

200941016A

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 21 年度 総括研究報告書

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 2009
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 22 年 3 月

研究代表者 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 21 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 2009
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)**

平成 22 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

平成 21 年度 研究報告書の刊行にあたって

研究代表者 鍋島 俊隆

厚生労働省発衛研第 4 2 6 号をもって交付決定の通知をうけた平成 21 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 22 年 3 月 吉日

目次

1. 平成 21 年度総括研究報告

2. 平成 21 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

(名城大学大学院薬学研究科・薬品作用学研究室 鍋島俊隆)

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)

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)

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)

Evaluation of cognitive and emotional behaviors in offspring of C57BL/6J mice after pre-/prenatal exposure of nicotine on six different time-windows.

(リサーチレジデント アルカム トルソン)

化学物質により誘導される分子群の発現解析および機能解析

(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)

3. 刊行物一覧(平成 21 年度)

4. 研究代表者・研究分担者一覧

平成 21 年度 総括研究報告

研究代表者 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

総括

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 21 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)、ジゾシルピン (+)MK-801] の胎生期における暴露が、成体期まで長期持続する情動性、学習・記憶、認知機能などの各化学物質に固有の精神障害を誘発することを明らかにした。②新生児期における異常免疫応答を惹起する化合物 [polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C)] の暴露は、精神発達障害を引き起こし、成体期まで長期間持続する行動異常を惹起すること、及びストレスに脆弱であることを明らかにした。また、この PolyI: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た結果、神経発達障害の原因となるようないくつかの因子を同定した。③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の周産期における暴露が、精神発達障害を惹起することを明らかにし、その異常を行動表現型から評価できる方法を確立した。

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)

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。本研究では、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) をマウスの胎生期 (胎生 6.5 日目から出生まで) に投与を行い、その影響について行動学的、神経化学的に明らかにすることを目的とした。本研究課題を通して、NMDA 受容体に作用する化学物質を含む食品及び医薬品の摂取・投与により、胎内の子供の神経発達に与える影響を評価できると考えている。前年度までに、胎生期における PCP 暴露が成体期での統合失調症様の行動異常を惹起し、NR1 リン酸化レベルの低下などの神経化学的变化を引き起こすことを報告している。また、神経発達における PCP 暴露の影響として、グルタミン酸神経前駆細胞の分裂を障害することで、神経細胞数を減少させていることも併せて報告した。これらの結果より、グルタミン酸神経系の機能低下が引き起こされていることが示唆されたため、本年度は胎生期 PCP 暴露によるグルタミン酸神経系機能の障害に焦点を当て、

より詳細な検討を試みた。まず、グルタミン酸機能を亢進させる目的でグルタミン酸トランスporter阻害薬を前頭前皮質に投与したところ、胎生期にPCPを暴露されたマウスで認められた行動障害の一部が緩解した。また、組織化学的解析により、この時期の前頭前皮質におけるグルタミン酸神経細胞数が減少しているのが確認された。さらに、神経細胞数の減少を生じた原因を明らかにするため、胎生期PCP暴露による神経前駆細胞内での遺伝子発現変化をPCRアレイ法により網羅的に解析したところ、PCP暴露により神経前駆細胞の分裂及び神経細胞の分化に関連するいくつかの遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、胎生期におけるPCPの暴露は、神経発達に重要な遺伝子の発現を攪乱し、神経前駆細胞の分裂、神経細胞の産生を抑制し、成体期まで長期間持続するグルタミン酸機能障害を生じることが明らかとなった。今後はさらに、PCPの投与によって神経前駆細胞内において生じる分子機構の異常について、詳細に検討したいと考えている。

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)

平成20年度は妊娠期、特に神経の発生および成長過程における化学物質の影響を検討するために、妊娠6日目から出産前日までマウスに化学物質(グルタミン酸受容体拮抗薬:ジゾシルピン 0.2 mg/kgあるいはニコチン型アセチルコリン受容体作動薬:ニコチン 0.5 mg/kg)を処置し、生まれたマウスの7週齢時の学習記憶および情動行動について検討した。その結果、ニコチンは特に影響を及ぼさなかったが、ジゾシルピンによって新奇物体認知試験、高架式十字迷路試験および社会的相互反応試験では生理食塩液投与群と比較して有意な障害が誘発されることが明らかとなった。平成21年度は、ジゾシルピンの影響についてさらに検討するために、幼若期あるいは成熟期に低用量のジゾシルピンを14日間投与し、その後の学習記憶および情動機能について行動薬理学的に検討した。

ICR系雌雄性マウス(3、9週齢および10ヶ月齢)に低用量ジゾシルピン0.02 mg/kg皮下)を14日間処置した。薬物処置終了2週間後からオープンフィールド試験、新奇物体認知試験、Y字型迷路試験、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。さらに生殖行動についても観察した。

ジゾシルピンを投与された3および10週齢のマウスでは、Y字型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較して有意な障害が観察されたが、10ヶ月齢のマウスでは何ら差は認められなかった。また、性行動については3週齢および10ヶ月齢のマウスではマウンティング行動そのものがほとんど見られなかったが、ジゾシルピンを投与された10週齢の雄性マウスにおいて有意なマウンティング回数の減少が認められ、生殖行動が低下している可能性が示唆された。

日常生活で神経伝達物質受容体に作用する化学物質に暴露されている可能性が極めて高いが、そうした意識は一般に高くない。本研究では化学物質暴露による危険性を学習記憶、情動性および生殖行動について今後さらに詳細に検討し、化学物質に対する喚起また、健康意識をさらに高めることに貢献していきたい。

3. 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)

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検討した。昨年度は、周産期異常免疫応答の動物モデルとして合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を生後 2 日目から 6 日目まで 1 日 1 回 5 日間連続する方法を新しく開発した。PolyI:C を処置した ICR 系マウスは、成熟後に不安様行動の増加、学習記憶、感覚情報処理および社会性行動の異常を示し、海馬における脱分極性グルタミン酸遊離の障害が認められた。本年度は、polyI:C 処置マウスの行動異常に対する抗精神病薬 (haloperidol, clozapine)、ニコチンおよび D-セリンの効果調べた。さらに、polyI:C 処置による神経発達障害のメカニズムを解明するために、培養アストログリア細胞および神経細胞に対する polyI:C の効果を調べた。

定型抗精神病薬である haloperidol は polyI:C 処置マウスの異常行動のうち、感覚情報処理 (プレパルス抑制) の障害のみを改善した。一方、非定型抗精神病薬である clozapine はプレパルス抑制の障害の他、不安様行動の増加、学習記憶・社会性行動の異常も改善した。ニコチンと D-セリンはプレパルス抑制の障害には無効であったが、その他の行動異常を改善した。ニコチンの効果はニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストにより、D-セリンの効果は NMDA 受容体アンタゴニストにより拮抗された。

海馬由来初代培養神経細胞およびアストログリア細胞において polyI:C の標的分子である toll-like receptor 3 の発現が認められた。低濃度の polyI:C (3-10 · g/mL) を直接神経細胞に添加しても細胞生存率およびその形態は変化しなかった。一方、培養アストログリア細胞に polyI:C を添加して 24 時間培養した培養上清 (polyI:C 処置アストログリア細胞培養上清: PolyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に添加すると、Control-ACM 処置した神経細胞に比較して、神経突起の伸張が抑制された。PolyI:C 処置したアストログリア細胞では interferon-induced transmembrane protein 3 (ifitm3) およびサイトカイン類の mRNA の増加が認められた。以上の結果より、polyI:C 処置マウスの行動異常にはドーパミン、アセチルコリンおよびグルタミン酸などの神経伝達物質の異常が関与していることが示唆された。培養実験の結果より、polyI:C 処置による脳神経発達障害には、アストログリア細胞の異常応答と神経細胞-アストログリア細胞間の相互作用の異常が関与していることが示唆された。

4. 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、実験動物の神経発生・発達過程に、環境的要因としての化学物質 (免疫異常発現薬二本鎖 RNA アナログ (Poly I:C)・NMDA 受容体アンタゴニスト、フェンジクリジン (PCP) など) や慢性社会ストレスを単独もしくは複合的に負荷し、その後に惹起される情動・認知障害について検討した。すなわち、新生仔期 (生後 2 日齢から 5 日間) における Poly I:C 処置による免疫異常、幼若期 (生後 3 週齢から 10 日間) における高攻撃性マ

ウスへの暴露による慢性社会ストレスおよび成体期（生後6週齢以降）におけるPCPの単回あるいは連続投与を複合的に負荷し、情動・認知機能に与える影響について行動薬理的および神経化学的に検討した。その結果、1) 慢性社会ストレス負荷マウスでは、社会性行動の障害が認められたが、海馬における神経細胞には変化は認められなかった。幼若期のストレス暴露は成体期まで遷延する影響を与えることが示唆され、現在、神経新生について解析中である。2) PolyI:C 処置マウスでは、PCP 急性投与による運動過多およびPCP連続投与による情動・認知障害の増強が認められた。このように新生仔期におけるPolyI:C処置は成体期でのPCP投与による行動異常を増強させることから、新生仔期における免疫異常も成体期まで遷延する影響を与えることが示唆される。今後、さらに詳細な形態学的、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与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。

5. Evaluation of cognitive and emotional behaviors in offspring of C57BL/6J mice after pre-/peri-natal exposure of nicotine on six different time-windows

Tobacco smoking during pregnancy has significant adverse impact on the overall mental quality of offspring. As an aid to smoking cessation during pregnancy, various nicotine replacement treatments are being alternatively applied. However, the effects of nicotine exposure at the prenatal stage on the cognitive and emotional behaviors in offspring are not well understood due to the lack of systematic investigations. The current study has therefore aimed to initially evaluate cognitive and emotional behaviors in mice offspring which experienced pre-/peri-natal nicotine exposure (PNE) in different time-windows. Pregnant C57BL/6J mice were exposed to nicotine via sweetened (2% sucrose) drinking water during 6 different time windows including gestational day 1 to day 13 (GD1-GD13), GD14-P0, G1-P0 GD14-postnatal day 7 (P7), GD1-P7, and P0-P7. During P28-P56 days, both male and female offspring were given a battery of behavioral tests in following order: light/dark box test, novelty-suppressed feeding test, marble burying behavior test, sociability test, social novelty preference test, social avoidance tube test, one-trial delayed alternation in T-maze test, object-based attention test, Y-maze test, novel object recognition test, elevated plus maze test, and prepulse inhibition test. PNE during all time-windows induced different types of attention deficits in offspring. PNE during GD1-P7, GD1-P0, GD14-P0, and GD14-P7 induced anxiety related behaviors in offspring. During GD14-P0, PNE exerted the strongest effects on the observed behaviors in offspring. Neither prenatal anti-oxidant treatment nor postnatal cross-fostering ameliorated the behavioral abnormalities induced by PNE during GD14-P0. Results indicated that PNE at any time windows of pregnancy impairs, irreversibly, emotional and cognitive behaviors in offspring. These findings urge further considerations for nicotine exposure during any periods of pregnancy.

6. 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)

化学物質には、生体に対してホルモン様の作用を有する物質や、逆にホルモン作用を阻害する物質、すなわち内分泌攪乱物質がある。生体内には内分泌系の他にも免疫系と呼ばれる生体恒常性を維持する機構が存在し、感染症によって異常免疫応答が惹起される。特に、周産期・発育期におけるウイルス感染症は脳発達異常を引き起こすことがある。したがっ

て、生体内に取り込まれた化学物質が免疫系の異常を引き起こし、中枢神経系に対して障害をもたらす可能性を考える必要がある。本研究では、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 polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (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質発現変化を網羅的に解析した。ICR 系の新生仔マウスに polyI:C を生後 2 日目から 6 日目まで連続皮下投与した。10 週齢に成長したマウスの海馬から細胞質分画タンパクを抽出し、fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis 法よりスポットの発現量を比較した。コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在した。さらに、個々のスポットについて解析した結果、スポット番号 SSP3707 および SSP7512 の 2 個のスポットに有意な発現変化が認められた。SSP3707 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 1.6 倍増加した。逆に、SSP7512 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 0.6 倍減少した。発現変化が認められたスポットについて peptide mass fingerprinting 法によりタンパク同定を行った結果、SSP3707 は aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1) および SSP7512 は collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) であると同定された。同定されたタンパクが ALDH1L1 および CRMP5 であるかどうかを調べるため、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。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。さらに、polyI:C 最終投与 24 時間後の新生仔マウスの海馬においても、ALDH1L1 のタンパク発現が増加し、CRMP5 のタンパク発現は減少していた。初代培養神経細胞において、CRMP5 タンパクは細胞体および神経突起の先端部分に高発現していた。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 ALDH1L1 および CRMP5 の機能解析を行うとともに新生仔期の免疫異常によって惹起される精神発達異常との関連について検討する予定である。

平成 21 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。本研究では、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) をマウスの胎生期（胎生 6.5 日目から出生まで）に投与を行い、その影響について行動学的、神経化学的に明らかにすることを目的とした。本研究課題を通して、NMDA 受容体に作用する化学物質を含む食品及び医薬品の摂取・投与により、胎内の子供の神経発達に与える影響を評価できると考えている。前年度までに、胎生期における PCP 暴露が成体期での統合失調症様の行動異常を惹起し、NR1 リン酸化レベルの低下などの神経化学的变化を引き起こすことを報告している。また、神経発達における PCP 暴露の影響として、グルタミン酸神経前駆細胞の分裂を障害することで、神経細胞数を減少させていることも併せて報告した。これらの結果より、グルタミン酸神経系の機能低下が引き起こされていることが示唆されたため、本年度は胎生期 PCP 暴露によるグルタミン酸神経系機能の障害に焦点を当て、より詳細な検討を試みた。まず、グルタミン酸機能を亢進させる目的でグルタミン酸トランスポーター阻害薬を前頭前皮質に投与したところ、胎生期に PCP を暴露されたマウスで認められた行動障害の一部が緩解した。また、組織化学的解析により、この時期の前頭前皮質におけるグルタミン酸神経細胞数が減少しているのが確認された。さらに、神経細胞数の減少を生じた原因を明らかにするため、胎生期 PCP 暴露による神経前駆細胞内での遺伝子発現変化を PCR アレイ法により網羅的に解析したところ、PCP 暴露により神経前駆細胞の分裂及び神経細胞の分化に関連するいくつかの遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、胎生期における PCP の暴露は、神経発達に重要な遺伝子の発現を攪乱し、神経前駆細胞の分裂、神経細胞の産生を抑制し、成体期まで長期間持続するグルタミン酸機能障害を生じることが明らかとなった。今後はさらに、PCP の投与によって神経前駆細胞内において生じる分子機構の異常について、詳細に検討したいと考えている。

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る神経発達障害を生じる危険性が高い。

我々が日常何気なく口にする食品や医薬品には NMDA 受容体拮抗作用を有するものは少ない¹⁾ (Table 1)。NMDA 受容体が周産期の神経発達において重要な役割を担っていることを考えると、このような食品等の摂取は出生児の精神機能に重大な影響を与える可能性を孕んでいると言える。しかしながら、神経発達における NMDA 受容体拮抗物質の影響について、詳細に検討した報告はほとんどなく、未知の点が多いのが現状である。そこで、本研究では、NMDA 受容体非競合的アンタゴニストであり、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フェンシクリジン (PCP)^{2,3)} を周産期のマウスに投与することで、NMDA 受容体拮抗作用を有する化学物質が神経発達にどのような影響を及ぼすのかを、行動学的、生化学的、組織化学的に解析することを目的とした。特に、前年度までの結果より、グルタミン酸作動性神経系の機能低下を示唆する結果が多数得られていることから、本年度はグルタミン酸作動性神経系に焦点を絞り、より詳細な検討を行った。

Table 1 : NMDA 受容体拮抗作用のある食品含有化合物、医薬品

▽ NMDA受容体機能阻害の報告のある、食品に含まれる化合物

カフェイン	コーヒー、紅茶、緑茶、コーラ、チョコレートなどに含まれる。
サッカリン	人工甘味料。低カロリー食品・飲料などに用いられる。
ソルビトール	甘味料。低カロリー食品・飲料、また清涼剤として用いられる。
コンドロイチン	健康食品に含まれることがある。
エチレンジクロール	甘みがある。毒性が強い。PET(ポリエチレンテレフタレート)の原料。
バニリン	バニラの匂いの主成分。
エタノール	酒類の主成分。

▽ NMDA受容体拮抗作用を有する医薬品

薬剤	用途
ケタミン	全身麻酔薬
ディゾルピド	抗痙攣薬
CPP	抗痙攣薬
メサドン	鎮痛薬
メマンチン	抗ウイルス薬、アルツハイマー病治療薬
アママンジン	抗パーキンソン病薬、A型インフルエンザ予防薬
イフェンプロシル	脳循環代謝改善薬
チキストロメルファン	鎮痙薬
硫酸マグネシウム液	血清電解質

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、DL-TBOA (Sigma) を使用した。

2. PCP 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 [5、10、20 mg/kg/day] を皮下投与で行い、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. 行動量測定試験

マウスをアクリル板で囲われた測定装置内 (45 x 26 x 40cm) に120分間入れ、赤外線センサーを用いることで、5分間隔でその行動量を測定した (Scanet SV-10; Melquest Ltd, Japan)。

4. 新規物体認識試験

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、その値を探索嗜好性 (Exploratory Preference) として評価値とし

た。

5. 強制水泳試験

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. DL-TBOA による拮抗実験

DL-TBOA (Tocris) は、P56において各行動試験の30分前に、1もしくは10 nmol/site/bilaterallyの容量で前頭前皮質[anteroposterior (AP): 1.7, mediolateral (ML): ± 0.5 from bregma, dorsoventral (DV): 2mm from the skull]に27ゲージの注射針を用い直接投与を行った。注入に関しては、25 μ lのハミルトンシリンジを用い、30秒間かけてゆっくりと0.1 μ l/10g body weight量を注入し、注入1分後に針を抜いた。

7. 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 \times 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。蛋白 (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 [horseradish 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。

8. Laser Capture Microdissection

E13.5 のマウスを子宮内から摘出し、頭部を OCT Compound (サクラ精機) 内で凍結させ、クリオスタットにより、20 μ m の厚さで脳スライスを作成した。その凍結脳組織切片を 1 分間室温に置き、メタノールにより 3 分間固定を行った後、クレシルバイオレット (LCM staining kit, Ambion) により 10 秒間の染色、DEPC 水により洗浄・乾燥し、PALM Laser Capture Microdissection System (Carl Zeiss) を用い、脳室帯領域の切り出しを行った。

9. PCR アレイ

Laser capture microdissection 法により切り出された脳室帯断片より、RNAqueous®-Micro Kit (Ambion)を用い、mRNA の抽出を行った。その後、RT² Profiler™ PCR Array for the Mouse Neurogenesis and Neural Stem Cells (SA Bioscience)を用い、添付プロトコールに従い、PCR アレイを行った。リアルタイム PCR には、Applied Biosystems 7500 Fastリアルタイム PCR システムを用いた。

10. 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

a) 抗精神病薬クロザピン及びハロペリドールによる改善効果

前年度までの結果により、胎生期における PCP の投与は、成体期まで長期間持続する統合失調症様行動異常を惹起することが明らかとなった。そこで、本年度はまず、これらの行動異常が既存の抗精神病薬であるクロザピン及びハロペリドールの投与により緩解され得るかについて、行動学的に解析することにした。

はじめに、統合失調症の陽性症状の指標となる低濃度 PCP への行動感作に対する効果を評価するため、行動量測定試験を行った。その結果、クロザピン、ハロペリドールの両方で、PCP による行動感作が抑制されることが示された (Fig.1)。

さらに、胎生期PCP投与により認められた認知機能障害が、クロザピン及びハロペリドールにより緩解するかを検討するため、新奇物体認識試験

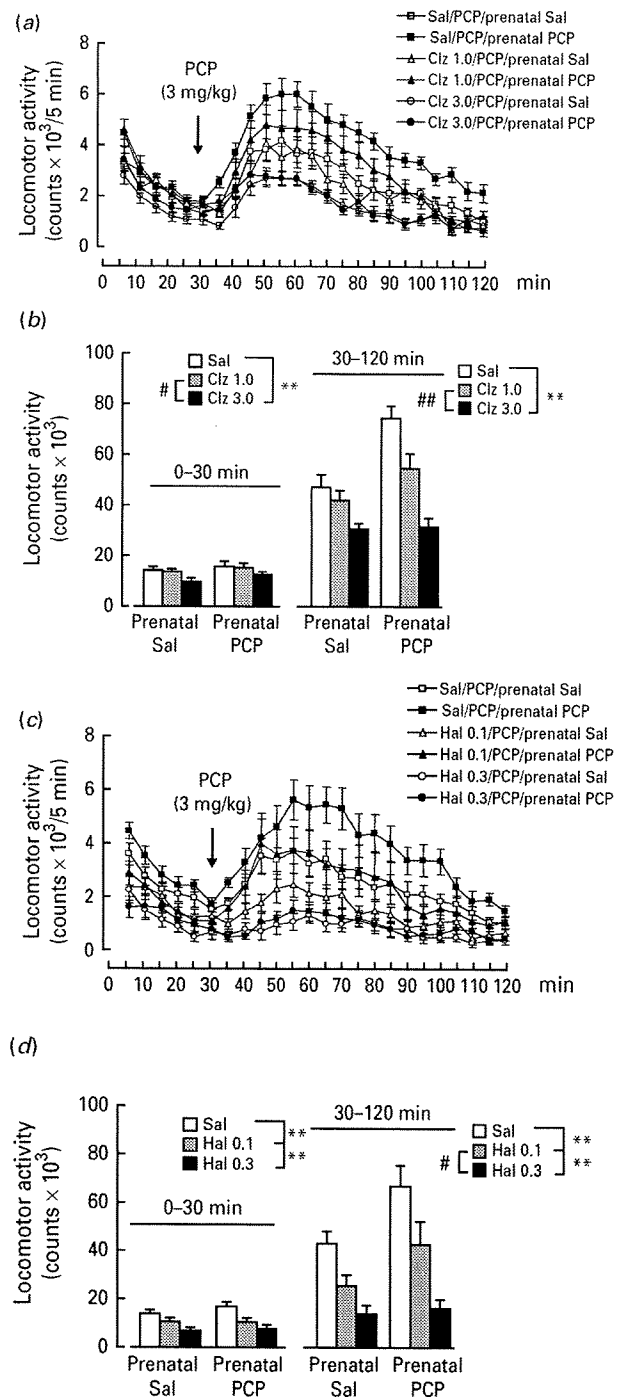


Fig. 1. Effects of antipsychotics on phencyclidine (PCP)-induced hyperlocomotion in prenatal PCP-treated mice. (a)(b) Clozapine (Clz ; 1 or 3 mg/kg) and (c)(d) haloperidol (Hal; 0.1 or 0.3 mg/kg) were administered to mice 30 min before the test. After 30 min habituation, mice were challenged with PCP (3 mg/kg). The effects of clozapine or haloperidol on the PCP-induced hyperlocomotion were assessed over 5-min intervals during the last 90 min after habituation. (d). ** p < 0.01 compared to saline (Sal) treatment. # p < 0.05, ## p < 0.01 compared to the lower dose of clozapine (1 mg/kg) or haloperidol (0.1 mg/kg) treatments. Data are expressed as the mean ± S.E.M. for 8–14 mice (Bonferoni's test).

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、PCP 投与群において認められた探索嗜好性の減少はクロザピンにより改善し、ハロペリドールによっては改善しないことが示された (Fig. 2)。

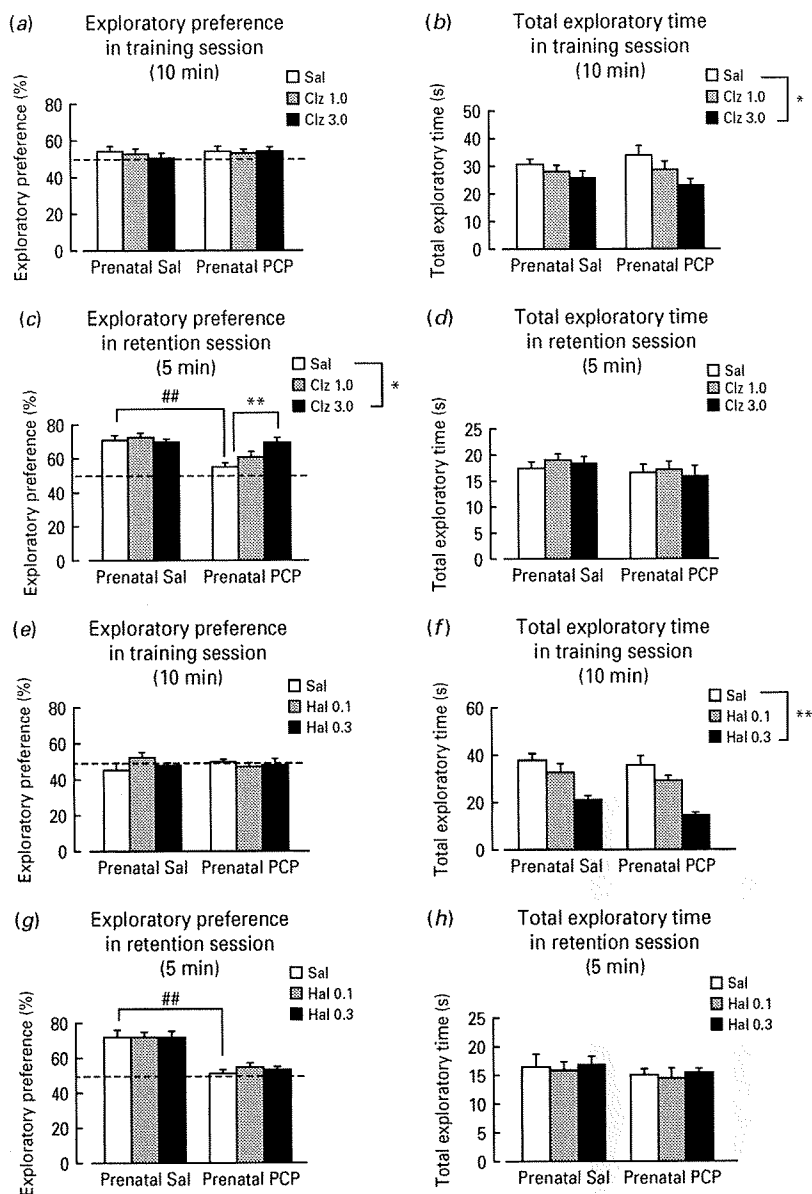


Fig. 2. Effects of antipsychotics on cognitive dysfunction in prenatal PCP-treated mice.

(a-d) Clozapine (Clz ; 1 or 3 mg/kg) and (e-h) haloperidol (Hal; 0.1 or 0.3 mg/kg) were administered 30 min before the training session. For clozapine treatment: (a) exploratory preference in the training session and (c) retention session. Total exploration time in (b) the training session and (d) retention session. For haloperidol treatment: (e) exploratory preference in the training session and (g) retention session. Total exploration time in (f) the training session and (h) retention session. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to saline (Sal) treatment. ## $p < 0.01$ compared to the prenatal Sal-treated group. Data are expressed as the mean \pm S.E.M for 8–12 mice (Bonferroni's test).

b) グルタミン酸トランスポーター阻害剤 DL-TBOA による改善効果

前年度の結果より、胎生期 PCP 投与により、成体期の前頭前皮質において、グルタミン酸作動性神経系の機能低下が引き起こされている可能性が示唆された。実際、NMDA 受容体コアゴニストである D-セリンの投与により、胎生期 PCP 投与マウスで認められた行動異常の一部が緩解することを明らかにしている。本年度はさらに、グルタミン酸トランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与により、シナプス間隙のグルタミン酸量を増加させ、グルタミン酸作動性神経系の機能低下を改善することで、胎生期 PCP 投与マウスで認められた行動異常が緩解することができるかについて、検討を行った。

はじめに、新奇物体認識試験における効果を評価した。DL-TBOA は、Training 試行の 30 分前にマイクロインジェクション法を用い、前頭前皮質内へ直接注入を行った。その結果、DL-TBOA 10nmol/site の投与により、胎生期 PCP 投与マウスにおいて認められた認知記憶障害が緩解することが示された (Fig.3)。

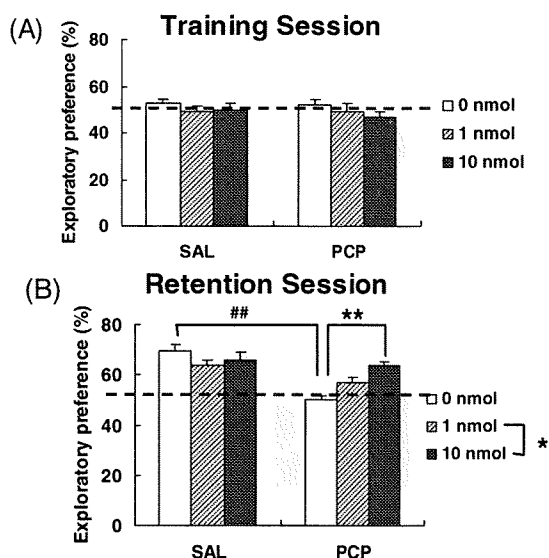


Fig. 3: Effect of DL-TBOA on the PCP-induced behavioral deficits in novel object recognition test. DL-TBOA was administrated 30min before the behavioral tests. The results in novel object recognition test are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). $^{##}p < 0.01$ vs. Saline group, $^{**}p < 0.01$ vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

次に、強制水泳試験における DL-TBOA の効果について検討を行った。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 30 分前に、前頭前皮質へ DL-TBOA を投与したところ、胎生期 PCP 投与マウスで認められた無動時間の延長が抑制され、陰性症状様の行動異常の改善効果が認められた (Fig.4)。

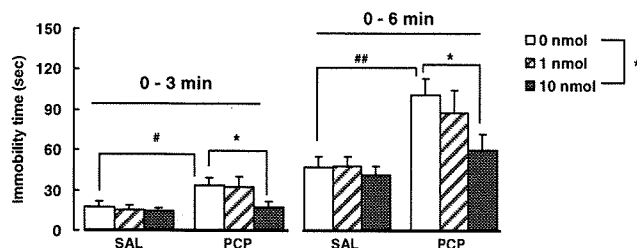


Fig. 4: Effect of DL-TBOA on the PCP-induced behavioral deficits in forced swimming test.

DL-TBOA was administrated 30min before the behavioral tests. The results in forced swimming test are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). $^{#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$ vs. Saline group, $^{*}p < 0.05$ vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

2. 胎生期 PCP 暴露による成体期生化学的変化

次に、胎生期 PCP の暴露が成体期の神経細胞、特にグルタミン酸神経系にどのような影響を及ぼし、行動異常をもたらしているのかを検討するために、生化学的解析を行った。

NMDA 受容体は、そのサブユニットの一つである NR1 タンパク質の 897 番目のセリンがリン酸化されることにより活性化することが知られている。本研究では、胎生期 PCP 暴露マウスの各脳部位において、この NMDA 受容体リン酸化レベルを定量化し、さらにこの定量化された値と行動障害との関係性について検討を行った (Fig.5)。

まず、前頭前皮質においては、NR1 の発現量自

体は増加しており、一方、リン酸化 NR1 量に関しては減少していることが明らかとなった。この結果より、全 NR1 のうちリン酸化を受けている NR1 の割合(NR1 リン酸化率)が減少していることが導かれた。さらに、このリン酸化 NR1 量と新奇物体認識試験における探索嗜好性のスコアを比較したところ、有意な相関関係があることが見出され

た。また、海馬においても同様の傾向が認められたが、線条体においては、NR1 発現量の増加は認められたものの、NR1 リン酸化量の増加は認められず、探索嗜好性との相関関係も見られなかった。但し、リン酸化率については、有意に減少していた。

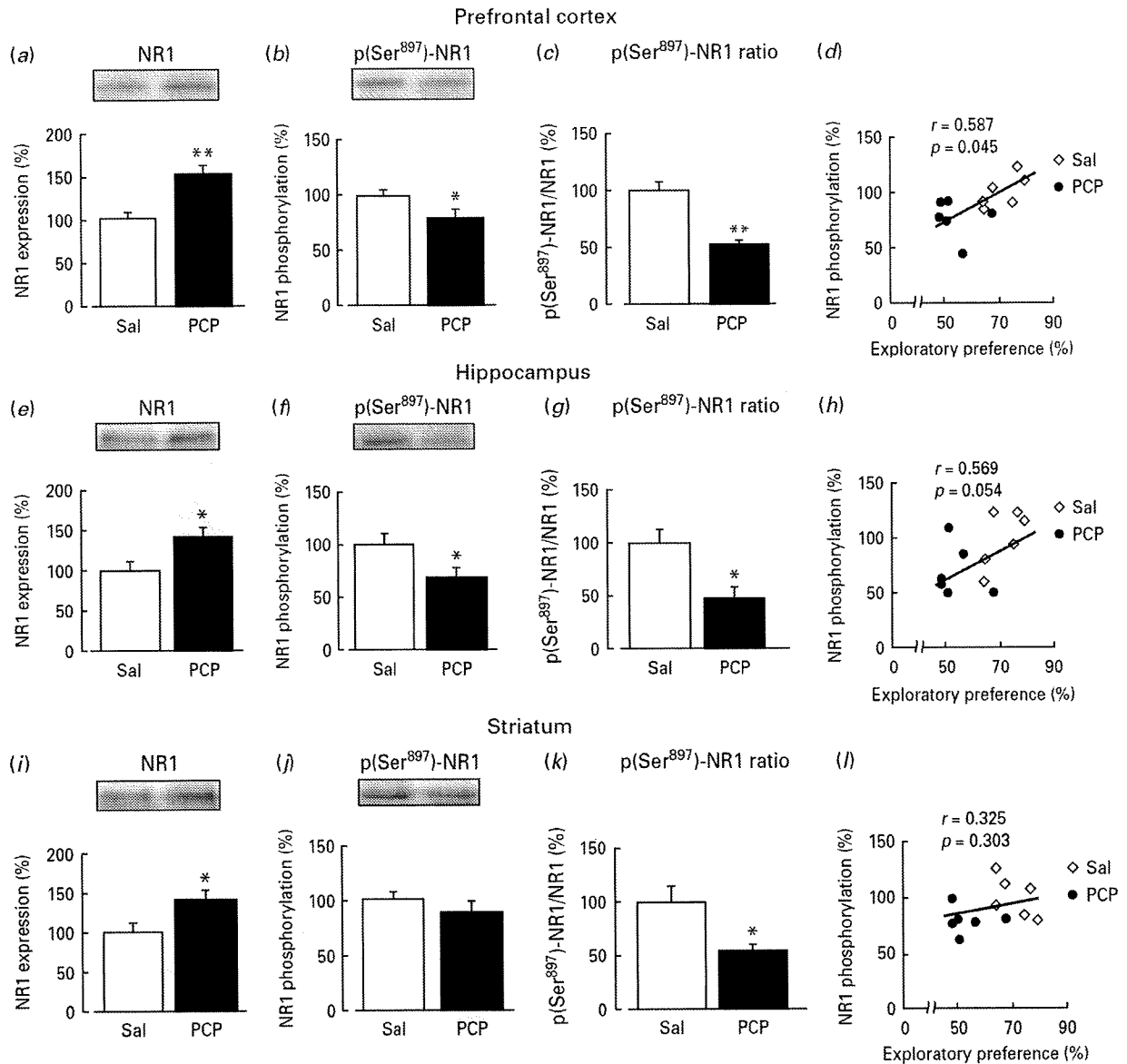


Fig. 5. Changes in the expression and phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor of prenatal phencyclidine (PCP)-treated mice.

Expression of NR1 and phosphorylated NR1 [p(Ser897)-NR1] was detected by Western blotting. Loaded protein was normalized to b-actin. The phosphorylation ratio was calculated as NR1 phosphorylation vs. NR1 expression. Results are represented as the level of NR1 expression in (a) the prefrontal cortex (PFC), (e) hippocampus and (i) striatum; the level of NR1 phosphorylation (Ser897) in (b) the PFC, (f) hippocampus and (j) striatum; and the ratio of NR1 phosphorylation vs. NR1 expression in (c) the PFC, (g) hippocampus and (k) striatum. The correlation of phosphorylated NR1 (Ser897) with exploratory preference in the retention session of the novel object recognition test in (d) the PFC, (h) hippocampus, and (l) striatum. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the prenatal saline (Sal) group. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. for six mice in each group (Student's *t* test).

3. 胎生期 PCP 暴露による神経前駆細胞内遺伝子発現変化の網羅的解析

前年度の結果より、胎生期における PCP の暴露は神経前駆細胞の分裂を障害することで、神経前駆細胞数の減少を引き起こし、結果的に、神経細胞数の減少を引き起こしていることが明らかとなった。そこで、本年度は、この神経細胞前駆細胞分裂障害を生じたメカニズムを明らかにするため、胎生期 PCP 暴露による神経前駆細胞内での遺伝子発現変化について網羅的に解析を行った。

まず、脳組織より神経前駆細胞を抽出するため、胎生 13.5 日目の胎児脳より、Laser capture

microdissection 法を用い、神経前駆細胞を豊富に含む脳室帯領域(VZ: ventricular zone)を切り出した (Fig.6)。その断片より mRNA を抽出後、PCR アレイ法を用い、網羅的な遺伝子発現スクリーニングを行った。この度用いた PCR アレイ法では、神経前駆細胞の増殖、分化、分裂、移動などにかかわる 86 遺伝子の発現量を一度に定量することが可能である。このスクリーニングの結果、胎生期 PCP の暴露によって、いくつかの遺伝子で発現量の減少が認められ、その中でも特に、Ep300、Notch2、Ntn1 という3つの遺伝子の発現量が有意に減少していることが明らかとなった (Table 2)。

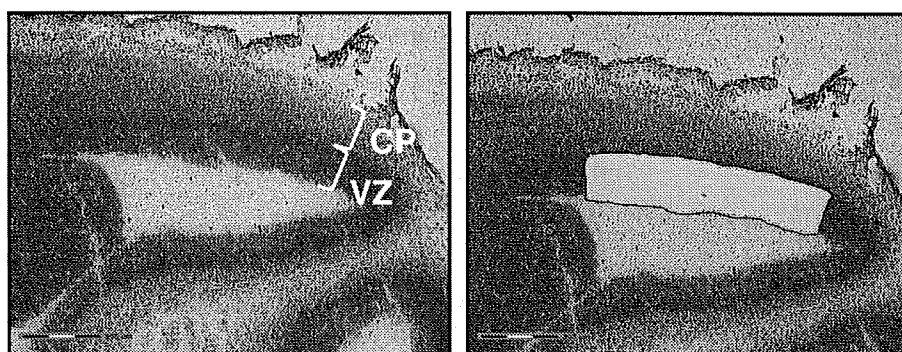


Fig. 6: Laser Capture Microdissection

These figures show the frontal cortex before (left) and after VZ was cut off by laser capture microdissection. VZ: ventricular zone, CP: cortical plate.

Table 2: Genes changed in the expression level in progenitor by PCP treatment (* $p < 0.05$)

	Symbol	Expression level		Fold Difference	T-TEST	Fold Up- or Down-
		PCP	SAL	PCP/SAL	p value	PCP/SAL
Down	Dvl3	1.65E-03	5.15E-03	0.320	0.335	-3.12
	Ep300	1.49E-02	3.00E-02	0.496	0.050*	-2.02
	Flna	1.77E-02	4.78E-02	0.370	0.494	-2.70
	Gnao1	5.00E-03	3.38E-02	0.148	0.294	-6.76
	Heyl	1.29E-04	3.01E-04	0.428	0.256	-2.34
	Mll1	1.93E-02	4.91E-02	0.394	0.241	-2.54
	Ncoa6	1.99E-03	6.88E-03	0.289	0.203	-3.46
	Notch2	9.42E-03	1.72E-02	0.546	0.047*	-1.83
	Nptx1	4.28E-04	9.72E-04	0.440	0.333	-2.27
	Nrcam	5.26E-03	2.06E-02	0.255	0.418	-3.92
	Ntn1	5.53E-05	2.15E-04	0.257	0.014*	-3.89
	Pou3f3	1.12E-02	6.88E-02	0.163	0.454	-6.14
	Ptn	2.91E-03	1.59E-02	0.183	0.534	-5.47
	Sema4d	8.83E-04	2.40E-03	0.368	0.317	-2.72
	Sox3	4.11E-03	8.65E-03	0.475	0.462	-2.11
Ywhah	3.70E-03	9.67E-03	0.382	0.658	-2.62	
Up	Pax6	4.48E-02	1.68E-02	2.666	0.573	2.67

D. 考察

本研究において得られた行動学的及び生化学的解析の結果を Table 3 にまとめる。周産期前期である胎生期において PCP を暴露させたマウスでは、多くの点で統合失調症に類似した傾向が認められた。成体期まで長期間持続する陽性症状、陰性症状、認知記憶障害等の統合失調症様行動異常が認められたことに加え、それらの行動異常のうち、陽性症状様のはクロザピン及びハロペリドールで緩解され、認知記憶障害はハロペリドールでは効果が認められず、クロザピンのみで緩解したことは統合失調症の病態に類似した結果である。さらには、行動異常の一部が NMDA 受容体コアゴニストである D-セリン、及びグルタミン酸トランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与により改善された。この結果は、胎生期 PCP 暴露マウスにおいてグルタミン酸神経系の機能低下が生じていることを示唆するものであり、統合失調症の発症要因のひとつとして『グルタミン酸機能低下仮説』が提唱されていることから、胎生期 PCP 暴露マウスは統合失調症様の病態を有していると言える。実際に、本研究において統合失調症患者の死後脳で認められる NMDA 受容体サブユニット NR1 発現量の増加、及びリン酸化量の減少が認められており⁴⁾、生化学的観点から見ても類似点が多い。

以上の結果は、子供を身籠った母親が NMDA 受容体拮抗作用をもつ化合物・医薬品を摂取することにより、胎児の神経発達に障害が生じ、成人になるまで持続する統合失調症に類似した精神障害が誘起される危険性があることを示唆するものである。我々が特に気に留めず摂取するものの中にも、PCP ほど効果は強くはないものの、NMDA 受容体拮抗作用を持つ化合物が含まれている¹⁾ (Table 1)。注意を喚起し、摂取を控えるなど、ある種の対策が必要となるかもしれない。

また、本研究により、胎生期における PCP の暴露が行動異常を惹起する機序として、グルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞の分裂を障害し、その神経前駆細胞数の減少、さらには神経細胞数の減少を引き起こしていることが示された。このグルタミン酸神経細胞数の減少が、上述のグルタミン酸機能の低下の直接的な原因だと考えられる。神経前駆細胞の NMDA 受容体の機能として、実際に、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^{5,6)}、本研究の結果と一致するような知見が得られている。さらに本年度は、PCP の暴露により神経前駆細胞内において発現変化を起こした遺伝子を網羅的に解析したところ、多くの遺伝子の

Table 3: 胎生期 PCP 暴露マウスで認められる行動異常及び生化学的变化

		5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
陽性症状	行動量測定試験	—	—	行動感作
	+Clozapine	—	—	抑制
	+Haloperidol	—	—	抑制
陰性症状	強制水泳試験	無動時間延長	無動時間延長	—
認知機能障害	新奇物体認識試験	障害	障害	障害
	+Clozapine	—	—	改善
	+Haloperidol	—	—	障害
	Y字型迷路試験	障害	—	—
	プレパルス抑制試験	障害	障害	—
神経化学的变化 (前頭前皮質)	NR-1発現量	—	—	増加
	NR-1リン酸化レベル	—	—	低下