

201035011 AB

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 22 年度 研究報告書

平成 20－22 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

Annual Report
Research on Risk of Chemical Substances,
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2008-2010
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 23 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 22 年度 研究報告書

平成 20-22 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

Annual Report

Research on Risk of Chemical Substances,

Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,

Japan in 2008-2010

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 23 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

発刊にあたって

研究代表者 鍋島俊隆

国立医薬品衛生食品衛生研究所発衛研第 454 号をもって交付決定の通知をうけた平成 22 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、平成 22 年度研究報告書および平成 20 年度から 3 年間の研究をまとめた総合研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 23 年 3 月吉日

目次

1. 平成 22 年度研究報告	1
2. 平成 22 年度分担研究報告	9
化学物質の周産期暴露による精神毒性発現機序に関する研究	11
(名城大学大学院薬学研究科・薬品作用学研究室 鍋島俊隆)	
妊娠期におけるコレシストキニン受容体関連化合物暴露が学習および情動機能に及ぼす影響	23
(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	29
(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	36
(名城大学大学院薬学研究科・病態解析学 野田幸裕)	
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	47
(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. 平成 20～22 年度総合研究報告	57
4. 平成 20～22 年度分担者総合研究報告	67
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	69
(名城大学大学院薬学研究科・薬品作用学研究室 鍋島俊隆)	
妊娠期における化学物質暴露による学習および情動障害	107
(名城大学薬学部・薬品作用学研究室 間宮隆吉)	
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	115
(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	128
(名城大学大学院薬学研究科・病態解析学 野田幸裕)	
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	146
(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)	
5. 平成 20～22 年度刊行物一覧	157

6. 研究代表者・研究分担者一覧	557
------------------------	-----

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 22 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 2010
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)**

平成 23 年 3 月

平成 22 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 (H20-化学-一般-011)

「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」

研究代表者 鍋島俊隆

研究報告

我々は昨年度までの研究により、簡便かつ安価で、再現性も高いという非常に有用な行動評価系を確立した。これらの行動評価系を用いて、グルタミン酸受容体拮抗薬やアセチルコリン受容体作動薬が情動性、学習・記憶、認知機能などの化学物質に固有な精神発達障害を誘発することを明らかにした。また、化学物質により免疫系を介した精神発達障害が引き起こされることも明らかにした。平成 22 年度は、これら精神障害の発現機序について検討した。妊娠マウスにフェンシクリジン (PCP) またはニコチンを与え、その仔マウスが成体期に達した時点で神経化学的な解析を行った。また、新生仔期 polyI:C 処置により誘発される神経発達障害について、マウス由来培養アストログリア細胞および培養神経細胞を用いて検討した。その結果、胎生期に PCP を暴露したマウスの前頭皮質では、グルタミン酸トランスポーターの発現増加および高カリウム誘発性グルタミン酸遊離量の減少が観察されたことから、胎生期の PCP 暴露はグルタミン酸作動性神経系の機能を障害すると考えられた。胎生期にニコチンを暴露したマウスの前頭皮質ではノルアドレナリン (NE) の代謝産物である MHPG 含量が低下しており、NE 作動性神経系の機能低下が認められた。一方、マウス大脳由来培養アストログリア細胞に polyI:C を添加して培養した上清 (polyI:C-ACM) を初代培養海馬神経細胞に添加すると神経細胞の成長が抑制されたが、IFITM3 遺伝子欠損マウス由来 polyI:C-ACM には障害効果が認められなかった。さらに、セクレトーム解析の予備的検討を行い polyI:C-ACM 中に遊離されるタンパクが存在することを確認した。また、異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞における IFITM3 の誘導と、アストログリア細胞から分泌される液性因子が関与していることが示唆された。これらの調査により、胎生期における PCP またはニコチンの暴露は、成体期の前頭前皮質においてグルタミン酸や NE 作動性神経系の機能を障害することを明らかにした。また、polyI:C 処置により誘発される神経発達障害にはアストログリア細胞の活性化と神経細胞-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を示唆した。

研究代表者氏名・所属機関及び職名

鍋島俊隆・名城大学薬学部・大学院薬学研究科・教授

研究分担者氏名・所属機関及び職名

山田清文・名古屋大学医学部附属病院・教授

野田幸裕・名城大学薬学部・教授

永井拓・名古屋大学医学部附属病院・准教授

間宮隆吉・名城大学薬学部・助教

1.化学物質の周産期暴露による精神毒性発現機序に関する研究

(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) 及びニコチンをマウスの発達期に投与を行い、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、また、その影響の有無を簡便かつ安価に行える行動評価系を確立することを目的とした。

前年度までに、胎生期 [胎生 6.5 日目 (E6.5) から E18.5] における PCP 暴露が成体期でのグルタミン作動性酸神経系の機能障害により統合失調症様の行動異常を惹起することを報告している。本年度は、本マウスにおけるグルタミン酸トランスポーターの機能に焦点を当て、神経科学的・生化学的な解析により検討を試みた。成体の前頭皮質において、グリア細胞上グルタミン酸トランスポーターの発現量の検討を行った結果、Glutamate-aspartate transporter (GLAST) の発現量が有意に増加しており、また、マイクロダイアリシス法により前頭皮質内のグルタミン酸遊離量の測定を行った結果、基礎遊離量の減少、及び高カリウム刺激後の遊離量の

減少が認められた。さらに、前年度までの結果で、グルタミントランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与により行動異常の一部が緩解されたことから、DL-TBOA 存在下での前頭前皮質グルタミン酸遊離量を測定したところ、減少していたグルタミン酸の遊離が正常レベルにまで改善され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、成体期の前頭前皮質において、グリア細胞上のグルタミン酸トランスポーターの発現量増加のような神経化学的な変化を一因とするグルタミン酸機能障害を惹起することが明らかとなった。

また、前年度までに、妊娠 14 日目 (G14)-P0 の期間にニコチン暴露された雄マウスにおいて不安などの情動障害および注意機能障害が顕著に認められことから、本年度はさらなる評価系として、水探索試験、断崖回避試験についても検討を行ったところ、両系においてニコチン暴露群に障害が認められた。また、それら行動異常の原因を明らかにするため、HPLC を用いた脳内モノアミン含量の測定を行ったところニコチン暴露群の P28 および P56 の前頭皮質において、ノルアドレナリン代謝産物である MHPG と代謝回転の低下が認められた。しかしながら、海馬ではこのような変化は認められなかった。以上より、胎生期におけるニコチンの暴露は前頭皮質での脳内ノルアドレナリン作動性神経系の機能の変化を生じさせ、出生後も持続する不安などの情動障害および注意機能障害を生じる

ことが明らかとなった。

2. 妊娠期におけるコレシストキニン受容体関連化合物暴露が学習および情動機能に及ぼす影響

(名城大学薬学部・間宮隆吉)

コレシストキニンは膵臓や胆のうなど消化管だけでなく脳内にも広く分布するペプチドで、作用する受容体も同様に分布している。コレシストキニン受容体リガンドは成熟ラットやマウスで、膵炎やパニック障害を誘発することから、この受容体に作用する化合物は末梢から中枢まで大きな影響を及ぼす可能性ある。そこで本年度は、コレシストキニン受容体拮抗薬の CI-988 について、マウス胎生 6 日目から出生前日まで 1 日 1 回処置し、生まれたマウスが 5、7 および 20 週齢になった時に行動薬理的解析を行った。C57BL/6J 系雌性マウス (15 週齢) を 12 週齢の雄性マウスと交配させ、妊娠 6 日目から出産前日まで (CI-988 0.1 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、7 週および 20 週目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、強制水泳試験および性行動試験を行った。また、行動実験実施後に血液採取および脳摘出を行い、それぞれサンプル調整を行った。その結果、CI-988 (0.1 mg/kg) を胎児期に暴露しても成熟後の情動および認知行動はなんら影響を受けなかったが、1 mg/kg では 7 週齢時でのみ新奇物体認知試験において溶媒投与群と比較して有意な障害が観察された。行動実験後、血中コレシストキニン濃度を測定したところ、このマウスではわずかであるが溶媒投与群と比較して有意に高かった。一方、ウェスタンブロッティング法にて脳内の CCK2 受容体発現量を比較したが各群間に有意な変化は認められなかった。これらのことにより、コレシストキニン受容体関連

化合物は胎児の脳高次機能の発達に影響を与え、学習記憶機能を障害することが分かった。また、その障害作用には血中コレシストキニン濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。

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)

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。また、周産期における化学物質への暴露は免疫毒性や異常免疫応答を誘発することが知られている。本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について新たに動物モデルを作製して研究した。昨年度までに、合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を新生仔期に処置したマウスは、(1) 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すこと、(2) 海馬における脱分極性グルタミン酸遊離に障害があること、(3) 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、(4) 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を明らかにした。本年度は、polyI:C により誘発される神経発達障害における interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) の役割について検討した。

マウス大脳由来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-ACM) を初代培養海馬神経細胞に添加すると、神経細胞の MAP2 陽性樹状突起の伸展および PSD95 陽性スパイン形成が有意に抑制された。一方、IFITM3 遺伝子欠損 (*ifitm3^{-/-}*) マウスから調製した polyI:C-ACM には神経樹状突起およびスパイン形成の障害効果は認められなかった。さらに、野生型 (WT) マウスにおいては、polyI:C 処置により前頭葉皮質 MAP2 タンパクが減少し、12 週齢では認知記憶障害が観察されたが、*ifitm3^{-/-}* マウスでは polyI:C 処置によるこれらの異常は認められなかった。

以上の結果より、polyI:C 誘発性異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞で誘導される IFITM3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、神経発達期における化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で IFITM3 が誘発されるかどうか、また、脳発達期における化学物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に IFITM3 が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

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、実験動物の発達過程である新生仔期および青年期に、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) を単独もしくは複合的に負荷し、その後には惹起される情動・認知障害の作用機序およびそれらに対する治療薬について検討した。新生仔期 (生後 2 日齢から 5 日間) における免疫異常発現薬である polyI:C の投与と青年期 (生後 4 週齢以降) における精神異常発現薬であるフェンシクリジン (PCP) 連続投与 (7 日間) の複合負荷により、前頭前皮質においてグルタミン酸トランスポーター (GLAST) の発現増加が認められ、GLAST 阻害薬の前頭前皮質への注入により複

合負荷による認知障害は改善した。そこで、GLAST の生理機能について検討するため、GLAST 遺伝子欠損マウスを用いて行動解析を行ったところ、情動行動の変化は認められなかったが、ホモ GLAST 遺伝子欠損マウスにおいて物体認知記憶ならびに連合学習に障害が認められた。また、生理機能に変化が認められなかったヘテロ GLAST 遺伝子欠損マウスにおいて、14 日間 PCP 連続投与により認められる行動障害は認められなかった。本研究から、化学物質の単独および複合負荷による高次精神機能の変容の一部にはグルタミン酸作動性神経系の機能異常が関与しており、その因子の一つとして GLAST が同定された。本知見を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ていきたい。

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・医学部
附属病院 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。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。イムノプロット法を行った結果、polyI:C 投与群において ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて

0.7 倍減少していた。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、同様の結果を得た。一方、polyI:C を投与した C57BL/6 系マウスでは ALDH1L1 および CRMP5 の発現に有意な変化は認められなかった。

PolyI:C を処置したアストロサイトの培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に添加した後の CRMP5 の発現を免疫染色法により調べた。CRMP5 の免疫活性は神経細胞の細胞体および軸索に認められた。コントロール細胞と比較して、polyI:C-ACM を処置した神経細胞では神経突起の抑制が認められ、軸索における CRMP5 の免疫活性も減弱していた。PolyI:C-ACM によって惹起される神経細胞の発達障害機構を調べるため、セクレトーム解析の予備的検討を行った。以上の結果から、新生仔期に polyI:C を投与した ICR 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り、その発現変化には種差が認められることが明らかとなった。

平成 22 年度 分担研究報告

化学物質の周産期暴露による精神毒性発現機序に関する研究

研究代表者：鍋島俊隆

研究協力者：鳥海和也、陸玲玲、Alkam Tursun、青山雄紀

名城大学 薬学部・大学院薬学研究科 薬品作用学研究室

[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) 及びニコチンをマウスの発達期に投与を行い、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、また、その影響の有無を簡便かつ安価に行える行動評価系を確立することを目的とした。

前年度までに、胎生期 [胎生 6.5 日目 (E6.5) から E18.5] における PCP 暴露が成体期でのグルタミン作動性酸神経系の機能障害により統合失調症様の行動異常を惹起することを報告している。本年度は、本マウスにおけるグルタミン酸トランスポーターの機能に焦点を当て、神経科学的・生化学的な解析により検討を試みた。成体の前頭皮質において、グリア細胞上グルタミン酸トランスポーターの発現量の検討を行った結果、Glutamate-aspartate transporter (GLAST) の発現量が有意に増加しており、また、マイクロダイアリス法により前頭皮質内のグルタミン酸遊離量の測定を行った結果、基礎遊離量の減少、及び高カリウム刺激後の遊離量の減少が認められた。さらに、前年度までの結果で、グルタミントランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与により行動異常の一部が緩解されたことから、DL-TBOA 存在下での前頭前皮質グルタミン酸遊離量を測定したところ、減少していたグルタミン酸の遊離が正常レベルにまで改善され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、成体期の前頭前皮質において、グリア細胞上のグルタミン酸トランスポーターの発現量増加のような神経化学的な変化を一因とするグルタミン酸機能障害を惹起することが明らかとなった。

また、前年度までに、妊娠 14 日目(G14)-P0 の期間にニコチン暴露された雄マウスにおいて不安などの情動障害および注意機能障害が顕著に認められことから、本年度はさらなる評価系として、水探索試験、断崖回避試験についても検討を行ったところ、両系においてニコチン暴露群に障害が認められた。また、それら行動異常の原因を明らかにするため、HPLC を用いた脳内モノアミン含量の測定を行ったところニコチン暴露群の P28 および P56 の前頭皮質において、ノルアドレナリン代謝産物である MHPG と代謝回転の低下が認められた。しかしながら、海馬ではこのような変化は認められなかった。以上より、胎生期におけるニコチンの暴露は前頭皮質での脳内ノルアドレナリン作動性神経系の機能の変化を生じさせ、出生後も持続する不安などの情動障害および注意機能障害を生じることが明らかとなった。

A. 研究目的

周産期とは、ヒトにおいては妊娠 22 週以降の胎児期と生後 7 日未満の新生児期を合わせた期間と定義され、出産前後に跨るため、合併症妊娠や分娩時の新生児仮死など、母体、胎児、新生児の生命に関わる事態が発生する危険性の高い時期でもある。また、周産期には多くの器官の発達が起こるため、内外からの様々な要因に対し非常に感受性が高く、薬剤の投与や化学物質の暴露には特に注意を要する。この時期における化学物質の暴露が、様々な発達障害を引き起こした例としては、1950 年代後半に睡眠薬のサリドマイドを服用した妊婦が多くの子形児を産んだ例が挙げられる。最近では抗血液凝固剤のワーファリンと抗癌薬のバルプロ酸ナトリウムが、同様の症状をもたらすことが報告されている。

周産期の器官発達の中でも特に神経系の発達は化学物質の影響を受けやすく、神経系形成に関わる精緻な分子機構が攪乱し、成体期まで影響を受け、神経発達障害を生じる危険性が高い。現在までの研究においても、その危険性については論じられてきてはいるが、細胞レベルでの研究が多く、生後のマウスの行動表現系に与える影響を評価したという報告は少ない。その理由のひとつとして、化学物質による神経発達障害を明確に検出することができる簡便かつ安価な行動評価系が存在しなかったことが挙げられる。そこで、本研究では、周産期において化学物質の暴露を行い、神経発達にどのような影響を及ぼすか、行動学的、生化学的、組織化学的な解析により評価することともに、その行動異常を検出することができる新たな行動評価系を確立することを目的とした。

フェンシクリジン(PCP)は、NMDA 受容体非競合的アンタゴニストであり、1970 年代に乱用され、その薬物依存者は統合失調症に類似した精神症状を惹起することが知られている化学物質である^{1,2)}。また、PCP を周産期後期である出生後の新

生児期に投与する実験が行われ、成体期まで長期持続する統合失調症様行動変化を呈することが分かってきた^{3,4)}。しかし一方で、NMDA 受容体は周産期前期においても神経発達において重要な役割を担っていることが数多く報告されているが、その時期における PCP の投与に関する知見は少なく、その影響など未知の点が多いのが現状である。

また、ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のアゴニストであり、タバコの主成分である。また禁煙補助剤であるニコチンパッチやニコチンガムに含まれる。成熟期におけるニコチン等で nAChR 受容体を刺激すると認知機能や注意機能が高まると示唆されているが^{5,6)}、胎生期にこの受容体刺激をした時に成熟期の情動や認知機能にどのような影響を与えるかは明らかでない。

本研究では、周産期において、PCP 及びニコチンを暴露したマウスを用い、その神経発達障害のメカニズムを探るとともに、新たな行動評価系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には、近交系である ICR 系マウス (中部科学資材、愛知) を使用した。室温 23 ± 1 °C、湿度 50 ± 5 %で、明暗サイクル (明期 8 時~20 時) の室内にて飼育し、水および餌は自由に摂取させた。交配は暗期に行い、翌日プラグを確認できたものを胎生 0.5 日目 (E0.5) とした。

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

実験には、我々が合成した PCP と、D-セリン (Sigma) を使用した。

2. 投与スケジュール

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

3. 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ライド (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 Glutamate transporter 1 (GLT-1) 抗体: 1:1000、抗 Glutamate-aspartate transporter (GLAST) 抗体: 1:1000 dilution] を加え、インキュベーションした後、2 次抗体 [horseradish peroxidase-conjugated 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、発現量を画像解析

により算出した。

4. HPLC 法

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

5. マイクロダイアリス法

マウスはペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) の麻酔下において、ガイドカニューレ (AG-6、エイコム、京都) を左前頭皮質 (AP +1.7, ML +1.0 from bregma, DV -1.5 from skull) に 15 度の角度から挿入した。翌日、ダイアリスプローブ (AI-6-1; 膜長 1mm, エイコム) をガイドカニューレを介して挿入、人工脳脊髄液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl and 2.3 mM CaCl_2) を $1.2 \mu\text{l}/\text{min}$ の流速で還流した。還流液を採取し、高速液相クロマトグラフィー (HTEC-300, エイコム) により細胞外ドパミン遊離量を測定した。

II. 簡便かつ安価な行動評価系を用いた胎生期のニコチン暴露が情動行動および認知機能に与える影響の研究

1. 実験動物および薬物

実験には、近交系である C57BL/6J 系マウス妊娠 13 日目 (日本エスエルシー、静岡) を使用した。室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ で、明暗サイクル (明期 8 時~20 時) の室内にて飼育し、ニコチン摂取前および出生後は水および餌は自由に摂取させた。

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。

実験にはニコチン (Sigma) を使用した。

2. ニコチン投与スケジュール

妊娠 C57BL/6J マウスに対し、E14.5 より出生直前まで、ニコチンを 2%スクロース水溶液に 0.02 mg/ml となるように混合し、自由に摂取させた。対照群としては 2%スクロース水溶液のみを自由に摂取させた。その仔マウスに対し、各種行動試験および神経化学的解析を行った。

3. Water finding test

実験装置は灰色の木製オープンフィールド (30×50×15 cm) を使用した。長い側壁の中央に一つの入り込み小部屋 (10×10×10 cm) を設置し、この小部屋の天井の中央から、ホームケージで使われているものと同じ型の給水用ノズルを挿入 (ノズルの床からの高さ; 6.5 cm) した。訓練試行は、十分に水を与えたマウスを一匹ずつオープンフィールドの小部屋と反対側の壁の角に頭を向けて置き、マウスを装置内に入れ、5 分間自由に探索させた。5 分間の探索期間中に一度も給水ノズルに接触しなかったマウスはテスト試行を行わず、実験の対象から削除した。訓練試行終了後、直ちにマウスをホームケージに戻し、テスト試行を開始するまで絶水した。テスト試行は、訓練試行の翌日に行った。訓練試行終了後絶水したマウスを再びテスト装置内の同じ角に置き、マウスが探索行動を開始するまでの時間 (starting latency)、装置に置かれてから小部屋に入るまでの時間 (entering latency)、マウスが装置内に置かれてから給水ノズル (ノズルの床からの高さ; 7.5 cm) を見つけて水を飲むまでの時間 (drinking latency)、およびマウスが給水ノズルのある部屋に入ってから給水ノズルを見つけて水を飲むまでの時間 (finding latency) を測定し、これらをマウスの基礎的な潜在学習能力・注意力の指標とした。また、区画線を横切った回数

(ambulation) を測定した。

4. Cliff avoidance test

実験装置として、1000 ml のビーカー (直径 11 cm, 高さ 15 cm) を使用した。マウスをビーカーの中央に置き、マウスがビーカーから降りるまでの時間 (jumping latency) を測定し、最大時間を 10 分間とし、これを衝動性の指標とした。

5. HPLC 法

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

6. 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 による分散分析を行い、群間比較には、Student's t-test、Bonferoni の多重比較検定法および χ^2 乗検定法を用いた。なお、危険率が 5%未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

I. 胎生期 PCP 暴露による成体期の行動への影響

前年度までの結果より、胎生期における PCP の投与は、神経発達を障害し、主にグルタミン酸作動性神経系に影響を与えることが明らかとなったため、本年度はグルタミン酸作動性神経系に焦点を当て、より詳細に検討を行った。

まず、グルタミン酸神経系機能の障害の確認として、成体の前頭皮質において 2 種のグリア

細胞上グルタミン酸トランスポーターの発現量の検討を行った。その結果、Glutamate transporter 1 (GLT-1) の発現量に変化はなかったものの、Glutamate-aspartate transporter (GLAST) の発現量が有意に増加していた (Fig.1)。

前年度までの解析で明らかになったグルタミン酸作動性神経細胞数の減少、さらに、トランスポーターGLAST の発現増加により、シナプス間隙のグルタミン酸量の減少が生じ、グルタミン酸

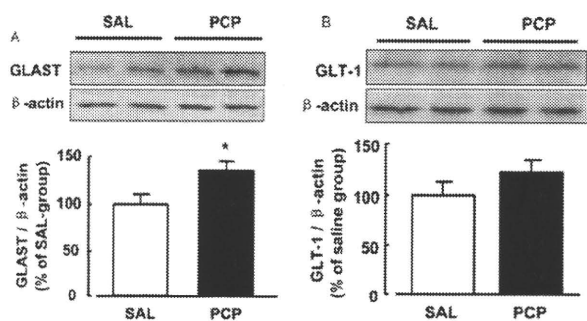


Fig. 1 Changes in the expression of glutamate transporters in the prefrontal cortex of prenatal PCP-treated mice.

Representative western blot bands for the expression of GLAST, GLT-1 and GFAP. The amount of protein (30 μg/well) loaded was normalized to that of β-actin. Results are represented as the level of GLAST (A), and GLT-1 (B) in the prefrontal cortex. *P < 0.05 compared with the prenatal SAL-treated group. Data are expressed as the mean ± S.E.M. for 6-7 mice in each group (Student's t-test).

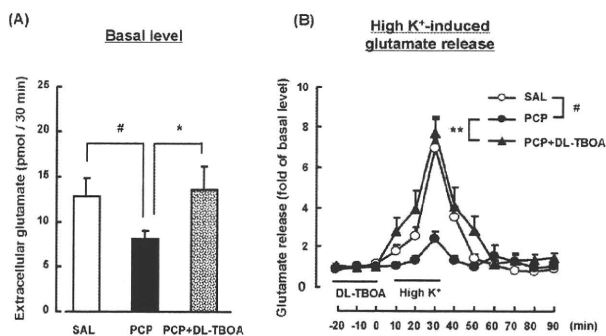


Fig.2 Effects of DL-TBOA on the reduction of glutamate release in the prefrontal cortex of prenatal PCP-treated mice.

DL-TBOA (1 mM) was administered through a microdialysis tube into the prefrontal cortex of mice for 30 min (μl/min). After the administration, basal glutamate release (A) and K⁺-evoked (100 mM) glutamate release (B) in the prefrontal cortex of prenatal SAL- or PCP-treated mice were determined. Data are expressed as the mean ± S.E.M. for 7 mice in each group. #p < 0.05 compared with the prenatal SAL-treated group; *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the prenatal PCP-treated group. (one-way ANOVA or repeated one-way ANOVA with Bonferroni's test).

神経伝達に異常を起こしている可能性が考えられる。そこで、実際に前頭前皮質内においてグルタミン酸神経伝達の障害が生じているかについて明らかにするため、マイクロダイアリシス法を用い、グルタミン酸細胞外遊離量の測定を行った。その結果、胎生期 PCP 暴露群において、グルタミン酸細胞外基礎遊離量、及び高カリウム刺激後の遊離の有意な減少が認められた (Fig. 2)。

また、前年度、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剤 DL-TBOA を前頭前皮質へ直接投与を行ったところ、PCP 投与群において認められた行動障害が改善された。そこで、DL-TBOA の改善効果はグルタミン酸機能の正常化を介したものかを確認するために、DL-TBOA 還流時のグルタミン酸遊離量の測定を行った。その結果、PCP 投与により減少したグルタミン酸遊離量の減少は、DL-TBOA 正常レベルにまで改善されることが明らかとなった (Fig. 2)。

II. 簡便かつ安価な行動評価系を用いた胎生期のニコチン暴露が情動行動および認知機能に与える影響の研究

まず、胎生期 GD14-P0 におけるニコチン暴露が、成体期の行動に与える影響を評価するため、P28、P56 において、各種行動解析を行った。その結果、ニコチン暴露群では、明暗箱試験、ビー玉覆い隠し試験、新奇抑制性摂食試験、社会性回避チューブ試験、高架式十字迷路試験において不安障害が認められた。また、社交性試験、社交性新奇嗜好試験において社会性行動の低下、Y 字型迷路試験、One-trial delayed alteration test、Object-based attention test、プレパルス抑制試験において注意機能障害が示唆された。新奇物体認知試験を除く、その他の行動試験すべてにおいて顕著な障害が認められ、再現性が確認できた。(Table 1)

上記行動試験に加え、水探索試験、断崖回避試

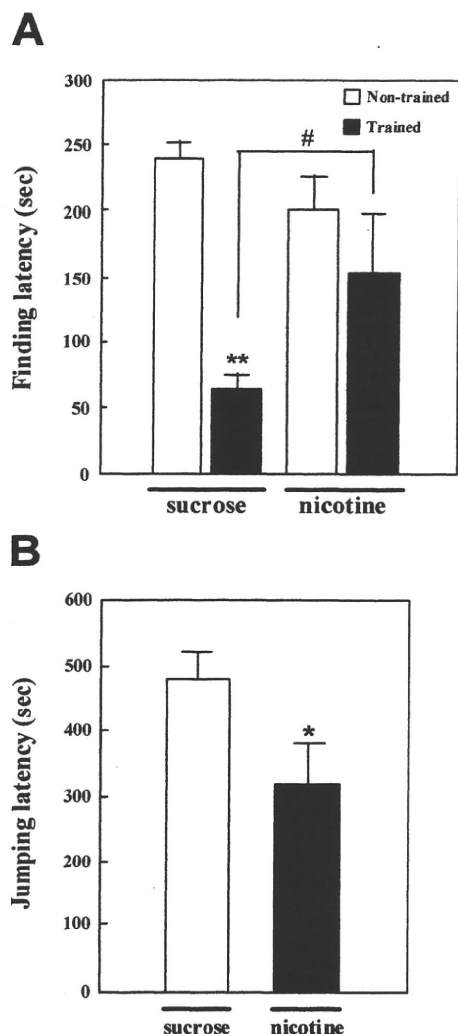


Fig. 3 Effect of prenatal nicotine exposure on the behaviors in water finding and cliff avoidance tests in adult mice
 (A): In water finding test, prenatal nicotine exposure prolonged finding latency in trained male mice compared with trained prenatal sucrose exposed mice. Data are the means \pm SEM (n=7-8). ** p <0.01 vs. non-trained sucrose, # p <0.05 vs. trained sucrose group (Bonferroni's test) (B): In cliff avoidance test, prenatal nicotine exposure shortened jumping latency in male mice. Data are the means \pm SEM (n=16). * p <0.05 by Student's t -test

験についても検討を行ったところともにニコチン暴露群に障害が認められた(Fig.3A, B)。

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

HPLC を用い成体期前頭皮質におけるモノアミン含量の測定を行ったところ、ニコチン暴露群の P 28 および P56 においてノルアドレナリン代謝産

物である MHPG の低下およびノルアドレナリンの代謝回転の低下が認められた。海馬ではこのような変化は認められなかった。(Table 2 and 3)

D. 考察

I. 胎生期 PCP 暴露による成体期の行動への影響

前年度までの結果では前頭皮質内においてグルタミン酸の機能低下を示唆するデータが数多く得られていた。そこで、本年度は、直接グルタミン酸量を測定するというマイクロダイアリシス法を行い、グルタミン酸神経伝達の異常の検出を試みた結果、実際にグルタミン酸基礎遊離量の低下や、刺激後のグルタミン酸遊離量の低下などが認められた。また、その現象を支持するグリア細胞上グルタミン酸トランスポーターの発現増加など生化学的な変化も見出された。

以上の結果は、胎生期 PCP 暴露は継続的なグルタミン酸神経系の機能低下をもたらし、統合失調様の行動異常を惹起したことを示唆する。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⁷⁾、さらにグルタミン酸トランスポーターの発現増加などが認められたことから⁸⁾、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

Table 1 Effect of prenatal nicotine exposure on the emotional and cognitive behaviors of male offspring

Behavioral tests	Time-windows					
	G0 - P7	G0-G13	G14 - P7	P0 - P7	G0-P0	G14-P0
Light and dark box test	=	=	=	=	+	+
Marble burying behavior test	+	+	+	=	+	+
Novelty-suppressed feeding test	+	=	+	=	+	+
Social avoidance tube test	+	=	+	=	=	+
Sociability test	+	=	+	=	+	+
Preference for social novelty test	+	=	+	=	+	+
Y maze test	+	=	+	=	+	+
One-trial delayed alternation	+	=	+	=	+	+
Novel object recognition test	=	=	=	=	=	=
Object-based attention	+	=	+	=	+	+
Elevated plus maze test	+	=	+	=	+	+
Pre-pulse inhibition test	+	+	+	+	+	+

+ : significantly impaired; = : not significantly impaired.

Table 2 Monoamine Changes in the Brain (P28)

A. Monoamine Contents in the Brain (sucrose v.s. nicotine) Values are expressed as ng/g wet weight and are the means \pm s.e.m							
	NA	MHPG	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
prefrontal cortex							
sucrose	447.90 \pm 31.69	1337.80 \pm 98.50	1579.73 \pm 417.57	189.64 \pm 40.34	320.60 \pm 51.92	706.20 \pm 67.35	423.97 \pm 49.36
nicotine	491.76 \pm 17.72	671.45 \pm 49.00**	873.04 \pm 207.51	114.62 \pm 22.04	194.45 \pm 35.68	583.51 \pm 24.26	371.64 \pm 27.53
Hippocampus							
sucrose	555.89 \pm 23.89	757.67 \pm 33.11	34.42 \pm 5.22	0.00 \pm 0.00	47.34 \pm 3.23	833.79 \pm 32.09	819.34 \pm 44.60
nicotine	518.74 \pm 20.62	717.74 \pm 36.72	33.08 \pm 4.87	6.67 \pm 3.47	34.47 \pm 7.26	810.48 \pm 40.81	774.04 \pm 37.29
B. Monoamine Turnover in the Brain (sucrose v.s. nicotine)							
	MHPG/NA	DOPAC/DA	HVA/DA	5-HIAA/5-HT			
prefrontal cortex							
sucrose	2.99 \pm 0.09	0.16 \pm 0.03	0.33 \pm 0.10	0.60 \pm 0.05			
nicotine	1.36 \pm 0.07**	0.15 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03	0.63 \pm 0.03			
Hippocampus							
sucrose	1.37 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.67 \pm 0.18	0.99 \pm 0.05			
nicotine	1.39 \pm 0.05	0.18 \pm 0.11	1.15 \pm 0.24	0.96 \pm 0.04			

Table 3 Monoamine Changes in the Brain (P56)

A. Monoamine Contents in the Brain (sucrose v.s. nicotine) Values are expressed as ng/g wet weight and are the means \pm s.e.m							
	NA	MHPG	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
prefrontal cortex							
sucrose	544.54 \pm 26.86	973.04 \pm 144.36	1021.02 \pm 264.29	154.96 \pm 42.15	279.09 \pm 65.43	914.39 \pm 69.96	811.42 \pm 94.79
nicotine	613.25 \pm 37.16	391.35 \pm 43.50**	614.93 \pm 179.86	85.84 \pm 22.69	228.41 \pm 45.88	1006.90 \pm 71.99	911.92 \pm 94.91
Hippocampus							
sucrose	879.86 \pm 98.58	702.28 \pm 69.69	196.30 \pm 70.34	65.17 \pm 28.42	228.42 \pm 97.22	1402.98 \pm 169.99	1637.16 \pm 259.3
nicotine	700.95 \pm 65.32	596.09 \pm 108.37	440.70 \pm 258.94	74.88 \pm 36.12	177.51 \pm 66.27	1235.09 \pm 161.89	1433.36 \pm 271.4
B. Monoamine Turnover in the Brain (sucrose v.s. nicotine)							
	MHPG/NA	DOPAC/DA	HVA/DA	5-HIAA/5-HT			
prefrontal cortex							
sucrose	1.79 \pm 0.28	0.16 \pm 0.09	0.68 \pm 0.36	0.89 \pm 0.07			
nicotine	0.64 \pm 0.06**	0.17 \pm 0.05	0.75 \pm 0.33	0.91 \pm 0.07			
Hippocampus							
sucrose	0.83 \pm 0.08	0.33 \pm 0.12	1.66 \pm 0.48	1.18 \pm 0.15			
nicotine	0.82 \pm 0.12	0.19 \pm 0.11	1.16 \pm 0.37	1.15 \pm 0.10			

いる⁹⁾(Table 4)。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。

Table 4 NMDA 受容体拮抗作用をもつ化合物

▽ NMDA受容体機能阻害の報告のある、食品に含まれる化合物	
化合物	備考
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。
エチレングリコール	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。

[Biosci. Biotech. Biochem., (1996) 60, 434-438]

▽ 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
チゾニルピド	抗痙攣薬
CPP	抗痙攣薬
メサドン	鎮痛薬
ママンチン	抗ウイルス薬、アルツハイマー病治療薬
アマタジン	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
デキストロトルファン	鎮咳薬
硫酸マグネシウム液	血清電解質

II. 簡便かつ安価な行動評価系を用いた胎生期のニコチン暴露が情動行動および認知機能に与える影響の研究

妊娠中の喫煙は脳の発達を障害し、子供の情動機能や認知機能障害を引き起こすため近年の健康問題として多く取り上げられてきている。臨床研究により妊娠中に喫煙していた母親から生まれた子供は不安症や注意欠陥多動性障害、学習遅滞、認知機能障害などの神経行動障害を引き起こすことが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。タバコには多数の成分が含まれているが胎児の脳発達に影響を及ぼすのは主にニコチンであると考えられ、胎盤を通過し、胎児のnAChRに作用すると考えられる。胎児期に喫煙による影響を受けると脳発達に重要な神経回路の発達障害を引き起こし、神経行動および機能障害に繋がると動物モデルを用いた研究により示唆されている^{13,14)}。発達期のニコチン暴露による脆弱性はニコチンによるnAChRの制御機構の破綻が関与していると示唆される。nAChRは中枢神経系発達の重要な役割を果たし胎生期や青年期における脳の成熟の制御を担っている¹⁵⁾。発達期のいくつかの時期でnAChRは受容体の構成サブユニットの発現量を変化させ

神経分化やシナプス形成を制御している¹⁶⁾。このような神経発達におけるnAChRの重要な役割は内在性の神経伝達物質であるアセチルコリンにより調節されている。そのため、発達期におけるnAChRの過剰な刺激は脳発達に影響を及ぼし、成体期にまで続く長期的な障害を引き起こすことが示唆される。

また、胎生期でのnAChRの発現量や分布に時期により違いがあることから¹⁷⁾、胎生期におけるニコチンの暴露時期によりその影響は大きく異なることが示唆される。

以上のことから、これまでのある時期のみにニコチン暴露を行いその影響を評価するだけでなく、妊娠期をいくつかの時期に分けそれぞれの時期でのニコチン暴露の影響についての検討を行うことでよりニコチン暴露の影響が強い時期で評価することが重要であると考えられる。

H21年度までの本研究により胎生期GD1-GD13、GD14-P0、G1-P0、GD14-P7、GD1-P7、P0-P7の6つの時期に分けて各行動解析を行ったところ、暴露される時期や性別によりその障害の程度に大きな差があることが明らかとなり、GD14-P0の期間にニコチン暴露された雄マウスにおいてもっとも顕著に不安などの情動障害および注意機能障害が認められた。そのため今年度はGD14-P0でのニコチン暴露が不安などの情動障害および注意機能障害に与える影響の再評価を行うとともに、成体期での行動障害が認められる要因を前頭皮質および海馬のモノアミン含量の変化の検討を行うことで明らかにした。

さらに本研究を行う上で、簡便かつ安価に情動機能や学習・記憶機能、また評価が難しいとされている注意機能についても評価可能である行動試験の確立を果たした。これら試験系を用いれば、より詳細に胎生期のニコチン暴露が情動機能および注意機能にどのような影響を与えるかの評価が可能になると考えている。