

200839025A

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

化学物質による神経伝達物質受容体を介した精神毒性発現機序の解明および

行動評価方法の開発に関する研究

平成 20 年度 研究報告書

Studies on the mechanism of chemical -induced psychological toxicity through neurotransmitter receptors and the development of algorithm for analyzing psychological abnormalities induced by chemicals.

**Annual Report
Research on Risk of Chemical Substances,
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2008
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)**

平成 21 年 3 月

主任研究者 鍋島俊隆

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質による神経伝達物質受容体を介した精神毒性発現機序の解明および

行動評価方法の開発に関する研究

平成20年度 研究報告書

Studies on the mechanism of chemical -induced psychological toxicity through neurotransmitter receptors and the development of algorithm for analyzing psychological abnormalities induced by chemicals.

Annual Report
Research on Risk of Chemical Substances,
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2008
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成21年3月

主任研究者 鍋島俊隆

平成 20 年度 研究報告書の刊行にあたって

主任研究者 鍋島 俊隆

厚生労働省発衛研第 4 1 2 号をもって交付決定の通知をうけた平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）課題名「化学物質による神経伝達物質受容体を介した精神毒性発現機序の解明および行動評価方法の開発に関する研究」について、その総括研究報告書、分担研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 21 年 3 月吉日

目次

1. 平成 20 年度総括研究報告	7
2. 平成 20 年度分担研究報告	13
化学物質の周産期暴露による情動性障害機構に関する研究 (名城大学大学院薬学研究科・薬品作用学研究室 鍋島俊隆)	15
妊娠後期における化学物質暴露が生後の学習・記憶行動に及ぼす影響 (名城大学薬学部・薬品作用学研究室 間宮隆吉)	29
神経発生・発達過程における化学物質・環境ストレス負荷による高次精神機能の変容 (名城大学大学院薬学研究科・病態解析学 野田幸裕)	36
周産期における異常免疫応答による神経精神毒性に関する研究 (名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学講座／医学部附属病院薬剤部 山田 清文)	47
新生仔期に polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を投与したマウスの海馬におけるタンパク発現の変化 (名古屋大学大学院医学系研究科・臨床薬物情報学・医療薬学 永井 拓)	54
3. 刊行物一覧(平成 20 年度)	61
4. 主任研究者・分担研究者一覧	239

平成 20 年度 総括研究報告

主任研究者 鍋島俊隆

化学物質による神経伝達物質受容体を介した精神毒性発現機序の

解明および行動評価方法の開発に関する研究

概 要

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。一方、脳神経系の発達がダイナミックに起こる周産期は化学物質に対して脆弱である。特に、神経情報伝達の基盤となる受容体は胎児期から新生児期にかけて形成されるため化学物質に曝露される危険性が最も高いと考えられる。統合失調症、注意欠陥・多動性障害や広汎性発達障害などの精神疾患は、遺伝的素因に加えて発生・発達過程における環境的要素（化学物質曝露、感染、ストレスなど）が相互的に作用して発症すると考えられている。したがって、神経伝達異常を引き起こす化学物質が子供の精神発達へ悪影響を及ぼすことは明白であるが、その詳細なメカニズムは不明であり、化学物質による行動評価系も確立されていない。

我々は日常生活において化学物質に曝露されている可能性が高く、環境・食品汚染に関する情報は報道機関でも大きく取り上げられるほどの社会問題となっている。また、少子化を迎えた現代社会において化学物質が子供の精神発達に及ぼす影響を明らかにすることは最重要課題である。本研究では、化学曝露による危険性を胎児期から検討しているため、妊婦および彼女らを取り巻く国民の安全意識の向上に大きく貢献すると考えられる。しかし、化学物質が情動・認知行動に与える影響を考える場合、数万種に及ぶ化学物質に固有の毒性と化学物質全般に共通する毒性を考える必要がある。本研究は、化学物質による固有の毒性と生体との相互作用を介した情動・認知行動への影響の評価手法の開発に貢献する。また、広汎性発達障害、注意欠陥・多動性障害、統合失調症や気分障害やうつ病などの他の精神疾患との臨床的・病態生理学的類似性から種々の精神疾患に対する発症メカニズムの解明にも応用することが可能である。さらに、精神疾患を診断するバイオマーカーを提唱することが可能となれば、病態に即した新たな予防法・治法の開発によって精神医学領域における医療の標準化などの国内的対応策を提案することができると考えられる。

本研究では情動性・認知機能に重要な役割を果たしていると考えられる神経伝達物質受容体に着目し、平成20年度までに①グルタミン酸受容体拮抗薬〔フェンシクリジン (PCP)、MK-801〕が情動性、学習・記憶、認知機能などの化学物質に固有な精神発達障害を誘発することを明らかにした。②異常免疫応答を惹起する化合物〔polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C)〕を用いて化学物質による生体との相互作用を介した

精神発達障害が引き起こされることを明らかにした。③PolyI:C の暴露による脳内のタンパク質発現変化をプロテオーム解析によって調べ、候補タンパク質を同定した。④アセチルコリン受容体に対して選択的に作用するニコチンを用いて精神発達障害を行動表現型から明らかにする研究を開始した。

また、平成 20 年度厚生労働科学研究（化学リスク研究推進事業）シンポジウム「健康と化学物質－化学物質と幼児行動－」では、化学物質による心の知能の障害について講演し、国民を啓蒙した。

本年度の成果および状況

1. PCP の周産期暴露による情動性障害機構に関する研究

（名城大学大学院薬学研究科・鍋島俊隆）

妊娠 ICR マウスへ胎生 6.5 日目（E6.5）より出生まで PCP の皮下投与を行い、その仔マウスに対し生後 28 日目（P28）の時点で各種行動試験を行った。その結果、PCP 投与群では、新規物体認知試験において認識記憶障害、Y 字迷路試験において短期記憶障害、強制水泳試験において無動時間の延長、プレパルス抑制試験において情報処理機能障害が確認され、統合失調症様の著しい行動異常を呈することが明らかになった。この一連の行動異常は D-セリンの投与により緩解し、さらに、P56 前頭皮質において NMDA 受容体の NR1 サブユニットのリン酸化レベルが減少していたことから、グルタミン酸作動性神経系の機能が障害されている可能性が示唆された。また、PCP の投与が周産期の神経発生に与える影響を組織化学的解析により検討したところ、大脳皮質においてグルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞が分裂障害を生じている可能性が示され、さらに P7 前頭皮質において神経細胞数の減少が確認された。以上の結果より、胎生期における PCP の投与は、発生段階におけるグルタミン酸作動性神経細胞数の低下、および成体期における NMDA 受容体の機能低下により、グルタミン酸作動性神経系の機能障害を生じ、成体期まで長期持続する行動異常を惹起したと考えられる。

2. 妊娠後期における MK-801 およびニコチン処置が生後の精神発達におよぼす影響

（名城大学薬学部・間宮隆吉）

ICR 系および C57BL/6 系雌性マウス（10 週齢）の性周期を確認後に交配させ、妊娠後 6 日目から出産前日まで（MK-801 0.02 および 0.2 mg/kg、ニコチン 0.5 および 1 mg/kg）を処置した。薬物処置された母マウスから生まれた仔マウスについて生後 5 週および 7 週に各種行動試験を行った。ニコチン（0.5 および 1 mg/kg）および MK-801（0.02 mg/kg）を妊娠母体に投与しても成熟仔マウスの行動に顕著な変化は認められなかった。新奇物体認知試験、高架式十字迷路試験および社会的相互反応試験において、生理食塩液投与群と比べて MK-801（0.2 mg/kg）を投与したマウスでは障害が観察された。したがって、MK-801（0.2 mg/kg）は認知機能および情動機能の発達を障害することが示唆された。ニコチン

(0.5 および 1 mg/kg) は仔マウスの行動に対して特に影響をおよぼさなかったため、投与条件の検討が必要である。

3. 神経発生・発達過程における化学物質・環境ストレス負荷による高次精神機能の変容 (名城大学大学院薬学研究科・野田幸裕)

本研究では、環境的要因の一つである社会ストレスをマウスの発達過程に負荷した場合、高次精神機能にどのような影響を与えるか行動解析した。また、PCP が社会ストレス負荷マウスの社会性行動に与える影響について検討した。攻撃性が高い 4 週齢以上の ICR 系雄性マウスの飼育ケージに発達過程にある 3 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを入れ、1 日 10 分間連続して 10 日間物理的に接触させた (社会ストレス: stress 群)。攻撃性が低い ICR 系雄性マウスの飼育ケージに入れた以外は、stress 群と同様に行った群を control 群とした。社会性行動試験には、オープンフィールドの端に透明アクリル樹脂製のボックス (標的マウス区域) が設置された装置を使用した。第 1 セッションでは、標的マウス区域に標的マウスを存在させず、第 2 セッションでは標的マウスを存在させて、装置内に各群を入れ、標的マウス区域に近づいた (交流区域) 時間を測定した。なお、control 群と stress 群がこれまでに一度も接触したことがない ICR 系マウスを標的マウスとして用いた。その結果、control 群では、第 2 セッションの交流区域滞在時間は、第 1 セッションのそれと比較して有意に延長したが、第 2 セッションにおいて標的マウスを存在させなかった場合では、そのような延長は認められなかった。したがって、標的マウスが標的マウス区域に存在する場合、control 群は標的マウスに対して社会性行動を示したものと示唆される。しかし、stress 群では、第 2 セッションの交流区域滞在時間は標的マウスが存在しているにもかかわらず、第 1 セッションのそれと比較して有意に延長せず、control 群のそれと比較して有意に短縮していた。したがって、神経発生・発達過程のマウスに社会ストレスを負荷すると、社会性行動が障害されることが示唆された。一方、生理食塩水あるいは PCP (10 mg/kg/day) を 7 日間連続投与し、最終投与の 1 および 8 日後に社会性行動試験を行ったところ、PCP の連続投与は社会性行動の発現を減弱させるが、顕著に障害させなかった。以上のように本研究において、環境ストレス負荷モデルとその機能評価系を確立した。

4. 周産期における異常免疫応答による神経精神毒性に関する研究

(名古屋大学大学院医学系研究科・医学部附属病院 山田清文)

本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて研究を行った。具体的には、生後 2 日目から 6 日目までの 5 日間、ICR 系マウスに合成 2 本鎖 RNA アナログである (polyI:C, 5 mg/kg) を皮下投与し、周産期擬似ウイルス感染モデルを作製した。PolyI:C 処置マウスが 10 週齢に達した後、学習記憶および情動の異常を系統的な行動解析により調べた。PolyI:C 処置マウスはコントロール群と比較して、不安様行動の増加、学習記憶や感覚情報処理機能の障害および社会性行動の異常を示した。しかし、自発運動活性やメタンフェタミンおよび NMDA 受容体アンタゴ

ニストである MK-801 により誘発される多動には変化は認められなかった。さらに、polyI:C 処置マウスでは、学習記憶や情動に関与している海馬におけるグルタミン酸の基礎遊離量が増加し、逆に高カリウム刺激による脱分極誘発性グルタミン酸遊離は低下した。DNA アレイを用いた解析により、polyI:C 処置マウスの海馬において mRNA レベルが 50%以下に有意に低下した 4 つの遺伝子 (Srd5a21, Creg2, Ptgds および機能不明の遺伝子) を見出した。一方、リアルタイム PCR 法による解析では、Ifitm3 mRNA が polyI:C 最終投与 2 時間から 24 時間後まで持続的に増加することが明らかになった。

4. 新生仔期に polyI:C を投与したマウスの海馬におけるタンパク発現の変化

(名古屋大学大学院医学系研究科：永井 拓)

自然免疫機構を活性化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyI:C を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。二次元電気泳動によってタンパクを分離した結果、2 個のスポットに有意な発現変化が認められた。polyI:C 投与群において発現が増加したスポットが 1 個、逆に発現が減少したスポットが 1 個検出された。発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1) および collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) を同定した。それぞれのタンパクに対する特異的抗体を用いてイムノブロットングを行った結果、polyI:C 投与群において ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.7 倍減少していた。PolyI:C 最終投与 24 時間後のマウスの海馬において、ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群の 1.4 倍に増加した。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群の 0.8 倍に減少していた。以上の結果から、新生仔期に polyI:C を投与したマウスにおいて発現が変化するタンパク群が存在することが明らかとなった。

今後は、これらの研究結果を踏まえて各化合物による精神発達障害の発現機序を明らかにして行動評価系・治療薬・予防法を考案する。

平成 20 年度 分担研究報告

化学物質の周産期暴露による情動性障害機構に関する研究

主任研究者：鍋島俊隆

研究協力者：鳥海和也、陸玲玲

名城大学薬学部薬品作用学

[研究要旨]

周産期は神経系形成途上であるため、内外からの様々な要因に対し非常に感受性の高い時期であり、この時期に化学物質を暴露すると、神経系形成に関わる精緻な分子機構を攪乱させ、成体期まで影響を残す神経発達障害を生じる危険性が高い。非競合的 N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体アンタゴニストであるフェンシクリジン (PCP) は、1970 年代に乱用され、その薬物依存者は統合失調症に類似した精神症状を呈することが知られている化学物質である。近年、出生直後のマウスに対する PCP 投与が、成体期まで長期持続する統合失調症様行動変化を呈することが示された。しかし一方で、周産期前期にあたる胎生期においては PCP 投与例が少なく、その影響については未知の点が多い。そこで本研究では、胎生期における PCP の効果を行動的、組織化学的に検討を行うことを目的とし、以下の実験を行った。妊娠 ICR マウスへ胎生 6.5 日目(E6.5)より出生まで PCP の皮下投与を行い、その仔マウスに対し生後 28 日目 (P28)、P56 の時点で各種行動試験を行った。その結果、PCP 投与群では、新規物体認知試験において認識記憶障害、Y 字迷路試験において短期記憶障害、強制水泳試験において無動時間の延長、プレパルス抑制試験において情報処理機能障害が確認され、統合失調症様の著しい行動異常を呈することが明らかになった。この一連の行動異常は D-セリンの投与により緩解し、さらに、P56 前頭皮質において NMDA 受容体のサブユニットのひとつである NR1 のリン酸化レベルの減少が生化学的解析により示されたことから、グルタミン酸機能が障害されている可能性が示唆された。また、PCP の投与が周産期の神経発生に与える影響を組織化学的解析により検討したところ、大脳皮質においてグルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞が分裂障害を生じている可能性が示され、さらに P7 前頭皮質において神経細胞数の減少が確認された。以上の結果より、胎生期における PCP の投与は、発生段階におけるグルタミン酸作動性神経細胞数の低下、および成体期における NMDA 受容体の機能低下により、グルタミン酸機能障害を生じ、成体期まで長期持続する行動異常を惹起したと考えられる。また、上記結果に加え、P56 前頭皮質においてドパミンおよびセロトニンの代謝回転の低下が示された。今後は、グルタミン酸作動性神経とモノアミン作動性神経の相互作用についても、詳細に検討していきたい。

A. 研究目的

周産期とは、ヒトにおいては妊娠 22 週以降の胎児期と生後 7 日未満の新生児期を合わせた期間

と定義され、出産前後に跨るため、合併症妊娠や分娩時の新生児仮死など、母体、胎児、新生児の生命に関わる事態が発生する危険性の高い時期でもある。また、周産期には多くの器官の発達が

起こるため、内外からの様々な要因に対し非常に感受性が高く、薬剤の投与や化学物質の暴露には特に注意を要する。この時期における化学物質の暴露が、様々な発達障害を引き起こした例としては、1950年代後半に睡眠薬のサリドマイドを服用した妊婦が多く、奇形児を産んだ例が挙げられる。最近では抗血液凝固剤のワーファリンと抗痙攣剤のバルプロ酸ナトリウムが、同様の症状をもたらすことが報告されている。

周産期の器官発達の中でも特に神経系の発達は化学物質の影響を受け易く、神経系形成に関わる精緻な分子機構が攪乱し、成体期まで影響を受け、神経発達障害を生じる危険性が高い。本研究で使用した、フェンシクリジン(PCP)は、NMDA受容体非競合的アンタゴニストであり、1970年代に乱用され、その薬物依存者は統合失調症に類似した精神症状を惹起することが知られている化学物質である^{1,2)}。マウスにおいても、成体期にPCPを単回投与、長期投与をすると統合失調症様の行動変化を惹起することが報告されている。また、PCPを周産期後期である出生後の新生児期に投与する実験が行われ、成体期まで長期持続する統合失調症様行動変化を呈することが分かってきた^{3,4)}。しかし一方で、NMDA受容体は周産期前期においても神経発達において重要な役割を担っていることが数多く報告されているが、その時期におけるPCPの投与に関する知見は少なく、その影響など未知の点が多いのが現状である。そこで、本研究では、周産期前期、つまり胎生期においてPCPの投与を行い、神経発達にどのような影響を及ぼすか、行動学的、生化学的、組織化学的解析を行い、評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には、野生型であるICR系マウス(中部科学資材、愛知)を使用した。室温 23 ± 1 °C、湿度

50 ± 5 %で、明暗サイクル(明期8時~20時)の室内にて飼育し、水および餌は自由に摂取させた。交配は暗期に行い、翌日プラグを確認できたものを胎生0.5日目(E0.5)とした。

なお、本実験計画はPrinciples of Laboratory Animal Care(National Institutes of Health Publication 85-23, 1985)に準じて行った。

実験には、我々が合成したPCPと、D-セリン(Sigma)を使用した。

2. 投与スケジュール

妊娠ICRマウスに対し、E6.5よりE18.5まで、PCPの皮下投与を10 mg/kg/dayで行い、その仔マウスに対し、各種行動試験、及び免疫組織化学的解析を行った。

3. 新規物体認知試験

出生後28日目(P28)、P56の時点において、新規物体認知試験を行った。オープンフィールド(30×30 cm、高さ35 cm)に、3日間、10分間ずつ入れ、環境に慣れさせた後、二つの異なる物体を箱の中に設置し、マウスを10分間自由に探索させ、各物体に対する探索時間を計測した(Training試行)。その24時間後に、片方の物体を新奇物体と置き換え、10分間自由に探索させ、各物体に対する探索時間を測定した(Retention試行)。全探索時間における新奇物体に対する探索時間の割合を算出し、その値を探索試行性(Exploratory Preference)として評価値とした。

4. Y字迷路試験

出生後P28、P56の時点において、Y字迷路試験を行った。1本のアームの長さが40cm、壁の高さ12cm、床幅3cm、上部幅10cmの3本のアームがそれぞれ120度の角度で接続されたY字迷路を用いた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後、8分間にわたって装置内を自由に散策さ

せ、移動したアームの位置をその順に記録した。連続して異なる3つのアームを選択した組み合わせを算出し、アーム総進入回数から2を引いた値に対する割合をAlternation (%) として、評価値とした。

5. 強制水泳試験

出生後P28、P56の時点において、強制水泳試験を行った。水(水温22°C、深さ13cm)の入ったシリンダー(直径15cm、高さ20cm)にマウスを入れ、その直後から1分間隔で4分間、無動時間をScanet MV-10 AQ(ブレインサイエンス・イデア社)により測定した。

6. プレパルス抑制試験

バックグラウンドとして65dBのホワイトノイズの流れる防音箱の中に設置されたチャンバー(長さ105mm、内径38mm、外径50mm)内に、マウスを入れ、10分間慣れさせた後、測定を開始した。

(1) バックグラウンド: 65dB ホワイトノイズのみ。(2) 驚愕反応: 40ミリ秒続く本刺激音(120dB ホワイトノイズ)のみ。(3) プレパルス抑制: 20ミリ秒プレパルス音(74、78、86dB ホワイトノイズ)を流した100ミリ秒後に、40ミリ秒続く本刺激音(120dB ホワイトノイズ)。上記(1)から(3)をランダムに、各10回ずつ試行し、本刺激音に対するチャンバー内での動きの最大値を、驚愕反応の程度として検出した。驚愕反応抑制率は、以下の式により算出した: 驚愕反応抑制率(%) = $100 \times [1 - (\text{各プレパルスでの驚愕反応}) / (\text{プレパルスなしでの驚愕反応})]$

7. D-セリンによる拮抗実験

D-セリン(Sigma)はP56において各行動試験の30分前に、0.5または1.0g/kgの容量で腹腔内に投与した。行動試験は、上記と同じ方法で行った。

8. ウェスタンブロッティング法

マウスを断頭し、摘出した脳から氷冷下で前頭皮質を摘出し、測定を行うまで-80°Cで凍結保存した。脳サンプルは溶解バッファー[20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin, and 10 mg/mL pepstatin (pH 7.4)] 中4°Cでソニケーターにより超音波破碎し、ホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルを13000×gで20分間遠心分離し、得られた上清を使用した。タンパク質量を調整したサンプルにサンプルバッファー[0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 0.002% bromphenol blue, and 5% 2-mercaptoethanol]を加えた後、95°Cで5分間煮沸した。タンパク質(20 mg)は10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(Millipore Corporation)へ蛋白質を転写し、Detector Block Kit (Kirkegard and Perry Laboratories)を加えてブロッッキングした。

PVDF膜に1次抗体[抗phospho-NR1抗体: 1:1000 dilution, phospho-NR1 (Ser897) Antibody #06-641, Millipore]を加え、インキュベーションした後、2次抗体[horseshoe peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:2000 dilution)]を加え、インキュベーションした。ウェスタンブロッティング検出試薬のECL (GE Healthcare Biosciences)を用いて免疫複合体を検出し、NR1リン酸化タンパク質の発現量を画像解析により算出した。次いで、総(リン酸化および非リン酸化)NR1タンパク質の発現量を調べるため、ストリッピングを行い、1次抗体(anti-NR1) [1:1000 dilution, NMDA zeta 1 Antibody #sc-1467, Santa cruz]を加え、インキュベ

ーションした。以降、上述と同様の処理を行い、総 NR1 タンパク質の発現量を算出した。結果は、得られたリン酸化 NR1 のバンドを NR1 のバンドで補正し、コントロール群に対する発現量を百分率 (%) として示した。

9. HPLC 法

マウスを断頭し、氷冷下で前頭前皮質を摘出し、使用するまで -80°C で保管した。内部標準物質 (Isoproterenol) を加え、0.2M perchloric acid の存在下で超音波によりホモジナイズし、タンパク質を除去した。遠心分離 ($20,000\times g$, 15 分, 1°C) により上清採取したものを、酢酸ナトリウムで pH 調整し、フィルターろ過したものをサンプルとして用いた。サンプル中のモノアミン代謝物含有量は、HPLC-ECD (Eicom) を用いて測定した。

10. Nissl 染色法

P7 においてマウスより脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS 液に 2 晩浸漬した。その後、一日おきに、5%、10%、20%スクロース /PBS へと移した。その脳サンプルは、OCT Compound (サクラ精機) 内で凍結させ、クリオスタットにより、 $20\mu\text{m}$ の厚さで脳スライスを作成後、スライドガラス上に載せ、一晩乾燥させた。その後、スライドを、下記の順に浸漬し染色を行い、乾燥後、封入剤により封入し、AxioCam HRc (Carl Zeiss) により観察を行った。

染色方法：キシレン 1 分、キシレン 1 分、100%エタノール 1 分、100%エタノール 1 分、95%エタノール 1 分、85%エタノール 1 分、70%エタノール 2 分、50%エタノール 1 分、超純水 1 分、染色液 [Cresyl violet acetate 0.5g, H₂O 60ml, 0.1M 酢酸ナトリウム 6ml, 0.1N 酢酸] 90 秒-2 分、超純水 2 分、50%エタノール 1 分、70%エタノール 1 分、85%エタノール 1 分、95%エタノール 1 分、100%エタノール 1 分、100%エタノール 1 分、キシレン 1

分、キシレン 1 分

11. BrdU

各投与時期において、BrdU (50 mg/kg, Sigma) を PCP 投与の 3 時間後に腹腔内投与した。その後、各検出時期において、上記の方法で脳スライスを作成し、BrdU ラベリング&ディテクションキット II (Roche) により検出を行い、二次抗体として、Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG (Invitrogen) を使用した。染色後は AxioCam HRc (Carl Zeiss) により観察を行った。

12. 免疫組織化学染色

母マウス子宮より、胎生期仔マウスを出し、そのまま 4% PFA/PBS に浸漬し固定を行った。その後、上記と同様の方法で、厚さ $5\mu\text{m}$ の脳スライスを作成し、乾燥させた。

スライド上の脳切片に、4%PFA/PBS を載せ、室温で 15 分静置した後、PBS で洗浄した。その後、メタノールを載せ、室温で 20 分静置した後、完全に乾燥させ、Permeabilization バッファ [0.3% Triton-X100, 100mM Tris-HCl (pH7.6)] に 37°C で 30 分間浸漬させた。その後、スライドを Antimasking Solution (Vector) に移し、オートクープにより 105°C で 2 分間、煮沸した。室温で完全に冷した後、PBS で洗浄し、Blocking Solution [10% FBS, 0.2% ブロックエース (雪印), PBS] を載せ、室温で 1 時間、静置した。その後、液を除去し、一次抗体液 [Blocking Solution に各抗体を添加したもの。Pax6: 1:1000 dilution, Pax6 Antibody #ab5790 Abcam, PCNA: 1:1000 dilution, PCNA Antibody #M0879 DAKO cytovation, Tbr2: 1:1000 dilution, Tbr2 Antibody #ab23345, Abcam] を載せ、 4°C で一晩、静置した。スライドを洗浄し、二次抗体液 [Blocking Solution に各抗体を添加したもの。抗マウス抗体: 1:1000 dilution, Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG #A11001 Invitrogen, 抗マウス抗体: 1:1000

dilution, Alexa Fluor® 568 Goat Anti-rabbit IgG #A11011 Invitrogen]を添加し、遮光し室温で3時間静置した。その後、スライドを洗浄し、封入剤により封入を行い、AxioCam HRc (Carl Zeiss) により観察を行った。

13. 統計解析

結果は平均値±標準誤差として示した。得られた結果は、one-way および two-way による分散分析を行い、群間比較には、Student's t-test および Bonferoni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が5%以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. 胎生期 PCP 暴露による成体期の行動への影響

まず、胎生期における PCP 暴露が、成体期の行動に与える影響を評価するため、P28、P56 において、各種行動解析を行った。

はじめに、新奇物体認識試験を行った。本試験は、マウスが新奇性を好むという習性を利用した試験で、マウスを二つの異なる形をした物体が設置された装置内に入れて自由に探索させ (Training 試行)、その24時間後、片方の物体を新奇物体と置換し、再び探索させる (Retention 試行)。正常なマウスでは Training 試行における物体に対する探索時間に比べ、新奇物体に対する探索時間が増加することから、認知記憶を評価することができる系である。なお、統合失調症の主症状のひ

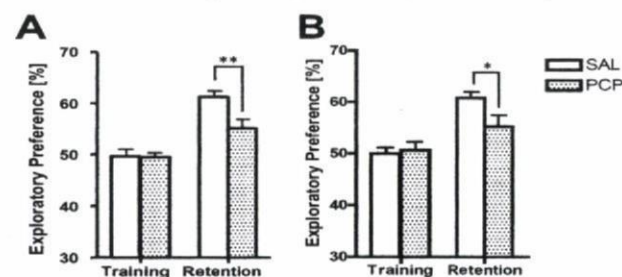


Fig. 1: Novel object recognition test at P28 and P56
In training and retention session at P28 (A) and P56 (B), exploratory preference for 10 min was measured. Data are means ± SEM (n=20). *p<0.05 and **p<0.01 by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferoni test.

とつとして、この認知記憶能力の障害が知られている。この試験の結果、P28、P56 ともに PCP 投与群において、探索嗜好性の減少が確認され、認知記憶能力の低下が示された (Fig. 1)。

次に、Y字迷路試験を行った。この試験は、マウスの自発的交替行動を利用し、短期記憶を評価することができる系である。自発的交替行動とは、Y字迷路内を進路探索する際に、直前に入ったアームとは異なったアームに入ろうとする習性に基づく行動のことで、試験ではマウスが異なる3本のアームを連続して選択した割合を計測する。連続して異なるアームに進入するためには、少なくともその前に選択したアームを記憶している必要があるため、短期記憶を評価できると考えられている。この試験の結果、P28、P56 ともに PCP 投与群において、短期記憶能力の低下が示された (Fig. 2)。

次に強制水泳試験を行った。この試験では、水を入れた狭いシリンダーにマウスを入れ、その無動時間の時間経過を観測する。水に入れたマウスは初め、そこから逃げようと激しく動くが、やがて水に浮かんでいるだけで動かない状態 (無動状態、または絶望状態) となる。この無動時間の増加は、統合失調症における陰性症状の指標として用いられる。この試験の結果、P28、P56 ともに PCP 投与群において、無動時間の増加が確認され、

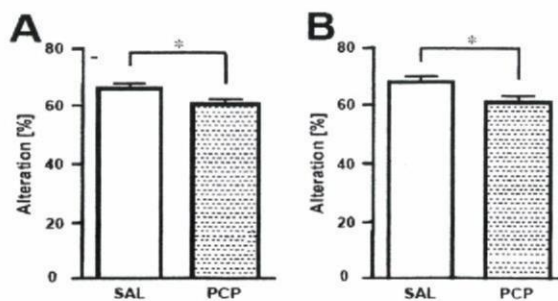


Fig. 2: Y-maze test at P28 and P56
In Y-maze test at P28 (A) and P56 (B), alteration(%) for 10 min was measured. Data are means ± SEM (n=15-16). *p<0.05 by Student's t-test.

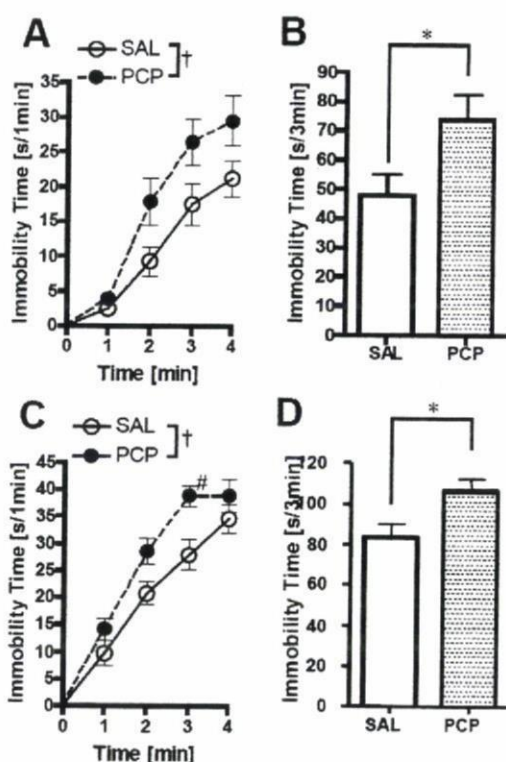


Fig. 3: Forced-swim test at P28 and P56

Immobility time was measured at 1 min interval for 4 min at P28 (A) and P56 (C). Data are means \pm SEM (n=20). †p<0.05, #p<0.05 by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferroni test. Total immobility time for 3 min except early 1 min was measured at P28 (B) and P56 (D). Data are means \pm SEM (n=20). *p<0.05, by Student's t-test.

統合失調症の陰性症状様の行動異常を呈していることが示された (Fig. 3)。

さらに、プレパルス抑制試験を P56 の時点においてのみ行った。この試験では、大きな音を突然マウスに聴かせると、驚愕反応を生じるが、その直前にそれよりも小さな音を聞かせると、その後の大きな音に対する驚愕反応が抑制されるという「プレパルス抑制」という現象を利用して、マウスの情報処理機能を評価することができる。実際、統合失調症の患者でも、このプレパルス抑制試験において障害が認められることが報告されている。この試験の結果、P56 の PCP 投与群において、驚愕反応抑制率の低下が示され、情報処理機能の障害が確認された (Fig. 4)。以上の行動試験より、胎生期の PCP 投与により、

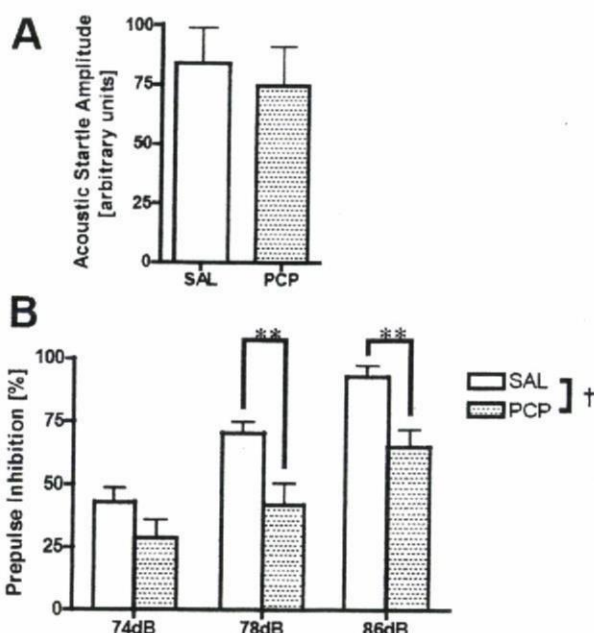


Fig. 4 Prepulse inhibition test at P56

(A) Acoustic startle amplitude was measured in the trials without prepulse. (B) Prepulse inhibition at three prepulse intensities (74, 78, and 86 dB). Data are means \pm SEM (n=20). †p<0.05 and **p<0.01 by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferroni test.

成体期において統合失調症様の行動異常が誘導されることが確認されたが、これらの障害の一部は、成体期に NMDA 受容体コアゴニストである D-セリンを、各行動実験の 30 分前に投与すると緩解することが示された。新奇物体認識試験 (Fig. 5A, B)、Y 字迷路試験 (Fig. 5C) においては、D-セリンの容量依存的な緩解効果が確認され、強制水泳試験 (Fig. 5D) では個体数が少なく、まだ有意な差は検出されていないが、改善の傾向は観察された。

2. 胎生期 PCP 暴露による成体期生化学的变化

次に、胎生期 PCP の暴露が成体期の脳にどのような影響を及ぼし、このような行動異常をもたらしているのかを検討するために、成体期における生化学的解析を行った。

まず、成体期 前頭前皮質における、NMDA 受容体サブユニット NR1 の発現量、およびそのリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法を用

い検討した結果、NR1 発現量の増加、およびリン酸化レベルの減少が確認された (Fig.6).

さらに、成体期前頭前皮質におけるモノアミン

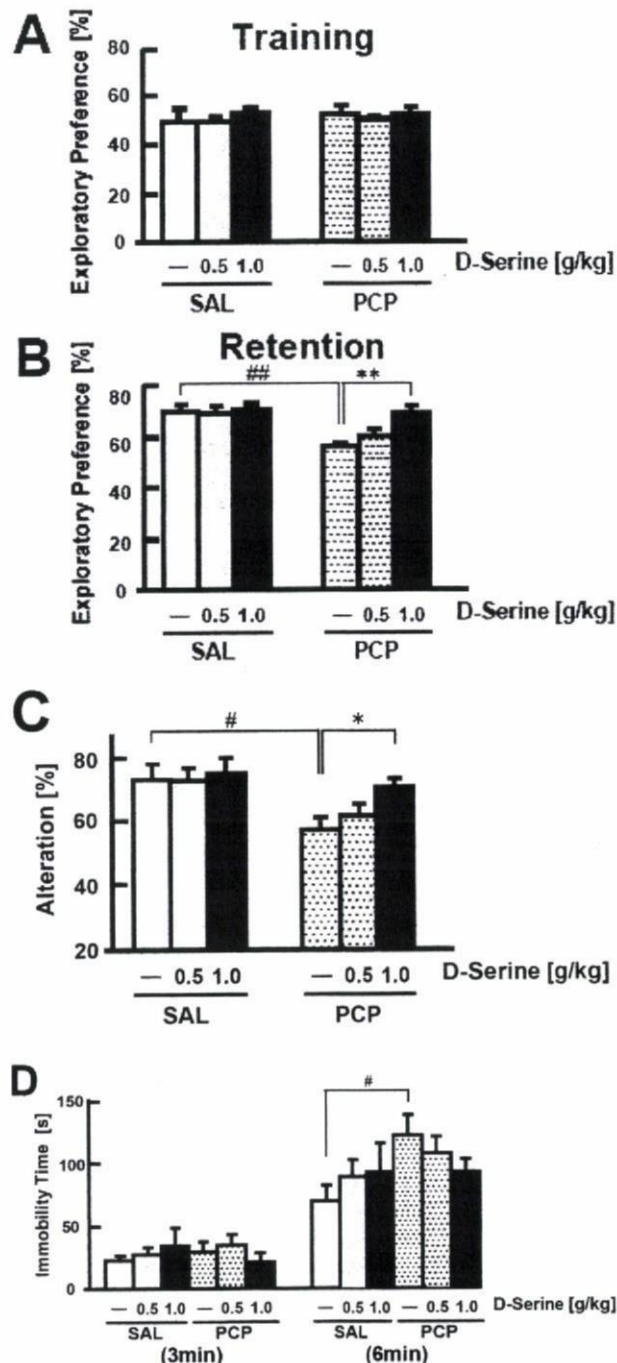


Fig. 5: Effect of D-serine on the PCP-induced behavioral deficits at P56

At P56, D-serine was administrated 30min before the behavioral tests. The results in novel object recognition test (A) (B), Y-maze test (C), and forced-swim test (D) are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. Saline group, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

代謝物の量を HPLC 法により定量した結果、ドパミン、およびセロトニンの代謝回転の低下が確認された (Fig. 7).

3. 胎生期 PCP の暴露による神経発生障害

さらに、胎生期における PCP の暴露が神経の発生、発達に与える影響を評価するため、まず、神経細胞の数や形体の観察を行った。生後 7 日目の脳サンプルを用い、Nissl 染色を行ったところ、前頭前皮質において、上層、下層の両方で神経細胞数の減少が確認された (Fig. 8 A, B)。しかし、細

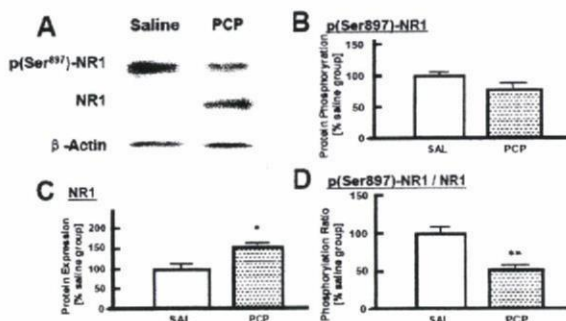


Fig. 6: Changes in the expression and phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the prefrontal cortex of prenatal PCP-treated mice.

Expression of NR1 and phosphorylated-NR1 [p (Ser897)-NR1] was detected by Western blotting. Loaded protein was normalized to β -actin. The phosphorylation ratio was calculated as NR1 phosphorylation versus NR1 expression. Results are represented as bands on the blot (a), the level of NR1 expression (b), level of NR1 phosphorylation (Ser897) (c), and the ratio of NR1 phosphorylation versus NR1 expression (d). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the prenatal SAL group. Data are expressed as the mean \pm S.E.M for 6 mice in each group (Student's-t test).

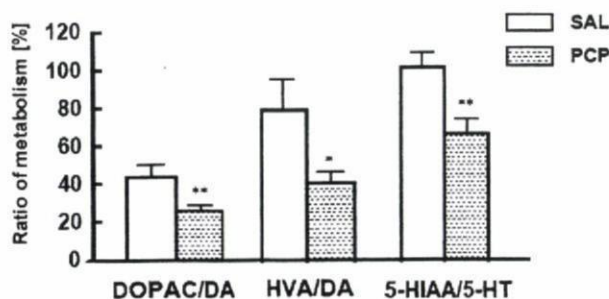


Fig. 7: Changes in the monoamine contents in prefrontal cortex at P56.

At P56, the monoamine contents in prefrontal cortex were measured by HPLC. Data are expressed as mean \pm SEM for 6 mice. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. Saline group (Bonferroni's test).

胞の異常な形体である萎縮などの神経細胞の大きさの変化は確認されなかった (Fig. 8 C)。

次に、この神経細胞数の減少の原因を明らかにするため、神経細胞の産生、及びその後の移動に対する PCP の影響を検討することにし、BrdU を用いた実験を行った。BrdU は、生体内への投与により、DNA 複製期である S 期にある細胞の DNA へチミジンに換わり、取り込まれる。その半減期が 2 時間と短いこと、また、抗 BrdU 抗体により、取り込まれた BrdU を検出できることから、投与時点で産生された細胞を標識、検出することが可能となる有用な試薬である。

BrdU を大脳皮質形成が活発に行われる時期である胎生 12.5、13.5、14.5、または 15.5 日において腹腔内投与し、出生後 7 日目に抗 BrdU 抗体を用い、各時期における BrdU 陽性細胞の検出を試みた。その結果、皮質構造は内側から Inside-out

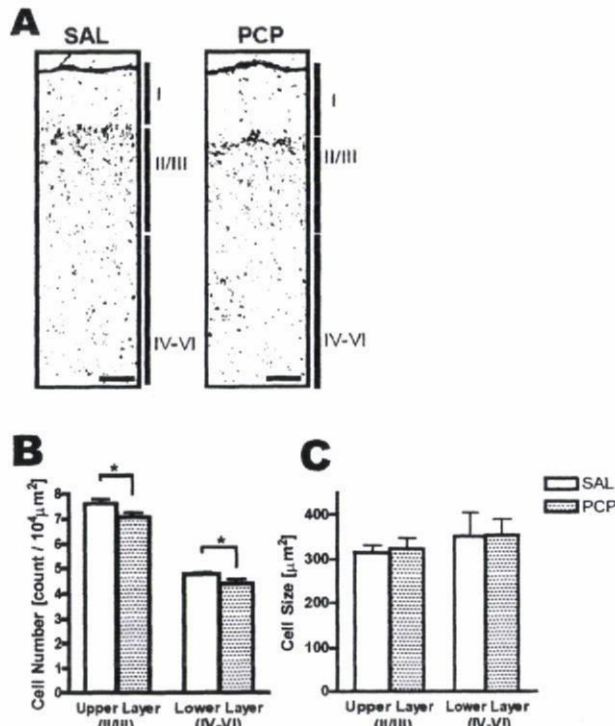


Fig. 8 Nissl staining in the prefrontal cortex at P7
(A) Nissl-stained coronal sections of the prefrontal cortex in PCP- and saline-treated mice. Scale bar : 200μm. Stereological analysis of the number of Nissl-staining cells (B) and the cell size (C) in PCP- and saline-treated mice. Values are the means ± SEM (n=6). *p<0.05 by Student's *t*-test.

パターンで形成されるが、その傾向は PCP 投与群でも観察され、どの時期の細胞移動に関しても、生理食塩水 (SAL) 投与群と比べ、有意な差は検出されなかった (Fig. 9 A-D)。しかしながら、BrdU 陽性細胞数に関して検討を行ったところ、PCP 投

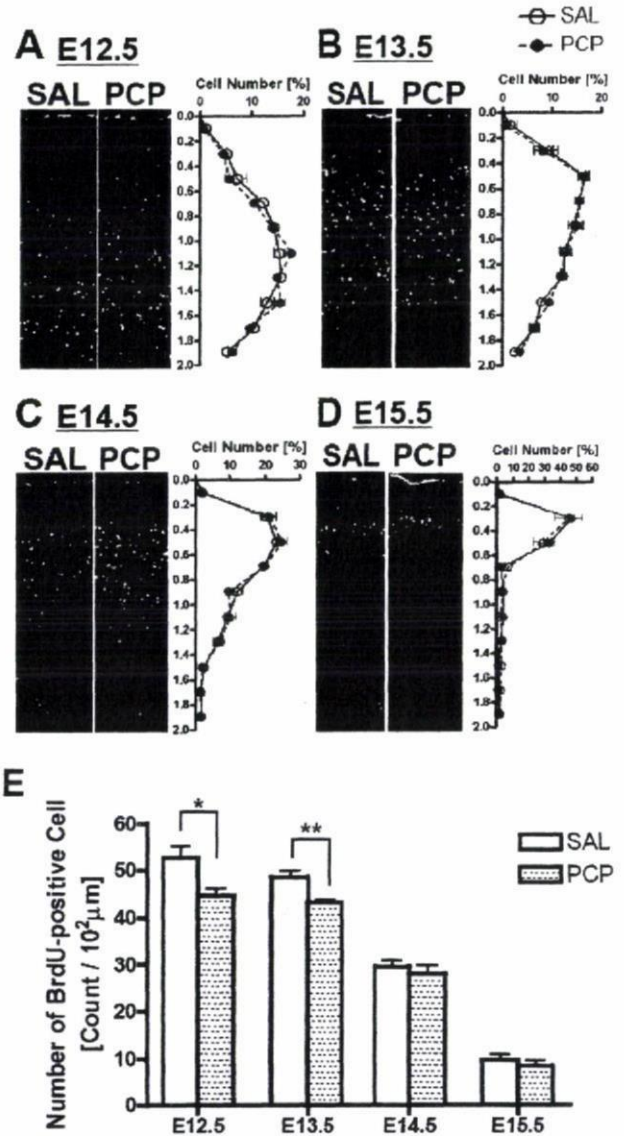


Fig. 9 Effect of prenatal PCP exposure on the migration and the number of BrdU-positive cells

A single BrdU injection at E12.5 (A), E13.5 (B), E14.5 (C), or E15.5(D), 3 hrs after PCP/saline administration to label mitotic progenitors in the embryonic brains. After the birth, the pups were fed for 7 days to examine cell migration. Fluorescence images of BrdU-positive cells using the antibody and the percentage of BrdU-positive cells in each distance from apical side are shown. Data are the means ± SEM (n=6). (E) The number of BrdU-positive cells per 10² mm tangential direction is shown. Data are means ± SEM (n=6). *p<0.05, **p<0.01 by Student's *t*-test.

与群において皮質形成初期の BrdU 陽性細胞数が減少しているのが観察された(Fig. 9 E)。さらに、詳細に検討するために E13.5 において BrdU を投与してから 3 時間後に検出を試みたところ、PCP 投与群では、BrdU 陽性細胞数が少なく、実際に細胞分裂を行っている細胞が減少していることが示された (Fig.10)。

大脳皮質において、神経を産生する神経前駆細胞には、2 種類があることが知られている^{5,6)}。神経内皮細胞、およびラジアルグリアは、大脳皮質形成初期に脳室帯 ventricular zone において対称分裂により自己複製をしながら、時折、非対称分裂をすることで上層の神経細胞を産生している神経前駆細胞である。また、Basal progenitor は後期になると、神経内皮細胞やラジアルグリアから生じるもうひとつの神経前駆細胞であり、脳室下帯 subventricular zone において、対称分裂をすることで神経細胞を産生することが知られている。BrdU を用いた解析により、胎生期の脳皮質において分裂細胞が減少していたことから、次に、これら神経前駆細胞に障害がもたらされている可能性を検討することにした。まず、神経内皮細胞および

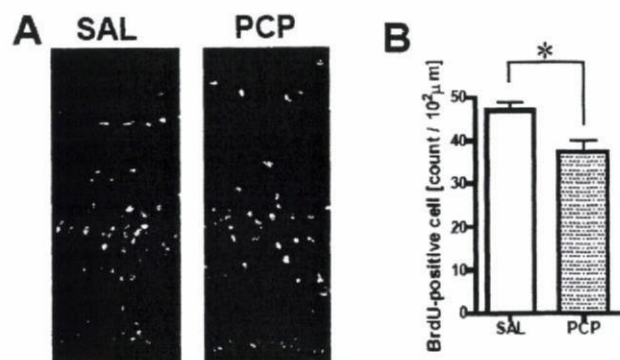


Fig. 10 Effect of prenatal PCP exposure on mitotic progenitor

At E13.5, the PCP/Saline-treated pregnant mice was given a single BrdU injections 3hrs before decapitation. The pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -BrdU antibody. (A) Fluorescence images of BrdU-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar : 100 μ m. VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone. (B) Stereological analysis of the number of BrdU-positive cells in PCP- and saline-treated mice are shown. Values are the means \pm SEM (n=6). *p<0.05 by Student's *t*-test.

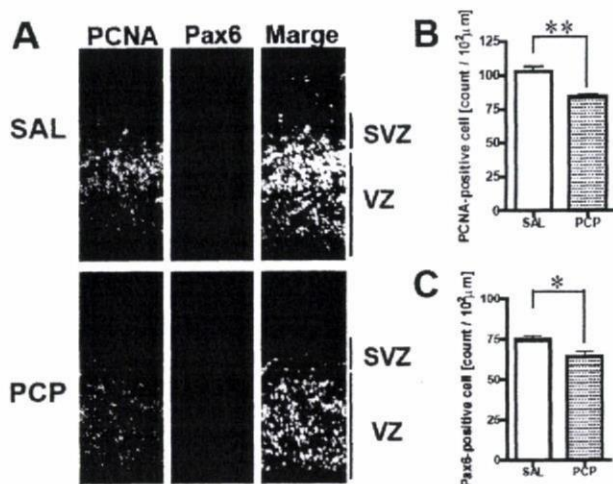


Fig. 11 Effect on Pax6-positive progenitor by prenatal PCP exposure

At E13.5, mice were decapitated 6hrs after PCP/Saline injection. The pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -PCNA, an proliferation marker, and α -Pax2 antibody, a progenitor marker. (A) Fluorescence images of PCNA-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar : 100 μ m. VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone. The number of (B) PCNA- and (C) Pax6-positive cells per 10² μ m tangential direction is shown. The Data are means \pm SEM (n=6). *p<0.05 **p<0.01 by Student's *t*-test.

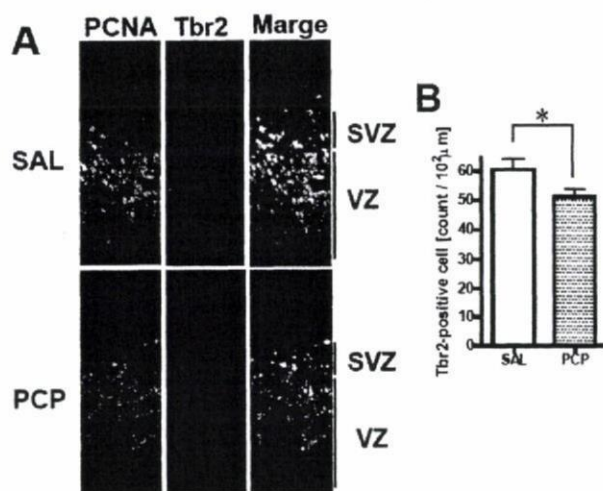


Fig. 12 Effect on basal progenitor by prenatal PCP exposure

At E13.5, the pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -PCNA, an proliferation marker, and α -Tbr2 antibody, a basal progenitor marker. (A) Fluorescence images of BrdU-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar: 100 μ m. (B) The number of Tbr2-positive cells per 10² μ m tangential direction is shown. The Data are means \pm SEM (n=6). *p<0.05 by Student's *t*-test.

びラジアルグリアについて検討を行うことにし、胎生 13.5 日目の大脳皮質を免疫組織化学的な手法により観察した。神経内皮細胞、およびラジアルグリアのマーカーとして抗 Pax6 抗体、また増殖下にある細胞のマーカーとして、抗 PCNA 抗体を用いた。その結果、PCP 投与群において、PCNA 陽性細胞、Pax6 陽性細胞の有意な減少が確認された (Fig. 11)。

さらに、同様にして、Basal progenitor をそのマーカーである Tbr2 により観察した結果、PCP 投与群において減少が確認された (Fig. 12)。

D. 考察

PCP は薬物依存者に統合失調症に酷似した精神症状 (PCP 精神病) を惹起することが知られている⁷⁾。覚せい剤依存者においても幻覚・妄想や認知障害など覚せい剤精神病を発症する⁸⁾。これらの依存性薬物による精神障害は統合失調症の症状に類似している。PCP 連続投与動物は、陽性症状の指標となる自発運動量の増加や常同行動、陰性症状の指標となる社会性行動の低下や強制水泳試験における意欲の低下および認知障害の指標となる放射状迷路試験における作業記憶障害や水探索試験における注意障害など、臨床症状を反映した多様な行動異常を示すことから、包括的な統合失調症のモデルとして提唱されている^{1,2)}。

本研究では、この PCP を周産期前期である胎生期において暴露させたところ、多くの行動実験において、成体期まで長期間持続する統合失調症様の行動異常を呈することが示された。昨今、統合失調症発症の要因として、『発達障害仮説』が取り沙汰されている状況を鑑みれば、本モデルは従来の成体期 PCP 投与による統合失調症モデルに比べ、組織化学的・生化学的に、より疾患の状態を再現した有用なモデルとなる可能性がある。

NR1 のリン酸化は NMDA 受容体の機能の上昇を起こすことが知られており、本研究において胎生期における PCP の暴露が NR1 のリン酸化レベ

ルを減少させたことは、グルタミン酸機能の低下が引き起こされている可能性を示唆している。NMDA 受容体コアゴニストである D-セリンの投与により、行動異常が緩解したことも、このグルタミン酸機能低下の可能性を支持するものである。実際、統合失調症患者の死後脳や、成体期 PCP 投与モデルにおいても NR1 のリン酸化レベルの低下が示されており^{9,10)}、統合失調症発症の機序として、『グルタミン酸機能障害仮説』が提唱されていることから、胎生期 PCP 暴露のモデルは、生化学的な変化においても妥当性が示されたと考えることができる。また、本研究において NR1 自体の発現量の増加が確認されたが、この結果もグルタミン酸の機能低下による代償的な効果と考えることができる。成体期に PCP を長期投与したモデルや、統合失調症患者の死後脳においても、NR1 の発現量上昇が報告されている^{9,11)}。

さらに、本研究において、胎生期における PCP の暴露は、神経前駆細胞の分裂障害を引き起こし、神経前駆細胞の減少、さらには、P7 の時点での神経細胞の減少を引き起こしている可能性が示された。初代培養やスライス培養の系では、グルタミン酸の添加が神経前駆細胞の増殖を活性化し、逆に NMDA 受容体アンタゴニストがその増殖を抑制したという報告が為されており^{12,13)}、本研究の結果と一致するような知見が得られている。ただし、この点において *in vivo* における検討を行った前例は少なく、神経前駆細胞の分裂における NMDA 受容体の意義を *in vivo* で示した点においても、本研究は有意義だといえる。

また、本実験で減少が示された神経前駆細胞は、グルタミン酸作動性神経を生じる細胞群であることから、大脳皮質内でのグルタミン酸作動性神経数が減少している可能性が考えられる。これは、上述のグルタミン酸機能低下の可能性に直接関係するような結果であり、胎生期 PCP の暴露が成体期まで長期間持続する行動異常を惹起した主