

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

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

研究分担者	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長 宇佐見 誠
研究協力者	宮島 敦子
研究協力者	入江 智彦

要旨

ラット神経堤細胞遊走実験法を用いて、発達神経毒性を有すると考えられる化学物質として、クロルピリホスの神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。ラット 10.5 日胚から菱脳部の神経管を摘出して培養し、培養 24 時間目にクロルピリホスを培養液に添加した。培養期間中に神経管から遊出する神経堤細胞の広がり測定し、神経堤細胞の遊走を調べた。その結果、25  $\mu\text{M}$  以上のクロルピリホスにより、形態変化を示す細胞が散見され、細胞毒性によると考えられた。神経堤細胞の遊走に及ぼす影響として、培養 48 時間までは 50  $\mu\text{M}$  までは促進傾向が認められ、100  $\mu\text{M}$  では抑制傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25  $\mu\text{M}$  以上で抑制傾向が認められ、25  $\mu\text{M}$  以上で有意差が認められた。神経堤細胞の遊走促進をより高感度に調べることができる方法として、培養 18 時間で神経管を除去すると、クロルピリホス (100  $\mu\text{M}$ ) は神経堤細胞の遊走を促進する場合もあったが、72 時間では遊走の抑制傾向が認められた。これらのことから、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。以上のように、ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有する化学物質の神経堤細胞に及ぼす影響を明らかにすることが出来た。本実験法は、毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている。神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

また、神経堤細胞のうち、頭部神経管に由来する頭部神経堤細胞の異常では、顔面の奇形などの形態形成に及ぼす影響も認められる。神経堤症による顔面奇形と同様の奇形は、胚のレチノイン酸への過剰暴露においても生じることから、神経堤細胞は化学物質によ

る毒性の標的組織となり得ると考えられている。しかし、適切な実験法が確立されていないため、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。

本研究では、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。神経堤細胞実験法としては、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞を用いた実験法の確立を目指した。

本実験法を利用することにより、神経堤細胞遊走に影響する化学物質とそのメカニズムを同定し、ヒトにおける当該化学物質に対する高暴露集団およびメカニズムに関与す

る遺伝子疾患等を有する集団などの、ハイリスク集団について、疫学的調査の基盤的情報を提供すると共に、健康影響の予防のための方策となる情報を得られることが期待される。

初年度は、神経系の発生に影響を及ぼすことが知られているバルプロ酸をモデル化学物質として用いて、ラット神経堤細胞遊走実験法の発達神経毒性評価法としての有用性について検討した。次年度は、内分泌攪乱作用を有する環境汚染物質であるトリブチルスズをモデル化学物質として用いた。最終年度である今年度は、神経発達毒性が報告されている農薬であるクロルピリホスをモデル化学物質として用いた。

## B. 研究方法

### 1. 動物

ウィスターラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) を用いた。発情前期の雌ラットを雄と終夜同居させ、妊娠ラットを得た。同居中の深夜を妊娠 0 日として起算した。妊娠 10.5 日に、妊娠ラットから初期着床胚を摘出して実験に用いた。

### 2. ラット神経堤細胞の培養

摘出したラット初期着床胚から、電解研磨したタングステン針を用いて、菱脳部を切り出し、物理的に神経管を取り出した。体幹神経堤細胞を用いる場合は、前肢芽の部位から神経管を同様の方法で取り出した。取り出した神経管を、培養シャーレ (Becton, Dickinson and Company) に培養液 (10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO<sub>2</sub>、37℃にて培養した。培養 24 時間目にクロルピリホスを含む培養液に交換して、48 時間まで培養した。クロルピリホスは、ジメチルスルホキシドに溶解して用いた。

### 3. ラット神経堤細胞の観察

培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への付着及び遊走細胞の広がりを観察した。

### 4. データの解析

細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールでつないでできる図形を円とみなして、そのピクセル数で表される面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。

### (倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験に関する指針」を遵守した。

## C. 研究結果

### 1. クロルピリホスのラット神経堤細胞遊走に及ぼす影響

クロルピリホス (6.25, 12.5, 25, 50 および 100  $\mu$ M) を培養 24 時間目に添加して、ラット神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、25  $\mu$ M 以上のクロルピリホスにより、形態変化を示す細胞が散見され、細胞毒性によると考えられた (図 1)。

神経堤細胞の遊走に及ぼす影響として、培養 48 時間までは 50  $\mu$ M までは促進傾向が認められ、100  $\mu$ M では抑制傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25  $\mu$ M 以上で抑制傾向が認められ、25  $\mu$ M 以上で有意差が認められた (図 2)。

一方、神経堤細胞の遊走促進をより高感度に調べるができる方法として、培養 18 時間で神経管を除去すると、クロルピリホス (100  $\mu$ M) は神経堤細胞の遊走を有意に促進した (図 3)。

遊走促進作用の確認および神経管の部位の違いによる神経堤細胞への影響を調べるために、頭部および腹部神経管を培養し、培養 18 時間で神経管を除去して、24 時間目にクロルピリホスを添加し 72 時間まで培養した。その結果、培養 48 時間では、クロルピリホスの影響は殆ど認められなかったが、培養 48 時間では、頭部神経堤細胞には遊走の抑制傾向が認められたが、腹部神経堤細胞には遊走の促進傾向が認められ、神経管の部位の違いによる影響が示された (図 4)。

## D. 考察

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するクロルピリホスの神経堤

細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に相反する作用を示したが、長時間の暴露では、細胞毒性によると考えられる遊走抑制作用が認められた。また、神経管の部位による影響の違いが認められた。これらのことから、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられる。

以上の結果から、発達神経毒性評価法として、本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する影響の評価法として有用であると考えられる。

#### E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するクロルピリホスの神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に、促進と抑制の相反する作用を示したが、長時間の暴露では、細胞毒性によると考えられる遊走抑制作用が認められた。クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- [1] Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A. and Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 285–292 (2014).
- [2] Usami M., Mitsunaga K., Irie T. and Nakajima M. Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions. *Congenital Anomalies* 54: 67–68 (2014).
- [3] Kim S.-R., Kubo T., Kuroda Y., Hojyo M., Matsuo T., Miyajima A., Usami M., Sekino Y., Matsushita T. and Ishida S. Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 717–23 (2014).
- [4] Usami M., Mitsunaga K., Irie T.,

Miyajima A. and Doi O. Simple in vitro migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-trans-retinoic acid on cephalic- and trunk-derived cells. *Congenital Anomalies* 54: 184–8 (2014).

- [5] Usami M., Mitsunaga K., Miyajima A., Takamatu M., Kazama S., Irie T., Doi O., and Takizawa T. Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. *Congenital Anomalies* (2015).
- [6] Irie T., Kikura-Hanajiri R., Usami M., Uchiyama N., Goda Y., and Sekino Y. MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology* 95: 479–491 (2015).

#### 2. 学会発表

- [1] 宇佐見 誠, 高松 美奈, 風間 崇吾, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 土井 守, 滝沢 達也. 化学物質が培養ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響に関する研究. 第55回日本先天異常学会学術集会. 横浜 (2015).

#### H. 知的財産の出願・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。

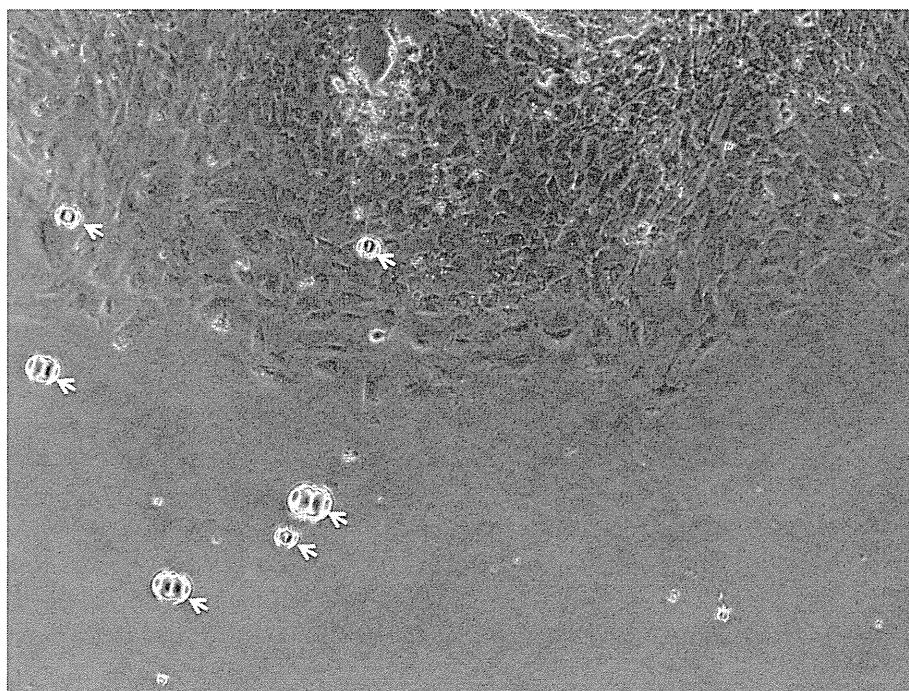


図 1. ラット神経堤細胞の形態に及ぼすクロルピリホスの影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホス (100  $\mu$ M) を培養液に添加した。矢印は形態異常を起こした細胞を示す。

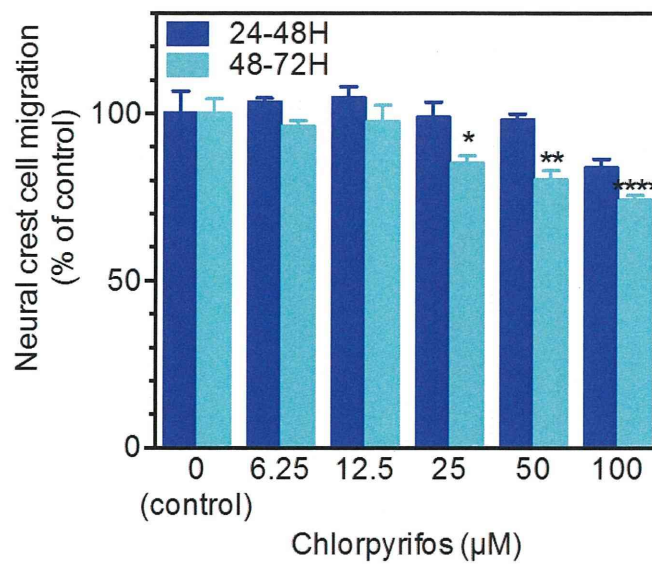


図 2. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,)。

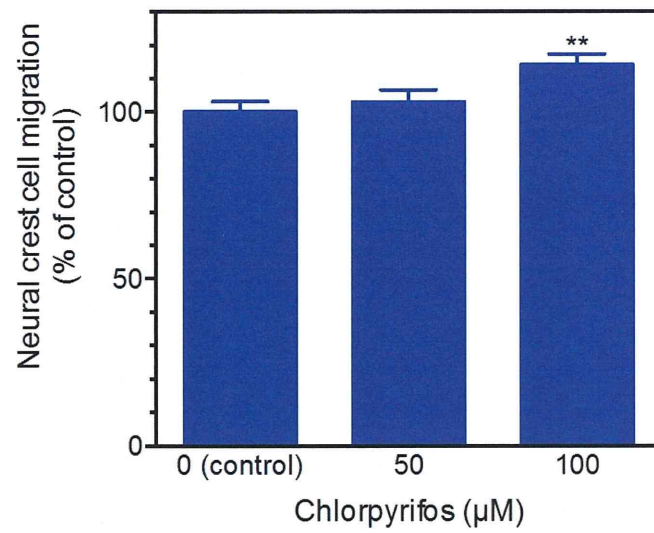


図 3. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*\*  $p < 0.01$ )。神経管を培養 18 時間目に除去した。

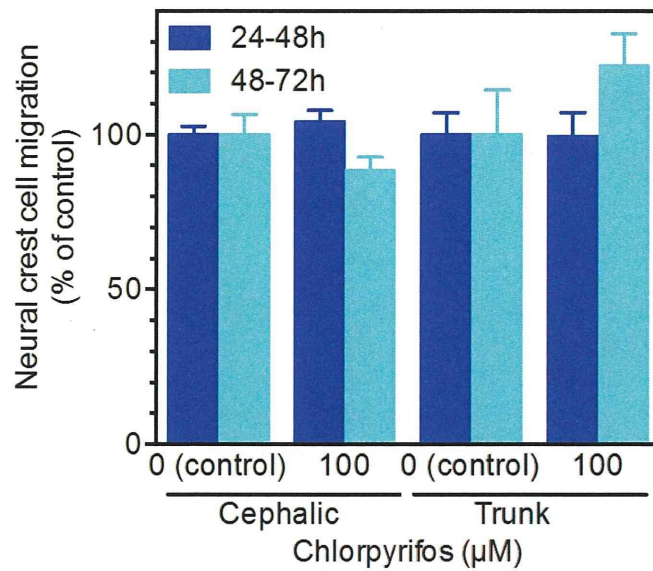


図 4. ラット頭部 (cephalic) および腹部 (trunk) 神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。神経管を培養 18 時間目に除去した。

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

発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長  
佐藤 薫

要旨

前脳矢状切片の側脳室下帯に存在する神経幹細胞および前駆細胞を蛍光標識し切片培養を行った。評価化合物クロルピリホスを適用し神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響について定量的評価を行った。クロルピリホスは新生細胞数を濃度依存的に減少させる傾向を示した。新生オリゴデンドロサイト数も減少の傾向を示したが、新生細胞全体の減少よりも小さな変化であった。新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合を算出したところ、クロルピリホス 10  $\mu\text{M}$  までは何ら影響がないが、100  $\mu\text{M}$  において新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合は増加の傾向を示した。従って、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制影響がある可能性が示された。

A. 目的

幼児期の側脳室下帯（subventricular zone: SVZ）からは神経系細胞（オリゴデンドロサイト、神経細胞、アストロサイト）新生が活発に起こっており、この時期にこれらの細胞に異常が起ると重篤な高次機能影響を引き起こす可能性が高い。実際に、幼児期の抗がん剤使用は知能障害を引き起こすことが知られており禁忌となっている。我々はこれまでに生後 2-3 日齢ラットの前脳矢状面切片培養系の SVZ に含まれる神経幹細胞および前駆細胞を緑色蛍光蛋白質（enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP）によりピンポイントで標識し、免疫組織化学的検討と組み合わせることにより神経系細胞（特にオリゴデンドロサイト）の新生や遊走に対する化学物質の影響評価系を確立した。本研究では有機リン酸系農薬であるクロルピリホスの神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響評価を行った。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系

生後 2-3 日齢ラットの前脳矢状面切片標本（150  $\mu\text{m}$ ）を作成しトランスメンブレン（Millipore）上に静置し、eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウィルスを SVZ に 30 nl ピンポイントで滴下することにより、局

所的に神経幹細胞および前駆細胞を標識した。その後、切片培養用培地で 3 日間培養した。

2. 前脳矢状面培養切片の免疫組織化学的検討

eGFP 標識細胞の O1（オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー）発現について免疫組織化学的に検討した。ブロッキング液で 1 時間処理した後、4°C で抗 O1 抗体（IgM）（Millipore [Chemicon] MAB344）により 2 日間処理し、PBS で 3 回洗浄した後、蛍光標識された二次抗体で 2 日間処理し（4°C）、PBS で洗浄した。eGFP(+) 細胞数、eGFP(+)O1(+) 細胞数、新生細胞遊走面積を算出した。

3. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いたクロルピリホスの評価

クロルピリホス（TRC, Canada）は 200 mM の DMSO ストックソリューションを作成し、培地にて用時希釈した。ピンポイントで eGFP で標識された神経幹細胞および神経系前駆細胞を SVZ に持つ前脳矢状面切片をクロルピリホス（1-100  $\mu\text{M}$ ）存在下で 3 日間培養し、新生細胞の増殖と遊走、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と遊走に対する作用を検討した。



## C. 研究結果

### 1. 被験化合物の神経系新生細胞およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響

クロルピリホスは DMSO に溶解したため、まず DMSO の影響について検討した。

eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を SVZ に含む培養前脳矢状面切片をクロルピリホス適用時に想定される最高濃度の DMSO（0.05%）を含む培地で 3 日間培養したところ、eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数、eGFP(+)O1(+) 細胞（新生オリゴデンドロサイト）数、新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合、これらの細胞の遊走に何ら影響はなかった（データ示さず）。

次に上記パラメーターに対するクロルピリホスの影響について検討した（図 1）。培養前脳切片をクロルピリホス入りの培地（final conc: 1-100  $\mu$ M）で 3 日間培養したところ、100  $\mu$ M クロルピリホス適用群では、培養前脳切片の膨潤がおこり切片の厚みが増していた。1-10  $\mu$ M においてはこのような変化は観察されなかった。クロルピリホス（1-100  $\mu$ M）は eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数を濃度依存的に減少させる傾向があった（図 1B, 黄土色カラム）。eGFP(+)O1(+) 細胞（オリゴデンドロサイト前駆細胞）数も減少の傾向を示したが、新生細胞全体の減少よりも小さな変化であった（図 1B, 黄色カラム）。新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合（eGFP(+)O1(+) cell No. / eGFP(+) cell No. \*100%）を算出し、クロルピリホスの作用を確認したところ、クロルピリホス 10  $\mu$ M まではほとんど影響がなかったが、100  $\mu$ M において新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の割合が増加の傾向を示した（図 1C）。新生細胞の遊走範囲もクロルピリホスによって濃度依存的に減少した。これは、上記に示す新生細胞数の減少に矛盾しない結果となっている。

## D. 考察

クロルピリホスは有機リン酸系の殺虫剤であり、害虫の神経系アセチルコリンエステラーゼを阻害することにより作用を発揮するとされている。しかし、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用よりも低い濃度で注意や記憶を損なうことが、ヒト、動物で

ともに報告されている（Brown and Brix, J Appl Toxicol 1998, 18, 393-408; Ray and Richards, Toxicol Lett 2001, 120, 343-351; Johnson et al., Toxicol Sci 2009, 109(1) 132-42）。このようにクロルピリホスは多岐にわたる作用メカニズムを持ち、その作用も多岐にわたることが予想されるが神経発達に対する影響はあまり知見がない。本研究では生後初期の神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響評価を前脳切片培養系を用いて行った。

クロルピリホス（1-100  $\mu$ M）は eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数を濃度依存的に減少させる傾向があった。また、新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の場合は 100  $\mu$ M において新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合が増加の傾向を示した。従って、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制を引き起こす可能性が示された。脳神経系は主に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管系細胞で構成されているが、胎生期から生後にかけてクロルピリホスに暴露されたマウスは海馬の神経新生が低下することも報告されている（Wang et al., Reprod Toxicol 2013, 38, 25-36）。培養ヒトアストロサイト培養を用いた実験では、クロルピリホスがアストロサイトの炎症性活性化を引き起こすことが示されている（Mense et al., Toxicol Sci, 2006, 93(1) 125-35）。また、胎生期もしくは生後のクロルピリホスの in vivo 適用においては、グリア細胞新生時期に適用したときに最も発達阻害が誘発された

（Garcia et al., Environ Toxicol Pharmacol 2005, 19(3), 455-61）。また、胎生期暴露はアストロサイト活性化マーカーである GFAP 発現レベルを上昇させた（Carcia et al., Brain Res Dev Brain Res 2002, 133(2), 151-61）。しかし、一方でオリゴデンドロサイト前駆細胞に対しても毒性が報告されている（Saulsbury et al., Toxicology 2009, 259(1-2), 1-9）。細胞種によりクロルピリホスへの感受性が違っており、アストロサイトは中でも感受性の高い細胞であることが考えられるが、細胞種による感受性の違いについては細胞種特異的なマーカーを用いて確認する必要がある。このような細胞毒性のメカニズムとして細胞骨格への影響が考え

られる。クロルピリホスの長期的な投与により、軸索内輸送に影響があることが報告されている (Hernandez et al., *Neurotoxicology* 2015, 47, 17-26)。キネシンによる輸送 (Gearhart et al., *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 218, 20-29)、tubulin の修飾 (Grigoryan et al., 2008, *Chem Biol Interact* 175, 180-186)、微小管形成阻害作用なども明らかとなっている (Prendergast, et al., *Neuroscience* 2007, 146, 330-339)。さらに、胎児新皮質において細胞分裂面が垂直から水平に移行する作用も報告されており、このような分裂面の角度が細胞の運命決定に影響を及ぼす可能性も示唆されている (Chen et al., *PLoS One* 2014, 9 (4) e95343)。さらに、ヒト胎生幹細胞由来神経幹細胞においてはクロルピリホスによって NF- $\kappa$ B 活性化を介したアポトーシスが誘導されること (Lee et al., *Neurotoxicology* 2014 42, 58-70)、ミトコンドリア長が増加するとともにその数が減ることも報告されており (Middlemore-Risher et al., 2011, *J Pharmacol Exp Ther*, 399(2) 341-9)、直接的なアポトーシス誘導作用を持つ可能性も考えられる。

クロルピリホスは高濃度領域 (100  $\mu$ M) において培養前脳切片の膨潤を引き起こした。これまでこのような報告はなく、新たなメカニズムを考慮に入れながら今後の検討を進める必要がある。

## E. 結論

クロルピリホスは新生細胞数、新生オリゴデンドロサイト数、遊走面積ともに濃度依存的に減少させたが、その作用はオリゴデンドロサイト以外の細胞が標的となっている可能性が示された。さらに、高濃度クロルピリホス (>100  $\mu$ M) が浮腫を引き起こす可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Ohara, Y., Koganezawa, N., Yamazaki, H., Roppongi, R. T., Sato, K., Sekino, Y., Shirao, T. (2015) Early-stage development of human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. *J Neurosci Res* 93(12): 1804-13.
- [2] 佐藤 薫. (2015) ミクログリアの発生と

分化. *Clinical Neuroscience* 32(12) 1338-1341.

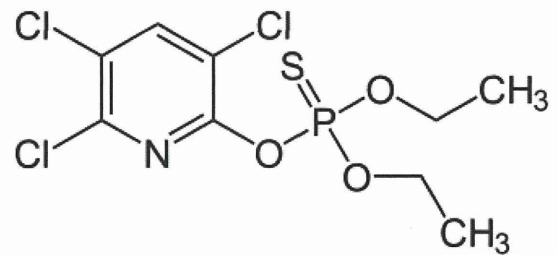
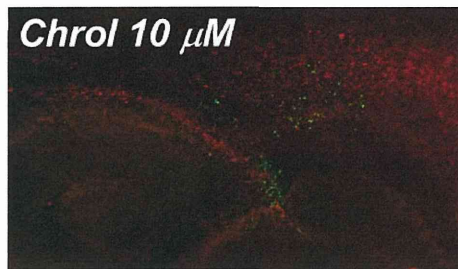
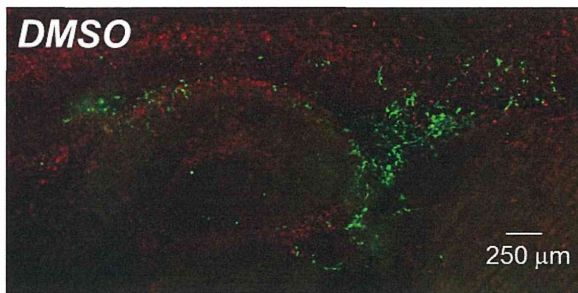
- [3] Sato, K. (2015) Microglia effects on neuronal development. *GLIA* 63(8): 1394-495.
- [4] Fujimori, K., Takaki, J., Miura, M., Shigemoto-Mogami, Y., Sekino, Y., Suzuki, T., Sato, K. (2015) Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation. *J Pharmacol Sci*, 127(1) 145-9.
- [5] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Microglia enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(5): 2231-2243.
- [6] Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Ikarashi, Y., Hirose, A., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells. *Fundam Toxcol Sci*, 1(3): 87-94.
- [7] Takahashi K., Ishii-Nozawa R., Takeuchi K., Nakazawa K., Sekino Y. and Sato K. Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner. *Biol Pharm Bull* 36(12): 1996-2004 (2013).
- [8] Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T. and Sato K. Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. *J Toxicol Sci* 38(3): 381-402 (2013).
- [9] Kinoshita M., Nasu-Tada K., Fujishita K., Sato K. and Koizumi S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1): 47-58 (2013).

### 2. 学会発表

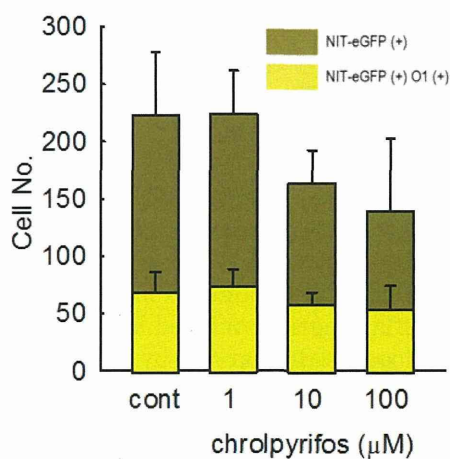
- [1] 高橋華奈子、最上(重本)由香里、清水英雄、中條かおり、干川和枝、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫:ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の機能的 NMDA 受容体発現とグルタミン酸興奮毒性発現の株間比較、日本薬学会第 136 年会(2016, 3,

- 横浜)
- [2] 重本一最上 由香里、片倉 明日美、長谷川 陽介、関野 祐子、田辺 光男、佐藤 薫: 神経幹細胞塊から機能的神経細胞を効率的に分化誘導するプロトコルの検討と分化に伴う機能的受容体分布変化、日本薬学会第 136 年会 (2016, 3, 横浜)
  - [3] 佐藤 薫: ミクログリアの中枢神経系発達機能とその創薬・治療への応用、第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬・治療のターゲットとしての細胞分化」(オーガナイザー) (2016, 3, 横浜)
  - [4] 清水英雄、小針彩奈、須知由未子、花村健次、白尾智明、田辺光男、関野祐子、佐藤 薫: シナプスイメージングに基づく中枢神経系有害反応の in vitro 評価のための新規パラメータ確立の試み、第 89 回日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
  - [5] 重本一最上由香里、干川和枝、関野祐子、佐藤 薫: 活性化型ミクログリアが引き起こす血液脳関門のバリア崩壊過程におけるサイトカイン・ケモカイン動態の解析、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
  - [6] 高橋華奈子、笠原のぞみ、小原悠、高瀬将弘、中條かおり、関野祐子、田辺光男、佐藤 薫: Neurosphere 維持期間が神経分化に及ぼす影響、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
  - [7] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Shimizu, H., Chujo, K., Hoshikawa, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y., Sato, K.: Comparison of the NMDA receptor expression and the extent of excitotoxicity in human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
  - [8] Shigemoto-Mogami, Y., Sato, K., Hoshikawa, K., Kikura-Hanajiri, R., Hakamatsuka, T., Sekino, Y.: Evaluation of drug-induced CB2 cannabinoid receptor activity in the CNS using the ERK1/2 phosphorylation pathway of microglial cells, CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
  - [9] 佐藤 薫, 清水英雄, 小針彩奈, 花村健次, 白尾智明, 田辺光男, 関野祐子: 神経細胞の微細構造イメージングに基づく中枢神経系有害反応 in vitro 評価系の開発. 第 24 回日本バイオイメーキング学会学術集会 (2015, 9, 東京)
  - [10] 佐藤 薫.: 非臨床薬理試験においてヒト iPS 細胞由来神経細胞を活用するために必要なこと. 千里ライフサイエンスセミナー J3 (講演), (2015, 9, 大阪)
  - [11] Hoshikawa, K., Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K.: Study about the mechanisms of DHA-induced enhancement of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
  - [12] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia regulate the cytokine/chemokine dynamics in the brain and enhance the functional maturation of blood-brain barrier. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
  - [13] Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K. Study about the mechanisms for the regulation of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function by docosahexanoic acid. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
  - [14] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia affect blood-brain barrier function via cytokines and chemokines release. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
  - [15] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia affect functional maturation and inflammation-induced breakdown of the blood brain barrier by modulating the dynamics of cytokines and chemokines. Society for Neuroscience 2015 (2015, 10, Chicago, USA)
  - [16] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia have roles in both of maturation and break down of the barrier function of blood brain barrier. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (2015, 7, Bilbao, Spain)

A.



B.



C.

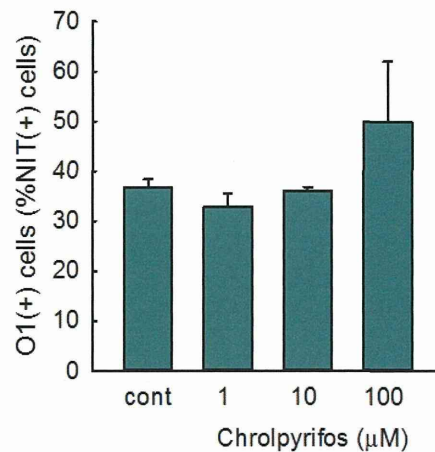


図 1. 前脳矢状面切片培養系における神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対するクロルピリホス の影響

SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を クロルピリホス (1-100 μM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。クロルピリホスは新生細胞数を濃度依存的に減少させる傾向を示した (黄土色カラム)。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は クロルピリホスで増加の傾向があり、その作用はオリゴデンドロサイト以外の細胞が標的となっている可能性が示された。\*:  $p < 0.05$ , Tukey's test following ANOVA,  $N=4$ .

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

生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究

研究分担者	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長 関野 祐子
研究協力者	豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 吉田 祥子

要旨

昨年までに研究班共通の化学物質であるバルプロ酸を用いて、生後の神経回路発達の変化を伝達物質放出分布の変化として捉えることに成功した。この作用の機序を確認するために、化学構造の異なる各種のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の生後神経回路発達に及ぼす効果を検討した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、神経発達の早期によって行動や脳の高次機能に影響することを明らかにした。一方、有機スズ化合物であるトリブチルスズは個体の行動に大きな影響現れるが神経構造への影響は小さいことが示唆された。さらに、反応機序の異なる発達神経毒性を有する有機リン系農薬であるクロルピリホスを追加して検討したところ、バルプロ酸と同様の影響が表れることを確認した。以上の結果、小脳の形態及び細胞機能の観察により、胎生期神経毒性を示す化学物質のスクリーニングが可能であることを示唆した。

A. 研究目的

バルプロ酸(VPA)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、MS-275 の3種のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤、およびトリブチルスズ(TBT)投与による神経回路発達の変化を、発達期小脳を用いて検討するために、酵素を利用した測定法によってATPの放出変化を観察した。同時に免疫組織化学的手法により、神経の形態的变化を観察した。さらに個体の行動に及ぼす変化を確認するために、発達期個体の行動観察を行った。

B. 研究方法

研究試料として発達期小脳を用いた(図1)。2013年から2014年にかけて、自閉症の特発脳部位が小脳であると報告されてきた。本研究では、小脳で、VPAが神経発達の早期化を引き起こすことが示唆され、また化学構造の異なるHDAC阻害剤、および異なる作用機序で神経発達に影響すると考えられるTBTを妊娠動物に投与し、その効果を観察した。妊娠16日のラットに、600mg/kgのVPA(経口)、50mg/kgのSAHA(腹腔内)、4mg/kgのMS-275(経口)、20mg/kgのTBT(経口)でそれぞれ投与した。また、VPAと同様に自閉症の

誘発が考えられているクロルピリホス(CPF) 10mg/kgを経口投与しその効果を観察した。

投与動物は、各投与動物の任意に選んだ3匹について、生後4日から10日にかけて、温度維持した明環境下での3分間の自由行動の観察を行った。

シナプス形成のシグナルとされるATPの放出量の変化を、酵素を用いた手法により測定した。各投与動物から、生後6日から12日の小脳スライスを調整し、ATP放出量を測定した。

神経回路に対する影響を観察するために、神経刺激に対するGABAの放出量の変化を、生後7日から18日にかけて観察した。

神経細胞の発達を免疫組織化学により観察するために、各投与動物から生後10日から18日の小脳スライスを調整し、抗カルベイン抗体による蛍光染色を行った。

さらに小脳全体への影響、長期にわたる影響を見るため、各時期の小脳スライスのHE染色を行い、小脳各層の変化を観察した。顆粒細胞の増殖時期を確認するため、ブロモデオキシウリジン(BrdU)の2時間投与を行い、採取した小脳を抗BrdU抗体で染色して観察

した。

### C. 研究結果

図2に示すように、行動観察の結果、VPA投与動物では、P4で多くの不随意運動を確認したが、成長するにつれて減少する傾向にあった。SAHA投与動物では、対照動物やVPA投与動物と比較して多くの不随意運動を確認し、且つP4～P8にかけ増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では対照動物より若干の不随意運動の増加が確認された。TBT投与動物では、対照動物と比較して当初明らかに行動が減少していたが、成長につれて差は確認されなくなった。CPF投与動物ではVPA投与動物と同じような傾向を示したが、より程度が軽度だった。これは投与量が少なかった可能性がある。

VPA、SAHA投与動物では、対照動物に比べ早期から小脳皮質でATPが放出されることが確認されたが、TBTは早期からの放出は顕著でなく、かつ放出量は対照動物よりむしろ少ないことが観察された（図3）。

AMPA刺激に対するGABA放出量変化は、対照動物では一過性の上昇を示した後に速やかに減少するのに対し、VPA投与動物では繰り返し、長くGABA放出が続く傾向が示された（図4）。

さらに、SAHA投与動物では、プルキンエ細胞に異常がみられ、細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察された。樹状突起伸長は対照動物より早く、神経発達の早期化が伺われた。MS-275投与動物では、P10でのみ、プルキンエ細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察されたが、P13ではそのような分化異常は確認されなかった。さらに、TBT投与動物では、プルキンエ細胞の層構造、樹状突起伸長のいずれにも異常はみられなかった（図5）。

VPA投与動物では、生後12日以降に、V～VI葉の一部に過剰な脳回の形成が観察された（図6, 7）。いくつかの小脳ではVIII葉にみられるものもあった。拡大すると、分子層上部に顆粒細胞が蓄積し、また分子層中にも分布することが観察された。これらの変化はCPF投与動物でも観察された。

生後35日以降、これらの過剰な脳回部位

を含め、小脳皮質の各所でプルキンエ細胞の死滅が観察された。これは、ヒトの自閉症において、小脳の萎縮・プルキンエ細胞死が見られるという報告と一致している。

過剰な脳回と分子層上部の顆粒細胞の蓄積は、これらの薬物投与によって顆粒細胞が過剰に増殖していることが示唆されたことから、顆粒細胞の増殖を確認するため、ブロモデオキシウリジン(BrdU)の2時間投与を行い、採取した小脳を抗BrdU抗体で染色して観察した。BrdU投与による顆粒細胞増殖の確認からは、VPA投与動物、CPF投与動物の顆粒細胞増殖は、対照動物よりも早期に停止していることが示された（図8）。過剰な脳回や蓄積した顆粒細胞は、増殖が延長されたのではなく、移動や選択的細胞死の抑制などによるものと考えられた。

### D. 考察

発達期神経毒性が疑われる薬物の投与により、動物においても発達の一時期に行動異常が見られることを示した。より早い時期の行動異常は小脳の神経発達の変化と強い相関がみられたが、やや後期の行動異常は、もっと脳の別の部位、海馬や大脳の異常による変化との相関を伺わせた。また、伝達物質ATP量の変化から、発達期神経毒性の機序には早すぎる神経発達と、遅滞型の神経発達があることが伺われた。GABA放出反応の異常は、早期（生後2週間）から神経回路の異常が始まっていることを示唆している。

さらに小脳の層に大きな変化が見られ、これが細胞死に至ることは、自閉症の発症機序に関わっていると考えられる。今後、薬物を追加して同様の現象が観察されるか検討する予定である。

### E. 結論

本研究において、研究班共通の化学物質であるバルプロ酸、トリブチルスズ、クロルピリホスを用いて、生後の神経回路発達の変化を動物の行動、伝達物質放出量の変化、神経分化の変化として捉えることに成功した。従って、化学物質により神経発達の早期化および遅滞化により脳の高次機能に影響を与える可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. ○Mabuchi H, Ong HY, Watanabe K, Yoshida S, Hozumi N. Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay. IEEEJ Transactions (in press).
2. ○Watanabe K, Takahashi N, Hozumi N, Yoshida S. Improvements in Enzyme-Linked Photoassay Systems for Spatiotemporal Observation of Neurotransmitter Release. *Sensors and Materials* 27:1035-1044 (2015).
3. ○Gunawan AI, Hozumi N, Yoshida S, Saijo Y, Kobayashi K, Yamamoto S. Numerical analysis of acoustic impedance microscope utilizing acoustic lens transducer to examine cultured cells. *Ultrasonics* 63:102-110 (2015).
4. Gunawan AI, Hozumi N, Yoshida S, Saijo Y, Kobayashi K, Yamamoto S. Numerical analysis of ultrasound propagation and reflection intensity for biological acoustic impedance microscope. *Ultrasonics* 61:79-87 (2015).
5. ○Wang T, Kumada T, Morishima T, Iwata S, Kaneko S, Yanagawa Y, Yoshida S, Fukuda A. Accumulation of GABAergic Neurons, Causing a Focal Ambient GABA Gradient, and Downregulation of KCC2 Are Induced During Microgyrus Formation in a Mouse Model of Polymicrogyria. *Cereb Cortex*. 24:1088-101. (2014)
6. Kobayashi K, Yoshida S, Saijo Y, Hozumi N. Acoustic impedance microscopy for biological tissue characterization. *Ultrasonics* 54:1922-8 (2014).
7. ○吉田祥子、穂積直裕、発達期小脳アストロサイトの機能と秩序形成、*日本神経回路学会誌* Vol. 20, p.14-18 (2013)
8. ○Yoshida S, Yamada H, Shioki Y, Hozumi N, Yagihashi M, Kobayashi K, Yamamoto S. Visualization of cancer distribution for living tissues using acoustic impedance microscope. *Ultrasonics Symposium (IUS)*, 2013 IEEE International, Doi:10.1109/ULTSYM.2013.0514 (2013)

9. Hozumi N, Gunawan AI, Kajima S, Yoshida S, Saijo Y, Kobayashi K, Yamamoto S. Sound field analysis for biological acoustic impedance microscope for its precise calibration. *Ultrasonics Symposium (IUS)*, 2013 IEEE International, 10.1109/ULTSYM.2013.0310 (2013)

2. 学会発表

- [1] 中嶋さりい、勝股大樹、阿部巧、穂積直裕、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、吉田祥子, Alteration of neuronal development and behavioral anomaly in autistic-like anomalous developing cerebellum. 第38回日本神経科学大会 神戸 2015
- [2] 高橋信人、渡邊一徳、穂積直裕、吉田祥子, Improvements of enzyme-Linked photo assay systems for rapid spatio-temporal observation of neurotransmitter release. 第38回日本神経科学大会 神戸 2015
- [3] 富田達朗、穂積直裕、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、吉田祥子, The effects of HDAC inhibitors to developing cerebellar astrocytes. 第38回日本神経科学大会 神戸 2015
- [4] Y. Fueta, Y. Sekino, S. Yoshida, S. Ueno, Gabaergic involvement in the hippocampal development of the basic excitability and feedback inhibition in juvenile rats prenatally exposed to valproic acid. *Society of Toxicology 54th Annual Meeting San Diego* 2015
- [5] S. Yoshida, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino, Prenatal administration of valproic acid or SAHA alters the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellum. 第58回日本神経化学学会大会 さいたま市 2015
- [6] N. Takahashi, H. Mabuchi, Y. Shigemoto - Mogami, K. Sato, Y. Sekino, N. Hozumi, S. Yoshida, Visualization of neurotransmitter release in the rat - derived neurosphere cells using enzyme - linked photo - assay. 8th FAOPS Congress Bangkok 2015
- [7] S. Iwamoto, D. Katsumata, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino, N. Hozumi, S. Yoshida, Developmental alteration with administration of valproate enhanced neuronal activities in the juvenile cerebellar cortex. *AP-IRC2015 Tahara* 2015
- [8] T. Mikami, S. Nakajima, Y. Fueta, S. Ueno, Y.

Sekino, N. Hozumi, S. Yoshida, Observation of the alteration of neuronal activities in Valproate-administrated rat cerebellum using the enzyme-linked photo-assay. AP-IRC2015 Tahara 2015

- [9] 馬淵 光・渡辺一徳・吉田祥子・穂積直裕, 神経伝達物質の可視化システムの開発. 平成 27 年電気学会全国大会 東京 2015

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 特許

1. 吉田祥子：特許出願番号 2011-176342、2015.12.10 特許査定「細胞放出物質検出装置、細胞放出物質検出方法及び細胞放出物質検出用固定化酵素基板」
2. 吉田祥子、穂積直裕、氏家雅彦、須山洋行：特許出願番号 2013-258731「光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム」
3. 吉田祥子、穂積直裕、氏家雅彦：特許出願番号 2015-223557「光学観察装置」



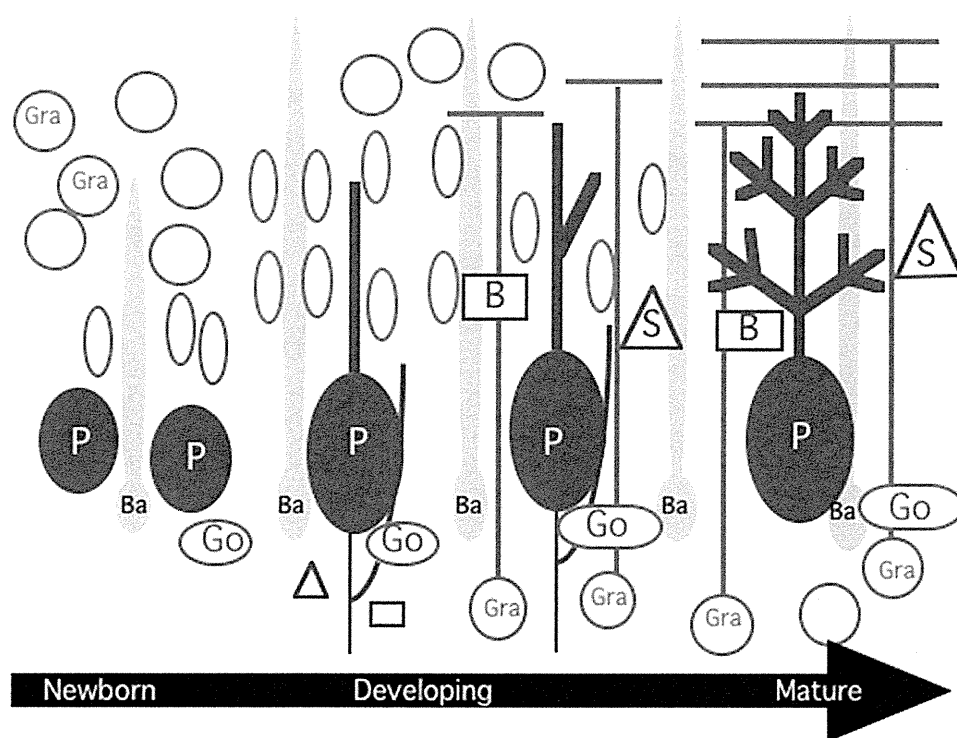


図1 ラット・マウスの小脳の発達様式

出生時のラット・マウスの小脳は、外顆粒層と未発達のプルキンエ細胞層(Purkinje cell layer; PL)から構成されるが、生後約2週間かけて顆粒細胞が分裂・分化しプルキンエ細胞下に遊走して内顆粒層(internal granular layer; IGL)を形成、同時にプルキンエ細胞は樹状突起を伸長させ、顆粒細胞および脳室帯から遊走してくるゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞と神経回路を構成して皮質表面に分子層(molecular layer; ML)を形成し、成熟した小脳の3層構造をかたち作る。

(P:プルキンエ細胞、Gra:顆粒細胞、B:バスケット細胞、S:星状細胞、Go:ゴルジ細胞、Ba:バークマングリア)。

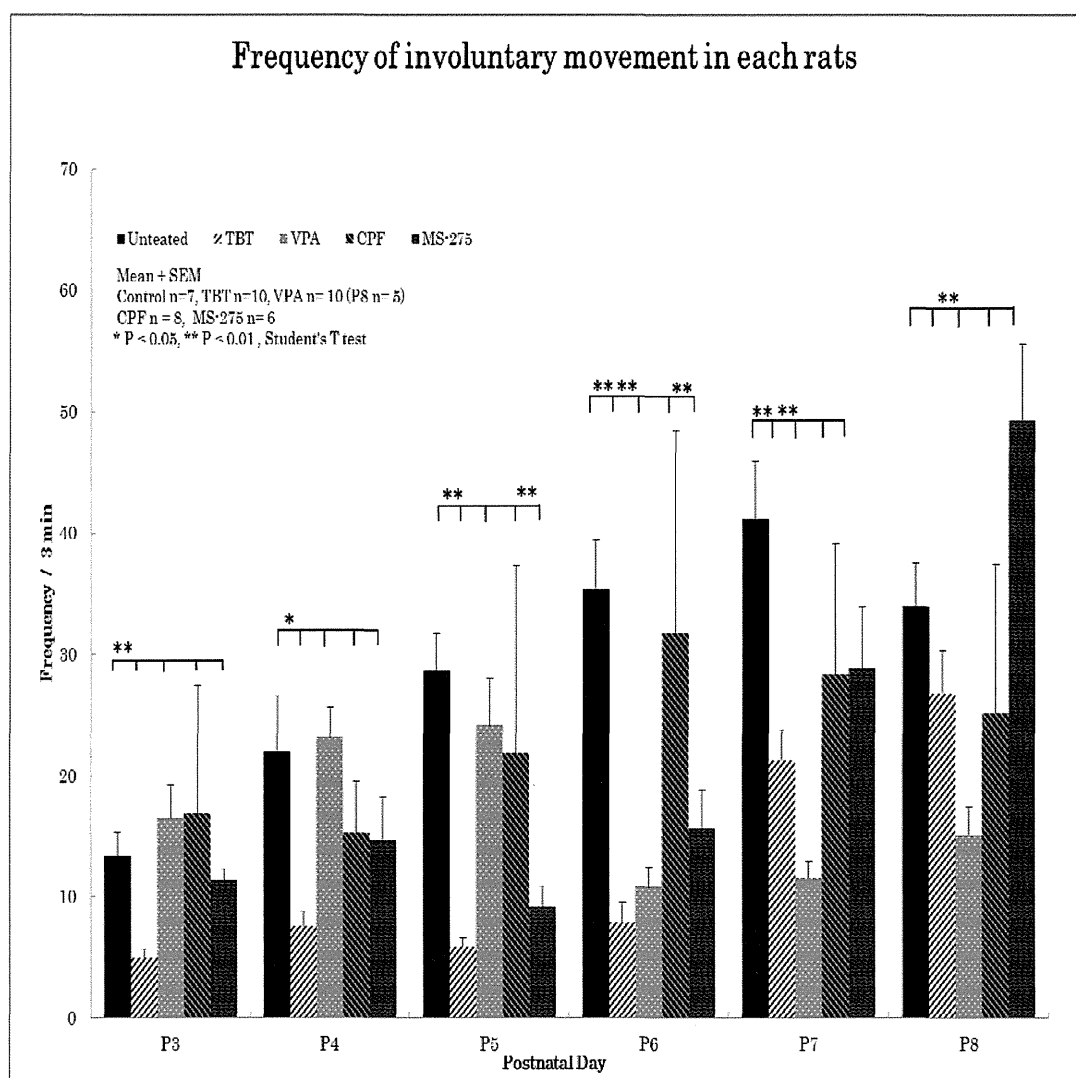


図 2 各投与動物の発達期の自由行動観察。

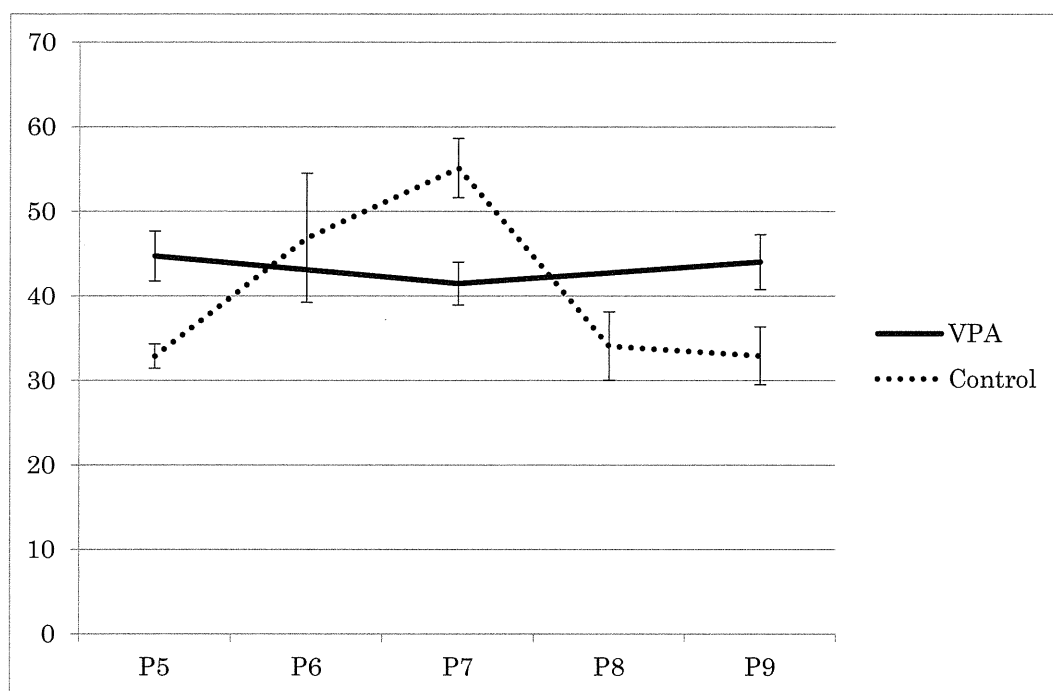
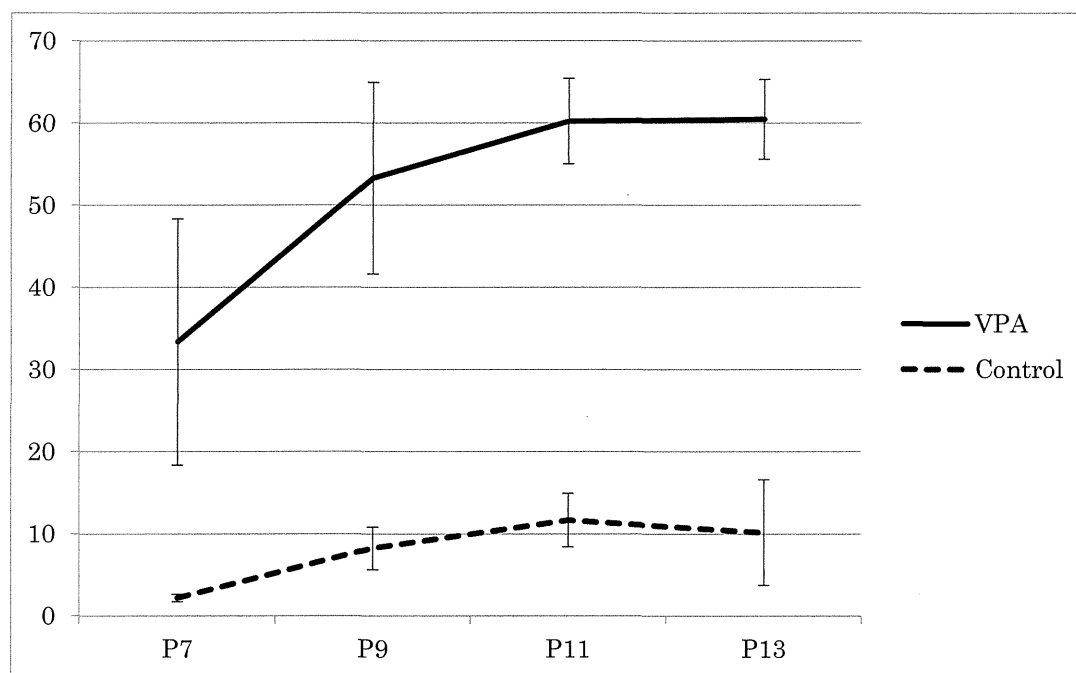


図3 発達期小脳皮質分子層からの GABA 放出量。発蛍光光量を相対値で示している。対照動物が一過性の GABA 放出量の増加を示すのに対し、VPA 投与動物では一定の放出量で変化を示さない。

A



B

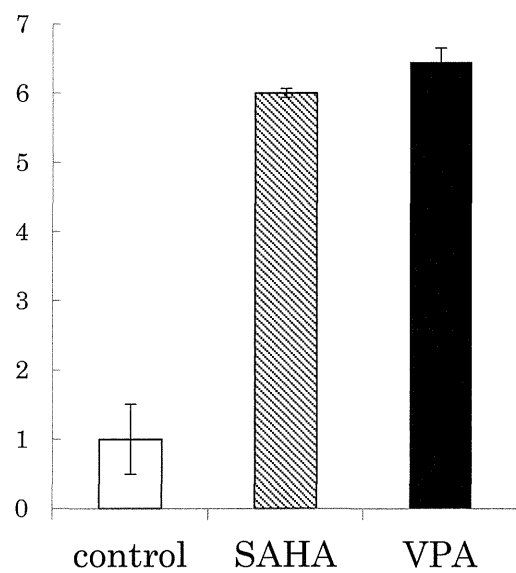


図4 発達期小脳皮質分子層からの100 $\mu$ Mグルタミン酸刺激によるATP放出量。A, 発蛍光量を相対値で示している。対照群に対し、発生初期から著しい増加を示す。B, 対照動物を1とした、P9でのATP放出量。SAHA投与群の放出量は、VPA投与群よりやや少ない。