

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価

研究分担者：産業医科大学 産業生態科学研究所 教授 上野 晋
研究協力者：産業医科大学 産業保健学部 講師 笛田由紀子

研究要旨

本研究では、胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指すこととし、発生過程の神経組織を用いて様々な化学物質の発達神経毒性評価へ応用できるか否かを検証していくことを目的とした。まず初年度に、抗てんかん薬バルプロ酸（VPA）と内分泌かく乱作用を示すトリブチルスズ（TBT）について、その発達神経毒性の特徴が定性的ばかりでなく定量的にも評価できるような解析手法を検討した。さらに産業現場で使用される化学物質の例として発達毒性が不明な有機溶剤 1-ブロモプロパン（1BP）を選択し、その遅延性発達神経毒性に関する評価を試みた。また、食品加工品に微量ながら含まれるものの、生殖毒性や末梢神経毒性を有することが知られているアクリルアミド（ACR）について、発達神経毒性の有無を含めた検討を行うための実験条件を確立した。

神経回路の入出力特性を示す EPSP-Spike (E-S) coupling に対してロジスティック解析を導入し、得られるパラメータを検討した。その結果、VPA を胎生期に投与した仔ラットでは神経回路の興奮性亢進現象が開眼前期となる生後 14～15 日齢に先んじて出現することがパラメータの比較からも明らかとなった。一方、TBT を胎生期に投与した仔ラットでは、生後早期の海馬神経回路機能に対してむしろ回路機能を抑制することが見出されていたが、ロジスティック解析でも生後 16 日齢で神経回路興奮性の亢進現象が遅延することを示すことができた。1BP に関しても E-S coupling のロジスティック解析を行ったところ、VPA の場合と同様に回路興奮性の亢進現象が開眼前に先んじて出現することが判明した。

以上の結果から、これまで知られている毒性作用が異なる化学物質について、胎生期曝露による発達神経毒性を評価できたことから、授乳期間中の特定の日齢に当たる仔ラットから作製される海馬スライス標本、ならびにこれを用いた神経回路機能の解析、特に E-S coupling のロジスティック解析によるパラメータの比較が発達神経毒性評価法として有用である可能性が示唆された。

ACR では、母ラットに末梢神経毒性が出現した場合、仔ラットの発育に与える影響が無視できない。本研究では妊娠 6 日から 19 日まで（胎生期曝露）と、妊娠 6 日から離乳まで（胎生授乳期曝露）の期間、自由飲水を介した経口曝露を行った。体重減少に伴う脳重量の低下は発達毒性を示している可能性があるが、今回、投与濃度 50 ppm において海馬重量が増加していたことから、発達神経毒性を評価する実験条件として 50 ppm を選択した。

離乳時に実施した Hindlimb landing foot-splay test では、胎生期曝露 50 ppm では変化しなかったが、曝露期間を離乳まで延長すると雄性仔ラットに有意な差が認められた。また、生後 5 日齢と 7 日齢の不随意運動を観察する行動試験を行った結果、対照群では 2 日間で不随意運動は変化しなかったが、ACR 曝露群では 2 日間の不随意運動の出現が増加した。不随意運動は脳神経系機能を反映すると考えられるので、胎生期の ACR 曝露が神経系に与えている可能性が示唆される。ACR を胎生期曝露した仔ラットの海馬神経回路興奮性の評価を現在行っているところであるが、その評価とこの不随意運動の評価を組み合わせることで、授乳期での発達神経毒性評価法の一つとして提案できる可能性が考えられる。

A. 研究目的

本研究では、胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指すこととし、発生過程の神経組織を用いて様々な化学物質の発達神経毒性評価へ応用できるか否かを検証していくことを目的とした。本分担任では、抗てんかん薬であるバルプロ酸 (VPA)、内分泌かく乱作用を示すとされるトリブチルスズ (TBT)、有機リン系の農薬であるクロルピリフォス (CP) 等を用いて、授乳期の海馬の興奮系神経回路機能およびγ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性抑制系神経回路機能を検討してきた。しかし、神経細胞群へのシナプス入力とスパイク電位としての出力をそれぞれに解析するなど、結果を理解するためには電気生理学的な専門知識を必要であったことから、回路発達期の神経細胞の特徴や化学物質に対する応答に関して、神経細胞の機能をより定量的に評価する必要があることが課題であった。そこで、本研究では、定量的な評価法を見出すこと、その評価法によりこれまでに検討してきた VPA と TBT についての再評価を行うことを目的とした。さらに産業化学物質の例として発達毒性が不明な有機溶剤 1-ブロモプロパン (1BP) についても遅延性発達神経毒性を授乳期の海馬神経回路機能で評価した。さらに食品加工品に微量ながら含まれるものの、生殖毒性や末梢神経毒性を有することが知られているアクリルアミド (ACR) につ

いて、発達神経毒性の有無を含めた検討を行うための実験条件を検討した。

B. 研究方法

1. VPA、TBT、1BP ならびに ACR の胎生期曝露モデルラットの作製 (研究協力者 笛田由紀子)

VPA と TBT については、妊娠 15 日目 (プラグ確認を第 0 日とする) の雌性 Wistar 系ラットに対して、イソフルラン麻酔下に化学物質を経口投与した。投与量については、VPA は 300 mg/kg、TBT は 20 mg/kg とした。VPA 投与群に対する対照群として生理食塩水を、TBT 投与群に対する対照群として 50% ポリエチレングリコールを同量投与した。生後 13 日齢 (PND13) から生後 18 日齢 (PND18) にわたり海馬スライス標本作製し、神経回路興奮性の電気生理学的解析を行った。実験スケジュールを図 1 に示している。

1BP は有機溶剤であるので、産業現場では蒸気を吸入することによって曝露されることが多い。そこで妊娠 Wistar 系ラットの妊娠 1 日から 20 日までの 20 日間、曝露チャンバー内で濃度 200、400、700 ppm で 1 日 6 時間の反復曝露を実施した。対照群には、1BP 蒸気の曝露を除いたすべての条件を曝露群と同様にした妊娠ラットを用いた。PND13-15 で海馬スライス標本作製し、神経回路興奮性の電気生理学的解析を行った。実験スケジュールを図 2 に示した。

ACR の曝露経路は経口曝露を想定し、

曝露量が容易に計算可能な飲水投与法を選択した。先行研究を参考にして、濃度は20、50、100、200 ppmのACR溶液を調整し、妊娠6日から19日までの13日間の胎生期曝露群とした。また、胎生期曝露群の結果を踏まえてACR濃度50 ppmについては投与期間を延長して、妊娠6日目から離乳日までの36日間の胎生授乳期曝露群を設定した(図3)。

2. 体重増加と一般成長(産仔数、開眼日、性比)への化学物質の影響(研究協力者 笛田由紀子)

有害な化学物質の胎生期曝露によって、出生仔ラットの産仔数や一般成長が影響を受ける場合がある。体重も毒性評価における重要な指標となるため、測定項目に含めた。産まれた次の日に産仔数を数えて体重測定を実施し、均等に授乳ができるように10匹を原則として産仔数の調整を行った。雄ラットと雌ラットが均等になるように調整したが、10匹以下の出産の場合はそのまま残した。その後生後7日目、14日目および離乳日である21日目の一定の時刻に体重を測った。

ラットの場合、開眼は一般的に生後15日から18日の間であるので、その期間の一定の時刻(午後1時~2時)に開眼の確認を行った。開眼は、閉じた上下瞼の中央付近にピンホールのような小さな穴が開くような様子で始まり、次第に薄眼になって開眼していくので、左右いずれかの瞼にピンホール状の隙間を観察できた日を開眼日とした。

性比は、産仔数調整を実施する前に雄と雌の数を数えた。死産の場合もその性は確認した。

3. 出生後早期に出現する不随意運動とその解析(研究協力者 笛田由紀子)

対照群の仔ラットにおいて、持続時間は短いものの痙攣用の不随意運動がしばしば生後1週目に観察されたことから、この不随意運動の頻度が化学物質の胎生期曝露により変動するのではないかと考えて、本研究ではその頻度を検討した。具

体的には母ラットから離れた仔ラットを、約32°Cに保温された観察箱に入れて体温の低下を防ぎながら行動を3分間観察するとともにビデオに記録した。仔ラットが新しい環境に移されると、随意運動で動き回ることがある。不随意運動はその体動が少なくなり、落ち着いた状態にある時に出現しやすいことから、観察箱に移動させた後、観察箱に覆いなどを被せて5~10分程度放置してからビデオ録画を開始した。行動の定量解析については、ビデオ再生下に3分間に生じた不随意運動の合計量を秒数で表記した。

4. 電気生理学的評価のための脳スライス標本の作製(研究協力者 笛田由紀子)

仔ラットが生まれた日を生後0日(PND)として、該当する日齢の雄性仔ラットをイソフルランで深麻酔したのち断頭し、速やかに海馬を取り出した。ティッシュチョッパー(McIlwain tissue chopper)を用いて、すべての日齢について厚さ600 µmの海馬スライス標本を両側の背側海馬(海馬長軸の中央あたり)から作製した。

実験にはその組成(mM)がNaCl, 124; KCl, 2; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 2; MgSO₄, 2; NaHCO₃, 26; glucose, 10である人工脳脊髄液を用いた。ただし、切片作製時には切断によるCa²⁺の細胞内流入を防ぐためにCa²⁺を除外したのものを用いた。脳の取り出しからスライス作製までのすべての過程は、混合ガス(O₂/CO₂:95%/5%)で飽和した人工脳脊髄液を3~4°Cに冷やしながらずばやく行った。作製したスライスは、Haas型チャンバー内(32.0±0.1°C)に静置し、記録開始まで約2時間回復させた後に実験に用いた。

5. 刺激応答性についての電気生理学的評価法(研究協力者 笛田由紀子)

刺激電極にステンレスの双極電極(直径50 µm)を用い、CA3領野からCA1錐体細胞への入力線維が密集するシナプス層に置いた。記録電極にはガラス微小電極を用い(抵抗1~2 MΩ)、CA1領野の錐

体細胞層と白板との中間領域から集合スパイク電位 (PS) を記録した。成獣ラットの海馬スライスでは、錐体細胞層外側(背側)近傍から PS が記録されるが、発達期の海馬スライスでは、PS と明らかに判別されうる電場電位は成熟ラットの時よりもさらに外側(錐体細胞と白板のほぼ中間)から記録された。同じスライスにおいて、錐体細胞よりも内側(腹側)に位置するシナプス層から、集合シナプス後電位 (fEPSP) を PS と同時に記録して『興奮系』神経回路の機能を評価した(図4)。図5に、海馬 CA1 領野から記録される集合スパイク電位電位 (PS) と集合シナプス後電位 (fEPSP) と解析部位を示した。PS の振幅は、神経細胞の活動電位の数を反映すると考えられており、主にナトリウムチャネルの活性化によるナトリウムイオンの総流入量に対応する。fEPSP の傾きは、シナプス後膜に局在する AMPA 型興奮性グルタミン酸受容体、主に GluR2 を含んだ AMPA 受容体の活性化を表すと解釈されている。電気刺激の強さは、10 μA から 600 μA まで大きくして、電気刺激と電位応答の大きさととの関係を記録した。

1BP を胎生期曝露した仔ラットが成長した後に、興奮性神経系の変化があるかどうかを調べるために同様の電気刺激に対する応答を調べた。分担者は成獣ラットに 1BP を亜慢性曝露するとフィードバック抑制が減弱することを報告していることから、1BP による胎生期曝露群が成長した後に抑制系が変化するのかどうかを調べるために、成獣ラットと同様の方法でフィードバック抑制を解析した。すなわち、2連続刺激で誘発される誘発電位について、フィードバック抑制が形成されていれば、2回目の応答は1回目の応答よりも小さくなる。つまり、2回目の応答の大きさを1回目の応答の大きさを除した比(ペアパルス比)は1よりも小さい値となるのである。比が1よりも小さい場合には、抑制系の強さを定量的に評価できるという簡便な方法である。今回は 1BP 曝露濃度 700 ppm 群での比較検討を行った。

6. EPSP-Spike (E-S) coupling とロジスティック解析 (研究協力者 笛田由紀子)

神経細胞の入出力特性とは、神経細胞への入力を集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope) とし、出力をその神経細胞群が発生する集合スパイク電位 (PS) の振幅とした時の関係性である。この入出力特性は、EPSP-Spike (E-S) coupling と称されており、例えばシナプスの長期増強時には、E-S coupling の亢進現象 (E-S potentiation) が観察される。本研究でもこの E-S coupling を定量的に評価するために、後述するロジスティック解析により回帰曲線を求めた(図6)。

解析には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用い、5パラメーターロジスティック式で非線形回帰を行った。600 μA 電気刺激における PS 振幅値を PS 振幅最大値の 90% と仮定した固定値を回帰曲線の最大値 (Top) として用い、PS 振幅値 = 0 mV を最小値 (Bottom) として固定した。この最大値の半分の値に対応する fEPSP slope 値 (量反応曲線における EC_{50} に相当する = $E.slope_{50}$)、傾斜因子 (Hill Slope)、および非対称性を定量化するパラメータ S、の 5 種類のパラメータで解析をした。

7. Hindlimb landing foot-splay test (研究協力者 笛田由紀子)

神経系に影響が認められた場合、その影響がいわゆる神経行動表現型として出現するか否かが重要な点となる。授乳期の行動試験としては種々の方法があるが、ACR に関しては顕著な影響が認められる結果は報告されていなかった。そこで、離乳後のラットへの ACR 投与で陽性の結果が報告された Hindlimb landing foot-splay test を実施した。これは Seale らの方法 (Seale et al. Pharmacol Biochem Behav. 2012) に従い、仔ラットの後肢足底にインクをつけ、約 15cm 程度の高さから記録用紙の上に落下させた時に用紙上に付いたインク跡より両後肢踵間を計測するという方法である。この神経行動学的評価を 3

群（対照群、胎生期曝露群 50 ppm、胎生授乳期曝露群）に対して PND21 の脳重量測定前に行った。

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、産業医科大学および豊橋技術科学大学に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をしながらそれぞれの研究が進められた。

C. 研究結果

1. 遅延性発達神経毒性の評価

ある化学物質によって成長後に引き起こされる神経毒性を、神経発生・発達の早期（*ex vivo* スライス実験系においては授乳期など）に検出することが目標である。よって、成長後に何らかの神経毒性を発現することが必要条件となる。VPA と TBT についてはすでに発達神経毒性を有することが知られていたが、1BP についてはヒトの事例はなく動物実験においても不明であった。したがって、まず、1BP 曝露モデルラットにおいて、成長後の神経機能の評価が必要であったことから、刺激応答性とフィードバック抑制を検討した。その結果、刺激応答性は対照群と有意差はないが、フィードバック抑制が減弱していることが判明した（図 7、8）。成長後に明らかな異常行動を示す仔ラットは認められなかったものの、フィードバック抑制の減弱はてんかん原性を形成する可能性が高いことから、1BP が遅延性発達神経毒性を有することが示唆された。この結果は平成 28 年度と 29 年度に報告した。このように、1BP 胎生期曝露においても成長後の抑制性回路機能に影響を与えることが示唆されたので、VPA や TBT に引き続いて 1BP についても E-S coupling の解析をした。

2. E-S coupling の解析による総合評価

VPA 胎生期曝露では発達に伴い出現する神経回路の刺激応答性の亢進現象が対照群より先んじて PND14、PND15 で認め

られた。一方、TBT 胎生期曝露の場合は、PND16 で出現するはずの刺激応答性の亢進現象が抑制されていることが確認されていた。これらの現象を E-S coupling として評価するために、VPA および TBT（ともに平成 30 年度に報告）による曝露実験で得られた電気生理学的結果に対してロジスティック解析を適用した。VPA では、E-S coupling の解析においても、回路興奮性の亢進現象が開眼前の PND14 と PND15 の段階で出現することが認められ（図 9）、さらにこの亢進現象は $E.slope_{50}$ の増加を伴っていた（図 10）。TBT については、開眼日の PND16 で出現する E-S coupling の亢進現象が減弱していることが認められ（図 11）、この減弱効果には $E.slope_{50}$ の値の有意な減少を伴っていた。

1BP については、VPA 胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した、生後 2 週齢における海馬神経回路興奮性の亢進に対する促進作用が、1BP の胎生期曝露ラットにおいても曝露濃度 400 ppm から認められた（図 12）。このことより、1BP の場合も、発達神経毒性を早期に検出できる我々の方法が適用できることが判明した。さらに、 $E.slope_{50}$ 、Hill 係数においては、PND14 における対照群と 1BP 曝露群との間で有意差を認めた。このように入出力特性の亢進が、E-S coupling のデータをロジスティック曲線で回帰して得られるパラメータの比較によって毒性を定量化することができることが判明した。

VPA、TBT および 1BP について、開眼前後の発達途中の海馬神経細胞への入出力関係をもとに、発達神経毒性評価を総合的に評価できる可能性が示唆された。

3. ACR の発達神経毒性

ACR の胎生期曝露に関しては先行実験が複数あるが、妊娠ラットに麻酔下に強制経口で反復投与する方法ではストレスの影響が除けないと考え、ストレスが少ない自由飲水投与で曝露することにした。

胎生期曝露群の 13 日間、胎生授乳期曝露群の 36 日間の飲水投与期間の ACR 水溶液摂取量から ACR 総摂取量を計算した。

は自由飲水投与であったにもかかわらず、飲水量には群間で有意な差が認められなかった。ACR の総投与量は ACR 濃度に依存して増加していた。

各群の産仔数、性比、開眼日には有意差が認められなかった。ACR 投与による母ラットの体重への影響は 100 ppm 以上の濃度で認められた。また濃度 50 ppm 以上の投与で仔ラットの体重増加の抑制が出現した (図 13)。さらに、PND21 における脳重量は曝露濃度依存的に減少した (図 14)。結果的に、脳重量の減少に体重増加の抑制を伴っていたことから、脳重量の減少を発達神経毒性の一つとは解釈できなかった。そこで肝重量と海馬重量を計測したところ、濃度 50 ppm で胎生期曝露された PND23 の仔ラットでは、肝重量の低下傾向 (データ掲載せず) と海馬重量の増加が、雌雄両方の仔ラットに認められた (図 15)。

海馬重量の変化を認めた濃度 50 ppm で胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群を作製し、Hindlimb landing foot-splay test を実施した。雄性仔ラットでは、対照群と胎生期曝露群に差はなく、胎生授乳期曝露群で踵間距離の有意な減少が認められた (図 16)。50 ppm の胎生授乳期曝露群では母ラットに体重の変化が認められており、母ラットの毒性の影響が仔ラットに出た可能性を否定できない。一方、雌性仔ラットでは、踵間の距離の減少傾向が認められたが有意には至らなかった。

4. 不随意運動の出現に対する ACR 胎生期曝露の影響

ACR 胎生期曝露において、不随意運動の評価を PND5 および PND7 の 2 日間で実施した結果、対照群では 2 日間の不随意運動量 (秒数) は増加傾向を示したものの有意な差には至らなかった (図 17)。ところが、ACR 曝露群では、どの曝露濃度においても有意な増加を示した。PND5 では曝露群と対照群に差は認められなかったものの、PND7 においては、対照群と比較して胎生期曝露群 50 ppm では平均値が 2 倍程度に増加した。この不随意運動は、

授乳期の早い時期に出現し発達とともに減少するものである。したがって ACR の胎生期曝露が生後 1 週目には過剰な運動つまり脳の過剰興奮を生じていることが考えられる。

D. 考察

本研究では海馬スライス標本を用いた電気生理学的評価手法により、胎生期の VPA、TBT および 1BP 曝露による発達神経毒性評価を生後早期で行った。そして海馬神経細胞群の入出力特性を表す E-S coupling にロジスティック解析を導入し、得られたパラメータから毒性を定量的に表示できる評価法を見出した。

平成 28 年度はこれまで検討してきた VPA と TBT について、その評価法についての適用性を検討するとともに、産業化学物質を対象とした評価として 1BP の検討を始めた。1BP の許容濃度勧告には発達毒性は考慮されておらず、発達毒性事例もなかった。よって、まず 1BP が遅延性の発達毒性を有するか、VPA や TBT の様に生後 2 週齢における神経回路興奮性に影響を及ぼすか否かを検討することから始めた。平成 29 年度は 1BP について、海馬神経細胞の入出力関係である E-S coupling の解析をおこなった。最終年度は VPA、TBT の E-S coupling 解析を終了し、併行して、食品に微量に含まれている生殖毒性第 2 群の ACR の発達神経毒性について検討する実験条件を決定した。

VPA 胎生期曝露では発達に伴う神経回路の刺激応答性の亢進が促進され、生後 14-15 日で認められた。一方、TBT 胎生期曝露では生後 16 日で出現する刺激応答性の亢進が抑制されることが確認されていた。TBT は内分泌かく乱作用を示す化学物質の一つと考えられており、先行研究では妊娠期間中～授乳期の長期にわたる期間の曝露モデル動物を用いたり、その毒性評価指標として胎仔死亡率や奇形発生率に焦点を置いたりしているため、発達神経毒性に焦点を置いた報告は少ない。

そこで、生後発達に伴う神経回路興奮

性の亢進とこれに対する影響を評価するために、ロジスティック解析を導入した E-S coupling による評価を用いた。VPA では、E-S coupling の解析においても、開眼前の PND14 と PND15 において興奮性の亢進現象が促進されていることが認められた (図 9)。この促進効果は E.slope₅₀ の増加を伴っていた (図 10)。TBT については、開眼日の PND16 における E-S coupling においても亢進現象の減弱化が認められた (図 11)。この現象には E.slope₅₀ の値の有意な減少を伴っていた。

産業化学物質 1BP の胎生期曝露ラットにおいて、VPA の胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した、発達に伴う神経回路の刺激応答性の亢進が促進されることを認めたことから、1BP も発達神経毒性を有する化学物質である可能性が示唆された。1BP については日本産業衛生学会より許容濃度 (0.5 ppm) がすでに勧告されているものの、その提案理由の中に発達毒性は考慮されていない。一方、米国産業衛生専門家会議 (ACGIH) が設定した許容濃度 (0.1 ppm) には、ヒトの事例は認められないものの動物実験データに基づく発達毒性が考慮されている。産業化学物質の発達神経毒性評価にも本研究で用いた評価手法が応用できれば、許容濃度の提案に対して有益な情報を提供できることが期待される。

1BP に関しては、産業現場における曝露様式を想定して吸入曝露という経路を選択した。曝露濃度については 1BP の亜慢性曝露におけるフィードバック抑制を指標とした場合の NOAEL (無毒性量) である 200 ppm、および LOAEL (最小毒性量) である 400 ppm に基づいたものである。VPA や TBT の評価を行った時のように妊娠後期における単回曝露という様式でも産業化学物質が評価できるかどうかは今後の検討課題である。

一連の実験結果から、授乳期における海馬 CA1 領域の神経細胞の発達については、興奮系の Na⁺チャネルやグルタミン酸受容体だけでなく、GABA 抑制系が生後の神経発達時期に相互に作用しているこ

とが推察される。従来の結果を含めて考察すると、1) 開眼前期では刺激応答性を抑制するように GABA_A 受容体を介した持続的な抑制が存在している、2) この持続的な抑制は開眼期となる生後発達の過程でむしろ減弱する、ということが示唆される。本研究で指標としている刺激応答性の生後発達の過程において、GABA_A 受容体を介した持続的な抑制系回路 (おそらくはシナプス外 GABA_A 受容体を介した経路) の変化が存在していることが考えられる。したがって、単回刺激による刺激応答性を検討するとともに、その GABA_A 受容体の拮抗薬 (ビククリン) に対する反応性についても併せて検討することにより、発達神経毒性を評価する指標としてより信頼性と有用性が高まる可能性が考えられる。

ACR のモノマーは化学反応性に富むため、産業界では他の化合物の原料としてポリウレタン樹脂製造、合成ゴム・塗料・接着剤の原料、繊維・皮革処理剤、土壌硬化剤などに用いられている。ACR には神経毒性があり、中枢及び末梢神経障害を生じることが報告されている。その他の毒性に関する情報では発がん性グループ 2A、生殖毒性第 2 群がある。また、許容濃度、管理濃度ともに 0.1 mg/m³ である。この生殖毒性があることから、平成 31 年現在、女性労働基準規則の適用化学物質とされている。また、ACR には発達神経毒性もあるといわれているが、日本産業衛生学会の許容濃度等の勧告には情報が少なく、発達神経毒性に関係することは妊娠 7 日から出産まで 10 mg/kg/日を強制経口投与したところ仔ラットの行動に影響が認められた、という記載のみ見受けられる。また ACR は加工食品にも微量ではあるが含有されていることから、厚生労働省だけでなく農林水産省も摂取量に関しては注意を喚起している化学物質である。

一般的な発達神経毒性による病態としては、若年期に発病する自閉症、多動症、注意欠陥障害など現在の社会問題となっている疾病を生じる可能性がある。最近、

このような疾患は学業のみならず労働の現場でも取り上げられつつある。したがって、発達神経毒性の評価は、小児を対象とした化学物質の毒性評価に留まらず、場合によっては成人後の社会生活を営む上での問題に発展する可能性も考えられる。したがって、ACRにおける発達神経毒性の評価に関する情報を提供することは急務であると考えられる。

化学物質の発達神経毒性評価で議論が必要な点は、母体の妊娠期あるいは出産後にどのくらい曝露されたら実際に子供の脳の発達に影響があると判断してよいのか、という点であるが、いまだ不明な要素も多い。また、化学物質の仔ラットへの直接影響のみでなく、化学物質による母体への影響が母へのストレスとなって、そのストレスによって仔ラットの脳の発達が間接的に影響を受ける可能性が高いことも動物実験で判明している。本研究においては、VPAやTBTに関しては、投与量は決して少なくないものの単回投与であったためか、母体への影響や仔ラット体重への影響はほとんど無視できる程度であった。したがって、本研究での胎生期曝露については発達毒性が出現しない条件であるといえ、その条件の下で発達神経毒性評価を実行したことになる。ただACRの場合は、食品からの曝露を考慮すると、微量な濃度で一定期間曝露することが現実的な曝露形式と思われた。ppmオーダーで自由飲水させるという投与法はこのような配慮で選択した投与形式である。

ACRについては、母ラットへの毒性影響を考慮したうえで、発達毒性を示す濃度を解析した。成獣動物ではACR曝露により末梢神経毒性が出現し、失調性歩行を呈することが報告されている。哺乳時に母ラットは一定の姿勢を保たなければならないため、末梢神経毒性とはいえ授乳への影響は無視できないことが考えられる。ACRの発達毒性の解釈については、母ラットの毒性影響の有無に注意が必要である。その結果、本実験条件において体重と脳重量を指標とした場合、20 ppmが

無毒性量 (NOAEL)、50 ppm が最小毒性量 (LOAEL) となった。また 100 ppm 以上の濃度では母ラットに体重低下という影響が出現したことから (データ掲載せず)、発達毒性は判明したが、発達神経毒性に関しては、さらに他の指標を考慮することが必要となった。そこで、今後の電気生理学的指標評価で重要となる海馬についてもその重量をPND23で測定したところ、雄性仔ラットで曝露濃度依存的に減少したPND21での脳重量は対照群と同程度までに回復していたにもかかわらず、海馬重量は有意に増加していた。OgawaらはACR曝露した仔ラットの海馬では介在ニューロンの数が増加すること、歯状回顆粒細胞下帯でのアポトーシスが減少することを報告している (Ogawa et al. Arch Toxicol. 2011)。この現象と本研究で認められた海馬重量の増加との関連については検討する必要がある。また、胎生期から授乳期までACRを連続曝露した例は他の論文でも見受けられるが、本研究では胎生授乳期曝露を行った母ラットで体重減少が認められていたので、仔ラットの神経行動試験の結果には、母ラットへの毒性が影響している可能性も現時点では否定できない。以上の結果から、発達神経毒性として、LOAELの投与濃度 (50 ppm) や投与期間が決定された。1BPやTBT、VPAと曝露期間が異なることから、この場合での神経回路興奮性の評価時期についてはあらためて検討する必要がある。

不随意運動の発現機序については現時点でも不明であり、しかもこの不随意運動はヒトにおいても乳幼児に観察されてんかんと鑑別しにくいものであるが、発達にともなって消失する運動であると考えられている (本研究では不随意運動という用語で統一しているが、同様の現象に対して『振戦』あるいは『けいれん様行動』といった表現を用いている研究グループも存在する)。この不随意運動の発現量は対照群においては観察した2日間 (PND5、PND7)の間では変化しない、ACR曝露濃度20 ppm以上の各群では

PND7において増加したことから、不随意運動の発達に伴う変化にもACR曝露が影響を及ぼす可能性があることが判明した。化学物質の胎生期曝露によって生まれた仔ラットの不随意運動の増加はTBT胎生期曝露でも観察されている（データ未掲載）。さらにVPAにおいても、本研究課題における他の研究分担者から雄性仔ラットでのみ不随意運動の数が変化したとの報告を受けている。前述した神経回路機能の評価を合わせると、この不随意運動もまた生後の神経発達と関連している可能性が考えられる。したがってこの不随意運動量の変化は化学物質の発達神経毒性の一面を反映している可能性が考えられる。

さらにこの不随意運動は飼育環境の変化にほとんど左右されることなく観察できる指標であり、観察後の仔ラットから数日後に海馬スライス標本を作製することも可能であることから、実験に使用する動物数が削減できるという利点をもった評価指標となることが期待できる。

E. 結論

発達神経毒性を早期にスクリーニングできる *ex vivo* の系の確立を目指して、VPAの胎生期曝露ラットばかりでなく、内分泌かく乱物質と考えられているTBTの胎生期曝露ラット、および有機溶剤である1BPの胎生期曝露ラットを用い、授乳期の海馬神経回路の発達を検討した。その結果、VPA胎生期曝露ラットと1BP胎生期曝露ラットでは興奮系あるいは抑制系機能の早熟化を、TBT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、神経毒性の早期スクリーニング手法として、授乳期の海馬神経回路発達の評価が有用である可能性が考えられた。さらに、神経細胞の入出力特性として、ロジスティック解析を導入したE-S couplingを用いれば、定量性を持って総合的に評価できる可能性を示した。正常の神経発達で観察される不随意運動を調べる試験系は、スライス標本を用いる *ex vivo* 実験系との併用が可能であるため、

OECDの成獣を用いた行動試験バッテリーよりも簡便であるとも考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Ishidao T, Fueta Y, Ueno S, Yoshida Y, Hori H. A cross-fostering analysis of bromine ion concentration in rats that inhaled 1-bromopropane vapor. *J Occup Health* 58: 241-246 (2016)

[2] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Kanda Y, Ueno S. Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. *Neurotoxicology* 65:1-8 (2018).

[3] Fueta Y, Ishidao T, Ueno S, Yoshida Y, Kanda Y, Hori H. Prenatal exposure to 1-bromopropane causes delayed adverse effects on hippocampal neuronal excitability in the CA1 subfield of rat offspring. *J Occup Health* 60:74-79 (2018)

2. 学会発表

[1] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Prenatal single administration of tributyltin alters developmental transient of spontaneous behaviors and basic excitability in the hippocampal slices of immature rats. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology, 2016年3月、USA.

[2] Yoshida Y, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y. Prenatal administration of valproic acid alters both the Purkinje cell dendrites and the granule cell proliferation in rat developing cerebellum. 55th Annual Meeting of Society for Toxicology, 2016年3月、USA.

[3] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野晋. 胎生期トリブチルスズあるいは酢酸スズ単回投与による授乳期ラットの行動と興奮・抑制系の変化. 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋

[4] Nakajima S, Tomida T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Yoshida S. Alteration of neuronal development by autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum. The 39th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年7月、横浜

[5] Tomida T, Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Sekino S, Roman M, Hozumi N, Yoshida S.

Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat. The 39th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年7月、横浜.

[6] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Ueno S. Novel approaches for electrophysiological and pharmacological evaluation of developmental neurotoxicity of chemicals using juvenile rat brain slices. 5th Prenatal Programming of Toxicology, 2016年10月、北九州.

[7] Tomida T, Fueta Y, Ueno S, Hozumi N, Sekino Y, Yoshida S. Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum. The 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2016年11月、San Diego.

[8] 笛田由紀子、石田尾徹、吉田祥子、保利一、諫田泰成、上野晋. 産業化学物質 1-ブロモプロパンの遅発性発達神経毒性評価. 第44回日本毒性学会学術年会、2017年7月、横浜.

[9] Iwamoto S, Tomida T, Nakajima S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Maev R, Hozumi N, Yoshida S. Maturation-dependent alteration of cerebellar structure in matured autistic model rat. 第40回日本神経科学大会、2017年7月、千葉.

[10] 笛田由紀子、石田尾徹、吉田祥子、関野祐子、諫田泰成、保利一、上野晋. 化学物質の胎生期曝露がもたらす発達神経毒性の評価—授乳期ラット海馬スライスを用いた神経細胞の応答特性の検討. 第6回日本DOHaD学会学術集会、2017年8月、東京.

[11] Ueno S, Fueta Y. Developmental neurotoxicity evaluation: Studies on neural network activity at synaptogenic period. 第60回日本神経化学学会大会、2017年9月、仙台.

[12] Miyamoto K, Mikami T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Hozumi N, Yoshida S. Alteration of GABA release in developing cerebellar cortex of VPA-administrated autistic model rat. 第60回日本神経化学学会大会、2017年9月、仙台.

[13] Mikami T, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y,

Kanda Y, Hozumi N, Yoshida S. Alteration of neurotransmitter release in cerebellar cortex of Valproate-administrated Autistic model rat. 第60回日本神経化学学会大会、2017年9月、仙台.

[14] Sato S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Yoshida S. Alteration of neural circuit with autism-inducing drug administration in developing rat cerebellum. 第60回日本神経化学学会大会、2017年9月、仙台.

[15] Ikai K, Nakajima S, Tomida T, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Yoshida S. Recovery effects from chemical-induced autistic degeneration with bumetanide or oxytocin in developing rat cerebellum. 第60回日本神経化学学会大会、2017年9月、仙台.

[16] Yoshida Y, Fueta Y, Ueno S, Hozumi N, Sekino Y, Kanda Y. Structural and functional alteration of developing rat cerebellum by administration of autism-inducing drugs. 10th DOHaD world congress, October 2017, Rotterdam.

[17] KwongSoon TT, Nishikawa C, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Altered gut microbiota observed in valproate-administered autistic model rats. 第95回日本生理学会大会、2018年3月、高松.

[18] 笛田由紀子、石田尾徹、上野晋、吉田祥子、諫田泰成、保利一. 1-ブロモプロパンのラット胎生期曝露は遅延性発達神経毒性をひきおこす. 第91回日本産業衛生学会、2018年5月、熊本.

[19] 笛田由紀子、吉田祥子、石田尾徹、保利一、諫田泰成、上野晋. 化学物質の発達神経毒性指標としての授乳期ラット神経細胞の E-S coupling. 第45回日本毒性学会学術年会、2018年7月、大阪.

[20] Fueta Y, Ishidao T, Yoshida S, Hori H, Yamasaki D, Kanda Y, Ueno S. Electrophysiological evaluation of developmental neurotoxicity induced by the prenatal exposure to 1-bromopropane. EUROTOX 2018, 2018年9月、Brussels.

[21] Yoshida Y, Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Nomura Y, Kanda Y. The malformation of Purkinje cells becomes the sensing tool for developmental neurotoxicity;

its potential and limitation. EUROTOX 2018, 2018年9月、Brussels.

[22] 笛田由紀子、吉田祥子、諫田泰成、保利一、上野晋. バルプロ酸やトリブチルスズによる発達神経毒性を授乳脳で評価するための電気生理学的指標. 第36回産業医科大学学会、2018年10月、北九州.

[23] Fueta Y, Yoshida S, Sekino Y, Kanda Y, Ueno S. Electrophysiological and pharmacological evaluation of developmental neurotoxicity using brain slices obtained from juvenile rats prenatally exposed to chemicals. Society for Neuroscience 48th Annual Meeting, 2018年11月、San Diego.

[24] Nishikawa C, Sato K, Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Autistic neuronal differentiation factors derived from astrocyte and microglia: Variant differentiation of cultured neurosphere in valproate-treated gliaconditioned medium. Society for Neuroscience 48th Annual Meeting, 2018年11月、San Diego.

G. 知的財産の出願・登録状況
(該当なし)

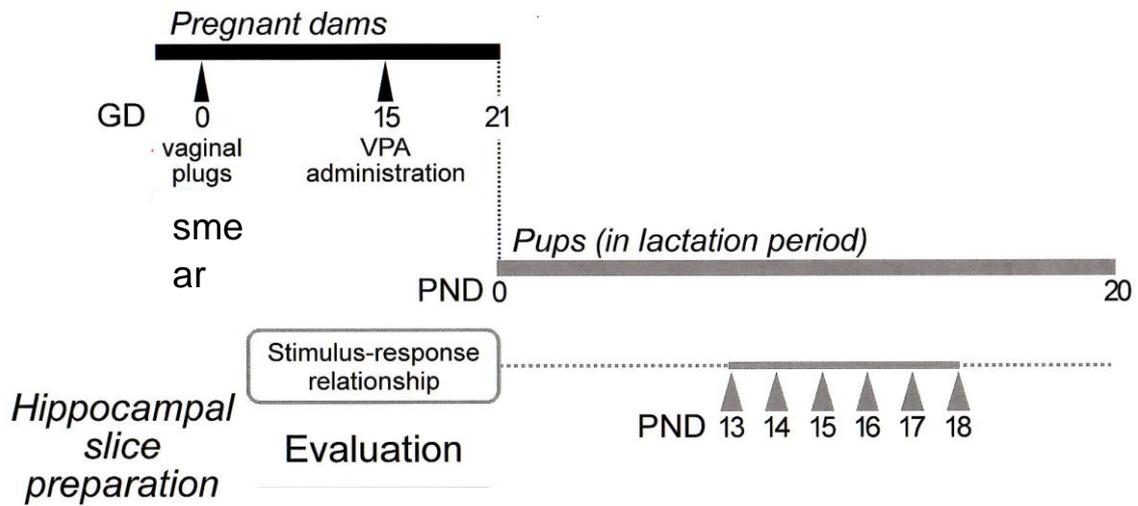


図1 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による VPA の遅延性発達神経毒性評価のためのプロトコル

ラットの妊娠 15 日に VPA (あるいは TBT) を麻酔下で経口投与した。開眼前の生後 13、14、15 日および開眼が始まる生後 16、17、18 日の 6 日間に、連続して海馬スライス標本を作製して発達神経毒性の評価を行った。

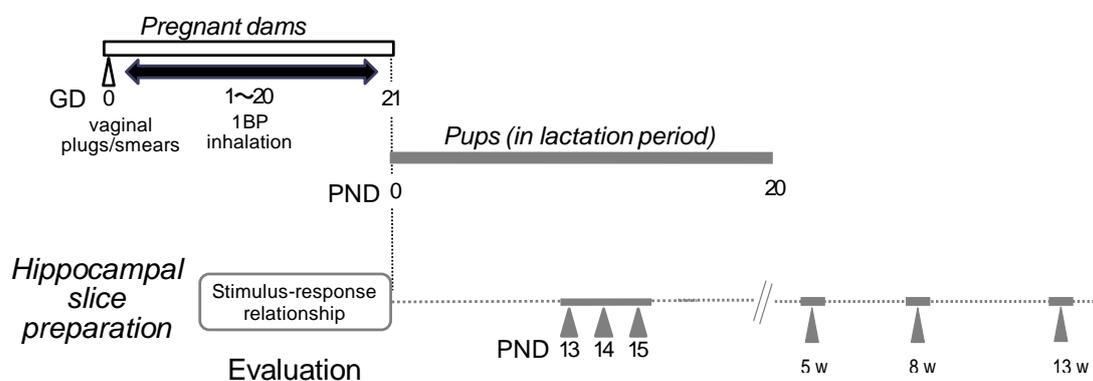


図 2 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による 1-BP の遅延性発達神経毒性評価のためのプロトコル

ラットの妊娠期 1-20 日の 20 日間、産業化学物質 1BP を吸入曝露した。開眼前の生後 13、14 日および開眼が始まる生後 15 日の 3 日間に、連続して海馬スライス標本作製して発達神経毒性の評価を行った。さらに、成長後の影響を調べるために、離乳後の幼若期（5 週齢）、性成熟後（8 週齢）、成獣期（13 週齢）の 3 点で遅延性の毒性の有無を調べた。

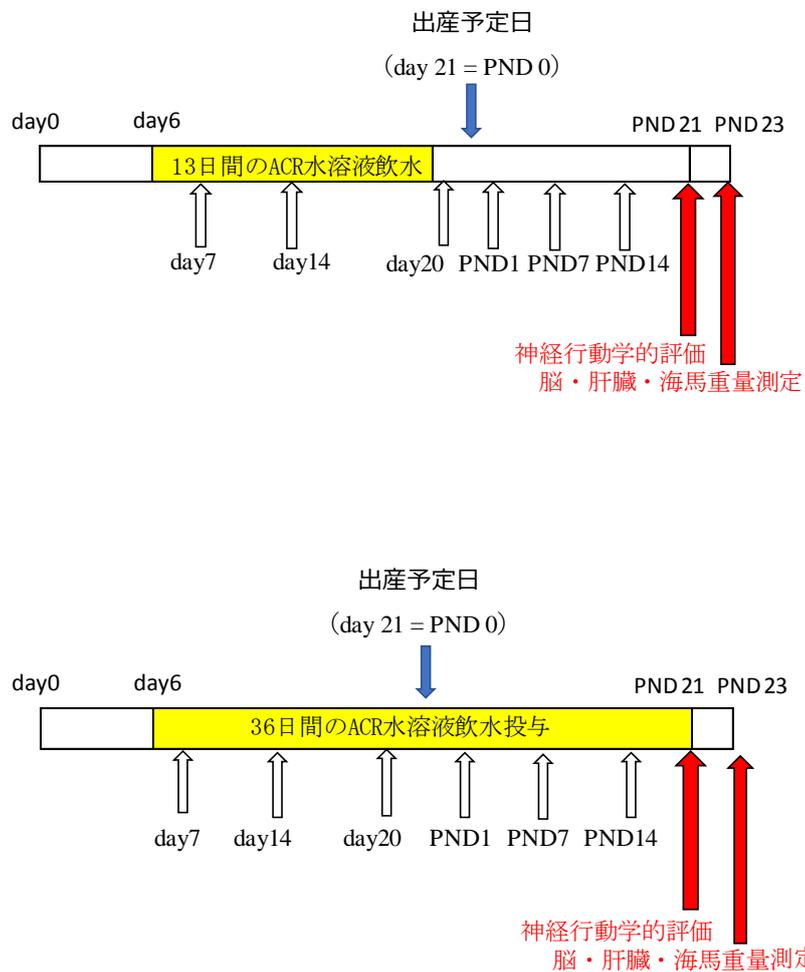
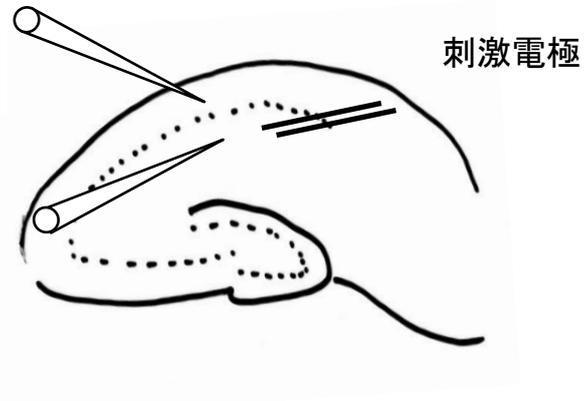


図3 ACR胎生期曝露群（上図）と胎生授乳期曝露群（下図）の実験スケジュール
 雌雄 Wistar ラットを同居させ、膣スメアに精子/プラグ等の存在が確認された日を妊娠初日 day0 と数えた。胎生期曝露群では day6 から day19 までの 13 日間、胎生授乳期曝露群では day6 から PND21 の離乳日まで 36 日間飲水投与した。白抜き矢印は体重測定の日を示す。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群は投与期間の違い以外は、同じ実験スケジュールで実施した。

集合スパイク電位
Population spike (PS)
を記録する微小電極



集合興奮性シナプス後
電位 (field excitatory
postsynaptic potential
(fEPSP)) を記録する微
小電極

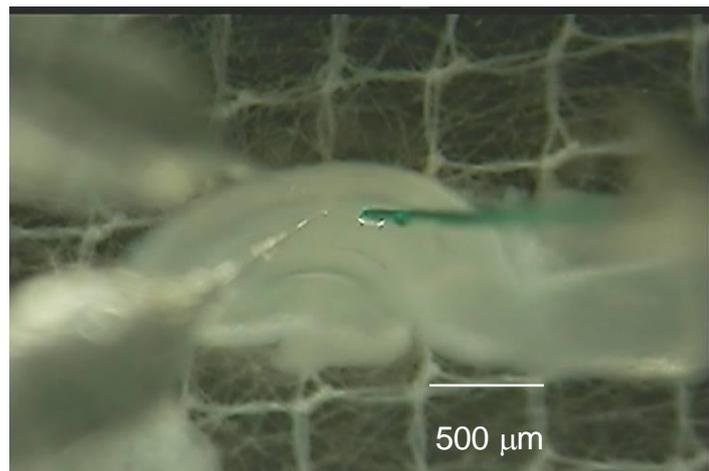
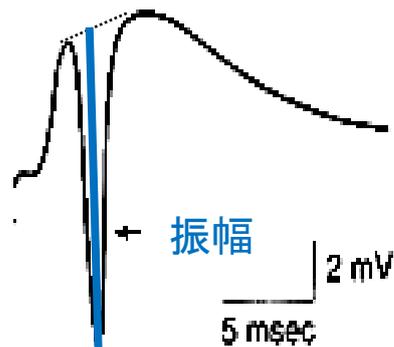


図4 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法
上図：海馬スライスにおける双極性電気刺激電極と2つの記録用ガラス微小電極の位置を示す。下図：実体顕微鏡下に撮影した生の海馬スライスと、刺激電極（右）および記録用ガラス微小電極（左）の配置。

集合スパイク電位
Population spike (PS)



集合興奮性シナプス後電位(集合EPSP)
(Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP))

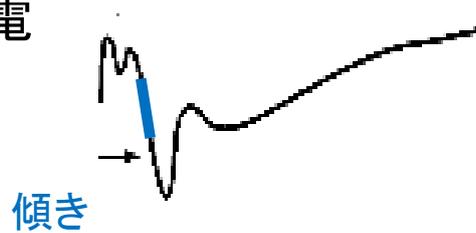


図 5 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き(fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

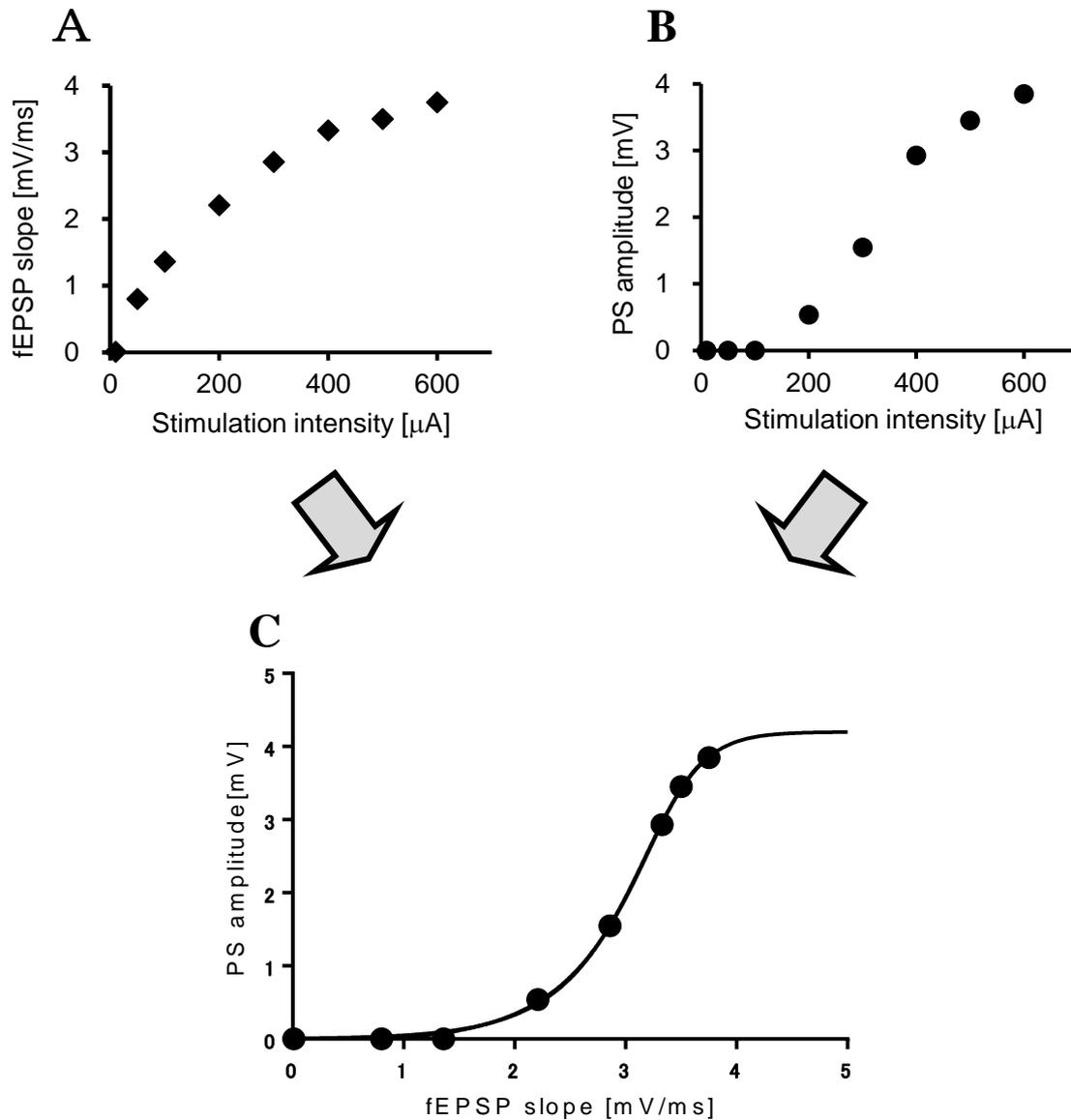


図6 fEPSP-spike (E-S) coupling と その非線形回帰モデル

A: 電気刺激の大きさに対する集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope)

B: 電気刺激の大きさに対する集合スパイク電位の振幅 (PS amplitude)

C: fEPSP-spike (E-S) coupling のグラフ。

集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope) に対する集合スパイク電位の振幅 (PS amplitude) の変化を示しており、スライス 1 枚ごとの神経細胞群の入出力特性を一つのグラフで表現できる。回帰曲線は 5 パラメータロジスティック回帰曲線である。データは 1BP700 ppm 群の 1 例である。

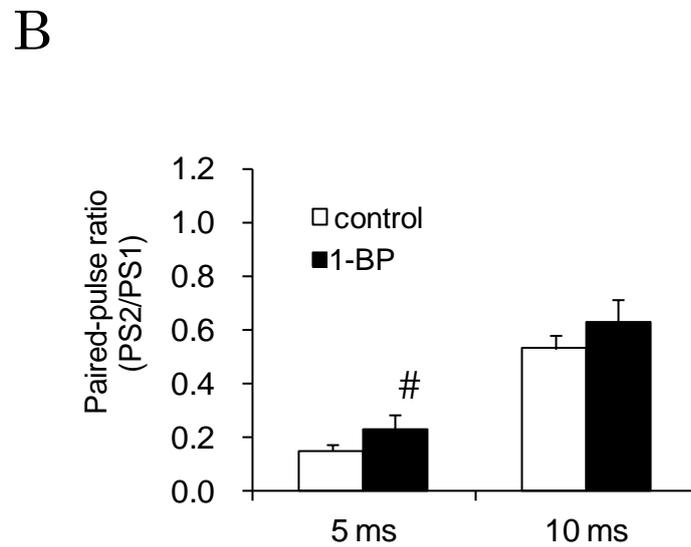
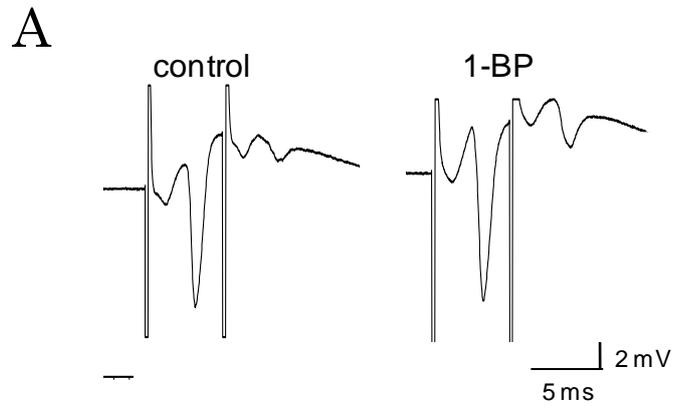
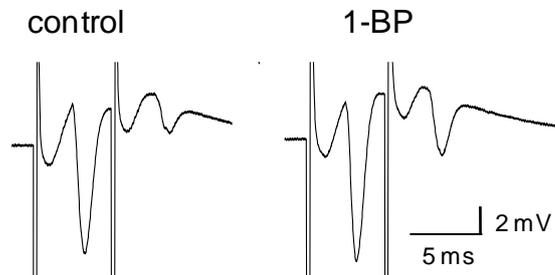


図 7 1BP を胎生期曝露した母ラットから生まれた仔ラット (8 週齢) の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

刺激間隔 5 ms と 10 ms で誘発される PS1 と PS2 の振幅の比から、フィードバック抑制を評価した。A: 刺激間隔 5 ms において、対照群、1BP ともに、2 回目の刺激で誘発される PS 振幅は小さくなった。両群ともにフィードバック抑制が機能していることを示す。B: しかし、1BP 群では対照群と比較して、PS2/PS1 が有意に増加していることから (# $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test)、フィードバック抑制が減弱していることが判明した。

A



B

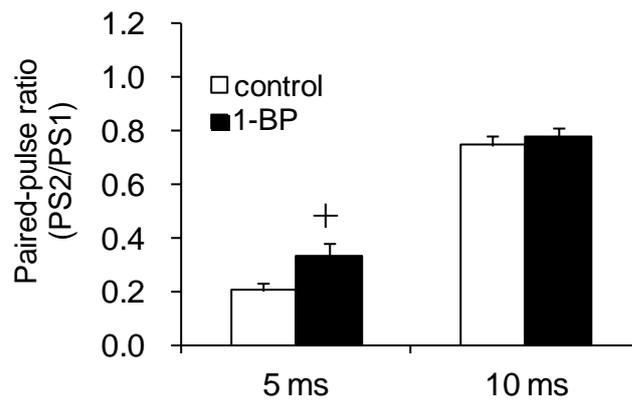


図8 1-BP胎生期曝露した母ラットから生まれた仔ラット(13週齢)の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

A: 8週齢と同様に、刺激間隔5msにおいて、対照群、1BPともに、2回目の刺激で誘発されるPS振幅が小さくなったことから、両群ともにフィードバック抑制が機能していることを示す。B: しかし、対照群と比較して、1BP群ではPS2/PS1が有意に増加していることから(# $p < 0.05$ by Welch's t test)、8週齢同様に抑制の減弱が継続していることが示唆された。

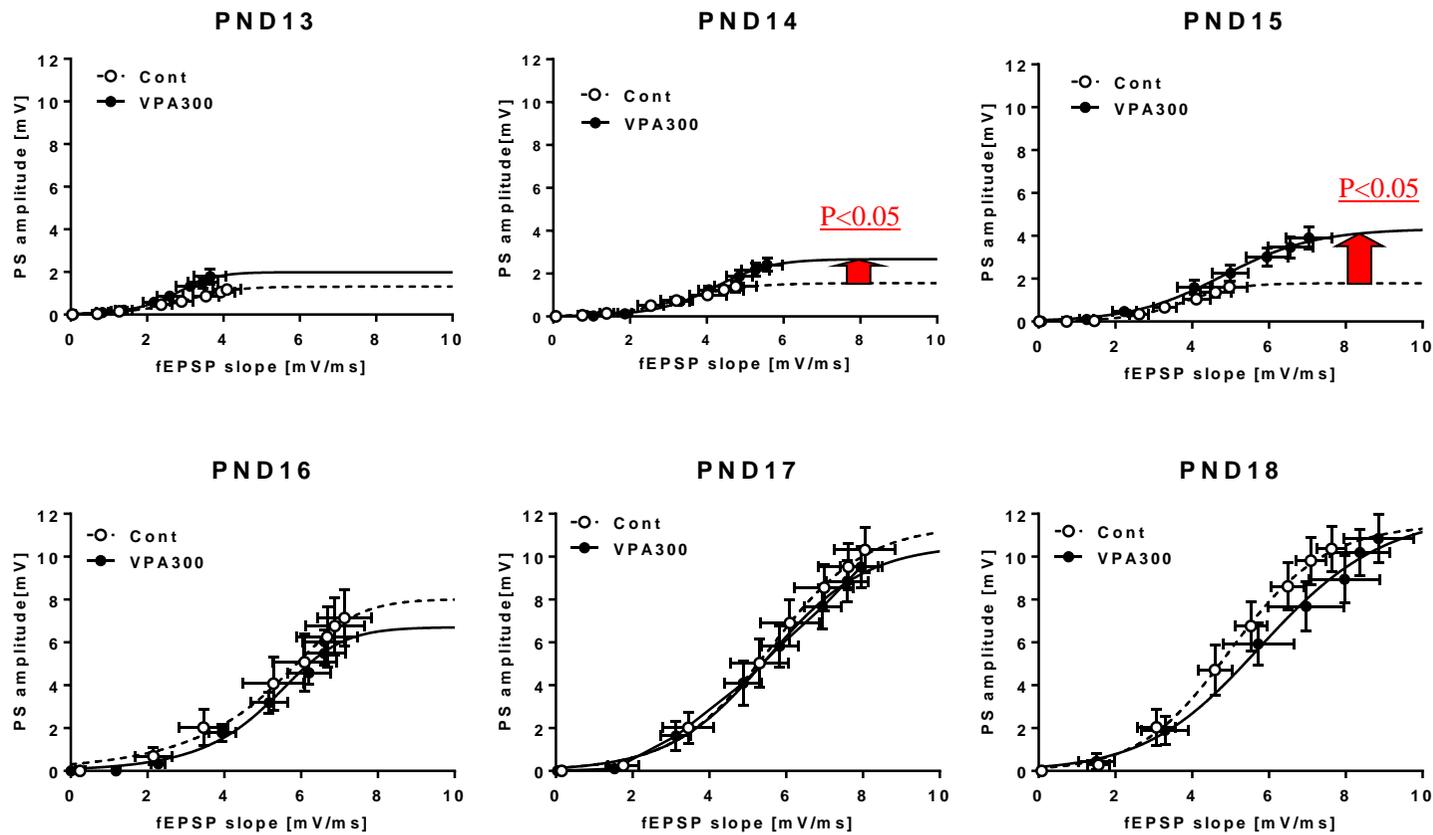


図9 VPA 300mg/kg (day15 に経口投与)による海馬刺激応答性の ES coupling

シナプス形成期に関して、PND13-18 について行ったロジスティック解析の結果をまとめた。開眼前である、PND14 と 15 において VPA 群で ES coupling の亢進が認められた (矢印)。点線が対照群、実線が VPA 群を示す。

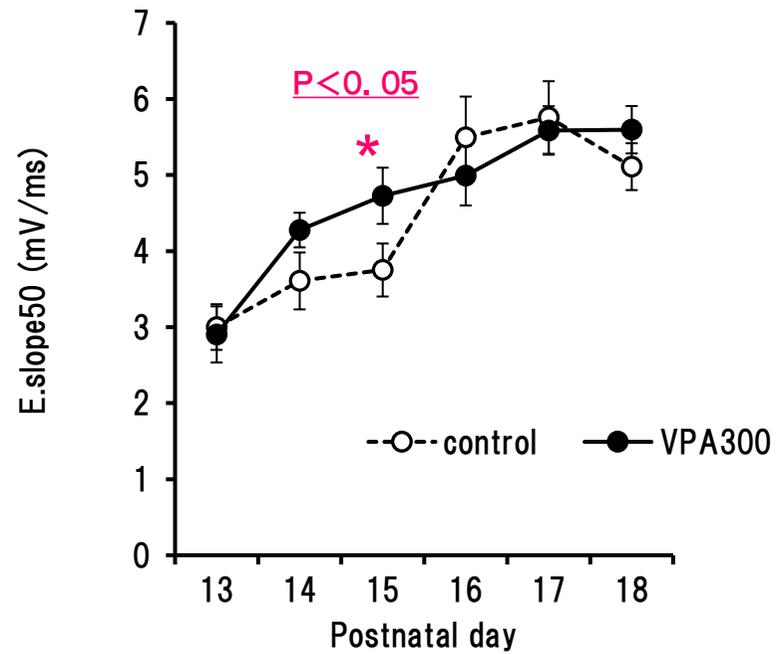


図 10 ロジスティック解析によって求めた VPA 投与による E.slope50 の発達に伴う変化

開眼前の PND15 において、VPA 群では E.slope50 が増加した。開眼後 (PND16 以降) は対照群と VPA 群の E.slope50 に差は認められなかった。

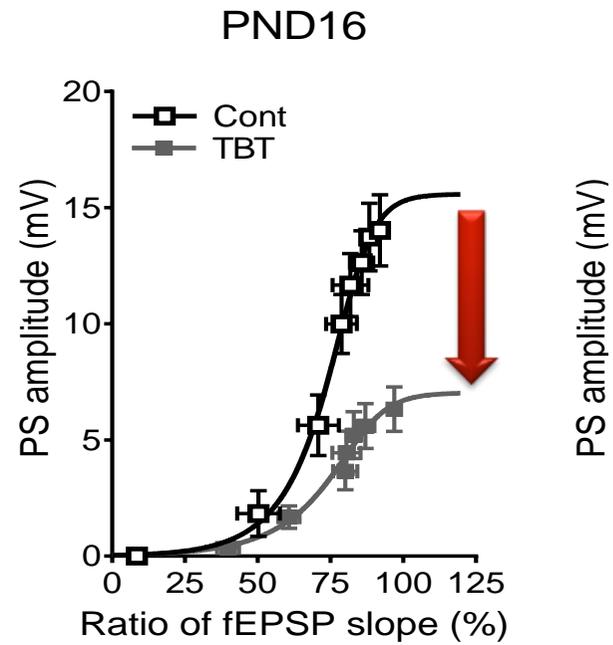


図 11 TBT 投与群の PND16 における E-S coupling

1 BP や VPA の胎生期投与群の場合とは異なり、PND16 においてのみ E-S coupling の抑制が認められ、PND16 以外では対照群との差は認められなかった。E.slope50 の有意な減少 (not shown) が PS の生成抑制と関連していると思われる。

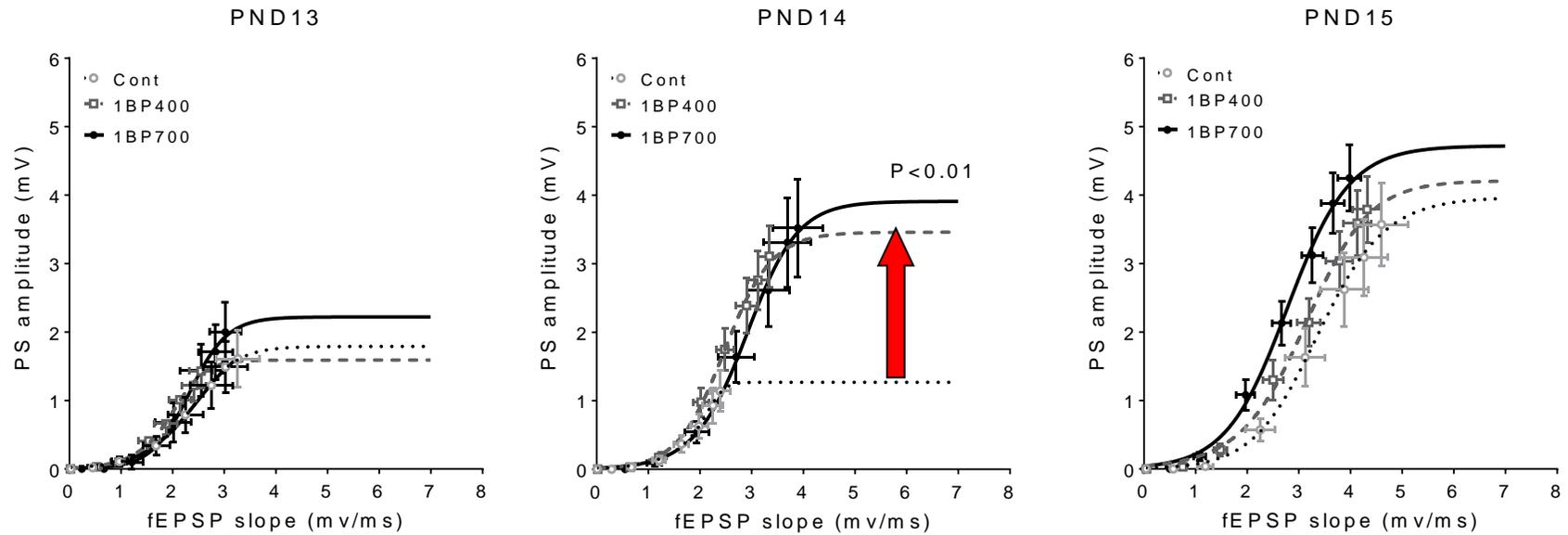


図 12 1BP 胎生期曝露による海馬刺激応答性の ES coupling とロジスティック曲線(平成 29 年度に報告)

PS 最大値 (PSmax)、非線形回帰における 50%·PSmax 値の時の fEPSP slope 値、およびその座標における曲線の傾き (Hill 係数) において、PND14 では対照群と 1BP 曝露群 (400 および 700 ppm) との間に統計学的な有意差を認めた。

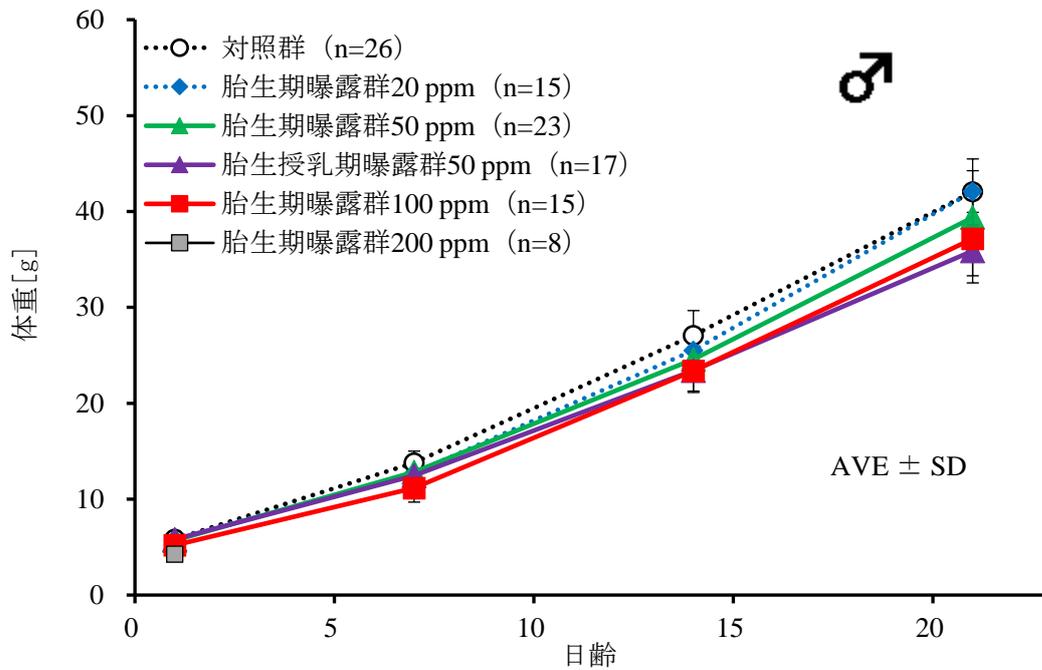


図 13 雄性仔ラットの生後の体重増加への ACR の影響

雄性仔ラットでは胎生期曝露群 20 ppm では対照群と差はなく、胎生期曝露群濃度 50 ppm 以上で体重増加の抑制がみられた ($p < 0.01$, 繰り返しのある二元配置分散分析法、Scheffe's F test)。胎生期曝露群 200ppm 群の仔ラットは、PND1 における体重が低く、母ラットが出産後に死亡したため、PND1 の結果のみを記した。雌性仔ラットでも胎生期曝露群 20 ppm では対照群と差はなかった (not shown)。雄性仔ラットと同様に、胎生期曝露群濃度 50 ppm より濃度が高くなると (体重増加の顕著な抑制がみられた ($p < 0.01$, 繰り返しのある二元配置分散分析法、Scheffe's F test)。括弧内は仔ラットの数を示す。

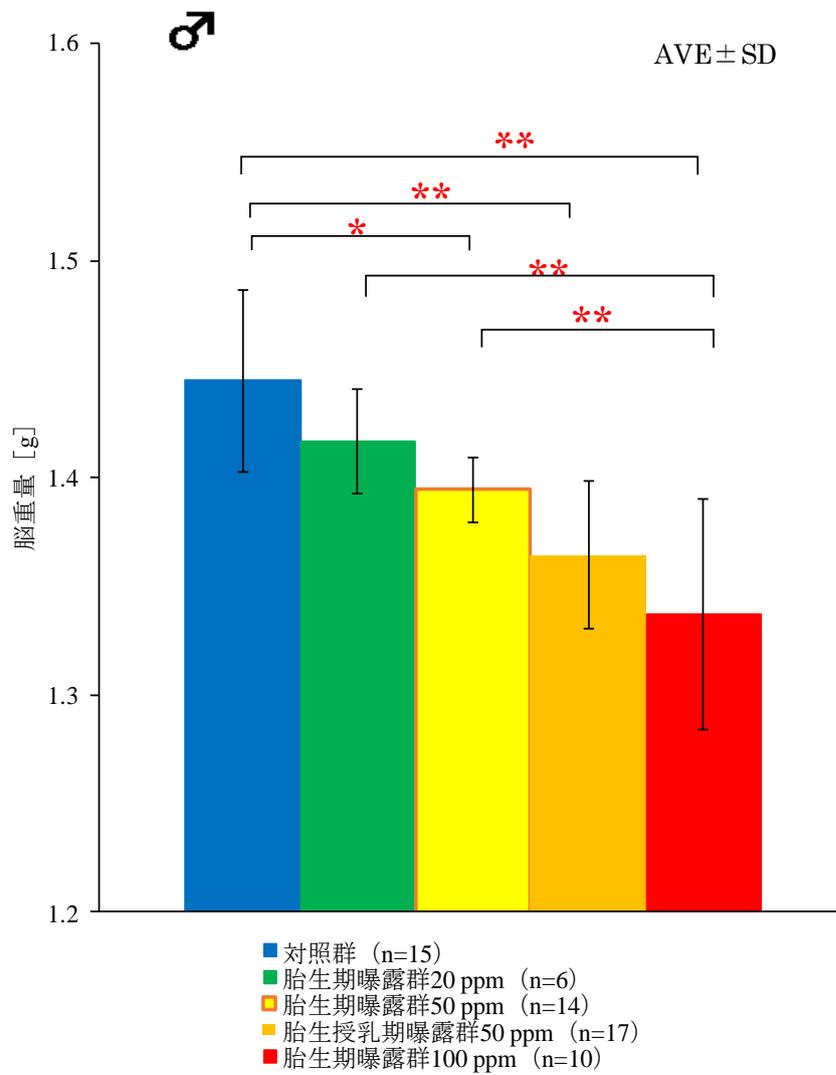


図 14 雄性仔ラットの PND21 における脳重量

ACR の濃度依存的に脳重量が減少した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 一元配置分散分析法、Scheffe's F test)。この現象は、雌性仔ラットでも同様であった (not shown)。括弧内は仔ラットの数を示す。

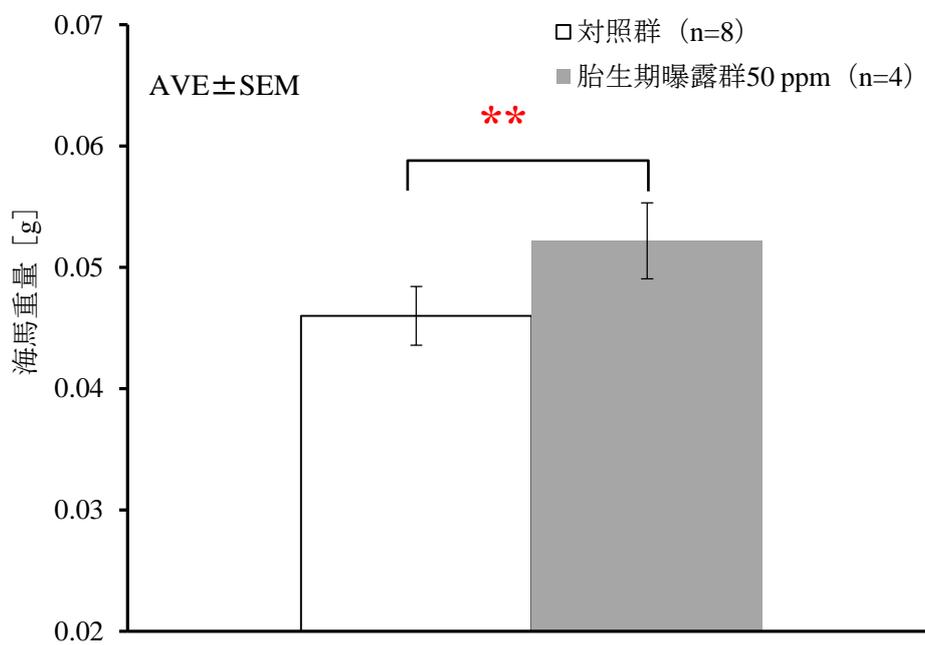


図 15 PND23 における海馬重量

胎生期曝露 50ppm 群の海馬重量は対照群より有意に増加した (** $p < 0.01$, Student's t test)。この現象は雌性仔ラットでも同様に観察された。括弧内は仔ラットの数を示す。

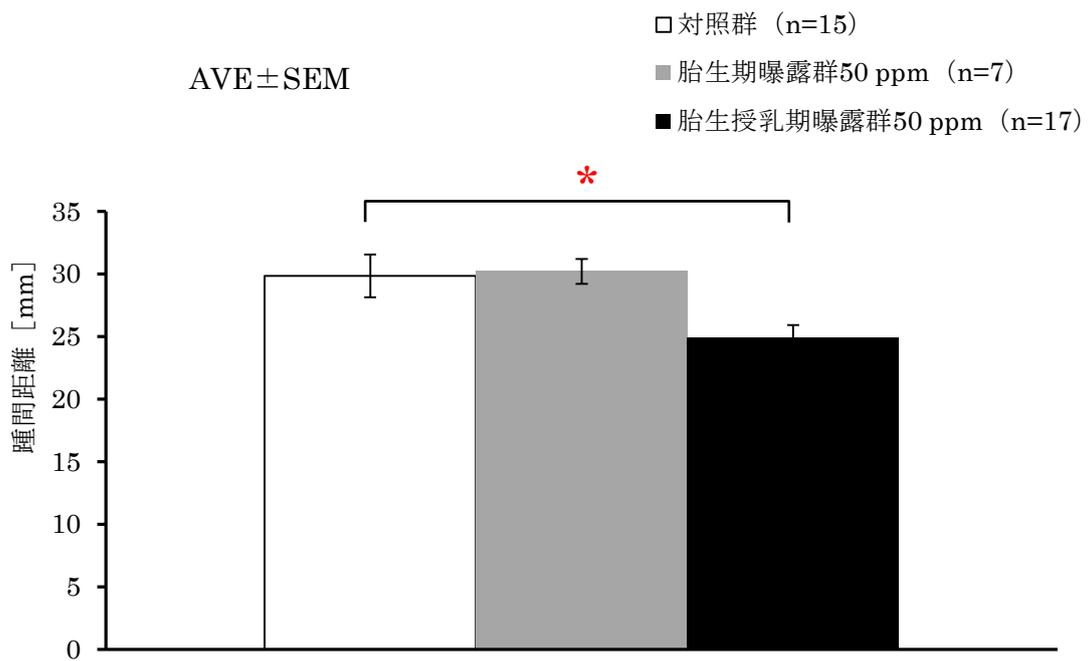


図 16 PND21 で実施した雄性仔ラットの Hindlimb landing foot-spray test 発達毒性 LOAEL である 50ppm について実施した。胎生期曝露群は対照群とは差がなく、胎生授乳期曝露群で踵間距離が減少した (* $p < 0.05$, one-way ANOVA, Scheffe's F test)。雌性仔ラットではこの 3 群に差が認められなかった。括弧内は仔ラットの数を示す。

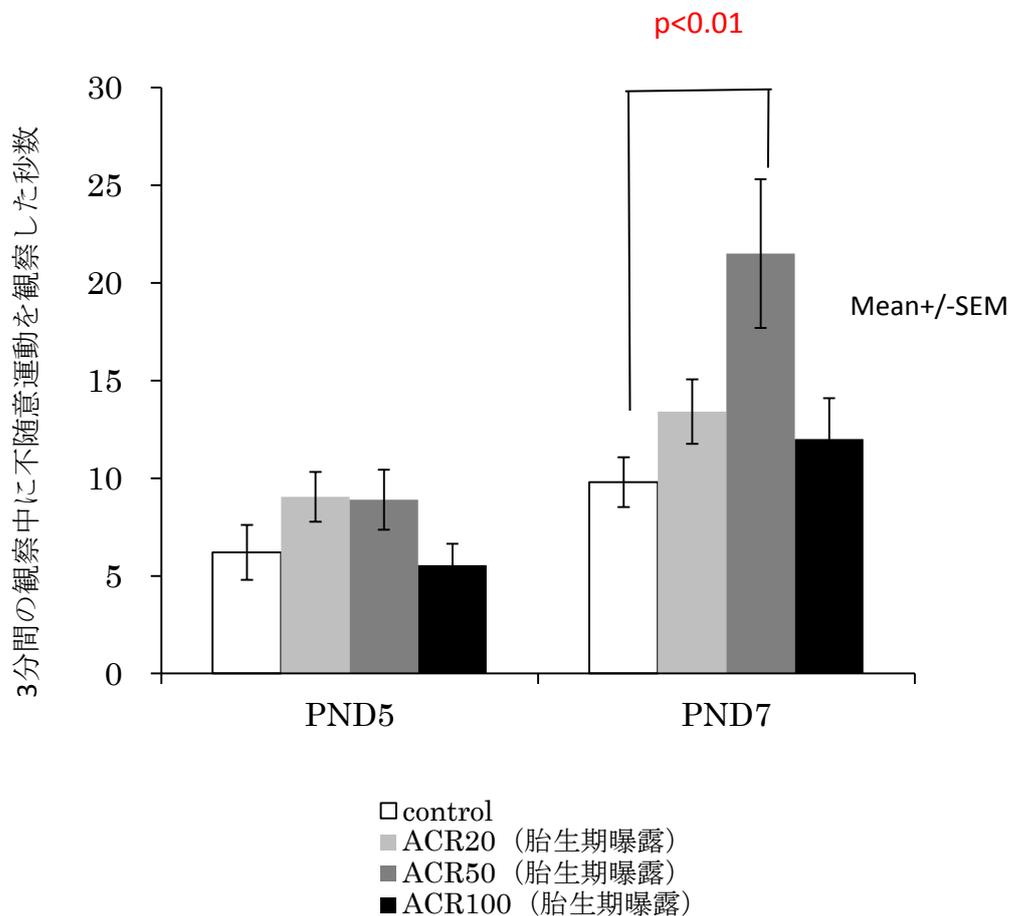


図 17 不随意運動の出現と ACR 胎生期曝露

ACR を胎生期 6 日から 19 日まで、20、50、100ppm 水溶液で飲水投与し、産まれた仔ラットの生後 5 日と 7 日で不随意運動の出現量を秒数で表した。観察は 3 分間 (180 秒) 行った。対照群はこの 2 日間で増加傾向を示すにとどまったが、曝露群は 3 群とも不随意運動の出現が増加した。PND7 における 50ppm 曝露群の増加は対照群よりも有意に増加した。