

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 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

平成 20 年～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

総合研究報告

脳神経系の発達がダイナミックに起こる周産期は化学物質に対して脆弱である。特に、神経情報伝達の基盤となる受容体は胎児期から新生児期にかけて形成されるため化学物質に曝露される危険性が最も高いと考えられる。したがって、神経伝達異常を引き起こす化学物質が子供の精神発達へ悪影響を及ぼすことは明白であるが、その詳細なメカニズムは不明であり、動物実験等による行動評価系も確立されていない。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ニコチン受容体およびグルタミン酸受容体に着目して以下の研究を行った。

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。加えて、当研究室にて注意機能・衝動性の定量的な評価が可能な 5-選択課題反応時間課題の確立を試み、いくつかの検討結果を得ている。この評価法を用いて、胎生期のニコチン曝露が情動行動および認知機能に与える影響について調べた。妊娠 1 日目より妊娠 13 日目(GD1-GD13)、妊娠 14 日目より出生日(GD14-P0)、G1-P0、GD14-P7、GD1-P7、P0-P7 のように妊娠期を分け、それぞれの時期にニコチン曝露されたマウスを用いて行った。その結果、妊娠 14 日目より出生日までが最もおけるニコチンの曝露に感受性が高いことが明らかとなった。この時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。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 (GD6.5-P0) に曝露し、精神発達に及ぼす影響について検討した。生後 28 日目 (P28)、P56 の時点で行動試験を行った結果、PCP 投与群では記憶障害、意欲の低下および情報処理機能障害など統合失調症様の著しい行動異常を呈した。また、胎生期における PCP の曝露は、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惹起した。他の非競合的 NMDA 受容体アンタゴニストであるジブシルピリン (MK-801) を胎生期 (GD6-P0) に処置したマウスでも生後に記憶障害および情動障害が観察された。

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、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。生後 2 日目から 6 日目までの 5 日間マウスに合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を皮下投与して異常免疫応答モデル動物を作製した。10 週齢に達した polyI:C 処置マウスは情

動行動、学習記憶・認知、社会性行動の異常を示した。また、polyI:C 処置マウスでは海馬における脱分極性グルタミン酸遊離の異常が認められ、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 interferon-induced transmembrane protein 3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、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、aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1)、collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) を候補タンパク質として同定した。

慢性社会ストレスまたは polyI:C と PCP を複合的に負荷して、その後に惹起される情動・認知障害について検討した。慢性社会ストレス負荷マウスおよび PolyI:C 単独処置マウスで認められる精神機能障害は PCP 投与により増強した。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いることを見出した。

本研究により 簡便かつ安価であるにも関わらず、再現性も高く、非常に有用な評価系を確立することができた。これら行動評価系を用いて、グルタミン酸受容体拮抗薬（フェンシクリジン、MK-801）やアセチルコリン受容体作動薬（ニコチン）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、化学物質による免疫系など生体との相互作用を介した精神発達障害が引き起こされることを明らかにした。今後は、我々の開発した行動評価系を他の化合物にも応用するとともに治療薬・予防法を考案する。本研究によって得られる成果は 化学物質による固有の毒性と化学物質全般に共通する毒性の両方に対する体系的な評価手法として大いに役立つものと思われる。

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
アルカムトルソン・名城大学薬学部
・リサーチレジデント

研究協力者氏名・所属機関及び職名

毛利彰宏・名城大学薬学部・研究員、
・名古屋大学・GCOE 特任助教
鳥海和也・名城大学薬学部・研究員
陸 玲玲・名城大学薬学部・研究員
衣斐大祐・名城大学薬学部
・日本学術振興会特別研究員
青山雄紀・名城大学薬学部・大学院生
安藤 雄・名城大学薬学部・大学院生
肥田裕丈・名城大学薬学部・大学院生

A. 研究目的

化学物質の精神毒性には、それぞれの化学物質に固有の物理化学的な性質に基づく毒性と化学物質全般に共通する生体との相互作用に基づく影響があると考えられる。一方、脳神経系の発達がダイナミックに起こる周産期は化学物質に対して脆弱である。特に、神経情報伝達の基盤となる受容体は胎児期から新生児期にかけて形成されるため化学物質に曝露される危険性が最も高いと考えられる。

統合失調症、注意欠陥・多動性障害（ADHD）や広汎性発達障害などの精神疾患は、生得的に持っていた遺伝的素因に加えて発生・発達過程における環境的要素（化学物質曝露、感染、ストレスなど）が相互的に作用して発症すると考えられている。例えば、妊娠中に喫煙した母親から生まれた子供は ADHD の発症率が高いことから、タバコの主成分であるニコチンが子供の脳に作用するこ

とが示唆されている (Am J Psychiatry 160: 1028-1040, 2003)。また、実験動物において、グルタミン酸受容体拮抗薬を母親に投与すると子供が発育後に意欲の低下、認知障害、コミュニケーション障害など統合失調症様の行動が誘発されることも分かってきた。さらに、広汎性発達障害患者ではアセチルコリン受容体数が減少していることが報告されている (Brain 125: 1483-1495, 2002)。したがって、神経伝達異常を引き起こす化学物質が子供の精神発達へ悪影響を及ぼすことは明白であるが、その詳細なメカニズムは不明であり、影響を検討する行動評価系も確立されていないのが現状である。

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グルタミン酸受容体およびアセチルコリン受容体に着目し、実験動物を用いた行動評価系を確立する。また、化学物質による精神毒性の発現機序を分子レベルで解明し、有害物質による精神毒性の早期発見と治療方法の開発を可能にする研究を目指す。

B. 研究方法

本研究では、表1に示した簡便で安価な、どこでも誰でも行える行動評価系を試行し、再現性や感度を確認した。化学物質による神経発達物質受容体を介した精神毒性発現機序を解明するために、アセチルコリン受容体、グルタミン酸受容体に対して選択的に作用する化合物 (アセチルコリン受容体作動薬ニコチン、グルタミン酸受容体拮抗薬フェンシクリジン (PCP) および MK801) を、周産期のマウスに投与して神経発達にどのような影響をおよぼすかを上記の行動評価系を用いて検討した。異常免疫応

答を惹起する化合物である polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を用いて化学物質による免疫系を介した精神発達障害機構についても解析した。また、各化合物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り調べた。

倫理面への配慮

本実験における動物実験は名城大学動物実験指針、名古屋大学医学部動物実験指針、文部科学省動物実験指針および Principle of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985) に準じ、各研究機関の動物実験委員会で承認された上で行った。遺伝子組み換えを伴う実験

表1. ニコチン暴露による精神発達への影響

行動指標(行動試験)	日齢					
	GD0-P7	GD0-P0	GD0-GD13	GD14-P7	GD14-P0	P0-P7
不安(明暗箱)	=	+	=	=	+	=
不安(ガラス玉覆い隠し)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
不安(新奇環境摂食抑制)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
不安(社会回避)	(雄のみ)	=	=	(雄のみ)	(雄のみ)	=
不安(高架式十字迷路)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
社会性(社交性)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
社会性・不安(社交的新奇嗜好)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
短期記憶(Y字型迷路試験)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
長期記憶(新奇物体認識)	=	=	=	=	=	=
空間注意力 (一試行遅延型自発交替行動)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	(雄のみ)	=
視覚的注意力(物体注意)	(雄のみ)	+	=	(雄のみ)	+	=
感覚情報処理(プレパルス抑制)	(雄のみ)	+	(雄のみ)	(雄のみ)	(雄のみ)	+
潜在学習・注意力(水探索)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(雄のみ)	N.D.
衝動性(断崖回避)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(雄のみ)	N.D.

+: 障害あり; =: 障害なし; N.D.: データ無

については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、各研究機関の組み換え DNA 実験に関する委員会で承認された上で行った。

C. 研究結果

1. 簡便で安価な情動・認知行動評価法の確立 (鍋

島俊隆、アルカムトルソン)

表1に示した各行動について、評価するための条件等を検討した。この方法で化学物質の情動・認知行動毒性を、誰でもどこでも評価できることを確認した。

2. ニコチンの周産期暴露による精神発達障害機構に関する研究 (鍋島俊隆、アルカムトルソン)

ニコチンの神経毒性が一番発現し易い時期を調べるために、周産期を胎生 1 日目—生後 7 日目 (GD1-P7)、胎生 1-13 日目 (GD1-GD13)、胎生 14—生後 7 日目 (GD14-P7)、胎生 14—生後 0 日目 (GD14-P0)、生後 0 日目—7 日目 (P0-P7) の 5 期に分け、母親のニコチン摂取が仔マウスの精神発達にどのような影響をおよぼすかを、上記の評価法を用いて行動薬理的に 4-8 週齢のマウスで検討した。ニコチン暴露群では、明暗箱試験、ビー玉覆い隠し試験、新奇環境摂食抑制試験、社会性回避試験、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、社交的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、一試行遅延型自発交替行動試験、物体注意試験、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。これらの行動試験に加

え、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、ともにニコチン暴露群に潜在学習・注意および衝動性の障害が認められた。さらに、GD1-P7、GD14-P7、GD14-P0 では情動性に障害が認められ、この情動性障害は母親がニコチンを GD14-P0 に摂取した場合で最も顕著に認められた (表1)。

つぎに、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およぼし、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。成体期マウスの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 P28 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。一方、海馬ではモノアミンおよび代謝産物含量の有意な変化は認められなかった。

3. PCP の周産期暴露による精神発達障害機構に関する研究 (鍋島俊隆、島海和也、陸玲玲)

胎生期 (GD6.5-P0) の PCP 暴露による精神発達への影響を経時的に調べた結果、PCP 投与群は、新規物体認識試験において認知記憶障害、Y 字迷路試験において短期記憶障害、強制水泳試験において無動時間の延長、プレパルス抑制試験におい

て情報処理機能障害が確認され、統合失調症様の著しい行動異常を示した (表2)。また、P56 における PCP 投与群の前頭皮質では、NMDA 受容体のサブユニットのひとつである NR1 のリン酸化レベルおよびグルタミン酸遊離量が有意に減少していた。グルタミン酸機能を亢進させる目的で、D-セリンおよび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、PCP 投与群で認められる統合失調症様の行

表2. NMDA受容体拮抗薬による精神発達への影響

測定項目	PCP			MK801
	胎生期	4週齢	7-8週齢	7-8週齢
行動指標(行動試験)				
学習・記憶(新奇物体認知試験)	-	障害	障害	障害
意欲(強制水泳試験)	-	障害	障害	±
感覚情報処理(プレパルス抑制試験)	-	-	障害	-
不安(高架式十字迷路試験)	-	-	-	障害
社会性(社会的相互反応試験)	-	-	-	障害
NMDA受容体NR1サブユニット				
タンパク発現	-	-	増加	-
リン酸化	-	-	減少	-
神経細胞数	-	減少	減少	-
神経前駆細胞数	減少	-	-	-

母マウス(妊娠後6日目から出産前日まで)にフェンシクリジン(PCP, 10 mg/kg)またはMK801(0.2 mg/kg)を処置した。薬物処置された母マウスから生まれた仔マウスについて生後4または7-8週齢時に行動試験を行った。-:データなし、±:変化なし

動障害の一部は改善した。以上の結果は、胎生期 PCP の投与がグルタミン酸機能を障害する可能性を示唆している。

次に、PCP の投与が周産期の神経発生に与える影響を組織化学的解析により検討したところ、グルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞が分裂障害を生じており、成体の前頭前皮質において、グルタミン酸作動性神経数の減少が認められた。さらに、この分裂障害の原因を明らかにする目的で、胎生期 PCP 暴露による神経前駆細胞内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数種類の遺伝子の発現が有意に減少した。

4. 妊娠後期における MK801 暴露が生後の精神機能におよぼす影響 (間宮隆吉)

ICR 系および C57BL/6 系雌性マウス (10 週齢) の性周期を確認後に交配させ、妊娠後 6 日目から出産前日まで MK801 (0.02 および 0.2 mg/kg) を処置した。薬物処置された母マウスから生まれた仔マウスについて生後 5 週および 7 週に各種行動試験を行った。MK801 (0.02 mg/kg) を妊娠マウスに投与しても成熟仔マウスの行動に顕著な変化は認められなかった。MK801 (0.2 mg/kg) を投与したマウスでは新奇物体認知試験、高架式十字迷路試験および社会的相互反応試験において、生理食塩液投与群と比べて障害が観察された (表 2)。

5. 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 (野田幸裕)

実験動物の発生・発達過程において環境因子としての化学物質 (免疫異常発現薬・精神異常発現薬など) や慢性社会敗北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性および認知障害について検討した。

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。慢性社会ストレスによる社会性行動の障害は 7 日間の PCP 連続投与により増強された。したがって幼若期のストレス暴露は成体期まで遷延し、成体期の精神機能異常やグルタミン酸作動性神経機能の低下を増悪させることが示唆された。

PolyI:C 単独処置マウスでは軽度の認知障害が認められるのみであったが、PCP 急性投与による運動過多および 7 日間の PCP 連続投与によって情動・認知障害は増強された。したがって新生仔期における免疫異常も成体期まで遷延し、グルタミン酸作動性神経機能を低下させることによって行動異常が顕在化することが示唆された。

6. 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 (山田清文)

新生仔マウスに polyI:C を連続投与すると、4 週齢までは若干の体重減少 (10% 以下、 $p < 0.05$) が観察されたが、それ以降はコントロール群との差は認められなかった。10 週齢の polyI:C 処置マウス脳の Nissl 染色では脳細胞の形態・層構造に異常は認められなかった。系統的行動解析の結果、polyI:C 処置マウスには不安様行動の増加、認知機能の障害および社会性行動の異常が認められた (表 3)。さらに、*in vivo dialysis* による解析より、

表3. 周産期免疫異常応答による精神発達への影響

測定項目	新生仔期ポリC投与マウスの変化
行動指標(行動試験)	
学習・記憶(新奇物体認知試験)	障害
感覚情報処理(プレパルス抑制試験)	障害
不安(オープンフィールド試験)	増加
社会性(社会的相互反応試験)	減少
グルタミン酸放出	異常

生後2日目から6日目まで新生児マウスにポリCを連続皮下投与し、成長後(10週齢)のマウスの学習記憶および情動行動を行動薬理学的に解析した。また、学習記憶に重要な役割を担っている神経伝達物質グルタミン酸の活動依存的な細胞外放出の変化についても検討した。

海馬におけるグルタミン酸基礎遊離の増加および脱分極性遊離の障害が認められた (表 3)。PolyI:C 処置マウスの学習記憶・情動行動の異常は抗精神

病薬（ハロペリドール、クロザピン）、ニコチンあるいはD-セリンにより改善した。

PolyI:C 最終投与 2 時間から 24 時間後において、統合失調者や自閉症との関連性が示唆されている *interferon-induced transmembrane protein 3 (ifitm3)* の mRNA レベルが顕著に増加した。PolyI:C 処置マウス脳において *ifitm3* タンパク質の増加も確認され、*ifitm3* はアストログリア細胞に局在し、神経細胞やミクログリア細胞には認められなかった。

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 処置による脳機能障害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。

7. 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 (永井拓)

PolyI:C 投与による精神発達障害のメカニズムを調べるため、新生仔期に polyI:C を投与した成獣マウスの海馬におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。二次元電気泳動によって海馬細胞質分画に含まれるタンパクを分離した結果、約 1000 個のスポットが検出された。PolyI:C 投与群において発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加したスポットが 1 個、逆に発現がコントロール

群に比べて 0.6 倍減少したスポットが 1 個検出された (図 1A)。発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1)、collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) であると同定された。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、同様の発現変化が認められた。

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ブロットティングを行った。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 (図 1B)。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 (図 1B)。さらに、polyI:C 最終投与 24 時間後のマウスの海馬において、ALDH1L1 の発現が増加し、CRMP5 の発現が減少していた。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。

D. 考察

本研究においては、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

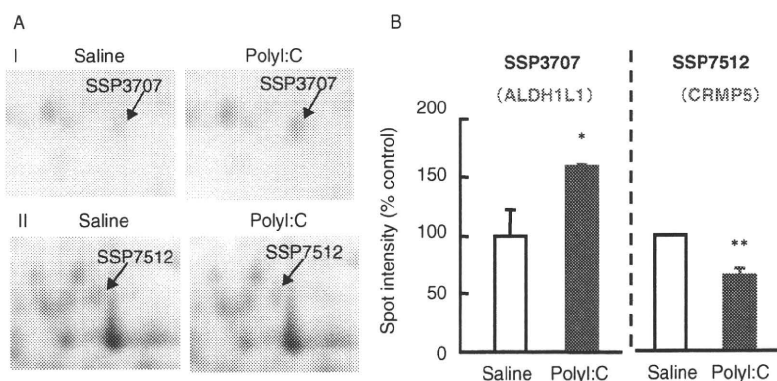


図1. 新生仔期にpolyI:C処置したマウス海馬におけるタンパク発現変化

A、発現に変化が認められたスポット。B、定量解析結果。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

立を果たした。加えて、当研究室にて注意機能・衝動性の定量的な評価が可能な5-選択課題反応時間課題の確立を試み、いくつかの検討結果を得ている。

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期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。これまでの報告は、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研究である。本研究では、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、我々の確立した行動評価法を使って検討を行い、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を明らかにした。特に、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。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。

さらに、胎生期にNMDA受容体非競合的拮抗薬PCPおよびMK801を暴露したマウスでは、発達に伴い異常行動が発現することを行動評価法で確認することができた。また、PCPモデルで認められた行動異常はグルタミン酸機能亢進薬により改善したこと、NR1発現量の増加とそのリン酸化レベルの減少が認められたことから、グルタミン酸機能の低下を生じている可能性が示唆された。この原因としては、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。以上の結果より、母体へのNMDA受容体を拮抗する化学物質を含む食品、医薬品の摂取、投与は、子供の神経発達を障害する可能性があることが明らかとなった。

環境的要因の一つである社会ストレスをマウスの発達過程に負荷した場合、高次精神機能にどのような影響を与えるか行動解析した。その結果、神経発生・発達過程のマウスに社会ストレスを負荷すると、社会性行動が障害されることが示唆された。現在、本マウスの神経細胞および神経新生の変化について解析中である。また、新生仔期polyI:C処置は成体期のフェンシクリジン投与による行動量増加を亢進させることから発達期における免疫異常は成獣期まで遷延して影響を与えることが示唆される。

生体との相互作用を介した化学物質による神経精神発達障害の機構解明を目的として、産期における異常免疫応答が胎児・新生児の脳神経精神発達におよぼす影響を検討した。新生仔期にpolyI:Cを連続処置したマウスは、不安様行動の増加、認知機能障害、社会性行動の異常および海馬における脱分極誘発性グルタミン酸遊離の障害を示した。初代培養神経細胞およびアストログリア細胞を用いた実験により、polyI:C処置による神経発達障害にはifitm3を介したアストログリア細胞の異常応答とアストログリア細胞-神経細胞間相互作用の障害が関与していることが示唆された。したがって、胎児期あるいは新生児期における化学物質への暴露により異常な免疫応答が惹起されると、神経発達が障害され成熟後の脳機能に異常が生じる可能性がある。

PolyI:Cを新生仔期に投与したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した結果、ALDH1L1およびCRMP5を同定した。ALDH1L1は10-formyltetrahydrofolate、NADP⁺およびH₂Oからtetrahydrofolate、CO₂およびNADPHへ変換する酵素である。CRMP5は神経細胞の分化および軸

索の伸長に關与する分子である。初代培養神經細胞において、CRMP5 タンパクは細胞体および神經突起の先端部分に高発現していたことから、神經發達障害のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では腦高次機能の發達に重要な役割を果たしていると考えられる神經伝達物質受容体に着目し、情動、認知機能および注意力の変化を簡便に評価できる方法について検討した。その結果、アセチルコリン受容体作動薬（ニコチン）およびグルタミン酸受容体拮抗薬（フェンシクリジン、MK-801）が情動性、学習・記憶、注意力などの精

神發達障害を誘発することを明らかにし、これらの行動異常を感度良く評価できる方法を確立することができた。また、異常免疫応答を惹起する化合物（polyI:C）を用いて、免疫系など生体との相互作用を介した化学物質による精神發達障害が引き起こされることを明らかにした。さらに、各化合物による精神發達障害の發現機序に関する知見が得られつつある。今後は、これらの行動評価方法を応用することによって、化学物質の精神毒性を効率よく評価し、治療薬および予防法を提案することが必要である。

F. 研究発表

(各分担研究者の報告書を参照のこと)

平成 20～22 年度 分担研究者総合報告

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、青山雄紀、陸玲玲、Alkam Tursun

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が攪乱され、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) と煙草の主成分であるニコチンを周産期のマウスに暴露させ、その影響について行動学的、神経科学的に明らかにすること、また、それらマウスを用い、神経発達異常を検出することが可能な、安価で簡便な行動評価系を確立することを目的とした。

まず、妊娠 ICR マウスへ胎生 6.5 日目 (E6.5) より出生まで PCP の皮下投与を行い、その仔マウスに対し生後 28 日目 (P28)、P56 の時点で各種行動試験を行った結果、PCP 投与群では、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た。

また、妊娠 1 日目より妊娠 13 日目 (GD1-GD13)、妊娠 14 日目より出生日 (GD14-P0)、G1-P0、GD14-P7、GD1-P7、P0-P7 のように妊娠期を分け、それぞれの時期にニコチンを暴露したところ、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 の期間にニコチンを暴露された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た。さらに、神経科学的な解析により、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。

さらに、ニコチンを暴露されたマウスを用い、3 種類の新たな行動評価系 (Social avoidance tube test、One-trial delayed alternation test、Object-based attention test) の確立に成功した。これらの試験系は簡便かつ安価であるにも関わらず、再現性も高く、非常に有用な評価系であることが示唆された。

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奇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痙攣剤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、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

I. 胎生期PCP暴露が神経発達に与える影響

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 ℃、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. 新規物体認知試験

出生後 28 日目 (P28)、P56 の時点において、新規物体認知試験を行った。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、その値を探索試行性 (Exploratory Preference) として評価値とした。

4. Y字迷路試験

出生後 P28、P56 の時点において、Y字迷路試験を行った。1 本のアームの長さが 40cm、壁の高さ 12cm、床幅 3cm、上部幅 10cm の 3 本のアームがそれぞれ 120 度の角度で接続された Y字迷路を用いた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後、8 分間にわたって装置内を自由に散策させ、移動したアームの位置をその順に記録した。連続して異なる 3 つのアームを選択した組み合わせを算出し、アーム総進入回数から 2 を引いた値に対する割合を Alternation (%) として、評価値とした。

5. 強制水泳試験

出生後 P28、P56 の時点において、強制水泳試験を行った。水 (水温 22 °C、深さ 13 cm) の入ったシリンダー (直径 15 cm、高さ 20 cm) 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. プレパルス抑制試験

バックグラウンドとして 65dB のホワイトノイズの流れる防音箱の中に設置されたチャンバー (長さ 105 mm、内径 38 mm、外径 50 mm) 内に、マウスを入れ、10 分間慣れさせた後、測定を開始した。

(1) バックグラウンド: 65 dB ホワイトノイズのみ。(2) 驚愕反応: 40 ミリ秒続く本刺激音 (120 dB ホワイトノイズ) のみ。(3) プレパルス抑制: 20 ミリ秒プレパルス音 (74、78、86 dB ホワイトノイズ) を流した 100 ミリ秒後に、40 ミリ秒続く本刺激音 (120 dB ホワイトノイズ)。上記 (1) から (3) をランダムに、各 10 回ずつ試行し、本刺激音に対するチャンバー内での動きの最大値を、驚愕反応の程度として検出した。驚愕反応抑制率は、以下の式により算出した: 驚愕反応抑制率 (%) = $100 \times [1 - (\text{各プレパルスでの驚愕反応}) / (\text{プレパルスなしでの驚愕反応})]$

7. 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 40 cm) 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)。

8. D-セリンによる拮抗実験

D-セリン (Sigma) は P56 において各行動試験の 30 分前に、0.5 または 1.0 g/kg の容量で腹腔内に投与した。行動試験は、上記と同じ方法で行った。

9. 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

ール 2 分、50 %エタノール 1 分、超純水 1 分、染色液 [Cresyl violet acetate 0.5 g, H₂O 60 ml, 0.1 M 酢酸ナトリウム 6 ml, 0.1 N 酢酸] 90 秒-2 分、超純水 2 分、50 %エタノール 1 分、70%エタノール 1 分、85 %エタノール 1 分、95 %エタノール 1 分、100 %エタノール 1 分、100 %エタノール 1 分、キシレン 1 分、キシレン 1 分。

13. BrdU

各投与時期において、BrdU (50 mg/kg、Sigma) を PCP 投与の 3 時間後に腹腔内投与した。その後、各検出時期において、上記の方法で脳スライスを作成し、BrdU ラベリング&ディテクションキット II (Roche) により検出を行い、二次抗体として、Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG (Invitrogen)を使用した。染色後は AxioCam HRc (Carl Zeiss)により観察を行った。

14. 免疫組織化学染色

母マウス子宮より、胎生期仔マウスを出し、そのまま 4 % PFA/PBS に浸漬し固定を行った。その後、上記と同様の方法で、厚さ 8 μ m の脳スライスを作成し、乾燥させた。

スライド上の脳切片に、4 %PFA/PBS を載せ、室温で 15 分静置した後、PBS で洗浄した。その後、メタノールを載せ、室温で 20 分静置した後、完全に乾燥させ、Permeabilization パッファ [0.3 % Triton-X100, 100 mM Tris-HCl (pH7.6)]に 37 °C で 30 分間浸漬させた。その後、スライドガラスを Antimasking Solution (Vector) に移し、オートクレーブにより 105 °C で 2 分間、煮沸した。室温で完全に冷した後、PBS で洗浄し、Blocking Solution [10 % FBS, 0.2 % ブロックエース (雪印), PBS]を載せ、室温で 1 時間、静置した。その後、液を除去し、一次抗体液 [Blocking Solution に各抗体を添加したもの。Pax6: 1:1000 dilution, Pax6 Antibody #ab5790 Abcam, PCNA: 1:1000 dilution, PCNA Antibody

#M0879 DAKO cytometry, Tbr2: 1:1000 dilution, Tbr2 Antibody #ab23345, Abcam]を載せ、4 °C で一晩、静置した。スライドガラスを洗浄し、二次抗体液 [Blocking Solution に各抗体を添加したもの。抗マウス抗体: 1:1000 dilution, Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG #A11001 Invitrogen, 抗マウス抗体: 1:1000 dilution, Alexa Fluor® 568 Goat Anti-rabbit IgG #A11011 Invitrogen]を添加し、遮光し室温で 3 時間静置した。その後、スライドガラスを洗浄し、封入剤により封入を行い、AxioCam HRc (Carl Zeiss) により観察を行った。

15. 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。

16. 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。

17. マイクロダイアリシス法

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