

バルプロ酸曝露後のラット胎児脳大脳皮質の微細構造

熊谷文明¹, 臼見憲司¹, 丸茂秀樹¹, 斉藤義明¹, 永田伴子², 桑形麻樹子¹**The ultrastructural observation of the cerebral cortex after valproic acid exposure in rat fetuses**Fumiaki KUMAGAI¹, Kenji USUMI¹, Hideki MARUMO¹, Yoshiaki SAITO¹,
Tomoko NAGATA², Makiko KUWAGATA¹

We examined the fetal cerebral cortex ultrastructure using a transmission electron microscope (TEM). Valproic acid (VPA, 600 mg/kg) was exposed to pregnant female rats on gestation day (GD) 11, and fetal brain was obtained on GD16. Epoxy-embedded sections were prepared for TEM examination.

In the ventricular zone (VZ), the VZ consisted of two distinctive cell types, the cells having oval nucleus with moderate chromatin and cells having invaginated nucleus with electron-dense cytoplasm. Cells on bottom of the VZ were bound together by desmosome junction, and multiple cell divisions were also observed. In the VPA group, the structure and numbers of organelles such as ribosome, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and centriole were comparable to those of the control group. In the intermediate zone (IZ), dark cells showing oval nucleus with long cytoplasmic processes were directed tangentially to the cortical surface, and microtubules were observed therein. Cell direction in the IZ was unordered in the VPA group as compared to the control group. In the sub-plate (SP), the vacuolar structures surrounded by the unit membrane, in the extracellular space and extended cell processes into the cortical plate (CP) were observed. In the VPA group, small vacuolar structures, and extracellular space were noticed, resulting in a fuzzy SP. The CP consisted of cells having large and pale stained nucleus that were lined up radially to the cortical structure mostly. Some dark cells were invaginated into the CP. In the VPA group, more numbers of this dark cell were observed, and arrangement of cells was disrupted.

From the results, cells constituting each layer showed a distinctive structure by TEM. Although organellar structures and their distribution were similar between the VPA and control groups, VPA exposure caused disruption of the cell position and symmetry.

緒言

臨床報告から、抗てんかん薬であるバルプロ酸 (valproic acid ; VPA) を妊婦がある時期に服用すると、その後生まれてきた子供が自閉症を発症するリスクが高くなることが知られている^{1,2)}。動物実験においても、ラット胎児の神経管閉鎖前後に相当する母動物の妊娠時期にVPAを曝露し、その出生児を用いた自閉症モデルの研究が近年行われている³⁻⁷⁾。

われわれは、ラット胎生期VPA曝露自閉症モデルを用いてVPA曝露後の神経発生への影響を調べてきた。800 mg/kgのVPAを妊娠ラットの11日に単回経口投与し、妊娠16日 (=胎齢16日, GD16) に採取した胎児脳の約45 μmゼラチン切片による組織学検査を実施した結果、VPA曝露により大脳皮質皮質板 (Cortical plate ; CP) の厚さが対照群よりも薄く、サブプレート層 (Sub-plate ; SP) も不明瞭となることを明らかにした⁸⁾。

中枢神経系は神経管から発生し、そこに存在する神経系幹細胞の分裂により神経芽細胞および神経膠芽細胞に分化するとされているが、GD16

1 毒性部病理学研究室

2 毒性部長

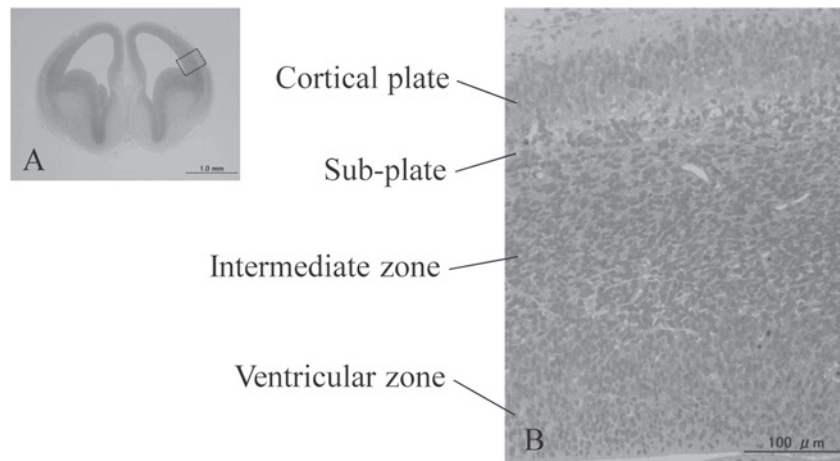


写真1 ラットGD16の胎児大脳の超薄切片作製部位
(約1 μm樹脂切片, トルイジン青染色)

A: 大脳前頭面の組織像, B: Aの□部の拡大像(超薄切片作製部位).

の発生段階では主に神経芽細胞産生の時期であり, 幼若な神経系の細胞の分裂, 移動および集積が観察可能な時期である. すなわち, 脳室帯 (Ventricular zone; VZ) で細胞分裂を終えた神経芽細胞が中間帯 (Intermediate zone; IZ) を移動した後, 脳膜側に集積し, SPおよびCPを形成する時期である.

本研究では, 透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて VPA 曝露後のラット GD16 胎児脳における VZ, IZ, SP および CP の微細構造を観察し, VPA 曝露による脳初期発生への影響を調べた.

材料および方法

実験には, 日本チャールス・リバーより購入した Fischer 妊娠ラット (F344/DuCrIj) を 8 匹 (対照群 4 匹, VPA 曝露群 4 匹) 用いた. 動物は, 室温 21.0~25.0°C, 湿度 40.0~75.0%, 照明 12 時間明暗周期 (7 時~19 時点灯) に設定された動物室で, 固型飼料 (CE-2, 日本クレア) および飲料水を自由摂取させて飼育した.

投与量は, われわれの SD ラットを用いた既報⁸⁾ に基づき実施した結果, 全胚吸収が認められたために, 600 mg/kg の VPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を GD11 (膈栓確認日 = GD0) の F344 ラットに 5 mL/kg の容量で経口投与し, GD16 に帝王切開した. 対照群には, 生理食塩液を同様に投与した. 胎児脳は, 0.1M リン酸緩衝

2% パラホルムアルデヒド・1.25% グルタルアルデヒド混合固定液を用いて浸漬固定した胎児頭部より, 頭蓋骨を除去して採取した. その後, 胎児脳を大脳の前額側から 1/3 の部位を前頭断で細切し, 固定液の浸透性を高めるために 70 kPa 程度の圧力で引き続き吸引浸漬固定した. さらに, 細切片を 0.1M リン酸緩衝液で洗浄後, 0.1M リン酸緩衝 2% 四酸化オスミウムで後固定したのち, エタノール上昇系列で脱水してエポキシ系樹脂に包埋・重合した.

重合が終了した樹脂ブロックから, 光学顕微鏡による観察および超薄部位の確認のために約 1 μm の厚さのトルイジン青染色標本を作製した (写真 1). その後, トリミングが終了した樹脂ブロックから 65~70 nm 程度の厚さ (干渉色: シルバー~シルバーゴールド) の超薄切片を作製し, 酢酸ウラニル染色液および佐藤の鉛染色液を用いた二重染色を施した. 染色後の超薄切片は, HT7700 形 TEM (日立ハイテクノロジー) を用いて観察した.

なお, すべての動物実験操作は, 「財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所動物実験に関する指針」に基づいて実施した.

結果および考察

1. 光学顕微鏡による観察

エポキシ系樹脂包埋による約 1 μm の厚さのトルイジン青染色切片観察において, 対照群と

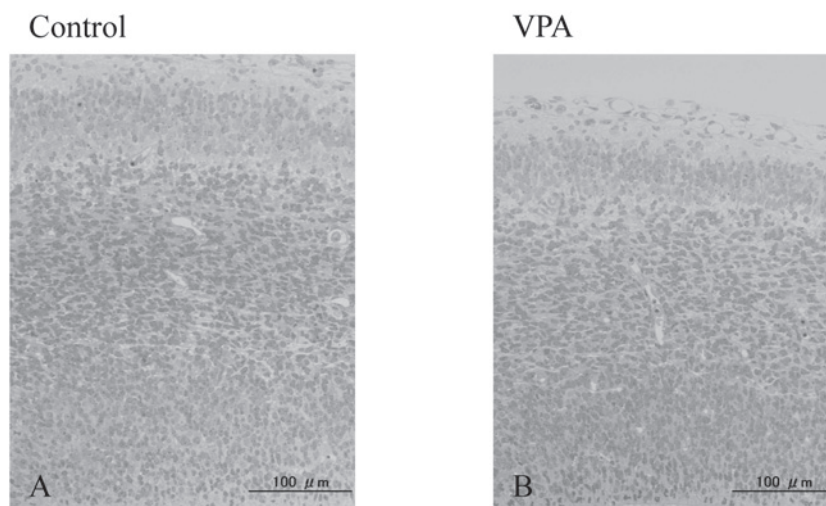


写真2 VPA曝露後のラットの胎児脳組織像(トルイジン青染色)
A; 対照群, B; VPA曝露群.

VPA曝露群を比較すると、VPA曝露群ではCPが薄く、その内側のSPが不明瞭であった(写真2)。これは、SDラットを用いて実施した45 μmゼラチン切片観察の結果と同様であった⁸⁾。皮質の厚さも対照群と比較して菲薄であった。

2. TEMによる観察

ラットGD16胎児脳(大脳皮質領域)のTEM観察では、対照群およびVPA曝露群ともに、幼弱な神経系細胞がみられ、細胞分裂像、細胞突起像あるいは集積により層形成を示す像などが認められた。

VZは、脳室に面する位置にある層であり、神経系幹細胞がVZ層内を放射方向に移動しながら細胞分裂を繰り返している領域であると言われている⁹⁾。VZ(写真3, 4)は、対照群およびVPA曝露群ともに、核小体が明瞭な楕円形の核を持つ明調細胞および形態的にこの明調細胞と同等の特徴を持つ暗調細胞で構成されていた(写真3-A, 3-B, 4-A, 4-B)。いずれの細胞にも、リボソーム、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置、細線維状構造物および中心小体等の細胞内小器官(写真3-C, 4-C, 4-D)がみられた。脳室面を構成する細胞は、デスマソーム様の細胞結合(写真3-D)により結合しており、細胞分裂像(写真3-E)も多数認められた。また、微絨毛(写真3-F)ならびに細胞膜の一部が陥入あるいは単一膜で囲まれた像

(写真3-G)も認められ、脳室内との物質輸送を示唆する所見と考えられた。その他、単位膜に囲まれた小胞の集合体(写真3-H)が細胞間隙および細胞突起の先端部に認められた。VZにおける細胞配列、細胞分裂の頻度、脳室面構造物の微細形態ならびに細胞内小器官の量および分布には、対照群とVPA曝露群とを比較して差は認められなかった。これらのことから、VZにおける神経系幹細胞の分裂には、VPA曝露による影響はないと考えられた。

IZは、VZの外側(脳膜側)に位置する層であり、VZにおいて分裂を終えた細胞が突起を伸ばしながら移動している領域である⁹⁾。さらにIZは、幼若な神経細胞マーカーであるTuJ-1(Neural Class III β -Tubulin)免疫染色陽性領域であることからIZを構成する多くの細胞は神経芽細胞で構成されていることが明らかになっている⁸⁾。IZ(写真5, 6)は、対照群およびVPA曝露群ともに、核小体が明瞭な紡錘形の核を持ち、核および細胞質ともに暗調な細胞で構成されていた。また、この暗調な細胞は、接線方向に伸長し、細胞体の間には同方向に伸長した細胞突起と考えられる細胞質が豊富に認められた(写真5-A, 6-A)。細胞突起内には細線維状構造物がみられ(写真5-C, 6-C)、VZに認められた単位膜に囲まれた小胞の集合体(写真6-D)も観察された。VZおよびIZにみられた単位膜に囲まれた小胞の集合体は、細胞

VZ-Control

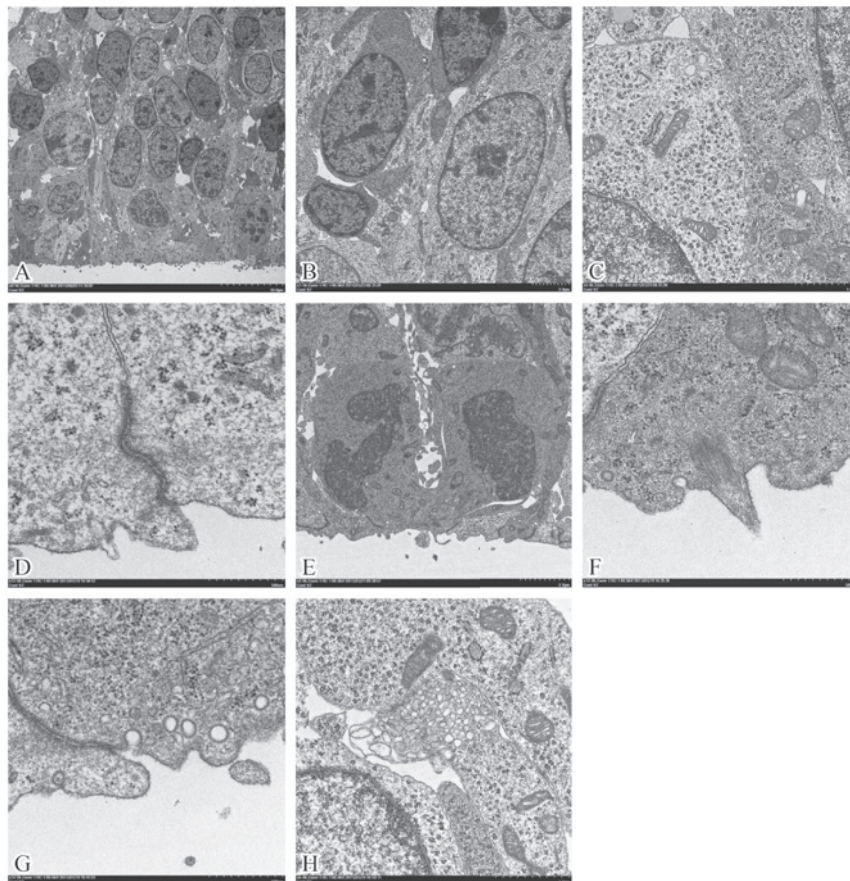


写真3 対照群のラットの胎児脳VZのTEM像(電子二重染色)

A: VZ弱拡像, B: 明調細胞および暗調細胞, C: 細胞内小器官(リボソーム, ミトコンドリア, 小胞体), D: デスモソーム様細胞接着, E: 細胞分裂像, F: 微絨毛, G: 細胞膜の一部が陥入あるいは単一膜で囲まれた像, H: 小胞の集合体.

VZ-VPA

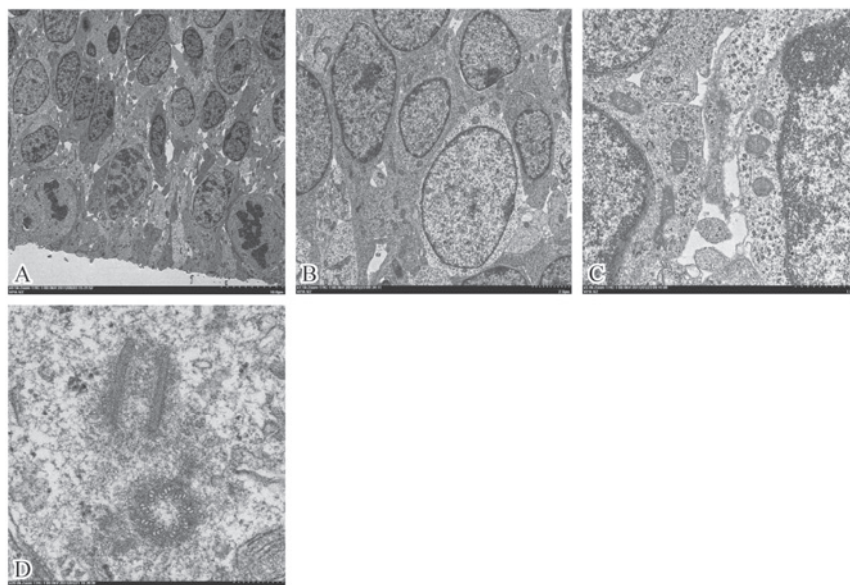


写真4 VPA曝露群のラットの胎児脳VZのTEM像(電子二重染色)

A: VZ弱拡像, B: 明調細胞および暗調細胞, C: 細胞内小器官(リボソーム, ミトコンドリア, 小胞体), D: 中心小体.

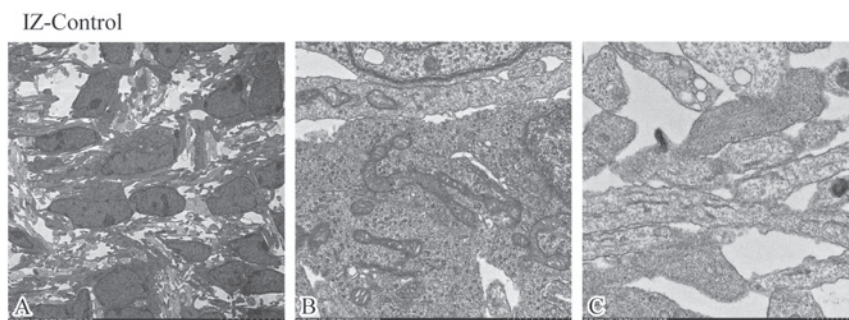


写真5 対照群のラットの胎児脳IZのTEM像(電子二重染色)

A ; IZ弱拡大像, B ; 細胞内小器官(リボソーム, ミトコンドリア, 小胞体),
C ; 細胞突起(細線維状構造物).

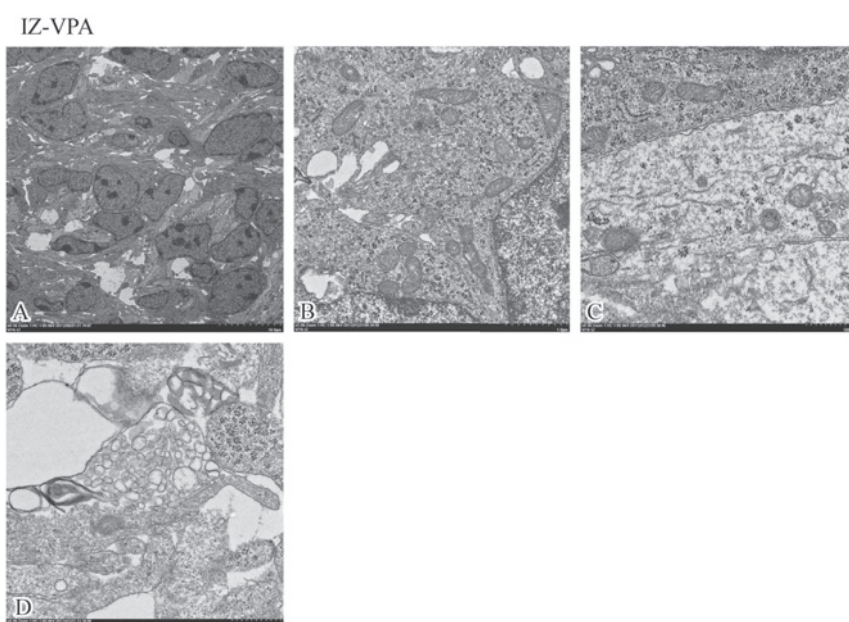


写真6 VPA曝露群のラットの胎児脳IZのTEM像(電子二重染色)

A ; IZ弱拡大像, B ; 細胞内小器官(リボソーム, ミトコンドリア, 小胞体),
C ; 細胞突起(細線維状構造物), D ; 小胞の集合体.

間隙または細胞突起の先端部に観察されたことから、細胞移動時の方向性に関連する構造物ではないかと考えられた。IZを構成する細胞の細胞内小器官(写真5-B, 6-B)の量および分布は、対照群およびVPA曝露群ともにVZに観察される細胞の細胞内小器官の量および分布とほぼ同等であったが、VPA曝露群では、細胞および突起の方向性に一部乱れ(写真6-A)が認められたことから、VPA曝露はIZにおける幼弱な神経系細胞の移動に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

SPは、IZの外側に位置する層であり、IZとCPの間隙としてみられる領域である。SP(写真7, 8)

は、対照群およびVPA曝露群ともに、明瞭な細胞間隙がみられ、その間を無秩序な方向性で走行する細胞突起(写真7-C, 8-C)および核小体が明瞭な暗調細胞(写真7-B, 8-B)で構成されていた。また、細胞突起の一部が袋状に膨らんでいる像も観察された(写真7-D, 8-D)。その他、SPにおいても、VZおよびIZでみられた小胞の集合体が認められた(写真8-E)。細胞内小器官は、その量および分布に両群の間に差は認められなかった。光学顕微鏡観察において不明瞭であったVPA曝露群のSPでは細胞間隙が少なかった(写真7-A, 8-A)。SPはその大部分が細胞間隙であることが明らか

SP-Control

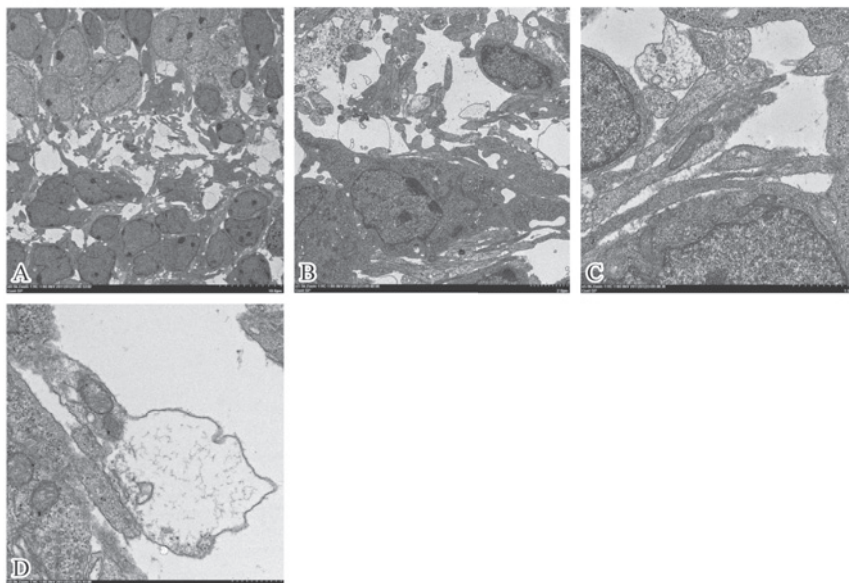


写真7 対照群のラットの胎児脳SPのTEM像(電子二重染色)

A : SP弱拡像, B : 暗調細胞, C : 細胞突起,
D : 細胞突起が袋状に膨らんでいる像.

SP-VPA

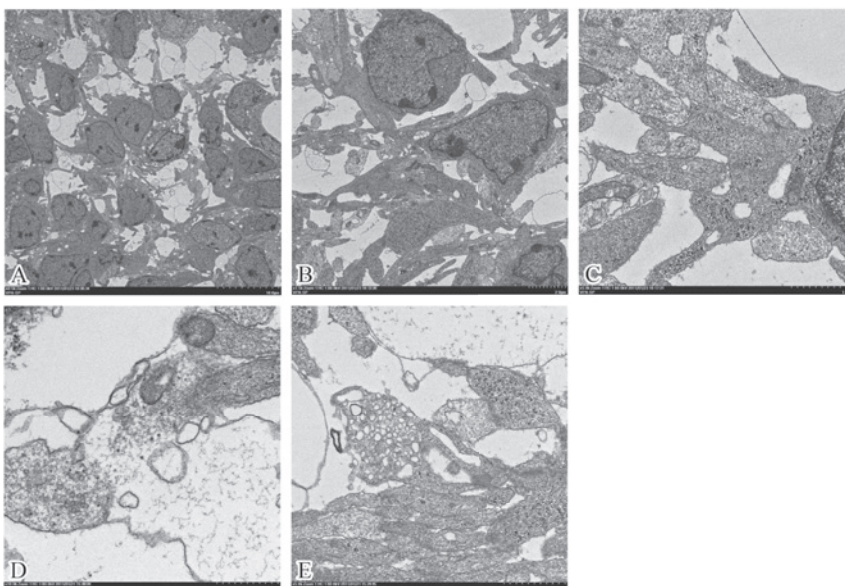


写真8 VPA曝露群のラットの胎児脳SPのTEM像(電子二重染色)

A : SP弱拡像, B : 暗調細胞, C : 細胞突起,
D : 細胞突起が袋状に膨らんでいる像, E : 小胞の集合体.

になったことから、IZおよびCPの乱れの影響によりその境界が不明瞭になったと考えられた。

CPはSPの外側に位置する層であり、移動してきた神経芽細胞が放射方向に集積する領域である。CPまで移動してきた神経芽細胞は、それ以

前に到達した神経芽細胞を超えて脳膜側に配置しCPを構築していくことが知られている⁹⁾。CP(写真9, 10)は、核小体が明瞭な大型の核を有する明調な細胞(写真9-B, 10-B)および暗調な細胞で構成されていた。対照群では、SPとの境界

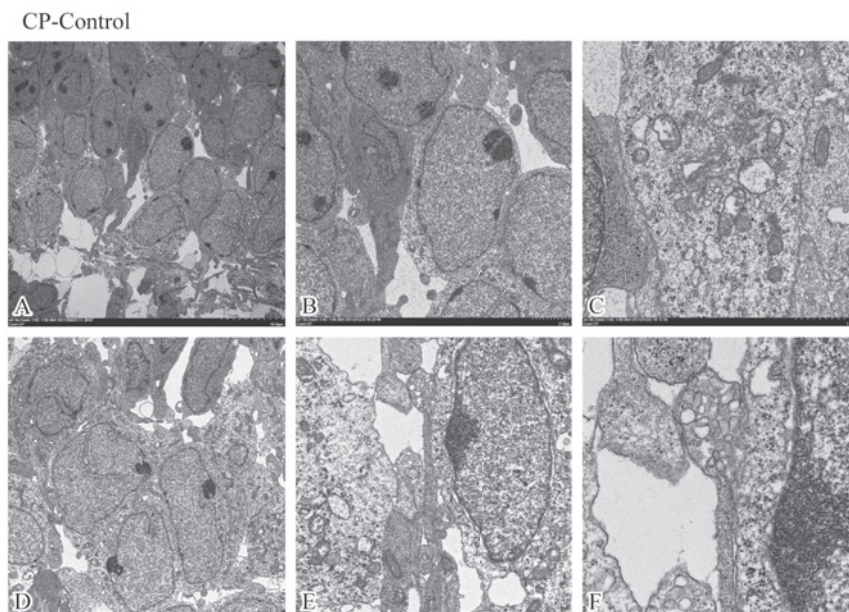


写真9 対照群のラットの胎児脳CPのTEM像(電子二重染色)

A：CP弱拡像， B：明調細胞および暗調細胞，
 C：細胞内小器官(リボソーム， ミトコンドリア， 小胞体)，
 D：核内に細胞質が陥入している像， E， F：小胞の集合体。

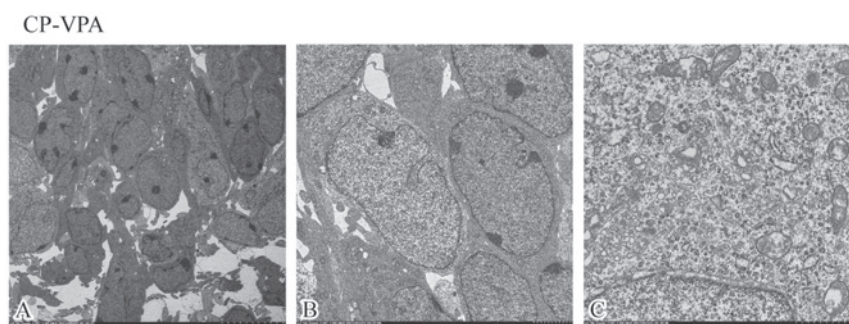


写真10 VPA曝露群ラットの胎児脳CPのTEM像(電子二重染色)

A：CP弱拡像， B：明調細胞および暗調細胞，
 C：細胞内小器官(リボソーム， ミトコンドリア， 小胞体)

において明調な細胞が並んで配列し，暗調な細胞がそこに入り込む様に存在していた。VPA曝露群では，SPとの境界において対照群と比較して暗調細胞の混在が多くみられ，配列に乱れ(写真9-A， 10-A)が認められたことから，VPA曝露はCPへの細胞の集積に影響を及ぼしている可能性が考えられた。CPを構成する細胞の細胞内小器官(写真9-C， 10-C)は，他の層に観察された細胞の細胞内小器官と比較して豊富に認められたが，それらの量および分布ともに両群の間に差は認められなかった。その他，一部の大型核を有する明調細胞では，核内の陥入像(写真9-D，

10-B)が認められた。さらに，細胞の移動方向を示す構造物と推察された単位膜に囲まれた小胞の集合体(写真9-E， 9-F)がCPにおいても観察された。

今回の結果から，GD16胎児脳の各層にみられる細胞の細胞内小器官の分布に差はみられなかったが，層毎に特徴的な細胞配列がみられた。また，VPA曝露群では，IZの細胞および細胞突起の方向性の乱れ，不明瞭なSPならびにCPの細胞配列の乱れが認められたことから，脳発生初期のVPA曝露が神経細胞の移動および集積に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

文 献

- 1) Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, et al.: A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet.* 2000; **37**: 489-497
- 2) Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, et al.: Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol.* 2005; **47**: 551-555
- 3) Ingram JL, Peckham SH, Tisdale B, et al.: Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol.* 2000; **22**: 319-324
- 4) Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, et al.: Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol.* 1996; **370**: 247-261
- 5) Ogawa T, Kuwagata M, Hori Y, et al.: Valproate-induced developmental neurotoxicity is affected by maternal conditions including shipping stress and environmental change during early pregnancy. *Toxicol Lett.* 2007; **174**: 18-24
- 6) Stanton ME, Peloso E, Brown KL, et al.: Discrimination learning and reversal of the conditioned eyeblink reflex in a rodent model of autism. *Behav Brain Res.* 2007; **176**: 133-140
- 7) Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, et al.: Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology.* 2008; **33**: 728-740
- 8) Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S, et al.: Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model; a developmental neurotoxicity study. *Int J Dev Neurosci.* 2009; **27**: 399-405
- 9) Sanes DH, Reh TA, Harris WA: "Development of the Nervous System, Second Edition", San Diego: Academic Press, 2006