

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510084

研究課題名(和文) 社会的行動の評価による揮発性有機化合物の発達神経毒性とそのバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Developmental neurotoxicity of volatile organic compounds: the evaluation of social behaviors and the developing of biomarkers

研究代表者

上野 晋 (UENO, Susumu)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：00279324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は揮発性有機化合物の発達神経毒性の評価、ならびに評価指標に応用できるバイオマーカーの探索であり、実験には有機溶剤1-ブロモプロパン(1BP)の胎生期曝露モデルラットを用い、その結果として一過性ではあるが離乳直後の飼育環境が探索行動量に影響を及ぼすことが判明した。また脳神経回路の刺激応答性の発達が1BP胎生期曝露により亢進することを見出し、その機序の一部に脳への臭素イオンの蓄積が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to evaluate developmental neurotoxicity of volatile organic compounds, and to explore a biomarker which can be applied to an evaluation index for the toxicity. We used model rats which were prenatally exposed to an organic solvent 1-bromopropane (1BP), and as a result, we found that a breeding environment soon after weaning day could affect exploration activity, although it was observed transiently. Additionally, we found that prenatal 1BP-exposure could enhance the development of the stimulation-response relationship in brain neural circuit, which could partly due to an accumulation of bromine ion in brain.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：1-ブロモプロパン 揮発性有機化合物 胎生期曝露 海馬神経回路 神経行動 飼育環境 臭素イオン

### 1. 研究開始当初の背景

化学物質曝露が子供の精神・神経発達に及ぼす影響、すなわち発達神経毒性については社会的にも非常に注目度が高くなっている。最近ではトキシコゲノミクスに代表される手法を用いて、脳内遺伝子・タンパク質レベルでの網羅的解析による毒性評価の試みも多くなされている。加えて高次の精神・神経機能に対する毒性評価の必要性が求められるようになり、ラットやマウスを用いた神経行動学的表現型についても研究が始められているが、行動試験については非常に多くの実験動物を必要とする試験であること、母体を含む様々な環境因子の影響も考慮する必要があること、動物実験で得られた結果とヒトの疾患との関連性を明確にする必要があることなど課題も多く、更なる知見の集積が望まれているところである。

申請者らはこれまで揮発性有機化合物の神経毒性に関して、電子部品洗浄剤である1-ブロモプロパン(1BP)について研究しており、毒性発現機構を分子薬理学的レベルで解明してきた。さらに最近では1BPの発達神経毒性を神経行動学的解析により評価する研究に着手している。しかしながら、個体間の相互関係のような社会的行動に対する影響の評価も必要とされること、さらに発達神経毒性評価にはスクリーニング試験法の開発に役立つ基礎研究が求められることなどを踏まえ着想に至ったのが本研究課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は化学物質、特に1BPを中心とした揮発性有機化合物の発達神経毒性について、社会的行動への影響を踏まえた神経行動による評価、揮発性有機化合物の発達神経毒性をスクリーニング的に評価するための基礎実験、ならびに曝露指標となるバイオマーカーの試験的探索である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 1BP 胎生期曝露モデルの作製

Wistar系ラット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、その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胎生期曝露群とした。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。

#### (2) 海馬神経回路の電気生理学的解析

生後13~15日齢の対照群および1BP胎生期曝露群ラットの海馬よりスライス標本作製し、CA1領域における電気刺激に対する神経回路興奮性~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。

#### (3) 神経行動学的評価

生後14日齢の対照群および1BP胎生期曝

露群の仔ラットに対して、カイニン酸(KA、0.1~2.0 mg/kg)あるいはペンチレンテトラゾール(PTZ、60 mg/kg)を腹腔内投与してその後30分間におけるKA誘発性wet dog shakes(WDS)、あるいはPTZ誘発性けいれん発作を観察した。

さらに離乳後の対照群および1BP胎生期曝露群の仔ラットを単独飼育(1匹/ケージ)あるいは集団飼育(3~4匹/ケージ)として、生後4週齢時に直径75cm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、探索行動を評価した。

#### (4) 1BP 脳内濃度のリアルタイムサンプリング

あらかじめガイドカニューレを装着した雄性Wistarラットの海馬に再生セルロース透析膜プローブを挿入し、1BP(3,000 ppm、4時間)を吸入曝露しながら、シリンジポンプを用いて生理食塩水(0.1% DMSO 添加)を流速0.5 μL/minでプローブに灌流した。灌流液をクロマトチューブに集め、ヘッドスペース法による濃度分析を一定時間間隔で行った。

#### (5) 臭化ナトリウム(NaBr)の胎生期曝露モデルの作製

20または25 mMのNaBrを含んだWistar系妊娠ラットに妊娠第1日から20日間、NaBr(20または25 mM)を含んだ水溶液を飲水として自由摂取させた。得られた産仔ラットに対して、生後14日齢で前述したPTZ誘発性けいれん発作を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 生後13~15日齢の海馬における海馬興奮性/抑制性神経回路発達、ならびにこれに対する1BP胎生期曝露の影響

海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析から、対照群では生後15日齢における刺激応答性の亢進が認められた。一方、1BP胎生期曝露群では生後14日齢より刺激応答性の亢進を認め、1BP胎生期曝露により興奮性神経系の発達が亢進している可能性が示唆された(図1A・B&2)。

さらに二連続刺激によるPSのペアパルス

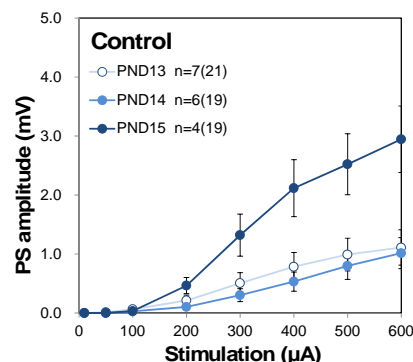


図1A 生後13日齢(PND13)から15日齢(PND15)での対照群から得られた、海馬CA1領域におけるPSの刺激応答性。数値はラットの匹数(カッコ内はスライス標本数)。

比を検討したところ、対照群と比較して、1BP 胎生期曝露群では生後 13 日齢より刺激間隔 10 ms でのペアパルス比が有意に減少しており、抑制性神経系についても 1BP 胎生期曝露により発達が進んでおり、しかも興奮性神経系よりも 1 日早く出現していることが判明した(図 3)。つまり 1BP 胎生期曝露によって

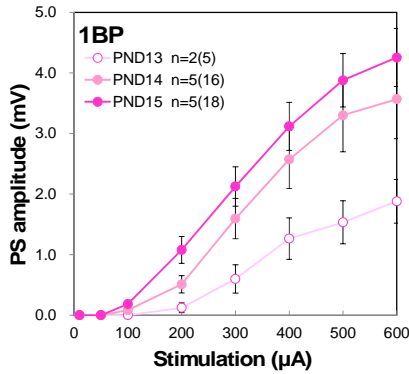


図 1B 生後 13 日齢(PND13)から 15 日齢(PND15)での 1BP 胎生期曝露群から得られた、海馬 CA1 領域における PS の刺激応答性。数値はラットの匹数(カッコ内はスライス標本数)。

抑制性神経系の発達の亢進が先行する形で、興奮性および抑制性いずれの神経系においても発達亢進を認めただけである。これらの現象が発達神経毒性の新たな指標に活用できる可能性を検証すべく、現在その機序について検討中である。

## (2) 神経行動学的解析

電気生理学的解析から得られた生後 13~15 日齢における、興奮性/抑制性神経系の発達の亢進を踏まえて、生後 14 日齢における KA 誘発性 WDS の出現率、ならびに PTZ 誘発性けいれん発作出現率を検討した。KA 誘発性 WDS については、低用量(0.1 あるいは 0.5 mg/kg)の KA における発作出現率が有意に低下していた~0.1 mg/kg で対照群は 11 匹中 11 匹、1BP 胎生期曝露群で 7 匹中 4 匹、0.5 mg/kg で対照群は 5 匹中 5 匹、1BP 胎生期曝露群で 5 匹中 2 匹であった。また PTZ により誘発される強直発作出現率については、対照群 31 匹中 20 匹、1BP 胎生期曝露群で 19 匹中 0 匹と、こちらでも有意な減少を認めた。

ラット・マウスにおいて、離乳後の飼育環境はその後の社会的行動に影響を及ぼすことが知られている。そこで離乳後に個別飼育(1 ケージあたり 1 匹)と集団飼育(1 ケージあたり 3~4 匹)という異なる環境下での飼育を行い、オープンフィールド試験による探索行動量を評価した。

まず離乳直後より個別飼育と集団飼育を開始して 1 週間以内、すなわち仔ラットが 4 週齢時に試験を行った。対照群では総行動距離に有意な差は認められなかった。一方、1BP

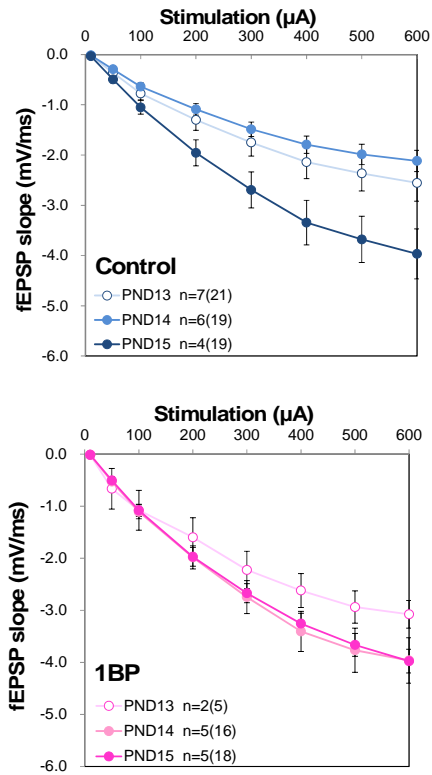


図 2 生後 13 日齢(PND13)から 15 日齢(PND15)での対照群(上図)および 1BP 胎生期曝露群(下図)から得られた、海馬 CA1 領域における fEPSP の刺激応答性。数値はラットの匹数(カッコ内はスライス標本数)。

胎生期曝露群では集団飼育のラットにおいては集団飼育を行った群において有意な減少が認められ、またこの群が他の 3 群と比べても探索行動量が最も少ない傾向にあった(図 4)。

一方、5 週齢で同様の試験を行ったところ、4 群すべてにおいて探索行動量が増加しており、4 週齢時では認められた 1BP 胎生期曝露群での個別飼育群と集団飼育群間での有意差は消失し、他の群間比較での有意差も認め

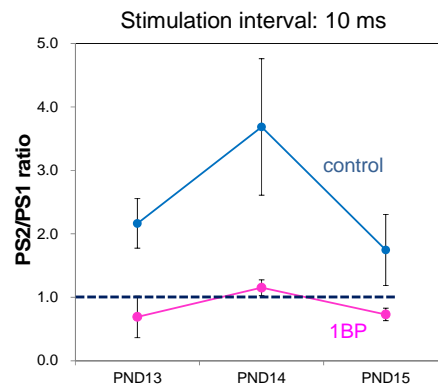


図 3 生後 13 日齢(PND13)から 15 日齢(PND15)での対照群(上図)および 1BP 胎生期曝露群(下図)から得られた、海馬 CA1 領域における PS のペアパルス比(刺激間隔 5 および 10 msec)。

られなかった(図5)。

このことから 1BP 胎生期曝露の影響が離乳後の飼育環境の違いにより顕在化する可能性があり、特に集団飼育により探索行動量が減少していたことから、社会的行動の発達に重要な集団による飼育がむしろストレスと

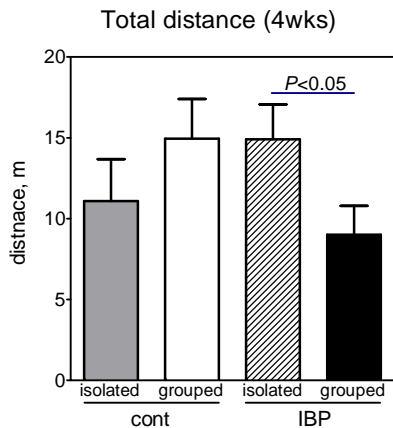


図4 生後4週齢での対照群および1BP胎生期曝露群のオープンフィールド試験(総行動距離)の結果。

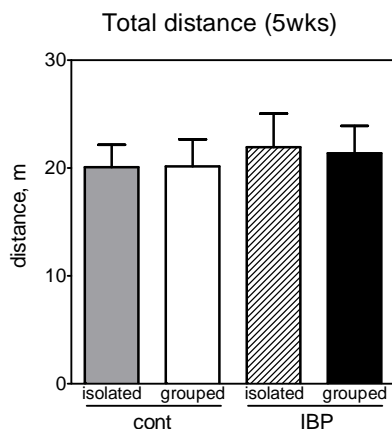


図5 生後5週齢での対照群および1BP胎生期曝露群のオープンフィールド試験(総行動距離)の結果。

なり、オープンフィールド試験という新奇環境下での順化に影響を与えた可能性が考えられる。しかしながら5種齢時にはその影響が消失していることから、一過性である可能性も否定できない。今後は飼育条件も考慮し、成長とともに一般的に神経行動がどのように変化していくのか検討する必要がある。

抗てんかん薬であるバルプロ酸(VPA)の胎生期曝露動物は自閉症のモデル動物として確立されている。我々は最近、VPA胎生期曝露ラットの生後2週齢前後での海馬神経回路において、1BP胎生期曝露で観察された興奮性および抑制性神経系の発達亢進と非常に類似した現象が観察されることを見出している(投稿準備中)。1BPの胎生期曝露が自閉症のような表現型を示す可能性も考えられ、今後の課題と考えている。

### (3) 1BP 脳内濃度と半減期

まず人工脳脊髄液(ACSF)を用いて 0.1 mM の 1BP 溶液を調整し、マイクロダイアリシスプローブの 1BP 回収率を求めたところ  $36.9 \pm 7.5\%$  であった。一方、1BP を吸入曝露しながら脳内 1BP をサンプリングしていった結果、回収 1BP 濃度は曝露停止時に最大値  $0.044 \pm 0.014$  mM となった。したがって今回の回収率を考慮した脳内濃度は約 0.12 mM と算出された。その後回収濃度は徐々に減少し、これより求められた半減期は  $5.9 \pm 2.1$  時間であった。

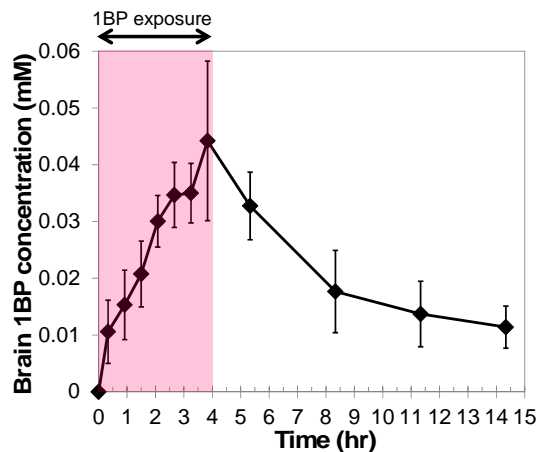


図6 リアルタイムサンプリングによる1BP脳内濃度(3,000 ppm、4時間の吸入曝露)の推移。

た(図6)。以前我々は血液中の1BPの半減期が約20分であることを報告しているが、今回の結果から脳内の半減期はその約18倍と長く、1BPは脳内蓄積性が高いことを示唆している。このことから、曝露停止後に血中濃度が検出限界以下になったとしても、脳神経系では蓄積した1BPによる曝露が持続している可能性が考えられる。

### (4) NaBr 胎生期曝露による脳内臭素イオン濃度とPTZ誘発性けいれん発作への影響

NaBrの摂取が終了した翌日(出産当日)における母ラットおよび胎仔ラットの脳内臭素イオン濃度を測定したところ、前者は約  $570 \mu\text{g/g-tissue}$ 、後者は約  $705 \mu\text{g/g-tissue}$  と、胎仔ラットの方が有意に高く胎仔脳に臭素イオンがより蓄積することが判明した。また生後14日齢における臭素イオン濃度は約  $194 \mu\text{g/g-tissue}$  であり、出産当日と比べて約20%程度まで低下しているものの、対照群(約  $10 \mu\text{g/g-tissue}$ )と比べ有意に高い値であった(図7)。

一方、PTZで誘発される強直発作の出現について生後14日齢で検討したところ、対照群における出現率(20匹中11匹、55%)に比べ、NaBr胎生期曝露群における出現率(33匹中1匹、3%)が低下していた。またこのNaBr胎生期曝露群における出現率は1BP胎生期曝露群におけるそれ(19匹中0匹)に匹敵するものであった。この結果は電気生理学的解析の結果から得られた、この時期の海馬における

抑制性神経系の亢進とも一致すると考えられ、脳内臭素イオンの蓄積が関与している可能性が示唆される。

1BP 胎生期曝露の中枢神経学的影響においては、少なくとも生後2週齢頃に認められる抑制性神経系への影響指標として脳内臭素イオン濃度が考えられる。有機溶剤には臭化合物も多いことから、臭化合物全般につ

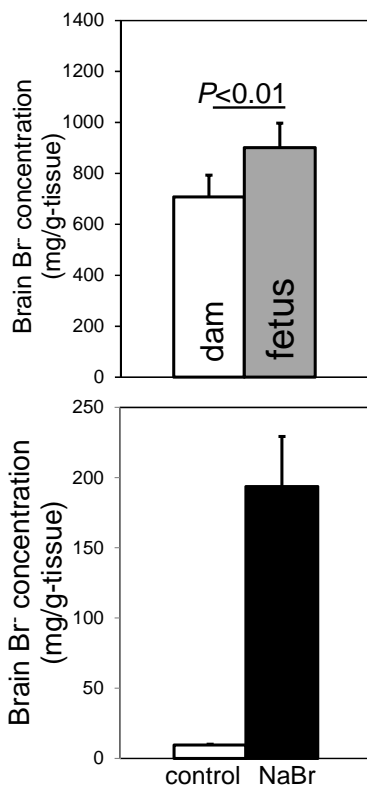


図7 (上)妊娠21日目でのNaBr飲水母親ラット脳およびその胎仔脳における臭素イオン濃度。(下)生後14日齢での対照群ならびにNaBr胎生期曝露群における脳内臭素イオン濃度

いて臭素イオン濃度の測定が神経毒性評価指標として重要な役割を果たすことになるかもしれない。そのためにも血中臭素イオン濃度と脳内臭素イオン濃度との相関関係をより詳細に検討することが必要である。一方、興奮性神経系の亢進については臭素イオンの蓄積で生じているとは考えにくく、この点についてはそのメカニズム自体を検討する必要がある。

#### 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25件)

1. 上野 晋、授乳期モデルラットの脳神経回路解析による発達神経毒性評価法とその応用、第87回日本産業衛生学会、

2014年5月24日、岡山(岡山コンベンションセンター)

2. 笹田由紀子、1-プロモプロパンの発達神経毒性：臭素イオンの関与、第87回日本産業衛生学会、2014年5月22日、岡山(岡山コンベンションセンター)
3. Yukiko Fueta、Alterations of Postnatal Development of Feedback Inhibition and Basic Excitability in the Hippocampus of Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid. Society of Toxicology 53rd Annual Meeting and ToxExpo, 2014年3月12日、USA (Phoenix Convention Center)
4. 笹田由紀子、授乳期の海馬CA1領野回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討、第31回産業医科大学学会総会、2013年10月26日、北九州(産業医科大学)
5. 松野瑞希、臭化ナトリウムを子宮内曝露した胎児ラットの脳内臭素イオン濃度の測定、第31回産業医科大学学会総会、2013年10月26日、北九州(産業医科大学)
6. 上野 晋、有機溶剤1-プロモプロパンの胎生期曝露が若年期ラット海馬興奮性の非対称性に及ぼす影響についての検討、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月19日、千葉(幕張メッセ国際会議場)
7. 笹田由紀子、有機溶剤の中枢神経毒性評価のためのin vitro直接投与系の開発、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月19日、千葉(幕張メッセ国際会議場)
8. 佐田 勇、マイクロダイアリシス法を用いた1-プロモプロパン吸入曝露ラットにおける脳内曝露指標のリアルタイムサンプリング、第86回日本産業衛生学会、2013年5月16日、松山(ひめぎんホール)
9. 笹田由紀子、自閉症モデル動物を用いた海馬の局所回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討、第86回日本産業衛生学会、2013年5月16日、松山(ひめぎんホール)
10. Yukiko Fueta、Prenatal exposure to 1-bromopropane changes basic excitability of the hippocampus and inhibits the behaviors induced by kainic acid and pentylentetrazole in the rat offspring during lactation period、Society of Toxicology 52nd Annual Meeting and ToxExpo, 2013年3月12日、USA (Henry B. Gonzalez Convention Center)
11. 池田 航、再生セルロース膜を用いた1-プロモプロパンの回収、第24回日本産業衛生学会 産業神経・行動学研究会、2012年12月8日、東京(東京女子医科大学)

12. 佐多 勇、マイクロダイアリス法を用いた脳内 1-ブロモプロパンのリアルタイムサンプリングシステムの開発、第 24 回日本産業衛生学会 産業神経・行動学研究会、2012 年 12 月 8 日、東京（東京女子医科大学）
  13. 池田 航、透析膜を採取したラット脳脊髄液内の 1-ブロモプロパン濃度の測定、第 30 回産業医科大学学会総会、2012 年 10 月 20 日、北九州（産業医科大学）
  14. 佐田 勇、吸入曝露モデルにおける脳内曝露指標のリアルタイムサンプリングシステム、第 30 回産業医科大学学会総会、2012 年 10 月 20 日、北九州（産業医科大学）
  15. Susumu Ueno、Neurobehavioral effects in rats subchronically/prenatally exposed to 1-bromopropane: Comparison to its direct effects on neurotransmitter receptors、The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology、2012 年 7 月 20 日、仙台（仙台国際センター）
  16. Yukiko Fueta、Prenatal exposure to 1-bromopropane, a substitute of ozone depleting chemicals, changes hippocampal basic excitability and drug-induced behaviors in the rat offspring during lactation period、The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology、2012 年 7 月 20 日、仙台（仙台国際センター）
  17. 笹田由紀子、フロン代替溶剤 1-ブロモプロパン胎生期曝露による仔ラット脳の興奮性への影響、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台（仙台国際センター）
  18. 上野 晋、フロン代替物質 1-ブロモプロパンの亜慢性/胎生期曝露によるラットの神経行動学的影響、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台（仙台国際センター）
  19. 金光雅成、授乳期ラットの scratching 及び wet-dog shake の行動発現に対する 1-ブロモプロパン胎生期曝露の影響、第 85 回日本産業衛生学会、2012 年 5 月 31 日、名古屋（名古屋国際会議場）
  20. 笹田由紀子、1-ブロモプロパン胎生期曝露モデル動物を用いた次世代脳の神経生理学的影響評価の検討、第 85 回日本産業衛生学会、2012 年 5 月 31 日、名古屋（名古屋国際会議場）
  21. 金光雅成、授乳期ラットの行動に対する 1-bromopropane 胎生期曝露の影響、第 23 回日本産業衛生学会 産業神経・行動学研究会、2011 年 12 月 2 日、名古屋（名古屋大学）
  22. 福田瑠美、幼若ラットの脳神経発達における 1-ブロモプロパン胎児期曝露の影響 ペンチレンテトラゾール感受性と曝露濃度、第 29 回産業医科大学学会総会、2011 年 10 月 18 日、北九州（産業医科大学）
  23. 笹田由紀子、1-ブロモプロパン胎生期曝露は次世代ラットにおいて海馬興奮性の asymmetry を修飾する、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜（パシフィコ横浜）
  24. 上野 晋、フロン代替物質 1-ブロモプロパンの胎生期曝露が及ぼす若年期の記憶機能への影響、日本産業衛生学会平成 23 年度九州地方会、2011 年 7 月 1 日、佐賀（アバンセ）
  25. 笹田由紀子、海馬シナプスの長期増強に対する 1-ブロモプロパン曝露の影響、第 84 回日本産業衛生学会、2011 年 5 月 18 日、東京（東京都立産業貿易センター浜松町館）
- 〔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・産業生態科学研究所・教授  
研究者番号: 00279324
- (2) 研究分担者  
笹田由紀子 (FUETA Yukiko)  
産業医科大学・産業保健学部・講師  
研究者番号: 10132482
- 吉田安宏 (YOSHIDA Yasuhiro)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10309958
- 石田尾 徹 (ISHIDA Toru)  
産業医科大学・産業保健学部・講師  
研究者番号: 10132482
- (3) 連携研究者  
なし