ダイオキシンによる出生児の性未成熟の分子機構

武田 知 起

Molecular Mechanism Whereby Maternal Exposure to Dioxin Suppresses Sexual Maturation of the Offspring after Growing Up

Tomoki Takeda

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University;
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.*

(Received June 21, 2017)

Dioxins, including 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), are responsible for producing serious toxic effects in the next generation, such as sexual immaturity. Our laboratory found that treating pregnant rats on gestational day 15 with TCDD (1 µg/kg orally) targets pituitary luteinizing hormone (LH) to attenuate testicular steroidogenesis in fetuses. Because sex steroids during a short window (“the critical period”) in the perinatal stage stimulate brain differentiation closely linked to sexual maturation, it is likely that TCDD imprints sexual immaturity on the offspring due to the lowered expression of LH during the fetal period. To address this hypothesis, we first investigated the effect of supplementation of equine chorionic gonadotropin (eCG), an LH-mimicking hormone, in fetuses exposed to TCDD. The result showed that eCG ameliorated defects in sexual behavior in adulthood as well as in steroidogenesis during the fetal stage. We also found that maternal exposure to TCDD induced the pituitary expression of histone deacetylases (HDACs) in fetuses. In agreement with this, TCDD deacetylated the histones wrapped around the LHβ gene, and valproic acid, an HDAC inhibitor, blocked the reduced level of LHβ caused by TCDD. These observations strongly suggest that TCDD induces the expression of HDACs to attenuate fetal LH production. Finally, such a transient reduction in steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis causes a decrease in the expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone, resulting in defects in sexual behavior in adulthood. This review increases our understanding of the developmental toxicities caused by endocrine disruptors including dioxins.

Key words——critical period; dioxin; fetus; luteinizing hormone; sex steroid; sexual immaturity

1. はじめに

ダイオキシン類は、ごみの焼却過程や塩素を扱う工場において非意図的に産生され、環境中に広く存在する代表的な汚染物質である。実験動物を用いたこれまでの研究から、比較的高い用量のダイオキシン類を曝露した場合、曝露個体において消耗症、免疫毒性及び発がんプロモーション作用など、多種多様な毒性が生じることが報告されている。¹⁾ 一方、妊娠期母体への曝露によって児に出現する次世代影響²⁾は、上記の毒性に比べて低用量で出現するため問題が大きい。代表的な例として、妊娠中にダイオキシン低用量曝露したラットを用いた研究によ

り、出産・成長後の児において、排卵低下や精子産生能の低下並びに交尾行動障害等の性機能に異常が起こることが知られている。²⁾ これらの毒性の多くは、成獣への曝露によっては発現しないか、あるいはかなりの高用量を要することから、発達期に感受性が高く、時期特異的な影響が引き金となって成長後にまで障害が固着するものと推定される。近年の出生コホート調査からも、ダイオキシンがヒト次世代の性特異的機能に与える影響が無視できないとの報告が蓄積しており、³⁻⁵⁾ こどもの健康を守るための対策の構築が望まれている。しかし、次世代影響に関しては、発現機構はもとより毒性の実態さえも不明な点が多く、対処法を構築するにはまずこの点を正確に理解しなければならない。

古くから、ダイオキシン類は内分泌攪乱作用、いわゆるホルモンの作用や代謝に影響を及ぼすことによって障害性を示す可能性が示唆されてきた。^{1,2,6)}

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

e-mail: takeda@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、平成 28 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

しかし、発達期におけるホルモン攪乱作用の実態に関しては十分に解析されておらず、次世代影響の根本的な理解を目指した研究は明らかに不足していた。このような状況を踏まえ、筆者が所属する研究室では、最強毒性を有するダイオキシン同族体である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) が、胎児の性ステロイドに及ぼす影響に着目した解析研究が行われてきた。その結果、妊娠 (gestational day; GD) 15 日目の母ラットに対して 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD を単回経口投与することにより、GD20 の胎児精巣において steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) や CYP17 等の性ステロイド合成に必須のタンパク質の発現が抑制される事実が発見された。^{7,8)} さらに、これらの低下は精巣への直接作用ではなく、上位制御因子である脳下垂体の黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) の β -サブユニットの発現低下に起因することも見い出された。^{7,8)}

交尾行動能等の性特異的形質の獲得は、脳の性分化と密接に関係している。脳の性分化とは、臨界期と呼ばれる特定期間 (ラット：出生前後の 10 日間、ヒト：胎生 3-5 ヶ月と推定されている) に、性ステロイド刺激によって起こる脳の性別の決定機構である (Fig. 1).^{9,10)} 脳は、性染色体に関係なくすべて女性型として発生するため、男児の場合には発達過程で脳を男性型へと変換する必要がある。すなわち、臨界期において胎児精巣で合成された大量の性ステロイドが、視床下部や視索を中心とする神経回路に過不足なく作用することで脳の脱女性化と男性化が起こる。^{8,9)} このように、臨界期の一過的な作用によって構築された神経回路の性差が、個体の一生涯にわたって性特異的な行動や特徴を決定づける。上記の性ステロイドの役割と筆者の研究室における先行研究とを合わせて考えると、ダイオキシンは臨界期の性ステロイド合成抑制を標的として成長後に交尾行動障害等の性未成熟を惹起するとの仮説が浮上する。筆者は、この仮説の実証を通して、ダイオキシンによる次世代影響の新規機構を提起することを目指し研究に取り組んできた。本総説では、これまでの研究成果を概説するとともに、最近の成果と展望についても紹介したい。

Fig. 1. Mechanism of Brain Sexual Differentiation

2. ダイオキシンによる胎児期の脳下垂体 LH 低下の毒性学的意義

先に述べた通り、ラットにおける脳の性分化の臨界期は、出生数日前から生後 5 日目あたりまでと考えられている。⁹⁾ 筆者はまず、臨界期の期間全体における性ステロイド合成能力に対する TCDD の影響を精査した。その結果、GD15 の妊娠ラットへの TCDD 曝露は GD20 の胎児から生後 2 日目まで *LHβ* mRNA 及び *StAR/CYP17* mRNA の発現を低下させるが、それ以降は影響が消失することが判明した [Figs. 2(A) and (B)].¹¹⁻¹³⁾ さらに、これらの ED₅₀ は 0.3-0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度¹⁴⁾ であること、並びに雌胎児も同様に *LHβ* 発現低下が起こること¹¹⁾ を確認した。そこで続いて、一過的な *LHβ* 及び性ステロイドの合成低下が、脳の性分化を障害することで成長後に性未成熟を惹起する可能性を検討するため、胎児への LH 補給実験を実施した。もし、胎児期の LH 発現低下が成長後にみられる障害の原因であるならば、不足する本ホルモンを補給することで改善するはずである。LH 様ホルモンである equine chorionic gonadotropin (eCG) を用いて検討を行ったところ、TCDD 曝露胎児への eCG 補給は、胎児期に起こる *StAR* 及び *CYP17* の発現低下のみならず、^{7,8)} 出生・成長後に出現する交尾行動障害をもほぼ正常レベルにまで改善させた [Figs. 2(C) and (D)].¹¹⁾ これら一連の成果から、ダイオキシンは出生前後の一過的な LH レベルの低下によって性ステロイド合成を抑制し、成長後に交尾行動障害等の性未成熟が出現するとの新規毒性機構が実証された。

Fig. 2. Effect of Maternal Exposure to TCDD on the Expression of Steroidogenic Proteins and LH during the Perinatal Stage, and Recovery from the TCDD-produced Defects in Sexual Behaviors at Adulthood by *in Utero* Injection of eCG¹¹⁻¹³⁾

(A and B) Pregnant rats at GD15 were given oral TCDD (1 µg/kg), and the fetal and neonatal tissues were collected during GD19 and postnatal day (PND) 7. The expressions of mRNAs coding for testicular StAR and CYP17 (A), and pituitary LH (B) were determined by real time RT-PCR, and normalized by β-actin mRNA. The inset in B is a graph that magnifies the data of GD19–21. Each plot represents the mean ± S.E.M. of 6–10 fetuses (neonates) that were removed (born) from different dams. (C and D) The masculine sexual behaviors of male offspring were measured at an age of 10 and 13 weeks. The bars are the means ± S.D. (*n* = 3 dams; at least two offspring born from one dam were analyzed). Significant difference: **p* < 0.05. Adapted from Takeda *et al.*¹¹⁻¹³⁾ with slight modification.

3. 胎児期の *LHβ* 発現低下の分子機構

続いて、*LHβ* 発現低下の機構解析の手始めとして、筆者は培養胎児脳下垂体を用いた *ex vivo* 実験に着手した。すなわち、GD20 の胎児より単離した脳下垂体に対して TCDD を添加したところ、LH 合成の上位制御因子であるゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) による *LHβ* 発現上昇に対して有意な拮抗作用を示すことが観察された。¹⁵⁾ これにより、TCDD による *LHβ* 発現低下には、胎児脳下垂体に対する直接作用が寄与することが推定されたため、引き続き DNA マイクロアレイ解析により標的因子を探索した。その結果、複数のヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) の発現が、TCDD 依存的に胎児脳下垂体において誘導されることを見出した。¹²⁾ 11 種の HDAC アイソフォームのうち、*LHβ* 転写制御への寄与が示唆されている¹⁶⁾ *HDAC1*, 5 及び 7 が *LHβ* 発現低下と同時期である出生前後において誘導されることが確認された [Fig. 3(A)].¹²⁾ これらの HDAC 発現変動は、胎児

視床下部や母体においては生起せず、胎児脳下垂体に選択的であった。¹²⁾ これらの結果を支持して、TCDD によって胎児脳下垂体の *LHβ* 遺伝子に会合するヒストンタンパク質の脱アセチル化が亢進したが、他の脳下垂体ホルモン遺伝子並びに母体 *LHβ* 遺伝子のヒストンアセチル化には影響を認めなかった [Fig. 3(B)].¹²⁾ さらに、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸を併用することにより、胎児の *LHβ* mRNA 並びに血中 LH レベルの低下が正常水準にまで改善された [Fig. 3(C)].¹²⁾ 以上の結果から、HDAC 発現誘導に基づく *LHβ* 遺伝子のヒストン脱アセチル化の亢進が、TCDD による *LHβ* 発現低下に重要であることが強く示唆された。

一般に、ダイオキシンによる毒性発現には、芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AHR) 活性化を通じた遺伝子発現変動が重要であると考えられている。^{1,17)} AHR は、basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim-family に属する受容体型転写因子であり、¹⁸⁾ その重要性は、AHR 遺伝子欠損動物においては多くのダイオキシン毒性が消失する事実

Fig. 3. The Role of the Induction of Histone Deacetylase (HDAC) mRNA in the TCDD-produced Attenuation of the Pituitary Expression of LH β during the Fetal and Neonatal Periods¹²⁾

(A) The level of pituitary HDAC5 mRNA during GD18 and PND4 was determined by real-time RT-PCR, and normalized by β -actin mRNA. (B) The acetylation of histones H3 in the male fetal pituitary was analyzed by a chromatin immunoprecipitation method. In the upper panel, two regions (P1 and P2) of the LH β promoter and a region of the growth hormone (GH) promoter were separately amplified by PCR, and electrophoresed on 1.5% agarose gel. H3 and NII represent the samples immunoprecipitated with anti-acetylhistone H3 and non-immune IgGs, respectively. In the lower bar graph, the relative level of histone acetylation was analyzed by real-time PCR, and normalized by each input sample. (C) Pregnant dams exposed to TCDD (1 μ g/kg, given orally) at GD15 were further treated with sodium valproate (200 mg/kg/d, given orally) during GD16 and 19. Each plot/bar represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6–10 fetuses (neonates) that were removed (born) from different dams. Significant difference: * p < 0.05. This research was originally published in the *Journal of Biological Chemistry*. Takeda T. *et al.*, Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases: a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 18440–18450. ©The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

から支持される.^{19–22)} 筆者は、LH 及び性ステロイドの合成低下に対しても、AHR が関与するか否かを明らかにするため、リガンド親和性の異なる AHR を発現する 2 系統のマウスを用いた検討を実施した。本法は、AHR の寄与を簡便に解析できる手法として古くから用いられている。²³⁾ 高親和性 AHR を有する C57BL/6J 系統の妊娠マウスへの TCDD 曝露により、GD18 胎児から生後 4 日目にかけて同様に LH の発現が低下し、ラットのみならずマウスにおいても同様に臨界期の性ステロイド合成系低下が起こることが確認された。²⁴⁾ しかし、低親和性 AHR を発現する DBA/2J マウスでは、同様の効果を引き起こすためには数十倍の高用量が必要であった。²⁴⁾ 以上のように、TCDD は AHR 活性化を通して胎児脳下垂体の HDAC 発現を誘導し、LH β 及び StAR/CYP17 等の性ステロイド合成系タンパク質の発現を抑制することが強く示唆された。

4. 成長後の交尾行動障害を規定する因子の同定

脳の性分化の主たる標的部位の 1 つである視床下部では、臨界期の性ステロイド刺激によって神経細胞の集合体である神経核の密度や大きさに性差が生じる。これによって生じる神経核は、性的二型核 (sexual dimorphic nucleus; SDN) と呼ばれ、成長後の交尾行動を始めとする性特異的形質を制御する本

体であると考えられている。^{9,25)} 例えば、視床下部にある視索前野 (preoptic area; POA) には雄に優位な神経核である SDN-POA が存在し、これを破壊することで雄特異的交尾行動が抑制される。²⁶⁾ このことから、TCDD による臨界期の性ステロイド合成抑制は、性特異的形質に係わる視床下部神経への影響を通して成長後にまで障害を固着する可能性が考えられる。筆者はまず、この可能性の検証に向けた手がかりを得る目的で、成熟児 (70 日齢) の視床下部を用いて DNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、胎児期の TCDD 曝露によって交尾行動発現に重要な神経ペプチドホルモンである GnRH の mRNA レベルが低値を示す事実を発見した。¹³⁾ 成長後にみられる GnRH 発現低下は、生後 4 日目から持続的にみられた [Fig. 4(A)]。さらに、TCDD 曝露出生児に対して脳室内に GnRH を補給することで、交尾行動障害がほぼ正常水準にまで改善したことから [Fig. 4(B)]、脳内における本ホルモンの低発現状況が、成長後の交尾行動障害の主因であることが明らかになった。¹³⁾ GnRH 発現低下がみられる生後 4 日目は、神経成熟期の最中であり、性ステロイド依存的な臨界期の時期とも合致する。筆者は、性ステロイド刺激の不足が GnRH 分泌に係わる神経の成熟を障害することで GnRH 発現低

Fig. 4. Maternal Exposure to Dioxin Imprints Defects in Sexual Behaviors of the Offspring through Fixing the Status of the Reduced Expression of Hypothalamic GnRH¹³⁾

(A) The levels of hypothalamic GnRH mRNA during GD18 and PND70 were determined by real-time RT-PCR, and normalized by β -actin mRNA. (B) Male pups at 9 weeks born of dams treated with TCDD at GD15 underwent intracerebroventricular (icv) infusion using a cannula-connected to an osmotic pump filled with 200 ng GnRH/mL saline containing 0.1 M HCl. The number of intromissions was observed at 10 and 11 weeks. (C) The TCDD-exposed fetuses were injected with eCG at GD17, and the hypothalamic protein levels of GnRH were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. Each plot/bar represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6–10 fetuses (neonates) that were removed (born) from different dams. Significant difference: $*p < 0.05$. Adapted from Takeda *et al.*¹³⁾ with slight modification.

Fig. 5. Proposed Mechanism Whereby Maternal Exposure to TCDD Causes Sexual Immaturity of the Offspring after Reaching Maturity

下をもたらす可能性を想定し、胎児への LH 補給による効果を検証した。その結果、TCDD 曝露胎児への eCG 補給により、脳内の GnRH レベルは正常水準に回復することが確認された [Fig. 4(C)].¹³⁾ 以上の成果から、ダイオキシンは胎児期の一過的な LH の発現低下によって出生・成長後に至るまで

GnRH 発現低下を固着させ、交尾行動障害が惹起するとの一連の分子機構が実証された。現在、GnRH ニューロンの成熟や形態に着目した研究を進めており、胎児期においては見かけ上の影響は認めないが、²⁷⁾ GnRH 発現低下が起こる乳児期には一部に形態的な影響が観察されている（未発表デー

タ)。引き続き、TCDDがGnRHニューロンに及ぼす影響とこれに対する性ステロイドの寄与に着目した研究を展開していくことが重要と思われる。

5. おわりに

筆者は現在までの研究により、ダイオキシンが出生前後に一過的なHDAC誘導によってLH発現を抑制し、性ステロイド合成を低下させること、並びにこの一過的な影響が引き金となってGnRHの低発現状態が成長後にまで継続し、交尾行動障害が起こる一連の毒性機構を明らかにした (Fig. 5)。本成果は、発達期特異的な影響という新たな視点からのアプローチが本質を理解するために肝要であることを明確に示した点で、発達毒性学的研究における新たな展開となるものと思われる。一方、発達期のホルモン刺激による脳分化の分子標的や機構は、いまだ十分には理解されていない。筆者は、ごく最近に作製したAHR欠損ラットを用いて、ダイオキシンによる肝毒性の発現機構に関する解析も行っている。²⁸⁾ この遺伝子改変動物等も使い、本研究をさらに発展させることで、ダイオキシンの次世代影響とその機構を明確にするとともに、臨界期における刺激が動物の成長や成熟にどのように寄与するのかを理解するための重要な基礎情報を提供していきたい。

謝辞 本稿を終えるにあたり、本研究の機会を頂き、何時も絶え間ない懇切丁寧なご指導並びにご鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野の故山田英之教授 (九州大学主幹教授、平成28年2月22日、胃がんにより逝去、従四位瑞宝小綬章) に対して、謹んで御礼申し上げますとともに、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

多くのご助言やご支援を賜りました石井祐次准教授、並びに現・崇城大学 石田卓巳准教授に深く御礼申し上げます。さらに、本研究の実施にあたり、胎児への直接投与法を始めとする技術指導、並びに多くのご意見・ご助言を頂きました九州保健福祉大学薬学部薬理学第2講座 武藤純平講師に謹んで感謝申し上げます。また、脳室内投与技術をご教授頂きました九州大学大学院薬学研究院臨床育薬学分野の島添隆雄准教授に御礼申し上げます。さらに、本研究は分子衛生薬学分野の卒業生並びに在校生の学生の皆様のご支援やご協力があってこそ成り得たものであり、この場を借りて謹んで感謝の意を表しま

す。最後に、このたびの学術奨励賞の選考委員の先生方、並びにご推薦頂きました福岡大学薬学部 山野 茂教授に深謝致します。なお、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金若手研究(B) (課題番号: 23790152) のご支援の下に行われました。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Poland A., Knutson J. C., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517–554 (1982).
- 2) Peterson R. E., Theobald H. M., Kimmel G. L., *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 283–335 (1993).
- 3) Grandjean P., Grønlund C., Kjær I. M., Jensen T. K., Sørensen N., Andersson A. M., Juul A., Skakkebaek N. E., Budtz-Jørgensen E., Weihe P., *Reprod. Toxicol.*, **34**, 498–503 (2012).
- 4) Winneke G., Ranft U., Wittsiepe J., Kasper-Sonnenberg M., Fürst P., Krämer U., Seitner G., Wilhelm M., *Environ. Health Perspect.*, **122**, 292–298 (2014).
- 5) Nowack N., Wittsiepe J., Kasper-Sonnenberg M., Wilhelm M., Schölmerich A., *PLoS One*, **10**, e0129906 (2015).
- 6) Vanden Heuvel J. P., Lucier G., *Environ. Health Perspect.*, **100**, 189–200 (1993).
- 7) Mutoh J., Taketoh J., Okamura K., Kagawa T., Ishida T., Ishii Y., Yamada H., *Endocrinology*, **147**, 927–936 (2006).
- 8) Taketoh J., Mutoh J., Takeda T., Ogishima T., Takeda S., Ishii Y., Ishida T., Yamada H., *Life Sci.*, **80**, 1259–1267 (2007).
- 9) MacLusky N. J., Naftolin F., *Science*, **211**, 1294–1302 (1981).
- 10) Arnold A. P., Gorski R. A., *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**, 413–442 (1984).
- 11) Takeda T., Matsumoto Y., Koga T., Mutoh J., Nishimura Y., Shimazoe T., Ishii Y., Ishida T., Yamada H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**, 1091–1099 (2009).
- 12) Takeda T., Fujii M., Taura J., Ishii Y., Yamada H., *J. Biol. Chem.*, **287**, 18440–18450 (2012).
- 13) Takeda T., Fujii M., Hattori Y., Yamamoto M., Shimazoe T., Ishii Y., Himeno M., Yama-

- da H., *Mol. Pharmacol.*, **85**, 74–82 (2014).
- 14) Taura J., Takeda T., Fujii M., Hattori Y., Ishii Y., Kuroki H., Tsukimori K., Uchi H., Furue M., Yamada H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **281**, 48–57 (2014).
- 15) Takeda T., Yamamoto M., Himeno M., Takechi S., Yamaguchi T., Ishida T., Ishii Y., Yamada H., *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 221–229 (2011).
- 16) Lim S., Luo M., Koh M., Yang M., bin Abdul Kadir M. N., Tan J. H., Ye Z., Wang W., Melamed P., *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4105–4120 (2007).
- 17) Whitlock J. P. Jr., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 251–277 (1990).
- 18) Ema M., Sogawa K., Watanabe N., Chujoh Y., Matsushita N., Gotoh O., Funae Y., Fujii-Kuriyama Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 246–253 (1992).
- 19) Fernandez-Salguero P. M., Hilbert D. M., Rudikoff S., Ward J. M., Gonzalez F. J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 173–179 (1996).
- 20) Schmidt J. V., Su G. H. T., Reddy J. K., Simon M. C., Bradfield C. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6731–6736 (1996).
- 21) Mimura J., Yamashita K., Nakamura K., Morita M., Takagi T. N., Nakao K., Ema M., Sogawa K., Yasuda M., Katsuki M., Fujii-Kuriyama Y., *Genes Cells*, **2**, 645–654 (1997).
- 22) Harrill J. A., Hukkanen R. R., Lawson M., Martin G., Gilger B., Soldatow V., Lecluyse E. L., Budinsky R. A., Rowlands J. C., Thomas R. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **272**, 503–518 (2013).
- 23) Poland A. P., Glover E., Robinson J. R., Nebert D. W., *J. Biol. Chem.*, **249**, 5599–5606 (1974).
- 24) Takeda T., Taura J., Hattori Y., Ishii Y., Yamada H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **278**, 220–229 (2014).
- 25) Lenz K. M., Nugent B. M., McCarthy M. M., *Front Neurosci.*, **6**, 26 (2012).
- 26) De Jonge F. H., Louwerse A. L., Ooms M. P., Evers P., Endert E., van de Poll N. E., *Brain Res. Bull.*, **23**, 483–492 (1989).
- 27) Takeda T., Matsuo Y., Nishida K., Fujiki A., Hattori Y., Koga T., Ishii Y., Yamada H., *J. Toxicol. Sci.*, **42**, 13–23 (2017).
- 28) Takeda T., Komiya Y., Koga T., Ishida T., Ishii Y., Kikuta Y., Nakaya M., Kurose H., Yokomizo T., Shimizu T., Uchi H., Furue M., Yamada H., *J. Biol. Chem.*, **292**, 10586–10599 (2017).