

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業

課題番号：H25-化学-一般-002 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 室長
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。

本研究では、発生毒性が懸念される陽性対照化合物として、遅発性神経毒性が懸念されるバルプロ酸、内分泌かく乱物質トリブチルスズ、有機リン系農薬クロルピリホスの3種類の化合物を選択して、胎生・神経発達期および成熟期（神経回路形成期）において検証した。その結果、作用機序の異なる化学物質に関して、幹細胞から生後神経回路にいたるまでの発達神経毒性を評価できることを明らかにした。従って、上記の方法を毒性メカニズムに基づき、各発達時期に応じた試験法を組み合わせることにより統合的な評価法が有用であることが示された。

研究分担者一覧

諫田泰成（国立衛研・室長）
「ヒト未分化細胞を用いた化学物質の影響」
宇佐見誠（国立衛研・室長）
「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・室長）
「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・部長）
「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・教授）
「幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価」

研究体制

胎生期と成熟期に分けて in vitro 神経毒性を検証し、統合的に発達期の化学物質毒性評価ができる体制にした。

【胎生・神経発達期】

発生過程に対応した培養標本を用いる試験

幹細胞・神経堤細胞遊走・グリアと神経細胞新生への化合物の直接作用
国衛研(諫田・宇佐見・佐藤)

【成熟期】

神経系の情報処理機能への影響評価

新生期・成熟期の仔脳切片標本によるシナプス機能影響評価
産業医大(上野)・国衛研(関野)

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、本研究において、遅発性の神経毒性が懸念されるバルプロ酸、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、有機リン系農薬で神経毒性作用を有する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「胎生・神経発達期」から「成熟期」までの各発達段階において、*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、各発達ステージにおいて、作用機序の異なる 3 種類の陽性対照化合物を用いて、神経毒性作用を検出できることを明らかにした。

下記に試験法の一覧表を示す。

胎生・神経発達期の影響評価

【①ヒト未分化細胞の代謝】

バルプロ酸によりヒト iPS 細胞の神経系への分化が亢進した。一方、トリブチルスズやクロルピリホスにより分化が抑制された。ま

た、化学物質の暴露によりヒト iPS 細胞や NT2/D1 細胞のミトコンドリア形態制御機構が破たんし融合因子 *mfn1* の分解を伴う ATP 産生が抑制される新規の毒性発現機構を明らかにした。

【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、バルプロ酸は神経堤細胞の遊走を促進すること、トリブチルスズは細胞遊走に影響しない濃度において増殖を抑制することを明らかにした。さらに、クロルピリホスは神経管がある状態で神経堤細胞の遊走を抑制することを見出した。本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

【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、評価化合物を定量的に評価した。バルプロ酸およびヒストン脱アセチル化酵素阻害が新生神経系細胞数増加、新生細胞の突起発達を引き起こすこと、トリブチルスズやクロルピリホスは神経系細胞新生を抑制する可能性が示された。

成熟期の影響評価

【④小脳の突起伸展】

バルプロ酸は伝達物質の放出異常と異常な突起進展を示した。一方、トリブチルスズの伝達物質放出の異常は軽微だったが、行動に大きな変化が観察された。したがって、発達期神経毒性には、行動に加えて伝達物質放出の異常が有用であることが示唆された。現在、クロルピリホスの作用を検討中である。

確立した試験法の一覧

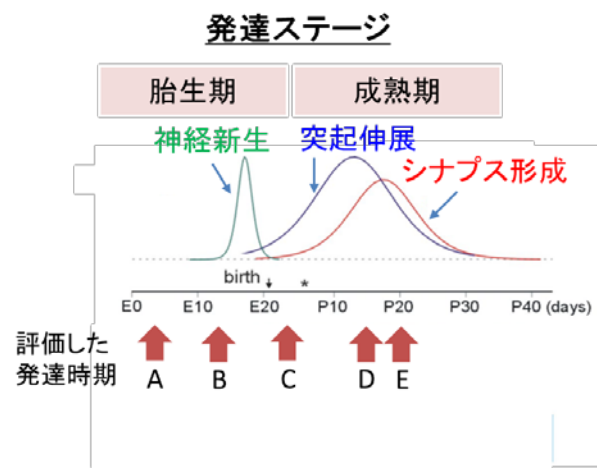
胎生・神経発達期の評価系

- A: ヒト iPS 細胞の神経系分化評価法 (諫田)
- B: ラット神経堤細胞の遊送評価法 (宇佐見)
- C: ラット生後初期の神経新生評価法 (佐藤)

成熟期のシナプス機能評価系

- D: ラット海馬の刺激応答評価法 (上野)
- E: ラット小脳の突起伸展評価法 (関野)

※評価した発達時期は右図の A～E である



【⑤海馬の刺激応答】

バルプロ酸胎生期曝露ラットならびに反回抑制の亢進時期を検討した結果、バルプロ酸の胎生期曝露ラットでは興奮系・抑制系機能の早熟化を、トリブチルスズの胎生期曝露ラットでは興奮系・抑制系機能の発達遅延を見出した。現在、クロルピリホスの作用を検討中である。

得られた結果を以下、表にまとめた。

発達神経毒性の各試験法を組み合わせた統合的な評価結果

バルプロ酸

胎児期

- ・ヒト iPS 細胞の神経分化亢進
- ・ラット神経堤細胞の遊走亢進
- ・ラット生後初期の新生神経細胞の増加

成熟期

- ・ラット小脳の過剰な突起伸展
- ・ラット海馬神経回路の刺激応答性の亢進

トリブチルスズ

胎児期

- ・ヒト iPS 細胞の神経分化抑制
- ・ラット神経堤細胞の増殖抑制
- ・ラット生後初期の新生神経細胞の減少

成熟期

- ・ラット海馬神経回路の刺激応答性の抑制

クロルピリホス

胎児期

- ・ヒト iPS 細胞の神経分化抑制
- ・ラット神経堤細胞の遊走抑制
- ・ラット生後初期の新生神経細胞の減少

D. 考察

本研究において、発達毒性が懸念される陽性対照化合物としてバルプロ酸およびトリブチルスズ、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評価した。バルプロ酸、トリブチルスズ、クロルピリホスはいずれもヒト幹細胞において毒性が認められた。バルプロ酸、トリブチルスズについては妊娠動物の投与により生後早期の海

馬神経回路に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。特に興味深いことに、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、いずれの段階でも VPA による亢進、TBT による抑制がみられた点があげられる。*in vivo* と *in vitro* 評価系の結果と同じ方向性であることから、幹細胞の異常が早期の神経回路に影響を与える可能性が示唆される。この結果は、高次機能の予測に *in vitro* の系が有用であると考えられ、さらなるメカニズムの検討が必要である。クロルピリホスは *in vitro* 評価ではよくしえの方向に作用しているが、*in vivo* の作用は現在検討中であり、パラレルな挙動を示すのか興味深い。さらに、それぞれのエンドポイントにおいて個々の発達期に選択的な毒性発現メカニズムも明らかにすることができた。したがって、上記の方法を毒性メカニズムに基づき、各発達時期に応じた試験法を組み合わせることにより統合的な評価法が湯様であることが示された。

今後は、各発達期における毒性発現メカニズムをもとにして、本評価法の予測性などを検証し、包括的かつ体系化手法として国内および OECD の評価法、試験法として発展させる。

E. 結論

我々が構築した各発達期の神経毒性評価を用いて、発達毒性を有する代表的な化学物質バルプロ酸、トリブチルスズ、クロルピリホスの神経毒性を明らかにした。特に、胎生期として発達過程に対応した培養標本による評価法、成熟期として脳切片標本によるシナプス機能影響評価法の確立を確立した。

今後、既存毒性データとの比較などにより、評価系の有用性・予測性を検証することにより、国内外の評価法/試験法として発展させることを目指す。

F. 研究発表

3年間による成果発表の件数は、**論文48件、学会発表156件**である。

(詳細は各分担研究者の項目を参照のこと)