

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：19KD1003） 総括研究報告
化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発
研究代表者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究要旨

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

本研究では、OECDと共有している化学物質リストをもとに、インビトロで構造と機能の両側面から神経毒性を検討した。神経系の構造に対する毒性に関しては、ロテノンによりヒトiPS細胞の分化能が抑制されることから、ミトコンドリア毒性を有する化合物を評価した。その結果、多くのDNT化合物は分化を抑制することを明らかにした。ヒトiPS細胞は株間差、人種間差が知られており、日本人由来のiPS細胞の整備を進めている。

次に、機能面として、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行ったところ、MEAシステムを用いてピレスロイド系農薬などの毒性を検出可能であることを明らかにした。また、MEAデータをもとに、農薬などのリスク分類を試みている。得られた細胞毒性データはOECDで進行中のバリデーションのデータと比較する予定である。

また、動物実験によるin vivoデータと検証を行いハザード評価を行った。他にも毒性が懸念される化学物質の評価を行い、動物脳組織におけるエピゲノムデータなどの取得を進めている。

さらに、これらのデータを統合する目的で、インシリコによる毒性評価法に着手した。既存の情報が非常に限られていることから、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験データベースのプロトタイプを構築した。

最終的に、OECDや米国EPAを中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験（TG424）や発達神経毒性試験（TG426）を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立し、統合な神経毒性評価法の構築を目指す。

<研究体制>

- ・ 諫田泰成（国立医薬品食品衛生研究所）
「化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発」
- ・ 齋藤潤（京都大学 iPS 細胞研究所）
「iPS 細胞の提供、基礎的な性状評価」
- ・ 渋谷淳（東京農工大学）
「In vivo 毒性評価」
- ・ 吉田祥子（豊橋技術科学大学）
「発達期・反復投与毒性試験」
- ・ 吉成浩一（静岡県立大学）
「神経毒性のインシリコ予測・評価手法開発」
- ・ 小田原あおい（東北工業大学）
「MEA 計測」
（若手育成枠）

A. 研究目的

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

我々は今までに、インビトロ毒性評価モデルとして、ヒトiPS細胞を用いた発達期における神経毒性評価法を構築し、その有用性を明らかにしてきた。また、米国EPA等との共同研究により、多点電極アレイ（MEA）システムにより成体における神経毒性を評価する手法を構築

しており、胎生期から成熟期において化学物質の神経毒性評価が可能である。

そこで、本研究では、OECD と共有している化学物質のリストをもとに、インビトロ、インビボ、インシリコ評価を用いて、化学物質の統合的な神経毒性評価法を開発する。

インビトロ毒性試験は、品質が安定したヒト iPS 細胞（京大樹立株）を整備するとともに、信頼性の高いデータを取得し、ヒトにおける予測性等を検証する。さらに、OECD で進行中のバリデーションのデータと比較を行う。また、動物実験による *in vivo* データと検証し、毒性評価法を開発する。さらに、既存の化学物質の反復投与毒性試験データなどを活用し、カテゴリーアプローチ等の手法を用いてインシリコによる評価法を確立して、統合的な神経毒性評価法を構築する。

最終的に、OECD や米国 EPA を中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験 (TG424) や発達神経毒性試験 (TG426) を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立を目指す。

現在、OECD で提案された発達神経毒性ガイダンス案の議論が進行中であり、日本から iPS 細胞などのデータを提供して、ガイダ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

【 iPS 細胞による *in vitro* 神経毒性評価】

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。分化能に関して大規模検証試験を行い、一定の予測性を明らかにした。また、ヒト iPS 細胞ニューロンを用いて MEA によりネットワーク評価を行い、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。

【 iPS 細胞の提供、基礎的な性状評価】

健常人ドナー由来ヒト iPS 細胞 6 株を対象として、遺伝子発現プロファイルと *in vitro* 三胚葉分化能を検討した。その結果、6 株について良好な分化能を確認できた。

【 *In vivo* 毒性評価】

ラットを用いた塩化鉛とエタノールの発達期曝露で生後に始まる海馬の神経新生に

おける顆粒細胞系譜のうち、神経前駆細胞を標的とした発達神経毒性を検出した。

【 発達期・反復投与毒性試験】

OECD リスト物質を用いた評価を踏まえ、今後、*in vitro* 研究法の開発につなげる。

【 神経毒性のインシリコ予測・評価手法】

既存の発達神経毒性情報を利用して、発達神経毒性を示す物質の物理化学的・構造的特徴の一端を明らかにした。また、既存の情報が非常に限られていることから、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験データベースのプロトタイプを構築した。

【 MEA 計測（若手育成枠）】

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから 15 化合物を選定し、MEA 計測法によってリスク評価を行い、3 つのカテゴリーに分類できた。

D. 考察

本研究において、インビトロ、インビボ、インシリコ評価を用いて、化学物質の統合的な神経毒性評価法を進めており、新規 DNT ガイダンス案との連携を推進している。

現在 OECD で提案されているインビトロ DNT ガイダンスと同様に、ヒト iPS 細胞の分化誘導能に基づく評価系およびヒト iPS 細胞由来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データ取得を行っている。OECD のブラインド化合物のデータはまだ開示されていないものの、日本のデータとして活用できるように、原著論文を執筆中である。

DNT ガイダンス案に関する資料ではヒト 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が (Bal-Price A, Toxicol Appl Pharmacol. 2018 Sep 1;354:7-18) 標準となる株については議論されていない。再生医療や創薬に加えて、化学物質の安全性評価においても、今後を見据えて、日本人樹立株の整備やデータ取得が重要な課題であると考えられる。衛研では現在、CiRA 株の神経分化能を評価中である。

インビボ、インビトロの関連に関しては、共通の化学物質を用いて、iPS 神経など細胞のデータと *in vivo* のデータを比較する予定

で進めている。例えば、グリホサートは既存の論文情報がなかったが、我々がグリホサートについて動物で得られた知見について、OECDとも国際的に連携している。他の化学物質について、インビボとインビトロで比較し、ハザード評価の議論をする予定である。

インシリコからのアプローチも重要である。OECDの発達神経毒性化合物リストは化学物質の数が少なかったため、現在、農薬評価書をもとに、インビボ毒性試験(二世代繁殖試験、発生毒性試験)のデータを収集・整理している。今後これをきちんと整理して、神経毒性の定義をしっかりとすれば、インビボ神経毒性(親、次世代)の陽性対照物質、陰性対照物質がさらに明確となる。従って、インシリコによる毒性試験データの解析に基づいて、インビボとインビトロ(細胞)間で相関性を検討し、橋渡しを行うことが可能となる。例えば、インシリコの予測をもとに、wetのデータでカテゴリーアプローチを行い、予測性を検証することなどを計画している。これにより、インビボとインビトロの相関をとるだけでなく、あわせてインシリコの利用法や有用性も議論できると考えられる。

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。OECDでも、

ヒトのデータや疫学データの拡充を進めている。将来的に、EUやMount Sinai医科大学などで進行中の大規模エクスポソーム、日本のエコチル調査などとの連携が必要となると思われる。

E. 結論

新たなin vitro神経毒性試験法の確立に向けて、陽性対照となる化学物質を用いて、in vitro, in vivo, in silicoにより多角的にデータを取得した。今後、統合化を進める予定である。

F. 研究発表

各分担研究者の報告書に示すように、論文発表および学会発表を行った。初年度が終わり、各分担研究のデータも蓄積されてきている。今後は研究班全体あるいはグループ間の発表が増える予定である。特に、本研究班の全体に関しては、第47回日本毒性学会学術年会で神経毒性に関するシンポジウムを組んでおり、2020年6月末にWEB開催の予定である。

今後、本研究班として、原著論文や他の学会でも積極的に発表していく予定である。