

総括報告書

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。その原因の一つとして、発達期における化学物質の曝露の可能性が考えられる。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可能性が想定され、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、統合的な発達神経毒性試験法の開発を行っている。

本研究においては、ヒトiPS細胞(神経発達のモデル細胞)のミトコンドリア機能などを指標にして、化学物質の評価に一定の予測性があることを明らかにした。動物データとの橋渡しを考えるうえで、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in vitroとin vivoデータの相関を示す明らかにするとともに、ラット海馬ニューロンを用いてスループット性の高いスクリーニング系を構築し、HESI NeuToxの検証試験に参加して実験プロトコルを整備して検証試験に参加して、データを提出した。現在、国際グループによりデータを詳細に解析中である。また、DoHaDコンセプトに基づいて、バルブ口酸投与症例の胎盤のメチル化情報の揺らぎによる検証を行い、その有用性を明らかにした。

我々の取り組みと並行して、OECDでインビトロ発達神経毒性ガイダンス案が提案された。現在、評価すべき化学物質を決定し、バリデーション試験が進行中である。今後は、日本としてヒトiPS細胞などに関するOECDのデータを検証し、動物のデータなどとの比較を行う。これにより、インビトロ発達神経毒性評価ガイダンス案に貢献し、将来的には化審法などの化学物質の管理に活用することが期待される。

<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)、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)により動物との橋渡しを行う。また、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、これらの発達神経毒性(DNT)の評価系やヒト試料の有用性を明らかにする。さらに、現在進行中のHESI NeuTox、OECD DNTグループとの国際連携のもと、試験法の確立に向けて科学的根拠を取得する必要がある。

OECD で提案された発達神経毒性ガイドランス案の議論が開始された。日本からヒト iPS 細胞や動物などを用いた DNT に関するデータを積極的に提供して、ガイドランスならびに化学物質の規制に貢献したい。

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

【 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として ATP 産生と分化能を選定した。ATP 産生に関して大規模検証試験を行い、その予測性を明らかにした。分化能は引き続きデータを取得する必要がある。以上の結果から、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 NeuTox メンバーとして国際連携を推進した。

【 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、共通プロトコルのもとバリデーション試験を実施した。すでにデータ取得を行って、解析法を議論している。

【 生後小脳の神経回路】

遅発性神経毒性の可能性が懸念される化学物質としてバルプロ酸、クロルピリホスを用いて、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展と小脳構造の変化、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。

【 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、発生毒性の可能性が懸念される IBP 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た。

【 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研究を行い、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た。さらに、バルプロ酸投与例の胎盤のエピゲノム解

析を行い、メチル化の揺らぎの重要性を見出した。

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、新規ガイドランス案との連携を推進している。

現在 OECD で提案されている in vitro DNT ガイドランスと同様に、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、国際的な議論に向けて科学的根拠のデータ取得を行っている。

諫田は OECD DNT の専門委員として参加しており、化合物などを共有しており、バリデーション試験が開始された。また、HESI においては、Tim Shafer (EPA)らとデータ解析法の議論が進んでいる。ガイドランス案ではヒト iPS 細胞は特に重要なツールになることが明記されていることから、日本樹立株のデータ取得が喫緊の課題である

海馬及び小脳についても in vitro と in vivo を橋渡しする評価系として重要であり、HESI NeuTox の steering committee 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 DNT の動物データを取得する必要があり、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、バルプロ酸投与例の胎盤エピゲノム解析を行い、メチル化状態が変化していることを示した。

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、in vitro DNT 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。