

**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 28-30 年度総合研究報告書

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-----	17
	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-----	52
	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-----	65
	上野 晋	
	既存の毒性データおよびヒトデータとの検証-----	93
	秦 健一郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	99
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	101

総括報告書

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。

本研究においては、ヒトiPS細胞(神経発達のモデル細胞)のミトコンドリア機能などを指標にして、化学物質の評価に一定の予測性があることを明らかにした。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データの相関を示す明らかにするとともに、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て実験プロトコルを整備して検証試験に参加して、データを提出した。現在、国際グループによりデータを詳細に解析中である。また、DoHaDコンセプトに基づいて、バルブ口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が進行中である。今後は、日本としてヒトiPS細胞などに関するOECDのデータを検証し、動物のデータなどとの比較を行う。これにより、インビトロ発達神経毒性評価ガイダンス案に貢献し、将来的には化審法などの化学物質の管理に活用することが期待される。

<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。日本からヒト iPS 細胞や動物などを用いた DNT に関するデータを積極的に提供して、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。ATP 産生に関して大規模検証試験を行い、その予測性を明らかにした。分化能は引き続きデータを取得する必要がある。以上の結果から、ヒト iPS 細胞における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化学物質としてバルプロ酸、クロルピリホスを用いて、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、発生毒性の可能性が懸念される IBP 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り、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、メチル化状態が変化していることを示した。

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 試験法の確立に向けて安定な評価指標とプロトコルを選定した。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

研究代表者 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、医薬品について影響評価に関する指標を検討した。その結果、遅発性神経毒性の可能性が懸念される農薬クロルピリホス（CPF）、船底防汚剤トリブチルスズ（TBT）などの曝露により、ヒト iPS 細胞における神経分化の抑制が認められた。また分化抑制メカニズムとして、Mfn1 分解を介したミトコンドリア機能異常を見出した。さらに医薬品の中で、神経毒性の可能性が懸念される抗がん剤 5 フルオロウラシル（5-FU）投与により同様のミトコンドリア異常及び神経分化抑制を見出した。以上より、ヒト iPS 細胞におけるミトコンドリア機能を指標にして、成長期において発達神経毒性の可能性のある化学物質や医薬品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、環境中化学物質の暴露や医薬品の副作用の可能性が指摘されている（Robaey et al., *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2008; Landrigan et al., *Environ. Health Perspect. Med.*, 2012; Ouzir et al., *Food Chem. Toxicol.*, 2016）。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、医薬品・化学物質など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・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 細胞を用いて分化に対する影響を調べた。評価系の構築には、HESI と共有している発達毒性の可能性が懸念される化合物リストから、農薬クロルピリホス（CPF）、船底防汚剤トリブチルスズ（TBT）、抗がん剤 5 フルオロウラシル（5-FU）を選択した。また陰性対照化合物としてアスコルビン酸及びソルビトールを選択した。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 (Nakagawa et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008) は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー[マトリゲル (BD Biosciences) コート]の条件で培養した。

2. 外胚葉分化

外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 (Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009) に従い、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いて iPS 細胞を 2 日間培養した。

3. 神経分化誘導

上記 Dual smad 阻害法を用いて、LDN193189 及び SB431542 により iPS 細胞を外胚葉からさらに神経前駆細胞へと分化させた。

4. ATP 量

ルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

5. qPCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

6. 細胞染色

細胞を 4%PFA で固定後、抗 PAX6 抗体 (Biolegend) を用いて染色を行った。さらに核を DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

7. shRNA を用いたノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

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 CPF および TBT の作用

我々はこれまでに TBT を用いて iPS 細胞への影響を検討し、TBT がミトコンドリア融合因子 Mfn1 を分解してミトコンドリア機能異常を引き起こすことを報告している。本研究では発達神経毒性が懸念される CPF 用いて同様に iPS 細胞への影響を検討した。CPF 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 CPF は TBT 同様、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、CPF 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、CPF によるミトコンドリア機能の低下は TBT 同様、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。

2. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する CPF の作用

CPF 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。CPF 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 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 NCAM1 (Polo-Parada et al., *J. Neurosci.*, 2004) の発現低下が認められた (図 3)。したがって、CPF 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。

3. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する TBT の作用

まず iPS 細胞の神経分化への影響を検討するために、外胚葉へ分化させ TBT の影響を調べた。TBT 曝露した iPS 細胞を Dual smad 阻害法で外胚葉へ分化させた結果、マーカーの OTX2 (Mortensen et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2015) や IRX1 (Houweling et al., *Mech. Dev.*, 2001) の発現低下が認められた (図 4)。したがって、TBT は iPS 細胞の外胚葉分化誘導を阻害することが明らかとなった。

TBT が iPS 細胞の外胚葉分化を阻害したので、さらに神経前駆細胞へと分化させて、TBT 曝露の影響を検討した。TBT 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、神経分化マーカーである PAX6 陽性細胞数の低下が認められた (図 5)。したがって、TBT は iPS 細胞の神経分化誘導を阻害することが明らかとなった。

4. CPF や TBT の神経分化阻害における Mfn1 の関与

次に CPF や TBT による神経分化の阻害が

ミトコンドリア異常を介しているかを明らかにするために、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。その結果、Mfn1 ノックダウンにより、CPF や TBT 曝露と同様に、PAX6 や OTX2 の遺伝子発現低下が認められた (図 6)。

5. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能や神経分化に対する医薬品 5-FU の影響

発達神経毒性が懸念される抗がん剤 5-FU を用いて、これまで見出した iPS 細胞の評価指標への影響を検討した。まず 5-FU 曝露は細胞内 ATP 量の低下を引き起こした (図 7A)。さらに 5-FU 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、PAX6 遺伝子の発現低下が認められた (図 7B)。一方、陰性対照であるアスコルビン酸及びソルビトール添加は ATP 量や PAX6 発現に影響を及ぼさなかった。したがって、5-FU は CPF や TBT と同様に、ミトコンドリア機能異常を引き起こし、神経分化を阻害する可能性が明らかとなった。

以上より、医薬品についても、iPS 細胞のミトコンドリア機能を指標にして発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

9. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する化学物質のコンコルダンス解析

これまでの結果から、CPF や TBT 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異常により引き起こされることが示唆された (図 8A)。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院生にカテゴライズされた。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 (図 8B)。

10. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する化学物質の作用

CPF, TBT, 5-FU を用いて、化学物質を曝露した iPS 細胞に dual smad 阻害法を用いて、神経分化誘導を行った。その結果、神経外胚葉のマーカである PAX6, FOXG1 や神経前駆細胞のマーカである NCAM1, Nestin の発現低下が認められた。一方、陰性対照のソルビトールやアスコルビン酸では変化がなかった。したがって、CPF, TBT, 5-FU 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。以上より、iPS 細胞の神経分化等の指標により、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。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、これまで見出したミトコンドリア指標 (ATP 産生など) により発達神経毒性が懸念される化学物質や医薬品の影響を評価できることを明らかにした。特に、iPS 細胞で使用した CPF, TBT, 5-FU は各々血中に存在しうる濃度 (Findlay et al., *Ann. Oncol.*, 1996; Whalen et al., *Environ. Res.*, 1999; Huen et al., *Environ. Res.*, 2012) をアッセイに使用しており、本アッセイ系は非常に好感度であると考えられる。

今回、iPS 細胞を用いて CPF や TBT の毒性作用点として、ミトコンドリア異常を介した神経分化の阻害を見出した。5-FU も同様のミトコンドリア異常や神経分化阻害を引き起こすことから、発達神経毒性評価においてミトコンドリア機能は有効であり、医薬品など幅広く応用できる可能性が期待される。今後も iPS 細胞において、発達神経毒性が懸念される被験物質を増やすことで、ミトコンドリアを指標とした毒性マーカーの探索や評価法の検討を行い、簡便で再現性のある評価法の確立を目指す。

また、研究代表者として、HESI NeuTox の国際検証試験の議論を新たに開始して、連携を取りながら試験法の確立に取り組みたい。

E. 結論

ヒト iPS 細胞の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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S., Asanagi M., Hirata N., Itagaki H., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces mitochondrial fission through Mfn1 degradation in human induced pluripotent stem cells.” *Toxicol. In Vitro.* (2016) 34:257-263
- [2] Asanagi M., Yamada S., Hirata N., Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells.” *J. Toxicol. Sci.* (2016) 41:207-215
- [3] Hirata N., Yamada S., Asanagi M., Sekino Y. and Kanda Y. “Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016) 470:300-305
- [4] Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y. and Kanda Y. “Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells.” *Sci Rep.* (2017) 7:40925
- [5] 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.* (2018) 8:12155
- [6] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. “5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.” *Nanotoxicology* (2018) 1-11
- [7] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. “5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.” *J. Toxicol. Sci.*

(2018) 43:727-734

- [8] 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).
- [9] 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)
- [10] 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 (2019年2月発行)

2. 学会発表

- [1] 山田茂、麻薙美紀、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリアダイナミクスを用いた細胞毒性評価、第 89 回日本薬理学会、2016 横浜
- [2] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPS cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30
- [3] 麻薙美紀、山田茂、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成: ヒト多能性幹細胞を用いた発達神経毒性評価の試み、第 89 回日本薬理学会、2016 横浜
- [4] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づいたクロルピリホスの毒性評価、第 134 回日本薬理学会関東部会、2016 大田原
- [5] 山田茂、久保祐亮、犬塚隆志、関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能による医薬品の毒性評価、第 43 回日本毒性学会、2016 名古屋
- [6] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ミトコンドリアを指標としたヒト iPS 細胞毒性評価系の検討、第 2 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、2016 東京
- [7] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ミトコン

- ドリア機能を介した新規神経誘導メカニズム、第 39 回日本分子生物学会、2016 横浜
- [8] 山田茂、久保祐亮、山崎大樹、関野祐子、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化におけるミトコンドリア因子 Mfn1 の機能、第 90 回日本薬理学会、2017 長崎
- [9] 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トリブチルスズの影響、第 44 回日本毒性学会、2017 横浜
- [10] 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クロルピリホス曝露の影響、第 136 回日本薬理学会関東部会、2017 東京
- [11] 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系の開発、第 3 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、2017 東京
- [12] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. : Development of human iPS cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, SPS, 2017, Berlin
- [13] 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)
- [14] 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)
- [15] 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)
- [16] Yamazaki, D., Yamada, S., Kanda, Y.: Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 広州(2018.10)
- [17] 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)
- [18] 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)
- [19] 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)
- [20] 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

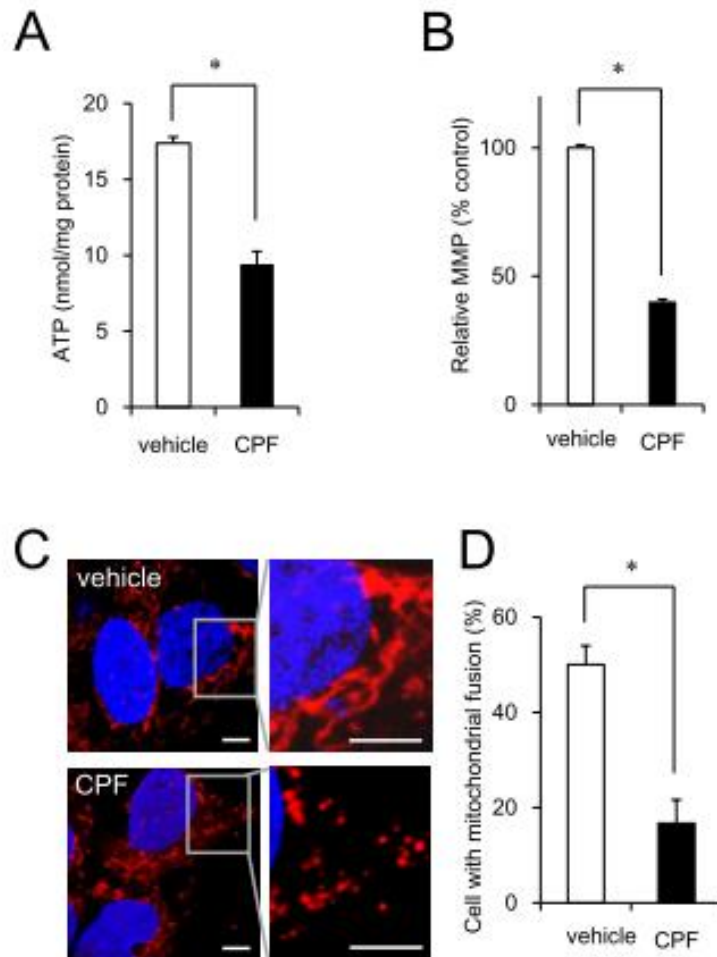


図1 CPFによるミトコンドリアの機能異常

- A) ヒト iPS 細胞において、CPF (30 μ M) 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、CPF 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、CPF 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。

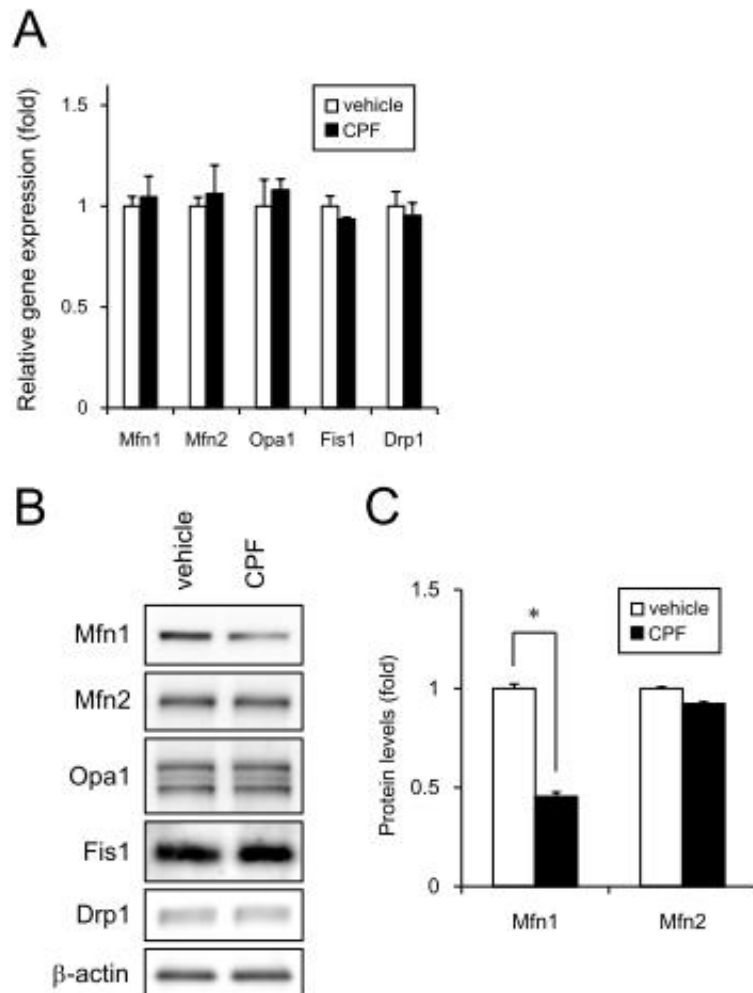


図2 CPFによるMfn1の分解

A) 30 μ M の CPF 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) 30 μ M の CPF 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。

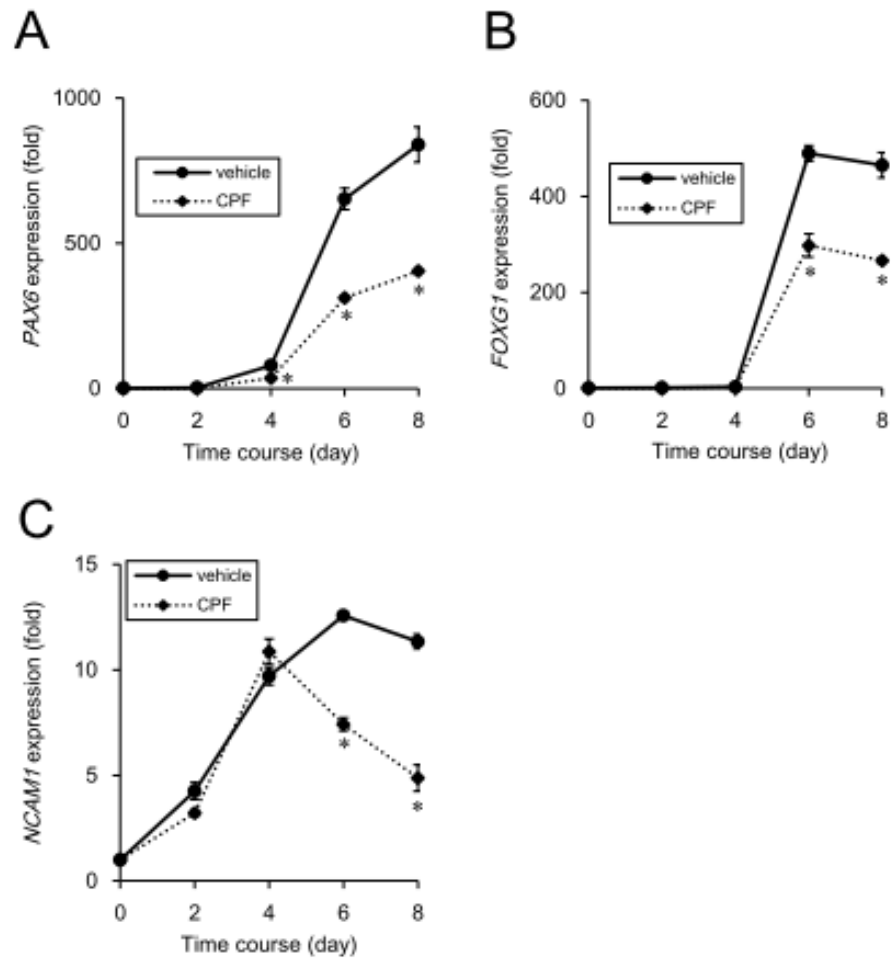


図3 CPFによる神経分化誘導の阻害

30 μ M の CPF 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-FOXG1 遺伝子の発現変化

C) 神経前駆細胞マーカー-NCAM1 遺伝子の発現変化

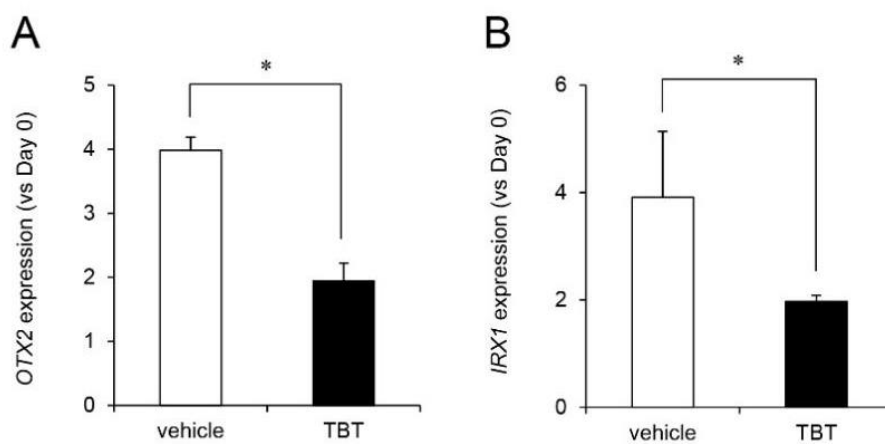


図4 TBTによる外胚葉分化阻害

50 nM の TBT を曝露したヒト iPS 細胞に外胚葉分化刺激を与えた後、分化マーカーの遺伝子発現を qPCR で調べた。

(A) 外胚葉マーカー OTX2 遺伝子の発現変化

(B) 外胚葉マーカー IRX1 遺伝子の発現変化

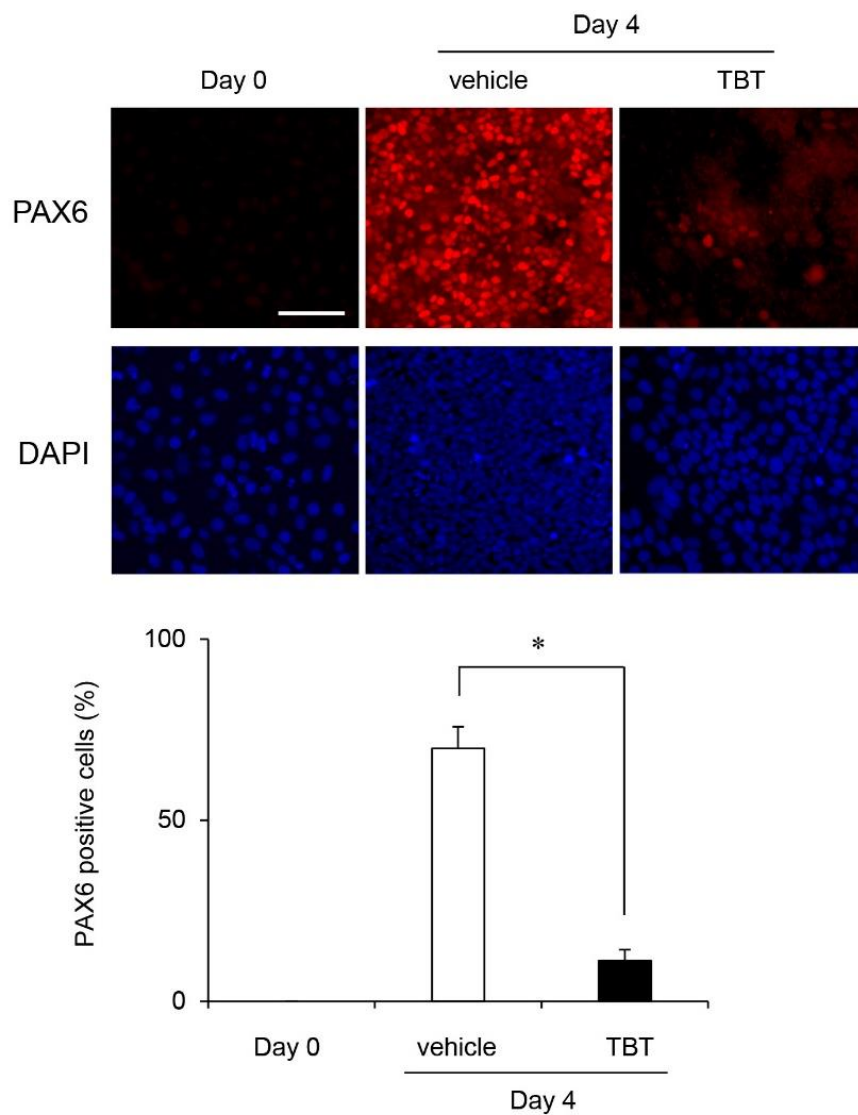


図5 TBTによる神経分化誘導の阻害

50 nM の TBT を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化刺激を与えた後、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の陽性細胞数を調べた。

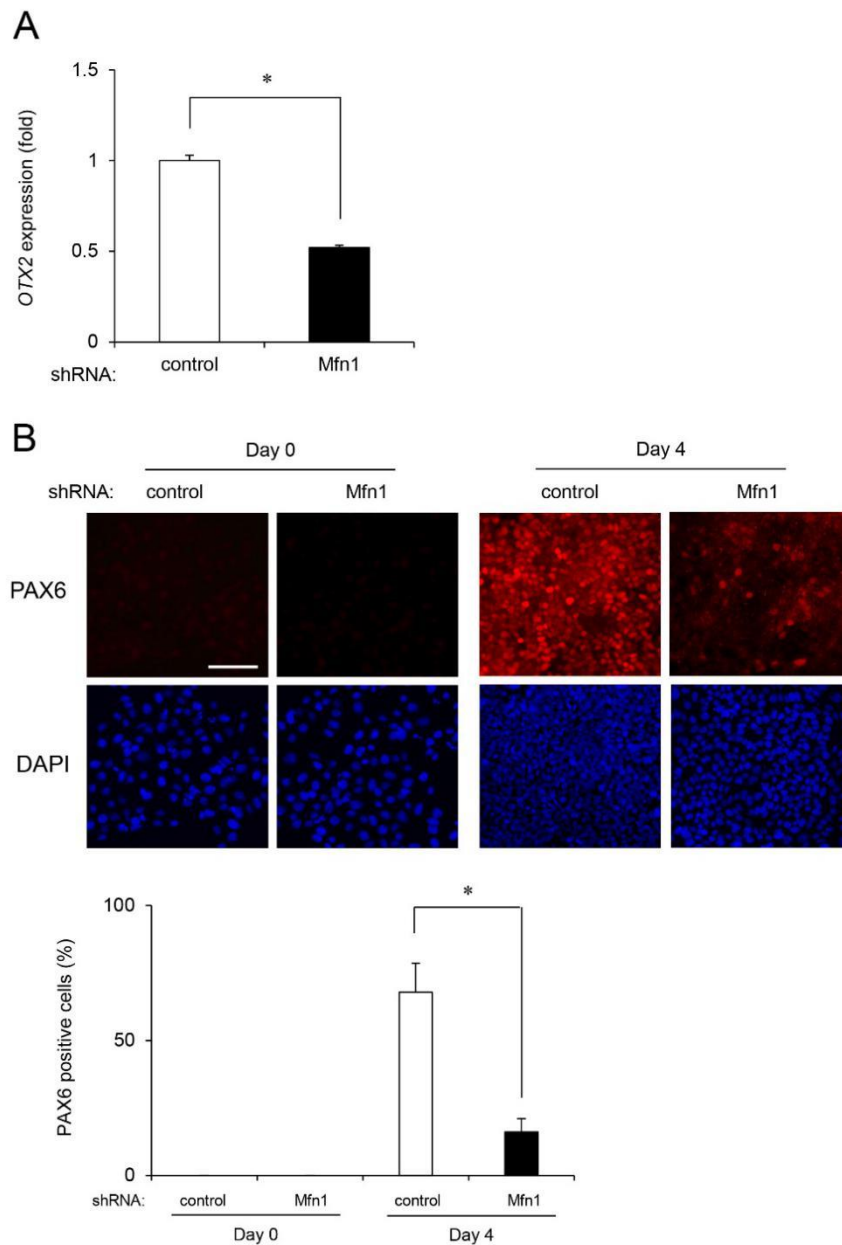


図 6 Mfn1 ノックダウンによる神経分化誘導の阻害

Mfn1 をノックダウンしたヒト 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発現を調べた。

(A) 神経分化 2 日目の外胚葉マーカー OTX2 遺伝子の発現変化

(B) 神経分化 4 日目の神経分化マーカー PAX6 陽性細胞数の変化

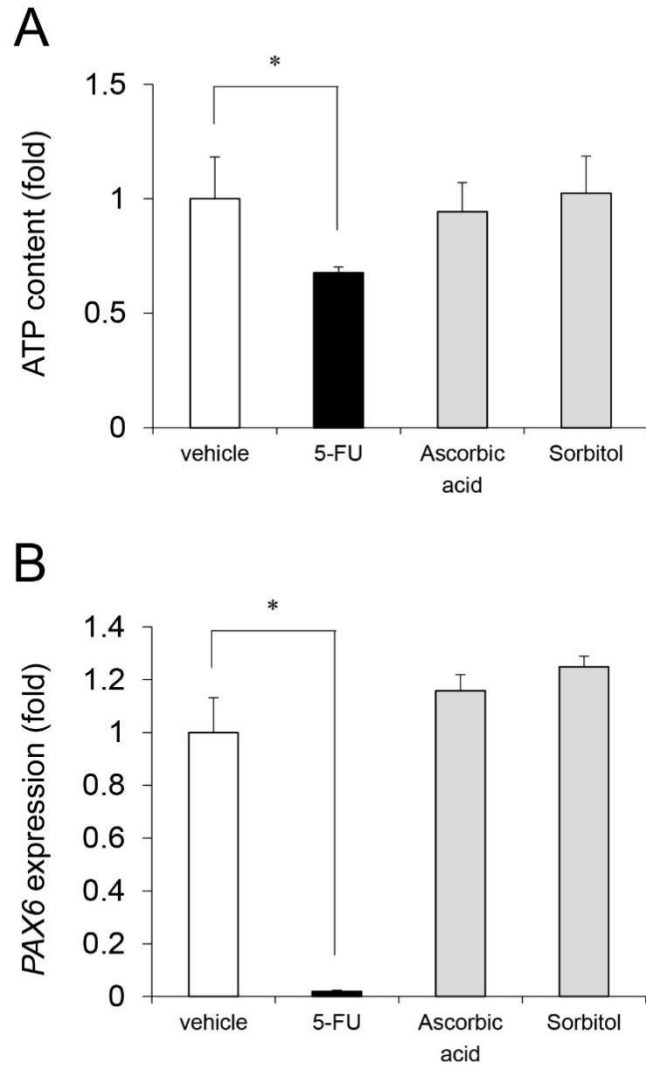


図7 5-FUによるATP産生及び神経分化誘導の阻害

(A) 1 μ Mの5-FUを曝露したヒトiPS細胞において細胞内ATP量を測定した。陰性対照としてアスコルビン酸及びソルビトール添加(各々100 μ M)の影響も調べた。

(B) 1 μ Mの5-FUを曝露したヒトiPS細胞に神経分化刺激を与えた後、4日目に神経分化マーカーPAX6遺伝子の発現変化を調べた。陰性対照としてアスコルビン酸及びソルビトール添加(各々100 μ M)の影響も調べた。

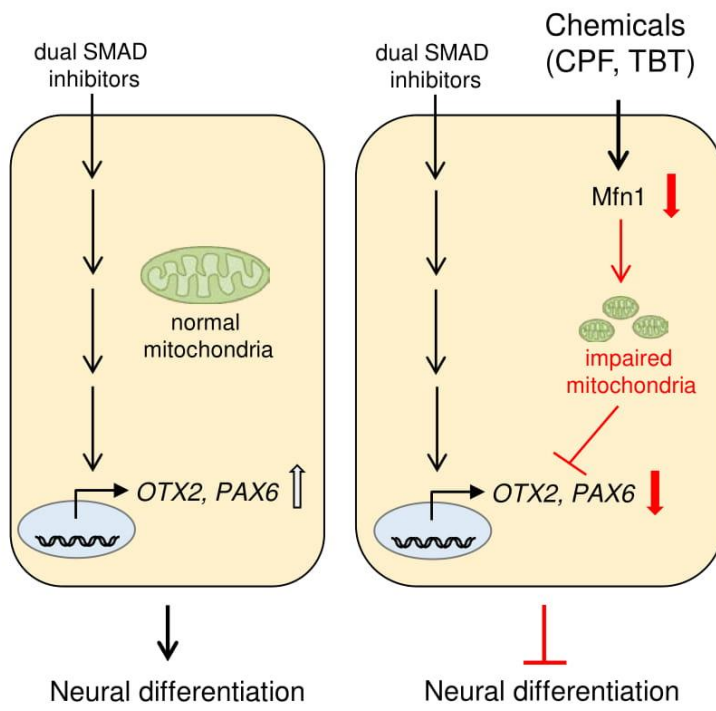


图 8 神经分化阻害作用 (模式图)

平成 28-30 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、スループット性が高い化学物質の *in vitro* リスク予測系の開発を目的として、ラット海馬神経細胞および HESI NeuTox バリデーション試験のためのラット大脳皮質神経細胞を用いて多点電極(MEA)システムにより、以下の内容を実施した。第一に、高い再現性を目指すための条件検討項目として、プレートのコーティング方法、播種細胞密度、AraC の添加の有無、培地交換の量及び化学物質の投与方法について検証を行い、最適化したネットワーク活動評価条件にて複数の化合物を評価した。各々の条件検討の結果から、最適条件を得ることができ、その条件において再現性の高い結果が得られた。次に、今回のプロトコル整備にあたり、米国環境保護庁の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制を構築した。さらに、HESI NeuTox の MEA サブチームにおけるプレバリデーション試験に関する議論に参加して、条件設定に関する有益な情報を得ることができた。また、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 12 化合物のバリデーション試験を実施した。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、環境中化学物質の暴露の可能性が考えられている。現在の化学物質に対する発達神経毒性を評価するガイドライン(OECD: TG426 および EPA: OPPTS870.6300)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(MEA: Multi electrode array)システム法による評価系の構築を目指した。

1 年目は、MEA システムとラット神経細胞の組み合わせによる培養や化学物質の投与方法などの検討を行い、実験条件の最適化を行った。2 年目には複数の化学物質を評価し、スループット性および再現性が高いスクリーニング系となるようプロトコルを確定するとともに、最適化された実験条件を用いて

評価指標の探索を行った。また、HESI NeuTox 多点電極サブチームにおけるバリデーション試験の実施を見据えて、ラット大脳皮質神経細胞を用いた測定条件の最適化および予備試験を実施した。3 年目には、最終化した実験条件および評価指標を用いて、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

細胞は群馬大学・白尾智明教授の研究室で胎生 18 日目のラット胎仔海馬より単離・凍結された凍結ラット胎仔海馬神経細胞およびラット大脳皮質神経細胞(Lonza)を用いた。

2. プレートコーティング

AxionBiosystems 社製 Maestro プレート(48 ウェルタイプ)の各ウェルに 100 μ l の 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))を添加し、インキ

ュベーター内に 1 時間静置した。その後、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°C に保管した。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。

3. 細胞の解凍および播種

細胞バイアルを液体窒素保存容器から取り出し、速やかに 37°C の温浴に 3 分間浸した。その後、クリーンベンチ内で細胞懸濁液を 50 ml チューブに移し、バイアル内を播種用培地 (海馬神経細胞: 10% FBS, 1.14 mM Pyruvic acid, 0.7% Glucose in Minimum Essential medium、大脳皮質神経細胞: 5% FBS, 2% B-27, 2 mM GlutaMax, 1% Penicillin Streptomycin in Neurobasal medium-A) を細胞懸濁液と合わせて 10 ml になるまで少しずつ加えた。よく混合した後に細胞数を計測した。海馬神経細胞は 200 x g で、大脳皮質神経細胞は 370 x g で 5 分間遠心し、一定の細胞密度 (海馬神経細胞: 6,000~50,000 細胞/ウェル、大脳皮質神経細胞: 120,000 細胞/ウェル) になるように 20 µg/ml ラミニンを含む播種用培地を添加し、10 µl/ウェルにて電極上に播種した。播種 2 時間後に、培養培地 (海馬神経細胞: 0.25% GlutaMAX, 1% Penicillin Streptomycin, 2% B27 in Neurobasal medium-A、大脳皮質神経細胞: 播種用培地と同じ組成) を添加した。必要に応じて 0.5 µM AraC を Day 5-7 で加えた。大脳皮質神経細胞について、Day 5 以降は播種用培地、血清除去培地 (2% B-27, 2 mM GlutaMax, 1% Penicillin Streptomycin in Neurobasal medium-A)、あるいは Brainphys neuronal medium (2% NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement) にて培養した。培養は 16-20 日目まで行い、定期的に培地交換および MEA による測定を行った。また、神経活動が安定して得られる培養 16-20 日後に、化合物を急性で添加し、その投与前後での神経活動の変化を解析した。2 時間後、500 µl の培地を添加し、2~3 日おきに培地交換を行った。化合物を 3~5 濃度ずつ添加し、その投与前後で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。

4. MEA システム

使用した 48 ウェルプレートの各ウェルには、4 x 4 の合計 16 個の電極がパターンニングされている。このプレートで細胞を培養した状態で MEA システムにセットすると、各電極における自発的なスパイク発生をアクティビティマップにて可視化することができる (図 1A)。MEA システムではスパイクの検出閾値をノイズレベルの 6~8 倍に設定することでノイズの検出を防いでおり、検出閾値を超えたスパイクはラスタープロットとして表される (図 1B)。神経細胞の成熟とともにスパイクの発生頻度は増加し、やがて神経細胞の突起同士がシナプスを形成することで神経ネットワークを構築する。神経ネットワークの構築により各神経細胞で独立に発生しているスパイクが同期し、最終的にはバーストやネットワークスパイクと呼ばれる連続的でウェル中の複数の電極で同期した電位変化が起こるようになる (図 1C)。

5. 解析

化合物の投与は、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とした。評価指標としては、平均発火頻度 (MFR: Mean firing rate、1 ウェルで 1 分間に発生したスパイク数を活性化電極数で割ったもの) と活性化電極数、バースト頻度 (Burst frequency、1 電極における 1 分間あたりのバースト発生頻度) や同期性 (Synchrony index) 等についても解析した。また、HESI NeuTox の化合物については下記の 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 2 に示した。

6. 化合物

評価した化合物は以下の通りである。トリブチルスズ (TBT)、クロルピリホス (CPF)、バルプロ酸 (VPA)、アセチルサリチル酸 (ASA)、ピ

ククリン(BIC)、ベラパミル(VER)。また、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。

C. 研究結果

1. 細胞の解凍

通常、ラット等げっ歯類の胎児から単離した神経細胞は、そのまま分散培養して各種実験に供する。しかしながら、状態の良い細胞を単離するには熟練した技術が必要であり、またそのための単離・培養設備を準備しなければならない。神経細胞を凍結することで同一ロットの細胞バイアルを大量に作成することができ、事前に当該ロットの状態をグルタミン酸に対する反応性などで確認することが可能なことから、再現性の高い結果が期待できる。一方で、細胞の凍結・融解は細胞に対してダメージを与えることが知られているため、凍結・融解による細胞の生存率への影響について、群馬大学・白尾教授の研究室にて作製されたラット海馬神経細胞を用いて検証した。表 2 にまとめたように生細胞数と死細胞数はほぼ半々であり、生存率としては平均 50%強であった。ロットや実験者(融解の際の)に依存した差はほとんどなかった。

2. コーティングに関する検討

Axion 社が提供している Maestro 用プロトコルでは、0.1% PEI によるプレートコーティングを推奨している。一方で、ラット海馬神経細胞のコーティングについては、群馬大学にて PLL (Poly-L lysine) コーティングが実施されている。そこで、PEI コーティングと PLL コーティングを 1 枚のプレートに施し、その他の条件を全く同一にして実験を行った。その結果、平均発火頻度、活性化電極ともに PLL コーティングよりも PEI コーティングにおいて、顕著な値の上昇が確認された。電極がパターンニングされていない通常プレートによる細胞観察では、培養開始 2 日後には細胞の凝集が PLL コーティングの方で観察されている一方で、PEI コーティングでは、細胞が接着していないことによる隙間が極端に少なかった。次に PEI コーティングがどの程度有効なのかを調べるため、PEI コーティング直後、約 3 週間後および約 4 週間後のプレートをを用いて実験を行った。その結果、コーティング 3 週間以降のプレートでは、活性化電極数はコーティング直後のものと大差ない変化を示すものの、平均発火頻度の時間依存的な上昇は AraC の有無にかかわらずコーティング直後に比べて低い値で推移することが明らかとなった(図 3)。活性化電極数については、コーティング期間の長さには影響されなかった。

以上より、Maestro による MEA システムにおいては、PEI コーティングの方が適しており、コーティングの効果は 3 週間保存することで低減することが示唆された。

3. 細胞播種密度の検討

3. 細胞播種密度の検討

MEA システムの性質上、電極部分に細胞が存在しなければスパイクの計測は不可能である。我々は再現性の高い結果を得るため、ラット海馬神経細胞について細胞播種密度の検討を行った。これまでに他の研究室ではラット大脳皮質神経細胞における検討が行われており、その際の細胞播種密度は 150,000 細胞/25 μl である。今回の検討では、播種する細胞懸濁液量を全電極が覆うことのできる最小量 10 μl とした。これまでの論文における細胞播種密度に関する情報と最小量 10 μl を鑑みたくて細胞播種密度以外の条件を揃えて 6,000、12,500、25,000、50,000 細胞/10 μl の 4 条件にて計測を行ったところ、12,500 細胞/10 μl 以下では平均発火頻度および活性化電極数のいずれもほとんど増加しなかった。25,000 細胞/10 μl の条件では、50,000 細胞/10 μl の条件と比較して、平均発火頻度の増加が緩やかであり、また最高値も低かった(図 4A)。活性化電極数については、50,000 細胞/10 μl では 16 電極全てが活性化する一方で、25,000 細胞/10 μl では最高で 12~14 電極が活性化した(図 4B)。細胞数を増やすことで 16 電極全てを確実に覆うことが可能になるものと考察される。以上より、ラット海馬神経細胞の細胞播種密度は、50,000 細胞/10 μl が妥当との結論に至った。

4. AraC の添加に関する検討

神経細胞単離の際、グリア細胞の混入は避けられない。また、血清存在下での培養によりグリア細胞は増殖するため、グリア細胞の割合によって化学物質に対する応答も異なる可能性が考えられる。

そこで、グリア細胞の増殖による神経ネットワーク形成への影響を検討するため、グリア細胞の増殖抑制剤である 0.5 μM AraC を培養開始 5 日目に添加し 7 日目に除去する群 (0.5 AraC) と AraC を添加しない群 (0 AraC) の 2 群についてラット海馬神経細胞を用いて比較した。その結果、0 AraC および 0.5 AraC のいずれにおいても培養開始 7 日後から急激な平均発火頻度の上昇が観察された (図 5A)。平均発火頻度の最高値は 0 AraC の方が高かった。これは、グリア細胞の増殖が抑制されなかったことにより、グリア細胞の影響により神経細胞間のネットワーク形成が亢進した可能性が考えられた。両群で活性化電極数の経時的変化に大きな差はなく (図 5B)、いずれの群においても培養開始 12~19 日目において平均発火頻度の値が安定していたことから、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目が最適だと考えられる。

培地を全量交換ではなく半量あるいは 1/3 量で交換することで AraC の濃度を徐々に薄くしていく方法もある。しかし、Maestro プレートはウェル間で培地の蒸発量が異なっていることから、AraC の濃度を徐々に薄める方法では、同一の条件とはなり得ない。従って今回は培養 7 日目に AraC を培地の全量交換によって除去した。神経細胞の単離 (ロット) ごとにどの程度グリア細胞が混入しているかは不明であることから、AraC 非添加の場合にグリア細胞と神経細胞の割合がどの程度なのかは全く予想できない。AraC の添加によってグリア細胞の増殖がある程度抑制されれば、培養期間を通じてのグリア細胞が混入している割合はそれほど大きくばらつかないのではないかと考えられる。現段階では、定量的にどちらが最良か判断できないため、引き続き条件検討を続けることが必要である。

5. 培地交換量

本研究では、最大で 28 日間の培養を行うが、その間 3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行う。その際、ウェル中のすべての培地を除

去して新たに培地を添加すると、細胞が乾燥してしまい結果に影響することが予想された。そこで、培地交換の量を半量あるいは全量の 2 条件について検討を行った。その結果、0 AraC の半量交換が全量交換に比べて顕著に高い平均発火頻度だったが、0.5 AraC では半量交換と全量交換に大きな差はなかった (図 6A)。活性化電極数にも半量交換と全量交換で大きな差はなかった (図 6B)。

3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行うと、インキュベーター内の湿度が十分であっても各ウェルより培地が蒸発していく。しかもウェルごとに蒸発量が異なるため培地量を一定に保つことが困難だと考えられる。0.5 AraC の場合、半量交換と全量交換で大差なかったことから全量交換によって毎回ウェル中の培地を一定量に保つことが最適だと考えられる。

6. 急性投与の投与操作の検討

上述したように、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目付近が最適だと考えられる。急性投与実験では、化学物質の投与前後でのパラメーターの比較を行うことから、化学物質による作用のみを抽出する必要があり、溶媒や投与操作によるパラメーター変動は避けたい。そこで、溶媒に最も多く用いられる培地と DMSO に関して、投与操作の検討を行った。DMSO の最終濃度を 0.1% に抑えたいため、500 μl の培地に対して 5% DMSO を 10 μl 投与した。

10 μl の培地および DMSO を 1 ショットで投与した場合、培地では平均発火頻度の大きな変化は観察されなかったものの、DMSO の投与により平均発火頻度の値が大きく変化し時にはまったくスパイクが観察されない時間帯もあった (図 7)。これは高濃度の DMSO が神経細胞に対して直接作用したためだと考えられる。次に高濃度の DMSO が細胞に直接作用することを避けるため、以下の 4 つの投与方法を検討した。① 10 μl の 5% DMSO を 1 ショットではなく、ゆっくりと時間をかけてウェル中に投与、② 96 ウェルプレートに配置した 10 μl の 5% DMSO に細胞を培養している実際のマエストロプレートのウェルから培地を 50 μl 抜いて混合し、元のウェルに戻す方法、③ ②における培地量を 100 μl にした方法、④ ②における培地量を 200 μl にした方法。①は 1 ショットで投

与した場合と同じように、平均発火頻度が大きく変動した(図 8A)。②では添加直後に平均発火頻度がゼロとなる時間帯も観察された(図 8B)。③④はウェルに投与する DMSO の濃度が大幅に薄くなっていることから、投与による影響はほぼ消失した(図 8C,D)。以上より 100 μ l 以上の培地と 5% DMSO を混合し、ウェルに投与することが最適だと考えられる。

7. ラット胎児凍結海馬神経細胞を用いた MEA による化学物質の毒性評価

ラット海馬神経細胞において、1 年目はこれまでに選定した評価指標のもと、ネットワーク活動評価の条件を以下のように定めた。1) プレートコーティング: 0.1% PEI, 2) 細胞播種密度: 生細胞数 50,000 細胞/ウェル, 3) AraC 濃度および投与期間: Day5-7 に 0.5 μ M, 4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換, 5) 化学物質の投与: Day 16~に 200 μ l の培養液と混合後に細胞に添加。まず、各ウェルの MFR および AE の経時的变化について、観察を行った。その結果、いずれのパラメーターもウェル毎のバラツキが小さく、MFR は Day 14 をピークとして、Day 16 では少し減少傾向であった(図 9A)。一方、Day 9 の時点でほとんどすべての電極が活性化状態となり、Day 16 までそれは維持された(図 9B)。そこで、Day 17 において、陰性対照物質であるアセチルサリチル酸 (ASA) を含む複数の化学物質(有機スズ化合物で船底塗料などに用いられているトリブチルスズ: TBT、有機リン系殺虫剤クロルピリホス: CPF、抗てんかん薬として用いられているバルプロ酸: VPA) を急性で 4 濃度ずつ投与し、MFR への影響を調べた。その結果、陰性対照物質である ASA は 300 μ M まで投与しても MFR に変化がなかったが、3 μ M TBT、30 μ M CPF、3 mM VPA にて有意に MFR が減少することを明らかにした(図 10A)。その他、GABA_A 受容体アンタゴニストであるビククリン (BIC) および Ca²⁺チャネル拮抗薬であるベラパミル (VER) についても実施したので、結果を掲載した(図 10B)。今後、発達神経毒性評価系として感受性や反応性等において、過去に本研究班で行った他の試験系と比較することで試験法としての有用性や予測性を検証する。

8. 国際共同研究体制の構築

上記の条件検討を行うにあたり非常に有用

だったのが、米国環境保護庁 (EPA) の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制である。EPA を訪問し、実際に作業を行っている実験補助の方を交えて直接話をする事で技術的な問題が解決できるとともに、プロトコルの最適化を加速することができた。特に、プレートのコーティングおよび細胞播種について、コーティング剤である Laminin を培地に混合しそこに細胞を懸濁させて播種することで、コーティング時間の短縮と電極上への確実な細胞播種を実現することができ、再現性が飛躍的に向上した。また、HESI (Health and Environmental Sciences Institute) の NeuTox サブチームにも参加し、プレバリデーションに関する議論を進めている。

9. HESI NeuTox MEA サブチームにおけるバリデーション試験

HESI NeuTox MEA サブチームでは、電話会議および対面会議にてバリデーション試験に関する議論を行いながら、痙攣誘発毒性評価法の開発および国際協調を推進している。バリデーション試験に参加した施設および使用する細胞を表 3 にまとめた。

我々は、NeuTox のバリデーション試験に参加するにあたり予備試験を実施することとした。予備試験の実施にあたり、バリデーション試験に用いるラット大脳皮質神経細胞にて、測定条件の最適化を行った。バリデーションに参加する他の施設の実験条件等と比較・検討した。その結果、以下の条件にて測定を行うこととなった。1) プレートコーティング: 0.1% PEI、2) 細胞播種密度: 総細胞数 120,000 細胞/ウェル、3) AraC: 投与しない、4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換、5) 化学物質の投与: およそ Day 20 に 200 μ l の培養液と混合後に細胞に添加。海馬神経細胞における培養条件を用いて、測定条件の最適化を開始した当初、ピクロトキシン投与により MFR および Burst frequency がピクロトキシンの濃度依存的に減少した。この反応はピクロトキシンの作用機序からは考えにくいものであったため、3 種類(播種用培地、血清除去培地、および Brainphys neuronal medium) の培地条件にてピクロトキシンの反応性について検討を行うこととした。図 11A には、3 種類の培地における MFR の経時的变化を、図 11B には、AE の経時的变化を

示した。MFR は 3 種類の培地でそれほど大きな違いはなかったが、活性化電極は Brainphys を用いた際には、Day 8 において半分以上が活性化し、その後緩やかに増加していった。また、播種用培地を用いた場合にも、Day 11 の時点で 3/4 の電極が活性化した。一方で、血清除去培地を用いた場合には、活性化電極の数は Day 19 まで緩やかに増加していった。逆に Burst frequency は血清除去培地を用いると他の 2 種類の培地よりも大きな値を示した(図 11C)。Day 20 において、GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシンおよびビククリンを急性投与した際の、MFR、Burst frequency および同期性(Synchrony index)についてそれぞれ図 12A-C にまとめた。ピクロトキシンおよびビククリンの作用機序は、神経活動に対して抑制的に寄与している GABA_A 受容体を阻害し、興奮性を上昇させるとともにスパイクの同期性を上昇させる。これに類似した反応を示したのが血清除去培地であった。今後、再現性を確認するとともにバリデーション試験のデータ提出に向けて合計 12 化合物のデータ取得を行う。

10. 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 13-24)。また、これらの結果を一見できるようヒートマップにまとめた(図 25)。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、フェントイン、4-アミノピリジン、アミキシシリンは 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、ラット神経細胞および MEA システムを用いて神経ネットワーク形成後の化学物質のリスク予測評価系の開発を目指し、1 年目にはプレートコーティング方法、播種細胞密度、AraC の添加、培地交換の量について検証を行った。その結果、最適だと考えられる条件が選択でき、より高い再現性が得られた。また、化学物質の投与方法についても溶媒である DMSO を用いて検証した。DMSO を 10 倍に薄めて投与する方法は測定パラメーターへ影響を与えないことが明らかとなった。

2 年目には、ラット海馬および大脳皮質神経細胞を用いて、MEA における化合物の急性投与に対する評価系の構築を行った。両細胞において、条件が最適化されたため複数の化合物を評価系した。ラット海馬神経細胞においては、過去に本研究班で実施済の他の評価系の結果との比較を行うことで試験法の有用性や予測性を検証することが可能である。一方で大脳皮質神経細胞においては、GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシンおよびビククリンを投与し、期待される結果が得られた。

3 年目には、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

海馬ニューロンを用いて神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒性評価系の開発を行い、再現性が高く最適な評価系を構築した。また、対照物質の投

与方法についても適切な方法を見出した。次いで、2種類のラット神経細胞を用いて、MEAによるスループット性および再現性の高い評価系の構築を行った。最後に、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

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Kanda Y. Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 7, 40925 (2017).
- [2] Yamazaki D, Kanda Y, Sekino Y. Field potential recording method using multi-electrode array system-Cellular responses in human iPSC-derived cardiomyocytes and rodent brain-derived neurons-. *BUNSEKI*, 7:290-295 (2017).
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [4] 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).
- [5] 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] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPSC cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational

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。

Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30

- [2] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 細胞の神経分化に対するクロルピリホス曝露の影響、第 136 回日本薬理学会関東部会、2017/7/8 (東京)
- [3] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 細胞の神経分化に対するトリブチルスズの影響、第 44 回日本毒性学会、2017/7/11 (横浜)
- [4] 山崎大樹、後藤和愛、小金澤紀子、花村健次、白尾智明、関野祐子、諫田泰成：海馬ニューロンを用いた神経活動ネットワークによる評価法の開発、第 44 回日本毒性学会、2017/7/12 (横浜)
- [5] Yamazaki D, Goto K, Koganezawa N, Hanamura K, Shirao T, Sekino Y, Kanda Y: Development the assay of spontaneous activity in rat hippocampal neural networks, 10th world congress, Alternative and animal use in the life science, 2017/8/20-24 (シアトル、米国)
- [6] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価系の開発、第 3 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、2017/9/16 (東京)
- [7] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y: Development of human iPSC cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, Safety Pharmacology Society 2017, 2017/9/24-28 (ベルリン、ドイツ)
- [8] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y : Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPSC cells, WCP, 2018/7/1-5 (京都、日本)

- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] 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)
- [13] 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)
- [14] 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、2019/3/16 (大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

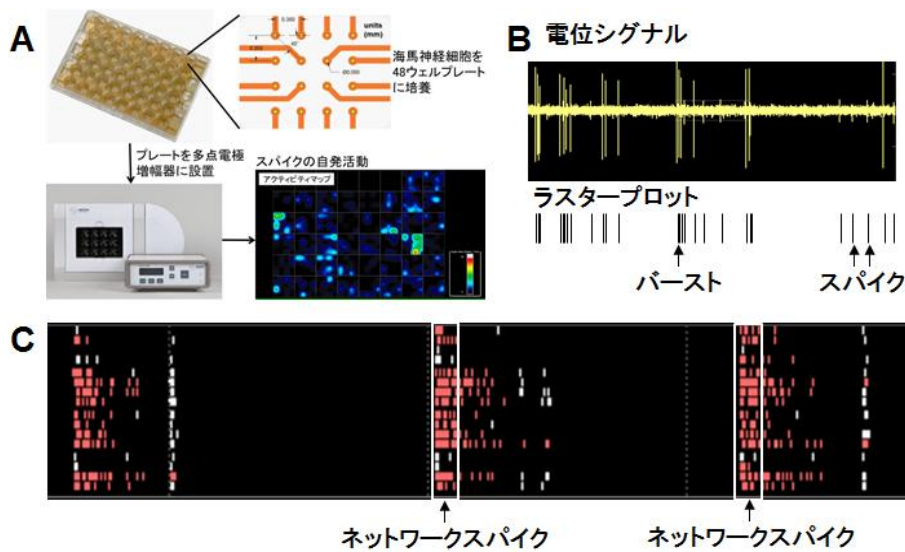


図 1. 神経細胞を用いた多点電極システムについて

A. 各ウェルに16個の電極が埋め込まれている48ウェルプレートに対して凍結ラット胎仔海馬神経細胞を1ウェルあたり50,000細胞を播種・培養し、Axion社製多点電極システムに設置し、神経活動を記録する。神経活動（スパイク）がアクティビティマップとして疑似カラー表示される。

B. 1電極ごとに電位シグナルが検出され、検出閾値よりも大きなシグナルはラスタープロットとして表示される。ラスタープロット1本1本はスパイクを表しており、スパイクがまとまって発生した場合にはバーストと呼ばれる。

C. 1ウェル（16電極）のラスタープロット。同期したスパイクをネットワークスパイクと呼ぶ。白のラスタープロットは単一のスパイク、赤のラスタープロットはバーストを表している。

1. Mean Firing Rate (単位時間あたりのスパイク数)

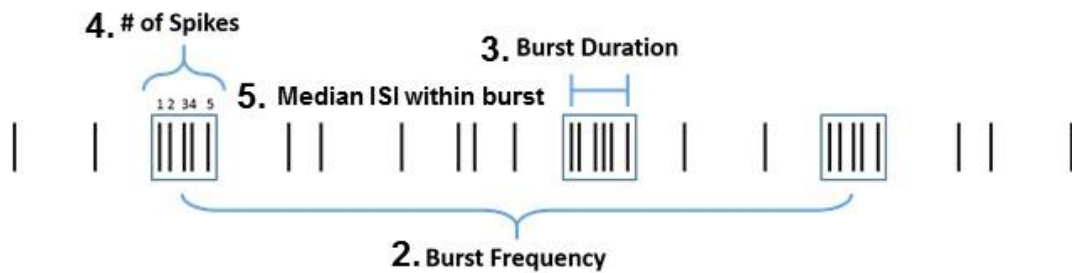


2. バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

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

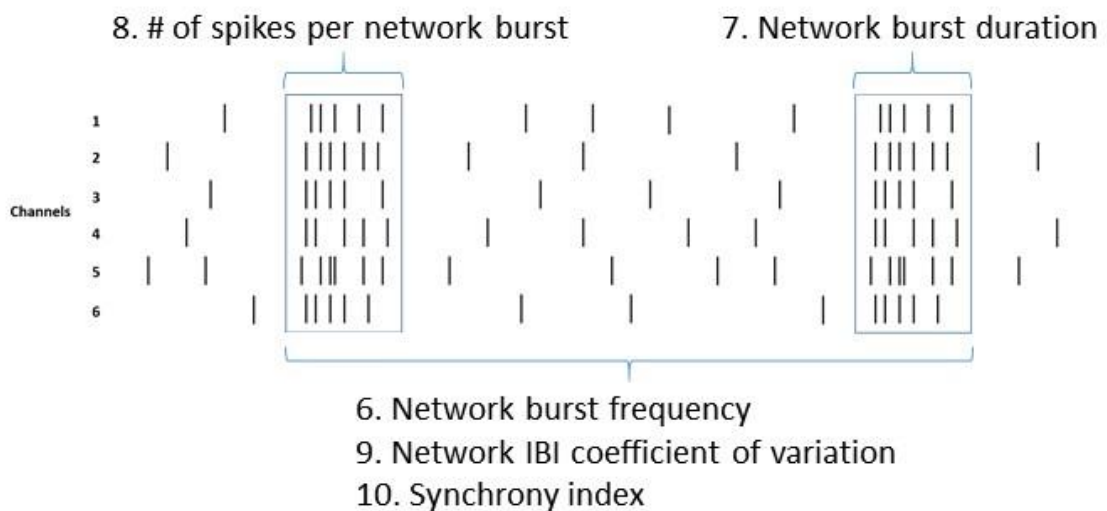


図 2. 各パラメーターについての説明

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。

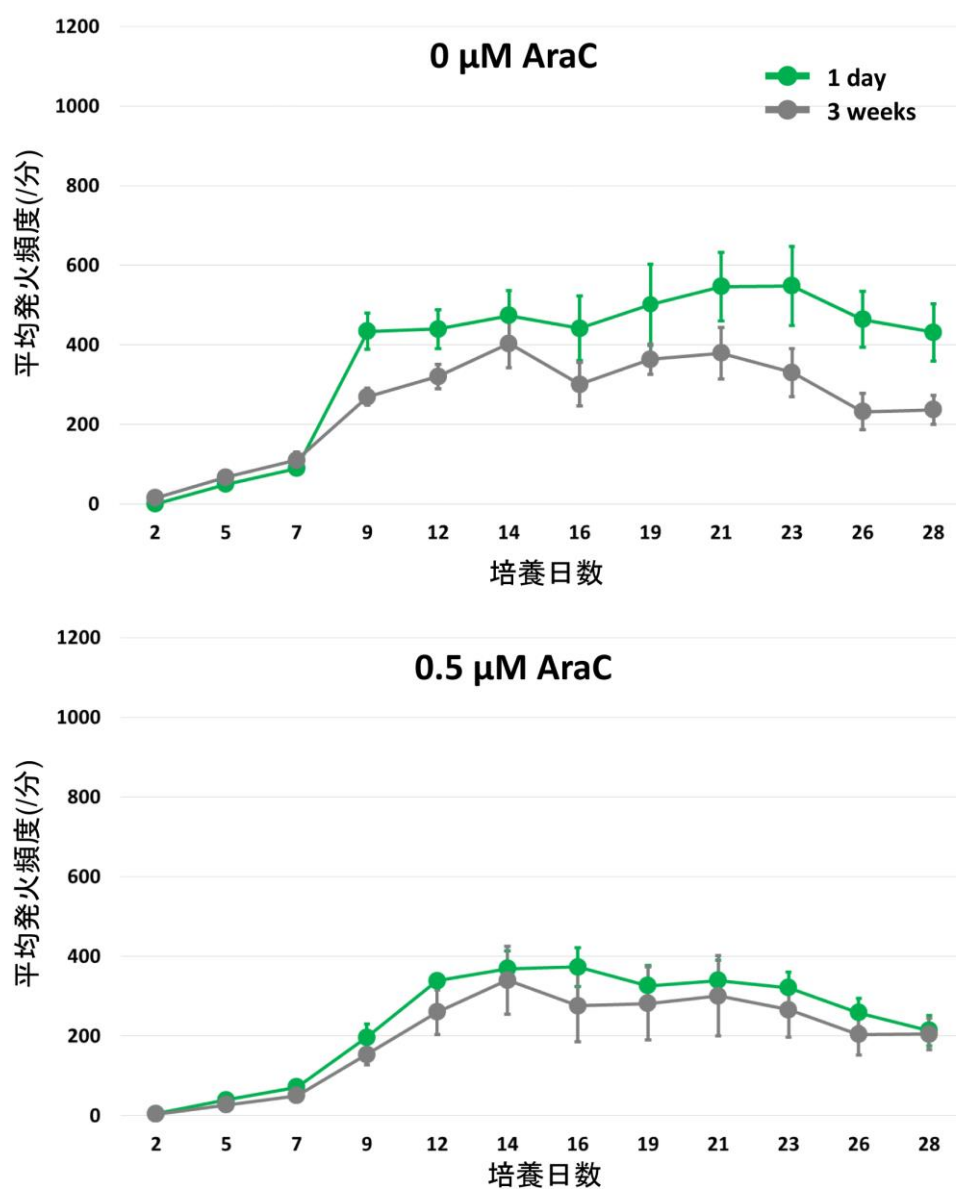


図 3. コーティング後の保存期間の検討

マエストロプレートに対して 0.1% PEI コーティングを行った後、1 日 (1 day) あるいは 3 週間 (3 weeks) 後に細胞を播種し、28 日後まで計測を行った。AraC を適用しない場合 (上段) には、3 weeks に比べて 1 day の方が平均発火頻度は高値であった。一方で、0.5 μM AraC の適用 (下段) では、1 day および 3 weeks に大きな差はなかったものの、コーティングから時間が経過すると、若干低い平均発火頻度で推移する傾向があった。

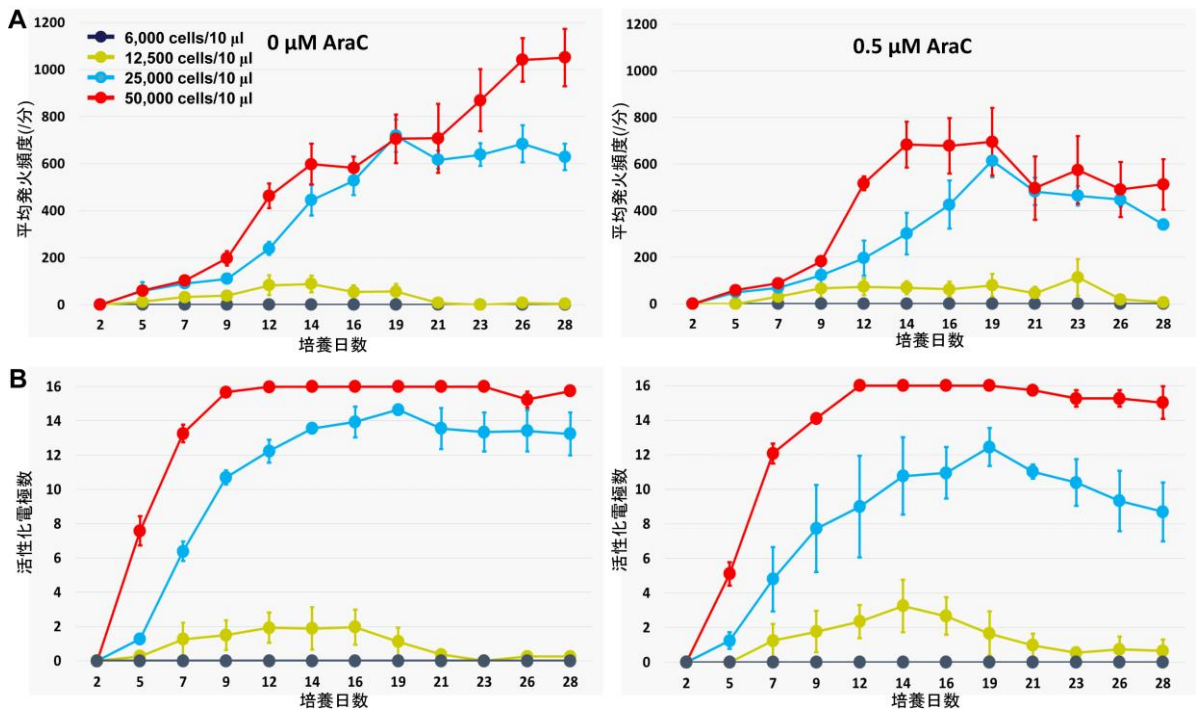


図 4. 播種細胞密度の検討

播種細胞密度について 6,000、12,500、25,000、50,000 細胞/10 μl で検討を行った。0 μM AraC (左) および 0.5 μM AraC (右) を適用した際の平均発火頻度 (A) および活性化電極数 (B) について 28 日まで計測した。6,000 細胞/10 μl および 12,500 細胞/10 μl では、培養期間が 9 日を過ぎたところで平均発火頻度が上昇せず、28 日目まで低値であった。活性化電極数も 12,500 細胞/10 μl や 25,000 細胞/10 μl ではほとんどの電極が活性化しなかった。25,000 細胞/10 μl では、50,000 細胞/10 μl に比べてわずかに遅れて平均発火頻度が上昇したものの、すべての電極が活性化しなかったことから全電極を覆うことができないものと考えられる。

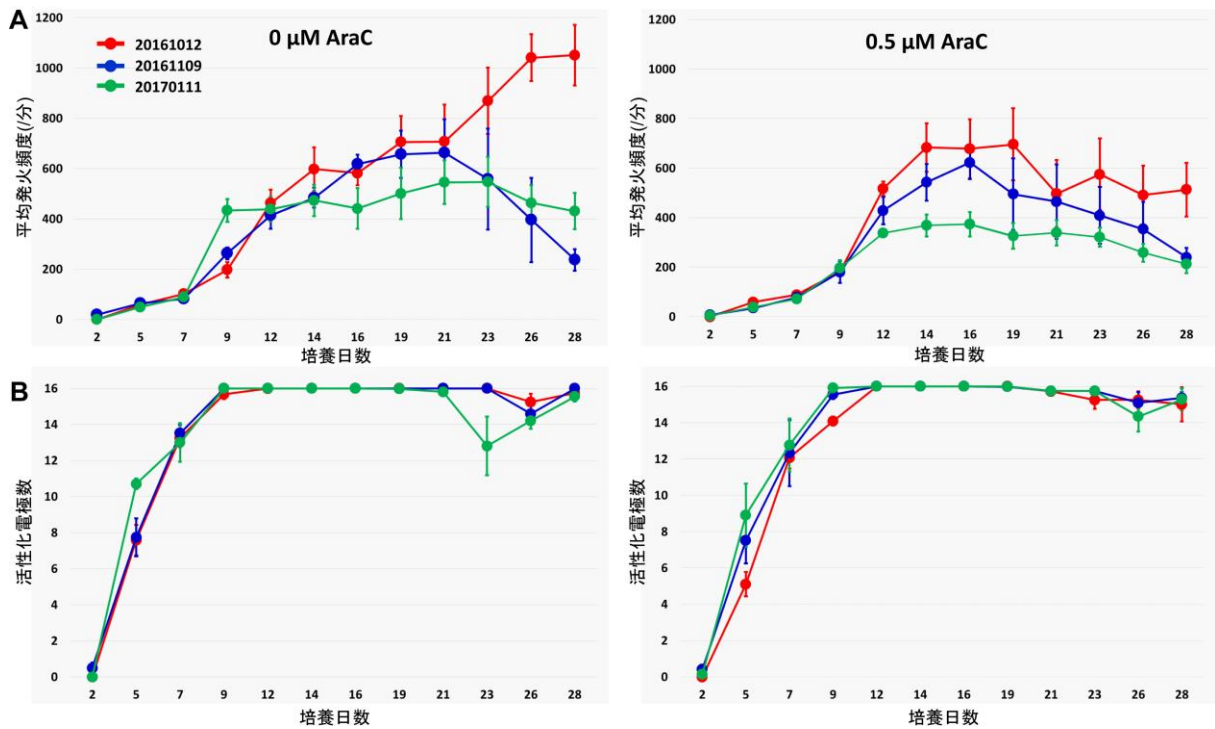


図 5. AraC 濃度の検討

Day 5 から Day 7 の 3 日間に培地に AraC を加えるかどうかの検討を行った。0 μM AraC (左) および 0.5 μM AraC (右) を適用した際の平均発火頻度 (A) および活性化電極数 (B) について 28 日まで計測した。それぞれ同一ロット、同一条件にて 3 回行った結果を示した。AraC の添加、非添加のいずれにおいても平均発火頻度は Day 7 あるいは Day 9 から上昇し、一部を除いて Day 21 あたりから下降を始めた。活性化電極数については、いずれも Day 12 では最大値まで到達し、Day 19 まではそれを維持した。

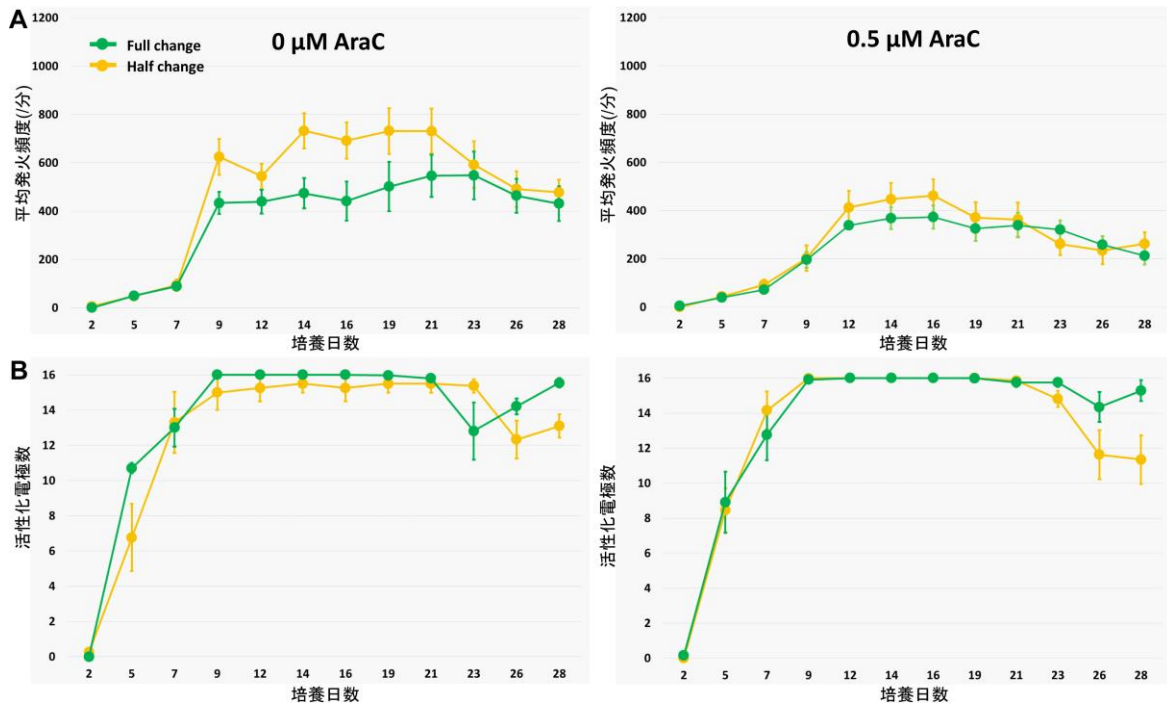


図 6. 培地交換量の検討

3日あるいは4日おきに実施している培地交換に関して、交換する培地の量を全量（緑）あるいは半量（黄色）か検討を行った。0 μM AraC（左）および0.5 μM AraC（右）を適用した際の平均発火頻度（A）および活性化電極数（B）について28日まで計測した。平均発火頻度については、0 μM AraCの半量交換を除いて他の3条件はほぼ同じような値で変化した。活性化電極数についても0 μM AraCの半量交換のみ最大値に到達しなかった。半量交換の条件では、培養期間後半のDay 23あたりから活性化電極数の下降が目立った。

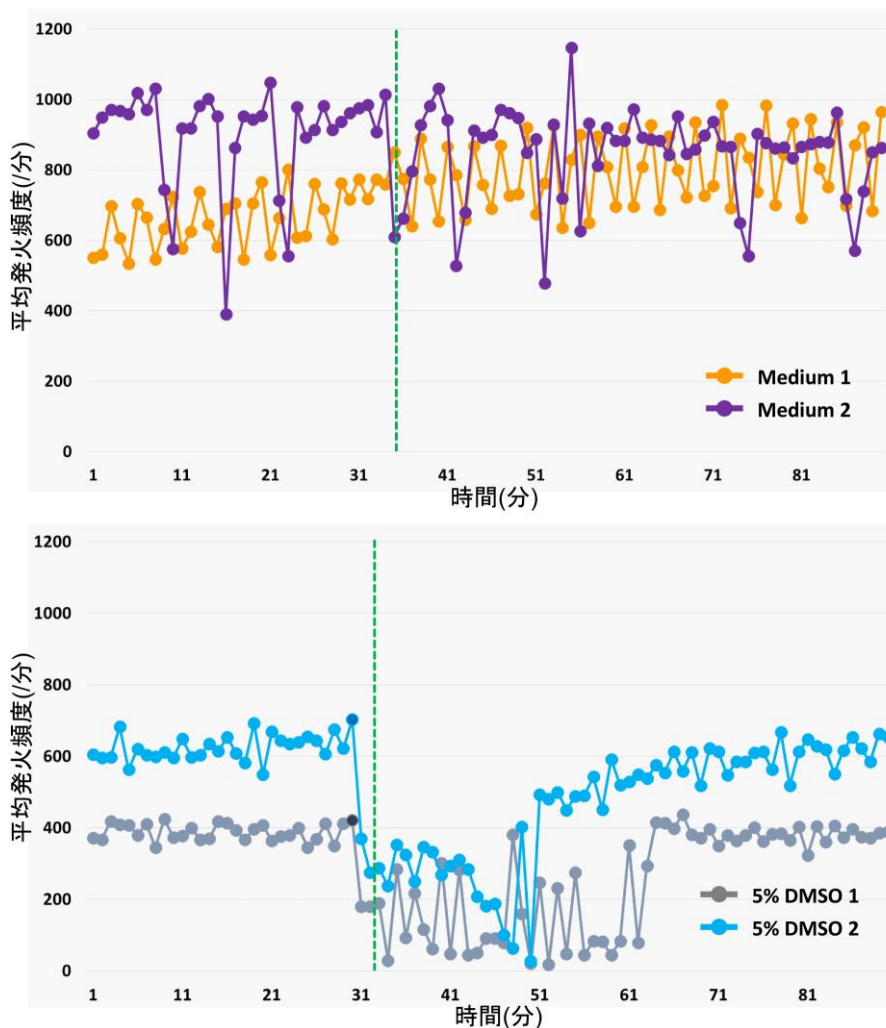


図7. 投与方法に関する検討1

化学物質の投与方法に関する検討。およそ30分間の測定後に10 μ lのmedium(上段)および5% DMSO(下段)を1ショットでウェル中に投与し、その後60分間平均発火頻度を記録した。1分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。Mediumを投与した細胞は培養26日目、DMSOを投与した細胞は培養16日目である。Mediumの投与では、平均発火頻度に大きな乱れは観察されなかったが、5% DMSOの投与によって急激な平均発火頻度の下降が観察され、その後30分間元の値に戻らなかった。

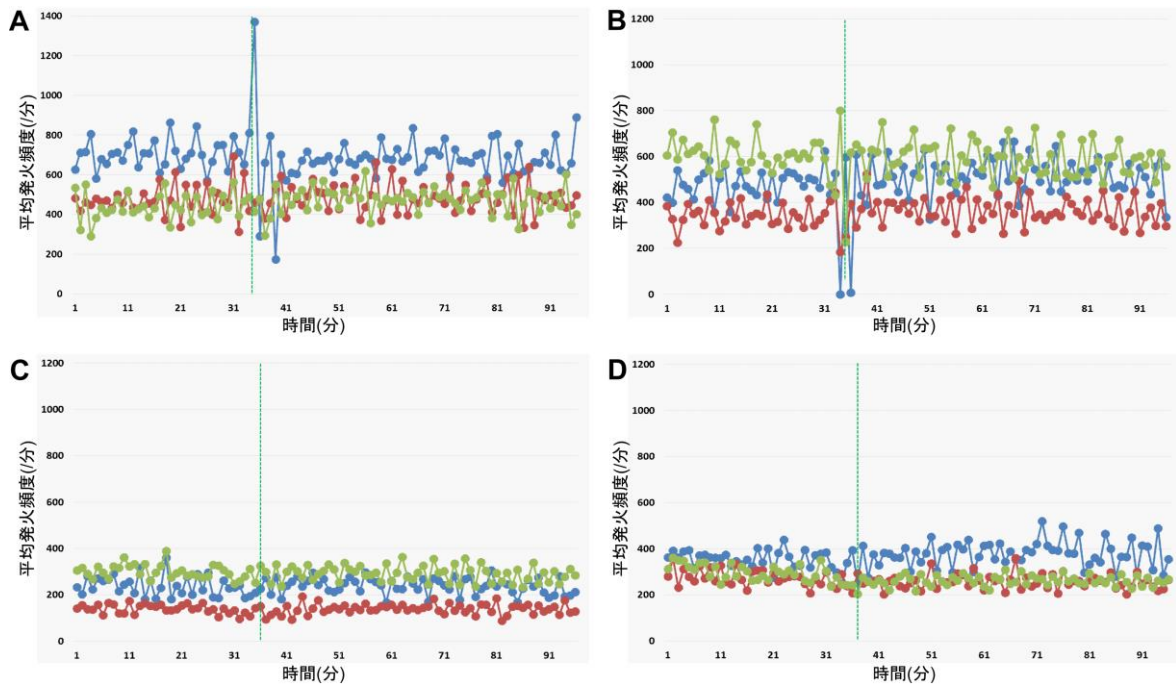


図 8. 投与方法に関する検討 2

化学物質の投与方法に関する検討。およそ 30 分間の測定後に 5% DMSO をウェルにゆっくりと添加 (A)、96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 50 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (B)、96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 100 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (C) および 96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 200 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (D) した。添加の後 60 分間平均発火頻度を記録した。1 分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。100 μ l 以上の培地に 5% DMSO を混合した場合に添加による影響が観察されなくなった。

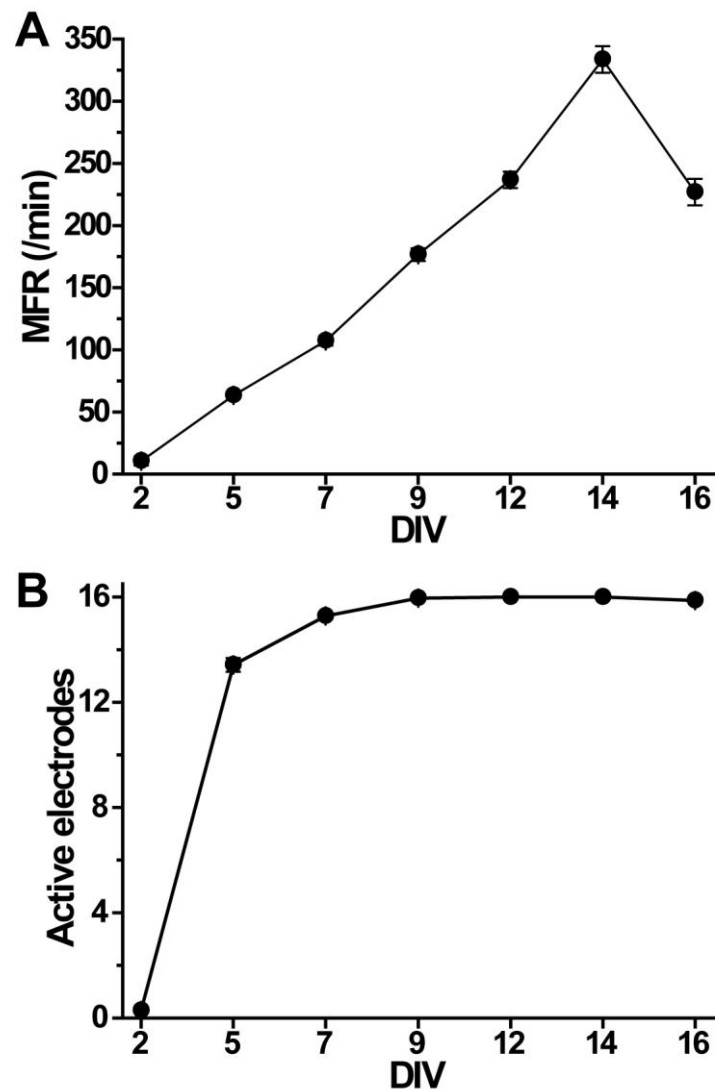


図9. ラット海馬神経細胞における神経活動の経時的変化

1) プレートコーティング: 0.1% PEI、2) 細胞播種密度: 生細胞数 50,000 細胞/ウェル、3) AraC 濃度および投与期間: Day5-7 に 0.5 μ M、4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換の条件にてラット海馬神経細胞を培養した際の、MFR (A) および Active electrodes (B) の経時的変化を示した。MFR が Day 16 にて落ち込んでおることから、このタイミングで化学物質を急性投与した。いずれも 48 サンプルの平均値および平均誤差 (SEM) を示した。

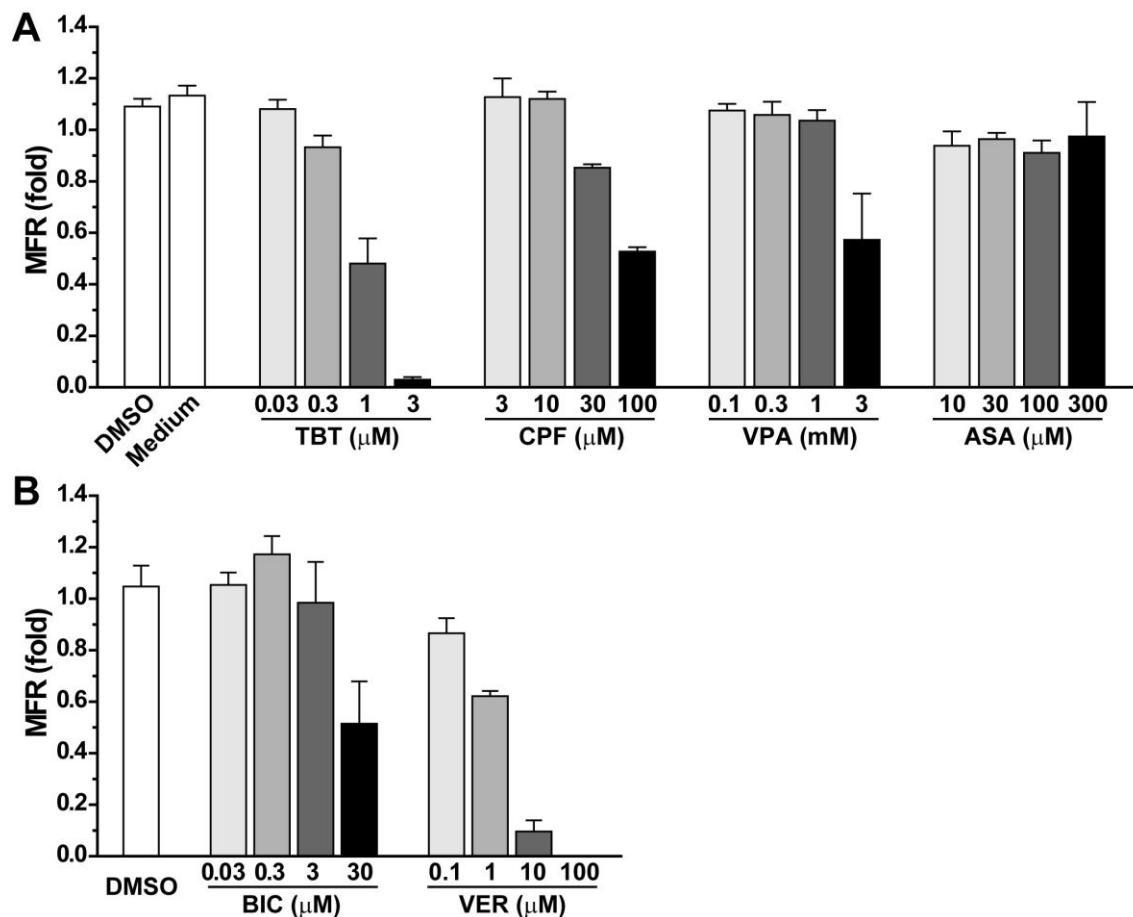


図 10. ラット海馬神経細胞における化学物質の急性投与に対する反応

(A) 図 1 の Day 16 のタイミングにて、トリブチルスズ (TBT)、クロルピリホス (CPF)、バルプロ酸 (VPA)、アセチルサリチル酸 (ASA) を 4 濃度ずつ急性投与した。各化学物質の投与前の MFR の値 (5 分間の平均値) を 1.0 として規格化し、投与 60 分後の MFR の値 (5 分間の平均値) を算出した。(B) 図 1 の Day 16 のタイミングにて、ビククリン (BIC)、ベラパミル (VER) を 4 濃度ずつ急性投与した。各化学物質の投与前の MFR の値 (5 分間の平均値) を 1.0 として規格化し、投与 60 分後の MFR の値 (5 分間の平均値) を算出した。例数はすべて 3 以上である。

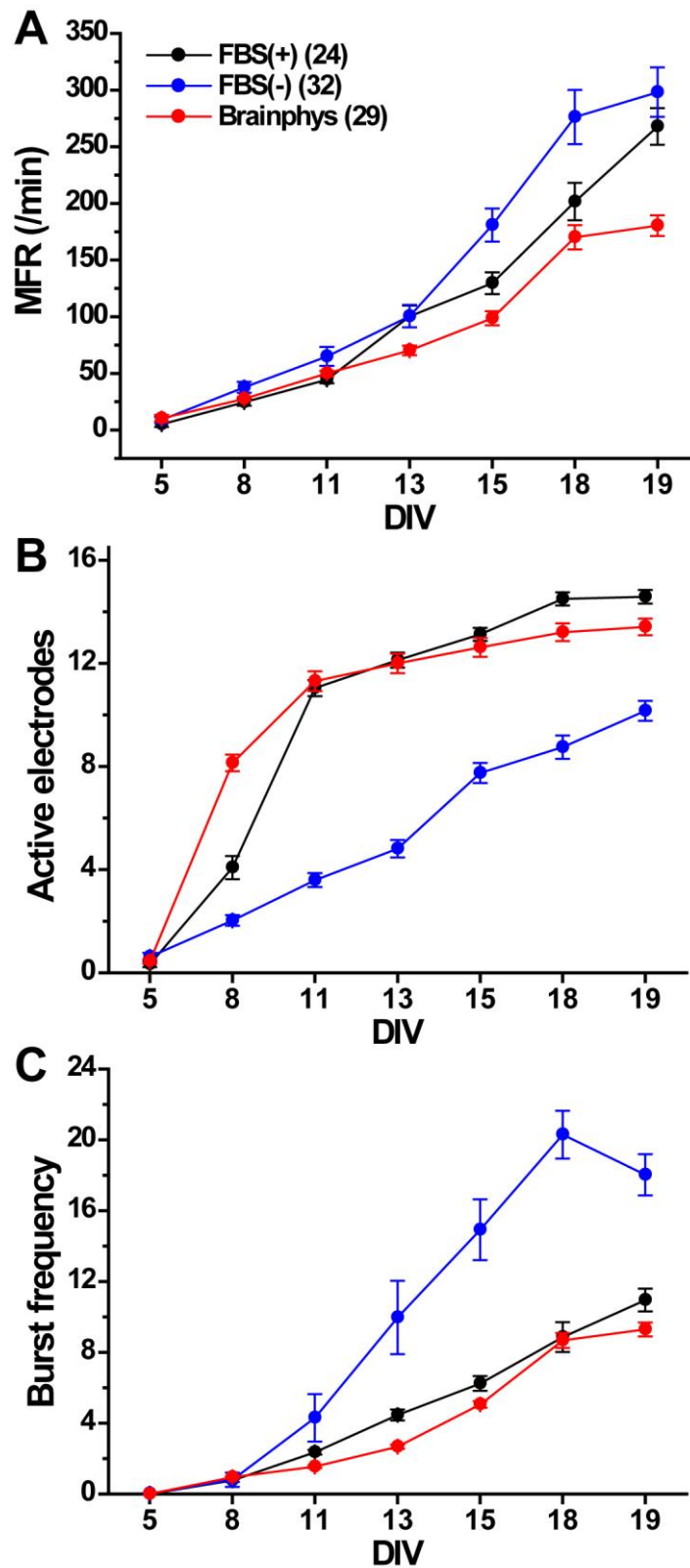


図 11. ラット大脳皮質神経細胞の神経活動に対する培地の検討

ラット大脳皮質神経細胞の神経活動に対する播種用培地 (FBS+)、血清除去培地 (FBS-、Day 5 までは播種用培地で培養し、Day 5 から FBS- に置換) および Brainphys の 3 種類の培地の影響を検討した。MFR (A)、Active electrodes (B) および Burst frequency (C) のそれぞれのパラメーターを Day 5 から Day 19 まで経時的変化を示した。括弧内は例数を示す。

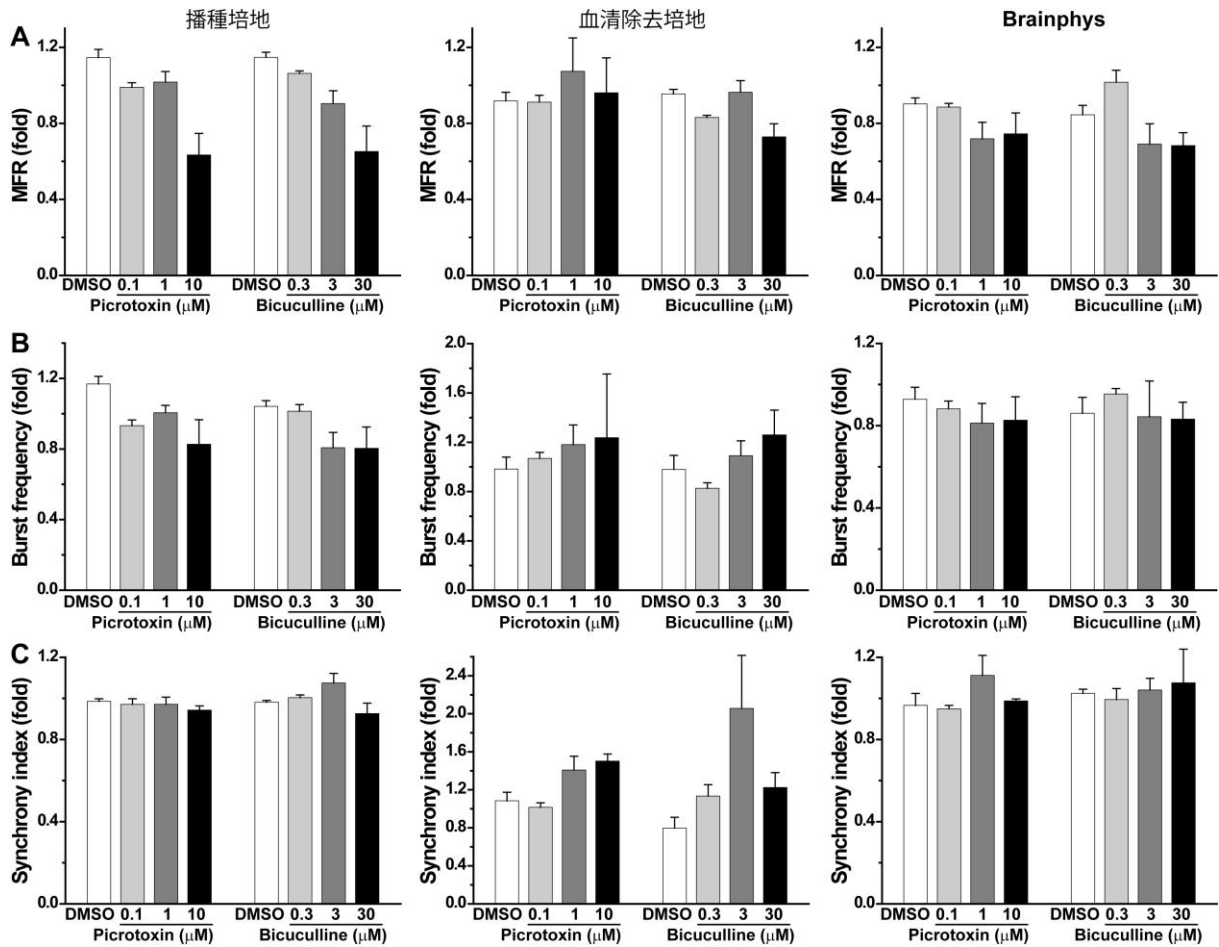


図 12. ラット大脳皮質神経細胞の GABA_A 受容体アンタゴニストによる反応性に対する培地の検討

GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシシンおよびビククリンの急性投与に対する、MFR (A)、Burst frequency (B) および Synchrony index (C) の反応を検討した。左レーンが播種用培地、真ん中が血清除去培地、右レーンが Brainphys 培地である。Day 20 において、両化合物を急性投与し、各化学物質の投与前の各パラメーター値 (5 分間の平均値) を 1.0 として規格化し、投与 60 分後の各パラメーター値 (5 分間の平均値) を算出した。いずれも 3 例以上のデータを示す。

1. ペンチレンテトラゾール

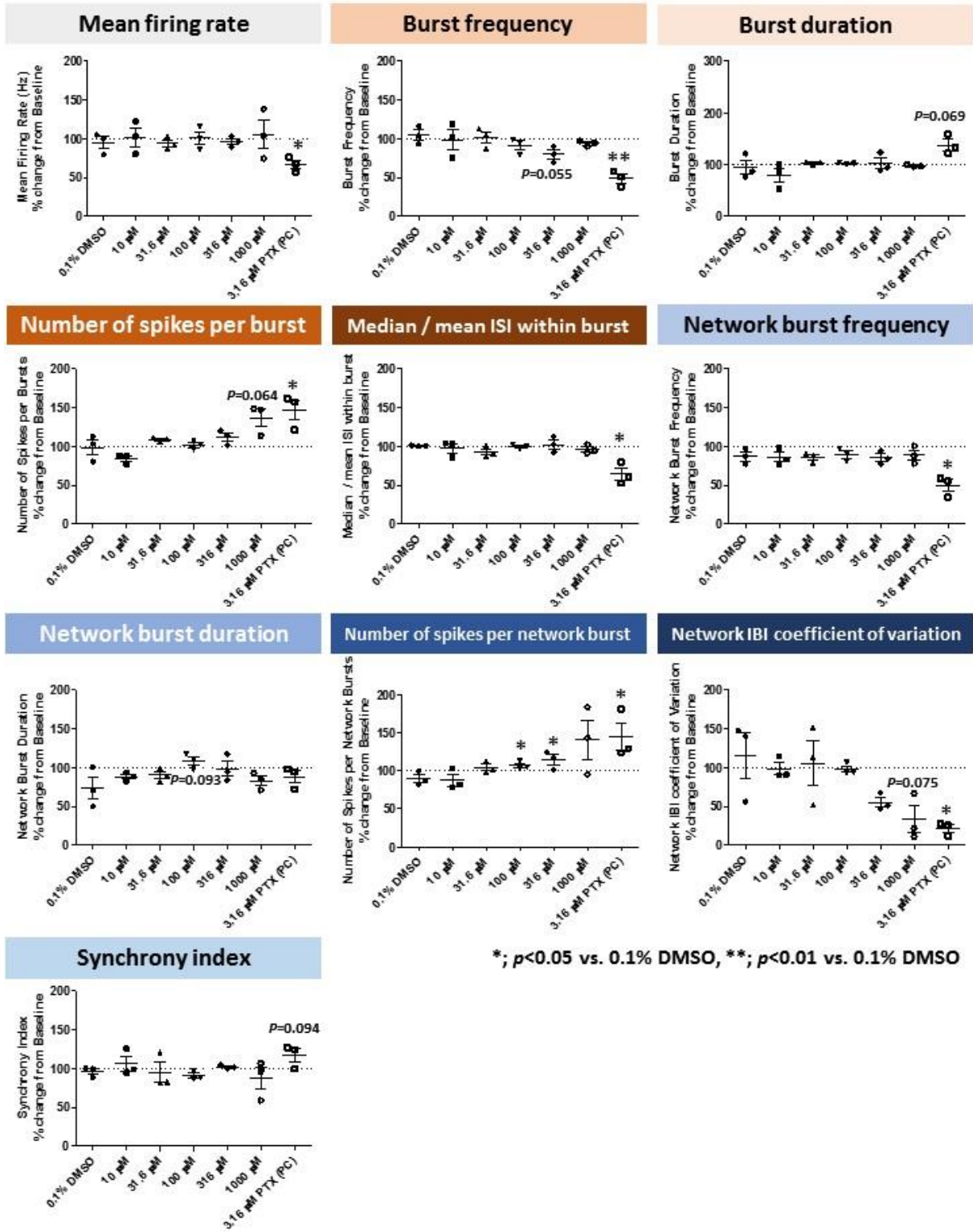


図 13. ペンチレンテトラゾール

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (PTX)、10-1000 μM 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土標準誤差を 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. ピクロトキシン

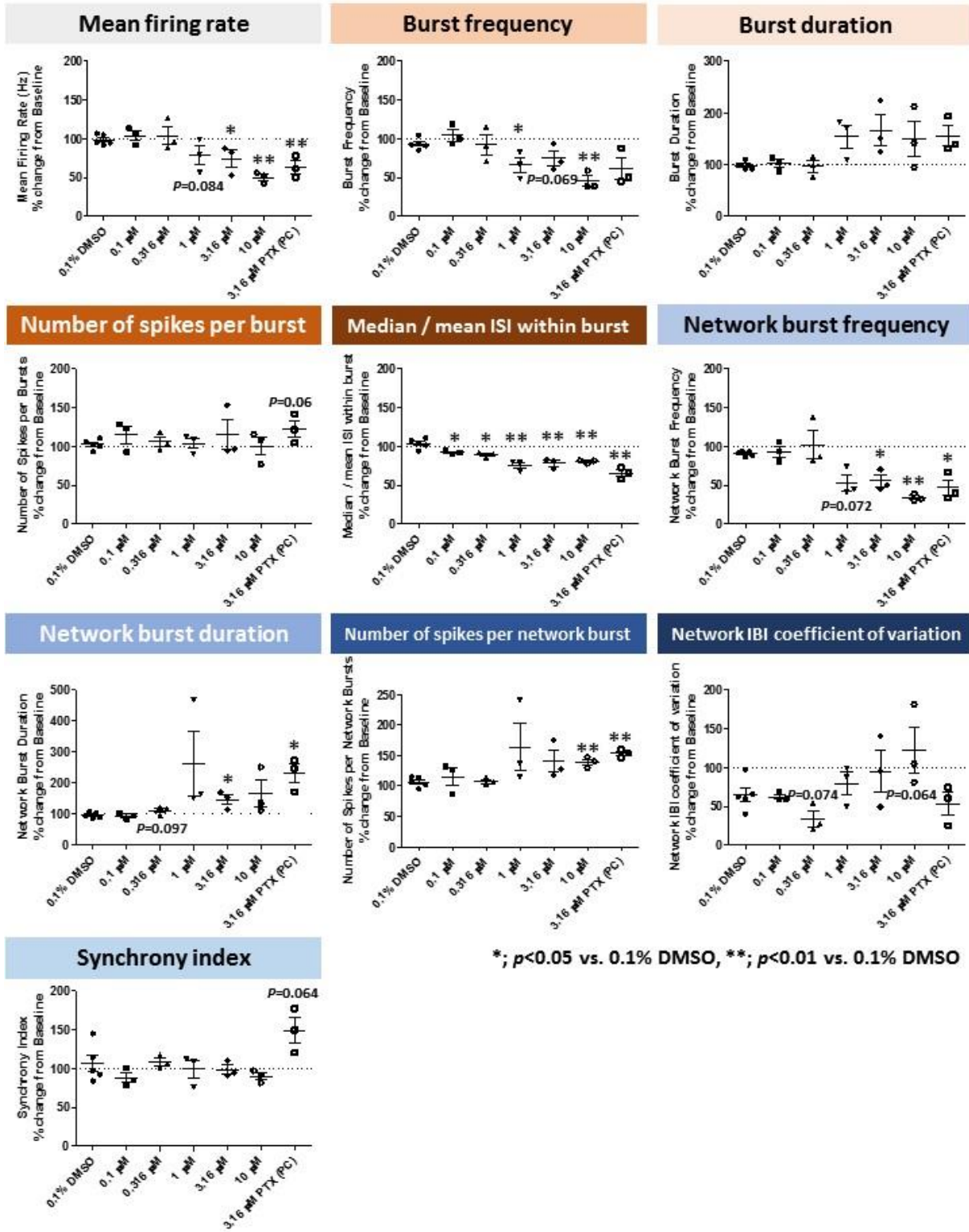


図 14. ピクロトキシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX)、0.1-10 μM ピクロト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

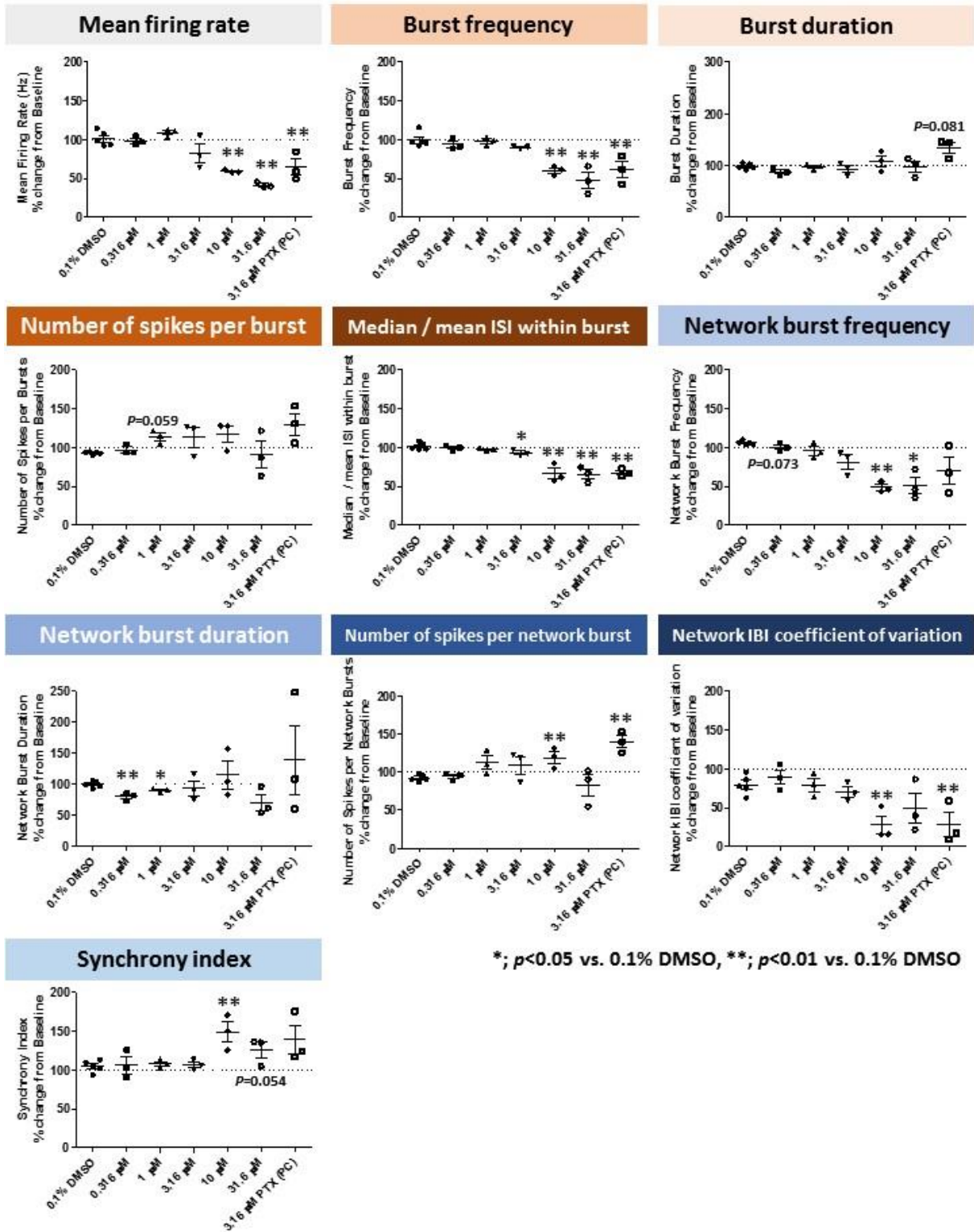
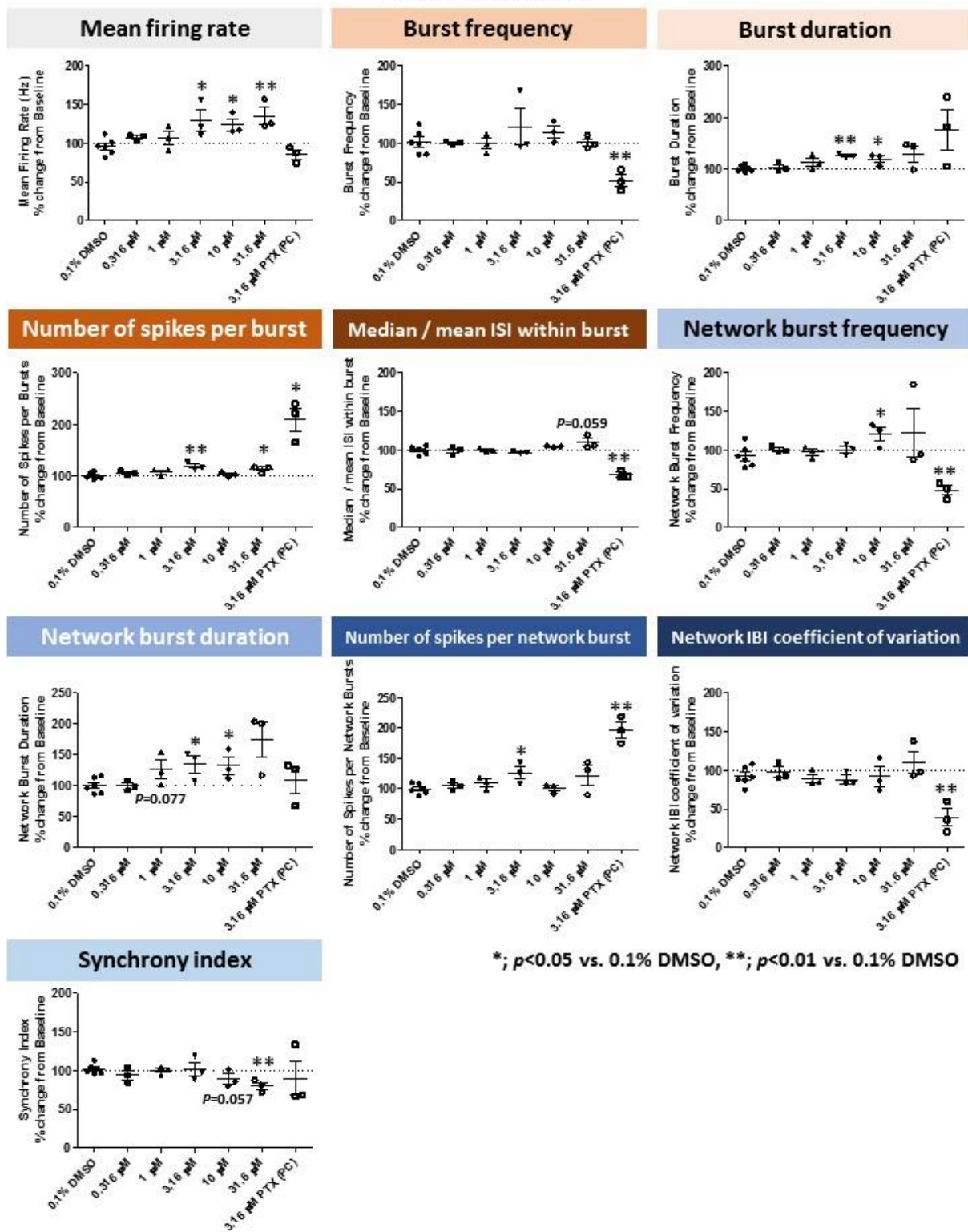


図 15. ストリキニーネ

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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



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

図 16. 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 ± 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

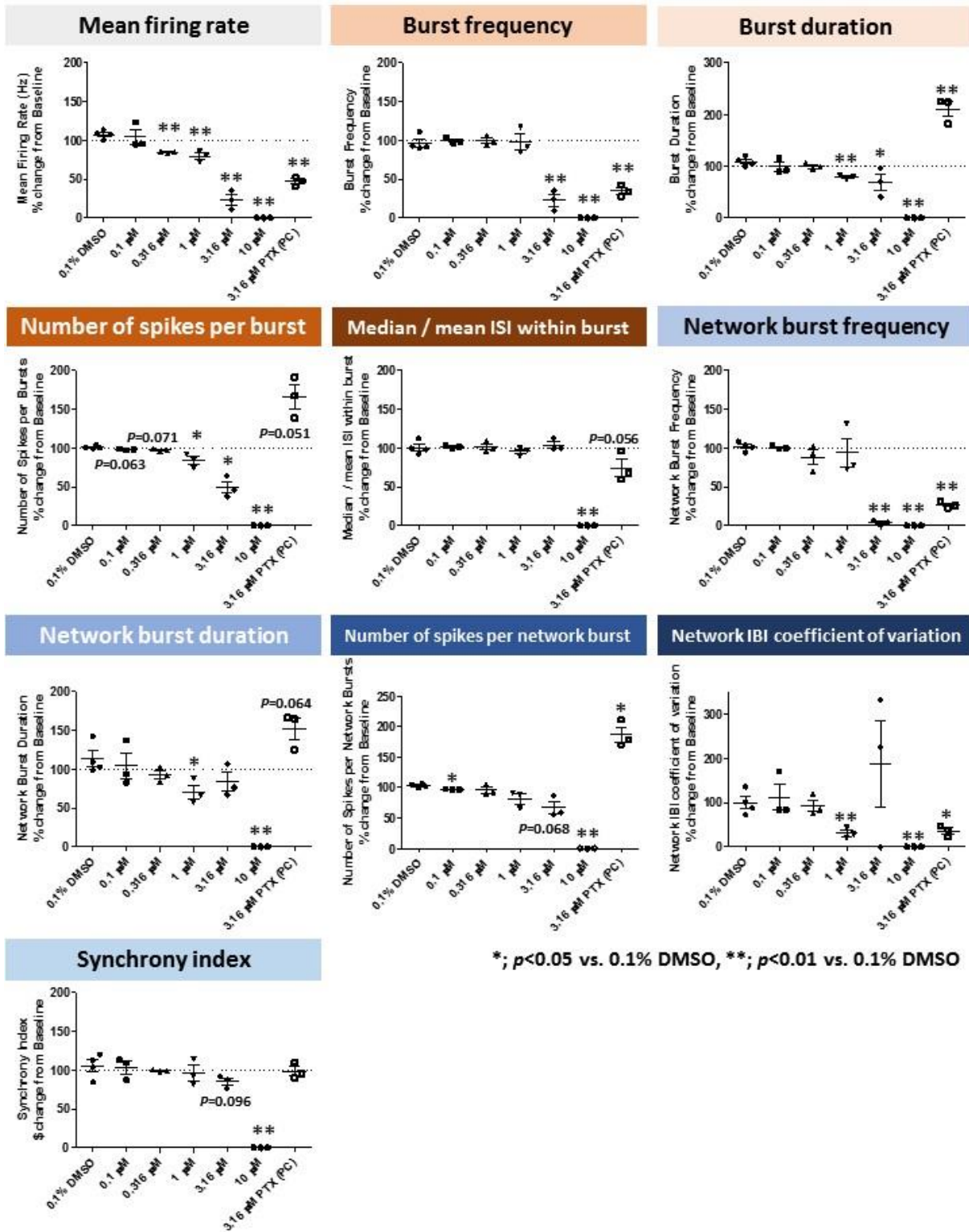


図 17. クロルプロマジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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 ± 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

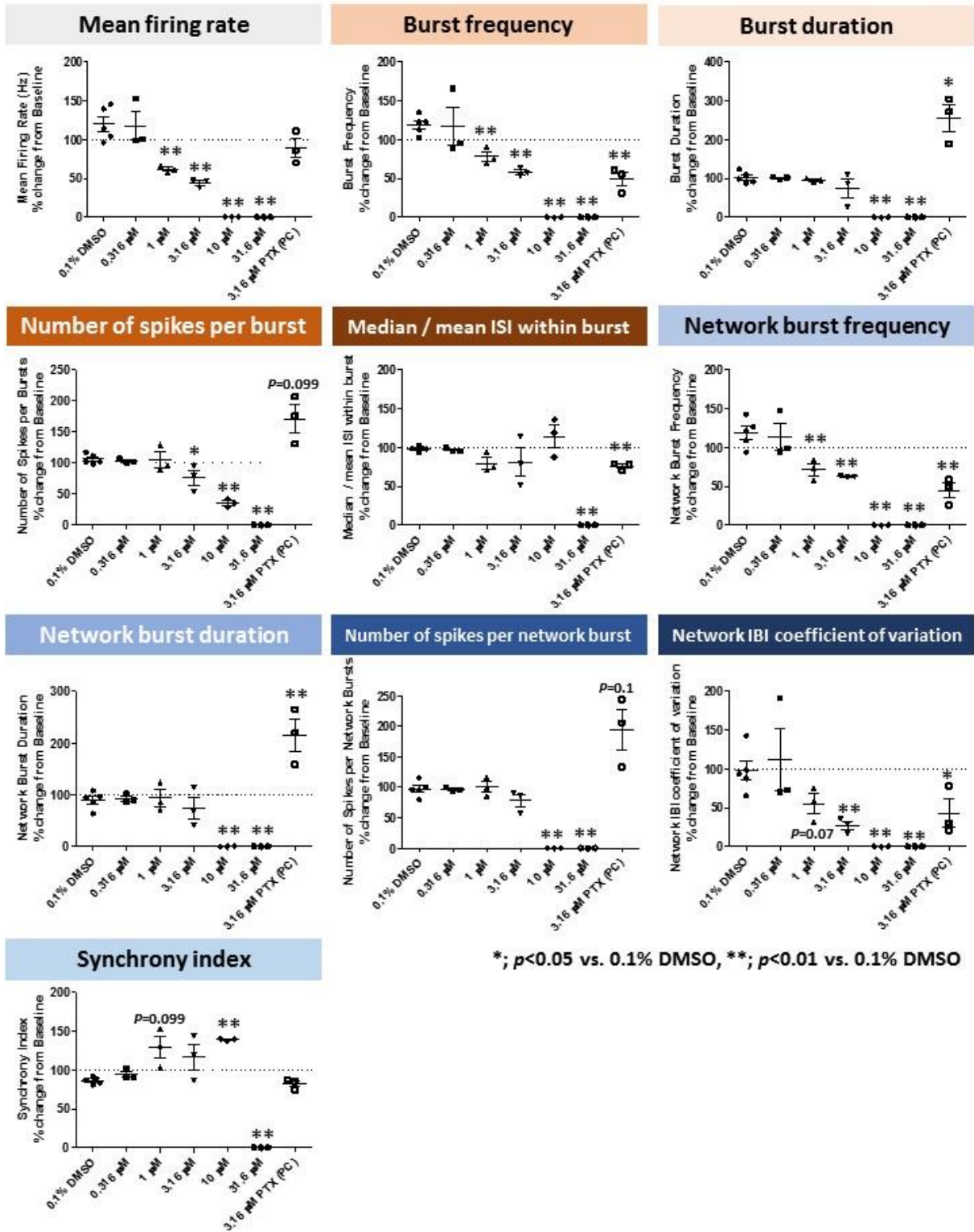


図 18. アモキサピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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

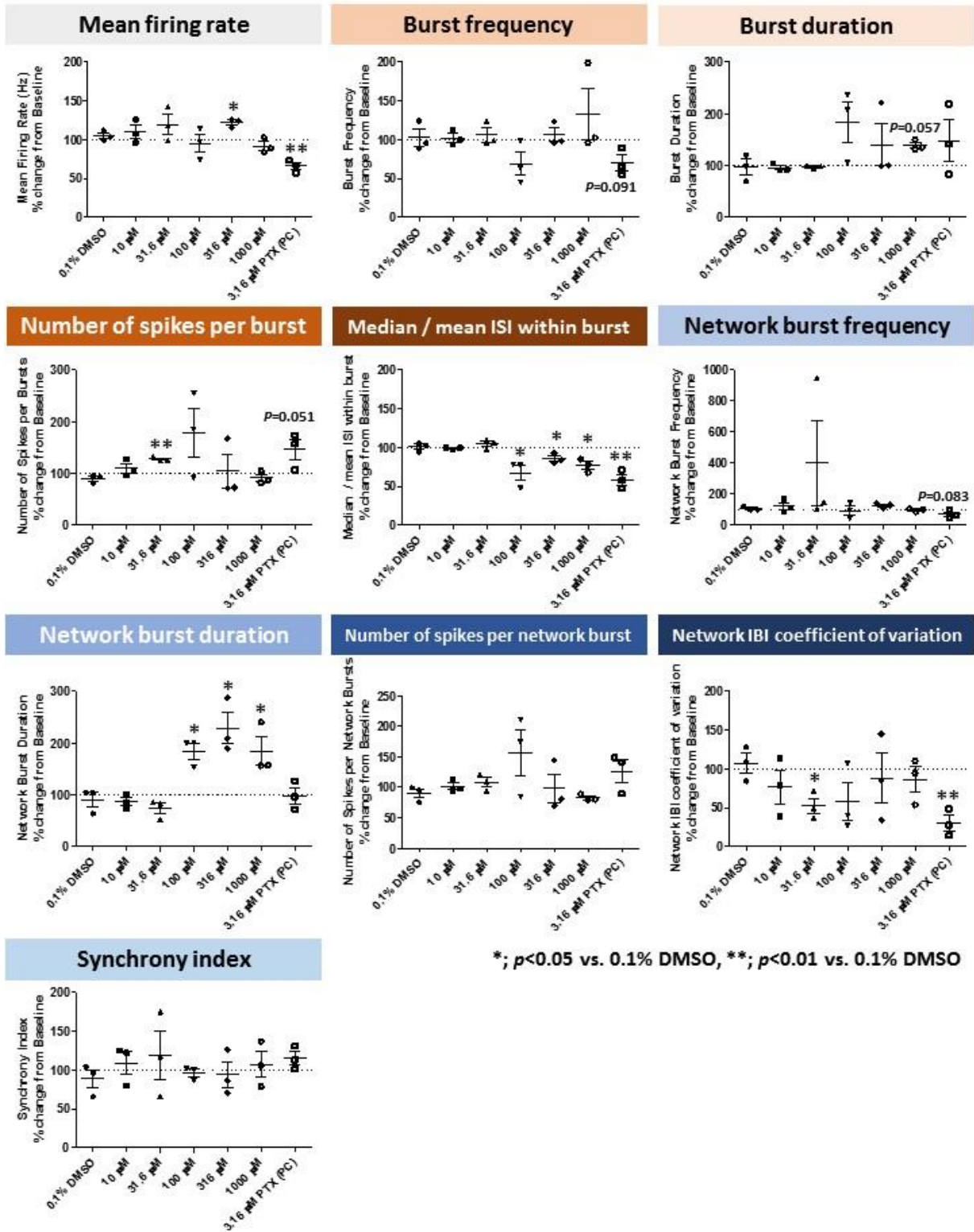


図 19. エノキサシン

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±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

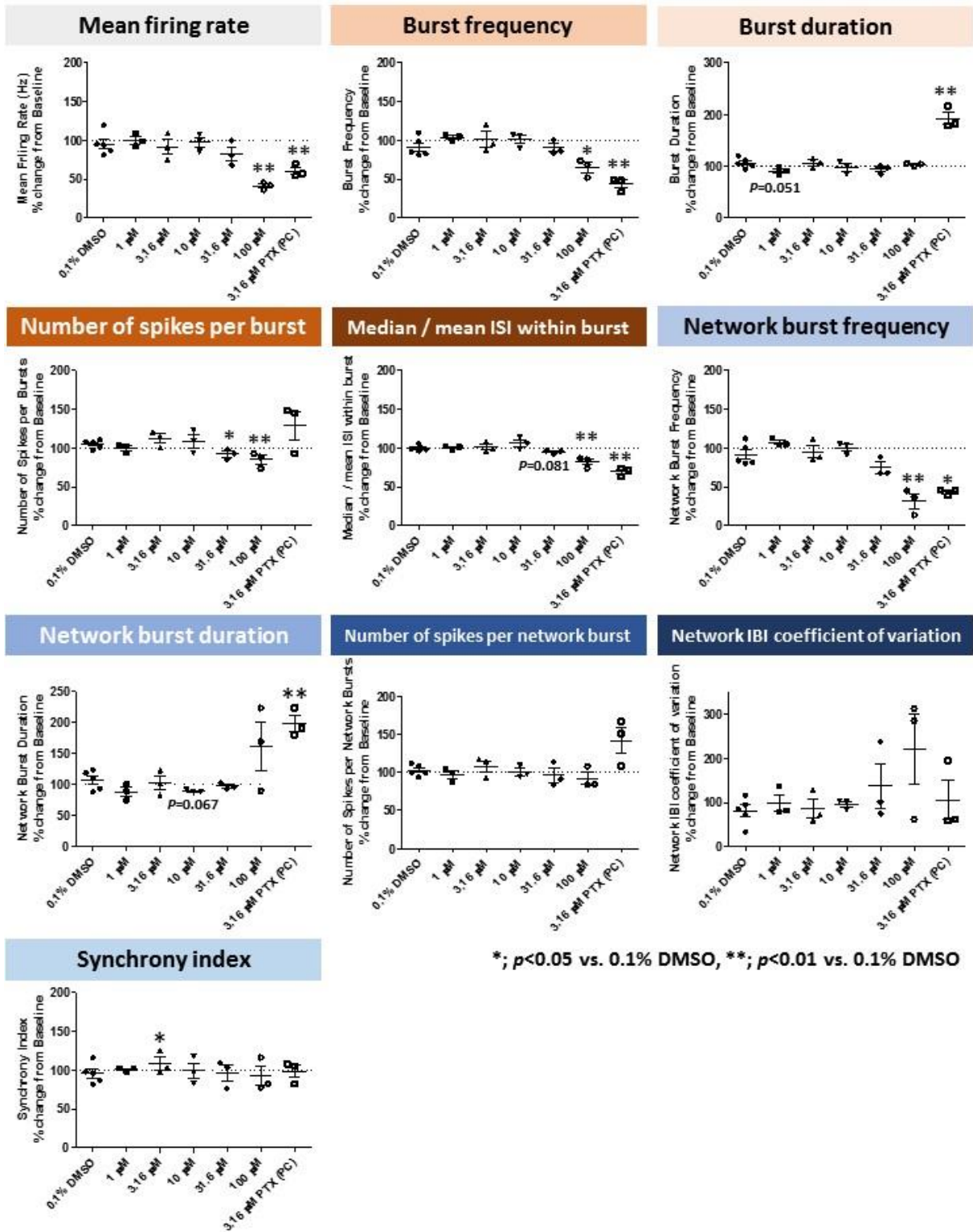


図 20. フェニトイン

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±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

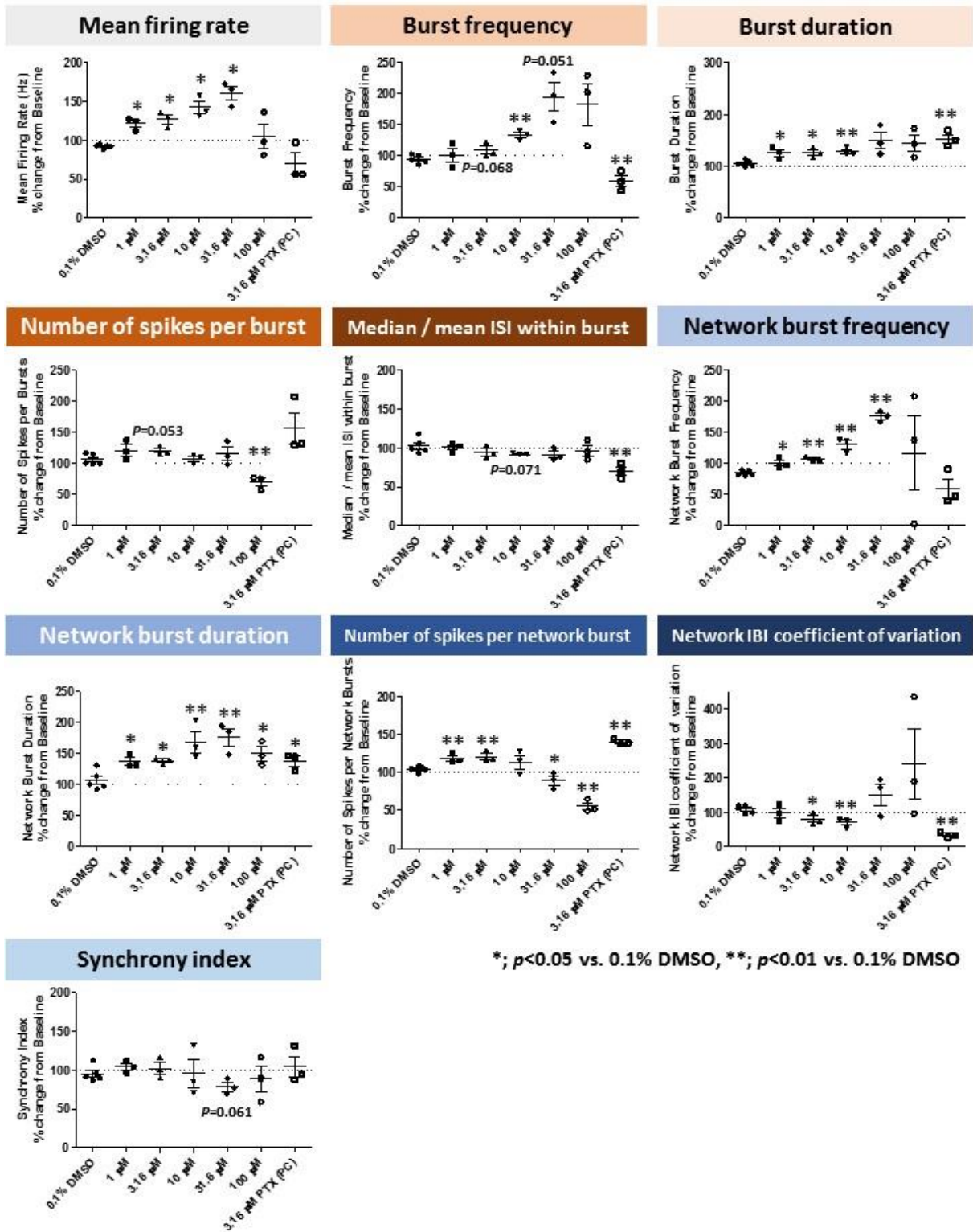


図 21. リノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (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

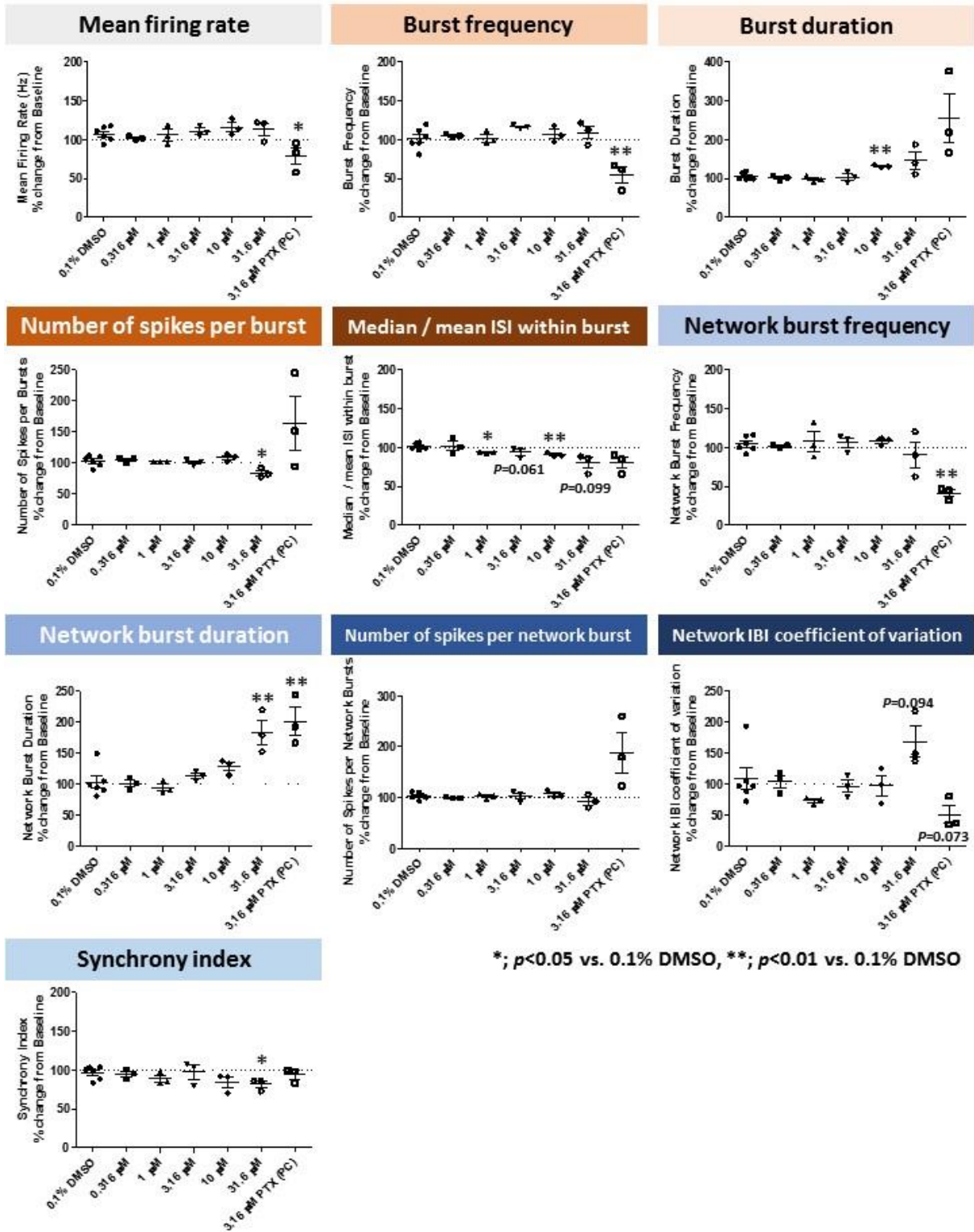


図 22. 4-アミノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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±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

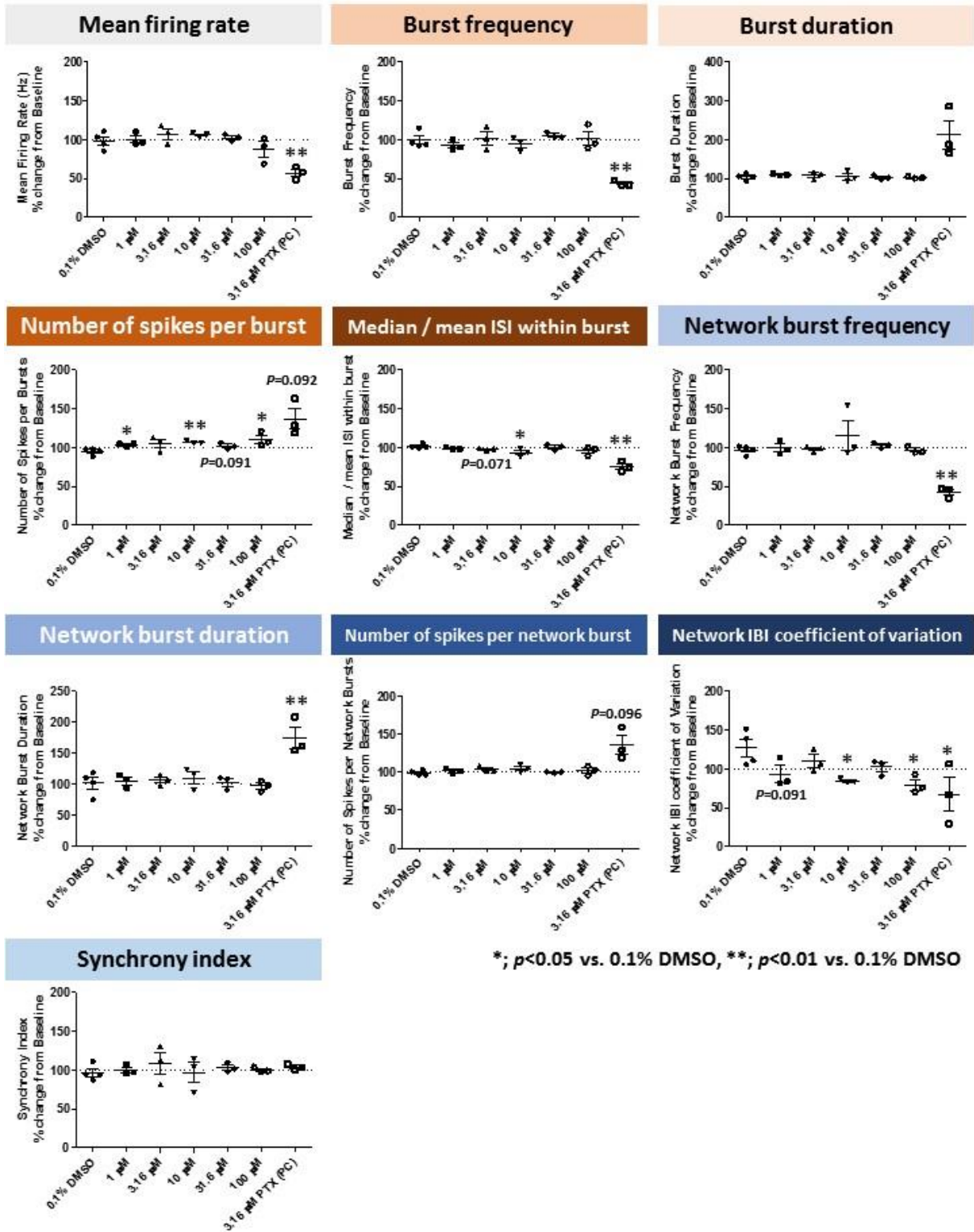


図 23. アモキシシリン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロトキシン (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土標準誤差を 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

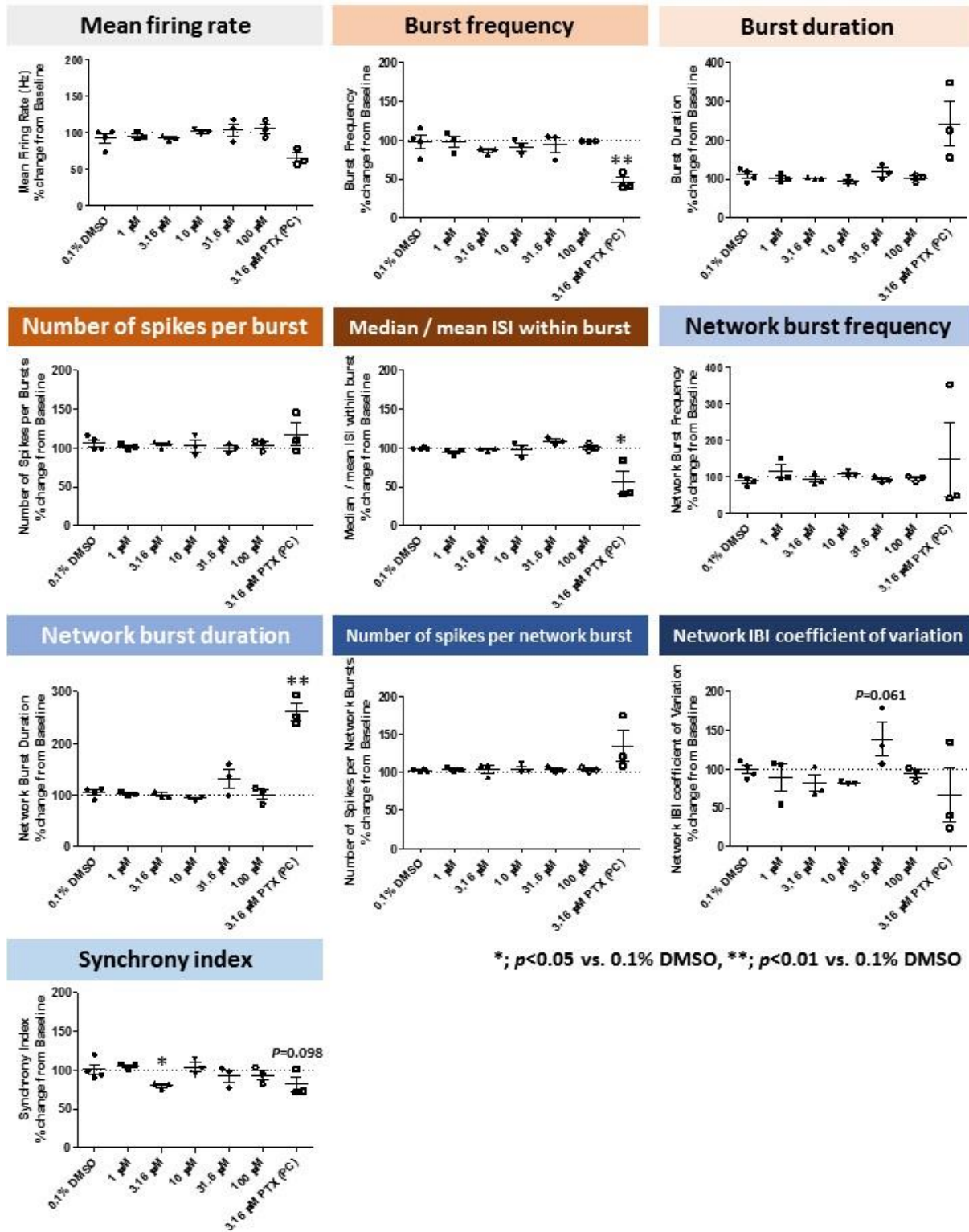


図 24. アセトアミノフェン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (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。

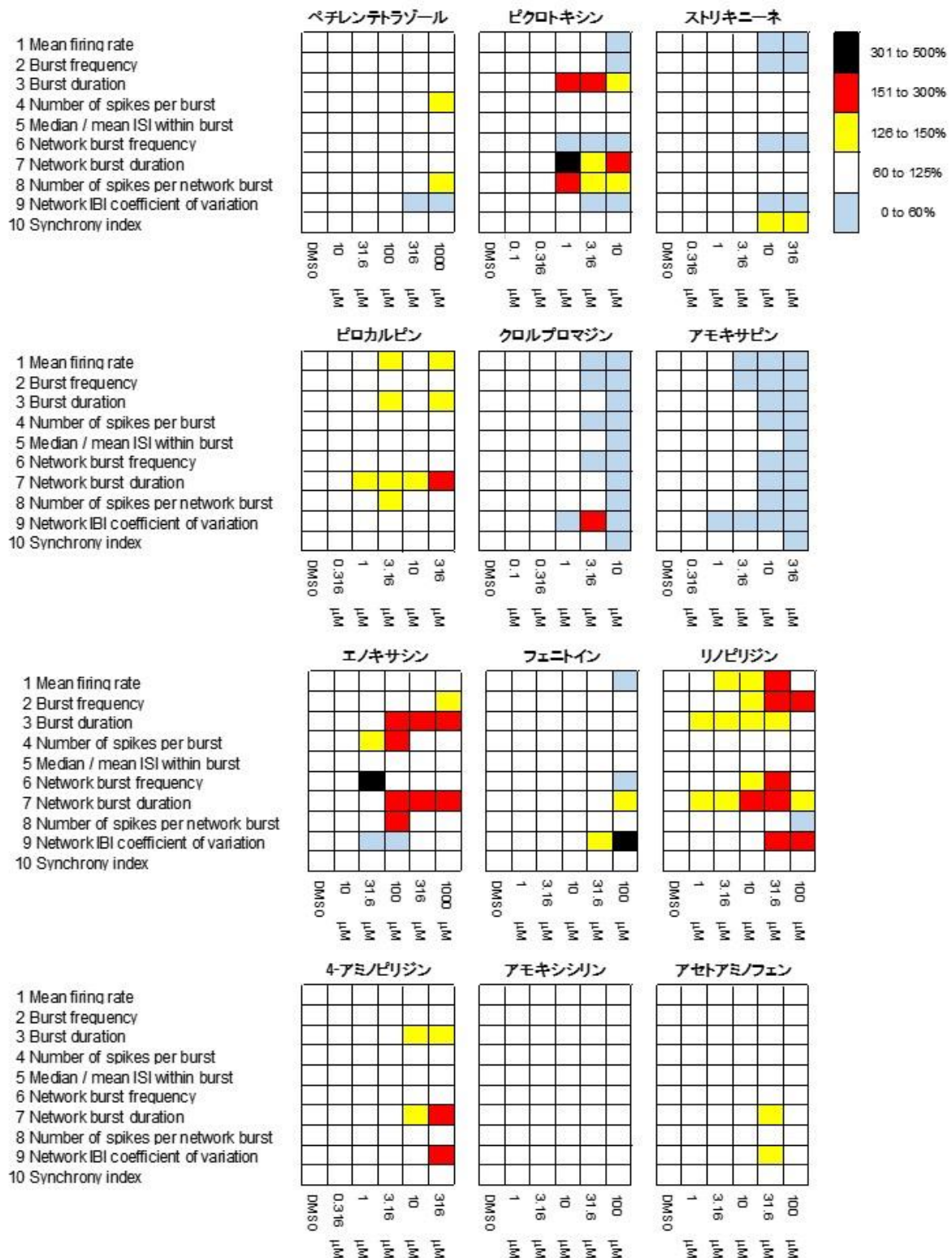


図 25. 12 化合物の結果のまとめ

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。

表 1 HESI NeuTox における化合物情報一覧

	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

表2 細胞融解時の生存率について

回数	生細胞数	死細胞数	生存率 (%)	総細胞数
1	0.86 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	56.6	1.52 x 10 ⁶
2	0.73 x 10 ⁶	0.85 x 10 ⁶	46.2	1.58 x 10 ⁶
3	0.9 x 10 ⁶	0.7 x 10 ⁶	56.3	1.60 x 10 ⁶
4	1.05 x 10 ⁶	0.9 x 10 ⁶	53.8	1.95 x 10 ⁶
5	2.2 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	50.0	4.4 x 10 ⁶
6	1.9 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁶	47.5	4.0 x 10 ⁶
7	0.78 x 10 ⁶	0.69 x 10 ⁶	53.1	1.47 x 10 ⁶
8	1.56 x 10 ⁶	0.78 x 10 ⁶	66.7	2.34 x 10 ⁶
9	0.53 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	43.4	1.21 x 10 ⁶
10	0.81 x 10 ⁶	0.54 x 10 ⁶	60.0	1.35 x 10 ⁶
11	1.8 x 10 ⁶	1.35 x 10 ⁶	57.1	3.15 x 10 ⁶
12	1.13 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	54.3	2.08 x 10 ⁶
13	0.81 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	55.1	1.47 x 10 ⁶
14	0.98 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	59.1	1.65 x 10 ⁶
15	0.80 x 10 ⁶	0.72 x 10 ⁶	52.3	1.52 x 10 ⁶
平均			54.1	

表3 HESI NeuTox バリデーション試験への参加施設の使用機器と細胞

施設	機器	細胞
Cyprotex	Axion Maestro	Glutaneurons
Janssen (JNJ)	Axion Maestro	Rat cortical neurons, hiPSC neurons (CNS4U)
Ncardia	Axion Maestro	iPS neurons + astro,
GlaxoSmithKline	Axion Maestro	Rat cortical neurons
NIHS	Axion Maestro	Rat cortical neurons
BMS	Axion Maestro	CDI GTN + Astrocyte
Axion	Axion Maestro	Rat cortical neurons
Tohoku Inst. of Tech	AlphaMed Presto	Rat Hippocampal Neurons, hiPSC Neurons
Eisai	Axion Maestro, AlphaMed Presto	Rat Hippocampal Neurons
NeuCyte	Axion Maestro APEX	SynFire Neural Cells
EPA	Axion Maestro	
BMS	Axion Maestro	CDI iPSC GlutaNeurons

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、行動への影響を検討し、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。評価物質としてバルプロ酸、クロルピリホス、SAHA、MS-275、有機スズ、グリホサートについて、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。さらにバルプロ酸について、投与時期と投与濃度を変化させその効果を検討した。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、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸が、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。これにより投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

A. 研究目的

遅発性神経毒性を予想される化学物質は多数あるが、その各々を毒性試験することは難しい。本研究では、いくつかの発達期神経毒性を予想される化学物質について、実験動物の神経回路発達期、神経形成期、成熟期の各時期で観察される現象を観察し、各化学物質の神経毒性予測について、動物実験から *in vitro* 研究への橋渡しを図ることを目的とする。

主たる研究対象の化学物質には、バルプロ酸(VPA)を用いた。さらに、VPA の作用機序として予想されているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害効果を持つ化学物質の、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、トリコスタチン(TSA)、MS-275 を観察した。VPA の結果と比較するため、クロルピリホス(CPF)、リポポリサッカライド(LPS)、および環境毒性物質のトリブチルスズ(TBT)、グリホサート(GLY)投与を観察した。これら化学物質を用いて、小脳発達に与える影響を、以下の方法で観察した。①免疫組織化学的手法による神経の形態的变化、②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③個体の行動に及ぼす変化を確認するために発達期と成熟期の個体の行動観察、④光学測定法による伝達物質放出の変

化。

B. 研究方法

各化学物質を妊娠 16 日（プラグ確認日を妊娠 1 日とする）のラットに下記のように投与した。200~600 mg/母体kgの VPA(経口)、50mg/kg の SAHA(腹腔内)、4mg/kg の MS-275(経口)、5mg/kg の CPF(経口)、1mg/kg の TSA(経口)、100 μ g/kg の LPS(腹腔内)、20mg/kg の TBT(経口)、250mg/kg の GLY(経口)をそれぞれ投与した。VPAについては、妊娠 14 日、18 日にそれぞれ 600 mg/kgの投与することを試験した。

各投与動物を生後の各時期で灌流固定後、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。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。また各投与動物の発達期（生後 4 日から 10 日）および成熟期（生後 6 週から 8 週）で行

動試験を行った。発達期では震えのような不随意運動の出現率を計測、成熟期では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

1. 神経回路発達期（生後2週：PW2）の変化

VPA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1.9倍、生後3週でも1.3倍の伸長を示した（結果1）。突起伸長の加速と同時に、プルキンエ細胞のプログラム細胞死が引き起こされず、単層化しないプルキンエ細胞層が観察された。樹状突起は複雑な網状の形状を示し、主たる垂直突起（apical dendrite）が識別できない状態を示した。

さらに、VPA投与動物では、小脳虫部第一裂（V葉-VI葉間）に過剰な褶曲が観察された。これを定量化するために、プルキンエ層の長さ（深さ）の比をとって定量化を試みた（結果2-1）。これにより、プルキンエ層が褶曲によって長くなり、対照動物の1.2倍の長さのプルキンエ層を持つことが示された。この変化はVPAの投与量に正の相関を示した（結果2-2、2-3a）また、妊娠14日にVPAを投与した動物では1.25倍のプルキンエ層が観察されたが、妊娠18日投与動物は対照動物と差を示さなかった（結果2-3b）。投与期依存性があり、また妊娠途絶が少ないことから、以降の実験は妊娠16日投与とした。

プルキンエ細胞の変化は、SAHA投与動物でも観察されたが、MS-275投与動物、TBT投与動物では明らかではなかった（結果3-1）。小脳虫部第一裂の過剰な褶曲は、SAHA投与動物で対照動物の1.1倍、CPF投与動物では1.05倍のプルキンエ層を示した。VPAに比べると、各化学物質の褶曲は小さく、TSAで1.05倍、LPSで1.09倍で出現にばらつきがあった。一方MS-275、TBT、GLY投与動物では変化が観察されず、神経突起伸展異常と同様の傾向を示した。

VPA投与動物と同様に、CPF投与動物、MS-275投与動物ではプルキンエ細胞の過剰な分布が観察されたが、LPS投与動物、GLY投与動物

物ではプルキンエ細胞のプルキンエ層からの欠損が観察された。

2. 神経形成期（PW1）の変化

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4）。

この時期の行動観察の結果、VPA投与動物では、初期に多くの不随意運動を確認したが、成長につれて減少する傾向があった。SAHA投与動物では、多くの不随意運動を確認し、且つ成長につれて増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では若干の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、多くの不随意運動を確認し、また、成長につれて不随意運動が増加する傾向にあった（結果5）。

3. 成熟期の行動変化（PW6以降）

VPA投与動物は、PW6以降の成熟期の行動において、新規環境でも警戒が少なく、過活動の傾向を示した（結果6-1）。移動速度は速く、躊躇なく中心部を通過し、対照動物との差異が見られた。一方社会的行動、対物的行動では、強い警戒心を示してフリーズする様子が観察され、ADHD様の行動が見られた（結果6-2、6-3）。

CPF投与動物、TSA投与動物の行動を、VPA投与動物と比較すると、VPAと同様にCPFを投与された動物は、VPA投与動物のような衝動性を示さず、むしろ探索行動を減少し硬直する傾向がみられ、行動異常を示しているのではないかと考えられる。VPAと同様のHDAC阻害剤であるTSA投与動物では、異なる点はあるもののVPA投与動物と類似したADHD状の行動を示した（結果6-4）。

4. 伝達物質放出の変化

VPA投与動物、SAHA投与動物では、発達期に過剰な伝達物質の放出が観察された（結果7a）。グルタミン酸誘発性のATP放出は、グリア細胞からのシナプス形成誘発因子と考えられており、ATP受容体の阻害によってシナプス

形成は著しく抑制される。VPA投与動物、SAHA投与動物ではグルタミン酸誘発性ATP放出が発達初期から亢進しており、何らかのグリア細胞性の異常が起こっていることを示唆した。神経回路が成熟してくる生後21日では、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7b)。

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化学物質の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ことを確認できた。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異を示唆しているものと考えられる。これらの神経回路レベル、行動レベルでの変化を細胞レベルの変化につなげることが必要と考えられる。

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としてバルプロ酸、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。さらに、各種の動態を持つ化学物質を投与し、小脳における変化を観察した。定量化により投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

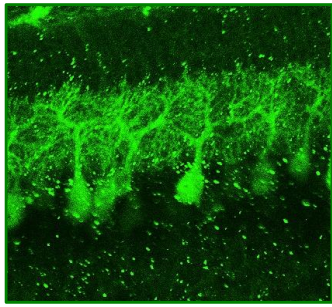
F. 研究発表

1. 論文発表

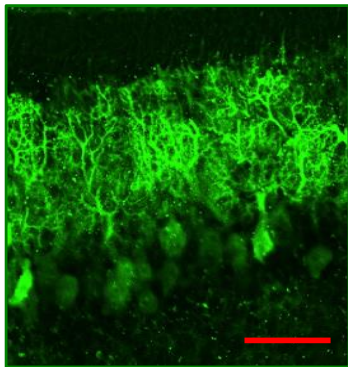
- [1] Mabuchi H., Ong HY., Watanabe K., Yoshida S., Hozumi N. "Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay." IEEJ Trans. Fund. Materials (2016) 136(2):99-104
 - [2] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y., Ueno S. "Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus." NeuroToxicology (2018) 65: 1-8
 - [3] 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] 富田達朗, 岩本早起, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, Roman Maev, 穂積直裕, 吉田祥子, Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
 - [2] 西川ちひろ, 高橋信人, 富田達朗, 重本-最上由香里, 佐藤薫, 関野祐子, 馬淵光, 穂積直裕, 吉田祥子, Interaction between neurosphere and cultured glial cell. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
 - [3] 三上哲理, 渡邊一徳, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 穂積直裕, 吉田祥子, Fast glutamate release detection in normal and valproate-administrated rat cerebellum. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
 - [4] 高橋信人, 馬淵光, 重本-最上由香里, 佐藤薫, 関野祐子, 穂積直裕, 吉田祥子, Visualization of neurotransmitter release in the developing neurosphere cells using the enzyme-linked photo-assay. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
 - [5] 中嶋さりい, 富田達朗, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, Alteration of neuronal development by Autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
 - [6] H. Mabuchi, N. Takahashi, K. Sato, Y. Sekino, N. Hozumi, S. Yoshida, Visualization of neurotransmitter released from cultured granule cells and the neurosphere cells using enzyme-linked photo-assay combined with ICA. 46th Neuroscience meeting, San Diego, 2016
 - [7] S. Nakajima, T. Tomida, K. Ikai, Y. Fueta, S. Ueno, N. Hozumi, Y. Sekino, S. Yoshida, Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum. 46th Neuroscience meeting, San Diego, 2016
 - [8] 佐藤誠太, 中嶋さりい, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, 抗てんかん薬バルプロ酸の曝露期・曝露濃度による発達期神経毒性の変化, 第47回中部化学関係学協

- 会連合会秋季大会, 豊橋, 2016
- [9] Yoshida S., Hozumi N., Fueta Y., Ueno S., Sekino S. Society of Toxicology, 55th Annual Meeting. New Orleans, USA (2016)
- [10] Yoshida S. Neuroscience meeting 2017, nanosymposium. Washington DC, USA (2017)
- [11] Yoshida S. 第 60 回日本神経化学学会大会 シンポジウム 仙台 (2017)
- [12] Yoshida S., Fueta Y., Ueno S., Hozumi N., Sekino Y., Kanda Y. 10th DOHaD world congress. Rotterdam, Nederland (2017)
- [13] Yoshida S., Rahayu RH., Takanashi K., Kishikawa K., Kurita H., Takashima K., Hozumi N., Kobayashi K., Yamamoto S. 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan. Waikiki, USA (2016)
- [14] Yoshida S., Hozumi N., Fueta Y., Ueno S., Sekino S. Society of Toxicology, 55th Annual Meeting. New Orleans, USA (2016)
- [15] 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
- [16] 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)
- [17] 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)
- [18] 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 20 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
- [2] 吉田祥子、細胞放出物質検出装置、細胞放出物質検出方法及び細胞放出物質検出用固定化酵素基板 特許 5871224
3. 実用新案登録
なし。
4. その他
なし。

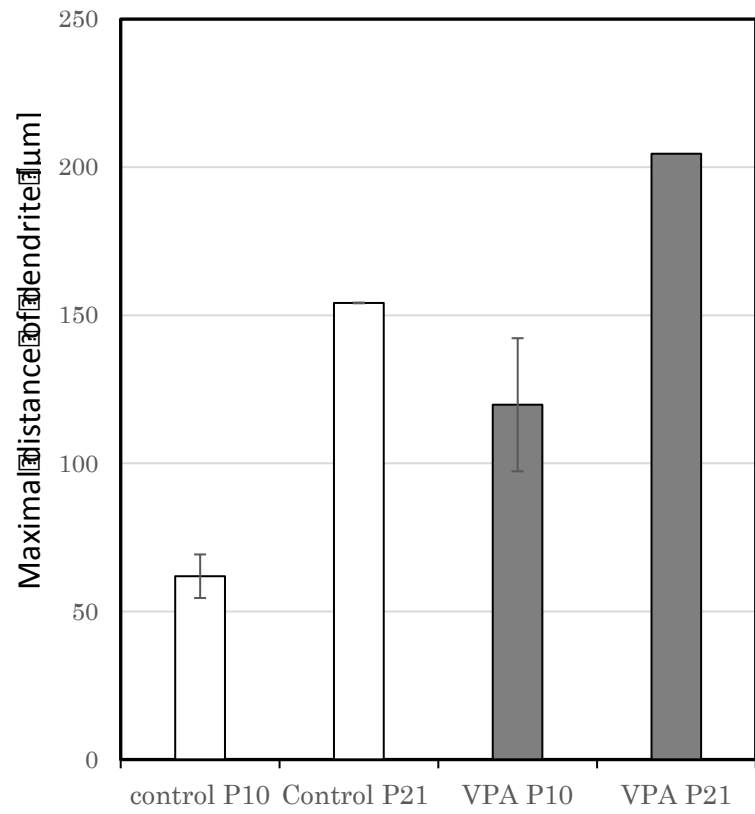
結果 1



生後10日の対照口物のプルキンエ細胞

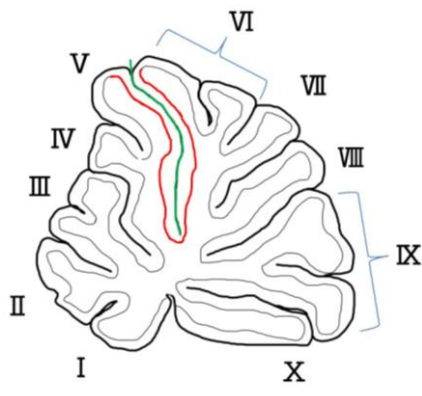


生後10日のVPA投与口物のプルキンエ細胞
(抗カルビンジン D-28k染色)



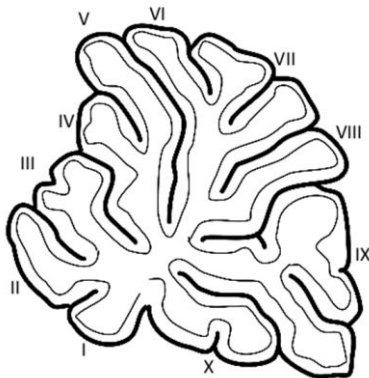
結果 2

2-1 小葉褶曲の定量方法

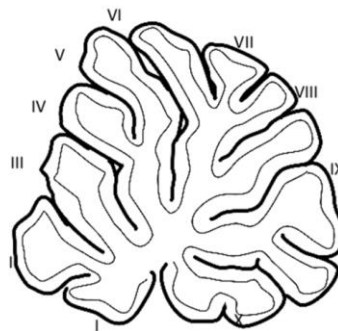


$$\text{Folding ratio} = \frac{\text{Length of PL}}{\text{Depth of gyrus}}$$

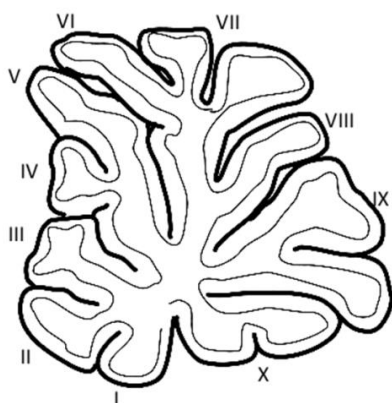
2-2 各条件で VPA を投与した動物の小脳虫部の褶曲構造の変化



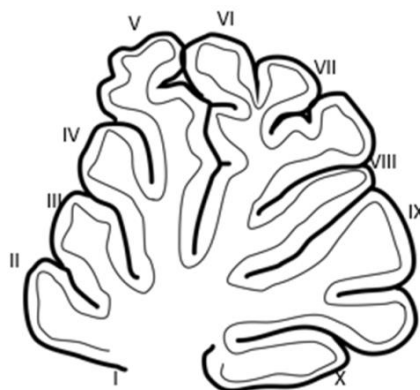
生後 16 日 対照動物小脳



VPA 200 mg/kg 投与動物小脳 (P15)



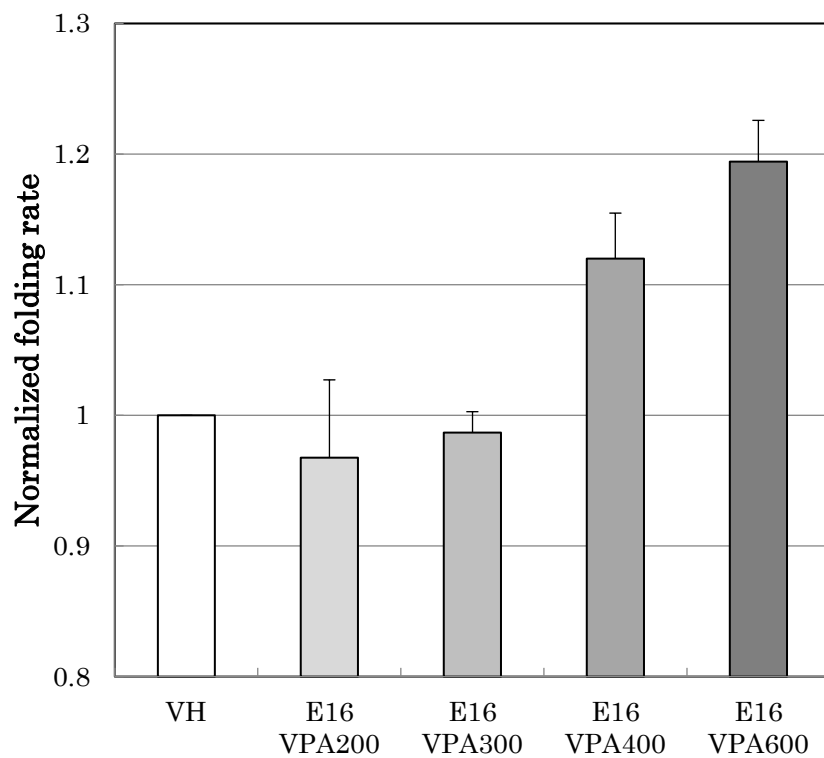
VPA 400 mg/kg 投与動物小脳 (P16)



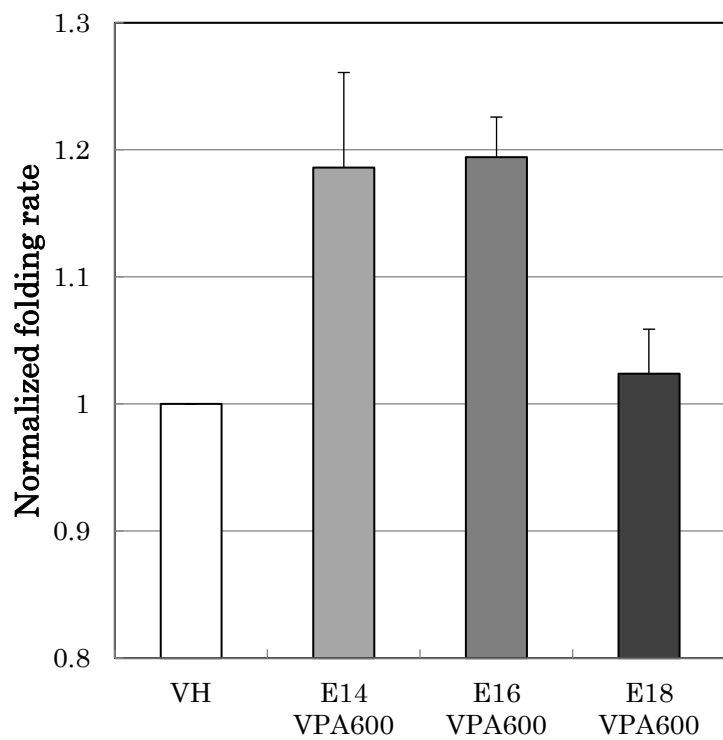
VPA 600 mg/kg 投与動物小脳 (P16)

2-3 VPA の投与濃度(a)、投与時期(b)による小脳虫部の褶曲度の変化

(a)

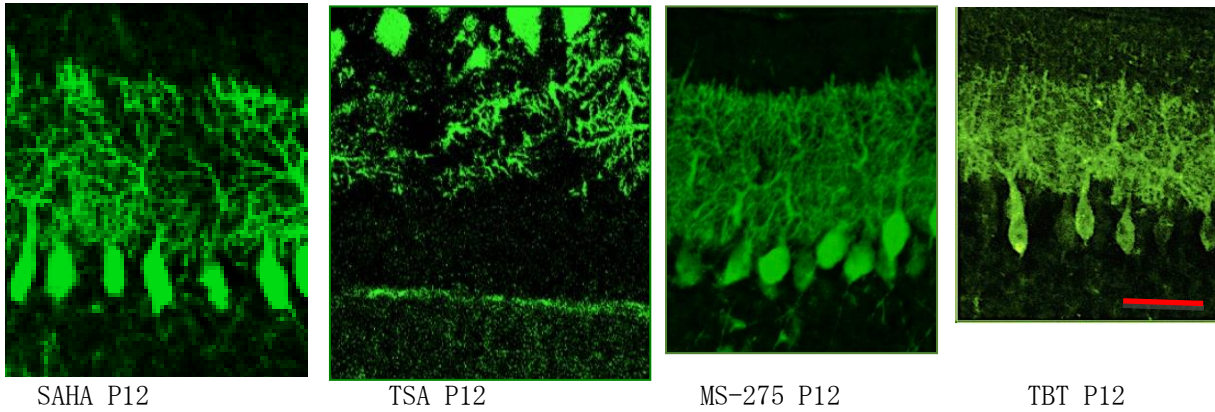


(b)

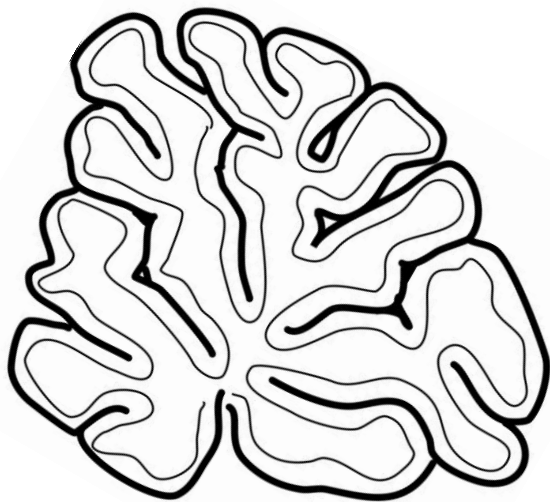


結果 3

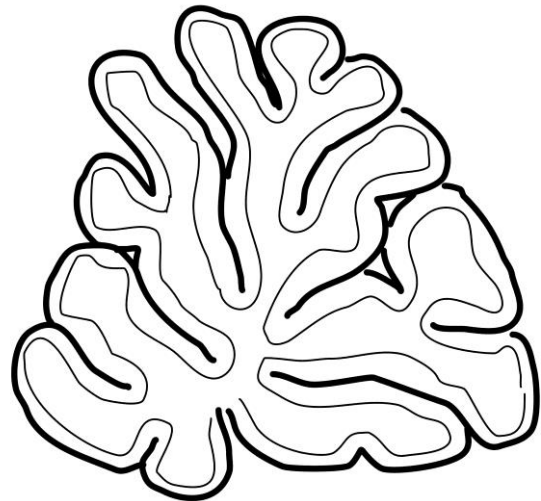
3-1 化学物質投与によるプルキンエ細胞の変化



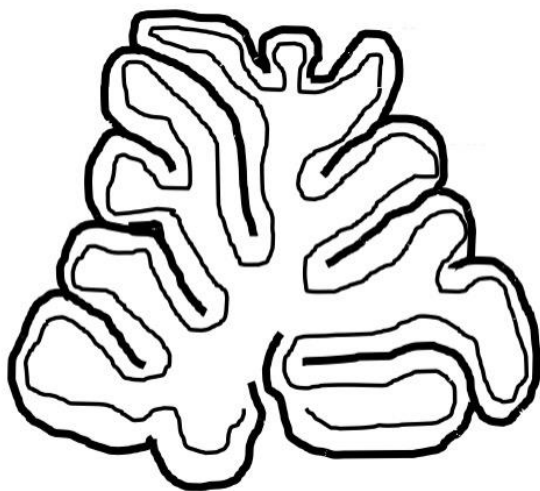
3-2 化学物質投与による小脳小葉褶曲の変化



CPF P14



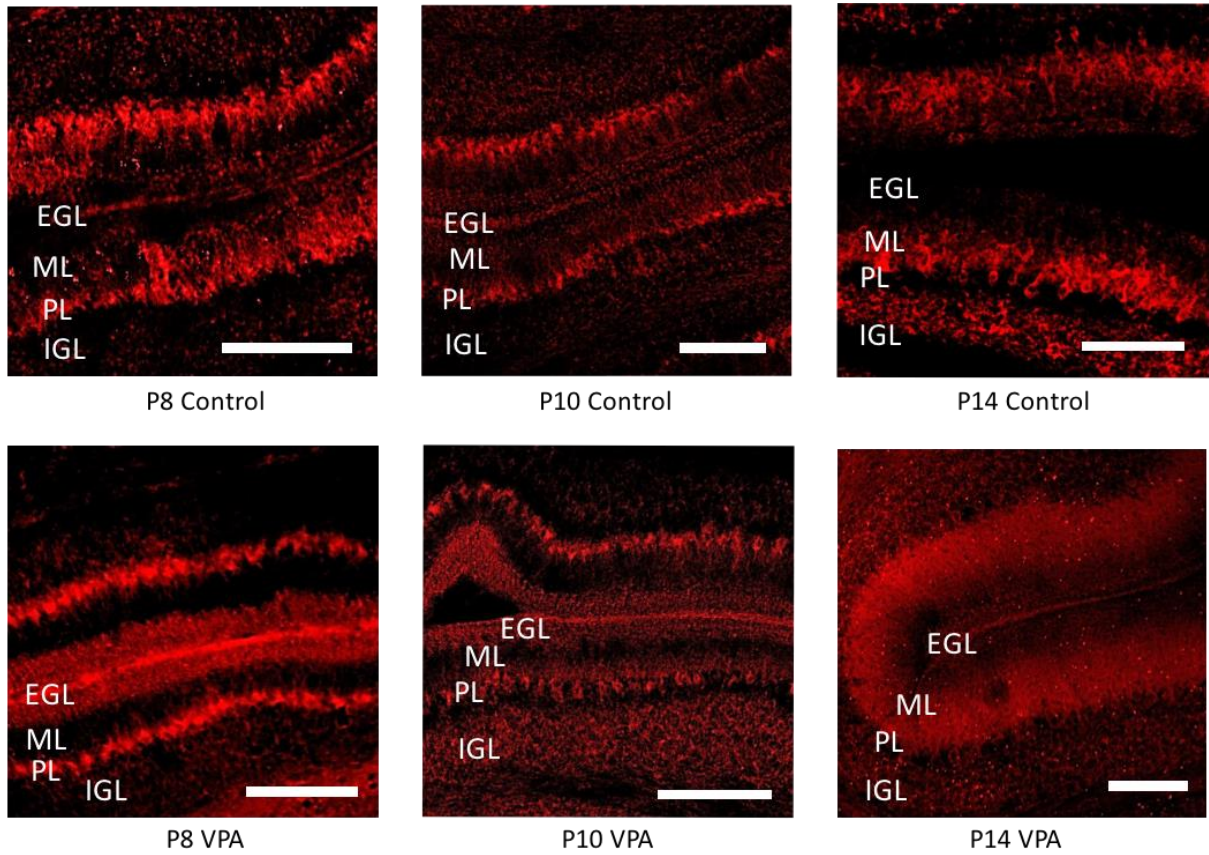
MS-275 P14



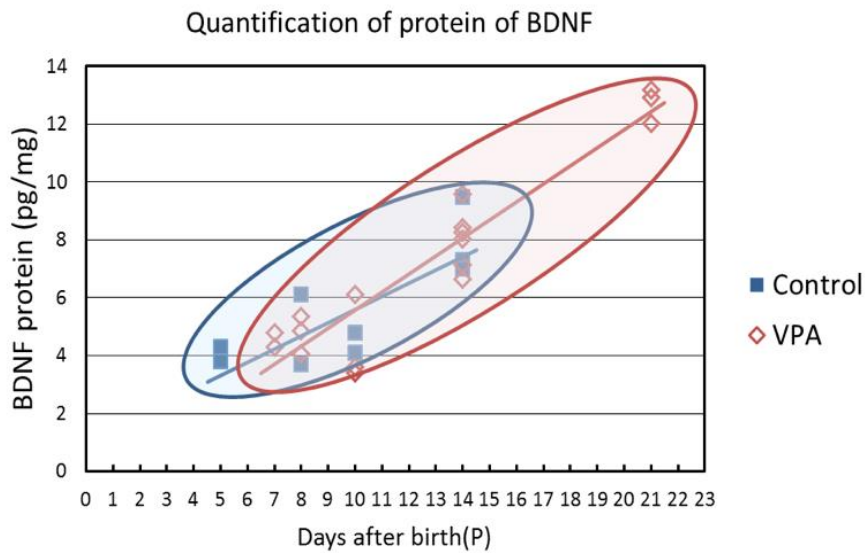
TBT P14

結果 4

4-1 小脳皮質における Reelin の発現

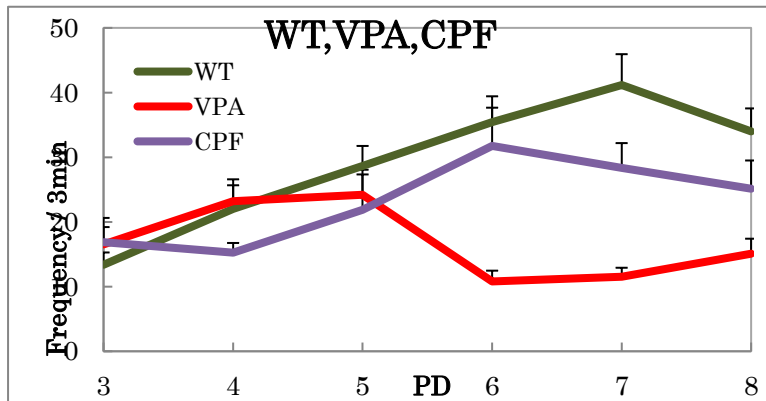


4-2 小脳皮質での BDNF の発現

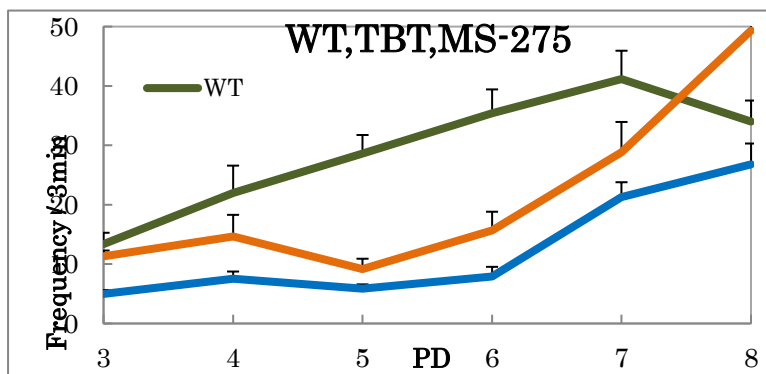


結果 5

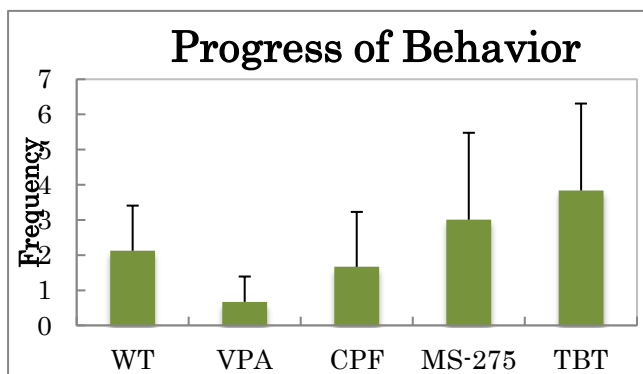
(a)



(b)



(c)



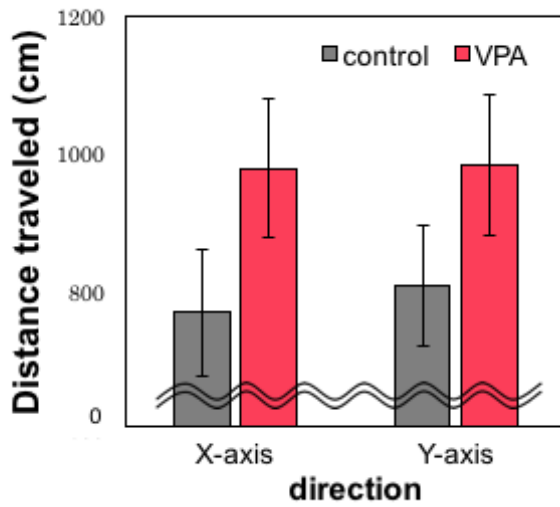
VPA, CPF, TBT, MS-275 投与動物の生後 10 日程度の不随意運動の発生頻度

(a) VPA は対照動物よりも早く不随意運動の低下が見られる。(b) TBT や MS-275 ではむしろ遅くなる。

(c) 運動の頻度変化をしめす。

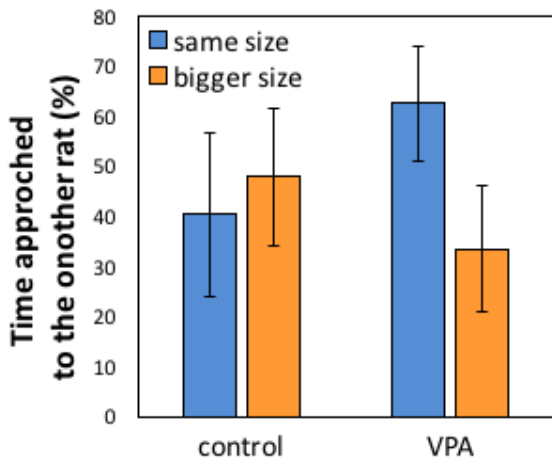
結果 6

6-1 個別行動

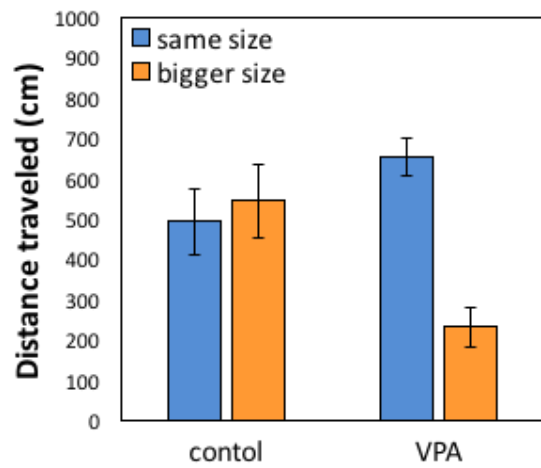


6-2 社会的行動

他ラットへの接近時間

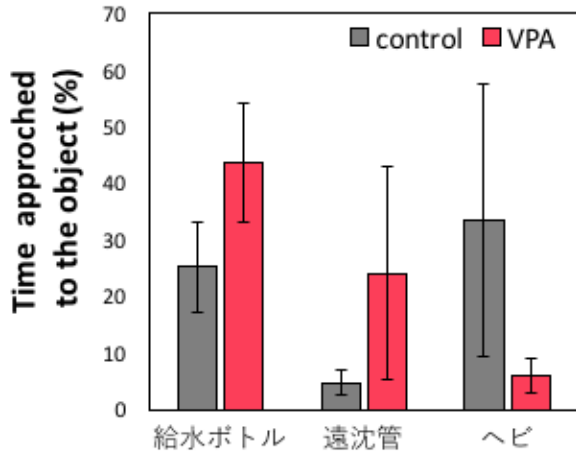


移動距離

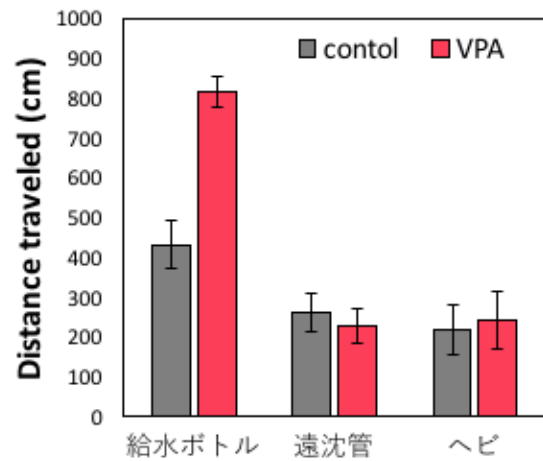


6-3 探索行動

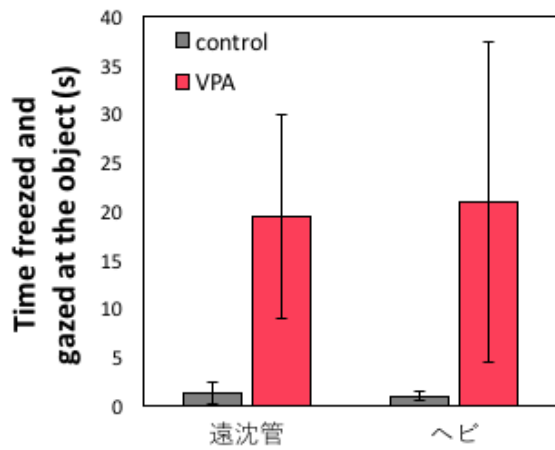
物体への接近時間



移動距離

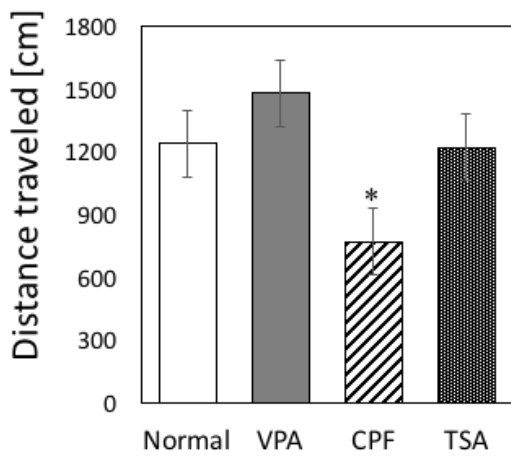


固まって新奇物体を凝視していた時間

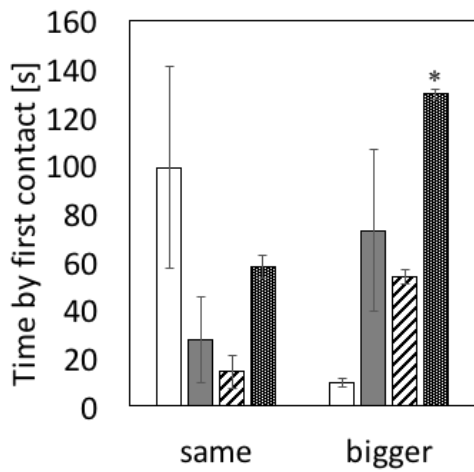


6-4 他の化学物質投与の影響

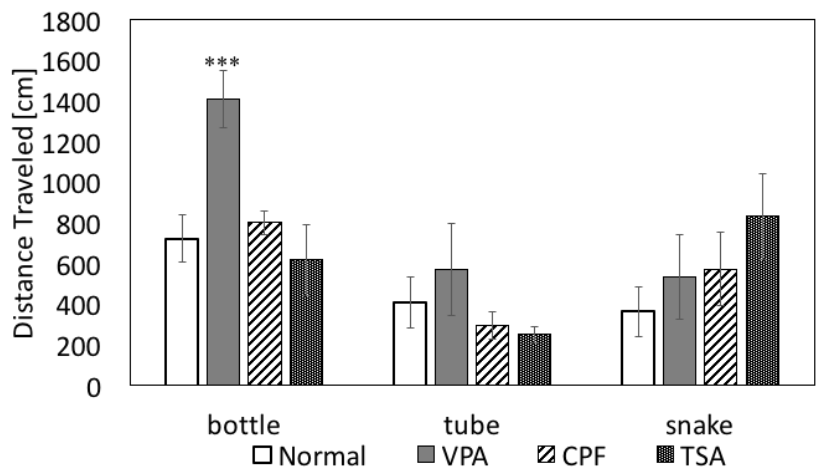
個別行動の移動距離



社会的行動

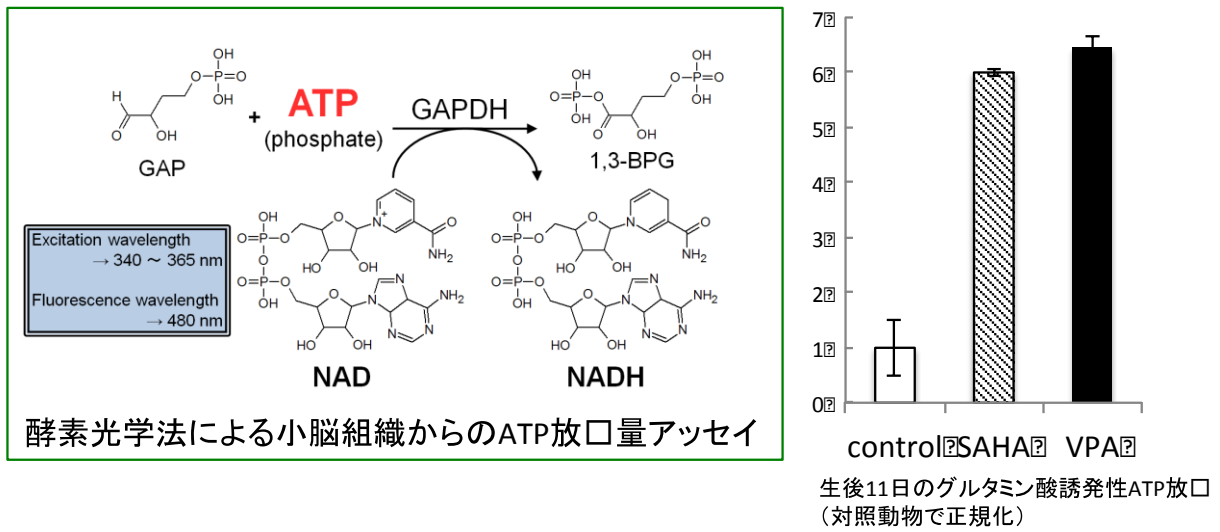


対物行動



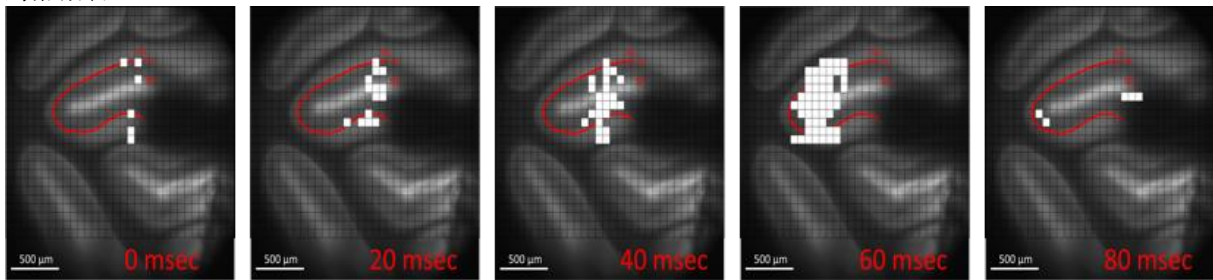
結果 7

(a) 生後 11 日の小脳皮質におけるグルタミン酸誘発性 ATP 放出量の変化

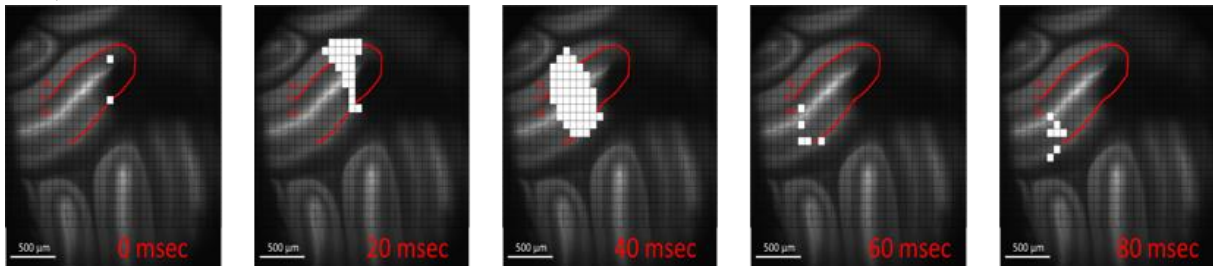


(b) 生後 21 日の小脳皮質における AMPA 刺激 (100mM) によるグルタミン酸放出の時間変化

対照動物



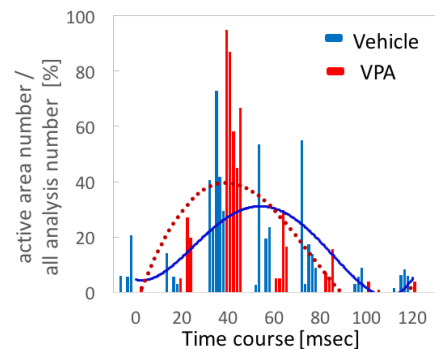
VPA 投与動物



Start
stimulate

Time course

Time course of maximum
Glutamate release



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(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.slope₅₀ 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.slope₅₀ 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.slope₅₀、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⁺チャン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)

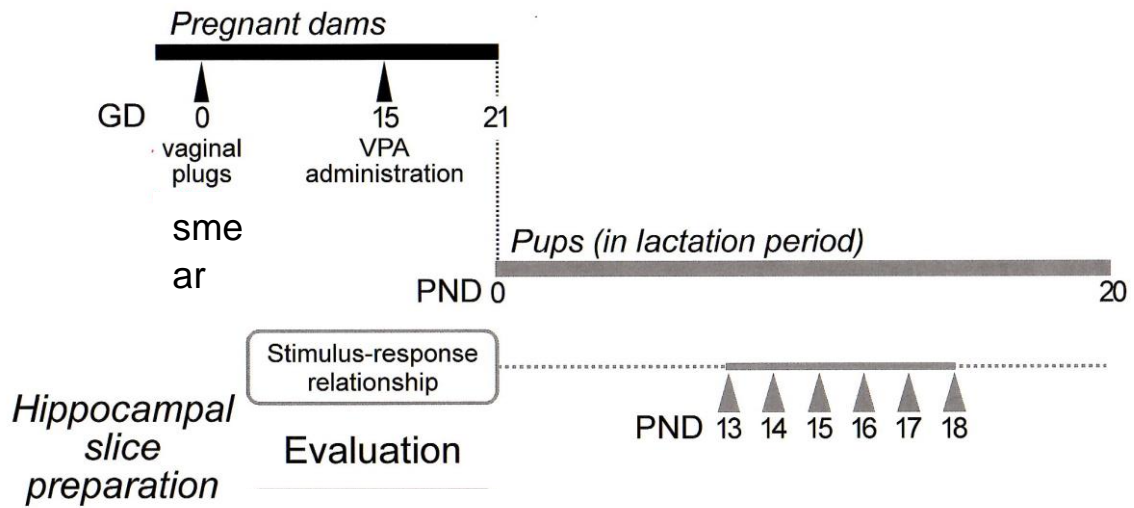


図1 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による VPA の遅延性発達神経毒性評価のためのプロトコル

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。

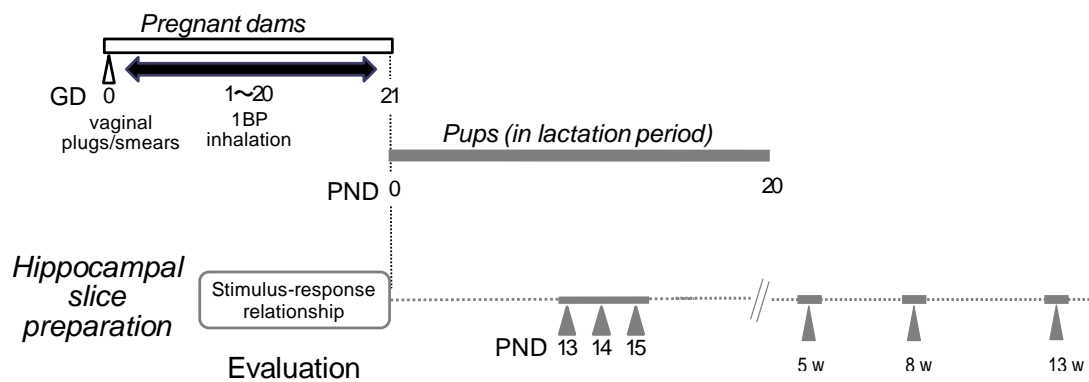


図 2 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による 1-BP の遅延性発達神経毒性評価のためのプロトコル

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。

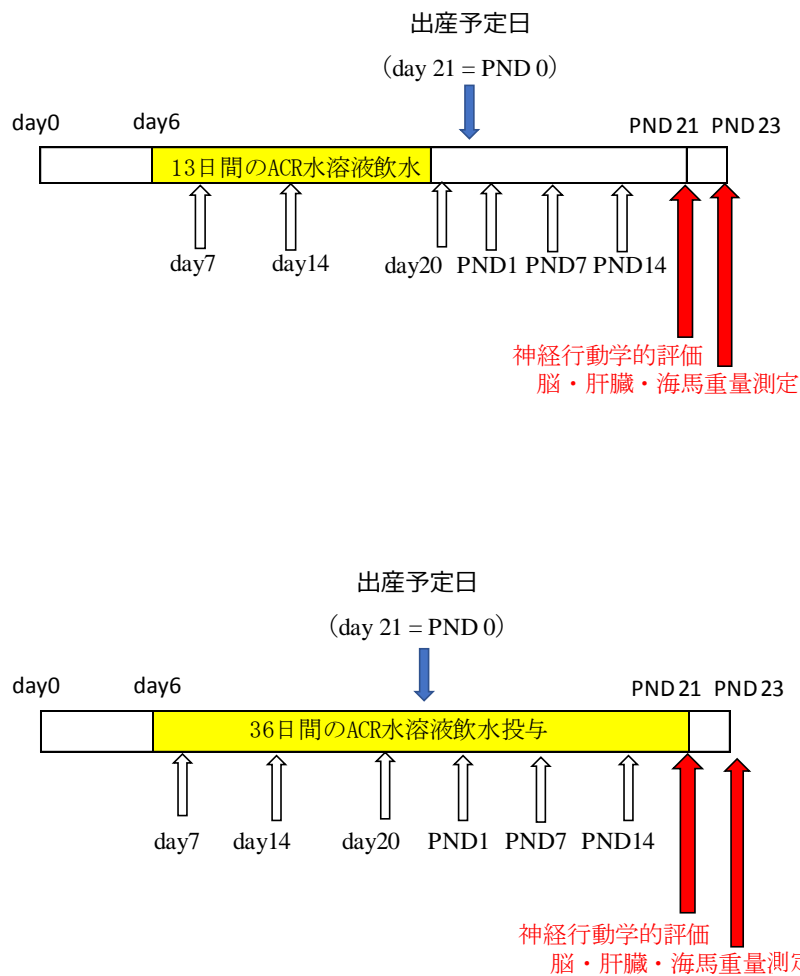
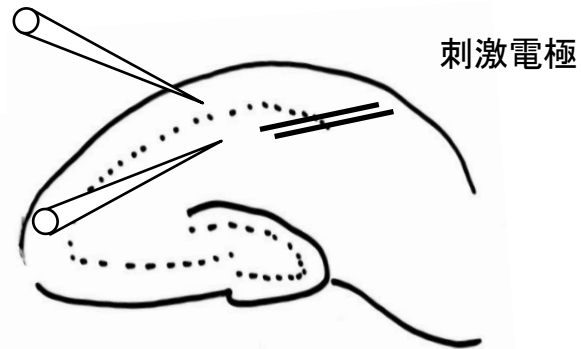


図3 ACR胎生期曝露群（上図）と胎生授乳期曝露群（下図）の実験スケジュール
雌雄Wistarラットを同居させ、膣スメアに精子/プラグ等の存在が確認された日を妊娠初日day0と数えた。胎生期曝露群ではday6からday19までの13日間、胎生授乳期曝露群ではday6からPND21の離乳日まで36日間飲水投与した。白抜き矢印は体重測定の日を示す。胎生期曝露群と胎生授乳期曝露群は投与期間の違い以外は、同じ実験スケジュールで実施した。

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

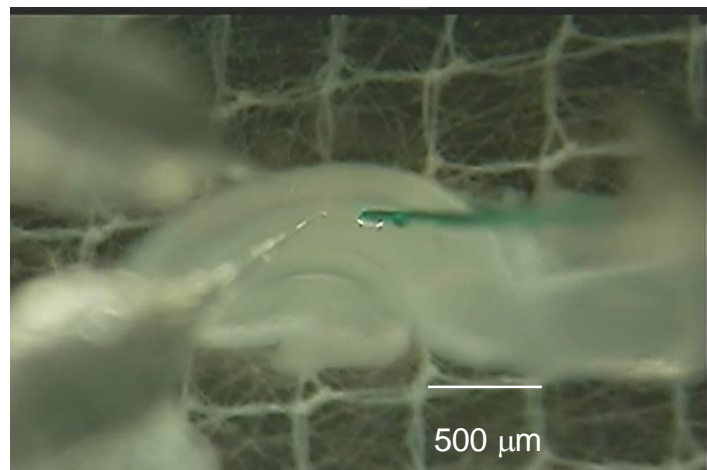
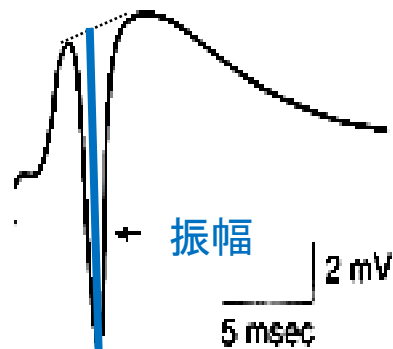


図 4 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法

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))

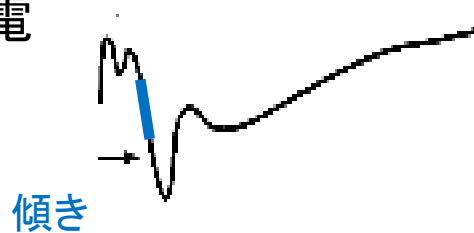


図 5 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き(fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

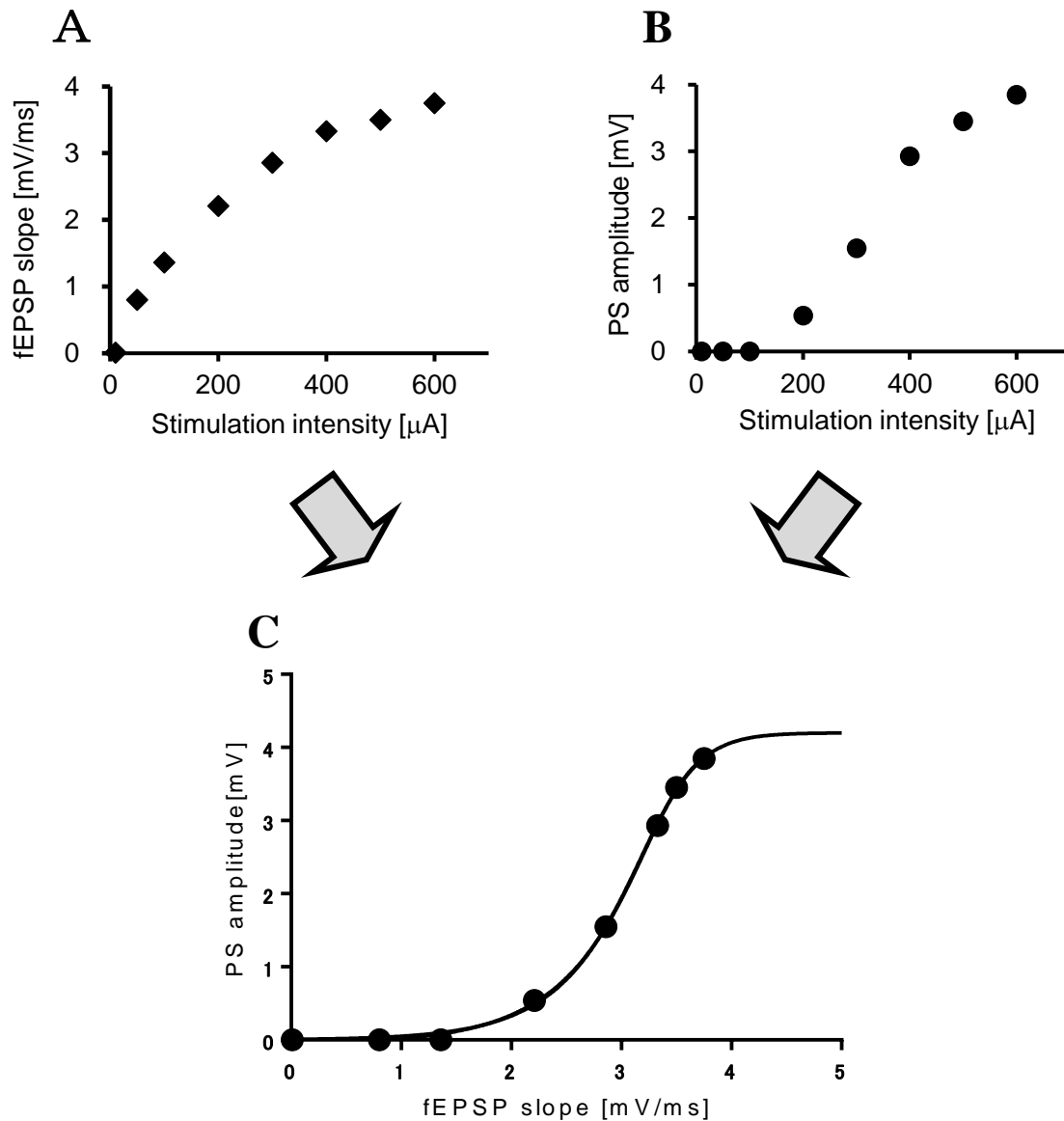


図6 fEPSP-spike (E-S) coupling と その非線形回帰モデル

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。

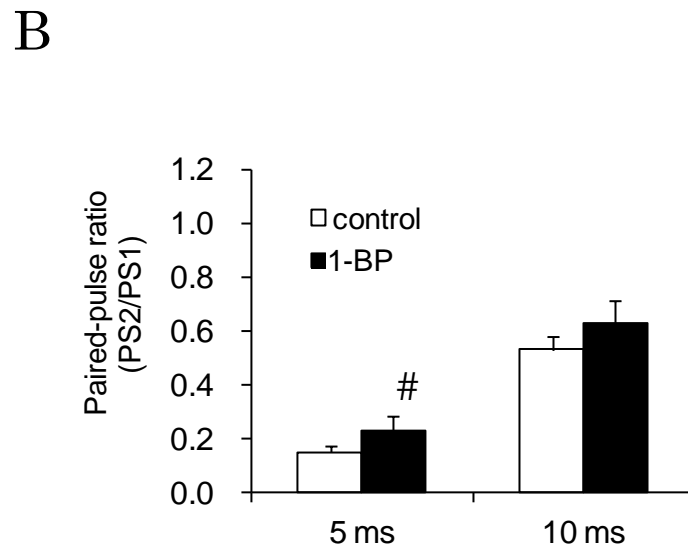
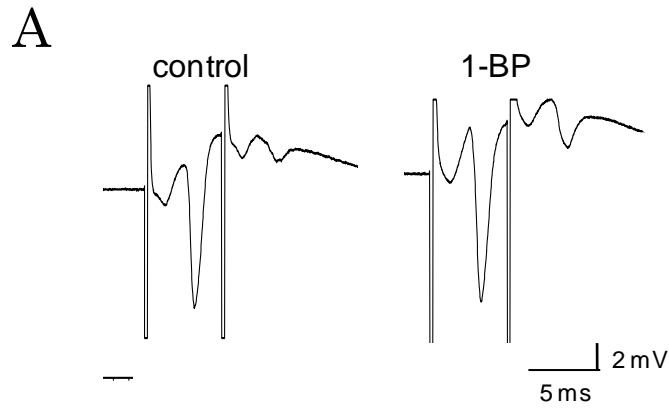
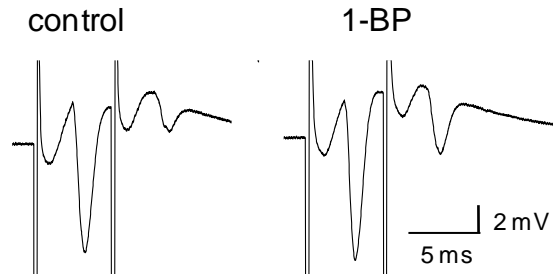


図7 1BPを胎生期曝露した母ラットから生まれた仔ラット(8週齢)の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

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

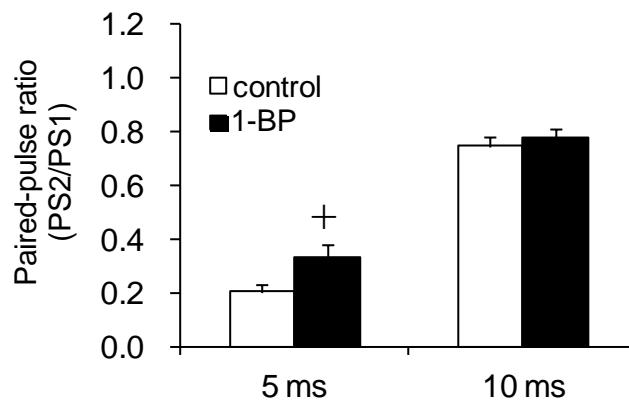


図8 1-BP胎生期曝露した母ラットから生まれた仔ラット(13週齢)の海馬におけるフィードバック抑制の減弱

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。

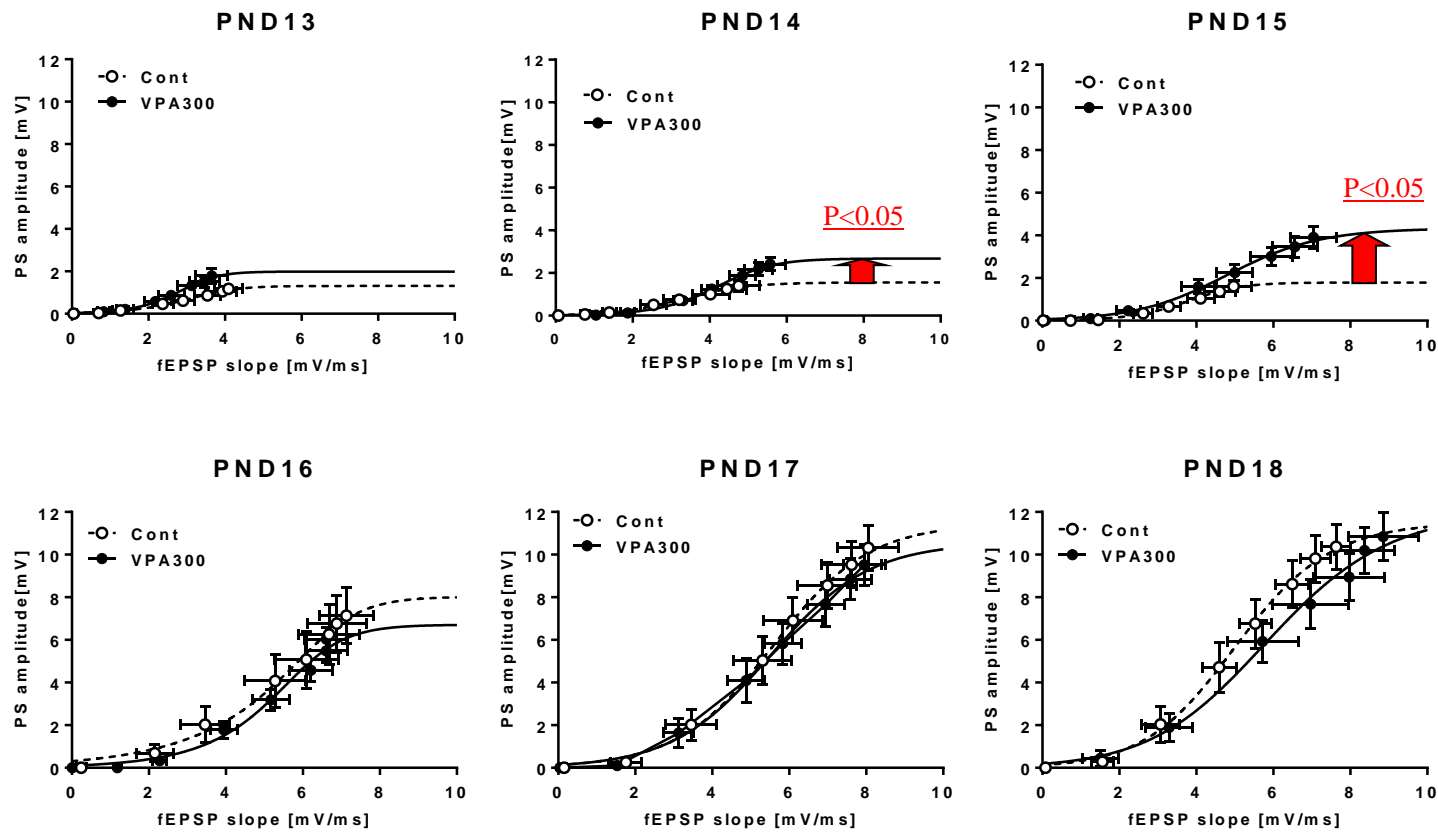


図9 VPA 300mg/kg (day15 に経口投与)による海馬刺激応答性の ES coupling

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。

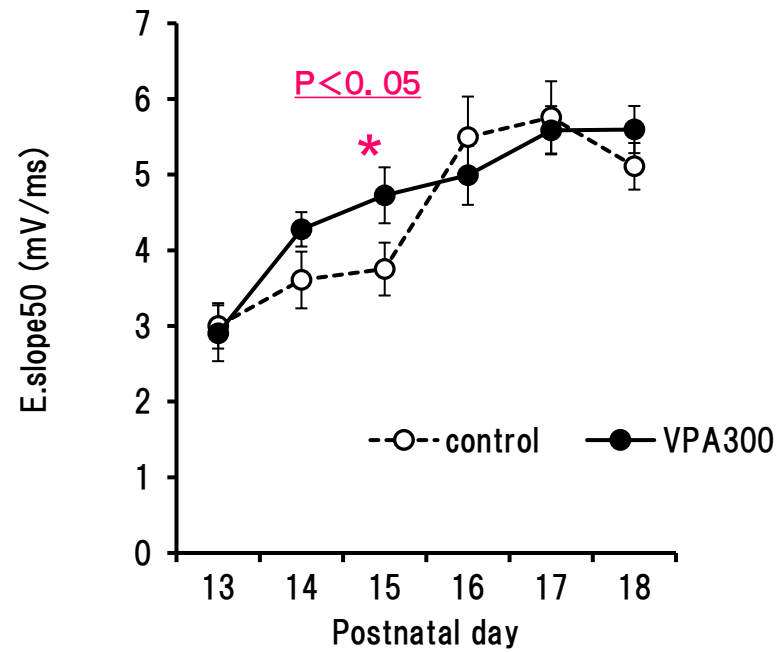


図 10 ロジスティック解析によって求めた VPA 投与による E.slope50 の発達に伴う変化

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。

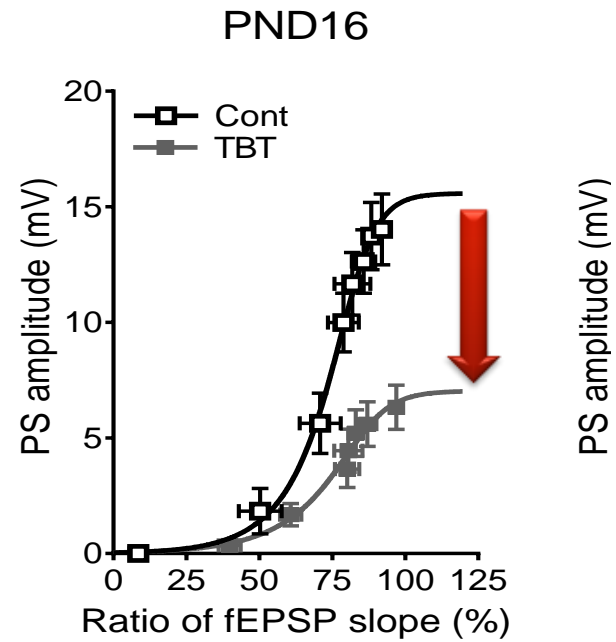


図 11 TBT 投与群の PND16 における E-S coupling

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。

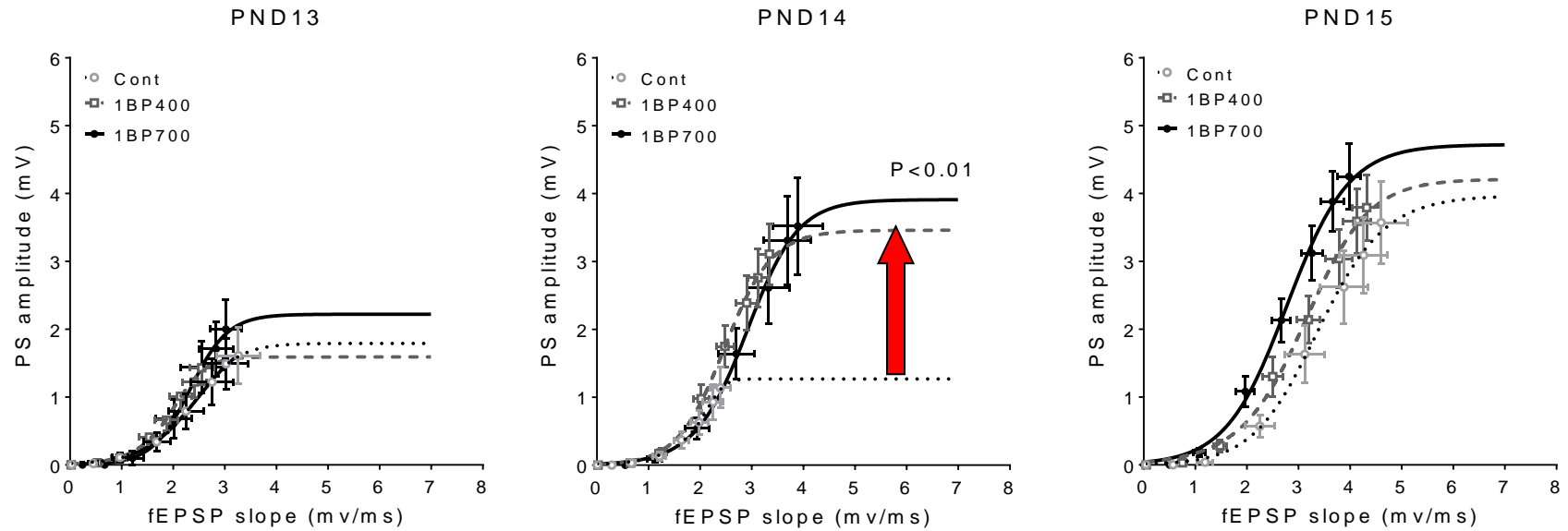


図 12 1BP 胎生期曝露による海馬刺激応答性の ES coupling とロジスティック曲線(平成 29 年度に報告)

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。

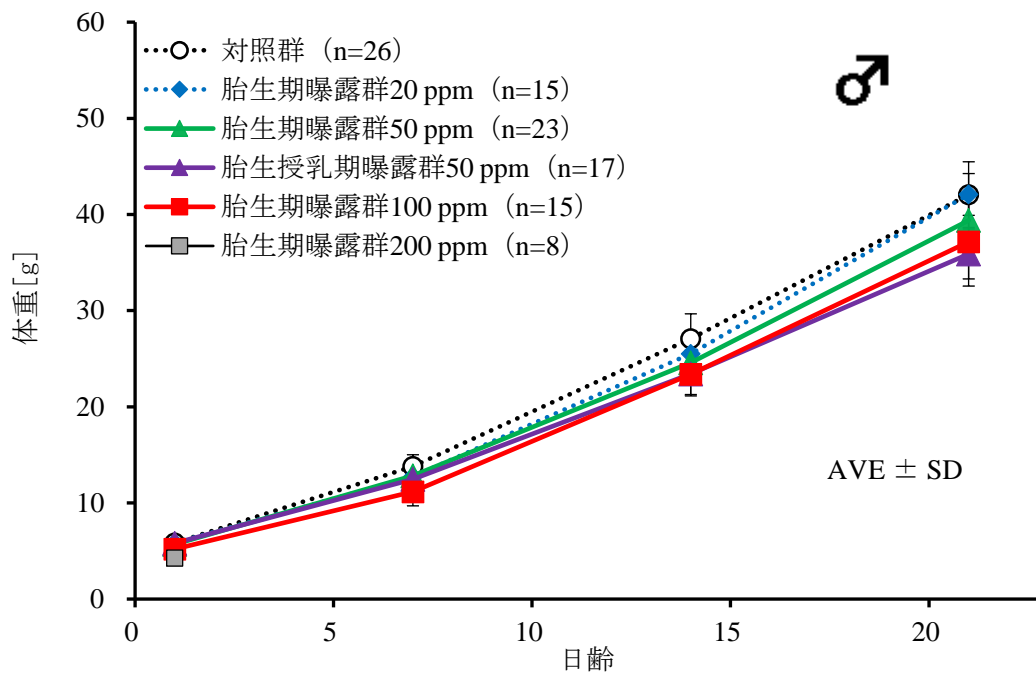


図 13 雄性仔ラットの生後の体重増加への ACR の影響

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。

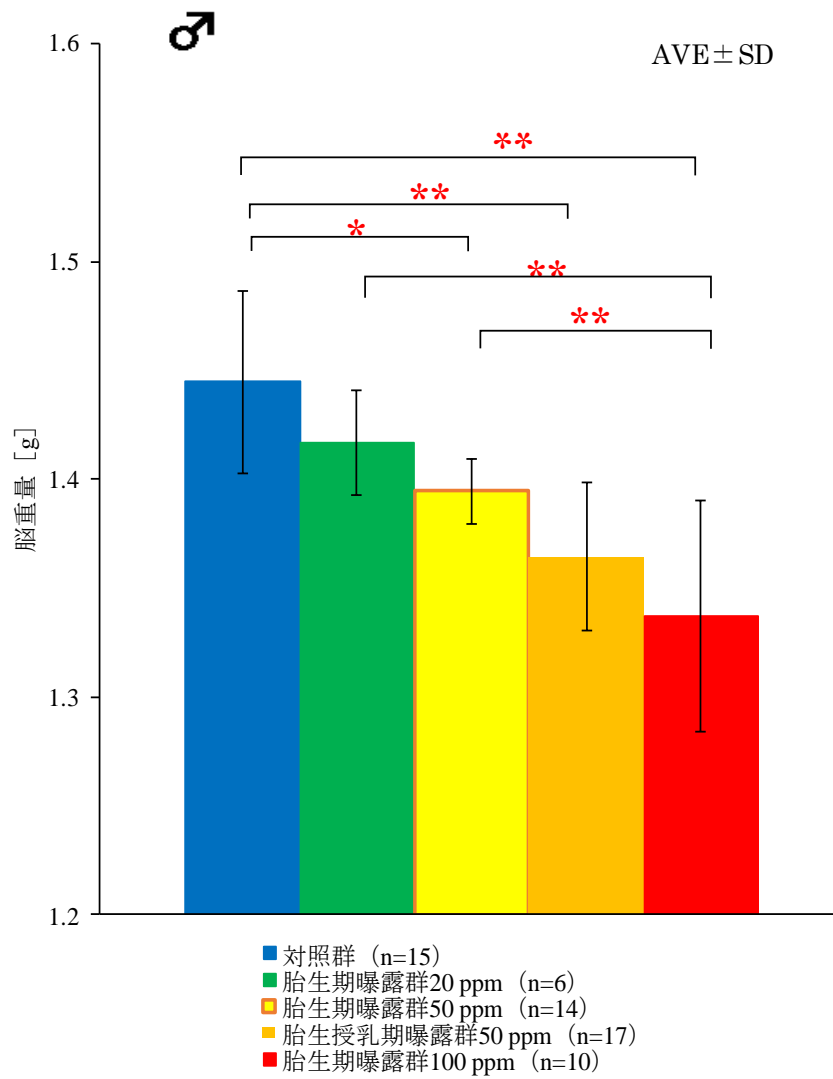


図 14 雄性仔ラットの PND21 における脳重量

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。

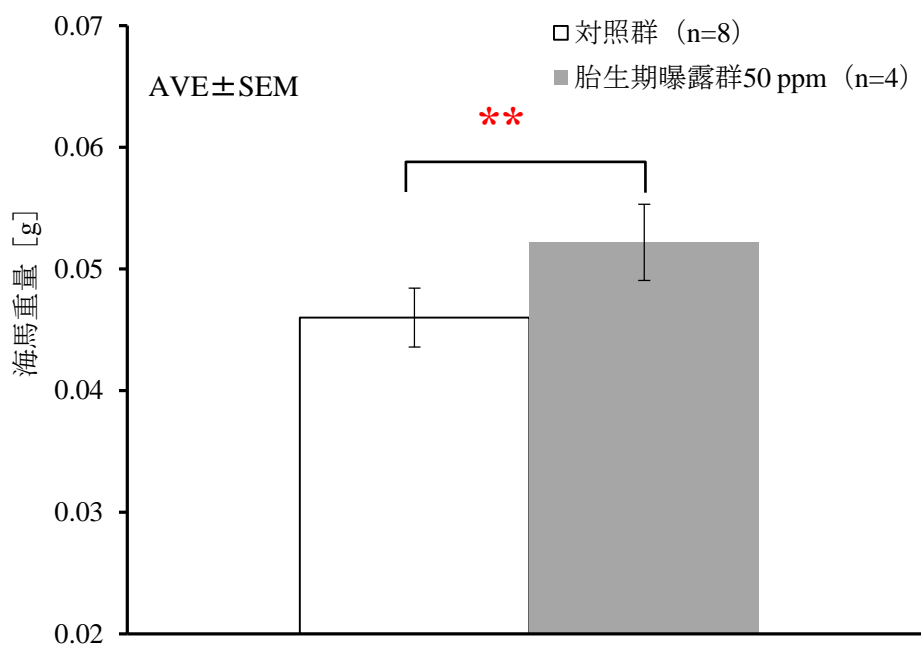


図 15 PND23 における海馬重量

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。

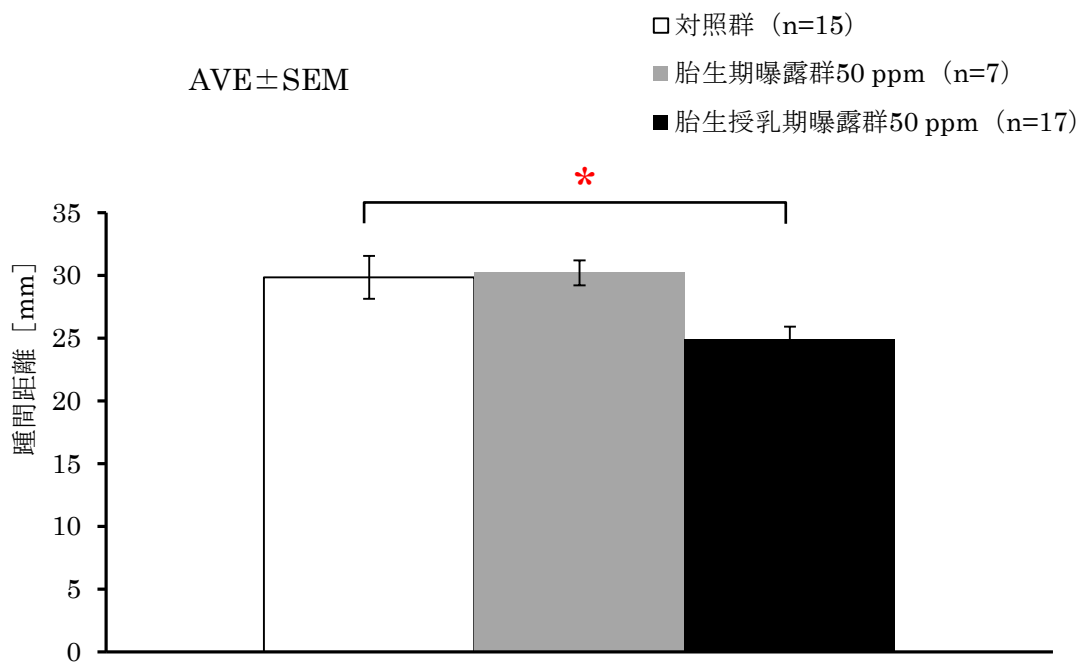


図 16 PND21 で実施した雄性仔ラットの Hindlimb landing foot-spray test 発達毒性 LOAEL である 50ppm について実施した。胎生期曝露群は対照群とは差がなく、胎生授乳期曝露群で踵間距離が減少した (* $p < 0.05$, one-way ANOVA, Scheffe's F test)。雌性仔ラットではこの 3 群に差が認められなかった。括弧内は仔ラットの数を示す。

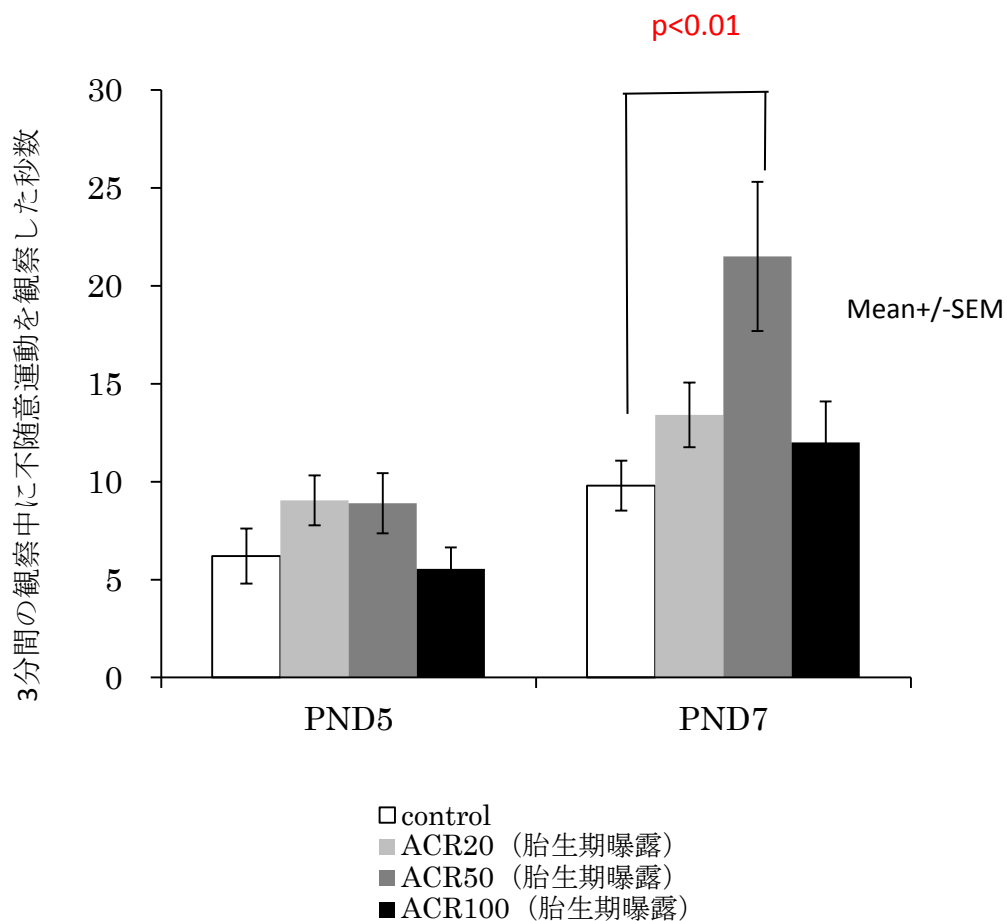


図 17 不随意運動の出現と ACR 胎生期曝露

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。

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

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、ヒトのエピゲノムデータについても調査を行った。

A. 研究目的

出生前後の環境が数十年後の疾患発症に関連していることが、疫学研究により明確に示されている。この現象を司る分子機構の一つとして、エピジェネティックな制御が示唆されており、それを裏付けるデータも集積してきている。これらの知見を背景に DOHaD（Developmental Origins of Health and Disease）学説が提唱され、予防医学や先制医療の観点からも注目されている。また、このメカニズムを介して疾患発症を引き起こす出生前後の環境要因についても、栄養環境だけではなく、様々な要因の関与が示唆されている。本研究では、DOHaD のメカニズム解明を目的に行われたこれまでの動物実験の報告より、とくに化学物質の影響に着目した報告を取りまとめることを目的とした。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ついても調査した。

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。また、妊娠中のバルプロ酸内服症例から出生した児の臍帯血 DNA メチル化状態を解析した。

C. 研究結果

調査研究の結果を、以下に記載する。エピゲノムすなわちエピジェネティックな情報とは、ゲノムを変化させずにはたらきを決め、しかもゲノム（DNA の塩基配列）を介さないにもかかわらず「遺伝」することである。エピゲノムを担う代表的な分子の実体として、ヒストンのメチル化・アセチル化や、DNA のシトシンのメチル化が挙げられる。哺乳類の初期発生時には特に、これらのエピゲノムがダイナミックに変化して消去と再構築されることが知られている。具体的には、受精直後に精子由来のメチル化は速やかに消去され（能動的脱メチル化）、卵子由来のメチル化はそれに遅れ、DNA 複製依存的に維持されずに失われていく（受動的脱メチル化）。親由来の DNA メチル化修飾情報はこのように、大部分が一度消去され、

その後胚盤胞期まで低メチル化状態にある。着床後、それぞれの細胞は複数の DNA メチル化酵素によって、発生段階特異的かつ組織特異的な DNA メチル化修飾を確立する。このように、受精後から発生初期に観察されるエピゲノムの初期化と再構築の時期は、可塑性に富んでいると考えられ、この時期の環境負荷により DNA メチル化状態の違いが生じれば、その違いは長期にわたりそのまま残っている可能性が考えられる。もともと DNA メチル化は、細胞が分裂しても安定して娘細胞に情報が維持される性質を有しており、そのような特徴もこの可能性を支持する点である。したがって、DOHaD 学説はこの時期のエピジェネティックな制御に注目している。さらに、DOHaD 学説が注目する受精時、胎児期、新生児乳幼児期の環境には、栄養環境だけではなく、内分泌かく乱物質などの影響や、喫煙や飲酒の影響、母体の精神状態に起因する内分泌の乱れ、等も含まれる。

(1) 妊娠中の神経内分泌異常の胎児への影響について

妊婦の精神的ストレスが、胎児の内分泌系にかかわる遺伝子のエピゲノム変化を誘導する可能性は、検証数を重ねることで確実性を増してきている。胎児の視床下部-下垂体-副腎の神経内分泌系、いわゆる HPA axis は、妊娠 22 週目より発達し 2 歳までの間は可塑性があることが知られている。したがって、妊娠中の母体のストレス経験が胎児の HPA axis をプログラムし永久的にその機能を変化させる可能性がある。Palma-Gudiel らによる 7 論文に基づく 977 人の被験者のメタ解析の結果は、妊娠中の不安状態やうつ傾向が、児のグルココルチコイドレセプター(GR) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルと有意に相関することを示している。メタ解析で対象とした 7 論文のうち 3 論文は 136 名、25 名あるいは 74 名分の臍帯血 DNA メチル化値を測定しており、残り 4 論文は、胎盤 (482 名分)、生後 2 か月前後の口腔粘膜 (56 名分)、14 か月時前後の唾液 (181 名分)、

14 歳前後の末梢血 (23 名分) を解析している (Palma-Gudiel H et al. Epigenetics 2015)。この領域の DNA メチル化が上昇していると、GR 遺伝子の発現抑制によるグルココルチコイド不応性、抵抗性、が亢進するため、社会心理的ストレスに脆弱性を示す可能性が示唆されている。

(2) 胎児期の外因性内分泌かく乱物質暴露が成人期の生殖能に及ぼす影響について
胎児期・新生児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) の新生児期への暴露により、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ビ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)。ビ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 α 、 β 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) 妊娠中の喫煙の影響

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)。

(4) 妊娠中の母体体重増加量の胎児への影響

妊娠中の体重増加量が妊婦の栄養状態を反映すると仮定し、胎児への影響を計測するために胎盤 DNA メチル化の計測を行った。母体の体重変化が適切でないと (妊娠中の体重増加が 7kg 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 1) (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ったと推測されるが、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 2)、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、異常な発達に関与するかもしれない可能性が示唆された。

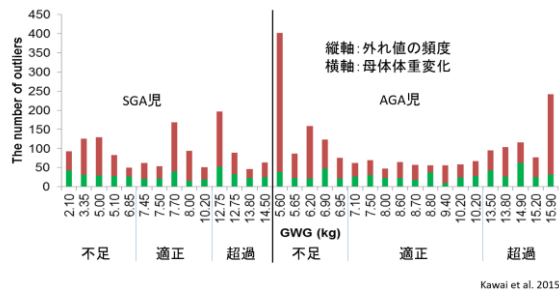


図1 妊娠中の体重変化が至適でないとき、出生児の体重は正常であっても、胎盤のDNAメチル化状態に外れ値が多く観察された。

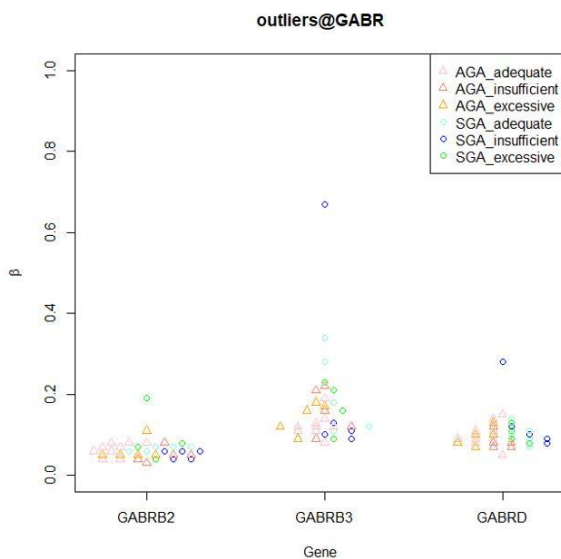


図2 妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの3例で、胎盤のGABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出された

(5) 世代を超えて遺残する環境の影響
環境の影響は、本人のみではなく、世代を超えた影響がありうることで、その分子機構の解明が、近年多数報告されている。つまりは、ここまで述べてきた対象者の胎児期や新生児・乳幼児期だけでなく、対象者の親が若い頃の環境や、祖父母が経験した環境の影響にも注目が集まっている。

慢性的な高脂肪食下にあるオスのラットを親とするメスは、適正な食餌を与えても糖代謝異常とβ細胞機能不全が認められ、対照群に比べ膵島で多くの遺伝子の発現量が異なっており、プロモーターのDNAメチル化状態が異なっている遺伝子も同定された(Ng et al. Nature 2010)。また、若い時にタンパク質欠乏食を与えられたオスは、その後適正な

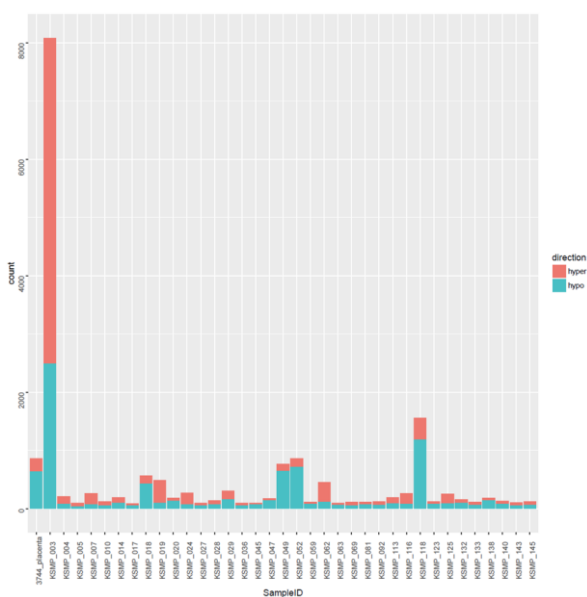
食餌を与えても、自身の仔の肝臓で代謝にかかわる多くの遺伝子の発現が異常を呈し、脂質代謝のマスターレギュレーターであるPparaのDNAメチル化が異なっていた(Carone et al. Cell 2010)。これらの報告が2010年に共に発表されて以来、父親の生活環境が次世代に影響する現象とその分子機構の解明に関する報告がこれまでに集積してきている。不適切な食事負荷により糖尿病予備軍にあるマウスでは、精子のDNAメチル化パターンが健常のそれと異なっており、この異常メチル化パターンが世代を超えて仔の膵島でも確認され、仔世代の代謝異常を引き起こしていると報告された(Wei et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。一方で、世代を超えて食事の乱れの影響が伝わるメカニズムは、DNAメチル化そのものの遺残ではないという報告もある。解析対象となるマウス(第3世代)の父(第2世代)が、父自身の母親(すなわち解析対象から見ると祖母、第1世代)の胎内にいる時期に栄養不良に曝されると、その時期の父(第2世代)の生殖細胞にDNAメチル化変化が起き、出生後も精子メチル化パターンの変化が遺残し、その影響が解析対象(すなわち、栄養不良だった妊娠マウスから見ると孫、第3世代)の代謝異常を引き起こしている可能性が示された(Radford et al. Science 2014)。この論文では、父(第2世代)の異常精子メチル化パターンは、仔(第3世代)の脳と肝臓には伝わっておらず、直接の代謝異常の原因ではないことが示唆される。前述したように、胚の発生初期には親由来のエピジェネティックな情報は一旦消去されて再構築されるため、これは理にかなっている。ところが、解析対象マウスの体組織において異常な発現が認められる遺伝子は、解析対象(第3世代)から見て祖母(第1世代)の栄養不良に伴い父(第2世代)の精子で観察されるDNAメチル化異常領域の近傍にある遺伝子であり、やはり何らかの因果関係があることが強く示唆される。DNAメチル化以外の分子機構、例えばヒストン修飾の異常による伝達が候補に挙げられるが、実際にヒ

ストン修飾の乱れが世代を超えて伝わる可能性も報告されており(Siklenka et al. Science 2015)、あるいはオスの食環境の乱れが精子内の RNA 分子を介した伝達をする可能性も示され(Sharma et al. Science 2016)、今後の研究発展が注目される。現在のところ、これらの分子機構は動物モデルにおける検証にとどまっているが、ヒトでも同様の分子機構が存在する可能性は十分に考えられる。

(5) 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)。

(6) 妊娠中のバルプロ酸内服が胎児に与える影響

国立成育医療研究センターバイオバンクで、1 例のみ、妊娠中にバルプロ酸内服を継続していた例を収集することができた。同症例の妊娠中のバルプロ酸血中濃度はお 40-60ug/ml を推移し、妊娠分娩経過に特段の異常を認めなかった。図 2 と同様に、本症例の胎盤 DNA メチル化の外れ値検定 (多いほど DNA メチル化が乱れている) を検証する



と、外れ値平均値が 282.3 ± 305.1 だったのに対し、同症例は 860 と外れ値が高い、すなわち、DNA メチル化が乱れている傾向が示唆

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。

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. ヒトでもこれらのエピゲノム変化が起こる可能性。
7. 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。
8. 1 症例ではあるが、バルプロ酸に暴露された胎児の DNA メチル化状態は乱れている傾向が観察された。

E. 結論

環境による影響は、胎児期あるいは新生児期にエピゲノム状態を変化させ、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。

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., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y., Nomura Y., Yoshida S., Kanda Y.	Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	Toxicol In Vitro.	34	257-263	2016
Asanagi M., Yamada S., Hirata N., Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y., Kanda Y.	Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells.	J Toxicol Sci.	41	207-215	2016
Hirata N., Yamada S., Asanagi M., Sekino Y., Kanda Y.	Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells.	Biochem Biophys Res Commun.	470	300-305	2016
Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y., Kanda Y.	Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells.	Sci Rep.	7	40925	2017
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.	Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells.	Nanotoxicology		1-11	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	
Yamazaki D., Kanda Y., Sekino Y.	Field potential recording method using multi-electrode array system-Cellular responses in human iPSC-derived cardiomyocytes and rodent brain-derived neurons-.	BUNSEKI	7	290-295	2017
Mabuchi H., Ong HY., Watanabe K., Yoshida S., Hozumi N.	Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay.	IEEJ Trans Fund Materials	136	99-104	2016
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

Urushiyama D., Suda W., Ohnishi E., Araki R., Kiyoshima C., Kurakazu M., Sanui A., Yotsumoto F., Murata M., Nabeshima K., Yasunaga S., Saito S., Nomiyama M., Hattori M., Miyamoto S., Hata K.	Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome.	Sci Rep.	7	12171	2017
Kawai T., Hata K.	Reproductive/Developmental Abnormalities Induced by Epigenetic Aberrations and Possible Environmental Causes.	Nihon Eiseigaku Zasshi.	71	195-199	2016
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.	81	353-358	2016
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.	36	105-112	2016
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.	5	14224	2015