

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791029

研究課題名（和文） 胎生期アルコール曝露による不安障害の機序を探る～不安発現と脳局所的5-HT動態～

研究課題名（英文） Etiological mechanisms of anxiety disorders induced by fetal alcohol exposure with special reference to fear condition and dynamics state of serotonin.

研究代表者

太田 健一（OHTA KENICHI）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50403720

研究成果の概要（和文）：

本研究では、胎生期のアルコール曝露による中枢神経系の発達異常が5-HT1A受容体アゴニストの投与によって回復することが認められた。また成熟後の曝露動物では恐怖状況下での内側前頭前皮質5-HT動態が通常と異なっていることが明らかとなった。これ等の結果は、胎生期アルコール曝露は脳発達に重要な役割を持つ5-HT神経系の機能低下、特に5-HT1A受容体を介した機能を低下させることで中枢神経系の発達異常を引き起こすこと、そしてこの機能異常は成熟後の不安様行動異常にも関与することを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

Previous study revealed that abnormalities of brain development induced by fetal alcohol exposure (FAE) were recovered by administration of serotonin 1A receptor agonist during period of brain development. In addition, we found disruption of dynamics state of serotonin under fearful state in mature FAE animals. These results suggest that FAE induces abnormalities of central nerves system via reduction of serotonergic function, mainly mediated by serotonin 1A receptor during period of brain development and prolonged abnormality of 5-HTergic function lead to anxiety-like behavior in mature FAE animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：発達神経学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：胎生期アルコール曝露、不安様行動、セロトニン、扁桃核、内側前頭前皮質、マイクロダイアリシス

## 1. 研究開始当初の背景

胎生期アルコール曝露は中枢神経系の発達障害を誘発し、それに伴う精神神経疾患を

引き起こすことが報告されている。既に我々は胎生期アルコール曝露が成熟後の不安様行動異常を引き起こすことを見出し、かつ曝露動物では中脳縫線核における上行性のセ

ロトニン(5-HT)神経細胞の減少が認められ、これは成熟後も持続する恒久的な障害あることを報告した。5-HT神経系は、脳発達に重要な役割を持ち、発達期における5-HT受容体の一過性の機能低下は神経回路網形成や成熟後の不安様行動の異常を引き起こすことが過去の研究において報告されている。更に成熟後の扁桃体や内側前頭前皮質に投射する5-HT神経系は不安・恐怖発現に密接に関与している。我々の研究も含め胎生期アルコール曝露に関する研究では、このような5-HT神経系の異常が認められているものの、この異常がどのような機序で中枢神経系の発達障害を引き起こしているのか、あるいは成熟後にどのような機序で不安様行動異常を引き起こしているのかの詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

我々は、上記のような背景の中で胎生期アルコール曝露動物における発達期及び成熟後の5-HT神経系の異常が及ぼす影響に着目した。まず脳発達期5-HT受容体、特に発達期の発現が成熟後の不安様行動に関与することが示唆されている5-HT<sub>1A</sub>受容体発現を中心に解析し、発達期5-HT神経系の異常が曝露動物の神経回路網形成に及ぼす影響の解明を目指した。加えて曝露動物の恐怖状況下での脳内5-HT動態を解析することで、成熟後の不安様行動異常を引き起こされる機序の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物の作製

Sprague-Dawleyラットに妊娠10~20日の間2.5~5.0%エタノール含有液体飼料を与え、その仔を各解析に用いた(Et群)。また対照群には、同期間にエタノールを等カロリーのショ糖で置換した液体飼料を与えた母獣の仔(Pf群)を用いた。各解析にはすべて雄を用いた。本研究は徳島及び香川大学動物実験委員会の承認を得て、同大学動物実験規則を遵守して遂行された。

### (2) RT-PCRによる脳発達期5-HT受容体発現解析

胎生20日齢で各群の脳を採取し、ホモジナイズ後、ISOGEN IIを用いてtotal RNAを抽出した。吸光度計で濃度と純度を測定した後、gDNA処理及びcDNA合成を行い、各5-HT受容体(5-HT<sub>1A</sub>, 2A, 2C受容体)に特異的なプライマーを用いてThermal cyclerにてmRNA発現解析を行った。各遺伝子の発現量はhousekeeping geneであるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Gapdh)にて補正し比較し

た。

### (3) 胎生期エタノール曝露に対する5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト投与

#### ①5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト投与

Fig.1のような日程で5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニストであるipsapironeを腹腔内投与した(3mg/kg/day)。対照群には同時期に生理食塩水を投与した。

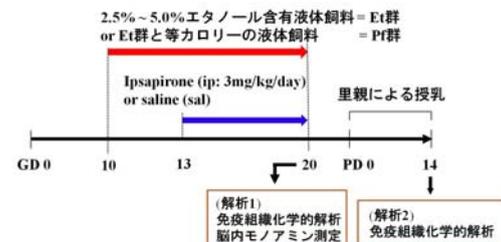


Fig.1 アルコール曝露及び ipsapirone 投与スケジュール

GD: Gestational day, PD: Postnatal day

#### ② 胎生20日齢での解析

##### 【免疫組織学的解析】

胎生20日齢で各群をブアン固定液により灌流固定し、脳を取り出してパラフィン切片にした。背側及び正中縫線核のレベルで冠状断して5 $\mu$ m厚の切片を作製し、50 $\mu$ mごと計5か所で5-HT合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素(TPH)に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、各縫線核のTPH陽性細胞数、すなわち5-HT神経細胞数を計測し比較した。

##### 【高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による脳内モノアミン量の解析】

胎生20日齢で各群を断頭して脳を取り出し、除蛋白処理を行った後サンプルを作製した。各サンプルを分離カラム(SC-50DS)で分離し、電気化学検出器(HTEC-500)にてノルエピネフリン(NE)、ドーパミン(DA)、5-HT及びそれらの代謝産物を検出・測定した。各モノアミンの代謝効率率は代謝産物/モノアミンで計算し評価した。

#### ③ 生後14日齢での解析

##### 【免疫組織学的解析】

生後14日齢で各群をブアン固定液により灌流固定し、脳を取り出してパラフィン切片にした。胎生20日齢の時と同様の方法で背側及び正中縫線核の5-HT神経細胞数を計測し比較した。更に内側前頭前皮質、大脳皮質感覚野及び扁桃体基底外側核における神経回路網形成を評価するため抗microtubule-associated protein 2(MAP-2)抗体を用いて樹状突起を染色し、Scion Imageを用いてoptical densityを

測定して樹状突起形成を評価した。

#### (4) マイクロダイアリスによる不安様行動試験中の5-HT動態解析

深麻酔下で脳定位置にラット頭部を固定し、ガイドカニューレを内側前頭前皮質に挿入した。先端位置はbregmaを基点としてanteroposterior:3.0mm、lateral:0.5 mm、dorsoventral:-3.0mmとした。ガイドカニューレにダミーカニューレを挿入した後、その周辺の頭蓋骨にアンカービスを挿入して歯科用セメントで覆い固定した。手術から一日後にジエチルエーテル麻酔下で迅速にダミーカニューレと透析用プローブを交換し、安定のため2時間置いた後に透析液の回収を開始した。透析試料の回収は、マイクロポンプを用いて毎分2 $\mu$ Lで移動相を流し、プローブからの透析液をフラクションコレクターを用いて10分おきにポリプロピレンチューブに回収した(透析液回収量は20 $\mu$ L/10min)。恐怖状況下でも5-HT動態を測定するために、試料回収開始から60分後にラットを高さ60cm、直径30cmの透明なシリンダー上に30分間置いた後、元のケージに戻した(この試験はオープンプラットフォーム試験と呼ばれ、既にこの試験時にEt群は過剰な不安様行動がみられる事を確認済)。恐怖曝露後の5-HT動態も解析するために透析液の回収は開始から160分間行われた。回収したサンプルは、分離カラム(PP-ODS)で分離した後、電気化学検出器(HEC-500)にて5-HT量を検出・測定した。各時間のデータはbaseline(0-60分までの各5-HT量の平均値)に対する百分率で示した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎生期5-HT受容体発現への影響

Et曝露群では胎生20日齢における5-HT<sub>1A</sub>、2A、2C受容体発現すべてに有意な減少が認められ、これらを介した5-HT機能の低下が示唆された(Fig. 2)。

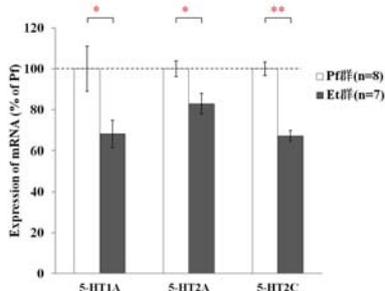


Fig. 2 胎生20日齢の脳内5-HT受容体発現  
Mean  $\pm$  SE, \*,\*\*p < 0.05, 0.01.

#### (2) 5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト投与による胎生期エタノール曝露影響の回復効果

胎生期エタノール曝露動物への5-HT<sub>1A</sub>受

容体アゴニストの投与は、胎生20日齢に見られるEt群の5-HT及び代謝産物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)量の減少には影響しなかったが、中脳縫線核における5-HT神経細胞の減少を回復させた(Fig. 3-6)。またその影響は一過性ではなく生後14日齢まで続くものであった(Fig. 7-8)。更に、Et群では大脳皮質感覚野と扁桃体基底外側核でMAP-2陽性線維の減少が認められたが、この減少もまた5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト投与によって回復していた(Fig. 9-10)。これらの結果から胎生期のエタノール曝露による中脳縫線核5-HT神経細胞数の恒久的な減少や大脳皮質感覚野や扁桃体基底外側核等の5-HT神経投射域における樹状突起形成の減少は、アルコール曝露による胎生期の5-HT<sub>1A</sub>受容体を介した5-HT機能の低下に起因していることが示唆された。

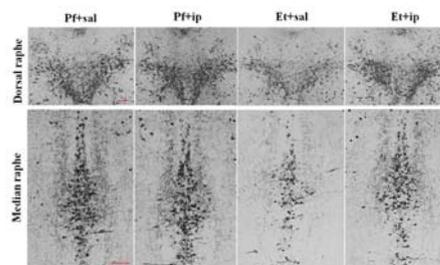


Fig. 3 胎生20日齢の中脳縫線核TPH陽性細胞  
Dorsal raphe nucleus: 背側縫線核, Median raphe nucleus: 正中縫線核, Ip: ipsapirone, Sal: saline. Scale bar = 100 $\mu$ m.

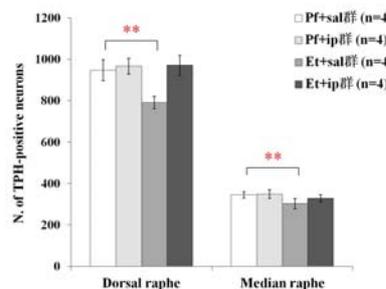


Fig. 4 胎生20日齢の中脳縫線核TPH陽性細胞数比較  
Dorsal raphe nucleus: 背側縫線核, Median raphe nucleus: 正中縫線核, Ip: ipsapirone, Sal: saline. Mean  $\pm$  SE, \*\*p < 0.01.

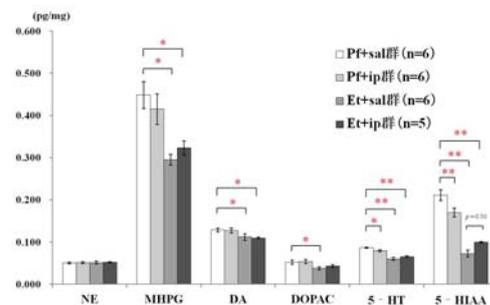
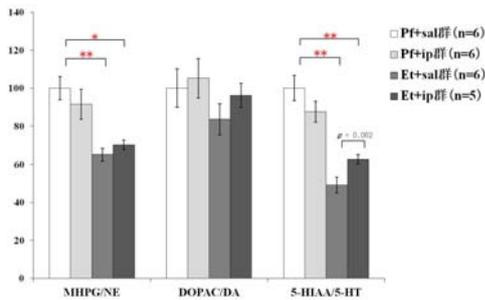
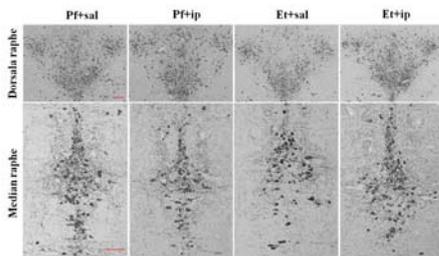


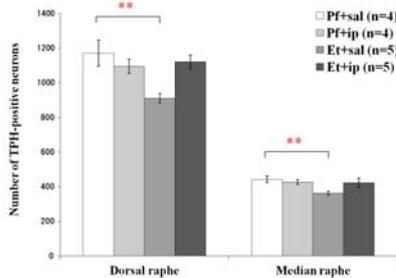
Fig. 5 胎生20日齢の脳内モノアミン及び代謝産物量  
NE: Norepinephrine, MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol, DA: Dopamine, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-HT: serotonin, 5-HIAA: 5-Hydroxyindoleacetic acid, Ip: psapirone, Sal: saline. Mean  $\pm$  SE, \*,\*\*p < 0.05, 0.01.



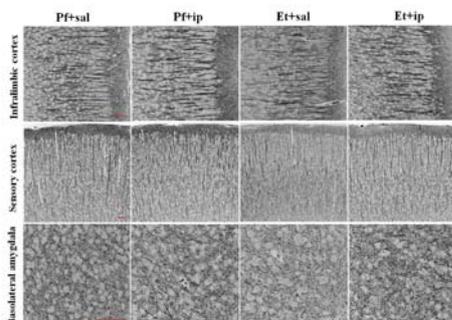
**Fig. 6** 胎生 20 日齢の各モノアミンの代謝効率  
NE: Norepinephrine, MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol, DA: Dopamine, DOPAC: 3,4- dihydroxyphenylacetic acid, 5-HT: serotonin, 5-HIAA: 5-Hydroxyindoleacetic acid, Ip: ipsapirone, Sal: saline. Mean  $\pm$  SE, \*, \*\*p < 0.05, 0.01.



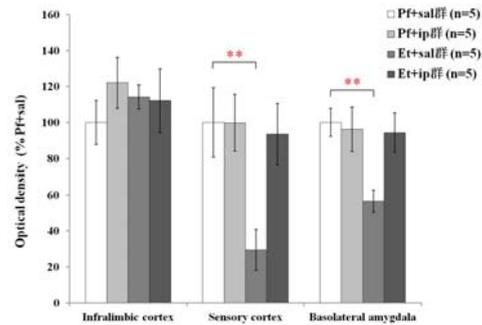
**Fig. 7** 生後 14 日齢の TPH 陽性細胞  
Dorsal raphe nucleus: 背側縫線核, Median raphe nucleus: 正中縫線核, Ip: ipsapirone, Sal: saline. Scale bar = 100 $\mu$ m.



**Fig. 8** 生後 14 日齢の中脳縫線核 TPH 陽性細胞数比較  
Dorsal raphe nucleus: 背側縫線核, Median raphe nucleus: 正中縫線核, Ip: ipsapirone, Sal: saline. Mean  $\pm$  SE, \*\*p < 0.01.



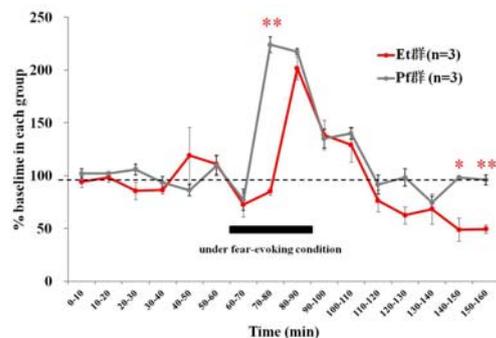
**Fig. 9** 生後 14 日齢での各領域の MAP-2 陽性線維  
Ip: ipsapirone, Sal: saline. Scale bar = 100 $\mu$ m.



**Fig. 10** 生後 14 日齢での各領域の MAP-2 陽性線維  
Ip: ipsapirone, Sal: saline. \*, \*\*p < 0.01.

### (3) 恐怖条件下における内側前頭前皮質 5-HT 動態の変化

Pf 群は、恐怖条件下におかれるとシナプス間隙における 5-HT 量が急激に増加し、通常ケージに戻すと速やかに通常状態に戻ることが認められた。それに対して Et 群では、恐怖条件下における 5-HT 量増加は認められるが Pf 群より遅延しており、更に通常ケージに戻した後の 5-HT 量は Pf 群よりも有意に減少していた (Fig. 11)。Baseline は同程度 (Pf 群 : 0.312pg, Et 群 : 0.306pg) であったことから、Et 群は恐怖下における 5-HT 神経系の反応が通常とは異なっていると考えられ、これが過剰な不安行動の原因となっている可能性が示唆された。



**Fig. 11** 不安状況下での内側前頭前皮質 5-HT 動態  
各群の 0-60 分までの平均値を baseline (100%) とした 10 分間隔での 5-HT 動態。恐怖曝露は 60-90 分に施行し、それ以外の時間は通常ケージに戻して行った。Mean  $\pm$  SE, \*, \*\*p < 0.05, 0.01.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Ohta K, Sakata-Haga H, Fukui Y. Influence of maternal ethanol intake on the expression of conditioned and unconditioned fear in rat offspring. Cong anom. 2010;50(4), P-62. 査読無

② Kanai T, Sakata-Haga H, Ohta K, Fukui

Y. Can ipsapirone, a serotonin 1A receptor agonist, mitigate a developmental defect of the serotonergic system caused by prenatal exposure to ethanol? Cong anom. 2011, 51(4), P-8. 査読無

〔学会発表〕（計 3 件）

①太田健一、坂田ひろみ、福井義浩：  
Conditioned fear 及び unconditioned fear  
の発現への胎生期エタノール曝露の影響。  
第 50 回日本先天異常学会学術集会，2010 年  
7 月 8 日（兵庫）

②太田健一、金井友宏、坂田ひろみ、福井義  
浩：胎生期エタノール曝露による 5-HT 神経  
系異常への 5-HT<sub>1A</sub>受容体agonistの効果。日  
本解剖学会第 62 回中国・四国支部学術集会，  
2010 年 10 月 10 日（広島）

③金井友宏、坂田ひろみ、太田健一、福井義  
浩：セロトニン 1A 受容体作動薬はエタノール  
によるセロトニン神経系発達障害を防  
ぐことができるか？第 51 回日本先天異常学  
会学術集会，2011 年 7 月 22 日（東京）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 健一 (OHTA KENICHI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50403720