

(Tashiro et al. 2000を改変)
 Fig. 1 神経管展開標本の作製と観察部位

分布が吻側に変位する傾向が認められた。しかし、このような生後の形態異常が胎生期から生じているかは明らかではない。

胎生期中枢神経系における細胞体の分布や軸索伸長の形態を観察するのに適した方法の一つとして、展開標本(後述)を活用することができる。発生期中枢神経系は管状構造をなす神経管である。管状構造をシート状に展開することで、三次元情報を相対的に保持したまま、吻尾軸、背腹軸方向に沿って、細胞体の分布や軸索の走行を容易に連続的に把握することができる。

本研究では、縫線核群を含む菱脳(後脳+髄脳)の展開標本を用いて、自閉症モデルラットにおけるセロトニン神経系の形態異常が、胎生期から存在することの解明を目的とした。

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。Wistar ラット(膻栓確認日を胎齢(E)0.5とした)を用いた。VPAの投与はE9にThal 500mg/kg またはVPA 800 mg/kg を溶媒として5%アラ

ビアゴム/蒸留水に溶かし、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で1回経口投与した。コントロール群には溶媒のみを同様に投与した。そのまま妊娠を継続させ、E14.5で帝王切開にて胎仔を取り出し、展開標本を作製した(Fig.1)。

4%パラホルムアルデヒドで6-8時間固定後、PBS中に4°Cで保存した。展開標本を浮遊の状態免疫染色を行い、抗セロトニン抗体(Invitrogen)とビオチン化した二次抗体を用いてABC法によりDABで神経線維を可視化した。

正立光学顕微鏡下で観察および写真撮影を行い免疫染色された細胞体および神経線維を定量化した。取り込んだ画像上で画像解析ソフトImage Jを用いて線維束の長さ、細胞数などを計測した。統計解析はMicrosoft Excel または Origin6を用いてt検定を行った。

C. 結果

対照群とサリドマイド投与群、VPA投与群を比較して、体表に顕著な奇形および頂殿長に有意な差はなかった(Fig.2)。

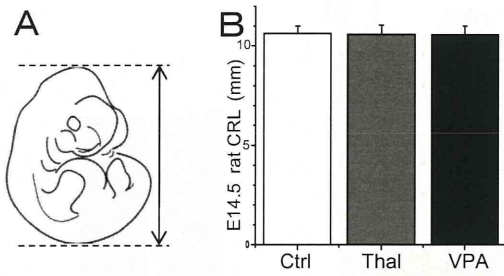


Fig.2 頂殿長(CRL)の長さ

菱脳の展開標本において、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 ± 0.28	1.46 ± 0.30	1.58 ± 0.19
Number of cellbody (N)	113 ± 20	97 ± 21	97 ± 12
Density of cells	69.5 ± 9.3	67.4 ± 12.2	61.7 ± 10.2

Means ± 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て ($p < 0.05$)。VPA 投与群においても有意差は認められ

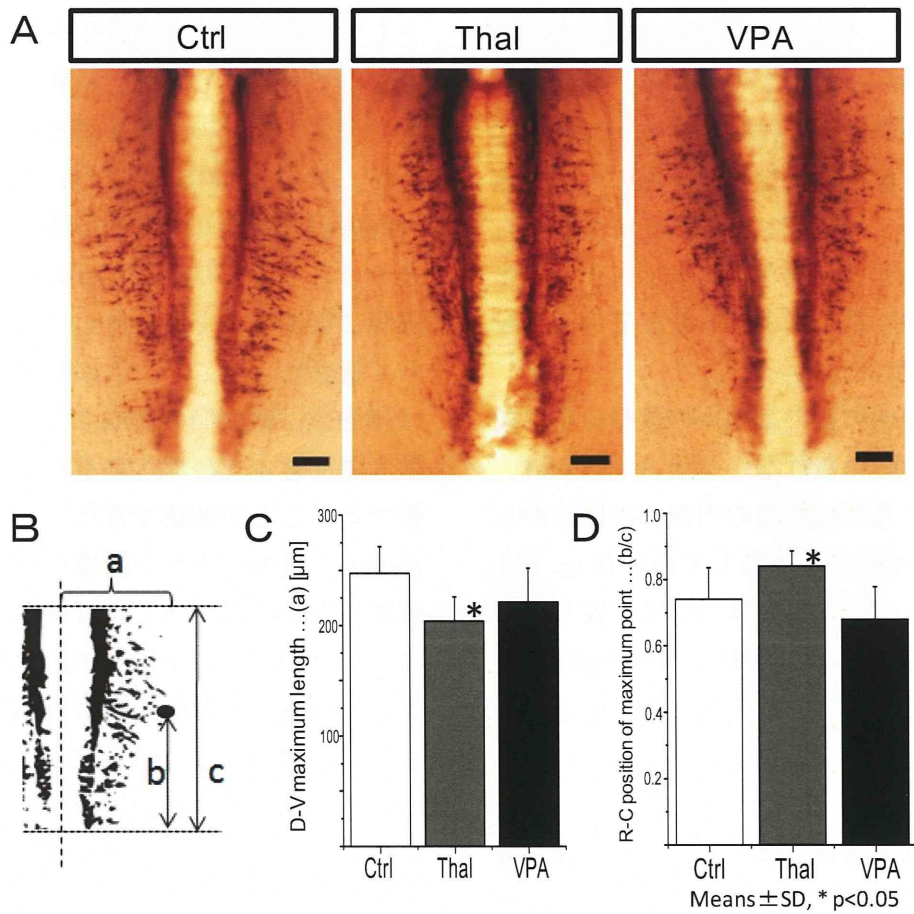


Fig.3 吻側縫線核群の細胞体分布

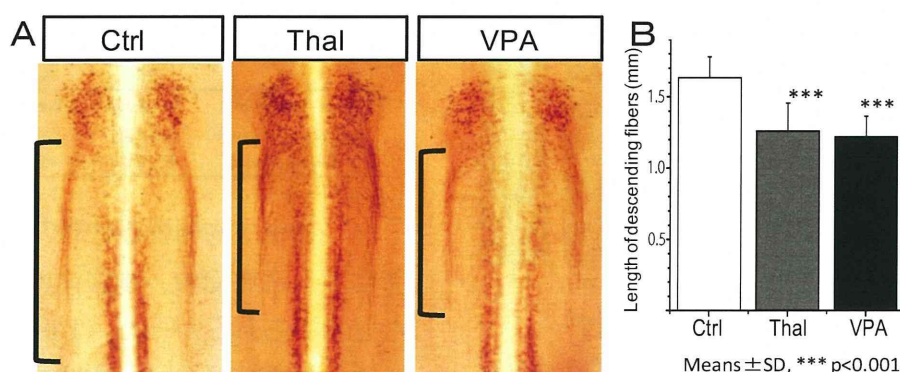


Fig.4 尾側縫線核群からの下行性線維

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出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ほぼ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や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) Ohkawara T, Oyabu A, Ida-Eto M, Tashiro Y, Tano K, Nasu F, Narita N, Narita M. Secretogranin II and its derivative peptide, manserin, are differentially localized in Purkinje cells and unipolar brush cells in the rat cerebellum. *Int J Pept Res Ther. in press*
- (2) Narita N, Saotome A, Higuchi H, Narita M, Tazoe M, Sakatani K. Impaired prefrontal cortical response by swithing stimuli in autism spectrum disorders *Pediatr Neurol. in press*
- (3) Narita N, Tazoe M, Narita M. Obsessive Eating In: *The Handbook of Behavior, Diet and Nutrition*. Springer, editor, Victor R. Preedy,

- in press*
- (4) Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Existence of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the rat inner ear; relevance to modulation of auditory and vestibular system. *J. Histochem Cytochem.* 60(1), 69-75, 2012
- (5) Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Embryonic exposure to thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal early development of serotonergic neurons. *Neurosci Lett.* 505, 61-64, 2011
- (6) Narita N, Tazoe M, Narita M. 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, 289-304, 2011.
- (7) Tashiro Y, Oyabu A, Imura Y, Uchida A, Narita N, Narita M. Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies. *Int J Dev Neurosci.* 29(4); 359-364:2011.
- (8) 成田正明 自閉症の動物モデル-胎生期の化学物質ばく露による情動・認知行動への影響解明のための動物モデル 認知神経科学 1(1), 54-58, 2011
- (9) 成田正明、江藤（伊田）みちる、成田奈緒子
胎児にとって大事なことー胎児の成長と化学物質、それと放射線も食べものの文化 2011年9月号 6-11
- (10) 成田奈緒子、原田ゆかり、樋口大樹、田副真美、成田正明 じゃれつき遊びによる前頭 抑制機能の変化 文教大学教育学部紀要 45; 81-89: 2011
- (11) Tano K, Oyabu A, Tashiro Y, Kamada N, Narita N, Nasu F, Narita M. Manserin, a secretogranin II-derived peptide, distributes in the rat endocrine pancreas colocalized with islet-cell specific manner. *Histochemistry and Cell Biology*, 134(1), 53-57, 2010
- (12) 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
- (13) Kamada N, Tano K, Oyabu A, Imura Y, Narita N, Tashiro Y, Uchida A, Komada Narita M. Immunohistochemical localization of manserin, a novel neuropeptide derived from secretogranin II, in rat adrenal gland, and its upregulation by physical stress. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16; 55-61, 2010
- (14) Narita N, Tazoe M, Narita M. Obsessive Eating In: *The Handbook of Behavior, Diet and Nutrition*. Springer, editor, Victor R. Preedy., in press
- (15) Narita N, Tazoe M, Narita M. 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. 2010.
- (16) 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 44, 15-24, 2010
- (17) 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) 松川岳久、横山和仁、鷹屋光俊、黒澤美智子、宇野洋太、内山登紀夫、成田奈緒子、成田正明：小児の毛髪中微量元素濃度と情動・認知行動への影響 第 82 回日本衛生学会学術総会, 京都, 3/24-26, 2012 (予定)
- (2) 松川岳久、横山和仁、黒澤美智子、宇野洋太、内山登紀夫、成田奈緒子、成田正明：本邦における小児の毛髪中微量元素濃度とその情動・認知行動への影響 第 76 回日本民族衛生学会総会, 福岡, 11/23-24, 2011
- (3) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Maternal exposure to thimerosal, an organomercury, affects early serotonergic development in the fetal rat brain. 10th International Meeting for Autism Research (IMFAR、国際自閉症学会) May 12-14, 2011, San Diego, USA
- (4) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M : Maternal administration of thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal serotonergic neurons in the offspring. Society for Neuroscience meeting, Washington DC, USA, 2011 Nov 12-16,
- (5) Ohkawara T, Oyabu A, Eto-Ida M, Tashiro Y, Narita N, Narita M : The influence of maternal immune activation by injection of poly I:C in the developing serotonergic neuron Society for Neuroscience meeting, Washington DC, USA, 2011 Nov 12-16
- (6) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M : Maternal exposure to thimerosal, an organomercury, affects early serotonergic development in the fetal rat brain. 10th International Meeting for Autism Research (IMFAR) 国際自閉症学会, San Diego, USA, May 12-14, 2011,
- (7) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、太城康、成田奈緒子、成田正明 胎生期有機水銀ばく露によるセロトニン神経異常 第 14 回環境ホルモン学会研究発表会 2011. 12. 1-2 東京大学山上会館
- (8) 雄山隆弘、大藪明子、大河原剛、江藤みちる、太城康良、成田正明：バルプロ酸曝露ラット胎仔における顔面神経核の形態発達 第 71 回日本解剖学会 中部支部会 2011 年 10 月 15-16 日 名古屋
- (9) 大藪明子、雄山隆弘、氏原健作、江藤みちる、大河原剛、太城康良、成田正明：バルプロ酸を用いた自閉症モデルラットにおけるセロトニン神経系背側縫線核の形態変化 第 34 回日本神経科学会 2011 年 9 月 14-16 日 横浜
- (10) 大河原剛、大藪明子、江藤みちる、太城康良、田野かおり、成田正明：ラット小脳顆粒層に局在する神経ペプチドマンセリンの小脳での役割考察 第 34 回日本神経科学会 2011 年 9 月 14-16 日 横浜
- (11) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、太城康良、成田正明：セロトニン神経の初期発生の異常は妊娠中の有機水銀ばく露によっても引き起こされる 第 34 回日本神経科学会 2011 年 9 月 14-16 日 横浜
- (12) 成田奈緒子、田副真美、成田正明：自閉症スペクトラムにおけるタスクスイッチングへの呼応の遅延ー近赤外線酸素モニターを用いた検討 第 29 回日本小児心身医学会学術集会 2011 年 9 月 16-18 日、大阪
- (13) 松川岳久、黒澤美智子、横山和仁、篠原光代、宇野洋太、内山登紀夫、柚木泰弘、山城正司、天笠光雄、成田正明：環境中の微量元素による小児の情動・認知行動への影響 第 81 回日本衛生学会学術総会, 東京, 3/25-28 (誌上

- 発表), 2011
- (14) 大藪明子、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回日本解剖学会学術集会 2011 (誌上開催)
- (15) 大藪明子、田野かおり、江藤みちる、太城康良、成田正明：ラット小脳における新規神経ペプチドマンセリンの役割 大河原剛、第116回日本解剖学会学術集会 2011 (誌上開催)
- (16) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、田野かおり、太城康良、成田正明：聴覚系と前庭系に局在する新規神経ペプチドマンセリン 第116回日本解剖学会学術集会 2011 (誌上開催)
- (17) Tano K, Oyabu A, Tashiro Y, Kamada N, Nasu F, Narita M : Manserin, a novel secretogranin II-derived peptide, distributes in the rat endocrine pancreas Society For Neuroscience Meeting 2010 Nov 13-17, USA
- (18) Narita M (招待講演) Pediatric developmental disorder, autism, caused by perturbation of serotonergic neuronal development induced by embryonic thalidomide exposure. BIT's Annual World Congress of NeuroTalk, 2010.6.21, Singapore
- (19) 成田正明、大藪明子、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
- (20) 成田正明 化学物質と健康・環境シンポジウム 「胎児と化学物質」2010年2月18日 (仙台)、3月2日 (東京)
- (21) 成田正明 三重メディカル研究会 第2回環境健康学研究会 「化学物質の胎内ばく露がもたらす発達の異常」2010年2月19日 伊賀
- (22) 大藪明子、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
- (23) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、太城康良、成田正明：神経ペプチドマンセリンの内耳における発現、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
- (24) 大河原剛、大藪明子、江藤みちる、太城康良、成田正明：新規神経ペプチド Manserin の小脳における発現 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
- (25) 太城康良、大藪明子、井村誉史雄、内田敦子、成田正明：バルプロ酸曝露ラットにおける脳神経の形態発達 第115回日本解剖学会総会全国学術総会 2010年3月28-30日 盛岡
- (26) 大藪明子、井村誉史雄、太城康良、内田敦子、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の分化誘導因子の発現異常とその影響について 第115回日本解剖学会総会全国学術総会 2010年3月28-30日 盛岡
- (27) 太城康良、大藪明子、井村誉史雄、内田敦子、成田正明：バルプロ酸曝露ラットにおける脳神経の形態発達 第69回日本解剖学会中部支部学術集会 2009年10月10-11日 浜松
- (28) 成田正明、大藪明子、井村誉史雄、横山智美、鎌田尚樹、田野かおり、太城康良、内田敦子：第52回日本神経化学会大会「シンポジウム (オーガナイザー) 発達障害における基礎研究の成果を臨床像と照らしつつ今一度検証する—発達障害モデル動物の現状」2009年6月21-24日伊香保
- (29) Kamada N, Tano K, Imura Y, Oyabu A, Yokoyama T, Narita N, Tashiro Y, Uchida A, Narita M : Immunohistochemical localization of manserin, a novel neuropeptide derived from secretogranin II, in the rat adrenal glands: Relevance to stress response mechanism Society For Neuroscience meeting 2009 Oct 23-27, Chicago, USA

- (30) 田野かおり、鎌田尚樹、大藪明子、井村誉史雄、横山智美、内田敦子、成田正明：新規神経ペプチドマンセリンにおける腓臓における局在 第 69 回日本解剖学会中部支部学術集会 2009 年 10 月 10-11 日 浜松
- (31) 井村誉史雄、高橋理貴、内田敦子、田代朋子、成田正明：モデル動物を用いた自閉症発症機構の解明～脳内セロトニン量に影響を及ぼす因子の探索 第 12 回活性アミンに関するワークショップ 2009 年 8 月 28 日 三重
- (32) 大藪明子、神谷知明、太城康良、内田敦子、成田正明：自閉症モデルラットにおける sonic hedgehog (shh) の発現と細胞死 第 13 回活性アミンに関するワークショップ 2009 年 8 月 28 日 三重
- トチーム衆参議員合同会議(政策提言)
2011 年 7 月 1 日参議院議員会館
- (2) 妊娠中の有機水銀ばく露の記事
2011 年 9 月 17 日中日新聞
- (3) 「化学物質の胎生期ばく露による情動認知行動に対する評価方法に関する研究」
三重大学環境報告書 2010 年
- (4) NHK テレビ視点論点 「妊娠中の化学物質と子どもの発達」2010 年 9 月 23 日放映
- (5) 中日新聞「研究室発」“発達障害の原因を探る” 2010 年 6 月 15 日

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

報道発表等

- (1) 公明党化学物質問題対策プロジェクト

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 21-23 年度研究課題: 「化学物質ばく露モデル動物解析」

その2 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における顔面神経の形態発達異常

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	太城 康良	三重大学大学院医学系研究科	講師
	大藪 明子	三重大学大学院医学系研究科	博士課程
	雄山 隆弘	三重大学医学部医学科	4 年次
	葛山 貴士	三重大学大学院医学系研究科	修士課程
	櫻本 新	三重大学大学院医学系研究科	修士課程

研究要旨:

抗てんかん薬として知られるバルプロ酸(Valproic acid; VPA) は神経系の催奇物質でもある。本研究では、ラット胎子の脳神経の形態発達に影響する VPA のばく露時期を特定し、さらに、異常がみられた脳神経の末梢の神経線維と中枢の起始核の形態を調べることを目的とした。E8.5 から E11.5 の妊娠ラットに VPA を経口投与し、全胚の免疫染色で末梢の神経線維を可視化すると、E9.5 以降の VPA ばく露三叉神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経において染色強度の減弱が観察された。特に顔面神経については末梢の神経線維の脱束化が認められたので、中枢側の顔面神経核を *in situ hybridization* で可視化すると、通常と同様の細胞移動が観察されるものの、顔面神経核の大きさは縮小していた。このように、胎生期の VPA ばく露は顔面神経を中心とする脳神経の形態発達の不全を生じることが明らかとなった。

A. 序論

抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム (VPA) は神経系の催奇性物質であることが知られている。研究代表者らは妊婦の内服で発達障害(自閉症)をきたす VPA を妊娠ラットに投与することにより、「自閉症モデルラット」を作成してきた。自閉症モデルラットでは、行動異常、セロ

トニン系の異常を認めヒト自閉症と多くの点で共通する。

セロトニン系の神経線維の起始核である縫線核群は橋から延髄にかけて存在する。この領域には、頭頸部の末梢器官と中枢神経系との情報伝達を担う脳神経の起始核も存在する。脳神経核、脳神経節の発生に関してもセロトニン神経のよう

に胎生期の早い時期から神経前駆細胞を経て分化・発達する。したがって、胎生期の発達にクリティカルなタイムウィンドウでのばく露が、セロトニン神経の初期発生の異常を引き起こすとともに、脳神経の分化・発達もばく露時期特異的に妨げていることが類推される。実際に、ヒト自閉症では顔面神経の発達不全が併発することがあると指摘されており、この仮説を検証することは臨床面からも意義が大きい。かつ、脳神経の形態形成異常を起因とする自閉症の病態理解とバイオマーカー検索のための基盤が確立されるものと期待される。

本稿では、VPA 胎生期ばく露が脳神経の初期発達に影響を与える開始時期を特定し、さらに顔面神経の末梢側と中枢側の形態発達を解明することを目的とした。

B. 方法

動物

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。Wistar ラット（膣栓確認日を胎齢(E)0.5 とした）を用いた。VPA の投与は E8, E9, E10, または E11 に VPA 800 mg/kg を溶媒として 5%アラビアゴム/蒸留水に溶かし、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で 1 回経口投与した。コントロール群には溶媒のみを同様に投与した。

全胚免疫染色

VPA 投与後、そのまま妊娠を継続させ、E13 で帝王切開にて胎仔を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、メタノール中に -20°C で保存した。全胚でニュー

ロフィラメント (165kD) に免疫染色を行い、2H3 モノクローナル抗体 (Hybridoma Bank) と HRP 結合の二次抗体を用いて DAB で神経線維を可視化した (Fig. 1)。

後脳展開標本の *in situ hybridization*

VPA 投与後、そのまま妊娠を継続させ、E14.5 で帝王切開にて胎仔を取り出し、展開標本を作製した。

4%パラホルムアルデヒドで 6-8 時間固定後、メタノール中に -20°C で保存した。展開標本を浮遊の状態で行った *in situ hybridization* を行った。初期の運動ニューロンで発現する転写調節因子 Tbx20 などをマーカーとして着目し、それらの mRNA を検出する non-RI のプローブを用いて、顔面神経核を可視化した。

観察および定量化

正立光学顕微鏡下で観察および写真撮影を行い染色された神経線維または神経核の面積とシグナル強度を定量化した。取り込んだ画像上で画像解析ソフト Image J を用いてバックグラウンドを除く域値以上のシグナルの面積を計測した。統計解析は Microsoft Excel または Origin6 を用いて t 検定を行った。

C. 結果

脳神経への影響が現れるバルプロ酸へのばく露時期の特定

対照群と VPA 投与群を比較して、動眼神経では神経線維の免疫染色性および走行形態に関して、ほとんど違いは見られなかった。以降、免疫染色性の比較には、

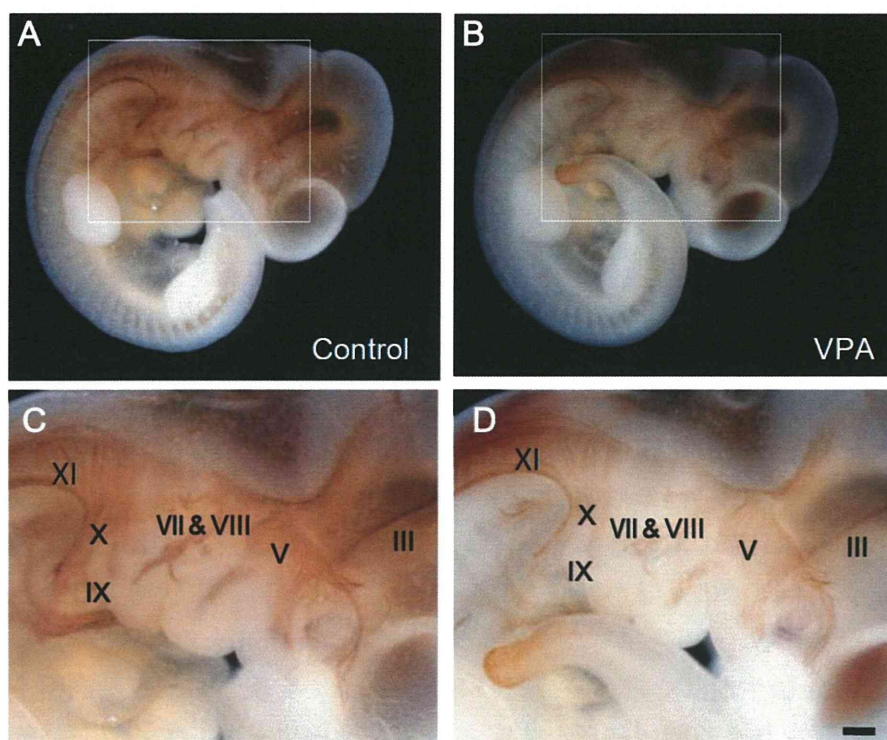


Fig. 1 胎齢13日ラット胚の後脳における脳神経

動眼神経の免疫染色性を基準に標準化したものを用いた。

眼杯周囲および第1 鰓弓に位置する三叉神経においては、VPA 投与群において免疫染色性の低下と線維束の占有面積の減少が観察された (Fig. 2A, B)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となった (Fig. 2C, D)。

第2 鰓弓に位置する顔面・内耳神経においては、免疫染色性の低下と軸索走行の異常が観察された (Fig. 3A)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となる傾向にあった (Fig. 3B)。線維束の占有面積に有意な差はないにもかかわらず (Fig. 3C)、線維束の近位—遠位 (P—D) 長はやや減少し (Fig. 3D)、前—後 (A—P) 長は増加する傾向にあった (Fig. 3E)。このように、線維束の占有面積は変わらず、全体的に伸長が短縮し

前後の幅が広がるような線維の走行異常が認められた。

第4/6 鰓弓に位置する舌咽神経および迷走神経においては、線維の免疫染色性の低下が観察された (data not shown)。この影響は E8 では観察されず、E9 で現れ、E10 以降でより顕著となった。線維の占有面積に有意な差はなかった。

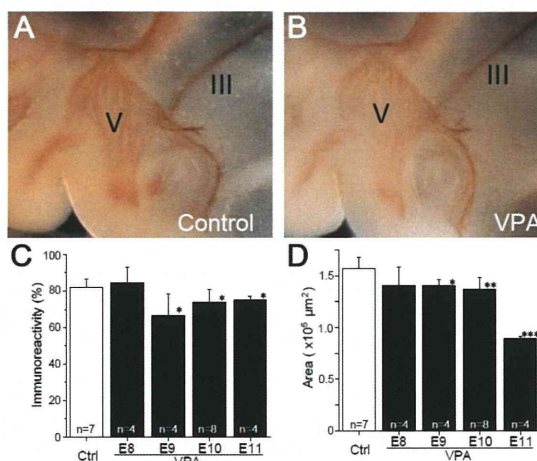


Fig. 2 三叉神経の免疫陽性と占有面積

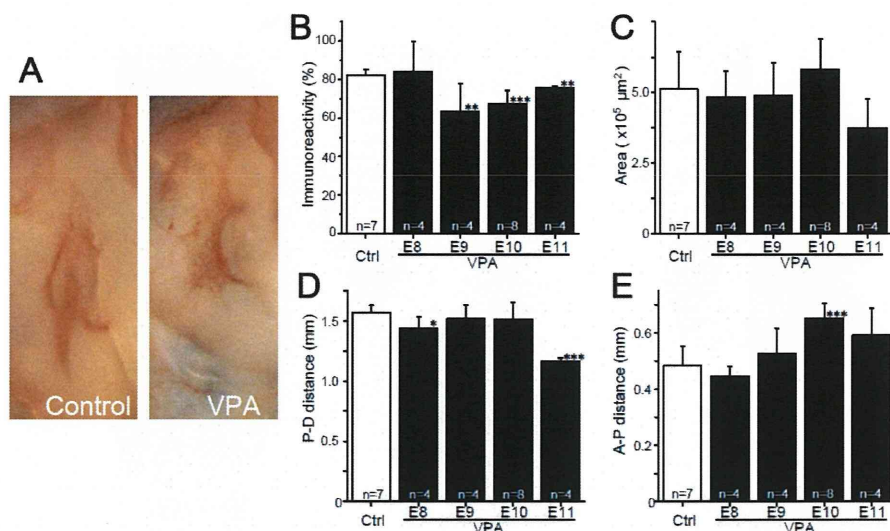


Fig. 3 顔面・内耳神経の免疫染色性、占有面積、線維束長

以上のように、三叉神経、顔面・内耳神経、舌咽神経、迷走神経の形態に影響するVPAの投与時期は、E9以降であることが明らかとなった。さらに前述の脳神経の中で末梢側の軸索走行の異常を認められたのは顔面・内耳神経であった。

顔面神経核の形態発達異常

顔面神経の末梢側に影響が生じ始めたVPAの投与時期における、顔面神経節の中核側、すなわち、顔面神経核の形態発達を観察した。

対照群のE13.5において、後脳の展開標本の前庭神経節レベルのフロアプレート付近で観察されたシグナルは、E14.5には尾側へ向かって「ハ」の字状に拡大した(Fig. 4, A, B)。この移動様式はVPA群においても同様であった(Fig. 4, C, D)。

対照群のE15.5において、脳室側では移動経路のシグナルが観察されたのに対し(Fig. 5, A 矢印)、軟膜側では神経核のシグナルが楕円状に観察された(Fig. 5, B*)。VPA群のE15.5においても、同様なシグナルのパターンが観察されたが、移

動経路上のシグナルは対照群よりも広く(Fig. 5, C)、また、顔面神経核は対照群よりも小さく観察された(Fig. 5, D)。

顔面神経の移動経路上にある細胞体群の占める面積と顔面神経核の面積を定量化した(Fig. 6)。VPA群の移動経路上の細胞体群の面積は対照群よりも有意に増大していた($p < 0.001$; Fig. 6, A)。VPA群の顔面神経核の面積は対照群よりも有意に減少していた($p < 0.01$; Fig. 6, B)。両者の面積の分散図を作成すると、「移動経路上の細胞体群の面積が増大すれば、顔面神経核の面積が減少する」という負

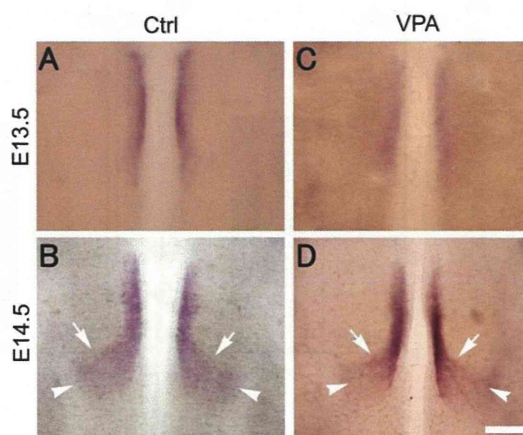


Fig.4 顔面神経核の尾側への細胞移動

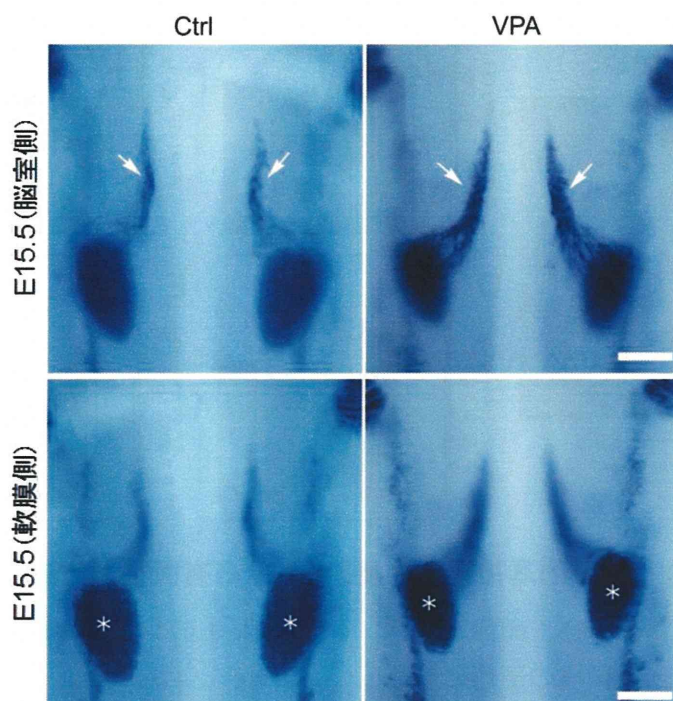


Fig.5 顔面神経の移動経路(上、矢印)と神経核(下、*)の面積

の相関がみられた ($R=-0.74$; Fig. 6, C)。

以上の結果をまとめると、VPA 群においても、対照群と同様な顔面神経核の移動パターンが見られるが、細胞移動が阻害されていることが明らかとなった。

D. 考察

化学物質の一つ、抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムの胎生期ばく露ラットで

は、これまで分かっていたセロトニン神経の初期発生の異常以外に、脳神経の初期発生においても異常が認められ、このような薬剤ばく露の影響を受ける時期は、E9 に始まり E10,11 以降で顕著になる傾向があり、セロトニン系とほぼ同様な胎生期のばく露時期であることが示された。

特に顔面神経については、末梢側の線維束形態が脱束化し、中枢側では起始部

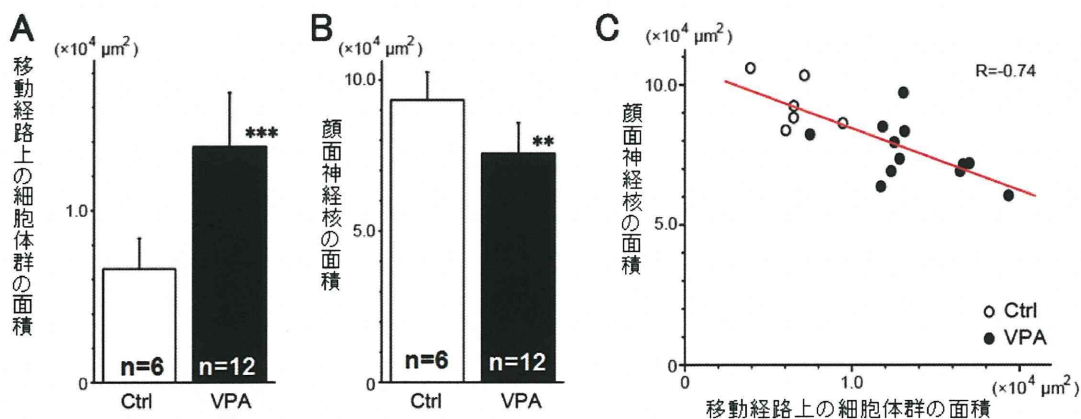


Fig.6 薬剤ばく露動物における顔面神経の移動経路上の細胞体の面積の増大と顔面神経核の大きさの減少

となる顔面神経核の大きさが減弱するという形態異常が認められた。

本研究では、まず、脳神経の末梢の線維束の形態の解析を中心に行い、三叉神経、顔面・内耳神経、舌咽神経、迷走神経において、免疫染色性の低下を認めた。線維束の免疫染色に用いた抗体は、ニューロフィラメントを有しある程度発達した軸索線維しか認識できないので、免疫陽性の低下の原因は、未発達な線維が増加した可能性と、軸索本数の減少の可能性が考えられる。両者を区別するためには、神経核や神経節の細胞数を定量する必要がある。

免疫染色性の低下だけでなく、線維走行の異常も観察された脳神経は顔面・内耳神経であった。今回の染色方法では厳密に顔面神経と内耳神経を区別することは困難であるが、内耳神経は耳胞周辺に分布し、近位よりに存在していると考えられる。したがって、遠位の線維束は顔面神経を多く含む成分と予測される。この遠位領域の線維が前後方向に広がった解釈すれば、占有面積の変化は伴わないことも矛盾なく説明できる。適切な末梢の標的に向かうことができなくなった顔面神経の線維がさらに後の発達でどのような発生運命をたどり、生理機能にどのような影響を与えるかは不明である。

次に、顔面神経の中核側、すなわち、顔面神経線維の起始部となる顔面神経核の発達過程を解析し、VPA 群においても、対照群と同様な顔面神経核の移動パターンが見られるが、顔面神経核の面積が減少していることが明らかとなった。顔面神経核の面積は約 30%減少した。顔面神

経核が球状であると仮定すると、体積は面積の $3/2$ 乗になるので、顔面神経核の体積の減少率は約 40%となり、VPA 曝露の顔面神経核の縮小に対する影響は見かけよりも大きいと考えられる。

顔面神経核が縮小した理由について、以下の 3 つの可能性が挙げられる。まず、移動経路上の顔面神経細胞群の面積が増加し、顔面神経核の面積が減少していることから、尾側への細胞移動の異常が顔面神経核の縮小に関与している可能性がある。細胞移動の異常の一つに、顔面神経細胞と移動経路上の基質との相互作用が減弱し、細胞移動が不完全で顔面神経細胞が顔面神経核に到達しない可能性がある。今後、後脳領域における細胞接着分子の発現量を網羅的に解析すれば、分子レベルでの解明につながる。

VPA がヒストンの脱アセチル化を阻害し、細胞分裂に関与するという報告を考慮すると、発生する顔面神経細胞数が減少した可能性がある。今後、顔面神経核の細胞数を計測する必要もある。しかし、発生する細胞数が減少すれば、移動経路上の顔面神経細胞数も比例して減少し、経路上のシグナル面積は減少すると予測されるが、本研究では増加しているため、この可能性は低いと考えられる。

VPA の投与時期は E9.5 で神経系の発生初期であることから、ロンボメアの形成に影響を与えた結果、顔面神経細胞の分化とその周囲の環境が変化した可能性がある。各ロンボメアの独自性を決め、ロンボメアに由来する構造を特徴付ける HOX 遺伝子の発現パターンが菱脳の頭尾方向の位置価を与えている。実際、VPA

ばく露により HOXA1 の発現が変化するという報告も存在ことから、VPA が HOX 遺伝子群に作用し、ロンボメアの形成異常を引き起こした結果、顔面神経核の形態が異常となった可能性がある。今回は顔面神経に焦点を当てたが、今後は r2 に存在する三叉神経などの形態異常を観察することによって、顔面神経核の形態異常の原因がロンボメアの広範囲な環境変化に付随するものかを理解するための手掛かりになる。

以上をまとめると、ラット E9.5 の胎生期の VPA のばく露により、顔面神経の末梢側では神経線維の脱束化、中枢側では顔面神経核の大きさの縮小という異常があり、顔面神経の全体にわたって発達が不完全であることが明らかとなった。このような形態発達の異常が、生後の生理機能にどの程度影響するかを解析することが今後の課題である。顔面神経が支配する眼輪筋が担う閉眼運動を指標に、モデル動物の単位時間当たりの瞬きの回数を計測することで評価できると考えられる。

今回は顔面神経を中心に報告したが、脳神経の末梢側の神経線維において染色強度が減弱した三叉神経、舌咽神経、迷走神経についての起始核の形態および生理機能への影響も詳細に解析されることが期待される。特に、舌咽神経と迷走神経は内臓知覚の情報を伝達し、呼吸の伸展反射、血圧の圧受容器反射などの自律神経系の機能を担っている。胎生期の

VPA ばく露が自律神経系の機能不全による先天性疾患の病態解明にも寄与する可能性もあり、臨床的な意義も大きいと考えられる。

E. 結論

ラット E9.5 胎仔へのバルプロ酸ばく露は、頭部脳神経の末梢側の神経線維の発達不全を引き起こし、顔面神経の末梢側では神経線維束の脱束化、中枢側では前駆細胞の後方への細胞移動を阻害し、顔面神経核の縮小という形態異常を引き起こす。

F. 健康危険情報

なし

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（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 21, 22, 23 年度研究課題：「化学物質ばく露モデル動物解析」

その3 胎生期チメロサルバク露によるモノアミン神経系の発達に関する研究

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

有機水銀の一種であるチメロサルバは、予防接種の防腐剤として広く使用されているが、人体、特に妊婦の母体を介した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。本研究では、妊娠9日目のラットへチメロサルバを投与後、(1) 胎生15日目のラット胎仔の後脳セロトニン神経についての形態学的解析、(2) 生後50日目の仔ラットの脳モノアミンについての定量的解析、を行った。その結果、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。さらに、生後50日での脳内モノアミン量の分析を行ったところ、チメロサルバばく露群の海馬セロトニン濃度および線条体マンセリン濃度は増加していた。以上の結果から、胎生期のチメロサルバばく露はセロトニン神経だけでなくドーパミン神経の初期発生異常を引き起こし、その影響は胎生期から生後にもまで継続的であることが示された。

A.研究目的

有機水銀は水俣病の原因として有名なメチル水銀に代表される有機化学物質であり、神経障害を引き起こすことが知られている。メチル水銀やエチル水銀は血液脳関門を通過して神経毒性を示す。また、胎児期でのばく露は、胎盤を通じて妊婦から容易に胎児へ移行し、胎児性水俣病としてより重篤な神経障害を引き起こす。

チメロサルバは有機水銀の一種であり、体内に取り込まれるとチオサリチル酸とエチル水銀に分解される。チメロサルバは殺

菌作用があり、古くから防腐剤として用いられてきた。現在でもワクチンの開封後細菌汚染防止に使用されていることから、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。

研究代表者らはこれまで、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。

チメロサールの生体に対する影響については、生後幼若期のばく露で痛みに対する感受性の変化、海馬における神経変性、ドーパミン神経系の変化と行動異常についての報告があるが、胎生期ばく露での報告は水銀蓄積量の分析のみで、機能的影響についての報告は皆無であった。本研究では、チメロサールの胎生期ばく露が胎児の神経発達にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

(1) 胎生期チメロサルばく露ラットの作製

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。チメロサル/生理食塩水溶液を妊娠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で投与した。チメロサールの投与量は1 mg Hg/kg, 0.1 mg Hg/kg, 0.01 mg Hg/kgとした。コントロールは生理食塩水のみを同様に投与した。

(2) 胎仔脳展開標本の作製と免疫組織染色

E15で帝王切開により胎仔を取り出し、神経管を背側から切開して脳幹部分の展開標本作製した。標本は4%パラホルムアルデヒドで一晩4℃にて固定後、TBS中で4℃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。

(3) HPLCによるモノアミンの定量

生後50日の雄ラットより海馬および線条体を採取し、液体窒素で凍結させた。海馬及び線条体は重量を測定した後、5倍容の0.2 M 過塩素酸-100 μ M EDTA溶液でソニケーションし除タンパクを行ってモノアミンを抽出した。内部標準として200 ng イソプロテレノール塩酸塩を加えた。SC-5 ODS カラム (エイコム) を用いて HPLC によりモノアミン量を測定した。

C.研究結果

まず、胎生期のチメロサルばく露が胎仔のセロトニン神経の発達にどのような影響を及ぼしているのかを調べるため、妊娠9日目のラットにチメロサルを投与し、その胎仔の脳幹部について胎生15日目で展開標本作製し、セロトニン神経の可視化を行った。

ラット胎仔の脳幹展開標本は、セロトニン神経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では、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(B3)と、さらに尾側の底板付近に存在する淡蒼縫線核(B1)と不確縫線核(B2)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、胎生9日目にチメロサルばく露を受けたラット胎

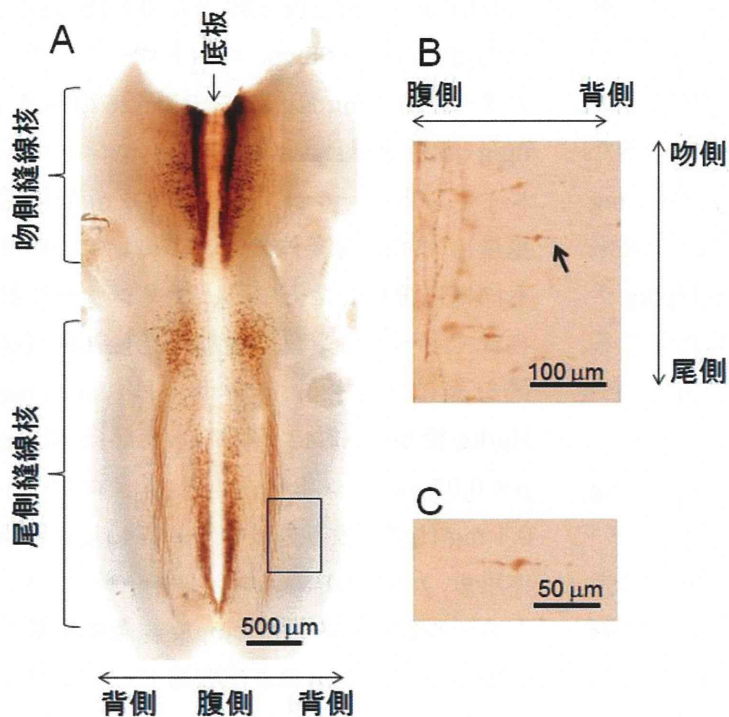


図1 胎生15日ラット脳の展開標本のセロトニン免疫染色
(A)弱拡大像。四角で囲んだ部分の拡大図をBに示す。さらにBの矢印で示した細胞の拡大図をCに示す。

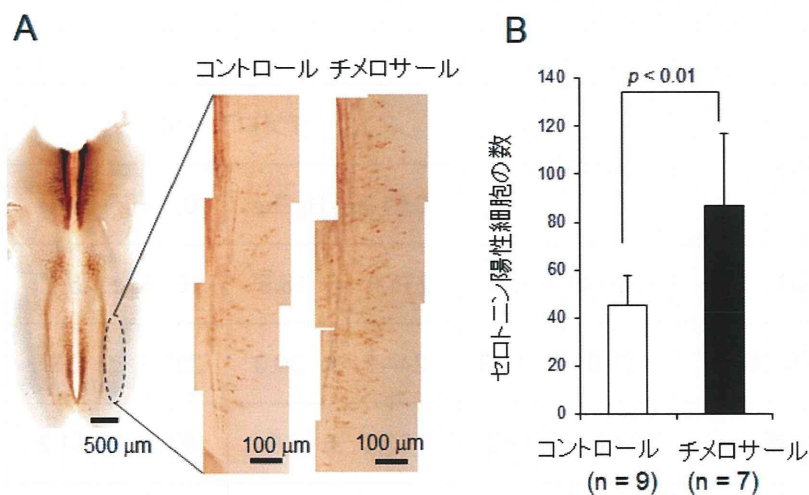


図2 セロトニン陽性細胞の比較
(A)チメロサル投与群およびコントロール群の後脳展開標本のセロトニン免疫染色
(B)セロトニン陽性細胞数の比較

仔のセロトニン神経を調べたところ、B 3から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)、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 B、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。

そこで、胎生期で見られたセロトニン神経系への影響が生後にまで及んでいるのかどうかを明らかにするため、胎生期チメロサルばく露による生後の影響を調べるために、1 mg Hg/kg、0.1 mg Hg/kg、0.01 mg Hg/kg の異なる濃度のチメロサルを妊娠9日目のラットに投与した。1 mg Hg/kg チメロサルを妊娠ラットに投与したところ、産仔数はコントロールと同程度であったが、生後直後に死んでしまう仔が多く見られた。チメロサル 0.1 mg Hg/kg、0.01 mg Hg/kg 投与では、産仔数や仔の行動についてはコントロールと同様で、一見異常は見られなかった。そこで、生後50日の仔の脳組織から海馬および線条体を採取し、HPLCでセロトニン量を測定したところ、チメロサル投与群の海馬セロトニン量は

生理食塩水投与群と比較して有意な増加が認められた（結果を表に示す：チメロサル 0.01 mg Hg/kg 投与群, 275.0 ± 18.5 ng/g 海馬重量, $p < 0.05$ vs. コントロール；チメロサル 0.1 mg Hg/kg 投与群, 267.6 ± 5.4 ng/g 海馬重量, $p < 0.01$ vs. コントロール；コントロール群, 220.4 ± 9.6 ng/g 海馬重量)。また、線条体のモノアミンについても同様に分析したところ、チメロサル投与群でドーパミン量の増加が見られた（結果を表に示す：チメロサル 0.01 mg Hg/kg 投与群, 6842 ± 457 ng/g 線条体重量, $p < 0.05$ vs. コントロール；チメロサル 0.1 mg Hg/kg 投与群, 6781 ± 974 ng/g 線条体重量, $p < 0.01$ vs. コントロール；コントロール群, 5559 ± 304 ng/g 線条体重量)。線条体セロトニンおよび海馬ドーパミンについては変化が見られなかった。

モノアミン	組織	コントロール	チメロサル	
			0.01 mg Hg/kg	0.1 mg Hg/kg
セロトニン	海馬	220.4 ± 9.6	275.0 ± 18.5*	267.6 ± 5.4**
	線条体	185.0 ± 11.3	244.2 ± 30.0	225.1 ± 36.5
ドーパミン	海馬	87.9 ± 14.3	82.3 ± 4.5	97.5 ± 11.2
	線条体	5559 ± 304	6842 ± 457*	6781 ± 974**

表. 胎生期チメロサルばく露ラットのモノアミン量.

単位は ng/g 組織重量。それぞれの値は平均値 ± SEM で示した。

* $p < 0.05$ vs. コントロール； ** $p < 0.01$ vs. コントロール。

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した後、その胎仔のモノアミン神経の解析を行い、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てセロトニン系神経の初期発生に影響を及ぼすこと、さらにその影響は生後まで続いており、海馬セロトニン量および線条体ドーパミン量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ばく露を受けた生後 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、チメロサルばく露による胎生 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。

さらに、この異常が生後にわたって見られるのかどうかについて検討したところ、生後 50 日のラット海馬においてチメロサル投与群ではコントロール群と比較して有意にセロトニン濃度の増加が見られた。このことは、胎生期チメロサルばく露による胎生 15 日縫線核セロトニン神経細胞の増加と矛盾しない結果であった。さらに他のモノアミンについて分析したところ、線条体ドーパミン量もまたチメロサルばく露群で約 1.2 倍に増加していた。セロトニン神経およびドーパミン神経はいずれも共通の幹細胞である神経上皮細胞が Shh および FGF8 の刺激を受けてそれぞれの前駆細胞から分化・成熟することが知られている。本研究ではセロトニンだけでなくドーパミンの異常も見られたことから、神経上皮細胞や Shh、FGF8 などのセロトニン神経およびドーパミン神経の初期発生に共通した細胞・分子にチメロサルが作用したと考えられる。これを明らかにするために、胎生期におけるドーパミン神経の発生や、Shh、FGF8 などの誘導物質の発現についてより詳細に調べる必要がある。

E. 結論

胎生期ラットにチメロサルをばく露することで、①胎生期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、②生後の海馬セロトニン量の増加、③生後の線