

研究成果概要

**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**

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室  
諫田 泰成

<全体要旨>

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の曝露とされる。発達期の神経系は成体より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられるため、子どもの影響評価法の確立が強く望まれる。

現在、OECDやEPAによって、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインが制定されているが、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。さらに、日本ではこのようなガイドラインは未整備である。そこで我々は、現行ガイドラインの欠点を克服し、簡便かつ低コストのin vitro評価系として、各発達期における神経系の毒性評価法、遅発性の神経回路異常による毒性評価法の基盤を開発している。

昨年度までに、遅発性神経毒性が懸念されるバルプロ酸および発生毒性が懸念される内分泌かく乱物質トリブチルスズを研究班で共通の化合物として用いて、各発達段階における神経毒性を明らかにした。本年度は、発達神経毒性を有する有機リン系農薬クロルピリホスを共通の化合物として新たに検証した。その結果、幹細胞から生後神経回路にいたるまで様々な毒性を明らかにした。これらの結果から、我々の手法は幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階において神経毒性を評価できることが示唆された。また、発生過程で毒性発現メカニズムが異なることが考えられた。

今後は、国際的な検証チームと連携を図りながら、再現性・予測性を検証し、新規試験法としての確立を目指す。

<研究分担者一覧>

宇佐見誠 (国立衛研)  
「神経堤細胞の機能解析による評価法の開発」

佐藤薫 (国立衛研)  
「発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価」

関野祐子 (国立衛研)  
「生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究」

上野晋 (産業医大)  
「幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価」

A. 研究目的

発達期の中枢神経系は成体組織より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが懸念される。

すでに我々は平成 22～24 年度の化学物質リスク事業「個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による化学物質の健康影響評価法に関する研究」において、各発達段階における評価系を構築した。

そこで、本年度は、遅発性の神経毒性が懸念されるバルプロ酸、および発生毒性が懸念される内分泌かく乱物質トリブチルスズに加えて、有機リン系農薬クロルピリホスを研究班共通の化学物質として使用し、当初の計画に従って、我々が独自に構築した各発達段階における in vitro 神経毒性評価を行った。

## B. 研究方法

詳細は各分担報告書を参照のこと。

## C. 研究結果

以下に示すように、幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階において、陽性対照化合物クロルピリホスの神経毒性作用が検出できることを明らかにした。

### 【①ヒト未分化細胞の代謝】

クロルピリホスによりヒト幹細胞のエネルギー代謝異常を見出した。とくに、化学物質によりミトコンドリア形態制御機構が阻害され ATP 産生が抑制されることにより増殖が抑制される新規の毒性発現メカニズムを明らかにした。

### 【②神経堤細胞の遊走】

ラット神経堤細胞遊走実験法により、培養 48 時間までは 50 $\mu$ M までは神経堤細胞の遊走促進傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25 $\mu$ M 以上で抑制傾向が認められた。従って、クロルピリホスは神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。

### 【③発達成長期神経系細胞新生】

前脳矢状切片の脳室下帯に存在する神経幹細胞および前駆細胞を蛍光標識し切片培養を行い、評価化合物を適用し定量的な評価を行った。クロルピリホスは、新生神経系細胞数減少、新生オリゴデンドロサイト数の減少を引き起こすことを明らかにした。

### 【④生後神経回路】

バルプロ酸は伝達物質の放出異常と神経発達の異常を示し、行動異常は早期に出現した。クロルピリホスも同様な変化が観察され、過剰な脳回の形成も認められた。

### 【⑤幼若期神経回路】

有機リン系農薬クロルピリホス (CP) を VPA や TBT と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。

## D. 考察

本研究において、陽性対照化合物であるバルプロ酸およびトリブチルスズに加えて、クロルピリホスを用いて、幹細胞から生後・幼若期までの毒性を統合的に評価した。

バルプロ酸およびトリブチルスズと同様に、クロルピリホスはすでに幹細胞に対して毒性が認められた。妊娠動物の投与により生後早期の海馬の興奮性神経回路の亢進、小脳の突起伸展の異常をきたすことから、我々が開発した各発達期における毒性評価系の有用性を示すことができた。

今後は、試験法の確立に向けて、本評価法の再現性、予測性などを検証する予定である。とくに、2015 年より開始された HESI の NeuroTOX と連携を図りながら、プロトコルの整備を進め、国際的な評価系へと発展させることを目指し、国内外のグローバルな化学物質の管理などに役立てたい。

## E. 結論

我々が構築した各発達期の神経毒性評価により、バルプロ酸およびトリブチルスズの各発達段階における神経毒性を明らかにした。

## F. 研究発表

分担研究者の報告書に示すように、多数の論文発表および学会発表を行った。