

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860909

研究課題名(和文)胎生期母体投与薬剤による、成長後の神経心理学的発達特性とその機序の解明

研究課題名(英文)Examination of neuropsychological developmental characteristics and mechanism of juvenile mice administered with drug at fetal stage

研究代表者

澤井 ちひろ (SAWAI, Chihiro)

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：30599824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経発達障害の成因を探索するため、ヒト妊娠中に汎用される薬剤を用いて、産仔の神経心理学的な発達特性と免疫組織学的検討を行った。母体マウスに子宮収縮抑制剤(2刺激薬)リトドリンと抗うつ剤を投与し、産仔にオープンフィールド試験、強制水泳試験を施行した。摘出脳の前頭前野と海馬中心に、脳由来神経栄養因子とミクログリアの免疫染色を行った。子宮収縮抑制剤投与群では、行動試験にて不安の高さを示唆し、胎生期の母体薬剤投与が産仔若齢期の行動に影響する可能性を示唆した。形態学的には、大脳皮質の層構造異常や限局的な萎縮は明らかではなく、ミクログリアの局所定量分析では、有意な変化は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the cause of neurodevelopmental disorder, neuropsychological developmental characteristics and immunohistological examination were carried out on juvenile mice, by using drugs at fetal period commonly prescribed for human pregnancy. Suppressant of uterine contraction (2 agonist) ritodrine and antidepressant were oral administered in maternal mouse. Open field test and forced swimming test were performed on juvenile mice, and then the brains were removed. Brain derived neurotrophic factor and microglia immunostaining were performed in the prefrontal cortex and hippocampus. In the group treated with ritodrine, behavioral tests suggested a high level of anxiety. Administration of maternal drugs in fetal period may affect behavior during juvenile age. Morphologically, abnormal layer structure of the cerebral cortex and focal atrophy were not clear, and significant changes could not be confirmed by local quantitative analysis of microglia.

研究分野：小児科学

キーワード：神経発達障害 DOHaD仮説 マウス リトドリン塩酸塩 発生神経毒性試験 行動解析 ミクログリア解析 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の神経発達障害は、遺伝性素因とともに母体の子宮内環境が発症に関与すると近年指摘されている (DOHaD 仮説)。脳の発生期から発達期の化学物質暴露は、脳の神経回路に不可逆的な構築異常をもたらす可能性がある。妊娠期の医薬品投与については、動物モデルにて催奇形性試験が実施され、厳密な安全性試験の実施及び審査を経て、市販されているが、出生後の脳神経系の発達や行動異常については、ほとんど検討されていないのが現状である。

(2) 子宮収縮抑制剤は、子宮平滑筋選択的アドレナリン 2 作動薬で、切迫早産の第一選択薬である。出生児の神経発達への影響は報告されていないが、同様の子宮収縮抑制および気管支拡張作用をもつ 2 作動薬テルブタリンの幼若期ラットへの投与にて、小脳形成異常や海馬低形成、神経炎症所見など自閉症剖検脳との共通点がみられたという報告がある (Rhodes 2004, Zerrate 2007)。

抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害薬は、成体マウスへの投与にて海馬や前頭葉の神経細胞の幼若化 (Kobayashi K et al. 2010, Ohira and Miyakawa. 2013) が報告されるが、胎生期投与に関しては未解明である。

2. 研究の目的

(1) 実験の構想

報告者はこれまで、胎生期母体投与薬剤による幼若期への神経心理学的影響への疑問を持ち、小児科診療を通して周産期診療情報検討と新生児フォローアップ調査を続けてきた。しかしながら疫学調査では、遺伝性素因など交絡要因の排除に限界があった。そのため、動物実験 (発生神経毒性試験) による行動解析や神経病理学的検索に着眼した。

(2) 本研究の目的

妊娠中に汎用される上記薬剤を母体モデル動物へ投与し、産仔の神経心理学的な発達特性と脳内生理の解明を目的とする。以下の三段階で進めることとする。

- 胎生期母体薬剤投与モデル動物の作成
- 行動解析
- 神経病理学的検索

3. 研究の方法

(1) 胎生期母体薬剤投与モデル動物の作成
雌雄マウスを交配し、妊娠マウスを作成する。薬剤投与法および至適投与量の設定を行う。

予備試験：投与法は、皮下注射もしくは強制経口投与 (ゾンデ法) を選択する。投与量設定は、無毒性量を常用量 (低用量) とし、常用量の 10-50 倍かつ半数致死量未満を高用量と設定する。生食投与群を対照群、抗うつ剤投与群を陽性対照群として用いる。

本試験：交配成立後雌ヘリトドリン塩酸塩 100, 500mg/kg を 21 日間連続経口投与する。

(2) 行動解析

オープンフィールド試験：障害物のない一定空間内の行動量を数値化する試験で、自発運動や新奇場面に対する情動を評価する。仔マウスの離乳期を経て、生後 6 週 (若齢期)、9 週 (生殖可能期)、12 週 (青年期) で行う。

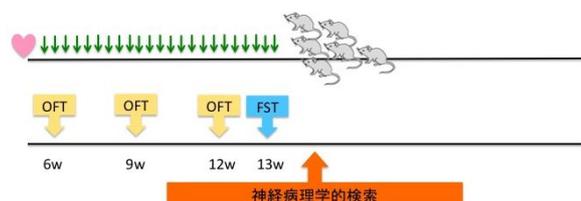
強制水泳試験：逃避不可能な水槽内での不動時間を測定することで、抑うつを定量的に評価する。生後 13 週 (青年期) に行う。

(3) 神経病理学的検索

行動解析終了後に、全脳を摘出する。パラフィン切片作成し、HE 染色にて形態学的検索を行う。脳内ミクログリアの活性化が、免疫反応を調節し、神経栄養因子シグナリングを通して、神経炎症や病変部の細胞死、組織修復に関与することに注目し、ミクログリアの特異的マーカーである Iba-1 の免疫組織化学的染色を施行する。

リトドリン塩酸塩投与 本試験

- 交配成立後の雌への連続経口投与
- 100, 500mg/kg p.o. 21 日間投与 n = 10
 - 対照群 同量の生食水 p.o. n = 10



本動物実験計画は、本学動物実験委員会の審査にて承認を受けた。(承認番号 2013-8-2)

4. 研究成果

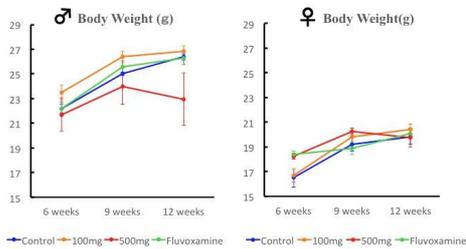
(1) 胎生期母体薬剤投与モデル動物の作成
妊娠マウスへのリトドリン塩酸塩投与法および至適投与量の設定を行った。

予備試験：投与量を 30, 150, 300, 500, 1000 mg/kg で妊娠マウスに連続皮下注射したところ、妊娠初期での胎内死亡、出生直後の産仔死亡があり、投与量を常用量 100mg/kg、高用量 500mg/kg の連続経口投与法に設定した。

本試験：交配成立後雌に、リトドリン塩酸塩 100, 500mg/kg を 21 日間連続経口投与した。陽性対照群として抗うつ剤（選択的セロトニン再取り込み阻害薬 SSRI）フルボキサミンマレイン酸塩 100mg/kg を投与した。

出生仔の体重推移

出生仔の体重推移

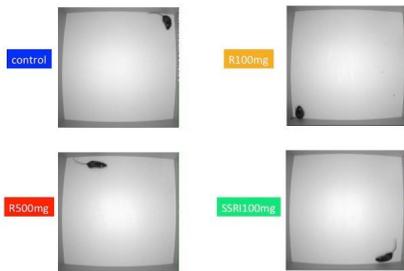


体重には性差があり雄が重かった。リトドリン高用量群は 9 週齢以降体重増加しなかった。

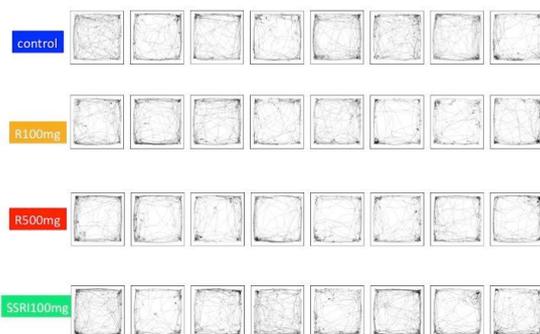
(2) 行動解析

オープンフィールド試験

9週齢♂のOpen Field Test

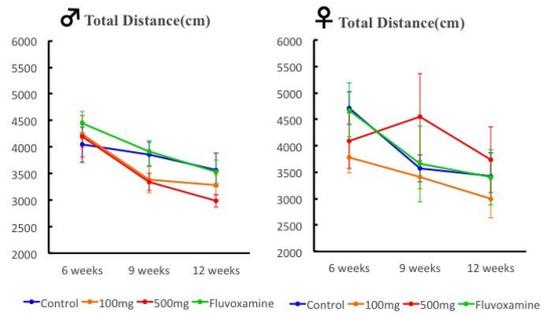


9週齢♂の自発運動軌跡 n=8



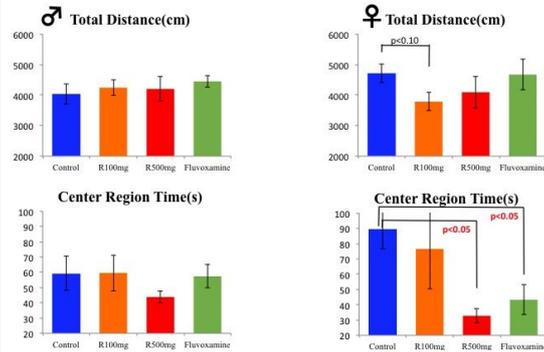
自動測定機器を用いて、総移動距離、平均速度、総移動時間、任意の区画ごとの滞在時間、行動軌跡などについて計測した。

OFT 出生仔の総移動距離

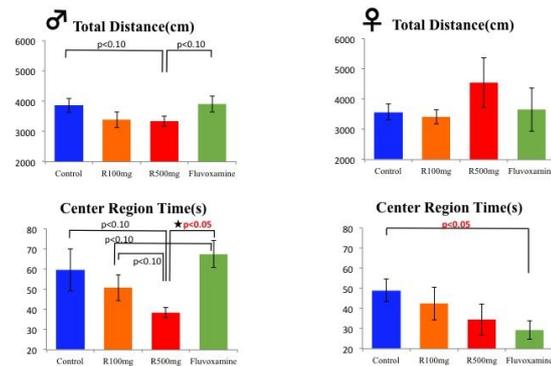


自発運動量を示す総移動距離は、各群ともに仔マウスの週齢が増すごとに減少した。加齢および再試行による馴化が考慮される。

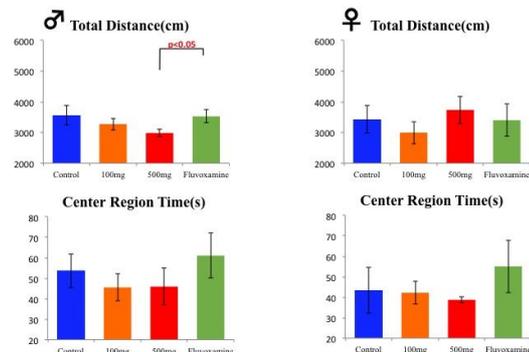
6週齢 総移動距離と中心滞在時間



9 週齢 総移動距離と中心滞在時間

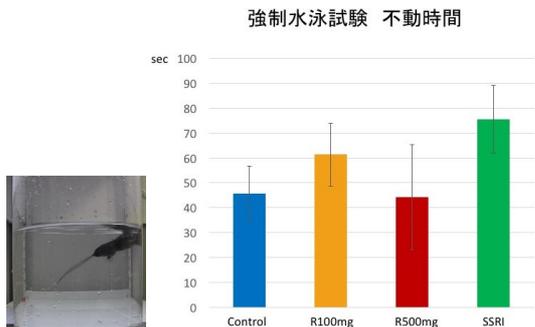


12週齢 総移動距離と中心滞在時間



中心滞在時間の減少は不安を示唆するが、各群間で性差および週齢差を認めた。リトドリン高用量群（R500mg：図では赤色で示す）では、雌は6週齢、雄は9週齢で、総移動距離の減少がないのにも関わらず、中心滞在時間が有意に減少しており、この時期の「無動ではない不安の高さ」を示唆した。常用量群（R100mg：橙色）における差異はなかった。抗うつ剤投与の陽性対照群（SSRI 100mg：緑色）では、雌で中心滞在時間が減少しており、母体抗うつ剤投与群の産仔における不安の高さを示唆する、逆説的な結果であった。

強制水泳試験

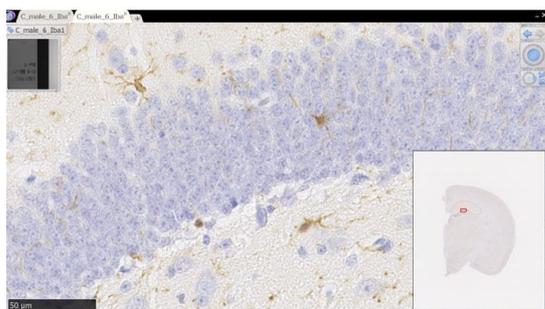


13週齢で施行した強制水泳試験では、統計学的有意差は認めなかったが、リトドリン高用量群の不動時間が短く、抗うつ剤投与の陽性対照群の不動時間が長くなる傾向があった。これはオープンフィールド試験で、母体抗うつ剤投与群の産仔に不安が高かった結果と同じく、母体抗うつ剤投与群の産仔が薬理効果とは逆に、抑うつ傾向を示すという興味深い結果につながる可能性がある。

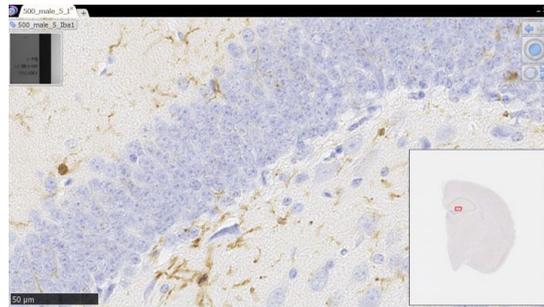
(3) 神経病理学検索

行動解析終了後に全脳を摘出し、形態学的検索とミクログリアの免疫組織化学的染色（Iba-1）を行った。

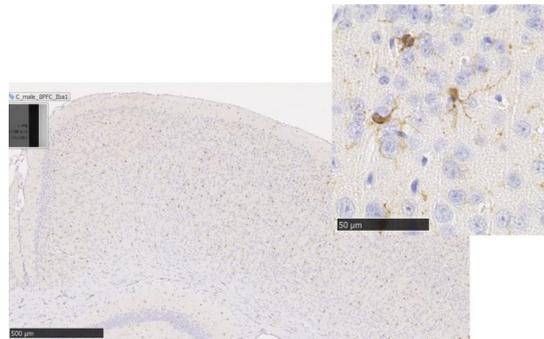
Control ♂ 海馬歯状回 顆粒細胞層 Iba-1染色



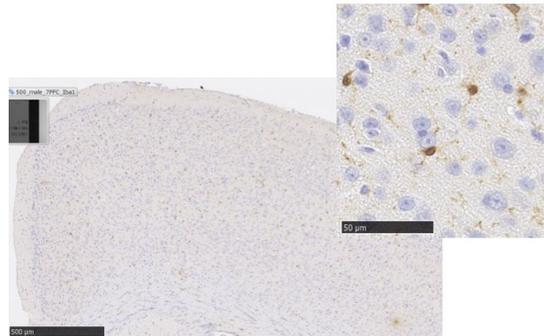
R500mg ♂ 海馬歯状回 顆粒細胞層 Iba-1染色



Control ♂ 前頭皮質 Iba-1染色



R500mg ♂ 前頭皮質 Iba-1染色



形態学的には、大脳皮質の層構造異常や限局的な萎縮は明らかではなかった。また今回、静止型および活性型ミクログリアの局所定量分析では、有意な変化は確認できなかった。

(4) 本研究報告にあたって

報告者は、小児科医として発達障害臨床に従事するなかで、早産低出生体重児のフォローアップで得た、胎生期投与薬剤の神経心理学的影響に関するクリニカル・クエスチョンから本研究を開始した。モデル動物の脳内生理の解明には到達し得なかったが、行動試験で見られた、「抑うつは強くないものの不安が高く動き回る姿」は印象的であった。本研究を端緒に、今後も子どもたちの健やかな成長発達を目指して調査研究を継続したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Inoue R, Sakaue Y, Sawai C, Tsukahara T (他3名、3番目). A preliminary investigation on the relationship between gut microbiota and gene expressions in peripheral mononuclear cells of infants with autism spectrum disorders. Biosci Biotechnol Biochem. Sep 1:1-9, 2016 (査読有) DOI:10.1080/09168451.2016.1222267

Maruo Y, Mori A, Sawai C, Matsui K, Takeuchi Y (他2名、4番目). Successful every-other-day liothyronine therapy for severe resistance to thyroid hormone beta with a novel THRB mutation; case report. BMC Endocr Disord. Jan 12;16:1, 2016 (査読有) DOI:10.1186/s12902-015-0081-7

〔学会発表〕(計22件)

澤井ちひろ、発達障害をもつ子どもへの地域支援～アウトリーチの実践報告～、第31回こどもの健康週間記念公開講座シンポジウム、2016年10月1日、滋賀医科大学(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、「勉強ができない」とは～学習支援の実際について話し合ってみませんか?～、草津市発達障害支援に関わる事業、2016年8月17日、草津市人権センター(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、5歳になったボクとワタシの「ちから」と「からだ」、草津市発達障害支援に関わる事業、2016年8月3日、草津市人権センター(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、神経発達障害における尿失禁への心理社会的問題の影響、第27回日本夜尿症学会学術集会、2016年7月3日(京都)

SAWAI Chihiro, Impact of psychosociological problems on

incontinence in neurodevelopmental disorders, International Children's Continenence Society, 2016.7.2, Kyoto(JAPAN)

澤井ちひろ、発達障害の病態と生理-薬物療法の実際-、草津市立発達支援センター医療相談連絡会、2016年3月23日、草津市社会福祉協議会(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、「滋賀県における発達障害をもつ子どもの支援体制について-小児科発達外来の診療を通して-」、滋賀県精神保健福祉協会の一般科・精神科連携事業講演会、2016年2月4日、栗東市商工会ウイングプラザ研修室(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、発達障害を有する児の夜尿症・遺尿症、第74回日本小児科学会滋賀地方会、2015年10月17日、滋賀医科大学(滋賀)

澤井ちひろ、よく見て、伝えて、ほめるコツ～ペアレント・トレーニングの手法から～」草津市、発達障害支援に関わる事業、2015年8月5日、草津市人権センター(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、思春期の育ちに向けて～ペアレント・トレーニングの手法から～、草津市発達障害支援に関わる事業、2015年7月22日、草津市人権センター(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、後期早産児の認知機能の発達について、第73回日本小児科学会滋賀地方会、2015年5月17日、滋賀医科大学(滋賀)

澤井ちひろ、親子教室通所児におけるDESC乳幼児社会的認知発達チェックリスト評価の有用性、第118回日本小児科学会、2015年4月19日、大阪国際会議場(大阪)

澤井ちひろ、発達障害の子どもたちの理解と支援「特性とその支援について」、障害児に関わる療育研修、2015年2月1日、彦根市障害者福祉センター(滋賀)(招待講演)

澤井ちひろ、発達障害の子どもたちの理解の支援「子どもの発達とそのバリエーション」、障害児に関わる療育研修、2015年1月18日、彦根市障害者福祉センター（滋賀）（招待講演）

澤井ちひろ、不登校の子どもたちへの支援、平成26年度第2回滋賀県教育支援センター（適応指導教室）連絡協議会研修会、2014年10月3日、滋賀県立男女共同参画センター（滋賀）（招待講演）

澤井ちひろ、発達外来受診児の身体症状の検討、第32回日本小児心身医学会、2014年9月12日、大阪国際交流センター（大阪）

澤井ちひろ、思春期のメンタルヘルス-発達障害だけで終わらないフォローアップ-、草津市発達障害支援に関わる事業、2014年7月30日、草津市人権センター（滋賀）（招待講演）

澤井ちひろ、発達障害児の早期徴候の検討、第117回日本小児科学会、2014年4月12日、名古屋国際会議場（名古屋）

澤井ちひろ、発達外来受診児の身体症状・第41回滋賀県学校保健学会、2014年2月4日、滋賀県立武道館（滋賀）

澤井ちひろ、不登校につながる発達障害児の特性および早期対応について-地域における不登校児への早期介入のために-、草津市発達障害支援に関わる事業、2014年1月17日、草津市役所（滋賀）（招待講演）

21 澤井ちひろ、子どものこころの問題とその対応について-“発達障害”で終わらせないために-、滋賀県精神保健福祉協会、2013年12月12日、長浜市勤労者福祉会館（滋賀）（招待講演）

22 澤井ちひろ、発達外来の現場から不登校を考える、第28回こどもの健康週間記念公開講座、2013年10月13日、滋賀県立男女共同参画センター（滋賀）（招待講演）

〔図書〕（計2件）

澤井ちひろ 他、ミネルヴァ書房、竹内義博・大矢紀昭編「よくわかる子どもの保健第3版」2015、234頁（精神機能の発達と保健、子どもの精神保健 p62-73, p82-89, p96-97）（査読無）

澤井ちひろ 他、ミネルヴァ書房、竹内義博・大矢紀昭編「よくわかる子どもの保健第2版」2014、208頁（精神機能の発達と保健、子どもの精神保健 p64-75, p84-91, p98-99）（査読無）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 ちひろ (SAWAI, Chihiro)
滋賀医科大学・医学部・特任講師
研究者番号：30599824

(2) 研究協力者

豊田 淳 (TOYODA, Atsushi)
松川 典子 (MATSUKAWA, Noriko)
川瀬 貴博 (KAWASE, Takahiro)
塚原 隆充 (TSUKAHARA, Takamitsu)