

原因と考えることができる。

E. 結論

本研究では、胎生期における PCP 暴露による影響を、行動学的、生化学的、組織化学的な解析により検討を行った。成体期まで長期間持続する統合失調症様行動異常と D-セリンによるその緩解、NR-1 リン酸化レベルの減少、グルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞の減少など、胎生期における PCP の投与は様々な異常を引き起こすことが示されたが、どれも一貫して『グルタミン酸の機能低下』を示唆する結果であることが興味深い。今後は、どのような作用機序によって、PCP が神経前駆細胞の分裂を傷害し、神経細胞数を減少させているのか、また、それにより実際に成体期の脳内においてグルタミン酸作動性神経細胞の数は変化しているのかを明らかにしたい。また、今回の実験で、前頭前皮質においてモノアミンの代謝回転の低下が示されたことから、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詳細に検討していく予定である。

[参考文献]

1. Mouri A, Noda Y, Enomoto T, Nabeshima T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int*, 51: 173-184 (2007).
2. Enomoto T, Noda Y, Nabeshima T. Phencyclidine and genetic animal models of schizophrenia developed in relation to the glutamate hypothesis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 29: 291-301 (2007).
3. Wang C, McInnis J, Ross-Sanchez M, Shinnick-Gallagher P, Wiley JL, Johnson KM. Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience*, 107: 535-550 (2001).
4. Cao YJ, Surowy CS, Puttfarcken PS, Nicotinic Andersen JD, Pouzet B. Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1080-1090 (2004).
5. Hevner RF. From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol Neurobiol*, 33:33-50 (2006).
6. Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8: 427-437 (2007).
7. Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41: 237-260 (2001).
8. Ujike H, Sato M. Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1025: 279-287 (2004).
9. Mouri A, Noda Y, Noda A, Nakamura T, Tokura T, Yura Y, Nitta A, Furukawa H, Nabeshima T. Involvement of a dysfunctional dopamine-D1/N-methyl-d-aspartate-NR1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II pathway in the impairment of latent learning in a model of schizophrenia induced by phencyclidine. *Mol Pharmacol*, 71:1598-1609 (2007).
10. Emamian ES, Karayiorgou M, Gogos JA. Decreased phosphorylation of NMDA receptor type 1 at serine 897 in brains of patients with Schizophrenia. *J Neurosci*, 24: 1561-1564 (2004).
11. Dracheva S, Marras SA, Elhakem SL, Kramer FR, Davis KL, Haroutunian V. N-methyl-D-aspartic

acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 158:1400-1410 (2001).

12. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci*, 24: 645-653 (2006).
13. Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci*, 20: 5764-5774 (2000).

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem*, 105: 921-32 (2008).
2. Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Takahashi K, Kamei H, Nabeshima T, Yamada K. Involvement of Pallidotegmental Neurons in Methamphetamine- and MK-801-Induced Impairment of Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Reflex in Mice: Reversal by GABA(B) Receptor Agonist Baclofen. *Neuropsychopharmacology*, 33: 3164-3175 (2008).
3. Taku Nagai, Rina Murai, Kanae Matsui, Hiroyuki Kamei, Yukihiro Noda, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin

5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 202: 315-328 (2009).

4. Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Ping Lu, Minae Niwa, Akihiro Mouri, Li-Bo Zou, Taku Nagai, Masayuki Hiramatsu and Toshitaka Nabeshima. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. *Behav. Brain Res*, 198: 172-178 (2009).
5. 古関竹直, 毛利彰宏, 村井里菜, 永井拓, 野田幸裕, 鍋島俊隆 【統合失調症の病態進行・難治化と動物モデル】 難治性統合失調症の動物モデルと治療薬開発 脳と精神の医学 19巻1号 Page31-40(2008)
6. 小松修一, 郡司明彦, 鍋島俊隆 最新の禁煙治療に対する考察 日本の喫煙状況と禁煙治療の実際 *Pharma Medica* 26巻10号 Page145-164(2008)

2. 学会発表

1. Nabeshima T. (Invited lecture): Our Bright Future : International Collaboration. Toshitaka Nabeshima Francke Medal Lecture , ASHP Meeting, Seattle, (2008.6.10)
2. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Rina Murai, Minae Niwa, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima : Molecular mechanism of cognitive deficits in schizophrenic animal models and efficacy of antipsychotics. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya (2008.9.24)
3. Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Akihiro Mouri, Ping Lu, Masayuki Hiramatsu, Li-Bo Zou, Toshitaka Nabeshima.: Long - lasting effects of prenatal expose to NMDA receptor antagonist, phencyclidine on behavior and drug - induced sensitivities in mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya (2008.9.24)
4. Kazuya Toriumi , Akihiro Mouri, Shiho Narusawa, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa,

- Lingling Lu, Toshitaka Nabeshima.: Prenatal treatment with phencyclidine induced the behavioral deficits in mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya (2008.9.24)
5. Akihiro Mouri, Yukihiro Noda, Akihiro Noda, Toshitaka Nabeshima. :Involvement of dopamine D4 receptor in the effects of clozapine on cognitive dysfunction in phencyclidine-treated mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya (2008.9.24)
 6. Takenao Koseki , Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuki Aoyama, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima.: Enriched Environment in Childhood Prevents Abnormal Behaviors Induced by Phencyclidine in Adulthood. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya (2008.9.24)
 7. Shiho Narusawa, Akihiro Mouri, Kazuya Toriumi, Takenao Koseki, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa, Takayoshi Mamiya, Toshitaka Nabeshima. : Anti-ADHD drugs attenuate abnormal behaviors induced by PCP. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology , Pusan (2008.11.7)
 8. Kazuya Toriumi, Akihiro Mouri, Shiho Narusawa, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa, Lingling Lu, Toshitaka Nabeshima. : Prenatal phencyclidine – treated mice showed abnormal behavior in adult. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan (2008.11.7)
 9. Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuuki Aoyama, Hiroshi HuruKawa, Toshitaka Nabeshima.: Phencyclidine-induced abnormal behaviors in adulthood is prevented by enriched environment breeding in childhood. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan (2008.11.7)
 10. 毛利 彰宏、野田 幸裕、村井 里菜、脇由 香里、田中 光一、鍋島 俊隆: 統合失調症モデルマウスに認められる情動障害におけるグルタミン酸トランスポーターの関与について、第3回トランスポーター研究会年会、京都 (2008.6.7)
 11. 鍋島俊隆(オーガナイザー) What is appropriate animal models of mental disorders? : Dialogue between basic science and clinical field シンポジウム 1 : 精神疾患モデルは如何にあるべきか : 基礎と臨床の対話 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会 東京 (2008.10.1)
 12. 野田幸裕、毛利彰宏、鍋島俊隆 : 統合失調症モデル作成のため、基礎研究者が臨床医に望むこと(シンポジウム) 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会 東京 (2008.10.1)
 13. 青山雄紀、毛利彰宏、井川夏実、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆 : PCP連続投与マウスに認められる行動障害に対する酪酸ナトリウムの効果 (ポスター) . 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会 東京 (2008.10.1)
 14. 毛利彰宏、野田幸裕、古川宏、小林和人、鍋島俊隆.: クロザピンのPCP連続投与による認知障害に対する緩解効果にはドパミンD4およびセロトニンS2受容体拮抗作用が関与する (ポスター) 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会 東京 (2008.10.1)
 15. 永井拓、衣斐大祐、溝口博之、鍋島俊隆、山田清文: 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都 (2008. 12. 20-21)

16. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏実、陸玲玲、永井拓、鍋島俊隆：胎生期における NMDA 受容体拮抗薬フェンサイクリジンの効果 名城大学学術フロンティア事業第 1 回若手シンポジウム，名古屋(2009. 3. 2)
17. 永井拓，鍋島俊隆：統合失調症モデル動物を用いたプロテオーム解析. 名城大学学術フロンティア事業第 1 回若手シンポジウム，名古屋(2009. 3. 2)
18. 鍋島俊隆(講演)：化学物質による心と知能の障害 社団法人日本食品衛生協会主催シンポジウム「健康と化学物質」平成 20 年度厚生労働科学研究（化学物質リスク研究推進事業）東京（2009. 2. 9）および 名古屋（2009 . 3. 4.）
19. 衣斐大祐、永井拓、溝口博之、北原裕子、小池宏幸、新田淳美、米田幸雄、澤明、鍋島俊隆、山田清文：新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第 82 回日本薬理学会年会，横浜(2009. 3. 16)

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

妊娠後期における化学物質暴露が生後の学習および情動行動に及ぼす影響

分担研究者：間宮隆吉

（名城大学大学院薬学研究科・薬品作用学研究室）

[研究要旨]

【目的】我々は日常生活の中で食品や空気中の化学物質に曝されながら生活している。本研究では特に妊婦に着目し、妊娠期が化学物質に暴露されることによる危険性について検討するために、ICR系マウスの妊娠6日目から出産前日まで化学物質（N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬：ジゾシルピンあるいはニコチン型アセチルコリン（ニコチン）受容体作動薬：ニコチン）を処置し、生まれたマウスの5および7週齢時の行動について検討した。

【方法】ICR系雌性マウス（10週齢）を8週齢の雄性マウスと交配させ、妊娠後6日目から出産前日まで（ジゾシルピン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マウスについて生後5週および7週にオープンフィールド試験、新奇物体認知試験、高架式十字迷路試験、社会的相互反応試験および強制水泳試験を行った。

【結果】今回の研究結果について右表にまとめた。ニコチン（0.5および1 mg/kg）を妊娠マウスに連続投与しても生まれたマウスの行動は影響を受けなかった。一方、ジゾシルピンを投与された妊娠マウスから生まれたマウスは、7週齢時では新奇物体認知試験（0.2 mg/kgのみ）、高架式十字迷路試験（0.2 mg/kgのみ）および社会的相互反応試験（0.02および0.2 mg/kg）において生理食塩液投与群と比較して有意な障害が観察された。さらに新奇物体認知試験では5週齢でもジゾシルピン（0.2 mg/kg）による障害が認められた。

表 ニコチンまたはジゾシルピン暴露による行動障害の発現

| 試験方法 (観察項目) | ニコチン受容体 | | NMDA受容体 | |
|--------------------------|-------------|-----------|----------------|-----------------------|
| | ニコチン 0.5 | ニコチン 1 | ジゾシルピン 0.02 | ジゾシルピン 0.2 (mg/kg) |
| 自発運動量 | 障害なし | 障害なし | 障害なし | 障害なし |
| オープンフィールド試験 (全般的評価) | 障害なし | 障害なし | 障害なし | 障害なし |
| 新奇物体認識試験 (認知機能) | 障害なし | 障害なし | 障害なし | 障害あり (5、7週齢) |
| 高架式十字迷路試験 (不安感受性) | 障害なし | 障害なし | 障害なし | 障害あり (7週齢) |
| 社会的相互反応試験 (相手との関わりあい) | 障害なし | 障害なし | 障害あり (7週齢) | 障害あり (7週齢) |
| 強制水泳試験 (うつ様状態) | 障害なし | 障害なし | 障害なし | 障害なし |

【まとめ】NMDA受容体関連化合物は胎児に影響を与え、生後の情動および学習記憶機能を障害する可能性があることが明らかとなった。また化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価する一連の行動実験方法について概ね確立できた。来年度以降は障害が認められた行動について、機能を神経化学的に解析し、障害発症メカニズムを明らかにしていきたい。

A. 研究目的

発達段階の脳は成熟した大人の脳と比べて外的刺激の影響を受けやすく、その結果、思春期・青年期を経て精神発達障害が発症することが多い。外的刺激には身体的および心理的ストレスなどのほか、日常生活で受ける化学物質による刺激があげられる。日本の歴史上最悪とも言われるサリドマイド薬害事件は、サリドマイドを服用した妊婦から生まれた胎児の四肢に発達不全が見られた。このように特に、妊娠中には化学物質暴露によって極めて深刻な事態を引き起こすこともありうる。

現在、我々をとりまく化学物質は無数に存在し、生物に対してどのように影響するかは一つ一つ調べなければ分からない。しかし、化学物質がどの神経系や受容体に関連するかによって分類することは、構造活性相関などから判断すれば比較的容易である。従って、どの神経系や受容体に作用する化学物質であるかを手がかりにして、それらの生物に対する影響を予測することは十分可能と考えられる。

本研究では、我々がこれまで培ってきた研究成果から、グルタミン酸作動性神経系の N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体とコリン作動性神経系のニコチン受容体に着目した。これらは学習記憶機能や情動機能に大きな役割を果たしており、発達成長にも欠くことのできない重要な神経および受容体の一つである。NMDA 受容体に作用する化合物にはフェンシクリジン (PCP) のように毒性が強く、麻薬指定されているものもある。また他にも (+)MK801 (ジソシルピン) のような選択的リガンドがある。ニコチン受容体に作用するニコチンは、煙草に含まれる代表的な成分である。妊婦が喫煙すれば胎児は受動的に煙草の成分を摂取することとなり、何らかの影響を及ぼすことは極めて明白である。本プロジェクトでは、妊娠マウスがジソシルピンおよびニコチンに

暴露されたとき、胎児にどのような影響を及ぼすかについて成熟後行動学的に検討し (平成20年度)、何らかの影響が認められた際にはその作用機序を明らかにする (平成21年度以降) ことを目的としている。さらに以上の解析を通じて実験動物を用いた行動評価系を確立し、有害化学物質による精神毒性の早期発見と治療方法の開発により、少子化を迎えた現代社会へ国内的対応策を提案していきたい。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験にはICR系10週齢の雌性マウスにPregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG; シグマ; 50 IU/mL) および human Chorionic Gonadotropin (hCG; シグマ; 50 IU/mL) をICR系8週齢の雄性マウスとの交配の52時間および4時間前に0.1 mL ずつ腹腔内に投与した。交配翌朝のプラグチェックによって交配を確認したマウスを実験に使用した。

Nicotine (ニコチン; シグマ; 0.5 および 1 mg/kg) および dizocilpine (ジソシルピン; シグマ; 0.02 および 0.2 mg/kg) を0.9%生理食塩液に溶解し、マウス体重10 gあたり0.1 mLの割合でそれぞれ皮下あるいは腹腔内投与した。4週齢で離乳させ、5週齢および7週齢になるまでは1ケージあたり4~5匹で飼育し、給餌給水は自由にさせた。マウスへのストレス負荷が少ない試験から順に自発行動量の測定、オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験を行った。すべての実験は名城大学薬学部動物実験指針および日本薬理学会動物実験指針に従って行った。

2. 各種行動実験

自発運動量の測定: マウスを装置 (W50 x L50 x H20 cm) に入れ、その直後からマウスの行動量を

赤外線センサーで自動的に測定した。

オープンフィールド試験：新規環境となるオープンフィールド内にマウスを入れ、10分間マウスの運動量、身繕い、脱糞や排尿などの回数を測定して、マウスの一般行動に変化があるかどうか、また新規環境への適応性について検討した。

新奇物体認識試験：実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱（W50 x L50 x H20 cm）を用い、装置の底には木屑を敷いた。NORTは馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に10分間マウスを慣らした。2日目の訓練試行では、装置内に2つのオブジェクトを設置し、マウスを10分間自由に探索させた。3日目の保持試行では、いずれか片方のオブジェクトを新奇オブジェクトに置換し、訓練試行24時間後に、再びマウスを装置内に入れ、10分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および2つのオブジェクトを探索している総探索時間を測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合（%）を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合（%）を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

社会性行動試験：1日目に装置に対して10分間の馴化を行い、2日後に社会性行動試験を行った。それぞれ異なるケージ内で飼育していた同系統の2匹のマウスを同時に装置中央に入れ、その直後から10分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動（sniffing）、相手の動物を追いかける行動（following）、相手の動物の上に乗る行動（mounting）、相手の動物の下に潜ろうとする行動（scrawling）のいずれかを示している時間を測定した。

高架式十字迷路試験：2つのオープンアーム（W8 x L20 cm）と同じ面積の2つのクローズドア

ームからなり、クローズドアームは高さ20 cmの壁に覆われている実験装置を床から高さ50 cmに設置した。マウスを静かに中央に置き、5分間オープンアームあるいはクローズドアームに入る回数及びその滞在時間を測定し、全体に占めるオープンアームに入る回数及びその滞在時間の割合を不安の指標として示した。

強制水泳試験：φ20 cm x H20 cmの亚克力製円筒容器に水（25°C）を張り、その中にマウスを入れ5分間観察し、無動時間を記録した。

3. 統計解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差として示した。得られた結果は、one-wayによる分散分析を行い、各群間比較には、Tukey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

自発行動量の測定：装置に入れてから5分ごとの自発行動量を60分まで測定したが、5週齢および7週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。

オープンフィールド試験：装置に入れてから10分間の運動量、身繕い回数、脱糞数および排尿数は5週齢および7週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。

新奇物体認識試験：訓練試行時の探索嗜好率は5週齢および7週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。一方、保持試行時では生理食塩液投与群、ニコチン投与群およびジゾシルピン（0.02 mg/kg）投与群では新奇物体に対する探索行動が有意に増加

していたが、ジゾシルピン (0.2 mg/kg) 投与群においては5週齢および7週齢の探索嗜好率が有意に低下した (図1 A および B)。

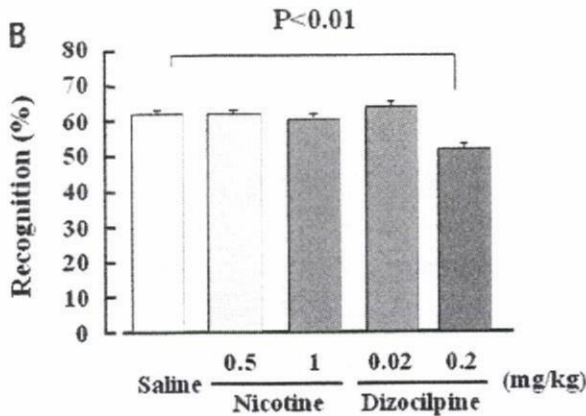
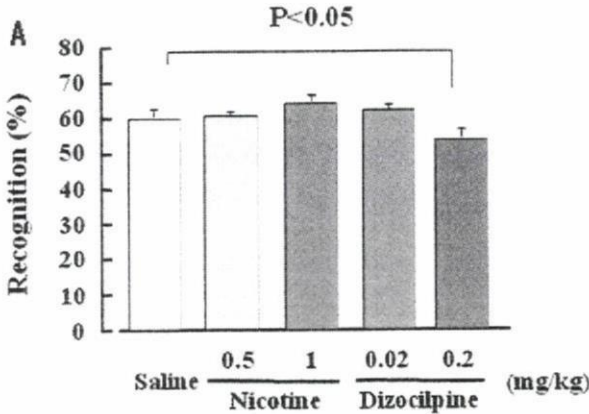


図1 5週齢 (A) および7週齢 (B) 時におけるジゾシルピン投与による新奇物体認識課題の障害。母マウスの妊娠6日目から出生時までニコチンあるいはジゾシルピンを投与した。

社会性行動試験: 10分間相手に対する追尾、身繕い時間を観察したところ、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群ではなんら影響は観察されなかったが、ジゾシルピン投与群ではそれらの行動時間が有意に減少した (図2)。この減少は7週齢でのみ観察され、5週齢では観察されなかった。

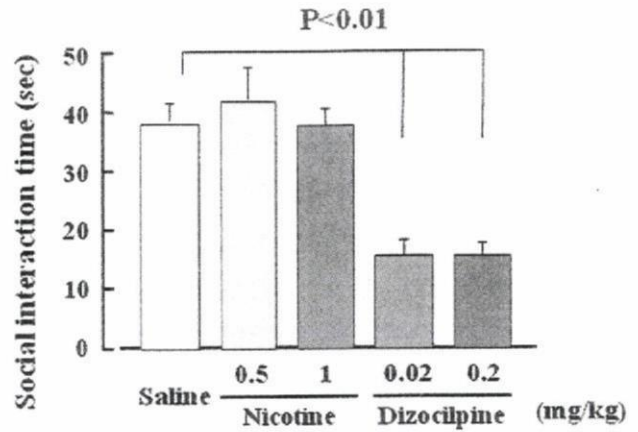


図2 7週齢時におけるジゾシルピン投与による社会性行動の障害。母マウスの妊娠6日目から出生時までニコチンあるいはジゾシルピンを投与した。

高架式十字迷路試験: オープンアームでの滞在時間の割合は、生理食塩液投与群、ニコチン投与群およびジゾシルピン (0.02 mg/kg) 投与群では特に差は認められなかったが、ジゾシルピン (0.2 mg/kg) 投与群においては7週齢では有意に低下していた。この減少は7週齢でのみ観察され、5週齢では観察されなかった。しかし、オープンアームへの侵入回数はいずれの週齢でも投与群間で有意な変化は認められなかった (図3)。

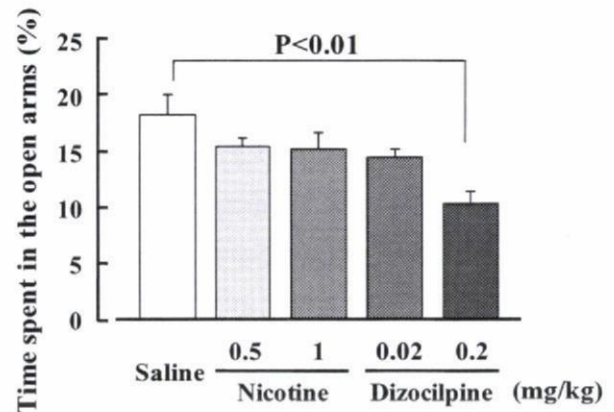


図3 7週齢時におけるジゾシルピン投与による高架式十字迷路課題の障害。母マウスの妊娠6日目から出生時までニコチンあるいはジゾシルピンを投与した。

強制水泳試験: 装置に入れてから5分間の無動時

間を測定したが、5週齢および7週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。

D. 考察

本研究では2種類の化合物をマウス妊娠6日目より出生前日までそれぞれ投与し、学習および情動機能について行動学的に解析した。我々のこれまでの予備試験から、妊娠初日から心理的ストレスを負荷すると、不妊となる可能性が高くなるということが分かっている（未発表データ）。また、マウスにおいては脳神経系の発達は妊娠6日目から始まり生後約12日まで続くことから、不妊とならないよう、かつ脳神経系への影響を検討できるように投与期間を妊娠期間内に絞り、妊娠6日目から出生前日までと設定した。

母マウスの体重は全ての投与群で同様に増加し、胎児数は母マウス一匹あたり9~12匹で、生後、どのマウス群も生理食塩液投与群と同様に生育した。行動実験をヒトの青年期に相当する7週齢時点で行った。新奇物体認識試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験においてジゾシルピン

(0.2 mg/kg) は生理食塩液と比較して有意な障害を誘発した。これまでのところ、本研究と同スケジュールでジゾシルピンの影響を検討した報告は無く、学習記憶及び情動機能に対して重大な影響を及ぼしている可能性が示唆された。成熟ラットやマウスにおいて同様な用量のジゾシルピン(0.1-0.2 mg/kg) 投与によって、認知障害(Karasawa et al., 2008)、社会性行動障害(Zou et al., 2008)、不安障害(Vasar et al., 1993)を誘発することが報告されており、外因性化学物質によるNMDA受容体刺激は、胎児期から成熟期までの広い時期で情動性及び学習記憶機能に影響を与える可能性があることが明らかとなった。しかしながら、学習記憶機能については1課題での評価で

あり、引き続き行動学的検討を行っていることから、今後、より慎重に結論を導きたい。また、NMDA受容体に作用する他の薬物(フェンシクリジン)の影響とも合わせて、次年度以降NMDA受容体関連化合物の胎児に及ぼす影響について総合的に判断したい。

一方、ニコチン受容体に作用するニコチン(0.5および1 mg/kg) は学習記憶及び情動機能に何ら影響を与えなかった。今回は成熟マウスにおいて精神的依存症状を誘発する用量を用いた(Nagai et al., 2006)。ニコチンは煙草の主成分の一つであり、妊婦の喫煙によって早産や低体重児が生まれる確率が高くなる(厚生労働省ホームページ)。この点についてもニコチン投与群は生理食塩液投与群と比較しても影響は観察されなかった。通常喫煙者は一日に何回かに分けて煙草を摂取することから、今回の投与スケジュールではヒトにおける煙草の摂取を反映していなかったことから、何ら影響が観察されなかったのかもしれない。

次にジゾシルピン(0.2 mg/kg) 投与群で観察された障害がいつから認められるか、またニコチンについては若齢時でも障害が認められないかを確かめるために、新たに生後5週齢のマウスについて同様に観察した。すると、ジゾシルピン(0.2 mg/kg) 投与群において新奇物体認識試験でのみ5週齢でも障害が観察された。したがってNMDA受容体関連化合物は低週齢から学習記憶機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。来年度以降はこのメカニズムについて詳細に検討する予定である。また、7週齢時に観察された障害が12週齢でも持続するかについて現在も引き続き検討している。

本研究のもう一つの目的は、毒性学的観点からの化学物質の情動・認知行動に対する影響評価手法を開発することである。「(i) 特に子どもの発達に対する影響を対象とし、個体の情動・認知行動

に生じる異常現象の評価だけでなく、組織・細胞機能レベルの客観的評価を組み合わせ、(ii) 化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価するシステムの開発に繋がる」ように本課題を進めている。この目標のうち、情動および認知機能についての行動学的側面からの評価システムは概ね確立できた。次年度以降は本年度の実験スケジュールおよび得られた知見を再検証しながら、新たに精神毒性の発現機序を分子レベルで解明していく予定である。

E. 結論

NMDA 受容体関連化合物は胎児に影響を与え生後の情動および学習記憶機能を障害する可能性があることが明らかとなった。また化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価する一連の行動実験方法について概ね確立できた。

[参考文献]

- Karasawa J, et al. D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. *Behav Brain Res.* 186:78-83 (2008).
- Nagai T, et al. The rewards of nicotine: regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system through protease activated receptor-1. *J Neurosci.* 26:12374-83 (2006).
- 厚生労働省ホームページ：
<http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/qa/detail2.html>
- Vasar E, et al. Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. Involvement of NMDA and CCK receptors. *Eur Neuropsychopharmacol.* 3:63-73 (1993).
- Zou H, et al. Low dose MK-801 reduces social investigation in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 90:753-7 (2008).

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文および著書発表

- Iwata Y, Suzuki K, Wakuda T, Seki N, Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N. Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PLoS ONE.* 3(5):e2283 (2008).
- 間宮隆吉 鍋島俊隆：マウスを用いた学習記憶試験法 老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック 日本基礎老化学会 編、(株)アドスリー、東京(2008)

2. 学会発表

- Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Akihiro Mouri, Ping Lu, Masayuki Hiramatsu, Li-Bo Zou, Toshitaka Nabeshima. Long-lasting effects of prenatal exposure to nmda receptor antagonist, phencyclidine on behavior and drug-induced sensitivities in mice. *International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.* 名古屋(2008.9.24)
- Shiho Narusawa, Akihiro Mouri, Kazuya Toriumi, Takenao Koseki, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa, Takayoshi Mamiya, Toshitaka Nabeshima. Efficacy of methylphenidate and atomoxetine in PCP-treated animal. *International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.* 名古屋 (2008.9.24)
- Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuki Aoyama, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima. Enriched environment in childhood prevents abnormal behaviors induced by phencyclidine in adulthood. *International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.* 名古屋 (2008.9.24)
- 青山雄紀、毛利彰宏、井川夏実、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆：PCP 連続投与マウスに

認められる行動障害に対する酪酸ナトリウムの効果 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会 合同年会 東京 (2008.10.1)

5. Shiho Narusawa, Akihiro Mouri, Kazuya Toriumi, Takenao Koseki, Yuki Aoyaoyama, Natsumi Ikawa, Takayoshi Mamiya, Toshitaka Nabeshima. Anti-ADHD drugs attenuate abnormal behaviors induced by PCP. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan Korea (2008.11.7)
6. Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuki Aoyama, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima. Phencyclidine-induced abnormal behaviors in adulthood is prevented by enriched environment breeding in childhood. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan Korea (2008.11.7)
7. 古関竹直、毛利彰宏、間宮隆吉、青山雄紀、鳥海和也、鍋島俊隆：エンリッチな環境はエピジェネティックな変化を介してフェンシクリジン連続投与による行動異常を抑制する 第 82 回日本薬理学会 (横浜) (2009.3.18)
8. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、青山雄紀、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンシクリジン連続投与マウスを用いた ADHD のモデルの作成の試み 第 82 回日本薬理学会 (横浜) (2009.3.18)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者：野田幸裕¹

研究協力者：脇由香里¹、吉見 陽¹、山田真之亮¹、安藤 雄¹、永井 拓²、毛利彰宏³、鍋島俊隆³

(¹名城大学薬学部病態解析学,²名古屋大学大学院医学系研究科臨床薬物情報学,

³名城大学薬学部薬品作用学)

[研究要旨]

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、精神異常発現薬であるフェンシクリジン（phencyclidine; 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には、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。今後、例数の追加やPCP投与用量の検討を行いながら、形態学および神経化学的变化を解析し、社会性行動の障害の発現機序の解明と環境的要因による脳機能の変化に関与する脆弱性因子の探索・同定を行なっていく予定である。

A. 研究目的

統合失調症や気分障害などの精神疾患の治療には、薬物治療や心理社会的治療が導入されているが、未だ十分な治療効果は得られていない。現在、病態生理の解明および病態生理に基づいた治療法や予防法の開発が期待されているが、統合失調症や気分障害などの精神疾患の発症機序および病態生理は未だ不明な点が多い。これまでの両疾患の患者における脳画像研究、死後脳研究および遺伝疫学的研究やこれらの疾患に類似した精神症状を惹起させる薬物に関する研究から、両疾患の発症機序および病態生理が少しずつ明らかになってきた (Belmaker and Agam, 2008; Campbell et al., 2004; Freedman, 2003; Lewis and Levitt, 2002; Ross et al., 2006)。統合失調症や気分障害などの精神疾患は、神経発生・発達過程における環境的要因 (物理化学的因子と心理社会的因子の双方) と生得的に持っていた脆弱性因子 (遺伝的要因) が相互に作用して発症に至ると考えられている (Bayer et al., 1999; Belmaker, 2004; Freedman, 2003; Maynard et al., 2001; McCarley et al., 1999)。したがって、神経発生・発達過程における多様な環境的要因 (暴力、いじめ、薬物摂取など) は当事者にとって環境の悪影響を受けた時点の問題に止まらず、それによって惹起される神経発達障害が精神疾患の発症の危険性を高め、ひいては当事者の長い人生を左右する可能性がある。近年、社会問題になっている幼少児に対する親の教育放棄や家庭内暴力および教師や同級生によるいじめ、薬物乱用の低学年化などは、精神疾患の発症に関与している神経発生・発達過程における環境的要因として考えられている (Heim et al., 2008)。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、成熟期に達したマウスの社会性行動を解析した。また、社会ストレス負荷マウスに、精神異常発現薬である非競合的 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮

抗薬のフェンシクリジン (phencyclidine; PCP) (Javitt and Zukin, 1991; Mouri et al., 2007) を連続投与した場合の社会性行動を調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、3週齢の C57BL/6J 系雄性マウス (日本エスエルシー株式会社、静岡) および 4~12 週齢の ICR 系雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を使用した。動物は実験を開始する前少なくとも 3 日間は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ で、12 時間 / 12 時間の明暗サイクル (明期 9 時~21 時) の室内にて飼育し、水および餌 (CE2; 日本クレア株式会社、東京) は自由に摂取させた。

なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った。

2. 薬物

実験には、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の非競合的拮抗薬であるフェンシクリジン塩酸塩 (phencyclidine hydrochloride; PCP) を使用した。PCP は Maddox ら (1965) の方法にしたがって薬化学教室 古川 宏教授および薬品作用学教室 鍋島俊隆教授が合成した。PCP は生理食塩水に溶解し、10 mg/mL に調製し、実験に使用した。

3. 実験手順および実験装置

3.1. 社会ストレス負荷

社会ストレス負荷は Berton ら (2006) の方法に若干の変更を加えて行った。すなわち、4~12 週齢の ICR 系雄性マウスの中で C57BL/6J 系雄性マウスに対して 10 分間に 1 分以上攻撃性を示すマウスを攻撃居住マウス、1 分未満しか攻撃性を示さないマウスを非攻撃居住マウスとして選別した。発達段階である 3 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス

を侵入マウスとして、1匹ずつ攻撃居住マウスの飼育ケージに入れ、1日10分間、連続して10日間物理的に接触させた(ストレス負荷:stress群)。対照群(control群)は、侵入マウスを非攻撃居住マウスの飼育ケージに1日10分間、連続して10日間入れた。なお、侵入マウスは毎日異なる居住マウスの飼育ケージに入れた。

3.2. 社会性行動試験

社会性行動試験には、オープンフィールド(42×42×30 cm)の端に透明アクリル樹脂製のボックス(標的マウス区域:10×6.5×30 cm、直径1 cmの数個の空気穴を有する)が設置された装置を使用した。

社会性行動試験は、第1セッションと第2セッションからなり、第1セッションでは、実験装置に設置された標的マウス区域内に標的マウスを存在させず、侵入マウスを30分間自由に探索させ、侵入マウスの探索行動を録画した。第1セッション終了後、直ちに侵入マウスを飼育ケージに戻し、1分後に第2セッションを行った。第2セッションでは、再び侵入マウスを標的マウス区域に標的マウスを存在させた装置に入れ、5分間自由に探索させ、侵入マウスの探索行動を録画した。なお、社会性行動試験での標的マウスには、侵入マウスがこれまでに一度も接触したことがないICR系雄性マウスを用いた。

録画したデータから、各セッションでの交流区域における滞在時間および第1セッションにおける装置内の総移動距離をEtho Vision XT(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)を用いて解析した。なお、第1セッションでは測定開始してから25~30分の5分間を解析した。

Control群およびstress群においては、居住マウスと10日間接触させた1(第1回目)、8(第2回目)および15(第3回目)日後に社会性行動試験を行った。

4. 薬物投与

生理食塩水(0.1 mL/10 g body weight/day s.c.)あるいはPCP(10 mg/kg/day s.c.)の投与は、第1回目の社会性行動試験終了後、直ちに開始し、7日間連続投与した。

5. 統計学的解析

得られた結果は全て平均値±標準誤差として示した。社会性行動試験における交流区域滞在時間の解析および第1セッションにおける装置内の総移動距離の解析には、“対応のある”あるいは“対応がない”Studentのt検定(2群間の比較の場合)あるいは一元配置分散分析(3群間以上の比較の場合)を用いた。

1(第1回目)、8(第2回目)および15(第3回目)日後の総移動距離の変化率の解析には、繰り返しのある二元配置分散分析を用い、各群間の比較にはBonferroniの多重比較検定を行った。全ての統計解析において有意水準を5%と設定し、危険率5%未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. 社会ストレス負荷マウス(stress群)における社会性行動

1.1. 第2セッションにおいて標的マウスを存在させた場合の社会性行動

対照群(control群)および社会ストレス負荷マウス(stress群)における1日あたりの平均攻撃負荷時間を図1に示した。Control群およびstress群の1日あたりの平均攻撃負荷時間はそれぞれ0.6±0.1および102.6±4.8秒であり、stress群における平均攻撃負荷時間は有意に長かった。

社会性行動試験におけるcontrol群およびstress群の交流区域滞在時間を図2に示した。Control群およびstress群における第1セッションの交流区域滞在時間には、いずれの試験日においても有意な差は認められなかった。図2Aに示したように、

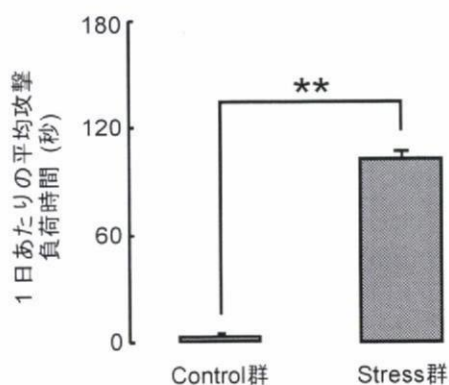


図1. 対照群 (control 群) および社会ストレス負荷マウス (stress 群) における1日あたりの平均攻撃負荷時間。Control 群および stress 群の1日あたりの平均攻撃負荷時間はそれぞれ 0.6 ± 0.1 および 102.6 ± 4.8 秒であった。グラフは平均±標準誤差で示した (control 群: $n=6$, stress 群: $n=8$)。** $p < 0.01$ vs control 群 (対応のない t 検定)。

性行動試験においても認められた (図 2B と C)。なお、第1回目の社会性行動試験における第1セッションの総移動距離は、control 群 ($1,752 \pm 97$ cm) と stress 群 ($1,435 \pm 100$ cm) との間に有意な差は認められなかった (データ示さず)。

1.2. 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の社会性行動

Control 群および stress 群の第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の交流区域滞在時間が、第1セッションのそれと比較して延長しないかどうか検討した。

Control 群および stress 群の1日あたりの平均攻撃負荷時間はそれぞれ 0.0 ± 0.0 および 124.2 ± 11.4

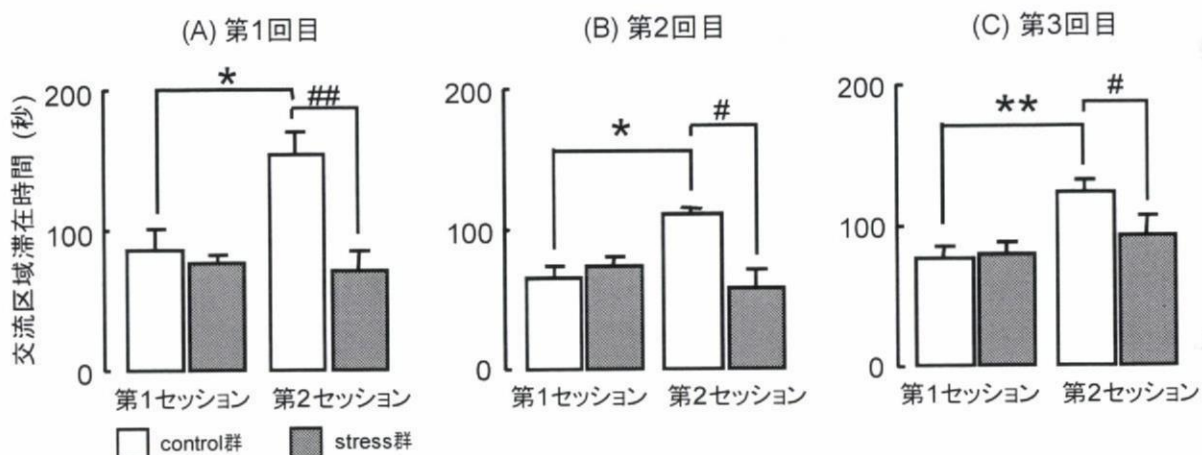


図2. 対照群 (control 群: □) および社会ストレス負荷マウス (stress 群: ■) における社会性行動。(A) 第1回目の社会性行動。(B) 第2回目の社会性行動。(C) 第3回目の社会性行動。居住マウスと10日間接触させた1 (第1回目)、8 (第2回目) および15 (第3回目) 日後に社会性行動試験を行った。グラフは平均±標準誤差で示した (control 群: $n=6$, stress 群: $n=8$)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs 各群の第1セッション (対応のある t 検定)、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ vs 対応する control 群 (対応のない t 検定)。

第1回目の社会性行動試験において、control 群の第2セッションにおける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、標的マウスに対して社会性行動を示した。一方、stress 群の第2セッションにおいて、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。同様の結果は、第2および3回目の社会

秒であり、stress 群における平均攻撃負荷時間は有意に長かった (データ示さず)。

Control 群および stress 群における第1セッションの交流区域滞在時間には、いずれの試験日においても有意な差は認められなかった (図 3)。また、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の第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いずれの試験日においても有意に延長しなかった (図 3)。な

お、第1回目の社会性行動試験における第1セッションの総移動距離は、control群 (1,768±161 cm) と stress群 (2,157±77 cm) との間に有意な差は認められなかった (データ示さず)。

日後] に社会性行動試験を行った。図4AとBに示したように、PCPを投与したcontrol群(PCP/control群)における第2回目の社会性行動試験の

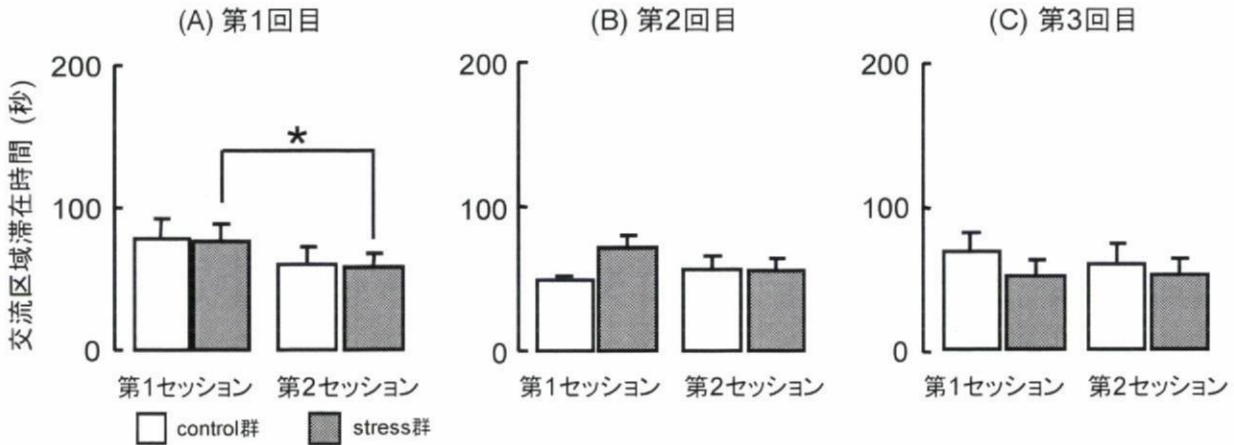


図3. 第2セッションにおいて標的マウスを存在させなかった場合の対照群(control群: □)および社会ストレス負荷マウス(stress群: ■)における社会性行動。(A) 第1回目の社会性行動。(B) 第2回目の社会性行動。(C) 第3回目の社会性行動。居住マウスと10日間接触させた1(第1回目)、8(第2回目)および15(第3回目)日後に社会性行動試験を行った。グラフは平均±標準誤差で示した(control群: n=4、stress群: n=4)。*p<0.05 vs 対応する第1セッションの交流区域滞在時間(対応のあるt検定)。

2. フェンシクリジン(PCP)を連続投与した場合のstress群における社会性行動

Control群およびstress群に精神異常発現薬である非競合的NMDA受容体拮抗薬のPCPを連続投与し、社会ストレス負荷マウスの社会性行動への影響を検討した。

Control群において、第1回目の社会性行動試験における第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。一方、stress群において、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せず、control群のそれと比較して有意に短縮していることを確認した(データ示さず)。

第1回目の社会性行動試験終了後、直ちにcontrol群およびstress群に生理食塩水あるいはPCP(10 mg/kg/day s.c.)を7日間連続投与し、最終投与の1および8日後[居住マウスと接触させた最終日からそれぞれ8(第2回目)および15(第3回目)

第1セッションの交流区域滞在時間は、生理食塩水を投与したcontrol群(saline/control群)と比較して有意に延長していたが、第3回目の社会性行動試験ではそのような現象は認められなかった。Saline/control群における第2セッションの交流区域滞在時間は、いずれの試験日においても第1セッションのそれと比較して有意に延長し、社会性行動が認められた。生理食塩水を投与したstress群(saline/stress群)における第2セッションの交流区域滞在時間は、saline/control群のそれと比較して有意に短く、社会性行動の障害が認められた。

一方、PCP/control群における第2および3回目の社会性行動試験の第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差はなく、saline/control群およびsaline/stress群の第2セッションのそれらとも有意な差は認められなかった。また、PCP/stress群の第2セッションの交流区域滞在時間も、第1セッションのそれと差は

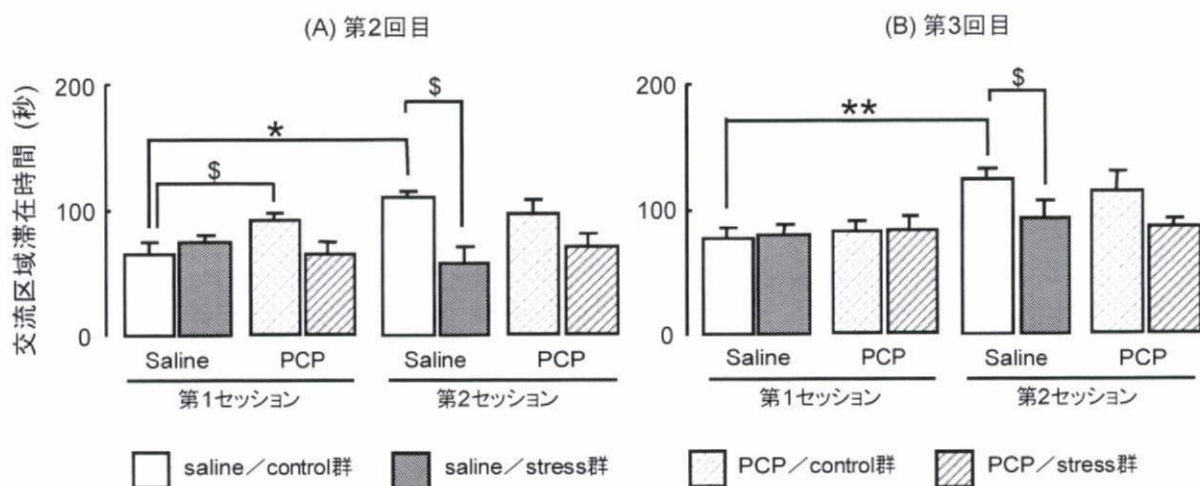


図 4. フェンシクリジン (PCP) を連続投与した場合の対照群 (control 群) および社会ストレス負荷マウス (stress 群) における社会性行動。(A) 第 2 回目の社会性行動。(B) 第 3 回目の社会性行動。居住マウスと 10 日間接触させた 8 (第 2 回目) および 15 (第 3 回目) 日後に社会性行動試験を行った。グラフは平均±標準誤差で示した (saline/control 群: n=6, saline/stress 群: n=8, PCP/control 群: n=6, PCP/stress 群: n=8)。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$: 対応する第 1 セッション時の交流区域滞在時間との比較 (対応のある t 検定)、 $Sp<0.05$: 同セッションにおける saline/control 群の交流区域滞在時間との比較 (対応のない t 検定)。

なく、saline/stress 群および PCP/control 群の第 2 セッションのそれらとも有意な差は認められなかった。これらの結果から、PCP/control 群では、saline/control 群ほど著明な社会性行動を示さないこと、PCP/stress 群では、社会性行動は障害されているが、その程度は、saline/stress 群と同程度であることが示唆された。

各群の第 2 回目の社会性行動試験における第 1 セッションの総移動距離には、一元配置分散分析で有意な差が認められた [$F(3, 24) = 3.54, p < 0.05$] が、Bonferroni の多重比較検定では有意な差は認められなかった (データ示さず)。

D. 考察

社会ストレス負荷モデル動物は、種内闘争を利用し、被験動物に繰り返し攻撃を受けさせ作製される。本モデル動物では攻撃を受けた後に不安・抑うつ様症状の発現 (Avgustinovich et al., 2005) や社会性行動の障害 (Berton et al., 2006) など、様々な精神行動障害が認められる (Buwalda et al., 2005)。したがって、社会ストレス負荷モデルは、環境的要因が高次精神機能に与える影響を検討

する上で非常に有用であると思われる。しかし、多くの研究では、成熟期に社会ストレスを負荷し、その後の行動学的、分子生物学的および神経薬理学的な検討が行われており、社会ストレスを神経発生・発達過程に負荷した場合の神経発生・発達に与える影響や、成熟期に達した時の精神行動におよぼす影響についてはほとんど検討されていない。神経発生・発達過程に社会ストレスを負荷した場合の神経発生・発達や精神行動におよぼす影響を調べることは、精神疾患の発症脆弱性因子の同定、精神疾患の発症機序や病態生理の解明および病態生理に基づいた治療法や予防法の開発につながるものと思われる。本研究では、神経発生・発達過程にある離乳後の幼若期のマウスに社会ストレスを負荷し、成熟期に達した時に精神行動障害が認められるかどうか、社会性行動試験を用いて検討した。

神経発生・発達過程にある離乳後の幼若期 (3 週齢) に攻撃居住マウスの飼育ケージにて 10 日間物理的な接触を負荷した stress 群における 1 日あたりの平均攻撃負荷時間は、非攻撃居住マウスの飼育ケージに入れた control 群のそれより有意に

長かった。したがって、**stress** 群には社会ストレスが十分に負荷できたものと示唆される。**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、社会性行動を示した。一方、**stress** 群において、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、最終ストレス負荷 15 日後まで認められた。これらの結果は、Berton ら (2006) が報告している最終ストレス負荷 28 日後まで社会性行動が障害されることと一致していた。また、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、**control** 群および **stress** 群における第 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せず、第 1 セッションの総移動距離に差は認められなかった。したがって、**stress** 群に認められる社会性行動の障害は、神経発生・発達過程のマウスに社会ストレスを負荷したことによる運動機能障害ではなく、神経発生・発達過程において高次精神機能が異常となり、持続的に社会性行動が障害されたものと示唆される。

精神疾患は、脳の発生・発達期である胎生期・周産期・生後発達期において遺伝的要因と環境的要因が相互的に作用して発達障害が起こり、発症に至ると考えられている (Belmaker, 2004; Freedman, 2003; Sawa and Snyder, 2002)。また、脳の発生・発達期において環境的要因が負荷されると精神疾患発症に対する脆弱性が形成され、思春期以降に社会ストレスや薬物乱用などが加わった場合にも精神疾患が発症すると考えられている。依存性薬物である非競合的 NMDA 受容体拮抗薬の PCP はヒトに統合失調症に酷似した精神症状 (PCP 精神病) を惹起させる (Javitt and Zukin, 1991) こと、PCP をマウスに連続投与すると、自発運動量の増加、強制水泳試験における意欲の低下の増強およ

び認知機能障害など多彩な精神行動異常が惹起されることが報告されている (Mouri et al., 2007)。そこで、成熟期以降に **control** 群および **stress** 群に PCP を連続投与し、神経発生・発達過程における社会ストレス負荷マウスの社会性行動への影響を検討した。PCP 最終投与の 1 および 8 日後において、PCP/**control** 群における第 2 セッションの交流区域滞在時間と第 1 セッションのそれと差はなく、**saline**/**control** 群のそれとも有意な差は認められなかった。PCP/**stress** 群における第 2 セッションの交流区域滞在時間も第 1 セッションのそれと差はなく、**saline**/**stress** 群および PCP/**control** 群のそれらとも有意な差は認められなかった。これらの結果から、PCP の連続投与は、社会性行動の発現を減弱させるが、顕著に障害させないものと示唆される。**Stress** 群に認められた社会性行動の障害も増強させないことから、**stress** 群での社会性行動障害の発現には、グルタミン酸作動性神経系は関与していないかもしれない。

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。しかし、**stress** 群に認められた社会性行動の障害の発現機序は不明である。今後、神経細胞および樹状突起などの形態学的変化、タンパク質の発現およびその局在、神経系の変化など、免疫組織化学的および神経化学的に解析し、環境的要因による脳機能の変化に関与する脆弱性因子を探索・同定していく予定である。

E. 結論

本研究において、精神疾患の発症に関与する環境的要因が高次精神機能へ与える影響について検討した。神経発生・発達過程のマウスに環境的要因として社会ストレスを負荷したところ、社会性行動の障害が認められた。また、神経発生・発達過程において社会ストレスを負荷したマウスに、精神異常発現薬である PCP を投与し、社会ストレスおよび PCP の双方がマウスの社会性行動に与

える影響について検討したところ、PCP (10 mg/kg/day) 7日間連続投与では、明らかな社会性行動の障害が認められなかった。今後、例数の追加およびPCP投与用量の検討を行い、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さらに検討しなければならない。さらに形態学的、免疫組織化学的および神経化学的な解析を行い、環境的要因による脳機能の変化に関する脆弱性因子を探索・同定し、精神疾患の発症機序や病態生理の解明および病態生理に基づいた治療法や予防法の開発につなげたい。

[参考文献]

- 1) Avgustinovich, D.F., Kovalenko, I.L. and Kudryavtseva, N.N.: A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 35, 917-924, 2005.
- 2) Bayer, T.A., Falkai, P. and Maier, W.: Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J. Psychiatr. Res.*, 33, 543-548, 1999.
- 3) Belmaker, R.H.: Bipolar disorder. *N. Engl. J. Med.*, 351, 476-486, 2004.
- 4) Belmaker, R.H. and Agam, G.: Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med.*, 358, 55-68, 2008.
- 5) Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., et al.: Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311, 864-868, 2006.
- 6) Buwalda, B., Kole, M.H., Veenema, A.H., et al.: Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 83-97, 2005.
- 7) Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., et al.: Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am. J. Psychiatry*, 161, 598-607, 2004.
- 8) Freedman, R.: Schizophrenia. *N. Engl. J. Med.*, 349, 1738-1749, 2003.
- 9) Javitt, D.C. and Zukin, S.R.: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1301-1308, 1991.
- 10) Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., et al.: The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 693-710, 2008.
- 11) Lewis, D.A. and Levitt, P.: Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.*, 25, 409-432, 2002.
- 12) Maddox, V.H., Godefroi, E.F. and Parcell, R.F.: The synthesis of phencyclidine and other 1-arylcyclohexylamines. *J. Med. Chem.*, 8, 230-235, 1965.
- 13) Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., et al.: Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 27, 457-476, 2001.
- 14) McCarley, R.W., Wible, C.G., Frumin, M., et al.: MRI anatomy of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 45, 1099-1119, 1999.
- 15) Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., et al.: Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem. Int.*, 51, 173-184, 2007.
- 16) Ross, C.A., Margolis, R.L., Reading, S.A., et al.: Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*, 52, 139-153, 2006.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, Y., Yamada, S., Takahashi, N., Saito, S.,

- Yoshimi, A., Inada, T., Noda, Y. and Ozaki, N.: No Association Between the Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z Polypeptide 1 (PTPRZ1) Gene and Schizophrenia in the Japanese Population. *Am. J. Med. Genet B Neuropsychiatr. Genet.*, 147B, 1013-1018, 2008.
2. Tsunekawa, H., Noda, Y., Miyazaki, M., Yoneda, F., Nabeshima, T. and Wang, D.: Effects of (R)-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane hydrochloride [(-)-BPAP] in animal models of mood disorders. *Behav. Brain Res.*, 189, 107-116, 2008.
 3. Tsunekawa, H., Noda, Y., Mouri, A., Yoneda, F. and Nabeshima, T.: Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). *Behav. Brain Res.*, 190, 224-232, 2008.
 4. Iwamoto, K., Takahashi, M., Nakamura, Y., Kawamura, Y., Ishihara, R., Uchiyama, Y., Ebe, K., Noda, A., Noda, Y., Yoshida, K., Iidaka, T. and Ozaki, N.: The effects of acute treatment with paroxetine, amitriptyline, and placebo on driving performance and cognitive function in healthy Japanese subjects: A double-blind crossover trial. *Hum. Psychopharmacol.*, 23, 399-407, 2008.
 5. Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., Kamei, H., Noda, Y., Furukawa, F. and Nabeshima, T.: Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 202, 315-328, 2009.
 6. 玉地亜衣, 吉見 陽, 野田幸裕: 心の病を治す薬の作用. *こころのりんしょう a・la・carte*, 27, 415-421, 2008.
 7. 吉見 陽, 野田幸裕, 齋藤真一, 尾崎紀夫: 統合失調症の病態と新薬開発の動向. *脳と精神の医学*, 19, 165-172, 2008.
- ## 2. 学会発表
1. 毛利彰宏, 野田幸裕, 村井里菜, 脇由香里, 田中光一, 鍋島俊隆: 統合失調症モデルマウスに認められる情動障害におけるグルタミン酸トランスポーターの関与について. 第3回トランスポーター研究会年会(京都, 平成20年6月7日)
 2. 丹羽美苗, 新田淳美, 溝口博之, 伊藤康之, 野田幸裕, 永井拓, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: メタンフェタミン依存における“Shati”の生理機能の解明. *Neuroscience2008* (第31回日本神経学会大会) (横浜, 平成20年7月11日)
 3. 鍋島俊隆, 間宮隆吉, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 溝口博之: ニコチン性コリン受容体の細胞内伝達系を介する認知機能の調節機構. 財団法人喫煙科学研究財団第23回平成19年度助成研究発表会(東京, 平成20年7月24日)
 4. 安藤 雄, 野田幸裕, Dayong Wang, 脇由香里, 桑原宏貴, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与マウスにおける認知機能障害に対するガラントミンの改善作用. *生体機能と創薬シンポジウム 2008 —生命システムにおける情報ネットワークの重要性を解く—* (東京, 平成20年9月5日)
 5. Yu Ando, Yukihiro Noda, Dayong Wang, Yukari Waki, Hiroki Kuwahara, Akihiro Mouri and Toshitaka Nabeshima: The ameliorating effect of galantamine on cognitive impairment through nicotin-dopamine-ERK1/2 systems in mice treated with methamphetamine repeatedly. 文部科学省学術フロンティア推進事業「International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders」(名古屋, 平成20年9月24日)
 6. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Rina Murai,