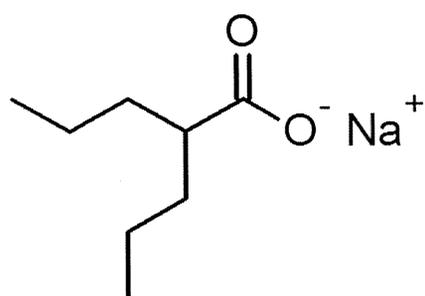


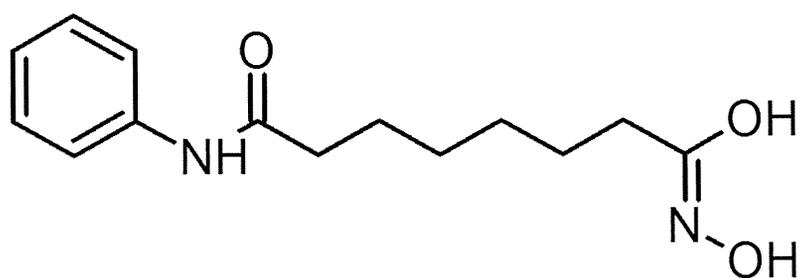
図1 ラット・マウスの小脳の発達様式

出生時のラット・マウスの小脳は、外顆粒層と未発達のプルキンエ細胞層(Purkinje cell layer; PL)から構成されるが、生後約2週間かけて顆粒細胞が分裂・分化しプルキンエ細胞下に遊走して内顆粒層(internal granular layer; IGL)を形成、同時にプルキンエ細胞は樹状突起を伸長させ、顆粒細胞および脳室帯から遊走してくるゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞と神経回路を構成して皮質表面に分子層(molecular layer; ML)を形成し、成熟した小脳の3層構造をかたち作る。

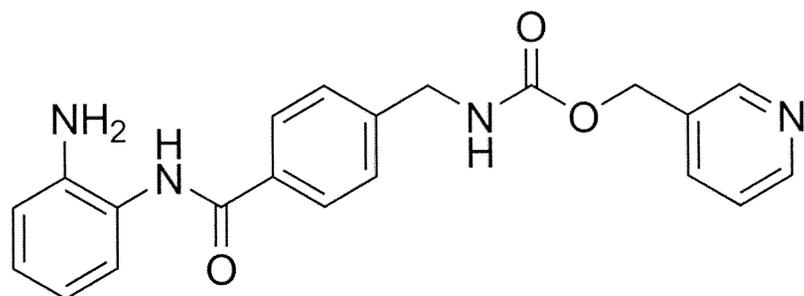
(P:プルキンエ細胞、Gra:顆粒細胞、B:バスケット細胞、S:星状細胞、Go:ゴルジ細胞、Ba:バークマングリア)。



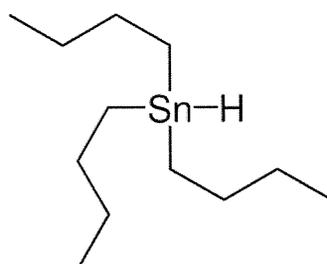
バルプロ酸ナトリウム (VPA)



ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド (SAHA)



MS-275



トリブチルスズ (TBT)

図2 本研究で使した化合物の構造

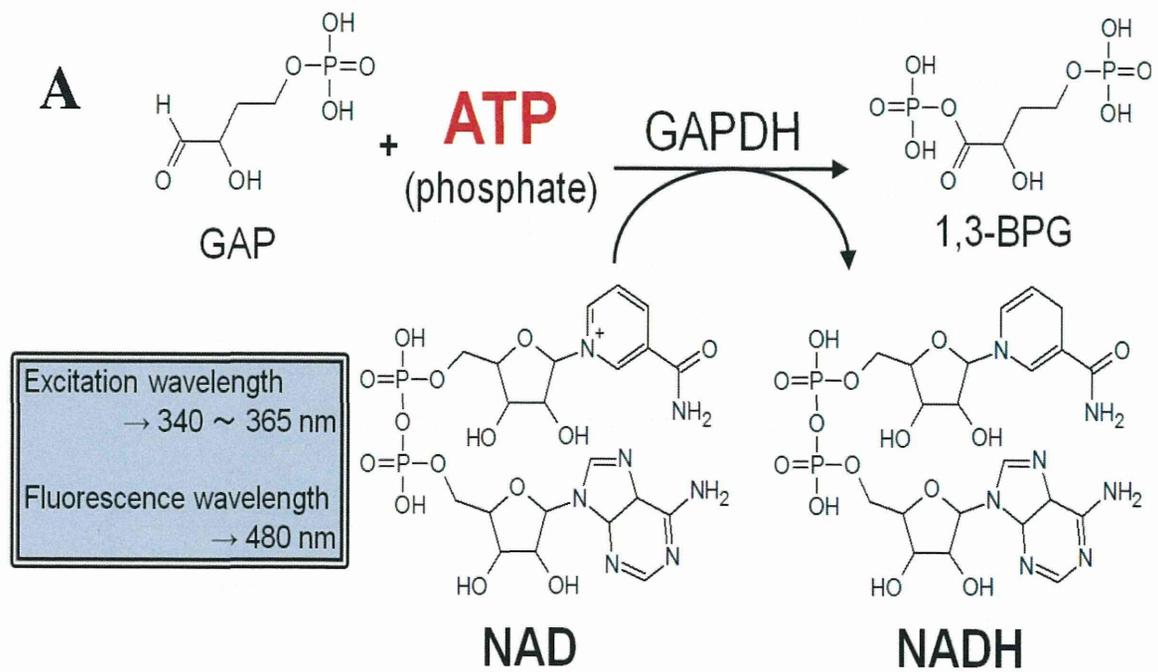
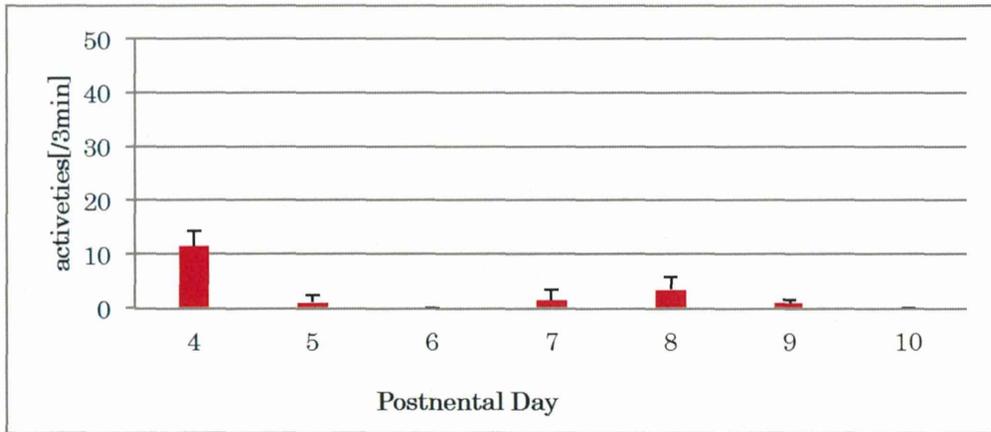
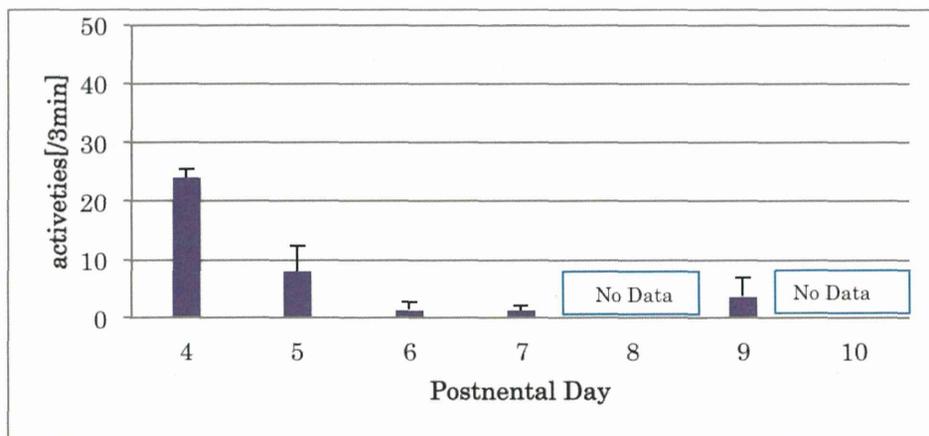


図3 ATPの放出分布の可視化方法

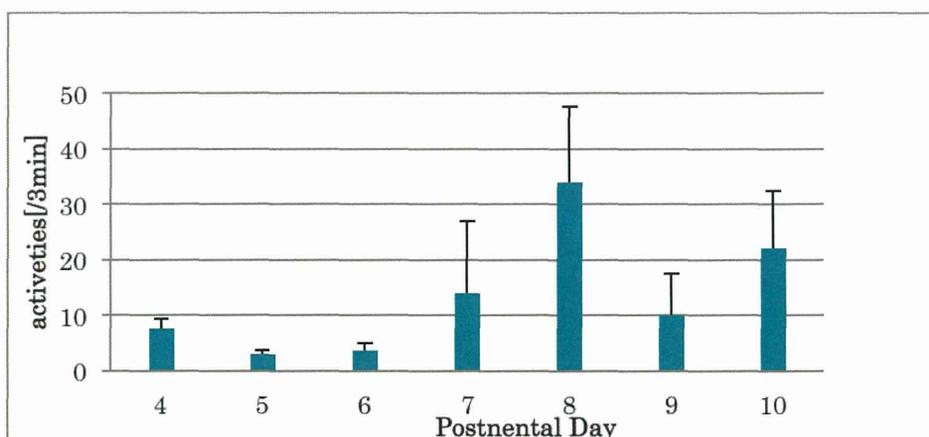
ATPを基質とするグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いてATPの放出分布を測定した



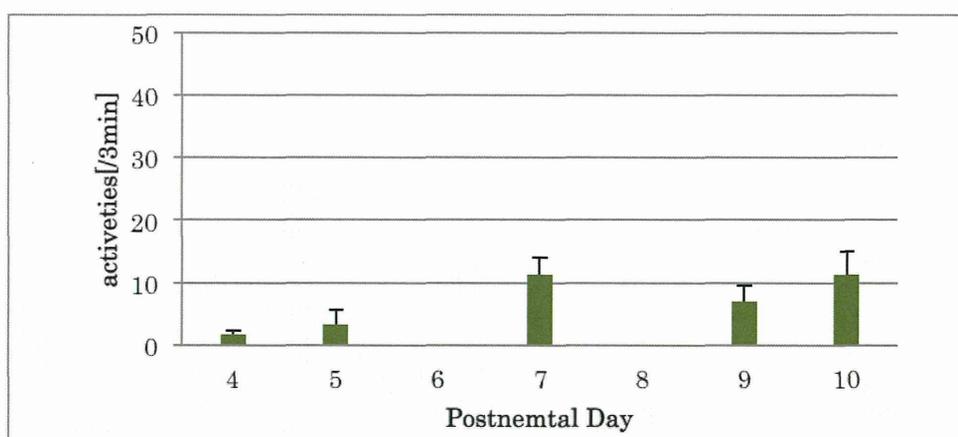
薬物を投与しない動物の不随意運動の回数



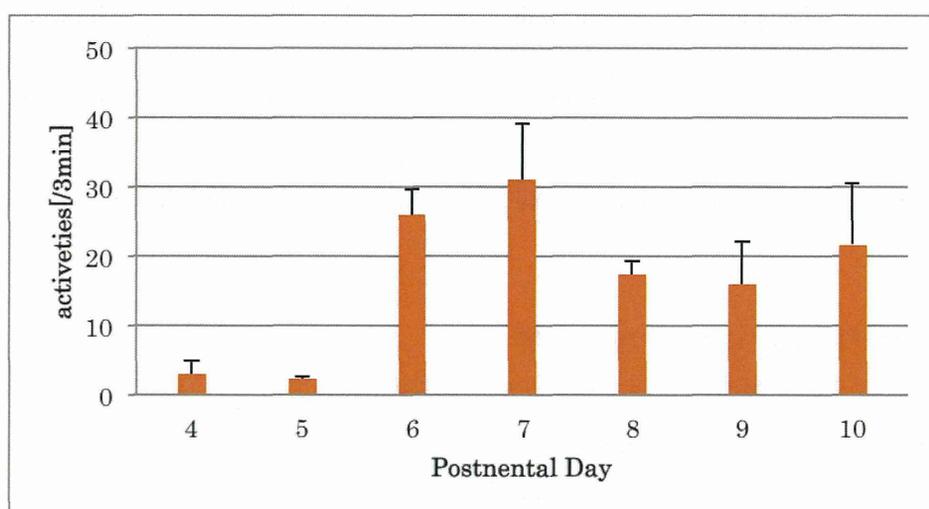
VPA 投与動物の不随意運動の回数



SAHA 投与動物の不随意運動の回数



MS-275 投与動物の不随意運動の回数



TBT 投与動物の不随意運動の回数

図4 各薬物投与動物の、自由行動（3分）における日齢ごとの不随意運動の回数

薬物を投与しない動物においても、各日齢で数回のけいれん状の不随意運動を確認した。特にP4 不近で多くの不随意運動を多く確認したが、これは、発達期前期ではまだ小脳の回路形成が不完全であり、そのため不随意運動を引き起こしたと考えられる。発達とともにこれらの行動は減少して行った。VPA投与動物では、P4で多くの不随意運動を確認した。一方対照動物と同様に成長するにつれて減少する傾向にあった。SAHA投与動物では、対照動物やVPA投与動物と比較して多くの不随意運動を確認し、且つP4～P8にかけ増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では対照動物より若干の不随意運動の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、対照動物と比較して多くの不随意運動を確認することができた。また、VPA投与動物とは異なりP4～P7にかけて不随意運動が増加する傾向にあった。

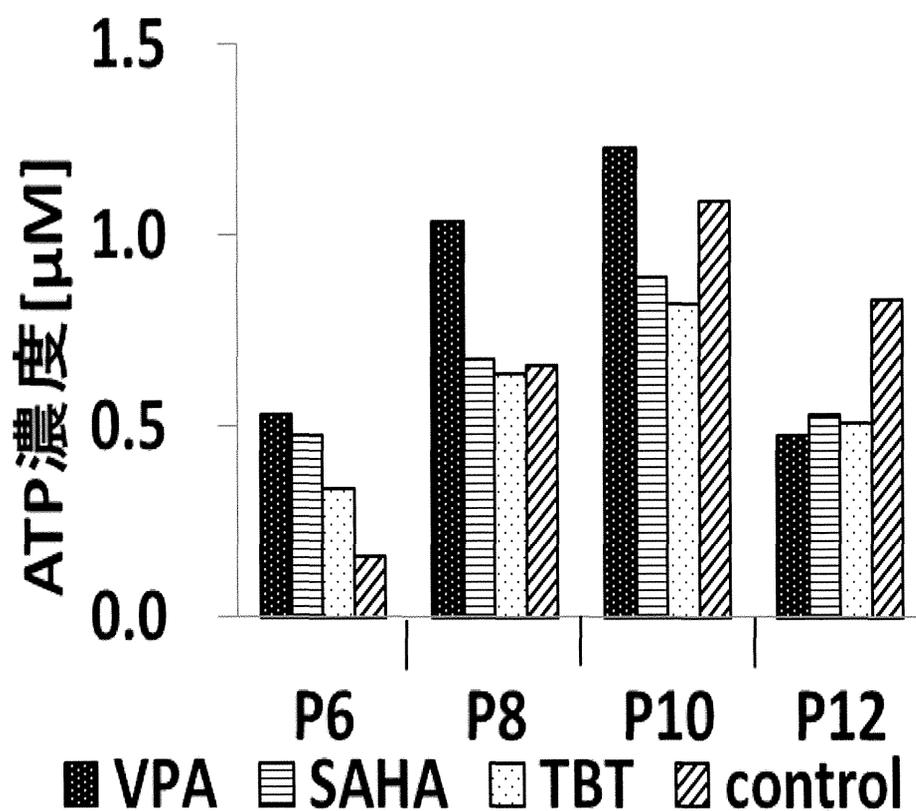
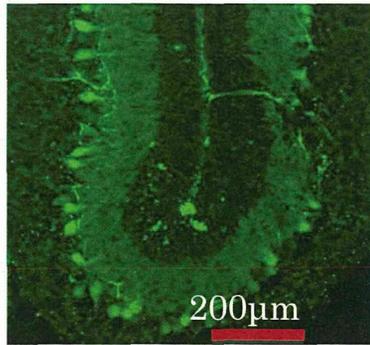
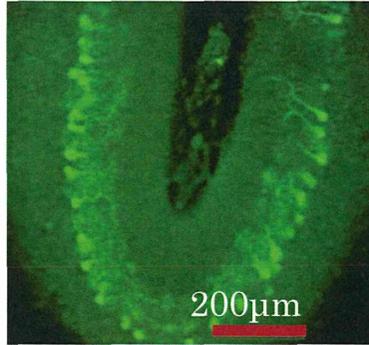


図5 ATP放出に対するVPA, SAHA, TBTの影響

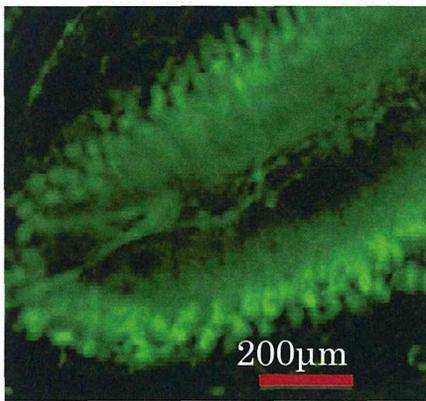
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるVPA、SAHA投与動物では、対照動物に比べ早期から小脳皮質でATPが放出されることが確認されたが、TBTは早期からの放出は顕著でなく、かつ放出量は対照動物よりむしろ少ないことが観察された。



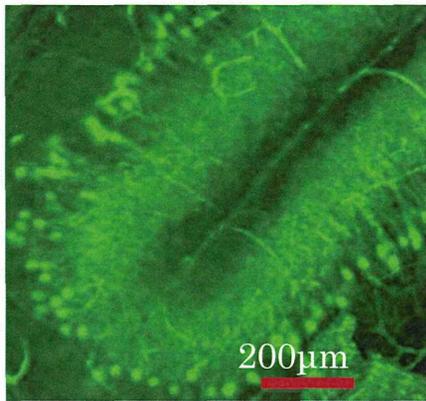
対照動物 P11



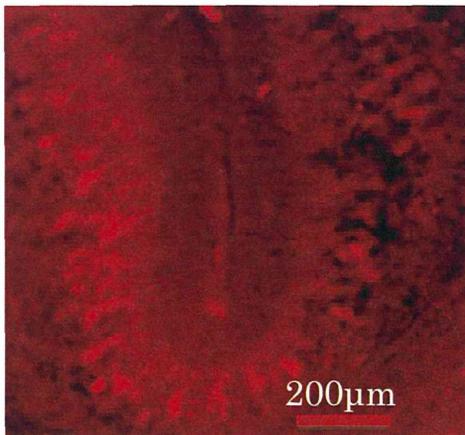
対照動物 P13



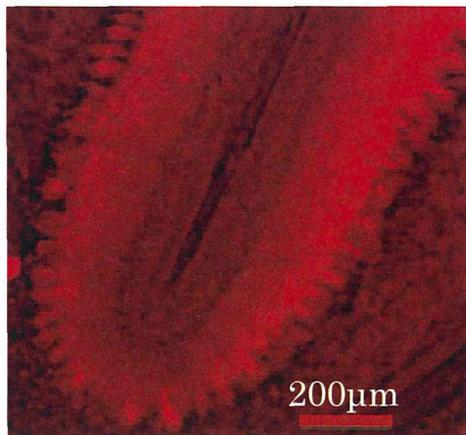
SAHA 投与動物 P10



SAHA 投与動物 P13



MS-275 投与動物 P10



MS-275 投与動物 P13

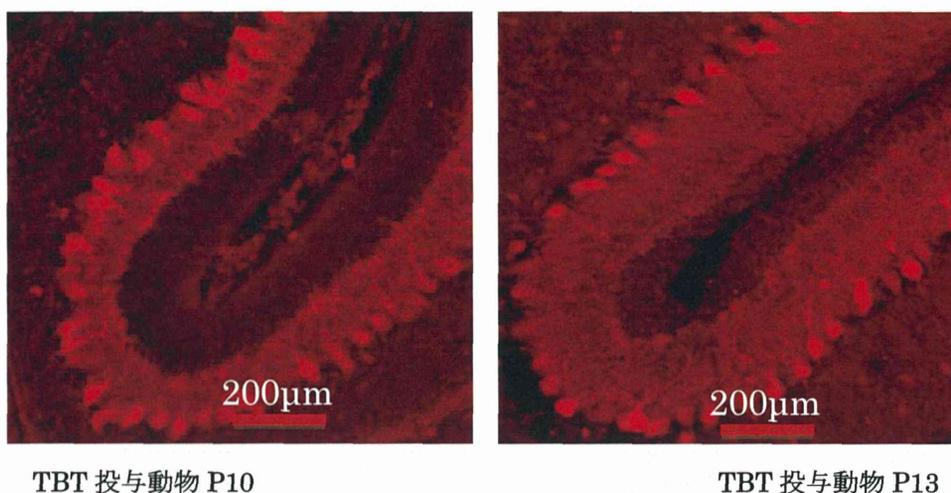


図6 プルキンエ細胞発達に対するSAHA, MS-275, TBTの影響

対照動物ではプルキンエ細胞層が通常きれいに一列に細胞が整列した構造をとり, ML方向へと樹状突起を伸長するのに対し, SAHA投与動物では, プルキンエ細胞に異常がみられ, 細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察された。樹状突起伸長は対照動物より早く、神経発達の早期化が伺われた。MS-275投与動物では, P10でのみ, プルキンエ細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察されたが, P13ではそのような分化異常は確認されず, 正常な層構造を形成していた。著しい樹状突起伸長も観察されなかった。さらに, TBT投与動物では, プルキンエ細胞の層構造、樹状突起伸長のいずれにも異常はみられず, 対照動物と同様の細胞層のきれいな列が観察された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価

研究分担者：産業医科大学 産業生態科学研究所 教授 上野 晋
研究協力者：産業医科大学 産業保健学部 講師 笛田由紀子
研究協力者：豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 講師 吉田祥子

研究要旨

平成 26 度も引き続き抗てんかん薬バルプロ酸（VPA）を胎生期投与した仔ラットの日齢 13 日から 18 日における海馬の興奮系神経回路機能および GABA 作動性抑制系回路機能を検討した。その結果、GABA_A 受容体拮抗薬ビククリンに対する反応性について、開眼前期となる生後 13～15 日齢で興奮系、抑制系ともに VPA 胎生期曝露による影響が認められた。このことから、VPA 胎生期曝露が特に GABA 作動性神経系の生後発達に影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに他の化学物質の評価への有用性を検証するためにトリブチルスズ（TBT）を胎生期に投与した仔ラットを用いて検討した。その結果、生後早期の海馬神経回路機能に対して TBT の胎生期曝露はむしろ回路機能を抑制することが見出され、TBT の胎生期曝露では海馬神経回路機能の発達遅延を生じる可能性が示唆された。VPA 以外の化学物質からも胎生期曝露の影響を検出できたことから、授乳期内の特定の時期にある仔ラットから作製される海馬スライス標本、ならびにこれを用いた神経回路機能の解析が発達神経毒性評価法として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では、胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指すこととし、発生過程の神経組織を用いて様々な化学物質の発達神経毒性評価へ応用できるか否かを検証していくことを 3 年間の目的とした。当分担研究班では、すでに発達神経毒性が報告されている化学物質を用い、胎生期に曝露された仔ラットの脳スライス標本を採取して、授乳期の神経発達を電気生理学的に解析するという *ex vivo* の手法を用いて検証した。

B. 研究方法

1. バルプロ酸（VPA）ならびにトリブチルスズ（TBT）の胎生期曝露（研究協力者 笛田由紀子、吉田祥子）

妊娠 15 日目（プラグ確認を第 0 日とする）の雌性 Wistar 系ラットに対して、イソフルラン麻酔下に VPA あるいは TBT を経口投与した。投与量について、VPA は 300 mg/kg（以下 VPA300 群）、TBT は 20 mg/kg（以下 TBT20 群）の割合で投与し、対照群として生理食塩水（VPA300 群）あるいは 50% ポリエチレングリコール（TBT20 群用）を投与したラットを用いた。

2. 電気生理学的評価のための脳スライス標本の作製（研究協力者 笛田由紀子）

PND（postnatal day の略、ラットが生まれた日を PND 0 としている）13 - 18 の雄性仔ラットをエーテルで深麻酔したのち断頭し、速やかに海馬を取り出した。ティッシュチョッパー（McIlwain tissue chopper）を用いて、すべての日齢について厚さ 600 μm の海馬ス

ライス標本を両側の背側海馬（海馬長軸の中央あたり）から作製した。

スライス時に用いた人工脳脊髄液の組成 (mM) は、NaCl, 124; KCl, 2; KH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 2; NaHCO₃, 26; glucose, 10、実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl, 124; KCl, 2; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 2; MgSO₄, 2; NaHCO₃, 26; glucose, 10 という組成とした。脳の取り出しからスライス作製までのすべての過程は、混合ガス (O₂/CO₂:95%/5%) で飽和した人工脳脊髄液を 3.5 - 4°C に冷やしながらすばやく行った。スライスは Haas 型チャンバー内 (32.0±0.1°C) で記録開始まで約 2 時間静置した後に実験に用いた。

3. 刺激応答性とフィードバック抑制の電気生理学的評価法 (研究協力者 笹田由紀子)

刺激電極にステンレスの双極電極 (直径 50 μm) を用い、CA3 領野から CA1 錐体細胞への入力線維が密集するシナプス層に置いた。記録電極にはガラス微小電極を用い (抵抗 1 - 2 MΩ)、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位 (PS) を、シナプス層から集合シナプス後電位 (fEPSP) を記録して『興奮系』神経回路の機能を評価した。

一方、『抑制系』神経回路機能の評価にはフィードバック抑制 (反回抑制ともいう) を指標とした。ダブルパルス刺激 (刺激間隔 5 および 10 ms) により惹起される誘発電位記録を用い、1 回目の電気刺激に対する応答に比べ 2 回目の電気刺激に対する応答がフィードバック抑制により小さくなることを利用して、1 回目の応答に対する 2 回目の応答比をもってフィードバック抑制の強度を定量的に評価した。

これには、最大の PS が記録される電気刺激の大きさ (最大の電気刺激値) で刺激する必要がある。先の刺激応答性で最大の電気刺激値を求め、その最大の電気刺激値でダブルパルス刺激を実施し、神経細胞の応答を記録した。解析した比は次式で計算し、海馬 CA1 領域から記録した PS の振幅の大きさからそれぞれ応答比を求めた。

神経細胞層へのフィードバック抑制の強さは

$1.0 - (\text{PS の比}) = 1.0 - (\text{2 回目の PS の振幅} / \text{1 回目の PS の振幅})$

によって求めた。すなわち、この値が 1.0 に近いほど、2 回目の応答がフィードバックによって抑制されていることを示し (例えば 0.8 であれば 1 回目の応答の 80% が抑制されていることを示す)、この値が 0 に近い時は 2 つの刺激応答が独立した事象であることを示す。さらに後述するように、GABA_A 受容体拮抗薬 (ピククリン、BMI) 存在下、非存在下において単回刺激による PS 振幅、ペーパルス刺激による抑制を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、産業医科大学および豊橋技術科学大学に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をしながらそれぞれの研究が進められた。

C. 研究結果

1. 海馬の興奮系および抑制系神経回路の生後発達に対する GABA_A 受容体拮抗薬の作用、およびこれに対する VPA 胎生期曝露の影響

平成 25 年度に引き続き、単回刺激による興奮系の刺激応答性については、対照群では PND15 から PND16 にかけて大きく亢進すること、対照群の平均開眼時期が PND16 であり、刺激応答性の変化がこの開眼時期を境に観察されたことから、開眼前期 (PND13 - 15) と開眼後期 (PND16 - 18) として分類し、単回刺激 (600 μA) で誘発される PS 振幅に対する GABA_A 受容体拮抗薬ピククリン (BMI, 1 μM) の効果について検討した。

対照群では BMI 存在下で開眼前期において PS 振幅の著増 (約 2 倍) が認められたものの開眼後期ではわずかな増加しか認められず、発達に伴う GABA 作動性抑制系の関与が異なることが見出された。一方、VPA300 群では開眼前期の時点で BMI 存在下での PS 振幅の増加は、対照群の開眼後期で認められたものと同程度のわずかな増加でしかなく、その傾向は開眼後期になっても変わらなかった (図 1)。

さらに BMI 存在下でのフィードバック抑制 (ダブルパルス刺激間隔 10 ms) につい

でも検討した。その結果、対照群と VPA300 群との間で有意差が認められたのは開眼前期のみであり、開眼後期ならびに成長後(8 週齢)では両群間に有意差を認めなかった。よって開眼前期のみではあるが、フィードバック抑制における BMI に対する反応性によっても VPA 胎生期曝露の影響が検出できることが判明した(図 2)。

2. 神経回路の生後発達に対する TBT 胎生期曝露の影響

本研究課題で用いている手法が VPA 以外の化学物質に応用できるかを検討するために、平成 26 年度は TBT 胎生期曝露の影響についての検討を開始した。VPA 胎生期曝露と同様の妊娠 15 日目に TBT (20 mg/kg) の曝露を受けた仔ラット(TBT20 群)について、生後の体重増加については対照群と比べ有意差を認めなかった(図 3)。さらに開眼時期についても有意差を認めなかった(表 1)。しかしながら単回刺激(200 μ A)で誘発される PS の振幅について PND14 から PND17 までで検討したところ、対照群と比べ TBT20 群では PND16 における PS 振幅が有意に小さくなることが認められた。しかしながら開眼後の PND17 においては対照群、TBT20 群との間で PS 振幅の大きさに有意差は認められなくなった(図 4)。

D. 考察

本研究では海馬スライス標本を用いた電気生理学的評価手法により、胎生期の VPA 曝露による発達神経毒性評価を生後早期で行った。その結果として平成 25 年度は海馬神経回路の興奮性シナプス機能と抑制性シナプス機能が VPA 胎生期曝露により亢進していることを見出した。そこで平成 26 年度はこのメカニズムの解明する目的で、GABA 作動性抑制系に着目した。

GABA 作動性抑制系の生後発達は脳機能に重要な役割を果たしていることが明らかとされている。そこで、GABA_A 受容体拮抗薬(ピククリン、BMI)を用いた薬理的なアプローチにより、本研究で指標としている刺激応答性の生後発達における GABA 作動性抑制系の関与、ならびにこれに対する VPA 胎生期曝露の影響を検討した。その結果、まず開眼前期においては対照群で BMI の存在

下で単回刺激による刺激応答性が増強された。このことから、この開眼前期においては GABA_A 受容体を介した抑制が、しかも持続的に存在している可能性が示唆される。さらに興味あることに、開眼後期においてはこの BMI による刺激応答性の増強作用がほとんど認められなくなっていた。一方、VPA 胎生期曝露群では開眼前期の時点で BMI による刺激応答性の増強作用はほとんど認められず、開眼後期も同様の反応であった。

これらの結果から、1) 開眼前期では刺激応答性を抑制するように GABA_A 受容体を介した持続的な抑制が存在している、2) この持続的な抑制は開眼後期となる生後発達の過程でむしろ減弱する、ということが示唆され、本研究で指標としている刺激応答性の生後発達の過程において、GABA_A 受容体を介した持続的な抑制系回路(おそらくはシナプス外 GABA_A 受容体を介した経路)の変化が存在していることが考えられる。さらに VPA 胎生期曝露によって、開眼前期ですでに持続的な抑制が減弱し、開眼後期とほぼ同程度になったことは、神経回路機能の生後発達の亢進を示しているとも考えられ、平成 25 年度に得られた結果と一致する。単回刺激による刺激応答性を検討するとともにその BMI に対する反応性についても併せて検討することにより、発達神経毒性を評価する指標としてより信頼性と有用性が高まる可能性が考えられる。

フィードバック抑制については GABA 作動性神経系が関与していることが知られているので、GABA_A 受容体拮抗薬である BMI の存在下ではフィードバック抑制が減弱する、すなわち『BMI 存在下でのペアパルス刺激による抑制比率』の方が『BMI 非存在下でのペアパルス刺激による抑制比率』よりも小さくなることが想定される。実際、図 2 で示したように、対照群/8 週齢においては『PPIR_BMI(+): BMI 存在下でのペアパルス刺激による抑制比率 (paired-pulse inhibition ratio, PPIR)』が『PPIR_BMI(-): BMI 非存在下でのペアパルス刺激による抑制比率』よりも小さくなっており(すなわち図 2 の Y 軸である“PPIR_BMI(+)” — “PPIR_BMI(-)” < 0)、GABA_A 受容体を介した経路が関与していることが分かる。ところが対照群/開眼前期では、平成 25 年度

の結果でも示したようにペアパルス抑制がまだ形成されていない (PPIR_BMI(-)の値が小さい) という状況で、PPIR_BMI(+)の値がむしろ大きくなるという結果が得られており、BMI 存在下において見かけ上はペアパルス抑制がむしろ出現しているように思える。しかしながら前述したように、BMI 存在下においては刺激応答性が約 2 倍に増強しており、この回路全体の増強作用がペアパルス抑制の出現に影響した可能性も否定できないが、開眼前期という時期におけるこの BMI に対する反応性もまた、ペアパルス抑制という回路特性の一面として指標になる可能性があると考えている。

さらに興味あることに、対照群/開眼後期ではやはり平成 25 年度の結果でも示したようにペアパルス抑制が出現していたのであるが、PPIR_BMI(+)値と PPIR_BMI(-)値との間に有意差は認められなかった

(“PPIR_BMI(+)” — “PPIR_BMI(-)” がゼロ値と有意差がなかった) ことから、この開眼後期で出現してきたペアパルス抑制には GABA_A 受容体を介した抑制には依存していないことが示唆される。しかしながら 8 週齢におけるペアパルス抑制評価の結果から、正常な成長に伴って GABA 作動性抑制系がペアパルス抑制に関与してくることが考えられる。このペアパルス抑制の生後発達については最終年度も検討を続け、そのメカニズムを解明したいと考えている。

以上を踏まえた上で VPA 胎生期曝露の影響を考察してみると、開眼前期、開眼後期ともにペアパルス抑制が出現しているにもかかわらず、PIR_BMI(+)値と PPIR_BMI(-)値との間に有意差は認められなかった (“PPIR_BMI(+)” — “PPIR_BMI(-)” がゼロ値と有意差がなかった)。したがって、詳細は不明であるがペアパルス抑制に係わる回路特性の生後発達に伴う変化が VPA 胎生期曝露群では認められない、という可能性も考えられる。さらに開眼前期では前述した対照群でのペアパルス抑制における BMI 反応性と比べても VPA 胎生期曝露群の反応性が異なっていることを見出したことは、VPA の発達神経毒性を評価する指標として、生後早期における興奮性・抑制系神経回路特性が有用であることを支持する結果であると考えている。

そこでこの電気生理学的評価手法を他の化学物質の毒性評価にも応用すべく、平成 26 年度から TBT の胎生期曝露による影響について検討を始めた。TBT はすでに環境ホルモンの一つとして知られている化学物質であり、先行研究では妊娠期間中～授乳期にわたる期間での曝露での動物モデルを用いる、あるいは毒性評価指標として胎仔死亡率や奇形発生率に焦点を置いており、発達神経毒性に焦点を置いたものは少ないのが現状である。本研究では我々の用いている評価方法の有用性を検討することが目的であるので、VPA 胎生期曝露モデルラットの作製方法に順じて TBT 胎生期曝露モデルを作製することを計画したことから、妊娠 15 日目のラットに TBT (20 mg/kg) を経口投与したものをモデルとして用いている。

得られた仔ラット、すなわち対照群と TBT20 群とでは生後の体重増加に有意差は認められず、また開眼日も同じであった。そこで海馬スライス標本を用いた CA1 領域における単回刺激での刺激応答性について、PND14 から PND17 までで検討したところ PND16、すなわちほぼ開眼日にあたる日齢で、対照群では VPA 胎生期曝露モデルでも認められたような、刺激応答性の亢進が認められた。しかしながら、TBT20 群では PND16 においても刺激応答性が亢進するような現象が認められず、PND17 において対照群と同程度に刺激応答性が亢進した。

以上の結果から、TBT 胎生期曝露では VPA 胎生期とは逆に、刺激応答性の亢進が遅れて出現することが判明し、この『遅れ』を指標とすることで、海馬スライス標本を用いた神経回路機能の解析が TBT の発達神経毒性に対しても早期に評価できる可能性が示唆された。

興味あることに、ヒト多能性幹細胞、胎児期の神経堤細胞、生後初期の神経・グリア細胞を用いた神経新生を指標とする *in vitro* 評価系において、TBT については神経細胞新生に対していずれの段階でも抑制を示す結果が得られている (研究代表者・諫田、研究分担者・宇佐見、研究分担者・佐藤の報告内容を参照)。本研究で得られた結果はこの *in vitro* 評価系の結果と同じ方向性であると考えられる。最終年度に向け、TBT 胎生期曝露における刺激応答性の生後発達について、

VPA 胎生期曝露と同様、刺激応答性とペーパー抑制、ならびにこれらに対する BMI の反応性について検討中であり、本試験法を評価系として確立させることを目指している。

E. 結論

発達神経毒性を早期にスクリーニングできる *ex vivo* の系の確立を目指しており、平成 26 年度は引き続き自閉症モデルとして確立された VPA の胎生期曝露ラットばかりでなく、環境ホルモンの一つとして知られている TBT の胎生期曝露ラットを用い、授乳期の海馬神経回路の発達を検討した。その結果、VPA 胎生期曝露ラットでは興奮系・抑制系回路機能の早熟化を、TBT 胎生期曝露ラットでは興奮系回路機能の発達遅延を見出し、神経毒性の早期スクリーニング手法として、授乳期の海馬神経回路発達の評価が有用である可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Okura D, Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Minami T, Kawasaki T, Sata T. Lidocaine preferentially inhibits the function of purinergic P2X7 receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *Anesth Analg*. 120:597-605 (2015).

[2] Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J., Igarashi T, Ueno S, Matsushita M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y, Yanagihara N., Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M. Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3 nephrectomized triple nitric oxide synthases-deficient mouse. *J Mol Cell Cardiol*. 77C:29-41 (2014).

[3] Horishita T, Yanagihara N, Ueno S, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Minami T, Kawasaki T, Sata T. Neurosteroids allopregnanolone sulfate and pregnanolone sulfate have diverse effect on the α subunit of the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology*. 121:620-31 (2014).

2. 学会発表

[1] 笛田由紀子、松野瑞希、石田尾 徹、石松維世、樋上光雄、上野 晋、保利 一。1-ブロモプロパンの発達神経毒性：臭素イオ

ンの関与。第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月、岡山

[2] 上野 晋、笛田由紀子。授乳期モデルラットの脳神経回路解析による発達神経毒性評価法とその応用。第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月、岡山

[3] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野 晋。胎生期バルプロ酸単回投与による授乳期ラット海馬の局所回路機能変化。第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸

[4] Yoshida S, Hozumi N, Katsumata D, Abe T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Alteration of GABA release dynamics in autistic-like anomalous developing cerebellum. *GABAergic Signaling in Health and Disease: 24th Neuropharmacology Conference*. 2014 年 11 月、USA

[5] Yoshida S, Muramoto H, Tanozaki M, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Fetal application of HDAC inhibitors facilitates the elongation of Purkinje cell dendrites and the network formation in rat cerebellar cortex. *44th Annual Meeting of Society for Neuroscience*. 2014 年 11 月、USA

[6] 上野 晋、笛田由紀子、関野祐子。バルプロ酸の胎生期曝露がもたらす授乳期ラットの海馬局所神経回路機能への影響。第 67 回日本薬理学会西南部会、2014 年 11 月、北九州

[7] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野 晋。発達神経毒性評価の *ex vivo* 評価系をめざして—女性研究者ネットワークで紡ぐ共同研究体制。日本女性科学者の会 第 10 回学術大会、2015 年 1 月、福岡

[8] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. GABAergic involvement in the hippocampal development of the basic excitability and feedback inhibition in juvenile rats prenatally exposed to valproic acid. *54th Annual Meeting of Society for Toxicology*. 2015 年 3 月、USA (発表予定)

[9] 笛田由紀子、上野 晋。自閉症モデルラットをもちいた早期の発達神経毒性評価—GABA 抑制系の関与。第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月、大阪 (発表予定)

H. 知的財産の出願・登録状況

(該当なし)

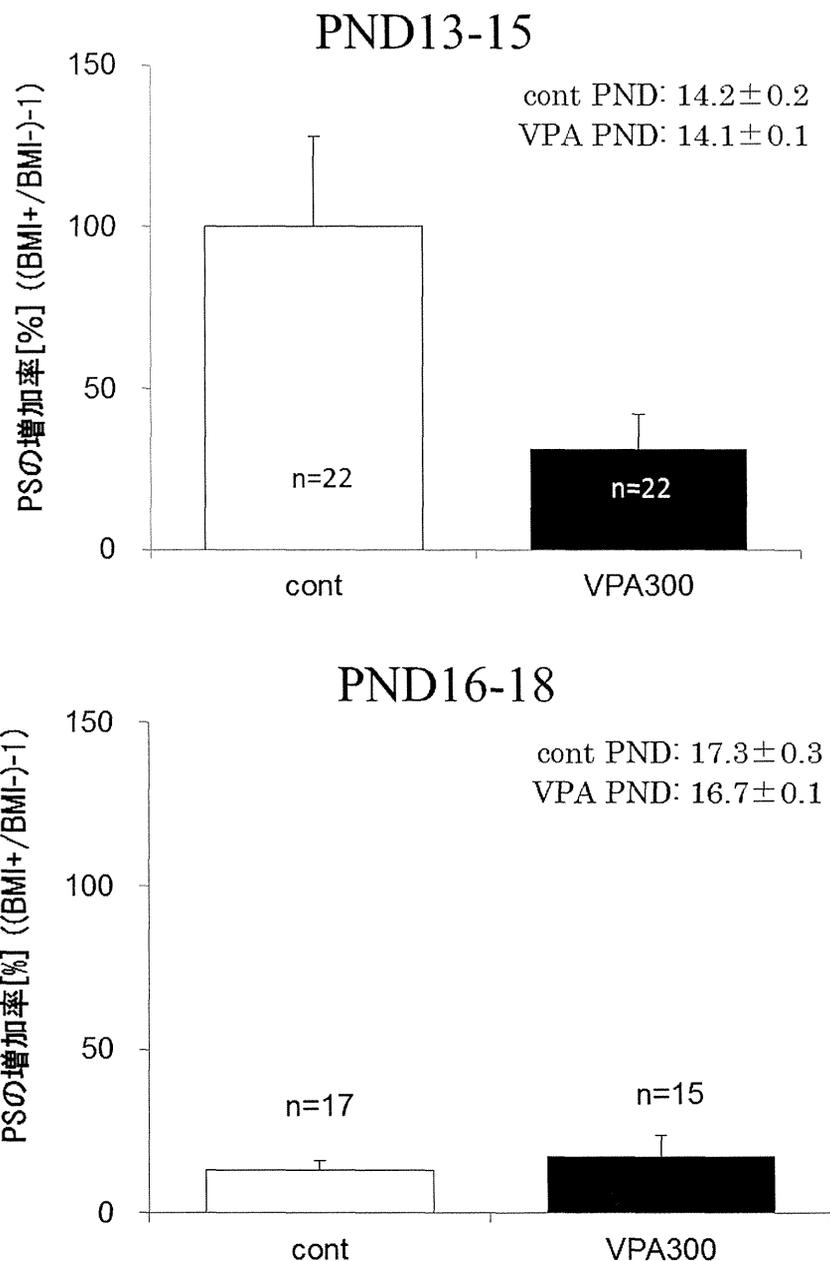


図1 単回刺激で誘発した集合スパイク電位の振幅（PS）に対する GABA_A 受容体拮抗薬ビククリン（BMI、1 μM）の効果

PND13-15の対照群（cont）ではPSが約2倍に増加したが、VPA300群では約30%の増加にとどまった（マンホイットニー検定、 $p < 0.01$ ）。PND15-18では、VPA300群との間に有意差は認められなかった。データは平均値 ± SEM。nはスライスの枚数。

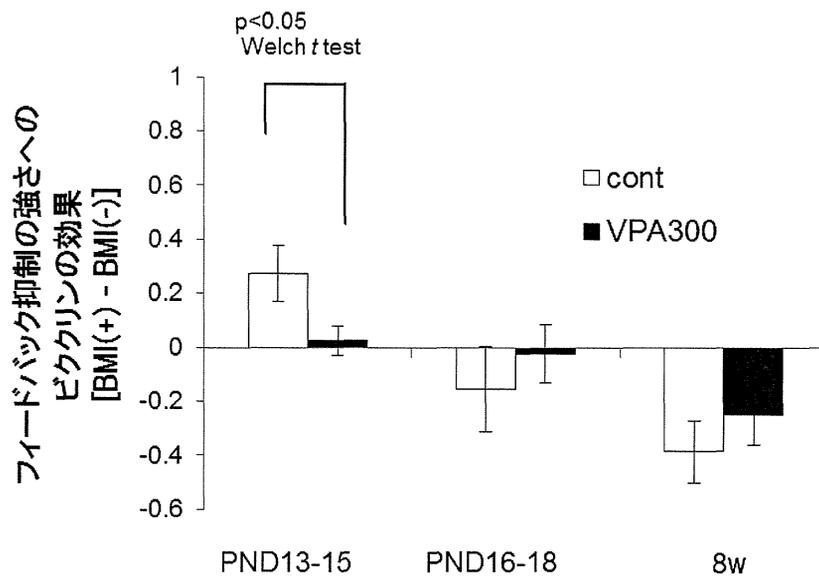


図2 フィードバック抑制の強さに対する GABA_A 受容体拮抗薬ビククリン (BMI、1 μM) の効果
 フィードバック抑制の強における BMI の反応性に対して VPA 胎生期曝露の有意な影響が認められたのは、図1の結果と同様に PND13-15 でのみでしかなく、PND16-18 と 8 週齢 (8w) では認められなかった。データは各群 11-16 枚のスライスの平均値 ± SEM。

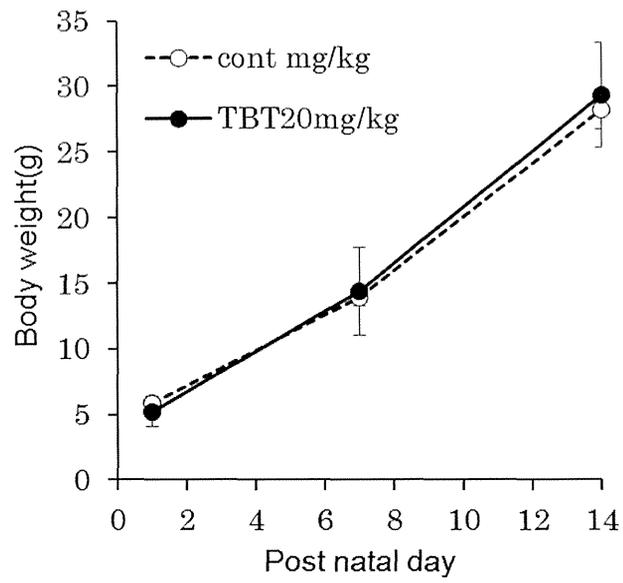


図3 対照群ならびにTBT20 mg/kg投与群の体重増加曲線

TBT胎生期曝露による有意な影響は認められなかった。データは平均値±SD。

Eye opening [day]				
group	mean	±	SD	n
control	16.8	±	0.4	22
TBT (20 mg/kg)	16.9	±	0.4	23

表 1 対照群と TBT20 群の開眼日

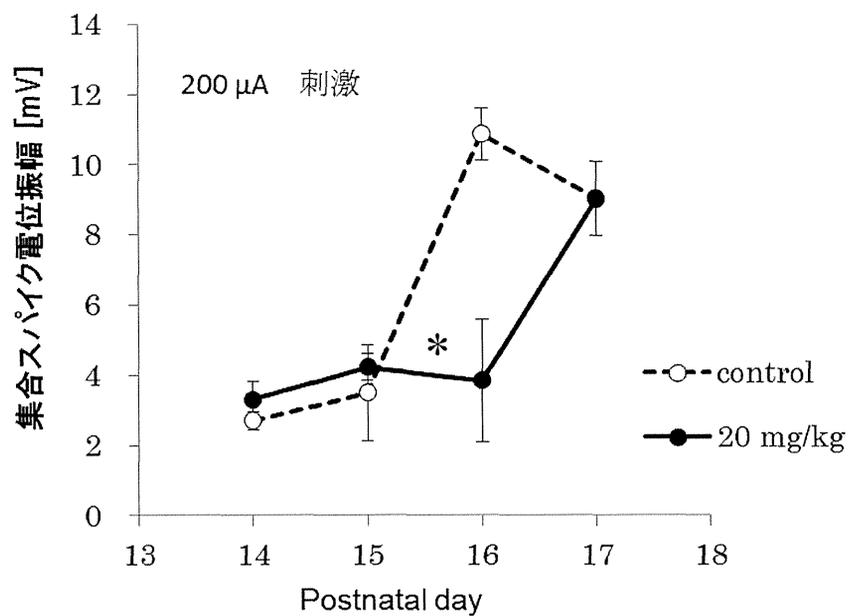


図4 単回刺激（刺激強度 200 μ A）による集合スパイク電位振幅（PS）の日齢に伴う変化

PND16 における刺激応答性に対照群と TBT20 群との間で有意差が認められており（マンホイットニー検定、 $p < 0.05$ ）、TBT20 群では発達に伴う PS の増加が 1 日遅れて出現する可能性が示唆された。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada S., Kotake Y., Demizu Y., Kurihara M., Sekino Y., Kanda Y.	Isocitrate dehydrogenase 3 as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells.	Sci. Rep.	4	5952	2014
Nagakubo T., Demizu Y., Kanda Y., Misawa T., Shoda T., Okuhira K., Sekino Y., Naito M., Kurihara M.	Development of cell-penetrating R7 fragment-conjugated helical peptides as inhibitors of estrogen receptor-mediated transcription.	Bioconjugate Chem.	25	1921-1924	2014
Hirata N., Yamada S., Shoda T., Kurihara M., Sekino Y., Kanda Y.	Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation	Nature Commun.	5	4806	2014
Hayakawa T., Kunihiro T., Ando T., Kobayashi S., Matsui E., Yada H., Kanda Y., Kurokawa J., Furukawa T.	Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology.	J. Mol. Cell. Cardiol.	77	178-191	2014
Hiyoshi H., Goto N., Tsuchiya M., Iida K., Nakajima Y., Hirata N., Kanda Y., Nagasawa K., Yanagisawa J.	YL-109 is a novel antitumor agent suppressing triple-negative breast cancer progression by inducing ubiquitin ligase CHIP.	Sci. Rep.	4	7095	2014
Tsuchiya M, Nakajima Y, Hirata N, Morishita T, Kishimoto H, Kanda Y, Kimura K.	Ubiquitin ligase CHIP suppresses cancer stem cell properties in a population of breast cancer cells.	Biochem Biophys Res Commun.	452	928-932	2014
Nakamura Y., Matsuo J., Miyamoto N., Ojima A., Ando K., Kanda Y., Sawada K., Sugiyama A., Sekino Y.	Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study.	J Pharmacol Sci.	124	494-501	2014
Ishida K., Kotake Y., Miyara M., Aoki K., Sanoh S., Kanda Y., Ohta S.	Involvement of GluR2 decrease in lead-induced neuronal cell death.	J. Toxicol. Sci.	38	513-521	2013
Yamada S., Kotake Y., Sekino Y., Kanda Y.	AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells	Metallomics	5	484-491	2013
諫田泰成	ヒトiPS細胞を用いた成熟心筋細胞の開発	心電図	34	306-309	2014