

若年者違法薬物使用防止の啓発活動のためのエビデンス収集

研究分担者：関野祐子 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授

研究協力者：筒井泉雄 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任研究員

間瀬省吾 東京大学大学院農学生命科学研究科 特定支援員

---

【研究要旨】

大麻や合成カンナビノイドなどの違法薬物の摂取は、未だ心身が発達段階の若年者に対して正常な脳機能発達をかく乱して記憶・認知・精神運動能力を変容させることから、薬物乱用防止は社会的に取り組むべき課題である。本研究課題では、違法薬物乱用防止の啓蒙活動のために、大麻の主な化合物成分であるテトラヒドロカンナビノイドの神経細胞に対する毒性がどのようなものであるか、またその毒性がなぜ若年者の心身の発達に有害であるかについて、専門家以外の人々に対して論理的に示すためのエビデンスを収集する。また、大麻の娯楽的利用を合法化した国においては妊娠中の大麻の使用率が急激に増加しており、胎児と乳児が慢性的にカンナビノイドに曝露されるリスクが高まったため、カンナビノイド曝露が脳発達にもたらしうる影響を研究するべきだとの警鐘が鳴らされている。我々は、脳の生後発達に対する合成カンナビノイドの作用を調べる目的で、ラット胎仔海馬凍結神経細胞を 96 ウェルプレートで培養する初代培養系を使って実験を行った。この実験系では、培養開始 7 日目から神経回路形成が始まり 21 日目には神経回路が完成することから、神経回路形成の実験モデルとなる。ラットの場合、生後 14 日に開眼し 21 日で離乳するので、培養神経細胞の実験結果は生体の脳発達に外挿できる。

培養 14 日目の海馬神経細胞に 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu\text{M}$  の合成カンナビノイド (CP55940)、溶媒コントロール (0.1% DMSO) をそれぞれ 6 ウェルずつ投与して 7 日間培養する。培養 21 日目に実験プレートの神経回路形成が完成していることを確認するための陽性コントロールの 100  $\mu\text{M}$  グルタミン酸を他の薬物が入っていない 6 ウェルに 10 分間投与した後に標本全体を固定して、神経細胞骨格である MAP2 とドレブリンの免疫細胞染色と DAPI による核染色をおこなった。3  $\mu\text{M}$  CP55940 の投与では神経細胞死は観察されなかったが、樹状突起スパインへのドレブリン集積に変化が生じていた。神経細胞死は 10  $\mu\text{M}$  CP55940 で観察された。CP55940 による神経細胞死の兆候が、神経細胞体の細胞骨格に対してどの濃度で発生するかを調べる目的で、解析ソフト CellPath Finder の Deep Learning 機能で、溶媒コントロール群からランダムに抽出した神経細胞体画像、10  $\mu\text{M}$  CP55940 投与群に特徴的に認められた細胞体画像、グルタミン酸投与群に特徴的に認められた細胞体画像を教師信号として学習させた後、各ウェルで撮像した全領域の神経細胞体を上記 3 群に分ける解析をおこなった。その結果、神経細胞体におけるドレブリン局在変化は 3  $\mu\text{M}$  CP55940 投与から始まることが分かった。神経細胞死はシナプス形成期に特有な有害反応であることから、妊娠中の大麻乱用は胎盤または母乳を介して子供の脳の発達に有害な影響をもたらすことを示している。

CP55940 で誘発される神経細胞死の前兆として、ドレブリンの分布変化は特徴的であり、グルタミン酸 10 分間投与で誘発されるドレブリン分布変化とは異なっていた。今後は MAP2 の局在変化について同様の解析を行うとともに、教師画像の選別を AI により行うなどして解析法を精緻化する。またドレブリンの局在変化については、今後樹状突起と樹状突起スパインについての解析を進める。

---

## A. 研究目的

大麻を医療用途だけでなく娯楽利用を合法化した国においては、つわりの苦痛を和らげるための妊娠中の大麻使用が増加しており、出生前に大麻に曝露された子供の脳発達に対する長期的影響を研究する必要性が高まっている<sup>1)</sup>。妊娠中の大麻使用は、出生時の低体重や頭囲の減少などに関係しており、さらに子供の自閉症スペクトラム障害の発症率が 1.5 倍であったという報告がある<sup>2)</sup>。その一方で、最新のコホート研究では、出産前の大麻曝露は 10 歳の神経心理学的検査スコアの悪化や 19 ~ 20 歳の自閉症特性とは関連しないとも報告されている<sup>3)</sup>。このように妊娠期の大麻使用が子供の脳発達障害をもたらすという強い証拠は未だ得られていない。しかし、カンナビノイドの長期使用者の脳には構造的な変化があることは報告されており、特に若年者では脳の一部で灰白質の欠損が生じるとの報告がある<sup>4)</sup>。最近のレビュー論文では、若年者におけるカンナビノイドへの曝露は将来的には統合失調症や依存症などの精神疾患に対しての脆弱性をもたらす可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。カンナビノイドの影響は脳発達の段階により異なる可能性が示唆されており<sup>4,5)</sup>、コホート研究では曝露の濃度や時期を厳密にグループ分けすることが困難であるため、一定の結論を出すには今後解析に十分な症例数を集めていく必要がある。従って、投与時期や期間を計画して実行できる基礎研究を進めることが非常に重要である。

脳における内因性カンナビノイドは生体の神経分化プログラムを調整しており、脳発達過程の様々なタイミングで必要なカンナビノイド受容体と内因性カンナビノイド(アナンダミド: 図 1A) が発現する。したがって、脳の発達期の途中で外因性カンナビノイド ( $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール: 図 1B, 合成カンナビノイド CP55940: 図 1C) が脳内に取り込まれると内因性カンナビノイドシステムが正確に働くことが

出来なくなるため、脳の正常な発達には阻害される<sup>6)</sup>。

我々は、合成カンナビノイド CP55940 の脳の生後発達に対する作用を調べる目的で、ラット胎仔海馬凍結神経細胞を 96 ウェルプレートで培養する初代培養系を使って実験を行った<sup>7)</sup>。この実験系では、培養開始 7 日目から神経回路形成が始まり 21 日目には神経回路が完成することから、神経回路形成の実験モデルとなる。またラットの場合、生後 14 日に開眼し動きまわることが出来るようになり、21 日で離乳するので、培養神経細胞においても生体内の脳発達とほぼ同様の過程が進んでいるとされている。

大麻に含まれるテトラヒドロカンナビノイド (THC) および THC と構造が類似している合成カンナビノイド CP55940 (図 1 B, 1C) はともに中枢神経細胞のカンナビノイド受容体の CB1 受容体と CB2 受容体に作用する。条件付け場所思考性試験法 (conditioned place preference paradigm; CPP 法) により評価したところ、CP55940 の報酬効果は THC よりも低用量で発現することから精神的依存性形成は CP55940 の方が強いとされる<sup>8)</sup>。我々はこれまでに、シナプス形成期においては 10  $\mu$ M CP55940 は神経細胞死をもたらすが、シナプス成熟後では神経細胞死が起こらないことを示してきた<sup>9)</sup>。本報告では、培養 14 日から CP55940 を 1 週間曝露した実験について、神経細胞死の兆候を神経細胞体の画像から検出する方法を考案した。10  $\mu$ M CP55940 投与群, グルタミン酸投与群, 溶媒コントロール群の神経細胞体のドレブリン染色画像を画像解析ソフトの Deep Learning 機能で学習させて、各ウェルの神経細胞体を 3 群に分ける解析をおこなった。

## B.研究方法

### ラット海馬神経細胞の初代培養

文献7に従って、ラット胎仔由来海馬凍結神経細胞 (SKY ニューロン; AlzMed, Tokyo) を解凍し PLL コートした 96 ウェルプレート

(Zeon 社非売品) に細胞数 1 万個/ウェルになるように播種し, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °Cにて培養を開始した。

### 化合物投与実験

CP55940 (0.1 ~ 10 μM) を, シナプス形成後期にあたる培養 14 日目から 21 日目まで 1 週間曝露する実験を行って撮像した。

### 免疫細胞化学染色と画像解析

免疫細胞化学染色は, ドレブリンの染色に抗ドレブリン抗体 (mouse monoclonal, M2F6, ハイブリドーマ培養上清), 樹状突起の微小管結合タンパク質である MAP2 の染色には抗 MAP2 抗体 (rabbit polyclonal, 1:2000) を用いた。4°Cで 24 時間反応させた後, 2 次抗体として Alexa Fluor 488 donkey anti-Mouse IgG (1:250) 及び Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG(1:250) で可視化した。核を染色するために, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI, 1:1000)を加えて, 細胞を 3 重に染色した。

画像取得は, 共焦点定量イメージサイトメーター (CellVoyager CQ1; 横河電機) の自動フォーカス機能(20×lens, numerical aperture 0.45)を使って, フォーカス面を決定し, 3 μm 間隔で z 方向に 3 枚の画像を撮影しプロジェクションマップを使って 1 視野の 1 枚の画像とした。神経細胞を培養したウェルについて中心部分の 16 視野を自動的に撮像した。ハイスループットで得られた大量の画像情報我々が独自に開発した解析プロトコル<sup>10)</sup>を参考にして, CQ1 の解析ソフト (CellPath finder; 横河電機) の解析アルゴリズムを構築した。アルゴリズムの開発は日本化学工業協会 LRI 委託研究課題 (第 8~10 期)

で開発したものをベースとして一部改良を行った。また本研究でのデータ取得の一部は日本化学工業協会 LRI 委託研究課題の研究助成金により行われた。

## C.研究結果

昨年度までの解析で, 10 μM CP55940 を培養 14 日後から 7 日間投与した場合には, 平均 73.1%

(n=5) まで神経細胞数が減少し, 培養 21 日目から 1 週間の投与では, 神経細胞数は平均 90.8%

(n=3) であり対照群の細胞数との有意差はなかったことを報告した<sup>9)</sup>。シナプス形成期の神経細胞は, 慢性的な 10 μM CP55940 曝露に対して脆弱であることが分かった。

3 μM CP55940 を培養 7 日目に投与して 14 日間培養した長期曝露では MAP2 陽性の樹状突起長が約 25%伸びて, ドレブリンクラスター数は約 33%増加することを昨年報告した。

図 2 には, 3 μM CP55940 を培養 14 日後に投与して 7 日後に固定染色した際のドレブリンクラスターの蛍光強度変化を示した。

図 2A はヒストグラム分布解析を示している。溶媒コントロールでドレブリンクラスターと認識された全クラスター (6 ウェルの全撮像画像) を蛍光強度ごとにヒストグラムを作成した (白抜きカラム: control)。

最頻度 (グラフ内青い下向き矢印) の蛍光強度以下を低蛍光強度 (低) とし, 最頻度の半分の頻度の蛍光強度以上を高蛍光強度 (高) として, 真ん中の範囲を中蛍光強度 (中) としてドレブリンクラスターを蛍光強度により低, 中, 高の 3 群に分けた。

3 μM CP55940 の存在下で培養 14 日から 7 日間培養した 6 ウェルの全撮像画像の全ドレブリンクラスターのヒストグラム (灰色カラム: 3 μM CP55940) を重ねたところ, 低蛍光強度と中蛍光強度のドレブリンクラスターが増えていることが分かった。

図 2 B では, 中蛍光強度のクラスターのみを可視化した画像を掲載した。図 2 B(a)には, 溶媒コントロールの培養神経細胞のドレブリンクラスターの

うち中蛍光強度のみを可視化した画像を掲載している。図 2 B(b)には、3  $\mu\text{M}$  CP55940 の存在下で培養 14 日から 7 日間培養すると中蛍光強度のドレブリンクラスターの増加したことがわかる。

10  $\mu\text{M}$  CP55940 を培養 14 日目に投与して 7 日間曝露すると神経細胞死が起こる(図 3A)が、培養 21 日目に投与して 7 日間培養した場合には神経細胞死は起こらなかった(図 3B)。10  $\mu\text{M}$  CP55940 を培養 14 日目に投与して 7 日間曝露した時に残存している神経細胞(図 3A(b))の画像を見ると、細胞死に至る種々の段階の細胞形態が認められた。そこで、10  $\mu\text{M}$  CP55940 によるシナプス形成期特異的な神経細胞死がどのような経過をたどって細胞死に至るのか、10  $\mu\text{M}$  CP55940 を培養 14 日目に投与して 7 日後に固定した標本から、残存した神経細胞の樹状突起の損傷状況を手掛かりとして細胞死までの経過を stage 1, Stage 2, Stage 3 として示した(図 4)。図 4A,B の Control は対照実験の溶媒コントロールの画像である。図 4A には、MAP2 とドレブリンの二重染色像を示しており、図 4B は同一画像のドレブリンの染色像のみを示した。図 4A の Control で見られるように、樹状突起の MAP2 の局在とドレブリン局在は特徴的であり、ドレブリンは樹状突起スパインに局在していることがわかる。図 4A の Stage 1 では樹状突起は残っていることが MAP2 染色との 2 重染色からわかるが、図 4B でドレブリンの分布を見ると Control の分布とは大きく異なっており、ドット状のクラスターではなく、樹状突起の幹で凝集した様子を呈しており細胞骨格変化が認められた。

図 5 はすでに報告書に掲載した図を再掲載したものである<sup>9)</sup>。図 5A は培養 21 日目の代表的な神経細胞である。図 5B は培養 7 日目に 10  $\mu\text{M}$  CP55940 を投与して 14 日間培養して残存した神経細胞の例である。図 5C と D は A,B に示した例について MAP2 陽性の神経突起の骨格をトレースしたものである。図 5E と F は A,B に示し

た例についてドレブリン陽性の樹状突起スパインを白丸でマークしたものである。5F 細胞体周辺部に矢印で示したような異常なドレブリン集積が観察されていた。また矢頭で示したように樹状突起にも異常なドレブリン集積のある通常よりも大きな樹状突起スパインが認められた。シナプス形成後期である培養 14 日目から 10  $\mu\text{M}$  CP55940 を投与して 7 日間培養した場合(図 4)と、シナプス形成前期である培養 7 日目から 10  $\mu\text{M}$  CP55940 を投与して 14 日間培養した場合(図 5)とでは、ドレブリンの分布に対する作用が異なることが示唆された。今後、詳細に検討する予定である。

図 6 は 10  $\mu\text{M}$  CP55940 による神経細胞死の兆候がどの濃度で発生するかを調べる目的で、解析ソフト CellPath Finder の Deep Learning 機能で、溶媒コントロール群からランダムに抽出した神経細胞体画像(A(a)), 10  $\mu\text{M}$  CP55940 投与群に特徴的とみられる細胞体画像(A(b)), グルタミン酸投与群に特徴的とみられる細胞体画像(A(c))を教師信号として学習させた後、各ウェルで撮像した全領域の神経細胞体を上記 3 群に分ける解析をおこなった。図 6B では、各濃度を投与したウェル毎に 3 群の特徴を持つ細胞体の割合をパイ表示で示した。図 6C では、n=6 のデータをすべて合計し全細胞数を 3 群に分けた比率を示した。トータルの細胞数はグラフ中に記載している。この解析により、3  $\mu\text{M}$  CP55940 投与群から 10  $\mu\text{M}$  CP55940 神経細胞体に認められた特徴的なドレブリン局在変化が始まることが分かった。

#### D.考察

今回の画像データ解析により、培養開始 14 日に CP559403 を投与した実験において、3  $\mu\text{M}$  CP55940 では神経細胞死は認められなかったが、10  $\mu\text{M}$  CP55940 では神経細胞死が認められた。10  $\mu\text{M}$  CP55940 投与で残存した神経細胞体のド

レブリン局在の特徴を解析ソフトの Deep Learning 機能を用いて学習させたところ、その特徴は 3  $\mu\text{M}$  CP55940 の投与で表れ始めていることが分かった。3  $\mu\text{M}$  CP55940 投与では樹状突起スパインにドレブリンが集積する結果が得られていることから、樹状突起スパインへのドレブリン集積が神経細胞死の前兆の変化である可能性が示唆された。

ドレブリンが集積した樹状突起スパインには PSD95 の過剰な集積<sup>11)</sup>が予想されることから、グルタミン酸受容体が集積している可能性がある。そのために興奮性シナプス機能異常を引き起こして神経細胞死が誘発されるカスケードが原因となっている可能性がある。

CP55940 で誘発される神経細胞死におけるドレブリンの分布変化は特徴的であり、グルタミン酸10分間投与で誘発されるドレブリン分布変化とは異なっていた。MAP2 の分布変化をドレブリンの分布変化と比較すると、群間の特徴抽出力は弱かった。神経細胞死が認められない濃度でも神経細胞体では細胞骨格の崩壊が始まることを示された。

Dhein<sup>4)</sup>によると、慢性的なカンナビノイド使用で血清中の成長因子のレベルが低下するという報告が複数ある。BDNF や NGF は神経活動依存的に神経細胞から放出される栄養因子であることから、培養神経細胞においても内因性で作用をしていると考えられる。これらの因子が不足することによる細胞死の可能性もある。

より低濃度では樹状突起スパインのドレブリン分布に影響があることが分かった。樹状突起スパイン内のドレブリン量はシナプス可塑性と密接にかかわっており、異常集積は可塑性を阻害すると考えられる。Martin ら<sup>12)</sup>は、オピオイドのアディクションにおいて、側坐核の神経細胞ではドレブリンが減少して樹状突起スパイン数が減ると報告している。この報告はドレブリンの分布の変化が薬物中毒の中枢神経毒性と関

与することを示している。薬物中毒と細胞骨格タンパク質との関係をまとめたレビュー<sup>13)</sup>が発表されており、今後は中毒性薬物とドレブリンの分布変化との関係を調べることは重要な研究課題となる。

## E. 結論

発達段階の培養海馬神経細胞を使ったハイスループットイメージングアッセイ法は、発達段階の神経細胞への影響を鋭敏に検出できることが示唆された。培養神経細胞がネットワーク形成を開始するところから合成カンナビノイドに神経細胞が曝露されると、時期特異的な神経細胞死が観察される。このことは若年期から大麻を使用した成人の脳の一部で灰白質の委縮が見られたという報告を説明する実験的根拠を示したことになる。また、近年問題となっている妊娠時の大麻使用が子供の脳の発達にもたらす影響に関してもリスクがあると考えられた。神経細胞死だけについてみた場合、高濃度でなければ問題ないと解釈される可能性があるが、実はそれよりも低濃度で起きている樹状突起スパインへのドレブリンの集積などの変化こそがシナプス可塑性を阻害して学習記憶障害につながる有害反応であると考えられた。

## F. 参考文献

1. Smith AM, Mioduszeowski O, Hatchard T, Byron-Alhassan A, Fall C, Fried PA. "Prenatal marijuana exposure impacts executive functioning into young adulthood: An fMRI study" *Neurotoxicol Teratol.* 58:53-59. 2016
2. Corsi DJ, Donelle J, Sucha E, Hawken S, Hsu H, El-Chaâr D, Bisnaire L, Fell D, Wen SW, Walker M. "Maternal cannabis use in pregnancy and child neurodevelopmental outcomes" *Nat Med.* 26; 1536-1540. (2020)

3. Isik OG, Guo L, Whitehouse AJO, Li G, Ing C. “Neurodevelopmental outcomes in children after prenatal marijuana exposure” , Paediatr Perinat Epidemiol. 37(6):536-546 (2023)
4. Dhein S. “Different Effects of Cannabis Abuse on Adolescent and Adult Brain”, Pharmacology 105; 609-617 (2020)
5. Peters KZ, Zlebnik NE, Cheer JF. “Cannabis exposure during adolescence: A uniquely sensitive period for neurobiological effects” Int Rev Neurobiol. 161: 95-120 (2022)
6. Keimpema E, Mackie K, Harkany T. “Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits” Trends Pharmacol Sci. 32(9):551-61 (2011)
7. Koganezawa N, Roppongi RT, Sekino Y, Tsutsui I, Higa A, Shirao T. “Easy and Reproducible Low-Density Primary Culture using Frozen Stock of Embryonic Hippocampal Neurons” J Vis Exp. Jan 27 (191), 2023
8. 船田 正彦, 富山 健一, 大麻成分の依存性と細胞毒性, YAKUGAKU ZASSHI, 140 巻 2 号, 205-214 (2020) Symposium Review
9. 厚生労働行政推進調査事業補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業) 20KC2001 (研究代表者 永沼章) 分担研究報告書: 関野祐子「若年者違法薬物使用防止の啓蒙活動のためのエビデンス収集」令和 2~4 年
10. Hanamura K, Koganezawa N, Kamiyama K, Tanaka N, Oka T, Yamamura M, Sekino Y, Shirao T. “High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons” J Pharmacol Toxicol Methods Sep-Oct : 99: 106607 (2019)
11. Mizui T, Takahashi H, Sekino Y, Shirao T. “Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions” **Mol Cell Neurosci.** 30(1):149-57. 2005
12. Martin JA, Werner CT, Mitra S, Zhong P, Wang ZJ, Gobira PH, Stewart AF, Zhang J, Erias K, Siemian JN, Hagarty D, Mueller LE, Neve RL, Li JX, Chandra R, Dietz KC, Lobo MK, Gancarz AM, Yan Z, Dietz DM. “A novel role for the actin-binding protein drebrin in regulating opiate addiction” Nat Commun. 10(1):4140 (2019)
13. Pandey S, Miller CA. “Targeting the cytoskeleton as a therapeutic approach to substance use disorders” Pharmacol Res. 202:107143. (2024)

## G. 研究発表

### 論文発表

なし

### 学会発表

1. 関野祐子, シナプスのアクチン細胞骨格は記憶を制御する 第 46 回日本神経科学大会ランチョンセミナー, 2023 年 8 月 1 日—4 日, 仙台
2. 関野祐子, 筒井泉雄, 白尾智明, 田邊思帆里, 樹状突起スパインからのドレブリン喪失による学習記憶障害の発現, 第 97 回日本薬理学会年会, 2023 年 12 月, 神戸

## H. 知的所有権の取得状況

なし

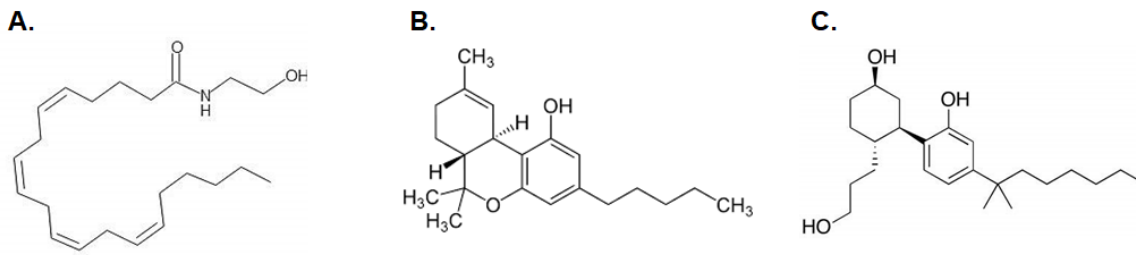


図1. 各種カンナビノイドの化学構造式

A:内因性カンナビノイドのアナンドアミド

B:大麻草由来のΔ9-テトラヒドロカンナビノール

C:合成カンナビノイド CP55940

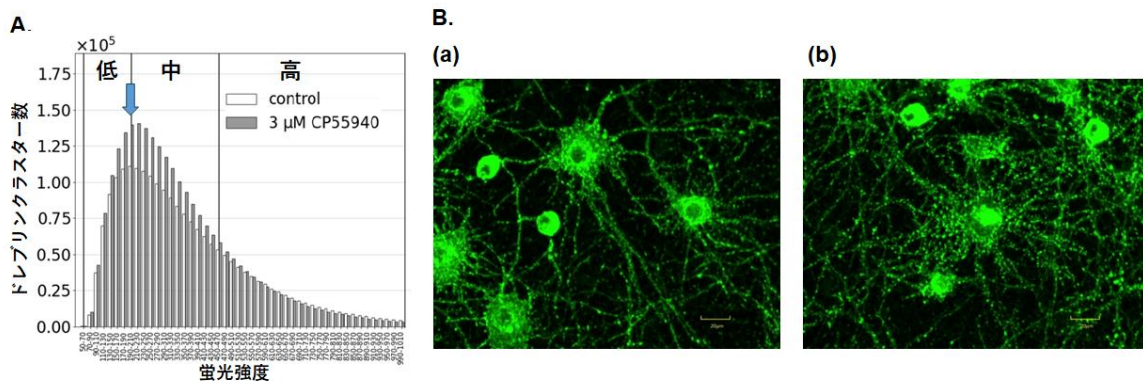


図2. 培養21日目のドレブリンの免疫細胞化学染色像

ドレブリンクラスター蛍光強度分布による解析

A: 溶媒コントロールでドレブリンクラスターと認識された全クラスター（6ウェルの全撮像画像）を蛍光強度ごとにヒストグラムを作成した（白抜きカラム：control）。最頻度（グラフ内青い下向き矢印）の蛍光強度以下を低蛍光強度（低）とし、最頻度の半分の頻度の蛍光強度以上を高蛍光強度（高）として、真ん中の範囲を中蛍光強度（中）としてドレブリンクラスターを蛍光強度から低、中、高の3群に分けた。3 μM CP55940 の存在下で培養14日から7日間培養した6ウェルの全撮像画像の全ドレブリンクラスターのヒストグラム（灰色カラム：3 μM CP55940）を重ねたところ、低蛍光強度と中蛍光強度のドレブリンクラスターが増えていることが分かった。

B(a)：溶媒コントロールの培養神経細胞のドレブリンクラスターのうち中蛍光強度のみを可視化した画像

B(b)：3 μM CP55940 の存在下で培養14日から7日間培養すると中蛍光強度のドレブリンクラスターの増加が認められた。

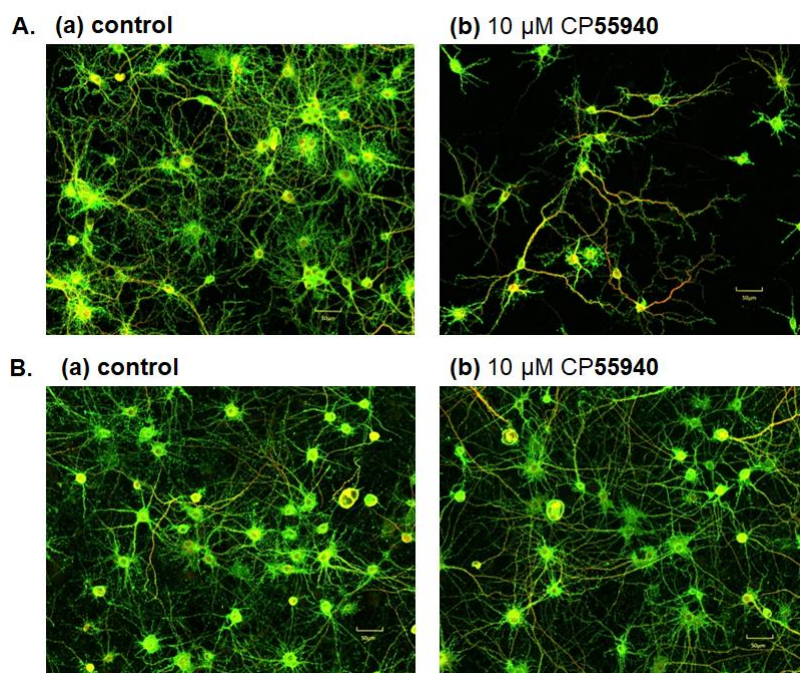


図 3. 10  $\mu\text{M}$  CP55940 によるシナプス形成期特異的神経細胞死

A: 培養開始 14 日目に 10  $\mu\text{M}$  CP55940 を投与して 7 日後に固定して免疫化学染色を行った実験結果の例を示した。(a) Control (溶媒 0.1% DMSO), (b) 10  $\mu\text{M}$  CP55940 の作用 : 神経細胞死により細胞数が減少している。残存した神経細胞は異常な突起形態を示している。

B: 培養開始 21 日目に 10  $\mu\text{M}$  CP55940 を投与して 7 日後に固定して免疫化学染色を行った実験結果の例を示した。(a) Control (溶媒 0.1% DMSO), (b) 10  $\mu\text{M}$  CP55940 の作用 : 神経細胞死は認められなかった。



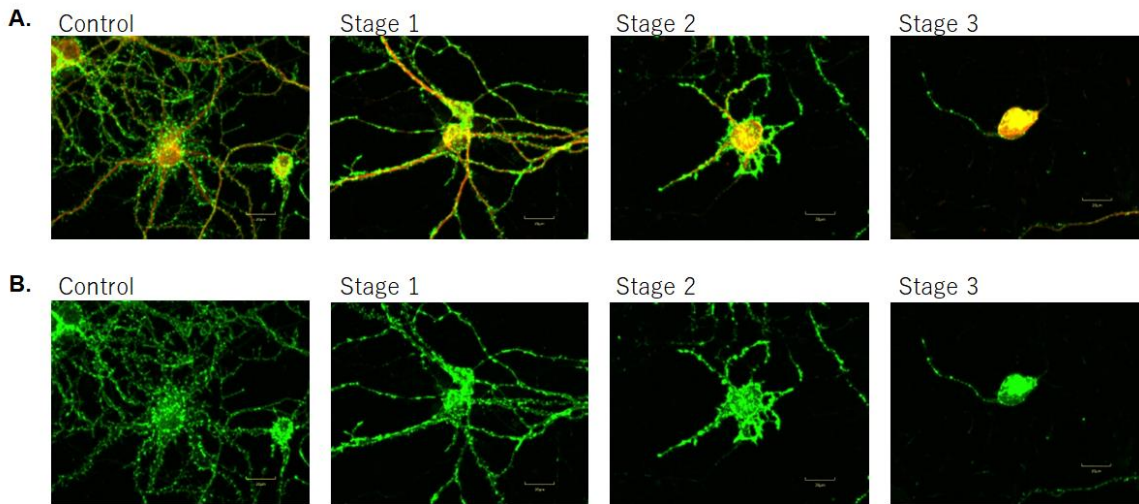


図 4. 10 mM CP55940 によるシナプス形成期特異的神経細胞死の経過

A: 抗 MAP2 抗体と抗 Drebrin 抗体による免疫細胞化学染色

Control は対照実験の溶媒コントロールの画像で, Stage 1, Stage 2, Stage 3 は 10 mM CP55940 を培養 14 日目に投与して 7 日後に固定した標本の神経細胞である。図 3A(b) の 1 撮影視野において Control に見られない種々の樹状突起長の神経細胞が見られることから, 樹状突起の残存レベルから細胞死までの経過を想定して典型的な形態を示す細胞の写真を示している。Control では樹状突起の MAP2 の染色像と Drebrin 染色像に特徴があり, Drebrin が樹状突起スパインに観察されている。

B: A と同視野の写真で Drebrin 分布変化を確認するために, Drebrin 染色のみを抽出した写真を掲載した。残存している樹状突起中で Drebrin が大きくクラスター状になっていることが分かる。

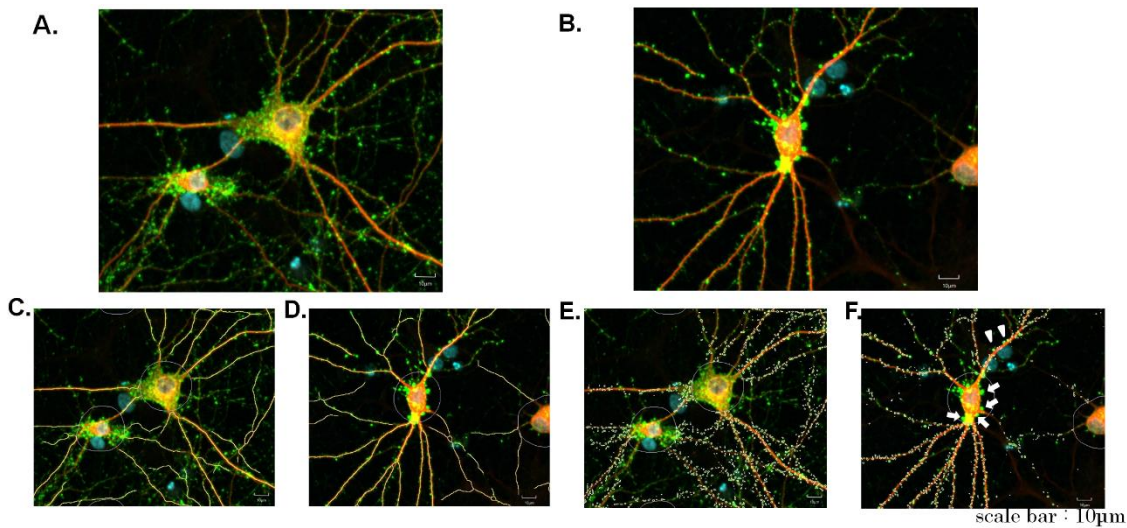


図5. シナプス発達前期(培養 7 日目から 2 週間)10 mM CP55940 に曝露した場合神経細胞の形態変化(令和 4 年度厚労科研費永沼班報告書<sup>9)</sup>より)

- A. 培養 21 日目の溶媒対照群の神経細胞
  - B. EXP\_D7\_2w で 10 mM CP55940 に曝露されて残存した神経細胞
  - C. A に示した神経細胞の MAP2 陽性神経突起の画像処理による骨格トレース
  - D. B に示した神経細胞の MAP2 陽性神経突起の画像処理による骨格トレース
  - E. A に示した神経細胞の Drebrin 陽性樹状突起スパインの画像処理によるトレース
  - F. B に示した神経細胞の Drebrin 陽性樹状突起スパインの画像処理によるトレース
- E と F を比較すると細胞体周辺部の異常な Drebrin 集積(矢印)と、樹状突起上にも Drebrin が異常に集積したスパイン(矢頭)が観察されていることがわかる。

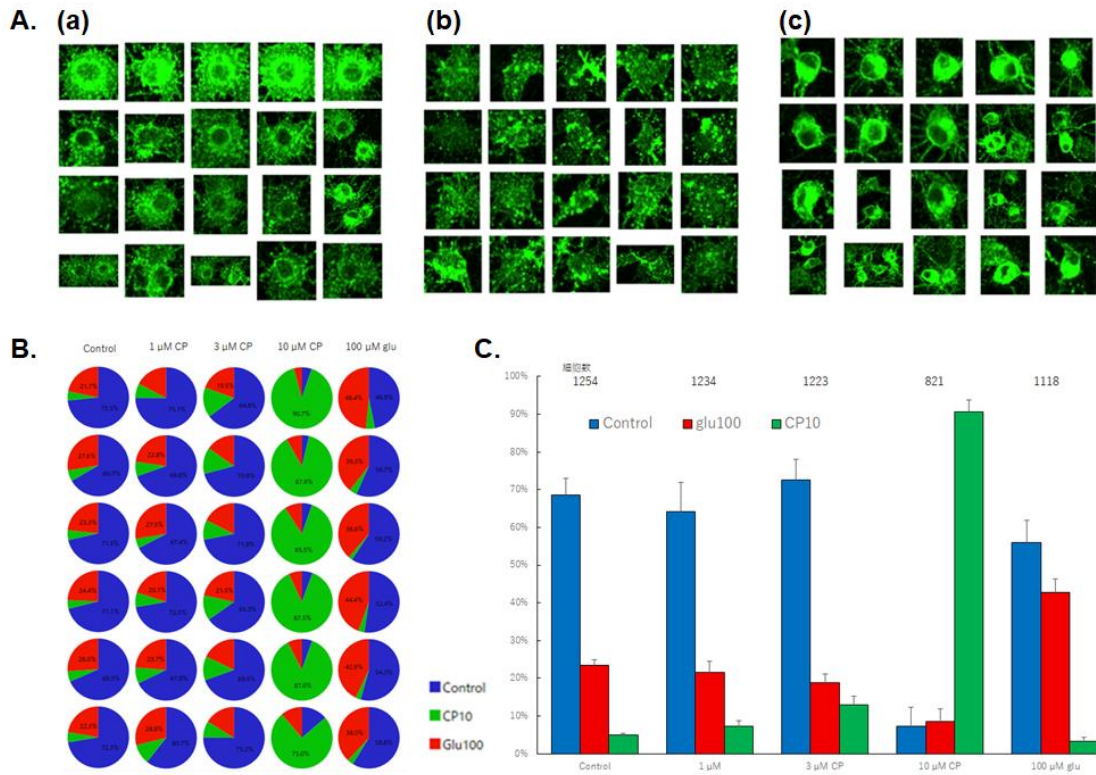


図 6. 培養 14 日目から 7 日間各濃度の CP55940 に曝露した神経細胞体のドレブリン分布変化

10 mM CP55940 による神経細胞死の兆候がどの濃度で発生するかを調べる目的で、解析ソフト CellPath Finder の Deep Learning 機能で、溶媒コントロール群からランダムに抽出した神経細胞体画像(A(a)), 10・M CP55940 投与群に特徴的な細胞体画像(A(b)), グルタミン酸投与群に特徴的に認められた細胞体画像(A(c))を教師信号として学習させた後、各ウェルで撮像した全領域の神経細胞体を上記 3 群に分ける解析をおこなった。B:各濃度を投与したウェル毎に 3 群の特徴を持つ細胞体の割合をパイ表示で示した。C:B のデータをすべて合計して、図示した。