

研究成果概要

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
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と比較して感受性が高く、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、子どもの健康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、発達期における細胞機能異常と神経回路異常の毒性作用メカニズムに基づいて、新たにスループット性の高い発達神経毒性評価スキームを作製し、評価指標の選定やプロトコルの最適化を行うことにより統合的な発達神経毒性試験法の開発を行っている。

ヒトiPS細胞（神経発生モデル細胞の評価系）やラット小脳および海馬（生後初期における遅発性毒性評価系）を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行った。特に、ラット海馬ニューロンを用いた、スループット性の高いスクリーニング系の構築に着手し、新たにHESI NeuToxと国際バリデーション実験を開始した。また、バルプロ酸などのメカニズムを理解する上で、妊娠中の母親への摂取栄養の程度や栄養成分の偏りによって胎児のエピゲノムに影響し生後の発育や疾患の発症に寄与する、というDoHaDについて調査研究を行った。さらにバルプロ酸投与症例の胎盤のメチル化エピゲノム解析に着手した。

今後は、最適化された評価指標をもとに遅発性毒性評価系の統合化を行う。さらに、OECDやHESIとの国際連携のもと試験法の開発を目指す。

<研究体制>

- ・ 諫田泰成（国立医薬品食品衛生研究所）
「ヒト幹細胞の分化による評価法の開発」
- ・ 山崎大樹（国立医薬品食品衛生研究所）
「海馬ニューロンを用いた神経ネットワークによる評価法の開発」
- ・ 吉田祥子（豊橋技術科学大学）
「生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発」
- ・ 上野晋（産業医科大学）
「幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発」
- ・ 秦健一郎（成育医療研究センター）
「既存の毒性データおよびヒトデータとの検証」

A. 研究目的

本研究では、胎児期の神経発生モデル細胞を用いたスクリーニングを行い（細胞評価グループ）、さらに生後の成熟期における遅発性神経毒性の早期予測評価法（神経ネットワーク評価グループ）を検証し、統合的な新規試験法として開発を目指す。現在進行中のHESI NeuTo、OECD DNT 専門家グループとの国際連携をもとに、試験法の確立に向けて、科学的根拠を取得する。

上記 2 グループにヒト毒性データ検証グループを加えた 3 グループの密な連携により、これらの評価系やヒト試料の有用性を明らかにして、国際的に整備が進められつつある発達神経毒性の評価系にデータを提供して、化学物質の規制行政への応用に取り組みたい。

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

【①ヒト幹細胞の分化による評価法】

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行い、ATP 産生と分化能を確定した。遅発性神経毒性が懸念される化学物質の作用を検出でき、陰性対照物質は影響を与えなかった。従って、ヒト iPS 細胞におけるミトコンドリア機能を指標にして、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。さらに、OECD DNT 専門委員、HESI steering committee として国際連携を推進した。

【②神経ネットワークによる評価法】

HESI NeuTox の多点電極システムサブチームに参加し、プレバリデーションの議論を行い、プロトコルを決定した。これをもとに、バリデーション試験のデータ取得を開始した。

【③生後小脳の神経回路】

遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスを胎生期の動物に投与し、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸長と小脳構造の変化、動物の行動変化から定量化して示した。また、行動異常との相関も明らかにした。

【④幼若期海馬の神経回路機能】

遅発性神経毒性試験手法の妥当性を調べる目的で、発達神経毒性の懸念がある 1BP について検討した結果、神経回路興奮性の亢進をもたらすことを明らかにした。規制値との比較を行うことにより妥当性を評価し、評価指標の有用となる可能性を明らかにした。

【⑤既存毒性データ、ヒトデータとの検証】

陽性対照物質バルプロ酸などの作用メカニズムを明らかにするため、ヒトのエピゲノムデータに関して調査を開始した。調査研究により、胎児期あるいは新生児期に受けた影響により、ゲノムのメチル化が生じ生後長期に渡って継続し、疾患リスクとなる可能性が示唆され、バルプロ酸投与例の胎盤のエピゲノム解析に着手した。

D. 考察

本研究において、これまでに我々が構築した神経発生モデル細胞の評価系および生後

初期における遅発性毒性評価系を用いて、化学物質の統合的な健康影響評価法のプロトコル、評価指標を確立し、新規試験法の提案に向けた取り組みを推進している。

現在 OECD で提案されている in vitro DNT と同様に、ヒト iPS 細胞の分化誘導能に基づく評価系およびラット神経細胞のプラットフォームを用いて化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を検討して、国際的な議論に資する科学的根拠の取得を行っている。諫田は OECD DNT の専門委員として参加しており、2018 年 3 月にキックオフ電話会議および WNT 会議で議論を行った。ヒト iPS 細胞は特に重要なツールであり、IATA の整備を進めることとなった。HESI に関して、Tim Shafer (EPA) らと議論を重ねてラット神経細胞の多点電極システムのプロトコルが決定し、現在、データ取得中である。

海馬及び小脳についても in vitro と in vivo をつなぐ評価系として重要であり、HESI NeuTox の steering committee (諫田が参加) においてもどのように両者を比較検証すべきなのか議論を行っている。日本としても科学的根拠となるデータを示す必要があり、引き続き取り組みたい。

化学物質の安全性評価においてはヒト試料の整備が必要不可欠である。我々は既存のデータベースの中で成育医療研究センターの胎盤の症例に着目し、発達神経が懸念される医薬品投与例の胎盤エピゲノム解析を行っており、発達との相関を検証中である。

E. 結論

胎児期、成熟期において陽性対照となる化学物質を用いて、試験法の確立に向けて安定な評価指標とプロトコルを選定した。ラット海馬ニューロンを用いた、スループット性の高いスクリーニング系を新たに構築し、国際バリデーション試験のデータ取得を開始し、OECD とも専門委員として連携している。また、新たにヒト胎盤試料の有用性を明らかにするため、エピゲノム解析に着手した。

F. 研究発表

各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。