

研究課題名

化学物質による脳機能攪乱の高感度検出

Highly sensitive detection of brain function disturbance by chemical substances

研究代表者

平井 杏梨

北海道大学大学院 獣医学院 D3

研究分担者

池中 良徳

北海道大学大学院 獣医学研究院 附属動物病院トランスレーショナルリサーチ推進室 教授

拠点構成員

野見山 桂

研究目的

一部の神経受容体モジュレーターは情報伝達に影響を及ぼすが、病理学的変化を伴わないこうした変化は検出が困難であり、現行の毒性評試験法はその評価法として不十分である。情動認知行動などの高次脳機能は情報伝達攪乱の指標として使用されるが、これには神経細胞やグリア細胞、神経伝達物質など複数の素因が複雑に関与しあっているため、細胞系などの単純な *in vitro* 試験系では評価は困難であり、*in vivo* の評価系を構築する必要がある。

注意欠如・多動性障害 (ADHD) などのいくつかの神経疾患は、農薬などの化学物質への曝露との関連性が示唆されており (Nilsen et al., 2020)、広く使用される農薬であるネオニコチノイド (NNs) について、本来毒性影響が認められない用量である無毒性量に曝露されたマウスで**不安様行動の増加** (Hirano et al., 2018)や脳神経活動の変化 (Hirai, Sugio, et al., 2022)、カテコールアミンの変

動 (Hirai, Yamazaki, et al., 2022)が観察されることが知られている。こうした背景から近年、より適切な神経毒性影響評価が求められ始めている。

そこで本研究では、NNs などの nAChRs アゴニストをモデル化合物とし、未だ毒性学分野で一般的に使用されていない手法に着目して *in vivo* 曝露試験を実施することによって、神経受容体モジュレーターが情動認知行動に影響を与える機序を解明し、これらの情報伝達攪乱を高感度に検出できる試験系を確立することを目的とする。

研究方法

C57BL/6 マウスを対照群と曝露群の二つに分け、曝露群には NNs の一つであるアセタミプリド(ACE)を経口投与した。ACE の投与濃度は、マウスにおける NOAEL である 20mg/kg 体重とした。投与から 30 分後に高架式 0 字迷路 (EZM)を実施し、脳を採材して、LC/MS/MS によりモノアミン濃度を分析した。

さらに、行動試験と同様の方法および濃度でマウスに ACE を投与し、30 分後に脳を採材して、凍結切片を作製した。この切片を抗セロトニン抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察することで、不安に関するセロトニン系において重要な脳部位である縫線核(RN)でのセロトニン活性を調べた。

また、Arc-Cre/ ER^{T2};Ai14 トランスジェニックマウスについて、行動試験と同様の投与方法および濃度を用いて化学物質を投与した後、投与 1 時間後に 4-OHT を投与した。マウス脳内における蛍光タンパク質の発現を約 1 ヶ月間待った後、脳を採材して凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡によって観察した。

研究成果

成果 1：ACE 誘発性不安様行動における脳内モノアミンの関与

ACE の投与 30 分後に、不安様行動が増加する傾向にあり ($p=0.057$)、迷路内での活動性は有意に低下した (図 1)。また、海馬と線条体において、ドーパミンとその代謝産物である 3-MT、セロトニンが増加した。縫線核を含む脳部位である脳幹では、セロトニンの増加が観察された。

これらのモノアミン濃度は EZM 直後に採材した脳サンプルを用いて分析して

いるため、EZM における結果とモノアミン濃度について相関解析を行った。Spearman の順位相関係数が有意な相関は対照群と ACE 群で異なり、特に海馬セロトニンは、ACE 投与群のみにおいて、不安様行動の指標であるオープンアームでの滞在時間と有意に相関した (図 2)。また、線条体ドーパミンにおいても同様の有意な相関が観察された。

セロトニン 1A 受容体アゴニストを海馬にマイクロインジェクションすると不安様行動が増加することが知られており (File et al., 2000)、海馬セロトニンが ACE 誘発性の不安様行動においても重要な役割を果たす可能性が示唆された。

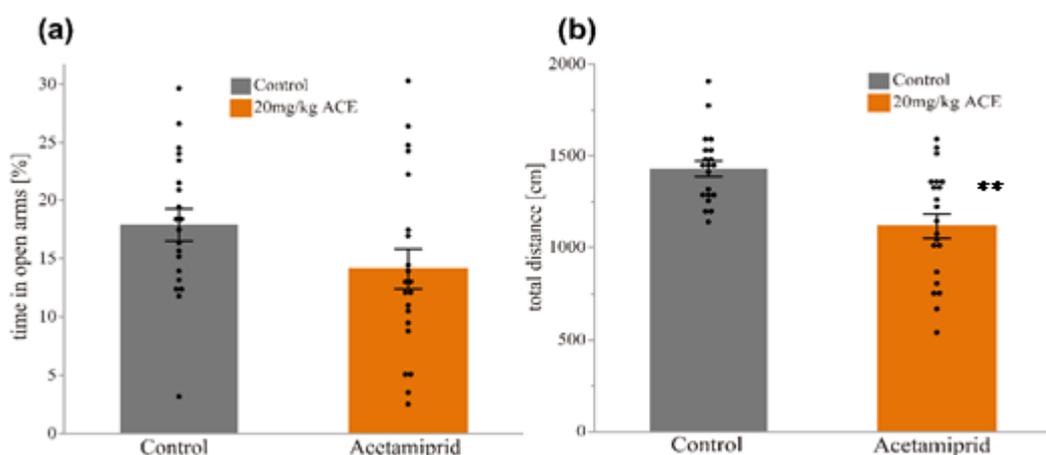


図 1. EZM における行動変化. (a)オープンアームでの滞在時間、(b)総移動距離

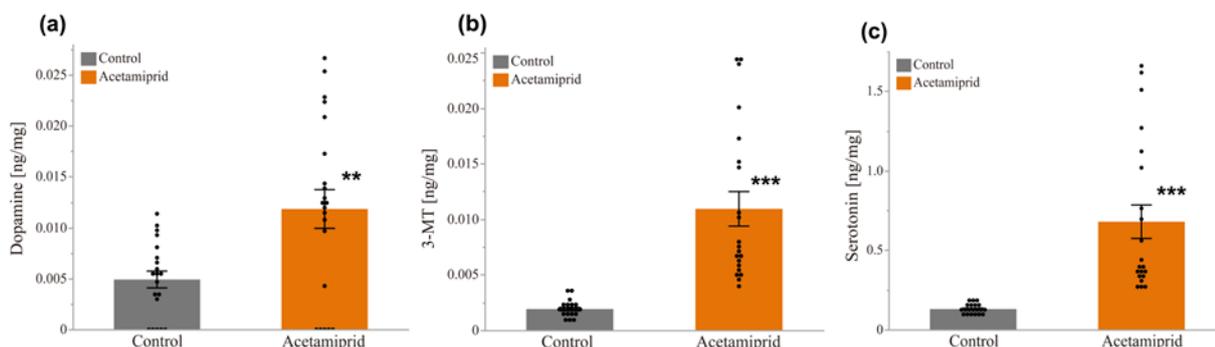


図 2. 海馬における (a)ドーパミン、(b)3-MT、(c)セロトニンの濃度.

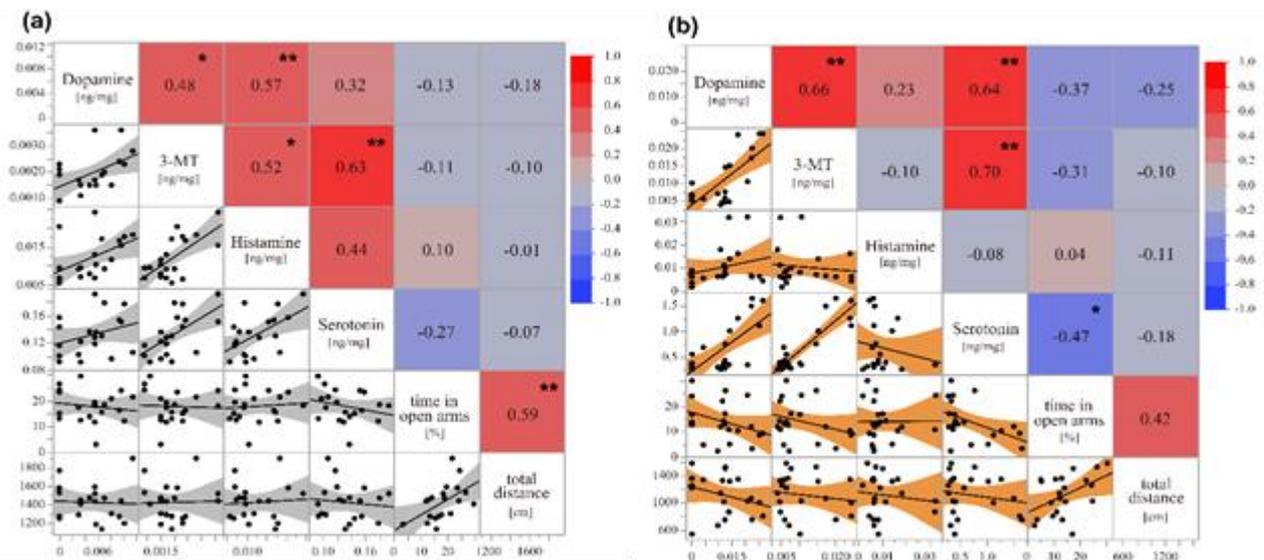


図 3. (a)対照群および(b)ACE 群における、行動と海馬モノアミン濃度の相関。

成果 2 : ACE による縫線核セロトニン活性の変化

前脳に投射するセロトニン神経の 50%以上は縫線核に起始し、主要なドーパミン経路は縫線核作動性神経によって支配されている。また、縫線核のセロトニン作動性神経を直接刺激すると、海馬セロトニンの放出を介して不安様行動が増加することが知られている (Abela et al., 2020; Ohmura et al., 2014)。

成果 1 とこれらの先行研究から、縫線核のセロトニンが ACE 誘発性の不安様行動に参与している可能性が示唆されたため、抗セロトニン染色により縫線核のセロトニン活性を調べた。共焦点顕微鏡で背側縫線核を観察し、赤色蛍光によって標識された細胞数を ImageJ を用いてカウントしたところ、ACE 投与群において染色原性を示す細胞数が有意に増加した (図 4)。

縫線核は、前述の通り海馬セロトニンの放出を介して不安を誘発するほか、恐怖に対する防御反応の一つとして知られるすくみ行動が、縫線核から下丘という脳領域へのセロトニン作動性経路の活性化によって引き起こされることも報告されている (da Silva Soares et al., 2019)。本研究では、EZM において総移動距離の減少が観察されたが、縫線核でのセロトニン活性が増加したことをふまえると、これは活動性の減少だけではなく、すくみも反映している可能性がある。

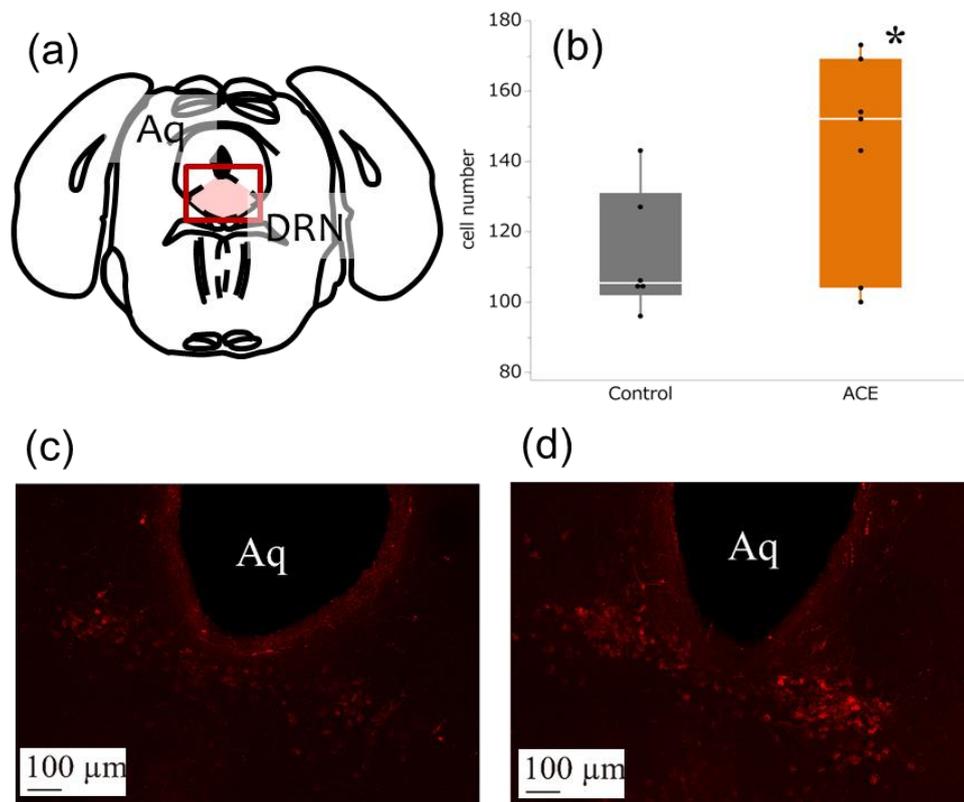


図 4. 背側縫線核におけるセロトニン活性. (a)観察領域、(b)染色原性を示した細胞数、(c)対照群および(d)ACE 群の鏡検画像の一例. DRN: 背側縫線核、Aq: 中脳水道

今後の課題

Arc-Cre/ ER^{T2};Ai14 トランスジェニックマウスを用いた実験について、自家繁殖による系統維持が上手くいかず、今年度は成果をあげることが出来なかった。来年度に The Jackson Laboratory から親ペアを新しく導入する予定なので、抗セロトニン抗体による染色も併用しながら研究を続けていく。

また、現在は単一の投与濃度でのみ実験を行っているが、複数の濃度段階における神経毒性影響も調べる必要がある。

本成果から、ACE による不安様行動にはセロトニン系への影響が重要であることが示唆された。神経毒性影響の機序をより詳細に解明するため、ブレインスライサーを用いた縫線核におけるセロトニン濃度の測定や、MSI による網羅的な解析などについて検討する。