

発現量が減少していることが見出され、これら遺伝子発現の変化が神経前駆細胞の分裂障害をもたらしている可能性が示唆された。特に、有意に発現量が減少した遺伝子の中でも Notch2 は、神経前駆細胞から神経細胞への分化の過程を抑制し、神経前駆細胞の状態を維持する因子として知られている⁷⁾。従って、PCP 暴露により、Notch2 の発現が減少したという結果は、その機能的に見ても、神経前駆細胞数が減少していたという結果と一致するものであり、今後、その詳細なメカニズムについて、検討していきたいと考えている。

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抗精神病薬、D-セリン、DL-TBOA によるその緩解、NR-1 リン酸化レベルの減少など、胎生期における PCP の投与は統合失調症に類似した様々な異常を引き起こすことが示された。また、胎生期に PCP を暴露すると、神経発達に重要な遺伝子の発現が変化し、神経前駆細胞の分裂、神経細胞の産生の過程が障害される可能性が示唆された。その結果、グルタミン酸作動性神経数が減少することが、統合失調症で認められるような成体期まで長期持続する行動異常を惹起した直接的な原因だと考えられる。

今後は、胎生期 PCP の暴露が、遺伝子発現変化などを介し、どのような作用機序によって、神経前駆細胞の分裂を障害したのか、より詳細に検討していきたいと考えている。また、成体期の脳内におけるグルタミン酸作動性神経細胞の機能低下について、マイクロダイアリシス法などのより直接的なアプローチを用いることで定量化できればと考えている。

[参考文献]

1. Aoshima H. Effects of alcohols and food additives on glutamate receptors expressed in xenopus oocytes: Specificity in the inhibition of the receptors. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 434-438 (1996).
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. Gaiano N and Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25: 471-490 (2002)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The Role of Cyclophilin D in Learning and Memory. *Hippocampus*, 20, 293-304, 2010
2. Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, and Ebihara S. Identification of Usp46, encoding a ubiquitin specific peptides, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test. *Nature Genetics*, 43, 648-653, 2009
3. Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Mouri A, Nabeshima T. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of dopaminergic - extracellular signal-regulated kinase 1/2 systems. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, in press
4. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. *Int J Neuropsychopharmacol.*, in press.
5. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo KI, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron* 65, 480-489, 2010

2. 学会発表

1. 陸玲玲、間宮隆吉、鳥海和也、毛利彰宏、路平、平松正行、鄒利波、鍋島俊隆：Abnormal behavior and NMDA receptor in the postpubertal mice after prenatal exposure to phencyclidine. 第115回日本薬理学会近畿部会、金沢 (2009.6.25)
2. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, Jaaro-Peled H, Lu L, Nakajima K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 in the developing cerebral cortex leads to dopaminergic disturbance and behavioral deficits after puberty. International Symposium on Brain and Mind Sciences Pathogenesis Study of Schizophrenia: Genes, neurobiology and Clinical Service, Taiwan (2009.8.14)
3. Toriumi K, Mouri A, Narusawa S, Aoyama Y, Ikawa N, Lu L, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal NMDA receptor antagonism impaired glutamatergic neurogenesis, leading to long-lasting behavioral deficits. The 6th Nagoya-Nanjing-Shenyang Symposium on Pharmaceutical and Life Science, Nagoya (2009.9.14)
4. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behavior and NMDA receptor function in the postpubertal mice. The 6th Nagoya-Nanjing-Shenyang Symposium on Pharmaceutical and Life Science, Nagoya (2009.9.14)
5. 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：胎生期におけるフェンシクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動障害をもたらす 第32回日本神経科学学会大会 Neuro2009、名古屋 (2009.9.16)

6. Alkam T, Nitta A, Furukawa-hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T; A neuroprotective dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus. Neurosciencemeeting2009 (2009.10.21)
7. 鍋島俊隆：統合失調症グルタミン酸仮説に基づくモデル動物の開発と創薬 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
8. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスを用いた抗精神病薬の作用発現におけるヒストン修飾の関与について 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
9. 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：胎生期におけるフェンサイクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動異常を惹起する 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
10. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、青山雄紀、古関竹直、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスの行動障害に対する注意欠陥・多動性障害治療薬の作用 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
11. 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 受容体拮抗薬の投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動異常を惹起する 第 32 回日本分子生物学会、横浜 (2009.12.11)
12. Turson Alkam, 平松正行、間宮隆吉、毛利彰宏、鳥海和也、鍋島俊隆妊娠期ニコチン曝露は出生マウスの感情及び認識行動を障害する 第 83 回日本薬理学会、大阪 (2010.3.18)
13. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：クロザピンはドパミン D1 受容体を介したヒストンアセチル化によりフェンサイクリジン投与マウスに認められる行動異常を緩解する 第 83 回日本薬理学会、大阪 (2010.3.18)

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 1. 発明の名称：「新規ステロイド誘導体及びその製造方法」出願番号：特願 2009-039770 ※現在 PCT 出願準備中 発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆
2. 実用新案登録
 - なし
3. その他
 - なし

幼若期および成熟期における化学物質暴露による学習および情動障害

分担研究者：間宮隆吉
（名城大学薬学部薬品作用学）

[研究要旨]

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。

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かかるとする行動（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℃）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。

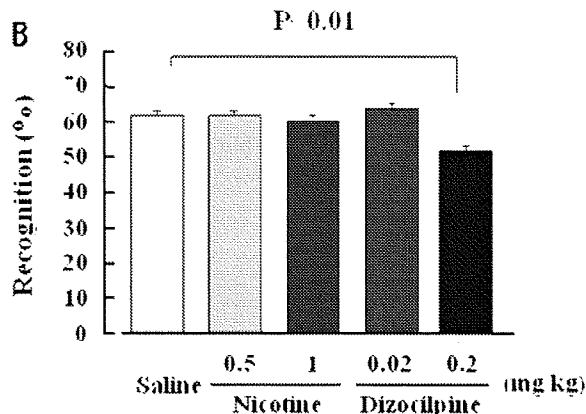
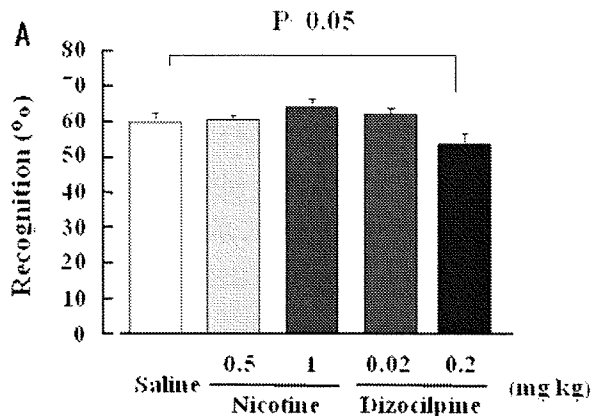
C. 研究結果

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



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。

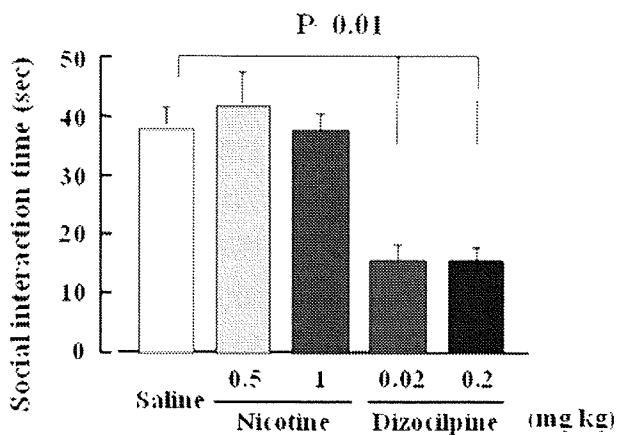


図2 7週齢時におけるジゾシルピン投与による社会性行動の障害。母マウスの妊娠6日目から出生時までニコチンあるいはジゾシルピンを投与した。

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)。

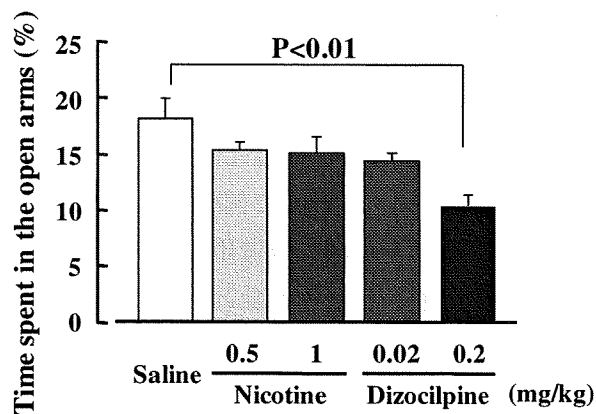


図3 7週齢時におけるジゾシルピン投与による高架式十字迷路課題の障害。母マウスの妊娠6日目から出生時までニコチンある

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て、(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

1. Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S. Identification of Usp46, encoding a ubiquitin specific peptidase, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test. *Nature Genetics.* 41:688-695 (2009).

2. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T.: Silibinin attenuates amyloid beta (25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 331:319-326 (2009).

3. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T.: Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol.* 157:1270-1277 (2009).

2. 学会発表

1. Ebihara S, Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T.: 1.Usp46, encoding a ubiquitin specific peptidase, is a quantitative trait gene underlying "behavioral despair" in mice. CREST 神経科学国際シンポジウム (淡路) (H21.6.2.)

2. 陸玲玲、間宮隆吉、鳥海和也、毛利彰宏、路平、平松正行、鄒利波、鍋島俊隆：Abnormal behavior and NMDA receptor in the postpubertal mice after prenatal exposure to phencyclidine

- 第 115 回日本薬理学会近畿部会（金沢）
(2009.6.15.)
3. 毛利彰宏、野田幸裕、王大勇、安藤雄、脇由香里、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆：覚せい剤により誘発される精神障害に対するガラントミンの効果 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会・第 21 回日本アルコール精神医学会・第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 21 年度合同学術集会(横浜) (H21.9.8.)
 4. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスを用いた抗精神病薬の作用発現におけるヒストン修飾の関与について 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会（京都）(2009.11.13.)
 5. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、青山雄紀、古関竹直、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスの行動障害に対する注意欠陥・多動性障害治療薬の作用 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会（京都）(2009.11.13.)
 6. 間宮隆吉、路平、毛利彰宏、鍋島俊隆：胎生期に受けた心理的ストレスによる成熟期以降の行動障害 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.16)
 7. Turson Alkam、平松正行、間宮隆吉、毛利彰宏、鳥海和也、鍋島俊隆：妊娠期ニコチン曝露は出生マウスの感情及び認識行動を障害する 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.17)
 8. 古関竹直、毛利彰宏、間宮隆吉、鍋島俊隆：マウスのメタンフェタミン探索行動に対するガラントミンの効果 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.18)
 9. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：クロザピンはドパミン D1 受容体を介したヒストンアセチル化によりフェンサイクリジン投与マウスに認められる行動異常を緩解する 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.18)

1. 特許取得
 発明の名称：「新規ステロイド誘導体及びその製造方法」
 出願番号：特願 2009-039770 ※現在 PCT 出願準備中
 発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆

H 知的財産権の出願・登録状況

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

分担研究者：山田清文

研究協力者：衣斐大祐、北原裕子、Jinghua Yu、新田淳美、永井拓
（名古屋大学大学院医学系研究科・附属病院薬剤部）

[研究要旨]

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-セリンの効果を調べた。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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、神経突起の伸展が抑制された。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。

A. 研究目的

これまでに我々は化学物質による精神神経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誘発性の脳神経発達障害動物モデルマウスの作製を行ってきた²⁾。本年度は、上記モデルマウスの情動行動の異常や認知記憶障害が抗精神病薬やその他の薬物で改善されるかどうか調べた。さらに、異常免疫応答によって引き起こされる精神神経発達障害のメカニズムを明らかにするために、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。

B. 研究方法

1. 周産期擬似ウイルス感染動物モデルの作製

生後2日目から6日目までの5日間、ICR系マウス(日本エスエルシー、静岡)に合成2本鎖RNAアナログである polyribinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を5 mg/kg の用量で1日1回皮下投与し、周産期異常免疫応答による脳神経発達障害モデルを作製した。コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。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、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

2. 薬物処置

抗精神病薬である clozapine (5 mg/kg) および haloperidol (0.3 mg/kg) は試験開始の60分前に経口投与した。ニコチン (0.15-0.5 mg/kg) は、試験開始の25分前に皮下投与した。 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト dihydro- β -erythroidine (DH β E, 2 mg/kg) および $\alpha 7$ ニコチン受容体アンタゴニスト methyllycaconitine (MLA, 5.0 mg/kg) はニコチン処置の10分前に皮下投与した。D-セリン (0.3-1 g/kg) および L-セリン (1 g/kg) は試験開始の30分前に腹腔内投与し、NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 (0.1 mg/kg) は D-セリン処置の15分前に腹腔内投与した。

3. 行動解析

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行動の異常を以下の行動試験により調べた。

オープンフィールド試験

灰色のアクリル製円形オープンフィールド(直径60 cm, 高さ35 cm)の中央にマウスを置き、5分間の外円および内円(直径40 cm)における歩行量および滞在時間を Ethovision 自動トラッキングプログラム (Brainscience Idea Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて解析した²⁾。

新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は Nagai らの方法 (2007) に準じて行った³⁾。実験装置はアクリル製のオープンフィールドを用いた (30×30×35 cm)。マウスを実験装置に3日間(10分間/日)慣らした後、訓練試行を行った。訓練試行では装置内に異なる2つの物体を置き、装置内を10分間自由に探索させた。訓練試行の24時間後に保持試行を行った。保持試行では訓練試行時に用いた2つの物体の片方を新奇物体と置き換え、動物を装置内に入れ5分間自由に探索させた。訓練試行および保持試行における2つの物体に対するそれぞれの探索(接触, 臭い嗅ぎなど)時間を測定した。訓練試行においては、2つの物体のいずれかを探索した時間と総探索時間との比を、保持試行においては新奇物体を探索した時間と総探索時間との比を探索嗜好性 (exploratory preference; EP) として示した。

プレパルス抑制試験

プレパルス抑制試験は Takahashi らの方法 (2007) に準じて SR-LAB 驚愕反応測定システム (San Diego Instruments, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて測定した⁴⁾。装置内には背景ノイズ (Back

ground; BG) として 65 dB の音を流した。65 dB の BG 下で 10 分間馴化させた後、次の 3 種類のトライアルをそれぞれ 10 回ずつ負荷した。①驚愕反応を引き起こす 120dB、40 msec の音刺激（パルス刺激）のみ、② パルス刺激の 100 msec 前に 69、73、77 または 81 dB、20 msec の音刺激（プレパルス刺激）を加えたトライアル、③BG のみ。テストでは最初にパルス刺激を 5 回、次に 3 種類のトライアルを 10 から 22 秒の間隔でランダムに 10 回ずつ、最後にパルス刺激を 5 回提示し、合計 70 回のトライアルを負荷した。この時、音刺激と同期させて 1 msec 間隔で 1 秒間驚愕強度を記録した。得られたデータから、以下の式に従い PPI を算出した。

$$PPI (\%) = [1 - (pPx / P120)] \times 100$$

P120：パルス刺激の単独提示時の驚愕強度最大値の平均

pPx：プレパルス刺激（69-81dB）とパルス刺激の連続提示時の驚愕強度最大値の平均

社会性行動試験

社会性行動試験は Tremolizzo らの方法（2005）に準じて行った⁵⁾。生理食塩水または polyI:C 処置マウスをポリカーボネート製試験ケージ（透明：34×22×15 cm）に移して 2 日間馴らした。これらのマウスとは別に通常飼育を行ったマウス（新奇侵入マウス）を試験ケージに入れ、5 分間の行動を解析した。社会性行動試験はこの試行を 30 分間隔で 4 回繰り返した。能動的な接近行動、追尾行動、臭い嗅ぎ行動、毛繕い行動を社会性行動として、噛み付き行動、尾の戦振、襲いかかり行動を攻撃行動として、また新奇侵入マウスから離れる行動を逃避行動として、それぞれの行動の時間を測定した。

3. 初代培養細胞を用いての解析

初代培養神経細胞の採取

妊娠 16 日目の ICR マウス(日本エスエルシー)より胎児を摘出した。胎児の海馬を実体顕微鏡下で取り出し、trypsin および DNase を用いて酵素処理をした後、ポリリジンでコーティングをしたセルデスクに採取した初代培養神経細胞を播いた。PolyI:C (3-10 μg/mL) またはアストログリア細胞培養上清の処置は培養開始 2 日目に行い、培養 3 日目に解析を行なった。免疫細胞化学を用いての解析では 24 well プレートに 1×10⁴ 個/well、MTT アッセイでは 96 well プレートに 3×10⁴ 個/well で初代培養神経細胞を播いた。

アストログリア培養細胞の採取

生後 0~2 日の新生児 ICR マウス(日本エスエルシー)から海馬および大脳皮質を取り出した。髄膜を剥がし dispase および DNase を用いて酵素処理をした後、初代培養としてフラスコに播いた。90~95%コンフルエントになった時点で二次培養を行った。すべての実験には二次培養アストログリア細胞を用いた。

実験を開始する 5 日前に培地を血清入り DMEM 培地から B27 サプリメントおよびグルタミンを添加した Neurobasal 培地に換え、polyI:C (10 μg/mL)処置後 24 時間後の培養上清を初代培養神経細胞に処置した。

免疫細胞化学

4%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗 toll-like receptor3、MAP2 および tau 抗体を用いて免疫染色を行った。正立顕微鏡で観察し、神経突起の長さの測定には NeuroLucida ニューロントレーシングプログラム (Brainscience Idea Co. Ltd.)を用いた。

MTT アッセイ

培地の 10 分の 1 量の MTT 溶液を培地に添加した。37 度、3 時間のインキュベーション後、培地

を除去、DMSO を加えて MTT が反応してできたホルマザンを溶解した。その溶解液の吸光度(570 nm)から細胞生存率を評価した。

遺伝子発現解析

リアルタイム PCR 法による定量では、polyI:C 最終投与 24 時間後のアストログリア培養細胞から抽出した RNA を Superscript III (Invitrogen, Eugene, OR) を用いて cDNA に変換した後、7300 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて ifitm3 およびサイトカインの mRNA 量を定量した。

5. 統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) または反復測定分散分析法 (repeated measures ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Bonferroni/Dunn の検定を行った。いずれの検定においても、危険率 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。2 群間の比較は Student t-test を用いて行った。

C. 研究結果

1. PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動変化に対する抗精神病薬の効果

PolyI:C 処置により誘発される認知記憶の障害が定型抗精神病薬 haloperidol (0.3 mg/kg)あるいは非定型抗精神病薬 clozapine (5 mg/kg) で改善されるかどうか調べた。新奇物体探索試験の保持試行において、polyI:C 処置マウスの探索嗜好性はコントロール群に比較して有意に低下していた (認知記憶障害)。この記憶障害は clozapine により改善したが、haloperidol では改善しなかった (Fig. 1)。

さらに、polyI:C 処置マウスが示すその他の行動異常に対する抗精神病薬の効果も調べた。Haloperidol は polyI:C 処置マウスの感覚情報処理

(プレパルス抑制) の障害を改善したが、社会性行動の減少とオープンフィールド試験における不安様行動の増加には無効であった。一方、clozapine は、認知記憶障害の他、プレパルス抑制の障害、不安様行動の増加および社会性行動の低下など、polyI:C 処置マウスで認められるすべての行動異常に対して改善効果を示した。

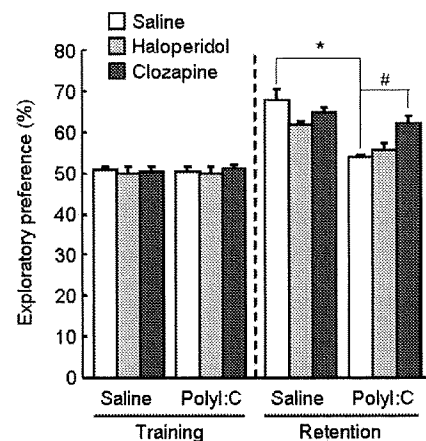


Fig. 1 Effect of antipsychotics on the impairment of recognition memory in polyI:C-treated mice. Values indicate the mean±SE (n=8). *p<0.05 vs. saline-injected control group. #p<0.05 vs. polyI:C-injected group.

2. PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動変化に対するニコチンの効果

新奇物体探索試験における polyI:C 処置マウスの認知記憶障害に対するニコチンの効果を調べた。新奇物体探索試験の保持試行における polyI:C 処置マウスの探索嗜好性の低下はニコチン (0.15-0.5 mg/kg) により用量依存的に改善した。このニコチン (0.5 mg/kg) の記憶改善作用は、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト DH β E および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト MLA により拮抗された (Fig. 2)。

PolyI:C 処置マウスが示すその他の行動異常がニコチンで改善されるかどうか調べた。

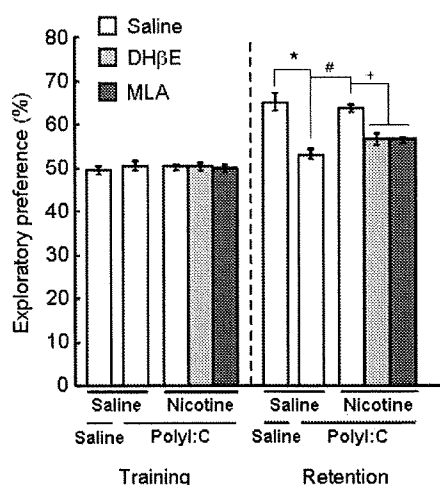


Fig. 2 Effect of nicotine on the impairment of recognition memory in polyI:C-treated mice. Values indicated the mean \pm SE (n=8). *p<0.05 vs. saline-injected control group. #p<0.05 vs. polyI:C-injected group. +P<0.05 vs. nicotine/polyI:C-injected group.

ニコチン (0.15-0.5 mg/kg) は感覚情報処理 (プレパルス抑制) の障害には無効であったが、社会性行動の減少と不安様行動の増加を有意に改善した。これらニコチンの改善効果も $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストの前処置により拮抗された。

3. PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動変化に対する D-セリンの効果

昨年度に実施した *in vivo* dialysis 実験により、polyI:C 処置マウスでは海馬におけるグルタミン酸遊離に異常があることが明らかになっている²⁾。そこで、polyI:C 処置マウスの記憶障害や情動行動の異常が NMDA 受容体複合体のグリシン結合部位のアゴニスト (NMDA 受容体コアゴニスト) である D-セリンで改善されるかどうか調べた。オープンフィールド試験における内円滞在時間はコントロール群と比較して polyI:C 処置マウスでは顕著に減少していた (不安様行動)。この polyI:C 処置マウスの不安様行動は D-セリン (0.3-1 g/kg) により用量依存的に改善した。一方、D-セリンの

光学異性体である L-セリン (1 g/kg) は D-セリンのような改善効果を示さなかった (Fig. 3A)。さらに、polyI:C 処置マウスの不安様行動に対する D-セリンの改善効果は NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 (0.1 mg/kg) の前処置によって消失した (Fig. 3B)。

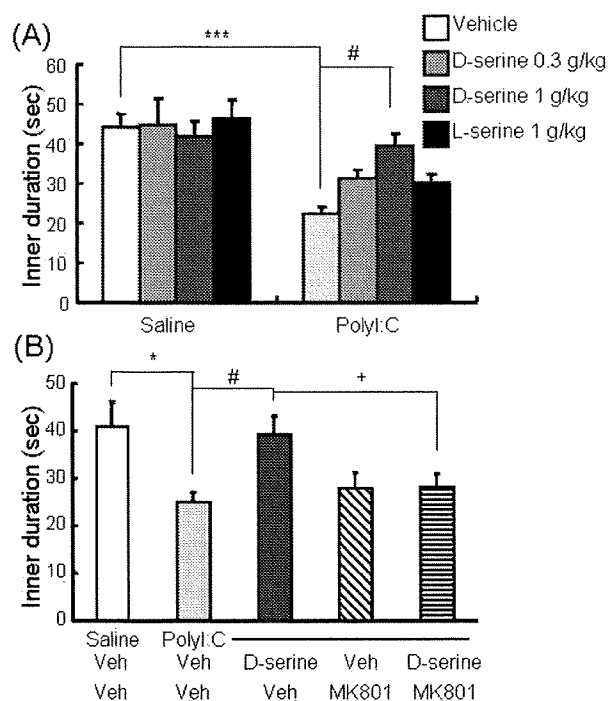


Fig. 3 Effects of D-serine and L-serine on the anxiety-related behavioral change in polyI:C-treated mice. Values indicated the mean \pm SE (n=8). *p<0.05 vs. saline-injected control group. #p<0.05 vs. polyI:C-injected group. +P<0.05 vs. nicotine/polyI:C-injected group.

PolyI:C 処置マウスが示すその他の行動異常および記憶障害に対する D-セリンの効果も調べた。D-セリン (0.3-1 g/kg) は感覚情報処理 (プレパルス抑制) の障害には無効であったが、社会性行動の減少と物体認知記憶障害を有意に改善した。また、D-セリンの改善効果は MK-801 の前処置によって拮抗された。すなわち、polyI:C 処置マウスの記憶障害および情動行動の異常に対する D-セリンの改善効果は NMDA 受容体を介してものであることが示唆された。

4. PolyI:C 処置アストログリア細胞由来の液性因子が神経細胞の突起伸展および細胞生存に及ぼす影響

PolyI:C 処置による神経発達障害のメカニズムを解明する為に、培養アストログリア細胞および神経細胞に対する polyI:C 処置の効果を調べた。低濃度(3 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の polyI:C を培養 2 日目の神経細胞に直接添加しても神経突起の伸展および細胞生存率に影響を与えなかった。次に培養アストログリア細胞に polyI:C(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を処置し、24 時間後の培地 (polyI:C 処置アストログリア細胞培養上清: polyI:C-ACM) を培養 2 日目の神経細胞に処置すると、control-ACM を処置した神経細胞と比較して、神経突起の伸展が有意に抑制された(Fig. 4)。一方、MTT アッセイを用いた細胞生存率には両群間で変化は認められなかった。

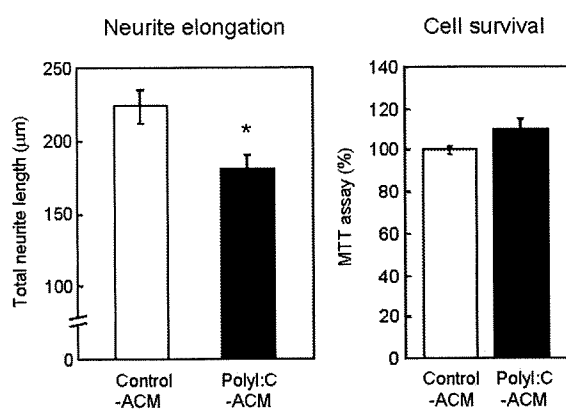


Fig. 4 Effect of polyI:C-ACM on the total neurite elongation and cell viability in primary cultured hippocampal neurons. Numbers of cells used for each calculation are 72-75 (Control-ACM: 75, PolyI:C-ACM: 72). Values are means \pm SE of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control-ACM.

昨年度、新生仔マウスに polyI:C を処置すると、海馬のアストログリア細胞で ifitm3 タンパク質の発現が増加することを報告した。そこで、培養アストログリア細胞に polyI:C を添加して 24 時間後の ifitm3 およびサイトカインの mRNA レベルを解

析した。その結果、polyI:C を処置したアストログリア細胞において ifitm3 mRNA および TNF- α 、interferon- β 、interleukin-1 β などのサイトカインの mRNA の増加が認められた。

D. 考察

胎児期あるいは新生児期に化学物質へ暴露されると、胎児あるいは新生児の体内で異常な免疫応答が生じる^{1,6)}。本研究では、胎児期あるいは新生児期に化学物質に暴露されることによる異常免疫応答が神経発達に悪影響を及ぼし、脳内神経伝達機能の異常により学習記憶や情動行動に障害が生じるという仮説を立て、動物モデルを用いてこの仮説を検証するとともに、神経発達障害のメカニズムの解明を目指している。

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 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²⁾。PolyI:C を処置したマウスは、成熟後に不安様行動の増加、認知記憶障害、感覚情報処理および社会性行動の異常を示した。さらに、同モデルマウスの海馬では脱分極性グルタミン酸遊離の障害も確認された。

本年度は、polyI:C 処置マウスの行動障害に対する各種薬物の効果を検討することにより、記憶障害や情動行動異常のメカニズムを行動薬理的に検討した。その結果、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様々な神経伝達物質の異常が関与していることが示唆された。

初代培養神経細胞およびアストログリア細胞を用いて、polyI:C 処置による神経発達障害のメカニズムについても検討した。PolyI:C-ACM を初代培養神経細胞に添加すると神経突起の伸展が抑制されたことより、polyI:C 処置マウスにおける神経発達障害に神経細胞-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。さらに、この細胞間相互作用の異常には、アストログリア細胞で誘導される ifitm3 やサイトカインが関与していることも示唆された。

今後、polyI:C 処置による神経細胞-アストログリア細胞間の相互作用の異常やアストログリア細胞の異常応答における ifitm3 の役割を検討していく予定である。

E. 結論

PolyI:C 処置により免疫異常応答を惹起したマウスの記憶や情動行動の異常には、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。さらに、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。胎児期あるいは新生児期における化学物質への暴露は異常免疫応答を惹起することが報告されており、これが神経発達に悪影響を及ぼし、成熟後の脳内神経伝達に異常が生じる可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Esser C, Rannug A, Stockinger B.: The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.*, 30: 447-454, 2009.
- 2) Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, et al.: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci Res*, 64: 197-305, 2009.
- 3) Nagai T, Takuma K, Kamei H, et al.: Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn. Mem.*, 14:117-125, 2007.
- 4) Takahashi K, Nagai T, Kamei H, et al.: Neural

circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Biol. Psychiatry*, 62:148-157, 2007.

- 5) Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, et al.: Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biol. Psychiatry*, 57:500-509, 2005.
- 6) Yusuf N, Timares L, Seibert MD, et al.: Acquired and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 224: 308-312, 2007.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arai, S., Takuma, K., Mizoguchi, H., Nagai, T., Kamei, H. and Yamada, K.: GABA_B receptor agonist baclofen improve methamphetamine-induced cognitive deficit in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 602: 101-104, 2009.
- 2) Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav. Brain Res.*, 202: 114-121, 2009.
- 3) Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda N, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64: 297-305, 2009.
- 4) Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa K, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T and Yamada K: Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid β -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,

331: 14-22, 2009.

- 5) Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, and Yamada K: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav. Brain Res.*, 206: 32-37, 2010.
- 6) Mizoguchi H, Arai S, Koike H, Ibi D, Kamei H, Nabeshima T, Kim HC, Takuma K and Yamada K: Therapeutic potential of nicotine for methamphetamine-induced impairment of sensorimotor gating: involvement of pallidotegmental neurons. *Psychopharmacology*, 207: 235-243, 2009.
- 7) Nagai T, Kitahara Y, Shiraki A, Hikita T, Taya S, Kaibuchi K and Yamada K: Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.*, 470(2):134-8. 2010

2. 学会発表

- 1) Yamada K, Ibi D, Kitahara Y, Nabeshima T and Nagai T: Perinatal immune activation impairs emotional and cognitive functions with altered hippocampal glutamatergic neurotransmission in adult mice. The 9th World Congress of Biological Psychiatry (Paris, France, June 28-July 2, 2009)
- 2) Nagai T, Ibi D, Koike H, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A and Yamada K: Synergistic impacts of DISC1 mutation and neonatal polyI: C treatment on adult phenotypes in mice: A novel mouse model of schizophrenia with gene - environment interactions. The 9th World Congress of Biological Psychiatry (Paris, France, June 28-July 2, 2009)
- 3) Ibi D, Nagai T, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. : The effect of polyI:C treatment on endophenotypes in dominant-negative DISC1 transgenic mice. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. (Nagoya, Japan, September,16-18,2009)
- 4) Nagai T, Ibi D, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K. : Neonatal poly:C treatment in mice induces schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. Society for Neuroscience2009 (Chicago, U.S.A., October,17-21,2009)
- 5) Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K : Synergistic influence of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. Society for Neuroscience2009 (Chicago,U.S.A.,October,17-21,2009)
- 6) 山田清文：遺伝-環境相互作用に基づく統合失調症モデル。第82回日本薬理学会年会（横浜, 2009. 3. 16-18）
- 7) 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. 16-18）
- 8) 北原裕子, 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, YU Jinghua, 新田淳美, 米田幸雄, 鍋島俊隆, 山田清文: 周産期ウイルス感染により誘発される統合失調症の神経発達モデルにおける行動およびグルタミン酸神経伝達異常。第82回日本薬理学会年会（横浜, 2009. 3-16-18）
- 9) 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳美, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期polyI:C投与ドミナントネガティブ型DISC1トランスジェニックマウスにおけるグルタミン酸作動性神経系の機能解析。・第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会(京都, 2009. 11. 13-15)
- 10) 山田清文: Poly:C誘発神経発達障害動物モデルの行動異常とその発現機構。愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 公開シンポジウム2009（春日井, 2009. 12. 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：安藤 雄¹，肥田裕丈¹，脇 由香里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、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・精神異常発現薬など）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）における二本鎖RNAアナログ（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）における精神異常発現薬（フェンシクリジン：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学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。

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;