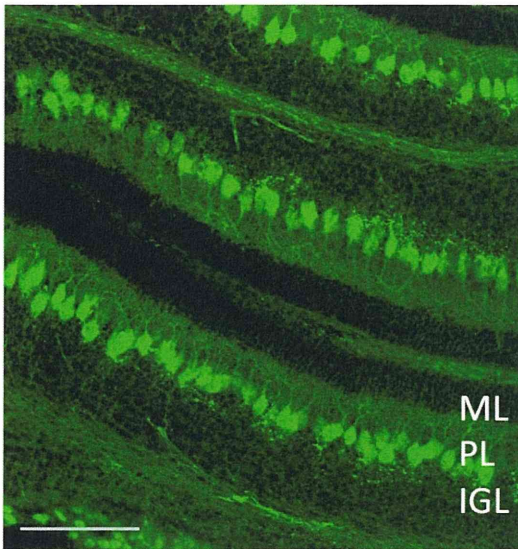
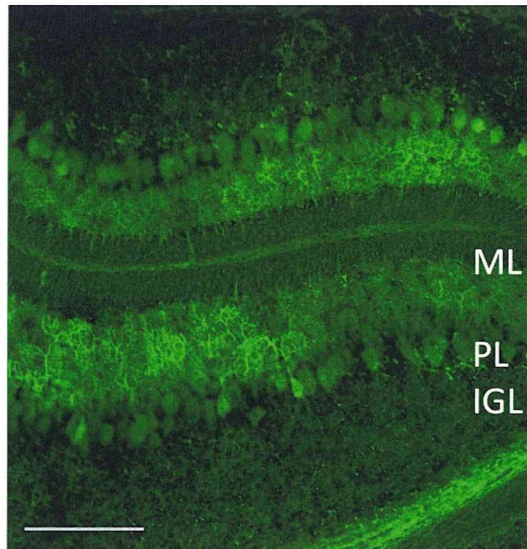


A



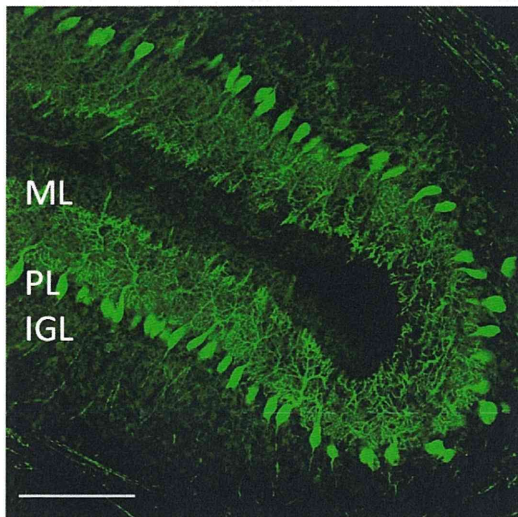
Control P11

B



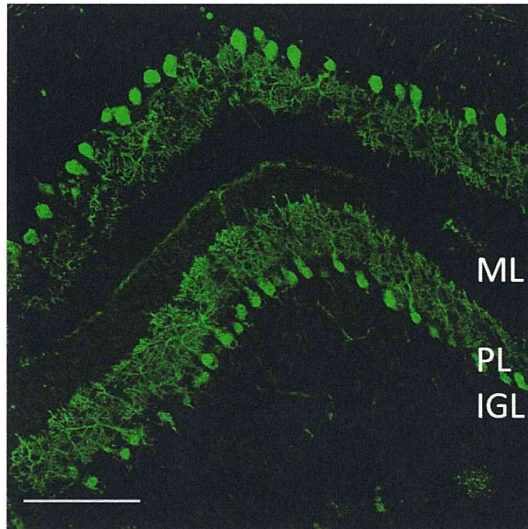
VPA P11

C



SAHA P11

D



TSA P11

図5 抗カルビンジン D-28k 抗体によるプルキンエ細胞染色。対照動物(A)に比べ、VPA 投与動物(B)、SAHA 投与動物(C)で網目状にプルキンエ細胞の樹状突起が伸長している。トリコスタチン投与動物(D)では大きな変化はない。

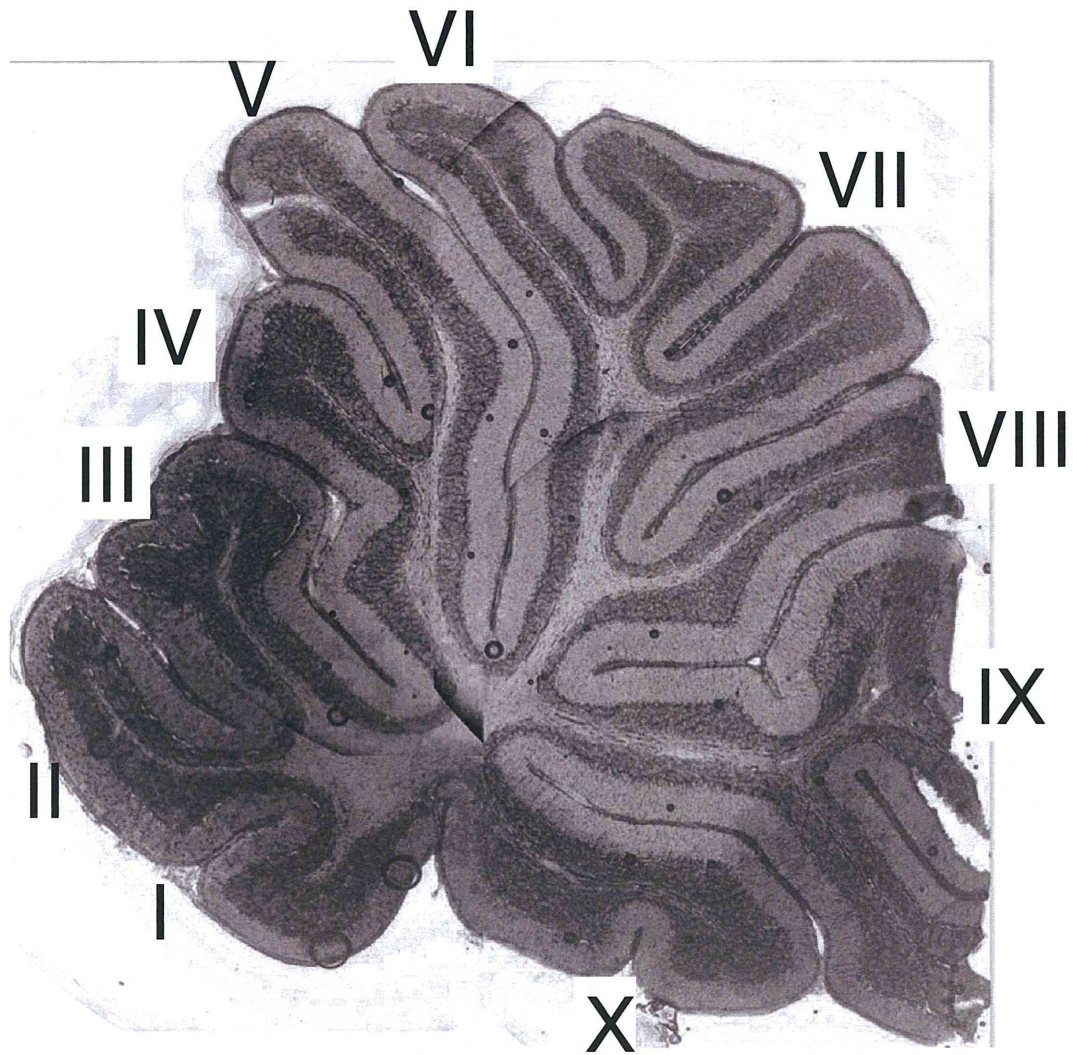


図6 P16小脳皮質と小葉I~X

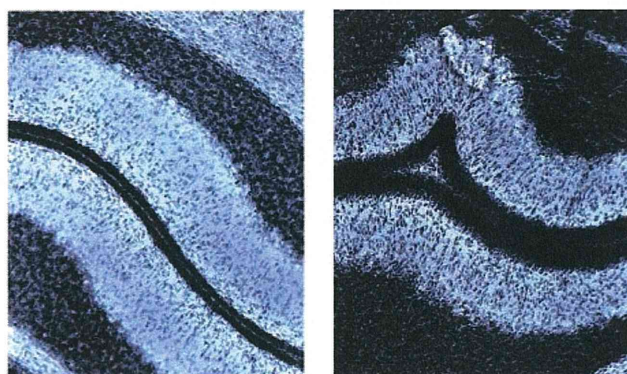
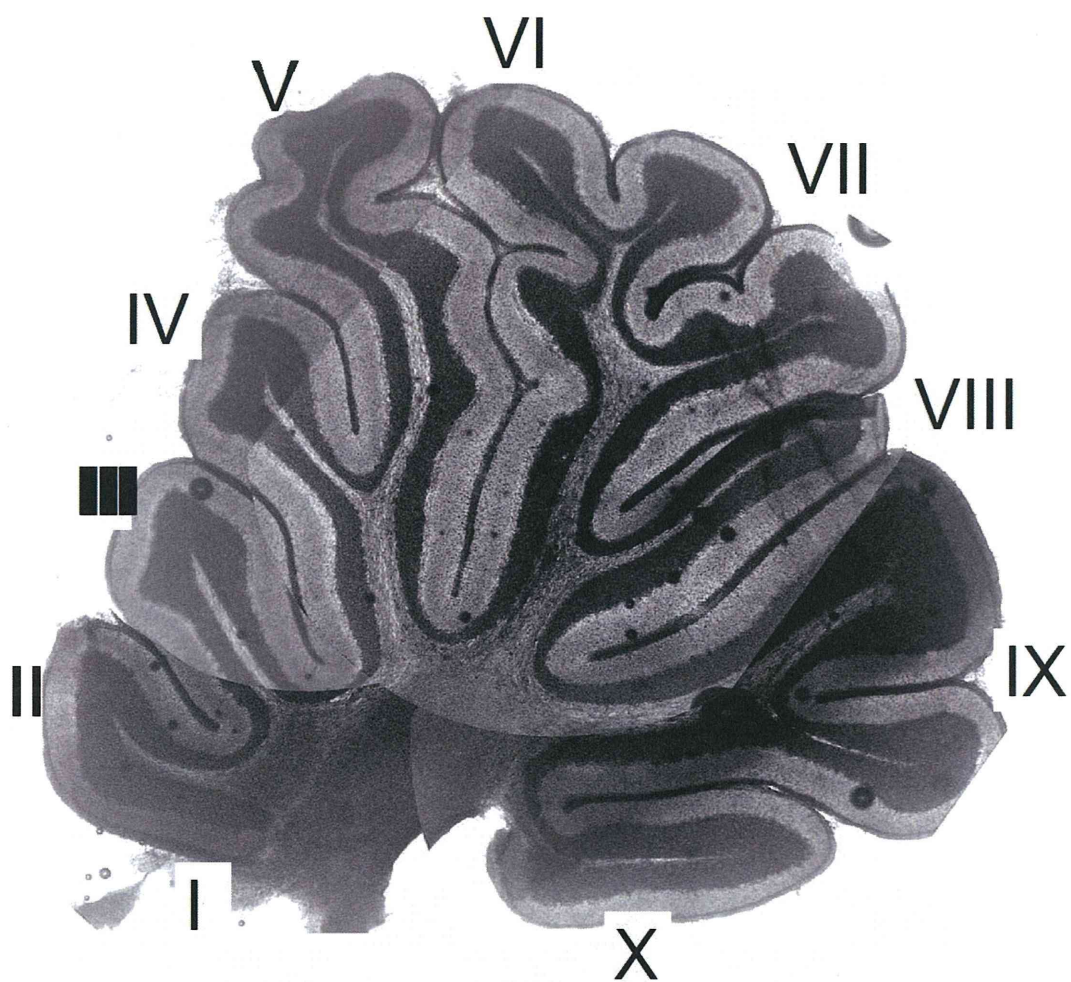


図7 P16 VPA 投与動物の小脳小葉(A)と拡大図(B:対照動物、C:VPA 投与動物)

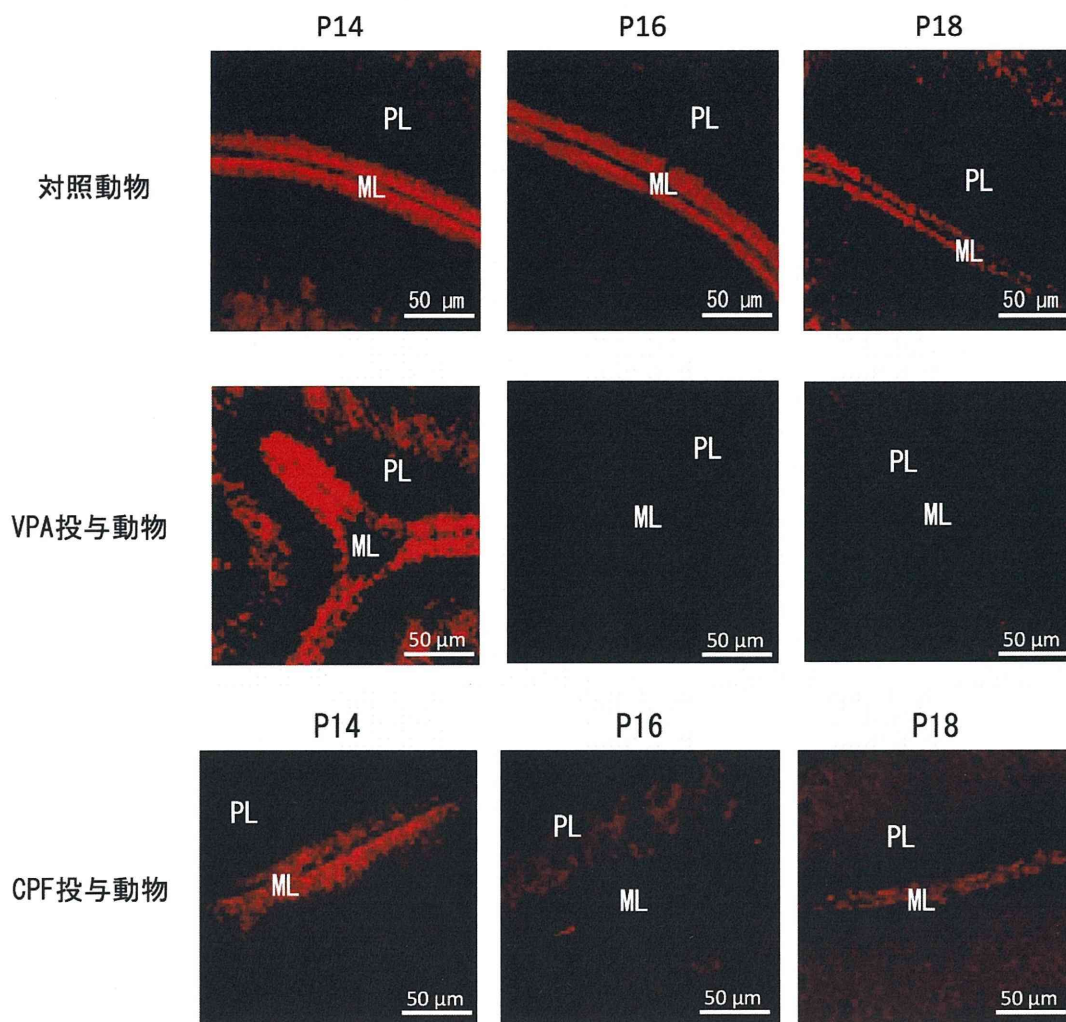


図8 ブロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みによる分裂期細胞の分布。対照動物では P18 まで BrdU 取り込みを示す細胞が分子層上部に分布しているが、VPA 投与動物、CPF 投与動物では P14 以降 BrdU 取り込み能を示す細胞が激減した。

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

要旨

平成 26 年度までのトリブチルスズ（TBT）の胎生期投与ラットを用いた検討で、生後早期の海馬神経回路機能に対して TBT の胎生期曝露は回路機能を抑制することが見出され、海馬神経回路機能の発達遅延を生じる可能性を示唆する結果を得ていた。平成 27 年度は GABA_A 受容体拮抗薬ビククリンに対する反応性について解析したところ、開眼後となる生後 16 日齢で抑制系に TBT 胎生期曝露による影響が認められた。このことから、VPA と同様に TBT 胎生期投与でも 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。このように作用機序が異なるとされる VPA および TBT という 2 種類の化学物質から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。

また生後 1 週目あたりに出現する不随意運動に着目し、日齢 5～7 日における不随意運動の出現を調べたところ、対照群ではこの期間で不随意運動量が次第に減少していったが、TBT 胎生期投与群では減少を認めなかった。海馬スライスを用いた指標との関連は不明であるものの、不随意運動も何らかの神経回路発達を反映しているものと考えれば、ここにも TBT 胎生期投与が影響している可能性が示唆される。この生後 1 週齢における不随意運動評価と、2 週齢に実施する海馬スライス標本を用いた神経回路機能の評価の関連性が明らかにできれば、発達神経毒性評価も 2 週齢までは同一の曝露モデルラットを用いることが可能になり、評価に使用する動物数の削減にも貢献することが考えられる。

第 3 の化学物質として有機リン系農薬クロルピリホス（CP）を選択し、同様に胎生期曝露ラットを用いた生後早期の海馬神経回路機能を評価したところ、VPA 胎生期曝露の場合に認められた興奮性神経回路の発達が亢進する傾向が認められた。今後は CP の投与量を増加して再評価する必要があると考えられる。

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. トリプチルスズ (TBT)、酢酸スズ (TA) ならびにクロロピリホス (CP) の胎生期曝露 (研究協力者 笹田由紀子、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 TBT あるいは CP を経口投与した。投与量について、TBT は 20 mg/kg (以下 TBT20 群)、TA は TBT 投与におけるスズの投与量を等しくするために 15 mg/kg (以下 TA15 群)、CP は 10 mg/kg (以下 CP10 群) の割合で投与し、対照として溶媒である 50% ポリエチレングリコール (TBT20 群の対照)、あるいは 0.1% ジメチルスルホキシド (CP10 群の対照) 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 笹田由紀子)

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; KH_2PO_4 , 1.25; MgSO_4 , 2; NaHCO_3 , 26; glucose, 10、実験に用いた人工脳脊髄液は NaCl, 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1.25; CaCl_2 , 2; MgSO_4 , 2; NaHCO_3 , 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 (O_2/CO_2 :95%/5%) で飽和し 3.5 - 4°C に冷やした人工脳脊髄液中ですば

やく行った。スライスは Haas 型チャンバー内 (32.0 \pm 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 M Ω)、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。

4. 興奮系発達における GABA_A 受容体拮抗薬 (ビククリン、BMI) の関与 (研究協力者 笹田由紀子)

GABA 抑制系は神経発達において重要な役割を果たすことから、胎生期における化学物質投与によって GABA 抑制系の機能が変化すれば神経発達にも何らかの影響を呈することは容易に予測される。そこで GABA 抑制系の変化を調べるために、PS 振幅の刺激応答性で明らかな変化が認められた日齢での海馬スライスを用いることとし、TBT 胎生期曝露では PND14 と PND16 を対象とした。単回刺激による PS と fEPSP の大きさを GABA_A 受容体拮抗薬 (ビククリン、BMI) 存在下、および非存在下で比較し、その変化率を検討した。

5. 生後1週目に出現する不随意運動を指標とする試験法と解析法 (研究協力者 笹田由紀子、吉田祥子)

後述するが、本研究を実施していく中で、生後1週目の TBT20 群仔ラットにおいて、持続性は短いものの痙攣用の不随意運動がしばしば観察された。この不随意運動は対照群の仔ラットでも観察されたことから、本来この時期の仔ラットに出現する運動であることが考えられる。そこで胎生期曝露によってこの不随意運動の出現が変化するのではないかと考えて、本研究ではその頻度を定量することにした。具体的には母ラットから離れた仔ラットを、約 32°C に保温された箱に入れて体温の低下を防ぎながら3分間行動を観察するとともにビデオに記録した。この運動の定量的解析については、計測の個人差

が出ることを考慮し validation を検討するために2名の計測者を決め、ビデオ再生下で1秒ごとに不随意運動の有無を独立して計測し、3分間の観察時間中に生じた不随意運動の合計量を秒数で表記した。すべてのビデオについて計測した後に、2名の計測者による結果の差を検討した。今回の不随意運動評価に用いた対照群および TBT20 群のラットの匹数については表 1 に示してある。

(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 TBT、TA および CP 胎生期曝露の影響

単回刺激による興奮系の刺激応答性について、平成 26 年度に引き続き実験数を増やした結果から、対照群では PND15 から PND16 にかけて著明に亢進することが確認できた (図 1、上段)。これに対して TBT20 群ではこの亢進は明確でなく、平成 26 年度に報告したように PND16 においては対照群と比較して減弱した刺激応答性を示した (図 1、中段)。TBT、すなわち有機スズの対照として用いた TA15 群においては、TBT 対照群と類似した刺激応答性のパターンを示した (図 1、下段)。

TBT 対照群の平均開眼時期が日齢 16.7 であり、刺激応答性の変化はこの開眼時期を境に観察されたことから、この前後すなわち PND14 と PND16 について、単回刺激 (600 μ A) 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 μ M) の効果について検討した (図 2)。TBT 対照群では BMI 存在下で開眼前期において PS 振幅は著増した (平均増加率 52 \pm 9.6%) もの開眼後期ではその増加はわずかなものとなり (平均増加率 9.8 \pm 3.0%)、GABA 作動性抑制系の関与が発達に伴い異なることが示唆された。一方、TBT20 群については、PND14 では BMI 存在下での PS 振幅の増加は、対照

群の同時期で認められたものと同様 (平均増加率 42 \pm 5.2%) であった。しかし PND16 になっても増加は認められていた (平均増加率 37 \pm 8.3%)。

さらに個々のスライス標本から得られた BMI に対する反応の比 (BMI 存在下での PS 振幅/BMI 非存在下で PS 振幅) をその分布ならびに近似曲線により検討した。PND14 では対照群と TBT20 群とでは近似曲線で示されるようにその分布はほぼ等しくなったが (図 3)、PND16 では対照群と比べ TBT20 群の分布近似曲線が右方移動していることが見出された (図 4)。言い換えると、対照群で見られるように本来は発達 (PND14 から PND16) に伴い分布近似曲線が左方移動するところが、TBT 胎生期曝露によって左方への移動が軽度ではあるが抑制されているとも言える。以上のことから、開眼期に認められる GABA 作動性抑制系の関与に対しても TBT の胎生期曝露は影響を与えていることが判明した。

CP 胎生期投与の刺激応答性の検討については実験数が十分とはいえないまでも、VPA 対照群や TBT 対照群の場合と同様に、PND15 から PND16 にかけて刺激応答性の亢進を示した (図 5)。

2. 不随意運動の出現、ならびにこれに対する TBT、TA 胎生期曝露の影響

不随意運動量を PND 5-7 の3日間で解析した結果、対照群では運動量 (総秒数) が日齢を経るとともに有意に減少していることが判明した ($p<0.05$)。ところが、TBT20 群と TA15 群については、3日間の不随意運動量には変化が認められなかった。また PND 5における不随意運動量については3群間に有意差はなかったが、PND 7においては対照群と TBT 群との間に有意な差が認められた。一方、授乳期の後半になるとこの不随意運動は3群ともに認められなくなった。このことから、今回着目したこの不随意運動は授乳期早期に出現し発達とともに減少するものであること、さらに TBT の胎生期投与はこの運動が減少する時期に影響を与えている可能性があることが考えられた。したがってこの不随意運動の発現および発達に伴う変化の背景にも、何らかの神経発達が関与している可能性が考えられる。不随意運動の結

果はTBT 対照群とTBT20 群についてのみ図6に示している。

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、TBT、TA およびCP 投与による発達神経毒性評価を生後早期で実施してきた。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、このメカニズムを解明する目的でGABA 作動性抑制系に着目し、授乳期の発達に伴うGABA 抑制系の関与が開眼時期に合わせて変化すること、VPA 胎生期投与群ではこの発達に伴う変化がすでに開眼時期以前に出現することを見出している。

今回、20 mg/kg のTBT を胎生期に投与することによって、開眼時期であるPND16 に興奮系の刺激応答性の発達遅延が出現することが示唆された。さらにGABA 抑制系についても、発達に伴ってGABA 抑制系に依存した反応性が減弱するという現象がTBT 胎生期投与により認められなかったことは発達遅延の可能性を示唆するものである。前述した分布度近似曲線の発達に伴う左方移動が抑制されていることも、発達遅延が生じていることを支持する結果であると言える。

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。本研究ではGABA_A受容体拮抗薬BMI を用いた薬理的なアプローチにより、VPA の胎生期投与では開眼前期において対照群の開眼期と類似した反応性であることから発達の亢進が示唆され、またTBT 胎生期投与では開眼期においても対照群の開眼前期に近い反応性であることから発達の遅延が示唆されており、これら化学物質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。

平成27年度はさらに、その作用ならびに作用機序がVPA やTBT とは異なるCP の胎生期投与の影響を検討する実験を開始したが、現在のところ、VPA やTBT の刺激応答性の発達に伴う変化は認められていない。

CP が胎生期に投与された場合、ヒトではVPA の場合のように自閉症が発生することが疫学研究で報告されている。また吉田らの今年度の成果として、(1) 不随意運動量の評価ではVPA 胎生期投与群と類似した結果を示すこと、(2) VPA 胎生期投与で認められた小脳プルキンエ細胞の細胞死抑制、樹状突起の異常伸長が観察されること、(3) VPA 胎生期投与で認められた小脳V/VI層における脳回の過剰形成が観察されること、の3点を速報として得ている。このことから化学物質によって、あるいは投与時期によって、脳内部位の感受性が異なることも考えられたため、今後CP の投与量を増加した胎生期曝露モデルを作成することも視野に入れている。

本年度の結果から、TBT 胎生期投与ではVPA 胎生期投与とは逆に、発達に伴う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 評価系においても、VPA による機能亢進、TBT による抑制が認められた(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)。またCP に関しても条件によりその作用に違いが認められたとの情報もあり、in vivo 評価系においても小脳と海馬で影響が異なる可能性は考えられる。

また今年度、本研究分担班では日齢5日から7日における不随意運動の出現に着目してその評価を行ったところ、対照群ではこの3日間で不随意運動量が次第に減少したが、TBT 胎生期投与群では減少しなかった。この結果は、吉田らの班においてVPA あるいはCP 胎生期投与群に対して実施された運動量の評価結果と類似した傾向を示している。不随意運動を3分間観察するという極めてシンプルな試験方法ではあるが、発達神経毒性評価のin vivo 実験系におけるスクリーニング的な指標として応用できる可能性も考えられるだろう。この不随意運動という指標と、海馬スライスを用いた指標との関連はまだ不明であり今後の検討課題であるが、生後1週目の発達期に対しても、TBT 胎生期投与が影響を与えていることを今回見出せたこと

は、この評価と2週齢に実施する海馬スライス標本を用いた神経回路機能の評価とを併せた発達神経毒性評価法を確立できることにも繋がる。これが実現すれば2週齢までは同一の曝露モデルラットを用いることが可能になり、評価に使用する動物数の削減にも貢献することが考えられる。

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27年度は環境ホルモン様作用を示すものの一つとして知られているTBTを投与した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、TBT胎生期曝露ラットでは神経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] Ishidao T, Fueta Y, Ueno S, Yoshida Y, Hori H. A cross-fostering analysis of bromine ion concentration in rats that inhaled 1-bromopropane vapor. *J. Occup. Health*, in press.
- [2] Fueta Y, Kanemitsu M, Egawa S, Ishidao T, Ueno S, Hori H. Prenatal exposure to 1-bromopropane suppresses kainate-induced wet dog shakes in immature rats. *J UOEH*. 37:255-261 (2015).
- [3] Li X, Toyohira Y, Horishita T, Satoh N, Takahashi K, Zhang H, Inuma M, Yoshinaga Y, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Ikarisoside A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 388:1259-1269 (2015).
- [4] 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).
- [5] 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).
- [6] 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).
- [7] Okura D., Horishita T., Ueno S., Yanagihara N., Sudo Y., Uezono Y., Sata T. The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7 and Nav1.8 in *Xenopus* oocytes. *Anesth. Analg*. 118:554-62 (2014).
- [8] Yanagihara N, Zhang H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K. New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids in the catecholamine system. *J Pharmacol Sci*. 124:123-8 (2014)
- [9] Inagaki H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Obara G, Kawagoe T, Tsutsui M, Hachisuga T, Yanagihara N. Effects of selective estrogen receptor modulators on plasma membrane estrogen receptors and catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci*. 124:66-75 (2014).
- [10] 上野 晋 化学物質（金属・有機溶剤）の毒性学と産業医としての対応 産業医科大学雑誌 第35巻特集号:91-6 (2013).
- [11] Park EK, Wilson D, Choi HJ, Wilson CT, Ueno S. Hazardous metal pollution in the republic of Fiji and the need to elicit human exposure. *Environ Health Toxicol*. doi:10.5620/eht.2013.28.e2013017 (2013).
- [12] Obara G., Toyohira Y., Inagaki H., Takahashi K., Horishita T., Kawasaki

T., Ueno S., Tsutsui M., Sata T., Yanagihara N. Pentazocine inhibits norepinephrine transporter function by reducing its surface expression in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci.* 121:138-47 (2013).

2. 学会発表

- [1] 笛田由紀子、上野 晋. 自閉症モデルラットを用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
- [2] Tomida T, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Yoshida S. The effects of HDAC inhibitors on developing cerebellar astrocytes. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [3] Waranabe K, Abe T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Hozumi N, Yoshida S. Alteration of neurotransmitter release in cerebellar cortex of valproate-administered rat using the enzyme-linked photo assay system. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [4] Nakajima S, Katsumata D, Abe T, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Yoshida S. Alteration of neuronal development and behavioral anomaly in autistic-like anomalous developing cerebellum. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
- [5] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Prenatal administration of valproic acid or tributyltin alters developmental transient of hippocampal excitability in juvenile rats. 第

58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月、大宮

- [6] Yoshida S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Prenatal administration of valproic acid or SAHA alters the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellum. 第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月、大宮
- [7] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Prenatal single administration of tributyltin alters developmental transient of spontaneous behaviors and basic excitability in the hippocampal slices of immature rats. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology. 2015 年 3 月、USA (発表予定)
- [8] Yoshida Y, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Prenatal administration of valproic acid alters both the Purkinje cell dendrites and the granule cell proliferation in rat developing cerebellum. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology. 2015 年 3 月、USA (発表予定)
- [9] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野晋. 胎生期トリブチルスズあるいは酢酸スズ単回投与による授乳期ラットの行動と興奮・抑制系の変化. 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月、名古屋(発表予定)

H. 知的財産の出願・登録状況
(該当なし)

	control			TBT		
	PND5	PND6	PND7	PND5	PND6	PND7
腹数	4	6	7	4	5	5
ラット数	40	60	70	37	46	46

表 1. 不随意運動解析に用いた対照群と TBT20 群の腹数および仔ラット数

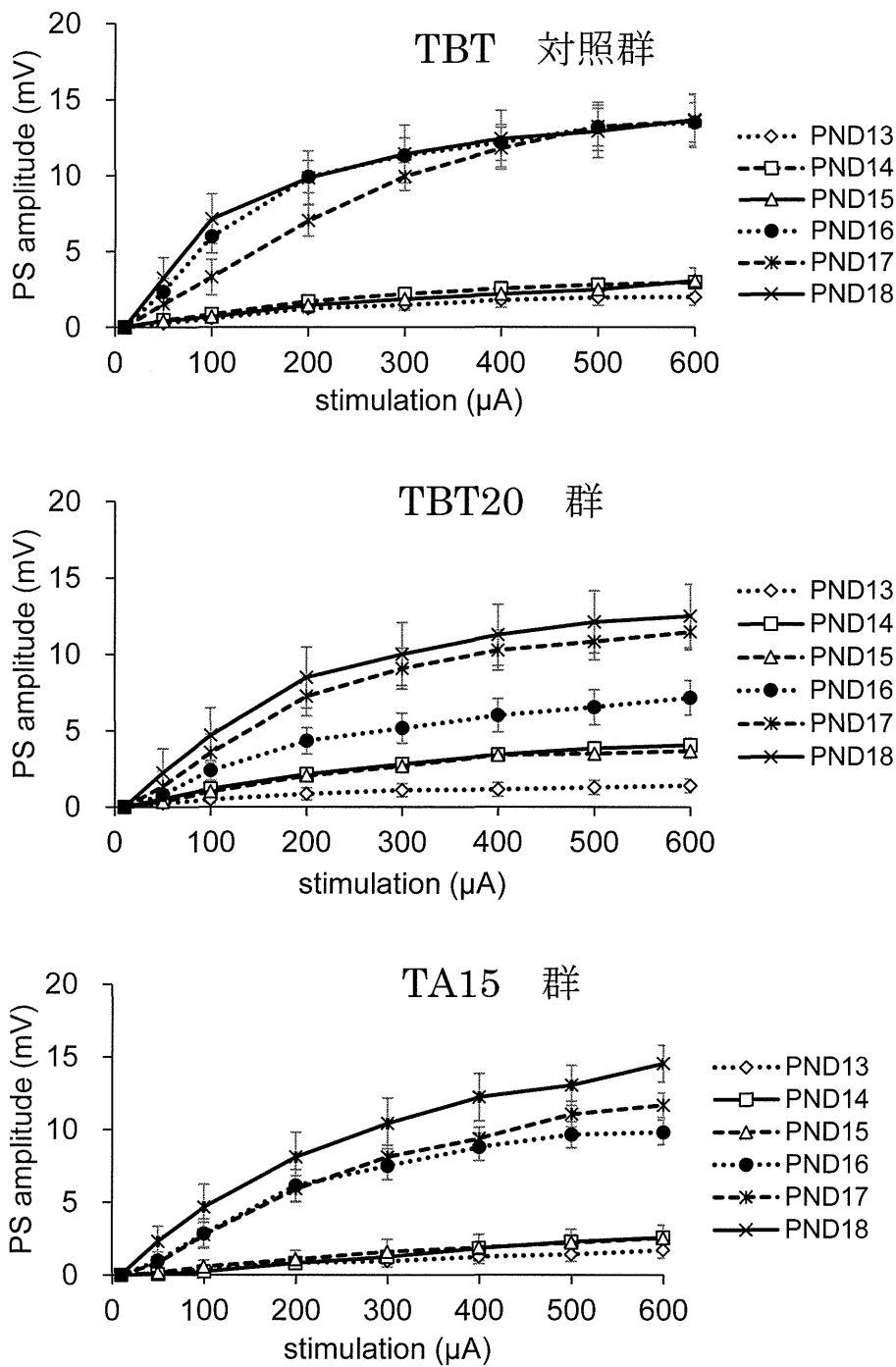


図1. トリブチルスズ (TBT) と無機スズ (TA) を胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた海馬 CA1 領域の集合スパイク電位 (PS) の振幅を指標とする刺激応答性。横軸は刺激の大きさ (μA)、縦軸は PS の振幅 (mV) である。

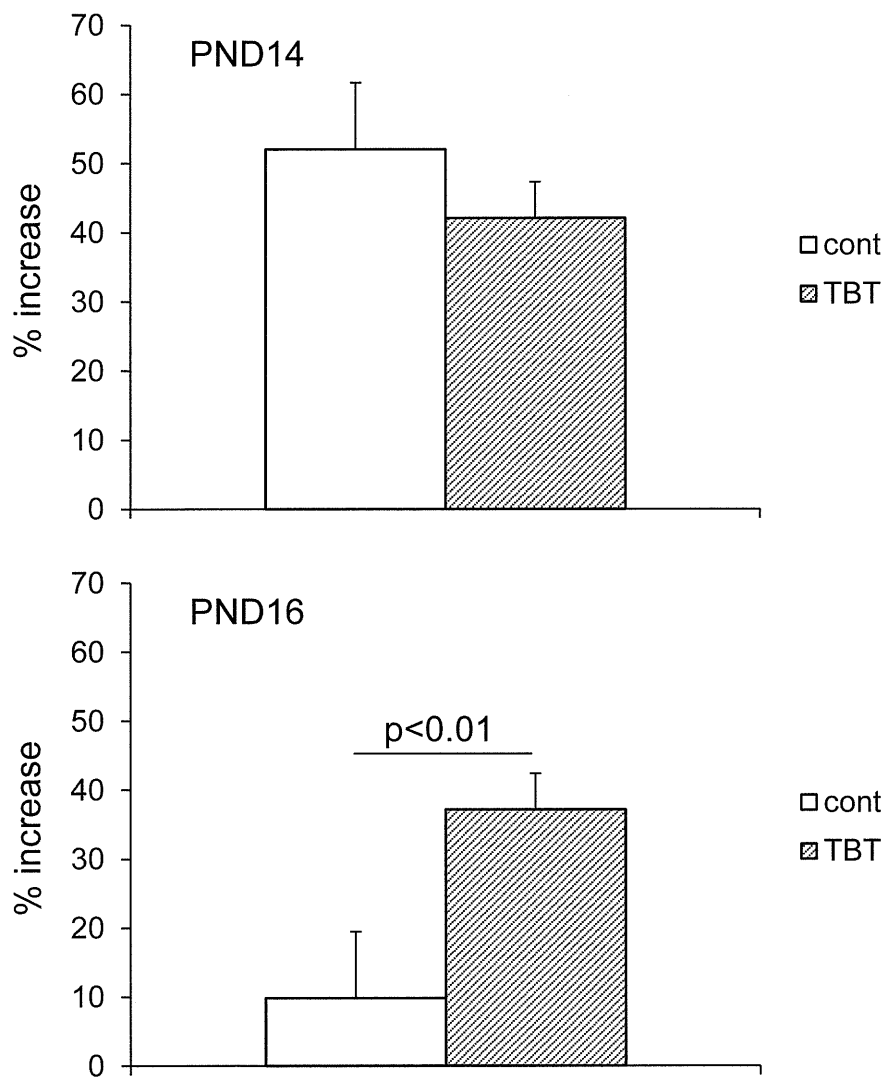


図2. 生後14日齢および16日齢における集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$) に対する $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) の増強作用とこれに対する TBT 胎生期曝露の影響。変化率 (%increase) は次式で求められている。

$$\%increase = (\text{BMI 存在下の応答} / \text{非存在下の応答} - 1) \times 100$$

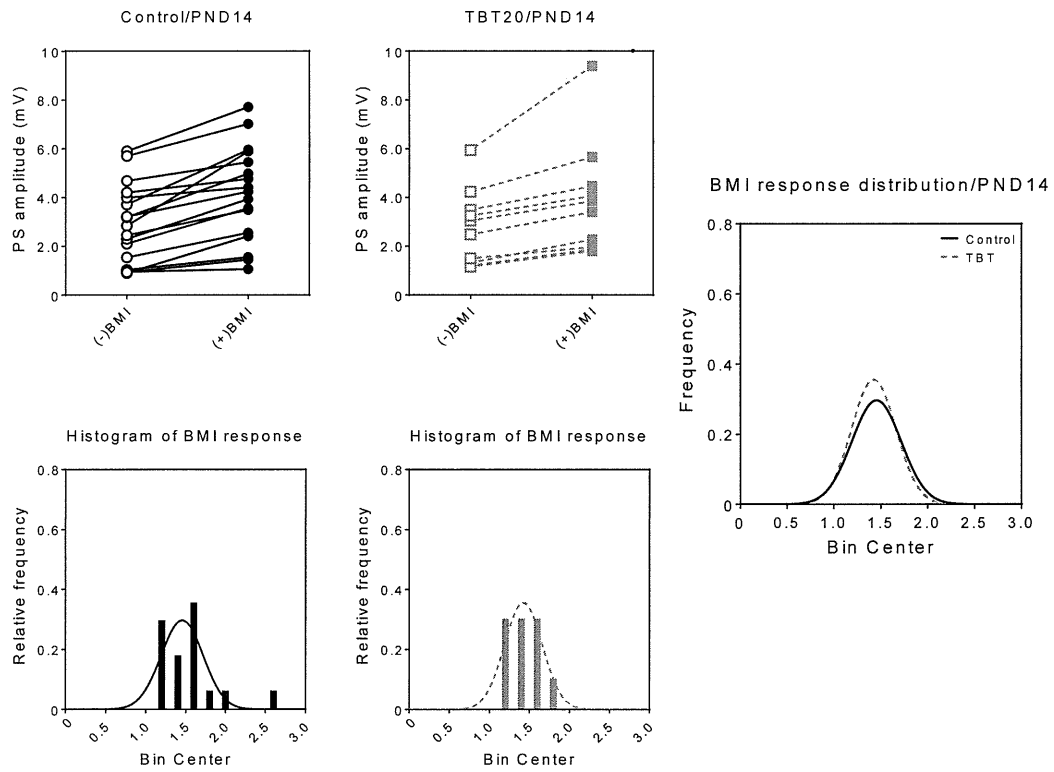


図3. 生後 14 日齢における対照群と TBT20 群から得られた $GABA_A$ 受容体拮抗薬ビククリン (BMI) 存在下、非存在下での集合スパイク電位 (PS) 振幅 (刺激電流値 $600 \mu A$)、および BMI による増強率の分布近似曲線。

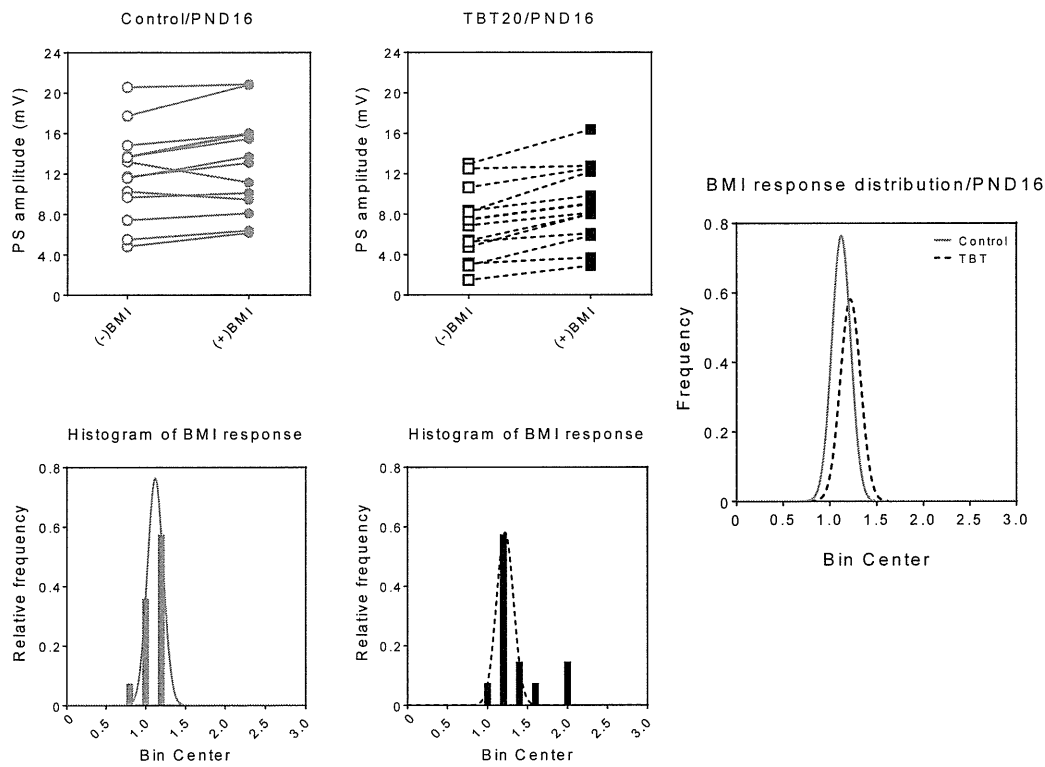


図4. 生後16日齢における対照群とTBT20群から得られたGABA_A受容体拮抗薬ビククリン(BMI)存在下、非存在下での集合スパイク電位(PS)振幅(刺激電流値600 μ A)、およびBMIによる増強率の分布近似曲線。

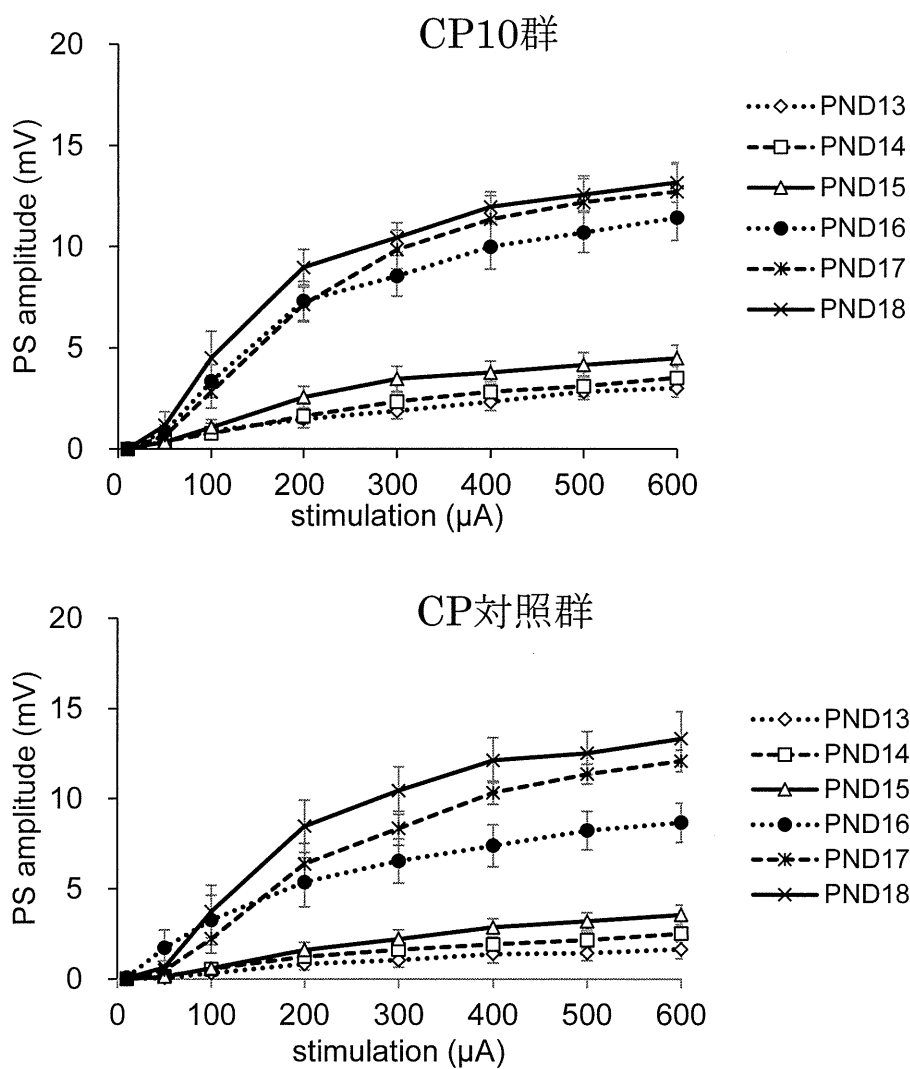


図5. クロルピリホス (CP) 胎生期に曝露された仔ラットを用いて、生後日齢毎に得られた海馬 CA1 領域の集合スパイク電位 (PS) の振幅を指標とする刺激応答性。横軸は刺激の大きさ (μA)、縦軸は PS の振幅 (mV) である。

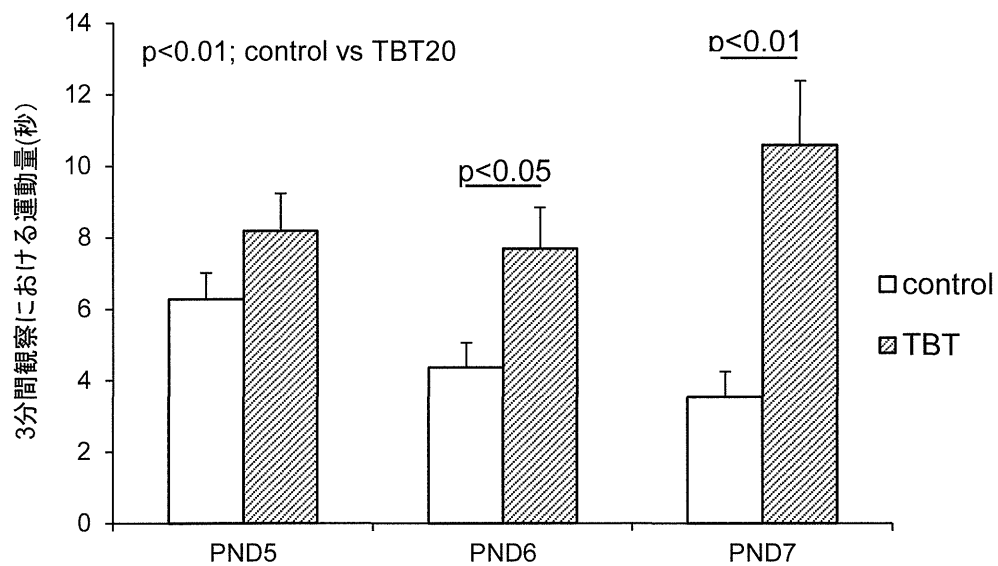


図6. 生後5日齢～7日齢の間で観察される不随意運動、およびこれに対するTBT胎生期曝露の影響。不随意運動は3分間における運動量を秒数で示した (mean±SEM)。

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
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
関野祐子、佐藤薫、諫田泰成、石田誠一	ヒトiPS分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	25-34	2013
諫田泰成	ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導法	日本薬理学雑誌	141	32-36	2013
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
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

澤田光平、松尾純子、 長田智治、吉田善紀、 白尾智明、佐藤薫、 諫田泰成、関野祐子	霧島会議Stem Cell Safety Pharmacology Working GroupまとめーヒトES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた 催不整脈作用検出とその 課題ー	心電図	34	302-305	2014
諫田泰成	癌幹細胞の受容体を標的と した創薬の可能性	日本薬理学雑誌	144	17-21	2014
Yosuke D, Takashi Mi, Takaya N, Yasunari K, Keiichiro O, Yuko S, Mikihiko N, Masaaki K.	Structural development of stabilized helical peptides as inhibitors of estrogen receptor (ER)-mediated transcription.	Bioorg.Med.Che m.	23	4132-8	2015
Asakura K, Hayashi S, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Nakamori C, Nagasawa C, Kitamura T, Osada T, Honnda Y, Kasai C, Ando H, Kanda Y, Sekino Y, Sawada K.	Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocyte.	Journal of Pharmacological and Toxicological Methods			2015
Yamada S., Kotake Y., Nakano M., Sekino Y. Kanda Y.	Tributyltin induces mitochondrial fission through NAD-IDH dependent mitofusin degradation in human embryonic carcinoma cells.	Metallomics	7	1240-6	2015
Asanagi M., Yamada S., Hirata N, Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y. Kanda Y.	Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells.	JTS	41	207-215	2016
Hirata N., Yamada S., Asa nagi M., Sekino Y., Kanda Y.	Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells.	BBRC	470	300-5	2016
Kim S.-R., Kubo T., Kuroda Y., Hojyo M., Matsuo T., Miyajima A., Usami M., Sekino Y., Matsushita T., Ishida S.	Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans.	J Toxicol Sci.	39	717-723	2014
Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A., Doi O.	Simple in vitro migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-trans-retinoic acid on cephalic- and trunk-derived cells.	Congenit Anom	54	184-188	2014
Usami M., Mitsunaga K., Irie T. Nakajima M.	Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions.	Congenital Anomalies	54	67-68	2014