

# 喫煙がおよぼす胎児脳発生障害 - 光学イメージング解析による新規メカニズムの提唱 -

関東学院大学 人間環境学部 健康栄養学科  
佐藤 容子

## 1. はじめに

妊娠中の喫煙は、胎児脳奇形、新生児低体重、早産などのほか、attention-deficit disorder、hyperactivity、learning disabilitiesなどの認知・高次脳機能障害や新生児突然死症候群 (sudden infant death syndrome: SIDS)を引き起こすことが知られており、特にSIDSに関してはニコチンによる呼吸中枢の機能発生異常との関連が強く示唆されている。しかし、喫煙による脳障害発生のメカニズムについては今なお不明の点が多く、その解明が強く求められている。

われわれは、これまでにニューロン電位活動の光学的イメージング法を用いて、脊椎動物中枢神経系の機能発生・機能構築過程の解析を行ってきたが、その過程で、胎生期における中枢神経系の機能発生に重要な役割を果たすと考えられる広範囲伝播性脱分極波 (depolarization wave)を見出した。この脱分極波は、前脳から脊髄まで、中枢神経系の非常に広範囲にわたって伝播する興奮波で、発生の一時期に限局して発現するが、その発現時期はシナプス回路網の形成期と重なっており、脱分極波を介するニューロン群の秩序正しい同期的活動が、神経回路網の正常な発生に不可欠であることが示唆された。これに続く伝播ネットワークの解析で、ニコチン性アセチルコリン受容体が、脱分極波の伝播に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この脱分極波は、当初鶏胚で見いだされたが、哺乳類にも発現していることが最近確認され、母体のニコチン摂取による胎児脳発達への影響という観点から、哺乳類における解析が極めて重要であることが強く示唆された。

本研究は、脱分極波を介した神経系の発生制御機構と、それに関連したニコチン性アセチルコリン受容体の役割について解析を行い、喫煙が及ぼす胎生期の神経系発生への影響について、新たなメカニズムを解明することを目的とする。

## 2. 方法

### 1) 哺乳類における脱分極波の特性とニコチン性アセチルコリン受容体の関与についての解析

哺乳類における脱分極波の特性、特にアセチルコリン受容体の関与とニコチンの影響について明らかにするために、マウス胚から摘出した中枢神経系標本を用いて、脱分極波の時空間パターンと薬理学的特性について解析を行った。胎生 11 - 14 日のマウス胚から、脳神経・脊髄神経をつけたままの脳幹-脊髄標本を摘出し、標本を膜電位感受性色素 (NK2761) で染色した。測定には、我々の研究室で独自に設計し従来用いてきた光学的 1020 チャンネル同時測定システムを用い、ニューロン電位活動を光学的変化としてイメージングした。中枢神経系内における脱分極波の伝播・時空間パターンを同定後、ニコチンをはじめとするニコチン性アセチルコリン受容体の agonist・

antagonist を外液に投与し、脱分極波がどのような影響を受けるのかを調べた。また、光学的計測と併行して、脳神経・脊髄神経から脱分極波にともなって生じる集合活動電位を電気生理学的にモニターし、自発活動のリズム頻度に対するニコチン性アセチルコリン受容体の agonist・antagonist の効果を解析した。

## 2) In ovo 鶏胚におけるニコチンの影響についての解析

母体の喫煙にともなう胎児脳発生異常の解析を行うにあたり、まず in ovo の鶏胚を用いて、胚の外部環境が脱分極波ならびに胚の発生にどのような影響を及ぼすのかについて調べた。鶏胚は、胚の取り扱いや発生段階のコントロールが容易であること、哺乳類に近い得られた結果を哺乳類における解析へと効率良く発展させることができること、などの利点を有している。本研究では、胚に対する薬理的慢性実験が容易であるという点をふまえ、まず鶏胚を用いて解析を行い、その結果に基づいて、妊娠ラット・マウスの母体のニコチン暴露について検討を行うこととした。

孵卵 4～5 日の鶏卵に穴を開け、卵殻、卵膜を丁寧に除去した後、鶏胚の動き (embryonic motility) を計測した。鶏胚の動きの記録は、目視で動きを確認しながらそのタイミングを記録装置にマークするという方法で行った。必要に応じて卵殻に開けた穴をテープで密封し、孵卵を継続して研究を行った。

## 3. 結果

### 1) 哺乳類における脱分極波の特性とニコチン性アセチルコリン受容体の関与についての解析

胎生 11～13 日のマウス胎仔から摘出した脳幹-脊髄標本を膜電位感受性色素で染色し、自発性神経活動を光学的に測定すると、脳神経・脊髄神経から記録される集合活動電位と同期して、中枢神経系内に広範囲に伝播する光学的シグナルが観察された。光学的シグナルの形状、伝播パターンは、これまでに鶏胚で観察されてきた広範囲伝播性脱分極波と類似しており、哺乳類においても鶏胚と同様の脱分極波が自発性に生じていることが示された。

胎生 11 日のマウス胎仔において、ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害剤である *d*-tubocurarine (50  $\mu$ M) を外液に投与すると、自発性神経活動は全例において消失した (n=3)。一方、グルタミン酸受容体の阻害剤 APV (200  $\mu$ M)、CNQX (5  $\mu$ M) の投与では、自発活動の頻度に変化は見られなかった (APV: 101.6 $\pm$ 13.5%, n=4; CNQX: 92.0 $\pm$ 20.2%, n=3)。自発活動の薬理学的特性は、発生が進むにつれてアセチルコリン依存性からグルタミン酸依存性へと変化し、胎生 14 日では、自発活動は *d*-tubocurarine (50  $\mu$ M) の投与では抑制されず (117.7 $\pm$ 42.4%, n=4)、APV (200  $\mu$ M) によって大きく抑制された (9.7 $\pm$ 16.8%, n=4)。この結果は、鶏胚の脱分極波でみられた薬理学的特性と類似しており、このことから、これまでに報告されてきた鶏胚と同じく、哺乳類においても、ニコチン性アセチルコリン受容体が発生初期のある一時期に特異的に脱分極波に関与していることが明らかとなった。

次に、ニコチン性アセチルコリン受容体の agonist である nicotine の効果について検討を行った。胎生 11～13 日のマウス胎仔において、nicotine (10  $\mu$ M) を外液に投与すると、自発活動は一過性に増強するが、その後は AC 成分のみが観察され、脳神経と脊髄神経の同期した活動 (DC 成分変化)、すなわち脱分極波に相当する活動は、消失してしまうことが明らかとなった。

### 2) In ovo 鶏胚におけるニコチンの影響についての解析

孵卵 5-7 日の鶏胚で in ovo の動きを観察すると、数十秒から数分に 1-2 回の頻度で、全身を折りたたまふような動きが見られた。この動きは embryonic motility と呼ばれ、鶏胚のみならず、子宮内のラット胚やマウス胚でも観察されることが知られている。脊髄神経からの集合活動電位を in ovo で解析した実験から、鶏胚のこの動きは自発性脱分極波を反映したものである事が分かっている。鶏胚の動きを 5 分間観察し、そのタイミングを調べると、摘出中枢神経系標本で光学的あるいは電気生理学的に測定された自発性脱分極波とほぼ同じ頻度で出現していることが示された。

孵卵 5-6 日の in ovo 鶏胚で、*d*-tubocurarine (1-5 mM, 100  $\mu$ l) を卵内に投与すると、*d*-tubocurarine の投与直後から鶏胚の動きが止まってしまう事がわかった。一方、APV (5-10 mM, 100  $\mu$ l) を投与した際には、動きの頻度はやや減少するものの消失することではなく、このことから、この時期の鶏胚では、embryonic motility はアセチルコリン受容体に依存していることが明らかとなった。*d*-tubocurarine が神経筋接合部に効いている可能性を検証するために、*d*-tubocurarine と同様に脱分極波を阻害することが知られている bicuculline と strychnine の混合液 (bicuculline 1 mM/strychnine 1 mM, 100  $\mu$ l) を投与すると、embryonic motility は *d*-tubocurarine と同様に消失した。同じ発生段階の鶏胚で、nicotine を in ovo に投与すると、投与直後に連続した動きが数十秒続いた後、動きが停止し、それ以降の鶏胚の動きがまったく見られなくなる事がわかった。

#### 4. 考察・まとめ

マウス胚摘出中枢神経系標本および in ovo の鶏胚において、アセチルコリン受容体の阻害剤や、agonist である nicotine によって、脱分極波とそれともなう embryonic motility が阻害される事が明らかとなった。Nicotine の効果は、アセチルコリン受容体に結合した nicotine が受容体の脱感作をおこし、その結果自発性脱分極波がブロックされるためと考えられる。中枢神経系の発生における脱分極波の意義を考慮すると、nicotine のこのような作用は、その後の脳発生に重大な影響を及ぼし、母体の喫煙ともなう胎児脳発生異常にも関与していることが推測される。

#### 5. 発表論文

1. Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Kinoshita, M. (2009)

Origin of the earliest correlated neuronal activity in the chick embryo revealed by optical imaging with voltage-sensitive dyes. *European Journal of Neuroscience* 29: 1-13.

2. Mochida, H., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2009)

Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. *European Journal of Neuroscience* 29: 14-30.

3. Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2010)

Monitoring population membrane potential signals during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. In "The Voltage Imaging Book", eds. M. Canepari and D. Zecevic, Springer, New York, in press.