

化学物質リスク研究事業・班会議資料

H25 年度

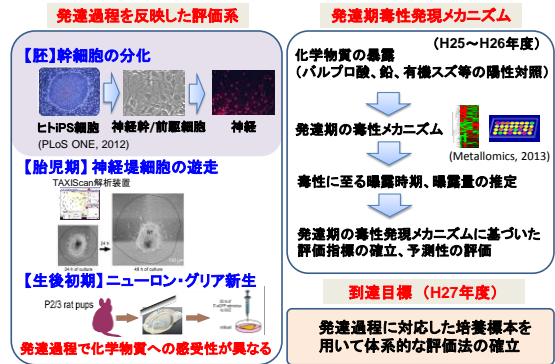


平成25年8月23日  
化学物質リスク事業・班会議(八重洲倶楽部)

## 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

## 胎生・神経発達期の評価系



## 神経毒性評価の流れ



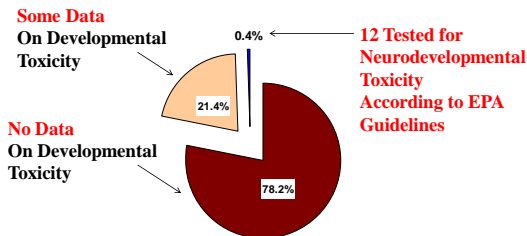
## Most Chemicals Have Not Been Adequately Tested for Toxicity

- 80,000+ chemicals in commerce
- 2,863 produced or imported in quantities of 1 million pounds or more per year (High Production Volume; HPV)
- No basic toxicity information is publicly available for about half of HPV chemicals
- Information on developmental toxicity is publicly available for about 20% of HPV chemicals

EPA: Chemical Hazard Data Availability Study, 1998

## Status of Developmental Toxicity Testing for the 2,863 Chemicals

Produced Above 1 million pounds/year



## 現在の発達毒性試験法の問題点

1. 時間・コストがかかりすぎる
2. 大規模なスクリーニングに向かない
3. ヒトと動物の「種差」の問題

## 現在の発達毒性試験法の問題点

1. 時間・コストがかかりすぎる
2. 大規模なスクリーニングに向かない
3. ヒトと動物の「種差」の問題



ヒトのモデル細胞を用いたin vitroアッセイ系により発達期の神経毒性を評価できないだろうか？

## 陽性対照物質:トリブチルスズ(TBT)

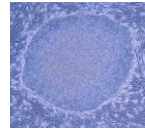
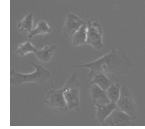
- ✓ 内分泌攪乱作用をもつ環境汚染物質。
- ✓ 低濃度の曝露により、神経系や免疫系など様々な細胞毒性を引き起こす。
- ✓ TBTを投与された妊娠ラットから生まれたF1は、行動異常を示す。
- ✓ ヒト発達期に対する影響ははまだ明らかではない。



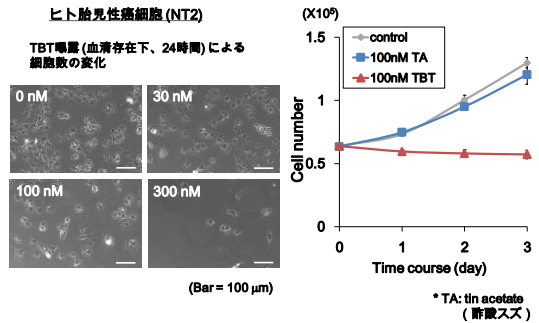
ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

## ヒト未分化細胞のモデル

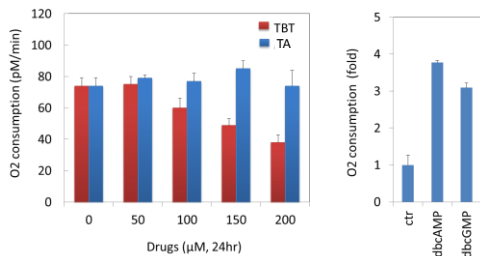
- ヒト胎児性癌細胞株NT2/D1
- ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞



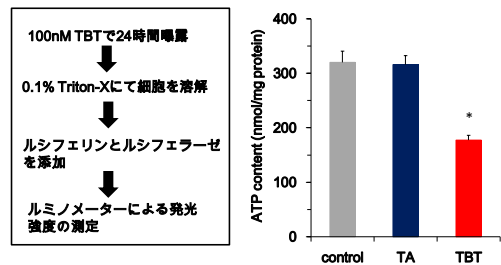
## 低濃度TBT曝露による増殖抑制



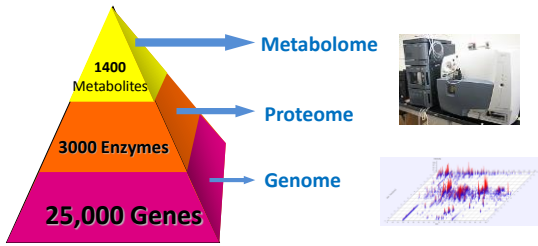
## TBT曝露による酸素消費量の抑制



## TBT曝露による細胞内ATP量の低下

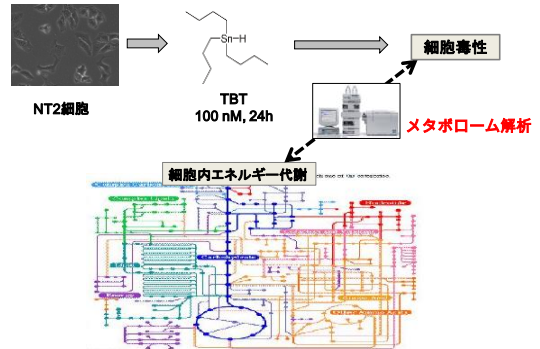


### メタボローム解析

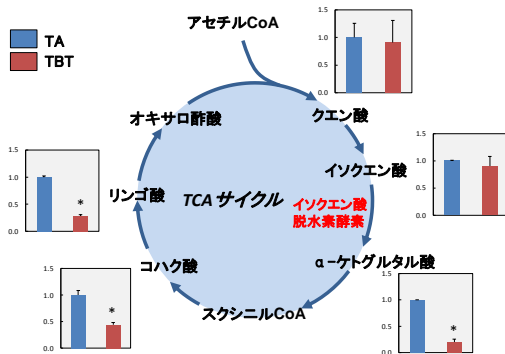


細胞全体の働きを理解するためには、ゲノム、プロテオームに加えて、アミノ酸など代謝物質の網羅的解析が有用。

### メタボローム法を利用したTBT毒性解析

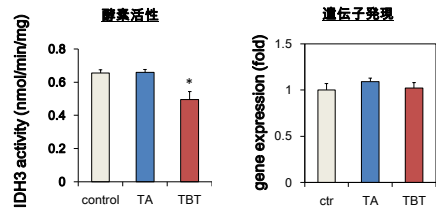


### TCAサイクルに対するTBT曝露の影響



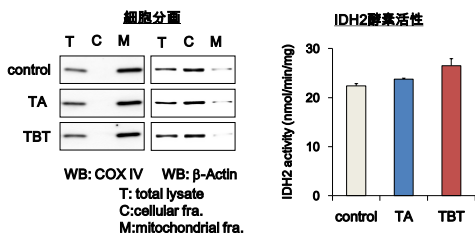
### IDH3活性に対するTBT曝露の影響

イソクエン酸脱水素酵素			
	細胞内局在	補酵素	反応
IDH1	細胞質	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH2	ミトコンドリア	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH3	ミトコンドリア	NAD <sup>+</sup>	不可逆



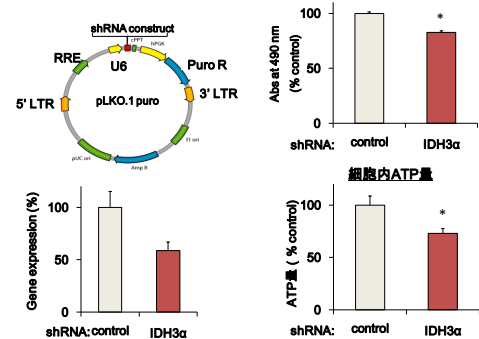
### IDH2活性に対するTBT曝露の影響

イソクエン酸脱水素酵素			
	細胞内局在	補酵素	反応
IDH1	細胞質	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH2	ミトコンドリア	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH3	ミトコンドリア	NAD <sup>+</sup>	不可逆



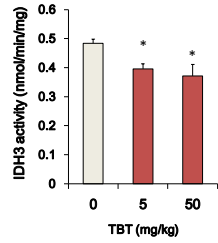
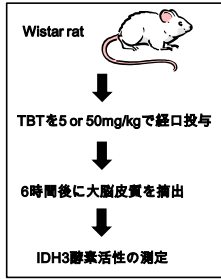
### 細胞増殖に対するIDH3αノックダウンの影響

IDH3α (熱震サブユニット)のノックダウン

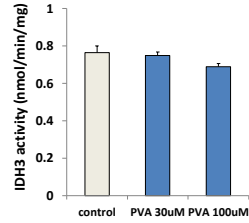




## in vivoにおけるTBTの作用



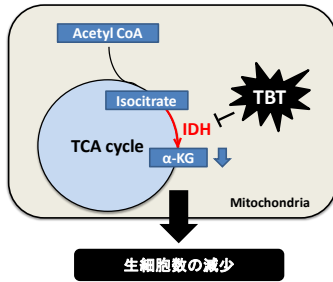
## 他の化学物質の影響は？



パルブロン酸処理によってもIDH3の活性が抑制される傾向であった。

IDH3を含めたエネルギー産生は高感度で毒性を検出できる可能性が考えられる。

## 結論



本研究において、メタボロームの手法を応用することにより、トリブチルスズの新たな毒性メカニズムを明らかにした。

## 今後の予定

メタボロームによるTBTの新たな毒性作用

1. 神経への分化過程に対する影響
2. より簡便なマーカーの探索
3. 有機スズ以外の化学物質の適用

発達神経毒性の新規評価法の構築

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1回 班会議

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

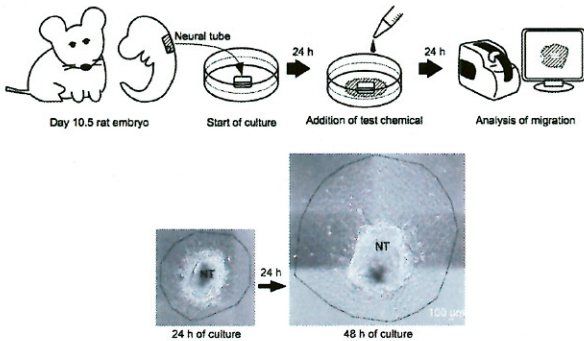
国立医薬品食品衛生研究所  
薬理部 第四室  
宇佐見 誠

神経堤細胞の機能解析による  
評価法の開発

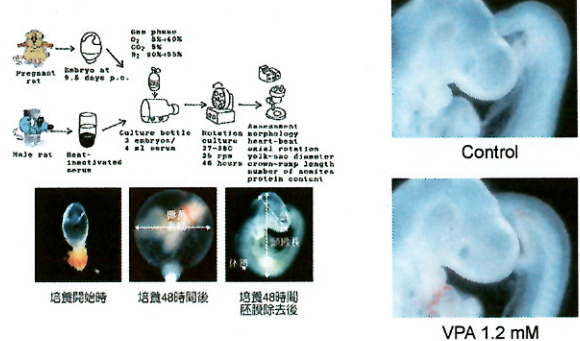
- 形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いる。



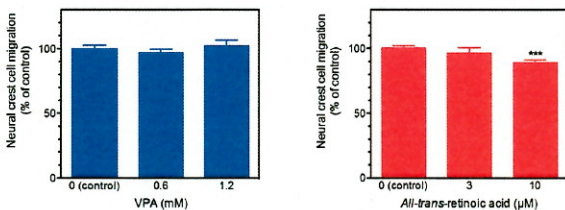
神経堤細胞遊走実験法



ラット培養胚に及ぼす  
バルプロ酸(VPA)の影響



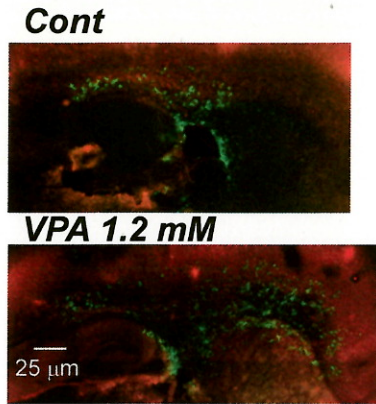
ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす  
バルプロ酸(VPA)の影響



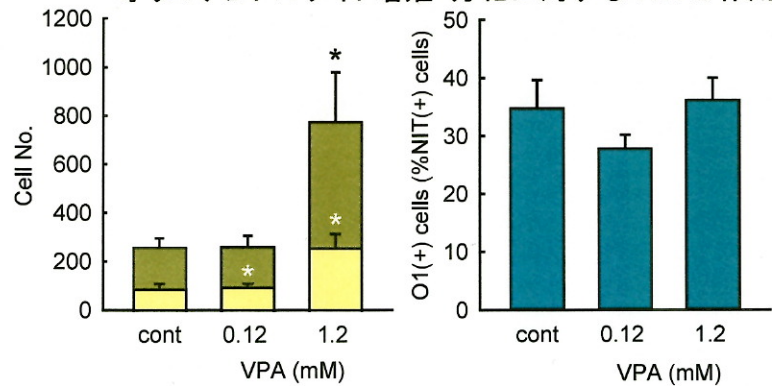
今後の計画

- 培養実験法の改良
  - 解析のための細胞収率の改善
- 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・生存率など

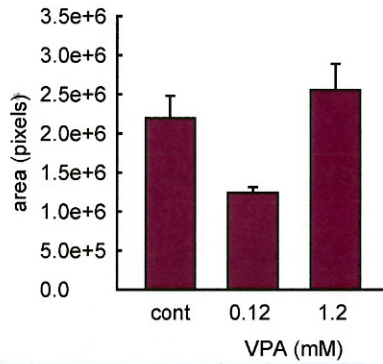
# オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用



オリゴデンドロサイト増殖・分化に対する VPA の作用

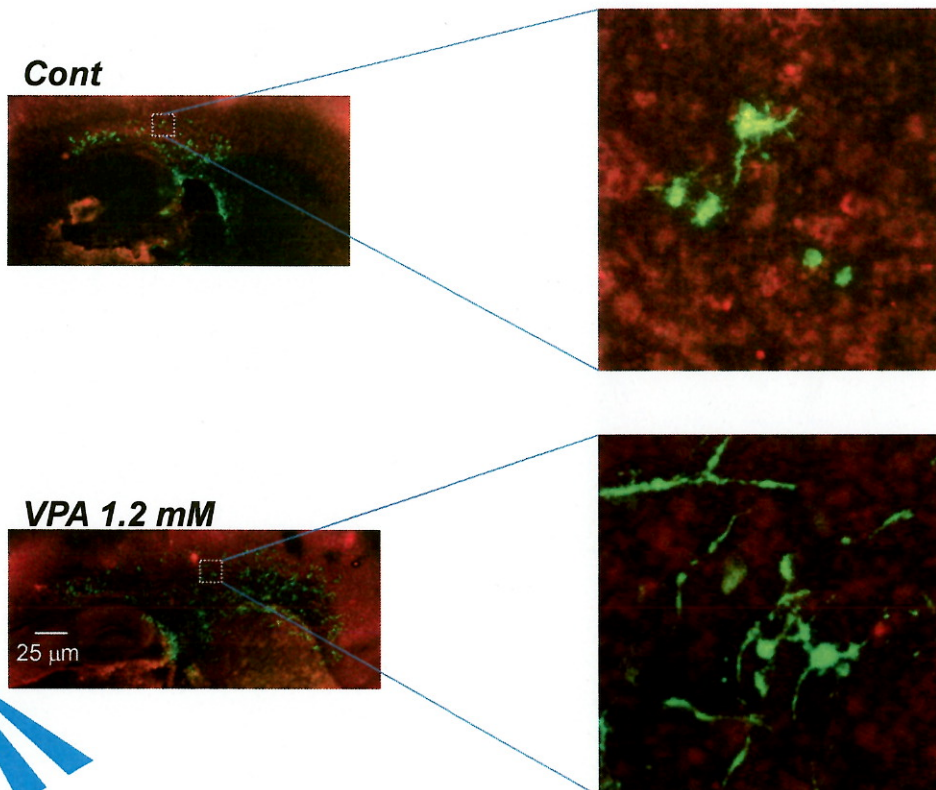


オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対する VPA の作用



\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

# 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—VPA

*Neurodegener Dis.* 2013 Aug 16. [Epub ahead of print]

**Valproic Acid Attenuates Disease Symptoms and Increases Endogenous Myelin Repair by Recruiting Neural Stem Cells and Oligodendrocyte Progenitors in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.**

Pazhoohan S, Satarian L, Asghari AA, Salimi M, Kiani S, Mani AR, Javan M.

Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

EAE モデルで VPA によるオリゴデンドロサイト新生の促進が観察されていた

*Neuroscience.* 2012 Sep 18;220:313-21. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.012. Epub 2012 Jun 13.

**Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke.**

Liu XS, Chopp M, Kassis H, Jia LF, Hozeska-Solgot A, Zhang RL, Chen C, Cui YS, Zhang ZG.

Department of Neurology, Henry Ford Health System, Detroit, MI 48202, USA. xsiiu@neuro.hfh.edu

虚血 モデルでも VPA によりオリゴデンドロサイト新生(神経新生も)の促進が観察されていた

*Nat Neurosci.* 2008 Sep;11(9):1024-34. doi: 10.1038/nn.2172.

**Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency.**

Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJ, Casaccia-Bonnel P.

Department of Neuroscience and Cell Biology, Robert Wood Johnson Medical School, 675 Hoes Lane, Piscataway, New Jersey 08854, USA.

VPA によるオリゴデンドロサイト新生は年齢依存的—若い脳では epigenetic control がききやすいが成熟すると効果が弱くなる。



厚生労働科研究助成金 化学物質リスク研究事業

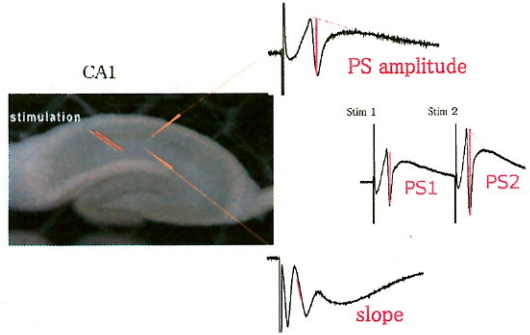
VPA胎生期単回投与ラットの授乳期における  
海馬CA1領野の電気生理学的検討

- IN VIVO 評価系 -

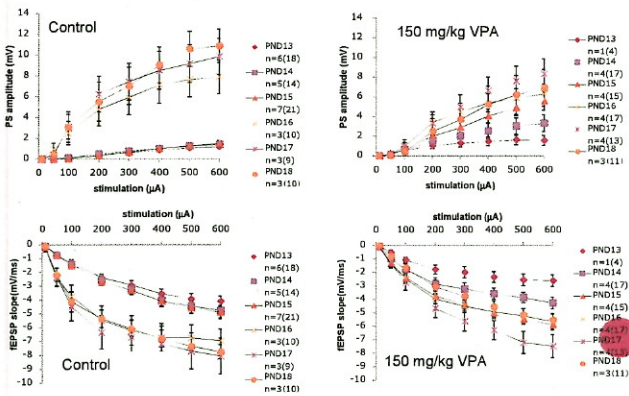
笛田由紀子<sup>1</sup>、上野 晋<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>産業医科大学 産業保健学部  
 環境マネジメント学科 作業環境計測制御学講座  
<sup>2</sup>産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性中毒学研究室

電気生理学的手法

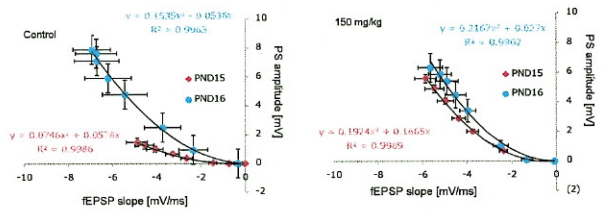
- PS amplitude: 活動電位を発生した細胞の数を反映
- Slope: 興奮性シナプスの活動
- ペアパルス比(PS2/PS1): 比が小さいほど抑制が強い



結果 PND13-18における  
CONTROL群と150MG/KG群の刺激応答性の発達

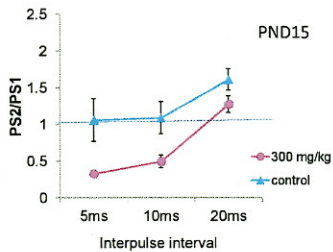


結果 PND15とPND16のPS/EPSP関係



- Control群のPND15と16では、PS/EPSP relationshipが異なる。
- 150 mg/kg群のPND15と16のPS/EPSP relationshipはほぼ同じ。

結果 VPA投与で抑制系の発達が亢進



対照群ではこの時期にはまだ抑制系の発達が見られない。しかし300mg/kg投与群では抑制系の発達が亢進していた。

平成25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  
(H25-化学-一般-002)

研究分担者班会議～in vivo研究グループ

関野祐子(国衛研)、吉田祥子(豊橋技科大)  
笛田由紀子(産業医大)、上野 晋(産業医大)

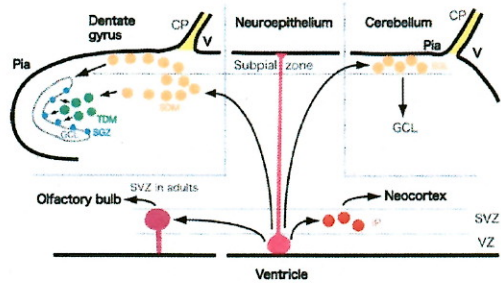
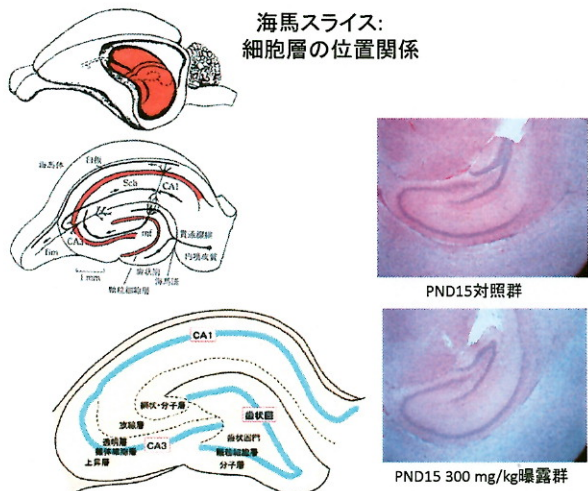
2014年2月6日～2月7日 於 産業医科大学

豊橋技科大・吉田研究室における  
光学測定の実験結果報告

2014年1月31日-2月1日  
報告者 笛田由紀子

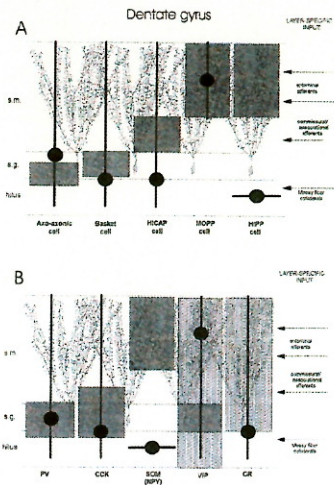
- 実験動物
  - VPA600 mg/kg 曝露群の仔ラット
  - 1月31日：1月15日生まれ 実験当日PND16
  - 2月1日：1月18日生まれ 実験当日PND14
- スライス等実験協力者
  - 吉田研究室 M2/村本氏

海馬スライス：  
細胞層の位置関係



大脳新皮質、側脳室下帯(嗅球のニューロンを新生)、海馬歯状回、小脳のニューロン新生様式の比較  
CP, 脈絡叢 choroid plexus; EGL, 外果粒層 external granular layer; IP, 中間神経前駆細胞 intermediate progenitors; GCL, 顆粒細胞層 granule cell layer; SDM, 2次歯状回マトリックス secondary dentate matrix; SGZ, 顆粒細胞層下帯 subgranular zone; SVZ, 脳室下帯 subventricular zone; TDM, 3次歯状回マトリックス tertiary dentate matrix; VZ, 脳室層 ventricular zone





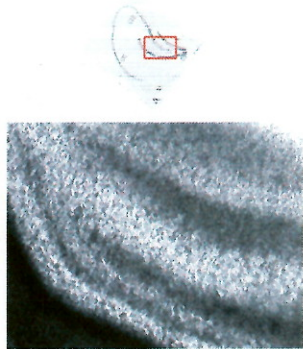
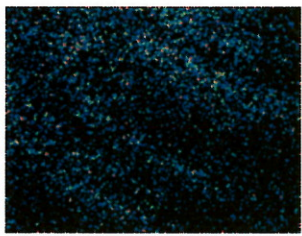
# Hilusのネットワーク??

"The rat neuvous system"  
3<sup>rd</sup> ed, Edited by G Paxinos  
Elsevier Academic Press, p642



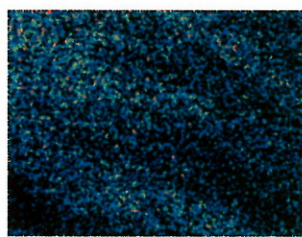
## 1月31日スライス1枚目:PND

- Spon GABA(GABA1)



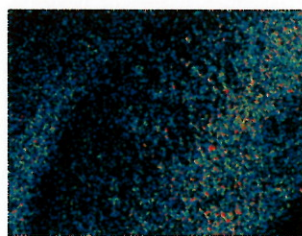
## 1月31日スライス2枚目

- Spon Glu(Glu1)



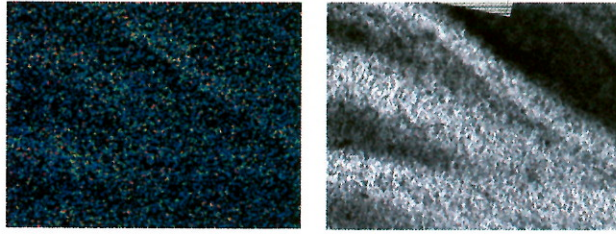
## 1月31日スライス3枚目

- Spon GABA(GABA2)

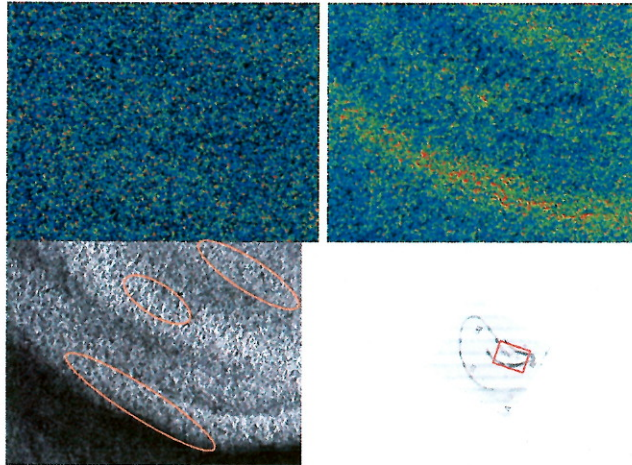


# 1月31日スライス4枚目

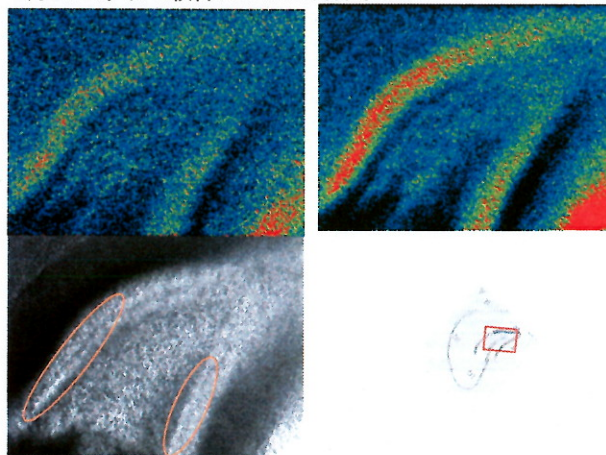
- Spon Glu(Glu2)



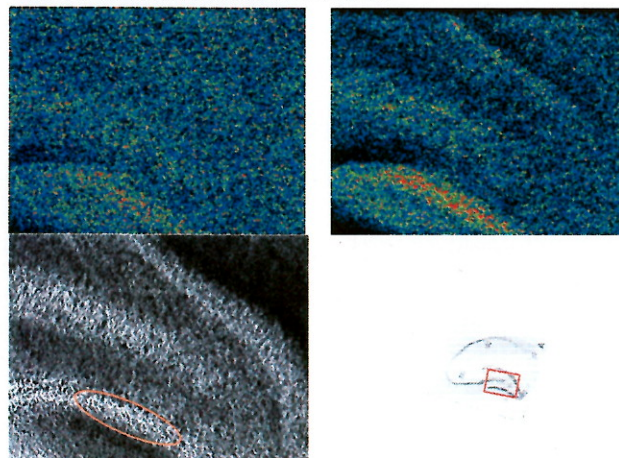
## 2月1日スライス1枚目:AMPA-induced Glu



## 2月1日スライス2枚目:AMPA-induced GABA



## 2月1日スライス3枚目:AMPA-induced Glu





化学物質リスク研究事業・班会議資料

H26 年度

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 11 月 1 日(土)11 時 00 分～18 時 15 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 (11:00～11:15)

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(11:15～12:30)

諫田「ヒト未分化細胞を用いた発達期毒性評価系の構築」

(ランチ・休憩)

3. 2 年目の研究班共通の陽性対照物質の選定(13:15～15:30)

4. in vivo 評価系の進捗状況 (15:30～18:15)

① 関野・吉田

「生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究」

② 上野・笛田

「幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価－BMI への感受性－」

以上

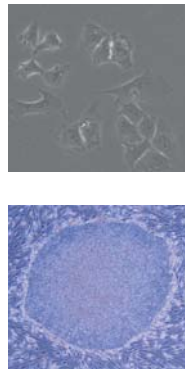
# ヒト未分化細胞を用いた 発達期毒性評価系の構築

国立医薬品食品衛生研究所  
薬理部第二室  
諫田 泰成

1. ヒアリング資料の再確認
2. 有機スズのin vitro作用

## ヒト未分化細胞のモデル

- ヒト胎児性癌細胞株NT2/D1
- ヒトiPS細胞



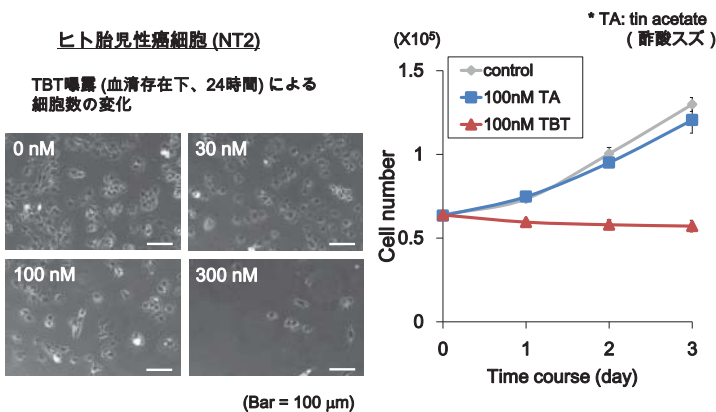
## 陽性対照物質:トリブチルスズ(TBT)

- ✓ 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はまだ明らかではない。

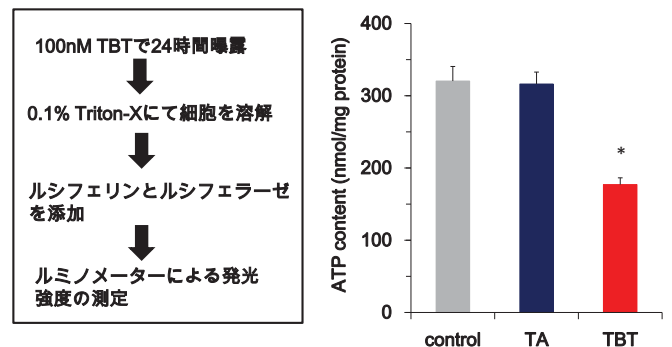


ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

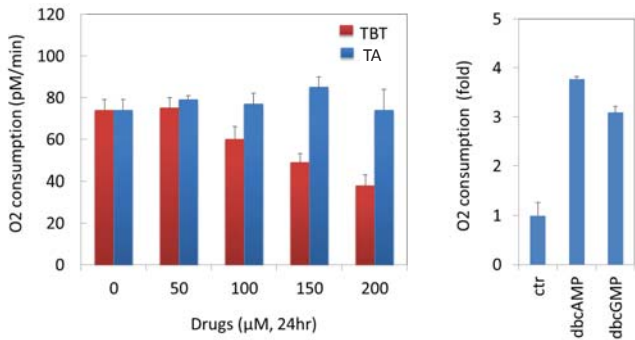
## 低濃度TBT曝露による増殖抑制



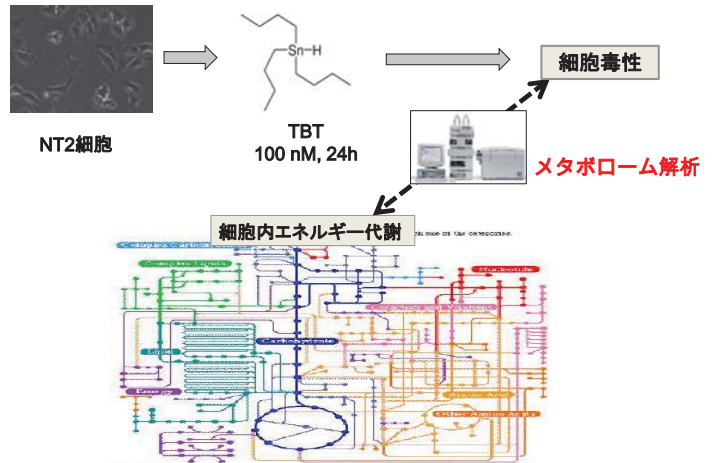
## 低濃度TBTによる細胞内ATP量の低下



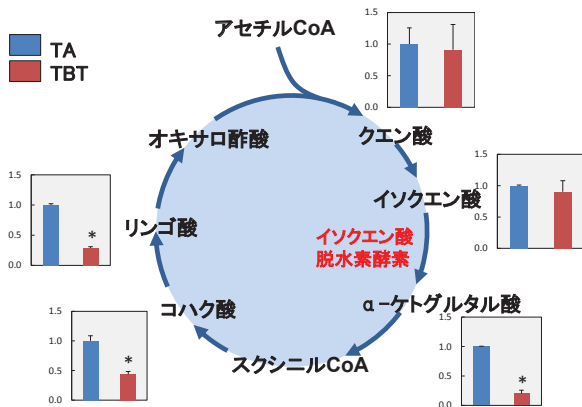
## TBT曝露による酸素消費量の抑制



## メタボローム法を利用したTBT毒性解析



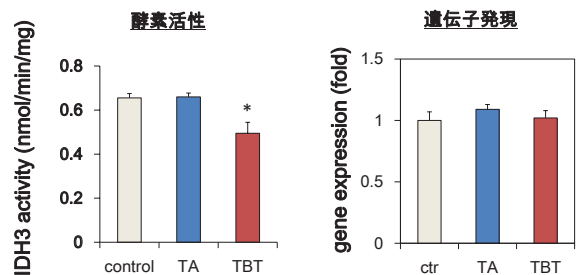
## TBTの新規作用点IDH3



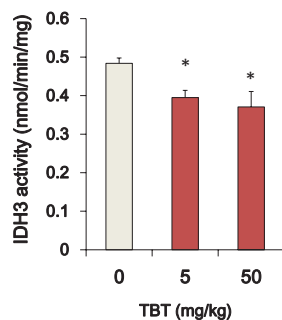
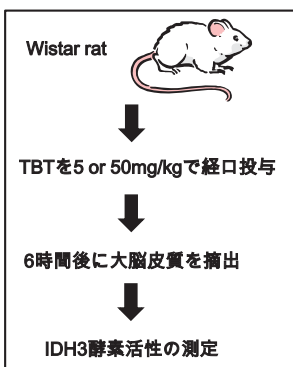
Yamada et al, Scientific Reports, 2014

## IDH3活性に対するTBT曝露の影響

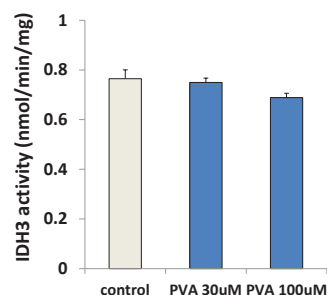
	細胞内局在	補酵素	反応
IDH1	細胞質	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH2	ミトコンドリア	NADP <sup>+</sup>	可逆
IDH3	ミトコンドリア	NAD <sup>+</sup>	不可逆



## in vivoにおけるTBTの作用



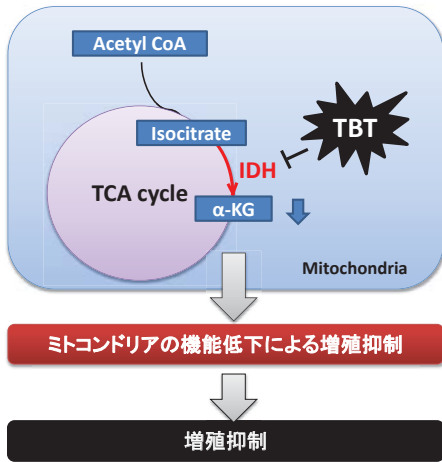
## 他の化学物質の影響は？



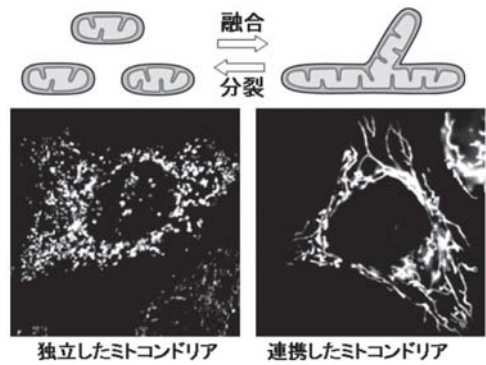
バルプロ酸処理によってもIDH3の活性が抑制される傾向であった。

IDH3を含めたエネルギー産生は高感度で毒性を検出できる可能性が考えられる。

## 小括

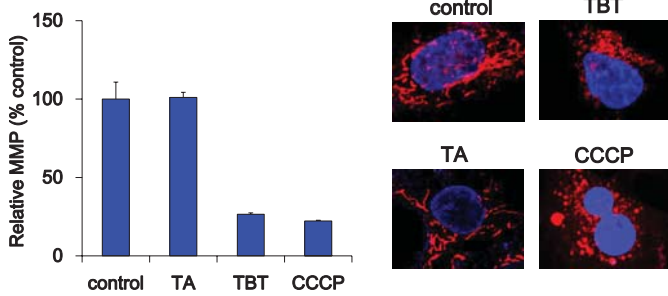


## ミトコンドリアの動的制御



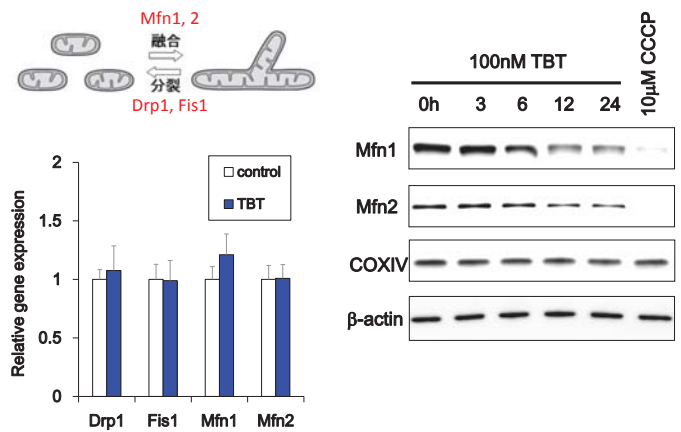
石原、生化学 83: 365-373 (2011)

## 低濃度TBTによるミトコンドリアの膜電位低下と形態変化

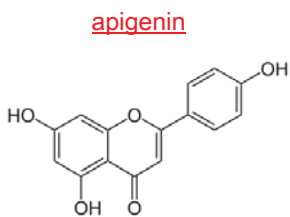


Yamada et al., in preparation

## TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解

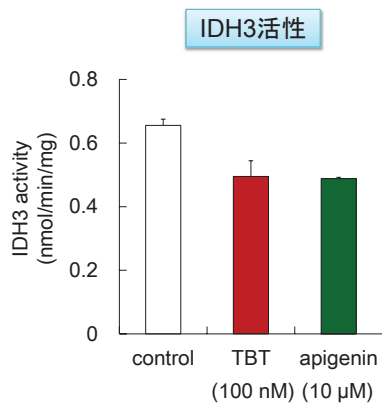


## IDH3阻害剤 apigenin

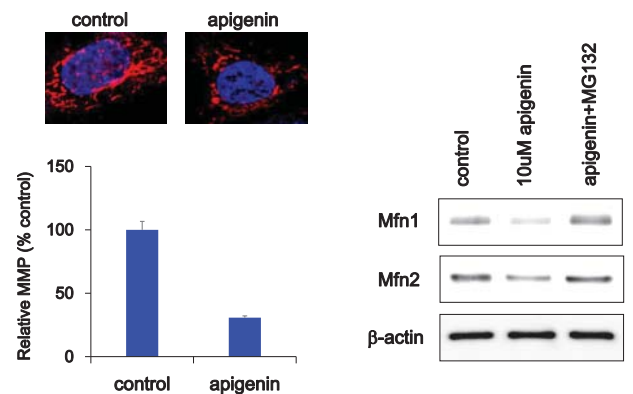


- 植物に含まれるフラボノイド
- IDH3活性を阻害することが報告されている

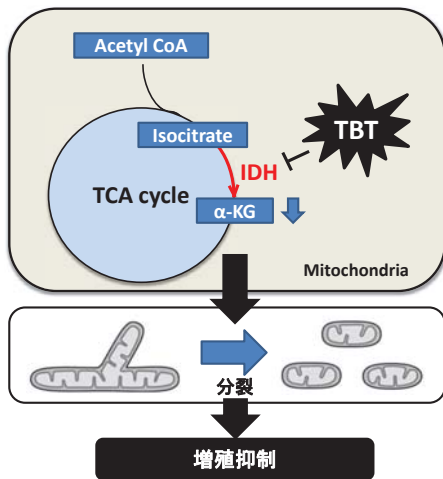
PNAS110: E2153-62 (2013)



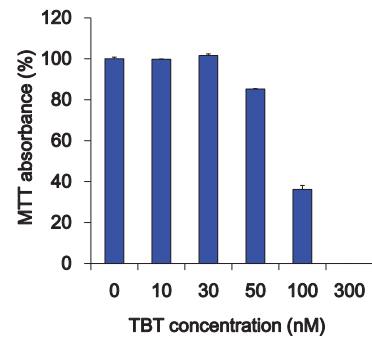
## IDH3阻害剤によるミトコンドリアの膜電位低下と融合タンパク質の分解



## 結論



## TBTによるiPS細胞の増殖抑制



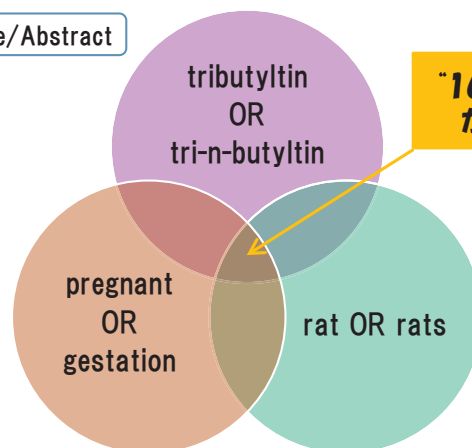
## まとめ

低濃度TBTは、ミトコンドリアの融合タンパク質の分解を促進して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が示唆された。

幹細胞におけるMfn分解にともなうATP産生は、毒性評価の有用な指標になる可能性が考えられる。

## トリブチルスズ/PubMed検索

Title/Abstract



## 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日目まで連続14日間。2.5, 5.0, 10, 12, 16 mg/kg 経口投与。

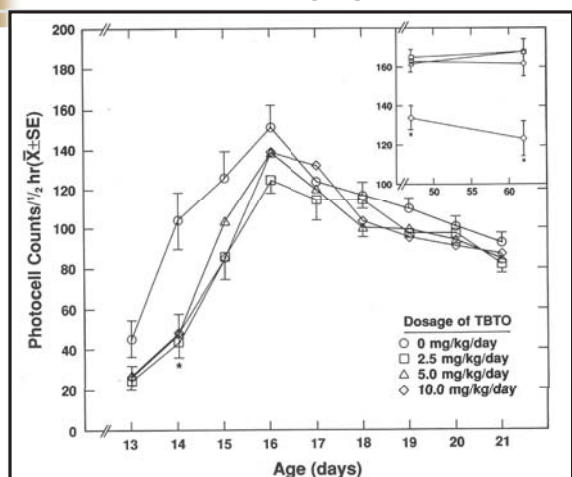
文献は送信済み

## 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日目まで連続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	15.5 ± 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	5	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

Parameter	Phenotypic changes	Period (days) <sup>a)</sup>
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 <sup>b)</sup>
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 <sup>b)</sup>

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

## 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 .

- 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

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-psycho stimulant 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](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

ELSEVIER

Toxicology Letters 155 (2005) 329–335

Toxicology Letters

[www.elsevier.com/locate/toxlet](http://www.elsevier.com/locate/toxlet)

Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity

Shigehiro Osada<sup>a,\*</sup>, Jun-ichi Nishikawa<sup>a</sup>, Tsuyoshi Nakanishi<sup>b</sup>, Keiichi Tanaka<sup>b</sup>, Tsutomu Nishihara<sup>a</sup>

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

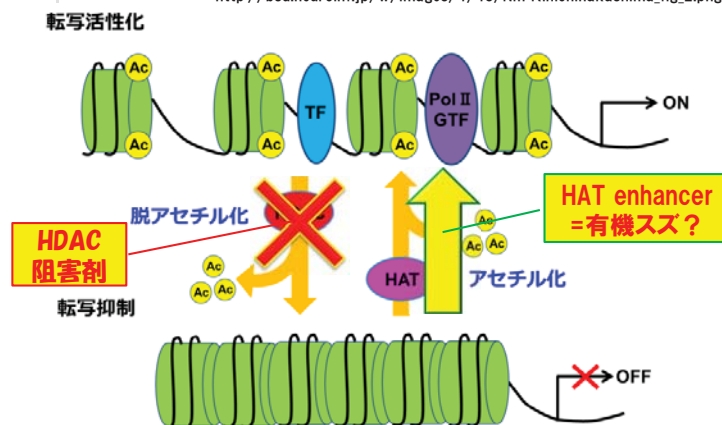
<sup>b</sup> Department of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

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](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 <sup>a</sup>	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
Monophenyltin 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
Dibutyltin dichloride	DBT	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 <sub>4</sub>	0.91 ± 0.025	10025-69-1	>97	Nacalai tesque
Tetraethyltin	TetBT	1.05 ± 0.042	1461-25-2	>93	Aldrich Chemicals
Trimethyltin 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	TPT	3.09 ± 0.080**	2279-76-7	>98	Merck Schuchardt
Triphenylsilyanol	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

<sup>a</sup> 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

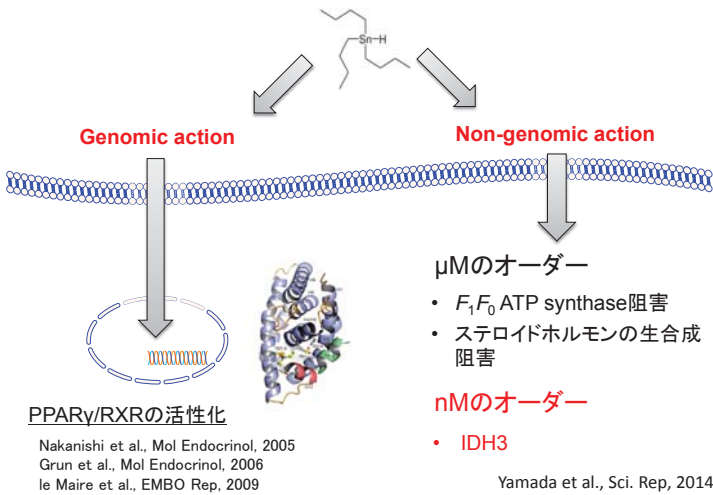
## 陽性対照物質:トリブチルスズ(TBT)

- ✓ 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。

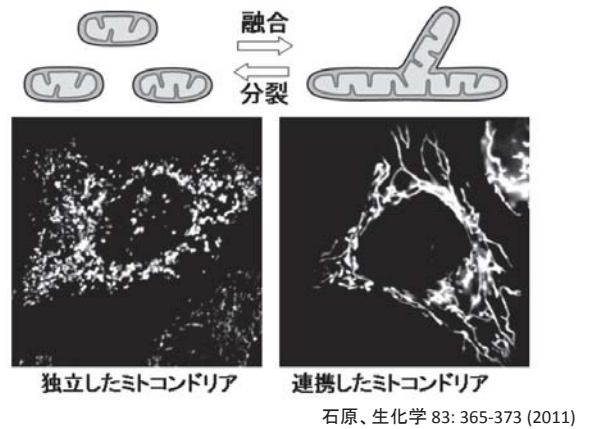


ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

### TBT-mediated signaling

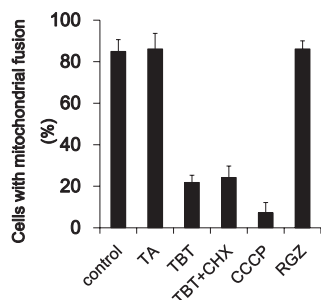
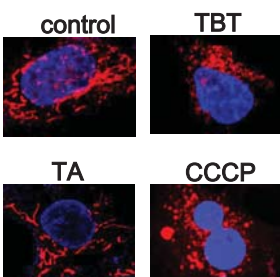


### ミトコンドリアの動的制御



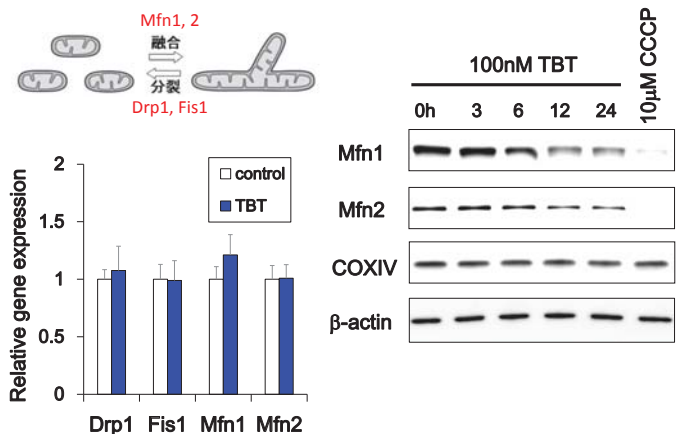
### 低濃度TBTによるミトコンドリアの 形態変化

ヒトNT2/D1細胞

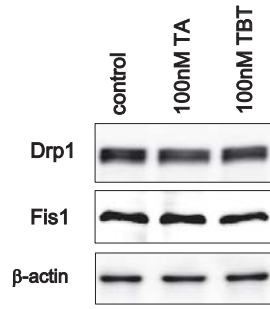
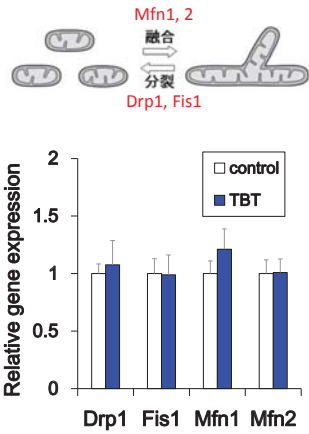


Yamada et al., in preparation

### TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解

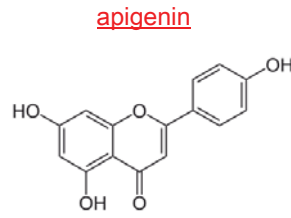


## TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解



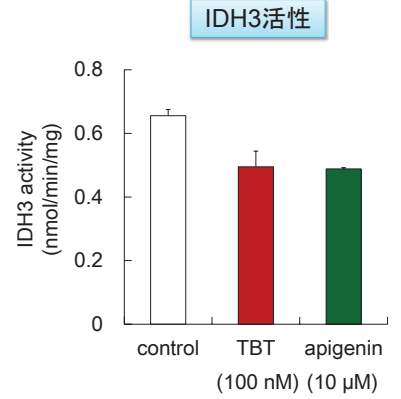
Mfn選択的!

## IDH3阻害剤 apigenin

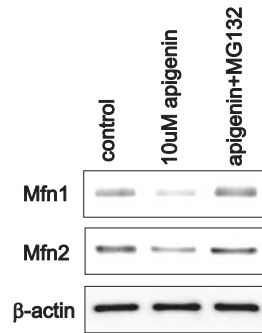
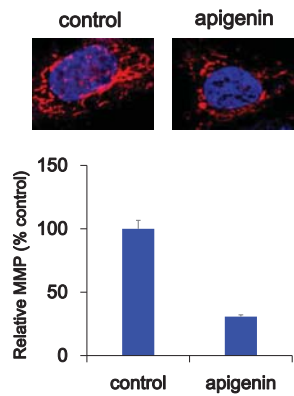


- 植物に含まれるフラボノイド
- IDH3活性を阻害することが報告されている

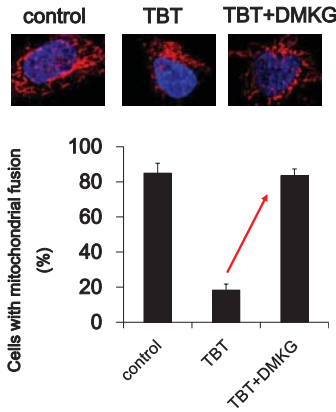
PNAS110: E2153-62 (2013)



## IDH3阻害剤によるミトコンドリア融合タンパク質の分解

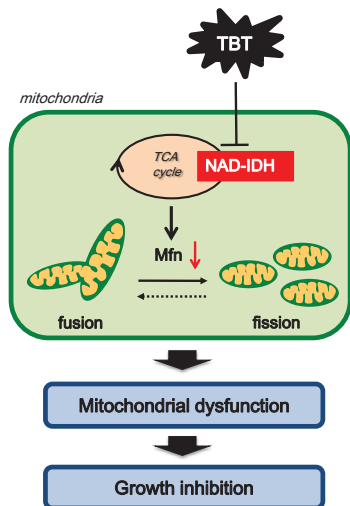


## 細胞膜透過性 $\alpha$ KGアナログであるDMKGの添加によるミトコンドリア機能の回復

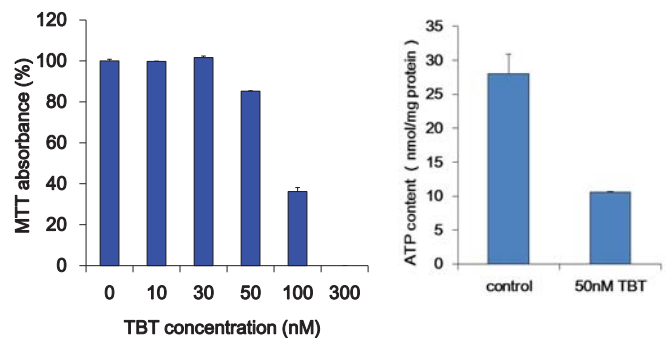


IDH3の阻害による増殖抑制であることが示唆された。

## 小括



## TBTによるヒトiPS細胞の増殖抑制

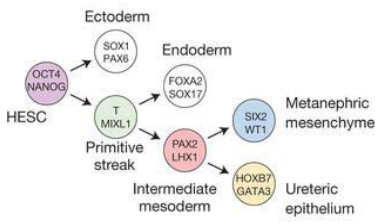


低濃度TBTの毒性作用はヒトiPS細胞でも同じ傾向!

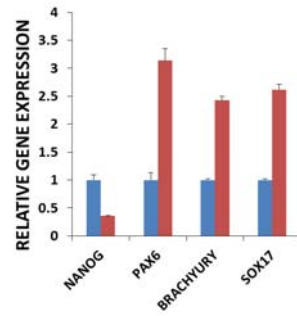


## Direct differentiation protocolによる 253G1株の分化能評価

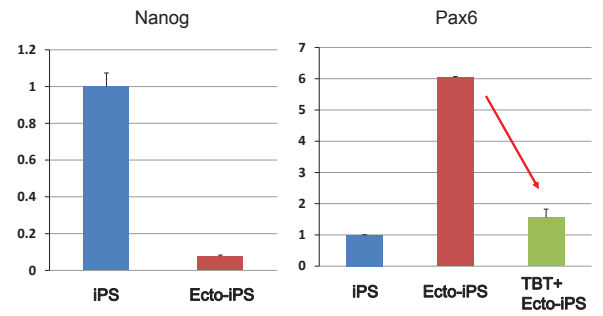
### 分化の系譜



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

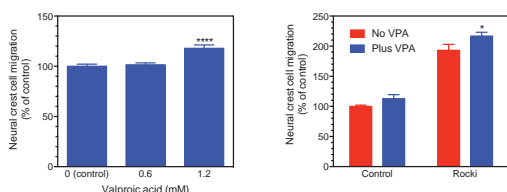
神経堤細胞の機能解析による  
評価法の開発

- 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

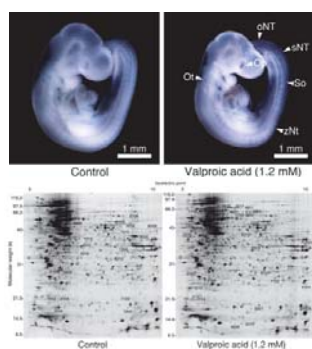
- バルプロ酸はラット神経堤細胞の遊走を促進した。
- バルプロ酸のラット神経堤細胞の遊走促進作用には、Rhoキナーゼの関与は認められなかった。



今回の結果

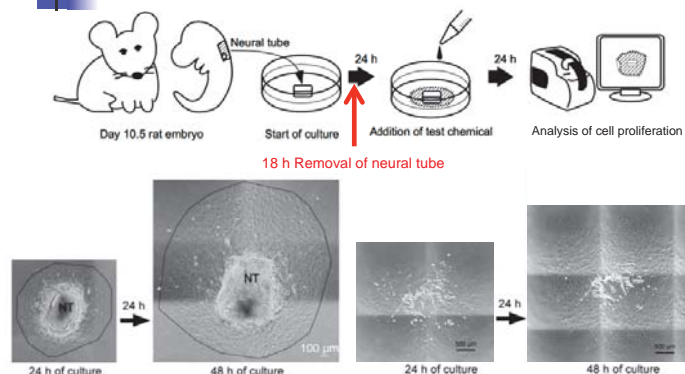
- バルプロ酸の発生毒性に關与するタンパクを調べた。
- 化学物質のラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

バルプロ酸(VPA)による発生毒性の  
プロテオミクス解析



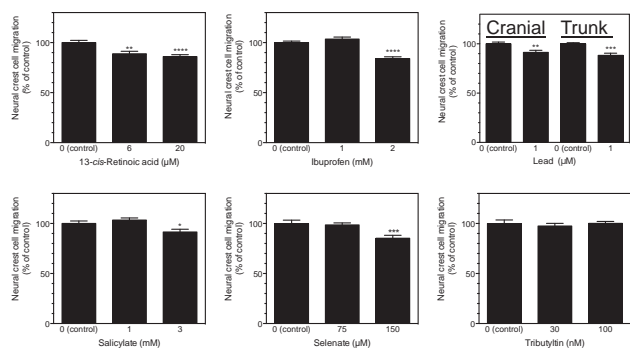
SSP	Protein Name	UniProt
0107	Protein Pbdc1 OR RGD1562502 protein	G3V6C3 OR B2RYV5
4110	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial Alpha-fetoprotein	Q9DCT2 P02773
4818		
4831	Serum albumin	P02770
4832		
5805	Cofilin-1 (phosphorylated)	P45592
6001	m7GpppX diphosphatase	Q8K4F7
6313	AND Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit AND Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog4	P63088 AND Q61136
7102	Glutathione S-transferase alpha-4	P14942

ラット神経堤細胞増殖実験法

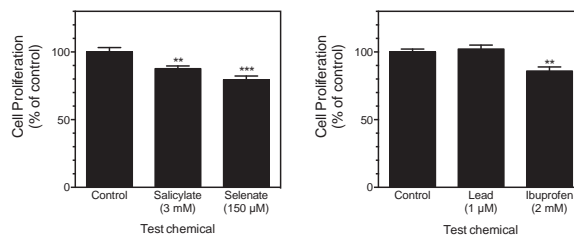




## ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす 化学物質の影響



## 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、バルプロ酸、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

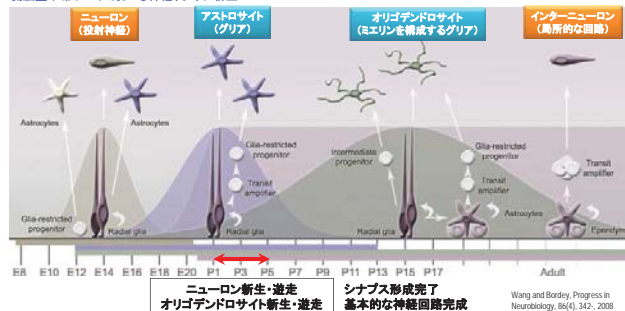


## 発達成長期ニューロン・グリア新生への化学物質の影響評価

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。

側脳室下帯 (SVZ) でおこる神経、グリア新生



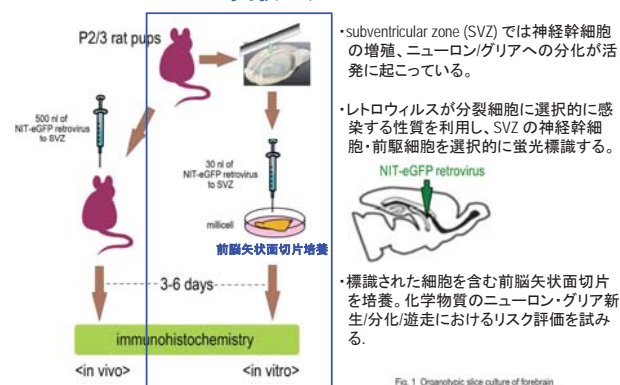
### 目的

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

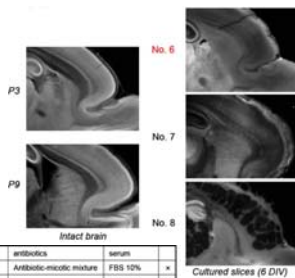
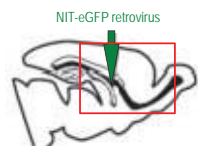
まずは生後初期に最も新生が活発なオリゴデンドロサイトに着目

- 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

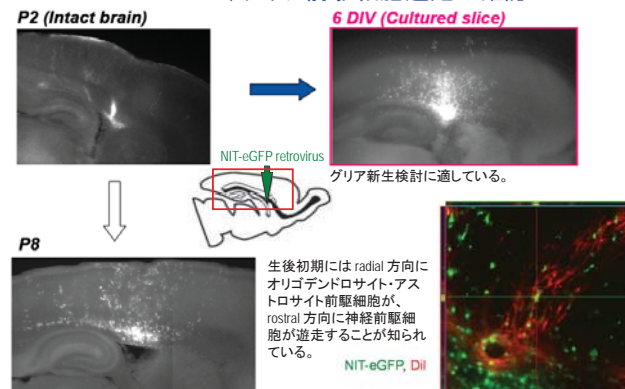


### 前脳切片培養 至適条件の検討

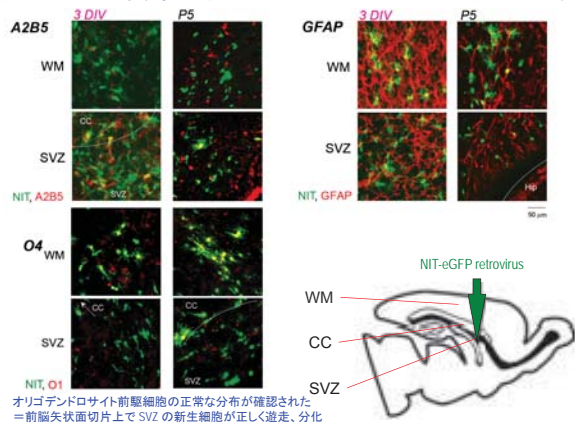


medium	supplement	buffer	antibiotics	serum
1 DMEM			Antibiotic-mycotic mixture	FBS 10% ×
2 DMEM	N2 1%			FBS 10% ×
3 DMEM : F-12 (1:1)	N2 0.1% L-glutamine 0.1 mM, D-glucose 13.3 mM		PS	FBS 10% ×
4 DMEM : F-12 (1:1)	ITS 1%, Progesterone 20 nM, Putrescine 40 μM L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3 mM	HEPES 45 mM		○
5 BME	L-glutamine 1 mM, D-glucose 27.8 mM	HBSS 25%		HS 0% ×
6 Neurobasal	N2 1%, B27 1% L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM Kynurenic acid 0.5 mM		PS	○
7 BME	N2 1%, B27 1%, ITS 1% L-glutamine 1 mM	HBSS 25%	PSA	FBS 0.5% ○
8 BME	D-glucose 36.7 mM	HBSS 25%	PSA	HS 25% ×

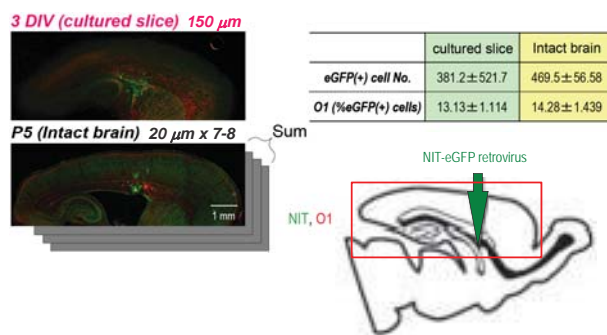
### 前脳矢状面培養切片におけるニューロン、グリア前駆細胞遊走の確認



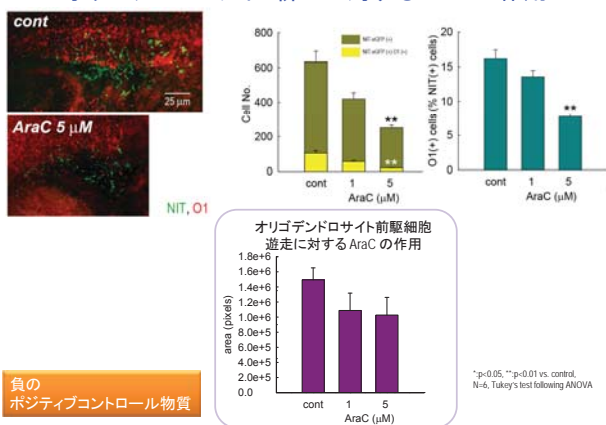
### 前脳矢状面培養切片における分化マーカーの発現分布



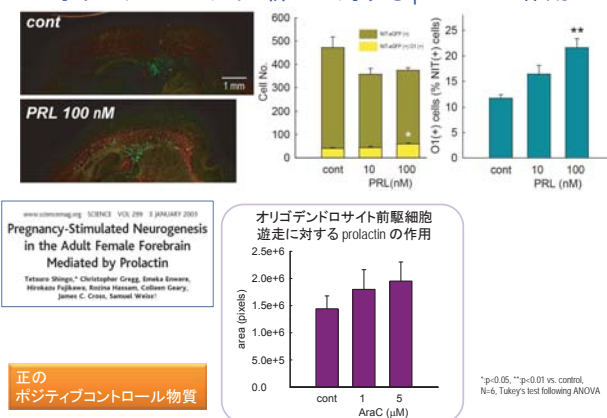
### 前脳培養切片におけるオリゴデンドロサイト新生



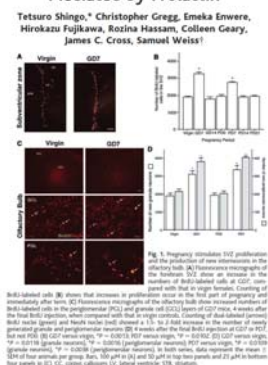
### オリゴデンドロサイト新生に対するAraCの作用



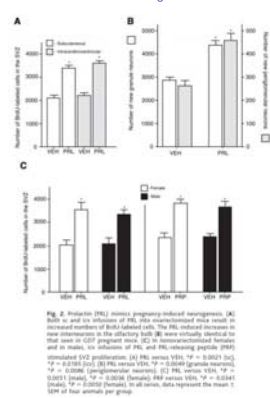
### オリゴデンドロサイト新生に対するprolactinの作用



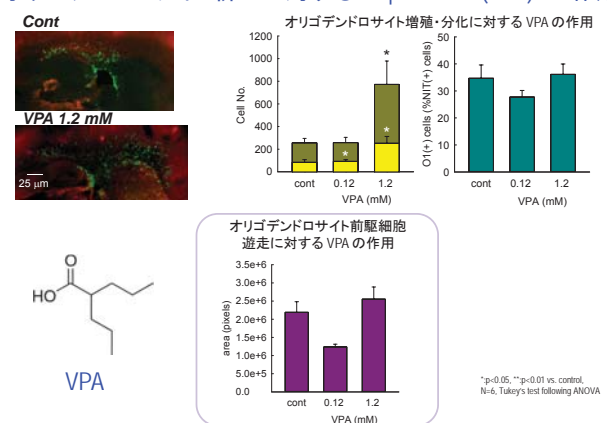
### Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin



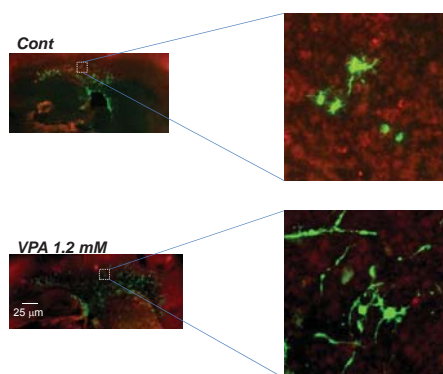
### Prolactin は SVZ の neurogenesis を促進する



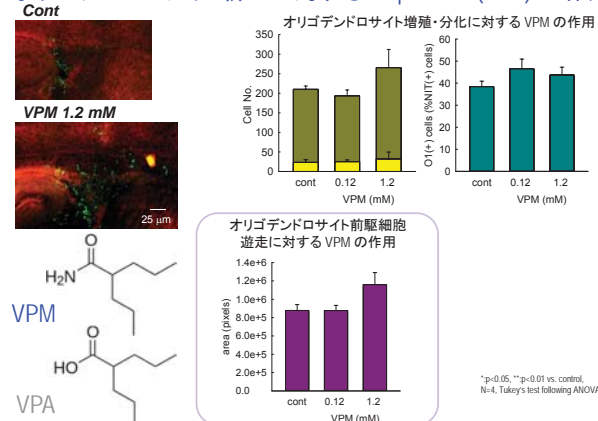
### オリゴデンドロサイト新生に対する Valproic acid (VPA) の作用



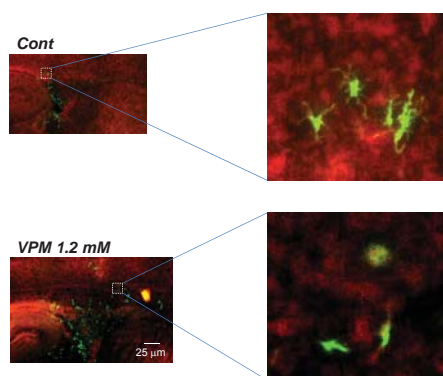
### オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用



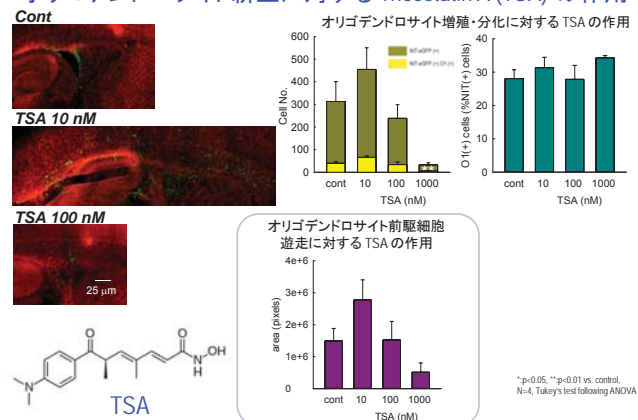
### オリゴデンドロサイト新生に対する Valpromide (VPM) の作用



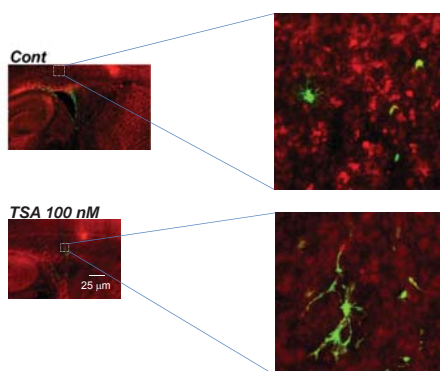
### オリゴデンドロサイト新生に対する VPM の作用



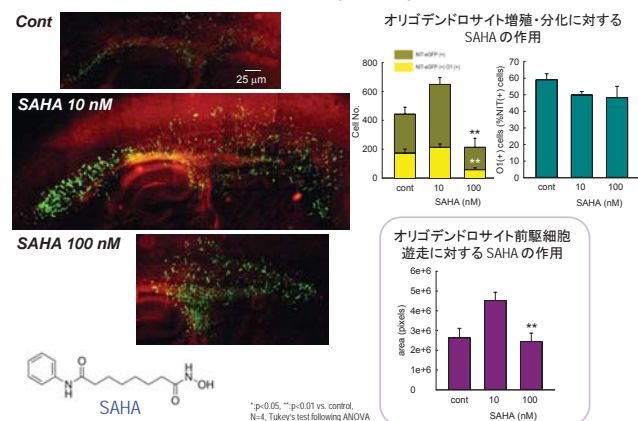
### オリゴデンドロサイト新生に対する Tricostatin A (TSA) の作用



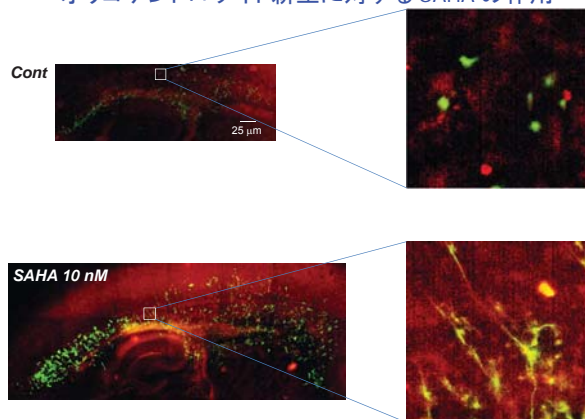
### オリゴデンドロサイト新生に対する TSA の作用



### 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）

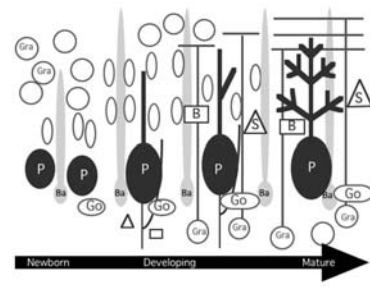
以上



# 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

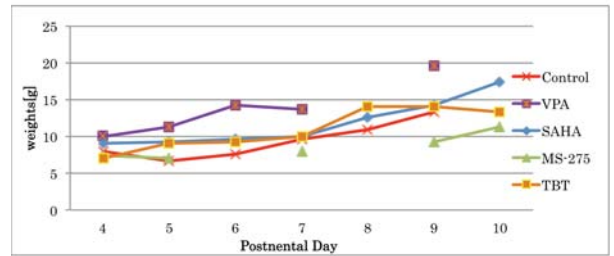
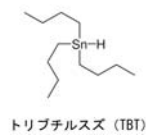
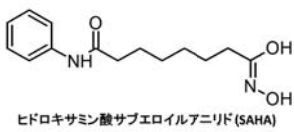
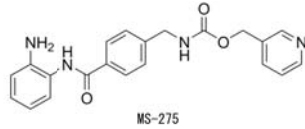
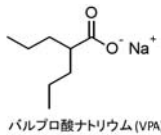
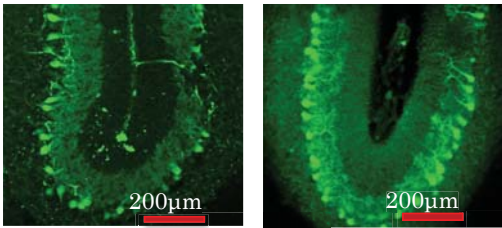
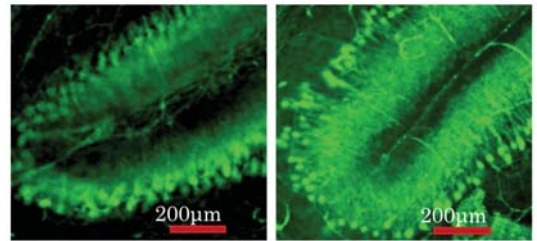


Figure 1 日齢に伴う体重の変化(体重は平均値)



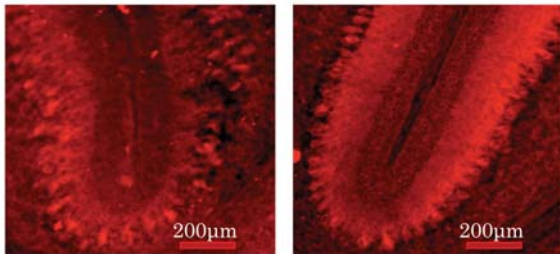
对照動物 P11

对照動物 P13



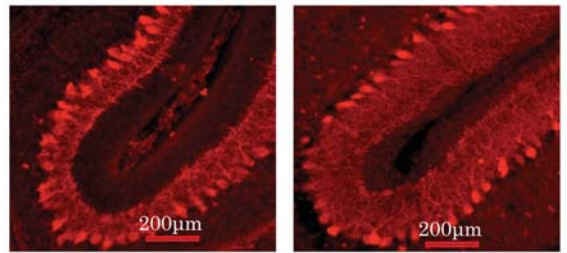
SAHA 投与動物 P10

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

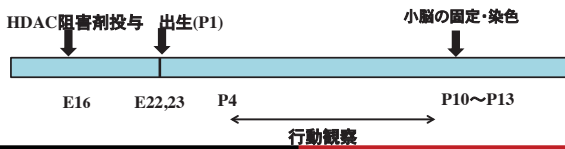


・行動観察(Open Field testing)

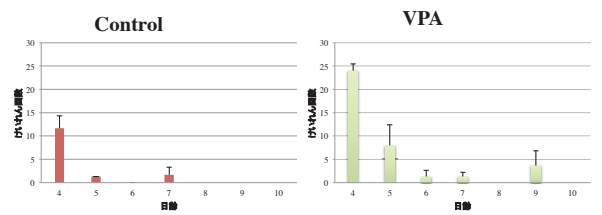


**不随意運動を計測**  
紙箱の中で3分間オープンフィールドテストを行った。  
(ラットは毎回無作為に3匹選出)

・実験の流れ



**まとめ: VPA被曝ラットの行動観察**



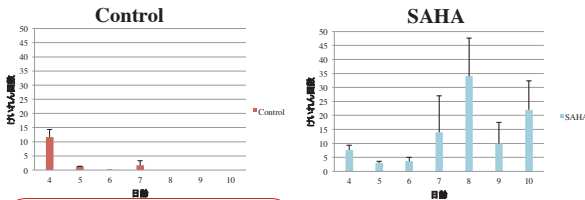
・P4付近で不随意運動をやや確認。

・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。

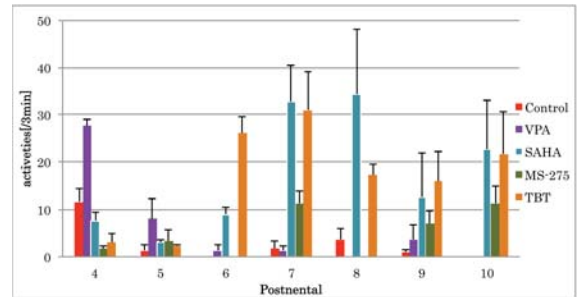
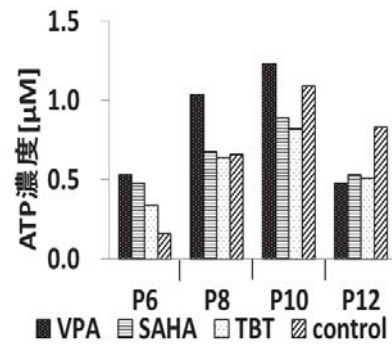
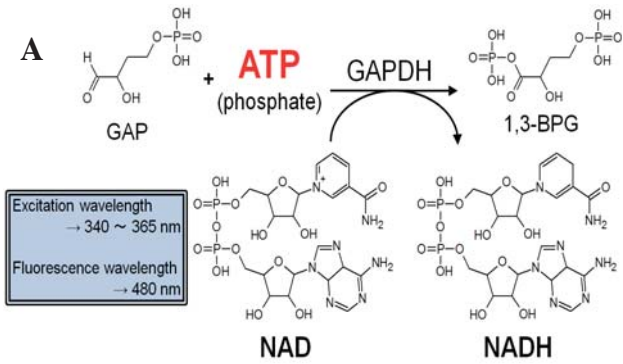


Figure 1 各日齢における不随意運動の回数-全実験ラット(n=3)

A



# 平成26年度班会議

## TBT実験の進捗状況と VPA実験結果の追加

平成27年1月31日(土)  
国立医薬品食品衛生研究所にて  
産業医科大学 上野晋、笛田由紀子

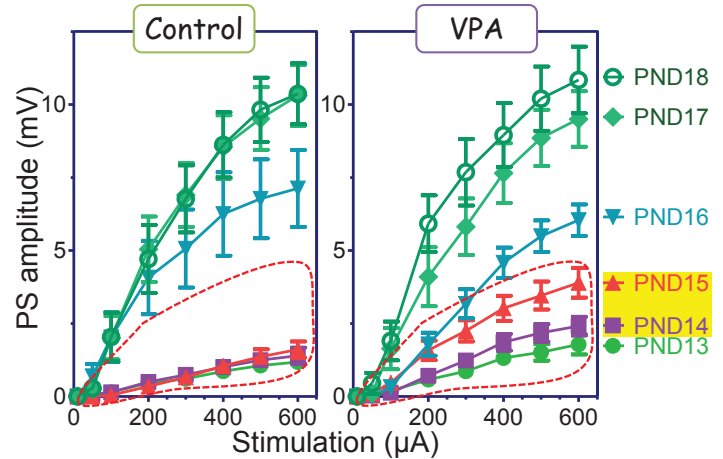
## 方法

- PEGを蒸留水で2倍に希釈して、20mg/kgとなるようにTBT溶液を加えた。
- Day15の午前11時～午後2時の間に、軽い麻酔下(女性がラットを保持できる)でTBT/希釈PEGを経口投与。対照群には希釈PEGのみ投与。
- PND1(出産日翌日)に体重の重い順に産仔数を10匹にした(み優先)。仔の数が10匹に満たない場合は、体重を測定してそのまま授乳させた。
- 班会議までに解析した腹数は、対照群2腹、曝露群3腹
- 体重増加の抑制がかかった仔が、対照群に1匹、曝露群に3匹(うち1匹死亡)いた⇒TBTの影響かどうか、腹数を増やして要観察。
- PND14-17で海馬スライスを作製し、刺激応答曲線を作製した。

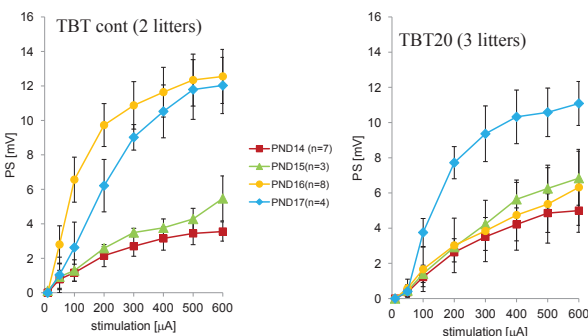
## 刺激応答性について PSの結果

- VPA
- TBT
- 1-BP

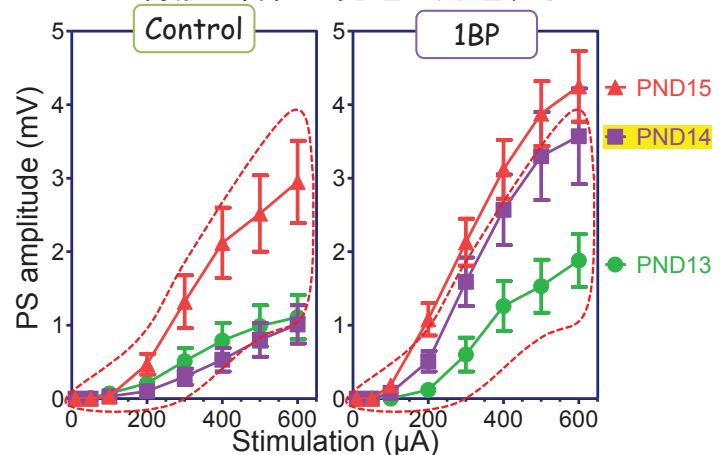
VPA胎生期曝露により生後14-15日齢での刺激応答性の発達が亢進する



## TBT: 刺激応答曲線

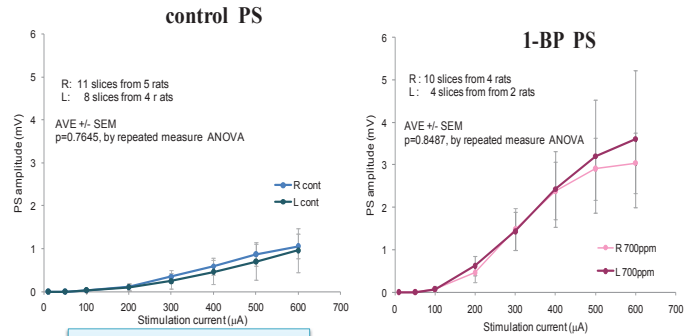
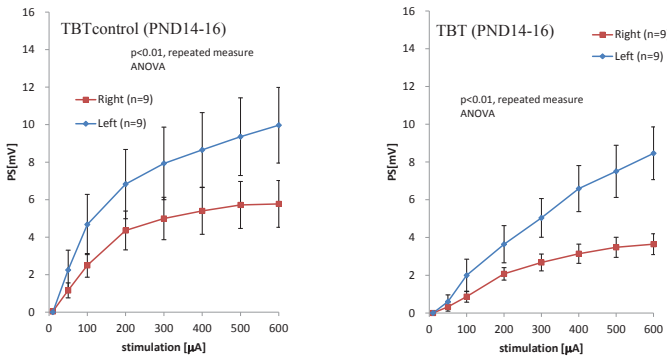


1BP胎生期曝露ラットでは生後13-14日齢で刺激応答性の発達が亢進する



# 産業化学物質1-ブロモプロパン PND14の海馬の刺激応答

TBTの場合、この左右差は本当？

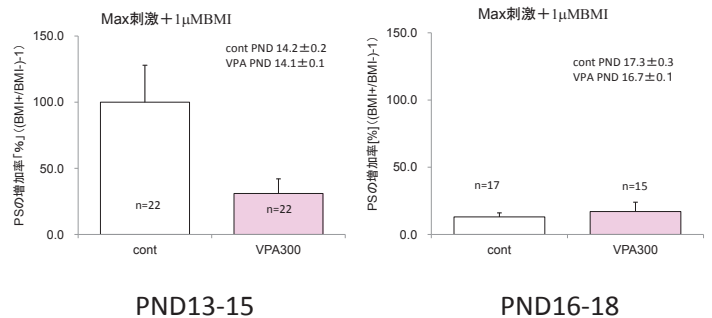


ただし、対照群において、  
slopeの刺激応答⇒R>L  
PSのペア比⇒R<L

ところで、VPA実験での  
BMI感受性について

- Single response への影響
- フィードバック抑制への影響と発達

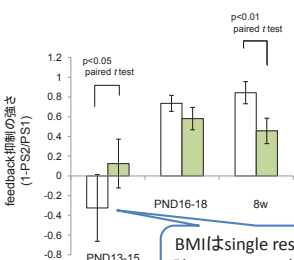
single responseへのBMI(1μM)の影響



フィードバック抑制の強さへの  
BMI(1μM)の影響

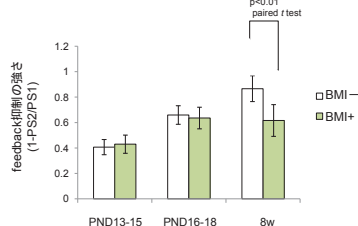
PND13-15で  
GABA<sub>A</sub>Rの機能はどうなってるのか？

feedback抑制の  
発達に伴うBMIの効果:  
対照群



BMIはsingle responseを増強して、フィードバック抑制を大きくした？

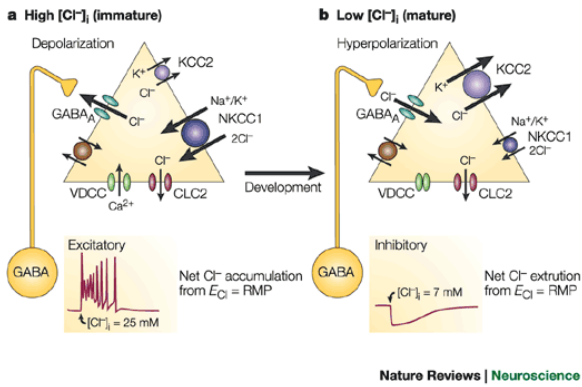
feedback抑制の  
発達に伴うBMIの効果:  
VPA300群



BMIはsingle responseに全く影響しない？

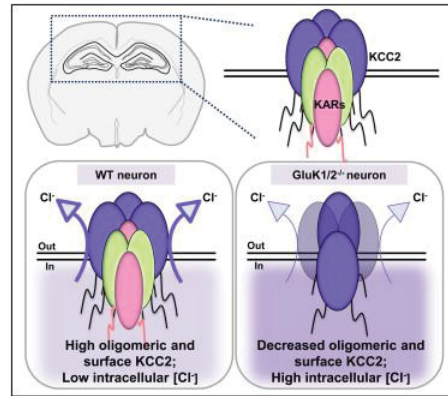
- Extrasynaptic GABA<sub>A</sub>Rへの作用が曝露群では低くなっている⇒すでに成長発達？
- PND16-18ではsingle responseへの影響はかなり低下
- 興奮性と抑制性の強さが並行している？  
- 興奮性が強い⇔抑制性も強い

However, aberrant KCC2 regulation results in increased neuronal Cl and contributes toward the pathophysiology of numerous neurological disorders including epilepsy, autism, and neuropathic pain (Coull et al., 2005; Kahle et al., 2008; Tyzio et al., 2014; Woo et al., 2002).



### Kainate Receptors Coexist in a Functional Complex with KCC2 and Regulate Chloride Homeostasis in Hippocampal Neurons

Vivek Mahadevan,<sup>1</sup> Jessica C. Pressey,<sup>1</sup> Brooke A. Acton,<sup>1</sup> Pavel Uvarov,<sup>2</sup> Michelle Y. Huang,<sup>1</sup> Jonah Chevier,<sup>1</sup> Andrew Puchalski,<sup>1</sup> Gabriel M. Li,<sup>1</sup> Evgenii A. Ivashin,<sup>2</sup> Matti S. Antkainen,<sup>1</sup> Eric Duppre,<sup>2</sup> Roderick R. McInnes,<sup>1,2</sup> and Melanie A. Woodin<sup>1,2\*</sup>



- Native KCC2 exists in a macromolecular complex that contains kainate receptors (KARS)
- Deletion of GluK1/2 KARS reduces KCC2 oligomerization and surface expression
- Acute silencing and genetic deletion of KARS decreases KCC2-mediated Cl<sup>-</sup> extrusion
- An ionotropic glutamate receptor can positively regulate the function of KCC2

化学物質リスク研究事業・班会議資料

H27 年度

平成27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27年9月12日(土) 15時00分～19時00分

場所:ソニックシティビル 7階 703会議室

(〒330-8669 埼玉県さいたま市大宮区桜木町1-7-5)

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)、  
諫田泰成(国衛研)

※関野祐子(国衛研):当会議に出席できないため事前打合せを行い、  
議事内容について了承済み。

(以上、敬称略、順不同)

議事:

1. 今年度に評価する化学物質候補の選定、およびその予備評価のための研究計画  
に関する討議

(15:00～16:25)

(休憩)

2. in vivo 評価系の結果のまとめと学術論文作成に向けた発表内容の構成に関する  
討議

(16:35～19:00)

以上

# 平成27年度班会議

## TBT実験の進捗状況

平成27年5月23日(土)

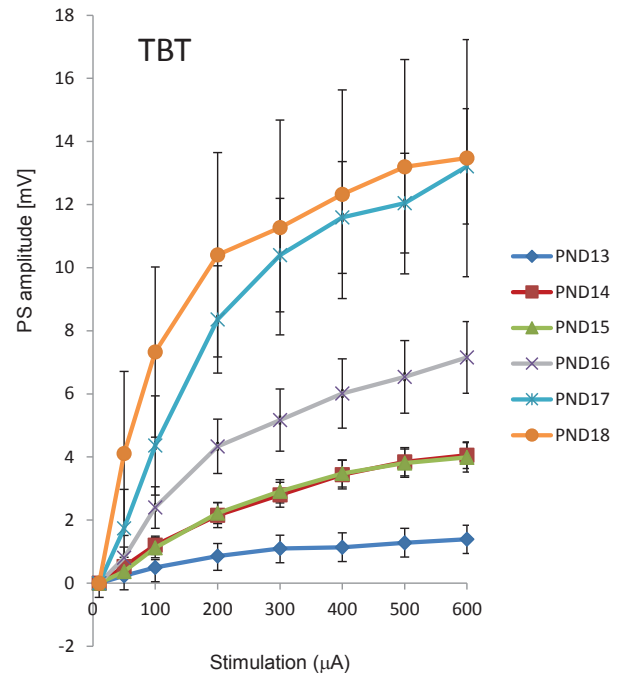
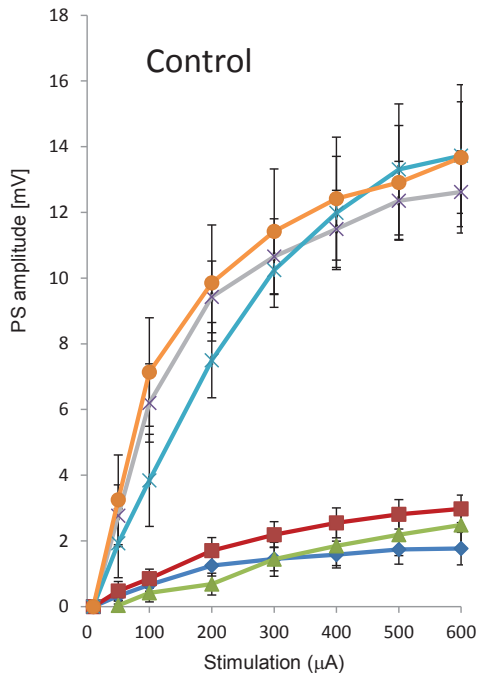
国立医薬品食品衛生研究所にて  
産業医科大学 上野晋、笛田由紀子

## 方法

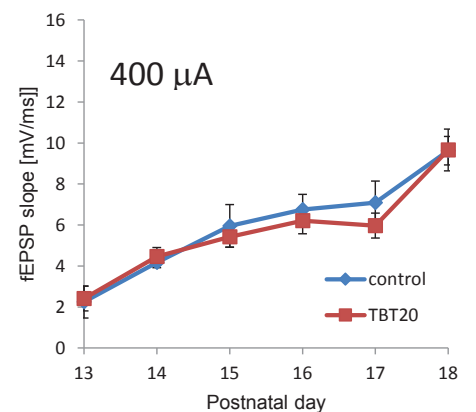
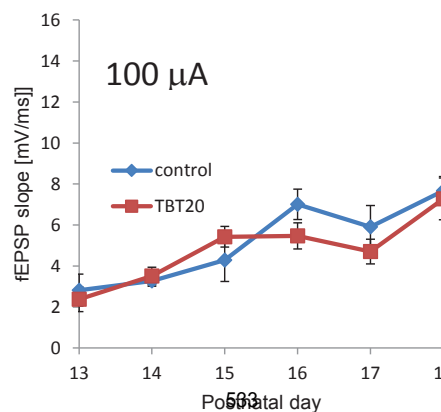
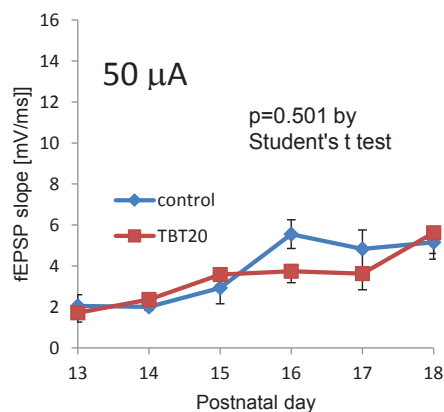
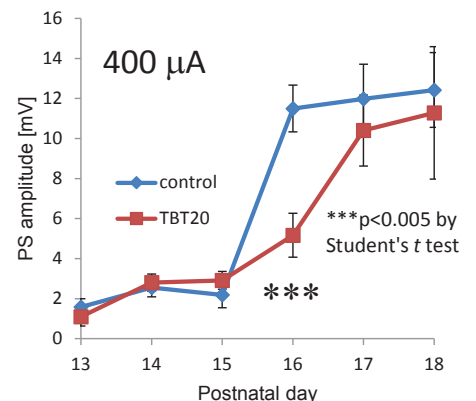
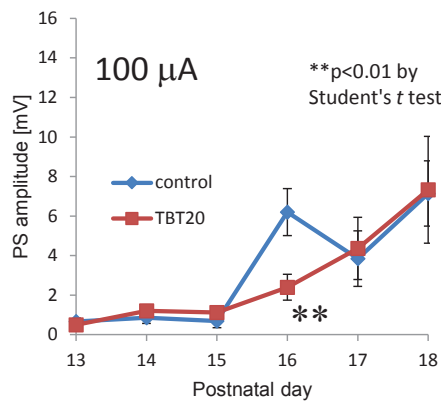
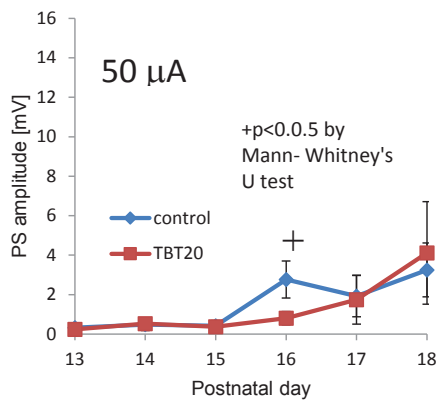
- PEGを蒸留水で2倍に希釈して、20mg/kgとなるようにTBT溶液を加えた。
- Day15の午前11時～午後2時の間に、軽い麻酔下(女性がラットを保持できる)でTBT/希釈PEGを経口投与。対照群には希釈PEGのみ投与。
- PND1(出産日翌日)に体重の重い順に産仔数を10匹にした(♂優先)。仔の数が10匹に満たない場合は、体重を測定してそのまま授乳させた。
- 本日の班会議までに解析した腹数は、**対照群5腹、TBT投与群6腹**
- 体重増加の抑制がかかった仔が、対照群に1匹、投与群に3匹(うち1匹死亡)いた⇒TBTの影響かどうか、腹数を増やして要観察。
- PND13-18で海馬スライスを作製し、解析。
- VPA投与実験の時のように、刺激応答曲線、発達曲線を作製し、対照群と投与群で比較した。



# 対照群とTBT群の刺激応答曲線



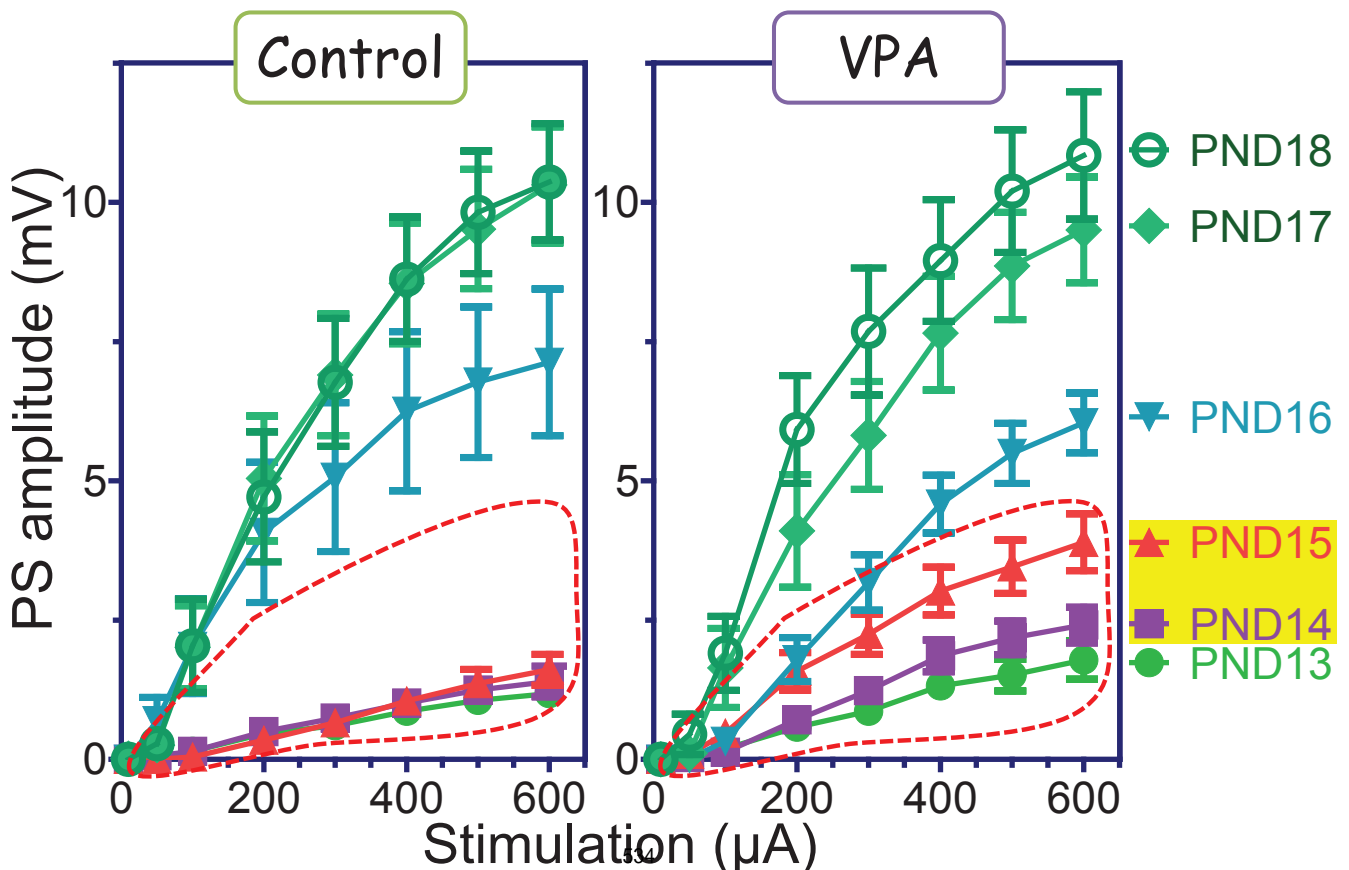
# TBT投与群の発達曲線



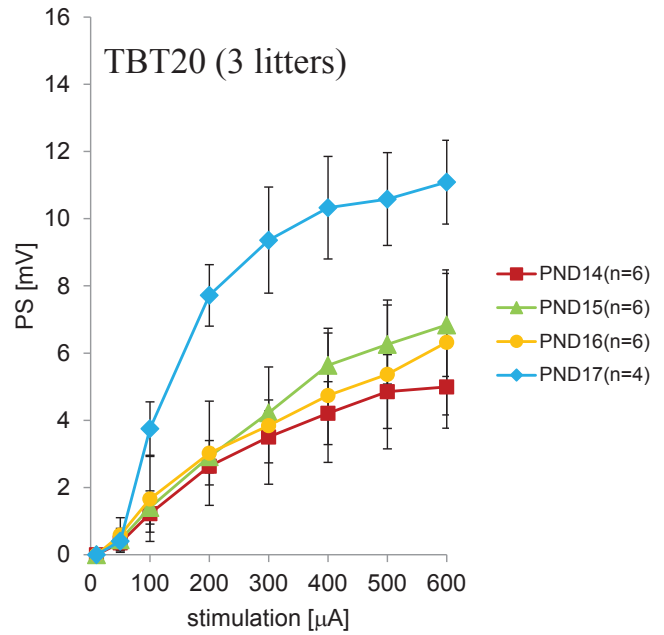
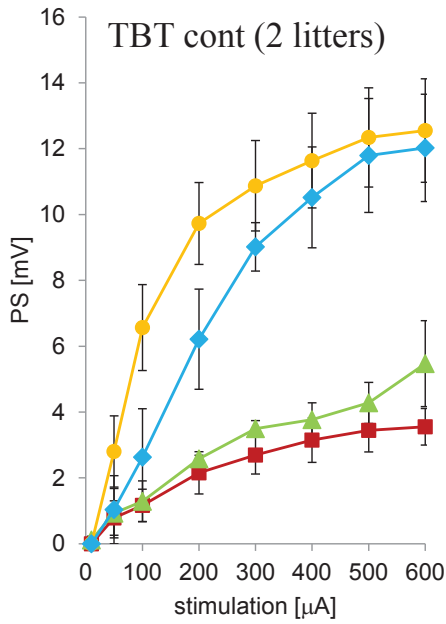
# 刺激応答性について PSの結果

- VPA
- TBT
- 1-BP

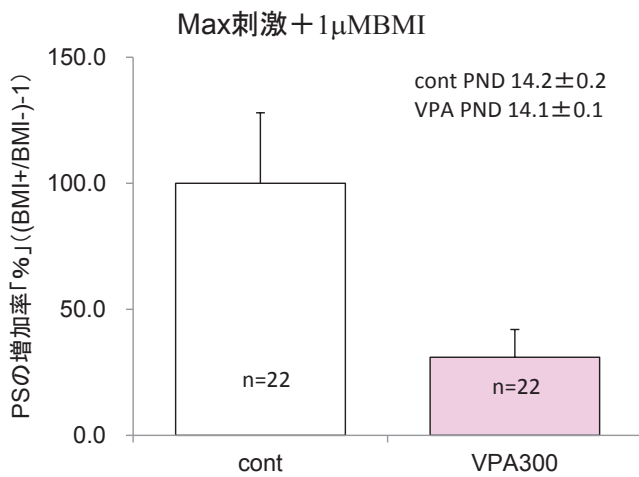
VPA胎生期曝露により生後14-15日齢での刺激応答性の発達が亢進する



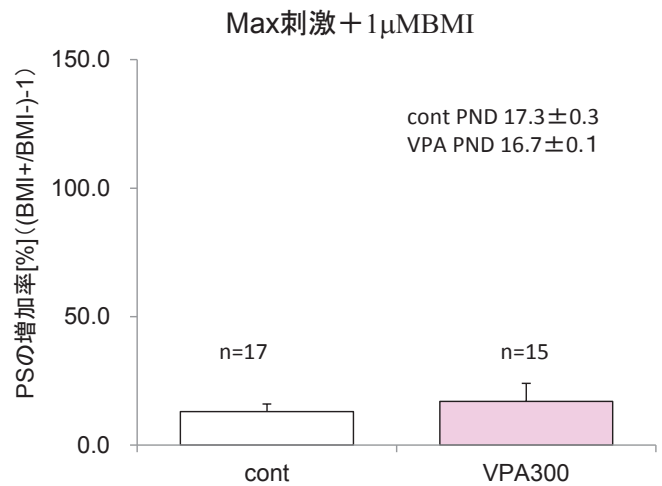
# TBT: 刺激応答曲線



## single responseへのBMI(1μM)の影響



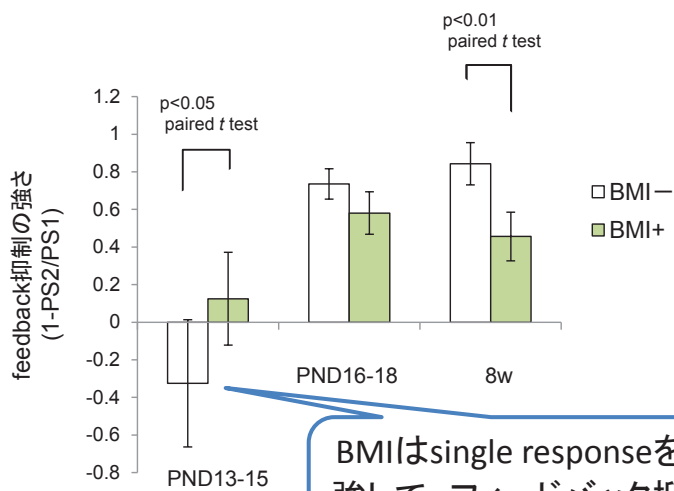
PND13-15



PND16-18

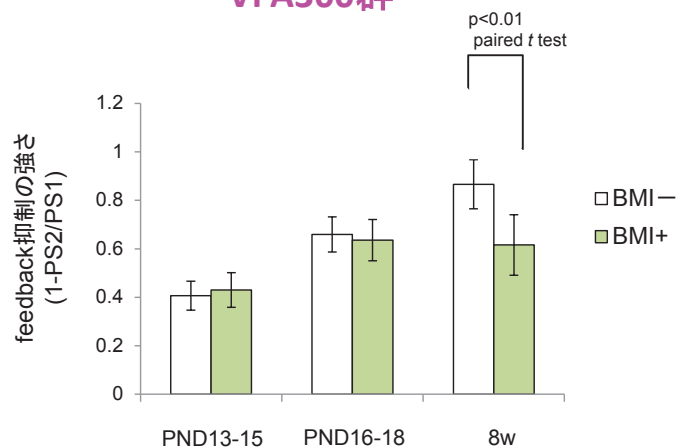
# フィードバック抑制の強さへの BMI(1 $\mu$ M)の影響

feedback抑制の  
発達に伴うBMIの効果:  
対照群



BMIはsingle responseを増強して、フィードバック抑制を大きくした??

feedback抑制の  
発達に伴うBMIの効果:  
VPA300群



BMIはsingle responseに全く影響しない?