

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の
誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究
(H30-化学-一般-003)

平成 30 年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 種村 健太郎

令和元年 5 月
(2019 年 5 月)

目 次

I. 総括研究報告書

研究の総括 (種村 健太郎) P9

II. 分担研究報告書

分担研究 1 (種村 健太郎) P21

「低用量化学物質の周産期暴露による成熟後マウスの行動様式への影響」

分担研究 2 (掛山 正心) P33

「液性因子影響 (神経内分泌) に関わる脳内分子の定量解析」

分担研究 3 (冨永 貴志) P41

「脳神経回路イメージング解析」

分担研究 4 (中島 欽一) P45

「家庭用品化学物質暴露による神経幹細胞動態解析」

分担研究 5 (北嶋 聡) P51

「網羅的遺伝子発現解析 (ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質ニコチンを周産期マウスに慢性飲水投与後、13 週齢時の海馬における遺伝子発現プロファイル)」

分担研究 6 (菅野 純) P63

「発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み」

分担研究 7 (五十嵐 勝秀) P67

「化学物質の周産期暴露による中枢神経系 DNA メチル化影響解析」

分担研究 8 (今村 拓也) P69

「家庭用品化学物質暴露を感知する新規脳 RNA マーカーの探索」

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P73

別添 3

I. 総括研究報告書

研究課題名

家庭用品化学物質が周産期の中樞神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究（H30-化学-一般-003）

研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

本研究は、先行研究(H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007)にて開発した評価系による独自の知見を応用することで、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を上記の様なシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中樞神経系への影響を検討する。

H30 年度の研究として、(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中樞神経系への影響解析と (2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中樞神経系への影響解析、(3) 発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組みを行った。

(1) 雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始し、妊娠期および出産期-授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 10 週齢時に行動解析を行った結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすみ率の低下が有意に認められた。さらに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析の結果、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた。(2) 塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を 0.025、0.25、2.5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 12-13 週齢時に行動解析を行った。その結果、いずれも空間連想記憶異常が疑われた。特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった。幼若期と成熟期におけるマウス海馬神経回路への塩化トリブチルスズ添加による直接影響の差違について、膜電位感受性色素を用いたイメージング解析を行った結果、40pM の低濃度にて、急性影響を受ける部位に違いがあることが示唆された。(3) OECD テストガイドラインの TG426 を補強するための、情動行動（不安関連行動）への影響、および学習記憶行動への影響を評価するバッテリー式のマウス行動評価系プロトコールの提案を行った。その際、従来のプロトコールでは不十分であった行動解析試験施行前のマウスの馴化と行動解析試験中の実験環境制御に関する記載も補強した。

以上の結果から、家庭用品に使われる一部の化学物質について、マウスでの発生-発達期（周産期を含む）におけるデータが収集できた。また、発生-発達期（周産期を含む）を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために、引き続きデータを収集するとともに、機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

【研究組織】

代表：種村 健太郎

東北大学大学院 農学研究科・教授

分担：掛山 正心

早稲田大学 人間科学学術院・教授

分担：富永 貴志

徳島文理大学 神経科学研究所・教授

分担：中島 欽一

九州大学大学院 医学研究院・教授

分担：北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部・部長

分担：菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構

日本バイオアッセイ研究センター・所長

分担：五十嵐 勝秀

星薬科大学 創薬科学学域・教授

分担：今村 拓也

九州大学大学院 医学研究院・准教授

協力：平舘 裕希

東北大学大学院 農学研究科・助教

A. 研究目的

家庭用品は、それに求められる機能が多様であり、種々の化学物質が使われている。その中にはフタル酸やビスフェノール A といった低分子化学物質に代表される物質や、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが考えられる物質等が含まれている。この様な特性を有する物質には、申請者らの今までの研究から、周産期にある動物の中枢神経系にシグナル異常を引き起こし、成熟後に遅発性の有害影響を誘発することが示唆されるものもある。世代や性別を問わず、妊婦（胎児）や小児を含む国民が広く日常的に長期に渡って接する家庭用品に関しては、この観点からの有害性評価の確立をすることには大きな意義があると考えられる。

本研究は、先行研究(H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007)にて開発した評価系による独自の知見を応用することで、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を上記の様なシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響を検討する。近年の使用量が増加傾向にある物質や中枢神経系の発生発達に関わる受容体に対して標的性があることが

知られている物質として塗料剤（研究1年目：トリブチルスズ化合物類として現在は規制対象である塩化トリブチルスズ）、ゴム製品老化防止剤（研究2年目ビスフェノール系化合物類を予定）、及び防虫加工剤（研究3年目：ピレスロイド系化合物類を予定）を用いて、周産期マウスへの経胎盤投与や経乳投与を行い、成熟後に、個体・器官（システム）レベル、組織・細胞レベル、分子レベルに生じた影響を実験的に捉えることによって生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響に関するデータを収集する。具体的な毒性評価指標は、先行研究において遅発性毒性が明らかとなった既知化学物質の結果を基準として、定量的に評価する。

B. 研究方法

従来型の毒性試験法による毒性情報が利用可能で、周産期暴露による中枢神経毒性に関する情報がない、または中枢神経系に発現している各種受容体に対して親和性がある化学物質を選択し、実際の用途を想定した低用量にて長期飲水投与（発生発達期投与については妊娠マウスを介しての経胎盤投与および授乳マウスを介しての経乳投与）を行い（種村、平舘）、成熟期（生後12週～13週）のマウスについて以下の個体・器官（システム）レベル、組織・細胞レベル、分子レベルでの解析を行い、低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響に関するデータを収集する。

【個体・器官レベルでの影響解析と毒性評価】

周産期投与が12週齢時マウスの情動認知行動に及ぼす影響を、オープンフィールド試験、明暗往来試験、及び、条件付け学習記憶試験（行動解析バッテリー試験）により定量的に評価する（種村）。この行動解析バッテリー試験は、測定機材及びプロトコルを先行研究において開発したもので、非常に高い再現性と精度を発揮する。行動解析バッテリー試験後のマウスについて、血液や唾液中の液性因子への影響を評価し、情動認知行動影響との関連性を検討する（掛山）。また、膜電位感受性色素を利用したマウス脳神経回路イメージング解析を同動物の海馬スライスを用いて実施し、影響を受けた脳神経回路の部位と程度を明らかにする（富永）。

【組織・細胞レベルでの影響解析と毒性評価】

行動解析バッテリー試験後のマウス脳について

病理組織学解析を行い、光学顕微鏡レベルでの脳組織構築への影響（種村）、組織化学レベル、およびタンパク発現レベルでの神経突起発達への影響を明らかにする（種村、平舘）。また、先行研究で中枢神経異常と高い相関性を示すことが明らかとなった神経幹細胞の動態の変化を、各種神経分化マーカーを用いて解析する（中島）。

【分子レベルでの影響解析と毒性評価】

行動解析バッテリー試験後のマウス脳より得られた海馬について、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにする（北嶋）とともに、先行研究にて蓄積した知見に基づくカスケード解析による毒性発現メカニズムの *in silico* 推定を行う（菅野）。こうした分子メカニズム解明研究による裏付けによって、前述の個体・器官（システム）レベルおよび組織・細胞レベルでの解析結果の人への外挿を客観的に行うことが可能となる。また、全ゲノムレベルでの DNA メチル化様式への影響に関する情報を蓄積する（五十嵐）とともに、近年、生物学的意義が明らかになり、有望な毒性指標としての利用が期待されるノン・コーディング RNA への影響の有無と程度を検討する（今村）。

個体・器官（システム）レベル、組織・細胞レベル、分子レベルでの具体的な毒性評価指標は、すでに人で毒性が明らかとなっている既知化学物質や、先行研究において遅発性毒性が明らかとなった化学物質の結果を基準として参照することにより定量的に評価する。これによって、家庭用品に含まれる化学物質の周産期暴露による遅発性の中枢神経毒性の高精度な有害性評価が普遍性を持って実施可能となる。

【発生-発達期における化学物質暴露によって成熟後に顕在化する影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み】

前述の中枢神経系への遅発性の有害影響を高精度かつ定量的に把握する為に開発しその性能が本研究で確認された試験法を元とし、行政対応目的で使用する為のバリデーションに耐えるガイドラインへの適用を目指す。また、既に家庭用品規制法によって規制された化学物質を含め、対象とする化学物質について、遅発性の中枢影響が認められた場合、その誘発分子機序を明らかにすることにより、人への外挿性を検討しつつ、当該物質に

ついて規制のあり方の検討に資する情報を提供する。

（※）研究代表者を二重下線、研究分担者を下線、研究協力者を下点線で示した。

倫理面への配慮：動物実験については、その計画及び実施に際して、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、各研究者が所属の研究機関が定める動物実験に関する規定・指針を遵守した。

C. 研究結果

H30 年度の研究として、(1) 発生発達期にかけてのペルメトリン（当初計画では研究開始 1 年目に検討予定であった）の低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析と (2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析。また (3) 発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組みを行った。

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始した。尚、用量設定はペルメトリンの一日摂取許容量 (ADI) から算出した。妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替え、生後 10 週齢時に行動解析（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験）を行った。その結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすくみ率の低下が有意に認められた。また明暗往来試験における暗所潜在時間の増加傾向が認められた（種村、北嶋）。さらに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析から、投与群マウスの海馬における神経幹細胞分化動態に影響が認められた。すなわち、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた（種村、中島）。

(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を 0.025、0.25、2.5ppm に調整（TDI 値を元に、安全係数として 10、100、1000 を用いて算出した）し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた。平成 30 年 1 月 7 日よりバッテリー式の行動解析（オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験）を行った結果、いずれも高架式十字迷路試験における総移動量、解放部滞在時間、総アーム選択数の増加傾向を示すとともに、空間連想記憶異常が疑われた。また、特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった（種村）。また、脳内分子の定量解析から行動解析後の脳に興奮性神経伝達情報のかく乱が疑われた（掛山）。一方で、成体への投与においては、神経幹細胞への影響は認められなかった（中島）。今後、組織・細胞レベルでの影響解析（種村、富永、中島、掛山、平舘）を重ねるとともに、分子レベルでの影響解析（北嶋、五十嵐、今村）を深める目的で、エピゲノム様式解析の高精度化を進める（五十嵐）。さらにマウス胎仔脳および脳オルガノイドをシングルセル RNA-seq に供与し、シングルセルレベルでの RNA 発現変動検出パイプライン固め（今村）を行った。また、幼若期と成熟期におけるマウス海馬神経回路への塩化トリブチルスズ添加による直接影響の差違について、膜電位感受性色素を用いたイメージング解析を開始した。その結果、40pM の低濃度にて、急性影響を受ける部位に違いがあることが示唆された（富永）。

(3) 発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み：OECD テストガイドラインの TG426 を補強するための、情動行動（不安関連行動）への影響、および学習記憶行動への影響を評価するバッテリー式のマウス行動評価系プロトコール（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験）の提案

（Standard Project Submission Form を OECD Advisory Group on Endocrine Disruptors Testing and Assessment に提出）を行った。その際、従来のプロトコールでは不十分であった行動解析試験施行前のマウスの馴化と行動解析試験中の実験環境制御に関する記載も補強した。その結果、良好な反響が得られるとともに、他の学習記憶行動解析試験と比較した優位性についての説明と、提出データの補強を行っている（菅野、種村）。

D. 考察

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：行動解析結果から、新規場面での適応不全と記憶想起に異常が疑われた。しかしながら、それらは先行研究で得られたネオニコチノイド系農薬成分の投与に比較し、軽度と言えるものであった。また海馬における神経幹細胞分化動態への影響は上述の行動影響と対応する神経科学的物証と考えられた。

(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：前述のペルメトリンを用いた解析における交配時からの投与は、雌雄の配偶子形成への影響の有無を排除できないため、妊娠マウスへの投与を投与開始点とした。すでに規制対象である塩化トリブチルスズを使用した本研究によって、発生-発達期における他の化学物質の中枢影響との毒性強度の比較が可能となると考えている。

(3) 発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み：行動解析試験施行前のマウスの馴化と行動解析試験中の実験環境制御を含めた我々のプロトコールは OECD における各国委員からの評価は非常に高く、さらに関連するデータを収集し、より妥当性を高める必要があると考えられた。

E. 結論

家庭用品に使われる一部の化学物質について、マウスでの発生-発達期（周産期を含む）におけるデータが収集できた。発生-発達期（周産期を含む）を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らか

にするために引き続きデータを収集するとともに、機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Epigenetic Regulation of Human Neural Stem Cell Differentiation. Honda M, Nakashima K, Katada S. In: Buzanska L. (eds) Human Neural Stem Cells. Results and Problems in Cell Differentiation, 2018;66:125-136. Springer, Cham.

2) 雑誌

Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhashi K, Takai M, Aoshi T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I. Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study. *Biologicals*. 55: 43-52., 2018.

Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 498(3): 674-679., 2018.

Yamada K, Hiradate Y, Goto M, Nishiyama C, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes during in vitro maturation. *Reprod Med Biol*. 17(2):143-148., 2018.

Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, Uchida T. Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 497(1):388-393., 2018.

Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci*. 30;80(3):536-543., 2018.

ioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion. Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi T, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AM, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T and Nakashima K. *Neuron* (in press).

Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury. Yoshikawa Y, Ago T, Kuroda J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, Shibahara T, Nakashima H, Nakashima K, Kitazono T. *Neuroscience*. 2018 Dec 5;398:193-205.

New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. *Cell Biol Toxicol*. 2018 Dec;34(6): 425-440.

Np95/Uhrf1 regulates tumor suppressor gene expression of neural stem/precursor cells, contributing to neurogenesis in the adult mouse brain. Murao N, Matsubara S, Matsuda T, Noguchi H, Mutoh T, Mutoh M, Koseki H, Namihira M, Nakashima K. *Neurosci Res*. 2018 May 31. pii: S0168-0102 (18) 30276-1.

Canonical TGF- β Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression. Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Ishizu M, Pan M, Kameda T, Nakashima K. *J Neurosci*. 2018 May 16; 38(20): 4791-4810.

Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice. Sakai A, Matsuda T, Doi H, Nagaishi Y, Kato K, Nakashima K. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Apr 17;115(16):4270-4275.

Prior Treatment with Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Boosts Human Neural Stem Cell Transplantation-Mediated Functional Recovery After Spinal Cord Injury. Uezono N, Zhu Y, Fujimoto Y, Yasui T, Matsuda T, Nakajo M, Abematsu M, Setoguchi T, Mori S, Takahashi HK, Komiya S, Nishibori M, Nakashima K. Stem Cells. 2018 May; 36(5): 737-750.

2. 学会発表

酒井和哉、大塚(出田) まき、斉藤洋克、平舘裕希、原健士朗、五十嵐勝秀、種村健太郎、「精子エピゲノム影響評価による非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーの探索」第12回日本エピジェネティクス研究会年会(2018. 5. 24-25)、札幌

種村健太郎、「周産期における低用量化学物質暴露が引き起こす情動認知行動毒性評価系開発に関する最近の知見」第45回日本毒性学会学術年会(2018. 7. 18-20)、大阪府

Hirokatsu Saito, Takashi Tominaga, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Early life exposure to low levels of permethrin exerts slight impairment of central nervous system in male mice」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム(2018. 7. 24-25)、京都市

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Chemical-Induced epigenetic effects on mouse sperm using valproic acid」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム(2018. 7. 24-25)、京都市

Kohei Umezu, Yuuki Hiradate, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Sperm migration is regulated by stromal cell-derived factor 1 in Japanese Black cattle」第111回日本繁殖生物学会大会(日中韓国際シンポジウム)(2018. 9. 12-16)、上田市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎、「ウシ精子走化性因子の特定と制御機構の解明」第2回日本胚移植技術研究会大会、(2018. 9. 20-21)、津市

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura, 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Paternal VPA-exposure affects the offspring's behavior through sperm DNA methylation」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

後藤萌、斉藤洋克、原唯花、富永貴志、種村健太郎、「マウス行動様式と海馬神経回路機能～系統間差と交雑影響～」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

斉藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、種村健太郎、「低用量ペルメトリン早期慢性暴露によるマウス次世代雄個体行動影響」第21回環境ホルモン学会研究発表会、(2018. 12. 15-16)、東京都

中島欽一〇: 転写因子 NeuroD1によるミクログリアからニューロンへの分化転換とそのメカニズム、第41回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2018年11月28日-30日(28日)(シンポジウム)

中島欽一〇: 転写因子ND1によるミクログリアからニューロンへの直接分化転換メカニズムの解明、神経発達・再生研究会、名古屋市、名古屋市立大学病院、2018年10月17-18日(17日)

中島欽一〇: 損傷部保全と神経幹細胞移植の併用による脊髄損傷治療法の開発、Walk Again2018、東京都、秋葉原コンベンションホール、2018年10月13日(講演)

中島欽一[○]: Preservation of the injured site boosts up neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury、第61回日本神経化学会大会、神戸市、神戸国際会議場、2018年9月6日-8日(7日)(シンポジウム)

山下りえ[○]、堅田明子、中島欽一 : Analysis of the impact of choroid plexus on adult neurogenesis focusing on a key chronic inflammatory regulator, Angiopoietin-like protein 2、第41回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018年7月26日-29日(27日)(ポスター)

松原周蔵[○]、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : Hemi-methylated DNA recognition factor, Np95/UHRF1, regulates the behavior of adult neural stem/progenitor cells、第41回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018年7月26日-29日(26日)(ポスター)

中島欽一[○]: Interplay between cell extrinsic cues and intrinsic epigenetic programs in the regulation of developmental stage-dependent fate specification of neural stem cells、第41回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018年7月26日-29日(28日)(シンポジウム)

中島欽一[○]: Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure increases seizure susceptibility in adult mice、国際シンポジウム、京都市、京都大学、2018年7月24日-25日(25日)

山下りえ[○]、堅田明子、中島欽一 : Analysis of the effects of choroid plexus on adult neurogenesis by focusing on a chronic inflammatory regulator, Angiopoietin-like protein 2、第16回幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018年6月1日-2日(2日)(ポスター)

松原周蔵[○]、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : The hemi-methylated DNA recognition factor, Np95 maintains adult hippocampal neurogenesis、第16回

幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018年6月1日-2日(2日)(ポスター)

堅田明子[○]、本田瑞季、中島欽一 : Decoding mouse embryonic neural stem cell fate by BMP2 responsiveness、第16回幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018年6月1日-2日(2日)

今村拓也[○]、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : 転写因子を基盤としたマウス神経幹細胞のDNAメチローム変換、第12回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでの2・7、2018年5月24日-25日(24日)(ポスター)

堅田明子[○]、本田瑞季、中島欽一 : 骨形成因子の応答性から読み解く、発生期神経幹細胞の分化運命決定機構、第12回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでの2・7、2018年5月24日-25日(24日)(ポスター)

土井浩義[○]、外須美夫、中島欽一 : 幼少期ミダゾラム暴露によるマウス海馬神経幹細胞の挙動解析とニューロン新生に与える影響、第65回日本麻酔科学会学術集会、横浜市、パシフィコ横浜、2018年5月17日-19日(ポスター)

Doi, H., Matsuda, T., Shirozu, K., Hoka, S., Nakashima, K. : Effects of Neonatal Exposure to Midazolam on Neural Stem/Progenitor Cell Behavior in the Adult Mouse Hippocampus, Anesthesiology, San Francisco, October 13-17, 2018

Nakashima, K. : Prior inhibition of HMGB1 boosts up human neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury, The 21st Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences, Grand Hilton, Seoul, August 30-31, 2018

Nakashima, K. : Preservation of damaged tissue by prior inhibition of HMGB1 boosts human neural

stem cell transplantation-mediated functional
recovery after spinal cord injury, STEM CELL
CROSSROADS, Shanghai, China, May 7-10, 2018

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

別添 4

Ⅱ. 分担研究報告書

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

分担研究課題名

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
～低用量化学物質の周産期暴露による成熟後マウスの行動様式への影響～

研究分担者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

H30 年度の研究として、(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析と (2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析を行った。

(1) 雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始し、妊娠期および出産期-授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 10 週齢時に行動解析を行った結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすくみ率の低下が有意に認められた。さらに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析の結果、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた。(2) 塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を 0.025、0.25、2.5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウス（生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた）を用いて生後 12 週齢時に行動解析を行った。その結果、いずれも空間連想記憶異常が疑われた。また、特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった。

以上の結果から、家庭用品に使われる一部の化学物質について、マウスでの発生-発達期（周産期を含む）におけるデータが収集できた。

A. 研究目的

家庭用品は、それに求められる機能が多様であり、種々の化学物質が使われている。その中にはフタル酸やビスフェノール A といった低分子化学物質に代表される物質や、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが考えられる物質等が含まれている。このような特性を有する物質には、申請者らのこれまでの研究から、周産期にある動物の中枢神経系にシグナル異常を引き起こし、成熟後に遅発性の有害影響を誘発することが示唆されるものもある。世代や性別を問わず、妊婦（胎児）や小児を含む国民が広く日常的に長期に渡って接する家庭用品に関しては、この観点からの有害性評価の確立をすることには大きな意義があると考えられる。

本研究は、先行研究(H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007)にて開発した評価系による独自の知見を応用することで、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を上記のようなシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響を検討する。具体的には、周産期マウスへの経胎盤投与や経乳投与を行い、成熟後に、行動様式および対応する神経科学的物証を実験的に捉えることによって生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響に関するデータを収集する。

B. 研究方法

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：成熟した雌雄マウスを交配させるとともにピレスロイド系農薬であるペルメトリンを含んだ飲水投与（0.3ppm）を開始し、妊娠期および出産期-授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えて飼育し、生後 10 週齢

時の雄マウスについて、オープンフィールド試験（検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数）、明暗往来試験（検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間）、条件付け学習記憶試験（検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度）からなるバッテリー式の行動解析を行って行動解析を行った。行動解析後のマウス脳組織を用いて、組織切片を作成に免疫組織化学解析を行った。(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析：塩化トリブチルスズ（かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている）を 0.025、0.25、2.5ppm に調整し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続し、得られた産仔雄マウスを生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えて生後 12 週齢まで飼育した。その後、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動様式について、オープンフィールド試験（検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数）、明暗往来試験（検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間）、高架式十字迷路試験（検定項目として、総移動量、オープンアーム滞在時間、総アーム選択数）、条件付け学習記憶試験（検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度）、プレパルス驚愕反応抑制試験（検定項目として、120dB に対する 90、95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制抑制度）からなるバッテリー式の行動解析を行うことで検討した。

倫理面への配慮：動物実験については、その計画及び実施に際して、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、東北大学が定める動物実験に関する規定・指針を遵守した。

C. 研究結果

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響

解析: 雌雄マウスを交配させるとともに 0.3ppm ペルメトリンを含んだ飲水投与を開始した。尚、用量設定はペルメトリンの一日摂取許容量 (ADI) から算出した。妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替え、生後 10 週齢時に行動解析 (オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験) を行った。その結果、投与群マウスにオープンフィールド試験における総移動距離の減少と条件付け学習記憶試験における音連想記憶度と対応するすくみ率の低下が有意に認められた。また明暗往来試験における暗所潜在時間の増加傾向が認められた (種村、北嶋)。さらに行動解析後のマウス脳切片を用いた各種神経分化マーカーによる免疫組織化学解析から、投与群マウスの海馬における神経幹細胞分化動態に影響が認められた。すなわち、成熟ニューロン数には影響が認められないものの未分化ニューロン数の増加が認められた。またグリア細胞であるアストロサイト数の減少と未発達な突起を持つアストロサイトの増加が確認できた (中島との共同研究)。

(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響

解析: 塩化トリブチルスズ (かつて塗料剤として使用されたが現在では特定化学物質として指定されている) を 0.025、0.25、2.5ppm に調整

(TDI 値を元に、安全係数として 10、100、1000 を用いて算出した) し、妊娠 11.5 日齢の雌マウスに飲水投与を開始し、妊娠期および出産期、授乳期を通して雌マウスに飲水投与を継続した。解析には産仔雄マウスについてのみ施行することとし、生後 4 週齢時に離乳し、以後は通常飲水に切り替えた。平成 30 年 1 月 7 日よりバッテリー式の行動

解析 (オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験) を行った結果、いずれも高架式十字迷路試験における総移動量、解放部滞在時間、総アーム選択数の増加傾向を示すとともに、空間連想記憶異常が疑われた。また、特に高用量投与群においては音連想記憶異常を伴うものであった (北嶋との共同研究)。

D. 考察

(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響

解析: 行動解析結果から、新規場面での適応不全と記憶想起に異常が疑われた。しかしながら、それらは先行研究で得られたネオニコチノイド系農薬成分の投与に比較し、軽度と言えるものであった。また海馬における神経幹細胞分化動態への影響は上述の行動影響と対応する神経科学的物証と考えられた。

(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響

解析: 前述のペルメトリンを用いた解析における交配時からの投与は、雌雄の配偶子形成への影響の有無を排除できないため、妊娠マウスへの投与を投与開始点とした。すでに規制対象である塩化トリブチルスズを使用した本研究によって、発生-発達期における他の化学物質の中枢影響との毒性強度の比較が可能となると考えている。

E. 結論

家庭用品に使われる一部の化学物質について、マウスでの発生-発達期 (周産期を含む) におけるデータが収集できた。こうした知見の集積は、発生-発達期 (周産期を含む) を対象とした国際的ガイドラインへの提言のためにも重要であることから、家庭環境レベル、生活環境レベルにおける化

学物質暴露による神経行動毒性の強度を明らかにするために引き続きデータを収集するとともに、機能変調に対応する神経科学的物証を捉える必要があると考えられる。

F. 研究発表

2. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhashi K, Takai M, Aoshi T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I. Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study. *Biologicals*. 55: 43-52., 2018.

Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 498(3): 674-679., 2018.

Yamada K, Hiradate Y, Goto M, Nishiyama C, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes during in vitro maturation. *Reprod Med Biol*. 17(2):143-148., 2018.

Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, Uchida T. Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 497(1):388-393., 2018.

Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci*. 30;80(3):536-543., 2018.

2. 学会発表

酒井和哉、大塚(出田)まき、斉藤洋克、平館裕希、原健士朗、五十嵐勝秀、種村健太郎、「精子エピゲノム影響評価による非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーの探索」第12回日本エピジェネティクス研究会年会(2018.5.24-25)、札幌

種村健太郎、「周産期における低用量化学物質暴露が引き起こす情動認知行動毒性評価系開発に関する最近の知見」第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18-20)、大阪府

Hirokatsu Saito, Takashi Tominaga, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Early life exposure to low levels of permethrin exerts slight impairment of central nervous system in male mice」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム(2018.7.24-25)、京都市

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Chemical-Induced epigenetic effects on mouse sperm using valproic acid」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム(2018.7.24-25)、京都市

Kohei Umezu, Yuuki Hiradate, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Sperm migration is regulated by stromal cell-derived factor 1 in Japanese Black cattle」第111回日本繁殖生物学会大会(日中韓国際シンポジウム)(2018.9.12-16)、上田市

梅津康平、平舘裕希、原健士郎、種村健太郎、「ウシ精子走化性因子の特定と制御機構の解明」第2回日本胚移植技術研究会大会、(2018. 9. 20-21)、津市

Hirokatsu Saito , Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura、「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura、「Paternal VPA-exposure affects the offspring's behavior through sperm DNA methylation」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

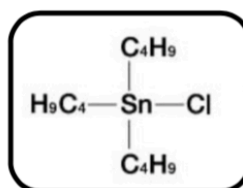
後藤萌、斉藤洋克、原唯花、富永貴志、種村健太郎、「マウス行動様式と海馬神経回路機能～系統間差と交雑影響～」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

斉藤洋克、原健士郎、富永貴志、中島欽一、種村健太郎、「低用量ペルメトリン早期慢性暴露によるマウス次世代雄個体行動影響」第21回環境ホルモン学会研究発表会、(2018. 12. 15-16)、東京都

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

塩化トリブチルスズ
Tributyltin chloride (TBTC)



分子式・分子量：C₁₂H₂₇ClSn=325.51
(CAS No. 30560-19-1)

用途：船底、漁網などにイガイ類、フジツボ類、海藻などが付着するのを防ぐ船底・漁網防汚剤。1990年1月に化審法による第一種特定化学物質に指定

LD50：122mg/kg(ラット、経口投与)

TBTC慢性飲水暴露用量の設定と調整

用量設定根拠：耐用1日摂取量(TDI)から算出したday (欧州食品安全機関(EFSA),2004)
TDI:Tributyltin chloride(TBTC) 0.25µg/kg/day

暴露3用量の算出と調整方法

TDI安全係数	一日暴露量 (µg/kg/day)	投与溶液濃度 (ppm)	投与溶液 mg/100ml
10	2.5	0.025	0.0025
100	25	0.25	0.025
1000	250	2.5	0.25

※動物体積=10mlに対し1日飲水量1mlとした。

※Bioavailability及び体内動態は考慮しないものとした。

TBTをエタノールに溶解したものをストックソリューションとし、水道水で10000倍希釈した(0.0001%エタノール)。

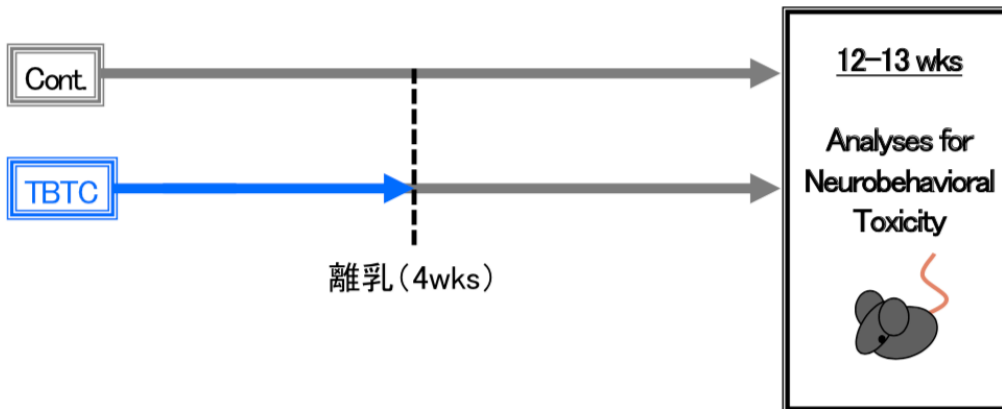
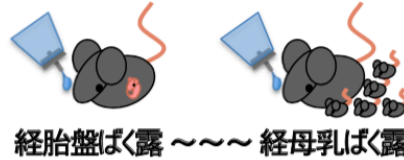
～発生-発達期 長期飲水投与～

Control (Cont.): 0.0001%EtOH水道水

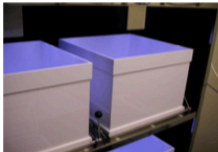

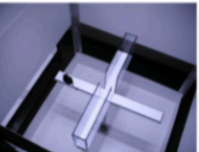
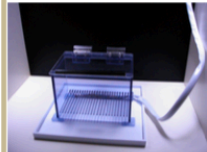
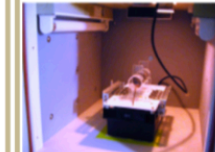
TBTC :2.5、25、250 μ g/kg/day※

胎生11.5日から生後4週齢まで長期飲水投与

※耐用一日摂取量(TDI:安全係数10、100、1000)

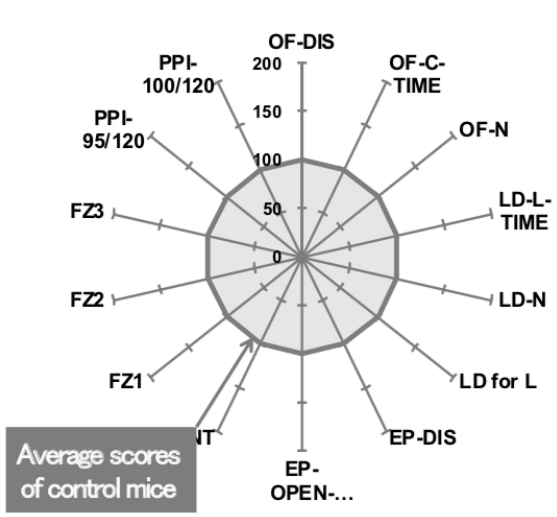


Behavioral Analysis

OF	LD	EP	FZ	PPI
				
Open Field test 10min.	Light/dark transition test 5min.	Elevated plus maze test 10min.	Fear conditioning test 6min. & 3days	Prepulse inhibition test 30min.
<u>Measurement</u> Total distance Center-time Number of movements	<u>Measurement</u> Light time Number of transition Latency to enter light	<u>Measurement</u> Total distance Number of selection Open arm time	<u>Measurement</u> Conditioning: 1 st day? Context: 2 nd day? Cued: 3 rd day?	<u>Measurement</u> Prepulse inhibition 80-105db:120db)
Emotional Behavior			Learning & Memory	Information processing

O'HARA & CO., LTD.

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)



OF
 OF-DIS : Total distance traveled
 OF-C% : Time spent % at center area
 OF-N : Number of movement

LD
 LD-L-TIME : Time spent in light area
 LD-N : Number of transition
 LD for L : Latency time

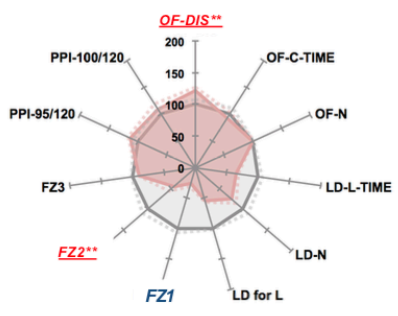
FZ
 FZ1 : Conditioning freezing
 FZ2 : Contextual freezing
 FZ3 : Cued freezing

PPI
 PPI-95/120 : Prepulse inhibition 95db/120db
 PPI-100/120: Prepulse inhibition 100db/120db

P value (t-test)
 p<0.01**
 p<0.05*
 p<0.1
 p>0.1

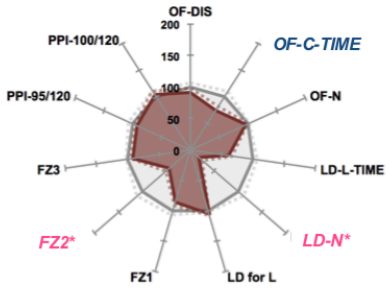
Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

**Low-dose
2.5µg/kg/day
(n=8)**

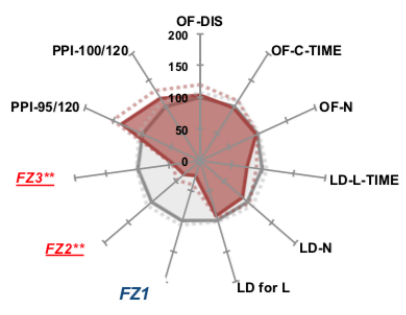


P value (t-test)
 p<0.01**
 p<0.05*
 p<0.1
 p>0.1

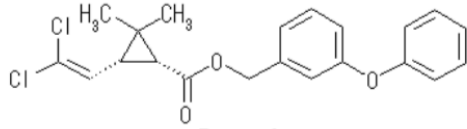
**Middle-dose
25µg/kg/day
(n=8)**



**High-dose
250µg/kg/day
(n=7)**



ペルメトリン (Permethrin)



分子式：C₂₁H₂₀Cl₂O₃
 分子量：391.29
 CAS 番号：52645-53-1
 LD₅₀：540mg/kg (マウス経口)



アディオン (農業用殺虫剤)



ヘルマイト (動物用医薬品)

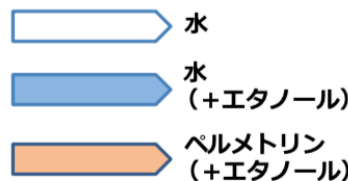
- 除虫菊の花に含まれる殺虫成分であるピレトリン (天然ピレスロイド) を化学的に安定化させ、残効・効力を増した合成ピレスロイド
- 昆虫やダニに対して広く効果を示し、残効性が高い
- アフリカでは、マラリア媒介蚊対策用にペルメトリンを含有した蚊帳の利用

農薬 (殺虫剤)、動物用医薬品など様々な用途で用いられている

(Bradberry et al. 2005; Miyamoto et al. 1995; Ray and Forshaw 2000)

実験スケジュール

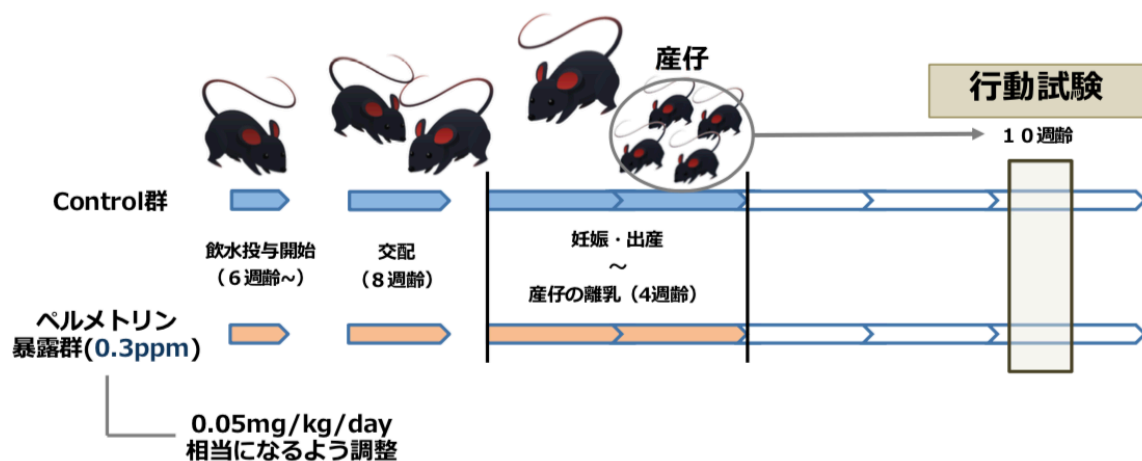
- ・ 供試動物：C57BL/6 [♂・♀]
- ・ 投与化学物質：ペルメトリン*
- ・ 溶媒：エタノールおよび水
- ・ 投与方法：飲水投与



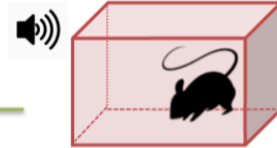
* 一日摂取許容量 (ADI)

ADI (mg/kg/day)	
日本・WHO	US-EPA
0.05	0.25

成熟期への長期暴露では影響のみられない濃度

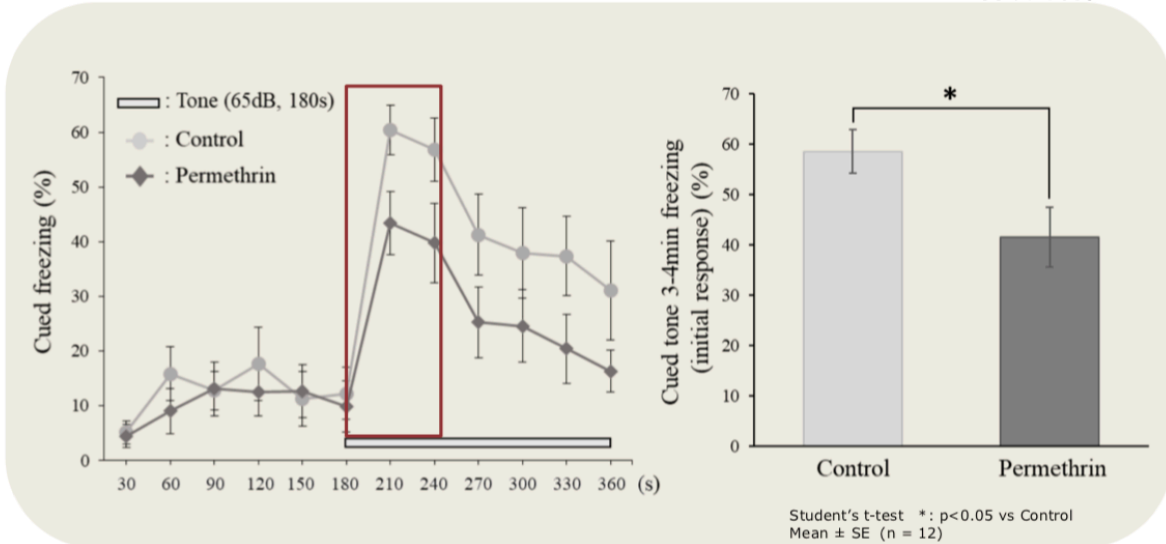


実験結果:恐怖条件付け学習記憶試験



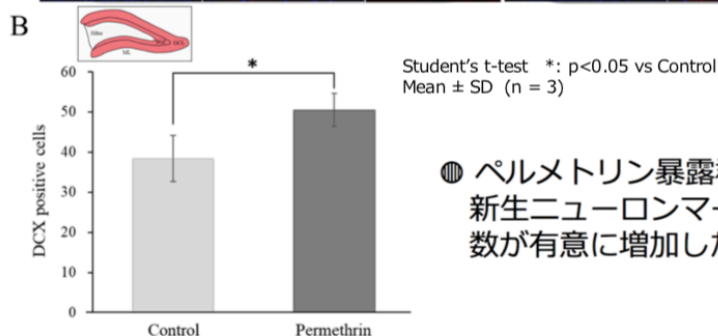
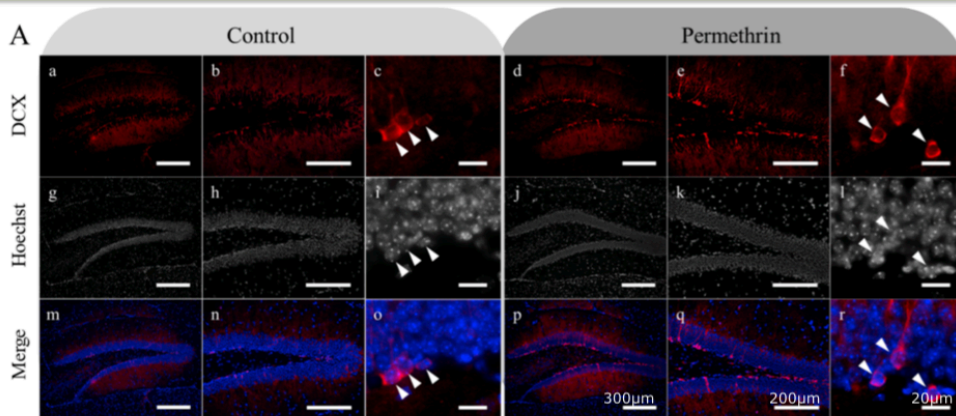
音-連想記憶

音-連想記憶試験時のフリージング率



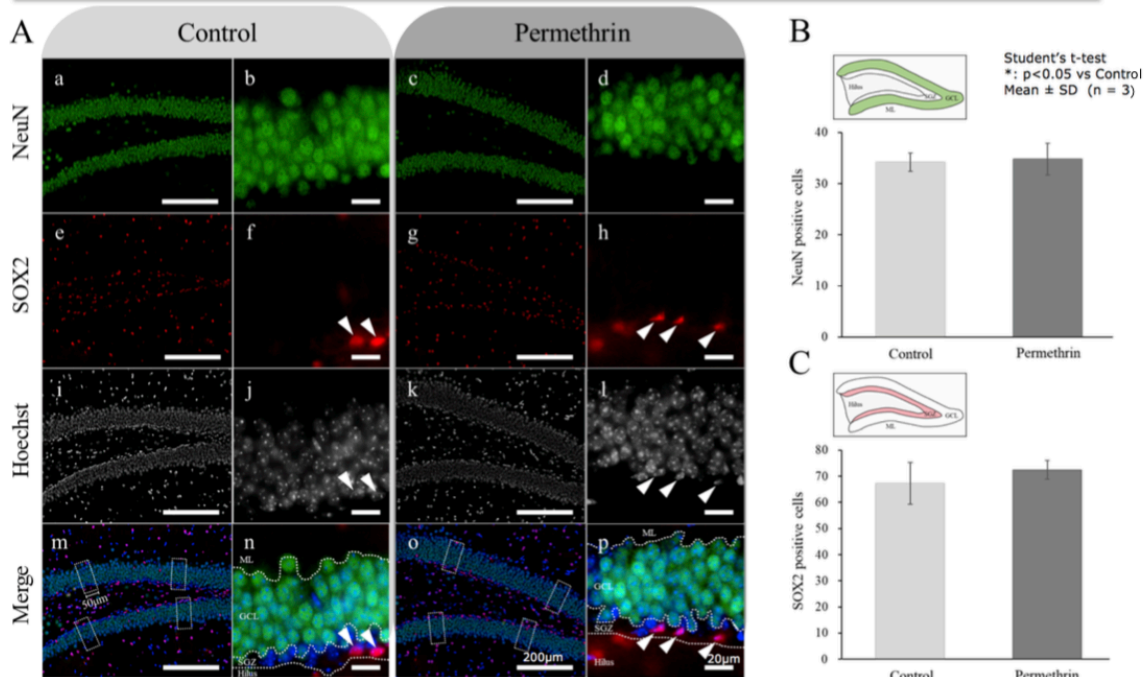
● ペルメトリン暴露群において、音刺激に対するフリージング率が有意に低下した

実験結果:免疫組織化学 (マウス海馬歯状回)



● ペルメトリン暴露群の海馬歯状回において、新生ニューロンマーカーであるDCX陽性細胞数が有意に増加した

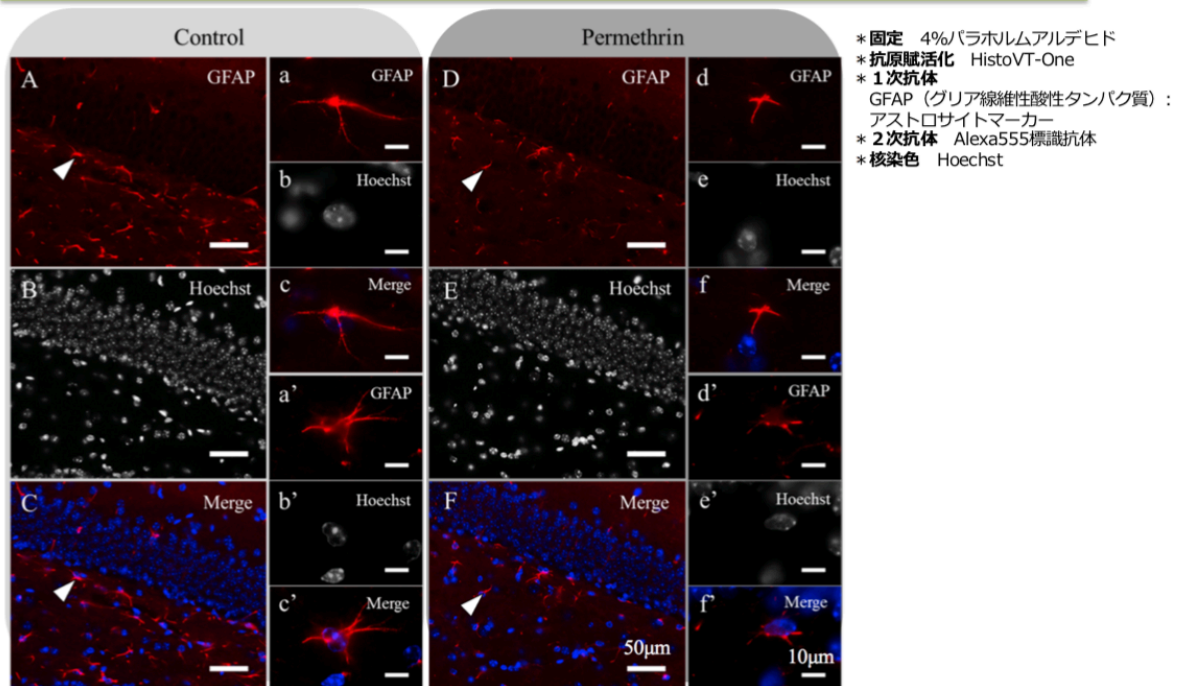
実験結果:免疫組織化学 (マウス海馬歯状回)



● NeuNおよびSOX2陽性細胞数に変化はみられなかった

44

実験結果:免疫組織化学 (マウス海馬歯状回)



● ペルメトリン暴露群において、アストロサイトの数の減少および形態影響が観察された

47

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「液性因子影響（神経内分泌）に関わる脳内分子の定量解析」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・予防医科学・応用生理学研究室・教授）

【研究要旨】

家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することを目的として、本研究では液性因子影響（神経内分泌）に関わる脳内分子の定量解析を行った。塩化トリブチルスズ(TBTC)を胎生11日から離乳4週齢まで慢性飲水暴露し、遅発性の中枢神経影響を解析した結果、トリブチルスズの発達期低用量暴露は、遅発的に興奮性神経伝達情報を攪乱する可能性が示唆された。今後ヒトへの外挿性の検討も含め、検討を進める必要があるだろう。

A. 研究目的

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することを目的とした。被験物質として、従来型の毒性試験法による毒性情報が利用可能で、周産期暴露による中枢神経毒性に関する情報がなく、かつ、中枢神経系に発現している各種受容体に対して親和性がある家庭用品化学物質を選択した。実際の用途を想定した低用量にて長期飲水投与を行い、成熟期（生後 12 週～13 週）のマウスについて個体・器官（システム）レベル、組織・細胞レベル、分子レベルでの解析を行い、低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響に関するデータを収集した。

本分担研究テーマとしては、液性因子影響解析（神経内分泌解析）を担当した。家庭用品に含まれる化学物質の周産期暴露による遅発性の中枢神経毒性の高精度な有害性評価が普遍性を持って実施可能とすることを目指した。

B. 研究方法

妊娠マウス及び新生仔マウスに対して塩化トリブチルスズ(TBTC)を胎生 11 日から離乳 4 週齢まで慢性飲水暴露した（溶媒対照群(Vehicle 群, n=3)、TBTC 低用量群(TBTC-L 群, n=3 : 2.5µg TBTC/kg/day)、TBTC 中用量群(TBTC-M 群, n=3 : 25µg TBTC/kg/day)、TBTC 高用量群(TBTC-H 群, n=3 : 250µg TBTC/kg/day)。12 週齢まで育成後、行動解析を実施した仔マウスについて、14 週齢時に頸椎脱臼した後に脳を摘出した。左脳を RNA 安定化溶液 (RNA later 1.5ml) 中に 1 晩浸漬した後、-80 度凍結保存した。

各個体の左脳サンプルから mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit (Thermo

Fisher Scientific)を用い RNA を抽出精製した。逆転写は、PrimeScript reverse transcription kit (Takara, Otsu, Japan)を用いて行い (oligo dT プライマーと random N6 プライマーを用いた)、各試料の cDNA を合成した。遺伝子発現量は、Thunderbird qPCR mix (Toyobo, Osaka, Japan)、Light Cycler リアルタイム PCR 装置 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA)を用いて解析した。

標的遺伝子は、オキシトシン (Oxt)、オキシトシン受容体 (Oxtr)、前癌遺伝子 c-Fos (cFos)、細胞骨格関連タンパク質 (activity-regulated cytoskeleton associated protein, Arc)、興奮性アミノ酸トランスポーター3 (Slc1a1)、興奮性アミノ酸トランスポーター2 (Slc1a2)、興奮性アミノ酸トランスポーター1 (Slc1a3)、クレアチントランスポーター1 (Slc6a8) とした。変動が少なく内在性コントロールとしてよく用いられている 18s rRNA をコントロールとして比較 Ct 法で算出した。

C. 研究結果

液性情報（ホルモン）と神経伝達情報（神経伝達物質）双方の働きをもつ oxt ならびにその受容体 oxtr の発現量には、TBTC 投与効果は見られなかった（図 1）。神経活動を反映する神経細胞活動マーカーとしても知られる cFos ならびに興奮性神経活動マーカーである Arc についても投与効果は見られなかった。ただし、cFos 発現については TBTC-M 群及び TBTC-L 群において若干の増加傾向が、Arc については TBTC-M 群においてのみ若干の増加傾向がみられた（図 2）。

NMDA 型受容体サブユニットの Nr2 遺伝子解析では、Nr2a には投与効果が見られなかったが、Nr2b 遺伝子については暴露用量依存的な低下傾向を見出した（図 3）。

アミノ酸トランスポーター遺伝子の解析では、

クレアチントランスポーターSlc6a8には投与効果は見られなかったが、興奮性アミノ酸トランスポーターであるSlc1a1, Slc1a2, Slc1a3のいずれでも、TBTC-M群において若干の増加傾向が見られた。

D. 考察

トリブチルスズの発達期暴露において、生後20日齢のマウス脳においてAMPA型グルタミン酸受容体GruR2遺伝子発現低下があることが報告されている(Ishida et al., Biol Pharm Bull. 2017;40:1121-1124)。本研究では遅発性の中枢神経毒性をターゲットとしているため、暴露後成獣になってからの遺伝子発現をみているため時期が異なる。また、AMPA型ではなくNMDA型である点も異なる点にも留意が必要である。しかしながら、興奮性神経伝達情報が影響を受ける可能性は、クレアチントランスポーターには影響がなく興奮性アミノ酸トランスポーターの発現に若干の変化がみられた本研究の結果からも支持される。すなわちトリブチルスズの発達期低用量暴露は、興奮性神経伝達に遅発性の影響をもたらす可能性が示唆される。

興味深いことに、我々は以前、ダイオキシン類の低用量発達期暴露が、ラットにおいて遅発的に、Nr2aには影響を及ぼさずNr2b遺伝子発現を低下させることを見出している(Kakeyama et al., Neuroreport. 2001; 12:4009-4012)。すなわちNr2b遺伝子発現は、トリブチルスズに限定されず他の化学物質の遅発性中枢神経毒性を検出する有効な指標となる可能性が考えられる。

また、今回対象とした遺伝子群は、自閉スペクトラム症研究において、ヒトヒトのプロトン磁気共鳴スペクトロスコピー(MRIによるMRS解析)で得られる指標に対応したマウス遺伝子セットとして構築したものであり(Benner & Aoki et al., Mol. Psychiatry 2018)、すなわちヒトへの外挿性の高い指標となる可能性も期待できる。今回の

TBTC暴露による遺伝子発現変化のパターンは自閉スペクトラム症当事者のそれとは異なるものだが、今後、マウス行動解析指標との対応づけ、ヒト精神神経疾患当事者のMRSデータとの対応づけを進めることで、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することが期待される。

E. 結論

トリブチルスズの発達期低用量暴露は、遅発的に興奮性神経伝達情報を攪乱する可能性が示唆された。今後ヒトへの外挿性の検討も含め、検討を進める必要があるだろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

掛山正心. 高次脳機能の健康を阻害する幼少期の環境要因と遺伝要因. 日本衛生学雑誌. 2018; 73:110-114. doi: 10.1265/jjh.73.110. PubMed PMID: 29848860.

掛山正心, ベナー聖子, 藤原昌也. マウスにおける自閉スペクトラム発現の行動指標. 日本生物学的精神医学会誌 2018, 29:103-108.

Benner S, Aoki Y, Watanabe T, Endo N, Abe O, Kuroda M, Kuwabara H, Kawakubo Y, Takao H, Kunimatsu A, Kasai K, Bito H, Kakeyama M, Yamasue H. Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. Molecular Psychiatry 2018, Sep 27. doi: 10.1038/s41380-018-0249-4. PubMed PMID: 30262887.

Endo N, Ujita W, Fujiwara M, Miyauchi H, Mishima H, Makino Y, Hashimoto L, Oyama H, Makinodan M, Nishi M, Tohyama C, Kakeyama M. Multiple animal positioning system shows that socially-reared mice influence the social proximity of isolation-reared cagemates. *Communications Biology* 2018, 1:225. doi: 10.1038/s42003-018-0213-5. PubMed PMID: 30564746 ; PubMed Central PMCID: PMC6290015.

2. 学会発表

乾ひとみ・石田綾・城宝大輔・藤原昌也・柚崎通介・掛山正心、2018、第 29 回日本行動神経内分泌研究会 (2018 年 9 月)、神奈川県立藤野芸術の家、セレブリン遺伝子欠損マウスの行動解析。第 29 回日本行動神経内分泌研究会要旨集, 27.

亀池彩乃・齋藤直哉・牧野友祐・遠藤俊裕・藤原昌也・掛山正心、2018、第 29 回日本行動神経内分泌研究会 (2018 年 9 月)、神奈川県立藤野芸術の家、マウスの他個体識別・認識能力を定量化する新規行動課題。第 29 回日本行動神経内分泌研究会要旨集, 30.

Kakeyama M, 2018, The Joint Congress of the 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry and the 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. (2018 年 9 月)、神戸国際会議場、Objective and quantitative analyses of social behaviors in group-housed mice. 第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学会大会合同年会プログラム集.

Kakeyama M, 2018, Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology (2019 年 3 月)、筑波大学、Progress and prospects of rodent social behavioral tasks: proximity, individual discrimination and cognition. Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

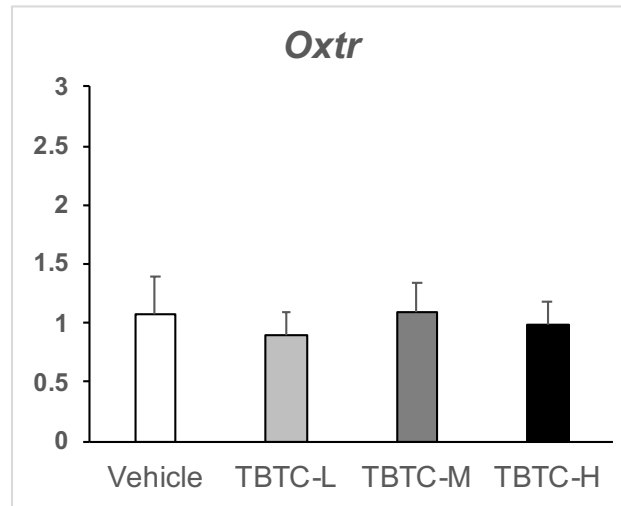
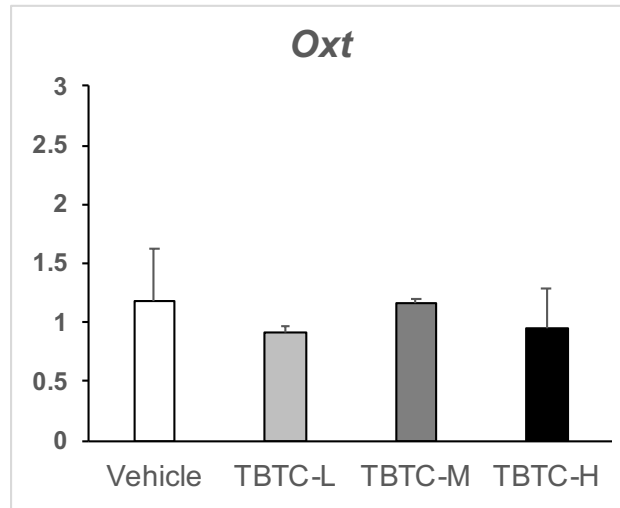


図 1. マウス脳 Oxt, Oxtr mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

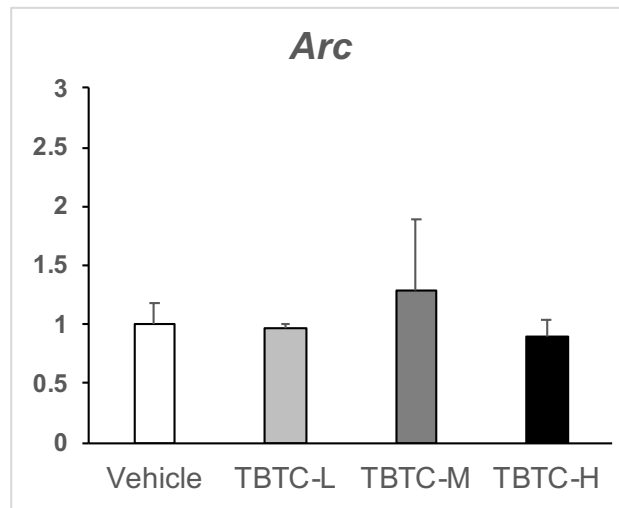
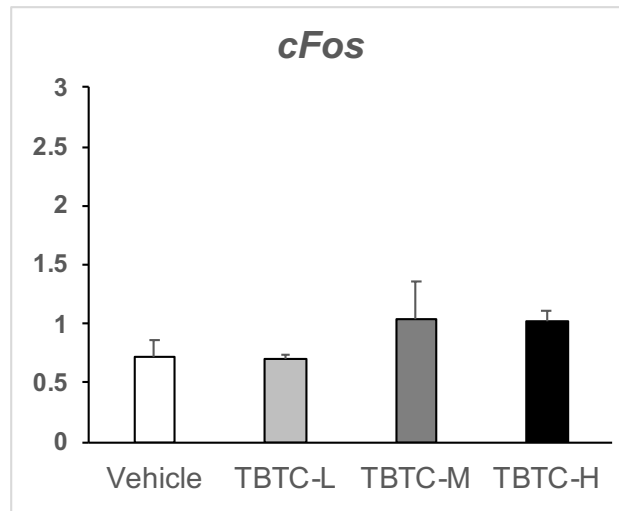


図 2. マウス脳 cFos, Arc mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

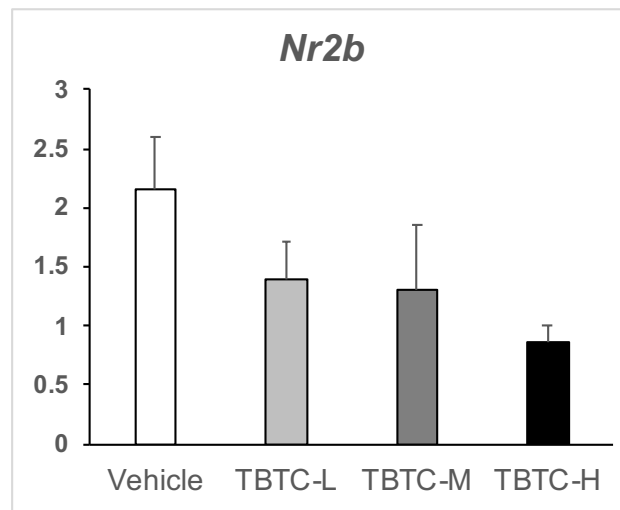
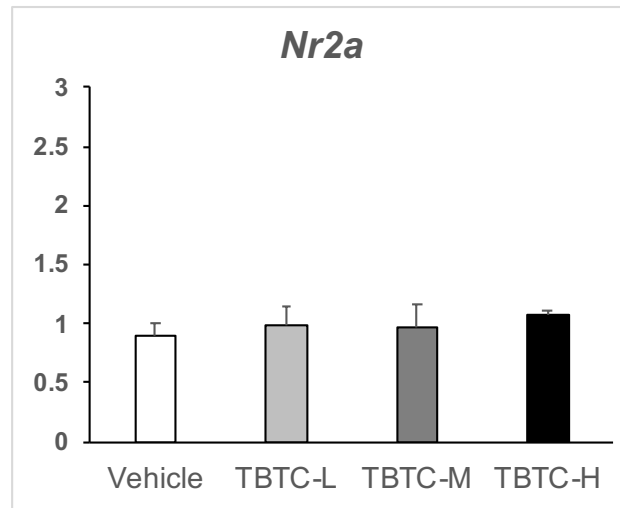


図 3. マウス脳 Nr2a, Nr2b mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

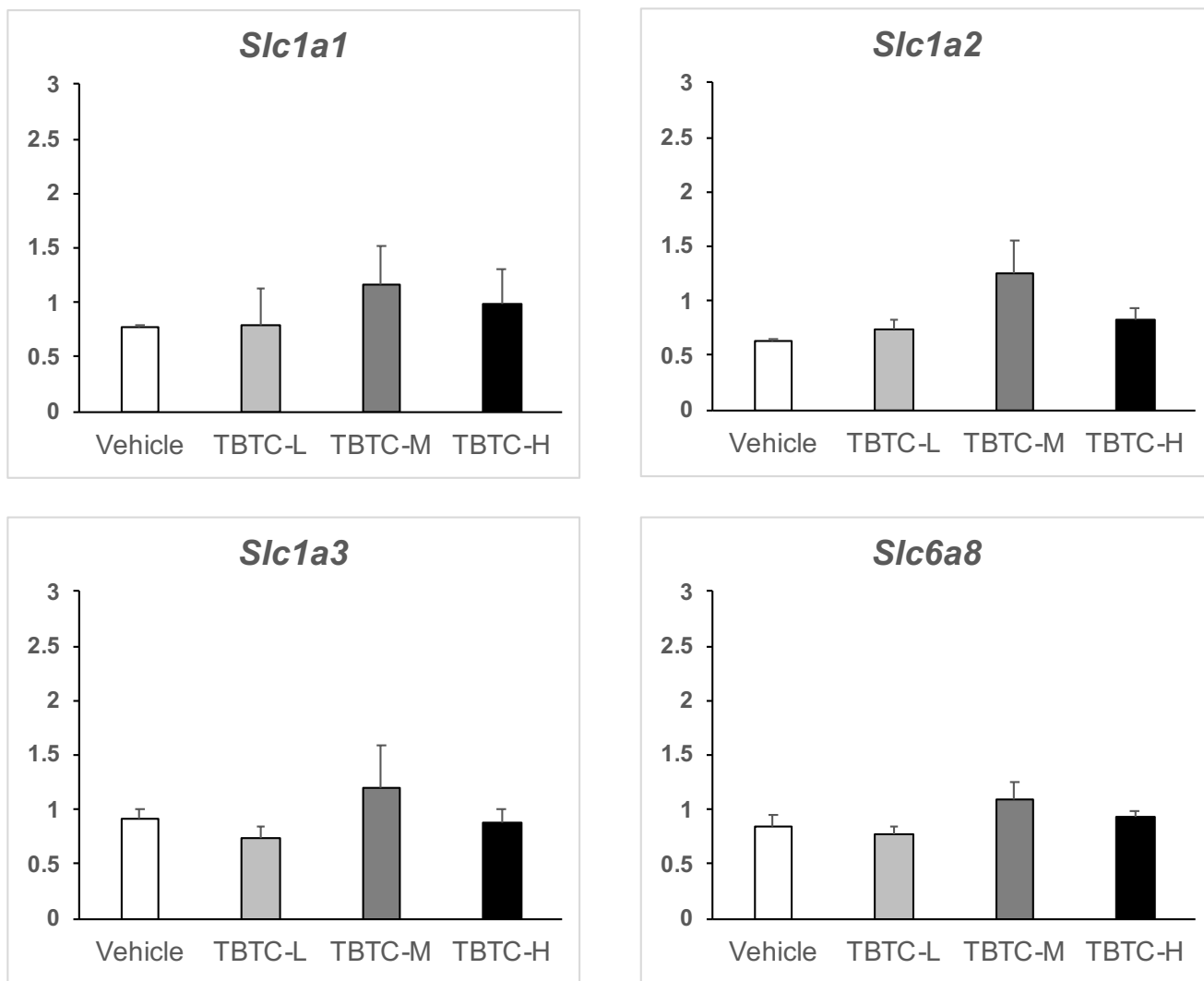


図 4. マウス脳 *Slc1a1*, *Slc1a2*, *Slc1a3*, *Slc6a8* mRNA 発現に対する TBTC 投与の影響.

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「脳神経回路イメージング解析」

研究分担者

富永 貴志（徳島文理大学・神経科学研究所・教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでの先行研究（H20-化学-一般-009、H23-化学-一般-004、H27-化学-一般-007）で既に示したように膜電位感受性色素による回路測定は網羅的でありかつ検出感度が高いことがわかっている。これまでに発生初期の投与で異常を起こすバルプロ酸、ビスフェノール、農薬類（ネオニコチノイド等）暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出しているが、今年度は特に、検出系の改良に取り組み長時間の連続的な測定を可能にすることを試みた。このため、よく知られた海馬回路シナプスの長期増強が光学的に連続的に検出可能であることを示した。また、さらに大きな回路として嗅内野とその周辺皮質の信号伝達の長期可塑性について検出できることを示した。同様の手法で化学物質の回路機能への影響を検出する系を確立するため、TBT、ビスフェノールの急性影響について、異なる発達段階の海馬回路において検討し、それぞれ影響が検出かのうであることを示した。また、平行して大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索し前帯状皮質（ACC）、傍梨状核（EPN）などのイメージング解析を行いその信号伝播パターンを明らかにした。また、無染色組織からの光信号の検出と解析を行っている。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を担保するものである。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際にマウスにおける小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中核である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、*ex vivo* 実験系（スライス標本）でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行い、毒性評価上の指標を設定することを目的とする。

B. 研究方法

マウスをモデル動物とした。マウスより、標準的な方法でスライス標本を作成し膜電位感受性色素（VSD）で染色した。このスライス標本を独自のチャンバーシステム内に置き、専用の光学系下で電気刺激を加え応答を超高速度カメラシステムで撮像し解析した。

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
海馬スライス標本を作成し、膜電位感受性色素で染色後、専用のチャンバーにて ACSF で還流しながら 30 秒—1 分に 1 回のシャーフター側枝に対する電子刺激に対する応答を、光計測ならびに電気生理学的手法で計測した。
適切なベースラインの測定後に 100Hz 1 秒のいわゆるテタヌス刺激かシータバースト様刺激を加え長期増強を起し計測を継続した。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的变化の観察系の確立
上と同様のプロトコルで、より視野の広い特殊な光学系を用いて嗅内野を含む大きな回路での信号伝達を計測した。嗅内野と嗅周囲皮質の境界に着目し、その間の信号伝

達を光計測法によって 1 分に 1 回の頻度で長い時間にわたって計測した。

- 3) 前帯状皮質（ACC）を含む大きな皮質組織での光学計測解析法の確立
マウス脳から coronal なスライス標本を作成し、視野の大きな光学系で光計測した。
- 4) トリブチルスズ TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
トリブチルスズ 40pM を海馬 CA1 でのシャーフター側枝電気刺激に対する応答を 30 秒に 1 回ずつ計測しながら還流した。
- 5) ビスフェノールの急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
ビスフェノール A（BPA）100 μM を還流して同様に応答を計測した

C. 研究結果

- 1) 海馬スライス標本での CA1 野における CA3-CA1 シナプスの長期増強の連続的な光学計測
専用のチャンバー内での計測は非常に安定で 12 時間以上もスライスの応答は良好に保たれた。また、光計測によるシナプス長期増強の観察に 12 時間以上にわたって成功した。この結果、CA1 回路の応答の変化を長期にわたって網羅的に解析することが可能になった。
- 2) 海馬、嗅内野、その周囲皮質を含む皮質組織での信号伝達系の可塑的变化の観察系の確立
長時間の計測の結果、嗅周囲皮質から嗅内野への投射が、刺激のパターンによって可塑的に変化し長い時間保持されることがわかった。
- 3) 前帯状皮質（ACC）を含む大きな皮質組織での光学計測解析法の確立
光学系の最適化によって 1cm 角にせまる視野で安定な光学計測が可能になり、ACC での発振や ACC を介した脳半球間の情報伝達の観察が可能となった。
- 4) TBT の急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
トリブチルスズ 40pM で生後 14 日のマウスから作成したスライスではわずかな応答の上昇が見られた。一方、生後 9—10 週のマウスではほとんど影響がみられなかった。その後、ドーズを増したところ応答に一貫

性がなくなり TBT の実験系への吸着が疑われたので一旦急性投与実験を中断した。

- 5) ビスフェノールの急性投与に対する海馬神経回路応答の変化の光学計測
大人のマウスでは若干の上昇傾向が得られてきているが継続して実験を行っている。

D. 考察

本年度の計測法の確立によって、海馬や他の神経回路組織の神経興奮の伝播の解析が長時間、網羅的に行えることを示した。これは通常の電気生理学的解析に匹敵するもので、同じ様な計測がはるかに多くの計測点で行えることで、より鋭敏に化学物質による神経回路動作の変調を捉えることが可能になったと言える。今後、さまざまな化学物質の影響について調べていく。

E. 結論

光計測法を使うことによって、海馬神経回路の変調を効率よく、定量的に検出する系が確立できた。この手法は幼若期から成長に伴ったどの成長段階の標本でも同じように適用できる上、電気生理学的な知見と密接な関係があり相補的に解釈することで神経機構の解明に重要な意義を持つ。今後とも光計測法を軸に、神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは、重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

Kajiwara R, Tominaga Y, Tominaga T (2019) **Network plasticity involved in the spread of neural activity within the rhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices** *Front. Cell. Neurosci.* doi: 10.3389/fncel.2019.00020

Tominaga Y, Taketoshi M, Tominaga T (2018) Overall Assay of Neuronal Signal Propagation Pattern With Long-Term Potentiation (LTP) in Hippocampal Slices From the CA1 Area With Fast Voltage-Sensitive Dye Imaging. *Front Cell Neurosci* 12:389.

2. 学会発表

1. T Tominaga, Y Tominaga, Theta

phase-dependent competitive long-term potentiation in area CA1 of the hippocampal slices caused by feed-forward and feedback gabaergic control 286.02 / F6 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2018 (2018.11.3-7) サンディエゴ

2. Takashi Tominaga Voltage-sensitive dye imaging: practical application to evaluate hippocampal and related cortical activities in health and disease 2018/10/20 OIST Mini Symposium "Voltage Imaging Symposium" (Organizer: Bernd Kuhn) OIST Seminar Room C209 (2018.10.19-21) **Invited lecture**, 恩納村
3. Takashi Tominaga: Voltage-sensitive dye imaging of the brain slice preparation - the hippocampus and the related cortexes. Merocyanine 540 45+1 MBL, Speck Auditorium in Rowe building (2018.9.1-2018.9.4) **Invited lecture**, ウッズホール
4. 富永貴志 「膜電位感受性色素を用いた脳神経回路活動の定量解析:海馬と関連領域の例から」 第三回 新学術領域「個性創発脳」若手研究者の会・技術支援講習会 (2018.11.16-17) 招待講演, 東京都
5. 富永貴志, 富永洋子 「The paired burst facilitation (PBF) of the hippocampus employ the distinct feedforward- and feedback- GABAergic controls in the circuit 海馬 CA1 でペアドバースト促進 (PBF)はフィードバックとフィードフォワードの異なる GABA 作動性制御を使う」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018.9.15-17), 岡山市
6. Gusain Pooja, Taketoshi Makiko, Tominaga Yoko, Tominaga Takashi Voltage-sensitive dye imaging of the interhemispheric neural activity across the anterior cingulate cortex (ACC) via corpus callosum 日本生物物理学会第 56 回年会 (2018.9.15-17), 岡山市
7. 河野 睦, 世戸 彩華, 富永 貴志, 石田 正樹, 堀 学 「Molecular mechanism of escape response induced by mechanical stimulation in Paramecium 機械刺激がゾウリムシの逃走反応を誘導するしくみ」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018.9.15-17), 岡山市
8. Takashi Tominaga, Yoko Tominaga 「A view with voltage-sensitive-dye onto the function of the hippocampal neural circuit

- 膜電位感受性色素 (VSD) で測る海馬神経回路のはたらき」シンポジウム「OS: 脳神経回路の動作を見て測る」(オーガナイザー: 富永貴志, 梶原利一, 九里信夫) 計測自動制御学会 ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2018 (2018. 9. 10-12) 招待講演, 郡山市
9. 富永 貴志, 富永 洋子 「海馬 CA1 野でシーターバースト刺激はフィードバック, フィードフォワード GABA 調節を使って位相依存的な LTP を起こす Feedforward- and feedback-GABAergic control of the theta burst stimulation (TBS) induce phase-dependent selective long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus.」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
 10. 富永洋子, 谷一小池 真紀, 谷知巳, 富永貴志 「マウス海馬 CA1 野における新規の早い内因性光学計測: 膜電位感受性信号との比較 Novel fast intrinsic optical signal related to the membrane potential change in the area CA1 of hippocampal slices in mice: comparison to the voltage-sensitive dye signal」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
 11. 和歌山ゆうか, 山田悠太, 富永貴志, 富永洋子, 梶原利一 「マウス脳スライス上の VSD 信号を用いた嗅周囲皮質の局所的な GABA 作動性抑制系システムの解析 Analysis of Local GABAergic inhibitory system in Perihinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Signal in Mice brain Slices.」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
 12. Pooja Gusain, Makiko Taketoshi, Yoko Tominaga, Naoko Maeda, Takashi Tominaga 「Analysis of functional connectivity of mice brain by real-time optical recording」第 41 回日本神経科学大会 (2018. 7. 26-29), 神戸市
 13. 富永貴志, 種村健太郎 膜電位感受性色素による脳神経回路イメージング Imaging of neuronal circuit activity with voltage-sensitive dye - stability matters 新学術領域研究「個性」創発脳 第 3 回領域会議 (2018. 7. 23) 招待講演, 京都府
 14. 富永 貴志, 富永 洋子 「子どもへの低用量化学物質暴露が誘発する脳回路機能異常のイメージング解析」シンポジウム「子どもへの低用量化学物質暴露が誘発する情動認知行動影響とその評価系の開発 Development of evaluation methods on emotional and cognitive behavioral toxicity induced by low-dosed chemical exposure at early life stage」(オーガナイザー: 種村健太郎, 北嶋聡) 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 18-20) 招待講演, 大阪市
 15. 常盤 果那, 竹歳 麻紀子, 富永 洋子, 富永 貴志 「ネオニコチノイド類の妊娠期投与が起こす遅発性脳機能異常の神経回路 機構解析」日本生物物理学会第 10 回中四国支部大会 (2018. 5. 20) 高知市
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露による神経幹細胞動態解析」

研究分担者

中島 欽一（九州大学大学院医学研究院・基盤幹細胞学分野・教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系、特に神経幹細胞は様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼすと考えている。本年度はまず、その対照ともいうべき成体期のマウスにトリブチルスズを低用量経口投与し、成体海馬ニューロン新生は影響を受けないことを明らかにした。このことは、同投与がマウス行動異常を示さないこととも一致した。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多く、また種々の化学物質によりこれらが受ける影響を数値化し、定量的に解析する方法も乏しい。そこで本分担者は、化学物質として、トリブチルスズ (TBTC) 等を選択し、周産期暴露及び成体期暴露が成体海馬のニューロン新生に及ぼす影響を解析するとともに数値化することを目的とした。

B. 研究方法

本年度は、耐用1日摂取量(TDI)0.25 µg/kg/dayの10倍量、2.5 µg/kg/dayのTBTCを11週齢(生後81日)マウスに強制単回経口投与を行った。その後生後84日から89日まで、BrdUを50 mg/kg/dayで腹腔内投与(増殖細胞のラベリング)し、生後92で脳を固定した。その脳を用いて切片を作製し、抗BrdU抗体及び未成熟ニューロンマーカーであるDcxに対する抗体を用いた免疫組織染色を行い、各陽性細胞を測定した。

C. 研究結果

最終ページに掲載した図から示されるように、成体期マウスへの2.5 µg/kg/dayのTBTC単回経口投与では、BrdU陽性の増殖性細胞、及びDcx陽性の新生ニューロンの数がコントロールと比べて変化が見られないことから、ニューロン新生への影響はないことが確認できた。

D. 考察

本研究において、この時期、この用量のTBTC単回暴露による成体海馬ニューロン新生への影響は見られないことが明らかとなった。このことは、一旦組織が構築された脳における小用量のTBTCに対するニューロン新生への影響はほとんど見られないことを示している。このことは同様にTBTCを投与した研究代表者・種村らの行動解析でも影響が見られていないこととも一致する。しかし、脳形成過程である周産期暴露では成体になってからの行動異常が観察されていることから、今後は周産期暴露による成体ニューロン新生への影響を調べ、行動異常とその相関やその度合いの数値化を検討する必要がある。

E. 結論

今回成体期マウスに対するTBTC暴露は、成体ニューロン新生を定量化により解析した場合、影響を与えないことが明らかとなった。このことは同様のTBTC暴露では行動異常が見られないことと一致した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Epigenetic Regulation of Human Neural Stem Cell Differentiation. Honda M, Nakashima K, Katada S. In: Buzanska L. (eds) Human Neural Stem Cells. Results and Problems in Cell Differentiation, 2018;66:125-136. Springer, Cham. doi:

10.1007/978-3-319-93485-3_5. PMID:30209657

2) 雑誌

Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion. Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi T, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AM, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T and Nakashima K. Neuron. 2019 Feb 6;101(3):472-485. e7. doi:

10.1016/j.neuron.2018.12.010. Epub 2019 Jan 9. PMID:30638745

Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury. Yoshikawa Y, Ago T, Kuroda J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, Shibahara T, Nakashima H, Nakashima K, Kitazono T. Neuroscience. 2018 Dec 5;398:193-205. doi:

10.1016/j.neuroscience.2018.11.046. PMID:30528855

New aspects of glioblastoma multiforme

revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. Cell Biol Toxicol. 2018 Dec;34(6):425-440. doi: 10.1007/s10565-017-9420-y. Review. PMID:29383547

Np95/Uhrf1 regulates tumor suppressor gene expression of neural stem/precursor cells, contributing to neurogenesis in the adult mouse brain. Murao N, Matsubara S, Matsuda T, Noguchi H, Mutoh T, Mutoh M, Koseki H, Namihira M, Nakashima K. Neurosci Res. 2018 May 31. pii: S0168-0102(18)30276-1. doi: 10.1016/j.neures.2018.05.007. PMID:29859850

Canonical TGF- β Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression. Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Ishizu M, Pan M, Kameda T, Nakashima K. J Neurosci. 2018 May 16;38(20):4791-4810. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2423-17.2018. PMID:29695415

Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice. Sakai A, Matsuda T, Doi H, Nagaishi Y, Kato K, Nakashima K. Proc Natl Acad Sci USA. 2018 Apr 17;115(16):4270-4275. doi: 10.1073/pnas.1716479115. PMID:29610328

Prior Treatment with Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Boosts Human Neural

Stem Cell Transplantation-Mediated Functional Recovery After Spinal Cord Injury. Uezono N, Zhu Y, Fujimoto Y, Yasui T, Matsuda T, Nakajo M, Abematsu M, Setoguchi T, Mori S, Takahashi HK, Komiya S, Nishibori M, Nakashima K. *Stem Cells*. 2018 May;36(5):737-750. doi: 10.1002/stem.2802. PMID:29517828

2. 学会発表

<国内>

中島欽一〇：転写因子 NeuroD1 によるミクログリアからニューロンへの分化転換とそのメカニズム、第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2018 年 11 月 28 日-30 日 (28 日) (シンポジウム)

中島欽一〇：転写因子 ND1 によるミクログリアからニューロンへの直接分化転換メカニズムの解明、神経発達・再生研究会、名古屋市、名古屋市立大学病院、2018 年 10 月 17-18 日 (17 日)

中島欽一〇：損傷部保全と神経幹細胞移植の併用による脊髄損傷治療法の開発、Walk Again2018、東京都、秋葉原コンベンションホール、2018 年 10 月 13 日 (講演)

中島欽一〇：Preservation of the injured site boosts up neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury、第 61 回日本神経化学学会大会、神戸市、神戸国際会議場、2018 年 9 月 6 日- 8 日 (7 日) (シンポジウム)

山下りえ〇、堅田明子、中島欽一 : Analysis of

the impact of choroid plexus on adult neurogenesis focusing on a key chronic inflammatory regulator, Angiopoietin-like protein 2、第 41 回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018 年 7 月 26 日- 29 日 (27 日) (ポスター)

松原周蔵〇、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : Hemi-methylated DNA recognition factor, Np95/UHRF1, regulates the behavior of adult neural stem/progenitor cells、第 41 回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018 年 7 月 26 日- 29 日 (26 日) (ポスター)

中島欽一〇：Interplay between cell extrinsic cues and intrinsic epigenetic programs in the regulation of developmental stage-dependent fate specification of neural stem cells、第 41 回日本神経科学大会、神戸市、神戸コンベンションセンター、2018 年 7 月 26 日- 29 日 (28 日) (シンポジウム)

中島欽一〇：Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure increases seizure susceptibility in adult mice、国際シンポジウム、京都市、京都大学、2018 年 7 月 24 日- 25 日 (25 日)

山下りえ〇、堅田明子、中島欽一 : Analysis of the effects of choroid plexus on adult neurogenesis by focusing on a chronic inflammatory regulator, Angiopoietin-like protein 2、第 16 回幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018 年 6 月 1 日- 2 日 (2 日) (ポスター)

松原周蔵○、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : The hemi-methylated DNA recognition factor, Np95 maintains adult hippocampal neurogenesis、第 16 回幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018 年 6 月 1 日- 2 日 (2 日) (ポスター)

堅田明子○、本田瑞季、中島欽一 : Decoding mouse embryonic neural stem cell fate by BMP2 responsiveness、第 16 回幹細胞シンポジウム、福岡市、九州大学医学部百年講堂、2018 年 6 月 1 日- 2 日 (2 日)

今村拓也○、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : 転写因子を基盤としたマウス神経幹細胞の DNA メチローム変換、第 12 回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでる 2・7、2018 年 5 月 24 日- 25 日 (24 日) (ポスター)

堅田明子○、本田瑞季、中島欽一 : 骨形成因子の応答性から読み解く、発生期神経幹細胞の分化運命決定機構、第 12 回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでる 2・7、2018 年 5 月 24 日- 25 日 (24 日) (ポスター)

土井浩義○、外須美夫、中島欽一 : 幼少期タリウム暴露によるマウス海馬神経幹細胞の挙動解析とニューロン新生に与える影響、第 65 回日本麻酔科学会学術集会、横浜市、パシフィコ横浜、2018 年 5 月 17 日- 19 日 (ポスター)

<国外>

Doi, H., Matsuda, T., Shirozu, K., Hoka, S., Nakashima, K. : Effects of Neonatal Exposure to Midazolam on Neural Stem/Progenitor Cell Behavior in the Adult Mouse Hippocampus, Anesthesiology, San Francisco, October 13-17, 2018

Nakashima, K. : Prior inhibition of HMGB1 boosts up human neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury, The 21st Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences, Grand Hilton, Seoul, August 30-31, 2018

Nakashima, K. : Preservation of damaged tissue by prior inhibition of HMGB1 boosts human neural stem cell transplantation-mediated functional recovery after spinal cord injury, STEM CELL CROSSROADS, Shanghai, China, May 7-10, 2018

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 特になし |

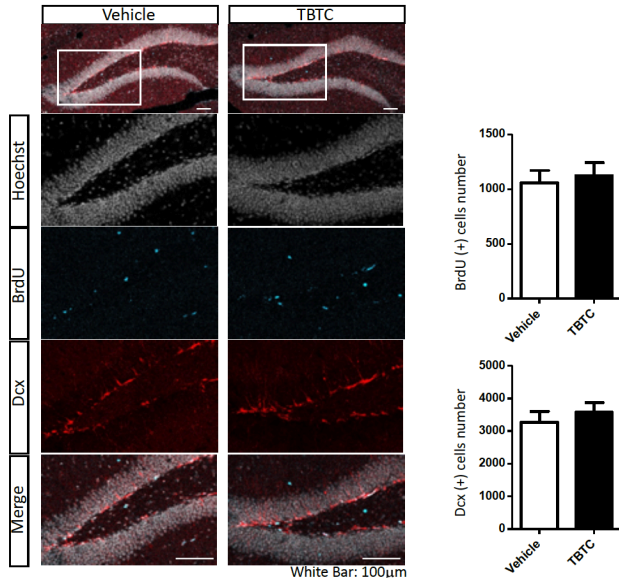


図. TBTC の成体期暴露が海馬ニューロン新生に及ぼす影響：(左図) 抗 BrdU 抗体 (水色)、抗 Dcx 抗体 (赤色)、Hoechst (グレー、核) による染色像。(右図) 左図の各陽性細胞の定量結果。この時期・容量の TBTC の暴露は、成体ニューロン新生に影響を与えないことがわかる。

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「網羅的遺伝子発現解析」

ーネオニコチノイド系農薬アセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、
モデル化学物質ニコチンを周産期マウスに慢性飲水投与後、13週齢時の
海馬における遺伝子発現プロファイルー

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
研究協力者 古川佑介 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本研究では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響を検討するが、本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、周産期マウスに慢性飲水投与後、13週齢時の行動解析バッテリー試験後のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的とする。

平成30年度（今年度）は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質としてニコチンを、周産期マウス（胎生11日～離乳生後4週齢）に各0.01 mg/kg/dayを周産期飲水投与後、成熟後13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、

A) アセタミプリドを0.01 mg/kg/day（ADIの1/10 程度の用量）の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆された。

B) イミダクロプリドを0.01 mg/kg/day（ADIの1/10 程度の用量）の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで異なり、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が減少、およびグリア細胞が減少している事が示唆された。この原因として、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化が抑制された可能

性、あるいは神経幹細胞が減少している可能性が示唆されたが、観察された神経幹細胞マーカーの有意な発現減少は、後者を支持するものと考えられた。また2) シナプス形成シグナル、CREB シグナル、エフリン受容体シグナルおよびタンパクユビキチン化シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制、シナプス形成の抑制および軸索誘導の抑制が誘発されていることが示唆された。このことは、上記した、投与群では対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることと関係している可能性が考えられる。

C) ニコチンを0.01 mg/kg/dayの投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬の場合、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかったことから、重篤な神経系の有害事象は観察されない可能性が示唆された。

このように、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを0.01 mg/kg/day (ADIの1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬では、投与群では、いずれもCREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、情動認知行動に影響する可能性があること、一方、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期の中枢神経系において、より多くの標的分子が存在する可能性が示唆されるが、同一用量とはいえ、単一の用量だけの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。また、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、この場合も同一用量とはいえ、単一の用量だけの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

A. 研究目的

本研究全体の目的は、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、対象とし、生活環境レベルでの低用量暴露による中枢神経系への遅発性の影響を明らかにし、従来の毒性試験を補強する毒性評価系の作出に資することである。家庭用品は、それに求められる機能が多様であり、この中には、フタル酸エステルやビスフェノールAといった、核内受容体や神経伝達物質受容体などに対して低濃度で作動性を発揮することが明らかな物質が含まれている。被験物質として、従来型の毒性試験法による毒性情報が利用可能で、周産期暴露による中枢神経毒性に関する情報がなく、かつ、中枢神経系に発現している各種受容体に対して親和性がある家庭用品化学物質を選択した。具体的には、塗料剤、ゴム製品老化防止剤、防虫加工剤を選択する。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、周産期に飲水投与後、成熟後13週齢時のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的としている。平成30年度（今年度）の被験物質として、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質ニコチンを選択した。

B. 研究方法

マウス、被験物質及び投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc（日本エスエルシー）を用いた。

被験物質は、ネオニコチノイド系農薬（2種）、アセタミプリド（CAS No. : 135410-20-7、

分子量:222.68, カタログ No. : 010-24541, lot No. : AWG6799, 純度 : 99.7%, WAKO) とイミダクロプリド (CAS No. : 138261-41-3, 分子量 : 255.66, カタログ No. : 099-03771, lot No. : KPF0614, 純度 : 99.1%, WAKO)、モデル化学物質としてのニコチン (CAS No. : 54-11-5, 分子量 : 162.23, カタログ No. : 148-01212, lot No. : PDH0911, 純度 : 97.0%, WAKO) を使用した。これらの試薬をエタノールに溶解してから飲水（水道水）に添加し（エタノールの最終濃度は0.01%）、一日投与量として、0.01 mg/kg/日を胎生11日から離乳4週齢までの周産期マウスに慢性飲水投与した。投与用量（0.01 mg/kg/日）は、各物質の許容1日摂取量（ADI）（アセタミプリド: 0.07 mg/kg/day、イミダクロプリド: 0.06 mg/kg/day）を参考に、ADIより10倍程度低い用量として選択した。対照群には、0.01%エタノールを含む水道水を摂取させた。飲水投与後、12週齢時に情動認知行動解析を行い（n=8）、その後、13週齢時の海馬（n=3; 8例から3例をランダムに選択）について網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

遺伝子発現変動解析

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳4部位（大脳皮質、小脳、脳幹部、海馬）（午前10時）（各n=4）について、Percellome法（遺伝子発現値の絶対化手法）（Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006）による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳4部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳

皮質の順に採取することにより得た（右脳はホルマリン固定した）。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD) にて示した。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは

45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: アセタミプリド の場合の海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、0.01 mg/kg/day のアセタミプリドを周産期に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下

のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は1.200より大きいものを、減少は0.833より小さいものを採用)。この際、細胞1個あたりの発現コピー数につき海馬において0.7コピー以上のものを採用した。

205 ps (増加)、924 ps (減少)

増加分 205 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった(>E-4)。

一方、減少分 924 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかったが、IPAによるCanonical pathwayによる検索においては、CREBシグナルが見いだせたことから、神経伝達や長期記憶の抑制が示唆された。次いで、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子としてCREBBPやAPPが抽出され、CREBシグナル、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が示唆された(この標的遺伝子数: 29)。この抑制機序は現時点では不明である。

なお増加・減少の場合共に、アポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

以上の通り、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドを0.01 mg/kg/day (ADI: 0.07 mg/kg/dayの1/10程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1)各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2)CREBシグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆された。

C-2: イミダクロプリドの場合の海馬(成熟期)における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまりMtap2とMapt(ニューロン)、Gfap(アストロサイト)、MagとMbp(オリゴデンドロサイト)、Nes(神経幹細胞)の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、投与群でニューロン(Mtap2)、アストロサイト(Gfap)および神経幹細胞(Nes)マーカーの有意な発現減少が認められた。以上のうち、Mtap2、Mapt、GfapおよびNes遺伝子の発現変動について図1(最終ページ参照)に示す。このことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が減少、およびグリア細胞が減少している事が示唆された。この原因として、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化が抑制された可能性、あるいは神経幹細胞減少している可能性が示唆されたが、観察された神経幹細胞マーカーの有意な発現減少は、後者を支持するものと考えられる。

次いで、対照群と比較し、0.01 mg/kg/dayのイミダクロプリドを周産期に投与した場合に、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プロ

一ブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

153 ps (増加)、 6,090 ps (減少)

増加分 153 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

一方、減少分 6,090 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、IPA による Canonical pathway による検索において、シナプス形成シグナル、CREB シグナル、エフリン受容体シグナルおよびタンパクユビキチン化シグナルが見いだせたことから、神経伝達や長期記憶の抑制、シナプス形成の抑制および軸索誘導の抑制が誘発されていることが示唆された。発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが抑制されている可能性が示唆されたが、

Canonical pathway による検索で影響が示唆されたシグナルとの関連は不明である。

なお増加・減少の場合共に、アポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

以上の通り、ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリドを 0.01 mg/kg/day (ADI: 0.06 mg/kg/day の 1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで異なり、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が減少、およびグリア細胞が減少している事が示唆された。この原因として、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化が抑制された可能性、あるいは神経幹細胞が減少している可能性が示唆されたが、観察された神経幹細胞マーカーの有意な発現減少は、後者を支持するものと考えられ、2) シナプス形成シグナル、CREB シグナル、エフリン受容体シグナルおよびタンパクユビキチン化シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制、シナプス形成の抑制および軸索誘導の抑制が誘発されていることが示唆された。このことは、上記した、投与群では対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることと関係している可能性が考えられる。

C-3: ニコチンの場合の海馬(成熟期)における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンド

ロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、0.01 mg/kg/day のアセタミプリドを周産期に投与した場合に、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

85 ps (増加)、 3,775 ps (減少)

増加分 85 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

一方、減少分 3,775 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、IPA による Canonical pathway による検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワー

クは現時点では見いだせなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、神経系の有害事象との関連を示唆する遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

以上の通り、ニコチンを 0.01 mg/kg/day (アセタミプリドとイミダクロプリドの場合と同一用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、1) 各細胞の増殖・分化程度は、投与群と対照群とで同程度である事が示唆され、2) 神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかったことから、重篤な神経系の有害事象は観察されない可能性が示唆された。

このように、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを 0.01 mg/kg/day (ADI の 1/10 程度の用量)の投与用量で周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、投与群では、いずれも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆された。この点、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

一方、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程

度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期中枢神経系において、より多くの標的分子が存在する可能性が示唆されるが、この場合も、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

アセタミプリドとイミダクロプリドの場合、投与群では、いずれも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、発現減少を示した遺伝子群が似ていることが示唆されたため、両者の集合関係を検討した。この集合関係を図 2（最終ページ参照）としてベン図に示す。両者で共通して発現減少した遺伝子数は 402 ps であったが、この遺伝子について IPA による Canonical pathway による検索を実施したところ、CREB シグナルが抽出され、このことは、両物質の場合に共通して、海馬における神経伝達や長期記憶の抑制の誘発の示唆を支持するものと考えられる。

D. 結論

平成 30 年度（今年度）は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド及びイミダクロプリドならびに、モデル化学物質としてニコチンを、周産期マウス（胎生 11 日～離乳生後 4 週齢）に各 0.01 mg/kg/day を周産期飲水投与後、成熟後 13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。その結果、投与群ではアセタミプリド及びイミダクロプリド、いずれの場合

でも CREB シグナルの抑制、すなわち神経伝達や長期記憶の抑制が誘発されることが示唆され、情動認知行動に影響する可能性があること、また、同じネオニコチノイド系農薬でありながらイミダクロプリドの方は、アセタミプリドと異なり、対照群と増殖・分化程度が異なること、すなわち神経細胞、グリア細胞および神経幹細胞が減少していることが示唆された。この違いの分子機序は不明であり、アセタミプリドよりもイミダクロプリドの方が、周産期中枢神経系において、より多くの標的分子が存在する可能性が示唆されるが、同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。一方、ニコチンではこのような遺伝子発現プロファイルが認められていないことから、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンとは異なる分子機序で中枢に影響を与える可能性が考えられたが、この場合も同一用量とはいえ、単一の用量だけでの比較であるため、今後、より高用量など複数の用量での検討が必要と考える。

令和元年度（来年度）は、本研究班全体の目的に則り、家庭用品に含まれる別の化学物質について、周産期に飲水投与後、13 週齢時のマウス脳より得られた海馬について、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi

Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 5: 167-170, 2018.

2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid, the 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASAITOX2018), (2018. 6. 19) Pattaya, Thailand

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between

PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018. 7. 6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMine による標的予測、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018. 9. 2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018. 9. 2-5) Brussels, Belgium

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

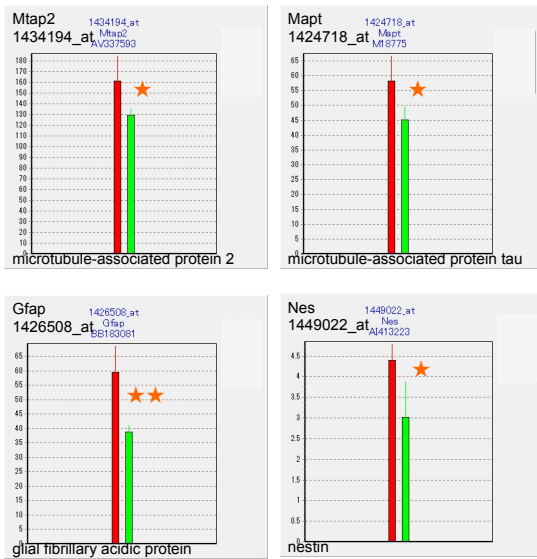


図 1 イミダクロプリドを周産期に投与し成熟後、マウス海馬（成熟期）において、有意に発現減少が認められた、ニューロンマーカーの Mtap2 と Mapt（上段左右）、アストロサイトマーカーの Gfap 遺伝子（下段左）および神経幹細胞マーカーの Nes 遺伝子の発現変動

溶媒対照群：赤、投与群：緑（n=3、平均値 ± 標準偏差、*：P<0.05, **：P<0.01

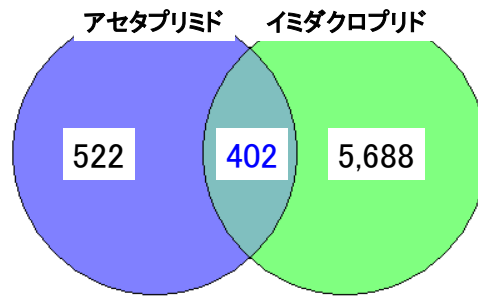


図 2 周産期飲水投与後、13 週齢時の海馬において、発現が有意に減少する遺伝子の内、アセタミプリドあるいはイミダクロプリド投与の場合の集合関係（ベン図で表記した）

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学-一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

発生-発達期における化学物質暴露影響評価に関する国際的なガイドラインの作出に向けた取り組み

研究分担者

菅野 純（独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター）

【研究要旨】

先行研究及び本研究において得られた成果から、神経行動毒性試験バッテリーを体系化し、その汎用性・網羅性・迅速性について、国際的会合に出席して情報発信した結果、この様な試験による高次脳機能に関する情報の必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その活用方法の検討を積み重ねようとしていることが判明した。本年度は、更に経済開発協力機構（OECD）の、内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に対し、OECD TG426（齧歯類発達期神経毒性試験ガイドライン）を補強するものとしてこの試験バッテリーに関する標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）を提出した。現在、国際コーディネータによる試験法ワーキンググループ（Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme (WNT)）において、Detailed Review Paper (DRP) の作成を先行させる方向で継続審議となり、OECD Developmental Neurotoxicity (DNT) との調整が行われる方向となった。

A. 研究目的

先行研究及び本研究において得られた成果から試験法ガイドラインとして提案可能なプロトコルに体系化した「神経行動毒性試験バッテリー」について、その汎用性・網羅性・迅速性といった実用性の高さをもって、既存の OECD-TG426（齧歯類発達期神経毒性試験ガイドライン）を補強する目的で、経済開発協力機構（OECD）の、内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に対し、標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）を作成し提出する。

B. 研究方法

B-1 「神経行動毒性試験バッテリー」の Standard Project Submission Form (SPSF)の作成と提出：

情動行動（不安関連行動）への影響、および学習記憶行動への影響を評価するバッテリー式のマウス行動評価系プロトコル（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、及び、プレパルス驚愕反応抑制試験からなる）の標準プロジェクト提出様式（Standard Project Submission Form (SPSF)）を作成し、参考資料（説明スライドを添付）と共に、経済開発協力機構（OECD）の内分泌かく乱化学物質の試験・評価顧問団（An advisory group on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA AG)）に提出した。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に/関する指針のある場合は、その指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1 「神経行動毒性試験バッテリー」の Standard Project Submission Form (SPSF)の作成と提出：

2019年4月9日に開催された第31回国際コーデイナータによる試験法ワーキンググループ

（Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)）において、当研究班として提案した「神経行動毒性試験バッテリー」が審議された。この提案を強く支持する、あるいは容認する代表が多数であったが、EUのみが承認しなかった。その理由は、OECDが欧州食品安全期間（EFSA）と主導している「in vitro 及び代替手法による発達神経毒性（Developmental Neurotoxicity: DNT）」において進められている内容との整合性が問題とされたことによる。OECDは全会一致が要求されるため、継続審議となり、2019年6月に予定されるDNTの専門家会合において当分担研究者が説明を行う予定となった。

提案した「神経行動毒性試験バッテリー」を構成するオープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、及び、プレパルス驚愕反応抑制試験は、情動、記憶、情報処理機能をカバーする。一群8匹でも十分な検出力を得られる条件を詳細に、使用する機具の標準化を含めて、整備したこと、同一動物をストレスの弱い試験から順に4試験に供するプロトコルとし、従来提案されている試験よりも必要動物数を著しく減らしたこと、測定器具を2機ずつ用意した場合の雄8匹/群、4群の規模の試験の所要期間を6日間に抑えたこと、が特徴である。雄雌を対象とする場合は、装置の規模を倍にするか、あるいは一週間ずらすことで、1乃至2週間で完了する事が可能である。

提案した「神経行動毒性試験バッテリー」は、毒性分野のみに閉じることによる性能低下を回避する目的を含み、マウスを用い、陽性対照として、種々の情動認知行動異常を発揮する事が知られている遺伝子変異マウスを用いることを提案した点も一つの特徴である。勿論、試験バッテリー自体はラットでの実施も可能である（ラット用の機具により）。

D. 考察

先行研究、及び、本研究班において得られた分子生物学的な成果を取り入れた「神経行動毒性試験バッテリー」は、OECD EDTA-AGにおいて、大方の賛同、特に現実の場面で化学物質の評価に携わる研究者からの賛同を得ていることは、当研究班の成果が国内外においても評価される内容であること、研究の方向性について妥当性と新規性があることが確認された。今後、OECD の場においては、in vitro や代替法による評価法を目指すグループとの調整が必要であるが、本試験バッテリーが生成する試験結果は、代替評価法の開発にとって有益であると考えられる。

E. 結論

当研究班の研究計画、成果ともに国際的に評価を得た。今後の展開が期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌

1. Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One*. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

2. 学会発表

<国内学会>

1. 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)
2. 菅野 純, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡, 「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—, 第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)
3. 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, 水口賢司, 菅野純, TargetMine による標的予測, 第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)
4. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium
5. Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium
6. Epigenetic mechanism of modification of the gene expression network induced by a repeated exposure to a chemical. 58th Society of Toxicology 2019, (2019.3.12.) Baltimore MD, USA (Featured session oral presentation).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
特になし。

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「化学物質の周産期暴露による中枢神経系 DNA メチル化影響解析」

研究分担者

五十嵐 勝秀（星薬科大学創薬科学科・生命機能創成科学研究室・教授）

【研究要旨】

家庭用品化学物質の周産期暴露においてそれがエピジェネティックな影響を及ぼした場合には、将来持続する遅発性毒性が生じる可能性がある。本分担研究ではエピジェネティックな影響のうち、より可逆性が低いDNAメチル化に焦点を絞り、全ゲノムレベルでの解析を蓄積し、遅発性毒性のメカニズム解明の一助とするとともに、毒性マーカーとしてとしての活用も目指した研究を進める。

A. 研究目的

家庭用品化学物質の周産期暴露においてそれがエピジェネティックな影響を及ぼした場合には、将来持続する遅発性毒性が生じる可能性がある。本分担研究ではエピジェネティックな影響のうち、より可逆性が低い DNA メチル化に焦点を絞り、全ゲノムレベルでの解析を蓄積し、遅発性毒性のメカニズム解明の一助とするとともに、毒性マーカーとしての活用も目指した研究を進める。

B. 研究方法

DNA メチル化の網羅的解析手法として、サンプルのゲノム DNA を断片化し、メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD2 で DNA メチル化の高いゲノム DNA 断片を濃縮し、配列を次世代シーケンサーで網羅的に解析する MBD2-seq 法がある。本手法の利点は、全ゲノムをフルに配列決定するのではなく、事前に DNA メチル化の高い領域を濃縮することで解析に値するゲノム領域を絞り込むことが出来ることにある。

C. 研究結果

本分担研究は、本研究班で明らかとなる周産期暴露中枢神経系遅発影響化学物質について、DNA メチル化影響を網羅的に調べる位置付けの研究である。よって、解析手法の精度の高さがより一層求められる。そこで本年度は、MBD2-seq 法の精度について標準サンプルを用い、解析手法の精度評価を行った。具体的には、マウス大脳皮質由来ゲノム DNA を標準サンプルとし、本法の各ステップ、1) ゲノム DNA の断片化、2) MBD2 による高メチル化ゲノム断片の濃縮、3) 次世代シーケンサーライブラリ作製、4) 網羅的 DNA 配列決定、5) 配列解析による DNA メチル化評価、の各々について評価した。その結果、全てのステップにおいて安定したデータを得られる各種条件の設定を行うことに成功した。

D. 考察

今年度の解析により、家庭用品化学物質の周産期暴露を受けた個体の中枢神経系サンプルについて、全ゲノムを対象とした網羅的 DNA メチル化解析を精度高く実施することが可能となった。一方で、今年度検討した MBD2-seq 法は解析に必要とする細胞数が多く、今後毒性研究でも主流となると

考えられる単一細胞解析には適さない。この点を踏まえ、極微量サンプルにも対応可能なエピゲノム解析手法の導入を考慮する必要がある。

E. 結論

DNA メチル化を、全ゲノムを対象に精度高く解析する手法の導入成功を踏まえ、今後は家庭用品化学物質の影響を評価し、影響メカニズム解明、バイオマーカーとしての活用に踏み込む必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Tanaka T, Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Ideta-Ohtsuka M, Woo GH, Yoshida T, Igarashi K, Shibutani M. Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Toxicol Sci.* 2019;44(2):93-105. doi: 10.2131/jts.44.93. PubMed PMID: 30726815.

Watanabe Y, Abe H, Nakajima K, Ideta-Ohtsuka M, Igarashi K, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Aberrant Epigenetic Gene Regulation in GABAergic Interneuron Subpopulations in the Hippocampal Dentate Gyrus of Mouse Offspring Following Developmental Exposure to Hexachlorophene. *Toxicol Sci.* 2018 May 1;163(1):13-25. doi: 10.1093/toxsci/kfx291. PubMed PMID: 29301063; PubMed Central PMCID: PMC5917777.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク事業）

家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究

(H30-化学一般-003)

年次報告書

分担研究課題名

「家庭用品化学物質暴露を感知する新規脳 RNA マーカーの探索」

研究分担者

今村 拓也（九州大学大学院医学研究院・統合的組織修復医学分野・准教授）

【研究要旨】

本研究では、脳形成過程である周産期の脳神経系は様々なシグナルに対して感受性が高く、また脆弱であるという観点から、周産期家庭用品化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼすと考えている。化学物質暴露に鋭敏な新規脳RNAマーカーの検出系の確立を目指すため、本年度はまず、マウス胎仔脳および脳オルガノイドをシングルセルRNA-seqに供与し、シングルセルレベルでのRNA発現変動検出パイプライン固めを行った。

A. 研究目的

周産期における家庭用品中の化学物質暴露が成体になって晩発性に影響を及ぼすような場合を仮定すると、多岐に渡るゲノム変異がリスク要因として潜在するはずである。一般に、疾患のゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study ; GWAS) の結果として、大多数の一塩基多型 (SNP) はタンパク質変異を伴わず、遺伝子をコードする領域の外にマップされる。毒性の作用点となるゲノム領域も、その例に漏れないことから、発症の原因となる SNP がタンパクをコードせずに、いわゆるノンコーディング RNA の発現を介して寄与しているものが相当数あることが考えられる。そこで、本研究では、遺伝子にとらわれずに、ノンコーディング RNA にまで毒性評価対象を拡大し、周産期家庭用品化学物質暴露の影響を鋭敏に検出しようとする RNA マーカー整備を行う。

B. 研究方法

[1] シングルセル RNA シーケンシング技術による機能ノンコーディング RNA データベースの大幅な拡張と海馬を構成する重要細胞群の同定

研究代表は近5年に次世代シーケンサー解析論文を責任著者として5本出版した。バルクレベルトランスクリプトーム解析および10x GENOMICS社のChromiumを用いたシングルセルレベル解析から、様々なバイオインフォマティクスを担当する。

[2] ノンコーディング RNA 発現改変による新規分子マーカーの重要度評価系の確立

種村班・中島班と連携して、化学薬品投与モデル動物を用いた行動パラメーターおよび神経幹細胞動態の定量情報と対応する、あるいは予見しうる RNA マーカーを、項目[1]のパイプラインにより取得し、得られた5つの機能ノンコーディング RNA

候補の発現改変を研究期間内に行っていく。

C. 研究結果

報告書の末尾図に示すのは、シングルセル解析から得た、胎仔期脳における細胞構成の変遷を示している。この場合、胎生11日目 (E11) から1日ごとにE16までの計約1万の細胞を解析しており、全部で10コの細胞群に大別することがわかる(色で識別されている)。また、発達にともなうこれら細胞の出現・消失もプロファイリングできており、マーカー遺伝子の動態から、神経幹細胞 (NSC) のうち、ニューロンに分化するものとグリア (アストロサイト・オリゴデンドロサイト) に分化するものも識別することが可能となった。同様の結果を脳オルガノイドモデルについても得た。

D. 考察

本方法を、in vivo 化学薬品投与モデルおよび in vitro 脳オルガノイドモデルに適用し、以下の項目を調べていくことが可能となった。

1. 周産期における家庭用品中の化学物質暴露が表現型誘発に至るまでの時系列を対照と比較することにより、海馬歯状回に重要な細胞群の推定を行える。特に、行動異常感受性を規定する NSC の同定は急務であると考えている。
2. マーカーとなるプロモーターノンコーディング RNA (pancRNA)-mRNA ペアをデータベース化する。
3. pancRNA-mRNA ペアの発現に関与するプロモーターの配列解析を行い、遺伝子ネットワークのコアを占める重要転写因子群を推定する。

E. 結論

バルクレベルのトランスクリプトームの技術に加えて、シングルセルレベルでの RNA-seq 解析パイプラインが脳細胞のタイピングに極めて有効であることがわかり、次年度以降の周産期家庭用品化学物質の影響を鋭敏に検出する RNA マーカー同定に備えることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion. Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi T, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AM, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T and Nakashima K. *Neuron*. 2019 Feb 6;101(3):472-485. e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.010. Epub 2019 Jan 9. PMID:30638745.

2. 学会発表

<国内学会>

1. 今村拓也○:プロモーターノンコーディング RNA 獲得によるほ乳類遺伝子活性化機構の多様化、第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2018 年 11 月 28 日- 30 日 (30 日) (ワークショップ)
2. 今村拓也○:長鎖ノンコーディング RNA による胚エピゲノム制御、第 36 回日本受精着床学会総会・学術講演会、千葉市、幕張メッセ国際会議場、

2018 年 7 月 26 日- 27 日 (27 日) (シンポジウム)

3. 今村拓也○、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一:転写因子を基盤としたマウス神経幹細胞の DNA メチローム変換、第 12 回日本エピジェネティクス研究会、札幌市、かでの 2・7、2018 年 5 月 24 日-25 日 (24 日) (ポスター)

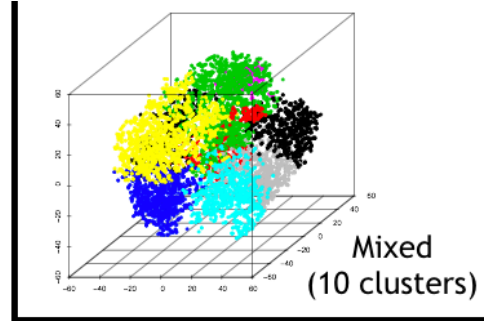
<国際学会>

1. Imamura, T. ○ : Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals ,The18th International Symposium on Developmental Biotechnology , Seoul National University, November 1-2, 2018
2. Imamura, T. ○ : Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals , 2108 Korea-Japan Joint Symposium on Neurodevelopment, Korea, June 8-10, 2018

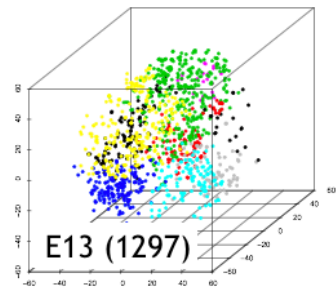
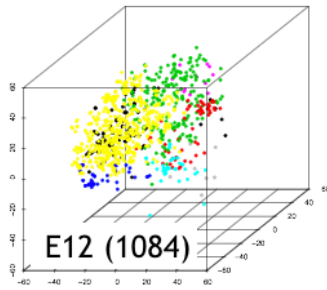
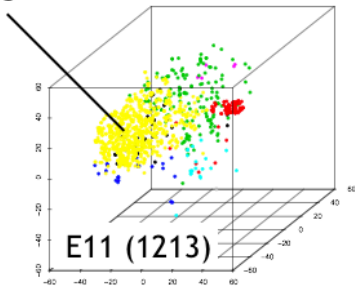
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

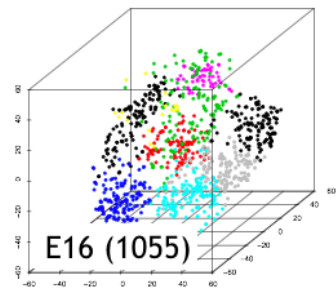
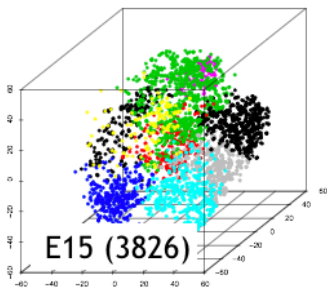
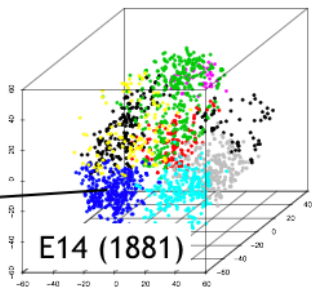
Density clustering of developing brain cells using tSNE data of RNA-seq



Neurogenic NSCs?



Gliogenic NSCs?



別添5

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Honda M, Nakashima K, Katada S.	Epigenetic Regulation of Human Neural Stem Cell Differentiation.	Buzanska L.	Human Neural Stem Cells. Results and Problems in Cell Differentiation	Springer	Cham	2018	125-136

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
Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhata K, Takai M, Aoshima T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I.	Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study.	Biologicals.	55	43-52	2018
Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K.	Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity.	Biochem Biophys Res Commun.	498(3)	674-679	2018
Yamada K, Hiradate Y, Goto M, Nishiyama C, Hara K, Yoshida H, Tanemura K.	Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes during in vitro maturation.	Reprod Med Biol.17(2)	17(2)	143-148	2018
Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, Uchida T.	Prolyl isomerase Pin1 is required for sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells.	Biochem Biophys Res Commun.	497(1)	388-393	2018

Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H.	Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA.	J Vet Med Sci.	80(3)	536-543	2018
Endo N, Ujita W, Fujiwara M, Miyauchi H, Mishima H, Makino Y, Hashimoto L, Oyama H, Makino M, Nishi M, Tohyama C, Kakeyama M.	Multiple animal positioning system shows that socially-reared mice influence the social proximity of isolation-reared cagemates.	Communications Biology	1	225	2018
Kajiwara R, Tominaga Y, <u>Tominaga T</u>	Network plasticity involved in the spread of neural activity within the rhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices	<i>Front. Cell. Neurosci.</i>	10	3389	2019
Tominaga Y, Taketoshi M, Tominaga T	Overall Assay of Neuronal Signal Propagation Pattern With Long-Term Potentiation (LTP) in Hippocampal Slices From the CA1 Area With Fast Voltage-Sensitive Dye Imaging.	<i>Front. Cell. Neurosci.</i>	12	389	2018
Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi T, Nagai T, Hamazaki N, Akedafuin AM, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T and Nakashima K.	Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion	Neuron	101	472-485	2019

Yoshikawa Y, Ago T, Kurahashi J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, Shibahara T, Nakashima H, Nakashima K, Kitazono T.	Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury	Neuroscience	398	193-205	2018
Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K.	New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells	Cell Biol Toxicol	34	425-440	2018
Murao N, Matsubara S, Matsuda T, Noguchi H, Mutoh T, Mutoh M, Kosaki H, Namihira M, Nakashima K.	Np95/Uhrf1 regulates tumor suppressor gene expression of neural stem/precursor cells, contributing to neurogenesis in the adult mouse brain	Neurosci Res			in press
Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Ishizu M, Pan M, Kameda T, Nakashima K.	Canonical TGF- β Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression	J Neurosci	38	4791-4810	2018
Sakai A, Matsuda T, Doi H, Nagaishi Y, Kato K, Nakashima K.	Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice	Proc Natl Acad Sci USA	115	4270-4275	2018
Uezono N, Zhu Y, Fujimoto Y, Yasui T, Matsuda T, Nakajo M, Abematsu M, Setoguchi T, Mori S, Takahashi HK, Komiya S, Nishibori M, Nakashima K.	Prior Treatment with Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Boosts Human Neural Stem Cell Transplantation-Mediated Functional Recovery After Spinal Cord Injury	Stem Cells	36	737-750	2018

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi.	Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing.	Commun Biol	2	57		2019
Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A.	Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt.	Fund Toxicol Sci		5	167-170	2018
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One		13(10)	e0205702.	2018
Tanaka T, Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Ideta-Ohtsuka M, Woo GH, Yoshida T, Igarashi K, Shibutani M.	Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile.	J Toxicol Sci.		44	93-105.	2019
Watanabe Y, Abe H, Nakajima K, Ideta-Ohtsuka M, Igarashi K, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M.	Aberrant Epigenetic Gene Regulation in GABAergic Interneuron Subpopulations in the Hippocampal Dentate Gyrus of Mouse Offspring Following Developmental Exposure to Hexachlorophene.	Toxicol Sci.		163	13-25	2018

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男 印



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

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 東北大学大学院農学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 種村 健太郎・タネムラ ケンタロウ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 早稲田大学人間科学学術院

所属研究機関長 職名 人間科学学術院長

氏名 藤本 浩志 印

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

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学一般-003)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 人間科学学術院・教授

(氏名・フリガナ) 掛山 正心・カケヤマ マサキ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 徳島文理大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 田村 禎 通



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

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中樞神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 神経科学研究所・教授
(氏名・フリガナ) 富永貴志・トミナガ タカシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

平成31年 3月 6日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人九州大学
 所属研究機関長 職名 総長
 氏名 久保 千春 印



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

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学研究院・教授
(氏名・フリガナ) 中島 欽一 (ナカシマ キンイチ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏 印



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

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部・部長
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 (独) 労働者健康安全機構
 日本バイオアッセイ研究センター

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 菅野 純



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

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) (独) 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター・所長
 (氏名・フリガナ) 菅野 純 (カンノ ジュン)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 中西 友子



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

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業 化学物質リスク研究事業2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)3. 研究者名 (所属部局・職名) 創薬科学域・教授(氏名・フリガナ) 五十嵐 勝秀・イガラシ カツヒデ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

平成31年 3月20日

機関名 国立大学法人九州大学
 所属研究機関長 職名 総長
 氏名 久保 千春



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

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学研究院・准教授
 (氏名・フリガナ) 今村 拓也 (イマムラ タクヤ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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