

## 胎生期に cytosine arabinoside を曝露されたマウスに誘発された行動異常

松井晋平\*, 藤原有基\*, 高岡良輔\*\*, 小林優紀\*\*, 巽純子\*, \*\*

## Behavioral disorder induced by prenatal exposure to cytosine arabinoside in mice

Shinpei MATSUI\*, Yuki FUJIWARA\*, Ryosuke TAKAOKA\*\*, Yuki KOBAYASHI\*\* and  
Junko TATSUMI-MIYAJIMA\*,\*\*

It has been reported in epidemiological studies that prenatal exposure to chemicals such as polychlorinated biphenyl, valproic acid and nicotine during pregnancy increases the risk of developmental disabilities in childhood. In this study, we examined neurobehavioral characteristics in offspring naturally delivered from dams treated with cytosine arabinoside (cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside ; Ara-C) to elucidate the association between the prenatal exposure to chemicals and the behavioral disorder. In the open field test, Ara-C prenatally exposed offspring showed a higher activity than control mice ( $p < 0.05$ ). The inhibitory avoidance response in elevated T-maze test and the freezing response in elevated platform test was significantly increased in the Ara-C exposed mice compared to the control mice ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). On the other hand, the memory performance in passive avoidance test did not significantly differ between control and Ara-C exposed groups. The concentration of dopamine and serotonin in the brain was significantly increased in Ara-C exposed compared mice to the control mice ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). These findings suggest that the prenatal exposure to Ara-C induces behavioral disorder such as increased anxiety to be reflected by the quantitative changes of serotonin and dopamine in the brain of offspring.

**Key word:** Ara-C, Behavioral disorder, Prenatal exposure, Mouse, Anxiety behavior, Dopamine, Serotonin

## 1 緒言

胎児期にポリ塩化ビフェニル(PCB), バルプロ酸, サリドマイド, アルコールおよびニコチンのような化学物質に曝露されると生後に注意欠陥・多動性障害(ADHD)あるいは自閉症のような発達障害を起こす可能性があるのではないかと疫学的調査あるいは

平成 25 年 7 月 27 日受理

\* 総合理工学部理学専攻

\*\* 理工学部生命科学科

臨床の報告がある[1-5]。このような胎児期化学物質と曝露と行動障害に関する関係性を明らかにするには、化学物質を胎児期に曝露させたモデルマウスを作成し、生後にその行動特性を調べる必要がある。

本研究においては、曝露する化学物質としてシトシンアラビノシド (Cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside, 以下 Ara-C と略記) を選び、妊娠マウスに投与し、生まれた子マウスを胎児期化学物質曝露モデルマウスとして作成し、行動試験を実施し行動の変化が認められるかどうかを調べることを目的とした。

Ara-C はヌクレオシド類似体であり、シトシンの代わりに DNA 合成時に取り込まれることで DNA ポリメラーゼを阻害し、DNA 鎖にニックを生じさせ DNA の断片化を引き起こす [6]。したがって、DNA 合成期にある細胞が多い増殖細胞に対して毒性があるため、急性骨髄性白血病や他の血液悪性腫瘍などの化学療法薬として知られ、妊娠期での当該疾患の治療において使用されることも禁忌とされていない [6]。実験動物を用いた研究では、妊娠期の Ara-C の大量投与が、胎児に脳ヘルニア、水頭症、小頭症などの中枢神経系障害、顔裂、骨格奇形、四肢減少奇形などを引き起こすことが報告され [7-10]、この催奇形性には Ara-C によるアポトーシスの関与が指摘されている [11,12]。

マウスの胚においては、胎生 10 日以降に脳の形成が始まる。マウス大脳皮質の形成はニューロン新生とともに胎生 12 日頃より始まり、胎生 13, 14 日にニューロンの生成が盛んにおこなわれることが知られている [13]。このような大脳皮質の細胞増殖期にある胎児に Ara-C を曝露すると、脳室帯および辺縁帯での組織構築の異常が認められるという報告がある [14,15]。

そこで、本研究では、妊娠マウスの 13, 14 日連日に Ara-C を腹腔内投与し自然分娩させて、児動物を得て、各種行動試験に供した。また、情動行動に関係する神経化学物質であるモノアミン類の脳各部位での濃度を測定し、行動の特徴との関係を検討した。

## 2 材料及び方法

### 2.1 使用動物

生後 8 週にて購入した雌雄の ICR マウス (Jcl:ICR) を馴化と検疫を兼ねて 1 週間予備飼育し、一般状態に異常のないマウスを実験に使用した。なお、マウスは温度約 24°C、12 時間明暗周期 (7:00 AM~7:00 PM 点灯) に条件設定された飼育キャビネット (EBAC-S, 給気・排気 HEPA フィルター, 日本クレア社製) の中で、飼育ケージ (雄・雌ともに 10 cm×17 cm×11 cm に個別飼育) にて飼育し、巣材として ALPFA-dri (Shepherd specialty papers, Inc. 米国) を用いた。また、実験動物用固形飼料 (オリエンタル酵母工

業製) および水道水を自由に摂取させた。

生後 8 週以上の雄と未経産雌を 1:2 もしくは 1:1 で終夜同居させ、翌朝、膈内に膈栓の認められた雌を交尾成立雌とした。また、この日を妊娠 0 日とした。

Ara-C (CAS 147-94-4, Sigma 社製) は、5, 10, 15 mg/5 ml となるように、使用直前に蒸留水にて濃度を調整し、投与液とした。Ara-C の投与量は、母動物の一般状態および体重増加に悪影響を及ぼさず、高い胚致死作用を示さない 5 から 15 mg/kg 体重 (以下 mg/kg bw と記述) に設定した [15]。妊娠 13 および 14 日の 12:00PM に連日腹腔内投与とした。

自然分娩により得られた出生児は、生後 4 日 (出生日を生後 0 日と規定する) に一腹の出生児数を雌雄合わせて 8 匹に調整した。なお、行動実験に使用するマウスは性周期の影響を考慮して雄個体に限定し、各群 8 匹以上 (母体数 3 匹以上) とした。

なお、対照群は無処置妊娠のマウスからの出生児とした。

### 2.2 成長過程の観察

出生児は、生後 0-70 日に体重を測定し、また身体分化の観察として、毛生 (背又は腹部に体毛が観察される時期)、切歯萌出 (上の切歯が、歯茎より萌出する時期)、耳介開展 (耳介が、頭部から離れ、開展する時期)、眼瞼開裂 (上下の眼瞼が開裂する時期) の完成時期を調べた。

運動機能・行動発達を調べるため、正向反射、断崖反射 [16] および背地走性 [17] を調べた。正向反射検査は、中枢神経系 (小脳および脳幹を含む前庭系) と筋との統合運動の発達の程度を測定する検査である。断崖反射検査は動物が高所から落下するのを避けようとする行動で、動物の意識状態を評価する検査である。背地走性検査は、運動協調性、平衡感覚、筋力などを複合的に評価する検査である。各検査とも、1 日齢より毎日ほぼ同じ時間帯に実施した。1 試行あたりの制限時間を 30 秒とし 2 試行を行い、制限時間内にそれぞれの動作が観察されない場合は、「成立せず」と記録した。2 日続けて全試行の成立が認められたとき、その初日を動作完成の日とした。

### 2.3 行動試験

#### 2.3.1 オープンフィールド試験

7 週齢時に実施した。マウスを直径 100 cm で壁の高さ

が40 cmの円形の桶(オープンフィールド)に置き、自発運動、また個体の運動活動性、探索行動および種々の情動反応を観察した。試験装置の内部は灰色にし、装置の底面中心上の160 cmの高さに20 Wの白色光をおき、装置内は常に一定の明さが保たれるようにした。底面はほぼ等面積の19区画に分け線を引き、装置の中心をC区画、装置の壁際をA区画、その間をB区画とした。マウスを装置中心の黒い箱に30秒間入れた後に、箱を開け、続く3分間におけるC区画での静止時間、各区画線を横切る回数(区画移動数)、脱糞・排尿数、身繕い数などを観察した。

### 2.3.2 高架式T字迷路試験

8週齢時に実施した。装置は3つのアームで構成されたT字の形状をしており、いずれも長さ25 cm×幅5.6 cmである。1本のアームには高さ30 cmの壁(クローズドアーム)、2本のアームには壁がなく(オープンアーム)開放状態となっている[19]。重なり合っている中央部のプラットフォームは5.6 cm×5.6 cmの領域であり、すべてのアームは床から40 cmの高さに位置する。以下の方法で観察時間の上限を300秒として行った。

- ① クローズドアームの末端に頭がプラットフォームに向くようにマウスを置き、クローズドアームから四肢が出るまでの時間を測定する。これは不安行動を観察するものである(baseline)。
- ② 30秒後に①と同じ試験を繰り返し行う。一度経験した恐怖を回避する(avoidance)行動を観察するものである。
- ③ 30秒後にオープンアームの末端に頭がプラットフォームに向くようにマウスを置き、クローズドアームに四肢が入るまでの時間を測定する。本能的に恐怖から逃避する(escape)行動を観察するものである。

### 2.3.3 受動的回避試験

9週齢時に実施した。ステップスルー型受動的回避実験装置(有限会社メルクエスト社製)を使用した。透明の壁に覆われた部屋を明室、光の入らない壁に覆われた部屋を暗室とし、二つの部屋を繋ぐ開閉式のドアが設置されている[20]。明室にマウスを入れドアを開け、マウスが暗室に

移動した後、ドアを閉め電気刺激(0.4 mAを2秒)を与えた。この試行をマウスが120秒間明室に留まるまで最大5回で続けた(training)。留まることの出来た時点を、その試行の完成とした(学習定着)。その後、40分後と24時間後にマウスを明室に入れ、暗室に移動するまでの時間300秒を限度に測定し、記憶の保持ができていのかどうかを調べた。

### 2.3.4 高架式プラットフォーム試験

10週齢時に実施した。ストレス状況下における動物の行動を解析及びストレス抵抗性を評価した。透明アクリル製のシリンダー(直径11.4 cm、高さ18 cm)を上下逆転させ、シリンダーの底の部分をプラットフォームとして実験を行った[21]。マウスをプラットフォームの上に乗せた際に呼吸以外の運動が見られない状態をすくみ行動と定義し、すくみ行動持続時間を測定した。なお、実験中にプラットフォーム上から滑り落ちたマウスは、速やかにプラットフォーム上に戻し、計測を続けた。

### 2.4 脳形態の観察と脳内モノアミン濃度定量

生後10週に脳を摘出し、重量を測定後、中性緩衝ホルマリン液(Mildform®10N, 和光純薬工業)下4℃で一晩固定後、大脳皮質長径、大脳皮質短径、大脳縦裂径、小脳縦、小脳横を計測した。

脳内各部位のモノアミン量の定量には、生後10週の個体を用いた。なお、脳内のモノアミン量が行動実験によって影響を受けないように配慮し、行動実験に用いていない個体から摘出した脳を測定試料とした。脳を摘出後、すみやかに海馬、扁桃核、大脳皮質および線条体を取り出し、0.2 Mの過塩素酸(PCA; 100 μM EDTA2·Na含有)で除タンパクを行い、超音波破砕機でホモジナイズしたあと、遠心分離後上清を採取し、pH3に調整して液体クロマトグラフィーにて電気化学検出器(HPLC-ECD法)(HPLC-ECD700, エイコム社)で脳内モノアミン(ドーパミン; DAおよびセロトニン; 5HT)濃度を定量した。

### 2.5 統計処理

すべての測定データは、Excel(Office 2010)を用いて平均値、標準偏差を求めた。有意差検定は、2群の比較の場合

は Student の t 検定を行い、多群間比較の場合は一元配置の分散分析 (ANOVA) で Tukey-Kramer の方法によって F 値を求め、検定を行った。

## 2.5 倫理面への配慮

いずれの実験も「近畿大学動物実験規定」に準拠して、「近畿大学動物実験委員会」の承認 (KASE-21-007) を受けて適正に行った。使用した動物の屠殺にあたっては、可能な限り苦痛の少ない方法を用いて、実験における倫理面に配慮した。

## 3 結果

### 3.1 母動物に対する影響

5 mg/kg bw, 10 mg/kg bw および 15 mg/kg bw 投与の各投与群の母動物には、投与後から妊娠末期まで異常は検出されず、また、体重増加において無処置母動物と有意な差は認められなかった。すなわち、本実験条件下での Ara-C 投与量は母動物の生理的状态に悪影響を与えなかった。また、Ara-C 投与の各群における出産児数は対照群の出産数に比較して有意な差は認められなかった。

### 3.2 成長過程の観察

胎児期 Ara-C 曝露群において出生後の死亡率に対照群との間に有意な差は認められなかった。また、出生児の体重増加においても Ara-C 曝露した各群と対照群の間に雄雌ともに統計学的有意な差は認められなかった。なお、Fig.1 には行動試験に用いた雄マウスの日齢と体重の関係を示す。身体的分化のいずれの項目の完成時期においても、Ara-C 曝露の各群は対照群に比較して統計学的に有意な差は認められなかった。また、どの行動発達指標の完成時期においても同様に有意な差は認められなかった。

### 3.3 行動試験

行動試験に用いた個体数は、オープンフィールド試験、高架式 T 字迷路試験および受動的回避試験では対照群 16 匹 (母体数 5 匹), Ara-C 5 mg/kg bw 投与群 23 匹 (母体数 6 匹), 10 mg/kg bw 投与群 8 匹 (母体数 3 匹), 15 mg/kg bw 投与群 25 匹 (母体数 5 匹) であった。また、高架式プラットフォーム試験では、対照群 10 匹 (母体数 3 匹), Ara-C 15 mg/kg bw 投与群 10 匹 (母体数 3 匹) であった。

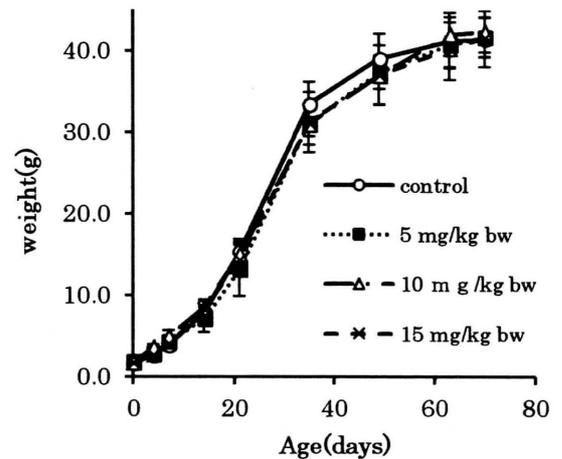


Fig.1 Comparison in growth between the Ara-C prenatally exposed mice and the control mice. Values are mean  $\pm$  SDM. The weight of the prenatal exposure of Ara-C groups was not different from the control group. Control; n=16, 5 mg/kg bw; n=23, 10 mg/kg bw; n=8, 15 mg/kg bw; n=25.

#### 3.3.1 オープンフィールド試験

##### ① 静止時間

Ara-C 曝露の各群の静止時間においては、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

##### ② 区画移動数

Fig.2 に示すように、すべての Ara-C 曝露群において各区画線を横切った回数 (区画移動回数) が有意に増加していた (ANOVA test,  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ )。また、曝露量に依存して区画移動数が増加する傾向が認めら

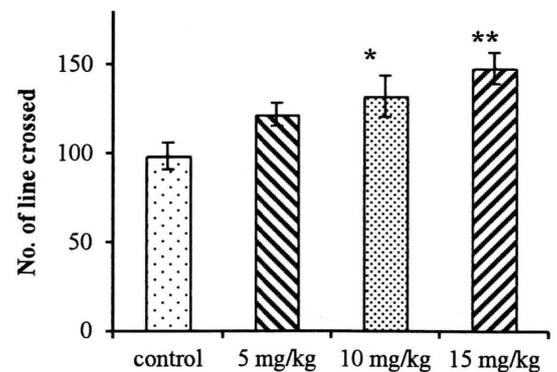


Fig.2 The number of line crossings of ambulation in the open field test. Values are mean  $\pm$  SEM. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  compared to the control group. Control; n=16, 5 mg/kg bw; n=23, 10 mg/kg bw; n=8, 15 mg/kg bw; n=25.

れた。特に 15 mg/kg bw 群では、対照群に比べ 1.5 倍の区画移動数を示した。

### ③脱糞・排尿数

Ara-C 曝露の各群の値において、対照群の値と比較して有意な差は認められなかった。

### ④身づくろい数

Ara-C 曝露の各群の値において、対照群の値と比較して有意な差は認められなかった。

### ⑤立ち上がり回数

Ara-C 曝露の各群では、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

## 3.3.2 高架式 T 字迷路試験

Ara-C 15 mg/kg bw 群において、1 回目の試行(不安行動: baseline)では他の群と比較して有意な増加が認められた (ANOVA test,  $p < 0.05$ )。baseline によって条件付けを行った後の 2 回目の試行(条件付き恐怖を回避する行動: avoidance)ではすべての Ara-C 曝露群において有意な増加が認められた (ANOVA test, 5, 10mg/kg bw,  $p < 0.01$ , 15mg/kg bw,  $p < 0.05$ )。しかし, escape (本能的恐怖からの逃避行動)には有意な差は認められなかった(Fig.3)。

## 3.3.3 受動的回避試験

学習定着までの training 回数において、各 Ara-C 曝露群と対照群間には統計的に有意な差は認められなかった。また、学習定着のあとに 40 分後の試行と 24 時間後の試行を実施したが、明室から暗室に入る時間は各曝露群と対照群の間に差は認められなかった (Fig.4)。すなわち、記憶保持期間には有意な差が認められなかった。

## 3.3.4 高架式プラットフォーム試験

Fig.5 に示すように、Ara-C 15 mg/kg bw 群のすくみ行動持続時間は、対照群に比較して約 2 倍となり、統計的に有意な増加が認められた(student's t test;  $p < 0.01$ )。

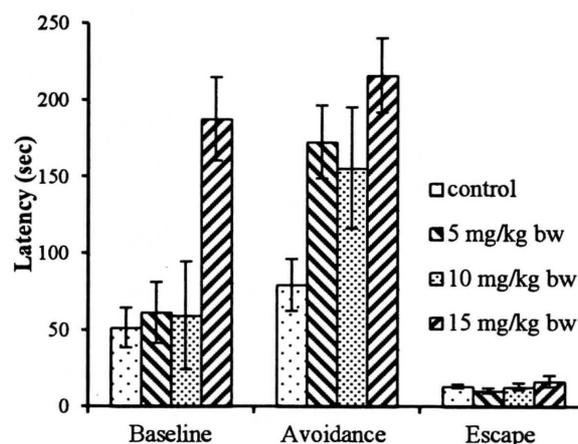


Fig.3 Effects of prenatal exposure of Ara-C on inhibitory avoidance and escape latencies in the elevated T-maze. Values are mean  $\pm$  SEM. \*= $p < 0.05$  or \*\*= $p < 0.01$  compared to the control group in the same trial (ANOVA test). Control; n=16, 5 mg/kg bw, n=23, 10 mg/kg bw, n=8, 15 mg/kg bw, n=25.

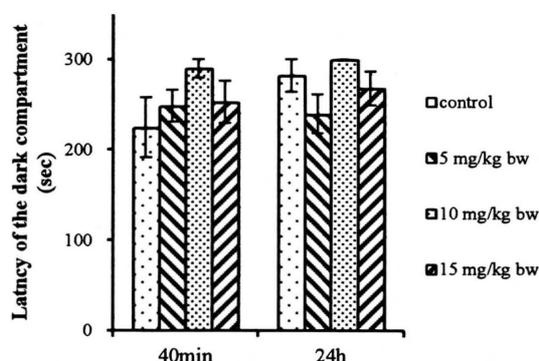


Fig.4 Step-through passive avoidance test. The latency of the mice entering the dark compartment was recorded 40 min and 24 hours after the training session. Between the latencies of the prenatal exposed and control groups were not significant (ANOVA test). Values are mean  $\pm$  SEM. Control: n=16, 5 mg/kg bw: n=23, 10 mg/kg bw: n=8, 15 mg/kg bw: n=25.

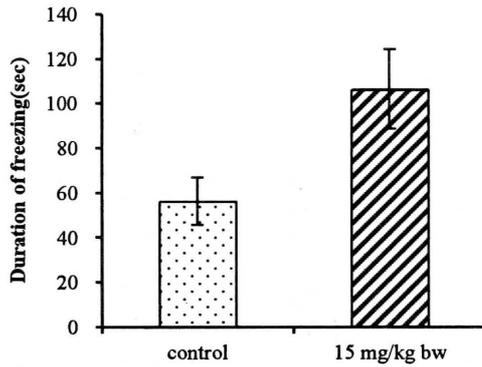


Fig.5 Effects of prenatal exposure of Ara-C on the duration of freezing in the elevated open-platform test. Values are mean  $\pm$  SEM. \*\*= $p < 0.01$  compared to the control group (Student's t-test). Control; n=10, 15 mg/kg bw; n=10.

### 3.3.5 脳形態の観察と脳内モノアミン濃度定量

対照群と各 Ara-C 曝露群の脳相対重量には有意な差は認められなかった。脳形態として計測を行った大脳皮質長径、大脳皮質短径および大脳縦裂径は、各 Ara-C 曝露群において対照群よりも有意に小さくなっていた ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ )。一方、小脳については小脳縦、小脳横ともに有意な差が認められなかった (Fig.6)。

対照群と Ara-C 15mg/kg bw 群の脳を摘出し、脳各部位における DA と 5HT の定量を行った結果、Ara-C 15mg/kg bw 群では線条体、大脳皮質、海馬および扁桃体における DA 濃度 (ng/g-wet tissue) の増加 (Fig.7) および線条体、海馬および扁桃体における 5HT 濃度 (ng/g-wet tissue) の増加 (Fig.8) が見られた ( $p < 0.01$  または  $p < 0.05$ )。特に扁桃体と海馬では 5HT 濃度の顕著な増加 (対照群の約 3 倍の濃度) が認められた。

## 4 考察

胎児期に Ara-C に曝露された各群において体重増加、身体分化完成時期、行動発達完成時期に対照群と比較して有意な差が認められなかったことから、妊娠 13,14 日における Ara-C 15 mg/kg bw までの母動物への投与は、出生した児の成長発育に大きな影響を及ぼさなかったと考えられる。したがって、行動試験を実施した時期である 7 から

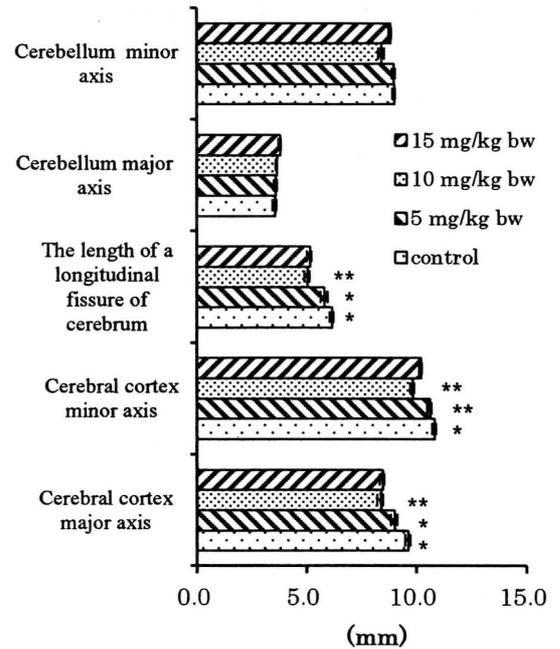


Fig.6 Anatomical sizes of cerebellum and cerebrum. The cerebellum sizes of the prenatal exposure of Ara-C groups were not different from the control group. On the other hand, cerebrum sizes were significantly decreased in the prenatal exposure groups compared to the control group. \*= $p < 0.05$  or \*\*= $p < 0.01$  compared to the control group (ANOVA test). Control; n=16, 5 mg/kg bw; n=23, 10 mg/kg bw; n=8, 15 mg/kg bw; n=25.

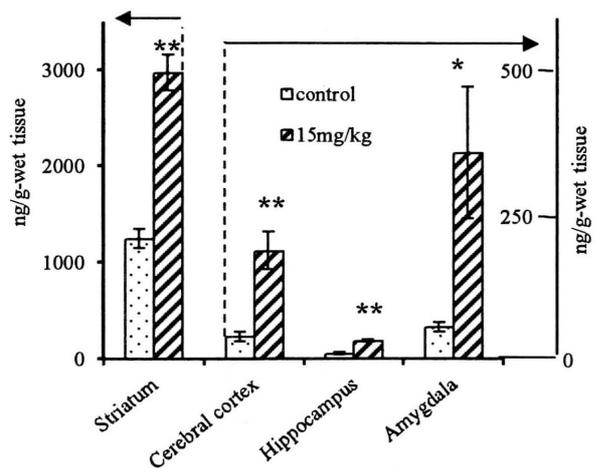


Fig.7 Effects of prenatal exposure of Ara-C on the concentration of dopamine in the brain at 10 weeks old. Values are mean  $\pm$  SEM. \*= $p < 0.05$  or \*\*= $p < 0.01$  compared to control group (Student's t-test). Control; n=5, 15 mg/kg bw; n=5.

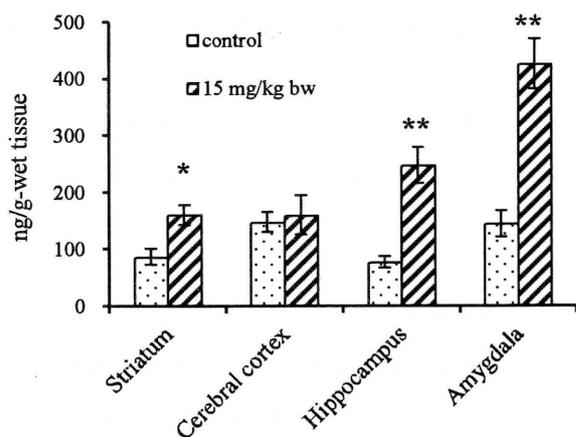


Fig. 8 Effects of prenatal exposure of Ara-C on the concentration of 5HT in the brain at 10 weeks old. Values are mean  $\pm$  SEM. \*= $p < 0.05$  or \*\*= $p < 0.01$  compared to the control group (Student's t-test). Control; n=5, 15 mg/kg bw; n=5.

10 週齢で発育抑制や体重減少などによる行動への問題は生じていなかったと考えられる。このことは、行動試験によってその情動的特性や学習・記憶を調べるには重要なことであり、本研究の発達障害に類似する行動の異常を把握するには適切な系であったと言える。

オープンフィールドという新奇環境下において、すべての Ara-C 曝露群において対照群に比較して有意に区画線を横切る回数 (区画移動数) が増加していた。また、曝露量に依存して数が増加していたことにより、それが Ara-C 曝露に起因するものと想定できる。しかし、この多動性が、探索性によるものか不安行動の一面を示しているのかは、この回数の解析のみでは不明である。また、不安の指標として用いられる脱糞・排尿数や落ち着きの指標であるとされる身繕い回数には、対照群と比べて統計学的に有意差は認められなかった。

高架式 T 字迷路では、Ara-C 曝露群はオープンフィールド試験では多動であるにもかかわらず、はじめて置かれたクローズドアームから出る行動を見るための 1 回目の施行 (baseline) においては 15 mg/kg bw 群のクローズドアームから出るまでの時間が有意に増加していた。15 mg/kg bw 群マウスがなかなかクローズドアーム外に出られないことは不安が強いことを意味していると考えられる [19]。

さらに、一度経験した恐怖体験を回避しようとする 2 回目の試行 (条件付き恐怖反応を見る) では、対照群と比較してすべての Ara-C 曝露群において、回避時間が有意に増加していた。このことは、Ara-C 曝露群において一度経験した恐怖からの回避反応が強くなっていることを示している。一方、オープンアームの端に置いて、クローズドアームに入るまでの時間 (逃避時間) を計測すると、対照群と各 Ara-C 曝露群間における差は認められなかった。これは、オープンアームにいる本能的恐怖は対照群も Ara-C 曝露群もともに強いため、素早くクローズドアームに入るため差が認められなかったためであろう。また、Ara-C 曝露群には成長過程の運動機能や行動発達に問題は観察されず、逃避行動で対照群に遅れることはなかったと考えられる。

高架式プラットフォーム試験におけるすくみ反応持続時間の計測は、動物に運動の強制や疼痛刺激のような身体的負荷を伴わず、高所ストレス負荷のみであることから、心理的ストレス状況下における動物の行動を解析することが可能であると言われている [20-22]。この試験において、Ara-C 15 mg/kg bw 群では対照群に比較して有意にすくみ反応の持続時間が増加しており、高所における本能的恐怖が強いことを示している。15 mg/kg bw 群における高架式 T 字迷路試験での baseline の時間と高架式プラットフォーム試験でのすくみ反応持続時間の有意な増加は、不安や高所恐怖反応が増大していることを示している。また、一度経験した恐怖を回避しようとする行動も Ara-C 曝露群のすべてで認められ、本研究で実施した 5 mg/kg bw は、実際に白血病治療に用いられる量に匹敵するが、そのような量を妊娠期の母動物へ投与する場合にも出生した児には条件付き恐怖反応の増加といった情動行動の変化が見られている。

一方、受動的回避試験を用いて学習定着に関わる能力と 40 分後と 24 時間後の記憶保持について試験を行ったが、Ara-C 曝露群と対照群には有意な差が認められなかった。すなわち、学習記憶行動の障害は、受動的回避試験によって検出され得るほど大きくはなかったと考えられる。

しかし、電気ショックという強い刺激は、Ara-C の曝露によって何らかの記憶障害や学習障害が起こるとしても、本実験で見出したような恐怖や不安が強いマウスに対しては、記憶や学習能力に違いを見出すには不向きな試験で

あるかもしれない。本研究で用いた受動的回避試験のような恐怖刺激を与えて、その記憶を見るような試験よりも、八方向迷路(Radial 8-arms maze)[23]のような摂食に対する学習行動を見る試験の方が適切かもしれない。

脳の形態においては、すべての Ara-C 曝露群の脳の大きさ(大脳皮質長径, 大脳皮質短径, 大脳縦裂径)は有意に小さくなっていた。しかし、小脳縦, 小脳横大脳には、有意な差はなかった。したがって、Ara-C 曝露によって大脳皮質において増殖している細胞にアポトーシスが生じて[12]細胞数の減少などの問題を生じた可能性を示唆している。

胎児期 Ara-C 曝露による情動行動の変化については、ラットの妊娠 19.5 と 20.5 日に Ara-C 30 mg/kg bw を連日腹腔内投与し、得た出生児の行動が統合失調症様の行動を示す(プレパルスインヒビション (PPI) 試験による驚愕反応の低下)と Elmer らが報告している[24]。アポモルフィンやアンフェタミンなどの DA 作動薬を投与された動物は DA 神経伝達の亢進を起し、PPI の障害を認める[25,26]なので、Elmer らの報告は、脳内 DA 濃度を計測していないので不明であるが、胎児期 Ara-C 曝露が DA 神経伝達亢進を招き、PPI 障害を生じた可能性も考えられる。

発達障害の一つである自閉症においても PPI 障害が報告されている。すなわち、自閉症を合併する脆弱 X 症候群の男性と脆弱 X 症候群モデルマウスにおいて PPI 試験において驚愕反応の低下が報告されている[27]。また、他の自閉症モデルマウスにおいても PPI の障害が認められている[28]。本研究によって作られた胎児期 Ara-C 曝露マウスは、PPI 試験を実施してないので統合失調症または自閉症と特定はできないが、情動行動に異常を示すという点で Elmer らの報告に矛盾はしていない

脳内 DA 量増加と不安様行動増加に関しては、胎児期にビスフェノール A に曝露された出生マウスの特に雄マウスにおいて不安様行動増加と脳内 DA 量増加が報告されている[29]。したがって、本研究における胎児期 Ara-C 曝露マウスにおいても脳内 DA 量の増加が不安様行動を増加させたのではないかと考えられる。

また、妊娠 9 日目の妊娠ラットにサリドマイド、あるいはバルプロ酸ナトリウムを投与して、その出生児を自閉症モデルラットとしている報告[30]があり、それらのラット

では海馬で 5HT 濃度、前頭皮質で DA 濃度が有意に上昇し、血中の 5HT 濃度の増加が観察されている[30]。自閉症と 5HT の関係については、ヒトの自閉症スペクトラム障害において全血 5HT レベル、または高 5HT 血の増加が認められており、5-HT 輸送体 (SERT) 遺伝子 (SLC6A4) のトランスジェニックマウスは、反復行動などの自閉症様行動を示し、かつ高 5HT 血を示している[31]。また、中枢神経系の神経伝達において 5HT の変化はヒトおよびげっ歯類ともに不安行動に関連していると報告もある[32]。

本研究では、中枢神経形成期の胎児期に Ara-C を曝露したマウスにおいて各種行動試験を用いて多動性、不安と恐怖反応、学習・記憶の行動の計測を実施した。それらのうち新奇環境下での多動性と不安と恐怖反応に有意な差を見出した。また、胎児期 Ara-C 曝露は、出生した児の脳内のモノアミン類の濃度を変化させていることを見出した。したがって、Ara-C 脳内モノアミン量の変化の反映として情動行動の異常を引き起こしたと考えられる。したがって、本研究の目的とする胎児期の化学物質曝露によって行動異常を呈するマウスの作出には成功したと言える。

今後は、これらの情動行動の異常がヒトにおける自閉症または統合失調症と関連するのかどうかを PPI 試験や社会性試験などを追加して調べる必要があると考えられる。また、モノアミン類の増加がどのようなメカニズムで起こったのかも調べる必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodriguez A, et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry* 160(2003)1028-1040.
- 2) Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, et al. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet*. 37(2000)489-497.
- 3) Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Koong SL, Shih LY, Taylor JS, et al. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 241(1988)334-336.

- 4) Stromland K, Nordin V, Miller M, Akerstrom B, Gillberg C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol.* 36(1994)351-356.
- 5) Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, et al. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 160(2003)1985-1989
- 6) Grant, S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv cancer Res.* 72(1998) 197-233.
- 7) Chiba, K., Ihikawa, H., Rahman, M.E. et al. Neonatal mouse hip joint and hindlimb anomalies induced by prenatal exposure to Ara-C. *Reprod Toxicol.* 10(1996) 215-219.
- 8) Ortega, A., Puig, M., Domingo, J.L. Maternal and developmental toxicity of low doses of cytosine arabinoside in mice. *Teratol.* 44(1991) 379-384.
- 9) Rahman, M.E., Ishikawa, H., Watanabe, Y. et al. Stage specificity of Ara-C induced carpal and tarsal bone anomalies in mice. *Reprod Toxicol.* 9(1995)289-296.
- 10) Vaux, K.K., Kahole, N.C., Jones, K.L. Cyclophosphamide, methotrexate, and cytarabine embryopathy: is apoptosis the common pathway? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 67(2003)403-408
- 11) Yamauchi, H., Katayama, K., Ueno, M. et al. Involvement of p53 in 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine-induced rat fetal brain lesion. *Neurotoxicol Teratol.* 26(2004)579-586.
- 12) Yamauchi, H., Katayama, K., Ueno, M. et al. Involvement of p53 in 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta. *Biol Reprod.* 70(2004)1762-1767.
- 13) Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno V., Ivic, L. et al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2004)136-144.
- 14) 杉本岳. 「Ara-C の胎生期投与による中枢神経系障害—妊娠期の薬剤影響の視点から—」. 近畿大学総合理工学研究科理学専攻 2009 年度修士論文. 2009.
- 15) Takano, T., Akahori, S., Takeuchi, Y. et al. Neuronal apoptosis and gray matter heterotopias in microcephaly produced by cytosine arabinoside in mice. *Brain Res.* 1089( 2006)55-66.
- 16) 栗原久, 断崖反射, 生体の科学 45(5)(1994)444-445.
- 17) 水谷正寛, 傾斜版テスト (背地走性テスト), 生体の科学, 45(5)(1994)452-453.
- 18) 山田勝士, オープンフィールドテスト, 生体の科学 45(5), (1994)426-427.
- 19) Graeffa FG, Nettoa CF, Zangrossi H Jr.. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23(1998)237-246.
- 20) Davis HP, Spanis CW, Squire LR. Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacol Biochem Behav.* 4(1)(1976)13-16.
- 21) 宮田茂雄, 大澤匡弘, 亀井淳三. 高架式プラットホーム試験法: ストレス抵抗性の評価に適した簡便な行動解析法, 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 132(2008)213-216.
- 22) Miyata S, Shimoi T, Hirano S, Yamada N, Hata Y, Yoshikawa N, Ohsawa M, Kamei J. Effects of serotonergic anxiolytics on the freezing behavior in the elevated open-platform test in mice. *J Pharmacol Sci.* 105(3)(2007)272-278.
- 23) Hiraga Y, Iwasaki T. Recent advances in studies of rat memory in the radial-arm maze, *Yakubutsu Seishin Kodo.* 3 (1983) 99-108.
- 24) Elmer GI, Sydnor J, Guard H, Hercher E, Vogel MW. Altered prepulse inhibition in rats treated prenatally with the antimitotic Ara-C: an animal model for sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 174(2)(2004)177-189.
- 25) Satake S, Yamada K, Melo LL, Barbosa Silva R. Effects of microinjections of apomorphine and haloperidol into the inferior colliculus on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in rat, *Neurosci Lett.* 509(1)(2012) 60-63.
- 26) Choy KH, de Visser YP, van den Buuse M. The effect of 'two hit' neonatal and young-adult stress on dopaminergic modulation of prepulse inhibition and dopamine receptor density, *Br J Pharmacol.* 56(2)(2009)388-396.
- 27) P.W. Frankland, Y. Wang, B. Rosner, T. Shimizu, B.W. Balleine, E.M. Dykens et al. Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. *Mol Psychiatry* 4(2004)417-425.

- 28) DeLorey TM, Sahbaie P, Hashemi E, Li WW, Salehi A, Clark DJ. Somatosensory and sensorimotor consequences associated with the heterozygous disruption of the autism candidate gene, *Gabrb3*, *Behav Brain Res.* 216(1)(2011)36-45.
- 29) Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Hormones Behav.* 58(2010)754-761.
- 30) Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr Res.* 52(4)(2002)576-579.
- 31) Veenstra-VanderWeele J, Muller CL, Iwamoto H, Sauer JE, Owens WA, Shah CR, Cohen J, Mannangatti P, Jessen T, Thompson BJ, Ye R, Kerr TM, Carneiro AM, Crawley JN, Sanders-Bush E, McMahon DG, Ramamoorthy S, Daws LC, Sutcliffe JS, Blakely RD. Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(14)(2013)5469-574.
- 32) Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, González-Maeso J, Hornung JP, Sibille E, Underwood M, Itohara S, Dauer WT, Ansorge MS, Morelli E, Mann JJ, Toth M, Aghajanian G, Sealfon SC, Hen R, Gingrich JA. Cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science.* 313(5786)(2006) 536-540.