

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

(H30-化学-一般-003)

分担研究課題名

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

研究分担者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量ばく露による遅発性中枢神経系への影響を検討する。令和2年度は、発生-発達期にかけてのアセフェートの低用量長期飲水投与による成熟後の行動影響の性差について検討した。その結果、発生（胎生 11.5 日）-発達期（生後 2 週）にかけてのアセフェート（妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続）の低用量長期飲水投与（用量：0.3 ppm、10 ppm、300 ppm）による、成熟後の行動影響の性差検討から、オープンフィールド試験では、雄における中央滞在率がコントロール群に対して高用量群で有意に減少したが、雌では有意差はみられなかった。また、明暗往来試験では、雌雄ともにすべての項目で有意差はみられなかった。一方、条件付け学習記憶試験では、雄における条件付け試験の際、コントロール群に対する低用量群のフリージング率が有意に減少していた。

さらに、発生-発達期暴露による遅発性（成熟後）の行動様式の影響と海馬における遺伝子発現様式についてのデータベース化については、先行研究（H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007）による成果を併せて、20 種（化学物質・用量・投与様式）についてデータベース化を進めた。

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

A. 研究目的

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

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

令和2年度は、発生-発達期にかけてのアセフェ

ートの低用量長期飲水投与による成熟後の行動影響の性差について検討した。さらに、発生-発達期暴露による遅発性（成熟後）の行動様式の影響については、先行研究(H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007)による成果を併せて、20種（化学物質・用量・投与様式）についてデータベース化を進めた。

B. 研究方法

マウス、被検物質および投与方法

実験の概要は図1に示した。アセフェート(Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, ON, Canada)は、1000 mLのメディウム瓶中で水道水に溶かし、マウス飼育用の給水ビンに分注した。マウスは、胎生11.5日(E11.5)のC57BL/6N雌マウスを日本SLC(Shizuoka, Japan)から購入し、コントロール群と、3つのアセフェート暴露群(用量:0.3 ppm、10 ppm、300 ppm)の合計4つに分けた。アセフェートの用量については、FAO/WHO合同残留農薬専門家会議(JMPR)におけるアセフェートのADIである0.03 mg/kg/dayに基づき、これに相当する0.3 ppmを低用量群、10 ppmを中用量群、300 ppmを高用量群とした。暴露期間はE11.5から産仔が2週齢となるまで、母マウスに飲水投与を行った。産仔は4週齢で離乳し、その後11週齢までは1ケージにつき4匹ずつ飼育した。その後、個飼いケージに移し、行動解析室で1週間のハビチュエーションを設けた。行動試験は生後12週~13週齢時に行ったが、使用するマウスは同腹仔が2~3匹となるように選択した。産仔の体重は生後3週齢から行動試験に供試するまでの1週間ごと、および行動試験の終了後に測定した。マウスは餌と水を自由に摂取でき、適切な温度(24 ± 1 °C)、湿度(60 % ± 10 %)、および明暗条件(12時間サイクル)が維持された飼育室で飼育した。マウスの管理および使用については、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に従った。いずれの性のマウスも離乳後、4匹/ケージ

にて飼育した。1 オープンフィールド試験 (OF)、明暗往来試験 (LD)、条件づけ学習記憶試験 (FZ) を含む行動試験バッテリーを実施した (図 2)。画像解析ソフト (Image OF2, Image LD2, and Image FZ2; O' Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan) は、ImageJ プログラムを使用して開発された。すべての試験は、各群 10 匹の雄マウスを用いて順次行われ、11 時~15 時の間に実施した。実験はオーディオスピーカーと光源を備えた防音箱 (78 × 63 × 65 (H) cm、白色・木製) の中で行った。行動試験中のバックグラウンド・ノイズは約 50 dB に設定した。行動試験中、各試行が終了するたびに、装置の汚れを拭き取り、洗浄した。OF: 装置は (50 × 50 × 30 (H) cm、白色・プラスチック製) を用い、マウスの自発運動量を 10 分間測定した。また、LED 照明を装置の中心より約 50 cm 上方に配置した (装置中央の照度が 25 Lux になるよう設定した)。マウスの行動は、オープンフィールド中央の上方に配置された CCD カメラを用いて測定した。各行動パラメータは Image OF2 によって測定した。LD: 装置は、開口部 (3 × 5 cm) が設けられた壁によって 2 つの部屋に分割された構造 (21 × 42 × 25 (H) cm、プラスチック製) であり、一方の部屋は照度を 250 Lux に設定した白色の明室、もう一方の部屋は照度を 5 Lux に設定した黒色の暗室である。マウスは 1 匹ずつ暗室に入れられ、試験開始から 60 秒後に開口部のドアを実験者の操作により開放し、以降の 5 分間開口部を通して 2 つの部屋を自由に移動させた。マウスの行動は、各部屋の上方にそれぞれ配置された CCD カメラを用いて測定した。行動パラメータは、不安関連行動の指標として Image LD2 によって測定した。FZ: 装置は、条件づけチャンバー (17 × 10 × 10 (H) cm、透明・プラスチック製) を用いた。条件づけチャンバーの底面は、直径 2 mm のステンレス製のグリッドが 5 mm 間隔に配置されており、マウスへ嫌悪刺激 (電気刺激) を与えることが可能である。チャンバーの内壁は白黒の縞模様をしたプラスチック製の囲いで覆った。LED 照明はチャンバーの約

50 cm 上方に配置し、フロア中央の照度が 50 Lux となるよう設定した。マウスの行動は、チャンバーの中心の上方に配置された CCD カメラで測定した。条件づけとして、マウスを個別に条件づけチャンバーに入れ、合計 3 回の音刺激と電気刺激 (30 秒間の音刺激 (65 dB)、音刺激の終わりの 3 秒間に 0.1 mA の電気刺激) を 120 秒間隔で提示した。その後、マウスをケージに戻した。2 日後、文脈条件付け試験として、音刺激および電気刺激を掲示せず、6 分間条件づけ時と同様のチャンバーに戻した。さらに 2 日後、音条件づけ試験として、マウスを新奇のチャンバー (17 × 10 × 10 (H) cm、白色・プラスチック製) に入れた。3 分後、条件づけ時に掲示した音刺激 (電気刺激なし) を 3 分間提示した。Image FZ2 により、マウスのすくみ反応 (フリーズング) を連続 2 秒間以上の不動時間として測定した。すくみ率 (フリーズング率) (%) は、[すくみ時間/実験時間] × 100 として計算した。各群の比較にはスチューデントの t 検定、またはダネットの多重比較検定を用いた。p < 0.05 を統計的に有意であるとした。

さらに、発生-発達期暴露による遅発性 (成熟後) の行動様式の影響と海馬における遺伝子発現様式についてのデータベース化については、先行研究 (H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007) による成果を併せて、20 種 (化学物質・用量・投与様式) についてデータベース化を進めた。

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

C. 研究結果

発生-発達期にかけてのアセフェートの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析と性差：実験期間中および行動試験前後において、コントロール群とアセフェート暴露群の体重に有意な差はなかった（図 3）。アセフェートに起因する振戦や歩行異常といった臨床的徴候は、投与期間中および投与後に観察されず、一般飼育環境下での異常行動は認められなかった。生後 12-13 週齢時にバッテリー式の行動解析（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験）を行った結果、オープンフィールド試験において、有意差はみられなかったものの、コントロール群と比較して、3 つのアセフェート暴露群では中央滞在時間が低下する傾向にあった（図 4B）。また、総移動距離（図 4A）や平均移動速度（図 4C）、移動回数（図 4D）では有意な差はみられなかった。明暗往来試験においては、すべての項目でコントロール群と 3 つのアセフェート暴露群の間に有意な差はみられなかった（図 5）。条件付け学習記憶試験においては、条件づけ試験の際、コントロール群に対する低用量群のフリージング率に大幅な低下傾向がみられた（図 6A, A'）。また、空間-連想記憶試験時のフリージング率は、すべてのアセフェート暴露群で低下傾向がみられたが、有意な差はなかった（図 6B, B'）。音-連想記憶試験時に関しては、低用量群および中用量群において、コントロール群と比較して、音刺激後に有意に低いフリージング率を示した（図 6C'）。また、高用量群については音刺激後に生じるフリージング率低下の傾向がみられなかった（図 6C）。

また、発生-発達期暴露による遅発性（成熟後）の行動様式の影響については、先行研究（H20-化学一般-009、H23-化学一般-004、H27-化学一般-007）による成果を併せて、20 種（化学物質・用量・投与様式）についてデータベース化を進めた（表 1、図 7-29:菅野、北嶋との共同研究）。

D. 考察

発生-発達期にかけてのアセフェートの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析と性差：マウスは通常、オープンフィールド試験のような広い新奇環境におかれた場合、立ち上がり行動や歩行を繰り返して探索行動を行うが、この際、壁に触れながら装置内の周辺部をより好んで歩行する行動パターン（接触走性）を示す。すなわち、マウスが不安を感じるほど装置中央部への探索行動は少なくなる。したがって、コントロール群に対するアセフェート暴露群の、中央滞在時間の低下傾向は、新奇環境に対する不安の高まりによるものであると考えられた（図 4B）。また、総移動距離（図 4A）、平均移動速度（図 4C）、移動回数（図 4D）では、4 群の間に差がみられないことから、アセフェート暴露群は自発運動量には極端な変化が生じずに、不安関連行動が増加していることが示された。明暗往来試験では、マウスは暗い場所を好み、明るい場所を嫌う習性のため、不安惹起物質を投与すると明室での探索行動や滞在時間が減少し、逆に、抗不安薬を投与すると明室でのこれらの指標は増加するとされている。しかし、明暗往来試験を利用した不安関連行動の検出（図 5）では、アセフェートを暴露したすべての群で有意差がみられなかった。これについて、明確な行動として現れなかったものの、明室移動距離（図 5A）や転室回数（図 5C）がコントロール群よりもアセフェートを暴露したすべての群でわずかに増加していたことから、警戒心の低下や衝動性の増加傾向を示している可能性が考えられた。条件付け学習記憶試験においては、コントロール群に比べ、条件づけ時のフリージング率が低用量群で大幅な低下傾向にあり（図 6 A'）、経時的変化の結果から短期記憶の形成に異常が生じている可能性が考えられた（図 6A）。空間-連想記憶試験時のフリージング率は、コントロール群とすべてのアセフェート暴露群の間に有意な差はみられな

かったが(図 6B'),嫌悪刺激の想起によるフリージング率の上昇およびその後のフリージング率は、すべてのアセフェート暴露群で低い傾向にあり、特に高用量群で低い結果となった(図 6B)。したがって、アセフェートの暴露が空間-連想記憶に軽度の悪影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、音-連想記憶試験において、音刺激後の初期反応(1分間)におけるフリージング率はコントロール群と比べて低用量群および中用量群で有意に低かった(図 6C')。この試験では通常、音刺激直後にフリージング率が上昇するが、その後は条件刺激に対する慣れによって徐々にフリージング率が低下する。これは、条件刺激のみを繰り返し提示し続けると、条件刺激に対する反応が見られなくなるという行動パターン(消去)である。しかし、高用量群ではこの変化がみられず、音刺激後から試験終了時まで一定のフリージング率を保っていた(図 6C)。したがって、条件付け学習記憶試験で検出されたアセフェート暴露群の記憶異常には、用量による質的違いが生じていることが示唆された。

E. 結論

令和2年度は、本研究では、環境化学物質の発生-発達期暴露による生体影響を明らかにするため、ADIレベルの用量もふまえたアセフェートの暴露を行い、成熟後の雌雄マウスにおける行動様式への影響について検討した。即ち、この時期におけるアセフェートの暴露は、ADIレベルの用量でさえ、成熟後における異常な行動影響を惹起し、また、その異常には用量によって質的違いが現れることを示した。また、発生-発達期(周産期を含む)を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために引き続きデータを収集、解析結果をまとめることができた。今

後、行動影響や脳機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

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

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

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

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

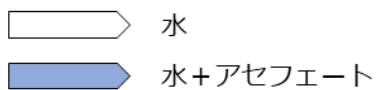
種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 26-28) 徳島市

G. 知的所有権の取得状況

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

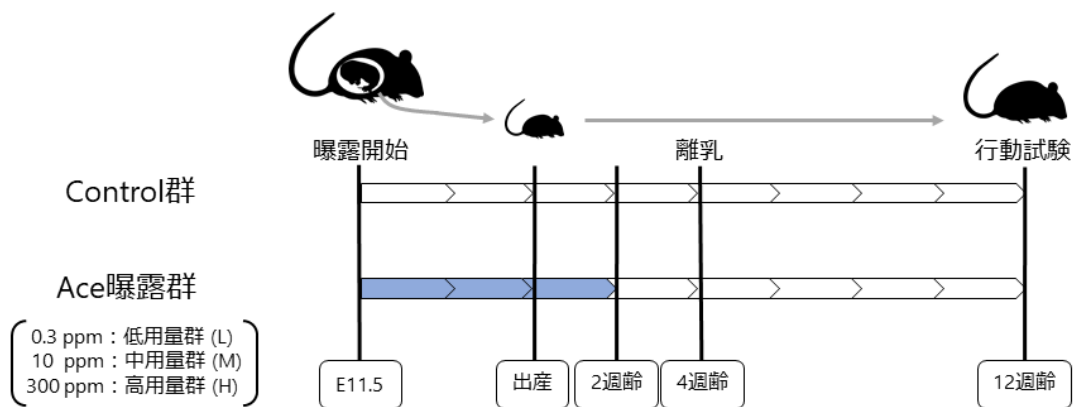
図 1. 実験スケジュールの概要

- ・ 供試動物：C57BL/6N
- ・ 投与方法：飲水投与
- ・ 投与物質：アセフェート
- ・ 溶媒：水



* 一日摂取許容量 (ADI)

ADI (mg/kg/day)
JMPR
0.03



* 1日あたりの摂取量 = L: 0.03mg/kg/day (ADIレベル)、M: 0.10mg/kg/day、H: 30mg/kg/day

図 2. 各行動試験の概要

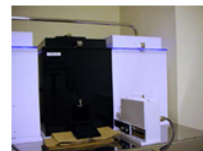
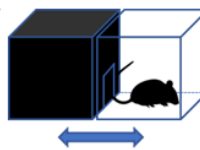
【オープンフィールド試験 (OF)】

マウスの新奇環境下における自発運動量や活動量、一般行動を測定する。



【明暗往来試験 (LD)】

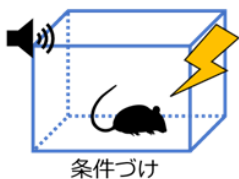
明室と暗室の2部屋で構成される装置にマウスを入れ、各部屋における移動距離や滞在時間を不安関連行動の指標として測定する。



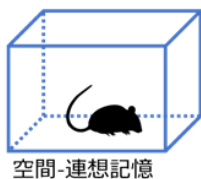
【条件づけ学習記憶試験 (FZ)】

音刺激（条件刺激）と電気刺激（無条件刺激）を組み合わせた条件づけの後、空間-連想記憶および音-連想記憶を評価する。

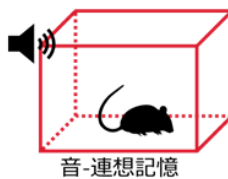
マウスがすくみ反応（フリージング）を示した時間を測定し、一定時間あたりのフリージング持続時間を記憶能力の指標として測定する。



条件づけ



空間-連想記憶



音-連想記憶



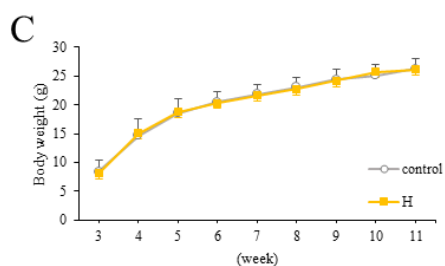
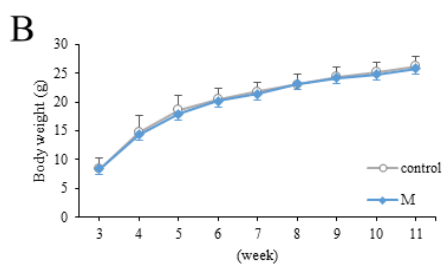
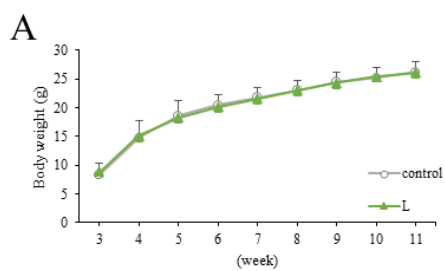
図 3. 産仔の体重変化

L: 低用量群、M: 中用量群、H: 高用量群

A. B. C) 各群における実験期間中の産仔 (3~11 週齢) の体重変化

D) 行動試験前後 (12 週齢および 13 週齢) における産仔の体重

Student's *t*-test, mean \pm S.D. $p < 0.05^*$ vs control. $n = 10$



D

Treatment groups	Body weight (g)	
	Before behavioral battery test	
	12w	13w
control	27.10 \pm 1.75 (n=10)	28.12 \pm 2.24 (n=10)
L	26.87 \pm 1.07 (n=10)	28.36 \pm 1.34 (n=10)
M	26.62 \pm 1.27 (n=10)	27.67 \pm 0.96 (n=10)
H	26.63 \pm 1.36 (n=10)	28.12 \pm 1.35 (n=10)

図4. オープンフィールド試験の結果 (OF)

L: 低用量群、M: 中用量群、H: 高用量群

A) 総移動距離、B) 中央滞在時間、C) 平均移動速度、D) 移動回数

Dunnett's multiple comparisons test, mean \pm S.E. $p < 0.05^*$ vs control. $n = 10$

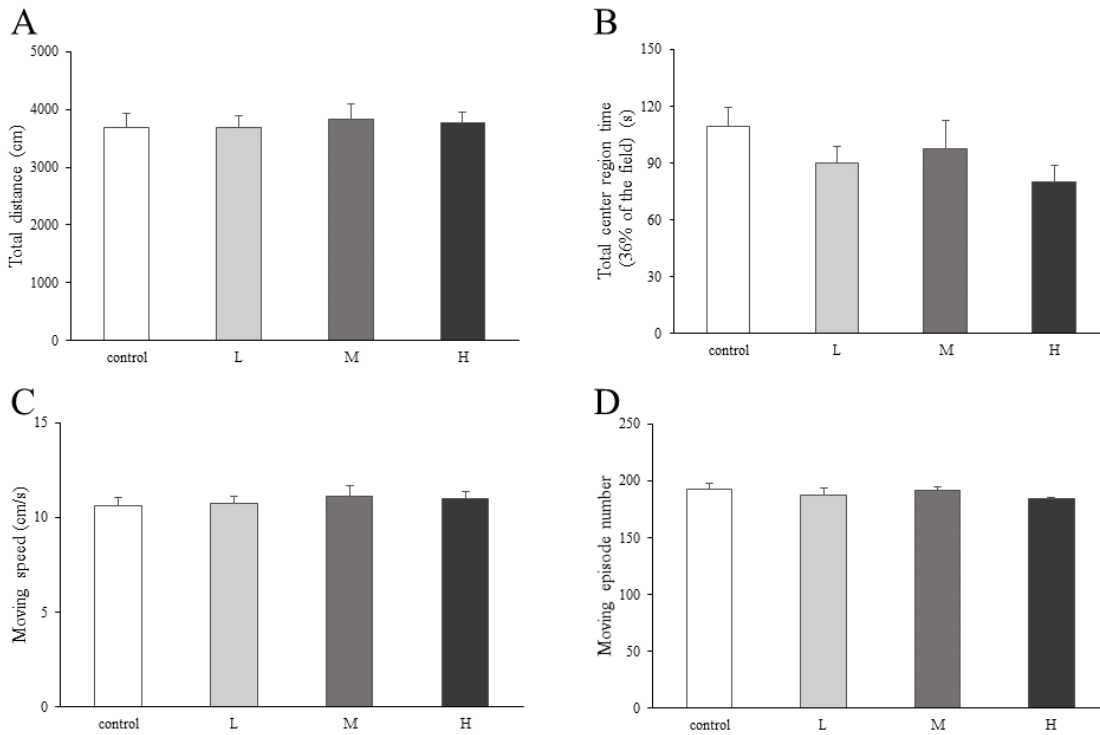


図 5. 明暗往来試験の結果 (LD)

L : 低用量群、M : 中用量群、H : 高用量群

A) 明室移動距離、B) 明室滞在時間、C) 転室回数、D) 暗室待機時間 (明室へ初めて入るまでにかかった時間) Dunnett's multiple comparisons test, mean \pm S.E. $p < 0.05^*$ vs control. $n = 10$

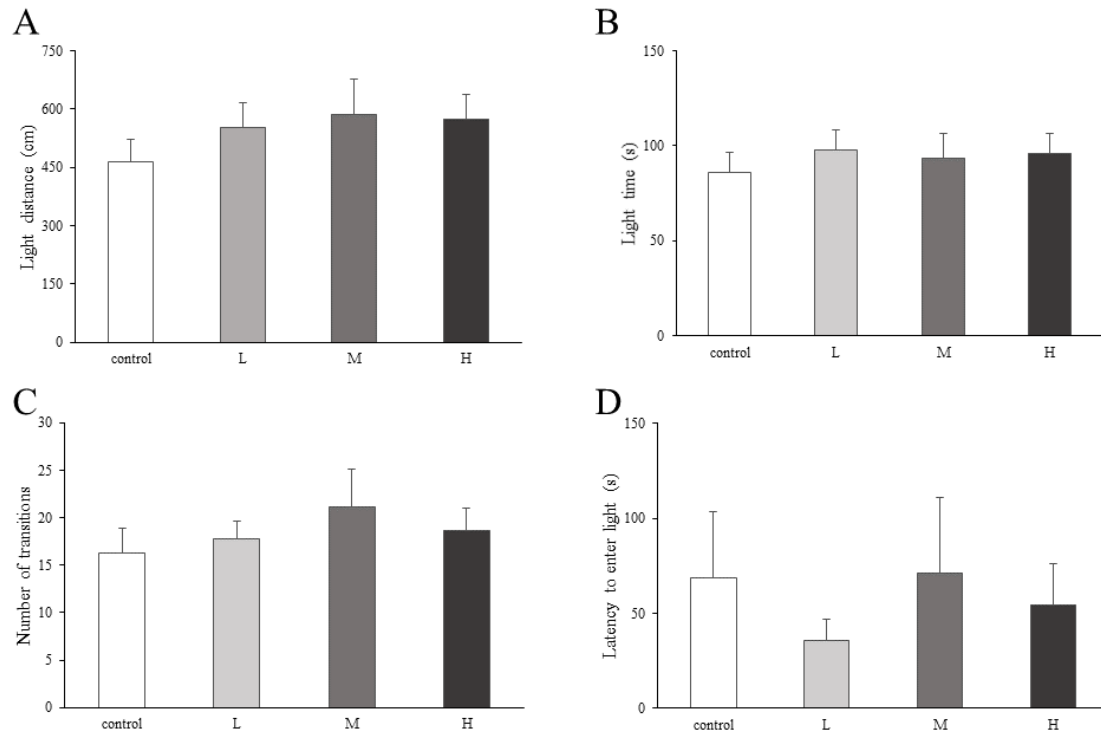


図 6. 条件づけ学習記憶試験 (FZ) の結果

L : 低用量群、M : 中用量群、H : 高用量群

A) 条件づけ時のフリージング率の経時的変化

A') 条件づけ時のフリージング率 (6 分間) の比較

B) 空間-連想記憶試験時のフリージング率の経時的変化

B') 空間-連想記憶試験時のフリージング率 (6 分間) の比較

C) 音-連想記憶試験時のフリージング率の経時的変化

C') 音-連想記憶試験時のフリージング率 (初期反応) の比較

Dunnett's multiple comparisons test, mean \pm S.E. $p < 0.05^*$ vs control. n = 10

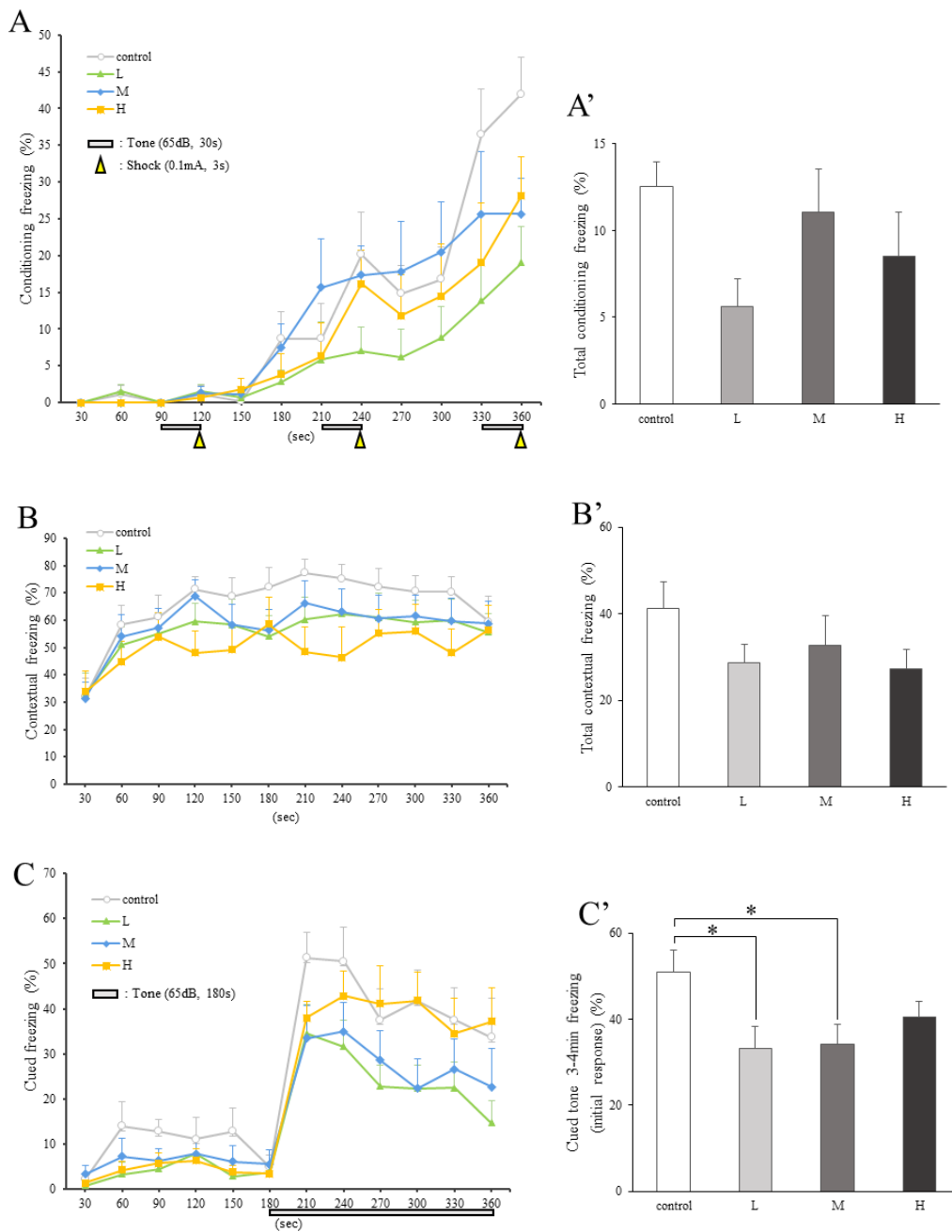


表 1 : 化合物・投与時・投与方法・投与濃度

No	化合物	投与時期	行動解析週齢	投与方法	濃度
1	トリアゾラム	胎生期 (E14)	1 2 ~ 1 3	単回/経口	1mg/kg
2	トリアゾラム	幼若期 (P14)	1 2 ~ 1 3	単回/経口	1mg/kg
3	トリアゾラム	成熟期	1 2 ~ 1 3	単回/経口	1mg/kg
4	アセタミプリド	幼若期 (P14)	1 2 ~ 1 3	単回/経口	10mg/kg
5	アセタミプリド	成熟期	1 2 ~ 1 3	単回/経口	10mg/kg
6	イミダクロプリド	幼若期 (P14)	1 2 ~ 1 3	単回/経口	8mg/kg
7	イミダクロプリド	成熟期	1 2 ~ 1 3	単回/経口	8mg/kg
8	アセタミプリド	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.01mg/kg/day
9	イミダクロプリド	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.01mg/kg/day
10	ニコチン	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.01mg/kg/day
11	アセタミプリド	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.1mg/kg/day
12	イミダクロプリド	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.1mg/kg/day
13	ニコチン	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.1mg/kg/day
14	BPA	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.5mg/kg/day
15	MBMTBP	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.5mg/kg/day
16	BBMTBP	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	0.5mg/kg/day
17	TBTC	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	2.5µg/kg/day(Low)
18	TBTC	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	25µg/kg/day(Middle)
19	TBTC	周産期 (E11-P28)	1 2 ~ 1 3	飲水	250µg/kg/day(High)
20	ERaKI_13w	-		-	-
21	ERbKI_13w	-		-	-

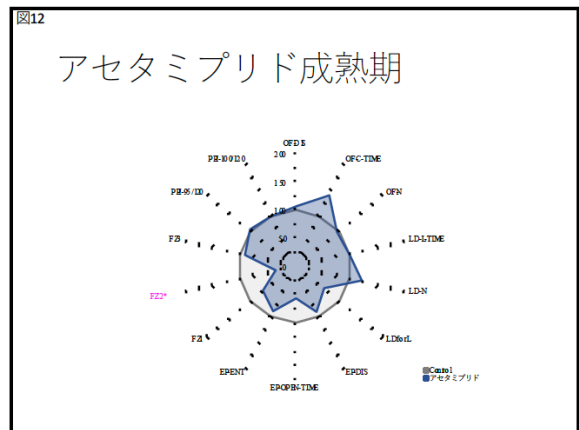
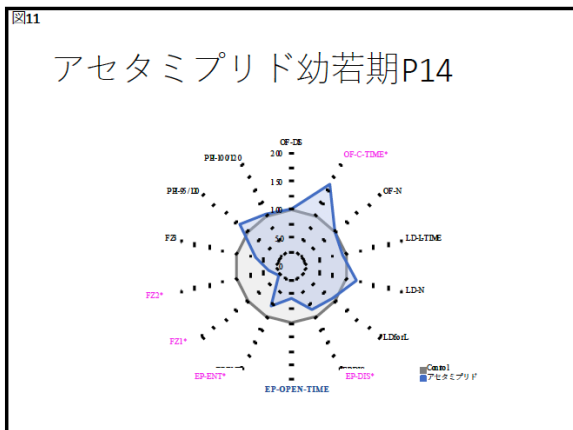
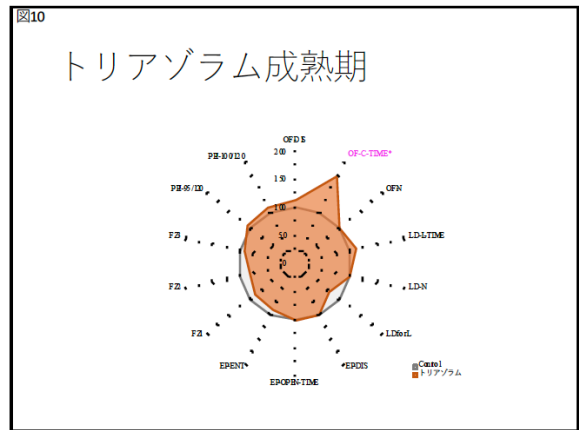
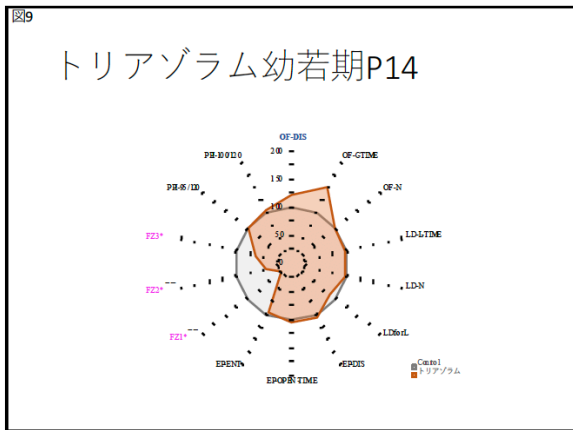
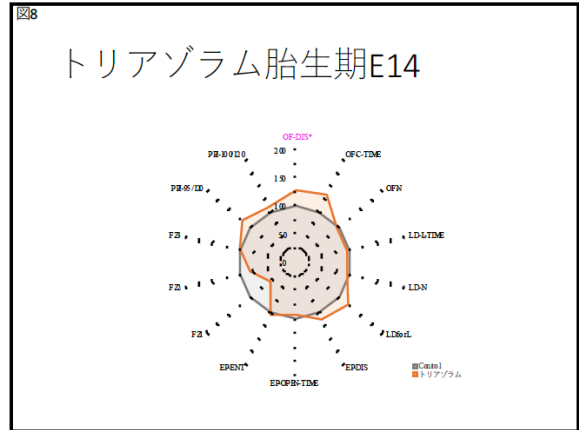
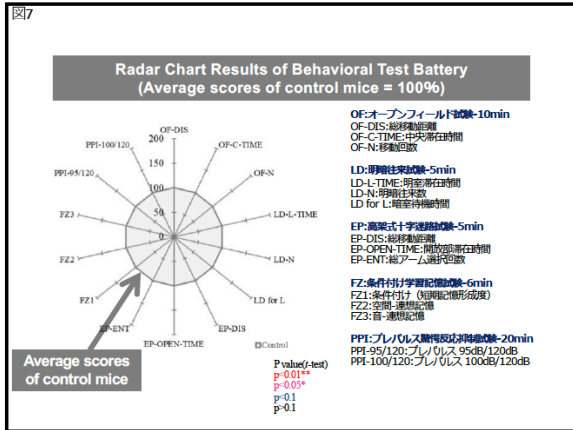


図13

イミダクロプリドP14

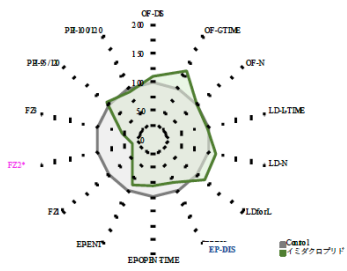


図14

イミダクロプリド成熟期

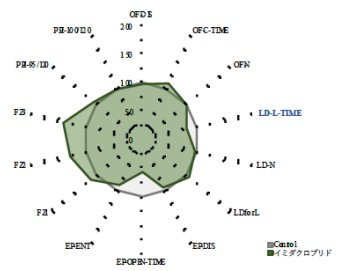


図15

アセタミプリド周産期0.01

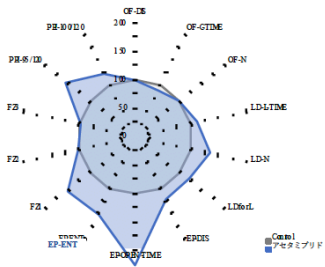


図16

イミダクロプリド周産期0.01

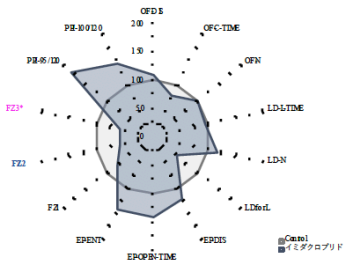


図17

ニコチン周産期0.01

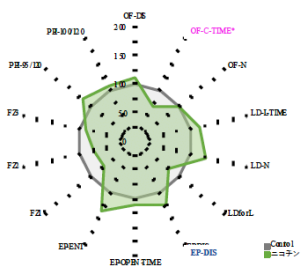


図18

アセタミプリド周産期0.1

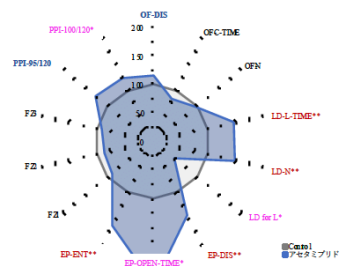


図20

イミダクロプリド周産期0.1

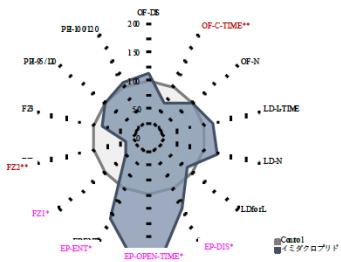


図21

ニコチン周産期0.1

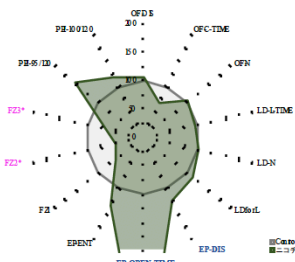


図22

BPA周産期0.5

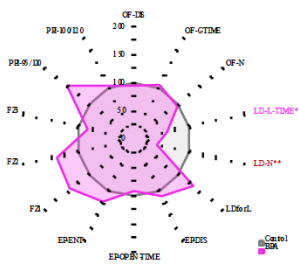


図23

MBMTBP周産期0.5

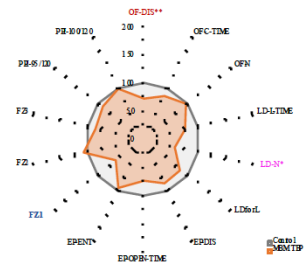


図24

BBMTBP周産期0.5

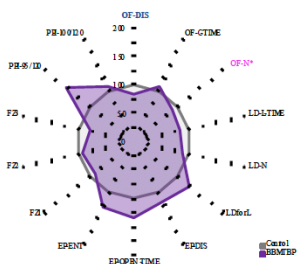


図25

TBTC周産期2.5

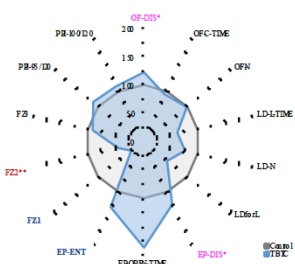


图26

TBTC周産期 2 5

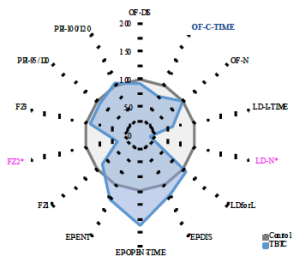


图27

TBTC周産期 2 5 0

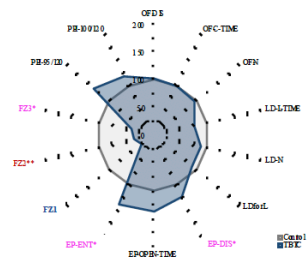


图28

ERaKI(Homo)_13w

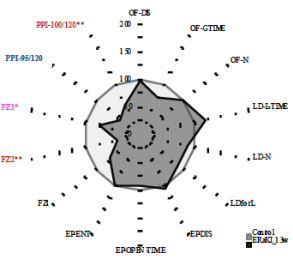
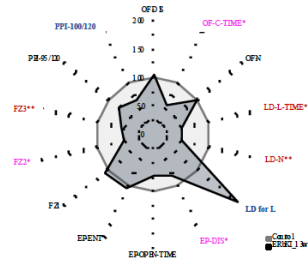


图29

ERbKI(Homo)_13w



令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

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

(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「液性因子影響（神経内分泌）に関わる脳内分子の定量解析」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・予防医科学・応用生理学研究室・教授）

【研究要旨】

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

A. 研究目的

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することを目指している。本年度は、血液・唾液中の小分子 RNA の抽出解析技術を構築することを目的として研究を進めた。低分子 RNA (small RNA) は、miRNA を含む 25 塩基前後のタンパク質へ翻訳されない RNA の総称である。他の RNA の転写や翻訳などに関わるなど生体機能に関わるものがあることがわかってきた。有名な miRNA の場合、ヒトでは約 2600 個が同定されており、1 個あたり平均 200 個の mRNA を標的にしている、すなわち 5 割以上のヒトヒト遺伝子の働きを調整・制御しているとされている。がんや心臓疾患など疾患発症に関わるものも見出され、核酸医薬として臨床応用の検討が進んでいる。加えて、バイオマーカーとしての意義も期待が高い。通常 RNA は細胞内で作用し細胞外では速やかに分解されるが、低分子 RNA はエクソソームに保護された状態で細胞が能動的に分泌しており、別の細胞に作用することもわかっている。よって血液や唾液中には全身の細胞由来の低分子 RNA が存在する可能性があり、細胞の特徴的な活動や異常のバイオマーカーとなる可能性がある。例えばがん細胞だけが発現する低分子 RNA は、血液検査でがんの有無を特定するバイオマーカーとなる。

B. 研究方法

動物実験は早稲田大学所沢キャンパスにて行った。動物飼育・実験は温度管理された動物飼育・実験室で行った。自由に餌と水を得られる状態で飼育した(室温 22 ± 3 °C、湿度 40~70 %、明暗周期 12 時間(明期 8:00~20:00))。全ての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導と機関長承

認(総長:田中愛治)のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。

雄性 C57BL/6N マウスに対して、新生児期における母子分離 (maternal separation) 処置を行った。具体的には、母体あたり半数の雄仔動物を一日 3 時間、母親と引き離す処置を連日行った (MS 群, n=5)。残りの半数は母親と引き離さない対照動物 (Cont 群, n=5) とした。

全脳組織から RNA を抽出し、mRNA シーケンス解析を Illumina 社の Illumina Novaseq 6000 を用いて実施した。血中 miRNA 解析については、心採血により採血した血液から $300 \mu\text{l}$ の血漿を抽出した。H2O 本研究事業 (201035010B) において開発したワンチューブ法を用いて miRNA を精製、cDNA を作成した。qPCR で複製、蛍光法により CP 値を求め元となったサンプルに含まれていた miRNA の発現量を定量した。miR-191 の発現量と比較することでサンプルごとに各 miRNA の相対的発現量として算出した。

C. 研究結果

全脳 mRNA 発現解析では、検出された 29004 遺伝子のうち、321 遺伝子が発現変動遺伝子として抽出された。発現変動した 321 種類の mRNA を KEGG データベースを用いて、パスウェイ解析を行なったところ、 $p < 0.1$ を満たす以下 15 種類のパスウェイが検出された(表 1)。

血漿サンプル miRNA 発現解析の結果、13 種類の発現変動遺伝子が抽出された。そのうち mmu-miR-18a-5p、mmu-miR-8110、mmu-miR-135a-1-3p、mmu-miR-144-3p、mmu-miR-494-3p、mmu-miR-711、mmu-miR-8090 の 7 つの遺伝子は MS 群で発現亢進、mmu-miR-6934-5p、mmu-miR-3093-3p、mmu-miR-5622-3p、mmu-miR-770-3p、mmu-miR-7648-3p、mmu-miR-6370 の 6 つの miRNA で発現低下がみられた。また、これらの miRNA の脳サンプルでの発現を調べたところ、mmu-miR-18a-5p、mmu-miR-135a-1-3p、

mmu-miR-711、mmu-miR-8090 mmu-miR-6934-5p、
mmu-miR-3093-3p、mmu-miR-770-3p、 mmu-miR-
7648-3p、mmu-miR-6370 の 9 つの miRNA のシグナ
ル値はmmu-miR-8110はCont 群 72.14, MS 群 66.04,
FC=0.78、mmu-miR-144-3pはCont 群 6.70, MS 群
10.49, FC=0.84、mmu-miR-494-3pはCont 群 131.26,
MS 群 101.11, FC=0.88、mmu-miR-5622-3pはCont
群 28.98, MS 群 33.32, FC=1.02 であった。

D. 考察

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

今回の実験結果から、このうち 7 遺伝子について、モデルマウスと野生型マウスで発現量が異なることが明らかとなった。すなわち、これらの遺伝子群は新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後は、実際に化学物質暴露動物での検証を進めることが必要である。

加えて、miRNA 発現解析には多くの血漿量が要求される。現実には RNA のクオリティチェックに 9 割以上の試料が消費されてしまうため、本研究ではワンチューブ法による測定を実用化した。今後は NGS 解析を進めるためにもサンプル調製法を開発することが化学物質リスク研究の命題になるといえる。一般のライフサイエンスでは RNA 増幅等により少量サンプルからの解析を行っているが、定量性と再現性が確保されていない現行法では、量反応関係の検証が困難なためである。

E. 結論

本研究により、小分子 RNA の液性因子バイオマーカーとしての可能性が示された。リーズナブルな選定方法の開発、そして RNA 抽出及び解析法のブラッシュアップが急務である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

Horigane SI, Ozawa Y, Zhang J, Todoroki H, Miao P, Haijima A, Yanagawa Y, Ueda S, Nakamura S, Kakeyama M, Takemoto-Kimura S. A mouse model of Timothy syndrome exhibits altered social competitive dominance and inhibitory neuron development. *FEBS Open Bio.* 2020 Aug;10(8):1436-1446. doi: 10.1002/2211-5463.12924. PubMed PMID: 32598571 PMCID: PMC7396430.

ベナー聖子・掛山正心. 社会的隔離の動物モデル. *精神科.* 39:1-6, 2021.

2. 学会発表

鈴木健, 城宝大輔, 奥野浩行, 掛山正心. Decision-making task in mice toward in vivo fluorescence imaging. 第 43 回日本神経科学大会 (2020. 7. 29-8. 1) Web 開催.

城宝大輔, 鈴木健, 藤原昌也, 皆川栄子, 斉藤貴志, 西道隆臣, 掛山正心. Age-related cognitive functions of App knock-in mice in IntelliCage system. 第 43 回日本神経科学大会 (2020. 7. 29-8. 1) Web 開催.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表 1. パスウェイ解析の結果、検出した 15 種類のパスウェイ

Term	Count	%	PValue	FDR
mmu04925:Aldosterone synthesis and secretion	4	1.438848921	0.022230609	0.769939082
mmu04114:Oocyte meiosis	4	1.438848921	0.043625721	0.769939082
mmu04725:Cholinergic synapse	4	1.438848921	0.044598821	0.769939082
mmu05200:Pathways in cancer	7	2.517985612	0.057147066	0.769939082
mmu04923:Regulation of lipolysis in adipocytes	3	1.079136691	0.060431626	0.769939082
mmu04913:Ovarian steroidogenesis	3	1.079136691	0.060431626	0.769939082
mmu04810:Regulation of actin cytoskeleton	5	1.798561151	0.061768	0.769939082
mmu04611:Platelet activation	4	1.438848921	0.063933208	0.769939082
mmu04550:Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	4	1.438848921	0.07234759	0.769939082
mmu05031:Amphetamine addiction	3	1.079136691	0.080125247	0.769939082
mmu05161:Hepatitis B	4	1.438848921	0.08254308	0.769939082
mmu04918:Thyroid hormone synthesis	3	1.079136691	0.086377826	0.769939082
mmu04976:Bile secretion	3	1.079136691	0.088494251	0.769939082
mmu04971:Gastric acid secretion	3	1.079136691	0.090626262	0.769939082
mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway	6	2.158273381	0.098663745	0.769939082

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

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「脳神経回路イメージング解析」

研究分担者

富永 貴志（徳島文理大学・神経科学研究所・教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでの先行研究（H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007）で既に示したように膜電位感受性色素による回路測定は網羅的でありかつ検出感度が高いことがわかっている。これまでに発生初期の投与で異常を起こすバルプロ酸、ビスフェノール、農薬類（ネオニコチノイド等）暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出しているが、これまでに検出系の改良に取り組み、長時間の連続的な測定を可能なことを立証するため、よく知られた海馬回路シナプスの長期増強が光学的に連続的に検出可能であることを示した。また、さらに大規模な神経回路として嗅内野とその周辺皮質の信号伝達の長期可塑性について検出できることを示した。この手法で化学物質の回路機能への影響を検出する系を確立するため、TBT、ビスフェノール、ビスフェノール代替物質（BBMTBP、MBMTBP）の急性影響について、異なる発達段階（2週齢、8週齢）の海馬回路において検討し、それぞれ影響が検出可能であることを示した。またこの解析のソフトウェアを開発し、迅速に網羅的な解析を可能にした。また、平行して大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索し前帯状皮質（ACC）、傍梨状核（EPN）などのイメージング解析を行いその信号伝播パターンを明らかにした。さらに前頭前野（mPF）に着目し、系統的な計測により標準的な伝播パターンの計測を可能とした。また、無染色組織からの光信号の検出と解析を行っている。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を担保するものである。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
海馬スライス標本を作成し、膜電位感受性色素で染色後、専用のチャンバーにて ACSF で還流しながら 30 秒—1 分に 1 回のシャーフアー側枝に対する電子刺激に対する応答を、光計測ならびに電気生理学的手法で計測した。
適切なベースラインの測定後に 100Hz 1 秒のいわゆるテタヌス刺激かシータバースト様刺激を加え長期増強を起こし計測を継続した。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的変化の観察系の確立
上と同様のプロトコルで、より視野の広い特殊な光学系を用いて嗅内野を含む大きな回路での信号伝達を計測した。嗅内野と嗅周囲皮質の境界に着目し、その間の信号伝達を光計測法によって 1 分に 1 回の頻度で長い時間にわたって計測した。
- 3) トリブチルスズ TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
トリブチルスズ 40pM を海馬 CA1 でのシャ-

ーフアー側枝電気刺激に対する応答を 30 秒に 1 回ずつ計測しながら還流した。

- 4) ビスフェノール代替物質 (BBMTBP、MBMTBP) の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測 週齢の異なるマウス (オス) から海馬スライス標本を標準的な手法で作成し、ビスフェノール A (BPA), 4,4'-Butylidene-bis(6-tert-butyl-m-cresol) (BBMTBP), 2,2'-Methylene-bis(4-methyl-6-tert-butylphenol) (MBMTBP) 5ppm を還流した。CA1, CA3, DG 野に入力する入力繊維を 2 段階の刺激強度で刺激し、応答を記録した。また、同じスライス標本で GABA_A 受容体阻害薬の GABAZINE (10 μ M) を追加的に灌流しに応答を計測した。
- 5) 前帯状皮質 (ACC) を含む大きな皮質組織での光学計測解析法の確立 マウス脳のプレグマから前の前頭野を中心に、連続で前額断スライス標本を作成し、視野の大きな光学系で光計測した。刺激を系統的に加え、光計測された興奮伝播パターンを集積するソフトウェアを開発した。

C. 研究結果

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
専用のチャンバー内での計測は非常に安定で 12 時間以上もスライスの応答は良好に保たれた。また、光計測によるシナプス長期増強の観察に 12 時間以上にわたって成功した。この結果、CA1 回路の応答の変化を長期にわたって網羅的に解析することが可能になった。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的変化の観察系の確立
長時間の計測の結果、嗅周囲皮質から嗅内野への投射が、刺激のパターンによって可塑的に変化し長い時間保持されることがわかった。
- 3) TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
トリブチルスズ 40pM で生後 14 日のマウスから作成したスライスではわずかな応答の上昇が見られた。一方、生後 9—10 週のマウスではほとんど影響がみられなかった。その後、ドーズを増したところ応答に一貫性がなくなり TBT の実験系への吸着が疑われ

たので一旦急性投与実験を中断した。

- 4) ビスフェノール、ビスフェノール代替物質の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測の解析結果を図 1 に示した。図 1 は 2 週齢、8 週齢の動物群から作成した海馬スライス標本の CA1、CA3、DG の各領野の入力繊維 (Schaffer collateral, Mossy fiber, Perforant path) に 2 種類の異なる刺激強度で刺激を加えた時の VSD 信号で捉えた応答の最大強度を各画素に投射して示した図である。それぞれ、コントロールの ACSF に対して 5ppm の BPA、BBMTBP、MBMTBP を負荷した時の応答を示しており、左側は GABAA 受容体阻害薬を含まない時、右側 (Gabazine) は含む時を示している。Gabazine を付加すると応答の大きさは大きくなるがその大きくなり方は、部位ごと、刺激強度条件によって異なり、コントロール条件に比べ明らかに変わっているものが見られる。図 2 は同じデータで、VSD 信号の時間積分値を投射した図である。これらのイメージデータはそれぞれ 5-6 スライスからの平均値を示している。これらの値を、各領野ごとの代表値で棒グラフにしたものが図 3、4 である。それぞれコントロールに対して、有意に差が見られた実験群に (*) をつけた。これで見ると、Gabazine を負荷した場合には多くの群で有意な差が現れること、2 週齢の動物よりは 8 週齢の動物の方が若干大きな差が見られることがわかる。また、BPA よりも BBMTBP、MBMTBP の方が影響が大きいことが明らかである。
- 5) 前帯状皮質 (ACC) を含む大きな皮質組織での光学計測解析法の確立
光学系の最適化によって 1cm 角にせまる視野で安定な光学計測が可能になり、ACC での発振や ACC を介した脳半球間の情報伝達の観察が可能となった。計測結果を、アトラス情報と照合して、興奮伝播パターンのカテゴリ化を可能とした (図 5)。

D. 考察

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

物質の影響について調べていく。最後のビスフェノール群の検定で見たように海馬での影響が異なる Age 群で網羅的に示されたことはこの手法の有用性を示している。

さらに、上記のような定量的な計測を前頭前野に広げ、これまで以上に確度の高い毒性検討が網羅的に示せるようにした。

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

- 論文発表
- 書籍
- 雑誌
- 1 Kajiwara R, Tominaga T. Perirhinal cortex area 35 controls the functional link between the perirhinal and entorhinal-hippocampal circuitry. *Bioessays* [Internet]. 2021;43(3):2000084. Available from: <https://authorservices.wiley.com/api/pdf/fullArticle/16925312> PMID: 33236360
- 2 Ishida M, Hori M, Ooba Y, Kinoshita M, Matsutani T, Naito M, Hagimoto T, Miyazaki K, Ueda S, Miura K, Tominaga T. A Functional Aqp1 Gene Product Localizes on The Contractile Vacuole Complex in Paramecium multimicronucleatum. *J Eukaryot Microbiol.* 2021;e12843. PMID: 33501744
- 3 Kawano M, Tominaga T, Ishida M, Hori M. Roles of Adenylate Cyclases in Ciliary Responses of Paramecium to Mechanical Stimulation. *J Eukaryot Microbiol.* 2020;67(5):532-540. PMID: 32379929
- 4 Luyben TT, Rai J, Li H, Georgiou J, Avila A, Zhen M, Collingridge GL, Tominaga T, Okamoto K. Optogenetic Manipulation of Postsynaptic cAMP Using a Novel Transgenic Mouse Line Enables Synaptic Plasticity and Enhances Depolarization Following Tetanic Stimulation in the

- Hippocampal Dentate Gyrus. *Front Neural Circuit.* 2020;14:24. PMID: 32581725
- 5 Hayase Y, Amano S, Hashizume K, Tominaga T, Miyamoto H, Kanno Y, Ueno-Inoue Y, Inoue T, Yamada M, Ogata S, Balan S, Hayashi K, Miura Y, Tokudome K, Ohno Y, Nishijo T, Momiyama T, Yanagawa Y, Takizawa A, Mashimo T, Serikawa T, Sekine A, Nakagawa E, Takeshita E, Yoshikawa T, Waga C, Inoue K, Goto Y, Nabeshima Y, Ihara N, Yamakawa K, Taya S, Hoshino M. Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility. *Acta Neuropathologica Commun.* 2020;8(1):206. PMID: 33256836
 - 6 Tominaga T, Kuhn B. Cutting-edge brain research from a biophysical perspective: symposium synopsis of Session 1SCP at BSJ2019 in Miyazaki, Kyushu, Japan. *Biophysical Rev.* 2020;12(2):261–262. PMID: 32056112
 - 7 Koike-Tani M, Tominaga T, Oldenbourg R, Tani T. Birefringence Changes of Dendrites in Mouse Hippocampal Slices Revealed with Polarizing Microscopy. *Biophys J.* 2020;118(10):2366–2384. PMID: 32294480
4. 富永 貴志、梶原 利一、富永 洋子「単回頻回の膜電位感受性色素 (VSD) による広視野可視化法 は神経回路の特異な活動や振動現象の発見に役立つ」第 43 回日本神経科学大会 (神戸、オンライン) 2020 年 7 月 29 日–8 月 1 日 口頭発表
 5. 富永 貴志, 富永 洋子 「VSD イメージングによる神経回路毒性の網羅的評価」シンポジウム 17 低用量低濃度暴露による発達神経毒性評価型の国際標準化に伴う課題と対応 菅野純、種村健太郎 第 47 回日本毒性学会学術年会 (仙台、オンライン) 2020 年 6 月 30 日 招待公演

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

2. 学会発表

1. Optical membrane potential recordings with voltage-sensitive dye (VSD) enabling recordings of rare and unique neuronal activity patterns Y Tominaga, R Kajiwara, T Tominaga Society for Neuroscience, Global Connectome (Online) 20201218-19
2. 富永 洋子, 竹歳 麻紀子, 富永 貴志 「Imaging analysis of the long-term potentiation of the mouse hippocampal activity マウス海馬の長期増強を膜電位感受性色素によるイメージングで観察する」第 58 回日本生物物理学会 20200916-18 (群馬、オンライン)
3. 待田 耀子, 山田 悠太, 富永 貴志, 梶原 利一 「発達期および成体期におけるマウス嗅皮質神経回路の膜電位イメージング解析」第 43 回日本神経科学大会 (神戸、オンライン) 2020 年 7 月 29 日–8 月 1 日

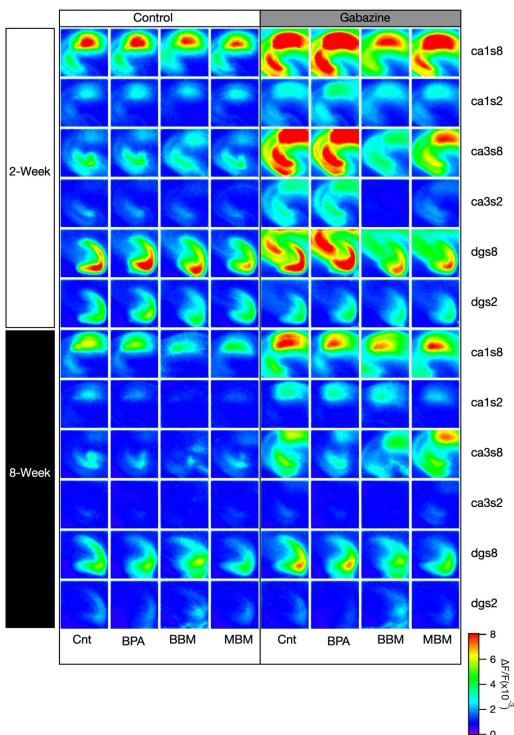


図 1 VSD 信号の最大値の投射図 動物は 2 週齢と 8 週齢で、CA1、CA3、DG のそれぞれの入力繊維に異なる刺激強度で刺激を加えた時の結果。それぞれ、通常の ACSF 溶液と GABAA 受容体阻害薬 (gabazine 10 μ M) を加えた時の応答の 5-6 スライスに応答の平均値を示している。

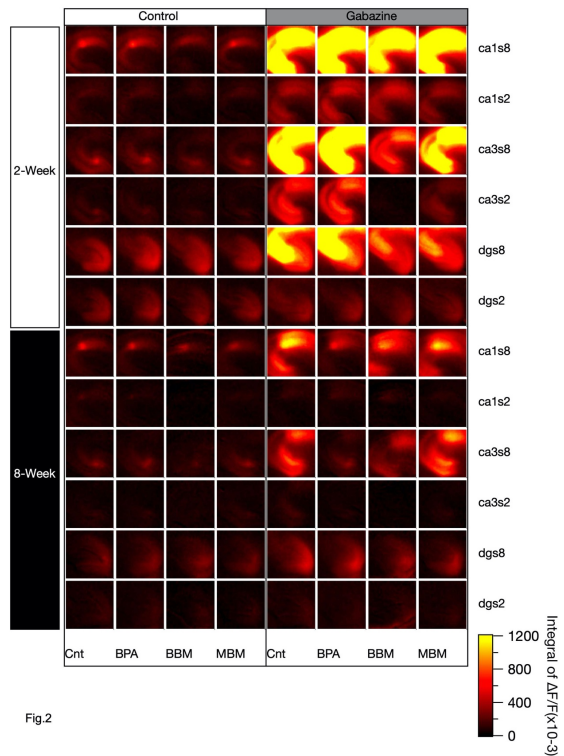


Fig.2

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

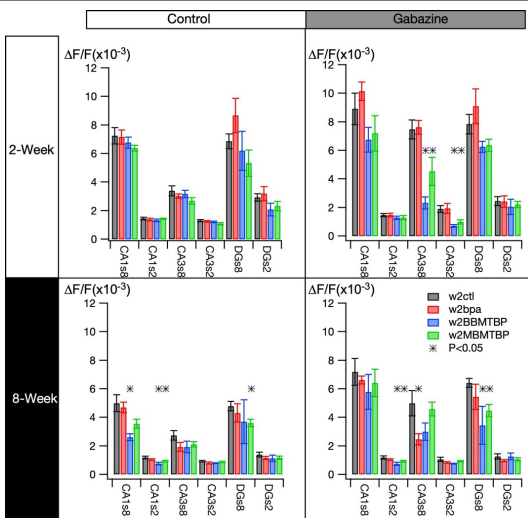


図 3 VSD 信号の最大値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

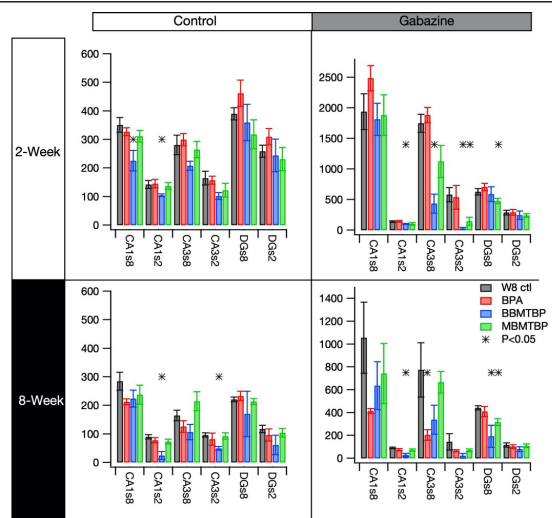
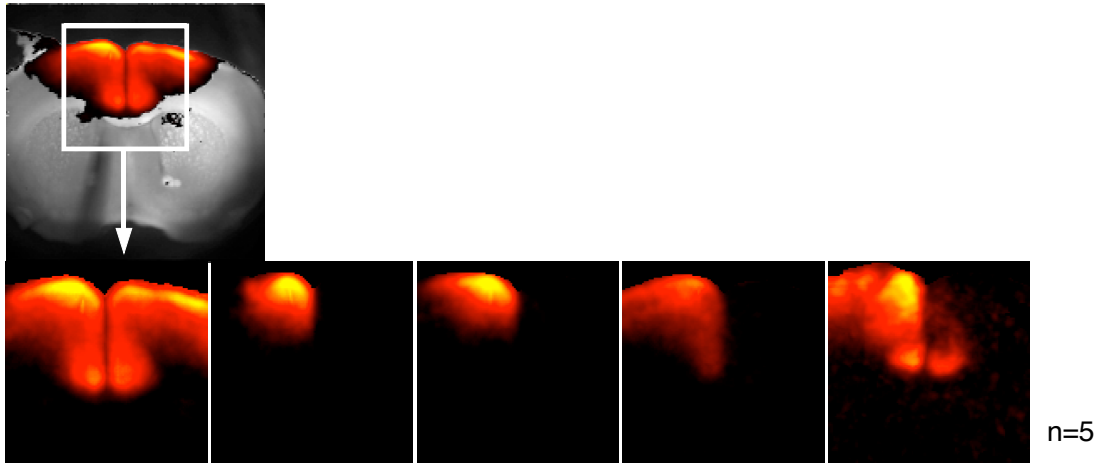


図 4 VSD 信号の積分値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

A



B

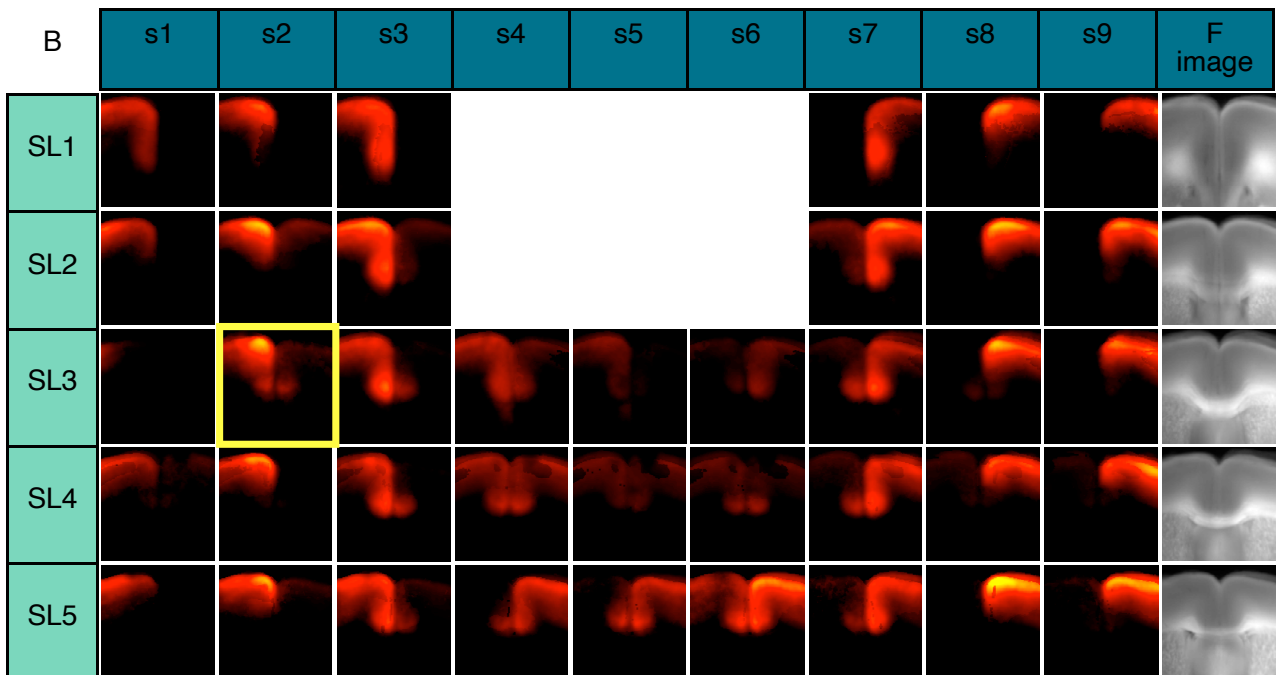


図5 マウス前頭前野皮質での興奮伝播パターンのアトラスの作成。

家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露による神経幹細胞動態解析」

研究分担者

中島 欽一（九州大学大学院医学研究院・基盤幹細胞学分野・教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系、特に神経幹細胞は様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼすと考えている。昨年度は、胎生11日から生後28日までトリブチルスズを、低用量（ $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）、中用量（ $25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）、高用量（ $250 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）で飲水投与し、産仔マウスが成体になるまで待ち、13週齢で海馬神経幹/前駆細胞の増殖を調べたところ、いずれの投与条件においてもコントロールと比べて、低下傾向にあることがわかった。本年度は新生ニューロンマーカーDcx陽性細胞数も調べ、やはり減少傾向にあることが判明した。以上より、周産期のトリブチルスズへの暴露は、成長後の成体期海馬におけるニューロン新生を低下させることがわかった。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟や増殖が時空間的に精妙に制御される必要がある。また、成長した後の成体期海馬におけるニューロン新生は、情動、認知、学習・記憶機能に重要な役割を果たすことが知られており。これらが破綻した場合、神経疾患や脳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い。さらに、種々の化学物質によりこれらが受ける影響を数値化し、定量的に解析する方法も乏しい。そこで本分担者は、化学物質として、トリブチルスズ (TBTC) を選択し、周産期暴露が成体海馬のニューロン新生に及ぼす影響を解析するとともに数値化することを目的とした。

B. 研究方法

本年度は、Vehicle (V) (飲水+0.0001%溶媒エタノール)、TBTC 耐用1日摂取量 (TDI) 0.25 µg/kg/day の10倍量である2.5 µg/kg/day (TBTC-L)、25 µg/kg/day (TBTC-M)、250 µg/kg/day (TBTC-H) を胎生11日から生後28日まで飲水投与を行った。その後生後91日から95日まで、BrdU を50 mg/kg/day で腹腔内投与 (増殖細胞のラベリング) し、生後96で脳を固定した。その脳を用いて切片を作製し、抗BrdU抗体及びDcXを用いた免疫組織染色を行い、各陽性細胞を測定した。更に脳内免疫担当細胞ミクログリアの状態も解析するために、抗Iba1抗体による免疫組織染色も行い、その数と形態の観察を行った。

C. 研究結果

最終ページに掲載した図からわかるように、TBTC-L、TBTC-M及びTBTC-Hのいずれの群においてもVと比較して、神経幹/前駆細胞の増殖の低下傾向と新生ニューロン数の減少を示すことがわかった。つまり、脳形成過程におけるTBTCへの暴露は、成体になってから海馬でのニューロン新生に影響を与える可能性が示唆された。また、今回ミクログリアの観察も行ったところ、TBTC-L、TBTC-M及びTBTC-Hのいずれの群においてもVと比較してミクログリア細胞数の増加傾向が観察された。

ただし、ミクログリア活性化の指標の一つである細胞体面積の増加は認められなかった。

D. 考察

本研究において、脳形成期に低用量であってもTBTCに暴露されると、成長後の成体海馬ニューロン新生に影響が及ぼされる可能性が示唆された。今後はn数を増やし統計学的に優位な差であることを示すと同時に、自発的運動などによりこの影響が改善できるかなどを調べる必要がある。また、TBTC暴露による海馬内のミクログリア数の増加傾向も見られたことから、ミクログリア数の増減も新たに化学物質の影響の定量化の指標として利用できる可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果から、化学物質による生体への影響に関し、少なくとも成体海馬ニューロン新生及びミクログリア数を数値化し、評価できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

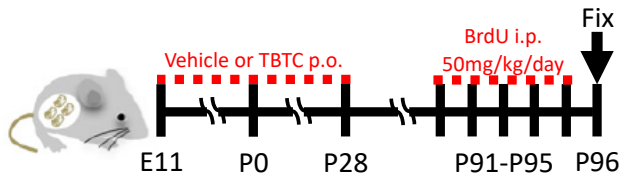
1. Nakayama K, Onishi H, Fujimura A, Imaizumi A, Kawamoto M, Oyama Y, Ichimiya S, Koga S, Fujimoto Y, Nakashima K, Nakamura M. NF κ B and TGF β contribute to the expression of PTPN3 in activated human lymphocytes. *Cell Immunol* (印刷中).
2. Takeuchi ., Takahashi Y, Iida K, Hosokawa M, Irie K, Ito M, Brown JB, Ohno K, Nakashima K, Hagiwara M. Identification of Qk as a Glial Precursor Cell Marker that Governs the Fate Specification of Neural Stem Cells to a Glial Cell Lineage. *Stem Cell Rep* 2020, 15:883-897. PMID: 32976762 DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.08.010

2. 学会発表

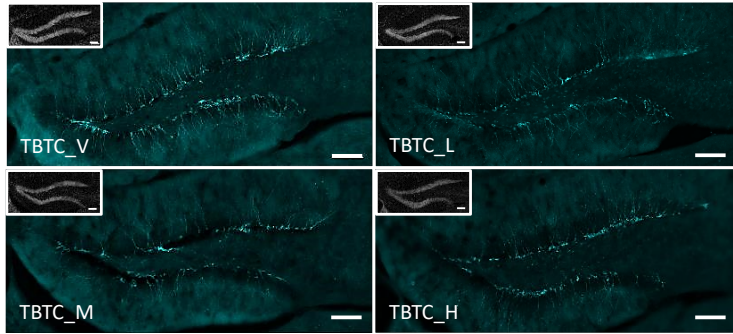
<国内>

1. 入江剛史[○]、松田泰斗、林良憲、吉良潤一、中島欽一: In vivo conversion from microglia to

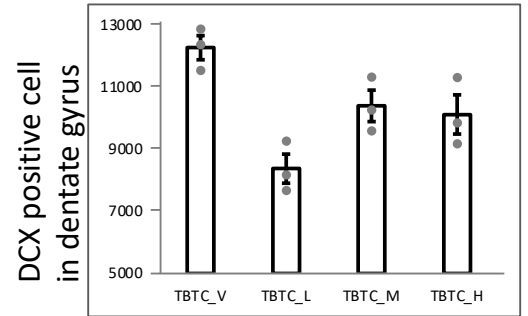
- neurons reinstates neurological function after ischemic injury、第61回日本神経学会学術大会、岡山県、岡山コンベンションセンター、2020年8月31日-9月2日(ポスター)
2. 中嶋秀行[○]、中島欽一:レット症候群原因因子 MeCP2のmiR-199aを介した神経幹細胞分化制御、NPBPPP2020合同年会、Web開催(シンポジウム)、2020年8月21日-23日
 3. 今村拓也[○]、藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一:母体由来炎症シグナルを胎仔脳由来ノンコーディングRNA制御により緩和する、第43回日本神経科学大会、Web開催(シンポジウム)、2020年7月29日-8月1日
 4. 松田泰斗[○]、入江剛史、中島欽一:成体マウス脳ミクログリアから機能的なニューロンへのダイレクトプログラミング、第43回日本神経科学大会、Web開催(シンポジウム)、2020年7月29日-8月1日
 5. 中島欽一[○]:脊椎動物の初期発生とエピジェネティックス、第47回日本毒性学会学術年会、Web開催(シンポジウム)、2020年6月29日-7月1日
1. G. 知的所有権の取得状況
 1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 特になし



TBTC: tributyltin compounds
 TBTC_L: 2.5 μ g/kg/day
 TBTC_M: 25 μ g/kg/day
 TBTC_H: 250 μ g/kg/day
 Vehicle: water + 0.0001% ethanol

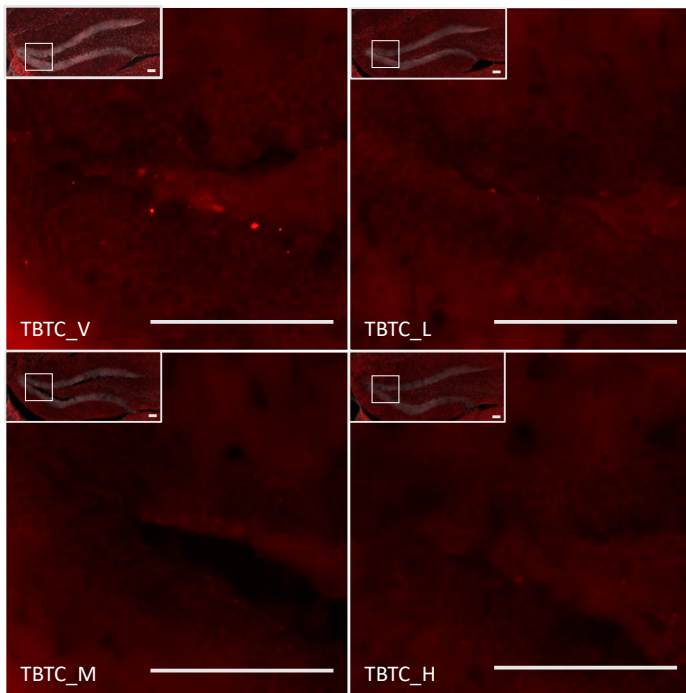


DCX Hoechst scale bar: 100 μ m

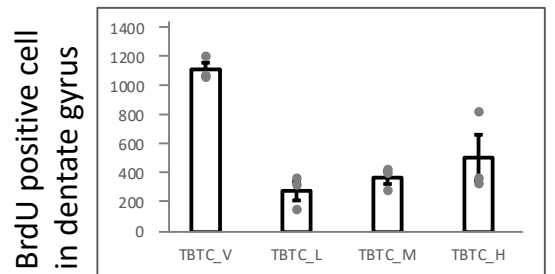


Mann-Whitney U-test
 n=3 per group

図 1. 胎仔期および離乳前のトリブチルスズの暴露は成体海馬における神経新生を低下させる傾向にある。

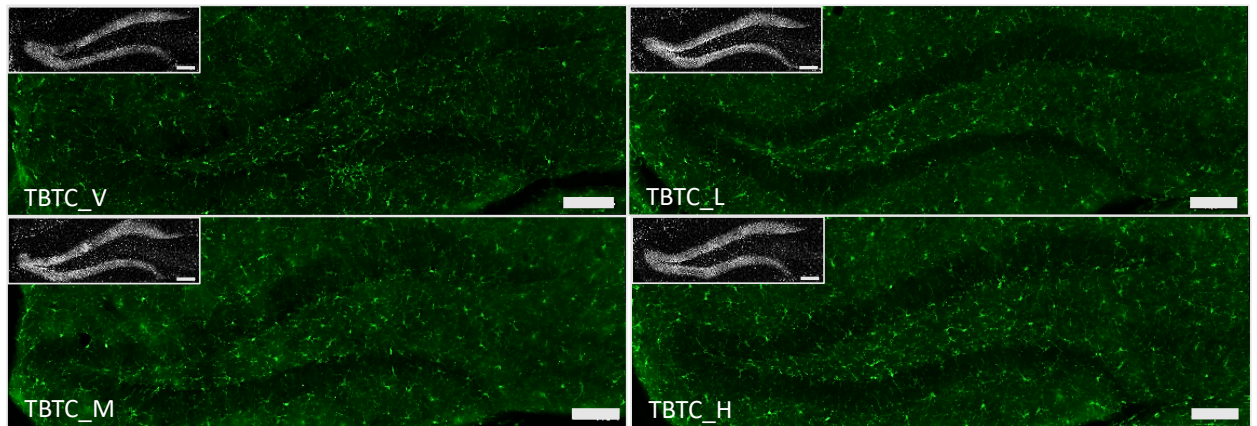


BrdU Hoechst scale bar: 50 μ m

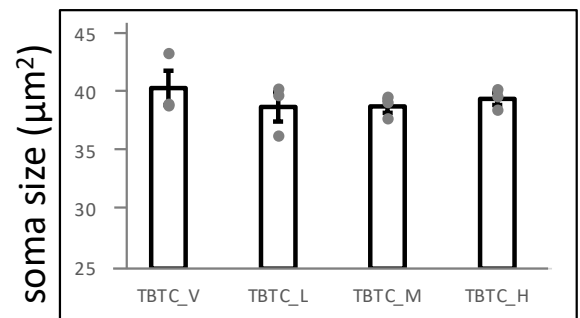
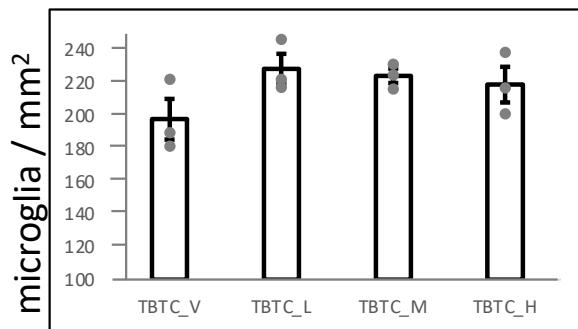


Mann-Whitney U-test
 n=3 per group

図 2. 胎仔期および離乳前のトリブチルスズの暴露は成体海馬における細胞増殖を低下させる傾向にある。



Iba1 Hoechst scale bar: 100 μ m



Mann-Whitney U-test n=3 per group

図 3. 胎仔期および離乳前のトリブチルスズの暴露により成体海馬におけるミクログリア数が増加する傾向にあるが、細胞体の大きさに変化はない。

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

分担研究課題

「網羅的遺伝子発現解析」

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

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

研究要旨

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

令和2年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール系酸化防止剤であるビスフェノールA(BPA)及び、ネオニコチノイド系農薬物質の対照物質としてのモデル物質ニコチンについて、不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向け、周産期マウス（胎生11日～離乳生後4週齢）に、BPA（0.5 mg/kg/日）あるいは、ニコチン（0.01 mg/kg/日）について周産期飲水投与後、得られた産仔雄マウスの成熟後13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。ニコチン及びBPAを選択した理由は、同様のプロトコールによる情動認知行動解析（先行研究）において不安関連行動が、ニコチンとBPAとが同様に変化していると考えられたためである。

解析の結果、

A) BPAを0.5 mg/kg/日(TDIの1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。

B) ニコチンを0.01 mg/kg/dayの投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかったことから、重篤な神経系の有害事象は観察されない可能性が示唆された。ただし遺伝子発現調節因子として、社会性や新奇性への対応に関係することが報告されているNR3C2（ミネラルコルチコイド受容体）遺伝子が抽出されたことから、こうした神経機能の（抑制ではなく）活性化が誘発される可能性が示唆された。

次いで、発現が増加あるいは減少した遺伝子について、両化合物間の集合関係を検討した結果、両化合物で共通して発現が増加した遺伝子数は3 ps、他方、減少した遺伝子数は17 psであった。不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向けては、双方に共通するシグナルネットワークが候補となり得るが、現時点では、双方で発現が増加あるいは減少した遺伝子リストからは特定のシグナルネットワークを見いだすことはできなかった。

A. 研究目的

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

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、周産期に飲水投与後、成熟後13週齢時のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的としている。被験物質として、令和2年度は、不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向け、ビスフェノール系酸化防止剤であるビスフェノールA(BPA)及び、ネオニコチノイド系農薬物質の対照物質としてのモデル物質ニコチンを選択した。

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。

被験物質は、ビスフェノール A (BPA, Cas No. 80-05-7, 分子量:228.29, カタログ No. 04225-10, 純度: >98.0%, 関東化学株式会社) 及び、ニコチン (CAS No.: 54-11-5, 分子量:162.23, カタログ No.: 148-01212, lot No.: PDH0911, 純度: 97.0%, WAKO) を使用した。以上2物質の構造式を図1に示す。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水(水道水)に添加し(エタノールの最終濃度はBPAの場合は0.0001%、ニコチンの場合は0.01%)、一日投与量として、BPA(0.5 mg/kg/日)あるいは、ニコチン(0.01 mg/kg/日)を胎生11日から離乳4週齢までの周産期マウスに飲水投与した。

各投与用量は、先行研究での曝露濃度である、BPAの場合は、その耐容一日摂取量(TDI)(0.05 mg/kg/日; EFSA)の10倍量、ニコチンの場合は、ネオニコチノイド系農薬のADI(アセタミプリド: 0.07 mg/kg/日、イミダクロプリド: 0.06 mg/kg/日)を参考に、その1/10倍量程度の用量を設定した。

得られた産仔雄マウスの12週齢時に情動認知行動解析を行い(n=8-9)、その後、13週齢時の海馬(n=3; 8-9例から3例をランダムに選択)について網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

遺伝子発現変動解析

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳(海馬)(各群 n=3)について、Percellome法(遺伝子発現値の絶対化手法)(Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006)による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて検討した。この際、我々が

独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。マウス海馬は、氷冷下にて左脳から、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の4部位に分割することにより得た。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出にあたっては、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 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIzol により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得られた cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 cDNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行

い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

C-1: BPA の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析:

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

次いで、対照群と比較し、0.5 mg/kg/日の BPA を周産期に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなっ

た(対照群に対して投与群の比率が、増加は1.200より大きいものを、減少は0.833より小さいものを採用)。この際、細胞1個あたりの発現コピー数につき海馬において0.7コピー以上のものを採用した。

315 ps (増加)、 130 ps (減少)

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

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

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

以上の通り、BPA を 0.5 mg/kg/日(TDI の 1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的

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

C-2: ニコチンの場合の海馬(成熟期)における遺伝子発現変動解析:

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

次いで、対照群と比較し、0.01 mg/kg/day のニコチンを周産期に投与した場合に、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は1.200より大きいものを、減少は0.833より小さいものを採用)。この際、細胞1個あたりの発現コピー数につき海馬において0.7コピー以上のものを採用した。

85 ps (増加)、 3,775 ps (減少)

増加分 85 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in*

silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子として NR3C2 (ミネラルコルチコイド受容体) 遺伝子が抽出された (>E-4) (標的遺伝子としては AGT、CNN3、PLAT 及び PLIN4 がリストアップされた)。ミネラルコルチコイドは最近になって、海馬において社会性や新奇性への対応に関係することが報告されており (McCann et al., Novel role for mineralocorticoid receptors in control of a neuronal phenotype. *Molecular Psychiatry* 26: 350-364, 2021)、関係する遺伝子の発現が増加したことから、これらの神経活動が活性化される可能性が示唆された。ただ重篤な神経系の有害事象に係るシグナルネットワークは現時点では見出せなかった。

一方、減少分 3,775 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、IPA による Canonical pathway による検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見出せなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、神経系の有害事象との関連を示唆する遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

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

以上の通り、ニコチンを 0.01 mg/kg/day の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が

示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見出せなかったことから、重篤な神経系の有害事象は観察されない可能性が示唆された。ただし遺伝子発現調節因子として、社会性や新奇性への対応に関係することが報告されている NR3C2 (ミネラルコルチコイド受容体) 遺伝子が抽出されたことから、こうした神経機能の(抑制ではなく)活性化が誘発される可能性が示唆された。

C-3: 海馬 (成熟期) における BPA 及びニコチンの場合の遺伝子発現変動解析の比較:

次いで、発現が増加あるいは減少した遺伝子について、両化合物間の集合関係を検討した。この集合関係を図 2 (最終ページ参照) としてベン図に示す。両化合物で共通して発現が増加した遺伝子数は 3 ps、他方、減少した遺伝子数は 17 ps と、少数であった。

本実験において、ニコチン及び BPA を選択した理由は、同様のプロトコールによる情動認知行動解析 (先行研究) において不安関連行動が、ニコチンと BPA とが同様に変化していると考えられたためであり、この不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向けては、双方に共通するシグナルネットワークが候補となり得るが、残念ながら現時点では、双方で発現が増加あるいは減少した遺伝子リストからは特定のシグナルネットワークを見出すことはできなかった。

増加した遺伝子数は 3 ps につき Common Name で以下に記載すると (名称がない場合は Affymetrix ID (Affy ID) とした)、

Mobp、Agxt2l1 及び(Affy ID.1441430_at)であった。減少した遺伝子 17 ps の場合は、Mcam、Ube2s、(Affy ID. 1420062_at)、AA517841、Ccadc134、5730528L13Rik、Trim8、1110021J02Rik、Top2a、Crhbp、Dand5、Acvr1c、(Affy ID. 1442200_at)、Klhl18、(Affy ID.1446868_at)、Kif5b 及び(Affy ID. 1458050_at)であった。

D. 結論

令和2年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール系酸化防止剤であるビスフェノール A(BPA)及び、ネオニコチノイド系農薬物質の対照物質としてのモデル物質ニコチンについて、不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向け、周産期マウス(胎生11日~離乳生後4週齢)に、BPA(0.5 mg/kg/日)あるいは、ニコチン(0.01 mg/kg/日)について周産期飲水投与後、得られた産仔雄マウスの成熟後13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。ニコチン及びBPAを選択した理由は、同様のプロトコールによる情動認知行動解析(先行研究)において不安関連行動が、ニコチンとBPAとが同様に変化していると考えられたためである。

その結果、この投与用量、投与期間といった条件では、両物質いずれの場合でも、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられ、このことから、いずれの場合でも、顕著な情動認知行動影響は認められないことが示唆された。ただしニコチン投与の場合、遺伝子発現調節因子として、社会性や新奇性への対応に関係することが報告されているNR3C2(ミネラルコルチコイド

受容体)遺伝子が抽出されたことから、こうした神経機能の(抑制ではなく)活性化が誘発される可能性が示唆された。

不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出に向けては、双方に共通するシグナルネットワークが候補となり得るが、現時点では、双方で発現が増加あるいは減少した遺伝子リストからは特定のシグナルネットワークを見いだすことはできなかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibani, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7): e0233755. [doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232. [doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ: 日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシシン; フグ毒のり

スク評価について、中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.) 2021; 34: 58-62.[ISSN: 0914-3777]

2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討2～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future

application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロゲン受容体α非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第113回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第18回食品安全フォーラム(2020.11.27.)

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究—極低濃度吸入曝露の際のマウス海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測—、令和2年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム(2021.2.4.) オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing、Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (2020.2.10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S : Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update、59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T,
Kitajima S, Hirabayashi Y: Evaluation of
extracellular vesicles (EVs) as toxic
biomarkers in mouse, 59th Annual Meeting
of Society of Toxicology
(2020.3.15) on-line

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

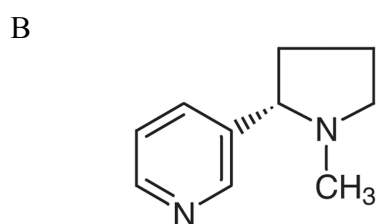
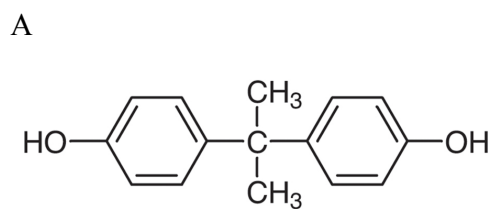
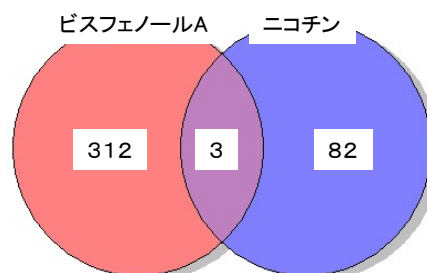


図 1 BPA(A)とニコチン(B)の化学構造式

増加



減少

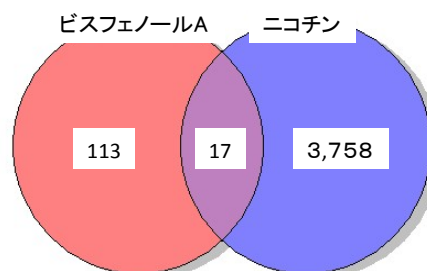


図 2 周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬において、発現が有意に減少する遺伝子の内、BPA あるいはニコチン投与の場合の集合関係 (上: 発現増加の場合、下: 発現減少の場合)

ベン図で表記した

令和2年度 厚生労働省科学研究費補助金（化学物質リスク事業）
家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
（H30-化学-一般-003）年次報告書

分担研究課題名

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

研究分担者

菅野 純（国立医薬品食品衛生研究）

【研究要旨】

先行研究及び本研究において得られた成果から、神経行動毒性試験バッテリーを体系化し、その汎用性・網羅性・迅速性について、国際的会合に出席して情報発信した結果、この様な試験による高次脳機能に関する情報の必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その活用方法の検討を積み重ねようとしていることが判明した。本年度は、昨年度末の経済開発協力機構（OECD）の Delopmental Neurotoxicity (DNT)との調整の結果、及び、JaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）の発達神経毒性試験資料編纂委員会からの推奨の結果を踏まえ、「神経行動毒性試験バッテリー」について、その汎用性・網羅性・迅速性といった実用性の高さをもって、標準プロジェクト化のための調整を行った。

A. 研究目的

先行研究及び本研究において得られた成果から試験法ガイドラインとして提案可能なプロトコールに体系化した「神経行動毒性試験バッテリー」について、その汎用性・網羅性・迅速性といった実用性の高さをもって、既存の OECD-TG426（齧歯類発達期神経毒性試験ガイドライン）を補強する事を目的とし、標準プロジェクト化のための調整を行う。加えて、本研究の成果を取りまとめた発達神経毒性の情報のデータベース化を進める。

B. 研究方法

B-1「神経行動毒性試験バッテリー」の標準プロジェクト化のための調整：

情動行動（不安関連行動）への影響、および学習記憶行動への影響を評価するバッテリー式のマウス行動評価系プロトコール（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、及び、プレパルス驚愕反応抑制試験からなる）、及び、参考資料（説明スライド付）を再整備した。

B-2「神経行動毒性試験バッテリー」結果のデータベース化：

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

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1「神経行動毒性試験バッテリー」の標準プロジェクト化のための調整：

2020年2月4日に開催された発達神経毒性試験資料編纂委員会第2回会議において、OECDの賛同を得られない場合でも、引き続き、国内でのガイダンス作成を目指すことが推奨されたことに依拠し、標準プロジェクト化を推進した。2020年4月に開催予定であったドイツ・コンスタントational conference on developmental neurotoxicity testing (DNT5)において、毒性評価に関わる欧米の研究者と、in vivo 試験系の必要性の論議や、当プ

ロジェクトの再評価の働きかけるを行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症拡大により、会合が中止となりその様な活動は延期する事となった。（<https://www.biologie.uni-konstanz.de/leist/caat-europe/current-announcements/>）

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

C-2「神経行動毒性試験バッテリー」結果のデータベース化：

発達神経毒性の情報のデータベース化計画を開始した。向中枢作用を有する化学物質で本研究班において検討した物質の内、アセフェート、トリアゾラム、イボテン酸、アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン、BPA (Bisphenol A)、MBMTBP (2,2'-Methylene-bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)、BBMTBP (4, 4'-butylidene bis (3-methyl-6-tert-butylphenol) 及び、対照動物として ERaKI マウス（エストロゲン受容体ノックインマウス）、について胎生期単回、幼若期単回、成熟期単回、及び周産期反復曝露のいずれかの曝露後の神経行動毒性試験バッテリー、と、海馬の遺伝子発現情報（マイクロアレイ解析）の情報との、結合を行った。

D. 考察

OECD の場においては、in vitro 試験法の組み合わせによる評価法の確立を目指すグループによる発達神経毒性プロジェクト (DNT) が進んでおり、もともと、動物試験を排除する事が前提にある事から、代替法としての考察も行われていない状況が明らかとなり、今後の調整が難航する事が明ら

かとなった。その為、OECDの Conceptual framework for testing and assessment of endocrine disrupter.

(<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelat-edtoendocrinedisrupters.htm>) のレベル4に位置付けられているTG426の補強という立場を再考し、むしろレベル5の確定試験の位置づけとする可能性を考慮することが考えられた。

情動認知行動異常モデルマウスを用いた陽性対照動物の標準化と、それらの分子メカニズム解析結果の蓄積によるヒトへの外挿性の向上を同時進行させる利点については、DNTのin vitro主体の計画では、ヒト由来培養細胞を用いる事で対応する事としており、in vitro と in vivo の関連性を含む論議が、会合の中止などで、深化しなかった点がOECDとの関係においては残念であった。

E. 結論

当研究班の研究計画、成果ともに毒性評価に携わる研究者には国際的にも評価を得たが、OECD全体としてのin vitro指向との調整が難航した。国内では、JaCVAM(日本動物実験代替法評価センター)の発達神経毒性試験資料編纂委員会からは、OECDとの関係に関わらず、本プロジェクトの推進が推奨されていることから、少なくとも現状及び近未来的には当該試験法バッテリーの標準プロジェクト化の重要性、及び、今までの成果の発信の必要性には、変わりがないと結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌

1. Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano H. A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One*. 2020 Jul 6;15(7):e0233755. doi: 10.1371/journal.pone.0233755.
2. Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol*. 2020 Oct

15;17(1):48. doi: 10.1186/s12989-020-00382-y.

2. 学会発表

1. 齊藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量ペルメリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.29-7.1)、Web開催、e-Poster
2. 種村健太郎、佐々木貴熙、齊藤洋克、高橋祐次、北嶋聡、菅野純、日本中毒学会合同シンポジウム:発達期マウスへのドーモイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討2～. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.29)、Web開催、シンポジウム、口演
3. 北嶋聡、種村健太郎、菅野純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演
4. 種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演
5. 菅野純、発生発達期暴露による情動認知行動毒性の背景とその評価系に関する国際的動向. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演
6. 小野竜一、相崎健一、北嶋聡、菅野純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演
7. 菅野純、北嶋聡、相崎健一、小野竜一、Percellome Projectにおける精度管理とその解析への影響. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演
8. 相崎健一、長谷武志、北嶋聡、小野竜一、北野宏明、菅野純、米国毒性学会合同シンポジウム: Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web開催、シンポジウム、口演
9. 菅野純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web開催、ワークショップ、口演
10. 菅野純、職場環境における化学物質の毒性発

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

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

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「化学物質の周産期ばく露による中枢神経系 DNA メチル化影響解析」

研究分担者

五十嵐 勝秀（星薬科大学創薬科学科・生命機能創成科学研究室・教授）

【研究要旨】

家庭用品化学物質の周産期ばく露において、それがエピジェネティックな影響を及ぼした場合には、将来持続する遅発性毒性が生じる可能性がある。本分担研究ではエピジェネティックな影響のうち、より可逆性が低く毒性影響として重要性が高いDNAメチル化に焦点を絞る。そして、家庭用品化学物質がDNAメチル化に影響を与えるかを判定する細胞システムとして、ルシフェラーゼおよびtdTomatoをレポーターとした評価システムを構築した。DNA脱メチル化促進物質である5-azacytidineを陽性物質として本評価システムの妥当性を検討し、ルシフェラーゼ活性上昇とDNAメチル化変化が相関することを確認した。今後は本システムを活用し、遅発性毒性のメカニズム解明の一助とするとともに、DNAメチル化変化を毒性マーカーとして活用することも考慮し研究を進める。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

そこで本研究では、生化学的手法を経ずに DNA メチル化影響の有無に関する予備情報を取得可能な評価システムを構築する。そのために、メチル化変化を反映するレポーターとしてルシフェラーゼおよび tdTomato を用い、特定のプロモーター下流にそれらを接続したベクターを培養細胞に導入し、評価システムとする。導入を検討した細胞システムは次の通りである。

細胞：HEK293T、Neuro-2A、レポーター：Agouti-IAP または Daz1 promoter に対し、ルシフェラーゼ (Nano-luc) または tdTomato、とした。細胞へのレポーターベクターの導入には、PiggyBac トランスポゾン system を用いたゲノム組み込み法を用いた。この細胞では、Agouti-IAP または Daz1 の promoter 領域における DNA メチル化状態に応じ、ルシフェラーゼまたは TdTomato が発現する。よって、ルシフェラーゼ活性または TdTomato の蛍光強度により、DNA メチル化状態の定性または定量的な解析が行えると期待される。

C. 研究結果

HEK293T 細胞に、Agouti-IAP レポーターまたは Daz1 レポーターを導入し、評価システムとしての妥当性を検討した。具体的には、DNA 脱メチル化陽性物質として 5-azacytidine (5-azaC) を用い、5-azaC 処理によってルシフェラーゼ活性または

tdTomato 活性が上昇するか検討した結果、DNA メチル化程度は Agouti は中間、Daz1 は高いことが予想される。すなわち、それに応じた TdTomato の発現は、Agouti で高い傾向、Daz1 は低い傾向となると予想される。実際、レポーターを導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、予想通りの結果が得られ、定性的な解析が可能であると結論した。

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

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

そこでレポーターを、顕微鏡での観察が困難で定性的解析には向かないが、感度が高く、定量的解析に向くルシフェラーゼに変えることを検討した。具体的には、レポーターをルシフェラーゼの中でも現在最も感度が高いとされる NanoLuc に変えたレポーターベクターを Agouti, Daz1 とともに作製し、HEK293T に導入し、レポーター感度と定量性を検討した。

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

D. 考察

今年度の解析により、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響の有無について、迅速かつ正確に評価するための評価システムを導入できた。今後、本システムを用い、本研究班で検討する家庭用品化学物質について、DNA メチル化影響の有無に関するデータを得る。それにより、周産期ばく露を受けた個体の中枢神経系における DNA メチル化変化の可能性に対し、参考となるデータを得る。

E. 結論

NanoLuc をレポーターとする細胞システムにより、化学物質の DNA メチル化影響を定量評価することが可能となり、陽性物質 5-azaC を用いて、評価システムの妥当性が示された。今後は、本システムを用いたデータの蓄積を行い、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響を総合的に評価し、影響メカニズム解明、バイオマーカーとしての活用に踏み込むことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46:83-90.

Kaiho-Soma A, Akizuki Y, Igarashi K, Endo A, Shoda T, Kawase Y, Demizu Y, Naito M, Saeki Y, Tanaka K, Ohtake F. TRIP12 promotes small-molecule-induced degradation through K29/K48-branched ubiquitin chains. *Mol Cell.* 2021;81:1411-1424.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

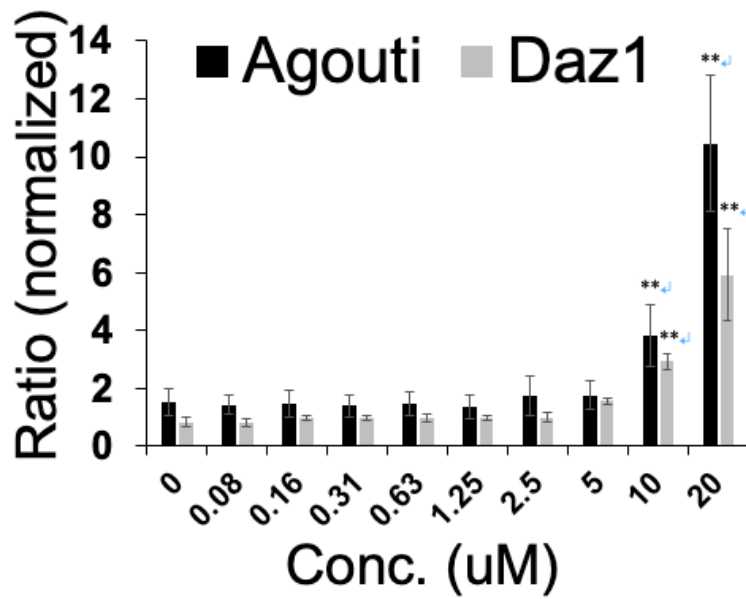


Fig. 1 5-azaCによるAgouti-IAP, Daz1プロモーター活性亢進の確認

Neuro-2A細胞に対し、Agouti-IAPまたはDaz1プロモーターを上流域に持ち、レポーターとしてNanoLucを有するベクターをPiggyBacトランスポゾンシステムによってゲノムに挿入した。この細胞に対し、各濃度の5-azaCを処理し、一定期間培養後、ルシフェラーゼ活性を定量測定した。その結果、10uM以上の5-azaCにより、細胞当たりのルシフェラーゼ活性が亢進することが確認され、本評価システムの妥当性が示された。

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露を感知する新規脳 RNA マーカーの探索」

研究分担者

今村 拓也（広島大学大学院統合生命科学研究科・生命医科学プログラム・教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系が様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になってエピゲノム変化を介して晩発性に影響を及ぼすと考えて、化学物質暴露に鋭敏な新規脳RNAマーカーの検出系の確立を目指す。本年度は、昨年度までに確立したRNA-seqデータの実験的及びバイオインフォマティクス解析法により、周産期家庭用品化学物質暴露の影響を鋭敏に検出するRNAマーカーを整備し、家庭用品化学物質暴露影響を仲介する機能ノンコーディングRNA候補のリストを得ることに成功した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

研究代表は次世代シーケンサー解析論文を多数出版している実績をもとに、バルクレベルトランスクリプトーム解析および 10x GENOMICS 社の Chromium を用いたシングルセルレベル解析から、様々なバイオインフォマティクスを担当する。

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

種村班・中島班と連携して、化学薬品投与モデル動物を用いた行動パラメーターおよび神経幹細胞動態の定量情報と対応する、あるいは予見する RNA マーカーを、項目 [1] のパイプラインにより取得し、得られたマーカーからさらに機能 RNA 候補を得ることを行う。

C. 研究結果

種村班と中島班と連携しながら行っている家庭用品化学物質の毒性検定実験において、表現型が想像以上に低い濃度でもみられてきていることから、最終年度である本年度は、昨年度までに項目 [1] を進行することで確立した RNA 動態の精密なモニタリング法を基礎として、濃度を低値に絞り込み、集中した実験を行った。さらにその結果を項目 [2] に流し込み、以下の 2 つ

の実験系に基づいた成果を得た。本年度は、Vehicle (V) (飲水+0.0001%溶媒エタノール)、TBTC 耐用 1 日摂取量 (TDI) $0.25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の 10 倍量である $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を胎生 11 日から生後 28 日まで飲水投与を行った。その後生後 96 日で海馬を摘出して、遺伝子発現 (mRNA) 定量と機能ノンコーディング RNA であるプロモーター RNA (pancRNA) 定量を行った。最終ページに示したヒートマップ解析から明らかのように、いずれのトランスクリプトームも個体差をよく検出していたことは、TBTC の周産期暴露が生後の海馬発達に顕著な影響を与えないことを意味している。一方で、これらのヒートマップの上部に示したクラスタリング解析結果は、確かにコントロール群と TBTC 周産期暴露群を見分けたことから、TBTC の周産期暴露は無視できない影響を与えていることが考えられた。特に、ヒートマップ上に赤枠で囲った遺伝子群及び pancRNA 群は TBTC の低用量投与の影響を鋭敏に検出するものである。さらに、ジーンオントロジー解析により、mRNA トランスクリプトームからは Serpin プロテアーゼや Inflammatory response が、また、pancRNA トランスクリプトームからはカリウムチャネル関連の G0 タームが挙がってきたことから、TBTC の周産期暴露は成熟後にもマイクログリア活性化による脳内炎症を持続させてしまうことが想定された。

D. 考察

昨年度までに pancRNA は DNA メチル化を含むエピゲノム成立に寄与することを明らかにしており論文報告を行なっている。本年度の結果を合わせ、化学物質投与に端を発し、DNA メチル化変化→機能 RNA 発現変化→表現型変化、と進んでしまう晩発影響の機能軸が存在することを明確に示すことができた。本研究の目的である機能 RNA データベース化を飛躍的に拡充し、化学薬品投与モデル動物への影響を予見する RNA マーカーを当初の期待通りに得ることに成功した。さらにこれを基礎として、家庭用品化学物質暴露の晩発影響としてのフェノタイプをバイオインフォマティクスにより推定できることも示された。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Ikegami K, Goto T, Nakamura S, Watanabe Y, Sugimoto A, Majarune S, Horihata K, Nagae M, Tomikawa J, Imamura T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H, Uenoyama Y. J Reprod Dev. 2020 Aug 20;66(4):359-367. doi: 10.1262/jrd.2020-026. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32307336

2. Takouda J, Katada S, Imamura T, Sanosaka T, Nakashima K. Pharmacol Res Perspect. in press

3. Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Trujillo CA, Ishizu M, Uesaka K, Pan M, Noguchi H, Andoh-Noda T, Okano H, Muotri AR, Nakashima K. Cell Reports. in press

2. 学会発表

<国内学会>

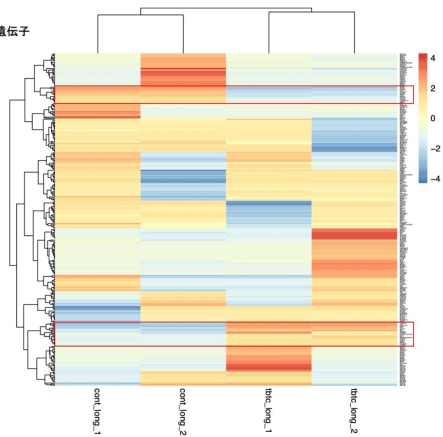
6. 今村拓也[○]、藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一:母体由来炎症シグナルを胎仔脳由来ノンコーディングRNA制御により緩和する、第43回日本神経科学大会、Web開催(シンポジウム)、2020年7月29日-8月1日
7. 今村拓也[○]:神経活性化は新規DNAメチル化を介して興奮性シナプス形成に関わる遺伝子のエンハンサー活性を制御する、第14回神経発生討論会、Web開催、2021年03月19日-20日

8. 亀田 朋典、中嶋秀行、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一、今村拓也[○]:神経活性化による新規DNAメチル化を介した遺伝子エンハンサー活性制御は興奮性シナプス形成に寄与する、第14回エピジェネティクス研究会年会、Web開催、2021年3月30日-31日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

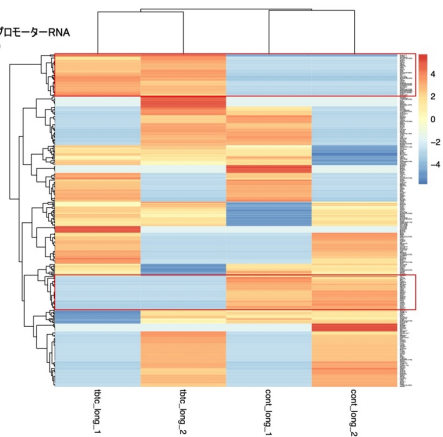
発現変動遺伝子 (mRNA)



ジーンオントロジー解析 (TBTCにより発現上昇した遺伝子)

GOデータベース	GOターム	P値
UP_SEQ_FEATURE	glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)	0.00127815
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	0.00290821
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031362~anchored component of external side of plasma membrane	0.00293503
INTERPRO	IPR023796:Serpin domain	0.00424948
INTERPRO	IPR000215:Serpin family	0.00424948
SMART	SM00093:SERPIN	0.00579603
INTERPRO	IPR013087:Zinc finger C2H2-type/integrase DNA-binding domain	0.01406557
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004867~serine-type endopeptidase inhibitor activity	0.0236083
INTERPRO	IPR07087:Zinc finger, C2H2	0.02589063
UP_KEYWORDS	GPI-anchor	0.02938002
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031225~anchored component of membrane	0.03014737
UP_SEQ_FEATURE	signal peptide	0.03352443
UP_KEYWORDS	S-adenosyl-L-methionine	0.03984388
UP_KEYWORDS	Inflammatory response	0.04174867
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043434~response to peptide hormone	0.04826105

発現変動プロモーターRNA (pancRNA)



ジーンオントロジー解析 (TBTCにより発現上昇したプロモーターRNA)

GOデータベース	GOターム	P値
INTERPRO	IPR003131:Potassium channel tetramerisation-type BTB domain	5.87E-04
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005730~nucleolus	0.001543668
INTERPRO	IPR000210:BTB/POZ-like	0.005621065
INTERPRO	IPR011333:BTB/POZ fold	0.006554725
SMART	SM00225:BTB	0.007869227
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005739~mitochondrion	0.0088392
UP_SEQ_FEATURE	domain:BTB	0.011166955
KEGG_PATHWAY	mmu04146:Peroxisome	0.019275937
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031463~Cul3-RING ubiquitin ligase complex	0.020132569
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005654~nucleoplasm	0.020941424
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051260~protein homooligomerization	0.030121685
UP_KEYWORDS	Peroxisome	0.042156785
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	0.047245034