

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591237

研究課題名(和文) 胎児期化学物質曝露による中枢神経形成期の神経機能と小児期の行動への影響

研究課題名(英文) Effects of prenatal chemical substance exposure on the neurofunctions at the stage of CNS formation and neurobehavior at juvenile period.

研究代表者

上野 晋 (UENO SUSUMU)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00279324

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではフロン代替物質1-ブロモプロパン(1BP)による胎児期曝露が及ぼす影響について、特に中枢神経形成期の神経機能と小児期の神経行動への影響について焦点を当て、胎児期曝露モデルラットを作製して検討した。その結果、1BP胎児期曝露が形成期の海馬刺激応答性、ならびに小児期での探索行動や記憶能に対して影響を及ぼすことが判明し、化学物質胎児期曝露の影響が成長後に神経行動異常となって出現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we investigated the effect of prenatal exposure to 1-bromopropane (1BP), an alternative to chlorofluorocarbons, on the neurofunctions at the CNS-formation stage and neurobehavior at juvenile period, using rat animal models. As a result, we found that prenatal exposure to 1BP may alter hippocampal stimulus-responsive relationship at the CNS-formation stage, and exploration and short-term memory function at the juvenile period, suggesting that the prenatal exposure to chemicals could induce a postgrowth abnormality of neurobehavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

近年の環境問題に対して国民の意識が高まるとともに、我々の生活環境や産業現場で使用されている様々な化学物質が及ぼす生体影響についても、基礎医学的、臨床医学的そして社会医学的な観点からの研究が必要とされてきている。特に化学物質への曝露が子供の発育や健康に及ぼす影響については

注目度も高まっており、環境省は2009年度からこれに関する大規模な疫学調査を計画している。このような疫学調査とともに、化学物質の小児への生体影響やこれを発症するメカニズムを解明する基礎医学的研究の重要性はさらに高まることが考えられ、その研究成果は社会的にも重要な意義を持つものとなってくる。

申請者らはこれまでに産業現場で用いられる化学物質の生体影響、特に中枢神経学的影響について、その神経毒性発現機構を分子薬理的なレベルで解明することをテーマに研究を行ってきた。その中で主に直接作用を評価するための *in vitro* の系(アフリカツメガエル卵母細胞・哺乳動物系培養細胞による受容体/イオンチャネル遺伝子再構成系)や急性ならびに亜慢性吸入曝露による毒性を評価するための *in vivo* の系(成獣吸入曝露モデル動物の作製)を確立させ、これまでに化学物質(フロン代替物質 1-ブロモプロパン)の標的分子の一つとして中枢神経系の神経伝達物質受容体(GABA_A およびニコチン性アセチルコリン受容体)があり、またその曝露期間・曝露濃度に依存してこれら受容体遺伝子の発現が変動すること、ならびに記憶や情動に関わる海馬神経回路の興奮性が変化することなどを見出した。

これをさらに発展させて、現在は胎児期の化学物質曝露が神経発達に及ぼす影響をテーマとして、胎児期曝露モデル動物の作製に着手している。これまでに化学物質の中には生後 14 日齢のラット海馬神経回路において、その興奮性を変化させるものがあることを見出した。この生後 14 日という日齢は海馬の神経形成に重要な時期であることが示唆されており、またその神経活動を調節している電位依存性 Na⁺チャネルの蛋白発現に特徴的な変化が生じる時期でもあることが報告されている [Beckh S, et al. (1989) Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J.* 12: 3611-3616; Lledo P.-M, et al. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 7: 179-193]。したがってこの時期の神経興奮性の変化が成長後の神経機能、とりわけ小児期の神経・精神発達に何らかの影響を与えている可能性があるのではないかと考えた。

そこで 1) 胎児期曝露モデル動物を用いて、化学物質曝露と神経形成期における海馬神経回路の興奮性への影響との関連を明らかにし、その背景として電位依存性 Na⁺チャネル蛋白の変化が存在するかを検討する、2) 成長後の若年齢期における行動(特に海馬が関与する記憶・情動など)への影響を評価する、いうことに焦点を当てた体系的研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は3ヵ年の期間で以下のような段階的計画をもとに化学物質の胎児期曝露による神経形成期での海馬神経回路興奮性への影響、ならびにその後の若年齢期における行動への影響を検討することを目的とする。

初年度はまず 1-ブロモプロパン(フロン代替物質)胎児期曝露モデル動物を用いて、神経形成期における海馬神経回路の興奮性への影響との関連を検討する。

次年度から最終年度にかけては、得られた胎児期曝露動物の若年齢期(4 週齢～6 週齢)における行動解析に重点を置いた研究を計画している。予定している行動実験は活動量や情動性を評価するオープンフィールド試験、不安様行動を評価する高架式十字型迷路試験、作業記憶(短期記憶)を評価する新奇物体探索試験、受動的回避試験などである。これらの行動試験により、胎児期曝露による若年齢期の情動・記憶などの行動への影響を検討するとともに、初年度に検討した神経形成期での海馬神経回路興奮性との関連についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 1-ブロモプロパン (1BP) 胎児期曝露モデルの作製。
Wistar 系ラット)あるいはの雄と雌を交配させ、インピーダンスチェックにより妊娠を確認したら、翌日より出産前日までの 20 日間吸入曝露チャンバーにより 1BP 濃度 700ppm にて吸入曝露(6 時間/日)を行い、得られた産仔を 1BP 胎児期曝露群とした。また同型チャンバー内で空気曝露を行った、ラットより得られた産仔を対照群とした。生後 20 日目で離乳とし、以降は 1～3 匹/ケージで飼育して、後述する電気生理学的解析ならびに行動試験に用いた。

(2) 電気生理学的解析

生後 14 日齢の対照群・1BP 胎児期曝露群ラットの海馬よりスライス標本を作製し、電気刺激に対する海馬神経回路興奮性～興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) および集合スパイク電位 (PS) を電気生理学的に解析して対照群と比較検討した。さらに 5 週齢の両群ラットの海馬よりもスライス標本を作製し、長期増強 (LTP) の増強度について規格検討した。

(3) 遺伝子解析

生後 14 日齢の対照群・1BP 胎児期曝露群ラットの海馬より total RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法を用いて、Na_v1.1、Na_v1.3 ナトリウムチャネル α サブユニット遺伝子、GluR1 AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット遺伝子の発現量を両群間で比較検討した。

(4) 行動試験

生後 4 週齢時に直径 75 cm の円型フィールドを用いてオープンフィールド試験を行い、探索行動量を両群間で比較検討した。6 週齢時では新奇物体探索試験および受動的回避試験を行い、短期記憶に対する胎児期曝露の影響を検討した。また一部のラットについては成長後の 12～13 週齢時にも再びオープン

フィールド試験、ならびに不安水準を評価する高架式十字迷路試験も行った。

4. 研究成果

(1) 生後 14 日齢における海馬神経回路興奮性に対する 1BP 胎児期曝露の影響。電気生理学的解析から、1BP 胎児期曝露ラットでは海馬 CA1 領域での fEPSP ならびに PS の刺激応答性が対照群と比較し有意に増強していた (図 1)。さらに fEPSP と関連する

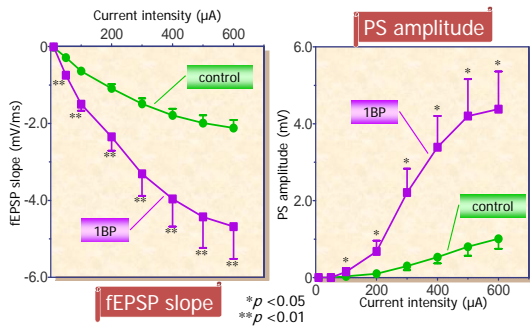


図 1 生後 14 日齢の海馬 CA1 領域における fEPSP および PS の刺激応答性

GluR1 AMPA 受容体サブユニット、PS と関連する $Na_v1.1$ および $Na_v1.3$ Na^+ チャネル α サブユニットの遺伝子発現を検討したところ、対照群と比較して 1BP 胎児期曝露ラットの海馬では GluR1、 $Na_v1.1$ が有意に増加していた (図 2)。以上の結果から、1BP 胎児期曝露によつ

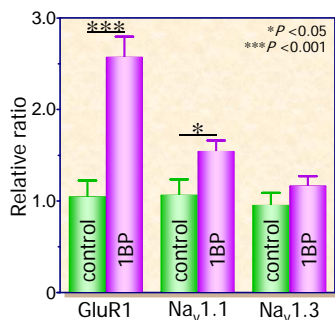


図 2 生後 14 日齢の海馬における GluR1、 $Na_v1.1$ 、 $Na_v1.3$ 遺伝子発現量

て生後 14 日齢という神経発達過程における海馬神経回路の刺激応答性が亢進すること、またこの現象には AMPA 受容体ならびに Na^+ チャネルサブユニットの発現の増加が関連していることが示唆された。

(2) 生後 4 週齢における探索行動量、ならびに 5~6 週齢における記憶機能に対する 1BP 胎児期曝露の影響。

生後 4 週齢時における探索行動量への影響をオープンフィールド試験 (試験時間 10 分) にて評価した。対照群と比べ 1BP 胎児期曝露群では総行動距離ならびに総行動時間に増加傾向が認められた (図 3-4)。

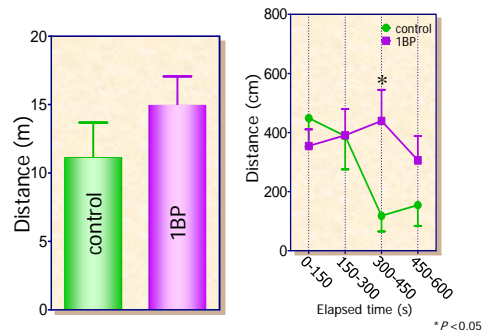


図 3 4 週齢でのオープンフィールド試験における総移動距離 (左) とその経時量変化 (右)

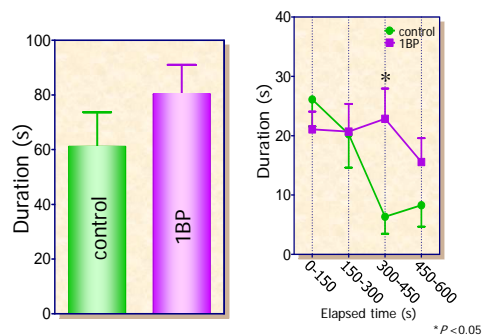


図 4 4 週齢でのオープンフィールド試験における総移動時間 (左) とその経時量変化 (右)

さらに生後 6 週齢において短期記憶を評価する新奇物体探索試験、ならびに受動的回避試験を行った。まず新奇物体探索試験は連続 3 日間の馴化試行の後、4 日目に訓練試行を、5 日目に保持試行を行い、保持試行における総探索時間に対する新奇物体への探索時間の割合 (識別指数) によって評価した。対照群では識別指数が 0.5 (=50%) を有意に超えており、訓練試行における記憶が保持されていたために保持試行における新奇物体への探索行動が増加していることが示唆されたが、1BP 胎児期曝露群では識別指数が 0.5 とは有意差なく、訓練試行における記憶が保持されていないことが示唆された (図 5A)。

また受動的回避試験は 1 日目に訓練試行、2 日目に保持試行を行い、保持試行での暗室に入るまでの時間 (進入潜時) を評価指標とした。訓練試行における電気刺激が $0.16\text{mA} \cdot 2$ 秒間の場合、対照群と 1BP 胎児期曝露群とのでは進入潜時に有意差が認められなかったが、 $0.2\text{mA} \cdot 2$ 秒間では対照群で認められた進入潜時の増加が 1BP 胎児期曝露群では認められなかったことから、ここでも 1BP 胎児期曝露群では訓練試行での記憶が保持されていないことが示唆された (図 5B)。

これと併せて 5 週齢時における海馬の LTP について検討したが、シータバースト刺激 ($3 \times \text{TBS}$ ($100 \text{ Hz} \times 5$, $5 \text{ Hz} \times 5$) @ 20 s) 直後の増強作用に一部有意差が認められたも

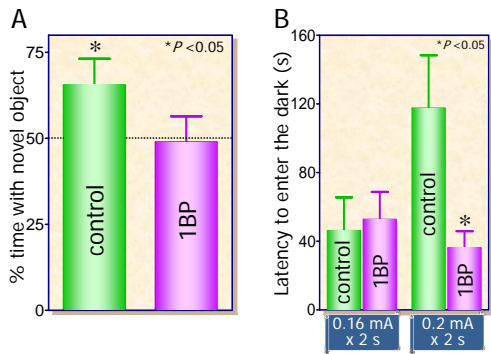


図5 A、6週齢での新奇物体探索試験における識別指標の結果。B、6週齢での受動的回避試験における進入潜時の結果。

この結果、結果的には対照群と1BP胎児期曝露群間での有意差は認められなかった(図6)。

以上の結果から、電気生理学的解析による結果との整合性については今後も検討が必要であるが、1BP胎児期曝露が成長後、若年期の記憶能、特に短期記憶能に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

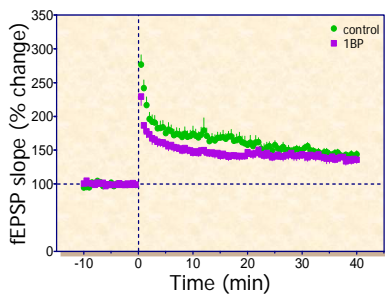


図6 5週齢の海馬より得られたLTP(長期増強)の比較

(3) 生後12~13週齢における探索行動量と不安水準に対する1BP胎児期曝露の影響。

対照群および1BP胎児期曝露群について、さらに成長後の12週齢時に再びオープンフィールド試験を試行した。その結果、総行動距離ならびに総行動時間いずれにおいても4週齢の結果とは一転して1BP胎児期曝露群で有意な減少が認められた(図7-8)。

オープンフィールド試験における探索行動量の減少は不安水準の変化による可能性も考えられたため、13週齢において高架式十字迷路試験を行った。行動量を反映する総アーム進入回数において1BP胎児期曝露群でやはり有意な減少を認めたが、不安水準の指標となるオープンアーム進入回数割合やオープンアーム滞在時間割合では対照群と1BP胎児期曝露群で有意差が認められなかった(図9)。したがって、現時点ではオープンフィールド試験で認められた探索行動量の減少に不安水準、すなわち情動性の変化が関連している可能性は明らかではないが、さらに詳細な検討が必要である。

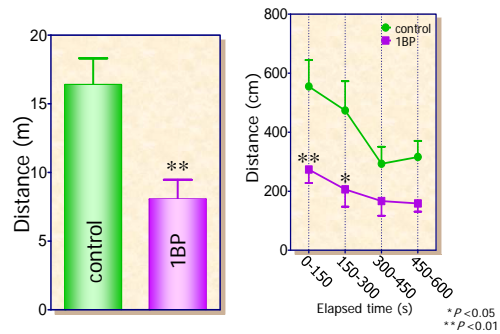


図7 12週齢でのオープンフィールド試験における総移動距離(左)とその経時量変化(右)

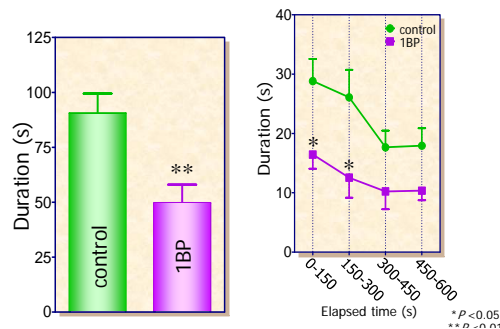


図8 12週齢でのオープンフィールド試験における総移動時間(左)とその経時量変化(右)

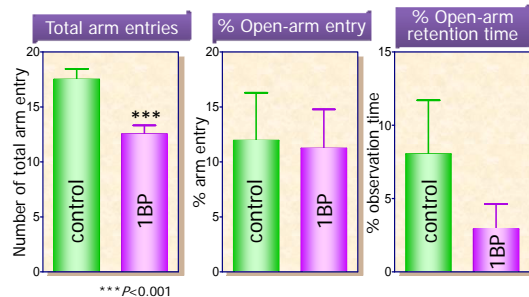


図9 13週齢での高架式十字迷路試験における総アーム進入回数(左)、オープンアーム進入回数割合(中央)、オープンアーム滞在時間割合(右)。

さらに探索行動量については小児期で認められた1BP胎児期曝露の影響が成獣期では異なる形で出現したことから、化学物質の胎児期曝露の影響が小児期と成人期で異なる可能性があることが示唆された。この探索行動量の変化の詳細なメカニズムについては今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

〔学会発表〕（計9件）

- ① 上野 晋、揮発性有機化合物 1-ブロモプロパンの一般および発達神経毒性：モデルラットの神経行動学的表現系に対する影響、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、横浜（パシフィコ横浜）
- ② Yukiko Fueta、Prenatal exposure to 1-bromopropane vapor changes brain excitability in the immature offspring、Neuroscience 2010、2010 年 11 月 16 日、San Diego, USA (San Diego Convention Center)
- ③ 上野 晋、化学物質の胎児期曝露がもたらす次世代の高次脳機能への影響の評価とその機序としてのエピジェネティック変異解析、産業医科大学学会、2010 年 10 月 7 日、北九州（産業医科大学）
- ④ 笛田由紀子、フロン代替化学物質 1-ブロモプロパンへの胎生期曝露は仔ラットの海馬興奮性を成長後も変化させる、Neuro 2010、2010 年 9 月 4 日、神戸（神戸コンベンションセンター）
- ⑤ 上野 晋、次世代の精神・神経発達に対する化学物質曝露の影響－胎児期/小児期曝露モデル動物の行動学的解析－、第 27 回産業医科大学学会、2009 年 10 月 6 日、北九州（産業医科大学）
- ⑥ 笛田由紀子、フロン代替物質 1-ブロモプロパンの次世代幼若仔ラット脳への影響、第 32 回日本神経科学会、2009 年 9 月 18 日、名古屋（名古屋国際会議場）
- ⑦ 上野 晋、胎仔期曝露モデル動物の神経行動学的評価によるフロン代替物質 1-ブロモプロパンの次世代に対する中枢神経学的影響、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年 5 月 20 日、福岡（福岡国際会議場）
- ⑧ 上野 晋、1-ブロモプロパンの胎仔期曝露は出生仔ラットの幼若期および若年期における海馬興奮性と行動を変化させる、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜（パシフィコ横浜）
- ⑨ 上野 晋、フロン代替物質 1-ブロモプロパンの胎仔期曝露による中枢神経学的影響、第 61 回日本薬理学会西南部会、2008 年 11 月 28 日、鳥取（米子コンベンションセンター）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 晋 (UENO SUSUMU)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00279324

(2) 研究分担者

笛田由紀子 (FUETA YUKIKO)
産業医科大学・産業保健学部・助教
研究者番号：10132482
由比友顕 (YUHI TOMOAKI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：60330982

(3) 連携研究者

なし