

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（19KD1003） 分担研究報告書

発達期・反復投与毒性試験

研究分担者

豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系  
吉田 祥子

要旨

*In vivo* 動物試験として、妊娠ラットに農薬グリホサート 25mg/kg から 250mg/kg を生理食塩水に溶解し経口にて単回投与し、出生仔動物において生後二週での神経細胞死とミクログリア活性化を確認した。また成長曲線をとったところ、生後二週ごろ一過性の成長抑制と動物死亡例の増加を見た。グリホサート 250mg/kg 投与動物の小脳における炎症性サイトカイン発現量を継時的に観察したところ、生後すぐには増加が見られなかった一方、生後一週間で IL1 の一過性の上昇、生後二週間で iNOS の上昇が観察された。この結果は、生後二週間のグリホサート投与動物の小脳でミクログリアが増加している知見とも一致する。さらにグリホサート投与妊娠動物および出生仔動物の双方で、腸内細菌叢の変化が確認され、特に酪酸産生菌の減少が確認された。出生仔は行動観察においても過度に抑制的な反応を示した。これらの結果は、OECD 評価化合物リスト物質であるグリホサートが高濃度投与量では神経死を一過性に誘導する可能性を示した。今後、*in vitro* 研究法の開発につなげる。

A. 研究目的

OECD と共有している化学物質のリストをもとに、動物実験による神経毒性評価を行う。動物実験による *in vivo* データを、ヒト iPS 細胞などのインビトロ実験で得られた細胞毒性データと比較し、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を開発する。

B. 研究方法

胎児期および発達期動物に、OECD と共有している化学物質のリストの単回あるいは反復投与を行い、動物の神経回路に及ぼす影響、および成長に及ぼす影響を細胞生物学的に追跡する。また組織の生化学的検討を行う。今年度は、胎児期のラットに OECD 評価化合物リスト物質であるグリホサートを単回投与し、出生仔の小脳発達の状態、炎症性サイトカイン発現の変化、腸内細菌叢の変化、行動の変化を観察した。（倫理面の配慮）

全ての動物執権は豊橋技術科学大学動物実験委員会の指針および文部科学省動物

実験倫理規程に基づきに基づき、審査の上実施する。

C. 研究結果

*In vivo* 動物試験として、妊娠ラットに農薬グリホサート 25mg/kg から 250mg/kg を生理食塩水に溶解し経口にて単回投与し、出生仔動物の出生数と成長を観察した（図 1）。出生仔数の減少と生後二週ごろ一過性の成長抑制を観察した（図 2）。同時期の小脳において神経細胞数の減少とミクログリア活性化を確認した（図 3）。グリホサート 250mg/kg 投与動物の小脳における炎症性サイトカイン発現量を継時的に観察したところ、生後すぐには増加が見られなかった一方、生後一週間で IL1 の一過性の上昇、生後二週間で iNOS の上昇が観察された（図 4）。この結果は、生後二週間のグリホサート投与動物の小脳でミクログリアが増加している知見とも一致する。さらにグリホサート投与妊娠動物および出生仔動物の双方で、腸内細菌叢の変化

が確認され、特に酪酸産生菌の減少が確認された(図5)。出生仔は行動観察においても過度に抑制的な反応を示した(図6)。

#### D. 考察

これらの結果は、OECD評価化合物リスト物質であるグリホサートの100mg/kg以上の高濃度曝露が出生仔の神経異常をもたらす可能性を示した。食品安全委員会評価法においては、ウサギを用いた発生毒性試験を妊娠6～18日の強制経口投与試験により行い、グリホサートのNOAELsを100 mg/kg bw/dayとしている。本試験の投与動物、投与方法はこれとは異なり、同一に議論できるものではない。さらに食品安全委員会が定めた1日摂取許容量は1mg/kg bw/dayであり、本実験の用量はかなりの高濃度と考えられる。その上で、胎児期のグリホサートが発達依存的な神経炎症を引き起こした可能性について、慎重に研究を進める必要がある。

#### E. 結論

OECD評価化合物リスト物質であるグリホサートが、高濃度投与量では神経死を一過性に誘導する可能性を示した。今後、*in vitro* 研究法の開発につなげる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- [1] Potentiation of developmental neurotoxicity of broad-applied herbicide, Glyphosate. Ken Futagami, Huang Yong Lin, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Naohiro Hozumi, Sachiko Yoshida 神経科学学会 2019.7.25 新潟
- [2] Behavioral alteration of chemical-induced autistic model rat and its neuronal mechanism. Rie Matsufusa, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida 神経科学学会 2019.7.25 新潟
- [3] Alteration of cerebellar developmental structures and metabolic condition in prenatal famine rat. Kana Miyamoto, Thomas Tiong Kwong Soon, Seta Sato, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida 神経科学学会 2019.7.26 新潟
- [4] Glial modification in developing VPA-induced ASD model rat cerebellum. Midori Fukushima, Chihiro Nishikawa, Yoko Nomura, Yukiko Fueta, Susumu Ueno, Yuko Sekino, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida 神経科学学会 2019.7.27 新潟

- [5] Developmental abnormality induced LPS, bacteria-derived inflammatory agent in rat cerebellar cortex. Haruko Ohtsuka, Noriyuki Asai, Thomas Tiong Kwong Soon, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida 神経科学学会 2019.7.27 新潟
- [6] 胎児期のLPS曝露がラットの小脳発達に与える影響、大塚暖子、常本和伸、諫田泰成、吉田祥子、日本薬学会第5回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2019.9.14 東京
- [7] Developmental neurotoxicity and immune abnormality of in-utero food-restriction on rat animal model. Yoshida S, Nomura Y, Kanda Y World Congress on Inflammation 2019 9.19 Sydney
- [8] The epigenetic change of granule cell precursors causes excess folding of cerebellar lobules to induce ASD-like malformation. Yoshida Sachiko, Fukushima Midori, Kanda Yasunari. EMBL Symposium: Metabolism Meets Epigenetics 2019.11.21, Heidelberg

#### G. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許・特許出願

なし。

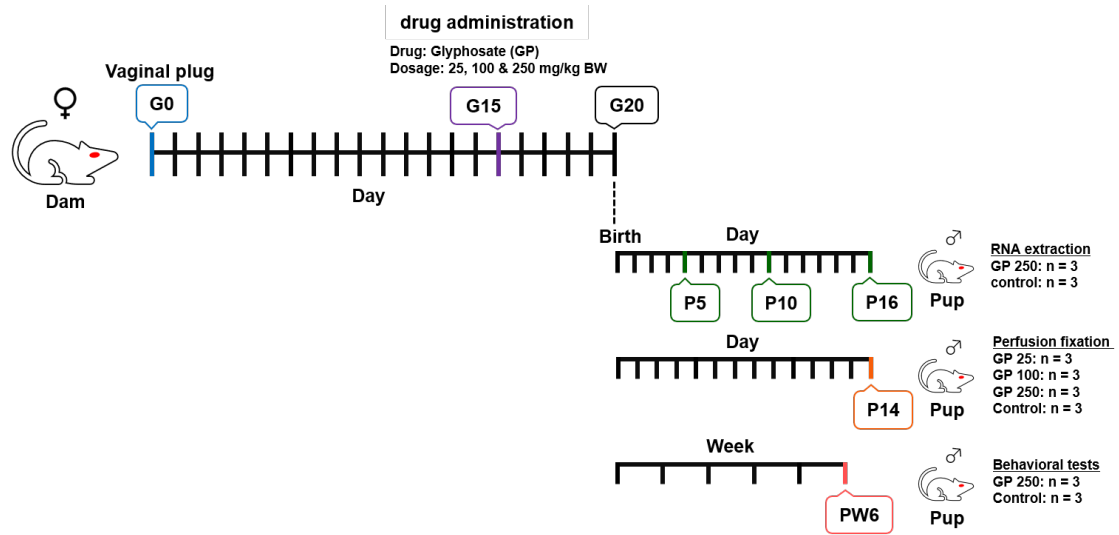
##### 2. 実用新案登録

なし。

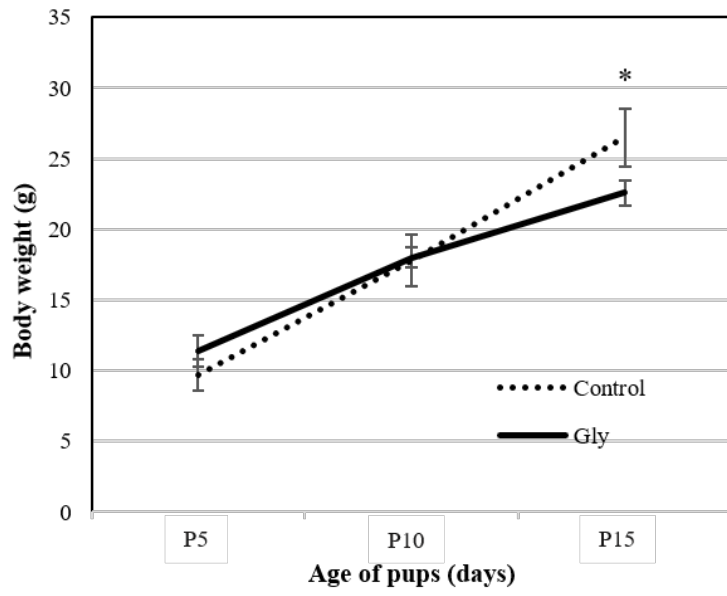
##### 3. その他

なし。

図 1

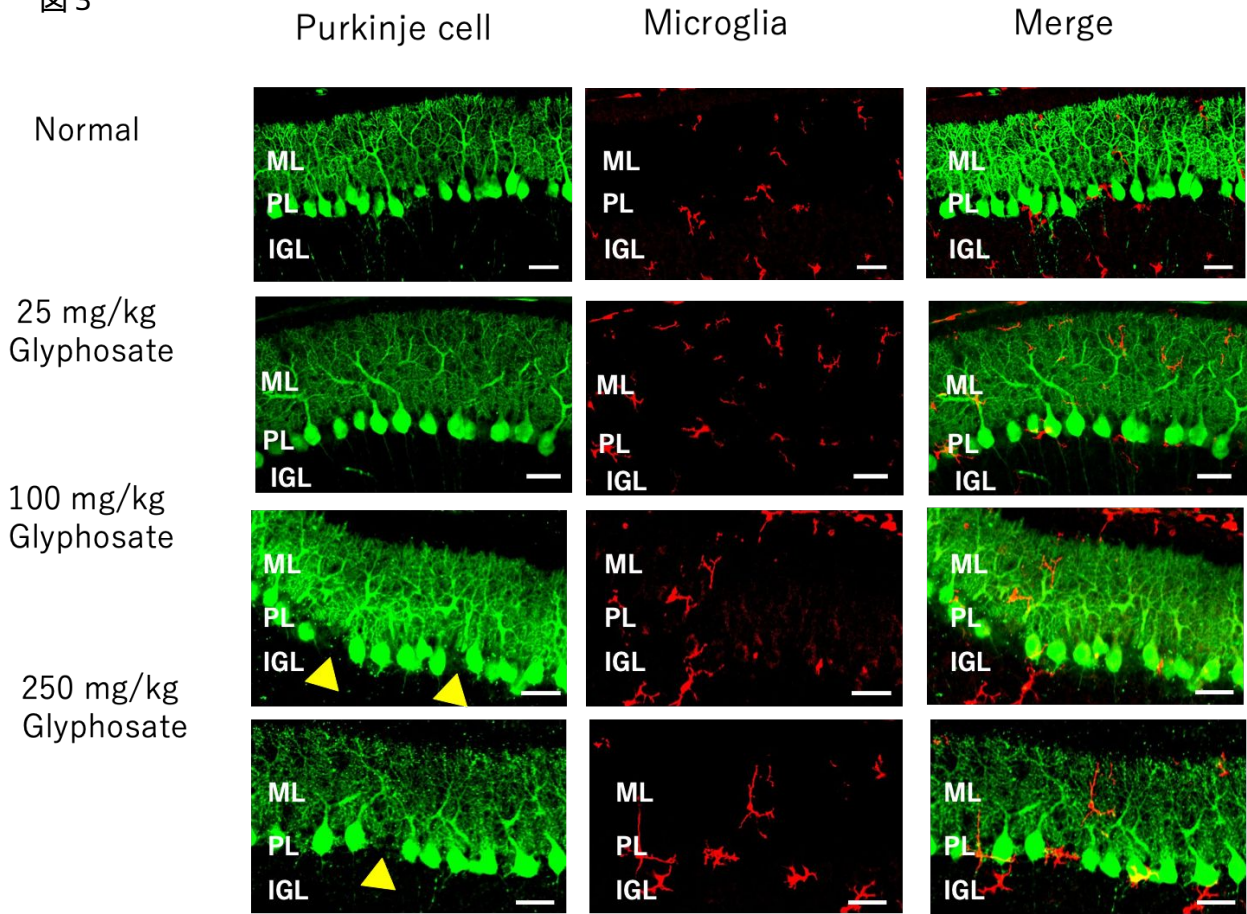


投与と試料調整のスケジュール

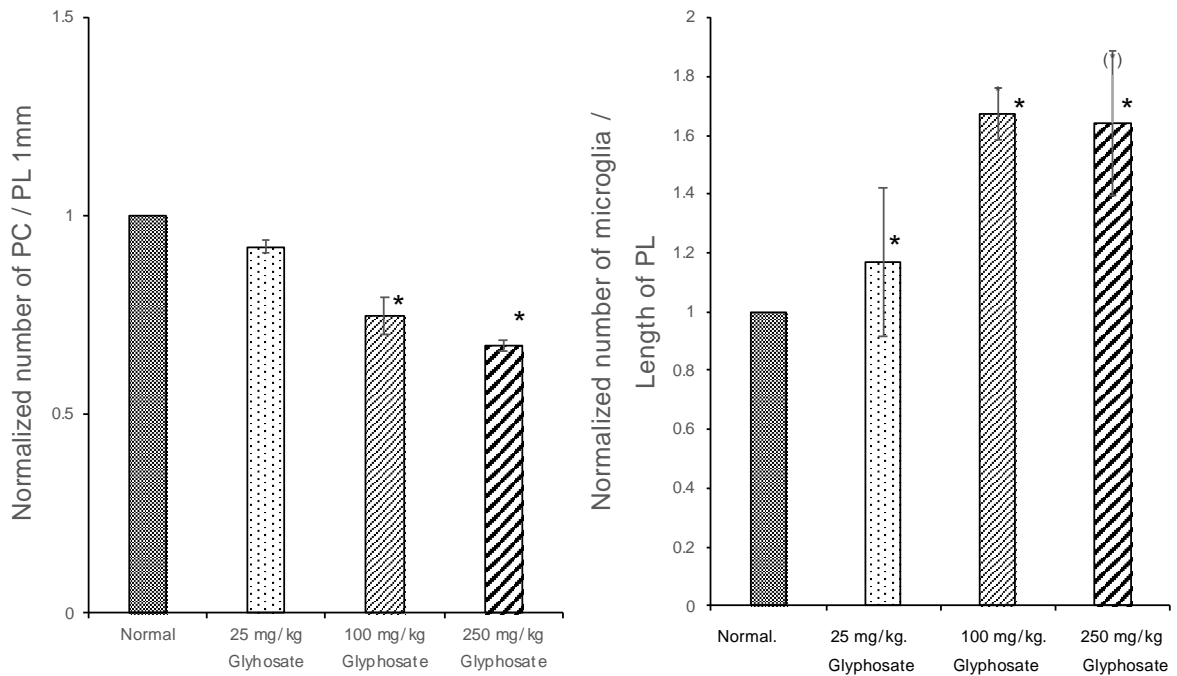


成長曲線

図 3

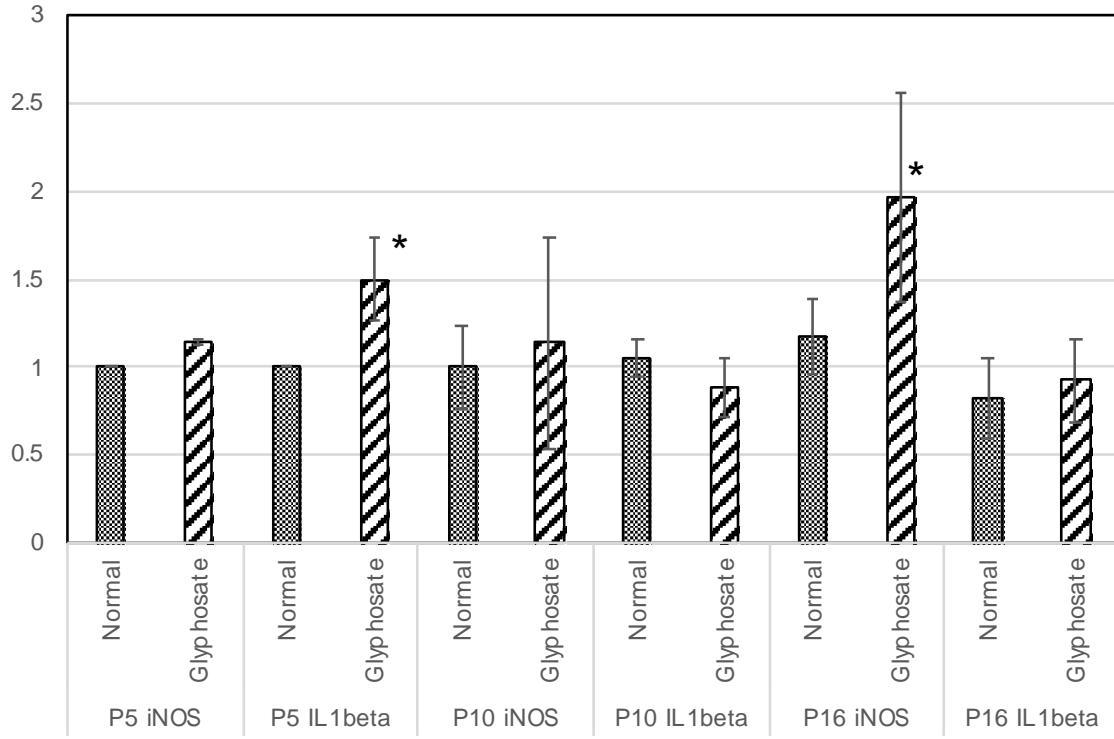


グリホサート投与による神経細胞の変化（緑）とミクログリア分布（赤）



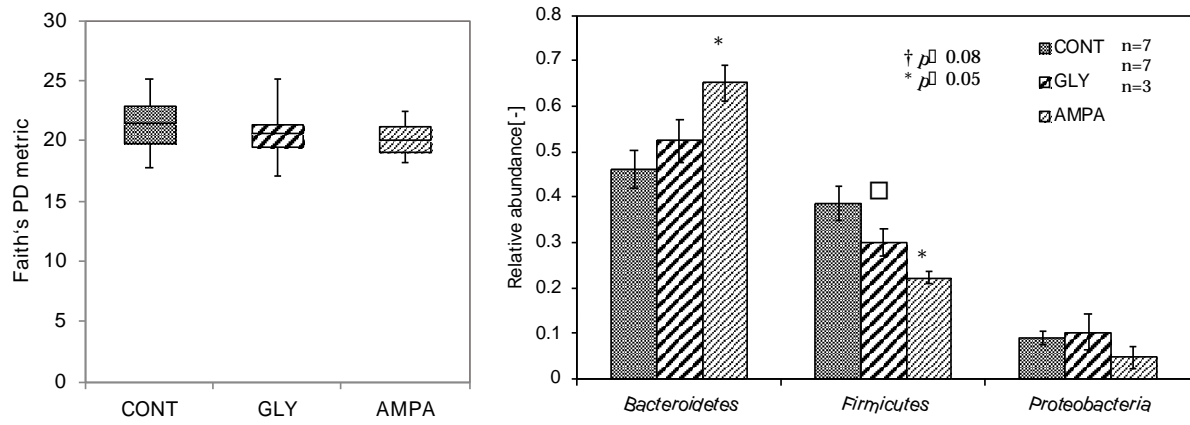
グリホサート投与による神経細胞の減少（左）とミクログリア増加（右）

4

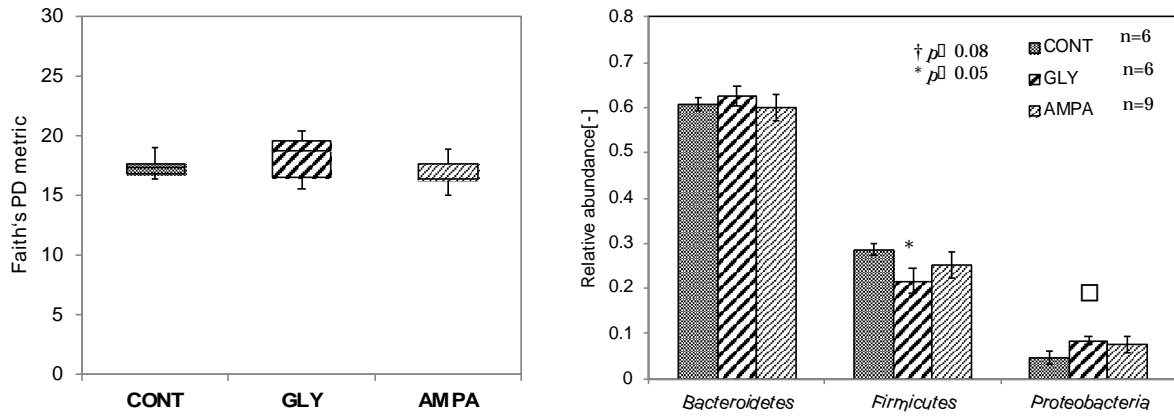


発達依存的サイトカイン発現量の変化

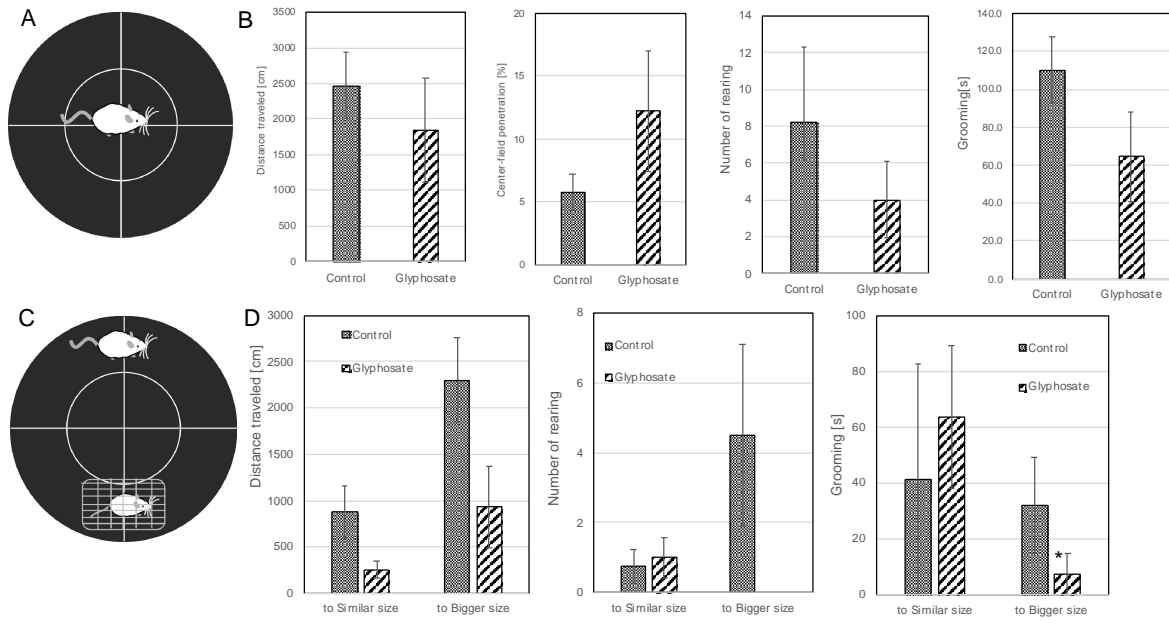
☒ 5



グリホサート投与妊娠動物の G20 での腸内細菌叢の変化



胎児期グリホサート投与動物の P28 での腸内細菌叢の変化



グリホサート 投与動物の6週での行動試験。