

**1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine**  
**(MPTP) の胎子および新生子マウスの**  
**中枢神経毒性に関する研究**

才 貴史

# 目次

緒論	1
第一章 胎子および新生子マウスにおける MPTP および MPP <sup>+</sup> 中枢神経毒性の生化学的評価	
要旨	7
序	8
材料と方法	10
結果	15
考察	18
第二章 胎子および新生子マウスにおける MPTP および MPP <sup>+</sup> 中枢神経毒性の病理組織学的評価	
要旨	33
序	34
材料と方法	36
結果	38
考察	39
第三章 胎子および新生子マウスにおける MPTP 中枢神経毒性への MAO-B の関与	
要旨	48
序	49
材料と方法	50
結果	53
考察	55
第四章 MPTP 投与によるマウス胎盤の MAO-B タンパク質発現量の変化	
要旨	67
序	68
材料と方法	69
結果	71
考察	72
総括	76
謝辞	80
参考文献	81

## 緒論

パーキンソン病 (PD) は振戦および筋肉の固縮を主要な症状とし、アルツハイマー病に次いで世界で二番目に患者数の多い神経変性疾患である (1)。PD は中脳の黒質から線条体に投射するドパミン神経細胞の変性および壊死により発症すると考えられている。PD 患者の黒質のドパミン神経細胞には、Lewy 小体と呼ばれる細胞質内封入体が観察される。人口 10 万人当たりの PD 患者数は、50~59 歳で 17.4 人、70~79 歳で 93.1 人であり、生涯における発症リスクは 1.5%と推定されている (2, 3)。PD は今後の高齢化社会の進展に伴い増加すると考えられており、加えて治療満足度の高い医薬品が存在しないことから新薬の開発が強く望まれている。なお、PD は基本的には孤発性の疾患であるが、発症の引き金となる環境因子が複数見つかっている (4-6)。

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) はヘロイン様作用を有する合成麻薬の製造過程における副産物として1982年に米国で発見された (7-9)。上記合成麻薬の中毒患者の一部に末期のPD患者に類似した症状が観察されたことから研究が進められ、MPTPの摂取によりドパミン神経細胞が傷害されることが判明した (10-12)。

ドパミン神経は記憶の形成および学習に関わる神経であり、神経伝達物質としてチロシンからチロシン水酸化酵素 (TH) により合成されたモノアミンの一種であるドパミンを用いている (1, 13, 14)。ドパミン神経細胞軸索末端より放出されたドパミンの一部は近隣のドパミン神経細胞膜上に発現するドパミントランスポーター (DAT) を介して細胞内に取り込まれて再利用され、また一部はドパミン神経細胞近傍のアストログリア細胞に取り込まれてモノアミン酸化酵素 (MAO) -B により分解される (Fig. 0-1) (15, 16)。

C57BL/6マウス等の実験動物にMPTPを投与すると、MPTPは血液-脳関門 (BBB)

を通過して中枢神経に入り、アストログリア細胞に取り込まれ、MAO-Bにより 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) に代謝される (17-23)。MPP<sup>+</sup>はDATと高い親和性を有するためドパミン神経細胞内に入って蓄積し、酸化ストレスによりミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iを傷害し神経細胞死を引き起こす (Fig. 0-2) (24-33)。MAO-Bは黒質のアストロサイトだけではなく中枢神経以外の部位でも発現していることから、血中にはMPTPだけではなく、これらMAO-BによってMPTPから代謝されたMPP<sup>+</sup>も存在する (34, 35)。しかし、MPP<sup>+</sup>は水溶度が高くBBBを通過できないため、ドパミン神経細胞を傷害するのは脳内でMPTPから代謝されて生じたMPP<sup>+</sup>であると考えられている (36, 37)。

MPTPによる中枢神経毒性に対する感受性については種差が大きく、ヒト、サルおよび一部の系統のマウスが感受性を有する一方、ラット、ハムスターおよび大部分の系統のマウスは抵抗性である (38-43)。感受性の種差および系統差が大きい理由は解明されていない。MPTP投与マウスはPD治療薬の探索研究に用いられる代表的なモデル動物であり、前述したように高い感受性を有する系統の一つであるC57BL/6マウスが多用されている (44-48)。また、MPTPの投与は $\alpha$ シヌクレイン陽性の細胞内線維性タンパク質封入体の形成を誘導することから、このモデル動物を用いた研究はPDの発症機序解明に有用と考えられている (49, 50)。

PDを発症させ得る環境因子として、農薬に用いられているパラコートおよびロテノンがある (4-6)。環境状況によってはこれらの因子に胎児の段階から暴露される可能性があることから、PDのモデルについては、成獣だけではなく胎子および新生子を用いた研究も重要であると考えられる。しかし、MPTPの中枢神経毒性研究の場合、大半が成獣マウスを用いており、中枢神経系が未成熟な胎子および新生子マウスを用いた研究はほとんど行われていない。これまでの研究において、妊娠6日目から15日目の雌マウスにMPTPを投与すると胎子の体重、出生後の運動性およびドパミン神経細胞数の減少

が認められた (51)。一方、妊娠17日目の雌マウスにMPTPを投与しても投与24時間後の胎子および出生後の新生子マウスでは脳内のドパミン濃度に変化が見られなかった (52)。このように、胎子および新生子マウスに対するMPTPの中樞神経毒性については研究自体が少ないことに加えて、矛盾した結果が見受けられるなど、未解明な点が多い。

また、近年、成獣 C57BL/6 マウスに投与された MPTP が黒質および線条体のドパミン神経細胞を傷害するだけでなく、側脳室に接する領域である subventricular zone (SVZ) の神経芽細胞に対してもアポトーシスを誘発することが明らかとなった (53-58)。神経芽細胞のアポトーシスは、MAO-B 阻害剤の前処理により抑制されるが、成獣マウスの SVZ には DAT の発現が認められず DAT 阻害剤の前処理ではアポトーシスが抑制されないことから、MPTP による SVZ の神経芽細胞に対する毒性は、ドパミン神経細胞に対する毒性とは異なる機序によると考えられている (59)。しかし、詳細は不明であり、特に、MPP<sup>+</sup>を細胞内へ取り込む機序は未解明である。さらに、胎子および新生子マウスでMPTPによるSVZの神経芽細胞に対する毒性を評価した研究は見当たらない。

SVZ の神経芽細胞数は若齢ほど多く、中枢神経系の傷害に際し神経細胞に分化して傷害部位へ遊走することが知られている (60, 61)。PD はドパミン神経細胞数の減少に起因して発症するが、加齢に伴う SVZ 由来神経細胞の供給減少も発症に関与している可能性も示唆されている (62)。従って、神経芽細胞が豊富に存在する若齢動物を用いて PD 発症の引き金となる環境因子のドパミン神経および SVZ への影響を調べることは、PD 発症の機序の解明に非常に有用であると考えられる。

本研究では、環境因子による PD 発症の機序を解明する一助として、胎子および新生子マウスを MPTP に暴露させ中枢神経への影響について評価した。まず、妊娠マウスに MPTP を投与し、胎子マウスの中樞神経に対する毒性を評価した。加えて、BBB が未成熟である新生子マウスを用い、MPTP に加えて成獣では BBB を通過できない MPP<sup>+</sup>の投与

も行うことで、MPTP および MPP<sup>+</sup>の胎子および新生子マウスに対する毒性発現の有無および機序を検討した。また合わせて、MPTP および MPP<sup>+</sup>による SVZ の神経芽細胞に対する影響についても評価した。

まず、第一章では、MPTP および MPP<sup>+</sup>の胎子および新生子 C57BL/6 マウスの中枢神経毒性の有無について、RT-PCR、Western blotting およびドパミン濃度測定等の生化学的手法を用いて評価した。次に、第二章では、胎子および新生子マウスの黒質、線条体および SVZ に対する MPTP および MPP<sup>+</sup>の毒性について、主に免疫組織化学的方法を用いて評価した。第三章は、胎子および新生子マウスの黒質、線条体および SVZ に対する MPTP および MPP<sup>+</sup>の毒性発現の機序について、成獣と同様に MAO-B および DAT が関与しているか否かを免疫組織化学的手法により検索した。最後に、第四章では、第一章から第三章の結果を補足する目的で、胎子マウスにおいて毒性発現に重要な役割を果たしている胎盤について、MPTP および MPP<sup>+</sup>投与による影響を免疫組織化学的に評価した。

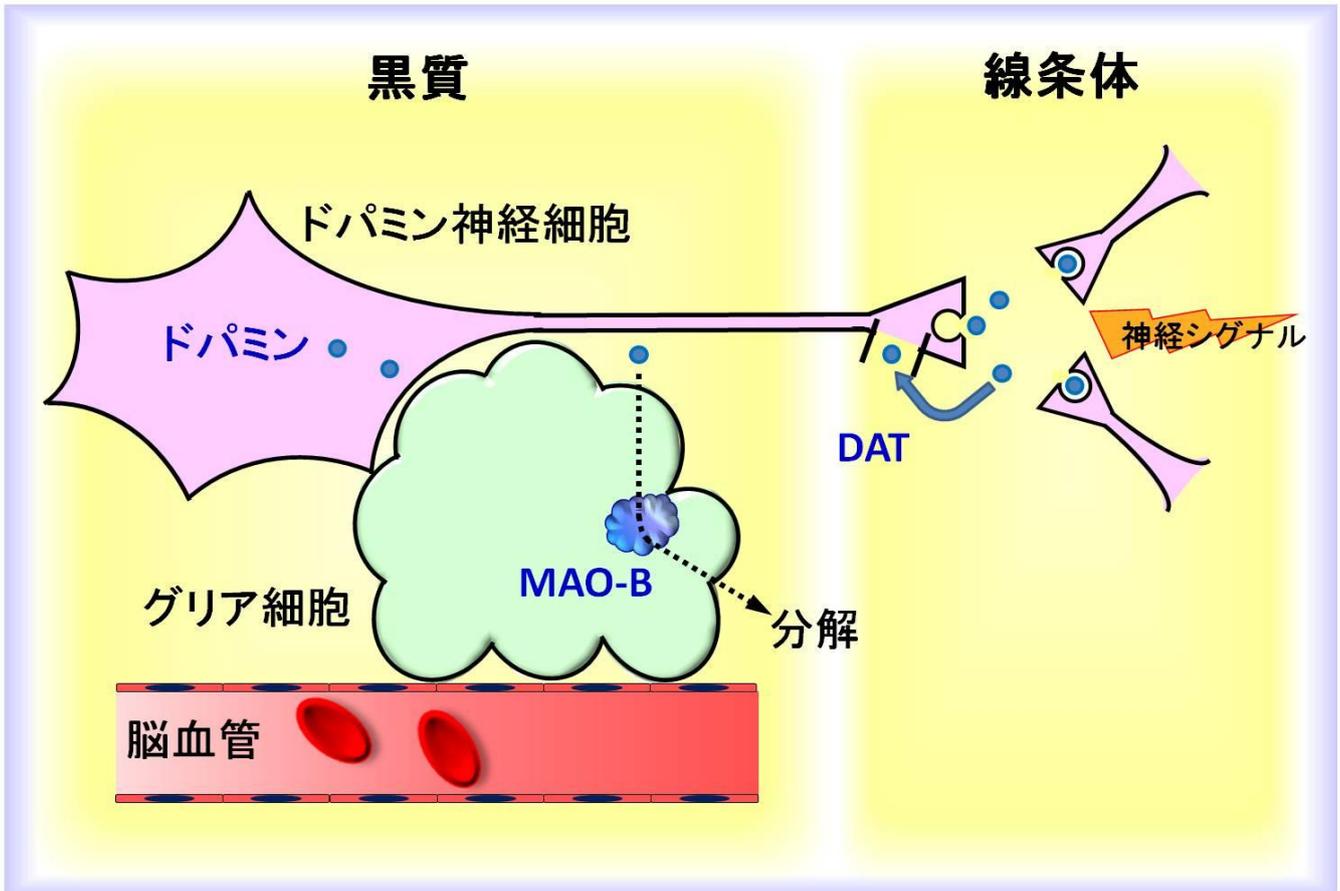
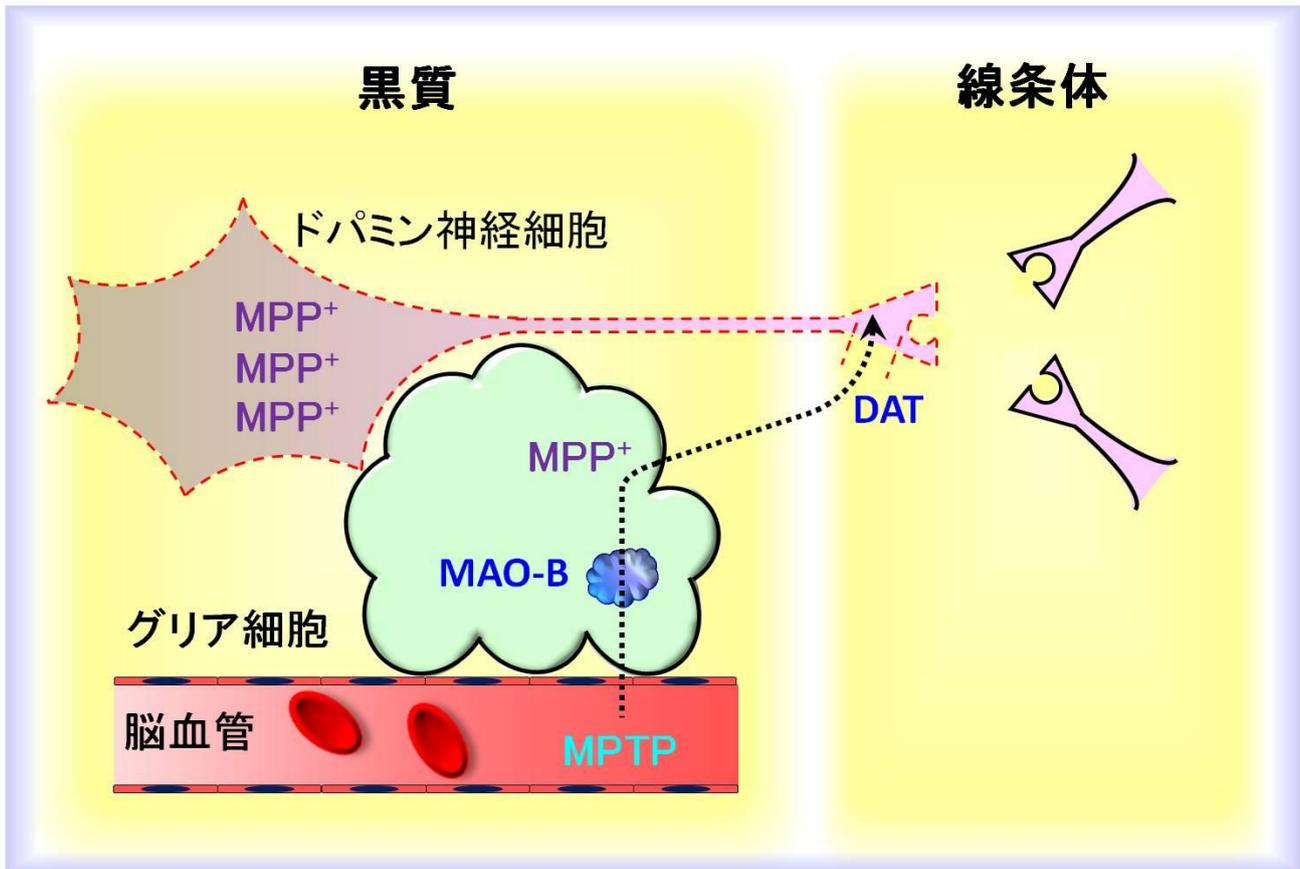


Fig. 0-1 Schematic drawing of the function of the dopamine neuron.



**Fig. 0-2** Schematic drawing of the toxicological mechanism of MPTP to the dopamine neuron.

# 第一章 胎子および新生子マウスにおける MPTP および MPP<sup>+</sup>中枢神経毒性の生化学的評価

## 要旨

MPTP をマウスに投与するとドパミン神経細胞を傷害し、その結果 PD と類似した症状を引き起こす。また、MPTP は SVZ の神経芽細胞に対しても毒性を有することが判明した。成獣マウスに対する MPTP の中枢神経毒性を評価した研究は数多く実施されているが、胎子あるいは新生子等の中枢神経系が未成熟なマウスを対象とした研究はほとんど行われていない。本章では、MPTP またはその代謝産物である MPP<sup>+</sup>を胎子あるいは新生子マウスに投与した際の脳における DAT、TH、MAO-B および MAO-A の発現量、ドパミンとその代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) および Homovanillic acid (HVA) の濃度の経時的変化について評価した。胎子および新生子マウスへの MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>の単回投与 6~12 時間後に、ドパミン、DOPAC および HVA 濃度の減少、DAT および TH の mRNA およびタンパク質発現量の減少が認められたが、これらの減少は投与 24 時間後に概ね回復した。従って、MPTP および MPP<sup>+</sup>は胎子マウスの胎盤および新生子マウスの BBB を通過することが明らかとなった。また、MPTP および MPP<sup>+</sup>は胎子および新生子マウスに中枢神経毒性を示すものの、これらの単回投与による影響は一時的であり、回復可能であると考えられた。なお、MAO-B および MAO-A の mRNA およびタンパク質発現量は胎子および新生子マウスにおいて、MPTP および MPP<sup>+</sup>のいずれの投与でも変化しなかった。

## 序

緒論で述べたように、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を投与されたマウス、コモンマーモセット (42) およびカニクイザル (43) などがパーキンソン病 (PD) モデル動物として開発され、治療薬の探索研究に用いられている。特に C57BL/6 マウスは高い感受性を有するため多用されている (44-48)。しかし、MPTP の中枢神経毒性についての研究は、ほとんどが成獣マウスを用いたものであり、胎子および新生子等、中枢神経系が未成熟なマウスに対する研究はほとんど行われていない。

これまでの研究により、妊娠6日目から15日目にかけて雌マウスにMPTPを投与すると胎子の体重、出生後の運動性および線条体のドパミン神経細胞数とドパミンおよびその代謝産物であるHomovanillic acid (HVA) 濃度が減少する (51) こと、および妊娠17日目の雌マウスにMPTPを投与しても投与24時間後の胎子マウスと、出生24時間後、14日後および28日後の新生子マウスで線条体のドパミン濃度に変化が見られない (52) ことが知られている。しかし、これらの研究は胎子期にMPTPに暴露された影響を出生後の新生子マウスで評価した研究であり、胎子および新生子マウスにMPTPを投与した直後の影響を評価した研究ではない。

本章では、胎子および新生子マウスに対する MPTP の影響の有無を評価することを目的とし、BBB が未成熟である胎子および新生子マウスに、MPTP だけでなく成獣では BBB を通過できない 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) も投与し、MPTP の胎子および新生子マウスに対する毒性発現について検討した。すなわち、ドパミン神経において MPTP の代謝に関連する因子であるドパミントランスポーター (DAT)、チロシン水酸化酵素 (TH)、モノアミン酸化酵素 (MAO) -B および-A の mRNA およびタンパク質発現量を評価した。さらに、ドパミン神経の機能を評価するため、新生子マウ

スの中脳および線条体で、ドパミンとその代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) および HVA を測定した。

## 材料と方法

### 動物の飼育、被験物質の投与および組織の摘出

日本チャールス・リバー（神奈川）より購入した妊娠 11 日目の雌 C57BL/6 マウスおよび生後 8 日目の雌雄 C57BL/6 マウスを金属ケージで飼育した。飼育室は室温 21～26°C、湿度 50～60%、照明 12 時間/日（8～20 時）に設定した。動物には固形飼料（MF; オリエンタル酵母, 東京）および水道水を自由に摂取させた。導入後 24 時間馴化した後、マウスを 3 群に分け（各群、妊娠マウスは n=4、新生子マウスは n=6（雄 3 例および雌 3 例））、それぞれ溶媒（生理食塩水）、MPTP-HCl（Sigma, St. Louis, 米国）もしくは MPP-Iodide（Sigma）を 10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。MPTP-HCl あるいは MPP-Iodide をマウスに単回腹腔内投与したこれまでの研究では、MPTP-HCl は 30 mg/kg 前後（63, 64）、MPP-Iodide は 12.5-25.0 mg/kg（65, 66）の用量であった。予備検討のため、MPTP-HCl は 50.0 mg/kg を、MPP-Iodide は 34.2 mg/kg を最高用量として公比 2 で各々 3 用量を妊娠マウスに投与した（各群 n=2）結果、最高用量群では全例が投与直後に死亡した。一方、最低用量群では MPTP-HCl を投与した 1 例を除き変化が見られなかったことから、MPTP-HCl は 25.0 mg/kg を、MPP-Iodide は 17.1 mg/kg を投与用量とした。投与 6、12 および 24 時間後にジエチルエーテルによる深麻酔下の放血により安楽殺し、妊娠マウスからは 1 匹あたり 6 匹の胎子を、新生子マウスからは脳を採取した。さらに、氷冷しながら胎子からは頭部を、新生子からは中脳（Fig. 1-1c）を、線条体および線条体に隣接する脳梁および中隔（Fig. 1-1d）を採取した。なお、本実験は東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物委員会の承認を得て、同委員会の指針に従って実施した。

## Total RNA の抽出および Reverse transcription (RT) -PCR

Total RNA 抽出のため、妊娠マウス 1 匹あたり 3 匹の胎子の頭部、および新生子マウスの右脳の中脳、線条体および線条体に隣接する脳梁および中隔を用いた。胎子マウスの脳、新生子マウスの中脳および線条体を ISOGEN 溶液（日本ジーン，東京）に入れ、Tissue-ruptor（Qiagen, Valencia, 米国）でホモジナイズした。ホモジナイズした組織をクロロホルムで処理し、RNA をイソプロパノールで沈殿させ、75%エタノールで洗浄した後に RNase-free 水で溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

抽出した RNA の逆転写および cDNA 合成は、PrimeScript RT reagent kit（タカラバイオ，滋賀）を用いて行った。約  $2\mu\text{g}$  の RNA に PrimeScript バッファー、オリゴ dT プライマー、dNTP ミックス、PrimeScript RT 酵素および RNase-free 水を加え、 $50\mu\text{L}$  とした。これらの混合物を  $42^{\circ}\text{C}$  で 50 分反応させた後、 $70^{\circ}\text{C}$  にして反応を停止させた。

RT-PCR は Ex Taq Enzyme Hot Start PCR kit（タカラバイオ）のプロトコールに従ってサンプルを調整し、Takara PCR Thermal Cycler MP（タカラバイオ）を用いて行った。 $1\mu\text{g}$  の cDNA に PCR バッファー、dNTP ミックス、EX Taq 酵素、RNase-free 水およびプライマーを加えて  $50\mu\text{L}$  とし、 $94^{\circ}\text{C}$  で 2 分間予熱した後、 $94^{\circ}\text{C}$  30 秒の変性、40 秒のアニーリングおよび  $72^{\circ}\text{C}$  1 分の伸長のサイクルを繰り返して DAT（GenBank Accession No. AF109391.1）、TH（GenBank Accession No. AK139568.1）、MAO-B（GenBank Accession No. AK054050.1）および MAO-A（GenBank Accession No. AK164457.1）の mRNA 発現量を定量的に評価した。プライマーの配列、反応のサイクル数およびアニーリングの温度を Table 1-1 に記載した。RT-PCR の後、2%アガロースゲルおよびエチジウムブロマイドを用いた電気泳動を行い、内部標準である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH、GenBank Accession No. AK140794.1）発現との比率を求めた。なお、DAT、TH、MAO-B、MAO-A および GAPDH の PCR 産物のサイズは、それぞれ 723 (67)、637、541 (68)、646 (69) および 983 bp

であった。

#### Total タンパク質の抽出および Western blotting

タンパク質抽出のため、妊娠マウス 1 匹あたり 3 匹の胎子の脳、および新生子マウスの左脳の中脳、線条体および線条体に隣接する脳梁および中隔を用いた。胎子マウスの脳、新生子マウスの中脳および線条体を 150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1% NP-40、10 mM フッ化ナトリウム、2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  および Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Penzberg, 独国) を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に入れ、Tissue-ruptor (Qiagen) でホモジナイズし、4°C で 20 分間 12000 × g で遠心分離した。上清に含まれるタンパク質の濃度を Lowry protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, 米国) で測定し、-80°C で保存した。

30 µg のタンパク質を含むサンプル溶液に同量の 5%メルカプトエタノール/Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) を加え、10% SDS-PAGE ゲルで 30 分間電気泳動し、25V の電圧で PVDF 膜 (Bio-Rad) に転写した。PVDF 膜を 0.1% Tween-20/Tris-buffered saline (TBST) およびスキムミルクにより室温で 1 時間洗浄した後、スキムミルクに溶解したウサギ抗 MAO-A 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 米国)、ヤギ抗 MAO-B 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ラット抗 DAT 抗体 (Millipore, Temecula, 米国)、ウサギ抗 TH 抗体 (Millipore) またはウサギ抗βアクチン抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, 米国) と 4°C で 18 時間反応させた。次いで TBST に溶解した二次抗体と室温で 1 時間反応させた後、DAT および TH については ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham, Amersham, 英国) を用いて、MAO-B および MAO-A については ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham) を用いてタンパク質のバンドを可視化し、ChemDoc XRS-J (Bio-Rad) により検出した。

抗体反応の詳細、予熱 (94°C、5 分) の有無および用いた抗体の希釈倍率は Table 1-2 に記載した。各タンパク質の発現量は、同一サンプルのβアクチンタンパク質のそれとの比率で算出した。

#### 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC/MS/MS)

ドパミン、DOPAC および HVA の定量のため、新生子マウスの中脳および線条体を氷上で摘出し、重量を測定した後に速やかに-80°C で保存した。各サンプルに対し、それぞれ 9 倍量 (285~785 μL) の 0.1%ギ酸を加え、Shakemaster (bms, 東京) を用いてホモジナイズした。

50 μL のホモジネートを、内部標準を含む 0.1%ギ酸で 300 μL に希釈した。ドパミン測定用サンプルは Restek Ultra PFPP カラム (1.9 μm, 50 × 2.1 mm) (Neta scientific, Hainesport, 米国) を用い、DOPAC および HVA 測定用サンプルは Waters HSS T3 カラム (1.7 μm, 50 × 2.1 mm) (Waters, Milford, 米国) を用いて、60°C で Captiva NDlipids フィルタープレート (Varian, Palo Alto, 米国) により濾過した。

分析用サンプルを HPLC システム (Acquity UPLC System, Waters, Milford, 米国) に注入し、mobile phase としてドパミン測定用には 0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を、DOPAC および HVA 測定用には 0.1%氷酢酸水溶液/0.1%氷酢酸アセトニトリル溶液を用いて測定した。ドパミン測定用のサンプル注入量は 5 μL、DOPAC および HVA 測定用は 5~10 μL とし、移動相の詳細な勾配は Table 1-3 に記載した。

LC/MS/MS (MDS Sciex API 4000, Applied Biosystems, Carlsbad, 米国) を用いて液体クロマトグラフィーにより検出されたドパミン、DOPAC および HVA を定量した。ドパミン分析は正イオンモードで、DOPAC および HVA 分析は負イオンモードでインターフェースを操作し、550°C に設定した。衝突エネルギーは、ドパミン分析は 35 V、DOPAC および HVA 分析は-15 V とし、デクラスタリングポテンシャルは、ドパミン

分析は 40 V、DOPAC および HVA 分析は-33 V とした。

#### 統計処理

mRNA およびタンパク質の発現量は Image J (NIH, Bethesda, 米国) を用いて計測した。結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で表示した。また、溶媒対照群と投与群間の統計学的検定には *F*-test、Student's *t*-test および Aspen-Welch test を用い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 胎子マウス

胎子マウスの脳では、MPTP または MPP<sup>+</sup>投与の 6~24 時間後に DAT mRNA の発現量が減少し、投与 12~24 時間後では溶媒対照群と比較して有意であった (Fig. 1-2a) が、DAT タンパク質の発現は見られなかった (data not shown)。MPTP または MPP<sup>+</sup>投与の 6~12 時間後に TH mRNA の発現量が溶媒対照群と比較して有意に減少し (Fig. 1-2b)、12 時間後に TH タンパク質の発現量が溶媒対照群と比較して有意に減少した (Fig. 1-3a)。MPTP または MPP<sup>+</sup>投与による MAO-A mRNA (Fig. 1-2c) およびタンパク質 (Fig. 1-3b) の発現量の変化は認められなかった。MAO-B mRNA の発現量は、MPTP または MPP<sup>+</sup>の投与では変化せず (Fig. 1-2d)、MAO-B タンパク質の発現量は非常に少量であったため、定量評価を行うことができなかった (Fig. 1-3c)。

### 新生子マウス

中脳では、MPTP または MPP<sup>+</sup>の投与 12 時間後に溶媒対照群と比較して DAT mRNA 発現量の減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった (Fig. 1-4a)。DAT タンパク質の発現量は、投与 6 時間後に溶媒対照群と比較して減少傾向が見られ、12 時間後に有意に減少し、24 時間後には回復した (Fig. 1-5a)。TH mRNA 発現量は MPTP または MPP<sup>+</sup>投与 6 時間後に (Fig. 1-4b)、タンパク質発現量は投与 12 時間後に (Fig. 1-5b)、溶媒対照群と比較して有意に減少した。MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与による MAO-A の mRNA (Fig. 1-4d) およびタンパク質 (Fig. 1-5c) 発現量の変化は認められなかった。また、MAO-B mRNA 発現量も変化しなかった (Fig. 1-4c)。なお、MAO-B タンパク質は発現量が非常に少なかったため、定量評価を行うことはできなかった (Fig. 1-5d)。

なお、母体の脳では豊富な MAO-B タンパク質の発現が確認された (Fig. 1-5d)。

MPTP 投与群の中脳では、投与 6~12 時間後にかけてドパミンおよび DOPAC 濃度が減少し、24 時間後に概ね回復した (Fig. 1-6a and b)。一方、MPP+投与群では、ドパミン濃度の変化は見られなかった。DOPAC 濃度は投与 6~12 時間後に減少したが、24 時間後には溶媒対照群と比較して有意に増加した (Fig. 1-6a and b)。HVA 濃度に、MPTP あるいは MPP+投与による変化は見られなかった (Fig. 1-6c)。

線条体では、MPP+投与 6 時間後に DAT mRNA が減少し、MPTP または MPP+投与 12 時間後には溶媒対照群と比較して有意に減少した (Fig. 1-7a)。DAT タンパク質は MPTP および MPP+投与 6 時間後に減少し、さらに 12 時間後には溶媒対照群と比較して有意に減少した (Fig. 1-8a)。TH mRNA は MPTP 投与 6 時間後に溶媒対照群と比較して有意に減少し、MPP+投与群でも投与 6~12 時間後にかけて減少傾向が見られた (Fig. 1-7b)。TH タンパク質発現量は MPTP または MPP+投与 12~24 時間後に減少傾向が見られ、MPP+投与 12 時間後には溶媒対照群と比較して有意に減少した (Fig. 1-8b)。MPTP あるいは MPP+投与による MAO-A の mRNA (Fig. 1-7d) およびタンパク質 (Fig. 1-8c) について発現量の変化は認められなかった。また、MAO-B mRNA の発現量も変化しなかった (Fig. 1-7c)。なお、MAO-B タンパク質は発現量が非常に少なかったため、定量評価を行うことはできなかった (Fig. 1-8d)。一方、母体の脳では豊富な MAO-B の発現が確認された (Fig. 1-8d)。

MPTP 投与群の線条体では、投与 12 時間後にドパミン濃度が溶媒対照群と比較して有意に減少し、24 時間後に回復した (Fig. 1-9a)。また、DOPAC 濃度は投与 6~24 時間後にかけて溶媒対照群より有意に減少した (Fig. 1-9b)。HVA 濃度は投与 6~12 時間後に溶媒対照群と比較して有意に減少したが、24 時間後に回復した (Fig. 1-9c)。これに対し、MPP+投与群では、ドパミン濃度は変化しなかった (Fig. 1-9a) が、DOPAC 濃度は投与 24 時間後に溶媒対照群と比較して有意に増加した (Fig. 1-9b)。HVA 濃度

は、MPTP 投与 6~12 時間後および MPP+投与 6 時間後に溶媒対照群と比較して有意に減少したが、投与 24 時間後にかけて回復傾向を示した (Fig. 1-9c)。

## 考察

胎子および新生子マウスの脳では、MPTP および MPP<sup>+</sup>投与 6~12 時間後に溶媒対照群と比較して、DAT と TH の mRNA とタンパク質発現量が減少し、さらに新生子マウスの脳ではドパミンとその代謝産物である DOPAC と HVA の濃度も減少した。DAT および TH タンパク質の発現量およびドパミンとその代謝産物の濃度は投与 24 時間後には概ね回復した。従って、MPTP および MPP<sup>+</sup>は血液-胎盤関門 (BPB) および新生子マウスの BBB を通過しドパミン神経細胞に対して毒性を示すものの、この現象は一時的であり回復可能であると推察された。一方で、MPTP の代謝に関わる MAO-B および MAO-A の発現量に変化は認められなかった。

成獣マウスに MPTP を反復投与するとドパミン神経細胞が傷害されることが知られている (17-33)。また、母体に MPTP を反復投与すると新生子の TH の活性が減少することも知られている (70, 71)。さらに、妊娠マウスを用いた研究 (72) では、MPTP 投与 4 時間後に胎子マウスの脳で DOPAC および HVA 濃度が大きく減少するが、24 時間後に概ね回復したという報告もある。この報告では、初回の MPTP 投与から 24 時間後に再度 MPTP を投与すると DOPAC および HVA 濃度は初回投与後と同様の推移を示したが、その濃度は初回投与後の濃度よりも低かった。また、3 日間連続で MPTP を妊娠マウスに投与すると、最終投与 5 日後の胎子マウスの脳の DOPAC および HVA 濃度は、溶媒対照群と比較して有意に低いままであった。これらの研究成果と本章の結果より、胎子マウスのドパミン神経は、数回までの MPTP 投与による傷害からは回復し得るが、投与回数が多くなると回復不能な傷害を受けると考えられた。また、MPTP に対する感受性は老齢マウスより若齢マウスの方が低いと考えられている (73, 74)。本章において、MPTP および MPP<sup>+</sup>投与による中枢神経毒性により減少した胎子および新

生子マウスの DAT および TH タンパク質発現量とドパミンおよびその代謝産物濃度が 24 時間後に回復したのは、胎子および新生子マウスが老齢マウスに比べて MPTP に対して低感受性であることに起因すると推察された。

本章の研究では、胎子マウスの TH および新生子マウスの DAT および TH の mRNA 発現量は MPTP および MPP<sup>+</sup>投与 6~12 時間後に最も減少したのに対し、これらのタンパク質発現量は投与 12 時間後に最も減少した。これらは、mRNA 発現量の変化がタンパク質発現量の変化に先行するというセントラルドグマに矛盾しない結果と考えられた。

また、新生子マウスの場合、中脳では MPTP 投与 6~12 時間後に、線条体では 12 時間後に、TH タンパク質発現量およびドパミン濃度が減少した。ドパミンが TH によって合成されることから、TH タンパク質発現量の減少はドパミン濃度の減少に先行すると予想されたが、この結果は予想とは異なっていた。同様の結果はこれまでの報告 (72, 75) でも見られ、C57BL/6 マウスに MPTP を投与すると 4~5 時間後にドパミンおよびその代謝産物である DOPAC および HVA 濃度が大きく減少したのに対し、TH タンパク質の発現量は投与 24 時間後まで減少しなかった。従って、MPTP 投与後の TH タンパク質発現量の減少に先行する急激なドパミン、DOPAC および HVA の減少は、新規のドパミンおよびその代謝産物の産生が減少したのではなく、ドパミン神経細胞の活性低下あるいは MPTP を MPP<sup>+</sup>に代謝したことによる MAO-B 活性の減少 (76) に起因するものと推察された。

さらに、中脳および線条体における DOPAC 濃度の減少は MPP<sup>+</sup>投与群よりも MPTP 投与群で顕著であった。MAO-B の活性は MPTP を MPP<sup>+</sup>に代謝することで低下する (77) こと、および DOPAC はドパミンが MAO-B で代謝されて産生されることが知られている。従って、MPTP 投与群における DOPAC 濃度の大きな減少は、MAO-B 活性が MPP<sup>+</sup>投与群と比較して大きく減少したことによるものと考えられた。

また、本章では、中脳および線条体においてMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>投与24時間後にDOPACおよびHVA濃度が溶媒対照群より有意に増加した。これまでの研究でも同様の結果が報告されている(72)が、これはドパミン濃度減少の代償性反応と考えられ、DOPACをHVAに代謝するcatechol-O-methyl transferaseの活性も影響していると推察された。

本章の研究の結果、MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>は成獣同様に胎子および新生子マウスにドパミン神経毒性を示すものの、これらの単回投与による毒性は一時的なものであり、回復可能であると推察された。

Gene	Sense primer (5'-3') Antisense primer (5'-3')	Cycle number	Annealing temperature (°C)
<i>DAT</i>	AAGATCTGCCCTGTCCTGAAAG	37 (embryo)	60
	CATCGATCCACACAGATGCCTC	32 (midbrain of newborn)	
		35 (striatum of newborn)	
<i>TH</i>	GAAGGGCCTCTATGCTACCCA	32 (embryo)	58
	TGGGCGCTGGATACGAGA	30 (midbrain of newborn)	
		32 (striatum of newborn)	
<i>MAO-B</i>	GTGGTATGTGAAGCAGTGTGG	33 (embryo)	54
	TCAGTGCCTGCAAAGAAAATC	30 (newborn)	
<i>MAO-A</i>	TCAATGTAGCCACTCCACTGT	33 (embryo)	54
	TTGGGGATAAAGTGAAGCTGA	32 (newborn)	
<i>GAPDH</i>	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	28 (embryo)	54
	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	24 (newborn)	

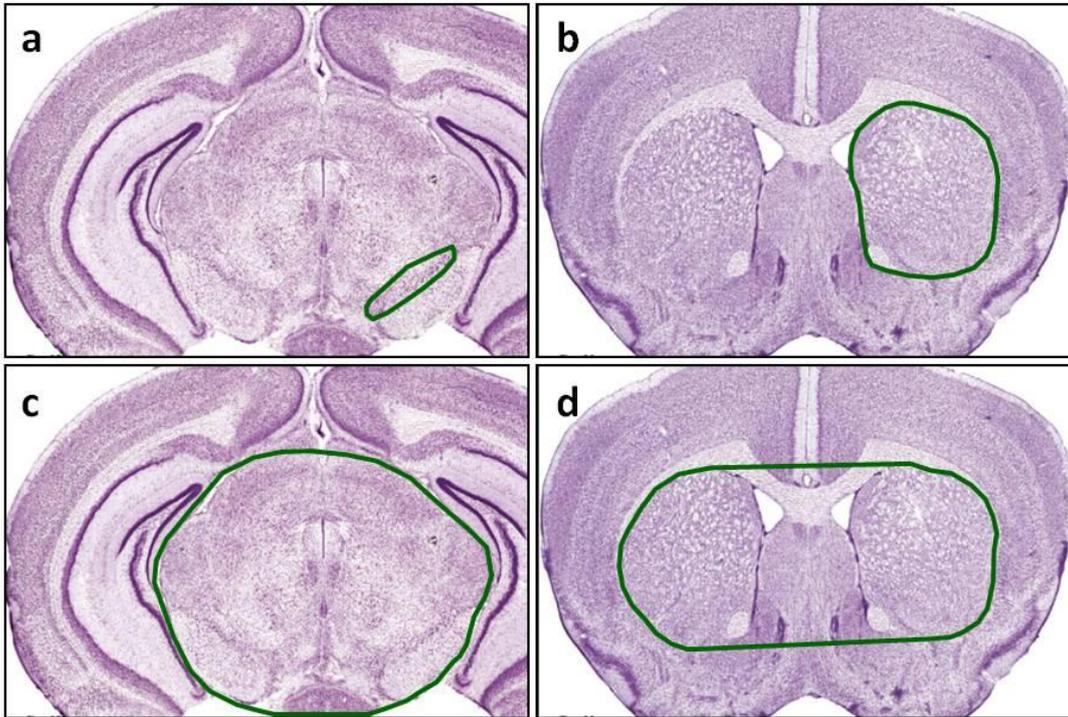
**Table 1-1** Primers and conditions for RT-PCR.

Detected proteins	Heating before SDS-PAGE	Concentrations of skim milk (%)	Dilutions of	
			First antibody	Second antibody
DAT	(-)	5.0	1: 900 (Newborn midbrain) 1: 2,500 (Newborn striatum)	1: 5,000
TH	(+) (Embryo) (-) (Newborn)	5.0	1: 4,000 (Embryo) 1:18,000 (Newborn)	1: 5,000
MAO-A	(+)	5.0	1: 800	1:12,500
MAO-B	(+)	0.8	1: 100	1:20,000
$\beta$ -actin	Same as above, respectively	5.0	1:20,000 (Embryo TH) 1: 3,500 (Newborn DAT and TH) 1:26,000 (MAO-A) 1:30,000 (MAO-B)	Same as above, respectively

**Table 1-2** Antibodies and conditions for Western blot.

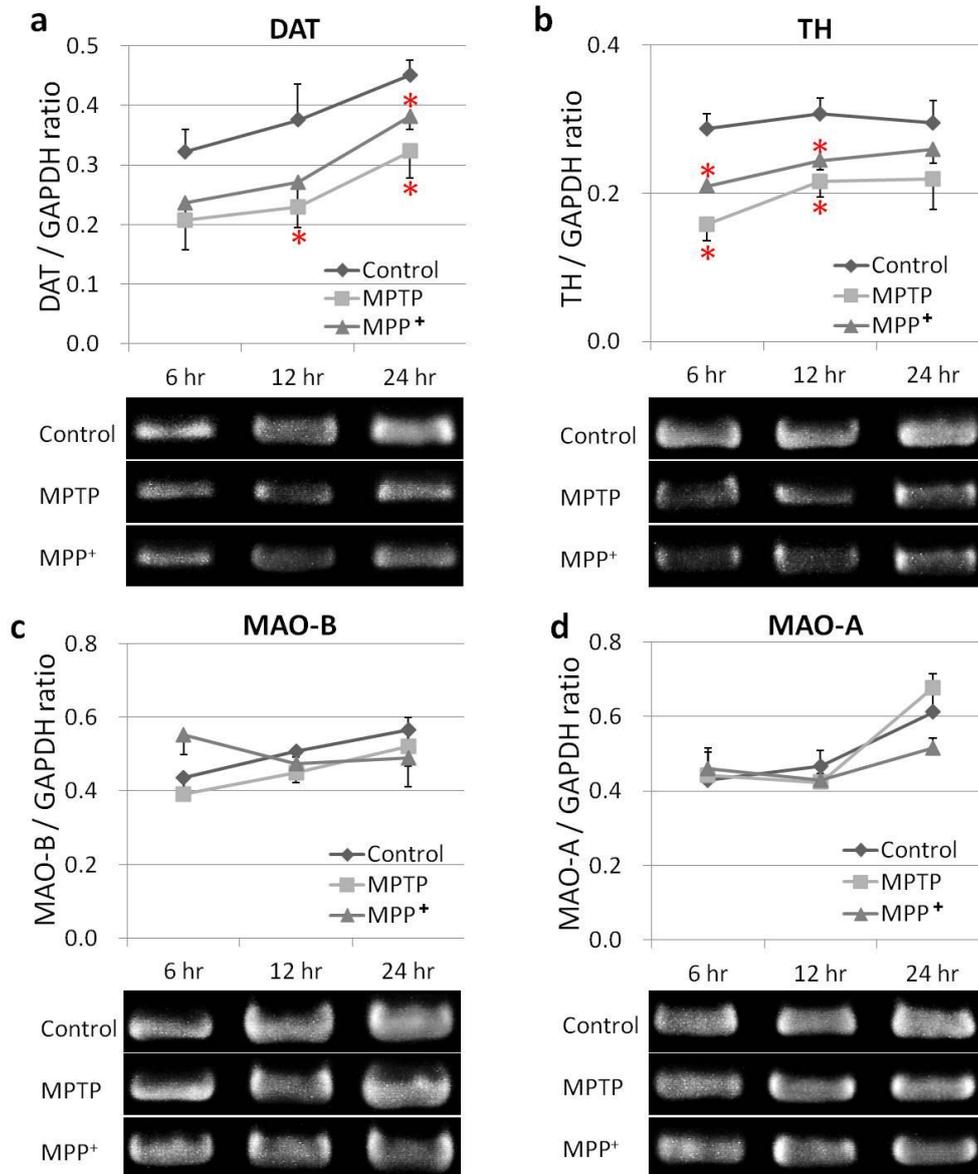
Dopamine		DOPAC and HVA	
Run time	Mobile phase ratio (A/B)	Run time	Mobile phase ratio (A/B)
0.00 – 0.50 min	100/0	0.00 – 2.50 min	100/0 – 75/25
0.50 – 2.60 min	100/0 – 70/30	2.50 – 2.60 min	75/25 – 5/95
2.60 – 2.70 min	70/30 – 10/90	2.60 – 3.21 min	5/95
2.70 – 3.30 min	10/90	3.21 – 3.30 min	5/95 – 100/0
3.30 – 3.31 min	10/90 – 100/0	3.30 – 4.00 min	100/0
3.31 – 4.00 min	100/0		

**Table 1-3** Gradient program of mobile phase for LC/MS/MS.

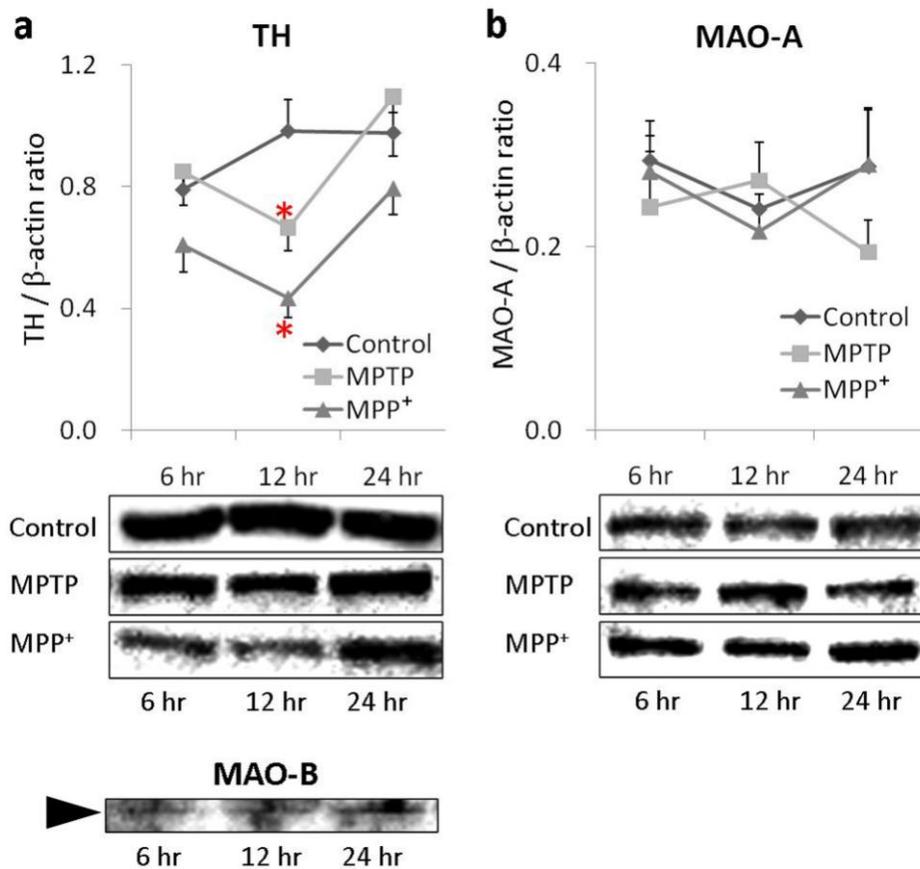


THE MOUSE BRAIN, 1996, Keith B.J. Franklin *et al*

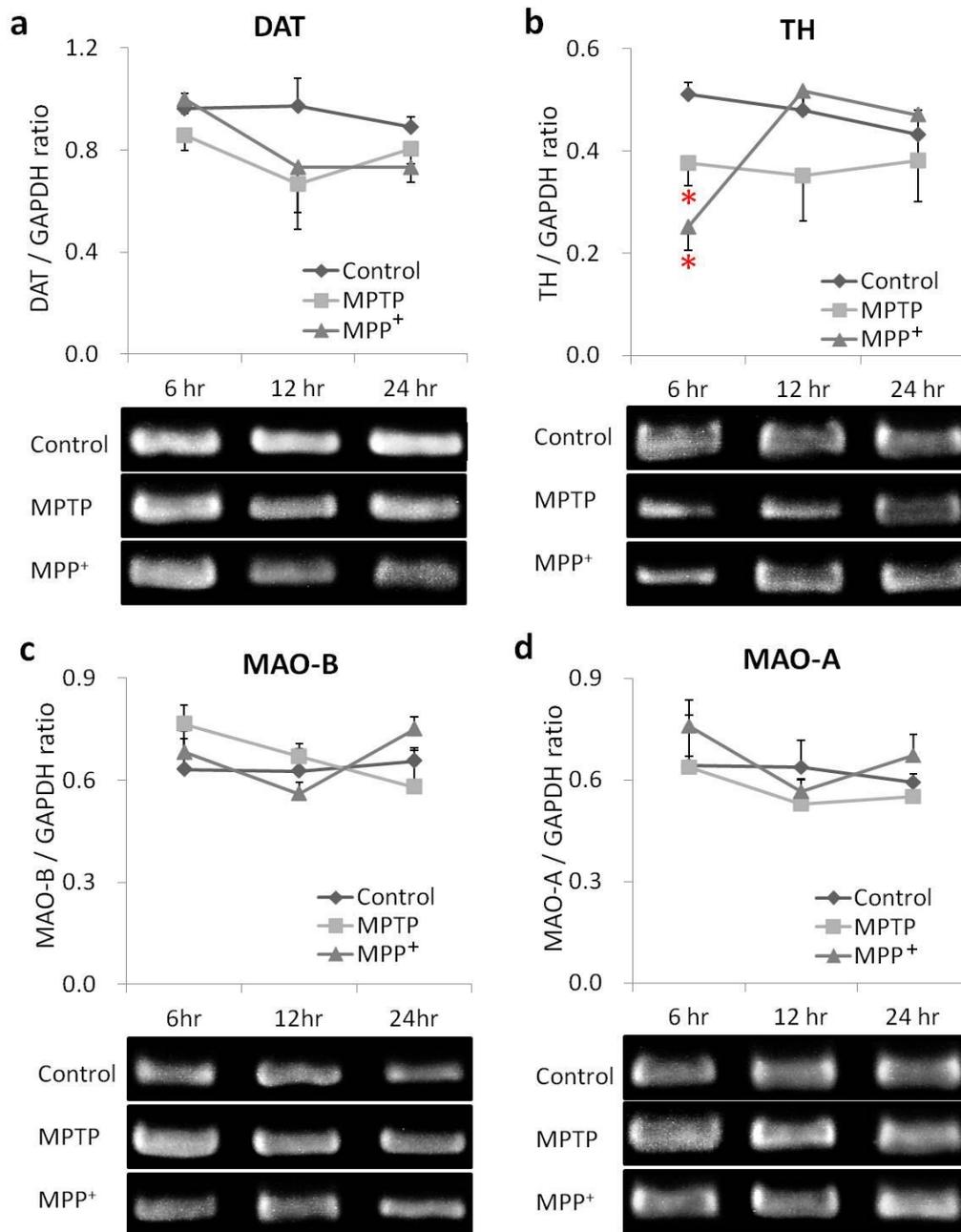
**Fig. 1-1** Coronal sections of mouse brain. (a and c) midbrain; and (b and d) striatum. (a and b) Substantia nigra and striatum in the right cerebral hemisphere are enclosed by green lines, respectively. (c and d) Quarried areas for total RNA or protein extraction are enclosed by green line.



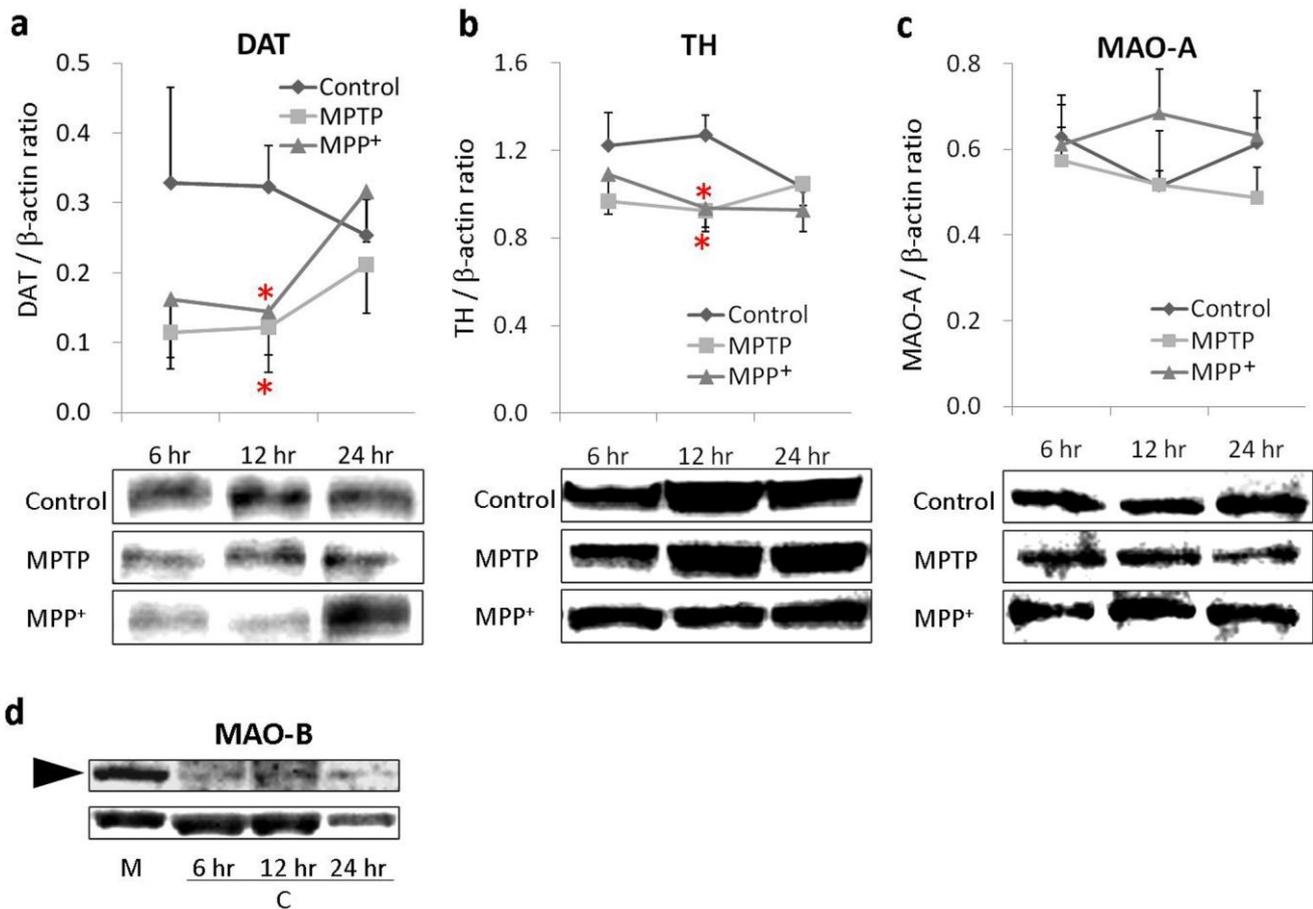
**Fig. 1-2** Changes of the mRNA expression in the head of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated embryos detected by RT-PCR. (a) DAT; (b) TH; (c) MAO-A; and (d) MAO-B. (a and b) Both *DAT* and *TH* mRNA levels became low 6 to 24 hr after MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treatment. (c and d) No significant changes were observed in the mRNA expression of *MAO-A* and *MAO-B*. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



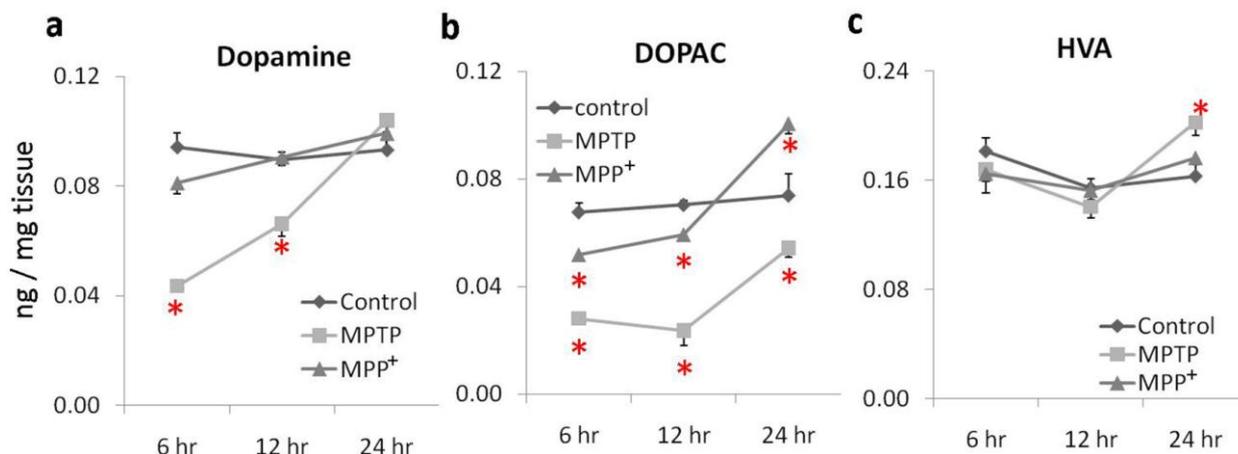
**Fig. 1-3** Changes of the protein expression in the head of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated embryos detected by Western blotting. (a) TH; (b) MAO-A; and (c) MAO-B. (a) The TH protein levels became low 12 hr after MPTP or MPP<sup>+</sup>-treatment, but recovered at 24 hr. (b) No significant change was observed in the protein expression of MAO-A. (c) Representative photograph of MAO-B protein expression at 6 to 24 hr in saline-treated control embryos. A very low level of the MAO-B protein was detected in the head of the saline-treated embryos, therefore a quantitative evaluation was impossible. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



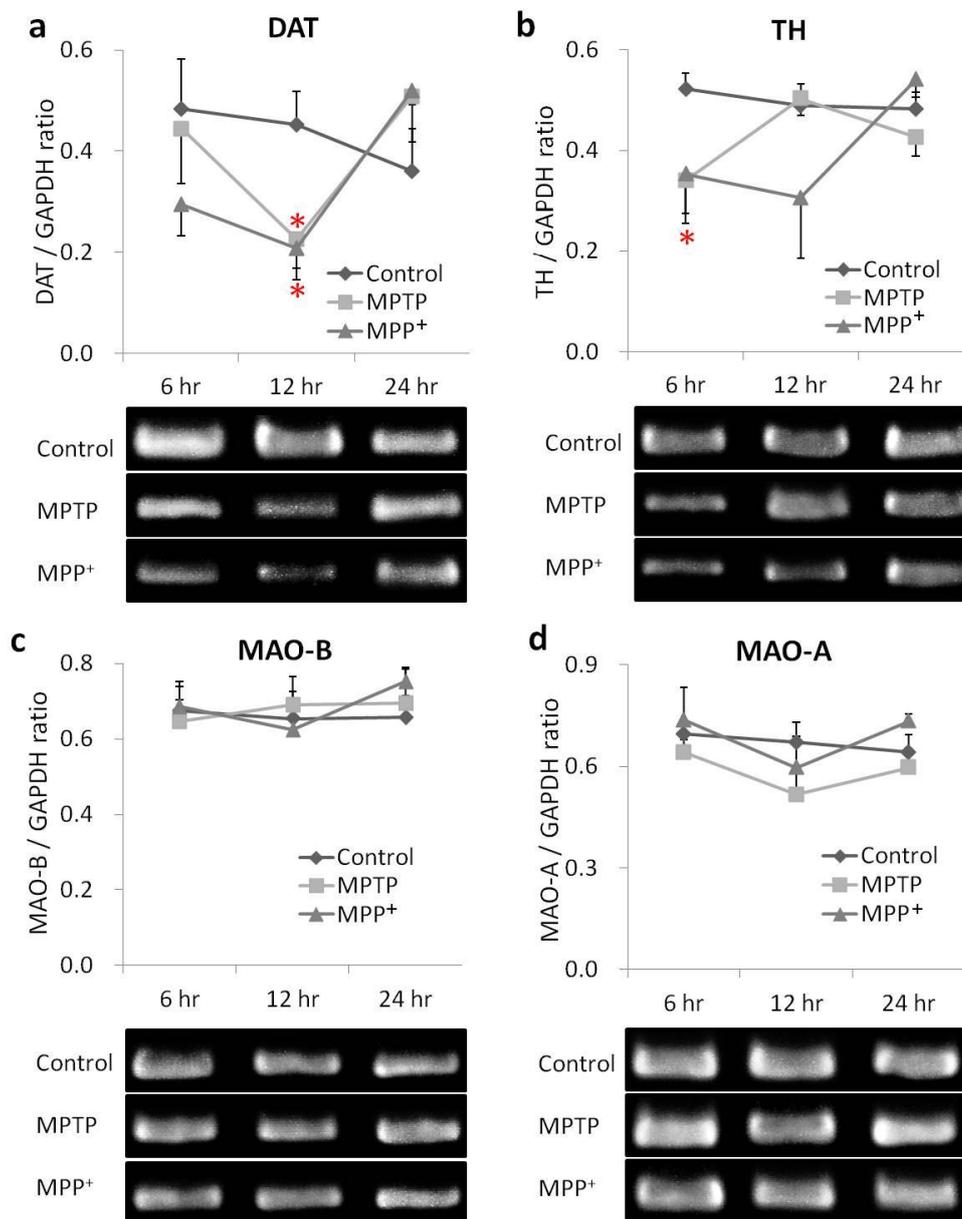
**Fig. 1-4** Changes of the mRNA expression levels in the midbrain of MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice by RT-PCR. (a) *DAT*; (b) *TH*; (c) *MAO-A*; and (d) *MAO-B*. (a and b) Both the *DAT* and *TH* mRNA expression became low 12 and 6 hr after MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treatment, respectively. (c and d) No significant changes were observed in the mRNA expression of *MAO-A* and *MAO-B*. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



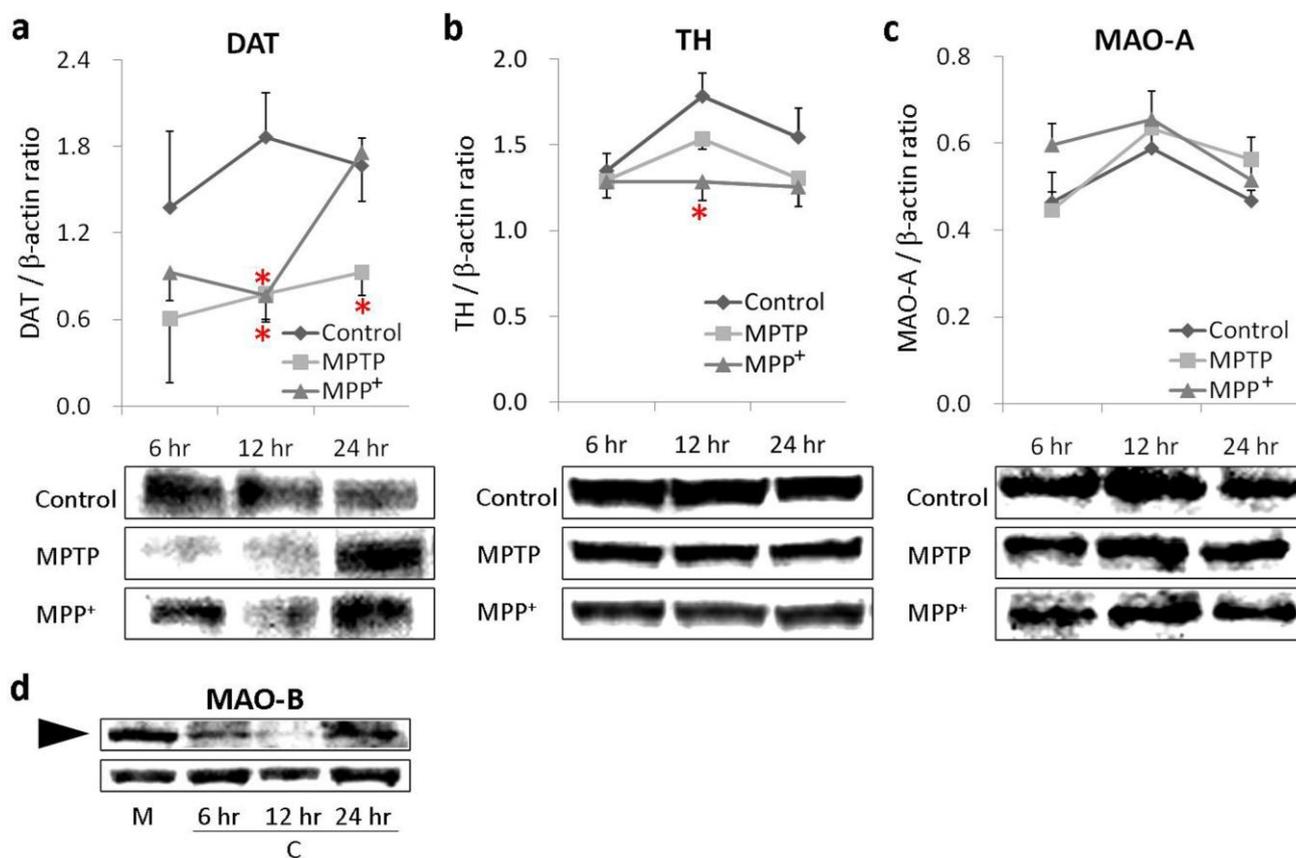
**Fig. 1-5** Changes of the protein levels in the midbrain of MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice detected by Western blotting. (a) DAT; (b) TH; (c) MAO-A; and (d) MAO-B. (a and b) The DAT and TH protein levels became low 6 to 12 hr after MPTP or MPP<sup>+</sup>-treatment, but had recovered at 24 hr. (c) No significant change was observed in the protein expression of MAO-A. (d) Representative photograph of the MAO-B protein expression at 6 to 24 hr in saline-treated newborn mice. A very low expression of the MAO-B protein was detected in the midbrain of saline-, MPTP- and MPP<sup>+</sup>-treated newborns, a quantitative evaluation was impossible. In contrast, abundant MAO-B protein expression was observed in the midbrain of maternal mice. M: maternal mice; C: saline-treated control newborn mice. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



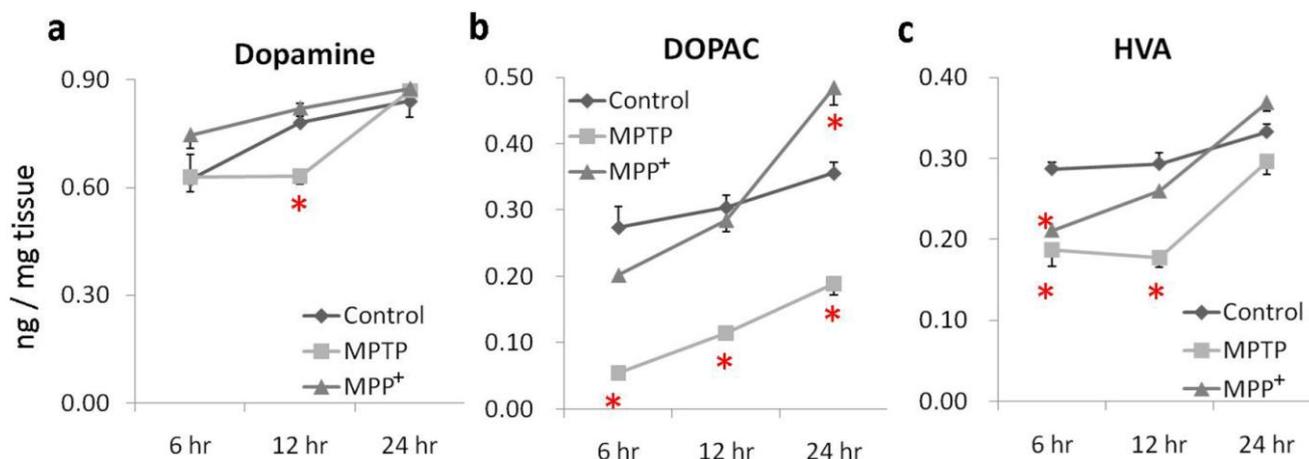
**Fig. 1-6** The levels of dopamine and its metabolites in the midbrain of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice. (a) Dopamine; (b) DOPAC; and (c) HVA. (a) A decrease in the level of dopamine was observed 6 to 12 hr after MPTP-treatment, but the level recovered at 24 hr. In contrast, no significant change in dopamine levels was observed in MPP<sup>+</sup>-treated mice. (b) The DOPAC level was decreased 6 to 24 hr after MPTP-treatment. However, the DOPAC level was slightly decreased 6 to 12 hr after treatment and increased at 24 hr in MPP<sup>+</sup>-treated mice. (c) The HVA level was not changed by MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treatment. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



**Fig. 1-7** Changes of the mRNA expression in the striatum of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice detected by RT-PCR. (a) DAT; (b) TH; (c) MAO-A; and (d) MAO-B. (a and b) *DAT* and *TH* mRNA levels became low 12 and 6 hr after MPTP-treatment, respectively. The *DAT* and *TH* mRNA levels were low at 6 to 12 hr in MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice. (c and d) No significant changes were observed in the mRNA expression of MAO-A and MAO-B. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



**Fig. 1-8** Changes of the protein expression in the striatum of MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice detected by Western blotting. (a) DAT; (b) TH; (c) MAO-A; and (d) MAO-B. (a) The DAT protein expression became low 6 to 24 hr after MPTP-treatment. The DAT protein expression was low at 6 to 12 hr in the MPP<sup>+</sup>-treated mice. (b) The TH protein expression was low 12 to 24 hr after MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treatment. (c) No significant change was observed in the protein expression of MAO-A. (d) Representative photograph of the MAO-B protein expression oat 6 to 24 hr in saline-treated newborn mice. A very low expression of the MAO-B protein was detected in the striatum of saline-, MPTP- and MPP<sup>+</sup>-treated newborns, therefore, a quantitative evaluation was impossible. Abundant MAO-B protein expression was observed in the striatum of maternal mice. M: maternal mice; C: saline-treated control newborn mice. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.



**Fig. 1-9** Levels of dopamine and its metabolites in the striatum of MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice. (a) Dopamine; (b) DOPAC; and (c) HVA. (a) A decrease in the dopamine level was observed 12 hr after MPTP-treatment, but the level had recovered at 24 hr. However, no significant change in dopamine levels was observed in the MPP<sup>+</sup>-treated mice. (b) The DOPAC level was decreased 6 to 24 hr after MPTP-treatment. However, the DOPAC level was increased 24 hr after treatment in MPP<sup>+</sup>-treated mice. (c) A decrease in the HVA level was observed 6 to 12 hr after MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treatment, and the level recovered at 24 hr. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  compared to the corresponding negative control.

## 第二章 胎子および新生子マウスにおける MPTP および MPP<sup>+</sup>中枢神経毒性の病理組織学的評価

### 要旨

本章では、胎子および新生子マウスに MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を投与した際の黒質、線条体および SVZ の病理学的変化について、組織化学的に評価した。MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を投与すると、胎子および新生子マウスで、ドパミン神経細胞のマーカである TH 陽性細胞の減少が、さらに新生子マウスでは黒質および線条体でアポトーシス細胞の増加が認められた。また、胎子および新生子マウスで SVZ のアポトーシス細胞が極めて顕著に増加した。以上の結果から、MPTP は成獣と同様に胎子および新生子マウスのドパミン神経細胞および SVZ の神経芽細胞に対して毒性を有することが明らかとなった。また、MPTP 投与によるアポトーシス細胞数は、黒質および線条体に比べて SVZ で極めて顕著に増加したことから、MPTP および MPP<sup>+</sup>による SVZ への毒性発現機序は、ドパミン神経細胞に対する機序とは異なると推察された。

## 序

これまで述べたように、MPTPは腹腔内投与されると、速やかに血中に移行し、BBBを通過して中枢神経のアストロサイトに取り込まれ、MAO-BによりMPP<sup>+</sup>へと代謝される(17-23)。MPP<sup>+</sup>はDATと高い親和性を有するため、これを有するドパミン神経細胞に取り込まれ蓄積し、酸化ストレスによりミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iを傷害することで神経細胞死を引き起こす(24-33)。なお、MAO-Bは黒質のアストロサイトだけではなく肝臓および血管内皮でも発現している(78, 79)ことから、MPTP投与動物の血中にはMPTPだけではなくMPP<sup>+</sup>も存在する。しかし、MPP<sup>+</sup>はBBBを通過できない(36, 37)ため、ドパミン神経細胞を傷害するのは脳内でMPTPから代謝されたMPP<sup>+</sup>であると考えられている。さらに近年、成獣C57BL/6マウスにおいて、MPTPが黒質および線条体のドパミン神経細胞だけでなく、subventricular zone (SVZ)の神経芽細胞に対してアポトーシスを誘発する(53-58)ことが明らかとなった。

しかし、こうしたMPTPの中枢神経毒性の研究は、ほとんどが成獣マウスを用いたものであり、胎子および新生子等、中枢神経系が未成熟なマウスに対する研究はほとんど行われていない。これまで、妊娠6日目から15日目の雌マウスにMPTPを投与すると胎子の体重、出生後の運動性および線条体のドパミン神経細胞数とドパミンおよびその代謝産物濃度の減少が認められ(51)、出生後も投与を続けることによりこれらの毒性が増強されることが報告されている(80)。一方、妊娠17日目の雌マウスにMPTPを投与しても投与24時間後の胎子、および出生24時間後、14日後および28日後の新生子マウスで線条体のドパミン濃度に変化が見られない(52)など、相反する報告もある。

本章では、胎子および新生子マウスにMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>を投与した際の黒質、線条体およびSVZの病理組織学的変化について、免疫組織化学的に評価することを目的と

した。なお、前章において、胎子および新生子マウスへMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>を投与した12時間後に最も大きな変化が見られたことから、本章では、投与12時間後における胎子および新生子マウスの脳を評価に用いた。

## 材料と方法

### 動物の飼育、被験物質の投与および病理組織標本の作製

日本チャールス・リバーより購入した妊娠 11 日目の雌 C57BL/6 マウスおよび生後 8 日目の雌雄 C57BL/6 マウスを金属ケージで飼育した。飼育室は室温 21~26°C、湿度 50~60%、照明 12 時間/日 (8~20 時) に設定した。動物には固形飼料 (MF; オリエンタル酵母) および水道水を自由に摂取させた。導入後 24 時間馴化した後、マウスを 3 群に分け (各群、妊娠マウスは n=4、新生子マウスは n=6 (雄 3 例および雌 3 例))、それぞれ溶媒 (生理食塩水)、25.0mg/kg MPTP-HCl (Sigma) もしくは 17.1 mg/kg MPP-Iodide (Sigma) を 10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。投与 12 時間後にジエチルエーテルによる深麻酔下の放血により安楽殺し、妊娠マウスからは 1 匹あたり 2 匹の胎子を、新生子マウスからは脳を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した後、常法に従いパラフィン包埋した。胎子および新生子脳の黒質・線条体および SVZ を含む領域の冠状面の連続切片を作製した。なお、本実験は東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物委員会の承認を得て、同委員会の指針に従って実施した。

### 免疫染色および TUNEL 染色

ドパミン神経細胞のマーカーである TH に対する抗体を用いた免疫染色を実施した。常法に従って脱パラフィンした切片を 10 mM のクエン酸バッファーに浸して 120°C で 15 分間オートクレーブ処理し、1%過酸化水素/メタノール溶液と 8%スキムミルクにより室温で各々 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした。ウサギ抗 TH 抗体 (1:500, Millipore) を 4°C で 18 時間反応させた。二次抗体 (LSAB キット、Dako, Carpinteria, 米国) を 37°C で 1 時間反応させた後、0.05% 3-3'-diaminobenzidine (DAB) /0.03%過

酸化水素水で発色させ、メチルグリーンによる対比染色を施した。

また、断片化 DNA を含むアポトーシス細胞を検出するため、常法に従って脱パラフィンした切片を用いて Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を実施した。染色は ApopTag Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection kit (Millipore) のプロトコールに従って実施し、メチルグリーンによる対比染色を施した。

#### 細胞数の計測および統計処理

胎子および新生子マウス脳の黒質、線条体および SVZ について、TH 陽性細胞数および TUNEL 陽性細胞数を計測した。なお、新生子マウス線条体では TH に陽性を示すドパミン神経細胞の軸索が縦横に走行しているため、Image J (NIH) を用いて TH 陽性細胞数ではなく TH 陽性領域の面積を計測した。結果は平均値  $\pm$  SE で表示した。また、溶媒対照群と投与群間の統計学的検定には  $F^2$  test および Student's *t* test を用い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 胎子マウス

MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>の単回腹腔内投与 12 時間後、投与群では溶媒対照群に比べて黒質 TH 陽性細胞の有意な減少が認められ (Fig. 2-1a to d)、特に吻側で顕著 (Fig. 2-1e) であった。線条体では、MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与により溶媒対照群と比較して TH 陽性領域の減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった (Fig. 2-2a to d)。

アポトーシス細胞数は、SVZ および SVZ に隣接する Lamina terminalis (LT) では MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与により極めて顕著に増加した (Fig. 2-3a to g) が、黒質および線条体では溶媒対照群と同様ほとんど認められなかった (data not shown)。

### 新生子マウス

MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>の単回腹腔内投与 12 時間後、投与群では溶媒対照群に比べて黒質 TH 陽性細胞の有意な減少が認められた (Fig. 2-4a to d)。線条体では、MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与により溶媒対照群と比較して TH 陽性領域の減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった (Fig. 2-4e to h)。

アポトーシス細胞数は、線条体では MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与により顕著に増加した (Fig. 2-5a to d) が、黒質では溶媒対照群と比較して顕著な変化は認められなかった (Fig. 2-5d)。SVZ では、MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>投与により極めて顕著に増加した (Fig. 2-6a to d)。

## 考察

第一章および本章の研究において、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>の投与12時間後に、胎子および新生子マウスの黒質および線条体においてTHタンパク質発現量の減少が、胎子マウスのSVZおよびLTと新生子マウスのSVZにおいてアポトーシス細胞の増加がそれぞれ見られた。従って、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>は胎子および新生子マウスに対し、成獣と同様に黒質、線条体およびSVZを標的として中枢神経毒性を引き起こすと考えられた。

免疫染色により、胎生12日目の胎子マウスでは黒質に比較的多数のTH陽性細胞が、線条体に若干のTH陽性領域が認められたことから、この時期の胎子マウスの黒質には既にドパミン神経細胞が存在し、線条体へ投射しつつあると考えられた。以前の報告により、ラットでは胎生13日目から黒質にドパミン神経細胞が認められ、胎生16日目にかけて線条体へ投射される (81-86) ことが知られている。ラットの胎生13日目から16日目はマウスの胎生11日目から14日目に相当する (87-89) ことから、胎子マウスでの所見は、ラットの所見と矛盾しないと考えられた。加えて、生後9日目の新生子マウスでは、広範なTH陽性領域が黒質および線条体で認められた。

MPTP投与胎子マウスの脳を形態的に評価した報告は少ない。生化学的には、妊娠マウスにMPTPを投与すると4時間後以降に胎子の脳からMPTPおよびMPP<sup>+</sup>が検出される (71) こと、および妊娠マーマーモセットへのMPTPの慢性的投与により出生1日後の新生子の脳のだパミン濃度が低下する (90) ことが報告されている。本章で行った免疫染色の結果は、これら生化学的な評価結果と一致し、また、MPTPが胎子および新生子マウスに対して中枢神経毒性を有することを形態学的に示したものであると考えられる。

また、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>がBPBおよび胎子と新生子のBBBを通過することが示された (44, 70, 71, 90) が、本研究の結果のみでは、MPTPを投与した胎子および新生子マ

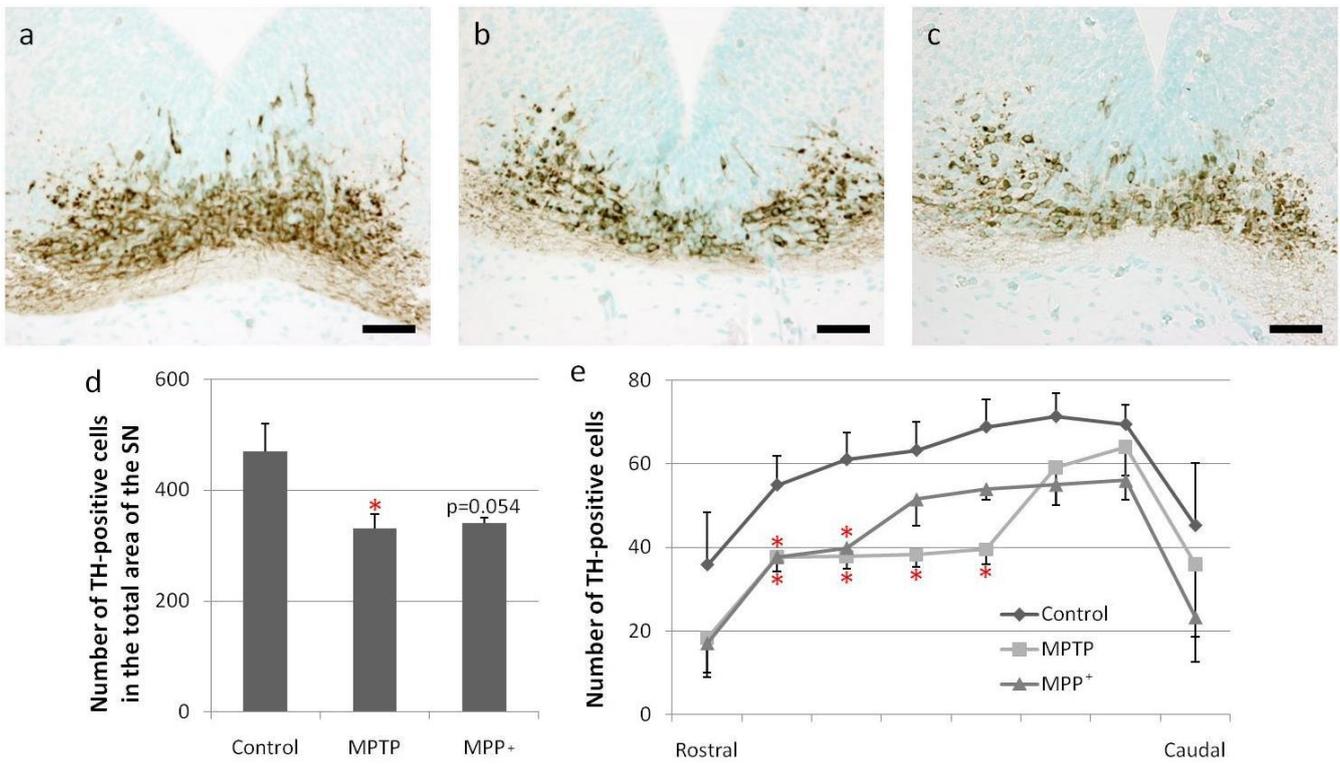
ウスで、MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>のいずれの形態でこれらの関門を通過したのかは不明であった。化学物質のBBB通過性は、その物質の脂溶性によって決定される (37) が、MPP<sup>+</sup>は水溶性が高いため、成獣で腹腔内あるいは皮下投与した場合、BBBを通過しない (37) と考えられている。しかし、げっ歯類では出生後しばらくはBBBがほとんど機能しないこと (91-93)、およびマウスでは生後数週間まではトリパンプルー等の高分子化合物が脳へ通過する (93-96) ことが知られている。アルカリフォスファターゼは脳の血管内皮に発現 (97) し、BBBの機能に必要な酵素であるが、マウス脳では出生12~24日後に、ラット脳では出生数週間後に発現し始める (93, 98-100) ことから、出生9日後の新生子マウス脳では、BBBはまだ機能していないと考えられる。

MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>の投与により、新生子マウスの黒質および線条体ではTHタンパク質発現量の減少およびアポトーシス細胞の増加が見られたのに対し、胎子ではTHタンパク質発現量が減少したのみであったことから、胎子マウスのドパミン神経細胞は新生子マウスのドパミン神経細胞と比べて、アポトーシスに対する抵抗性が高いと推察された。一方、SVZでは、MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>の投与により胎子および新生子マウスでアポトーシス細胞が極めて顕著に増加した。成獣C57BL/6マウスを用いたこれまでの研究において、MPTPの腹腔内投与 (53, 59) およびMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>の側脳室内投与 (56-58) によりSVZでアポトーシス細胞が増加した。これらの結果および本章の結果より、少なくとも胎生12日以降のSVZの神経芽細胞はMPTPおよびMPP<sup>+</sup>により傷害を受けると考えられた。さらに、MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>投与によるSVZのアポトーシス細胞の増加は、黒質および線条体よりも顕著であった。従って、ドパミン神経細胞と神経芽細胞ではMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>の細胞毒性の機序もしくはこれらに対する感受性が大きく異なると考えられ、その原因としてそれぞれの細胞におけるMAO-BあるいはDATタンパク質の発現量および活性の相違が推察された。

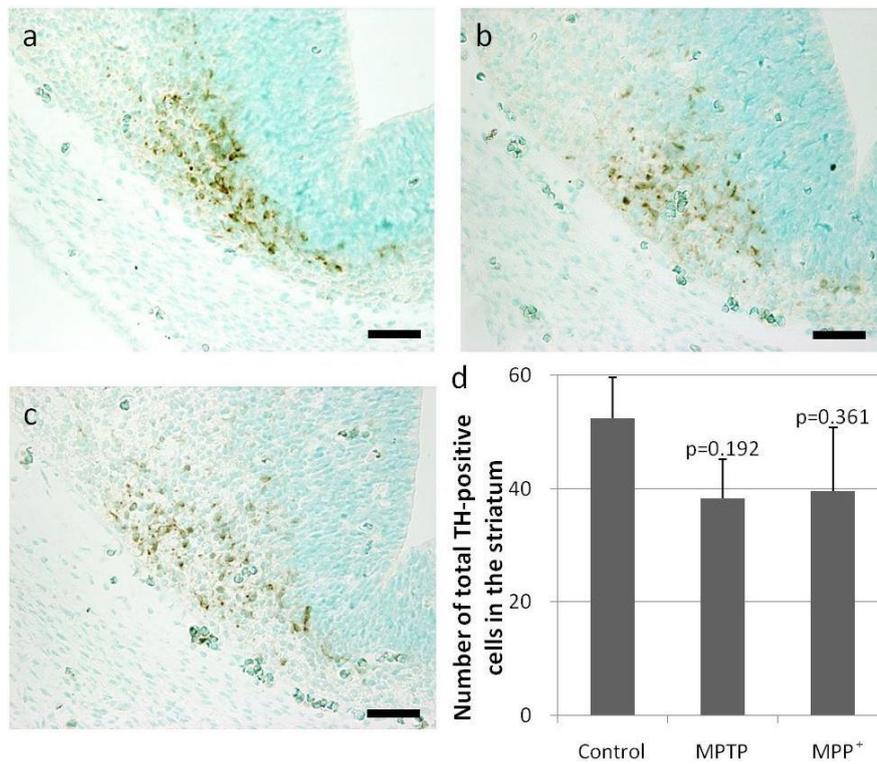
なお、前章および本章において、MPP<sup>+</sup>投与群よりもMPTP投与群でTHのmRNAとタ

ンパク質の発現量、ドパミンとその代謝産物の濃度が重度に減少し、アポトーシス細胞が増加した。この現象の原因の一つとして、MPTP および MPP<sup>+</sup>の投与用量設定が考えられ、本試験で用いた用量よりやや高用量の MPP<sup>+</sup>を投与することで、MPTP 投与群と同程度の変化が見られた可能性があるかと推察された。

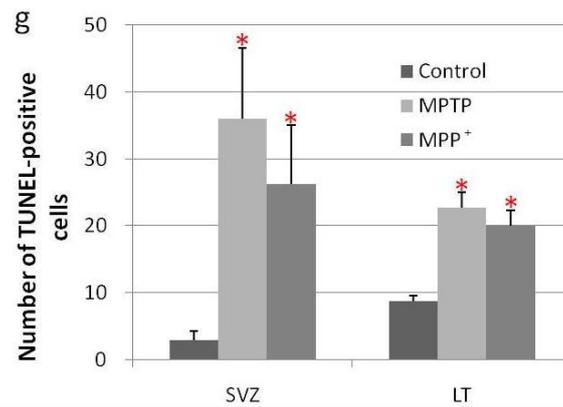
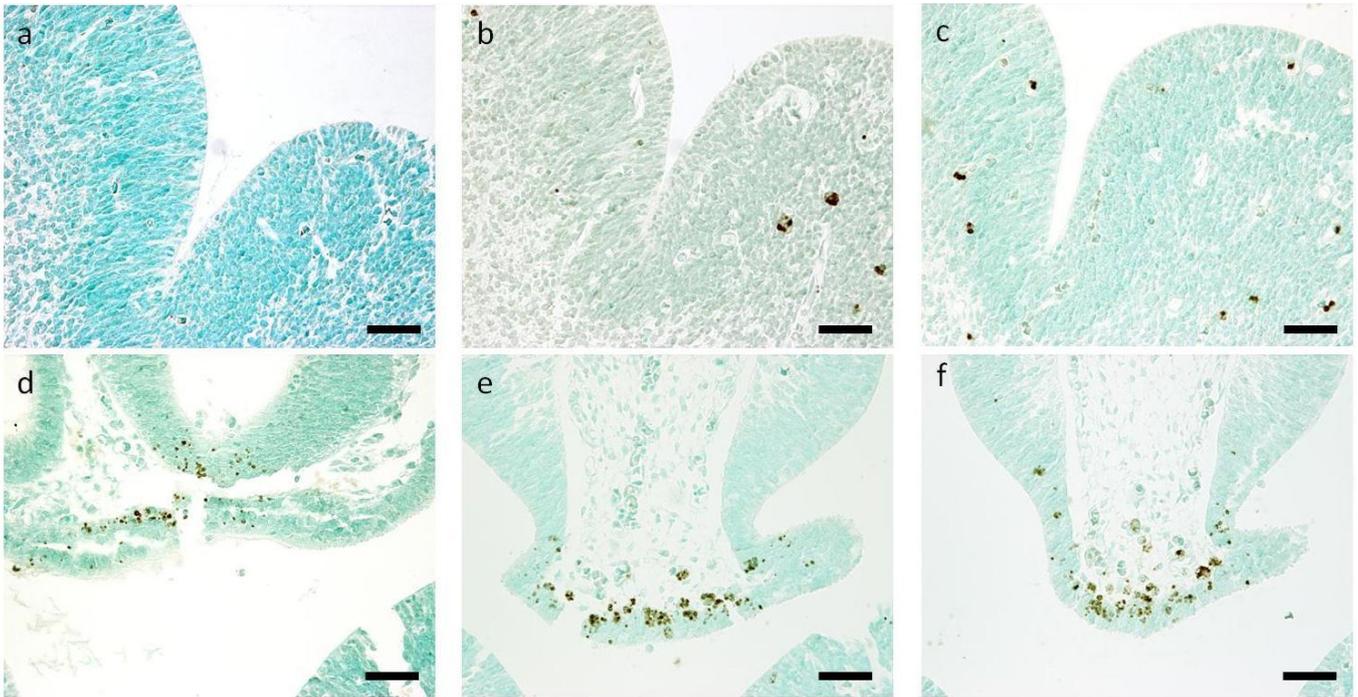
本章の結果をまとめると、妊娠マウスの腹腔内に投与したMPTPおよびMPP<sup>+</sup>は、胎子および新生子マウスのドパミン神経細胞およびSVZの神経芽細胞に毒性を示すことが明らかとなった。また、ドパミン神経細胞と神経芽細胞ではMPTPあるいはMPP<sup>+</sup>の細胞毒性の機序もしくはこれらに対する感受性が大きく異なると推察された。



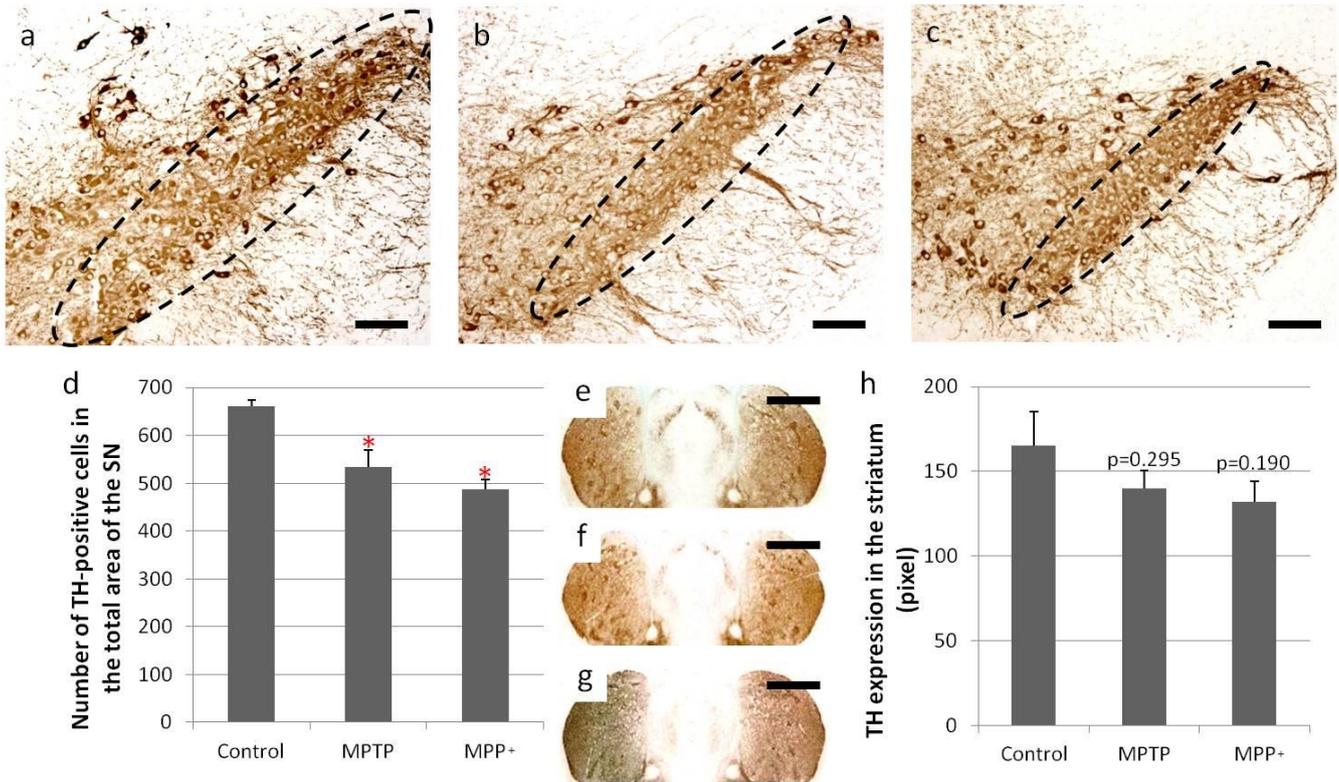
**Fig. 2-1** TH-positive cells were significantly decreased in the fetal SN of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a: Control; b: MPTP ; c: MPP<sup>+</sup>. d: The number of TH-positive cells in the total area of SN was decreased in MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. e: Distribution of TH-positive cells from rostral to caudal SN. Significant decreases of TH-positive cells were seen on the rostral side. Values are shown as the mean ± SE. \*,  $P < 0.05$ ; significantly different from control. Scale bars = 50  $\mu$ m.



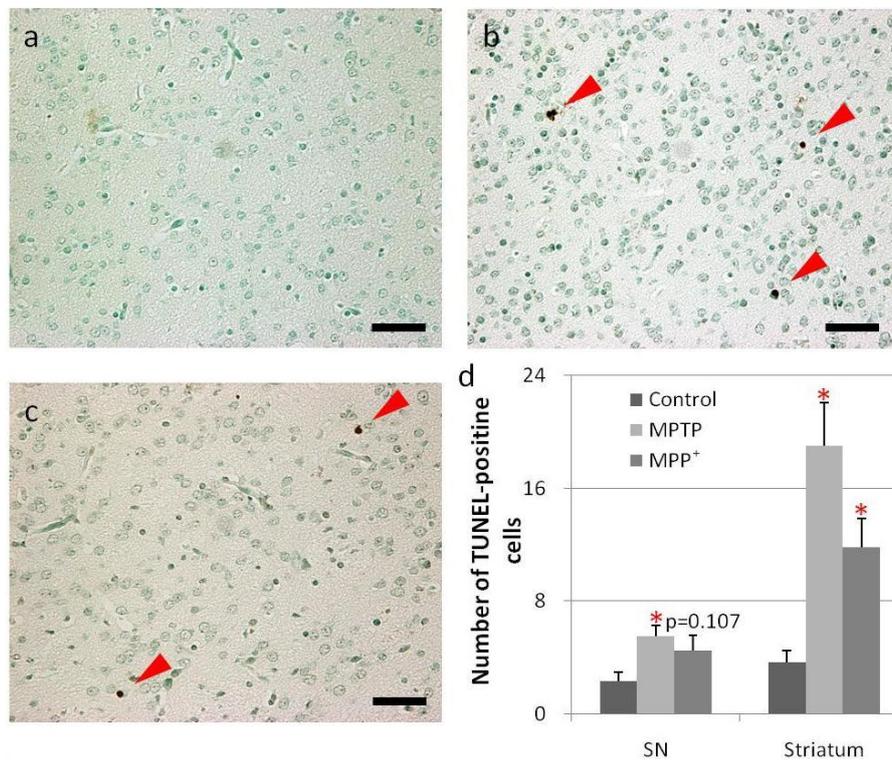
**Fig. 2-2** TH-positive cells tended to be decreased in the fetal striatum of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a: Control; b: MPTP; c: MPP<sup>+</sup>. d: Total number of TH-positive cells was decreased in MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated mice, although the difference was not significant. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. Scale bars = 50  $\mu$ m.



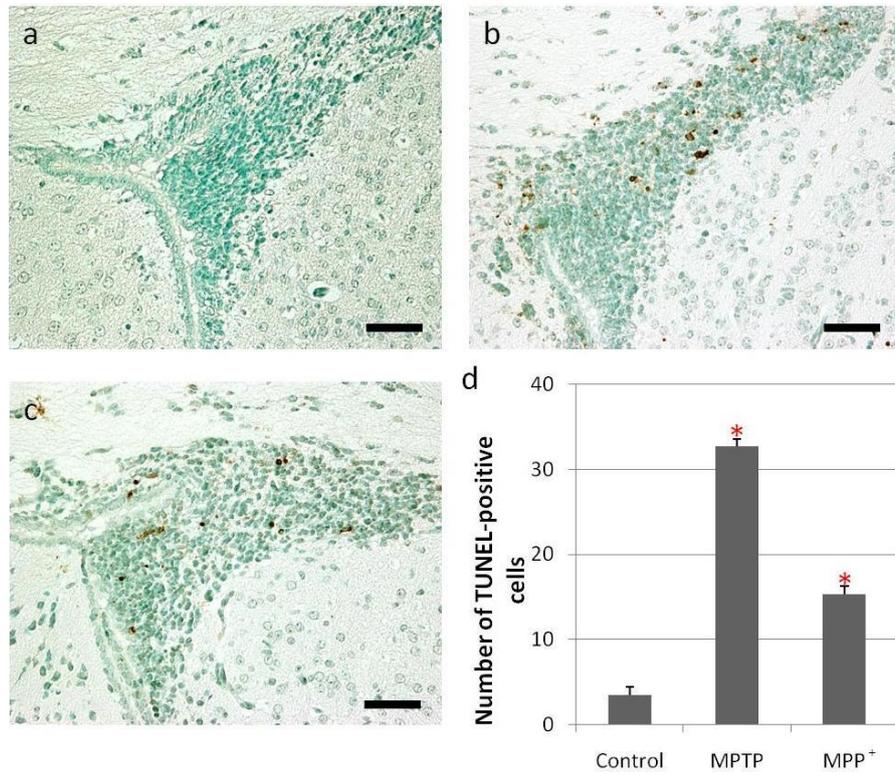
**Fig. 2-3** TUNEL-positive cells were significantly increased in the fetal SVZ and LT of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a-c: SVZ; d-f: LT. a and d: Control; b and e: MPTP; c and f: MPP<sup>+</sup>. g: Total number of TUNEL-positive cells in the SVZ and LT of MPTP or MPP<sup>+</sup>-treated mice. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; significantly different from control. Scale bars = 50  $\mu$ m.



**Fig. 2-4** TH-positive cells were decreased in the newborn SN and striatum of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a and e: Control; b and f: MPTP; c and g: MPP<sup>+</sup>. White dotted circle in a-c: TH positive cells in SN pars compacta. d: Average number of TH-positive cells was significantly decreased in the newborn SN of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; significantly different from control. h: TH expression level was mildly decreased in MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice, although the difference was not significant. a-c: scale bars = 100  $\mu$ m, e-g: scale bars = 1 mm.



**Fig. 2-5** TUNEL-positive cells were increased in the newborn SN and striatum of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a-c: striatum; a: Control; b: MPTP; c: MPP<sup>+</sup>. d: Total number of TUNEL-positive cells in the newborn SN and striatum. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; significantly different from control. Scale bars = 50  $\mu$ m.



**Fig. 2-6** TUNEL-positive cells were significantly increased in the newborn SVZ of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice. a-c: SVZ; a: Control; b: MPTP; c: MPP<sup>+</sup>. d: Total number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the newborn SVZ. Values are shown as the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; significantly different from control. Scale bars = 50  $\mu$ m.

### 第三章 胎子および新生子マウスにおける MPTP 中枢神経 毒性への MAO-B の関与

#### 要旨

第一章および第二章の結果より、MPTP および MPP<sup>+</sup>は成獣マウスだけではなく胎子および新生子マウスのドパミン神経細胞および SVZ の神経芽細胞に対しても毒性を有することが明らかとなったが、その機序は不明のままであった。本章では、胎子および新生子マウスにおける MPTP の中枢神経毒性機序について、MPTP 代謝における MAO-B の関与、および神経細胞への MPP<sup>+</sup>の取り込みにおける DAT の関与が成獣と同様であるか否かを評価した。免疫染色および二重免疫蛍光染色の結果より、MPTP を投与した場合にのみ胎子および新生子マウスのグリア細胞で MAO-B 発現量の増加が見られた。これは、MAO-B の基質が増加したことによる反応性の変化であると推察された。従って、胎子および新生子マウスでは成獣と同様 MPTP の代謝に MAO-B が関与していると考えられた。一方、DAT の発現は新生子マウスのドパミン神経細胞のみで認められ、胎子マウスおよび新生子マウスの SVZ では認められなかった。従って、胎子および新生子マウスでは、成獣と同様 MPTP の代謝に MAO-B が関与していると考えられた。

## 序

成獣 C57BL/6 マウスにおいて、MPTP は黒質から線条体へ投射するドパミン神経細胞だけでなく、nestin 陽性の SVZ 神経芽細胞にもアポトーシスを誘発する (53-55)。ドパミン神経細胞および神経芽細胞のアポトーシスは、MAO-B 選択的阻害剤であるデイプレニルの前処理により抑制されることから、MAO-B は脳内で MPTP から MPP<sup>+</sup> への代謝に関与していると考えられる (54-55)。しかし、神経芽細胞のアポトーシスは、DAT 阻害剤の前処理では抑制されず、ドパミンと同じくモノアミン神経伝達物質であるセロトニンおよびノルアドレナリンのトランスポーター阻害剤の前処理でも抑制されない (59) ことから、MPP<sup>+</sup> は未知の機序により細胞内へ取り込まれると考えられる。MPTP の SVZ 神経芽細胞に対する毒性は、ドパミン神経細胞に対する毒性とは異なる機序に起因すると考えられているが詳細は不明であり、特に、MPP<sup>+</sup> を細胞内へ取り込む機序は未解明である。さらに、MPTP による胎子および新生子マウスの SVZ の神経芽細胞に対する毒性を評価した研究も見当たらない。

第一章および第二章において、MPTP および MPP<sup>+</sup> は胎子および新生子マウスでもドパミン神経細胞および神経芽細胞に対して毒性を示すことが明らかとなった (101, 102)。本章では、胎子および新生子マウスのドパミン神経細胞および神経芽細胞に対する MPTP および MPP<sup>+</sup> による毒性発現に成獣と同様に MAO-B および DAT が関与しているか否かを評価した。

## 材料と方法

### 動物の飼育、被験物質の投与および病理組織標本の作製

日本チャールス・リバーより購入した妊娠 11 日目の雌 C57BL/6 マウスおよび生後 8 日目の雌雄 C57BL/6 マウスを金属ケージで飼育した。飼育室は室温 21~26°C、湿度 50~60%、照明 12 時間/日 (8~20 時) に設定した。動物には固形飼料 (MF; オリエンタル酵母) および水道水を自由に摂取させた。導入後 24 時間馴化した後、マウスを 3 群に分け (各群、妊娠マウスは n=4、新生子マウスは n=6 (雄 3 例および雌 3 例))、それぞれ溶媒 (生理食塩水)、25.0mg/kg MPTP-HCl (Sigma) もしくは 17.1 mg/kg MPP-Iodide (Sigma) を 10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。投与 12 時間後にジエチルエーテルによる深麻酔下の放血により安楽殺し、妊娠マウスからは 1 匹あたり 2 匹の胎子を、新生子マウスからは脳を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した後、常法に従いパラフィン包埋した。胎子および新生子脳の黒質、線条体および SVZ を含む領域の冠状面の連続切片を作製した。なお、本実験は東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物委員会の承認を得て、同委員会の指針に従って実施した。

### 免疫染色

抗 MAO-B 抗体、抗 DAT 抗体および抗 TH 抗体を用いた免疫染色を実施した。常法に従って脱パラフィンした切片を 10m M のクエン酸バッファーに浸して 120°C で 15 分間オートクレーブ処理し、1%過酸化水素/メタノール溶液と 8%スキムミルクで各々 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした後、ウサギ抗 MAO-B 抗体 (1:25, Proteintech Group, Chicago, 米国)、ラット抗 DAT 抗体 (1:50, Santa Cruz Biotechnology)、およびウサギ抗 TH 抗体 (1:500, Millipore) を 4°C で 18 時間反応さ

せた。二次抗体 (LSAB キット、Dako) を 37°C で 1 時間反応させた後、0.05% DAB/0.03% 過酸化水素水で発色させ、メチルグリーンによる対比染色を施した。

#### MAO-B 陽性領域の測定および統計処理

胎子マウスおよび新生子マウスの脳では、MAO-B は細胞質に微細顆粒状に発現していたため、Image J (NIH) を用いて MAO-B 陽性領域の面積を計測した。結果は平均値  $\pm$  SE で表示した。また、溶媒対照群と投与群間の統計学的検定には *F*-test、Student's *t*-test および Aspen-Welch test を用い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

#### 二重免疫蛍光染色

MAO-B について、成獣と同様にグリア細胞で発現しているか否かを確認するため、抗 MAO-B 抗体と神経細胞マーカーもしくはグリア細胞マーカーを用いた二重免疫蛍光染色を実施した。なお、胎子マウスについては側脳室に接する LT 領域で、新生子マウスについては黒質および SVZ で評価した。

常法に従って脱パラフィンした胎子マウス脳の切片について、未熟神経細胞のマーカーであるヤギ抗 doublecortin (DCX) 抗体 (1:60, Santa Cruz Biotechnology) もしくは未熟グリア細胞のマーカーであるウサギ抗 nestin 抗体 (1:4, 免疫生物研究所, 群馬) を 37°C で 1 時間反応させた。新生子マウスの切片については、上記の抗 DCX 抗体、抗 nestin 抗体、成熟神経細胞のマーカーであるラット抗 neurofilament (NF) 抗体 (1:1, Dako) もしくは成熟グリア細胞のマーカーであるウサギ抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (1:40, Dako) を 37°C で 1 時間反応させた。その後、Alexa Fluor 594 標識二次抗体 (Invitrogen, Carlsbad, 米国) を 37°C で 1 時間反応させた。

次いで、胎子の切片にはヤギ抗 MAO-B 抗体 (1:5, Santa Cruz Biotechnology) を、新生子の切片には上記の抗 MAO-B 抗体またはウサギ抗 MAO-B 抗体 (1:10,

Proteintech Group) をそれぞれ 4°C で 18 時間反応させた。Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen) を 37°C で 1 時間反応させた後、Vectashield hard set with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, 米国) で封入した。

## 結果

### 胎子マウス

MAO-B タンパク質の発現は、側脳室に接する LT 領域で見られた (Fig. 3-1a to c)。MPTP 投与 12 時間後に溶媒対照群と比較して発現量の増加傾向が認められたが、有意差は認められなかった (Fig. 3-1d and e)。LT での MAO-B の発現は nestin 陽性の未成熟グリア細胞で認められ (Fig. 3-2a)、DCX 陽性の未成熟神経細胞では認められなかった (Fig. 3-2b)。また、黒質および線条体では MAO-B タンパク質の発現は認められなかった (data not shown)。脳以外では、肝臓 (Fig. 3-3a)、鼻腔上皮 (Fig. 3-3b) 神経管 (Fig. 3-3c) および皮膚 (Fig. 3-3d) で MAO-B の発現が認められた。

DAT タンパク質の発現は、溶媒対照群、MPTP 投与群および MPP<sup>+</sup>投与群のいずれでも全ての臓器で認められなかった (data not shown)。

### 新生子マウス

MAO-B タンパク質の発現は黒質で見られ (Fig. 3-4a to c)、MPTP 投与 12 時間後に溶媒対照群と比較して有意に発現量が増加した (Fig. 3-4d and e)。また、線条体でも発現が見られた (Fig. 3-5a to c) が、MPTP 投与による発現量の変化は認められなかった (Fig. 3-5d and e)。なお、黒質では、MAO-B の発現は GFAP 陽性の成熟グリア細胞で認められ (Fig. 3-6a)、NF 陽性の成熟神経細胞では認められなかった (Fig. 3-6b)。

また、MAO-B タンパク質の発現は、SVZ でも見られ (Fig. 3-7a to c)、MPTP 投与 12 時間後に溶媒対照群と比較して発現量の増加傾向が認められたが、有意差は認められなかった (Fig. 3-7d and e)。なお、SVZ では、MAO-B の発現は nestin 陽性の未成熟グリア細胞で認められ (Fig. 3-8a)、DCX 陽性の未成熟神経細胞では認められなかつ

た (Fig. 3-8b)。

DAT タンパク質の発現は、黒質 (Fig. 3-9a)、線条体 (Fig. 3-9b) および橋 (data not shown) で認められたが、SVZ では認められなかった (Fig. 3-9b)。なお、DAT 陽性領域は、TH 陽性領域とほぼ同じであった (Fig. 3-9a to d)。

## 考察

本章の結果より、胎子および新生子マウスの脳では、基質の一つである MPTP を投与した場合のみ MAO-B タンパク質発現量の増加傾向が認められたことから、胎子および新生子マウスでも MAO-B が MPTP から MPP<sup>+</sup>への代謝に関与すると推察された。MPP<sup>+</sup>を神経細胞内へと取り込む DAT は、新生子マウスの黒質および線条体のみで発現が認められたことから、成熟ドパミン神経細胞でのみ MPP<sup>+</sup>の取り込みに関与すると考えられた。

成獣マウス (33, 103)、ネコ (104) およびヒト (105) では、MAO-B はグリア細胞に発現することが知られている。本章の結果から、MAO-B タンパク質は、胎子マウスでは脳の LT、肝臓、鼻腔上皮、神経管および皮膚で、新生子マウスでは黒質、線条体、海馬および視床下部のグリア細胞で発現することが確認された。これらの結果は、胎子 (103, 106) および新生子マウス (107, 108) におけるこれまでの研究結果と一致した。

MAO-B は、胎子マウスでは LT の nestin 陽性未成熟グリア細胞に、新生子マウスでは黒質および線条体の GFAP 陽性成熟グリア細胞と SVZ の nestin 陽性未成熟グリア細胞で発現が認められた。従って、哺乳類では MAO-B タンパク質は年齢にかかわらずグリア細胞で発現していると考えられた。

また、本章では、MPTP を投与した場合にのみ MAO-B タンパク質発現量の増加傾向が見られた。基質となる物質の増加による代謝酵素の誘導は生体内でよく見られる反応である (109) ことから、胎子および新生子マウスの脳では投与された MPTP が何らかの受容体との結合を介して MAO-B 発現量の増加を誘導する可能性が組織化学的に推察された。なお、新生子マウスの線条体では、MPTP 投与による MAO-B タンパク質発現量の変化は見られなかった。第二章においても新生子の黒質では MPTP あるいは

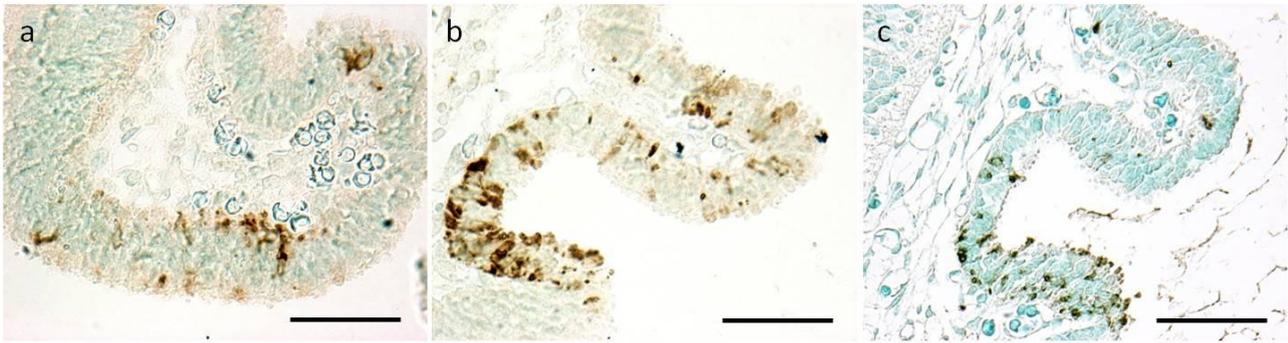
は MPP<sup>+</sup>投与により TH タンパク質発現量が顕著に減少したのに対し、線条体では顕著な変化は見られなかった。この点については、ドパミン神経細胞は黒質に存在するニューロンの軸索が線条体へ伸長することから、MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>に対する変化の主体は黒質であり、線条体は黒質と比べ反応性が低いためであると推察された。

本章の結果から、母体に投与された MPTP は胎子に移行し、胎子の様々な部位で MAO-B によって MPTP から MPP<sup>+</sup>に代謝されると考えられたが、胎子の神経細胞に DAT タンパク質発現は認められなかった。これまでの研究においても、マウス胎子で DAT タンパク質発現が認められるのは胎生 14 日以降であり (110, 111) 胎生 12 日では DAT mRNA 発現のみしか認められない (112) ことから、マウス胎子のドパミン神経および SVZ の未成熟神経細胞に MPP<sup>+</sup>が取り込まれる機序は依然不明のままであった。これに対し、新生子マウスでは、MPTP によるドパミン神経細胞への毒性は、成獣とほぼ同様で、脳内の MAO-B による MPTP の MPP<sup>+</sup>への代謝および DAT を介した MPP<sup>+</sup>の神経細胞内への取り込みによって引き起こされると考えられた。しかし、SVZ では DAT の発現が認められなかったことから、SVZ の未成熟神経細胞に MPP<sup>+</sup>が取り込まれる機序は、新生子でも不明のままであった。

胎子マウスの中樞神経 (113) および出生後のマウスの SVZ (105, 114) には多数の未成熟神経細胞が存在することが知られている。また、本研究においても、免疫蛍光二重染色の結果、胎子マウスの黒質、線条体、SVZ および新生子マウスの SVZ の神経細胞は nestin 陽性の未成熟神経細胞であることが示された。しかし、これらの細胞は DAT を発現していないため、未成熟神経細胞には DAT を介さない未知の MPP<sup>+</sup>取り込み機構が存在する可能性が推察された。

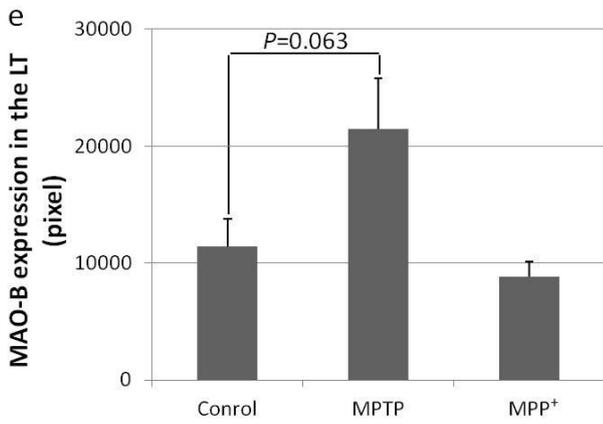
MAO-B タンパク質発現量の増加は、第一章の生化学的評価では検出できなかったが、本章の病理学的評価では検出できた。その原因として、病理学的評価法では黒質、線条体および SVZ の該当する領域のみでタンパク質発現量を評価できた一方で、生化学的

評価法では、実体顕微鏡下で該当部を含む広い部分を採取しホモジネートして評価に供したためと考えられた。

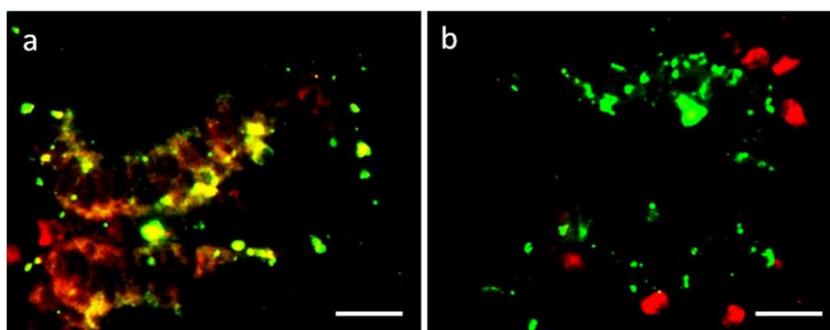


d

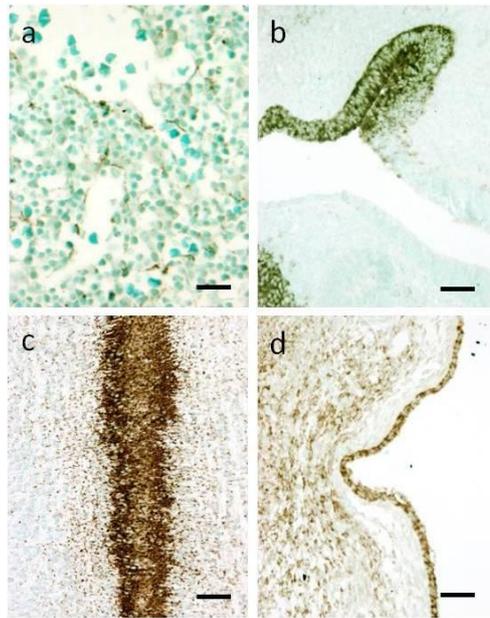
	MAO-B expression (pixel)							
Control	11452.1 ± 2336.2	(24440.6, 6856.8,	16812.6, 7484.1,	9808.7, 5220.8,	14236.7,	6756.3)		
MPTP	16092.8 ± 4377.5	(32323.4, 17247.0,	10766.7, 41672.5,	9988.6, 33277.5,	11426.6,	14938.7)		
MPP <sup>+</sup>	8855.3 ± 1299.9	( 8144.5, 8811.0,	12391.7, 3670.1,	11837.3, 12989.4,	3529.7,	9468.7)		



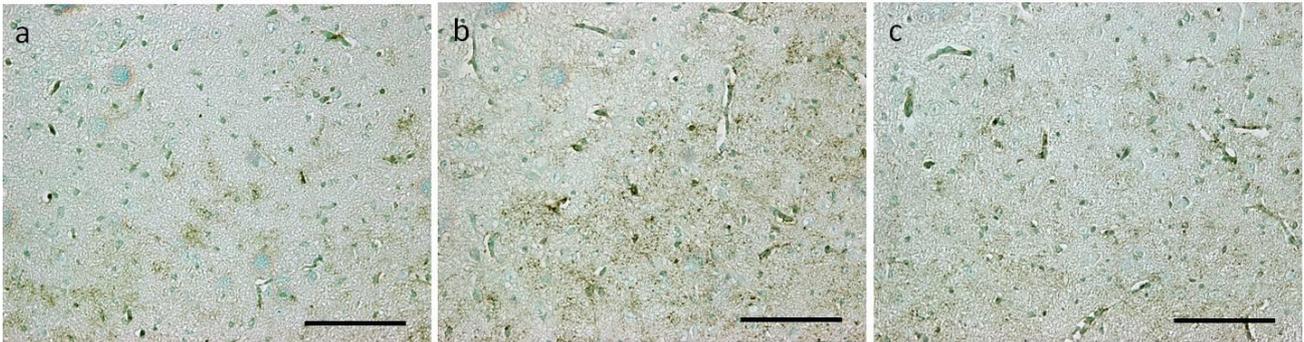
**Fig. 3-1** MAO-B protein expression was increased in the LT of MPTP-treated embryos. (a) Control; (b) MPTP; (c) MPP<sup>+</sup>. (d) Mean ± SE of the MAO-B expression level. Values in the parenthesis. (e) MAO-B expression level was increased in MPTP-treated mice, although the difference was not significant. Values are shown as the mean ± SE. Scale bars = 50 μm.



**Fig. 3-2** MAO-B protein expression in immature glial cells in the LT of MPTP-treated embryos. Green fluorescence indicates MAO-B expression, and red fluorescence does nestin (a) or DCX (b). MAO-B was expressed in nestin-positive immature glial cells (a), not in Dcx-positive neuroblasts (b). Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

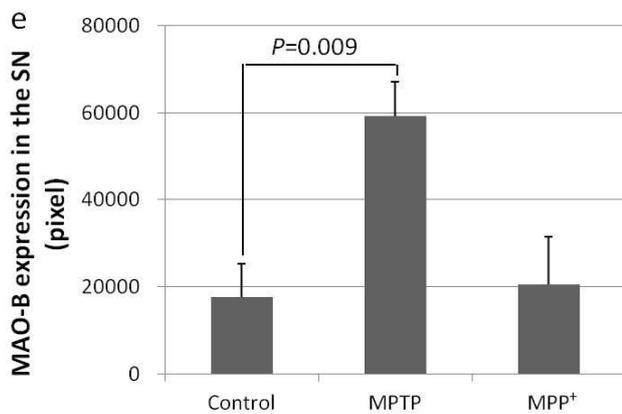


**Fig. 3-3** MAO-B protein expressions in mouse embryonic tissues other than the brain. MAO-B expression in the liver (a), nasal epithelium (b), neural tube (c) and epidermis (d). Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ .

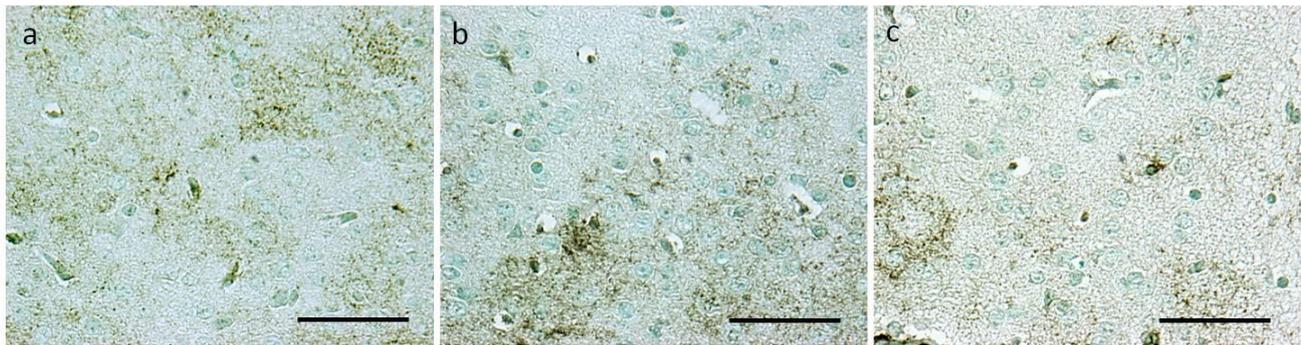


d

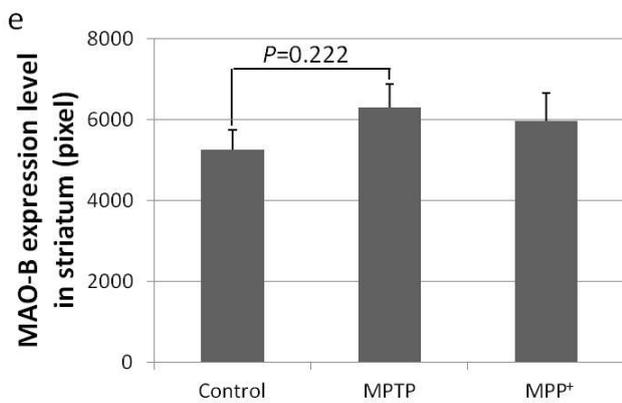
	MAO-B expression (pixel)			
Control	17612.6 ± 7742.5	(33799.7, 27152.4,	542.3,	8955.9)
MPTP	59239.2 ± 7778.4	(77025.2, 66314.1,	41777.9,	51839.7)
MPP <sup>+</sup>	20557.4 ± 11054.0	(51845.6, 18123.4,	11836.6,	423.8)



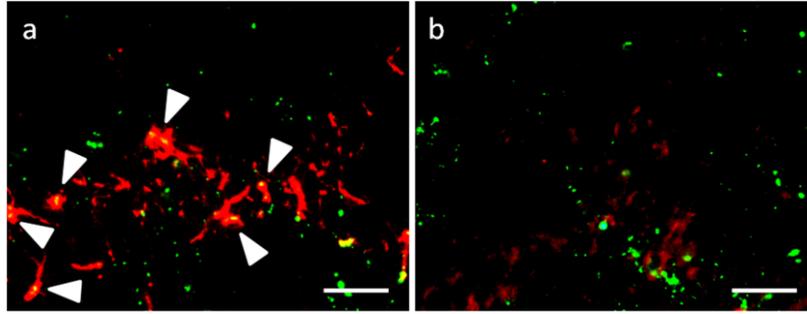
**Fig. 3-4** MAO-B protein expression was significantly increased in the SN of MPTP-treated newborn mice. (a) Control; (b) MPTP; (c) MPP<sup>+</sup>. (d) Mean ± SE of the MAO-B expression level. Values in the parenthesis. (e) MAO-B expression level was significantly ( $P < 0.05$ ) increased in the SN of MPTP-treated mice. Values are shown as the mean ± SE. Scale bars = 100  $\mu$ m.



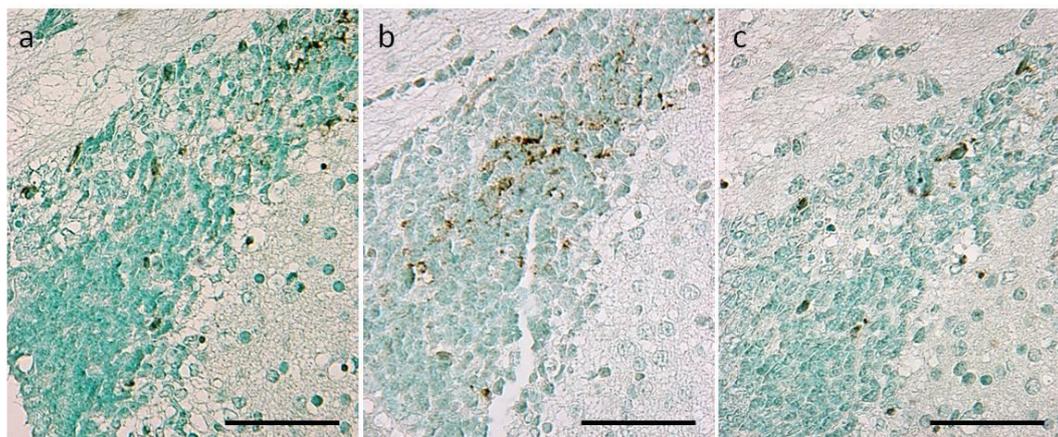
	MAO-B expression (pixel)
Control	5257.9 ± 494.1 (6105.9, 4410.0, 6121.5, 4394.4)
MPTP	6312.7 ± 595.5 (5657.1, 5441.0, 6102.0, 8050.8)
MPP <sup>+</sup>	5979.7 ± 693.7 (5321.0, 7714.5, 6378.1, 4505.4)



**Fig. 3-5** MAO-B protein expression was not changed among the striatum of control, MPTP- and MPP<sup>+</sup>-treated newborn mice. (a) Control; (b) MPTP; (c) MPP<sup>+</sup>. (d) Mean ± SE of the MAO-B expression level. Values in the parenthesis. (e) No change of MAO-B expression level was seen in the striatum by MPTP or MPP<sup>+</sup> treatment. Values are shown as the mean ± SE. Scale bars = 50 μm.

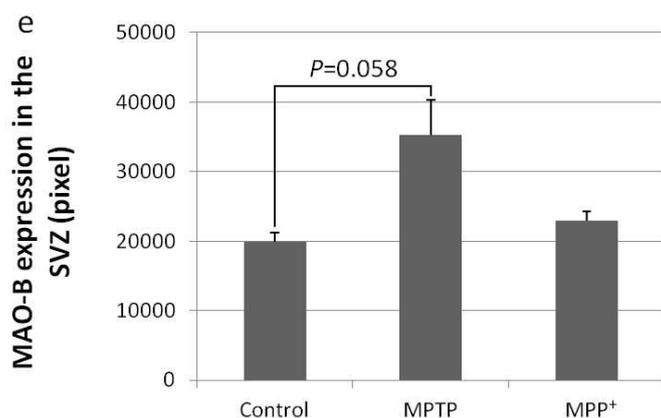


**Fig. 3-6** MAO-B protein expression in mature glial cells in the SN of MPTP-treated newborn mice. Green fluorescence indicates MAO-B expression, and red fluorescence does GFAP (a) or NF (b). MAO-B was expressed in GFAP-positive mature glial cells (a, arrowheads), not in NF-positive neuroblasts (b). Scale bars = 20  $\mu$ m.

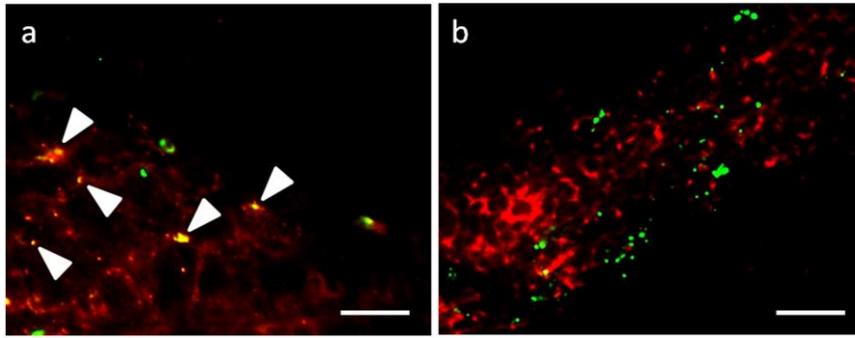


d

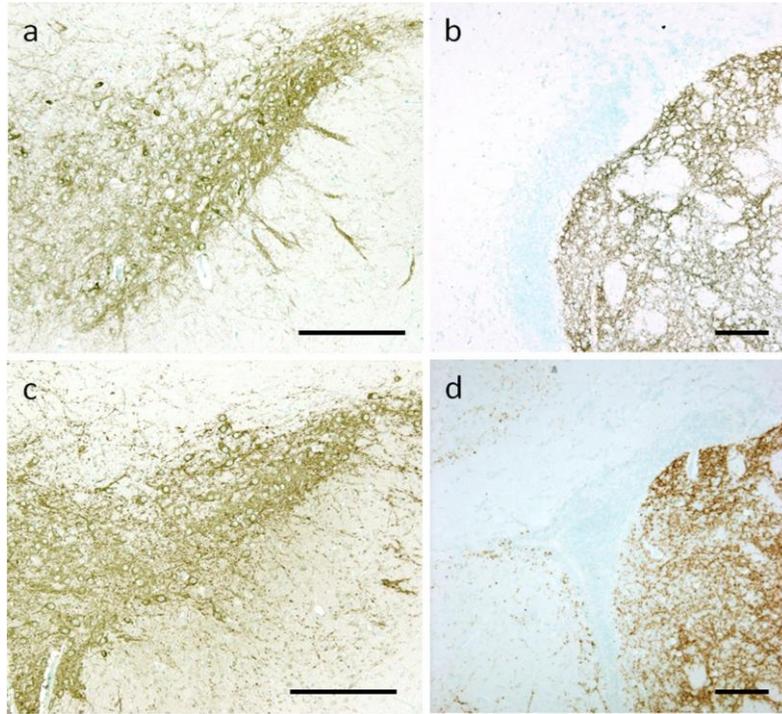
	MAO-B expression (pixel)	
Control	19965.5 ± 1216.4	(19467.4, 21368.8, 22263.0, 16762.7)
MPTP	35306.1 ± 4962.6	(25654.6, 41822.5, 45675.7, 28080.5)
MPP <sup>+</sup>	22966.1 ± 1357.7	(22009.1, 21016.1, 21852.9, 26986.2)



**Fig. 3-7** MAO-B protein expression was increased in the SVZ of MPTP-treated newborn mice. (a) Control; (b) MPTP; (c) MPP<sup>+</sup>. (d) Mean ± SE of the MAO-B expression level. Values in the parenthesis. (e) MAO-B expression level was increased in MPTP-treated mice, although the difference was not significant. Values are shown as the mean ± SE. Scale bars = 50 μm.



**Fig. 3-8** MAO-B protein expression in immature glial cells in the SVZ of newborn mice. Green fluorescence indicates MAO-B expression, and red fluorescence does nestin (a) or DCX (b). MAO-B was expressed in nestin-positive immature glial cells (a, arrowheads), not in Dcx-positive neuroblasts (b). Scale bars = 20  $\mu$ m.



**Fig. 3-9** DAT protein was expressed in the SN and striatum of newborn mice, and co-localized with TH. (a and c) SN; (b and d) striatum and SVZ; (a and b) DAT expression; (c and d) TH expression. DAT was expressed in the SN and striatum, but not in the SVZ. Scale bars = 100  $\mu$ m.

## 第四章 MPTP 投与によるマウス胎盤の MAO-B タンパク質発現の変化

### 要旨

第一章および第二章において、妊娠マウスに MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を投与すると胎子マウスで中枢神経が傷害されることが示された。その機序を解明する一助として、本章では胎盤に対する MPTP および MPP<sup>+</sup>の影響を評価した。その結果、胎盤では、MPTP もしくは MPP<sup>+</sup>投与による形態変化およびアポトーシス細胞の増加は認められず、MAO-B タンパク質の発現量が増加したのみであった。従って、MPTP および MPP<sup>+</sup>を単回投与した場合、胎盤に対しほとんど毒性を示さないと考えられた。また、MPTP または MPP<sup>+</sup>を投与すると胎盤基底層の MAO-B タンパク質発現量が減少したが、これは細胞活性の減少に起因すると推察された。一方、迷路層では MPTP を投与した場合のみ MAO-B タンパク質発現量が増加したことから、胎盤においても MAO-B により MPTP が MPP<sup>+</sup>へ代謝されると考えられた。本章の結果から、胎盤は MPTP および MPP<sup>+</sup>による影響をほとんど受けないものの、MPTP から MPP<sup>+</sup>への代謝に関与している可能性が考えられた。

## 序

第一章および第二章の研究で、妊娠 12 日目の雌マウスに MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を単回投与すると、胎子マウスの中樞神経系でアポトーシス細胞の増加および TH 陽性細胞の減少が誘発されることが示された (103)。母体に投与された MPTP および MPP<sup>+</sup>は胎盤を通過して胎子に移行したと考えられるが、MPTP および MPP<sup>+</sup>の胎盤への影響を評価した研究はこれまでほとんど見当たらない。

胎盤のうち胎子に由来する部位である迷路層では、母体血と胎子血が混ざらないよう絨毛細胞層で分離されており (115, 116)、酸素、栄養分および老廃物等の様々な物質は、この層を介して母体血と胎子血で交換される (115)。絨毛細胞層は合胞体栄養細胞、栄養膜細胞、結合組織および胎子血管内皮から構成されており (117, 118)、この層における母体から胎子への物質の移行制限を BPB という (116, 117)。低分子量の物質は受動輸送により、高分子量の物質は上述細胞の貪食作用もしくは受容体を介した貪食作用により、胎子の血液に取り込まれる (118)。

本章では、第一章および第二章で示された妊娠マウスに投与した MPTP もしくは MPP<sup>+</sup>の胎子マウスでの中樞神経毒性機序を解明する一助として、胎盤に対する MPTP および MPP<sup>+</sup>の影響を評価した。また、胎盤における MPTP の代謝を明らかにするため、MAO-Bに加えて MAO-A タンパク質の発現についても調べた。

## 材料と方法

### 動物の飼育、被験物質の投与および病理組織標本の作製

日本チャールス・リバーより購入した妊娠 11 日目の雌 C57BL/6 マウスを金属ケージで飼育した。飼育室は室温 21~26°C、湿度 50~60%、照明 12 時間/日 (8~20 時) に設定した。動物には固形飼料 (MF; オリエンタル酵母) および水道水を自由に摂取させた。導入後 24 時間馴化した後、マウスを 3 群に分け (n=4)、それぞれ溶媒 (生理食塩水)、25.0mg/kg MPTP-HCl (Sigma) もしくは 17.1 mg/kg MPP-Iodide (Sigma) を 10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。投与 12 時間後にジエチルエーテルによる深麻酔下の放血により安楽殺し、胎盤を採取し 10%中性緩衝ホルマリンで固定した後、常法に従いパラフィン包埋し、切片を作製した。なお、本実験は東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物委員会の承認を得て、同委員会の指針に従って実施した。

### 免疫組織化学的染色および TUNEL 染色

MPTP 代謝に関与する MAO-B、MAO-A およびアポトーシスに関与する Cleaved Caspase-3 の免疫染色を実施した。常法に従って脱パラフィンした切片を 10m M のクエン酸バッファーに浸して 120°C で 15 分間オートクレーブ処理し、1%過酸化水素/メタノール溶液と 8%スキムミルクにより室温で各々 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした後、ウサギ抗 MAO-B 抗体 (1:30, Proteintech Group)、ウサギ抗 MAO-A 抗体 (1:300, Proteintech Group) もしくはウサギ抗 Cleaved Caspase-3 抗体 (1:200, Cell Signaling Technology) を 4°C で 18 時間反応させた。二次抗体 (LSAB キット、Dako) を 37°C で 1 時間反応させた後、0.05% DAB/0.03%過酸化水素水で発色させ、メチルグリーンによる対比染色を施した。

また、断片化 DNA を含むアポトーシス細胞を検出するため、常法に従って脱パラフィンした切片を用いて TUNEL 染色を実施した。染色は ApopTag Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection kit (Millipore) のプロトコールに従って実施し、メチルグリーンによる対比染色を施した。

#### MAO-B および MAO-A 陽性領域の測定および統計処理

胎盤の MAO-B および MAO-A 陽性領域は Image J (NIH) を用いて計測した。結果は平均値  $\pm$  SE で表示した。また、溶媒対照群と投与群間の統計学的検定には *F*-test、Student's *t*-test および Aspen-Welch test を用い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

MPTP もしくは MPP<sup>+</sup>投与 12 時間後の胎盤に形態的な変化は見られなかった (Fig. 4-1)。TUNEL 陽性もしくは Cleaved Caspase-3 陽性のアポトーシス細胞が溶媒対照群、MPTP 投与群および MPP<sup>+</sup>投与群の迷路層でわずかに認められたが、その数に群間差は認められなかった (data not shown)。

MAO-B タンパク質の発現は、迷路層では栄養膜細胞および血管内皮で (Fig. 4-2a to c)、基底層では海綿状栄養膜細胞および栄養膜細胞で (Fig. 4-2d to f) 認められた。迷路層では、MPTP 投与により MAO-B タンパク質発現量が増加した (Fig. 4-2g) が、基底層では、MPTP もしくは MPP<sup>+</sup>投与により発現量が減少した (Fig. 4-2h)。これに対し、MAO-A タンパク質の発現は迷路層の栄養膜細胞および血管内皮で認められ (Fig. 4-3a to c)、MPTP もしくは MPP<sup>+</sup>投与により発現量が減少した (Fig. 4-3d)。一方、基底層で MAO-A タンパク質の発現は認められなかった (data not shown)。

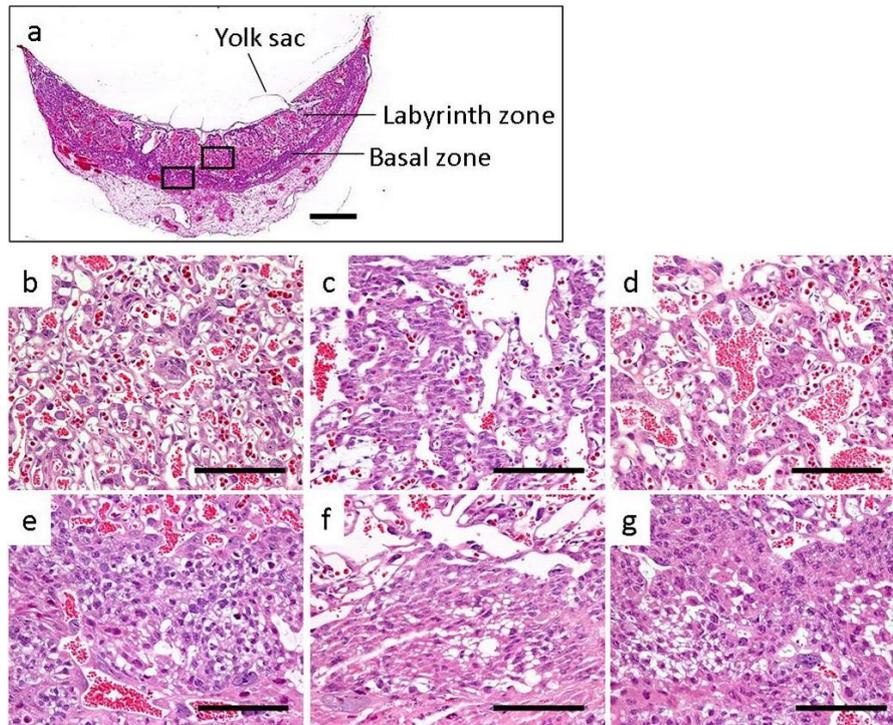
## 考察

妊娠マウスに MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を投与しても胎盤の形態的变化は見られず、アポトーシス細胞数も変化しなかったことから、MPTP および MPP<sup>+</sup>の単回投与は、胎盤に対して重篤な毒性を示さないと考えられた。

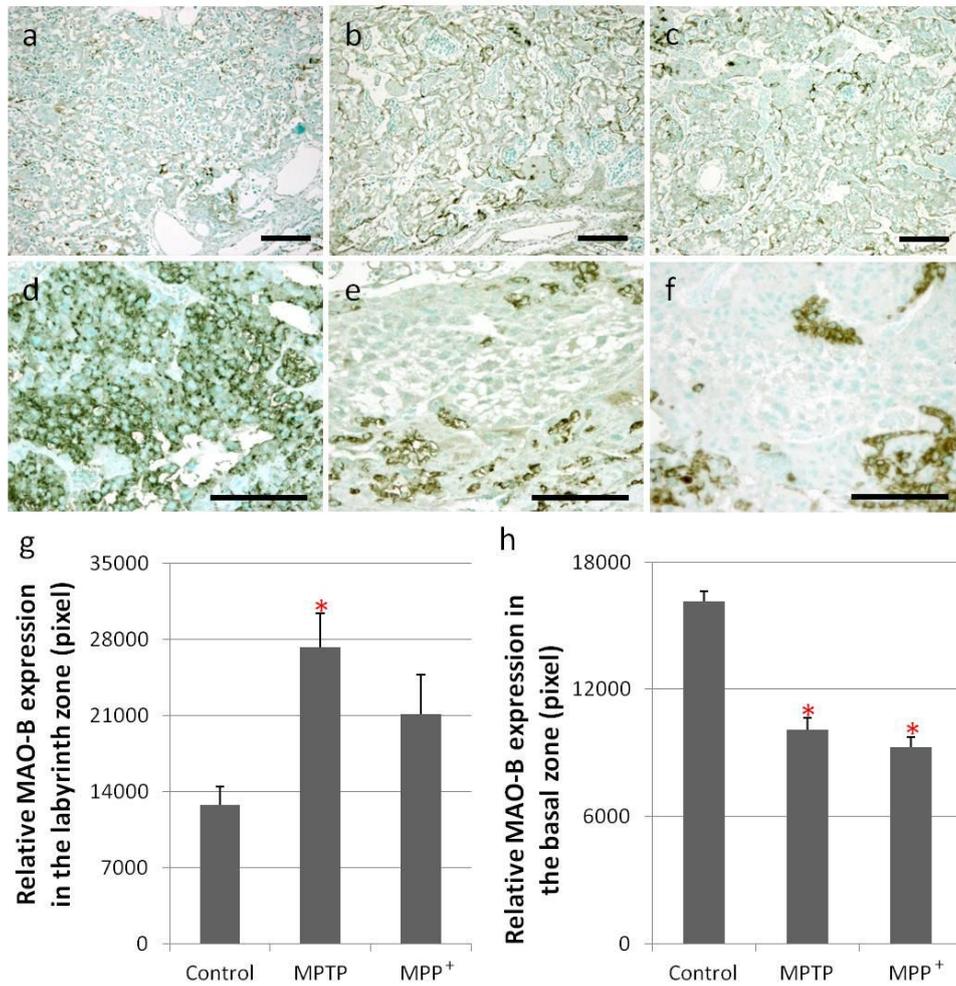
MAO-B 陽性細胞が迷路層および基底層で見られたこと (119)、および MAO-A 陽性細胞が迷路層のみで見られ基底層では見られなかったこと (120, 121) はこれまでの研究結果と一致しており、本研究に用いた抗体が評価に耐え得ることが確認された。

基底層の MAO-B タンパク質および迷路層の MAO-A タンパク質は MPTP および MPP<sup>+</sup>投与により発現量が減少した。これは、MPTP および MPP<sup>+</sup>の海綿状栄養膜細胞および栄養膜細胞への毒性によると推察された。一方、迷路層では、MAO-B タンパク質発現量が MPTP 投与 12 時間後に溶媒対照群と比較して有意に増加した。これは、第三章で得られた結果と同様、MAO-B の基質となる物質が増加したことによる反応性の変化であると考えられた。従って、胎盤においても MAO-B による MPTP から MPP<sup>+</sup>への代謝が行われていることが確認された。

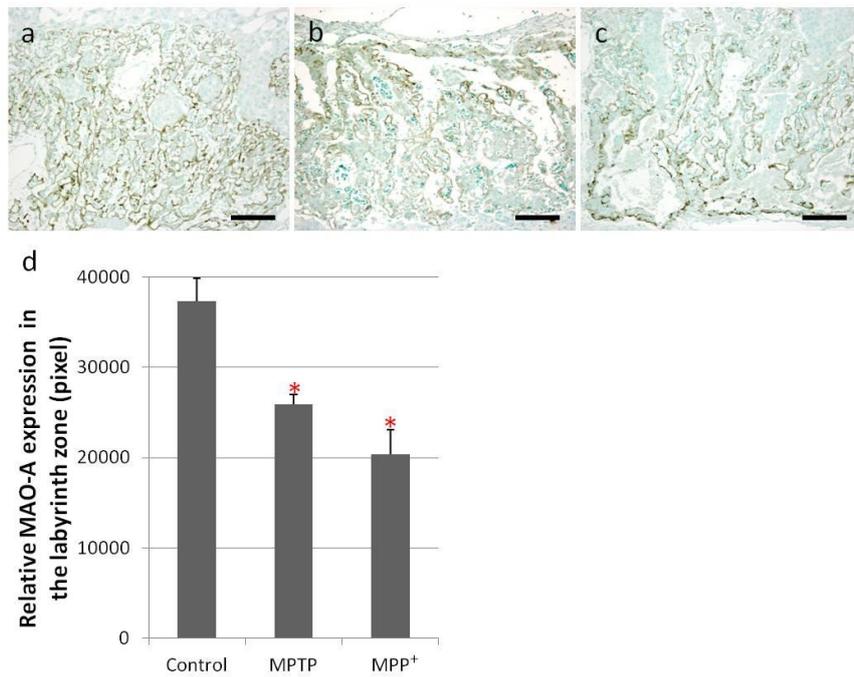
MPTP および MPP<sup>+</sup>の分子量はそれぞれ 173.3 および 170.3 であるが、分子量が概ね 600 以下の物質は BPB によらず母体から胎子へと輸送される (122, 123) ことが知られている。第一章および第二章において、妊娠マウスに投与された MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>および母体で MPTP から代謝された MPP<sup>+</sup>は速やかに胎盤を通過し、胎子マウスへ移行すると考えられた。



**Fig. 4-1** Histopathology of the placenta. The boxes in the placenta (a) indicate the sites shown in (b) to (g). No morphological changes were observed in the placentas of mice treated with either MPTP or MPP<sup>+</sup>. Control (b and e), MPTP-treated (c and f) and MPP<sup>+</sup>-treated (d and g) mice. Labyrinth zone (b, c and d) and basal zone (e, f and g). Scale bars = 1 mm (a) and 100  $\mu$ m (b-g). HE stain.



**Fig. 4-2** Changes of MAO-B protein expression in the labyrinth zone and basal zone of mice treated with MPTP or MPP<sup>+</sup>. MAO-B was expressed in the trophoblasts and capillary endothelium in the labyrinth zone and in the spongiotrophoblast and trophoblastic giant cells of the basal zone. Control (a and d), MPTP-treated (b and e) and MPP<sup>+</sup>-treated (c and f) mice. Labyrinth zone (a, b and c) and basal zone (d, e and f). MAO-B expression was significantly increased in the labyrinth zone of MPTP treated mice (g), but was significantly decreased in the basal zone of the mice treated with MPTP or MPP<sup>+</sup> (h). Scale bars = 100  $\mu$ m (a-f). Values are mean  $\pm$  SE (g and h). \* $P$  < 0.05.



**Fig. 4-3** Changes of MAO-A protein expression in the labyrinth zone of mice treated with MPTP or MPP<sup>+</sup>. MAO-A was expressed in the trophoblasts and capillary endothelium of the labyrinth zone. Control (a), MPTP-treated (b) and MPP<sup>+</sup>-treated (c) mice. MAO-A expression was significantly decreased in the labyrinth zone of MPTP- or MPP<sup>+</sup>-treated mice (d). Scale bars = 100  $\mu$ m (a-c). Values are mean  $\pm$  SE (d). \**P* < 0.05 (d).

## 総括

本研究では、MPTP および MPP<sup>+</sup>の胎子および新生子マウス中枢神経系への影響について評価し、以下の結果を得た。

第一章では、胎子および新生子マウスに対するMPTPおよびMPP<sup>+</sup>の影響の有無を生化学的に評価した。その結果、胎子および新生子マウスの脳では、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>投与6～12時間後にDATとTHのmRNAとタンパク質発現量が減少し、さらに新生子マウスの脳ではドパミンとその代謝産物であるDOPACとHVAの濃度が減少したことから、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>が胎盤のBPBおよび新生子マウスのBBBを通過し、胎子および新生子マウスに中枢神経毒性を示すことが明らかとなった。また、DATおよびTHタンパク質の発現量およびドパミンとその代謝産物の濃度は投与24時間後には概ね回復したことから、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>の胎子および新生子マウスに対する中枢神経毒性は一過性であり、かつ回復可能であると考えられた。

次いで、第二章では、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>の胎子および新生子マウスの中枢神経に対する毒性標的部位を明らかにするため、その影響を病理組織学的に評価した。その結果、MPTPおよびMPP<sup>+</sup>は胎子および新生子マウスのドパミン神経細胞およびSVZの神経芽細胞を傷害することが明らかとなった。さらに、MPTPあるいはMPP<sup>+</sup>投与によるアポトーシス細胞の増加は黒質および線条体よりもSVZで顕著であったことから、ドパミン神経細胞と神経芽細胞では細胞毒性の発現に異なる要因が関与すると推察された。

第三章では、胎子および新生子マウスに対する MPTP の中枢神経毒性の発現に成獣と同様に MAO-B による MPTP の代謝が関与するか否かを調べた。その結果、MAO-B タンパク質は胎子および新生子マウスでもグリア細胞に発現しており、MPTP から MPP<sup>+</sup>への代謝に関与することが推察された。MPP<sup>+</sup>を神経細胞内へと取り込む DAT は、

新生子マウスの黒質および線条体のみで発現が認められたことから、DAT が MPP<sup>+</sup>の取り込みに関与するのは成熟したドパミン神経細胞のみで、DAT を発現していない未成熟神経細胞では未知の MPP<sup>+</sup>取り込み機構が存在する可能性が示唆された。

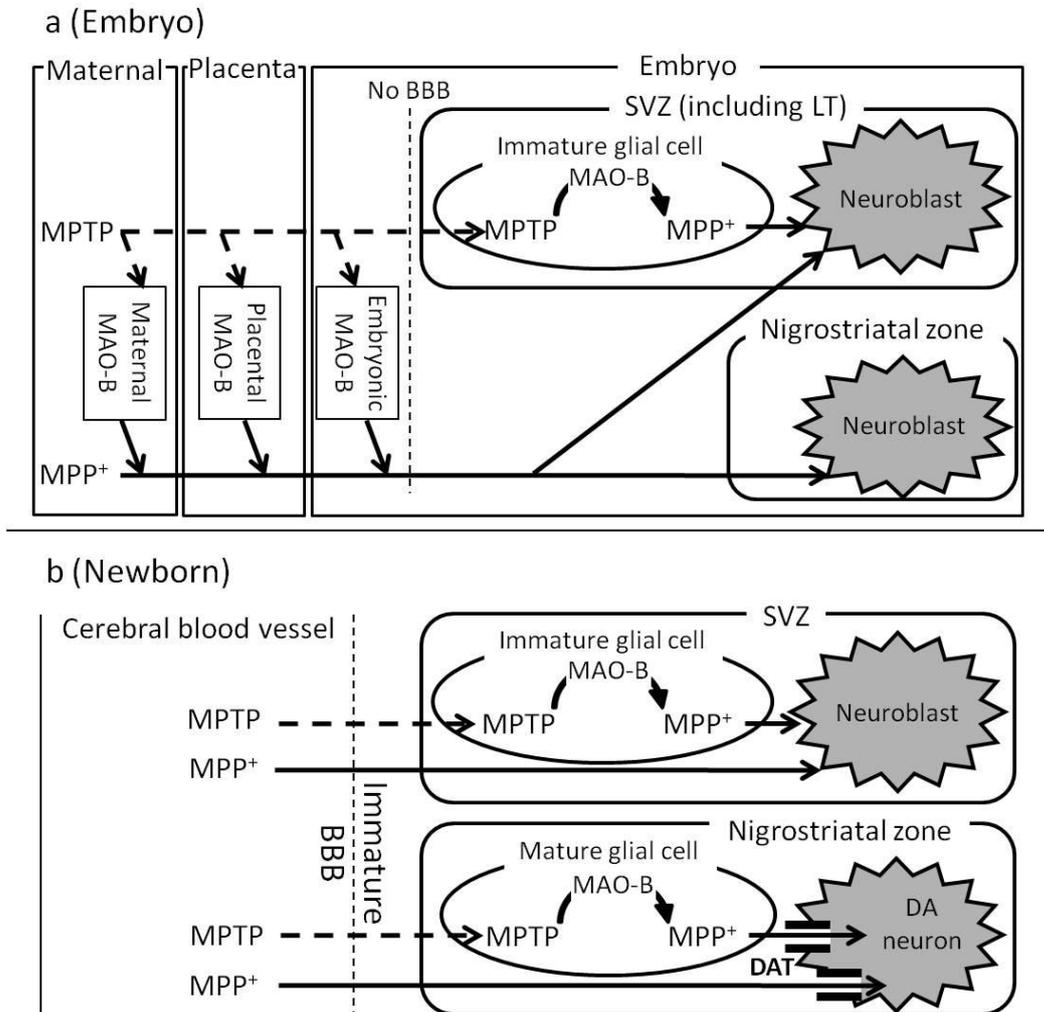
第四章では、妊娠マウスに MPTP および MPP<sup>+</sup>を投与した際の胎子マウスの中枢神経毒性を解明する一助として、胎盤に対する MPTP および MPP<sup>+</sup>の影響を評価した。その結果、MPTP および MPP<sup>+</sup>の単回投与はマウス胎盤に対してほとんど毒性を示さないこと、および胎盤で発現する MAO-B が MPTP から MPP<sup>+</sup>への代謝に関与することが示唆された。

本研究の結果から推察される MPTP および MPP<sup>+</sup>の胎子マウスにおける中枢神経毒性機序を Fig. 5-1a に示した。妊娠マウスに投与された MPTP の一部は母体内および胎盤で MAO-B によって MPP<sup>+</sup>に代謝される。MPTP および MPP<sup>+</sup>はいずれも分子量が約 170 程度の低分子であるため、受動輸送により胎盤を通過する (122, 123)。胎子の脳に達した MPTP の一部は MAO-B を発現する lamina terminalis (LT) などの組織で MPP<sup>+</sup>へと代謝され、ドパミン神経および SVZ の未成熟な神経細胞に DAT 以外のトランスポーターを介した未知の機序により取り込まれると考えられた。

同様に、MPTP および MPP<sup>+</sup>の新生子マウスに対する中枢神経毒性機序を Fig. 5-1b に示した。新生子マウスでは BBB が未完成なので投与された MPTP および体内で代謝された MPP<sup>+</sup>の両方が脳へ移行し、MPTP はグリア細胞で MPP<sup>+</sup>に代謝されることが考えられた。黒質および線条体では、MPP<sup>+</sup>は成獣マウスと同様に DAT を介した機序によりドパミン神経細胞内へ取り込まれると考えられたが、SVZ では DAT の発現が認められなかったことから、その取り込み経路は不明であった。

中枢神経系が傷害を受けた場合、SVZ の神経芽細胞が神経細胞に分化し、傷害部位へと遊走して、神経細胞の減少を補っている (60, 61)。また、PD の発症機序としてはドパミン神経細胞の直接的な傷害および加齢に伴う MAO-B タンパク質発現量の増加

ばかりではなく、このような SVZ の傷害によるドパミン神経細胞の供給低下も考察されている (62)。胎児期または新生児期に SVZ に対する中枢神経毒性を有する物質に暴露されることで、ドパミン神経傷害に加えて神経細胞の補完不全が生じ、成年期以降に PD を発症する可能性も考えられる。従って、本研究で用いた胎子および新生子マウスに MPTP を投与して PD を誘発する実験系は、今後の PD 発症機序の解明に関する研究にとって有用な実験系であると考えられた。



**Fig. 5-1** MPTP and MPP<sup>+</sup> toxicity in the nigrostriatal zone and SVZ of embryo (a) and newborn (b) mice. (a) MPTP is metabolized to MPP<sup>+</sup> by MAO-B in the maternal body, placenta and embryonic organs including LT, and injures the embryonic CNS. (b) MPTP and MPP<sup>+</sup> pass thorough the immature BBB, are metabolized to MPP<sup>+</sup> by MAO-B in mature and immature glial cells either in the nigrostriatal zone or SVZ, and injures the newborn CNS.

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かいご指導と適切なお教示を賜り、研究に必要な獣医病理学の知識をご教授賜りました東京大学農学部 中山裕之教授に深く敬意を表し、感謝します。本研究に終始暖かいご指導と適切なお教示を賜り、また、病理組織診断のご指導を賜りました内田和幸准教授に深く敬意を表し、感謝します。本研究および病理組織診断のご指導を賜りました東京農工大学農学部 鈴木和彦講師および東京大学農学部 Chambers James Kenn 特任助教に深く感謝します。

本研究を行う機会を与えて頂くと共に、暖かいご理解とご鞭撻を賜りました東レ株式会社 医薬研究所安全性研究室 宮本庸平博士および富樫裕子氏に厚く御礼申しあげます。また、大学への長期出張に際し、暖かいご理解と共に送り出して頂いた東レ株式会社 医薬研究所安全性研究室の同僚の皆様に感謝の意を表します。

さらに、本研究の実施にあたり手技のご指導を頂いた伊藤強博士を始め、2年間に渡る研究室生活を支えて頂き、多くの刺激と示唆を与えて頂いた東京大学農学部 獣医病理学教室の皆様に感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Prediguer RD, Aguiar AS Jr, Moreira FC, Matheus FC, Castro AA, Walz R, Bem AF, Latini A, Tasca CI, Farina M and Raisman-Vozari R. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2011, 75, 489-507.
2. Blasberg RG, Patlak C and Fenstermacher JD. Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975, 195, 73-83.
3. de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, Moche FG and Hofman A. Prevalance of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology.* 1995, 45, 2143-2146.
4. Bower JH, MAraganore DM, McDonnell SK and Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurol.* 1999, 52, 1214-1220.
5. Taylor KS, Counsell CE, Gordon JC and Harris CE. Screening for undiagnosed parkinsonism among older people in general practice. *Age Aging.* 2005, 34, 501-504.
6. Bove J and Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neurosci.* 2012, 211, 51-76.
7. Johannessen JN and Markey SP. Assessment of the opiate properties of two constituents of a toxic illicit drug mixture. *Drug Alcohol Depend.* 1984, 13,

367-374.

8. Riederer P, Foley P, Bringmann G, Feineis D, Brückner R and Gerlach M. Biochemical and pharmacological characterization of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline: a biologically relevant neurotoxin? *Eur J Pharmacol.* 2002, 442, 1-16.
9. Vanitallie TB. Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction. *Metabolism.* 2008, 57, 50-55.
10. Langston JW. MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 1987, 26, 2-10.
11. Mandel SA, Sagi Y and Amit T. Rasagiline promotes regeneration of substantia nigra dopaminergic neurons in post-MPTP-induced Parkinsonism via activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway. *Neurochem Res.* 2007, 32, 1694-1699.
12. Yokoyama H, Kuroiwa H, Yano R and Araki T. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2008, 29, 293-301.
13. Tam SY and Roth RH. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions? *Biochem Pharmacol.* 1997, 53, 441-453.
14. Zigmond MJ, Hastings TG and Perez RG. Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity? *Parkinsonism Relat Disord.* 2002, 8, 389-393.
15. Napolitano A, Cesura AM and Da Prada M. The role of monoamine oxidase and catecholO-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission. *J Neural Transm Suppl.* 1995, 45, 35-45.

16. Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. The role of glial monoamine transporters in the central nervous system. *Nihon Shinkei Yakugaku Zassi*. 2003, 24, 171-178.
17. Levitt P, Pintar JE and Breakefield XO. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 1982, 79, 6385–6389.
18. Singer TP, Salath JI, Castagnoli N Jr and Trevor A. Interactions of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine with monoamine oxidases. *Biochem J*. 1986, 235, 785–789.
19. Di Monte DA, Wu EY, Irwin I, Delaney LE and Langston JW. Production and disposition of 1-methyl-4-phenylpyridinium in primary cultures of mouse astrocytes. *Glia*. 1992, 5, 48-55.
20. O'Callaghan JP and Seidler FJ. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced astrogliosis does not require activation of ornithine decarboxylase. *Neurosci Lett*. 1992, 148, 105-108.
21. Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE and Pahan K. Selective inhibition of NF- $\kappa$ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2007, 104, 18754-18759.
22. Chen X, Lan X, Roche I, Liu R and Geiger JD. Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. *J Neurochem*. 2008, 107, 1147-1157.
23. Sonsalla PK, Wong LY, Winnik B and Buckley B. The antiepileptic drug zonisamide inhibits MAO-B and attenuates MPTP toxicity in mice: clinical relevance. *Exp Neurol*. 2010, 221, 329-334.

24. Javitch JA. and Snyder SH. Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol.* 1984, 106, 455-456.
25. Chiba K, Trevor AJ and Castagnoli N Jr. Active uptake of MPP<sup>+</sup>, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985, 128, 1228-1232.
26. Lotharius J and O'Malley KL. The Parkinsonism-inducing Drug 1-Methyl-4-phenylpyridinium Triggers Intracellular Dopamine Oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Biol Chem.* 2000, 275, 38581-38588
27. Obata T. Nitric oxide and MPP1-induced hydroxyl radical generation. *J Neural Transm.* 2006, 113, 1131-1144.
28. Reinhard JF Jr, Diliberto EJ Jr, Viveros OH and Daniels AJ. Subcellular compartmentalization of 1-methyl-4-phenylpyridinium with catecholamines in adrenal medullary chromaffin vesicles may explain the lack of toxicity to adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1987, 84, 8160-8164.
29. Daniels AJ and Reinhard JF Jr. Energy-driven uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium into chromaffin granules via the catecholamine transporter. *J Biol Chem.* 1988, 263, 5034-5036.
30. Del Zompo M, Piccardi MP, Ruiu S, Quartu M, Gessa GL and Vaccari A. Selective MPP<sup>+</sup> uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity. *Br J Pharmacol.* 1993, 109, 411-414.
31. Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Mendez-Alvarez E, Soto-Otero R and Labandeira-Garcia JL. Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of

- parkinsonism. *Neuropharmacol.* 2006, 51, 112-120.
32. Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Flotte TR, Matsuno-Yagi A and Yagi T. In vivo complementation of complex I by the yeast Ndi1 enzyme. Possible application for treatment of Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2006, 281, 14250-14255.
33. Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 2007, 14, 1261-1266.
34. Riachi NJ, Harik SI, Kalaria RN and Sayre LM. On the mechanisms underlying 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. II. Susceptibility among mammalian species correlates with the toxin's metabolic patterns in brain microvessels and liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988, 244, 443-448.
35. Yoshihara S and Ohta S. Involvement of hepatic aldehyde oxidase in conversion of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP+) to 1-methyl-4-phenyl-5,6-dihydro-2-pyridine. *Arch Biochem Biophys.* 1998, 360, 93-98.
36. Riachi NJ, Dietrich WD and Harik SI. Effects of internal carotid administration of MPTP on rat brain and Blood-brain barrier. *Brain Res.* 1990, 533, 6-14.
37. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, and Shiono H. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 2001, 906, 135-42.
38. Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM and Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the parts compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983,

80, 4546-4550.

39. Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannssen JN, Pert A and Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1984, 100, 189-194.
40. Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1984, 292, 390-394.
41. Mitra N, Mohanakumar KP and Ganguly DK. Resistance of golden hamster to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: relationship with low levels of regional monoamine oxidase B. *J Neurochem.* 1994, 62, 1906-1912.
42. Jenner P. From the MPTP-treated primate to the treatment of motor complications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009, 15, 18-23.
43. Johnston TH, Fox SH, McIlldowie MJ, Piggott MJ and Brotchie JM. Reduction of L-DOPA-Induced Dyskinesia by the Selective Metabotropic Glutamate Receptor 5 Antagonist 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Lesioned Macaque Model of Parkinson's Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010, 333, 865-873.
44. Eldad M, Jutta R, and Moussa BH. Youdim. Immunity of Fetal Mice to Prenatal Administration of the Dopaminergic Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin. *J Neurochem.* 1990, 55, 1427-1431.
45. Teismann P, Schwaninger M, Weih F and Ferger B. Nuclear factor-kappaB activation is not involved in a MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroreport.*

- 2001, 12, 1049-1053.
46. Xiao YL, Fu JM, Dong Z, Yang JQ, Zeng FX, Zhu LX and He BC. Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin.* 2004, 25, 301-305.
  47. Smeyne M, Jiao Y, Shepherd KR and Smeyne RJ. Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice. *Glia.* 2005, 52, 144-152.
  48. Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell death differ.* 2007, 14, 1261-1266.
  49. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV and Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000, 3, 1301-1306.
  50. Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I and Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol.* 1986, 20, 449-455.
  51. Wolfgang S and Beat U. Placental toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. *Toxicol.* 1991, 67, 63-74.
  52. Melamed E, Rosenthal J and Youdim MB. Immunity of fetal mice to prenatal administration of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 1990, 55, 1427-1431.
  53. He XJ, Nakayama H, Dong M, Yamauchi H, Ueno M, Uetsuka K and Doi K. Evidence of apoptosis in the subventricular zone and rostral migratory stream

- in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006, 65, 873-882.
54. He XJ, Yamauchi H, Uetsuka K and Nakayama H. Neurotoxicity of MPTP to migrating neuroblasts: Studies in acute and subacute mouse models of Parkinson's disease. *Neurotoxicol.* 2008, 29, 413-420.
55. He XJ, Uetsuka K and Nakayama H. Neural progenitor cells are protected against MPTP by MAO-B inhibitors. *Neurotoxicology.* 2008, 29, 1141-1146.
56. Ito T, Suzuki K, Uchida K and Nakayama H. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neuroblastic apoptosis in the subventricular zone is caused by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)) converted from MPTP through MAO-B. *Exp Toxicol Pathol.* 2012, 64, 761-765.
57. Ito T, Uchida K and Nakayama H. Neuronal or inducible nitric oxide synthase (NOS) expression level is not involved in the different susceptibility to nigro-striatal dopaminergic neurotoxicity induced by 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) between C57BL/6 and BALB/c mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2013, 65, 121-125.
58. Ito T, Suzuki K, Uchida K and Nakayama H. Different susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+))-induced nigro-striatal dopaminergic cell loss between C57BL/6 and BALB/c mice is not related to the difference of monoamine oxidase-B (MAO-B). *Exp Toxicol Pathol.* 2013, 65, 153-158.
59. Shibui Y, He XJ, Uchida K and Nakayama H. MPTP-induced neuroblast apoptosis in the subventricular zone is not regulated by dopamine or other monoamine transporters. *Neurotoxicol.* 2009, 30, 1036-1044.

60. Hagg T. Endogenous regulations of adult CNS neurogenesis. *Curr Pharm Des.* 2007, 13, 1829-1840.
61. Plane JM, Andjelkovic AV, Keep RF and Parent JM. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol Dis.* 2010, 37, 218-227.
62. Winner B, Couillard-Despres S, Geyer M, Aigner R, Bodgahn U, Aigner L, Kuhn HG and Winkler J. Dopaminergic lesion enhance growth factor-induced neuroblast migration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008, 67, 105-116.
63. Chen JF, Steyn S, Staal R, Petzer JP, Xu K, Van der Schyf CJ, Castagnoli K, Sonsalla PK, and Castagnoli N. Schwarzschild MA. 8-(3-Cholorostyryl) caffeine may attenuate MPTP neurotoxicity through dual actions of monoamine oxidase inhibition and A<sub>2A</sub> receptor antagonism. *J Boil Chem.* 2002, 277, 36040-36044.
64. Quinn LP, Crook B, Hows ME, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Upton N, Medhurst AD, and Virley DJ. The PPAR  $\gamma$  agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol.* 2008, 154, 226-233.
65. Sundstom E, Goldstein M, and Jonsson G. Uptake inhibition protects nigro-striatal dopamine neurons from the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) in mice. *Eur J Pharmacol.* 1986, 131, 289-292.
66. Freyaldenhoven TE, Ali Syed F, and Hart RW. MPTP<sup>-</sup> and MPP<sup>+</sup>-induced effects on body temperature exhibit age- and strain-dependence in mice. *Brain Res.* 1995, 688, 161-170.
67. Lam PY, Chen K and Shin JC. The circadian rhythm of 5-TH biosynthetic and

- degradative enzymes in immortalized mouse neuroendocrine pineal cell line-a model for studying circadian rhythm. *Life Sci.* 2004, 75, 3017-3026.
68. Xu L, Chen WF and Wong MS. Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-1 receptor signaling pathway. *Br J Pharmacol.* 2009, 158, 738-748.
69. Du F, Li R, Huang Y, Li X and Le W. Dopamine D3 receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *Eur J neurosci.* 2005, 22, 2422-2430.
70. Ochi N, Naoi M, Mogi M, Ohya Y, Mizutani N, Watanabe K, Harada M and Nagatsu T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in prenatal stage on the dopamine system in the postnatal mouse brain. *Life sci.* 1991, 48, 217-223.
71. Ohya Y, Naoi M, Ochi N, Mizutani N, Watanabe K and Nagatsu T. Transplacentally-transported 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) affects the catecholamine and indoleamine levels in the fetal mouse brain. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1990, 2, 277-283.
72. Freyaldenhoven TE, Cadet JL and Ali SF. The dopamine-depleting effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in CD-1 mice are gender-dependent. *Brain Res.* 1996, 735, 232-238.
73. Sugama S, Yang L, Cho BP, Degiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT and Joh TH. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res.* 2003, 964, 288-294.
74. Ohashi, S, Mori A, Kurihara N, Mitsumoto Y and Nakai M. Age-related severity

- of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57Bl/6 mice. *Neurosci Lett.* 2006, 401, 183-187.
75. Ookubo M, Yokoyama H, Kato H and Araki T. Gender difference on MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in C57BL/6 mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2009, 311, 62-68.
76. Youngster SK, McKeown KA, Jin YZ, Ramsay RR, Heikkila RE and Singer TP. Oxidation of analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by dopamine oxidases A and B and the inhibition of monoamine oxidases by the oxidation products. *J Neurochem.* 1989, 53, 1837-1842.
77. Hiebert CK, Sayre LM and Silverman RB. Inactivation of monoamine oxidase by 3,3-dimethyl analogues of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ion. Dramatic effect of beta-mercaptoethanol on substrate turnover and enzyme inactivation. *J Biol Chem.* 1989, 264, 21516-21525.
78. Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompart G, Cambon C, Parini A and Frances B. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2003, 284, 1460-1467.
79. Castagnoli K, Murugesan T. Tobacco leaf, smoke and smoking, MAO inhibitors, Parkinson's disease and neuroprotection; are there links? *Neurotoxicol.* 2004, 25, 279-291.
80. Muthian G, Mackey V, King J, and Charlton CG. Modeling a sensitization stage and a precipitation stage for Parkinson's disease using prenatal and postnatal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Neurosci.* 2010; 169: 1085-1093.

81. Lauder J and Bloom F. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei, and substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol.* 1974, 155, 469-482.
82. Altman J and Bayer SA. Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. *J Comp Neurol.* 1981, 198, 677-716.
83. Specht LA, Pickel VM, Joh TH and Reis DJ. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. *J Comp Neurol.* 1981, 199, 255-276.
84. Marchand R, and Poirier LJ. Isthmic origin of neurons of the rat substantia nigra. *Neurosci.* 1983, 9, 373-381.
85. Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B and Groenewegen HJ. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neurosci.* 1988, 25, 857-887.
86. Hynes M and Rosenthal A. Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol.* 1999, 9, 26-36.
87. Hoar RM and Monie IW. Comparative development of specific organ systems. *Dev toxicol.* 1981, 13-33.
88. Schwedler SB, Gilbert T, Moreau E, Striker LJ, Merlet-Bénichou C and Striker GE. Nephrotoxin exposure in utero reduces glomerular number in sclerosis-prone but not sclerosis-resistant mice. *Kidney Int.* 1999, 56, 1683-1690.
89. Soucy NV, Riley JP, Templin MV, Geary R, de Peyster A and Levin AA.

- Maternal and fetal distribution of a phosphorothioate oligonucleotide in rats after intravenous infusion. *Birth Defects Res.* 2006, 77, 22-28.
90. Pérez-Otaño I, Oset C, Trinidad Herrero M, Luquin MR, Kupsch A, Oertel W, Obeso JA and Del Río J. Neurotoxic effect of prenatal exposure to MPTP on the dopaminergic systems of the marmoset brain. *Eur J Pharmacol.* 1992, 217, 211-3.
  91. Penta P. Sulla colorazione vitale del sistema nervoso centrale negli animali neonati. *Riv Neurol.* 1932, 5, 62-80.
  92. Stewart PA and Hayakawa EM. Interendothelial junctional changes underlie the developmental “tightening” of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1987, 429, 271-281.
  93. Watson RE, DeSesso JM, Hurtt ME, and Cappon GD. Postnatal Growth and Morphological Development of the Brain: A Species Comparison. *Birth Defects Res.* 2006, 77, 471-484.
  94. Ford DH. Selected maturational changes observed in the postnatal rat brain. *Prog Brain Res.* 1973, 40, 1-12.
  95. Risau W, Hallman R and Albrecht U. Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier. *Dev Biol.* 1986, 117, 537-545.
  96. Ribatti D, Nico B, Crievellato E and Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat.* 2006, 289, 3-8.
  97. Calhau C, Martel F, Soares-da-Silva P, Hipólito-Reis C and Azevedo I. Regulation of [(3)H]MPP<sup>+</sup> transport by phosphorylation/dephosphorylation pathways in RBE4 cells: role of ecto-alkaline phosphatase. *Naunyn*

- Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2002, 365, 349-56.
98. Vorbrodt AW, Lossinsky AS, and Wisniewski HM. Localization of alkaline phosphatase activity in endothelia of developing and mature mouse blood-brain barrier. Dev Neurosci. 1986, 8, 1-13.
99. Clark JB, Bates TE, Cullingford T and Land JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. Dev Neurosci. 1993, 15, 174-180.
100. Al-Sarraf H, Preston JE and Segal MB. Changes in the kinetics of the acidic amino acid brain and CSF uptake during development in the rat. Brain Res Dev Brain Res. 1997, 102, 127-134.
101. Sai T, Uchida K and Nakayama H. Acute toxicity of MPTP and MPP<sup>+</sup> in the brain of embryo and newborn mice. Exp Toxicol Pathol. 2012, 65, 113-119.
102. Sai T, Uchida K, and Nakayama H. Involvement of monoamine oxidase-B in the acute neurotoxicity of MPTP in embryonic and newborn mice. Exp Toxicol Pathol. 2013, 65, 365-373.
103. Nicotra A, Pierucci F, Parvez H and Senatori O. Monoamine Oxidase Expression During Development and Aging. Neuro toxicol. 2004, 25, 155-165.
104. Schneider JS and Markham CH. Immunohistochemical localization of monoamine oxidase-B in the cat brain: clues to understanding N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) toxicity. Exp Neurol. 1987, 97, 465-481.
105. Pugliese M, Rodriguez MJ, Gimeno-Bayon J, Pujadas L, Billett EE, Welles C and Mahy N. Alzheimer's Disease Modifies Progenitor Cell Expression of Monoamine Oxidase B in the Subventricular Zone. J Neurosci Res. 2010, 88,

2588-2597.

106. Vitalis T, Fouquet C, Alvarez C, Seil I, Price D, Gaspar P and Cases O. Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous system of the mouse. *J Comp Neurol.* 2002, 442, 331-347.
107. Willoughby J, Glover V and Sandler M. Histochemical localisation of monoamine oxidase A and B in rat brain. *J Neural Transm.* 1988, 74, 29-42.
108. Sandyk R, Iacono RP and Kay SR. The hypothalamus in MPTP-induced parkinsonism. *Ital J Neuro Sci.* 1990, 11, 367-372.
109. Curtis D. Klaassen. Casarett & Doull's Toxicology 6<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2001.
110. Torres GE, Yao WD, Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levev AI, Staudinger J and Caron MG. Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK 1. *Neuron.* 2001, 30, 121-134.
111. Smith SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP and Smidt MP. Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. 2003, 18, 1731-1738.
112. Hwang DY, Hong S, Jeong JW, Choi S, Kim H, Kim J and Kim KS. Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporters are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurochem.* 2009, 111, 1202-1212.
113. Fitzgerald DP, Cole SJ, Hammond A, Seaman C and Cooper HM. Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain. *Neurosci.* 2006, 142,

703-716.

114. de Chevigny A, Cooper O, Vinuela A, Reske-Nielsen C, Lagace DC, Eisch AJ and Isacson O. Fate Mapping and Lineage Analyses Demonstrate the Production of a Large Number of Striatal Neuroblasts After Transforming Growth Factor  $\alpha$  and Noggin Striatal Infusions into the Dopamine-Depleted Striatum. *Stem Cells*. 2008, 26, 2349-2360.
115. Riquelme G. Placental syncytiotrophoblast membranes-domains, subdomains and microdomains. *Placenta*. 2011, 32, 196-202.
116. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S and Ogawa I. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *J toxicol Pathol*. 2011, 24, 95-111.
117. Mori M, Ishikawa G, Luo SS, Mishima T, Goto T, Robinson JM, Matsubara S, Takeshita T, Kataoka H and Takizawa T. The Cytotrophoblast Layer of Human chorionic Villi Becomes Thinner but Maintains Its Structural Integrity During Gestation. *Biol Reprod*. 2007, 76, 164-172.
118. DeSesso JM, Williams AL, Ahuja A, Bowman CJ and Hurtt ME. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. *Crit Rev Toxicol*. 2012, 42, 185-210.
119. Verhaagh S, Barlow DP and Zwart R. The extraneuronal monoamine transporter Slc22a3/Orc1l3 co-localizes with the *Maoa* metabolizing enzyme in mouse placenta. *Mech Dev*. 2001, 100, 127-130.
120. Riley LA, Waguespack MA and Denney RM. Characterization and quantitation of monoamine oxidases A and B in mitochondria from human placenta. *Mol Pharmacol*. 1989, 36, 54-60.
121. Auda RG, Kirk SH, Billett MA and Billet EE. Localization of Monoamine

- Oxidase mRNA in Human Placenta. *J Histochem Cytochem.* 1998, 46, 1393-1400.
122. Ceckova-Novotna M, Pavek P and Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol.* 2006, 22, 400-410.
123. Suzuki T, Matsunami T, Hisa Y, Tanaka K, Takamatsu T and Oyamada M. Roles of gap junctions in glucose transport from glucose transporter 1-positive to -negative cells in the lateral wall of the rat cochlea. *Histochem Cell Biol.* 2009, 131, 89-102.