

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 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日の小脳スライス进行调整し、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日の小脳スライス进行调整し、抗カルビンジ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、プ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. IEEJ 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」

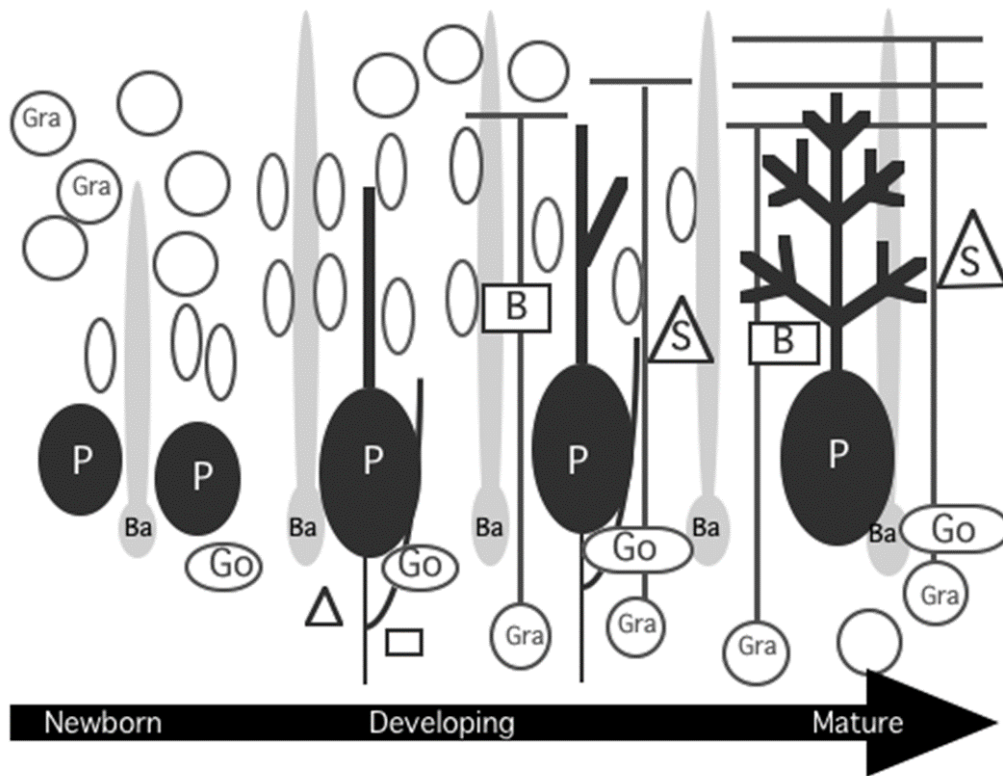


図1 ラット・マウスの小脳の発達様式

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)。

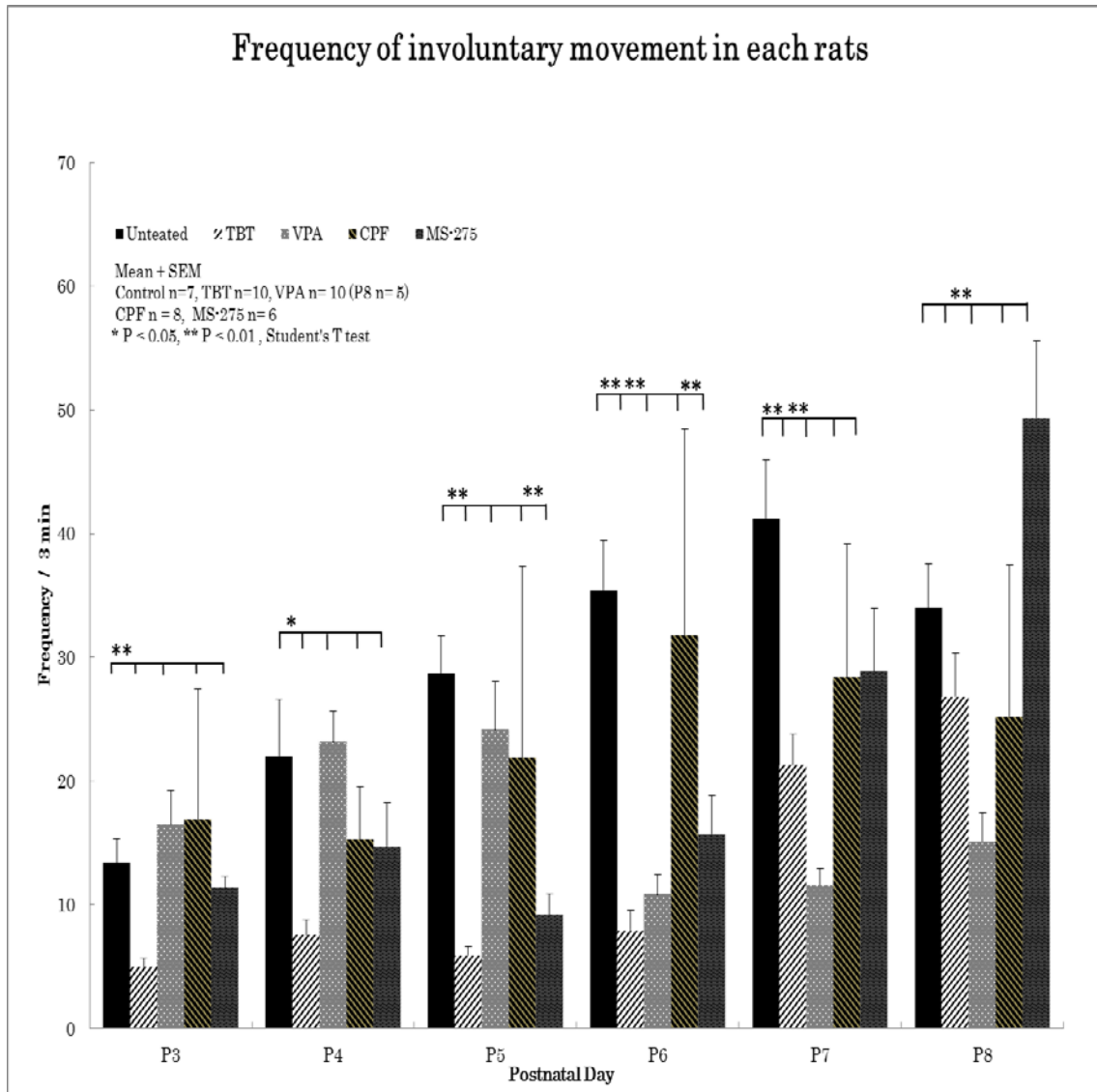


図2 各投与動物の発達期の自由行動観察。

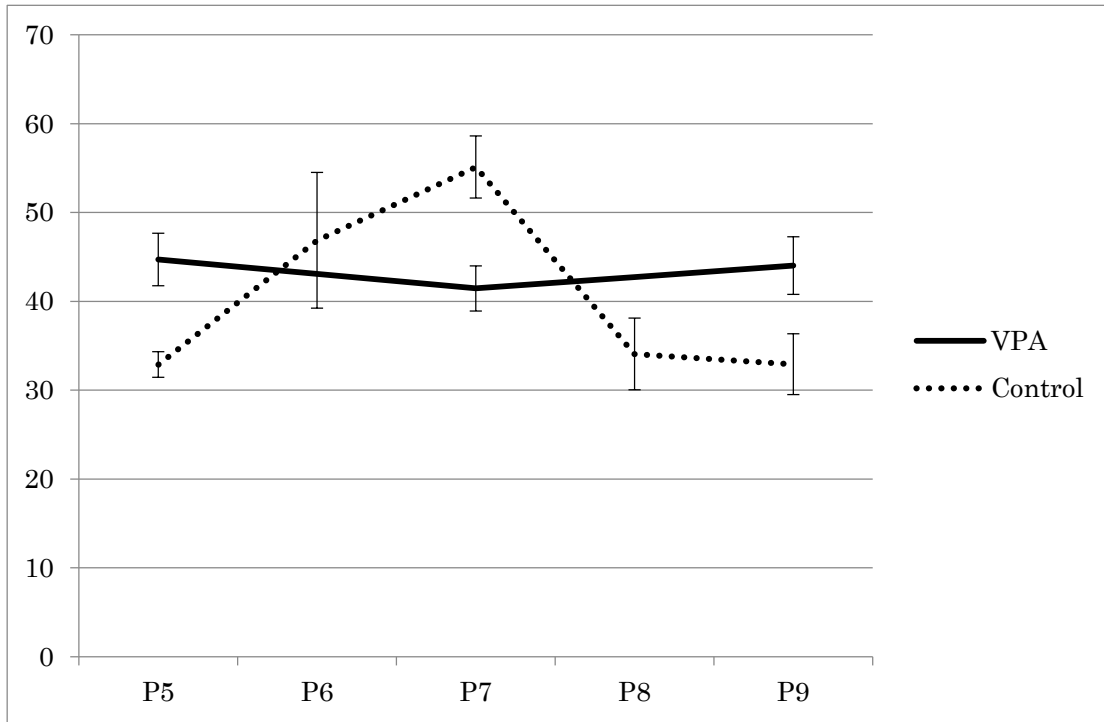
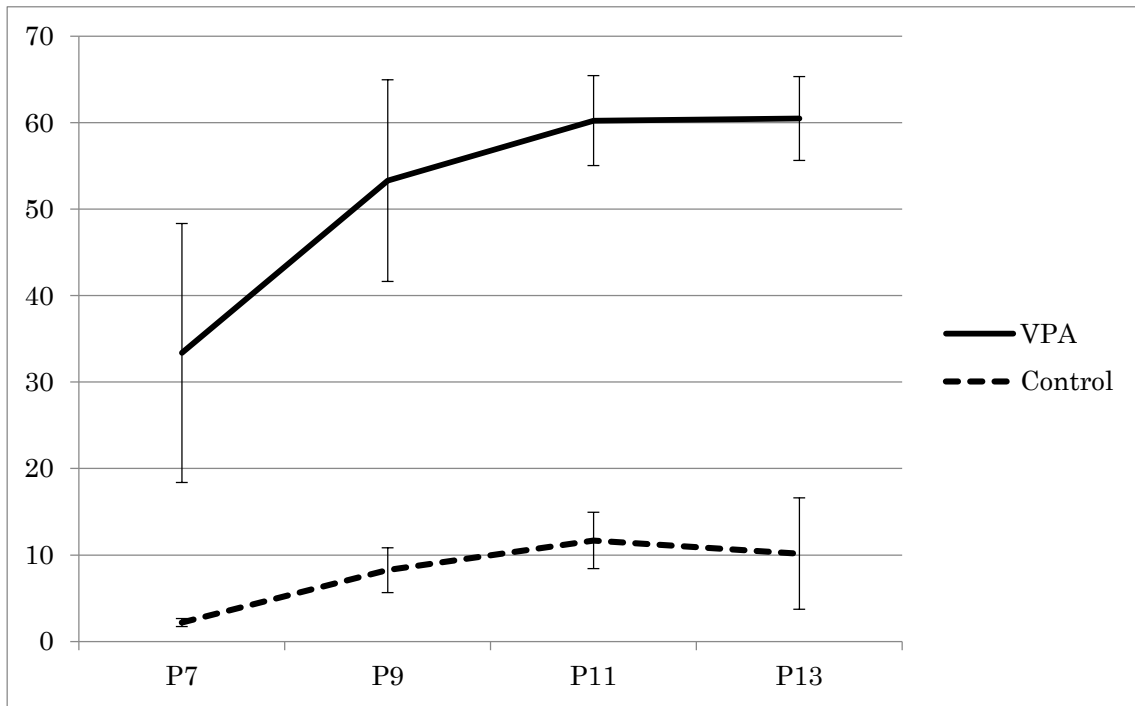


図3 発達期小脳皮質分子層からの GABA 放出量。発蛍光光量を相対値で示している。対照動物が一過性の GABA 放出量の増加を示すのに対し、VPA 投与動物では一定の放出量で変化を示さない。

A



B

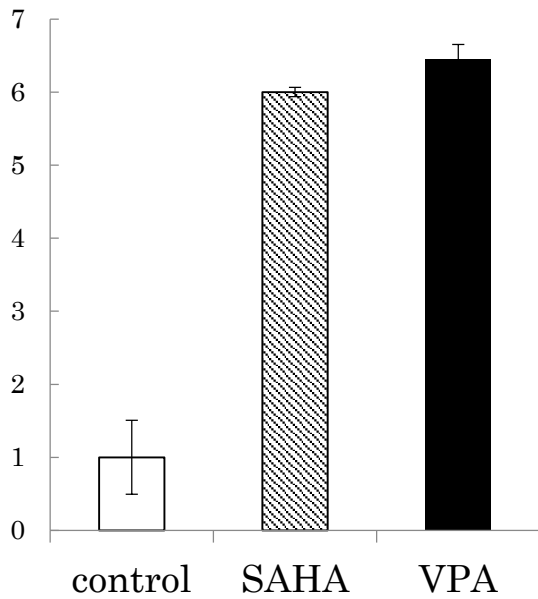
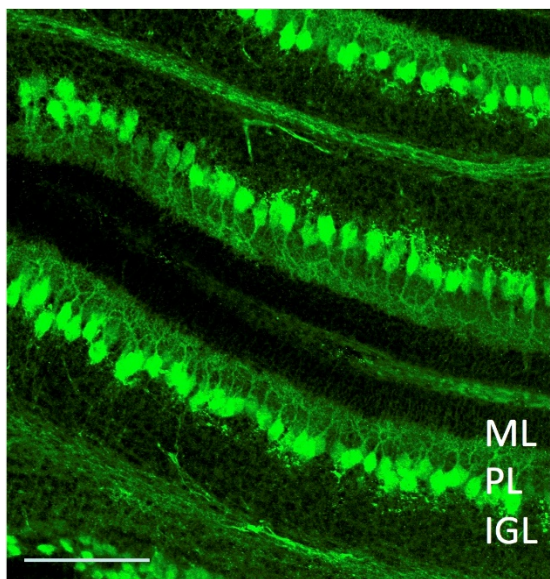


図4 発達期小脳皮質分子層からの100 $\mu$ Mグルタミン酸刺激によるATP放出量。A, 発蛍光量を相対値で示している。対照群に対し、発生初期から著しい増加を示す。B, 対照動物を1とした、P9でのATP放出量。SAHA投与群の放出量は、VPA投与群よりやや少ない。

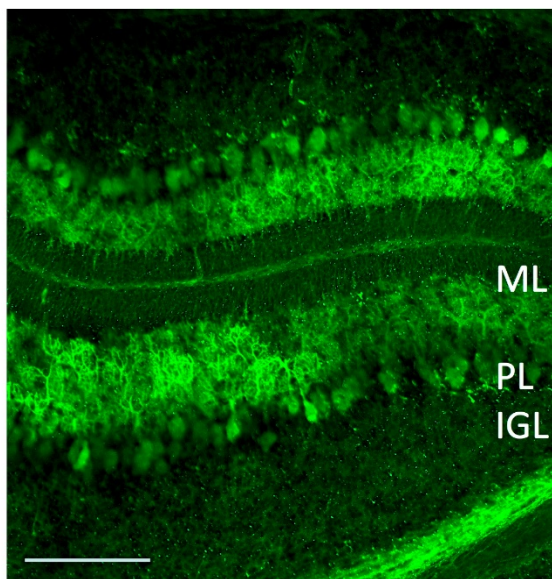


A



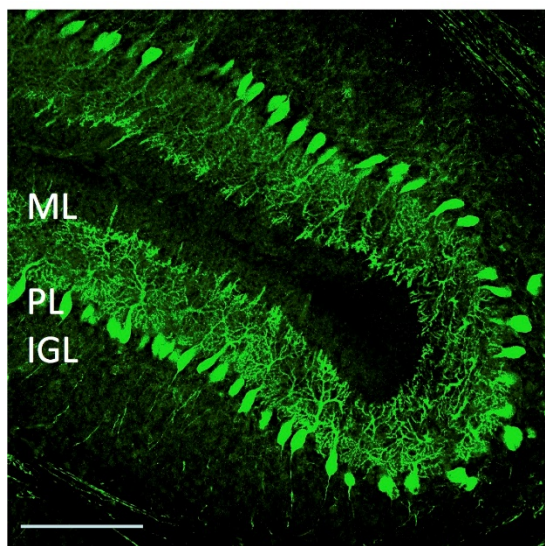
Control P11

B



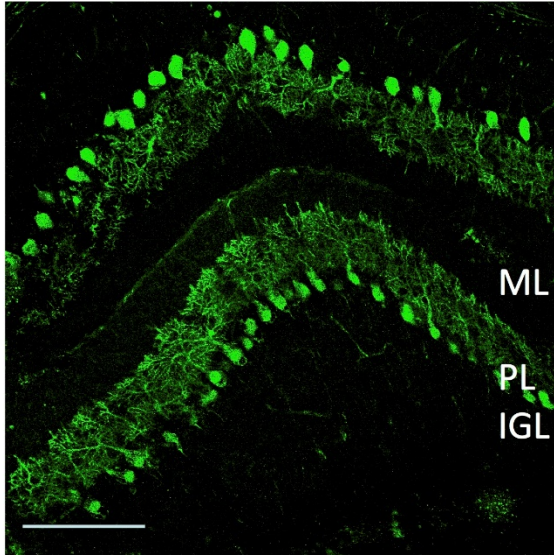
VPA P11

C



SAHA P11

D



TSA P11

図5 抗カルビンジン D-28k 抗体によるプルキンエ細胞染色。対照動物(A)に比べ、VPA 投与動物(B)、SAHA 投与動物(C)で網目状にプルキンエ細胞の樹状突起が伸長している。トリコスタチン投与動物(D)では大きな変化はない。

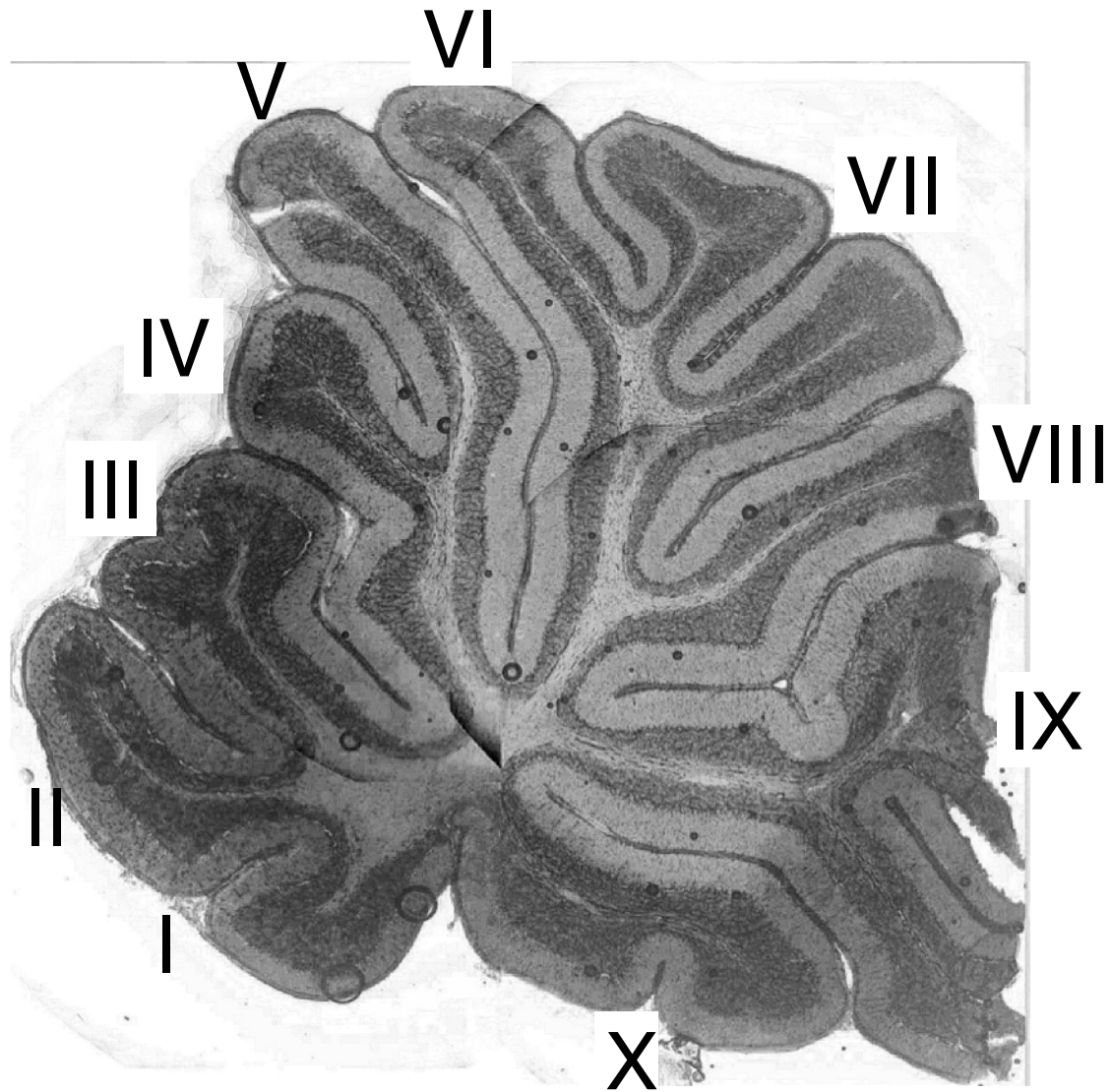


図6 P16小脳皮質と小葉I~X

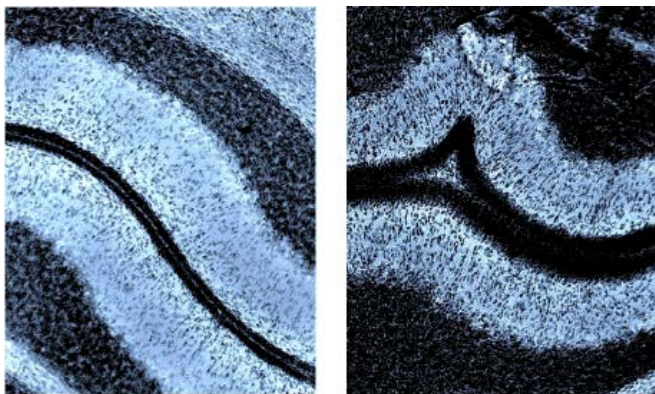
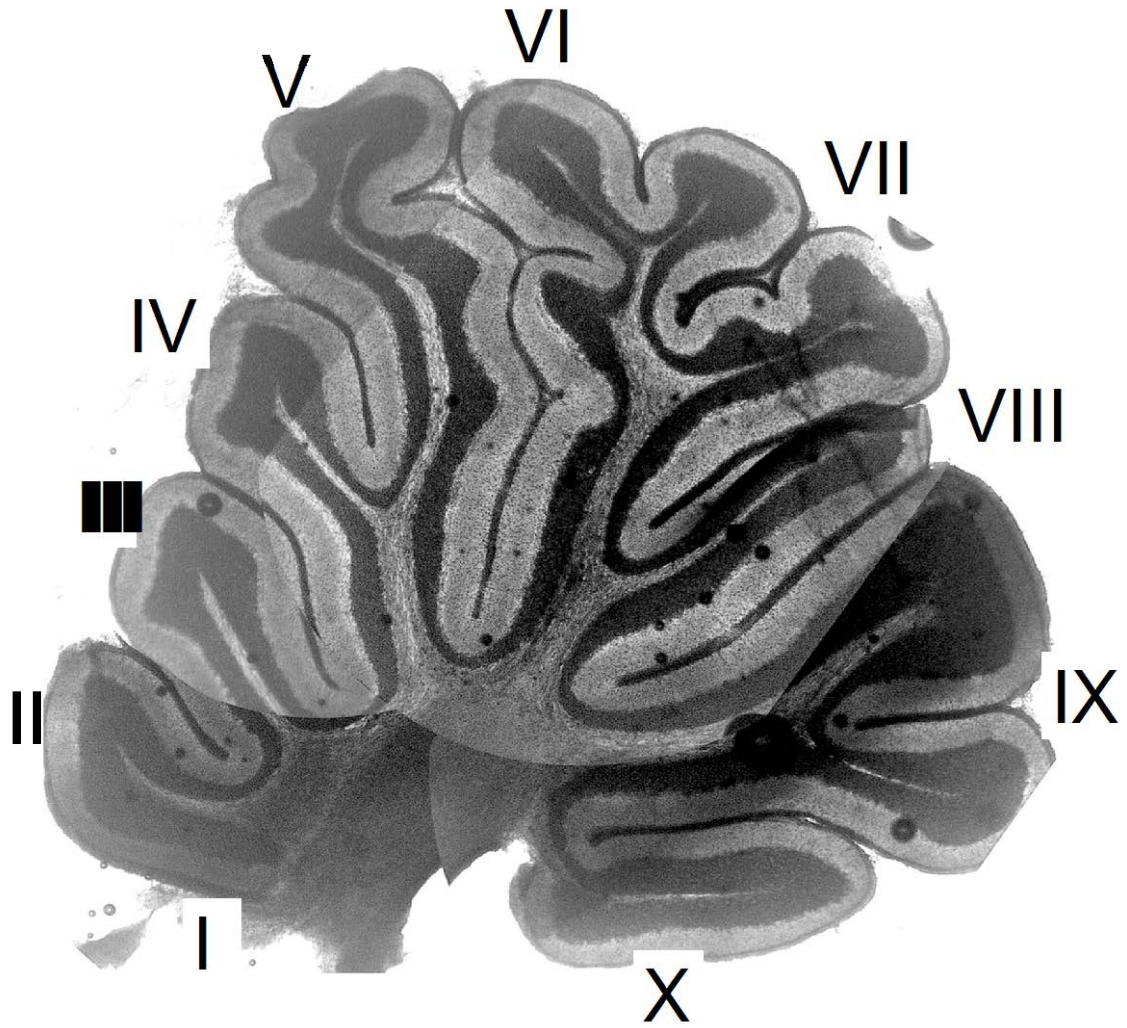


図7 P16 VPA 投与動物の小脳小葉(A)と拡大図(B:対照動物、C:VPA 投与動物)

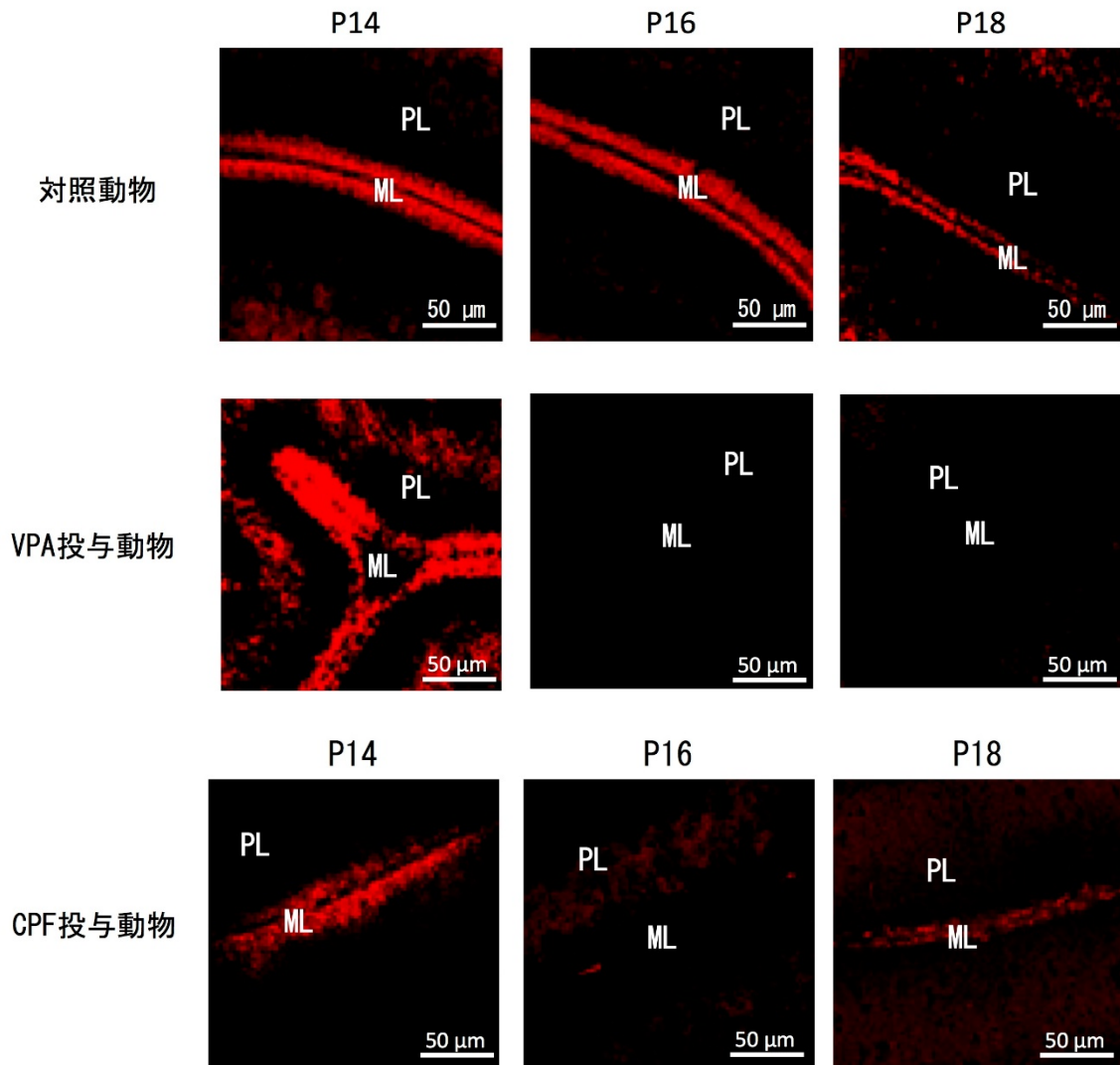


図8 ブロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みによる分裂期細胞の分布。対照動物では P18 まで BrdU 取り込みを示す細胞が分子層上部に分布しているが、VPA 投与動物、CPF 投与動物では P14 以降 BrdU 取り込み能を示す細胞が激減した。