

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

小児白血病・小児腫瘍の発生における母体を介した化学物質・発ガン物質・薬物等による影響及び、
ES細胞を用いた化学物質影響解析

分担研究者 田上昭人 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 部長

研究要旨

抗けいれん剤の一つであるバルプロ酸の細胞毒性、神経組織形成に及ぼす影響をマウス胚性幹細胞(ES細胞)ならびにマウス神経芽腫由来N1E-115細胞を用いて解析した。その結果、バルプロ酸の添加によりマウスES細胞は内胚葉系及び中胚葉系への細胞分化は抑制され外胚葉系への分化は促進されることが明らかとなった。N1E-115細胞ではGadd45a遺伝子を介して神経細胞の分化を促進することが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで化学物質・薬物の毒性評価試験には、種々の細胞や動物が用いられてきた。近年、薬物毒性試験(特にembryotoxicityに関して)としてこれまで行われてきた評価系にかわって、胚性幹細胞(ES細胞)が用いられるようになりその有用性が報告されている。Spielmannらにより開発されたEmbryonic Stem Cell Test (EST法)は、マウスES細胞の分化障害を指標とした*in vitro*毒性試験方法で、すでにヨーロッパ各国の研究機関(EU Center for Validation of Alternative Methods; ECVAM)にてバリデーションテストが終了し、その有用性が証明されている。マウスES細胞を用いたEST法は、従来の動物実験を用いる方法と比較して、短時間で原因物質の特定やその解析を行うことが可能であり、さらに動物実験代替法の観点からもRussel and Burchによる3Rs(Replacement, Reduction, Refinement)の提唱に沿ったものであると考えられる。しかしながら、マウスES細胞を用いたEST法は、ヒ

トの発生毒性データとの高い相関性や再現性について認められているものの、種差の問題は残されておりヒトに適応できない場合もある。その種差の問題を克服するために、手術などで得られるヒト検体組織(主に肝臓、腎臓)を用いた薬物評価も試みられているが、充分量の検体を得ることは非常に困難である。マウス由来ES細胞に替わってヒト由来ES細胞を用いたEST法も今後期待されているが、細胞の入手の問題、倫理的問題など、一般的に普及させるためには課題が多く残されている。

以上に述べた薬物毒性評価方法の問題点を解決する方法の一つとして、ヒト由来組織幹細胞の利用が注目されている。これまでに、血球系幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など種々の組織に由来する幹細胞が同定されており、その中でも胎盤および胎盤に付随する組織(臍帯、羊膜)は胎児由来ゆえ、血球形、間葉系、神経系いずれにも胚葉を超えて分化する「多能性幹細胞」が含まれているという報告がなされている。

本研究では、マウスES細胞を用いたEST法に加えて、ヒト組織細胞を用いた毒性試験方法の開発を目指す。さらに、従来のEST法で用いられている評価の指標(細胞生存率、心筋細胞分化障害を指標とする形態学的評価)に加えて、幹細胞の分化増殖に及ぼす化学物質・薬物の影響を分子生物学的手法(細胞表面マーカー、DNAチップ解析による網羅的遺伝子発現プロファイル等)を用いて解析を行う。18年度はマウスES細胞を用いたバルプロ酸の細胞に与える毒性のメカニズムの解析を行った。さらに、マウス神経芽腫由来N1E-115細胞を用いて細胞分化増殖に及ぼすバルプロ酸の影響について解析を行った。

B. 研究方法

1. ES細胞を用いたバルプロ酸の細胞毒性解析

EST法は、ES細胞が特別な誘導を行うことなく自然に心筋細胞に分化するという特性を利用した評価方法である。ES細胞を培養する際、薬物を加えることにより、心筋細胞への分化障害を指標としている。薬物によるES細胞分化抑制効果は、マウスES細胞株を用いて行う。解析を行う化学物質・薬物を添加した試験液にES細胞を調整し、ディッシュの蓋の内面に700細胞/20 μ lの懸濁滴を。蓋を裏返してディッシュに被せ、湿潤状態で37 $^{\circ}$ Cで3日間懸滴培養する。その後、液滴内に形成された胚様体—embryoid bodies (EBs)をさらに浮遊培養してEBsをさらに成熟させる。2日後、24穴マルチプレートにEBsを各ウェルに1個ずつ移し、各試験液で静置培養する。5日間経過後に倒立位相差顕微鏡にて各ウェル毎の心筋細胞の鼓動の有無を調べる。ES細胞の分化度は、細胞の鼓動を認めるウェル数の割合をすべてのウェル数の百分率から算出し、各

濃度段階のウェル数の百分率からID₅₀を求めている。さらに、ES細胞と3T3細胞の薬物による細胞毒性数値IC₅₀求め、ID₅₀とともにモデル計算式に挿入して、薬物の毒性の指標とした。さらに、バルプロ酸を添加したES細胞を用いて未分化細胞、内胚葉、中胚葉、外胚葉組織に特異的な遺伝子マーカーの発現解析を行い、バルプロ酸の細胞分化に及ぼす影響を観察した。

2. N1E-115細胞をバルプロ酸の細胞毒性解析

神経生理の分野においては神経細胞の軸索や樹状突起の長さ、数、分岐数など形態の異常性を観察する手法は一般的である。N1E-115細胞に血清を添加すると細胞の分化は起こらないが、血清を除去すると神経突起の伸長など細胞が分化することが知られている。血清を添加し細胞の分化を抑制した状態のN1E-115細胞にバルプロ酸を添加すると神経突起の伸長がみられる。この薬物による神経細胞分化への影響について解析を行い、バルプロ酸による神経突起伸長の分子生物学的解析を行う。

(倫理面への配慮)

直接ヒト検体の解析を行う場合には研究機関での倫理委員会に申請を行い承認が得られた後研究を行う。動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養および保管の改善にも最大限努力する。

C. 研究成果

1. マウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いたバルプロ酸の毒性評価ならびにその機序

ES細胞およびNIH3T3細胞におけるバルプロ酸の細胞毒性を細胞毒性試験法(MTT法)にて解析した。

バルプロ酸は用量依存的に細胞の生存率を抑制し、50%細胞生存抑制濃度 (IC₅₀) はNIH3T3細胞で、3.25mM、ES細胞で0.56 mMであった(図1)。

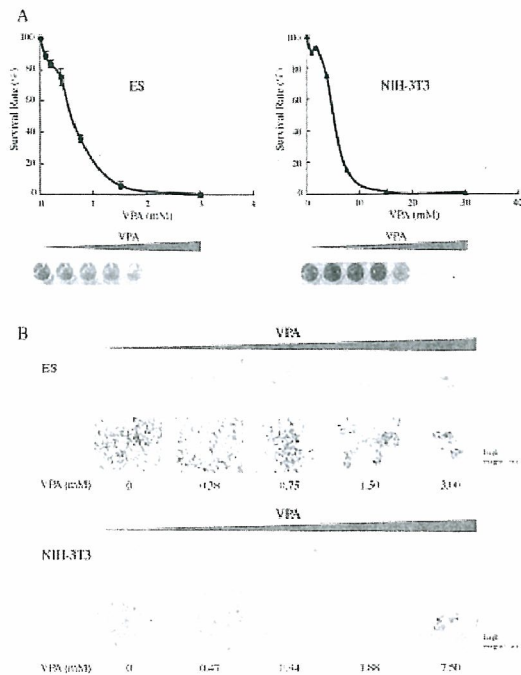


図1 バルプロ酸による細胞生存抑制効果
次にES細胞の分化におけるバルプロ酸の影響を観察するためにバルプロ酸添加後10日目のES細胞よりRNAを抽出し、内胚葉、中胚葉、外胚葉特異的マーカーの遺伝子発現量をRT-PCR法にて解析した。その結果、バルプロ酸添加によりES細胞は、内胚葉中胚葉特異的な分子マーカーの発現量は用量依存的に抑制されていたが、外胚葉特異的な分子マーカーは用量依存的に発現量が増加していることが明らかとなった(図2)。

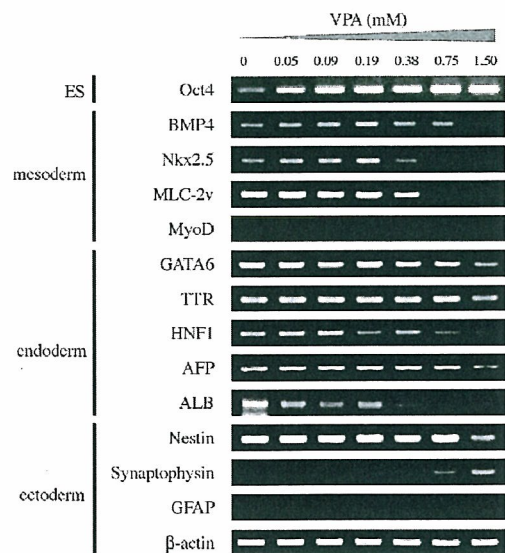
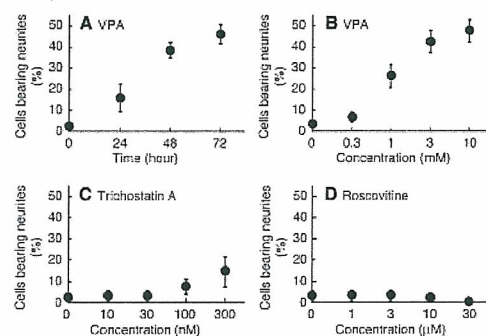


図2 細胞特異的分子マーカーの発現量

2. N1E-115細胞をバルプロ酸の細胞毒性解析

N1E-115細胞はマウス神経芽腫由来細胞で培養液に血清を含んだ条件で培養を行うと未分化な細胞の状態を増殖するが、培養液から血清を除去すると神経突起の伸長がみられ、細胞分化が進行することが知られている。血清を含む培養液にてN1E-115細胞を培養し、その細胞にバルプロ酸を添加したところ神経突起の伸長がみられた。



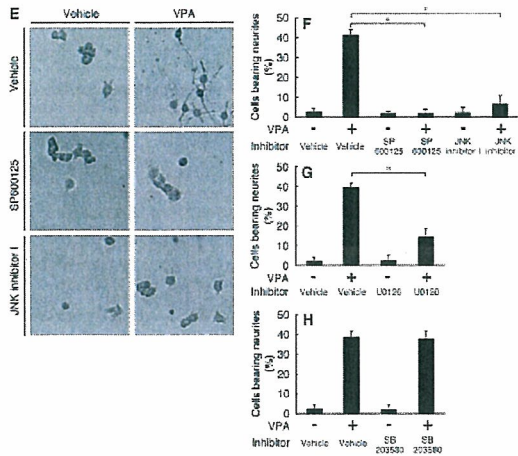


図3 バルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果

このバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果は、トリコスタチンA (HDACインヒビター) やロスコビチン (サイクリン依存性キナーゼインヒビター) では抑制がみられなかった (図3C, D)。次にバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果におけるSP600125 (JNKインヒビター) およびU0126 (ERKインヒビター) の効果について解析を行った。解析の結果、SP600125およびU0126によりバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果は抑制されるためにバルプロ酸による効果はJNK, ERKを必要とすることが明らかとなった。このJNKを介する効果はJNKのリン酸化を介していることが明らかとなった (図4)。

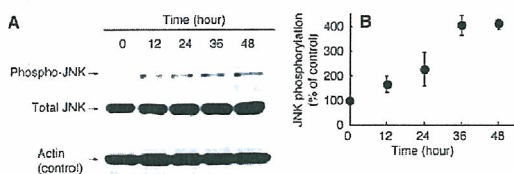


図4 バルプロ酸添加によるJNKのリン酸化

次に細胞接着因子の一つであるパキシリンがバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果に関与しているかどうかについて

検討を行った。パキシリンのリン酸化部位である178番目のアミノ酸をセリンからアラニンに変化させた変異パキシリンを遺伝子導入した細胞ではバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果が抑制された (図5)。

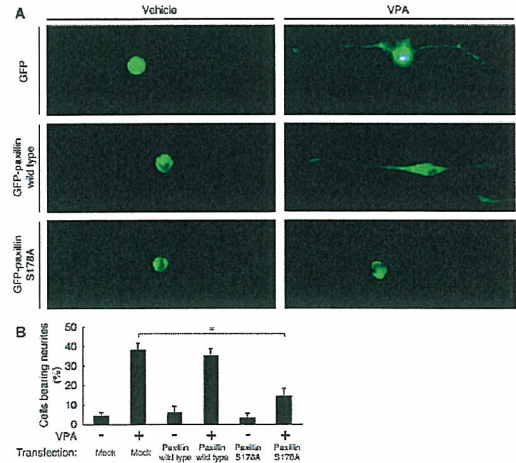


図5 パキシリンの変異体導入によるバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果抑制

バルプロ酸が実際にパキシリンの178番目のセリンをリン酸化することにより細胞分化を誘導していることを確認するためにウエスタンブロット法にてパキシリンのリン酸化を解析した。その結果、バルプロ酸刺激によりパキシリンは時間依存的にリン酸化されこのリン酸化はSP600125により抑制されることが明らかとなった (図6)。

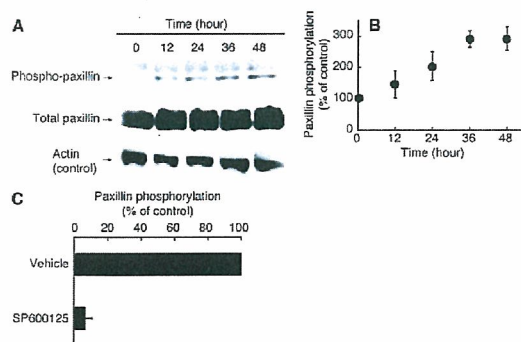


図6 バルプロ酸刺激によるパキシリンのリン酸化

以上の結果より、JNKのリン酸化を介してパキシリンのリン酸化を誘導することにより神経突起伸長が起こっているものと考えられる。バルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果に關与する分子生物学的メカニズムを解明するためにジーンチップを用いて変動する遺伝子の解析を行った。その結果、Gadd45a遺伝子の発現が上昇しているのが明らかとなった。RT-PCR法にてバルプロ酸添加によるGadd45a遺伝子の発現を解析したところ投与後その発現が上昇しているのが確認できた(図7)。Gadd45a遺伝子の発現によりN1E-115細胞の神経突起の伸長作用を明らかにするためにGadd45a遺伝子を発現させたところN1E-115細胞では神経突起の伸長が観察され、siRNAにてGadd45a遺伝子の発現を抑制した細胞では神経突起の伸長の抑制が観察された(図7)。以上の結果より、N1E-115細胞ではバルプロ酸によりGadd45a遺伝子の発現が亢進し、その結果神経突起の伸長が起こることが明らかとなった。

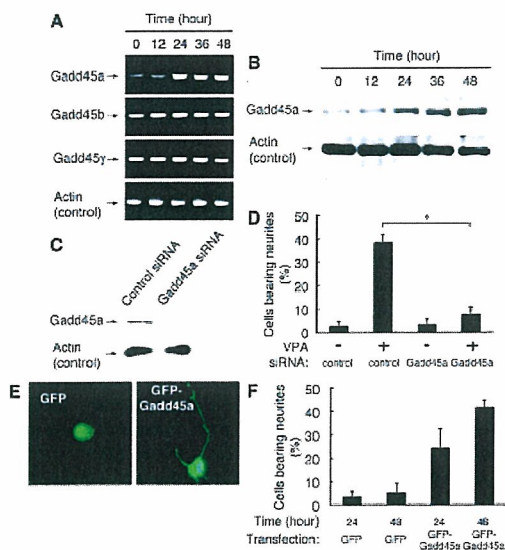


図7 Gadd45a遺伝子によるN1E-115細胞の神経突起伸長効果

Gadd45a遺伝子がJNKを介してバルプロ酸によるN1E-115細胞の神経突起伸長を誘導していることを証明するために、Gadd45a遺伝子発現におけるSP600125の抑制効果を検討した。その結果、Gadd45a遺伝子の発現による神経突起伸長効果は、U0126(ERKのインヒビター)では抑制されず、SP600125(JNKインヒビター)にて抑制されることより、Gadd45a遺伝子の発現によりJNKがリン酸化され活性化されることにより神経突起伸長が起こっているものと考えられた(図8)。さらに、178番目のセリンをアラニンに変異させたパキシリンを発現させるとGadd45a遺伝子の発現による神経突起伸長は抑制されることによりGadd45a遺伝子はJNK、パキシリンを介して神経突起伸長を起こしているものと考えられる(図8、9)。

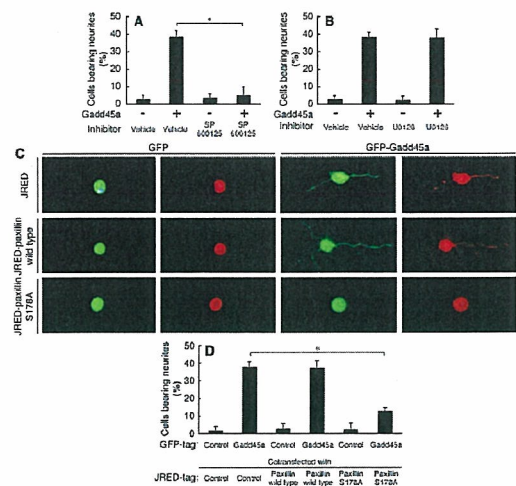


図8 Gadd45a遺伝子発現におけるJNKインヒビターの抑制効果

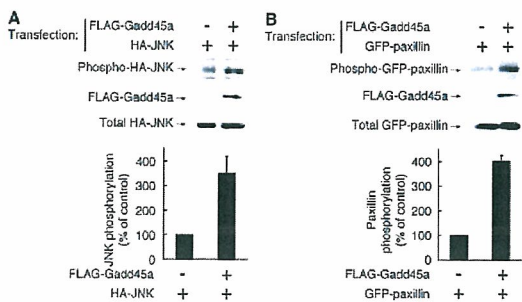


図9 Gadd45a遺伝子発現によるJNKとパキシリンのリン酸化

次にGadd45a遺伝子発現による神経突起伸長作用にMEKK4遺伝子が関与しているかどうかについて検討した。Gadd45a遺伝子発現またはバルプロ酸による神経突起伸長作用は、siRNAによるMEKK4遺伝子の発現の抑制により抑制されることが明らかとなった(図10)。

同様にMEKK4遺伝子の発現の抑制によりJNK、パキシリンのリン酸化が抑制されることが明らかとなった(図11)。

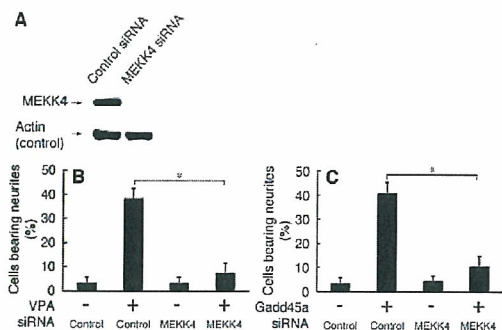


図10 Gadd45a遺伝子およびバルプロ酸による神経突起伸長作用におけるMEKK4の解析

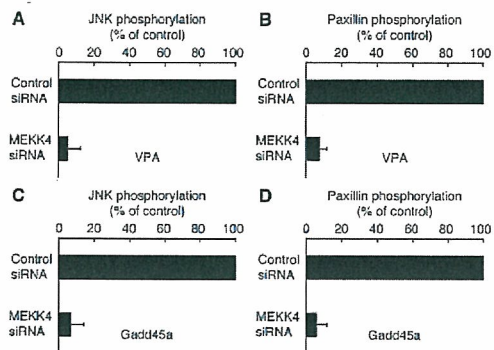


図11 Gadd45a遺伝子およびバルプロ酸によるJNK、パキシリンリン酸化におけるMEKK4の解析

以上の解析の結果、N1E-115細胞におけるバルプロ酸の神経突起伸長は、MEKK4、JNK、パキシリンの活性化を通して行われているものと考えられる(図12)。

N1E-115細胞の分化とVPA

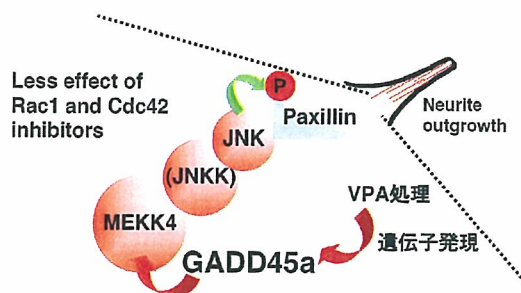


図12 N1E-115細胞におけるバルプロ酸の神経突起伸長作用のメカニズム

D. 考察

1. IC₅₀値がES細胞で0.56mM、NIH3T3細胞で、3.25mMであったことを考えれば、未分化なES細胞ではバルプロ酸による細胞毒性の感受性が高く、分化したNIH3T3細胞では比較的に感受性が低いと考えられる。バルプロ酸の血中有効濃度は、0.3~0.7mMと報告されていることより、未分化なES細胞で

のバルプロ酸の感受性を考慮すると大人では安全と考えられていても未分化な小児や胎児では大人に比べると感受性が高く毒性の現れる可能性も高いと考えることが出来る。バルプロ酸は胎児期において神経管欠損や二分脊椎などの中枢神経系の発生分化に影響を与えることが知られている。今回我々のES細胞の分化障害を指標とした解析により、バルプロ酸が内胚葉・中胚葉系の細胞への分化は抑制し、外胚葉系(神経系を含む)への分化を促進していることは胎児期へのバルプロ酸の *in vivo* での効果と関連性があるものと考えられる。

2. N1E-115細胞におけるバルプロ酸の作用は、神経細胞の分化を促進しその効果はGadd45a遺伝子を介していることが明らかとなった。バルプロ酸の神経細胞の分化に影響を及ぼすことは個体レベルで報告されており、今回のN1E-115細胞での結果はこれを裏付けるものと考えられる。

E. 結論

マウスES細胞及びN1E-115細胞でバルプロ酸の細胞毒性効果ならびに細胞分化に及ぼす影響について分子生物学的手法により明らかにした。今後、この結果は個体レベルでのバルプロ酸の催奇形性の発症のメカニズムの解明に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Murabe M, Yamauchi Y, Fujiwara F, Hiroshima M, Sanbe A, Tanoue A. A novel embryotoxic estimation method of VPA

using ES cells differentiation system. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 5;352(1):164-9.

村部麻由、山内淳司、藤原葉子、三部篤、田上昭人. Embryonic Stem Cell Test (EST法)による薬物毒性評価. 日本小児臨床薬理学会雑誌 19(1) 印刷中 (2006)

2. 学会発表

村部麻由、王淑一、美留町潤一、山内淳司、三部篤、田上昭人 Embryonic Stem Cell test (EST法)による薬物毒性評価 第33回日本小児臨床薬理学会、11月30日～12月1日、2006、東京

山内淳司、宮本 幸、藤原葉子、三部 篤、村部麻由、田上昭人. バルプロ酸による新規誘導遺伝子 Gadd45a による神経分化作用の解析 第33回日本小児臨床薬理学会、11月30日～12月1日、2006、東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

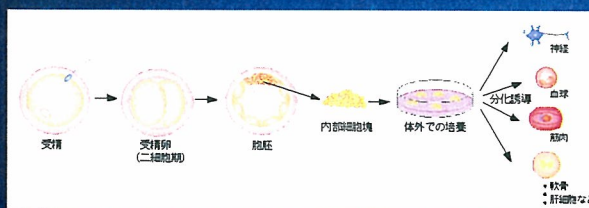
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ES細胞 (Embryonic Stem Cell : 胚性幹細胞)

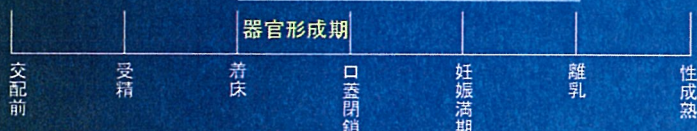


- ・胚発生初期の胚盤胞の胚体を形成する内部細胞塊を培養して作られる
- ・未分化状態を維持し、無限に増殖可能
- ・多分化能を有する



ES細胞

生殖発生試験 (III試験)



Embryonic Stem Cell test (EST法)

1) 細胞毒性

Step 1: 0日目-

ES cells とNIH-3T3 fibroblast (500 cells/200 μ l/well)を試験薬物の希釈系列培養液中にて培養 (3日目に培地交換、5日目に形態観察、培地交換)



Step 2: 10日目

MTT assayにより、細胞生存率を測定



Embryonic Stem Cell test (EST法)

2) 分化抑制

Step 1: 0-3日目

ES細胞を懸滴培養(750 cells/20 µl)
—ES細胞凝集体を作成



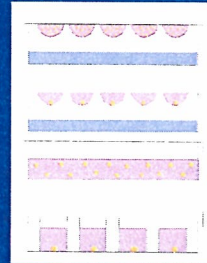
Step 2: 3-5日目

ES細胞凝集体を浮遊培養
胚様体“embryoid bodies”(EBs)



Step 3: 5-10日目

作成したEBsを24ウェルプレートに移し、
5日後に心筋細胞の収縮運動による検出



懸滴培養



胚様体 (EBs) (3日目)

DNA Primer 5'-GAGGGGTACTTTCGGTCTTTCCTGTTTGTGTTCTGTGGCCTGTTTC-3'
3'-CCTGCAATGCTGGTCAGCTGTTGTTGTGTTGGTGGGTTGTTTGGT-5'

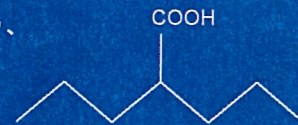
心筋細胞 (10日目)

Valproic acid (VPA)

抗痙攣薬

適用 1. 各種てんかん(広い発作抑制スペクトル)、
及びてんかんに伴う性格行動発作
2. 躁鬱病の躁状態など

作用機序 GABAトランスアミナーゼ阻害
ナトリウムチャンネル阻害
電位依存型T型カルシウムチャンネル阻害
HDAC 阻害

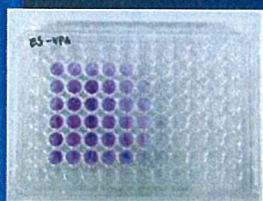
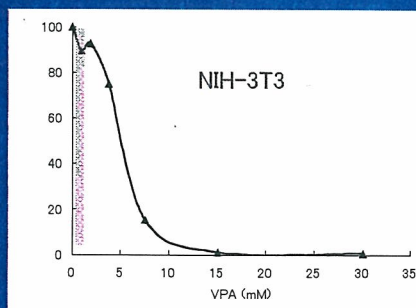
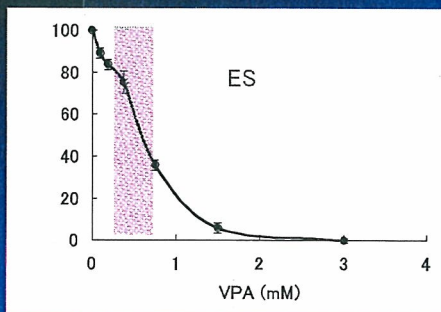


Valproic acid (VPA)

副作用 1. 催奇形性 (神経管欠損、二分脊椎などの神経発生異常、
心室中隔膜欠損などの心奇形、多指症、口蓋裂などの外表奇形)
2. 肝障害(劇症肝炎など)

VPA一細胞毒性 (MTT assay)

(細胞毒性一10日目)



IC₅₀: 0.56 mM



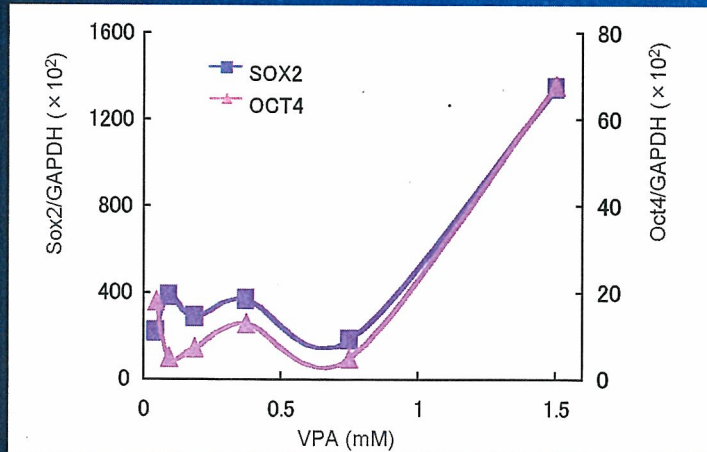
IC₅₀: 3.25 mM

VPA一細胞毒性

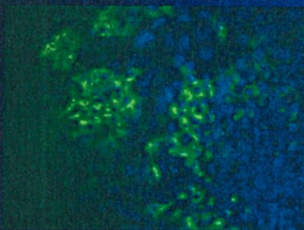
形態觀察 (MTT assay)一細胞毒性: 5日目

VPA (mM)	0	0.38	0.75	1.50	3.00
(1) ES					
VPA (mM)	0	0.47	0.94	1.88	7.50
(2) NIH-3T3					

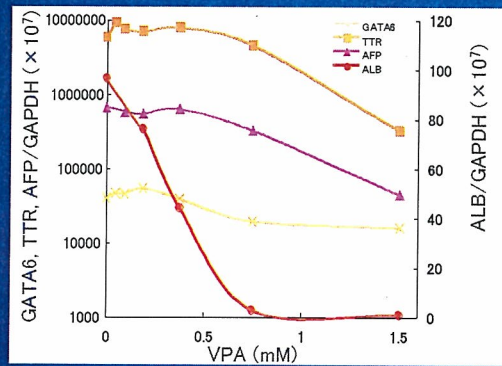
VPA—未分化マーカー



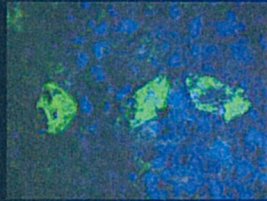
VPA—内胚葉系



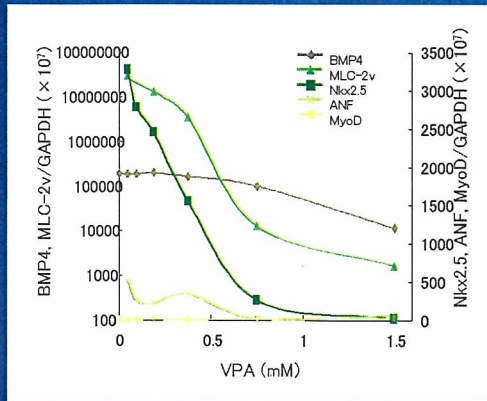
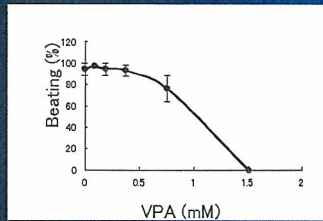
内胚葉性細胞
(緑: albumin、青: DAPI(核))



VPA—中胚葉系

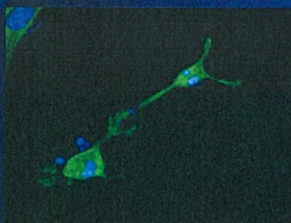


心筋細胞
(緑: anti-troponin I)

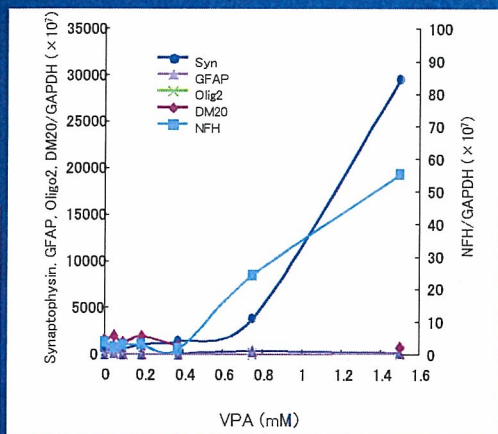
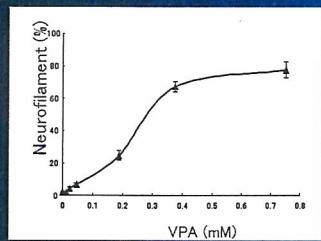


Cardiomyocytes - ID₅₀: 0.83 mM

VPA—外胚葉系



ニューロン
(緑: NF, 青: nuclei)

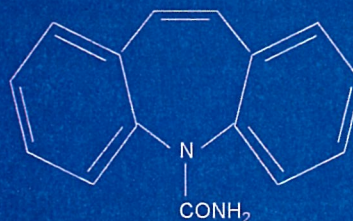


Carbamazepine (CBZ)

抗痙攣薬(イミノステルベン誘導体)

- 適用: 1. 精神運動発作、てんかんの痙攣発作
てんかん性格、てんかんに伴う精神異常
2. 躁病、躁鬱病の躁状態
統合失調症の興奮状態
3. 三叉神経痛

作用機序—ナトリウムチャネル阻害
(活動電位抑制)
HDAC 阻害

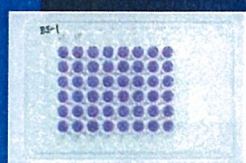
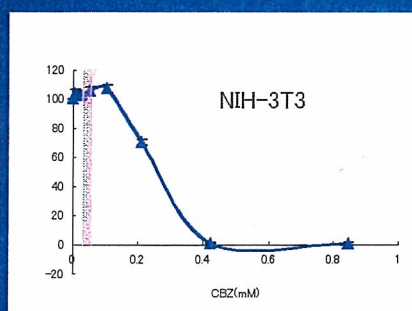
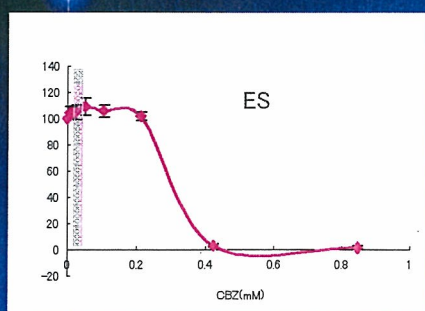


Carbamazepine
(CBZ)

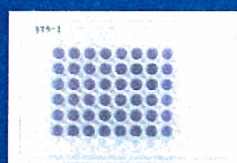
副作用—催奇形性(二分脊椎などの神経発生異常、頭部・顔面などの小奇形、手指の爪の低形成、一催奇形性は全体的にバルプロ酸より程度・頻度が低い)、再生不良性貧血、皮膚病(スティーブンス—ジョンソン症候群など)、肝機能障害、急性腎不全、過敏症候群ほか

CBZ—細胞毒性 (MTT assay)

細胞毒性—10日目



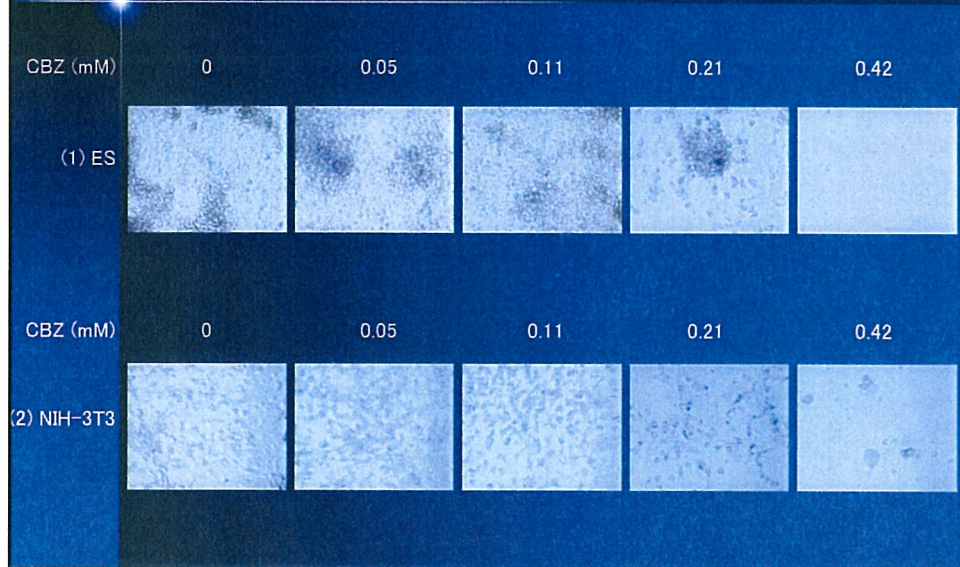
IC₅₀: 0.309 mM



IC₅₀: 0.242 mM

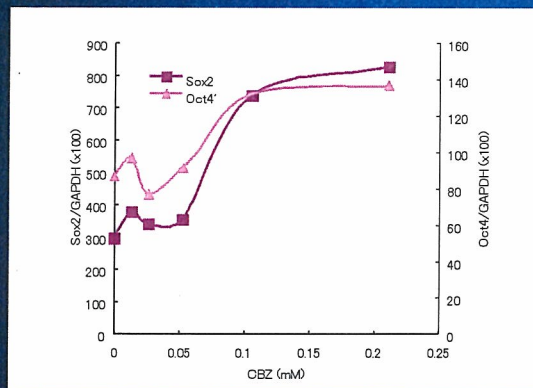
CBZ—細胞毒性

形態観察 (MTT assay)—細胞毒性: 5日目

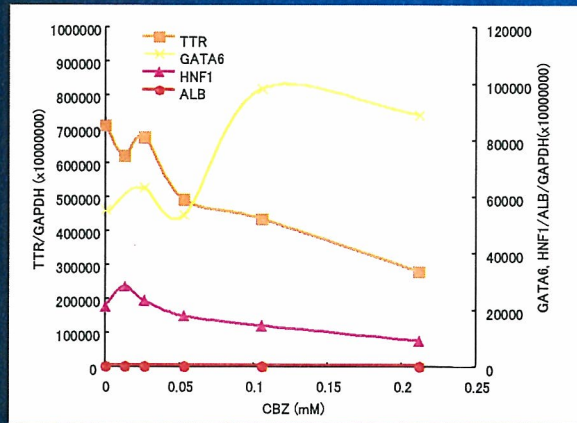


CBZ—未分化マーカー

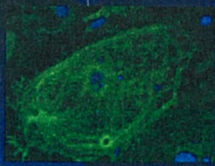
分化抑制実験—5日目



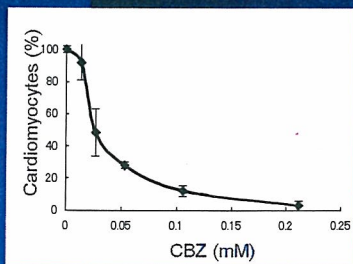
CBZ—内胚葉系



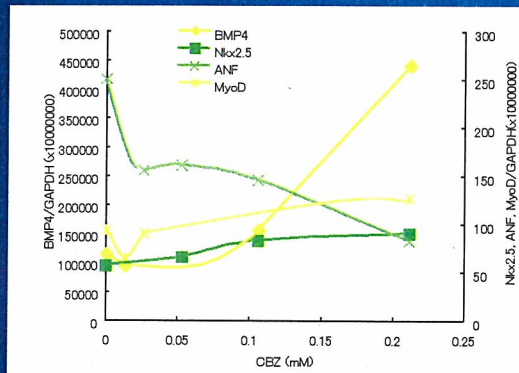
CBZ—中胚葉系



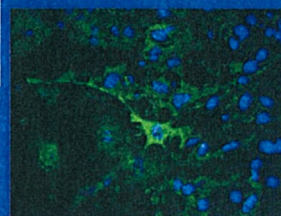
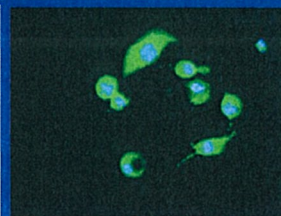
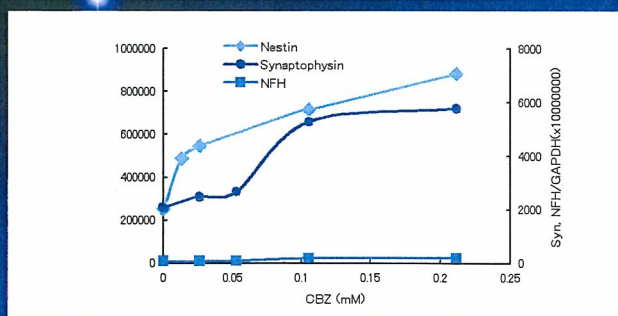
心筋誘導
(10日目)



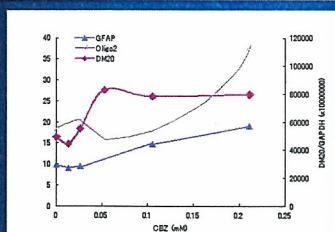
Cardiomyocytes - ID₅₀: 0.021 mM



CBZ—外胚葉系



CBZ 0.1 mM添加時のニューロンの誘導 (12日目)
(緑: Tuj1、青: DAPI)



VPAとCBZの比較—1. 細胞生存率

	Valproic acid (VPA)	Carbamazepine (CBZ)
血中濃度 (mM) (治療域)	0.30 - 0.70 mM	0.02 - 0.05 mM
細胞生存率	ES細胞、NIH-3T3細胞共に、濃度依存的な生存率の低下	ES細胞、NIH-3T3細胞共に、濃度依存的な生存率の低下
ES IC ₅₀	0.56 mM	0.31 mM
NIH-3T3 IC ₅₀	3.25 mM	0.24 mM
考察	<p>NIH-3T3細胞とES細胞に感受性の大きな差 (ES細胞のIC₅₀は治療域内であり、損傷を受ける可能性有り)</p> <p>→ 発生途中の未熟な細胞に特異的な毒性?</p> <p>→ <i>In vivo</i>においてVPAが胎児に強い奇形性などを有する反面、成人に対し、副作用が少ないこととの相関</p>	<p>NIH-3T3細胞とES細胞の感受性に差なし (両細胞のIC₅₀は治療域より、はるかに高く、治療域内で損傷を受ける可能性は少ない)</p> <p>→ <i>In vivo</i>においてCBZの毒性はVPAに比較して、胎児、成人ともに対して低いこととの相関</p>

VPAとCBZの比較—2. 組織形成—1

	Valproic acid (VPA)	Carbamazepine(CBZ)
未分化細胞	分化マーカーSox2、Oct4の濃度依存的上昇 形態観察—細胞容積の小さい未分化様細胞の増加	分化マーカーSox2、Oct4の濃度依存的上昇 形態観察—細胞容積の小さい未分化様細胞の増加と一致
内胚葉系	分化マーカーGATA6、TTR、AFP、ALBの濃度依存的減少 形態観察—抗ALB抗体陽性細胞の減少	初期分化マーカーGATA6の濃度依存的上昇、及び後期マーカーTTR、HNF1、ALBの濃度依存的減少
中胚葉系	分化マーカーBMP4、Nkx2.5、MLC-2v、ANFの濃度依存的減少 形態観察—抗troponin I抗体陽性及び、収縮運動を行う心筋細胞の濃度依存的減少	初期分化マーカーBMP4、Nkx2.5(心筋)の濃度依存的上昇、及び後期分化マーカーMLC-2v、ANFの濃度依存的減少 形態観察—収縮運動を行う心筋細胞の濃度依存的減少

VPAとCBZの比較—3. 組織形成—2

	Valproic acid (VPA)	Carbamazepine(CBZ)
外胚葉系	ニューロンのマーカーSynaptophysin、NFHの濃度依存的上昇、グリア細胞のマーカーGFAP、Olig2、DM20の発現無し 形態観察—抗Neurofilament抗体陽性のニューロンの濃度依存的上昇	神経の初期マーカーNestin、ニューロンのマーカーSynaptophysinの濃度依存的上昇 (VPAに比して発現量は少ない)、グリア細胞のマーカーGFAP、Olig2、DM20の濃度依存的上昇 形態観察—抗Neurofilament抗体陽性のニューロンの濃度依存的上昇(誘導されるニューロンは幼弱な形態のものが多い)
考察	VPAは治療域内の濃度において、ES細胞の内胚葉、中胚葉系への分化を抑制し、外胚葉系の神経に関してはニューロン特異的な分化誘導を促進 in vivoでの催奇形性との相関	CBZは治療域内においては、ES細胞の各組織への分化誘導にほとんど影響無し。それより高濃度域において、内胚葉、中胚葉のごく初期の誘導に対しては促進、中々後期発生には抑制傾向。外胚葉系の神経に関しては、分化促進傾向であるが、VPAより弱い。VPAのようなlineage-specificな誘導は無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T.	Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys.	Reproductive Toxicology	23	12-19	2007
Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats.	Reproductive Toxicology	22	672-678	2006
Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats.	Reproductive Toxicology	45	30-36	2006
Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat.	Drug Chem Toxicol	29	215-225	2006
Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T.	Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells.	Stem Cells	25	562-570	2006
Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K.	Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development.	Proc Natl Acad Sci USA.	103	12161-12166	2006
Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, Takashima A.	Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1).	J Biol Chem.	281	5037-5041	2006
Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T. & Nakashima, K.	Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons.	J Neurosci Res	84	969-979	2006
Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J.C.	Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells.	Proc Natl Acad Sci USA	103	10294-10299	2006

Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Belmonte, J.C.	Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification.	Nat Clin Pract Cardiovasc Med	3	S114-S122	2006
Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.	TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against <i>Trypanosoma cruzi</i> .	J. Immunol.	177	7059-7066	2006
Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.	Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c ⁺ lamina propria cells.	Nat. Immunol.	7	868-874	2006
Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.	Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling.	Nat. Immunol.	7	962-970	2006
Kobayashi M., Takahashi E., Miyagawa S., Watanabe H. and Iguchi T.	Chromatin immunoprecipitation-mediated target identification proved aquaporin 5 is regulated directly by estrogen in the uterus.	Genes to Cells	11	1133-1143	2006
Kato H., Furuhashi T., Tanaka M., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T.	Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats.	Reproductive Toxicology	22	20-29	2006
Suzuki A., Watanabe H., Mizutani T., Sato T., Ohta Y. and Iguchi T.	Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages.	Experimental Biology and Medicine	231	632-640	2006
Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B.	Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates.	Mol Endocrinol.	20	2141-2155	2006
Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T.	"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.	BMC Genomics.	7	64	2006
Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.	Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice.	Proc Natl Acad Sci U S A.	103	224-229	2006
Murabe M, Yamauchi Y, Fujiwara F, Hiroyama M, Sanbe A, Tanoue A.	A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system.	Biochem Biophys Res Commun.	352	164-169	2007



Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys

Makoto Ema^{a,*}, Katsuhiko Fukunishi^b, Mariko Matsumoto^a, Akihiko Hirose^a,
Eiichi Kamata^a, Toshio Ihara^b

^a *Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

^b *Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd., Kagoshima, Japan*

Received 20 June 2006; received in revised form 15 August 2006; accepted 6 September 2006

Available online 12 September 2006

Abstract

Dibutyltin dichloride (DBTCl) has been shown to be teratogenic in rats. The present study was conducted to determine the teratogenic potential of DBTCl given to pregnant monkeys during the entire period of organogenesis. Cynomolgus monkeys were dosed once daily by nasogastric intubation with DBTCl at 0, 2.5 or 3.8 mg/kg on days 20–50 of pregnancy, the whole period of organogenesis. The pregnancy outcome was determined on day 100 of pregnancy. In both DBTCl-treated groups, a significant increase in the incidence of pregnant females with soft stool and/or diarrhea, and with yellowish stool was observed. Maternal body weight gain at 3.8 mg/kg and food consumption at 2.5 and 3.8 mg/kg were decreased during the administration period. The survival rate of fetuses at terminal cesarean sectioning was decreased in the DBTCl-treated groups and significantly decreased at 2.5 mg/kg. There were no changes in the developmental parameters of surviving fetuses, including fetal body weight, crown-rump length, tail length, sex ratio, anogenital distance and placental weight, in the DBTCl-treated groups. No external, internal or skeletal malformations were found in the fetuses in any group. Although internal and skeletal variations were found, no difference in the incidence of fetal variation was noted between the control and DBTCl-treated groups. No effect on skeletal ossification was observed in fetuses in the DBTCl-treated groups. The data demonstrate that DBTCl is embryo-lethal but not teratogenic in cynomolgus monkeys.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Dibutyltin; Organotin; Teratogenicity; Embryo-lethality; Monkey

1. Introduction

Organotin compounds are widely used in agriculture and industry. The most important non-pesticidal route of entry of organotin compounds into the environment is through the leaching of organotin-stabilized polyvinyl chloride (PVC) by water [1], and its use in antifouling agents, resulting in the entry of organotin into the aquatic environment [2]. Disubstituted organotin compounds are commercially the most important derivatives, being used as heat and light stabilizers for PVC plastics to prevent degradation of the polymer during melting and the forming of the resin into its final products, as catalysts in the production of polyurethane foams, and as vulcanizing agents for silicone rubbers [3,4]. The identification of dibutyltin (DBT) and tributyltin (TBT) in aquatic marine organisms [5,6] and marine

products [7] has been reported. TBT is degraded spontaneously and biochemically via a debutylation pathway to DBT in the environment [8,9]. Organotin compounds are introduced into foods by the use of pesticides and antifoulants and via the migration of tin from PVC materials [4].

We previously demonstrated that tributyltin chloride (TBTCl) during early pregnancy caused early embryonic loss [10–12], and TBTCl on days 10–12 and on days 13–15, but not on days 7–9 of pregnancy, produced fetal malformations in rats [13]. The predominant malformation induced by TBTCl was cleft palate [13,14]. It has been reported that TBT is metabolized to DBT and MBT, and DBT was metabolized to monobutyltin (MBT) [15–17]. DBT is also reported to have toxic effects on reproduction and development in rats [18]. The oral administration of dibutyltin dichloride (DBTCl) during early pregnancy caused early embryonic loss in rats [19–21]. The oral administration of DBTCl to rats throughout the period of organogenesis resulted in a significant increase in the incidence of fetuses with malformations [22], and rat embryos were highly susceptible to the

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9878; fax: +81 3 3700 1408.
E-mail address: ema@nihs.go.jp (M. Ema).