

Fig.2 頂殿長(CRL)の長さ

菱脳を展開標本において、抗セロトニン陽性の細胞体および線維が観察された。この標本においては後脳に位置する細胞体群を吻側縫線核群、髄脳に位置する細胞体群を尾側縫線核群と称する (Fig.1B)。

吻側縫線核群においては、対照群、サリドマイド投与群、VPA 投与群ともに、

Table 1 Feature in dorsal raphe nucleus (DRN)

	Ctrl	Thal	VPA
Area ($\text{mm}^2 \times 10^2$)	1.64 \pm 0.28	1.46 \pm 0.30	1.58 \pm 0.19
Number of cellbody (N)	113 \pm 20	97 \pm 21	97 \pm 12
Density of cells	69.5 \pm 9.3	67.4 \pm 12.2	61.7 \pm 10.2

Means \pm SD

Table 1 吻側縫線核群の特徴

細胞数、占有面積、細胞体の密度に有意な差はみられなかった (Table 1)。

吻側縫線核群の細胞体はフロアプレートの両側に分布している (Fig.3A)。フロアプレートから最も背側に離れて位置する細胞体までの距離 (Fig.3B, a; Fig.3C) は、対照群と比較してサリドマイド投与群では有意に短くなっていった ($p < 0.05$)。VPA 投与群においても有意差は認められ

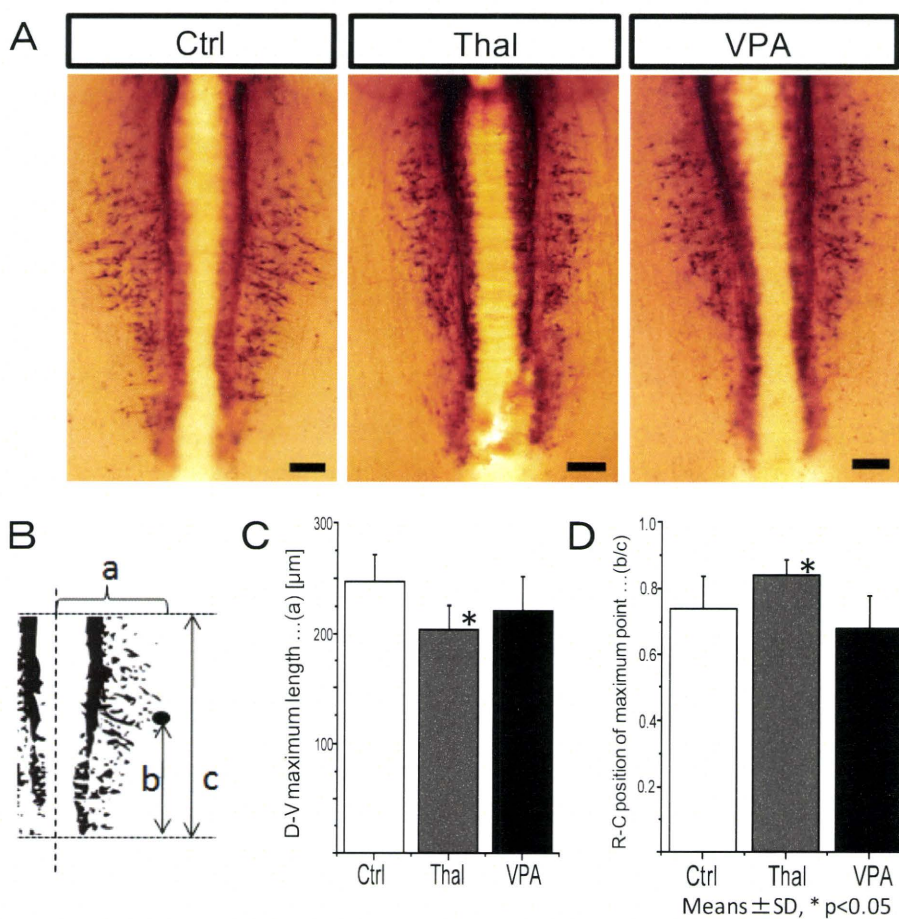


Fig.3 吻側縫線核群の細胞体分布

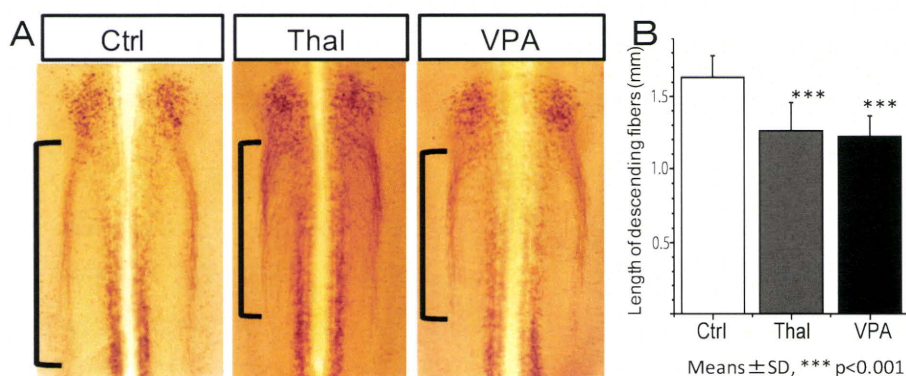


Fig.4 尾側縫線核群からの下行性線維

ないものの、減少する傾向にあった。また、フロアプレートから最も背側に離れて位置する細胞体の吻尾軸方向での相対的な位置 (Fig. 3B, b/c; Fig. 3D) は、対照群よりもサリドマイド群がやや吻側に、有意に変位することが認められた

($p < 0.05$)。VPA 投与群では有意な差は認められなかった。このように、サリドマイド投与群や VPA 投与群では、細胞体の数や占有面積は変化しないものの、分布の様式がフロアプレート寄りに集合し、背側への拡大が少なくなっており、この傾向は VPA 投与群よりもサリドマイド投与群で現れやすかった。

尾側縫線核群の細胞体の数や分布に顕著な差は認められなかった (data not shown)。尾側縫線核の吻側の神経核からは、下行性線維が伸長していた (Fig. 4A)。対照群と比較してサリドマイド投与群、VPA 投与群ともに、下行性線維の長さは有意に短くなっていた ($p < 0.001$) (Fig. 4B)。

D. 考察

胎生期のセロトニン神経の起始核となる縫線核群と下行性線維の形態について、自閉症モデルであるサリドマイド投与と VPA 投与群では、吻側縫線核群の細胞体分

布と尾側縫線核からの下行性線維に異常が観察された。

菱脳の展開標本は吻尾軸、背腹軸方向の連続情報の把握に優れた標本である。この標本において腹側正中線であるフロアプレートは中央に位置し、ここを原点として座標軸を決め定量化を簡便に行うことができる。しかし、軟膜—脳室側方向 (深さ方向) の情報を得るのは困難である。特に、抗体染色においては抗体の浸透の程度が検知できる形態の制約条件となりうる。この懸念を払拭するために、実際に展開標本を切片にして同様に染色して観察したところ、この時期の胎仔では細胞体は軟膜側の表層に位置し、細胞数も展開標本で観察されるものと同数であることが確認できた (data not shown)、抗セロトニン陽性の細胞体の一部ではなくほぼすべてを可視化できている。したがって、本研究の胎生期のセロトニン神経系の形態観察に展開標本を用いたことは適切かつ有用であるといえる。

吻側縫線核群の細胞体分布の異常について、最も背側に位置する細胞体の位置が腹側寄りになったことに着目し、その機序を考察する。その原因の一つはセロトニンニューロンの誕生・誘導に関わる

因子の発現範囲 (progenitor domain) が縮小した可能性がある。とくに関連する先行研究では Shh の発現量がリアルタイム PCR で減少し、全胚 *in situ* hybridization で中脳後脳境界部から橋にかけて減少傾向にあることが報告されている。今回用いた展開標本において、Shh などの関連因子の発現状況を調べれば、この仮説の傍証となると考えられる。もう一つは誕生したニューロンの細胞移動の機構が影響された可能性である。セロトニンニューロンの接線方向の細胞移動に関する基本的な知見は十分でなく、今回の細胞体に細胞移動の形態に特徴的な先導突起 (leading process) が観察されなかったものの、細胞体は背腹軸方向に伸びた紡錘状をしており、細胞移動の可能性を排除することはできない。細胞移動の方向を規定する軸索ガイド因子であり腹側に発現する semaphorin ファミリーの発現状況などを確認すれば傍証となりうる。

尾側縫線核群からの下行性線維について、神経線維の伸長抑制が胎仔の成長そのもの阻害による影響でないことは、頂殿長に差がないことからその可能性を排除することができる。セロトニン神経系の下行性線維は、脊髄レベルに達し、姿勢の調節や痛覚情報の修飾に働くとも言われているが、今回観察された下行性線維の伸長抑制が、成体でのどのような線維連絡に対応し、生理的な意義を有するかは十分明らかではない。しかし、下行性線維の伸長抑制が存在することは、同時期に、上行性線維の伸長も抑制されることを示唆する。上行性線維は大脳皮

質にも投射し、広汎に情動に関与するので、自閉症をはじめ種々の気分障害の病態解明の端緒を開くことに繋がると考えられる。今回の標本では起始核の形態を調べるため、菱脳領域を対象としたが、中脳以前の領域の標本も作製し、上行性線維の形態観察が今後の課題として挙げられる。

E. 結論

サリドマイド、バルプロ酸のばく露は、胎生期のセロトニン神経の起始核の形態発達にも影響を与える。下行性線維の伸長の抑制が認められたことから、上行性線維の伸長も抑制される可能性があり、中枢神経系の広汎なセロトニン神経の投射形成が阻害されている予見される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Narita M, Oyabu A, Imura Y, Kamada N, Yokoyama T, Tano K, Uchida A, Narita N. Nonexploratory Movement and Behavioral Alterations in a Thalidomide or Valproic acid-induced Autism Model Rat. *Neuroscience Research*, 66: 2-6; 2010
2. Narita N, Tazoe M, Narita M. (分担執筆) Obsessive Eating In: The Handbook of Behavior, Diet and Nutrition. Springer, editor, Victor R. Preedy., *in press*
3. Narita N, Tazoe M, Narita M. (分担執筆) Hyperkalemia and hyperdopaminemia along with

psychological modification induced by an obsessive eating of banana in an anorexia nervosa adolescent. In: Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues. Editor: Alisha E. Cohen, Nova Science Publishers, Inc. 2011.

4. 成田正明 乳幼児突然死症候群とセロトニン MMJ(The Mainichi Medical Journal) vol.6 (8); 448: 2010.

5. 成田奈緒子・熊倉悠佳・田副真美・成田正明・酒谷薫、役割演技の脳科学的評価と学級活動への応用性の検討, 文教大学教育学部紀要 第44集 15-24: 2010

6. 成田正明 化学物質の胎生期ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究 食品衛生研究 60; 7-13: 2010

学会発表

1, 成田正明、大薮明子、太城康良、成田奈緒子、自閉症の動物モデル 第15回認知神経科学会学術集会 シンポジウム (シンポジスト) 2010年7月17日 島根

2. (招待講演) Pediatric Developmental Disorder, Autism, Caused by Perturbation of Serotonergic Neuronal Development Induced by Embryonic Thalidomide Exposure. BIT' s 1st Annual World Congress of

NeuroTalk (2010.6.21 Singapore)

3, Kaori Tano, Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Naoki Kamada, Fumihiko Nasu, Masaaki Narita

Manserlin, a novel secretogranin II-derived peptide, distributes in the rat endocrine pancreas

Society For Neuroscience meeting 2010 Nov 13-17, USA

4, 大薮明子、太城康良、江藤みちる、大河原剛、成田正明

自閉症モデルラット胎生期におけるセロトニン神経系の形態異常

第70回日本解剖学会中部支部学術集会 2010年10月16-17日 岐阜

5, 大薮明子、田野かおり、江藤みちる、大河原剛、太城康良、成田正明

胎生期におけるサリドマイド/バルプロ酸ばく露によるセロトニン神経の形態異常

第116回日本解剖学会総会全国学術総会 2011年3月28-30日 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

平成 22 年度研究課題：「化学物質ばく露モデル動物解析」・

その2 胎生期チメロサルバく露によるセロトニン神経の初期発生に関する研究

研究代表者 成田 正明 三重大学大学院医学系研究科 教授
研究協力者 江藤 みちる 三重大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

チメロサルバは、予防接種の防腐剤として広く一般に使用されているが、有機水銀であることから、人体、特に妊婦の母体を経て胎児に対する悪影響が懸念されている。しかし、その安全性は明確にされていない。今回の研究では、胎生 9 日目のラットにチメロサルバく露を行い、胎生 15 日目のラット胎仔後脳のセロトニン神経について免疫組織化学的手法を用いて形態学的に調べたところ、コントロール群と比較してセロトニン神経細胞の増加が見られた。このことから、チメロサルバはセロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことが示された。

A. 研究目的

水俣病の原因であるメチル水銀に代表される有機水銀は神経障害を引き起こすことでよく知られている。メチル水銀やエチル水銀は、血液脳関門を通り抜け、神経毒性を示す。また、胎盤も通過できることから、妊婦から胎児へ移行することで胎児性水俣病も発生し、重篤な神経障害を引き起こしてきた。

チメロサルバは有機水銀の一種であり、その化学構造にはエチル水銀が含まれている。チメロサルバは防腐剤として知られており、なかでもワクチンの開封後細菌汚染防止に広く用いられていることか

ら、特に小児における頻回投与による体内への蓄積や、妊娠期における胎児への影響について懸念されている。

研究代表者らは、妊婦の内服で発達障害をきたすサリドマイドや抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムを胎生期にばく露することで発達障害モデルラットを作製してきた。このラットでは生後の「行動異常」および「セロトニン神経系の異常」を呈する。また、すでに胎児期においてセロトニン神経系の異常が始まっていることが明らかにされている。チメロサルバの生体に対する影響については生後幼若期において痛みに対する感受性の変化

や海馬における神経変性についての報告があるが、胎生期における影響については調べられていない。本研究では、チメロサールの胎生期ばく露が神経の初期発生に影響を与えるか否かを明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

本研究は三重大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。チメロサール/生理食塩水溶液 (1 mgHg/kg) を妊娠 9 日目の Wistar ラット (膣栓確認日を胎齢 0 日とした) の大臀筋に筋肉注射により投与した。コントロールは生理食塩水のみを同様に投与した。E15 で帝王切開により胎児を取り出し、神経管を背側から切開して脳幹部分の展開標本を作製した。標本は 4%パラホルムアルデヒドで一晩 4°C にて固定後、TBS 中で 4°C にて保存した。標本を抗セロトニン抗体で ABC 法による免疫染色を行い、DAB で発色を行った。光学顕微鏡下で観察し、デジタルカメラ

による撮影を行った。背尾側に見られたセロトニン弱陽性細胞の数を片側について計測し、実験群と対照群で比較した。

C.研究結果

ラット胎仔の脳幹展開標本は、セロトニン系の神経核や線維を空間的に把握することができる優れた方法である。胎生 15 日ラット胎仔の脳幹展開標本において、セロトニン系の神経核は吻側縫線核群と尾側縫線核群の主に二か所に存在する。尾側縫線核群には、底板より背側に存在する大縫線核 (B 3) と、さらに尾側の底板付近に存在する淡蒼縫線核 (B 1) と不確縫線核 (B 2) が存在し、それぞれの神経核から尾側へと神経線維が伸びている。これらの神経核および神経線維は、抗セロトニン抗体を用いた免疫染色で検出することが可能である。本研究では、この方法を用いて、胎仔 9 日にチメロサールばく露を受けたラット胎仔のセロトニン神経を調べたところ、B 3 から

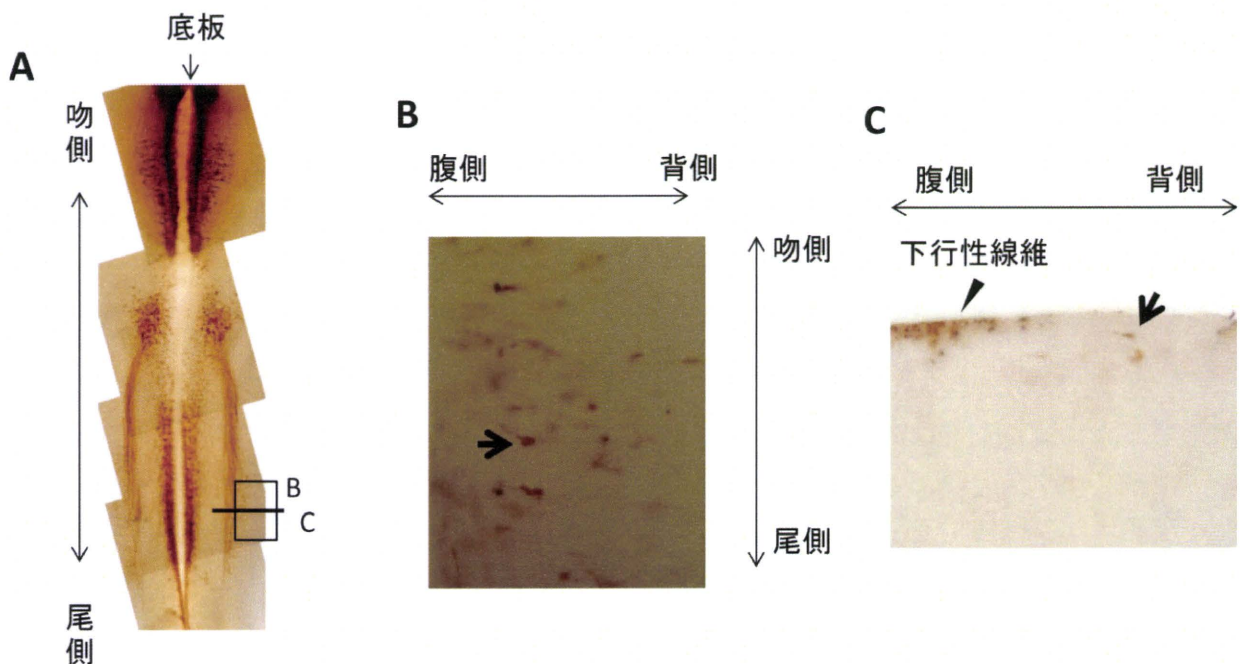


図1 胎生15日ラット脳を展開標本のセロトニン免疫染色
 (A)弱拡大像、(B)強拡大像。矢印はセロトニン陽性細胞を示す。
 (C)断面。矢印はセロトニン陽性細胞を示す。矢頭は大縫線核から伸びる下行性線維を示す。

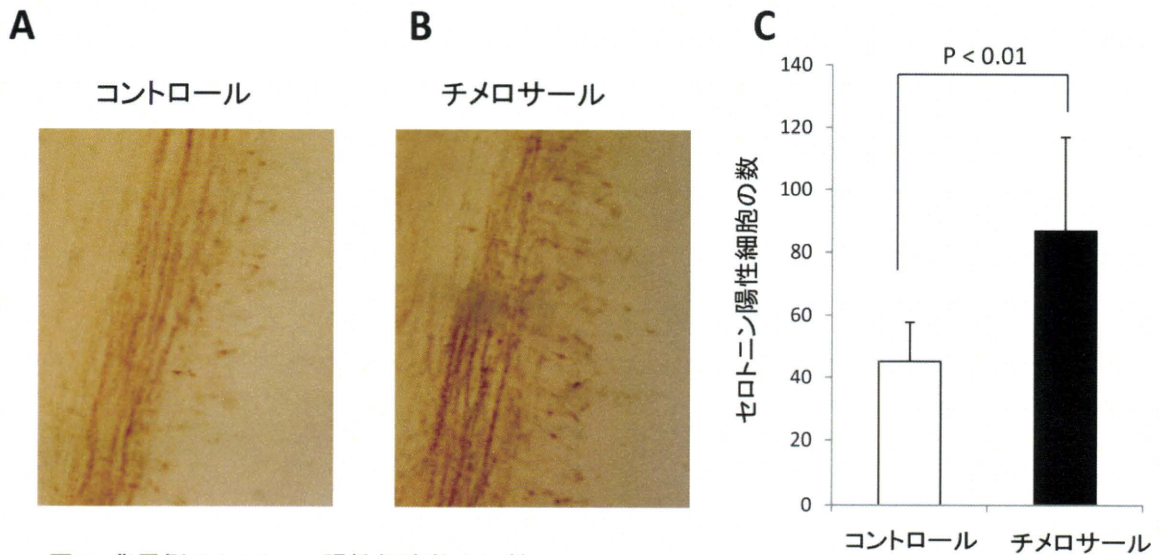


図2 背尾側のセロトニン陽性細胞数の比較
 (A、B)チメロサル投与群およびコントロール群のセロトニン免疫染色
 (C)セロトニン陽性細胞数の比較

伸びた下行性線維の延長線上でB 1 – B 2 よりも背側に位置した部分に、セロトニン弱陽性細胞が検出された (図 1 A)。

この細胞は底板に直行した方向に紡錘状の形態を示したものが多く見られた (図 1 B)。この細胞の局在をより詳しく調べるため、固定後の展開標本をビブラトームで 100um の厚さにスライスし、セロトニン抗体で免疫染色を行った。展開標本の断面から観察したところ、この細胞は軟膜側の比較的表層に位置していたことから (図 1 C)、展開標本のままで十分染色が可能であることが示された。この細胞は、対照群と比較してチメロサル投与群に多く見られ (図 2 A、B)、対照群 (n=9) とチメロサル投与群 (n=7) でセロトニン陽性細胞の数を比較するとチメロサル群はコントロール群の 1.9 倍であった (図 2 C、Unpaired T-test で $p < 0.01$)。この細胞群以外の縫線核セロトニン陽性細胞の数・分布・線維の長さについては、対照群およびチメロサル投

与群で差は見られなかった。

D.考察

チメロサルは有機水銀の一種であることから、その神経毒性について懸念されていたが、詳細は明らかにされていなかった。本研究では、妊娠ラットにチメロサルをばく露後その胎仔のセロトニン系神経の形態学的解析を行い、胎生期チメロサルばく露がセロトニン神経細胞の増加を引き起こしセロトニン系神経の初期発生に影響を及ぼすことを初めて示した。

セロトニン神経細胞は胎生 13 日に縫線核の吻側の縫線核群から発生しはじめ、胎生 15 日には尾側の縫線核群も出現してくることが知られている。セロトニン神経細胞はそれぞれしかるべき場所に移動し、上行性および下行性線維を伸ばしていく。

本研究で着目したセロトニン陽性細胞については、これまでに明確に報告された論文はない。その理由は、縫線核にお

ける他のセロトニン陽性神経核と比較して数が少ないために、従来の薄切法では見つからなかったと考えられる。また、展開標本を用いた論文でもこの細胞については記述されていない。

この細胞は底板に直行した方向に紡錘型を呈しており、背腹方向に移動途中であることを示唆している。胎生 14 日では尾側縫線核のセロトニン神経は発現していなかったことから、この細胞は胎生 14 日以降 15 日までの間に発生したと考えられる。どこから発生してきたのかを明らかにするためには、胎生 14.5 日などさらに詳しく解析する必要がある。一方、胎生期にチメロサルバク露を受けた生後 50 日ラット海馬のセロトニン濃度を測定したところ、予備的結果ではあるが、コントロールと比較してセロトニン量の増加が見られた。このことは、チメロサルバク露による胎生 15 日縫線核セロ

トニン神経細胞の増加したと矛盾しない。この細胞の最終的な到達位置や線維の投射先など、その後の神経の発達についても詳細に調べる必要がある。

E.結論

胎生期にチメロサルバク露することで、ラットの腹尾側縫線核におけるセロトニン系神経細胞の分布異常が見られ、セロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことが示された。

G.研究発表

「その 1」にまとめて記載

H.知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 22 年度研究課題：「DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析」
研究分担者 田代朋子 青山学院大学・理工学部 教授

研究要旨

本分担研究は、化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響を明らかにし、より客観的な発達障害診断法を開発することを目的とする研究の中で、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤に、化学物質の影響を強く受ける脳内部位とタイミングを効率的に検討し、バイオマーカーの発見を目指すものである。本年度は、初年度に引き続き、(1)胎生期サリドマイドばく露による自閉症モデルラット、および(2)胎生期-生後初期トリブチルスズ(TBT)ばく露ラット、の二種類のモデル動物を用いた研究を進めるとともに、(3)培養細胞を用いた評価系についても研究を開始した。

(1) では、初年度に行った大集積アレイの解析結果を精査したところ、Rett 症候群の原因遺伝子であるメチル CpG 結合タンパク MeCP2 の標的として知られる複数の遺伝子の発現が THA 群で上昇することが新たに判明したため、この経路でエピジェネティックな調節を受ける遺伝子群の発現プロファイルが THA ばく露により変化するかどうかを検討した。(2) TBT ばく露では、胎生期-乳児期の経世代ばく露と成熟後の直接ばく露との比較を行った。(3)では、E18 ラット大脳皮質由来の神経細胞とアストロサイトの混合培養系を用いて化学物質ばく露の影響を調べる系を立ち上げ、TBT の影響評価を開始した。

A. 研究目的

複雑な構造と機能を持ち、部位により異なる発達経過を示す脳に対する化学物質の影響を調べるには、効率的かつ高感度な方法の確立が急務である。

化学物質による遺伝子発現の変化を調べることにより、その影響および作用メカニズムを特定するトキシコゲノミクスは、感度の良いリスク評価法として注目されている。多数の遺伝子の発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイは、この方法の有力な道具であるが、感度、定量性、コストなどに課題が残り、現状では一般的なリス

ク評価方法とはなり得ていない。分担研究者・田代は、シナプスの構造と機能に関与し、発達に伴って大きく発現変化する遺伝子群に焦点を絞ることで、効率よく脳の発達過程をモニターする独自の DNA マイクロアレイ「シナプトアレイ」を作成し、実際に発達期小脳 (Takahashi et al., *J. Neurosci. Res.*, 2005; *J. Neurochem.*, 2008) や培養神経細胞 (Kitamura et al., *J. Neurosci. Res.*, 2007)、海馬切片培養 (Kawaai et al., *J. Neurosci. Res.*, 2010) に応用してその有効性を実証している。

本分担研究ではまず、成田らが確立した

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

B. 研究方法

化学物質胎生期ばく露ラットの作成：初年度に引き続き、サリドマイド誘発自閉症モデルラットおよび胎生期－生後初期トリブチルスズばく露ラットを作成し、使用した。(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラットは、成田らの方法 (Narita et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005) に従い、妊娠 9 日目ラットにサリドマイド (500mg/kg) を単回強制経口投与することで作成した (6 腹)。溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与し、対照群を作成した (6 腹)。生後 7、14、20、40 日の各時点で、生まれた仔ラット (♂) の頸動脈から PBS を灌流した後、大脳皮質および海馬を採取した。大脳皮質は左右それぞれの前半部を RNA 抽出用とタンパク質抽出用に使い、後半部で HPLC によるセロトニンの定量を行った。(2) 胎生期－生後初期トリブチルスズ (TBT) ばく露ラットは、妊娠 2 日目から出産後 3

週まで、母ラットに 125 ppm の TBT クロライドを混餌投与して作成した。TBT を含まない通常餌を与えた親から生まれた仔を対照群とした。生後 3 週間で離乳後は、TBT を含まない通常餌に切り替えて生後 6 週まで飼育した。2010 年度はさらに、生後 6 週～9 週まで TBT を含む餌を直接投与することにより、成熟後ばく露群と再びばく露群を作成した。3、6、9 週の各時点で各群の仔ラット (♂) から、大脳皮質、中脳、および海馬を採取した。

リアルタイム PCR 解析：各個体、各組織の total RNA から逆転写によって cDNA を作製し、各遺伝子に特異的なプライマーと蛍光インターカレーター Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った (ABI 社、StepOne)。Ppia または β -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット：2010 年度に三重大学グループと共同で、市販のラット用大集積アレイ (44,000 プローブ; Agilent 社) を用いた P14 大脳皮質におけるサリドマイド曝露群 (THA 群)、対照群 (CTL 群) およびヴァルプロ酸曝露群 (VPA 群) の遺伝子発現解析を行った。THA 群と VPA 群に共通した発現変化に焦点を絞って

解析した昨年度とは別に、今年度改めて THA 群の結果を精査したところ、以下のようにメチル化 DNA 結合タンパク MeCP2 との関連が示唆されたので、この点に注目してリアルタイム PCR による確認を行った。

表 1 に示すように、CTL 群に比べて THA 群で 1.3 倍以上発現上昇した遺伝子中には

THA 曝露により発現 が上昇した遺伝子	THA 曝露により発現 が低下した遺伝子
1.5 倍以上 : 30 <i>pkp2, erbb2, fkbp5,</i> <i>agtr1a, fgf16</i>	0.5 倍以下 : 42 <i>irs1, htr3b, egr1,</i> <i>camk2b, faslg</i>
1.3~1.5 倍 : 63 <i>igfbp3, htr7,</i> <i>htr1a, sncg, cnp1,</i> <i>ucp2</i>	0.7~0.5 倍 : 13 <i>adrala, slc23a3,</i> <i>slc9a3</i>

表 1 : DNA マイクロアレイ法で検出された THA ばく露により発現変化する遺伝子の候補

fkbp5, *igfbp3*, *ucp2*が含まれていた。これらは Rett 症候群の原因遺伝子である *mecp2* の標的として知られる遺伝子である。また、発現低下した遺伝子群に検出された *egr1* の遺伝子産物である Egr1 タンパクは神経活動により発現上昇する転写因子で、MeCP2 と相互に発現を制御しあうことが知られている。

MeCP2 はプロモーター領域にあるメチル化 DNA 部位に特異的に結合し、その遺伝子の転写を抑制するメチル化 DNA 結合タンパクの一種である。本モデル動物にみられる発達障害にこのようなエピジェネティックな調節機構が関与する可能性を検討するため、マイクロアレイ法で検出された *fkbp5*、

igfbp3, *ucp2*の三種類に加えて *bdnf*, *mobp* の二種類の MeCP2 標的遺伝子および *mecp2* 自身の発現プロファイルを今年度新たに作成した THA 群、CTL 群を用いてリアルタイム PCR 法で解析した (表 2)。

	P7	P14	P20	P40
<i>mecp2</i>	→	→	→	→
<i>fkbp5</i>	→	↑	→	→
<i>igfbp3</i>	→	→	→	→
<i>ucp2</i>	↑*	↑*	↑*	→
<i>mobp</i>	↑*	→	→	→
<i>bdnf</i>	→	→	→	↑

表 2. リアルタイム PCR 法による *mecp2* とその標的遺伝子の発現変化。両群で差のない場合(→)、THA>CTL(↑)、THA<CTL(↓) ; 有意差あり*

その結果、*mecp2* 自身の発現変化はみられなかったが、*ucp2*, *mobp* で有意な発現上昇が、*fkbp5*, *bdnf* では一部の時点で上昇傾向がみられた。現在、MeCP2 の発現やリン酸化状態についてタンパク質レベルで調べている。一方、*egr1*, *camk2b* など神経活動と密接に関連する遺伝子が発現低下していることから、ポストシナプス側の構造を中心にタンパクレベルでの変化を検討予定。

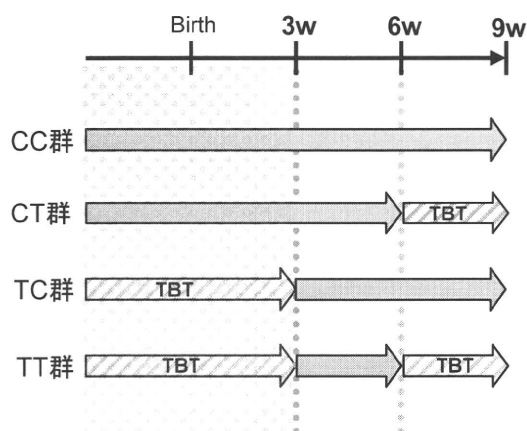


図1. TBT ばく露の有無とばく露時期による4群の作成。CC；非ばく露対照群、CT；成熟後ばく露群、TC；発達期ばく露群、TT；再ばく露群

(2) 胎生期-生後初期 TBT ばく露ラット：

2010年度は、胎齢2日目から生後3週まで継続的にTBTを経世代ばく露するこれまでの実験群に、生後3週～6週にわたって直接ばく露する群を加えた4群で実験を行い、比較した(図1)。

表3に示したように、9週齢における4群の体重および肝臓、腎臓の組織重量を比較すると、成熟後ばく露(CT群; adult-exposed)では非ばく露対照群(CC群; control)と差がなく、発達期にばく露を受けた二群(TC群; perinatally-exposed および TT群; re-exposed)で約25%の減少がみられた。一方、胸腺の組織重量は、発達期、成熟期を問わず、直前までばく露された群(CT群、

表3. 9週齢における4群の体重および臓器重量

		3w	6w	9w
体重	Control	50.64 ± 1.44	220.08 ± 4.81	362.82 ± 8.66
	Adult-exposed			360.73 ± 6.11
	Perinatally-exposed	33.31 ± 1.39	160.69 ± 5.40	278.08 ± 6.92
	Re-exposed			268.62 ± 6.51
肝臓	Control	1.96 ± 0.07	10.51 ± 0.35	15.17 ± 0.55
	Adult-exposed			16.35 ± 0.52
	Perinatally-exposed	1.37 ± 0.06	8.05 ± 0.35	11.81 ± 0.32
	Re-exposed			12.28 ± 0.52
腎臓	Control	0.57 ± 0.02	2.00 ± 0.04	2.82 ± 0.06
	Adult-exposed			2.61 ± 0.06
	Perinatally-exposed	0.39 ± 0.02	1.59 ± 0.06	2.23 ± 0.06
	Re-exposed			1.98 ± 0.06
脾臓	Control	0.28 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.93 ± 0.04
	Adult-exposed			1.05 ± 0.05
	Perinatally-exposed	0.11 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.80 ± 0.02
	Re-exposed			0.74 ± 0.04
胸腺	Control	0.18 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.04
	Adult-exposed			0.43 ± 0.02
	Perinatally-exposed	0.07 ± 0.00	0.53 ± 0.03	0.57 ± 0.02
	Re-exposed			0.40 ± 0.02

TT 群) で有意に低下しており、免疫系に対する影響が TBT ばく露を止めると回復しやすいことと一致する。

この 4 群を用いて、昨年度までの実験により TBT の影響が大きい部位であることが明らかになった中脳の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で比較した。ドパミン産生の律速酵素であり、ドパミン神経細胞のマーカーともなるチロシン水酸化酵素 (*th*) の発現は、発達期ばく露が終了した 3 週齢の時点では、TBT ばく露群で有意に上昇していたが、6 週齢では非ばく露群と同レベルに戻っていた。しかしながら、6 週~9 週での再ばく露により、図 2 に示すように、発達期ばく露群は *th* の大幅な発現低下を示した (図 2)。一方、6 週~9 週の初回ばく露 (CT 群) での発現低下は発達期ばく露に比べて緩やかであった。

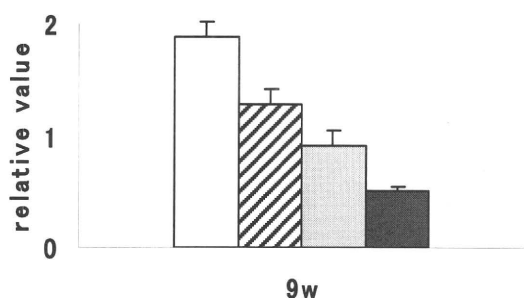


図 2. 9 週齢・中脳における 4 群のチロシン水酸化酵素 (*th*) の発現比較。左から CC 群：白、CT 群：斜線、TC 群：グレー、TT 群：黒。CC 群に比較して他の 3 群で有意に発現が低下。

ドパミン輸送体 (*dat*) については、3 週齢、6 週齢では TBT ばく露による変化がなく、9 週齢では再ばく露群 (TT 群) のみ、CC 群または CT 群に比較して有意に発現が低下していた (図 3)。一方、ドパミン分解酵素 *comt*

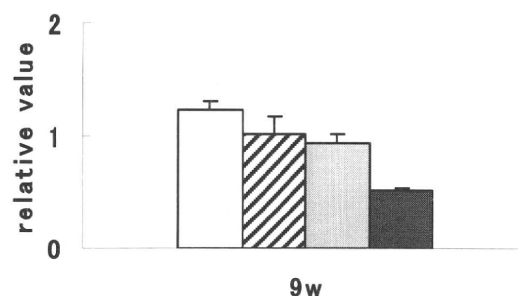


図 3. 9 週齢・中脳における 4 群のドパミン輸送体 (*dat*) の発現比較。左から CC 群：白、CT 群：斜線、TC 群：グレー、TT 群：黒。TT 群のみ CC 群、CT 群と比較して有意に発現が低下。

およびドパミン受容体の一つである *drd2* については、9 週齢の時点で 4 群の間に発現差はみられなかった。オープンフィールド・テストにおいても、成熟後に TBT にばく露した群 (CT 群) は非ばく露群 (CC 群) に比べて差はなかったが、発達期ばく露を受けた 2 群 (TC 群、TT 群) では行動量に低下傾向がみられた。

(3) 培養細胞を用いた評価系：

胎齢 18 日ラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞を用いて TBT の影響評価を試みた。初めは血清入り培地で培養し、培養 48 時間後に無血清培地に交換すると同時に様々な濃度で TBT を添加した。細胞内の還元性を指標に細胞生存を評価する MTT 法で TBT 添加 24 時間後に調べた結果、図 4 に示すように TBT 濃度 $1.25 \mu\text{M}$ 以上で細胞死が誘発されることが分かった。また、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を同時に添加すると、この TBT 濃度での細胞死が有意に抑制された。

次に、より低濃度・長時間のばく露による神経回路への TBT の影響を評価する系を確立するために、 $1.0 \mu\text{M}$ 以下の TBT 濃度で

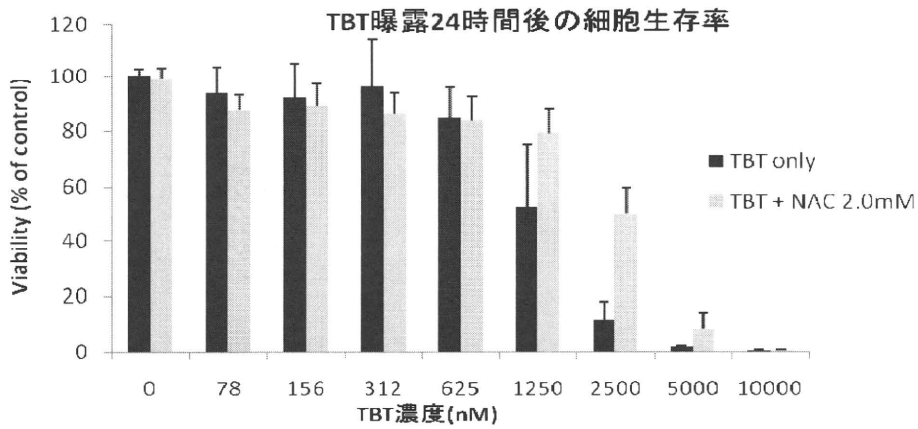


図4. 初代培養神経細胞を用いたTBTの細胞毒性評価と抗酸化剤NACによる毒性の低減

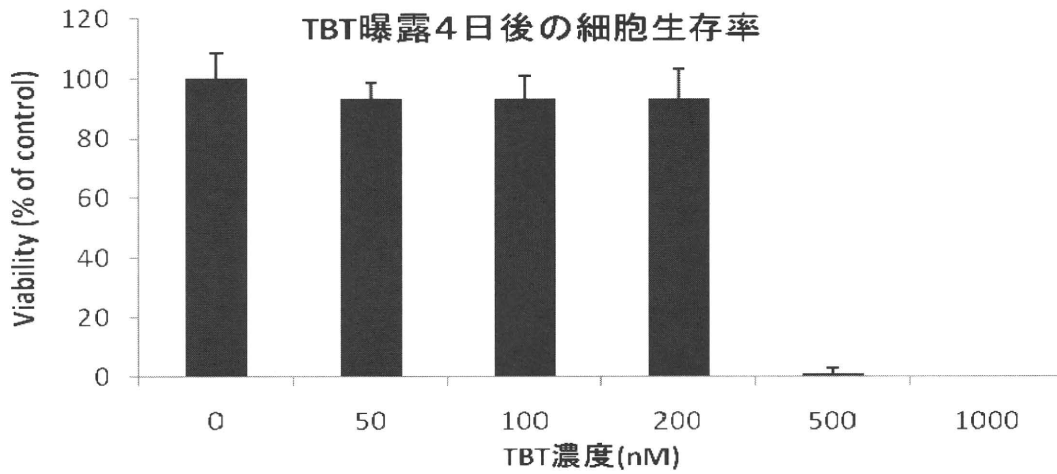


図5. 初代培養神経細胞を用いた低濃度・長時間のTBT曝露の影響評価

4 日間培養後の生存率を同様の方法で調べた。その結果、図 5 に示すように、200nM 以下の濃度であれば細胞死を誘発せずに、より詳細に神経突起やシナプス形成に対する TBT の影響を評価できることが分かった。

D. 考察

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット

成田らの研究により、胎生 9 日目サリドマイド曝露ラット (THA 群) では、成熟後 (P50) の時点で海馬セロトニン濃度が高値を示すこと、縫線核におけるセロトニン神経細胞・細胞体の分布に正常とは異なる偏りがみられること、からセロトニン神経系の発達異常が示唆されていた (Narita et al., *Pediatr. Res.*, 2002; Miyazaki et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005)。昨年度の研究により、セロトニン神経の投射先である大脳皮質において、このモデル動物ではセロトニン受容体の発現プロファイルが正常と異なることをはじめ、シナプス形成の時間的ずれや早期からのミエリン形成など、神経発達異常が生じていることを示唆する結果を得た。2010 年度は、大集積アレイの解析結果から MeCP2 によるエピジェネティックな制御の低下がこのような発達異常の要因である可能性が示唆されたため、MeCP2 経路の因子に関して検討を開始した。Rett 症候群の原因遺伝子産物・MeCP2 タンパクにより発現が抑制される標的遺伝子には神経系の発達・成熟に関与するものが多いこと、MeCP2 と同じファミリーに属するメチル化 DNA 結合タンパク・MBD1 が自閉症に関連すること、などから、今後、個体レベルと培養細胞レベルの双方でこの経路の重要性を確認する予定である。

また、シナプス形成やミエリン形成の異常をタンパク質レベル、形態レベルでさらに確認するとともに、発達期のセロトニン濃度上昇と MeCP2 経路との関連について研究を進める。

(2) 胎生期 - 生後初期における TBT 曝露の影響

TBT は当初、水生生物に対する内分泌かく乱物質として注目を集めた。これは TBT のアロマターゼ阻害作用によるものと考えられるが、その他に TBT はミトコンドリア・ATP 合成酵素を直接阻害することが *in vitro* の実験で示されている。さらに近年、TBT がごく低濃度で塩素イオンの細胞膜透過をひき起こす Cl⁻イオノフォアとなることが示され、神経細胞においては GABA 神経伝達に直接影響を与える可能性が懸念される。

今回の実験から、発達期の TBT ばく露の方が成熟後のばく露より影響が大きいこと、発達期にばく露を受けた動物が成熟後に再びばく露した場合はさらに影響が大きくなること、が確認できた。

また、より詳細に TBT の毒性メカニズムを調べるために、初代培養神経細胞の系を立ち上げた。この系では 1 μ M 程度の TBT で細胞死が誘発されるが、これは NAC で抑制できることから、酸化ストレスによるものと考えられる。今後、細胞死を誘発しない低濃度で神経細胞の突起やシナプス形成に対する TBT の影響、混在するアストロサイトに対する影響などを検討するとともに、他の化学物質にも摘要できる簡便な評価法を確立する。

E. 結論

サリドマイド誘発自閉症モデルラットでは、セロトニン神経の投射先である大脳皮質において、シナプス形成やミエリン形成に異常が生じるが、その要因の一つに MeCP2 によるエピジェネティック調節機構の変化が考えられる。一方、TBT 曝露ラットでは、発達期のばく露の方が成熟後のばく露より大きな影響を残すこと、発達期にばく露を受けた動物が成熟後に再度ばく露すると更に影響が大きくなることを示す結果が得られた。

このような一連の研究から、焦点を絞ったカスタム DNA マイクロアレイと市販の大集積アレイとを相互補完的に利用することで、発達期脳における化学物質の時期特異的、部位特異的影響を効率的に調べられることが確認できた。また、多様な化学物質をこのような方法で分類することで、その作用機序と障害に到る過程を解明し、バイオマーカーの探索に結びつけることができると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaai K., Tominaga-Yoshino K., Urakubo T., Taniguchi N., Kondoh Y., Tashiro H., Ogura A., Tashiro T. Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate *J. Neurosci. Res.*, 88, 2911-2922 (2010)

2. 学会発表

国際学会

1) Takefumi Uno, Yoh Ishibashi, Masaki Takahashi, Takayuki Negishi, Tomoko Tashiro. Analysis of gene expression profiles in the hippocampus and cerebellum of the Goto-Kakizaki rat, and animal model of type 2 diabetes. 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010

2) Negishi T., Oyanagi K., Takahashi M., Imai N., Ihara T., Tashiro T. Investigation of cerebral development in cynomolgus monkey-histological and biochemical analyses. 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010

3) Erika Sawano, Takayuki Negishi, Tomoko Tashiro

Local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of senescence-accelerated SAMP8 mice.

10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010

4) Oyanagi, K., Negishi, T., Tashiro, T. Effects of thyroid hormone on the survival and neurite outgrowth of cultured cerebellar granule cells. 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific

Society for Neurochemistry, Phuket,
October 2010

(2) 国内学会

1) 澤野恵梨香、中森裕介、根岸隆之、田代
朋子、学習記憶障害を特徴とする SAMP8 海
馬における甲状腺ホルモン関連遺伝子の発
現変化、第 25 回 老化促進モデルマウス
(SAM)研究協議会・金沢大学、2010 年 7 月

2) Erika Sawano, Takayuki Negishi, Tomoko
Tashiro

Alterations in local thyroid hormone
metabolism in the hippocampus of
senescence-accelerated SAMP8 mice
第 53 回日本神経化学会、第 33 回日本神経
科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会、
合同大会・神戸、2010 年 9 月

3) Koshi Oyanagi, Takayuki Negishi,
Tomoko Tashiro

Non-genomic action of Thyroxine (T4) on
survival and neurite outgrowth of
cerebellar granule cells in culture
第 53 回日本神経化学会、第 33 回日本神経
科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会、
合同大会・神戸、2010 年 9 月

4) Takayuki Negishi, Masaki Takahashi,
Koshi Oyanagi, Hiroaki Ohnishi, Seishiro
Hirano, Tomoko Tashiro

Diphenylarsinic acid induced oxidative
stress and expression of neuroactive and
vasoactive peptides in cerebellar
astrocytes

第 53 回日本神経化学会、第 33 回日本神経
科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会、
合同大会・神戸、2010 年 9 月

5) Masashi Tsunoda, Yuki Takeuchi,
Ryosuke Yoshioka, Takayuki Negishi,
Ryutaro Ikeuchi, Takaya Kaido, Mayuko
Hosokawa, Chiemi Sugaya, Tomoko Tashiro,
Yoshiharu Aizawa

Perinatal exposure affects the
sensitivity to TBT neurotoxicity after
maturation: evaluation by gene
expression and behavioral analyses

第 53 回日本神経化学会、第 33 回日本神経
科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会、
合同大会・神戸、2010 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

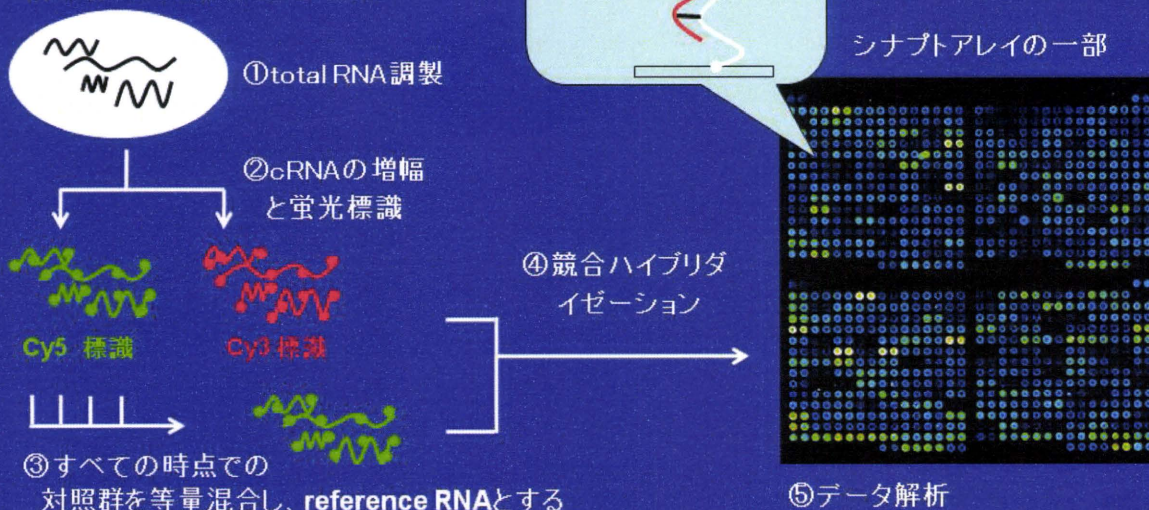
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

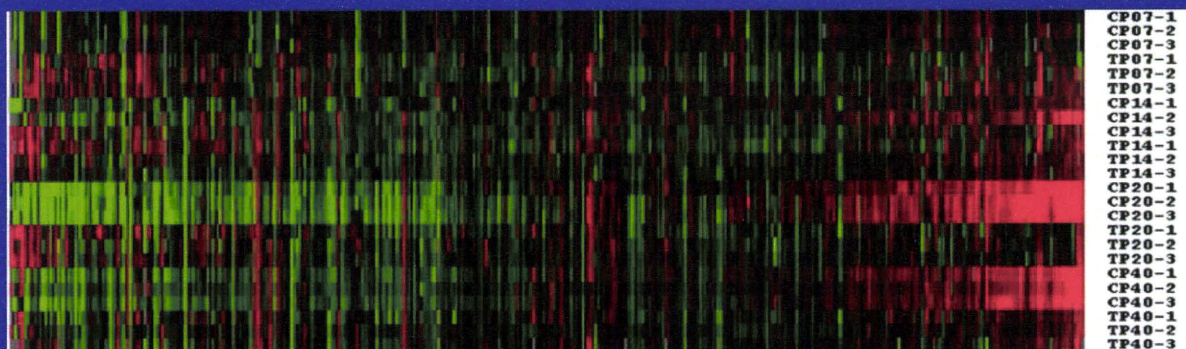
DNAマイクロアレイ実験の手順

Reference RNAを用いる
競合ハイブリダイゼーション法

実験試料(化学物質投与群または
非投与対照群の組織・細胞)

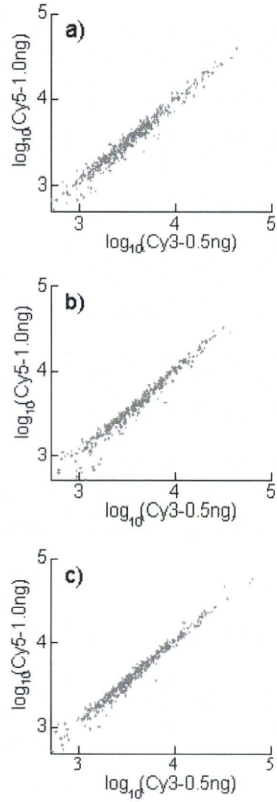
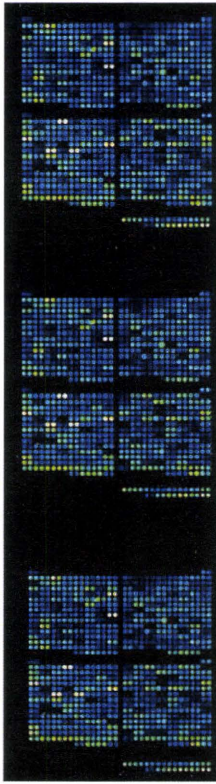


胎生期THA曝露による大脳皮質での遺伝子発現プロファイルの変化



P07, P14, P20, P40 の時点で対照群 C、THA群 T の各3個体由来のサンプルをreference RNA
と競合ハイブリダイゼーションにより比較: 赤はreference より発現上昇、緑は発現低下した遺伝子

- * 対照群では遺伝子発現がP20で大きく変化、THA群ではそのような変化がない。
- * THA群と対照群の差異はP20で最も大きい。
- * P20の両群で発現差のあった遺伝子 (THA>CTL、THA<CTL)
シナプス後部の足場タンパクの遺伝子: *homer 1, shank3, spinophilin*
ミエリン構成タンパクの遺伝子: *mbp, plp*
細胞骨格タンパクの遺伝子: *nf-l, nf-h*



私達の「シナプトアレイ」

- * シナプスの構造と機能を支える遺伝子を中心に選ぶ
- * 定量性を上げる技術的工夫
- * 神経回路の状態や脳の機能状態を効率的にモニターする

ver. 4 (178 遺伝子) → ver. 7 (500 遺伝子)

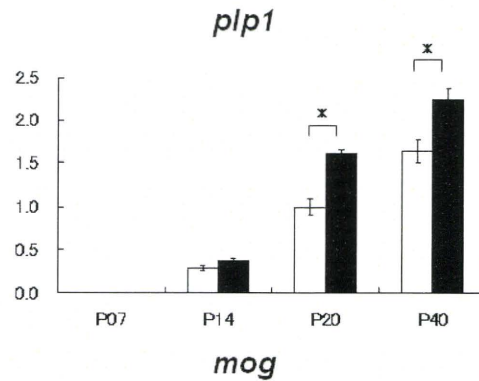
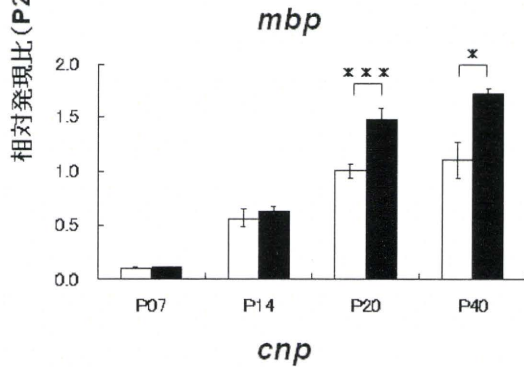
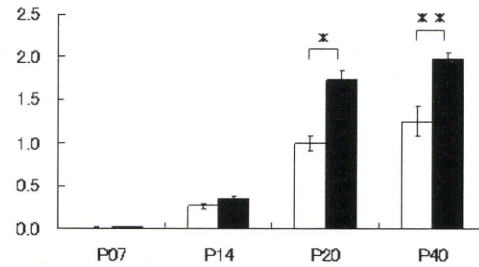
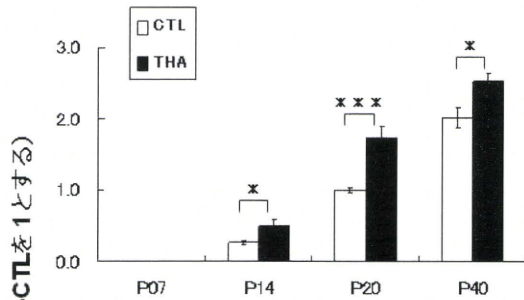


市販の「大集積アレイ」

- * 数万種類の遺伝子(網羅性)
- * 発現変化するのは~数%
- * 感度、定量性、コストに問題
- * 一次スクリーニングに利用

THA曝露によるミエリン構成タンパク遺伝子群の協調した発現変化

Real-time PCR法



厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 22 年度研究課題: 「近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価」

研究分担者 成田 奈緒子 文教大学教育学部特別支援教育専修 教授

研究要旨: 前年度までの研究結果より、情動想起タスクを負荷した際の健常者と自閉症スペクトラム (ASD) 者での差異が明確になった。健常被験者 19 名では、情動想起開始とともに平均的に左側優位の O₂Hb 濃度上昇が認められたのに対し、ASD 患者及び一部の健常被験者健常被験者と異なり、右側優位の O₂Hb 濃度変化が多く観察され、これは情動処理機能の差異、及びストレス耐性の低下を示す所見と考えられた。また、情動想起の内容による差異を検討するため、健常者において情動刺激を行った直後に計算タスクを負荷したところ、単位時間当たりの正答数はポジティブ情動刺激後がネガティブ情動刺激後に比較して有意に高い結果であり、ASD 者においては、先天性の脳機能障害に起因する不安・ストレス処理における前頭葉の異所性活性化が起こっている可能性が示唆された。今年度はこれをさらに詳細に検討するため、前頭葉の実行機能の一つであるワーキングメモリ機能を賦活／非賦活する課題を交互に出現させ、難易度を上昇させる顔表情刺激を用いたタスクを用いてその際の前頭葉 O₂Hb 濃度変化を検討した。その結果、健常者 (n=22) においてもそのタスク遂行率は大きく差異があり、これを成績上位群・中位群・下位群に分類したところ上位群・中位群では平均的に左側優位の前頭葉 O₂Hb 濃度上昇が認められたのに対し、下位群においては平均的に右側優位で推移しており、課題の難易度が上昇するにつれ O₂Hb 濃度の相対値が低下する傾向が認められた。これまでに得られた結果から、①個体の不安レベルにより情動想起の際の前頭葉賦活の laterality が変化する。②この laterality の差異は計算やワーキングメモリなどの前頭葉実行機能に関連する可能性がある。③その本態として不安の高さ、前頭葉機能の先天性障害が示唆されている ASD 児者での前頭葉機能異常は、刺激に呼応する laterality の差に起因する可能性が高いと考えられる。という 3 点が示唆された。

A. 研究目的: 自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder: 以下 ASD) とは、重度の自閉症から高機能自閉症、アスペルガー障害、そしてその周辺にあるどの定義も厳密には満たさない特定不能の広汎性発達障害を 1 つの連続した障害として捉えたものであり、社会的相互関係の障害 (同調・集団行動の困難)、コミュニケーション能力の障害、反復常同的あるいは