

した。翌日、ダイアリシスプローブ (AI-6-1; 膜長 1 mm, エイコム) をガイドカニューレを介して挿入し、人工脳脊髄液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl and 2.3 mM CaCl₂) を 1.2 μl/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。

18. 統計解析

結果は平均値±標準誤差として示した。得られた結果は、one-way および two-way による分散分析を行い、群間比較には、Student's t-test および Bonferoni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が 5 % 以下の場合を有意差ありと判定した。

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±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、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. 明暗箱試験

明るい箱 (30 x 27 x 30 cm) と暗い箱 (15 x 27 x 30 cm) からなり、2 つの箱の間にはマウスが行き来できるような穴があけてある測定装置を用いた。また、明るい箱は 100 W の電球を用いて照らした。マウスを明るい箱に入れ、暗い箱へ侵入した時点から 5 分間試験を行い、暗い箱での滞在時間およびそれぞれの箱への移動回数を測定した。

4. ビー玉覆い隠し試験

本試験前日から床敷き (深さ 3 cm) を入れたケージ内 (26 x 21 x 15 cm) にマウスを入れて順化させる。試験の日に直径 1.5 cm のビー玉を 12 個等間隔でケージに並べ 15 分間放置し、その後 3 分の 2 以上ビー玉が隠れている数を数えて評価値とした。

5. 新奇抑制性摂食試験

本試験前日からマウスを絶食させ、絶食 24 時間後に本試験を行った。オープンフィールド (40 x 40 x 40 cm) 中央のろ紙 (直径 9 cm) の上に餌を置き、その装置内の隅にマウスを入れ、餌を食べるまでの時間を測定した。また、試験後自由に餌を 5 分間摂取させ、その摂食量も合わせて測定した。

6. 社会性回避チューブ試験

透明なチューブ (長さ 30 cm x 直径 3.5 cm) に性別が同じマウスを左右の穴から 1 匹ずつ入れチューブから追い出されたマウスを 0、チューブに残ったマウスを 1 とカウントし、評価値とした。

7. 社交性試験および社交性新奇嗜好性試験

それぞれの区画の間に直径 3.5 cm の穴が開いている移動可能な 3 つの区画からなる実験装置 (20 x 40.5 x 22 cm) にマウスを 10 分間入れ左右および中央での滞在時間をそれぞれ測定した(A)。その

後、左右どちらかの区画にカゴ (高さ 10 cm x 底面の直径 10.5 cm) をかぶせて逃げられないようにしたマウスを入れ、試験マウスを再び装置内で自由に探索させ、先ほどと同様にそれぞれの区画での滞在時間を 10 分間測定した(B)。次に新たなマウスを同様の方法で逃げられないようにカゴへ入れ、左右どちらか空いている方の区画へ置き、試験マウスを装置内へ入れて自由に 10 分間探索させそれぞれの区画での滞在時間を測定した(C)。Bのセッション時の滞在時間を社交性の指標として、Cのセッション時の滞在時間を社交性新奇嗜好性の指標とした。

8. One-trial delayed alteration

T字型迷路の実験装置 (アームの長さ 50 x 幅 4 x 高さ 12 cm) を用いた。マウスを装置内に入れ 30 秒間 1 本のアームを自由に探索させた。その後、自由にどのアームも移動できるようにさせ、初めて違うアームに侵入した時点でそのアームから 30 秒間出られないようにアームの入り口をブロックした。30 秒後、再びどのアームにも移動可能にし、マウスがはじめに入れられたアームに戻れば 0、今までに入ったことのないアームに入れば 1 とカウントし評価値とした。

9. Object-based attention

不透明のプラスチック板で区切られた探索区画 (40 x 40 x 22 cm) と試験区画 (40 x 20 x 22 cm) からなる実験装置を用いた。それぞれの区画に 6 分間ずつ入れ、環境に慣れさせた後、4 つの異なる物体を探索区画の中に設置し、マウスを 3 分間自由に探索させ、1 番目と 2 番目に探索行動を示した物体に対する探索時間を計測した (Training 試行)。その試行直後に、片方の物体を新奇物体に換え試験区画に置き、3 分間自由に探索させ、各物体に対する探索時間を測定した (Retention 試行)。全探索時間における新奇物体に対する探索時

間の割合を算出し、その値を探索嗜好性 (Exploratory Preference) として評価値とした。

10. Elevated-plus maze test

壁の高さが 20 cm、長さ 25 cm、幅 8 cm のアーム (closed arm) と同様の長さを持つ、壁のないアーム (open arm) を十字に組み合わせ、高さ 50 cm の位置に設置した実験装置を用いた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後 5 分間にわたって装置内を自由に散策させ、open arm での滞在時間の割合および arm に入った回数を測定した。

11. Water finding test

実験装置は灰色の木製オープンフィールド (30 x 50 x 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 x 10 x 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。

12. 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。

13. 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 ($20,000 \times g$, 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。

14. 統計解析

結果は平均値 \pm 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 暴露が神経発達に与える影響

1. 胎生期 PCP 暴露による成体期の行動への影響

まず、胎生期における PCP 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。

はじめに、新奇物体認識試験を行った。本試験は、マウスが新奇性を好むという習性を利用した試験で、マウスを二つの異なる形をした物体が設

置された装置内に入れて自由に探索させ (Training 試行)、その 24 時間後、片方の物体を新奇物体と置換し、再び探索させる (Retention 試行)。正常なマウスでは Training 試行における物体に対する探索時間に比べ、新奇物体に対する探索時間が増加することから、認知記憶を評価することができる系である。なお、統合失調症の主症状のひとつとして、この認知記憶能力の障害が知られている。この試験の結果、P28、P56 ともに PCP 投与群において、探索嗜好性の減少が確認され、認知記憶能力の低下が示された (Fig. 1)。

次に、Y 字迷路試験を行った。この試験は、マウスの自発的交替行動を利用し、短期記憶を評価することができる系である。自発的交替行動とは、Y 字迷路内を探索する際に、直前に入ったアームとは異なったアームに入ろうとする習性に基づく行動のことで、試験ではマウスが異なる 3 本のアームを連続して選択した割合を計測する。連続して異なるアームに進入するためには、少なくともその前に選択したアームを記憶している必要があるため、短期記憶を評価できると考えられている。この試験の結果、P28、P56 ともに PCP 投与群において、短期記憶能力の低下が示された (Fig. 2)。

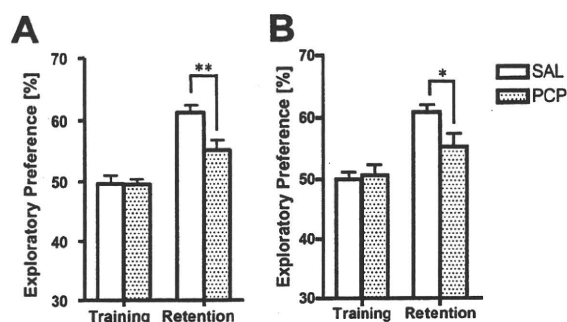


Fig. 1 Novel object recognition test on P28 and P56 in prenatal PCP-treated mice

In training and retention session on P28 (A) and P56 (B), exploratory preference for 10 min was measured. Data are means \pm SEM (n=20). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferroni test.

次に強制水泳試験を行った。この試験では、水を入れた狭いシリンダーにマウスを入れ、その無動時間の時間経過を観測する。水に入れたマウスは初め、そこから逃げようと激しく動くが、やがて水に浮かんでいるだけで動かない状態（無動状態、または絶望状態）となる。この無動時間の増加は、統合失調症における陰性症状の指標として用いられる。この試験の結果、P28、P56ともにPCP投与群において、無動時間の増加が確認され、統合失調症の陰性症状様の行動異常を呈していることが示された (Fig. 3)。

さらに、プレパルス抑制試験をP56の時点においてのみ行った。この試験では、大きな音を突然マウスに聴かせると、驚愕反応を生じるが、その直前にそれよりも小さな音を聞かせると、その後の大きな音に対する驚愕反応が抑制されるという「プレパルス抑制」という現象を利用して、マウスの情報処理機能を評価することができる。実際、統合失調症の患者でも、このプレパルス抑制試験において障害が認められることが報告されている。この試験の結果、P56のPCP投与群において、驚愕反応抑制率の低下が示され、情報処理機能の障害が確認された (Fig. 4)。

さらに、統合失調症の陽性症状の指標となる低濃度PCP [3mg/kg] への応答性を評価するため、行動量測定試験を行った。その結果、PCP投与群

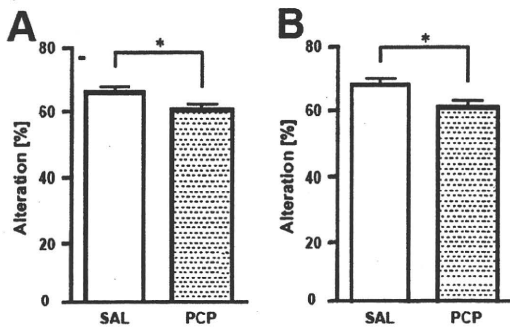


Fig. 2 Y-maze test at P28 and P56 in prenatal PCP-treated mice
In Y-maze test on P28 (A) and P56 (B), alteration (%) for 10 min was measured. Data are means \pm SEM (n=15-16). *p<0.05 by Student's t-test.

において、有意な行動量の増加が認められた (Fig. 5)。

以上の結果より、胎生期におけるPCPの投与は、成体期まで長期間持続する統合失調症様行動異常を惹起することが明らかとなった。

そこで、次に、これらの行動異常が既存の抗精神病薬であるクロザピン及ハロペリドールの投与により緩解され得るかについて、行動学的に解析することにした。

はじめに、行動量測定試験における効果を評価したところ、クロザピン、ハロペリドールの両方で、PCPによる行動感作が抑制されることが示された (Fig.5)。

さらに、胎生期PCP投与により認められた認知機能障害が、クロザピン及びハロペリドールによ

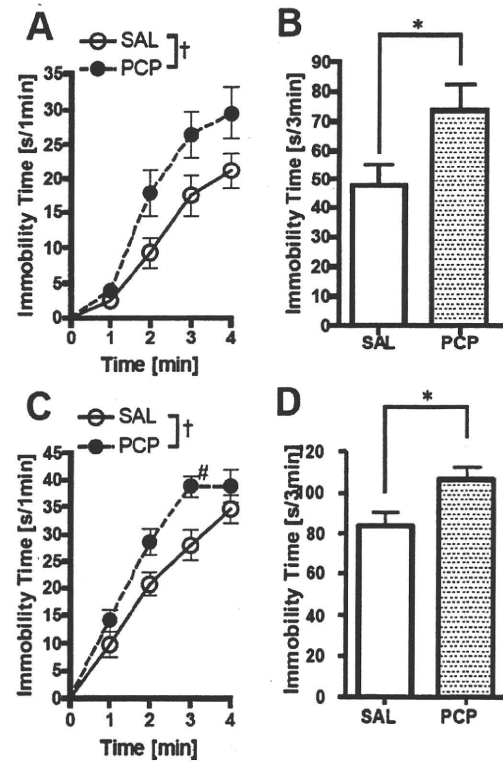


Fig. 3 Forced swimming test on P28 and P56 in prenatal PCP-treated mice

Immobility time was measured at 1 min interval for 4 min on P28 (A) and P56 (C). Data are means \pm SEM (n=20). †p<0.05, #p<0.05 by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferroni test. Total immobility time for 3 min except early 1 min was measured at P28 (B) and P56 (D). Data are means \pm SEM (n=20). *p<0.05, by Student's t-test.

り緩解するかを検討するため、新奇物体認識試験を行った。薬剤はTraining試行の30分前に投与を行った。この試験の結果、PCP投与群において認められた探索嗜好性の減少はクロザピンにより改善し、ハロペリドールによっては改善しないことが示された (Fig. 6)。

2. 胎生期 PCP 暴露による成体期生化学的変化

次に、胎生期 PCP の暴露が成体期の神経細胞、特にグルタミン酸神経系にどのような影響を及ぼし、行動異常をもたらしているのかを検討するために、生化学的解析を行った。NMDA 受容体は、そのサブユニットの一つである NR1 タンパク質の 897 番目のセリンがリン酸化されることにより活性化することが知られている。本研究では、胎生期 PCP 暴露マウスの各脳部位において、この NMDA 受容体リン酸化レベルを定量化し、さらにこの定量化された値と行動障害との関係性について検討を行った (Fig. 7)。

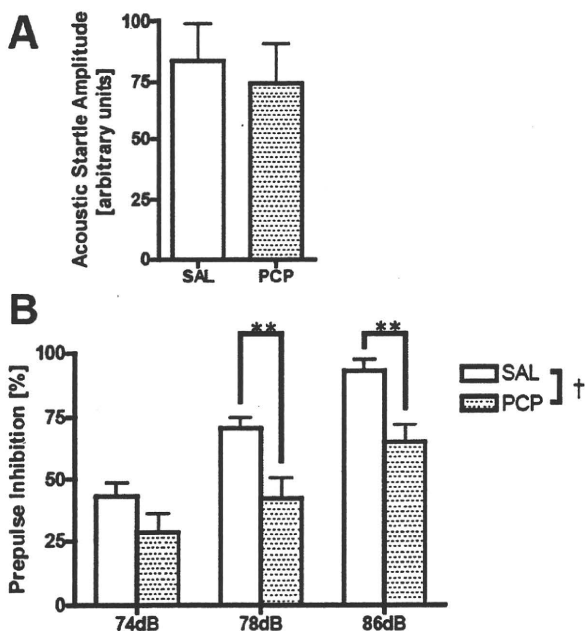


Fig. 4 Prepulse inhibition test on P56 in prenatal PCP-treated mice

Acoustic startle amplitude (A) was measured in the trials without prepulse. Prepulse inhibition (B) at three prepulse intensities (74, 78, and 86 dB). Data are means \pm SEM ($n=20$). † $p<0.05$ and ** $p<0.01$ by repeated measures ANOVA and post hoc Bonferroni test.

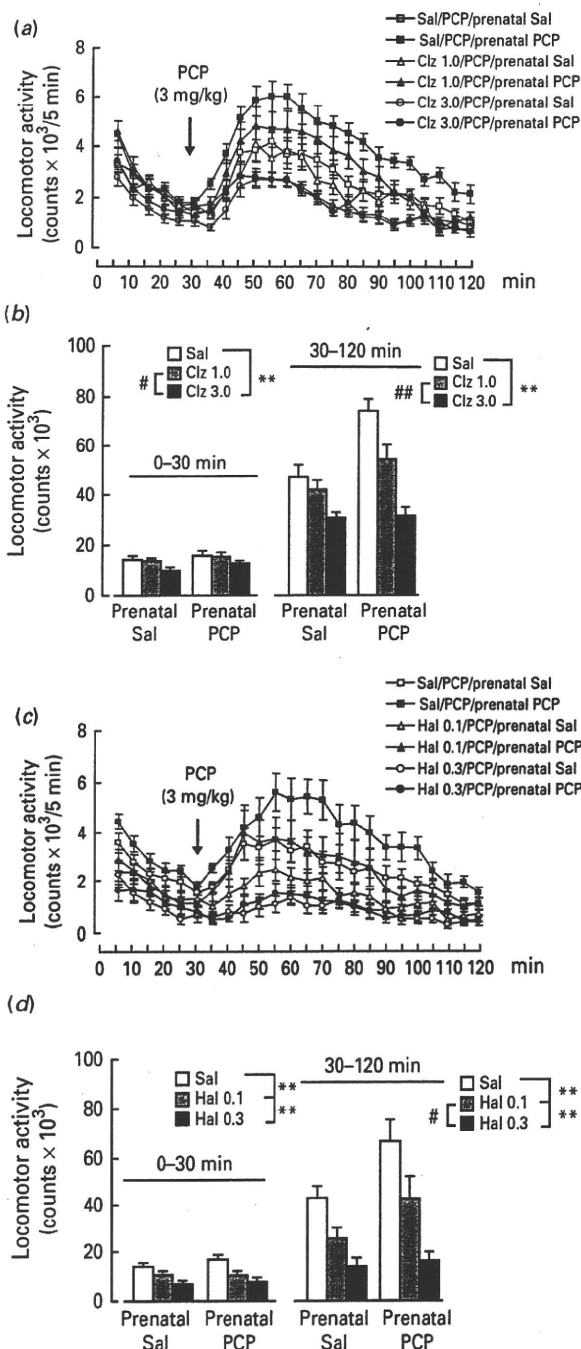


Fig. 5 Effects of antipsychotics on PCP-induced hyperlocomotion in prenatal PCP-treated mice. Clozapine (Clz; 1 or 3 mg/kg) (a) (b) and haloperidol (Hal; 0.1 or 0.3 mg/kg) (c) (d) were administered to mice 30 min before the test. After 30 min habituation, mice were challenged with PCP (3 mg/kg). The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

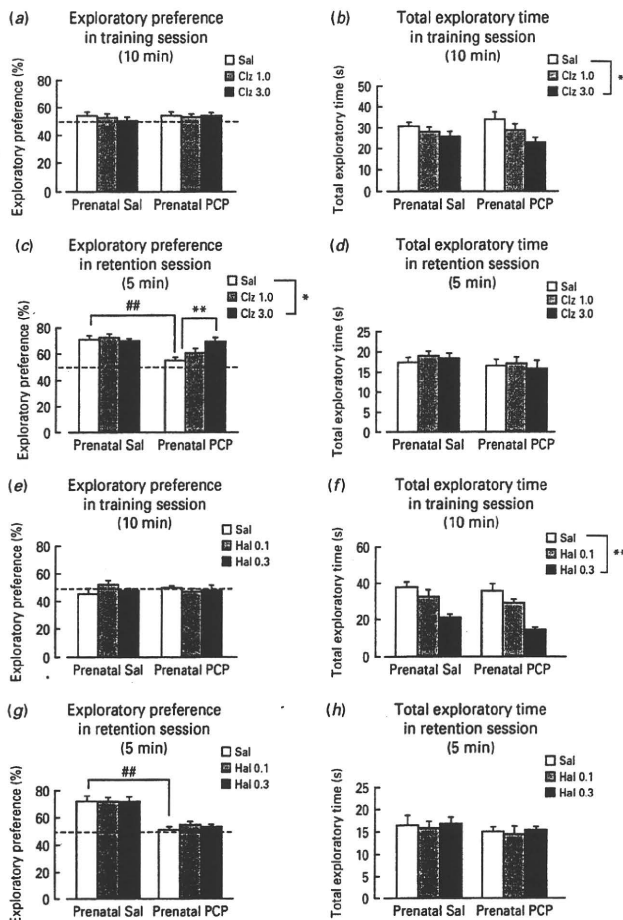


Fig.6 Effects of antipsychotics on cognitive dysfunction in prenatal PCP-treated mice.

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

まず、前頭前皮質においては、NR1 の発現量自体は増加しており、一方、リン酸化 NR1 量に関しては減少していることが明らかとなった。この結果より、全 NR1 のうちリン酸化を受けている NR1 の割合 (NR1 リン酸化率) が減少していることが導かれた。さらに、このリン酸化 NR1 量と新奇物体認識試験における探索嗜好性のスコアを比較したところ、有意な相関関係があることが見出された。また、海馬においても同様の傾向が認められ

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

また、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.8)。さらに、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. 9)。

3. 胎生期 PCP の暴露による神経発生障害

さらに、胎生期における PCP の暴露が神経の発生、発達に与える影響を評価するため、まず、神経細胞の数や形体の観察を行った。生後 7 日目の脳サンプルを用い、Nissl 染色を行ったところ、前頭前皮質において、神経細胞数の減少が確認された (Fig. 10)。

神経化学的な解析により、前頭前皮質においてグルタミン酸作動性神経系の機能異常が生じていたことより、この神経細胞の減少はグルタミン酸作動性神経系である可能性が考えられたため、次にグルタミン酸作動性神経細胞のマーカーである PAG に対する抗体を用い、グルタミン酸作動性神経細胞数を計測することにした。その結果、胎生期 PCP 投与群の前頭前皮質においては、グルタミン作動性神経細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 11)。

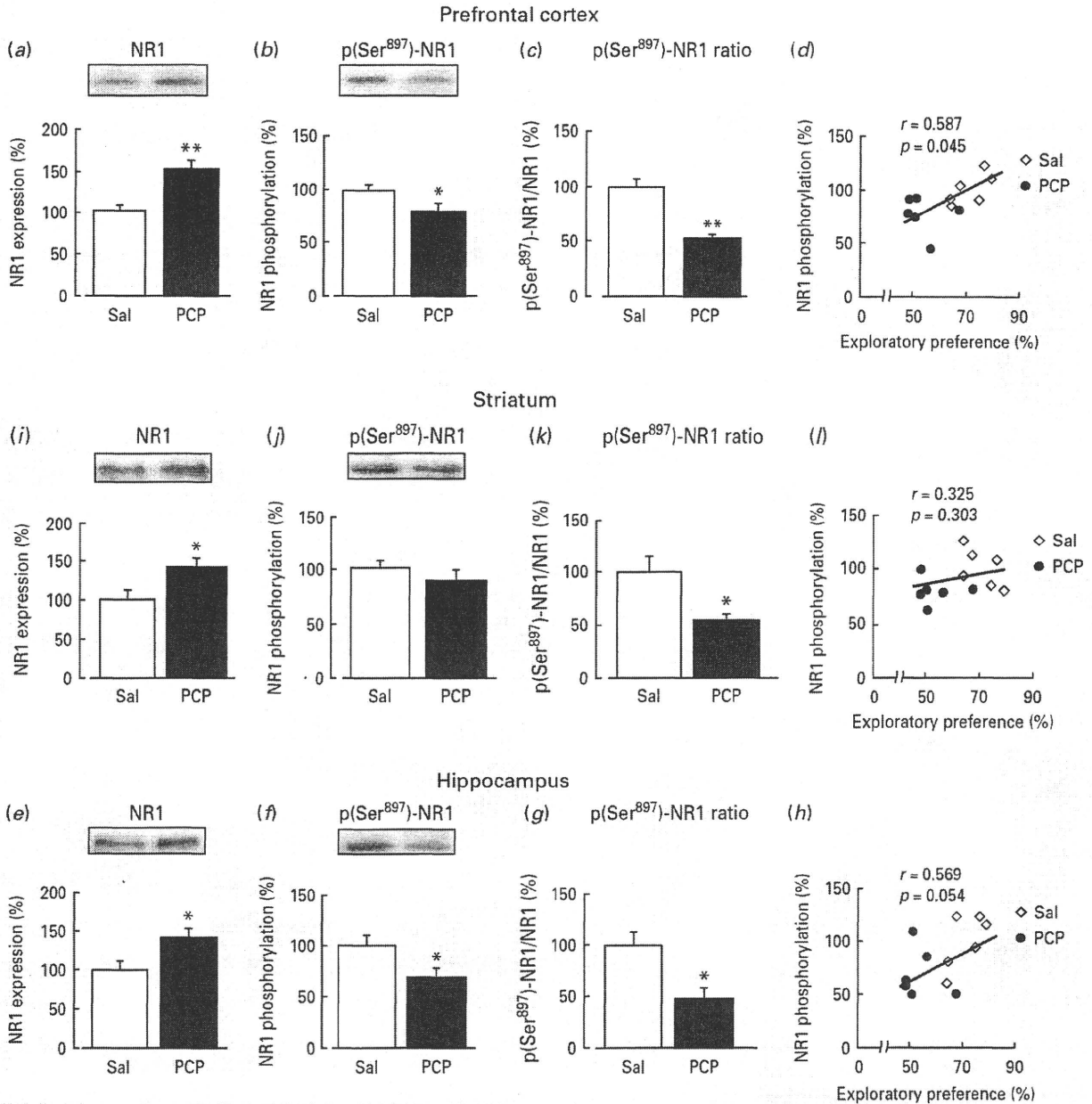


Fig. 7 Changes in the expression and phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor of prenatal phencyclidine (PCP)-treated mice
 Expression of NR1 and phosphorylated NR1 [p(Ser897)-NR1] was detected by Western blotting. Loaded protein was normalized to β -actin. The phosphorylation ratio was calculated as NR1 phosphorylation vs. NR1 expression. Results are represented as the level of NR1 expression in the prefrontal cortex (PFC) (a), hippocampus (e) and striatum (i); the level of NR1 phosphorylation (Ser897) in the PFC (b), hippocampus (f) and striatum (j); and the ratio of NR1 phosphorylation vs. NR1 expression in the PFC (c), hippocampus (g) and striatum (k). The correlation of phosphorylated NR1 (Ser897) with exploratory preference in the retention session of the novel object recognition test in the PFC (d), hippocampus (h), and striatum (l). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the prenatal saline (Sal) group. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. for six mice in each group (Student's t test).

次に、この神経細胞数の減少の原因を明らかにするため、神経細胞の産生、及びその後の移動に対する PCP の影響を検討することにし、BrdU を用いた実験を行った。BrdU は、生体内への投与

により、DNA 複製期である S 期にある細胞の DNA へチミジンに換わり、取り込まれる。その半減期が 2 時間と短いこと、また、抗 BrdU 抗体により、取り込まれた BrdU を検出できることから、投与

時点で産生された細胞を標識、検出することが可能となる有用な試薬である。

BrdU を大脳皮質形成が活発に行われる時期である胎生 12.5、13.5、14.5、または 15.5 日において腹腔内投与し、出生後 7 日目に抗 BrdU 抗体を用い、各時期における BrdU 陽性細胞の検出を試みた。その結果、皮質構造は内側から Inside-out パターンで形成されるが、その傾向は PCP 投与群でも観察され、どの時期の細胞移動に関しても、生理食塩水 (SAL) 投与群と比べ、有意な差は検出されなかった (Fig. 12 A-D)。しかしながら、

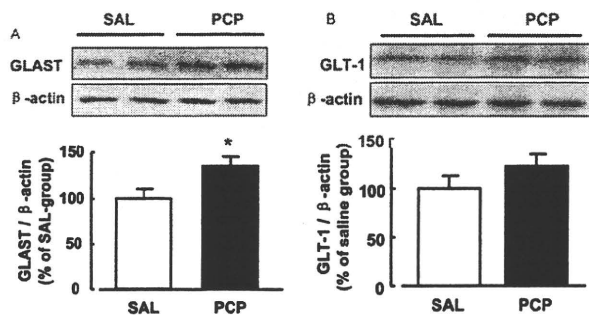


Fig. 8 Changes in the expression of glutamate transporters in the prefrontal cortex of prenatal PCP-treated mice
Representative western blot bands for the expression of GLAST, GLT-1 and GFAP. The amount of protein (30 μg/well) loaded was normalized to that of β-actin. Results are represented as the level 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).

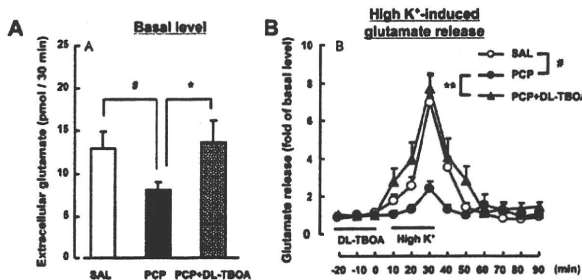


Fig. 9 Reduction of glutamate release in the prenatal PCP-treated mice and effects of DL-TBOA on the reduction.
DL-TBOA (1 mM) was administered through a microdialysis tube into the prefrontal cortex of mice for 30 min (μl/min). After the administration, basal glutamate release (A) and K⁺-evoked (100 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

BrdU 陽性細胞数に関して検討を行ったところ、PCP 投与群において皮質形成初期の BrdU 陽性細胞数が減少しているのが観察された (Fig. 12 E)。さらに、詳細に検討するために E13.5 において BrdU を投与してから 3 時間後に検出を試みたところ、PCP 投与群では、BrdU 陽性細胞数が少なく、実際に細胞分裂を行っている細胞が減少していることが示された (Fig.13)。

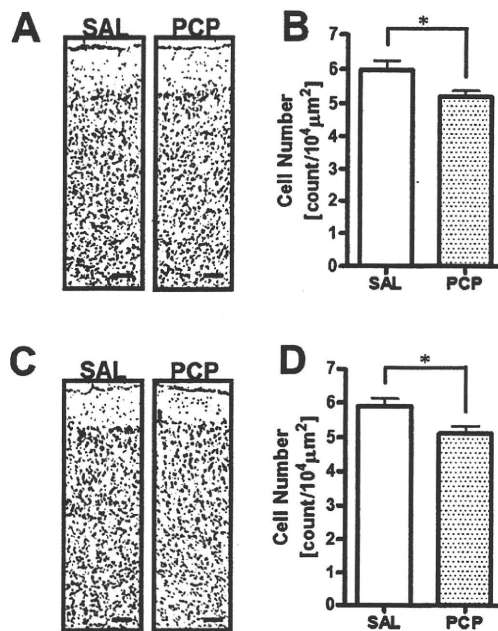


Fig. 10 Nissl staining in the prefrontal cortex in adult
Nissl-stained coronal sections of the prefrontal cortex in PCP- and saline-treated mice on P28 (A) and P56 (C). Scale bar : 200 μm. Stereological analysis of the number of Nissl-staining cells on P28 (B) and P56 (D) in PCP- and SAL-treated mice. Values are the means ± SEM (n=6). *p<0.05 by Student's *t*-test.

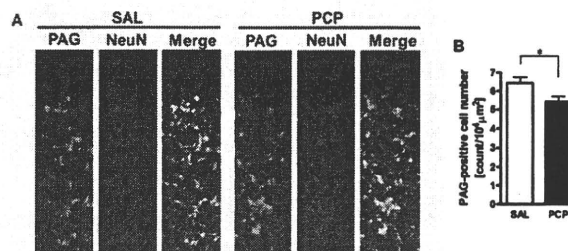


Fig. 11 Prenatal PCP-treatment decreased the density of glutamatergic neurons in the prefrontal cortex
(A): PAG-immunostained coronal sections of the prefrontal cortex in PCP- and saline-treated mice. Scale bar: 200 μm. (B): Stereological analysis of the density of PAG-staining cells. Values are the means ± SEM (n=8). *p<0.05 by Student's *t*-test.

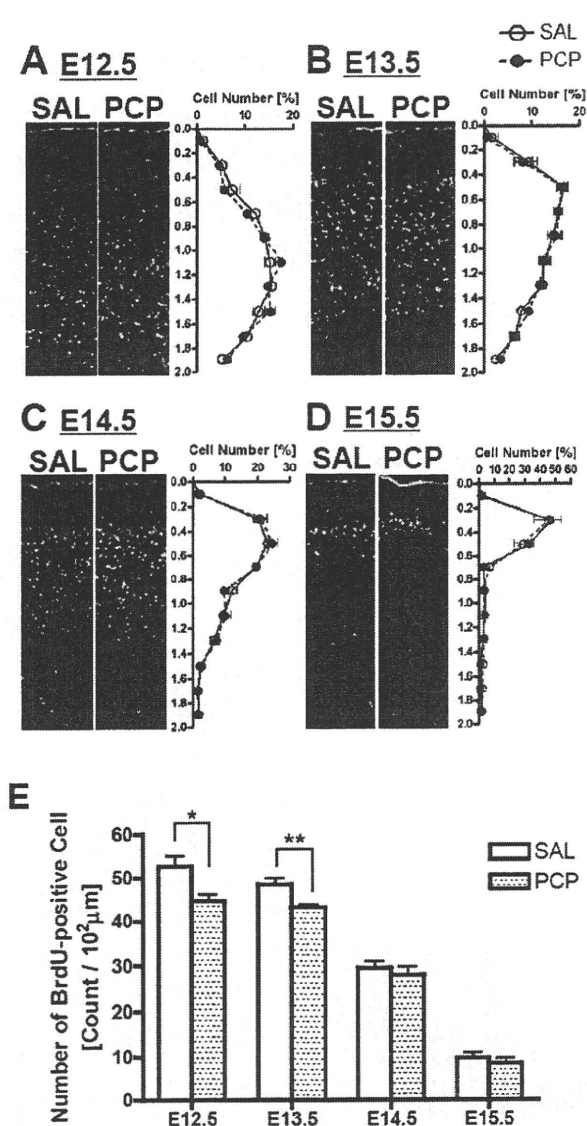


Fig. 12 Effect of prenatal PCP exposure on the migration and the number of BrdU-positive cells

A single BrdU injection on E12.5 (A), E13.5 (B), E14.5 (C), or E15.5(D), 3 hrs after PCP/saline administration to label mitotic progenitors in the embryonic brains. After the birth, the pups were fed for 7 days to examine cell migration. Fluorescence images of BrdU-positive cells using the antibody and the percentage of BrdU-positive cells in each distance from apical side are shown. Data are the means \pm SEM (n=6). (E): The number of BrdU-positive cells per 10² mm tangential direction is shown. Data are means \pm SEM (n=6). *p<0.05, **p<0.01 by Student's *t*-test.

大脳皮質において、神経を産生する神経前駆細胞には、2種類があることが知られている^{7,8)}。神経内皮細胞、およびラジアルグリアは、大脳皮質形成初期に脳室帯 ventricular zone において対称分裂により自己複製をしながら、時折、非対称分裂をすることで上層の神経細胞を産生している神

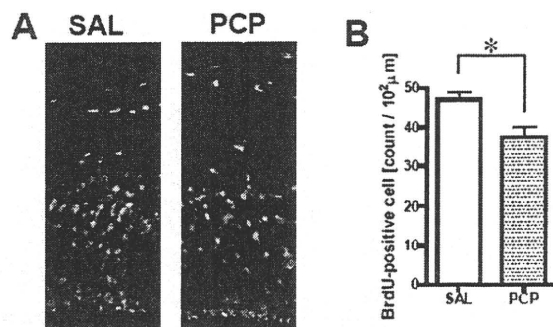


Fig. 13 Effect of prenatal PCP exposure on mitotic progenitor

At E13.5, the PCP/Saline-treated pregnant mice was given a single BrdU injections 3hrs before decapitation. The pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -BrdU antibody. (A) Fluorescence images of BrdU-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar : 100 μ m. VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone. (B) Stereological analysis of the number of BrdU-positive cells in PCP- and saline-treated mice are shown. Values are the means \pm SEM (n=6). *p<0.05 by Student's *t*-test.

経前駆細胞である。また、Basal progenitor は後期になると、神経内皮細胞やラジアルグリアから生じるもうひとつの神経前駆細胞であり、脳室下帯 subventricular zone において、対称分裂をすることで神経細胞を産生することが知られている。BrdU を用いた解析により、胎生期の大脳皮質において分裂細胞が減少していたことから、次に、これら神経前駆細胞に障害がもたらされている可能性を検討することにした。まず、神経内皮細胞およびラジアルグリアについて検討を行うことにし、胎生 13.5 日目の大脳皮質を免疫組織化学的な手法により観察した。神経内皮細胞、およびラジアルグリアのマーカとして抗 Pax6 抗体、また増殖下にある細胞のマーカとして、抗 PCNA 抗体を用いた。その結果、PCP 投与群において、PCNA 陽性細胞、Pax6 陽性細胞の有意な減少が確認された (Fig. 14)。さらに、同様にして、Basal progenitor をそのマーカである Tbr2 により観察した結果、PCP 投与群において減少が確認された (Fig. 15)。以上の結果は、胎生期における PCP の暴露は神経前駆細胞の分裂を障害することで、神経前駆細胞数の減少を引き起こし、結果的に、神経細胞数の減少を引き起こしていることを示唆するもので

ある。そこで、さらに、この神経細胞前駆細胞分裂障害を生じたメカニズムを明らかにするため、胎生期 PCP 暴露による神経前駆細胞内での遺伝子発現変化について網羅的に解析を行った。

まず、脳組織より神経前駆細胞を抽出するため、

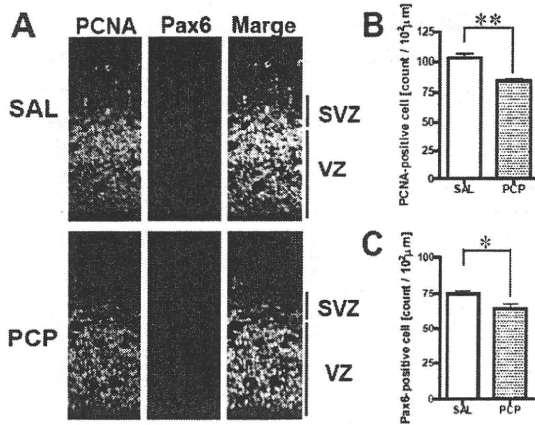


Fig. 14 Effect of prenatal PCP exposure on Pax6-positive progenitor

On E13.5, mice were decapitated 6hrs after PCP/Saline injection. The pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -PCNA, a proliferation marker, and α -Pax2 antibody, a progenitor marker. (A): Fluorescence images of PCNA-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar: 100 μ m. VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone. The number of PCNA- (B) and Pax6- (C) positive cells per 10² μ m tangential direction is shown. The Data are means \pm SEM (n=6). * p <0.05 ** p <0.01 by Student's t -test.

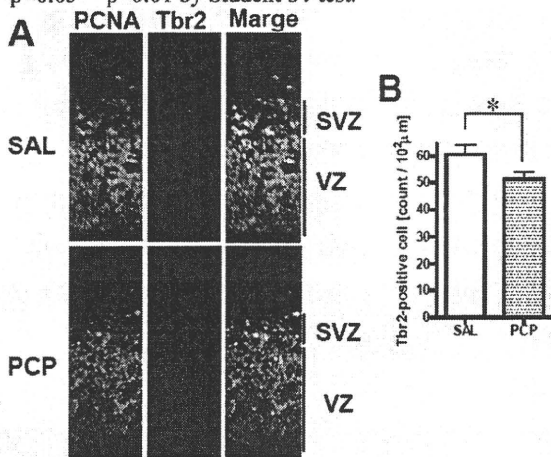


Fig. 15 Effect of prenatal PCP exposure on basal progenitor

On E13.5, the pups were analyzed by immunohistochemical analysis using α -PCNA, an proliferation marker, and α -Tbr2 antibody, a basal progenitor marker. (A): Fluorescence images of BrdU-positive cells in embryonic cortex are shown. Scale bar: 100 μ m. (B): The number of Tbr2-positive cells per 10² μ m tangential direction is shown. The Data are means \pm SEM (n=6). * p <0.05 by Student's t -test.

胎生 13.5 日目の胎児脳より、Laser capture microdissection 法を用い、神経前駆細胞を豊富に含む脳室帯領域(VZ: ventricular zone)を切り出した (Fig.16)。その断片より mRNA を抽出後、PCR アレイ法を用い、網羅的な遺伝子発現スクリーニングを行った。この度用いた PCR アレイ法では、神経前駆細胞の増殖、分化、分裂、移動などにかかわる 86 遺伝子の発現量を一度に定量することが可能である。このスクリーニングの結果、胎生期 PCP の暴露によって、いくつかの遺伝子で発現量の減少が認められ、その中でも特に、Notch2、Ntn1 という 2 つの遺伝子の発現量が有意に減少していることが明らかとなった (Table 1)。

4. グルタミン酸作用薬による行動異常の改善

以上の結果より、胎生期の PCP 投与により、成体期においてグルタミン酸作動性神経の機能異常を原因とする統合失調症様の行動異常が誘導されることが確認された。そこで、次に、グルタミン酸作動性神経の機能亢進をもたらすような薬剤の投与がこれら行動異常を緩解し得るかについて、検討を行った。

まず、NMDA 受容体コアゴニストである D-セリンを、各行動実験の 30 分前に投与すると緩解することが示された。行動量測定試験 (Fig. 5)、新奇物体認識試験 (Fig. 17A, B)、Y 字迷路試験 (Fig. 17C) においては、D-セリンの用量依存的な緩解効果が確認され、強制水泳試験 (Fig. 17D) では個体数が少なく、現在までに有意な差は検出されてはいないが、改善の傾向は観察された。

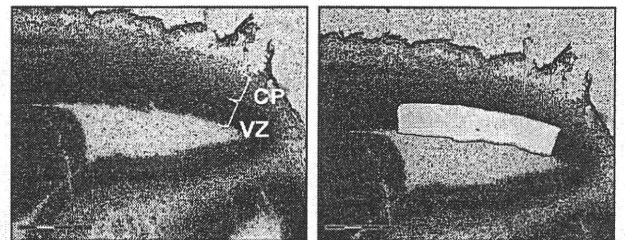


Fig. 16 Laser Capture Microdissection

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

Table 1: Genes changed in the expression level in progenitor by PCP treatment (* $p < 0.05$)

Gene name	Symbol	Gene number	Fold Difference PCP/SAL	T-TEST p value	Fold Up- or Down- PCP/SAL
Dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)	Dvl3	NM_007889	0.320	0.335	-3.12
E1A binding protein p300	Ep300	NM_177821	0.496	0.050	-2.02
Filamin, alpha	Flna	NM_010227	0.370	0.494	-2.70
Guanine nucleotide binding protein, alpha o	Gnao1	NM_010308	0.148	0.294	-6.76
Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	Heyl	NM_013905	0.428	0.256	-2.34
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1	Mll1	NM_001081	0.394	0.241	-2.54
Nuclear receptor coactivator 6	Ncoa6	NM_019825	0.289	0.203	-3.46
Decrease Notch gene homolog 2 (Drosophila)	Notch2	NM_010928	0.546	0.047*	-1.83
Neuronal pentraxin 1	Nptx1	NM_008730	0.440	0.333	-2.27
Neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	Nrcam	NM_176930	0.255	0.418	-3.92
Netrin 1	Ntn1	NM_008744	0.257	0.014*	-3.89
POU domain, class 3, transcription factor 3	Pou3f3	NM_008900	0.163	0.454	-6.14
Pleiotrophin	Ptn	NM_008973	0.183	0.534	-5.47
Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	Sema4d	NM_013660	0.368	0.317	-2.72
SRY-box containing gene 3	Sox3	NM_009237	0.475	0.462	-2.11
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	Ywhah	NM_011738	0.382	0.658	-2.62
Increase Paired box gene 6	Pax6	NM_013627	2.666	0.573	2.67

さらに、グルタミン酸トランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与により、シナプス間隙のグルタミン酸量を増加させ、グルタミン酸作動性神経系の機能低下を改善することで、胎生期 PCP 投与マウスで認められた行動異常が緩解することができるかについて、検討を行った。

はじめに、新奇物体認識試験における効果を評価した。DL-TBOA は、Training 試行の 30 分前にマイクロインジェクション法を用い、前頭前皮質内へ直接注入を行った。その結果、DL-TBOA 10 nmol/site の投与により、胎生期 PCP 投与マウスにおいて認められた認知記憶障害が緩解することが示された (Fig.18)。

次に、強制水泳試験における DL-TBOA の効果について検討を行った。この試験の 30 分前に、前頭前皮質へ DL-TBOA を投与したところ、胎生期 PCP 投与マウスで認められた無動時間の延長が抑制され、陰性症状様の行動異常の改善効果が認められた (Fig.19)。

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. 既存の行動評価系を用いた周産期におけるニコチン暴露がマウスの行動に与える影響の評価
まず、周産期の間のどの時期におけるニコチン暴露が神経発達により重大な影響を与えるかを評価するために、周産期を、妊娠 1 日目から 13 日目(GD1-GD13)、GD14-P0、G1-P0、GD14-P7、GD1-P7、P0-P7 の 6 つの期間に分け、ニコチンの暴露を行い、P28 から各種行動試験を行った (Fig.20)。

まず、不安様行動を評価するための既存の行動試験について報告する。

明暗箱試験(Fig. 21)では、G0-G20 及び G14-G20 の期間、ニコチン暴露された群の雄で暗箱内の滞在時間がコントロール群に比べ有意に増加しており、不安様行動が惹起されていることが示された。また、雌では、G14-G20 の期間ニコチンに暴

露された群で同様の結果が得られた。

高架式十字迷路試験(Fig. 22)では、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄でオープンアームでの滞在時間

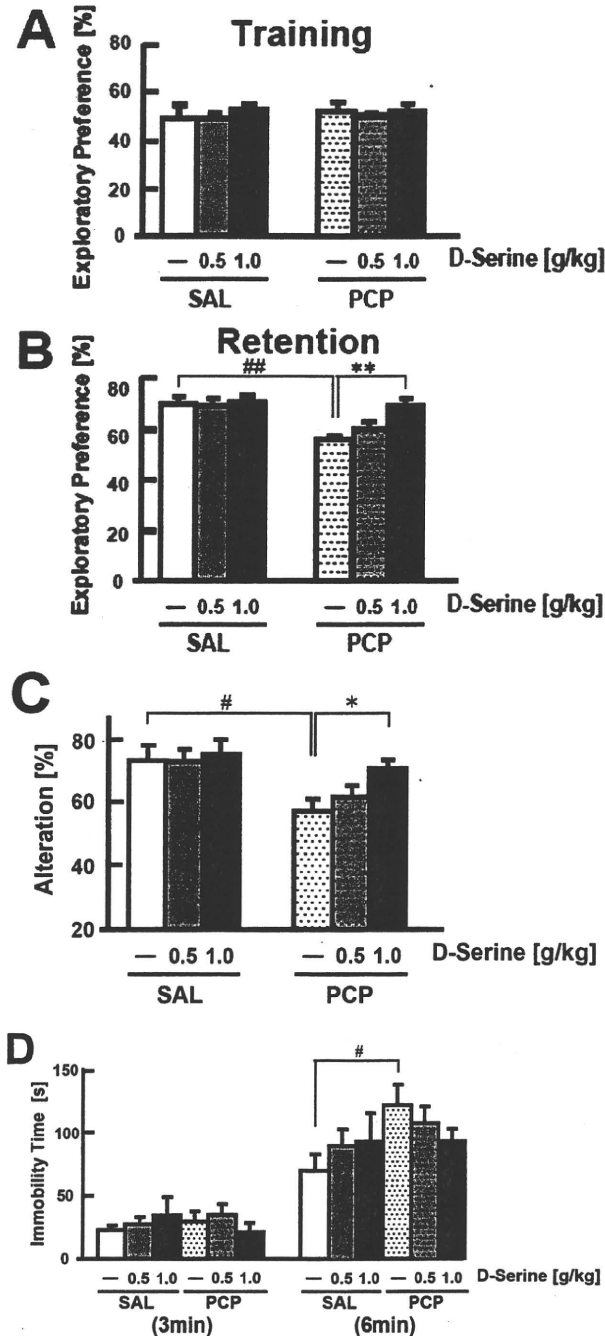


Fig. 17 Effect of D-serine on the PCP-induced behavioral deficits on P56
On P56, D-serine was administrated 30min before the behavioral tests. The results in novel object recognition test (A) (B), Y-maze test (C), and forced-swim test (D) are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. Saline group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

がコントロール群に比べ、有意に減少しており、不安様行動が惹起されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

ビー玉覆い隠し試験では(Fig. 23)、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で、ビー玉を覆い隠す行動がコントロール群に比べ増加しており、不安様行動が惹起されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

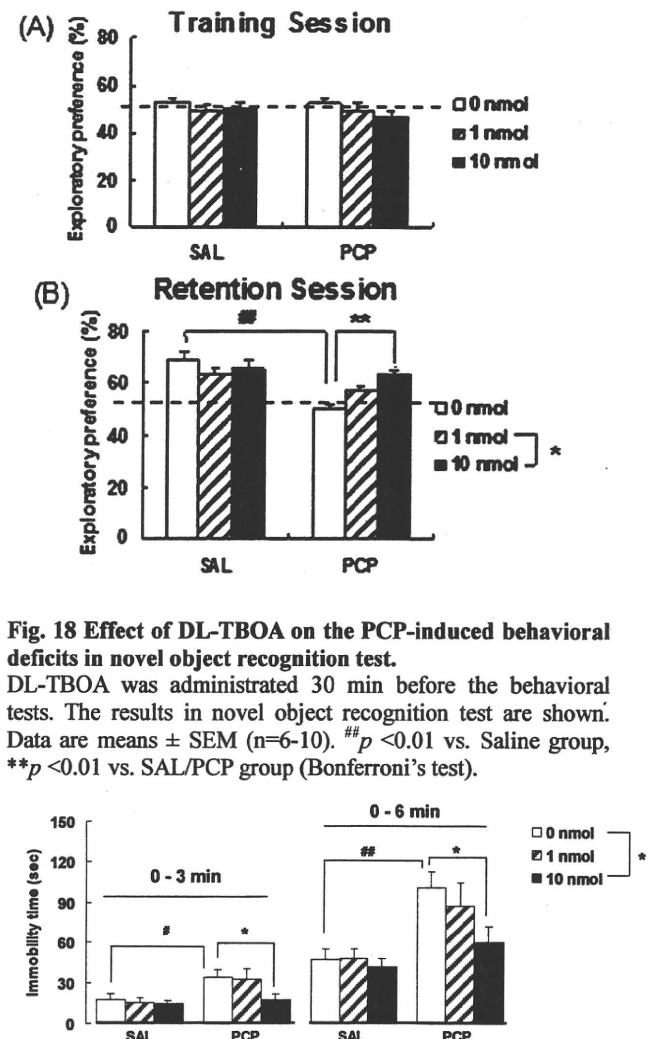


Fig. 18 Effect of DL-TBOA on the PCP-induced behavioral deficits in novel object recognition test.
DL-TBOA was administrated 30 min before the behavioral tests. The results in novel object recognition test are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). ##*p* < 0.01 vs. Saline group, ***p* < 0.01 vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

Fig. 19 Effect of DL-TBOA on the PCP-induced behavioral deficits in forced swimming test.
DL-TBOA was administrated 30 min before the behavioral tests. The results in forced swimming test are shown. Data are means \pm SEM (n=6-10). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. Saline group, **p* < 0.05 vs. SAL/PCP group (Bonferroni's test).

新奇抑制性摂食試験では(Fig. 24)、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で摂食するまでの時間がコントロール群に比べ、有意に延長しており、不安様行動が惹起されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

次に、社会性行動について評価する既存の試験系について、報告する。

社交性試験(Fig. 25)では、雄、雌両方において有意な異常は検出されなかった。しかしながら、社交性新奇嗜好性試験においては(Fig.26)、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で、新奇の個体に対する社会性行動がコントロール群に比べ、有意に減少しており、社会性行動異常が惹起されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

さらに、ニコチンを暴露されたマウスにおける

記憶機能を評価する既存の試験系を行った。

Y字型迷路試験では(Fig. 27)、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で、短期記憶が障害されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

新奇物体認識試験では(Fig. 28)、雄、雌両方において有意な認識記憶の異常は検出されなかった。

さらに、既存の注意機能の評価系として、プレパルス抑制試験を行ったところ、雄ではすべての期間で障害が認められた一方、雌ではどの期間においても障害は認められなかった(Fig. 29)。

以上の結果より、周産期におけるニコチンの暴露は、成体期まで長期持続する行動異常を惹起することが明らかとなった。また、その行動異常は、ニコチンを G14-P0 の期間において暴露した群で顕著に認められ、また、雄と雌に異なった影響をもたらすことも明らかとなった。

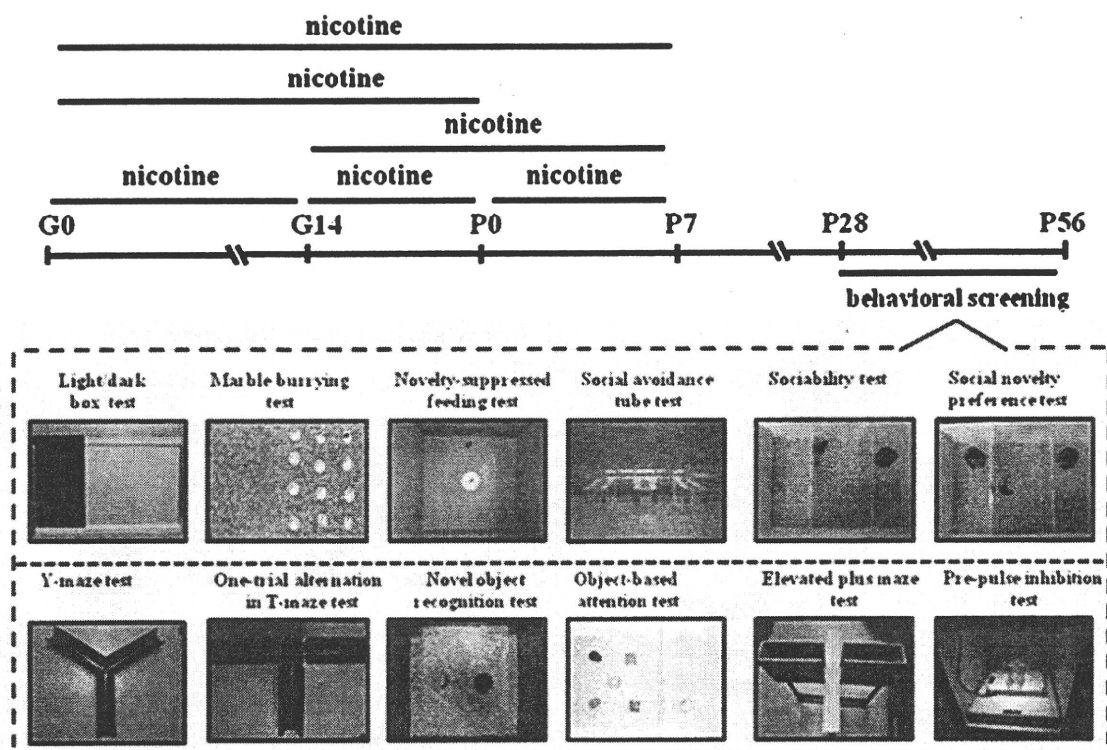


Fig. 20 Experimental schedule

また、顕著に障害が認められた G14-P0 にニコチンを暴露したマウスを用い、衝動性及び潜在学習能力を評価する試験（断崖回避試験及び水探索

試験）を行ったところ、雄において障害が認められ、雌では障害が認められなかった(Fig. 30)。

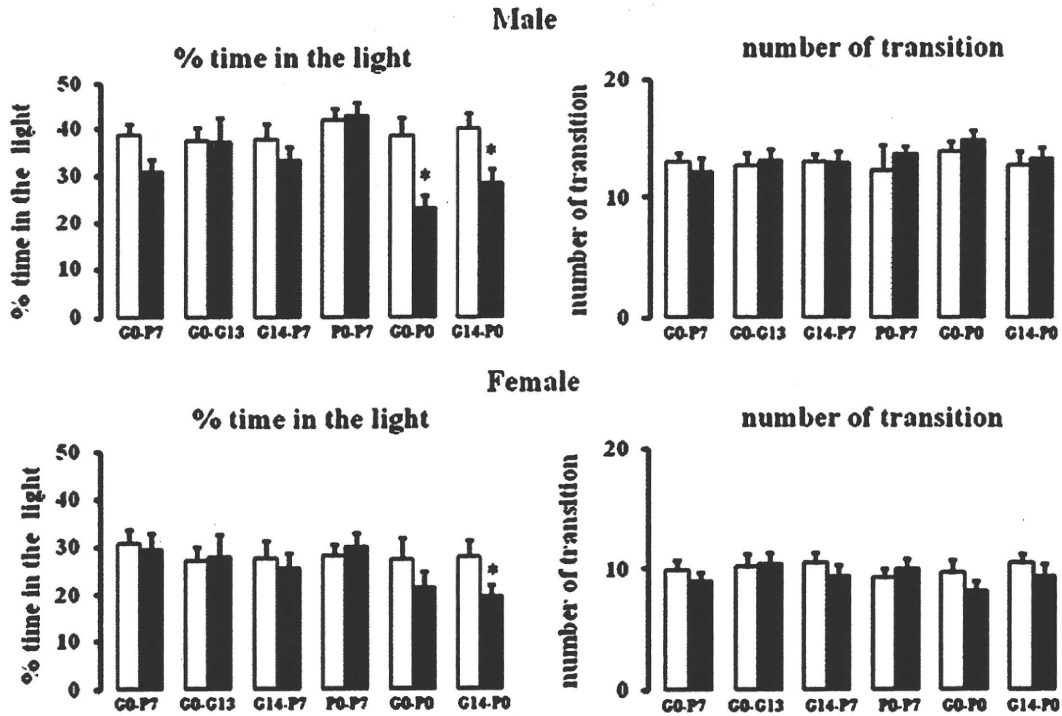


Fig. 21 Light and dark box test

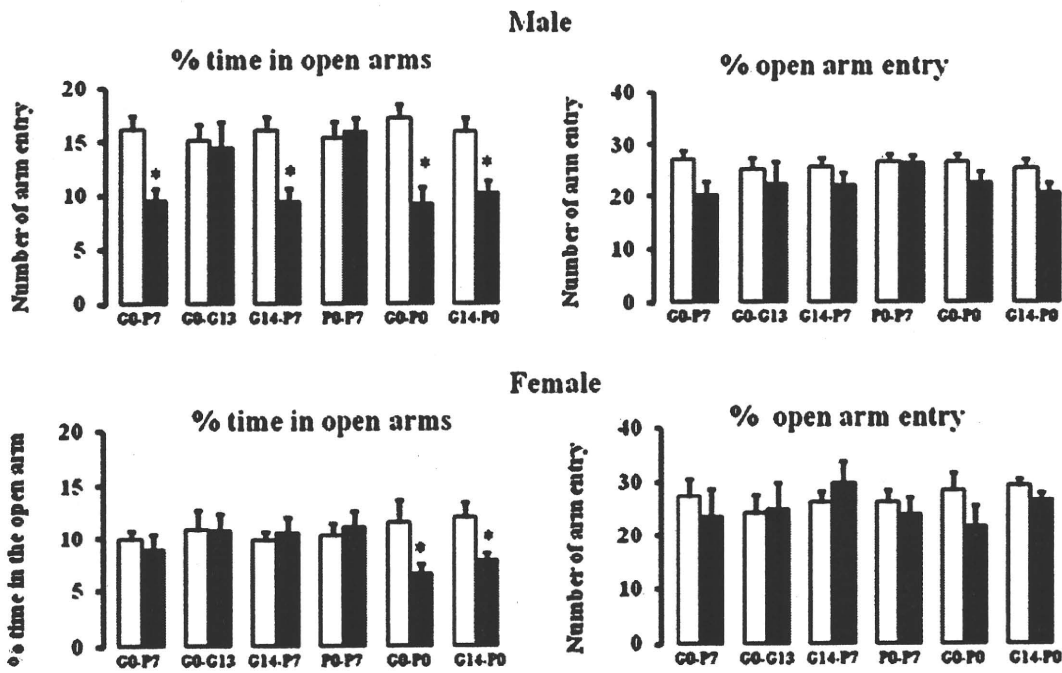


Fig. 22 Elevated plus maze test

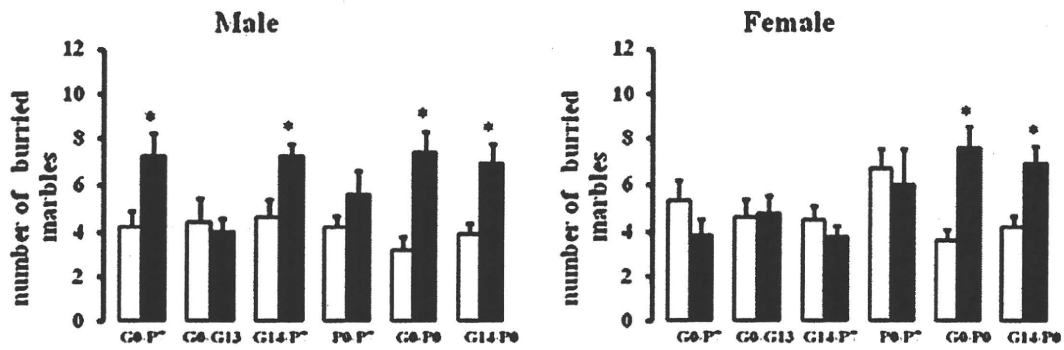


Fig. 23 Marble burying test

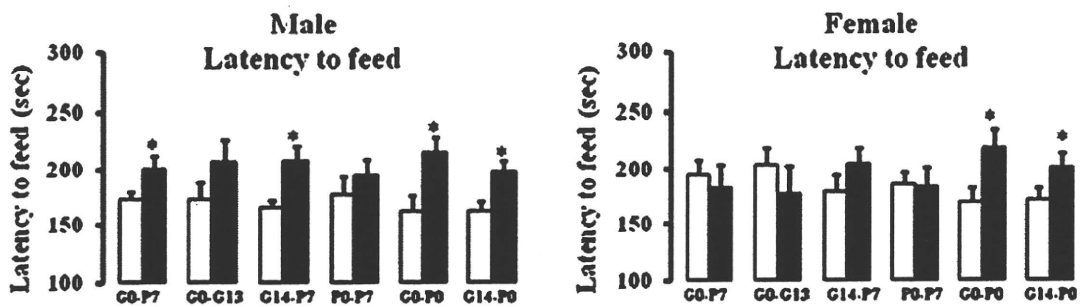


Fig. 24 Novelty-suppressed feeding test



Fig. 25 Sociability test

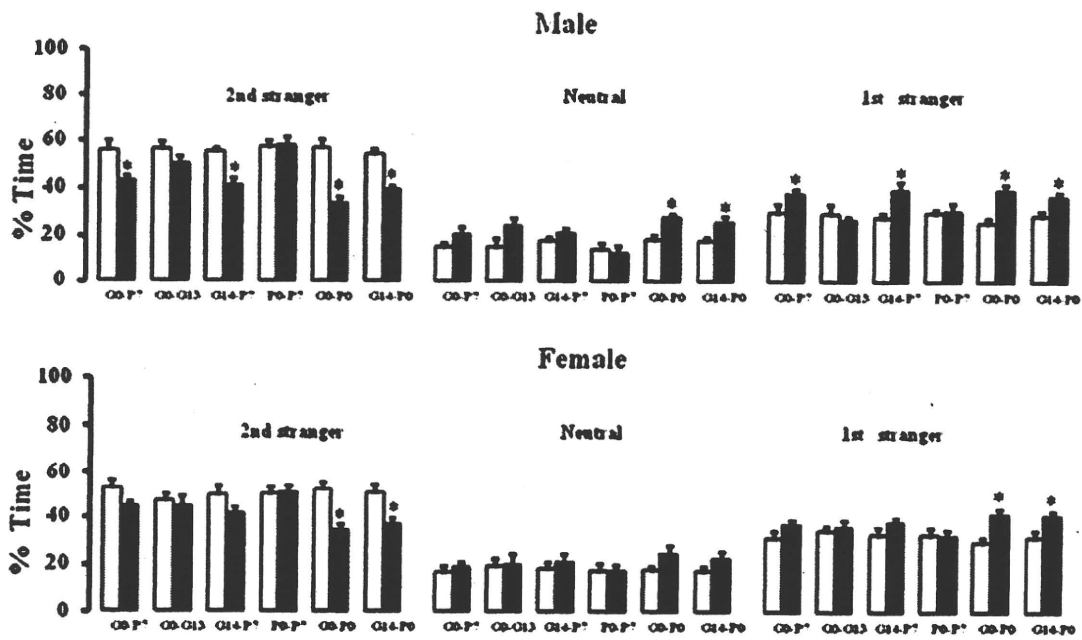


Fig. 26 Preference for social novelty test

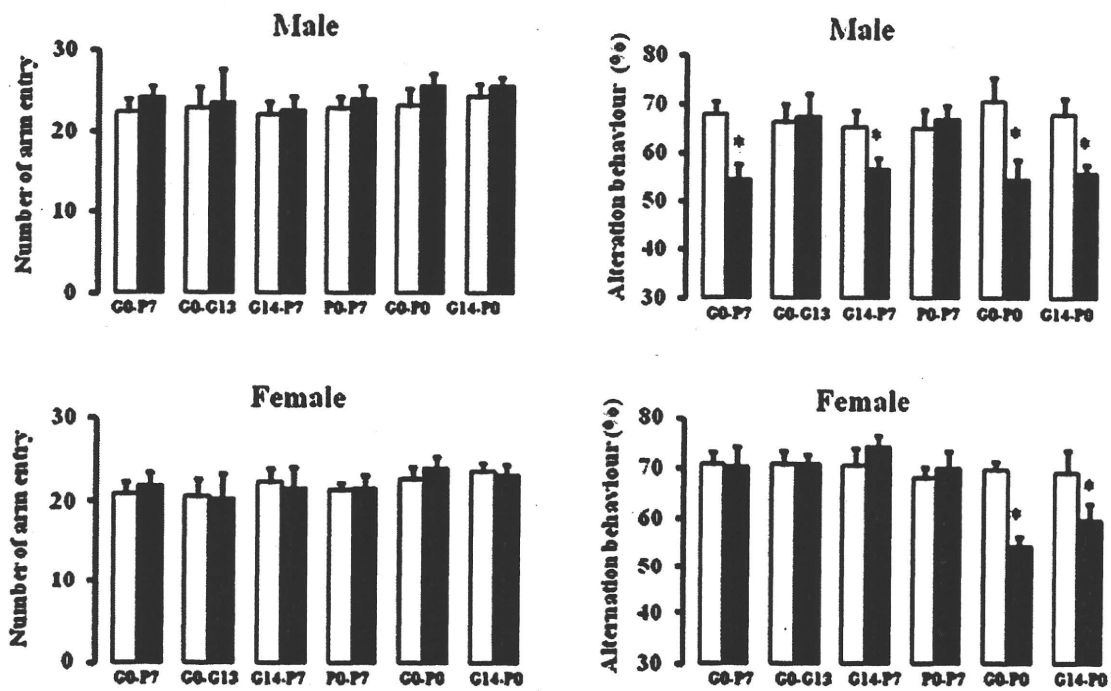


Fig. 27 Y-maze test

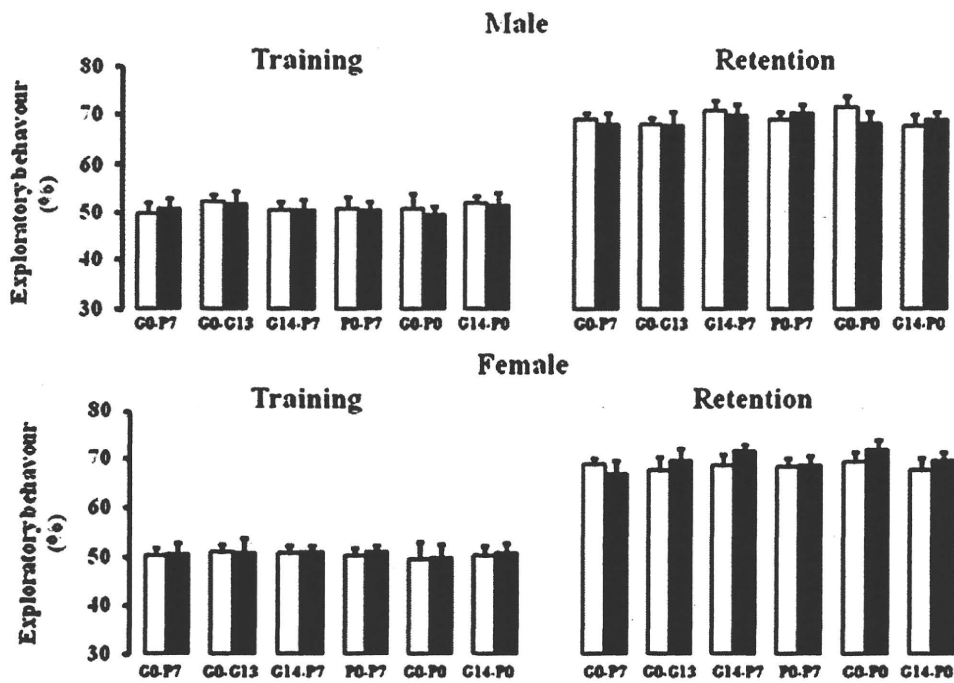


Fig. 28 Novel object recognition test

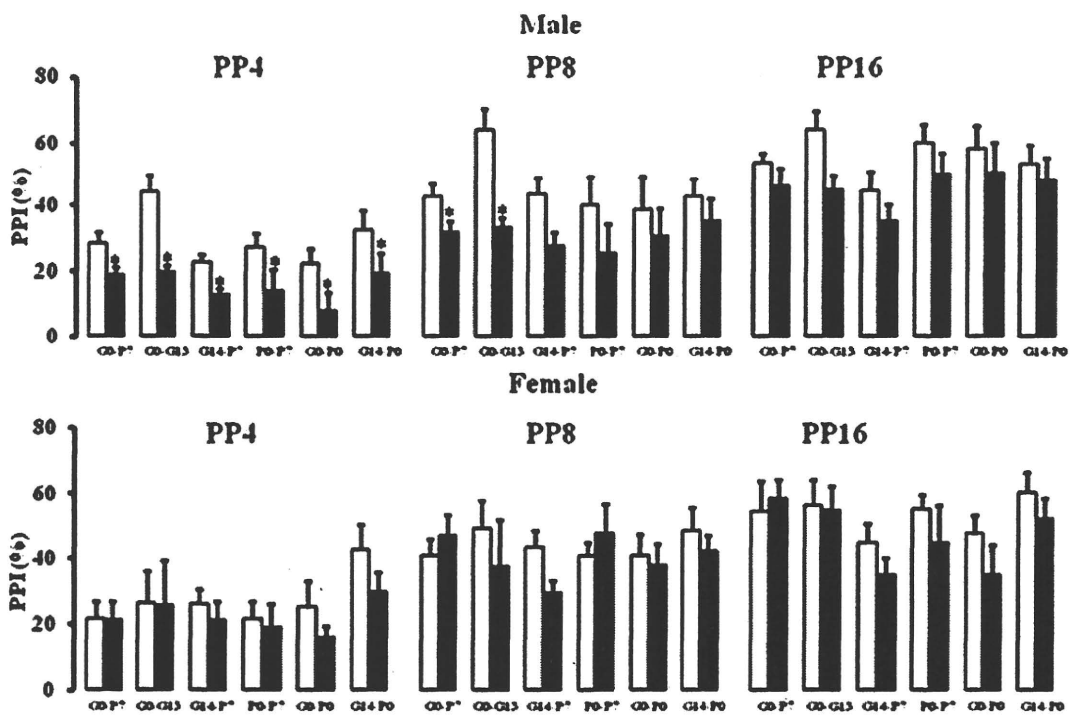


Fig. 29 Prepulse inhibition test

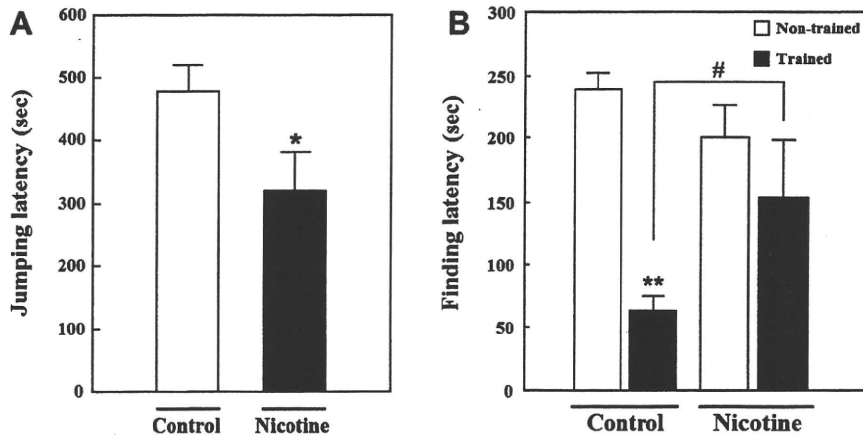


Fig. 30 (A) Cliff avoidance test and (B) Water finding test

2. 周産期ニコチン暴露マウスを用いた新規行動評価系の確立

周産期ニコチン暴露マウスを用い、既存の行動評価系に加え、より安価で簡便に行動異常を検出できる新たな系の確立を行った。

まず、社会性行動を評価するための系として、Social avoidance tube test を確立した。この試験では、マウスが一匹で通れるほどの透明なチューブを用いる(Fig. 31A)。異なるホームケージで飼育した非験マウスとコントロールマウスをチューブ

の両側から入れる。非験マウスがコントロールマウスをチューブから追い出す、もしくは逆に追い出されることにより、社会不安を評価することができる。この試験の結果(Fig. 31B)、G0-P7、G14-P7 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で、不安が亢進していることが示された。また、雌では、どの群においても異常は検出されなかった。

次に、作業記憶を評価する系として、One-trial delayed alternation test を確立した。この試験では、

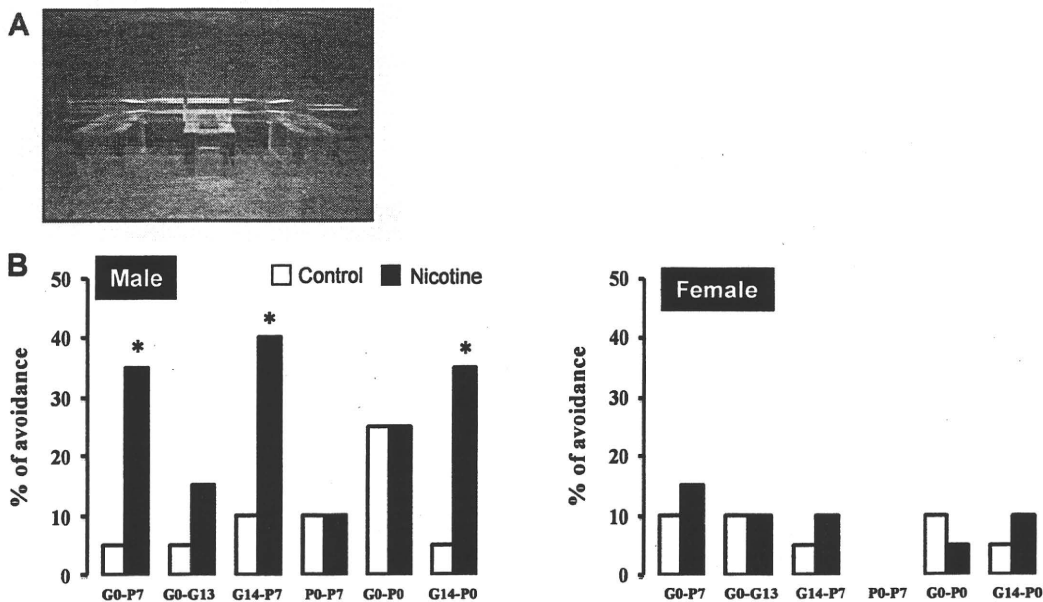


Fig. 31 Social avoidance tube test

マウスの探索行動を利用した解析法で、新しいアームへの選択の割合を計測することにより短期作業記憶を評価することができる系である(Fig. 32A)。この試験の結果(Fig. 32B)、G14-P0の期間、ニコチン暴露された群の雄で、作業記憶が障害されていることが示された。しかしながら、雌ではどの期間、ニコチンに暴露された群においても障害は認められなかった。さらに、注意機能を評価する系として Object-based attention test を確立した。この試験系は、Novel

object recognition test を応用した解析法で、マウスが新奇物体を好む性質を利用し、物体への探索時間の割合を測定することにより注意機能を評価することができる(Fig. 33A)。この試験の結果(Fig. 33B)、G0-P7、G14-P7、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチン暴露された群の雄で、注意機能が障害されていることが示された。また、雌では、G0-P0 及び G14-P0 の期間、ニコチンに暴露された群で同様の結果が得られた。

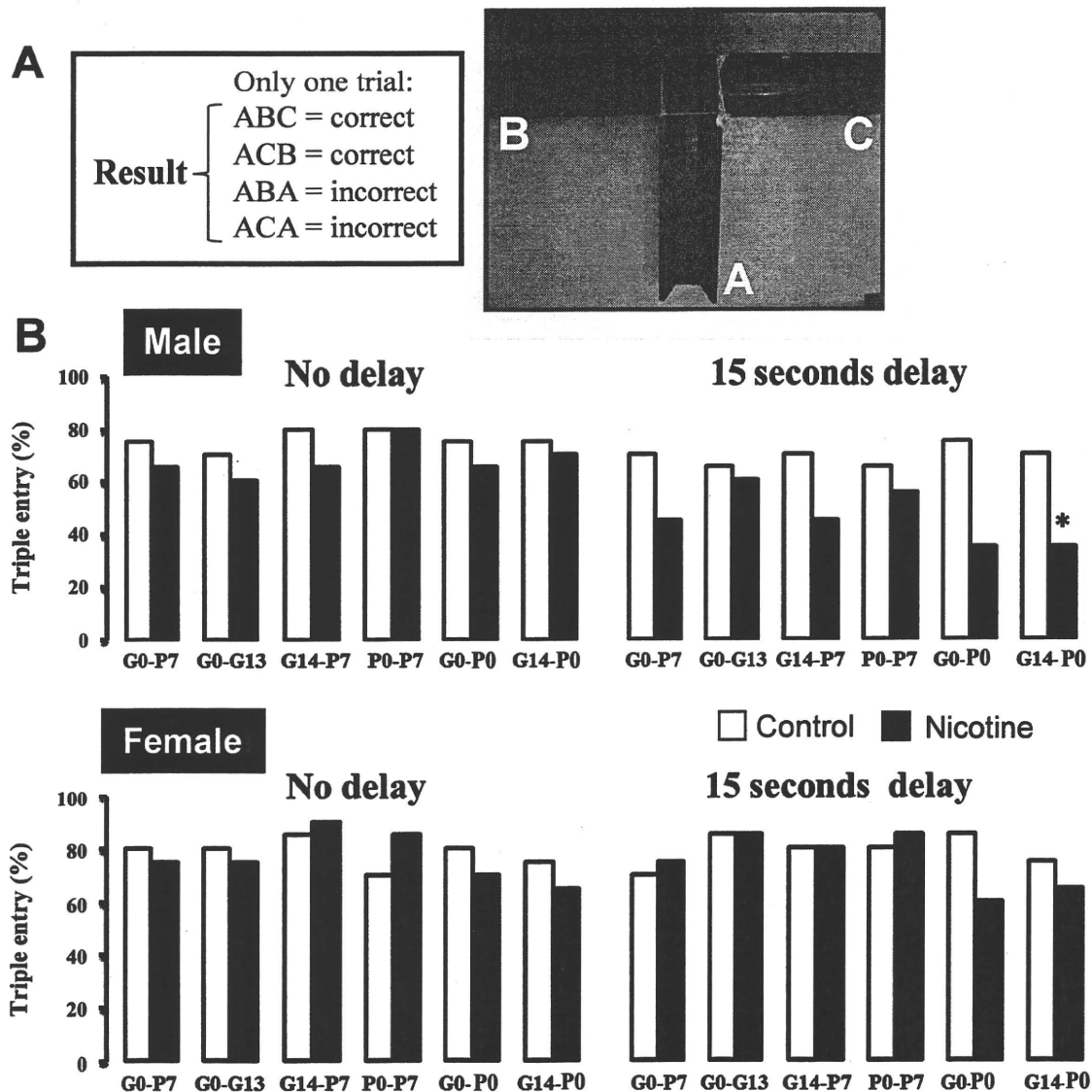


Fig. 32 One-trial delayed alternation test

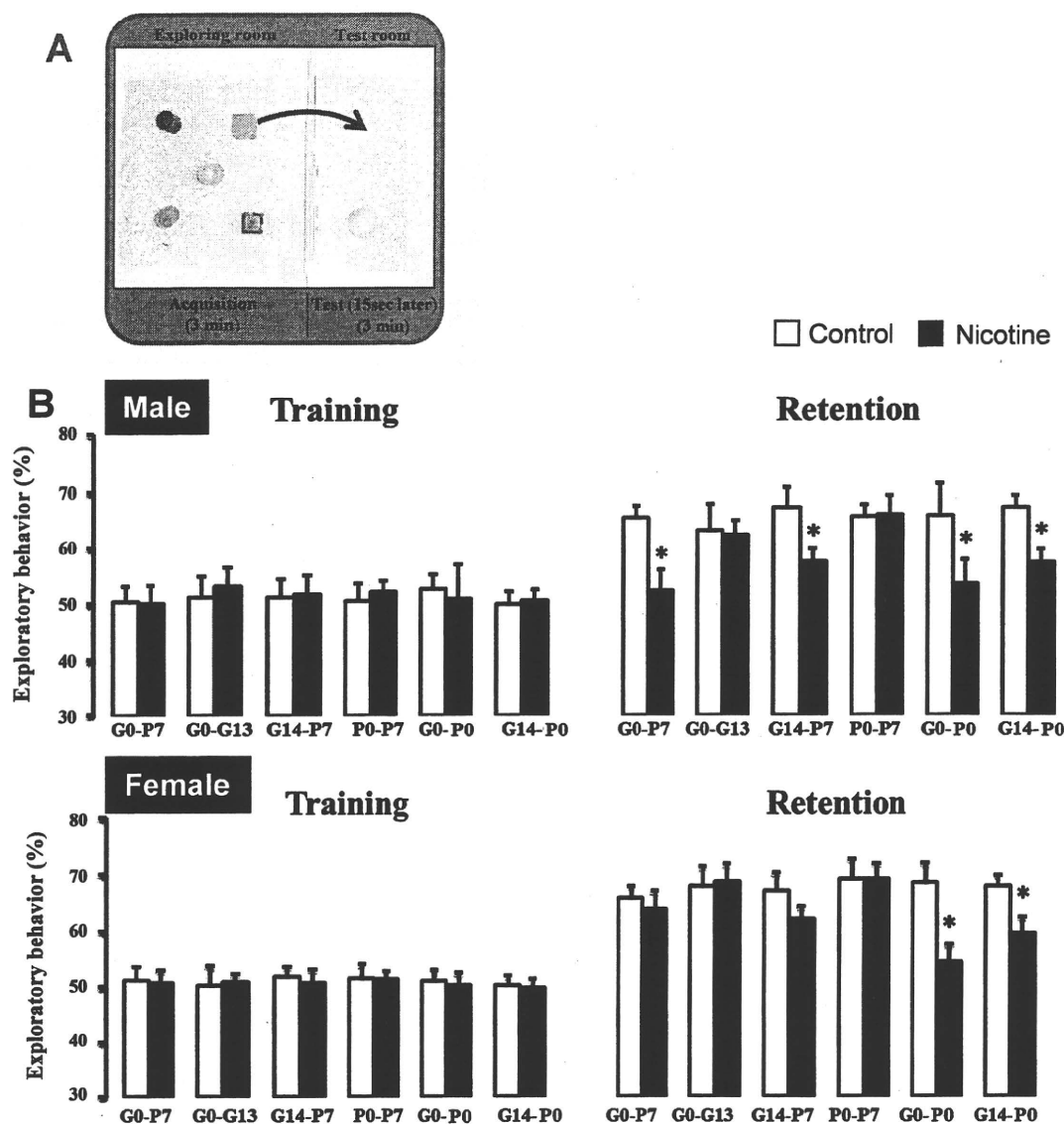


Fig. 33 Object-based attention test

3. 周産期ニコチン暴露による成体期マウス脳における生化学的変化

各種行動試験により、周産期、特に G14-P0 におけるニコチンの暴露が成体期の行動異常を惹起することが明らかになった。そこで次に、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、HPLC 法を用い、G14-P0 ニコチン暴露マウスの脳内における生化学的変化の

解析を行った。

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結果、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。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。(Table 2 and 3)