

図 6. 遊走中細胞の形態に対する VPM の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられた。VPM 処理群はこれらの形態にほとんど影響を与えなかった。

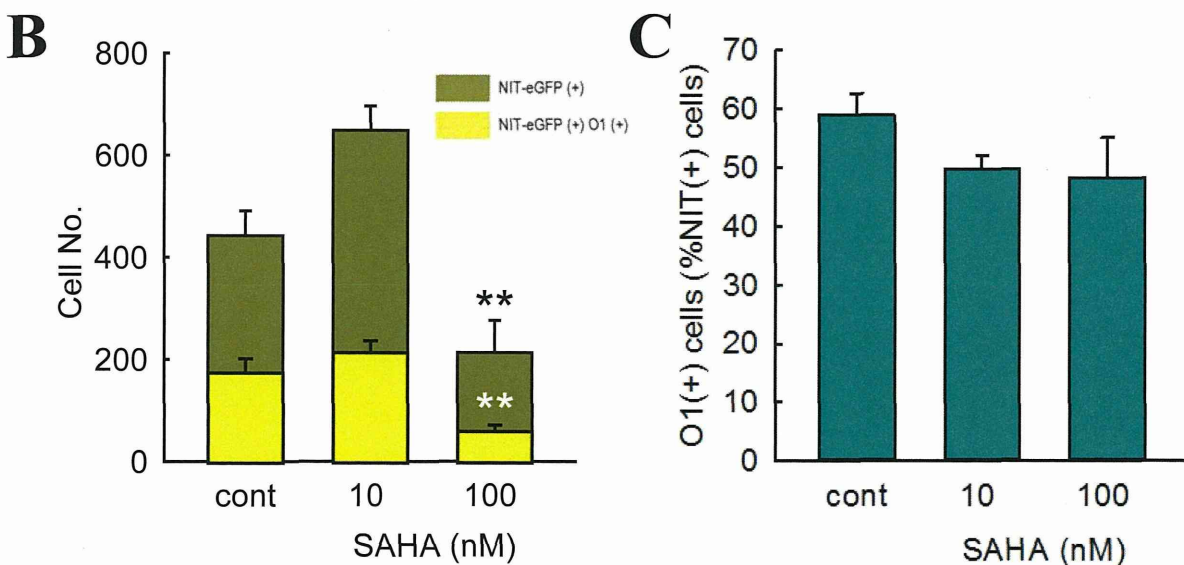
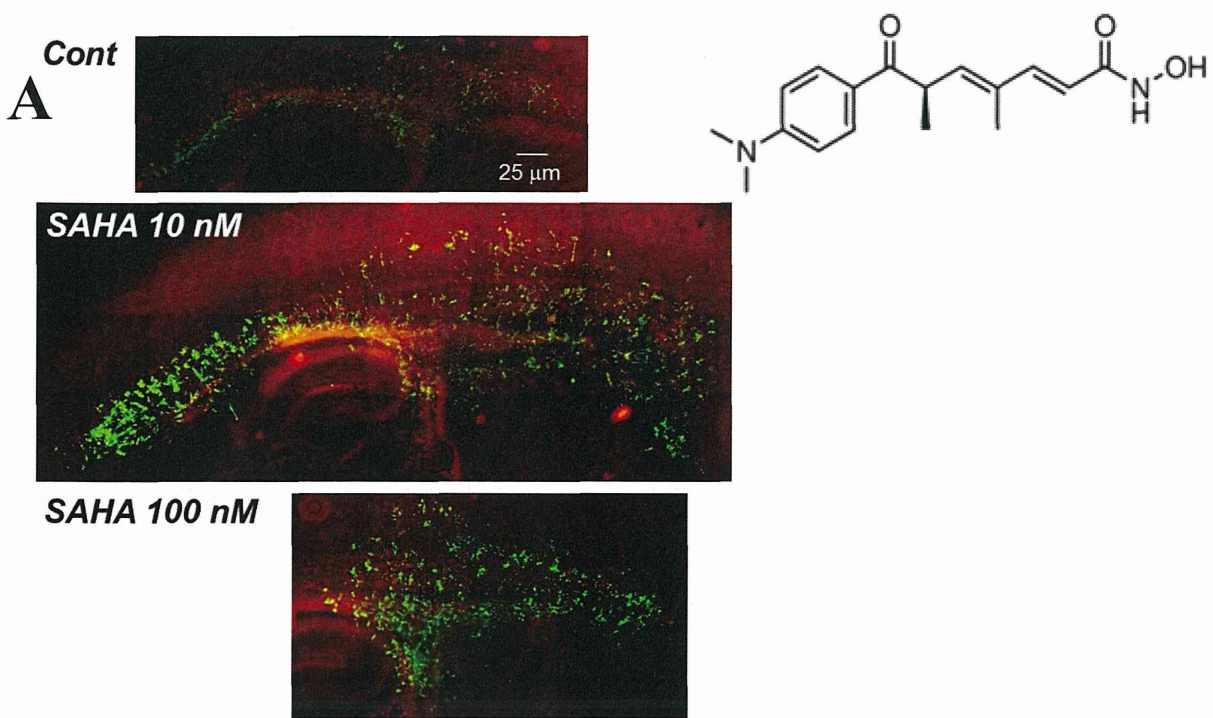


図 7. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する SAHA の影響
SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群 (神経幹細胞および前駆細胞) を含む培養前脳矢状面切片を SAHA (10-100 nM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 10 nM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数に対する SAHA の作用はベルシェープの結果となった (黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も eGFP(+) 細胞数と同様の变化を示した (図 1B、黄色カラム)。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 SAHA によって減少する傾向にあったが有意な差には至らなかった。*: $p < 0.05$, Tukey's test following ANOVA, $N=4$ 。

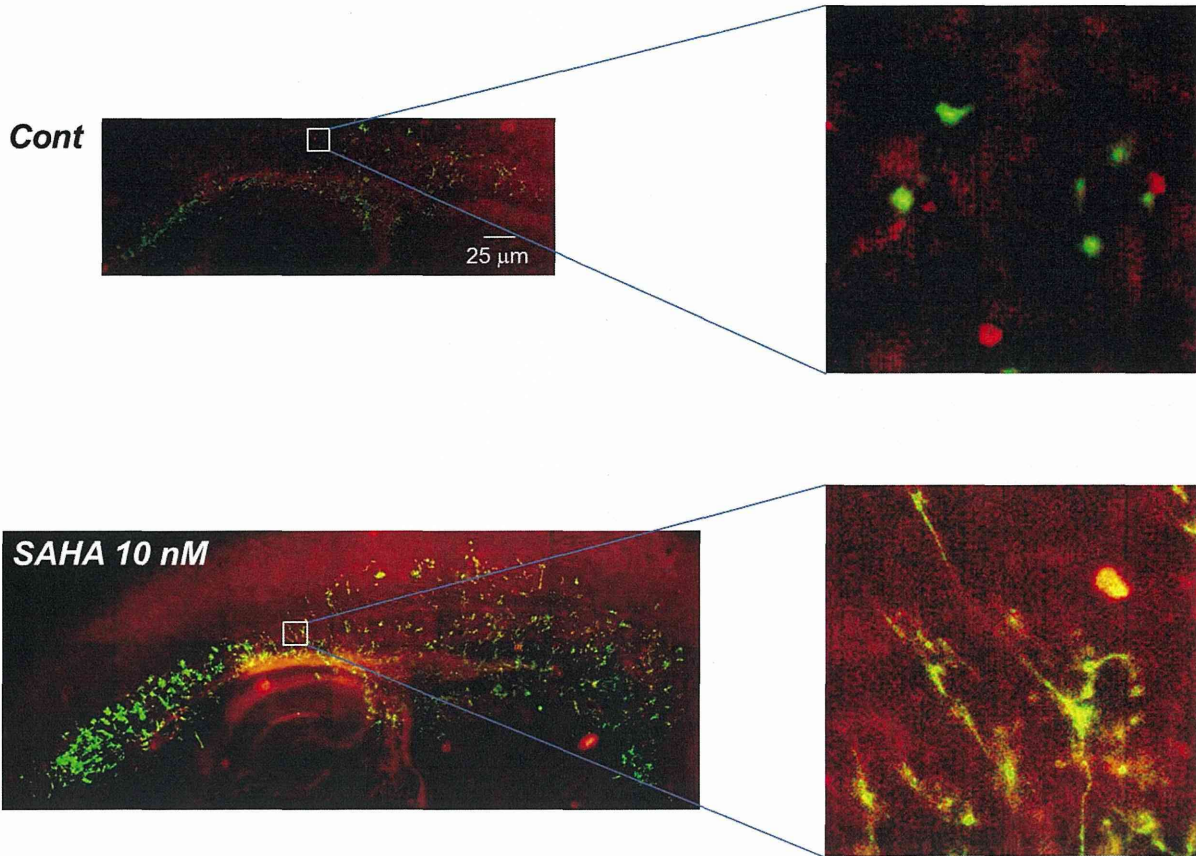


図 8. 遊走中細胞の形態に対する SAHA の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、SAHA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

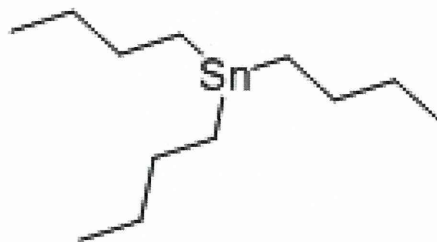
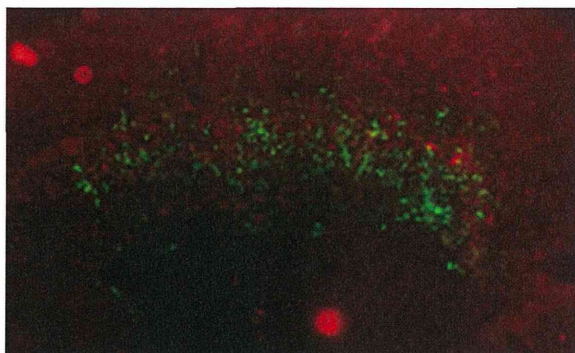
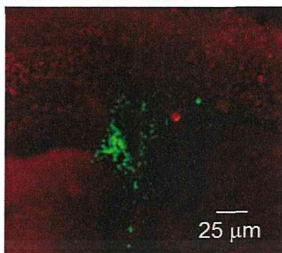
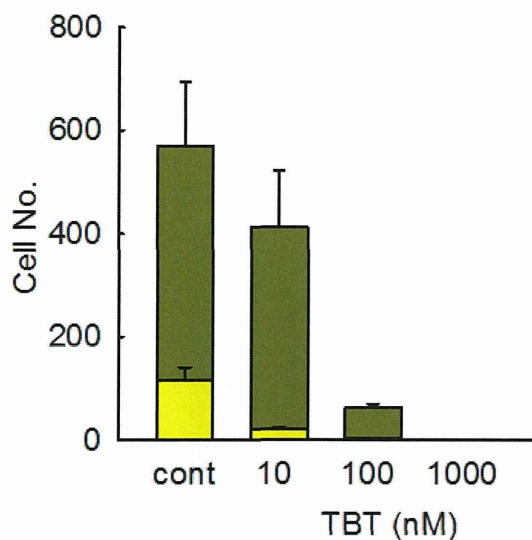
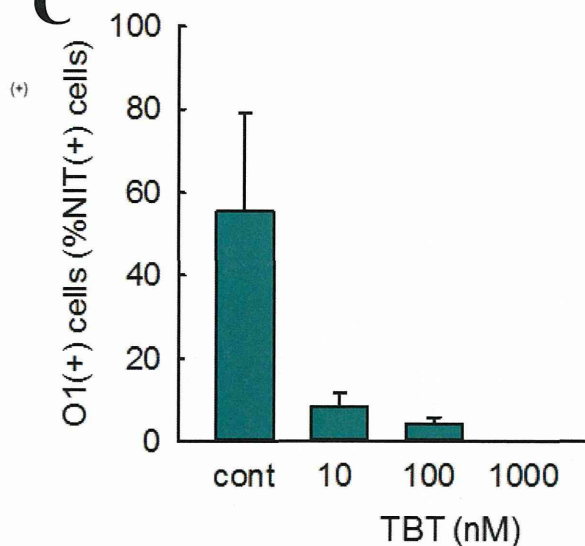
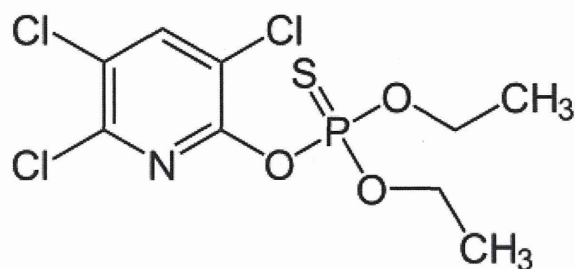
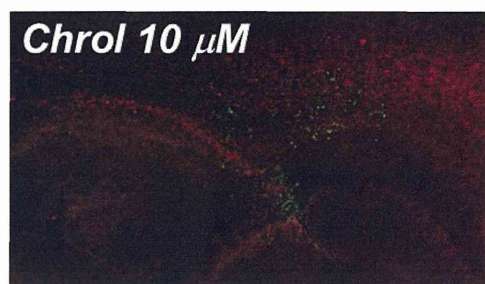
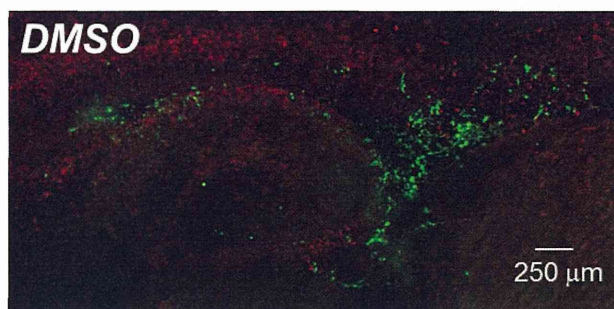
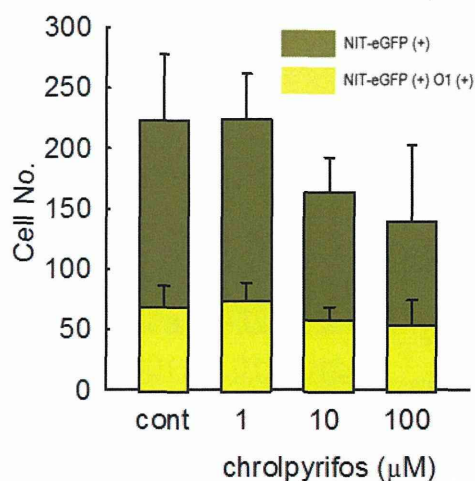
A**Cont****TBT 100 nM****B****C**

図 9. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する TBT 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 TBT (10-100 nM) 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)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 100 nM 以上で劇的に低下した。1 μM においては生存細胞がほとんど確認されなかった。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数 (黄土色カラム)、eGFP(+)O1(+) 細胞数 (黄色カラム) は 100 nM 以上で劇的な減少が引き起こされた。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 10 nM 以上で劇的な減少が起こった。

A.



B.



C.

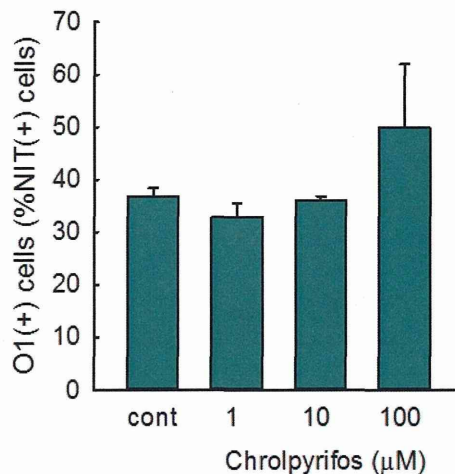


図 10. 前脳矢状面切片培養系における神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対するクロルピリホスの影響

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

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。これらの結果から、神経発達の早期化が脳の高次機能発達にも影響しているものと考えられる。この効果が、バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤効果に由来するものであるか確認するために、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。さらに、新たな共通化学物質として有機スズを選定し、これの投与による神経発達への効果を、行動と神経発達の両面から調査した。これらの結果から、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一方、有機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化学物質クロルピリホスを用い、バルプロ酸と同様の影響が表れることを確認した。これらの研究を通じて、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. 目的

曝露ラットの小脳皮質の発達と変化によって、胎生期の化学物質投与による神経系への影響をスクリーニングする技術の開発を目的とした。胎生期神経毒性陽性物質としてバルプロ酸ナトリウム(VPA)を用い、さらに作業仮説による類縁化学物質、同様の作用が疑われる化学物質及び *in vitro* 系でスクリーニングされた物質の曝露による変化と比較した。

B. 研究方法

1. 小脳の構造と発達

研究試料として、発達期小脳を用いた。ほ乳類の小脳は深い脳溝によって大脳に匹敵する広大な表面積をもち、5種の神経細胞が一定の様式で層状に配列し小脳皮質を形成する。小脳の発生過程では、GABA 作動性神経細胞であるプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞がすべて脳室帯 (ventricular zone) で発生し、小脳板表面に順次整列する。唯一のグルタミン酸作動性神

経細胞である顆粒細胞は胎生期の菱脳唇で発生し、未分化な状態で小脳板表面に遊走し、小脳皮質の最表面に未分化細胞の層である外顆粒層 (external granular layer; EGL) を形成する。これらの神経細胞の発生には、いくつかの特異的な遺伝子の発現が必要であることが示唆される。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 (図1。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)。

2. 自閉症と小脳

代表的な高次機能障害の一つである自閉症は、アメリカ精神医学会が刊行した”Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders(DSM-IV-TR)”の診断基準が」よく用いられている。自閉症の基本的特徴は3歳位までに表れ、「対人的相互反応の質的な障害」、「意志伝達の質的な障害」、「限定された活動や興味」を主な特徴とする行動的症候群である。これらの特徴は、認知や情動と深くかかわるため、長く大脳皮質性の障害と考えられてきたが、近年、自閉症が小脳の変異で発症することが分かってきた。

自閉症では死後脳所見およびMRI研究から小脳異常が繰り返し報告されてきており、小脳虫部 VI-VII 小葉の形成不全と過形成を示す2つの亜群が自閉症患者に見られることも報告されている。また、自閉症患者では小脳半球、虫部の部位においてプルキンエ細胞数の減少や、小脳正中部での一部の裂隙が不整な形をしていることも報告されている。プルキンエ細胞数は減少するだけでなく、大きさが小さくなっており、reelin、Bcl-2 蛋白などの形成に関する蛋白の減少が小脳のこれらの変化に関係していることが示唆されている。さらに、小脳プルキンエ細胞が少なく、位置の異常がある可能性が高いこと、また、小脳の深部にある神経細胞の集合体である歯状核の形が不整であることなども明らかにされている。

3.投与薬物

VPA による神経回路発達の変化がこれらの伝達物質放出と小脳分化に与える影響を調べるために、妊娠16日から19日のラット腹腔内に600mg/kgのVPAを投与した。これから得られた結果を標準とし、さらに下記の薬物の投与を行った。

妊娠16日のラットに、50mg/kgのヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド(SAHA)を腹腔内投与した。

妊娠16日のラットに、4mg/kgのMS-275を経口投与した。

妊娠16日のラットに、20mg/kgのトリブチルスズ(TBT)を経口投与した。

妊娠16日のラットに、クロルピリホス(CPF) 10mg/kgを経口投与した。

構造式を図2に示す。

VPAの経口投与は、出生仔数を40~50%低下させたが妊娠16日での600mg/kg投与

により安定した変化が現れたためこれを胎生期神経毒性の標準状態とした。SAHA、MS-275は、投与濃度をあげると出生仔の死亡例が急激に増え、母体の死亡もみられた。出生仔数は50%程度にとどまった。TBTは出生仔数の変化は見られなかった。CPFにおいても、出生仔は減少しなかったが、時折出生仔が全滅する現象がみられた。

4.伝達物質放出の観察

投与による神経回路発達の変化を発生初期の小脳回路を用いて検討するために、酵素を利用した光測定法によって、小脳皮質からの伝達物質グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸(GABA)およびATPの放出変化を観察した。

本研究でのGABA放出分布は、研究者らが開発したガラス表面に固定化したGABA分解酵素(GABase)を用いた蛍光測定法を使用した。GABaseはGABA転移酵素とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素の複合体で、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP+)存在下でGABAを異化し、コハク酸とグルタミン酸に分解する。このとき同時に、NADP+はNADPHになり、360nm近辺の励起光により、480nmの蛍光を発する(図3A)。この蛍光によって、GABA放出を間接的に光学測定することができる。

同様にグルタミン酸の分布はグルタミン酸脱水素酵素、ATPの放出分布は、ATP要求性のグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いて行った。

酵素をガラス基板表面に固定化し、試料から放出される伝達物質を分解して発生する蛍光分子のNAD(P)Hを、紫外光の表面光で励起するデバイスにより観察した(図3B)。光源はUV-LEDとし、高感度CCD(ORCA-ER, Hamamatsu)を用いて観察した。

酵素はガラス導波路表面に有機化学的に有機化学的に固定化している(図3C)。

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。

C. 研究結果

1.GABA放出量の変化

対照動物では、ラット発達期小脳からのGABA放出は生後1週間で最大値に達した後減少する。これは、放出部位がGABA性神経細胞の分布が完了していない分子層で

あることから、当初グリア性 GABA 放出があらわれ、その後神経細胞性 GABA 放出へ転換するものと考えられる。これに対し、VPA 投与ラットでは、対照動物と比べ GABA が小脳皮質全体から放出され続け、その放出量は変化なく一定であることが観察された (図 4)。

この結果と同様の結果を、Ben-Ari らが自閉症モデルラットで観察している (Science 243 2014)。脳部位は異なるが、対照動物が生後一過性の GABA 放出上昇と減少を示すのに対し、自閉症モデル動物では GABA 放出は変化せず一定と報告している。これらのことから、発達期の脳において、GABA 放出の一過性の変化が見られないことが、自閉症の発症と深く関与していることが示唆される。

2. グルタミン酸刺激性 ATP 放出の変化

ATP はシナプス形成のシグナルとして働いていると考えられており、ATP 受容体を阻害することで神経回路発達が抑制される。本研究では、ATP 放出の空間分布を可視化する方法を開発して観察を行った。

対照動物で上記の方法で ATP の放出分布を観察すると、100 μ M グルタミン酸刺激性の ATP 放出が、生後 9 日で急激に増加することが観察された。一方 VPA 投与動物ではこの増加が生後 5 日ごろから始まり、著しく大きく増加することが観察された (図 5 A)。

さらに、SAHA 投与群においても VPA 投与群と同じく、生後 5 日から ATP の放出が観察されたが放出量は VPA 投与群より少なかった (図 5 B)。

3. プルキンエ細胞の樹状突起変化

薬物投与による GABA および ATP 放出量の変化は、投与によって発達期小脳の神経発達が変化していることを示唆する。そこで、カルビンジン D-28 抗体を用いて小脳プルキンエ細胞の形態変化を観察した (図 6)。

VPA 投与ラット、SAHA 投与ラットでは、対照動物より数日早く樹状突起の伸長が進むことが観察された。生後 12 日でのプルキンエ細胞樹状突起発達を比較すると、対照動物 61.9 \pm 7.4 μ m に対し、VPA 投与動物 119.8 \pm 22.5 μ m、SAHA 投与動物 113.4 \pm 22.8 μ m と、著しい樹状突起伸長を示し、神経回路の早期発達が進んでいることを

表した (表 1)。

一方、対照動物ではプルキンエ細胞の細胞体が発達に伴って一列に整列するが、VPA 投与動物、SAHA 投与動物では細胞体の整列がみられず、複数の細胞が並ぶ現象がみられた。これは、プルキンエ細胞が早期に発達したのではなく、樹状突起は伸長しているが発達自体はむしろ遅れていることを示唆する。

4. 脳回の異常

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。小脳虫部には I~X までの小葉があり、このうち V~VII 葉は認知・情動に関わるとされる。ヒト自閉症では VI、VII を中心に変異や欠落が報告されている。図 7 に対照動物の小脳虫部を示した。

VPA 投与動物では、生後 1 2 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 8 A)。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 (図 8 B)。これらの変化は CPF 投与動物でも観察された。

生後 3 5 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。

5. 顆粒細胞の BrdU 取り込み能の変化

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を示唆した。そこで、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 9)。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。

6. 行動観察

対照動物および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(図10)。

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。

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。

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。これらの結果から、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があらわれると考えられる。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に重要なチェック項目を提示できた。

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] 勝股大樹, 村本英樹, 田野崎真, 笛田由紀子, 関野祐子, 吉田祥子, 胎生期バルプロ酸曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化. 第60回中部日本生理学会, 岐阜, 2013

[2] 吉田祥子, 田野崎真, 福田敦夫, 笛田由紀子, 関野祐子, Valproate application to rat fetus changes developing GABA release and neuronal differentiation. 第56回日本神経科学学会大会, 京都, 2013

[3] S. Yoshida, H. Muramoto, M. Tanozaki, N. Hozumi, Y. Fueta, Y. Sekino, Valproate application to rat fetus encourages the development of Purkinje cell dendrites and network formation in cerebellar development. 43th Neuroscience meeting, San Diego, 2013

[4] 阿部巧, 村本英樹, 笛田由紀子, 関野祐子, 吉田祥子, Developmental change of ATP transmission to glutamate stimulation and in normally developing or valproate-modified rat cerebellar slices. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014

[5] 勝股大樹, 村本英樹, 穂積直裕, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, Fetal application of HDAC inhibitors changes the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellar cortex. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014

[6] S. Yoshida, N. Hozumi, D. Katsumata, T. Abe, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino, Fetal application of HDAC inhibitors facilitates the elongation of Purkinje cell dendrites and the network formation in rat cerebellar cortex. 44th Neuroscience meeting, Washington,

2014

[7] S. Yoshida, N. Hozumi, D. Katsumata, T. Abe, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino, Alteration of GABA release dynamics in autistic-like anomalous developing cerebellum. 24th Neuropharmacology Conference, Arlington 2014

[8] 中嶋さりい, 勝股大樹, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, 胎生期HDAC阻害剤曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化と行動観察. 第61回中部日本生理学会 名古屋 2014

[9] 富田達朗, 山田ひかり, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, 胎生期バルプロ酸投与動物由来の培養グリア細胞の発達変化. 第61回中部日本生理学会 名古屋 2014

[10] 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

[11] 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

[12] 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

[13] 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

[14] 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

- [15] 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
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 馬淵 光・渡邊一徳・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

特許取得

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」

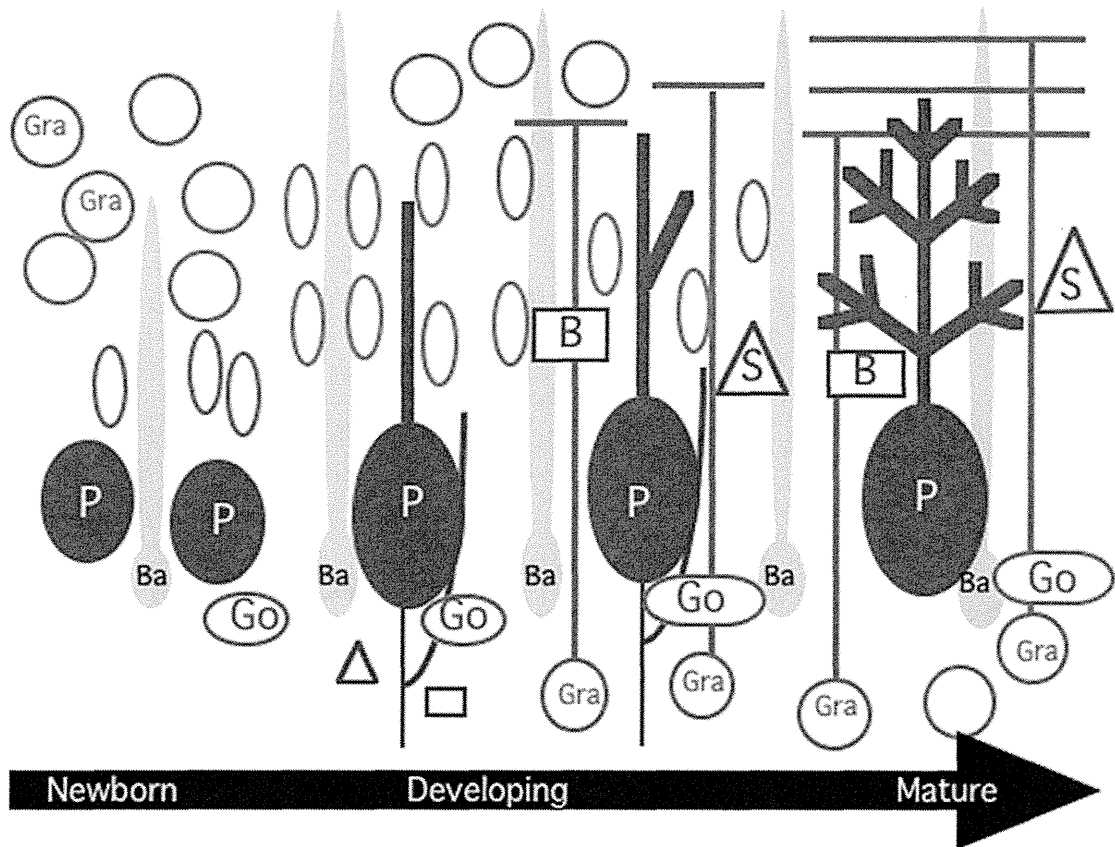
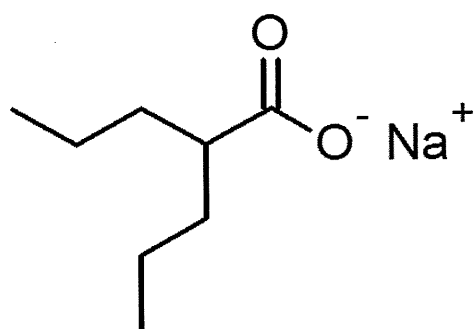


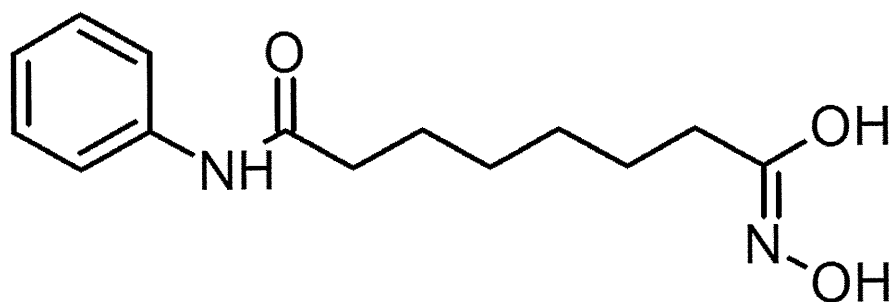
図1 ラット・マウスの小脳の発達様式

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。

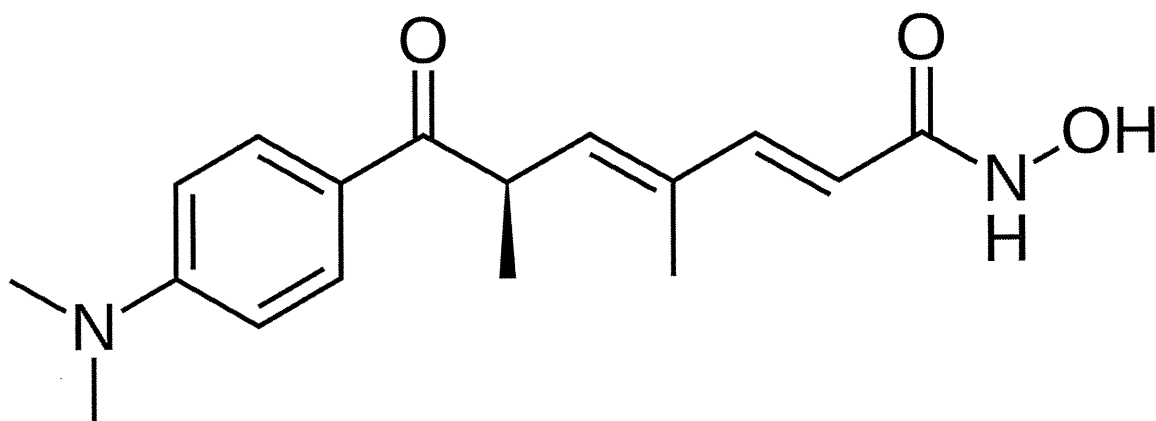
(P:プルキンエ細胞、Gra:顆粒細胞、B:バスケット細胞、S:星状細胞、Go:ゴルジ細胞、Ba:バークマングリア)。



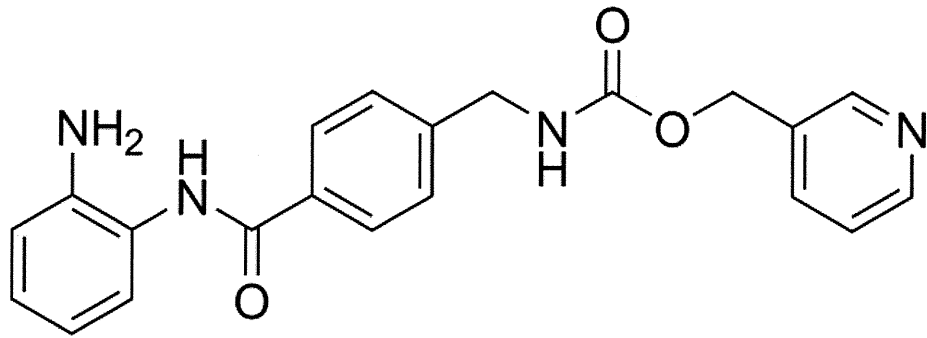
バルプロ酸ナトリウム (VPA)



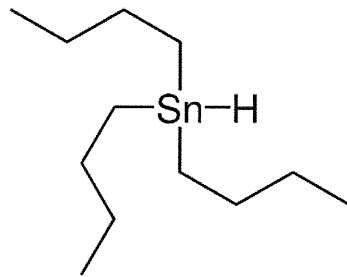
ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド (SAHA)



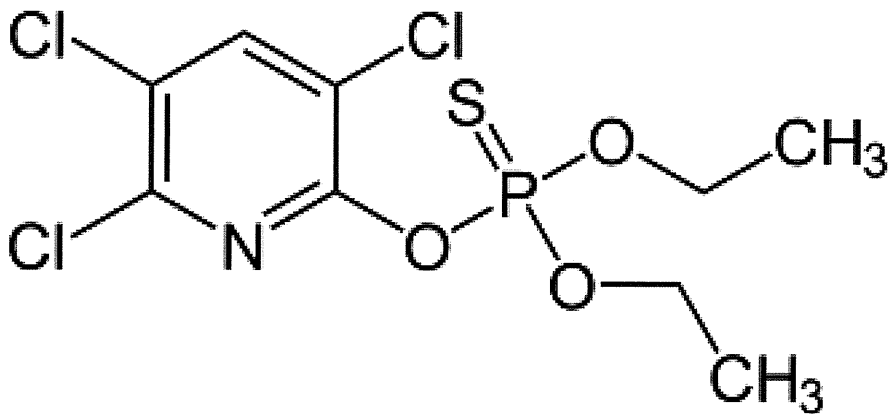
トリコスタチン



MS-275



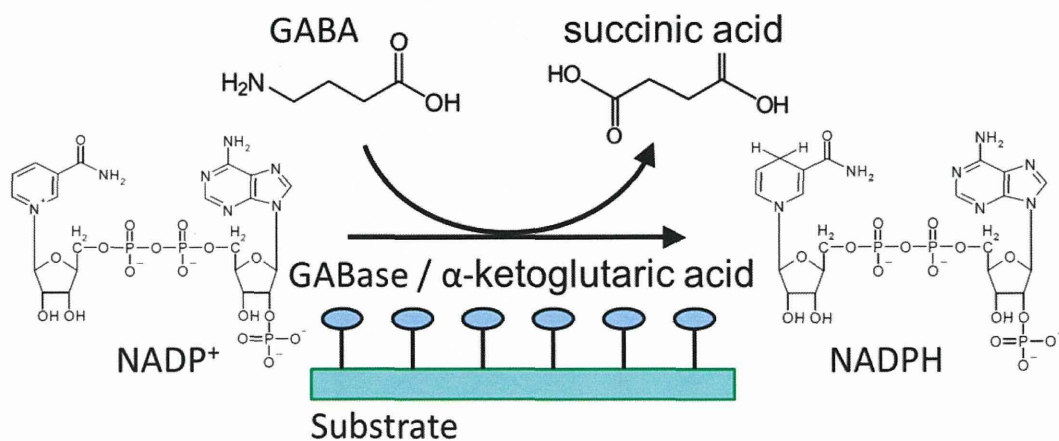
トリブチルスズ (TBT)



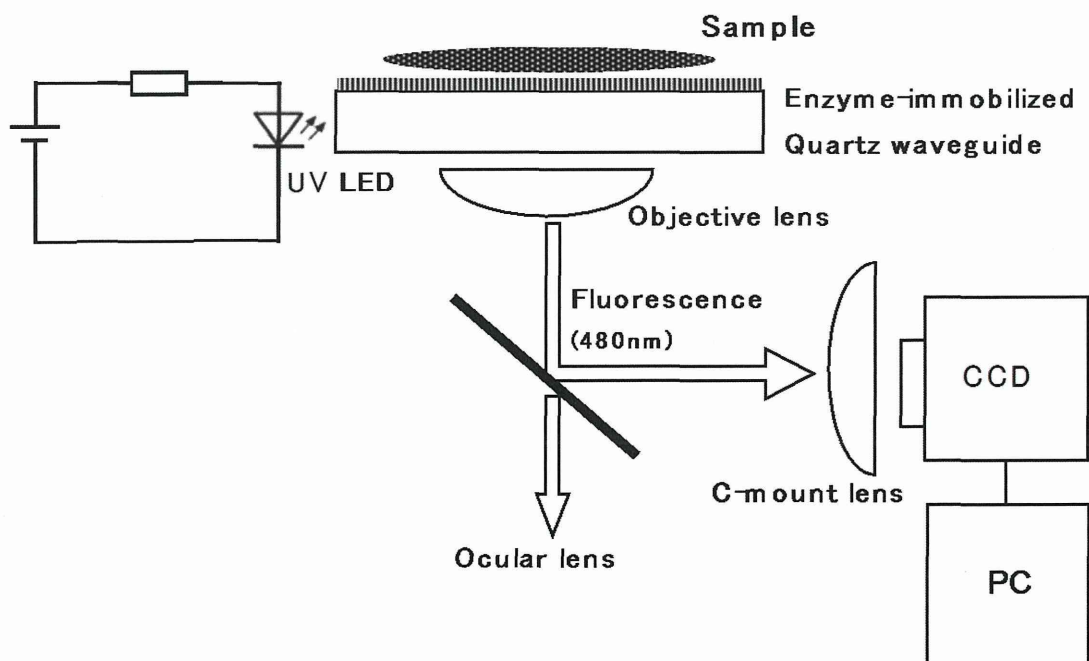
クロルピリホス

図 2 本研究で使用した化合物の構造

A



B



C

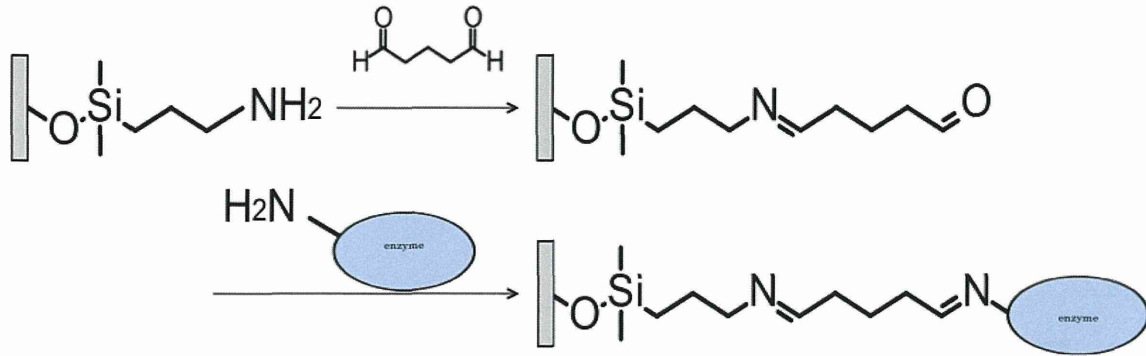


図3 伝達物質放出分布の可視化方法

伝達物質放出分布は、GABAの場合、GABA分解酵素(GABase)を用いた蛍光測定法を使用した(A)。GABaseはGABA転移酵素とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素の複合体で、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP⁺)存在下でGABAを異化し、コハク酸とグルタミン酸に分解する。このとき同時に、NADP⁺はNADPHになり、360nm近辺の励起光により、480nmの蛍光を発する。

同様にグルタミン酸の分布はグルタミン酸脱水素酵素、ATPの放出分布は、ATP要求性のグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いて行った。

酵素をガラス基板表面に固定化し、試料から放出される伝達物質を分解して発生する蛍光分子の還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド(リン酸)(NAD(P)H)を、紫外光LEDの表面光で励起するデバイスにより観察した(B)。

酵素は石英ガラス表面に、有機化学的に固定化している(C)。

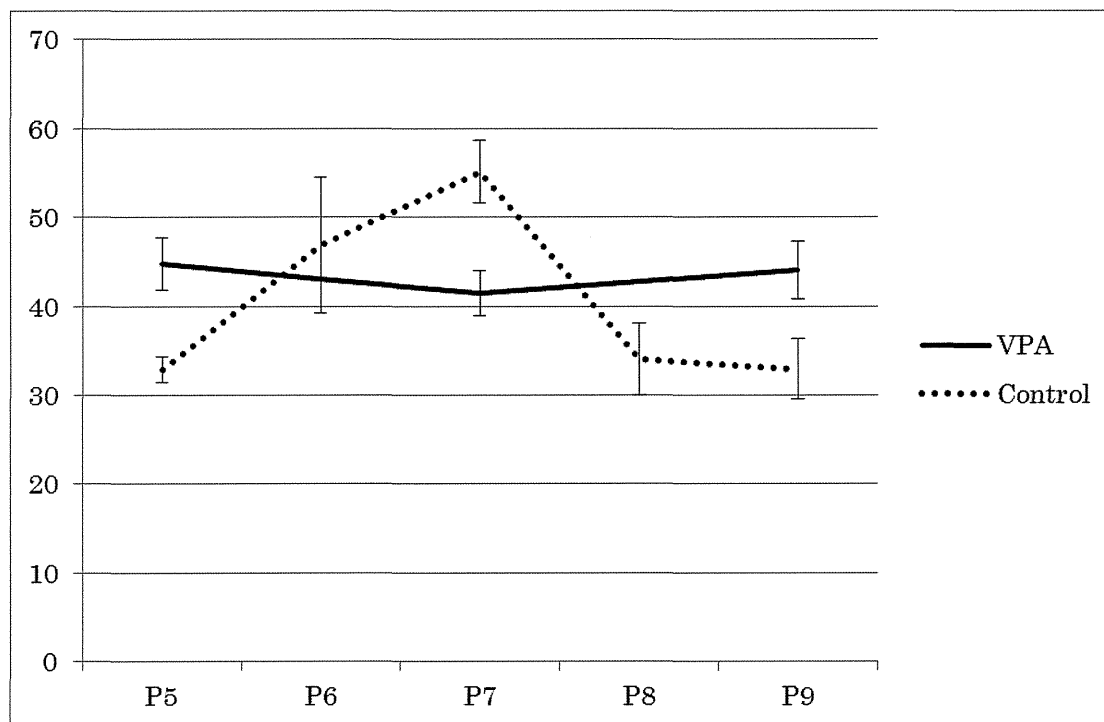
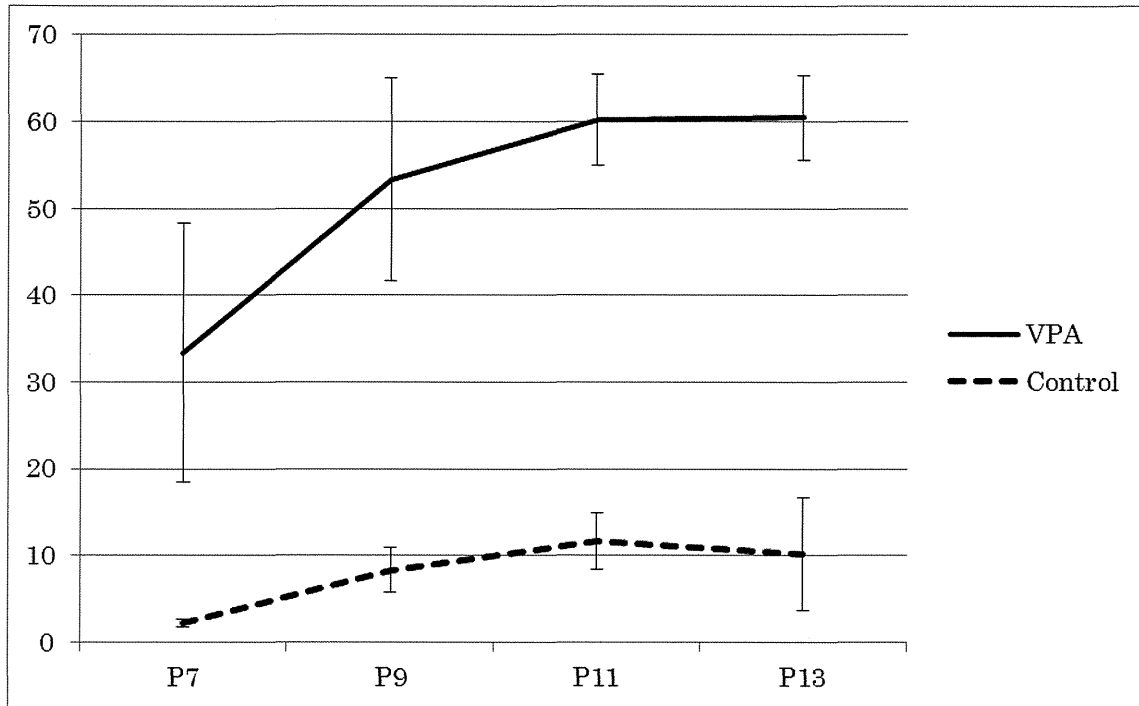


図4 発達期小脳皮質分子層からの GABA 放出量

GABA 放出量は、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

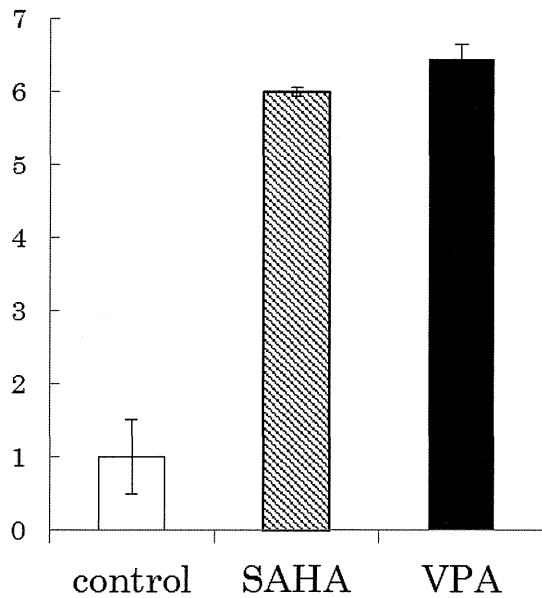
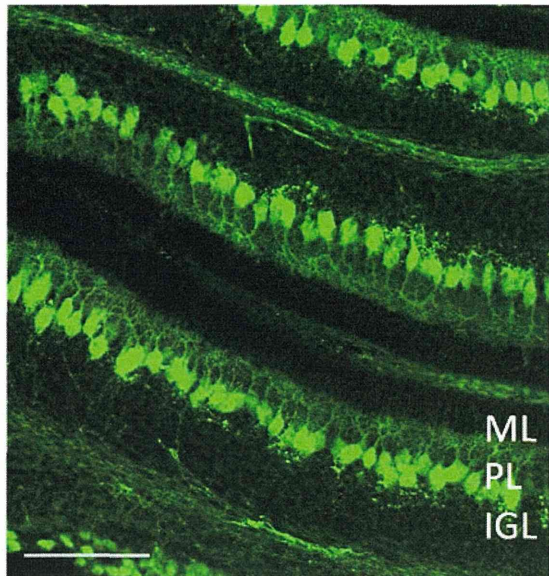


図5 発達期小脳皮質分子層からの $100\mu\text{M}$ グルタミン酸刺激による ATP 放出量

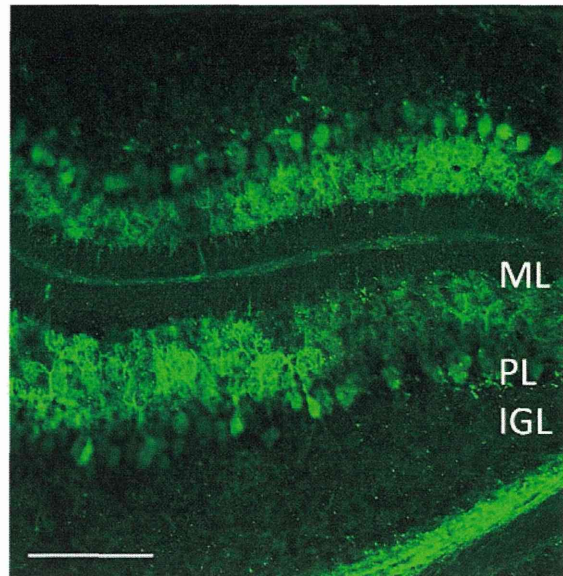
A, 発蛍光光量を相対値で示している。対照群に対し、発生初期から著しい増加を示す。B, 対照動物を1とした、P9でのATP放出量。SAHA投与群の放出量は、VPA投与群よりやや少ない。

A



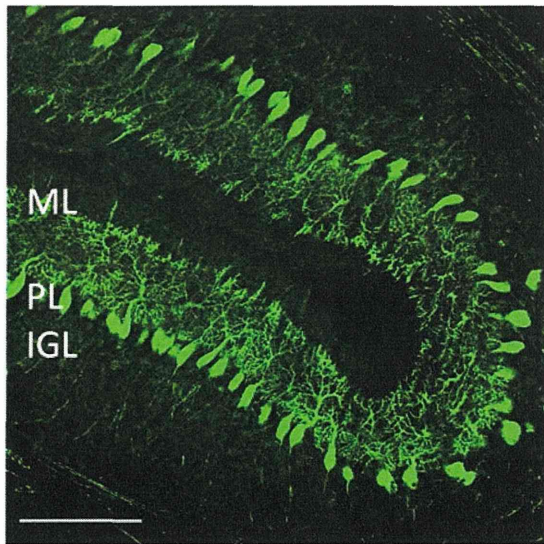
Control P11

B



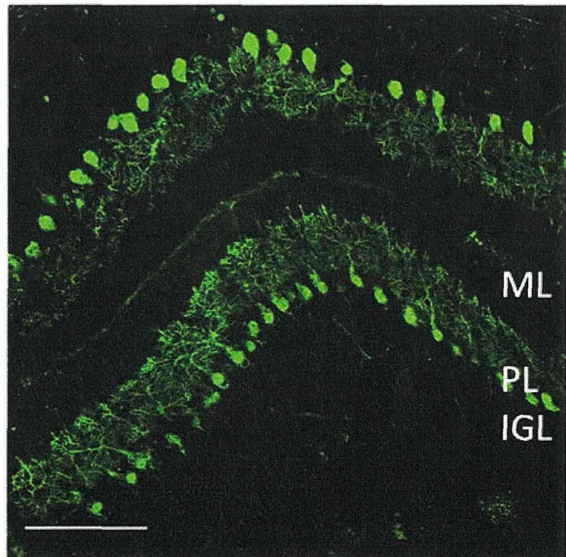
VPA P11

C



SAHA P11

D



TSA P11

図6 抗カルベジン 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。

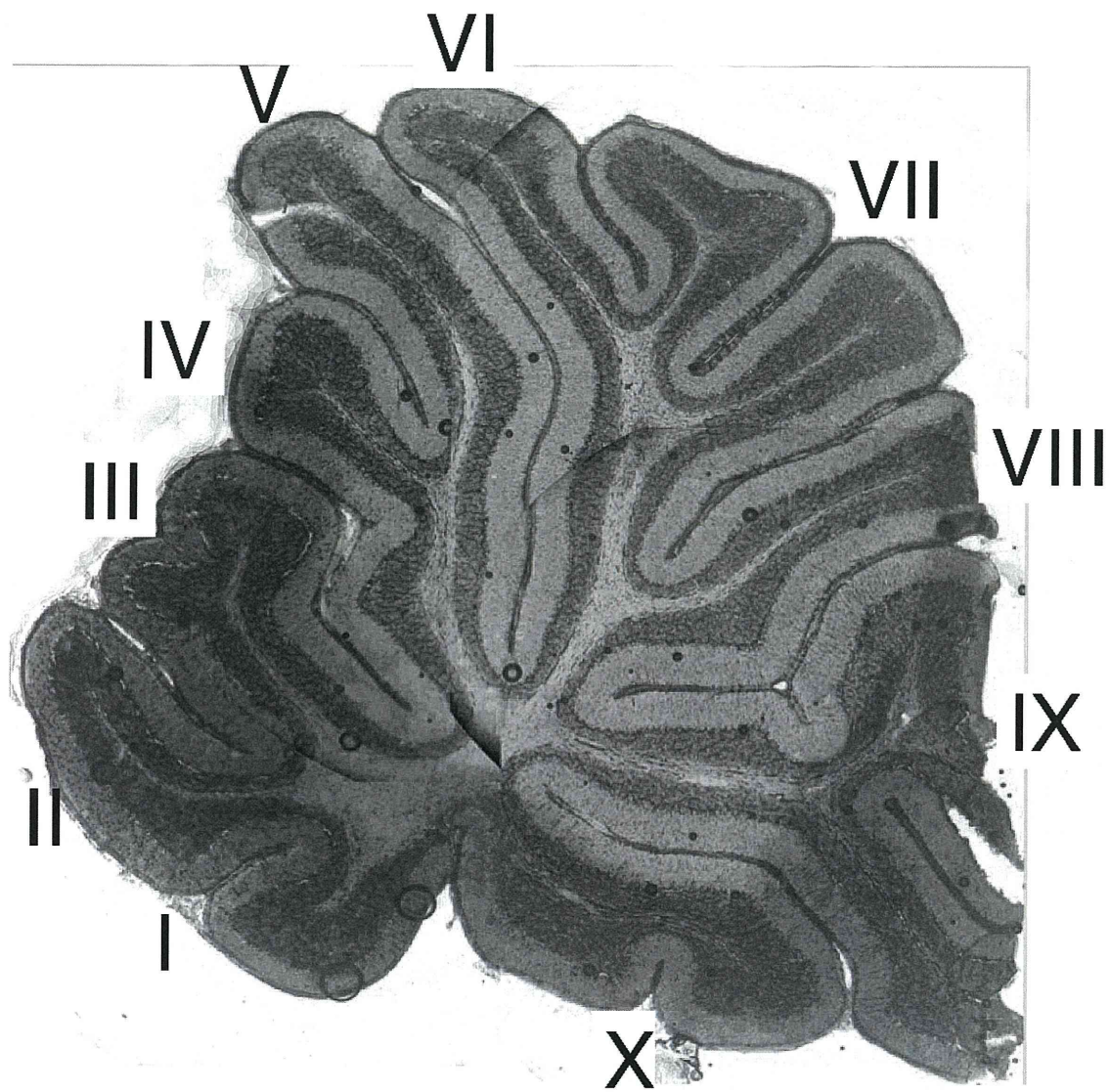


図7 P16小脳皮質と小葉I~X