

D. 考察

チメロサルは有機水銀の一種であり、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。

平成 22 年度は、妊娠ラットにチメロサルをばく露したのちに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、セロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことを初めて示した。

平成 23 年度は、胎生期に見られたセロトニン神経の異常が生後にまで見られるかどうか、また他のモノアミンについて異常が見られるかについて検討したところ、胎生 9 日目にチメロサルばく露を受けた生後 50 日のラット海馬のセロトニン濃度はコントロールと比較して約 1.2 倍の増加が見られた。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（平成 22 年度の成果）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。

平成 24 年度は、チメロサルの投与時期の検討を行ったところ、これまで確認された胎生 9 日目にばく露された群の変化（＝胎生 15 日目で展開標本作製してセロトニン神経細胞数の増加）は、胎

生 11 日目、胎生 13 日目投与でも見られる一方、胎生 7 日目では影響が少なく、胎生 5 日目投与ではチメロサルばく露の影響がみられなかった。このことは胎生期の有機水銀ばく露がセロトニン神経初期発生に与える影響はばく露される妊娠日齢によって異なることを示唆するものである。

平成 25 年度は、①生後の発達に伴う脳内ノルアドレナリンの変化を調べたところ、ノルアドレナリンが多く含まれている橋・延髄、中脳、視床の 3 領域（ノルアドレナリン神経細胞体が多く存在し、かつ主要な線維束＝背側束、腹側束、内側前脳束＝が走行する領域）は生後 3 週でほぼプラトーに達していた。一方、海馬、前頭葉、頭頂葉-側頭葉-後頭葉の 3 領域は、生後 1 週でのノルアドレナリン量は少ないものの、その後発達に伴ってノルアドレナリン量は増加の一途をたどった。②胎生期化学物質ばく露による海馬ノルアドレナリンの変化では、コントロール群と比較してチメロサル量 0.01 mgHg/kg では約 1.43 倍、チメロサル量 0.1 mgHg/kg では約 1.53 倍に増加していた（いずれも $p < 0.01$ ）。③ノルアドレナリン神経細胞の分布では、成獣ラット脳スライスを作製し DBH（ドーパミンβヒドロキシラーゼ）免疫染色を行ったところ、青斑核に多くの DBH（ドーパミンβヒドロキシラーゼ）陽性の神経細胞体が見られ、脳幹の A2 にも DBH 陽性細胞体が存在していた。DBH 陽性の神経線維は海馬、大脳皮質（前頭葉、頭頂葉）など脳の他の領域にも見られノルアドレナリン神経が脳全体に投射していることが

観察されたことを報告した。

今年度（平成 26 年度）は妊娠中のチメロサル投与での生後の線条体のモノアミン量に着目した。妊娠 9 日目にチメロサルを投与したところ、生後 50 日の線条体モノアミン量はコントロールに比し、セロトニン、ドーパミンで増加、ノルアドレナリンで減少であった。このことは海馬同様、妊娠中のチメロサル投与での生後のモノアミン量は、線条体でも影響を受けることを示唆する。

E. 結論

妊娠中の化学物質のばく露は生後の情動・認知行動に関連する脳内神経伝達物質セロトニンの正常な発生・発達に大きな影響を与えるが、それは化学物質個々に特有の事象ではなく、特有なのは妊娠中のばく露の時期であることを、様々な化学物質を用いて明らかにした。

妊婦の魚介類摂取許容量の目安については国が定めた指針がある。これは胎児への有機水銀の経胎盤ばく露を考慮してのものであるが、私どもは有機水銀の胎生期ばく露実験で、感情を司るセロトニン神経の発達に異常が起きることを動物実験で明らかにした。

F.研究発表

論文発表

Maternal viral infection during pregnancy impairs development of fetal serotonergic neurons.

Takeshi Ohkawara, Takashi Katsuyama, Michiru Ida-Eto, Naoko Narita, Masaaki Narita *Brain and Development*, 37:88-93;2015

Localization of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the reproductive tract of female rats

Michiru Ida-Eto, Makiko Nomura, Takeshi Ohkawara, Naoko Narita, and Masaaki Narita *Acta Histochemica*, 116(3), 522-526, 2014

Impaired prefrontal cortical response by switching stimuli in autism spectrum disorders. Naoko Narita, Akiyuki Saotome, Hiroki Higuchi, Masaaki Narita, Mami Tazoe, and Kaoru Sakatani. *Journal of Pediatric Neurology*, 10; 87-94: 2012

Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development. Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita *International Journal of Developmental Neuroscience* 31(2) 138-144, 2013

Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in

the rat brain: Implications for association with developmental disorders. Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita. *Brain and Development* 35; 261-264: 2013

Subtype-specific parafollicular localization of the neuropeptide manserin in the rat thyroid gland. Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita *Acta Histochemica* (2013) 115(2): 190-194

Prefrontal cortical hemodynamic change due to facial expression switching task in autism spectrum disorders. Higuchi H, Narita M, Sakatani K, Narita N. *Shonan Journal* 3: 41-55, 2012

Kouhei Nishikawa, Norihito Soga, Kenichiro Ishii, Manabu Kato, Yoichi Iwamoto, Yasuhide Hori, Michiru Etoh, Takeshi Ohkawara, Tomomi Yamada, Katsunori Uchida, Hideaki Kise, Kiminobu Arima, Masaaki Narita, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
Manserin as a novel histochemical neuroendocrine marker in prostate cancer. *Urologic Oncology*, 31, 787-795, 2013

Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita
Morphology of the facial motor nuclei in a

rat model of autism during early development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 31(2)138-144, 2013

Localization of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the reproductive tract of female rats
Michiru Ida-Eto, Makiko Nomura, Takeshi Ohkawara, Naoko Narita, and Masaaki Narita
Acta Histochemica, 116, (3), 522-526:2014

自閉症スペクトラム児における統合型
—HTP法を用いた描画の経時的変化
成田奈緒子、成田正明、田副真美
日本小児心身医学会雑誌、22(3), 175-182, 2013

自閉症スペクトラム児における統合型
—HTP法を用いた描画の経時的変化
成田奈緒子、成田正明、田副真美
日本小児心身医学会雑誌、22(3), 175-182, 2013、

キャンプを用いた発達障害児の家族支援
(1)
-児の前頭葉抑制機能変化に関する因子-
小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈都子、樋口大樹、田副真美、成田正明、成田奈緒子 発達障害研究 35(4)334-340, 2013

キャンプを用いた発達障害児の家族支援
(2)
-保護者の心理的効果とそれに関連する生活習慣 -

今泉奈津季、岡戸奈都子、小澤有希、小関英里圭、樋口大樹、田副真美、成田正明、成田奈緒子 発達障害研究 35(4)341-347, 2013

学会発表 (抜粋)

シンポジウム

「胎生期の化学物質ばく露による情動認知行動異常に関する基礎的研究—厚生労働省研究班の研究より」

(全6演題)

第118回日本解剖学会総会・全国学術総会シンポジウム

2013年3月28日香川

オーガナイザー成田正明 (主任研究者)

○演題1

「胎生期の化学物質ばく露による情動認知行動異常に関する基礎的研究」
成田正明 (主任研究者)

○演題2

「小児の毛髪中微量元素と情動・認知行動との関連」横山和仁、松川岳久、横山和仁 (分担研究者)

○演題3

「遺伝子発現プロファイルによる胎生期化学物質ばく露の影響評価」田代朋子 (分担研究者)

○演題4

「有機水銀の胎内ばく露によるモノアミン神経系への影響」江藤みちる、成田正明 (主任研究者)

○演題5

「近赤外線酸素モニター等を応用した情動・認知行動の多角的評価の試み」成田奈緒子 (分担研究者)

○演題6

「胎内でのウイルス感染モデルによ

るセロトニン神経系への影響—化学物質ばく露とのメカニズムの違い」
大河原剛、成田正明（主任研究者）

「小児の毛髪中微量元素濃度と情動・認知行動への影響」

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

第 82 回日本衛生学会 2012 年 3 月（福岡）

最優秀演題賞

「基礎研究から見た小児神経疾患の病態—臨床への応用を目指して」

第 40 回日本小児神経学会東海地方会 特別講演

成田正明

2014 年 1 月 25 日名古屋

「妊娠中のサリドマイドと生後の発達障害—妊娠ラットへのサリドマイド投与による自閉症モデル動物」

第 30 回日本毒性病理学会総会 シンポジウム 2014 年 1 月 30 日—31 日、徳島

「妊娠中の化学物質と生後の発達障害」

成田 正明 、江藤 みちる 、大河原剛

第 41 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム・化学物質曝露と子どもの脳発達・・・発達神経毒性ガイドラインの現状と課題、

2014 年 7 月 2-4 日、神戸

「疫学的事実に基づいた自閉症モデル動物の行動計量学的検討」特別セッション；ヒトの精神・情動・心理行動の医学、薬学、生物学的基盤を解き開く；「動物モデル」と「発達」

大河原剛、江藤みちる、成田正明

第42回日本行動計量学会2014年9月5日仙台

「妊娠中の有機水銀ばく露とセロトニン神経の発達異常」江藤みちる、大河原剛、成田正明

第 53 回日本先天異常学会総会

2013 年 7 月 21 -23 日

「妊娠中のウイルス感染による胎児の情動神経への影響」

大河原剛、葛山貴士、江藤みちる、成田正明

第 53 回日本先天異常学会総会

2013 年 7 月 21 -23 日

「さまざまな言語活動を行わせた際の脳活動の可視化の試み—睡眠不足の影響」成田正明、江藤みちる

第 9 回日本疲労学会総会 ミニシンポジウム、2013 年 6 月 7,8 日秋田

Abnormalities in cerebellar Purkinje cells in autism model rats induced by thalidomide. Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Takashi Katsuyama, Arata Sakuramoto, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Masaaki Narita 北米神経科学

会 2012年11月15日ニューオーリンズ

Developmental Expression of a Novel Neuropeptide, Manserin, in the Rat Cochlea

Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Arata Sakuramoto, Takashi Katsuyama, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Masaaki Narita

14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2012年8月26-29日京都

(3) 投影法による発達障害児の経時的評価の意義について 成田奈緒子¹⁾、成田正明、田副 真美 第30回日本小児心身医学会学術集会

2012年9月7-9日、名古屋

(4) 体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(1) ~児における前頭葉機能の変化とストレスマーカー、気分との関連~ 小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈都子、田副真美、成田正明、成田奈緒子 日本発達障害学会 2012年8月11,12日 横浜

(3) 体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(2) ~PARSから見た保護者の捉えの変化に影響を及ぼす要因~ 今泉奈津季、岡戸奈都子、小澤有希、小関英里圭、田副真美、成田正明、成田奈緒子

日本発達障害学会 2012年8月11-12日横浜

(4) 前頭葉賦活化課題を遂行中の脳機能の可視化—近赤外線分光法による解析

櫻本新、葛山貴士、江藤みちる、大河原剛、成田正明 第16回活性アミンに関するワークショップ 2012年8月24日札幌

(5) 解剖学的領域とそれに対応する領域の脳機能の可視化—近赤外線分光法による解析 櫻本新、葛山貴士、江藤みちる、大河原剛、成田正明 第72回日本解剖学会中部支

部会 2012年10月13-14日 岐阜

(6) 妊娠中のウイルス感染におけるセロトニン神経系の発生異常—ウイルス感染モデル動物を使った実験 葛山貴士、大河原剛、櫻本新、大藪明子、江藤みちる、成田正明 第72回日本解剖学会中部支部会 2012年10月13-14日 岐阜

(7) 妊娠中の有機水銀ばく露が胎仔セロトニン神経の初期発生に及ぼす影響

—ばく露時期依存性の影響 江藤みちる、櫻本新、大藪明子、葛山貴士、大河原剛、太城康良、成田正明 第72回日本解剖学会中部支部会 2012年10月13-14日 岐阜

(8) 妊娠中の有機水銀ばく露と生後の脳発達—厚生労働省研究班の成果より

三重メディカル研究会・第7回環境健康学研究会 江藤みちる (=研究協力者)

2013年1月25日 三重大学社会連携研究センター伊賀研究拠

(9) 胎生期の化学物質ばく露による情動認知行動異常に関する基礎的研究

—厚生労働省研究班の研究より

成田正明 (=オーガナイザー)

日本解剖学会総会学術集会シンポジウム

2013年3月28日香川

報道発表等

(1) クジラやイルカの食習慣ある和歌山県太地町における住民の有機水銀摂取の不安、とくに妊婦や子どもに対する懸念について、研究代表者の成田正明が厚生労働省研究班として紙上で論評した(2012年6月1日読売新聞)。

(2) 「化学物質ホルムアルデヒドと健康」 NHKテレビ “視点論点” 2012年6月15日。

平成 24 年度

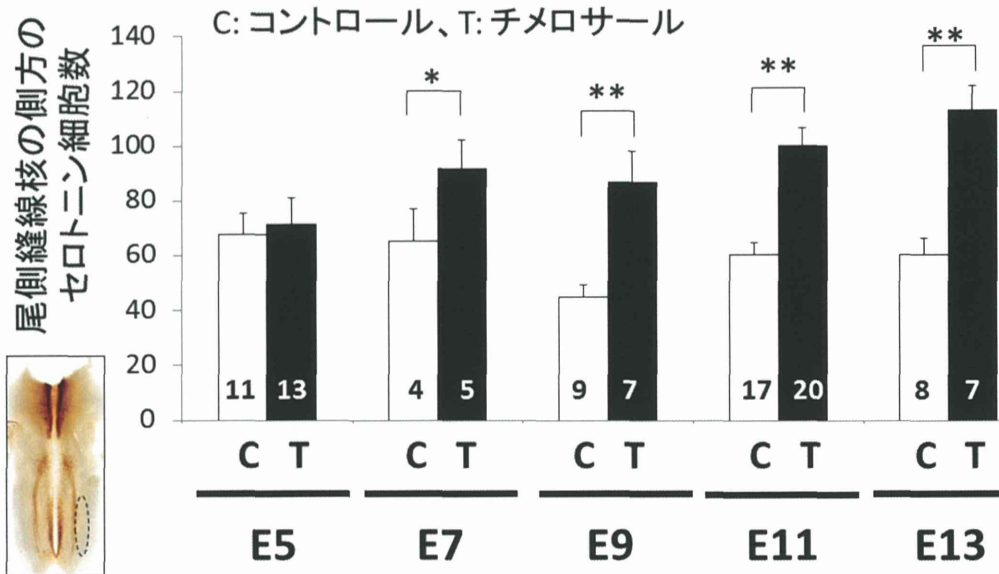


図 尾側縫線核側方のセロトニン細胞数のチメロサール投与時期による比較
左下の写真は胎生15日展開標本のセロトニン免疫染色像。点線で囲んだ部分に存在する尾側縫線核側方セロトニン細胞の数を計測した。バーの中の数字は胎仔の個体数。C: コントロール群、T: チメロサール投与群。* $p < 0.05$ vs. コントロール; ** $p < 0.01$ vs. コントロール。

平成 25 年度

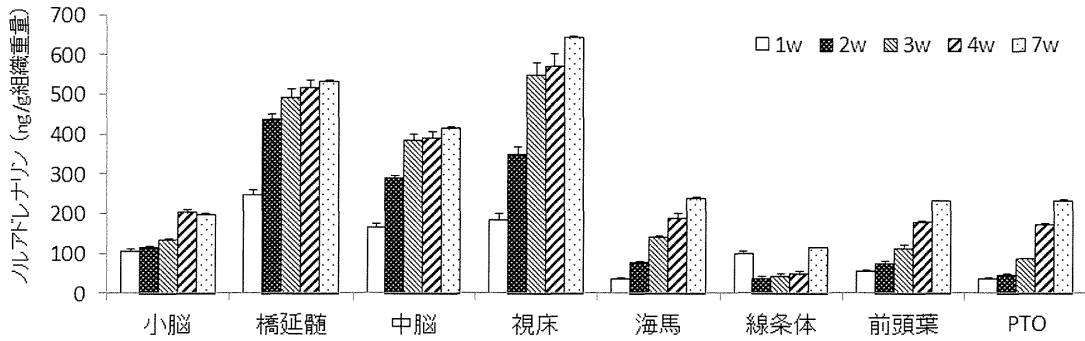
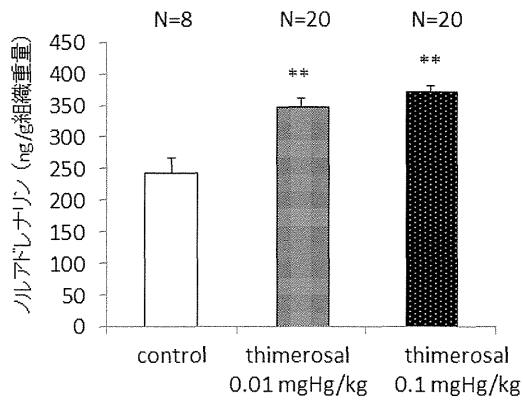


図1 脳各領域におけるノルアドレナリン量の生後の発達に伴う変化の比較。それぞれn=6。単位はng/g組織重量。平均値±SEM(n=6)。PTO, Parietal-Temporal-Occipital (頭頂葉-側頭葉-後頭葉)。

(A) チメロサル



(B) サリドマイド

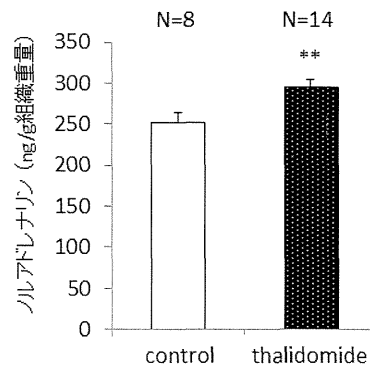


図2 胎生期の化学物質ばく露後の、生後50日における海馬ノルアドレナリン量の比較。
 (A) 妊娠9日目にチメロサル(0.01 mgHg/kg, 0.1 mgHg/kg)をばく露し、コントロールは生理食塩水とした。
 (B) 妊娠9日目、10日目にサリドマイドをばく露し、コントロールはアラビアゴム水溶液とした。
 単位はng/g組織重量。平均値±SEMで示した。** $p < 0.01$ vs. コントロール。

平成 25 年度

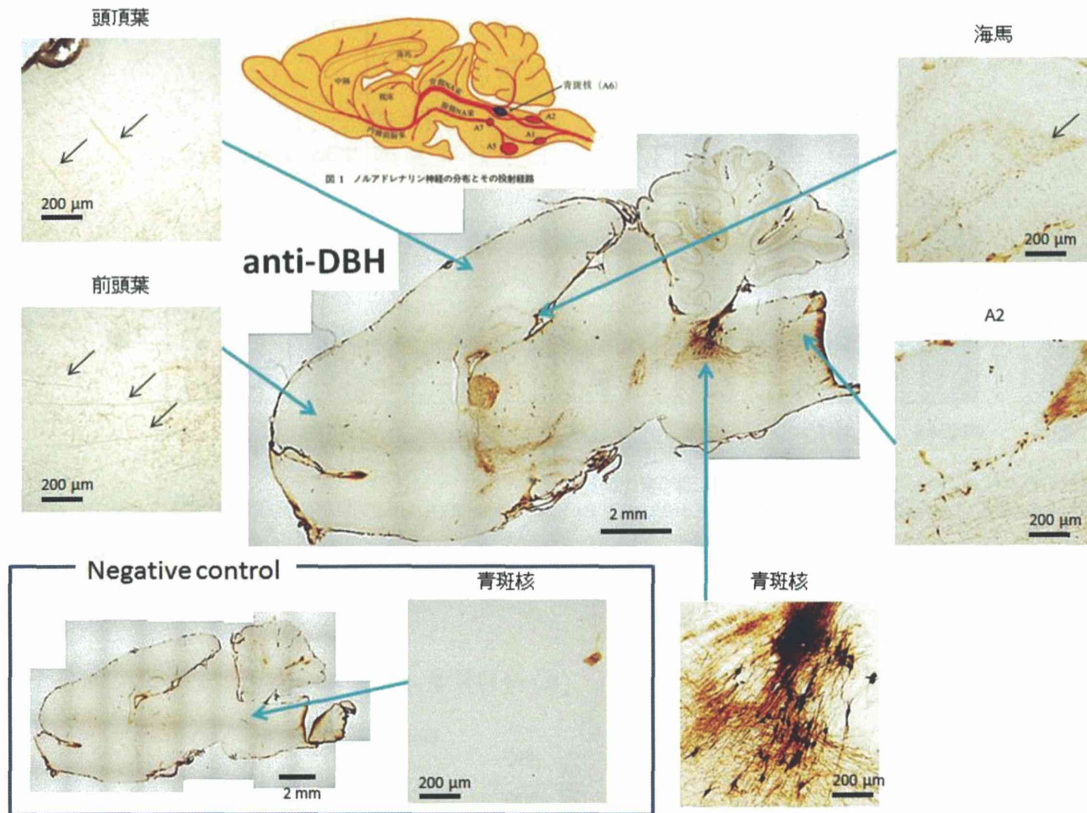


図3 成獣ラット脳スライスのノルアドレナリン免疫染色。ノルアドレナリン神経細胞をドーバミンβヒドロキシラーゼ (DBH) 抗体を用いて可視化した。DBH陽性細胞の細胞体は青斑核や延髄のA2に局在し、海馬、大脳皮質前頭葉、頭頂葉には神経線維(矢印)が観察された。ネガティブコントロールでは青斑核に陽性細胞が観察されなかった。

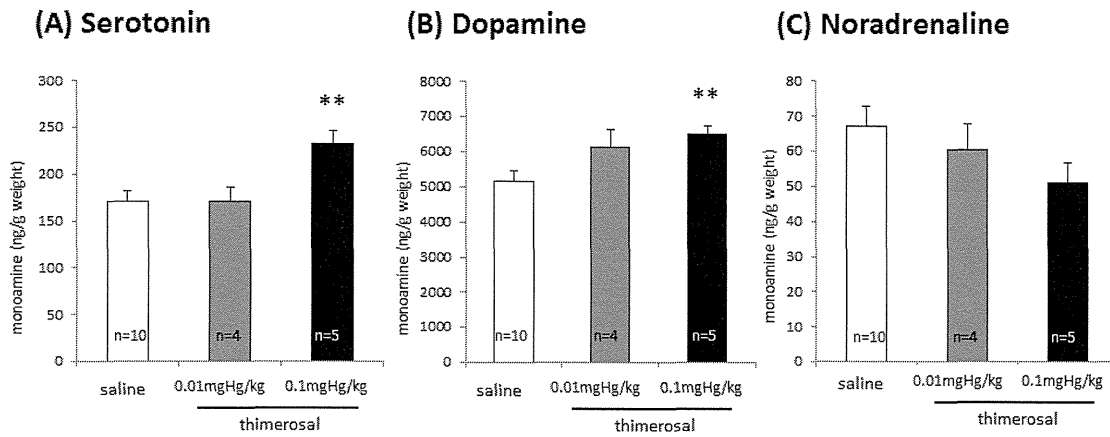


図 胎生期チメロサルバク露後の生後50日における線条体モノアミン量の比較
妊娠9日目にチメロサル (0.01 mgHg/kg, 0.1 mgHg/kg) を投与した。コントロールは生理食塩水とした。
生後50日仔の脳から線条体を採取し、セロトニン(A)、ドーパミン(B)、ノルアドレナリン(C)を定量した。
単位はng/g組織重量。平均値±SEMで示した。** $p < 0.01$ vs. コントロール。

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 24～26 年度 分担研究課題： 動物実験（ばく露の有無を知るバイオマーカー検索）

研究分担者	田代 朋子	青山学院大学・理工学部教授
研究協力者	澤野 恵梨香	青山学院大学・理工学部助手
	小柳 洸志	青山学院大学大学院理工学研究科 博士後期課程
	岩谷 可南子	青山学院大学大学院理工学研究科 博士前期課程
	上田 茜	青山学院大学大学院理工学研究科 博士前期課程

研究要旨

本分担研究では、動物モデルを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、胎生期の化学物質ばく露の影響が顕在化する時期および強く影響を受ける脳内部位やプロセスを特定し、ばく露の有無を知るバイオマーカーを探索するとともに、その妥当性を生化学的、形態学的に確認することを目的とした。動物モデルとして、(a) 胎生期サリドマイドばく露による自閉症モデルラット、(b) 胎生期メチマゾールばく露による甲状腺ホルモン(TH) 低下ラット、(c) 若齢期に多動、低不安など顕著な行動異常を示す SAMP8 マウス、の三種を用いた。その結果、これらの動物に共通して、生後 2 週のシナプス形成期を中心に海馬や大脳皮質で発達過程の異常が顕在化することを見出した。なかでも GABA システムを構成する GAD65、KCC2 の二種類はタンパク質レベルで再現的に発現低下を示した。また、GABA 神経細胞のサブタイプであるニューロペプチド Y-陽性細胞が(b)、(c) の海馬で有意に減少しており、電気生理学的性質が変化していることを見出した。これらの結果から、ばく露される化学物質により影響を受ける経路は異なっても、シナプス形成がほぼ完了し、TH 作用の臨界期が終了するこの時期に異常が顕在化するものと考えられる。GABA 作用は、シナプス後細胞での KCC2 発現により、生後 10 日を中心に興奮性から抑制性にスイッチングすることから、特に影響が強く表れると推測される。一方、脳の発達に必須の TH については、血中ホルモン濃度は正常であるにも関わらず、TH 活性化酵素・2 型脱ヨード化酵素 (DIO2) の減少により、脳内で局所的な TH 欠乏が起こる事例を SAMP8 で見出し、TH シグナルの新たな攪乱ポイントを提案した。また、従来の 3,5,5'-triiodothyronine (T3) による遺伝子発現調節に加えて、輸送型とされてきた thyroxine (T4) による細胞骨格の安定性制御を介した新たな作用を確認した。

A. 研究目的

胎生初期から生後まで長期にわたって発達する脳は、化学物質ばく露の影響を受ける確率が高く、かつ感度も高いが、その複雑な構造と機能から、化学物質ごと、脳内

部位ごとに、また発達期を通してその影響を調べるには膨大な時間と労力を必要とし、現実的ではない。これに対し、分担研究者・田代は、本研究でモデル動物を用いて、化学物質ばく露の影響が顕在化する時期や脳

内部位を絞り込み、共通の特徴を抽出することで、バイオマーカーとなる遺伝子やタンパク質を選定することを目的とした。

げっ歯類では、生後の2週間にほぼ集中してシナプスが形成され、神経回路が構築されるが、この時期までは、血液・脳関門が未完成なため、外来化学物質が血管から容易に脳内に到達する。同時に、脳の発達に必須のホルモンである甲状腺ホルモン (TH) の臨界期とも重なる。

ばく露の有無による差を、まず DNA マイクロアレイ法やリアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析によって抽出し、これに関わるプロセスを推定し、次いで生化学的、形態学的方法で確認する過程を通して、ばく露のバイオマーカーとなる遺伝子あるいはタンパク質の特定を試みた。

B. 研究方法

(1) 動物モデル

a) サリドマイド誘発自閉症モデルラット : 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) を単回経口投与することで作成した。溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与したものを対照群とした。

b) メチマゾールによる実験的甲状腺ホルモン低下ラット :

母ラットに妊娠 15 日目より授乳期を通して甲状腺ホルモン合成阻害剤メチマゾール (MMI : 0.025%) を飲水投与することにより甲状腺ホルモン低下ラットを作成した。また、このラットに生後 1 日より毎日、甲状腺ホルモン・サイロキシシン (T4 : 20ng/g 体重/日) を皮下投与し、回復群を作成した。

c) 老化促進モデルマウス SAMP8、SAMR1

SAM (Senescence accelerated mouse) は京都大学で確立された老化促進モデル動物で、促進老化と短寿命を呈する SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統から成る。SAMP 系統のうち SAMP8 は、身体的老化は緩やかであるが、5 カ月齢以降、進行性の学習・記憶障害など、主として中枢神経系の病態を示し、脳の加齢変化を調べるモデルとして使用されてきた。しかしながら田代らは最近、SAMP8 と対照群である SAMR1 を生後初期から比較解析し、学習・記憶障害の顕れる以前の若齢期 (1 ~ 5 ヶ月齢) の SAMP8 に顕著な多動や低不安などの行動異常が見られること、海馬において甲状腺ホルモン活性化酵素 (2 型脱ヨード化酵素) が減少し、甲状腺ホルモン・シグナルが減弱していることを見出した (Sawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2013a)。SAMP8 は、いわゆる甲状腺機能低下モデルとは異なり、血中 TH 濃度は正常であるにも関わらず、局所的に活性型 3,5,3'-triiodothyronine (T3) が低下することにより発達障害を引き起こす最初のモデルである。

(2) 行動解析

オープンフィールド・テストおよび明暗箱による受動的回避テストを行った。

(3) 培養細胞

初代培養小脳顆粒細胞 :

生後 6 日ラット小脳から採取した小脳顆粒細胞は培養下で、生理的な細胞外 K⁺濃度 (5mM; K5) では 48 時間以内に細胞死を起こすが、より高い K⁺濃度 (25mM; K25) で脱分極させることで生存する性質を持ち、脱分極、即ち神経活動に依存した細胞生存

のモデル実験系とされている。本研究では、この K5 誘発細胞死に対する以下三種類の甲状腺ホルモンの効果を調べた；thyroxine (T4)、3,5,5'-triiodothyronine (T3)、3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3; rT3)。

(4) 遺伝子およびタンパク質発現解析

DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析：市販の大集積アレイ（44,000 プローブ；Agilent 社）を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

リアルタイム定量 PCR：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。

ウェスタン・ブロッティング：各個体、各組織を SDS サンプルバッファーに溶解し、SDS 電気泳動後、PVDF 膜に転写し、目的タンパク質に特異的な抗体を用いて ECL 法により定量した。内部標準として β アクチンを用いた。

(5) 免疫組織化学および免疫細胞化学

各週齢の動物の脳を麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、パラフィン包埋し、厚さ 8 μ m の切片を作製した。GAD65、GAD67、PV、NPY などに対する特異抗体を用いて ABC 法で切片を染色し、海馬を中心に GABA ニューロンの数や分布を測定した。

培養細胞については、4%パラホルムアルデヒド - 8%ショ糖液で 5 分間固定後、PBS でゆすぎ、冷メタノール (-20°C) で 2 分間固定した。0.2% Triton X-100 を含む液で細胞膜を溶解後、抗タウ抗体を用いて染

色した。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて青山学院大学工学部ラ イスサイエンス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：

平成 23 年度までの研究で、網羅的遺伝子 発現解析により、胎生期サリドマイドばく 露群（THA 群）と非ばく露正常群（CTL 群）の 大脳皮質および海馬における生後発 達過程を比較した結果、両群の遺伝子発現 の差異は生後 20 日頃に最も顕著であるこ とが分かった。正常群でこの時期を中心 にみられる遺伝子発現のスイッチングが THA 群では見られないことがその主な理 由である。

生後 20 日頃は初期のシナプス形成がほぼ 完了し、活動依存的な発達が始まる時期で あることから、両群でシナプス形成に違い があるのではないかと考え、本研究では、 グルタミン酸作動性シナプスならびに GABA 作動性シナプスに局在するタンパク の量的変化を大脳皮質で調べたところ、生 後 14 日で PSD95 (postsynaptic density protein 95) と GAD67 (glutamic acid decarboxylase) が THA 群では CTL 群の 40 ~50%に一過性に減少しており（図.1）、 GAD65 および KCC2 についても同時点で 減少傾向が確認された。

(2) 実験的甲状腺ホルモン低下ラット：

妊娠 15 日目から母ラットに MMI を飲水 投与し、生まれた TH 欠乏状態の仔ラット (hypo 群)、hypo 群に生後 1 日目より毎日、

T4 を皮下投与した回復群、MMI 非投与の母ラットから生まれた正常群、の三群を生後 4、10、15、28 日の各時点で比較した。まず、大脳皮質、海馬、線条体、中脳、小脳の 5 部位で、甲状腺ホルモン応答配列を持つ三つの遺伝子 (*rc3*, *hr*, *mbp*) の発現を比較した結果、海馬の TH 感受性が非常に高いことが確認された。

次いで、TH 欠乏の影響が大きいとされる GABA 作動性シナプスの生後発達過程を

これら三群の海馬で調べた結果、GABA 合成の律速酵素である二種類のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) のうち、主としてシナプスに局在し、神経活動に応じた GABA 合成を司る GAD65 は、*hypo* 群では正常群の 50% に減少し、回復群では正常レベルまで回復していた (図 2A)。もう一つの GAD、GAD67、の発現は甲状腺ホルモン・レベルに影響されなかった (図 2B)。免疫組織化学的にも、GAD65 陽性細胞数が *hypo* 群で

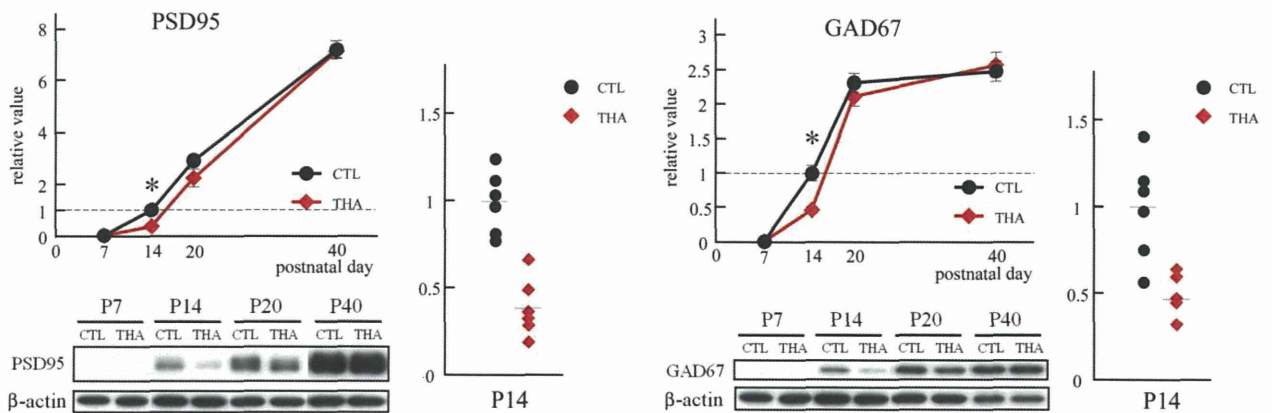


図 1. 生後の大脳皮質のシナプス形成に対する胎生期サリドマイドばく露の影響:

PSD95(左)および GAD67(右)に対する特異抗体を用いた生後発達期のタンパク量の変化をウェスタンブロットティング法で定量。

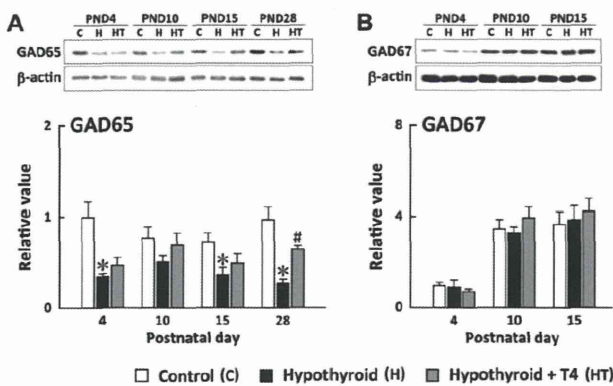


図 2. 発達期海馬における GAD65 および GAD67 の甲状腺ホルモン応答性。

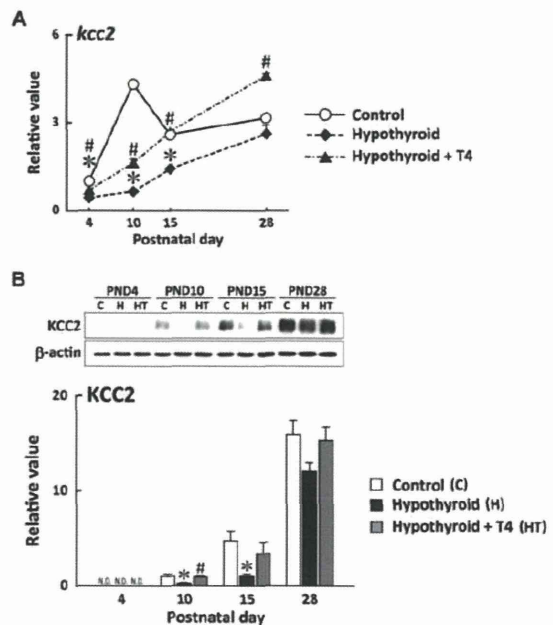


図 3. 甲状腺ホルモン・レベルによる KCC2 の mRNA およびタンパク発現変化

37%減少しており、GAD65 陽性の神経突起も減少していた。一方、シナプス後細胞で GABA 作用のスイッチングに関わる K^+ , Cl^- 共輸送体・*kcc2* の mRNA レベルには、正常群では生後 10 日をピークとする一過 mRNA レベルには、正常群では生後 10 日をピークとする一過性の大きな発現上昇がみられるが、*hypo* 群ではこれが消失しており、生後 15 日目における KCC2 タンパク量は正常群の 20%に留まっていた

KCC2 は、 Cl^- を細胞外に排出し、細胞内 Cl^- 濃度を低下させることで GABA の作用を発育初期の興奮性から抑制性へと変換する重要な因子である。甲状腺ホルモンはこれら二つのタンパク質の発現を介して GABA 作動性システムの発達と成熟に深く関与していることが分かった。

(3) SAMP8 マウス :

SAMP8 では、(2)の甲状腺機能低下モデルとは異なり、血中 TH 濃度は正常であるにも関わらず、発達初期から海馬や大脳皮質で 2 型脱ヨード化酵素が大幅に減少していることにより、局所的に T3 によるシグナルが減弱する結果、若齢期の行動異常を引き起こすと考えられる (図. 4)。

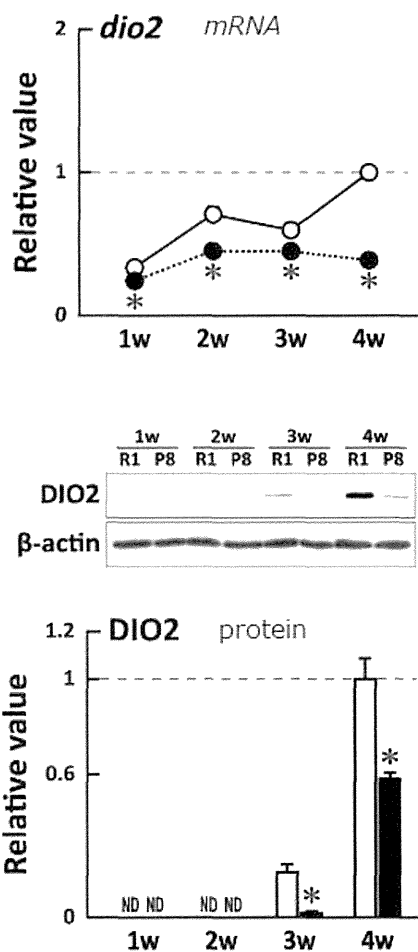


図. 4 生後初期 SAMP8, SAMR1 海馬における DIO2 の発現

特にシナプス形成期である生後 2-3 週の時点で、SAMP8 では DIO2 タンパクがほとんど検出されないほど発現が弱い。

SAMP8 海馬でも発達期の GABA シナプス構成タンパクについて対照群である SAMR1 と比較した結果、生後 2 週の時点で、GAD65 には減少傾向、KCC2 には有意な減少がみられた。これら二種類のタンパクは、両群に共通して生後 1 週から 3 週にかけて増加するが、SAMP8 では 2 週での増加が少なく、3 週では SAMR1 と同レベルに回復していた (図 5)。

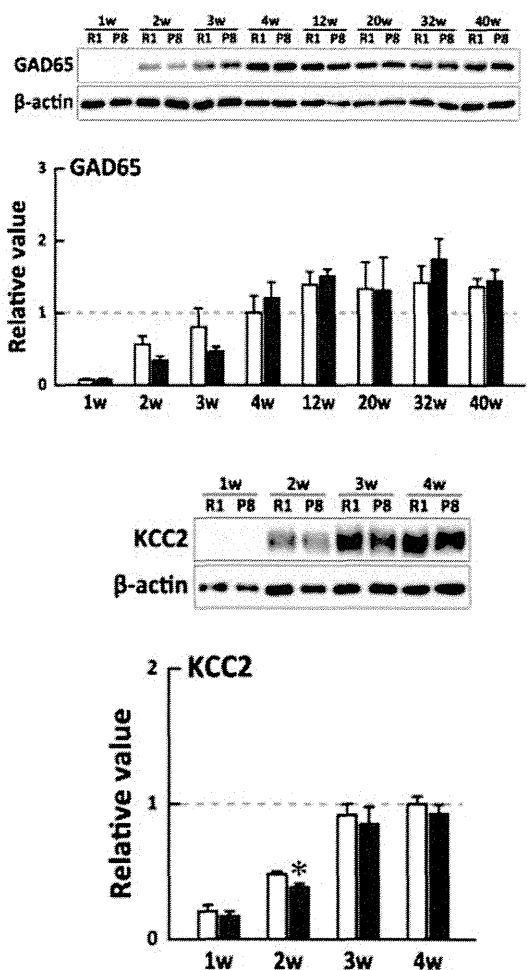


図. 5 生後初期 SAMP8、SAMR1 海馬における GAD65 および KCC2 の発現

これらの結果は SAMP8 で GABA システムの発達にわずかな遅れがみられることを意味している。

さらに、免疫組織化学により、各週齢の海馬における全 GABA ニューロン(GAD67 陽性細胞)、PV 陽性細胞、NPY 陽性細胞の分

布を両系統で比較したところ、GABA ニューロンの総数や分布には差がなく、PV 陽性細胞についても同様であったが、NPY 陽性細胞については、SAMP8 で有意に減少していた。図 6 に 2 週齢の海馬 CA3 領域および DG 領域の染色像を示す。

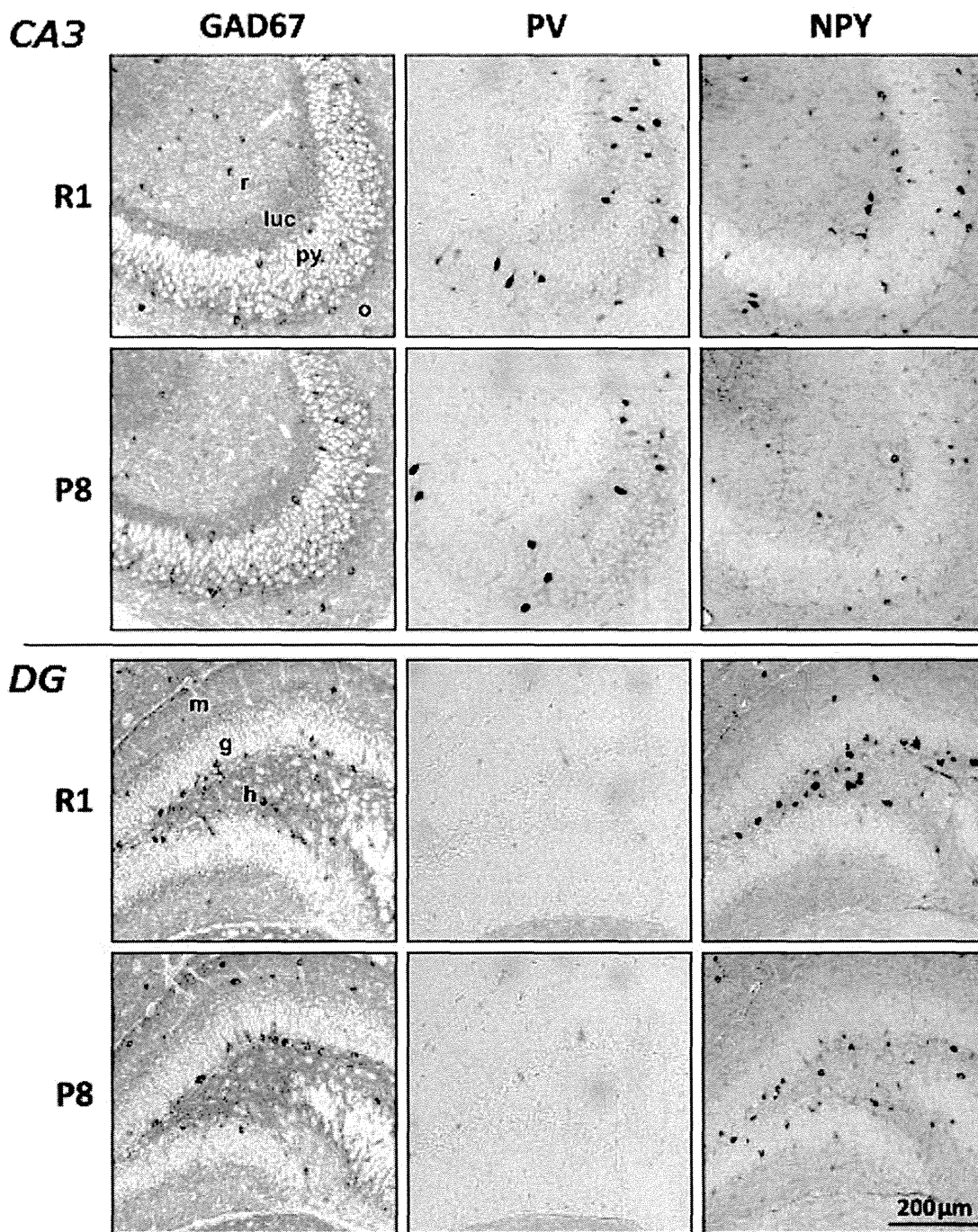


図.6 SAMP8、SAMR1 海馬 CA3 (上段) および DG 領域 (下段) における全 GABA ニューロン(GAD67 陽性細胞)、PV 陽性細胞、および NPY 陽性細胞の分布。

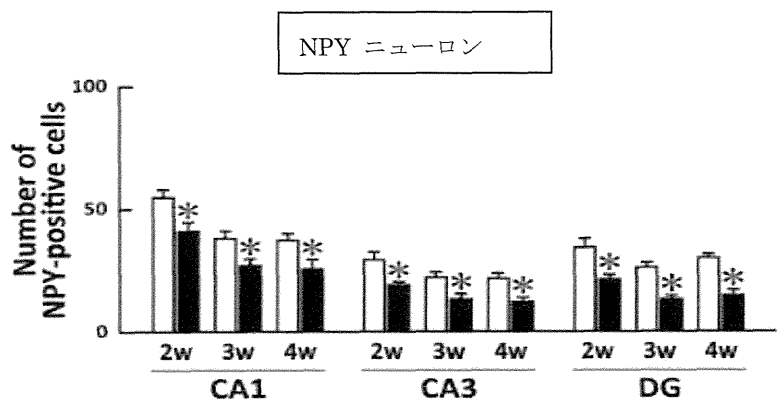
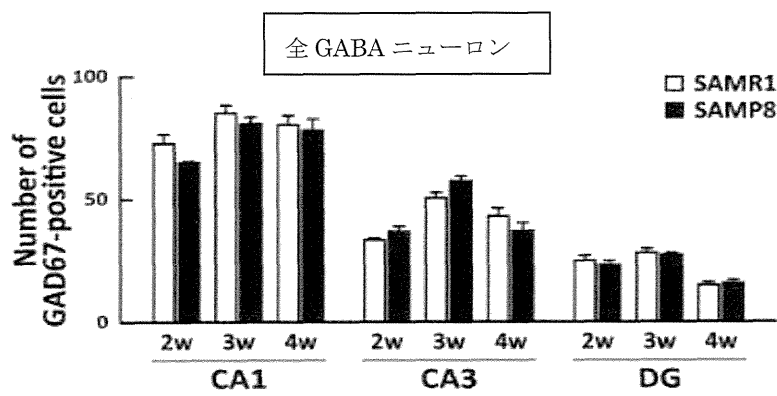


図. 7
2、3、4 週齢 SAMP8、SAMR1 海馬各領域における全 GABA ニューロン(GAD67 陽性細胞)および NPY 陽性細胞の数

SAMP8 では NPY 陽性細胞の数が少ないだけでなく、個々の細胞の免疫染色強度が弱く、細胞ごとの NPY 発現も低い。

GAD67 陽性細胞数は 3 週齢で成体レベルに達し、その後は一定であるのに対し、NPY 陽性細胞は 1 週齢で最も多く、成長に伴って有意に減少した (図 7)。一方、PV 陽性細胞は成長に伴って増加していた。

NPY は内在性の抗てんかん物質として知られ、海馬では錐体細胞に発現する Y2 受容体を介してグルタミン酸放出を抑制するため、NPY の減少は錐体細胞の興奮性を上げると考えられる。実際、海馬切片での電気生理学的実験により、SAMP8 では高頻度刺激で誘発される痙攣波が有意に長く持続するという結果を得ている。

(4) 培養小脳顆粒細胞に対する thyroxine (T4)の細胞死抑制効果

通常、神経細胞の初代培養には細胞外液と同様のイオン組成を持つ培養液が用いられるが、小脳顆粒細胞の場合はこの条件では 24~48 時間で細胞死を起こし、生存を維持するためには、培養液のカリウム濃度を通常 5 mM から 25 mM まで引き上げて細胞の膜電位を上昇させ、脱分極しやすい状態を作る必要がある。

本研究ではまず、未成熟な顆粒細胞が外顆粒層に存在する生後 1 日目 (P1)、および顆粒細胞が内顆粒層への遊走を開始している生後 6 日目 (P6)、の二時点でラット小脳より細胞を採取し、poly-L-lysine でコーティングしたディッシュに撒き、10% ウ

シ胎仔血清 (FBS)、25 mM KCl を含む培養液で 48 時間培養した後、FBS を除去し、25 mM KCl を含む培養液 (K25) または 5mM KCl を含む培養液 (K5) に交換して、さらに 48 時間培養後の細胞生存率を MTT 法で比較した。その結果、P6 採取細胞でのみ細胞死が観察された。P7 小脳の切片を K5 で 48 時間培養した場合、死細胞のほとんどが内顆粒層に検出されることから、生存に神経活動を必要とするのは遊走後の顆粒細胞であることが明らかになった。

このように K5 条件下で細胞死を起こす P6 採取細胞を以後の実験に用い、この低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモンの影響を調べた。甲状腺ホルモンは、4 個

のヨウ素原子を含む thyroxine (T4) として合成された後、位置特異的な酵素的脱ヨード化により、複数の種類が生成される。ここでは、血中に最も高濃度 (約 100 nM) に存在する T4、T4 内環の脱ヨード化により生成する T3、T4 外環の脱ヨード化によって生成する rT3 について検討した。T3 は、血中濃度が T4 の 1/10 であるが、甲状腺ホルモン核内受容体に強い親和性を持つ活性型ホルモンである。様々な濃度の T4、T3 または rT3 を含む K5 で 48 時間培養したところ、T4 を添加した場合のみ、100 nM 以上で細胞死抑制効果がみられ、200nM で細胞死は完全に抑制された。T3、rT3 では同程度あるいはそれ以上の濃度でも細胞死抑制効果は見られなかった。

微小管結合タンパク・タウに対する抗体を用いた蛍光抗体法によって観察した結果、200 nM T4 を添加した K5 培養液 (K5+T4) 中では神経突起が K25 培養液 (K25) 中と

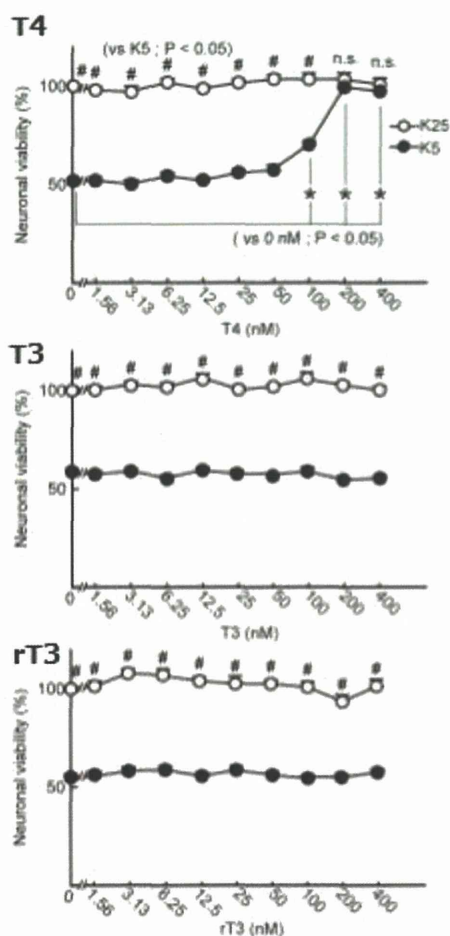


図. 8 小脳顆粒細胞の低カリウム誘発細胞死に対する T4、T3、rT3 の効果

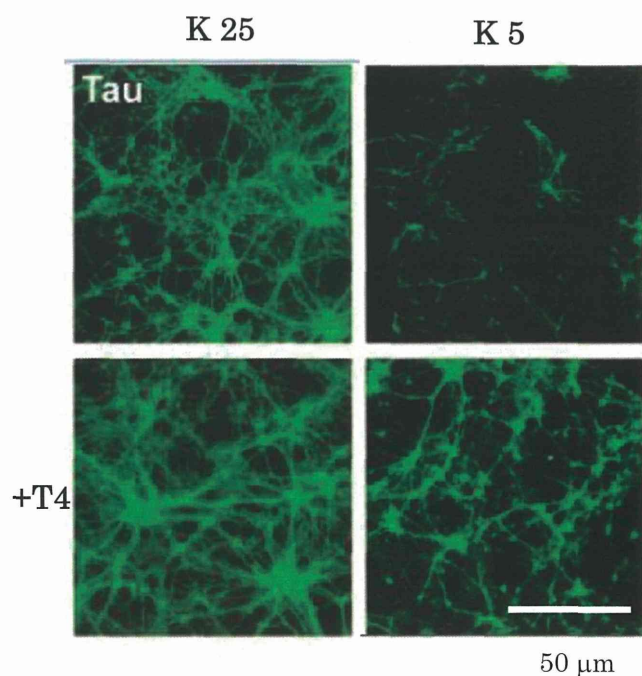


図. 9 48 時間培養後の小脳顆粒細胞の突起形態

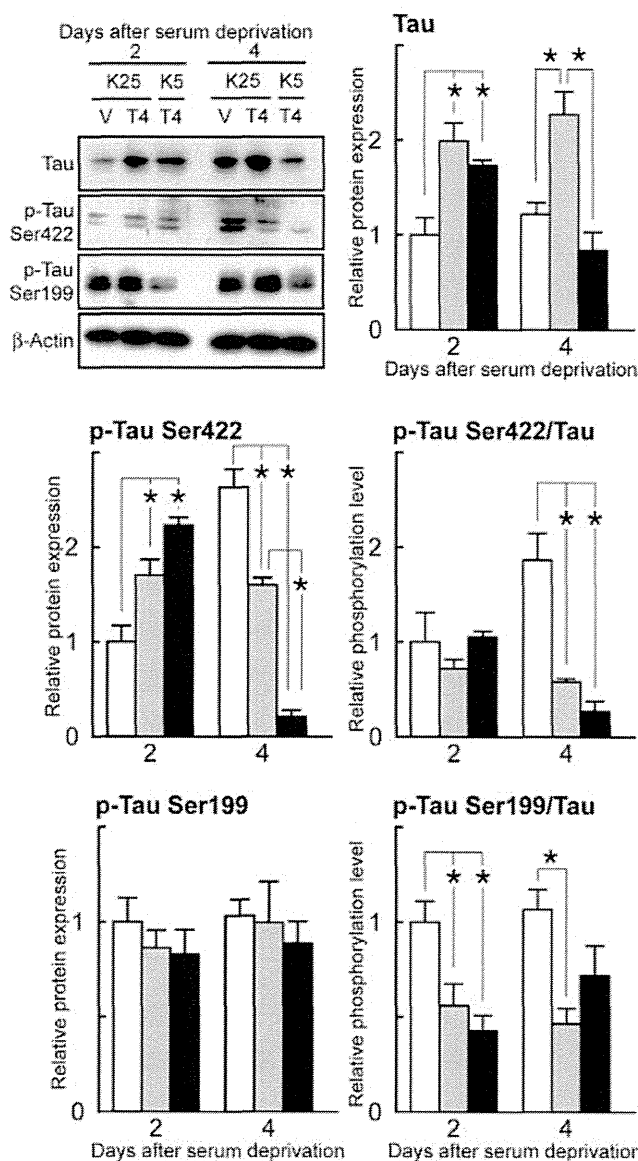
同等に伸展し、維持されており、K25 に T4 を添加した培養液 (K25+T4) 中では突起の密度がさらに増加していた (図 5)。微小管とそのサブユニット・チューブリンを超速心によって分別定量してその重合状態を調べた結果、K25 と比較して、K25+T4 でチューブリン重合が有意に促進されており、K5+T4 でも重合促進傾向が観察された。

チューブリン重合および微小管の安定性を調節する重要な因子は微小管結合タンパ

合力はリン酸化によって低下するため、過度なリン酸化は微小管の安定性を損なうが、重合・脱重合による微小管のダイナミックな変換を伴う突起伸展には MAPs の適度なリン酸化が必要である。顆粒細胞の生存が維持される三種の培養条件下 (K25、K5+T4、K25+T4) で神経軸索の代表的 MAPs であるタウの発現量を比較したところ、T4 添加 2 日後には K25 + T4 および K5 + T4 でタウの発現量が K25 の約 2 倍に増加していた

(図 10)。T4 添加 4 日後には K5+T4 のタウ発現量は K25 のレベルに低下したが、K25+T4 では増加したままであった。次いで、タウの多数のリン酸化サイトのうち、発達期に限定したリン酸化のみられる Ser422 および Ser199 のリン酸化をリン酸化特異的抗体によって調べた (図 10)。リン酸化 Ser422 を含むタウは、T4 添加 2 日後の K25+T4、K5+T4 において一過性に増加し、T4 添加 4 日後には K25 に比べて減少していた。K5+T4 における減少は特に顕著であった。一方、リン酸化 Ser199 を含むタウには三種の培養条件間で量的な差がみられなかったが、前述のように T4 添加によってタウの総量が増加するため、K25+T4、K5+T4 では相対的に Ser199 のリン酸化レベルが低下していた。

以上の結果から、脱分極効果により生存している場合 (K25) と比較して、T4 添加により生存している場合 (K5+T4) には、タウのリン酸化が大幅に抑制されることによる微小管の安定化が突起の維持に寄与しており、脱分極効果と T4 添加が共存する場合 (K25+T4) には、タウ



ク (MAPs) である。MAPs の微小管への結

図.10 K25、K25+T4、K5+T4 の各条件でのタウの総量および Ser422、Ser199 のリン酸化