

ハウスダスト中の化学物質が誘導する発達神経毒性の 包括的理解に向けた多面的評価法確立 (所内公募型提案研究)

Establishment of multidisciplinary strategy toward comprehensive understanding
of developmental neurotoxicity induced by environmental chemicals in house dust

平成26～28年度
FY2014～2016

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第130号

NIES Research Project Report, No.130

SR－130－2017

ハウスダスト中の化学物質が誘導する発達神経毒性の 包括的理解に向けた多面的評価法確立 (所内公募型提案研究)

Establishment of multidisciplinary strategy toward comprehensive understanding
of developmental neurotoxicity induced by environmental chemicals in house dust

平成26～28年度
FY2014～2016

所内公募型提案研究「ハウスダスト中の化学物質が誘導する発達神経毒性の
包括的理解に向けた多面的評価法確立」
(期間：平成 26 ～ 28 年度)

課題代表者：前川文彦

執 筆 者：前川文彦、中山祥嗣、磯部友彦、Tin Tin Win Shwe、佐野一広、鈴木 剛、
橋本俊次、川嶋貴治

編 者：前川文彦

序

本報告書は、平成 26 ～ 28 年度の 3 年間にわたって実施した所内公募型提案研究「ハウスダスト中の化学物質が誘導する発達神経毒性の包括的理解に向けた多面的評価法確立」（課題代表者：前川文彦）の研究成果をとりまとめたものです。ヒトを含む生物は自然環境中の様々な化学物質の影響を受けつつ活動しています。それに加えてヒトは自らが新規化学物質を製造し、豊かな社会の構築に役立っています。このような環境の人工化に伴い身の回りに存在する化学物質の種類は飛躍的に増加しています。

現在、有害化学物質への曝露が精神疾患発症率の増加に関与している可能性が危惧されています。特に発達期の子どもの脳は化学物質曝露の影響を受けやすいと考えられており、脳の発達に悪影響を及ぼすことが知られている化学物質が身の回りの環境中に存在しないか注意深く監視する必要があります。ところが化学物質の発達期の脳への影響を調べる評価手法は世界的に見ても未だ開発途上の段階であり、必ずしも化学物質の発達期の脳への有害性が十分に評価できる体制が整っているわけではありません。

この所内公募型提案研究課題は細胞レベル－胚レベル－動物個体レベルといった様々な手法で発達神経毒性評価法を開発・確立することで、発達期の脳への毒性が確定していない化学物質の有害性を多面的に評価できる体制を構築することを目的としています。脳は神経細胞、グリア細胞といった複数の細胞種から構成されていますが、それぞれの細胞種を単離し単一細胞種への化学物質影響を評価できる手法を開発することで、神経系細胞のハイスループット（高効率）な影響評価への貢献が見込まれます。一方、細胞レベルの手法のみでは脳の特徴である細胞間情報伝達などの細胞間相互作用への影響評価は困難ですので、時間と労力を要しますが動物個体レベルでの影響評価も並行して行う必要があります。特に近年、有害化学物質曝露が社会的コミュニケーションに障害を来す発達障害発症率の上昇に関連している可能性が懸念されており、動物個体レベルで社会性に関わる行動異常を検出する手法の開発が求められています。また、鳥類初期胚を用いた胚レベルでの曝露評価法は、哺乳類胚では困難な発生・発達初期の脳・頭部形態形成を可視化することが可能であり、細胞レベルの研究と動物個体レベルの研究の中間に位置する発展性の高い研究課題であるといえます。発達神経毒性を様々な角度から評価できる手法の開発を試みた今回の所内公募型提案研究課題は、化学物質の発達神経毒性の効果的な検出に貢献し、環境からの有害化学物質曝露を防ぐ一助となることが期待されます。本研究報告書が発達神経毒性研究の一例として関係者のご参考になることを願っております。

平成 30 年 3 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 渡 辺 知 保

目 次

1 研究の概要	1
1.1 研究全体の目的、目標、構成等	1
2 研究の成果	3
2.1 サブテーマ1 発達神経毒性検出基盤の整備	3
2.1.1 目的と経緯	3
2.1.2 方法	4
2.1.3 結果と考察	6
2.2 サブテーマ2 発達神経毒性評価法の構築	11
2.2.1 目的と経緯	11
2.2.2 方法	13
2.2.3 結果と考察	16
2.3 サブテーマ3 毒性機構の解明と診断・予防に役立つバイオマーカーの確立	28
2.3.1 目的と経緯	28
2.3.2 方法	28
2.3.3 結果と考察	30
2.4 まとめと今後の課題	34
[資 料]	
1 研究の組織と研究課題の構成	37
1.1 研究の組織	37
1.2 研究課題と担当者	37
2 研究成果発表一覧	38
2.1 誌上発表	38
2.2 口頭発表	39

1 研究の概要

1.1 研究全体の目的、目標、構成等

目的：

2012年に発表された文科省調査で普通学級の小中学生の約6.5%が発達障害に罹患している可能性が指摘されるなど、子供の脳の発達異常の急増に国民の不安が高まっている。発達障害急増傾向は世界中で確認されており、原因として遺伝要因の他に環境要因の関与が疑われている。様々な環境要因の中の一要因として、金属類や工業製品に含まれる有害化学物質の曝露が、遺伝要因と相まって発達障害を誘導することが危惧されている。そのため、国際的な動向として、生活環境中の化学物質が発達期の脳に及ぼす有害性を鋭敏に検出する評価法を構築し、原因を特定する研究の必要性が叫ばれている。本研究では、動物モデルを用いて、発達期の脳への有害性評価を多面的に評価する体制を構築し、生活環境中に存在するハウスダストに含まれる化学物質の中でも有害性が推測される物質を中心に有害影響メカニズムを明らかにすることで、小児の健康な発達を育む環境づくりに貢献する。ハウスダスト中に含まれる化学物質としては家電製品や家具等に含まれる難燃剤の生体内への蓄積性や有害性について懸念が示されている。また、住環境中に存在する建材等に含まれる防虫剤・防腐剤等の農薬の一部がハウスダストに移行することで一定の割合で生体内に移行し、有害性を発揮する可能性が懸念されている。本研究では、ハウスダスト中に存在する可能性が指摘されており、かつ、有害性に関する情報が不足している難燃剤と農薬の一部に関して実際に評価法への適用を試み、構築した手法で評価することでどのようなエンドポイントに影響が現れるのか検討を行う。

目標：

1. 生活環境中に存在する化学物質に対応可能な簡便、迅速、鋭敏な評価モデルを整備する。
2. 有害性が確定していない化学物質に対する影響評価の有効性を検討する。
3. 有害性メカニズムの解明とその知見を生かした診断・予防に有効なバイオマーカーを確立する。

構成：

- サブテーマ1 発達神経毒性検出基盤の整備
担当：前川文彦、川嶋貴治、**田中光一、**中村和昭
- サブテーマ2 発達神経毒性評価法の構築
担当：前川文彦、佐野一広、鈴木 剛、Tin Tin Win Shwe、川嶋貴治、*浜崎浩子
- サブテーマ3 毒性機構の解明と診断・予防に役立つバイオマーカーの確立
担当：前川文彦、鈴木 剛、橋本俊次、中山祥嗣、磯部友彦、*塚原伸治
- (注) *客員研究員、**協力研究者

研究の概要：

【サブテーマ1】発達神経毒性検出基盤の整備

a. マウスを用いた遺伝的脆弱性に着目した鋭敏評価モデルの整備：

化学物質の発達神経毒性影響により誘導される可能性が指摘されている発達障害の発症仮説として、①脳の興奮と抑制のバランスの異常、②個体間の社会的相互作用を形成する神経回路に特異的に利用される神経伝達物質の放出・作用の異常、等が挙げられる。マウスモデルに関しては、「脳の興奮と抑制のバランスの異常」に関連する遺伝要因と化学物質曝露影響の相互作用を調べるための鋭敏評価モデルとして、脳内の興奮性の神経伝達物質・グルタミン酸の作用量が増加する大脳皮質特異的 GLT1 欠損マウスを東京医科歯科大学から導入し行動評価を行った。また、「個体間の社会的相互作用を形成する神経回路に特異的に利用される神経伝達物質の放出・作用の異常」に関連する遺伝

要因と化学物質曝露影響の相互作用を調べるための鋭敏評価モデルとして、バソプレシン受容体のサブタイプである V1a, V1b のそれぞれあるいはその両方を欠損したマウスを国立成育医療研究センターより導入し、新規環境への適応能力を検討し、サブタイプの両方を低下検出に成功した。

b. 遺伝子改変マウスを用いた高感度可視化検出モデルの整備：

神経突起可視化マウスや細胞周期可視化マウス等を用いて、神経細胞の微細構造や神経細胞をサポートするグリア細胞の細胞周期の可視化が可能となった。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた発達神経毒性検出モデルの整備：

実体顕微鏡により脳形成異常が検出できるシステムを構築し、最も効率的な曝露方法、曝露時期、溶媒選択等基盤的検討を行い、化学物質の曝露影響を検出できる基盤を整えた。

【サブテーマ 2】 発達神経毒性評価法の構築

a. 脆弱性を考慮した *in vitro* 評価法の確立：

【サブ 1】 で系統維持している神経細胞可視化マウスや細胞周期可視化マウスから単離培養した神経細胞・グリア細胞の蛍光イメージングにより、微細構造、細胞機能を同時に解析することが可能になった。また、そのシステムを利用して、代表的な神経毒性物質である無機ヒ素曝露により、細胞異常が起こるメカニズムの解明に成功し、ハイスループット影響解析の可能性が見出せた。

b. 新規行動試験法の確立：

情動行動、性行動、攻撃行動、認知行動等の様々な行動試験法を取り入れてテスト・バッテリーを構築した。またそのようなバッテリーを用いて、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドの発達期曝露を行い、特定の濃度の曝露により性行動、攻撃行動、不安行動異常が雄マウス特異的に起こる可能性を見出した。また、エストロゲン活性を持つリン系難燃剤の曝露により、陰開口日齢早期化や、発情周期異常、雌性行動低下等の雌生殖生理・行動異常を見出した。さらに、新規オブジェクト認知試験における認知機能低下の可能性も見出している。このように複数の化学物質曝露影響評価により、我々が構築したテスト・バッテリーが曝露物質種特異的な影響パターンの理解に役立つことが示された。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた神経発生試験法の確立：

初期胚に化学物質曝露を行うことでどの胚時期にどのような異常が現れるか検討した。ネオニコチノイド系農薬の曝露によって発達遅延がおこることや、その中の一部は頭部形成の異常（眼、嘴、脳）を誘導することを明らかにした。

【サブテーマ 3】 毒性機構の解明と診断・予防に役立つバイオマーカーの確立

a. 毒性機構の解明：

ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドやエストロゲン活性を持つリン系難燃剤の脳への移行量を分析するための基盤をつくり、発達期マウスに投与することで子どもの脳への移行量を測定することが可能になった。また、エストロゲン活性を持つリン系難燃剤の発達期曝露が脳の性的二型核形成に影響を与えることを明らかにした。

b. 血中バイオマーカーの確立：

エストロゲン活性を持つリン系難燃剤曝露後のオキシトシンという個体間の社会的相互作用に関連した神経伝達物質の遺伝子発現解析を行い、バイオマーカーとなる可能性を見出した。

【成果のまとめ】

発達神経毒性検出基盤を整備し、農薬・難燃剤の評価を行うことで影響エンドポイントを明らかにした。また、農薬・難燃剤の体内動態を評価するとともに、バイオマーカーとなる指標を発見した。

2 研究の成果

2.1 サブテーマ1 発達神経毒性検出基盤の整備

2.1.1 目的と経緯

a. マウスを用いた遺伝的脆弱性に着目した鋭敏評価モデルの整備：

自閉症を含む発達障害と発症機序として様々な要因が挙げられているが、その一つの原因として脳内の神経伝達物質の分泌異常や作用の異常があげられる。また、神経細胞（ニューロン）の樹状突起や樹状突起上に存在する神経伝達物質の受容に重要なスパインと呼ばれる構造を形成する様々なタンパク質の異常が関連する可能性が示唆されている¹⁾。神経伝達物質の種類としては、神経興奮を司るグルタミン酸や抑制を司るガンマアミノ酪酸、モノアミンといった脳全体の働きを制御する神経伝達物質の分泌・作用の異常が発達障害と関連するとの報告の他に²⁾、視床下部の室傍核や視索上核といった神経核に細胞体が局在し、特定の脳部位に神経投射するオキシトシンやバソプレシンといった神経ペプチドの分泌・作用の異常も社会性行動異常を誘導する可能性が報告されている³⁾。また、発達障害が誘発される原因として、複数の遺伝的要因の複合作用、あるいは、遺伝的要因と環境要因の相互作用により発症することがほとんどであり、単一要因で発症する例はごくわずかであると考えられている⁴⁾。そのような状況を鑑みて、神経伝達物質／神経ペプチドの作用異常を呈する遺伝子組換えマウスの中に遺伝的要因と化学物質曝露影響の相互作用を調べるための鋭敏評価モデルとして利活用できるものがあるか検討を行い、遺伝的要因と環境要因の相互作用研究に利用できる体制を構築することが脆弱性を考慮に入れた発達神経毒性影響研究に求められていると考えた。サブテーマ1aでは、脳内の興奮性の神経伝達物質・グルタミン酸の作用量が増加する大脳皮質特異的グルタミン酸輸送体 GLT1 欠損マウスや、個体間の社会的相互作用を形成する神経回路に特異的に利用されてことが知られているバソプレシン⁵⁾の作用異常を呈するバソプレシン受容体 V1a, V1b 欠損マウスの行動評価を行い、その行動特性を明らかにした。

b. 遺伝子改変マウスを用いた高感度可視化検出モデルの整備：

発達障害の原因として複合的な環境要因の関与が疑われているが、環境要因の中では、有機水銀、鉛、ヒ素など金属類の曝露が脳の正常な発達に重篤な悪影響を与え、様々な精神・神経疾患を誘導することが知られている⁶⁾。また近年、難燃剤、可塑剤、殺虫剤等の工業製品・薬品に含まれる成分が、金属類とは異なる作用機序を介して脳の発達障害を誘導することも危惧されている。このような背景もあり、国際的な動向として生活環境中に存在する化学物質が発達期の脳に及ぼす有害性を迅速に検出する評価法を構築し、有害性が確認された際にはその機序を速やかに特定する仕組みを構築する必要性が指摘されている。

発達神経毒性評価法は、神経細胞や神経細胞をサポートするグリア細胞等に分化可能な培養細胞を用いる手法と実験動物個体を用いる手法とに大別できる。前者は迅速性の点で優れており、また比較的安価にハイスループット解析が可能である。一方、後者は時間と費用を要すが、細胞レベルでの研究では解析不可能な行動・生理機能といったヒトへの外挿が比較的容易な評価指標を設定できる。増え続ける化学物質の脳への有害性を検討するためには、両方の手法を有効に組み合わせ、効率的に曝露影響を検出できる仕組みを構築する必要がある。サブテーマ1bでは、培養細胞を用いた発達神経毒性評価試験法に着目し、特定の機能を蛍光可視化できる遺伝子改変マウスから取り出した神経細胞やグリア細胞を用いて発達毒性影響評価指標の構築を試みた。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた発達神経毒性検出モデルの整備：

鳥類モデルは発生学、内分泌学、遺伝学、神経科学のような研究分野において重要なツールであるが⁷⁻⁹⁾、特にニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) やウズラ (*Coturnix japonica*) などの家禽は卵の入手が容易であり、胚形成を容易に観察することが可能なため発生生物学において最も広く使用されるモデル生物になっている¹⁰⁻¹²⁾。特に、ニホンウズラは Padgett と Ivey (1959) によって実験動物として使用できることが評価されて以来¹³⁾、頑強さ、取り扱いの容易さ、高

い卵生産性等の理由から発生学の分野で高い評価を受けてきた。一方、ニワトリやウズラには、一般にげっ歯類のような遺伝的に統御された系統がほとんど存在せず、系統によってはゲノム情報も不足しているため、遺伝子発現解析等分子生物学的な手法での解析に関しては、げっ歯類で行うことが可能な厳密な解析が困難であり、実験モデルとして用いる際の障害となっていた。国立環境研究所では 1980 年より新しい実験モデル動物の確立を目指して循環交配によって黄褐色の羽毛色の変異が固定されたウズラの閉鎖コロニーを開発し、NIES-L 系統と名付けた。近年、次世代シーケンシングによって NIES-L 系統のゲノムのドラフト配列が解読され¹⁴⁾、ウズラの個体間の遺伝的変異を評価するための 100 個のマイクロサテライトマーカーが開発されている。只野らはマイクロサテライトマーカー多型分析を用いて、NIES-L コロニーの近親率をランダム交配で確立された一般的な系統と比較し、NIES-L 系統における遺伝的統御が向上していることを明らかにしており¹⁵⁾、NIES-L 系は基礎研究および環境研究分野において潜在的に有用な実験モデルである可能性が示されている。サブ 1c では、NIES-L 系の初期胚が化学物質の発達毒性スクリーニングに有効活用できる可能性を検討するため、NIES-L 系の初期胚を用いた鳥類胚培養系の構築を試みた。

2.1.2 方法

a. マウスを用いた遺伝的脆弱性に着目した鋭敏評価モデルの整備：

環境化学物質の発達神経毒性影響を調べる動物モデルとして一般にマウスやラット等のげっ歯類が用いられ、特にマウスでは C57BL/6J 系統に代表される近交系が用いられることが多い。一方で、ヒトの発達障害を含む精神疾患の原因としては、環境要因、遺伝要因が単独で病因となることはまれであり、環境要因と遺伝要因の両者の相互作用が原因となる場合が多いと推測されている。すなわち実際にヒトで起こっている精神疾患発症率の上昇を捉えるための動物モデルとしては遺伝的脆弱性も考慮に入れて評価を行うことが求められる。将来の化学物質曝露評価に資する動物モデルへの適用を目指して、1) 大脳皮質特異的 GLT1 欠損マウス、および 2) バソプレシン受容体 V1a, V1b 欠損マウスおよびその 2 重欠損マウスを導入して、その行動特性を全自動型行動記録測定システム IntelliCage を用いて明らかにした。

IntelliCage は測定ケージの中でマウスを飼育することで、オペレータフリーの状態で、30 日以上長期連続実験が行える装置であり、1 つのケージで通常 16 匹以上のマウスを対象に、予めプログラムしたタスクに従って行動・学習・記憶・空間認知実験等を同時に行える。マウスの個体認識法としては RFID チップ (2.2mmφ×11.5mm、0.1 g 以下) を採用しており実験動物として使用されるマウスの行動をストレス影響を与えず長期に涉って観察できる。測定ケージには給餌フード、ストレスの軽減のためのエンリッチメントも付属されている。測定ケージには 4 つの学習実験コーナーが存在し、各コーナーにはマウス検出センサー、センサー内蔵のノーズポーク (穴) 及びシャッターが装備されている。また開閉シャッターの奥には給水ボトルが装備されており、給水を報酬として利用することで空間学習実験を行うことが可能である。また、自発活動量の解析プログラム、各種行動・学習・記憶・空間認知実験の測定用プログラムが予め用意され、個々の動物における反応が記録・解析できる。IntelliCage による行動計測・認知実験に関しては Endo et al. (2011) *Behav Brain Res.*¹⁶⁾ に詳細が記載されている。

b. 遺伝子改変マウスを用いた高感度可視化検出モデルの整備：

主要な神経細胞に関しては、グルタミン酸等の興奮性神経伝達物質を放出する興奮性神経細胞とガンマアミノ酪酸等抑制性神経伝達物質を放出する抑制性神経細胞の 2 種類に大別できる。マウスの大脳皮質には両者が混在しており、それぞれ異なった遺伝子発現と機能を有すると考えられているが、通常の初代培養神経細胞ではこの 2 つのタイプを容易に区別することができない。サブ 1b では、特に抑制性介在神経細胞である神経ペプチド Y (NPY) 神経細胞に着目して影響評価を行う手法を開発した。NPY は統合失調症、うつ病、発達障害など多くの中枢神経疾患との関連が指摘されており、NPY 合成・分泌量の異常はこれらの疾患原因の一つとなりうると考えられているため¹⁷⁾、NPY ニューロンを標的とした化学物質の影響評価法の構築が求められている。

NPY プロモーターの下流にヒト化ウミシイタケ緑色蛍光タンパク質 hrGFP が挿入された遺伝子組換えマウス (Stock#006417, Jackson Laboratory より購入) の妊娠 17 日目胎仔より培養神経細胞を作製した。胎仔の遺伝子型は、実

体顕微鏡用蛍光アダプター SFA-RB (米 NIGHTSEA 社、日本代理店 BEX 社) を実体顕微鏡と組み合わせて用い、頭部の緑色蛍光を検出することで容易に判別することができる。緑色蛍光が確認された胎仔に関しては、実体顕微鏡下で大脳皮質を摘出した後、酵素処理とピペッティングにより細胞を単離し、最終的に遠心分離により細胞をペレット状にした。このペレットに B-27 supplement、L- グルタミンを添加した Neurobasal medium (Invitrogen) を加え、実験内容に応じて必要な細胞密度に希釈し、分散させ、最終的に 500 細胞 / μm^2 程度の密度になるよう調整した。このように調整した細胞培養液を、前日にウェル底に直径 12 mm 丸ガラスを敷き、さらにポリ-L- オルニチンで予めコーティングしておいた培養プレートに播種し、CO₂ インキュベーターで培養した。この細胞培養実験手法に関しては Maekawa et al. (2009) Journal of Neurochemistry 107(3) 789-798 および Maekawa et al. (2013) Neurotoxicology 37: 197-206 で記載された方法に準じて行った。

神経細胞以外にも発達中の脳には化学物質の標的細胞が存在する。アストロサイトは、神経細胞と比較して脳により豊富に存在し、血液脳関門の形成および維持に寄与する細胞集団である。血液脳関門は毛細血管を形成する内皮細胞とそれを囲むアストロサイトとからなり¹⁸⁾、循環血中の有害物質から脳を保護することに貢献する。発達中の脳は毒性化学物質に対して脆弱であると考えられており、その理由の 1 つに、血液脳関門の形成が不十分であることが挙げられる¹⁹⁾。脳の発達段階では先に神経細胞が発生し、次にグリア細胞が発生するが、げっ歯類の大脳皮質ではアストロサイトの発生は胎生 18 日目にはじまり新生仔期にピークに達する²⁰⁾。この発生期間中の神経毒性物質の曝露はアストロサイトの発生、増殖、細胞数の変化に影響する可能性が指摘されており、大脳皮質におけるアストロサイト数の減少は統合失調症およびうつ病等の神経病理学的変化に関連する等アストロサイトの異常と精神障害との間には因果関係が指摘されている²¹⁾。サブ 1b では、このようなアストロサイトの発生・分化に関わる最重要因子として細胞周期と細胞死に着目し、細胞周期を蛍光で観察することができる遺伝子組換えマウスの大脳からアストロサイトを初代培養し、ライブイメージングにより化学物質曝露による細胞周期異常と細胞死誘導を評価する手法を開発した。

ヒト Cdt1 のユビキチン化ドメインと融合した蛍光単量体 Kusabira Orange2 (mKO2) による赤色蛍光により G1 期を、ヒト Geminin のユビキチン化ドメインと融合した蛍光単量体 Azami Green (mAG) による緑色蛍光により S/G2/M 期を検出できる細胞周期可視化マウス (Fucci マウス)²²⁾ を用いて細胞周期のライブイメージングを行った。Fucci マウスを出生後 1 または 2 日目に屠殺し、脳から大脳皮質を単離した後、髄膜を除去し、皮質組織をピペッティングによる穏やかな機械的刺激によって単離し、ダルベッコ変法イーグル培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% ウシ胎児血清 (FBS; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加えた培養液に入れ、ポリ-L- オルニチンで予めコーティングしておいた 4 区画ガラス底皿 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) に播種し、37℃ の 5% CO₂ インキュベーターで 1 週間以上培養した後、ライブイメージング解析を行った。アストロサイト培養手法は、Maekawa F et al. (2008). Journal of Neurochemistry 107(3) 789-798 に詳細が記載されている。アストロサイトの細胞周期を観察するためのライブイメージングには蛍光顕微鏡 BioZero 8100 (Keyence, Osaka, Japan) に 2 つの蛍光フィルターセット (励起フィルター: 542AF15; 発光フィルター: 585QM30; ダイクロイックミラー: 560 および、励起フィルター: 475QM20、発光フィルター: 518QM32、ダイクロイックミラー: 500DRLP、いずれもオプトサイエンス社) を導入して、観察を行った。観察時の細胞条件については、低濃度の FBS を加えた培地で 72 時間培養すると G1 期の細胞集団が増加することが知られているため²³⁾、まずアストロサイトの細胞周期を血清飢餓により G1 期に同期させた。その後、アストロサイトを 0.1% FBS を加えた培養培地中で 3 日間培養した。最終的にアストロサイトを再び 10% FBS を含む培地で培養することで増殖を促し、20 倍の対物レンズ (Plan Fluor ELWD DM 20×C, NA 0.45; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて 6 時間毎に計 150 時間、mKO2 および mAG の蛍光画像を取得した。mKO2 および mAG 発現の画像分析は、BZ-II ソフトウェア (Keyence) を用いて行った。このライブイメージングに関する技術的な詳細は Hike et al. (2016) Frontiers in Neuroscience 10: 297 に記載されている。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた発達神経毒性検出モデルの整備:

胚培養系: 鳥類最初の胚培養系は Perry によってニワトリで確立され²⁴⁾、その後 Naito らによって培養法が発展し

た²⁵⁾。ニホンウズラについても胚培養系が開発されている²⁶⁾。Perry の胚培養系は3段階の培養システムを組み合わせたもので、システムⅠは早期分裂段階で卵管から得られた胚を培養し、1細胞から胚盤葉形成(第Ⅰ期)までの胚を培養するために使用され、システムⅡは形態形成期(第Ⅱ期)、システムⅢは胚発生中間期から孵化までをそれぞれカバーするために代理卵殻を用いた。本検討では、形態形成期(第Ⅱ期)で、卵形の透明な人工培養容器を用いて、ウズラ胚の培養に成功し、Perry の原法においてシステムⅡで用いる代理卵殻培養容器培養系を比較しても、同程度の培養成功率を示した。鳥類の胚を *in vitro* で孵化まで(第Ⅲ期)培養しようとする試みもなされている。歴史的には、Auerbach らはペトリ皿で3~4日齢のニワトリ胚を14日胚まで培養し、約40%の生存率を得ている²⁷⁾。その後、Kamihira らは、カルシウム添加と酸素吸気に加えてガス透過性テフロン膜(Millipore; Nihon Millipore Co., Tokyo, Japan)を用いることで、2日齢のウズラ胚を孵化させることに成功している²⁸⁾。本研究手法の詳細は Kawashima et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience* 10: 296 に記載されている。

2.1.3 結果と考察

a. マウスを用いた遺伝的脆弱性に着目した鋭敏評価モデルの整備:

大脳皮質特異的 GLT1 遺伝子欠損マウスは大脳皮質に発現する *Emx1* のプロモーター下流に *Cre* を発現する遺伝子組換えマウスと GLT1 *floxed* 遺伝子組換えマウスを交配することで大脳皮質特異的にグルタミン酸輸送体である GLT1 遺伝子を欠損させたマウスである(未発表)。このマウスに関しては IntelliCage を用いて15日間の累積探索行動測定を行った。新規環境に置かれた際の探索回数には違いはないものの、馴化した後の探索回数の低下が認められた(図1)。次にバソプレシン受容体 *V1a*, *V1b* 遺伝子欠損マウス²⁹⁾に関する検討を行った。*V1b* 遺伝子欠損マウスに関しては先行研究でホームケージにおける行動量増加が報告されているが、IntelliCage を用いた行動量解析において同様に野生型と比較して行動量の増加が観察された(図2)。一方、*V1a* 遺伝子欠損マウスでは行動量に野生型との違いは認められなかった。さらに、*V1a*, *V1b* 遺伝子2重欠損マウスに関する検討を行った結果、IntelliCage に導入した直後の1日間の行動量が低下し、その後、野生型と同程度にまで行動量が回復するという行動量の推移が認められた(図3)。このような新規環境における行動量低下は新規環境に対する適応力の低下が原因であると推測される。*V1a*, *V1b* 遺伝子のいずれかが欠損していた場合ではこのような行動異常は認められなかったため *V1a*, *V1b* 遺伝子はそれぞれ新規環境適応に関す

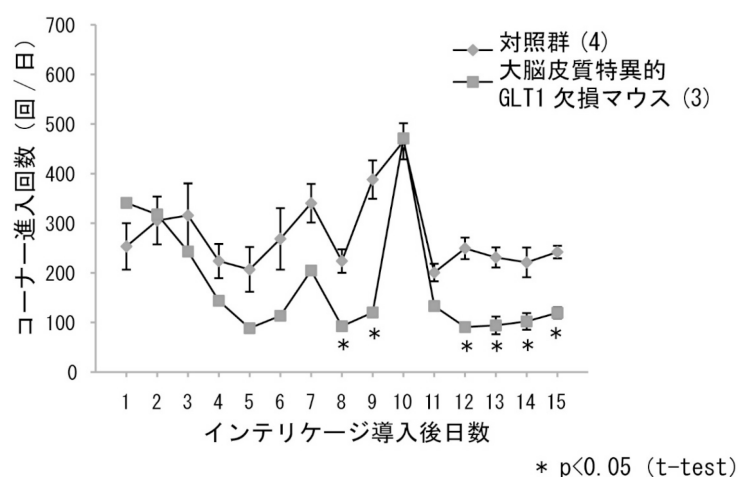


図1 大脳皮質特異的 GLT1 遺伝子欠損マウスにおける探索回数の低下
全自動型行動記録測定システム IntelliCage を用いて、IntelliCage に導入してからの各日毎のコーナーへの侵入回数を15日間カウントすることで、対照群と大脳皮質特異的 GLT1 遺伝子欠損マウスの間で探索行動に違いがあるか検討を行った。その結果、大脳皮質特異的 GLT1 遺伝子欠損マウスにおいて探索行動の8, 9, 12, 13, 14, 15日目の1日当たりの侵入回数において有意な減少が確認された。() 内の数字は匹数。プロットは平均値±標準誤差(大脳皮質特異的 GLT1 欠損マウスは3匹の為標準誤差は表記せず)。

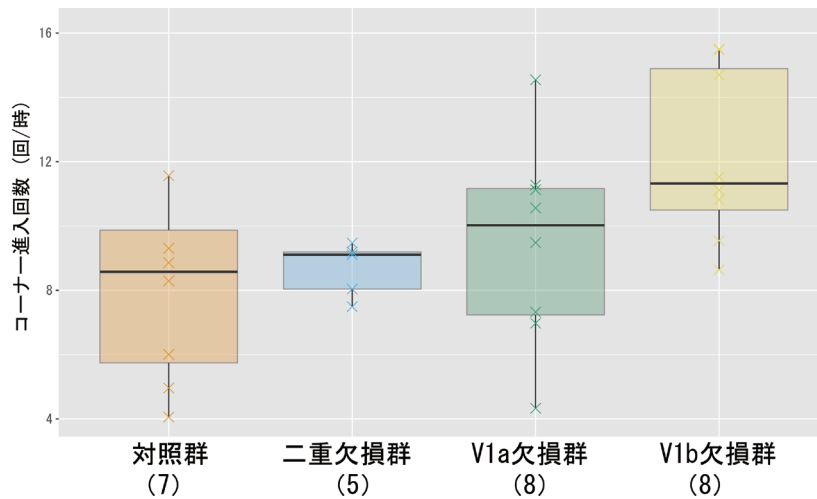


図2 V1b 遺伝子欠損マウスにおける行動量の増加

全自動型行動記録測定システム IntelliCage を用いて毎時のコーナーへの平均侵入回数をカウントしたところ、V1b 欠損群において有意なコーナーへの侵入回数増加を認めた。() 内の数字は匹数。プロットは平均値 ± 標準誤差。

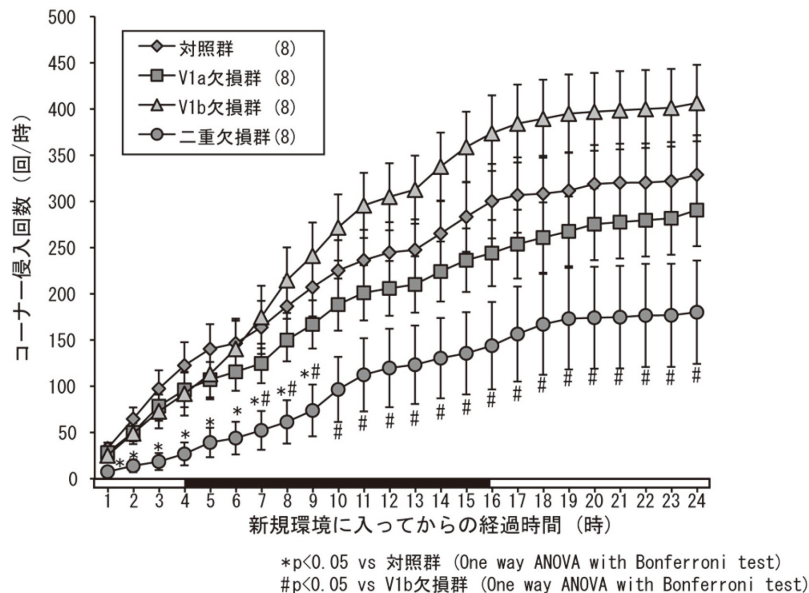


図3 V1a,V1b 遺伝子 2 重欠損マウスにおける新規環境での行動量の低下

個別飼育ケージから全自動型行動記録測定システム IntelliCage に導入後の 24 時間の累積コーナー侵入回数の各時毎の平均値を算出した。その結果、二重欠損群において有意なコーナー進入回数の低下が認められ、新規環境への適応が悪化している可能性が見出した。プロットは平均値 ± 標準誤差、() 内の数字は匹数。

るバソプレシンの機能に関して相補的に働いており、両者が同時に欠損することで初めて影響が現れると考えられる。すなわち、V1a, V1b 遺伝子 2 重欠損マウスは個々の遺伝子欠損マウスよりも、より有効な新規環境適応異常モデルとして活用できる可能性を見出すことができた。

b. 遺伝子改変マウスを用いた高感度可視化検出モデルの整備：

大脳皮質初代培養神経細胞の神経突起伸長の評価

大脳皮質の初代神経細胞を倒立位相差顕微鏡で観察した場合、通常培養 2 日目に神経突起伸長が確認でき、その後日を追って益々神経突起が伸長していく様子を位相差顕微鏡で確認した。今回培養した NPY-hrGFP ニューロンでは細胞

体のみならず神経突起内にも hrGFP が存在するため、蛍光観察でも明瞭に突起伸長を確認することができ（図 4）、さらに蛍光により伸長の程度を定量的に評価することも可能となった。

大脳皮質初代培養アストロサイトの細胞周期の評価

Fucci マウスの大脳皮質由来の初代培養されたアストロサイトは血清飢餓により同調し、増殖中 mAG/mKO2 の蛍光比は経時的变化の観察に成功した（図 5）。mAG/mKO2 の蛍光比は、増殖用の培地に変更後 12 ～ 18 時間まで低く、その間多くの細胞が G1 期にとどまっていることを意味している。この比は培養開始後 24 ～ 42 時間で劇的に増加し、多くの細胞が S/G2/M 期に移行した。その後、mAG/mKO2 の蛍光比は培養開始後 54 時間までに減少した後、再び増加し 66 時間後にピークに達した。このようにライブイメージング期間中 mAG/mKO2 蛍光比の周期的変化が 4 回観察された。mAG/mKO2 蛍光比の平均ピーク間隔は 30、28、32、30 時間で、正常なアストロサイトは我々の培養条件下で平均 30 ± 0.82 時間の細胞周期を示すことが明らかとなった。

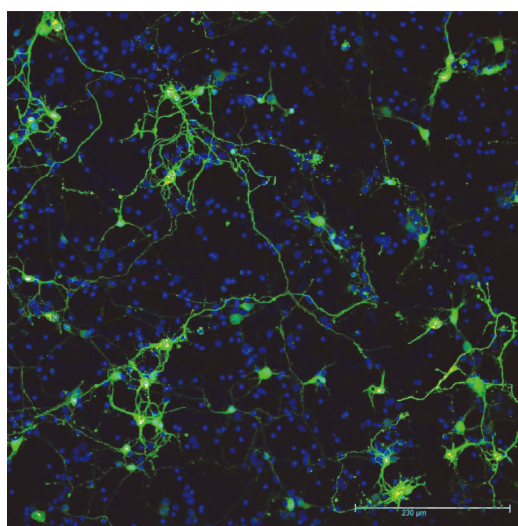


図 4 神経細胞の神経突起における緑色蛍光蛋白質の発現

神経ペプチド Y (NPY) 遺伝子のプロモーター下流に緑色蛍光蛋白質 (hrGFP) が挿入された DNA カセットを持つ遺伝子組換えマウスから初代培養大脳皮質神経細胞を培養することにより、NPY 神経細胞の細胞体および神経突起を選択的に検出する系を構築した。

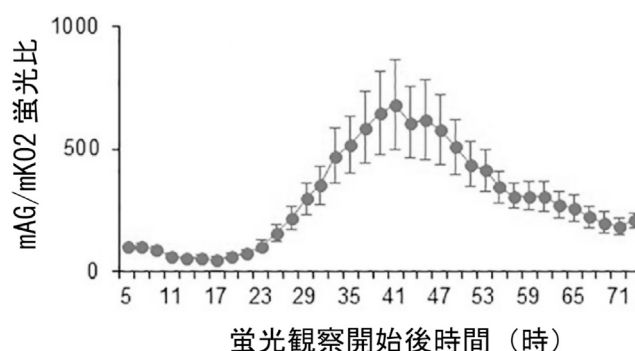


図 5 Fucci マウスから得られたアストロサイトにおける細胞周期に応じた蛍光変化

2 種類の蛍光蛋白質の発現変化によって細胞周期がリアルタイムで観察できるよう遺伝子導入がなされた Fucci マウスから作製したアストロサイトの培養皿毎の全体の蛍光比を示した。培養皿数 6、プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた発達神経毒性検出モデルの整備：

Kamihara ら²⁸⁾と同様の方法で NIES-L 系統のウズラ胚を培養することに成功し（図 6）、化学物質の曝露影響を完全に *in vitro* で行う体制を構築することが可能となった。この鳥類胚培養系は特に化学物質の発育毒性が予測される場合に、他の手段よりも倫理的問題点が低く *in vivo* 毒性スクリーニングできるという利点がある。さらに、鳥類胚培養系は直接的な胚の観察および操作が可能であり、胚毒性の時空間特性を容易に調べることが可能になる。この鳥類胚培養系を用いた研究例はサブ 2c において記載する。

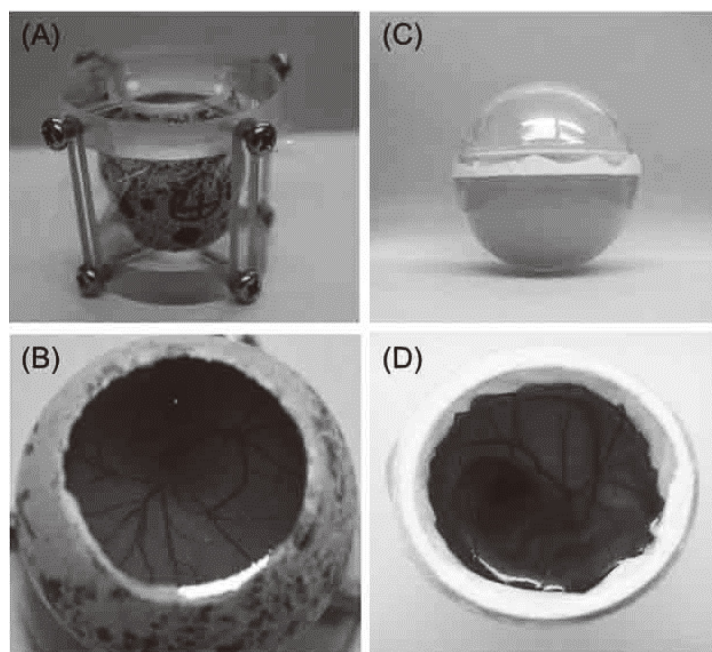


図 6 ウズラ胚培養法の概要

(A) ペリーの培養法（システム II）として胚盤胞期から使用した代理卵殻の写真。(B) ペリーの培養法（システム III）として孵化まで使用する代理卵殻の写真。(C,D) A,B で用いた培養法とは異なるタイプの人工培養容器。

引用文献

- 1) Persico AM, Bourgeron T. (2006) Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. Trends Neurosci. 29(7): 349-358.
- 2) Geschwind DH. (2011) Genetics of Autism Spectrum Disorders. Trends Cogn Sci. 15(9): 409-416.
- 3) Lam KS, Aman MG, Arnold LE. (2006) Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. Res Dev Disabil. 27(3): 254-89.
- 4) Johnson ZV, Young LJ. (2017) Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. Neurosci Biobehav Rev. 76(Pt A): 87-98.
- 5) Insel TR. (2010) The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. Neuron. 65(6):768-79.
- 6) Fujiwara T, Morisaki N, Honda Y, Sampei M, Tani Y. (2016) Chemicals, Nutrition, and Autism Spectrum Disorder: A Mini-Review. Front Neurosci. 10: 174.
- 7) e Douarin N. M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. Mech. Dev. 121, 1089-1102.
- 8) tern, C. D. (2005). The chick: a great model system becomes even greater. Dev. Cell 8, 9-17.

- 9) Emery, N. J. (2006). Cognitive ornithology: the evolution of avian intelligence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 23-43.
- 10) Le Douarin, N. M., and Dieterlen-Lièvre, F. (2013). How studies on the avian embryo have opened new avenues in the understanding of development: a view about the neural and hematopoietic systems. *Dev. Growth Differ.* 55, 1-14.
- 11) Nakamura, H., and Funahashi, J. (2013). Electroporation: past, present and future. *Dev. Growth Differ.* 55, 1-14.
- 12) Sato, Y. (2013). Dorsal aorta formation: separate origins, lateral-to-medial migration, and remodeling. *Dev. Growth Differ.* 55, 113-129.
- 13) Padgett, C. A., and Ivey, W. D. (1959). Coturnix quail as a laboratory research animal. *Science* 129, 267-268.
- 14) Kawahara-Miki, R., Sano, S., Nunome, M., Shimmura, T., Kuwayama, T., Takahashi, S., et al. (2013). Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. *Genomics* 101, 345-353.
- 15) Tadano, R., Nunome, M., Mizutani, M., Kawahara-Miki, R., Fujiwara, A., Takahashi, S., et al. (2014). Cost-effective development of highly polymorphic microsatellite in Japanese quail facilitated by next-generation sequencing. *Anim. Genet.* 45, 881-884.
- 16) Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Takeyama M. (2011) Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behav Brain Res.* 221(1): 172-81.
- 17) Reichmann F, Holzer P. (2016) Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides.* 55: 99-109.
- 18) Abbott NJ. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200(6): 629-38.
- 19) Zheng, W., Aschner, M., and Ghersi-Egea, J. F. (2003). Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192, 1-11.
- 20) Miller, F. D., and Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357-369.
- 21) Cotter, D. R., Pariante, C. M., and Everall, I. P. (2001). Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res. Bull.* 55, 585-595.
- 22) Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., et al. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132, 487-498.
- 23) Khammanit, R., Chantakru, S., Kitiyanant, Y., and Saikhun, J. (2008). Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology* 70, 27-34.
- 24) Perry, M. M. (1988). A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331, 70-72.
- 25) Naito, M., Nirasawa, K., and Oishi, T. (1990). Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.* 254, 322-326.
- 26) Ono, T., and Wakasugi, N. (1983). Development of cultured quail embryos. *Poult. Sci.* 62, 532-536.
- 27) Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., and Folkman, J. (1974). A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol.* 41, 391-394.
- 28) Kamihira, M., Oguchi, S., Tachibana, A., Kitagawa, Y., and Iijima, S. (1998). Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev. Growth Differ.* 40, 449-455.
- 29) Nakamura K, Velho G, Bouby N. (2017) Vasopressin and metabolic disorders: translation from experimental models to clinical use. *J Intern Med.* 282(4): 298-309.

2.2 サブテーマ2 発達神経毒性評価法の構築

2.2.1 目的と経緯

a. 脆弱性を考慮した *in vitro* 評価法の確立:

サブ1bで確立した神経細胞、アストロサイトの発達神経毒性評価法を用いて代表的な神経毒性物質の評価を行い、評価法による実践的な応用可能性を探った。試験法確立のための陽性対照物質として亜ヒ酸ナトリウムを利用した。亜ヒ酸ナトリウムを含む無機ヒ素は自然界では土壌や地下水等に含まれ、慢性曝露が自閉症、注意欠陥多動性障害、脳性麻痺などの脳高次機能の発達に悪影響を及ぼす恐れが疫学研究によって指摘されている¹⁾。また、森永ヒ素ミルク事件によるヒ素中毒の生存者を調べた長期前向きコホート研究から、幼児期のヒ素中毒は成人期の神経疾患発症に影響を与えることが報告されている²⁾。さらに、南米・アジア諸地域等において飲用水からヒ素の慢性的な曝露は学齢期の子供の認知能力の低下を引き起こすことが示唆されている³⁻⁵⁾。

一方、動物モデルを用いた実験的研究からもヒ素の発達期曝露が神経発達に有害であることが報告されている。妊娠中および生後初期に亜ヒ酸ナトリウムを曝露すると成長後のラットの空間学習、神経筋反射、自発運動に障害が現れることが報告されている^{6,7)}。また、亜ヒ酸ナトリウムに慢性曝露された雌マウスから産まれた仔は情動行動や海馬依存性学習課題において、異常を示すことも報告されている^{8,9)}。培養細胞を用いた研究では、初代培養神経細胞^{10,11)}および神経細胞株¹²⁻¹⁴⁾において、無機ヒ素がカスパーゼ3の活性化を促しアポトーシスを誘導したり、細胞骨格形成に関わるタウやチューブリンの遺伝子発現に影響を及ぼすことで神経突起形成阻害を誘導したりすることが報告されている¹⁵⁾。

一方、発達中の脳には神経細胞以外にもヒ素の標的となる細胞が存在する。グリア細胞の一種であるアストロサイトは神経細胞と比較して脳でより多く存在し、血液脳関門形成および維持に寄与する細胞集団である。血液脳関門は、内皮細胞からなる毛細血管とそれを囲むアストロサイトとからなり循環血中に存在する様々な有害化学物質から脳を保護する機能を有する。特に、発達中の脳は血液脳関門形成が未熟であるため、有害化学物質の脳内への移行に対して脆弱性を呈することが知られている。無機ヒ素は妊娠マウスに曝露した際、胎盤を通過し、胎仔に移動し、また新生仔の脳にも蓄積が認められることが報告されている¹⁶⁾。従って、血液脳関門を形成するアストロサイトは無機ヒ素に脳で最初に接触する細胞群ということになる。無機ヒ素はグルタミン合成酵素およびグルタミン酸輸送体の発現および活性を低下させることにより、アストロサイトのグルタミン酸代謝を阻害することが報告されている¹⁷⁾。また、ヒ素曝露されたアストロサイトを培養した条件培地で培養することによって初代培養神経細胞のシナプス形成が阻害されることも報告されており¹⁸⁾、無機ヒ素の神経毒性の少なくとも一部はアストロサイトへの作用を経由して引き起こされると考えられる。

脳の発達段階においては、神経細胞の発生が先に起こり、次いでグリア細胞が発生する。げっ歯類の大脳皮質では、アストロサイトの発生は胎生18日目に始まり新生仔期にピークに達する¹⁹⁾。発達段階での有害化学物質への曝露は神経新生のみならずアストロサイトの発生、増殖に影響を与え、成長後の細胞数等の異常に影響すると考えられている。統合失調症およびうつ病における脳の病理学的所見として大脳皮質におけるグリア細胞数減少が報告されており、グリア細胞異常と精神疾患発症には何らかの因果関係があると考えられている²⁰⁾。ラット初代培養アストロサイトにおいては無機ヒ素はDNA損傷を増加させ細胞生存率を低下させるが²¹⁾、無機ヒ素がアストロサイトの細胞生存率を低下させるメカニズムは明らかになっていない。細胞周期は細胞数制御に必須の細胞機能でありG1期、S期、G2期、M期の順で周期が繰り返される。この細胞周期の異常は細胞死につながるため、周期中のどの時期にどのように異常が起こるかを明らかにすることは細胞生存率低下のメカニズム解析の基盤となる。近年、蛍光タンパク質の蛍光色で細胞周期を見分ける手法が開発され、化学物質曝露影響評価への応用が可能となっている。中でも、G1期検出にヒトCdt1のユビキチン化ドメインと融合した単量体赤色蛍光タンパク質 Kusabira Orange2 (mKO2) を、S-G2-M期検出にヒトGemininのユビキチン化ドメインと融合した単量体緑色蛍光タンパク質 Azami Green (mAG) を用いて、赤色から緑色蛍光への変化を検出することで細胞周期をライブイメージングにより可視化できる「蛍光ユビキチン化に基づく細胞周期インジケーター」(Fucci) システムが開発され、細胞周期ダイナミクスの視覚化に有用であることが報告されている。本研究では、Fucciを全身で発現するトランスジェニックマウスの大脳皮質から摘出した初代培養アストロサイトを用

いてライブイメージング解析を行い、無機ヒ素を陽性対照化学物質として、細胞周期と細胞生存率の評価を一体的に評価できる検出系を構築し、ヒ素の細胞周期・細胞死への影響を検出できるか検討を行い、他の手法での生存率、細胞死、および細胞死関連遺伝子発現との検出法との比較を行った。

b. 新規行動試験法の確立：

発達期の環境化学物質曝露が脳の発達を妨げる可能性が示唆されているが²²⁾、近年注目を集めている化学物質の1つとしてネオニコチノイド系農薬が挙げられる。ネオニコチノイド系農薬は昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)の過剰活性化により殺虫作用を示すように設計されているが、哺乳類のAChRに対する結合親和性が低く、哺乳類に対しては比較的有害性が低いと考えられてきた^{23,24)}。しかし、最近の*in vivo* および*in vitro* 研究によりネオニコチノイド系農薬が哺乳類nAChRに対して当初考えられていたよりも強い結合親和性およびアゴニスト活性を有し、ある程度のニコチン様作用を発揮することが報告されている²⁵⁻²⁸⁾。アセタミプリド(ACE)、イミダクロプリド、クロチアニジンなどのネオニコチノイド系農薬はnAChRの $\alpha 4\beta 2$ サブユニットに結合する。 $\alpha 4\beta 2$ nAChRは扁桃体、視床下部、黒質、腹側被蓋野、縫線核、海馬および内側手綱核などの様々な脳領域に存在し^{29,30)}、これらの領域の機能を制御している^{31,32)}。これらの脳領域は社会性行動、不安、抑うつ、記憶、学習の調節に関与していることが知られている³³⁻³⁸⁾。従って、ネオニコチノイド系農薬の発達期曝露は、これらの領域を含む神経回路の形成に影響を与えることで正常な発達を阻害すると考えられる。ACEは他のネオニコチノイドと比較して、哺乳類nAChRに対して高い親和性を有することが報告されているため、本研究では特にACEへの発達期曝露の成長後の行動に対する影響を社会性行動・生殖行動・不安関連行動・行動柔軟性に焦点を当てて検討した。

農薬以外の生活環境中に存在する化学物質として難燃剤の発達神経毒性が注目を集めている。難燃剤の中には発達期曝露により甲状腺ホルモン作用や性ステロイドホルモン作用を攪乱することで脳の組織化作用を阻害するものが存在することが報告されている。臭素系難燃剤の一部には動物実験において発達神経毒性を示す可能性が見出されているものが報告されており、我が国でも「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」においてポリ臭化ジフェニルエーテルが第一種特定化学物質に指定される等規制が行われている。さらにテトラブプロモビスフェノールA(TBBPA)やヘキサブプロモシクロデカンといった臭素系難燃剤に関しても、内分泌かく乱作用を介した悪影響が懸念されている。一方で臭素系難燃剤以外のリン系難燃剤に関しては、臭素系と比較して一般に残留性が比較的短いと考えられているが、内分泌かく乱作用を持つものが存在することが最近明らかになりつつある。近年、リン酸トリス(2,6-ジメチルフェニル)(2,6-TDMPP)が、レポーターアッセイによってエストラジオールの1/10,000程度のエストロゲン様活性を持つことが報告され³⁹⁾、動物実験によって胎児期・小児期に脳の性分化異常を導く可能性が懸念されている。2,6-TDMPPは、縮合型リン系難燃剤のレゾルシノールビスジギレニルホスフェート(RDX)製剤の不純物であり、RDX製剤の需要は増加傾向にあるため、2,6-TDMPPに曝露する機会もまた増加していくことが予想される。またTBBPAに関しても甲状腺ホルモン作用やエストロゲン作用をかく乱する可能性が示唆されている。哺乳類における内分泌かく乱のターゲットとして脳の性分化が挙げられる。哺乳類の雄では、性分化の臨界期に精巣から分泌されるテストステロンが脳内でエストロゲンに変換され、エストロゲン作用を介して雌雄共通のデフォルトである雌型の脳を脱雌性化し、雄型に切り替えることで行動や生殖生理機能の性分化が誘導されることが報告されている。よって、2,6-TDMPPとTBBPAに共通するエストロゲン作用のかく乱は、特に哺乳類が発達期に曝露された場合、成長後の雌性行動や雌生殖生理機能の発達に大きな影響を与える可能性が考えられる。そこで、難燃剤の曝露影響評価に関しては、2,6-TDMPPとTBBPAの発達期曝露が、雌脳の性分化にどのように影響に及ぼすかに着目してマウスモデルを用いて検討を加えた。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた神経発生試験法の確立：

野生生物やヒトの神経発達や生殖機能に及ぼす農薬や除草剤などの内分泌かく乱物質の曝露影響研究は四半世紀以上にわたって続けられてきているが内分泌かく乱物質は生物の周産期、若年期および思春期等発達の比較的初期に、より大きな毒性を発揮する可能性が指摘されている⁴⁰⁾。既存の発達神経毒性試験で行われている*in vivo* 研究は妊娠した実

験用哺乳類を使用するため、コストがかかり、試験期間が長く、新規に開発される数多くの毒性不明な化学物質に対して *in vivo* 研究のみで十分対応することは困難である。また、近年では動物愛護の観点からも *in vivo* 実験で使用する動物匹数の削減が推奨されている。一方、従来から代替法として利用されてきた培養細胞を用いた *in vitro* 実験では、細胞個別の影響を検討することはできても、脳のような多様な種類の細胞間ネットワークで構築された臓器の発達過程に対する評価を実現することは困難であり、*in vivo* と *in vitro* をつなぐ代替法の確立が必要とされている。サブテーマ1で開発した鳥類胚の培養技術は1) 卵内曝露により胚に曝露する化学物質質量・濃度の設定が容易であることや2) 系時的観察が可能であること、といった点で従来のげっ歯類モデル生物を用いた試験法より優れており *in vivo* と *in vitro* との間をつなぐ試験法として有効なプラットフォームとなり得る可能性が高い。本研究ではサブテーマ1で開発した鳥類胚の培養技術を用いてネオニコチノイド系農薬の曝露影響を特に催奇形性に着目して検討した。

2.2.2 方法

a. 脆弱性を考慮した *in vitro* 評価法の確立：

大脳皮質初代培養神経細胞による評価

本研究では、サブ1で記載した手法を用いて NPY-hrGFP ニューロンを培養し、その培養液中に亜ヒ酸ナトリウムが最終濃度 0、0.5、1.0、2.0 μM となるよう、培養2日目に添加し培養を継続した。培養4日目に 4% paraformaldehyde-リン酸緩衝液によって細胞を固定し、VECTASHIELD HardSet (Vector Laboratories 社) を用いてスライドガラスにマウントした。NPY-hrGFP ニューロンの蛍光画像は Leica TCS SP5 AOBS filter free Spectral confocal microscope を用いて取得した。標的となる各細胞毎に Z 軸方向に 1 μm ステップで画像を取得し、約 10 枚前後数の画像を重ね合わせて 1 枚の画像として再構築した。こうして得られた画像を NIH が開発したソフト ImageJ に導入したプラグイン NeuronJ を使って解析した。このプラグインにより神経突起の描画することで、突起長および分岐数を算出した。

大脳皮質初代アストロサイトによる評価

Fucci 発現アストロサイトの経時的解析：亜ヒ酸ナトリウム (和光純薬) を 100 mM の濃度で滅菌濾過水に溶解し、培養液でさらに希釈し、曝露濃度に調整した。曝露前に一次培養した Fucci 発現アストロサイトを血清飢餓状態にして細胞周期を同期させた。同期後、亜ヒ酸ナトリウムを 0、1、2 または 4 μM の濃度で曝露した。亜ヒ酸ナトリウム曝露直後に、BioZero 8100 蛍光顕微鏡に装備したインキュベーションチャンバー (東海ヒット) (温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 濃度 5%) にアストロサイトを培養した培養皿をセットし、亜ヒ酸ナトリウム曝露の開始後 73 時間まで経時的蛍光イメージングを行った。mKO2 および mAG 発現の蛍光画像および明視野画像は 2 時間毎に取得した。この評価手法の技術的な詳細は Hike et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience*10:297 に記載されている。

イメージ分析：経時的蛍光イメージングからのデジタル画像データを用いて mKO2 および mAG シグナルの強度、mKO2 および mAG を発現する細胞数および S 期エントリー後の細胞運命を分析した。画像分析は BZ-II 上で作動する分析ソフトウェアを用いて行った。各時点での mKO2 (赤色) と mAG (緑色) の単色画像における輝度をそれぞれ測定した。また、緑色信号の輝度値を赤色信号の輝度値で割ることにより mAG/mKO2 蛍光比を算出した。さらに、mKO2 および mAG を発現する細胞を計数するために、亜ヒ酸ナトリウム曝露の開始後 1 時間後から 8 時間毎に取得した単色画像を使用し、自動計測により mKO2 および mAG 発現細胞数を計測したのち、各時点での値を亜ヒ酸ナトリウム曝露 1 時間後の同じ領域の細胞数を用いて補正した。S 期進入後の細胞が細胞死に至るか分析するために 4 μM の亜ヒ酸ナトリウムに曝露したアストロサイトから得られた mKO2、mAG および明視野の画像を各時点でマージし、生存率を決定するためにイメージングの終わりまで追跡して、対照群と比較した。生存細胞は mAG/mKO2 を発現する細胞として定義され、死細胞は mAG/mKO2 を発現した後、続いて蛍光シグナルが消失した細胞として定義された。対照群 434 および亜ヒ酸ナトリウム曝露群 426 の細胞を追跡して細胞の生死を決定した。各群について総細胞数を 100% として生細胞および死細胞集団のパーセンテージを計算した。この手法の技術的な詳細は Hike et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience*10: 297 に記載されている。

Real time PCR：S 期進入およびアポトーシスに関与する分子の遺伝子発現レベルを測定するために、細胞周期に関

連する遺伝子である p21、p53、E2F1、E2F4、Gm36566 の遺伝子発現を LightCycler 96 (Roche Diagnostics) を用いて Real time PCR 法により定量解析した。Real time PCR は 2×SYBR プレミックス Ex Taq (Takara Bio) および各遺伝子に対応するプライマーを含む反応混合物中で増幅した。各試料中の標的遺伝子の mRNA 量はハウスキープ遺伝子シクロフィリン B (CPB) mRNA レベルを用いて補正した。

統計分析：反復のある 2 元配置分散分析 (ANOVA) を用いて、亜ヒ酸ナトリウムおよび時間経過が mAG/mKO2 放出比に及ぼす影響を検定した。1 元配置 ANOVA によって有意な全体的効果が検出された場合、Tukey-Kramer 検定を post-hoc 解析に使用した。2 元配置 ANOVA を行って、標的遺伝子の mRNA レベルに対する亜ヒ酸ナトリウムの濃度および曝露時間の影響を決定した。生細胞および死細胞の差は Mann-Whitney U 検定によって分析した。

b. 新規行動試験法の確立：

ACE の発達期曝露影響評価

動物：C57BL/6J マウスを CLEA Japan から購入し、国立環境研究所内で交配した。マウスは一定温度 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$)、湿度 ($50 \pm 10\%$)、12 時間の明暗周期条件で維持した。餌および水は自由に与え、膣栓の存在を検査し、妊娠日齢 (GD) 0 日を膣栓が検出された日として定義した。水に溶解した ACE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を母体に 0 mg/体重 (kg) (対照群)、1.0 mg/体重 (kg) (1.0 用量群)、または 10.0 mg/体重 (kg) (10 用量群) の用量で、出生後 21 日目になるまで連日経口で投与した。仔は最後の ACE 投与後 2～3 時間後の母親から分離し、性別毎に群飼育した。すべての処置は所内動物実験委員会によって承認され、規程に従って実施した。体重は出生時、離乳時および 23～26 週齢時に測定し、処理群間の平均体重を比較した。離乳時脳重量は、行動試験に使用しない無作為に選択した個体をイソフルランで深麻酔し、断頭した後、脳を取り出し重量を測定した。

行動試験：9～12 週齢時から雌雄性行動、攻撃行動、不安関連行動の行動テストバッテリーを行うため、母体につき 1-2 匹の雄雌をランダムに選択した。これらの行動試験は赤色光下で暗期に行った。また並行して、母体毎に同腹仔から 1-2 匹を使用して IntelliCage (NewBehavior AG, チューリッヒ、スイス) を使用した行動柔軟性試験を行った。行動柔軟性試験に関しては下記に詳しく記載した。

雄性行動試験：性成熟した雄マウスをプラスチックケージ ($5 \times 22 \times 12 \text{ cm}$) で個別飼育した。12～14 日後に行動試験を開始し、卵巣摘出し、更に発情状態を模倣するレベルの性ホルモン処置を行った C57BL/6J 雌刺激マウスに対して行う雄性行動を、3 週間、毎週 1 回、30 分間観察した。雌刺激マウスには試験 24 時間前と 48 時間前にゴマ油 ($10 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$) に溶解したエストラジオールベンゾエート (EB) の皮下注射を施し、さらに試験 4～6 時間前にゴマ油 ($500 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$) に溶解したプロゲステロン (P) を投与した。雄マウスのマウント試行回数、マウント成功回数、イントロミッション回数および射精回数をカウントした。雄性行動試験の実験手法に関しては、Sano et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience* 10: 228 に詳細を記載している。

雄攻撃行動試験：性行動試験最終日の 5～7 日後、居住者-侵入者パラダイムと呼ばれる雄攻撃行動試験により、侵入者役となる嗅球摘除 C57BL/6J 雄マウスに対する居住者役の雄マウスの攻撃行動を観察した。各 15 分間の試験を毎週 3 日間×3 週間、計 9 回行った。侵入者に対する攻撃時間および数を各マウスについてスコア付けした。各週に得られた 3 試験のデータを各マウスについて平均し統計分析に使用した。攻撃行動に関しては「追跡」、「ボクシング」、「レスリング」、「噛みつき」、「尾振回し」、「側面方向攻撃」と分類される攻撃行動のうち少なくとも 1 つを含む一連の行動を行った際、攻撃行動とカウントした。2 回の行動の間隔が 3 秒を超えなかった場合、2 回の行動は連続的であるとし 1 回としてスコア付けした。雄攻撃行動試験の実験手法に関しては、Sano et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience* 10: 228 に詳細を記載している。

雌性行動試験：10～12 週齢で個別にプラスチックケージ ($5 \times 22 \times 12 \text{ cm}$) で飼育し、単離の 14～16 日後に、イソフルラン吸入麻酔下で全てのマウスの卵巣を摘出した。卵巣摘出 14～16 日後に各雌マウスを、性経験のある ICR/JCL 雄マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) と同居させ雌性行動について試験した。この試験は週 3 回実施した。試験前 24 時間および 48 時間に EB ($5 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$: ゴマ油に溶解) を、P ($250 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$: ゴマ油に溶解) を試験前 4-6 時間に皮

下に投与した。各試験は雌が雄から 15 回のマウントまたはイントロミッションを受けるまで行い、雄のマウントまたはイントロミッションによって誘起される受容行動であるロードシス反応が見られた回数を各雌マウスについてスコア付けた。15 回のマウントまたはイントロミッションでロードシス反応が起こった割合をロードシス指数として雌性行動指標として用いた。雌性行動試験は Ogawa et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96, 12887-12892 に準じて行った⁴¹⁾。

明暗箱試験：各マウスにつき 10 分間明暗箱内の行動を観察した。試験装置は、暗箱と明箱（それぞれ 30×30×30 cm）が中央に位置する扉（3×3 cm）によって接続されたもので、明箱は白色光（350 ルクス）で照明されている。暗箱から明箱に入る潜時、明箱滞在累積時間および明箱滞在時の移動総距離を、自動ビデオ追跡システム（ANY-maze、Stoelting、USA）によって測定した。2 匹分の雄マウス（1.0 用量群 1 匹、10 用量群 1 匹）のデータはコンピュータのエラーにより記録ができなかったため分析から除外した。

IntelliCage を用いた行動柔軟性試験：全自動行動記録装置 IntelliCage（ケージサイズ：55×37.5×20.5 cm、コーナーチャンバーサイズ：15×15×21 cm）を使用して雄雌マウスの行動柔軟性について試験した。雄マウスは 13～20 週齢で IntelliCage に導入し 57 日間試験した。雌マウスは 23～32 週齢で IntelliCage に導入し 56 日間試験した。装置に導入する 2～3 日前にイソフルラン麻酔下で RFID チップ（Datamars、Temple, TX, USA）をマウス皮下に移植し、その後行動柔軟性試験前にマウスを IntelliCage に 9 日間順化させた。行動柔軟性試験は学習獲得期と反転課題期の 2 つの時期から構成される。学習獲得期では報酬として飲水可能な対角線上に存在する 2 つのコーナーを往復することで報酬が獲得できる空間学習を施した。続く反転課題期では報酬となるコーナーのパターンを逆転させ、学習獲得期の正解であったコーナーとは異なる 2 つのコーナーの場所を再学習させた。このように雌雄マウスに 9～10 回の反転課題を施した。学習課題 1 日あたりの最初の 100 回のコーナーへの侵入のうち、報酬を得られないコーナーに入った割合を識別エラー率と定義し、群間で比較した。行動柔軟性試験の手法の詳細に関しては Endo et al. (2011) Behav. Brain Res. 221, 172-181 に記載されている⁴²⁾。

統計解析分析：全てのデータは平均値±標準誤差として表示した。データの解析には分散分析（ANOVA）を用い、Fisher PLSD Post hoc 検定を行った。P<0.05 の場合に統計的に有意とみなした。統計解析は SPSS 19.0 統計パッケージ（SPSS Inc.、Chicago, IL, USA）または R ソフトウェア（R for Statistical Computing, Vienna, Austria）を使用して分析した。

2,6-TDMPP および TBBPA の発達期曝露影響評価

CLEA Japan から購入、または、国立環境研究所内で交配することで妊娠 C57BL/6J マウスを作製した。マウスは一定温度（24±1℃）、湿度（50±10%）、12 時間毎の明暗周期条件で維持した。餌および水は自由に与え、陰栓が検出された日を妊娠日齢（GD）0 日として定義した。2,6-TDMPP は、GD14 から分娩までセサミ油に融解した 2,6-TDMPP を皮下に 500 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（500 µg-50 µg 投与群）あるいは 5000 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（5000 µg-500 µg 投与群）を母体に投与した。出産後は出生後 9 日目まで、新生仔に 50 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（500 µg-50 µg 投与群）あるいは 500 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（5000 µg-500 µg 投与群）の 2,6-TDMPP を投与した。対照群にはセサミ油を投与した。

TBBPA に関しては、GD14 から分娩までセサミ油に融解した TBBPA を皮下に 662 µg / 0.2 mL セサミ油 / 日（662 µg-66 µg 投与群）あるいは 6624 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（6624 µg-662 µg 投与群）を母体に投与した。出産後は出生後 9 日目まで、新生仔に 66 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（662 µg-66 µg 投与群）あるいは 662 µg/0.2 mL セサミ油 / 日（6624 µg-662 µg 投与群）の 2,6-TDMPP を投与した。仔は離乳後母親から分離し、性別毎に群飼育した。すべての処置は所内動物実験委員会によって承認され、その規程に従って実施した。

雌生殖機能：雌マウスの陰開口日齢を観察するとともに、26 日間膣スメアを連続採取することで発情周期の回数をカウントした。膣スメア実験の詳細に関しては Caligioni (2009) Curr Protoc Neurosci. APPENDIX: Appendix 4I. に準じて行った。

雌性行動：ACE 曝露試験と同様の実験プロトコルで雌性行動への影響を確認した。

統計解析分析：全てのデータは平均値±標準誤差として表示した。全てのデータの解析には分散分析を用い、Fisher PLSD Post hoc 検定を行い、P<0.05 の場合に統計的に有意とみなした。統計解析は SPSS 19.0 統計パッケージ（SPSS

Inc.、Chicago、IL、USA）または R ソフトウェア（R for Statistical Computing、Vienna、Austria）を使用した。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた神経発生試験法の確立：

孵卵開始後 2 日目にネオニコチノイドの 1 種であるアセタミプリド（6 $\mu\text{mol}/\text{卵}$ ）、イミダクロプリド（3 パターンの用量：群 1: 0.078-0.117 $\mu\text{mol}/\text{卵}$ 、群 2: 0.391-0.488 $\mu\text{mol}/\text{卵}$ 、群 3: 0.585-1.171 $\mu\text{mol}/\text{卵}$ ）を卵内に曝露した。アセタミプリドの溶媒としては水を、イミダクロプリドの溶媒としては 5% DMSO を使い、それらのみを曝露した群を対照群とした。孵化直前の 16 日目に胚を卵から取り出し、体重、脳重量の測定を行った。また同時に、胚の頭部の形態学的観察を行い、眼や嘴の形成に影響があった個体に関しては、その詳細を記載した。ウズラ胚の培養法は Kawashima et al. (2016) *Frontiers in Neuroscience* 10: 296 に準じて行った。また、イミダクロプリド投与群に関しては、頭部や眼の形態形成に関わる Pax6 遺伝子の発現を Real time RT-PCR 法を用いて検討した。Real time RT-PCR 法に関しては、Maekawa et al. (2013) *Neurotoxicology* 37: 197-206 に記載された手法に準じて行った。

2.2.3 結果と考察

a. 脆弱性を考慮した *in vitro* 評価法の確立：

大脳皮質初代培養神経細胞による評価

1.0 μM 曝露で有意に神経突起伸長の抑制が観察され、その影響は 2.0 μM でより顕著になった。また逆に 0.5 μM 曝露により神経突起伸長が促進することが明らかとなった（図 7）。1.0 μM 以上の曝露による突起伸長抑制は大脳皮質の

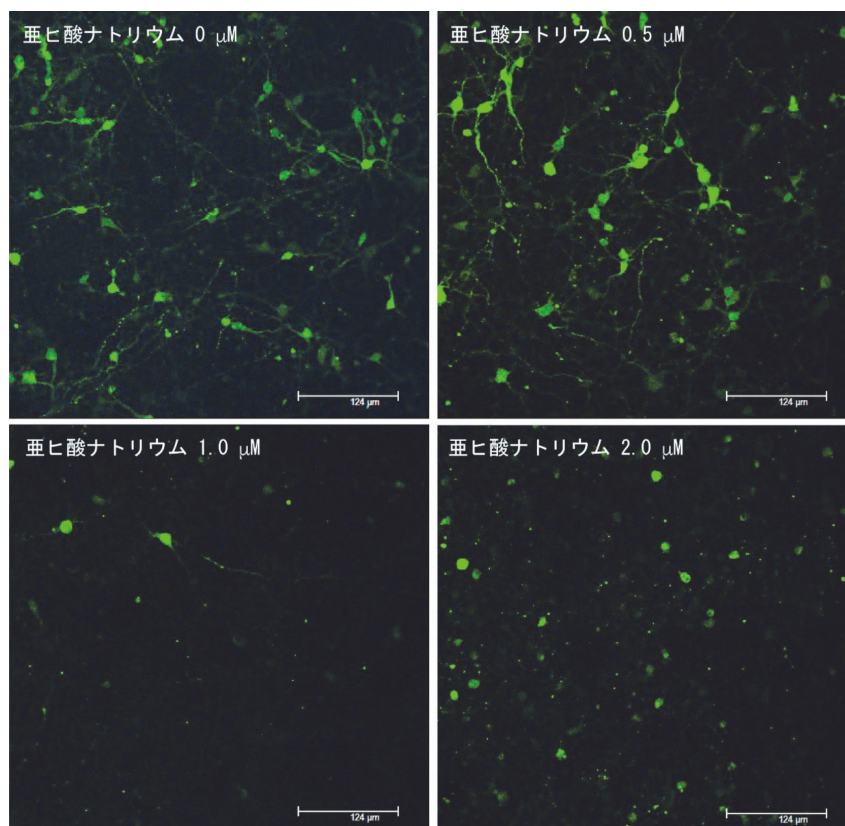


図 7 大脳皮質初代培養神経細胞の神経突起伸長に対する無機ヒ素の曝露影響
神経ペプチド Y (NPY) 遺伝子のプロモーター下流に緑色蛍光蛋白質 (hrGFP) が挿入された DNA カセットを持つ遺伝子組換えマウスから初代培養大脳皮質神経細胞を培養し、NPY 神経細胞の神経突起への無機ヒ素（亜ヒ酸ナトリウム）の影響を検討した。亜ヒ酸ナトリウムを培地に加えていない群（0 μM ）や 0.5 μM 曝露群では明瞭に神経突起が認められたが、亜ヒ酸ナトリウム 1.0 μM 曝露群では神経突起伸長が著しく低下し、2.0 μM 群ではほとんど観察できなかった。

神経細胞にランダムに蛍光タンパク発現ベクターを遺伝子導入し突起伸長を検討した場合に得られた結果と一致していたが、神経細胞間でのばらつきが少ないためかより少ない例数で有意差が得られた。また、0.5 μM 曝露による突起伸長促進は、大脳皮質の神経細胞にランダムに蛍光タンパク発現ベクターを遺伝子導入した場合には傾向は見られたものの有意差は得られておらず NPY-hrGFP ニューロンの検討によって初めて無機ヒ素の低濃度曝露が明確な神経突起伸長作用を示すことを明らかにできた。単一細胞種を用いることで影響パターンが均一化することで、より突起伸長・抑制作用の濃度依存性を鮮明に検出することが可能になったと推測できる。蛍光遺伝子組換えマウスを用いることで特定の細胞種を標的とした評価が可能となることが明らかになり、かつ、単一細胞種を用いることでばらつきが低下し、その結果、有害物質の濃度依存的に異なった作用を検出できることが明らかとなった。

大脳皮質初代培養アストロサイトによる評価

アストロサイトの細胞周期に及ぼす亜ヒ酸ナトリウムの影響：培養皿ごとの蛍光強度を調べると、ライブイメージングの開始直後の Fucci 発現アストロサイトは亜ヒ酸ナトリウム曝露の有無にかかわらず mAG 蛍光はほとんど検出されず、mKO2 蛍光が多数を占めた (図 8)。その後、対照群および 1、2 μM で亜ヒ酸ナトリウムを曝露した群では、亜ヒ

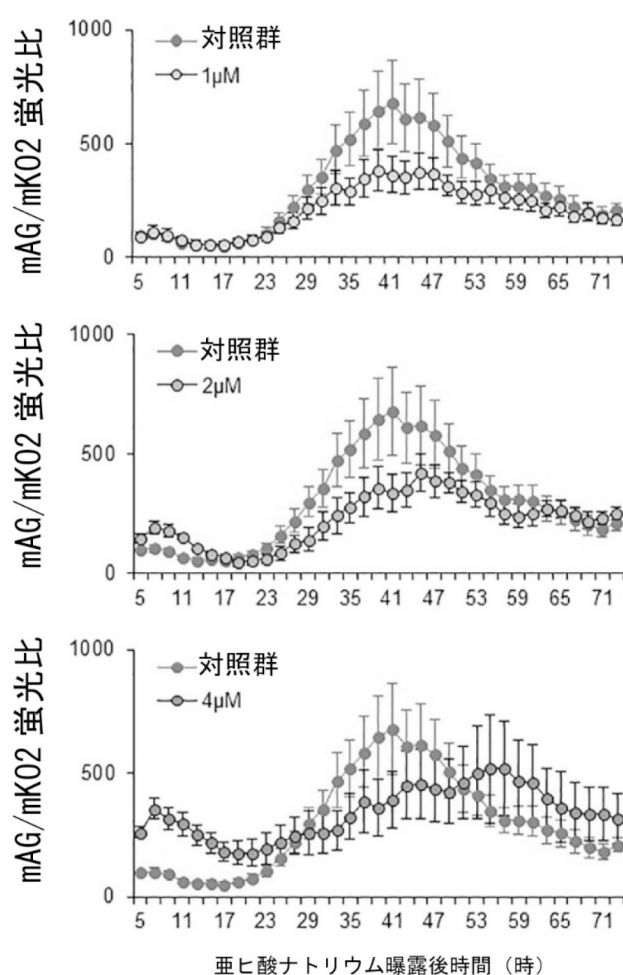


図 8 Fucci 発現アストロサイトの細胞周期に伴う蛍光変化に及ぼす亜ヒ酸ナトリウムの影響

2 種類の蛍光蛋白質の発現変化によって細胞周期がリアルタイムで観察できるよう遺伝子導入がなされた Fucci マウスから作製したアストロサイトの培養皿毎の全体の蛍光比を対照群 (図 5 と同一結果を再掲)、亜ヒ酸ナトリウム 1 μM 曝露群、2 μM 曝露群、4 μM 曝露群とで比較した。その結果、亜ヒ酸ナトリウム曝露群において蛍光比のピークのずれが検出された。培養皿数は各群 6、プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差。

酸ナトリウム曝露開始後33～49時間の間でmAG蛍光が強く観察され、その後時間経過に伴ってmAG蛍光が減少した。一方、4 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群では曝露後5～9時間でmAG蛍光が強く見られ、その後31時間後までに蛍光が消失した。

Fucci 発現アストロサイト数に対する亜ヒ酸ナトリウム曝露の影響：対照群および1 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群では曝露33～41時間後におけるmAG発現細胞数は他の時点と比較して多かった(図9)。2 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群では曝露25、33、41時間後のmAG発現細胞数は対照群と比較して有意に少なかった($p < 0.05$)。4 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群ではmAG発現細胞の数は曝露後9時間で対照群より有意に多かった($p < 0.05$)。

S期エントリー後の細胞死に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響：S期エントリー後の細胞運命を解析するために対照群と4 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群においてFucci 発現アストロサイトの画像を比較した。対照群では蛍光発光シグナルの変化が認められ、明視野画像で確認される細胞形態も正常であり、ほとんどの細胞は記録の最後まで生存していた(図10)。逆に、4 μ M 亜ヒ酸ナトリウム曝露群のほとんどのアストロサイトでは曝露後9時間前後でmAG蛍光が観察されたが、その後mAG/mKO2ともに発現が消失したり、デブリ様の構造を有する異常な形態を示したりする細胞が現れ、細胞死が生じていることが推測された。

アポトーシスマーカーおよび細胞周期調節遺伝子 mRNA 発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響：アストロサイトにおけるE2F1、E2F4、Gm36566、p21、p53といったアポトーシスマーカーおよび細胞周期調節遺伝子のmRNAレベルに関して検討した。細胞周期の変動に伴ってこれらの遺伝子発現は従来の報告と類似の変動周期を示したが、亜ヒ酸ナトリウム曝露は検討した遺伝子発現には影響を与えず、細胞死や細胞周期への特定の影響がどのようなものかを明らかにすることはできなかった(図11)。

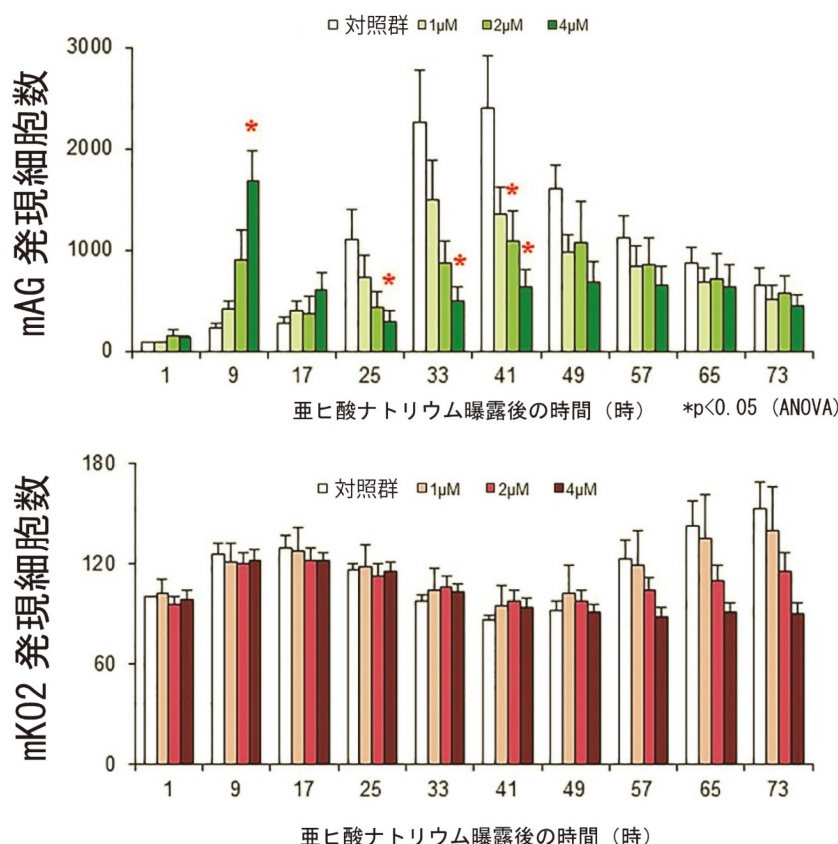


図9 Fucci 発現アストロサイト細胞数に対する亜ヒ酸ナトリウム曝露の影響

図8で示した培養皿全体結果を更にそれぞれの蛍光を示した個々の細胞数をプロットした。その結果、特に、亜ヒ酸ナトリウム曝露後9、25、33、41時間後の時点で対照群と比較して亜ヒ酸ナトリウム曝露群(2 μ M、4 μ M 曝露群)におけるmAG発現細胞数の顕著な異常が認められた。培養皿数は各群6、プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差。

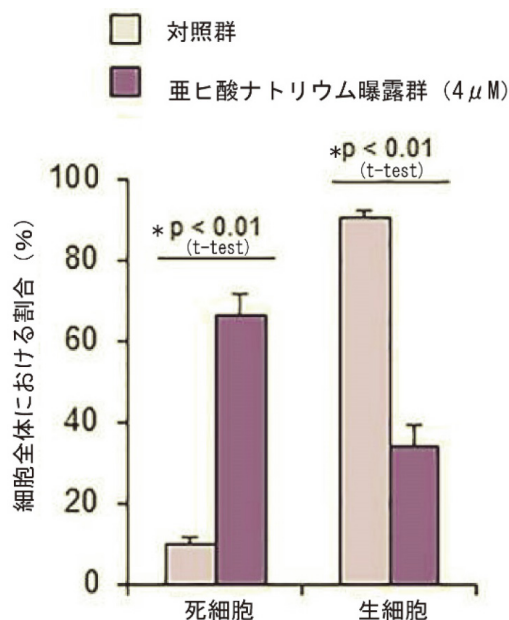


図 10 S 期に入ってから以降の細胞死に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響

Fucci 発現アストロサイトを用いて、対照群 (434 細胞)、亜ヒ酸ナトリウム曝露群 (4 μM、426 細胞) を解析し、細胞周期のうち S 期に入ってから死んだ細胞と生き残る細胞の割合を検討した。亜ヒ酸ナトリウム曝露群 (4 μM) において有意に死んだ細胞の割合が増加した。プロットは平均値 ± 標準誤差。

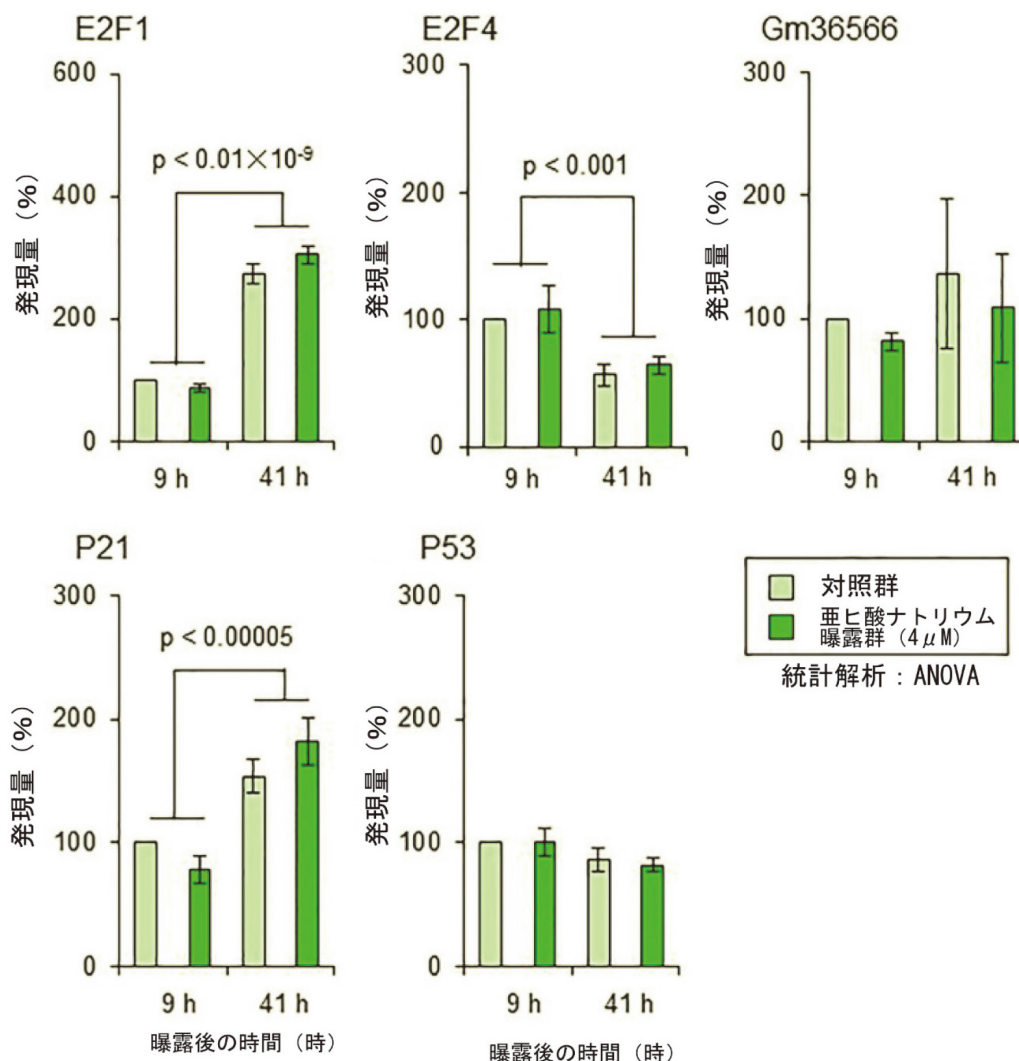


図 11 アポトーシスマーカーおよび細胞周期調節遺伝子 mRNA 発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響

Real time RT-PCR 法によって亜ヒ酸ナトリウム (4 μM) 曝露後 9 時間、41 時間後の代表的なアポトーシスマーカーおよび細胞周期調節遺伝子の mRNA 発現を検討したが、群間の違いは認められなかった。各群 4。プロットは平均値 ± 標準誤差。

ヒ素汚染水の慢性的飲用は認知機能の障害を引き起こすことが懸念されており、世界保健機関（WHO）では飲水中ヒ素濃度の上限を 0.01 mg/L（0.01 ppm）と設定しているが⁴³⁾、現実にはバングラデシュで 0.3 mg/L 以上の濃度で井戸水中のヒ素汚染が確認される等⁴⁴⁾、世界各地でヒ素曝露が起こっている。我々が行った Fucci 発現アストロサイトのライブイメージングから、4 μ M の亜ヒ酸ナトリウム曝露が予定外のタイミングでの S 期移行を促し、その結果、細胞死が誘導されることが明らかになった。予定外の S 期移行は DNA 損傷後のアポトーシス細胞死に関連することが知られているため^{45,46)}、アポトーシスの調節因子や細胞周期に関連する遺伝子の mRNA レベルを測定したが亜ヒ酸ナトリウム曝露による大きな影響は認められず、細胞死の原因を突き止めるまでには至らなかったため、今後、予定外の S 期移行による細胞死を誘発するヒ素毒性の分子機構を明らかにするためのさらなる研究が必要である。これらの一連の研究から、アストロサイトを代表とするグリア細胞に関しても有害化学物質の影響を細胞死、細胞周期の側面から検討できる体制を構築することができた。

b. 新規行動試験法の確立：

ACE 曝露影響評価の結果

体重：対照群、1.0 用量群、10 用量群の雄雌マウスで体重の測定を行ったが、出生時、21 日齢、23 ～ 26 週齢で比較したが、群間で体重の違いは認められなかった。

脳重量：21 日齢での雄雌のいずれのマウスの脳重量にも差異は見られなかった。

雄性行動：1.0 用量群で性行動の総数が対照群や 10 用量群と比較して有意に増加した（ $P < 0.05$ 、図 12）。

雄攻撃行動：1.0 用量群の総攻撃時間、攻撃回数は対照群や 10 用量群と比較して有意に増加した（ $P < 0.05$ 、図 13）。

雌性行動：雌性行動指標であるロードシス指数には群間での有意差は認められなかった。

明暗箱試験：1.0 用量群および 10 用量群の雄マウスは、対照群と比較して明箱で有意に多く滞在した（ $P < 0.05$ 、図 14）。また、対照群と比較して明箱でより長い距離を移動する傾向があった（ $P = 0.055$ 、図 14）。雄マウスとは対照的に、雌マウスでは群間で有意な差は認められなかった。

行動柔軟性試験：馴化期間中、IntelliCage の 1 週間あたりのコーナーへの訪問数は、雌雄共に群間で差はなく、ACE 発達期曝露が活動量に影響しないことが示唆された。また、学習獲得期と反転課題期においても、群間に統計的な差異は認められず、発達期 ACE 曝露は成長後の空間学習能力および行動柔軟性に影響しないことが示唆された。

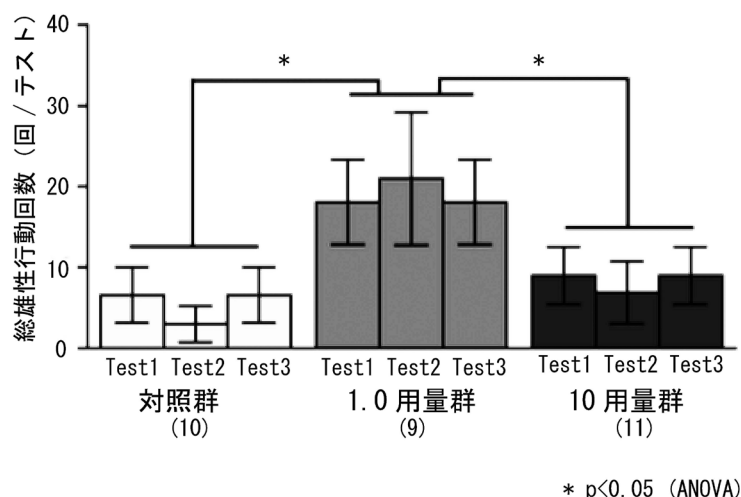


図 12 発達期アセタミプリド曝露による後発的な雄性行動への影響

胎仔期～新仔児期にアセタミプリド曝露を受けた個体が成熟した後に、雄と発情状態にした雌を同一ケージにいたれた際に起こる総雄性行動回数の結果を 3 回の試験毎に示した（それぞれ Test1,2,3 と表記）。対照群、10 用量群と比較して、1.0 用量群において有意な雄性行動回数の増加が確認された。プロットは平均値 ± 標準誤差、() 内の数字は匹数。

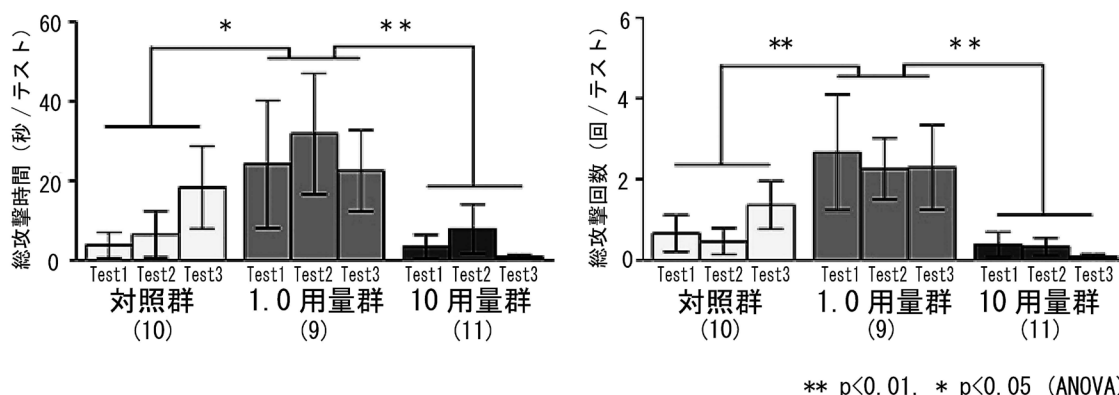


図 13 発達期アセタミプリド曝露による後発的な雄攻撃行動への影響

胎仔期～新生仔期にアセタミプリド曝露を受けた個体が成熟した後に、2匹の雄を同一ケージにいた際に起こる攻撃行動の総攻撃時間と総攻撃回数の結果を3回の試験毎に示した（それぞれTest1,2,3と表記）。対照群、10用量群と比較して、1.0用量群において有意な雄性行動回数の増加が確認された。プロットは平均値±標準誤差、()内の数字は匹数。

本項の考察：今回の用量での母体へのACE曝露は仔の体重および脳重量を変化させなかった。また成長後の曝露マウスにおいて空間学習、行動柔軟性への影響は認められなかった。一方、雄マウス特異的に性行動や攻撃行動といった社会性や不安関連行動に影響が現れることが示唆された。結合親和性はニコチンより70～80倍以上低いACEはα4およびβ2サブユニットを含むニコチン性アセチルコリン受容体に結合するため^{23,24}、ニコチンと類似作用がACEの脳での中心的作用点である可能性が考えられる。

先行研究において動物モデルに対する周産期のニコチン曝露は、投与量、投与時間などの実験条件に応じて影響の程度や方向性は異なるが産仔の不安関連行動に影響を与えることは既に報告されており^{47,48}、情動行動を制御する神経回路はニコチンを含むニコチン性アセチルコリン受容体作動薬に対して脆弱であることが指摘されている。今回の研究では、明暗箱試験において1.0用量群、10用量群の雄マウス特異的に「不安反応が軽減し衝動性が増す」と解釈可能な結果が得られたが、これと類似の結果は周産期のニコチン曝露の先行研究の報告例の中にも存在しており、ACEがニコチンと同様の神経回路への影響を介して不安や衝動性などの情動の制御に影響を与えている可能性が考えられる。また、雄マウスの1.0用量曝露群では攻撃行動、性行動において用量特異的に影響が認められた。ニコチン性アセチルコリン受容体を含むコリン作動性神経系はまた、これらの行動の

神経基盤としての役割を果たすと考えられており^{31,49}、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合する薬剤はこの神経基盤の発達を妨げる可能性がある。用量特異的な非単調な影響に関してはダイオキシンやビスフェノールA等有害化学物質で広く観察されており^{50,51}、ニコチンの有害作用も複雑で非単調であることが報告されている⁵²⁻⁵⁴。また影響の性差に関しても、先行研究から、雄は雌より発達期のニコチン曝露に感受性が高いことが示唆されている⁵⁵⁻⁵⁸。このように本研究で観察されたACEの様々な曝露影響は先行研究におけるニコチン曝露影響の結果と一致しており、ニコチンとACEが共通の経路を介して毒性作用を誘発する可能性を示唆している。

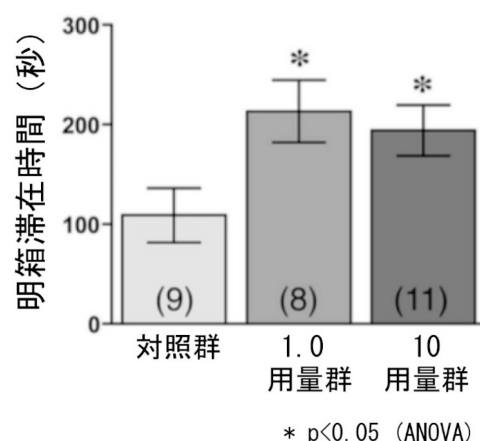


図 14 明暗箱試験を利用した発達期アセタミプリド曝露による後発的な情動行動への影響評価（雄）

胎仔期～新生仔期にアセタミプリド曝露を受けた個体が成熟した後に、雄を明暗箱にいた際の明箱滞在時間を検討することにより、情動行動への評価を行った。その結果、対照群と比較して、1.0用量群、10用量群において有意な明箱滞在時間の増加が確認された。この結果は本来不安を感じる場所に対する反応に異常が現れている可能性を示唆するものである。プロットは平均値±標準誤差、()内の数字は匹数。

2,6-TDMPP および TBBPA 曝露影響評価の結果

雌マウスの膣開口日齢と発情周期への影響：2,6-TDMPP に関しては、通常出生後 30 日以上経過後起こる膣開口日齢が、5000 μ g-500 μ g 投与群で対照群と比較して有意に早期化し、22-23 日齢で全ての雌で膣開口が認められた（図 15）。一方、500 μ g-50 μ g 投与群では、対照群と同程度の膣開口日齢であり、有意差は認められなかった。一方、TBBPA の膣開口日齢に関しては、全ての群で有意な違いは認められなかった。性成熟後、膣スメアの採取により発情周期の決定を行ったが、対照群は 4～5 日周期の発情周期を示したが、2,6-TDMPP を投与された群に関しては、500 μ g-50 μ g 投与群、5000 μ g-500 μ g 投与群共に発情周期を示した回数が対照群と比較して有意に低下し、低下の程度は 5000 μ g-500 μ g 投与群の方がより強かった（図 16）。一方、TBBPA の曝露による発情周期への影響は認められなかった。

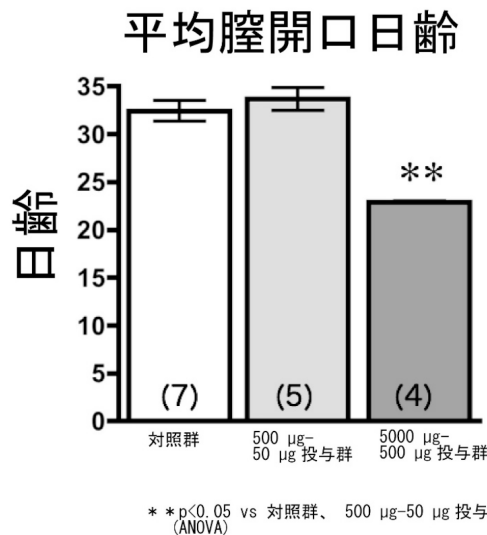


図 15 発達期 2,6-TDMPP 曝露の雌膣開口への影響
胎仔期から新生仔期にかけて 2,6-TDMPP が曝露された雌マウスの膣開口日齢を検討したところ 5000 μ g-500 μ g 投与群において有意な平均膣開口日齢の早期化が確認された。プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差、() 内の数字は匹数。

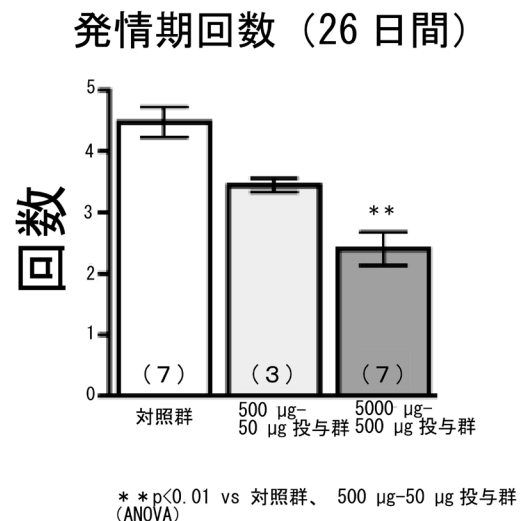


図 16 発達期 2,6-TDMPP 曝露の雌発情周期への影響
胎仔期から新生仔期にかけて 2,6-TDMPP が曝露された雌マウスが性成熟した後に発情期の回数を膣スメア法により検討したところ 5000 μ g-500 μ g 投与群において有意な発情期回数の低下された。プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差、() 内の数字は匹数。500 μ g-50 μ g 投与群は例数 3 のため標準誤差は示さず。

雌性行動への影響：雌性行動指標であるロードシス指数を検討したところ、2,6-TDMPP に関しては対照群と比較して 5000 μ g-500 μ g 投与群において、ロードシス指数が対照群と比較して有意に低下し雌性行動の発現が阻害されることが明らかとなった。500 μ g-50 μ g 投与群では低下傾向にあったものの対照群との有意差は認められなかった。一方、TBBPA の曝露によるロードシス指数への影響は認められなかった。

本項の考察：リン系難燃剤に含有される 2,6-TDMPP の発達期曝露により雌マウスにおいて、特に 5000 μ g-500 μ g 投与群で膣開口日齢の早期化および発情周期異常が認められた。また雌性行動指標であるロードシス指数の低下も認められ、雌性行動の発現が阻害されていた。エストロゲンやビスフェノール A 等のエストロゲン様作用を持つ化学物質の発達期曝露が 2,6-TDMPP の結果同様に、雌脳を脱雌性化させることで雌生殖機能や雌性行動の異常を誘導するとの先行研究がある⁵⁹⁾。今回の結果でも、それらの先行研究と一致した影響が認められたため、2,6-TDMPP は脳でエストロゲン様作用をかく乱することを介して脳を脱雌性化させた可能性が示唆される。脳の性分化異常はヒトでは生殖生理・性指向性の異常につながるのみならず発達障害の原因となる可能性も指摘されている。例えば Cohen らは発達期のテストステロン曝露と発達障害との関連性を指摘しており⁶⁰⁾、2,6-TDMPP の発達期曝露においても生殖機能・雌性機能を司る神経回路のみならず、より高次な脳機能に悪影響を与える可能性も考えられるため、今後の課題として検討して

いきたい。一方、TBBPA に関しては、2,6-TDMPP とモル比で同等の用量で発達期曝露を行っても雌マウスの生殖生理・行動異常は認められなかった。TBPPA にはエストロゲン様作用があることは報告されているものの⁶¹⁾、脳の性分化に関しては2,6-TDMPP ほど強い影響を持たない可能性が考えられる。一方、特に TBBPA に関しては脳高次機能に影響を及ぼす甲状腺ホルモンかく乱作用も疑われているが⁶²⁾、本研究ではその様な影響を捉える評価は行うことができなかった。脳の性分化以外の他の発達神経毒性評価法も取り入れた評価を今後検討する必要がある。

c. 鳥類・ウズラ初期胚を用いた神経発生試験法の確立：

アセタミプリド (6 $\mu\text{mol}/\text{卵}$)、イミダクロプリド (0.39-1.17 $\mu\text{mol}/\text{卵}$) の初期胚への曝露影響を検討したところ、アセタミプリド (6 $\mu\text{mol}/\text{卵}$) 曝露により体重および脳重量を低下させることが明らかになった (図 17)。また、イミダクロプリド投与群 1 (0.078-0.117 $\mu\text{mol}/\text{卵}$)、群 2 (0.391-0.488 $\mu\text{mol}/\text{卵}$)、群 3 (0.585-1.171 $\mu\text{mol}/\text{卵}$) と対照群で比較を行うと群 2 において対照群と比較して有意に体重、脳重量の低下が認められた (図 18)。さらにイミダクロプリド投与群 2 に関しては、有意差は認められなかったものの頭部における嘴や眼の形成不全を示す奇形発生率が対照群と比較して高い傾向が

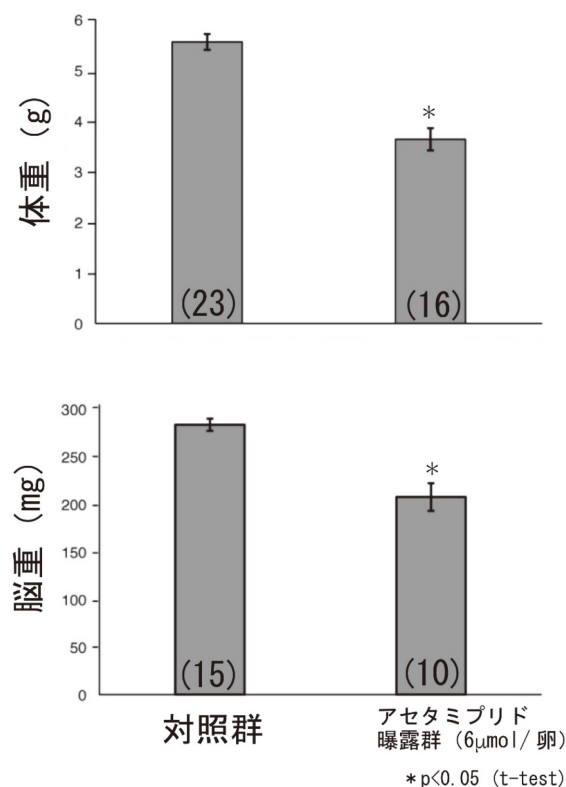


図 17 鳥類胚に対するアセタミプリド曝露の体重・脳重への影響

ウズラの卵内にアセタミプリド 6 μmol を投与し、孵化前の胚における体重と脳重への影響を検討した。アセタミプリド曝露群では有意に体重と脳重の低下が認められた。プロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。

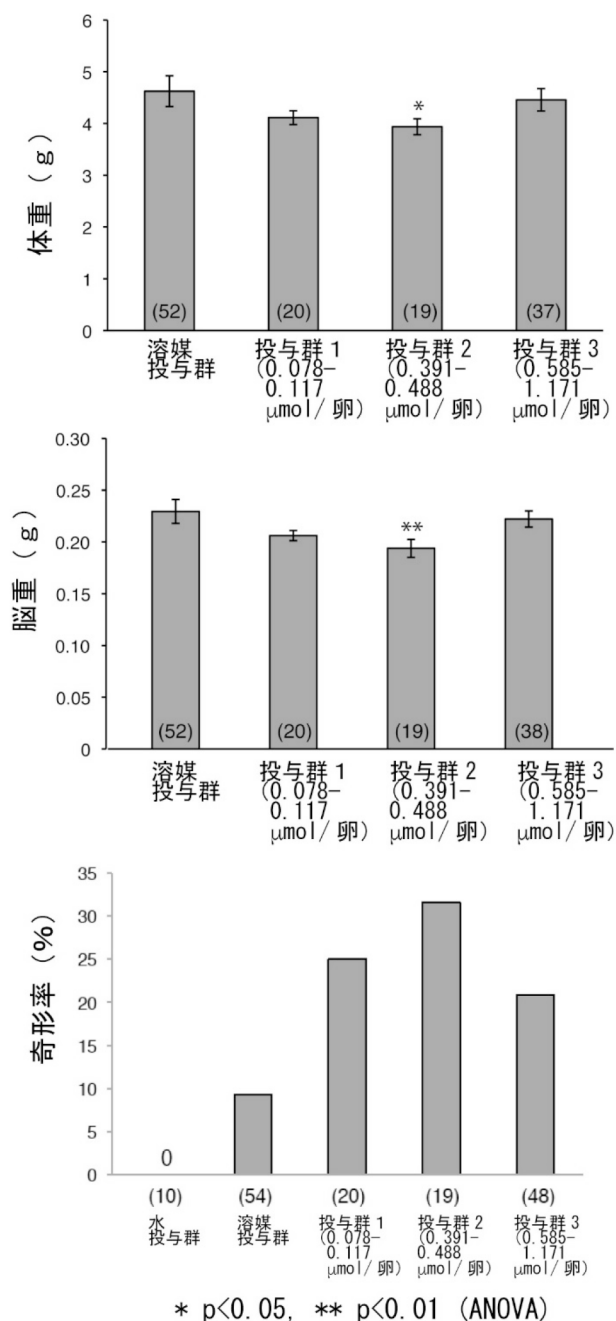


図 18 鳥類胚に対するイミダクロプリド曝露の体重・脳重・催奇形性への影響

ウズラの卵内に図に標記した濃度でイミダクロプリドを投与し、孵化前の胚における体重、脳重、頭部奇形率への影響を検討した。イミダクロプリド投与群 2 で有意な体重、脳重の低下が認められた。有意差はないが投与群 2 で奇形率の上昇傾向が認められた。体重、脳重のプロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。

認められた (図 18)。また、その原因として形態形成関連遺伝子である Pax6 の遺伝子発現を検討したところ、対照群と比較して Pax6 遺伝子発現の低下が認められた (図 19)。このような結果から、アセタミプリドとイミダクロプリドの共通した結果として体重・脳重量の低下が、イミダクロプリドでのみ検出された結果として頭部奇形発生率の上昇傾向が認められた。妊娠中の母親の喫煙や受動喫煙が産子の口蓋裂などの頭部奇形を誘発する可能性が報告されており⁶³⁾、実験的にもタバコの成分であるニコチンなどの有害化学物質との関連が報告されている⁶⁴⁾。今回の研究により見出されたネオニコチノイド系農薬による奇形誘導傾向はニコチンと同様ニコチン性アセチルコリン受容体に結合する作用による可能性があり、今後、他のネオニコチノイド種の有害性も含めて複数のネオニコチノイド種を用いて作用機序の検討も行っていく、さらなる詳細な研究が必要である。

引用文献

- 1) Grandjean, P., and Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 13, 330-338.
- 2) Dakeishi, M., Murata, K., and Grandjean, P. (2006). Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ. Health* 5, 31.
- 3) Calderon J., Navarro M. E., Jimenez-Capdeville M. E., Santos-Diaz M. A., Golden A., Rodriguez-Leyva I., et al. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.* 85, 69-76.
- 4) Tsai, S. Y., Chou, H. Y., The, H. W., Chen, C. M., and Chen, C. J. (2003). The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology* 24, 747-753.
- 5) Wasserman, G. A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Factor-Litvak, P., Kline, J., et al. (2007). Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihazar, Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 115, 285-289.
- 6) Rodriguez, V. M., Carrizales, L., Mendoza, M. S., Fajardo, O. R., and Giordano, M. (2002). Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 743-750. d
- 7) Xi, S., Sun, W., Wang, F., Jin, Y., and Sun, G. (2009). Transplacental and early life exposure to inorganic arsenic affected development and behavior in offspring rats. *Arch. Toxicol.* 83, 549-556.
- 8) Martinez, E. J., Kolb, B. L., Bell, A., Savage, D. D., and Allan, A. M. (2008). Moderate perinatal arsenic exposure alters neuroendocrine markers associated with depression and increases depressive-like behaviors in adult mouse offspring. *Neurotoxicology* 29, 647-655.
- 9) Martinez-Finley, E. J., Ali, A. M., and Allan, A. M. (2009). Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 271-277.
- 10) Namgung, U., and Xia, Z. (2001). Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174, 130-138.
- 11) Wong, H. K., Fricker, M., Wyttenbach, A., Villunger, A., Michalak, E. M., Strasser, A., et al. (2005). Mutually exclusive subsets of BH3-only proteins are activated by the p53 and c-Jun N-terminal kinase/c-Jun signaling pathways during cortical neu-

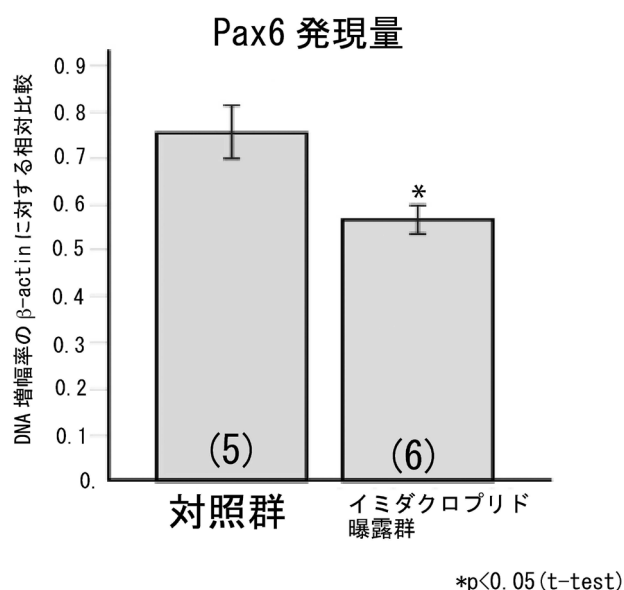


図 19 鳥類胚に対するイミダクロプリド曝露の Pax6 遺伝子発現への影響

ウズラの卵内に図に標記した濃度でイミダクロプリドを投与し、孵化前の胚の脳における Pax6 遺伝子の発現量を Realtime PCR 法で検討したところ、イミダクロプリド投与群において発現量の低下が認められた。プロットは平均値 ± 標準誤差、() 内の数字は匹数。

- ron apoptosis induced by arsenite. *Mol. Cell Biol.* 25, 8732-8747.
- 12) Koike-Kuroda, Y., Kakeyama, M., Fujimaki, H., and Tsukahara, S. (2010). Use of live imaging analysis for evaluation of cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death. *Toxicol. In Vitro* 24, 2012-2020.
 - 13) Keim, A., Rossler, O. G., Rothhaar, T. L., and Thiel, G. (2012). Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun. *Neuroscience* 206, 25-38.
 - 14) Frankel, S., Concannon, J., Brusky, K., Pietrowicz, E., Giorgianni, S., Thompson, W. D., et al. (2009). Arsenic exposure disrupts neurite growth and complexity in vitro. *Neurotoxicology* 30, 529-537.
 - 15) Aung, K. H., Kurihara, R., Nakashima, S., Maekawa, F., Nohara, K., Kobayashi, T., et al. (2013). Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite. *Neurotoxicology* 34, 226-235.
 - 16) Jin, Y., Xi, S., Li, X., Lu, C., Li, G., Xu, Y., et al. (2006). Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups. *Environ. Res.* 101, 349-355.
 - 17) Zhao, F., Liao, Y., Jin, Y., Li, G., Lv, X., and Sun, G. (2012). Effects of arsenite on glutamate metabolism in primary cultured astrocytes. *Toxicol. In Vitro* 26, 24-31.
 - 18) Wang, Y., Zhao, F., Liao, Y., Jin, Y., and Sun, G. (2013). Effects of arsenite in astrocytes on neuronal signaling transduction. *Toxicology* 303, 43-53.
 - 19) Miller, F. D., and Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357-369.
 - 20) Cotter, D. R., Pariante, C. M., and Everall, I. P. (2001). Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res. Bull.* 55, 585-595.
 - 21) Catanzaro, I., Schiera, G., Sciandrello, G., Barbata, G., Caradonna, F., Proia, P., et al. (2010). Biological effects of inorganic arsenic on primary cultures of rat astrocytes. *Int. J. Mol. Med.* 26, 457-462.
 - 22) Júlvez, J., Paus, T., Bellinger, D., Eskenazi, B., Tiemeier, H., Pearce, N., et al. (2016). Environment and brain development: challenges in the global context. *Neuroepidemiology* 46, 79-82.
 - 23) Tomizawa, M., and Casida, J. E. (1999). Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 127, 115-122.
 - 24) Tomizawa, M., and Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247-268.
 - 25) de Oliveira, I. M., Nunes, B. V. F., Barbosa, D. R., Pallares, A. M., and Faro, L. R. F. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicol. Lett.* 192, 294-297.
 - 26) Rodrigues, K. J. A., Santana, M. B., Do Nascimento, J. L. M., Picanço-Diniz, D. L. W., Maués, L. A. L., Santos, S. N., et al. (2010). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 101-107.
 - 27) Li, P., Ann, J., and Akk, G. (2011). Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *J. Neurosci. Res.* 89, 1295-1301.
 - 28) Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., and Kawano, H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE* 7: e32432.
 - 29) Cimino, M., Marini, P., Colombo, S., Andena, M., Cattabeni, F., Fornasari, D., et al. (1995). Expression of neuronal acetylcholine nicotinic receptor $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits during postnatal development of the rat brain. *J. Neural Transmission* 100, 77-92.
 - 30) Millar, N. S., and Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237-246.
 - 31) Dwyer, J. B., McQuown, S. C., and Leslie, F. M. (2009). The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol. Ther.* 122, 125-139.
 - 32) Takarada, T., Nakamichi, N., Kitajima, S., Fukumori, R., Nakazato, R., Le, N. Q., et al. (2012). Promoted neuronal differen-

- tiation after activation of alpha4/beta2 nicotinic acetylcholine receptors in undifferentiated neural progenitors. *PLoS ONE* 7: e46177. d
- 33) Pfaff, D. W. (1989). Features of a hormone-driven defined neural circuit for a mammalian behavior. Principles illustrated, neuroendocrine syllogisms, and multiplicative steroid effects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 563, 131-147.
 - 34) Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877, 242-257.
 - 35) Nelson, R. J., and Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 536-546.
 - 36) Drevets, W. C., Price, J. L., and Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.* 213, 93-118.
 - 37) Gaskin, S., and White, N. M. (2013). Parallel processing of information about location in the amygdala, entorhinal cortex and hippocampus. *Hippocampus* 23, 1075-1083.
 - 38) Russo, S. J., and Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609-625.
 - 39) Suzuki G, Tue NM, Malarvannan G, Sudaryanto A, Takahashi S, Tanabe S, Sakai S, Brouwer A, Uramaru N, Kitamura S, Takigami H. (2013) Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays. *Environ Sci Technol.* 47(6): 2898-908.
 - 40) Frye C. A., Bo E., Calamandrei G., Calzà L., Dessì-Fulgheri F., Fernández M., et al. (2012). Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* 24, 144-159.
 - 41) Ogawa, S., Chan, J., Chester, A. E., Gustafsson, J. Å., Korach, K. S., and Pfaff, D. W. (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor β gene-deficient (β ERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12887-12892.
 - 42) Endo, T., Maekawa, F., Vöikar, V., Haijima, A., Uemura, Y., Zhang, Y., et al. (2011). Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behav. Brain Res.* 221, 172-181.
 - 43) World Health Organization (2011). Guidelines for Drinking-Water Quality, 4th Edn. Geneva: WHO press.
 - 44) Smith, A. H., Lingas, E. O., and Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. World Health Organ.* 78, 1093-1103.
 - 45) Dimova, D. K., and Dyson, N. J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24, 2810-2826.
 - 46) Cho, Y. J., and Liang, P. (2011). S-phase-coupled apoptosis in tumor suppression. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 1883-1896.
 - 47) Ajarem, J. S., and Ahmad, M. (1998). Prenatal nicotine exposure modifies behavior of mice through early development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 313-318.
 - 48) Vaglenova, J., Birru, S., Pandiella, N. M., and Breese, C. R. (2004). An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav. Brain Res.* 150, 159-170.
 - 49) Blood-Siegfried, J., and Rende, E. K. (2010). The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J. Midwifery Womens Health* 55, 143-152.
 - 50) Endo, T., Kakeyama, M., Uemura, Y., Haijima, A., Okuno, H., Bito, H., et al. (2012). Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS ONE* 7: e50741
 - 51) Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response* 12, 259-276.
 - 52) Anderson, S. M., and Brunzell, D. H. (2012). Low dose nicotine and antagonism of β 2 subunit containing nicotinic acetylcholine receptors have similar effects on affective behavior in mice. *PLoS ONE* 7: e48665.
 - 53) Alkam, T., Kim, H.-C., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., et al. (2013). Evaluation of emotional behaviors in young offspring of C57BL/6J mice after gestational and/or perinatal exposure to nicotine in six different time-windows. *Be-*

hav. Brain Res. 239, 80-89.

- 54) Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C., Correa-Santos, M., Cavina, C. C., Naiff, V. F., Krahe, T. E., et al. (2015). Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 1693-1703.
- 55) Fung, Y. K., and Lau, Y. S. (1989). Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33, 1-6.
- 56) Ribary, U., and Lichtensteiger, W. (1989). Effects of acute and chronic prenatal nicotine treatment on central catecholamine systems of male and female rat fetuses and offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 786-792.
- 57) von Ziegler, N. I., Schlumpf, M., and Lichtensteiger, W. (1991). Prenatal nicotine exposure selectively affects perinatal fore-brain aromatase activity and fetal adrenal function in male rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 62, 23-31.
- 58) Pauly, J. R., Sparks, J. A., Hauser, K. F., and Pauly, T. H. (2004). In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependent changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57Bl/6 mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 329-337.
- 59) Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM.(2006)Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology.* 147(8): 3681-91.
- 60) Baron-Cohen S, Auyeung B, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Abdallah MW, Melgaard L, Cohen AS, Chakrabarti B, Ruta L, Lombardo MV.(2015) Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Mol Psychiatry.* 20(3): 369-76.
- 61) Sanders JM, Coulter SJ, Knudsen GA, Dunnick JK, Kissling GE, Birnbaum LS.(2016) Disruption of estrogen homeostasis as a mechanism for uterine toxicity in Wistar Han rats treated with tetrabromobisphenol A. *Toxicol Appl Pharmacol.* 298: 31-9.
- 62) Lai DY, Kacew S, Dekant W. (2015) Tetrabromobisphenol A (TBBPA): Possible modes of action of toxicity and carcinogenicity in rodents. *Food Chem Toxicol.* 80: 206-14.
- 63) Sabbagh HJ, Hassan MH, Innes NP, Elkodary HM, Little J, Mossey PA. (2015)Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 10(3): e0116963.
- 64) Baroni T, Bellucci C, Lilli C, Pezzetti F, Carinci F, Lumare E, Palmieri A, Stabellini G, Bodo M.(2010) Human cleft lip and palate fibroblasts and normal nicotine-treated fibroblasts show altered in vitro expressions of genes related to molecular signaling pathways and extracellular matrix metabolism. *J Cell Physiol.* 222(3): 748-56.

2.3 サブテーマ3 毒性機構の解明と診断・予防に役立つバイオマーカーの確立

2.3.1 目的と経緯

a. 毒性機構の解明：

比較的近年になって製造、使用が進められている化学物質に関しては毒性が現れる用量や機構のみならず、曝露後の体内動態に関しても不明なものが多く存在する。特に周生期における胎児・小児における曝露に関しては、胎盤移行量や母乳移行量といった複雑な要因が関係するとともに、胎児・小児の血液脳関門形成が不十分であることから脳への移行量に関しては成体とは異なった挙動を示すため動態解析の詳細が明らかなものは少なく、毒性研究の成果をヒトに外挿する際にも大きな支障となっている。また、ヒトへの有害性の外挿を試みる上では、動物モデルとヒト影響の間をつなぐ指標として毒性を定量的に表現できる動物モデルとヒトで類似の動態を示す有害バイオマーカーの確立が有効なツールとなる。サブテーマ3aでは、サブ2で確立した発達神経毒性評価法を使った成果をヒトにおける有害性評価につなげていくために、曝露化学物質の脳への移行量検討と有害バイオマーカーの検討を行った。脳への移行量の検討に関しては、ネオニコチノイド系農薬の分析法を開発しアセタミプリドの新生仔マウスにおける脳移行量解析への応用と、2,6-TDMPPの計測手法の開発および新生仔マウスの曝露後の脳移行量解析を行った。また、有害バイオマーカーの確立としては、2,6-TDMPPの発達期曝露が雌雄で神経細胞数が異なる脳の性的二型核形成への影響を検討することで、性的二型核の構造変化が発達期のエストロゲン様化学物質曝露影響を反映する有効なバイオマーカーとなるか検討を行った。

b. 血中バイオマーカーの確立：

ヒトにおいて化学物質の有害影響を定量的に検出できる非侵襲的な手法として、血中成分解析は最も有効な手法の一つである。サブ2の研究で発達神経毒性影響を示した動物モデルにおいては、視床下部や下垂体から放出されるホルモンやその影響下で各種臓器から分泌される様々なホルモンの合成・分泌動態が変化している可能性があり、それらの動態変化を検出できれば化学物質曝露影響評価の定量的指標として活用できる可能性がある。発達期アセタミプリド曝露マウスに関しては雄マウスにおいて攻撃行動に影響が認められたため、攻撃行動に関連することが知られるホルモンである精巣から分泌されるテストステロン¹⁾や視床下部室傍核から分泌されるホルモン・パソプレシン²⁾の発現について検討を加えた。また、2,6-TDMPPの曝露に関してはサブ2のマウスを用いた研究から雌性行動や雌生殖生理機能に異常が現れる可能性が明らかになった。そこで、性行動や生殖生理に関わり内分泌かく乱物質の影響を受けやすいことが知られている視床下部ホルモン・オキシトシン³⁾に着目し、成体雌マウスにおいて2,6-TDMPPがオキシトシンの合成に影響を与えるか明らかにするため、曝露後に視床下部を摘出しオキシトシンの遺伝子発現を検討した。

2.3.2 方法

a. 毒性機構の解明：

アセタミプリド（ACE）の新生仔マウスにおける脳移行量解析

C57BL/6J マウスを CLEA Japan から購入し、国立環境研究所内で交配した。マウスは一定温度（24±1℃）、湿度（50±10%）、12時間の明暗周期条件で維持した。餌および水は自由に与え、膣栓の存在を検査し、妊娠日齢（GD）0日を膣栓が検出された日として定義した。水に溶解した ACE（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）を母体に 0 mg/体重（kg）（対照群）または 10.0 mg/体重（kg）（10 用量群）の用量で、出生後 21 日目になるまで連日経口で投与し、屠殺して脳を摘出した。

ACE 標準は Sigma-Aldrich から入手した。内部標準（IS）として Acetamiprid-d3（Fluka、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）を使用した。標準および IS はアセトニトリルで希釈し -20℃で保存した。生後 21 日目に母体に ACE を投与後 2-3 時間後の雌雄 3 匹ずつの新生仔脳に摘出した。脳全体（0.34-0.49 g）を 15 mL ポリプロピレン（PP）チューブに移し、500 µL の精製水および 50 µL の 50 ng/mL の IS 溶液と混合し、超音波破碎機を用いて 2 分間溶液をホモジナイズした。2 mL のアセトニトリルを添加した後、試料溶液をボルテックスし、5 分間再度超音波処理した。抽出液

を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、15 mL の PP チューブに移し、遠心エバポレーターで 90 分間処理した。乾燥物を 0.1 mL のアセトニトリルに再溶解し、精製水で 1 mL まで希釈した。その溶液を 1 mL のアセトニトリルおよび 1 mL の精製水で Oasis HLB カートリッジに通し、1 mL の精製水を流した後 1 mL のアセトニトリル/精製水 (1 : 1, v/v) で、ACE を溶出した。この溶出液を遠心エバポレーターで 60 分間乾燥させ、分析前に 0.5 mL のアセトニトリル/精製水 (1 : 9, v/v) に再溶解した。定量はタンデム質量分析計 (LCMS8050, Shimadzu) に連結した超高速液体クロマトグラフィー (Nexera UHPLC, Shimadzu) を用いて行った。分析カラムは Kinetex C18 (100×2.1mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) を使い、10 μ L を注入した。流速 0.4 mL/分、移動相は (a) アセトニトリル中の 17 mmol/L 酢酸および 5 mmol 酢酸アンモニウム、および (b) 精製水中の 17 mmol/L 酢酸および 5 mmol 酢酸アンモニウム、を用いた。勾配パラメータは初期条件 (相比 a : b = 10 : 90) を 5 分間、40 : 60 を 5.5 分間、100 : 0 を 1 分間とした。多重反応モニタリングを使用して IS に対して相対定量化を行った。ACE 標準液の検量線の直線性は 0.1 ~ 100 ng/mL で $r^2 > 0.998$ であった。標準溶液の 7 回の反復分析の結果から ACE 検出限界は 0.024 ng/mL とした。

2,6-TDMPP の新生仔マウスにおける脳移行量解析

投与液は、2,6-TDMPP (林純薬工業) を秤量し、ゴマ油で 25 mg/mL 液を調製した。新生仔期曝露試料は、出生後 1 日齢の C57BL/6L 系統の新生仔マウスに投与液 20 μ L (2,6-TDMPP 500 μ g) を単回投与してから 0、8、16、24、48 時間後にそれぞれ、雄新生仔マウスから 3 試料と雌新生仔マウスから 3 試料を採取した。胎仔期曝露試料は、妊娠 16 日目の母マウスに投与液 200 μ L を単回投与してから 0、8、16、24、48 時間後にそれぞれ、雄胎仔マウスから 6 ~ 7 試料と雌胎仔マウスから 5 ~ 6 試料を採取した。各試料は、-75°C 以下に設定した冷凍庫で保存した。脳組織試料を解凍後、3,5-TDMPP-d₉ (林純薬工業) を内標準物質として添加してホモジナイズし、メタノールで超音波抽出を行った。抽出液を Oasis WAX 150 mg/30 μ m カートリッジカラム及び ENVI-Carb 250 mg カートリッジカラムで精製した後、液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計を用いて MS 測定 (m/z 100 ~ 1500) 及び MSMS 測定 (m/z 50 ~ 1000) を行った。2,6-TDMPP の定量値の日間変動及び日内変動はそれぞれ 14% 及び 12% であり、新生仔期及び胎仔期曝露試料における 3,5-TDMPP-d₉ の回収率の平均値は 75% であった。

2,6-TDMPP の脳の性的二型核形成への影響

脳の性的二型核の中でも特に視索前野に存在する SDN-POA と呼ばれる神経核は雄優位の神経容積を示すことで知られている。この SDN-POA の一部を特異的に特定する手段としてカルビンディンと呼ばれるタンパク質を免疫染色することで明瞭にその雌雄差を同定することができる⁴⁾。本研究ではカルビンディンを染色することで特異的に同定可能な SDN-POA の一部を CALB-SDN と定義し、その雌雄差および 2,6-TDMPP の発達期曝露によりその神経細胞数に及ぼす影響を検討した。カルビンディン免疫染色に関しては、凍結薄切脳切片を作成し、室温で 60 分間、0.6% H₂O₂ を含有する 1% Triton X-100 を含む 0.05 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBST) と共にインキュベートすることで内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、5% 正常ヤギ血清を含む PBST で室温 60 分間インキュベートし抗体の非特異的結合をブロックした。さらに、切片をモノクローナル抗カルビンディン抗体 (C9848, Sigma Aldrich, US、希釈係数 1 : 15,000) を含む PBST で 4°C で 2 日間インキュベートした。再度洗浄後、一次抗体で処理した切片を PBST で洗浄後ペルオキシダーゼ標識ポリマーに結合させたヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体溶液 (Dako EnVision Plus, Dako, USA) と室温で 30 分間反応させた。発色反応は 3,3'-ジアミノベンジジンを用い、発色後に切片をゼラチンコーティングスライドに載せ、光学顕微鏡下で観察した。CALB-SDN 中のカルビンディン免疫反応性を示した神経核の神経細胞数は StereoInvestigator ソフトウェア (MBF Bioscience Inc., USA) を用いて分析した。免疫染色手法の詳細に関しては Moe et al. (2016) Neurosci Lett. 631:63-9 に準じて行った。

b. 血中バイオマーカーの確立:

発達期アセタミプリド曝露マウスの血中テストステロン値の解析

行動試験終了後ペントバルビタール (60 mg/kg 体重) でマウスを深麻酔し、左心室から血液を採取した。全血から血漿 (100 μ L) を分離し、酢酸エチルでステロイドホルモンを含む分画を抽出した。その後テストステロン酵素免疫アッ

セイキット（Cayman Chemicals、USA）を用いてテストステロン濃度を測定した。

発達期アセタミプリド曝露マウスのバソプレシン神経細胞数の解析

行動試験終了後、ペントバルビタール（60 mg/kg 体重）でマウスを深麻酔し 4% パラホルムアルデヒド（PFA）- 0.1M リン酸緩衝生理食塩水を用いて灌流固定を行った。脳を摘出し同溶液で一晩 4℃ で後固定し、さらに 30% スクロース含有 0.1M リン酸緩衝生理食塩水を用いて凍結保護処置を行った。このような脳試料を用いて凍結マイクロトームにより厚さ 30 μm の前額断凍結切片を作製した。切片は 0.5% 過酸化水素を含む PBS-X（0.1M リン酸緩衝生理食塩水および 0.2% Triton X-100）で 20 分間インキュベートすることで内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、さらに 1% カゼイン含有 PBS-X で室温 2 時間インキュベートすることで抗体の非特異的結合防止処置を施した。続いて、組織切片をウサギポリクローナル抗バソプレシン抗体（1:4000、Immunostar、USA）を用いて 4℃ で 24 時間インキュベートした。その後、DAKO EnVision Detection System（Peroxidase/DAB+、K5007）を用いてバソプレシン陽性細胞を可視化した。光学顕微鏡（Leica DFC290 HD; Leica Microsystems、Germany）に取り付けられたデジタルカメラを用いて、室傍核を含む切片（Bregma 0.70 ～ 0.94 mm）の画像を撮影し、各動物毎に免疫反応性細胞の総数を計測した。解析の詳細は Sano et al. (2016) Frontiers in Neuroscience10:228 に記載してある。

2,6-TDMPP の曝露によるオキシトシン遺伝子発現の解析

予め卵巣除去を行い卵巣ホルモンの影響を排除した成体雌マウスを用いて 2,6-TDMPP の急性曝露影響の検討を行った。2,6-TDMPP は 25 μg 投与群、250 μg 投与群、2500 μg 投与群の 3 群および溶媒を投与する対照群を作製し、それぞれ視床下部摘出の 48 時間前と 24 時間前に 2 度投与した。サンプリング時には、急性頸椎脱臼により屠殺後、視床下部領域を選択的に摘出して遺伝子発現解析に用いた。オキシトシンの遺伝子発現は Real time RT-PCR 法を用いて検討した。Real time RT-PCR 法に関しては、Maekawa et al. (2013) Neurotoxicology 37: 197-206 に記載された手法に準じて行った。

2.3.3 結果と考察

a. 毒性機構の解明：

アセタミプリド（ACE）の新生仔マウスにおける脳移行量解析

確立したアセタミプリドの脳での定量法に基づいて、ACE の脳残留濃度を対照群 6 匹およびアセタミプリド 10 用量群 6 匹のマウスで測定した。対照群でアセタミプリドは検出されなかった。一方、10 用量群における脳中の濃度は、雄雌それぞれ 1.29±0.46 および 1.23±0.20 ng/g であった（表 1）。このことから、母体に投与した ACE のすくなくとも一部は新生仔の脳に移行することが明らかになった。

2,6-TDMPP の新生仔マウスにおける脳移行量解析

2,6-TDMPP 投与後 8 時間以降の新生仔期曝露の脳から 2,6-TDMPP が検出された。2,6-TDMPP の脳内濃度は投与後 16 時間に 870 ng/g を示し（図 20）、新生仔マウスにおける 2,6-TDMPP の脳内蓄積量は投与量（500 μg）の 0.017% に相

表 1 新生仔マウスにおけるアセタミプリドの脳移行量
水に溶解した ACE を母体に 0 mg/ 体重（kg）（対照群）または 10.0 mg/ 体重（kg）（曝露群）の用量で、出生後 21 日目になるまで連日経口で投与し、屠殺して脳を摘出した。値は平均値、匹数は各群 3。

群		脳内アセタミプリド値 (ng/mg 組織重量)
雄	対照群	検出限界以下
	曝露群	1. 29
雌	対照群	検出限界以下
	曝露群	1. 23

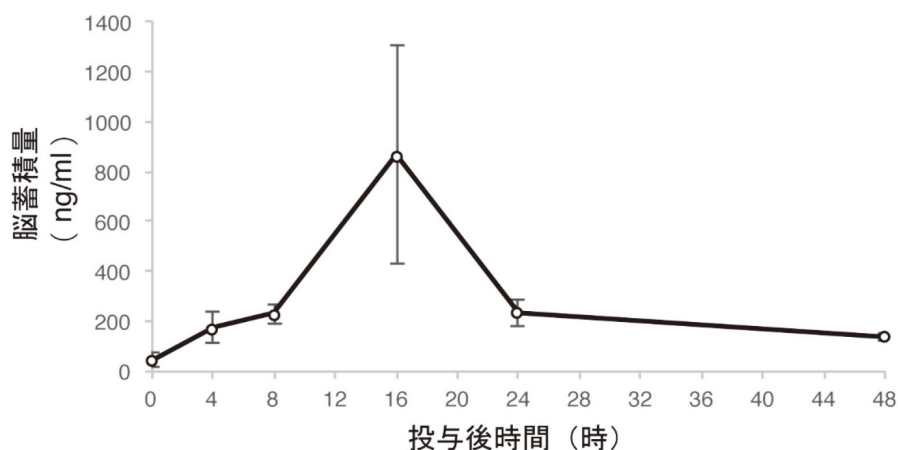


図 20 2,6-TDMPP の新生仔マウスにおける脳移行量

0.5 mg の 2,6-TDMPP を単回投与した後の新生仔マウスの脳における蓄積量を時間経過を追ってプロットした。各時点 6 匹。プロットは平均値±標準誤差。

当した。新生仔期曝露試料においては、投与後 16 時間以降、投与後 24 時間には 16 時間値の 27%、投与後 48 時間には 16 時間値の 16% まで低下したが、検出限界未満には至らなかった。本研究から、2,6-TDMPP は新生仔の血液脳関門を通過し、脳内に輸送されることが示唆された。

2,6-TDMPP の脳の性的二型核形成への影響

成体雌雄間で CALB-SDN 内のカルビンディン免疫陽性細胞数を比較したところ、雄で有意に多い性的二型性を示すことが確認できた (図 21)。次に、胎仔期～新生仔期にかけて 2,6-TDMPP 曝露された成体雌マウスの CALB-SDN 内のカルビンディン免疫陽性細胞数を対照群と比較した。500 µg-50 µg 投与群、5000 µg-500 µg 投与群と対照群で比較したところ、投与群は両群とも対照群と比較して有意な細胞数の増加が確認され (図 22)、雄の CALB-SDN に近い形態を

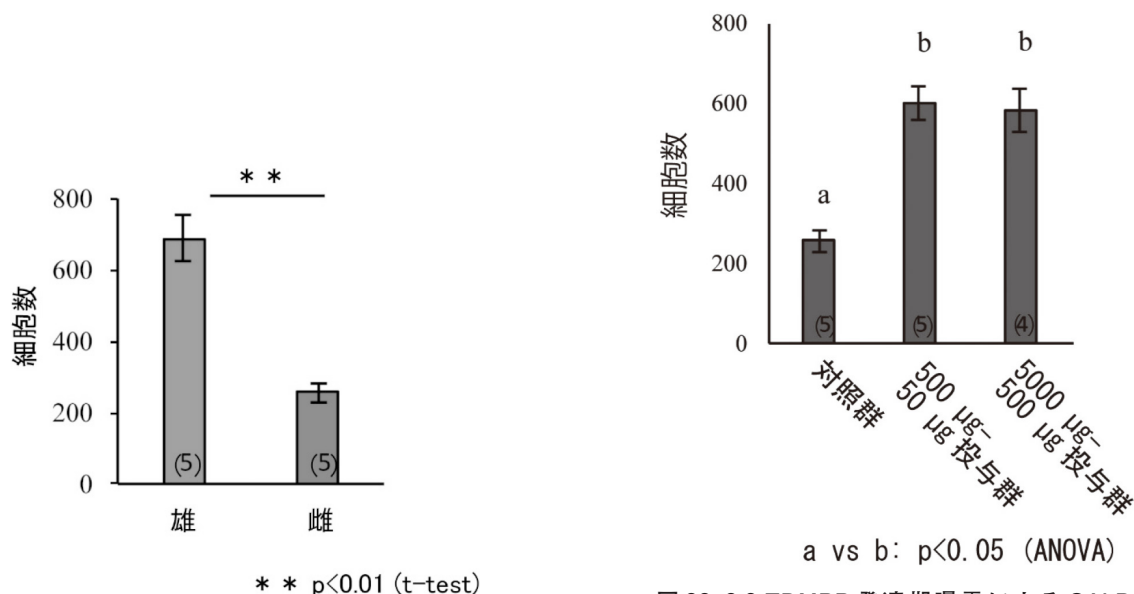


図 21 典型的な性的二型核 CALB-SDN におけるカルビンディン免疫陽性細胞数の雌雄差

成体雌雄のマウスにおいて視索前野に存在する特異的な性的二型核 CALB-SDN の細胞数を検討したところ、雄で有意に細胞数が多いことが確認された。プロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。

図 22 2,6-TDMPP 発達期曝露による CALB-SDN におけるカルビンディン免疫陽性細胞数への影響

成体雌のマウスにおいて対照群と 2,6-TDMPP 発達期曝露群間で視索前野に存在する特異的な性的二型核 CALB-SDN の細胞数を比較したところ 2 用量の曝露群両者で有意な細胞数の増加が確認された。プロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。

とすることが明らかになった。この結果から、エストロゲン様作用を示す化学物質が CALB-SDN の細胞数変化を誘導することが示され、CALB-SDN 内細胞数の発達期エストロゲン様物質曝露の影響バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。マウス SDN-POA とヒト前視床下部間質核とは相同領域である可能性が指摘されている。核磁気共鳴画像法等の非侵襲的な脳イメージングで前視床下部間質核を同定することが可能となれば、ヒトにおいてもエストロゲン様物質曝露の影響バイオマーカーとして活用できる可能性がある。

b. 血中バイオマーカーの確立：

発達期アセタミプリド曝露マウスの血中テストステロン値の解析

アセタミプリドの発達期曝露マウスにおいて、成長後血漿を採取してテストステロン値を測定した。テストステロン値は対照群の雌雄で比較すると雄で有意に高かった ($p < 0.01$ 、図 23)。曝露群と対照群を比較すると血漿テストステロン値で ACE 曝露の影響は見られなかった。攻撃行動など社会性行動に影響が見られた原因としてテストステロン値の異常が原因となる可能性が考えられるが、テストステロンはアセタミプリドの発達期曝露雄マウスに見られた社会性異常の原因ではなく、バイオマーカーともならないことが示唆された。

発達期アセタミプリド曝露マウスのバソプレシン神経細胞数の解析

視床下部室傍核のバソプレシン神経細胞は下垂体後葉に神経線維を送り循環血中にバソプレシンを分泌し浸透圧調節に中心的な役割を果たすとともに、脳内でもバソプレシンを放出することで社会性行動の調節に関与している。まず、このバソプレシン免疫陽性細胞数の性差を検討したところ、細胞数は対照群で雄は雌より有意に高かった ($P < 0.01$ 、図 24)。一方、発達期アセタミプリド曝露群と対照群を比較したところ、雄雌ともにバソプレシン免疫陽性細胞数に曝露の影響は見られなかった。脳内のバソプレシン放出や作用が攻撃行動や情動行動などに影響を与えることは多数の既報があるが、発達期アセタミプリド曝露群の社会性異常の原因としてバソプレシン産生への影響は無い、あるいは少ないと考えられる。バソプレシンの産生への影響は見られなかったことから血中バソプレシン値に関しても、アセタミプリドの発達期曝露バイオマーカーとなる可能性は少ないと推測できる。

2,6-TDMPP の曝露によるオキシトシン遺伝子発現の解析

発達期 2,6-TDMPP 曝露の血中成分変化への影響を調べる前段階として成体において 2,6-TDMPP が急性に視床下部のオキシトシン遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。オキシトシンは視床下部室傍核および視索上核において産生され下垂体後葉に投射することで下垂体から分泌され、分娩・射乳など出産や子育てといった雌に特有の生殖生理現象に中心的に関わるホルモンであるとともに、脳内で働いて社会性の制御因子として働く。25 μg 投与群、250 μg 投与群、2500 μg 投与群の 3 群および溶媒投与群と比較したところ、2500 μg 投与群で他の群と比較して有意にオキシトシンの遺伝子発現が増加していた (図 25)。血中オキシトシン値に関しては現状で検討を行うことができていないため、今後発達期

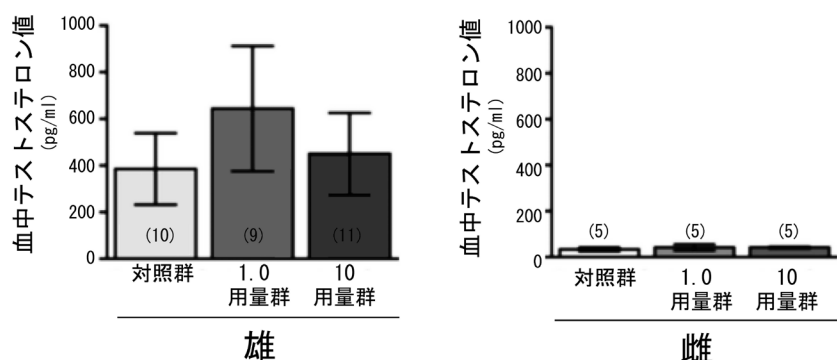


図 23 発達期アセタミプリド曝露が成長後のマウスの血中テストステロン値に及ぼす影響

発達期アセタミプリド曝露が成長後の血中テストステロン値に影響するか検討を行ったところ、雌雄間では血中テストステロン値は雄が高く、雌が低かったが、雄でも雌でも曝露群と対照群間での違いは認められなかった。プロットは平均値 $\pm$ 標準誤差、() 内の数字は匹数。

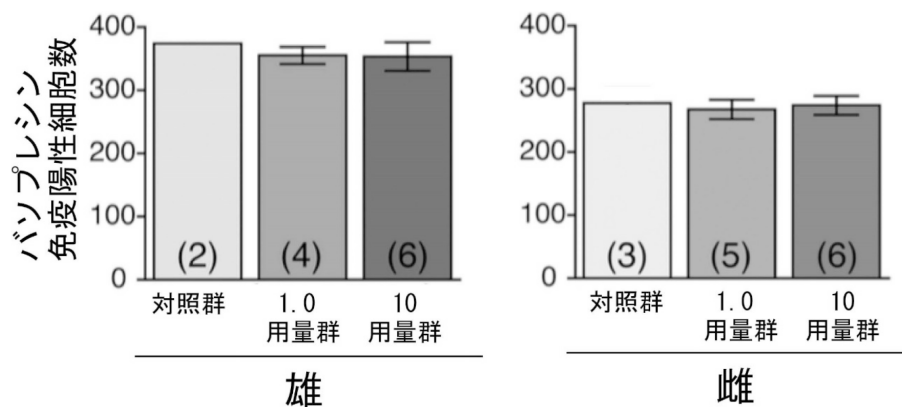
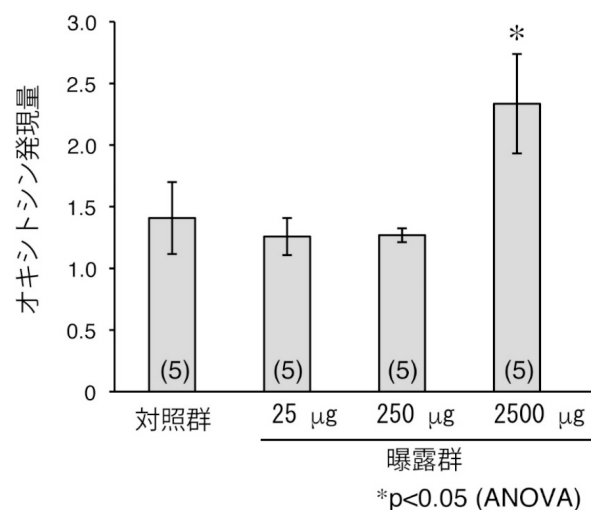


図 24 発達期アセタミプリド曝露が成長後のマウスの室傍核バソプレシン神経細胞数に及ぼす影響

発達期アセタミプリド曝露が成長後の室傍核に影響するか検討を行ったところ、雌雄間では血中テストステロン値は雄が高く、雌が低かったが、雄でも雌でも曝露群と対照群間での違いは認められなかった。プロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。対照群は例数が3 以下のため標準誤差は示さず。



*p<0.05 (ANOVA)

図 25 2,6-TDMPP 曝露が雌マウスの視床下部オキシトシン遺伝子発現に及ぼす影響

2,6-TDMPP 曝露が雌マウスの視床下部オキシトシン遺伝子発現に検討を行ったところ、2500 μg 曝露群において有意に発現量の増加が確認された。プロットは平均値±標準誤差、() 内の数字は匹数。

曝露条件も含めて血中オキシトシン値が2,6-TDMPP 曝露のバイオマーカーとして有効に利用できるか検討を進める予定である。

引用文献

- 1) Batrinos ML. (2012) Testosterone and aggressive behavior in man. Int J Endocrinol Metab. 10(3): 563-8.
- 2) Ferris CF. (2005) Vasopressin/oxytocin and aggression. Novartis Found Symp. 268: 190-8.
- 3) Patisaul HB. (2017) Endocrine Disruption of Vasopressin Systems and Related Behaviors. Front Endocrinol (Lausanne) 8: 134.
- 4) Moe Y, Tanaka T, Morishita M, Ohata R, Nakahara C, Kawashima T, Maekawa F, Sakata I, Sakai T, Tsukahara S. (2016) A comparative study of sex difference in calbindin neurons among mice, musk shrews, and Japanese quails. Neurosci Lett. 631: 63-9.

2.4 まとめと今後の課題

本研究では、動物モデルを用いて発達神経評価法を確立し様々な角度から発達神経毒性を捉えることで、とりこぼしの少ない評価を可能とする体制を構築することを目的とした。

サブテーマ1では評価モデルの整備を試み、*in vivo* 実験においては遺伝的に発達障害を発症しやすい脆弱モデルとして2種の動物モデルを見出した。特に、バソプレシン受容体欠損マウスにおいては脳内で発現する2つのサブタイプの両方を欠損した際に初めて確認できる発達障害様の表現型を見出し、欠損によって引き起こされる代償性を排除した2重欠損マウスにおいてより環境適応に脆弱性を示す可能性を見出した。これらの新規動物モデルは、特定の遺伝子型と環境との相互作用による発達障害誘導の研究を推進していく上で有用であり、この動物モデルを用いて化学物質曝露影響評価を行うことで遺伝的脆弱性も考慮にいたれた曝露評価を行う一助となる可能性がある。*in vitro* 実験においては、脳内に存在する特徴的な細胞種である神経細胞の神経突起伸長とグリア細胞の一種であるアストロサイトの細胞周期・細胞死への影響を蛍光可視化によって検討することが可能となった。蛍光イメージング技術は微細な構造変化を検知できるという利点に加え、蛍光色の変化により細胞機能を経過毎に評価できるという利点があるため、今後毒性評価分野においてもより一層の応用が見込まれており *in vitro* で評価する意義を活かすために今後よりハイスループットに評価が可能な体制を構築していきたいと考えている。またサブテーマ1ではほ乳類では不可能な、発生段階を追って生きたままでの評価が可能な鳥類胚を *in vivo* と *in vitro* の評価の間をつなぐシステムとして用いて、ウズラ胚を用いた発達神経毒性評価に向けて培養法の整備も行った。

サブテーマ2では、サブテーマ1で確立した評価法を用いて、有害性が確定していない化学物質に対する影響評価の有効性を検討した。*in vitro* 実験に関しては、典型的な神経毒性物質の一つである無機ヒ素の神経細胞、アストロサイトへの影響を評価することができた。*in vivo* 実験に関しては、情動行動、性行動、攻撃行動、認知行動等の様々な行動試験法を取り入れて試験バッテリーを構築・利用して、発達期のマウスにネオニコチノイド系農薬とエストロゲン様作用を示すリン系難燃剤、臭素系難燃剤を曝露し、それぞれどのような表現系に影響が出るのか明らかにした。また、鳥類胚を用いることで哺乳類では検討が困難な発生初期胚への影響評価を行い、ネオニコチノイド系農薬の実験的投与により脳重量や頭部奇形率の発生に影響が現れる可能性を示した。化学物質種や曝露時期によって様々な行動特性・生理要因・構造に影響が現れることが明らかになり、異なった発達神経評価法を組み合わせる包括的に評価する必要性がより明確となった。

サブテーマ3では、サブテーマ2で影響が検出された動物モデルを活用して、有害性メカニズムの解明とその知見を生かした診断・予防に有効なバイオマーカーの確立を試みた。代表的なネオニコチノイド系農薬・リン系難燃剤に関して脳移行量を動物モデルで測定する基盤を築くとともに、リン系難燃剤に関しては脳における性的二型核やオキシトシン値がバイオマーカーとして利用できる可能性を見出すことができた。

このような一連の研究を行うことによって、*in vitro* ～胚～*in vivo* の各段階において化学物質の脳への有害影響を検出できる評価系を構築し、一部の化学物質に関してはその成果をヒトに応用するために必要なバイオマーカーとなり得る情報も取得できた。しかしながら、今回検討した化学物質の種類や曝露条件などは限られたものであり、より一層の網羅的な検討が求められる。今後も様々な化学物質の発達神経毒性評価を行うことができる基盤作りを継続して行うことが必要である。

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境リスク・健康研究センター	前川文彦
環境リスク・健康研究センター	中山祥嗣
環境リスク・健康研究センター	磯部友彦
環境リスク・健康研究センター	Tin Tin Win Shwe
環境リスク・健康研究センター	佐野一広
資源循環・廃棄物研究センター	鈴木 剛
環境計測研究センター	橋本俊次
生物・生態系環境研究センター	川嶋貴治

(注) 所属は年度終了時点のもの。

[B 客員研究員]

浜崎浩子	北里大学一般教育部生物学	(平成 26 ～ 28 年度)
塚原伸治	埼玉大学理工学研究科生命科学部門	(平成 26 ～ 28 年度)

[C 協力研究者]

田中光一	東京医科歯科大学難治疾患研究所	(平成 26 ～ 28 年度)
中村和昭	国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部	(平成 26 ～ 28 年度)

1.2 研究課題と担当者

サブテーマ 1 発達神経毒性検出基盤の整備

前川文彦、川嶋貴治、**田中光一、**中村和昭

サブテーマ 2 発達神経毒性評価法の構築

前川文彦、佐野一広、鈴木 剛、Tin Tin Win Shwe、川嶋貴治、*浜崎浩子

サブテーマ 3 毒性機構の解明と診断・予防に役立つバイオマーカーの確立

前川文彦、鈴木 剛、橋本俊次、中山祥嗣、磯部友彦、*塚原伸治

(注) *客員研究員、**協力研究者

2 研究成果発表一覧

2.1 誌上発表

<雑誌>

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

Aung KH., Tsukahara S., Maekawa F., Nohara K., Nakamura K., Tanoue A. (2015) Role of Environmental Chemical Insult in Neuronal Cell Death and Cytoskeleton Damage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38 (8), 1109-1112

Aung K.H., Kyi-Tha-Thu C., Sano K., Nakamura K., Tanoue A., Nohara K., Kakeyama M., Tohyama C., Tsukahara S., Maekawa F. (2016) Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 10: 137.

Htike N.T.T., Maekawa F., Soutome H., Sano K., Maejima S., Aung K.H., Tokuda M., Tsukahara S. (2016) Arsenic Exposure Induces Unscheduled Mitotic S Phase Entry Coupled with Cell Death in Mouse Cortical Astrocytes. *Frontiers in Neuroscience*, 10: 297.

Kawashima T., Ahmed WM., Nagino K., Ubuka T., Tsutsui K. (2016) Avian Test Battery for the Evaluation of Developmental Abnormalities of Neuro- and Reproductive Systems. *Frontiers in Neuroscience* 10: 296.

Maekawa F., Tsukahara S., Kawashima T., Nohara K., Ohki-Hamazaki H. (2014) The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: relative contributions of sex steroids and sex chromosomes. *Frontiers in Neuroscience*, 8: 242.

前川文彦, チョウテッアウン, 中村和昭, 佐野一広, Tin-Tin-Win-Shwe, 田上昭人, 野原恵子, 塚原伸治 (2014) 培養細胞を用いた発達神経毒性評価試験法の近年の動向. 化学工業, 65 (7), 538-547.

前川文彦 (2015) 環境化学物質が誘導する発達神経毒性の評価法開発. 日仏生物学会誌, 54, 16-22.

前川文彦, 佐野一広 (2016) ネオニコチノイド系農薬の発達期曝露が誘導する後発的な行動異常の検出. 環境ホルモン学会ニュースレター, 19 (2), 4.

Maekawa F., Nakamura K., Nakayama SF. (2017) Editorial: Chemicals in the environment and brain development: Importance of neuroendocrinological approaches. *Front. Neurosci.* 11:133.

Moe Y., Tanaka T., Morishita M., Ohta R., Nakahara C., Kawashima T., Maekawa F., Sakata I., Sakai T., Tsukahara S. (2016) A comparative study of sex difference in calbindin neurons among mice, musk shrews, and Japanese quails. *Neuroscience Letters*, 631, 63-69

Sano K., Isobe T., Yang J., Tin-Tin-Win-Shwe, Yoshikane M., Nakayama S., Kawashima T., Suzuki G., Hashimoto S., Nohara K., Tohyama C., Maekawa F. (2016) In utero and Lactational Exposure to Acetamiprid Induces Abnormalities in Socio-Sexual and Anxiety-Related Behaviors of Male Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 10: 228.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi Tha thu, Yadanar Moe, Maekawa F., Yanagisawa R., Furuyama A., Tsukahara S., Fujitani Y., Hirano S. (2015) Nano-Sized Secondary Organic Aerosol of Diesel Engine Exhaust Origin Impairs Olfactory-Based Spatial Learning Performance in Prewaning Mice. *Nanomaterials* (5), 1147-1162

Win-Shwe TT, Kyi-Tha-Thu C, Moe Y, Fujitani Y, Tsukahara S, Hirano S. (2016) Exposure of BALB/c Mice to Diesel Engine Exhaust Origin Secondary Organic Aerosol (DE-SOA) during the Developmental Stages Impairs the Social Behavior in Adult Life of the Males. *Frontiers in Neuroscience* 9: 524.

2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

Aung KH., Maekawa F., Chaw Kyi TT., Sano K., Nakamura K., Tanoue A., Kakeyama M., Nohara K., Tsukahara S. (2014) Effect of prenatal exposure to arsenic on cell number and morphology of neuron in prelimbic cortex of adult mice. 21st Japanese Society for Behavioral Neuroendocrinology, Abstracts, 17

Dores R.M., Thomas A., Maekawa F., Kawashima T., Sakamoto H., Sukamoto T. (2016) Melanocortin Receptors and MRAP expression in the chick adrenal gland: correlating mRNA expression levels and ligand sensitivity of chick melanocortin receptors expressed in CHO cell. 11th International Symposium on Avian Endocrinology, 11th International Symposium on Avian Endocrinology Abstracts, 60

家田曜世, 橋本俊次, 高澤嘉一, 田邊 潔, 頭士泰之, 柴田康行, 前川文彦, 佐野一広, 鈴木 剛, 中山祥嗣, 磯部友彦, Tin-Tin-Win-Shwe, 川嶋貴治 (2016) GC × GC-HRTOFMS による多成分網羅分析—ソフトウェアによる化合物の自動検出とマトリックスの影響評価—. 第 25 回環境化学討論会, 同予稿集

Ieda T., Hashimoto S., Takazawa Y., Tanabe K., Zushi Y., Shibata Y., Maekawa F., Sano K., Suzuki G., Nakayama S., Isobe T., Tin-Tin-Win-Shwe, Kawashima T. (2016) Comprehensive analysis of house dust using GC × GC-HRTOFMS and in-house software. DIOXIN2016, Abstracts

磯部友彦, 佐野一広, 吉兼光葉, 鈴木 剛, Tin-Tin-Win-Shwe, 橋本俊次, 川嶋貴治, 前川文彦, 中山祥嗣 (2016) 生体試料中ネオニコチノイド系農薬の分析. 第 25 回環境化学討論会, 同予稿集, 486-487

加藤智美, 中森智啓, 千葉ゆりの, 前川文彦, 浜崎浩子 (2016) ニワトリのヒナでみられる雌雄差について. 日仏生物学会第 185 回例会, 日仏生物学会第 185 回例会プログラム, 4

前川文彦 (2014) 幼少期の環境が行動発達に及ぼす影響. 第 20 回「性と生殖」公開シンポジウム「人間科学における神経内分泌研究の展開」要旨無

前川文彦, チョウ・テツ・アウン, チョウ・チー・ター・トゥー, 佐野一広, 中村和昭, 田上昭人, 掛山正心, 塚原伸治, 野原恵子 (2015) 発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出. 第 14 回分子予防環境医学研究会大会, 第 14 回分子予防環境医学研究会大会プログラム・抄録集, 51

Maekawa F., Aung KH., Thu CK., Sano K., Nakamura S., Tanoue A., Kakeyama M., Tohyama C., Nohara K., Tsukahara S. (2015) PRENATAL ARSENIC EXPOSURE IMPAIRED BEHAVIORAL FLEXIBILITY AND MORPHOLOGY OF CORTEX IN MICE. 9th World Congress International Brain Research Organization, Abstracts, (301)

前川文彦, 佐野一広, Yang Jiaxin, Tin-Tin-Win-Shwe, 野原恵子 (2015) 発達期ネオニコチノイド系農薬曝露の社会行動への後発影響. 第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会, 同予稿集, 71

前川文彦 (2016) 発達期の環境とこころの発達～有害化学物質から子どもを守る基礎研究～. 日仏生物学会主催一般公開シンポジウム「すこやかな子どもの発生・発達とそれを育む環境」(主催:日仏生物学会, 共催:日仏会館, 後援:国立環境研究所), パンフレット, 9

前川文彦, 佐野一広, 鈴木 剛, Nang Tinn Thinn Htike, 森下雅大, Tin-Tin-Win-Shwe, 橋本俊次, 川嶋貴治, 磯部友彦, 中山祥嗣, 塚原伸治 (2016) エストロゲン様活性を示す難燃剤の影響評価指標としての「脳の性分化」. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会, 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会プログラム・要旨集, 51

Maekawa F. (2016) Developmental exposure to a neonicotinoid affects certain behavioral parameters of mice in adulthood: Requirement of evaluation of socio-sexual and emotional behaviors using animal models. Symposium on Systemic Pesticides Post-Neonics -What Next?, Abstracts

Maekawa F., Nagino K., Yang J., Ubuka T., Tsutsui K., Kawashima T. (2016) Analysis of aggressive behavior in two Japanese quail strains and their gene expressions possibly related to aggression in the hypothalamus. 11th International Symposium on Avian Endocrinology, 11th International Symposium on Avian Endocrinology Abstracts, 68

Maekawa F., Sano K., Suzuki G., Nakayama S., Isobe T., Tin-Tin-Win-Shwe, Hashimoto S., Kawashima T. (2016) Evaluation of potentially developmentally neurotoxic chemicals using behavioral testing and neuroendocrinological analysis. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Proceedings of The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 66(supplement1), S73

Nagino K., Ubuka T., Tsutsui K., Maekawa F., Kawashima T. (2016) Male aggressive and reproductive behaviors in long-term breeding closed colony NIES-L of Japanese quail. Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform, Proceedings of Avian Model System 9: A New Integrative Platform, 115

佐野一広, Tin-Tin-Win-Shwe, 藤谷雄二, 野原恵子, 掛山正心, 前川文彦, 平野靖史郎 (2014) ディーゼル排ガス由来二次生成有機エアロゾルの発達期曝露が後発的に雄性行動および行動柔軟性に及ぼす影響の解析. 日本行動神経内分泌学研究会第 21 回全国集会, 同予稿集, 16

佐野一広, Yang Jiaxin, Tin-Tin-Win-Shwe, 野原恵子, 前川文彦 (2015) マウスモデルを用いたネオニコチノイド系農薬の発達期曝露影響評価. 日仏生物学会第 182 回例会, 同予稿集

Sano K., Yang J., Tin-Tin-Win-Shwe, Nohara K., Maekawa F. (2015) Effect of developmental exposure to acetamiprid on behavioral profiles in mice. The 8th congress of the federation of the asian and oceanian physiological societies, Abstracts, 65 (Supplemental 2), S-A179

佐野一広, 鈴木 剛, 楊 家欣, Tin-Tin-Win-Shwe, 磯部友彦, 川嶋貴治, 橋本俊次, 中山祥嗣, 前川文彦 (2016) エストロゲン様活性を示すリン系難燃剤の曝露が脳の性分化異常を誘導する. 日仏生物学会第 184 回例会, 日仏生物学会第 184 回例会プログラム, 4

Sano K., Suzuki G., Htike N.T.T., Morishita M., Tin-Tin-Win-Shwe, Hashimoto S., Kawashima T., Isobe T., Nakayama S., Tsukahara S., Maekawa F. (2016) In vivo evaluation of a flame retardant having estrogenic activity using mouse model. Application of Recent Advances in Neuroscience to Environmental Health Research, abstract, 1-4

Sano K., Yang J., Tin-Tin-Win-Shwe, Maekawa F. (2016) Developmental exposure to acetamiprid alters behavioral profile of male mice. 10th FENS (the Federation of European Neuroscience Societies) Forum, Abstracts, (C076)

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi Tha Thu, Yadanar Moe, Fujitani Y., Tsukahara S., Maekawa F., Hirano S. (2016) Novel approach to olfactory-based spatial learning ability for preweaning mice and the effects of early exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol. 44th Myanmar Health Research Congress, Abstract, 79

Tin-Tin-Win-Shwe, Sano K., Isobe T., Kawashima T., Suzuki G., Hashimoto S., Nakayama S., Maekawa F. (2016) Perinatal exposure to a phosphate ester flame retardant affects memory function and related gene expression in adult mice. The 5th Annual Meeting of The Japan Society for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD-Japan), Abstract(P-07), 40

Tin-Tin-Win-Shwe, Sano K., Isobe T., Kawashima T., Suzuki G., Hashimoto S., Nakayama S., Maekawa F. (2017) Effects of perinatal exposure to a phosphate ester flame retardant on novel object recognition ability and memory function-related gene expression in adult mice. 45th Myanmar Health Research Congress, Abstract, 120

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 130 号
NIES Research Project Report, No.130

(SR - 130 - 2017)

ハウスダスト中の化学物質が誘導する発達神経毒性の
包括的理解に向けた多面的評価法確立
(所内公募型提案研究)
平成 26 ～ 28 年度

Establishment of multidisciplinary strategy toward comprehensive understanding
of developmental neurotoxicity induced by environmental chemicals in house dust
FY2014 ～ 2016

平成 30 年 3 月 15 日発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

March 2018

組 版 株式会社 イ セ ブ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。

<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>