

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461634

研究課題名(和文) 抗てんかん薬の発生毒性の再評価

研究課題名(英文) Spinal nerve defects induced by prenatal valproic acid exposure

研究代表者

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：50144168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期バルプロ酸(VPA)曝露に起因する脊髄神経形成異常(SNDs)について、神経管閉鎖不全(NTDs)と比較して検討した。ICRマウスの妊娠6,7,8,又は9日にVPA100-400 mg/kgを投与し、妊娠10日に胚を採取した。抗ニューロフィラメント抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い、脊髄神経の走行とNTDsの有無を観察したところ、VPAが誘発するSNDs発症は、NTDsの場合と同様に感受期が妊娠8日で、発症頻度が用量相関性を示したが、NTDs発症抑制に有効な葉酸投与でもSNDs発症は抑制されなかった。よってSNDsとNTDsは異なるメカニズムにより誘発される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of prenatal exposure to valproic acid (VPA) on the development of the nervous system. VPA (100-400 mg/kg) was subcutaneously injected to pregnant ICR mice on gestational day (GD) 6, 7, 8, or 9. And their embryos were collected on GD 10. The whole-mount immunostaining using an anti-neurofilament antibody clearly identified nerve fiber bundles and dorsal ganglia consisting of spinal nerves. The incidence of these spinal nerve defects (SNDs) was significantly increased in the embryos exposed to VPA on GD 8. The incidence of SNDs caused by VPA administration was increased in a dose dependent manner. Folic acid supplementation (3 mg/kg/day) during GD 6-10 reduced the incidence of VPA-induced neural tube defects (NTDs), but not SNDs. Thus, NTDs and SNDs after prenatal VPA-exposure might be induced by different mechanisms.

研究分野：先天異常学

キーワード：抗てんかん薬 バルプロ酸 脊髄神経 発達障害 神経管閉鎖不全 葉酸

1. 研究開始当初の背景

抗てんかん薬であるバルプロ酸は催奇性を有することが知られている。マウスを用いたこれまでの研究では、胎生期バルプロ酸曝露が神経管閉鎖不全(neural tube defects: NTDs)の一種である外脳症の発症率を増加させること、及び母獣への葉酸投与がバルプロ酸に起因する外脳症の発症率を抑制することが報告されている。また、胎生期バルプロ酸曝露により脊椎や肋骨の形成異常、および脊髄神経形成異常(spinal nerve defects: SNDs)が生じることも知られている。

2. 研究の目的

本研究は、胎生期バルプロ酸曝露によるSNDsの詳細について、NTDsと比較して検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験デザインの概要はFig. 1に示した。まず、バルプロ酸曝露時期によるSNDsの発症頻度の違いを検討するため、ICRマウスの妊娠6、7、8、又は9日のいずれかにバルプロ酸400 mg/kgを投与した。妊娠10日に胚を採取し、抗ニューロフィラメント抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い脊髄神経の走行を観察した(実験1)。次に、SNDs発症頻度とバルプロ酸投与量の相関性を明らかにするため、妊娠8日に100, 200, 400, 又は600 mg/kgのバルプロ酸を投与し、同様の観察を行った(実験2)。さらにSNDs発症に対する葉酸の効果を検討するため、妊娠6~8日に3 mg/kg/dayの葉酸投与を受けたマウスに対し、妊娠8日に400 mg/kgのバルプロ酸を投与し、SNDsとNTDsの発症頻度を解析した(実験3)。

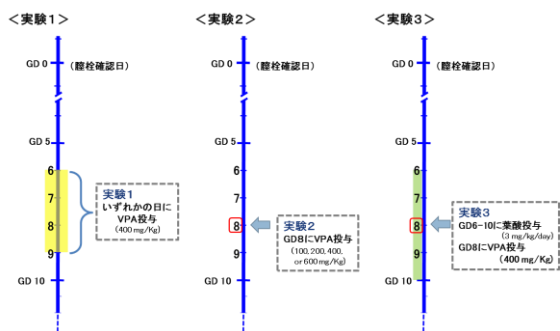


Fig. 1. 各実験のデザイン

また、まず、マウスにバルプロ酸を投与した場合の血中バルプロ酸濃度の推移を把握するため、非妊娠ICRマウス雌に200, 400, 又は700 mg/kgのバルプロ酸を皮下投与し、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、および24時間後に採血し、血中バルプロ酸濃度を測定した。

4. 研究成果

各種用量のバルプロ酸を投与された非妊娠ICRマウス雌の血中バルプロ酸濃度の推移

をFig. 2に示した。全ての投与群において、少なくとも投与後1時間はヒトてんかん治療における血中バルプロ酸の治療域を超える濃度となり、本研究に用いたマウスでは一過性に高濃度のバルプロ酸に曝露されていたことが推察された。しかし、多くの場合は投与後6時間までに治療域を下回る血中バルプロ酸濃度となり、投与量が多い場合でも24時間までに血中バルプロ酸はほぼ検出されなくなった。

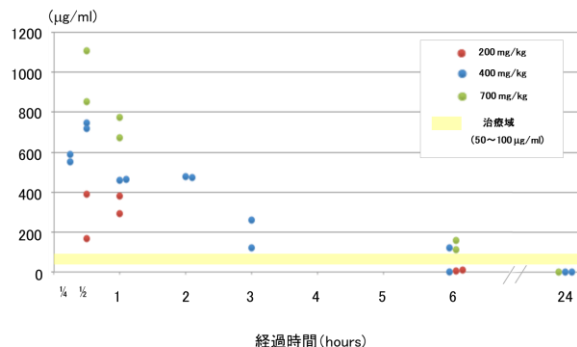


Fig. 2. 血中バルプロ酸濃度の推移(非妊娠ICRマウス♀)

GD10のマウス胚を、抗ニューロフィラメント抗体を用いたWhole mount免疫染色法で染色したところ、脳神経と脊髄神経が明瞭に染色された(Fig. 3)

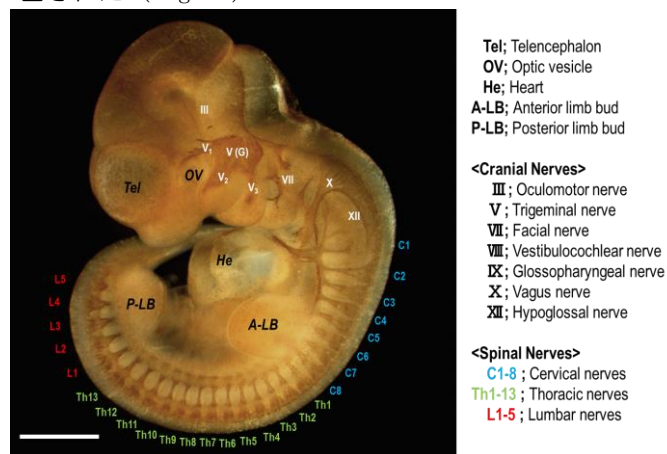


Fig. 3. 抗neurofilament抗体を用いたホルマウント免疫染色

胎生期バルプロ酸曝露マウス胚では、主に胸神経と腰神経において神経束の欠損や隣接する神経束との吻合などの脊髄神経走行異常が認められた。また、後根神経節の分節化の異常も多数認められたが、その一部は脊髄神経走行異常を伴っていた(Fig. 4)。また、一部の胎生期バルプロ酸曝露マウス胚では、NTDsを認めた(Fig. 5)

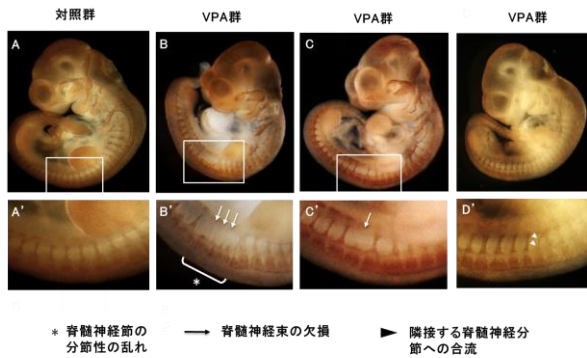


Fig. 4. 胎生期バルプロ酸曝露による脊髄神経の走行異常



Fig. 5. 胎生期バルプロ酸曝露マウスにおける神経管閉鎖不全(外脳症)

バルプロ酸投与日毎の SNTDs の発症頻度を解析したところ、妊娠 8 日でのバルプロ酸曝露は有意に SNTDs の発症頻度を増加させた (60.0%)。一方、NTDs の発症頻度は妊娠 7 日 (26.4%) または 8 日 (27.7%) のバルプロ酸投与で有意に増加した。

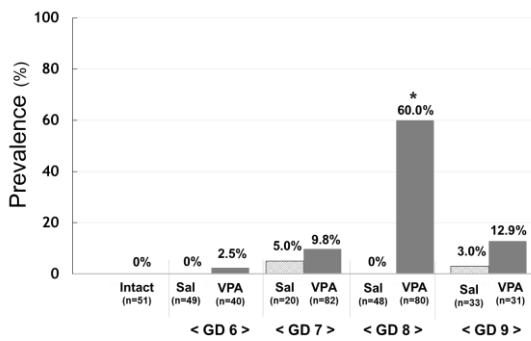


Fig. 6. バルプロ酸曝露マウスにおける脊髄神経走行異常の有病率  
～投与日による違い～

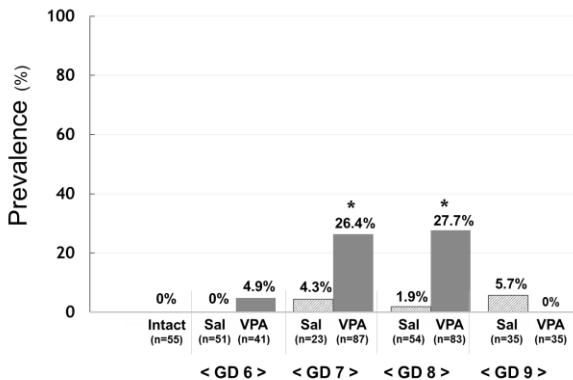


Fig. 7. バルプロ酸曝露マウスにおける神経管閉鎖不全の有病率  
～投与日による違い～

また、妊娠 8 日のバルプロ酸投与では、SNTDs と NTDs の発症頻度にはそれぞれ用量相関性が認められた (Fig. 8)。

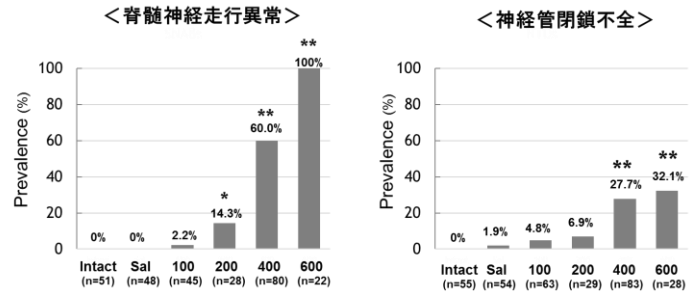


Fig. 8. バルプロ酸曝露マウスにおける脊髄神経走行異常および神経管閉鎖不全の有病率  
～投与量による違い～

さらに妊娠 6～8 日の葉酸投与は、バルプロ酸により誘発される NTDs の発症を有意に抑制したが、SNTDs に対しては効果を示さなかった。

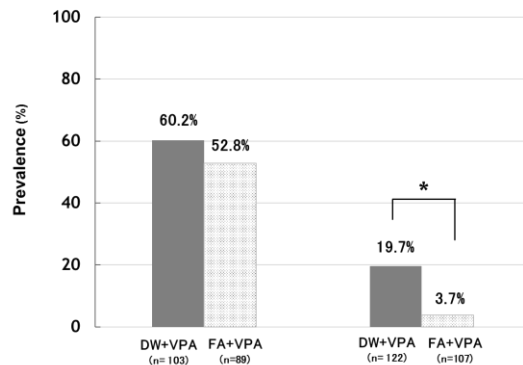


Fig. 9. バルプロ酸曝露マウスにおける脊髄神経走行異常および神経管閉鎖不全に対する葉酸の効果

以上より、胎生期バルプロ酸曝露による SNTDs の感受期は妊娠 8 日であること、および SNTDs の発症頻度はバルプロ酸投与量と用量相関性があることが明らかになった。また、胎生期バルプロ酸曝露による SNTDs と NTDs は、臨界期は類似するものの、葉酸による抑制効果の違いから、異なるメカニズムにより誘発される可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Bold J, Sakata-Haga H, Fukui Y. Spinal nerve defects in mouse embryos prenatally exposed to valproic acid] Anatomical Science International :1-7 (2017) (査読有)

②Tsukasa Ishiguro, Hiroimi Sakata-Haga,

Yoshihiro Fukui

A 5HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonist,  
1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, mitigates developmental neurotoxicity of ethanol to serotonergic neurons

Congenital Anomalies, 56:163-171 (2016)

(査読有)

③Sakamoto K, Sawada K, Fukunishi K, Imai N, Sakata-Haga H, Fukui Y

Postnatal Change in Sulcal Length Asymmetry in Cerebrum of Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*)

Anatomical Record (Hoboken)297(2) :

200-207 (2014) (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50144168

(2) 研究分担者

坂田 ひろみ (SAKATA, Hiromi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50294666