

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03036

研究課題名(和文) 環境要因による発達障害症状を早期に検出する幼若期モデル動物試験系の確立

研究課題名(英文) Establishment of test method to detect developmental disorders in juvenile animal models by environmental factors

研究代表者

遠山 千春 (Tohyama, Chiharu)

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：10150872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品・環境中の有害化学物質は、こどもの脳の健全な発育を阻害することが懸念されている。人への外挿を念頭に、幼若期マウスの認知的行動における微細な影響を早期に検出し、その阻害のメカニズムを解明するための行動試験法の確立を行った。そのために、成熟マウスの認知行動試験として既に確立した全自動行動試験システムを原型とし、そのハードウェアや試験プロトコルを改良した。その結果、3週齢幼若期からのマウスの認知的行動を全自動で継続的に評価することが世界で初めて可能となった。次に、妊娠マウスへのメチル水銀曝露により、その仔に発達障害様行動異常が現れることを見出し、毒性評価試験系としての有用性も確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

離乳直後の幼若期モデル動物を対象として、化学物質へのばく露に起因する行動変容を検出し、発達途上の脳や末梢組織において生じている異常状態を解明するための新たな学術的研究アプローチが可能となった。確立した認知行動試験は、全自動で実施することができるため、実験の効率性を飛躍的に高めることができる。この手法は、その新規性、効率性から、今後毒性学のみならず、神経科学や精神医学等、様々な生物医学研究分野に応用され、広く社会にその成果が還元されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hazardous chemicals in food and the environment may disturb the infant's brain's natural growth and development. In order to detect the subtle alterations and elucidate the toxicity mechanisms, we aimed to establish behavioral tests for juvenile mice. To this end, we established the hardware and its test protocol by improving the automated cognitive behavioral assay system, IntelliCage, initially developed for adult mice. Consequently, we enabled, for the first time, to evaluate the cognitive behavior of mice 3-week-old and older. Next, we found atypical behaviors in juvenile mice born to methyl-mercury exposed dams and confirmed the applicability of the toxicity evaluation test system.

研究分野：環境保健学

キーワード：認知行動試験 幼若期マウス 高次脳機能 発達神経毒性 リスク評価 安全性評価

1. 研究開始当初の背景

近年、食品・環境中の有害化学物質への妊娠期曝露が、周産期の脳の健全な発育を阻害し、自閉症スペクトラム症（ASD）や注意欠陥多動性障害（AD/HD）といった発達障害の発症要因となり得ることが明らかになってきた。そのため、早急にその作用機序を明らかにし、科学的根拠に基づいた化学物質規制を進めていく必要がある。研究の戦略としては、ヒトの発達障害の好発時期に相当する幼若期モデル動物において、化学物質曝露に起因する行動変容を見出し、同時期に脳や末梢組織でどのような問題が起こっているかを明らかにしていく、というアプローチが考えられる。しかしながら、このような戦略に基づいて研究を遂行するためには、幼若期モデル動物を対象とした認知行動毒性スクリーニング系の確立が必要であった。また、モデル動物を用いた認知行動試験系全般において、実験者であるヒトが動物に触れることにより動物にストレスがかかり、実験結果の大きな変動要因となることが指摘されている。

これらの問題点を克服し、実験の信頼性・効率性を高めるため、ヒトの手を介さない自動化された試験系の必要性が求められている。我々はこれまでに、集団飼育環境下での全自動マウス認知行動解析システム IntelliCage を用いた認知行動解析法の開発を行ってきた。上記の研究戦略を実現するうえで、この方法を幼若期のマウスにも適用することを思い付き、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景をもとに「環境要因に起因する発達障害症状を、より早く正確に検出する幼若期モデル動物試験法」を世界に先駆けて開発することを目的とした。特に、ヒトが実験動物に触れることでその行動試験の結果が大きく変動してしまうという報告をふまえ、ヒトが一切実験動物に触れることなく、全自動で効率的に、幼若期モデル動物の認知行動試験を実施できる試験法を構築することを目指した。

我々はこれまで、集団飼育環境下全自動マウス認知行動解析システム IntelliCage を用い、微量の化学物質（ダイオキシンやビスフェノール A など）の周産期曝露が、成熟後のマウスにおいて様々な認知行動の変容を引き起こされることを明らかにしてきた。しかし、この IntelliCage は体重がおおよそ 20 g 以上の成熟したマウスに適用することを想定してハードウェアがデザインされている。そのため、体重がおおよそ 8~20 g の幼若期マウスを用いて試験を行うと、個体の ID とセンサーデータとの紐づけができず、正確なデータを得ることができない。そこで、この IntelliCage のハードウェアと試験プロトコルを独自に改良することで、離乳直後の 3 週齢期（体重が 10 g 未満）のマウスから IntelliCage を用いた認知行動試験を実施することができるようにすること、そしてその手法が実際に幼若期モデル動物を用いた認知行動毒性スクリーニングに有用であることを確かめることを目指した。

3. 研究の方法

(1) IntelliCage システムの改良と幼若期マウス試験への適用

成熟マウス用の IntelliCage のハードウェア仕様を身体の小さい幼若期マウスに適用可能にすべく、オペラントユニット入口のチューブ型アンテナ部、及びオペラントユニット内部や給水ノズル形状を改良し、幼若期マウス実験に適用可能にするハードウェアの改良を行った。発達期（体重 8~20 g）の複数のマウスの身体 3D モデル、及びそれらのサイズに合うように数種類のハードウェアインサートパーツの 3D モデルを作製し、3D プリンターで造形した。

次に、そのインサートパーツが想定通り幼若期マウスの試験に有用かどうかを確かめるため、C57BL/6Ncr 系統の母マウスから生まれた仔マウスに対し、生後 22 日目にイソフルラン麻酔下で小型マイクロチップ（ISO11784/85）を皮下に埋め込み、翌日 IntelliCage に全てのマウスを入れ、行動の記録を行った。

IntelliCage では、環境馴化後に認知行動試験（空間情報を利用した行動系列の獲得およびその反復的転換課題：SP-FLEX）を行なった（図 1）。SP-FLEX では、マウスに IntelliCage 内に 4 つあるオペラントチャンバー（以下、コーナー）のうち、2 つのコーナーを往復する行動系列の獲得課題を課した。課題実施期間中、個々のマウスの行動系列学習の成績を、Wald の逐次確率比検定を用いてリアルタイムに評価した。正答率が基準値を超えたと判定されたマウスに

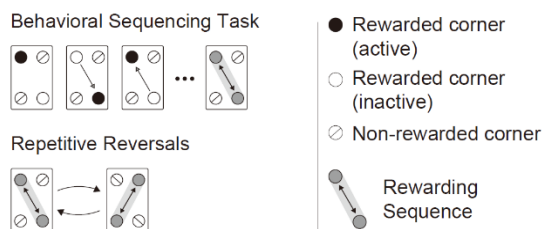


図 1: IntelliCage を用いた認知行動試験課題 (SP-FLEX)

は、その度に新たにそれまでと異なる 2 つのコーナーを往復する行動系列の獲得課題を課した。この課題を 4 週間継続して行った。

(2) 胎仔期 VPA 曝露及び母体免疫賦活化モデルマウスを用いた幼若期マウス行動試験

C57BL/6J 系統の妊娠マウスに対し、妊娠 12.5 日目にバルプロ酸 (VPA) 500 mg/kg 体重を腹腔内投与し得られた仔マウスを、胎仔期 VPA 曝露による発達障害モデルマウスとして実験に使用した。同様に、妊娠 12.5 日目のマウスに Poly(I:C) 20 mg/kg 体重、ないし LPS 60 ug/kg 体重を腹腔内投与し得られた仔マウスを、母体免疫賦活化による発達障害モデルマウスとして実験に使用した。対照群、VPA 投与群、Poly(I:C) 投与群、LPS 投与群の計 4 群について、離乳直後の 3 週齢時に小型マイクロチップを皮下に埋め込み、上記の行動試験システム内に同居させ、4 週間にわたり認知行動試験 (SP-FLEX) を行った。並行して、Poly(I:C) および LPS 投与後の母マウスの血液から、Bio-Plex システムを用いて血漿中の 23 種類のサイトカイン量を測定し炎症反応の程度を評価した。

(3) 周産期メチル水銀曝露モデルマウスを用いた幼若期マウス行動試験

C57BL/6J 系統の妊娠マウスに対し、妊娠 7 日目および 14 日目に体重 1 kg あたり 0 mg (溶媒のみ) もしくは 5 mg の塩化メチル水銀を投与した。溶媒投与妊娠マウスより産まれた雌の仔マウスを対照群とし、5 mg 投与妊娠マウスより産まれた雌の仔マウスを曝露群とした。すべての仔マウスに小型マイクロチップを皮下に埋め込み、3 週齢時より同一の集団飼育環境下で 4 週間にわたる認知行動試験 (SP-FLEX) を実施した。

上記の動物実験は、共同研究者が所属するフェノバンス・リサーチ・アンド・テクノロジー合同会社動物実験委員会および国立環境研究所動物実験委員会の承認を得て実施された。

(4) 統計学的解析

統計学的解析には、GraphPad Prism 8 ソフトウェア上で、繰り返しのある/繰り返しのない二元配置分散分析、Holm-Sidak の方法による多重比較検定、Welch の補正による t 検定のいずれかを用い、有意水準を 5% として検定を行った。

4. 研究成果

(1) IntelliCage システムの改良と幼若期マウスの試験への適用

新規にデザインした IntelliCage のインサートパーツ (図 2) は、既存の RFID リーダーやセンサー類の機能に干渉しないことが確認された。また、実際の幼若期マウスの行動のデータから、IntelliCage のコーナーへのアクセス数および滞在時間、飲水回数といった基礎活動データを正確かつ安定した計測できることも確認された。



図 2: インサートパーツの 3D モデルと実際に成形したインサートパーツ類

このインサートパーツと IntelliCage を用いて、成熟マウス試験用に我々が既に確立した認知行動試験課題（SP-FLEX）を幼若期マウスに適用したところ（図3）、7週間にわたる長期の認知行動データを取得することに成功した（図4）。これにより、当初の目標としていた3週齢以降の幼若期マウスの認知行動スクリーニング系の基礎が完成した。



図3. 3週齢マウスが IntelliCage 内を探索している様子

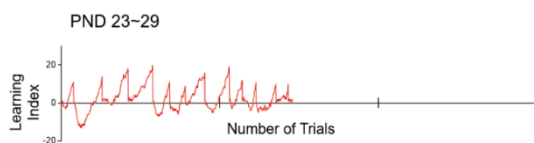


図4. 3週齢マウスから得られたデータ例

(2) 胎仔期 VPA 曝露及び母体免疫賦活化モデルマウスを用いた幼若期マウス行動試験

Bio-Plex システムを用いた試験の結果から、本研究で用いた Poly(I:C) および LPS 投与後の母マウスの体内では想定されたサイトカイン量の増加がみられ、妊娠期母体中での免疫賦活化が確認された。しかしながら、IntelliCage を用いた3週齢以降の幼若期マウスの行動試験では、VPA 投与群、Poly(I:C) 投与群、LPS 投与群のいずれにおいても、対照群との有意な行動学的変化はみとめられなかった。

(3) 周産期メチル水銀曝露モデルマウスを用いた幼若期マウス行動試験

曝露群および対照群のマウスを IntelliCage に入れた直後2日間の活動量を解析した結果、曝露群では対照群と比較して有意な活動量の低下がみられた。その後4週間にわたり SP-FLEX を実施した。この試験では、正常な認知的行動の発達過程として、3週齢から6週齢にかけて行動柔軟性指標の1つである不必要な反復的ノーズポーク行動数が減少する様子が両群で確認された。ただし、4週齢時には同指標において曝露群は対照群よりも有意に高い値を示しており、認知的行動発達に遅れがあることが示唆された。以上から、この新たな試験系を用いることで、環境要因に起因する発達障害に関連する症状を幼若期モデル動物において早期検出できることがわかった。

以上から、目的としていた「環境要因に起因する発達障害症状を、より早く正確に検出する幼若期モデル動物試験法」の確立、およびその手法が実際に幼若期モデル動物を用いた認知行動毒性スクリーニングに有用であることを確かめることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 遠藤俊裕、前川文彦、遠山千春
2. 発表標題 幼若期マウスの全自動認知行動毒性試験法の確立
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihiro Endo, Fumihiko Maekawa, Chiharu Tohyama
2. 発表標題 Development of an automated cognitive behavioral testing method for juvenile mice in a group-housed environment and its application to developmental neurotoxicological study
3. 学会等名 EUROTOX 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤俊裕、前川文彦、遠山千春
2. 発表標題 幼若期マウスの全自動認知行動毒性試験法の確立
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihiro Endo, Fumihiko Maekawa, Chiharu Tohyama
2. 発表標題 Development of an automated cognitive behavioral testing method for juvenile mice in a group-housed environment and its application to developmental neurotoxicological study
3. 学会等名 EUROTOX 2021/2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 俊裕、ベナー 聖子、遠山 千春
2. 発表標題 「個性」はいつ現れるか? : 離乳後からの全成長過程を追うマウス高次脳機能 試験系の確立
3. 学会等名 第8回日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 俊裕、ベナー 聖子、Hans-Peter LIPP、遠山 千春
2. 発表標題 幼若期マウスにおける集団飼育ホームケージ環境下全自動認知行動試験法の確立
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiro ENDO, Seico BENNER, Hans-Peter LIPP, Chiharu TOHYAMA
2. 発表標題 Automated Cognitive Assay for Juvenile Mice:An application to a mixed-sex colony of C57BL/6N strain in IntelliCage
3. 学会等名 第6回アジア神経精神薬理学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiro ENDO, Seico BENNER, Hans-Peter LIPP
2. 発表標題 Development of an automated neurotoxicological assay in juvenile mice
3. 学会等名 Society of Toxicology 59 th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	遠藤 俊裕 (Endo Toshihiro)		
研究協力者	前川 文彦 (Maekawa Fumihiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	University of Zurich			