

かを調べることにした。CA1 錐体細胞への興奮性入力には CA3 錐体細胞の軸索であるシャーファー側枝の末端である。その末端からの興奮性グルタミン酸放出機構について調べた。伝達物質の放出機構の機能を測る一つの方法として、通常、70-100 ms 間隔でダブルパルスを与え、2 回目のシナプス応答が大きくなることを確認する。いわゆるシナプス促進が起こる度合いを調べるのである。本実験では、シナプス促進を調べるために、通常用いられている刺激間隔 70、100、200 ms を用いた。集合シナプス後電位と集合スパイク電位についての刺激応答性に関して、VPA の投与量による影響の違いがなかったことから、以下の解析については、対照群と VPA300 群とで比較した。図 4 9 には 70 ms 刺激間隔で行った 3 日間の結果を示した。70 ms のみでなく、100、200 ms いずれの刺激間隔においてもシナプス促進への VPA 曝露の影響は見られなかった。

樹状突起における興奮性シナプスの応答と細胞体における活動電位生成の関係、すなわち神経細胞に内在する興奮性の性質を示す指標を EPSP/Spike (E/S) potentiation という。Slope と PS の関係性について対照群と VPA300 群について調べた。図 5 0 に示すように、E/S potentiation を示す曲線の傾きに顕著な変化は見られなかった。

つぎに GABA が関与する抑制性神経回路機能を調べた。前述したように、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見るために 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 5 1 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。図 5 1 をみると観察した PND13 からすでに PS の比が小さいことが分かる。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。成熟したラット CA1 領域の PS ペア比は 0.5 程度であることから、VPA 曝露は海馬の神経回路の反回抑制の発達を早めている可能性がある。

D. 考察

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響を調べる実験系として、ラット神経堤細胞遊走実験系を確立した。この実験法は、タンパク発現の解析が可能であり、毒性発現機序に基づく評価法として有用であると考えられる。毒性発現機序を推定できるバイオマーカータンパクの同定などにより、将来的には神経堤幹細胞などの株化細胞におけるタンパク発現に及ぼす影響を調べることによる健康影響評価法への発展が期待できる。

神経堤細胞遊走阻害の作用機序としては、細胞の遊走への直接作用の他に、他の細胞における遊走の足場となる分子の合成阻害、走化性因子の合成・分泌阻害等が考えられる。本実験法では基本的には、細胞遊走への直接作用を検出する方法である。しかし、細胞遊走の解析法の検討において、移動量に対応する半径の差に比べて半径の比のバラツキが小さいことから、本実験法における細胞遊走は培養組織片の大きさに依存すると考えられる。この依存性は、神経管からの分泌物および遊出細胞数によると思われることから、本実験で検出される遊走阻害作用には、神経管を介した影響を含む可能性がある。

陽性対照物質として用いたオールトランス-レチノイン酸による遊走阻害は阻害率と対照群の移動距離から、平均 $54 \mu\text{m}$ と計算される。これは神経堤細胞 1 個の大きさ程度でしかないが、神経管からの遊走を直線距離として測定したものである。胚においては、遊走阻害による影響はより大きいと考えられる。いずれにしても、本実験法は $50 \mu\text{m}$ 程度の遊走阻害を検出できる感度を有し、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響を評価するために、十分な感度があると考えられる。

Rho シグナルパスウェイのキナーゼである ROCK の阻害剤及び活性化剤を用いた実験により、Rho シグナルパスウェイによるアクチン結合タンパクのリン酸化制御により、神経堤細胞の遊走が制御されていることが示された。このことから、本実験法において、Rho シグナルパスウェイにより制御される神経堤細胞の遊走を解析することが可能であると考えられる。しかし、ROCK の活性化によると予想されたレチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は ROCK 阻害剤による影響を受けなかったため、メカニズムを解析する方法の確立には、さらに検討が必要で

ある。

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

本研究で用いたレトロウイルスはマウス白血病レトロウイルスに eGFP tag を組み込んだものである。レトロウイルスは細胞に感染すると細胞分裂を起こしている核に組み込まれる性質があるため、SVZ を狙ってウイルスを注入/滴下することにより、SVZ 中の神経幹細胞および前駆細胞を特異的に標識することができる。本研究では培養前脳矢状面切片の神経幹細胞および前駆細胞を標識、培養後、オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーの発現を免疫組織化学的に検討することにより、オリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立した。オリゴデンドロサイト新生への影響評価系が求められる理由は、生後初期に生涯のほとんどのオリゴデンドロサイト新生が起こるため、この時期の異常が成長後におよぼす影響が甚大であることがあげられる。実際、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知られている。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。

AraC はピリミジン系抗がん剤の一種 (商品名: キロサイド) としても知られている。細胞分裂阻害剤として基礎研究でもよく使用されている。細胞分裂阻害のメカニズムは細胞内で迅速にシトシンアラビノシドトリ

フォスフェート (cytosine arabinoside triphosphate) に変換され、S 期の DNA にダメージを与えることである。また、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ を阻害することも知られている (The Chemotherapy source book Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 80, 2008)。AraC は予想通り、オリゴデンドロサイト分化および遊走も神経細胞阻害した。また、Prl を用いて培養前脳矢状面切片においてオリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であるかどうか検討した。妊娠中動物において神経新生が促進されることが知られているが、Prl がこの作用本体であることが明らかにされている (Science 299 (5603) 117-20, 2003)。我々は Prl がオリゴデンドロサイトの分化および遊走も神経細胞同様、促進することも見いだした。このように、すでに作用メカニズムの明らかな化学物質を用いて、eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系でオリゴデンドロサイト新生への正負両方向の影響を検出できることが確認された。

ラット前脳矢状面切片培養系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として FGFR1、PDGFR α を見いだした。FGFR1 は多発性硬化症においてオリゴデンドロサイト前駆細胞が活発にリクルーティングされるときにオリゴデンドロサイト前駆細胞に高発現している分子である (J Neurosci 31(42) 14899-14909, 2011)。また、多発性硬化症などのミエリン異常疾患においてオリゴデンドロサイト前駆細胞を移植する場合、PDGF α (+) 細胞を移植すると非常に遊走能が高く移植の効果が高いことが知られている (Nat Biotechnol 29 (10) 934-942, 2011)。今回、培養前脳矢状面切片において O1(+) 細胞はほぼ全てが FGFR1(+), PDGFR α (+) であった。FGFR1(+)/O1(+) 細胞数の減少曲線は新生オリゴデンドロサイト前駆細胞数の減少曲線に類似していたことから、FGFR1 はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を反映するマーカーとして有望であることが示唆された。一方、O1(+)/PDGF α (+) 細胞の減少曲線はオリゴデンドロサイト前駆細胞遊走の減少曲線と類似していたことから、PDGF α は

オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走を反映するマーカーとして有望であることが示唆された。

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 μM 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。オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養系で鉛によってオリゴデンドロサイトマーカーの発現が抑制されることが示されているが (Deng et al., *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 174(3):235-44)、我々の実験系からはむしろ、細胞増殖全般に対する負の作用である可能性が高いことが示唆される。オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走に対しても負の作用を持つことが示された。オリゴデンドロサイトによって形成されるミエリンに鉛が蓄積することが報告されている (Dabrowska-Bouta et al., *Food Chem Toxicol.* 2008 46(3):961-6)。このとき、ミエリンに蓄積した鉛により、細胞膜の流動性に変化が現れることも観察されている (Dabrowska-Bouta et al., *Exp Toxicol Pathol.* 2000 52(3):257-63)。今回の増殖、遊走阻害メカニズムに関連する可能性も考えられる。

これまで、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 (Aceves et al., *J Immunol* 2004 173(9):5721-9)、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 (Rauschka et al., *Neurotoxicology* 2007 28(1):33-7)、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。

現在、酢酸鉛、サリチル酸の FGFR1, PDGF α 発現への影響について検討しており、増殖、遊走のマーカー分子としての有用性について検証中である。

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が可能な指標をエネ

ギー代謝の観点から探索した。その結果、種々の金属毒性のマーカーとして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いうような nM オーダーの TBT や μM オーダーの鉛、銅による毒性が検出可能であることから、非常に高感度であることが明らかになった。

酸素は電子伝達系・酸化リン酸化に使用されるため、酸素消費速度や消費量を指標とすることにより、ミトコンドリア活性の解析が可能である。本研究において金属属性の指標にはミトコンドリアの活性が有用であることを明らかにしたが、現時点において酸素消費量の解析装置は非常に高額であり、簡単に測定可能なデバイスの開発も必要である。ミトコンドリア機能のマーカーとしては、今回明らかにした酸素消費以外にもミトコンドリア特異的な遺伝子発現など様々な評価指標が知られている。今後、最も簡便で高感度、低コスト、高いスクリーニング性の手法に発展させることが期待される。

ヒト NT2/D1 細胞株はレチノイン酸によって神経細胞に分化が可能であり、我々も β III チューブリンなどの発現誘導を確認している。TBT や鉛などは未分化の細胞に加えて、神経分化能に影響を与える可能性も考えられる。また、ヒト iPS 細胞は NT2/D1 細胞よりも未分化であり、各胚様体や各種機能細胞への分化誘導法が確立されているため、TBT や鉛などが同じような毒性を誘導するのか興味深い。今のところ、このような分化誘導技術を基盤とした毒性評価の可能性についてほとんど明らかになっておらず、今後検討すべき課題である。

日本ではまだ発達神経毒性ガイドラインが未整備である。今回見いだした評価技術を基盤として、既存の OECD や EPA の発達神経毒性ガイドラインを補完できるような in vitro 評価系に発展させていきたい。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、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、ヒト胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より分化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

養および成人肝細胞の単層培養の4種の *in vitro* 培養系に対するメタボローム解析を行った。

ヒト胎児肝細胞の単層培養、並びに、それより分化誘導した肝芽細胞の単層培養とスフェロイド培養を行い、各培養条件での細胞の CYP3A4 活性を測定したところ、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の順に活性が増大し、成人肝細胞に近づくことが示された。また、成人肝細胞は、3ドナー分の非凍結初代培養細胞を入手し、胎児肝細胞由来の3種の細胞とともにメタボローム解析に用いるサンプルを調製した。

メタボローム解析により検出された217の化合物の主成分分析では、第1主成分による群分けで、胎児肝細胞由来の3種の細胞が成人肝細胞とは分けられたが、非常に近傍にプロットされていた (data not shown)。また、成人肝細胞由来のサンプルはサンプル間でばらつきが大きく、由来するドナーの個人差を反映すると考えられた。階層的クラスタリング解析では、成人肝細胞が胎児肝細胞の単層培養と類似性が高いことが示唆された。そこで、胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞の2群間の比較、胎児肝細胞に由来する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の3群間の比較を行った。

胎児肝細胞と成人肝細胞間の比較では、47の化合物の変動が確認され、そのうち31化合物が成人肝細胞で増加し、16化合物が減少していた。変動率の大きかった上位十位までには、ornithine (46.9-fold, $p=0.001$), urea (7.7-fold, $p=0.029$), guanidoacetic acid (6.4-fold, $p=0.0007$)の「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」に属する3化合物、Cys (22.2-fold, $p=0.0004$), glycerophosphocholine (13.1-fold, $p=0.01$), glycerol 3-phosphate (13.1-fold, $p=0.0004$)の「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」に属する3化合物が、下位十位までには、 β -Ala (0.03-fold, $p=0.008$), O-acetylcarnitine (0.11-fold, $p=0.021$), carnitine (0.19-fold, $p=0.029$)の「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」に属する3化合物が含まれていた。

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。尿素回路の各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ところ、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。これらの結果は、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。

エネルギー代謝に関連する代謝物では、TCA 回路の中間代謝物である、fumaric acid (4.03-fold, $p=0.014$), 2-oxoglutaric acid (3.36-fold, $p=0.02$), malic acid (2.89-fold, $p=0.034$), succinic acid (2.56-fold, $p=0.034$)などが、解糖系/糖新生の中間代謝物である glucose 6-phosphate (2.48-fold, $p=0.042$)とともに増加していた。一方、脂肪酸の β -酸化に関与する代謝物のうち、diacylglycerol, triacylglycerol の合成に必要とされる glycerol 3-phosphate (13.12-fold, $p=0.0004$)は成人肝細胞で増加し、脂肪酸の細胞質からミトコンドリアへの運搬に必要とされる carnitine (0.19-fold, $p=0.029$), O-acetylcarnitine (0.11-fold, $p=0.021$)は減少していた。このことは、成人肝細胞では脂肪酸の酸化によりエネルギーを産生するよりも脂肪を蓄える方向に反応が進んでいると考えられる。また、成人肝細胞での解糖系/糖新生から TCA 回路に至る経路の代謝物の増加も糖新生による余剰エネルギーの保存が、グリコーゲン合

成という成人肝細胞の特徴を表しているものと思われる。

胎児肝臓では、成人肝臓に比べ化学物質代謝の第Ⅱ相反応のうち、グルクロン酸抱合能が低いことが知られている。今回の測定結果でも、glucuronic acidの相対的存在量が成人肝細胞で高く(1.87-fold, $p=0.041$)、胎児肝細胞においてはグルクロン酸抱合能が低いことが示唆された。この胎児肝細胞における代謝産物のプロファイルは、胎児期の肝機能を反映しているものと思われる。

次に、化学物質代謝の第Ⅱ相反応の一つであるグルタチオンの生合成経路では、Cysの相対的存在量が胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で増加していた(22.2-fold, $p=0.0004$)。Cysからは、 γ -glutamylcysteine synthetase と glutathione synthetase により γ -Glu-Cys, glutathione が合成されるが、これらの代謝産物は、成人肝細胞で減少傾向にあった。一方、2-aminobutyrate (2-AB)は、成人肝細胞で増加傾向(2.2-fold, $p=0.238$)であったが、Cysと同様な代謝を受け 2-AB より生成される γ -Glu-2-AB, ophthalmic acid は、成人肝細胞でのみ検出され、胎児肝細胞では検出されなかった(図32)。Glutathione の生合成経路では、生成された glutathione が γ -glutamylcysteine synthetase をフィードバック阻害することにより、glutathione の生成量を調節していることが知られている。成人肝細胞では、生成された glutathione が消費されることにより、 γ -glutamylcysteine synthetase に対するフィードバック阻害が起こらず、2-AB から γ -Glu-2-AB を経て ophthalmic acid が生成される一方、胎児肝細胞では、生成された glutathione により γ -glutamylcysteine synthetase が阻害され、同酵素により生成される、 γ -Glu-2-AB、さらには下流の ophthalmic acid が検出されないことが考えられる(図32)。これらの結果は、glutathione 抱合により代謝される薬物の胎児肝臓での動態を研究するうえで重要な知見となりうる。

胎児肝細胞に由来する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の3群間の比較では、細胞の分化誘導に従って増加する化合物として「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」(11化合物)および「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」(11化合物)、「アミノ酸代謝

(Asp, Ala, Lys)」(9化合物)、「その他の糖代謝」(8化合物)、「プリン代謝、ピリミジン代謝」(8化合物)などの代謝経路に属する化合物が分類され、逆に減少する化合物として「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」(8化合物)および「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」(8化合物)の代謝経路に属する化合物が分類された。これらの胎児肝細胞の分化誘導による代謝物プロファイルの変化は、必ずしも成人肝細胞の代謝物プロファイルを反映しておらず、肝細胞分化の途上の細胞と成熟肝細胞では隔たりがあることが推察された。

本研究は、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おり、その端緒として胎児肝細胞と成人肝細胞間の代謝機能の差異をメタボローム解析によって明らかにしてきた。この結果を踏まえ、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察される化合物による暴露実験を行った。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、 IC_{50} 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。

今後、今回得られた知見をもとに胎児肝臓に対して毒性を示しやすい化合物を暴露した細胞のメタボローム解析を進めることが必要と考えられる。また、本研究で得られた結果は、個体の成長期における化合物の毒性発現メカニズムを明らかにするとともに、化学物質の健康影響評価法を確立するうえで重要な知見となることが考えられる。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

妊娠後期に相当する肝細胞では、細胞の形態および非実質細胞の混在が多細胞の調整法の検討が必要であると考えられた。

ヒト肝において CYP1A および CYP1B1 の酵素活性とタンパク、および mRNA の発現は極めて低いことが知られている。同様に幼若期のドナーに由来するヒト肝細胞においても CYP1 分子種の発現は低いものの、CYP1 mRNA は LNR 曝露により強く誘導された。特に CYP1A1 mRNA に対する誘導効果が顕著 (75 μ M で、587 倍) であることから、幼若期のヒト肝細胞は、CYP1 分子種特に CYP1A1 を強く誘導する能力を有することが示された。一方、生体内基質の代謝に関与することが知られている CYP1A2 も LNR により強く誘導されている (CYP1A1 > CYP1B1 \cong CYP1A2)。これらの結果から、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝酵の誘導を考慮する必要があると考えられた。

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. 成長期の大脳辺縁系回路機能解析

本研究において、遊離 GABA を可視化する方法と、ダブルパルス刺激を用いて反回抑制を調べる方法により、GABA 機能の生後発達が簡便に再現性高く評価できることが判明した。一方、膜電位変化を可視化する方法では、生後変化に関する実験が行えなかったために、その有用性を検証することはできなかった。最終年度は、遊離 GABA を可視化する方法と、ダブルパルス刺激を用いて反回抑制を調べる方法を用いて、バルプロ酸の胎児期曝露の生後脳発達にもたらす影響を評価した。

GABA 機能の正常な発達は脳機能発達に重要な過程である。特に脳においては興奮性シナプスよりも抑制性シナプスの機能はそれに遅れて発達する。生後の脳の経験に対する特別な感受性の高さは GABA による抑制系の発達とともに終了することが、近年神経科学により明らかにされた。したがって、GABA 機能の生後発達は、神経毒性評価において重要な指標である。化学物質の安全性を

評価する試験法は、新しい科学的知見により随時見直しされるべきであり、今後の試験法に GABA 抑制の生後発達を発達指標として取り入れることを提案する。

胎児期における化学物質への曝露が仔の脳の成長にもたらす影響は、生後発達中の小脳皮質からの GABA の遊離量と、海馬の興奮性シナプスと反回抑制を調べることで予測できることが示唆された。化学物質の脳の発達への影響を調べるたまた、脳スライス標本を用いる、一匹の仔ラットから数枚の実験を行うことが出来る。化学物質の生後の脳の発達への影響を調べる実験において、成長期の仔の脳から作成するスライス標本をもちいて、GABA 機能を指標とした試験法を開発すると、①仔が成熟するまで待たずに試験が出来る。②1 個体から数例のデータが取得出来る。このように、本研究で示した実験法には、現行の発達神経毒性試験法 (TG426) の問題点を解決する可能性があることを示している。

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。

小脳

生後 4 日～6 日の発達期の小脳皮質から観察される GABA 遊離は、トランスポータタンパク質を介したグリア細胞由来である。生後 7 日にはこれが消失し、神経細胞由来の GABA 放出に転換する。脳の発達期にグリア細胞から遊離される GABA は、抑制性伝達物質としての機能よりも神経細胞の増殖と成熟に重要とされている。生体外からの GABA の投与、または GABA 受容体阻害剤による GABA 抑制が、神経細胞数の変化や神経回路の変成をもたらすことがすでに報告されている。さらにグリア細胞に由来する GABA 遊離は神経活動の開始によって減少し、発達期の小脳における GABA の役割が変化する。すなわち、生後 7 日以降に細胞外に遊離される GABA は抑制性神経伝達物質を産生する GABA 神経細胞の機能発達を反

映している。幼若期の神経細胞、および障害を受けた神経細胞では GABA が興奮性伝達物質として働いて神経回路の形成と修復を促すことが知られている。このように細胞外に遊離される GABA の濃度と機能変化は、興奮と抑制のバランスを取りながら、神経回路の形成のために綿密にプログラムされている。

今回の実験のように、外来性の薬物によって発達期の小脳における GABA 遊離パターンが変化することは、過興奮または過抑制をもたらす、小脳の神経回路の分化に影響をもたらすことは確実である。

海馬

海馬に関しては、VPA 曝露の影響が PND15 にのみ興奮性機能への影響がみとめられた。CA1 領域は反回抑制を調べるのに適したシンプルな基本構築をしている (図 5 2)。CA1 領域には、主細胞である錐体細胞とその興奮をコントロールする GABA 性の抑制性神経細胞が存在する。CA1 錐体細胞の軸索は、大脳皮質に行くメインのルートのほか、近隣の GABA 性介在神経細胞に側枝を伸ばして興奮性シナプスを形成している。GABA 性介在神経細胞の軸索は、CA1 錐体細胞に抑制性シナプスを形成している。このような基本構築において、ひとたび錐体細胞に活動電位が発生すると、側枝を伝導した活動電位が軸索末端に到達し、グルタミンを放出することによって GABA 抑制性神経細胞の膜電位を浅くし、閾値を小さくする。GABA 抑制性神経細胞の膜電位が閾値に達して活動電位が発生すると、今度は錐体細胞軸索丘に向かって伸びた軸索を活動電位が伝導し、軸索末端から抑制性シナプス伝達物質 GABA を錐体細胞に放出する。錐体細胞軸索丘に存在する GABA 受容体が活性化すると、CA1 錐体細胞の膜電位を過分極によって深くし、その結果、興奮の閾値が相対的にあがり、錐体細胞が活動電位を発生しにくくなる。このようにして、CA1 領域の興奮性神経細胞は自分自身の過剰な興奮を防ぐため、フィードバック抑制を使うことによって制御しているのである。

興奮性機能に関して、VPA 曝露の影響が PND15 にのみ見られた。CA1 錐体細胞の興奮性は、CA3 錐体細胞の軸索末端の機能亢進ではなく、CA1 錐体細胞樹状突起に局在するグルタミン酸受容体の機能亢進、あるいは、

活動電位発生機構である Na チャネルの機能亢進の可能性が残った。このように興奮系機能には PND15 において VPA 投与による有意な亢進が認められた。この機能亢進がその後の発育で対照群レベルに回復するのか、あるいは亢進した状態で成長していくのかは不明である。海馬においては、抑制性 GABA 機能と興奮性機能ともに VPA によって機能が亢進し、対照群よりも adult-like に近づいた(発達が早まった)こと、抑制性 GABA 機能亢進のほうが興奮系の機能亢進よりも早期に見られたことなど、海馬スライスを用いての簡便なダブルパルス刺激での応答解析は、神経発達毒性を評価する上で有用である可能性が示唆された。

今回用いたラットは 3 群各週齢で 3-7 匹である。1 匹から 6 枚程度の海馬スライスを作成することができるので、実験群は計 9 群にもかかわらず動物数は合計 39 匹という結果となったことから、動物数の削減に効果的な手法であることも示すことができた。

授乳期(生後 3 週間以内)において観察される抑制機能発達の亢進は、産業化学物質である 1-ブロモプロパンでも観察されている。この指標が他の化学物質に対しても有用であるかどうか、汎用性を調べる必要があると思われる。

統合失調症や自閉症が興奮と抑制のアンバランスにより生ずることが近年明らかになり、GABA 機能の生後発達を検証することは、生後の比較的早い時期に成熟後の行動異常を予測するために重要な発達指標である。インビトロ評価系により、生後の早い時期に GABA 機能の生後発達の異常が検出できれば OECD (TG426) で提案されている発達神経毒性試験の実験項目と比較すると、試験期間が大幅に短縮され、使用動物数が大幅に削減されることが期待される。

発生神経毒性試験における発達指標として、生後の GABA 機能変化を定量的に捉えるインビトロ実験として、脳スライス標本を用いる複数の評価方法を比較検討し、簡便性、定量性、実験者ごとのデータの再現性について考察すると、以下ようになる。

関野らが行った膜電位変化を可視化する実験方法は簡便ではあるが、実験系が高価であることが多施設での実験によるバリデーションにおいて障害となる可能性がある。またその他の問題として、過分極応答のパター

ンが刺激の強さに依存するため、生後発達に伴う抑制応答の空間パターンの変化を比較する際に実験者ごとのデータのばらつきが大きくなる可能性がある。この方法により大脳辺縁系の抑制性回路の成熟を比較評価するためには、パラメータを決定するまでに今後いくつかの条件検討が必要である。たとえば、興奮/抑制バランスの比をとる、薬物に対する反応性を見るなど、多施設間の試験を可能とする定量化パラメータを検討することが優先的課題である。

吉田らが開発した、脳組織から遊離する GABA を可視化してその分布を調べる方法は、ガラスへの酵素の担持に熟練を要し、感度の良い CCD カメラを必要とするが膜電位変化のイメージング法に比べれば安価であり、すでに設備の整っている実験室も多いことから多施設間比較は可能である。実験そのものは非常に簡便であり再現性も高い。さらに、脳の成熟ともなっていて起こる遊離部位の変化は、扁桃体でも小脳でも非常に大きいため、遊離の空間パターン変化が各脳部位で起こる時期を調べることは、発達指標として非常に有望である。吉田らは、小脳スライスを用いて VPA を母体に投与する予備実験を行ったところ、小脳において GABA の機能発達が早まっていることが示唆されている。神経毒性の評価系としての有用性が期待できる。

笹田らが行っている海馬スライスのダブルパルスによる反回抑制を定量化する方法は、他の電気生理学的手法に比べると数段修得率の高い方法である。

笹田らの研究によると、反回抑制を評価する方法は簡便であり、生後発達変化が明確であり、かつ定量性が高いと言える。成熟した脳のネットワークで説明すると、例えば興奮性ニューロンのインパルスが抑制性ニューロンへのシナプスに伝わり、抑制性ニューロンが活性化することによってその軸索終末部から興奮性ニューロンへ GABA を放出するという回路である。つまり、興奮性ニューロンが自らの興奮によって周辺に存在する GABA ニューロンを活性化して、興奮性ニューロン自身の興奮が過剰にならないように自己制御するというニューロンが正常に機能して続けるための戦略的回路ともいえる。比の大きさが 1 に近ければダブルパルスによって誘発された応答が独立であることを

意味する。すなわち反回抑制の効果は非常に小さいか無いに等しいと解釈される。比が 1 より小さいほど、2 回目の刺激で誘発された応答は 1 回目の応答と比較して小さく、反回抑制が強いという解釈が成り立つ。この応答の比に本当に GABA 系の活性化が関与しているかどうかは、GABA_A 受容体の拮抗薬であるビククリンで比が大きくなること、逆に作用薬たとえばフェノバルビタールなどで比が小さくなることが観察される必要がある。今回の結果では、反回抑制が成長とともにどのように変化するのかに注目しており、2 週齢で比が大きくなった要因や関連する受容体については確認するに至っていない。また、2 つの刺激の時間間隔は重要である。反回抑制の評価に使われる時間間隔は 5~10 ミリ秒が多い。これは数秒かかるシナプス伝達を 2 回経ているためである。10 秒より長い刺激間隔たとえば 20 ミリ秒や 50 ミリ秒くらいになると反回抑制の持続時間すなわち GABA シナプス間隙における GABA の滞在確率を反映すると考えられる。このように、同じ大きさの電気刺激を適当な間隔で 2 回与えるというシンプルな方法で反回抑制が評価できるのである。今回の結果から GABA 系がどのように関与しているのかさらに検討していくための有力な情報を得たと考える。

7. 体系的な健康影響評価法

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 5 3)。

E. 結論

ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす化学物質の影響を調べるための簡便な実験法を確立した。ラット神経堤細胞遊走実験法において、Rho シグナルパスウェイにより制御されるアクチン結合タンパクのリン酸化を介した神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を解析することが可能である。レチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用などにおけるメカニズムの解析法の確立にはさらに検討が必要である。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に化学物質が及ぼす影響について薬理的に検討可能な *in vitro* 評価系 (=eGFP 標識神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系) を確立し、鉛、およびサリチル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。オリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカーとして、FGFR1、PDGFR α を見いだした。

ヒト未分化細胞における酸素消費量を指標として、化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

ヒト胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より分化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、および、成人肝細胞の単層培養の4種の *in vitro* 培養系について、メタボローム解析を行い、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を明らかにした。特に、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、同回路を構成する酵素遺伝子の発現解析によっても同様な結論を得た。また、エネルギー代謝や化学物質代謝の第II相反応においても、胎児および成人肝細胞間で差異があることを明らかにした。化合物暴露実験では、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種の化合物が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことを明らかにした。

成長期および成熟期ヒト肝細胞の薬物代謝酵素系の特性調査、成長期ヒト肝細胞の収集並びに遺伝子解析サンプルの調製法を検討した。CYP1の誘導剤への暴露により、幼若期ヒト肝細胞において薬物代謝酵素のCYP1ファミリーが強く発現誘導されたことから、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝酵の誘導を考慮する必要があると考えられた。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。

抑制性神経回路機能をインビトロ実験で調べる手法は、化学物質の成長期における神

経系への影響の評価系として現在利用可能な方法としては簡便な方法である。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] Usami M., and K. Mitsunaga. 2011. Proteomic analysis and *in vitro* developmental toxicity tests for mechanism-based safety evaluation of chemicals. *Expert Rev Proteomics* 8: 2. 153-155.
- [2] Usami M., K. Mitsunaga, A. Miyajima, M. Sunouchi, and O. Doi. 2010. Complement component C3 functions as an embryotrophic factor in early postimplantation rat embryos. *Int J Dev Biol* 54: 8/9. 1229-1239.
- [3] Takahashi K., R. Ishii-Nozawa, K. Takeuchi, K. Nakazawa, K. Sato. 2010. Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. *J Pharmacol Sci* 112, 113-117.
- [4] Hirata N., Y. Sekino, and Y. Kanda. 2010. Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403:138-143.
- [5] Kikura-Hanajiri R, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, and Y. Goda. 2010. Determination of a new designer drug, N-hydroxy-3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in rats using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 98(1-3):62-9.
- [6] M. Tanaka, T. Nagai, M. Usami, K. Hasui, S. Takao, T. Matsuyama, Phenotypic and

- functional profiles of CRIG (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. *Innate Immunity*. 18 (2012) 258-67.
- [7] K. Sato, J. Kuriwaki, K. Takahashi, Y. Saito, J. Oka, Y. Otani, Y. Sha, K. Nakazawa, Y. Sekino, T. Ohwada, Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci*. 3 (2012) 105-113 (C.A.)
- [8] 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* (in press)
- [9] 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* (in press)
- [10] 佐藤 薫, グリア型グルタミン酸トランスポーター, *日薬理誌*. 138 (2011) 127.
- [11] Y. Kanda, T. Hinata, S.W. Kang S.W., Y. Watanabe. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 89 (2011) 250-258.
- [12] W. Lin, N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets* (in press).
- [13] R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda, Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 400 (2011) 153-155.
- [14] 簾内桃子, トキシコキネティクス, 代謝試験の実験手法. 最新動物実験代替法の技法ノウハウ. 小島 肇監修 (2011) pp 262-270 (東京)
- [15] 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.)
- [16] Y. Shigemoto-Mogami, J.E. Goldman, Y. Sekino, K. Sato, Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. (submitted) (C.A.)
- [17] 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.)
- [18] 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.
- [19] 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.)
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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).
- [24] Y. Kanda. Cardiac differentiation of human iPS cells. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 141 (2013) 32-6.
- [25] Y. Kanda. Cancer Stem Cells - Fact or Fiction? Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. *Science*

Publishers (2013) 1-22.

- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Y. Kanda. Cigarette smoke and breast cancer stem cells. *Journal of Women's Health Care* 1 (2012) e104.
- [30] Y. Kanda. Isolation and characterization of cancer stem cells using flow cytometry (Chapter6, p107-124). *Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications*, InTech (2012).
- [31] 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.
- [32] 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] Miyajima-Tabata A., M. Nakajima, K. Mitsunaga, M. Sunouchi, O. Doi, Y. Sekino, and M. Usami. 2010. Proteomic approach to embryotoxic mechanisms of indium in cultured rat embryos. XII International Congress of Toxicology, Barcelona.
- [2] 宇佐見 誠, 満長 克祥, 宮島 敦子, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. 培養ラット胚における胚本体および卵黄囊膜のプロテオーム解析. 第 55 回日本先天異常学会学術集会, 淡路島.
- [3] 宇佐見 誠, 宮島 敦子, 満長 克祥, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. ラット着床胚におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのチャージバリエーション発現に関する研究. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 宜野湾.
- [4] Miyajima-Tabata A., M. Sunouchi, K. Mitsunaga, Y. Yamakoshi, K. Nakazawa, and M. Usami. 2010. Sexing of early postimplantation rat embryos by amplification of *Sry* gene in stored 2-DE samples for developmental toxicity studies. The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City.
- [5] 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, 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誘導する *Neuro2010* (2010. 9, 神戸市)
- [6] 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節 *Neuro2010* (2010. 9, 神戸市)
- [7] 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, 生後初期脳におけるミクログリアの役割 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
- [8] 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
- [9] 佐藤 薫, 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
- [10] 高木 淳平, 佐藤 薫, 鈴木 岳之, パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
- [11] 佐藤 薫, James E Goldman, 関野 祐子, 生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築、日本薬学会第 132 回年会 (2011. 3, 静岡市)
- [12] Kanda Y., N. Hirata, W. Lin, Y. Sekino.

- TGF β -induced stem cell phenotype in breast cancer cells. Keystone Symposia (A8), Vancouver, British Columbia, Canada, 2011.01.21-26.
- [13] 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：乳癌細胞に含まれる癌幹細胞の割合に対するニコチンの影響、第10回再生医療学会、東京、2011.03.01-02
- [14] 平田尚也、林和花、関野祐子、諫田泰成：MCF-7細胞における乳癌幹細胞に対するエストロゲンの影響、第84回日本薬理学会、誌上開催、2011.03.22-24
- [15] Hori T., T. Kubo, A. Miyajima, M. Sunouchi, K. Nakazawa, Y. Sekino, S. Ozawa, F. More, A. Corlu, and S. Ishida. Effects of a newly developed 3D-cell culture vessel on drug metabolism-related gene expressions in HepaRG cells, 第25回日本薬物動態学会年会(2010,10)
- [16] 石田誠一. 医薬品の安全性・毒性研究への幹細胞の応用 — ガイドライン案作成への取り組み、日本動物実験代替法学会、第23回大会(2010,12)
- [17] Sunouchi M., A. Miyajima, R. Hanajiri, Y. Gouda. O- and N-Demethylation of Levomethorphan by human cytochrome P450 enzymes. (2011.03.06-10; The 50th Annual Meeting of Society of Toxicology, Washington D.C.)
- [18] 宮島敦子, 酒井恵子, 河上強志, 加藤玲子, 松岡厚子, 尾崎正康, 宇佐見誠, 伊佐間和郎, A549細胞を用いたナノマテリアルの*in vitro*生体影響評価系の検討. 日本薬学会第132年会, 札幌, 2012.
- [19] 宇佐見誠, 満長克祥, 宮島敦子, 簾内桃子, 関野祐子, 化学物質の発生毒性評価のための簡便なラット神経堤細胞遊走試験法の検討. 第51回日本先天異常学会学術集会, 東京, 2011.
- [20] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤薫, 鈴木岳之, 炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 東京, 2011.
- [21] 佐藤薫, 高木淳平, 藤森康希, 鈴木岳之, 関野祐子, パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する. 第34回日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [22] 鈴木岳之, 高木淳平, 藤森康希, 佐藤薫, 炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [23] 最上(重本)由香里, 関野祐子, 大野泰雄, 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34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [24] 片山(小口)敦子, 門間彰彦, 大友ゆき, 守口徹, 関野祐子, 佐藤薫, 胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [25] 高橋由香里, 永瀬将志, 落合敏平, 安井豊, 中尾彩乃, 渡部文子, 高木聡, 佐藤優, 奥津浩也, 守口徹, 佐藤薫, 加藤総夫. 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法. 第34回日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [26] 中誠則, 真嶋悠幾, 井手総一郎, 佐藤薫, 南雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.
- [27] 真嶋悠幾, 中誠則, 井手総一郎, 佐藤薫, 南雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第62回日本薬理学会北部会, 仙台市, 2011.
- [28] 佐藤薫, iPS細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング. 平成23年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒトiPS細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 東京, 2012.
- [29] 佐藤薫, 最上由香里, 関野祐子, 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性. 日本薬学会第132回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」. 札幌市, 2012.
- [30] 高橋華奈子, 最上(重本)由香里, 岡田洋平, 大津香苗, 福角勇人, 正礼智子, 金

- 村米博, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫, ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [31] 最上(重本) 由香里, 藤森 康希, 五十嵐 良明, 広瀬 明彦, 関野 祐子, 佐藤 薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [32] 片山敦子, 門馬彰彦, 大友ゆき, 今井美鈴, 秋友孝文, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫, 胎生~新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [33] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳志, 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [34] 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善郎, 岡淳一郎, 尾谷優子, 沙宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦, エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見, 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [35] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ. ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece, 2011.
- [36] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ. ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology, Ljubljana, Slovenia, 2011.
- [37] K. Sato, J. Takaki, K. Fujimori, T. Suzuki, Y. Sekino, Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication. Washington D.C., USA, 2011.
- [38] 諫田 泰成, 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, Effects of sex hormones on proliferation of breast cancer stem cell. 第 9 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2011.
- [39] 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [40] 李 敏, 黒川 洵子, 諫田 泰成, 関野 祐子, 古川 哲史, Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [41] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingosine-1-phosphate mediates proliferation of breast cancer stem cells, FASEB summer conference, 2011.
- [42] 諫田 泰成, 平田 尚也, 関野 祐子, 乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸の作用, 第 34 回分子生物学会, 横浜, 2011.
- [43] M. Li, J. Kurokawa, Y. Kanda, S. Toyama, M. Murata, Y. Sekino, K. Fukuda, T. Furukawa Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, The 1st HD physiology international symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics, Tokyo, Japan 2012.
- [44] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingolipid-mediated proliferation of cancer stem cells, Keystone Symposia (Q3), Banff, Canada, 2012.
- [45] 諫田 泰成, 厚生労働省公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 分化心筋細胞のクオリティコントロール, 2012.
- [46] 平田 尚也, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖に対する Src の影響, 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012.
- [47] 諫田 泰成, 平田 尚也, 山田 茂, 関野 祐子, トリブチルスズのミトコンドリア機能に対する影響, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012.
- [48] 石田 誠一, 久保 崇, 黒田 幸恵, 関野 祐子, 三次元培養による肝癌由来培養細胞の機能調節. 日本薬学会 第 132 年会, 札幌, 2012.
- [49] 太田 庸介, 大野 彰子, 石田 誠一, 黒田 幸恵, 栗原 正明, 関野 祐子, 斎藤 嘉朗, 福原 潔, ¹H NMR を用いた HepG2 細胞のメタボロミクス: APAP の影響. 日本薬学会 第 132 年会札幌, 2012.
- [50] M. Sunouchi, A. Miyajima-Tabata, R.

- Kikura-Hanajiri, S.-R. Kim, T. Kubo, S. Ishida, M. Usami, Y. Sekino. Inducibility of CYP1A by linuron in primary cultured human hepatocytes. The 47th Congress of the European Society of Toxicology, Paris, 2011.
- [51] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, Modulation of neuronal circuits by GABA_B receptor activity in the mouse lateral amygdala (マウス扁桃体外側核の GABA_B 受容体による神経回路機能の修飾). 神経科学学会 Neuro2011, 横浜, 2011.
- [52] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, マウス扁桃体外側核の GABA 受容体応答の可塑性に関する研究 (Plasticity of GABA receptor activity in the mouse lateral amygdala). 第 58 回 北関東医学会, 前橋, 2011.
- [53] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, Inhibitory synaptic plasticity in the mouse lateral amygdala (マウス扁桃体外側核における抑制性シナプス可塑性に関する研究). 第 2 回 放射線神経生物学研究集会, 前橋, 2011.
- [54] 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.
- [55] 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)
- [56] 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)
- [57] 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)
- [58] 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ぼす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)
- [59] 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)
- [60] 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)
- [61] 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)
- [62] 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)
- [63] 三浦麻利衣, 佐藤 薫, 鈴木岳之: 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)
- [64] 大和田智彦, 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善彦, 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)
- [65] 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)
- [66] 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)

- [67] 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)
- [68] 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)
- [69] 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)
- [70] 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)
- [71] 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)
- [72] 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)
- [73] 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)
- [74] 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)
- [75] 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)
- [76] 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)
- [77] 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)
- [78] 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)
- [79] 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)
- [80] 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)
- [81] 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)
- [82] 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).

- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] 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
- [90] 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
- [91] 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.
- [92] 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

吉田祥子 (研究協力者) 生体からの ATP、アデノシン、リン酸放出分布可視化デバイス, 吉田祥子, 特願 2011-176342 (2011).

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)

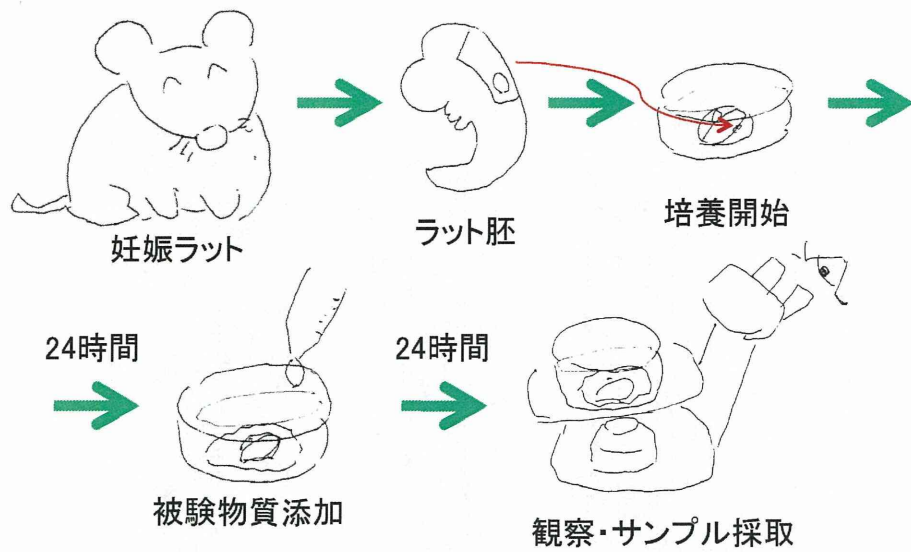


図1. ラット神経堤細胞遊走実験法の概要

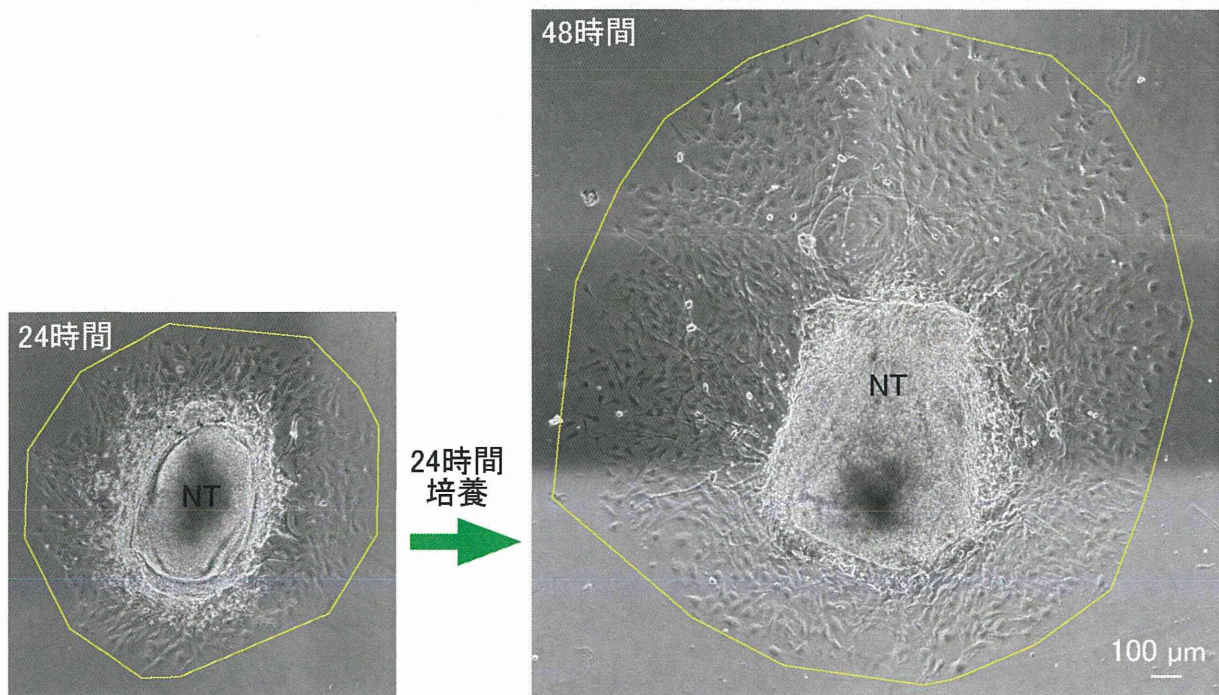


図2. 培養24時間から48時間における神経堤細胞の遊走距離の解析. 画像解析ソフトのポリゴンツールで、最外側の神経堤細胞を繋いだ線(黄色い線)を円とみなして、その内側の面積から計算した半径の比を遊走量とした. NT, 神経管.

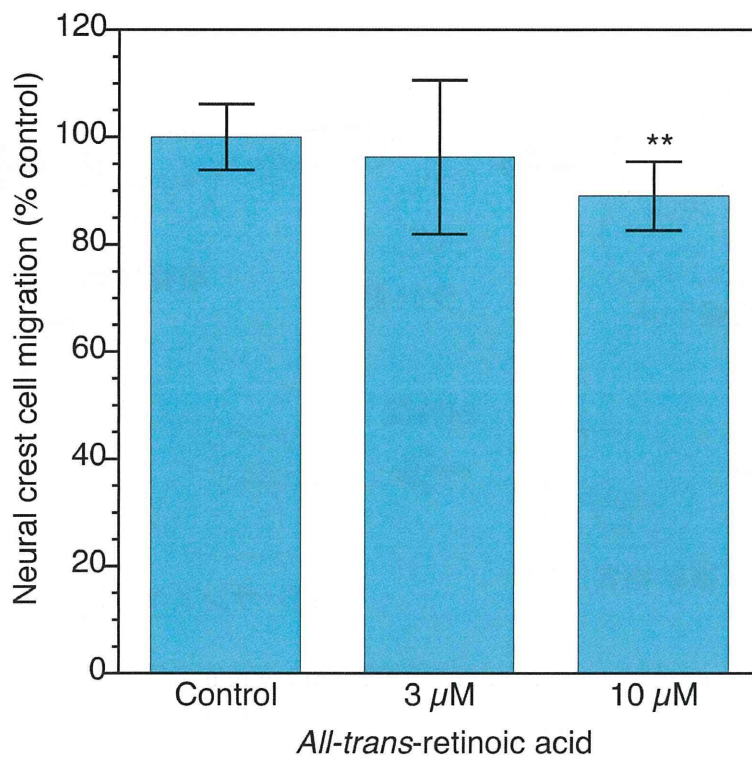
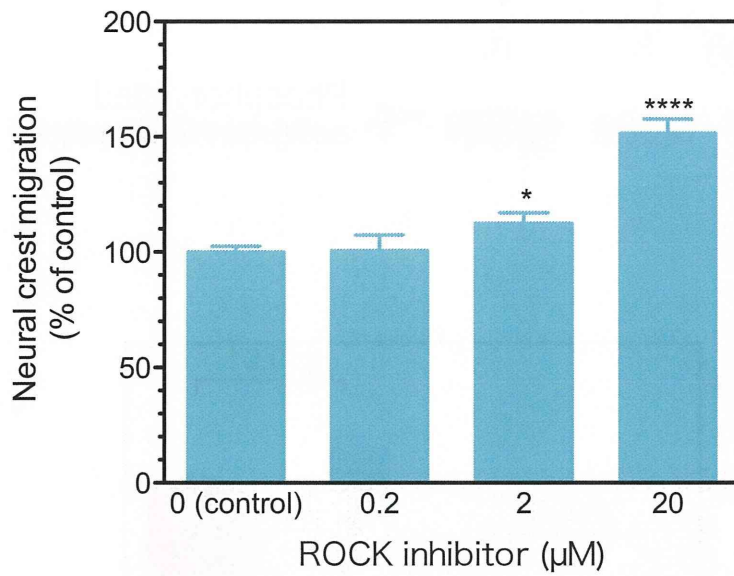
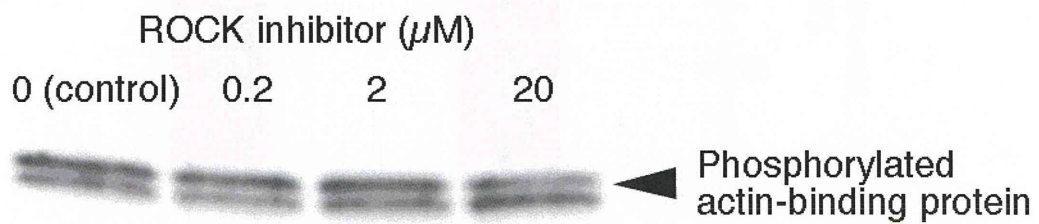


図3. オールトランス-レチノイン酸のラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響. 培養24時間および48時間で求められる細胞の広がりを見なして求められる半径の比から1を引いて増加量とした後に、対照群の増加量を100%として遊走距離を計算した。平均値と標準偏差を示す。**, 対照群と比較して、有意差があることを示す($p < 0.01$). N=9-11.

A



B



C

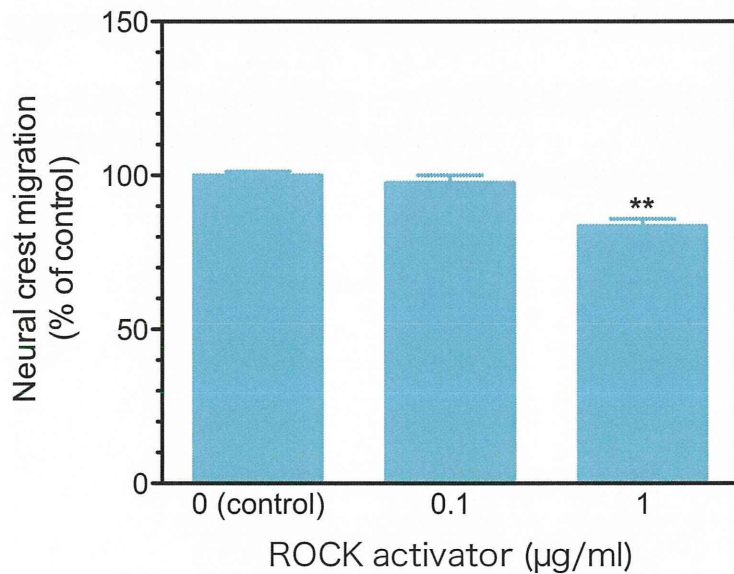


図4. ROCK 阻害剤および活性化剤がラット頭部神経堤細胞の遊走に及ぼす影響
 A, ROCK 阻害剤の影響。B, ROCK 阻害剤が頭部神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウェスタンブロット解析。C, ROCK 活性化剤の影響。
 平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$)。

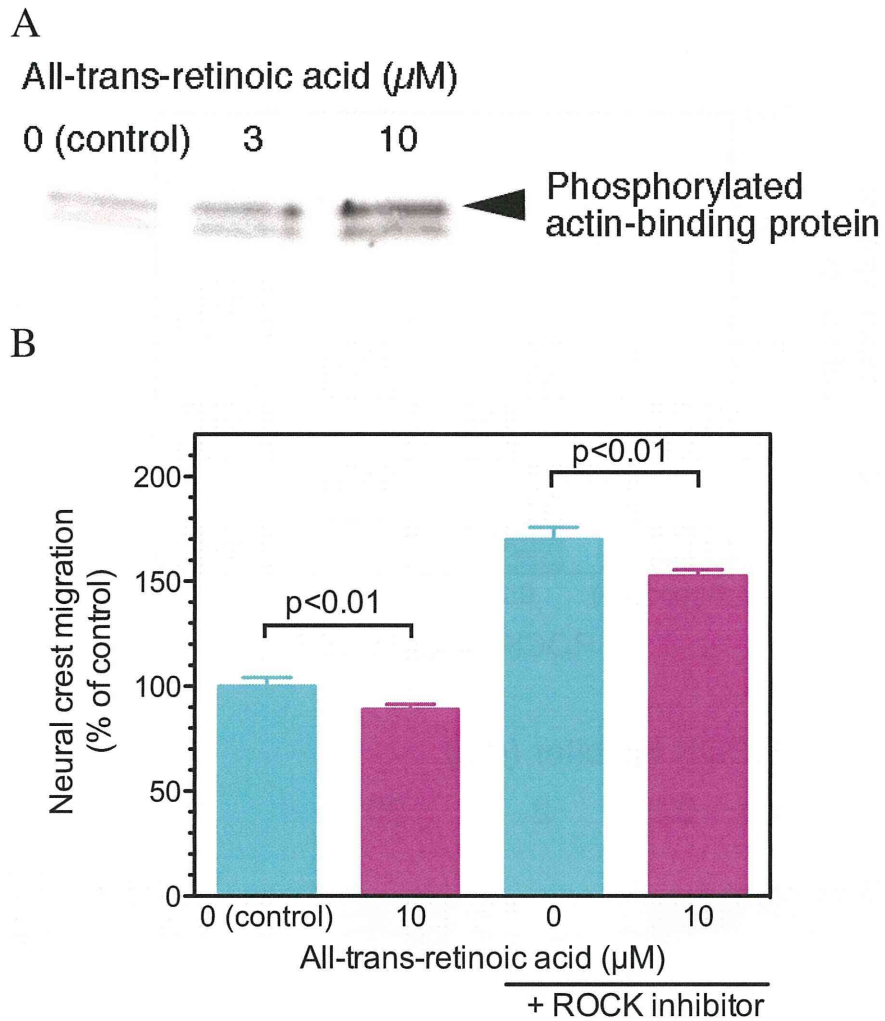


図5. レチノイン酸によるリン酸化アクチン結合タンパクおよび神経堤細胞遊走に及ぼす影響

A, レチノイン酸が頭部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ェスタンブロット解析。B, レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害作用に及ぼす ROCK 阻害剤の影響。平均値と標準誤差を示す。