

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380174

研究課題名（和文）ドーモイ酸による記憶毒性および神経変性のメカニズム解明

研究課題名（英文）Impairment of memory and neurotoxic mechanism in male mice induced by exposure of domoic acid.

研究代表者

種村 健太郎（TANEMURA KENTARO）

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

研究者番号：20332322

研究成果の概要（和文）：

ドーモイ酸による記憶毒性のメカニズム解明を目的として、マウスを用いて行動解析を行った。その結果ドーモイ酸投与による記憶異常が経時的に進行することを、条件付け学習記憶試験によって見いだした。その際、神経細胞死、神経原線維変化の出現や神経細胞の脱落といった神経病理所見を伴わないことが明らかになった。免疫組織化学解析、生化学解析、および遺伝子発現解析の結果、ドーモイ酸による記憶異常は、軸索機能影響、及びシナプス機能影響によるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To know the neurotoxic mechanism induced by domoic acid (DA; amnesic shellfish poison), we administered DA to male mice by intraperitoneal injection. We found subacute impairment of contextual memory and delayed cued memory loss by using fear conditioning test. Although we never detect histopathological damages, i.e. neural death, neurofibrillary tangles, neural loss, we found the effects on synapse by immunohistochemical study in hippocampus of mice. Furthermore, we found the influences on axonal guidance signal pathway and synaptic function in hippocampus of mice by molecular analysis using percellome methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	0	4,600,000
2008年度	3,800,000	0	3,800,000
2009年度	3,800,000	0	3,800,000
年度			
年度			
総計	12,200,000	0	12,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：毒性学

### 1. 研究開始当初の背景

1987年にカナダ東海岸で採取されたムラサキイガイ（ムール貝）を食した際に、4人が死亡、12人に記憶障害の後遺症が残るという中毒事件が生じた。その原因化学物質が興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体に対する強力なアゴニストであるドーモイ酸（珪藻が産生したものがムール貝に蓄積したと考えられている）と判明した。即ち、ドーモイ酸は、記憶喪失性貝毒として報告された。特徴的な症状は記憶障害で、重症例においては、前行性健忘のみならず、中毒以前の記憶が障害を受ける逆行性健忘を伴う。また中毒死した患者脳組織においては海馬および扁桃体に神経細胞死および神経変性が報告されている。尚、ドーモイ酸の毒性発現メカニズムとして、グルタミン酸受容体の過剰刺激による神経細胞の過興奮を起点とした神経変性が疑われてきた。しかしながら、その詳細については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスをモデルに、グルタミン酸の強力なアゴニストであるドーモイ酸を用いて、投与の結果に生じる記憶毒性および神経変性、もしくは神経機能低下のメカニズムを解明し、もって認知症を含めた認知機能障害を主症状とする脳疾患の予防および治療への発展にも応用可能な知見を得ることを目指すとともに、神経細胞の細胞内骨格系タンパクであり、アルツハイマー病を始めとする認知症において発現が認められる神経原線維変化の主成分であるタウに焦点を合わせた解析も行い、タウを介した神経変性メカニズムへの応用が可能かについても検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 記憶障害マウスモデルの作成

生後11週齢の雄B6マウスへの、ドーモイ酸0.1、0.3、1.0mg/kg（溶媒は生理食塩水）を腹腔注射によって記憶障害マウスモデルの作成を試みた。尚、同条件によるドーモイ

酸の急性毒性はLD50が約4mg/kgであり、経口摂取によるヒトの致死量は50mg/kg程度と推測されている。図1にドーモイ酸の構造式を示す。

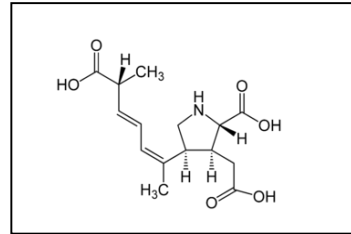


図1、ドーモイ酸（IUPAC名 [2' 'S' '-[2a, 3b, 4b(1' 'Z' ', 3' 'E' ', 5' 'R' ')]]-2-カルボキシ-4-(5-カルボキシ-1-メチル-1,3-ヘキサジエニル)-3-ピロロリジン酢酸）

#### 2. マウス記憶能解析

条件付け学習記憶試験装置（図2）を用いて、マウスに対して条件付けを行った後、海馬依存性が高いとされる空間-連想記憶能、及び海馬のみならず扁桃体依存性が高いとされる音-連想記憶能について、マウスのすくみ率を指標として解析した。即ち、条件付けとして「箱」内のマウスに対して「音刺激」と「電気刺激」を提示することで行い、1日後以降に①同じ「箱」に入れた際に生じるマウスのすくみ行動を指標として空間-連想記憶能を、②新規環境下にてマウスに「音刺激」を提示した後に生じるマウスのすくみ行動を指標として音-連想記憶能を測定する。その際、投与から記憶能の解析時期を複数用意することによって、記憶異常の有無のみならず、進行について検討した。

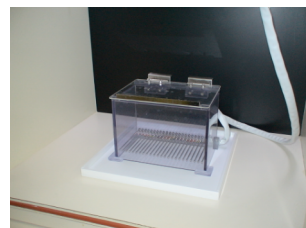


図2、条件付け学習記憶試験装置

### 3. 形態解析

ドーモイ酸を投与したマウスの脳について、経時的に、通常の病理染色像解析に加えて、コンゴレッド染色を施し、偏光顕微鏡観察下での緑色屈折光（神経原線維変化の指標として最も重要な病理学的マーカーのひとつである）の検出を試みた。さらに主に神経突起の形状や構成タンパク群の発現パターンについて免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

### 4. タンパク発現解析

ドーモイ酸を投与したマウスについて、経時的に、海馬を採取し、タンパク発現量への影響を検討する目的でウェスタンブロット法による解析を行った。その際、一部のサンプルについては、界面活性剤に対する溶解性を利用したフラクショネーションを行い、界面活性剤不溶性タンパクについても検討を行った。

### 5. 網羅的遺伝子発現解析

単飼いマウス、群飼いマウスの脳について、組織の構成細胞1個当たりのmRNA絶対量を計測することのできる「percellome」法に準じ、Affymetrix GeneChip Mouse Expression Array 430 2.0（1部位につき、1GeneChip）にて、ドーモイ酸投与後1日後及び4日後のマウスの脳を大脳、海馬、脳幹、小脳の4部位に分割し、特に海馬の遺伝子発現データを得て、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、得られた解析結果をIngenuity Pathway Analysisに投入し、パスウェイ解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) マウス行動解析

0.1、0.3、1.0mg/kgのドーモイ酸（溶媒は生理食塩水）を単回腹腔投与し、24時間後に一般状態に異常が無いことを確認した上で、条件付け試験を投与3日目に、空間-連想記憶試験を投与4日目に、音-連想記憶試験を投与5日目に行った。その結果、いずれの用量においても、海馬依存性が高いとされる、空間-連想記憶能の低下を示すすくみ率の低下が明らかとなった（図3）。一方で、いずれの用量においても、音-連想記憶能への影響

は認められなかった（図4）。さらに15日後（投与20日後）に、再び音-連想記憶試験を行ったところ、高用量群にて、扁桃体依存性も高いとされる音-連想記憶能の低下が認められた（図5）。

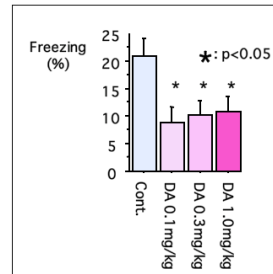


図3、ドーモイ酸投与後3日目の空間-連想記憶：いずれの用量群においても記憶異常が認められた（各群ともn=8）。

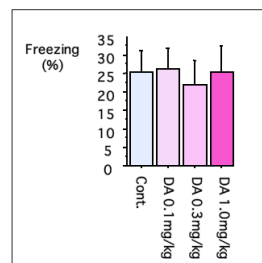


図4、ドーモイ酸投与後4日目の音-連想記憶：いずれの用量群においても逸脱は認められなかった（各群ともn=8）。

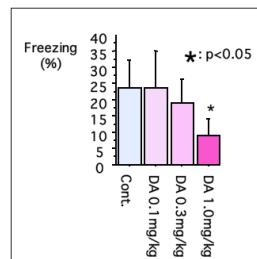


図4、ドーモイ酸投与後20日目の音-連想記憶：高用量群にて異常が認められた（各群ともn=8）。

### 2) 形態解析

1.0mg/kgのドーモイ酸（溶媒は生理食塩水）を単回腹腔投与し、1、4、7日後の海馬についてHE染色による病理染色像解析を行った結果、神経細胞死、神経細胞脱落の異常像は得られず、またコンゴレッド染色後、偏光顕微鏡観察下での緑色屈折光の検出も認められなかった。

抗体を用いた免疫組織化学解析から、海馬における神経突起マーカー発現パターンに大きな変化は認められなかったが（図6）、シ



図 10、ドーマイ酸投与 1 日後のマウス海馬にて発現変動が認められた遺伝子リスト (t-test:  $p < 0.01$ , ratio  $> 1.2$ ,  $n = 4$ ) を元で作成した前後シナプス影響解析結果。青色が発現抑制遺伝子を示す。

ドーマイ酸投与 4 日後に、71 遺伝子 ps (ブローセット) の発現増加、49 遺伝子 ps の発現減少が認められた (t-test:  $p < 0.01$ , ratio  $> 1.2$ ,  $n = 4$ )。解析結果を元にパスウェイ解析を行った結果、癌関連シグナル、細胞死関連シグナルへの影響が示され、いずれも神経系においては、シナプス機能への関与が報告されており、ドーマイ酸による記憶異常を裏付ける結果と考えられた (図 11)。

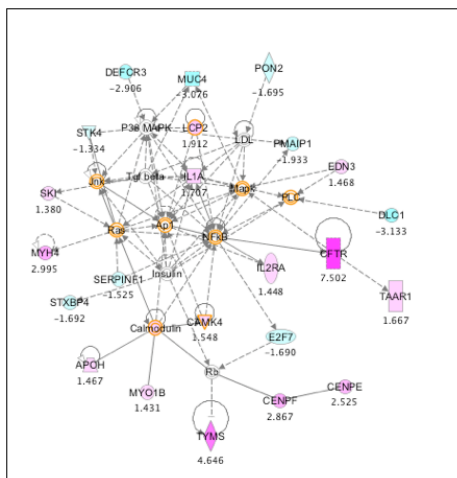


図 11、ドーマイ酸投与 4 日後のマウス海馬にて発現変動が認められた遺伝子リスト (t-test:  $p < 0.01$ , ratio  $> 1.2$ ,  $n = 4$ ) を元に抽出された遺伝子パスウェイ。赤色が発現増加遺伝子、青色が発現抑制遺伝子、橙色の印はパスウェイ上の癌関連シグナル及び細胞死関連遺伝子を示す。

## 5) 結論と考察

本研究によって、ドーマイ酸投与によって亜急性的に記憶異常が生じ、それが経時的に進行することが実験的に示された。その際、神経細胞死、神経原線維変化の出現や神経細胞の脱落といった神経病理所見を伴わないことが明らかになった。すなわち、これまでに想像されてきた、ドーマイ酸による興奮毒性によって、神経細胞が死滅し、その結果として記憶毒性が生じるというプロセスは、本研究で使用した用量では生じないことが判明した。免疫組織化学解析、生化学解析、および遺伝子発現解析の結果、ドーマイ酸によ

る記憶毒性は、軸索機能影響、及びシナプス機能影響によるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. J Toxicol Sci. 34 (Suppl 2) .SP279-286. (2009).

Sekiyama K, Hashimoto O, Ushiro Y, Adachi C, Kikusui T, Tanemura K, Hasegawa Y. Abnormalities in aggression and anxiety in transgenic mice overexpressing activin E. Biochem Biophys Res Commun 385 (3) 319-323. (2009).

Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawan M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawa A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. Stem Cells. 25(3) 562-570. (2007)

[学会発表] (計 9 件)

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、菅野 純、「社会共生系形成過程における個の適応と連鎖に関する研究」第 149 回日本獣医学会 (2010 年 3 月、東京)

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのトリアザラム投与による学習記憶障害について-」第 36 回日本トキシコロジー学会、シンポジウム (2009 年 7 月、盛岡)

種村 健太郎、菅野 純、「受容体原性毒性モデルとしての ER ノックダウンマウスの中枢神経症状、及び神経伝達かく乱による遅発影響の解析」第 20 回環境ホルモン学会講演会（2009 年 2 月、東京）

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害」第 35 回日本トキシコロジー学会、シンポジウム（2008 年 6 月、東京）

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「エストロゲン受容体 ( $\alpha$  型) ノックダウンマウスの神経行動解析」第 35 回日本トキシコロジー学会(2008 年 6 月、東京)

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「授乳期マウスへのドーモイ酸投与による遅発性神経行動毒性の発現メカニズム解析」第 145 回日本獣医学会（2008 年 3 月、東京）

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「Percellome analysis of Neurobehavioral toxicity induced by acephate exposure in male mice.」第 30 回日本分子生物学会（2007 年 12 月、横浜）

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「エストロゲン受容体 ( $\alpha$  型) 非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析」第 100 回日本繁殖生物学会（2007 年 10 月、東京）

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、「アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性の発現機構の Percellome 解析」第 34 回日本トキシコロジー学会、シンポジウム（2007 年 6 月、東京）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

なし。

○ 取得状況 (計 0 件)

なし。

[その他]

なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

種村 健太郎 (TANEMURA KENTARO)  
国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・  
毒性部・  
主任研究官  
研究者番号：20332322

### (2) 研究分担者

なし。

### (3) 連携研究者

なし。