研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品中化学物質への胎生～新生期暴露が情緒社会性におよぼす影響評価手法の開発（課題番号：1003）（研究期間：平成２２年度～平成２４年度）
主任研究者名	研究者名：佐藤　薫 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

食品中化学物質への胎生～新生児期暴露が情緒社会性におよぼす影響評価系を脳神経科学技術を網羅的に駆使して構築することを目的とした。

情緒社会性行動への影響についてコンセンサスが得られている化学物質（バルプロ酸、エタノール、ニコチンなど）をポジティブコントロール物質として以下の試験系を開発した。化学物質の脳内移行性を in vitroBBB モデルを用いて評価可能にした。化学物質の脳内移行性は年齢依存性があることを発見した。モデルを構成する細胞をヒト細胞に置き換え、ラット細胞モデルで十分にヒト予測性が高いことを明らかとした。胎生～新生期に化学物質に暴露したラットを 4-5 週齢まで生育し、情緒社会性行動の責任脳部位である扁桃体に注目してマイクロアレイ解析によるリスクマーカー遺伝子の同定を試みたところ、有意に変動する遺伝子は存在せず、変動は小さいが情緒社会性に影響が現れるときにまとまって変動する遺伝子群（58 遺伝子）があることを見いだした。この 58 遺伝子群の変動についてポジティブコントロール物質暴露動物および母子分離条件成育動物の主成分分析（統計解析手法の一種）を行い分離度を数値化したところ、行動解析における異常度と非常に相関が高く情緒社会性リスクを予測できることが判明した。よってこの評価手法を「情緒社会性リスク遺伝子変動指数法」とした。扁桃体の情動制御メカニズムをより直接的に反映する電気生理学的なパラメーターの内、特に重要な 12 種のパラメーターを一挙に記録するため、汎用性の高い電気刺激プロトコルおよび反応を計測・識別するプログラムを開発した。複数のパラメーターに基づく異常検出のため、「有意性カラースケールプロット」、「有意性カラーマッププロット」を開発した。以上の情緒社会性への影響評価に最適化した電気生理学的解析手法をニューロエキシトミクス試験とした。情緒社会性を直接反映する複数の行動薬理学的試験を組み込んだ新たな行動試験法を開発した。各行動試験における拘束ストレス負荷への脆弱性を評価することで高感度化を実現した。

今後、より多くの化学物質評価を想定した場合、一度に取り扱い可能な被験物質数やデータあたりの時間やコスト、専門装置の必要性、情緒社会性への精度・選択性を鑑みると、in vitro 脳内移行性試験、情緒社会性リスク遺伝子変動指数法を 1 次スクリーニングとして化学物質を絞り込み、ニューロエキシトミクス試験および情緒社会性行動試験をフォローアップとして用いることにより、最終的なリスク判定に至る、というフローで評価系を統合することが望ましいと考えられる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品中化学物質への胎生～新生期暴露が情緒社会性におよぼす影響評価手法の開発（研究期間：平成２２年度～平成２４年度）
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室 氏名：佐藤　薫（研究課題番号：１００３）

Ⅰ　研究の期間及び研究目標等

１　研究期間

平成２２年度～２４年度（３年間）

２　研究目的

食品中化学物質への胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価系を確立する。このために、まず、情緒社会性に影響をおよぼすことが既知のポジティブコントロール物質暴露動物を用いて、行動試験、扁桃体神経回路機能試験、扁桃体マイクロアレイ解析、脳内移行性解析を行い、これらを軸とした情緒社会性リスク評価基盤を確立する。マイクロアレイ解析結果、脳内移行性の結果を基に、実験系と被験物質の絞り込みを行いながら、実際に食品中に含まれる化学物質を上記評価実験系に適用し、食品中化学物質の情緒社会性に対する影響についてのデータを集積する。同時に、リスク評価系の効率化および高精度化を図る。以上の成果を総括し、多軸評定を行えるよう、行動試験、扁桃体神経回路機能試験、扁桃体マイクロアレイ解析、脳内移行性を軸としたスコアリング法を確率する。多軸化に基づき、数式化を行い判定基準値を算出する。

３　研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
1. 胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価基盤の確立	ア　ポジティブコントロール物質暴露動物の作成、供与	守口　徹（麻布大学）
	イ　ポジティブコントロール物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験	南　雅文（北海道大学）
	ウ　ポジティブコントロール物質暴露動物の扁桃体神経回路機能試験	加藤　総夫（東京慈恵会医科大学）
	エ　ポジティブコントロール物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ解析	佐藤　薫（国立医薬品食品衛生研究所）
	オ　ポジティブコントロール物質の脳内移行性に関する検討	小泉　修一（山梨大学）
2. 胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価系	カ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物の作成、供与	守口　徹（麻布大学）
	キ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験	南　雅文（北海道大学）

の効率化および高精度化	ク　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた扁桃体神経回路機能試験	加藤　総夫（東京慈恵会医科大学）
	ケ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ等解析	佐藤　薫（国立医薬品食品衛生研究所）
	コ　食品中化学物質を含む化学物質の脳内移行性に関する検討	小泉　修一（山梨大学）
3. 胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化	サ　行動試験結果の数値化	南　雅文（北海道大学）
	シ　神経回路機能試験結果の数値化および情緒社会性リスク評価の多軸化にもとづく数式化，基準値算出	加藤　総夫（東京慈恵会医科大学）
	ス　マイクロアレイ解析結果の数値化	佐藤　薫（国立医薬品食品衛生研究所）
	セ　脳内移行性結果の数値化	小泉　修一（山梨大学）

4　倫理面への配慮について

動物実験は各研究施設において施行される動物実験の適正な実施に関する規程に従う。ウィルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いは「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（所謂カルタヘナ法）および各研究施設において施行される遺伝子組換え実験安全管理規則に準拠する。

Ⅱ　研究内容及び成果等

１　研究内容及び方法

研究項目名１　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価基盤の確立

情緒社会性への影響が既知のポジティブコントロール物質として、エタノール、ニコチン、バルプロ酸を用いて、行動試験、扁桃体神経回路試験、扁桃体マイクロアレイ解析、脳内移行性解析を軸とした情緒社会性リスク評価基盤の確立を試みる。エタノールは胎児期～生後初期の暴露により不安行動が増加することが報告されている（Neurotoxicol., 30, 23-（2009), Psychoneuroendocrinology, 31, 1046-（2006)）。また、ニコチンも胎児期～生後初期の暴露により不安が増加することが報告されている（Neurotoxicol. Teratol., 32, 336-（2010), Neurobiol. Learn. Memory, 90, 527-（2008)）。バルプロ酸は胎児期および生後初期での適用が自閉症モデルとして確立されている（Psydoneuroendocrinology, 33, 728-（2008), Neuropsychopharmacology, 33, 901-(2008)）。いずれも報告数は多く、情緒社会性に影響を及ぼすことについてはコンセンサスが得られている。

ア　ポジティブコントロール物質暴露動物の作成、供与（守口　徹　麻布大学）

情緒社会性に対し影響を及ぼすことが明らかなポジティブコントロール物質に暴露した動物を作成し、班員へ供与する。

イ　ポジティブコントロール物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験(南　雅文　北海道大学)

ポジティブコントロール物質暴露動物の情緒社会性行動試験を行う。

ウ　ポジティブコントロール物質暴露動物の扁桃体神経回路機能試験(加藤　総夫　東京慈恵会医科大学)

ポジティブコントロール物質暴露動物の脳スライス標本を用いて、扁桃体機能の電気生理学的解析を行う。

エ　ポジティブコントロール物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ解析(佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所)

ポジティブコントロール物質暴露動物の扁桃体の遺伝子発現変動をマイクロアレイによって解析する。

オ　ポジティブコントロール物質の脳内移行性に関する検討（小泉　修一　山梨大学）ポジティブコントロール物質の BBB 機能に対する影響および脳内移行性を検討する。

研究項目名２　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価系の効率化および高精度化

情緒社会性リスク評価系の効率化および高精度化を図る。バルプロ酸および同程度の影

響が期待されるポジティブコントロール物質を用いて行動試験（南班）、扁桃体神経回路機能試験（加藤班）、マイクロアレイ解析、qRT-PCR 解析を行い（佐藤班）、評価系の最適化を進める。加藤班、佐藤班への動物供給は守口班が行う。さらに、食品中化学物質の評価を試行し評価系のさらなる効率化、高精度化を進める。脳内移行性についてはすでに方法が確立しているので、先行して食品中化学物質を含む化学物質の脳内移行性及びその発達依存性について検討を行う。

カ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物の作成、供与（守口　徹　麻布大学）

リスク評価系の効率化及び高精度化を図るため、ポジティブコントロール物質暴露動物の作製、供与を行う。情緒社会性に対して確実なデータが取得できる被験物質およびヒトにおけるデータが集積している被験物質を選択する。暴露動物を用いた行動試験を継続し行動試験の実効性を確認する。ポジティブコントロール物質の作用を確認次第、他の食品中化学物質を含む化学物質暴露動物の作製、供与と暴露動物を用いた行動試験を実施する。

キ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験（南　雅文　北海道大学）

情緒社会性に対して確実なデータが取得できる被験物質およびヒトにおけるデータが集積している被験物質を選択する。作用が未知の化学物質を評価することを考慮し、高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験に加え、ソーシャルインターラクション試験などの複数の行動試験を網羅的に行いリスク検出の高感度化を目指す。化合物暴露群にストレスを負荷した後に行動試験を行うことにより、情緒社会性におけるストレス脆弱性の評価系を構築する。バルプロ酸、また同様の顕著な作用が期待されるポジティブコントロール物質を用いて試験系の高感度化、効率化を実現する。確立した評価系に食品中化学物質を適用する。マイクロアレイ解析結果とのすり合わせにより、遺伝子発現パターン変化と相関性の高い行動実験系の絞り込みや行動実験プロトコールの改良を行うことで、さらなる高感度化・効率化を図る。

ク　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた扁桃体神経回路機能試験（加藤　総夫　東京慈恵会医科大学）

被験物質として情緒社会性に対して確実なデータが取得できる被験物質およびヒトにおけるデータが集積している被験物質を選択し、個別課題ウで確立した方法を用いて、自動的かつ網羅的スコア化を試み、試験系の効率化、高検出化を実現する。また食品含有物への応用性と妥当性を検討・評価し自動化を進めるとともに、解析パラメーターの妥当性を評価して最適化する。

ケ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ等解析（佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所）

被験物質として情緒社会性に対して確実なデータが取得できる被験物質およびヒトに

おけるデータが集積している被験物質を選択し、①情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補遺伝子リストの確定、②マイクロアレイに代わる発現変動の検出系の検討、③ ①及び②において確立された評価系を用いた食品中化学物質のリスク評価の試行、を行う。情動に強く作用する物質を投与した場合に確実かつ顕著に同じような挙動で変動する共通の遺伝子群が検出できない場合は、対照群と化学物質暴露群の識別能力の高い遺伝子変動現象を絞り込む。なお、これらの検討は用量作用性、低用量作用を念頭に進める。

コ　食品中化学物質を含む化学物質の脳内移行性に関する検討（小泉　修一　山梨大学）

In vitro BBB モデルを用いた、食品中に含まれる化学物質の脳内移行性評価法の検討

個別課題オで作成した *in vitro* BBB モデルを用い、食品中に含まれる各種化学物質の脳内移行性及びその発達依存性の検討を行う。被検物質としては、安全域の狭い医薬品やすでに血中濃度データなどがそろっているものを対照する。また、ヒト外挿可能性を検討するため、ここで確立した *in vitro* BBB モデルにヒト由来細胞の応用を試みる。

In vivo BBB モデルを用いたポジティルコントロール物質の脳内移行性評価の補完

いくつかの化学物質に関しては、マウスを用いた脳灌流法により、*in vivo* での BBB を介した薬物移行を評価し、*in vitro* BBB システムとの相関性を検討する。方法はこれまでと同様、放射ラベルした被検物質を、左心室より注入灌流させ、一定時間後に脳内へ移行した量と血中に残存した量を定量することで、物質の脳内移行性を評価する。マウスの週齢を変化させることにより、物質の脳内移行における年齢依存性を確認する。

In vitro BBB 機能に与える化学物質の検討

ポジティブコントロール物質が、BBB 機能に与える影響を *in vitro BBB* システムで検討する。BBB 透過性の変化は、sodium fluorescein を用いその密着結合性を、細胞内 rhodamine 123 濃度を指標として、P-糖蛋白のトランスポーター機能を評価する。

研究項目名３　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化

これまでに蓄積された化学物質の行動試験、扁桃体神経回路試験、扁桃体マイクロアレイ解析、脳内移行性解析における成績を数値化し、リスク評価判定のためのスコアリング法を開発する。これに基づき、各被験物質ごとに暴露群と対照群の差を判定するための独立判定項目を選定し、判定基準を策定する。

サ　行動試験結果の数値化（南　雅文　北海道大学）

情緒社会性についての補足的行動薬理学的実験を行い、基準値算出、および数式化を行うことで、スコアリング法を確立する。ここで得られた基準値を、総合的リスク判定基準式を策定するため加藤班に提供する。

シ　神経回路機能試験結果の数値化および情緒社会性リスク評価の多軸化にもとづく数式化，基準値算出（加藤　総夫　東京慈恵会医科大学）

電気生理学的手法で得られたリスク度評価法をさらに、班構成メンバーが取得した行動

実験、ならびに、発現解析実験のデータと組み合わせた因子分析を行い、さまざまな方法を駆使したリスク評価関数を策定する

ス　マイクロアレイ解析結果の数値化（佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所）

対照群と暴露群を識別し得る遺伝子変動現象の数値化を試みる。対照群と暴露群について、解析ソフトの一つである GeneSpring のアルゴリズムによる主成分分析に基づくスコア、遺伝子変動の P 値等を数値化し、データを加藤班に提供する。

セ　脳内移行性結果の数値化（小泉　修一　山梨大学）

これまで評価した化学物質について、BBB 移行性（*in vitro* BBB システム）及び BBB 障害性（TEER、隙細胞透過性、経細胞透過性）、さらにその年齢依存性の側面から数値化を行い、加藤班にデータを提供する。

２　研究成果、考察、今後の課題

研究項目名１　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価基盤の確立

要旨

胎生～新生期ラットを情緒社会性に影響を及ぼすことが知られている 3 種の化学物質（バルプロ酸、ニコチン、エタノール）に暴露し、行動試験、扁桃体神経回路機能試験（電気生理学的解析）、扁桃体マイクロアレイ解析、脳内移行性の検討を行い、評価手法の確立を試みた。行動試験では高架式十字迷路を用いて情緒社会性リスクを評価できることが示された。扁桃体神経回路機能試験では複数のパラメーターの変化を「有無」でデジタル的に評価し、その発現率の変化の有意性を「発現率比の危険水準」表示することによって検出する新規の解析手法を開発した。マイクロアレイ解析から情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補遺伝子群の絞り込みを行い、候補遺伝子をリストアップした。脳内移行性検討では幼弱期における化学物質の脳内移行性が in vitro BBB モデルを用いて外挿出来る可能性が示唆された。また、脳内移行性の年齢依存性が化学物質によって異なることから、新たなリスクとして評価対象となり得ることを見いだした。

ア　ポジティブコントロール物質暴露動物の作製、供与（守口　徹　麻布大学）

守口班において、3 種のポジティブコントロール物質を以下に示すように Wistar Hannover 種ラット胎仔ならびに新生仔に暴露し 4-5 週齢まで飼育し、雌雄個体 4-5 匹ずつを扁桃体神経回路機能試験班（加藤班）とマイクロアレイ解析班（佐藤班）に供給した。

・バルプロ酸（VPA:E12IP）：確定妊娠 12.5 日齢に 600 mg/kg を腹腔内投与した。

・バルプロ酸（VPA:P14SC）：新生仔 14 日齢に 400 mg/kg を皮下投与した。

・ニコチン(Nicotine:28dPump)：浸透圧ポンプを用い、確定妊娠 3 日齢から 6 mg/kg/day となるように 28 日間皮下投与した。

・エタノール(EtOH:E3Drink)：確定妊娠 3 日齢から出産 10 日目まで給水瓶を用いて 3% EtOH 溶液を飲水投与した。

対照群にはエタノールでは 4.1% スクロース溶液を用いたが、その他では生理食塩水を用いた。薬物投与経路については、情緒社会性への影響について報告している複数の文献に従った[Neurotoxicol, 30 , 23- (2009), Psychoneuroendocrinology, 31, 1046- (2006), Neurotoxicol. Teratol. 32, 336- (2010), Neurobiol. Learn. Memory, 90, 527- (2008), Psydoneuroendocrinology, 33, 728- (2008), Neuropsychopharmacology, 33, 901- (2008)]。バルプロ酸の腹腔内投与動物（VPA:E12IP）は、流産ならびに出産後の食殺により雄のみを班員へ供与するに留まった。また、行動試験班（南班）は動物の輸送によるストレスが高すぎると判断し、南班において上記動物を作成することとなった。残余動物に

ついては 5 週齢で 1　群　10-15　匹を用いて、高架式十字迷路試験ならびに新奇環境摂食抑制試験を実施し、行動試験の施設間バリデーションおよび実効性の確認を行った（後述）。VPA:E2IP の雌について扁桃体神経回路機能試験班とマイクロアレイ解析班への供与を再度試みたが、前回同様、流産ならびに食殺により十分な個体数が確保できなかったため、マイクロアレイ解析班への供与のみにとどまった。

イ　ポジティブコントロール物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験(南　雅文　北海道大学)

ポジティブコントロール物質に暴露した動物（**VPA:E12IP, VPA:P14SC, Nicotine:28dPump, EtOH:E3Drink 雌雄**）に関して、4 及び 10 週齢の情緒社会性について検討した。情緒社会性の検討項目としては、不安、多動、衝動性について、高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験により検討した。一部の群については情動との関連性が報告されている分界条床核（BNST）領域におけるセロトニン受容体（$5\text{-}HT_{1A, 2A, 2C, 7}$）、アドレナリン受容体（β1,2）、コルチコトロピン放出因子受容体（CRF1,2）、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）およびその受容体（PAC1）の mRNA 発現量の変化を real-time PCR 法により検討した。これらの分子はいずれも不安や抑うつに関与することが報告されている。PCR 実験は当初計画に含まれていなかったが、1)BNST は近年、不安などの情緒変化との関連が示唆されている、2）慢性的なストレス負荷により不安状態を呈した動物の BNST においてセロトニン受容体や PACAP 受容体の発現変化が報告されていること、３）BNST は遺伝子発現解析を行っている扁桃体との機能的関連性が非常に強いこと（扁桃体中心核と BNST を併せて拡張扁桃体（extended amygdala）という機能単位を形成している）などから、BNST における遺伝子発現変化も有用な指標になる可能性が考えられたためパイロット実験として行った。

高架式十字迷路試験［不安・衝動性］

床面より高い位置に壁に囲まれた走路（クローズドアーム）と壁のない走路（オープンアーム）とで構成される高架式の十字迷路を用いた。ラットを迷路の中心のプラットフォームに置いた後、10 分間の行動を観察し、オープンアーム滞在時間、オープンアーム侵入回数を測定した。オープンアーム滞在時間の延長、侵入回数の増加により、不安水準の低下あるいは衝動性の亢進として評価し、オープンアーム滞在時間の短縮、侵入回数の減少を、不安水準の亢進として評価した。

オープンフィールド試験［多動・不安］

新奇環境下にラットを置いた後、行動パターン（移動距離・軌跡など）を解析した。移動距離や立ち上がり行動回数の増加及び軌跡（頻繁に進行方向を変え中心部を横断する行動）を指標として多動を評価した。また、中心部への侵入回数の少なさを指標として不安を評価した。

情緒社会性に及ぼす影響の評価における実験動物の週齢の妥当性を検証するために、7週齢の **VPA:E12IP-V** 群を用いた行動実験を追加で行うとともに、**VPA:P14SC-V** 群に水泳ストレス（2 min, 22℃）を負荷した後に行動試験を行うことにより、情緒社会性におけるストレス脆弱性の検討も行った。

結果

行動実験系の妥当性検証のために、成体への単回投与にて不安様行動を引き起こすことが知られている、m-CPP（セロトニン受容体 $5HT_{2B,2C}$ アゴニスト）を用いて高架式十字迷路試験を行った。雄性 SD 系ラット（7 週齢）に対して、m-CPP（0.3 mg/kg）を腹腔内投与（i.p.）し、30 分後に検討を行ったところ、オープンアーム侵入回数及びオープンアーム滞在時間が有意に減少することが示された（図 1）。この時に自発運動量に有意な変化は見られなかったことから、本実験系において不安水準の変化を評価できることが示唆された。

a) バルプロ酸

・バルプロ酸胎生期処置（VPA:E12IP）

4 週齢時に、高架式十字迷路試験を行ったところ、雄バルプロ酸暴露群（**VPA:E12IP-V**）（n = 5）は行動変化は見られなかった（図 2）。一方、**雌 VPA:E12IP-V** 群（n = 5）はオープンアーム滞在時間が有意に減少しており（図 2； $p < 0.05$, Student's *t*-test）不安水準が亢進していることが示された。一方、オープンフィールド試験では雌雄どちらにおいても有意な行動変化は見られなかった。10 週齢時に高架式十字迷路試験を行ったところ、**雄 VPA:E12IP-V** 群（n = 5）はオープンアーム滞在時間の減少傾向がみられた（図 3； $p = 0.069$, Student's *t*-test）。また、**雌 VPA:E12IP-V** 群（n = 5）ではオープンアーム滞在時間（$p = 0.053$, Student's *t*-test）ならびにオープンアーム侵入回数（$p = 0.061$, Student's t-test）が減少傾向を示していた（図 3）。一方、オープンフィールド試験を行ったところ有意な行動変化は見られなかった。

10 週齢における行動実験終了後、背外側ならびに腹側の BNST（dlBNST ならびに vBNST）における不安・抑うつ関連 mRNA 発現量の変化を検討したところ、**雄 VPA:E12IP-V** 群では dlBNST での $5\text{-}HT_{1A}$ および PAC1 受容体 mRNA 発現量の有意な減少と、$5\text{-}HT_{2A}$ 受容体 mRNA 発現量の有意な増加、ならびに、vBNST での $5\text{-}HT_{2c}$、$5\text{-}HT_{7}$ 受容体および PACAP mRNA 発現量の有意な減少が見られた（表 1）。一方、**雌 VPA:E12IP-V** 群では $5\text{-}HT_{2A}$ および $5\text{-}HT_{2c}$ 受容体 mRNA 発現量の有意な減少と、β1 受容体 mRNA 発現量の有意な増加が見られた。

異なる実験セットにおいて、7 週齢時に高架式十字迷路試験を行ったところ、**雄 VPA:E12IP-V** 群（n = 7）は**雄 VPA:E12IP-S** 群（n = 5）と比較し、有意な行動変化は見られなかったものの、**雌 VPA:E12IP-V 群**（n = 4）は**雌 VPA:E12IP-S** 群（n = 7）と比較

しオープンアーム滞在時間の減少傾向がみられた（図 4）。一方、オープンフィールド試験を行ったところ、雌雄どちらにおいても、VPA:E12IP-V 群と VPA:E12IP-S 群間で有意な行動変化は見られなかった。

・バルプロ酸新生期処置（VPA:P14SC）

高架式十字迷路試験を用いて解析を行い、VPA:P14SC-V 群（雄：n = 7、雌：n = 7）はアームへの総侵入回数が**雌** VPA:P14SC-V 群において有意に減少していたものの（P < 0.05, Student's *t*-test）、情緒社会性関連行動の有意な変化は見られなかった（図 5）。また、オープンフィールド試験を行ったところ、雌雄どちらにおいても、VPA:P14SC-V 群では行動変化は見られなかった。さらに、4 週齢時の**雄** VPA:P14SC-V 群では dlBNST ならびに vBNST いずれにおいても、mRNA 発現量の変化が検出されなかった。一方、**雌** VPA:P14SC-V 群では 5-HT_{2c} 受容体 mRNA が dlBNST で、CRF2 受容体 mRNA が vBNST で有意に増加していた。

さらに、バルプロ酸新生期処置が情緒社会性におけるストレス脆弱性に与える影響を、4 週齢時に行動試験したものと異なる 7 週齢、雄を用いて、高架式十字迷路試験ならびにオープンフィールド試験により検討した。22 ± 1℃の水が入った水槽（深さ 40 cm、水深 25 cm、直径 20 cm の円柱型）に 2 分間入れることによる強制水泳ストレスを動物に負荷し、各行動試験はその 5 分後に行った。高架式十字迷路試験法において、ストレス負荷 VPA:P14SC-V 群（n = 10）は、ストレス負荷 VPA:P14SC-S 群（n = 10）と比較し、有意なオープンアーム滞在時間減少（p < 0.05, Student's t-test）ならびにアームへの総侵入回数の減少（p < 0.01, Student's t-test）、総移動距離の減少（p < 0.01, Student's t-test）が確認された。また、VPA:E12IP-S 群では、ストレス負荷群と非ストレス負荷群間（n = 10）で有意な行動変化は確認されなかったが、VPA:P14SC-V 群では、非ストレス負荷群（n = 10）と比較して、オープンアーム滞在時間減少傾向（p = 0.082, Student's t-test）ならびに有意なアームへの総侵入回数の減少（p < 0.01, Student's t-test）と総移動距離の減少（p < 0.01, Student's t-test）が確認された（図 6）。また、オープンフィールド試験法においては、VPA:E12IP-S 群と VPA:E12IP-V 群間で、ストレス負荷の有無に関わらず有意な行動変化は見られなかったが、VPA:E12IP-V 群では、非ストレス負荷群と比較しストレス負荷群で有意な総移動距離の減少が確認された（p < 0.05, Student's t-test）。

b) ニコチン（Nicotine:28dPump）

4 週齢時において、高架式十字迷路試験（図 7）ならびにオープンフィールド試験のいずれの試験法においても、Nicotine:28dPump-N 群（雄：n = 8、雌：n = 8）は有意な行動変化は見られなかった。10 週齢時では、オープンフィールド試験において、雄性ラットで Nicotine:28dPump-N 群において中心部での滞在時間の有意な増加（p < 0.05, Student's *t*-test）、ならびに総移動距離の増加傾向（P = 0.059）が見られた。しかし

ながら、対照群（Nicotine:28dPump-S）の中心部滞在時間及び総移動距離が、他の化学物質の処理における対照群で見られた値と大きく異なっているため、これについては再検討を要する。一方、雌ラットや高架式十字迷路試験を用いた解析においては、有意な行動変化は見られなかった。

c） エタノール（EtOH:E3Drink）

4 週齢時において、高架式十字迷路試験でのアーム総侵入回数が**雄 EtOH:E3Drink-E** 群において有意に減少していたものの（$P < 0.05$, Student's *t*-test）、高架式十字迷路試験ならびにオープンフィールド試験のいずれの試験法においても、**EtOH:E3Drink-E** 群（雄：n = 8、雌：n = 8）は有意な情緒社会性関連行動変化は見られなかった（図 8）。次に 10 週齢の仔ラットを用いて解析を行ったところ、高架式十字迷路試験において、雌性ラットでのみ、**EtOH:E3Drink-E** 群においてオープンアーム滞在時間の減少傾向（$p=0.064$, Student's *t*-test）が見られた（図 9）。

一方、オープンフィールド試験では、雌雄どちらにおいてもエタノール処置による有意な行動変化は見られなかった。

以上の検討により、高架式十字迷路試験は胎生～新生期化学物質暴露による情緒社会性リスクの検討に有効であることが示された。一方、オープンフィールド試験では、いずれの薬物においても有意な行動変化を見いだすことができなかったことから、胎生～新生期化学物質暴露による情緒社会性リスクの検出には感度不足である可能性が考えられる。また、ニコチン（雌・雄）およびエタノール（雄）処置群において高架式十字迷路試験での変化が見られなかったことから、検出力の向上のためには他の試験法との組み合わせを考える必要がある。ストレスなどの環境要因が負荷されることで情緒社会性関連行動に変化が生じる可能性についても今後検討する。行動試験の解析時期については研究項目キにおいても引き続き検討することとした。

<u>行動試験の施設間バリデーションおよび実効性の確認（麻布大学　守口　徹）</u>

雄 VPA:P14SC は自発運動の有意な上昇と高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間の有意な減少が確認された。**雌 VPA:P14SC** では、自発運動には差がないものの，高架式十字迷路試験では オープンアーム滞在時間減少傾向が観察された（図 10）。1 月以降、週齢ならびにストレスの感受性への影響を検討した。**VPA:P14SC** を群飼育もしくは個別飼育（ストレス群）で 7 週齢まで飼育して高架式十字迷路試験ならびに新奇環境摂食抑制試験を行い、ストレス負荷により、バルプロ酸による不安行動の上昇が確認された（図 11）。

Nicotine:28dPump は、雌雄ともに自発運動と高架式十字迷路試験には著差は認められなかった。**EtOH:E3Drink** では、雌雄ともに自発運動の上昇傾向が観察された。高架式十字迷路試験では、雄性個体において、オープンアーム滞在時間の延長が認められた。行動

試験の施設間バリデーションについては、環境の差異、雌雄の差こそあれ、バルプロ酸のような作用が劇的な化学物質については、南班と同一方向性の作用を確認した。また現在の行動試験だけではニコチン、エタノールなどの作用には検出力が弱いことも確認された。

ウ　ポジティブコントロール物質暴露動物の扁桃体神経回路機能試験（加藤　総夫　東京慈恵会医科大学）

ポジティブコントロール物質に暴露した動物から扁桃体ニューロン活動を記録し、ニューロン機能の評価法の新規開発を行った。

扁桃体脳スライス標本作製とニューロン膜電位記録

生後 6～10 週扁桃体を含む脳スライス（厚さ 400 μm）を常法に従い作成し、扁桃体中心核ニューロンから常法に従いパッチクランプ法で全細胞電流記録を行った。

神経生理学・薬理学的研究において慣例的に標的とされるプロトコルの適用

バルプロ酸処置群ラットを対象として、扁桃体中心核ニューロンから記録を行った。神経生理学・薬理学的研究において慣例的に標的とされる下記の現象について、慣用されるプロトコルを用いて対照群との比較解析を行った。①脱分極活性化不活性化型カリウム電流（A 電流）、②過分極活性化非不活性化型陽イオン電流（h 電流）、③活動電位発射パターン、④外側基底核刺激誘発興奮性シナプス後電流、ならびに⑤OT および NA　投与が上記①、②、④に及ぼす影響。

閾値下応答に関与する各種コンダクタンス応答の評価プロトコル策定と実施（図 12）

脳内のニューロンには、神経回路の中で担うさまざまな機能的役割に対応して、異なる組み合わせの各種イオン・コンダクタンスが発現しており、それらの発現の有無あるいは程度が、そのニューロンの特性、神経系の発達分化プロセスに対応していると考えられている。しかし、一般に発現イオンチャネルの解析は、膜電位固定下に、それぞれ個別に設計された細胞内外のイオン環境・薬物環境を用いた記録、厳密なプロトコルと特異的阻害薬の影響評価、さらに、実験終了後の詳細な解析などを必要とし、1 次スクリーニングとしてニューロン興奮性に影響を及ぼす被験物質を検出するという目的には不適切な面がある。この問題を解決するために、興奮性に影響を及ぼしうる因子の網羅的な検出を可能にするような扁桃体中心核ニューロンのコンダクタンスの発現状況を検出する（A）標準電流負荷プロトコル、および、その結果を実験中に判定するための（B）評価チャートを考案した。図 12 は、標準電流負荷プロトコルとそれを負荷した 1 扁桃体ニューロンの例を示す。このプロトコルのポイントは、①脱分極電流注入時の応答による電位依存性活性化チャネルの挙動、②過分極電流注入による過分極活性化チャネルの挙動、③過分極による不活性化型電位依存性チャネルの脱不活性化特性、および、④活動電位発生に伴うカルシウム依存性チャネルの挙動を、一連の電流注入パターンの繰り返しによって、網羅的

かつ自動的な定性的評価を可能にする点にある。図 13 は、本標準電流負荷プロトコルの実施中に各種膜電位変動の有無を実験中に判定し記入するために作成した判定チャートである。このように判定された評価パラメーターを実験シリーズ終了後、表計算ソフトに入力し、下記の統計解析を行った。

扁桃体内因性生理活性物質の投与に対するニューロン応答の検討

情緒社会性に影響を及ぼす可能性が既に指摘されており、さらに、評価対象とした扁桃体にその受容対の発現が報告されているオキシトシン［OT（1 μM）］およびノルアドレナリン［NA（50 μM）］を脳スライスに投与し、ニューロンの応答を観察した。OT, NA は 5 分間バス内投与した。膜電位固定モードにて保持電位 -60 mV でこれらの生理活性物質によって生じる膜電流の変化を記録した。膜総コンダクタンスの変化を捉えるため、図 14 に示した保持電位コマンドを 10 s ごとに反復負荷した。

データ記録と解析

ニューロン細胞膜電流および膜電位をデジタル化し、負荷コマンドとともに取り込みコンピューターに記録した。取り込まれたデータから膜電位応答の自動書き出しを行うとともに、それぞれの波形の変化を自作のプログラムで数値化し、SPSS 統計解析ソフト(IBM, Tokyo)で解析した。

結果（プロトコル開発とその結果）

a) バルプロ酸 (VPA:E12IP, VPA:P14SC)

第 1 段階としてバルプロ酸処置群ラット（VPA:E12IP, VPA:P14SC）を対象として、扁桃体中心核ニューロンから記録を行った。神経生理学・薬理学的研究において慣例的に標的とされる①脱分極活性化不活性化型カリウム電流（A 電流）、②過分極活性化非不活性化型陽イオン電流（h 電流）、③活動電位発射パターン、④外側基底核刺激誘発興奮性シナプス後電流、ならびに⑤ OT および NA 投与が上記①、②、④に及ぼす影響、について慣用されるプロトコルを用いて、対照群との比較解析を行った。これらの実験によって以下の問題点が明らかとなった。1）一つのスライスからの記録ニューロン数に限界がある、2）誰でもどこでも行える手法ではない、3）十分な統計的解析を行うのに必要となるニューロン数を獲得するのに多くの動物を用いる必要がある、4）データが膨大であり、その解析にも高度な解析手法、データ処理、膨大な時間が必要である。この分析結果に基づき、標準化されうる影響評価手法の開発のため、1）より簡便で、2）実施が容易かつ再現性があり、そして、3）比較的短時間で多くのデータの収集が可能となる、簡便法の開発が必要であると考えた。そこで新規に考案・開発した上記方法欄に記載した記録・解析法を、ニコチン投与群、およびエタノール投与群の扁桃体中心核ニューロンからの記録に適用した（N>30）。

b) ニコチン (Nicotine:28dPump)、エタノール (EtOH:E3Drink)

各パラメーターに及ぼす影響を簡便かつ効率的に評価するため、評価スクリーニング方法を以下の３レベルに分けた。

① **レベル 1**：図 12 に示した標準プロトコル負荷実験中に図 13 に示した判定チャートに記入された結果のみに基づき、その各パラメーターが観察された率を、被験物質投与群と対照群の間で比較し、Fisher の直接確率法を用いてその変化の有意性を評価した（膜電位特性発現率比解析）。

② **レベル 2**：記録された膜電位データを読み込み、各電流負荷プロトコルごとに生じた特異的膜電位変化パターンを数値化解析し、全部で 64 点の解析評価値を数値化して出力すると同時に、ニューロンの応答パターンのトレースを1 枚にまとめて出力し、ニューロン特性判定に用いた（図 15）

③ **レベル 3**:OT および NA 投与による膜電流および膜総コンダクタンスの変化を自動解析し定量化した（図 16）。結果を統計解析した。

① **レベル１** - 膜電位特性発現率比解析

全 35 の評価パラメーター（Yes もしくは No）の陽性率を各群ごとに定量化し、対照群における陽性率を横軸に、被験物質投与群における陽性率を縦軸にプロットし、さらに、その際の Fisher 直接確率法の有意水準をマーカーの色スペクトル表示で表した（図17;本図には解析を終了し、客観的に再評価した 20 のパラメーターについてまとめた(図17）。今回評価対象とした被験物質のうち、エタノール（**EtOH:E3Drink**）は、一過性活性化型電位依存性カリウム・チャネル（Kv4 クラス）の不活性化カイネティクスと発現を反映する可能性があるパラメーター 3 および 8、および 4（雄のみ）の発現率を変化させ、また、雄のみにおいて NA による抑制性外向き電流の発現率が有意に増加した（図 17左）。メスでは特に顕著な変化は認められなかった。一方、ニコチン（**Nicotine:28dPump**）は、OT および NA で興奮性内向き電流を示すニューロンの率が低下した。特に OT による興奮性応答の発現率低下は雄において顕著であった。さらに、過分極活性化細胞内環状ヌクレオチド活性化チャネル（KCNG クラス）の発現を表す「sag rebound」の発現率は、オスで増加、メスで減少するという興味深い所見が得られた。この変化は、雌雄をプールして解析すると検出されず、雌雄を分けた解析が有効である可能性が示唆される。さらに、VPA 投与群 4 匹、および、対象群 4 匹から、VPA 投与群 17 例、および、対象群 20 例のニューロン、計全 37 ニューロンの記録を行い、その解析を進めた。研究項目ウで開発した発現率カイ二乗値パラメータープロットを用い、その影響を定量的に評価した（図18）。その結果、他の被験物質以上に、多くの電気生理学的パラメーターにおいて、VPA 投与による有意な影響が認められた。研究項目ウで施行した他の被験物質よりも明瞭な有意さを示す項目が多く、その作用の強さが示された。以上、VPA による扁桃体ニューロンの興奮性の異常と、この解析方法の有用性がさらに証明された。

② **レベル２**

上記レベル 1 のスクリーニングは定性的判定に基づいているため、十分な検出感度を上げられない可能性がある。そこで、実験中に負荷したプロトコルに対する応答の半自動的定量評価を試みた。上述の図 15 は、その定量評価プログラムによって生成された結果一覧用オリジナル・トレース書き出し画面である。この表示から、それぞれの膜電位変化の特徴を定量的に抽出するプログラムを作成した。このプログラムにより、1 ニューロンから 35 のパラメーターを定量的数値として抽出した。横軸と縦軸それぞれに、代表的もしくは典型的な変化を示す各パラメーターをプロットしたのが図 19 である。現在、市販統計パッケージを用いて、（１）主成分分析による独立因子の同定（意味のあるパラメーター数を縮退し、解析の効率を高める）、（２）クラスター分析による複数独立パラメーターを用いた類別（これらのパラメーターを用いて、ニューロン特性群間の類似性・距離を評価し、それにおよぼす被験物質の影響を検討する）、および、（３）多変量解析、あるいはニューラル・ネット解析手法を用いて、多因子による群間判別手法の開発を試みている。

③ レベル３

OT および NA の投与に対する膜電流ならびに膜抵抗の変化を上記図 16 の方法で定量化し､ニューロン群間におけるそれらの関係を比較検討するプロットを作成した(図 20)。現在、各定量化パラメーターに対し、被験物質が有意な影響を及ぼしたかどうか、古典的なパラメトリック検定を用いて検証しているが、35 パラメーターの自動統計解析を行うマクロを作成し、自動化する予定である。

今回の戦略は、対照群との比較において、神経回路機能に生じている何らかの変化を網羅的に探索し、その因果性を考慮せずに、変化を示している因子を効率的にピックアップすることによって、情緒社会性に影響を及ぼしうる候補物質を同定する、という方法である。そのための方法として、簡便に、かつ効率的にニューロン活動の評価をするプロトコルおよび評価チャートが必要であり、その開発と策定に時間を割いた。その結果、35 の複数パラメーターの変化を「有無」でデジタル的に評価し、その発現率の変化の有意性を「発現率比の危険水準」表示することによって検出する新規の解析手法を開発した（図 17）。さらに、定量的な比較解析を可能とするため、定量的な変化を比較することを可能とする、自動計測プログラムを作成した。

エ　ポジティブコントロール物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ解析(佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所)

ポジティブコントロール物質に暴露した動物(**雌雄 VPA:E12IP, 雌雄 VPA:P14SC, 雌雄 Nicotine:28dPump, 雌雄 EtOH:E3Drink**）の 4-6 週齢における扁桃体の遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析し、情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質候補遺伝子群を探索した。

発現データのフィルタリング

情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群として可能性のある遺伝子が極力漏れないよ

うにフィルタリングを行うこととした。得られたデータは、Affymetrix 社の GeneChip 用解析ソフト GeneChip Operating Software （GCOS）により、以下の手順でデータのフィルタリングを行った。

① 各処理群、雌雄別に『Presence Call（当該遺伝子が発現しているか否かを示す）』が『P （Presence）』である遺伝子を抽出した[発現していない場合は『A（Absence）』]。

② ①について、対照群と 1 対 1 対応で比較し N=4 のうち半数以上で『I（Increase）』あるいは『D（Decrease）』と判定された遺伝子を抽出した。

③ ②のうち、4 種の薬物処理群のうち少なくとも 3 群で共通して変動を示した遺伝子を抽出した。（増減を問わず、雌雄どちらか一方でも変動していれば変動とみなす）

IPA によるパスウェイ解析

フィルタリング②までで抽出された遺伝子リストを用いて、Ingenuity 社の機能及びパスウェイ解析ソフト、Ingenuity Pathway Analysis（IPA）により、各処理群ごと、雄雌別に（7 グループ）、二通りのパスウェイ解析を行った。

① 当該遺伝子同士の相関について

IPA は、関連（発現促進・抑制、蛋白質相互作用、等）が報告されている遺伝子同士を 1 対 1 で結んだ相関図を描かせることができる。**VPA:P14SC** におけるパスウェイ解析の結果の一部を図 21, 22 に示す。

同様の相関図をそれぞれのグループについて描かせたところ、7 グループすべてにおいて NFκB を中心とする図、また TNF を中心とする図が示された。さらに POMC を介する系は**雌 VPA:P14SC**、**雄 VPA:P12IP** 及び**雄 Nicotine:28dPump** の 3 グループに、レプチンを介して相関を示す系は**雌 VPA:P14SC**、**雄 VPA:P12IP**、**雄 Nicotine:28dPump** 及び**雌 EtOH:E3Drink** の 4 グループに見られた。

② 既知のパスウェイとの相関について

IPA のアルゴリズムにより有意に相関があると判定された既知のパスウェイが、複数のグループに共通して存在した。AMPAR、mGluR、NMDAR などのグルタミン酸受容体を介して PLC や PKC、CAMK などが変動するパスウェイは、雌雄 **VPA:P14SC**、雄 **VPA:P12IP** の 3 グループに共通して相関があるとされた（図 23-1）。 また G 蛋白質に結合する A2A 受容体を介したパスウェイ（図 23-2）は、雌 **Nicotine:28dPump** を除くすべてのグループに共通して相関を示した。

IPA を用いた機能に基づく抽出

IPA は機能に基づいて遺伝子を抽出できる。遺伝子のリスト漏れを防ぐため、フィルタリング②までで得られた全ての遺伝子について、1 処理群以上で変動有りとされた遺伝子について全て等しく解析を行った。その結果、不安感や記憶、認知、学習等に関連する遺伝子として、表 3 のような遺伝子が抽出された。

情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補遺伝子群の絞り込み

これまでの検討結果をふまえ、以下①～④の方針で情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補となる約 120 の遺伝子をリストアップした。

① 4 処理群のうち、少なくとも 3 処理群で増減どちらかに変動を示した遺伝子（発現データのフィルタリング③）

③ 共通の遺伝子を介して相関があるとされた遺伝子（IPA によるパスウェイ解析①）

④ 共通の既知のパスウェイと相関があるとされた遺伝子（IPA によるパスウェイ解析②）

⑤ 情動・行動に何らかの影響があるとされた遺伝子（IPA を用いた機能に基づく抽出）

発現量及び変動の大きさ、データの再現性などからさらに絞り込みを行い、表 4 の 30 遺伝子を今後の検討対象とした。

7 週齢雄ラットを用いた解析

解析に最適な時期を探るため、7 週齢の雄ラットを用いてバルプロ酸投与（D14）による発現変動を調べたところ、7 週齢においても上記 30 遺伝子のうち 21 遺伝子の変動が検出された。また 7 週齢においてのみ変動を示す、情動の変化と相関がある可能性の高い遺伝子（カンナビノイド受容体、シナプシン II 等）が存在した。一方、4 週齢と 7 週齢で同じように変動する遺伝子であっても、7 週齢において 4 週齢より変動の幅が小さくなったり、また変動の向きが逆転したりするなどの現象が見られた。

オ　ポジティブコントロール物質の脳内移行性に関する検討（小泉　修一　山梨大学）

ポジティブコントロール物質を用いて週齢による BBB 透過性の違いを、*in vivo* 及び *in vitro* BBB 評価系を用いて比較検討した。

In vivo BBB モデル（改変型）を用いた、ポジティブコントロール物質の脳内移行性の週齢による変化の検討

2 及び 8 週齢の Wistar Hannover（オス）を用いた。下行大動脈をクリップで止めた後、左心室より ^{3}H ラベル体の各ポジティブコントロール物質（各 0.2 μCi/匹）を注入した。ネガティブコントロール物質としては、BBB 難移行物質 inulin（^{14}C 体、0.1 μCi/匹）を用いた。各物質注入後、15～120 秒後に採血及び脳の取り出しを行い、血液及び脳内放射活性測定により、各物質の脳内移行性を定量した。

In vitro BBB モデルを用いた、ポジティブコントロール物質の脳内移行性の週齢による変化の検討。

2 及び 8 週齢 Wistar Hannover ラットの血管内皮細胞と 2 週齢同ラットより採取した血管周皮細胞、アストロサイトを用いた。血管内皮細胞をトランスウェルの内側に播種し、外側に血管周皮細胞を貼り付けた。またウェルの底にはアストロサイトを播種した。^{3}H ラベル体の各ポジティブコントロール物質（各 0.2 μCi/well）をトランスウェルに注

入し、1, 10 及び 30 分後にトランスウェル内及び通過した下層の溶液を回収して放射活性を測定することにより、脳内移行性を定量した。ネガティブコントロール物質としては、BBB 難移行物質 inulin（^{14}C 体、0.1 μCi/well）を用いた。

2 及び 8 週齢の *in vitro* BBB モデルに VPA を暴露し、sodium fluorescein の透過性解析を行い、BBB 機能そのものに与える影響及びその週齢差の有無に関する検討を開始した。

結果

図 24 は、*in vivo* BBB モデルを用いて各物質の脳移行性の週齢による差異を確認し、それを *in vivo* BBB モデルでの結果と比較検討したものである。*In vivo* BBB モデルを用いた検討より、バルプロ酸は幼弱動物（2 週齢）の動物における脳内移行性（Ki 値）が非常に高いことが明らかとなった。バルプロ酸の脳内移行性は、BBB 機能（tight junction）に強く依存しており、その発達が不完全な幼弱期にはより容易に脳内へ移行することが明らかとなった。バルプロ酸のこのような性質は、*in vitro* BBB モデルでも再現することが出来た。また、ネガティブコントロール物質として用いた脳内難移行性物質 inulin は、非常に僅かではあるが脳内へ移行し（注：縦軸の値）、これは *in vivo* 及び *in vitro* BBB モデルを用いても同様であった。また、バルプロ酸同様、その Ki 値は 2 週齢動物でより高かった。エタノール（ethanol）の Ki 値は、*in vivo* BBB モデルでは僅かではあるが 2 週齢で高かった。しかし、この週齢による差は *in vitro* BBB モデルでは検出出来なかった。ニコチン（nicotine）の Ki 値は、*in vivo* において、週齢による差は全く認められなかったことから、その透過性は BBB 機能に依存していない可能性が示された。*In vitro* BBB モデルでも同様の結果であった。図 24 で得られた *in vivo* 及び *in vitro* BBB モデルそれぞれにおける、各薬物の週齢毎の脳内移行性を図 25 にまとめた。本検討の結果、化学物質の脳内移行性に年齢依存性があること、さらにこの年齢依存性が化学物質によって全く異なることを見いだした。これは我々が発見した化学物質の全く新たなリスクである。またこれら化学物質の年齢依存的脳内移行性は、*in vitro* BBB モデルによっても評価出来ることが示唆された。

研究項目名２　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価系の効率化および高精度化

要旨

ポジティブコントロール物質として鉛、セボフルランを被検物質に加えた。情緒社会性行動試験は 7 週齢でストレス脆弱性を検討することにより、情緒社会性リスク評価の高感度化を実現できる可能性が示された。扁桃体神経回路機能試験では被験物質のニューロンの電気生理特性に及ぼす影響を視覚的に一望する「発現率有意差カラースケールプロット」を改良し、より明確かつ定量的に理解されうるようにした。さらに、これまでの全被検物質の影響を一望するための、有意差危険率カラープロットも作成し、影響の差異をより定量的、網羅的に理解しうる方法を開発した。扁桃体マイクロアレイ等解析では増減の方向性や大きさというクライテリアをはずし、主成分分析において対照群と暴露群との差別化が顕著な遺伝子リストを作成した。主成分分析では、コントロールと強力なポジティブコントロールを用いた相対評価が情緒社会性リスクの数値化に有効であることが示唆された。化学物質ではないが、情緒社会性に対して強い影響を与えることが知られている母子分離条件下で成長した動物の解析を行い、遺伝子リストの確実性を向上させた。このリストを用いた主成分分析ではバルプロ酸の濃度依存性も可視化できることを確認した。脳内移行性に関する検討では、BBB の年齢依存性に関して TEER、 Na-F、 EBA、BBB 関連蛋白質の発現といったさらなる科学的根拠を得た。さらに化学物質に BBB 機能そのものに対する直接作用があり、この作用にも年齢依存性があることが判明し、判定項目が追加された。さらに、食品中化学物質の一例としてネオニコチノイド系農薬イミダクロプリドを用いて、胎生期暴露の影響についてこれまでに確立した評価系の妥当性について検討を進めている。

カ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物の作成（守口　徹　麻布大学）

Wistar Hannover 種ラット胎仔ならびに新生仔に以下の処置を行い 4-5 週齢まで飼育し、雌雄個体 4-5 匹ずつを扁桃体神経回路機能試験班とマイクロアレイ解析班に供給した。

・エタノール（EtOH）： 5% エタノールを含む人工乳で新生仔 2 日齢より、18 日齢まで人工飼育した。

・鉛（Pb）: 確定妊娠 3 日齢から出産 14 日目まで母獣に 500 ppm 酢酸鉛溶液を飲水投与した。

・バルプロ酸（VPA：P14SC）： 0.4、4.0、40.0、400 mg/kg の投与量で雄性新生仔 14 日齢時に皮下投与した。本動物群はマイクロアレイ解析班に配布し用量作用性が確認された。

・イミダクロプリド（Imidacloprid：E9IP）： 3.4、33.7、337 mg/kg の投与量で確定妊娠 9 日齢時に腹腔内投与した。

・母子分離（AR：P2PO）： 新生仔 2 日齢時より，18 日齢まで人工乳による 人工飼育した。

対照群としては、エタノール暴露実験では、7% スクロース添加人工乳を、鉛暴露実験では、660 ppm 酢酸ナトリウム水溶液を用いた。エタノール暴露実験は個別課題アのプロトコルでは EtOH:E3Drink で顕著な作用が見られなかったことから、人工ほ乳を試行することにした。南班は動物の輸送ストレス等の問題により、独自に動物を作成した。VPA：P14SC では、生理食塩水を、Imidacloprid：E9IP では、懸濁溶媒であるコーン油を同様の投与経路で用いた。 AR：P2PO では、母獣で保育させた新生仔を対照群として新生仔を人工乳で飼育し、授乳間を保育器で飼育グループと、卵巣除去した成獣雌ラット（母乳がでない）に世話をさせたグループの 2 群を作製した。

残余動物については、各母獣から 2-3 匹の雄性個体（1 群 7-16 匹）を用いて 5 週齢時に高架式十字迷路試験ならびに新奇環境摂食抑制試験を実施した。

キ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた情緒社会性行動試験（南　雅文　北海道大学）

高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験に加え、ソーシャルインターラクション試験、ロータロッド試験、強制水泳試験（以下に説明）などの複数の行動試験を網羅的に行い、情緒社会性のスコア化によりリスク検出の高感度化を目指した。また、化合物暴露群にストレスを負荷した後に行動試験を行うことにより、情緒社会性におけるストレス脆弱性評価系の構築を目指した。個別課題イに最も作用が顕著であったバルプロ酸を用いて詳細な検討を行い、試験系の高感度化、効率化を実現した。また、確立した評価系に食品中化学物質である鉛を適用した。セボフルランを用いた検討により、試験系の感度および精度の確認を行う。確立した評価系を食品中化学物質(イミダクロプリド)に適用し評価系のさらなる検証を進める。また、行動実験系の妥当性検証および情緒社会行動変調のメカニズム解明のため、正常ラットを用いた行動薬理学的解析も引き続き行う。

高架式十字迷路試験 [不安・衝動性]

個別課題アの通り。

オープンフィールド試験 [多動・不安]

個別課題アの通り。

ソーシャルインターラクション試験［社会性行動］

新奇ペアのラット（親が異なり、異なるケージで飼育されてきた初対面同士のラット）をオープンフィールド内に置いた後、移動距離、個体間平均距離、接近時間、ならびに行動パターンを15分間解析する。特定の行動パターン（sniffing・following・mounting・crawling）を指標として社会性行動を評価する。

ロータロッド試験［協調性運動機能］

等加速度（6 rpm / min）で次第に回転速度の増すロッドの上にラットを置き、ラットが

ロッド上から落下するまでの時間を測定する。ロッド上での滞在時間を指標として協調性運動機能を評価する。

強制水泳試験［抑うつ］

円柱水槽（直径20 cm、水深25 cm）にラットを入れた後、ラットの行動（水泳）を6分間観察し、無動時間を測定する。無動時間延長を抑うつの指標とする。

結果

a） バルプロ酸

・バルプロ酸新生期処置

バルプロ酸新生期処置が情緒社会性関連行動に与える影響を、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、ソーシャルインターラクション試験ならびに強制水泳試験を用いて検討した。14 日齢の雄性 Wistar/Hannover 系ラットにバルプロ酸（400 mg/kg, s.c.）を処置後、7 週齢まで飼育した群（VPA 群）を用い、同時期に生理食塩水を処置した群（SAL 群）を対照群として比較検討した。さらに、それぞれの群を 2 つに分け、一方に 2 分間の強制水泳ストレスを各行動薬理試験の直前に負荷することにより、ストレス脆弱性に対する評価を併せて検討した（図 26）。

高架式十字迷路試験を用いて解析を行ったところ、ストレス非負荷の VPA 群は SAL 群と比較し、総移動距離には変化が見られなかったものの、オープンアームならびにオープンアーム先端（frontal open arm：オープンアームの先端側半分）での滞在時間に減少傾向が見られた（図 27）。また、ストレス負荷により、VPA 群ならびに SAL 群の両群においてオープンアーム先端滞在時間の有意な減少が見られ（$P < 0.05$, Student’s *t*-test）、さらに VPA 群でのみストレス負荷により有意な総移動距離の減少が見られた（$P < 0.05$, Student’s t-test）。

一方、オープンアーム滞在時間は、ストレス負荷の VPA 群において、ストレス非負荷の VPA 群（$P < 0.01$, Student’s t-test）ならびにストレス負荷した SAL 群（$P < 0.05$, Student’s t-test）と比較し、共に有意に減少しており、ストレス負荷により不安水準が亢進していることが示されると共に、バルプロ酸新生期処置が不安様行動発現においてストレス脆弱性を示すことが明らかとなった。

また、オープンフィールド試験を行ったところ、総移動距離は、バルプロ酸処置ならびにストレス負荷のいずれによっても影響は見られなかった。一方、中心部での滞在時間においては、VPA 群で SAL 群と比較して減少傾向が見られ、中心部への侵入回数では、有意に減少しており（図 28； $P < 0.05$, Student’s t-test）、バルプロ酸新生期処置により不安水準が亢進していることが示された。

次に、ソーシャルインターラクション試験を行ったところ、総移動距離、個体間平均距離、接近時間（ラットペア間の距離が 10 および 20 cm 以下であった時間）、ならびに社会性行動（ペアラットに対する臭い嗅ぎ行動（生殖器臭い嗅ぎ行動を除く）、後追い行

動、乗りあがり行動、もぐり込み行動などを行った時間の総和）において、バルプロ酸処置単独ではいずれも若干の減少傾向が見られたものの、有意な変化は確認できなかった。一方、ストレス負荷によってはVPA群ならびにSAL群いずれにおいても、総移動距離と社会性行動に有意な減少が見られたが（総移動距離；SAL群ならびにVPA群共に$P < 0.01$, 社会性行動；SAL, $P < 0.01$, VPA, $P < 0.05$, Student’s t-test）、他の解析項目では変化が見られなかった（図 29）。

また、強制水泳試験を行ったところ、6分間の行動観察における総無動時間について、バルプロ酸処置ならびにストレス負荷による有意な影響は見られず、抑うつについては変化が見られなかった。一方、ストレス負荷群は、繰り返し強制水泳ストレスを負荷されているため、VPA 群ならびにSAL 群いずれにおいても開始1分間の無動時間には有意な延長が確認された（$P < 0.01$, Student’s t-test）。

ラットの運動機能低下の有無を調べるために、ロータロッド試験を行ったところ、バルプロ酸処置ならびにストレス負荷のいずれによっても、ロッド上の滞在時間に影響は見られなかった。

b） 鉛

鉛の胎生期～新生期処置が情緒社会性関連行動に与える影響を、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、ソーシャルインターラクション試験ならびに強制水泳試験を用いて検討した。Wistar/Hannover系妊娠ラットに、酢酸鉛を溶解した飲料水（鉛濃度：500 ppm）を胎生3日から生後14日目まで与えることで、母体および母乳を介して鉛に暴露された雄性仔ラット群（Pb 群）を用いた。同様に、酢酸ナトリウムを溶解した飲料水（ナトリウム濃度：660 ppm, 酢酸摂取量を同一にするための濃度）を母ラットに与えた雄性仔ラット群（Na 群）を対照群として比較検討した。さらに、それぞれの群を2つに分け、一方に金属ケージに閉じ込める拘束ストレスを 15 分間、各行動薬理試験の直前に負荷することにより、ストレス脆弱性に対する評価を併せて検討した。行動実験スケジュールはバルプロ酸処置と同様のタイムコースを用いて行った（図 26）。

高架式十字迷路試験を用いて解析を行ったところ、ストレス非負荷のPb群はNa群と比較し、総移動距離、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に減少傾向が見られたものの、有意な変化は観察されなかった。また、ストレス負荷により、Na 群においては同様に、総移動距離、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に減少傾向が見られた。一方、ストレス負荷したPb 群においては総移動距離、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に増加傾向が見られた（図 30）。これらのことより、鉛の胎生期～新生期処置ならびに拘束ストレス負荷は、それぞれ単独で不安を亢進する傾向は見られるが、その効果は相加的では無いことが示された。

オープンフィールド試験を行ったところ、総移動距離は、Pb 処置ならびにストレス負荷のいずれによっても影響は観察されなかった。一方、中心部での滞在時間においては、

Pb 群で Na 群と比較して減少傾向が見られた。さらに、ストレス負荷によって Na 群においては有意な中心部滞在時間の減少が見られたが（$P < 0.05$, Student’s t-test）、Pb 群においてはストレス負荷による有意な変化は見られなかった（図 31）。これらのことより、拘束ストレス負荷および鉛の胎生期～新生期処置では、高架式十字迷路試験の結果と同様に、それぞれ単独で不安亢進および不安亢進傾向が見られるが、その効果は相加的では無いことが示された。

ソーシャルインターラクション試験では、総移動距離、個体間平均距離、接近時間（ラットペア間の距離が 10 および 20 cm 以下であった時間）においては、Pb 処置ならびにストレス負荷のいずれによっても影響は見られなかった。社会性行動に対する変化に関しては、現在ビデオ解析をすすめている。

強制水泳試験では、6 分間の行動観察における総無動時間に対してバルプロ酸処置単独による有意な影響は見られなかった。一方、ストレス負荷した Na 群においては、無動時間の減少傾向が見られ、Pb 群においては有意な減少が確認された（図 32；$P < 0.05$, Student’s t-test）。鉛の胎生期～新生期処置が、拘束ストレス負荷により誘発される抗うつ傾向を亢進する可能性を示している。

ラットの運動機能低下の有無を調べるために、ロータロッド試験を行ったところバルプロ酸処置ならびにストレス負荷のいずれによっても、ロッド上の滞在時間に影響は見られなかった。

c) セボフルラン

セボフルラン新生期処置が情緒社会性関連行動に与える影響を、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、ソーシャルインターラクション試験ならびに強制水泳試験を用いて検討した。6 日齢の雄性 Wistar/Hannover 系ラットに 2%セボフルラン(carrier: 空気）を体温管理下で 6 時間処置後、7 週齢まで飼育した群（Sevo 群）を用い、同時期に空気を処置したコントロール群（Cont 群）を対照群として比較検討した。さらに、それぞれの群を 2 つに分け、一方に金属ケージに閉じ込める拘束ストレスを 15 分間、各行動薬理試験の直前に負荷することにより、ストレス脆弱性に対する評価を併せて検討した（図 26）。

高架式十字迷路試験を用いて解析を行ったところ、Sevo 群は Cont 群と比較し、総移動距離には変化が見られなかったものの、ストレス負荷によっていずれも有意な総移動距離の増加が見られた（$P < 0.05$, Student’s t-test；図 33）。また、オープンアームならびにオープンアーム先端（frontal open arm：オープンアームの先端側半分）での滞在時間においても、ストレス負荷によって Sevo 群において増加傾向がみられ、Cont 群で有意な増加が見られた（$P < 0.05$, Student’s t-test）。一方、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に関して、Cont 群と Sevo 群の間に有意な差は見られなかった。これらの結果は、セボフルラン新生期処置は不安様行動発現には影響を与えない

ことを示唆している。Cont 群で見られている有意な差が、Sevo 群では見られない、すなわち、ストレス負荷群では Cont 群と比較し Sevo 群においてオープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間が短い傾向が観察されたため、セボフルラン新生期処置の不安様行動発現におけるストレス脆弱性に関してはさらなる検討が必要である。

また、オープンフィールド試験を行ったところ、総移動距離においてストレス負荷したセボフルラン処置群で若干の減少傾向は確認されたものの、総移動距離ならびにセンターエリアでの滞在時間は、セボフルラン新生期処置ならびにストレス負荷のいずれによっても有意な影響が見られなかった（図 34）。これらの結果は、高架式十字迷路試験の結果と同様に、セボフルラン新生期処置は不安様行動発現には影響を与えないことを示唆している。

次に、ソーシャルインターラクション試験を行ったところ、総移動距離、個体間平均距離、接近時間（ラットペア間の距離が 10 および 20 cm 以下であった時間）、ならびに社会性行動（ペアラットに対する臭い嗅ぎ行動（生殖器臭い嗅ぎ行動を除く）、後追い行動、乗りあがり行動、もぐり込み行動などを行った時間の総和）において、セボフルラン処置単独ではいずれの解析項目においても有意な変化は確認できなかった（図 35）。また、ストレス負荷のみによっても、いずれの解析項目においても有意な変化は確認できなかった。一方、ストレス負荷したセボフルラン処置群においては、総移動距離や社会性行動に有意な変化は見られなかったものの、乗りあがり行動で有意な減少が確認された（$P < 0.05$, Student’s t-test；図 35）。

また、強制水泳試験を行ったところ、6 分間の行動観察における総無動時間について、セボフルラン新生期処置ならびにストレス負荷による有意な影響は見られず、抑うつについても変化が見られなかった。

ラットの運動機能低下の有無を調べるために、ロータロッド試験を行ったところ、セボフルラン新生期処置ならびにストレス負荷のいずれによっても、ロッド上の滞在時間に影響は見られなかった。

d) イミダクロプリド（ネオニコチノイド系農薬）

イミダクロプリドの胎生期処置が情緒社会性関連行動に与える影響を、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、ソーシャルインターラクション試験ならびに強制水泳試験を用いて検討した。Wistar/Hannover 系妊娠ラット（妊娠 9 日目）に、コーン油に溶解したイミダクロプリド（100 mg/kg）を腹腔内投与で処置することで、母体を介してイミダクロプリドに暴露された雄性仔ラット群（IMD 群）を用いた。同様に、コーン油を母ラットに腹腔内投与した雄性仔ラットを対照群（Cont 群）として比較検討した。さらに、それぞれの群を 2 つに分け、一方に金属ケージに閉じ込める拘束ストレスを 15 分間、各行動薬理試験の直前に負荷することにより、ストレス脆弱性に対する評価を併せて検討した。行動実験はセボフルラン処置の場合と同様のスケジュールを用いて行った（図 26）。

高架式十字迷路試験を用いて解析を行ったところ、ストレス非負荷の IMD 群は Cont 群と比較し、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に増加傾向が見られたものの、有意な変化は観察されなかった。また、ストレス負荷により、Cont 群においては、オープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に増加傾向が見られた。一方、ストレス負荷した IMD 群においてはオープンアームならびにオープンアーム先端滞在時間に変化する傾向は見られなかった（図 36）。これらのことより、イミダクロプリド胎生期処置は、不安様行動を亢進させず、またストレス脆弱性も惹起しない可能性が示された。

オープンフィールド試験を行ったところ、総移動距離は、イミダクロプリド処置ならびにストレス負荷のいずれによっても影響は観察されなかった。また、中心部での滞在時間においては、IMD 群で Cont 群と比較して減少傾向は見られるものの有意な変化は見られなかった。一方、ストレス負荷によって Cont 群ではストレス負荷による有意な変化は見られなかったものの、ストレス負荷した IMD 群においては有意な中心部滞在時間の減少が見られた（P＜0.05 vs 非ストレス負荷 Cont 群、P＜0.001 vs ストレス負荷 Cont 群、Student’s t-test；図 37）。これらのことより、ネオニコチノイド胎生期処置は、それ単独で不安様行動を亢進はさせないものの、高架式十字迷路試験の結果とは異なり、不安様行動の発現に対してストレス脆弱性を惹起する可能性が示された。ソーシャルインターラクション試験、強制水泳試験、ロータロッド試験の実験結果については研究期間内に解析を終了する。

食品中化学物質を含む化学物質暴露動物に対する行動試験の実効性の確認（守口　徹　麻布大学）

作成したポジティブコントロール物質投与動物の残余動物の中から，各母獣から 2-3 匹の雄性個体（1 群 10-16 匹）を用いて，高架式十字迷路試験ならびに新奇環境摂食抑制試験を実施した．また，鉛負荷実験では，離乳後から行動試験まで約 4 週間の個別飼育（ストレス）群も設け，ストレス負荷時の影響も検討した．

結果

1. エタノール

新生仔2日齢より5% エタノール人工乳で飼育した雄性ラット（7 週齢）では、高架式十字迷路試験、新奇環境摂食抑制試験共に著差は認められなかった。 しかし、行動試験終了後の脳組織採取では、エタノール群で有意な小脳重量の低下が認められた（表 5）。

2. 鉛

確定妊娠 3 日目から出産後 14 日間、母獣へ 500 ppm 酢酸鉛溶液を飲水投与して得られた新生仔(7 週齢)では、飼育環境を群飼育群と個別飼育群の 2 種類を設定し、行動試験

を行なった。 飼育環境による情動性の違いは散見されたが、鉛負荷に影響したと思われる行動変化は検出するまでには至っていない。 しかし、行動試験終了後の脳組織重量において、鉛負荷群では、飼育環境に関わらず全脳と海馬重量の有意な低下が認められた（表6）。

3. イミダクロプリド（Imidacloprid：E9IP）

確定妊娠 9 日目にイミダクロプリド 3.4、33.7、337 mg/kgを腹腔内投与した場合、高投与量 337 mg/kg（75% LD50 量）については，すべての母獣が 48 時間以内に死亡したため、3.4、33.7 g/kg 投与群から得られた雄性ラットのみを実験に用いた.

高架式十字迷路試験では、イミダクロプリド暴露群は、対照群に対してオープンアームの滞在時間が有意に延長していた。これは南班の結果と一致する。しかし、侵入回数は，減少する方向差異が確認された（図 38）。 この変化は、エタノール暴露個体と類似の作用を示していることから、認知機能の低下を生じている可能性が考えられる。 一方、新奇環境摂食抑制試験では、イミダクロプリド処理群は、摂食時間の延長傾向（不安レベルの上昇傾向）が観察されたが、有意差を得るまでには至らなかった。

4. 母子分離（AR：P2PO）

母子分離での飼育は情緒社会性に影響を与えることがすでにコンセンサスが得られている。そこで、これらの動物を我々の評価系の中でも特に一次スクリーニング的要素の高いマイクロアレイ等解析班に提供した。人工乳による人工飼育は、新生仔 2 日齢時から，18 日齢まで，半日（8:00～20：00）まで、3時間毎に糞便処理と授乳を行うもので、この方法は、すでに確立・報告（J Lipid Res, 45: 1437-45（2004））されている。 母獣群、人工飼育群で高架式十字迷路を実施したところ、母獣群に対して、人工飼育群は仮親の有無にかかわらず確かにオープンアームの滞在時間の低下が観察された（図 39）。

ク　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物を用いた扁桃体神経回路機能試験（加藤　総夫　東京慈恵会医科大学）

ポジティブ・コントロール物質を胎生期および／もしくは新生期にラットに投与し、成長後の扁桃体における神経細胞興奮性に及ぼす影響を対象群と比較し、正常範囲、および、逸脱値の判定基準を作成する。現時点において特定の分子がどのような異常を示すのかが確定しているわけではない。また、何か特定の「マスター分子・マスター現象」が、下流の異常発現を誘発するという可能性も現在までの研究からは考えにくく、「情緒社会性に影響を及ぼす（可能性のある）物質の影響」を予測評価する上で、これだけを見ればよいという現象は少なくとも a priori には存在せず、そのような状況を踏まえた研究戦略が必要である。このような現状を鑑み、効率的、かつ確実にこれらの神経回路に影響を及

ぼす物質の作用を検出・評価しうる方法の確立が先決問題であると考えた。その目的のために、以下の小目標を目指す研究を進めてきた。①「網羅的」とはいっても「オミクス」ではないので、とにかく、検出可能な現象を効率的に、数多く、一挙に記録しうる方策を確立する。②記録結果から、さまざまなパラメータの変動を一挙に解析評価する方法を確立する。③ポジコン被験物質で、実際にこれらの記録・評価法の有用性を評価検証する。

１）胎生期動物へのポジティブ・コントロール物質投与

本研究の主要なゴールは、情緒社会性行動に影響を及ぼしうる物質の影響を評価する方法の開発である。そのために本研究課題全体として以下の４段階のアプローチを採用している。

アプローチ１：情緒社会性行動の重要な基盤神経機構と考えられている扁桃体における神経回路機能の評価実験標準化プロトコルを策定する。

アプローチ２：同標準化プロトコルを、暫定的に、すでに情緒社会性行動に影響を及ぼすことが先行研究によって既知である物質に対して応用し、プロトコルの最適化を行う。

アプローチ３：影響既知の物質の影響を、実際に、同標準化プロトコルを用いて評価し、複数の影響既知物質に対し、同じ標準化プロトコルを適応した例を増やす。

アプローチ４：複数の影響既知物質の影響を同標準化プロトコルによって評価した結果を統合し、これらのデータすべてを用いて因子分析ならびにクラスター分析を行い、リスクを総合的に評価しうる多元的評価法を開発する。

研究項目ウでは、影響既知被験物質として、エタノール（EtOH）、バルプロ酸（VPA）、ニコチンを用いた。これらの物質の中には、アプローチ１～２の段階として、記録プロトコルが確定していないデータしか得られていないもあり、研究項目クでは、①EtOH の人工ほ乳による直接投与、および、新たな被験物質として、②酢酸鉛（Pb）、の影響を評価し、アプローチ３のデータを増やし結果の統合を目指した。

２）扁桃体脳スライス標本作製とニューロン膜電位記録

生後6～10週に麻酔下に脳を摘出し、扁桃体（外側核・外側基底核・中心核）を含む脳スライス（厚さ400 μm）を常法に従い作成した。人工脳脊髄液（NaCl 125, KCl 3, CaCl2 2, MgCl2 1.3, NaH2PO4 1.25, D-glucose 10, L-ascorbic acid 0.4 and NaHCO3 25; mM）潅流下に維持し、ビデオ顕微鏡下、扁桃体を可視化同定し、扁桃体中心核ニューロンから常法に従いパッチクランプ法で全細胞電流記録を行った。ピペット内溶液は、標準的な細胞興奮性の記録に適した組成（120 potassium gluconate, 6 NaCl, 1 CaCl2, 2 MgCl2, 2 ATP magnesium, 0.5 GTP sodium, 5 EGTA, 10 HEPES hemisodium, 12 phosphocreatine disodium）とした。

３）閾値下応答に関与する各種コンダクタンス応答の評価プロトコル（図 40）

① 一般的評価：静止膜電位・膜入力抵抗
② 過分極活性化チャネルの評価
③ 過分極によって脱不活性化するチャネルの評価
④ 分極によって活性化するチャネルの評価と同定
⑤ 発火パターン（漸増型、漸減型、fast spiking）

これらを、全１４のパラメーターを用いて、実験中に評価した。判定基準（表 7）とそれぞれの実例を図 40 に示す。

４）データ記録と解析

ニューロン細胞膜電流および膜電位をディジタル化し、負荷コマンドとともに、取り込みコンピューターに記録した（16 bit, 4 kHz）。それぞれの波形の変化を自作のプログラムで数値化し、結果を表計算ソフトに出力し、SPSS統計解析ソフト(IBM, Tokyo)で解析した。なお、記録、および、解析は、被験物質投与群・対照群に関し、一重盲実験計画下に行った。

なお、高齢動物での良好なニューロン記録を可能とする新しいスライス作製法を開発したので、それを別項に記す。

結果

上述の標準プロトコルを適用した表 8 の④～⑦の 4 被験物質（物質、用量および投与法の組み合わせ数）とそれらの対照物質の作用の検討から得られたデータを解析対称とした。研究項目ウでは、新たな評価法として「発現率有意差カラープロット」を開発した。今回、この方法をさらに厳密かつ応用性高く発展させ、現在までに行った被験物質投与実験のすべてのデータをまとめた。

改良点 1：発現率有意差の検定に、Fisher の直接確率法（正確確率法）を用いた。研究項目ウにおいてはカイ二乗検定を全パラメーターに対して行ったが、パラメーターの中には、カイ二乗検定の前提となる条件を満たさない、いうなれば、少数ニューロンでしか観察されないか、あるいはまったく観察されない応答も見出されることがわかった（期待値が 5 以下の桝目が全体の桝目の 20% 以上あるか，期待値が 1 以下の桝目が 1 つでもある場合はカイ二乗検定の正規性前提を用いることができない）。そこで、同等の発現率有意差の検定を行うため、純粋に発現確率に基づいて推定を行う、Fisher の exact probability test を前例に対して行い、危険率の値 P を推定しなおした。

改良点 2：「発現率有意差カラープロット」において、横軸に対照群ニューロンにおける当該応答の発現率、縦軸に処置群ニューロンにおける発現率をプロットし、さらに、それぞれの点の色で、統計的有意性を危険率のカラースケールとして表したが、このカラースケールを、危険率そのままのスケールではなく、対数スケールに改め、有意性の基準と

なる、P=0.01, P=0.05, および P=0.1 の付近の危険率が明確にわかるように改めた。
以上の 2 点を改良して、全被験物質の結果について示したプロットが図 41 である。
改良点 3：さらに、この「発現率有意差カラープロット」を被験物質の総合的評価がしやすい危険率のみのまとめの有意差プロットとして、作成した（図 42）。

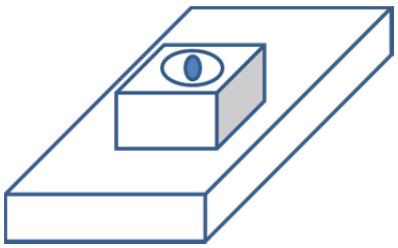
Neuroexcitomics 解析手法の拡大応用

上記のように開発したニューロン興奮性の網羅的解析手法「neuroexicitomics」の応用可能性をさらに拡張するため、これまでの研究データの再解析再評価を進めるとともに、例数が不足し共通試行パターンが未だ完成していなかったバルプロ酸生後 14 日齢投与後の4 週齢、および 7 週齢における扁桃体ニューロン興奮性の記録・解析を行った。投与実験、二重盲検下における脳スライス作製とニューロン記録、およびデータの実験後解析を進めることによって扁桃体ニューロン興奮性に及ぼすバルプロ酸の影響の網羅的解析を進めた。図43 は P14においてバルプロ酸ナトリウム（VPA; （400 mg/kg））を皮下投与し、７週齢で急性脳スライス標本を作製したのち電気生理学的記録を行った。左が生理食塩水投与群、右がVPA投与群から記録されたニューロンに脱分極電流を注入した際の膜電位応答。電位依存性カルシウムチャネルの活性化によって生じる「早い」後脱分極電位（afterdepolaring potential, ADP）を発現するニューロンの典型例。「サグ・リバウンド」を示すニューロンの例とその発現頻度を示す（図 44）。上段がバルプロ酸投与群（右; VPA）および非投与群（左; saline）の典型的ニューロンの膜電位波形の例。矢頭is, 初期値、矢頭ss, 定常状態値。下段、定常状態値と初期値の差（縦軸）と定常状態値膜電位（横軸）の関係（散布図）および定常状態値と初期値の差が 5 mV よりも大きいニューロンの含有率（円グラフ）。図 45 は、過分極コマンドののちに印加した脱分極コマンドによって観察される興奮遅延の典型例（上段）、脱分極後 5 秒間の活動電位数（左下）、および、ニューロンの基本的膜特性（右下表）におよぼす VPA の影響を示す。脱分極後 5 秒間の活動電位数の間に有意な差は認められなかった（U test）。新たに実験を加えた群において統一標準記録プロトコルを施行した群から得られた結果から作製した発現率カラープロットを 図 46 に示す。発現率をVPA群（縦軸）および対照群（横軸）間で比較したもの。左は 4 週齢、右は 7 週齢での記録。各マーカーの色は、Fisher の直接確率法で求めた発現率の差の有意性の P 値。解析パラメータ１（高振幅サグリバウンド）およびパラメータ１０（早い後脱分極電位）の発現率が VPA 群（縦軸）および対照群（横軸）間で有意に異なっていた。

高齢動物からの良好標本作成法

本研究班内の行動解析試験において用いられている動物の週齢と本神経回路解析において用いられている動物の週齢の差をどのように埋めるか、という課題の解決を試みた。潜在的に情緒社会性に影響を及ぼし得る物質の影響を動物実験データから検出する

方策としては、ヒト症例においても情緒社会性の異常が顕著となる思春期以降に相当する動物を使用することが必要である。本研究でも試行されているさまざまな動物行動試験は、装置、プロトコル、ともに、8 週齢以降の成熟動物を前提としている。したがって、ニューロン興奮性に及ぼす影響の in vitro 標本での解析には、やはり 8 週齢以降の脳を用いることが理想的である。他方、一般に、6 週齢以降の動物の脳で、良好な、記録に耐えうるニューロンを有する脳スライスの作成をすることはきわめて困難であるとされている。そこで、近年新たに開発されてきた新しい脳スライス作成法をさらに本研究目的用に改良し、特殊な装置なく 8 週齢以上の脳でニューロンの状態の良い脳スライスを作成することに成功した。



その方法を以下に示す。

１）麻酔下に氷冷 N-methyl-D-glucamide 含有人工脳脊髄液（低 Na 溶液）を経心的に還流する。

２）摘出脳を脳スライス作製装置ステージに接着したのち、中央を円筒でくり抜いた 5% agar のブロックを脳を囲むように接着する。保温ミックスローターを用いて 37℃に保温し、連続に撹拌して凝固を防いた 1.6% agarose をブロックと脳の間に流し込み、氷冷低 Na 溶液をかけて急冷し脳を保定する（左図）。

３）切断後の脳を低 Na 溶液で 15 分間インキュベートしたのち通常の人工脳脊髄液でインキュベートする。

この方法で作成されたスライスを観察したところ 10-12 週齢の高齢動物においても生理学的記録に耐えうる質のニューロンが多く存在することが確かめられた。本方法を用いて 7 週齢の動物から多くのニューロンを容易に、効率よく記録できた。本方法は、今後、発達障害のような成熟依存的脳機能の in vitro～ex vivo 解析において必須の手法となると想定される。

ケ　食品中化学物質を含む化学物質暴露動物扁桃体のマイクロアレイ等解析（佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所）

① 情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補遺伝子リストの確定、②マイクロアレイに代わる発現変動の検出系の検討、③ ①及び②において確立された評価系を用いた食品中化学物質のリスク評価の試行、を行う。

情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群候補遺伝子リストの確定について

個別課題エにおいて、サンプリングの最適時期の決定を行った。それに従い、バルプロ酸以外に情動に強く影響を及ぼすと期待される薬物（エタノール、鉛、セボフルラン）を用いて発現解析を行う。さらに、対照群と化学物質暴露群の識別能力の高い遺伝子変動現象の信頼性の確認を行う。情緒社会性への影響の数値化手法を開発するため、確実なデー

タが取得できる被験物質およびヒトにおけるデータが集積している被験物質を選択する。解析はバージョンアップにより、より詳細な解析が可能となったパスウェイ解析ソフト（Ingenuity Pathway Analysis; Ingenuity Systems社製）を用いて、１）これまでのポジティブコントロール物質と共通の遺伝子、共通のパスウェイに変動が見られるか、２）バルプロ酸と共通して変動する遺伝子やパスウェイが存在するか、それが情動と相関があるか、に着目して行う。

識別能力の高い遺伝子リストの信頼性確認について

これまでに行われたポジティブコントロール物質の情緒社会性リスクを再評価し、遺伝子変動現象選択の信頼性を確認する。また、行動試験により情緒社会性への影響が最も顕著であるバルプロ酸（VPA）を用いて、用量作用性を念頭に行動試験との相関をみながら低用量作用について検討する。また、母子分離下での飼育が情緒社会性に悪影響を及ぼすことは多数報告されている。このような実験的手法も取り入れ、遺伝子リストの信頼性を確認する。

マイクロアレイに代わる発現変動の検出系の検討

マイクロアレイは高価であるため、情緒社会性リスクマーカーの、新たな検出系についても検討する。個別課題エで安定して発現している遺伝子（A2A受容体等）を複数選び、qRT-PCRによりマイクロアレイの結果（発現及び増減）の再現性やqRT-PCRとマイクロアレイとの量的な相関について確認する。候補遺伝子の中には、発現量が少ないもの、変動があまり顕著でないものも含まれているため、qRT-PCRの検出限界を確認するとともに、評価系の高感度化、効率化、高経済性化を図る。

使用動物

エタノール、鉛、VPA, イミダクロプリド暴露動物、母子分離動物は守口班から、セボフルラン暴露動物は加藤班から供与された。いずれも 4〜6 週齢において、麻酔下で脳の摘出を行い、扁桃体領域より全 RNA を抽出して発現解析を行った（n=4）。

結果

マイクロアレイ解析の時期

VPA-P14 暴露実験を行った 7 週齢の動物を用いて発現解析に最適な時期の検討を行った。7 週齢において、4-5 週齢では見られなかった発現変動も存在したがその数は多くなかった。また 7 週齢と 4 週齢で同じように変動する遺伝子であっても、 7 週齢において 4 週齢より変動の幅が小さくなったり、また変動の向きが逆転したりするなどの現象が見られ、特に 7 週齢を基準とするべき優位性は認められなかった。このデータはその他の分担研究班に先駆けて得られたため、発現解析および神経回路試験は今後も 4-5 週齢で行うこととした。

発現データのフィルタリング

基本的な方針として、情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群として可能性のある遺伝子が極力漏れないようにフィルタリングを行うこととした（粗フィルタリング）。遺伝子の発現は、中央値を 500 とする相対的な蛍光強度及び、対照群との蛍光強度のログ比で表される。得られたデータについては、Affymetrix 社の GeneChip 用解析ソフト GeneChip Operating Software（GCOS）により、以下の手順でデータのフィルタリングを行った。

① 各処理群、雌雄別に『Presence Call（当該遺伝子が発現しているか否かを示す）』が『P (Presence)』である遺伝子を抽出した。（発現していない場合は『A (Absence)』で表される）

② ①で抽出された遺伝子について、対照群と1対1対応で比較し N=4 のうち半数以上で『I (Increase)』あるいは『D (Decrease)』と判定された遺伝子を抽出した。

③ 上記フィルタリング後、遺伝子ごとに抽出し、 2 群以上で共通するもの（ 1081 遺伝子）を、情緒社会性に影響する遺伝子変動現象の候補とした。

IPAによるパスウェイ解析

フィルタリング②までで抽出された平成 22 年度および 23 年度におけるすべての遺伝子リストを用いて、Ingenuity社の機能及びパスウェイ解析ソフト、Ingenuity Pathway Analysis（IPA）により、処理群ごとにパスウェイ解析を行った。IPA は、 2011 年 12 月下旬に、変動の増減の方向性を含めたパスウェイ解析が可能となるバージョンアップが行われ、生体内におけるパスウェイの動きをより正確に解析できるようになったことから、再度の解析を試みた。その結果、 Gap Junction Signaling, Neuropathic Pain Signaling, Synaptic Long Term Potentiation, Dopamine Receptor Signaling, Axonal Guidance Signaling, GABA Receptor ,Signaling 等の既存のパスウェイが、多くの処理群で共通して動いていたが、その方向性がすべての処理群で一致している例は存在しなかった。

エタノール投与方法による発現の変化について

対照としてのスクロース溶液投与群に対して変動を示したエタノール投与群の発現比較を行った。前年度に比べ、変動する遺伝子数は減少し、情動に関連する可能性が高いと思われる遺伝子の変動は検出されなかった。

鉛投与群における発現について

鉛暴露群において変動を示した遺伝子と、バルプロ酸投与群において変動を示した遺伝子の比較を行った。バルプロ酸と鉛投与群においてのみ、他のポジティブコントロール物質よりも顕著に変動する遺伝子が検出されることを期待したが、そのような傾向は見られ

なかった。

マイクロアレイ解析等による情緒社会性リスク評価の新しい考え方

遺伝子の抽出について

ここまでに、特に著しい変動を見せるポジティブコントロール共通の遺伝子が現れないため、情動に特に強く相関する複数の遺伝子を同定することは困難であると判断し、方針を改めた。増減の方向や幅を問わず、多くの処理群に共通して変動する遺伝子を抽出し、遺伝子変動現象としての総体的な再解析を試みた。すなわち、選択した遺伝子について対照群と化学物質暴露群間とで主成分分析を行った場合、これらの差別化が容易となる遺伝子リストの作成である。具体的には、

① すべてのマイクロアレイ解析において、機械的にその半数以上のグループで出現する遺伝子
② 特に強く情動に影響すると思われる VPA 投与群 (P14SC male, P14SC female, E12IP male, E12IP female) において、その半数以上のグループで出現する遺伝子リスト、
③ VPA 及び鉛投与群において、その半数以上で出現する遺伝子
④ これまでの母獣哺乳群に対して母子分離群で半数以上で出現する遺伝子
⑤ VPA および 母子分離群の中で増減の向きが同方向である遺伝子、の計 5 つのリストを作成した。

主成分分析について

（1）遺伝子リストの決定について

上記 5 つの遺伝子リストを用いて、主成分分析を行ったところ、⑤のリスト 49 遺伝子を使うと最も顕著に、対照群と暴露群が分かれることが判明した（表 9）。

（2）対照群の取り扱い

いかなる手法を用いた暴露実験においても、対照群は、『情動に影響がない』という事象が共通でなければならないという観点に基づき、これまでの暴露実験におけるすべての対照群のデータをまとめて共通の対照群とし、主成分分析を行ったところ、対照群と暴露群が分離している様子が明らかとなった（図 47）。

（3）ポジティブコントロールについて

上記（2）において、 VPA の雄サンプルは対照群と暴露群が非常に明確に分離されたが、他の化学物質は対照群と暴露群の差が VPA ほど顕著ではなかった（作用強度は行動試験の結果と相関する）（図 47:雄c-d, 雌a, b, d ）。これは、主成分分析という方法が、各群の属性の違いを相対的な距離で表すために、対照群との違いがあまり大きくないサンプルの場合に、対照群付近の狭い空間範囲だけが拡大されて表示されてしまうから

である（対照群自体も分散して見えてしまう）。そこで分析を行う際に、対照群から最も分離の高い暴露群を解析のポジティブコントロールとして常に加えることを考えた。図 48 の通り、雄では VPA-P14SC が（13-1 ）、雌では鉛暴露群が（13-2 ）、最も対照群から遠い位置に分類されており、それぞれをポジティブコントロールとして用いて、再度主成分分析を行ったところ、すべての暴露実験において対照群と暴露群が（２）よりも明確に分離された（図 48）。これは、主成分分析において化学物質の情緒社会性リスクを数値化するためには、コントロールと作用の強力なポジティブコントロールを基準にした相対評価が有効である可能性を示唆している。

セボフルラン暴露群における発現について

セボフルラン暴露群において変発現動を示した遺伝子と、バルプロ酸投与群において変動を示した遺伝子の比較を行った。バルプロ酸とセボフルラン暴露においてのみ、他のポジティブコントロール物質よりも顕著に変動する遺伝子が検出されることを期待したが、そのような傾向は見られなかった。しかし変動の方向が各化合物で一致しないことが多い中、バルプロ酸 400 mg/kg のすべての実験及びセボフルランで変動の方向が一致した、A2ar, Rasd2, Col3a1, Col1a2, Sncg や、バルプロ酸 400 mg/kg のすべて及びセボフルラン 2 回解析のうち 1 回については一致する Vim, Drd1, Drd2, Rgs9 については着目することが必然と思われる。バルプロ酸とセボフルランの作用強度の傾向は個別課題ク　扁桃体神経回路機能試験の結果とも一致している。

母子分離ストレスによる発現の変化について

新生仔より雄のみ選択し、①母獣群、②仮親（母乳は出ない）人工飼育群、③人工飼育群の 3 群を作成し発現変動について検討を行った。これは飼育条件の違いの他に、母乳と人工乳の違いというもうひとつ別のファクターを介入させないためであったが、仮親と新生仔の相性が悪かったせいか③と②の発現に顕著かつ有意な違いは見られなかった。これは、実は行動試験の結果ともよく相関していた（図 39）。①と③の比較では情緒社会性に関わる可能性が高いと思われる変動現象が検出された。

主成分分析における遺伝子リストのブラッシュアップ

バルプロ酸及び母子分離（人工哺乳）群の発現変動現象のうち同方向に変動する 49 プローブセットを選択し主成分分析に用いたが、実はこれまで、オーダーチップ作成等の実用化を念頭に置いたため Expressed Sequence Tag (EST) はリストから外していた。そこで、新たに EST を含め遺伝子変動現象リストのブラッシュアップを試みた。既に情緒社会性に明確な影響をおよぼすことが多数報告されているバルプロ酸（ P14 および E12 ）暴露群および母子分離群における発現変動現象に注目して、より精度の高いリストを作成した。クライテリアとしては、①バルプロ酸の用量作用性実験の最大用量である 400

mg/kg、②バルプロ酸の E12 暴露群、③母子分離群の結果より、それぞれの処置群において特に明確に変動する遺伝子や EST のみを並列して選択するもの、単独の処置群における確実性はやや劣るものの複数の処置群で共通して同方向に変動するものなど、異なる観点から多数の遺伝子変動リストを作成し、それらを用いて主成分分析を行った。その結果、バルプロ酸において用量作用性を検出可能で（図 49 ）、なおかつ他の化学物質暴露群と対照群を分離することが可能な遺伝子（EST 含む）リストの候補を複数（ 3 リスト）得ることができた（表 10-12）。これらのリストはどれも、これまでに複数回行ったバルプロ酸暴露群（ 400 mg/kg ）が対照群に対して同様な位置に分離され（図 50）、 P14 およびE12 のバルプロ酸暴露群･母子分離群はもちろん、リスト作成には使用しなかったエタノール等をも明確に分離することができた（図 51 および 52）。

バルプロ酸の用量作用性について

用量作用性の実験は 3 回行った。情緒社会性に関わると推測される 49 遺伝子セットによる主成分分析においては 1 回目の実験では 100 mg/kg が、また 3 回目の実験では 40 mg/kg が、対照群から最も遠い位置に分離された。この結果から、現時点の情緒社会性リスクマーカー候補遺伝子リストから予測される危険値は 40-100 mg/kg 付近にある可能性が推測された。この結果をうけて、現在守口班において行動試験の用量依存性について追試を行っており（3月末には終了予定）、行動異常では 400 mg/kg でのみ有意な影響が検出されている（データ示さず）。従って、マイクロアレイ解析が行動解析よりリスク評価において感度がよく、危険値の設定に有効であることが示唆された。また、この遺伝子解析を一次スクリーニング的に使用し、安全域を行動解析によって検証する、というストラテジーが有効であることが示された。

イミダクロプリドの発現変動現象について

現在解析中であり、年度内終了予定。

マイクロアレイに代わる発現変動の検出系の検討について

表 9 の 49 遺伝子のうち、情動に関連すると思われる遺伝子（A2AR, DRD2, COMT ）を含む、発現量の異なる遺伝子を用いて基礎検討を行った。qRT-PCR とアレイでの結果に相関が見られない例が存在した。特に、アレイの蛍光強度の値がおよそ 100 以下になると相関が失われることが確認された。しかし、本課題のストラテジーが特定遺伝子の発現変動による検出から、遺伝子グループの主成分分析による分離へと移っており、また、直近の有力候補リストには多くの EST が含まれていることから、qRT-PCR の位置づけはマイクロアレイ解析の精度確認にとどまりそうである。

コ　食品中化学物質を含む化学物質の脳内移行性に関する検討　（小泉　修一　山梨大学

)

個別課題オでは、in vitro BBB モデルを確立し、それを用いて（1）脳内移行性の年齢依存性が化学物質によって全く異なること、（2）脳内移行性が低い化学物質でも BBB 障害性の年齢依存性が有ることを見いだした。これは我々が発見した化学物質の全く新たなリスクである。よって、これらを将来の多軸評定の軸の一つと据えることとし、電気生理、発現解析に先行して種々の化学物質について幅広くデータを収集する。また、このモデルを用いて、食品中化学物質のヒト BBB を介する脳内移行性の外挿性を担保する。これまで検討してきたラット *in vitro* BBB モデルによる食品中化学物質を含む化学物質の脳内移行性評価法を高精度化させ、信頼性を増すために、ヒト細胞を用い、ヒト *in vitro* BBB モデルを作成した。本ヒトモデルを用いて食品中化学物質の脳内移行性を検討し、ラット *in vitro* BBB モデルのそれとの比較検討することで、ヒトへの外挿性を評価する。

In vitro BBB モデルの精査及びポジティブコントロール物質（バルプロ酸；VPA）の BBB 機能に与える影響に関する検討

In vitro BBB モデルの化学物質透過性の年齢依存性の分子メカニズムを明らかとする目的から、2 及び 8 週齢（2 w 及び 8 w）動物から作成した in vitro BBB モデルの基本的な性質を検討した。定量に用いたパラメーターは以下に示すとおりである。

・TEER: 経内皮電気抵抗
・Na-F（sodium fluorescein）：隙細胞経路（para cellular）による物質指標（細胞－細胞間のギャップ結合を介して移動する物質の量を反映）
・EBA: Evans-blue albumin: 経細胞経路（trans cellular）による物質移動の指標（細胞を透過する物質の量を反映）

図 53 で示すように、8 w 動物から作成した BBB モデルでは、2 w 動物のそれに比べ、TEER(A)が大きく、隙細胞透過性（Na-F）及び経細胞透過性（EBA）が小さかった。これらの性質は、すべて化学物質の脳内移行性が 8 w で小さくなることとよく一致していた。次に、*in vitro* BBB モデルにおける BBB 関連蛋白質の発現量を 2 w 及び 8 w 動物間で比較した。図 54 で示すように、密着結合のアダプター蛋白質として重要な ZO-1、密着結合蛋白質 occludin 及び claudin-5 のすべての発現が、8 w 動物の *in vitro* BBB モデルで 2 w 動物のそれよりも大きかった。

研究項目オにおいて、VPA は特に幼弱期（2 w）に脳内に移行しやすい化学物質であることを、in vitro 及び in vivo BBB モデルを用いて明らかとした。しかし、VPA 自身が BBB 機能に与える影響については未解決のままであった。そこで、VPA が BBB 機能に与える影響を、TEER、隙細胞透過性（Na-F 透過性）及び経細胞透過性（EBA 透過性）の側面から検討した。異なる濃度の VPA（100 - 1000 μM）は 24 時間 in vitro BBB システムに添加した。図 55 で示すように、VPA は経細胞透過性には影響を与えなかった。しか

し、高濃度 VPA は TEER を亢進、隙細胞透過性を低下、つまり BBB 機能を亢進させる作用を呈した。しかも、この BBB 機能亢進作用は、成獣 BBB（8 w）でのみに認められた。

Pb の脳内透過性及び BBB 機能に与える影響に関する検討

Pb（酢酸鉛； PbAc として）の脳内移行性を in vitro BBB モデルを用いて検討した。図 56 で示すように、血管内腔側から Pb を投与し一定時間後に血管外腔側の Pb 量を測定したが、どの時間においても外腔側の Pb は検出できなかった。つまり、Pb の脳内移行性（BBB 透過性）は認められなかった。ポジティブコントロール物質として、VPA の結果を同様に示した。通常の化学物質は、40 分間の透過性を 10 分毎に経時的に測定するが（図 56、VPA）、Pb の場合はその時間を 24 時間まで延長した場合でも、血管外腔側への移行は認められなかった。Pb の脳内移行性の欠如は、若年齢（2ｗ）及び成獣（8ｗ）細胞のどちらの BBB においても同様であった。次に in vivo BBB モデルを用い、Pb の脳内移行性を検討した。図 57A で示すように左心室から Pb （PbAc として投与） を投与し、一定時間後に脳内実質内濃度を測定したが、0.5-1.5 min 後のどの時間においても Pb は検出できなかった。図 57A 挿入図で示すように、2 min では僅かに脳内に移行し、さらにその移行量は 2ｗ が 8ｗ に比べて顕著に高かった。しかし、脳内難移行性物質で BBB 透過性実験のネガティブコントロールとして頻用される inulin （図 57B）の透過性と比較しても、Pb の透過性は約百分の 1 程度であり、in vitro BBB モデルの結果と同様、Pb は脳内移行性が極めて低い物質であることが明らかとなった。Pb が BBB 機能に与える影響を in vitro BBB モデルを用いて検討した。図 58 で示すように、Pb は 0.01 μM という低濃度から濃度依存的（0.01 - 100 μM）に TEER を低下させた。また、この TEER の低下は、幼弱の BBB モデル（2 w）でのみ認められた。Pb 自体の BBB 透過性は低いものの、Pb に暴露されることにより、幼弱期の BBB 機能が障害される可能性が示唆された。

ヒト細胞を用いた in vitro BBB モデル作成

ラットモデルと同様に、トランスウェル・メンブレンに、ヒト脳毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及び、アストロサイトを重層化し、*in vitro* BBB モデルを作成する。これに種々の化学物質を添加してその透過係数測定より脳内移行性を検討する。これらヒト *in vitro* BBB モデルで得られた結果と、これまで得られたラット等のモデルを用いて評価した化学物質の脳内移行性が、ヒト BBB 機 能を外挿できるものであるかどうかを明らかとする。ラットと同様、トランスウェル・メンブランに、ヒト脳毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及び、アストロサイトを重層化した。ヒトアストロサイトは Lonza 社の正常成人初代培養ヒトアストロサイトを、ヒト周皮細胞は、ScienCell 社正常成人脳初代周皮細胞を用いた。ヒト血管内皮細胞は、初代培養系がうまく機能しなかったため、てんかん患者脳（成人）から採取した血管内皮細胞をセルライン化した hCMEC/D3 細胞を用いた。これらを重層化して作成した、ヒト in vitro BBB モデルを作成し（図 59）、VPA、nicotine 及

び inulin の透過性を検討した。化学物質の脳内移行性は、図 60 に示す in vitro 透過クリアランス算出式に従って、透過クリアランス（PStrans）を算出した。図 61 は、ヒト in vitro BBB モデルを用いて得られた各種化学物質の透過クリアランスの値である。細胞隙透過性指標である Na-F（sodium fluorescein）は非常に低く、細胞間に密着結合（tight junction）が形成されていることが明らかとなった。また、細胞間透過性指標である EBA（Evans’ blue albumin）の透過性はほぼ 0 であった。また、経皮内電気抵抗値抗（TEER）は約 100Ωcm2 であり、成獣ラットで得られた値と同様であった。以上より、本ヒト細胞を用いた in vitro モデル系により薬物透過性を評価できると判断し、以下の薬物の透過性を解析した。VPA, nicotine 及び inulin の透過クリアランスである。透過クリアランスの大きさは nicotine>VPA>inulin の順であり、これは rat in vitro BBB モデルで得られたそれと同様であった。昨年度までに構築した rat in vitro BBB モデルを用いて得られた、VPA、nicotine 及び inulin の透過クリアランスの値を図 62 に示した（図 62 の横線カラム）。ラット in vitro BBB モデルの透過クリアランス値のなかでも、特に成獣（8 weeks） in vitro BBB モデルとの相関性が高かった。そこで、ヒト及びラット in vitro BBB モデルを用いて得られた各薬物透過クリアランス値の相関性を解析した。図 63 に示す様に、両モデルにより得られた値は、非常に強く相関していた(R2=0.973)。

研究項目名３　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化

サ　行動試験結果の数値化（南　雅文　北海道大学）

行動試験に関して、研究結果のスコア化を行い、胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化のためのスコア一覧表をエクセルファイルとして作成し、加藤班に提供した。

シ　神経回路機能試験結果の数値化および情緒社会性リスク評価の多軸化にもとづく数式化，基準値算出（加藤　総夫　東京慈恵会医科大学）

行動解析、電気生理学的解析、マイクロアレイ解析、脳移行性、といった全てデータをもとに、多軸化を目指した。図 64 は、横軸に 3 年間の研究期間に施行された全被験物質を共通表示で並べたものであり、縦軸は、行動解析（2 機関で得られたデータをすべてプールして解析した）の各個体のデータに基づいて行ったロジスティック回帰解析によって得られたリスクのオッズ比である。ある記録パラメーターのリスク予測能力は、このロジスティック回帰解析で得られたオッズ比の数値と、その値の有意性の両面から評価される。本解析では、オッズ比推定の有意性をカラーコードで表示した。実際の行動試験において有意差の得られる評価項目がほとんどなかった事実に呼応して、高い有意性をもつ高オッズ比のパラメーターは見いだせなかった（上段）。しかしながら、いくつかの試験において、高いオッズ比を示すパラメーターは存在するので、被験動物匹数の増加などの対応によって精度をあげられる可能性がある。

一方、本ロジスティック解析の結果は、本解析手法の選択性の低さも示している。上図下段は、さまざまな被験物質投与実験において作成された対照群のデータをもとに、対照群間のデータからオッズ比を求めたものである。多くのパラメーターにおいて、有意な高オッズ比が示されており、これらは false positive なリスク因子である、という可能性、あるいは、溶媒という本質的に無作用であることが期待される物質でもその投与手法などによって情緒社会性行動に有意な影響を及ぼしうる、という可能性なども考えられる。この解析法を採用した場合に被験物質投与群において高有意度高リスク因子が見いだされなかった事実は、より強力なプロトコールを設定する必要性が示唆される。

一方、図 65 に示した neuroexcitomics 試験で得られた全被験物質・全ニューロン記録に基づくロジスティック回帰分析では、被験物質投与群においても、高有意性高リスク指標が安定して見いだされている。この結果は、本解析手法が、リスク因子を検出する上で十分な感度を持っているが選択性の面では十分ではなく、false negative を検出する可能性を意味している。

しかしながらこれらの問題は、必要例数、対照群の取り扱いなどの手順をより最適化することによって解決できる可能性が高い。従って、これらの試験を同時に並行して進めるのではなく、論理的に進めることによって、最小の実験数で最大の評価を進め、効率的な

リスク判定が可能となるものと期待される。この点は下記、マイクロアレイ解析での成果においても補足する。

ス　マイクロアレイ解析結果の数値化（佐藤　薫　国立医薬品食品衛生研究所）

マイクロアレイ解析結果に関して、研究結果のスコア化を行い、胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化のためのスコア一覧表をエクセルファイルとして作成し、加藤班に提供した。スコア化した遺伝子変動現象候補リストは 3 種類あったが、最終的には加藤班で数値化解析を行い最良のリストを選別することとした。

一方、マイクロアレイ解析の成果としてあがってきた遺伝子リストは、これらの遺伝子発現変化について主成分分析をかけると、行動試験での異常行動と非常に相関が高い。既存のリスク因子（バルプロ酸、母子分離）との相対評価を行うことにより十分な情報を得ることができる。個別課題シでの提案と考え合わせると図 66 で示されるように、マイクロアレイ解析による一次スクリーニングを行った後に、行動解析や電気生理学的解析により安全域を確認するという段階的な評価システムとすることが評価系の検出力向上、頑健性向上につながるものと思われる。

セ　脳内移行性結果の数値化（小泉　修一　山梨大学）

ラット及びヒト in vitro BBB モデルを用いて得られた各化学物質透過性クリアランス、さらにラット in vitro BBB モデル機能に対する各化学物質の影響を数値化し、多軸評価系の１つの軸となるよう加藤班に解析を依頼した。

研究全体の成果、考察及び結論

情緒社会性のかなりの部分が（拡張）扁桃体および関連領域の活動によって成立している事実はほぼ確立しており、これらの領域に注目する根拠はほぼ確立している。我々は情緒社会性行動試験、脳内移行性試験、に加え、扁桃体領域の神経回路機能試験（電気生理学的解析）および扁桃体マイクロアレイ解析を行い、食品中化学物質への胎生～新生期暴露が情緒社会性におよぼす影響評価手法の開発を試みた。

情緒社会性行動試験について

高架式十字迷路試験を用いた検討により、バルプロ酸胎生期処置群では、4 週齢雌において対照群と比較し有意なオープンアーム滞在時間の減少がみられた。さらに、10 週齢においては雌雄共にオープンアーム滞在時間の減少傾向が確認された。また、エタノール胎生～新生期処置群では、10 週齢雌においてオープンアーム滞在時間の減少傾向が見られた。これらの結果より高架式十字迷路試験は、胎生～新生期化学物質暴露による情緒社会性リスクの検討に有効であることが示された。また、4 週齢および 10 週齢において行動解析を行ったが、上述のように、10 週齢の方が検出感度が高い可能性が示唆されたため、本研究結果を踏まえ、電気生理学的解析が容易であり、かつ、高感度での行動試験を行えることが期待される 7 週齢動物を用いた行動試験を胎生期バルプロ酸暴露群について検討したところ、7 週齢雌においても対照群と比較しオープンアーム滞在時間の減少傾向がみられた。一方、化合物への暴露だけでは行動変化を引き起こす要因としては不十分であり、ストレスなどの環境要因が負荷されることで情緒社会性関連行動に変化が生じる可能性が考えられた（情緒社会性におけるストレス脆弱性）。7 週齢におけるストレス負荷（2 分間の強制水泳ストレス）の影響を検討したところ、ストレス負荷した新生期バルプロ酸暴露群は、非ストレス負荷新生期バルプロ酸暴露群ならびにストレス負荷生理食塩水投与群の両者と比較し、有意なオープンアーム滞在時間の減少が確認された。化合物暴露群にストレスを負荷した後に行動試験を行うことにより、より感度よく情緒社会性リスクを検出できる可能性が示されたものと考えられる。ニコチン（雌・雄）およびエタノール（雄）のように作用が劇的ではない化学物質の作用が検出されなかった原因としては、①母獣体内での代謝による薬物の減少、②胎盤による薬物通過の制限、③脳の形成早期による評価、④成獣用の行動評価装置に若齢個体(5 週齢)を適用させた、⑤胎生～新生期における化合物処置の研究では、処置から行動試験までの期間が長く、その間の飼育条件等の影響を受けた、などが考えられる。そこで、複数の行動試験を網羅的に採用し、ストレス脆弱性という新しい評価対象を設定することで評価系の高感度化を図った。また、行動試験では、4 週齢および 10 週齢において行動解析を行ったが、上述のように、10 週齢の方が検出感度が高い可能性が示唆された。そこで、より高感度での行動試験を行えることが期待される 7 週齢動物を用いた行動試験を行うこととした。VPA 処置単独で、有意

ではないもののオープンアーム滞在時間減少傾向が見られた。さらに、ストレス負荷したVPA 処置群では、ストレス負荷した対照群ならびにストレス非負荷の VPA 処置群と比較し有意なオープンアーム滞在時間の減少がみられた。また、オープンフィールド試験では、非ストレス負荷群において VPA 処置により、中心部への侵入回数の有意な減少が見られた。これらの結果は、新生期バルプロ酸処置は、不安水準を亢進することを示すと共に、不安様行動発現においてストレス脆弱性を有する可能性を示している。また、Pb の胎生～新生期処置群では、高架式十字迷路試験においてオープンアーム滞在時間の減少傾向、さらにオープンフィールド試験において中心部の滞在時間の減少傾向が見られたが、ストレス負荷による有意な影響は確認されなかった。これらの結果は、Pb 処置は、不安水準を亢進する可能性を示しているが、新生期 VPA 処置とは異なり、不安様行動発現においてストレス脆弱性を有していないことを示している。一方で、強制水泳試験を用いた検討により、鉛処置単独では、無動時間に変化が見られないものの、拘束ストレス負荷により無動時間の有意な短縮が見られた。この結果は、拘束ストレス負荷により誘発される情緒社会性変化、特に抑うつ状態の惹起を増幅する可能性を示している。以上のように、化合物への暴露だけでは行動変化を引き起さない場合でも、ストレスなどの環境要因が負荷されることで情緒社会性関連行動に変化が生じることから（情緒社会性におけるストレス脆弱性）、化合物暴露群にストレスを負荷した後に行動試験を行うことにより、より感度よく情緒社会性リスクを検出できることが示された。この新しい行動解析バッテリーを用いて、セボフルラン新生期処置群について検討したところ、有意な影響ならびにストレス脆弱性は確認されなかった。また、セボフルラン新生期処置群においては、ソーシャルインターラクション試験における社会性行動全体としては変化が見られなかった。これらの結果は、セボフルラン新生期処置は、単独処置では情緒社会性に影響を与えない可能性を示唆している。しかしながら、社会性行動の指標の一つである乗りあがり行動においては、セボフルラン処置単独で減少傾向が見られ、拘束ストレス負荷したセボフルラン処置群では有意に減少していた。この結果は、一部の社会性行動においては、セボフルラン新生期処置がストレス脆弱性を惹起する可能性を示唆している。また、イミダクロプリドの胎生期単独処置群では、高架式十字迷路試験においてオープンアーム滞在時間の増加傾向、さらにオープンフィールド試験において中心部の滞在時間の増加傾向が見られたが、いずれにおいても有意な影響は確認されなかった。一方、ストレス負荷したイミダクロプリド胎生期処置群においては、ストレス非負荷並びにストレス負荷いずれのコントロール群と比較しても、有意なオープンアーム滞在時間の減少が見られた。これらの結果は、ネオニコチノイド系農薬胎生期処置は、単独では不安水準に殆ど影響を与えないものの、新生期バルプロ酸処置と同様に、不安様行動発現においてストレス脆弱性を惹起する可能性を示している。

行動試験の施設間バリデーションおよび実効性の確認について

行動試験の施設間バリデーションについては、環境の差異、雌雄の差こそあれ、バルプロ酸のような作用が劇的な化学物質については、南班と同一方向性の作用を確認した。また、ストレスを負荷した後の行動試験がこれまでより感度が高い点でも南班と一致した。ストレス感受性を考慮することで情緒社会性リスクを感度よく検出できる可能性がさらに支持された。

扁桃体神経回路機能試験について

本研究課題では、情緒社会性に関わる神経機構に影響を及ぼしうる物質によってもたらされうる神経回路の諸変化を、網羅的、効率的、かつ鋭敏に検出しうる実験的評価法を確立する必要がある。このようなアプローチは一般的な電気生理学研究とは一線を画すものであり、独自の評価技法をゼロから構築する必要がある。我々が採用した戦略は、対照群との比較において、神経回路機能に生じている何らかの変化を網羅的に探索し、その因果性を考慮せずに、変化を示している因子を効率的にピックアップすることによって、情緒社会性に影響を及ぼしうる候補物質を同定する、という方法である。そのための方法として 35 の複数パラメーターの変化を「有無」でデジタル的に評価し、その発現率の変化の有意性を「発現率比の危険水準」表示することによって検出する新規の解析手法を開発した。情緒社会性が、単一、もしくは、数組の分子マーカーによって評価できるという可能性はほとんどないため、最も効率的な戦略は、網羅的な解析を加え何らかの機能的変化を捉えるという戦略であると考えられる。さらに、定量的な比較解析を可能とするため、定量的な変化を比較することを可能とする、自動計測プログラムを作成した。バルプロ酸の影響を定量的に評価したところ、他の被験物質以上に、多くの電気生理学的パラメーターにおいて、VPA 投与による有意な影響が認められた。他の被験物質よりも明瞭な有意さを示す項目が多く、その作用の強さが示された。以上、VPA による扁桃体ニューロンの興奮性の異常と、この解析方法の有用性が証明された。

扁桃体のマイクロアレイ解析について

現在まで、ヒトおよび動物における研究では、情緒社会性に部分的に影響を及ぼしうる複数の候補因子が提唱されてはいるものの、この分子（もしくは分子群）の発現状況を解析すれば情緒社会性に及ぼす影響を予測できる、というような分子（群）は未だ同定されていない。我々は、ポジティブコントロール物質に暴露したラット扁桃体のマイクロアレイ解析により、情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群として可能性のある遺伝子群の同定を試みたが、確実かつ顕著に同じような挙動で変動する共通の遺伝子群、というものは検出できない可能性が示唆された。そこで戦略を変え、（増減の方向性や大きさにかかわらず）化学物質に共通して動く遺伝子群に注目した主成分分析を行って、対照群と化学物質暴露群との分離の良い遺伝子グループ（リスト）を探索することにした。結果として、バルプロ酸（ P14, E12 とも）群と母子分離群の各群中において、またそれぞれを比較し

た場合においても、同じ方向に共通して変動する現象を選んだ時、対照群がより凝集し、バルプロ酸と母子分離群はもちろん、他の化学物質暴露群の分離も良好な結果が得られることがわかった。また、このリストを用いると、バルプロ酸の用量依存性を可視化できることも示された。さらに、雄がより強く影響を受けるという既報の結果を反映することができた。ニコチンでは対照群と暴露群の区別があまり明確でないが、これは行動試験でもポジティブなデータが得られていないことと相関している。またエタノール暴露群に関しては、抽出された遺伝子において変動の方向が他処理群と真逆である例が多く見られたが、二次元の主成分分析において対照群を挟んで VPA と反対側に分布していた。エタノール暴露群は、行動試験においても同様に、不安を示す指標となる行動がむしろ減退する傾向を示しており、発現変動の結果を反映していると見られる。セボフルランは発現変動で対照群からの分離がやや弱かったが、これは電気生理実験における結果（対照群との違いは存在するが、バルプロ酸より弱い）と一致する。また今回のリストは、雌においても対照群と化学物質暴露群が分離されることが確認され、化学物質・処置（母子分離）・性特異的ではなく、情緒社会性に関するリスクを検出するための一般的な指標となり得ることが考えられる。マイクロアレイ解析においても VPA-P14 暴露後 7 週齢の動物を用いてマイクロアレイ解析を行った。7 週齢において 4 週齢より変動の幅が小さくなったり、また変動の向きが逆転したりするなどの現象が見られ、特に 7 週齢の優位性は認められなかった。従って、in vitro 解析は 4-5 週齢動物で行うこととした。

<u>ポジティブコントロール物質の脳内移行性に関する検討について</u>

ポジティブコントロール物質の BBB 透過性の違いを、*in vivo* 及び *in vitro* BBB 評価系を用いて比較検討した。その結果、化学物質の脳内移行性に年齢依存性があること、さらにこの年齢依存性が化学物質によって全く異なることを見いだした。これは我々が発見した化学物質の全く新たなリスクである。またこれら化学物質の年齢依存的脳内移行性は、*in vitro* BBB モデルによっても評価出来ることが示唆された。In vitro BBB モデルでは、細胞を採取する動物の週齢に依存して、その TEER 亢進，隙細胞透過性低下、経細胞透過性低下が認められることが明らかとなったが、幼弱動物（2 w）に比べ、成獣（8 w）から採取し培養した血管内皮細胞では ZO-1、occludin 及び claudin-5 が強く発現していた。一般に、in vivo で認められる種々の蛋白質発現量の年齢による差異は、in vitro の培養細胞レベルでは認められ難い、とされているが、本 BBB モデルでは、採取した動物の年齢により、幼弱期の BBB 脆弱性を反映した in vitro BBB モデルが作成できることが明らかとなった。また、本 in vitro BBB モデルを用いて VPA の BBB 機能自体に与える影響を検討した。VPA は経細胞透過性には影響しなかったが驚いたことに、成獣 BBB の TEER を亢進させ、隙細胞透過性を低下させる作用、つまり BBB の機能を高める作用が認められた。この作用は、幼弱動物 BBB（2 w）モデルでは認められなかった。VPA は、幼弱期（2 w）に特に脳内移行性が高く、成獣（8 w）では非常に低い。このような、顕著

な脳内移行性の年齢依存性は、一部には今回のように成獣 BBB の機能亢進作用を併せ持つことに起因する可能性が示唆された。食品中に含まれる化学物質として、Pb の脳内移行性及び BBB 機能に与える影響及びその年齢依存性を検討した。In vitro 及び in vivo BBB モデルのどちらを用いた検討でも、Pb の BBB 透過性は非常に低かった。In vivo BBB モデルを使った検討では、若年動物 BBB で Pb の透過が検出されたが、その透過性は BBB 難透過物質である inulin の 1% 未満であったことから、通常では幼弱期であってもその透過性は極めて低いものと考えられる。しかし、Pb に暴露されると、幼弱動物で BBB 機能（TEER）が顕著に低下することも明らかとなった。Pb は自身の BBB 透過性は低くても、BBB 機能を特に幼弱期に障害する可能性が示唆された。このように、食品中化学物質の中枢有害性を考える際には、化学物質自身の透過性とその年齢依存性に加え、BBB 機能自体への影響とその年齢依存性を考慮する必要があることが示唆された。In vitro BBB モデルは、一度の細胞培養（妊娠動物 1 腹分）で、約 50 回分（24 穴プレート 2 枚）の検討を行うことができるという高効率性、簡便性及び使用薬物量を減らせる経済性を考慮すると、種々の食品中に含まれる化学物質の脳内移行性を、幼児と成人で簡便に比較するハイスループットなスクリーニング系として非常に有用である。しかし、in vivo BBB モデルと比較すると感度はやや鈍く、例えばエタノールのように週齢による透過性差異が少ないものは、in vitro BBB ではその差を検出することが出来なかった。In vitro BBB モデルの有用性は明らかとなったが、脳内移行性（Ki 値）の差が 10% 未満のものは、in vivo BBB を併用する等の工夫をしながら、検討を行う必要があるだろう。ヒトへの外挿性について検討するために、ヒト由来脳血管内皮細胞、アストロサイト及び周皮細胞を用いてヒト in vitro BBB モデルを構築した。このモデルは、ラット in vitro BBB モデルとの高い相関性を示した。さらに、本ヒトモデルを用いて得られた化学物質透過性とラット成獣 in vitro BBB モデルを用いて得られたそれらとの間には、非常に高い相関性が認められた。昨年までの検討により、ラット in vitro BBB モデルと in vivo BBB モデルの化学物質透過性には非常に高い相関性があることも明らかとなった。従って、食品に含まれる化学物質の脳内移行性は、ラット in vitro BBB モデルを用いた簡便かつハイスループットな解析により、ヒトにおける脳内移行性へと外挿できる可能性が強く示唆された。これまでのラットを用いた in vitro BBB モデルによる化学物質の脳内移行性は、ヒトの BBB 透過性に外挿出来る可能性が強く示唆された。しかし、ヒトモデルでは年齢に依存したサンプルを取得する困難がある。マーモセット等を用いた系を用いる等、代替案の検討が必要である。

<u>胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化</u>

行動解析、電気生理学的解析、マイクロアレイ解析、脳移行性、といった全てデータをもとに、多軸化を目指した。本ロジスティック解析において、さまざまな被験物質投与実験において作成された対照群間のデータからオッズ比を求めると、多くのパラメーターに

おいて有意な高オッズ比が示されており、これらは false positive なリスク因子である、という可能性、あるいは、溶媒という本質的に無作用であることが期待される物質でもその投与手法などによって情緒社会性行動に有意な影響を及ぼしうる、という可能性なども考えられる。一方 neuroexcitomics 試験で得られた全被験物質・全ニューロン記録に基づくロジスティック回帰分析では、被験物質投与群においても、高有意性高リスク指標が安定して見いだされている。以上の結果は、本解析手法が、リスク因子を検出する上で十分な感度を持っているが選択性の面では十分ではなく、false negative を検出する可能性を意味している。

しかしながらこれらの問題は、必要例数、対照群の取り扱いなどの手順を最適化することによって解決できる可能性が高い。従って、これらの試験を同時に並行して進めるのではなく、論理的に進めることによって、最小の実験数で最大の評価を進め、効率的なリスク判定が可能となるものと期待される。この点は下記、マイクロアレイ解析での成果においても補足する。

マイクロアレイ解析の成果としてあがってきた遺伝子リストは、これらの遺伝子発現変化について主成分分析をかけると、行動試験での異常行動と非常に相関が高い。既存のリスク因子（バルプロ酸、母子分離）との相対評価を行うことにより十分なリスク情報を得ることができる。

以上の結果を総合し、図 66 で示されるように、マイクロアレイ解析による一次スクリーニングを行った後に、行動解析や電気生理学的解析により安全域を確認するという段階的な評価システムとすることが評価系の検出力向上、頑健性向上につながるものと思われる。

＜図＞研究項目名１　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価基盤の確立

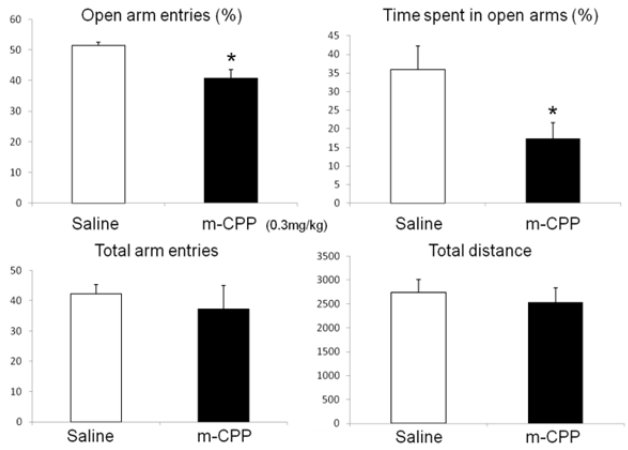


図 1　m-CPP 処置による高架式十字迷路試験での行動変化

*P < 0.05 vs Saline 処置群（Student's t-test）
Open arm entries：全アームへの侵入回数のうちオープンアーム侵入回数の割合
Time spent in open arms：測定時間中にオープンアームに滞在した時間の割合
Total arm entries：全アームへの侵入回数
Total distance：総移動距離
（以下の図でも同様）

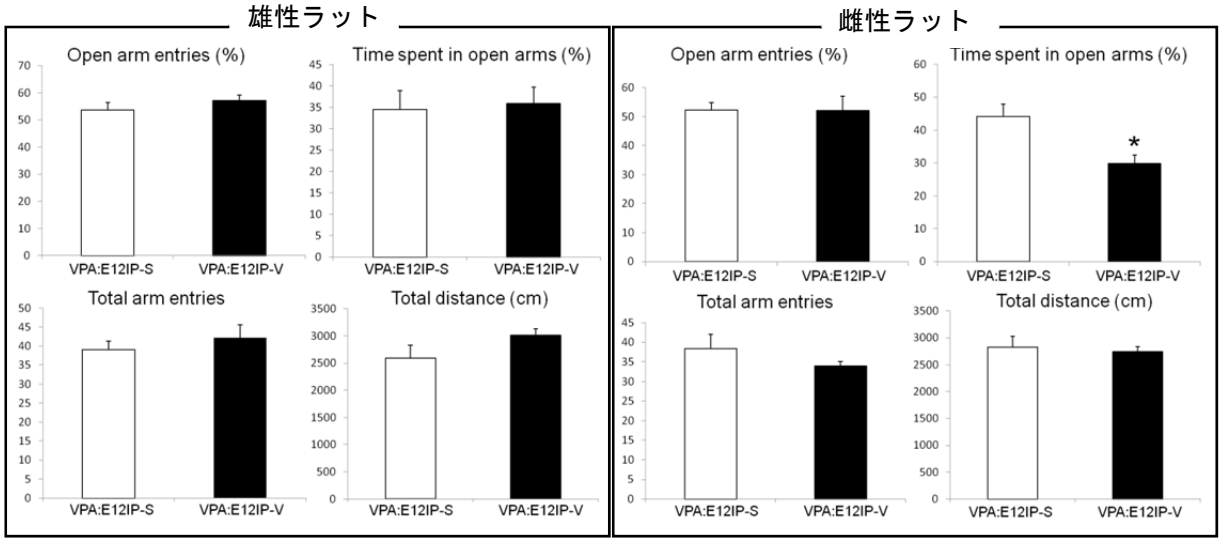


図 2　バルプロ酸胎生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（4 週齢）

*P < 0.05 vs VPA:E12IP-S 群（Student's *t*-test）

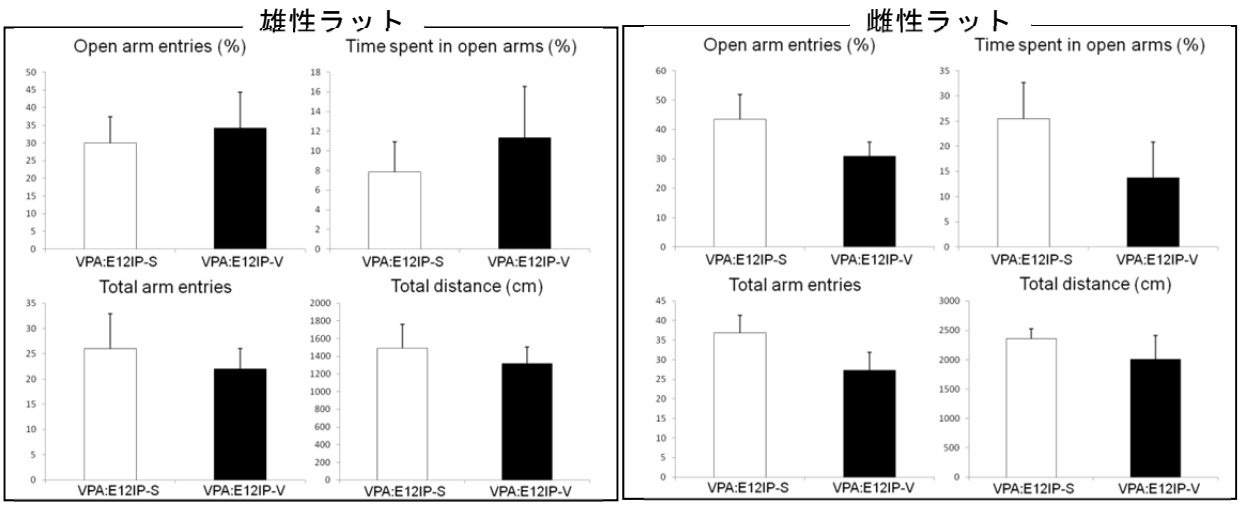


図 4 バルプロ酸胎生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（7 週齢）

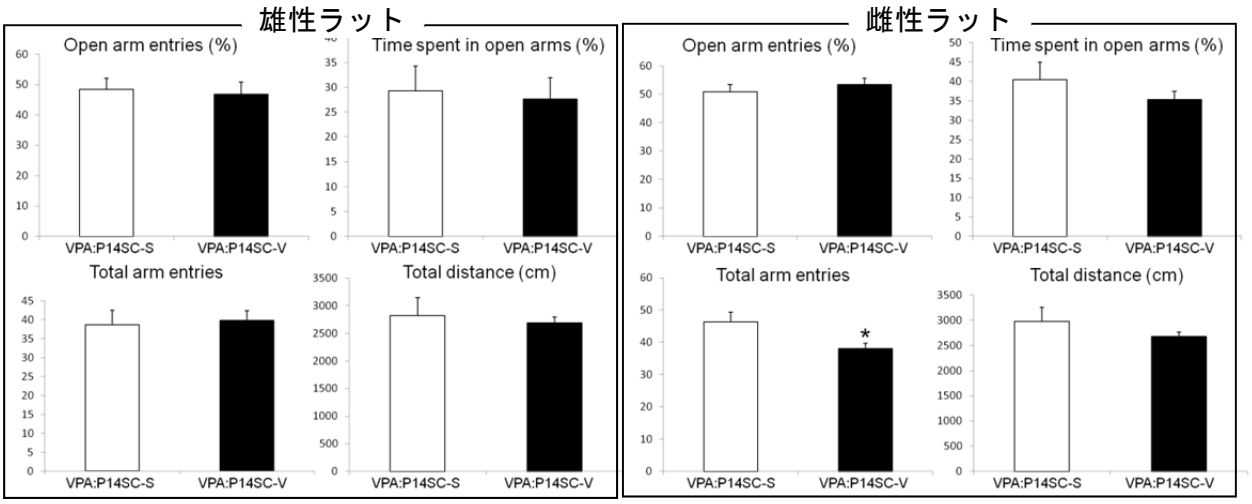


図 5 バルプロ酸新生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（4 週齢）

*P < 0.05 vs VPA:P14SC-S 群（Student's *t*-test）

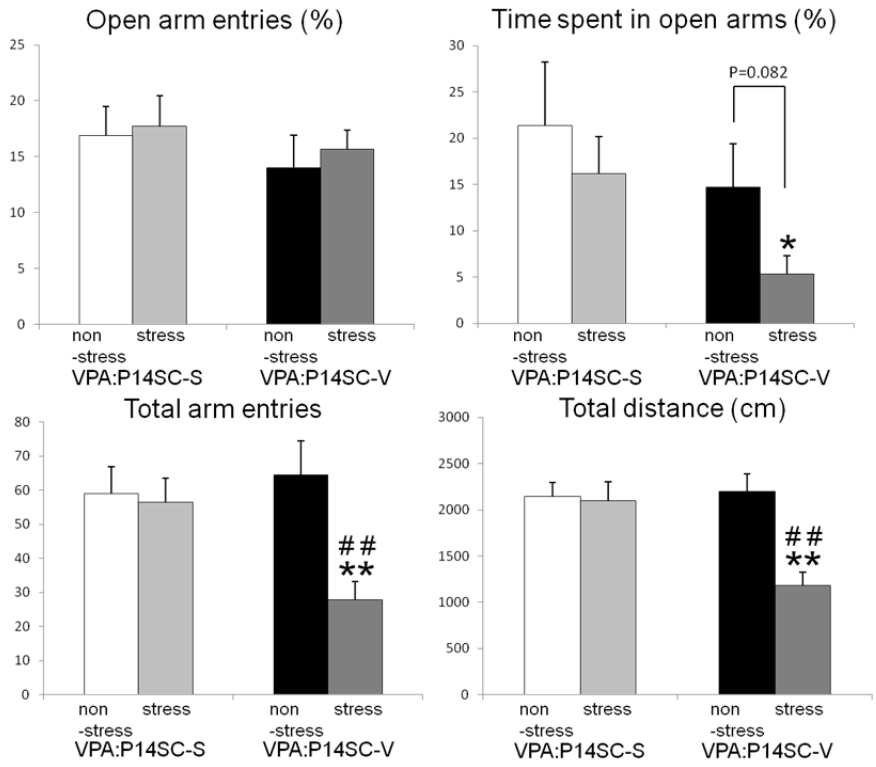


図 6 バルプロ酸新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷による高架式十字迷路試験での行動変化

（7 週齢・雄性ラット）

*,** P < 0.05, 0.01 vs ストレス負荷 VPA:P14SC-S 群（Student's t-test）

P < 0.01 vs 非ストレス負荷 VPA:P14SC-V 群（Student's t-test）

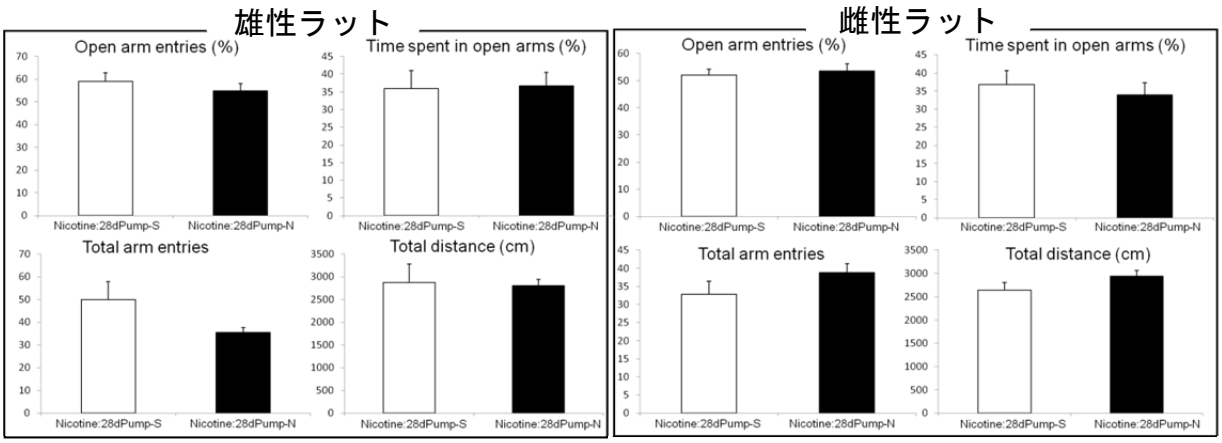


図 7　ニコチン胎生～新生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（4 週齢）

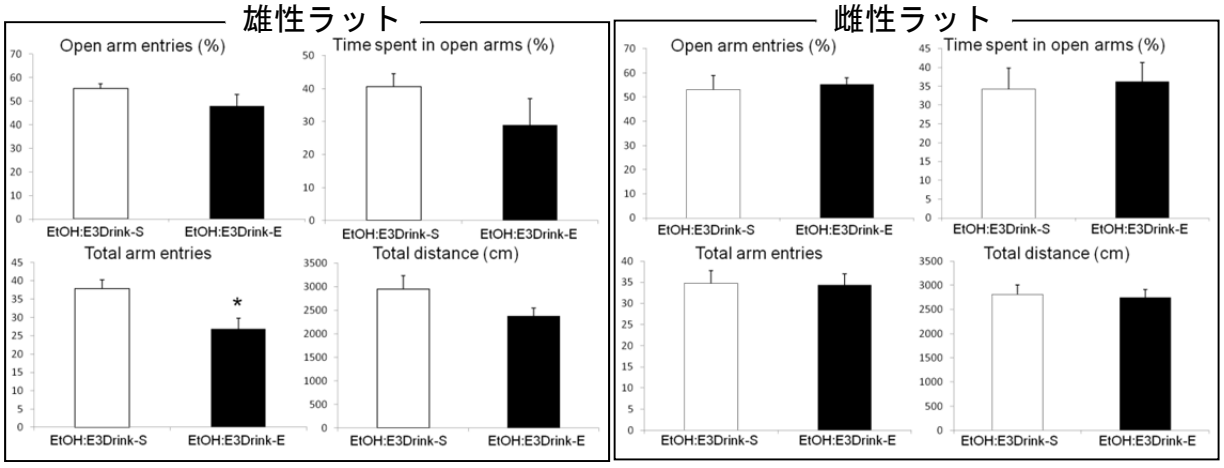


図 8　エタノール胎生～新生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（4 週齢）

*P < 0.05 vs EtOH:E3Drink-S 群（Student's *t*-test）

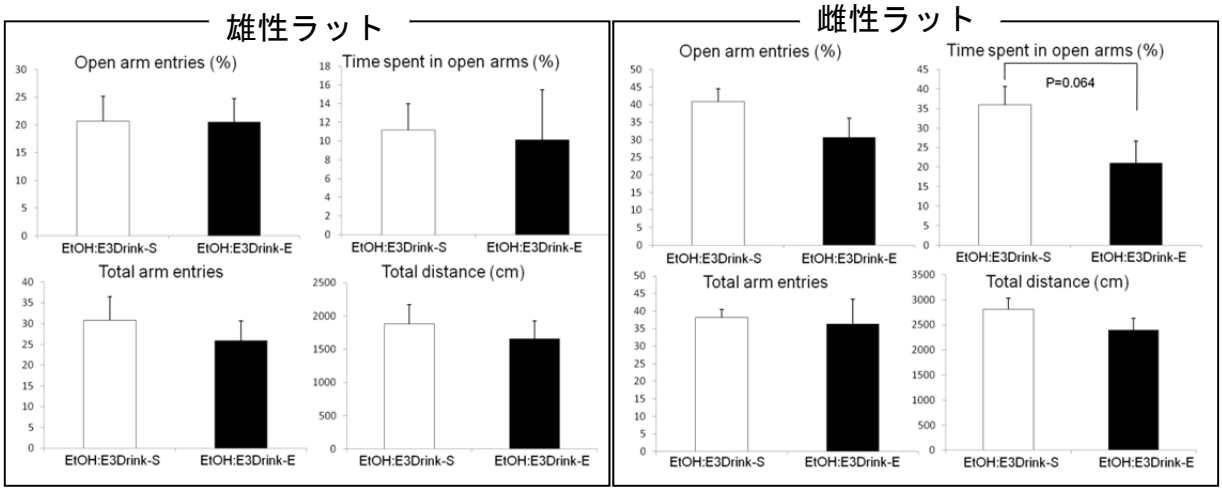


図 9　エタノール胎生～新生期処置による高架式十字迷路試験での行動変化（10 週齢）

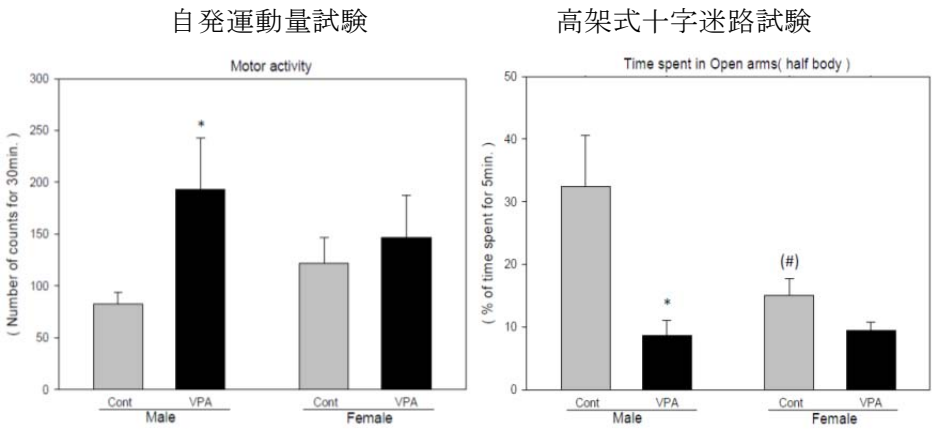


図 10 運動量ならびに高架式十字迷路試験におけるバルプロ酸処理の影響

自発運動量は，ワイヤレスホイール（ENV-044）を用いて，30 分間の回転数を記録した． 高架式十字迷路試験では，5 分間の測定時間のうちにオープンアーム上に上半身（剣状突起）までが進出，滞在した時間を記録した（*P<0.05, student's *t* test, n=13-15）.

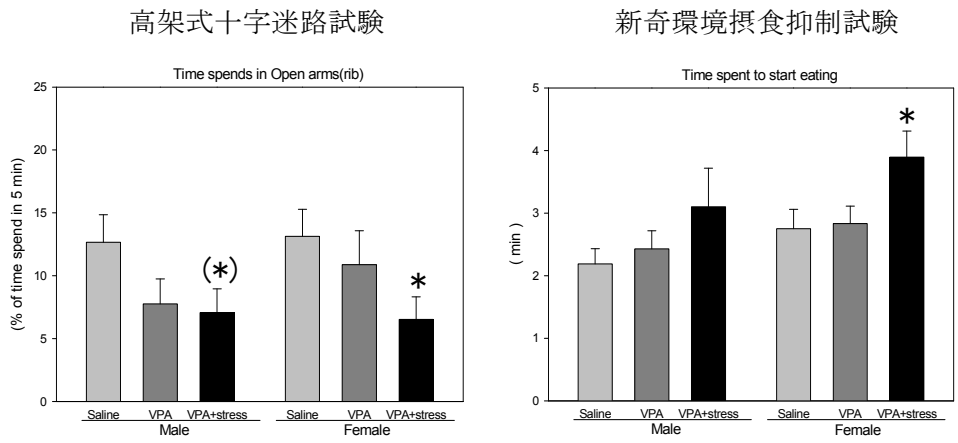


図 11. 高架式十字迷路試験ならびに新奇環境摂食抑制試験におけるバルプロ酸処理の影響（7 週齢）

高架式十字迷路試験は，5 分間の測定時間のうちに Open arm 上に上半身(剣状突起)までが進出，滞在した時間を記録した.新奇環境摂食抑制試験では，一晩絶食した動物を 70 cm 四方の空間に置き，中央に置いた餌を摂食するまでの時間を測定した（(*)P<0.10, *P<0.05, *t*-test, n=12）.

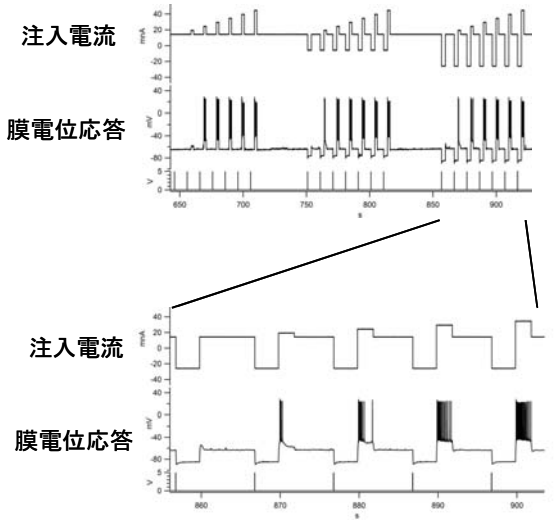


図 12 電流負荷プロトコル

１．Sag rebound (SR)の評価

手順１：過分極パルスで電位が-95~-85 mVに達した過分極ステップに注目する。

手順１－１：このとき、sag rebound が 1div以上ある？

Yes→SR=1 / No→SR=0 / 観察条件を満たさないので観察せず→N

２．Delayed excitation (DE)の評価

手順２：プレ過分極なし（0 mV）に注目する。

手順２－１：脱分極ステップが小さいとき、最初の活動電位まで遅れがある。

Yes→DErest=1 / No→DErest=0 / 観察条件を満たさないので観察せず→N

手順２－２：活動電位の頻度がdepoの後半で次第に上昇する。

Yes→DErestAP=1 / No →DErestAP=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

手順３：プレ過分極で-80 mV以下に達したときの脱分極ステップに注目する。

手順３－１：最初の活動電位までわずかな遅れがある。

Yes→DEhyper=1 / No→DEhyper=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

手順３－２：活動電位の頻度がdepoの後半で次第に上昇する。

Yes→DEhyperAP=1 / No →DEhyperAP=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

３．Firing patternの評価

手順４：プレ過分極なし（0 mV）で、APが発生しうる電位に達した脱分極パルス時に下記のパターンが見られたとき、それぞれの変数に1を入れる。記録状態や波形などで判定できないときは0とし、また、観察条件を満たさなかった時はN。

- □ Adaptation (ADAP): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が減少し、脱分極パルスが終わる前に出なくなる。
- □ Early burst (EB): 脱分極パルス開始直後にAPがバースト的に数発発生し、その後出ない
- □ Incrementing (INC): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が増加する
- □ Decrementing (DEC): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が減少する（が脱分極パルス中は出続ける）
- □ Regular firing (RF): 脱分極パルス中頻度の大きな変化なくコンスタントにAPが出続ける
- □ Late (after burst) ADP (lADP): 脱分極パルスの終了後、膜電位が-60 mV付近に戻るのが遅い。
- □ Fast ADP (fADP): 1発のAPの直後に小さな山のような形の脱分極が生じる
- □ Slow (after burst) AHP (sAHP): 脱分極パルスが終わった直後に-60mVよりもわずかに過分極し、その後-60 mV付近に戻る
- □ Fast AHP (fAHP): 1発のAPの直後に時間経過の速い谷状の過分極が生じる

４．OTおよびNAの作用

準備：膜電位固定モードに切り替え、-60 mVで膜電位を固定する。
縦軸を5 mV/1 cm、横軸を1 min /1 cm程度に表示させる。投与後、記録波形から下記を判定する。

- □ OTinward: OTによって膜電流の内向きシフトが生じる。
- □ OToutward: OTによって膜電流の外向きシフトが生じる。
- □ OTnoresp: OTによって検出可能な変化が見られない。

- □ NAinward: NAによって膜電流の内向きシフトが生じる。
- □ NAoutward: NAによって膜電流の外向きシフトが生じる。
- □ NAnoresp: NAによって検出可能な変化が見られない。

図 13 ニューロン興奮性判定チャート

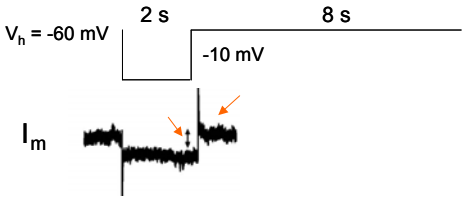


図 14 膜電流測定時の膜電位固定保持電位コマンド

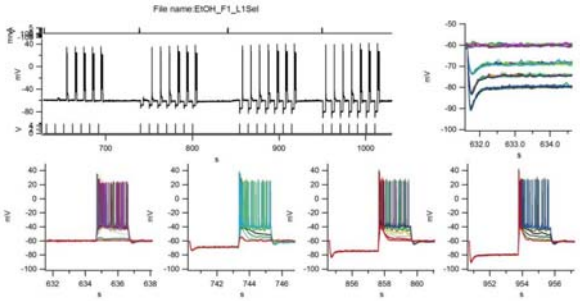


図4　膜電位応答特性定量化画面の例
図 15 膜電位応答特性定量化画面の例

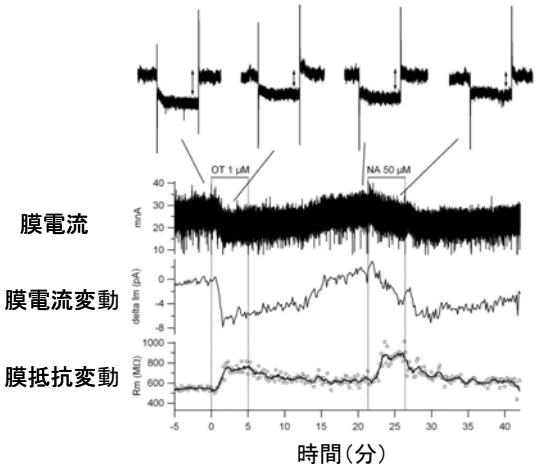


図 16 膜電位固定（-60 mV）に記録された OT および NA 投与による膜電流変動の記録

解析パラメーター
1 SR
2 DE21
3 DE22
4 DE31
5 DE32
6 ADAP
7 EB
8 INC
9 DEC
10 RF
11 IADP
12 fADP
13 sAHP
14 fAHP
15 OT hyper
16 OT Rinput up
17 OT freq up
18 OT amp up
19 NA hyper
20 NA Rinput up
21 NA freq up
22 NA amp up
23 OT no base change
24 OT Rinput no change
25 OT freq no change
26 OT amp no change
27 NA no base change
28 NA Rinput no change
29 NA freq no change
30 NA amp no change
31 OT depo
32 OT Rinput down
33 OT freq down
34 OT amp down
35 NA depo

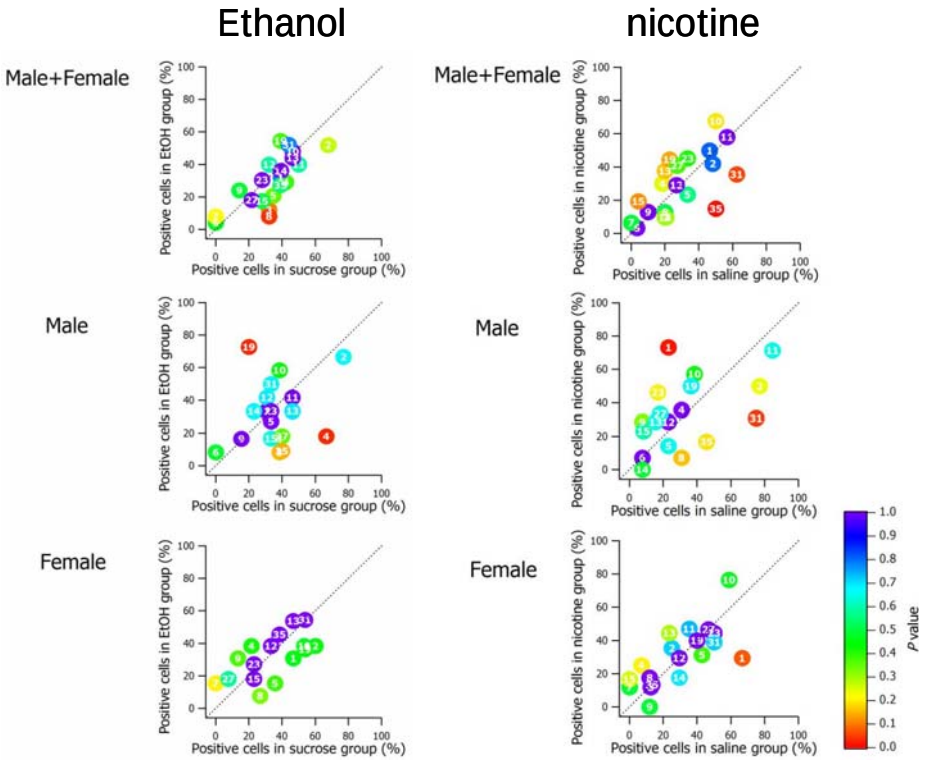


図6　膜電位変動発現率比解析

図 17 膜電位変動発現率解析

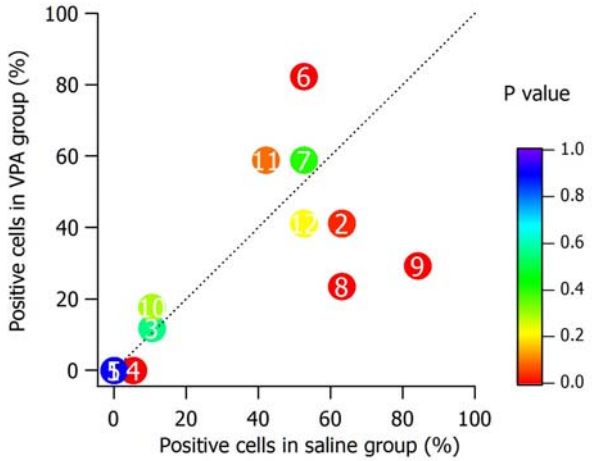


図 18 VPA による各ニューロンの興奮性指標の有意性プロット。カラースケールの値はカイ二乗検定による危険率。

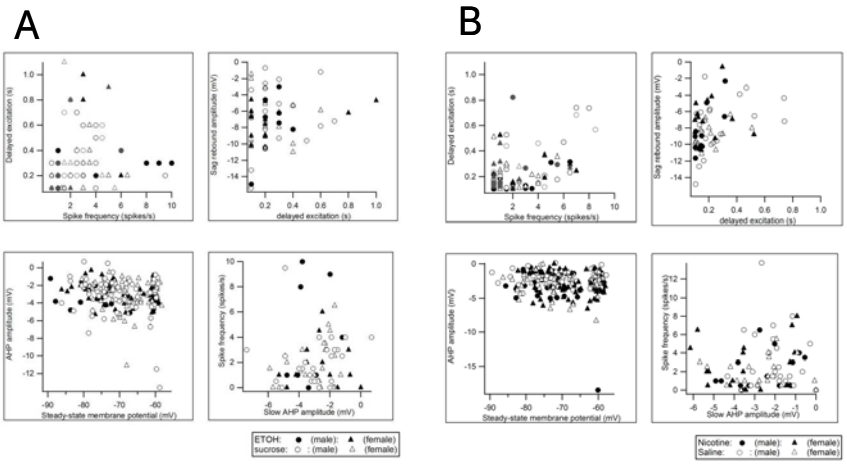


図 19 投与群（A, エタノール; B, ニコチン）と対照群の各種閾値下膜電位応答の定量的比較の例

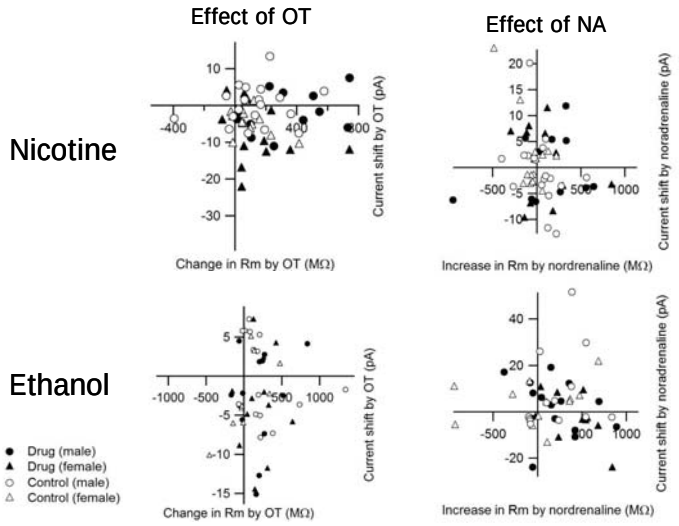


図 20 投与群（エタノールおよびニコチン）と対照群のニューロンの OT および NA による膜電流（縦軸）および膜抵抗（横軸）におよぼす影響の定量的比較の例

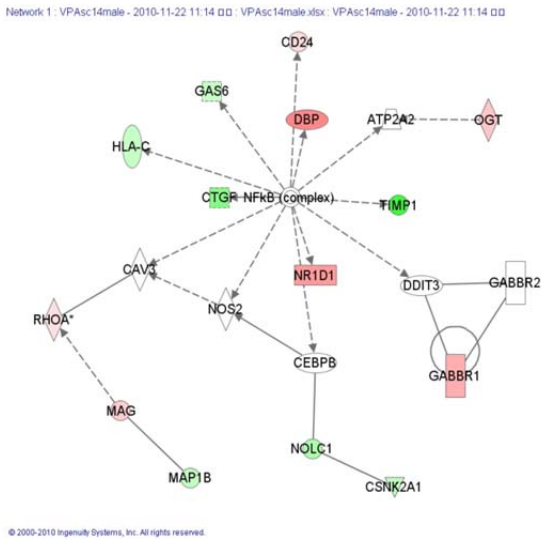


図 21 雄 VPA:P14SC における相関図

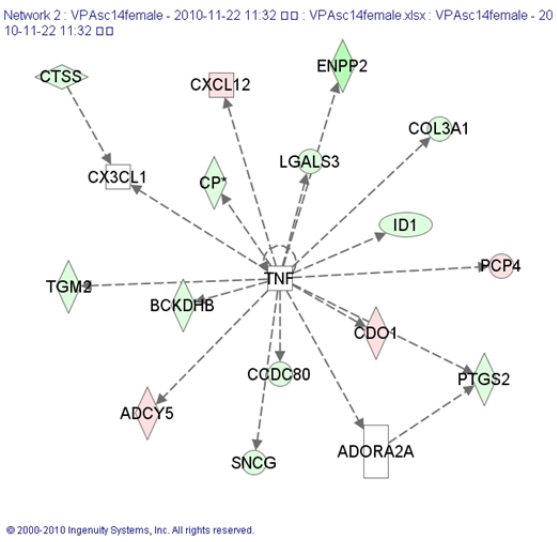


図 22 雌 VPA:P14SC における相関図

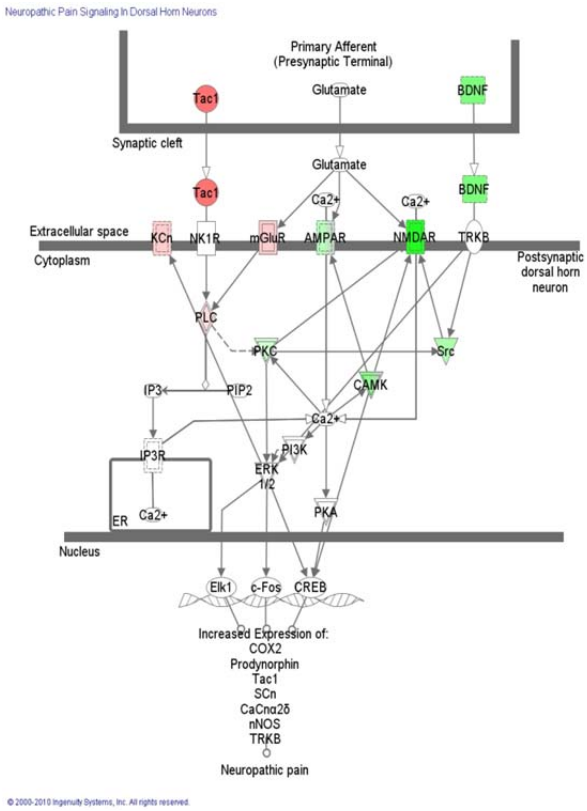


図 23-1

図 23 雄 VPA:P14SC 発現変動における既知のパスウェイとの相関

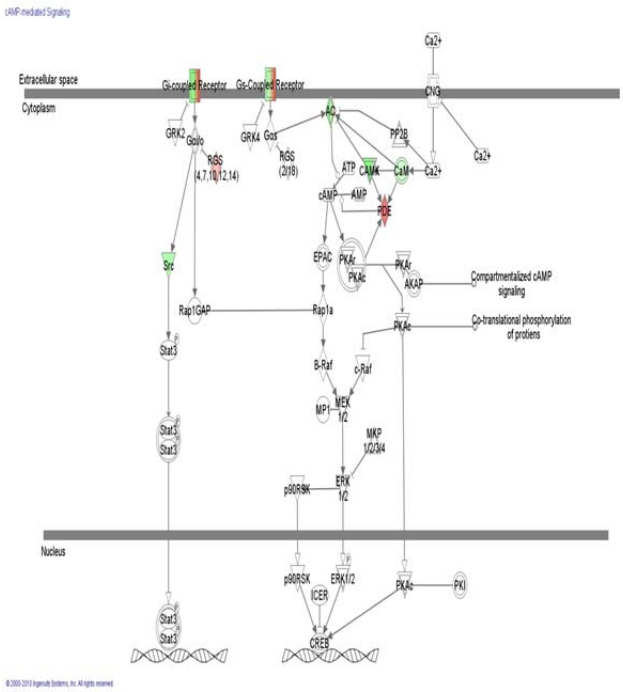


図 23-2

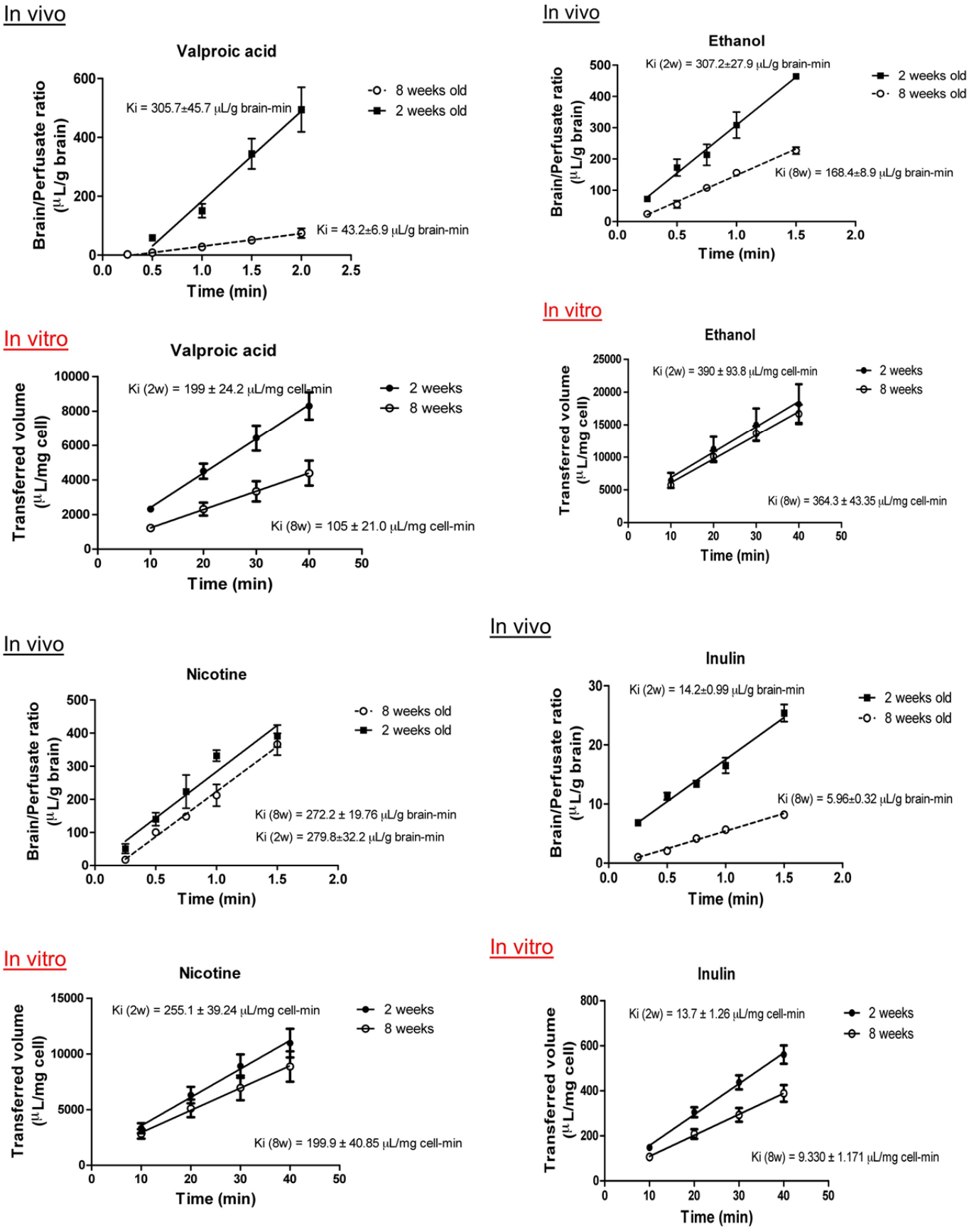


図 24　*In vivo* 及び *in vitro* BBB モデルを用いた、各種薬物の脳内移行性タイムコースの比較

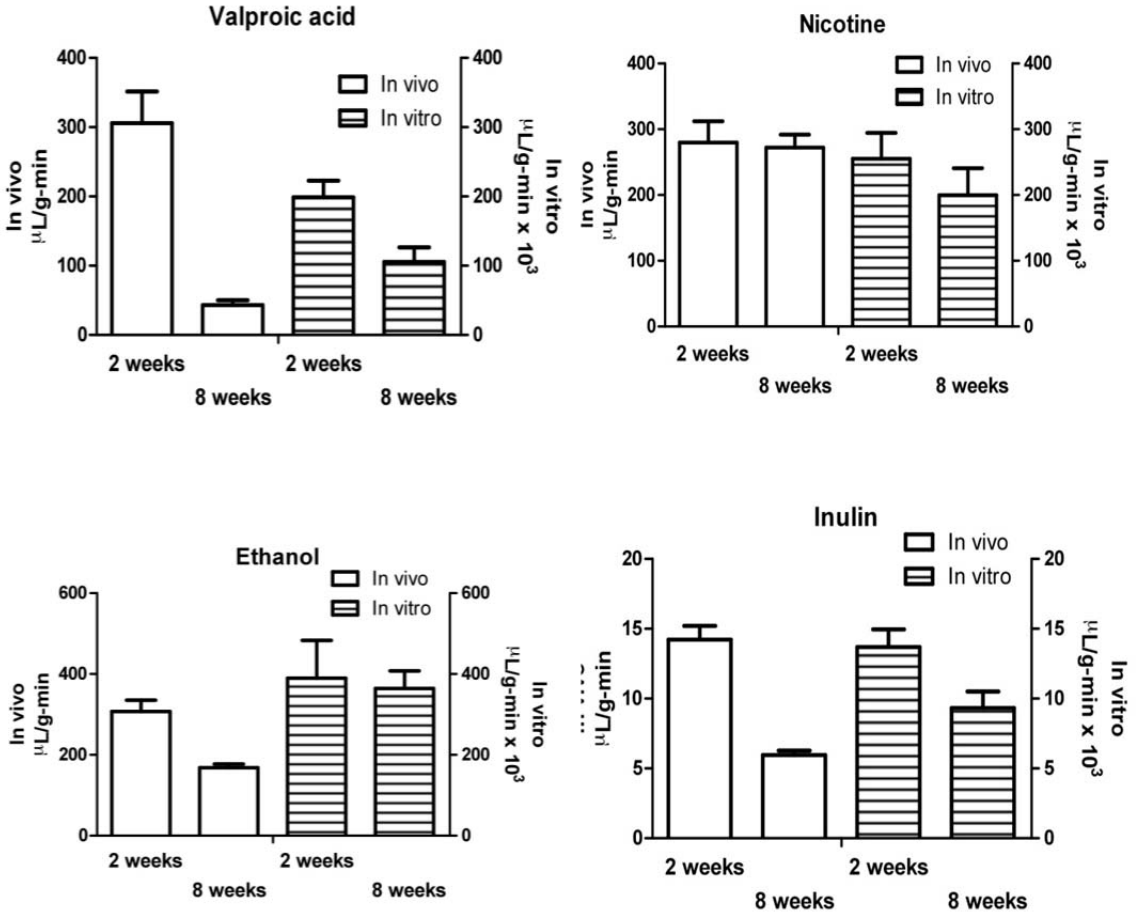
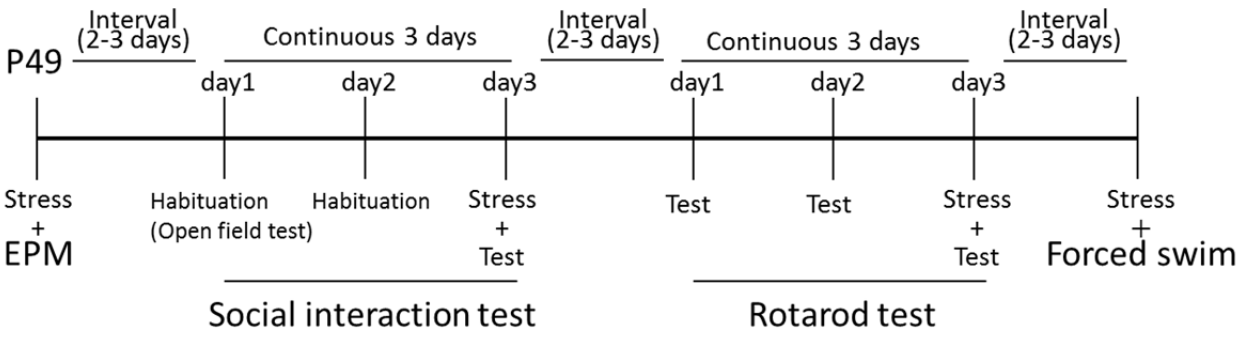


図 25　*In vivo* 及び *in vitro* BBB モデルを用いた、各種薬物の脳内移行性（Ki 値）の比較から算出した、各週齢（2 及び 8 週齢）におけるそれぞれの薬物の Ki 値を、*in vivo*（左側のオープンカラム）、*in vitro*（右側の横線カラム）BBB モデル毎に示した。



研究項目名２　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価系の効率化および高精度化

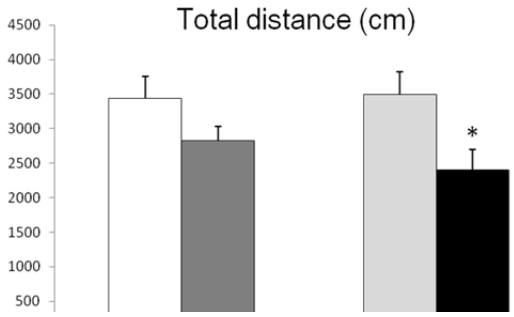


図 26　行動薬理学的試験のタイムスケジュール

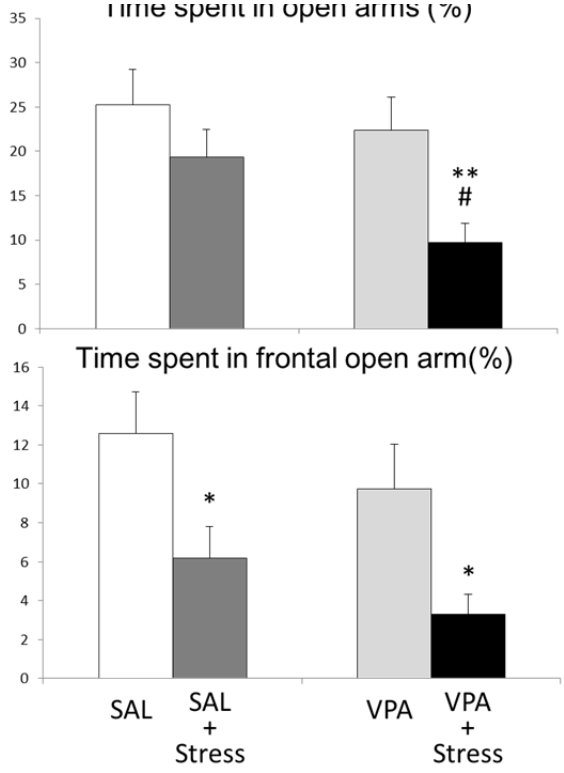


図 27　バルプロ酸新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷による高架式十字迷路試験での行動変化（各群 n = 20）

*, ** P < 0.05, 0.01 vs 非ストレス負荷群、# P < 0.05 vs SAL 群（Student's t-test）

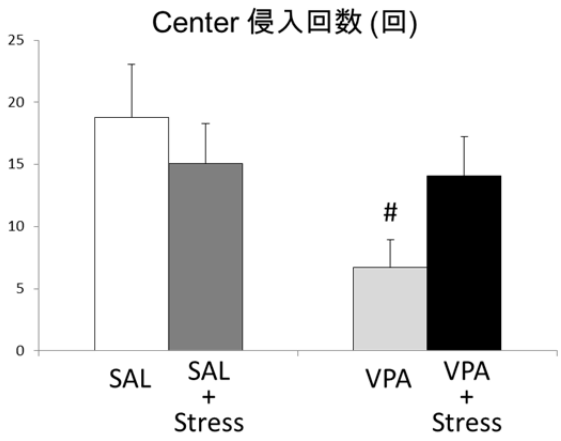


図 28 バルプロ酸新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷によるオープンフィールド試験での行動変化（各群 n = 10）

#, P < 0.05 vs SAL 群（Student's t-test）

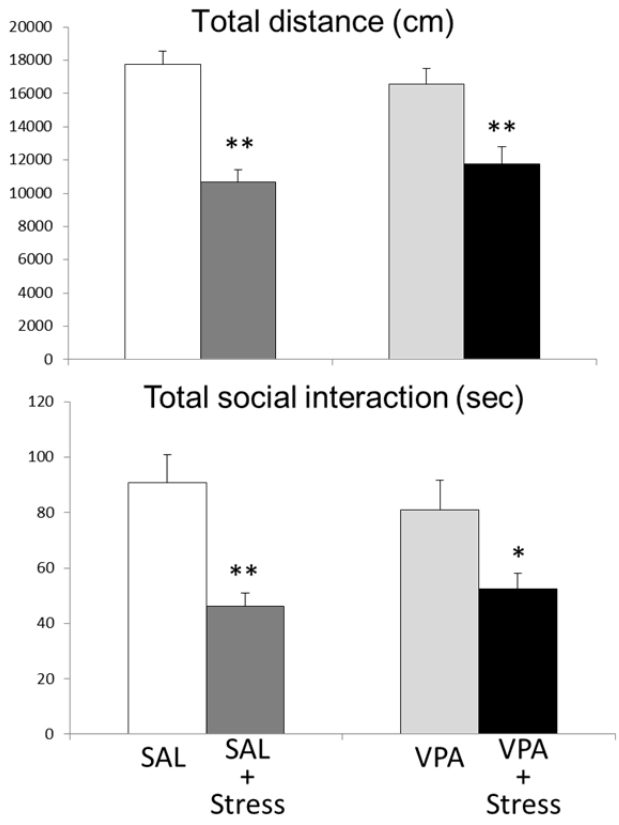


図 29 バルプロ酸新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷によるソーシャルインターラクション試験での行動変化（各群 n = 10）

*, ** P < 0.05, 0.01 vs 非ストレス負荷群（Student's t-test）

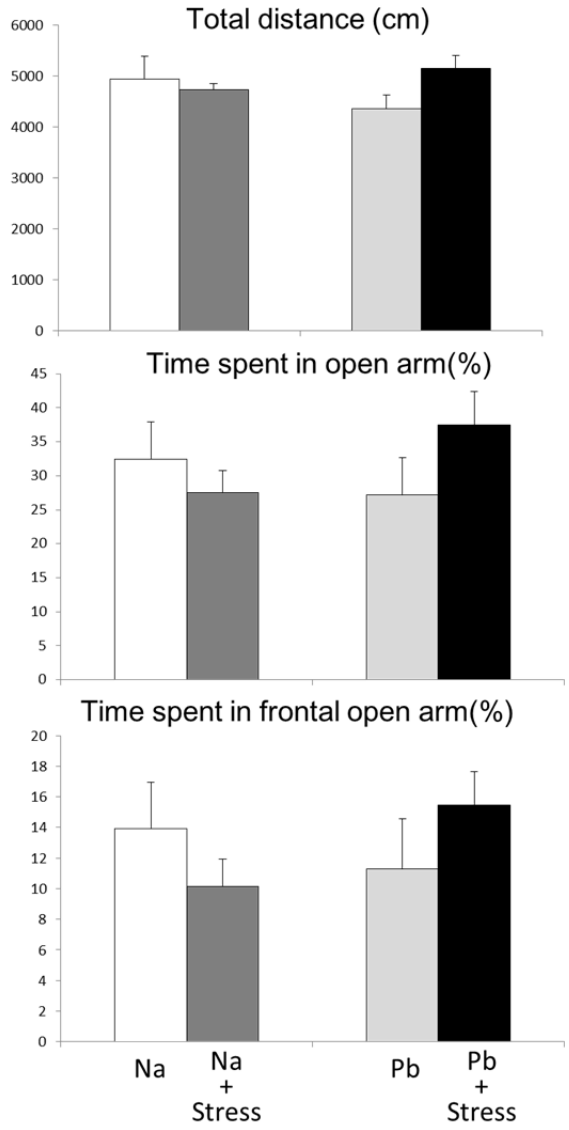


図 30 鉛胎生～新生期処置ならびに拘束ストレス負荷による高架式十字迷路試験での行動変化 （各群 n = 10）

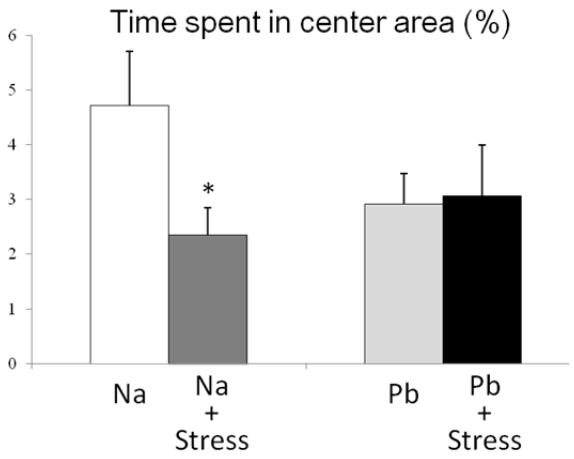


図 31 鉛胎生～新生期処置ならびに拘束ストレス負荷によるオープンフィールド試験での行動変化 （各群 n = 10）
*, P < 0.05 vs 非ストレス負荷群
（Student's t-test）

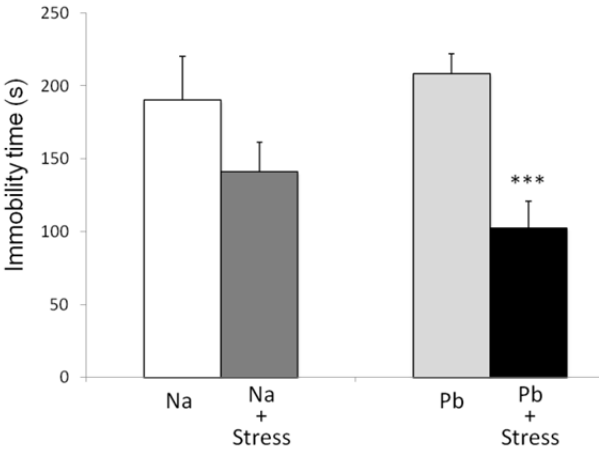


図 32 鉛胎生～新生期処置ならびに拘束ストレス負荷による強制水泳試験での行動変化 （各群 n = 10）
***, P < 0.001 vs 非ストレス負荷群
（Student's t-test）

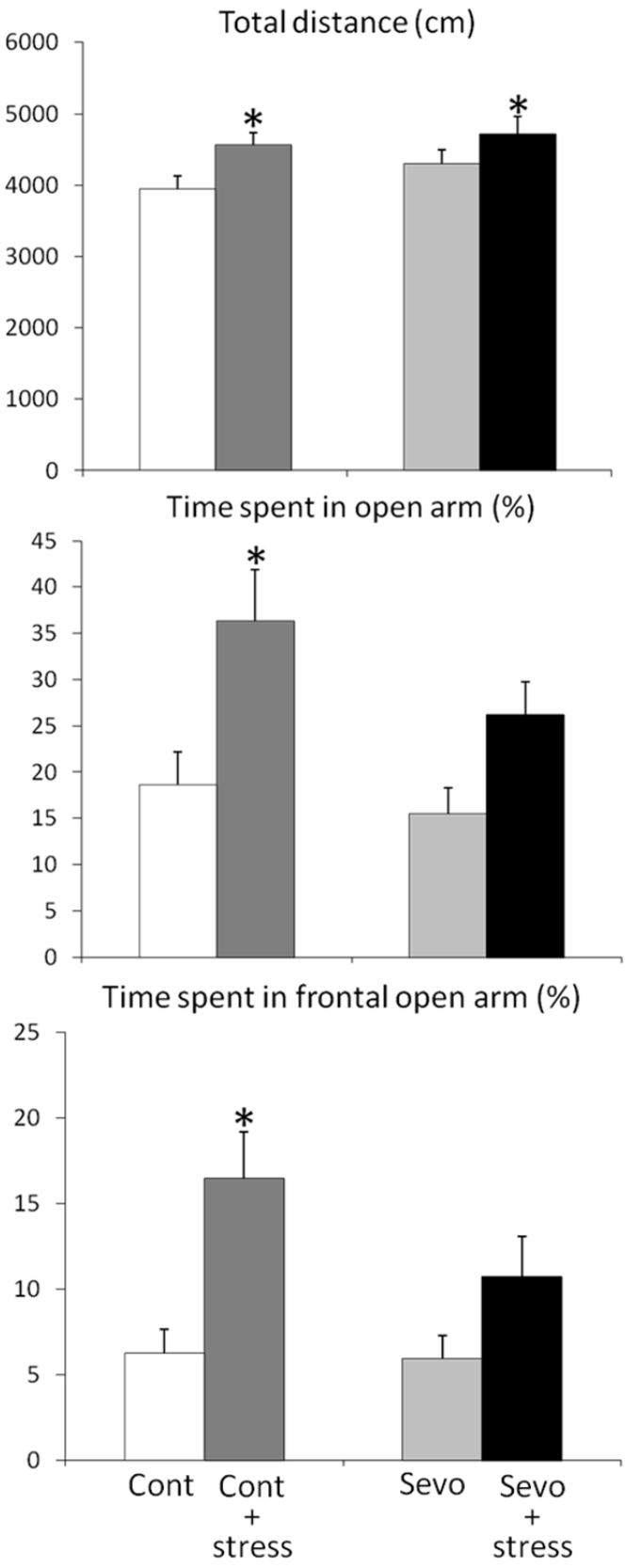


図 33 セボフルラン新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷による高架式十字迷路試験での行動変化 （各群 n = 10）* P < 0.05 vs 非ストレス負荷群（Student's t-test）

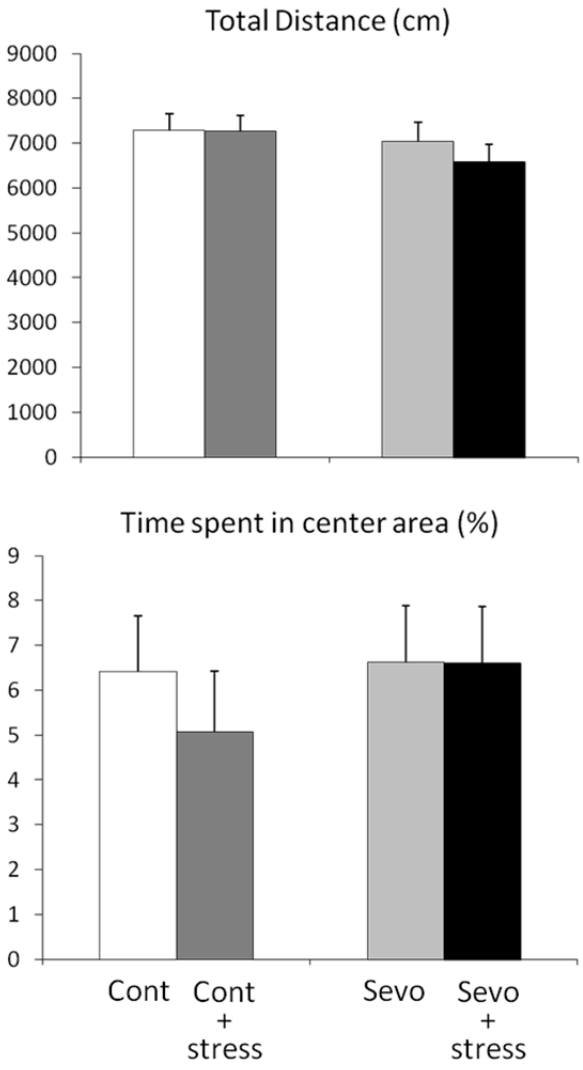


図 34 セボフルラン新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷によるオープンフィールド試験での行動変化（各群 n = 10）

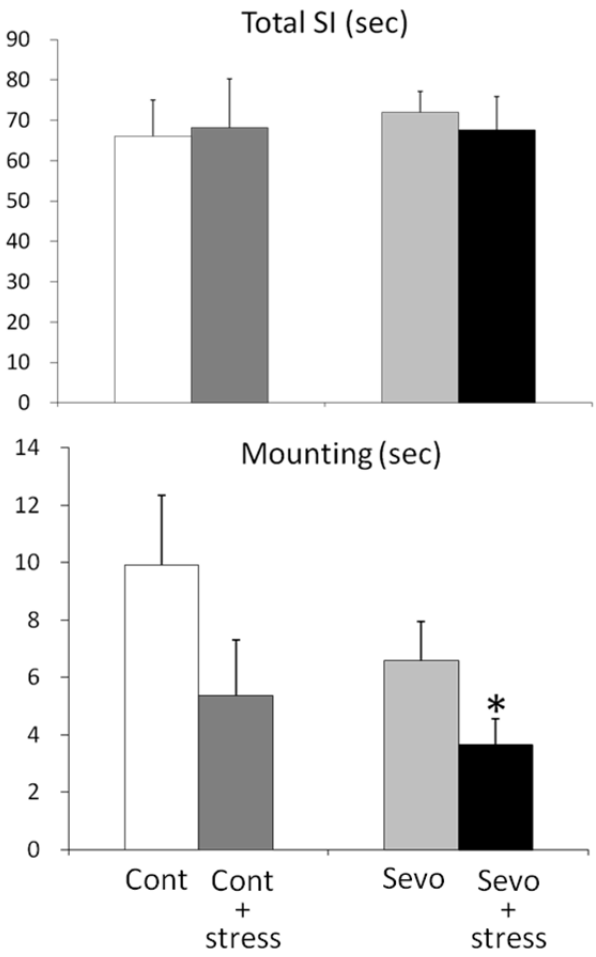


図 35 セボフルラン新生期処置ならびに強制水泳ストレス負荷によるソーシャルインターラクション試験での行動変化（各群 n = 10）
*P < 0.05 vs 非ストレス負荷 Cont 群
（Student's t-test）

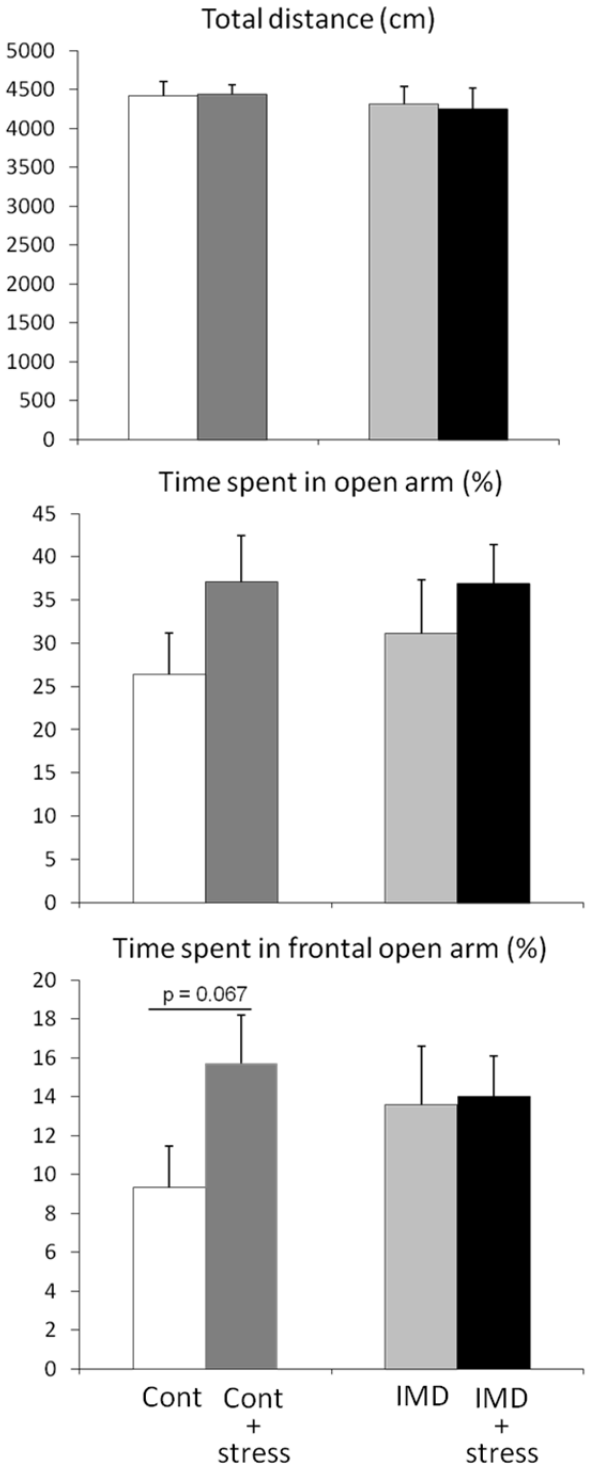


図 36 イミダクロプリド胎生期処置ならびに拘束ストレス負荷による高架式十字迷路試験での行動変化 （各群 n = 10）

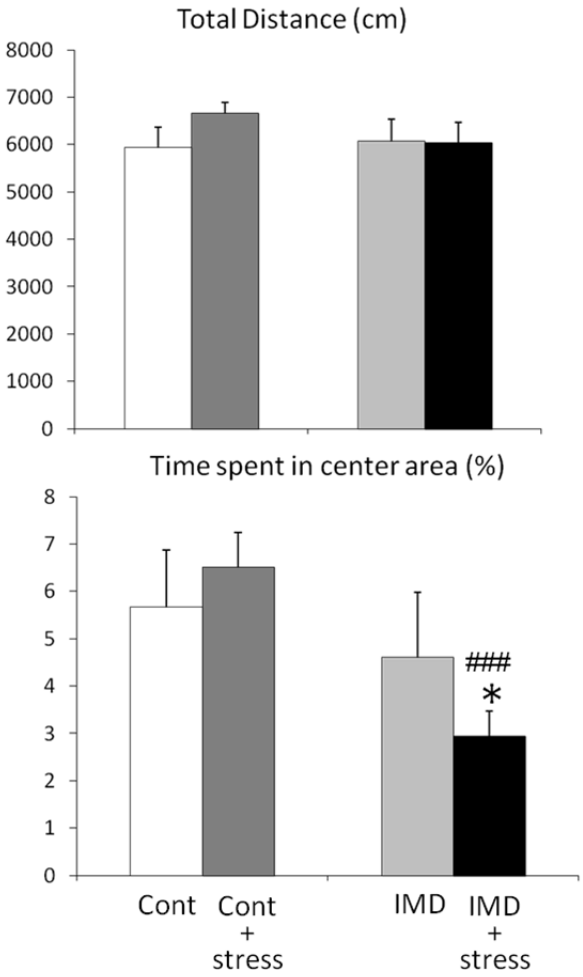


図 37 イミダクロプリド胎生期処置ならびに拘束ストレス負荷によるオープンフィールド試験での行動変化 （各群 n = 10）
* P < 0.05 vs 非ストレス負荷 Cont 群、### P < 0.001 vs ストレス負荷 Cont 群
（Student's t-test）

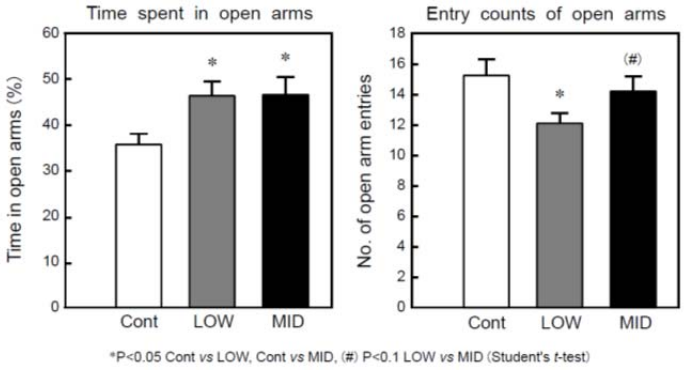


図 38 高架式十字迷路試験におけるイミダクロプリド処理の影響（5 週齢）

高架式十字迷路試験では 5 分間の測定時間のうちにオープンアーム上に進出，滞在した時間と回数を記録した。
（(#)P<0.10 vs LOW，*P<0.05 vs Cont，*t*-test，n=12）

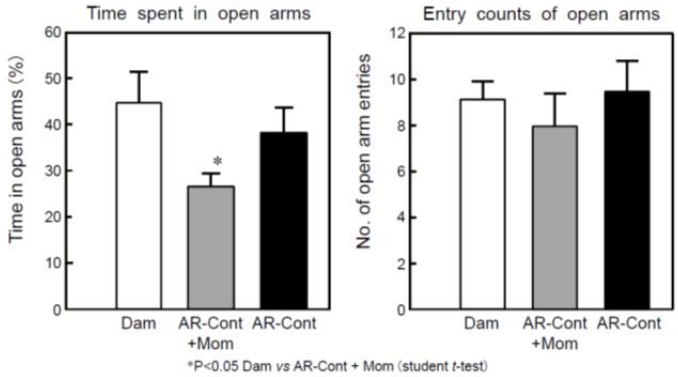


図 39 高架式十字迷路試験における人工飼育の影響（5 週齢）

高架式十字迷路試験では，5 分間の測定時間のうちにオープンアーム上に進出，滞在した時間と回数を記録した.
（*P<0.05 vs Dam，*t*-test，n=12）

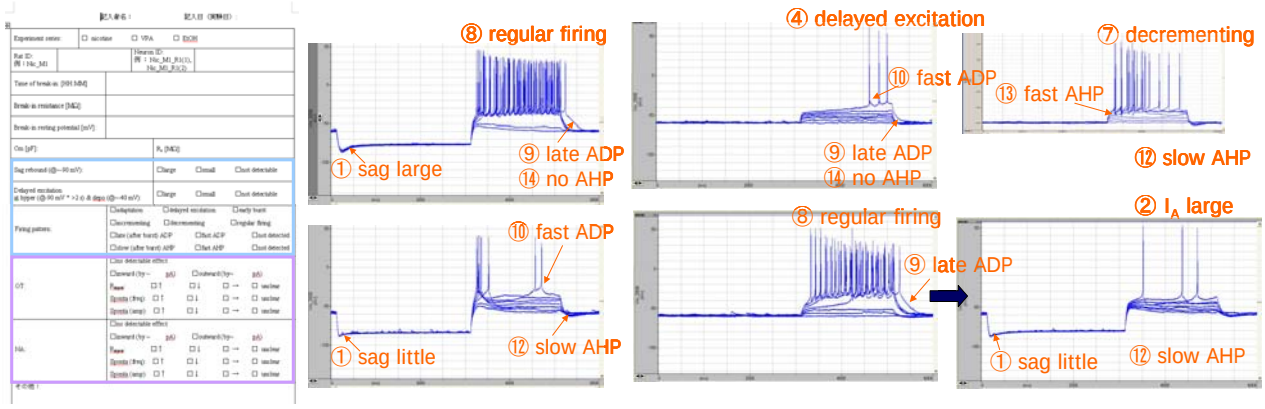


図 40 実際のニューロンにおけるプロトコル実施記録の例

扁桃体ニューロン興奮性におよぼす被験物質の影響の網羅的解析
発現率有意差カラープロット

1	Sag: large	**8**	regular firing
2	Delayed excitation	**9**	late ADP
3	Spike adaptation	**10**	fast ADP
4	delayed excitation	**11**	no ADP
5	Early burst	**12**	slow AHP
6	Incrementing firing	**13**	fast AHP
7	decrementing firing	**14**	no AHP

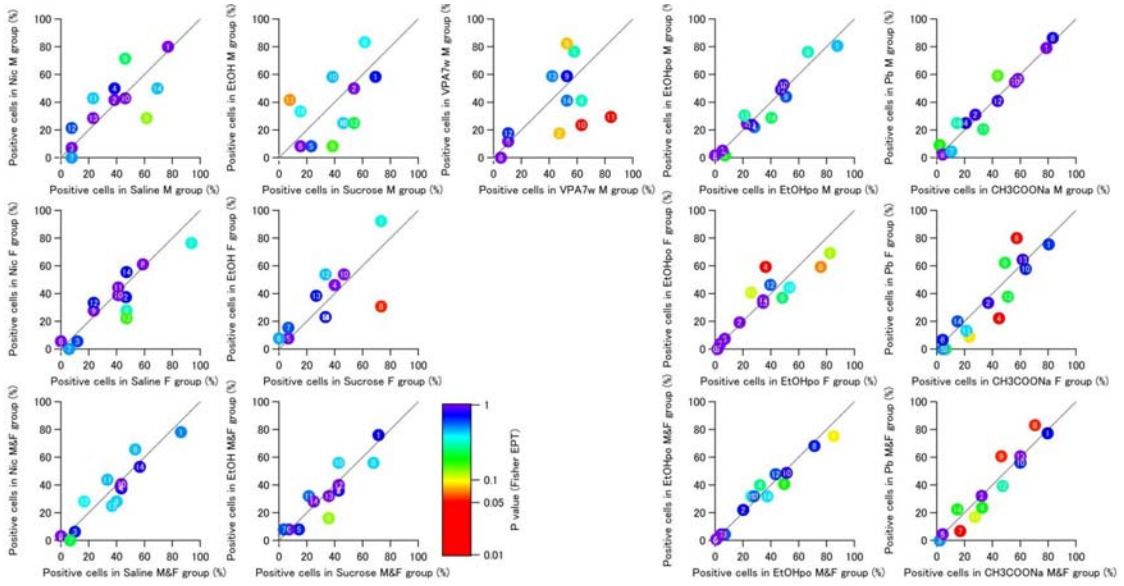


図 41

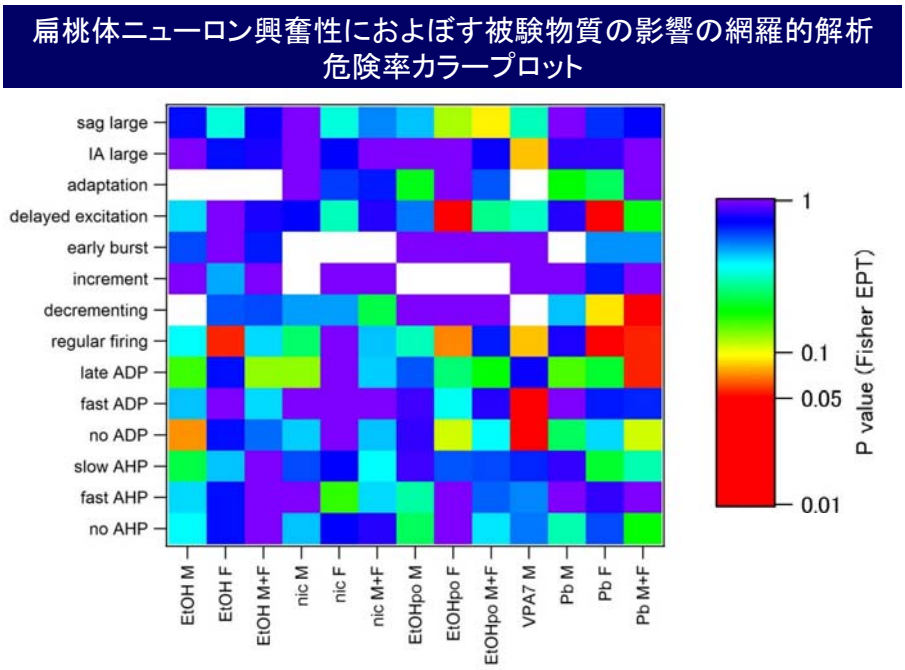


図 42　水平方向に各電気生理学応答のパラメーター名、垂直方向に各被験物質処置を格子状に並べ、それぞれの処置群の対照群に対する発現率の有意性を検定した危険率をカラースケールで表した

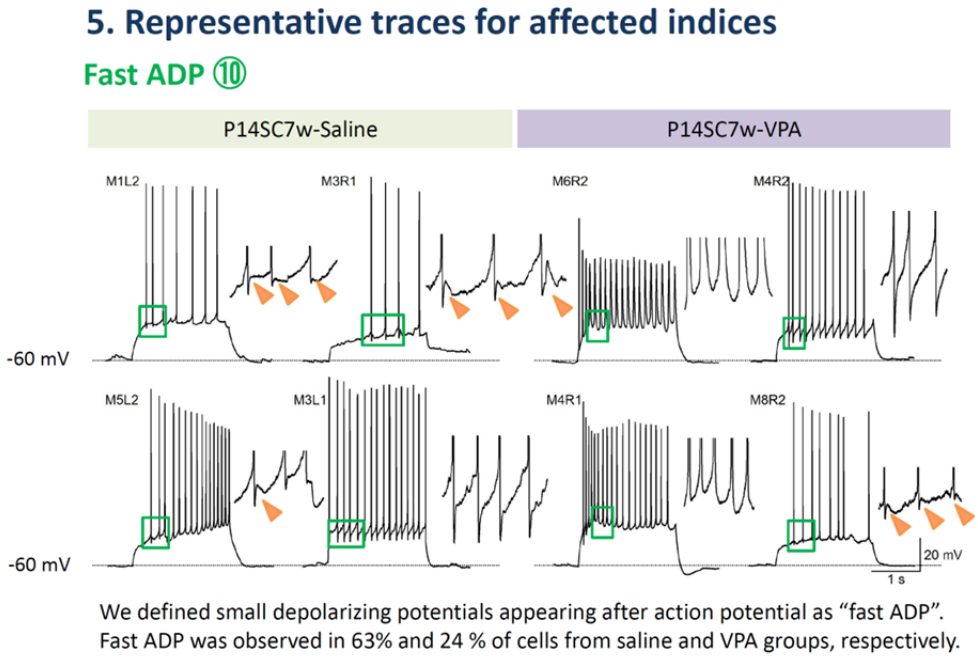
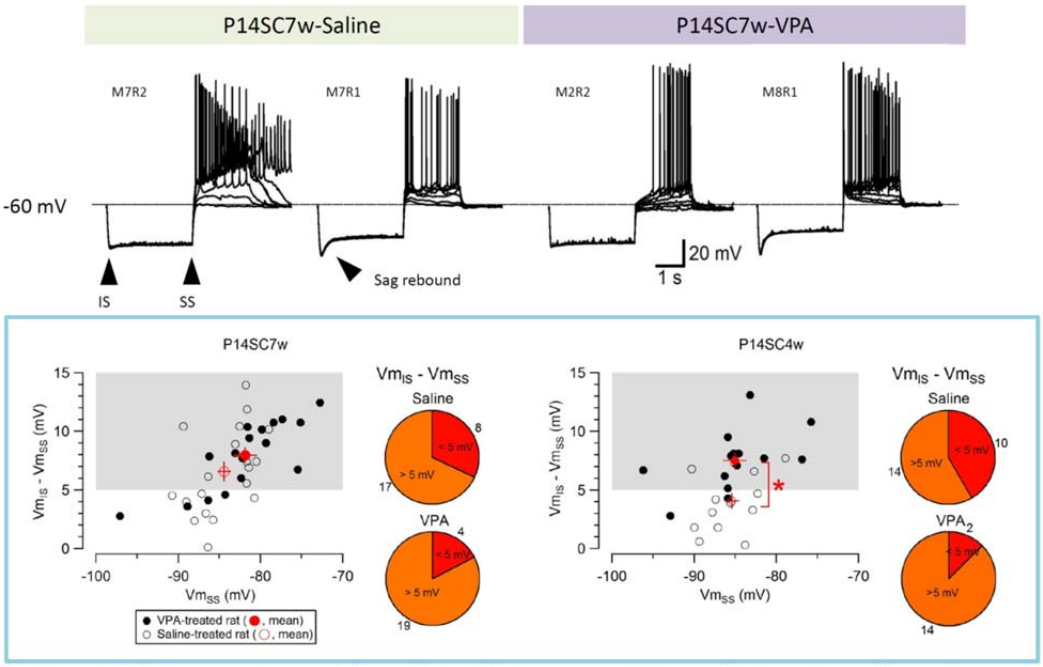


図 43

Hyperpolarization-activated potential (Sag-rebound) ①

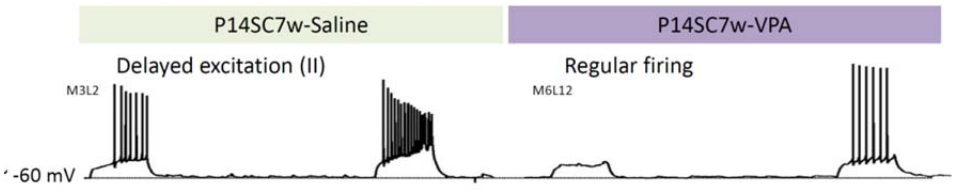


Most CeC/L neurons presented “sag rebound” in response to hyperpolarizing step with various amplitudes.

Top panels show representative traces from the cells showing large- (left) and small-sags (right) in saline- and VPA- groups. Bottom panels show the amplitude of “hyperpolarization-activated” non-inactivating depolarization in two groups. Vm_{IS}, membrane potential at initial state; Vm_{SS}, at steady state. Red circles indicate average ± SEM. *; P = 0.05, KS-test. The pie charts indicate the fraction of neurons showing a large (> 5 mV) hyperpolarization-activated depolarization.

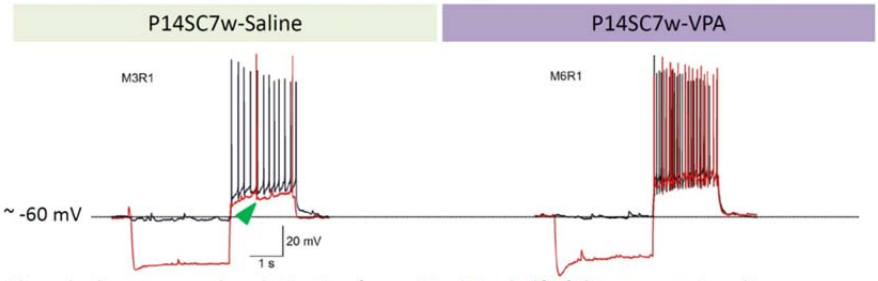
図 44

Firing pattern: ④ and ⑧



Delayed excitation (left) and regular firing (right) in response to depolarizing current injection are among the most frequently observed firing patterns in saline- and VPA-treated groups, respectively.

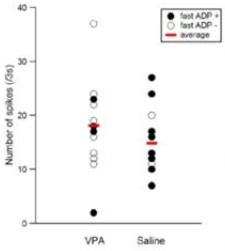
Delayed excitation only after hyperpolarization (I) ②



Though absent upon depolarization from -60 mV, a half of the neurons in saline group exhibited slower onset of firing when depolarized from hyperpolarized level, a phenotype less frequently observed in VPA-treated group.

Spike frequency & fast ADP

P14SC7w



P = 0.064, Mann-Whitney U-test

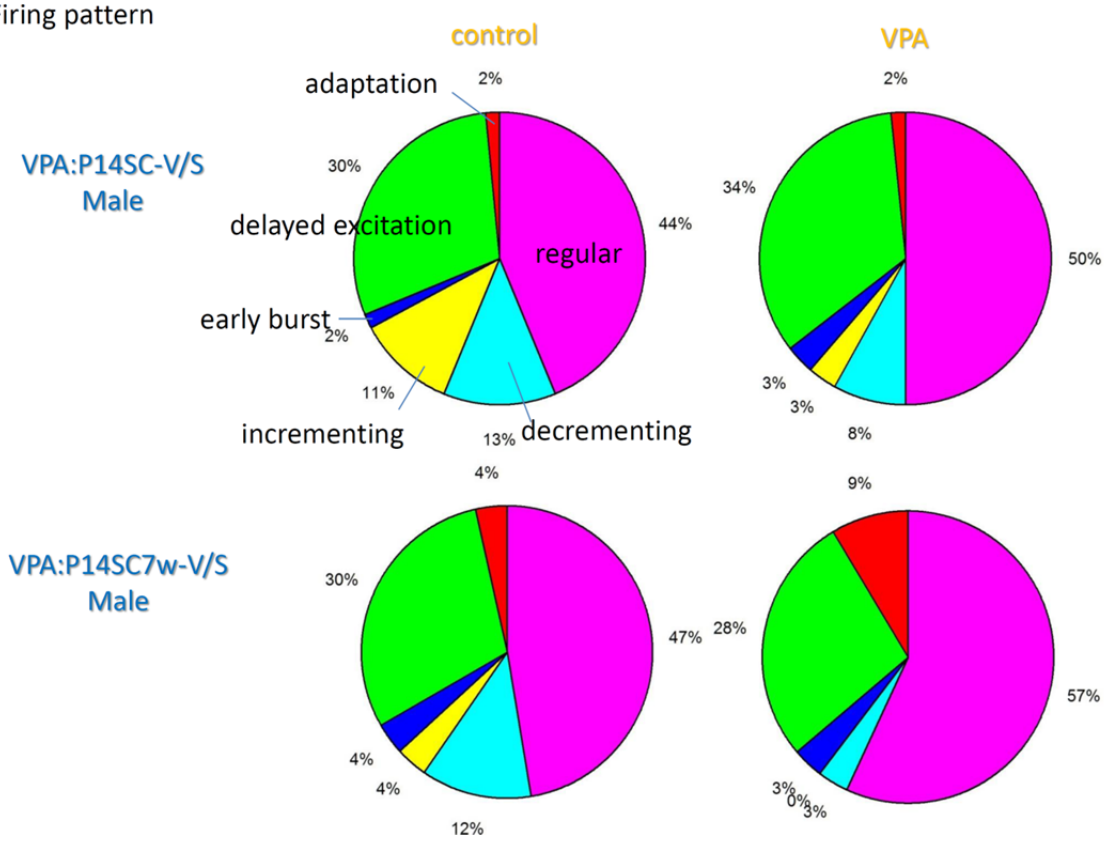
Passive membrane properties

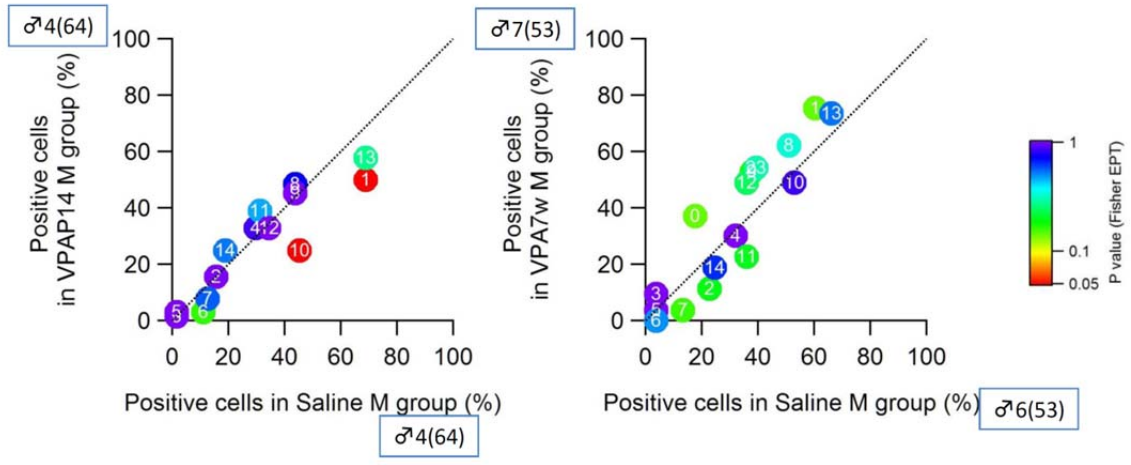
P14SC4w	Rinput (MΩ)	Vrest (mV)	Cm (pF)
VPA (n = 14)	228.1 ± 23.9	-63.5 ± 2.3*	13.8 ± 1.0
Saline (n = 14)	241.9 ± 27.5	-61.8 ± 1.9	14.9 ± 1.5
P14SC7w	**Rinput (MΩ)**	**Vrest (mV)**	**Cm (pF)**
VPA (n = 17)	224.7 ± 24.2	-60.2 ± 2.3	11.5 ± 1.1
Control (n = 19)	207.0 ± 16.3	-61.4 ± 2.3	18.4 ± 6.6

*; P < 0.005, Student t-test

図 45

Firing pattern



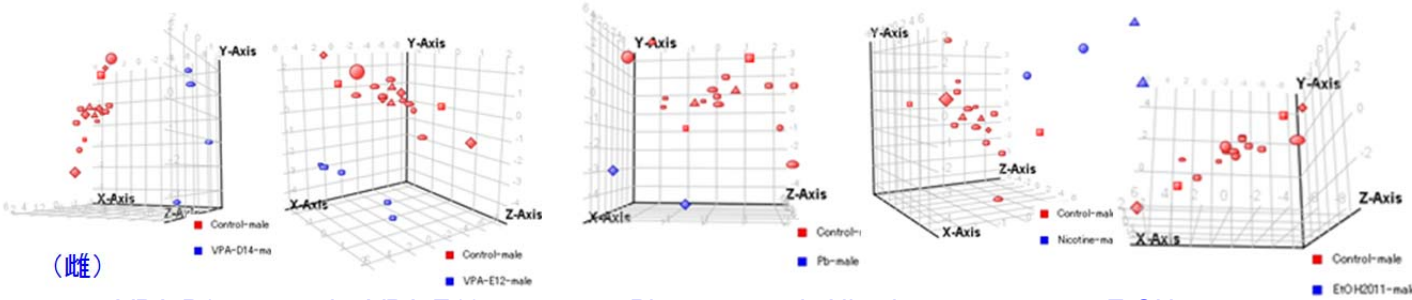


1	Sag: large
2	Delayed excitation
3	Spike adaptation
4	delayed excitation
5	Early burst
6	Incrementing firing
7	decrementing firing
8	regular firing

9	late ADP
10	fast ADP
11	no ADP
12	slow AHP
13	fast AHP
14	no AHP
0	fork-type AP
23	oscillation

（雄）

a. VPA-P14　　b. VPA-E12　　c. Pb　　d. Nicotine　　e. EtOH



（雌）

a. VPA-P14　　b. VPA-E12　　c. Pb　　d. Nicotine　　e. EtOH

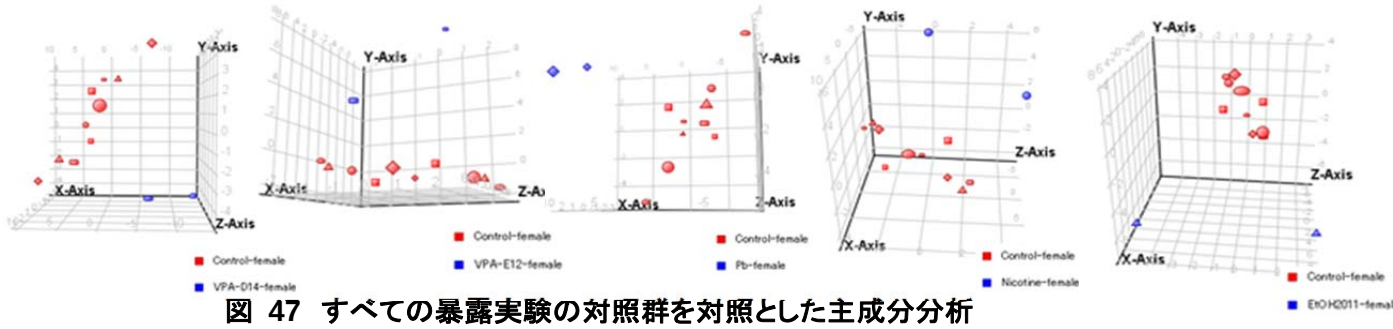
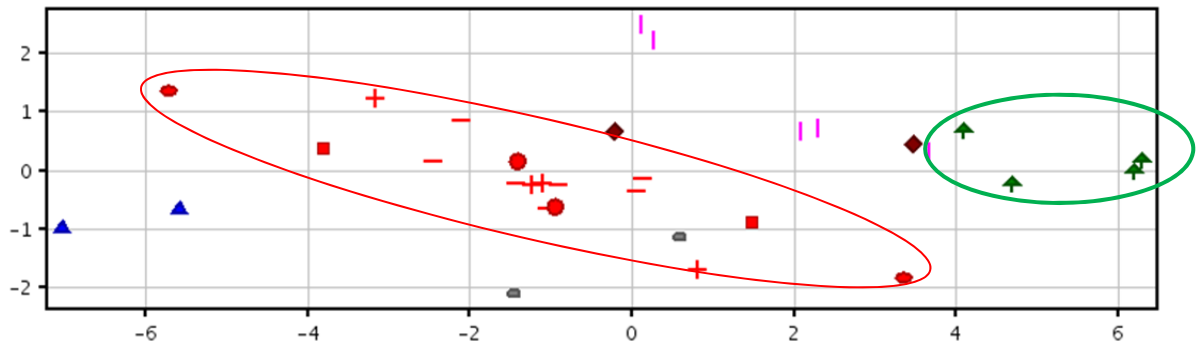
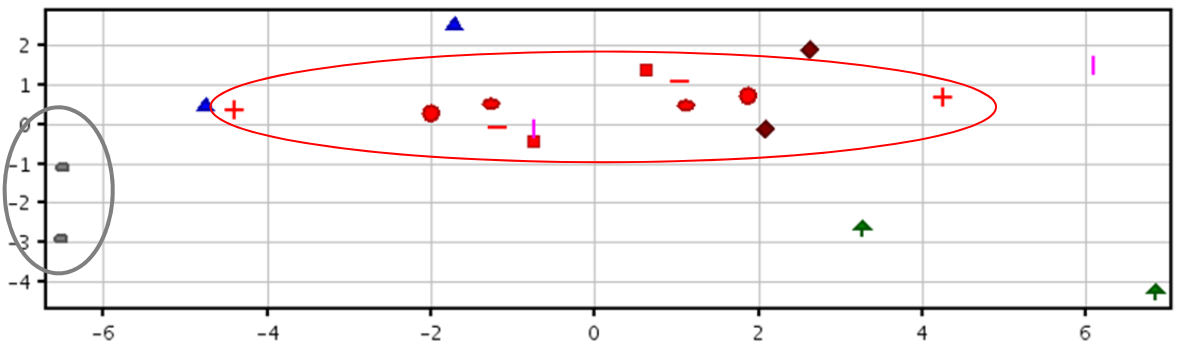


図 47　すべての暴露実験の対照群を対照とした主成分分析

13-1 ； 雄のすべてのサンプルの主成分分析

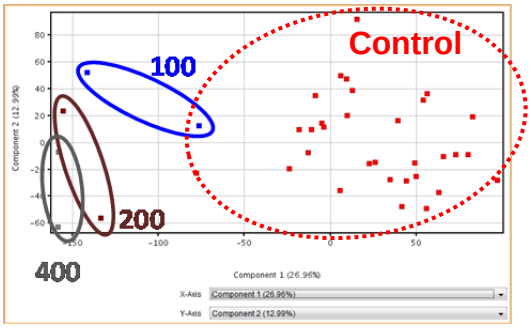


13-2 ； 雌のすべてのサンプルの主成分分析



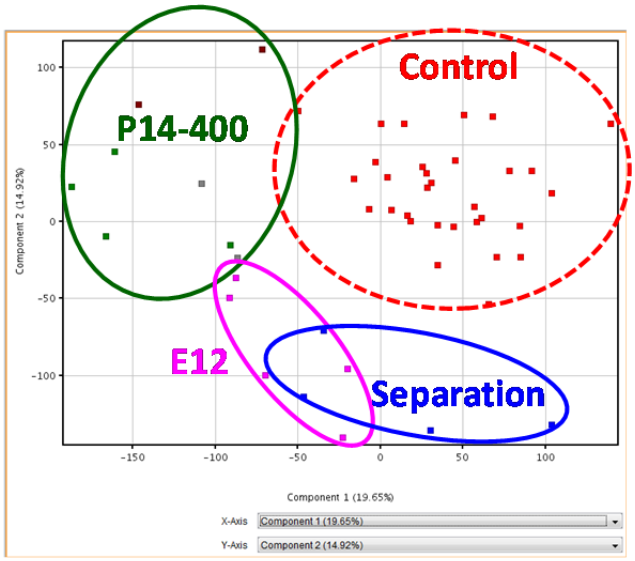
（赤：対照群、緑： VPA-P14 、ピンク： VPA-E12 、灰色：鉛、茶：ニコチン、青：エタノール）

図 48　雄は VPA-P14 を、雌は鉛をポジティブコントロールとして加えた主成分分析結果



左図のように、遺伝子変動現象の候補として決定したリストはすべて、バルプロ酸の用量作用性実験（ P14 ）において用量依存性を示した。

図 49 候補リストによるバルプロ酸の用量作用性実験結果



変動現象の候補リストはすべて、リスト作成の手がかりとしたバルプロ酸（ P14, E12 ）および母子分離群を対照群から明確に分離することができ、その際に各群は対象に対して同様な位置に分離されていることがわかる。

図 50 候補リストによるバルプロ酸（ P14, E12 ）および母子分離群の分離

とくに分離のきれいだった候補リスト 1 を示す。

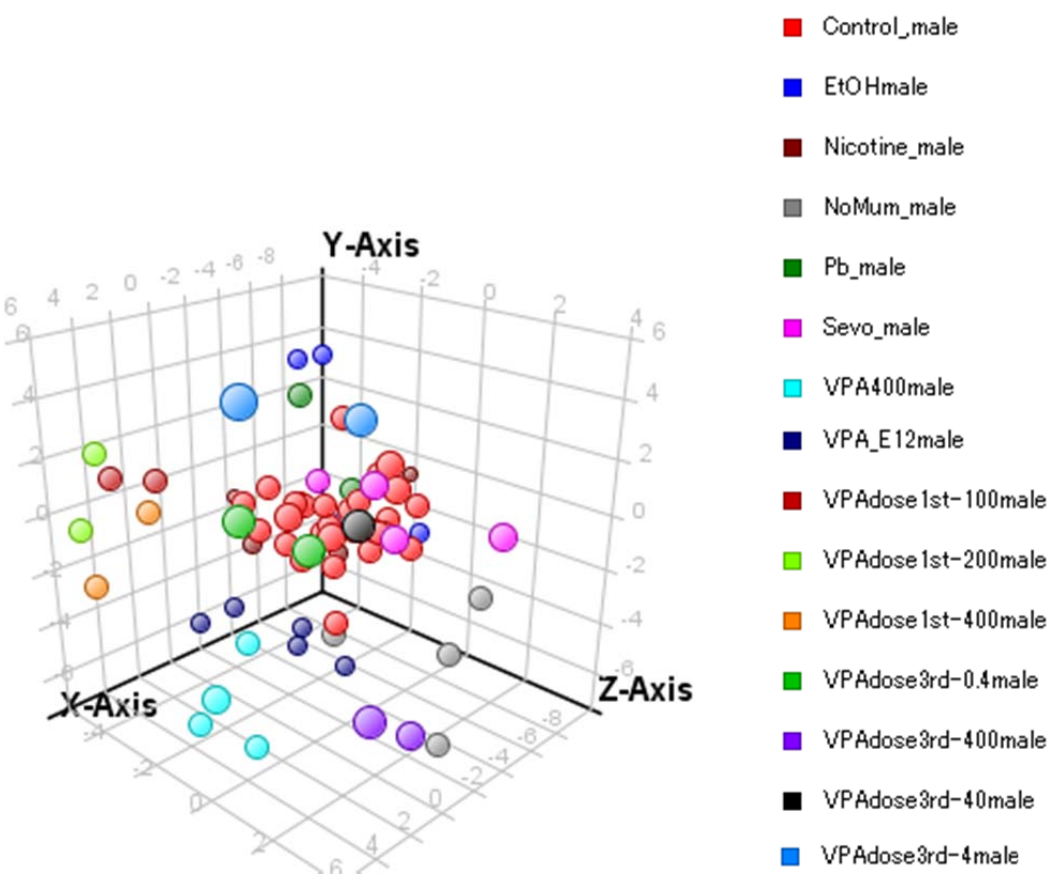
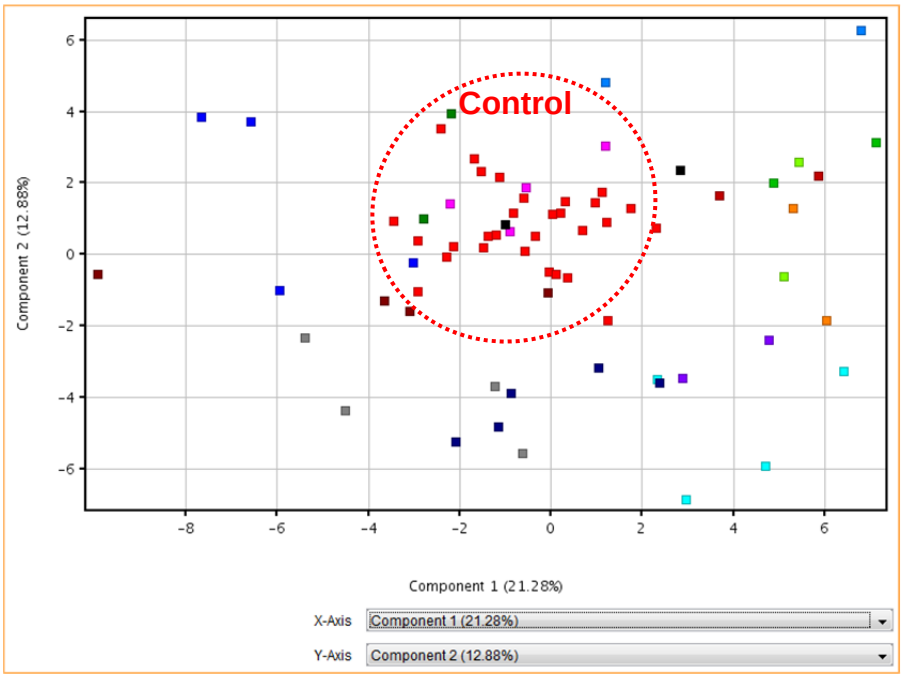


図 51 候補リスト 1 によるすべての化学物質暴露および母子分離群の分離



複数の遺伝子変動減少リストはどれも左図のように対照群が凝集し、暴露軍は主成分の各軸において、どれかひとつに偏ることなく分散する傾向が見られた。

図 52 候補リスト 1 を用いてすべての暴露群について二次元で表した主成分分析図

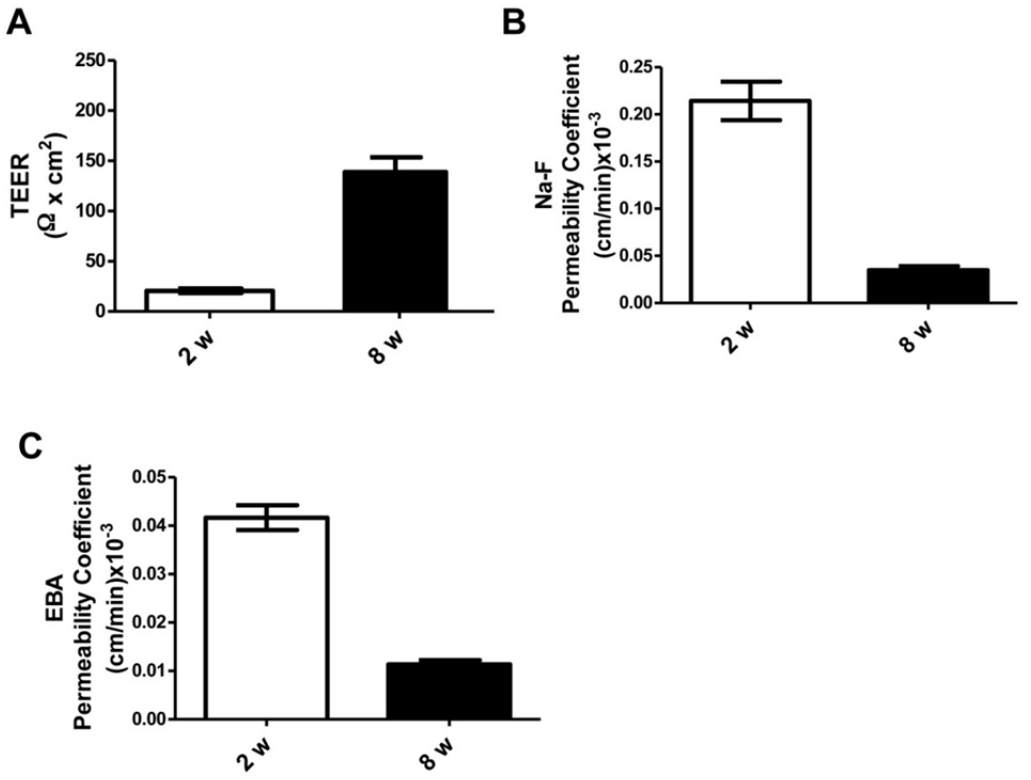


図53 *In vitro* BBBモデルの年齢依存性

異なる週齢の動物（2 w 及び 8 w）から作成した *in vitro* BBB モデルの TEER(A), 隙細胞透過性（Na-F）、経細胞透過性（EBA）の差異。若齢動物の *in vitro* BBB モデルは、TEER が小さく、隙細胞透過性及び経細胞透過性が大きい。

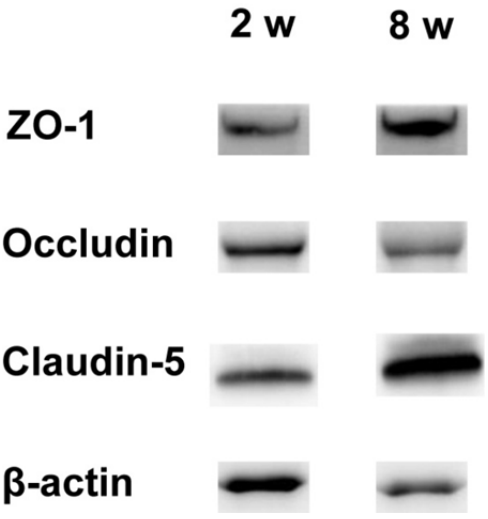


図 54 BBB 関連蛋白質発現の年齢依存性

密着結合に重要な occluding 及び claudin-5, アダプター蛋白質の ZO-1 のすべてが、2 w に比べて 8 w の動物から採取した in vitro BBB モデルで発現が大きかった。

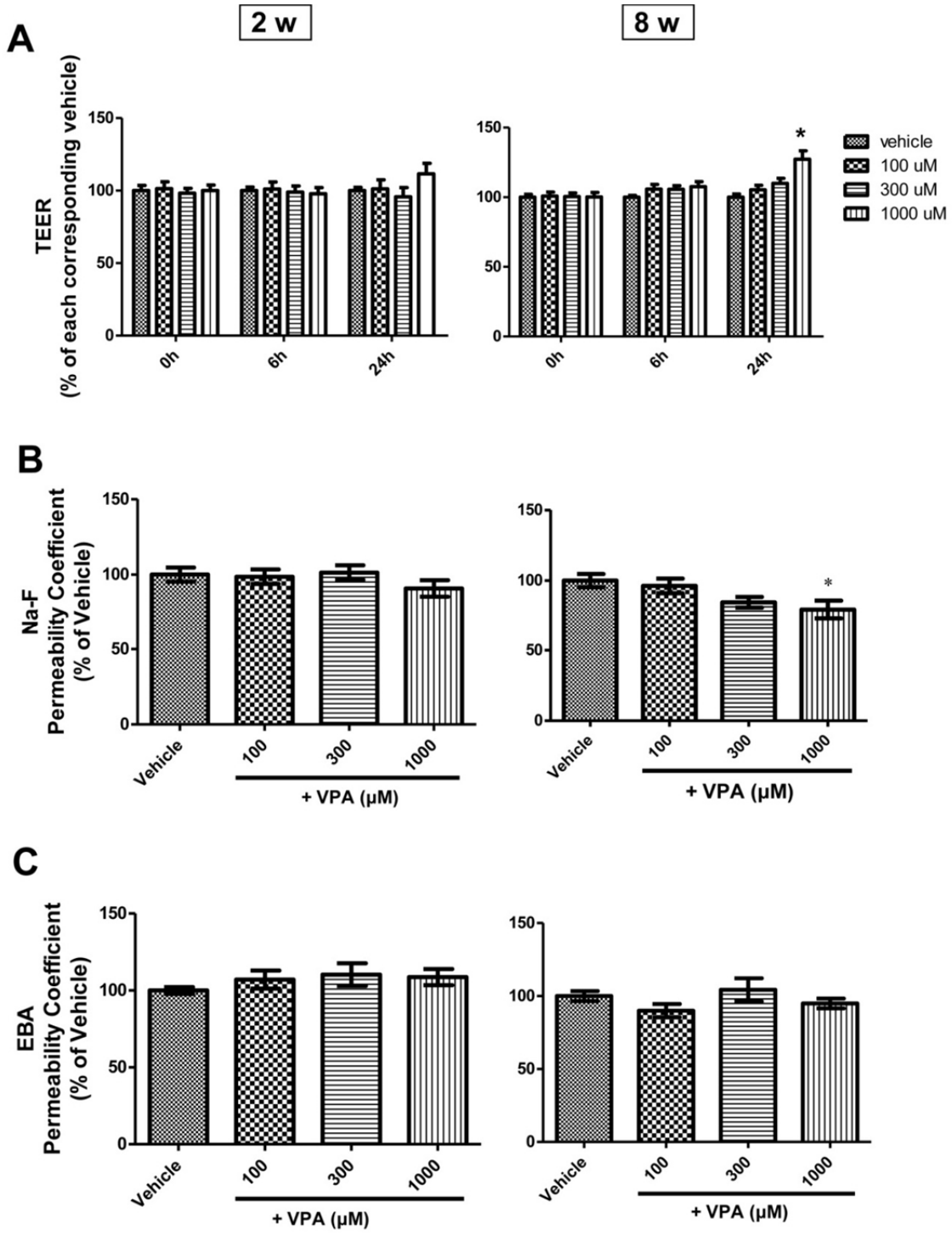


図 55 バルプロ酸（VPA）の BBB 機能に与える影響の検討

In vitro BBB モデルにおける TEER、隙細胞透過性（Na-F）及び経細胞透過性（EBA）に対する VPA（100-1000μM, 24 hr）の影響。VPA は 8 w の TEER を増大させ、隙細胞透過性を低下させた。経細胞透過性には影響しなかった。

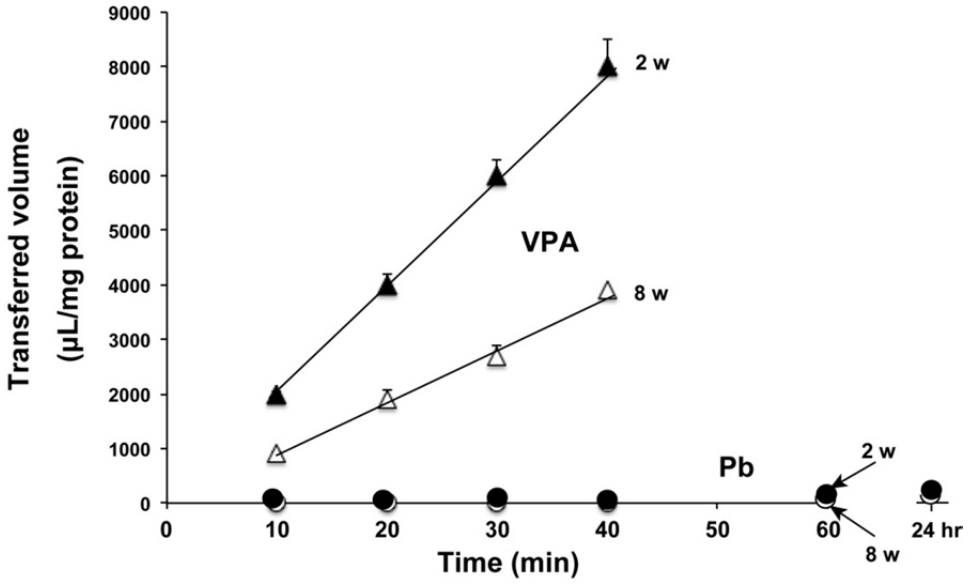


図 56 *In vitro* BBB モデルを用いた Pb の BBB 透過性

In vitro BBB モデルを用いた解析では、Pub (Pacとして) の脳内透過性は認められなかった。これは 2 w 及び 8 w で同様であった。24 時間後でも、Pub の透過性は認められなかった。比較のために、VPA の透過性及びその週齢依存性を記載した。

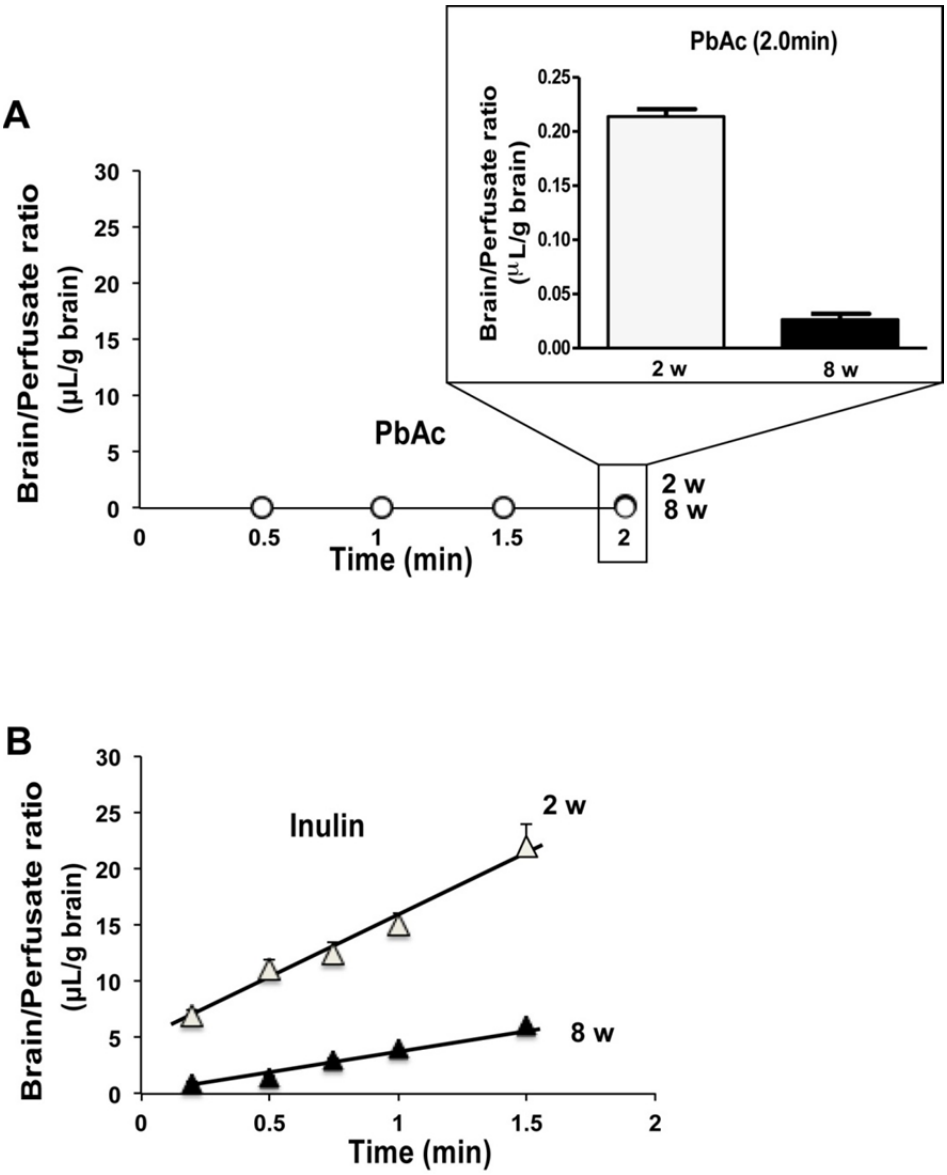


図 57 *In vivo* BBB モデルを用いた Pub の脳内移行性

In vivo BBB モデルにおける Pub (Pacとして投与) の脳内移行性（A）。Pub は BBB 透過性及びその週齢依存性は無い。投与 2 分後において、2 w 及び 8 w 動物の BBB の透過性を敢えて比較すると（四角の枠内）、2 週齢の動物でその透過性が高い。しかし、Pub の透過性は、BBB 透過のネガティブコントロール として使われるinulin (B)の1%未満である（A及びBの縦軸値比較）。

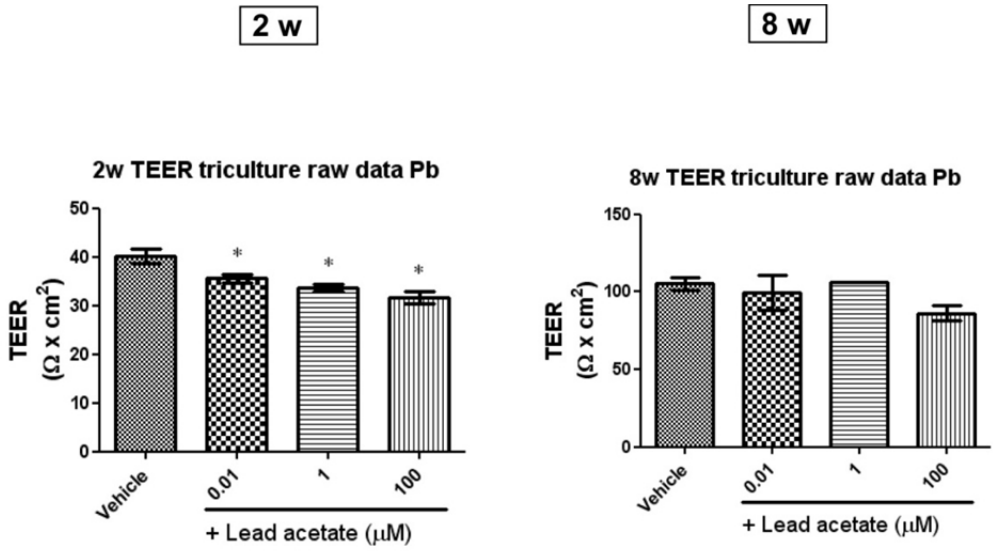


図 58 *In vitro* BBB モデルを用いた Pb の BBB 機能への影響

In vitro BBB モデルを用い、Pb（0.01 – 100 μM、PbAc として投与）に暴露された BBB の機能を TEER を指標として検討した。Pb は濃度依存性に 2 w 動物 BBB の TEER を低下させた。Pb は 8 w の TEER には影響しなかった。

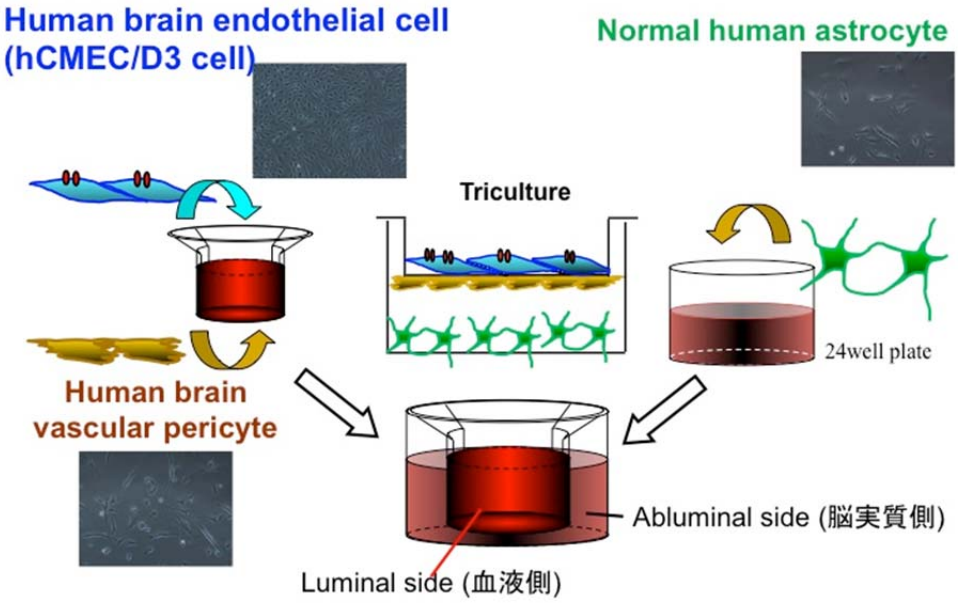


図 59 ヒト細胞を用いた *in vitro* BBB モデル作成



図 60 *In vitro* 透過クリアランス算出式

PS_{app}:見かけの透過クリアランス、$PS_{membran}$:トランス・ウェルメンブランの透過クリアランス、PS_{trans}:in vitro BBB の透過クリアランス。

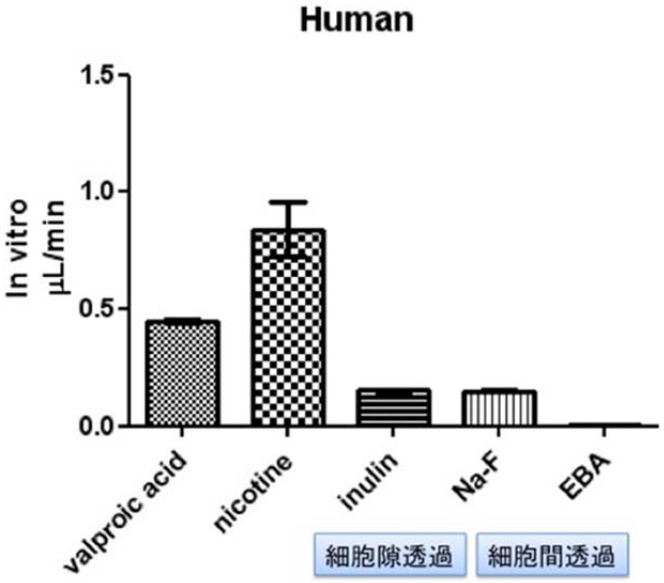


図 61 ヒト細胞を用いた in vitro BBB モデル

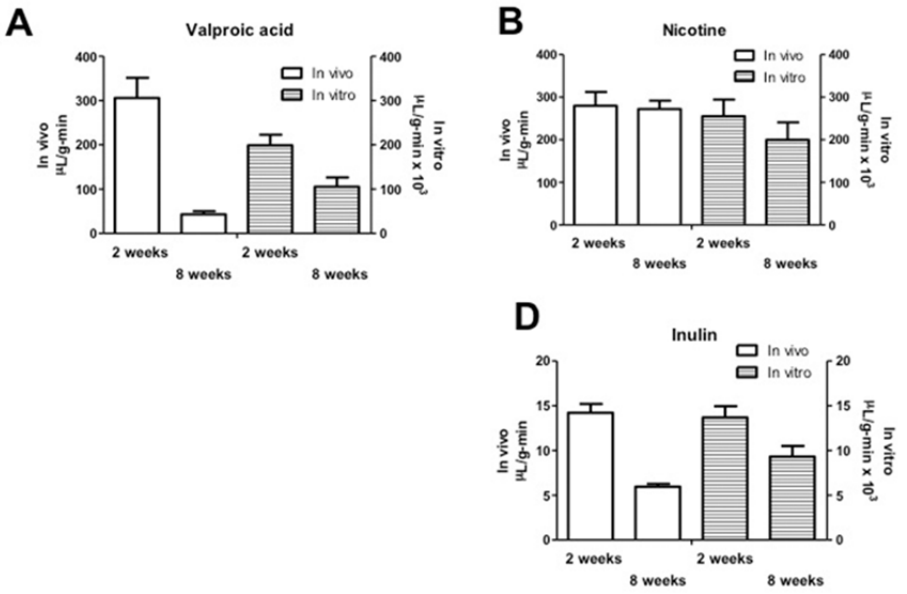


図 62　ラット *in vitro* BBB モデルによる評価

A-C の斜線カラムが、*in vitro* BBB モデルにより得られた透過クリアランス値（A, VPA; B, nicotine; C, inulin）。白カラムは *in vivo* BBB モデルによる値

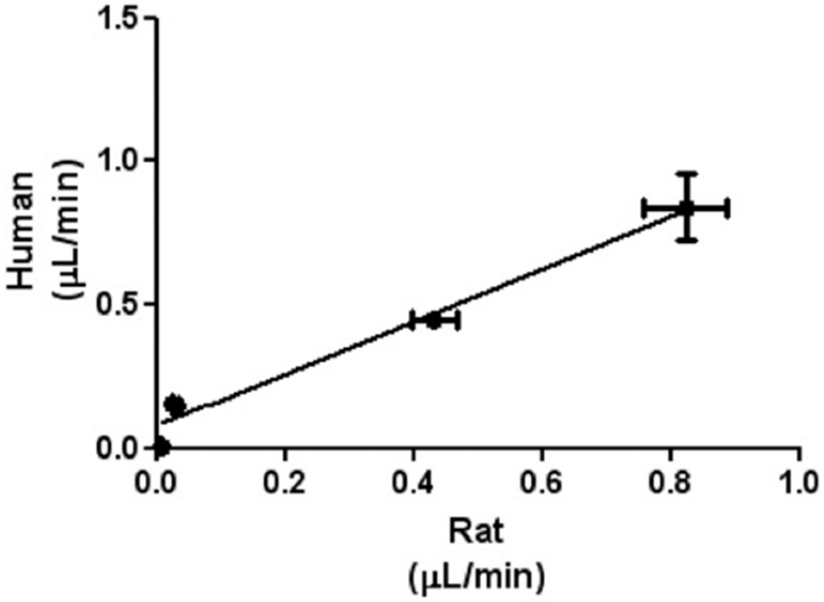


図 63　ヒト及びラット in vitro BBB モデルにおける薬物透過性の相関性

ヒト（Y 軸）及びラット（X 軸）in vitro BBB を用いて得られた VPA, nicotine, inulin の透過クリアランス値をプロットした。両者間には非常に高い相関性が認められた（R^2=0.973）

研究項目名 3　胎生～新生期暴露の情緒社会性リスク評価判定基準の数値化

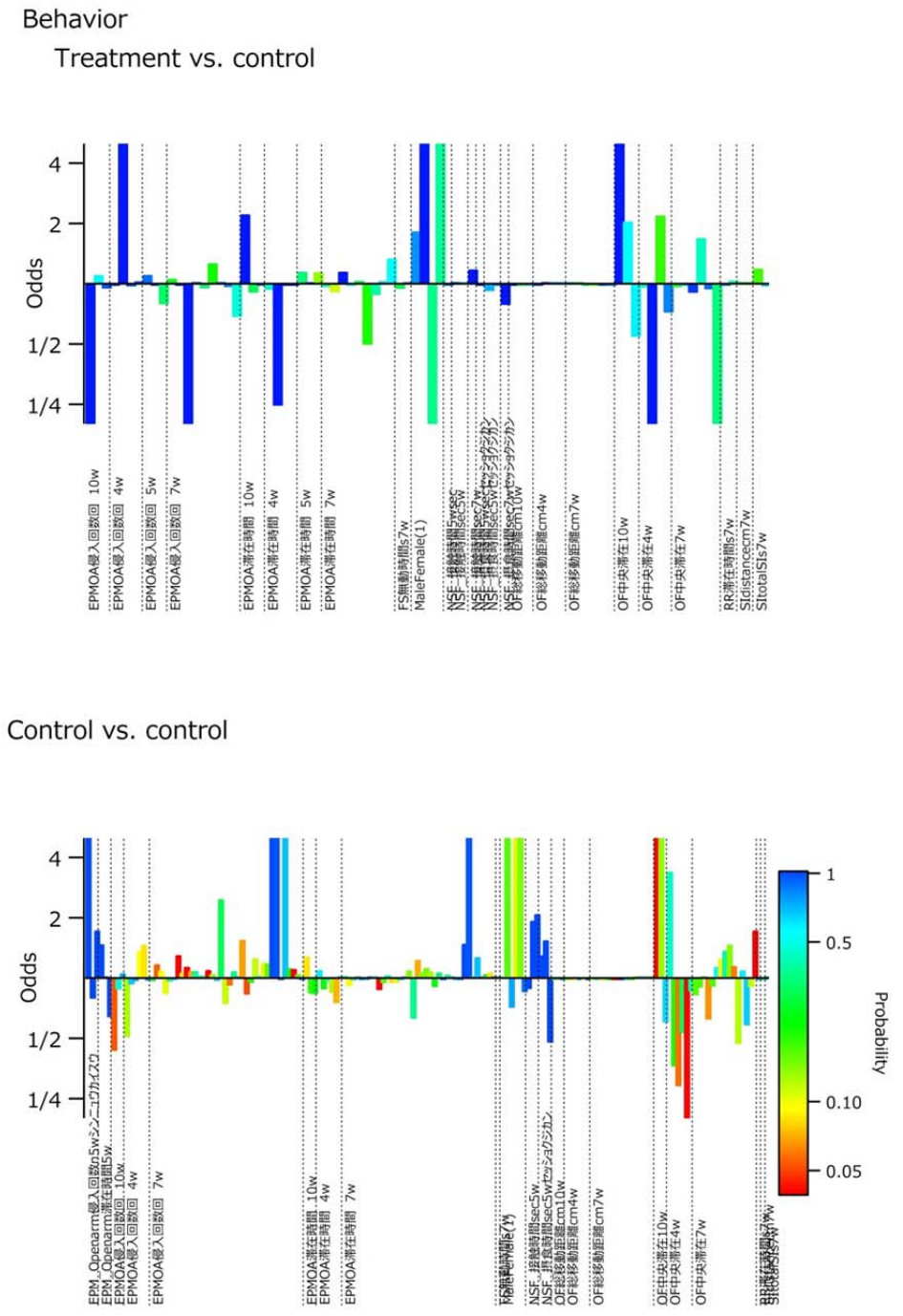


図 64

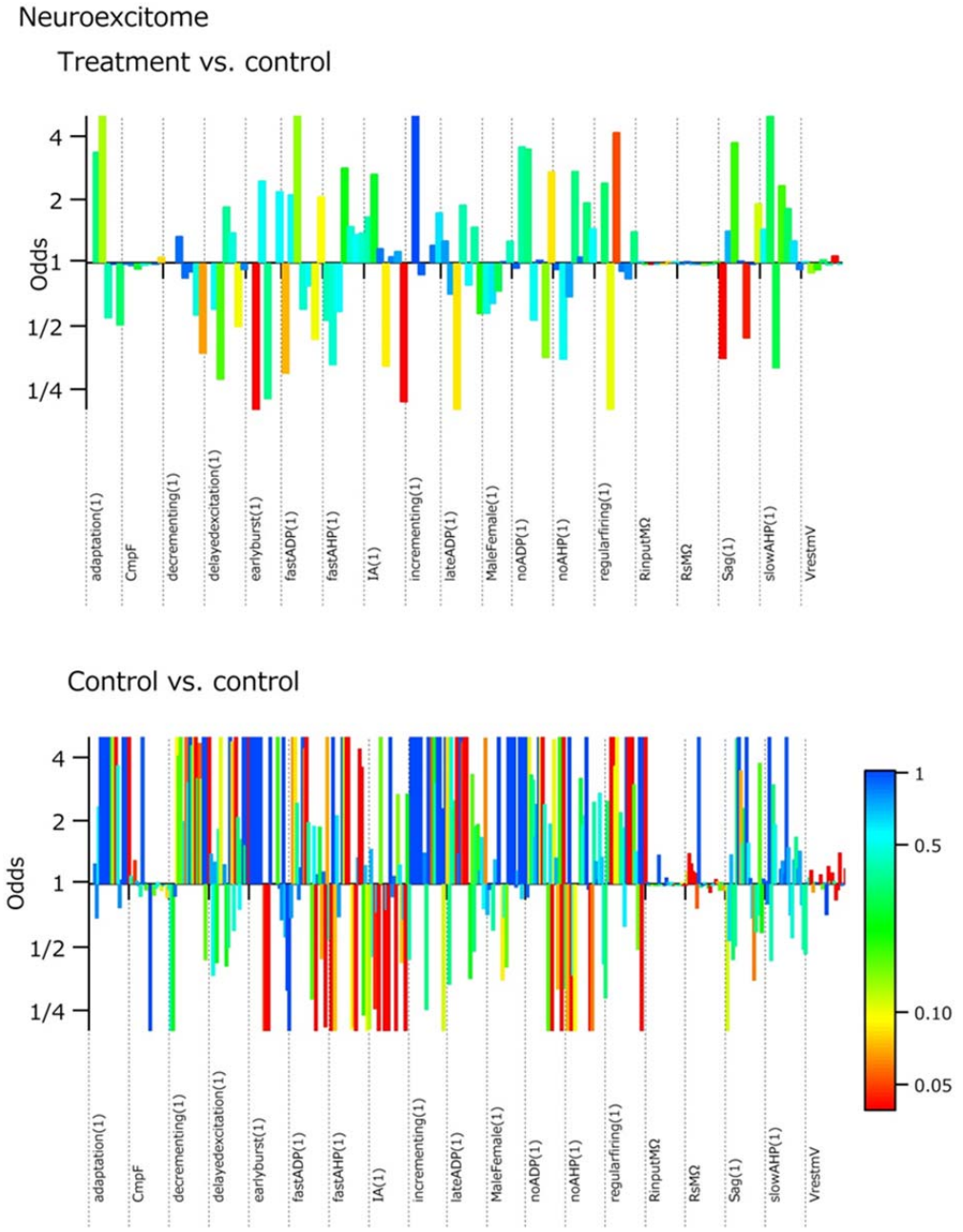

Neuroexcitome
Treatment vs. control
Odds
4
2
1
1/2
1/4
adaptation(1)
CmpF
decrementing(1)
delayedexcitation(1)
earlyburst(1)
fastADP(1)
fastAHP(1)
IA(1)
incrementing(1)
lateADP(1)
MaleFemale(1)
noADP(1)
noAHP(1)
regularfiring(1)
RinputMΩ
RsMΩ
Sag(1)
slowAHP(1)
VrestmV
Control vs. control
Odds
4
2
1
1/2
1/4
adaptation(1)
CmpF
decrementing(1)
delayedexcitation(1)
earlyburst(1)
fastADP(1)
fastAHP(1)
IA(1)
incrementing(1)
lateADP(1)
MaleFemale(1)
noADP(1)
noAHP(1)
regularfiring(1)
RinputMΩ
RsMΩ
Sag(1)
slowAHP(1)
VrestmV
1
0.5
0.10
0.05

図 65

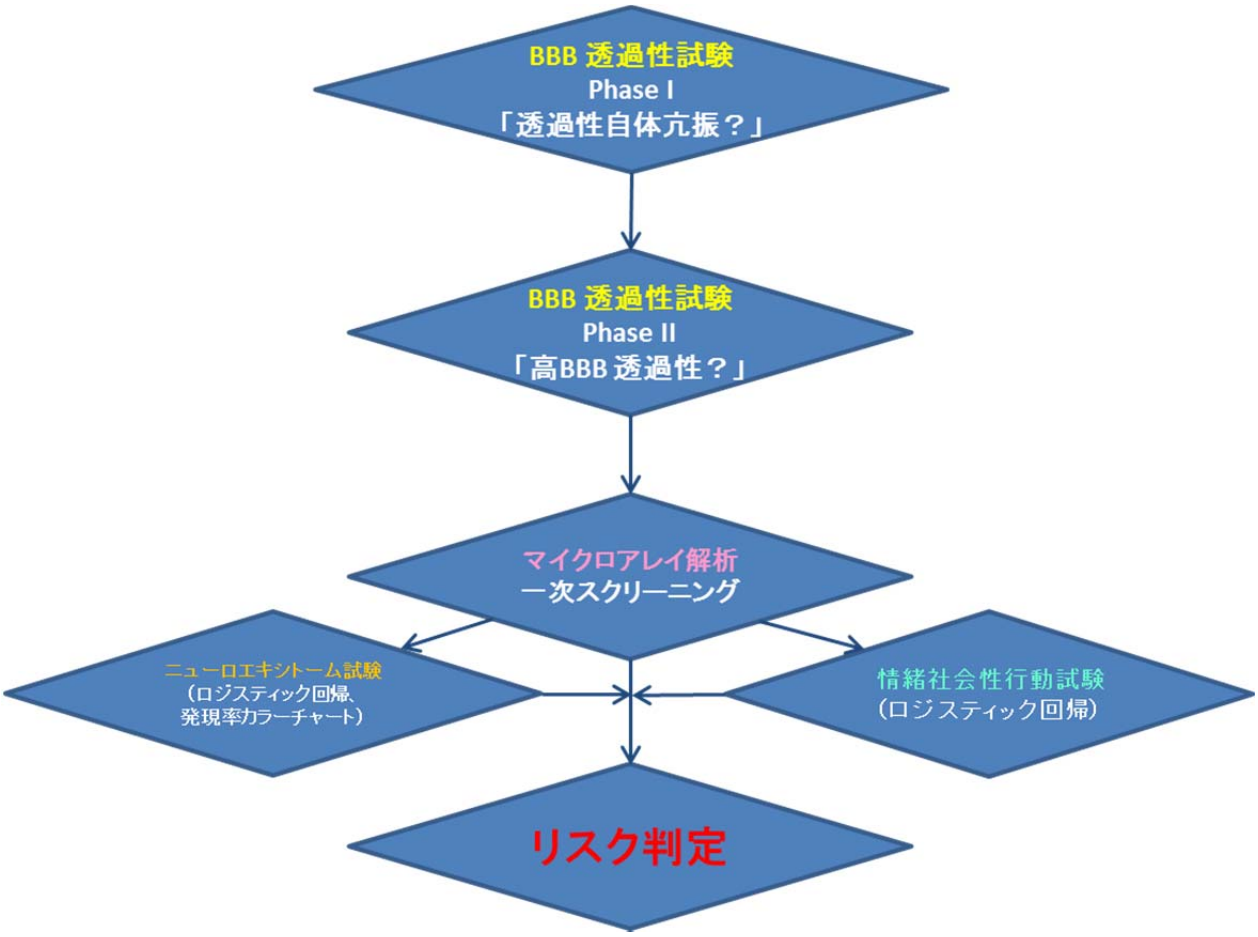

BBB 透過性試験
Phase I
「透過性自体亢振？」
BBB 透過性試験
Phase II
「高BBB 透過性？」
マイクロアレイ解析
一次スクリーニング
ニューロエキシトーム試験
（ロジスティック回帰、
発現率カラーチャート）
情緒社会性行動試験
（ロジスティック回帰）
リスク判定

図 66

＜表＞

	male		female	
	dlBNST	vBNST	dlBNST	vBNST
5-HT_{1A} R	↓↓	−	−	−
5-HT_{2A} R	↑↑	−	↓↓	−
5-HT_{2c} R	−	↓	↓	−
5-HT_{7} R	−	↓	−	−
β1 R	−	−	↑	−
β2 R	−	−	−	−
CRF1 R	−	−	−	−
CRF2 R	−	−	−	−
PACAP	−	↓	−	−
PAC1 R	↓	−	−	−

表 1 VPA:E12IP-V 群における mRNA 発現量の変化

↑,↑↑ :P < 0.05, 0.01　VPA:E12IP-S 群と比較し有意な増加
↓,↓↓ :P < 0.05, 0.01　VPA:E12IP-S 群と比較し有意な減少（Student's *t*-test）

Subject substance		Sub-group	
Nicotine		N	S
(Nicotine:28dPump)	Number of rats (M:F)	10 (5:5)	10 (5:5)
	Number of neurons (M:F)	36 (18:18)	55 (22:23)
Ethanol		E	S
(EtOH:E3Drink)	Number of rats (M:F)	8 (4:4)	10 (5:5)
	Number of neurons (M:F)	36 (17:19)	42 (21:21)

表 2 各被験物質の影響を評価するために用いられた動物数（雌雄別）および記録ニューロン数（雌雄別）のまとめ。

（表 3)IPA により不安感などに関連するとして抽出された遺伝子

Anxiety	neuropeptide Y proenkephalin tachykinin, precursor 1 oxytocin, prepropeptide prolactin receptor prepronociceptin
Others (related to behavior)	adenosine A2a receptor brain-derived neurotrophic factor calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase dopamine receptor D1 high mobility group box 1 interleukin 6 receptor melanocortin 4 receptor pro-melanin-concentrating hormone arginine vasopressin CART prepropeptide catechol-O-methyltransferase corticotropin releasing hormone glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65kDa) hypocretin (orexin) neuropeptide precursor 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 serum/glucocorticoid regulated kinase 1 early growth response 1 jun proto-oncogene sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit neuropeptide Y receptor Y5 neurotrophin 3 basic helix-loop-helix family, member e41 dihydropyrimidine dehydrogenase dopamine receptor D2 cannabinoid receptor 1 (brain) chemokine (C-X-C motif) ligand 12 activity-regulated cytoskeleton-associated protein cAMP responsive element modulator protein kinase C, zeta prostaglandin-endoperoxide synthase 2

	reticulon 4 receptor

(表 4) 情緒社会性リスクマーカー機能蛋白質群　候補遺伝子リスト

	機能	再現性	変動の大きさ
adenosine A2a receptor	○	○	○
oxytocin, prepropeptide	○	○	○
gap junction protein, beta 6, 30kDa	○	○	○
tachykinin, precursor 1	○	○	○
dopamine receptor D1	○	○	○
dopamine receptor D2	○	○	○
pro-melanin-concentrating hormone	○	○	○
arginine vasopressin	○	○	○
prolactin receptor	○	○	○
catechol-O-methyltransferase	○		○
Sult1a1 / sulfotransferase SULT1A1		○	○
metallothionein-2 and metallothionein-1		○	○
tandem pore domain potassium channel TREK-1		○	○
regulator of G-protein signaling 9 (Rgs9)		○	○
heat shock 27kDa protein 1		○	○
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa		○	○
ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 2		○	○
crystallin, alpha B		○	○
synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)		○	○
low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1		○	○
putative N-acetyltransferase CML3 (Cml3)		○	○
Rasd2 / Rhes protein		○	○
G-protein coupled receptor 88 (Gpr88)		○	○
Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I) (Ttr)		○	○
Col1a2 / procollagen, type I, alpha 2		○	○
osteomodulin (osteoadherin) (Omd)		○	○
Neuron specific protein PEP-19 (Purkinje cell protein 4)		○	○
phosphodiesterase 10A (Pde10a)		○	○
gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1		○	○
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12		○	○

表 5 エタノール負荷ラットの行動試験終了後の脳組織重量の変化（Mean ± SEM）

グループ	個体数 (n)	全脳重量 (g)	海馬 (mg)	小脳 (mg)	皮質 (mg)
対照群	7	1.50 ± 0.03	51.7 ± 2.2	109.2 ± 4.4	343.5 ±10.2
エタノール群	11	1.45 ± 0.03	50.9 ± 1.0	95.9 ± 3.1*	321.9 ± 5.1
母獣群	16	1.80 ± 0.03**	58.4 ± 1.6*	117.4 ± 2.8	385.3 ± 5.6**

（Mean ± SEM, * P<0.05, ** P<0.01 vs 対照群）

表 6 鉛負荷ラットの行動試験終了後の脳組織重量の変化（Mean ± SEM）

グループ	個体数 (n)	全脳重量 (g)	海馬 (mg)	小脳 (mg)	皮質 (mg)
対照群(群)	11	1.88 ± 0.01	61.8 ± 1.3	129.9 ± 2.3	412.3 ± 12.0
対照群(個別)	11	1.90 ± 0.01	60.3 ± 1.6	129.9 ± 3.8	419.7 ± 6.5
鉛 群(群)	10	1.81 ± 0.02**	56.4 ± 2.0*	126.6 ± 3.3	400.2 ± 7.3
鉛 群(個別)	11	1.79 ± 0.01$^{\#\#}$	55.9 ± 1.4$^{\#}$	130.3 ± 1.7	390.6 ± 4.3$^{\#\#}$

（* P<0.05, ** P<0.01 vs 対照群(群), $^{\#}$ P<0.05, $^{\#\#}$ P<0.01 vs 対照群(個別)）

表 7 記録中判定に用いたプロトコル表

1．Sag rebound (SR)の評価

手順１：過分極パルスで電位が-95~-85 mVに達した過分極ステップに注目する。

手順１－１：このとき、sag rebound が 1div以上ある？

Yes→SR=1 / No→SR=0 / 観察条件を満たさないので観察せず→N

2．Delayed excitation (DE)の評価

手順２：プレ過分極なし（0 mV）に注目する。

手順２－１：脱分極ステップが小さいとき、最初の活動電位まで遅れがある。

Yes→DErest=1 / No→DErest=0 / 観察条件を満たさないので観察せず→N

手順２－２：活動電位の頻度がdepoの後半で次第に上昇する。

Yes→DErestAP=1 / No →DErestAP=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

手順３：プレ過分極で-80 mV以下に達したときの脱分極ステップに注目する。

手順３－１：最初の活動電位までわずかな遅れがある。

Yes→DEhyper=1 / No→DEhyper=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

手順３－２：活動電位の頻度がdepoの後半で次第に上昇する。

Yes→DEhyperAP=1 / No →DEhyperAP=0 / 観察条件を満たさず観察せず→N

3．Firing patternの評価

手順４：プレ過分極なし（0 mV）で、APが発生しうる電位に達した脱分極パルス時に下記のパターンが見られたとき、それぞれの変数に1を入れる。記録状態や波形などで判定できないときは0とし、また、観察条件を満たさなかった時はN。

- □ Adaptation (ADAP): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が減少し、脱分極パルスが終わる前に出なくなる。
- □ Early burst (EB): 脱分極パルス開始直後にAPがバースト的に数発発生し、その後出ない
- □ Incrementing (INC): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が増加する
- □ Decrementing (DEC): 脱分極パルス開始直後からAPが発生し、徐々に頻度が減少する（が脱分極パルス中は出続ける）
- □ Regular firing (RF): 脱分極パルス中頻度の大きな変化なくコンスタントにAPが出続ける
- □ Late (after burst) ADP (lADP): 脱分極パルスの終了後、膜電位が-60 mV付近に戻るのが遅い。
- □ Fast ADP (fADP): 1発のAPの直後に小さな山のような形の脱分極が生じる
- □ Slow (after burst) AHP (sAHP): 脱分極パルスが終わった直後に-60mVよりもわずかに過分極し、その後-60 mV付近に戻る
- □ Fast AHP (fAHP): 1発のAPの直後に時間経過の速い谷状の過分極が生じる

表 8

Tested chemicals		Administration		Control	Age of recording	Number of rats (neurons)	
		age	route			Treated	Control
① Valproate sodium	400 mg/kg	P14	s.c.	Saline	P28-39	♂ 5(19) ♀ 5(20)	♂ 5(19) ♀ 5(22)
② Valproate sodium	600 mg/kg	E12	i.p.	Saline	P32-41	♂ 1(10) ♀ 1(4)	♂ 5(22) ♀ 5(24)
③ Valproate sodium	400 mg/kg	P14	s.c.	Saline	P49-55	♂ 4(19)	♂ 4(17)
④ Nicotine	6 mg/kg/day	E3-(28 days)	Osmotic pomp	Saline	P29-57	♂ 5(18) ♀ 5(18)	♂ 5(22) ♀ 5(23)
⑤ Ethanol	3%	E3-P10	In drinking water	Isocaloric sucrose solution	P53-69	♂ 4(17) ♀ 4(19)	♂ 5(21) ♀ 5(21)
⑥ Ethanol	5%	P2-P18	In artificial milk	7% sucrose artificial milk	P31-39	♂ 4(59) ♀ 4(58)	♂ 4(58) ♀ 4(55)
⑦ Pb	500 ppm (Lead (II) acetate trihydrate)	E3-P14	In drinking water	660 ppm Sodium acetate	P31-49	♂ 4(49) ♀ 4(49)	♂ 4(49) ♀ 4(49)

表 9 主成分分析に用いた遺伝子リスト

1370372_at	Rasd2 /Rhes protein
1387241_at	G-protein coupled receptor 88 (Gpr88)
1388271_at	metallothionein-2 and metallothionein-1
1367813_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14a (Ppp1r14a)
1368300_at	Adenosine A2a-receptor (Adora2a)
1368438_at	phosphodiesterase 10A (Pde10a)
1368500_a_at	regulator of G-protein signaling 9 (Rgs9)
1368708_a_at	Dopamine receptor D2 (Drd2)
1369309_a_at	Tac1 /Tachykinin (substance P, neurokinin A, neuropeptide K, neuropeptide gamma)
1369705_at	X transporter protein 3 (Xtrp3)
1370019_at	Sult1a1 /sulfotransferase SULT1A1
1367949_at	preproenkephalin, related sequence (Penk-rs)
1368104_at	Tspan-2 protein (Tspan-2)
1368127_at	neuraminidase 2 (Neu2)
1368478_at	Dopamine-1A receptor (Drd1a)
1370026_at	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab)
1370155_at	Col1a2 /procollagen, type I, alpha 2
1386936_at	galectin-related inter-fiber protein (Grifin)
1367631_at	connective tissue growth factor (Ctgf)
1367802_at	serumglucocorticoid regulated kinase (Sgk)
1368298_at	adenylate cyclase 5 (Adcy5)
1368426_at	carnitine O-octanoyltransferase (Crot)
1368479_at	Drd1a /D1 dopamine receptor
1368577_at	gap junction protein, beta 6 (connexin 30) (Gjb6)
1368981_at	aquaporin-4 water channel (AQP4)
1370432_at	POU domain, class 3, transcription factor 2
1370669_a_at	PDE10A3
1371123_x_at	BM1k MHC class Ib antigen, strain SHR.
1387197_at	osteomodulin (osteoadherin) (Omd)
1387306_a_at	early growth response 2 (Egr2)
1387874_at	Dbp /D site albumin promoter binding protein
1367771_at	glucocorticoid-induced leucine zipper (Gilz)
1367851_at	Ptgds /Prostaglandin D synthase
1368154_at	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 (Gucy1a3)
1368384_at	kallikrein 6 (neurosin, zyme) (Klk6)
1368418_a_at	Cp /GPI-anchored ceruloplasmin
1368527_at	Ptgs2 /cyclooxygenase 2
1368533_at	hephaestin (Heph)
1368554_at	Pancreatic lipase (Pnlip)
1368677_at	Brain derived neurothrophic factor (Bdnf)
1369047_at	tyrosine-ester sulfotransferase (Sult-n)
1369113_at	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 (Cktsf1b1)
1370355_at	liver stearyl-CoA desaturase
1371237_a_at	metallothionein 1
1386884_at	protease, serine, 11 (Igf binding) (Prss11)
1386909_a_at	voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)

1387391_at	p21 (WAF1)
1387543_at	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 (Slc5a7)
1389250_at	Lfng mRNA for lunatic fringe

表 10 遺伝子候補リスト 1

Candidate List 1		
Probe Set ID	Accession No.	Comment
1368253_at	NM_012793.1	Guanidinoacetate methyltransferase (Gamt)
1368384_at	NM_019175.1	kallikrein 6 (neurosin, zyme) (Klk6)
1368858_at	L21698.1	Ugt8 /ceramide UDP-galactosyltransferase
1368861_a_at	NM_017190.1	Myelin-associated glycoprotein (Mag)
1369773_at	NM_017105.1	Bone morphogenetic protein 3 (Bmp3)
1370019_at	AF394783.1	Sult1a1 /sulfotransferase SULT1A1
1370026_at	NM_012935.1	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab)
1370693_a_at	M18630.1	Cnp /2,3- Cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase
1371245_a_at	BI287300	Hbb /Hemoglobin, beta
1371363_at	BI277042	ESTs
1371499_at	AI227627	ESTs, Highly similar to CD9 ANTIGEN (R.norvegicus)
1372336_at	BE115454	ESTs
1373053_at	AI169620	ESTs
1373098_at	BF394321	ESTs, Moderately similar to BCAS_HUMAN BREAST CARCINOMA AMPLIFIED SEQUENCE 1 (NOVEL AMPLIFIED IN BREAST CANCER 1) (AMPLIFIED AND OVEREXPRESSED IN BREAST CANCER) (H.sapiens)
1374796_at	AI413058	ESTs
1375353_at	BI296696	ESTs
1376944_at	AI407163	ESTs
1378806_at	BF392451	ESTs
1379275_at	AI007889	ESTs, Weakly similar to SNXC_MOUSE SORTING NEXIN 12 (SDP8 PROTEIN) (M.musculus)
1380405_at	BF549570	ESTs
1380577_at	AI175616	ESTs, Moderately similar to ABG2_HUMAN ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY G, MEMBER 2 (PLACENTA-SPECIFIC ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER) (BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN) (H.sapiens)
1383486_at	AA926109	ESTs
1383751_at	AI555007	ESTs
1383838_at	BI296294	ESTs
1385092_at	AW523694	ESTs
1386936_at	NM_057187.1	galectin-related inter-fiber protein (Grifin)
1387897_at	L16532.1	2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPII)
1388271_at	BM383531	metallothionein-2 and metallothionein-1
1388337_at	AI102495	ESTs, Moderately similar to PNPH MOUSE PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE (M.musculus)
1388395_at	AI406939	ESTs, Highly similar to G0S2 MOUSE PUTATIVE LYMPHOCYTE G0G1 SWITCH PROTEIN 2 (M.musculus)
1388480_at	AI412863	ESTs, Weakly similar to F49D11.9.p (Caenorhabditis elegans) (C.elegans)
1388901_at	AW534837	ESTs, Weakly similar to FKB5 MOUSE 51 KDA FK506-BINDING PROTEIN (M.musculus)
1389068_at	BI288819	ESTs, Highly similar to T12539 hypothetical protein DKFZp434J154.1 (H.sapiens)
1389883_at	BF284719	ESTs
1390722_at	AW531272	ESTs
1391680_at	BF410646	ESTs
1391809_at	BE106814	ESTs
1392736_at	AW532939	ESTs
1393075_at	BF386199	ESTs
1393128_at	BI288424	ESTs
1393253_at	BF408799	ESTs
1396060_at	AI500735	ESTs
1398258_at	NM_012777.1	Apolipoprotein D (Apod)

表 11 遺伝子候補リスト 2

Candidate List 2		
Probe Set ID	Accession No.	Comment
1367771_at	NM_031345.1	glucocorticoid-induced leucine zipper (Gilz)
1368253_at	NM_012793.1	Guanidinoacetate methyltransferase (Gamt)
1368384_at	NM_019175.1	kallikrein 6 (neurosin, zyme) (Klk6)
1368438_at	NM_022236.1	phosphodiesterase 10A (Pde10a)
1368708_a_at	NM_012547.1	Dopamine receptor D2 (Drd2)
1368858_at	L21698.1	Ugt8 /ceramide UDP-galactosyltransferase
1368861_a_at	NM_017190.1	Myelin-associated glycoprotein (Mag)
1369773_at	NM_017105.1	Bone morphogenetic protein 3 (Bmp3)
1370019_at	AF394783.1	Sult1a1 /sulfotransferase SULT1A1
1370026_at	NM_012935.1	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab)
1370693_a_at	M18630.1	Cnp /2,3- Cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase
1370991_at	AF187814.1	putative N-acetyltransferase CML3 (Cml3)
1371237_a_at	AF411318.1	metallothionein 1
1371363_at	BI277042	ESTs
1371499_at	AI227627	ESTs, Highly similar to CD9 ANTIGEN (R.norvegicus)
1372336_at	BE115454	ESTs
1373053_at	AI169620	ESTs
1373098_at	BF394321	ESTs, Moderately similar to BCAS_HUMAN BREAST CARCINOMA AMPLIFIED SEQUENCE 1 (NOVEL AMPLIFIED IN BREAST CANCER 1) (AMPLIFIED AND OVEREXPRESSED IN BREAST CANCER) (H.sapiens)
1374796_at	AI413058	ESTs
1374839_at	BE329255	ESTs
1375353_at	BI296696	ESTs
1376124_at	BG375480	ESTs
1376944_at	AI407163	ESTs
1378806_at	BF392451	ESTs
1379275_at	AI007889	ESTs, Weakly similar to SNXC_MOUSE SORTING NEXIN 12 (SDP8 PROTEIN) (M.musculus)
1379740_at	AW521797	ESTs
1380405_at	BF549570	ESTs
1380577_at	AI175616	ESTs, Moderately similar to ABG2_HUMAN ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY G, MEMBER 2 (PLACENTA-SPECIFIC ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER) (BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN) (H.sapiens)
1380683_at	BE107433	ESTs, Highly similar to A48758 protein-tyrosine-phosphatase (R.norvegicus)
1381646_at	BE101561	ESTs
1383486_at	AA926109	ESTs
1383751_at	AI555007	ESTs
1383838_at	BI296294	ESTs
1385092_at	AW523694	ESTs
1386936_at	NM_057187.1	galectin-related inter-fiber protein (Grifin)
1387897_at	L16532.1	2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPII)
1388271_at	BM383531	metallothionein-2 and metallothionein-1
1388337_at	AI102495	ESTs, Moderately similar to PNPH MOUSE PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE (M.musculus)
1388395_at	AI406939	ESTs, Highly similar to G0S2 MOUSE PUTATIVE LYMPHOCYTE G0G1 SWITCH PROTEIN 2 (M.musculus)
1388480_at	AI412863	ESTs, Weakly similar to F49D11.9.p (Caenorhabditis elegans) (C.elegans)
1388901_at	AW534837	ESTs, Weakly similar to FKB5 MOUSE 51 KDA FK506-BINDING PROTEIN (M.musculus)
1389068_at	BI288819	ESTs, Highly similar to T12539 hypothetical protein DKFZp434J154.1 (H.sapiens)
1389883_at	BF284719	ESTs
1390722_at	AW531272	ESTs
1391680_at	BF410646	ESTs
1391809_at	BE106814	ESTs
1392736_at	AW532939	ESTs
1393075_at	BF386199	ESTs
1393128_at	BI288424	ESTs
1393253_at	BF408799	ESTs
1393553_at	AI059872	ESTs
1394407_at	AW530287	ESTs
1394477_at	BG380672	ESTs
1396060_at	AI500735	ESTs
1397766_at	BI291982	ESTs
1398258_at	NM_012777.1	Apolipoprotein D (Apod)

表 12 遺伝子候補リスト 3

Candidate List 3		
Probe Set ID	Accession No.	Comment
1367571_a_at	NM_031511.1	Insulin-like growth factor II (somatomedin A) (Igf2)
1368253_at	NM_012793.1	Guanidinoacetate methyltransferase (Gamt)
1368650_at	NM_031135.1	TGFB inducible early growth response (Tieg)
1368861_a_at	NM_017190.1	Myelin-associated glycoprotein (Mag)
1369713_at	M99418.1	Cckbr /brain cholecystokinin receptor
1370019_at	AF394783.1	Sult1a1 /sulfotransferase SULT1A1
1370026_at	NM_012935.1	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab)
1370410_at	AF322216.1	inhibin binding protein long isoform
1370693_a_at	M18630.1	Cnp /2,3- Cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase
1370959_at	BI275716	Col3a1 /procollagen, type III, alpha 1
1371245_a_at	BI287300	Hbb /Hemoglobin, beta
1371363_at	BI277042	ESTs
1371499_at	AI227627	ESTs, Highly similar to CD9 ANTIGEN (R.norvegicus)
1371586_at	AF209972	ESTs, Moderately similar to CGI-118 protein (H.sapiens)
1372438_at	AI411100	ESTs, Weakly similar to T43198 nitrilaseFhit protein - Caenorhabditis elegans (C.elegans)
1373053_at	AI169620	ESTs
1373098_at	BF394321	ESTs, Moderately similar to BCAS_HUMAN BREAST CARCINOMA AMPLIFIED SEQUENCE 1 (NOVEL AMPLIFIED IN BREAST CANCER 1) (AMPLIFIED AND OVEREXPRESSED IN BREAST CANCER) (H.sapiens)
1374839_at	BE329255	ESTs
1374921_at	BI274548	ESTs, Weakly similar to T45294 hypothetical protein KIAA1088 (H.sapiens)
1375353_at	BI296696	ESTs
1375519_at	AI237401	Hba1 /Hemoglobin, alpha 1
1376226_at	BG377636	ESTs
1376944_at	AI407163	ESTs
1378133_at	AW532618	ESTs
1378269_at	AI112113	ESTs
1379275_at	AI007889	ESTs, Weakly similar to SNXC_MOUSE SORTING NEXIN 12 (SDP8 PROTEIN) (M.musculus)
1379855_at	BF413298	ESTs
1380405_at	BF549570	ESTs
1380577_at	AI175616	ESTs, Moderately similar to ABG2_HUMAN ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY G, MEMBER 2 (PLACENTA-SPECIFIC ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER) (BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN) (H.sapiens)
1380683_at	BE107433	ESTs, Highly similar to A48758 protein-tyrosine-phosphatase (R.norvegicus)
1381208_at	BE104595	ESTs
1382291_at	AI454332	ESTs
1383330_at	AW915049	ESTs
1383331_at	BF548234	ESTs
1383486_at	AA926109	ESTs
1383751_at	AI555007	ESTs
1383864_at	BF412512	ESTs
1386660_at	BF565021	ESTs
1387854_at	BI282748	Col1a2 /procollagen, type I, alpha 2
1387897_at	L16532.1	2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPII)
1388203_x_at	BI395698	RT1Aw2 /RT1 class Ib gene
1388271_at	BM383531	metallothionein-2 and metallothionein-1
1388337_at	AI102495	ESTs, Moderately similar to PNPH MOUSE PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE (M.musculus)
1388395_at	AI406939	ESTs, Highly similar to G0S2 MOUSE PUTATIVE LYMPHOCYTE G0G1 SWITCH PROTEIN 2 (M.musculus)
1388480_at	AI412863	ESTs, Weakly similar to F49D11.9.p (Caenorhabditis elegans) (C.elegans)
1388901_at	AW534837	ESTs, Weakly similar to FKB5 MOUSE 51 KDA FK506-BINDING PROTEIN (M.musculus)
1391680_at	BF410646	ESTs
1391915_at	BE120145	ESTs, Moderately similar to GR75 RAT MITOCHONDRIAL STRESS-70 PROTEIN PRECURSOR (R.norvegicus)
1392736_at	AW532939	ESTs
1393075_at	BF386199	ESTs
1393128_at	BI288424	ESTs
1393553_at	AI059872	ESTs
1394407_at	AW530287	ESTs
1394620_at	BI288579	ESTs, Moderately similar to MT1 RAT METALLOTHIONEIN-I (R.norvegicus)
1394837_at	BF405797	ESTs, Weakly similar to A43778 neurofilament triplet H protein - mouse (M.musculus)
1395014_at	BI282068	ESTs
1395260_at	BM383147	ESTs
1396060_at	AI500735	ESTs
1396240_at	AI575096	ESTs
1396388_at	AW522161	ESTs
1396855_at	AW528402	ESTs
1398875_at	AI105044	Rpl30 /ribosomal protein L30

Ⅲ　本研究を基に発表した論文等

１　本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Sekino, Y., Moriguchi, T, Sato, K. Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. J Toxicol Sci, (in press)

Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K., Koizumi, S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). (2013) Cell Mol Neurobiol 33 (1), 47-58.

Takaki, J., Fujimori, K., Miura M., Suzuki T., Sekino, Y., Sato, K., L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. (2012) J. Neuroinflammation 9.

Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S. (2012) Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. Cell Mol Neurobiol 32 (6), 953-6.

Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S., In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. (2013) PLoS ONE 8 (1), e55166.

２　本研究を基にした学会発表の実績

国内学会

佐藤　薫、片山敦子、門馬彰彦、守口　徹、関野祐子、バルプロ酸を胎生期あるいは生後適用したラット扁桃体の遺伝子発現マイクロアレイ解析、第 86 回　日本薬理学会年会（2013.3）（福岡）

片山敦子、門馬彰彦、秋友孝文、廣末　愛、星裕姫乃、守口　徹、関野祐子、佐藤　薫、バルプロ酸幼弱期暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー遺伝子群の探索、日本薬学会第 133 回年会（2013.3）（横浜）

Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Otomo, Y., Imai, M., Akitomo, T., Takahashi, Y., Kato, F., Sekino, Y., Sato, K., Search for genetic markers for risks in emotion and social interaction caused by exposure to chemical compounds in embryonic or neonatal periods, 第 35 回　日本神経科学大会（2012. 9）（名古屋）

高田 芙友子，小泉　修一、片岡泰文、乳児期と成人期の血液脳関門 in vitro モデル、第 14 回応用薬理シンポジウム、（2012. 9）（甲府市）

片山　敦子、守口　徹、関野祐子、佐藤　薫、幼弱期化学物質暴露による情緒社会性への影響の予測、第14 回応用薬理研究会（2012. 9）（甲府市）

里吉　寛、眞嶋　悠幾、井手　聡一郎、佐藤　薫、南　雅文、胎生～新生期における鉛暴露が成熟後のラットの情動に及ぼす影響、日本薬学北海道支部第138回例会（2012. 6）（札幌市）

片山敦子、門馬彰彦、大友ゆき、今井美鈴、秋友孝文、守口　徹、関野祐子、佐藤　薫、胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索　日本薬学会第132回年会（2012.3）（札幌）

真嶋悠幾、中　誠則、井手総一郎、佐藤　薫、南　雅文、新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響　第62回　日本薬理学会北部会（2011.9）（仙台）

中　誠則、真嶋悠幾、井手総一郎、佐藤　薫、南　雅文、新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響　第21回　日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会（2011.9）（東京）

高橋由香里、永瀬将志、落合敏平、安井　豊、中尾彩乃、渡部文子、高木　聡、佐藤　優、奥津浩也、守口　徹、佐藤　薫、加藤総夫、胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法　第34回　日本神経科学大会（2011.9）（横浜）

片山（小口）敦子、門間彰彦、大友ゆき、守口　徹、関野祐子、佐藤　薫、胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析　第 34 回　日本神経科学大会 (2011.9)（横浜）

Kinoshita, M., Koizumi, S., アストロサイトの MMP-9 産生と P2 受容体、グリア研究会、（2010, 10）（福岡）

国際学会

Takahashi, Y., Katayama, A., Nagase, M., Moriguchi, T., Sato, K., Kato, F. Electrophysiological and transcriptomic identification of the remote influence in the central amygdala following single postnatal administration of valproate in rats, FENS meeting 2012 (2012.7) (Barcelona, Spain)

Koizumi, S., Fujishita, K., Hiasa, M., Moriyama, Y.　Mechanisms of release of gliotransmitter ATP and neuronal functions.　Asian-Pacific Neurochemical Society, (2010. 10) (Phuket, Thai)

Ⅳ　主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
１　研究の妥当性	５	これまで､胎生～新生期に化学物質に暴露された場合の情緒社会性に対する影響評価法は存在していなかったことから､社会的要求の高いテーマである｡本研究では脳神経科学のほぼ全て解析パラメーターを網羅的に用いてリスク評価を試みている点で周到な計画である。
２　研究目標の達成度	４	行動解析、電気生理学的解析、マイクロアレイ解析、脳内移行性について､リスク評価に最適のパラメーター算出法を確立した｡それぞれの解析系の弱点を鑑み､全体のリスク評価システムの体系化を試みた｡今後はより多くの被検物質を用いて評価系の予測性を向上させる必要がある。
３　研究成果の有用性	５	胎生～新生期に化学物質に暴露された場合の情緒社会性に対する影響評価法は存在していなかったため､科学的根拠なく食品リスクが指摘される場合もあった。しかし､本研究成果によって､食品中化学物質の情緒社会性リスクを科学的根拠を持って早期に予測することが可能となった。
合　計	１４	
総合コメント　本研究成果によって確立した評価系は今後､より多くの被検物質を用いてさらなる予測性の向上をはかり､その有効性を検証する必要がある。まずは本研究成果を論文化し公開することで、広く意見を求めたいと思う。		

注）評価結果欄は、「５」を最高点、「１」を最低点として５段階で記述する。