

201236004A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究
(H22-化学一般-004)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成24(2013)年5月

目 次

I. 総括研究報告

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による 化学物質の健康影響評価法に関する研究 -----	1
宇佐見 誠	

II. 分担研究報告

1. 神経堤細胞の機能解析による評価法の開発 -----	27
宇佐見 誠	
2. 発達成長期ニューロン・グリア新生評価法 -----	35
佐藤 薫	
3. 神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築 -----	43
諫田 泰成	
4. 胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析 -----	51
石田 誠一	
5. 周産期における薬物動態関連因子の発現解析 -----	65
簾内 桃子	
6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析による評価法の開発 -----	73
関野 祐子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	83
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	85
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究

研究代表者 宇佐見 誠 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長

研究要旨

本研究は、神経系および肝臓系の細胞を用いた、発生・発達・再生過程の神経系において、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の確立を目的とする。前年度までに、実験系の確立および新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析に関する検討および毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性についての検討を行った。今年度は、共通の化学物質を被験物質として用いることにより、これらの実験系の特徴および有用性を検討し、化学物質の健康影響評価法として確立することを目的として、下記①～⑥の成果を得た。

①ラット神経堤細胞遊走実験法においては、種々の発生毒性物質による影響を調べ、神経堤細胞遊走に及ぼす化学物質の影響のメカニズムおよびそれを利用した健康影響評価法について検討した結果、本実験法は化学物質の発生毒性メカニズムに関する探索に利用できると考えられた。

②新生ラット前脳矢状面切片培養系においては、ヒトへの外挿を目指すため、メカニズムに基づくマーカー分子の探索を行った結果、マーカー分子として **FGFR1**, **PDGF α** が有望であることを見いだした。また、鉛およびサリチル酸の影響評価を行い、両化学物質が生後初期オリゴデンドロサイトの分化、遊走を阻害することを明らかにした。

③神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築においては、発達神経毒性が懸念される化学物質として鉛、銅がヒト胎児性癌細胞の生細胞数、糖輸送、酸素消費量に及ぼす影響を調べた結果、酸素消費量の低下が最も高感度のマーカーであったことから、酸素消費量は毒性評価に応用できる可能性が示唆された。

④胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析においては、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では尿素回路が機能していないことを明らかにした。化学物質暴露実験では、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化学物質が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

⑤幼若期ヒト肝細胞においては、成体における薬物動態データを利用するために、ヒト周産期薬物動態関連因子の発現解析を行い、データを蓄積した。

⑥成長期の脳辺縁系回路機能解析による評価法においては、細胞外に遊離する γ -アミノ酪酸の可視化法と海馬反回抑制の電気生理学的評価法を用いて、抗てんかん薬であるバルプロ酸の胎児期曝露が脳の生後発達にもたらす影響を調べた結果、海馬神経活動の亢進と小脳抑制性神経伝達物質の放出量の増加が認められ、抑制性神経回路の早熟化が示唆された。生後の早い段階の脳スライス標本を用いたこれらの解析が発達神経毒性評価に有用であることを示した。

以上の結果および前年度までの結果を基にして、各実験系の特徴および有用性を検討し、成長期の個体における各発達段階において、遊走、分化、増殖、神経回路形成、神経応答および薬物動態を指標とすることによって体系的に発達段階特異的な毒性を評価できる健康影響評価法を確立した。この評価法は、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団の特定、および感受性の高い個体についても安全を確保できる安全係数の実験データに基づく決定法の確立、等に寄与することが期待される。

究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名	
佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長
諫田 泰成	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長
石田 誠一	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長
簾内 桃子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部研究員
関野 祐子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は、長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

そこで本研究では、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的として、(1)神経堤細胞の遊走等機能解析法、(2)発達成長期脳神経系ニューロン・グリア新生評価法、(3)学習などの高次機能に影響を与える神経幹/前駆細胞を用いた方法、(4)成体における代謝データを利用可能な新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立する。神経系および肝臓系の細胞を組み合わせることにより、発生・発達・再生過程の神経系においての、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、化学物質の健康影響評価法の確立を目指す。

本研究では、化学物質の安全対策の観点から、国民の健康と生活環境の維持・向上に資する成果が期待される。すなわち、成長期等の化学物質に対する感受性の高い個体を対象とする、メカニズムのみならず薬物動態を考慮した実験データのヒトへのより確かな外挿を可能とする化学物質の健康影響評価により、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団を特定し、健康被害を予防することが期待さ

れる。また、成体での実験結果から経験的に決められている、化学物質の暴露許容量を設定するための安全係数について、感受性の高い個体についても安全を確保できるような、実験データに基づく決定法の確立に寄与することが期待される。

化学物質による健康被害が生じてしまった場合には、被害の軽減および治療法の開発に資すると考えられる。さらに、細胞系を利用した迅速かつ簡便な化学物質のリスク評価という特色により、グローバルな化学物質管理のための、化学物質の効率的な評価手法として活用されることが期待される。複合的な化学物質の影響評価に応用し、体系的・総合的な評価手法として発展させることにより、新たな毒性学概念の確立に資する。

前年度までに、実験系の確立および新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析に関する検討および毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性についての検討を行った。今年度は、共通の化学物質を被験物質として用いることにより、これらの実験系の特徴および有用性を検討し、化学物質の健康影響評価法として確立することを目的とした。

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後に、末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

そこで本研究では、神経堤細胞の機能解析による評価法の開発として、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。今年度は、本研究の最終年度として、発生毒性を有する種々の化学物質による神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べ、得られた結果に基づいて、神経堤細胞

遊走に及ぼす化学物質の影響のメカニズムおよびそれを利用した健康影響評価法について検討した。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

グリア前駆細胞であるオリゴデンドロサイトはニューロンの髓鞘を形成するグリアであり、発達期にこの細胞が十分に作られないと重篤な認知障害が引き起こされることが示唆されている。また、オリゴデンドロサイトが特異的に失われる脳疾患である多発性硬化症では、しびれ、運動麻痺、歩行障害などが現れる。従って、発達期のオリゴデンドロサイトの正常な分化、遊走は脳神経系が健全に発達するためには欠かせない過程であるが、これまでにオリゴデンドロサイトの発達に着目した評価系は確立されていない。

そこで本研究では、発達成長期ニューロン・グリア新生評価法として、放射状に遊走するグリア前駆細胞、特にオリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立する。オリゴデンドロサイト発達を緑色蛍光蛋白質 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を採用した実験法の確立を確立した。また、cytokine arabinoside (AraC)、プロラクチン (prolactin: Prl) を用いて、この *in vitro* 実験系がオリゴデンドロサイトの分化・遊走に対する正負両方向の影響を検出できることを確認した。また、これらの細胞現象への影響を反映するバイオマーカーとして fibroblast growth factor receptor (FGFR)1 および platelet derived growth factor receptor (PDGFR) が有力な候補であることを見いだした。本年度はこれらのバイオマーカー候補を用いて、化学物質として鉛およびサリチル酸の影響評価を試行した。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

神経幹/前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られている。発達期に化学物質に暴露されて神経幹/前駆細胞に影響が出る場合には、その後長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性が考えられる。従って、神経幹/前駆細胞を用いることによって、特に発達期における化学物質のリスクを評価できる可能性がある。

化学物質の健康影響評価法に使用可能なヒト神経幹/前駆細胞のソースとしては、初代培養細胞および幹細胞が考えられる。しかし、ヒト神経幹/前駆細胞の初代培養細胞は入手が困難であり、また倫理的な問題があることから現実的ではない。幹細胞としては、ヒト Embryonic Stem (ES) 細胞やヒト induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞、ヒト Embryonic carcinoma (EC) 細胞などがある。

ヒト ES 細胞の場合には初代培養細胞と同様に倫理的な障害があり、また培養の過程で脱分化することがある。ヒト iPS 細胞の場合には、様々な形質を有する細胞に分化誘導されるために、形質が安定した細胞が得られず、健康影響評価のモデル細胞には適さないと考えられる。

一方、ヒト EC 細胞はヒト胎児の繊維芽細胞から樹立され、神経系を含む多くの組織への分化能を有する。不死化されていることから形質も安定で、モデル細胞として扱える可能性が高い。しかし、ヒト EC 細胞から神経幹/前駆細胞への分化誘導法は確立されていない。そこで本研究では、ヒト EC 細胞を用いてヒト神経幹/前駆細胞のモデル細胞の作製を行い、化学物質の健康影響評価システムの開発を目指した。昨年度は、トリブチルスズ(TBT)の毒性を評価するマーカーとして酸素消費量を明らかにした。本年度は、酸素消費量のメカニズムとして、上流に位置する解糖系に対する TBT の影響を検討した。さらに、他の金属毒性に応用できるのか明らかにするために、化学物質として鉛と銅を追加して、これまでに得られた指標を比較検討した。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

個体の成長期である胎児・新生児においても、肝臓は重要な外来性化学物質の代謝器官であると共に、その毒性発現の標的器官でもある。また、胎児・新生児の肝臓は、成体と比べて、化学物質に対する感受性および代謝能などの機能に差異がある。そのため、個体の成長期における化学物質の健康影響評価においては、成長期の肝臓の感受性および機能を評価できる実験法が必要である。

本研究では、これまでに我々が研究してきたヒト胎児由来肝細胞培養実験法を、化学物質の健康影響評価に利用する方法を確立す

る。本年度は、昨年度に引き続き、メタボローム解析結果に関して、更に詳細な解析を加えるとともに、関連する遺伝子の発現解析により、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を確認した。また、化合物暴露実験を進めることにより、化学物質に対する感受性も胎児と成人肝細胞との間で異なることを明らかにした。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝臓の薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、化学物質の健康影響評価において体内動態に関与する重要な因子であるだけでなく、化学物質の代謝活性化などの毒性発現およびステロイドホルモン等生体内基質の生合成と密接に関連している。そのため、その発現変動は個体の成長に大きな影響を及ぼす可能性がある。

しかし、実験動物とヒトとの間には、発現している CYP 酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で種差が認められることから、化学物質の暴露がヒト成長期に及ぼす健康影響を予測するためにはヒト組織を利用した検討が必要である。日本国内におけるヒト組織の入手は極めて困難であるが、成長期および成人ドナー由来の市販ヒト肝細胞を海外から入手し、各成長期における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の特性、および化学物質暴露による影響を明らかにすることで、化学物質がヒト成長期に与える影響の予測に貢献できると考えられる。

本研究では、成長期のヒト肝細胞における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の発現の特性およびそれらの化学物質への暴露による影響を、遺伝子レベルで調べる。今年度は、種々の年齢由来のヒト肝細胞を用いて薬物代謝酵素ならびに薬物動態関連因子の発現を mRNA レベルで明らかにした。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

動物を用いた試験結果のヒトへの外挿性を担保するためには、ヒトでも動物でも共通の機能バイオマーカーを設定する必要がある。GABA は、ヒトでも動物でも成熟脳の抑制性神経機能を担う伝達物質である。したがって、GABA の機能を評価の対象とすることで、動物を使った試験結果をヒトに外挿することが可能となる。また、扁桃体が情動を司り、小脳が運動機能を司り、海馬が記憶と学

習を司るということに関しても、動物とヒトで共通している。さらに、成長期の脳の経験により機能を獲得していく可塑性の高さを決定する臨界期は、動物でもヒトでも GABA の機能発達により決定されている。このように GABA の機能は、動物にもヒトに共通するメカニズムである。成長期の GABA の働きは、脳の発達において重要な鍵である。近年、自閉症、統合失調症、気分障害などの原因として GABA 機能の発達異常が示唆されている。

今年度は、抗てんかん薬であるバルプロ酸の胎児期曝露による発達神経毒性を、抑制性伝達物質 GABA の機能発達を指標として、脳発達期の脳スライス標本を用いて、細胞外に遊離される GABA を酵素で可視化する実験法、海馬神経回路の反回抑制を電気生理学的に定量的に評価する実験法により評価した。

B. 研究方法

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

ウィスター系ラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) の妊娠 10.5 日胚から、タングステン針を用いて、物理的に菱脳部神経管を取り出した。取り出した菱脳部神経管を、培養シャーレに培養液と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO₂、37°Cにて培養した。培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への遊走細胞の広がりを観察した。細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールで繋いでできる図形を円とみなして、その面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。培養 48 時間に培養底面から神経管を掻き取り、培養器底面に残った神経堤細胞として回収してウエスタンブロッティングを行い、リン酸化アクチン結合タンパクを検出した。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系では、生後 2 日齢ラットの脳矢状面切片標本を作成し (150 mm) トランスメンブレン (millipore) 上に静置し、SVZ に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス (NIT-eGFP) を 30 nl 注入

することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識し3日間培養した。

オリゴデンドロサイト分化および遊走の確認では、eGFP 標識細胞の O1 (オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) の発現について免疫組織化学的に検討した。ブロッキング液で1時間処理した後、4°C で抗 O1 抗体により2日間処理し、PBS で3回洗浄した後、蛍光標識された二次抗体で4°C で2日間処理し PBS で洗浄した。eGFP (+) 細胞中の eGFP (+) O1 (+) 細胞の比率を算出した。

前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討では、SVZ の神経幹細胞および神経系前駆細胞が eGFP で標識された前脳矢状面切片を酢酸鉛 (3, 10 μ M) 存在下で3日間培養し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と遊走に対する作用を検討した。同様に、サリチル酸ナトリウム (1, 3 μ M) の作用についても検討した。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト胎児性癌細胞 NT2/D1 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Ashrat, Israel)、100U/ml penicillin (Gibco BRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、100 μ g/ml streptomycin (Gibco BRL) を加えた培地にて培養した。

メタボローム解析では解糖系の代謝物質として、グルコース 6 リン酸 (G6P)、フルクトース 6 リン酸 (F6P) の量は Human Metabolome Technologies 社で開発した CE-MS を用いて定量した。

糖輸送活性は、2-デオキシグルコース (2-DG) の蛍光アナログである 2-NBDG の取り込みによって測定した。

酸素消費量は、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience 社) を用いて、酸素消費速度 OCR (Oxygen Consumption Rate) により解析した。専用の 96 穴プレートに細胞を播種後、化学物質を添加し、24 時間後に OCR の測定を行った。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞 (CS-ABI-3716) は、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入し

た。この細胞は、正常胎児肝臓 6 ドナー (妊娠週齢平均 16 週) に由来する。ヒト胎児肝細胞の播種後、培養 4 時間後に培地交換を行い、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で8日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った。肝芽細胞の三次元培養には、Hormone Defined Medium (HDM 培地)を用いた。培養後、セルスクレーパーにより剥離し、遠心によって回収した後、メタボローム解析のサンプルとした。リアルタイム PCR 解析は、ABI7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems)により行った。

メタボローム解析における代謝物質の測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社に委託した。測定により検出された 217 の候補化合物 (カチオン 99、アニオン 118) について、その相対的存在量を主成分分析により解析した。胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間の比較は、統計的に有意な変動がみられた 47 化合物について、階層的クラスタリング解析を行った。階層的クラスタリング解析は、距離の定義に Pearson uncentered を使い、群平均距離法(Average)により行った。

トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛 (II) 三水和物、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの 6 種の化学物質について、胎児および成人肝細胞に対する暴露実験を行い、各化合物の IC₅₀ 値を算出した。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

薬物動態関連遺伝子は、QuantiGene Plex2.0 mRNA Assay Kit (Affimetrix) と Luminex technology による薬物動態関連遺伝子の発現を Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad, 171-000201JA) にて測定した。薬物代謝第 1 相から CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、第 2 相から UGT1A1、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1、SULT2A1、SULT1B1 等の抱合酵素系を、他に電子伝達系酵素 POR (P450 oxidoreductase)、G6PC (Glucose-6-phosphatase)、CYP1A 誘導に関与する核内受容体 AHR、ARNT、ARNT2、PXRA、PPARA、PPARG 等である。

ヒト凍結肝細胞 (0.01 歳~47 歳) は BD Gentest、Celsis、GIBCO、および Tissue

Transformation Technologies から購入した。Lysate Sample の調製には、融解後における肝細胞の viability が 75% 以上 (75% ~ 96%) の 11 ドナーの肝細胞を用い、viability が 75% 以下の肝細胞は測定サンプルから除外した。

2007 年から 2011 年の期間にヒト肝細胞供給元 A 社より市販された凍結ヒト肝細胞 54 ドナー (男性 23、女性 31、2~82 歳、Viability 73-91%) の細胞を選択し、公開されている代謝酵素活性情報により、特に年齢差が期待できる CYP1A2、CYP3A4 および UGT general の活性レベルと年齢間の相関性について調べた。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

バルプロ酸 (VPA) 胎児期曝露は、ヒトでの曝露経路に合わせて経口投与とした。妊娠 15 日 (プラグ確認を 0 日とする) の妊娠ウイスターラットをイソフルラン麻酔下に VPA を 0 (対照群、生理食塩水のみ)、300、600 mg/kg 濃度で投与した。細胞外に遊離する GABA の可視化法については、仔ラット (PND5, 6, 8, 10, 14) から作成した小脳スライスを用いた。また、海馬反回抑制の電気生理学的評価法については児ラット (PND13, 14, 15) から作成した海馬スライスを用いた。

細胞外 GABA は、ガラス表面に固定化した GABA 分解酵素 (GABAse) を用いた蛍光測定法により可視化した。海馬反回抑制の電気生理学的評価法ではラット海馬スライス標本の CA1 領域へのダブルパルス刺激により惹起される生体電気信号を記録した

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。

ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

ヒト胎児肝細胞は、米国 ABI 社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入した。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施した。

凍結ヒト肝細胞は、個人情報確実に連結不可能匿名化されている市販品で、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において審査「非該当」と判断されたものを使用した。

C. 研究結果

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

発生毒性を有する 13 種類の化学物質を、ラット全胚培養において胚毒性を示す濃度又は、文献における発生毒性を起こす血中濃度を参考にして、培養液に添加して、神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。その結果、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛、サリチル酸およびセレン酸の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に阻害された (図 1)。

神経堤細胞の遊走を阻害した化学物質について、ウエスタンブロッティング法により、回収した神経堤細胞におけるリン酸化アクチン結合タンパクを調べた。その結果、セレン酸においてタンパク量の減少が認められた (図 2)。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

酢酸鉛 (3, 10 μ M) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した (図 3A)。また、eGFP(+)O1(+)細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3, 10 μ M とともに同程度減少していた (図 3B)。さらに、NIT-eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走も濃度依存的に阻害された。

サリチル酸 (1, 3 μ M) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した (図 4A)。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少し、3 μ M ではほぼ 0 となった。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3 μ M の濃度で有意に減少した (図 4B)。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト胎児性癌細胞を用いて有機スズ化合物の曝露により酸素消費量が低下したが、解糖系の低下によるものか明らかにするため、解糖系の代謝産物の量に対するトリブチル

スズ (TBT) の影響を検討した。その結果、低濃度 (100nM) の TBT 曝露により G6P、F6P の量が低下した。一方、細胞毒性を示さない酢酸スズ (TA) はほとんど影響を示さなかった (図 5)。

化学物質として TBT に加えて鉛と銅を用いて、ヒト未分化細胞における生細胞数、糖輸送、酸素消費量に対する影響を検討し、最も感受性の高い指標を検討した。その結果、鉛および銅の曝露 (1 μ M、24 時間) により、酸素消費量の減少が認められた (図 6)。一方、生細胞数は 10 μ M まで濃度あげてもほとんど影響が認められなかった。糖輸送に関しては、Cu (10 μ M、24 時間) により減少したが、Pb はほとんど影響を与えなかった。従って、酸素消費量は、生細胞数、糖輸送よりも高感度な指標となる可能性が示唆された。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

メタボローム解析の結果を、各代謝経路別にみると、まず、尿素回路とその周辺の代謝産物に胎児肝細胞と成人肝細胞間で変化が見られた。成人肝細胞では胎児肝細胞に比べ、ornithine (46.99-fold, p=0.001), urea (7.70-fold, p=0.029), guanidoacetic acid (6.39-fold, p=0.0007), citruline (4.82-fold, p=0.034) などの代謝産物が増加する一方で、クレアチン経路の代謝産物である creatine (0.44-fold, p=0.02), phosphocreatine (0.11-fold, p=0.035) が減少していた (図 7)。

メタボローム解析の成人肝細胞において代謝物の相対的存在量の増加がみられた尿素回路について、回路を構成する 4 種の酵素遺伝子の発現量を Real-Time PCR により測定し、胎児肝細胞と成人肝細胞間で比較した。その結果、argininosuccinate synthase 1 (ASS1, 2.59-fold, p=0.01), argininosuccinate lyase (ASL, 9.89-fold, p=0.026) の 2 遺伝子で胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で発現量が高く、残りの 2 種の遺伝子 arginase (ARG1), ornithine transcarbamylase (OTC) は、胎児肝細胞ではほとんど発現しておらず、成人肝細胞でのみ発現が確認された (図 8)。

胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察されるトリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛 (II) 三水和物、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの 6 種の化学物質に

ついて暴露実験を行い、各化合物の IC₅₀ 値を算出した (図 9)。その結果、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの 3 種の化合物は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の順に、IC₅₀ 値が上昇し、成人肝細胞から胎児肝細胞に向けて化合物に対する感受性が高くなることが示された。酢酸鉛 (II) 三水和物では、胎児肝細胞由来の 3 細胞間で変化はなく、成人肝細胞に比べ感受性が高くなった。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

新たに入手したヒト肝細胞を加え、薬物動態関連遺伝子の年齢依存的変化のパターンを調べ、以下の 4 グループに分類した (図 10 および 11)。①成人に比べ新生児期において発現が高いグループ; CYP3A7 および CYP1A1。②新生児に比べ成人において発現が高いグループ; CYP1A2。③新生児期-成人間での変化が明確に認められず、ほぼ全年齢で発現しているグループ; CYP1B1、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、UGT1A1、UGT1A4、SULT2A1、SULT1B1、POR、G6PC、AHR、ARNT、ARNT2、PXRA、PPARA、PPARG。④幼児期から思春期までの間の遺伝子発現が低いグループ; CYP3A4、CYP3A5、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1 (CYP2C8)。

年齢に伴う変化が予測される CYP3A4、CYP1A2、および UGT general について、酵素活性値と年齢との相関性について検討したが、相関性は認められなかった。性差について解析したところ、CYP1A2 においては、雌雄間で有意な差が認められた。

6. 成長期の大脳辺縁系回路機能解析

神経細胞発達に伴って PND5 より GABA 放出量が増加し、徐々に減少することが観察されるが、VPA 暴露、ラットでは PND4 で外顆粒層での GABA 放出が観察された。PND4 の VPA 投与ラットの GABA 放出量は著しく高く、小脳皮質全域で観察された。PND5 の対照群では、外顆粒層に特徴的な GABA 放出量の増加が見られるが、VPA300mg 投与動物では、外顆粒層の GABA 放出は減少する傾向が観察された。VPA600mg 投与動物ではその後も高い

GABA 放出量が観察され、VPA 被曝ラットは通常より約 20%増加した (図 12)。

GABA が関与する抑制性神経回路機能を調べた。フィードバック抑制は 2 個のシナプスを介する応答であるため、刺激間隔は 5、10、20 ms と短くなる。GABA 系の効果がどのくらい続くかをみるために 20 ms まで調べた。3 日間の変化について、刺激間隔ごとに図 13 にまとめた (図では VPA300 群と対照群を示している)。PS 振幅の比は、VPA 曝露群で 3 日間とも小さい値となった。これは、この 3 日間においてフィードバック抑制が亢進していることを示す。また、PS の比は PND13 からすでに小さかった。すなわち、抑制性 GABA 機能は興奮系機能よりも早期に亢進していることが示唆された。

D. 考察

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

前年度までに確立した実験法を用いて、発生毒性を有する種々の化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響を調べた結果、半数近い種類の発生毒性物質に頭部神経堤細胞の遊走阻害作用が認められた。したがって、本実験法は発生毒性物質の健康影響評価法として有用であると考えられる。

本実験法により神経堤細胞の遊走阻害作用が認められた発生毒性物質には、Rho シグナルパスウェイのリン酸化アクチン結合タンパクのタンパク量に変化が認められたものと認められなかったものがあった。これらの発生毒性物質間では遊走阻害作用のメカニズムが異なると推定される。Rho シグナルパスウェイ以外のシグナルパスウェイの関与など、ヒトへの外挿性を高めるためには、これらの発生毒性物質の遊走阻害作用メカニズムについて検討する必要がある。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

酢酸鉛は濃度依存的にオリゴデンドロサイト前駆細胞数を減少させたが、eGFP(+) 細胞における オリゴデンドロサイト前駆細胞数の割合は 3、10 mM で変化がなかったことから、酢酸鉛はオリゴデンドロサイト以外のグリア、神経の前駆細胞の増殖に対しても負の作用を持つことが示唆される。

サリチル酸の中樞神経系における毒性情報はほとんどなく、今回の結果は新知見として検証の必要がある。サリチル酸はリンパ系

細胞において NFAT を介したサイトカイン産生を阻害することが知られており、今回の作用との関連に興味を持たれる。急性毒性症例報告として、大脳皮質白質のミエリン脱落、グリア細胞における caspase-3 発現が報告されており、オリゴデンドロサイトが毒性標的となる可能性も考えられる。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

本研究において、ヒト未分化細胞を用いて、化学物質の毒性評価の指標の探索を行い、ミトコンドリアにおける酸素消費量を新たに見いだした。この酸素消費量は細胞が死ななような nM オーダーの TBT による毒性が検出可能であり、非常に高感度であると考えられた。

金属属性の指標にはミトコンドリアの活性が有用であり、低コスト、スクリーニング性の高い毒性評価手法となる可能性がある。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

メタボローム解析および遺伝子発現解析の結果は、成人肝細胞がアミノ酸代謝の過程で細胞内に産生するアンモニアを主に尿素回路およびクレアチン経路により代謝する一方で、胎児肝細胞で尿素回路が機能しておらず、細胞内で産生するアンモニアを代謝できないことが示唆される。また、成人肝細胞で胎児肝細胞に比べ、クレアチン経路の下流の代謝産物である creatine, phosphocreatine がともに減少しているのは、成人肝細胞でこれらの代謝産物を排出する能力が高まっているためと考えられるが、詳細は不明である。

暴露実験の結果からは、今回使用した候補化合物のうち、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの 3 種の化合物は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の順に、IC₅₀ 値が上昇し、成人肝細胞から胎児肝細胞に向けて化合物に対する感受性が高くなることが示された。酢酸鉛 (II) 三水和物では、胎児肝細胞由来の 3 細胞間で変化はなく、成人肝細胞に比べ感受性が高くなった。all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムは、他の 4 種の化合物とは逆に成人肝細胞で最も感受性が高く、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の

スフェロイド培養も成人肝細胞と同程度の感受性を示した。以上の結果から、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物が胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

一般的に CYP の発現は新生児期において低いと考えられているが、本実験結果は、新生児期と乳児期において予期した以上の薬物動態関連遺伝子が、出生直後に発現している事を示す結果が得られた。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

本研究結果は、バルプロ酸の胎児期曝露が小脳と海馬において GABA 機能の早熟化をもたらしていることを示唆している。生後の早い時期に脳発達異常が検出されることは、化学物質の発達神経毒性の評価においては、非常に重要なことで、今後の試験法に組み込むべき価値のある発見である。また早熟化は、成熟した脳を用いても検出できないために、脳の成長期のこの時期に試験を行うことが重要である。

以上の各試験法の簡便さ、スループット、感度などの特徴に基づいて、周産期薬物動態関連因子の発現解析の結果も利用して、成長期の神経系または肝臓系の細胞機能において特有なリスクの可能性のある化学物質の体系的な健康影響評価法を枝分かれ図として示す (図 14)。

E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法は発生毒性メカニズムに基づいた化学物質の健康影響評価法として有用であると考えられる。

生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生評価法を用いて、鉛、およびサリチル酸の影響評価を行い、両化学物質が生後初期オリゴデンドロサイトの分化、遊走を阻害することを明らかとした。

ヒト未分化細胞の酸素消費量を指標として、発達神経毒性が懸念される化学物質の毒性を評価できる可能性が示唆された。

メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では尿素回路が機能し

ていないことを明らかにし、同回路の遺伝子発現解析によっても同様な結論を得た。化学物質曝露実験では、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化学物質が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

新生児期から成人の肝細胞を用い、薬物動態関連因子の発現について検討した。薬物動態関連遺伝子は新生児期の肝においてすでに発現していることを明らかにした。

胎児期に一回バルプロ酸に曝露されただけで、抑制性 GABA 機能が早期に成熟化することが明らかとなった。このことから、胎生期の化学物質への曝露の影響は、生後の抑制回路形成への影響評価で成長期の早い段階で評価できることが示唆された。

本研究における化学物質の健康影響評価法は、健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団の特定、および感受性の高い個体についても安全を確保できるような安全係数の実験データに基づく決定法の確立、等に寄与することが期待される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] K. Takahashi, R. Ishii-Nozawa, K. Takeuchi, K. Nakazawa, Y. Sekino, K. Sato, Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner . (Submitted) (C.A.)
- [2] Y. Shigemoto-Mogami, J.E. Goldman, Y. Sekino, K. Sato, Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. (submitted) (C.A.)
- [3] A. Oguchi-Katayama, A. Monma, Y. Sekino, Y. T. Moriguchi, K. Sato, Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. J Toxicol Sci (in press) (C.A.)
- [4] M. Kinoshita, K. Nasu-Tada, K. Fujishita, K. Sato, S. Koizumi, Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). Cell

- Mol Neurobiol 33 (1) (2013) 47-58.
- [5] J. Takaki, K. Fujimori, M. Miura, T. Suzuki, Y. Sekino, K. Sato, L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, (2012) (C.A.)
- [6] Y. Morizawa, K. Sato, J. Takaki, A. Kawasaki, K. Shibata, T. Suzuki, S. Ohta, S. Koizumi, Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 32 (6) (2012) 953-6.
- [7] F. Takata, S. Dohgu, A. Yamauchi, J. Matsumoto, T. Machida, K. Fujishita, K. Shibata, Y. Shinozaki, K. Sato, Y. Kataoka, S. Koizumi, In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. *PLoS ONE* 8 (1) (2013) e55166.
- [8] 最上 (重本) 由香里、佐藤 薫 (2012) ミクログリアの最近の話題 ～次々と明らかになるミクログリアの生理的新機能～*日薬理誌* 140: 216～220.
- [9] S. Yamada, Y. Kotake, Y. Sekino, Y. Kanda, AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* (in press).
- [10] Y. Kanda. Cardiac differentiation of human iPS cells. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 141 (2013) 32-6.
- [11] Y. Kanda. Cancer Stem Cells - Fact or Fiction? Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. *Science Publishers* (2013) 1-22.
- [12] Y. Ihara, Y. Kanda, M. Seo, Y. Watanabe, T. Akamizu, Y. Tanaka. cAMP blocking but growth stimulating antibody; as another predisposing factor of Graves' disease (GD) -analysis using monoclonal TSH receptor antibodies derived from patients with GD. *Endocrine J.* 59 (2012) 571-7.
- [13] T. Kuroda, S. Yasuda, S. Kusakawa, N. Hirata, Y. Kanda, K. Suzuki, M. Takahashi, S. Nishikawa, S. Kawamata, Y. Sato. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 7 (2012) e37342.
- [14] W. Lin, N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets* 13 (2012) 656-65.
- [15] Y. Kanda. Cigarette smoke and breast cancer stem cells. *Journal of Women's Health Care* 1 (2012) e104.
- [16] Y. Kanda. Isolation and characterization of cancer stem cells using flow cytometry (Chapter6, p107-124). *Clinical Flow Cytometry – Emerging Applications*, InTech (2012).
- [17] 諫田泰成、ヒト幹細胞を用いた医薬品の安全性評価、*ファルマシア*、48 (2012) 862-7.
- [18] K. Kato, T. Shirao, H. Yamazaki K. Imamura, Y. Sekino, Regulation of AMPA receptor recruitment by the action binding protein drebrin in cultured hippocampal neurons, *J.Neurosci. Neuroengineer.* 1 (2012) 153-160.
2. 学会発表
- [1] 宇佐見 誠, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 関野 祐子, 培養ラット胚におけるエタノールによる発生毒性のプロテオミクス解析. 第 52 回日本先天異常学会学術集会, 東京, 2012.
- [2] 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価系の可能性, 日本薬学会第 133 回年会シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築 –現状と課題そして期待–」(オーガナイザー, シンポジスト), 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [3] 最上 (重本) 由香里, 干川和枝, 三浦麻利衣, 関野祐子, 佐藤 薫: 神経細胞とグリア細胞 (アストロサイト・ミクログリア) が共存する新規 In Vitro 血液脳関門モデルの開発, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [4] 高橋華奈子, 最上 (重本) 由香里, 大津香苗, 岡田洋平, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の遺伝子発現プロファイリングの株間比較, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [5] 片山敦子, 門馬彰彦, 秋友孝文, 廣末 愛, 星裕姫乃, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫: バルプロ酸幼弱期暴露が情緒社会性に

- および影響を予測するマーカー遺伝子群の探索, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [6] 佐藤 薫, 片山敦子, 門馬彰彦, 守口 徹, 関野祐子: バルプロ酸を胎生期あるいは生後適用したラット扁桃体の遺伝子発現マイクロアレイ解析, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [7] 最上由香里, 大野泰雄, ジェームズ E ゴールドマン, 関野祐子, 佐藤 薫: ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生, オリゴデンドロサイト新生を促進する, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [8] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木武之: パロキセチンは P2X4 受容体活性化の抑制によりミクログリアの活性化を抑制する, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [9] 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価実現にむけた取り組み, スーパー特区フォーラム in 大阪 (講演) (2013, 1, 大阪)
- [10] 三浦麻利衣, 佐藤 薫, 鈴木武之: グリア型グルタミン酸トランスポーター機能に対し極長鎖脂肪酸が与える影響の検討, 第 6 回先端分子薬理研究会 (2012. 12, 東京)
- [11] 大和田智彦, 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 齊藤善彦, 岡 淳一郎, 中澤憲一, 関野祐子, 沙宇, 尾谷優子: タモキシフェンを基盤としたグルタミン酸トランスポーター阻害剤の開発, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2012. 11, 東京)
- [12] Fujimori, K., Takaki, J., Sato, K., Suzuki, T.: Paroxetine prevents the functional impairment of L-glutamate transporters in inflammation by microglial glutamate release, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [13] Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Igarashi, Y., Hirose, A., Sekino Y., Sato, K.: Effects of carbon nanotubes on: proliferation of neural stem cells and microglial viability, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [14] Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K.: Development of the epitope-tagged EAAT2 in *Xenopus* oocyte expression system, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [15] Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Otomo, Y., Imai, M., Akitomo, T., Takahashi, Y., Kato, F., Sekino, Y., Sato, K.: Search for genetic markers for risks in emotion and social interaction caused by exposure to chemical compounds in embryonic or neonatal periods, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [16] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The Clonal difference in response to L-glutamate and ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [17] 最上 (重本) 由香里, 関野祐子, 佐藤 薫: 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [18] 片山 敦子, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫: 幼弱期化学物質暴露による情緒社会性への影響の予測, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [19] 高橋華奈子, 入江智彦, 関野祐子, 佐藤 薫: グルタミン酸トランスポーター EAAT2 機能調節機構の解析ツールとしてのエピトープ標識 EAAT2 の開発, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [20] 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 齊藤善彦, 岡 淳一郎, 尾谷祐子, 謝宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦: タモキシフェンを基盤とした新規グルタミン酸トランスポーター阻害剤の開発, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [21] 里吉 寛, 眞嶋 悠幾, 井手 聡一郎, 佐藤 薫, 南 雅文: 胎生~新生期における鉛暴露が成熟後のラットの情動に及ぼす影響, 日本薬学北海道支部第 138 回例会 (2012. 6, 札幌市)
- [22] 佐藤 薫: iPS 細胞由来ニューロンの薬理的解析 平成 24 年度厚科研 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業公開シンポジウム in 前橋「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」(2012. 5, 前橋)
- [23] Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J., Suzuki, T., Sekino, Y.: Paroxetine Prevents the

- Functional Impairment of L-Glutamate Transporters in Inflammation by Modulating Microglial Glutamate Release. SfN 2012 (2012. 10) (New Orleans, USA)
- [24] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, Y., Sekino, Y.: The comparative study of the mRNA-expression of P2 receptors and glutamate receptors between neurons differentiated from 201B7 and 253G1 human induced pluripotent stem cell lines. the 11th biennial meeting of APSN and the 55th annual meeting of JSN (2012. 9, Kobe, Japan)
- [25] Sekino, Y., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, Y., Sato, K.: The clonal difference in response to ATP and L-Glutamate of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 11th biennial meeting of APSN and the 55th annual meeting of JSN (2012. 9, Kobe, Japan)
- [26] Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa K., Sekino, Y., Ohwada, T.: Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors, FENS meeting 2012 (2012.7, Barcelona, Spain)
- [27] Takahashi, Y., Katayama, A., Nagase, M., Moriguchi, T., Sato, K., Kato, F.: Electrophysiological and transcriptomic identification of the remote influence in the central amygdala following single postnatal administration of valproate in rats, FENS meeting 2012 (2012.7, Barcelona, Spain)
- [28] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The clonal difference in response to ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, ISSCR2012 (2012.6, Yokohama, Japan)
- [29] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The clonal difference in response to ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, Purine2012 (2012.5-6, Fukuoka, Japan).
- [30] 諫田泰成, 山田茂, 平田尚也, 関野祐子, Embryonic carcinoma 細胞の増殖に対するトリブチルスズの影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台, 2012.
- [31] 諫田泰成, 山田茂, 関野祐子, トリブチルスズ毒性に対するメタボローム解析の応用, 第 3 回メタロミクス研究フォーラム, 東京, 2012.
- [32] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, メタボロームを利用した有機スズ化合物による毒性機構の解析, 第 127 回薬理学会関東部会, 東京, 2012.
- [33] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, 金属毒性に対するメタボロームの応用, 第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 2012.
- [34] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, ヒト胎児性癌細胞の糖輸送に対する有機スズの影響, 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 2013.
- [35] S. Ishida, S.-R. Kim, T. Kubo, Y. Kuroda, M. Hojyo, A. Miyajima, T. Matsushita, Y. Sekino, The comprehensive analysis of the basal metabolic functions of human fetal and adult hepatocytes. 27th JSSX Annual Meeting in Chiba, 2012.
- [36] 田野崎 真、勝股 大樹、関野 祐子、福田 敦夫、吉田 祥子、過剰量の GABA は小脳発達に影響を及ぼす 第 35 回神経科学学会, 名古屋, 2012
- [37] Muramoto, H., Sekino, Y., Hozumi, N. Yoshida, S. Developing transition of ATP release to glutamate stimulation in rat cerebellar slices using a new ATP imaging system. 42th Society for Neuroscience New Orleans, Oct.13-17,2012
- [38] 笛田由紀子, 吉田祥子, 関野祐子, 自閉症モデルを用いた海馬の局所回路機能解析による発達神経毒性評価法の検討. 第 86 回日本産業衛生学会, 松山, 2013.
- [39] M. Sunouchi, K. Nakazawa, R. Kikura-Hanajiri, K. Kobayashi, H. Kojima, M. Usami, Age-dependent capability of drug metabolism in commercial available human hepatocytes. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2010.
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
諫田 泰成, メタロミクス研究会若手奨励賞受賞(2012年8月)

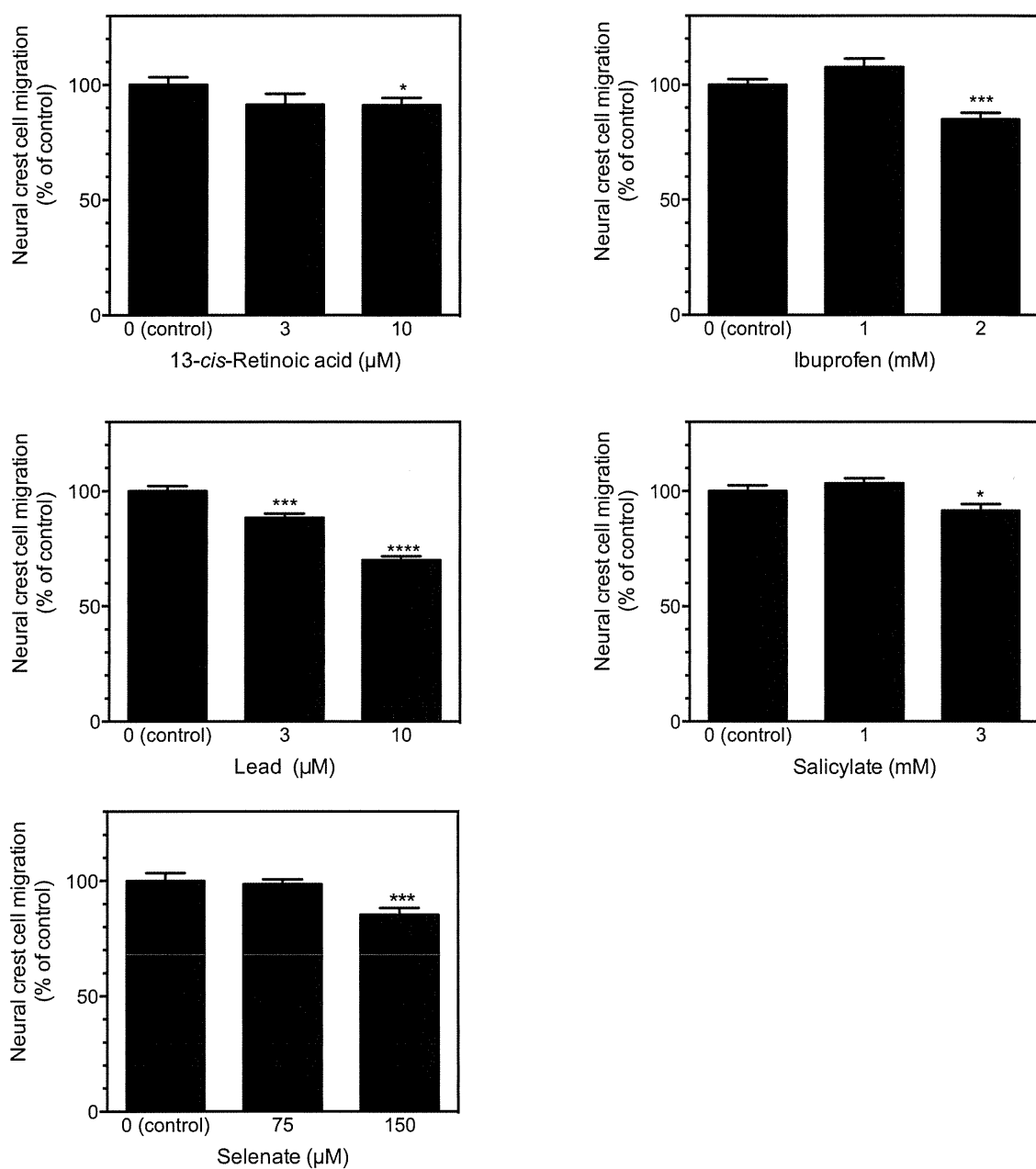


図1. ラット頭部神経堤細胞の遊走を阻害した発生毒性を有する化学物質
 平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があること
 を示す (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$)。

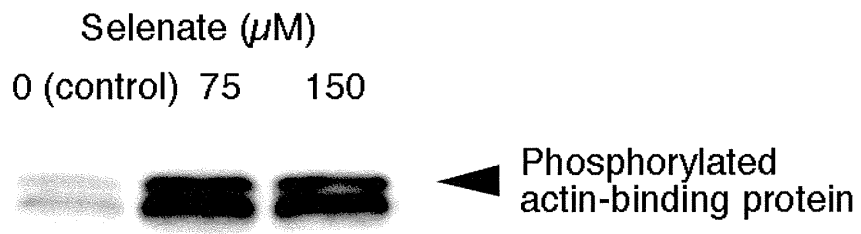


図2. セレン酸が神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウエスタンブロット解析

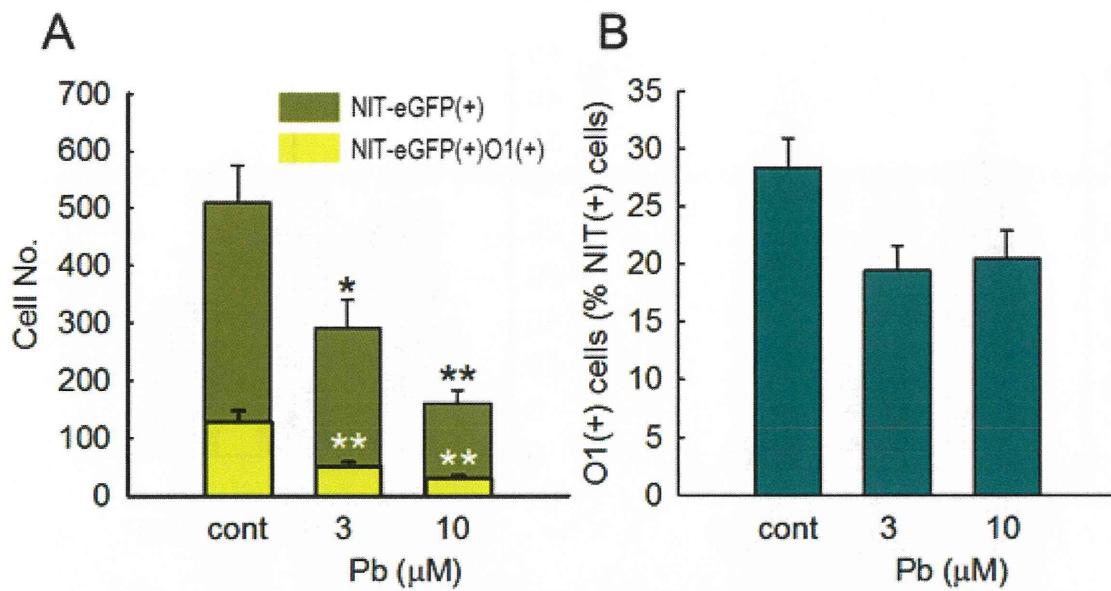


図3. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対する酢酸鉛の影響
 生後2日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯に NIT-eGFP ウィルスを滴下し酢酸鉛 (3, 10 mM) 存在下で3日間培養し、eGFP(+) および eGFP(+)O1(+) 細胞数を計測した (A)。酢酸鉛 (3, 10 mM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合を算出した (B)。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3, 10 mM とともに同程度減少していた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

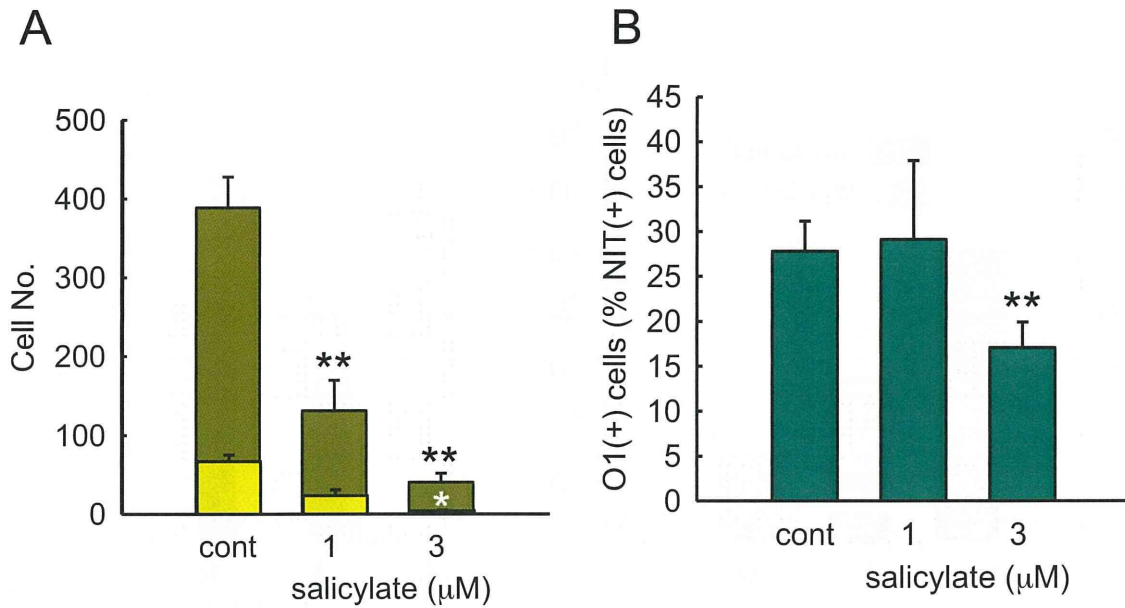


図4. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対するサリチル酸の影響
 生後2日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯にNIT-eGFP ウィルスを滴下しサリチル酸ナトリウム(1, 3 mM)存在下で3日間培養し、eGFP(+)およびeGFP(+)O1(+)細胞数を計測した(A)。サリチル酸(1, 3 mM)によりeGFP(+)細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+)細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+)細胞におけるO1(+)細胞の割合を算出した(B)。eGFP(+)細胞におけるO1(+)細胞の割合は3 mMで顕著に減少していた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

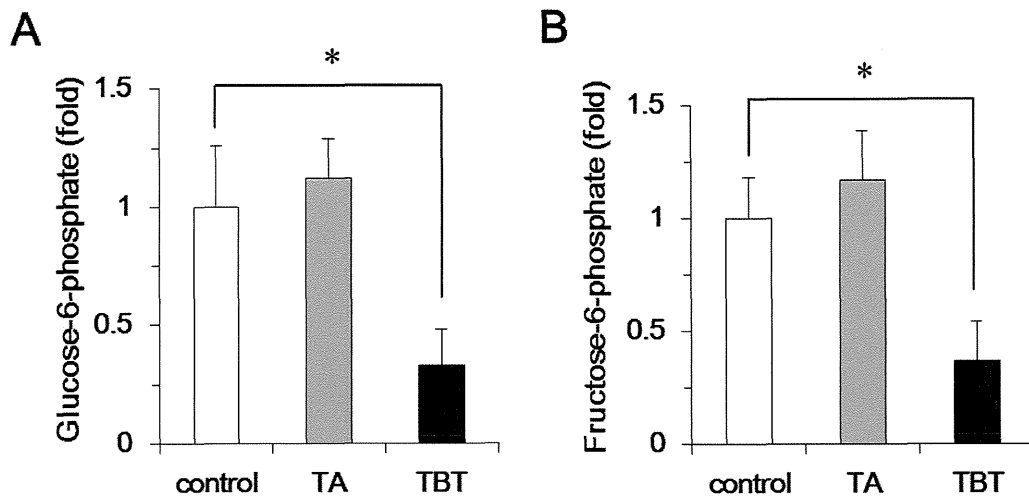
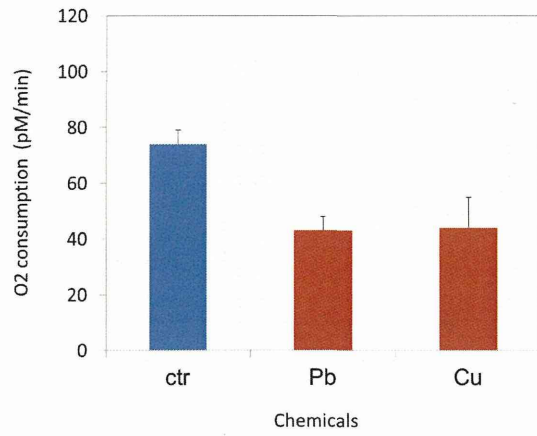
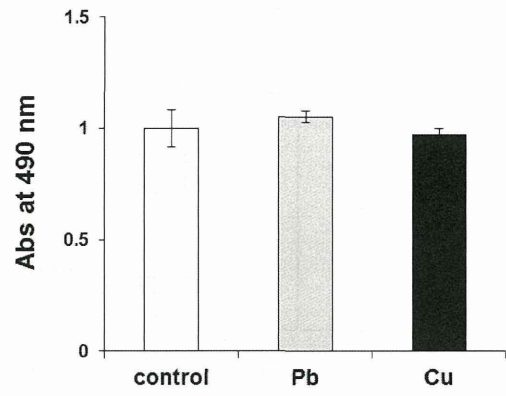


図 5. 解糖系の代謝産物に対する TBT 曝露の影響
 (A) TBT 曝露によるグルコース 6 リン酸量の低下
 (B) TBT 曝露によるフルクース 6 リン酸量の低下

A



B



C

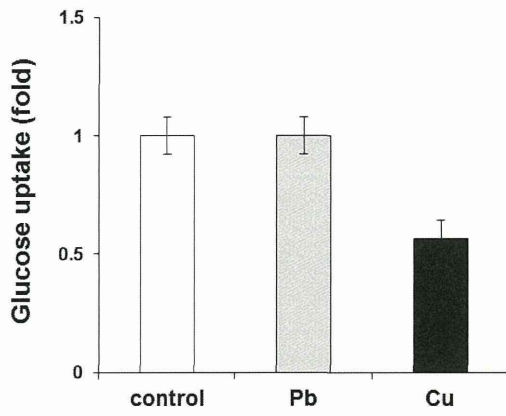


図6. 酸素消費量に対する銅と鉛の影響

(A) 酸素消費量に対する鉛および銅曝露 (1 μ M、24 時間) の影響。

(B) 生細胞数に対する鉛および銅曝露 (10 μ M、24 時間) の影響。

(C) 糖取込に対する鉛および銅曝露 (10 μ M、24 時間) の影響。