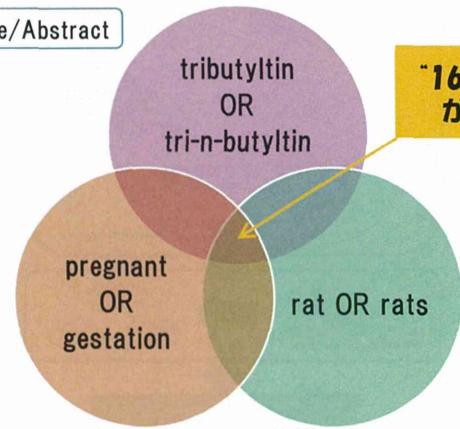


トリブチルスズ/PubMed検索

Title/Abstract



16の文献がヒット

2014.11.01 班会議資料

平成26年度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毒性メカニズムに基づく
新規in vitro発達神経毒性評価法に関する研究」

研究分担者 産業医大 上野

トリブチルスズの発達神経毒性

Crofton KM, et al. Prenatal or postnatal exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat: postnatal evaluation of teratology and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol.* 97(1):113-23, 1989.

- Long Evans ラット
- 胎生期曝露: TBTOを妊娠6日目から20日まで連続14日間。2.5, 5.0, 10, 12, 16 mg/kg 経口投与。

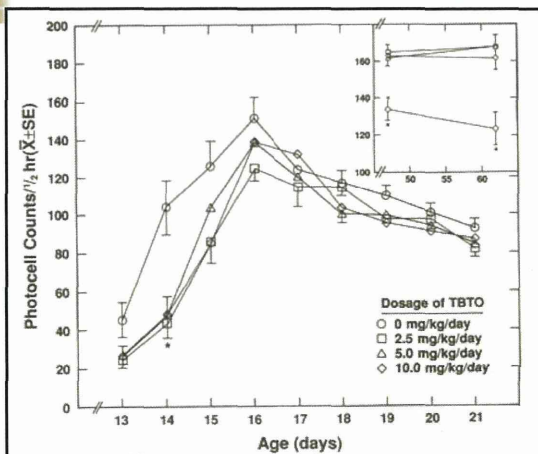
文献は送信済み

トリブチルスズの発達神経毒性

Crofton KM, et al. Prenatal or postnatal exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat: postnatal evaluation of teratology and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol.* 97(1):113-23, 1989.

- 10 mg/kgで母ラットの体重増加の抑制+PND1/PND3 pupsの体重の有意な減少。
- PND14で2.5~10 mg/kg群は活動量の減少。

Crofton KM, et al. のTBTO胎生期曝露
PND14で2.5~10 mg/kg群は活動量の減少



トリブチルスズの発達神経毒性

三宅久美子ら ラットの学習行動および発育に及ぼすbis(tri-n-butyltin) oxideの毒性 日衛誌 45(4):926-934, 1990

- THA(Tokai High Avoiders)ラット
- 成獣曝露: 10週齢でTBTOを連続12日間。10, 15 mg/kg 経口投与。
- 胎生期曝露: TBTOを妊娠6日目から20日まで連続14日間。5.0, 10 mg/kg 経口投与。

トリブチルスズの発達神経毒性

三宅久美子ら ラットの学習行動および発育に及ぼすbis(tri-n-butyltin) oxideの毒性 日衛誌 45(4):926-934, 1990

- 成獣曝露: 15 mg/kg群で投与初期に軽度の体重・自発行動量の減少、回避学習試験成績低下。10 mg/kg群で学習試験成績のみわずかに低下傾向。
- 胎生期曝露: 5, 10 mg/kg群の母ラットに影響なし。10 mg/kg群の仔ラット、生後3日目までにすべて死亡。5 mg/kg群の仔ラットは生後5日目までに6匹死亡。5 mg/kg群の学習試験の成績低下。

トリブチルスズの発達神経毒性

Adeeko A, et al. Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. Toxicological Sciences 74, 407-415, 2003

| Tributyltin chloride (mg/kg) | Day 0-19 | | | | Day 8-19 | | | |
|------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0 | 0.25 | 2.5 | 10 | 20 | 0.25 | 2.5 | 10 |
| Dams | | | | | | | | |
| No. females mated | 25 | 12 | 12 | 12 | 13 | 12 | 12 | 12 |
| No. of dams pregnant | 23 | 12 | 11 | 10 | 9 | 11 | 12 | 11 |
| Dams' body weight gain (g) | 116 ± 4.4 | 119.3 ± 3.7 | 115.6 ± 7.2 | 110.2 ± 5.4 | 86.5 ± 6.4** | 122.4 ± 3.9 | 121.9 ± 4.9 | 95.0 ± 5.5* |
| No. implantation sites | 14.8 ± 0.5 | 15.6 ± 0.3 | 14.3 ± 1.1 | 15.6 ± 0.5 | 14.0 ± 1.0 | 15.9 ± 0.6 | 16.3 ± 0.6 | 15.3 ± 0.6 |
| Pre-implantation loss | 1.1 ± 0.5 | 1.4 ± 0.5 | 1.4 ± 0.6 | 1.0 ± 0.5 | 1.8 ± 0.6 | 1.3 ± 0.3 | 2.4 ± 0.9 | 1.0 ± 0.3 |
| Post-implantation loss | 0.5 ± 0.2 | 0.3 ± 0.3 | 1.4 ± 0.6 | 0.7 ± 0.2 | 2.4 ± 1.3* | 0.7 ± 0.4 | 0.4 ± 0.2 | 1.1 ± 0.3 |
| Fetuses | | | | | | | | |
| Litter size | 14.2 ± 0.5 | 15.2 ± 0.3 | 14.2 ± 0.6 | 14.7 ± 0.5 | 11.5 ± 1.0* | 15.0 ± 0.5 | 15.7 ± 0.6 | 14.5 ± 0.6 |
| No. dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| Placental weight (g) | 0.52 ± 0.02 | 0.51 ± 0.01 | 0.53 ± 0.01 | 0.68 ± 0.04* | 0.77 ± 0.14** | 0.54 ± 0.02 | 0.53 ± 0.01 | 0.61 ± 0.03* |
| Fetal weight (g) | | | | | | | | |
| Male | 3.3 ± 0.05 | 3.1 ± 0.06 | 3.3 ± 0.09 | 3.0 ± 0.08 | 2.2 ± 0.17** | 3.6 ± 0.05 | 3.7 ± 0.09 | 3.3 ± 0.12 |
| Female | 3.1 ± 0.05 | 3.1 ± 0.06 | 3.2 ± 0.08 | 2.9 ± 0.08 | 2.1 ± 0.16** | 3.3 ± 0.06 | 3.5 ± 0.08 | 3.1 ± 0.11 |
| Anogenital distance (mm) | | | | | | | | |
| Male | 2.69 ± 0.02 | 2.84 ± 0.04* | 2.79 ± 0.03* | 2.86 ± 0.04* | 2.71 ± 0.09 | 2.72 ± 0.03 | 2.69 ± 0.03 | 2.75 ± 0.04 |
| Female | 1.41 ± 0.02 | 1.42 ± 0.03 | 1.39 ± 0.02 | 1.43 ± 0.03 | 1.52 ± 0.08 | 1.39 ± 0.03 | 1.33 ± 0.01 | 1.42 ± 0.03 |
| Sex ratio | 159/167 | 101/81 | 75/85 | 78/69 | 51/53 | 85/80 | 86/97 | 74/86 |

トリブチルスズの発達神経毒性

Ema M, et al. Comparative developmental toxicity of butyltin trichloride, dibutyltin dichloride and tributyltin chloride in rats. J Appl Toxicol. 15(4):297-302, 1995.

- 胎生期曝露: TBTを妊娠7日目と8日目。40, 80 mg/kg 経口投与。
- While treatment with TBT at 40 and 80 mg/kg caused a significantly decreased maternal weight gain and increased postimplantation embryoletality, no significantly increased incidence of malformed fetuses occurred.

トリブチルスズ胎生期曝露：条件設定における課題

- 先行研究は胎仔死亡率や奇形発生率に焦点を置いたものが多い。
- VPAのように胎生期曝露が妊娠中の1日 one shotでおしまいというモデル作製例がほとんどない。
- 投与期間もcase by caseであり、中には胎生期～出生後授乳期にわたり曝露を続けている例もある。
- 母体に影響が出ないことを前提にするならmaxでも5.0 mg/kg以下か？(ただし連続12日間での場合)。
- 用量・投与期間を変えた場合、成長後の神経行動学的表現型についても自分らで検証することが必要では？

トリ[メチル]スズ

- 中枢神経毒性がすでに知られている。1985年のreviewがある。
 - McMillan & Wenger Neurobehavioral toxicology of trialkyltins. Pharmacol. Rev. 37(4):365-379, 1985.
- 急性毒性として『海馬』を特異的に傷害する模様(後述)。
- 小脳はターゲットではないらしい。
- 神経変性のモデルとしてその機序の解明や神経保護手段の開発に利用されている。
 - Corvino V, et al. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. Neurochem Res. 38(2):240-53, 2013.

『トリ[メチル]スズ』について

トリメチルスズの神経毒性

新谷紀人ら. 中枢神経系におけるトリメチルスズの作用. 薬学誌127 (3):451-461, 2007

- 研究や産業機関での事故によって高濃度のTMTに曝露されたヒトの症例報告では、種々の内臓器官の強烈な痛みに加え、集中力の消失などの中枢機能障害が認められ、脳でも神経変性が観察される。
- げっ歯類においても、高用量TMTの腹腔内投与は、副腎や腎臓、肝臓、免疫担当器官の傷害や、聴覚などの感覚器官の傷害に加え、特に大脳の辺縁領域(海馬、梨状皮質、嗅皮質、嗅結節、扁桃体など)に重篤な傷害を及ぼす。
- TMTを投与されたげっ歯類は、これらの神経傷害に関連するとされる、多動や痙攣、攻撃性の亢進などの行動異常や、食欲低下に伴う体重減少、そして記憶障害などの特異な表現型変化が観察され、その一部はヒトの症例報告と類似したものといえる。

トリメチルスズの神経毒性

新谷紀人ら. 中枢神経系におけるトリメチルスズの作用. 薬学誌127 (3):451-461, 2007

- 高用量のTMT投与は、ラットではCAおよびDG領域(特にCA3領域)の神経細胞を傷害するのに対し、マウスではDG顆粒細胞を特異的に傷害する。
- TMT(2.8 mg/kg)を成体のマウスに腹腔内投与すると、DG領域において投与1日後から顆粒神経細胞の脱落、およびDNAの断片化(抗ssDNA抗体陽性細胞の増加)が観察され、神経細胞脱落は2-3日で最大となる。しかしこのようなアポトーシスを含む神経細胞死は、CA領域では少なくとも投与30日後まで全く認められない。

トリメチルスズの発達神経毒性

Paule MG, et al. Developmental toxicology of trimethyltin in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 30:84(2):412-7, 1986 .

- By PND 20, weights of pups treated on GD 7 greater than GD 12 greater than GD 17.
- Neuropathology of pups sacrificed on PND 1 was minimal in all animals with lesions only identified in animals treated on GDs 12 or 17 which consisted of subtle degenerative changes in the CA3 and CA4 regions of Ammon's horn of the hippocampus.
- Muscarinic cholinergic receptor binding in whole brains from pups on PND 1 did not show any significant changes compared to controls for any dose or day of exposure.
- These data indicate that prenatal TMT exposure results in postnatal toxicity in treated pups but only in the presence of maternal toxicity.

トリメチルスズの神経毒性

新谷紀人ら. 中枢神経系におけるトリメチルスズの作用. 薬学誌127 (3):451-461, 2007

| Parameter | Phenotypic changes | Period (days) ^{a)} |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| General behavior | Hyperactivity, convulsion and aggressiveness | 1~3 |
| Appetite | Decrease in food and water intakes | ~2 |
| Body weight | Decrease (recovered —7 days) | ~2 |
| Object memory | Decrease (recovered at 14 days) | 4 ^{b)} |
| Histology in the CA1 | No significant changes | ~30 |
| Histology in the DG | Severe neurodegeneration | ~3 (~54) |
| | Decrease in molecular markers of neurons | ~3 (~54) |
| | Increase in granule cells | 4~7 |
| | Increase in genes related to neurogenesis | 4~5 |
| Plasma corticosterone | Increase | 1~3 ^{b)} |

a) Period when phenotypic changes were observed. b) Time course analysis was not performed.

トリメチルスズの発達神経毒性

Paule MG, et al. Developmental toxicology of trimethyltin in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 30:84(2):412-7, 1986 .

- Pregnant rats were treated on either gestational day (GD) 7, 12, or 17 with single doses of trimethyltin chloride (TMT) ip at either 0, 5, 7, or 9 mg/kg.
- A significant effect of dose was manifest as decreased maternal weight at term, which persisted during lactation until postnatal day (PND) 15 in some groups.
- For all treatments combined, term weights of dams exposed on GDs 7 and 12 were greater than those treated on GD 17.
- Litter sizes were decreased for groups treated on GD 17 with 9 mg/kg TMT.
- Pups treated in utero and exhibiting treatment-induced decreases in weight at or near birth remained smaller than untreated animals into adulthood (PND 280).

トリメチルスズの発達神経毒性

三宅久美子ら. ラットの発育および学習行動に及ぼす出生前 trimethyltin 曝露の影響. 産業医学 31:363-371, 1989.

- THA(Tokai High Avoiders)ラット
- 胎生期曝露: TMTを妊娠12日目に腹腔内投与。5.0, 7.0 mg/kg
- 母ラットの体重増加で7.0 mg/kg群に投与直後で一時的な減少あり。それ以外は有意差のない体重増加推移。出生率有意差なし。
- 仔ラット発育状態・行動発達検査においてもほとんど影響なし。ただし7.0 mg/kg群で離乳率が著しく低かった。
- シドマン回避学習試験による学習習得において5.0, 7.0 mg/kg両軍とも習得障害を生じていた。

トリメチルスズの発達神経毒性

Tamburella A, et al. The selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine counteracts behavioral impairments in trimethyltin-intoxicated rats. *Eur J Pharmacol.* 683(1-3):148-54, 2012.

- This study was carried out to assess the behavioral effects of the non-psychostimulant drug atomoxetine, in rats **prenatally-exposed to the organic compound trimethyltin chloride (TMT) and in spontaneously hypertensive rat (SHR), two rodent models of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD).**
- At birth, neonatal reflexes (righting, cliff aversion, forelimb placing, forelimb grasping, bar holding and startle) had an earlier onset (i.e. percent of appearance) and completion (maximum appearance, i.e. 100% of the brood exhibiting each reflex) in prenatally TMT-exposed and SHR pups as compared to control groups. Two months after birth, TMT-exposed and SHR rats showed impaired cognitive performances in both the step-through passive avoidance test and the shuttle box active avoidance test.

トリメチルスズの発達神経毒性

Tamburella A, et al. The selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine counteracts behavioral impairments in trimethyltin-intoxicated rats. *Eur J Pharmacol.* 683(1-3):148-54, 2012.

- Atomoxetine (1, 3 and 6 mg/kg, i.p.), already at the lowest dose tested, improved learning and memory capacity of prenatally TMT-exposed rats and SHR; while methylphenidate (1, 3 and 6 mg/kg, i.p.), used here as positive control, elicited a significant cognitive enhancing effect only at the higher doses. In the open field test, both TMT-exposed rats and SHR displayed enhanced locomotor activity. Methylphenidate further increased locomotor activity in all groups, whereas atomoxetine reduced the enhanced locomotor activity of TMT-exposed rats and SHR down to the level of controls.
- These results suggest that **prenatal TMT-exposure could be considered as a putative experimental model of ADHD** and further support the effectiveness of atomoxetine in the ADHD pharmacotherapy. Furthermore, despite the similar effect of the two drugs on cognitive tasks, they exhibit distinct profiles of activity on locomotion, in ADHD models.

トリメチルスズ胎生期曝露：条件設定における課題

- 先行研究はVPAのように妊娠期間中の1日one shotが多い。
- そもそも中枢神経の変性作用が強い。しかも海馬が標的だがCA1でなくCA3&DG(ラットの場合)。小脳は標的に非ず？
- 母ラットへの影響の二次的なものとして胎仔に影響が出る可能性は示唆されており、厳密に発達神経毒性物質といえるか？
- トリメチルスズ胎生期曝露がADHDのモデルとなる可能性を示唆している研究(2012)があるがそれ以降は見当たらず(ヒトの曝露事例報告で過活動(多動性)というのがあるらしい)。
- 用量・投与期間によってはやはり成長後の神経行動学的表現型を検証する必要がある？

有機スズとヒストンアセチル化

文献より

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

ELSEVIER

Toxicology Letters 155 (2005) 329–335

www.elsevier.com/locate/toxlet

Toxicology Letters

Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity

Shigehiro Osada^{a,*}, Jun-ichi Nishikawa^a, Tsuyoshi Nakanishi^b, Keiichi Tanaka^b, Tsutomu Nishihara^a

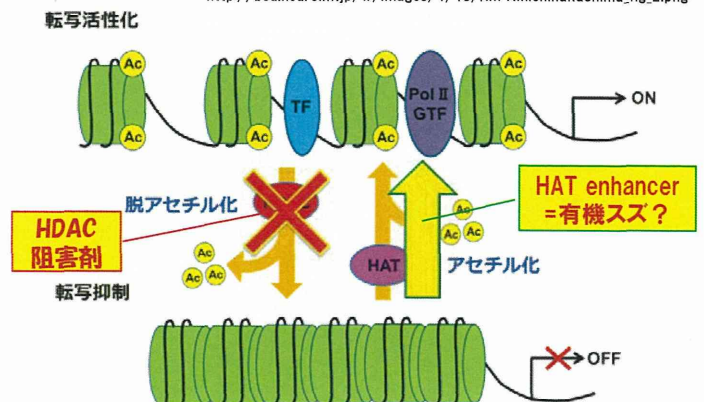
^a Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Received 16 September 2004; received in revised form 24 October 2004; accepted 25 October 2004
Available online 28 November 2004

ヒストンアセチル化

http://bsd.neuroinf.jp/w/images/4/48/Nm-Kinichinakashima_fig_2.png





有機スズのヒストンアセチル基転移 酵素への影響

Table 1
Effect of organotin and related chemicals on HAT activity

| Chemical | Abbreviation | Relative HAT activity ^a | CAS no. | Purity (%) | Source |
|---------------------------|-------------------|------------------------------------|------------|------------|-------------------|
| Triphenyltin chloride | TPT | 2.03 ± 0.13** | 639-58-7 | >95 | Aldrich Chemicals |
| Diphenyltin dichloride | DPT | 1.63 ± 0.061** | 1135-99-5 | >96 | Aldrich Chemicals |
| Monochlorotin trichloride | MPT | 0.97 ± 0.026 | 1124-19-2 | >98 | Aldrich Chemicals |
| Tributyltin chloride | TBT | 2.22 ± 0.13** | 1461-22-9 | >95 | Tokyo Kasei Kogyo |
| Diisobutyltin dichloride | DiBT | 1.81 ± 0.045** | 683-18-1 | >97 | Tokyo Kasei Kogyo |
| Monobutyltin trichloride | MBT | 1.01 ± 0.037 | 1118-46-3 | >95 | Aldrich Chemicals |
| Tin chloride | SnCl ₄ | 0.91 ± 0.025 | 10025-09-1 | >97 | Nacal Tesque |
| Tetraethyltin | TetBT | 1.05 ± 0.042 | 1461-25-2 | >93 | Aldrich Chemicals |
| Triethyltin chloride | TMT | 0.95 ± 0.011 | 1066-45-1 | >98 | Aldrich Chemicals |
| Triethyltin bromide | TET | 1.27 ± 0.034* | 2767-54-6 | >97 | Aldrich Chemicals |
| Tripropyltin chloride | TPCT | 3.09 ± 0.080** | 2279-76-7 | >98 | Merck Schuchardt |
| Triphenylsilanol | TPSiOH | 1.14 ± 0.23 | 791-31-1 | >95 | Merck Schuchardt |
| Triphenylmethane | TPM | 0.95 ± 0.12 | 519-73-3 | >98 | Kanto Chemical |
| Triphenylethylene | TPE | 0.91 ± 0.12 | 58-72-0 | >98 | Kanto Chemical |

^a Core histones and 10 μM of chemicals were used for the HAT assay. Relative HAT activity shows mean HAT activities (±S.D.) relative to a control treated without chemical (three independent experiments). *P < 0.05 and **P < 0.01 compared to control.

**Relative
HAT
activity**

1. トリプロピルスズ : 3.09倍
2. トリブチルスズ : 2.22倍
3. トリフェニルスズ : 2.03倍
4. ジブチルスズ : 1.81倍

• トリメチルスズ : 0.95倍

平成26年度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毒性メカニズムに基づく新規in vitro発達神経毒性評価法に
関する研究」

班会議 議事録

日時:平成 26 年 12 月 3 日(土)10 時 00 分～12 時 00 分

場所:国立医薬品食品衛生研究所 4 号館 2 階 薬理部部長室

(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

出席者:諫田泰成、佐藤薫、宇佐見誠、石田誠一、関野祐子(国衛研)

(以上、敬称略、順不同)

議事:

1. はじめに (10:00～10:15)

本年度の研究班の進め方について(諫田)

2. in vitro 評価系の進捗状況(10:15～12:00)

諫田 「ヒト未分化細胞を用いた発達期毒性評価系の構築」

佐藤 「発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価」

宇佐見 「神経堤細胞の機能解析による評価法の開発」

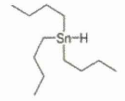
以上

ヒト未分化細胞を用いた 発達期毒性評価系の構築

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部第二室
諫田 泰成

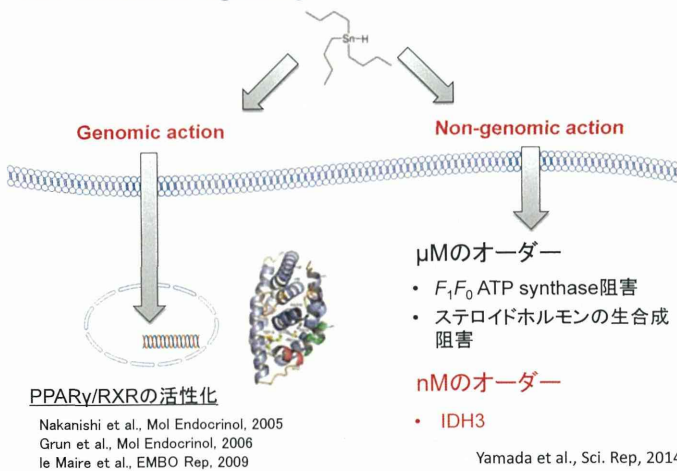
陽性対照物質:トリブチルスズ(TBT)

- ✓ 内分泌攪乱作用をもつ環境汚染物質。
- ✓ 低濃度の曝露により、神経系や免疫系など様々な細胞毒性を引き起こす。
- ✓ TBTを投与された妊娠ラットから生まれたF1は、行動異常を示す。
- ✓ ヒト発達期に対する影響はまだまだ明らかではない。

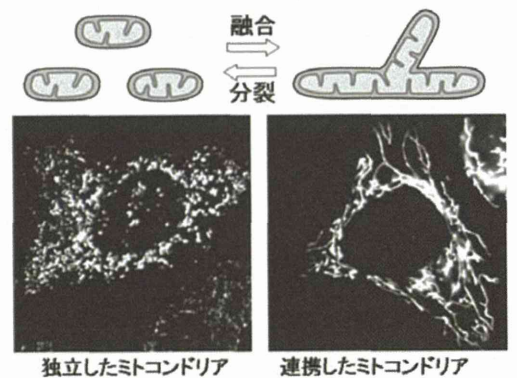


ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、
TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

TBT-mediated signaling



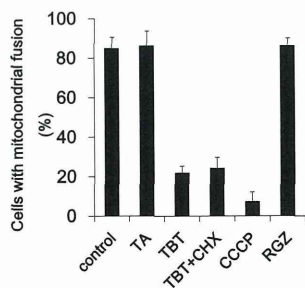
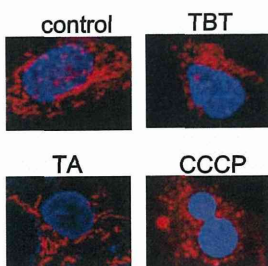
ミトコンドリアの動的制御



石原、生化学 83: 365-373 (2011)

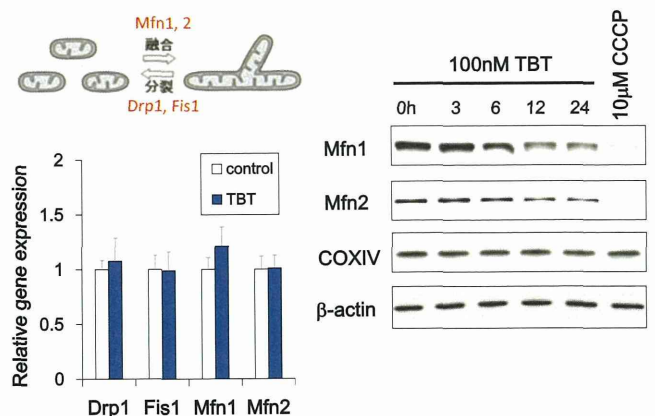
低濃度TBTによるミトコンドリアの 形態変化

ヒトNT2/D1細胞

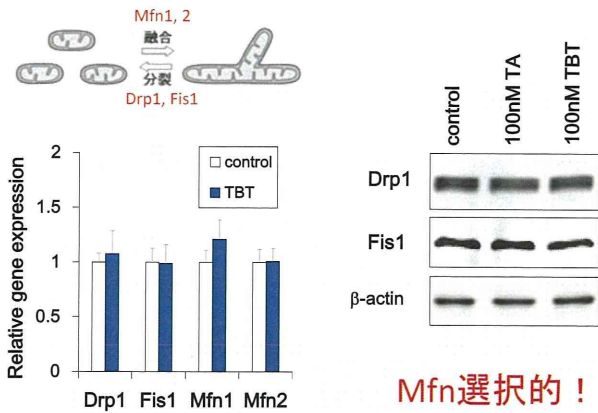


Yamada et al., in preparation

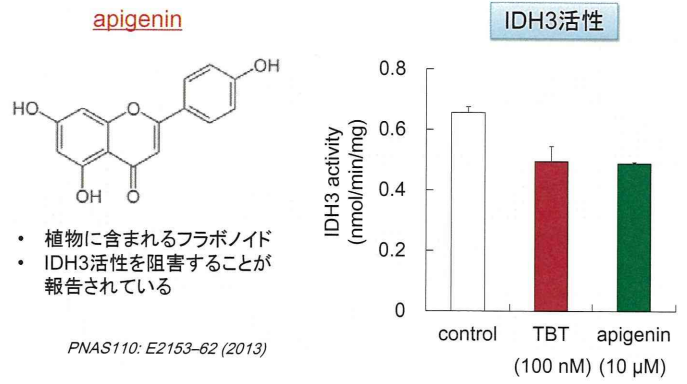
TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解



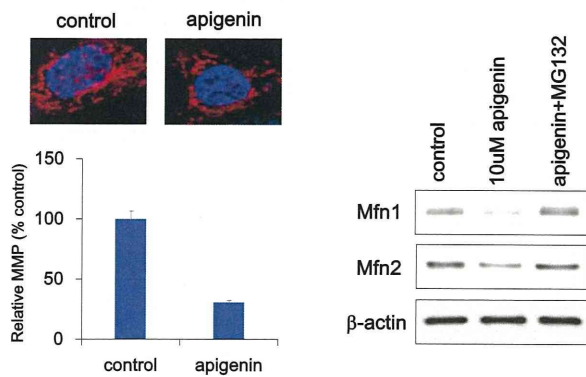
TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解



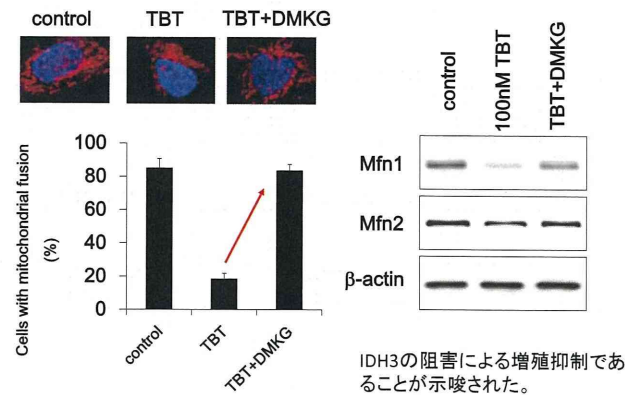
IDH3阻害剤 apigenin



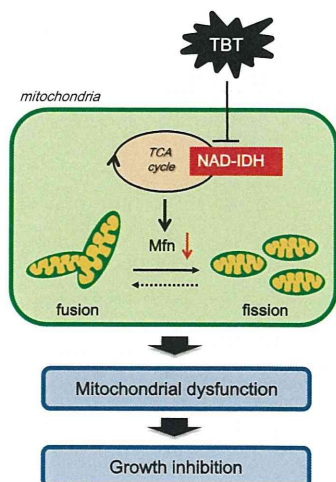
IDH3阻害剤によるミトコンドリア融合タンパク質の分解



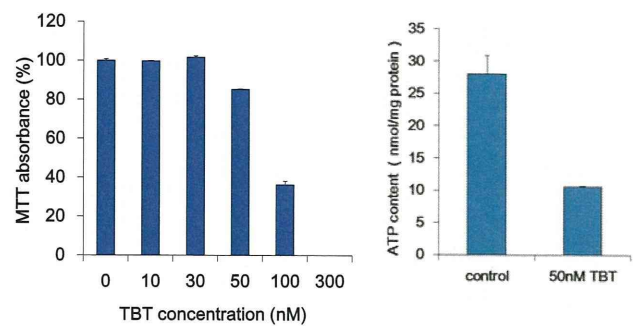
細胞膜透過性αKGアナログであるDMKGの添加によるミトコンドリア機能の回復



小括



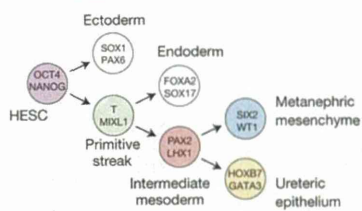
TBTによるヒトiPS細胞の増殖抑制



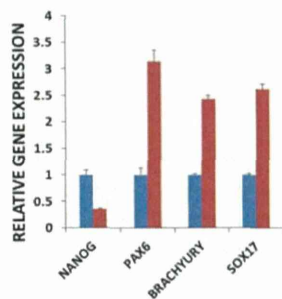
低濃度TBTの毒性作用はヒトiPS細胞でも同じ傾向!

Direct differentiation protocolによる 253G1株の分化能評価

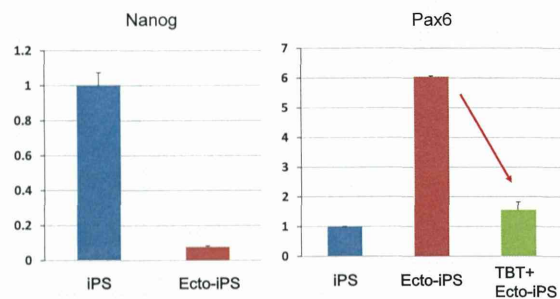
分化の系譜



Nature Cell Biology 16, 118–126 (2014)



神経系分化に対するTBTの影響



1. Mfn1を介した新たな神経分化制御機構があるのか？
2. TBTの毒性作用は、幹細胞からどの分化段階で最も強いのか？分化細胞にも影響を与えるのか？iCell-Neuronなども検討したい。

まとめ

1. 低濃度TBTは、ミトコンドリア融合タンパク質の分解を促進しミトコンドリアの機能低下を引き起こす新たな毒性発現メカニズムを明らかにした。
2. 低濃度TBTによる神経分化抑制の新たな作用を見出した。
3. ヒトiPS細胞を含めた幹細胞におけるATP産生は、化学物質の毒性評価の有用な指標になる可能性が考えられる。

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毒性メカニズムに基づく
新規in vitro発達神経毒性評価法に関する研究
(H25-化学-一般-002)
第2回 班会議

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 第四室
宇佐見 誠

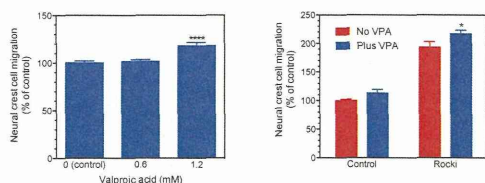
神経堤細胞の機能解析による 評価法の開発

- 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。



これまでの結果

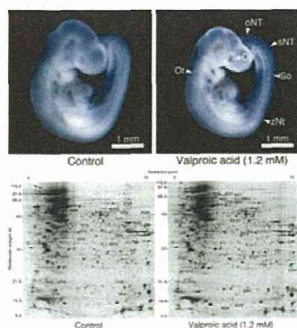
- バルプロ酸はラット神経堤細胞の遊走を促進した。
- バルプロ酸のラット神経堤細胞の遊走促進作用には、Rhoキナーゼの関与は認められなかった。



今回の結果

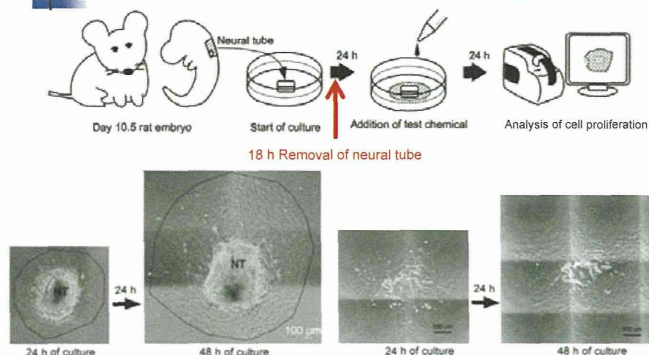
- バルプロ酸の発生毒性に関与するタンパクを調べた。
- 化学物質のラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

バルプロ酸(VPA)による発生毒性 のプロテオミクス解析

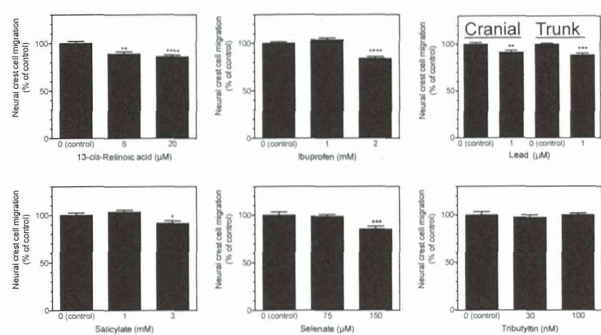


| SSP | Protein Name | UniProt |
|------|---|--|
| 0107 | Protein Pbdc1 OR RGD1562502 protein | G3V6C3 OR B2RYV5 |
| 4110 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial | Q9DCT2 |
| 4818 | Alpha-fetoprotein | P02773 |
| 4831 | | |
| 4832 | Serum albumin | P02770 |
| 5805 | | |
| 6001 | Cofilin-1 (phosphorylated) | P45592 |
| 6313 | m7GpppX diphosphatase AND Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit AND Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog4 | Q8K4F7 AND P63088 AND O61136 |
| 7102 | Glutathione S-transferase alpha-4 | P14942 |

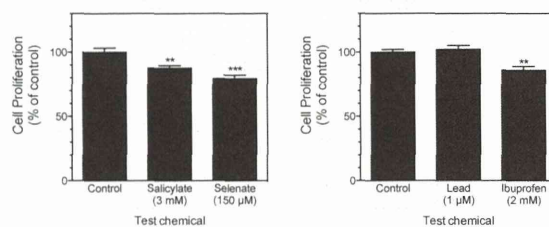
ラット神経堤細胞増殖実験法



ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす 化学物質の影響



ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす 化学物質の影響



13-シス-レチノイン酸、パルブロ酸、トリブチルスズについては解析中。

今後の計画

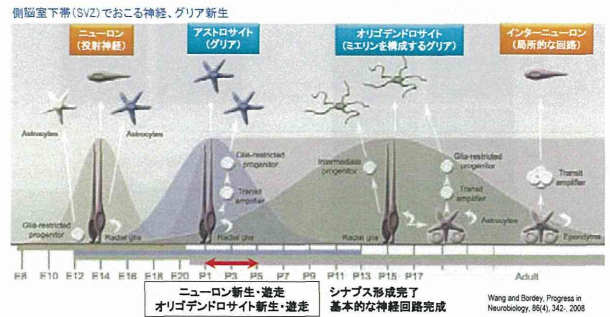
- siRNAを用いた毒性発現メカニズム解析法の確立
 - オフターゲット効果の低減
- ハイコンテンツアナリシスの応用
 - マルチパラメータによる同時解析
 - 細胞形態・タンパクの細胞内分布など



発達成長期ニューロン・グリア新生への 化学物質の影響評価

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部第一室 佐藤 薫

中枢神経系発達に必要なこと
 ・ニューロン、グリアが正常に新生される。
 ・ニューロン、グリアが正常に配置される(遊走)。
 ・シナプス形成が正しく起こり、正常な神経回路が形成される。



目的

新生期のニューロン・グリア新生(増殖・分化・遊走)への化学物質の影響を評価可能な in vitro 実験系を確立する

まずは生後初期に最も新生が活発なオリゴデンドロサイトに着目

- この時期の悪影響は・・・
- ・重篤な認知障害をもたらす可能性がある。
 - ・一生続く重篤な器質的障害が残る可能性がある。
- (脳腫瘍の小児に対して抗がん剤の使用は禁忌とされている)

実験スケジュール

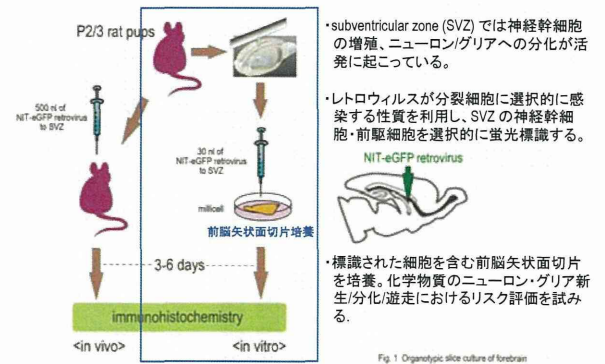
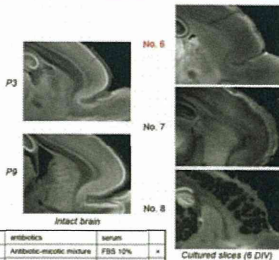
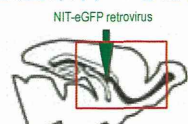


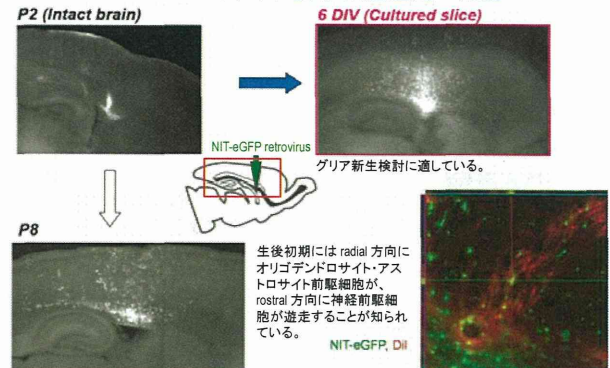
Fig. 1 Organotypic slice culture of forebrain SVZ. 100 µm sagittal sections were made at P23. NIT-eGFP was injected into the subventricular zone (SVZ), and the forebrain slices were cultured in culture medium containing NIT-eGFP. The SVZ of SVZ and sagittal sections were made 14 days later.

前脳切片培養 至適条件の検討

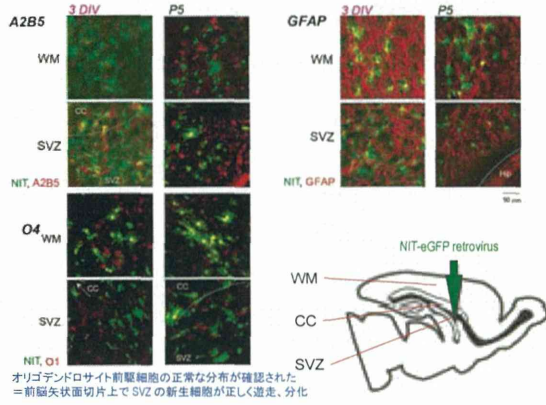


| medium | supplement | buffer | antibiotics | serum |
|--------|-----------------|---|-----------------------------|----------------|
| 1 | DMEM | | Antibiotic-miscotic mixture | FBS 10% × |
| 2 | DMEM | N2 1% | | FBS 10% × |
| 3 | DMEM F-12 (1:1) | N2 0.1% | PS | FBS 10% × |
| 4 | DMEM F-12 (1:1) | ITS 1%, Progesterone 20 nM, Putrescine 40 µM, L-Glutamine 2 mM, D-Glucose 33.3 mM, Na ₂ CO ₃ 3 mM | HEPES 45 mM | |
| 5 | BME | L-Glutamine 1 mM, D-Glucose 27.8 mM | HEPES 25% | HB 5% × |
| 6 | Neurobasal | N2 1%, B27 1%, L-Glutamine 2 mM, D-Glucose 33.3 mM, Kynurenine acid 0.5 mM | PS | |
| 7 | BME | N2 1%, B27 1%, ITS 1%, L-Glutamine 1 mM | HEPES 25% | PSA FBS 0.5% ○ |
| 8 | BME | D-Glucose 36.7 mM | PSA | HB 25% × |

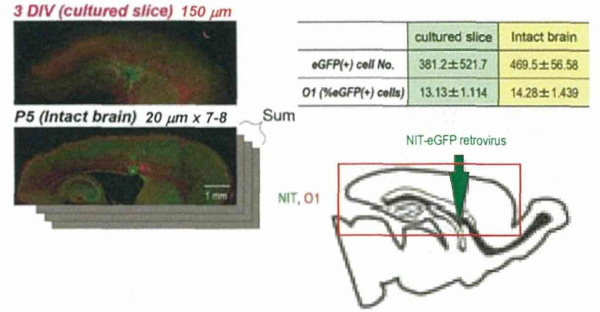
前脳矢状面培養切片における ニューロン、グリア前駆細胞遊走の確認



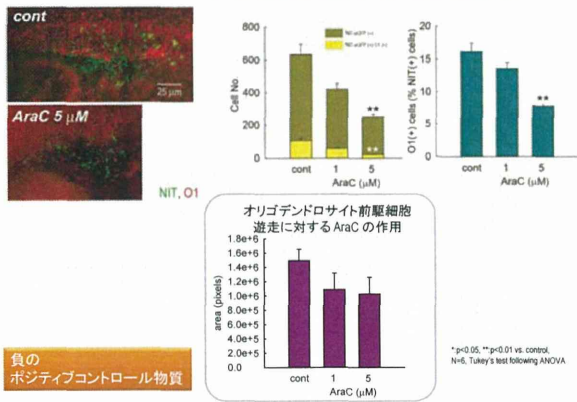
前脳矢状面培養切片における分化マーカーの発現分布



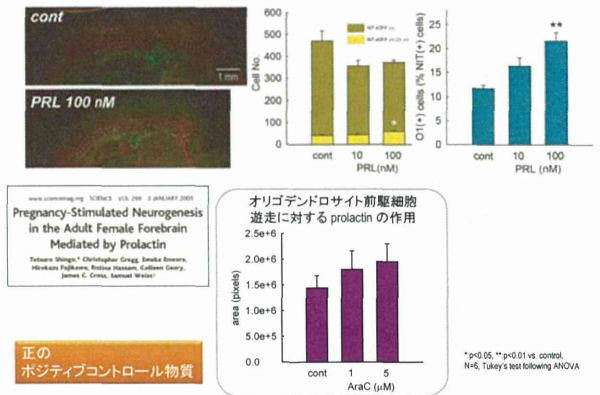
前脳培養切片におけるオリゴデンドロサイト新生



オリゴデンドロサイト新生に対する AraC の作用

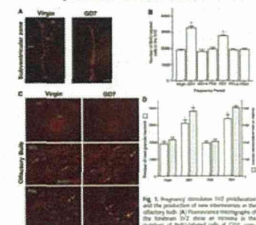


オリゴデンドロサイト新生に対する prolactin の作用

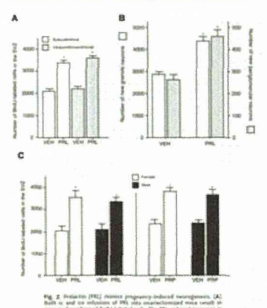


Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin

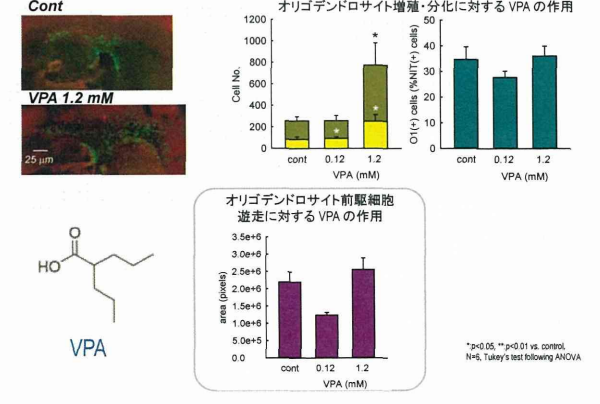
Tetsuro Shingo,* Christopher Gregg, Emeka Enwere, Hirokazu Fujikawa, Rozina Hassam, Colleen Geary, James C. Cross, Samuel Weiss!



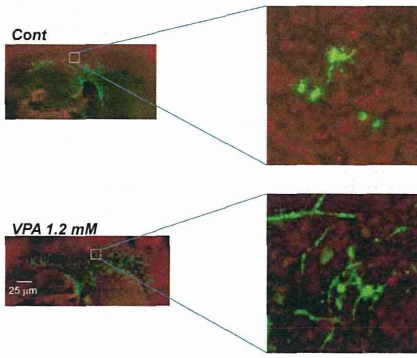
Prolactin は SVZ の neurogenesis を促進する



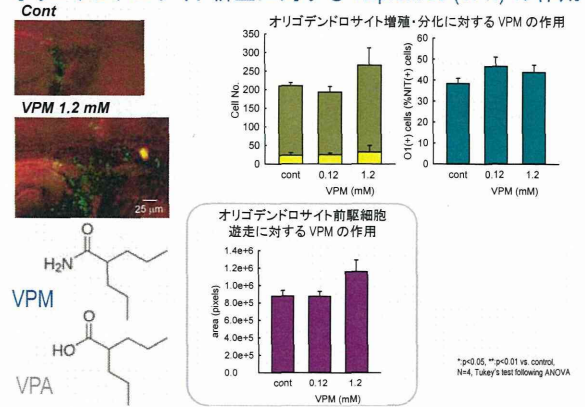
オリゴデンドロサイト新生に対する Valproic acid (VPA) の作用



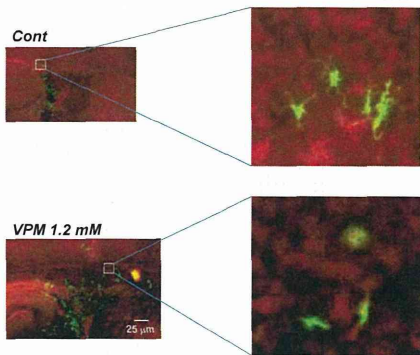
オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用



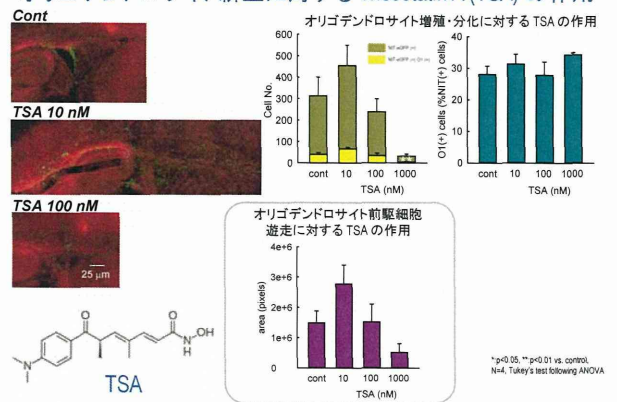
オリゴデンドロサイト新生に対する Valpromide (VPM) の作用



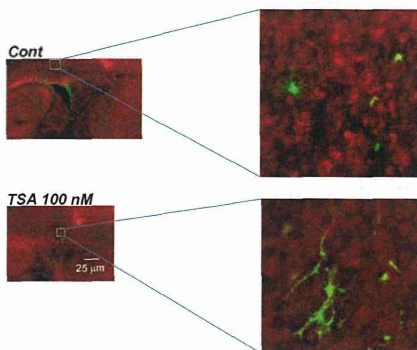
オリゴデンドロサイト新生に対する VPM の作用



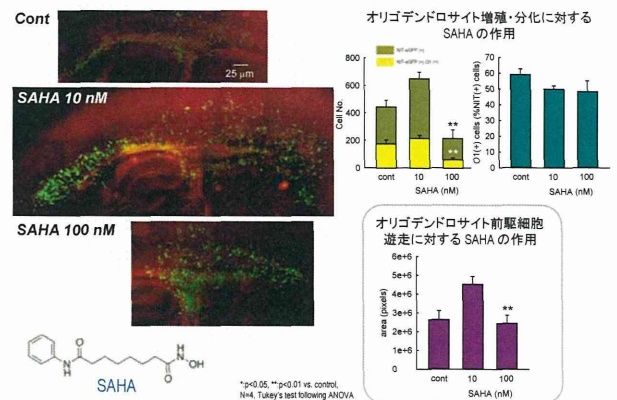
オリゴデンドロサイト新生に対する Tricostatin A (TSA) の作用



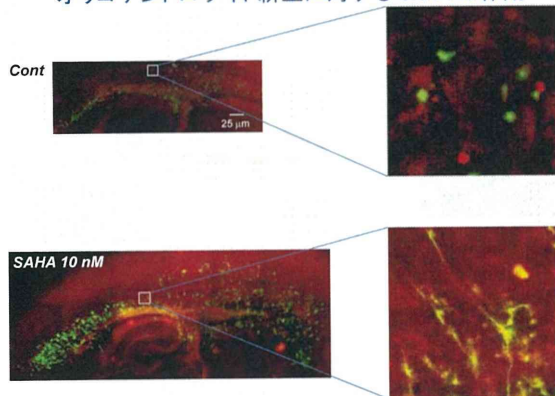
オリゴデンドロサイト新生に対する TSA の作用



オリゴデンドロサイト新生に対する suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の作用



オリゴデンドロサイト新生に対する SAHA の作用



まとめ

・SVZ 新生細胞を蛍光標識した前脳矢状面切片培養系を用いて、バルプロ酸 (valproic acid: VPA) が新生細胞数を増加させること、この影響は細胞種 (将来神経細胞になるか、グリア細胞になるか) に依存しないこと、VPA 適用スライス中の遊走細胞の突起が非常に発達することを見いだした。

・HDAC inhibition 作用をもたない VPA アナログ Valpromide (VPM) は上記パラメーターに何ら影響を与えなかった。

・HDAC inhibitor である Tricostatin A (TSA)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) は新生細胞数を増加させる傾向を見せた。また、新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の割合に影響を与えなかった。遊走中の新生細胞の突起発達を引き起こした。

→HDAC inhibition が新生細胞数や新生細胞の突起発達に影響を与えること裏付けられた。

現在、TBT の作用検討準備中

平成26年度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毒性メカニズムに基づく新規in vitro
発達神経毒性評価法に関する研究」
班会議 議事次第

日時：平成27年1月31日（土）9時00分～17時00分

場所：国立医薬品食品衛生研究所 4号館2階 薬理部部長室

（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1）

出席者：上野 晋、笛田由紀子（産業医大）、吉田祥子（豊橋技術科学大）、
関野祐子、諫田泰成（国衛研）

（以上、敬称略、順不同）

議 事

1. はじめに（9:00～10:00）

諫田：「中間報告書について」

2. in vivo 評価系の進捗状況①（10:00～11:45）

関野・吉田：「有機スズ胎生期単回投与ラットの授乳期における行動観察と小
脳発達・機能の検討～第1報」

【ランチ】

3. in vivo 評価系の進捗状況②（13:00～14:45）

上野・笛田：「有機スズ胎生期単回投与ラットの授乳期における海馬CA1領野
の局所神経回路機能の検討～第1報」

【休憩】

4. in vitro 評価系の進捗状況（15:00～16:00）

諫田：「ヒト未分化細胞を用いた有機スズの毒性に関する知見」

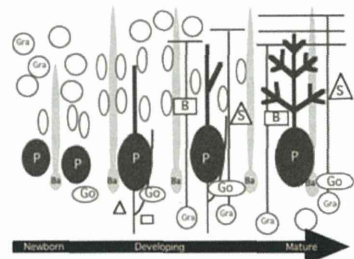
5. 総合討論・まとめ（16:00～17:00）

以上

生後神経回路の機能的影響 評価指標に関する研究

吉田祥子

豊橋技術科学大学環境生命工学系



P: プルキンエ細胞, Gra: 顆粒細胞, B: バスケッ細胞, S: 星状細胞, Go: ゴルジ細胞, Ba: バーグマングリア

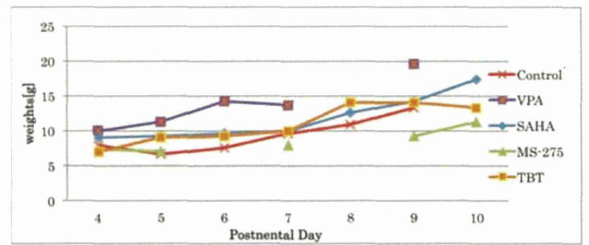
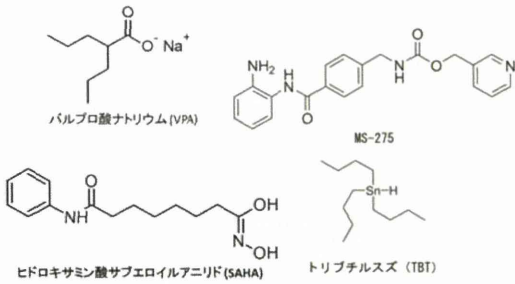
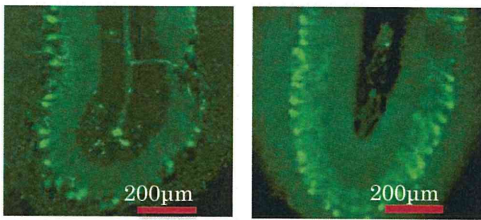
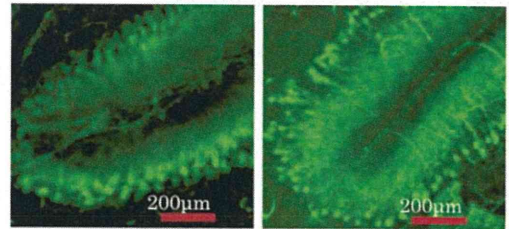


Figure 1 日齢に伴う体重の変化(体重は平均値)



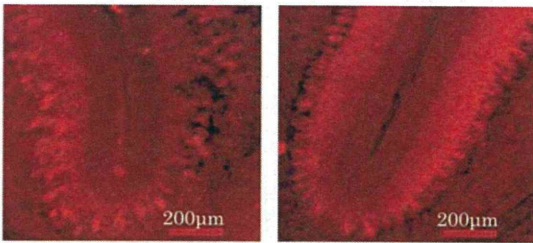
对照動物 P11

对照動物 P13



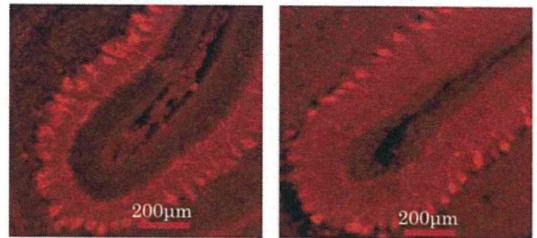
SAHA 投与動物 P10

SAHA 投与動物 P13



MS-275 投与動物 P10

MS-275 投与動物 P13



TBT 投与動物 P10

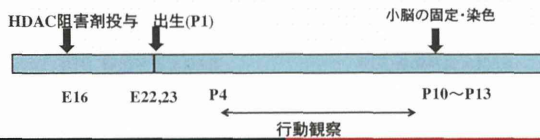
TBT 投与動物 P13

・行動観察(Open Field testing)

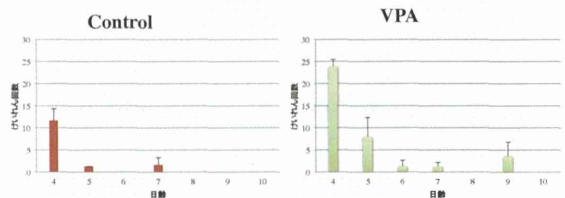


不随意運動を計測
紙箱の中で3分間オープンフィールドテストを行った。
(ラットは毎回無作為に3匹選出)

・実験の流れ



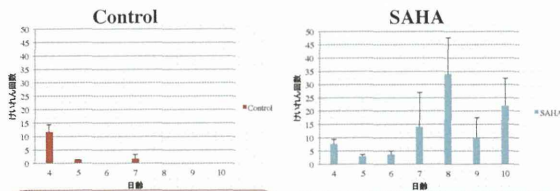
まとめ: VPA被曝ラットの行動観察



・P4付近で不随意運動をやや確認。
・成長するにつれて不随意運動の減少

・Controlと比較して各日齢で不随意運動が多く確認できた。
・成長と共に不随意運動が減少。

まとめ: SAHA被曝ラットの行動観察



・P4付近でやや不随意運動を確認。
・成長と共に不随意運動の減少。

・Control, VPAと比較して不随意運動が多く確認できた。
・成長と共に不随意運動の増加し、特にP6以降で増加した。

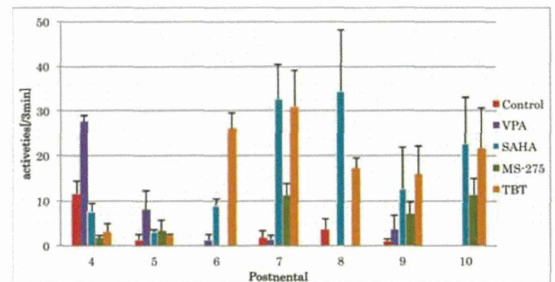


Figure 1 各日齢における不随意運動の回数-全実験ラット(n=3)

