学 ゾウリムシの逃走反応におけるストマチン様タンパク質の役割, 2017/11/18, 第50回日本原生動物学会大会と第1回日本共生生物学会大会 つくば

富永貴志 「ゾウリムシと電気生理学」シンポジウム「ゾウリムシ研究の新潮流」(オーガナイザー富永貴志, 堀学, 石田正樹) 日本動物学会 2017.09.21 (富山大学)

富永貴志, 富永洋子 「海馬 CA1 野のペアドバーストファシリテーション (PBF) の GABAergic なフィードフォワード, フィードバック調節: 膜電位感受性色素による研究」(Feedforward- and feedback-GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of hippocampus: A voltage-sensitive dye study Takashi Tominaga, Yoko Tominaga) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.20 口頭発表

吉村 弘, 須貝 外喜夫, 加藤 伸郎, 富永 貴志, 富永洋子, 長谷川 敬展, 姚 陳娟, 赤松 徹也 カフェイン投与により誘発されるラット視覚野オシレーションにおける non-NMDA 受容体と NMDA 受容体の相互交錯的関与 (Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21

和歌山 ゆうか, 鎌田 翔仁, 山田 悠太, 富永 貴志, 梶原 利一 膜電位イメージングによる嗅周囲皮質の抑制性/興奮性神経活動の層分布解析 (Layer Distribution Analysis of Inhibitory

and Excitatory Activity Components in Perirhinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Imaging) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21

梶原 利一, 和歌山 ゆうか, 富永 洋子, 富永 貴志 神経興奮伝播の促進に關与するマウス嗅皮質神経回路可塑性の膜電位イメージング (Voltage-sensitive dye imaging of the network plasticity facilitating the neural excitation propagation in mouse rhinal cortices) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21

富永貴志, 富永洋子 「情動認知行動影響の毒性評価における神経回路機能イメージング法を用いた神経基盤解析」第44回日本毒性学会学術年会 パシフィコ横浜 2017.07.12 シンポジウム招待講演

富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第2回領域会議 「個性」創発の神経基盤解析のための神経回路イメージング法と行動様式プロファイリング 御殿場 2017.0708

富永貴志 「膜電位感受性色素を使った光計測法により神経回路機構を探る—海馬を中心として」第37回 Neuroscience Seminar Tokushima 徳島大学病院 2017.03.06 招待講演

Takashi Tominaga Cellular electrophysiology to VSD imaging, International Symposium on Future of Brain Science 2017.03.03 東北大学 招待講演

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA

Jun Kanno, Nanomaterial respiratory toxicity monitored in rats after whole body inhalation. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018.1.26) 沖縄、シンポジウム

菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第20回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演

Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote.

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017.9.13) poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura. Percellome Toxicogenomics Project for Mechanism-Based Toxicity Prediction. Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA (2017.8.17)

#### H. 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

平成 29 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

#### 研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学-一般-007）

#### 分担研究課題名

「周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、およびエストロジェン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み」

#### 研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授）

#### 【研究要旨】

本研究は、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。

平成29年度は、昨年度に引き続き、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを妊娠11.5日齢の妊娠雌マウスに低用量（0.01および0.1mg/kg/day）にて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行い、生後12-13週齢時に成長した産仔雄マウスについて情動認知行動解析を行った。また併行して類似構造化合物としてニコチンを飲水投与（0.01、0.1mg/kg/day）し、得られた雄産仔マウスについて成熟期の情動認知行動解析を進めた。その結果、アセタミプリド0.1mg/kg/day飲水投与による顕著な不安関連行動異常の誘発と、イミダクロプリド0.1mg/kg/day飲水投与による顕著な不安関連行動異常並びに学習記憶異常の誘発が認められた。しかし併行して行ったニコチン投与群に比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/dayアセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

## A. 研究目的

先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECD への提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

H28 年度には、①低用量化学物質の慢性暴露による次世代個体の神経行動毒性発現を検討する目的で、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動異常について検討した。また、②情動認知行動異常値を設定する目的で、これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生

発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を推し進めるために 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、同様の情動認知行動解析を行った。

## B. 研究方法

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリド、類似構造化合物としてニコチンについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスにネオニコチノイド農薬類の一日摂取許容量 (ADI) を参照とした低用量 (0.01 および 0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動様式について、オープンフィールド試験 (検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往来試験 (検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験 (検定項目として、総移動量、オープンアーム滞在時間、総アーム選択数)、条件付け学習記憶試験 (検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度)、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 90、95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制抑制度) からなるバッテリー式の行動解析を行うことで検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東北大学の規定にのっとり、あらかじめ実験計画について承認を受け、かつ 3R の原則を遵守しつつ実施した。

## C. 研究結果

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を

行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウスについて行動解析を行った結果、アセタミプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による総移動量の増加、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加が誘認められた ( $p < 0.05$ )。また、イミダクロプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加、条件付け学習記憶試験における学習度、場所-連想記憶度の低下が認められた ( $p < 0.05$ )。しかしながら併行して行ったニコチン投与群に比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

#### D. 考察

発生-発達期における慢性暴露モデルとして、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行ったが、胎仔マウスに対しては経胎盤投与、産仔マウスに対して経乳投与されたと考えられる (特に、産仔マウスは、体が小さく給水口まで到達することがないため、化学物質は母マウスを介しての投与となる)。アセタミプリドによって重篤な多動が、またイミダクロプリドによって多動を伴う学習記憶異常が誘発されたと考えられる。今回の用量設定においては、一日摂取許容量 (ADI) を元に、安全係数を 10 として、さらに母マウスの体重の約 1/10 を産仔マウスへ移行すると仮定し、いずれも 0.1mg/kg/day としたが、同用量のニコチン暴露影響結果に比較するとやや程度は低いが、重篤な行動異常を誘発すると考えられた。しかしながら、0.01mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

#### E. 結論

ネオニコチノイド系農薬の発生-発達期における化学物質の慢性暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について捕捉することに成功した。また、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの利用によって情動認知行動「毒性基準値」の設定に向けた取り組みが大きく進んだ。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

1: Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Apr 6;498(3):674-679.

2: Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci.* 2018 Mar 30;80(3):536-543.

3: Saito H, Hara K, Tanemura K. Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. *Reprod Toxicol.* 2017 Dec;74:108-115.

4: Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high

developmental competence. Sci Rep.  
2017 Jul 28;7(1):6815.

5: Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara  
K, Tanemura K. Effects on glycocalyx  
structures of frozen-thawed bovine  
sperm induced by flow cytometry and  
artificial  
capacitation. J Reprod Dev. 2017 Oct  
18;63(5):473-480.

#### 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



# 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

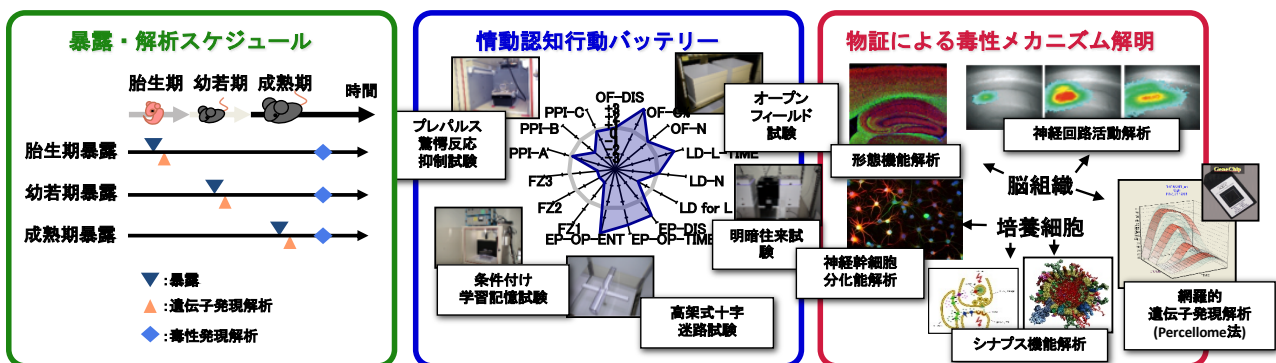
## 発生-発達期における低用量の化学物質暴露による 成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、 その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

東北大学大学院  
農学研究科動物生殖科学分野 教授  
種村 健太郎

### 先行研究(1)による成果

H20-化学-一般-009

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究  
-特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立-  
(研究代表者 北嶋 聡)



周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与によって、

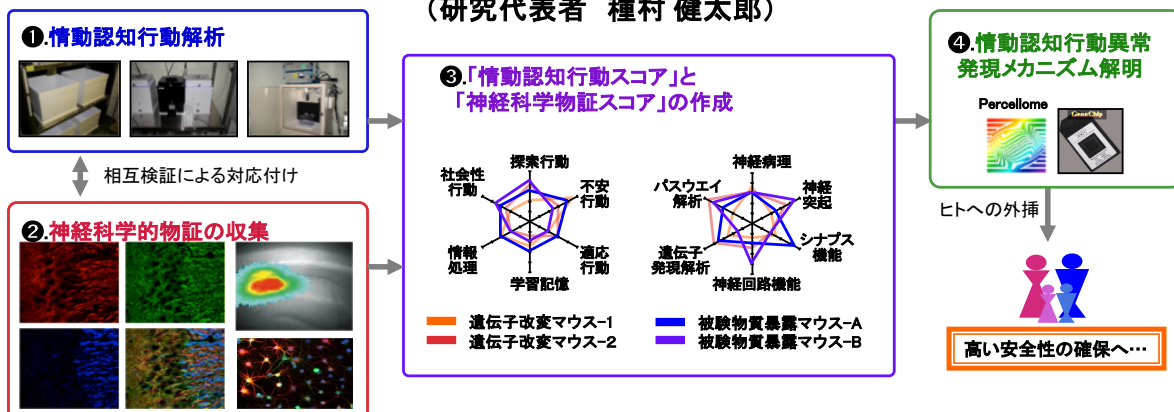
- ①従来の神経毒性試験法では同定困難な中枢神経毒性を情動認知行動異常として検出可能であり、
- ②その異常に対応する神経科学的物証を検出可能であること、を示した。

1. 細胞死や細胞変性を惹起しないレベルの暴露で遅発性異常が誘発される
2. 遅発性の情動-認知行動異常には計測可能な脳の異常を伴う
3. 胎生期・幼若期暴露後の遅発性異常は、成熟期暴露後のそれと原則的に異なる。
4. 胎生期・幼若期暴露後の遅発性異常の方が重篤なことが多い。

# 先行研究(2)による成果

H23-化学-一般-004

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく  
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究  
(研究代表者 種村 健太郎)



周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与によって誘発される①情動認知行動異常や、②それに対応する神経科学的物証が、毒性指標として定量評価できるものであることを示した。

1. 行動異常と対応した神経突起異常像が認められる。
2. 行動異常と対応した神経幹細胞動態異常が認められる。
3. 遺伝子発現解析から、異常行動の分子メカニズムの一端を捉えることができる。
4. 神経回路機能解析から、行動異常の責任部位を絞り込むことができる。
5. いずれも異常の数値化が可能である。

## 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

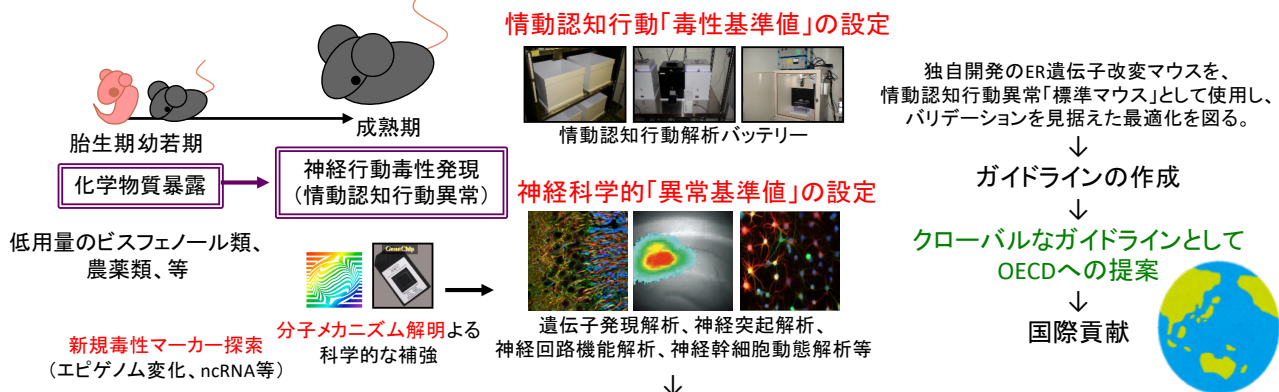
発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

研究代表者 東北大学大学院・農学研究科・動物生殖科学分野 種村 健太郎

先行研究1(H20-化学-一般-009)から  
周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、成熟期の情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。

先行研究2(H23-化学-一般-004)から  
上記の情動認知行動異常や神経科学的物証が毒性指標として定量評価できるものであることを示した。

【目的】周産期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできるリスク評価系を作出する。



本研究により情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成に向けた大きな前進と、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法として、OECDへの提案を通じての国際貢献も期待できる。

正常な脳の発生-発達は  
適切な神経シグナルによるものである。

**NX (neuroactive xenobiotics)**

Proper Neural Signals  
↓  
Normal Brain Development  
↓  
Healthy Brain Function

正常な脳の発生-発達は  
適切な神経シグナルによるものである。

NX (neuroactive xenobiotics)

Disturbance of Neural Signals  
↓  
Abnormal Brain Development  
↓  
Aberrant Brain Function

**Behavioral Impairment**

正常な脳の発生-発達は  
**Early Exposure** 神経シグナルによるものである。

**NX (neuroactive xenobiotics)**

Disturbance of Neural Signals



Abnormal Brain Development



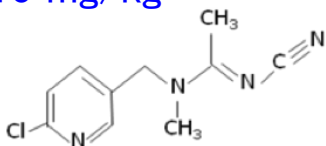
Aberrant Brain **Late Effects**

**Behavioral Impairment**

## ネオニコチノイド系農薬による 中枢神経影響解析および生殖機能影響解析

	作用点	主な農薬
アセチルコリン	コリンエステラーゼ阻害	有機リン系・カーバメート系
	アセチルコリン受容体活性化	ネオニコチノイド系
	アセチルコリン受容体阻害	ネライストキシシン系
GABA	GABA受容体拮抗	有機塩素系・フェニルピラゾール系
	GABA受容体作用	マクロライド系
セロトニン	セロトニン受容体作用	ピメトロジン
神経軸索シグナル伝達阻害	ナトリウムチャネル開口時間延長	ピレスロイド系

10 mg/kg



物質名: アセタミプリド 英名: Acetamiprid(ACT)

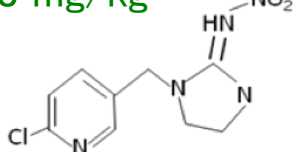
CAS No.: 135410-207 分子式・分子量:

$C_{10}H_{11}ClN_4=222.68$

純度: 98% メーカー: 和光純薬株式会社

カタログNo.: 099-03771

8 mg/kg



物質名: イミダクロプリド 英名: Imidacloprid(IM)

CAS No.: 117-81-7 分子式・分子量:

$C_9H_{10}ClN_5O_2=255.7$

純度: 98% メーカー: 和光純薬株式会社

カタログNo.: 010-24541

溶媒はコーンオイル、ゾンデを用いた単回強制経口投与、  
尚、急性参照用量(ARfD)も元に安全係数を100として用量設定を行った。

## 慢性飲水暴露用量の算出と調整

用量設定根拠: 1日摂取許容量(ADI)から算出した(農薬評価書, 食品安全委員会, 2007年)

ADI: イミダクロプリド 0.057mg/kg/day, アセタミプリド 0.071mg/kg/day

暴露用量0.1mg/kg/dayまたは0.01mg/kg/dayの  
算出と調整方法

各単位における溶液中濃度の換算		1日暴露量
mg/ml	ppm	mg/kg/day
0.001000	1.000000	0.100000
0.000100	0.100000	0.010000

※動物体積=10mlに対し1日飲水量1mlとした。

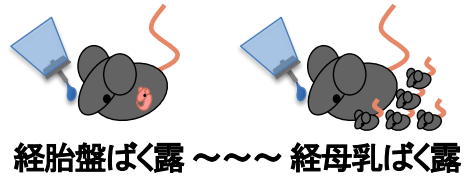
※Bioavailability及び体内動態は考慮しないものとした。

### ★飲水暴露溶液の調整

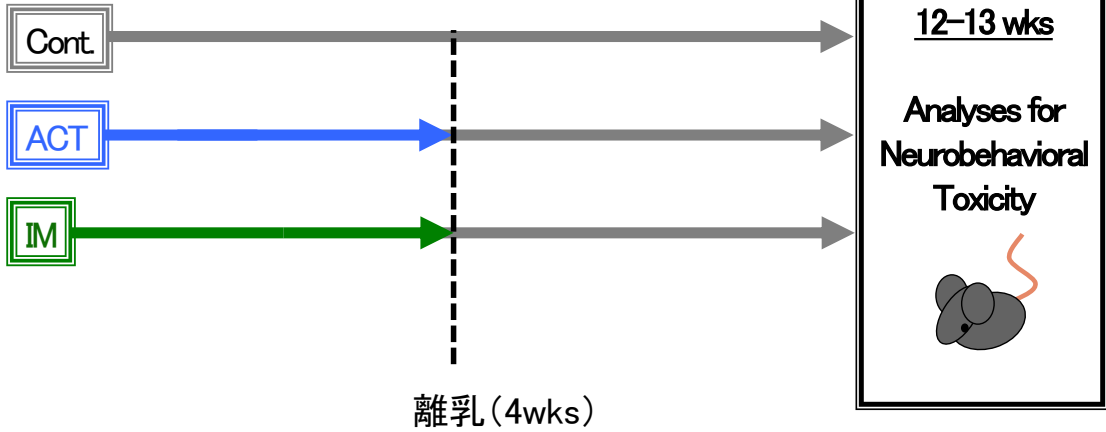
目的濃度1000倍のStock solution(検体を注射用水に溶解)1mlを  
飲水(水道水)で1000mlにメスアップした。

## ～発生-発達期 長期飲水投与～

Control (Cont.): 通常の給水  
 Acetamidrid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day  
 Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day

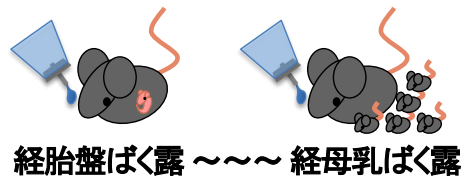


胎生11.5日から生後4週齢まで長期飲水投与

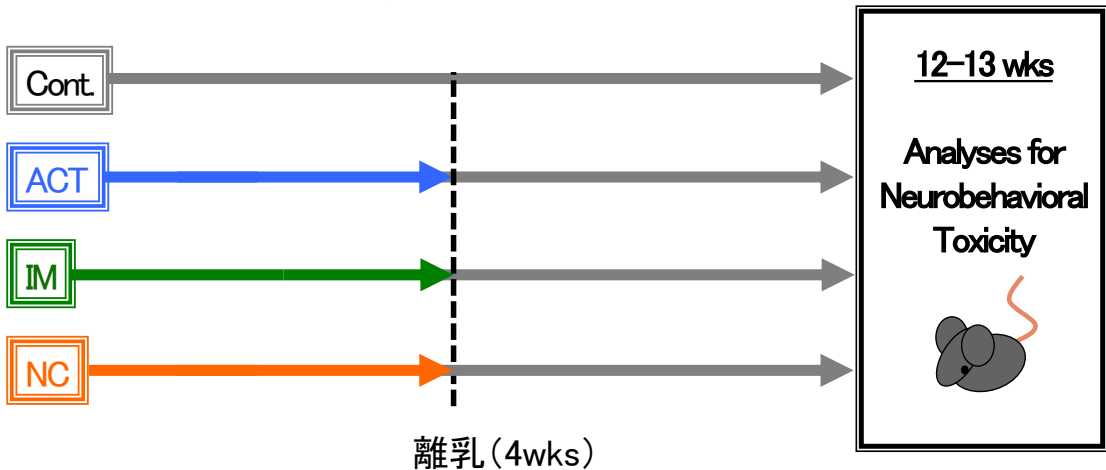


## ～発生-発達期 長期飲水投与～

Control (Cont.): 通常の給水  
 Acetamidrid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day  
 Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day  
 Nicotine (NC) : 0.01、0.1mg/kg/day



胎生11.5日から生後4週齢まで長期飲水投与

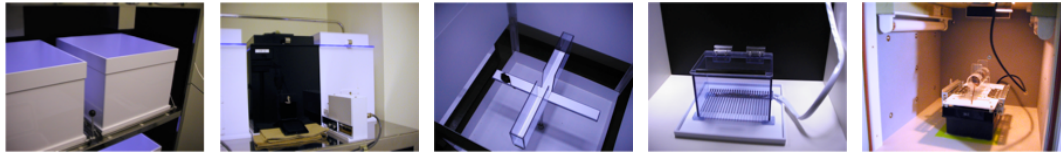


# 行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、  
比較的に短時間で、判りやすい結果が得られる試験を選択した。

→化学物質による行動影響があるか？

→毒性発現と呼べる行動異常か？



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

第1週  
水曜日



第1週  
木曜日



第1週  
金曜日

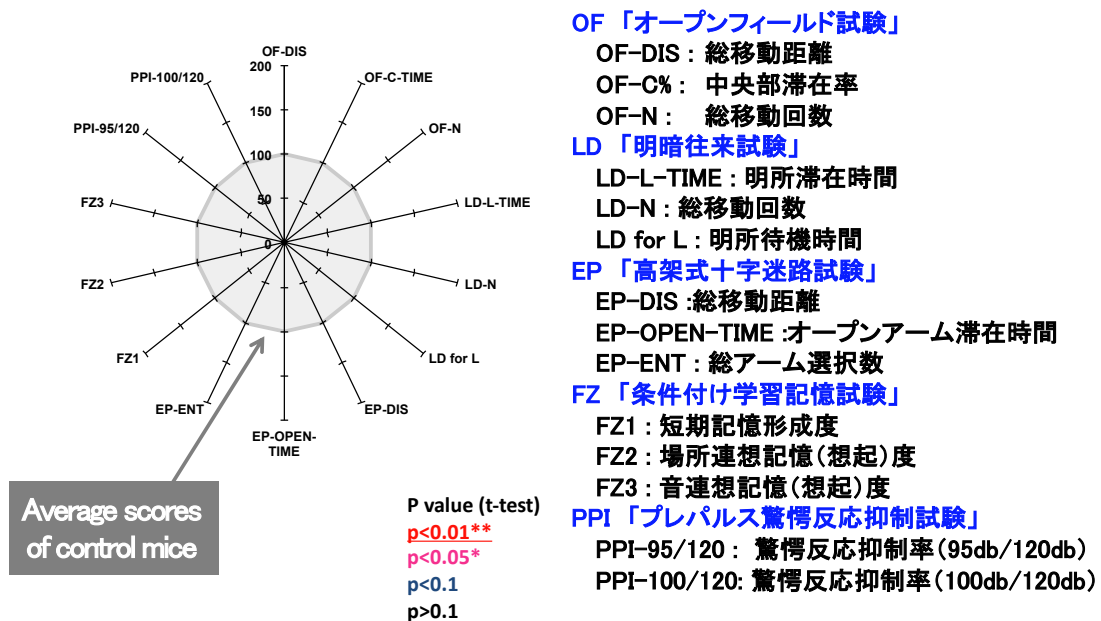


第2週  
月～水曜日



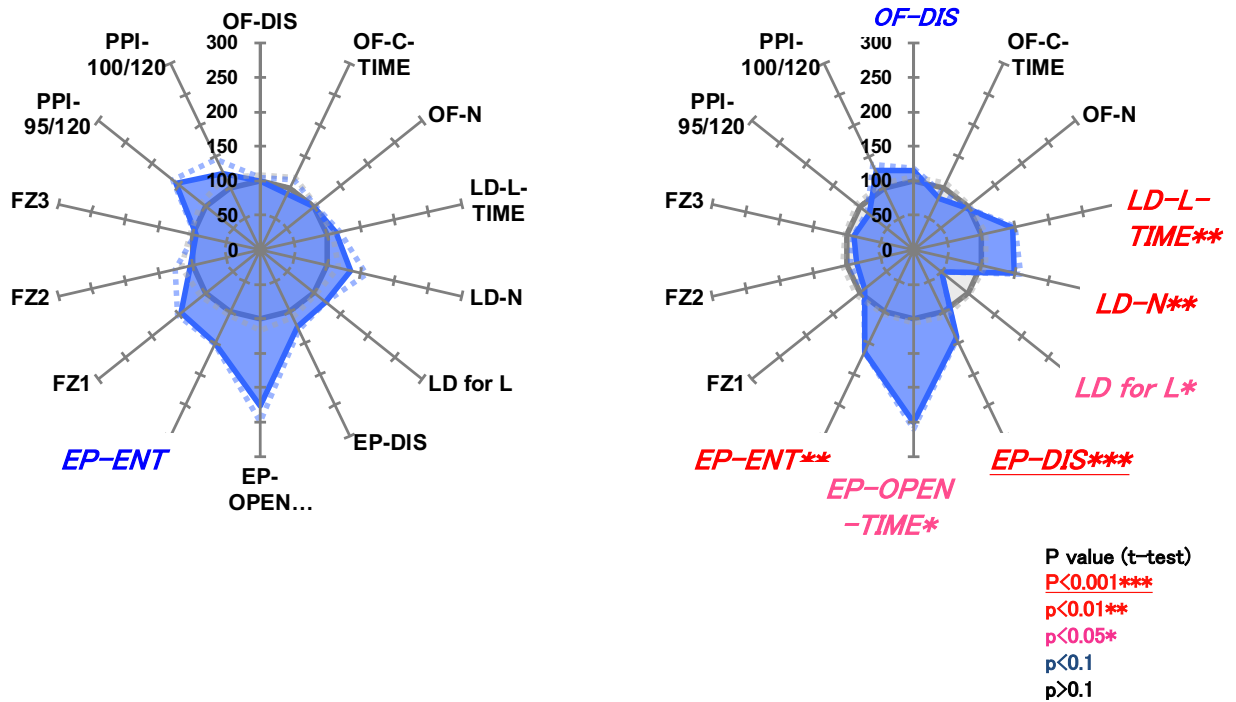
第2週  
木曜日

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



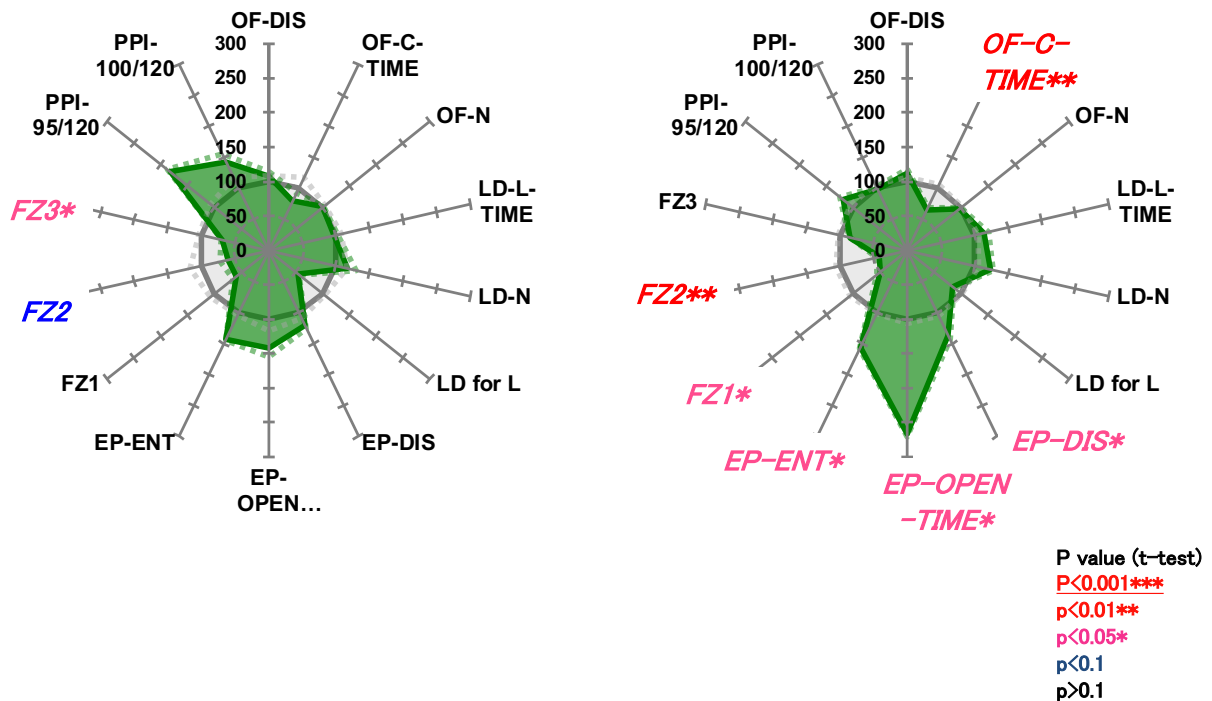
## Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

Acetaminiprid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day



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

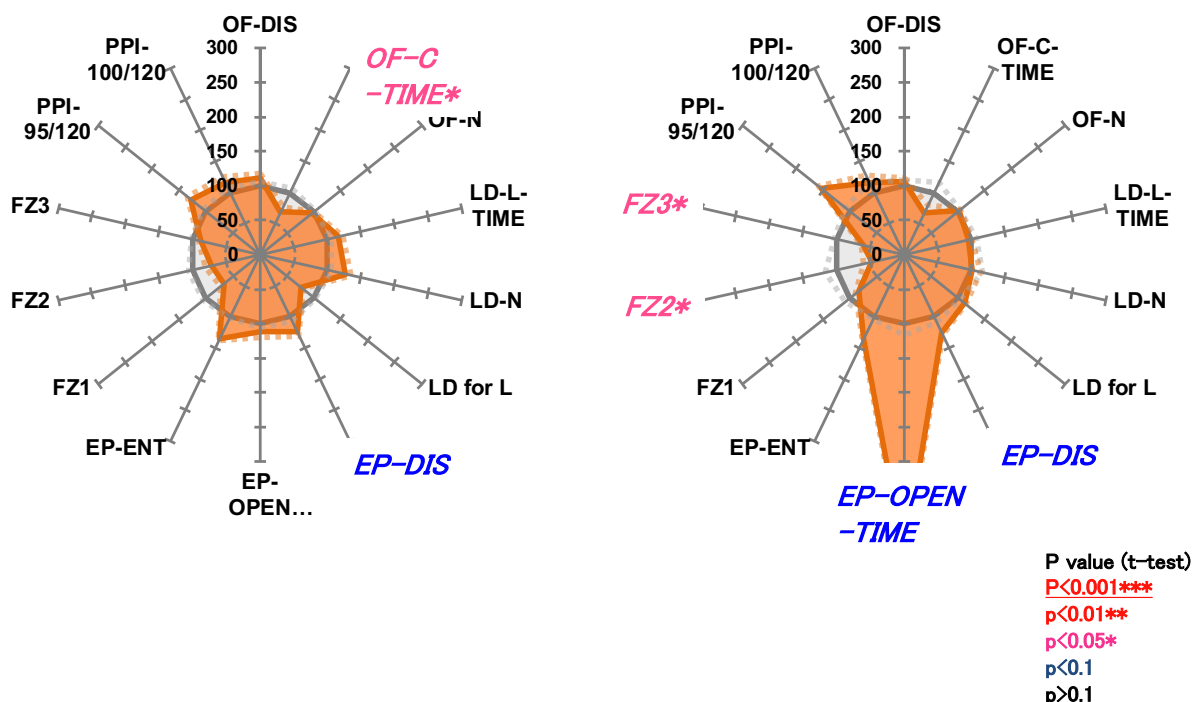
Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day





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

Nicotine (NC) : 0.01、0.1mg/kg/day



## 期待される成果

本研究により従来の神経毒性試験法では検出が困難であった中枢神経毒性について、遅発的に顕在化する情動認知行動異常として検出することにより、高精度に普遍性を持ってリスク評価を実施することが可能となった。これにより、**行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成**が期待できる。

本研究成果は、内外の情報を適切に考慮しつつ、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案を目指しており、具体的にはOECDへの提案を通じての国際貢献も期待できる。

国際毒性学連盟ICT XIV 2016 (メリダ, メキシコ)シンポジウムにて成果の一部を発表した結果、特に農薬類暴露による神経行動毒性(行動異常)評価系の標準化への期待が高いことが確認されるとともに、2018年3月に、米国毒性学会SOT 2018(サンアントニオ、アメリカ)シンポジウムでも発表予定である。

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学一般-007）班会議資料/年次報告書

分担研究課題名

「行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・行動神経科学研究室・教授）

【研究要旨】

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている。本研究グループでは昨年度までに、タッチスクリーンを用いることで、ヒトで行われている認知機能試験法（Go/NoGo課題）を、マウスにおいて行うことに成功した。今年度は試験法を最適化して高い再現性を担保することを目指し、行動課題スケジュールの検討を行った。マウスを3群に分け、Go/NoGo課題前にそれぞれ異なる事前課題（Pre-training）を経験させた。結果、Go/NoGo課題のGo正答率が高かったのは、Pre-trainingにおいてGoトライアルのみのセッションを経験した群であった。Goトライアルのみのセッションを経験した群は2群あり、試験期間が短い群はPre-trainingが8日間であったが、2群とも同程度のGo正答率を示した。NoGo正答率は、Pre-trainingにおいてNoGoトライアルを経験する回数が多いほど上昇した。またGo/NoGo課題においても、試行を重ねるに連れ、NoGo正答率は上昇する傾向が見られた。以上より、既存のプロトコルに比べ、Pre-trainingを短縮した上で、Go正答率、NoGo正答率とも上昇させることに寄与する知見を得ることに成功した。

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている（Cummings, 2011）。Go/NoGo 課題では、Go Cue、NoGo Cue と呼ばれる2種類の視覚刺激を使用する。視覚刺激としては、色や文字、図形が使用される。Go/NoGo 課題では、Go Cue が提示された際には行動すること（例えば、“ボタンを押す” など）、NoGo Cue が提示された際には行動しないこと（行動抑制；セルフコントロール）が要求される。ヒトにおける Go/NoGo 課題では、特に注意欠如・多動症や認知症を持つ人の成績不良（健常者に比べ、“Go Cue” の際の反応時間が長くなる）や課題遂行時の脳活動異常が報告されている。これは、認知機能低下による状況判断速度の低下や行動抑制機能の問題によるものと考えられている。Go/NoGo 課題臨床検査や疫学調査でも多く用いられている。これまでのげっ歯類における Go/NoGo 課題ではラ

ットにおいては報告があるものの、マウスにおける成功例は極めて少ない。またラットにおいても、成績指標は Go/NoGo 課題の正答率が用いられており、ヒトにおける Go/NoGo 課題の成績指標とは必ずしも一致していない（後述）。

そこで本研究では、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の確立に取り組んだ。

## B. 研究方法

### (1) 実験動物

本研究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(P1A)で行った（室温 22±3℃、湿度 40～70%、明暗周期 12 時間（明期 8:00～20:00））。すべての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導

と機関長の承認（総長：鎌田薫）のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。研究室で繁殖維持していた21~26週齢の12匹の雄C57BL/6マウスに加えて、日本クレア（東京）より購入した10週齢の雄C57BL/6マウスを8匹使用した。21~26週齢の12匹のマウスは6匹ずつ2群（実験群1-1, 1-2）に分け、10週齢の8匹のマウスは実験群2とした。課題では餌を報酬として用いたため、試験期間中、日本クレアが公開しているC57BL/6マウスの体重曲線を参考に、平均体重の80%以上を維持しながら制限給餌を行った。試験期間中、飲水は自由とした。

## (2) タッチスクリーンオペラント実験装置

15インチのタッチスクリーン、スピーカーと報酬ディスペンサーを備えたタッチスクリーンオペラント実験装置を作製した（図1）。タッチスクリーンモニターは、15インチの有機ELディスプレイとタッチ検出ユニットから構成される。実験チャンバーはタッチパネルモニター側（240 mm）から報酬ディスペンサー側（55 mm）に向けて狭まっている台形状の高さ200 mmの不透明アクリル製である。チャンバーとタッチスクリーンの間には、直径35 mmの穴が開けられた黒色のプラスチック板が設置されており、チャンバー内のマウスはこの穴よりスクリーンを見てnose pokingにより回答する。また、チャンバーの両側には給水瓶が設置され、試験中、マウスは自由に飲水できるようになっている。チャンバーの上部にはカメラが設置され、課題中のマウスの行動をリアルタイムでモニタリングした。報酬としては1粒10mgのペレットを使用し、課題時、自動的に報酬ディスペンサーより与えた。

### (3) 行動課題の手順

以下のすべての段階において、1日1セッション行った。

#### 慣化 (Habituation)

慣化は30分を1セッションとした。初めの15分は、前もって報酬ディスペンサーに15粒の報酬ペレットが置かれており、投入されたマウスはチャンバー内を自由に探索できる。次の15分間は、30秒毎に高いビーブ音 (Correct Sound) とともに1粒の報酬ペレットが報酬ディスペンサーから獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、報酬ディスペンサーに残ったペレットの数を計測した。全ての実験群に行い、次の段階（行動形成）に進むまでに、少なくとも1セッションを行った。

#### 行動形成 (Shaping)

行動形成は全ての実験群で5セッション行った。

全てのセッションは15分間に設定した。各画像が提示されてから、nose poking するまでには制限時間は設定しなかった。初めの2セッションでは、マウスが報酬ディスペンサーへnose poking することで開始し、モニター上に刺激画像が提示される。モニター上の刺激画像にマウスがnose poking する（タッチ検出ユニットにおいて検出する）と、報酬ディスペンサーよりCorrect Soundとともに3つのペレットが獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、マウスが食べたペレット数を記録した。次の2セッションでは、報酬として獲得できるペレットが3つから1つに減少する以外は、前の2セッションと同一である。最後のセッションでは、nose poking することで報酬が獲得できる刺激画像よりも先に、十字型の固定点画像 (Fig. 3B) が提示される。固定点画像にnose poking しなければ、刺激画像は提示されない。固定点画像にnose poking した後の手順は、前の2セッションと同一である。

#### Pre-training 1 (Go/NoGo 課題)

Pre-training 1 (Go/NoGo 課題) では、Go Cue と NoGo Cue の2種類の視覚刺激 (Fig. 4A) が使用される。Go Cue は60%、NoGo Cue は40%の割合で擬似ランダム提示された。マウスが固定点画像にnose poking した直後に、Go Cue もしくはNoGo Cue が1.2秒間提示される。提示された画像が、Go Cue の場合 (Go トライアル) はモニターへnose poking すれば、NoGo Cue の場合 (NoGo トライアル) はnose poking をしなければ、Correct Sound とともに報酬を獲得することが出来る。Go Cue において、1.2秒以内にnose poking しなかった場合、NoGo Cue においてnose poking した場合はエラーとされ、報酬は得られない。固定点画像提示から報酬獲得もしくはエラーまでを1トライアルとし、100 トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから45分経過した時点で終了とした。報酬獲得後2秒で次のトライアルが自動的に開始される。エラーの場合は低いビーブ音 (Error Sound) とともに、実験装置内のランプが消灯された。消灯は20秒間に設定し、20秒経過後は再びランプが点灯し、自動的に次のトライアルに移行する。

なお、マウスはGo Cue, NoGo Cue を逆にした2群に分け、カウンターバランスをとった。Pre-training 1 は実験群1-1 のみに25セッション行った。

#### Pre-training 2 (Alternative task)

Pre-training 2 (Alternative task) では、1トライアルの手順、及び総トライアル数、制限時間

はPre-training 1と同一であるが、1セッション(100 トライアル)が全てGo トライアルもしくはNoGo トライアルである。Go トライアルのみのセッション、NoGo トライアルのみのセッションは1日毎に交互に行った。なお、マウスはGo Cue, NoGo Cue を逆にした2群に分け、カウンターバランスをとった。Pre-training 2は、実験群1-2のみに25セッション行った。

#### Reversal task

Reversal taskは、実験群1-1, 1-2それぞれでPre-training 1, 2の後、1セッション行った。

Pre-training 1, 2のセッション手順自体は変更せず、割り当てたGo CueとNoGo Cueを入れ替えて行った。

#### Pre-training 3 (Visual discrimination task)

Pre-training 3 (Visual discrimination task)では、モニターとチャンバーの間に設置されたプラスチック板の穴が2つに増える。チャンバー内のマウスには、左右の穴から独立した2つの視覚刺激(Correct Cue, Error Cue)が提示される。視覚刺激は、Go/NoGo Cueを使用し、それぞれのマウスに割り当てられたGo CueをCorrect Cueに、NoGo CueをError Cueとした。Correct Cueにnose pokingすれば、報酬が獲得でき、報酬獲得後2秒で次のトライアルが自動的に開始される。マウスがError Cueにnose pokingした場合はエラーとし、Error Soundとともに実験装置内のランプが消灯される。消灯は20秒間に設定し、20秒経過後は再びランプが点灯し、自動的に次のトライアルに移行する。視覚刺激提示からnose pokingするまでに時間制限はない。Correct Cue、Error Cueの左右配置は擬似ランダムとした。Correct CueとError Cueが提示されてから、報酬獲得もしくはエラーまでを1トライアルとし、100トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから45分経過した時点で終了とした。

#### Pre-training 4 (Go-only task)

Pre-training 4 (Go-only task)の手順、及び総トライアル数、制限時間は、Pre-training 2のGo トライアルのみのセッションと同一である。Pre-training 4では、全てGo トライアルのみのセッションを行った。実験群2においてのみ、8セッション行った。

#### Go/NoGo 課題

Go/NoGo 課題は、Pre-training 1と同一である。

Pre-training 3もしくは4の後、全ての実験群に対し、18セッション行った。最後の3セッションでは、Go /NoGo Cueの提示時間を1.2秒から2.0秒にした。

#### 記録項目

行動形成では、セッション毎に報酬としてディスプレイより与えられた餌の数を記録した。

Pre-training 1、Pre-training 2、Go/NoGo 課題では、セッション毎に全Go トライアルにおける正答数(報酬獲得数)と全NoGo トライアルにおける正答数(報酬獲得数)を記録し、3セッション毎に合計した(3 Session-Blocks)。Go/NoGo トライアルそれぞれで、合計正答数を総トライアル数で割り、Go/NoGo 正答率とした。

Pre-training 3では、セッション毎に正答数(Correct Cueにnose pokingした数; 報酬獲得数)を記録し、3セッション毎に合計した。合計した正答数を、総トライアル数(300 トライアル)で割り、Pre-training 3における正答率とした。

Pre-training 4では、セッション毎にGo トライアルにおける正答数(報酬獲得数)を記録した。セッション毎にGo トライアル正答数を総トライアル数(100 トライアル)で割り、Go 正答率とした。

#### 統計解析

統計解析にはGraphPad PRISM 7 (GraphPad Software)を用いた。

各課題における正答率の推移にはrepeated measure 2-way ANOVAとrepeated measure 1-way ANOVAを用いた。同一課題での最初のセッションと最後のセッションの試行数もしくは正答率の比較には1-way ANOVAと対応のあるt検定を用いた。多重比較は、Tukey検定を用いて行った。P値0.5以下を統計的有意とみなした。

## C. 研究結果

Go/NoGo Cueの提示時間が1.2秒であった第1から第5セッションブロックでは、Go/NoGo 正答率とも大きな変化はなく、どのセッションブロックでも、全ての実験群の正答率の順位は変化しなかった。Go 正答率では、実験群1-2と実験群2が約75%を維持したが、実験群1-1では約50%であった。NoGo 正答率では、実験群1-1が約65%、実験群1-2が約40%、実験群2が約30%であった(図5)。

Go/NoGo Cueの提示時間を1.2秒から2秒にして課題を行ったところ、全ての実験群でGo 正答率

は上昇、NoGo 正答率は低下する傾向が見られた。第15セッションと第18セッションを比較すると、Go 正答率は全ての実験群において、10~15%程度上昇した。実験群1-2では、第18セッションのGo 正答率が90%を超えた。第18セッションのNoGo 正答率は、第15セッションに比べ、実験群1-2で約2分の1、実験群2で約3分の1に低下した。一方で、実験群1-1においては、NoGo 正答率の低下は約3%に留まった(図6)。

#### D. 考察

今回の実験では、我々の研究グループが先行研究において検討したGo/NoGo課題のプロトコル最適化を主眼に、3つの実験群に異なるPre-trainingを実施し、Go/NoGo課題の成績を測定した。

結果、Go 正答率が高い傾向にあるのは、Pre-trainingにおいて、Go トライアルのみのセッションとNoGo トライアルのみのセッションを1日毎に繰り返した群(実験群1-2)とGo トライアルのみのセッションに限って行った群(実験群2)であった。このことより、Go トライアルで報酬を得るための手順をマウスに理解させるためには、始めからGo トライアルとNoGo トライアルが混在する課題ではなく、Go トライアルを繰り返すことが重要と思われる。

一方、対照的にNoGo 正答率が高い傾向にあったのは、始めからGo/NoGo課題を行った実験群1-2であった。これは、NoGo トライアルを適切に学習しているとも考えられるが、NoGo トライアルの性質上、マウスがNoGo Cue提示の際、スクリーンに注目していないにもかかわらず、制限時間をすぎれば報酬が得られてしまうため、学習を放棄、もしくは“何もしないこと”を習得してしまった可能性も多分にある。NoGo トライアルにおける、指標の鋭敏化は今後の課題である。今回の実験では、実験期間の短縮を目的とした。行動形成は、先行研究において9セッションかけていたが、5セッションに短縮することが出来た。一方、Go/NoGo課題では、正答率改善のため、プロトコルの修正していく必要があると考えられる。以下、個々の実験群について考察する。

##### (1) 実験群1-1

実験群1-1では、Pre-training 1すなわち、行動形成後に直ちにGo/NoGo課題を24セッション(8セッションブロック)行った。第8セッションブロックでは、Go 正答率は51.3%、NoGo 正答率は61.9%であった。Pre-training 1の後には、Pre-

training 3 (Visual discrimination task)を行っている。Pre-training 3を経験しながらも、次のGo/NoGo課題において、実験群1-1は、Go 正答率約50%、NoGo 正答率約65%で、Pre-training 1と同程度であった。更に、Go/NoGo課題の最後の3セッションでGo/NoGo Cueの提示時間が変更されても、NoGo 正答率の低下は3.3%に留まっており、他の実験群と比しても、有意にNoGo 正答率が高かった。

以上より、Go/NoGo課題を長期間行うことでNoGo行動が影響を受けにくくなると考えられる。

##### (2) 実験群1-2

実験群1-2の最終セッションブロック(Go/NoGoそれぞれの第4セッションブロック)における、Go 正答率は61%、NoGo 正答率は60.4%であった。Pre-training 3を行った後のGo/NoGo課題では、Go 正答率が約75%、NoGo 正答率が約40%で推移した。また、Go/NoGo Cueの提示時間の変更後、Go 正答率は73%から90%に上昇した一方で、NoGo 正答率は47.9%から25.8%に低下しており、Go トライアルのみで構成されるセッションとNoGo トライアルのみで構成されるセッションを1日毎に交互に行った場合、同じ試行数のGo/NoGo課題を行った場合に比べ、Go行動が優位になりやすいことが示唆される。

##### (3) 実験群2

実験群2はGo/NoGo課題の前に、Go トライアルのセッションだけを行い、NoGo トライアルは経験していない。Go トライアルのみのセッションでは、正答率は76.3%に達しており、その後のGo/NoGo課題でも、Go 正答率は約75%で推移している。一方で、NoGo 正答率は、どのセッションブロックでも、全ての実験群中で最低であった。これは、Go/NoGo課題までにNoGo トライアルを経験していないことが大きいと考えられる。

しかしながら、Go/NoGo課題でのNoGo 正答率において、第1セッションブロックでは24.5%、第5セッションブロックでは34.4%で、他の実験群に比して上昇幅も大きい傾向にある。試行を続けた場合、更に上昇していくことも考えられる。

また、Go 正答率において、実験群2はPre-training 4が8セッションのみにも関わらず、Pre-training 2でGo トライアルのみを12セッション行った実験群1-2と同程度のGo 正答率であり、Go 正答率を上昇させるには、8セッションで十分であると考えられる。

## E. 結論

本研究では、昨年度までに開発した、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の短縮化について検討した。実験群 2 が Pre-training を 8 日 (8 セッション) のみで、実験群 1-2 と同程度の Go 正答率を記録し、更に NoGo 正答率も上昇する傾向が見られている。今後は Pre-training としては Alternative task を採用し、Alternative task の期間を短縮・改良していくことが最善と思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Ling W, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse. *PLoS One*. 2017 Aug 18;12(8):e0183497. doi: 10.1371/journal.pone.0183497. eCollection 2017.

Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight*. 2017 May 18;2(10). pii: 88609. doi: 10.1172/jci.insight.88609.

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J Toxicol Sci*. 2017;42(1):25-30. doi: 10.2131/jts.42.25.

### 2. 学会発表

掛山正心. 子どもへの低用量化学物質ばく露評価のための新たなマウス情動認知行動毒性試験装置の開発. 第 44 回日本毒性学会学術年会 (シンポジウム子ども期への低用量化学物質ばく露が誘発する情動認知行動影響の定量的解析法の開発状況と評価法確立への未来)、2017 年 7 月、横浜.

掛山正心、マウスにおける早期環境要因操作による自閉スペクトラム表現型発現の検討. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム 2017/09、札幌.

掛山正心、集団生活下のマウス個体識別と行動計測. 日本動物行動関連学会 2017 (Koudou2017) (5 学会・研究会合同シンポジウム) 2017/09、東京.

## 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

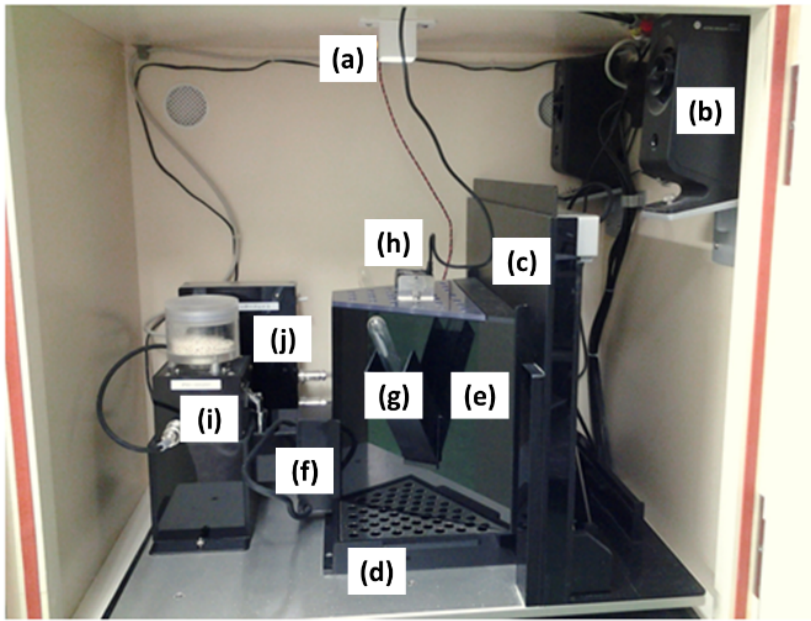


図1. タッチスクリーンオペラント実験装置. (a) house lamp (b) speaker (c) OLED monitor (d) stage (e) wall of testing arena (f) pellet dispensing area (g) water dispenser (h) LCD camera (i) reward dispenser (j) control panel

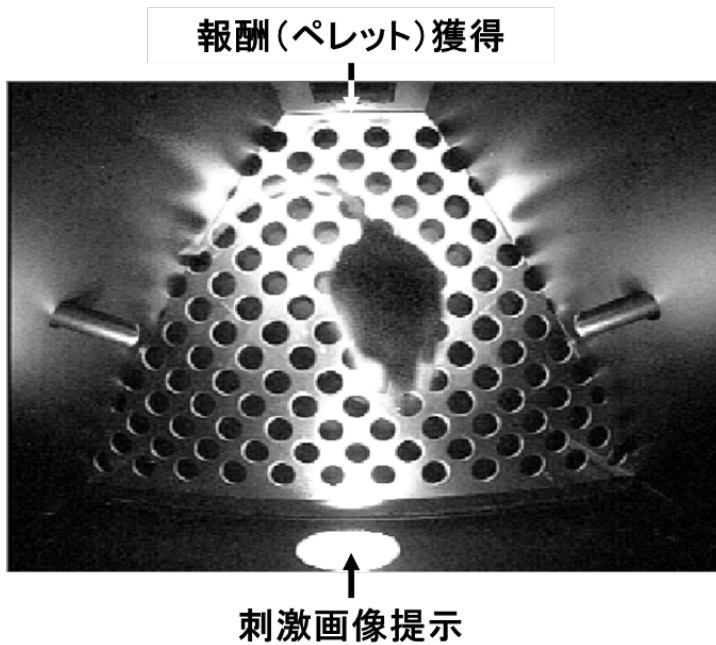


図2. チャンバー内観。刺激画像に対し、適切な行動をすれば、報酬を獲得できる。左右には給水瓶が設置され、課題中、飲水は自由である。

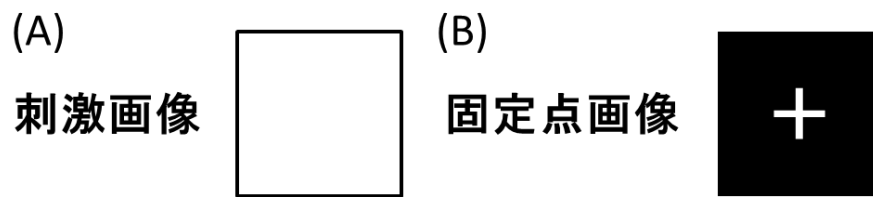


図 3. (A) 刺激画像 (B) 固定点画像

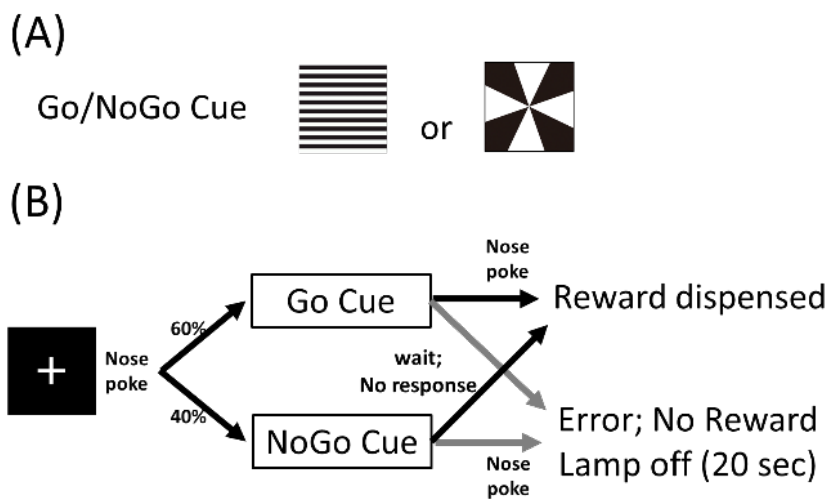


図 4. (A) Go/NoGo 課題スケジュールの模式図。



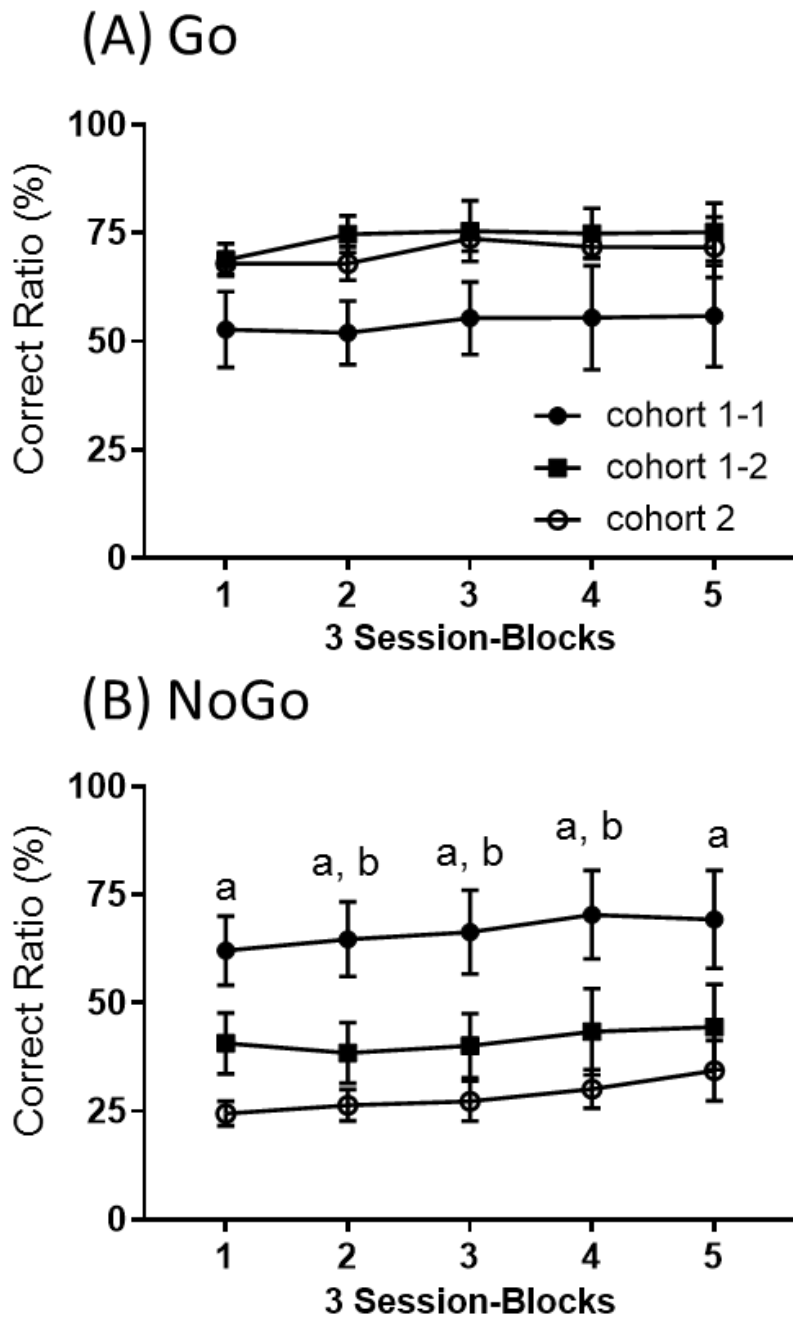


図5. Go/NoGo 課題における(A)Go 正答率と(B)NoGo 正答率. a:  $p < 0.05$ , vs cohort 2, b:  $p < 0.05$ , vs cohort 1-2.

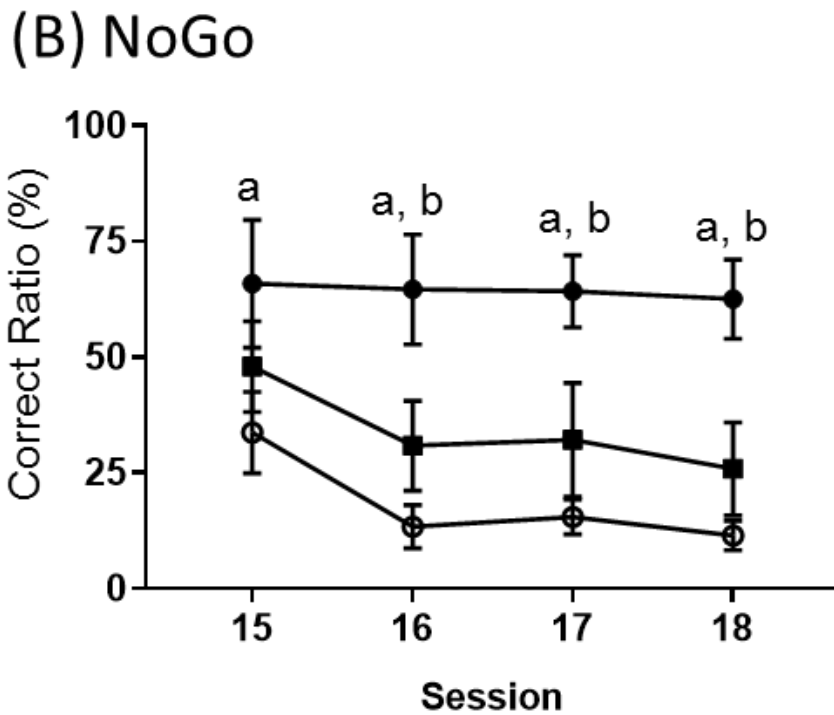
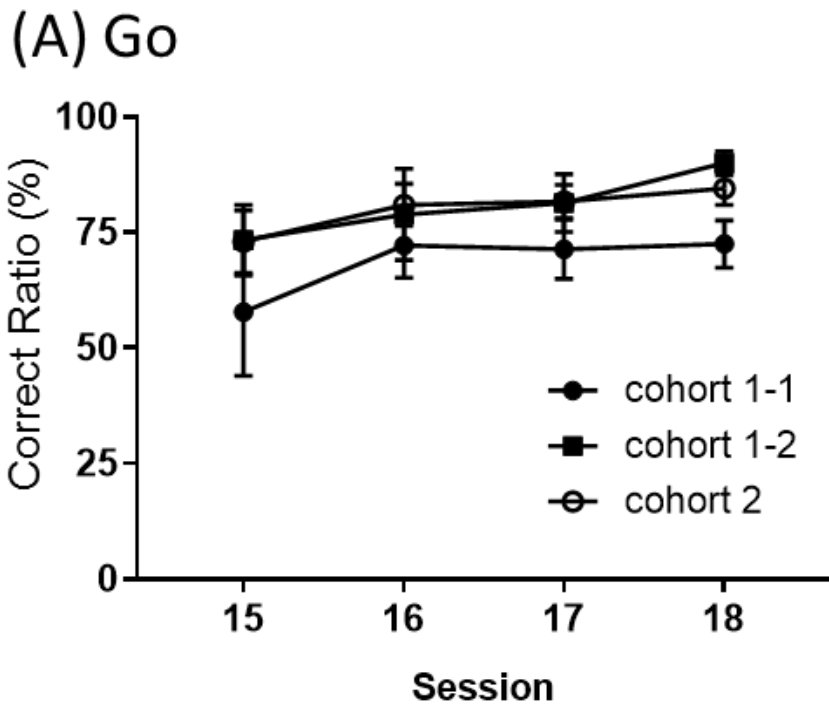
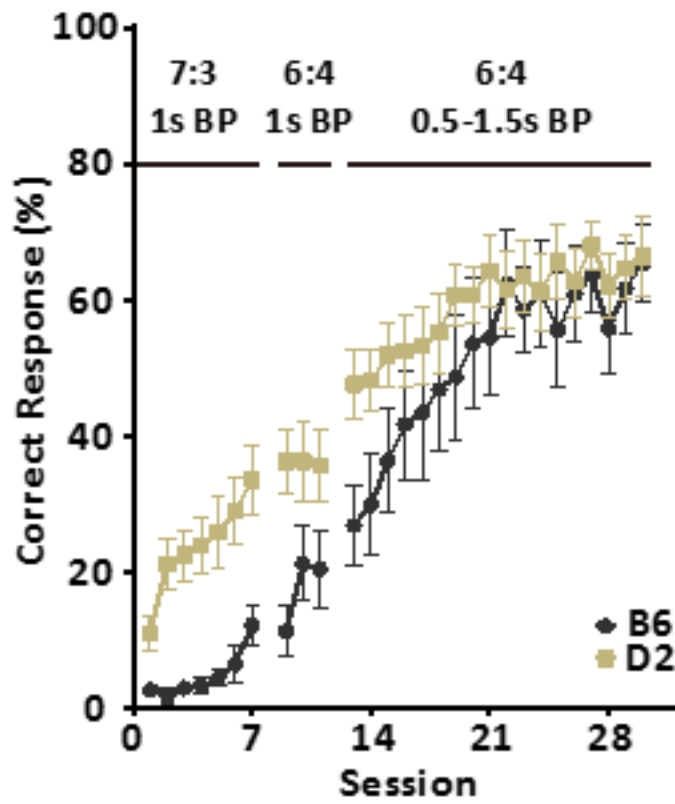


図 6. Go/NoGo 課題の最後の 4 セッションにおける (A)Go 正答率と (B)NoGo 正答率. a:  $p < 0.05$ , vs cohort 2, b:  $p < 0.05$ , vs cohort 1-2; 第 15 セッションは第 5 セッションブロックの最終日のデータ.



参照図 1. 昨年度報告した長期間訓練による Go/NoGo 課題の NoGo Cue 提示時の正答率 (nose poke (誤反応) をせずに報酬を受け取りに行くという正反応を示した割合)。

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の  
誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学-一般-007）

分担研究課題：

「行動異常標準マウス脳の遺伝子発現解析」

–ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドとイミダクロプリドを、  
2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、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 室長  
研究協力者 古川佑介 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種（国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した）を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、平成27年および28年度は、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

平成27年度は、エストロゲン(ER)  $\alpha$  遺伝子座に、ER  $\alpha$  cDNAと牛成長ホルモン由来の3' -UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER  $\alpha$  受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER  $\alpha$  KIと記載）を使用し、脳3部位（大脳皮質、海馬、脳幹）について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。ER  $\alpha$  KIマウス、すなわちER  $\alpha$  の発現が低下したER  $\alpha$  ノックダウンマウスの、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER  $\alpha$  シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、ER  $\alpha$  KIマウスは、ER  $\alpha$  スプライシングバリエントが発現できないマウスとの考える事が出来るが、多くのER  $\alpha$  スプライシングバリエントがER  $\alpha$  シグナルに対してdominant-negativeであることが報告されている事から、ER  $\alpha$  シグナルが活性化していることが推察された。加えて、情動認知行動解析結果から、ER  $\alpha$  KIマウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。解析の結果、ER  $\alpha$  欠失マウスとER  $\alpha$  KIマウスにおける情動認知行動異常の差（情動障害）は、大脳皮質におけるRARシグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

平成28年度は、エストロゲン(ER)  $\alpha$  遺伝子座に、ER  $\beta$  cDNAと牛成長ホルモン由来の3' -UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER  $\beta$  受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER  $\beta$  KIと記載）を使用し、脳2部位（大脳皮質、海馬）について網

網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型あるいはER $\alpha$  KIのものと比較・検討した。ER $\beta$  KIマウスは、ER $\alpha$  の代わりにER $\beta$  が発現するマウスであり、また理論上、ER $\alpha$  のスプライシングバリエントが発現できないマウスと考えることができる。なお、ER $\beta$  KIマウスにおけるER $\beta$  蛋白の発現量は、よい抗体がないために、残念ながら現時点では不明である。遺伝子発現変動解析の結果、ER $\alpha$  欠失マウスとER $\beta$  KIマウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。他方、海馬では、K<sup>+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>チャネルおよびCa<sup>2+</sup>チャネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Camk2a遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析(in silico) の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されたため、ER $\alpha$  シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

したがって今後特に、エストロジェンと概日リズムあるいはRAR (レチノイン酸受容体) のシグナルネットワークとの関連に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

他方、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定するが、これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させることも目的としている。そこで本分担研究では、平成29年度(今年度)、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬である10 mg/kgアセタミプリドと8 mg/kgイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、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。その結果、

1) アセタミプリドを成熟期に投与したマウス (成熟期) 海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2, Mapt)およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められる事から、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、EIF2 シグナル (翻訳過程の活性化)、 Protein Kinase A シグナル (軸索誘導、軸索再生やシナプス伝達の活性化)、 Axonal Guidance シグナル (軸索誘導の活性化) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。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) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する A $\beta$  が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

2) アセタミプリドを幼若期に投与したマウス (成熟期) 海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2)およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められ、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、Mitochondrial Dysfunction (Oxidative

Phosphorylation) (ミトコンドリアにおけるATP合成系の亢進)、 Protein Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 EIF2 signaling (翻訳過程の活性化)、 CREB signaling (神経伝達活性化、長期記憶)、 Protein Kinase A signaling (軸索誘導、軸索再生やシナプス伝達の活性化) が見いだされ、海馬において「神経伝達の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する  $A\beta$  が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、神経伝達の活性化に関係している事が考えられた。

3) イミダクロプリドを成熟期に投与したマウス(成熟期)海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められる事から、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、EIF2 シグナル(翻訳過程の活性化)、 Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 Axonal Guidance シグナル(軸索誘導の活性化)、 Mitochondrial Dysfunction (ミトコンドリアにおけるATP合成系の亢進)、 Oxidative stress (酸化ストレス) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する  $A\beta$  が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

4) イミダクロプリドを幼若期に投与した(成熟期)海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められ、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、Axonal Guidance シグナル(軸索誘導の活性化)、 Unfold protein response (異常タンパク応答)、 Protein Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 Oxidative stress (酸化ストレス)、 Endoplasmic Reticulum Stress pathway (小胞体ストレス) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、APPが抽出されてきたため、神経毒性を有する  $A\beta$  が生成されるアミロイド形成が亢進するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

このように、ネオニコチノイド系農薬である10 mg/kgアセタミプリドと8 mg/kgイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、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、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化していることが示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果から、この活性化に、PSEN1、APPやMAPT分子が関与している事が示唆された。

## A. 研究目的

本研究全体の目的は、平成20年度に開始した先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉え、次の研究(H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できるものであることを示したが、これらを背景に、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することである。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、平成27年および28年度は、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

この目的遂行の為に、平成27年度は雄性ER $\alpha$ KIマウスの脳3部位(大脳皮質、海馬及び脳幹)の遺伝子発現変動を解析・検討した。平成28年度は、成熟期の雄性ER $\beta$ KIマウスの脳2部位(大脳皮質及び海馬)のサンプルについて、Percellome法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

他方、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定するが、これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させることも目的としている。そこで本分担研究では、平成29年度(今年度)、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに投与後、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。

## B. 研究方法

### マウス、被検物質及び投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー)を用いた。

ネオニコチノイド系農薬(2種)の単回投与実験では、10 mg/kg アセタミプリド(CAS No. : 135410-20-7, 分子量: 222.68, カタログ No. : 010-24541, lot No. : AWG6799, 純度: 99.7%, WAKO)と 8 mg/kg イミダクロプリド(CAS No. : 138261-41-3, 分子量: 255.66, カタログ No. : 099-03771, lot No. : KPF0614, 純度: 99.1%, WAKO)(溶媒: コーンオイル[CAS No. : 8001-30-7, カタログ No. : C8267, Sigma-Aldrich]、投与容量: 10 ml/kg 体重)を、2週齢(以下、幼若期)、或いは11週齢(以下、11週齢以降を成熟期と定義)のマウスに投与後、12週齢時に情動認知行動解析を行い(n=8)、その後、13週齢時の海馬(n=3; 8例から3例をランダムに選択)における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2部位(大脳皮質、海馬)(午前10時)(各n=4)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。脳2部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た(右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Studentのt検定によりおこない、P値が0.05未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

### 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。抽出にあたっては、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砕液を調製した。得られた破砕液の10  $\mu$ 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 µg 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、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 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: アセタミプリドを成熟期に投与したマウス海馬 (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、投与群でニューロン (Mtap2, Mapt) およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆された。以上のうち、Mtap2、Mapt および Gfap 遺伝子の発現変動について図 1 (最終ページ参照) に示す。

次いで、対照群と比較し、10 mg/kg アセタミプリドを成熟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。

2,418 ps (増加)、40 ps (減少)

増加分 2,418 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として、Axonal Guidance シグナルが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、EIF2 シグナル、Protein Kinase A シグナルおよび Axonal Guidance シグナル (軸索誘導の活性化) が抽出され、それぞれ、翻訳過程の活性化、軸索誘導・軸索再生やシナプス伝達の活性化及び、軸索誘導の活性化が示唆された。なお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。

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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する Aβ が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

一方、減少分 40 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。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)。

C-2: アセタミプリドを幼若期に投与したマウス海馬 (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、投与群でニューロン (Mtap2) およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、10 mg/kg アセタミプリドを幼若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。

5,056 ps (増加)、8 ps (減少)

増加分 5,056 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として、CREB シグナルが見いだされたことから、神経伝達の活性化や長期記憶の増強が示唆された。IPA による Canonical pathway による検索においても、Mitochondrial Dysfunction (Oxidative Phosphorylation)、Protein Ubiquitination pathway、EIF2 signaling、CREB signaling、Protein Kinase A signaling が抽出され、それぞれ、ミトコンドリアにおける ATP 合成系の亢進、タンパク分解系の亢進、翻訳過程の活性化、神経伝達活性化・長期記憶、軸索誘導・軸索再生やシナプス伝達の活性化が示唆された。なお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。

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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A $\beta$  が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、神経伝達の活性化や、タンパク分解系・ATP 合成系の亢進に関係している事が考えられた。

一方、減少分 8 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。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)。

C-3: イミダクロプリドを成熟期に投与したマウス海馬(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、投与群でニューロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、8 mg/kg イミダクロプリドを成熟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。

4,253 ps (増加)、12 ps (減少)

増加分 4,253 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として、Axonal Guidance シグナルおよび酸化ストレスが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、EIF2 シグナル、Ubiquitination pathway、Axonal Guidance シグナル、Mitochondrial Dysfunction、Oxidative stress が抽出され、それぞれ、翻訳過程の活性化、タンパク分解系の亢進、軸索誘導の活性化、ミトコンドリアにおける ATP 合成系の亢進、酸化ストレスが生じている事が示唆された。なお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。

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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A $\beta$  が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化や、タンパク分解系・ATP 合成系の亢進、酸化ストレスに関係している事が考えられた。

一方、減少分 12 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。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)。

C-4: イミダクロプリドを幼若期に投与したマウス海馬(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、投与群でニュー

ーロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆された。

次いで、海馬について、対照群と比較し、8 mg/kg イミダクロプリドを幼若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。

2,256 ps (増加)、 11 ps (減少)

増加分 2,256 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として、Axonal Guidance シグナルおよび酸化ストレスが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、Axonal Guidance シグナル、Unfold protein 応答、Protein Ubiquitination pathway、Oxidative stress、Endoplasmic Reticulum Stress 応答が抽出され、それぞれ、軸索誘導の活性化、異常タンパク応答、タンパク分解系の亢進、酸化ストレス、小胞体ストレスが生じている事が示唆された。なお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。

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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、APP が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A $\beta$  が生成されるアミロイド形成が亢進するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化や、タンパク分解系の亢進、酸化ストレス、小胞体ストレスに関係している事が考えられた。

一方、減少分 11 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。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)。

以上のように、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2 週齢或いは 11 週齢のマウスに投与後、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、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化し

ていることが示唆された。プロモーター解析 (*in silico*) の結果から、この活性化に、PSEN1、APP や MAPT 分子が関与している事が示唆された。

このように、それぞれの場合に発現変動を示した遺伝子群が似ていることが示唆されたため、これらの集合関係を検討したところ、発現増加分については重複するものが多く、とくに幼若期投与の場合に両物質を比較した場合、アセタミプリドにより発現増加が認められた遺伝子は全て、イミダクロプリドにより発現増加が認められた遺伝子と一致した。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。

#### D. 結論

平成 27 年度は、ER $\alpha$  KI マウス、すなわち ER $\alpha$  の発現が低下した ER $\alpha$  ノックダウンマウスの脳における遺伝子発現変動解析の結果、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER $\alpha$  シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  スプライシングバリエントが発現できないマウスとの考える事が出来るが、多くの ER $\alpha$  スプライシングバリエントが ER $\alpha$  シグナルに対して dominant-negative であることが報告されている事から、ER $\alpha$  シグナルが活性化していることが推察された。加えて、情動認知行動解析結果から、ER $\alpha$  KI マウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。解析の結果、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\alpha$  KI マウスにおける情動認知行動異常の差(情動障害)は、大脳皮質における RAR シグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

平成 28 年度は、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  KI マウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。したがって、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  KI マウスとの共通の情動認知行動異常である、「情動および認知」障害は、概日リズムが乱れる事により誘発されている可能性が示唆された。他方、海馬では、K<sup>+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>チャネルおよび Ca<sup>2+</sup>チャネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Camk2a 遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析 (*in silico*) の結果、遺伝子発現調節因子として ESR1 が抽出されたため、ER $\alpha$  シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

今後特に、エストロゲンと概日リズムあるいは RAR (レチノイン酸受容体) のシグナルネットワークとの関連に着目することにより、遅発性の情

動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

平成 29 年度 (今年度) は、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2 週齢或いは 11 週齢のマウスに投与後、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。投与群では、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化していることが示唆された。プロモーター解析 (in silico) の結果から、この活性化に、PSEN1、APP や MAPT 分子が関与している事が示唆された。

今後特に、PSEN1、APP や MAPT 分子と、軸索誘導の活性化のシグナルネットワークとの関係に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period induced by neonicotinoid pesticides exposure at juvenile period of male mice. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, Double Strand Break Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Leading-Edge Technology, (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA, poster

Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi, An emerging new possible risk of genome editing for human gene therapy, (2018.1.31) Keystone Symposia Conference / Precision Genome Editing with Programmable Nuclease, Colorado, USA, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

北嶋 聡、シックハウス症候群レベルの極低濃度ばく露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性の情動認知行動影響解析、第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017.7.12.)

相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、菅野 純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析、第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017.7.11.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster

#### 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

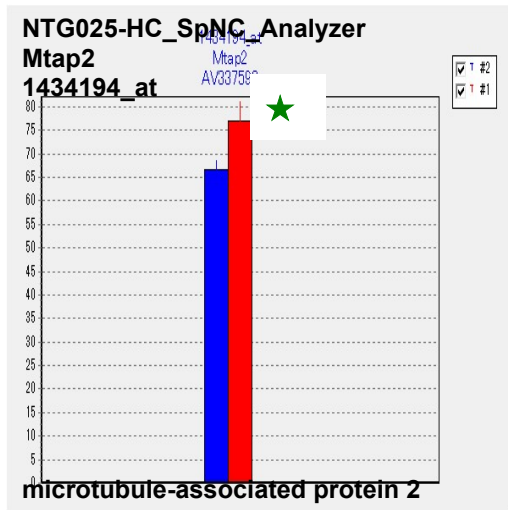


図1 アセタミプリドを成熟期に投与したマウス海馬（成熟期）において、有意に発現増加が認められた、ニューロンマーカーの Mtap2 と Mapt（上・中段）、及びアストロサイトマーカーの Gfap 遺伝子（下段）の発現変動

溶媒対照群：青、投与群：赤（n=3、平均値±標準偏差、\*:P<0.05, \*\*: P<0.01）

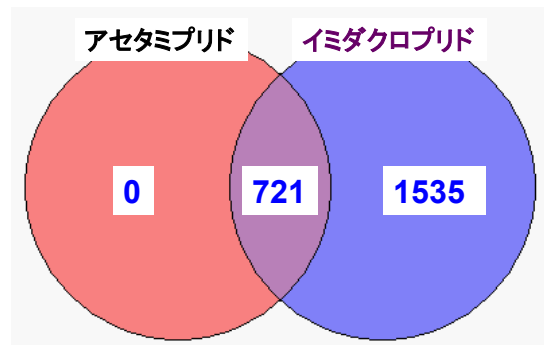
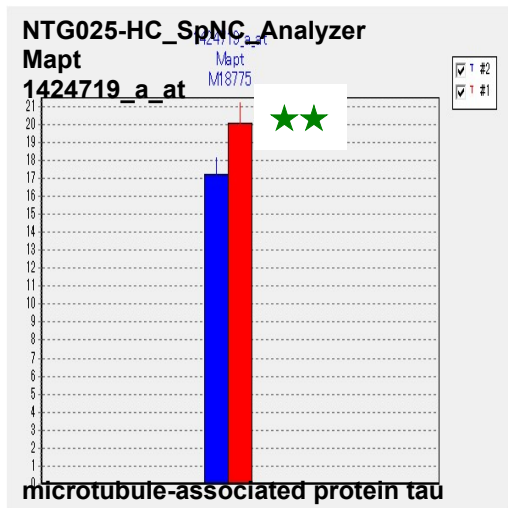
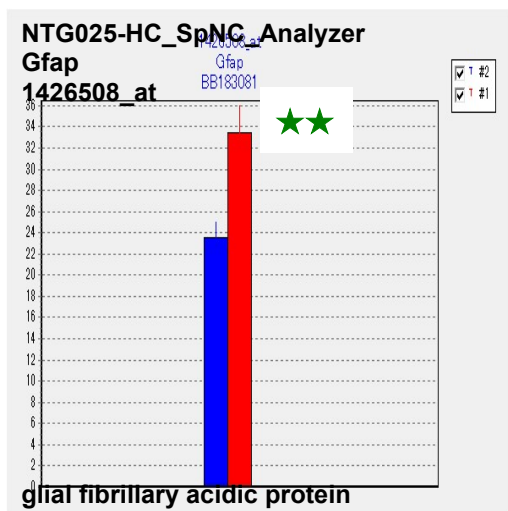


図2 海馬において、幼若期投与の際に、発現が有意に増加する遺伝子の中、アセタミプリドあるいはイミダクロプリド投与の場合の集合関係（ベン図で表記した）



研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の  
誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

分担研究課題名

「神経幹細胞動態解析および大脳層構造形態解析と異常基準値の設定、新規毒性マーカー探索」

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】

昨年度の解析から、ネオニコチノイド系農薬である、アセタミプリド（10mg/kg）、イミダクロプリド（8mg/kg）投与直後には、海馬ニューロン新生への影響が検出しにくいことが分かった。したがって、その影響を明らかにするためには、成体期でのニューロン新生解析とノンコーディングRNA解析による定量化が必要であると考えられた。そこで、本年度は、次世代シーケンサーによるRNA発現プロファイリングが神経系への影響を定量化する指標となりうるかどうかを検討するための研究を進め、農薬暴露による異常値検出の精度を鋭敏化できる一例を示すことに成功した。

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・幼若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。ところで、ネオニコチノイド系の農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドの幼若期暴露によって遅発性の情動・認知行動異常が生じることが明らかとなっており、またニューロン新生への影響が示唆される結果が研究代表者らによって

得られている。そこで、本分担者は、対象化学物質として、ネオニコチノイド系農薬を選択し、ニューロン新生とノンコーディングRNAの発現・機能に及ぼす影響の詳細な解析、及びその定量化を目的として研究に着手した。

B. 研究方法

まず、幼若期（2週齢）マウスに、コントロールとしてコーンオイル、アセタミプリド（10mg/kg）、イミダクロプリド（8mg/kg）を単回経口投与し、3週齢時あるいは成体期（13週齢）まで待ち、遺伝子とノンコーディングRNA発現解析用に脳を凍結保存した。この脳よりノンコーディングRNAを含むRNAを抽出し、ライブラリーを作製後、次世代シーケンサーを用いて発現データを得る（生後単回投与群）。更に、母マウスにコーンオイル、アセタミプリド（0.01mg/kg/day）、イミダクロプリド

(0.01mg/kg/day)に飲水投与することで、胎生 11 日目から出生後 28 日目まで慢性に暴露し、遺伝子とノンコーディング RNA 発現解析用に脳を凍結保存した。この脳よりノンコーディング RNA を含む RNA を抽出し・ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いて発現データを得る(慢性母性投与群)。

## C. 研究結果

生後単回投与群において、1 週間後に発現上昇してくる遺伝子群には、細胞増殖関連のものと細胞移動関連のものが認められた。例えば、イミダクロプリド投与群の場合、ジーンオントロジー(GO)タームに属する遺伝子として、MITOTIC CYTOKINESIS や MYOSHIN II COMPLEX 関連の遺伝子が総じて発現上昇していた(図 1)。したがって、神経幹細胞の増殖が異常に促進され、細胞移動を開始し、ニューロンに早期分化してしまうと考えられた。一方で、成体期に発現減少する遺伝子のプロファイリングから、ニューロンの質の低下あるいは量の減少が晩発性の影響として起こってしまうことも分かってきた。例えば、イミダクロプリド及びアセタミプリドいずれの投与群においても、GO タームに属する遺伝子として、NEURON SPINE 関連の遺伝子が総じて発現減少していた(図 2)。

この生後単回投与群のノンコーディング RNA 発現解析については、生後単回投与群におけるノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの作製スキームを開発中であり、定量したモデルトランスクリプト候補と遺伝子発現との関連付けの予備的検討を終えたところである。慢性母性投与群については、各脳より抽出した RNA を用いて、シーケンス用のライブラリー作製まで行った。

## D. 考察

研究代表者が行った、同様に両農薬を投与したマウスの成体期(12-13 週齢)にお

ける行動解析では、恐怖条件付けテストにおいて明らかに障害がみられていたが、そのことに一致して、今回、遺伝子発現プロファイリングから、ニューロンの質の低下あるいは量の減少が起こっていたことは興味深い。原因についても今回の遺伝子発現プロファイリングから明らかになりつつあり、ネオニコチノイド投与が 1 週間以内に神経幹細胞の異常増殖・早期分化を引き起こしたことである可能性が高い。今後、生後単回投与群と慢性母性投与群の結果を併せることで、上記の考察をサポートできる結果を得ることが出来るかは興味深く、また引き続きこのような取り組みを行うことで、ノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの精度が格段に上昇することが期待できる。

## E. 結論

昨年度の解析において、免疫染色では判別できなかった海馬ニューロン新生への影響が、次世代シーケンサー解析による遺伝子発現プロファイリングにより検出できたことは意義深く、現在取り組んでいるノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの精度上昇により、農薬暴露による異常値検出の精度を更に鋭敏なものにすることも強く期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

#### 2) 雑誌

1. Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2018 Jan 31. doi: 10.1007/s10565-017-9420-y. [Epub ahead of print] Review. PMID:29383547.

2. Kawamura Y, Katada S, Noguchi H, Yamamoto H, Sanosaka T, Iihara K, Nakashima K. Synergistic induction of astrocytic differentiation by factors secreted from meninges in the mouse developing brain. *FEBS Lett.* 2017 Nov;591(22):3709-3720. doi: 10.1002/1873-3468. 12881. PMID: 29029363.
  3. Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K. DNA Methylation Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell Rep.* 2017 Sep 19;20(12):2992-3003. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.086. PMID: 28930691.
  4. Kimura A, Matsuda T, Sakai A, Murao N, Nakashima K. HMGB2 expression is associated with transition from a quiescent to an activated state of adult neural stem cells. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):229-238. doi: 10.1002/dvdy.24559. PMID: 28771884.
  5. Zhu Y, Uezono N, Yasui T, Nakashima K. Neural stem cell therapy aiming at better functional recovery after spinal cord injury. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):75-84. doi: 10.1002/dvdy.24558. Review. PMID: 28766845.
  6. Honda M, Nakashima K, Katada S. PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells. *J Neurochem.* 2017 Jul;142:901-907. doi: 10.1111/jnc.14123. [Epub ahead of print] PMID: 28695568.
  7. Kameda T, Imamura T, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. *Cell Tissue Res.* 2018 Jan;371(1):189-199. doi: 10.1007/s00441-017-2656-2. Epub 2017 Jul 10. Review. PMID: 28695279.
  8. Yasui T, Uezono N, Nakashima H, Noguchi H, Matsuda T, Noda-Andoh T, Okano H, Nakashima K. Hypoxia Epigenetically Confers Astrocytic Differentiation Potential on Human Pluripotent Cell-Derived Neural Precursor Cells. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1743-1756. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.001. PMID: 28591654.
  9. Brulet R, Matsuda T, Zhang L, Miranda C, Giacca M, Kaspar BK, Nakashima K, Hsieh J. NEUROD1 Instructs Neuronal Conversion in Non-Reactive Astrocytes. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1506-1515. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.013. Epub 2017 May 11. PMID: 28506534.
  10. Uesaka M, Agata K, Oishi T, Nakashima K, Imamura T. Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancrRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals. *BMC Genomics.* 2017 Apr 7;18(1):285. doi: 10.1186/s12864-017-3662-1. PMID: 28388877.
2. 学会発表  
<国内学会>
1. 中島欽一<sup>○</sup>: 胎生期エピジェネティック攪乱による遅発性学習記憶障害とてんかん感受性増加のメカニズム、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、

- 2017年9月30-10月1日(30日)(特別講演)
2. 今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylome s identify transcription factor-based epigenomic signatures for timed acquisition of differentiation competence in neural stem/progenitor cells towards neuronal and glia lineages、4<sup>th</sup> World Congress of Reproductive Biology、沖縄県、沖縄コンベンションセンター、2017年9月27-29日(29日)(ポスター)
  3. 吉川容司<sup>○</sup>、吾郷哲郎、立花正輝、古森元浩、芝原友也、脇坂義信、黒田淳哉、中嶋秀行、中島欽一、北園孝成 : 海馬歯状回における傷害反応性神経幹細胞増殖と神経新生における活性酸素種産生酵素Nox4の役割、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、2017年9月30-10月1日(30日)(一般口演)
  4. 中島欽一<sup>○</sup> : Hypoxia epigenetically confers astrocytic differentiation potential on human pluripotent cell-derived neural precursor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13日)(口頭)
  5. 今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multi-lineage competence in neural stem/progenitor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  6. 本田瑞季<sup>○</sup>、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一 : Mechanism underlying developmental stage dependent changes in neural stem cells responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  7. 亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : Neuronal activity-dependent DNA methylation changes in the naïve hippocampal neurons accelerate gene expression responses to the following stimuli、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  8. 今村拓也<sup>○</sup>、山本直樹、阿形清和、中島欽一 : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells、第43回内藤コンファレンス、北海道、シャトレセガトキングダムサッポロ、2017年8月27日-30日(29日)(ポスター)
  9. 中嶋秀行<sup>○</sup>、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor、



- mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20日- 23日 (22日) (口頭)
10. 中島欽一<sup>○</sup> : DNA Methylation Regulating Neuron-Glia Fate Switching of Neural Stem Cells、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20-23日 (21日) (シンポジウム)
  11. 今村拓也<sup>○</sup> : 長鎖ノンコーディングRNAによるほ乳類エピゲノム制御、第2回次世代生命科学の研究会、福岡県、九州大学コラボレーションI、2017年7月13-14日 (14日) (口頭)
  12. 今村拓也<sup>○</sup> : ニューロンにおけるエピゲノム制御とその破綻、第44回日本毒性学会学術年会、神奈川県、パシフィコ横浜、2017年7月10-12日 (12日) (シンポジウム)
  13. 亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス海馬ニューロンは神経活動依存的にDNAメチロームを変動し、脱メチル化を介して遺伝子発現応答を高速化する、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日 (23日) (ポスター)
  14. 松田泰斗<sup>○</sup>、入江剛史、アデフィンアリア、中島欽一 : エピゲノム変換を介したミクログリアからニューロンへの直接分化転換機構の解明、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日 (22日) (ポスター)
- Workshop 2017, Paris-Diderot University, November 6-8, 2017
2. Katada, S., Honda, M., Takouda, J., Igarashi, K., and Nakashima, K. : Developmental stage-dependent change of SMAD target genes defines the direction of neural stem cell differentiation induced by bone morphogenetic proteins, EMBO Conference 'Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions', San Juan de Alicante, Spain, September 7-10, 2017
- 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。

<国際学会>

1. Imamura, T., Yamamoto, N., Agata, K., Nakashima, K. : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells, France•Japan EPIGENETICS



研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学一般-007）

分担研究課題名

「光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用」

研究分担者

富永貴志（徳島文理大学・神経科学研究所 准教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでに発生初期の投与で異常を起こすネオニコチノイド暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出しているが、今年度は特に遅発毒性について検討した。海馬神経回路でのGABA系の働きの変調と、シナプス可塑性の変調を見出した。また、ネオニコチノイド、バルプロ酸、ビスフェノールなどの遅発神経毒性に関わる物質による興奮/抑制バランス（E/Iバランス）の変調を精度よく検出できる可能性がある系として、GABA受容体が関係する各種の長期・短期可塑性を詳細に検討した。また、平行して大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索し前帯状皮質（ACC）、傍梨状核（EPN）などのイメージング解析を行いその信号伝播パターンを明らかにした。これに、新規共焦点顕微鏡を利用したin vivo系での計測系、新規パターン刺激イメージング顕微鏡、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行ない、特に無染色組織からの光信号の検出に成功した。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を示している。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、ex vivo 実験系（スライス標本）

でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行い、毒性評価上の指標を設定することを目的とする。

B. 研究方法

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

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

#### (2) 海馬以外の基準神経回路の探索

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

(3) 海馬 CA1 野における GABA 受容体の関与する可塑性調節機構についての光計測による解析

マウス海馬 CA1 野の基本的な神経回路動作をリストアップするために、各種の刺激パターンに対する応答を計測し、GABA 受容体の関与について検討した。この中で、シャーパー側枝を 2 群に分割する手法を開発し、より自然な情報伝達での役割について検討した。

(4) 各種光計測技術の開発-網羅的計測、遺伝子改変動物の利用、偏光などを使った新規の計測法を開発している。

### C. 研究結果

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

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

#### (2) 海馬以外の基準神経回路の探索

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

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

(3) 海馬 CA1 野での結果から、シータ周期で引き起こされる新規の GABA 依存性の短期可塑性を見出した。これは、高頻度刺激で引き起こされる短期可塑性と合せて、周期的な神経活動が抑制性の回路を介して回路演算を調節する機構と考えた。さらに脳情報処理における意義を明らかにするため、複数入力に対する応答を検討した。その結果、GABA 受容体の働き方として、フィードフォワードとフィードバックでそれぞれ異なる働き方をすることを明らかにした。これを遅発毒性検出に使えるかどうか、さらに可塑性との関連について検討を始めた。

(4) In vivo 系での神経回路計測系の開発、膜電位依存性蛋白の使用を含む新規イ

メージング法の開発を進めている。今年度は特に無染色のスライス標本での計測を行いこれまで報告されていない哺乳類脳組織での光散乱による膜電位応答の光学計測に成功した。

#### D. 考察

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

これとともに、昨年度以前に見出しているバルプロ酸、ビスフェノールの遅発毒性における興奮-抑制バランスの変化が見られている。これを再現性よく、鋭敏に測定するためには、興奮-抑制バランスによって回路動作が大幅に変わる神経回路指標を設定する必要がある。シータ周期のような周期的な神経活動の変調なども含め検討をすすめる。また、無染色標本での計測は評価系として有用だと思われるのでさらに計測法を確立する。

#### E. 結論

光計測法を使うことによって、海馬神経回路の変調を効率よく、定量的に検出する系が確立できた。この手法は幼若期から成長に伴ったどの成長段階の標本でも同じように適用できる上、電気生理学的な知見と密接な関係があり相補的に解釈することで神経機構の解明に重要な意義を持つ。今後とも光計測法を軸に、神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは、重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1) 書籍

##### 2) 雑誌

##### 2. 学会発表

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

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

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

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

成果報告 5  
光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

富永 貴志 (徳島文理大学・神経科学研究所)

平成29年度班会議

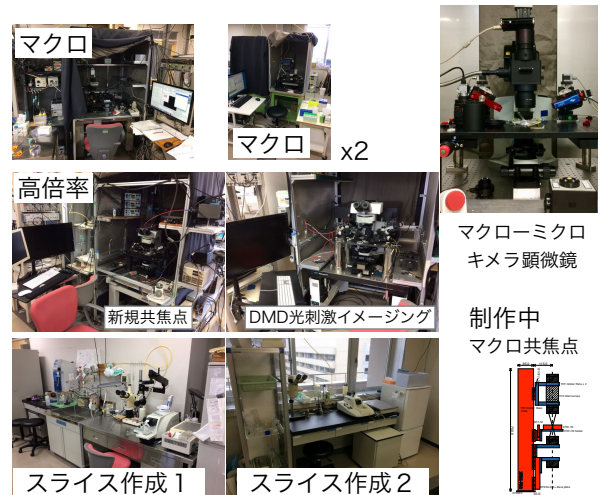
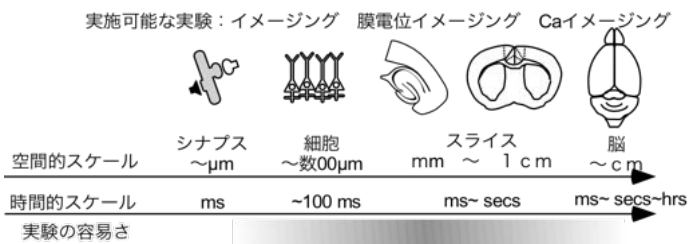
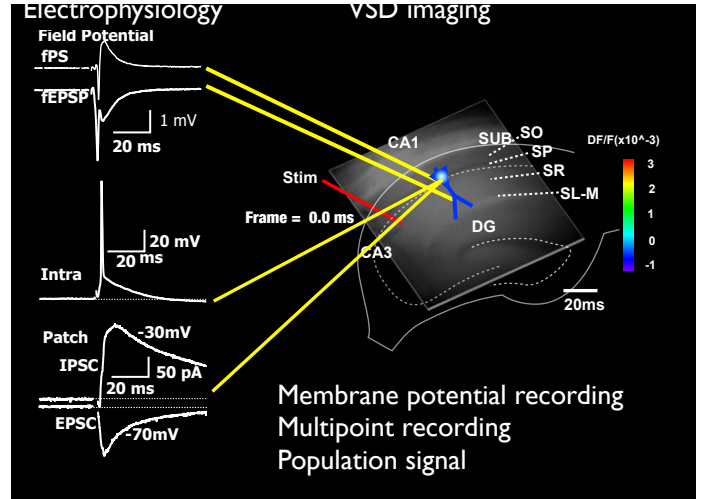
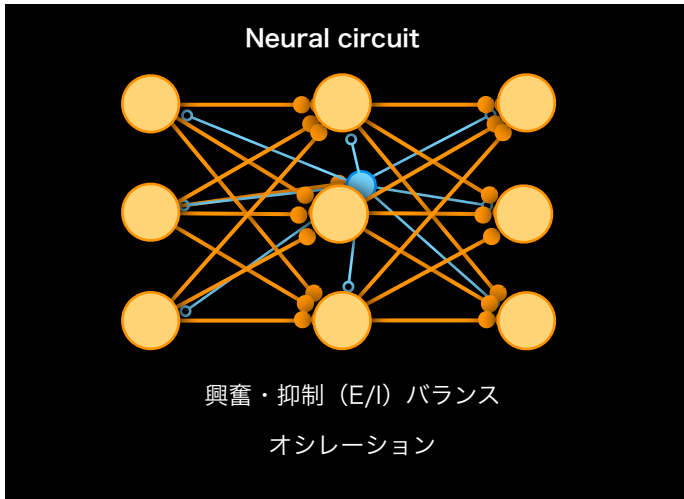
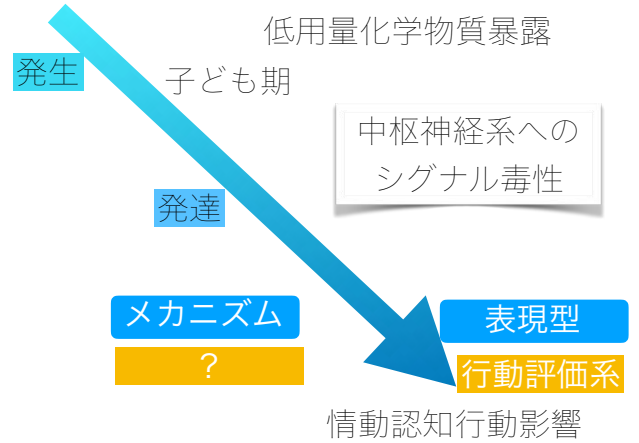
平成29年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

日時: 平成30年 2月22日 (木) 13:30-16:40

場所: 東京国際フォーラム会議室 G401

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

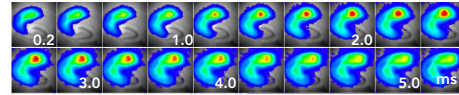


## neonicotinoid

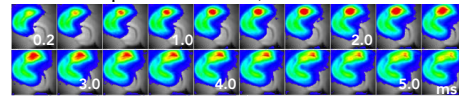


7

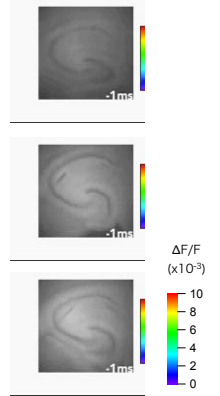
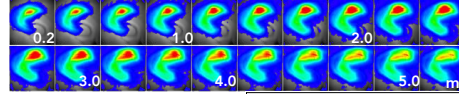
## Control



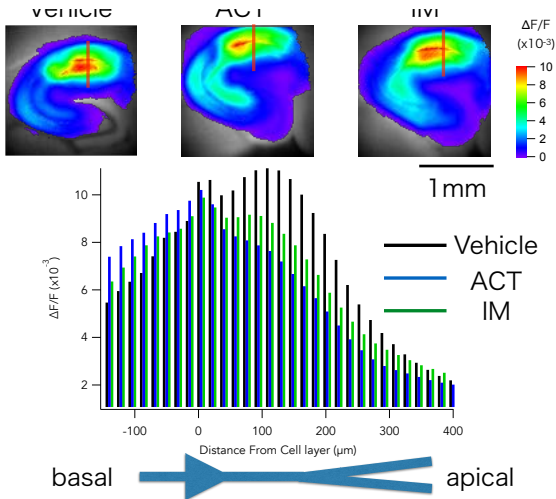
## Acetamiprid (ACT)



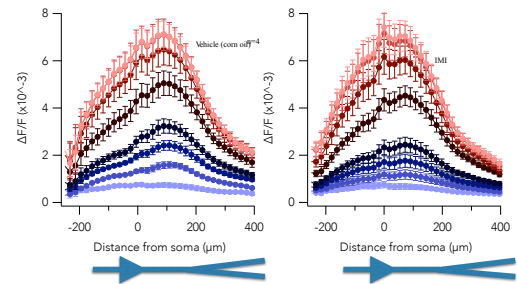
## Imidacloprid (IM)



8



9



10

## Stem Cell Reports

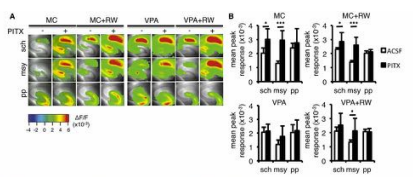
### Article



OPEN ACCESS

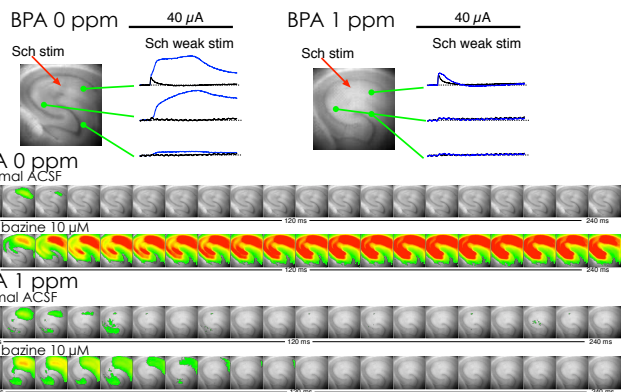
## Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid

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



**Figure 7. Voluntary Running Restores Neuronal Activity in VPA-Treated Mice**  
 (A) Representative postnatal activity maps images of brain slices including the hippocampus show that voluntary running can only recover the impairment of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition in the mossy fiber pathway (mfj) of VPA-treated mice, after treatment with the GABA<sub>A</sub> receptor channel antagonist picrotoxin (PTX) (n = 4 for MC, n = 9 for MC + RW, n = 7 for VPA, n = 8 for VPA + RW). Electrical stimulation was applied to Schaffer collateral afferents at the CA1/CA3 border of CA1 (sch) to the granule cell layer to stimulate the mossy fiber pathway (mfj) and to the molecular layer of the upper blade in the DG (dg).  
 (B) Quantification of the neural response to artificial cerebrospinal fluid (ACSF) with (black bars) or without PTX (white bars; n = 6 for MC, n = 9 for MC + RW, n = 7 for VPA, n = 8 for VPA + RW). Note that although the augmentation of the neural response caused by GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition with PTX application seen in sch and mfj was abolished in VPA-treated mice, voluntary running could restore the augmentation only in the mfj.  
 MC, prenatal methylcellulose (vehicle); MC + RW, prenatal methylcellulose and postnatal running; VPA, prenatal valproic acid; VPA + RW, prenatal valproic acid and postnatal running. Data are represented as means. Error bars indicate the SD. \*p < 0.05, \*\*p < 0.001, two-tailed t test.

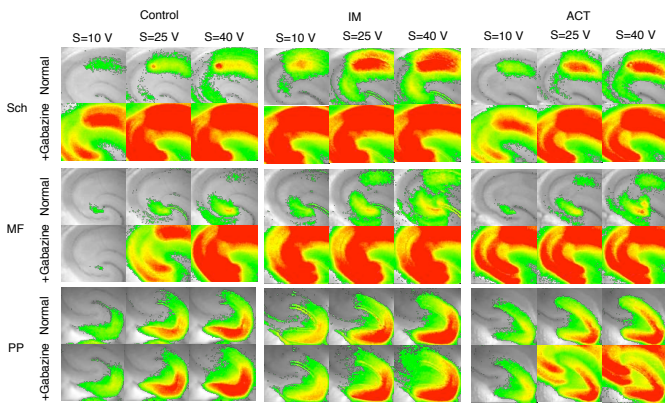
11



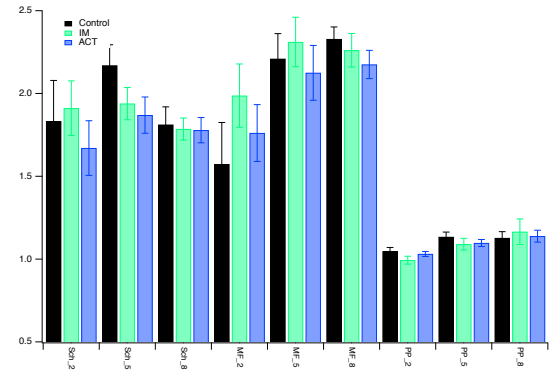
12

Tanemura & Tominaga, unpublished

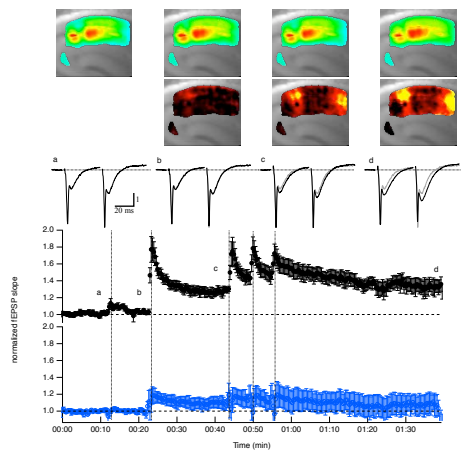




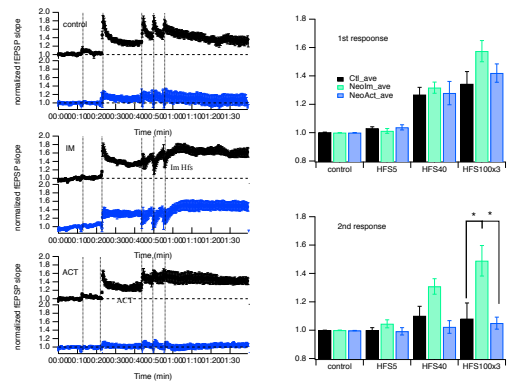
13



14

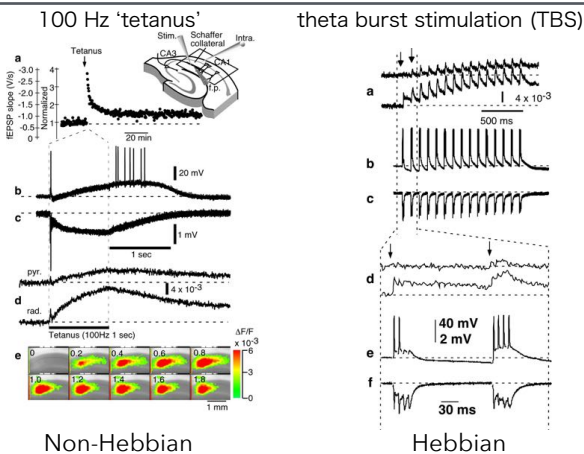


15



16

LTP induction stimulus



Non-Hebbian

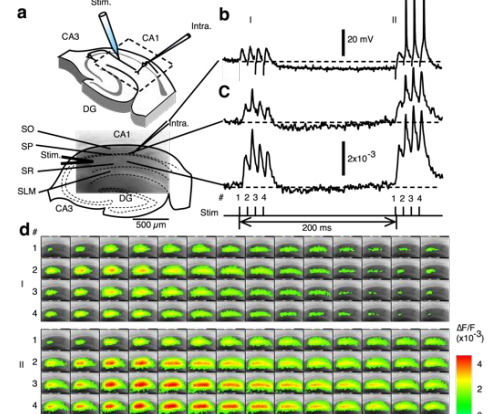
Hebbian

17

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

The first pair of the burst stimulation induced the facilitation

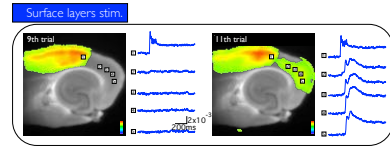
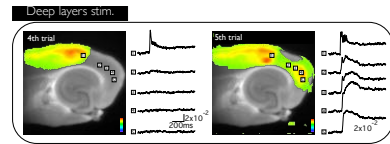
Paired burst facilitation (PBF)



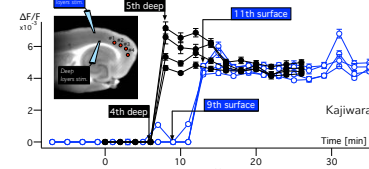
Tominaga & Tominaga, *Front Cell Neurosci.*, 2016

18

海馬以外はどうか？



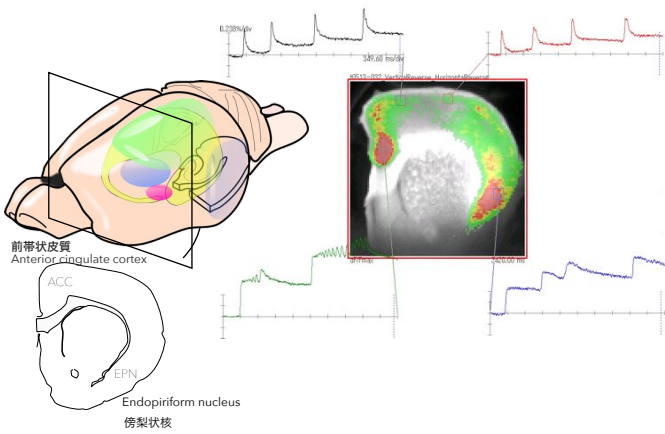
B Averaged maximum amplitude plot of the EC response at ROI #1-#4 in the picture.



Kajiwara, Tominaga, SFN2016, SanDiego

19

### Cortical oscillation

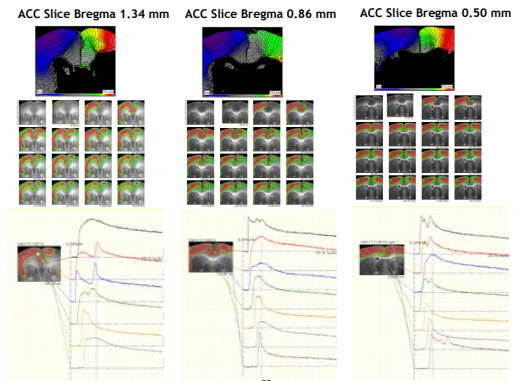


徳島大学 吉村先生のグループとの共同研究

21

### ANTERIOR CINGULATE CORTEX (ACC)

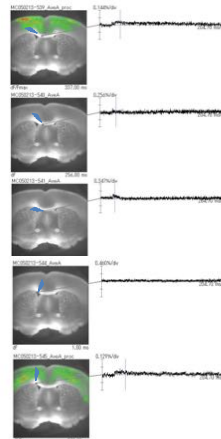
The anterior cingulate cortex (ACC) lies in a unique position in the brain, with connections to both the "emotional" limbic system and the "cognitive" prefrontal cortex. Thus, the ACC likely has an important role in integration of neuronal circuitry for affect regulation and can be identified as a distinctive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



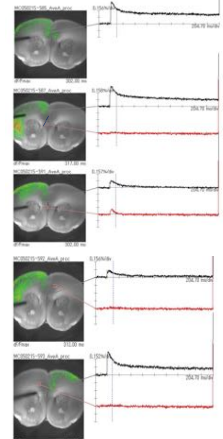
22

### ANTERIOR CINGULATE CORTEX (ACC)

Different Stimulation Points (no

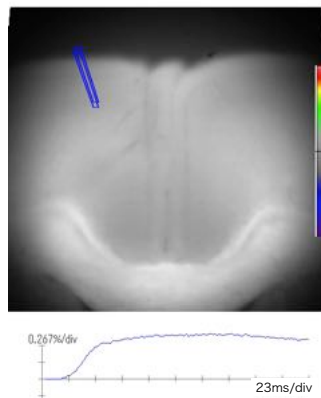
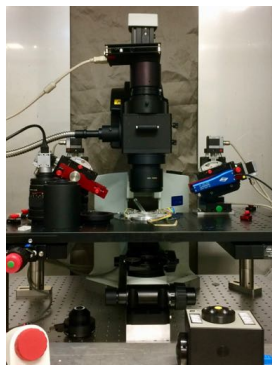
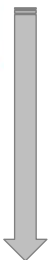


Stimulation After Cutting



Before Cut

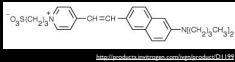
After Cut



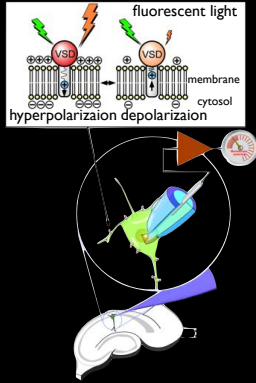
23

24

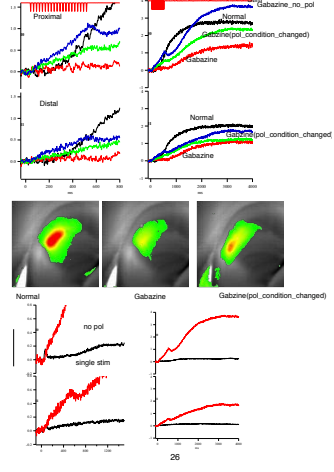
# Voltage Sensitive Dye (VSD) imaging



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



# Fastest recording of intrinsic signal !



光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

計測できた遅発性神経毒性

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



指標としてわかりやすい(計測しやすい)活動はどれか？

抑制系の関与する短期可塑性 E/I

シータリズムなど特定の周期活動に依存した可塑性

海馬以外のモデルとなる神経回路の設定

発生時期ごとの応答の計測

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学一般-007）

分担研究課題名

「国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探索に関する研究」

研究分担者

菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員）

【研究要旨】

本研究班において得られた神経行動毒性所見、神経科学的所見ならびに分子生物学的な所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法について、国際的会合に出席し、情報発信した。その内容は、興味深く受け入れられた。国際的に、このような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。

A. 研究目的

情動認知行動異常を呈したマウスにエピゲノム異常が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかに関する OECD 対応、および国内外の情報を収集する。

B. 研究方法

B-1 情報収集：

OECD 内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合：今年度は 2017 年 5 月 17 日～20 日、パリでの第 6 回会議に出席した。2017 年 10 月 4～5 日開催の第 7 回は日程等の都合により、国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・広瀬明彦部長が出席し、同氏より情報を得た。2017 年 8 月 13～18 日に Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA, 2017 年 10 月 15～18 日に the 8<sup>th</sup> National Congress of Toxicology (V-III CSOT)、Jinan, China, 2017 年 12 月 04 日に Endocrine Disruption Strategies Workshop、Raleigh, North Carolina, USA, 2017 年 12 月 12 日に環境ホルモン学会第 20 回研究発表会、神戸、2018 年 3

月 24 日に The 33th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, Taiwan, に出席し、本研究班における成果の一部を情報発信するとともに情報収集を行った。

（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、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、その指針を遵守している。（国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程（平成 27 年 4 月版）及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行った。

C. 研究結果

C-1 情報収集：

第 6 回 OECD 内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（2017 年 5 月 17 日～20 日、パリ）において、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を、その背景と共に口頭発表し、情報交換を行った。現状では、標準化が行われる段階に到達していない問題が明らかとなり、本研究の先行研究で開発した機材の

有用性を強調した。

第7回 OECD 内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合 2017年10月4～5日は、広瀬明彦・、安全性予測評価部長が出席し、主に環境関係の論議がなされたとの報告を受けた。

Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA (2017年8月13～18)において、同会長からの招致をうけ、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を口頭発表し、情報交換を行った。評価が高く、2年後の開催に向けて、企画への参画を要請された。

The 8<sup>th</sup> National Congress of Toxicology (V-III CSOT), Jinan, China (中国毒理学会学術年会 2017年10月15～18日)に招致され、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を基調講演として口頭発表し、情報交換を行った。1,500人ほどの参加者には若い毒性学者が多く含まれ興味を引いた。

Endocrine Disruption Strategies Workshop、Raleigh, North Carolina, USA (2017年12月04日)に全体講演者として招致され、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を口頭発表し、情報交換を行った。従来の内分泌かく乱という枠組みに収まらない中枢神経毒性という視点を強調し、所定の反響を得た。

環境ホルモン学会第20回研究発表会、神戸(2017年12月12日)にて、特別講演を行い、本研究班の成果である情動認知行動試験の成果を中心に口頭発表し、情報交換を行った。人における事例との類似性についての論議がなされた。

The 33<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, Taiwan (台湾毒理学会、2018年3月24日)に、本研究班の成果を中心に、特別講演を行う予定である。

#### D. 考察

本研究班において得られた分子生物学的な所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられ、高評価を得たと判断できた。国際的に、このような情報のリスク評価への適応については、そ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。

また、当研究班の成果は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。

#### E. 結論

当研究班の研究計画、成果ともに一定の評価を得た。今後の展開が期待された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌

1. Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A., (2017) Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol.
2. Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

##### 2. 学会発表

<国内学会>

1. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA
2. Jun Kanno, Nanomaterial respiratory toxicity monitored in rats after whole body inhalation. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018.1.26) 沖縄、シンポジウム
3. 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第20回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演
4. Jun Kanno, Broadening Perspective

from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary

5. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote.

6. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017.9.13) poster

7. Percellome Toxicogenomics Project for Mechanism-Based Toxicity Prediction. Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura. Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA (2017.8.17)

#### 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。

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

著書 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K.	Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity.	Biochem Biophys Res Commun.	498(3):	674-679	2018
Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H.	Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA.	J Vet Med Sci.	80(3)	536-543	2018
Saito H, Hara K, Tanemura K.	Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice.	Reprod Toxicol.	74	108-115	2017
Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB.	Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence.	Sci Rep.	7(1)	6815	2017
Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara K, Tanemura K.	Effects on glyocalyx structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation.	J Reprod Dev.	63(5)	473-480	2017

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Ling W, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C.	Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse.	PLoS One	12(8)	e0183497.	2017
Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K.	Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. JCI Insight.	JCI Insight.	2(10)	pii: 88609.	2017
Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C.	Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse.	J Toxicol Sci.	42(1)	25-30	2017
Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K.	New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells.	Cell Biol Toxicol.	Epub ahead of print		2018



Kawamura Y, Katada S, Noguchi H, Yamamoto H, Sanosaka T, Iihara K, Nakashima K.	Synergistic induction of astrocytic differentiation by factors secreted from meninges in the mouse developing brain.	FEBS Lett.	591	3809–3720	2017
Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K.	DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells.	Cell Reports	20	2992–3003	2017
Kimura A, Matsuda T, Sakai A, Murao N, Nakashima K.	HMGB2 expression is associated with transition from a quiescent to an activated state of adult neural stem cells.	Dev Dyn.	247	229–238	2018
Zhu Y, Uezono N, Yasui T, Nakashima K.	Neural stem cell therapy aiming at better functional recovery after spinal cord injury.	Dev Dyn.	247	75–84	2018
Honda M, Nakashima K, Katada S.	PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells.	J Neurochem.	142	901–907	2017

Kameda T, Imamura T, Nakashima K.	Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration.	Cell Tissue Res.	371	189-199	2018
Yasui T, Uezono N, Nakashima H, Noguchi H, Matsuda T, Noda-Andoh T, Okano H, Nakashima K.	Hypoxia Epigenetically Confers Astrocytic Differentiation Potential on Human Pluripotent Cell-Derived Neural Precursor Cells.	Stem Cell Reports	8	1743-1756	2017
Brulet R, Matsuda T, Zhang L, Miranda C, Giacca M, Kaspar BK, Nakashima K, Hsieh J.	NEUROD1 Instructs Neuronal Conversion in Non-Reactive Astrocytes.	Stem Cell Reports	8	1506-1515	2017
Uesaka M, Agata K, Oishi T, Nakashima K, Imamura T.	Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals.	BMC Genomics	18	285	2017

<p>Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A.</p>	<p>Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop.</p>	<p>Regul Toxicol Pharmacol</p>	<p>91 Suppl 1</p>	<p>S3-S13</p>	<p>2017</p>
<p>Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J.</p>	<p>Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration.</p>	<p>J Toxicol Sci.</p>	<p>42</p>	<p>121-128</p>	<p>2017</p>