

- s analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25)
- Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose, Kamata E. Pre- and post implantation embryonic loss induced by dibutyltin given to mice during early pregnancy. The 26<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25)
- Ema M, Arima A, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2006) Prenatal developmental toxicity of dibutyltin in cynomolgus monkeys given on consecutive three days during organogenesis. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Hasegawa R, Hirata-Koizumu M, Dourson M, Hirose A, Nakai S, Kamata E, Ema M. (2006) Comprehensive evaluation on pediatric susceptibility to 18 chemical. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. (2006) Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Teratogenic effects of rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG), in rats. 27<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Toxicology (Palm Springs, 10/5-8)
- 林 真、広瀬明彦、鎌田栄一、秋山浩子、高橋美加、江馬 眞、森田 健、既存化学物質の染色体異常誘発性評価のためのin silico評価系の開発、日本環境変異学会大35回大会 (堺, 11/20-21)
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. International Conference on Food Contamination and Neurodevelopmental Disorders (Valencia, 12/3-5)
- Ema M, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Hasegawa R, Yamamoto N., The Contribution of the Japanese Government to the OECD High Production Volume Chemicals Programme: Summary of 1<sup>st</sup> to 21<sup>st</sup> SIDS Initial Assessment Meetings. First U.S. Conference on Characterizing Chemicals in Commerce: Using Data on High Production Volume (HPV) Chemicals. (Austin, 12/12-14)
- 江馬 眞、OECD発生神経毒性試験ガイドラインについて、第17回神経行動毒性研究会、2005.
- 江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性：ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第7回環境ホルモン学会研究会、2005.
- Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.
- Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. Susceptibility of new born rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005
- Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M,

Igarashi K, Kanno J, Em M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazoleのラットにおける発生毒性、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する新生児の感受性に関する研究：1,3-ジブロモプロパン及び1,1,2,2-テトラブロモエタン、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第45回日本先天異常学会学術集会、2005.

江馬 眞、OECD神経発生毒性試験ガイドライン426（ドラフト）の進捗状況、第45回日本先天異常学会学術集会BTシンポジウム、2005.

Em M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Em M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

#### H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得：  
特になし
2. 実用新案登録  
該当しない
3. その他（データベース等）  
該当しない

別添 4

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

主任研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—

研究課題名: 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析

主任研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 平田睦子 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 松本真理子 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 鎌田栄一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

紫外線吸収剤として使われている 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzo- triazole (DBHCB)及び 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)による毒性発現の毒性発現様式と感受性の変化についてラットを用いて検討した。5-6 週齢の雌雄のラットに DBHCB または HDBB を反復強制経口投与したとき雄で毒性が強く発現した。雌雄のラットを去勢し 6 週齢から DBHCB または HDBB を 28 日間強制経口投与したところ、毒性の性差が著しく軽減した。生後 4-21 日の雌雄の新生児ラットに DBHCB または HDBB 直接強制経口投与したところ、毒性に雌雄差はみられなかった。これらのことから DBHCB または HDBB の毒性発現には内分泌学的影響が関与していることが示唆された。雌雄の 5 週齢ラットに HDBB を強制経口投与後の血漿中 HDBB 及び代謝物の測定を行ったところ、初回投与後の血漿中 HDBB 濃度は、雌雄で投与 5~8 時間後に最高値に達し、投与 24 時間後には著しく低下した。雌雄ともに、未変化体の検出限界を超える濃度の代謝物は確認できなかった。雄では総 P450 量の増加が認められ、アミノピリン *N*-脱メチル化活性、テストステロン 2 $\alpha$  水酸化活性およびテストステロン 16 $\alpha$  水酸化活性、EROD 活性の低下が認められたが、雌ではいずれの測定値にも HDBB 投与による影響は認められなかった。これらのことから、ラットの週齢によって毒性の雌雄差等の発現様式、感受性が大きく異なることが明らかになった。

A. 研究目的

化学物質を発生発育段階の異なる児に投与し、毒性発現、感受性の違いを明らかにし、各発生発育段階の児における毒性発現機序の解析を

行うことを目的として実験を行った。

B. 研究方法

使用動物: Crj:CD(SD)IGS ラットを使用した。

被験物質: 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) は 5%アラビアゴムに懸濁した。

(2'-Hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole (HDBB)はコーン油に懸濁した。

投与経路および投与方法: 強制経口投与した。

DBHCB の 14 日間反復投与毒性試験: 6 週齢の雌雄のラットに 0, 250, 500, 1000 mg/kg bw/day を 14 日間投与した。

DBHCB の反復投与毒性・生殖毒性併合試験: 0, 2.5, 25, 250 mg/kg bw/day を 12 週齢の雄ラットの交配前 28 日から交配中を含めて 56-57 日間投与した。また 11 週齢の雌ラットの交配前 28 日から交配中、妊娠中及び分娩後 3 日まで投与した。

DBHCB の新生児投与試験: 雌雄のラットの生後 4-21 日に 0, 250, 500 mg/kg bw/day を投与し、生後 22 日にラットを剖検した。

DBHCB の去勢ラット投与試験: 6 週齢の雌雄去勢ラットに、0, 250 mg/kg bw/day を 28 日間投与した。

HDBB の 28 日間反復投与毒性試験: 5 週齢の雌雄のラットに 0, 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg bw/day を 28 日間投与した。

HDBB の新生児投与試験: 雌雄のラットの生後 4-21 日に 0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day を投与した。

HDBB の去勢ラット投与試験: 6 週齢の雌雄去勢ラットに 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day を 28 日間投与した。

HDBB 投与ラットの血漿中濃度測定及び肝薬物代謝酵素活性測定: 5 週齢の雌雄のラットに 0, 0.5,

2.5, 12.5 mg/kg bw/day を投与し、血漿中 HDBB 及び代謝物を測定し、28 日間投与後の肝代謝酵素活性を測定した。

(倫理面への配慮)動物実験は(財)食品農医薬品安全性評価センター及び(株)新日本科学の実験動物倫理委員会規則において定める倫理基準に従って行った。

### C. 研究結果

DBHCB の 14 日間反復投与毒性試験: 肝絶対相対重量の増加が雄で 250mg/kg 以上でみられたが、雌では 1000 mg/kg でもみられなかった。

DBHCB の反復投与毒性・生殖毒性併合試験: 肝絶対相対重量、A/G 比及び血清アルブミンの増加が、雄の 25 mg/kg 以上でみられたが、雌では 250 mg/kg 投与群でさえもこれらの変化はみられなかった。

DBHCB の新生児投与試験: 250 mg/kg 以上の雌雄で AST, ALT, ALP 及び肝絶対相対重量の増加(相対肝重量 80-95%増加)、肝細胞肥大及び壊死がみられた。

DBHCB の去勢ラット投与試験: 250 mg/kg の雄で肝絶対相対重量の増加(相対肝重量 42%増加)がみられたが、雌ではみられなかった。

HDBB の 28 日間反復投与毒性試験: 雄ラットで血液生化学的指標の変化及び肝細胞肥大(0.5 mg/kg 以上)、肝絶対相対重量の増加、赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビンの低下(2.5 mg/kg 以上)がみられた。雌では肝絶対相対重量の増加及び肝細胞肥大(12.5 mg/kg 以上)が観察された。

HDBB の新生児投与試験: 雌雄ともに、2.5 mg/kg 以上で相対肝重量の増加、肝細胞分裂像の増加が、また、12.5mg/kg で血漿アルブミン、AST、ALP 及び絶対肝重量の増加、肝細胞肥大が観察された。

HDBB の去勢ラット投与試験: 雄で肝絶対相対重量の増加及び肝細胞肥大(0.5 mg/kg 以上)、AST、ALT 及び ALP の上昇(12.5 mg/kg)がみられ、雌で肝細胞肥大(2.5 mg/kg 以上)、肝絶対相対重量の増加(12.5 mg/kg)が観察された。

HDBB 投与ラットの血漿中濃度測定: 初回投与後の血漿中 HDBB 濃度は、雄では、投与 5~8 時間後に最高値に達したが、投与 24 時間後には 1/6-1/28 のレベルにまで低下した。投与 28 日でも初回投与後と同等の血漿中 HDBB プロファイルが認められた。雌でも雄と同様の血漿中 HDBB プロファイルが観察された。

HDBB 投与ラットの肝薬物代謝酵素活性測定: 雄では 2.5 mg/kg 以上で、総 P450 量の増加、アミノピリン *N*-脱メチル化活性、テストステロン 2 $\alpha$  水酸化活性及びテストステロン 16 $\alpha$  水酸化活性の低下がみられ、すべての投与群で EROD 活性の低下が認められた。ECOD 活性およびテストステロン 6 $\beta$  水酸化活性に変化は見られなかった。雌ではいずれの測定値にも HDBB 投与による影響は認められなかった。

#### D. 考察

DBHCB のラットを用いた反復投与試験により、DBHCB の標的器官は肝臓であり、雄では雌に比べて 100 倍以上強く毒性が発現することが示された。化学物質の毒性に性差が存在することがあることはよく知られており、性差発現にステロイド・ホルモンが関与していることも知られている。DBHCB の毒性の性差発現におけるステロイド・ホルモンの影響を調べるために、6 週齢の雌雄の去勢ラットまたは離乳前の雌雄のラットに DBHCB を投与したところ、毒性の雌雄差は去勢ラットで著しく軽減し、離乳前のラットで雌雄差はみられなくなった。これらのことから、DBHCB の毒性発現におけるステロイド・ホルモンの関与が示唆された。

DBHCB と同様紫外線吸収剤として使われてい

る DBHCB の構造類似化合物である HDBB の毒性の雌雄差について検討した。HDBB の毒性は DBHCB よりはるかに強く、雄ラットで貧血、肝毒性等が認められた。DBHCB と同様雌に比べて雄で毒性が強く発現し、雄の HDBB に対する感受性は雌よりも約 25 倍高かった。HDBB 投与により観察されたいずれの毒性影響も、雄で強く発現していることから、HDBB の代謝、移行もしくは排泄の性差が雄の HDBB もしくはその代謝物の血中濃度を高くしている可能性が考えられる。DBHCB の場合と同様に、HDBB の毒性の性差におけるステロイド・ホルモンの役割を検討するために、雌雄の去勢ラットに HDBB を投与したところ HDBB の毒性の雌雄差は著しく軽減した。さらに、離乳前の雌雄のラットに HDBB を直接強制経口投与したとき、5 週齢ラットで観察された毒性とほぼ同様な肝臓の重量増加を伴う毒性がみられたが、雄では毒性が減弱し、雌では毒性が増強され、離乳前のラットでは、HDBB の毒性発現の性差が消失することが示された。これらのことは HDBB の毒性発現には内分泌学的な性差が関与している可能性を示している。

HDBB の 5 週齢ラットにおける初回及び反復投与後の血漿中 HDBB プロファイルに雌雄差はみられず、未変化体の検出限界を超える濃度の代謝物は雌雄で確認できなかった。雌ではいずれも薬物代謝酵素活性にも HDBB 投与による影響は認められなかったが、雄ラットでは、成熟雄ラットに特異的な CYP2C11 活性の低下が顕著であったことから、毒性発現にホルモン経由の影響がある可能性が示唆された。

以上のことから、本研究において、ラットの週齢によって毒性の雌雄差等の発現様式、感受性が大きく異なることが明らかになった。

#### E. 結論

5-6 週齢のラットに DBHCB または HDBB を投与したとき雄で毒性が強く発現した。6 週齢の去勢ラットに DBHCB または HDBB を投与したとき毒性の性差が軽減した。離乳前のラットに DBHCB または HDBB 直接強制経口投与したところ、毒性に雌雄

差はみられなくなった。5週齢ラットにHDBBを投与後の血漿中HDBB及び代謝物の測定では、雌雄差はみられなかった。雄で成熟雄ラットに特異的な薬物代謝酵素活性が著しく低下した。これらのことから、ラットの週齢によって毒性の雌雄差等の発現様式、感受性が大きく異なることが明らかになった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Emma M. (in press) Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. *Reprod Toxicol*

Emma M., Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E. (in press) Repeated dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*

Emma M., Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E (in press) Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats. *Reprod Toxicol*, 25 (1)

Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (in press) Lack of gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem Toxicol*

Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Emma M. (in press) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regulat Toxicol Pharmacol*,

Emma M., Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M,

Hirose A, Kamata E. (in press) Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol* 25 (1)

Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C, Emma M. (in press) Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of the nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol, in rats. *Environ Toxicol*

Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (2008 in press) Gonadal influence of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31 (1)

Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (in press) A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31 (1)

江馬 眞 (印刷中)有機スズ化合物の生殖発生毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125  
高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (印刷中): OECD 化学物質対策の動向 (第13報) - 第22回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2006年パリ)、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125

Hirata-Koizumi M, Watari T, Mukai D, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (2007) A 28-Day repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 30, 327-341.

Emma M., Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M. (2007) Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats. *Congenit Anom Kyoto*, 49, 149-155

松本真理子、大井恒宏、宮地繁樹、菅谷芳雄、江馬 眞 (2007): OECD 高生産量化学物質点

- 検プログラム—第23回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌, 3, 56-65.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007)、OECD 化学物質対策の動向(第12報)—第20回、第21回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2005年パリ、ワシントンDC)、化学生物総合管理学会雑誌, 3, 43-55.
- Ena M, Ito Y, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2007) Screening study for repeated dose and reproductive/developmental toxicity of rubber accelerator, N, N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide, in rats. *Drug Chem Toxicol*, 30, 167-180.
- Ena M, Fukui Y, Aoyama H, Fujiwara M, Fuji J, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Oi A, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T. (2007) Comments from the Developmental Neurotoxicology Committee of the Japanese Teratology Society on the OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (October 2006 version), and on the Draft Document of the Retrospective Performance Assessment of the Draft Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity. *Congenit Anom Kyoto*, 47, 74-76.
- Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson M, Parker A, Hirose A, Nakai S, Kamata E, Ena M. (2007) Pediatric Susceptibility to 18 Industrial Chemicals, A Comparative Analysis of Newborn with Young Animals. *Regr Toxicol Pharmacol*, 47, 296-307.
- 江馬 眞 (2007) 生殖発生毒性試験の役割、産科と婦人科 74 巻 3 号(特集/妊娠と薬), 309-315.
- Ena M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2007) Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. *Reprod Toxicol*, 23, 12-19.
- 松本真理子、日下部哲也、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2006) OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第22回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌, 2, 302-312
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2006)、OECD 化学物質対策の動向(第10報)—第18回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2004年パリ)、化学生物総合管理学会雑誌, 2, 286-301
- Ena M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 672-678.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2006)、OECD 化学物質対策の動向(第9報)—第17回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2003年アローナ)、化学生物総合管理学会誌, 2, 163-175
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2006) OECD 化学物質対策の動向(第8報)—第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌, 2, 147-162.
- 松本真理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2006) OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第21回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌, 2, 135-146.
- 松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2006) OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第18回初期評価会議までの概要 化学生物総合管理学会誌, 2, 104-134.
- 江馬 眞 (2006) OECD の高生産量化学物質安全性点検プログラムとその手順、化学生物総合管理学会, 2, 83-103.



- Enma M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 30-36.
- Enma M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) 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.
- Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Enma M (2006) Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto*, 46, 26-33.
- Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Enma M, Hasegawa R. (2006) Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific  $\alpha 2u$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35-47.
- Enma M, Hirose A. (2006) Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. In *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity* (Golub MS, Ed.), pp. 23-64, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton
- 江馬 眞: 巻頭言: OECD の化学物質対策への関わり リスクセンター四季報, 13 (2), 1 (2005).
- 江馬 眞: 特集: OECD 化学品プログラムへの貢献: OECD における化学物質対策—高生産量化学物質の安全性点検作業について リスクセンター四季報, 13 (2), 2-3 (2005).
- Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Enma M. (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, 588, 129-135.
- Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Enma M, Hasegawa R. (2005) Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-*tert*-butylphenol and 2,4-di-*tert*-butyl phenol toxicity. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 146-153.
- Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Enma M. (2005) Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 137-145.
- 松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2005) OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第20回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌 1, 445-453.
- 高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2005) OECD 化学物質対策の動向(第7報)—第15回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2002年ボストン)衛研報告、123, 46-52.
- 松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2005) OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第19回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌 1, 280-288.
- Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Enami T, Wada H, Ogata H, Yamamoto Y, Ito Y, Kamata E, Enma M, Hasegawa R. (2005) The susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. *J. Toxicol. Sci.*, 30, 29-42.
- Enma M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2005) Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food Chem Toxicol*, 43, 325-331
- 高橋美加・平田睦子・松本真理子・広瀬明彦・鎌田栄一・長谷川隆一・江馬 眞 (2005)、OECD 化学物質対策の動向(第6報)—第14回OECD

高生産量化学物質初期評価会議(2002年パリ)、  
化学生物総合管理学会誌、1、46-55.

## 2. 学会発表

Emma M., Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C.  
(2007) Screening study for repeated dose and reproductive and developmental toxicity of the nitrophenolic herbicide dinoseb in rats. SETAC North America 28<sup>th</sup> Annual Meeting (11/11-15, Milwaukee)

Emma M., Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Hirose A, Kamata, E. (2007) Evaluation of two-generation reproductive toxicity of a vulcanization accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in rats. 2007 EUROTOX

Harada T, Kimura E, Hirose A, Kamata E, Emma M.  
(2007) Reproductive/developmental screening toxicity of 4-aminophenol in rats. 2007 EUROTOX

江馬 眞 (2007) OECD Developmental Neurotoxicity Study ガイドライン・ドラフトのその後、第47回日本先天異常学会学術集会(7月7日、名古屋)

江馬 眞, 伊藤義彦, 松本真理子, 平田睦子, 広瀬明彦, 鎌田栄一 (2007) 加硫促進剤 N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide のラットにおける反復/生殖発生毒性併合試験、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)

平田睦子, 松山隆史, 今井俊夫, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007) 紫外線吸収剤 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)を離乳前ラットに投与したときの影響、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)

江馬 眞, 原 洋明, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一(2007)ポリソルベート80のラットにおける発生神経毒性、第34回日本トキシコロジー

学会学術集会(6月27日、東京)

平田睦子, 渡 修明, 向井大輔, 今井俊夫, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007)

2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)の28日間反復投与毒性試験、第34回日本トキシコロジー学会学術集会(6月28日、東京)

Emma M., Matsuyama T, Matsumoto M, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kamata, E. (2007) Toxicity study of ultraviolet light absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) in rats during the pre-weaning period. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (Charlotte, 3/25-29, 2007)

Fukunishi K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Emma M. (2007) Combined repeated dose toxicity with the reproductive/developmental toxicity screening test of ultraviolet absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole (DBHCB) in rats. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (Charlotte, 3/25-29, 2007)

Hirose A, Yamazoe Y, Emma M., Kawamura Y. (2007) Toxicity testing schema for the initial risk assessment of food contact plastics based on the concept of ttc and usage probabilistic factors. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (Charlotte, 3/25-29, 2007)

Emma M., Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Hasegawa R, Yamamoto N. (2007) The Contribution of the Japanese Government to the OECD High Production Volume Chemicals Programme: Summary of 1<sup>st</sup> to 21<sup>st</sup> SIDS Initial Assessment Meetings. First U.S. Conference on Characterizing Chemicals in Commerce: Using

- Data on High Production Volume (HPV) Chemicals. (Austin, 12/12-14)
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. International Conference on Food Contamination and Neurodevelopmental Disorders (Valencia, 12/3-5)
- 林 真、広瀬明彦、鎌田栄一、秋山浩子、高橋美加、江馬 眞、森田 健、既存化学物質の染色体異常誘発性評価のための in silico 評価系の開発、日本環境変異学会大35回大会(堺, 11/20-21)
- Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Teratogenic effects of rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG), in rats. 27<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Toxicology (Palm Springs, 10/5-8)
- Ema M, Arima A, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2006) Prenatal developmental toxicity of dibutyltin in cynomolgus monkeys given on consecutive three days during organogenesis. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Hasegawa R, Hirata-Koizumu M, Dourson M, Hirose A, Nakai S, Kamata E, Ema M. (2006) Comprehensive evaluation on pediatric susceptibility to 18 chemical. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. (2006) Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (Dubrovnik/Cavtat, 9/20-24)
- Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Ema M. Gene Expression s analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25).
- Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose, Kamata E. Pre- and post implantation embryonic loss induced by dibutyltin given to mice during early pregnancy. The 26<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25).
- 江馬 眞 (2006) 生殖毒性、第7回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会(名古屋、7/3)
- 江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 加硫促進剤 1,3-di-o-tolylguanidine のラットにおける出生前発生毒性、第33回日本トキシコロジー学会学術年会(名古屋、7/4-6)
- 江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、伊原敏夫 (2006) カニクイザルにおけるジブチルスズの発生毒性試験、第46回日本先天異常学会学術集会(山形、6/29-30)
- 江馬 眞、松山隆史、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 紫外線吸収剤 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラット新生児における毒性、第46回日本先天異常学会学術集会(山形、6/29-30)
- Nishimura T, Tahara M, Kubota R, Shimizu M, Ema M, Tokunaga H. (2006) Behavior of fenthion after chlorination treatment and effect of its products on cholinesterase activity. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego
- Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Arima A, Ihara T. (2006) Teratology study of dibutyltin in cynomolgus monkeys given during organogenesis. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego

江馬 眞 (2005) OECD 発生神経毒性試験ガイドライン、安全性評価研究会2005年冬のセミナー(12月3日)

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2005) 有機スズ化合物の生殖発生毒性:ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第7回環境ホルモン学会研究会

江馬 眞 (2005) OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第17回神経行動毒性研究会(8月5日)

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantation. The 25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

Ema M., Kimura E, Hirose A, Kamata E. (2005) Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. (2005) Susceptibility of newborn rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2005) ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第45回日本先天異常学会学術集会

江馬 眞 (2005) OECD 神経発生毒性試験ガイドライン 426(ドラフト)の進捗状況、第45回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一 (2005) 化学物質に対する新生児の感受性に関する研究:1,3-ジブロモプロパン及び1,1,2,2-テトラブロモエタン、第32回日本トキシコロジー学会学術年会

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2005) 紫外線吸収剤

2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発生毒性、第32回日本トキシコロジー学会学術年会

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究

分担研究者 中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨

本研究は神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明を目的としている。化学物質の中でもレチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)に焦点を絞り、その神経幹細胞分化における作用および作用機序の解明を目指す。これまでの研究で、1)RAがES細胞の早期アストロサイト分化を誘導する際に、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化が生じること、2)RAが胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化をサイトカイン LIF と協調して誘導すること、3)VPA が神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を顕著に抑制すること、4)VPA が損傷脊髄機能回復に有効である可能性などを見出した。

A. 研究目的

本研究は化学物質の神経幹細胞系譜制御における影響の分子基盤の解明を目的とした。特に催奇形成を有するビタミンA(レチノイン酸)や明確な奇形を伴わない状況で自閉症を誘発するバルプロ酸の機能に着目した。マウス胚性幹細胞(ES細胞)や胎仔および成体神経幹細胞を用いた先行実験では、レチノイン酸(RA)が神経幹細胞からアストロサイトへの分化時期を早めること、バルプロ酸(VPA)が成体神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することなどを明らかにしていた。このような作用及び作用機序を明らかにすることにより、化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となる知見が集積できると考えた。

B. 研究方法

生体内の発生過程において神経幹細胞はニューロ

ンへの分化がアストロサイトへの分化に先行する。本分担研究者らはマウス ES 細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで上記現象を再現できる *in vitro* の系を確立している。ES 細胞を血清非存在下に4日間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様細胞が誘導されるため、アストロサイト誘導性サイトカインLIFで刺激した場合にもアストロサイトへの分化は観察されない。しかしこの4日間の浮游培養中にRAを添加することで、LIFに応答したアストロサイトへの分化が見られるようになることが先行実験において明らかになっていた。分担研究者はこれらの結果と自身のこれまでの研究結果とを合わせて、このアストロサイト早期分化能獲得に DNA メチル化というエピジェネティックなゲノム修飾の関与を想定した。そこで本研究ではDNAのメチル化状態がRAによって実際に変化を受けることを bisulfite シークエンスなどによって検討した。これと並行してRAが胎仔神経幹細胞

分化に及ぼす影響についても細胞種特異的抗体を用いた免疫染色法などにより検討した。VPA に関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進することが分かっているものの胎仔神経幹細胞に対する影響については不明であった。そこで本研究では胎仔神経幹細胞に対する影響を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みた。また VPA の脊髄損傷治療応用への可能性も検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行うものである。

### C. 研究結果

1. ES 細胞から神経系細胞への分化における RA の影響: 我々は RA が ES 細胞からの早期アストロサイト分化を誘導するという結果を得ている。さらに我々はアストロサイト特異的遺伝子 GFAP プロモーターの転写因子 STAT3 結合配列は、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得する胎生後期に脱メチル化を受けることを報告している。そこで RA 処理した ES 細胞においてこの STAT3 結合配列を含む周辺領域のメチル化を調べたところ、コントロールと比較して脱メチル化が促進されていることが分かった。またクロマチン免疫沈降法による解析から RA 刺激に応じて維持型 DNA メチル基転移酵素 Dnmt1 の GFAP プロモーターへの結合が減弱することがわかった。一方、Dnmt1 遺伝子欠損 ES 細胞では GFAP プロモーターは低メチル化状態にあり、アストロサイトへの早期分化が見られることも明らかにした。以上の結果から、RA による ES 細胞の早期アストロサイト分化誘導機構における Dnmt1 の関与が考えられる。またヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子欠損 ES 細胞においては、RA で刺激した場合にも全くアストロサイトへの分化が誘導されないことも見出している。

2. RA の胎仔神経幹細胞分化における影響: 我々は RA の合成・分解酵素や受容体群が胎生期の脳でも発現していることから、RA の胎仔期神経幹細胞分化における影響も検討した。既にアストロサイトへの分化能を獲得したマウス胎生 14 日の神経幹細胞をアストロサイト誘導性サイトカインである LIF と同時に RA で刺激したところ、相乗的なアストロサイト分化誘導が見られた。その分子基盤として、RA 刺激によりアストロサイト特異的遺伝子プロモーター中のヒストンのアセチル化が亢進し、結果として転写因子 STAT3 の結合が促進されるためであることを明らかにした。

3. 神経幹細胞分化における VPA の影響: 我々は本研究で、VPA が成体ラット神経幹細胞の場合と同様にマウス胎生期神経幹細胞のグリア細胞(アストロサイトとオリゴデンドロサイト)への分化を抑制しつつニューロンへの分化を促進することを示した。また、経時的に VPA 処理した神経幹細胞から抽出した RNA を用いマイクロアレイ解析からは、ニューロン軸索伸長阻害タンパク質遺伝子の発現抑制が観察された。また VPA 処理した神経幹細胞を脊髄損傷モデルマウスの脊髄に移植したところ、未処理細胞移植群と比較して、顕著な機能回復が見られた。

### D. 考察

1. ES 細胞から神経系細胞への分化における RA の影響: 本年度の研究から RA による ES 細胞からの早期アストロサイト分化誘導過程において、「Dnmt1 のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合減弱による脱メチル化促進」というメカニズムが推察された。また G9a 遺伝子欠損 ES 細胞では RA による早期アストロサイト分化誘導が観察されないことから、今後は DNA メチル化とヒストンメチル化双方のエピジェネティックな観点から RA の作用機序解明に臨む。

2. 神経幹細胞分化における VPA の影響: 本研究から、VPAは損傷脊髄において移植幹細胞のニューロン分化を誘導できると共に、損傷脊髄機能回復を増進できることがわかった。今後はその作用機序を解明を目指す。

## E. 結論

本研究によって RA や VPA が神経幹細胞分化制御に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。今後はそのメカニズムを詳細に解析することで、生物学的に興味深い発見や、ひいては化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となるような概念の提示を目指したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

該当無し

#### 2) 雑誌

(#, Shared correspondence, \*, Equal first authorship)

1. Li, W., Sun, G., Yang, S., Qu, Q., Nakashima, K. & Shi, Y. Nuclear receptor TLX regulates cell cycle progression in neural stem cells of the developing brain. *Mol Endocrinol* in press.
2. Fukuda, S., Abematsu, M., Mori, H., Yanagisawa, M., Kagawa, T., Nakashima, K., Yoshimura, A. & Taga, T. Potentiation of astrogliogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 4931-4937 (2007).
3. Jessberger, S., Nakashima, K., Clemenson, G.D., Jr., Mejia, E., Mathews, E., Ure, K., Ogawa, S., Sinton, C.M., Gage, F.H. & Hsieh, J. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive

decline. *J Neurosci* 27, 5967-5975 (2007).

4. Chang, M.Y., Sun, W., Ochiai, W., Nakashima, K., Kim, S.Y., Park, C.H., Kang, J.S., Shim, J.W., Jo, A.Y., Kang, C.S., Lee, Y.S., Kim, J.S. & Lee, S.H. Bcl-XL/Bax Proteins Direct the Fate of Embryonic Cortical Precursor Cells. *Mol Cell Biol* 27, 4293-4305 (2007).
5. Ohno, M., Kohyama, J., Namihira, M., Sanosaka, T., Takahashi, J.A., Hashimoto, N. & Nakashima, K. Neupoietin induces neuroepithelial cells to differentiate into astrocytes via activation of STAT3. *Cytokine* 36, 17-22 (2006).
6. Kubota, A., Nishida, K., Nakashima, K. & Tano, Y. (2006) Conversion of mammalian Muller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 514-520.
7. Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T. & Nakashima, K. (2006) Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res* 84, 969-979.
8. Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J.C. (2006) Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10294-10299.
9. Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Belmonte, J.C. (2006) Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1, S114-S122.
10. Barkho, B.Z., Song, H., Aimone, J.B., Smrt, R.D.,

- Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H. & Zhao, X. (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15, 407-421.
11. Abematsu, M., Smith, I. and Nakashima, K. (2006) Mechanisms of neural stem cell fate determination: extracellular cues and intracellular programs. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 1, 267-277.
12. \*Muotri, A.R., \*Nakashima, K., Toni, N., Sandler, VM. and Gage, F.H. (2005) Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18644-18648.
13. Yanagisawa, M., Nakashima, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Setoguchi, T., Uemura, A., Takizawa, M., Nobuhisa, I. and Taga, T. (2005) Fate redirection of hippocampal astrocytes toward neuronal lineage by aggregate culture. *Neurosci. Res.* 53, 176-182.
14. Shimozaki, K., Namihira, M., Nakashima, K. and Taga, T. (2005) Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *J. Neurochem.* 93, 432-439.
2. 学会発表(抜粋)  
(国内学会)
1. 精松昌彦<sup>○</sup>、辻村啓太、神山淳、波平昌一、瀬戸口啓夫、米和徳、小宮節郎、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽一: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バシルプロ酸による神経幹細胞分化制御機構の解明と損傷脊髄再生治療への応用。第28回日本炎症・再生医学会、京王プラザホテル、2007年8月2日-3日
2. 浅野弘嗣<sup>○</sup>、波平昌一、神山淳、青沼真、佐野坂司、中島欽一: レチノイン酸によるヒストン修飾変換を介した神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構の解明。第5回幹細胞シンポジウム、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、2007年5月17日-19日
3. 浅野弘嗣<sup>○</sup>、波平昌一、神山淳、青沼真、佐野坂司、中島欽一: レチノイン酸による胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化制御機構の解明、日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日
4. 精松昌彦<sup>○</sup>、辻村啓太、瀬戸口啓夫、神山淳、波平昌一、井尻幸成、米和徳、小宮節郎、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽一: ヒストン脱アセチル化阻害剤による神経幹細胞分化制御機構の解明と損傷脊髄再生治療への応用。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日
5. 波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一<sup>○</sup>: 未成熟ニューロンが誘導する胎生中期神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日(シンポジウム、口頭)
6. 中島欽一<sup>○</sup>: 神経系細胞の分化制御とエピジェネティクス。千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ第19回、千里ライフサイエンスセンタービル、2006年10月24日
7. 中島欽一<sup>○</sup>、神山淳、田賀哲也、波平昌一: Notchシグナル活性化による神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構、第29回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2006年7月19-21日
8. 神山淳、黒見靖、瀬戸口廣貴、波平昌一、中島欽一<sup>○</sup>: メチル化DNA結合タンパク質による神経系細胞分化可塑性制御機構の解析、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日
9. 青沼真<sup>○</sup>、波平昌一、瀬戸口廣貴、神山淳、中島欽一<sup>○</sup>: レチノイン酸とLIFによる神経幹細胞の相乗的アストロサイト分化誘導、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日



10. 波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一<sup>○</sup>: Accelerated demethylation in an astrocyte specific gene promoter mediated by Notch-signaling、第48回日本神経科学会(福岡)大会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年9月28日-30日
11. 波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一<sup>○</sup>: 神経幹細胞多分化能獲得機構の解析。日本発生生物学会第38大会。仙台国際センター、2005年6月1-4日

(国際学会)

1. Namihira, M., Kohyama, J., Taga, T., and Nakashima, K<sup>○</sup>: Pre-generated Differentiating Neurons Confer an Astroglial Potential to Neural Precursors through Notch-signal Activation. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Conference Center COEX, Seoul, Korea, October 17-19, 2007 (symposium)
2. Namihira, M., Kohyama, J., Taga, T., and Nakashima, K<sup>○</sup>: Differentiating neurons confer astrocyte-differentiation potential to neural precursor cells through an epigenetic modification. KEYSTONE SYMPOSIA, Keystone Resort, Keystone, March 2-7, 2007
3. Nakashima, K<sup>○</sup>: Differentiating neurons confer a potential to differentiate into astrocyte on neural stem cells. The 8<sup>th</sup> NAIST-KRIBB-KK Joint Symposium. KOREA UNIVERSITY, Seoul, November 10, 2006 (oral)
4. Namihira, M., Kohyama, J., Taga, T., and Nakashima, K<sup>○</sup>: Notch signal-induced DNA demethylation switching the differentiative potential of neural stem cells. The 5<sup>th</sup> JBS Symposium, Nagano, March 1-3, 2006 (oral)
5. Nakashima K.<sup>○</sup>: Notch signal-mediated DNA

demethylation regulation the differentiative potential of neural stem cells. NAIST-CDB International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, December 1-2, 2005

6. Aonuma M.<sup>○</sup>, Namihira M., Setoguchi H., Kohyama J. and Nakashima K.: Retinoic acid cooperates with LIF to induce astrocyte differentiation of embryonic neural stem cells. NAIST-CDB International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, December 1-2, 2005
7. Nakashima K.<sup>○</sup>: Epigenetic modification involved in fate determination of neural stem cells. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Korea, May 13, 2005
8. Nakashima K.<sup>○</sup>: Epigenetic modification regulating fate specification of neural stem cells. NAIST 21st Century COE International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, January 17-19, 2005

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
平成17年度文部科学大臣表彰若手科学者  
賞受賞  
第4回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞  
受賞

脳形成・発達過程における神経伝達物質シグナルの外因性かく乱による脳障害に関する研究  
—モデル系開発とメカニズム解明—

分担研究者 種村健太郎

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

研究要旨

胎生期におけるグルタミン酸シグナルの外因性かく乱による神経毒性発現の解明を目的として、マウスにドーモイ酸、サリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の経胎盤暴露を行った結果、成熟期に神経細胞軸索突起の発達不全が確認されるとともに、予期せぬ情動・認知行動の逸脱が生じた。特にドーモイ酸胎生期暴露実験系は胎児期におけるグルタミン酸シグナルかく乱を原因とする脳形成不全をともなう脳機能発達障害モデルとして位置づけることが出来ると考えられ、これまでに報告されている複数の統合失調モデルマウスの表現型は、本系の示す一連の表現型の一部に該当することが指摘された。

A. 研究目的

中枢における主たる興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のシグナル調節機構は、発生期の脳構造形成においても重要な役割を演じている。本研究は、(1)発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激の脳構造形成への影響の有無、(2)胎生期の、大脳形成過程における感受性の差違、(3)生まれた場合の遅発性中枢行動毒性として影響の有無、について明らかとすることを目的とする。

B. 研究方法

胎生 11.5、14.5、17.5 日齢のマウスに対して経胎盤経由で、グルタミン酸のアゴニストであるドーモイ酸を投与(H18 年度)、また胎生 14.5 日齢のマウスに対して経胎盤経由で、サリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸を投与(H19 年度)し、得られた雄マ

ウスについて生後 10 週齢時に以下の形態機能解析及び行動解析を行った。

脳構造における障害性の有無に関しては、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせた免疫組織化学により検討した。同時に、脳内の興奮-抑制バランスへの影響評価を目的として各種受容体および調節因子タンパクの発現を検討した。また行動解析は、情動-認知系行動に焦点を合わせ、オープンフィールド試験、明暗往來試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、及びプレパルス驚愕抑制試験を組み合わせたバッテリー試験として実施した。

C. 研究結果

胎生期ドーモイ酸暴露雄マウスについて、大脳皮質における神経細胞軸索構成タンパクに対する抗体

を用いた免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、神経細胞軸索突起の発達不全が確認された。神経細胞軸索構成タンパクのリン酸化修飾状態および界面活性剤に対する溶解性について解析を行った結果、暴露群マウスにおける神経細胞軸索構成タンパクの特性は対照群と大きく異なることが示された。情動・認知系行動解析を行った結果、胎生11.5日齢暴露群では、高架式十字迷路試験及びプレパルス驚愕反応抑制試験に変化が見られたのに対し、胎生14.5及び17.5日齢暴露群においては、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の増加、明暗往来試験における明所滞在時間の増加、明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量増加とアーム選択回数の増加が見られ、情動行動に変化が生じていることが確認された。恐怖条件付け試験からは、場所-連想記憶障害及び音-連想記憶障害が確認され、プレパルス驚愕反応抑制試験からは驚愕反応抑制度の低下が明らかとなった。

胎生期サリドマイド暴露雄マウスでは情動・認知行動に関する逸脱は認められなかったが、胎生期フタルグルタミン暴露雄マウスでは、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間増加と、プレパルス驚愕反応抑制試験での驚愕反応抑制度の低下が明らかとなった。また胎生期フタルグルタミン酸暴露雄マウスでは、オープンフィールド試験での総移動量減少と、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間及びアーム選択回数の増加、また場所-連想記憶障害が確認できた。

#### D. 考察

ドーモイ酸は、ヒトにおいて海馬を選択的に破壊する記憶毒性物質であることが報告されている。生後10週齢の成熟雄マウスへのドーモイ酸暴露は、海馬依存的な場所-連想記憶障害のみを誘発したことから、

成熟したマウスに対するグルタミン酸受容体過剰刺激による神経行動毒性標的部位はヒトと同様に海馬であると判断された。これに対して、胎生11.5日齢暴露群では10週齢時点において大脳皮質への影響が想定されたが、胎生14.5及び17.5日齢ドーモイ酸暴露を受けた暴露群マウスには、10週齢時点において(1)大脳皮質における神経細胞突起発達不全、(2)軸索構成タンパクの生化学性状変化、(3)情動行動での逸脱、(4)重度の学習-記憶障害、及び(5)プレパルス驚愕反応抑制試験による驚愕反応抑制度の低下が確認された。以上の結果から、ドーモイ酸胎生期暴露実験系は胎児期におけるグルタミン酸受容体過剰刺激を原因とする脳形成不全をともなう脳機能発達障害モデルとして位置づけることが出来ると考えられた。尚、これまでに報告されている複数の統合失調モデルマウスの表現型は、本系の示す一連の表現型の一部に該当することが指摘される。

胎生期サリドマイド暴露はヒトの広汎性発達障害の一因とされているが、そのメカニズムは不明である。今回、サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルグルタミン酸のマウスへの経胎盤暴露の結果、成熟期に情動・認知行動の逸脱を認めたことは、外因性のグルタミン酸シグナルカ×乱が、行動異常を伴う発達障害の起点となり得ることを示すものと考えられる。

#### E. 結論

- (1)ドーモイ酸の経胎盤暴露は大脳皮質及び海馬に、神経細胞突起発達不全を主体とする脳構造形成不全を引き起こす。
- (2)上記影響に対する感受性は胎生前期(胎生11.5日齢ごろ)よりも胎生後期(胎生14.5~17.5日齢ごろ)の方が高い。
- (3)ドーモイ酸の経胎盤暴露は上記の脳構造形成不全を原因として矛盾しない情動・認知行動異常を

遅発性の中枢神経毒性として引き起こす。

- (4) サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルルグルタミン酸のマウスへの経胎盤暴露は、成熟期の情動・認知行動の逸脱を引き起こす。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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. (2007). 25(3):562-570.

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. (2006). 281(8):5037-5041.

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. (2006). 103(32):12161-12166.

Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saïdo TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M.  
Loss of M(5) muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. Neurobiol Dis. (2006).24(2): 334-344.

### 2. 学会発表

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性の発現機構の Percollome 解析  
種村健太郎、五十嵐勝秀、中津則之、相崎健一、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純  
(2007年6月、日本トキシコロジー学会)

エストロゲン受容体( $\alpha$ 型)非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析  
種村健太郎、五十嵐勝秀、北嶋聡、菅野純  
(2007年11月、日本繁殖生物学会)

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性とその発現機構の Percollome 解析  
種村健太郎、五十嵐勝秀、中津則之、相崎健一、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純  
(2007年12月、日本分子生物学会)

授乳期マウスへのドーモイ酸暴露による遅発性神経行動毒性発現のメカニズム解析  
種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋聡、菅野純  
(2008年3月、日本獣医学会)

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし