

みえメディカル研究会 第2回 環境健康学研究会

日時 2010年2月19日(金) 13:30 ~

場所 三重大学社会連携研究センター伊賀研究拠点 3F テクノホール
〒518-0131 伊賀市ゆめが丘一丁目3番地の3
産学官連携地域産業創造センター「ゆめテクノ伊賀」内
TEL 0595-41-1071

プログラム

定員 : 50名程度 (環境と健康と化学物質に興味のある方々)

主催 みえメディカル研究会・環境健康学研究会

12:30 受付開始

13:30 開会挨拶

環境健康学研究会

主査 山本 好男

13:40 特別講演

『健康を理解するための病態生化学』

滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座・分子病態生化学

教授 大久保 岩男

14:50 休憩

15:00 特別講演

『化学物質の胎内ばく露がもたらす発達の異常』

三重大学大学院 医学系研究科・発生再生医学

厚生労働省研究班・化学物質リスク研究事業・班長

教授 成田 正明

16:10 閉会挨拶

環境健康学研究会

主査 山本 好男

お問い合わせ先 三重大学社会連携研究センター伊賀研究拠点 山本・辻村
(参加申込み) TEL 0595-41-1071 FAX 0595-41-1062

E-mail tsujimura@crc.mie-u.ac.jp

(株)三重ティーエルオー 國枝

TEL 059-231-9822 FAX 059-231-9829

第2回 環境健康学研究会 参加申込書 (申込締切 2月15日)

TEL 0595-41-1071 または FAX 0595-41-1062 までお申し込みください

所属機関	
氏名	役職()
連絡先	TEL
	E-mail

※ご記入いただいた個人情報は、本研究会の実施目的以外には利用いたしません。

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 21 年度研究課題: 「化学物質ばく露モデル動物解析及びバイオマーカー検索」

その 2 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットにおける発現遺伝子の検討—バイオマーカー検索に向けて

研究代表者	成田 正明	三重大学大学院医学系研究科	教授
研究協力者	井村 誉史雄	三重大学大学院医学系研究科	大学院生
	内田 敦子	三重大学大学院医学系研究科	講師

研究要旨

ヒト妊娠 20-24 日の化学物質 (サリドマイド) ばく露で、児に自閉症が高率に発症することが報告されている。この疫学的事実をもとに、妊娠ラットでヒト妊娠 20-24 日に相当する妊娠時期 (妊娠 10 日) にサリドマイドを投与すると生まれた子ラットはヒト自閉症に似た症状を呈し、「自閉症モデルラット」とした。今回の研究では生後 14 日目の大脳皮質の mRNA を、モデル動物 (サリドマイド 3 個体、バルプロ酸 2 個体)、コントロール群 3 個体について、アジレント社の大集積マイクロアレイ (44000 遺伝子) を用いて、薬物投与モデル動物群 (サリドマイド投与、またはバルプロ酸投与群) とで発現遺伝子の変化をコントロール群と比較した。最終的に上昇がみられたもの 6 個、減少していたもの 3 つにまで絞り込んだ。うち詳細な発現定量でも一貫したデータが得られたものは ErbB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene 2) であった。

A. 研究目的

催奇形物質として知られるサリドマイドは、手足の奇形が出る前の、妊娠のごく早期の内服で児に自閉症が発症することが知られている。自閉症は先天的な脳の機能障害とされ、「目に見えない先天異常」と言える。研究代表者は、ヒトで起こったこの疫学的事象を妊娠ラットで忠実に再現し、セロトニン神経の胎生期の分化成熟遅延を明らかにし、「自閉症はセロトニン神経の初期発生の異常である」

との仮説を立ててきた。

化学物質の妊婦ばく露による先天異常をめぐっては、たとえばサリドマイドによる四肢の異常、アルコールによる胎児の顔貌異常など、目に見える形態的異常 (先天奇形) はよく知られている。これらの先天奇形は、器官形成期 (臨界期) におけるばく露により引き起こされ、発生学的観点からも理解しやすい。一方、化学物質の妊婦へのばく露は、目に見え

ない機能的な障害、即ち知能や発育・発達の障害（自閉症など）をも引き起こし得る。しかしながらこの機能的な障害の発症機序については、「発達」の臨界期がはっきりしないこともあり、実験的検討、即ちどういった化学物質をどの妊娠時期に投与するかなどが明確でなかった。

先天的な脳の機能障害として知られている自閉症は、対人関係の障害、コミュニケーションの障害、こだわりなど、人との関わりを主症状とする発達障害である。その症状からの類推により、神経伝達物質セロトニン系の異常が根底にあると考えられているが、詳細は不明のままである。本症の有病率は現在では150人に一人と、30年前に比し数十倍に激増している。これは単に診察医の診断技術の向上だけでは説明がつかないほどの増加であり、ここ数十年の妊婦をめぐる環境の変化、薬物（含アルコール）・環境ホルモン・ストレスなどによると考えられている。2005年発達障害者支援法が施行され発達障害者に対し正しい理解と対応が求められており、その病態の解明は社会的にも急務であった。

研究代表者は、ヒトで起こった疫学的事実を妊娠ラットで忠実に再現することで、「自閉症モデルラット」を作成した(Narita et al, *Pediatric Research*, 52; 576: 2002)。即ちサリドマイドを内服した妊婦から生まれた児に自閉症児を高率（通常の頻度の30倍）に合併したという疫学的事実(*Dev Med Child Neurol*, 36; 351: 1994)に着目した。ここで自閉症を発症したサリドマイド被害児たちは、通常見られる四肢の奇形はなく、外表奇形

としては耳介の小奇形のみ見られた。このことより器官形成臨界期のタイムテーブルから、児に自閉症を併発した場合のサリドマイド内服時期（即ち自閉症発症の臨界時期）は妊娠20-24日と同定した。ヒト妊娠20-24日はラットでは妊娠9日目に相当する。そこで本モデルラットは妊娠9日目の妊娠ラットにサリドマイドを内服させて作成したものである。その後の解析で本ラットでは胎生期のセロトニン神経の初期発生・分化の異常（isthmusからの遊走異常＝縫線核の形の異常）を認めている(*Intl J Dev Neurosci*, 23; 287: 2005)。なおセロトニンは自閉症児の臨床病像を説明できる唯一のマーカーとして知られており、自閉症研究もまたセロトニンとの関連を中心に発展してきた。

研究代表者はE10でのサリドマイドやVPAの投与での脳の形態学的異常として、抗セロトニン抗体を用いて明らかにした中脳セロトニン神経の起始核（縫線核）の形の異常を報告してきた。この「縫線核の形の異常」は薬剤によるセロトニン神経の初期発生の異常によるものでshh発現の異常を介していることは我々が明らかにしてきた。しかしながら、脳のより細部にいたる、計測に基づく構造上の違いの有無については不明のままである。もし単純な形態上・構造上の違いが存在すればそれもばく露評価の指標となり得る。そこで本課題では薬剤投与群、正常対照群で、生後50日においてパラフォルムアルデヒド固定後の脳をブレインマトリックスを用い形態評価した。

B. C. 研究方法及び結果

本研究は三重大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。

Wistar系ラット（CLEA社）を交配し、plug確認日をEmbryonic Day1（E1）とした。E10の時期に5%アラビアゴム2m1へ溶解したサリドマイド500 mg/kgまたはVPA 800 mg/kgを経口胃チューブ（アトムメディカル株式会社）により妊娠ラットへ経口投与した。なお、対照群として同時期に5%アラビアゴム2m1投与したラットを使用した。飼育は飼料及び水は自由に摂取でき、25°Cの恒温室で午前7時より午後7時まで照明のついた環境下にて行った。

セロトニン量の変化が顕著となる、生後14日目の大脳皮質のmRNAを、モデル動物（サリドマイド3個体、バルプロ酸2個体）、コントロール群3個体について調整し、アジレント社の大集積マイクロアレイ（44000遺伝子）を用いて、コントロール群と比較し、薬物投与モデル動物群（サリドマイド投与、またはバルプロ酸投与群）で発現量に変化が認められた遺伝子数を表1に示す。

ここで大集積アレイとは、ラット大脳に発現している遺伝子をいくつかDNAチップに結合させてあるもので、コマーシャルベースのDNAアレイとして再現性の高いとされるアジレント社製のDNAチップにより解析を行った。また、ここでコントロールに比較して発現が「高い」とはサリドマイド、VPA両群においてともに発現上昇、即ち、各群の固体間（n=2-3）で計測値にばらつきがあるものを削除したり、コントロールに対する、サリドマ

イド群、コントロールに対するバルプロ酸群で統計解析を行った際のp-value 0.05以上のものを削除したり、さらには蛍光強度をlog2で表記させ、（プラスのものは増加、マイナスのものは減少）同じ遺伝子の違う部位について作成されたスポットがあれば、それらをまとめて並べ替え、さらに値の大きい順に並べ替え、その値が絶対値0.5以上のもののみを選出する、そしてこの段階でしぼった数が、発現上昇53個、低下31となった。

続いてこの53個の遺伝子名をNIHサイトで検索し、明らかに関連性のなさそうなもの（普遍的に出現していたり、他の生物由来と考えられるものなど）を除いたうえで、機能がある程度解析が進んでいて、サリドマイドとバルプロ酸群で共通に変化が見られる傾向があるものを絞りこみ、最終的に上昇がみられたもの6個、減少していたもの3つにまで絞り込んだ。

＜上昇していた遺伝子＞

ErbB2: erythroblastic leukemia viral oncogene 2

Igfbp3: insulin like growth factor binding protein 3

5HT1a receptor

Htr7: 5HT-receptor 7

Agtr1a: Angiotensin II receptor type1

Pappa: pregnancy-associated plasma protein A

＜減少していた遺伝子＞

Egr1: early growth response 1

Ank3: Ankylin3

Irs1: insulin receptor substrate 1

これらの遺伝子すべてについて、リアルタイム PCR で発現の変化を確認したが、一定して再現性が得られるものは ErbB2 遺伝子のみであった。

D. 考察

化学物質ばく露モデル動物解析で、いずれもヒトで情動・認知行動の異常をきたす、全く作用機序の異なる 2 種類の薬剤（サリドマイド、バルプロ酸 Na）間のばく露で、共通した発現プロファイルを呈する遺伝子をアレイによる網羅的検索で絞り込んだ。確認のため、リアルタイム PCR 法にてそれら発現遺伝子の定量をコントロール、サリドマイド、バルプロ酸で行ったところ、ErbB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene 2) の発現上昇が裏付けられた。

ErbB2 遺伝子は Neureglin シグナルのレセプターとしての働きを担っているが、単独では生体内で働くことができず、同じファミリー遺伝子である Egfr、ErbB3、ErbB4 とともに働くことが知られていることから、現在それらの変化についても解析中である。

E. 結論

化学物質ばく露モデル動物解析で網羅的発現遺伝子解析は、化学物質ばく露の影響の機序解明、またバイオマーカー検索に有用な手法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1, 論文発表

Nonexploratory Movement and Behavioral Alterations in a Thalidomide or Valproic Acid-induced Autism Model Rat

Masaaki Narita, Akiko Oyabu, Yoshio Imura Naoki Kamada, Tomomi Yokoyama, Kaori Tano, Atsuko Uchida, Naoko Narita

Neuroscience Research 2010; 66: 2-6.

2, 学会発表

1) 国内

1, 井村誉史雄、高橋理貴、内田敦子、田代朋子、成田正明 モデル動物を用いた自閉症発症機構の解明～脳内セロトニン量に影響を及ぼす因子の探索 第 12 回活性アミンに関するワークショップ 2009 年 8 月 28 日 三重

2, 大藪明子、井村誉史雄、太城康良、内田敦子、成田正明 自閉症モデルラット胎生期におけるセロトニン神経の分化誘導因子の発現異常とその影響について 第 115 回日本解剖学会総会全国学術総会 2010 年 3 月 28-30 日 盛岡

3, 成田正明、大藪明子、井村誉史雄、横山智美、鎌田尚樹、田野かおり、太城康良、内田敦子 第 52 回日本神経化学学会大会 シンポジウム（オーガナイザー）発達障害における基礎研究の成果を臨床像と照らしつつ今一度検証する 発達障害（自閉症）モデル動物の現状 2009 年 6 月 21-24 日 伊香保

4, 成田正明 三重メディカル研究会 第

2回環境健康学研究会 化学物質の胎内
ばく露がもたらす発達の異常 2010年2
月19日 三重

5, 成田正明 化学物質と健康・環境シン
ポジウム 2010年2月18日 仙台、3月2日
東京

2) 海外

1, Akiyuki Saotome, Mami Tazoe, Osawa,
Mitaka, Masaaki Narita, Kaoru Sakatani,
Naoko Narita,

Impaired prefrontal cortical response by
switching stimuli in autism spectrum
disorders assessed by near-infrared
spectroscopy.

8th Annual International Meeting For Autism
Research

May 8-10, 2009, Chicago, USA

2, Naoki Kamada, Kaori Tano, Yoshio Imura,
Akiko Oyabu, Tomomi Yokoyama, Naoko
Narita, Yasura Tashiro, Atsuko Uchida,
Masaaki Narita

Immunohistochemical localization of
manserin, a novel neuropeptide derived from
secretogranin II, in the rat adrenal glands:
Relevance to stress response mechanism

Society For Neuroscience meeting, Oct
23-27, Chicago, USA

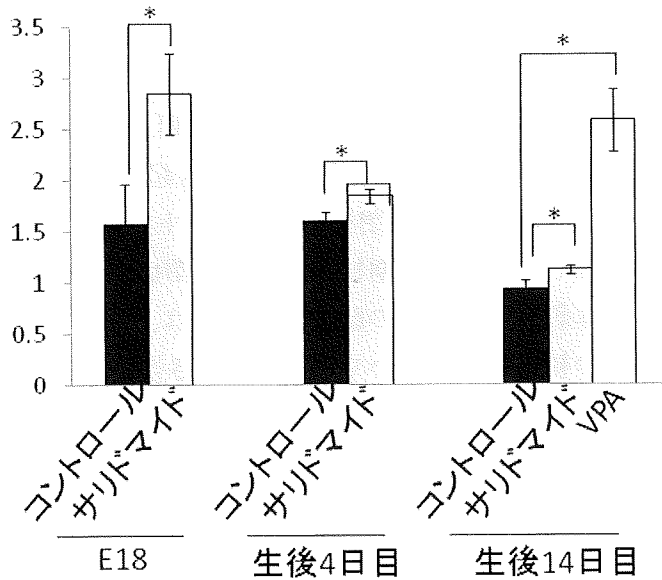
**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）**

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

TABLE1. Number of genes

		THA/Ctrl (n=3)			sum	analyzable data
		up	no change	down		
VPA/Ctrl (n=2)	up	53	106	0	159	26565
	no change	719	24935	505	25819	
	down	10	546	31	587	
	sum	782	33353	536		
analyzable data		34671				

アレイ検索で発現増加と確認されたErbB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene 2) 遺伝子は、のちの詳細な定量検査でも、E18, P4, P14で発現上昇を認めた(前頭葉皮質) (内部標準との発現比) *; $p < 0.05$



網羅的遺伝子解析により薬剤ばく露群で発現が増加または減少していた遺伝子群のうち、のちの詳細な遺伝子定量実験で、その他の遺伝子群では増減は再現できなかった

→変動候補から除外

	Agtr1a (angiotensin II receptor type 1)	Ank3 (ankylin3)	Egr1 (early growth response 1)	Irs1 (insulin receptor substrate 1)
対照群	1.24 +/- 0.12	0.99 +/- 0.07	0.71 +/- 0.09	1.27 +/- 0.10
サリドマイド投与群	1.09 +/- 0.08	0.96 +/- 0.06	0.87 +/- 0.10	1.17 +/- 0.08

内部標準遺伝子との発現比 +/- S.E.M

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 21 年度研究課題: 「化学物質ばく露モデル動物解析及びバイオマーカー検索」

その 3 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における脳神経形態の初期発達

研究代表者	成田 正明	三重大学大学院医学系研究科	教授
研究協力者	太城 康良	三重大学大学院医学系研究科	講師
	大藪 明子	三重大学大学院医学系研究科	大学院生

研究要旨

抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム(VPA)は、妊婦の服用、即ち胎生期のばく露で児に情動・認知行動の異常である発達障害(自閉症)を引き起こすことが知られており、私どもはこれを妊娠ラットで再現し、「自閉症モデルラット」として報告してきた。自閉症モデルラットでは、VPA ばく露の時期特異的に、自閉症病態の鍵物質とされるセロトニンの異常がある。本研究では VPA の胎生期ばく露は、セロトニン系の異常以外に、顔面神経など脳神経の初期発達において形態異常をきたすことを見出した。胎生期 VPA ばく露による脳神経の形態異常が観察される時期も、セロトニン系とほぼ同様な胎生期のばく露時期に開始され、胎齢 9 日からその影響が現れ、胎齢 10 日目以降に顕著になった。

結論;セロトニン系に影響を与える時期の化学物質ばく露は、脳神経の形態発達にも影響を与える。

A. 研究目的

その 1、その 2 で述べたように、研究者らは妊婦の内服で発達障害(自閉症)をきたすサリドマイドや抗てんかん薬バルプロ酸 Na (VPA) を妊娠ラットに投与することにより、「自閉症モデルラット」を作成してきた。自閉症モデルラットでは、行動異常、セロトニン系の異常を認めヒト自閉症と多くの点で共通する。

セロトニン系の神経線維の起始核である縫線核群は橋から延髄にかけて存在する。この領域には、頭頸部の末梢器官と中枢神経系との情報伝達を担う脳神経の起始核も存在する。脳神経核、脳神経節の発生に関してもセロトニン神経のように胎生期の早い時期から神経前駆細胞を経て分化・発達する。したがって、胎生期の発達にクリティカルなタイムウイン

ドウでのばく露が、セロトニン神経の初期発生の異常を引き起こすとともに、脳神経の分化・発達もばく露時期特異的に妨げていることが類推される。実際に、ヒト自閉症では顔面神経の発達不全が併発することがあると指摘されており、この仮説を検証することで、脳神経の形態形成異常を起因とする自閉症の病態理解とバイオマーカー検索のための基盤が確立されるものと期待される。

本稿では、VPA 胎生期ばく露が脳神経の初期発達に影響を与える開始時期を解明することを目的とした。

B.方法

本研究は三重大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。

Wistar ラット（膣栓確認日を胎齢

(E)0.5 とした) を用いた。VPA の投与は E8, E9, E10, または E11 に VPA 800 mg/kg を溶媒として 5%アラビアゴム/蒸留水に溶かし、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で1回経口投与した。コントロール群には溶媒のみを同様に投与した。そのまま妊娠を継続させ、E13 で帝王切開にて胎仔を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、メタノール中に-20℃で保存した。全胚でニューロフィラメント (165kD) に免疫染色を行い、2H3 モノクローナル抗体(Hybridoma Bank)と HRP 結合の二次抗体を用いて DAB で神経線維を可視化した (Fig. 1)。

実体顕微鏡下で観察および写真撮影を行い免疫染色された神経線維を定量化した。取り込んだ画像上で画像解析ソフト Image J を用いて染色強度、占有面積、

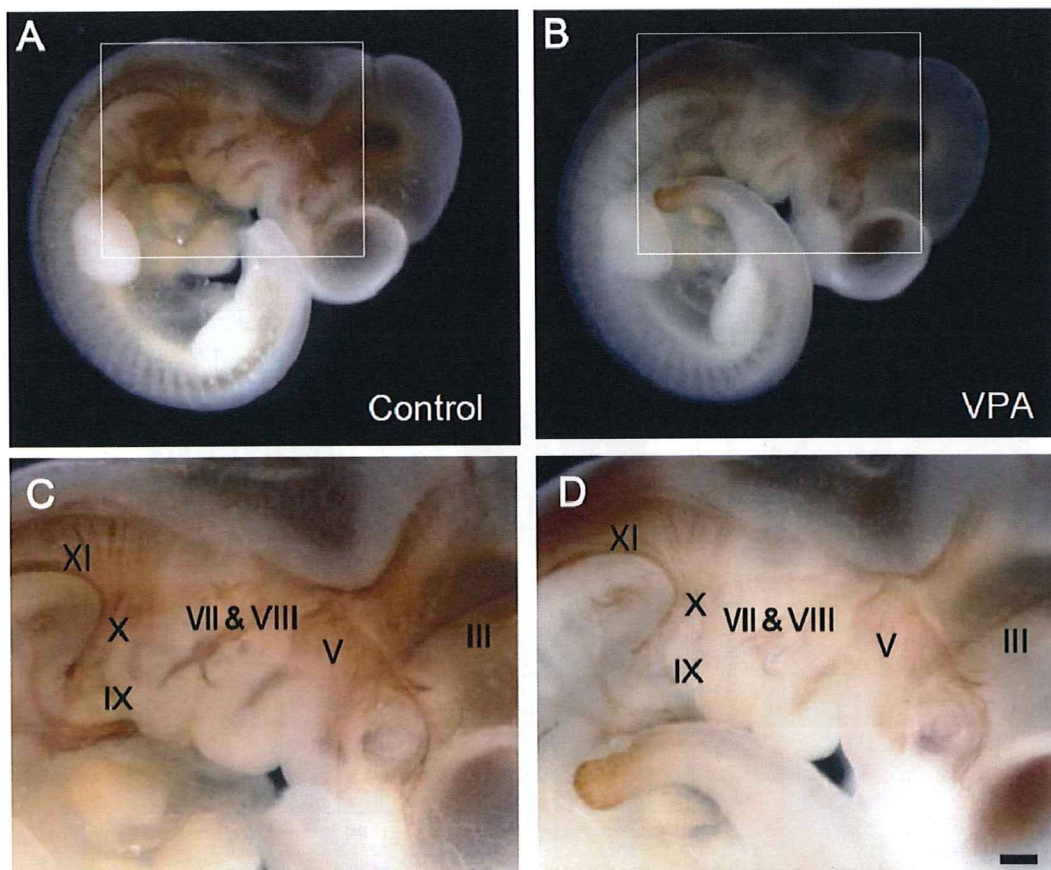


Fig. 1 胎齢13日ラット胚の後脳における脳神経

線維束の長さを計測した。

C. 結果

対照群と VPA 投与群を比較して、動眼神経では神経線維の免疫染色性および走行形態に関して、ほとんど違いは見られなかった。以降、免疫染色性の比較には、動眼神経の免疫染色性を基準に標準化したものを用いた。

眼杯周囲および第 1 鰓弓に位置する三叉神経においては、VPA 投与群において免疫染色性の低下と線維束の占有面積の減少が観察された (Fig. 2A, B)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となった (Fig. 2C, D)。

第 2 鰓弓に位置する顔面・内耳神経においては、免疫染色性の低下と軸索走行の異常が観察された (Fig. 3A)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となる傾向にあった (Fig. 3B)。線維束の占有面積に有意な差はないにもかかわらず (Fig. 3C)、線維束の近位—遠位 (P—D) 長はやや減少し (Fig. 3D)、前—後 (A—P) 長は増加する傾向にあっ

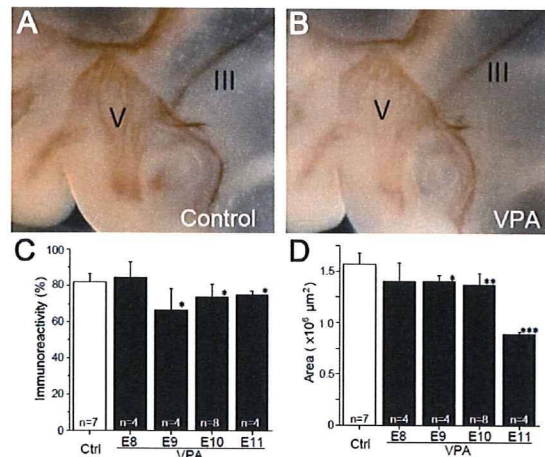


Fig. 2 三叉神経の免疫陽性と占有面積

た (Fig. 3E)。このように、線維束の占有面積は変わらず、全体的に伸長が短縮し前後の幅が広がるような線維の走行異常が認められた。

第 4/6 鰓弓に位置する舌咽神経および迷走神経においては、線維の免疫染色性の低下が観察された (Fig. 4A)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となった (Fig. 4B, D)。線維の占有面積に有意な差はなかった (Fig. 4C, E)。

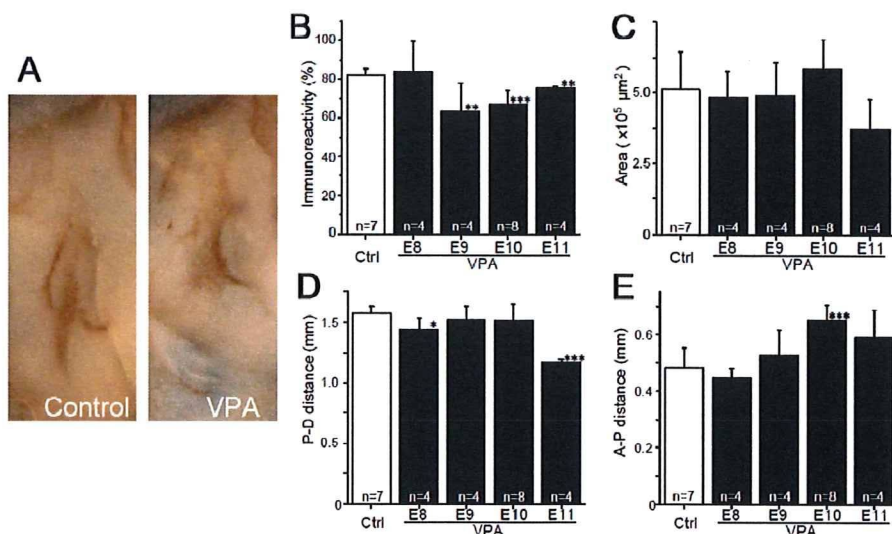


Fig. 3 顔面・内耳神経の免疫染色性、占有面積、線維束長

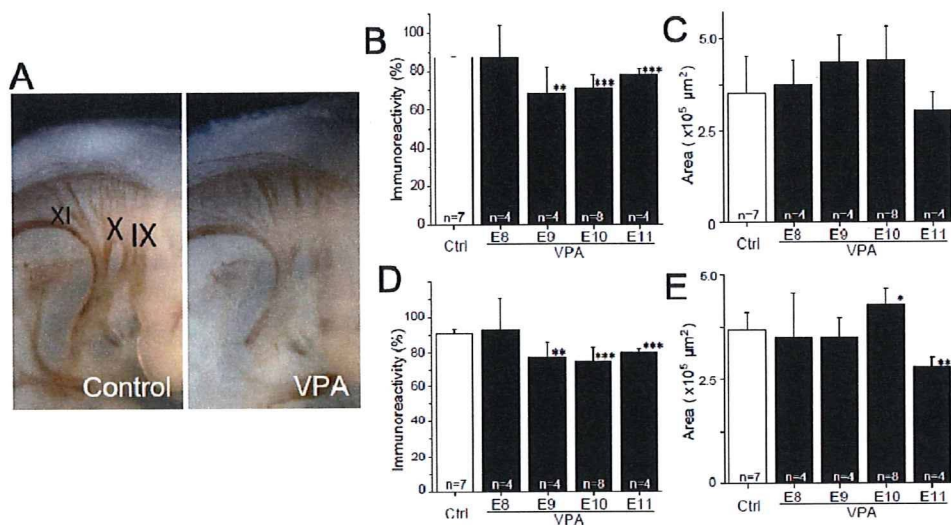


Fig. 4 舌咽神経・迷走神経の免疫染色性と占有面積

D. 考察

化学物質の一つ、抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムの胎生期ばく露ラットでは、これまで分かっていたセロトニン神経の初期発生の異常以外に、顔面神経の線維束形態など、脳神経の初期発生においても異常が認められた。このような薬剤ばく露の影響を受ける時期は、E9に始まりE10,11以降で顕著になる傾向があり、セロトニン系とほぼ同様な胎生期のばく露時期であることが示された。

本研究では脳神経の末梢の線維束の形態の解析を中心に行い、三叉神経、顔面・内耳神経、舌咽神経、迷走神経において、免疫染色性の低下が認められた。線維束の免疫染色に用いた抗体は、ニューロフィラメントを有しある程度発達した軸索線維しか認識できないので、免疫陽性の低下の原因は、未発達な線維が増加した可能性と、軸索本数の減少の可能性が考えられる。両者を区別するためには、神経核や神経節の細胞数を定量する必要がある。

免疫染色性の低下だけでなく、線維走行の異常も観察された脳神経は顔面・内耳神経であった。今回の染色方法では厳密に顔面神経と内耳神経を区別することは困難であるが、内耳神経は耳朶周辺に分布し、近位よりに存在していると考えられる。したがって、遠位の線維束は顔面神経を多く含む成分と予測される。この遠位領域の線維が前後方向に広がった解釈すれば、占有面積の変化は伴わないことも矛盾なく説明できる。適切な末梢の標的に向かうことができなくなった顔面神経の線維がさらに後の発達でどのような発生運命をたどり、生理機能にどのような影響を与えるかは不明である。

胎内ばく露の影響を受け始める時期に関して、顔面神経、三叉神経などいわゆる脳神経もまた、セロトニン神経のように胎生期の早い時期から神経前駆細胞を経て分化・発達することが知られている。今回の研究で、脳神経の分化・発達にもばく露時期特異的な影響が明らかとなり、

化学物質の胎生期ばく露の恐ろしさが改めて浮き彫りとなった。

これまでの研究代表者らによる研究で、ラット E9-E10 にかけての VPA ばく露は、ヒト自閉症類似の症状、所見を呈することがわかっており、その原因としてセロトニン神経の初期発生の妨げであることも報告されている。今回 VPA 胎生期ばく露が脳神経に時期特異的な発達障害、特に顔面神経の発達（免疫染色性）に影響を与えたのは興味深い。というのはヒトにおいてこの時期のサリドマイド（やおそらく VPA も）ばく露による自閉症では、顔面神経の異常も伴うことがあることも知られているからだ。その意味でラットで E9-10 にかけての VPA ばく露がセロトニン系の異常に加えて、顔面神経の異常をも呈したのは興味深い。

古くから胎生期の VPA の経胎盤的ばく露は、様々な先天奇形、特に水頭症、神経管閉鎖障害などを引き起こすことが知られてきた。これら外表あるいは内臓奇形のばく露のクリティカルなタイムウィンドウは様々である。発達障害は、外表、内臓奇形などとは異なるが、目に見えない先天異常ともいえ、それだけにばく露の有無について、発達障害顕在化前の、指標、バイオマーカーなどが求められる。

ヒト自閉症の“情動・認知行動の異常”の本態は、神経伝達物質セロトニン系の異常とされる。本モデルラットにおいては脳や血液中のセロトニンの異常を呈し、これらはヒト自閉症でも見られる所見である。研究代表者らは、生後に見られるこれらの所見は化学物質の胎生期ばく露によるセロトニン神経系の初期発生の異

常であると報告してきた。

自閉症モデルラットでのセロトニン系の異常の所見は、胎生期のばく露時期、即ち、妊娠中のどの胎齢日齢にばく露されたかの、時期特異的（ヒトで妊娠 20-24 日、ラットで妊娠 9-10 日）である。即ち脳セロトニン濃度など、ばく露後の所見を解析することが、ばく露があったかどうか、あったとすればその後の発達にクリティカルなタイムウィンドウでのばく露だったのか、判定することができる。判定に用いる項目はできるだけ多いほうがよいが、現在そのような項目は生後の海馬セロトニン濃度測定くらいであった。

E. 結論

化学物質の一つ、抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムの胎生期ばく露ラットでは、顔面神経など脳神経の初期発達において、これまで分かっていたセロトニン神経とほぼ同様なばく露時期に、形態異常が出現し始める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1, 太城康良、大藪明子、井村誉史雄、内田敦子、成田正明「バルプロ酸曝露ラットにおける脳神経の形態発達」第 69 回日本解剖学会中部支部学術集会 2009 年 10 月 10-11 日 浜松

2, 太城康良、大藪明子、井村誉史雄、内田敦子、成田正明「バルプロ酸曝露ラッ

トにおける脳神経の形態発達」第 115 回
日本解剖学会総会全国学術総会 2010 年 3
月 28-30 日 盛岡

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）**

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 21 年度研究課題：「DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 田代 朋子 青山学院大学・理工学部 教授

研究要旨

本分担研究は、化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響を明らかにし、より客観的な発達障害診断法を開発することを目的とする研究の中で、モデル動物を用いた網羅的遺伝子発現解析により、化学物質が影響を与える脳内部位とタイミングおよび発達障害に到るメカニズムを明らかにし、バイオマーカーの発見を目指すものである。本年度は(1)胎生期サリドマイドばく露による自閉症モデルラット、および(2)胎生期－生後初期トリブチルスズ(TBT)ばく露ラット、の二種類のモデル動物の生後発達過程における遺伝子発現プロファイルを非ばく露対照群と比較解析した。(1)では生後20日を中心に脳皮質で、ポストシナプス構成タンパクやミエリン構成タンパクの遺伝子に有意な発現変化を見出した。また、セロトニン受容体サブタイプの多くは、生後20日以降に有意に発現上昇した。(2) TBT ばく露では、脳皮質に比べて中脳での発現変化が大きく、離乳後に TBT 摂取を止めた場合にも一部の遺伝子の変化が持続することから、不可逆的な影響を残す可能性があることを見出した。今後、このように作用メカニズムの異なる数種類の化学物質が発達期脳に与える影響を詳細に比較解析することにより、多様な発達障害に到る過程を明らかにし、早期診断に利用できるバイオマーカーを探索する。

A. 研究目的

血液－脳関門が未成熟な胎生期から乳児期は、化学物質が血液を介して容易に脳内に侵入し、形成途上の神経回路に影響を与えることで、発達障害の要因となる可能性が懸念されている。

化学物質が生体に有害な作用を及ぼすメカニズムは、DNA 損傷による遺伝子変異、エネルギー産生阻害、酸化細胞傷害、細胞間コミュニケーションの攪乱など、多岐にわたり、従来の生化学的方法や形態学的方法だけでは膨大な数の化学物質のリスク評価は不可能である。なか

でも、複雑な構造と機能を持ち、部位により多様な発達経過を示す脳に対する影響を調べるには、効率的かつ高感度な方法の確立が急務である。

遺伝子発現、すなわち遺伝子が使われる場所やタイミング、が化学物質によってどう変化するか、を調べることにより、化学物質の作用メカニズムを特定する手法はトキシコゲノミクスと呼ばれ、感度の良いリスク評価法として注目されている。多数の遺伝子の発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイは、この方法の有力な道具であるが、感度、定量性、

コストなどに課題が残り、現状では一般的なリスク評価方法とはなり得ていない。研究分担者・田代は、シナプスの構造と機能に關与する遺伝子を中心に、脳の発達過程で大きく発現変化する遺伝子群に焦点を絞ることで、効率よく脳の発達過程をモニターする独自の DNA マイクロアレイ「シナプトアレイ」を作成し、実際に発達期小脳 (Takahashi et al., J. Neurosci. Res., 2005, J. Neurochem., 2008) や培養神経細胞 (Kitamura et al., J. Neurosci. Res., 2007) に応用してその感度と定量性を確認している。

本分担研究ではまず、研究代表者・成田正明らが確立した「自閉症モデルラット」をはじめ、異なるタイプの化学物質に胎生期ばく露したラットを用いて、発達過程における脳内各部位の遺伝子発現プロファイルを「シナプトアレイ」により解析し、それぞれの化学物質が影響を与える部位とタイミングを明らかにする。次いで遺伝子発現から推察される毒性メカニズムを生化学的、形態学的方法で確認する。得られた結果を総合し、異なる毒性メカニズムを反映する遺伝子群を特定して、より効率的な発達期神経毒性評価法を確立する。また、ヒトへの応用を目指し、血液あるいは脳脊髄液を材料に、脳で起きている変化を反映して変動するバイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

化学物質胎生期ばく露ラットの作成：今年度はサリドマイド誘発自閉症モデルラットおよび胎生期一後初期トリブチルスズばく露ラットを作成し、使用した。

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラットは、成田らの方法 (Narita et al., Int. J. Dev. Neurosci., 2005) に従い、妊娠 9 日目ラットにサリドマイド (500mg/kg) を単回強制経口投与することで作成した。溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与し、対照群を作成した。生まれた仔ラット (♂) から、生後 7、14、20、30、40 日の各時点で大脳皮質および海馬を採取した。

(2) 胎生期一後初期トリブチルスズ

(TBT) ばく露ラットは、妊娠 2 日目から出産後 3 週まで、母ラットに 25 または 125 ppm の TBT クロライドを混餌投与して作成した。TBT を含まない通常餌を与えた親から生まれた仔を対照群とした。生後 3 週間で離乳後は、TBT を含まない通常餌に切り替えて生後 6 週まで飼育した。生後 1、2、3、6、9 週の各時点の仔ラット (♂) から、大脳皮質、中脳、および海馬を採取した。

オリジナル DNA マイクロアレイ「シナプトアレイ」の作製：神経突起やシナプスの構造と機能、神経伝達、細胞周期と細胞死、ミトコンドリア機能、などに関与する遺伝子約 500 を選び、それぞれに特異的かつ 56-67% の GC 含量を持つ 45 塩基長のプローブ配列を選定し、合成を依頼した (日本 EGT 社)。高精度アレイヤーでこれらのプローブを特殊コーティングされたスライドガラス (日清紡、Carbostation) 上にスポットティングした。一枚のスライドガラス上に各プローブは場所を変えて 6 回スポットされている。アレイ用標識 cRNA の作製とハイブリダイゼーション：胎生期曝露動物の各個体

より採取した脳組織から Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出し、キャピラリー電気泳動で品質検定を行った。各 total RNA 標品は、T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む oligo dT プライマーを用いて逆転写し、cDNA を調製した。この cDNA を鋳型とし、アミノアリル UTP を基質に添加して、アミノアリル U を含む cRNA を増幅した (タカラバイオ社、SureLABEL core kit)。増幅したアミノアリル cRNA に、蛍光色素 Cy3 または Cy5 を反応させ、蛍光標識 cRNA を作製した。アレイにハイブリダイズする直前に、混合した標識 RNA を断片化した (Ambion 社、断片化試薬)。

実験ごとに、使用する各時点の対照群の Cy5 標識 RNA を等量混合し、標準 RNA とした。ハイブリダイゼーション・チャンバー (Agilent Technologies 社) にセットした一枚のシナプトアレイに対し、Cy5 標識標準 RNA 1 μ g と比較する Cy3 標識 RNA 1 μ g を混合して 500 μ l としたものを注入し、55°C、16 時間、ゆっくりと回転しながら反応させた。反応後、アレイを取り出して、順次、濃度を下げた SSC で洗浄した後、窒素ガスを噴射し

て乾燥させた。

アレイ・データの取得と解析：反応後のマイクロアレイを DNA Scope IV (Gene Focus 社) を用いて Cy3、Cy5 両波長域で蛍光スキャンし、得られた蛍光強度データを Imagen Software

(Biodiscovery 社) で定量化した。データは、アレイ上の 6 種類の標準遺伝子 (*rpL3*, *rpL13a*, *rpL22*, *rpL23*, *Ppia*, *ubiquitin1e*) の値を用いて標準化した。

リアルタイム PCR 解析：各個体、各組織の total RNA から逆転写によって cDNA を作製し、各遺伝子に特異的なプライマーと蛍光インターカラーター Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った

(ABI 社、StepOne)。Ppia または β -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

セロトニンおよび代謝産物の測定：脳組織を過塩素酸抽出し、逆層 HPLC 法により、セロトニン、ドーパミン、および HIAA 含量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて青山学院大学工学部動物実験委員会の承認を得、獣医師の指導のもとに必要最低限の頭数を使用した。

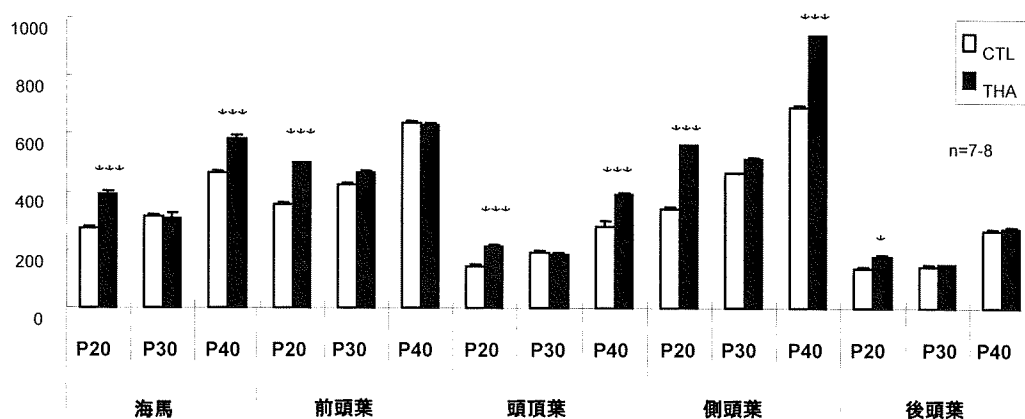


図1. 胎生期サリドマイド曝露 (THA) 群および対照 (CTL) 群における脳内セロトニン含量 (ng/g tissue)

C. 研究結果

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット:胎生9日目サリドマイドばく露(THA)群5腹、対照(CTL)群5腹を作成し、生後、20日(P20)、30日(P30)、40日(P40)の各時点で、大脳皮質4部位(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉)と海馬のセロトニンおよびHIAA含量を測定した。5部位のすべてにおいて、P20の時点でTHA群ではCTL群と比較してセロトニン含量(組織湿重量あたり)が30~40%上昇しており、P40でも上昇傾向がみられた(図1)。セロトニンと代謝産物HIAAとの比には両群で有意な差はなかった。

P7、P14、P20、P40の4時点で、THA、CTL両群のそれぞれ3個体の大脳皮質および海馬から個別に抽出したRNAを用いて、「シナプトアレイ」による遺伝子発現解析を行った。各時点での3個体間の再現性は良く、海馬よりも大脳皮質においてTHA群とCTL群の発現プロファイルに顕著な差が見られたため、以後の実験は大脳皮質サンプルに集中して行った。大脳皮質では、P20でもっとも両群の差が大きかった(表1)。P20の時点はCTL群では遺伝子発現の転換期であり、多くの遺伝子がreference RNA(すべての時点の平均値に相当)に比べて発現上昇または低下を示したが、THA群ではこのような発達期特有の変化が見られなかったためである。

P20の時点で、シナプトアレイで発現変化のみられた主な遺伝子は、(a) ミエリン構成タンパクの遺伝子、(b) ポストシナプス足場タンパクの遺伝子、(c) 細胞骨格およびその調節タンパクの遺伝子、であ

った。

これらの遺伝子の発現変化はリアルタイムPCR法で確認した。なかでもミエリン構成タンパクの遺伝子は、図2に示すように協調して発現上昇を示した。

一方、セロトニン受容体サブタイプについてもリアルタイムPCR法で生後発達に伴う発現変化を調べたところ、THA群はCTL群に比べて、生後初期(P7、P14)に低く、P20以降は高くなるという共通した傾向がみられた(図3に一部を示す)。ただし、唯一のイオンチャネル型受容体である*htr3*は例外でCTL群との差がみられなかった。

THA/CTL	P7	P14	P20	P40
発現上昇 (>1.5)	8	2	38	7
発現低下 (<0.67)	5	0	46	16

表1. 各時点の大脳皮質においてTHA、CTL両群で発現差のみられた遺伝子の数(全489遺伝子中)

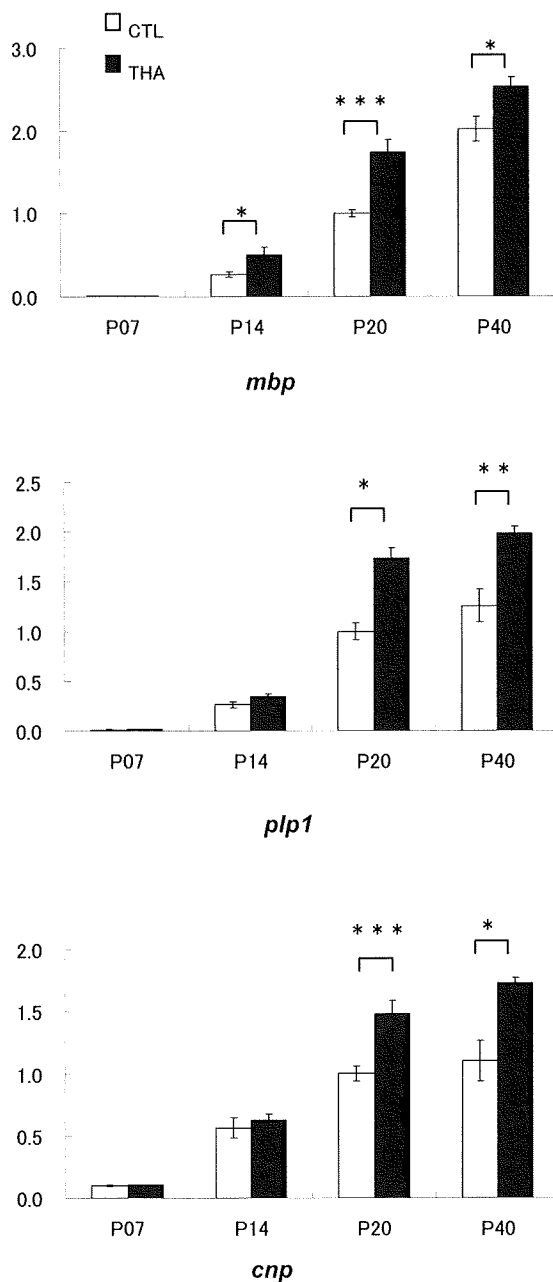


図2. サリドマイドばく露(THA)および対照(CTL)群大脳皮質の発達過程におけるミエリン構成タンパク遺伝子の発現変化。P20-CTLを1とした相対発現レベルを示す。n=5-6

(2) 胎生期 - 生後初期 TBT ばく露ラット:

妊娠2日目から6週間にわたって継続

的に TBT を投与する今回の実験条件で、母ラットの体重および産仔の数、性比、離乳までの生存率に影響はなかった。仔ラット(雄)の体重、肝臓、腎臓の重量についても、25ppm TBT 投与群では対照群と有意差はなかったが、125ppm 投与群では生後3週の時点で対照群の約60%に減少しており、その後TBT投与を止めると3週間後(生後6週)に対照群の約73%まで回復した。生後3週の時点で、脾臓および胸腺の重量は25ppm投与群で対照群の70%、125ppm投与群で50%まで減少しており、TBTの免疫毒性を裏付ける結果であった。

生後1、2、3、6週の4時点でTBT低用量群、TBT高用量群、対照群の大脳皮質および中脳から個別に抽出したRNAを用いて、「シナプトアレイ」による遺伝子発現解析を行った。低用量群、高用量群のいずれかで、上記4時点のうち1時点以上で対照群に対して有意な遺伝子発現変化(1.5倍以上または1/2倍以下)を示した遺伝子は、大脳皮質で32遺伝子、中脳で33遺伝子であった(489遺伝子中)。これらの遺伝子は、大脳皮質では合計41時点(低用量、高用量x4時点x32遺伝子で合計256時点中)、中脳では合計65時点(264時点中)で有意に発現変化していた。また、変化率も中脳の方が大きく、TBTの影響は中脳でより強いことが明らかになった。TBTにより発現変化した遺伝子は、大脳皮質ではミトコンドリア電子伝達複合体の構成サブユニット、細胞内Ca²⁺ホメオスタシスに関与するタンパク、アクチン制御タンパク、などの遺伝子、中脳ではこれらに加えてド

パミン神経伝達に関与する遺伝子であった。

リアルタイム PCR 法により定量的に解析した結果、TBT の累積摂取量が最大となる生後 3 週齢の時点で、ミトコンドリア・シトクロム酸化酵素複合体を構成する *cox6c*, *cox7a3* が大脳皮質ではともに発現低下、中脳では発現上昇すること、いずれも TBT 摂取停止 3 週間後の時点（生後 6 週齢）では対照群と同レベルに復していること、が分かった（図 4）。一方、中脳では Ca^{2+} ホメオスタシスに関与する二つの遺伝子、すなわち IP3 受容体 Ca^{2+} チャネルの活性を調節するクロモグラニン B (*chgb*) および細胞膜の交換輸送体である Na^+/Ca^{2+} exchanger 2 (*slc8a2*)、の発現が 6 週齢を含むすべての時点で上昇していた（図 4）。大脳皮質においては *chgb* のみが生後 3 週齢で有意に発現低下したが、6 週齢では対照群と差が無くなっていた。

ドパミン産生細胞のマーカーである tyrosine hydroxylase (*th*) の遺伝子発現には有意な変化はみられなかったが、TH タンパク質は生後 1 週の時点で有意に減少していた。

D. 考察

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット： 成田らの研究により、胎生 9 日目サリドマイドばく露ラット (THA 群) では、成熟後 (P50) の時点で海馬セロトニン濃度が高値を示すこと、縫線核におけるセロトニン神経細胞・細胞体の分布に正常とは異なる偏りがみられること、からセロトニン神経系の発達異常が示唆されていた (Narita et al., *Pediatr. Res.*, 2002; Miyazaki et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005)。今回、海馬および大脳皮質各部位で発達期からセロトニン濃度が 40% 程度上昇していること、大脳皮質におけるセロトニン受容体の発現プロファイルが正常と異なること、が確認され

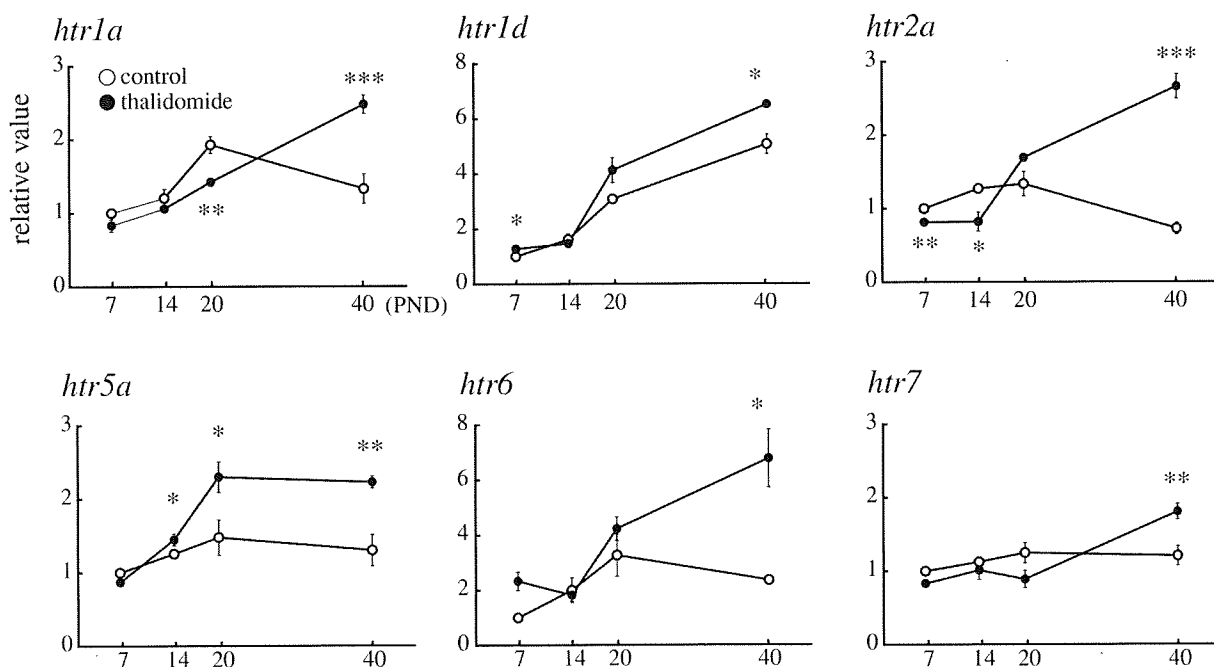


図3. サリドマイド曝露群と対照群の大脳皮質発達過程におけるセロトニン受容体の発現変化

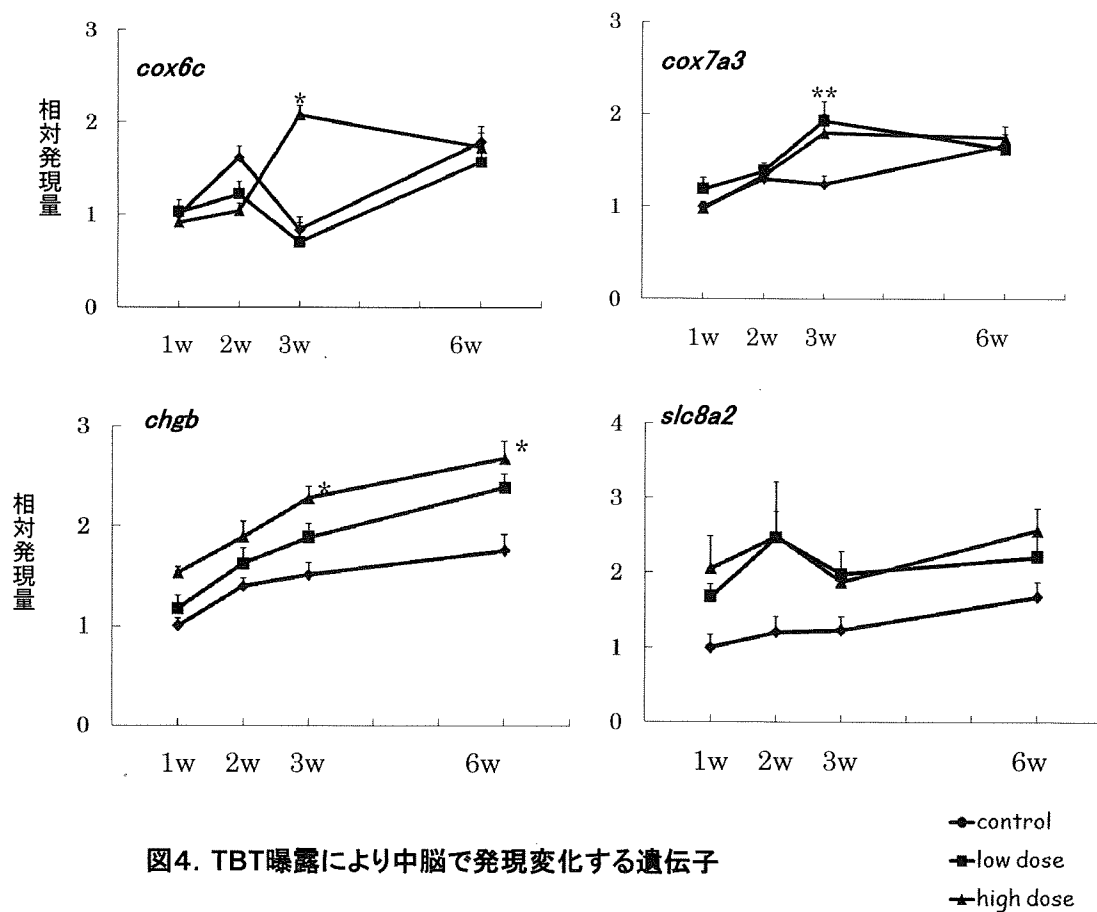


図4. TBT曝露により中脳で発現変化する遺伝子

たことは、このモデル動物においてセロトニン神経の投射先において広汎な異常が生じていることを裏付けている。

シナプトアレイによる遺伝子発現解析の結果、正常群とTHA群の差は生後20日の時点でもっとも顕著であることが分かった。正常群ではこの時点で、それまで上昇していた突起伸展やシナプス形成に必要な遺伝子の発現が低下に転じ、ミエリン形成やシナプス成熟に関わる遺伝子の発現が上昇する。THA群ではこのようなはっきりした変化が起こらず、シナプス形成の時間的なずれが示唆される。

ミエリン構成タンパクの遺伝子には協調した発現上昇が確認され、ミエリン形成がより早く、かつ過度に進んでいる可能性が示唆される。

今後、シナプス形成やミエリン形成の異常をタンパク質レベル、形態レベルで確認するとともに、発達期のセロトニン濃度上昇との関連を追求する。

(2) 胎生期 - 生後初期 TBT ばく露ラット:

TBTはミトコンドリア機能を阻害する可能性が *in vitro* 実験から示唆されていたが、今回、生体内でもミトコンドリア電子伝達系に対する一過性の影響が確認された。一方、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与する二つの遺伝子の発現変化は、中脳ではTBT摂取停止後も持続し、TBTばく露によって不可逆的な影響が残る可能性を示唆している。

今回の結果からTBTの影響は大脳皮質よりも中脳で大きいことが分かった。中