

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

(H30-化学-一般-003)

分担研究課題名

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

研究分担者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・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の中枢神経系への影響を検討する。H30 年度の研究として、発生発達期にかけてのペルメトリン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（2）発生発達期にかけての塩化トリブチルスズ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を行った。また雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始し、妊娠期および出産期-授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 10 週齢時に行動解析を行った結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすくみ率の低下が有意に認められた。さらに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析の結果、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた。塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を 0.025、0.25、2.5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 12 週齢時に行動解析を行った。その結果、いずれも空間連想記憶異常が疑われた。また、特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった。平成 31/令和元年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール類を取り上げ、具体的には、ビスフェノール類として、ビスフェノール A とゴム老化防止剤である BBMTBP（4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)）および MBMTBP（2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)）を、いずれも 5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを用いて生後 12-13 週齢時に行動解析を行った。その結果、いずれの投与群においても不安関連行動異常が疑われたが、先行して解析した塩化

トリブチルスズの発生-発達期低用量長期飲水投与による行動影響と比較し、その影響は軽微なものであることが推察され、今後、対応する神経科学的物証による検証が重要と考えられた。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。この様な特性を有する物質は、申請者らの今までの研究から、周産期にある動物の中枢神経系にシグナル異常を引き起こし、成熟後に遅発性の有害影響を誘発することが強く示唆されるものである。世代や性別を問わず、妊婦（胎児）や小児を含む国民が広く日常的に長期に渡って接する家庭用品に関しては、この観点からの有害性評価の確立には大きな意義があると考えられる。

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

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

【H30 年度】(1) 発生発達期にかけてのペルメトリン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：成熟した雌雄マウスを交配させるとともに

ピレスロイド系農薬であるペルメトリンを含んだ飲水

投与(0.3ppm)を開始し、妊娠期および出産期-授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを生後4週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えて飼育し、生後10週齢時の雄マウスについて、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）、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）からなるバッテ

リー式の行動解析を行って行動解析を行った。行動解析後のマウス脳組織を用いて、組織切片を作成に免疫組織化学解析を行った。(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズ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：塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を0.025、0.25、2.5ppmに調整し、妊娠11.5日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを生後4週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えて生後12週齢まで飼育した。その後、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

制抑制制度) からなるバッテリー式の行動解析を行うこととで検討した。

【H31/R1 年度】マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー) を用いた。

被験物質は、ビスフェノール A (BPA, Cas No. 80-05-7, 分子量: 228.29, カタログ No. 04225-10, 純度: >98.0%, 関東化学株式会社) およびゴム製品老化防止剤 (2 種)、4,4'-ブチリデンビス (6-tert-ブチル m-クレゾール) (BBMTBP, Cas No. 85-60-9, 分子量: 382.59, カタログ No. B0724, 純度: >97.0%, 東京化成工業株式会社)、2,2'-メチレンビス (6-tert-ブチル p-クレゾール) (MBMTBP, Cas No. 119-47-1, 分子量: 340.51, カタログ No. M0217, 純度: >99.0%, 東京化成工業株式会社) を使用した。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水 (水道水) に添加し (エタノールの最終濃度は 0.0001 %)、5ppm に調整した (BPA の TDI 値を元に、安全係数として 10 を用いて算出した)。妊娠 11.5 日齢の雌マウスに調整したビスフェノール類の飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。対照群には、0.0001% エタノールを含む水道水を摂取させた。解析には産仔雄マウスについてのみに用いることとし、生後 4 週齢時に離乳、以後は通常飲水に切り替えた。いずれのマウスも離乳後、4 匹/ケージにて飼育した。12-13 週齢時にオープンフィールド試験 (検定項目として、総移動距離、中央部滞在時間、移動回数)、明暗往来試験 (検定項目として、明室滞在時間、明暗往来数、暗室待機時間)、高架式十字迷路試験 (検定項目として、総移動距離、開放部滞在時間、総アーム選択回数)、条件付け学習記憶試験 (検定項目として、学習度、空間-連想記憶、音-連想記憶)、プレパルス驚愕反応抑制試験 (検定項目として、120dB に対する 95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制率) からなるバッテリー式の情動認知行動解析を行った (n=8-9)。

【R2 年度】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 ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($60\% \pm 10\%$)、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)、条件付け学習記憶試験 (FZ) を含む行動試験バッテリーを実施した。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 ($78 \times 63 \times 65$ (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 ($50 \times 50 \times 30$ (H) cm、白色・プラスチック製) を使い、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 ($21 \times 42 \times 25$ (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、条件付けチャンバー ($17 \times 10 \times 10$ (H) cm、透明・プラスチック製) を用いた。条件付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提示せず、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、条件づけ時に提示した音刺激 (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 (フリージング) を連続 2 秒間以上の不動時間として測定した。すくみ率 (フリージング率) (%) 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

【H30 年度】

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリン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: 雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始した。尚、用量設定はペルメトリンの一日摂取許容量 (ADI) から算出した。妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替え、生後 10 週齢時に行動解析 (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。その結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすくみ率の低下が有意に認められた。また明暗往来試験における暗所潜在時間の増加傾向が認められた (種村、北嶋)。さ

らに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析から、投与群マウスの海馬における神経幹細胞分化動態に影響が認められた。すなわち、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた (中嶋との共同研究)。

(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズ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: 塩化トリブチルスズ (かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている) を 0.025、0.25、2.5ppm に調整 (TDI 値を元に、安全係数として 10、100、1000 を用いて算出した) し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた。平成 30 年 1 月 7 日よりバッテリー式の行動解析 (オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験) を行った結果、いずれも高架式十字迷路試験における総移動量、解放部滞在時間、総アーム選択数の増加傾向を示すとともに、空間連想記憶異常が疑われた。また、特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった (北嶋との共同研究)。

【H31/R1 年度】

発生-発達期にかけてのビスフェノール類の低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析: 生後 12-13 週齢時にバッテリー式の行動解析 (オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験) を行った結果、BPA 投与群において、対照群と比較して明暗往来試験での明室滞在時間および明暗往来数の有意な減少、BBMTBP 投与群において、対照群と比較してオープンフィールド試験での総移動回数の有意な減少が認められた。また、MBMTBP 投与群において、対照群と比較してオープンフィールド試験での総移動距離の有意な減少および明暗往来試験での明暗往来数の有意な減少が認められた (北嶋との共同研究)。

【R2 年度】

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。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。また、総移動距離や平均移動速度、移動回数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。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。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。音-連想記憶試験時には、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。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。

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、菅野、北嶋との共同研究）。

D. 考察

発生発達期にかけてのペルメトリン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：行動解析結果から、新規場面での適応不全と記憶想起に異常が疑われた。しかしながら、それらは先行研究で得られたネオニコチノイド系農薬成分の投与に比較し、軽度と言えるものであった。また海馬における神経幹細胞分化動態への影響は上述の行動影響と対応する神経科学的物証と考えられた。

発生発達期にかけての塩化トリブチルスズ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：前述のペルメトリンを用いた解析における交配時からの投与は、雌雄の配偶子形成への影響の有無を排除できないため、妊娠マウスへの投与を投与開始点とした。すでに規制対象である塩化トリブチルスズを使用した本研究によって、発生-発達期における他の化学物質の中枢影響との毒性強度の比較が可能となると考えている

発生-発達期にかけてのビスフェノール類の低用量長

期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：3 種のビスフェノール類の発生-発達期低用量長期飲水投与群の行動解析結果から、いずれの投与群においてもオープンフィールド試験あるいは明暗往来試験での、不安関連行動の指標となる項目に有意な減少が認められ、各投与群において、対照群と比較して不安の亢進が疑われた。その中でも、BPA 投与群が最も影響を受けていると考えられた。しかし、先行して解析した塩化トリブチルスズの発生-発達期低用量長期飲水投与による行動影響と比較して、いずれのビスフェノール類においても、多くの項目で対照群との間に顕著な差は認められず、その影響は軽微なものであることが推察された。また、共同で行った行動解析後のマウスについての percellome 法による網羅的遺伝子発現解析（海馬）の結果およびそれに基づくパスウェイ解析の結果から、いずれの投与群においても、この投与用量、投与期間といった条件では、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられた。すなわち、今回の行動解析において顕著な情動認知行動影響、特に、海馬を主な責任部位とする学習記憶に関連する行動影響が認め

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。また、総移動距離、平均移動速度、移動回数では、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、明室移動距離や転室回数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、経時的变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。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、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。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。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。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

平成 30 年度は、規制値レベルの低用量であっても発生-発達期(周産期を含む)の長期に及ぶ化学物質暴露は成熟後の中枢神経系に行動様式異常という形で機能的な影響を及ぼすことが明らかとなった。こうした知見の集積は、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重要であることから、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、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。

平成 31(令和元)年度は、ビスフェノール類である BPA とゴム老化防止剤である BBMTBP および MBMTBP を選択し、周産期マウス(胎生 11.5 日～離乳生後 4 週齢)に各 0.5 mg/kg/day を飲水投与後(BPA の TDI 値を元に、安全係数として 10 を用いて算出した)、産仔が成熟後 12-13 週齢時に情動認知行動解析を実施した。その結果、軽微なものではあるが、規制値レベルの低用量であっても発生-発達期(周産期を含む)の長期に及ぶ化学物質暴露によって成熟後の中枢神経系に行動様式異常という形で機能的な影響を及ぼすことが明ら

かとなった。また、発生-発達期(周産期を含む)を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために引き続きデータを収集、解析結果を精査するとともに、行動影響や脳機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

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

Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhashi K, Takai M, Aoshi T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I. Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study. *Biologicals*. 55: 43-52., 2018.

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.

Yamada K, Hiradate Y, Goto M, Nishiyama C, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes

during in vitro maturation. *Reprod Med Biol.* 17(2):143-148., 2018.

Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, Uchida T. Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 497(1):388-393., 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.* 30;80(3):536-543., 2018.

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

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

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

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

Kurata S, Hiradate Y, Umezumi 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.

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

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

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

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

Kurata S, Hiradate Y, Umezumi 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

酒井和哉、大塚（出田）まき、斉藤洋克、平舘裕希、原健士朗、五十嵐勝秀、種村健太郎、「精子エピゲノム影響評価による非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーの探索」第12回日本エピジェネティクス研究会年会（2018. 5. 24-25）、札幌

種村健太郎、「周産期における低用量化学物質暴露が引き起こす情動認知行動毒性評価系開発に関する最近の知見」第45回日本毒性学会学術年会（2018. 7. 18-20）、大阪府

Hirokatsu Saito, Takashi Tominaga, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Early life exposure to low levels of permethrin exerts slight impairment of central nervous system in male mice」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム（2018. 7. 24-25）、京都市

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Chemical-Induced epigenetic effects on mouse sperm using valproic acid」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム（2018. 7. 24-25）、京都市

Kohei Umezu, Yuuki Hiradate, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Sperm migration is regulated by stromal cell-derived factor 1 in Japanese Black cattle」第111回日本繁殖生物学会大会（日中韓国際シンポジウム）（2018. 9. 12-16）、上田市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎、「ウシ精子走化性因子の特定と制御機構の解明」第2回日本胚移植技術研究会大会、（2018. 9. 20-21）、津市

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」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、（2018. 12. 12-14）、東京都

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Paternal VPA-exposure affects the offspring's behavior through sperm

DNA methylation」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、（2018. 12. 12-14）、東京都

後藤萌、斉藤洋克、原唯花、富永貴志、種村健太郎、「マウス行動様式と海馬神経回路機能～系統間差と交雑影響～」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、（2018. 12. 12-14）、東京都

斉藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、種村健太郎、「低用量ペルメトリン早期慢性暴露によるマウス次世代雄個体行動影響」第21回環境ホルモン学会研究発表会、（2018. 12. 15-16）、東京都

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、斉藤洋克、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

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 |

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	-		-	-

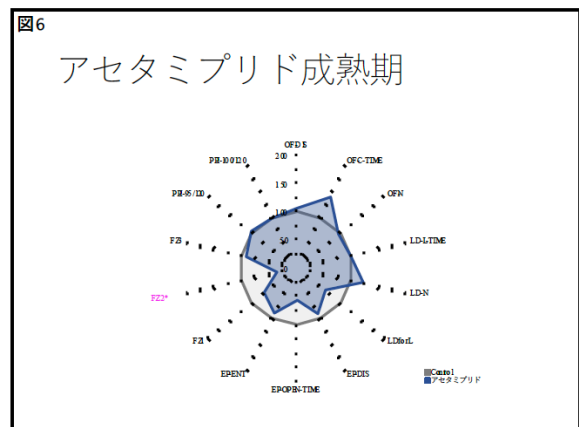
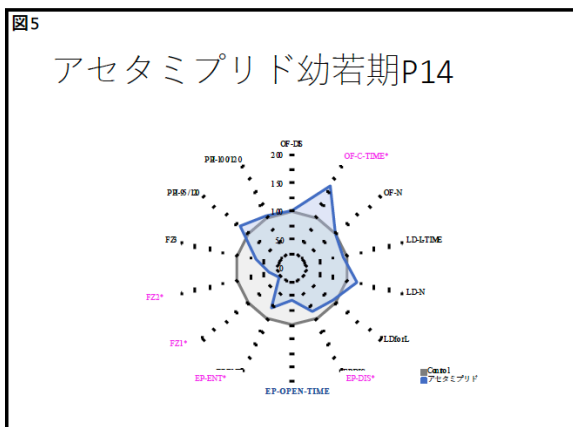
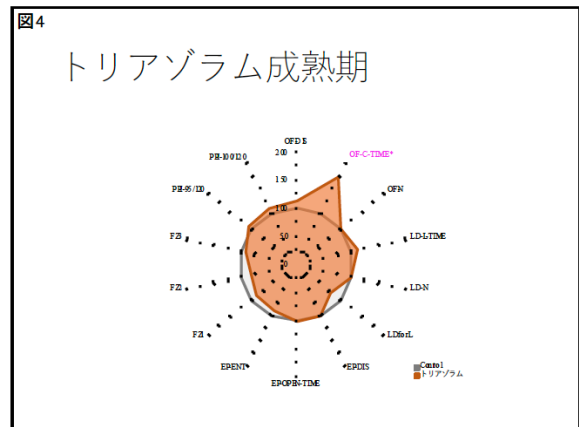
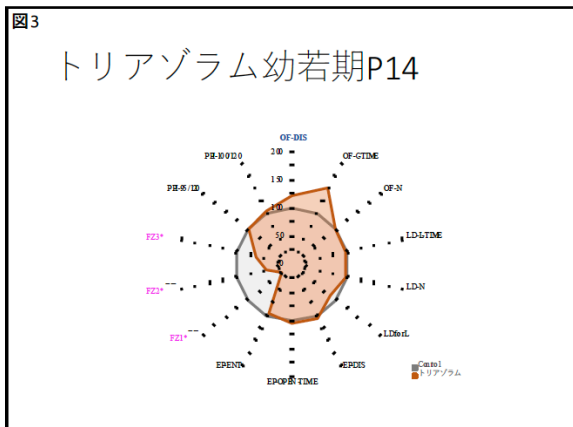
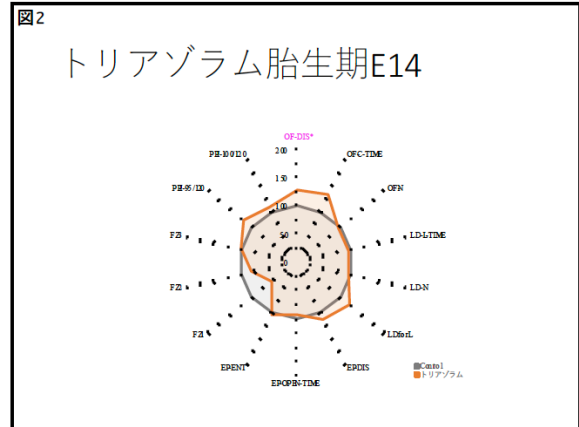
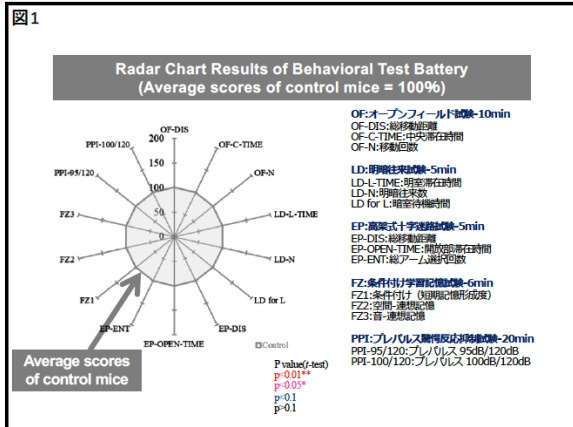


図7

イミダクロプリドP14

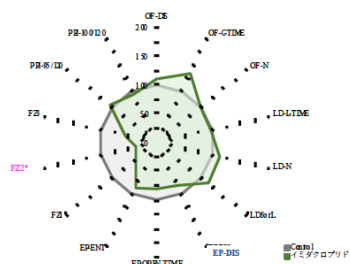


図8

イミダクロプリド成熟期

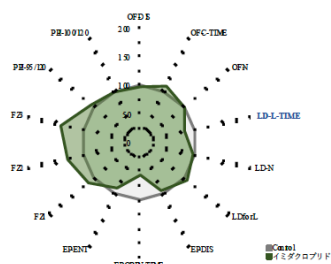


図9

アセタミプリド周産期0.01

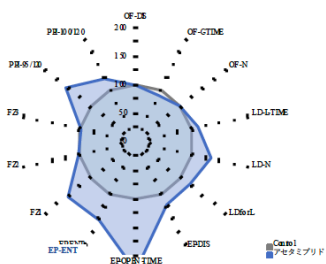


図10

イミダクロプリド周産期0.01

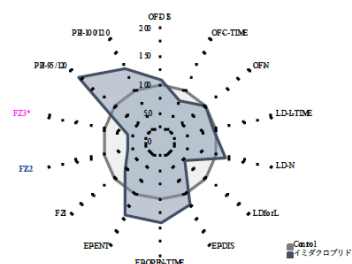


図11

ニコチン周産期0.01

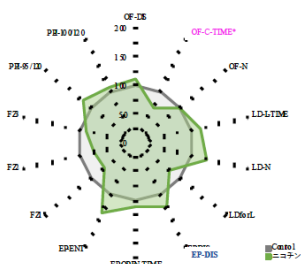
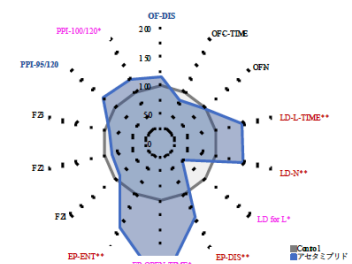


図12

アセタミプリド周産期0.1



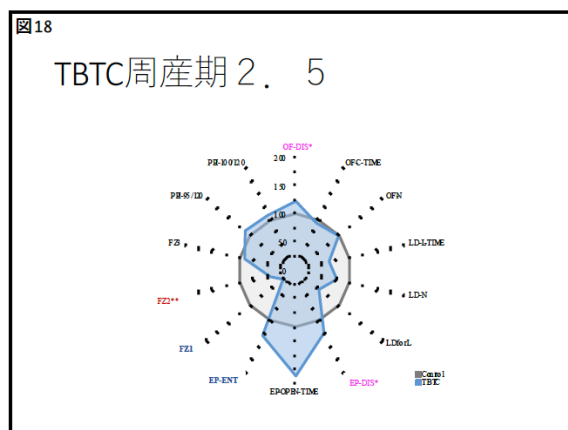
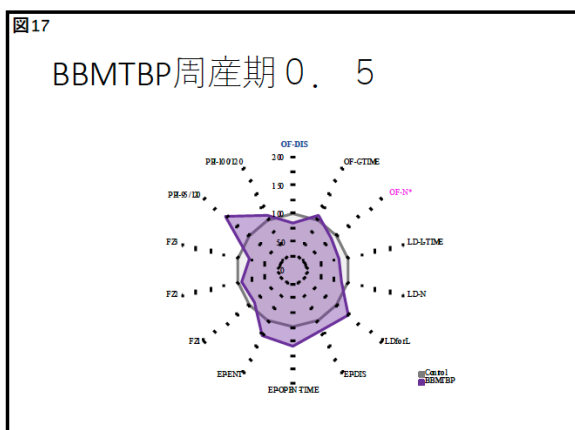
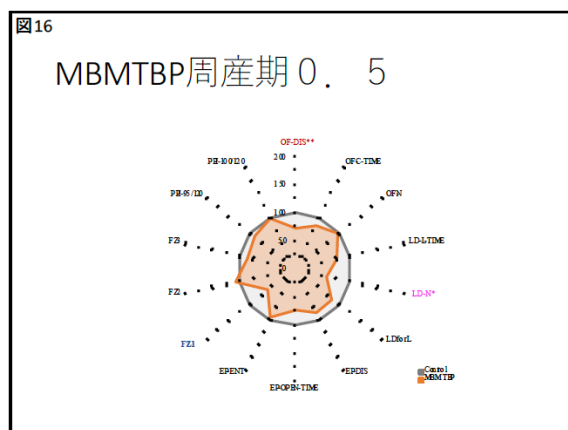
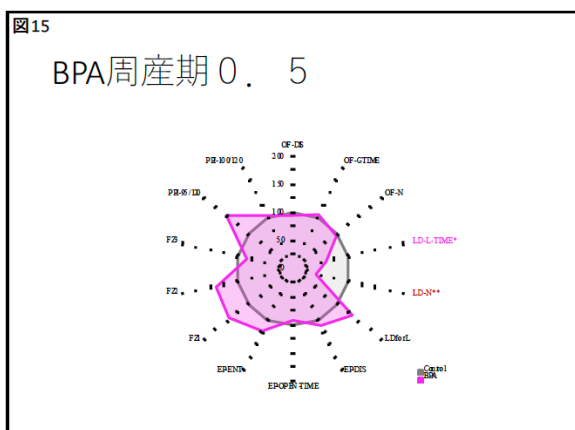
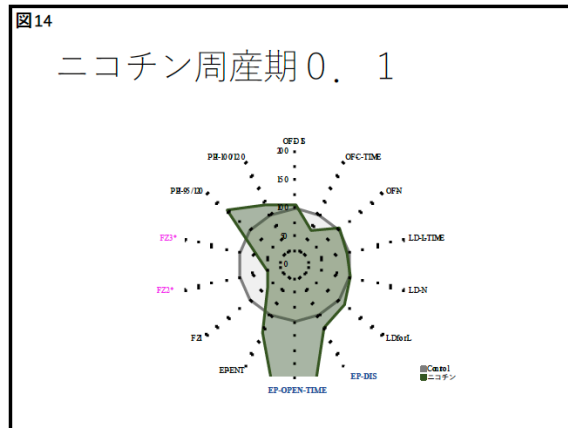
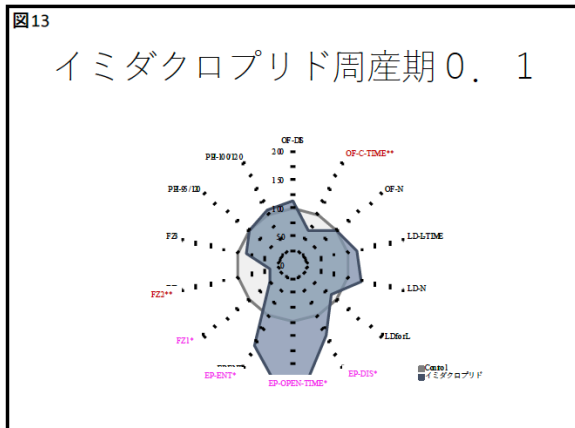


図19

TBTC周産期 2 5

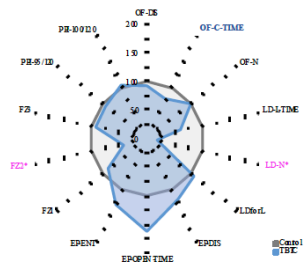


図20

TBTC周産期 2 5 0

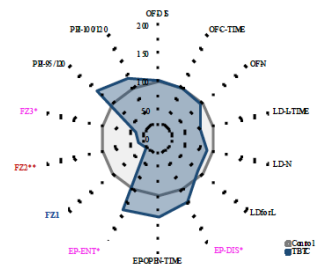


図21

ERaKI(Homo)_13w

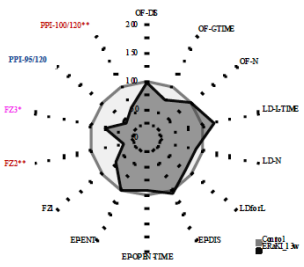
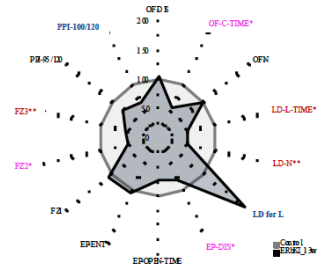


図22

ERbKI(Homo)_13w



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

(H30-化学一般-003)

分担研究課題名

「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。塩化トリブチルスズ(TBTC)を胎生11日から離乳4週齢まで慢性飲水暴露し、遅発性の中枢神経影響を解析した結果、トリブチルスズの発達期低用量暴露は、遅発的に興奮性神経伝達情報を攪乱する可能性が示唆された。モデル動物を対象とした検討により、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。今後ヒトへの外挿性の検討も含め、検討を進める必要があるだろう。

。

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を目的とした。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。実際の用途を想定した低用量にて長期飲水投与を行い、成熟期（生後 12 週～13 週）のマウスについて個体・器官（システム）レベル、組織・細胞レベル、分子レベルでの解析を行い、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した。

本分担研究テーマとしては、液性因子影響解析（神経内分泌解析）を担当した。家庭用品に含まれる化学物質の周産期ばく露による遅発性の中枢神経毒性の高精度な有害性評価が普遍性を持って実施可能とすることを目指した。

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。

妊娠マウス及び新生仔マウスに対して塩化トリブチルスズ(TBTC)を胎生 11 日から離乳 4 週齢まで慢性飲水暴露した（溶媒対照群 (Vehicle 群,

n=3)、TBTC 低用量群 (TBTC-L 群, n=3: 2.5 μ g TBTC/kg/day)、TBTC 中用量群 (TBTC-M 群, n=3: 25 μ g TBTC/kg/day)、TBTC 高用量群 (TBTC-H 群, n=3: 250 μ g TBTC/kg/day)。12 週齢まで育成後、行動解析を実施した仔マウスについて、14 週齢時に頸椎脱臼した後に脳を摘出した。左脳を RNA 安定化溶液 (RNA later 1.5ml) 中に 1 晩浸漬した後、-80 度凍結保存した。

各個体の左脳サンプルから mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い RNA を抽出精製した。逆転写は、PrimeScript reverse transcription kit (Takara, Otsu, Japan) を用いて行い (oligo dT プライマーと random N6 プライマーを用いた)、各試料の cDNA を合成した。遺伝子発現量は、Thunderbird qPCR mix (Toyobo, Osaka, Japan)、Light Cycler リアルタイム PCR 装置 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA) を用いて解析した。

標的遺伝子は、オキシトシン (Oxt)、オキシトシン受容体 (Oxtr)、前癌遺伝子 c-Fos (cFos)、細胞骨格関連タンパク質 (activity-regulated cytoskeleton associated protein, Arc)、興奮性アミノ酸トランスポーター3 (Slc1a1)、興奮性アミノ酸トランスポーター2 (Slc1a2)、興奮性アミノ酸トランスポーター1 (Slc1a3)、クレアチントランスポーター1 (Slc6a8) とした。変動が少なく内在性コントロールとしてよく用いられている 18s rRNA をコントロールとして比較 Ct 法で算出した。

次に、同定済の miRNA を対象として、モデルマウスの唾液および血液試料を用い、モデルマウスと野生型対照マウスとの比較、血液試料と唾液資料の比較を行った。使用したマウスは雄 BTBR T+ Itpr3tf/J (BTBR, Jackson Stock Number:002282) マウスおよびその対照として雌性 C57BL/6J マウス各群 7 匹を用いた。

唾液は綿球により採取し遠心分離にて 0.5 μ l

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

さらに、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。H20 本研究事業（201035010B）において開発したワンチューブ法を用いて miRNA を精製、cDNA を作成した。qPCR で複製、蛍光法により CP 値を求め元となったサンプルに含まれていた miRNA の発現量を定量した。miR-191 の発現量と比較することでサンプルごとに各 miRNA の相対的発現量として算出した。

C. 研究結果

TBTC 暴露について、液性情報（ホルモン）と神経伝達情報（神経伝達物質）双方の働きをもつ oxt ならびにその受容体 oxtr の発現量には、TBTC 投与効果は見られなかった（図 1）。神経活動を反映する神経細胞活動マーカーとしても知られる cFos

ならびに興奮性神経活動マーカーである Arc についても投与効果は見られなかった。ただし、cFos 発現については TBTC-M 群及び TBTC-L 群において若干の増加傾向が、Arc については TBTC-M 群においてのみ若干の増加傾向がみられた（図 2）。

NMDA 型受容体サブユニットの Nr2 遺伝子解析では、Nr2a には投与効果は見られなかったが、Nr2b 遺伝子については暴露用量依存的な低下傾向を見出した（図 3）。アミノ酸トランスポーター遺伝子の解析では、クレアチントランスポーター Slc6a8 には投与効果は見られなかったが、興奮性アミノ酸トランスポーターである Slc1a1, Slc1a2, Slc1a3 のいずれでも、TBTC-M 群において若干の増加傾向が見られた。

BTBR マウス実験について、28 検体（7 匹 \times 2 群 \times 唾液と血液） \times 9 遺伝子の計 252 試料の定量データを表 1 に示す。2 検体（個体番号 11 番の唾液試料における miR642a_1、個体 13 番の血液試料における miR642a_1）において発現を認めなかったが、同試料から他の遺伝子測定は行うことができていることから、欠損データとせず「0」として集計した（表 1）。群別試料別に比較すると、miR1184_2、miR1236_1、miR1280_1、miR196a_2、miR221_1、miR29c_1、miR320d_2 の 7 遺伝子が、BTBR 群は対照群に比して低い発現量であることがわかった（表 2）。miR1184_2 は血液試料において 70.15% の低下であり、唾液試料において 70.33% の低下だった。miR1236_1 は血液試料において 68.37% の低下であり、唾液試料において 70.67% の低下であった。miR1280_1 は血液試料において 71.26% の低下であり、唾液試料において 71.39% の低下であった。miR196a_2 は血液試料において 72.07% の低下であり、唾液試料において 76.15% の低下であった。miR221_1 は血液試料において 71.09 % の低下であり、唾液試料において 68.85% の低下であった。miR29c_1 は血液試料において 80.40 % の低下であり、唾液試料において 77.99% の低下であった。miR320d_2 は血液試料において 81.48% の低下で

あり、唾液試料において 86.36% であった。miR642a_1 は BTBR 群のほうが高く、miR652_3 は群間に違いはなかった。唾液試料と血液試料との違いはみられなかった (表 2)。

MS 実験について、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 3)。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

トリブチルスズの発達期暴露において、生後 20 日齢のマウス脳において AMPA 型グルタミン酸受容体 Grm2 遺伝子発現低下があることが報告されている (Ishida et al., Biol Pharm Bull. 2017;40:1121-1124)。本研究では遅発性の中枢神経毒性をターゲットとしているため、暴露後成獣になってからの遺伝子発現をみているため時期が

異なる。また、AMPA 型ではなく NMDA 型である点も異なる点にも留意が必要である。しかしながら、興奮性神経伝達情報が影響を受ける可能性は、クレアチントランスポーターには影響がなく興奮性アミノ酸トランスポーターの発現に若干の変化がみられた本研究の結果からも支持される。すなわちトリブチルスズの発達期低用量暴露は、興奮性神経伝達に遅発性の影響をもたらす可能性が示唆される。

興味深いことに、我々は以前、ダイオキシン類の低用量発達期暴露が、ラットにおいて遅発的に、Nr2a には影響を及ぼさず Nr2b 遺伝子発現を低下させることを見出している (Kakeyama et al., Neuroreport. 2001; 12:4009-4012)。すなわち Nr2b 遺伝子発現は、トリブチルスズに限定されず他の化学物質の遅発性中枢神経毒性を検出する有効な指標となる可能性が考えられる。

また、今回対象とした遺伝子群は、自閉スペクトラム症研究において、ヒトヒトのプロトン磁気共鳴スペクトロスコピー (MRI による MRS 解析) で得られる指標に対応したマウス遺伝子セットとして構築したものであり (Benner & Aoki et al., Mol. Psychiatry 2018)、すなわちヒトへの外挿性の高い指標となる可能性も期待できる。今回の TBTC 暴露による遺伝子発現変化のパターンは自閉スペクトラム症当事者のそれとは異なるものだが、今後、マウス行動解析指標との対応づけ、ヒト精神神経疾患当事者の MRS データとの対応づけを進めることで、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が期待される。

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

うち7遺伝子について、モデルマウスと野生型マウスで発現量が異なること、唾液と血液中発現量には大きな違いがないことが新たに明らかとなった。すなわち、これらの遺伝子群は新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

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

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

そこで本研究では、MS 条件における検証も行い、モデルマウスと野生型マウスで発現量が異なることを見出した。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

掛山正心. 高次脳機能の健康を阻害する幼少期の環境要因と遺伝要因. 日本衛生学雑誌. 2018 73:110-114. doi: 10.1265/jjh.73.110. PubMed PMID: 29848860.

掛山正心, ベナー聖子, 藤原昌也. マウスにおける自閉スペクトラム発現の行動指標. 日本生物学的精神医学会誌 2018, 29:103-108.

Benner S, Aoki Y, Watanabe T, Endo N, Abe O, Kuroda M, Kuwabara H, Kawakubo Y, Takao H, Kunitatsu A, Kasai K, Bito H, Kakeyama M, Yamasue H. Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Molecular Psychiatry* 2018, Sep 27. doi: 10.1038/s41380-018-0249-4. PubMed PMID: 30262887.

Endo N, Ujita W, Fujiwara M, Miyauchi H, Mishima H, Makino Y, Hashimoto L, Oyama H, Makinodan M, Nishi M, Tohyama C, Kakeyama M. Multiple animal positioning system shows that socially-reared mice influence the social proximity of isolation-reared cagemates. *Communications Biology* 2018, 1:225. doi: 10.1038/s42003-018-0213-5. PubMed PMID: 30564746 ; PubMed Central PMCID: PMC6290015.

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

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

乾ひとみ・石田綾・城宝大輔・藤原昌也・柚崎通介・掛山正心、2018、第29回日本行動神経内分泌研究会(2018年9月)、神奈川県立藤野芸術の家、セレブリン遺伝子欠損マウスの行動解析. 第29回日本行動神経内分泌研究会要旨集, 27.

亀池彩乃・齋藤直哉・牧野友祐・遠藤俊裕・藤原昌也・掛山正心、2018、第29回日本行動神経内分泌研究会(2018年9月)、神奈川県立藤野芸術の家、マウスの他個体識別・認識能力を定量化する新規行動課題. 第29回日本行動神経内分泌研究会要旨集, 30.

Takeyama M, 2018, The Joint Congress of the 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry and the 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. (2018年9月)、神戸国際会議場、Objective and quantitative analyses of social behaviors in group-housed mice. 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会合同年会プログラム集.

Takeyama M, 2018, Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology (2019年3月)、筑波大学、Progress and prospects of rodent social behavioral tasks: proximity, individual discrimination and cognition. Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology.

鈴木健、城宝大輔、掛山正心「マウスにおける意思決定の客観的及び定量的解析」第49回日本神経精

神薬理学会(2019.10.12-13) 福岡市.

城宝大輔、鈴木健、藤原昌也、斉藤貴志、西道隆臣、掛山正心「Appノックインマウスにおける認知機能の時系列変化の評価」第49回日本神経精神薬理学会(2019.10.12-13) 福岡市.

Suzuki T, Joho D, Takeyama M. Establishment of a decision-making task in mice. 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (2019.10.11-13) 福岡市.

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

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

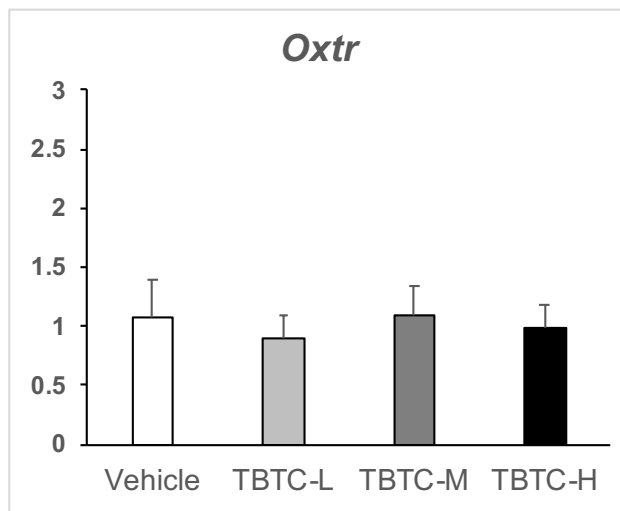
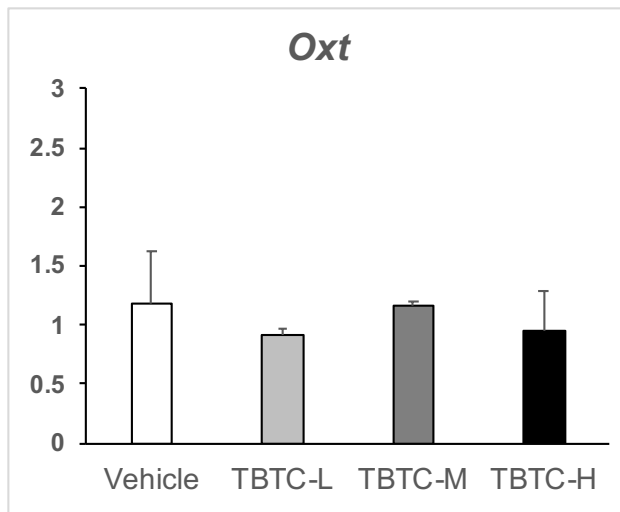


図 1. マウス脳 *Oxt*, *Oxtr* mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

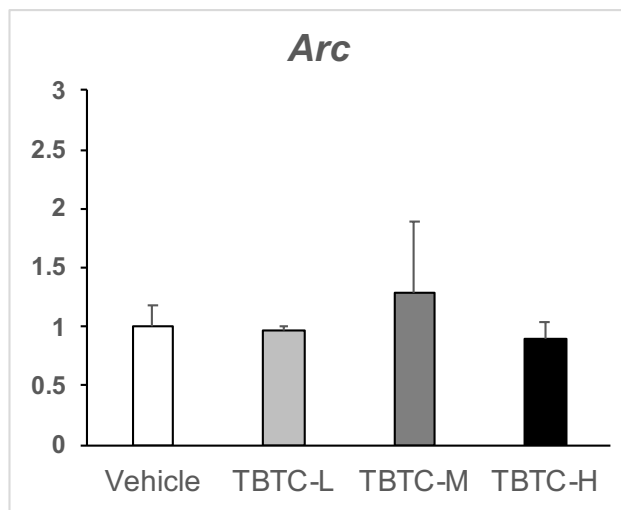
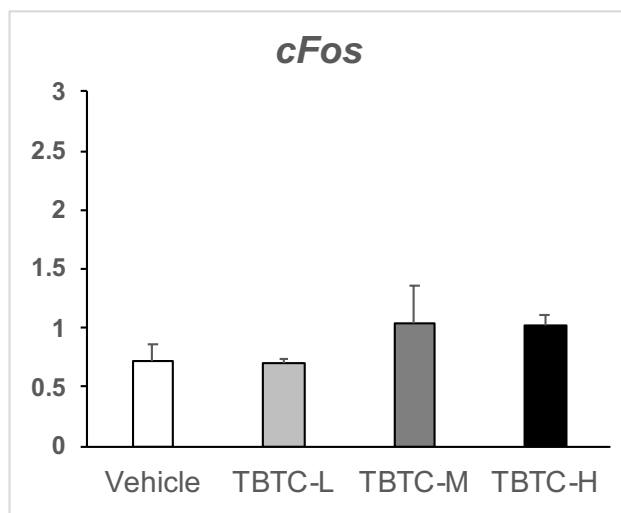


図 2. マウス脳 cFos, Arc mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

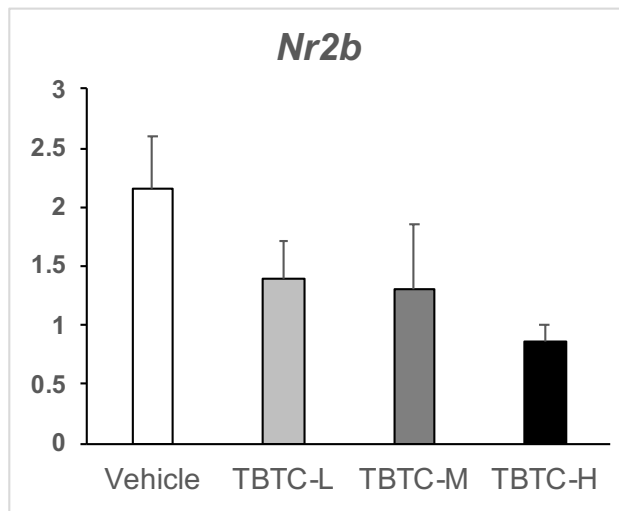
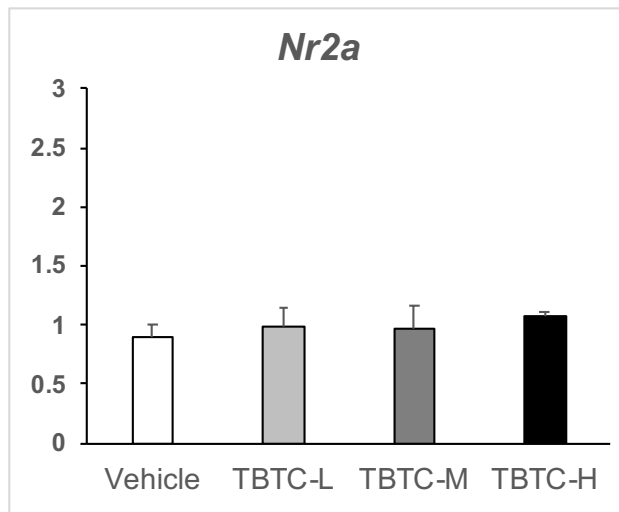


図 3. マウス脳 Nr2a, Nr2b mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

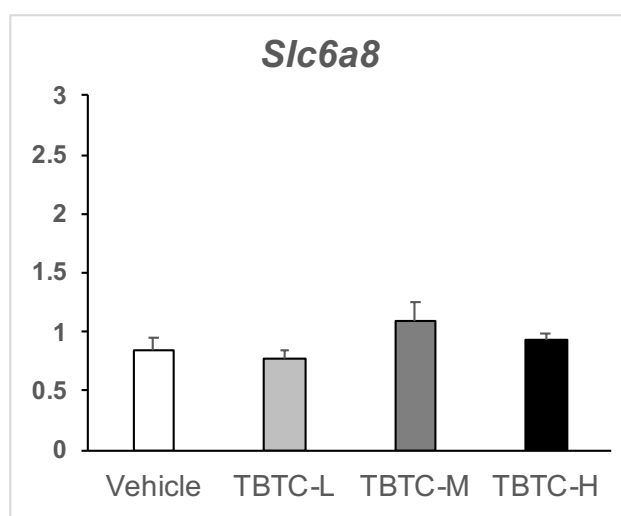
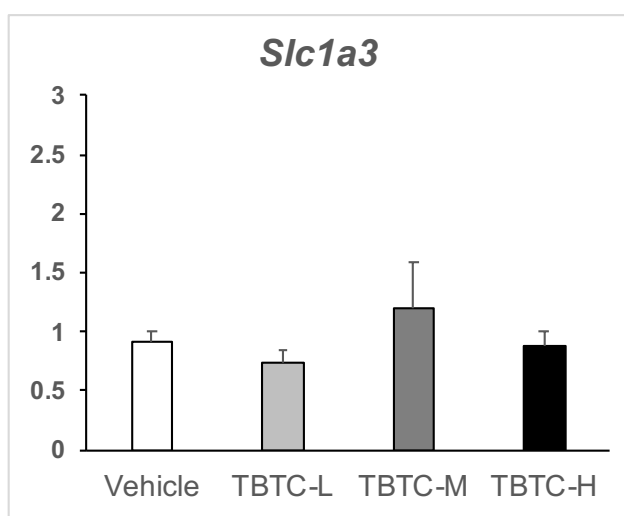
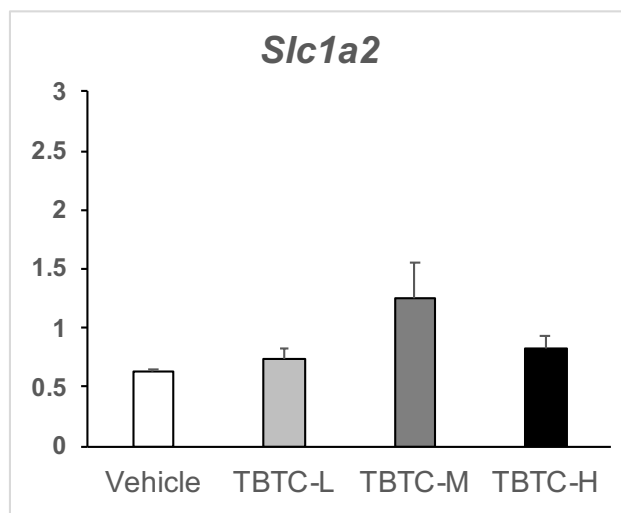
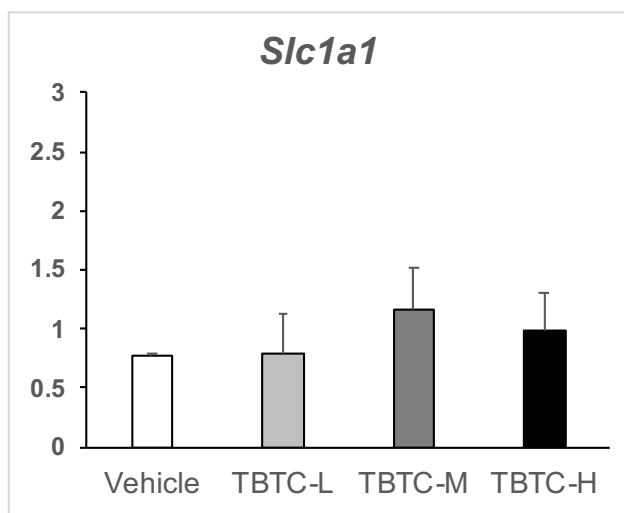


図 4. マウス脳 *Slc1a1*, *Slc1a2*, *Slc1a3*, *Slc6a8* mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

表1. BTBRマウスの各個体ごとの血液および唾液中の小分子RNA発現量

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

表2. 候補小分子RNAの唾液および血液中発現量

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

*n=7 in each group

表 3. 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樞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
「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 回のシャーファ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 100Hz1 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

ファ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 GABAA 受容体阻害薬の GABAZINE (10μM) を追加的に灌流しに応答を計測した。
- 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
マウス脳のブ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タログ化を可能とした (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

1. 論文発表
- 1) 書籍

- 2) 雑誌

- 1 Kajiwarara 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
 - 8 Tominaga Y, Taketoshi M, Maeda N, Tominaga T. Wide-field Single-photon Optical Recording in Brain Slices Using Voltage-sensitive Dye. *J Vis Exp*. 2019;(148):e59692. PMID: 31282882
 - 9 Kajiwara R, Tominaga Y, Tominaga T. Network Plasticity Involved in the Spread of Neural Activity Within the Rhinal Cortices as Revealed by Voltage-Sensitive Dye Imaging in Mouse Brain Slices. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:20. PMID: 30804757
 - 10 Koike-Tani M, Tominaga T, Oldenbourg R, Tani T. Instantaneous polarized light imaging reveals activity dependent structural changes of dendrites in mouse hippocampal slices. *bioRxiv*. 2019;523571.
 - 11 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. *Journal of Applied Toxicology*. 2019; PMID: 31415104
 - 12 Tominaga Y, Taketoshi M, Tominaga T. Overall Assay of Neuronal Signal Propagation Pattern With Long-Term Potentiation (LTP) in Hippocampal Slices From the CA1 Area With Fast Voltage-Sensitive Dye Imaging. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:389. PMID: 30405360
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
 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
 6. Yoko TOMINAGA, Maki KOIKE-TANI, Tomomi TANI, *Takashi TOMINAGA A fast intrinsic optical signal (fios) from unstained hippocampal slice is a novel kind of optical signal: comparison with the voltage-sensitive dye signal Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience 20191019 Chicago McCormick Place
 7. Yoko Tominaga, Makiko Taketoshi, Kentaro Tanemura, Takashi Tominaga Optical Recording

- Methods with Voltage-Sensitive Dye (VSD) Is Useful to Evaluate the Impact of Chemicals on Brain Activities in Acute and Late Effects. IUTOX 15th International Congress of Toxicology July 15–18, 2019 | Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
8. Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura. Early-Life Exposure to Low Levels of Permethrin Exerts Impairments in Learning and Memory Associated with Glial Cell Disturbance in Adult Male Mice. Hirokatsu Saito¹, Kenshiro Hara¹, Takashi Tominaga², Kinichi Nakashima³, Kentaro Tanemura¹. IUTOX 15th International Congress of Toxicology July 15–18, 2019 | Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
 9. *Machida Y, Yamada Y, Mizunuma S, Tominaga T, Kajiwar R: Time-lapse optical imaging system for monitoring the resting membrane potential change of neurons in a mouse brain slice. Proc of Life Eng Symp 2019, 139-142, 2019 / ISSN: 2187-9605
 10. 富永貴志「脳神経回路膜電位イメージングの技術支援」新学術領域「個性」創発脳 第4回若手の会・技術支援講習会 2019年11月14日～15日会場:自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 中会議室
 11. 富永 貴志, 富永 洋子 「光信号で「見る」神経回路のはたらきー膜電位感受性色素(VSD)を中心に」シンポジウム 1SCP 生物物理で見る脳神経回路 (オーガナイザー: 富永貴志、Bernd Kuhn) 第57回日本生物物理学会年会、宮崎県シーガイアコンベンションセンター 2019年9月24日ー26日 9月24日 (招待公演)
 12. 富永貴志 「脳神経回路膜電位イメージングの技術支援」新学術領域「個性」創発脳 第4回若手の会・技術支援講習会 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 中会議室 2019年11月14日～15日
 13. 富永貴志・富永洋子・竹歳麻紀子 「脳の「個性」創発の神経機構を測る計測技術ー膜電位感受性色素による回路動態計測 新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月2日招待講演
 14. 齊藤 洋克¹、後藤 萌¹、原 唯香¹、富永 貴志²、種村 健太郎 「マウス行動様式と海馬神経回路機能ー系統間差と交雑影響ー」 新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月1日
 15. 原唯香、齊藤洋克、富永貴志、種村健太郎 「成熟マウスにおける条件付け学習記憶の形成・維持・想起・消去の性差」新学術領域研究「個性」創発脳 第4回領域会議 (香川県琴平町・琴参閣) 2019年8月1日
 16. 富永貴志, 富永洋子「神経回路ダイナミクスのリアルタイム光学計測: 膜電位感受性色素 (VSD) と早い内因性信号 (FIOS) Optical recording of the real-time in vitro neural circuit dynamics: the voltage-sensitive dye (VSD) imaging and the fast intrinsic optical signal (FIOS)」 (シンポジウム 2S06 膜電位イメージング: 新展開 Voltage Imaging: What's New?, Bernd Kuhn, 富永貴志オーガナイズ) 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日 (金) 朱鷺メッセ (新潟市)
 17. 富永 洋子 / Yoko Tominaga:1 竹歳 麻紀子 / Makiko Taketoshi:1 富永 貴志 / Takashi Tominaga:1 マウス海馬長期増強 (LTP) の光学測定 Optical evaluation of the long-term potentiation (LTP) of the mouse hippocampal slices 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日 (金) 朱鷺メッセ (新潟市)
 18. 山本 融 / Tohru Yamamoto:1 尾嶋 大喜 / Daiki Ojima:1 Hossain MD Razib / MD Razib Hossain:1 多田 篤史 / Atsushi Tada:1,2 黒川 直弘 / Naohiro Kurokawa:2 長澤 研 / Ken Nagasawa:2 琢磨 和晃 / Kazuaki Takuma:2 中井 雄規 / Yuhki Nakai:3 高橋 弘雄 / Hiroo Takahashi:1 富永 貴志 / Takashi Tominaga:3 岸本 泰司 / Yasushi Kishimoto:2 シナプス形成抑制因子 MDGA ファミリー分子群の欠失が引き起こす E/I バランス偏移がもたらす認知・行動異常 Cognitive and behavioral impairments caused by E/I imbalance in MDGA1/2 synaptic suppressor deficient mice. 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日 (金) 朱鷺メッセ (新潟市)
 19. 梶原 利一 / Riichi Kajiwar:1 富永 洋子 / Yoko Tominaga:2 富永 貴志 / Takashi Tominaga:2 嗅周囲皮質/嗅内皮質ネットワーク可塑性への遅延性不活性化カリウム電流の関与: マウス脳スライスの膜電位イメージング D-current related plasticity in the perirhinal-entorhinal network: a voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会 2019年7月26日 (金) 朱鷺メッセ (新潟市)
 20. 富永貴志「低用量化学物質ばく露が誘発する脳回路機能変調を検出する膜電位イメージング解析」シンポジウム 26 第46回日本毒性学会学術年会 2019 2019年7月28日 (金曜) アスティとくしま 「幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神

経影響の評価の現状」

21. 石原 康宏 1, 本田 達也 1, 富永 貴志 2, 伊藤 康一 3, 山崎 岳 「胎児期バルプロ酸曝露のミクログリア活性と神経回路機能に及ぼす影響」第 46 回日本毒性学会学術年会 2019 2019 年 7 月 28 日 (金曜) アスティとくしま
22. 高橋和可子, 竹歳麻紀子, 富永洋子, 石原康宏, 富永貴志「バルプロ酸とミノサイクリンの周産期投与による遅発性の海馬回路機能変化の膜電位感受性色素による可視化解析」11 回日本生物物理学会 中国四国支部大会 (広島県民文化センター) 2019 年 5 月 11 日
23. 中井雄規, 尾嶋大喜, 山本融, 富永貴志「海馬神経回路の興奮/抑制 (E/I) バランスを欠く MDGA1 欠損マウスにおける歯状回長期増強への影響」11 回日本生物物理学会 中国四国支部大会 (広島県民文化センター) 2019 年 5 月 11 日
24. T Tominaga, Y Tominaga, Theta phase-dependent competitive long-term potentiation in area CA1 of the hippocampal slices caused by feed-forward and feedback gabaergic control 286.02 / F6 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2018 (2018. 11. 3-7) サンディエゴ
25. Takashi Tominaga Voltage-sensitive dye imaging: practical application to evaluate hippocampal and related cortical activities in health and disease 2018/10/20 OIST Mini Symposium "Voltage Imaging Symposium" (Organizer: Bernd Kuhn) OIST Seminar Room C209 (2018. 10. 19-21) *Invited lecture*, 恩納村
26. Takashi Tominaga: Voltage-sensitive dye imaging of the brain slice preparation - the hippocampus and the related cortexes. Merocyanine 540 45+1 MBL, Speck Auditorium in Rowe building (2018. 9. 1-2018. 9. 4) *Invited lecture*, ウッズホール
27. 富永貴志「膜電位感受性色素を用いた脳神経回路活動の定量解析: 海馬と関連領域の例から」第三回 新学術領域「個性創発脳」若手研究者の会・技術支援講習会 (2018. 11. 16-17) 招待講演, 東京都
28. 富永貴志, 富永洋子「The paired burst facilitation (PBF) of the hippocampus employ the distinct feedforward- and feedback- GABAergic controls in the circuit 海馬 CA1 でペアドバースト促進 (PBF) はフィードバックとフィードフォーワードの異なる GABA 作動性制御を使う」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018. 9. 15-17), 岡山市
29. Gusain Pooja, Taketoshi Makiko, Tominaga Yoko, Tominaga Takashi Voltage-sensitive dye imaging of the interhemispheric neural activity across the anterior cingulate cortex (ACC) via corpus callosum 日本生物物理学会第 56 回年会 (2018. 9. 15-17), 岡山市
30. 河野 睦, 世戸 彩華, 富永 貴志, 石田 正樹, 堀 学「Molecular mechanism of escape response induced by mechanical stimulation in Paramecium 機械刺激がゾウリムシの逃走反応を誘導するしくみ」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018. 9. 15-17), 岡山市
31. Takashi Tominaga, Yoko Tominaga「A view with voltage-sensitive-dye onto the function of the hippocampal neural circuit 膜電位感受性色素 (VSD) で測る海馬神経回路のはたらき」シンポジウム「OS: 脳神経回路の動作を見て測る」(オーガナイザー: 富永貴志, 梶原利一, 九里信夫) 計測自動制御学会 ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2018 (2018. 9. 10-12) 招待講演, 郡山市
32. 富永 貴志, 富永 洋子「海馬 CA1 野でシーターバースト刺激はフィードバック, フィードフォワード GABA 調節を使って位相依存的な LTP を起こす Feedforward- and feedback- GABAergic control of the theta burst stimulation (TBS) induce phase-dependent selective long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus.」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
33. 富永洋子, 谷一小池 真紀, 谷知巳, 富永貴志「マウス海馬 CA1 野における新規の早い内因性光学計測: 膜電位感受性信号との比較 Novel fast intrinsic optical signal related to the membrane potential change in the area CA1 of hippocampal slices in mice: comparison to the voltage-sensitive dye signal」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
34. 和歌山ゆうか, 山田悠太, 富永貴志, 富永洋子, 梶原利一「マウス脳スライス上の VSD 信号を用いた嗅周囲皮質の局所的な GABA 作動性抑制系システムの解析 Analysis of Local GABAergic inhibitory system in Perihinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Signal

in Mice brain Slices.」 第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市

35. Pooja Gusain, Makiko Taketoshi, Yoko Tominaga, Naoko Maeda, Takashi Tominaga
「Analysis of functional connectivity of mice brain by real-time optical recording」
第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
36. 富永貴志, 種村健太郎 膜電位感受性色素による脳神経回路イメージング Imaging of neuronal circuit activity with voltage-sensitive dye - stability matters 新学術領域研究「個性」創発脳 第 3 回領域会議 (2018. 7. 23) 招待講演, 京都府
37. 富永 貴志, 富永 洋子 「子どもへの低用量化学物質暴露が誘発する脳回路機能異常のイメージング解析」シンポジウム「子どもへの低用量化学物質暴露が誘発する情動認知行動影響とその評価系の開発 Development of evaluation methods on emotional and cognitive behavioral toxicity induced by low-dosed chemical exposure at early life stage」(オーガナイザー: 種村健太郎, 北嶋聡)
第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 18-20) 招待講演, 大阪市
38. 常盤 果那, 竹歳 麻紀子, 富永 洋子, 富永 貴志 「ネオニコチノイド類の妊娠期投与が起こす遅発性脳機能異常の神経回路 機構解析」
日本生物物理学会第 10 回中四国支部大会 (2018. 5. 20) 高知市
- 39.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

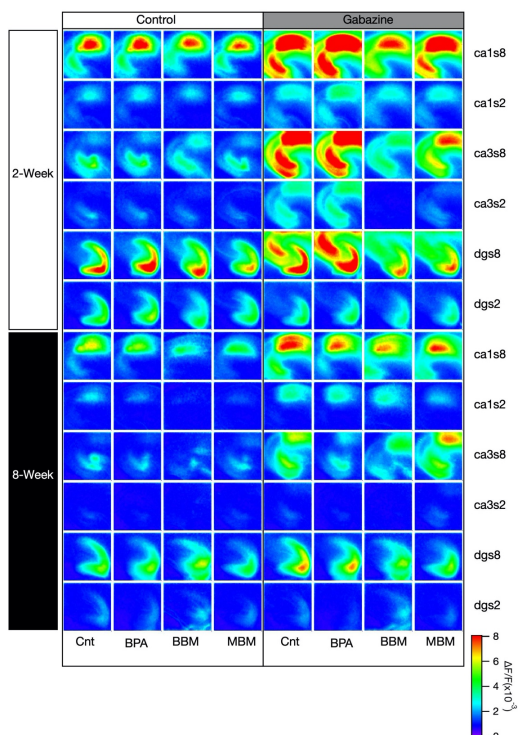


図 1 VSD 信号の最大値の投射図 動物は 2 週齢と 8 週齢で、CA1、CA3、DG のそれぞれの入力繊維に異なる刺激強度で刺激を加えた時の結果。それぞれ、通常の ACSF 溶液と GABAA 受容体阻害薬 (gabazine 10 μ M) を加えた時の応答の 5-6 スライスの応答の平均値を示している。

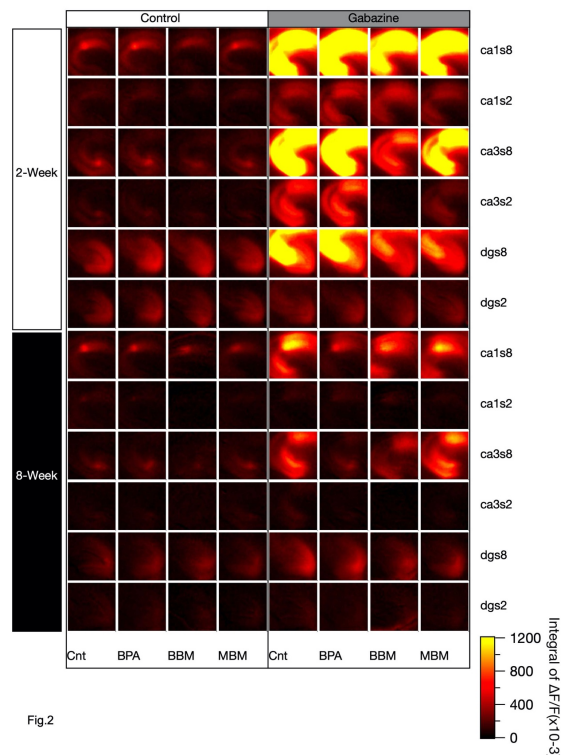


Fig.2

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

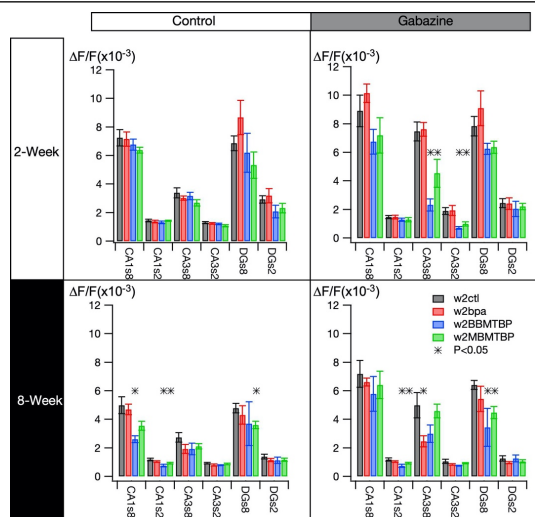


図 3 VSD 信号の最大値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

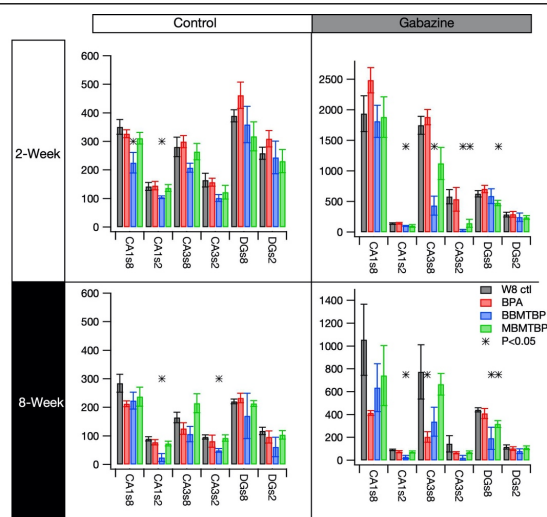
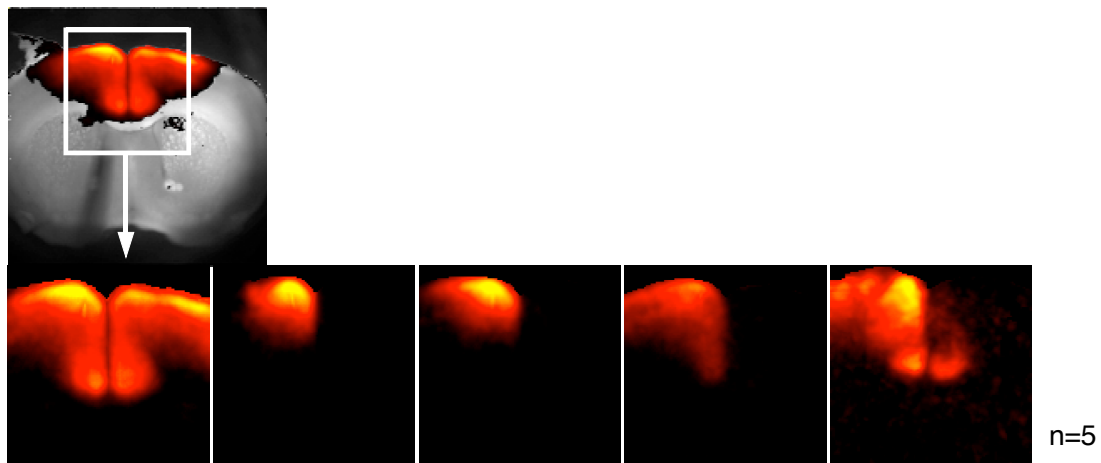


図 4 VSD 信号の積分値の平均値を CA1、CA3、DG の各領域で数値化して示した。平均 \pm SEM ANOVA で有意な差があった群に*をつけた。

A



B

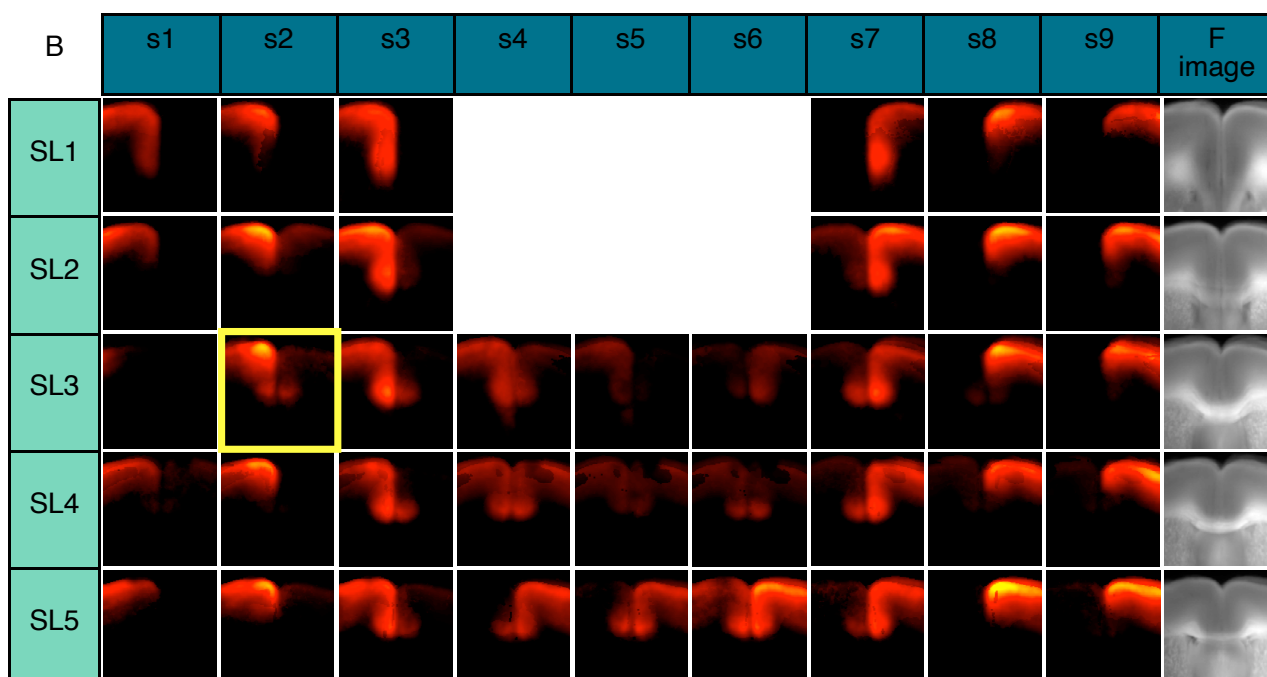


図 5 マウス前頭前野皮質での興奮伝播パターンのアトラスの作成。

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

分担研究課題名

「家庭用品化学物質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。まず、胎生11日から生後28日までトリブチルスズを、低用量（ $2.5 \mu\text{g/kg/day}$ ）、中用量（ $25 \mu\text{g/kg/day}$ ）、高用量（ $250 \mu\text{g/kg/day}$ ）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。さらに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

Vehicle (V) (飲水+0.0001%溶媒エタノール)、TBTC 耐用1日摂取量 (TDI) $0.25 \mu\text{g/kg/day}$ の10倍量である $2.5 \mu\text{g/kg/day}$ (TBTC-L)、 $25 \mu\text{g/kg/day}$ (TBTC-M)、 $250 \mu\text{g/kg/day}$ (TBTC-H) を胎生11日から生後28日まで飲水投与を行った。その後生後91日から95日まで、BrdU を 50mg/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。さら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

図1および図2に示したように、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 (図3)。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

- Hamazaki N, Kyogoku H, Araki H, Miura F, Horikawa C, Hamada N, Shimamoto S, Hikabe O, Nakashima K, Kitajima TS, Ito T, Leitch HG, Hayashi K. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature* 2020, 589:264-269. PMID: 33328630 DOI: 10.1038/s41586-020-3027-9
- 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* 2020, 358:104237. PMID: 33137650 DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104237
- Takeuchi A, 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

4. Mishima Y, Brueckner L, Takahashi S, Kawakami T, Otani J, Shinohara A, Takeshita K, Garvilles RG, Watanabe M, Sakai N, Takeshima H, Nachtegael C, Nishiyama A, Nakanishi M, Arita K, Nakashima K, Hojo H, Suetake I: Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3. Genes Cells 2020, 25:22-32. PMID: 31680384 DOI: 10.1111/gtc.12732
5. Yoshikawa Y, Ago T, Kuroda J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, Shibahara T, Nakashima H, Nakashima K, Kitazono T: Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury. Neuroscience 2019, 398:193-205. PMID: 30528855 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.046
6. Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K: Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. J Appl Toxicol 2019, 39:1651-1662. PMID: 31415104 DOI: 10.1002/jat.3882
7. Noguchi H, Castillo JG, Nakashima K, Pleasure SJ: Suppressor of fused controls perinatal expansion and quiescence of future dentate adult neural stem cells. Elife 2019, 8:e42918. PMID: 30973324 PMID: PMC6459675 DOI: 10.7554/eLife.42918
8. Nakajo M, Uezono N, Nakashima H, Wake H, Komiya S, Nishibori M, Nakashima K: Therapeutic time window of anti-high mobility group box-1 antibody administration in mouse model of spinal cord injury. Neurosci Res 2019, 141:63-70. PMID: 29604317 DOI: 10.1016/j.neures.2018.03.004

2. 学会発表
<国内>

1. 中島欽一[○]:ミクログリアからニューロンへの直接分化転換による脳梗塞治療法の開発、STROKE2021、福岡県、福岡国際会議場、2021年3月11日-13日(シンポジウム)
2. 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)
3. 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
4. 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
5. 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リプログラミング、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
6. 中島欽一[○]:脊椎動物の初期発生とエピジェネティクス、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
7. 中島欽一[○]: Artificial generation of new neurons in adult central nervous systems、第42回日本分子生物学会年会、福岡県、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2019年12月3-12月6日(3日)(シンポジウム)
8. 中島欽一[○]: Artificial Production of New Neurons in the Adult Central Nervous System、Cell&Gene Therapy Asia2019、神戸市、Sheraton Kobe Bay Hotel & Towers、2019年11月11日-12日(12日)
9. 中島欽一[○]: Prior inhibition of HMGB1enhances human neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury、9th International DAMPs and Alarmins Symposium、岡山県、岡山大学Junko Fukutake Hall、2019年11月6日-8日(6日)(招待)
10. 中島欽一[○]:転写因子NeuroD1によるミクログリアからニューロンへのダイレクトリプログラミングのメカニズム、第91回日本遺伝学会、福井県、

福井大学文京キャンパス、2019年9月11日- 14日(13日)(ワークショップ)

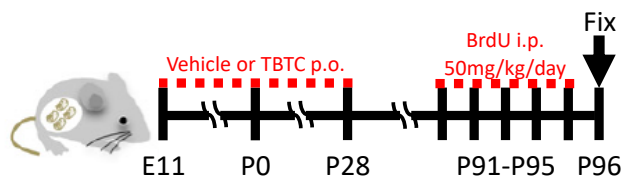
11. 中島欽一[○]:生体神経組織における人為的ニューロン新生とその作用、第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、福岡県、国民宿舎マリントラスあしや、2019年9月5日- 7日(5日)(招待講演)
12. 中島欽一[○]:胎生期バルプロ酸曝露によるけいれん感受性増大のメカニズムとその改善法、第46回日本毒性学会学術年会、徳島県、アスティとくしま、2019年6月26日- 28日(28日)(シンポジウム)
13. 中島欽一[○]: 転写因子 ND1によるミクログリアからニューロンへのダイレクトリプログラミングの分子基盤、第46回日本毒性学会学術年会、徳島県、アスティとくしま、2019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

<国際>

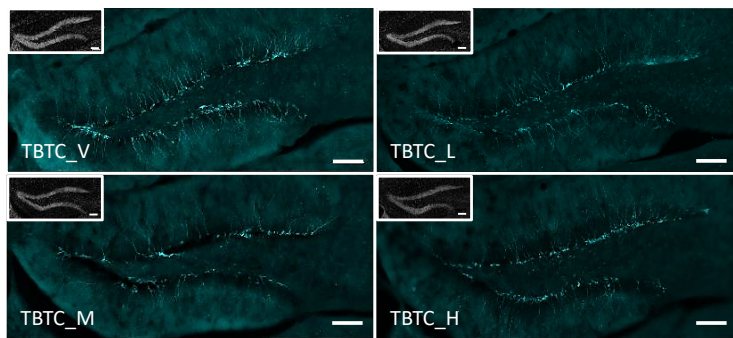
1. Nakashima, K.: Artificial neurogenesis in the adult central nervous system and it's effect on functional recovery after injury, 2nd Neuroepigenetics & Neuroepitranscriptomics, Nassau, Bahamas, March 3-6, 2020

G. 知的所有権の取得状況

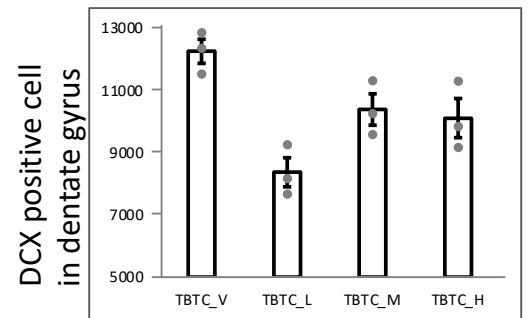
- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 特になし |



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

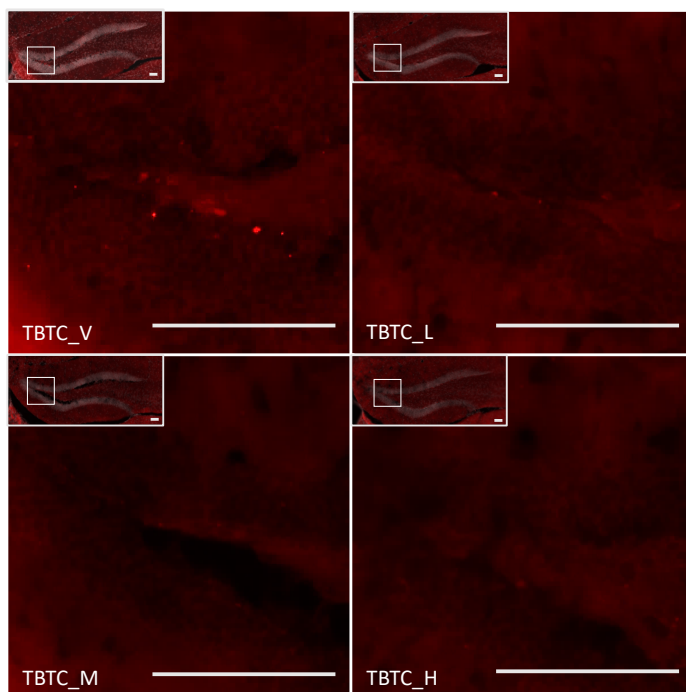


DCX Hoechst scale bar: 100 μ m

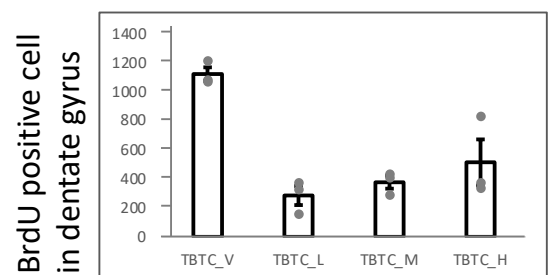


Mann-Whitney U-test
 n=3 per group

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。

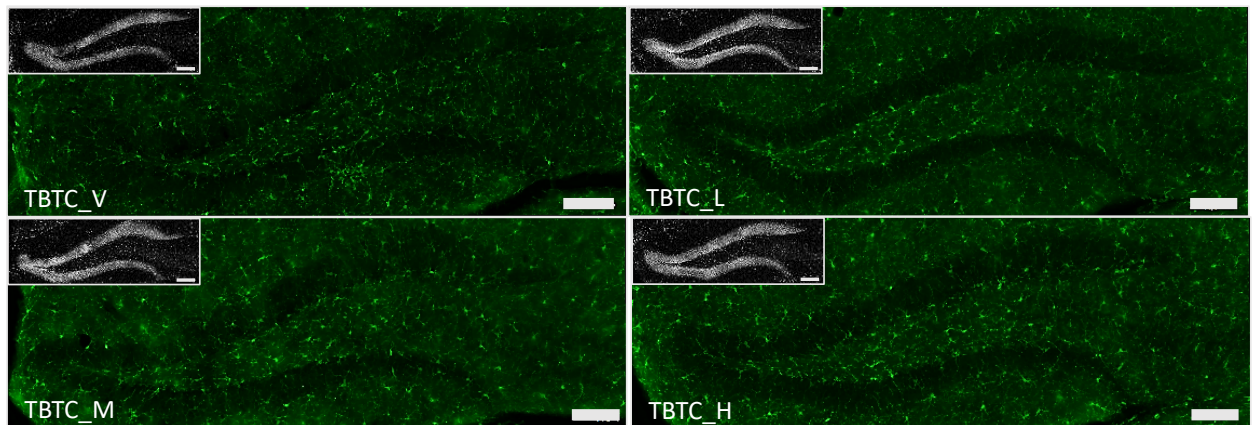


BrdU Hoechst scale bar: 50 μ m

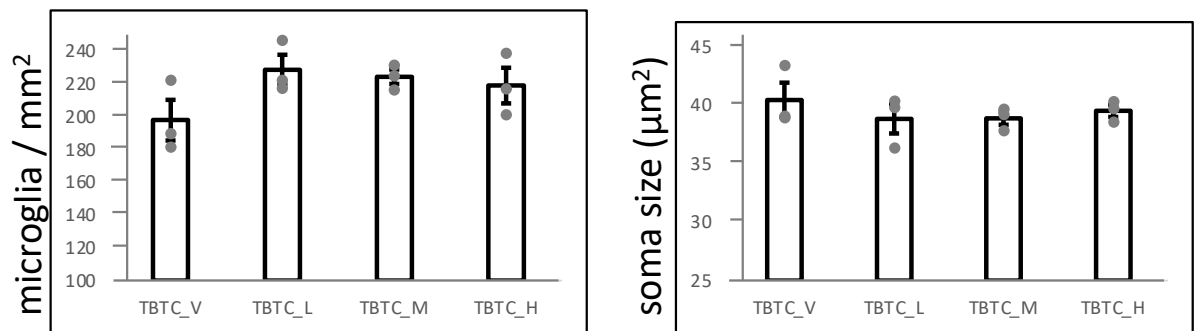


Mann-Whitney U-test
 n=3 per group

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」

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

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

平成 30 年度は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質としてニコチンを、周産期マウス（胎生 11 日～離乳生後 4 週齢）に各 0.01 mg/kg/day を周産期飲水投与後、成熟後 13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、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 0.01 mg/kg/day (ADI の 1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬では、投与群では、いずれも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、情動認知行動に影響する可能性が高いこと、一方、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期の中枢神経系において、より多くの標的分子が存在する可能性が示唆されるが、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。また、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、この場合も同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

平成 31(令和元)年度は、家庭用品に含まれる化学物質として、ビスフェノール類を取

り上げ、具体的には、ビスフェノール A(BPA)とゴム老化防止剤である BBMTBT (4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)) および MBMTBT (2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)) を、周産期マウス (胎生 11 日～離乳生後 4 週齢) に、いずれも 0.5 mg/kg/日を周産期飲水投与後、得られた産仔雄マウスを用いて成熟後 13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、3 物質ともに、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、また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ず、顕著な情動認知行動影響は認められないことが示唆された。

令和 2 年度は、BPA 及びニコチンについて、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比較した。その結果、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ず、不安関連行動に係るシグナルネットワークの描出はできなかった。

以上、検討した結果からは、今後特に、解析の結果見出された、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドとの標的分子及びシグナルネットワークの差異、あるいはネオニコチノイド系農薬とニコチンとの標的分子及びシグナルネットワークの差異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。

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、の中には、フタル酸エステルやビスフェノールAといった、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが明らかな物質が含まれている。被験物質として、従来型の毒性試験法による毒性情報が利用可能で、周産期ばく露による中枢神経毒性に関する情報がなく、かつ、中枢神経系に発現している各種受容体に対して親和性がある家庭用品化学物質を選択した。具体的には、塗料剤、ゴム製品老化防止剤、防虫加工剤を選択する。

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

BPA及びニコチンを選択した。

B. 研究方法

マウス、被験物質及び投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc（日本エスエルシー）を用いた。

被験物質は、ネオニコチノイド系農薬（2種）、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）、モデル化学物質としてのニコチン（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。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水（水道水）に添加し（エタノールの最終濃度は 0.01 %）、一日投与量として、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慢性飲水投与した。投与用量（0.01 mg/kg/日）は、各物質の許容 1 日摂取量（ADI）（アセタミプリド:0.07 mg/kg/day、イミダクロプリド: 0.06 mg/kg/day）を参考に、ADI より 10 倍程度低い用量として選択した。対照群には、0.01 %エタノールを含む水道水を摂取させた。

ビスフェノール A（BPA, Cas No. 80-05-7, 分子量:228.29, カタログ No. 04225-10, 純度 : >98.0%, 関東化学株式会社）およびゴム製品老化防止剤（2種）、4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)（BBMTBP, Cas No.85-60-9, 分子量 : 382.59, カタログ No.B0724, 純度:>97.0%,

東京化成工業株式会社)、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール) (MBMTBP, Cas No. 119-47-1, 分子量: 340.51, カタログ No. M0217, 純度: >99.0%, 東京化成工業株式会社)を使用した。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水(水道水)に添加し(エタノールの最終濃度は 0.0001 %)、一日投与量として、0.5 mg/kg/日を胎生 11 日から離乳 4 週齢までの周産期マウスに慢性飲水投与した。投与用量 (0.5 mg/kg/日) は、BPA の耐容一日摂取量 (TDI) (0.05 mg/kg/day; EFSA) を参考に、その 10 倍量程度の用量を設定した。対照群には、0.0001 %エタノールを含む水道水を摂取させた。

いずれの場合も、飲水投与後、12 週齢時に情動認知行動解析を行い(n=8-9)、その後、13 週齢時の海馬 (n=3; 8-9 例から 3 例をランダムに選択)について網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

遺伝子発現変動解析

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳(海馬)(各群 n=3)について、Percellome 法(遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。マウス海馬は、氷冷下にて左脳から、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の 4 部位に分割することにより得た。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に

4℃で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 µL 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℃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：平成 30 年度は、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質ニコチンについて検討した。

C-1-1：アセタミプリドの場合の海馬（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 のアセタミプリド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。

205 ps (増加)、 924 ps (減少)

増加分 205 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抽出されてこなかった(>E-4)。

一方、減少分 924 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が、IPA による Canonical pathway による検索においては、CREB シグナルが見いだせたことから、神経伝達や長期記憶の抑制が示唆された。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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として CREBBP や APP が抽出され、CREB シグナル、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が示唆された(この標的遺伝子数： 29)。この抑制機序は現時点では不明である。

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、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドを 0.01 mg/kg/day (ADI: 0.07 mg/kg/day 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) CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆された。

C-1-2: イミダクロプリドの場合の海馬(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、投与群でニューロン (Mtap2)、アストロサイト (Gfap) および神経幹細胞 (Nes) マーカーの有意な発現減少が認められた。このことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が減少、およびグリア細胞が減少している事が示唆された。この原因として、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化が抑制された可能性、あるいは神経幹細胞減少している可能性が示唆されたが、観察された神経幹細胞マーカーの有意な発現減少は、後者を支持するものと考ええる。

次いで、対照群と比較し、0.01 mg/kg/day のイミダクロプリド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。

153 ps (増加)、 6,090 ps (減少)

増加分 153 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった(>E-4)。

一方、減少分 6,090 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、シナプス形成シグナル、CREB シグナル、エフリン受容体シグナルおよびタンパクユビキチン化シグナルが見いだせたことから、神経伝達や長期記憶の抑制、シナプス形成の抑制および軸索誘導の抑制が誘発されていることが示唆された。発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、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 β 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)するシグナルが抑制されている可能性が示唆されたが、Canonical pathway による検索で影響が示唆されたシグナルとの関連は不明である。

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、ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリドを 0.01 mg/kg/day (ADI: 0.06 mg/kg/day 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異なり、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が減少、およびグリア細胞が減少している事が示唆された。この原因として、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化が抑制された可能性、あるいは神経幹細胞が減少している可能性が示唆されたが、観察された神経幹細胞マーカーの有意な発現減少は、後者を支持するものと考えられ、2) シナプス形成シグナル、CREB シグナル、エフリン受容体シグナルおよびタンパクユビキチン化シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制、シナプス形成の抑制および軸索誘導の抑制が誘発されていることが示唆された。このことは、上記した、投与群では対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることと関係している可能性が考えられる。

C-1-3: 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 のアセタミプリド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は抽出されてこなかった(>E-4)。

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いだせなかった。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)。

以上の通り、ニコチンを 0.01 mg/kg/day

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

このように、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0.01 mg/kg/day (ADI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、投与群では、いずれも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆された。この点、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

一方、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期の中枢神経系において、より多くの標的分子が存在する可能性が示

唆されるが、この場合も、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

アセタミプリドとイミダクロプリドの場合、投与群では、いずれも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、発現減少を示した遺伝子群が似ていることが示唆されたため、両者の集合関係を検討した。両者で共通して発現減少した遺伝子数は 402 ps であったが、この遺伝子について IPA による Canonical pathway による検索を実施したところ、CREB シグナルが抽出され、このことは、両物質の場合に共通して、海馬における神経伝達や長期記憶の抑制の誘発の示唆を支持するものと考ええる。

C-2:平成31(令和元)年度は、ビスフェノール A(BPA)とゴム老化防止剤である BBMTBT (4,4'-ブチリデンビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール))および MBMTBT (2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール))について検討した。

C-2-1: 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-2-2 : BBMTB の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

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

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

236 ps (増加)、 102 ps (減少)

増加分 236 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

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

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

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

C-2-3 : MBMTB の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較

を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

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

852 ps (増加)、 69 ps (減少)

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

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

サイトカインとして TGF-B1 が抽出されてきたが、神経系の有害事象との関連は見出せなかった (>E-4)。

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

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

このように、ビスフェノール類 BPA、BBMTBT 及び MBMTBT を 0.5 mg/kg/日 (BPA の TDI の 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、投与群では、いずれも 1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。したがって、この投与用量、投与期間といった条件では、これらの物質により、海馬における神経機能に顕著な影響はないものと考えられた。

次いで、発現が増加あるいは減少した遺伝子について、各 3 化合物間の集合関係を検討した。3 化合物で共通して発現が増加した遺伝子数は 11ps であったが、3 化合物に共通して発現が減少した遺伝子はなかつ

た。この共通して増加した 11 ps につき Common Name で以下に記載すると、Lipt1、Ctbs、E130309D02Rik、6530403M18Rik、C030013D06Rik、Zbtb1、Galnt13、Inpp4b、Csmd1、Mettl14 及び Nup54 であった。この遺伝子リストからは特定のシグナルネットワークを見いだすことはできなかった。

C-3：平成 30 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、BPA 及びニコチンについて検討した。

C-3-1：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：

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。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いだ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、Ccgc134、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。

なお再解析の結果、ニコチンの場合、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。

D. 結論

平成 30 年度は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質としてニコチンを、周産期マウス(胎生 11 日～離乳生後 4 週齢)に各 0.01 mg/kg/day を周産期飲水投与後、成熟後 13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、投与群ではアセタミプリド及びイミダクロプリド、いずれの場合でも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、情動認知行動に影響する可能性が高いこと、また、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期の中樞神経系において、よ

り多くの標的分子が存在する可能性が示唆されるが、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。一方、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、この場合も同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

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

令和 2 年度は、BPA 及びニコチンについて、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比較した。その結果、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ず、不安関連行動に係るシグナル

ネットワークの描出はできなかった。

以上について検討した結果からは、今後特に、解析の結果見出された、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドとの標的分子及びシグナルネットワークの差異、あるいはネオニコチノイド系農薬とニコチンとの標的分子及びシグナルネットワークの差異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

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 5: 167-170, 2018.

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

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

北嶋 聡、エディトリアル：ドーピングの中毒学・毒性学-序文-、中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.) 32: 373-374.2019.

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 CC14. *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 Shibana, 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；フグ毒のリスク評価について、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、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第 45 回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid, the 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASAITOX2018), (2018.6.19) Pattaya, Thailand

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α

and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第 45 回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMine による標的予測、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

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

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

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第 35 回食品化学シンポジウム (2019.11.8.) 東京

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

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

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

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

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

種村 健太郎、北嶋 聡、菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性—子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在—、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.) 徳島

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.) ハワイ

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.) ハワイ

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the

Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.) ハワイ

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

家庭用品化学物質が周産期の中樞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

「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】

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。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。加えて、情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の3時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施した。その結果、細胞増殖促進（発現増加）及び抑制（発現減少）に関わる遺伝子、神経細胞分化マーカー（発現増加）、グリア細胞分化マーカーとその上流遺伝子（発現増加）が確認され、情動認知行動の逸脱を裏付ける客観的指標として有用であることが強く示唆された。

A. 研究目的

情動認知行動異常を呈したマウスの中枢神経組織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。

加えて、外因性の要因により誘発される情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の 3 時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

B. 研究方法

B-1 情報収集：

平成 27 年度は、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（2015 年 10 月 8～9 日、OECD 経済開発協力機構 フランス・パリ）へ出席した。第 2 回マレーシア毒性学会（マレーシア、クアラルンプール、2015 年 10 月 29 日）において内分泌かく乱化学物質問題と子供の毒性についての招待講演、ECETOC ワークショップ「生殖毒性におけるエピジェネティクスの役割」（ベルギー、ブリュッセル、2015 年 11 月 12 日）においてシグナル毒性の概念とエピジェネティクスに関する招待講演、基礎生物医学研究所における第 63 回カンファレンス（2015 年 12 月 1 日）においてシグナル毒性と内分泌かく乱化学物質問題についての招待講演を行った。また、第 37 回日本中毒学会学術集会（2015 年 7 月 17 日、和歌山）、第 42 回日本中毒学会学術年会（2015 年 7 月 1 日、金沢）にて、遅発性中枢毒性に関する発表を行った。

平成 28 年度は、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：今年度は非開催となった（次年度 5 月開催予定）。2016 年 9 月 14～15 日に USEPA Accelerating Risk Assessment Workshop（於 国環境防護庁（D.C., USA））、2016 年 9 月 19～20 日に European Commission International Workshop on Endocrine Disruptors（於 Hotel Bloom, Rue Royale 250, 1210 Brussels, Belgium）、2016 年 10 月 10～12 日に European Centre For Ecotoxicology and toxicology of Chemicals (ECETOC) Workshop on Applying ‘Omics Technologies in Chemicals Risk Assessment（於 NH Eurobuilding Hotel, Madrid, Spain）、2016 年 11 月 29 日に The Korean Academy of Science and Technology International Symposium（於 Maple

Hall, The Plaza Hotel, Seoul, Korea）、に出席し、情報収集を行うとともに、本研究班における成果の一部を情報発信した。

平成 29 年度は、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 8th 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。

B-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析：

情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の 3 時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

B-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠 8 日齢の C57BL/7NcrSlc 雌マウス（日本 SLC）を購入し、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日の胎児終脳を採取する。

B-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、Y 染色体配列の検出により雄性を判別する。その際に用いる CR プライマーは下記である。

・ Y-chromosome specific sequence
sense: 5' GAC TGG TGA CAA TTG TCT AG 3'
antisense: 5' TAA AAT GCC ACT CCT CTG TG 3'

B-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点の終脳の遺伝子発現解析を Percellome 法により実施する。

(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：

平成27年度は、内分泌かく乱化学物質評価のためのAOPに関して、研究成果の報告及び提案を行うとともに、試験及び評価に関するテストガイドライン作成に向けて、参加各国及び関連研究機関を含む国際協調の下で最新の情報を交換し、今後の方針について討議を行った。各学会等において、情報収集と意見交換を行った。

平成28年度は、USEPA Accelerating Risk Assessment Workshop：国際的な規制当局の科学支援研究者による様々なレベルの複雑な要件を含む定量的なリスク評価のための新たな優先付け、スクリーニングなどのツールの適用に関するディスカッションを行う場においてシグナル毒性としての知見を口頭発表(30分)し、2日間の会を通じて、情報交換を行った。

EC International WS on Endocrine Disruptors：EU内、及び関係する国際的な通商関係にあるパートナー間での内分泌かく乱化学物質の試験法と評価に関するアプローチの共通点と相違点を明らかにし、その評価への適応法を論議するとともに、シグナル毒性としての内分泌かく乱化学物質の研究と試験法開発に関する知見を口頭発表(30分)し、2日間の会を通じて、情報交換を行った。

ECETOC WS：オミクス技術の化学物質リスク評価への適応に関する会合にて、今後の戦略構築に関するブレインストーミングと、それを受けての企画委員会に参画した。

The Korean Academy of Science and Technology International Symposium：環境汚染物質への暴露と糖尿病発症に関するシンポジウムにおいて、そのメカニズムに関わる分子機構の考え方の例として、シグナル毒性の考え方、実際のデータ、及び解析手法を口頭発表(20分)により

提示した。

平成29年度は、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 8th 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 33th 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、特別講演を行った。

C-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析：

C-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠8日齢のC57BL/7NCrSlc 雌マウス(日本

SLC)を購入し、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日に胎児を順次摘出し、全ての胎児の実体顕微鏡下にて終脳を採取し、RNA レイター中に浸漬し保管した。この、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点（以下、E11、E14、E17 と表記）、各 3 標本のクオリティチェックを行った。その結果、Percellome 法による遺伝子発現解析が可能であることが確認できた。

C-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、終脳の採取時に得た胎児の尾部によって、Geno Typing による雌雄判別を行った(2015 年 12 月 7～8 日)。胎児尾部を溶解し、Y 染色体配列の検出により雄性胎児を選抜した。

C-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生 11.5 日胎児 1 匹の終脳では、Percellome 法において必要な総 RNA 量に満たないため、4 胎児分の終脳をプールし 1 標本とした(2016 年 2 月 29 日)。胎生 14.5 日、17.5 日の終脳に関しては十分な組織量であるため、1 胎児 1 標本とした。以上を踏まえ、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点、各 3 標本により Percellome 法による遺伝子発現解析を実施した。

N=3 のサンプルサイズにおける群間 t 検定の $p < 0.01$ 、細胞一個当たり mRNA コピー数 1 以上の Probeset のリストを解析した。経時的な遺伝子発現の増減を分類し、その PS 数を表 1 に示した。E14 から E17 にかけて、急速に発現増加する (E14 < E17 と表記) 遺伝子の数が増加することが示された。細胞増殖、分化に関わる遺伝子のいくつかを図 1 ～11 に示す。細胞増殖促進（発現増加）及び抑制（発現減少）に関わる遺伝子、神経細胞分化マーカー（発現増加）、グリア細胞分化マーカーとその上流遺伝子（発現増加）が確認された。

D. 考察

本研究班において得られた分子生物学的な所見に裏打ちされた成果、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るとともに高評価を得え、その研究の方向性について妥当性と新規性が確認された。国際的に、この様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。

本研究班において得られた分子生物学的な所見、及び、それを裏付けるデータ取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されるとともに、その研究の方向性について妥当性と新規性が確認された。

国際的に、この様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。

自らデータを作成しない方針を取る国や組織も、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。

E. 結論

当研究班の研究計画、成果とともに、交流した範囲において国際的に一定の評価を得た。また、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし。

2) 雑誌

1. Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F.(2015) Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep*.;5:12281
2. Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H.(2015) Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci*.;106(7):825-32.
3. Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K,

Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* :16(2):192-201

4. Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci* 10: 339- , 2016.
5. Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol Cell* 64(2): 251-266, 2016.
6. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H., Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107(7): 924-935, 2016.
7. 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.*
8. 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

1. Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study

(2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

2. 菅野 純、複合影響の考え方—マウンテン・オブ・ハピネスから「ホルミシス」まで—(2016.2.26)、化学物質の安全管理に関するシンポジウム-複数化学物質のリスク評価-、東京、シンポジウム
3. 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性-毒性学的観点からの考察-(2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演
4. 菅野 純、OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み (2015.12.11)、環境ホルモン学会第 18 回研究発表会、栃木、シンポジウム
5. Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium
6. Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral
7. Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral
8. Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium
9. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro

- Tanemura and Ken-ichi Aisaki, “Signal Toxicity” to study Endocrine Disruptors Issues and Children’s Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote
10. Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies (2015.10.21), 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEHE 2015), South Africa, Symposium
 11. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study (2015.9.15), 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015), Porto, Portugal, poster
 12. 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露・遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について(2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010)、東京、セミナー
 13. 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるかー有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験よりー(2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム
 14. 菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dinamic Biomaker) のカタログ化とその毒性予測利用 (2015.7.1)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
 15. 北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度暴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中枢影響解析 (2015.6.30)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、口演
 16. 北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
 17. 菅野 純、高橋祐次、高木篤也、小川幸男、広瀬明彦、石丸 直澄、今井田克己、Taquann 直噴全身暴露吸入法によるナノマテリアル有害性評価 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
 18. 津田洋幸、徐結苟、酒々井真澄、二口 充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野 純、多種のカーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
 19. Jun Kanno, Construction of “Dynamic Biomarkers” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “Signal Toxicity”, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25) Jeju, Korea, 特別講演
 20. Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, 2, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masumi Suzui, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Involvement of macrophage in inducing proliferative and neoplastic lesion development of the pleura of rats intrapulmonary treated with multi-walled carbon nanotubes, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
 21. Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Development of High Dispersion-Small Scale Whole Body Inhalation System

- for Nanomaterials (Taquann System): Application to Multi-wall Carbon Nanotube, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
22. Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
 23. Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity. 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016. 6. 29)
 24. Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016. 10. 3), Merida, Mexico
 25. Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study, Society of Toxicology 55th Annual Meeting (2016. 3. 16), New Orleans, USA.
 26. 菅野 純 Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology. 第 105 回日本病理学会総会 (2016. 5. 13)
 27. 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡 Percellome Project の進捗 ―単回および新型反復曝露の比較による予測性向上― 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016. 7. 1)
 28. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study. The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016. 9. 6), Seville, Spain.
 29. Jun Kanno, Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016) (2016. 10. 3), Merida, Mexico
 30. Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health. The 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016. 11. 29), Seoul, Korea,
 31. Kentaro Tanemura and Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period Induced by pesticide exposure at juvenile period. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016. 10. 5), Merida, Mexico
 32. 種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純 キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解, 析第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016. 6. 30)
 33. 種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純 キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析, 第 159 回日本獣医学会学術集会 (2016. 9.)
 34. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA
 35. 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
 36. 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

37. Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary
38. 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.
39. Jun Kanno, Satoshi Kitajia, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster
40. 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。

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った。1年目は、全ゲノムレベルでのDNAメチル化データを蓄積させるために、その主な解析手法の一つであるMBD2-seq法の精度評価を行い、安定したデータを得られる各種条件の設定に成功した。2年目と3年目は、家庭用品化学物質がDNAメチル化に影響を与えるかを判定する細胞システムを導入することを目的とし、そのような評価システムとして、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。以上、本分担研究では、家庭用品化学物質が有する可能性のあるDNAメチル化影響を精度高く解析する手法の設定および、そのような化学物質を評価するシステムの構築に成功した。

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

1) MBD2-seq 法の精度評価

DNA メチル化の網羅的解析手法として、サンプルのゲノム DNA を断片化し、メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD2 で DNA メチル化の高いゲノム DNA 断片を濃縮し、配列を次世代シーケンサーで網羅的に解析する MBD2-seq 法がある。本手法の利点は、全ゲノムをフルに配列決定するのではなく、事前に DNA メチル化の高い領域を濃縮することで解析に値するゲノム領域を絞り込むことが出来ることにある。

2) DNA メチル化影響評価システム

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

1) MBD2-seq 法の精度評価

本分担研究は、本研究班で明らかとなる周産期ばく露中枢神経系遅発影響化学物質について、DNA メチル化影響を網羅的に調べる位置付けの研究である。よって、解析手法の精度の高さがより一層求められる。そこで1年目は、MBD2-seq 法の精度について標準サンプルを用い、解析手法の精度評価を行った。具体的には、マウス大脳皮質由来ゲノム DNA を標準サンプルとし、本法の各ステップ、I) ゲノム DNA の断片化、II) MBD2 による高メチル化ゲノム断片の濃縮、III) 次世代シーケンサーライブラリ作製、IV) 網羅的 DNA 配列決定、V) 配列解析による DNA メチル化評価、の各々について評価した。その結果、全てのステップにおいて安定したデータを得られる各種条件の設定を行うことに成功した。

2) DNA メチル化影響評価システム

2年目の検討として、HEK293T 細胞に tdTomato をレポーターとするベクターを導入し、定量測定可能か検討したところ、蛍光レポーターは感度が低く、定量測定が困難であった。そこで、レポーターとしてルシフェラーゼも導入し、定量測定可能であることを確認した。

3年目の検討として、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。その結果、予想に反し、5-azaC を添加してもルシフェラーゼ活性は上昇せず、ほとんど変化しなかった。その理由として、レポーターコンストラクトがオープンクロマチンに挿入され、基本レベルのメチル化程度が低く、5-azaC を添加してもそれ以上の DNA 脱メチル化が生じなかった可能性が考えられた。実際、パイロシーケンス法によって検討した結果、Agouti-IAP, Daz1 promoter のどちらも DNA メチル化程度が低く、仮説が裏付けられた。

そこで次に、HEK293T 細胞ではなく、Neuro-2A 細胞を試すこととした。Neuro-2A 細胞も HEK293T 細胞同様、様々な研究室で研究に用いられており、標準的評価システムとして用いやすいと考えられ

たからである。その結果、Fig.1に示すように、5-azaC 添加によりルシフェラーゼ活性が上昇する結果を得ることが出来た。さらには、5-azaC 添加による DNA メチル化の低下も確認された。以上から、Neruo-2A を用いることで、化学物質の DNA 脱メチル化作用をルシフェラーゼ活性の亢進として検出可能な評価システムを構築することが可能であることが示された。なお、本評価システムは論文発表済みである (*J Toxicol Sci.* 46, 83-90, 2021)。

D. 考察

3 年間の研究により、家庭用品化学物質の DNA メチル化影響について、精度高く全ゲノムレベルでのデータを得るための MBD2-seq 法の整備に成功し、迅速かつ正確に DNA メチル化影響に関するデータを得るための評価システムの構築に成功した。今後は特に、構築した DNA メチル化影響評価システムを活用し、本研究班で取り上げた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ことが望ましい。それにより、周産期ばく露を受けた個体の中枢神経系における DNA メチル化変化の有無を考察に資することが出来る。

E. 結論

エピジェネティック毒性は細胞の性質を半恒久的に変化させる性質があることから、非常に重要な毒性の一つである。しかし、細胞のエピジェネティック状態を評価するには高度な生化学手法が必要なため、エピジェネティック毒性の評価はあまり進んでいない。本研究により構築した DNA メチル化影響評価システムはそのようなエピジェネティック毒性研究の現状を打破しうるツールとなると考えられる。今後は、本システムを家庭用品化学物質のみならず、様々な化学物質の検討に用い、化学物質の DNA メチル化影響を総合的に評価し、影響メカニズムの解明、バイオマーカーの開発など、一歩踏み込んだ解析を行うことが重要である。

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.

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

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

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

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

Tanaka T, Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Ideta-Ohtsuka M, Woo GH, Yoshida T, Igarashi K, Shibutani M. Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Toxicol Sci.* 2019;44(2):93-105. doi: 10.2131/jts.44.93. PubMed PMID: 30726815.

Watanabe Y, Abe H, Nakajima K, Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Aberrant Epigenetic Gene Regulation in GABAergic Interneuron Subpopulations in the Hippocampal Dentate Gyrus of Mouse Offspring Following Developmental Exposure to Hexachlorophene. *Toxicol Sci.* 2018 May 1;163(1):13-25. doi: 10.1093/toxsci/kfx291. PubMed PMID: 29301063; PubMed Central PMCID: PMC5917777.

2. 学会発表

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

G. 知的所有権の取得状況

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

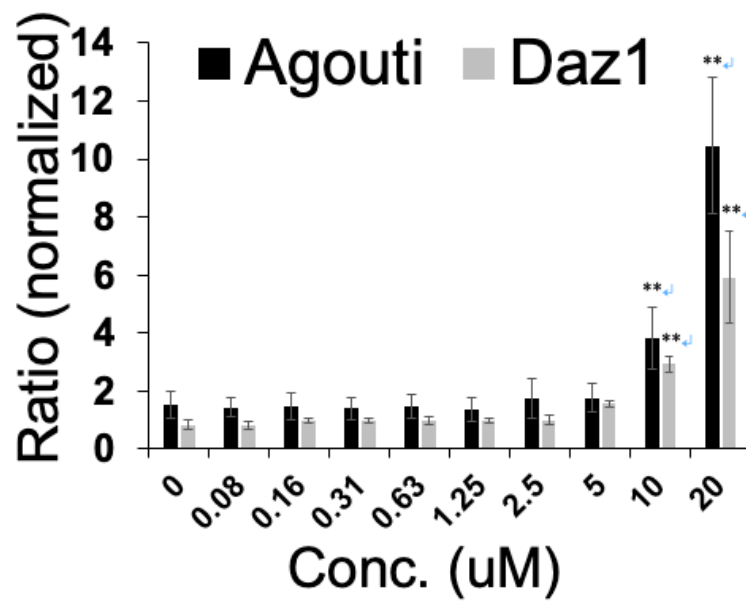


Fig.1 5-azaC による Agouti-IAP, Daz1 プロモーター活性亢進の確認

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。

平成 30 年度-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)

総合報告書

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。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ため、平成30度はまず、マウス胎仔脳および脳オルガノイドをシングルセルRNA-seqに供与し、シングルセルレベルでのRNA発現変動検出パイプライン固めを行った。令和元年度は、昨年度に得たマウス胎仔脳および脳オルガノイドをシングルセルRNA-seqデータを参考に、胎生後期由来のニューロンを用いて、化学物質暴露によりエピゲノム変化を介して特定RNA発現に影響することで機能的脳形成が乱されるのか、を検討し、良績を得た。令和2年度は、前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しうる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、遺伝子にとらわれずに、RNA を毒性評価対象とし、周産期家庭用品化学物質暴露の影響を鋭敏に検出する RNA マーカー整備を行うこととした。

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した。

[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った。

C. 研究結果

初年度である平成 30 年度の概要を報告書の末尾図に示す。シングルセル解析から得た、胎仔期大腦における細胞構成の変遷を示している。この場合、胎生 11 日目 (E11) から 1 日ごとに E16 までの計約 1 万の細胞を解析しており、全部で 10 コの細胞群に大別することがわかる (色で識別されている)。また、発達にとまうこれら細胞の出現・消失もプロファイリングで

きており、マーカー遺伝子の動態から、神経幹細胞 (NSC) のうち、ニューロンに分化するものとグリア (アストロサイト・オリゴデンドロサイト) に分化するものも識別することが可能となった。同様の結果を脳オルガノイドモデルについても得た。

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

最終年度である令和 2 年度は、前年度までに項目[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。Vehicle (V) (飲水+0.0001%溶媒エタノール)、TBTC 耐 1 日摂取量 (TDI) 0.25 μ g/kg/day の 10 倍量である

2.5 μ g/kg/day 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なように、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 GO 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

これまで 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しうる 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. Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi T, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AM, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T and Nakashima K. Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion. *Neuron*. 2019 Feb 6;101(3):472-485. e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.010. Epub 2019 Jan 9. PMID:30638745.

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

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

4. 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. Conditional kisspeptin neuron-specific Kiss1 knockout with newly generated Kiss1-floxed and Kiss1-cre mice replicates a hypogonadal phenotype

of global Kiss1 knockout mice. J Reprod Dev. 2020 Aug 20;66(4):359-367. doi: 10.1262/jrd.2020-026. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32307336

5. Takouda J, Katada S, Imamura T, Sanosaka T, Nakashima K. SoxE group transcription factor Sox8 promotes astrocytic differentiation of neural stem/precursor cells downstream of Nfia. Pharmacol Res Perspect. in press

6. 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. MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP-Smad signaling. Cell Rep. in press

2. 学会発表

<国内学会>

1. 今村拓也○:プロモーターノンコーディングRNA獲得によるほ乳類遺伝子活性化機構の多様化、第41回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2018年11月28日-30日(30日)(ワケショップ)

2. 今村拓也○:長鎖ノンコーディングRNAによる胚エピゲノム制御、第36回日本受精着床学会総会・学術講演会、千葉市、幕張メッセ国際会議場、2018年7月26日-27日(27日)(シンポジウム)

3. 今村拓也○、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:転写因子を基盤としたマウス神経幹細胞のDNAメチローム変換、第12回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでの2・7、2018年5月24日-25日(24日)(ポスター)

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

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

ー発表)

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

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

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

9. 亀田朋典○、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一:ニューロンは神経活性化により新規DNAメチル化を介してエンハンサー活性を調節し、興奮性シナプス形成に影響する、第42回日本分子生物学会年会、福岡市、福岡国際会議場、2019年12月3-6日(ポスター発表)

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

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

11. 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

12. 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

13. 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

<国際学会>

1. Imamura, T.○: Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals , 2018 Korea-Japan Joint Symposium on Neurodevelopment, Korea, June 8-10, 2018

2. Imamura, T.○: Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals , The 18th International Symposium on Developmental Biotechnology , Seoul National University, November 1-2, 2018

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

Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation

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

2019年9月22日

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

Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation

ISSCR/KSSCR International Symposium, 韓国, ポスター発表

2019年9月26日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

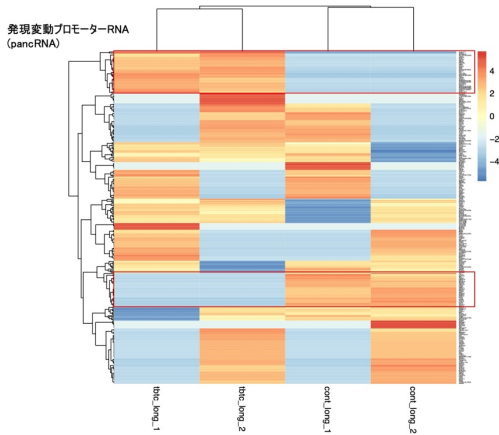
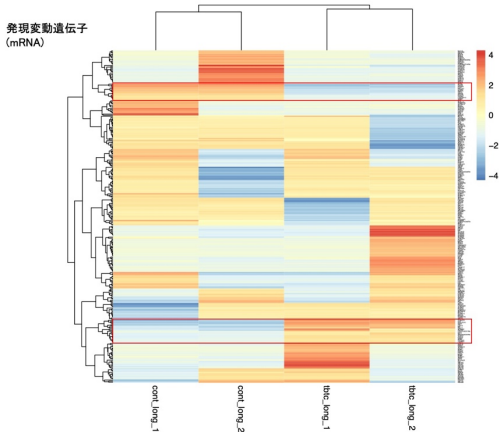
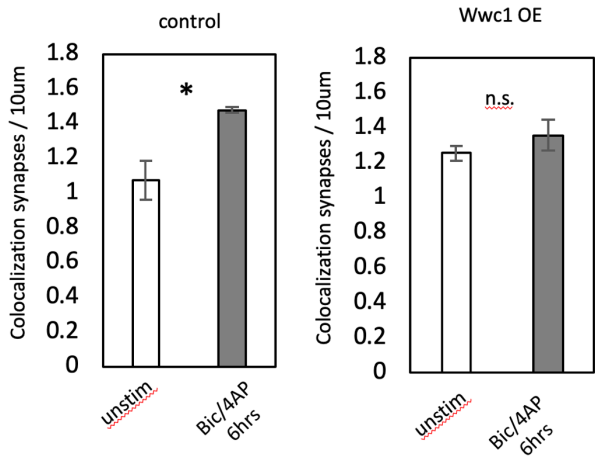
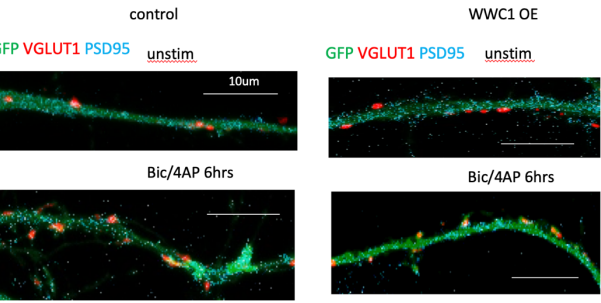
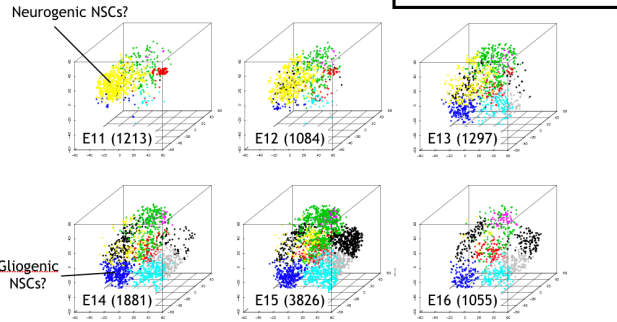
2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

Density clustering of developing brain cells using tSNE data of RNA-seq



遺伝オントロジー解析 (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	IPR00215: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	IPR007087: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

遺伝オントロジー解析 (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