

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

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

研究分担者

豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田 祥子

要旨

化学物質に対して感受性の高い発達期の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。医薬品のバルプロ酸に加え、各種のHDAC阻害剤、農薬、細菌毒素、環境内物質などについて、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。これら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、一群の化学物質の投与が、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、動物の行動変化を引き起こすことを定量的に示した。この中には発達期神経毒性が報告されていないものも含まれ、発達期の動物小脳を用いた試験によって、神経毒性の定量的な試験が可能であることを示した。これらの結果は、今後遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性試験とつながると期待される。

A. 研究目的

ヒトにおいて発達期神経毒性の懸念がある医薬品、農薬、生物毒素、環境内物質などの化学物質について、ラットへの胎生期曝露を行い、それらの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

運動に関係する臓器として小脳を研究試料に用いた。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のバルプロ酸(VPA、経口)、VPAと同様にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるトリコスタチン(TSA、1 mg/kg、経口)、農薬クロルピリホス(CPF、10mg/kg、経口)、細菌毒素のリポポリサッカライド(LPS、100μg/kg、腹腔内)、環境毒性物質のグリホサート(Gly、250mg/kg、経口)、および毒性対照物質のサリドマイド(THA、500mg/kg、経口)をそれぞれ投与した。

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 28k 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。また神経炎症と相関の高いミクログリアを可視化するため抗Iba1抗体染色を行なった。いくつかの試料は、出生1週間で灌流固定し分化誘導因子の発現を観察した。

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深さの比を計算し、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。また各投与動物の成熟期(生後6週から8週)で、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、CPF投与動物でも観察されたが、LPSおよびGly投与動物では観察されなかった。

VPA投与動物では、小脳虫部第一裂に過剰な

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倍のプルキンエ層を持つに至った。褶曲率の増加は、TSA、LPS投与動物でも観察されたが、CPF、THA、Glyでは観察されず、神経突起伸展異常と一部異なる傾向を示した（結果1）。

プルキンエ細胞死と脳内マクロファージ細胞であるミクログリアの活性化には強い相関が見られた。VPA投与動物ではプルキンエ細胞の生存数が多く、これはTSA、THAでも同様だった。これらの組織ではミクログリアがあまり活性化されなかった。一方、炎症を模倣する系としてLPSを投与した動物ではプルキンエ細胞死とミクログリアの活性化が見られ、神経細胞死の進行が発達異常となることが伺われた。この現象はGlyでも見られ、一部の投与動物は運動障害を示した（結果2）。

発達期の変化が出生後の早い時期から出現しているのではないかと考え、VPA投与動物における生後1週間の小脳での分化誘導因子ReelinとBDNFの発現を見た。VPA投与動物では生後早い段階で、小脳分子層にReelinが分布し、これが神経回路の異常を誘発することが示唆されたが、BDNF量には差異はなく、これを介さないメカニズムが示唆された（結果3）。

行動観察の結果、VPA投与動物では、新規環境でも警戒が少なく、過活動の傾向を示した（結果4）。これはTSAでも同様であり、HDAC阻害剤の影響が伺われた。一方CPF投与動物では新規環境に警戒が強く、緊張状態を示した。VPAとCPFで、動物の行動が興奮（VPA）と緊張（CPF）に大きく分かれ、これが小脳組織の変化の差と相関することを伺わせた（結果5）。

神経回路が成熟してくる生後21日のVPA動物の伝達物質放出を光学測定で観察した結果、AMPA刺激で誘発されるグルタミン酸放出が、対照動物では周辺の細胞を連続的に刺激するのに対し、VPA投与動物では単発的で広がり少なく、神経伝達物質の取り込みなどに変化が生じていることをうかがわせた（結果6）。

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事が確

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化が、神経回路レベル、行動レベルでの変化につながる事が考えられ、さらに検証する必要がある。

E. 結論

本研究において、遅発性神経毒性の懸念が想定される化学物質を胎生期の動物に投与し、小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化を定量化して示した。これにより化学物質の特性と神経異常との関係が明瞭になり、今後遺伝子レベル、たんぱく質レベルにおける発達期神経毒性の簡便なスクリーニング法などにつながる事が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] 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
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Nomura Y, Yoshida S. Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Scientific Reports* (2018) 8:12155

2. 学会発表

- [1] Yoshida S., Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Y. Sekino Y, Nomura Y, Kanda Y. The malformation of Purkinje cells becomes the sensing tool for developmental neurotoxicity; its potential and limitation. *EUROTOX 2018, oral session.* Brussel (2018)
- [2] Yoshida S., Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y. Microglia activation related to neuronal malformation in developing cerebellar cortex of drug-induced autistic model rat. *Keystone symposia: New Frontiers in Neuroinflammation.* Keystone (2018)
- [3] Tiong TKS, Nishikawa C, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Altered gut microbiota observed in valproate-administrated autistic model rats. 第97回日本生理学会大会

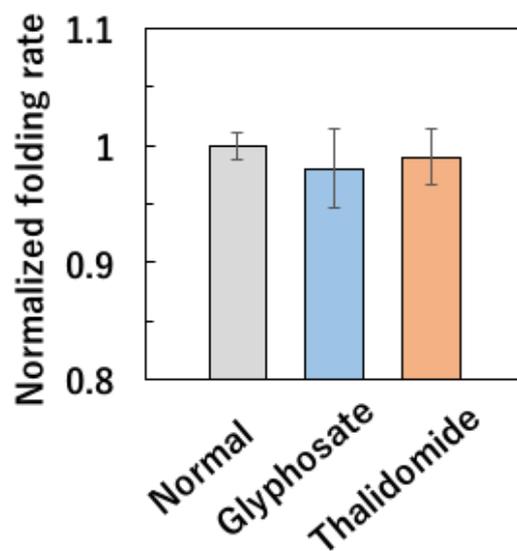
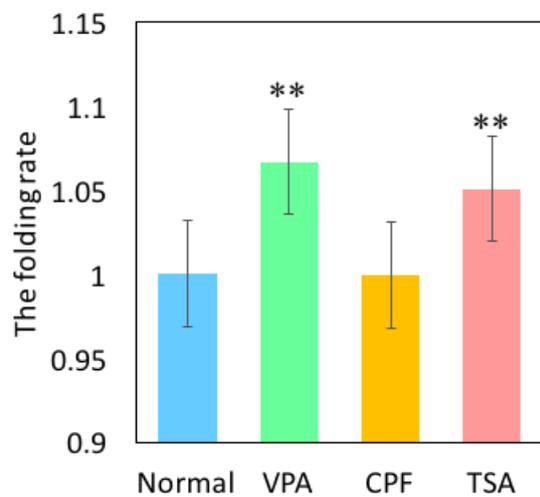
他 7 件

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許・特許出願

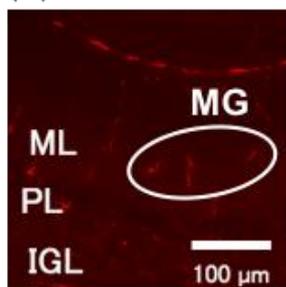
- [1] 吉田祥子, 穂積直裕, 氏家雅彦, 須山洋行, 光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム, 特許番号: 6295396
他 1 件

結果1 各化学物質による生後2週の小脳虫部の褶曲度の変化

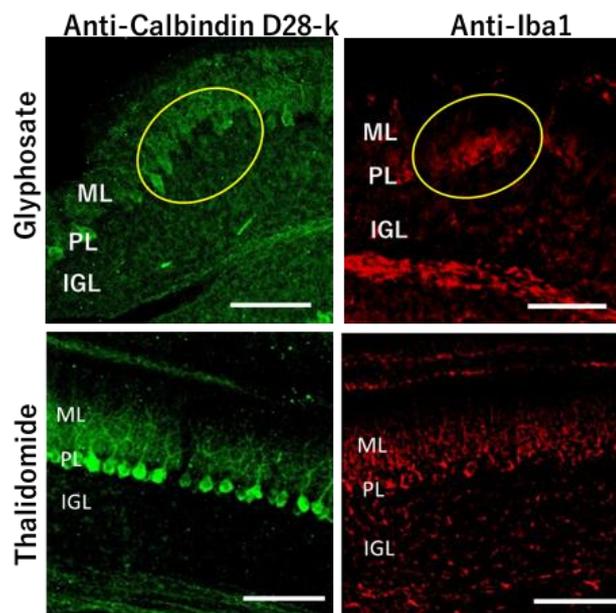
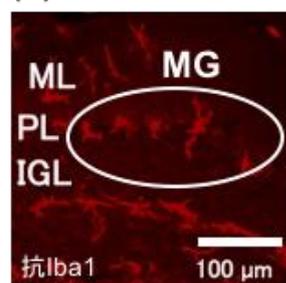


結果2 化学物質投与による生後2週の小脳皮質におけるミクログリアの変化

(a) Normal

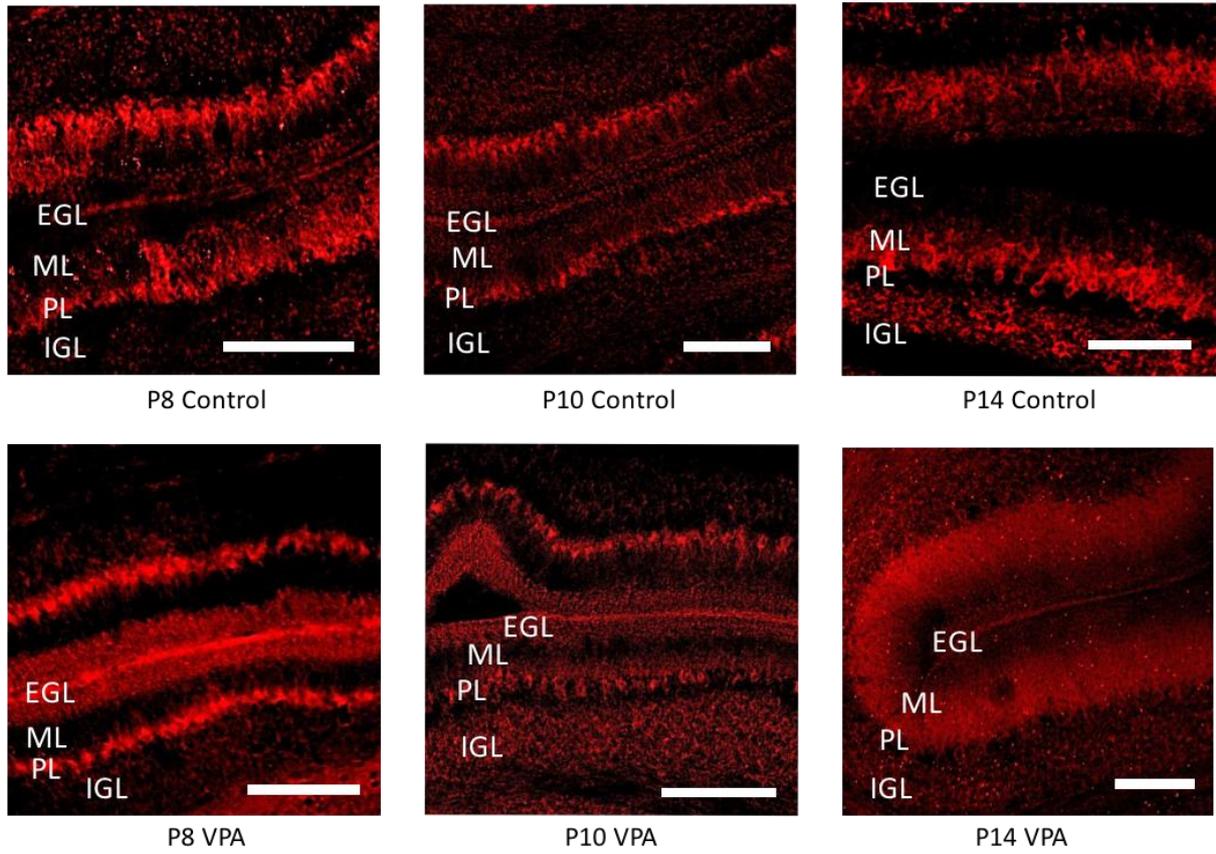


(c) LPS

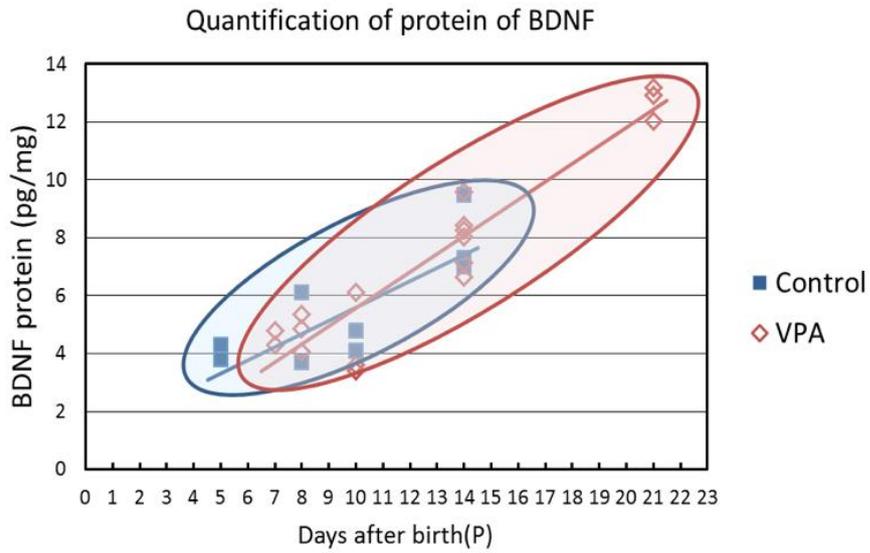


結果 3

4-1 小脳皮質における Reelin の発現

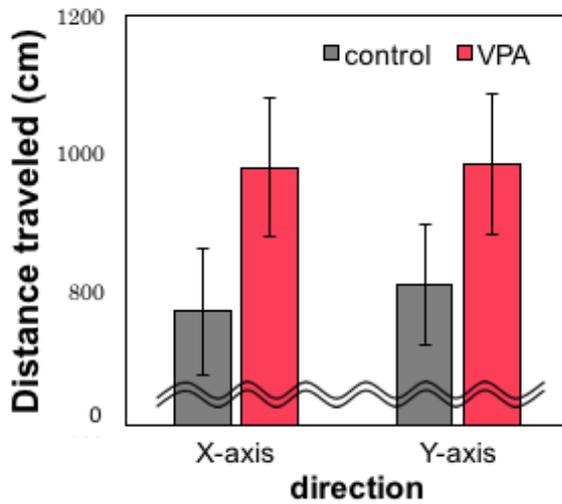


4-2 小脳皮質での BDNF の発現



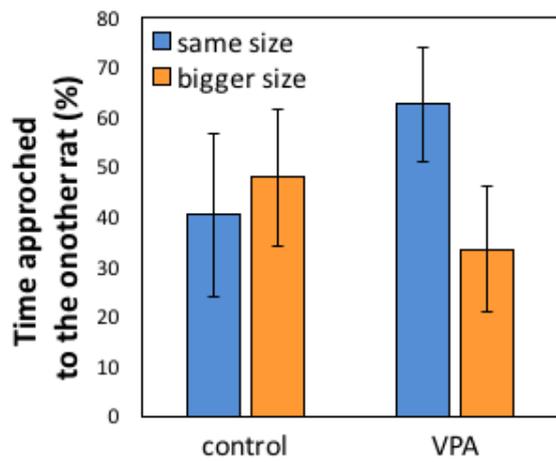
結果4 VPA投与動物の行動変化

4-1 個別行動

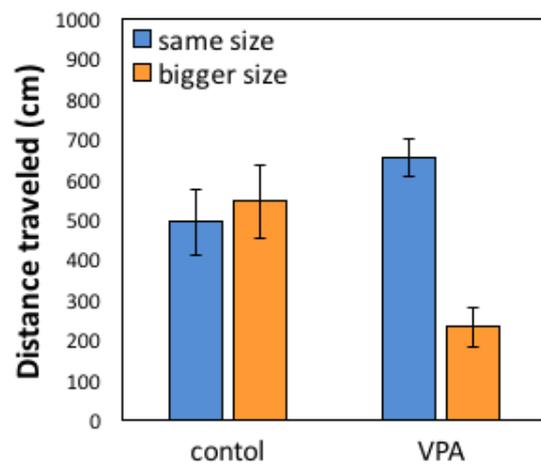


4-2 社会的行動

他ラットへの接近時間

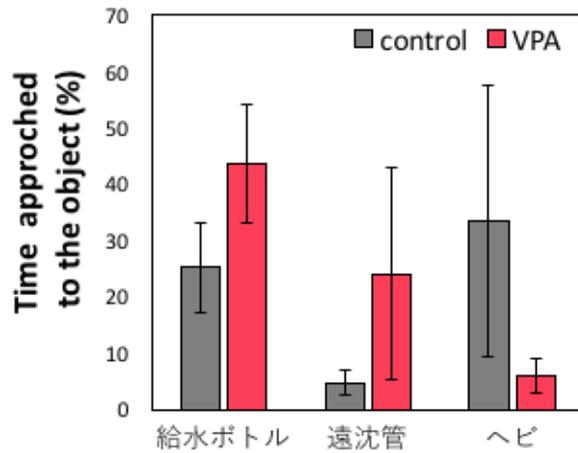


移動距離

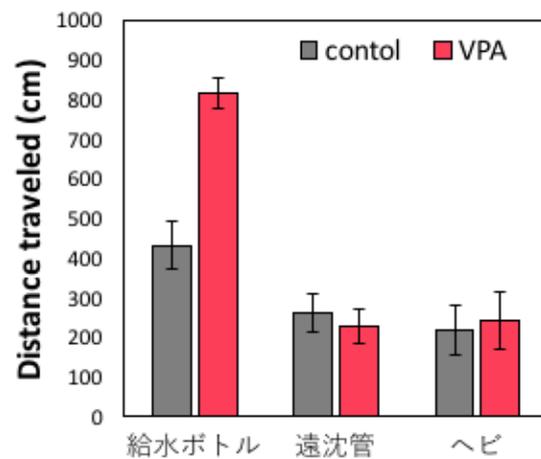


4-3 探索行動

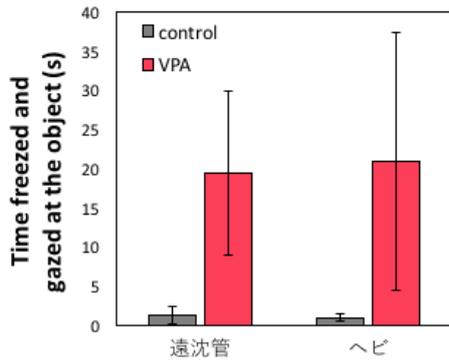
物体への接近時間



移動距離

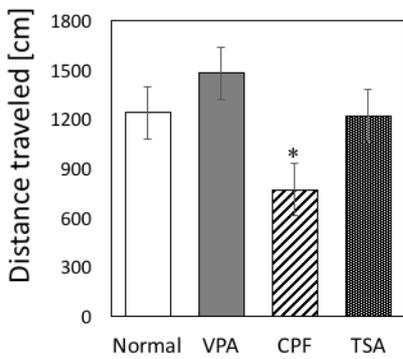


固まって新奇物体を凝視していた時間

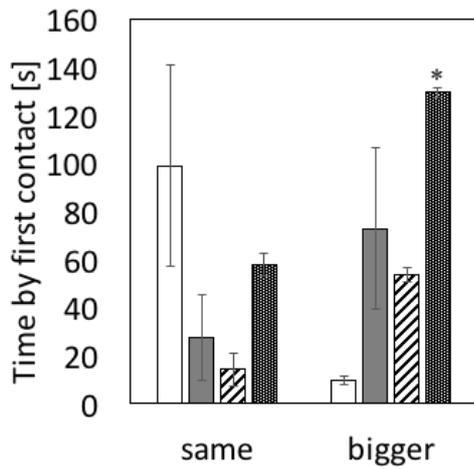


結果 5 他の化学物質投与の影響

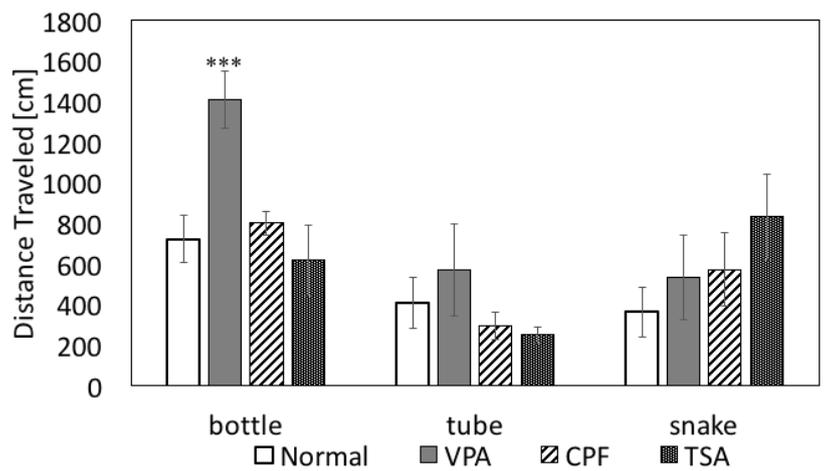
5-1 個別行動の移動距離



5-2 社会的行動

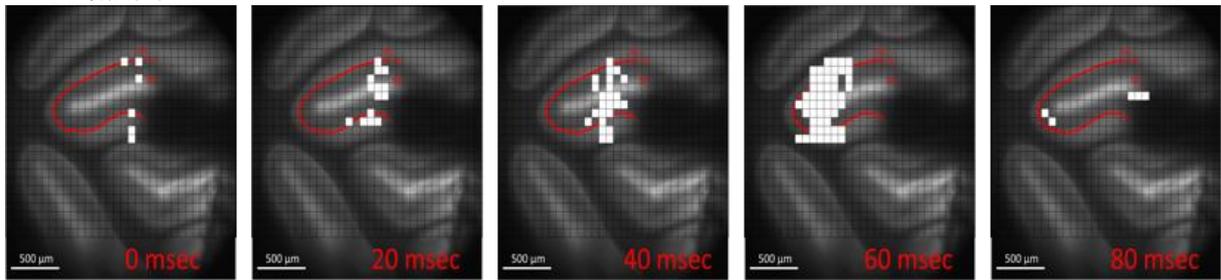


5-3 対物行動

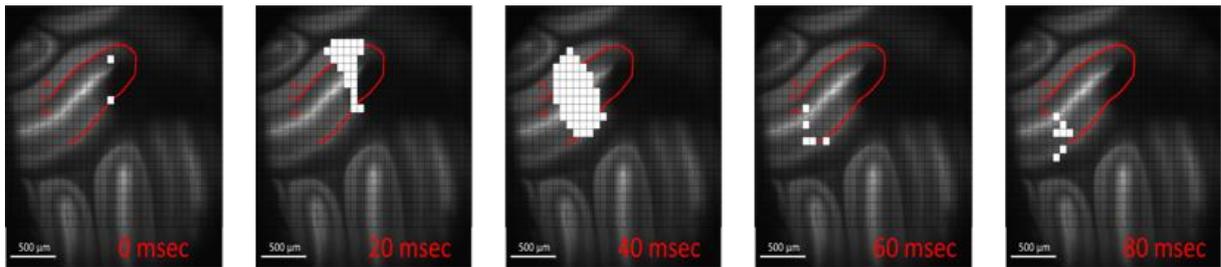


結果6 生後21日の小脳皮質におけるAMPA刺激(100mM)によるグルタミン酸放出の時間変化

6-1 対照動物



6-2 VPA投与動物



6-3 グルタミン酸放出の時間分布

