

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

生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発

研究分担者 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系  
吉田 祥子  
研究協力者 東京大学 薬学部  
関野 祐子

**要旨**

本年度は、化学物質に対して感受性の高いラット小脳皮質を用いて、化学物質曝露による神経突起進展、神経回路形成への影響を検討し、最も適切な定量化方法を決定することを目的として実施した。ヒト自閉症誘発が報告されているバルプロ酸、およびクロルピリホスに加え、同様の薬理作用機序が考えられる SAHA、MS-275、環境毒性物質の有機スズについて、神経細胞レベルおよび小脳組織レベルでの変化を観察し、定量化を試みた。さらにバルプロ酸について、投与時期と投与濃度を変化させその効果を検討した。本年度は、化学物質投与による神経伸長変化の定量化、小脳虫部第一裂の過剰な褶曲の定量化、行動観察の定量化を行った。その結果、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスが、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸長と小脳構造の変化、動物の行動変化を引き起こすことを定量的に示した。これにより投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につながることを期待される。

**A. 研究目的**

ヒト自閉症誘発が報告されているバルプロ酸(VPA)、VPAと同様にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、MS-275、ヒト自閉症誘発が報告されているクロルピリホス(CPF)、および環境毒性物質のトリブチルスズ(TBT)投与による小脳発達への影響を、免疫組織化学的手法による神経の形態的变化、およびヘマトキシリン-エオシン染色(HE 染色)による小脳虫部全体の構造変化を観察した。さらに個体の行動に及ぼす変化を確認するために、光学測定法による伝達物質放出の変化の観察、および発達期と成熟期の個体の行動観察を行った。

**B. 研究方法**

近年自閉症の変異部位であることが報告されている小脳を研究試料として用いた。各化学物質を妊娠動物に投与し、出生動物の小脳を摘出してその効果を観察し

た。妊娠 16 日のラットに、600 mg/kg の VPA(経口)、50mg/kg の SAHA(腹腔内)、4mg/kg の MS-275(経口)、10mg/kg の CPF(経口)、20mg/kg の TBT(経口)をそれぞれ投与した。VPA については、妊娠 14 日、18 日にそれぞれ 600 mg/kg の投与することを試験した。また、妊娠 16 日に 200 mg/kg、300 mg/kg、400 mg/kg の VPA 投与を試験した。

各投与動物を生後 2 から 3 週で灌流固定後、小脳虫部の矢状面スライス进行调整し、抗カルビンジン抗体染色によってプルキンエ細胞の樹状突起長を測定し、化学物質投与による神経伸長変化の定量化を行った。さらにスライス全体を HE 染色し、小脳虫部スライスの第 V/VI 小葉間にある primary fissure (第一裂) について、プルキンエ層の長さとの比を計算し、投与動物と対照動物を比較して化学物質投与の影響の定量化を行った。また各投与動物の発達期(生後 4 日から 10 日)お

よび成熟期（生後6週から8週）で、発達期では震えのような不随意運動の出現率を計測、成熟期では新規環境での行動を計測し定量化を行った。さらに生後10日から21日の小脳皮質層からの伝達物質放出を、酵素光学測定法を用いて観察した。

### C. 研究結果

VPA投与動物、SAHA投与動物では、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が対照動物より早く著しく、生後2週で1.6倍、生後3週でも1.3倍の伸長を示した。これはCPF投与動物でも観察されたが、MS-275投与動物、TBT投与動物では観察されなかった（図1）。突起伸長の加速と同時に、プルキンエ細胞のプログラム細胞死が引き起こされず、単層化しないプルキンエ細胞層が観察された。樹状突起は複雑な網状の形状を示し、主たる垂直突起が識別できない状態を示した。

VPA投与動物では、小脳虫部第一裂（V葉-VI葉間）に過剰な褶曲が観察された。これにより、プルキンエ層が長くなり、対照動物の1.2倍の長さのプルキンエ層を持つに至った。CPF投与動物では1.05倍のプルキンエ層を示した。一方MS-275、TBT投与動物では観察されず、神経突起伸展異常と同様の傾向を示した。妊娠14日にVPAを投与した動物では1.25倍のプルキンエ層が観察されたが、妊娠18日投与動物は対照動物と差を示さなかった。この変化はVPAの投与量に正の相関を示した（図2）。

行動観察の結果、VPA投与動物では、初期に多くの不随意運動を確認したが、成長につれて減少する傾向があった。SAHA投与動物では、多くの不随意運動を確認し、且つ成長につれて増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では若干の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、多くの不随意運動を確認し、また、成長につれて不随意運動が増加する傾向にあった（図3）。成熟期の行動では、VPA投与動物は新規環境でも警戒が少なく、過活動の傾向を示した（図4）。移動速度は速く、躊躇なく中心部を通過し、対照動物との差異が見られた。

伝達物質放出では、発達期に過剰な伝達物質の放出が観察された（図5）。グルタミン酸誘発性のATP放出は、グリア細胞からのシナプス形成誘発因子と考えられており、ATP受容体の阻害によってシナプス形成は著しく抑制される。VPA投与動物、SAHA投与動物ではグルタミン酸誘発性ATP放出が発達初期から亢進しており、何らかのグリア細胞性の異常が起きていることを示唆した。

### D. 考察

研究結果を通じ、発達期小脳皮質の形成異常、プルキンエ細胞の形成異常、伝達物質放出の異常によって自閉症誘発が疑われる化学物質の神経毒性の定量化の可能性を示した。発達期神経系におけるこれらの変化は、成熟期では個体の行動異常につながることを確認できた。神経細胞の変化を引き起こす発生制御たんぱく質、神経栄養因子などの発現変異を示唆しているものと考えられる。これらの神経回路レベル、行動レベルでの変化を細胞レベルの変化につなげることが必要と考えられる。

### E. 結論

本研究において、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスを胎生期の動物に投与し、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化から定量化して示した。定量化により投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

### 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 Trans FM. (2016) 136(2):99-104
- [2] Takanashi K., Washiya M., Ota K., Yoshida S., Hozumi N., Kobayashi K. “Quantitative evaluation method for differentiation of C2C12 myoblasts by ultrasonic microscopy.” Jpn J

- Appl Phys. (2017) 56:07JF11
- [3] Tiong TKS., Chean TW., Yamada H., Takahashi K., Hozumi N., Kobayashi K., Yoshida S. “Effects of anticancer drugs on glia–glioma brain tumor model characterized by acoustic impedance microscopy.” Jpn J Appl Phys. (2017) 56:07JF15
- [4] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y., Ueno S. “Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus.” NeuroToxicology (2018) 65: 1-8
- [5] Zhang W., Qian L., Lambertini L., Finik J., Huang Y., Tsuchiya K.J., Pehme P., Buthmann J., Yoshida S., Chen J., Nomura Y. “Timing of Prenatal Exposure to Trauma and Altered Placental Expressions of HPA-Axis Genes and Genes Driving Neurodevelopment.” J Neuroendocrinol. (2018) DOI: 10.1111/jne.12581 in press

他 2件

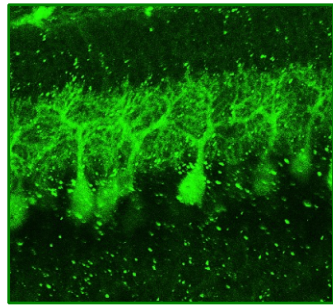
## 2. 学会発表

- [1] Yoshida S. Neuroscience meeting 2017, nano-symposium, 2017, Washington DC
- [2] Yoshida S. 第 60 回日本神経化学会大会 シンポジウム、2017 仙台
- [3] Yoshida S., Fueta Y., Ueno S., Hozumi N., Sekino Y., Kanda Y. 10th DOHaD world congress, 2017, Rotterdam
- [4] Yoshida S., Rahayu RH., Takanashi K., Kishikawa K., Kurita H., Takashima K., Hozumi N., Kobayashi K., Yamamoto S. 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan, 2016, Waikiki
- [5] Yoshida S., Hozumi N., Fueta Y., Ueno S., Sekino S. Society of Toxicology, 55th Annual Meeting, 2016, New Orleans
- 他 20 件

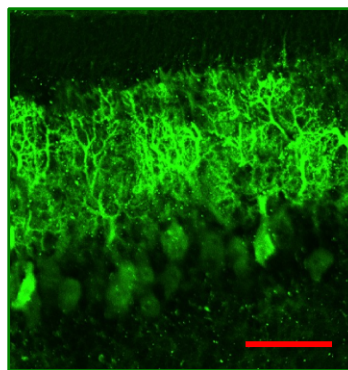
## H. 知的財産権の出願・登録状況

- [1] 吉田祥子, 穂積直裕, 氏家雅彦, 光学観察装置, 特願 2016-221213
- [2] 吉田祥子、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  
(ア)特許 5871224

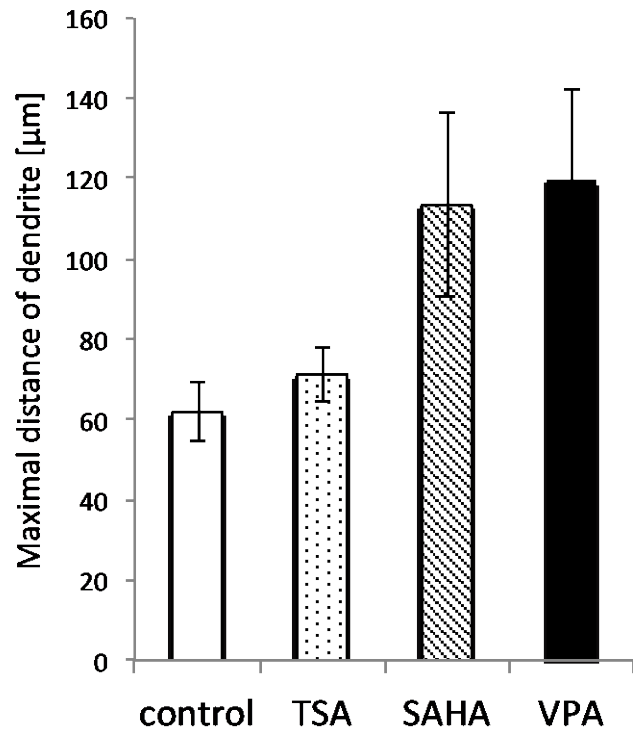
他 1 件



生後10日の対照 物のプルキンエ細胞



生後10日のVPA投与 物のプルキンエ細胞  
(抗カルピンジン D-28k染色)

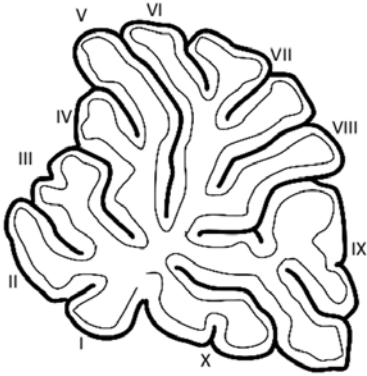


生後10日のプルキンエ細胞樹状突起最長部までの距離

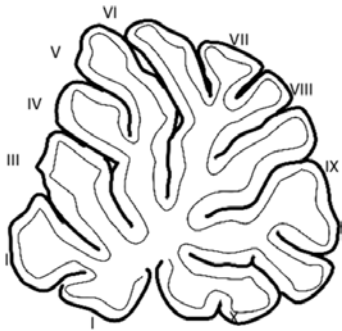
### 図1 化学物質を投与した生後10日目の動物のプルキンエ細胞

VPA 投与動物、SAHA 投与動物では、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が対照動物より早く、より長くなる傾向が認められた。

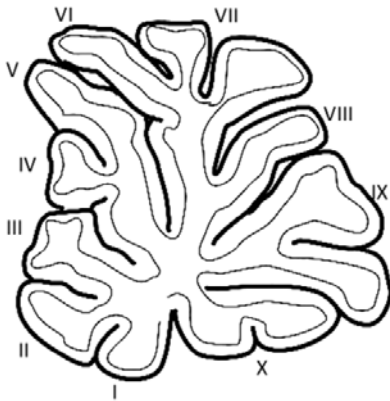
**A**



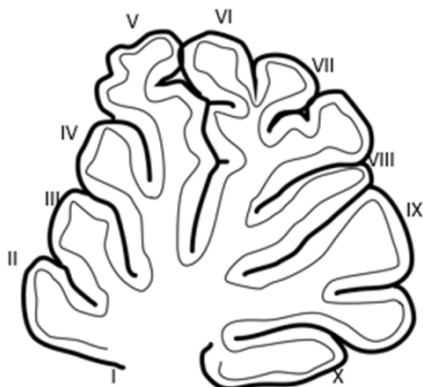
生後 16 日 対照動物小脳



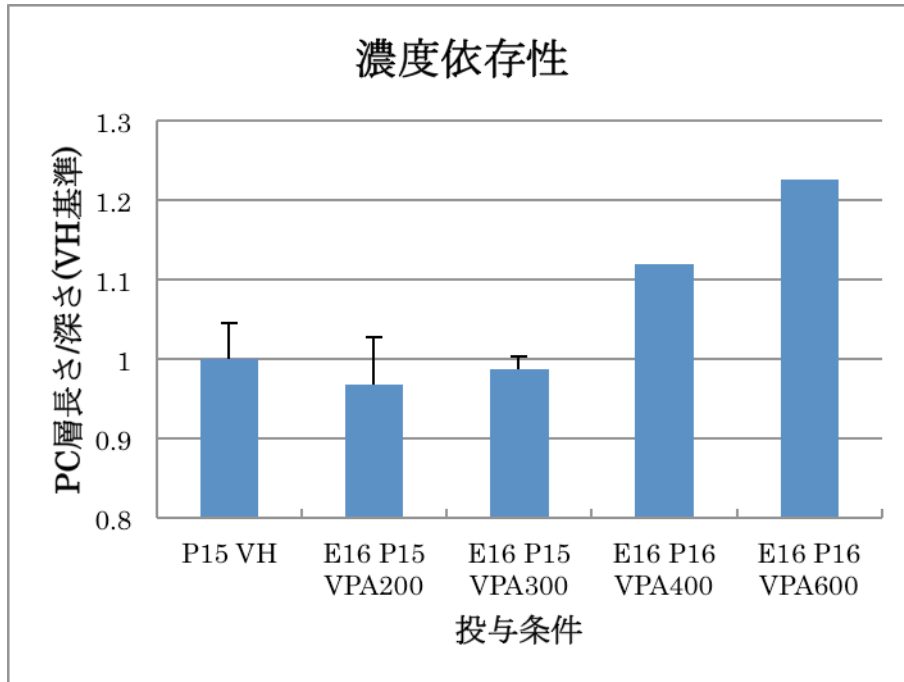
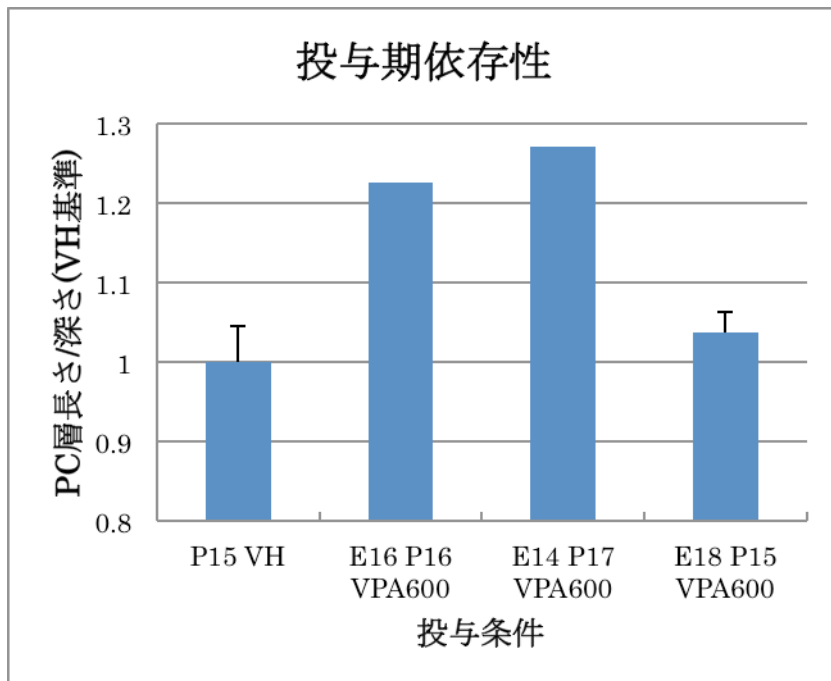
VPA 200 mg/kg 投与動物小脳 (P15)



VPA 400 mg/kg 投与動物小脳 (P16)

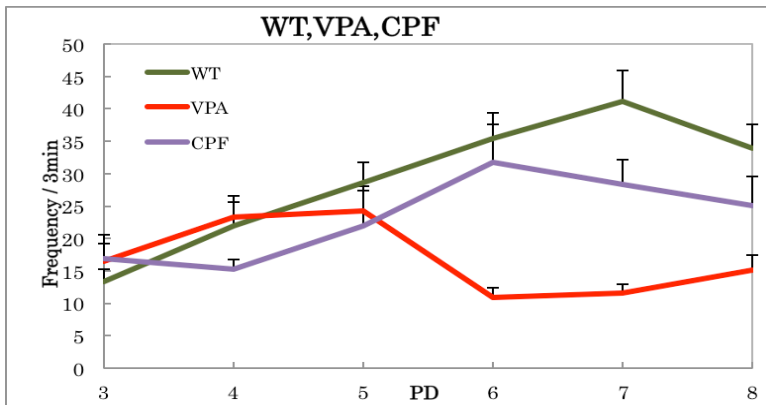
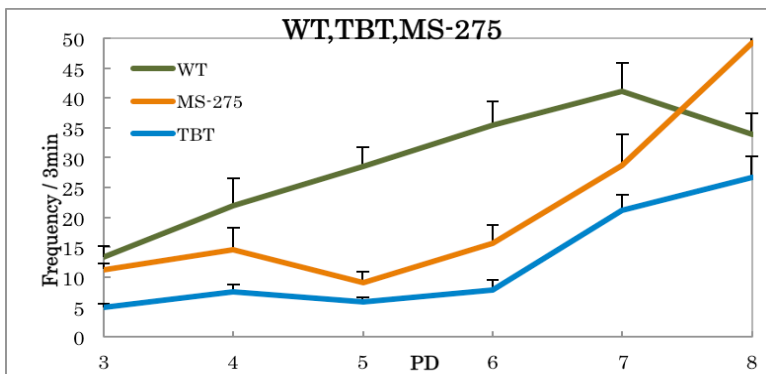
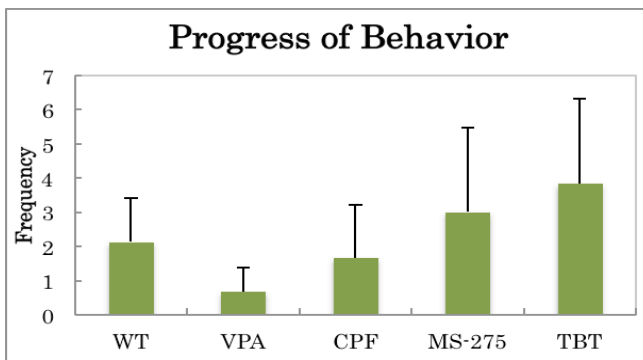


VPA 600 mg/kg 投与動物小脳 (P16)

**B****C**

**図2** 各条件でVPAを投与した動物の小脳虫部

- (A) 小脳虫部褶曲構造の変化
- (B) VPAの投与濃度による小脳虫部の褶曲度の変化
- (C) VPAの投与時期による小脳虫部の褶曲度の変化

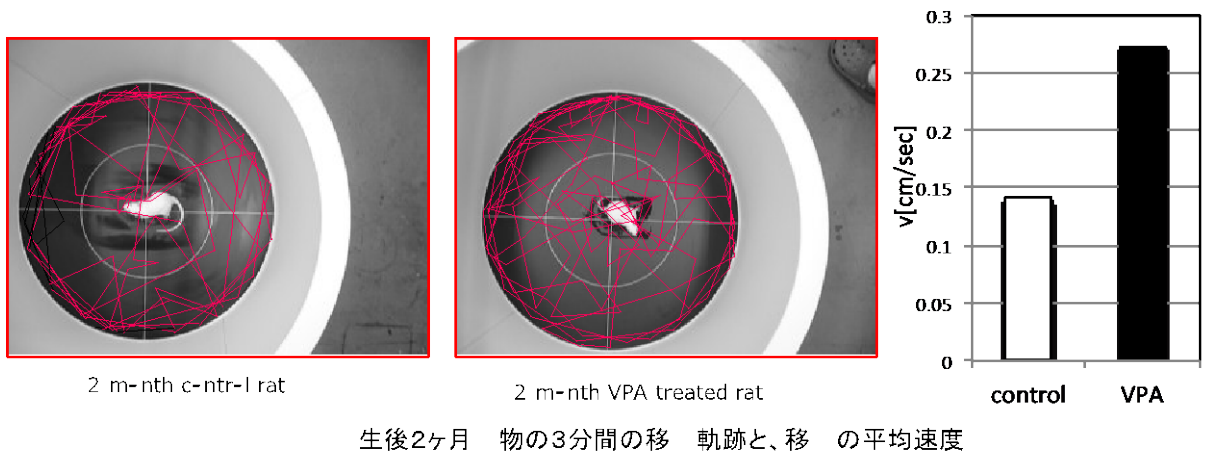
**A****B****C**

**図 3** VPA, CPF, TBT, MS-275 投与動物の生後 10 日程度の不随意運動の発生頻度

(A) VPA は対照動物よりも早く不随意運動の低下が見られる。

(B) TBT や MS-275 ではむしろ遅くなる。

(C) 運動の頻度変化をしめす。



**図 4** 生後 2 ヶ月の動物の 3 分間の移動軌跡と移動の平均速度



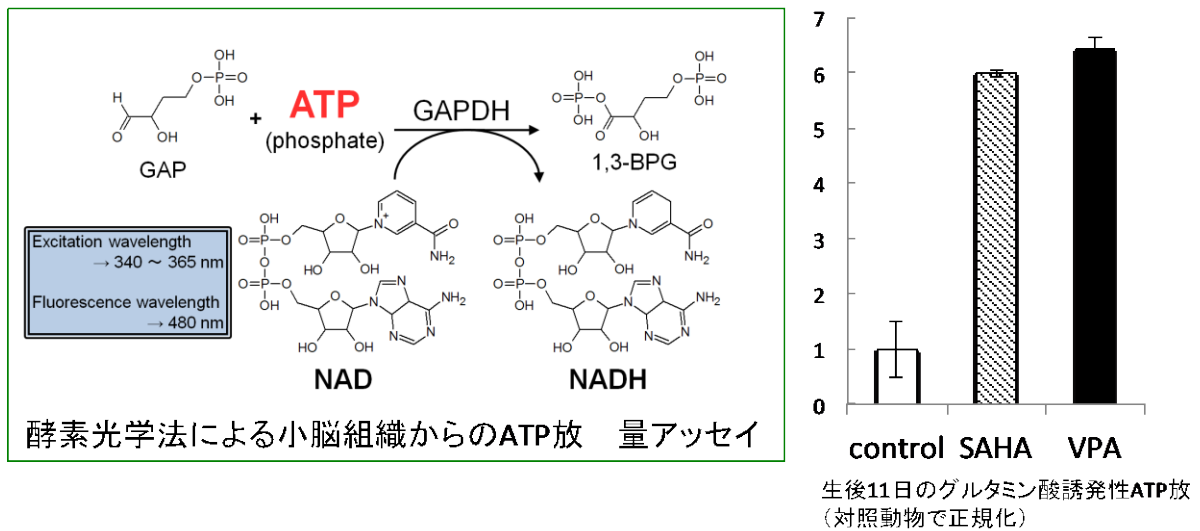


図5 生後11日のグルタミン酸誘発性ATP放出