

研究要旨

本研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的とし、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と動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性あるいは反復投与による神経毒性評価を行う。

令和元年度はヒトに対する重要脳発達障害物質である酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールについてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討した。妊娠SDラットに、酢酸鉛を0.2%、0.4%、塩化アルミニウムを0.25%、0.5%、エタノールを10%、12.5%の濃度で妊娠6日目から分娩後21日目まで飲水投与し、児動物に発達期曝露した。いずれの被験物質投与群でも母動物の体重、摂餌量、摂水量などに軽度な影響は見られたが、妊娠の維持と児動物への重篤な毒性は見られなかった。児動物を出生後21日目、77日目に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。免疫組織化学的解析により、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯(SGZ)の顆粒細胞系譜の分化状況 (GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN)、海馬歯状回門の介在ニューロンの分布 (reelin, parvalbumin, somatostatin, calbindin, calretinin, GAD67)、細胞増殖とアポトーシス (PCNA, TUNEL) および神経可塑性 (FOS, ARC, COX2) を中心に検討し、標的となる顆粒細胞の分化段階を同定している。現時点で酢酸鉛では、0.4%で生後21日目にSOX2⁺細胞、TBR2⁺細胞の増加、DCX⁺細胞の減少が確認された。GABA性介在ニューロンでは、0.4%で生後21日目にreelin⁺細胞の減少、calretinin⁺細胞、somatostatin⁺細胞の増加が認められた。calretinin⁺細胞の増加は生後77日目まで持続していた。以上より、酢酸鉛の発達期曝露は、曝露終了時にtype-2からtype-3神経前駆細胞の増殖を促し、それにはcalretinin⁺介在ニューロンによる神経新生増強の関与が示唆された。また、未成熟顆粒細胞への分化阻害も認め、それにはreelinシグナルの減少の関与が示唆された。介在ニューロンへの影響は成熟後まで持続しており、不可逆的な神経新生障害が示唆された。エタノール曝露では10%以上で生後21日目にSOX2⁺細胞の増加、12.5%で生後21日目にDCX⁺細胞の減少、PCNA⁺細胞の増加が観察された。GABA性介在ニューロンでは、12.5%でcalretinin⁺細胞、somatostatin⁺細胞の増加が認められた。

以上より、エタノールの発達期曝露は、曝露終了時にtype-2a神経前駆細胞の増殖を促し、それにはcalretinin⁺介在ニューロンによる神経新生増強の関与が示唆された。また、未成熟顆粒細胞への分化阻害も認められた。塩化アルミニウムについても、海馬の神経新生傷害性に関する免疫組織化学的解析を進めている。今後、障害に関連する神経新生関連因子（コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など）に関して、遺伝子発現解析を行い原因分子の特定を行う。

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、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と動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性あるいは反復投与による神経毒性評価を行う。

神経発達には神経幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖・分化、移動、成熟の各段階から構成され、神経細胞系譜が標的となる発達神経毒性ではこれらの過程のいずれかが障害を受ける。神経新生はそれら全ての発達過程を含むため、生後に始まる海馬の神経新生は様々な発達神経毒性物質の発達

期曝露に対して感受性を示す可能性が高い。また、成体でのニューロンの生存や維持に関わる分子機序には、神経発達における神経突起やシナプスの形成、髄鞘形成の機序と共通する部分が多い。そのため、成熟神経に対する毒性物質は発達神経毒性を示す可能性がある。

令和元年度はヒトに対する重要脳発達障害物質である酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールについてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討する。ヒト iPS 細胞（京大樹立株）を用いたインビトロデータと検証し、化学物質の物性情報から代謝などの情報も加味して毒性評価法の開発に寄与する。

B. 研究方法

妊娠 SD ラット（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、一群あたり 12-13 匹ずつとして、純水、酢酸鉛 0.2%, 0.4%、塩化アルミニウム 0.25%, 0.5%、エタノール 10%, 12.5% の濃度で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで飲水投与した。最高用量は、発達神経毒性試験ガイドライン（OECD TG426）に準じ、予備的に酢酸鉛 0.2%, 0.4%、塩化アルミニウム 0.25%, 0.5%, 1%、エタノール 10%, 12.5% の濃度で母動物に対して飲水投与した際に、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定した。本実験では、出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に 8 匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。出生後 21 日目（離乳時; PND 21）に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。各群 6 匹以上の児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で血液または脳を採取し、被験物質濃度測定に供した。

残り半数の児動物は出生後 77 日（PND 77）まで被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日目（成熟後）に各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。

PFA 灌流固定脳については大脳の bregma の後方約 -3.5 mm の 1 カ所を冠状断面を作製して、その前後の対称面（2 切面）が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞系譜の分化段階の指標 [GFAP, SOX2, TBR2, doublecortin (DCX), NeuN]、介在ニューロンの指標 [reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), somatostatin (SST), calbindin (CALB1), calretinin (CALB2), GAD67]、細胞増殖活性の指標 (PCNA)、アポトーシスの指標 (TUNEL) および神経可塑性の指標 (FOS, ARC, COX2) に対する抗体を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。海馬歯状回の SGZ において単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。

メタカーン固定脳は、大脳の bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚スライスより生検パンチを用いて海馬歯状回部分を採取し、total RNA を抽出した。total RNA から cDNA を合成し、RT-PCR により遺伝子発現解析を実施している。

鉛塩化鉛曝露実験では、雌児動物で PND 21, PND

77 における脳組織中の鉛濃度を ICP-MS 分光解析 (HP-7500; Hewlett-Packard 社, Palo Alto, CA, USA) により測定した。

（倫理面の配慮）

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

C. 研究結果

酢酸鉛 0.2% の母動物で、摂餌量、摂水量の低値、酢酸鉛 0.4% の母動物で体重、摂餌量、摂水量の低値、塩化アルミニウム 0.25% の母動物で摂餌量、摂水量の低値、塩化アルミニウム 0.5% の母動物で体重、摂餌量、摂水量の低値、エタノール 10% の母動物で、摂餌量、摂水量の低値、エタノール 12.5% の母動物で体重、摂餌量、摂水量の低値が見られたが、いずれの被験物質群でも産子数に影響は見られなかった（図 1）。

酢酸鉛 0.2% の児動物の体重、摂水量の低値、酢酸鉛 0.4% の児動物の体重、摂餌量、摂水量の低値、塩化アルミニウム 0.5% の児動物の体重の低値、エタノール 10% の児動物の体重、摂餌量の低値、エタノール 12.5% の児動物の体重、摂水量の低値が見られた（図 1）。

3 月末までに、免疫組織化学的解析により、顆粒細胞層下帯の顆粒細胞系譜の分化状況、細胞増殖とアポトーシスおよび神経可塑性、海馬歯状回門の介在ニューロンの分布を中心に検討し、標的となる顆粒細胞の分化段階を同定する。現時点で酢酸鉛では、0.4% で PND 21 に SOX2⁺細胞、TBR2⁺細胞の増加、DCX⁺細胞の減少が確認された。また PCNA⁺細胞が両投与群で増加傾向を示した。GABA 性介在ニューロンでは、0.4% で PND 21 に RELN⁺細胞の減少、CALB2⁺細胞、SST⁺細胞の増加が認められた。CALB2⁺細胞の増加は PND 77 まで持続していた（図 2）。エタノール群では 10% から PND 21 に SOX2⁺細胞の増加、12.5% で PND21 に DCX⁺細胞の減少、PCNA⁺細胞の増加が観察された。GABA 性介在ニューロンでは、12.5% で CALB2⁺細胞、SST⁺細胞の増加が認められた（図 3）。塩化アルミニウムについても、海馬の神経新生傷害性に関する免疫組織化学的解析を進めている（図 4）。

その後、障害が検出された場合、関連する神経新生関連因子（コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など）に関して、遺伝子発現解析を行い原因分子の特定を行う。

鉛塩化鉛曝露実験では、雌児動物の脳組織の鉛濃度は、両投与群で PND 21, PND77 共に増加した（図

5)。

D. 考察

酢酸鉛の発達期曝露は、曝露終了時に type-2 から type-3 神経前駆細胞の増殖を促し、それには CALB2 陽性介在ニューロンによる神経新生増強の関与が示唆された。また、未成熟顆粒細胞への分化阻害も認め、それには reelin シグナルの減少の関与が示唆された。介在ニューロンへの影響は成熟後まで持続しており、不可逆的な神経新生障害が示唆された。

エタノールの発達期曝露は、曝露終了時に type-2a 神経前駆細胞の増殖を促し、それには CALB2 陽性介在ニューロンによる神経新生増強の関与が示唆された。また、未成熟顆粒細胞への分化阻害も認められた。

E. 結論

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。それには GABA 性介在ニューロンの傷害性を介した機序が推定された。塩化アルミニウムに関しては、神経新生に対する傷害性について検討を実施している。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

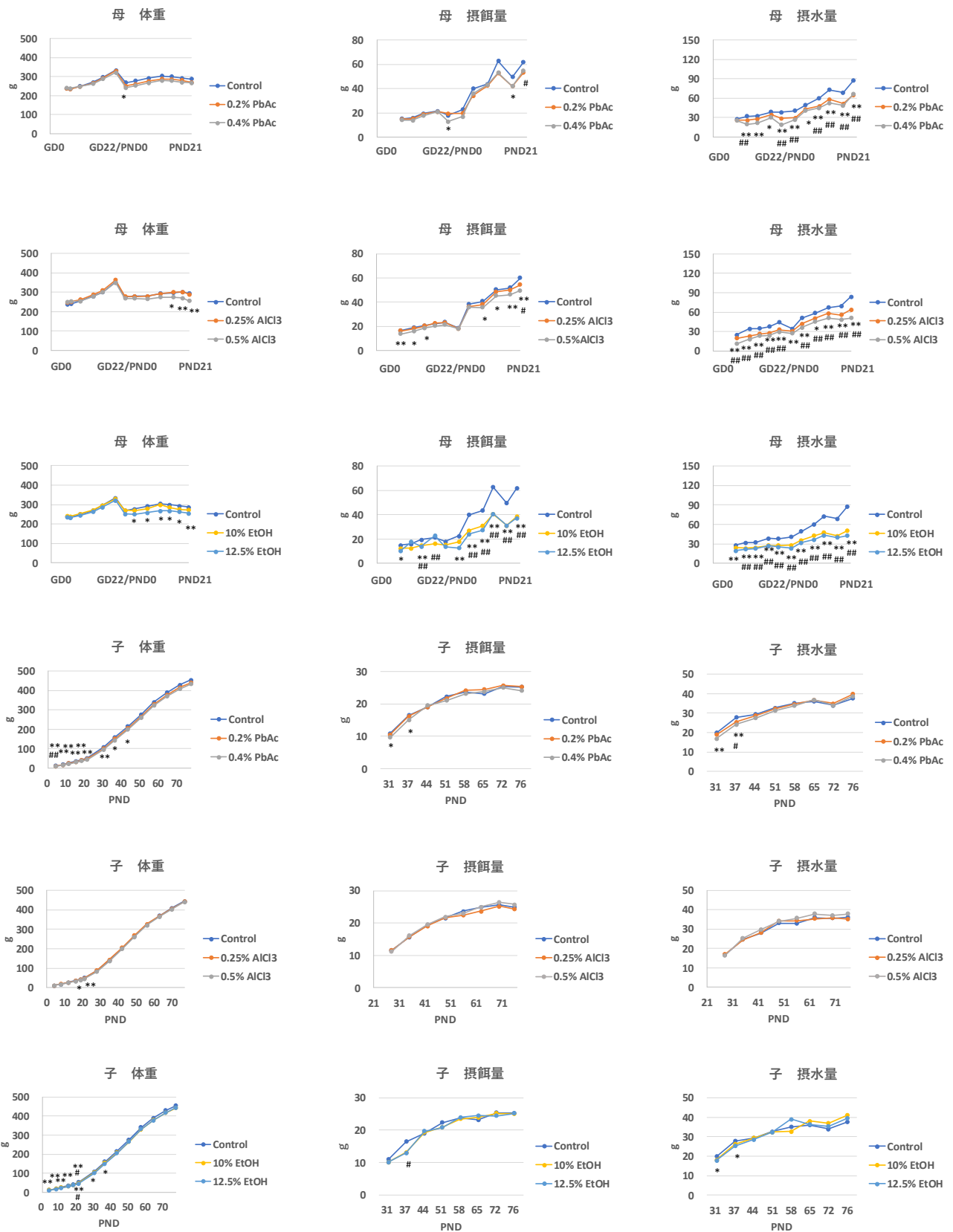


図1 母動物、児動物の体重、摂餌量、摂水量

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ in low dose group, vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in high dose group, vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

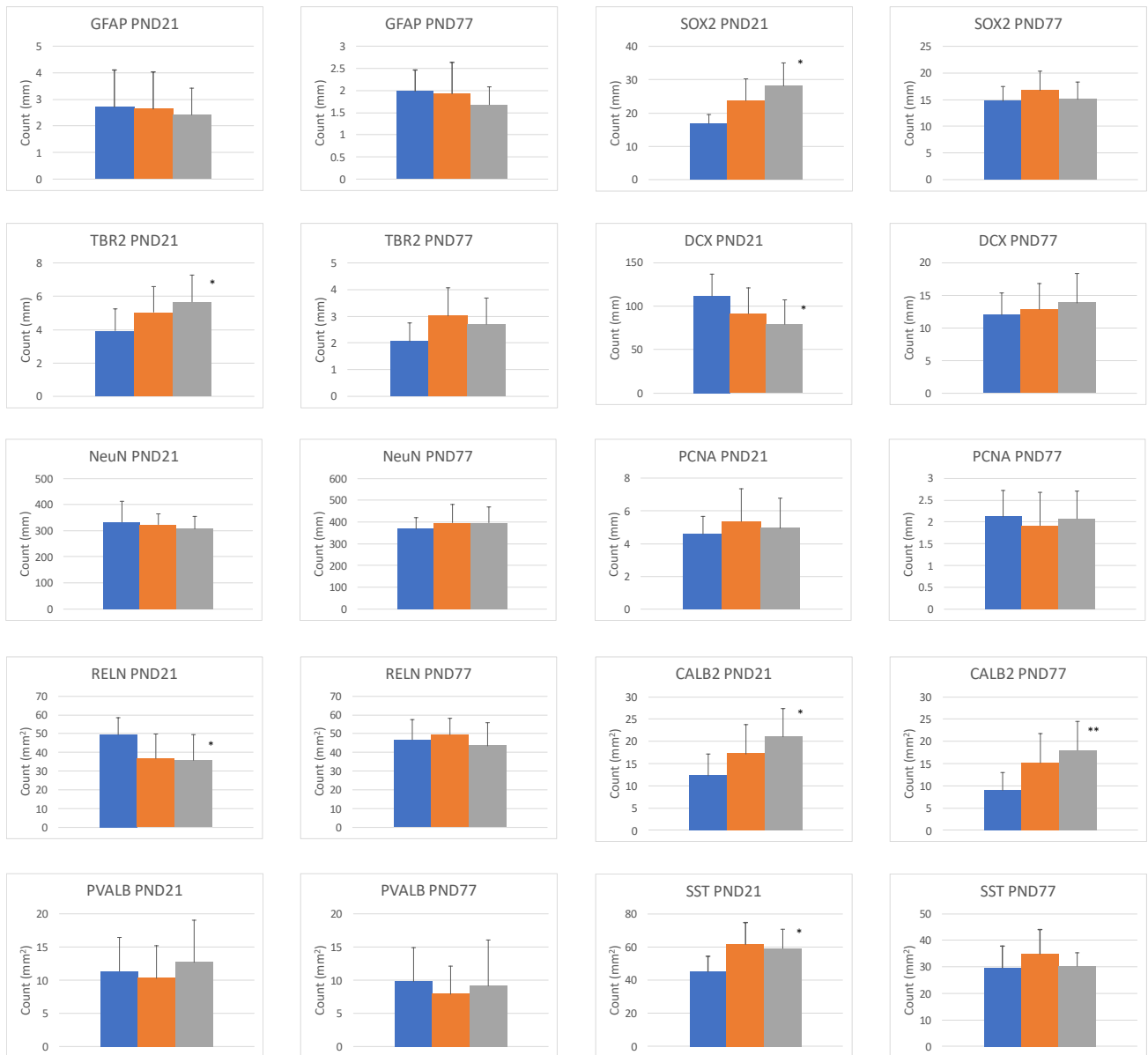


図2 酢酸鉛の免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

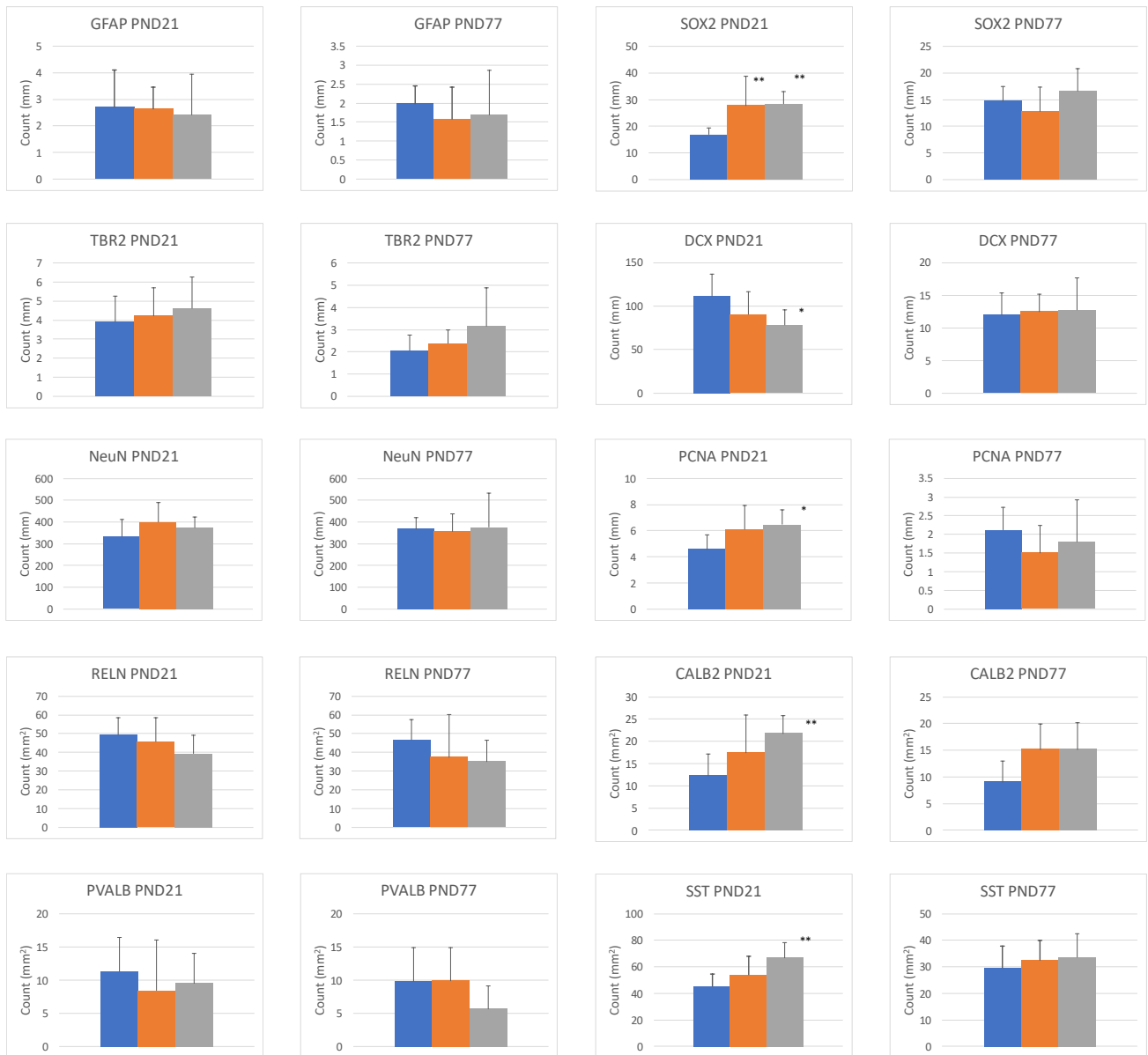


図3 エタノールの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

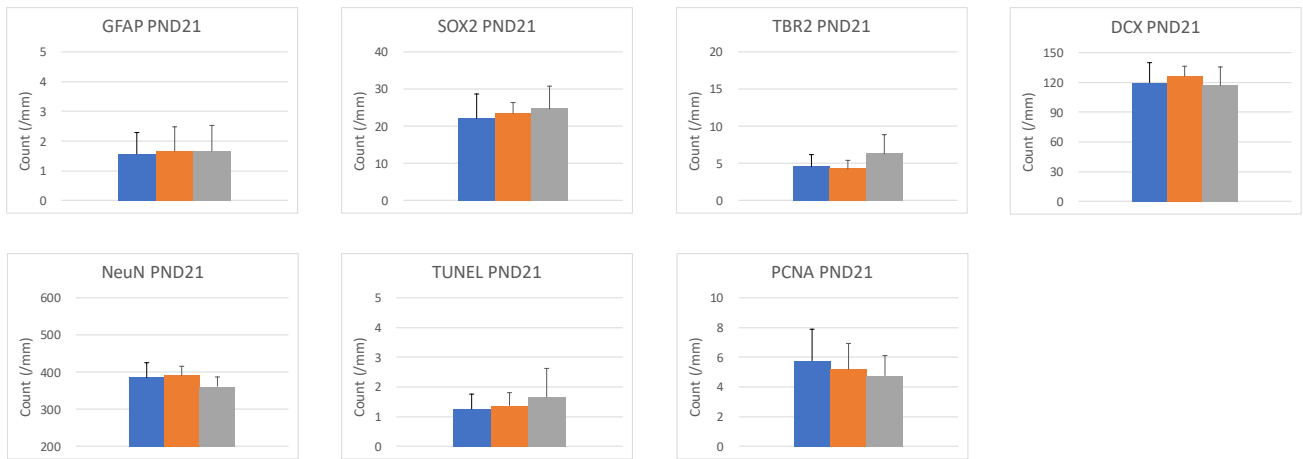


図4 塩化アルミニウムの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量

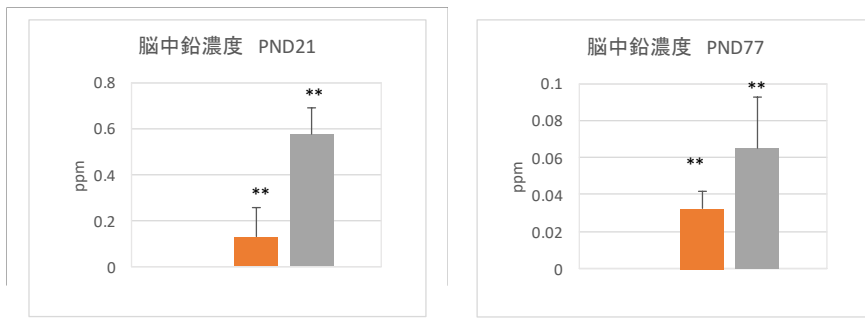


図5 誘導結合プラズマ質量分析による脳中鉛濃度 左から対照群、低用量、高用量
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.