

**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±s.e.m							
	NA	MHPG	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
prefrontal cortex							
sucrose	447.90±31.69	1337.80±98.50	1579.73±417.57	189.64±40.34	320.60±51.92	706.20±67.35	423.97±49.36
nicotine	491.76±17.72	671.45±49.00**	873.04±207.51	114.62±22.04	194.45±35.68	583.51±24.26	371.64±27.53
Hippocampus							
sucrose	555.89±23.89	757.67±33.11	34.42±5.22	0.00±0.00	47.34±3.23	833.79±32.09	819.34±44.60
nicotine	518.74±20.62	717.74±36.72	33.08±4.87	6.67±3.47	34.47±7.26	810.48±40.81	774.04±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±0.09	0.16±0.03	0.33±0.10	0.60±0.05			
nicotine	1.36±0.07**	0.15±0.02	0.27±0.03	0.63±0.03			
Hippocampus							
sucrose	1.37±0.03	0.00±0.00	0.67±0.18	0.99±0.05			
nicotine	1.39±0.05	0.18±0.11	1.15±0.24	0.96±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±s.e.m							
	NA	MHPG	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
prefrontal cortex							
sucrose	544.54±26.86	973.04±144.36	1021.02±264.29	154.96±42.15	279.09±65.43	914.39±69.96	811.42±94.79
nicotine	613.25±37.16	391.35±43.50**	614.93±179.86	85.84±22.69	228.41±45.88	1006.90±71.99	911.92±94.91
Hippocampus							
sucrose	879.86±98.58	702.28±69.69	196.30±70.34	65.17±28.42	228.42±97.22	1402.98±169.99	1637.16±259.3
nicotine	700.95±65.32	596.09±108.37	440.70±258.94	74.88±36.12	177.51±66.27	1235.09±161.89	1433.36±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±0.28	0.16±0.09	0.68±0.36	0.89±0.07			
nicotine	0.64±0.06**	0.17±0.05	0.75±0.33	0.91±0.07			
Hippocampus							
sucrose	0.83±0.08	0.33±0.12	1.66±0.48	1.18±0.15			
nicotine	0.82±0.12	0.19±0.11	1.16±0.37	1.15±0.10			

**D. 考察**

**I. 胎生期 PCP 暴露が神経発達に与える影響**

本研究において得られた行動学的及び生化学的解析の結果を Table 4 にまとめる。周産期前期である胎生期において PCP を暴露させたマウスでは、多くの点で統合失調症に類似した傾向が認められた。成体期まで長期間持続する陽性症状、陰性症状、認知記憶障害等の統合失調症様行動異常が認められたことに加え、それらの行動異常のうち、陽性症状様のもはクロザピン及びハロペリドールで緩解され、認知記憶障害はハロペリドールでは効果が認められず、クロザピンのみで緩解したことは統合失調症の病態に類似した結果である。さらには、行動異常の一部が NMDA 受容体コアゴニストである D-セリン、及びグルタミン酸トランスポーター阻害剤 DL-TBOA の投与に

より改善された。この結果は、胎生期 PCP 暴露マウスにおいてグルタミン酸神経系の機能低下が生じていることを示唆するものであり、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<sup>9)</sup>、さらにグルタミン酸トランスポーターTの発現増加などが認められたことから<sup>10)</sup>、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

**Table 4 Prenatal PCP treatment-induced behavioral and neurochemical changes**

		PCP 用量		
		5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
陽性症状	行動量測定試験	—	—	行動感作
	+Clozapine	—	—	抑制
	+Haloperidol	—	—	抑制
陰性症状	強制水泳試験	無動時間延長	無動時間延長	—
	+D-Serine	抑制傾向	—	—
	+DL-TBOA	抑制	—	—
認知機能障害	新奇物体認識試験	障害	障害	障害
	+Clozapine	—	—	改善
	+Haloperidol	—	—	効果なし
	+D-Serine	改善	—	—
	+DL-TBOA	改善	—	—
	Y字型迷路試験	障害	—	—
情報処理障害	プレパルス抑制試験	障害	障害	—
神経化学的变化 (前頭前皮質)	NR-1発現量	—	—	増加
	NR-1リン酸化レベル	—	—	低下
	GLAST発現量	増加	—	—
	グルタミン酸基礎遊離量	低下	—	—
	グルタミン酸高K <sup>+</sup> 刺激後遊離量	低下	—	—

—:未試験

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いる<sup>11)</sup>(Table 5)。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。

また、本研究により、胎生期における PCP の暴露が行動異常を惹起する機序として、グルタミン酸作動性神経を産生する神経前駆細胞の分裂を障害し、その神経前駆細胞数の減少、さらには神経細胞数の減少を引き起こしていることが示された。このグルタミン酸神経細胞数の減少が、上述のグルタミン酸機能の低下の直接的な原因だと考えられる。神経前駆細胞の NMDA 受容体の機能として、実際に、初代培養やスライス培養の系では、グルタミン酸の添加が神経前駆細胞の増殖を活性化し、逆に NMDA 受容体アンタゴニス

トがその増殖を抑制したという報告が為されており<sup>12,13)</sup>、本研究の結果と一致するような知見が得られている。さらに、PCP の暴露により神経前駆細胞内において発現変化を起こした遺伝子を網羅的に解析したところ、多くの遺伝子の発現量が減少していることが見出され、これら遺伝子発現の変化が神経前駆細胞の分裂障害をもたらしている可能性が示唆された。特に、有意に発現量が減少した遺伝子の中でも Notch2 は、神経前駆細胞から神経細胞への分化の過程を抑制し、神経前駆細胞の状態を維持する因子として知られている<sup>14)</sup>。従って、PCP 暴露により、Notch2 の発現が減少したという結果は、その機能的に見ても、神経前駆細胞数が減少していたという結果と一致するものであり、今後、その詳細なメカニズムについて、検討していきたいと考えている。

**Table 5 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

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。
パニリン	パニラの匂いの主成分。
エタノール	酒類の主成分。

▽ 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
ディゾシリン	抗痙攣薬
CPP	抗痙攣薬
メサドン	鎮痛薬
メマンチン	抗ウイルス薬、アルツハイマー病治療薬
アマニタジン	抗パーキンソン病薬、A型インフルエンザ予防薬
イフェンプロジル	脳循環代謝改善薬
デキストロメトラン	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<sup>15-17)</sup>。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<sup>18,19)</sup>。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<sup>20)</sup>。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<sup>21)</sup>。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<sup>22)</sup>、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。

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(Table 6 and 7)。さらに、GD14-P0 でのニコチン暴露が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。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。5-CSRTT はその複雑で長い手順のため、マウスを用いての解析は、世界でも数グループのみしか行っていない<sup>23,24)</sup>。さらにマウスを用いての 5-CSRTT はその複雑な手順に加え、ラットに比べ学習能力が劣るため非常に長い手間は

**Table 6 Prenatal nicotine exposure-induced behavioral deficits in male**

Behavioral analysis	Time-windows					
	G0 - P7	G0-G13	G14 - P7	P0 - P7	G0-P0	G14-P0
Light and dark box test (不安様行動)	=	=	=	=	+	+
Elevated plus maze test (不安様行動)	+	=	+	=	+	+
Marble burying behavior test (不安様行動)	+	=	+	=	+	+
Novelty-suppressed feeding test (不安様行動)	+	=	+	=	+	+
Social avoidance tube test (社会性行動)	+	=	+	=	=	+
Sociability test (社会性行動)	=	=	=	=	=	=
Preference for social novelty test (社会性行動)	+	=	+	=	+	+
Y-maze test (作業記憶)	+	=	+	=	+	+
One-trial delayed alternation (作業記憶)	=	=	=	=	=	+
Novel object recognition test (認識記憶)	=	=	=	=	=	=
Object-based attention test (注意機能)	+	=	+	=	+	+
Pre-pulse inhibition test (注意機能)	+	+	+	+	+	+

+ : significantly impaired, = : not significantly impaired

**Table 7 Prenatal nicotine exposure-induced behavioral deficits in female**

Behavioral analysis	Time-windows					
	G0 - P7	G0-G13	G14 - P7	P0 - P7	G0-P0	G14-P0
Light and dark box test (不安様行動)	=	=	=	=	=	+
Elevated plus maze test (不安様行動)	=	=	=	=	+	+
Marble burying behavior test (不安様行動)	=	=	=	=	+	+
Novelty-suppressed feeding test (不安様行動)	=	=	=	=	+	+
Social avoidance tube test (社会性行動)	=	=	=	=	=	=
Sociability test (社会性行動)	=	=	=	=	=	=
Preference for social novelty test (社会性行動)	=	=	=	=	+	+
Y-maze test (作業記憶)	=	=	=	=	+	+
One-trial delayed alternation (作業記憶)	=	=	=	=	=	=
Novel object recognition test (認識記憶)	=	=	=	=	=	=
Object-based attention test (注意機能)	=	=	=	=	+	+
Pre-pulse inhibition test (注意機能)	=	=	=	=	=	=

+ : significantly impaired, = : not significantly impaired

かかり、その確立をより困難にしている。しかし、我々が確立した評価系に加え、5-CSRTTを用いた解析を行うことは、注意欠陥多動性障害、統合失調症など様々な精神疾患の病態研究や治療薬開

発に役立つと考えられる。また、本研究で見出した GD14-P0 にニコチン暴露されたマウスにおいて5-CSRTTを用いた検討を行うことで、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解析評価が可能になると考えている。

## E. 結論

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

また、周産期にニコチンを暴露したマウスでは、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ることが明らかとなった。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。

## [参考文献]

1. Mouri A, Noda Y, Enomoto T, Nabeshima T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int*, 51: 173-184 (2007).
2. Enomoto T, Noda Y, Nabeshima T. Phencyclidine and genetic animal models of schizophrenia developed in relation to the glutamate hypothesis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 29: 291-301 (2007).
3. Wang C, McInnis J, Ross-Sanchez M, Shinnick-Gallagher P, Wiley JL, Johnson KM. Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience*, 107: 535-550 (2001).
4. Cao YJ, Surowy CS, Puttfarcken PS. Nicotinic Andersen JD, Pouzet B. Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1080-1090 (2004).
5. Levin ED, Rose JE. Anticholinergic sensitivity following chronic nicotine administration as measured by radial-arm maze performance in rats. *Behav Pharmacol*. 1: 511-520 (1990).
6. Semenova S, Stoleran IP, Markou A. Chronic nicotine administration improves attention while nicotine withdrawal induces performance deficits in the 5-choice serial reaction time task in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 87: 360-368 (2007).
7. Hevner RF. From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor

- cascades in cerebral cortex development. *Mol Neurobiol*, 33:33-50 (2006).
8. Molyneux BJ, Ariotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8: 427-437 (2007).
  9. Dracheva S, Marras SA, Elhakem SL, Kramer FR, Davis KL, Haroutunian V. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 158:1400-1410 (2001).
  10. Simpson MD, Slater P, Deakin JF. Comparison of glutamate and gammaaminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:423-427 (1998).
  11. Aoshima H. Effects of alcohols and food additives on glutamate receptors expressed in xenopus oocytes: Specificity in the inhibition of the receptors. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 434-438 (1996).
  12. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci*, 24: 645-653 (2006).
  13. Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci*, 20: 5764-5774 (2000).
  14. Gaiano N and Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25: 471-490 (2002)
  15. Chisolm MS, Tuten M, Brigham EC, Strain EC, Jones HE. Relationship between cigarette use and mood/anxiety disorders among pregnant methadone-maintained patients. *Am J Addict.* 18:422-429 (2009).
  16. Langley K, Rice F, van den Bree MB, Thapar A. Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. *Minerva Pediatr.* 57: 359-371 (2005).
  17. Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol.* 25: 427-436 (2003).
  18. Lv J, Mao C, Zhu L, Zhang H, Pengpeng H, Xu F, Liu Y, Zhang L, Xu Z. The effect of prenatal nicotine on expression of nicotine receptor subunits in the fetal brain. *Neurotoxicology.* 29: 722-726 (2008).
  19. Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF. Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 32: 336-345 (2010).
  20. Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther.* 122: 125-139 (2009).
  21. Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 84: 30-44 (2008).
  22. Azam L, Chen Y, Leslie FM. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience.* 144: 1347-1360 (2007).
  23. Young JW, Finlayson K, Spratt C, Marston HM, Crawford N, Kelly JS, Sharkey J. Nicotine improves sustained attention in mice: evidence for involvement of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropsychopharmacology.* 29: 891-900

(2004).

24. Paine TA, Tomasiewicz HC, Zhang K, Carlezon WA Jr. Sensitivity of the five-choice serial reaction time task to the effects of various psychotropic drugs in Sprague-Dawley rats. *Biol Psychiatry*. 62: 687-693 (2007).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem*, 105: 921-32 (2008).
2. Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Takahashi K, Kamei H, Nabeshima T, Yamada K. Involvement of Pallidotegmental Neurons in Methamphetamine- and MK-801-Induced Impairment of Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Reflex in Mice: Reversal by GABA(B) Receptor Agonist Baclofen. *Neuropsychopharmacology*, 33: 3164-3175 (2008).
3. Taku Nagai, Rina Murai, Kanae Matsui, Hiroyuki Kamei, Yukihiko Noda, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 202: 315-328 (2009).
4. Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Ping Lu, Minae Niwa, Akihiro Mouri, Li-Bo Zou, Taku Nagai, Masayuki Hiramatsu and Toshitaka Nabeshima. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. *Behav. Brain Res*, 198: 172-178 (2009).
5. Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The Role of Cyclophilin D in Learning and Memory. *Hippocampus*, 20, 293-304, 2010
6. Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, and Ebihara S. Identification of Usp46, encoding a ubiquitin specific peptides, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test. *Nature Genetics*, 43, 648-653, 2009
7. Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Mouri A, Nabeshima T. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of dopaminergic - extracellular signal-regulated kinase 1/2 systems. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 1343-1354 (2010).
8. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 877-889 (2010).
9. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo KI, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer

- disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron* 65, 480-489 (2010).
10. Sugiura S, Asano M, Kinoshita K, Tanimura M, Nabeshima T. Risks to health professionals from hazardous drugs in Japan: a pilot study of environmental and biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *J Oncol Pharm Pract.* in press (2010).
  11. Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem.* in press (2010).
  12. Shin EJ, Whang WK, Kim S, Bach JH, Kim JM, Nguyen XK, Nguyen TT, Jung BD, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Parishin C Attenuates Phencyclidine-Induced Schizophrenia-Like Psychosis in Mice: Involvements of 5-HT(1A) Receptor. *J Pharmacol Sci.* 113,404-408 (2010).
  13. Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Torii Y, Yamada S, Waki Y, Noda Y, Furukawa H, Nabeshima T, Ozaki N. Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal formation of PCP-treated mice. *Neurosci Res.* In press (2010).
  14. Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima T, Yamada K. Alterations of Emotional and Cognitive Behaviors in Matrix Metalloproteinase-2 and -9-Deficient Mice The *Open Behavioral Science Journal*, 4, 19-25 (2010).
  15. Hagino Y, Kasai S, Han W, Yamamoto H, Nabeshima T, Mishina M, Ikeda K. Essential Role of NMDA Receptor Channel  $\epsilon 4$  Subunit (GluN2D) in the Effects of Phencyclidine, but Not Methamphetamine. *PLoS ONE*, 5, e13722 (2010).
  16. Shin EJ, Whang WK, Kim S, Bach JH, Kim JM, Nguyen XK, Nguyen TT, Jung BD, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Parishin C attenuates phencyclidine-induced schizophrenia-like psychosis in mice: involvements of 5-HT1A receptor. *J Pharmacol Sci.* 113: 404-408 (2010)
  17. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. *Behav Brain Res.* 220:132-139 (2011).
  18. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Kim HC, Nabeshima T. Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res.* 220: 185-193 (2011).
  19. Shin EJ, Duong CX, Nguyen XK, Bing G, Bach JH, Park DH, Nakayama K, Ali SF, Kanthasamy AG, Cadet JL, Nabeshima T, Kim HC. PKCd inhibition enhances tyrosine hydroxylase phosphorylation in mice after methamphetamine treatment *Journal of the National Cancer Institute.* in press (2011).
  20. Yu J, Nagai T\*, Ibi D, Kitahara Y, Nabeshima T, Yamada K. Nicotine ameliorates emotional and cognitive impairments induced by neonatal polyI:C treatment in mice. *Open Behav. Sci. J.* 4: 9-18 (2010). (\*co-first author).
  21. 安藤 雄, 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: 統合失調症モデル動物に認められる行動異常。 *アニテックス.* 22, 20-25, (2010).
  22. 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆 第1編 行 動薬理研究における実験技術 10 統合失調 症動物モデルとその評価法 実験薬理学シリ ーズ 第1巻, 日本薬理学会編集, 金芳堂, 東



京, pp.79-93 (2010).

23. 古関竹直、鍋島俊隆 薬物自己投与と再発・再燃のモデルマウス 日本アルコール・薬物医学会雑誌 第45巻 第3号 p147-156 (2010).
24. 古関竹直、鍋島俊隆 フェンシクリジン 日本臨床 第68巻 第8号 p1511-1515 (2010).

## 2. 学会発表

1. 毛利 彰宏、野田 幸裕、村井 里菜、脇由 香里、田中 光一、鍋島 俊隆 統合失調症モデルマウスに認められる情動障害におけるグルタミン酸トランスポーターの関与について 第3回トランスポーター研究会年会、京都 (2008.6.7)
2. Nabeshima T. (Invited lecture) Our Bright Future:International Collaboration Francke Medal Lecture, ASHP Meeting, Seattle, (2008.6.10).
3. Yukihiro NODA, Akihiro MOURI, Rina MURAI, Minae NIWA, Hiroshi FURUKAWA, Toshitaka NABESHIMA. MOLECULAR MECHANISM OF COGNITIVE DEFICITS IN SCHIZOPHRENIC ANIMAL MODELS AND EFFICACY OF ANTIPSYCHOTICS. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. 名古屋 (2008.9.24)
4. Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Akihiro Mouri, Ping Lu, Masayuki Hiramatsu, Li-Bo Zou, Toshitaka Nabeshima. LONG-LASTING EFFECTS OF PRENATAL EXPOSURE TO NMDA RECEPTOR ANTAGONIST, PHENCYCLIDINE ON BEHAVIOR AND DRUG-INDUCED SENSITIVITIES IN MICE International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. 名古屋 (2008.9.24)
5. Kazuya TORIUMI, Akihiro MOURI, Shiho NARUSAWA, Yuki AOYAMA, Natsumi IKAWA, Lingling LU, Toshitaka NABESHIMA PRENATAL TREATMENT WITH PHENCYCLIDINE INDUCED THE BEHAVIORAL DEFICITS IN MICE. (Poster) International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.名古屋 (2008.9.24)
6. Akihiro MOURI, Yukihiro NODA, Akihiro NODA and Toshitaka NABESHIMA. Involvement of dopamine D4 receptor in the effects of clozapine on cognitive dysfunction in phencyclidine-treated mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. 名古屋 (2008.9.24)
7. Takenao KOSEKI, Akihiro MOURI, Takayoshi MAMIYA, Yuki AOYAMA, Hiroshi FURUKAWA and Toshitaka NABESHIMA. ENRICHED ENVIRONMENT IN CHILDHOOD PREVENTS ABNORMAL BEHAVIORS INDUCED BY PHENCYCLIDINE IN ADULTHOOD (Poster) International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.名古屋 (2008.9.24)
8. 野田幸裕他 統合失調症モデル作成のため、基礎研究者が臨床医に望むこと(シンポジウム) 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会 合同年会 東京 (2008.10.1)
9. 青山雄紀、毛利彰宏、井川夏実、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆 PCP連続投与マウスに認められる行動障害に対する酪酸ナトリウムの効果 (ポスター) 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会 合同年会 東京 (2008.10.1)

10. 毛利彰宏、野田幸裕、古川宏、小林和人、鍋島俊隆 クロザピンのPCP連続投与による認知障害に対する緩解効果にはドパミンD4およびセロトニンS2受容体拮抗作用が関与する (ポスター) 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会 合同年会 東京 (2008.10.1)
11. Shiho NARUSAWA, Akihiro MOURI, Kazuya TORIUMI, Takenao KOSEKI, Yuki AOYAYAMA, Natsumi IKAWA, Takayoshi MAMIYA, Toshitaka NABESHIMA. Anti-ADHD drugs attenuate abnormal behaviors induced by PCP. (Poster) The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan (2008.11.7)
12. Kazuya TORIUMI, Akihiro MOURI, Shiho NARUSAWA, Yuki AOYAMA, Natsumi IKAWA, Lingling LU, Toshitaka NABESHIMA. PRENATAL PHENCYCLIDINE-TREATED MICE SHOWED ABNORMAL BEHAVIOR IN ADULT. (Poster) The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan (2008.11.7)
13. Takenao KOSEKI, Akihiro MOURI, Takayoshi MAMIYA, Yuuki AOYAMA, Hiroshi HURUKAWA and Toshitaka NABESHIMA. Phencyclidine-induced abnormal behaviors in adulthood is prevented by enriched environment breeding in childhood. (Poster) The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan (2008.11.7)
14. 永井拓、衣斐大祐、溝口博之、鍋島俊隆、山田清文 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (京都) (2008.12.20)
15. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏実、陸玲玲、永井拓、鍋島俊隆 胎生期における NMDA 受容体拮抗薬フェンサイクリジンの効果 名城大学学術フロンティア事業第1回若手シンポジウム、名古屋 (2009.3.2)
16. 陸玲玲、間宮隆吉、鳥海和也、毛利彰宏、路平、平松正行、鄒利波、鍋島俊隆: Abnormal behavior and NMDA receptor in the postpubertal mice after prenatal exposure to phencyclidine. 第115回日本薬理学会近畿部会、金沢 (2009.6.25)
17. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, Jaaro-Peled H, Lu L, Nakajima K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 in the developing cerebral cortex leads to dopaminergic disturbance and behavioral deficits after puberty. International Symposium on Brain and Mind Sciences Pathogenesis Study of Schizophrenia: Genes, neurobiology and Clinical Service, Taiwan (2009.8.14)
18. Toriumi K, Mouri A, Narusawa S, Aoyama Y, Ikawa N, Lu L, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal NMDA receptor antagonism impaired glutamatergic neurogenesis, leading to long-lasting behavioral deficits. The 6th Nagoya-Nanjing-Shenyang Symposium on Pharmaceutical and Life Science, Nagoya (2009.9.14)
19. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behavior and NMDA receptor function in the postpubertal mice. The 6th Nagoya-Nanjing-Shenyang Symposium on Pharmaceutical and Life Science, Nagoya (2009.9.14)
20. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏実、陸玲玲、永井拓、鍋島俊

隆：胎生期におけるフェンシクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動障害をもたらす 第32回日本神経科学学会大会 Neuro2009、名古屋 (2009.9.16)

21. Alkam T, Nitta A, Furukawa-hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T; A neuroprotective dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus. Neurosciencemeeting2009 (2009.10.21)
22. 鍋島俊隆：統合失調症グルタミン酸仮説に基づくモデル動物の開発と創薬 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
23. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスを用いた抗精神病薬の作用発現におけるヒストン修飾の関与について 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
24. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏実、陸玲玲、永井拓、鍋島俊隆：胎生期におけるフェンサイクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動異常を惹起する 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
25. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、青山雄紀、古関竹直、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスの行動障害に対する注意欠陥・多動性障害治療薬の作用 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会、京都 (2009.11.13)
26. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏実、陸玲玲、永井拓、鍋島俊隆：胎生期における NMDA 受容体拮抗薬の投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動異常を惹起する 第32回日本分子生物学会、横浜 (2009.12.11)
27. 永井拓、鍋島俊隆統合失調症モデル動物を用いたプロテオーム解析 名城大学学術フロンティア事業第1回若手シンポジウム、名古屋 (2010.3.2)
28. 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響 衣斐大祐、永井拓、溝口博之、北原裕子、小池宏幸、新田淳美、米田幸雄、澤明、鍋島俊隆、山田清文 第82回日本薬理学会年会、横浜 (2010.3.16)
29. Alkam Tursun, 平松正行、間宮隆吉、毛利彰宏、鳥海和也、鍋島俊隆妊娠期ニコチン曝露は出生マウスの感情及び認識行動を障害する 第83回日本薬理学会、大阪 (2010.3.18)
30. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：クロザピンはドパミン D1 受容体を介したヒストンアセチル化によりフェンサイクリジン投与マウスに認められる行動異常を緩解する 第83回日本薬理学会、大阪 (2010.3.18)
31. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. CINP 2010 WORLD CONGRESS, 香港 (2010.6.7)
32. Nitta A, Alkam T, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T. CINP 2010 WORLD CONGRESS, 香港 (2010.6.7)
33. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Effect of antipsychotics on the

- behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. International Behavioral Neuroscience Society, サルディニア, (2010.6.10)
34. Mouri A, Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Nabeshima T. The College on Problem of Drug Dependence (CPDD) 72nd Annual Meeting, アリゾナ (H2010.6.14)
35. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer impaired postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and adult behaviors. コペンハーゲン (2010.7.20)
36. 鍋島俊隆、間宮隆吉、毛利彰宏、野田幸裕: ニコチン性コリン受容体の細胞内情報伝達系を介する認機能の調節機構 喫煙科学財団報告会、東京 (2010.7.28)
37. 永井拓、衣斐大祐、鍋島俊隆、澤明、山田清文: 周産期の免疫異常が神経精神発達におよぼす影響 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
38. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤雄、鍋島俊隆、野田幸裕: 新生仔期の免疫異常は若年期フェンシクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
39. 山田清文、衣斐大祐、中島晶、鍋島俊隆、永井拓: Poly:C 誘発性神経発達障害モデル: 統合失調症動物モデルとしての有用性と発症機構 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)
40. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文: 発達期疑似ウイルス感染モデル動物の神経発達障害における Ifitm3 の役割 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)
41. 野田幸裕、毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、山田清文、鍋島俊隆: 新生期の Poly:C 投与は若年期フェンシクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台(2010.9.15)
42. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Impairment of postnatal dopaminergic maturation and adult behavior in disc1 knockdown mice by utero gene transfer. The International Symposium of Pharmacology-The 3rd Mainland, Taiwan and Hongkong Symposium of Pharmacology, 瀋陽 (2010.9.25)
43. 毛利彰宏、鍋島俊隆: ガランタミンは覚せい剤連続投与マウスに認められる認知障害を緩解する 平成22年度アルコール薬物依存関連学会合同学術総会、小倉 (2010.10.8)
44. 鍋島俊隆: 精神疾患と脆弱遺伝子 DISC1 第20回日本医療薬学会年会、千葉 (2010.10.13)
45. 鍋島俊隆: 遺伝子とストレスの関わりによる精神障害モデル動物 フォーラム富山「創薬」第32回研究会、富山 (2010.10.14)
46. 鍋島俊隆: 薬物依存抑制遺伝子の発見とその機能 日本薬学会北陸支部特別講演会、富山 (2010.10.15)
47. 鍋島俊隆: 薬物依存抑制遺伝子の発見とその機能 日本薬学会北陸支部特別講演会、富山 (2010.10.15)

48. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文: PolyI:C : 誘発性神経発達障害における interferon-induced transmembrane protein 3 の役割 第 118 回日本薬理学会近畿部会、大阪 (2010.10.19)
49. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文 神経発達期の免疫応答誘発性脳機能障害における IFITM3 の役割 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.23)
50. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆 フェンシクリジンによる異常行動に対するクロザピンのエピジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)
51. 丹羽美苗、松本友里恵、毛利彰宏、尾崎紀夫、鍋島俊隆 生後発達期の母子分離・隔離飼育に対する脆弱性が成熟後の行動障害の原因となる 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)
52. 松本友里恵、丹羽美苗、毛利彰宏、Hanna Jaaro-Peled、澤明、鍋島俊隆 遺伝子-環境の相互作用 : Disrupted-In-Schizophrenia 1 遺伝子変異と社会隔離飼育ストレスによるグルタミン酸作動性神経系への相乗的な影響第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)
53. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕 新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)
54. 安藤雄、毛利彰宏、肥田裕丈、脇由香里、吉見陽、鍋島俊隆、尾崎紀夫、野田幸裕 幼若期における社会敗北ストレスは、脳内モノアミン量変化を伴う社会性行動の障害を惹起

する 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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

分担研究者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直

（名城大学薬学部薬品作用学）

## [研究要旨]

【目的】神経が発生・発達する胎児～新生児期は生育環境の影響を最も受けやすい時期のひとつである。私は本研究課題の中で、3種類の受容体関連化合物（N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬：ジゾシルピン、ニコチン型アセチルコリン（ニコチン）受容体作動薬：ニコチン、コレシストキニン受容体拮抗薬：CI-988）について、マウス胎生6日目から出生前日までを処置し、生まれたマウスの5、7及び20週齢時の行動について解析した。

【方法】ICR および C57BL/6J 系雌性マウス（10週齢）を8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（ジゾシルピン 0.02 および 0.2 mg/kg、ニコチン 0.5 および 1 mg/kg、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。

【結果】今回の研究結果について右表にまとめた。ニコチン（0.5 および 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影響を受けなかった。一方、ジゾシルピンは、7週齢時では新奇物体認知試験（0.2 mg/kg のみ）、高架式十字迷路試験（0.2 mg/kg のみ）および社会的相互反応試験（0.02 および 0.2 mg/kg）において生理食塩液投与群と比較して有意な障害が観察された。さらに新奇物体認知試験では5週齢でもジゾシルピン（0.2 mg/kg）による障害が認められた。CI-988（1 mg/kg）は、7週齢時で新奇物体認知試験においてのみ障害が観察された。

【まとめ】NMDA 受容体関連化合物および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、NMDA 受容体関連化合物は生後の情動および学習記憶機能の両方を、コレシストキニン受容体関連化合物は学習記憶機能を障害する可能性があることが分かった。

表 妊娠後期の化学物質暴露によって生後影響を受けた行動

受容体	アセチルコリン		グルタミン酸		コレシストキニン	
	ニコチン		ジゾシルピン		CI-988	
試験方法 (観察項目)	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
	0.5	1	0.02	0.2	0.1	1
オープンフィールド試験 (全般的評価)	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし
新奇物体認知試験 (認知機能)	障害なし	障害なし	障害なし	障害あり (5,7週齢)	障害なし	障害あり (7週齢)
高架式十字迷路試験 (不安感受性)	障害なし	障害なし	障害なし	障害あり (7週齢)	障害なし	障害なし
社会的相互反応試験 (相手との関わりあい)	障害なし	障害なし	障害あり (7週齢)	障害あり (7週齢)	障害なし	障害なし
強制水泳試験 (うつ様状態)	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし
性行動試験(雄性)	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし	障害なし
20週齢では障害は全く観察されなかった。						

## 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

分担研究者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直

(名城大学薬学部薬品作用学)

### A. 研究目的

発達段階の脳は成熟した大人の脳と比べて外的刺激の影響を受けやすく、その結果、思春期・青年期を経て精神発達障害が発症することが多い。外的刺激には身体的および心理的ストレスなどのほか、日常生活で受ける化学物質による刺激があげられる。日本の歴史上最悪とも言われるサリドマイド薬害事件は、サリドマイドを服用した妊婦から生まれた胎児の四肢に発達不全が見られた。このように特に、妊娠中には化学物質暴露によって極めて深刻な事態を引き起こすこともありうる。

現在、我々をとりまく化学物質は無数に存在し、生物に対してどのように影響するかは一つ一つ調べなければ分からない。しかし、化学物質がどの神経系や受容体に関連するかによって分類することは、構造活性相関などから判断すれば比較的容易である。従って、どの神経系や受容体に作用する化学物質であるかを手がかりにして、それらの生物に対する影響を予測することは十分可能と考えられる。

本研究では、我々がこれまで培ってきた研究成果から、グルタミン酸作動性神経系のN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体とコリン作動性神経系のニコチン受容体に着目した。これらは学習記憶機能や情動機能に大きな役割を果たしており、発達成長にも欠くことのできない重要な神経および受容体の一つである。NMDA 受容体に作用する化合物にはフェンシクリジン (PCP) のように毒性が強く、麻薬指定されているものも

ある。また他にも (+)MK801 (ジソシルピン) のような選択的リガンドがある。ニコチン受容体に作用するニコチンは、煙草に含まれる代表的な成分である。妊婦が喫煙すれば胎児は受動的に煙草の成分を摂取することとなり、何らかの影響を及ぼすことは極めて明白である。本プロジェクトでは、妊娠マウスがジソシルピンおよびニコチンに暴露されたとき、胎児にどのような影響を及ぼすかについて成熟後行動学的に検討し、何らかの影響が認められた際にはその作用機序を明らかにすることを目的としてきた。そしてその実験過程で、どちらの神経系にも調節機能を持つコレシストキニン受容体が重要な役割を担う可能性が考えられたため、中枢神経系上に豊富なコレシストキニン受容体2 (CCKR2) 拮抗薬のCI-988を用いて、上記と同様に行動薬理的に検討した。さらに以上の解析を通じて実験動物を用いた行動評価系を確立し、有害化学物質による精神毒性の早期発見と治療方法の開発により、少子化を迎えた現代社会へ国内的対応策を提案していきたい。

### B. 研究方法

#### 1. 実験動物および薬物

実験にはICR系10週齢の雌性マウスにPregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG; シグマ; 50 IU/mL) および human Chorionic Gonadotropin (hCG; シグマ; 50 IU/mL) をICR系8週齢の雄性マウスとの交配の52時間および4時間前に0.1 mL ずつ腹腔内に投与した。交配翌朝のプラグチェックによって交配を確認したマウスを実験に使用した。

Nicotine (ニコチン; シグマ; 0.5 および 1 mg/kg)、dizocilpine (ジソシルピン; シグマ; 0.02 および 0.2 mg/kg) およびCI-988 (トクリスバイオサイエンス; 0.1 および 1mg/kg) を0.9%生理食塩液に溶解し、マウス体重10 gあたり0.1 mLの割合でそれぞれ皮下あるいは腹腔内投与した。4週

齢で離乳させ、5 週齢および 7 週齢になるまでは 1 ケージあたり 4~5 匹で飼育し、給餌給水は自由にさせた。マウスへのストレス負荷が少ない試験から順に自発行動量の測定、オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験を行った。すべての実験は名城大学薬学部動物実験指針および日本薬理学会動物実験指針に従って行った。

## 2. 各種行動実験

自発運動量の測定：マウスを装置 (W50 x L50 x H20 cm) に入れ、その直後からマウスの行動量を赤外線センサーで自動的に測定した。

オープンフィールド試験：新規環境となるオープンフィールド内にマウスを入れ、10 分間マウスの運動量、身繕い、脱糞や排尿などの回数を測定して、マウスの一般行動に変化があるかどうか、また新規環境への適応性について検討した。

新奇物体認識試験：実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱 (W50 x L50 x H20 cm) を用い、装置の底には木屑を敷いた。NORT は馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1 日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に 10 分間マウスを慣らした。2 日目の訓練試行では、装置内に 2 つのオブジェクトを設置し、マウスを 10 分間自由に探索させた。3 日目の保持試行では、いずれか片方のオブジェクトを新奇オブジェクトに置換し、訓練試行 24 時間後に、再びマウスを装置内に入れ、10 分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および 2 つのオブジェクトを探索している総探索時間を測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合 (%) を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合 (%) を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

社会性行動試験：1 日目に装置に対して 10 分間の馴化を行い、2 日後に社会性行動試験を行った。それぞれ異なるケージ内で飼育していた同系統の 2 匹のマウスを同時に装置中央に入れ、その直後から 10 分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動 (sniffing)、相手の動物を追いかける行動 (following)、相手の動物の上に乗るかかるとする行動 (mounting)、相手の動物の下に潜ろうとする行動 (scrawling) のいずれかを示している時間を測定した。

高架式十字迷路試験：2 つのオープンアーム (W8 x L20 cm) と同じ面積の 2 つのクローズドアームからなり、クローズドアームは高さ 20 cm の壁に覆われている実験装置を床から高さ 50 cm に設置した。マウスを静かに中央に置き、5 分間オープンアームあるいはクローズドアームに入る回数及びその滞在時間を測定し、全体に占めるオープンアームに入る回数及びその滞在時間の割合を不安の指標として示した。

強制水泳試験： $\phi$  20 cm x H20 cm のアクリル製円筒容器に水 (25°C) を張り、その中にマウスを入れ 5 分間観察し、無動時間を記録した。

## 3. 統計解析

実験結果は平均値  $\pm$  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、各群間比較には、Tukey の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。

## C. 研究結果

自発行動量の測定：装置に入れてから 5 分ごとの自発行動量を 60 分まで測定したが、5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。



オープンフィールド試験：装置に入れてから 10 分間の運動量、身繕い回数、脱糞数および排尿数は 5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群およびジゾシルピン投与群間に有意な差は認められなかった。

新奇物体認識試験：訓練試行時の探索嗜好率は 5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較してニコチン、ジゾシルピンおよび CI-988 の各投与群間に有意な差は認められなかった。一方、保持試行時では生理食塩液投与群、ニコチン投与群、ジゾシルピン (0.02 mg/kg) 投与群および CI-988 (0.1 mg/kg) 投与群では新奇物体に対する探索行動が有意に増加していたが、ジゾシルピン (0.2 mg/kg) 投与群および CI-988 (1 mg/kg) 投与群においては 7 週齢の探索嗜好率が有意に低下した (図 1)。

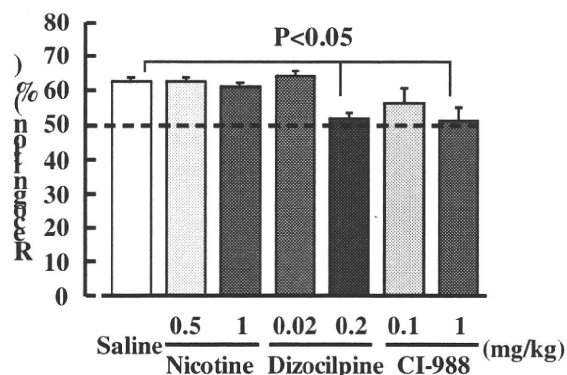


図 1 7 週齢時におけるジゾシルピンあるいは CI-988 投与による新奇物体認識課題の障害。母マウスの妊娠 6 日目から出生時までニコチン、ジゾシルピンあるいは CI-988 を投与した。

社会性行動試験：10 分間相手に対する追尾、身繕い時間を観察したところ、生理食塩液投与群と比較してニコチンあるいは CI-988 投与群ではなんら影響は観察されなかったが、ジゾシルピン投与群ではそれらの行動時間が有意に減少した (図 2)。この減少は 7 週齢でのみ観察され、5 週齢では観察されなかった。

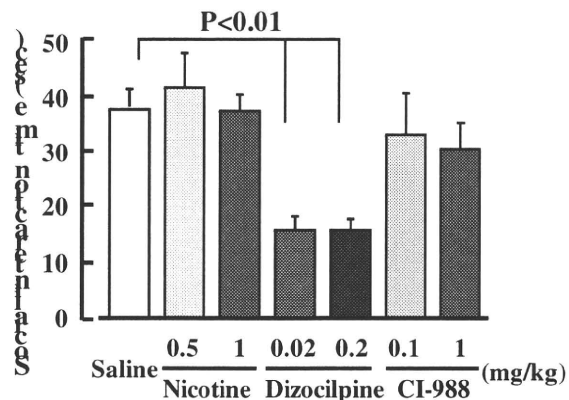


図 2 7 週齢時におけるジゾシルピン投与による社会性行動の障害。母マウスの妊娠 6 日目から出生時までニコチン、ジゾシルピンあるいは CI-988 を投与した。

高架式十字迷路試験：オープンアームでの滞在時間の割合は、生理食塩液投与群、ニコチン投与群、ジゾシルピン (0.02 mg/kg) および CI-988 投与群では特に差は認められなかったが、ジゾシルピン (0.2 mg/kg) 投与群においては 7 週齢では有意に低下していた。この減少は 7 週齢でのみ観察され、5 週齢では観察されなかった。しかし、オープンアームへの侵入回数はいずれの週齢でも投与群間で有意な変化は認められなかった (図 3)。

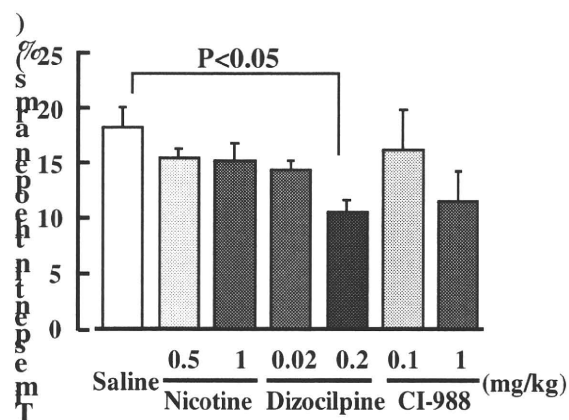


図 3 7 週齢時におけるジゾシルピン投与による高架式十字迷路課題の障害。母マウスの妊娠 6 日目から出生時までニコチン、ジゾシルピンあるいは CI-988 を投与した。

強制水泳試験：装置に入れてから 5 分間の無動時間を測定したが、5 週齢および 7 週齢の両時点に

において、生理食塩液投与群と比較してニコチン投与群、ジゾシルピンおよび CI-988 投与群間に有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では3種類の化合物をマウス妊娠6日目より出生前日までそれぞれ投与し、学習および情動機能について行動学的に解析した。我々のこれまでの予備試験から、妊娠初日から心理的ストレスを負荷すると、不妊となる可能性が高くなることが分かっている（未発表データ）。また、マウスにおいては脳神経系の発達は妊娠6日目から始まり生後約12日まで続くことから、不妊とならないよう、かつ脳神経系への影響を検討できるように投与期間を妊娠期間内に絞り、妊娠6日目から出生前日までと設定した。

母マウスの体重は全ての投与群で同様に増加し、胎児数は母マウス一匹あたり9~12匹で、生後、どのマウス群も生理食塩液投与群と同様に生育した。行動実験をヒトの青年期に相当する7週齢時点で行った。新奇物体認識試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験においてジゾシルピン (0.2 mg/kg) は生理食塩液と比較して有意な障害を誘発した。これまでのところ、本研究と同スケジュールでジゾシルピンの影響を検討した報告は無く、学習記憶及び情動機能に対して重大な影響を及ぼしている可能性が示唆された。成熟ラットやマウスにおいて同様な用量のジゾシルピン (0.1-0.2 mg/kg) 投与によって、認知障害 (Karasawa et al., 2008)、社会性行動障害 (Zou et al., 2008)、不安障害 (Vasar et al., 1993) を誘発することが報告されており、外因性化学物質による NMDA 受容体刺激は、胎児期から成熟期までの広い時期で情動性及び学習記憶機能に影響を与える可能性があることが明らかとなった。しかしながら、学習記憶機能については1課題での評価で

あり、引き続き行動学的検討を行っていることから、今後、より慎重に結論を導きたい。また、NMDA 受容体に作用する他の薬物 (フェンシクリジン) の影響とも合わせて、NMDA 受容体関連化合物の胎児に及ぼす影響について総合的な判断が必要と思われる。

一方、ニコチン受容体に作用するニコチン (0.5 および 1 mg/kg) は学習記憶及び情動機能に何ら影響を与えなかった。今回は成熟マウスにおいて精神的依存症状を誘発する用量を用いた (Nagai et al., 2006)。ニコチンは煙草の主成分の一つであり、妊婦の喫煙によって早産や低体重児が生まれる確率が高くなる (厚生労働省ホームページ)。この点についてもニコチン投与群は生理食塩液投与群と比較しても影響は観察されなかった。通常喫煙者は一日に何回かに分けて煙草を摂取することから、今回の投与スケジュールではヒトにおける煙草の摂取を反映していなかったために、何ら影響が観察されなかったのかもしれない。

試験方法 (観察項目)	ジゾシルピン(0.02 mg/kg)の投与開始時期		
	3週齢	9週齢	10ヶ月齢
オープンフィールド試験 (全般的評価)	障害なし	障害なし	障害なし
自発的交替行動試験 (認知機能)	障害あり	障害あり	障害なし
新奇物体認識試験 (認知機能)	障害なし	障害なし	障害なし
高架式十字迷路試験 (不安感受性)	障害なし	障害なし	障害なし
社会的相互反応試験 (相手との関わりあい)	障害あり	障害あり	障害なし
強制水泳試験 (うつ様状態)	障害なし	障害なし	障害なし
性行動試験(雄性)	障害なし	障害あり	障害なし

表1 ジゾシルピンの投与時期による行動障害のまとめ

次にジゾシルピン (0.2 mg/kg) 投与群で観察された障害がいつから認められるか、またニコチンについては若齢時でも障害が認められないか確かめるために、新たに生後5週齢のマウスについて同様に観察した。すると、ジゾシルピン (0.02 mg/kg) 投与群において新奇物体認識試験でのみ5週齢でも障害が観察された。したがって NMDA

受容体関連化合物は低週齢から学習記憶機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、9 週齢及び 10 ヶ月齢でジブシルピンを投与しても何ら影響がなかったことから、やはり化学物質の影響を受けやすい時期があり、それは若年齢時であると思われる (表 1)。

一方、コレシストキニン受容体拮抗薬の CI-988 は胎児期に暴露されると生後 7 週目で、主に認知機能障害が観察された。コレシストキニン受容体の拮抗によって神経伝達物質 (グルタミン酸など) の機能が低下した可能性が考えられる。

本研究のもう一つの目的は、毒性学的観点からの化学物質の情動・認知行動に対する影響評価手法を開発することである。「(i) 特に子どもの発達に対する影響を対象とし、個体の情動・認知行動に生じる異常現象の評価だけでなく、組織・細胞機能レベルの客観的評価を組み合わせて、(ii) 化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価するシステムの開発に繋がる」ように本課題を進めている。この目標のうち、情動および認知機能についての行動学的側面からの評価システムは概ね確立できた。

## E. 結論

NMDA 受容体関連化合物は胎児に影響を与え生後の情動および学習記憶機能を障害する可能性があることが明らかとなった。また化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価する一連の行動実験方法について概ね確立できた。

## [参考文献]

- Karasawa J, et al. D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. *Behav Brain Res.* 186:78-83 (2008).
- Nagai T, et al. The rewards of nicotine: regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system

through protease activated receptor-1. *J Neurosci.* 26:12374-83 (2006).

厚生労働省ホームページ：  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/qa/detail2.html>

Vasar E, et al. Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. Involvement of NMDA and CCK receptors. *Eur Neuropsychopharmacol.* 3:63-73 (1993).

Zou H, et al. Low dose MK-801 reduces social investigation in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 90:753-7 (2008).

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文および著書発表

1. Iwata Y, Suzuki K, Wakuda T, Seki N, Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N. Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. **PLoS ONE.** 3(5):e2283 (2008).
2. 間宮隆吉 鍋島俊隆：マウスを用いた学習記憶試験法 老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック 日本基礎老化学会 編、(株)アドスリー、東京(2008)
3. Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S. Identification of Usp46, encoding a ubiquitin specific peptidase, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test. **Nature Genetics.** 41:688-695 (2009).
4. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T.: Silibinin attenuates amyloid beta (25-35) peptide-induced memory impairments:

implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 331:319-326 (2009).

5. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T.: Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. **Br J Pharmacol.** 157:1270-1277 (2009).
  6. Chen Q, Tang M, Mamiya T, Im HI, Xiong X, Joseph A, Tang YP. Bi-directional effect of cholecystokinin receptor-2 overexpression on stress-triggered fear memory and anxiety in the mouse. **PLoS One.** 5(12):e15999 (2010).
  7. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. **Behav Brain Res.** 220(1):132-139 (2011).
  8. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Kim HC, Nabeshima T. Evaluation of object-based attention in mice. **Behav Brain Res.** 220(1):185-193 (2011).
- ## 2. 学会発表
1. Lingling Lu, Takayoshi Mamiya, Akihiro Mouri, Ping Lu, Masayuki Hiramatsu, Li-Bo Zou, Toshitaka Nabeshima. Long-lasting effects of prenatal exposure to nmda receptor antagonist, phencyclidine on behavior and drug-induced sensitivities in mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. (名古屋) (H20.9.24.) (国際学会)
  2. Shiho Narusawa, Akihiro Mouri, Kazuya Toriumi, Takenao Koseki, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa, Takayoshi Mamiya, Toshitaka Nabeshima. Efficacy of methylphenidate and atomoxetine in PCP-treated animal. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. (名古屋) (H20.9.24.) (国際学会)
  3. Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuki Aoyama, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima. Enriched environment in childhood prevents abnormal behaviors induced by phencyclidine in adulthood. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. (名古屋) (H20.9.24.) (国際学会)
  4. 青山雄紀、毛利彰宏、井川夏実、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆：PCP 連続投与マウスに認められる行動障害に対する酪酸ナトリウムの効果 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会 合同年会 (東京) (H20.10.1.) (国内学会)
  5. Shiho Narusawa, Akihiro Mouri, Kazuya Toriumi, Takenao Koseki, Yuki Aoyama, Natsumi Ikawa, Takayoshi Mamiya, Toshitaka Nabeshima. Anti-ADHD drugs attenuate abnormal behaviors induced by PCP. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan Korea (H20.11.7.) (国際学会)
  6. Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Yuki Aoyama, Hiroshi Furukawa, Toshitaka Nabeshima. Phencyclidine-induced abnormal behaviors in adulthood is prevented by enriched environment breeding in childhood. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Pusan Korea (H20.11.7.) (国際学会)
  7. 古関竹直、毛利彰宏、間宮隆吉、青山雄紀、鳥海和也、鍋島俊隆：エンリッチな環境はエピジェネティックな変化を介してフェンシクリジン連続投与による行動異常を抑制する 第 82 回日本薬理学会 (横浜) (H21.3.18)
  8. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、青山雄紀、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンシクリジン連続投与マウスを用いた ADHD のモデルの作成の試み 第 82 回日本薬理学会 (横浜) (H21.3.18.)
  9. Ebihara S, Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T.: 1.Usp46, encoding a ubiquitin specific peptidase, is a quantitative trait gene underlying "behavioral despair" in mice. CREST 神経科学国際シンポジウム (淡路) (H21.6.2.)