

**厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業**

**発達期における総合的な
遅発性神経毒性試験法の開発
(H28-化学-一般-003)**

平成 30 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 諫田 泰成

令和元（2019）年 5 月

目 次

I.	総括研究報告	
	発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発-----	1
	諫田 泰成	
II.	分担研究報告	
	ヒト幹細胞の分化による評価法の開発-----	4
	諫田 泰成	
	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-----	12
	山崎 大樹	
	生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発-----	32
	吉田 祥子	
	幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発-----	40
	上野 晋	
	既存の毒性データおよびヒトデータとの検証-----	56
	秦 健一郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	60
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	61

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。

本年度は、ヒトiPS細胞（神経発達のモデル細胞）を用いて、化学物質のcase studyとして、ゼブラフィッシュで発生毒性が懸念されている銀ナノ粒子の検証を行った。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データの相関を明らかにするとともに、DoHaDコンセプトに基づいて、バルプロ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などが進行中である。今後は、日本としてヒトiPS細胞などの手法に関してOECDと議論を進めて、インビトロ発達神経毒性評価ガイダンスに貢献する必要がある。

< 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ダンス案の議論が開始された。日本からiPS細胞や動物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

【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。本年度はcase studyとして、ゼブラフィッシュで発生毒性が知られている銀ナノ粒子を評価した。その結果、銀ナノ粒子の暴露により、iPS細胞における以上の結果から、ヒトiPS細胞におけるATP産生と分化能が抑制されることを見出した。従って、

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バルプロ酸、クロルピリホスを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、発達神経毒性の懸念がある1BP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in vitro 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。ガイダンス案ではヒト 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る、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、メチル化情報の解析を行った。

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 評価系を構築した。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。

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

ヒト幹細胞の分化による評価法の開発

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
諫田 泰成

要旨

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質や医薬品の影響評価に関する指標の最適化を行ったその結果、遅発性神経毒性が懸念される農薬クロルピリホスや防汚剤トリブチルスズ曝露により、ヒト iPS 細胞において ATP 産生や神経分化の抑制が認められた。そこで、多数の化学物質を用いて大規模検証試験を実施したところ、ATP により懸念のある化学物質をスクリーニングできる可能性を見出している。以上より、ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能を指標にして、化学物質や医薬品の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因の一つとして環境中の化学物質の暴露の可能性が考えられる。ヒト iPS 細胞はヒト発生過程を in vitro で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できる可能性が考えられる。しかし、評価系としての手法は確立されていない。

本研究では、医薬品を含む化学物質の発達期における毒性を評価するために、ヒト iPS 細胞を用いて発達神経毒性を評価できるか検討を行った。特に、case study として近年毒性が懸念されているナノマテリアル(銀ナノ粒子, AgNPs) を追加して評価を行った。

本年度は、ヒト iPS 細胞における毒性メカニズムの検討を行い、毒性評価における有用性を検証した。また、HESI NeuTox のメンバーとなり、国際検証試験に取り組んだ。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー条件で培養した。

2. ミトコンドリアの形態

細胞を 4%FFA で固定後、ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos および核を DAPI により染色し、confocal 顕微鏡 (Nikon A1) で観察した。点状のミトコンドリアが 10%未

満の細胞数を計測した。

3. ATP 量

ルシフェラーゼ法により計測した。

4. qPCR

TRIzol 試薬を用いて RNA を抽出した。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

5. 神経分化

Dual smad 阻害法を用いて、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 により iPS 細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞へと分化させた。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する化学物質の作用

発達神経毒性が懸念される 40 種類の化学物質を用いて iPS 細胞のミトコンドリアへの影響を検討した。その結果、iPS 細胞の ATP 量だけでも 7 割の化合物の毒性を検出できることを見出した。一方、陰性対照のソルビトールやアスコルビン酸では陰性にカテゴリー化された。したがって、iPS 細胞のミトコンドリア機能異常は良い評価指標になることが示唆された。

2. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する AgNP の作用

発達神経毒性が懸念される AgNP を用いて iPS 細胞への影響を検討した。AgNP 曝露

は細胞内 ATP 含量の低下、ミトコンドリア膜電位の低下およびミトコンドリア形態異常を引き起こした(図1)。したがって、iPS細胞において AgNP はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが示唆された。

次に、ミトコンドリアの形態制御因子の発現について検討した。分裂因子(Drp1, Fis1) および融合因子(Mfn1, Mfn2, Opa1) の遺伝子発現には影響がなかった(図2A)。一方で、AgNP 暴露によって Mfn1 のタンパク分解が誘導されることを見出した(図2B, C)。すでに報告したように shRNA を用いて Mfn1 をノックダウンするとミトコンドリア形態異常が観察されることから、AgNP によるミトコンドリア機能の低下はミトコンドリア融合タンパク質の分解によって誘導されることが示唆された。

3. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する AgNP の作用

AgNP が iPS 細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、Dual smad 阻害法を用いて、iPS 細胞の神経分化誘導を行った。AgNP 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、神経外胚葉のマーカーである OTX2, PAX6 (Manuel et al., *Front. Cell Neurosci.*, 2015), FOXG1 (Shen et al., *Hippocampus*, 2006) や神経前駆細胞のマーカーである Nestin (Hendrickson et al., *PLoS One*, 2011) の発現低下が認められた(図3)。したがって、AgNP は iPS 細胞の初期の神経分化誘導を阻害することが明らかとなった。

我々はこれまでに Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞を用いて、神経分化誘導を行った結果、OTX2, PAX6, FOXG1, Nestin の発現が低下することを見出している。したがって、AgNP による神経分化の阻害は、Mfn1 分解を介したミトコンドリア機能異常により引き起こされると考えられる。

4. AgNP の神経分化阻害における Erk シグナルの関与

ミトコンドリア機能の破綻は Erk のリン酸化を引き起こすことが報告されている(Yu et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012)。一方、Erk のリン酸化によって OTX2 の発現が抑制され神経分化が阻害されるという報告もある(Greber et al., *EMBO J.*, 2011)。したがって、AgNP による神経分化阻害の経路として Erk シグナルの関与が考えられる。まず AgNP の

作用に対する Erk シグナルの関与を調べるために、ヒト iPS 細胞に AgNP を曝露した結果、Erk のリン酸化レベルの亢進が認められた。またこのリン酸化は Erk 阻害剤 U0126 処理により消失した(図4A, B)。さらに AgNP 曝露による OTX2 の低下は U0126 処理により回復した(図4C)。

我々はこれまでに Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞において Erk のリン酸化を調べた結果、Erk リン酸化レベルの亢進を見出している。またこのリン酸化は U0126 処理で消失し、Mfn1 ノックダウンによる OTX2 経路の低下は U0126 処理により回復することも見出している。したがって、AgNP によるミトコンドリア機能異常を介した神経分化の阻害は Erk シグナルが関与していることが示唆された(図5)。

以上より、iPS 細胞において TBT と同様に、AgNP はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが明らかになった。また、iPS 細胞で ATP 量、ミトコンドリア膜電位・形態さらには神経分化といった指標を用いることにより、発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、これまで見出した指標により発達神経毒性が懸念される化学物質の検証試験を実施した。その結果、ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能により発達神経毒性の懸念のある化合物を評価できることを明らかにした。神経分化能に関しても、今後化学物質の数を増やして、検証する必要がある。

また、ヒト iPS 細胞を用いて、ゼブラフィッシュで発生毒性が認められる銀ナノマテリアルを評価したところ、ATP 産生の低下を見出した(論文1)。発達神経毒性が懸念される抗がん剤 5-フルオロウラシルでも同様の事象が認められることから(論文3) 化合物の毒性評価においてミトコンドリアの機能異常は有効であり幅広く応用できる可能性が期待される。

また、諫田は OECD DNT 専門委員として 2018 年 3 月以降に電話会議に参加している。また、HESI NeuTox の運営委員としても議論を行っており、in vivo と in vitro の相関やヒトにおける予測性をどのように考えるのか議論している。これらの国際連携を取りなが

ら、iPS 細胞などの有用性や適用限界などを明らかにする必要がある。さらに、QSAR などとの組み合わせを議論することにより、さらに予測性の高い試験法に発展できることが期待され、引き続き OECD で議論を深める予定である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能や分化を指標に、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Nomura Y, Yoshida S, Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 8, 12155 (2018).
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells. *J Toxicol Sci*. 43, 727-734 (2018).
- [4] 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).
- [5] 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)
- [6] 佐塚文乃, 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞を用いた医薬品の副作用予測法の開発と国際標準化, 情報技術強会 (印刷中)

2. 学会発表

- [1] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda, Y.: Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPS cells, 18th

World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 京都 (2018.7)

- [2] 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づく発達神経毒性の評価, 第 4 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, 東京 (2018.9)
- [3] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda Y.: Assessment of neurotoxicity of silver nanoparticles using human iPS cell-based platform, Safety Pharmacology Society 2018, ワシントン DC (2018.10)
- [4] Yamazaki, D., Yamada, S., Kanda, Y.: Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 広州 (2018.10)
- [5] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda, Y.: Silver nanoparticles inhibit neural induction via mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells, Society for Neuroscience, サンディエゴ (2018.11)
- [6] 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞の神経分化に対する銀ナノ粒子曝露の影響, メタルバイオサイエンス研究会, 仙台 (2018.11)
- [7] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術による新たなインビトロ神経毒性試験法の開発と国際動向, 第 92 回日本薬理学会, 大阪 (2019.3)
- [8] 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価, 第 92 回日本薬理学会, 大阪 (2019.3) など。

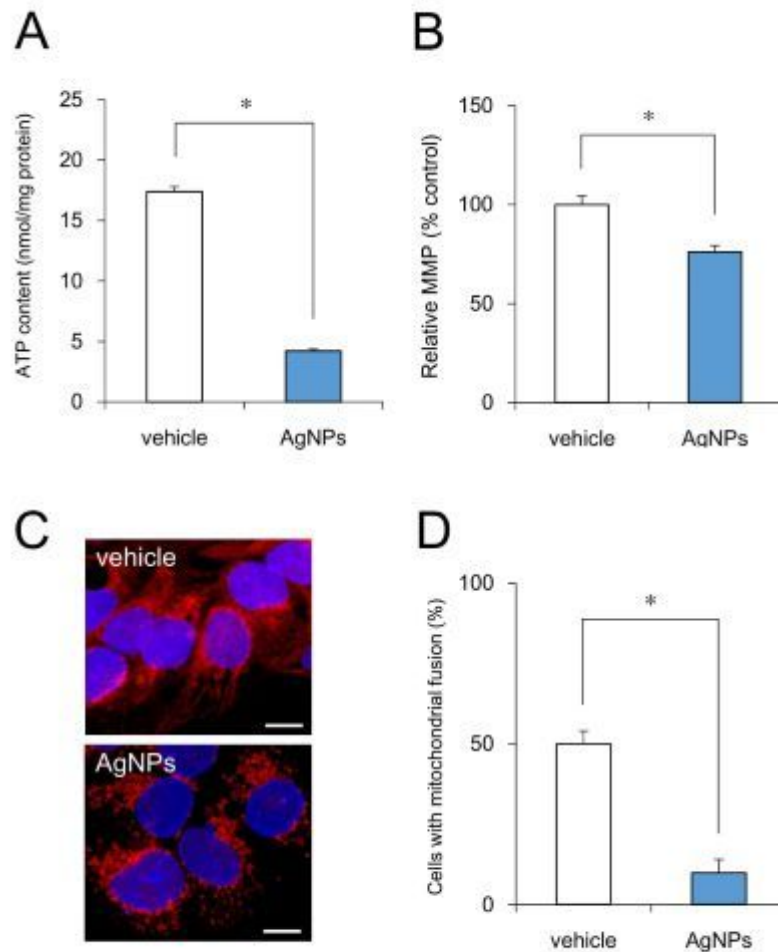


図1 AgNPによるミトコンドリアの機能異常

- A) ヒト iPS 細胞において、AgNP (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の暴露によって ATP 産生低下が認められた。
- B) ヒト iPS 細胞において、AgNP の暴露によってミトコンドリア膜電位の低下が認められた。
- C) ヒト iPS 細胞において、AgNP の暴露によってミトコンドリアの分裂が誘導された。
- D) C)の結果を定量的に評価した。

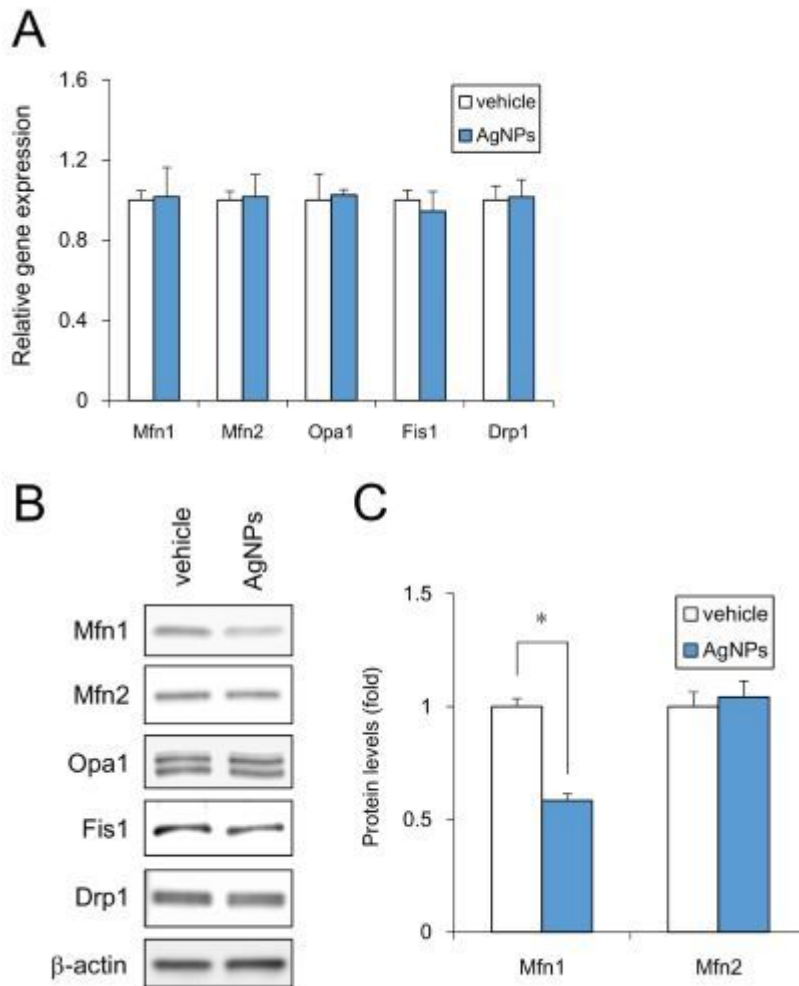


図2 AgNPによるMfn1の分解

A) 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の AgNP を曝露したヒト iPS 細胞から RNA を抽出し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 遺伝子の qPCR を行った。

B) 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の AgNP を曝露したヒト iPS 細胞から cell lysate を作成し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 蛋白質の発現をウエスタン法によって調べた。

C) B) の Mfn1、Mfn2 蛋白質の発現を定量的に評価した。

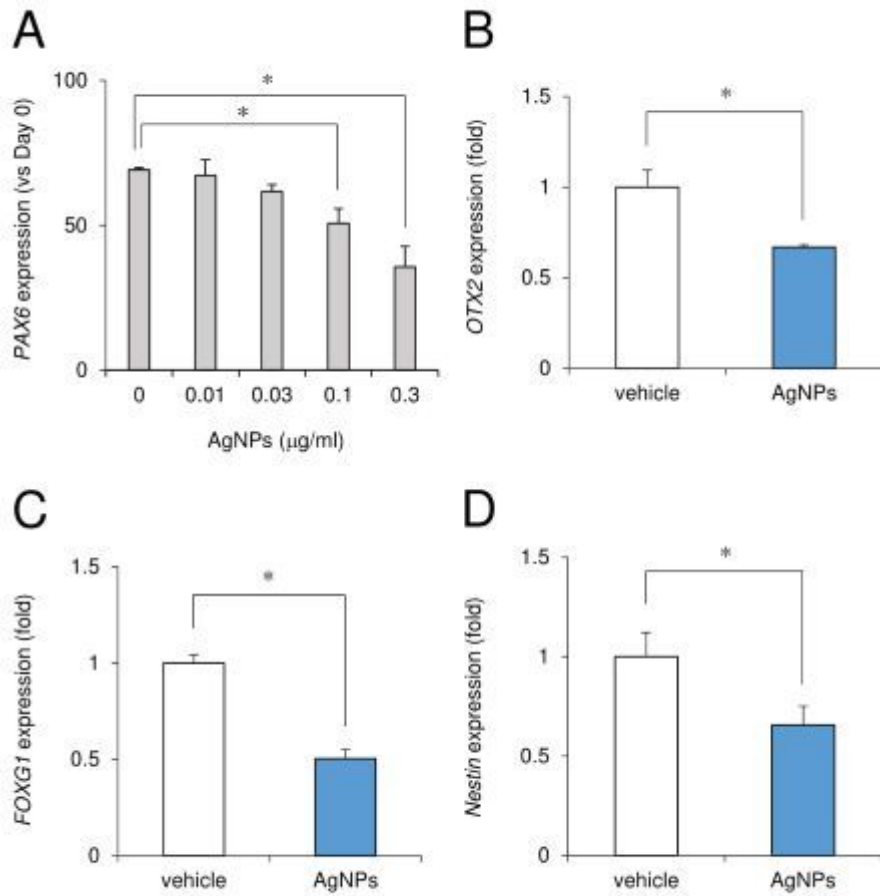


図3 CPFによる神経分化誘導の阻害

0.3 $\mu\text{g/ml}$ の AgNP を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化刺激を与えた後、タイムコースをとって神経分化マーカーの遺伝子発現を qPCR で調べた。

- A) 神経外胚葉マーカー-PAX6 遺伝子の発現変化
- B) 神経外胚葉マーカー-OTX2 遺伝子の発現変化
- C) 神経外胚葉マーカー-FOXG1 遺伝子の発現変化
- D) 神経前駆細胞マーカー-Nestin 遺伝子の発現変化

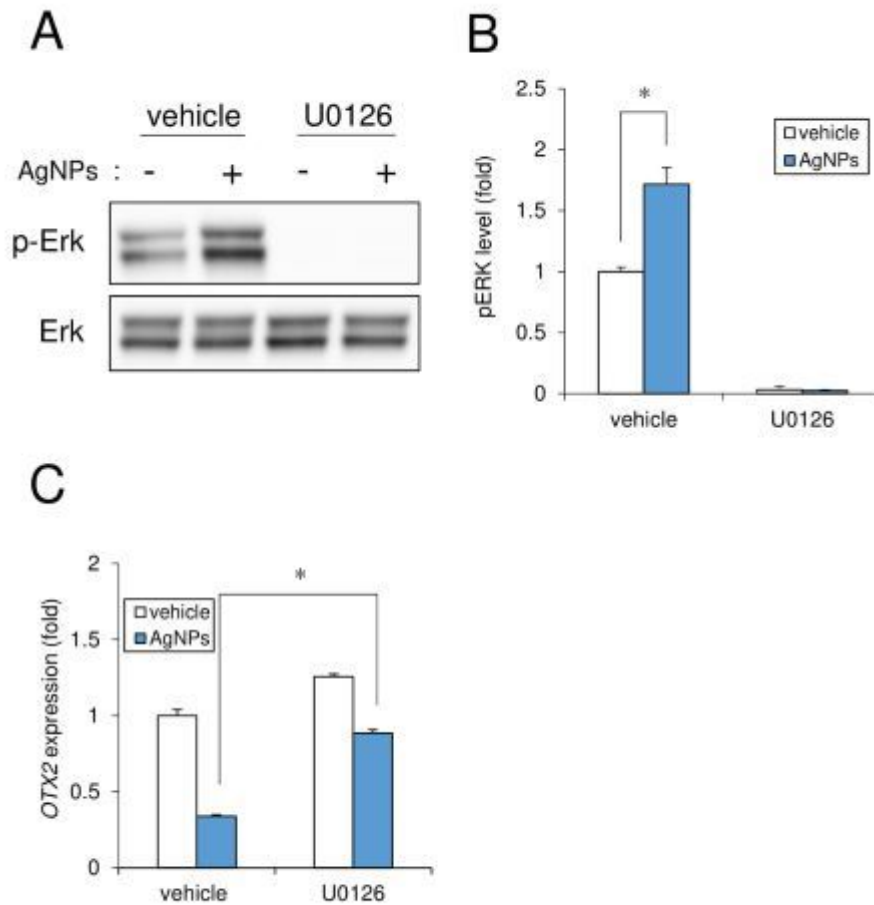


図4 AgNPの神経誘導阻害におけるErkシグナルの関与

A) 0.3 μg/mlのAgNPを曝露したヒトiPS細胞からcell lysateを作成し、Erkのリン酸化レベルをウエスタン法によって調べた結果、Erkリン酸化の亢進が認められた。このリン酸化レベルの亢進はErk阻害剤であるU0126処理により消失した。

B) A)の結果を定量的に評価した。

C)ヒトiPS細胞の神経分化誘導において、AgNP曝露によるOTX2の発現低下は、U0126処理により回復した。

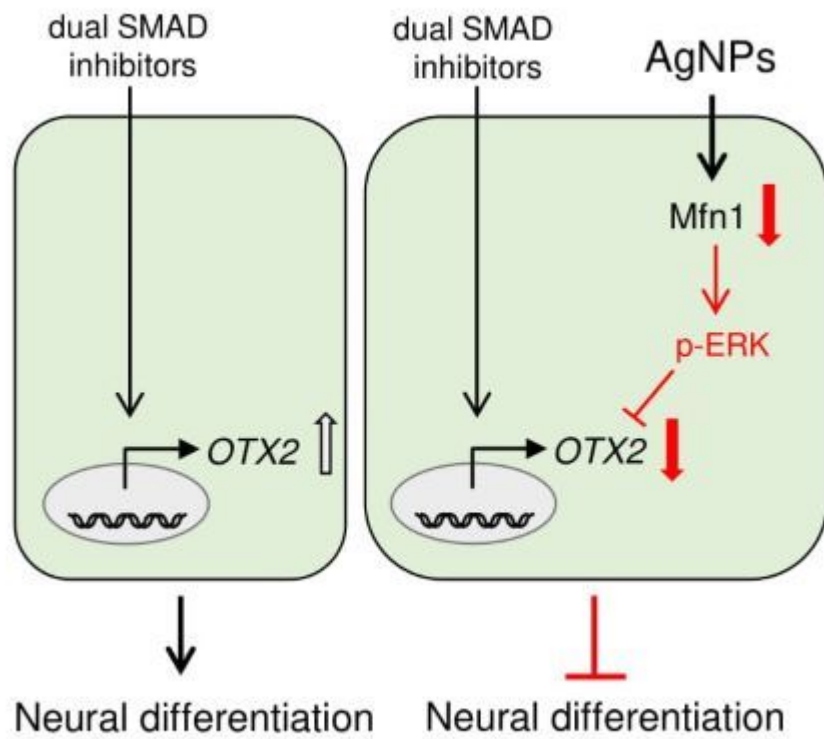


図5 AgNPの神経分化阻害作用(模式図)

平成 30 年度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

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

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第二室長 山崎 大樹

要旨

本研究では、ラット大脳皮質神経細胞を用いて HESI NeuTox 多点電極サブチームで計画されたバリデーション試験を実施した。昨年度、培養・測定条件について最適化を行っており、最終化した条件にて HESI NeuTox 多点電極サブチームで定められた陰性対照化合物を含む 12 化合物について多点電極システムを用いた評価を行った。これら 12 化合物は大きくわけて 3 種類の異なる作用点を有するものが含まれており、作用点の違いによる応答性の違いを明らかにするため、10 種類の解析パラメーターについて、化合物・濃度ごとに化合物の投与前後の変化量を算出しヒートマップとしてまとめた。今後、ヒトやラットに関する既存の同一化合物データとの比較を行い、多点電極データの妥当性の検証やスループロット性の高い化学物質リスク予測法の開発へと繋げることが期待される。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因の一つとして発達期における化学物質の暴露の可能性が考えられる。発達神経毒性を評価する現在のガイドライン(OECD および EPA)は、妊娠ラットを用いた複雑な試験系であり、試験期間が 1 年以上、動物数も 700 以上にも及び経費も膨大であるため、これまでにわずかな化学物質しか評価できていない。そこで本研究では、スループロット性および再現性の高いラット神経細胞を用いた多点電極システム法による評価系の構築を目指した。今年度は、特に作用点の異なる化合物による多点電極パラメーターの応答性を把握するために、HESI NeuTox のバリデーション試験で定められた 12 種類の化合物に関して評価を行った。

B. 研究方法

1. 細胞

細胞はラット大脳皮質神経細胞(Lonza)を用いた。使用前は液体窒素内で保管し、播種の際には液体窒素から取り出し、37℃の温浴にて 3 分間インキュベートして溶解した。

2. 多点電極システム法による神経活動計測

多点電極システムとして Maestro (Axion Biosystems 社)を用いて、神経活動を計測した。細胞播種前日までに Maestro 用 48 ウェルプレートに 0.1% ポリエチレンイミン (PEI) (0.1% PEI in 0.1 M Boric acid buffer solution (pH 8.5) でコーティングした。0.1% PEI 溶液を各ウェルに 100 μ l ずつ添加後 CO₂ インキュベーター内に 1 時間静置した後、滅菌水で 3 回リンスし、クリーンベンチ内で 1 時間乾燥させた。乾燥後、フタをしてアルミホイルで遮光し、4℃に保管した。過去の検討により、PEI コート後 1 週間以上経過すると、神経活動の抑制が観察されたことから、PEI コートしたプレートは 1 週間以内に使用した。細胞を解凍後、20 μ g/ml

ラミンを含む播種培地(10 μ l)にて 120,000 細胞/ウェルで電極上に播種した。播種 2 時間後に、5% ウシ血清含有の培養培地 (Neurobasal-A + B-27) を添加した。培養 5 日目からは 5% ウシ血清不含の培地で培養を行った。培養は 19 あるいは 20 日目まで行い、定期的(2~3 日おき)に培地交換および多点電極システムによる測定を行った。また、培養 19 あるいは 20 日後に、化合物を各 5 濃度ずつ添加し、その投与前後の神経活動データを取得した。投与前後の記録時間は 15 分間、化合物曝露時間は 1 時間とした。なお、活性化電極(1 分間に 5 スパイク以上観察された電極)が半数の 8 個以上存在するウェルに 1 ウェルあたり 1 濃度で化合物を添加した。

3. 化合物

HESI NeuTox 多点電極サブチームで定められた 12 化合物(ペンチレンテトラゾール、ピクロトキシン、ストリキニーネ、ピロカルピン、クロルプロマジン、アモキサピン、エノキサシン、フェニトイン、リノピリジン、4-アミノピリジン、アモキシシリン及びアセトアミノフェン)について評価を行った。各化合物の濃度および作用点については表 1 を参照のこと。

4. 解析

下記の 10 パラメーターについて解析を行った。1. 1 電極における 1 分間あたりのスパイク発生頻度(MFR: Mean firing rate)、2. バースト頻度(1 電極における 1 分間あたりのバースト発生頻度)、3. バーストの持続時間、4. バースト中に存在するスパイク数、5. バースト中のスパイク間隔の中央値、6. 同期バースト頻度(単位時間あたりのバースト頻度)、7. 同期バーストの持続時間、8. 同期バースト中に存在

するスパイク数、9. 同期バースト間隔のバラつき、10. シンクロ指標。各パラメーターの説明については、図 1 に図示した。

C. 研究結果

HESI NeuTox 多点電極サブチームにおけるバリデーション試験

HESI NeuTox 多点電極サブチームのバリデーション試験について、最適化された条件にて凍結ラット大脳皮質神経細胞を培養し、培養 19 あるいは 20 日後に上記 12 化合物を添加し、投与前後の 10 パラメーターの変化率を算出した(図 2 - 13)。また、これらの結果を一見できるようにヒートマップにまとめた(図 14)。GABA_A 受容体を阻害し、Cl⁻透過性を抑制させるペンチレンテトラゾールは、高濃度でも 10 パラメーターについては大きな変化がなかった一方で、同じ作用点を有するピクロトキシンは、バースト持続時間や同期バーストの持続時間、同期バースト中に存在するスパイク数といったパラメーターについて、増加が観察された。また、ドパミン D2 受容体を抑制し、K⁺チャネルを抑制させるクロルプロマジンは高濃度で各パラメーターの減少が観察された。しかし、同じ作用点を有するエノキサシンは変化率が増加するパラメーターが多かった。ピロカルピンとアモキサピンについては、最終的にカテコラミン濃度上昇作用を示すが、逆の反応性を示すパラメーターが多かった。一方で、フェニトイン、4-アミノピリジン、アモキシシリンは 10 パラメーターではほとんど変化がなかった。陰性対照化合物であるアセトアミノフェンについても 10 パラメーターで変化はほとんどなかった。

D. 考察

本研究では、多点電極システムおよびラット大脳皮質神経細胞を用いて、HESI NeuTox 多点電極サブチームのバリデーション試験で定められ多作用点の異なる 12 化合物について評価を行った。同一の作用点ながら異なる反応性を示したり、異なる作用点にもかかわらず同じような反応性を示したりするなど、一定の見解を得ることはできなかった。今後、より多くの化合物について評価を行っていく必要があると思われる。

E. 結論

今回、化合物の作用点から神経活動への影響について反応性を元に議論を行うべく 12 種類の化合物について評価を行った。しかしながら一定の見解を得ることができなかった。12 種類という限られた数では不十分であることが考えられるため、より多くの化合物について評価を行っていくことが求められる。さらに、得られた結果を in vivo あるいは ex vivo のヒトおよびラットから得られた既存の同一化合物データと比較を行い、多点電極データの妥当性の検証や、スループロット性の高い化学物質リスク予測法の開発につなげることが期待される (図 15)。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y,

Nomura Y, Yoshida S, Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 8, 12155 (2018).

- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells. *J Toxicol Sci*. 43, 727-734 (2018).

2. 学会発表

- [1] YamadaS, Yamazaki D, Kanda Y : Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPS cells, WCP, 2018/7/1-5 (京都、日本)
- [2] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づく発達神経毒性の評価、第 4 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、2018/9/15 (東京)
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Assessment of neurotoxicity of silver nanoparticles using human iPS cell-based platform, Safety Pharmacology Society 2018, 2018/10/1-3 (ワシントン DC、米国)
- [4] Yamazaki D, Yamada S, Kanda Y. Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 2018/10/10-12 (広州、中国)
- [5] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y: Silver nanoparticles inhibit neural induction via mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells, Society for Neuroscience, 2018/11/2-8 (サンディエゴ、米国)

[6] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化に対する銀ナノ粒子曝露の影響、メタルバイオサイエンス研究会、2018/11/17（仙台）

2019/3/16（大阪）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

[7] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価、第 92 回日本薬理学会、

表 1 化合物情報一覧

	化合物名	作用機序		予想される興奮性の反応	薬効	化合物の位置付
1	ペンチレンテトラゾール	GABAA受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	Positive control (興奮性上昇)
2	ピクロトキシン	GABAA受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	Positive control (興奮性上昇)
3	ストリキニーネ	グリシン受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	被験物質
4	ピロカルピン	ムスカリンM3 受容体作動薬	細胞内Ca濃度上昇(興奮性神経) →神経伝達物質遊離上昇	↑	緑内障治療	被験物質
5	クロルプロマジン	D2(Giカップル) 受容体阻害	K ⁺ チャンネル抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	抗精神病薬	被験物質
6	アモキサピン	MAO取り込み 阻害	シナプスにおける カテコールアミン濃度上昇	↑	抗うつ薬	被験物質
7	エノキサシン	D2(Giカップル) 受容体阻害	K ⁺ チャンネル抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	抗精神病薬	被験物質
8	フェニトイン	電位依存性Na ⁺ チャンネル阻害	脱分極抑制	↓	抗てんかん薬	Positive control (興奮性下降)
9	リノピリジン	KCNQ2/3阻害薬	脱分極	↑	—	被験物質
10	4-アミノピリジン	非選択的 K ⁺ チャンネル阻害	脱分極	↑	—	被験物質
11	アモキシシリン	β ラクタマーゼ 不可逆的結合	—	↑	抗生物質	被験物質
12	アセトアミノフェン	Cox-2阻害	—	→	解熱鎮痛	Negative Control

1. Mean Firing Rate (単位時間あたりのスパイク数)

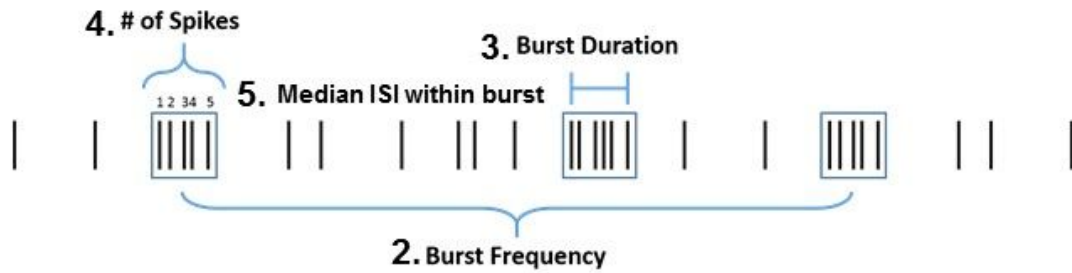


2. バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

3. バーストの持続時間

4. バースト中に存在するスパイクの数

5. バースト中のスパイク間隔の中央値



6. 同期バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

7. 同期バーストの持続時間

8. 同期バースト中に存在するスパイクの数

9. 同期バースト間隔のバラつき

10. シンクロ指標

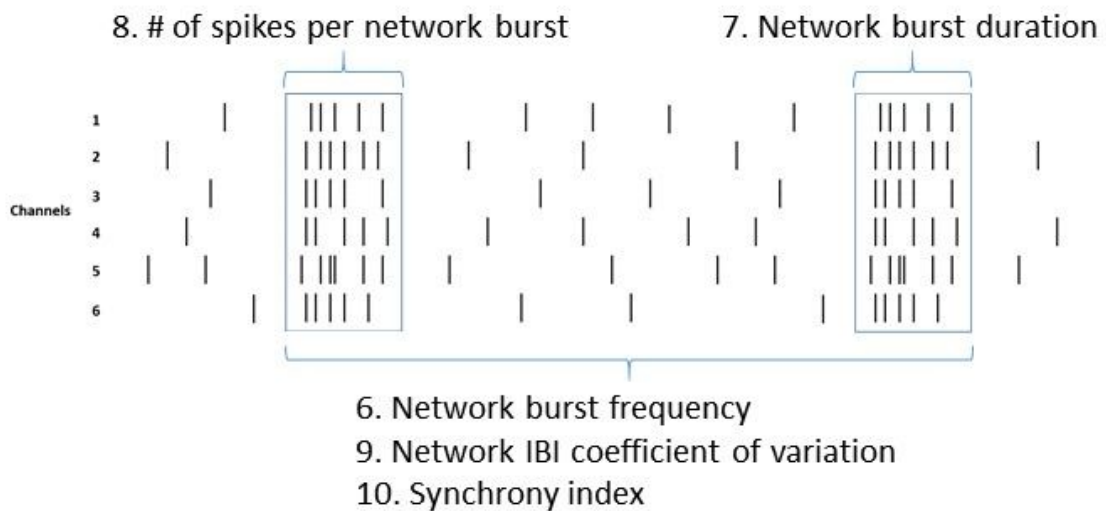


図1 各パラメーターについての説明

解析した10パラメーターについて、具体的なパラメーター内容を図示した。

1. ペンチレンテトラゾール

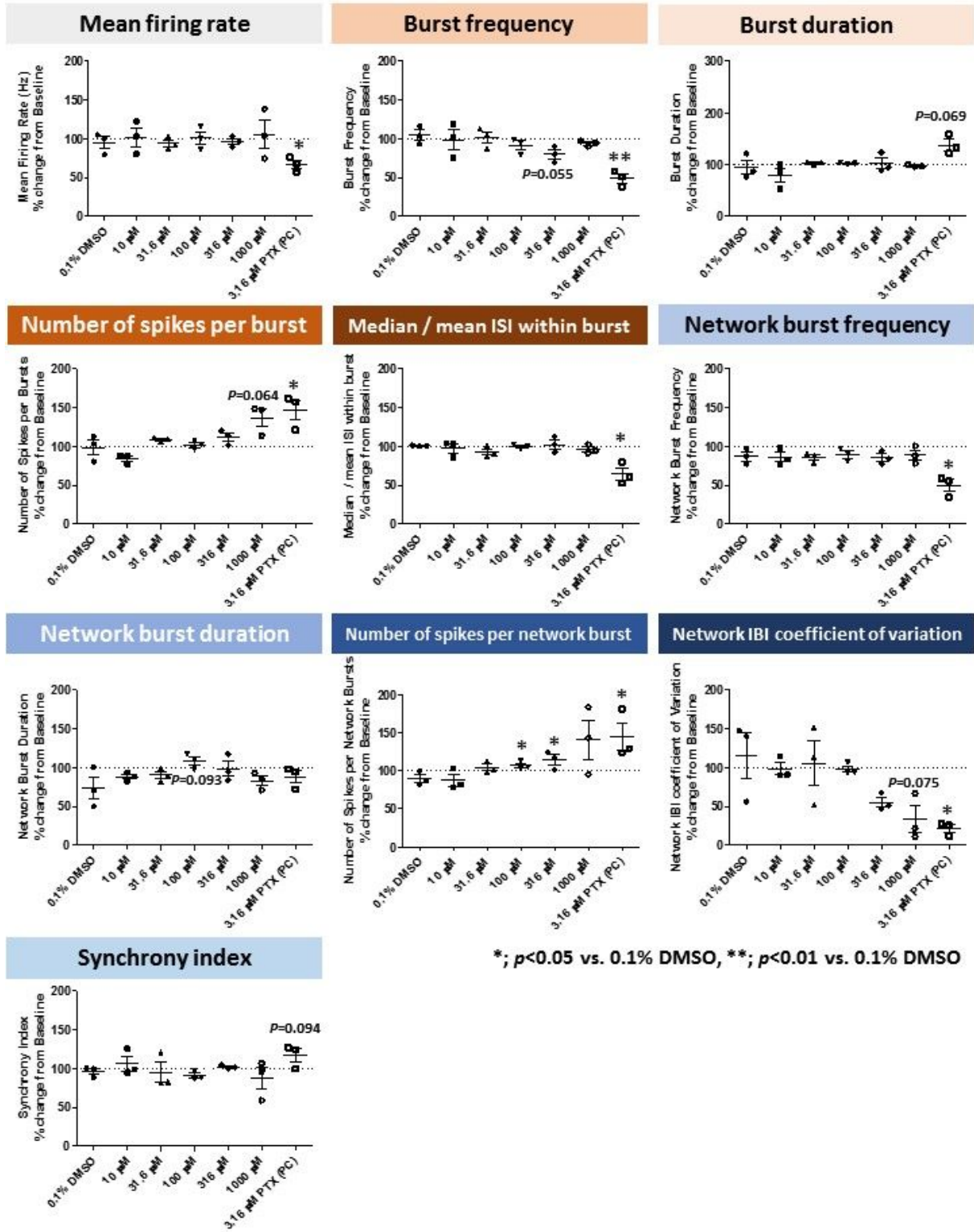


図2 ペンチレンテトラゾール

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μ M ピクروتキシン (PTX) 10-1000 μ M ペンチレンテトラゾールの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

2. ピクروتキシン

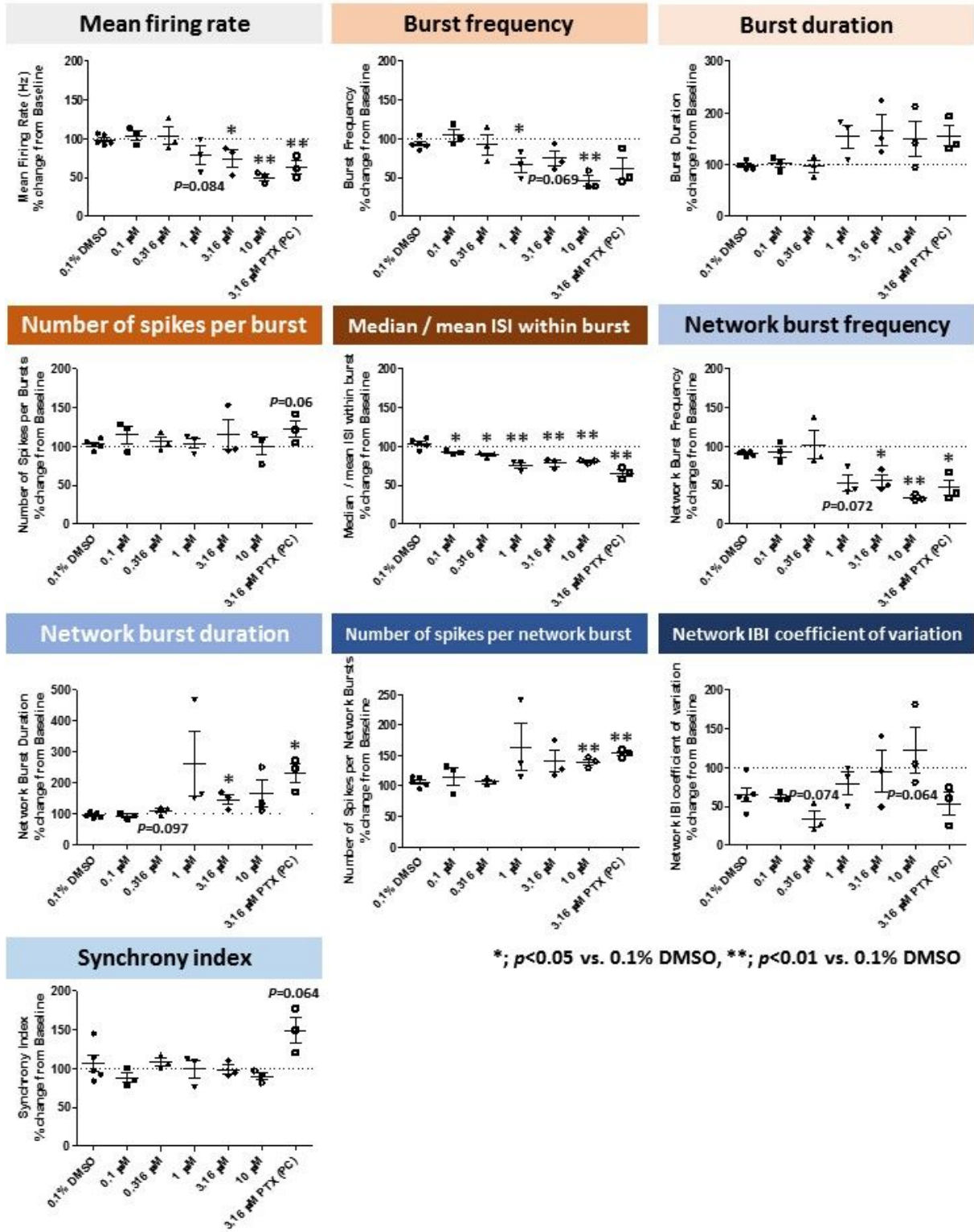


図3 ピクروتキシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.1-10 μM ピクروتキシンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

3. ストリキニーネ

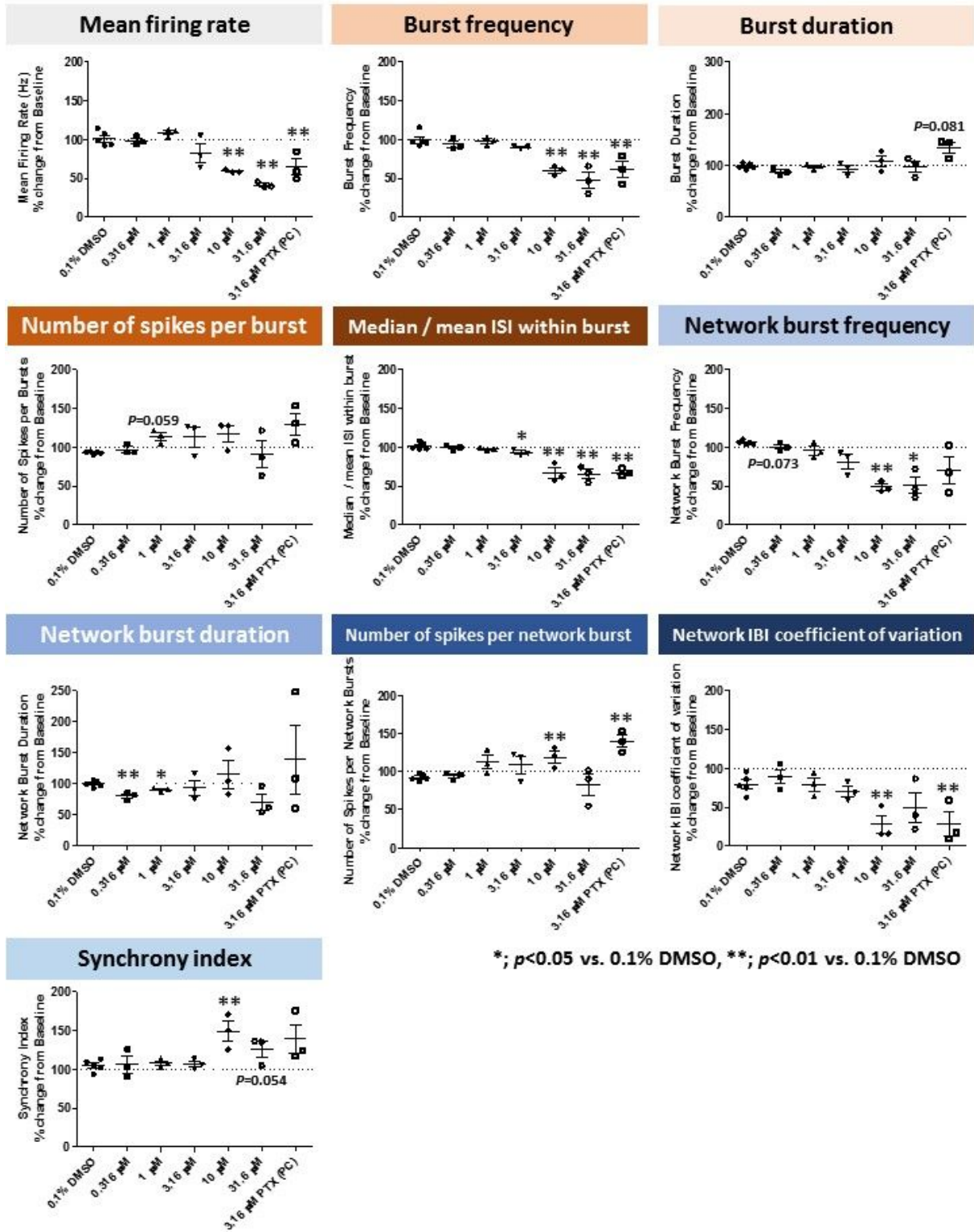


図4 ストリキニーネ

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.316-31.6 μM ストリキニーネの投与前の値を 100%に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 ± 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

4. ピロカルピン

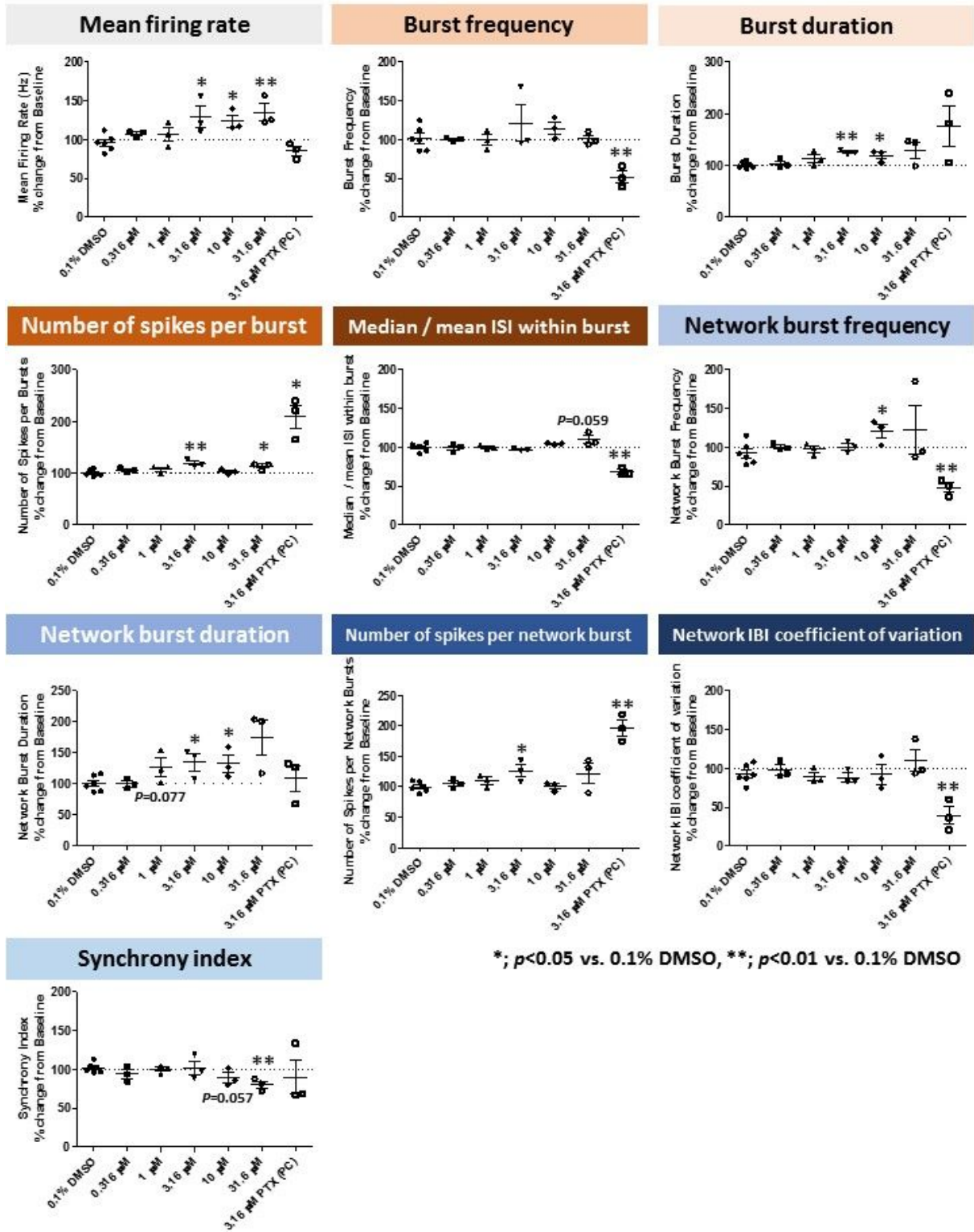


図5 ピロカルピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 0.316-31.6 μM ピロカルピンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

5. クロルプロマジン

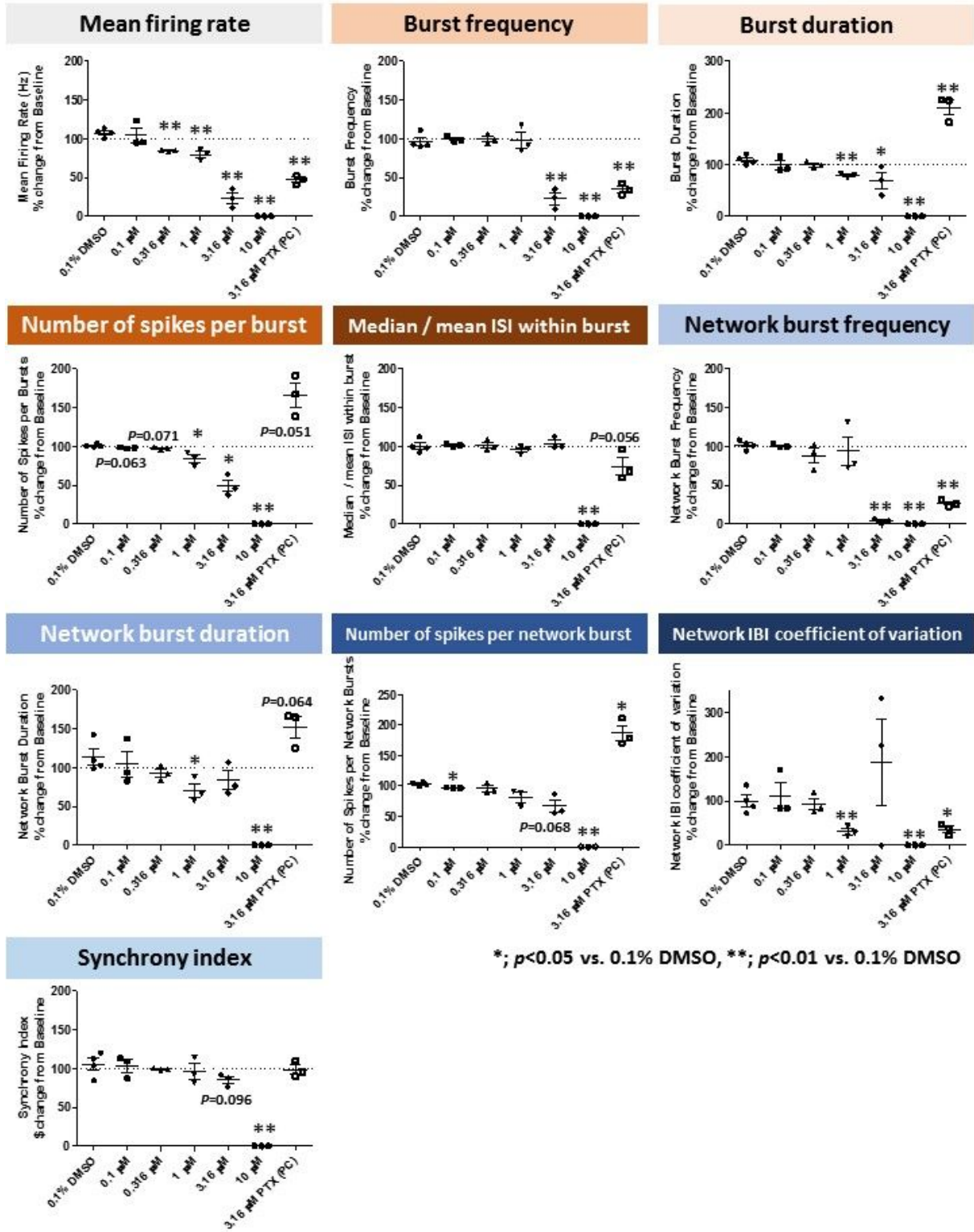


図6 クロルプロマジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシン (PTX)、0.1-10 μM クロルプロマジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

6. アモキサピン

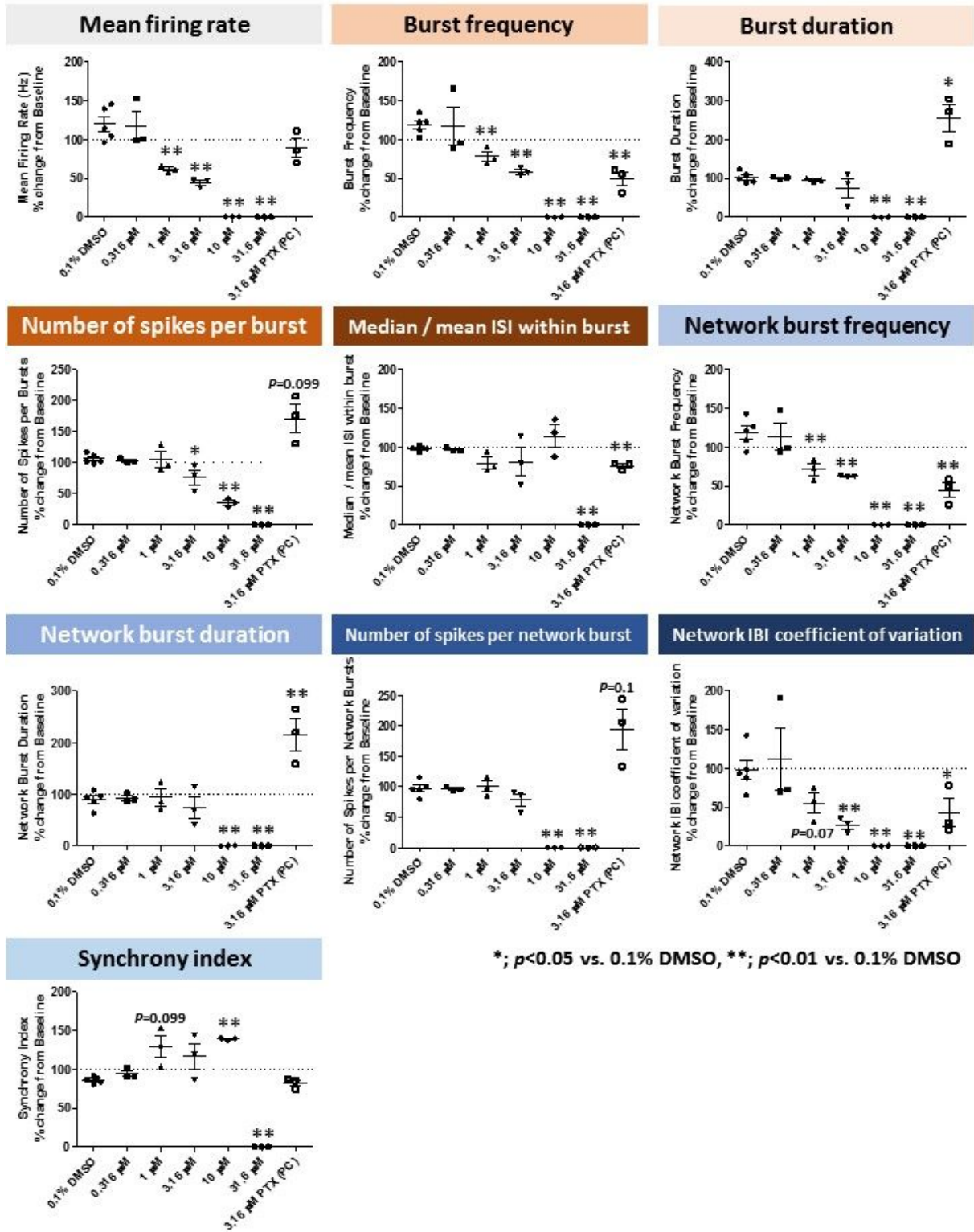
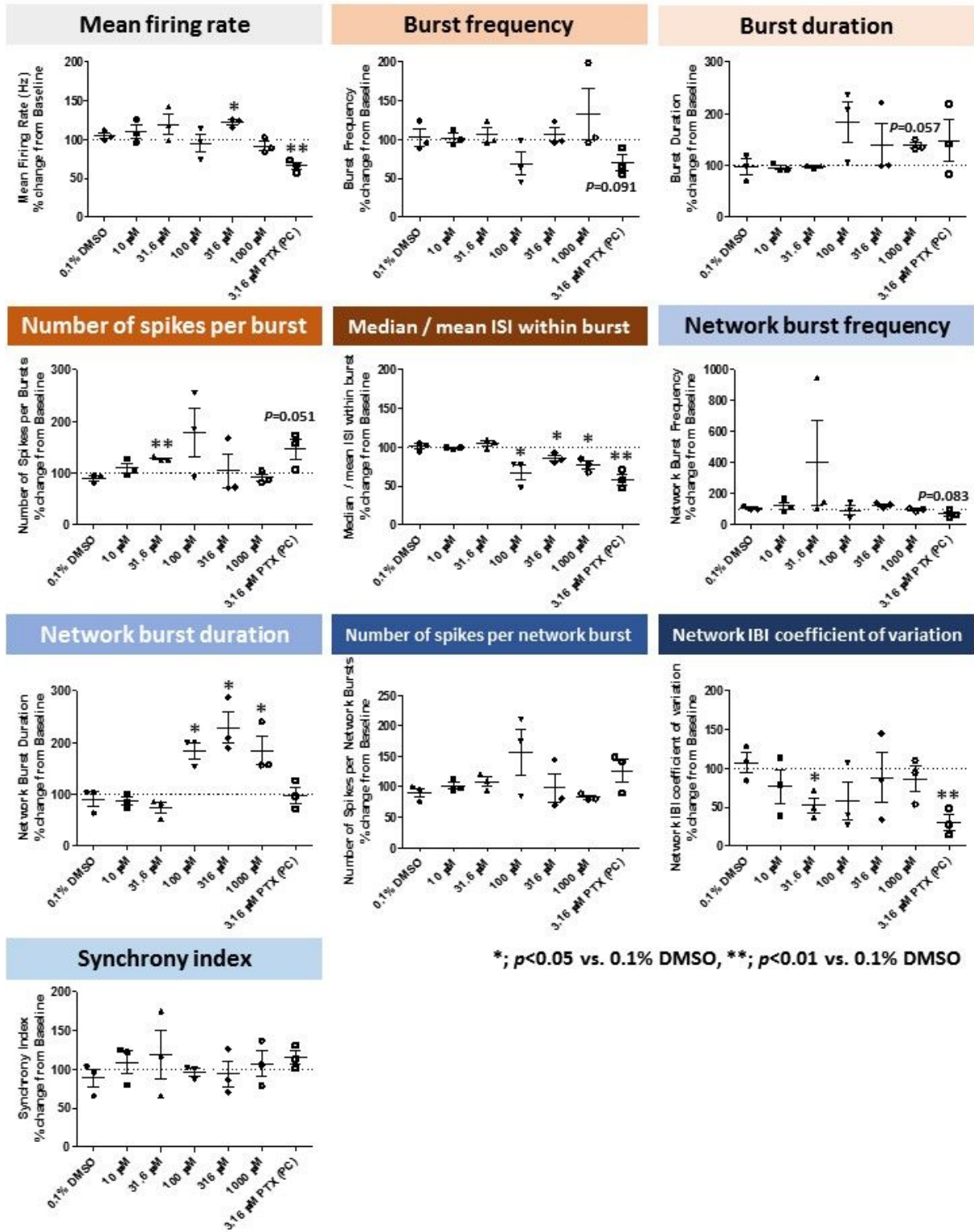


図7 アモキサピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.316-31.6 μM アモキサピンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

7. エノキサシン

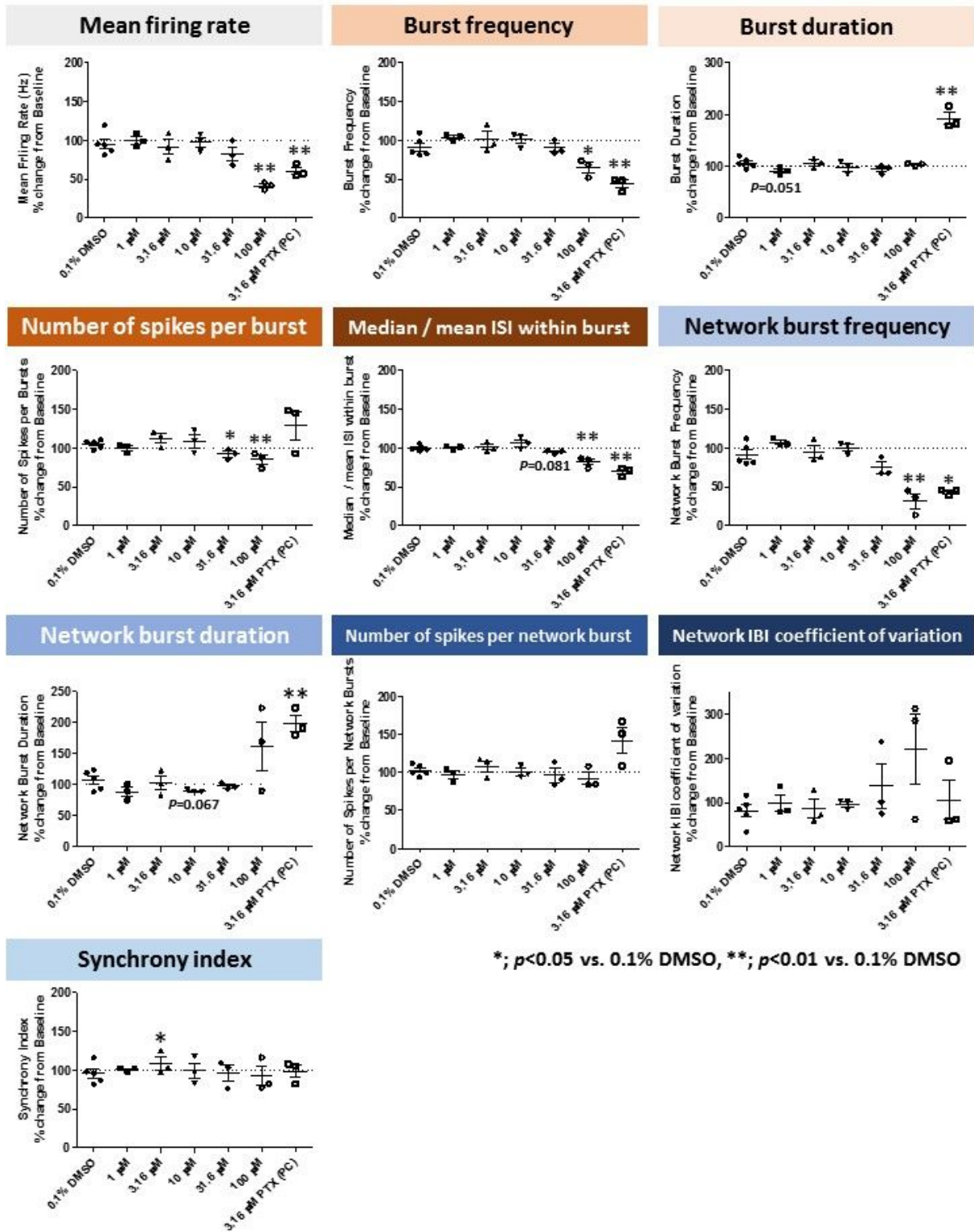


*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図8 エノキサシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 10-1000 μM エノキサシンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

8. フェニトイン



*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図9 フェニトイン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX), 1-100 μM フェニトインの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

9. リノピリジン

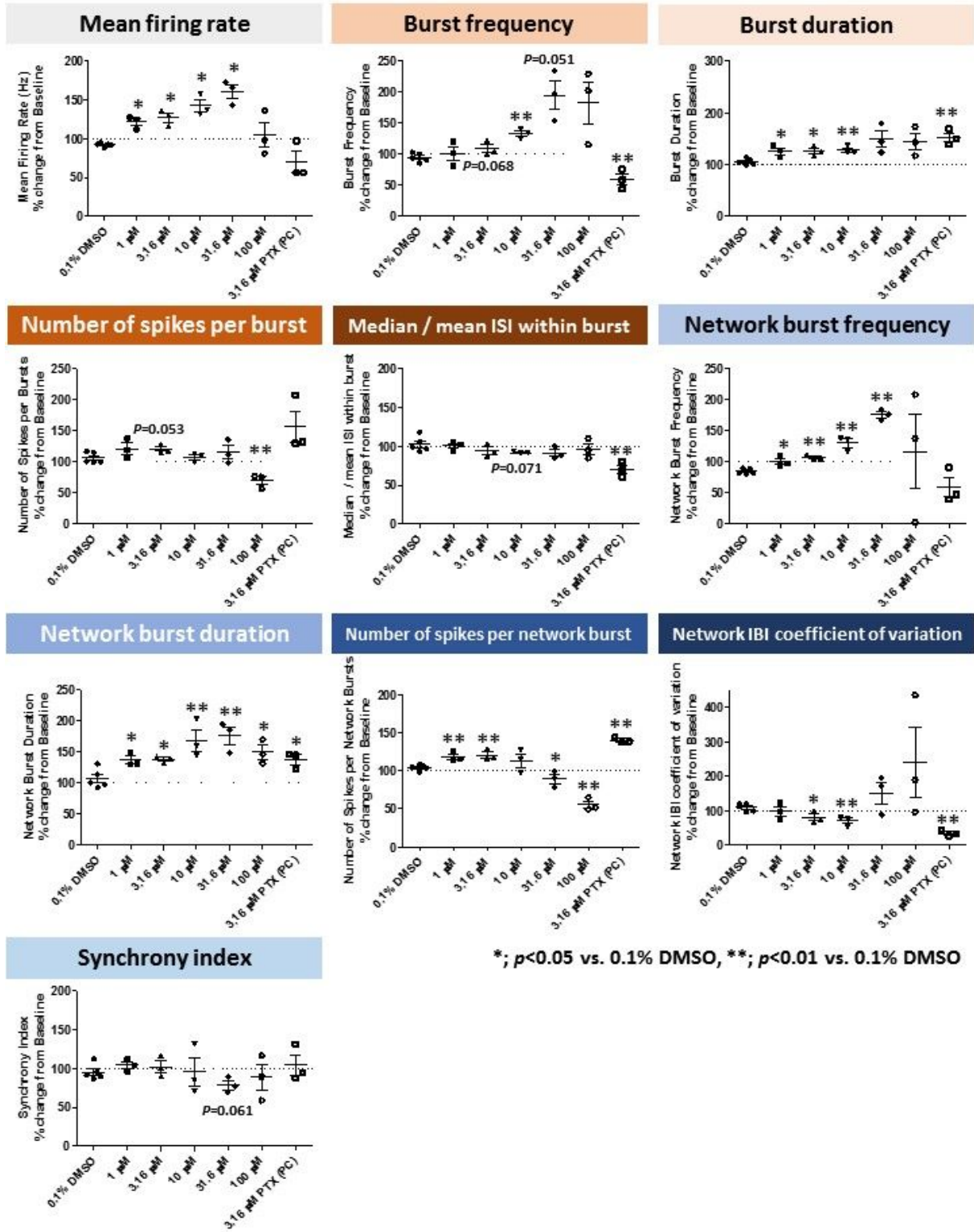


図 10 リノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 1-100 μM リノピリジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

10. 4-アミノピリジン

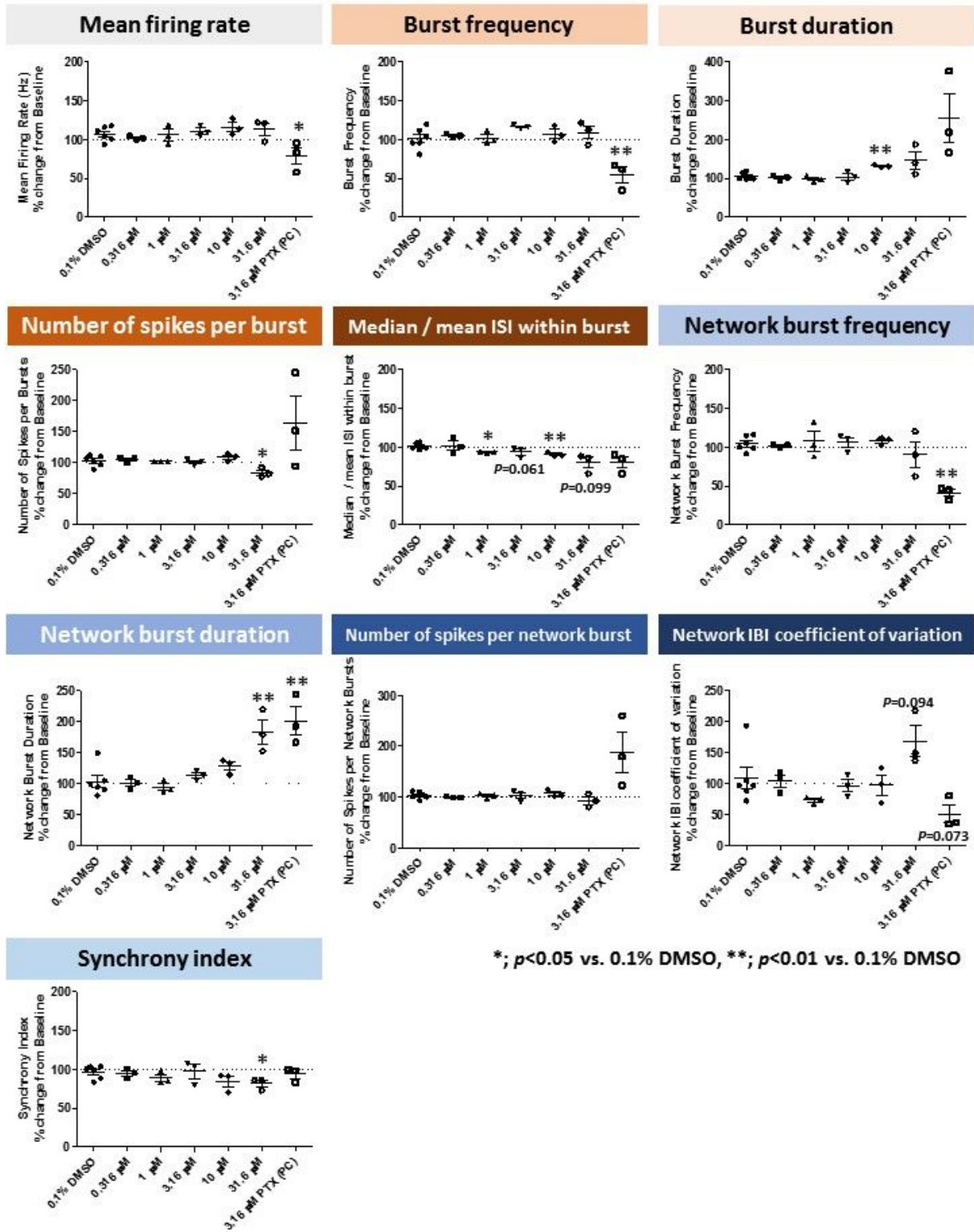


図 11 4-アミノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.316-31.6 μM 4-アミノピリジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

11. アモキシシリン

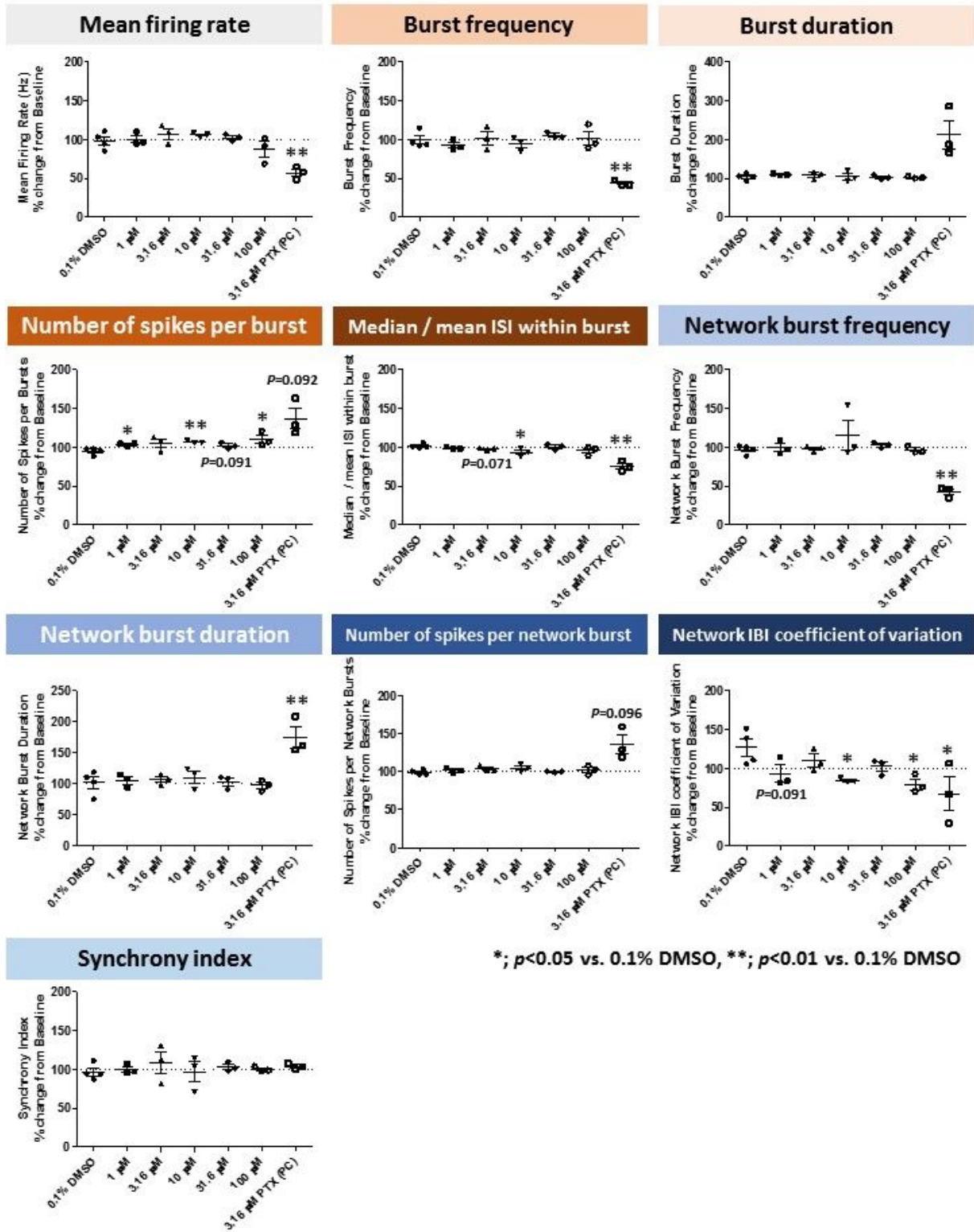


図 12 アモキシシリン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (PTX) 1-100 μM アモキシシリンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 ± 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

12. アセトアミノフェン

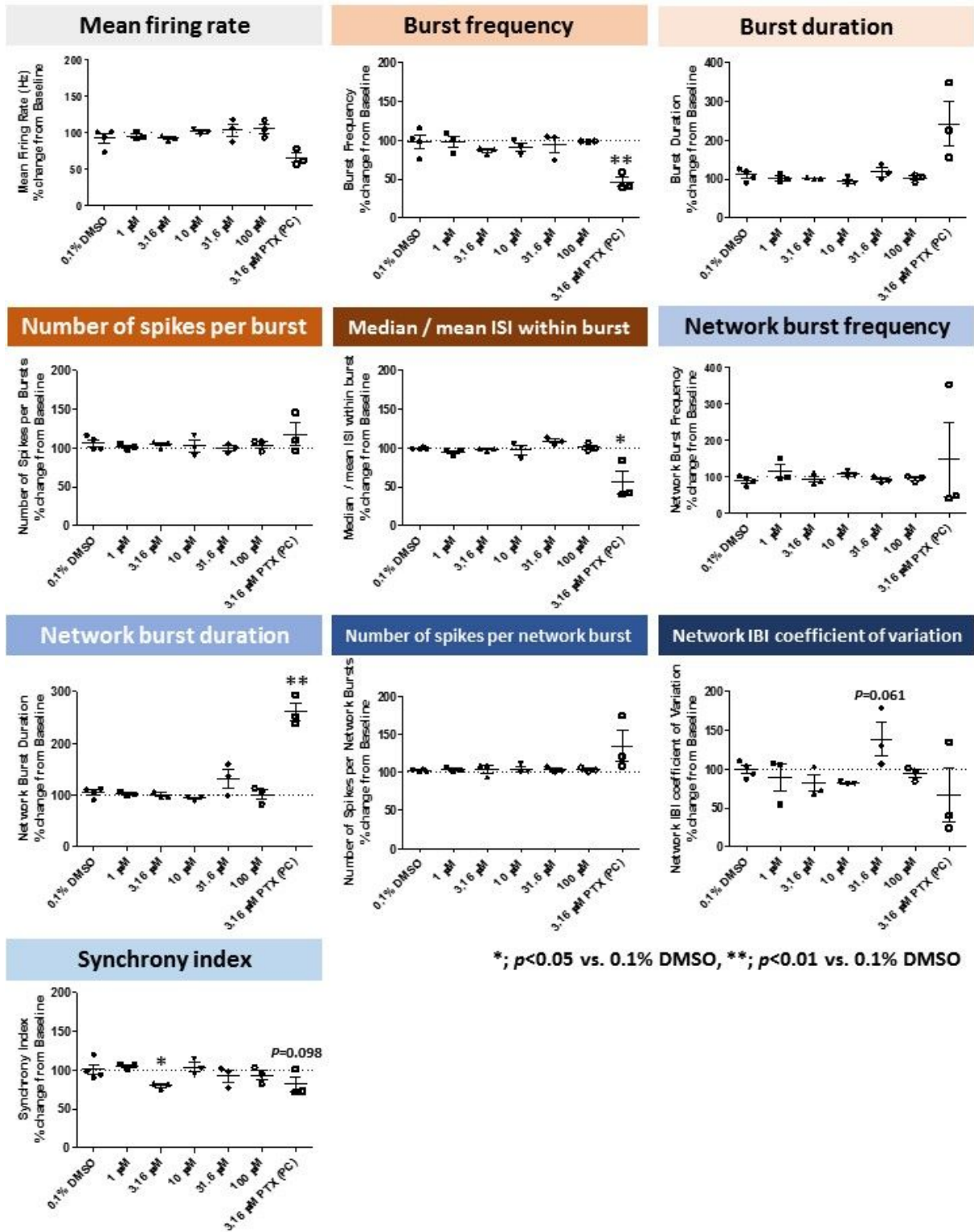


図 13 アセトアミノフェン

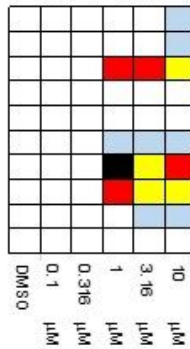
溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 1-100 μM アセトアミノフェンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

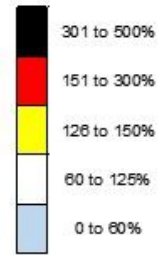
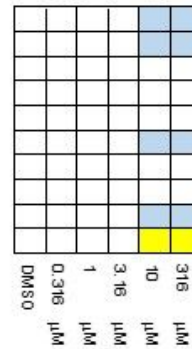
ペチレンテトラゾール



ピクロトキシン

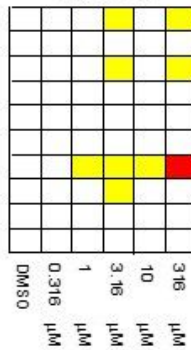


ストリキニーネ

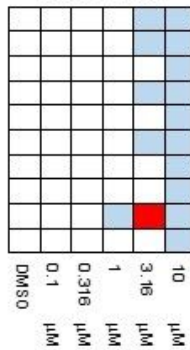


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

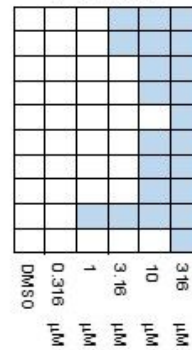
ピロカルピン



クロルプロマジン

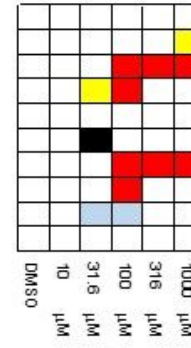


アモキサピン

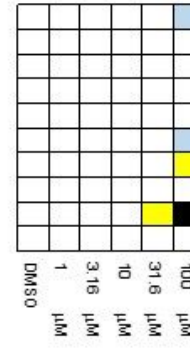


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

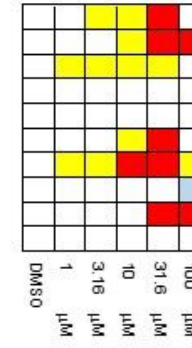
エノキサシン



フェニトイン



リノピリジン

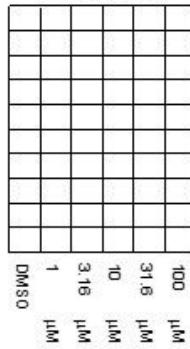


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

4-アミノピリジン



アモキシシリン



アセトアミノフェン

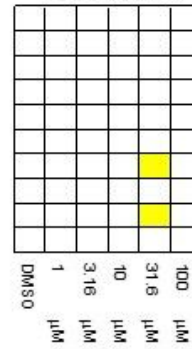


図 14 12 化合物の結果のまとめ

12 化合物について、投与後の変化率が 0-60% (薄水色)、60-125% (白)、126-150% (黄色)、151-300% (赤色)、301-500% (黒色) と設定し、ヒートマップにまとめた。

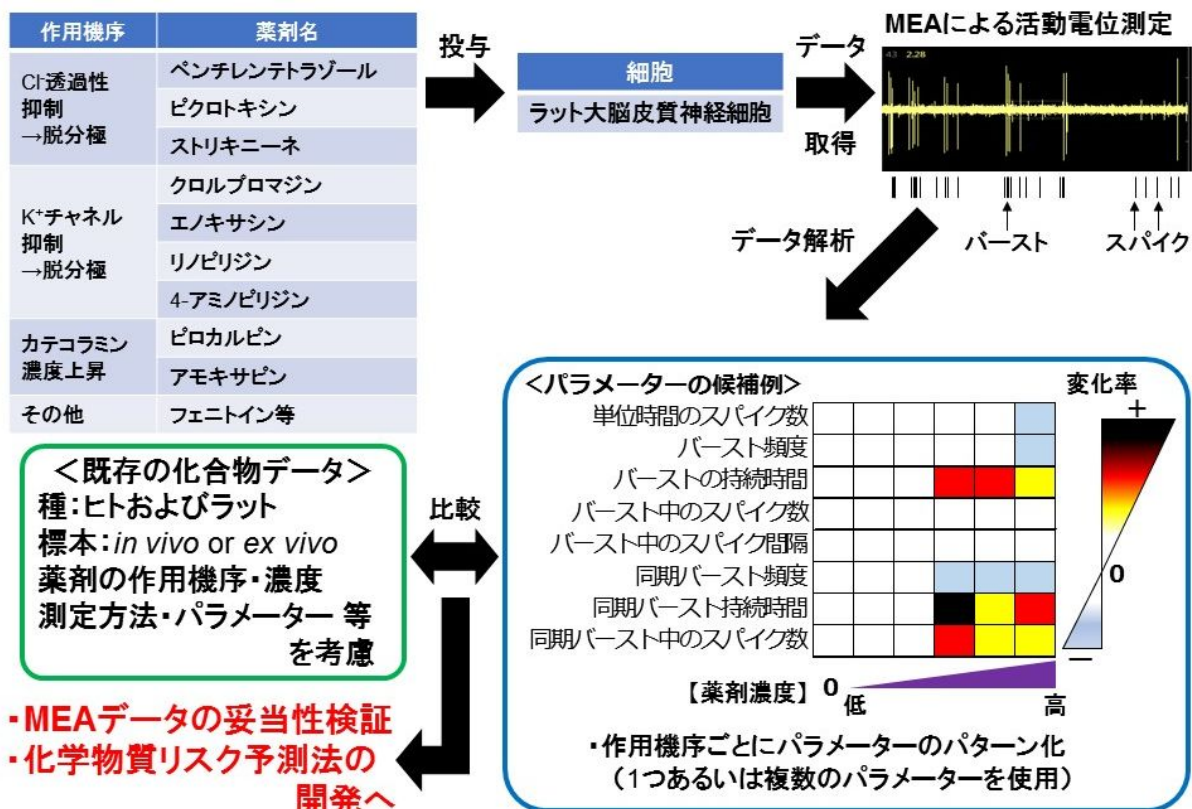


図 15 MEA による化学物質リスク予測法の開発戦略

今回得られたデータに加えてより多くの化合物データを取得し、ヒトやラットなどの *in vivo* あるいは *ex vivo* の既存データと比較することで、MEA データの妥当性を検証するとともに、化学物質リスク予測法への開発へとつながることが期待される。

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

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

研究分担者

豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田 祥子

要旨

化学物質に対して感受性の高い発達期のラット小脳皮質を用いて、化学物質曝露による神経突起進展、神経回路形成への影響を検討し、最も適切な定量化方法を決定することを目的として実施した。医薬品のバルプロ酸に加え、各種のHDAC阻害剤、農薬、細菌毒素、環境内物質などについて、神経細胞レベルおよび小脳組織レベルでの変化を観察し、定量化を試みた。これら化学物質投与による神経伸長変化の定量化、小脳虫部第一裂の過剰な褶曲の定量化、行動観察の定量化を行った。その結果、一群の化学物質の投与が、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、動物の行動変化を引き起こすことを定量的に示した。この中には発達期神経毒性が報告されていないものも含まれ、発達期の動物小脳を用いた試験によって、神経毒性の定量的な試験が可能であることを示した。これらの結果は、今後遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性試験とつながると期待される。

A. 研究目的

ヒトにおいて発達期神経毒性の懸念がある医薬品、農薬、生物毒素、環境内物質などの化学物質について、ラットへの胎生期曝露を行い、それらの小脳発達への影響を、免疫組織化学的手法による神経の形態的变化、およびヘマトキシリンエオシン染色(HE染色)による小脳虫部全体の構造変化を観察した。さらに個体の行動に及ぼす変化を確認するために、光学測定法による伝達物質放出の変化の観察、および発達期と成熟期の個体の行動観察を行った。

B. 研究方法

運動に関係する臓器として小脳を研究試料に用いた。各化学物質を妊娠動物に投与し、出生動物の小脳を摘出してその効果を観察した。妊娠16日のラットに、600 mg/kgのバルプロ酸(VPA、経口)、VPAと同様にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるトリコスタチン(TSA、1 mg/kg、経口)、農薬クロルピリホス(CPF、10mg/kg、経口)、細菌毒素のリポポリサッカライド(LPS、100µg/kg、腹腔内)、環境毒性物質のグリホサート(Gly、250mg/kg、経口)、および毒性対照物質のサリドマイド(THA、500mg/kg、経口)をそれぞれ投与した。

各投与動物を生後2から3週で灌流固定後、小脳虫部の矢状面スライス进行调整し、抗カルビ

ンジン 28k 抗体染色によってプルキンエ細胞の樹状突起長を測定し、化学物質投与による神経伸長変化の定量化を行った。また神経炎症と相関の高いミクログリアを可視化するため抗Iba1抗体染色を行なった。いくつかの試料は、出生1週間で灌流固定し分化誘導因子の発現を観察した。

さらにスライス全体をHE染色し、小脳虫部スライスの第V/VI小葉間にあるprimary fissure(第一裂)について、プルキンエ層の長さとの深さの比を計算し、投与動物と対照動物を比較して化学物質投与の影響の定量化を行った。また各投与動物の成熟期(生後6週から8週)で、新規環境での行動を計測し定量化を行った。さらに生後10日から21日の小脳皮質層からの伝達物質放出を、酵素光学測定法を用いて観察した。

C. 研究結果

VPA投与動物、SAHA投与動物では、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が対照動物より早く著しく、生後2週で1.6倍、生後3週でも1.3倍の伸長を示し、CPF投与動物でも観察されたが、LPSおよびGly投与動物では観察されなかった。

VPA投与動物では、小脳虫部第一裂に過剰な

褶曲が観察された。これにより、プルキンエ層が長くなり、対照動物の1.2倍のプルキンエ層を持つに至った。褶曲率の増加は、TSA、LPS投与動物でも観察されたが、CPF、THA、Glyでは観察されず、神経突起伸展異常と一部異なる傾向を示した（結果1）。

プルキンエ細胞死と脳内マクロファージ細胞であるミクログリアの活性化には強い相関が見られた。VPA投与動物ではプルキンエ細胞の生存数が多く、これはTSA、THAでも同様だった。これらの組織ではミクログリアがあまり活性化されなかった。一方、炎症を模倣する系としてLPSを投与した動物ではプルキンエ細胞死とミクログリアの活性化が見られ、神経細胞死の進行が発達異常となることが伺われた。この現象はGlyでも見られ、一部の投与動物は運動障害を示した（結果2）。

発達期の変化が出生後の早い時期から出現しているのではないかと考え、VPA投与動物における生後1週間の小脳での分化誘導因子ReelinとBDNFの発現を見た。VPA投与動物では生後早い段階で、小脳分子層にReelinが分布し、これが神経回路の異常を誘発することが示唆されたが、BDNF量には差異はなく、これを介さないメカニズムが示唆された（結果3）。

行動観察の結果、VPA投与動物では、新規環境でも警戒が少なく、過活動の傾向を示した（結果4）。これはTSAでも同様であり、HDAC阻害剤の影響が伺われた。一方CPF投与動物では新規環境に警戒が強く、緊張状態を示した。VPAとCPFで、動物の行動が興奮（VPA）と緊張（CPF）に大きく分かれ、これが小脳組織の変化の差と相関することを伺わせた（結果5）。

神経回路が成熟してくる生後21日のVPA動物の伝達物質放出を光学測定で観察した結果、AMPA刺激で誘発されるグルタミン酸放出が、対照動物では周辺の細胞を連続的に刺激するのに対し、VPA投与動物では単発的で広がり少なく、神経伝達物質の取り込みなどに変化が生じていることをうかがわせた（結果6）。

D. 考察

研究結果を通じ、発達期小脳皮質の形成異常、プルキンエ細胞の形成異常、伝達物質放出の異常によって神経毒性の定量化の可能性を示した。発達期神経系におけるこれらの変化は、成熟期では個体の行動異常につながる事が確

認できた。神経細胞の変化を引き起こす発生制御たんぱく質、神経栄養因子などの発現変化が、神経回路レベル、行動レベルでの変化につながる事が考えられ、さらに検証する必要がある。

E. 結論

本研究において、遅発性神経毒性の懸念が想定される化学物質を胎生期の動物に投与し、小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化を定量化して示した。これにより化学物質の特性と神経異常との関係が明瞭になり、今後遺伝子レベル、たんぱく質レベルにおける発達期神経毒性の簡便なスクリーニング法などにつながる事が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] 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* (2018) 65: 1-8
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Nomura Y, Yoshida S. Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Scientific Reports* (2018) 8:12155

2. 学会発表

- [1] Yoshida S., Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Y. Sekino Y, Nomura Y, Kanda Y. The malformation of Purkinje cells becomes the sensing tool for developmental neurotoxicity; its potential and limitation. *EUROTOX 2018*, oral session. Brussel (2018)
- [2] Yoshida S., Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y. Microglia activation related to neuronal malformation in developing cerebellar cortex of drug-induced autistic model rat. *Keystone symposia: New Frontiers in Neuroinflammation. Keystone* (2018)
- [3] Tiong TKS, Nishikawa C, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Altered gut microbiota observed in valproate-administrated autistic model rats. 第97回日本生理学会大会

他 7 件

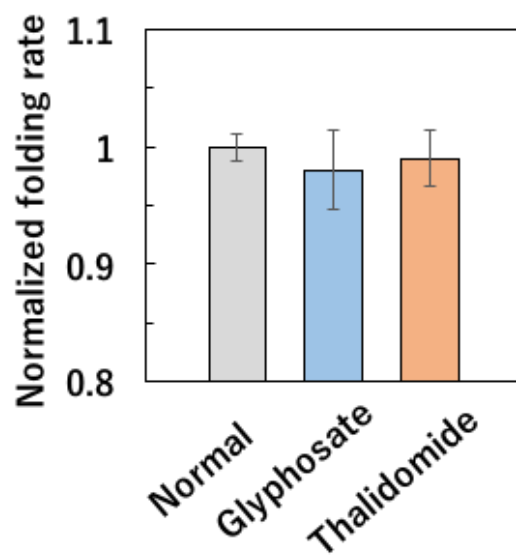
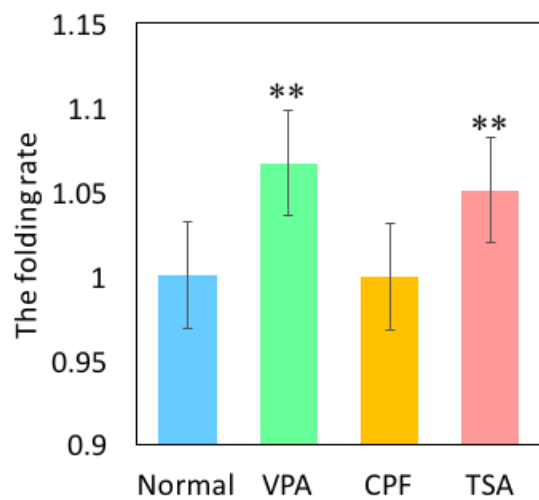
H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許・特許出願

- [1] 吉田祥子, 穂積直裕, 氏家雅彦, 須山洋行, 光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム, 特許番号: 6295396

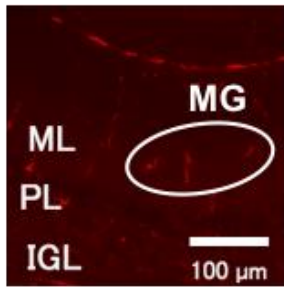
他 1 件

結果1 各化学物質による生後2週の小脳虫部の褶曲度の変化

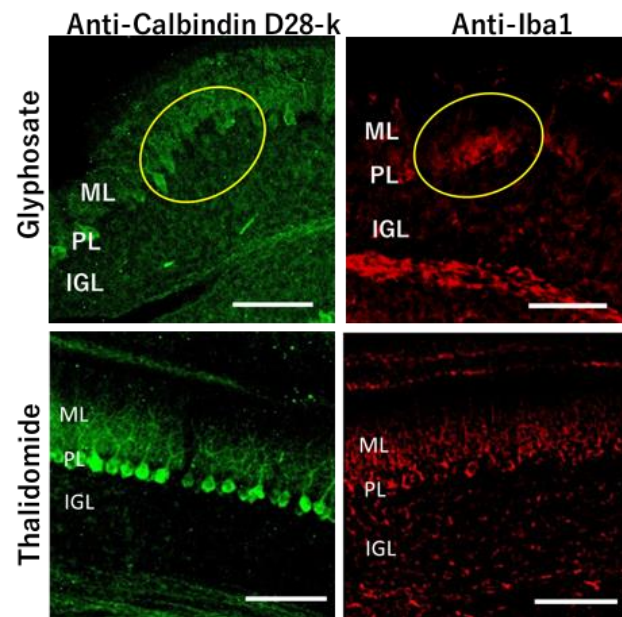
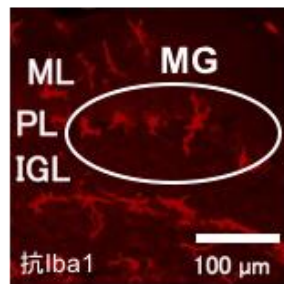


結果2 化学物質投与による生後2週の小脳皮質におけるミクログリアの変化

(a) Normal

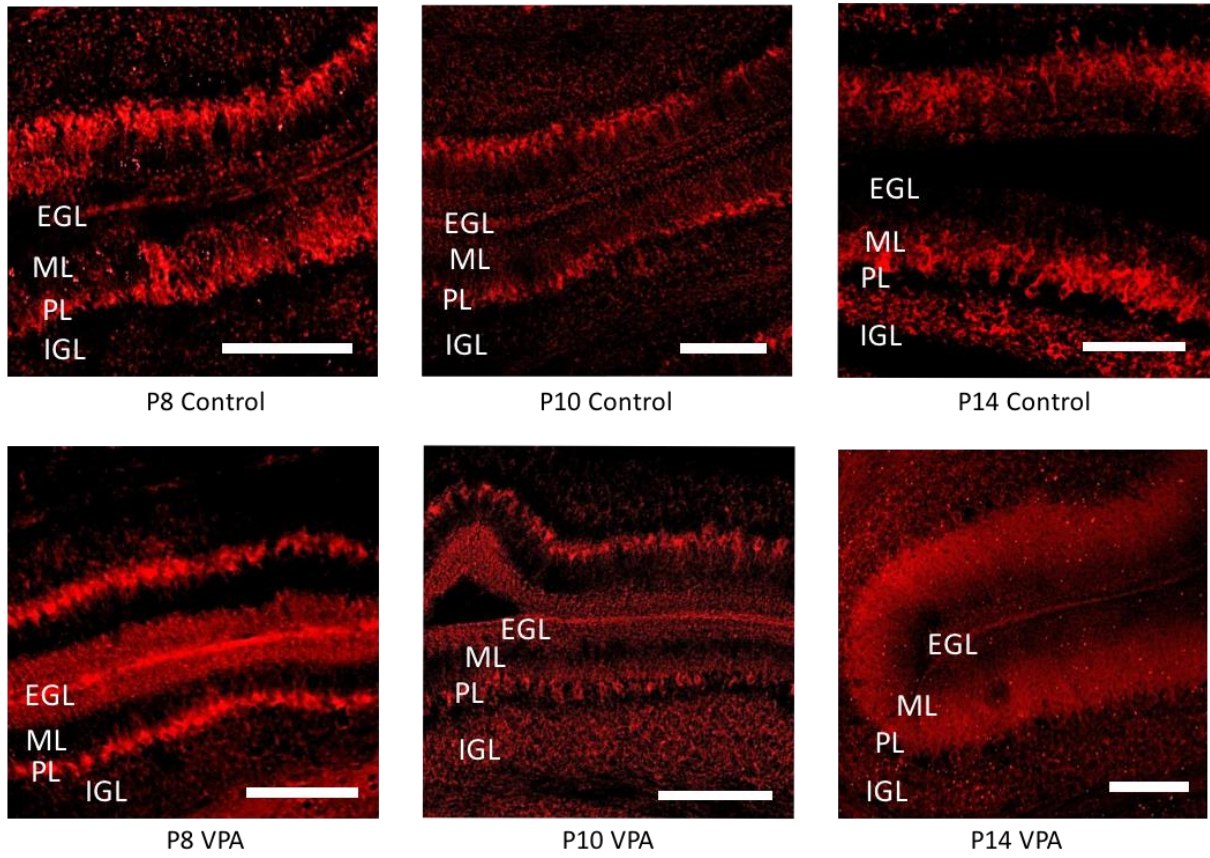


(c) LPS

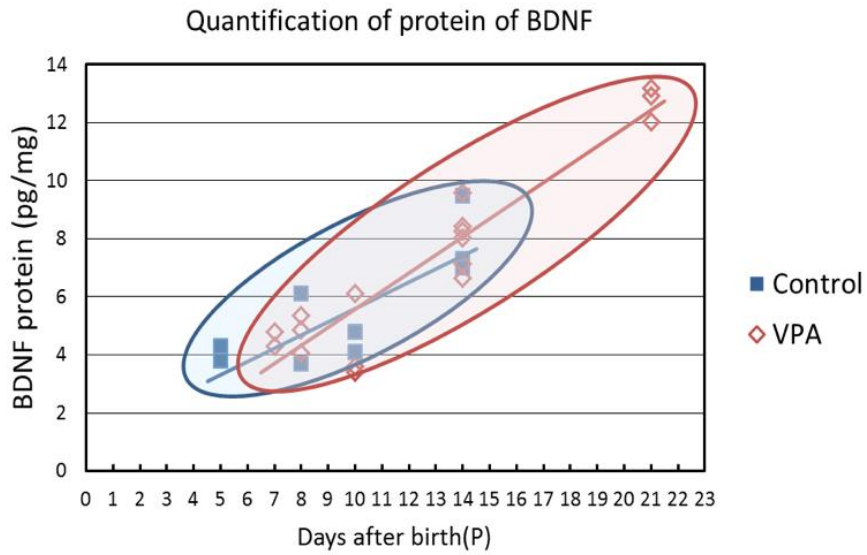


結果 3

4-1 小脳皮質における Reelin の発現

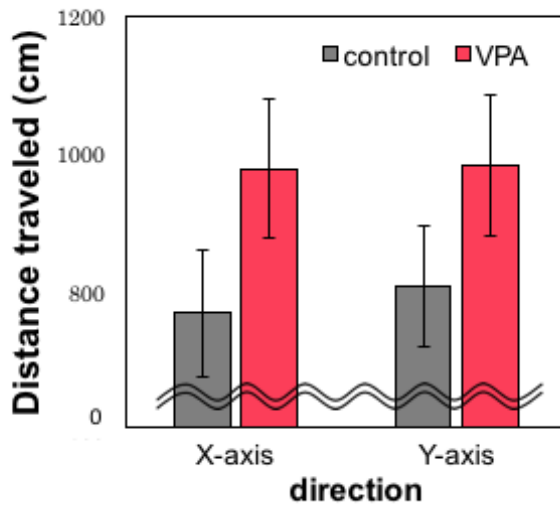


4-2 小脳皮質での BDNF の発現



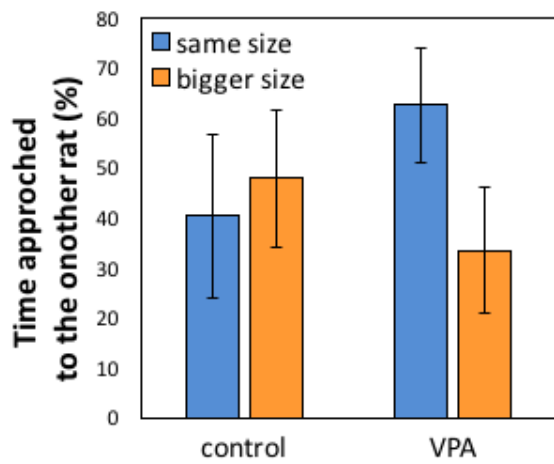
結果4 VPA投与動物の行動変化

4-1 個別行動

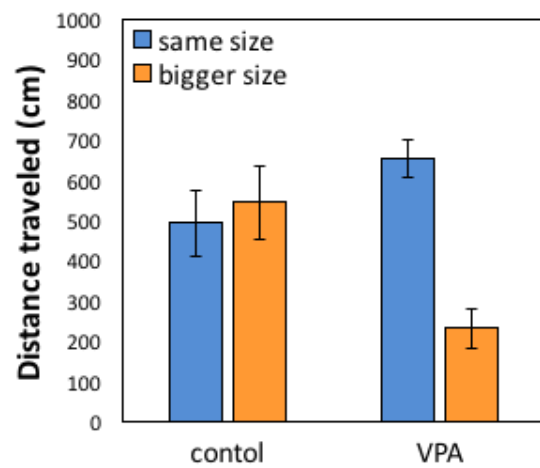


4-2 社会的行動

他ラットへの接近時間

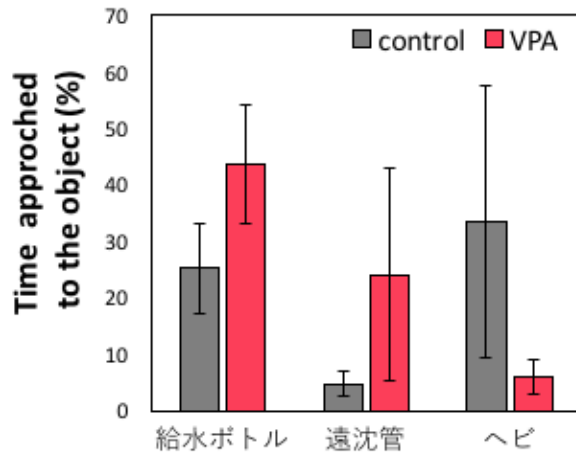


移動距離

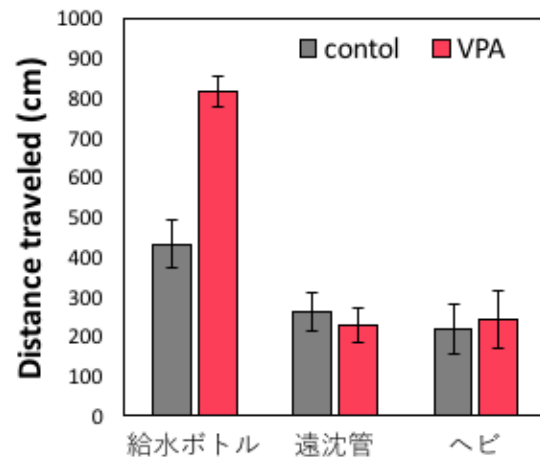


4-3 探索行動

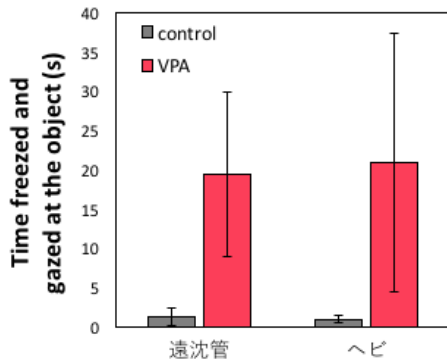
物体への接近時間



移動距離

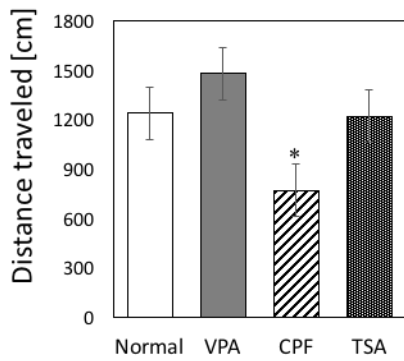


固まって新奇物体を凝視していた時間

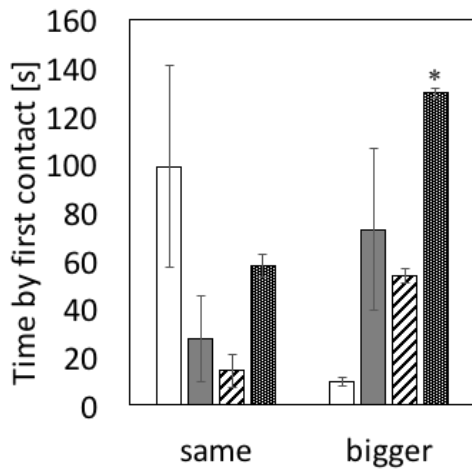


結果5 他の化学物質投与の影響

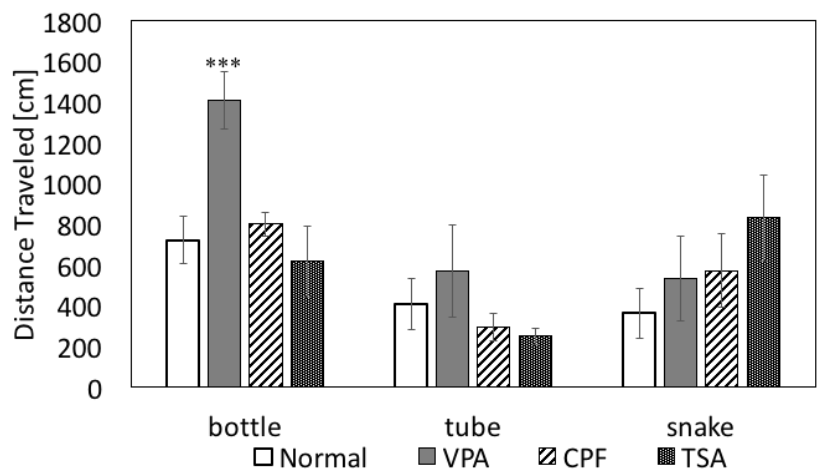
5-1 個別行動の移動距離



5-2 社会的行動

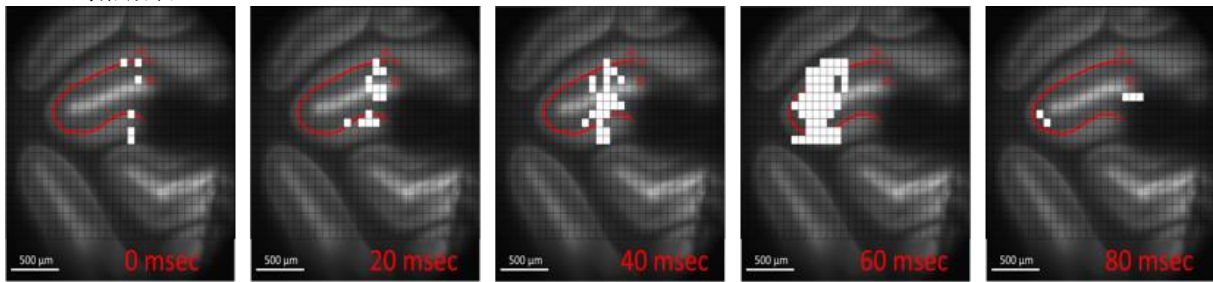


5-3 対物行動

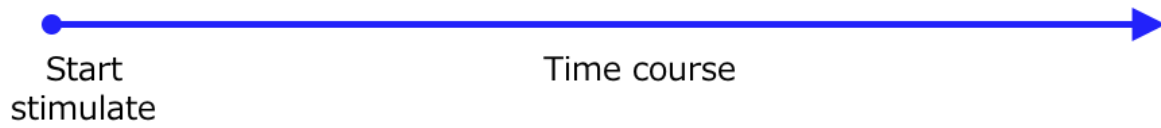
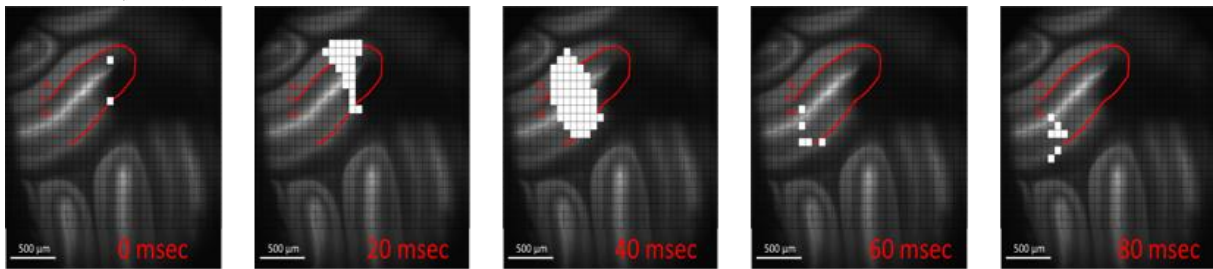


結果6 生後21日の小脳皮質におけるAMPA刺激(100mM)によるグルタミン酸放出の時間変化

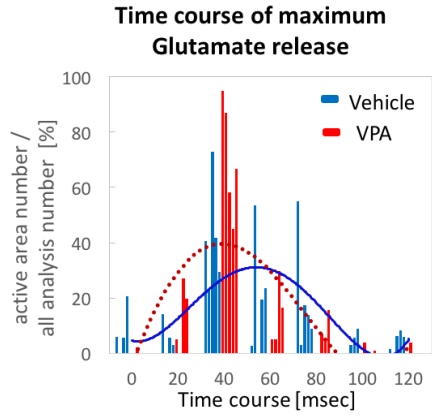
6-1 対照動物



6-2 VPA投与動物



6-3 グルタミン酸放出の時間分布



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

幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発

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

本研究班が提案してきた遅発性神経毒性試験手法の妥当性を調べる目的で、平成 28 年度と平成 29 年度に発達神経毒性が不明な産業化学物質 1-プロモプロパン（1BP）を検討した。そして、1BP 胎生期曝露により授乳期、すなわち神経回路発達期における回路機能の興奮性亢進現象が促進されること、成長後にはその回路興奮性に対する抑制系機能が減弱することを報告した。特に授乳期の変化については、神経細胞の入出力特性がロジスティック解析により総合的に評価できる可能性を見出した。平成 30 年度は、発達神経毒性の懸念があるバルプロ酸（VPA）とトリブチルスズ（TBT）を用いて、胎生期曝露の評価についても同様の解析法を用いて、VPA では回路興奮性の亢進現象が開眼前に出現することを定量的に評価できた。一方、TBT では回路興奮性の亢進現象が抑制されることが判明したが、これは *in vitro* 評価系による結果と相関するものであった。また、アクリルアミド（ACR）曝露による発達神経毒性の出現を評価する実験系を確立し、ACR の用量および投与時期と神経回路特性との関係性を解明することに活用できることが期待される。

A．研究目的

我々はこれまでに胎生期・神経発達期の化学物質曝露により、生後の遅発性神経毒性を脳スライスにより評価する方法の開発を目指し、作用の異なる神経毒性物質として、バルプロ酸（VPA）、有機スズ化合物（TBT）、有機リン系農薬クロルピリホス - を用いて、海馬神経回路機能に対する影響を指標とした発達期の神経毒性評価を行ってきた。この知見をもとに、当分担研究班では発達神経毒性が不明な産業化学物質 1-プロモプロパン（1BP）について平成 28 年度と 29 年度に検討し、ロジスティック解析を用いて神経細胞の入出力特性を総合的に評価する手法が有効である可能性を示した。平成 30 年度は、VPA と TBT について 1BP 同様に、神経発達期における神経細胞機能の総合的な評価を試みた。また、アクリルアミド（ACR）については、母ラット自身への毒性が出現する可能性があることから、その影響を最小限に止めて胎生期曝露による影響を評価するための投与実験系

を確立し、発達神経毒性評価に適した条件を検討した。

B．研究方法

1．使用動物と化学物質の曝露

本学飼養保管飼育室にて交配により得られた Wistar 系妊娠ラット（13-19 週齢、初産）を用いた。VPA は 300mg/kg を生食に溶解し、妊娠 15 日目にイソフルラン吸入による軽麻酔下に経口投与した。対照群には生食のみを経口投与した。

TBT は 20 mg/kg を 50% ポリエチレングリコール水溶液に溶解し、対照群には 50% ポリエチレングリコール水溶液を同様に経口投与した。

ACR では、母ラットへの投与によるストレスが少なく、かつ継続的な投与が必要であることから飲水投与を選択した。濃度 20、50、100、200 ppm の ACR 水溶液を妊娠 6 日～19 日（胎生期曝露群）あるいは、妊娠 6 日～生後 21 日の離乳日（胎生授乳期曝露群）まで自由飲水で投与し、飲水量から投与量を計算した。対照群には通常

の精製水を自由飲水させた。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群の実験スケジュールを図1に示している。

2. 電気生理学的評価

VPA 胎生期曝露群とTBT 胎生期曝露群については、それぞれの対照群とともに生後2週齢前後の授乳期雄性仔ラットから海馬スライス標本を作製した。刺激電極と記録電極を海馬スライスに設置した後(図2)、CA1領野の錐体細胞へのシナプス入力とその錐体細胞からの出力を記録し(図3)、海馬神経細胞の入出力特性についてロジスティック解析による定量的な評価を試みた(図4)。

3. 一般成長の観察：ACR 曝露実験

ACRには生殖毒性があることが知られている。そのため、母ラットに対する生殖毒性が結果に影響を及ぼす可能性を考慮すべきであることから、ACR曝露群については産仔数、性比、一般成長の一つとして開眼日の時期を検討した。

4. 体重、臓器重量の測定：ACR 曝露実験

母ラットへの毒性評価として行動観察を飼育中に行うとともに、定期的に体重測定を行った。出産後は、仔ラットの体重測定時に母ラットの体重測定も行った。

離乳後の生後21日目(PND21)に後述の行動試験を行い、その後に脳重量を測定した。生後体重の増加に対して影響が認められた場合には、その投与濃度群の生後23日目(PND23)において脳重量に加えて海馬重量、および肝重量を測定した。

5. Hindlimb landing foot-splay test

本研究では神経行動学的評価として、Sealeらの方法に従って、生後21日目の仔ラットを約15cm程度の高さから落下させた時の両後肢踵間を計測した(Seale et al, 2012)。

本研究の遂行にあたっては、産業医科大学に定められた、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た。

C. 研究結果

VPA 胎生期曝露では発達に伴う神経回路の刺激応答性亢進を促進させることが生後2週齢で認められた。一方、TBT 胎生期曝露では刺激応答性の亢進現象が抑制されることを見出した。これらの現象を数値化するために、ロジスティック解析を用いた(図5、6、7、8)。1BP(平成29年度に報告) VPAおよびTBT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ところ、開眼前後の神経回路発達期における海馬神経細胞への入出力関係から、発達神経毒性の出現を評価できる可能性が示唆された。

ACRの総投与量はACR濃度に依存して増加したものの、各群の産仔数、性比、開眼日には有意な差は認められなかった。ACR投与による母ラットの体重への影響であるが、100ppm以上の濃度で認められた。また仔ラットの成長に伴う体重増加は濃度50ppm以上の投与で抑制された(図9)。さらにPND21における脳重量は、曝露濃度依存的に減少していた(図10)。また、濃度50ppmで胎生期曝露されたPND23の仔ラットでは、雌雄両方ともに海馬重量の増加が認められた(図11)。一方、肝重量には低下傾向が認められた(データ掲載せず)。

Hindlimb landing foot-splay testについては、雄性仔ラットでは、対照群と胎生授乳期曝露群50ppmで踵間距離の有意な減少が認められた(図12)。一方、雌性仔ラットでも減少傾向が認められたが有意な差には至らなかった。

D. 考察

平成29年度に、1BP胎生期曝露によって海馬神経回路興奮性が促進することを、ロジスティック解析を用いて定量的に評価できることを報告した。濃度400ppmの1BP胎生期曝露の結果から、種差、個体差、LOAELの安全性係数を考慮すると、日本産業衛生学会が勧告する許容濃度0.5ppmとほぼ同程度の濃度(0.4ppm)が得られた。許容濃度0.5ppmの勧告理由には発達神経毒性は考慮されていないが、発達神経毒性を考慮しても現行の許容濃度は妥当な数値であると考えられる。

この知見をもとに、VPA胎生期曝露とTBT胎生期曝露についてもロジスティック解析により評価を行った。前者について

は、1BP 胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した海馬神経回路興奮性の促進が、VPA300 mg 投与群の生後 14 日齢 (PND14) と生後 15 日齢 (PND15) に認められた (図 6)。この神経回路興奮性の促進作用は、E.slope50 (ロジスティック解析において、出力 = 集合スパイク電位の最大値の 50% を誘導する時の入力 = 興奮性シナプス後電位の大きさ) の値も有意な差を伴っていることから (図 7) シナプス応答の出力側のみならず、入力側にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

一方、TBT は 1BP や VPA とは異なり、回路興奮性の亢進現象がむしろ抑制されることが判明したが (図 8) これは研究代表者の諫田らによる *in vitro* 評価系で見出された TBT による神経新生抑制作用と相関すると考えられる。また TBT は GABA 作動性抑制系に直接作用するという培養細胞を用いた報告もある (Yamada et al. Toxicol. Lett. 2010)。本研究は *ex vivo* 実験で、妊娠 15 日目に単回投与した TBT の影響を、投与後約 3 週間経過した生後 13 日齢から 18 日齢で評価したものである。したがって TBT が示す GABA 抑制系への直接作用とシナプス形成期に出現した回路興奮性に対する作用との関連や、そのメカニズムについては今後の検討課題である。

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ため、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。

授乳期の神経回路興奮性の亢進現象には、シナプス外 GABA が誘導する tonic inhibition が発達に伴い変化することと関連していることが示唆された。そこで海馬における GABA 系機能分子の分布を免疫組織化学的手法で検討したが、曝露による顕著な差は認められなかった。GABA 系機能分子の評価については生化学的手法を用いる別のアプローチを検討している。

E. 結論

in vitro 系による評価との相関性が得られた化学物質もあったことから、生後早期の海馬神経回路機能の評価は、発達神経毒性の評価指標として有用である可能性が示唆された。またロジスティック解析を導入することによって、その定量性を総合的に評価できる可能性も示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

[1] 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。

[2] 笛田由紀子、石田尾徹、上野晋、吉田祥子、諫田泰成、保利一。1-プ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

[3] 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。

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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。

[7] 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.

[8] 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

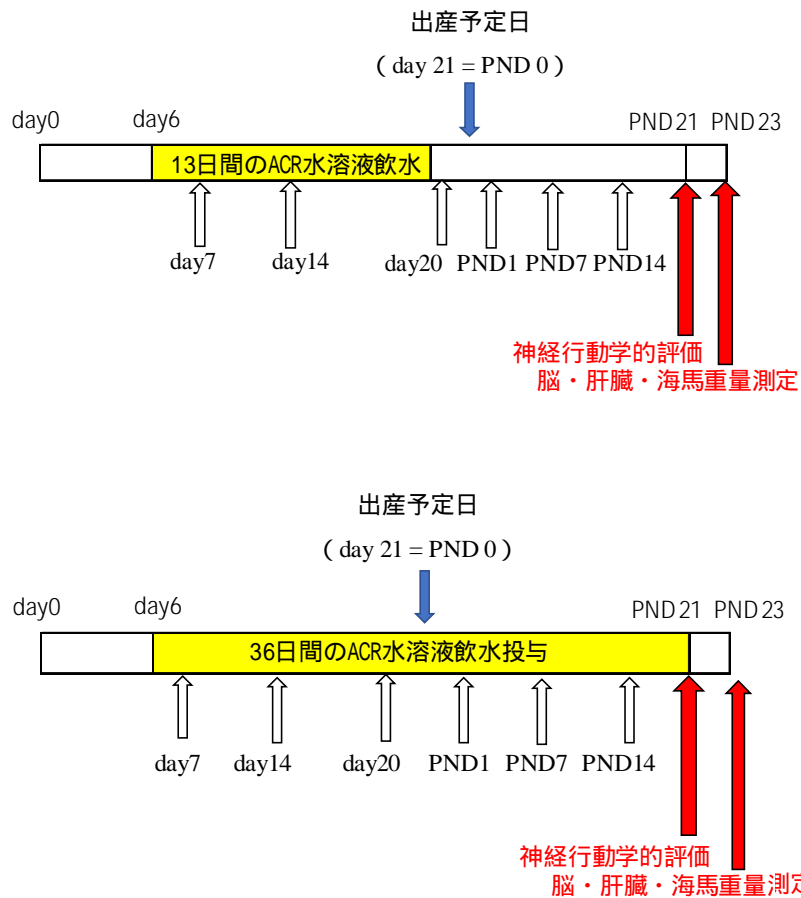


図1 ACR胎生期曝露群(上図)と胎生授乳期曝露群(下図)の実験スケジュール
雌雄Wistarラットを同居させ、膣スメアに精子/プラグ等の存在が確認された日を妊娠初日day0と数えた。胎生期曝露群ではday6からday19までの13日間、胎生授乳期曝露群ではday6からPND21の離乳日まで36日間飲水投与した。白抜き矢印は体重測定の日を示す。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群は投与期間の違い以外は、同じ実験スケジュールで実施した。

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

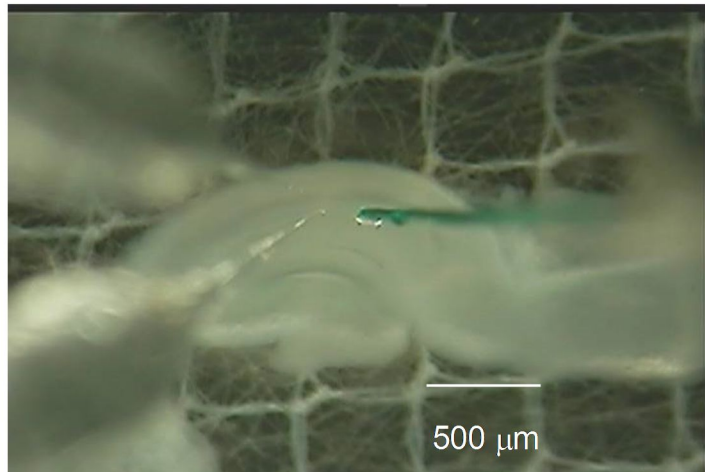
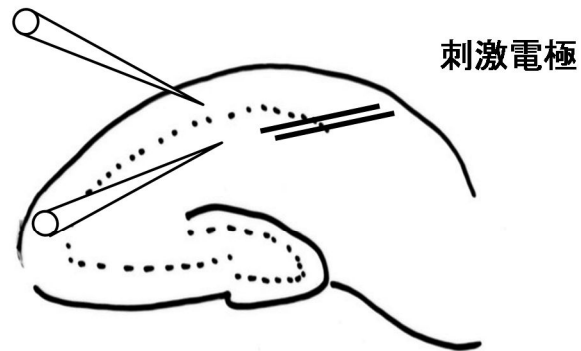
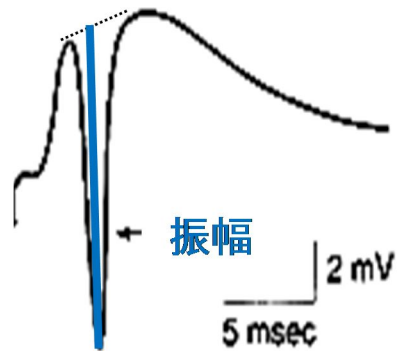


図2 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法
上図：海馬スライスにおける双極性電気刺激電極と2つの記録用ガラス微小電極の位置を示す。下図：実体顕微鏡下に撮影した生の海馬スライスと、刺激電極（左）および記録用ガラス微小電極（左）の配置。

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)

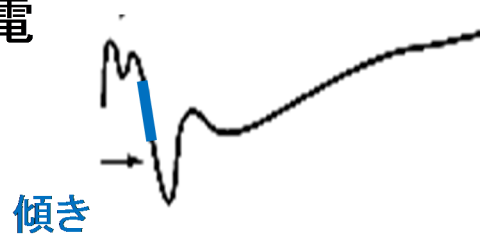


図 3 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き (fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

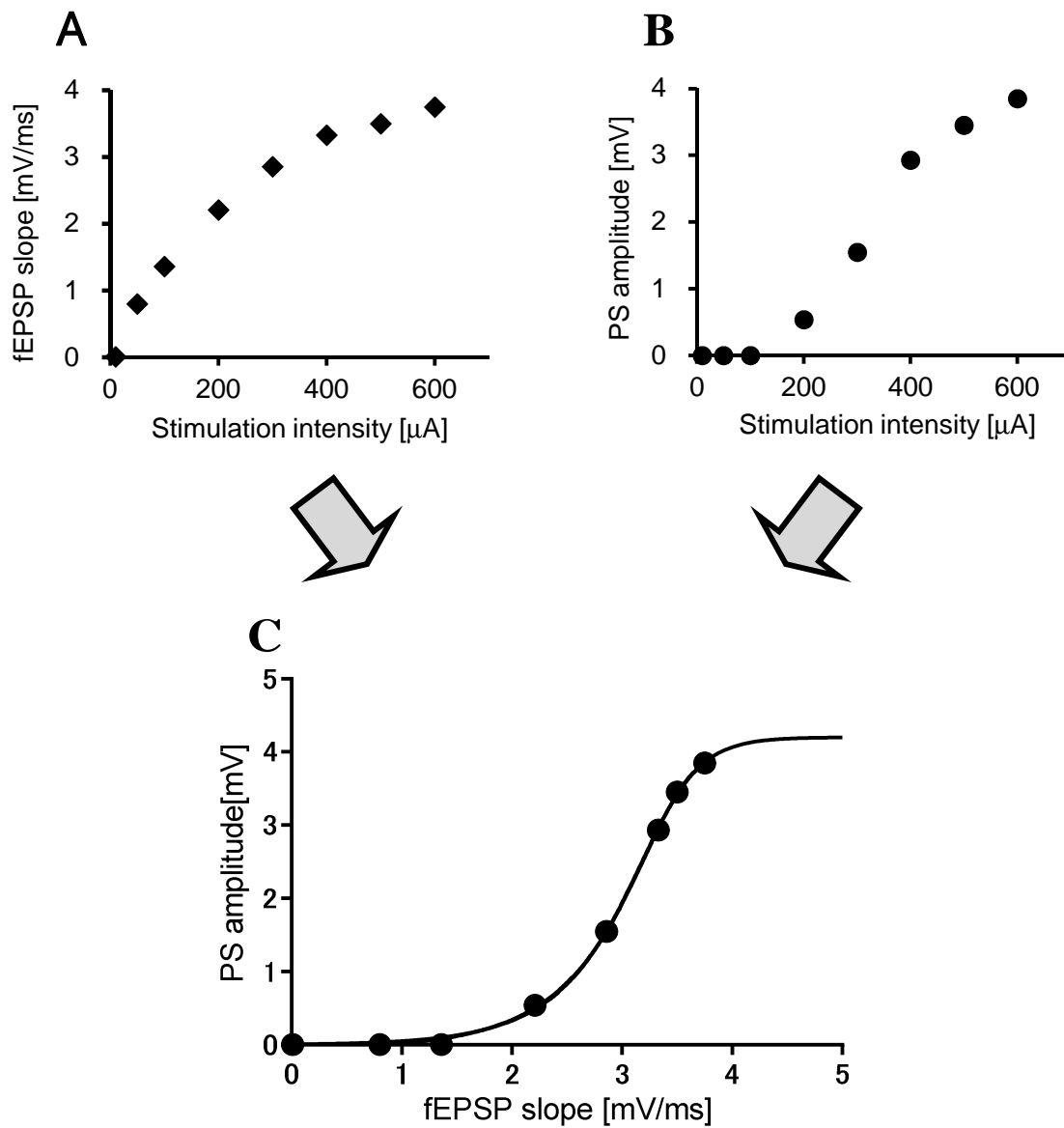


図4 fEPSP-spike (E-S) couplingと その非線形回帰モデル

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。

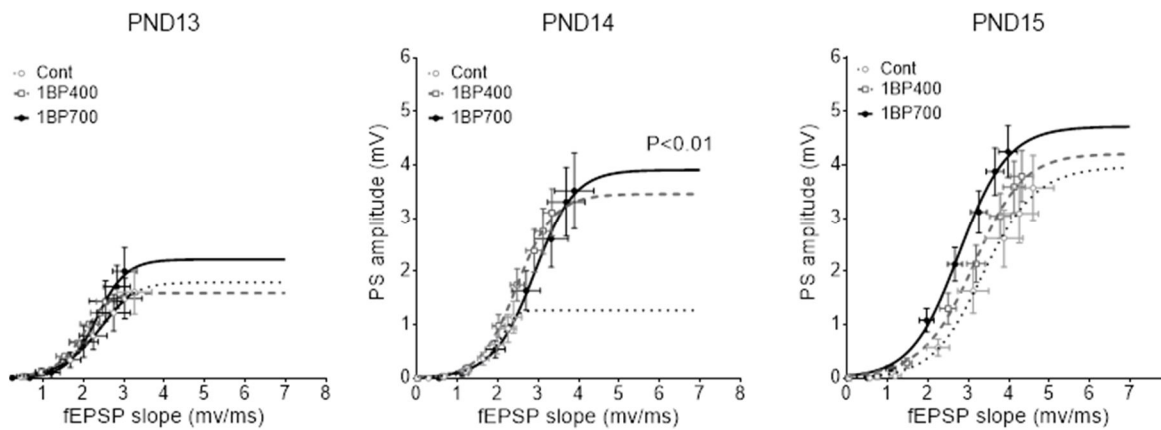


図5 1BP胎生期曝露による海馬刺激応答性のES couplingとロジスティック曲線(平成29年度に報告)

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。

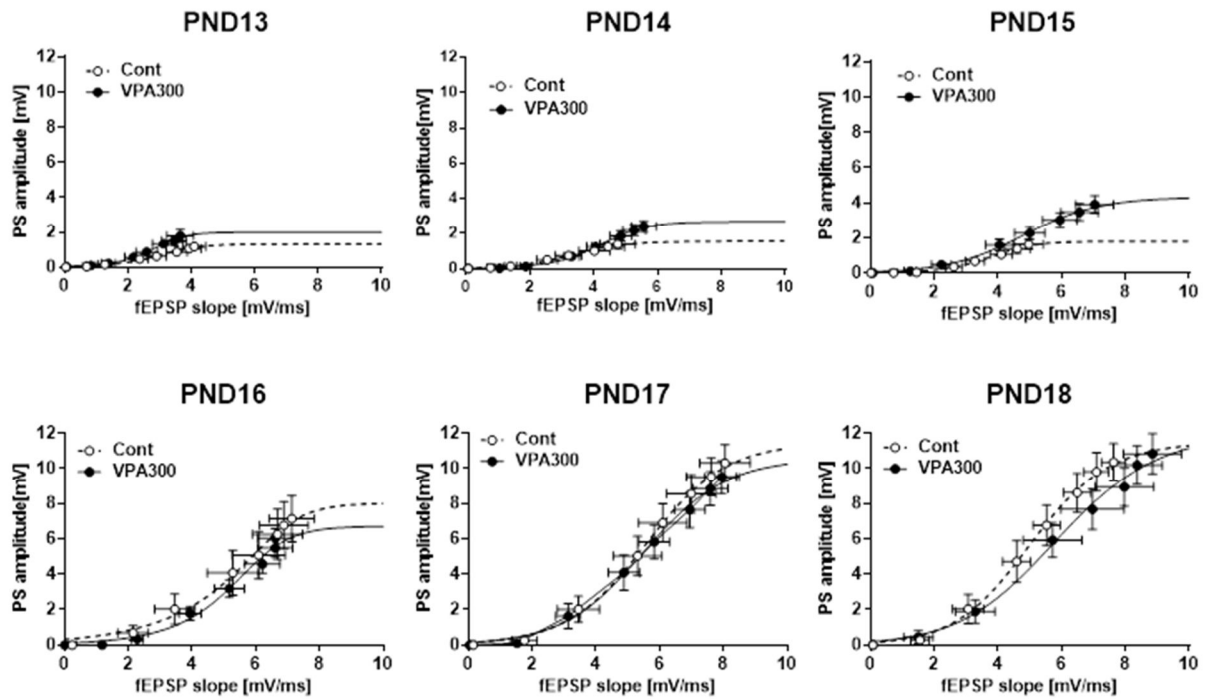


図6 VPA 300mg/kg (day15 に経口投与)による海馬刺激応答性の ES coupling シナプス形成期に関して、PND13-18 について行ったロジスティック解析の結果をまとめた。開眼前である、PND14 と 15 において VPA 群で ES coupling の亢進が認められた (矢印)。点線が対照群、実線が VPA 群を示す。

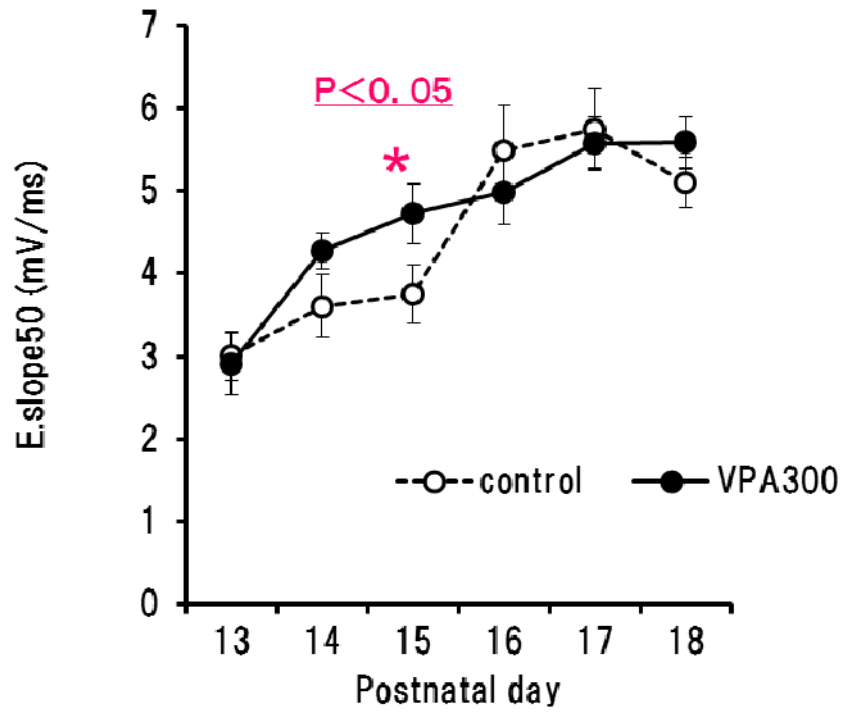


図7 ロジスティック解析によって求めた VPA 投与による E.slope50 の発達に伴う変化
 開眼前の PND15 において、VPA 群では E.slope50 が増加した。開眼後 (PND16 以降) は対照群と
 VPA 群の E.slope50 に差は認められなかった。

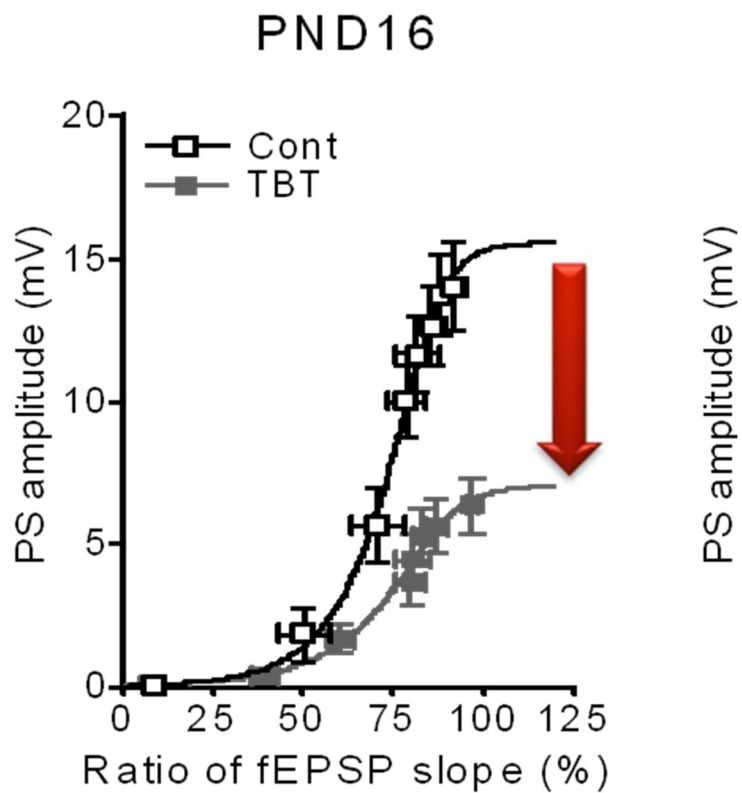


図8 TBT 投与群の PND16 における E-S coupling
 1 BP や VPA の胎生期投与群の場合とは異なり、PND16 においてのみ E-S coupling の抑制が認められ、PND16 以外では対照群との差は認められなかった。E.slope50 の有意な減少 (not shown) が PS の生成抑制と関連していると思われる。

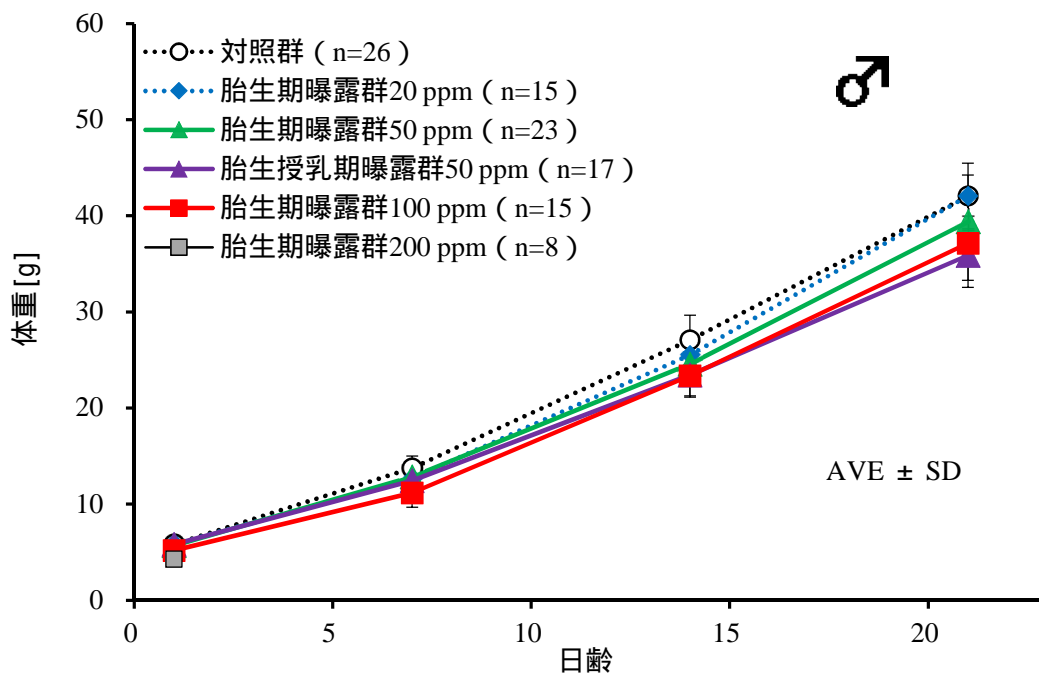


図9 雄性仔ラットの生後の体重増加へのACRの影響

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。

♂

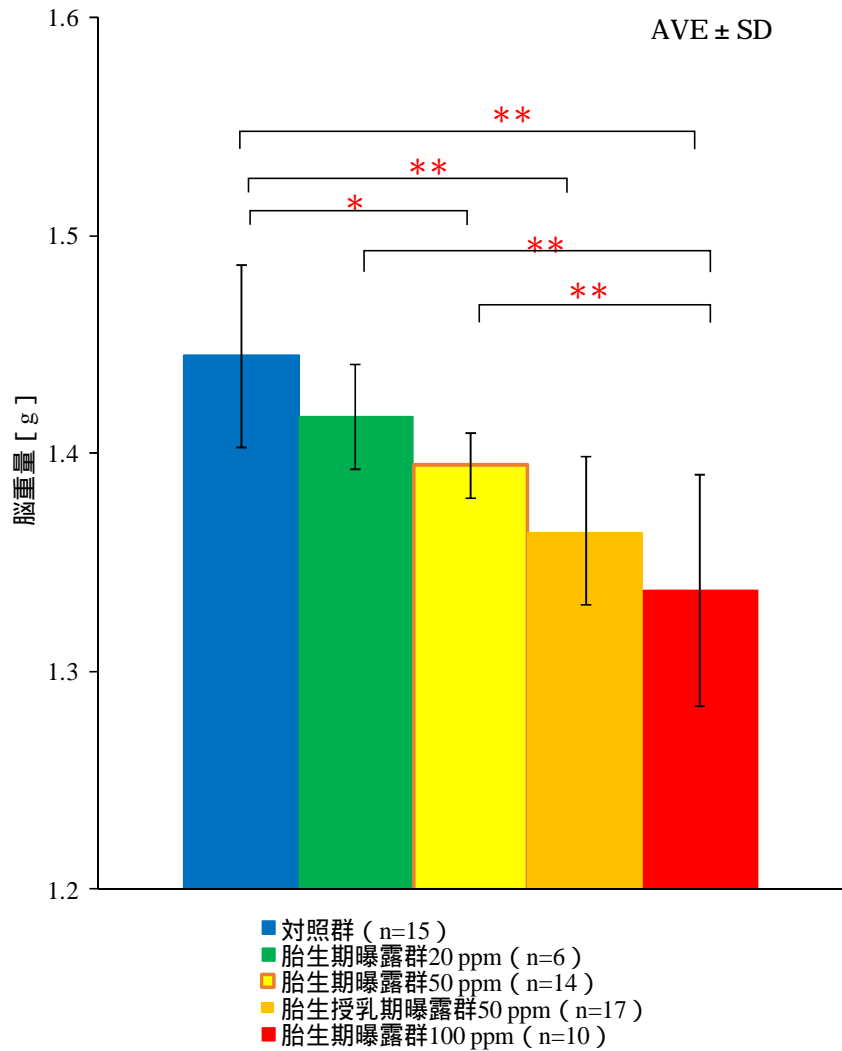


図 10 雄性仔ラットの PND21 における脳重量

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。

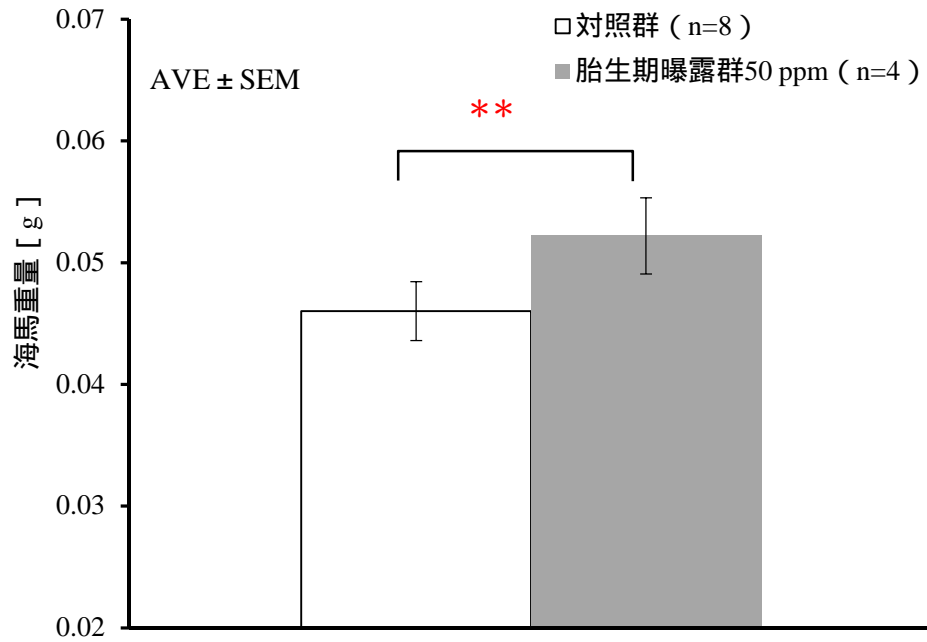


図 11 PND23 における海馬重量

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。

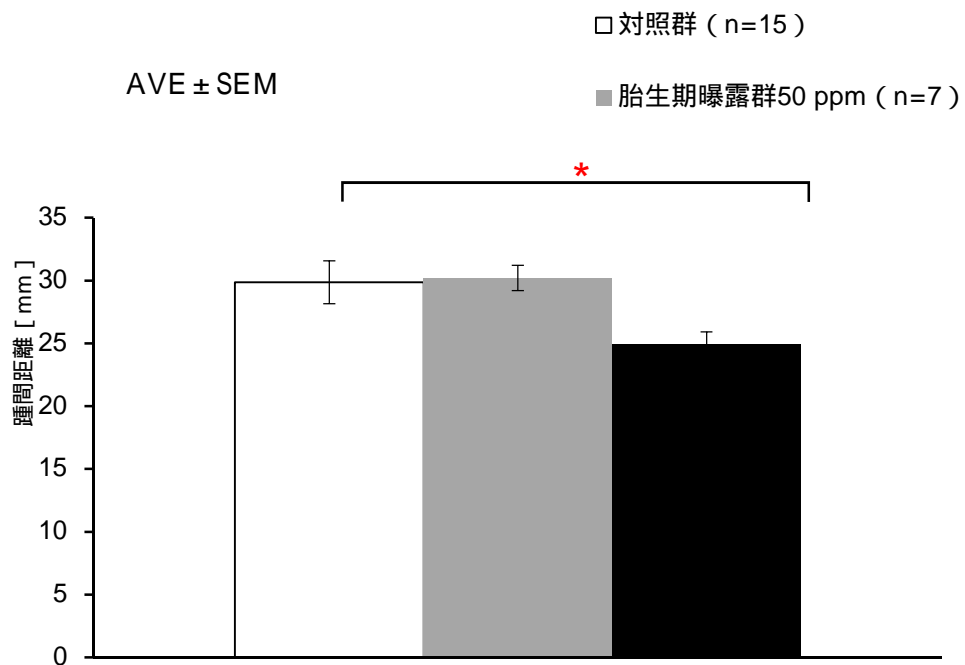


図 12 PND21 で実施した雄性仔ラットの Hindlimb landing foot-spray test 発達毒性 LOAEL である 50ppm について実施した。胎生期曝露群は対照群とは差がなく、胎生授乳期曝露群で踵間距離が減少した (* $p < 0.05$, one-way ANOVA, Scheffe's F test)。雌性仔ラットではこの 3 群に差が認められなかった。括弧内は仔ラットの数を示す。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成30年度分担研究報告書

既存の毒性データおよびヒトデータとの検証

研究分担者 国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所
周産期病態研究部 部長
秦 健一郎

要旨

近年、妊娠中の母親への摂取栄養の程度や栄養成分の偏りによって、胎児のエピゲノムに影響し、生後の発育や疾患の発症に寄与するという DoHaD (Developmental Origins of Health and Disease) のコンセプトが提唱されており、そのメカニズムについて明らかになりつつある。本研究では動物実験を中心に DoHaD のメカニズムについて文献調査を行った。また、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を見出した。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明らかにした。本調査研究により、胎児期あるいは新生児期の環境要因はゲノムの DNA メチル化状態を変化させ、長期遺残して遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では動物実験を中心に DoHaD のメカニズムについて文献調査を行った。また、ヒトのエピゲノムデータに関する調査を開始した。

B. 研究方法

DoHaD コンセプトをもとに動物実験によりメカニズムの解析を行っている文献を調査した。また、ヒトのエピゲノムデータを解析している文献についても調査研究を行った。

C. 研究結果

調査研究の結果を、以下に記載する。

(1) 胎仔期・新生仔期の外因性内分泌かく乱物質への暴露が精子のインプリント領域 DNA メチル化異常を誘引し、その精子で受精した胚は最終的に流産あるいは不妊・不育症の原因となる (Guerrero-Bosagna et al. Curr Opin Genet Dev. 2014)。広く環境中に存在する合成エストロゲンのビスフェノール A (BPA) の新生仔期への暴露により、H19 インプリント領域の有意な低メチル化と遺伝子発現異常が認められ、かつこのラットの精子で受精した胚は着床後胚損失が生じた (Doshi et al. Mol Biol Rep. 2013)。農業用の防カビ剤の成分であるピンクロゾリンの胎仔の生殖腺の性分化が行われる時期の妊娠中雌ラットへの暴露は、胎仔の精子エピジェ

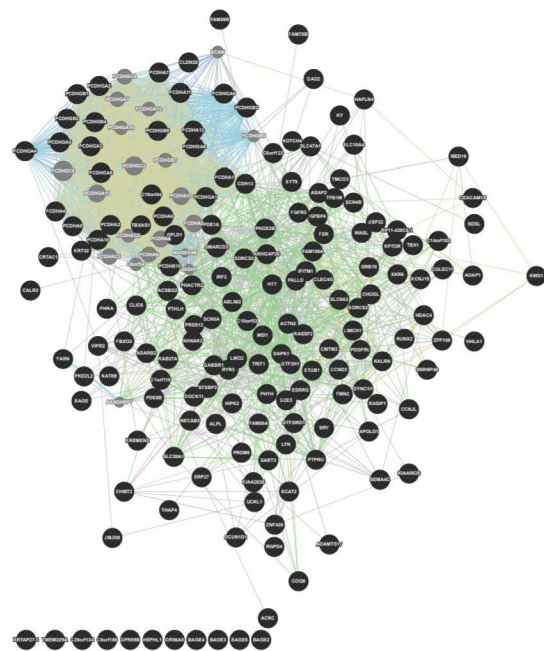
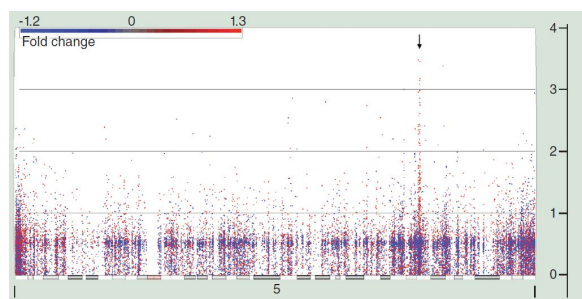
ネティック異常と精子形成細胞のアポトーシスが3世代後まで遺残する (Anway et al. Science. 2005)。世代を超えたエピジェネティクス異常がいくつかのインプリント領域で生じる一方、世代を超えるごとに徐々に正常化する (Stouder et al. Reproduction. 2010)。ピンクロゾリン暴露による精子エピジェネティックへの影響は、胎生期の中でも始原生殖細胞ゲノムのDNAメチル化が一度すべて消去される時期での暴露が顕著 (Skinner et al. PLoS ONE. 2013)。

(2) ヒト血中レベルのBPAの妊娠期間中マウスへの暴露は、出生直前 (E18.5) の雌胎仔マウスの脳内のDNAメチル化酵素Dnmt1とDnmt3a量減少とグルタミン酸トランスポーターSlc1a1発現を上昇させた (Wolstenholme et al. PLoS One. 2011)。子宮内のBPA暴露によって生後28日目の雌仔マウスの海馬Bdnfの発現が上昇し、一方で雄仔マウスが減少。この影響は雌雄ともに生後60日目まで確認され、雄マウスの発現低下はBdnfプロモータの高メチル化と連動していた。さらに、ヒトにおいても妊娠中の血中のBPA濃度が高かった母親から生まれた男児の臍帯血DNAでBDNFのメチル化が高くなった (Kundakovic et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。最近の報告では、人体に影響はないといわれている濃度以下での動物実験において、妊娠中のBPA暴露が新生仔の脳内の遺伝子発現を変化させている。影響に性差が認められる結果は一致しており、新生雌ラットでは、視床下部におけるエストロゲンレセプター、の発現と、海馬と視床下部のオキシトシンの発現が上昇していた。一方新生雄ラットでは海馬のオキシトシンの発現が減少していた (Arambula et al. Endocrinology. 2016)。妊娠中のBPA暴露の影響は、孫世代の仔の行動異常にも認められた (Wolstenholme et al. Horm Behav. 2013)。

(3) 妊娠中の喫煙はヒト臍帯血の解毒や免疫機能に関わる遺伝子 (AHRR、MYO1G、CYP1A1、CNTNAP2 など) のメチル化を変化させ、この変化は17歳時点の血液中でも

継続した (Richmond et al. Hum Mol Genet. 2015)。

(4) 妊娠中のアルコール摂取がDNAメチル化をはじめエピジェネティック制御に及ぼす影響についても、動物モデルからヒト培養細胞を用いた解析、胎児性アルコール・スペクトラム障害 (FASD) 検体の解析までと、広く報告されている。アルコールはDNAメチル化酵素DNMT1の活性を低下させ、全体のメチル化レベルを抑制することが明らかにされており (Garro et al. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1991)。この結果は、マウスの妊娠中のアルコール曝露実験でも、神経幹細胞のメチル化獲得の遅延として確認されている (Chen et al. PLoS One. 2013)。FASDである3-6歳の幼児の頬粘膜上皮細胞のDNAメチル化解析の結果、protocadherin遺伝子上でクラスター



を形成して21か所のメチル化サイトが高メチル化していること、メチル化変化が認められた遺伝子群は、hippo signaling,

glutamatergic synapse, calcium signaling と神経細胞の機能を示唆するパスウェイ上の遺伝子で有意に濃縮されていることが認められている(図 1) (Laufer et al. Epigenomics 2015)。

図 1 胎児性アルコール・スペクトラム障害患児に共通してメチル化変化が認められた遺伝子。PCDHG 遺伝子クラスターに集中して変化が認められた。(Laufer et al.より)

さらに多検体の FASD の児童を解析した報告でも、FASD の頬粘膜上皮細胞で有意に高メチル化していた遺伝子群に protocadherin 遺伝子が認められ、neurodevelopmental processes や anxiety, epilepsy, autism spectrum disorders に関連した遺伝子が有意に濃縮されていたことを明らかにした (Portales-Casamar et al. Epigenetics Chromatin 2016)。

(5) 妊娠中の体重変化が至適でない(妊娠中の体重増加が 7 kg 未満あるいは 12kg 以上だと) 出生児の胎盤の DNA メチル化状態に外れ値が多く観察された(図 2) (Kawai et al. SciRep.2015)。体重変化が至適でない妊婦では、何らかの栄養状態の偏りがあつたと推測されるが、その環境ストレスは胎児に影響を与えた結果、DNA メチル化値の外れ値の多寡(エピゲノムの「乱れ」)を引き起こしたと考えられる。妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの 3 例で、胎盤の GABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出されたことより(図 3)、神経発生においても子宮内環境が同遺伝子のエピジェネティック制御に影響し、異常な発達に關与するかもしれない可能性が示唆された。

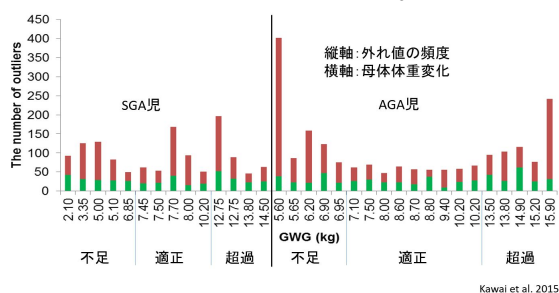


図 2 妊娠中の体重変化が至適でない、出生児の体重は正常であっても、胎盤の DNA メ

チル化状態に外れ値が多く観察された。

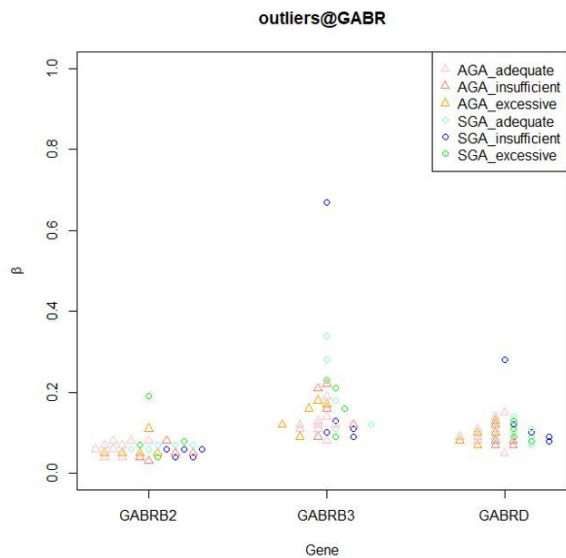


図 3 妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの 3 例で、胎盤の GABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出された

D. 考察

上記の調査研究により、以下のことが示唆された。

- ・胎仔期・新生仔期の環境要因の影響が出生後も持続して認められる。
- ・発生段階の脳では、一過性の発現変化も結果的に不可逆的な脳機能変化を引き起こし、これは初期エピジェネティックな調節異常が遺残するためである。
- ・始原生殖細胞における親由来 DNA メチル化情報の消去が正常に行われることが生殖能力に重要。
- ・発生段階の脳において、外因性内分泌かく乱物質暴露によるエピジェネティック異常に伴う機能異常が生じる。
- ・発生初期の子宮内における環境要因の影響が、脳の発達においてエピジェネティックな制御を介し生後遺残する可能性。
- ・ヒトでもこれらのエピゲノム変化が起こる可能性。
- ・ヒトの子宮内環境の影響は、神経細胞以外の細胞でも、神経細胞の機能に関連する遺伝子の DNA メチル化変化として発達後も確認される。

E. 結論

本調査研究により、胎児期あるいは新生児期の環境要因はゲノムのDNAメチル化状態を変化させ、長期遺残して遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Urushiyama D, Suda W, Ohnishi E, Araki R, Kiyoshima C, Kurakazu M, Sanui A, Yotsumoto F, Murata M, Nabeshima K, Yasunaga S, Saito S, Nomiya M, Hattori M, Miyamoto S, Hata K : Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome. Scientific Reports, 2017;7:12171
2. Kawai T, Hata K : Reproductive/Developmental Abnormalities Induced by Epigenetic Aberrations and Possible Environmental Causes. Nihon Eiseigaku Zasshi. 2016;71:195-199
3. Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, Migita O, Higashimoto K, Soejima H, Okamoto A, Nakamura H, Kimura T, Wake N, Taniguchi T, Hata K : Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole. Gynecol Obstet Invest. 2016;81:353-358
4. Nohara K, Okamura K, Suzuki T, Murai H, Ito T, Shinjo K, Takumi S, Michikawa T, Kondo Y, Hata K :

Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. J Appl Toxicol. 2016;36:105-112

5. Kawai T, Yamada T, Abe K, Okamura K, Kamura H, Akaishi R, Minakami H, Nakabayashi K, Hata K : Increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators following inadequate maternal gestational weight gain. Sci Rep. 2015;5:14224.

2. 学会発表

1. 秦健一郎 : DOHaD theory in human cases: Inheritable epigenetic changes caused by environmental factors. 第60回日本神経化学学会, 仙台, 2017.9.7
2. 秦健一郎 : 「『ARTとDOHaDの相互理解と将来への展望』-生命誕生とエピジェネティクス」第35回日本受精着床学会総会・学術講演会, 米子, 2017.7.21
3. 秦健一郎 : 「DOHaDをひろげるために」DOHaD研究会学術集会会長講演, 東京, 2016.7.25
4. 秦健一郎 : Inadequate maternal gestational weight gain increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators in placenta, Joint Japan-New Zealand DOHaD Researchers Seminar, Auckland, 2016.2.2

G. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y.	Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells.	Nanotoxicology		1-11	2018
Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y., Nomura Y., Yoshida S., Kanda Y.	Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	Sci Rep.	8	12155	2018
Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y.	5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.	J Toxicol Sci.	43	727-734	2018
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
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
佐塚文乃, 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成	ヒトiPS細胞を用いた医薬品の副作用予測法の開発と国際標準化	情報技術強会		印刷中	

平成31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿、

機関名 国立医薬品食
所属研究機関長 職名 所長
氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬理部・部長
(氏名・フリガナ) 諫田 泰成・カンダ ヤスナリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発
- 研究者名 (所属部局・職名) 薬理部・第二室長
(氏名・フリガナ) 山崎 大樹・ヤマザキ ダイジュ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月22日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立研究開発法人
国立成育医療研究センター

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 五十嵐 隆

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
- 研究課題名 発達期における総合的な遅発性神経毒性試験法の開発
- 研究者名 （所属部局・職名）国立研究開発法人国立成育医療研究センター 周産期病態研究部 部長
（氏名・フリガナ） 秦 健一郎 ・ ハタ ケンイチロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：）	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （有の場合はその内容：）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 産業医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 東 敏世

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

3. 研究者名 (所属部局・職名) 産業生態科学研究所 教授

(氏名・フリガナ) 上野 晋 ・ ウエノ ススム

4. 倫理審査の状況

Table with 5 columns: 該当性の有無 (有/無), 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) (審査済み/審査した機関/未審査 (※2)). Rows include: ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針, 遺伝子治療等臨床研究に関する指針, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3), 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針, その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

Table with 2 columns: 研究倫理教育の受講状況, 受講 (有) / 未受講 (無)

6. 利益相反の管理

Table with 2 columns: 管理項目, 有 (有) / 無 (無) (無の場合はその理由:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 元 年 5 月 1 0 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人豊

所属研究機関長 職 名 学 長

氏 名 大 西 隆

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 平成30年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
2. 研究課題名 発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発（H28-化学一般-003）
3. 研究者名 （所属部局・職名） 大学院工学研究科・講師
（氏名・フリガナ） 吉田祥子・ヨシダサチコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。