

**厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業**

**化学物質のインビトロ神経毒性  
評価法の開発  
(19KD1003)**

**令和1年度総括・分担研究報告書**

**研究代表者 諫田 泰成**

**令和2(2020)年5月**

## 目 次

I.	総括研究報告	
	化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発-----	1
	諫田 泰成	
II.	分担研究報告	
	化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発-----	4
	諫田 泰成	
	iPS 細胞の提供、基礎的な性状評価に関する研究-----	14
	齋藤 潤	
	In vivo 毒性評価-----	18
	渋谷 淳	
	発達期・反復投与毒性試験-----	26
	吉田 祥子	
	神経毒性のインシリコ予測・評価手法開発-----	34
	吉成 浩一	
	「MEA 計測」に関する研究-----	43
	小田原 あおい	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	51
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	52

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（課題番号：19KD1003） 総括研究報告  
化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発  
研究代表者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

## 研究要旨

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

本研究では、OECDと共有している化学物質リストをもとに、インビトロで構造と機能の両側面から神経毒性を検討した。神経系の構造に対する毒性に関しては、ロテノンによりヒトiPS細胞の分化能が抑制されることから、ミトコンドリア毒性を有する化合物を評価した。その結果、多くのDNT化合物は分化を抑制することを明らかにした。ヒトiPS細胞は株間差、人種間差が知られており、日本人由来のiPS細胞の整備を進めている。

次に、機能面として、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行ったところ、MEAシステムを用いてピレスロイド系農薬などの毒性を検出可能であることを明らかにした。また、MEAデータをもとに、農薬などのリスク分類を試みている。得られた細胞毒性データはOECDで進行中のバリデーションのデータと比較する予定である。

また、動物実験によるin vivoデータと検証を行いハザード評価を行った。他にも毒性が懸念される化学物質の評価を行い、動物脳組織におけるエピゲノムデータなどの取得を進めている。

さらに、これらのデータを統合する目的で、インシリコによる毒性評価法に着手した。既存の情報が非常に限られていることから、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験データベースのプロトタイプを構築した。

最終的に、OECDや米国EPAを中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験（TG424）や発達神経毒性試験（TG426）を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立し、統合な神経毒性評価法の構築を目指す。

## <研究体制>

- ・諫田泰成（国立医薬品食品衛生研究所）  
「化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発」
- ・齋藤潤（京都大学 iPS 細胞研究所）  
「iPS 細胞の提供、基礎的な性状評価」
- ・渋谷淳（東京農工大学）  
「In vivo 毒性評価」
- ・吉田祥子（豊橋技術科学大学）  
「発達期・反復投与毒性試験」
- ・吉成浩一（静岡県立大学）  
「神経毒性のインシリコ予測・評価手法開発」
- ・小田原あおい（東北工業大学）  
「MEA 計測」  
（若手育成枠）

## A. 研究目的

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

我々は今までに、インビトロ毒性評価モデルとして、ヒトiPS細胞を用いた発達期における神経毒性評価法を構築し、その有用性を明らかにしてきた。また、米国EPA等との共同研究により、多点電極アレイ（MEA）システムにより成体における神経毒性を評価する手法を構築

しており、胎生期から成熟期において化学物質の神経毒性評価が可能である。

そこで、本研究では、OECD と共有している化学物質のリストをもとに、インビトロ、インビボ、インシリコ評価を用いて、化学物質の統合的な神経毒性評価法を開発する。

インビトロ毒性試験は、品質が安定したヒト iPS 細胞（京大樹立株）を整備するとともに、信頼性の高いデータを取得し、ヒトにおける予測性等を検証する。さらに、OECD で進行中のバリデーションのデータと比較を行う。また、動物実験による *in vivo* データと検証し、毒性評価法を開発する。さらに、既存の化学物質の反復投与毒性試験データなどを活用し、カテゴリーアプローチ等の手法を用いてインシリコによる評価法を確立して、統合的な神経毒性評価法を構築する。

最終的に、OECD や米国 EPA を中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験（TG424）や発達神経毒性試験（TG426）を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立を目指す。

現在、OECD で提案された発達神経毒性ガイダンス案の議論が進行中であり、日本から iPS 細胞などのデータを提供して、ガイダンスならびに化学物質の規制に貢献したい。

## B. 研究方法

詳細は各分担報告書を参照のこと。

## C. 研究結果

### 【 iPS 細胞による *in vitro* 神経毒性評価】

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標として ATP 産生と分化能を選定した。分化能に関して大規模検証試験を行い、一定の予測性を明らかにした。また、ヒト iPS 細胞ニューロンを用いて MEA によりネットワーク評価を行い、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

さらに、OECD DNT 専門委員、HESI NeuTox メンバーとして国際連携を推進した。

### 【 iPS 細胞の提供、基礎的な性状評価】

健常人ドナー由来ヒト iPS 細胞 6 株を対象として、遺伝子発現プロファイルと *in vitro* 三胚葉分化能を検討した。その結果、6 株について良好な分化能を確認できた。

### 【 *In vivo* 毒性評価】

ラットを用いた塩化鉛とエタノールの発達期曝露で生後に始まる海馬の神経新生に

おける顆粒細胞系譜のうち、神経前駆細胞を標的とした発達神経毒性を検出した。

### 【 発達期・反復投与毒性試験】

OECD リスト物質を用いた評価を踏まえ、今後、*in vitro* 研究法の開発につなげる。

### 【 神経毒性のインシリコ予測・評価手法】

既存の発達神経毒性情報を利用して、発達神経毒性を示す物質の物理化学的・構造的特徴の一端を明らかにした。また、既存の情報が非常に限られていることから、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験データベースのプロトタイプを構築した。

### 【 MEA 計測（若手育成枠）】

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから 15 化合物を選定し、MEA 計測法によってリスク評価を行い、3 つのカテゴリーに分類できた。

## D. 考察

本研究において、インビトロ、インビボ、インシリコ評価を用いて、化学物質の統合的な神経毒性評価法を進めており、新規 DNT ガイダンス案との連携を推進している。

現在 OECD で提案されているインビトロ DNT ガイダンスと同様に、ヒト iPS 細胞の分化誘導能に基づく評価系およびヒト iPS 細胞由来神経細胞のプラットフォームを用いて、化学物質の影響評価に関するデータ取得を行っている。OECD のブラインド化合物のデータはまだ開示されていないものの、日本のデータとして活用できるように、原著論文を執筆中である。

DNT ガイダンス案に関する資料ではヒト iPS 細胞は特に重要なツールになることが明記されているが（Bal-Price A, Toxicol Appl Pharmacol. 2018 Sep 1;354:7-18）標準となる株については議論されていない。再生医療や創薬に加えて、化学物質の安全性評価においても、今後を見据えて、日本人樹立株の整備やデータ取得が重要な課題であると考えられる。衛研では現在、CiRA 株の神経分化能を評価中である。

インビボ、インビトロの関連に関しては、共通の化学物質を用いて、iPS 神経など細胞のデータと *in vivo* のデータを比較する予定

で進めている。例えば、グリホサートは既存の論文情報がなかったが、我々がグリホサートについて動物で得られた知見について、OECDとも国際的に連携している。他の化学物質について、インビボとインビトロで比較し、ハザード評価の議論をする予定である。

インシリコからのアプローチも重要である。OECDの発達神経毒性化合物リストは化学物質の数が少なかったため、現在、農薬評価書をもとに、インビボ毒性試験(二世代繁殖試験、発生毒性試験)のデータを収集・整理している。今後これをきちんと整理して、神経毒性の定義をしっかりとすれば、インビボ神経毒性(親、次世代)の陽性対照物質、陰性対照物質がさらに明確となる。従って、インシリコによる毒性試験データの解析に基づいて、インビボとインビトロ(細胞)間で相関性を検討し、橋渡しを行うことが可能となる。例えば、インシリコの予測をもとに、wetのデータでカテゴリーアプローチを行い、予測性を検証することなどを計画している。これにより、インビボとインビトロの相関をとるだけではなく、あわせてインシリコの利用法や有用性も議論できると考えられる。

化学物質の安全性評価においてはヒト試料の整備が必要不可欠である。OECDでも、

ヒトのデータや疫学データの拡充を進めている。将来的に、EUやMount Sinai医科大学などで進行中の大規模エクスポソーム、日本のエコチル調査などとの連携が必要となると思われる。

## E. 結論

新たなin vitro神経毒性試験法の確立に向けて、陽性対照となる化学物質を用いて、in vitro, in vivo, in silicoにより多角的にデータを取得した。今後、統合化を進める予定である。

## F. 研究発表

各分担研究者の報告書に示すように、論文発表および学会発表を行った。初年度が終わり、各分担研究のデータも蓄積されてきている。今後は研究班全体あるいはグループ間の発表が増える予定である。特に、本研究班の全体に関しては、第47回日本毒性学会学術年会で神経毒性に関するシンポジウムを組んでおり、2020年6月末にWEB開催の予定である。

今後、本研究班として、原著論文や他の学会でも積極的に発表していく予定である。

## II. 分 担 研 究 報 告

## 研究要旨

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

本研究では、OECDと共有している化学物質リストをもとに、インビトロで構造と機能の両側面から神経毒性を検討した。神経系の構造に対する毒性に関しては、ロテノンによりヒトiPS細胞の分化能が抑制されることから、ミトコンドリア毒性を有する化合物を評価した。その結果、多くのDNT化合物は分化を抑制することを明らかにした。次に、機能面として、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行ったところ、ピレスロイド系農薬などの毒性を検出可能であることを明らかにした。

得られた細胞毒性データはOECDで進行中のバリデーションのデータと比較するとともに、動物実験によるin vivoデータと検証する。特に、インシリコにおいて定量的構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチ等の手法を用いて、統合な神経毒性評価法の構築を目指す。

最終的に、OECDや米国EPAを中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験(TG424)や発達神経毒性試験(TG426)を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立する。

## A. 研究目的

神経毒性評価は、新規化合物の安全性評価において必要不可欠である。神経毒性試験において、子供の薬剤応答は大人とは大きく異なるというのが基本的な考え方である。現行の神経毒性ガイドライン(OECD TG424及びTG426)は多くの動物と費用を必要とするため、より正確で予測可能な評価法を確立する必要がある。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、我々は、ヒトiPS細胞を用いた化合物評価を構造と機能に分けてエンドポイントの探索を試みた。本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。特に、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の活用、iPSニューロンの評価を行い、ヒトにおける予測性等を検証することにより新たな神経毒性評価法を開発する。

## B. 研究方法

### 1. ヒトiPS細胞株の培養

ヒトiPS細胞株201B7は、TeSR-E8培地(Stem Cell Technologies)にてフィーダーフリー条件で培養した。コーティング剤にはES細胞用のマトリゲル(BD Biosciences)を用いた。

### 2. ヒトiPS細胞から神経細胞への分化

神経分化法には、文献(Chambers et al., Nat Biotechnol 2009)に基づいてDual smad阻害法を用

いた。BMPシグナル阻害剤LDN193189(Wako)及びActivinシグナル阻害剤SB431542(Wako)によりiPS細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞、さらに神経細胞へと分化させた。

### 3. 分化細胞における遺伝子発現の評価

TRIzol試薬(Thermo Fisher)を用いて分化細胞よりRNAを抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit(Qiagen)を用いて反応液を調製し、ABI PRISM 7900HTを用いてqPCRを行った。神経分化マーカーPax6などの発現量により評価を行った。

### 4. MEAシステムによる神経活動の評価

ヒトiPS細胞由来神経細胞は市販のX Cell Science社の細胞を、多点電極アレイ(MEA)システムとしてMED64-PRESTO(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いて、神経ネットワーク機能を評価した。計測までの細胞播種・細胞培養は会社から提供されたプロトコールに従った。

初めに、細胞播種前日にMED64-PRESTO用24ウェルプレートを0.005%ポリエチレンジアミン(PEI)/ホウ酸緩衝液(0.005% PEI / 0.1M Boric acid buffer solution (pH 8.5))で1時間コーティングし、滅菌蒸留水で4回洗浄後、15時間クリーンベンチ内で無菌的に乾燥させた。播種2.5時間前に、成熟培地(Neuronal medium)(Xcell science社)に

iMatrix-511(ニッピ社)を 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように加え、各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  添加後、室温で 2.5 時間、クリーンベンチ内でインキュベートした。細胞を解凍する直前に iMatrix-511 でコーティングした 24 ウェルプレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置した。その後直ちに CellSpotter (アルファメッドサイエンティフィック社)およびクローニングリング RING-5 ( $\phi 5\text{mm}$ )(AGC)をセットした。細胞を解凍後、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ラミニンを含む播種培地 (30  $\mu\text{l}$ ) にて 30,000 細胞/ウェルでクローニングリング内の電極上に播種、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。播種 1 時間後に、クローニングリングおよび CellSpotter をゆっくり取り除いた。播種 2 時間後に 600  $\mu\text{L}$  の成熟培地をゆっくり添加した。培養 2, 4, 6 日目は成熟培地で半量交換した。培養 8 日目に成熟培地を完全に取り除き、神経生理学用無血清維持培地 (BrainPhys + SM1 Supplement)(STEMCELL Technologies 社)に交換した。培養は 60 あるいは 61 日目まで行い、定期的 (3~4 日おき)に維持培地の半量交換および多点電極システムによる測定を行った。化学物質暴露は神経ネットワークが成熟した播種 60 日以降に実施した。培養 60 日以降に、化合物を各 5 濃度ずつ累積添加し、その投与前後での神経活動データを取得した。投与前後の記録時間は 10 分間、化合物曝露時間は 10 分間とした。なお、活性化電極 (1 分間に 5 スパイク以上観察された電極) が半数の 8 個以上存在するウェルに化合物を累積添加した。計測データは Spike Extract for PRESTO, Burst Analysis for Advanced (いずれもアルファメッドサイエンティフィック社)を用いて解析した。

初年度は OECD と共有している化学物質のうちピレスロイド系農薬 5 種類(シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン,  $\lambda$ -シハロトリン,  $\tau$ -フルバリネート)に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 $\mu\text{M}$  とした。なお、MEA 陽性対照化合物としてピクロトキシン (0.1~10 $\mu\text{M}$ ) を、毒性陽性対照化合物として iPS 細胞の分化能抑制の検討に使用したロテノン (1~100 $\mu\text{M}$ ) を用いた。

## C . 研究結果

### 1. ヒト iPS 細胞および iPS 前駆細胞の分化能への影響の評価

OECD で議論されているリストから化学物質を選定し、京大 CiRA で樹立されたヒト iPS 細胞株 201B7 を用いて化学物質の神経毒性評価を行った。ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するロテノンによりヒト iPS 細胞の分化能が抑制された。これをもとに、OECD で追加されたミトコンドリア毒性を有する農薬などの評価を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりもヒト iPS 細胞の方が高感度で、多くの農薬の毒性を検出できる可能性が示唆さ

れた(図 1)。

### 2. MEA システムによるヒト iPS 細胞由来神経細胞の神経活動の評価

ヒト iPS 細胞由来神経細胞に関しても、神経活動を MEA システムで記録して機能面での神経毒性の評価を行った。特に、OECD のグループは農薬を用いて慢性毒性評価を行なっているため、我々は急性毒性の発火データを取得した (図 2)。

次に、得られた発火データより、MEA 陽性対照化合物であるピクロトキシンを用いて、文献(Odawara et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2019)を参考に神経ネットワーク機能の評価に必要なエンドポイントを検討した結果、以下に示す 9 つのエンドポイントを決定した(図 3)。

1. 総発火数
2. ネットワークバースト発火数
3. ネットワークバースト発火間隔
4. ネットワークバースト発火の持続時間
5. ネットワークバースト発火中の発火数
6. ネットワークバースト発火のピーク
7. 6 のばらつき
8. ネットワークバースト発火のピーク間隔
9. 8 のばらつき

次に毒性陽性対照化合物のロテノンでエンドポイントを検討した。その結果、暴露前と比較して暴露最小濃度 (1 $\mu\text{M}$ )より自発発火が急激に減少することに伴い、ネットワークバースト発火などのパラメータは検出されなかった (図 4)。このことからロテノンは低用量でも神経ネットワークを阻害することで神経毒性を有することが認められた。以上のことから、機能面では 9 種類のエンドポイントが化合物を評価するのに有効性であることを確認した。

上記結果を踏まえ、5 種類のピレスロイド系農薬(シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン,  $\lambda$ -シハロトリン,  $\tau$ -フルバリネート)で MEA データを取得し検討した。その結果、5 種類のピレスロイド系農薬はすべて容量依存的に総発火数 (図 5)、ネットワークバースト発火数 (図 6)などが減少することが確認された。次いで急性神経毒性のフェノタイプを調べるため、9 種の MEA エンドポイントからヒートマップを作製した (図 7)。その結果、ロテノンに類似したフェノタイプが確認され、in vitro 試験結果ではあるがピレスロイド系農薬も急性神経毒性を示すことが明らかになった。また急性神経毒性はデルタメトリン > シフルトリン,  $\lambda$ -シハロトリン >

α-フルバリネート > シペルメトリンの順に急性神経毒性が強いことが示唆された。

以上の結果よりピレスロイド系農薬は、iPS 細胞由来神経細胞を用いた MEA システムにより、急性神経毒性を検出可能であることを明らかにした。

#### D. 考察

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストから、特に農薬を中心に評価した。単独の手法では毒性予測に限界があることから、いくつかの手法を組み合わせる必要があると考えられる。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、我々は化学物質の毒性をインピトロで構造と機能に分けて検証した。

神経系の構造に対する毒性に関しては、化学物質を暴露したヒト iPS 細胞を用い、分化誘導した神経前駆細胞の分化能を検証することで神経毒性評価の可能性を示唆した。また用いた化合物はミトコンドリア毒性も有しており、ミトコンドリアが神経毒性評価において有効な指標になる可能性が考えられる。さらにヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりもヒト iPS 細胞の方が高感度であったことから、未成熟な細胞ほど化学物質に対する感度が高いと考えられる。この観点から鑑みて、胎生期モデルであり、未分化能状態にあるヒト iPS 細胞は神経毒性評価において最も有効な細胞である。ヒト iPS 細胞は初期化される細胞由来や方法に応じてさまざまな株が存在する。今後は化学物質の神経毒性における株間差の検討を行い、iPS 細胞の有効性を検証する必要がある。

神経系の機能面としては、ヒト iPS 由来神経細胞の神経ネットワーク機能を電気生理学的に検出可能な MEA システムを用いることにより評価した。初年度検証したピレスロイド系農薬は、MEA システムで急性神経毒性が検出可能であったことから、OECD と共有しているその他の DNT 化合物も、それぞれの薬理作用などに応じたフェノタイプを明らかにすることにより、毒性評価が可能になると考えられた。また、OECD と共有している化学物質で神経細胞内での作用機序が不明な化合物に関しても、フェノタイプを比較することにより神経毒性の予測が可能であることが示唆された。

今後、カテゴリーアプローチなどの手法を基にしてインシリコとインピトロデータの統合化を図ることにより新たな神経毒性評価法を開発できることが期待される。

これらのデータは、2020 年 4 月の DNT ワークショップや OECD DNT 対面会議にて共有することにより、新たな神経毒性のガイダンスに貢献したい。

#### E. 結論

iPS 細胞の分化能および MEA システムによる iPS 細胞由来神経細胞の神経ネットワークにより、

OECD 化合物の評価を行い、一定の予測性が得られることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

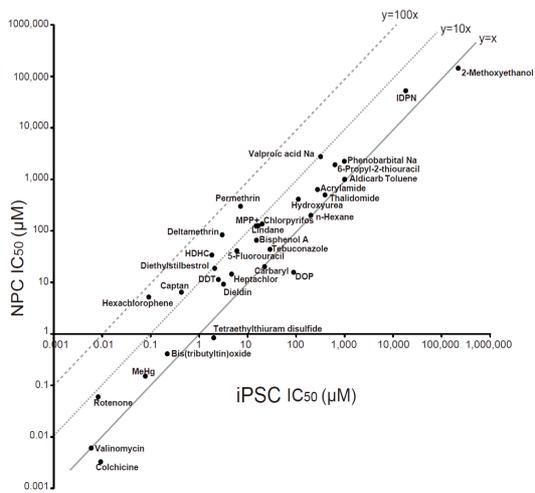
##### 2. 学会発表

1. 山田茂、常本和伸、諫田泰成：ヒト iPS 細胞技術を用いた統合的な発達神経毒性評価法の開発、第 5 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、北里大学、東京、2019 年 9 月 14 日、口頭、国内。
2. 諫田泰成：ヒト幹細胞を用いた新たな安全性評価法の開発と国際標準化、幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム第 2 回研究会、横浜薬科大学、神奈川、2019 年 10 月 1 日、口頭、国内。
3. 諫田泰成、常本和伸、山田茂：ヒト iPS 細胞を用いた新たな神経毒性評価法の開発、第 249 回生理学東京談話会、千葉大学、千葉、2019 年 11 月 30 日、口頭、国内。
4. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞技術を用いた心血管系・中枢神経系の安全性評価に関する現状と今後の展望、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020 年 3 月（誌上開催）、口頭、国内。
5. 常本和伸、山田茂、諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020 年 3 月（誌上開催）、口頭、国内。など。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

A)



B)

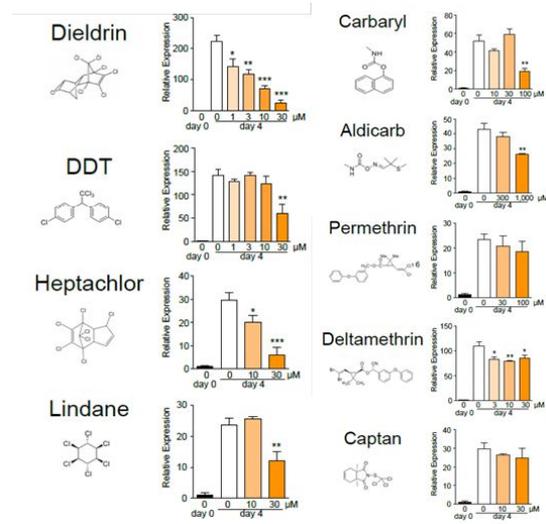
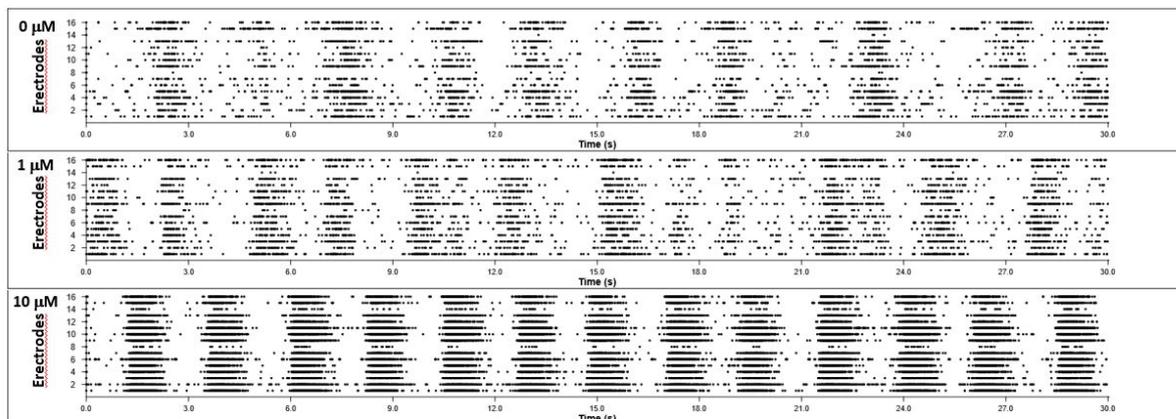


図1. ヒトiPS細胞の分化能による化学物質の評価

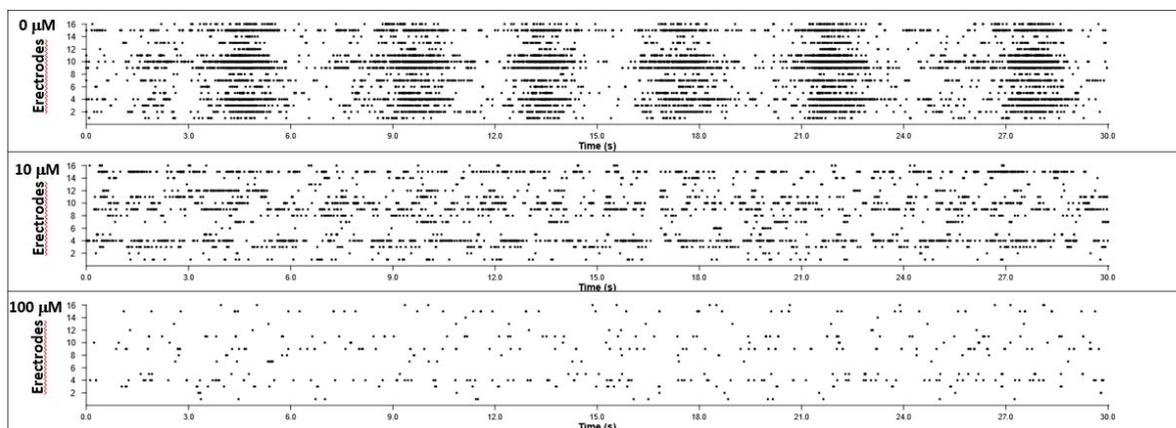
A) iPS細胞とiPS神経前駆細胞を用いて検出力の比較を行い、iPS細胞はiPS神経前駆より検出力が高いことを示した

B) DNTで検討されている農薬に関して、分化能に関するデータを取得した。

### (A) ピクロトキシン



### (B) ロテノン



### (C) シフルトリン

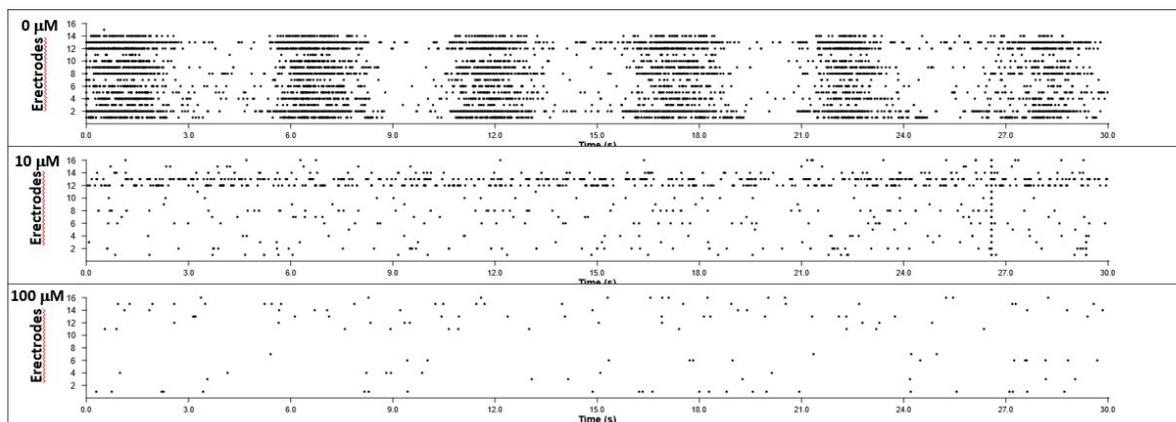
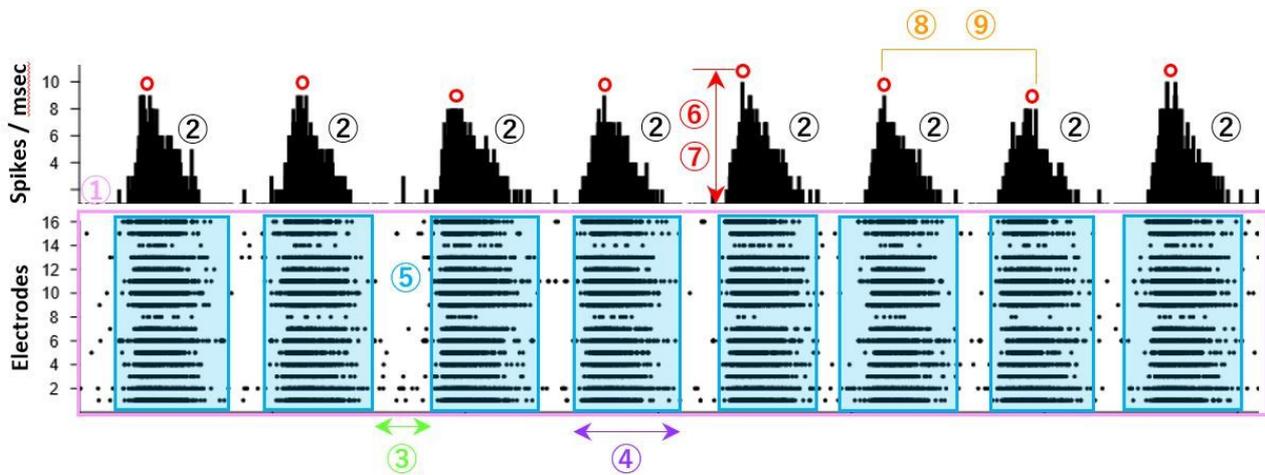


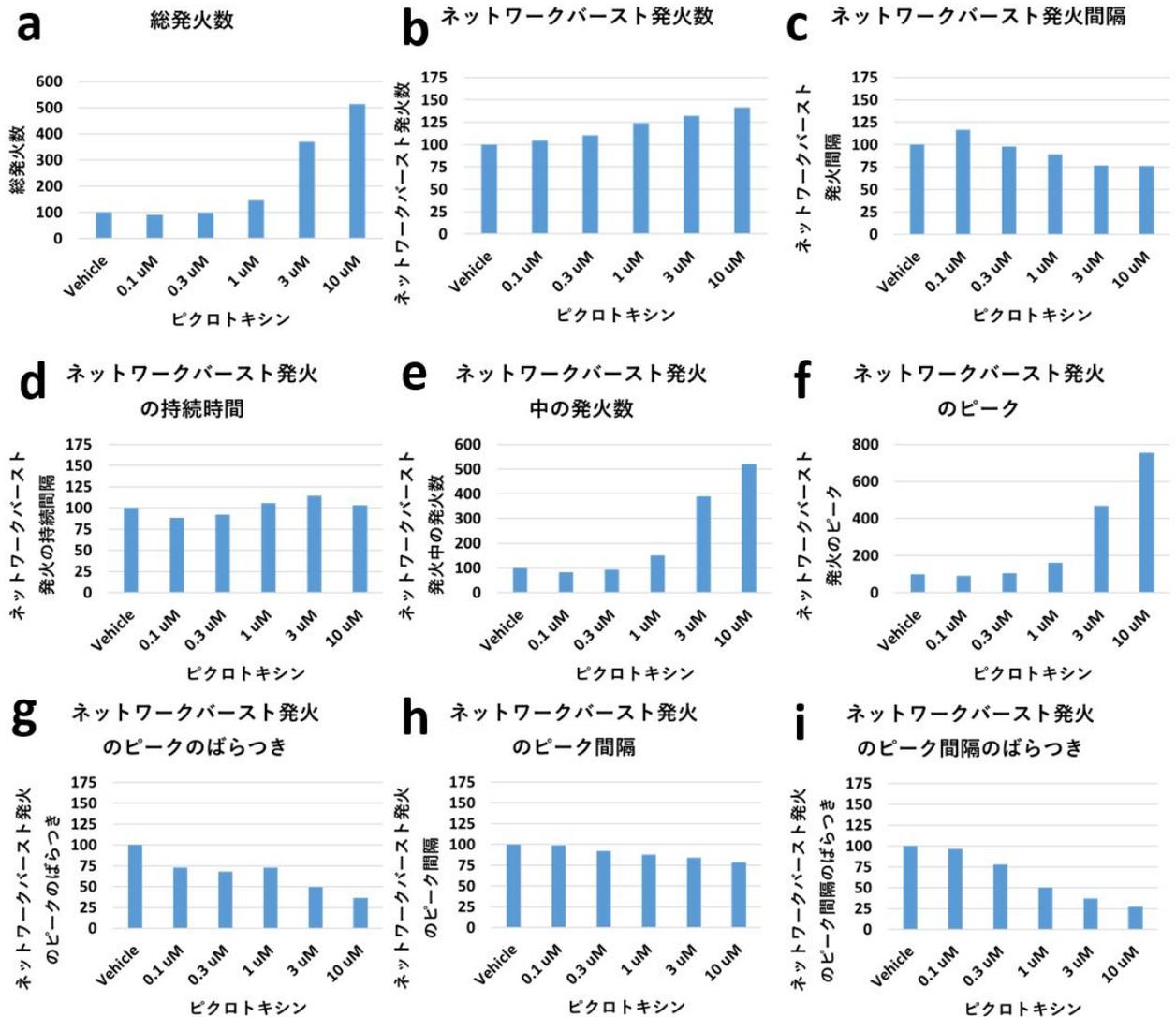
図2. MEAシステムから得られた発火のラスタプロット  
(A) ピクロトキシン, (B) ロテノン, (C) シフルトリン。



- ① Total number of Spikes (総発火数)
- ② Number of Network Burst (ネットワークバースト発火数)
- ③ Network Inter Burst Interval (ネットワークバースト発火間隔)
- ④ Network Burst Duration (ネットワークバースト発火の持続時間)
- ⑤ Number of Spikes / Network Burst (ネットワークバースト発火中の発火数)
- ⑥ Peak Spikes (PS) in a Network Burst (ネットワークバースト発火のピーク)
- ⑦ Coefficient of Variation of PS in a Network Burst (⑥のばらつき)
- ⑧ Network Inter Peak Interval (IPI) (ネットワークバースト発火のピーク間隔)
- ⑨ CV of Network IPI (⑧のばらつき)

図3. MEAシステムから得られる発火のヒストグラム, ラスタプロット (10  $\mu$ Mピクロトキシン)および決定した解析エンドポイント  
ヒトiPS由来神経細胞に化合物を10分間暴露して得られたスパイクデータをもとに解析した。

## (A) ピクロトキシン



## (B) ロテノン

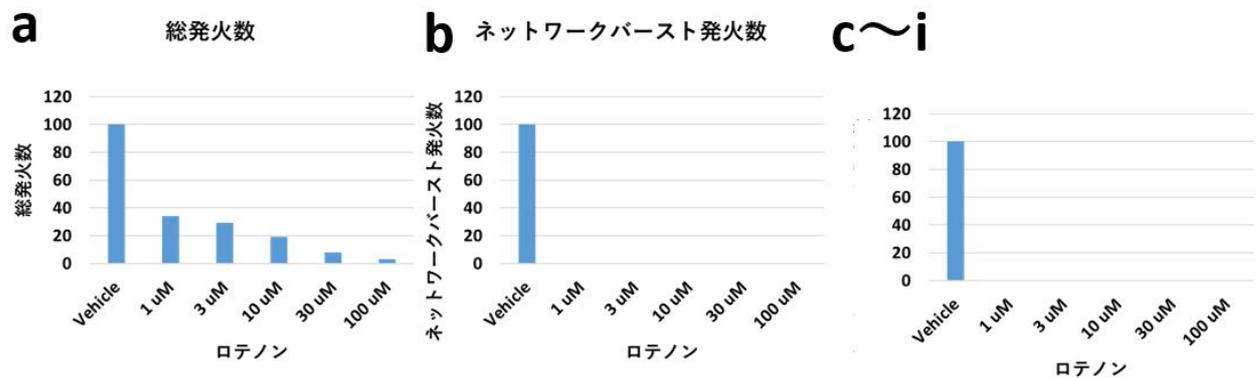


図4. 陽性対照化合物のMEAエンドポイント

(A) ピクロトキシン、(B) ロテノン、a 総発火数、b ネットワークバースト発火数、c ネットワークバースト発火間隔、d ネットワークバースト発火の持続時間、e ネットワークバースト発火中の発火数、f ネットワークバースト発火のピーク、g ネットワークバースト発火のピークのばらつき、h ネットワークバースト発火のピーク間隔、i ネットワークバースト発火のピーク間隔のばらつき

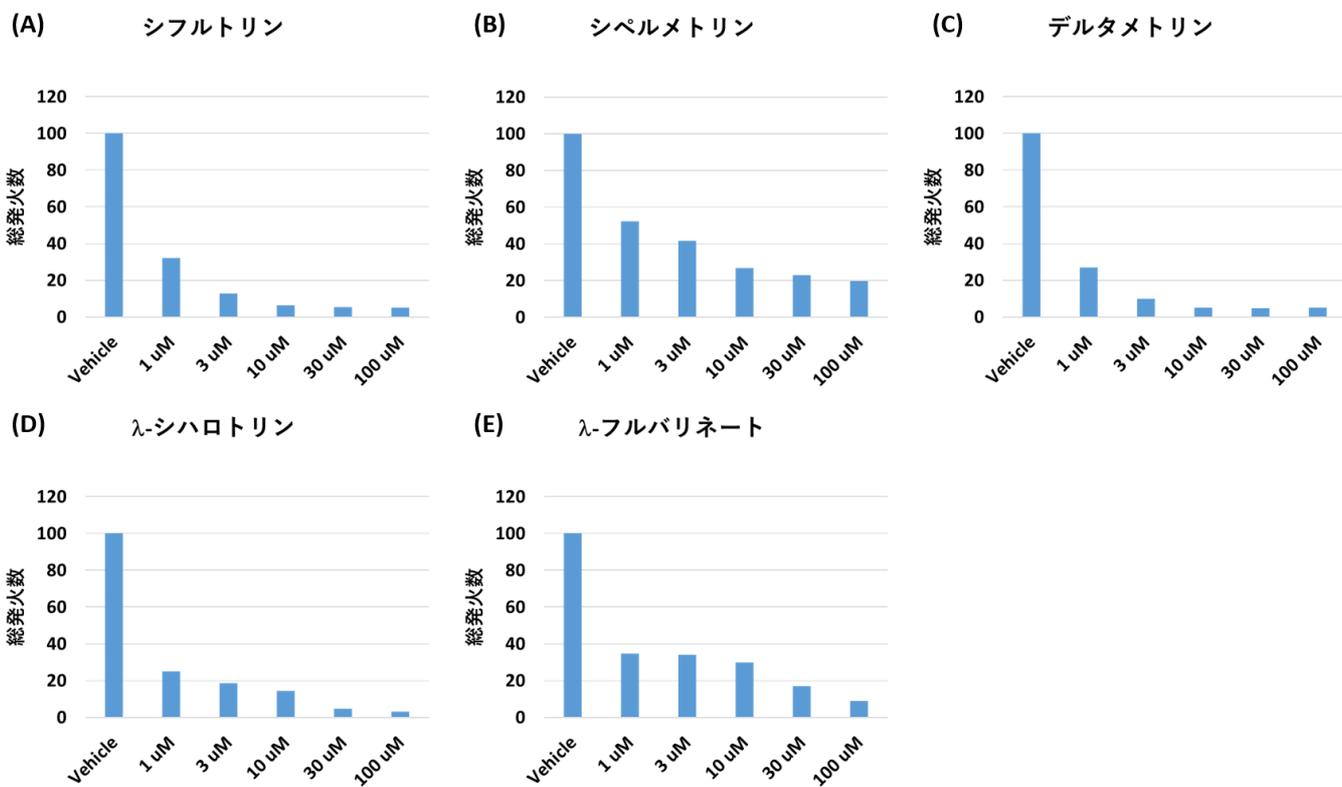


図5. ピレスロイド系農薬の総発火数

(A) シフルトリン、(B) シペルメトリン、(C) デルタメトリン、(D) λ-シハロトリン、(E) λ-フルバリネート

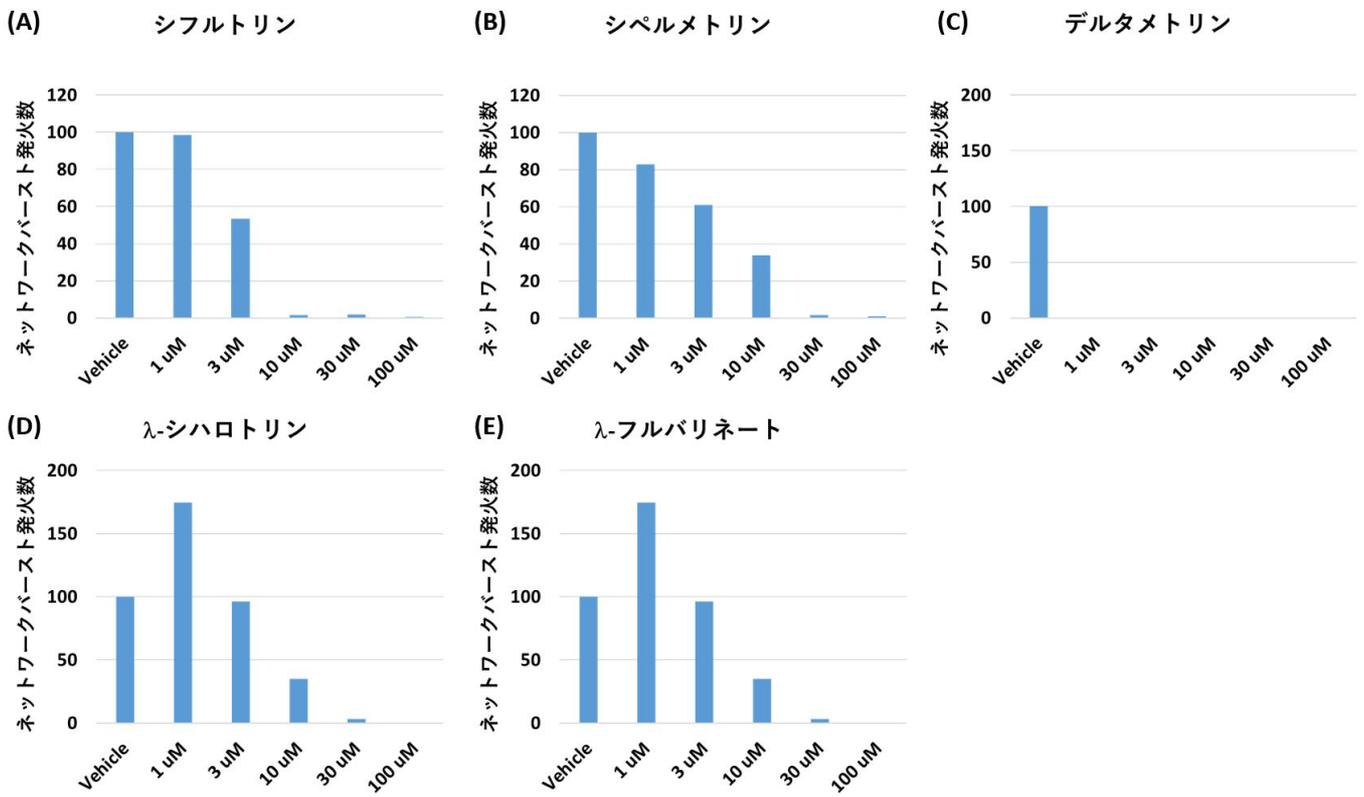
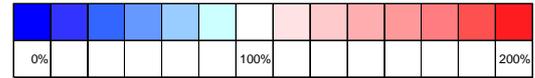


図6. プレスロイド系農薬のネットワークバースト発火数  
 (A) シフルトリン、(B) シペルメトリン、(C) デルタメトリン、(D)  $\lambda$ -シハロトリン、(E)  $\tau$ -フルバリネート

(A) 陽性対照化合物 (MEAおよび毒性)

化合物名		ピクロトキシン					ロテノン				
濃度 (μM)		0	0.3	1	3	10	1	3	10	30	##
MEAデータ	総発火数										
	ネットワークバースト発火数										
	ネットワークバースト発火間隔										
	ネットワークバースト発火の持続時間										
	ネットワークバースト発火中の発火数										
	ネットワークバースト発火のピーク										
	のばらつき										
	ネットワークバースト発火のピーク間隔										
	のばらつき										



(B) ピレスロイド系農薬 (OECD)

化合物名		シフルトリン					シベルメトリン					デルタメトリン					λ-シハロトリン					ε-フルバリネート				
濃度 (μM)		1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100
MEAデータ	総発火数																									
	ネットワークバースト発火数																									
	ネットワークバースト発火間隔																									
	ネットワークバースト発火の持続時間																									
	ネットワークバースト発火中の発火数																									
	ネットワークバースト発火のピーク																									
	のばらつき																									
	ネットワークバースト発火のピーク間隔																									
	のばらつき																									

図7. MEAシステムから得られるスパイクの解析ヒートマップ

(A)ピクロトキシンおよびロテノン

(B) OECDリストに含まれるピレスロイド系農薬

## 研究要旨

本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を選別し、その分化能を評価することである。既に別事業で樹立した健康人ドナー由来ヒトiPS細胞を6株を対象として、遺伝子発現プロファイルと*in vitro*三胚葉分化能を検討した。OCT4、NANOG遺伝子の発現量を評価したがいずれも標準範囲であった。また、*in vitro*の三胚葉分化について、いずれの株も良好な分化能を示した。特に神経細胞の前駆細胞である外胚葉前駆細胞については、いずれも70%以上の分化能を示した。今回検討したiPS細胞株はいずれも良好な外胚葉への分化指向性を示し、本研究での神経分化実験も効率よく実施できる可能性が示された。

## 研究分担者

齋藤潤 京都大学 iPS細胞研究所 准教授

## A. 研究目的

本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を選別し、その分化能を評価することである。

## B. 研究方法

既に別事業で樹立した健康人ドナー由来ヒトiPS細胞を6株を対象として、遺伝子発現プロファイルと*in vitro*三胚葉分化能を検討した。選択基準として、以下を設定した。

- 外胚葉分化能(PAX6+)が良い
- 中胚葉分化と内胚葉分化に問題がない(平均的に分化)
- 細胞増殖が平均的(doubling time: 25-30h)
- iPSコロニー形態が良い
- 分化細胞の出現が低い、もしくはほとんど存在しない

遺伝子発現については、OCT4とNANOGの発現量をqPCRで評価した。三胚葉分化能については、フローサイトメトリーで各胚葉特異的転写因子の発現量を評価した(図1)。

## (倫理面の配慮)

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。iPS細胞作製にあたり、“人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれをを用いた疾

患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守しドナーさんの同意・協力を得て行う。

## C. 研究結果

OCT4、NANOG遺伝子の発現量を評価したがいずれも標準範囲であった。また、*in vitro*の三胚葉分化について、いずれの株も良好な分化能を示した。特に神経細胞の前駆細胞である外胚葉前駆細胞については、いずれも70%以上の分化能を示した(図2)。

## D. 考察

今回検討したiPS細胞株はいずれも良好な外胚葉への分化指向性を示し、本研究での神経分化実験も効率よく実施できる可能性が示された。

## E. 結論

既存の健康人ドナー由来iPS細胞株6株について、良好な分化能を確認できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Grajcarek J, Monlong J, Nishinaka-Arai Y, Nakamura M, Nagai M, Matsuo S, Loughed D, Sakurai H, Saito MK, Bourque G, Woltjen K. Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations. *Nat Commun.* 2019 Oct 24;10(1):4856. doi: 10.1038/s41467-019-12829-8.
2. Shiba T, Tanaka T, Ida H, Watanabe M, Nakaseko H, Osawa M, Shibata H, Izawa K, Yasumi T, Kawasaki Y, Saito MK, Takita J, Heike T, Nishikomori R. Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Sep 13. pii: S0091-6749(19)31039-5. doi: 10.1016/j.jaci.2019.07.039. [Epub ahead of print]

- PPMID: 31542286.
3. Lin CY, Yoshida M, Li LT, Ikenaka A, Oshima S, Nakagawa K, Sakurai H, Matsui E, Nakahata T, Saito MK\*. iPSC-derived functional human neuromuscular junctions model the pathophysiology of neuromuscular diseases. **JCI Insight**. 2019 Sep 19;4(18). pii: 124299. doi: 10.1172/jci.insight.124299. PubMed PMID: 31534050.
  4. Ohta R, Sugimura R, Niwa A, Saito MK\*. Hemogenic Endothelium Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells in A Feeder- and Xeno-free Defined Condition. **J Vis Exp**. 2019 Jun 16;(148). doi: 10.3791/59823. PMID: 31259914
  5. Kanazawa N, Honda-Ozaki F, Saito MK. Induced pluripotent stem cells representing Nakajo-Nishimura syndrome. **Inflamm Regen**. 2019 May 23;39:11. doi: 10.1186/s41232-019-0099-8. eCollection 2019. Review.
  6. Kunitomo K, Honda-Ozaki F, Saito MK, Furukawa F, Kanazawa N. Beneficial effect of methotrexate on a child case of Nakajo-Nishimura syndrome. **J Dermatol**. 2019 May 6. doi: 10.1111/1346-8138.14907. [Epub ahead of print].
  7. Matsubara H, Niwa A, Nakahata T, Saito MK\*. Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immunotherapy under chemically defined conditions. **Biochem Biophys Res Commun**. 2019 Apr 2. pii: S0006-291X(19)30474-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.085. [Epub ahead of print]
  8. 齋藤潤. 希少難治性疾患研究の将来展望 分子リウマチ治療. 12(1):1-3, 2019
  9. 齋藤潤. iPS 細胞を用いた自己炎症疾患の病態解明 リウマチ科. 61(5):447-452, 2019
- 2. 学会発表**
1. Megumu K. Saito : PRULIPOTENT STEM CELL DERIVED MYELOID CELL LINES FOR DISSECTING THE MECHANISM OF AUTOINFLAMMATION. . ISSAID2019 , 2019/04/01, 口頭, 国内.
  2. Megumu K. Saito : Disease Modeling of Pediatric Diseases with iPSCs. The 4th TMU International Symposium for Cell Therapy and Regenerative Medicine, 2019/09/19, 口頭, 国内.
  3. 齋藤潤 : 疾患 iPS 細胞の病態解析と創薬への応用について. 再生医療 JAPAN, 2019/10/11, 口頭, 国内.
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
    1. (特許申請) 分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法(齋藤潤, 丹羽明, 杉村竜一, 太田諒)出願番号 : 特願 2019-086767

図1：分化能評価法の概要（上）と代表的な分化能評価結果（下）

# 1) STEMdiff Trilineage differentiation kit (StemCell Technologies)

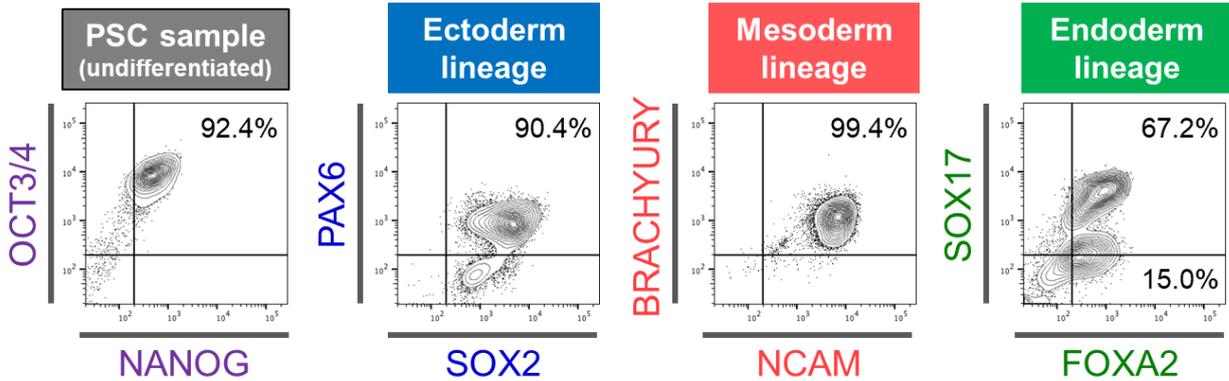
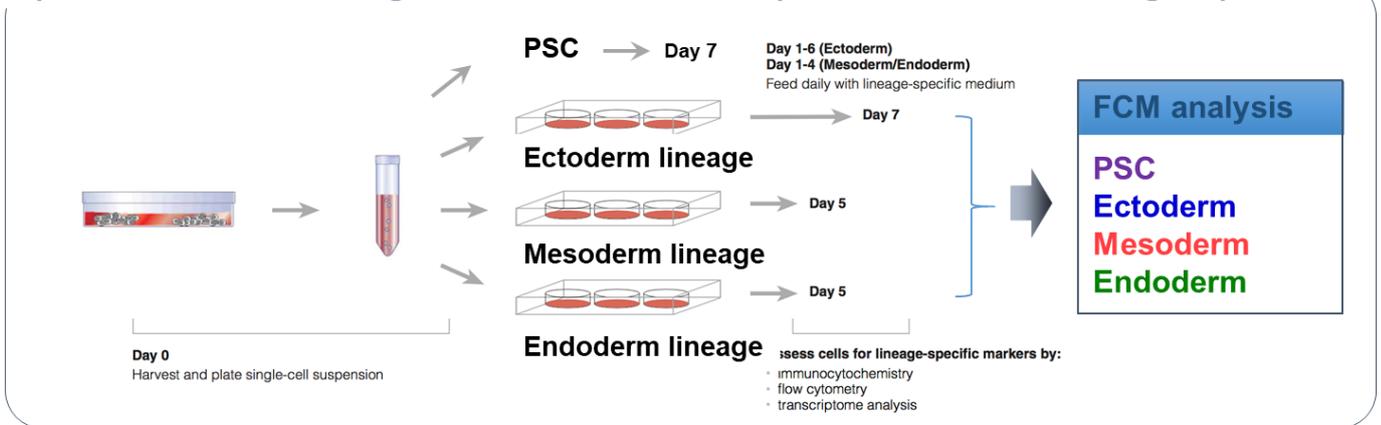
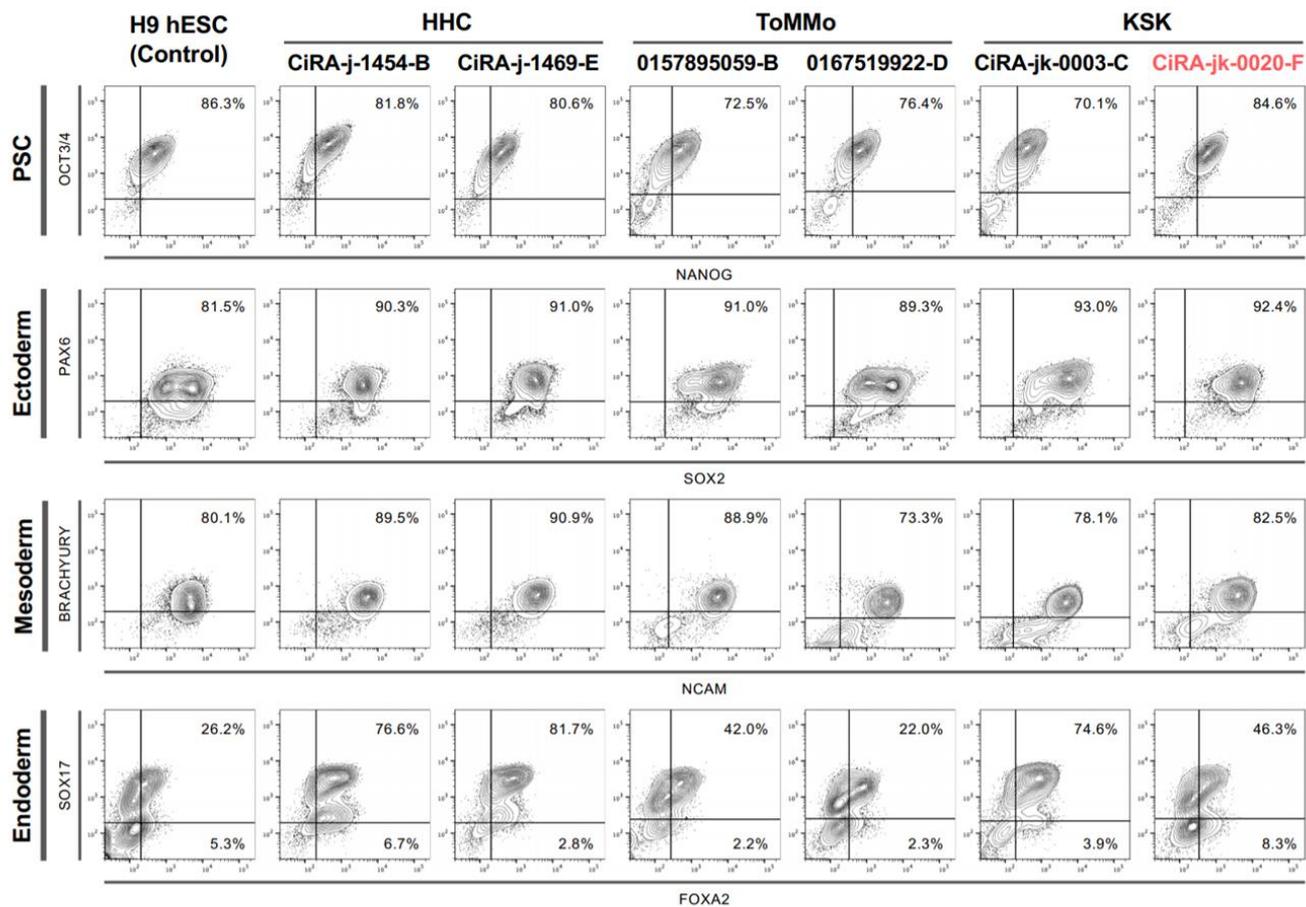


図2：iPS細胞株の分化能。右端は対照ES細胞株(H9)。



Copyright © 2019 Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University. All rights reserved

## 研究要旨

本研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的とし、OECDと共有している化学物質のリストをもとにインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性あるいは反復投与による神経毒性評価を行う。

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

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

## A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、OECDと共有している化学物質のリストをもとにインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性あるいは反復投与による神経毒性評価を行う。

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

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

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

## B. 研究方法

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

残り半数の児動物は出生後 77 日（PND 77）まで被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日目（成熟後）に各群 10 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。

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

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

鉛塩化鉛曝露実験では、雌児動物で PND 21, PND

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

（倫理面の配慮）

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

## C. 研究結果

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

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

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

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

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

5)。

#### D. 考察

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

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

#### E. 結論

ラットを用いた塩化鉛とエタノールの発達期曝露で生後に始まる海馬の神経新生における顆粒細胞系譜のうち、神経前駆細胞を標的とした発達神経毒性を検出した。それには GABA 性介在ニューロンの傷害性を介した機序が推定された。塩化アルミニウムに関しては、神経新生に対する傷害性について検討を実施している。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

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

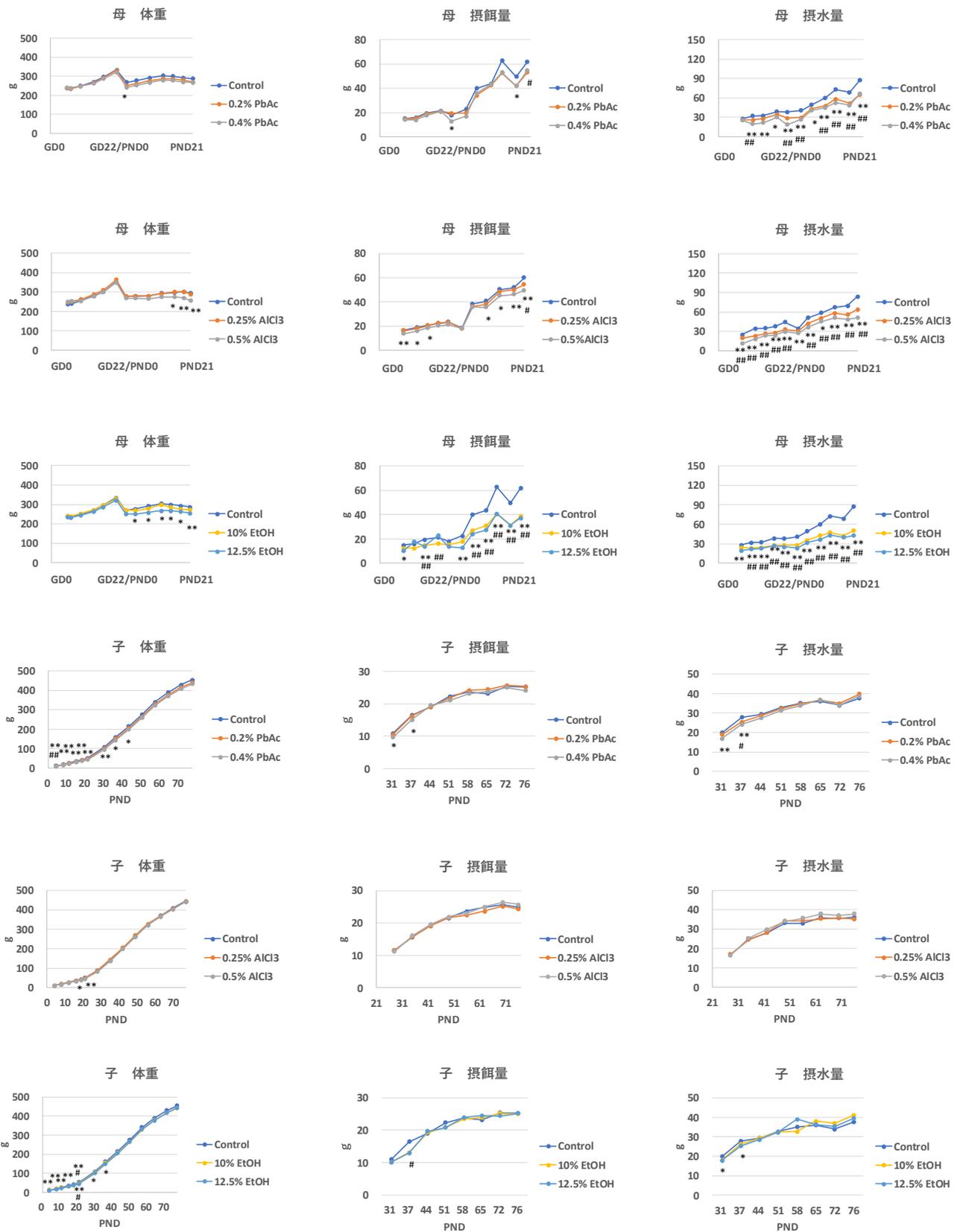


図1 母動物、児動物の体重、摂餌量、摂水量

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

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

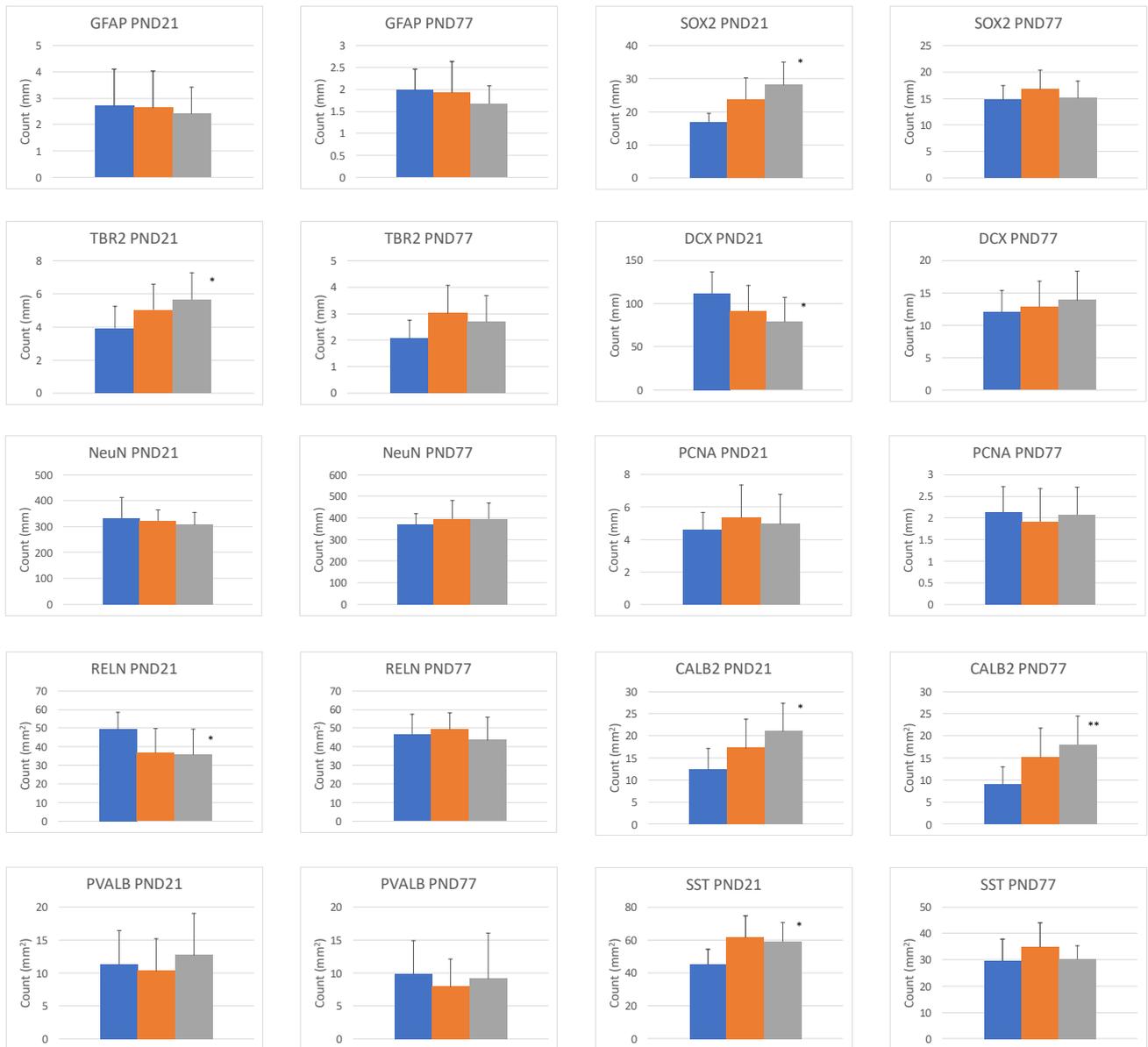


図2 酢酸鉛の免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量  
 \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

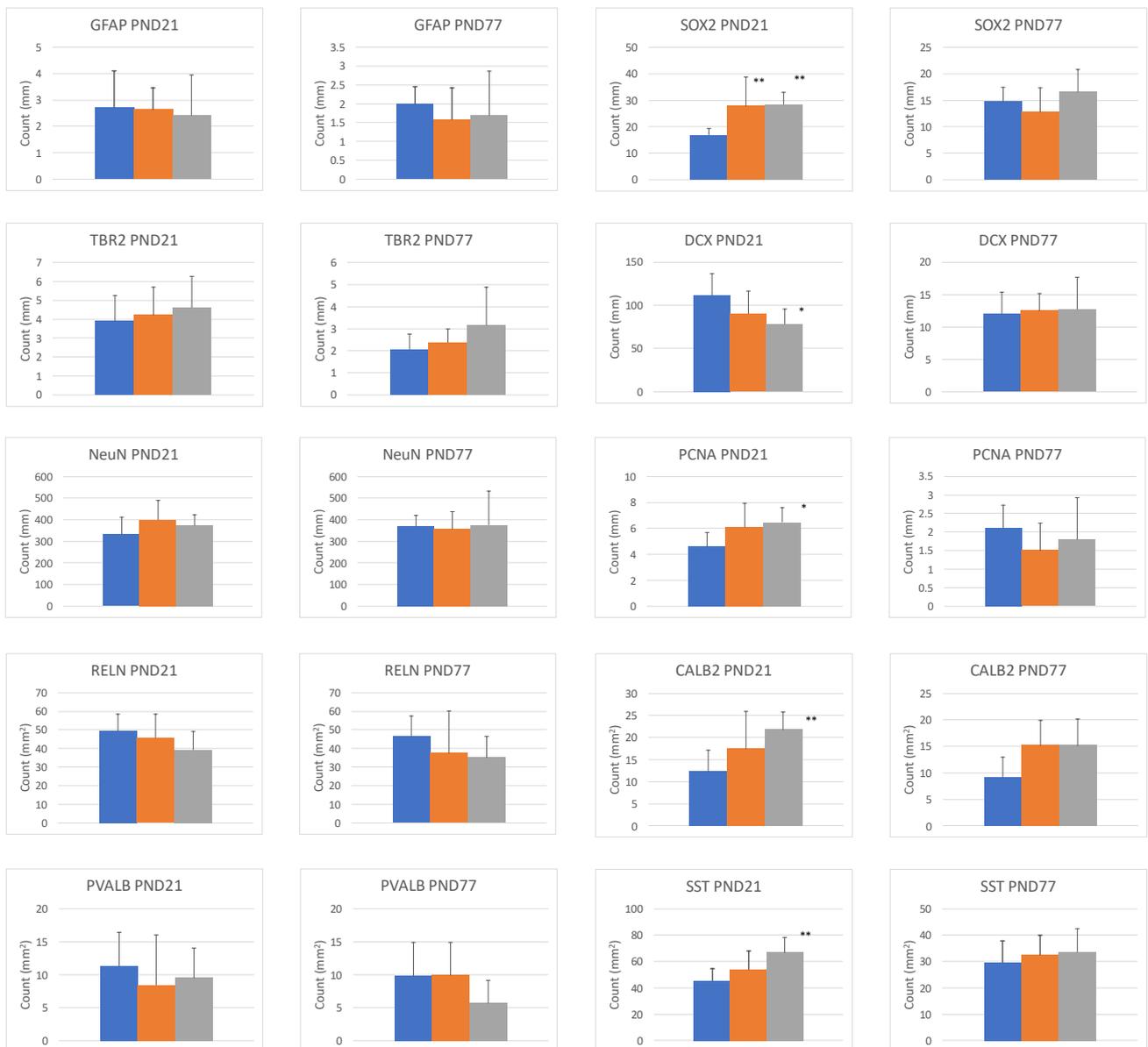


図3 エタノールの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

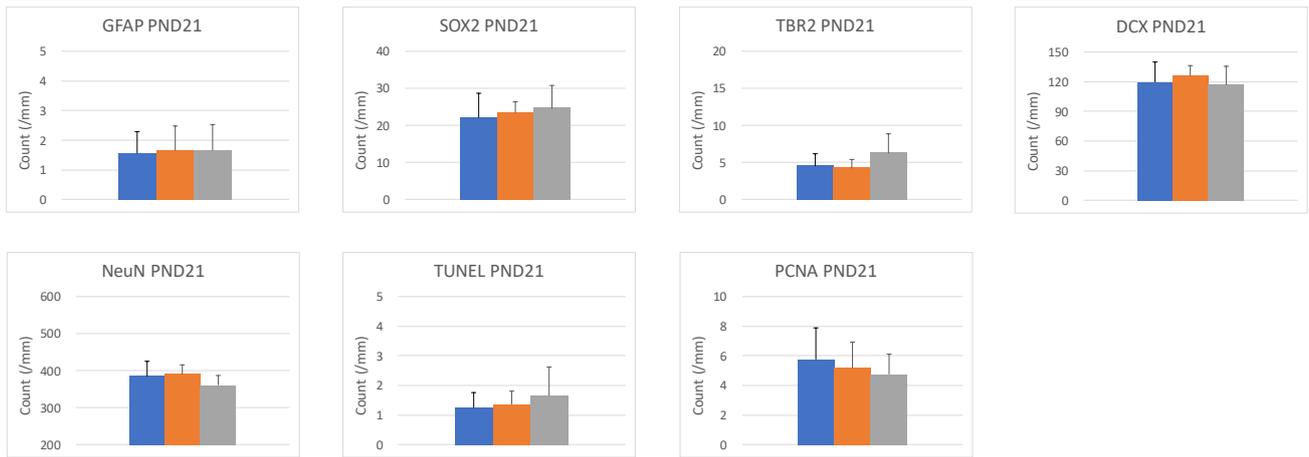


図4 塩化アルミニウムの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量

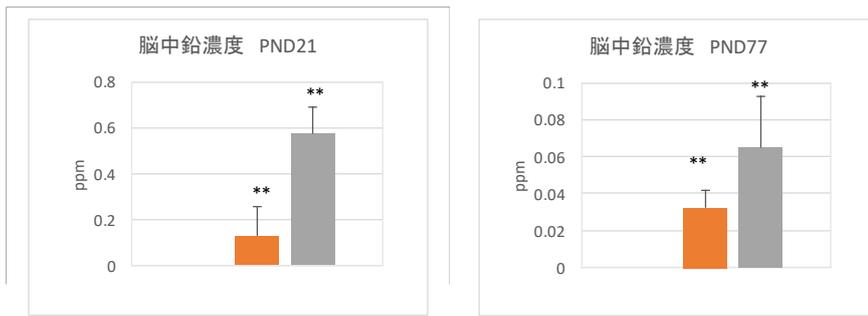


図5 誘導結合プラズマ質量分析による脳中鉛濃度 左から対照群、低用量、高用量  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. untreated control by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

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

発達期・反復投与毒性試験

研究分担者

豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系  
吉田 祥子

要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

全ての動物執権は豊橋技術科学大学動物実験委員会の指針および文部科学省動物

実験倫理規程に基づきに基づき、審査の上実施する。

C. 研究結果

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

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

#### D. 考察

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

#### E. 結論

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

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

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

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

#### G. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許・特許出願

なし。

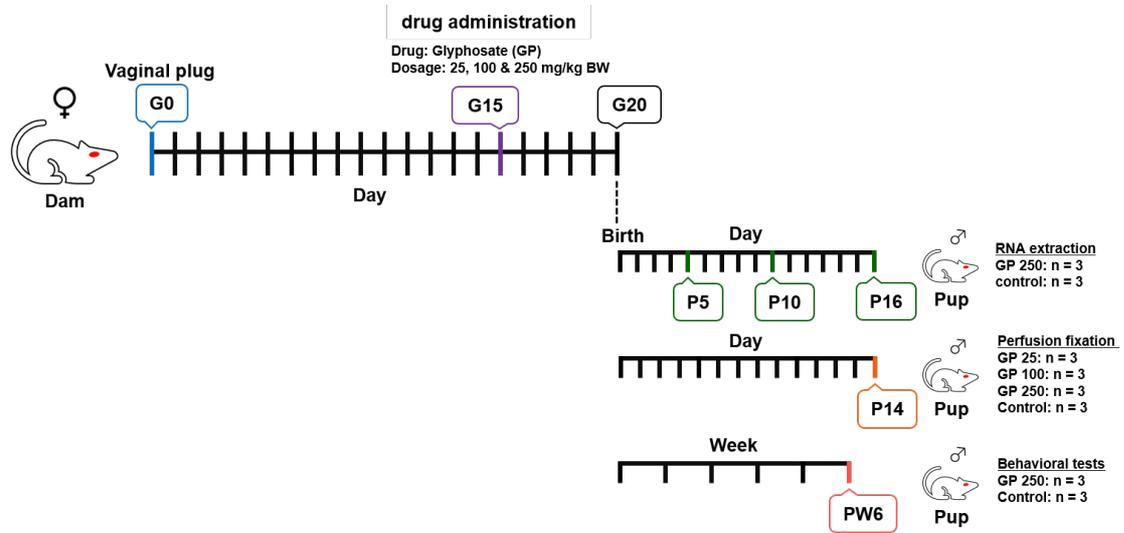
##### 2. 実用新案登録

なし。

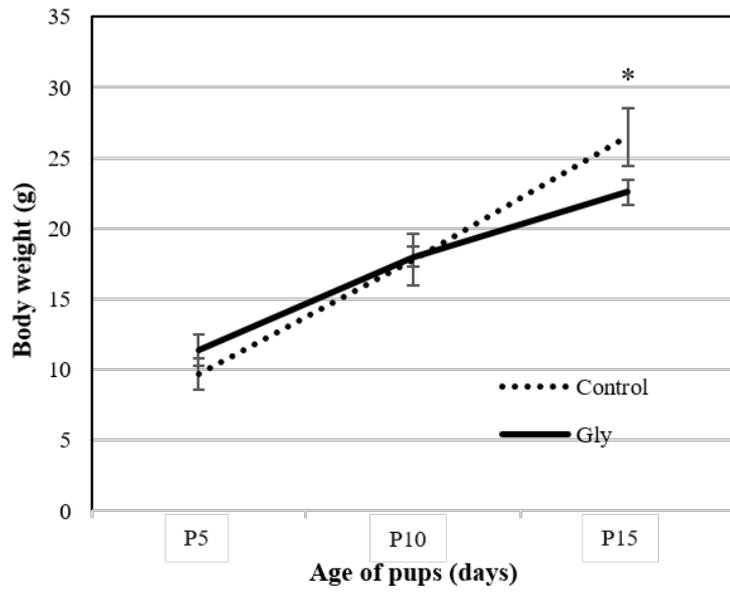
##### 3. その他

なし。

図 1

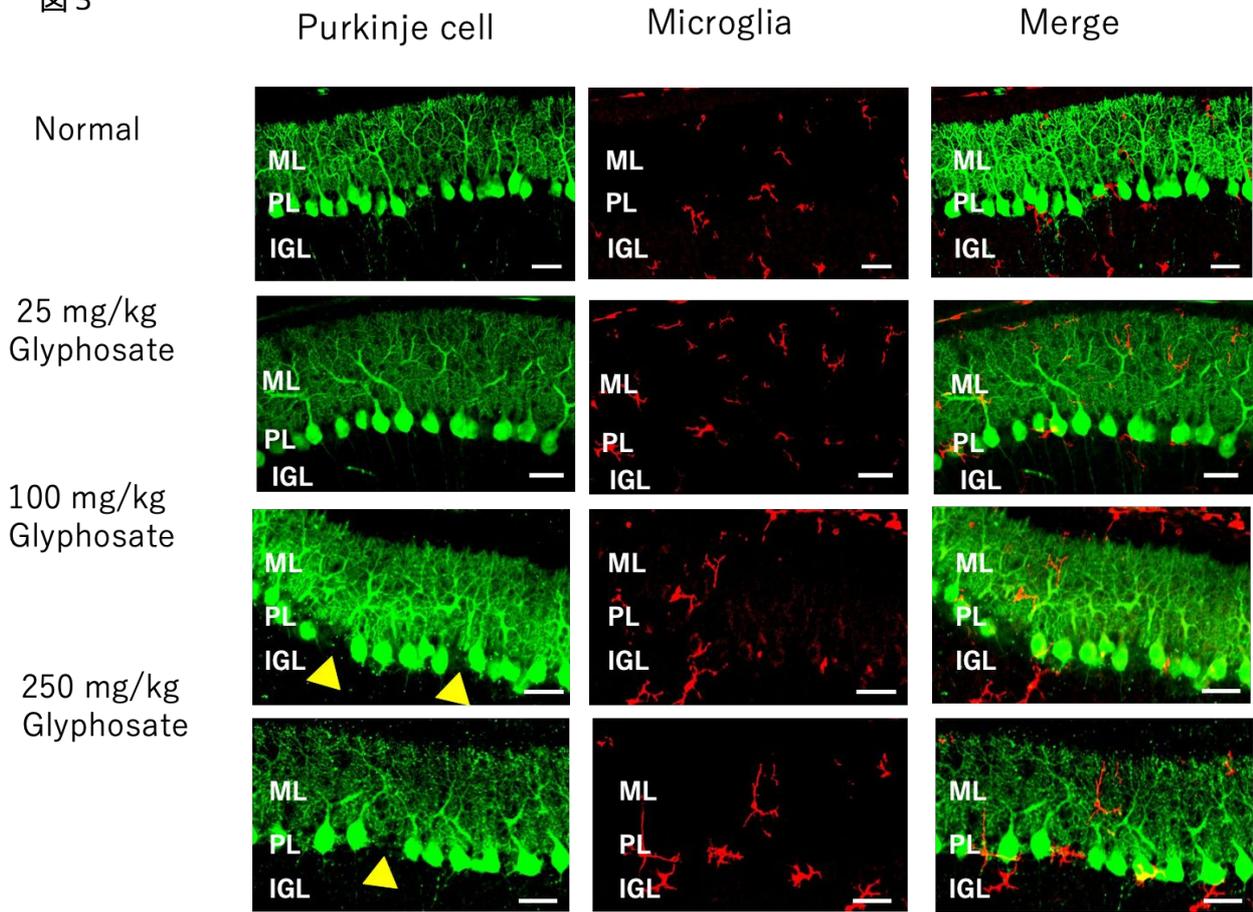


投与と試料調整のスケジュール

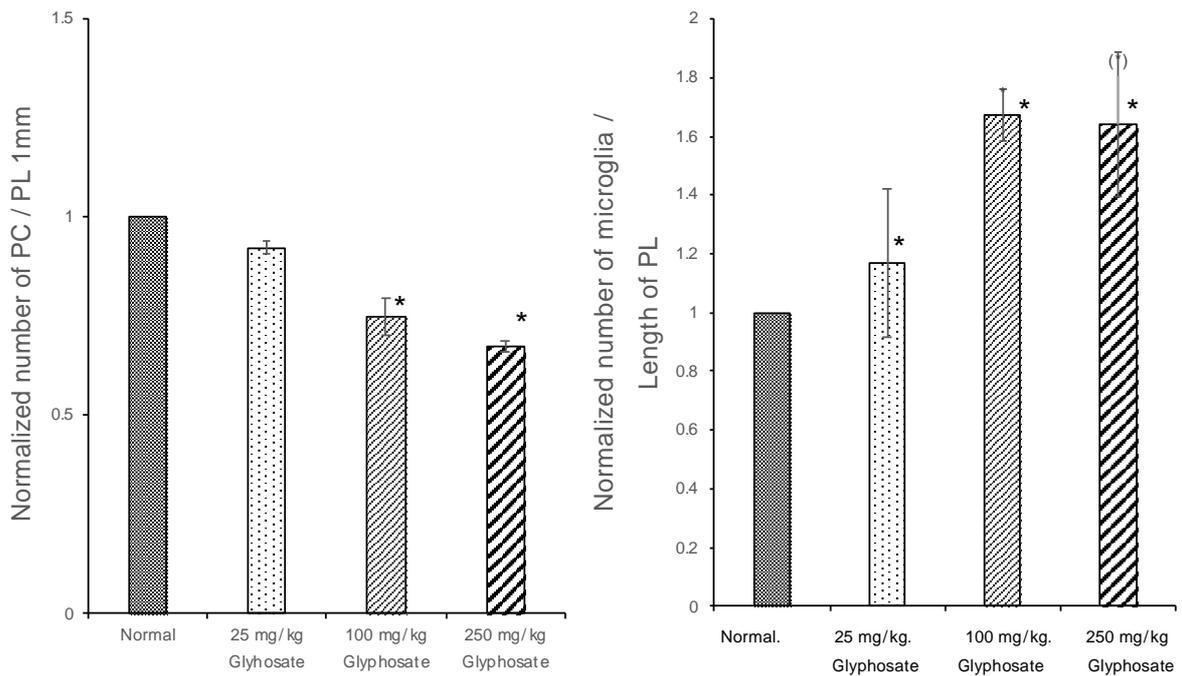


成長曲線

図 3

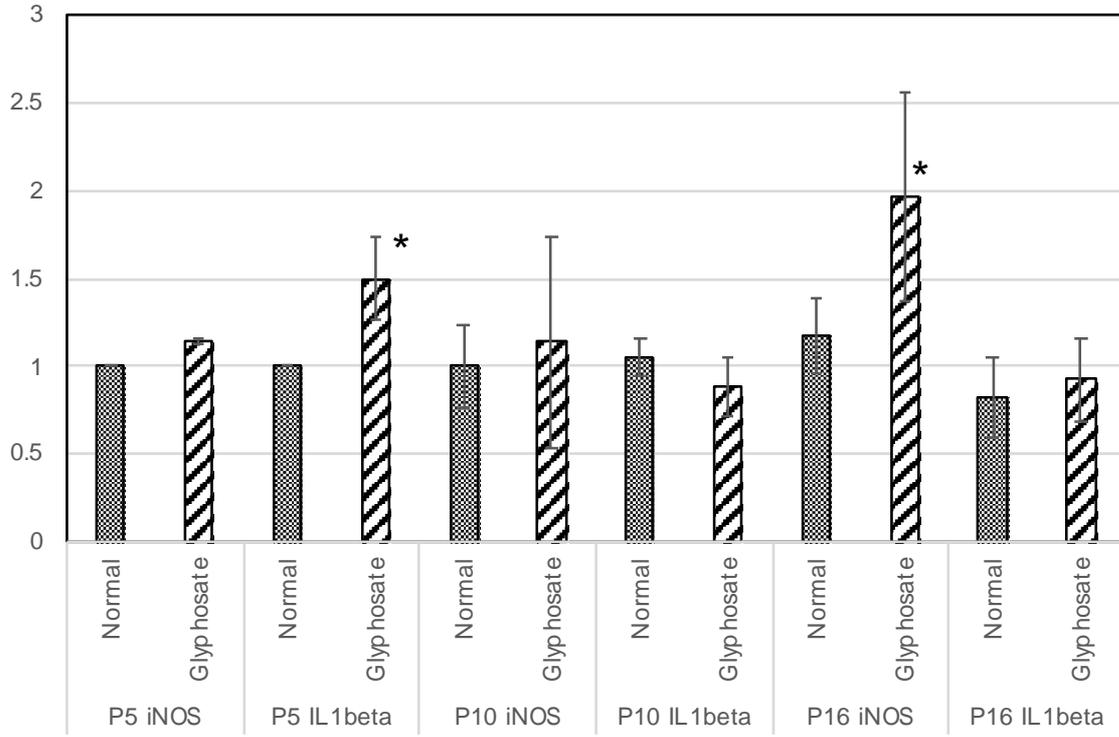


グリホサート投与による神経細胞の変化（緑）とミクログリア分布（赤）



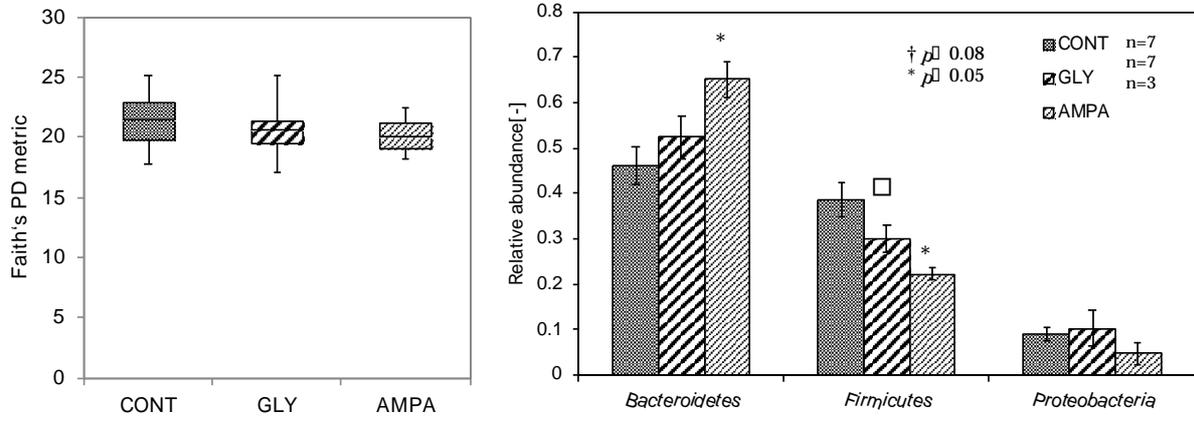
グリホサート投与による神経細胞の減少（左）とミクログリア増加（右）

4

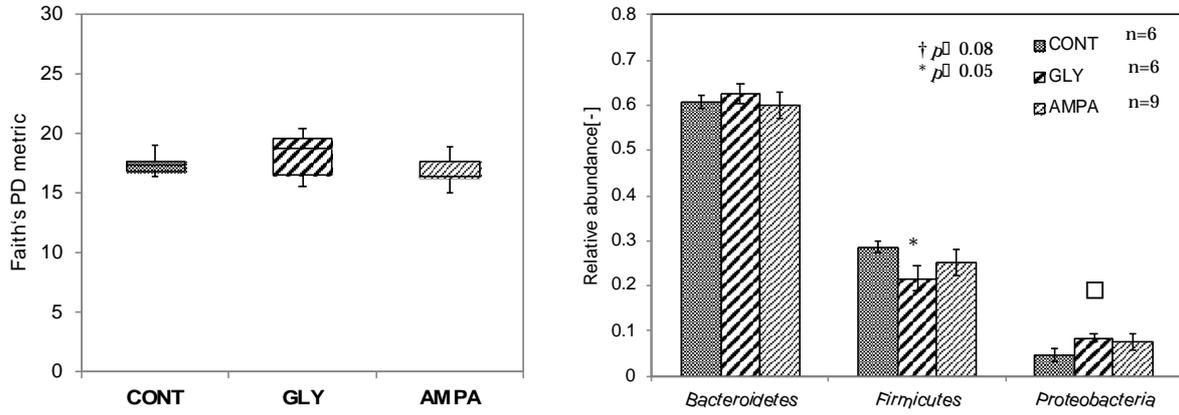


発達依存的サイトカイン発現量の変化

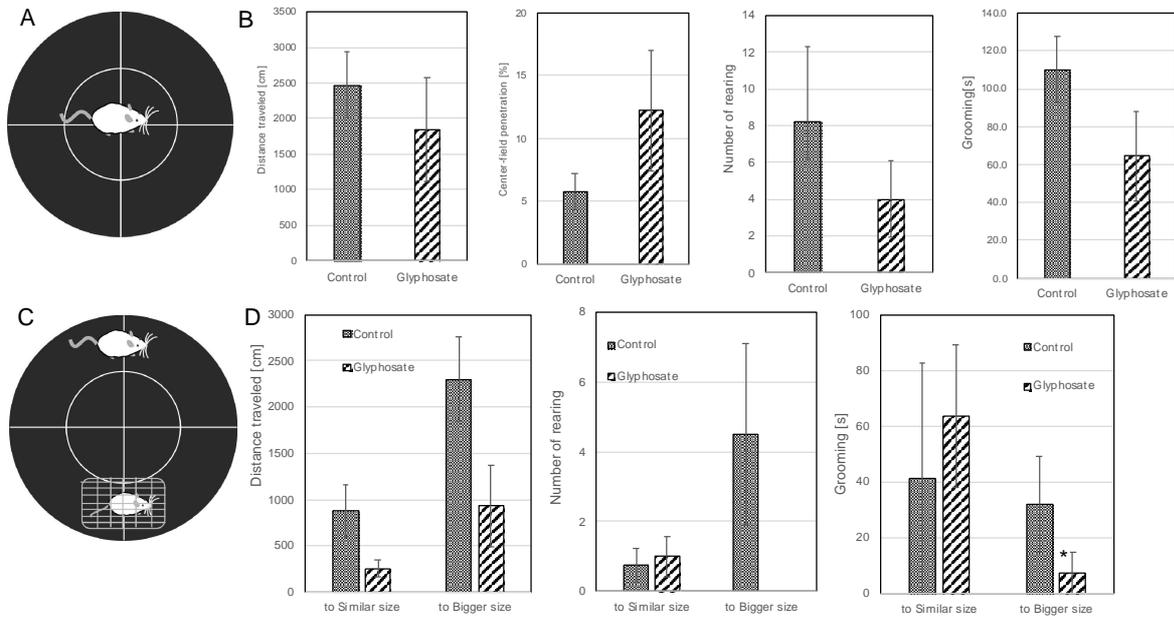
☒ 5



グリホサート投与妊娠動物の G20 での腸内細菌叢の変化



胎児期グリホサート投与動物の P28 での腸内細菌叢の変化



グリホサート 投与動物の6週での行動試験。

神経毒性のインシリコ予測・評価手法開発

研究分担者 吉成 浩一 静岡県立大学薬学部 教授

## 研究要旨

本研究の最終目的は、既存の動物実験データを収集し、それらを利用して神経毒性・発達神経毒性を誘発する化学物質の構造的・物理化学的特徴を同定すること、並びに毒性判別モデルを構築することである。本年度はまず、文献情報等から発達神経毒性を示す物質と示さない陰性物質を抽出し、両物質群間における物理化学的特徴の差を分子記述子データを基に比較解析した結果、陽性物質では塩素原子等のハロゲン数が多く、脂溶性や不飽和度が高いことなどが明らかになり、発達神経毒性と組織・胎児への移行性との関連が示唆された。他方、食品安全委員会で開催されている農薬評価書からラットの繁殖毒性試験及び発生毒性試験の情報を抽出して整理した。今後、毒性所見の整理を進めてデータベースを完成させることで、神経毒性・発達神経毒性を示す化学物質の物理化学的特徴の解明、陽性物質のグループ化並びに神経毒性・発達神経毒性判別モデルの構築が可能になると期待される。

研究分担者  
吉成 浩一 静岡県立大学薬学部 教授

### A. 研究目的

近年、インシリコ手法による化学物質の毒性予測・評価が行われているが、反復投与毒性、発がん性、神経毒性・発達神経毒性など、毒性発現機序が複雑な毒性については、公的に利用可能な動物試験結果データベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで本研究では、既存の動物実験データを収集してデータベースを構築し、それらを利用して神経毒性・発達神経毒性を誘発する化学物質の構造的特徴を明らかにすること、さらには毒性判別モデルを構築することを最終目標とした。

### B. 研究方法

#### 化学構造的特徴の解析

文献情報等から発達神経毒性を示すと考えられる175物質並びに発達神経毒性を示さないと考えられる44物質の情報を抽出した。これら219物質について、化学名やCAS番号から二次元化学構造をChem Draw Professional (PerkinElmer)により描画した。次いで、Chem3D (PerkinElmer)のMM2コマンドにより構造最適化を行い、三次元(3D)構造を取得した。得られた3D構造に基づき分子記述子計算ソフトウェアであるDragon 7 (Talet)により分子記述子を計算した。統計的解析にはMicrosoft Excel及びJMP Pro 14 (SAS Institute)を使用した。

#### 毒性試験データの収集

食品安全委員会で開催されている農薬評価書をダウンロードし、ラットの二世代(又は三世代)繁殖毒性試験及び発生毒性試験の情報を抽出した。得られた情報はMicrosoft Excelを利用して整理した。

(倫理面の配慮)

本研究では動物実験データを利用した解析を行うため、倫理的配慮を必要とする情報は含まれない。

### C. 研究結果

#### 1. 発達神経毒性と関連する構造的特徴

Dragon 7で計算された5270種の分子記述子について、

175種の発達神経毒性陽性物質及び44種の陰性物質間でWelchのt検定を行った。その結果、517記述子の平均値が有意( $P < 0.05$ )に異なることが明らかになった。このうち、 $P < 0.01$ であったのが303記述子、 $P < 0.001$ であったのが172記述子であった。P値が小さいものから上位30種類を表1に示した。塩素等のハロゲン原子や脂溶性に関連するものが多かった。一方で、構造的特徴が分かりにくい記述子も多く認められた。

Dragon 7では各記述子をいくつかのグループに分けていることから、比較的化学構造的な理解をしやすい基本記述子群「Constitutional indices」と官能基数「Functional group counts」のグループにおいて有意差( $P < 0.05$ )が認められた記述子をそれぞれ表2及び表3に示した。

分子量に両群で有意な差は認められなかったが、ハロゲン関連記述子に加え、AMW(平均分子量:分子量を原子数で除した値)、nHM(重原子数:原子量が酸素より大きい原子数)、nCsp2(Sp2:炭素間結合数)、nAB(芳香族性結合数)、nMB(多重結合数)が陽性物質で多く、H%(水素原子数の割合)、O%(酸素原子数の割合)、nO(酸素原子数)が陽性物質で有意に小さかった(表2)。これらの結果は、陽性物質では脂溶性が高いことを示しており、組織・胎児移行性と関連しているのかもしれない。

官能基では、nHDon(水素結合ドナー数)、nROH(脂肪族ヒドロキシ基数)、nRCOOH(脂肪族カルボン酸数)、nRCONR2(脂肪族アミド数)、nHBonds(分子内水素結合数)、nRNR2(3級アミン数)、nRNH2(2級アミン数)、nOHs(2級アルコール数)、nOHp(1級アミン数)が陽性物質に比べて陰性物質で大きかったのに対し、nCb-(ベンゼン環における置換基数)やnArX(芳香環における置換基数)、nCar(芳香族/sp2炭素の数)が陽性物質で大きい値を示した。陰性物質では水溶性が高い官能基が多く、解毒排泄されやすいことを示唆する結果と考えられる。

#### 2. 発達神経毒性判別モデル構築の予備検討

「Functional group counts」グループの記述子は構造的な特徴を理解する上で有用であること、また上記の統計解析で発達神経毒性陽性物質ではハロゲン関連

記述子の値が大きかったことから、「Functional group counts」グループに含まれる 101 種の記述子に nX（ハロゲン原子数）、nCL（塩素原子数）及び nF（フッ素原子数）の 3 記述子を加えた 104 記述子を説明変数として、JMP Pro を利用して決定木解析を行った。

バギング法（ブートストラップ法）により複数の木を作成し、高い頻度で利用され、発達神経毒性判別に重要と考えられる記述子を探索した結果、nROH（脂肪族ヒドロキシ基数）、nHDon（水素結合ドナー数）、nX（ハロゲン原子数）及び nCbH（ベンゼン環における未置換水素数）の 4 記述子を選出された。これらはいずれも発達神経毒性陽性群と陰性群で有意に異なる記述子として同定されたものであった（表 1~3）。各物質について 4 記述子の分布を調べてみると、表 1~3 に示した通り、nHDon や nROH では陰性物質で高い傾向が、nX や nCbH では陽性物質で高い傾向が認められた（図 1）。

次に、これら 4 記述子のうち 1 つが第 1 分岐となる決定木をそれぞれ作成し、誤判別率が 10%以下であった判別条件（記述子単独又は組合せ）を抽出した結果、上述の 4 記述子に加えて、nRCONR2（アミド結合数）、nHBonds（分子内水素結合数）並びに nCar（芳香族/sp<sup>2</sup>炭素の数）と nROH の組合せが同定された。

そこで、これら記述子を用いて全 219 物質を最もよく判別できるモデルの構築を試みた。得られたモデルを図 2 に示した。このモデルの一致率は 0.890（219 物質中 195 物質一致）、陽性物質を陽性と判定する感度は 0.954（175 物質中 167 物質一致）、陰性物質を陰性と判定する特異度は 0.636（44 物質中 28 物質一致）であり、非常に高い精度でデータセットの物質を分類できることが示された。

### 3. 毒性試験データの収集

食品安全委員会で開催されている農薬評価書について、ラット二世又は三世繁殖試験結果の記載内容を確認し、使用動物数が不明確な試験等を除いた 359 物質、418 試験の結果を入手できた。得られた情報は Microsoft Excel を利用して整理した。

具体的には、親（二世試験では P 及び F1）シートと仔（二世試験では F1 及び F2）シートに分け、系統や投与量などの試験情報、無毒性量や繁殖能への影響などの試験結果概要、ならびに認められた個別の所見とその投与量の情報を、世代、雌雄別に整理した（図 3）。

最終的には親で 1100 所見、仔で 492 所見が得られた。これら所見のうち、当研究室で以前に作成したラット反復投与毒性試験データベース（Masuda et al, *Yakugaku Zasshi*, 137: 611-622, 2017）に基づいて作成した類義語集（シソーラス）に掲載されているものにはそのコード番号を付与した。妊娠、出産など繁殖に関連する所見は本類義語集にはないことから、現在これらの所見の整理を進めている。

発生毒性試験についても同様の作業を進めて試験情報・毒性所見の抽出を行い、270 物質、341 試験の情報を収集した。所見数は親で 550、仔で 490 であった。

## D. 考察

### 発達神経毒性物質の化学構造的特徴

発達神経毒性を生じる化学物質の構造化学的な特徴を明らかにするために、既知の情報をもとに発達神経毒性陽性物質並びに陰性物質を選出し、物理化学及び構造的特徴量の指標である分子記述子を掲載して両群物質間での差異を解析した。その結果、陽性物質は、ハロゲン原子を多く含み、脂溶性が高いことが示唆された。これらの結果は、例外物質はあるものの、発達神経

毒性を示す物質は組織移行性が高く、陰性物質群に比べて脳血液関門や胎盤血液関門などを通過しやすいことを示している。

さらに、発達神経毒性を化学構造から予測可能なモデルの構築を最終的なゴールとし、本年度は比較的解析しやすい官能基数や原子数などの限られた分子記述子を利用して決定木解析による判別分類モデルの作成を試みた。その結果、7 つの記述子により一致率 0.890 のモデルを構築することができた。

作成した決定木の感度（陽性物質の的中率）は 0.954 と高かったが、特異度（陰性物質の的中率）は 0.636 と低かった。これは用いたデータセットが、陽性物質 175 種、陰性物質 44 種と物質数に偏りがあったことによるものと考えられる。実験バイアスや報告バイアスのため、一般的に毒性物質に比べて、非毒性物質の情報は限られている。本研究では生殖発生毒性試験の情報を収集しデータベース化を進めていることから、本データベースにより得られた陰性物質を今後追加して解析データのインバランスを解消することで、感度と特異度のバランスが取れたモデルの構築が可能になると考えている。

また、通常の機械学習においては、データセットを学習用データと検証用データに分割して、学習用データで作成したモデルを検証用データで検証する、いわゆる外部検証が行われる。しかしながら本研究では、入手できた物質情報が少なかったため、外部検証を行っていない。このため、作成したモデルの適応範囲が、用いた化学物質に限定される可能性は否定できない。今後本研究で作成しているデータベースを利用するなど、物質数を拡充して外部検証を行いながら発達神経毒性予測モデルの構築を進める予定である。

### ラット毒性試験データの収集

発達神経毒性や神経毒性に関する公開データベースはなく、機械学習等を用いた解析は困難である。実際、本研究でも既知見から収集できた物質数は非常に限られていた。それらを踏まえて本研究では、公開されているラット生殖発生毒性試験のデータベース化も併せて進めている。現時点で、食品安全委員会で開催されている農薬評価書から入手可能な繁殖毒性試験データについてはほぼすべてのデータ収集が終了した。前述の通り、ラット反復投与毒性試験で認められる所見に関しては当研究室で作成した類義語集に基づいて所見名の整理を行っているが、繁殖試験では妊娠、出産に関する未登録の所見が非常に多く認められた。そこで、これら所見のシソーラスの作成を始めた。所見整理が終了次第、入力データのダブルチェックを行い、データベースを完成させる予定である。

本研究では、繁殖毒性試験に加えて発生毒性試験に関してもデータベース化を進めている。これら生殖発生毒性試験のデータベースは世界的にも珍しく、データベース自体としても非常に貴重なものになると思われる。さらに、全所見の中から、神経毒性・発達神経毒性と考えられる所見を定義することで、統計学解析による発達神経毒性と関連する化学構造的特徴の同定や、機械学習を利用した発達神経毒性予測モデルの構築に関する研究が飛躍的に進むものと期待している。

さらに、本毒性試験データは、共同研究者が実施している発達神経毒性インビトロ評価系で使用される被験物質の選択にも非常に有用であると考えている。一般的に評価系の構築には典型的な毒性物質、非毒性物質が用いられるが、その陽性・陰性の判定は、各物質で個別に行われており、体系的に評価されているわけではな

い。そこで、本毒性試験データベースを利用して陽性及び陰性検証物質を選択して試験系の構築を進めることで、インビボ試験（毒性）とインビトロ試験の関連性が明確になり、評価系の信頼性向上につながることを期待される。

#### **E. 結論**

既存の発達神経毒性情報を利用して、発達神経毒性を示す物質の物理化学的・構造的特徴の一端を明らかにした。また、既存の情報が非常に限られていることから、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験データベースのプロトタイプを構築した。

#### **F. 研究発表**

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### **G. 知的所有権の取得状況**

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

表 1 発達神経毒性陽性物質及び陰性物質間で有意差が認められた分子記述子（上位30種）

記述子	P 値	平均値		中央値		最大値		最小値	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<b>P_VSA_ppp_hal</b>	1.12E-10	44.883	2.669	0.000	0.000	391.486	78.297	0.000	0.000
<b>nX</b>	5.95E-10	1.474	0.068	0.000	0.000	17.000	2.000	0.000	0.000
<b>ALOGP2</b>	7.43E-10	16.080	5.211	10.700	2.250	111.674	30.424	0.000	0.000
<b>MLOGP2</b>	1.26E-08	11.723	4.628	6.972	2.811	51.296	22.991	0.000	0.007
<b>X%</b>	3.90E-08	5.318	0.327	0.000	0.000	57.692	11.765	0.000	0.000
<b>H0p</b>	4.08E-08	1.444	1.046	1.210	1.088	5.677	1.618	0.412	0.603
<b>ALOGP</b>	8.22E-08	3.172	1.018	3.271	1.223	10.568	5.516	-2.484	-2.974
<b>P_VSA_v_3</b>	1.40E-07	127.119	75.369	111.272	75.793	396.620	154.260	0.000	0.000
<b>R3p+</b>	1.59E-07	0.039	0.024	0.026	0.023	0.243	0.047	0.000	0.011
<b>Eta_alpha_A</b>	2.01E-07	0.494	0.464	0.487	0.471	0.754	0.501	0.358	0.417
<b>R2p+</b>	2.61E-07	0.049	0.035	0.038	0.034	0.179	0.066	0.012	0.015
<b>P_VSA_p_3</b>	3.39E-07	125.180	75.341	110.923	75.793	396.620	154.260	0.000	0.000
<b>HATS2p</b>	5.10E-07	0.159	0.115	0.131	0.113	0.575	0.225	0.041	0.048
<b>R4p+</b>	5.92E-07	0.030	0.019	0.020	0.017	0.149	0.039	0.000	0.012
<b>SpPosA_B(m)</b>	6.94E-07	1.518	1.398	1.414	1.380	3.053	1.679	1.166	1.308
<b>BIC3</b>	7.84E-07	0.735	0.817	0.773	0.824	0.938	0.947	0.000	0.541
<b>P_VSA_ppp_L</b>	9.68E-07	99.286	56.433	82.181	52.821	391.486	129.577	0.000	0.000
<b>BIC4</b>	1.04E-06	0.747	0.830	0.776	0.839	0.951	0.966	0.000	0.541
<b>HATSp</b>	1.27E-06	3.325	2.479	2.880	2.594	14.376	3.743	0.771	1.066
<b>nCL</b>	1.74E-06	0.743	0.068	0.000	0.000	10.000	2.000	0.000	0.000
<b>H0v</b>	2.07E-06	1.261	1.017	1.160	1.022	3.504	1.481	0.386	0.526
<b>P_VSA_e_4</b>	2.12E-06	28.858	2.669	0.000	0.000	391.486	78.297	0.000	0.000
<b>NsCl</b>	2.12E-06	0.960	2.386	0.000	2.000	8.000	6.000	0.000	0.000
<b>F01[C-Cl]</b>	2.12E-06	0.737	0.068	0.000	0.000	10.000	2.000	0.000	0.000
<b>Mp</b>	2.15E-06	0.693	0.638	0.674	0.648	1.119	0.760	0.496	0.529
<b>HATS0p</b>	2.21E-06	0.194	0.102	0.112	0.088	1.802	0.256	0.025	0.031
<b>H2m</b>	2.33E-06	1.516	0.899	1.130	0.837	7.437	2.360	0.003	0.052
<b>T(O..Cl)</b>	2.54E-06	7.434	0.409	0.000	0.000	108.000	18.000	0.000	0.000
<b>X0Av</b>	2.73E-06	0.634	0.586	0.612	0.592	0.977	0.646	0.421	0.497
<b>SsCl</b>	2.75E-06	4.386	0.389	0.000	0.000	65.668	11.160	0.000	0.000

ハロゲン原子又は脂溶性に関わる記述子を太字で示した。

P\_VSA\_ppp\_hal, P\_VSA-like on potential pharmacophore points, hal - halogen atoms; nX, number of halogen atoms; ALOGP2, squared Ghose-Crippen octanol-water partition coeff. ( $\log P^2$ ); MLOGP2, squared Moriguchi octanol-water partition coeff. ( $\log P^2$ ); X%, percentage of halogen atoms; H0p, H autocorrelation of lag 0 / weighted by polarizability; ALOGP, Ghose-Crippen octanol-water partition coeff. ( $\log P$ ); P\_VSA\_v\_3, P\_VSA-like on van der Waals volume, bin 3; R3p+, R maximal autocorrelation of lag 3 / weighted by polarizability; Eta\_alpha\_A, eta average core count; R2p+, R maximal autocorrelation of lag 2 / weighted by polarizability; P\_VSA\_p\_3, P\_VSA-like on polarizability, bin 3; HATS2p, leverage-weighted autocorrelation of lag 2 / weighted by polarizability; R4p+, R maximal autocorrelation of lag 4 / weighted by polarizability; SpPosA\_B(m), normalized spectral positive sum from Burden matrix weighted by mass; BIC3, Bond Information Content index (neighborhood symmetry of 3-order); P\_VSA\_ppp\_L, P\_VSA-like on potential pharmacophore points, L - lipophilic; BIC4, Bond Information Content index (neighborhood symmetry of 4-order); HATSp, leverage-weighted total index / weighted by polarizability; nCL, number of Chlorine atoms; H0v, H autocorrelation of lag 0 / weighted by van der Waals volume; P\_VSA\_e\_4, P\_VSA-like on Sanderson electronegativity, bin 4; NsCl, Number of atoms of type sCl; F01[C-Cl], Frequency of C - Cl at topological distance 1; Mp, mean atomic polarizability (scaled on Carbon atom); HATS0p, leverage-weighted autocorrelation of lag 0 / weighted by polarizability; H2m, H autocorrelation of lag 2 / weighted by mass; T(O..Cl), sum of topological distances between O..Cl; X0Av, average valence connectivity index of order 0; SsCl, Sum of sCl E-states.

表 2 発達神経毒性陽性物質及び陰性物質間で有意差が認められたConstitutional indicesの分子記述子

記述子	P 値	平均値		中央値		最大値		最小値	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
nX	5.95E-10	1.474	0.068	0.000	0.000	17.000	2.000	0.000	0.000
X%	3.90E-08	5.318	0.327	0.000	0.000	57.692	11.765	0.000	0.000
nCL	1.74E-06	0.743	0.068	0.000	0.000	10.000	2.000	0.000	0.000
Mp	2.15E-06	0.693	0.638	0.674	0.648	1.119	0.760	0.496	0.529
AMW	1.09E-05	9.237	7.664	7.986	7.351	27.981	12.119	4.760	5.774
nHM	1.22E-05	1.354	0.477	1.000	0.000	10.000	3.000	0.000	0.000
Mv	3.62E-05	0.657	0.612	0.642	0.618	1.045	0.746	0.461	0.516
nP	7.40E-04	0.143	0.023	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
H%	2.29E-03	42.551	47.124	44.444	47.018	66.667	58.824	0.000	29.412
nCsp2	6.87E-03	8.806	6.591	8.000	7.000	26.000	16.000	0.000	0.000
O%	7.50E-03	7.416	10.872	6.667	10.000	80.000	30.000	0.000	0.000
nAB	9.29E-03	7.760	5.500	6.000	6.000	27.000	16.000	0.000	0.000
nBM	1.86E-02	9.480	7.341	9.000	7.000	27.000	17.000	0.000	0.000
C%	2.17E-02	39.066	35.423	38.710	37.232	64.706	58.333	0.000	16.667
nO	2.52E-02	2.571	3.500	2.000	3.000	18.000	13.000	0.000	0.000
MW	0.125	310.227	274.065	294.340	258.830	1111.500	734.050	32.050	92.110

nX, number of halogen atoms

X%, percentage of halogen atoms

nCL, number of Chlorine atoms

Mp, mean atomic polarizability (scaled on Carbon atom)

AMW, average molecular weight

nHM, number of heavy atoms

Mv, mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom)

nP, number of Phosphorous atoms

H%, percentage of H atoms

nCsp2, number of sp2 hybridized Carbon atoms

O%, percentage of O atoms

nAB, number of aromatic bonds

nBM, number of multiple bonds

C%, percentage of C atoms

nO, number of Oxygen atoms

MW, molecular weight

表3 発達神経毒性陽性物質及び陰性物質間で有意差が認められたFunctional group countsの分子記述子

記述子	P 値	平均値		中央値		最大値		最小値	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
nHDon	1.90E-05	1.051	2.682	0.00	2.00	17.000	2.000	0.000	0.000
nROH	4.71E-05	0.280	1.409	0.00	1.00	57.692	11.765	0.000	0.000
nCb-	8.52E-05	2.560	1.318	2.00	1.00	10.000	2.000	0.000	0.000
nArX	1.64E-04	0.480	0.068	0.00	0.00	1.119	0.760	0.496	0.529
nCar	2.63E-03	7.160	4.841	6.00	6.00	27.981	12.119	4.760	5.774
nRCOOH	4.39E-03	0.074	0.341	0.00	0.00	10.000	3.000	0.000	0.000
nCbH	7.49E-03	3.943	2.545	3.00	3.00	1.045	0.746	0.461	0.516
nRCONR2	8.28E-03	0.017	0.182	0.00	0.00	1.000	1.000	0.000	0.000
nHBonds	1.42E-02	0.230	0.568	0.00	0.00	66.667	58.824	0.000	29.412
nRNR2	1.44E-02	0.074	0.250	0.00	0.00	26.000	16.000	0.000	0.000
nOHp	3.02E-02	0.040	0.250	0.00	0.00	80.000	30.000	0.000	0.000
nRSR	3.43E-02	0.034	0.205	0.00	0.00	27.000	16.000	0.000	0.000
nOHs	4.25E-02	0.091	0.432	0.00	0.00	27.000	17.000	0.000	0.000
nRNH2	4.44E-02	0.040	0.159	0.00	0.00	64.706	58.333	0.000	16.667
nR=Cs	4.91E-02	0.434	0.205	0.00	0.00	18.000	13.000	0.000	0.000
nHDon	1.90E-05	1.051	2.682	0.00	2.00	1111.500	734.050	32.050	92.110

nHDon, number of donor atoms for H-bonds (N and O)

nROH, number of hydroxyl groups

nCb-, number of substituted benzene C(sp<sup>2</sup>)

nArX, number of X on aromatic ring

nCar, number of aromatic C(sp<sup>2</sup>)

nRCOOH, number of carboxylic acids (aliphatic)

nCbH, number of unsubstituted benzene C(sp<sup>2</sup>)

nRCONR<sub>2</sub>, number of tertiary amides (aliphatic)

nHBonds, number of intramolecular H-bonds (with N,O,F)

nRNR<sub>2</sub>, number of tertiary amines (aliphatic)

nOHp, number of primary alcohols

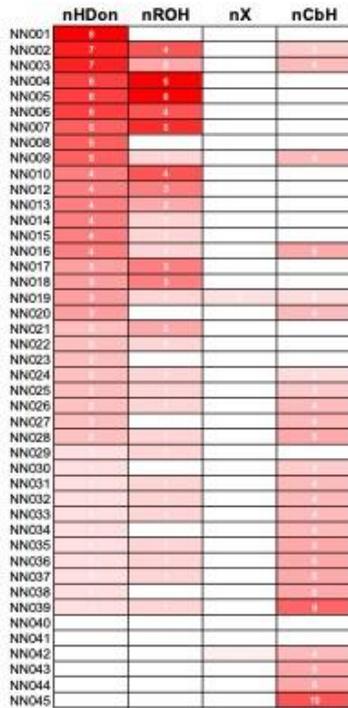
nRSR, number of sulfides

nOHs, number of secondary alcohols

nRNH<sub>2</sub>, number of primary amines (aliphatic)

nR=C<sub>s</sub>, number of aliphatic secondary C(sp<sup>2</sup>)

### 陰性物質



#### 最大値

記述子	陰性物質	陽性物質
nHDon	8	8
nROH	6	4
nX	2	17
nCbH	10	15

#### 平均値 ± 標準偏差

記述子	陰性物質	陽性物質
nHDon	2.68 ± 2.15	1.05 ± 1.52
nROH	1.41 ± 1.61	0.28 ± 0.71
nX	0.07 ± 0.33	1.47 ± 2.76
nCbH	2.55 ± 2.57	3.94 ± 4.36

### 陽性物質

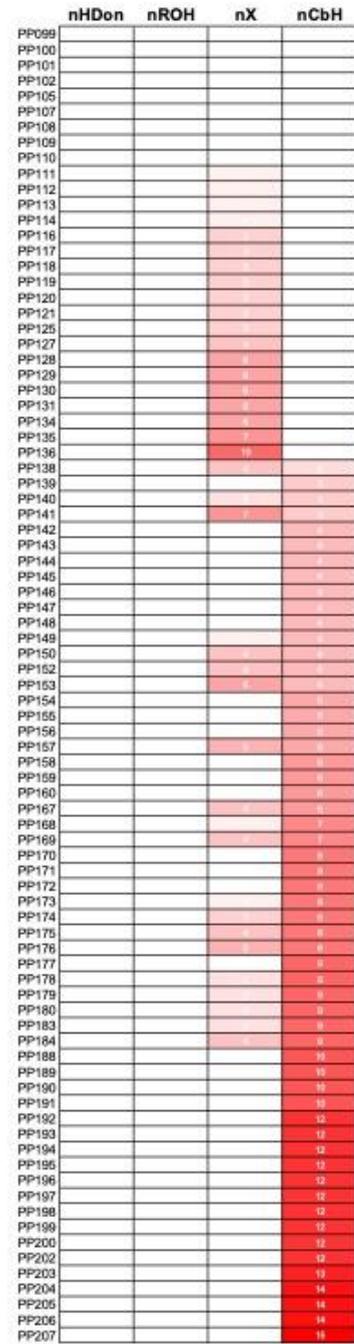
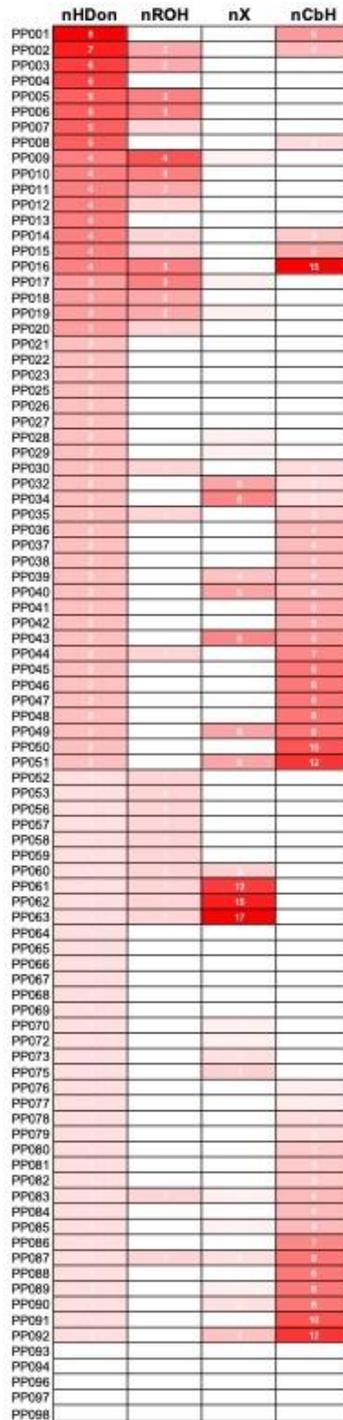


図1 同定した重要変数の分布

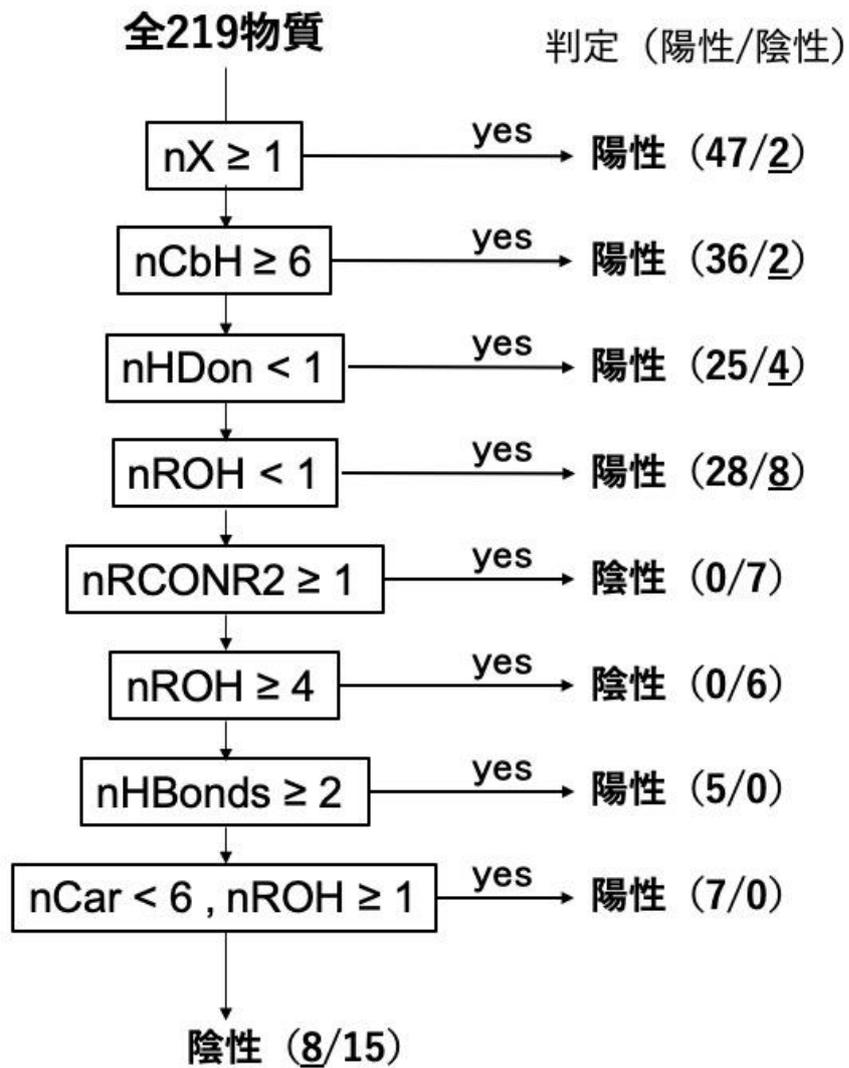


図2 本研究で作成した発達神経毒性判別モデル  
 カッコ内の下線を付した数字は誤判別となった物質数を表す。

①	所見コード	該当数	146				147				148				
			ジフルベンズロン		ジフルベンズロン 3世代試験より		シフルメトフェン		シプロロジニル						
②	農薬	418													
	試験備考														
	試験番号														
	系統		SD		SD		Wistar		SD						
	投与方法														
	投与量 1		50000		160		1500		4000						
投与量 2		5000		40		500		1000							
投与量 3		500		20		150		100							
投与量 4				10				10							
投与量 5															
③	無毒性量		500未		500未		500未		500未		500未		500未		
	無毒性量 (mg/kg体重/日)		39.1~		41.2~		11.8 12.6 11.8 13.1		30.6 13.8 33.2 14.0		6.73 8.21 7.53 8.78				
	無毒性量(繁殖能)														
	無毒性量(繁殖能) (mg/kg体重/日)														
繁殖能認められなかった:1 (雄/雌)	332	1		1		1		1		1					
動物数 (一群につき)		ppm		ppm		ppm		ppm		ppm		ppm			
世代・雄雌		32 P雄		32 F1雄		20 P雄		24 P雄		24 F1雄		30 P雄		30 F1雄	
確認用所見数合計	1672	14		15		14		13		1		1		1	
投与量1実落されず		10		3											
所見なし		-		-		-		-		-		-		-	
肝絶対重量増加	1010110	313										12		12	
肝比重量増加	1010120	364		12		12						12		12	
肝矯正重量増加	1010190	31													
肝対脳重量比増加	1010190	4													
肝絶対重量減少	1010210	14													
肝絶対重量低下	1010210	1													
肝比重量減少	1010220	15													
肝腫大	1010310	17										1		1	
肝腫脹	1010310	1													
肝肥大	1010310	1													
小葉中心性肝細胞肥大	1010410	196		1		12		1		12					
小葉中心性肝細胞肥大 (軽度)	1010410	4													
小葉中心性肝細胞肥大 (好酸性)	1010410	2													
小葉中間帯肝細胞肥大	1010420	2													
小葉周辺性肝細胞肥大	1010430	10													
門脈周辺性肝細胞肥大	1010430	7													
びまん性肝細胞肥大	1010440	22													
肝細胞肥大	1010440	66													
小葉中心性肝細胞空胞化	1010510	15		1											
小葉中心性肝細胞脂肪化	1010510	5													
小葉中心性肝細胞脂肪酸性	1010510	1													
小葉中心性肝細胞脂肪増加	1010510	2													
小葉中心性肝脂肪酸性	1010510	1													
小葉中心性肝脂肪空胞化	1010510	2													
小葉中心性脂肪化	1010510	2													
小葉中間帯肝細胞空胞化	1010520	8													
小葉中間帯肝細胞脂肪化	1010520	2													
小葉周辺性肝細胞脂肪酸性増加	1010530	1													
門脈周辺性肝細胞空胞化	1010530	3													
びまん性肝細胞脂肪化	1010540	2													
肝細胞脂肪沈着	1010590	2													
肝細胞脂肪酸性	1010590	6													
肝細胞脂肪化	1010590	10													
肝細胞空胞化	1010590	14													
肝細胞空胞酸性	1010590	1													
肝細胞単細胞壊死	1010610	2													
肝単細胞壊死	1010610	4													
小葉中心性肝細胞壊死	1010620														
小葉中心性肝細胞壊死重	1010620														
葉状肝細胞壊死	1010630														
多葉性肝細胞壊死	1010630														
肝細胞壊死	1010690														
局局性肝細胞壊死	1010690														
肝有糸分裂	1010710														
肝胆管増生	1010730														
胆管増生	1010730														
胆管増生	1010730														
胆管過形成	1010730	11													
胆管上皮過形成	1010730	2													
肝細胞酸性	1010890	2													

- ① 農薬名・番号、試験種別
- ② 試験情報：系統、投与方法、投与量
- ③ 試験結果概要：無毒性量、繁殖能への影響等
- ④ 毒性所見：所見名、所見コード、投与量

以下省略

図3 繁殖毒性試験情報の整理

作成した繁殖毒性試験情報ファイルのうち、親世代のデータシートの一部を示す。④の欄にある数字はその投与量で所見が認められたことを表している。

「MEA 計測」に関する研究  
分担研究者 東北工業大学・特任助教 小田原あおい

## 研究要旨

ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから15化合物を選定し、MEA計測法によってリスク評価を行った。3パラメータを用いた主成分解析法によって、化合物リスクの低、中、高を分離した。神経毒性が報告されているDeltamethrin、Methamidophos、Tebucomazoleは、高リスクを示し、リスク用量も先行研究と一致していた。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA計測法、および構築した解析法はリスク評価法として妥当であることが示唆された。また、我々の解析結果から、これまで神経毒性が報告されていないAcibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneがリスク判定されたことから、新たな神経毒性の存在が示唆された。また、Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告はあるが、ラット大脳皮質初代培養細胞のMEA計測において毒性検出されなかったとの報告がある。しかしながら、我々のヒトiPS細胞由来ニューロンの解析結果からは、10 $\mu$ Mで中リスク、100  $\mu$ Mで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。本年度、明らかになった課題を来年度以降検討し、信頼性の高いインビトロ神経毒性評価法を構築して行く。

### A. 研究目的

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストを基に、ヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化学物質のin vitro毒性評価法の構築を目的としている。本年度は、OECDと共有している化学物質のリストから入手可能な15種類を選択し、ヒトiPS細胞由来中枢ニューロンを用いた平面微小電極アレイ（MEA）計測によるインビトロ毒性検出法について検討した。

### B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から分化させた中枢の Glutamatergic neuron (Glutamatergic induced neurons, 1001-7.5 ; NeuCyte Inc.)と GABAergic neuron (GABAergic induced neurons, 1002-3.5 ; NeuCyte Inc.)とヒト初代培養アストロサイト (Astroglia, 1003-1; NeuCyte Inc.)を7 : 3 : 3.5 の割合で混合し、8.0  $\times$  10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 0.1% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich)と 20  $\mu$ g/mL の Laminin-511 (Nippi)でコーティングした 48well MEA plate (M768-tMEA-48B ; Axion BioSystems) に播種した。播種時の培地は、Seeding Supplement (2001S-20 ; NeuCyte Inc.)を加えた Seeding Basal Media (2001-20 ; NeuCyte Inc.)を 50  $\mu$ L/well 使用した。また、培養 1 日目に Short-Term Supplement (2002S-40 ; NeuCyte Inc.)を加えた Short-Term Basal Media (2002-40 ; NeuCyte Inc.)を 250  $\mu$ L/well 追加した。1 日毎に Short-Term Basal Media を半量交換し、培養 7 日目に Long-Term Supplements (2003S-120 ; NeuCyte Inc.)を加えた Long-Term Basal Media (2003-120 ; NeuCyte Inc.)に半量交換した。その後、培養 5 週目まで Long-Term Basal Media

を 1 週間に 2 回半量交換し、培養 5 週目に B27 Plus Supplement (A3582801 ; Gibco)と 100 U/mL penicillin/streptomycin (68-23191, Wako)を加えた Neurobasal Plus Medium (A3582901 ; Gibco)に全量交換した。薬理試験は培養 7 週目に、

- Tebuconazole (T2988 ; Tokyo Chemical Industry),
- Deltamethrin (D4775 ; Tokyo Chemical Industry),
- 3,5,6-Trichloro-2(1H)-pyridone (327-85421 ; Wako),
- 2-Mercapto-1-methylimidazole (M0868 ; Tokyo Chemical Industry),
- N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactone (C2699 ; Tokyo Chemical Industry),
- Omethoate (36181-100MG ; Sigma Aldrich),
- Methamidophos (33395-100MG ; Sigma Aldrich),
- Cymoxanil (34326-100MG ; Sigma Aldrich),
- Acibenzolar-S-methyl (SC-227215 ; Santa Cruz Biotechnology),
- Sodium chlorite (28-2350-5-500G-J ; Sigma Aldrich),
- Mepiquat Chloride (D4016 ; Tokyo Chemical Industry),
- Thiamethoxam (37924-100MG-R ; Sigma Aldrich),
- Tembotrione (32766-100MG ; Sigma Aldrich),
- Flubendiamide (32801-100MG ; Sigma Aldrich),
- Aldicarb (P001N ; AccuStandard Inc.)

を 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M の用量で累積投与を行った。試薬はすべて DMSO(D8418-100ML ; Sigma

Aldrich)で溶解し、Neurobasal Plus Mediumで希釈した。陰性対象として、DMSOを0.1%から0.6%まで累積投与した。神経ネットワーク活動の計測は、Maestro Pro (Axion BioSystems)を用いて37℃、CO<sub>2</sub> 5%存在下で行った。計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems)を用いてデータの解析を行った。計測データからAxIS Navigatorを用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 ± 530%の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、我々が開発した4-step method (Biochem Biophys Res Commun, 497, 612-618, 2018)を用いて同期バースト発火の検出を行った。解析パラメータは、図1に示すように、Total Spikes, No. of SBF, Inter Burst Interval, Duration of SBF, Spikes in a SBF, Max Frequency (MF), CV of MF, Inter MF Interval (IMFI), CV of IMFIの9つを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究で実施するヒトiPS細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成30年8月、令和元年6月に本学研究倫理審査委員会承認済である。本研究では、遺伝子解析、遺伝子組み換え実験、動物実験等は行わない為、その他必要な手続きはない。

### C. 研究結果

ヒトiPS細胞由来ニューロンの培養条件を検討したところ、グルタミン酸ニューロン、GABAニューロン、アストロサイトを7:3:3.5の割合で混合し、 $8.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の播種密度の培養条件が、well間差が比較的少なく、神経ネットワークの成熟化指標であるシナプス伝播を介した同期バースト発火が早期に検出されることがわかった。自発活動は培養2週目で観察され、同期バースト発火は培養3-4週目で観察された。発達神経毒性において、回路形成前から化合物をばく露し続けて評価する考え方とシナプス結合後にばく露して神経機能への影響を急性的に評価する考え方がある。

本実験で使用したヒトiPS細胞由来ニューロンにおいては、用量依存的に発火数と同期バースト発火数が増加する傾向が見られた。但し、DMSOにおいても増加傾向が見られた為、陽性化合物の判定には、発火数と同期バースト発火数は適していないと判断した。また、その他のパラメータにおいて、単一パラメータで毒性判定することは難しい為、多変量解析を用いることとした。DMSOの各濃度(0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%)の間に有意差が1つも認められない主

成分マップを作成することで、DMSOの影響を除外する解析法を採用した。使用したパラメータは、同期バースト内の最大周波数(Max Frequency)、最大周波数の変動係数(CV of MF)、最大周波数時刻の間隔における変動係数(CV of IMFI)である。

我々は、シナプス結合による同期バースト発火が確認され、化合物評価に十分な自発活動が観察された培養50-55日目に化合物試験を行った。図2のAにヒトiPS細胞由来ニューロンの活動電位を細胞外で記録した典型的な波形を示す。異なる電極で同期した信号(同期バースト発火)と個々のニューロンの発火が混じった自発活動が観察されているのがわかる。Methamidophos 100 μM投与で、同期バースト発火頻度の上昇が見られた(図2A)。図2Bは、16電極/wellで10分間計測した際のラスタープロットと発火数のヒストグラムを示している。Methamidophosの用量依存的に、同期バースト発火が上昇する現象が認められた。同期バースト発火はシナプス伝達を介して行われる為、培養神経ネットワークにおける薬剤応答において、同期バーストに関する解析パラメータが有効である。我々は、総発火数(Total spikes)以外の8つのパラメータについて、同期バースト発火に関するパラメータを採用して解析を進めた。

図3は、15化合物+DMSO投与における、9つの解析パラメータの結果である。各パラメータにおいて、Vehicleを100%とし、上昇した場合は赤、減少した場合は青で表したヒートマップである。Deltamethrin 1 μM以上、Flubendiamide 100 μM、Tebuconazole 100 μMで同期バースト発火が消失した。

図4は、作成した主成分マップに各化合物の用量データをプロットしたものである。第一主成分と第二主成分の寄与率はそれぞれ51%と29%であり、合わせて80%であった為、情報量としては十分である。主成分マップに、DMSOの標準偏差(SD)の範囲と2×SDの範囲を描き、SDの範囲内であれば低リスク、2×SDの範囲であれば中リスク、2×SDの範囲外であれば高リスクとして評価を行った。各化合物の用量依存別のリスク評価結果を図5にまとめた。

同期バースト発火の消失を含め、高リスクを示した化合物が7化合物選出され、用量も選出された。高リスクを示す用量は化合物毎に異なっていた。一方、Cymoxanil、N-Carbobenzyloxy-L-homoserine Lactoneは、100 μMまでの濃度域で低リスクであった。リスク判定化合物において、低、中、高リスクの順番が逆転することはなかったことから、化合物の応答は、用量依存的に検出されていることが示唆された。

## D. 考察

Na<sup>+</sup>チャネルに作用するDeltamethrinは、培養マウス大脳皮質ニューロンにおいて、発火数が減少することが報告されている (NeuroToxicology 29, 203–212, 2008)。報告では、0.1 μM以上の濃度で発火数や同期バースト発火数が減少しており、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いた本実験結果と一致した。0.1μMで高リスクであると判定した結果も妥当であると考えられる。TebuconazoleはCa<sup>2+</sup>流入の阻害作用を持つことが株化細胞であるPC12を用いた実験から明らかにされている。5 μMばく露時からCa<sup>2+</sup>流入が減少し、100 μMでほぼ見られなくなる (Toxicological sciences 134(2), 374–381 2013)。我々の結果においても、100 μMで同期バースト発火が消失した。Tebuconazoleにおいても、結果が一致した。Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告があるが (EFSA Scientific Report (2008) 146, 1-73)、ラット大脳皮質初代培養細胞においては、毒性が検出されなかったとの報告がある (NeuroToxicology 48 (2015) 152–165)。インビトロでの毒性検出に成功していない。我々のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたデータとその解析結果からは、10μMで中リスク、100 μMで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。

変化が見られなかった N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactoneは、AChE阻害剤Carbarylの代謝物である。Carbarylの神経毒性は報告されているが、代謝物である N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactoneでの毒性報告はない。毒性が出ない可能性が考えられる。陽性対照化合物であるCarbaryl自体の毒性評価は来年度行う予定である。Cymoxanilも100 μMでリスク検出されなかった化合物であるが、現在までのところ神経毒性を示唆する文献は出ていない。毒性が出ない可能性が高いと考えている。神経毒性が報告されている薬剤、報告が無い薬剤において、一致した結果が得られていることから、主成分解析法によるリスク判定は妥当性があると考えられる。妥当性があると考え、Acibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneは、神経毒性があると考えられる。これまで、神経毒性の報告が無い為、新規神経毒性の発見である可能性を有している。

しかしながら、実験から解析に至る一連の過程において検討すべき課題は多い。以降、今後の課題と展望を記載する。今年度は、Neucyte社のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、化合物の評価を行ったが、用いるサンプルについては議論が必要である。今回のサンプルにおいては、DMSOで発火数や同期バースト発火数が増大する傾向が見られた。DMSOでの変化は望ましくない。他のヒトiPS細胞由来ニューロンでの応答、Rodentの初代培養ニューロンにおける応答を比較する必要がある。また、動物実験廃止の流れの中、ヒトiPS細胞由来ニューロンの使用が今後期待されるが、RodentとヒトiPS細胞由来ニューロンの反応性の違いも明らかにする必要がある。

用量設定問題についても考慮する必要がある。大抵の化合物において、高用量になれば何らかの神経作用を示す。今回、100 μMで変化が検出されなかった薬剤について、更なる高用量試験を行うと共に、現実的なばく露量を考慮して、毒性濃度を決定する必要がある。

毒性濃度の決定については、in vivoデータとの相関で決定することが望ましい。in vivoでの毒性症状を基に、毒性濃度を決定することができれば、in vitroの神経活動がどの程度変化すれば、リスクと捉えて良いかが決定する為である。変化を検出する解析手法およびパラメータが決定できれば、未知化合物であっても毒性およびリスク判定が可能となる。

in vivoのデータに頼らず、in vitroのみで毒性評価系を構築する手法として、陰性対照化合物のデータとの乖離で評価する手法がある。今回も採用した手法であるが、DMSOデータのみであった為、陰性対照化合物を増やす必要がある。来年度は、陰性対照化合物を増やし、毒性検出法を構築する計画である。

また、陽性対照化合物の応答特性と化合物の構造との相関を得ることができれば、実験を必要としない毒性評価が可能となる。今回、我々は9個の解析パラメータのみを用いたが、80パラメータ程度を算出し、化合物の構造と神経活動の相関を調べる研究も有効であると考えている。

## E. 結論

ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから15化合物を選定し、MEA計測法によってリスク評価を行った。3パラメータを用いた主成分解析法によって、化合物リスクの低、中、高を分離した。神経毒性が報告されているDeltamethrin、Methamidophos、Tebuconazoleは、高いリスクを示し、リスク用量も先行研究と一致していた。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA計測法および、構築した解析法は、リスク評価法として妥当であることが示唆された。我々の解析結果から、これまで神経毒性が報告されていないAcibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneにおいて、神経毒性がある可能性が示唆された。新規神経毒性の発見につながることを期待している。また、Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告があるが、ラット大脳皮質初代培養細胞においては毒性が検出されなかったとの報告がある。しかしながら、我々のヒトiPS細胞由来ニューロンと解析法を用いた結果からは、10μMで中リスク、100 μMで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

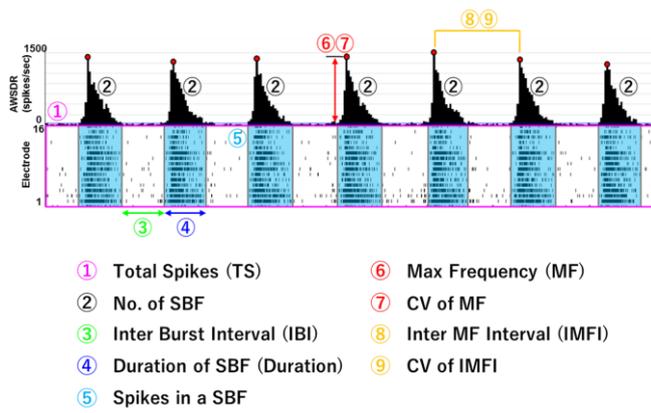


図1 MEAデータから算出する解析パラメータの模式図

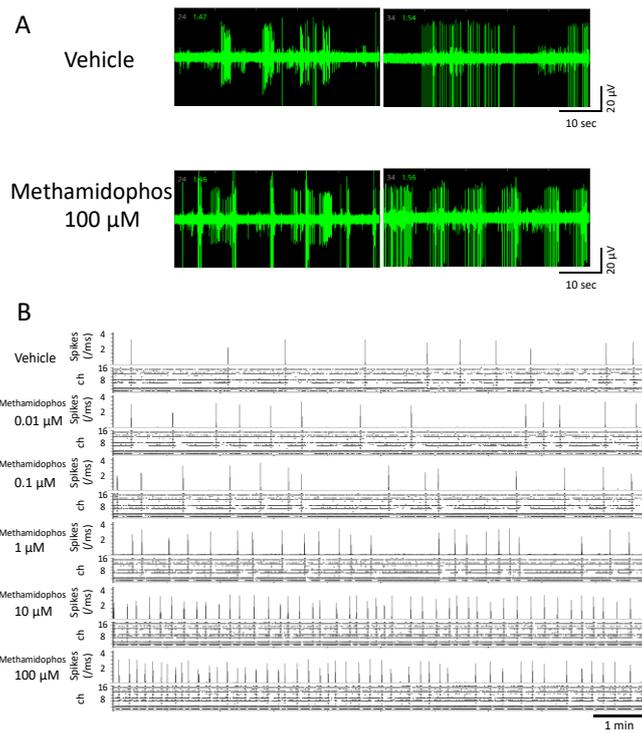


図 2 Methamidophos 投与によるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの活動変化

(A) Vehicle と Methamidophos 100 μ M投与における細胞外電位波形。(B) Methamidophos 0.01, 0.1, 1, 10,100 μ M投与における 16 電極/well の 10 分間のラスタープロットとヒストグラム (bin size=10 ms)。

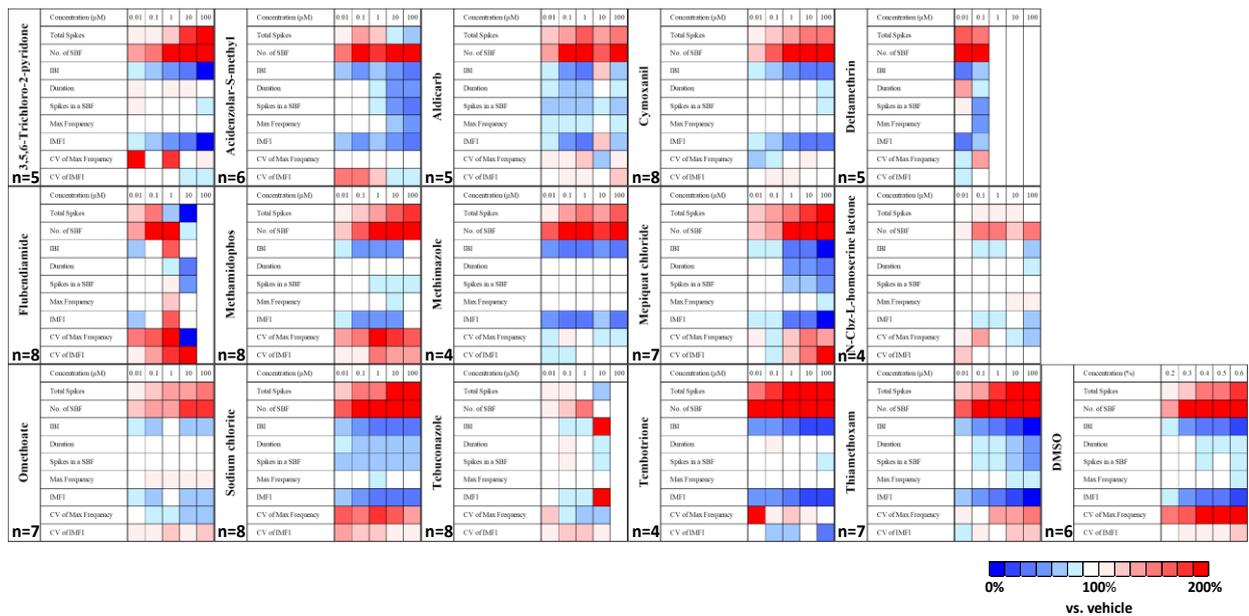


図3 15化合物+DMSOの用量依存的な9解析パラメータのヒートマップ

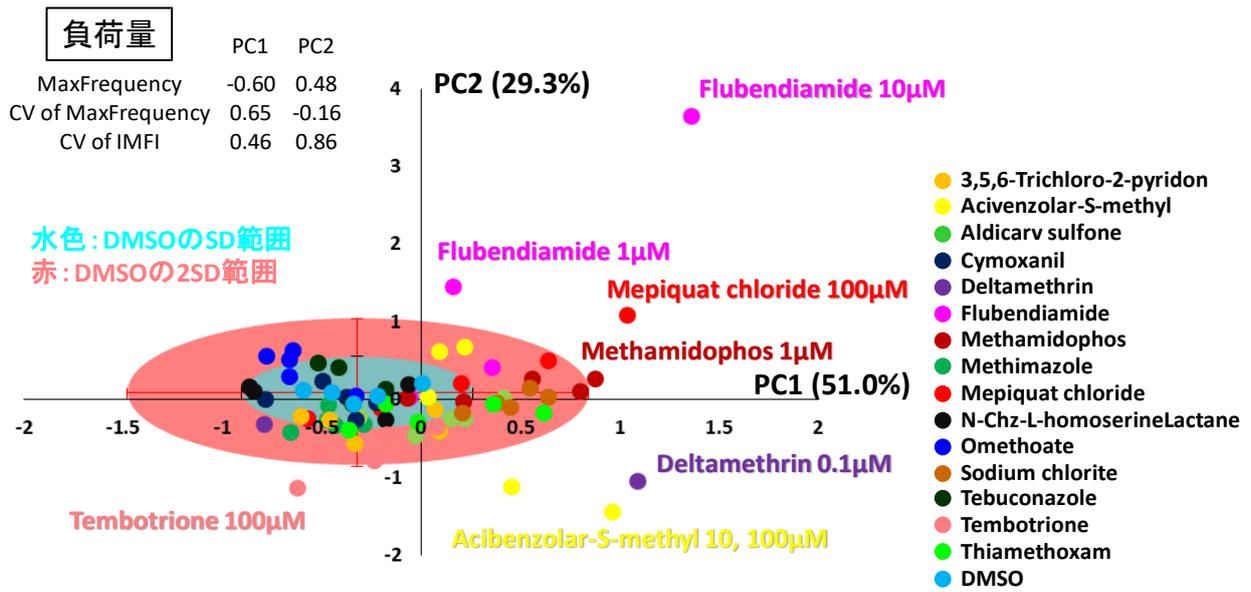


図4 3パラメータを用いた主成分マップと15化合物の用量プロット

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
	0.01	0.1	1	10	100
3,5,6-Trichloro-2-pyridone	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Acibenzolar-S-methyl	中リスク	中リスク	低リスク	高リスク	高リスク
Aldicarb sulfone	中リスク	中リスク	中リスク	低リスク	中リスク
Cymoxanil	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク
Deltamethrin	中リスク	高リスク	-	-	-
Flubendiamide	低リスク	中リスク	高リスク	高リスク	-
Methamidophos	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	高リスク
Methimazole	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	中リスク
Mepiquat chloride	低リスク	低リスク	低リスク	中リスク	高リスク
N-Cbz-L-homoserine Lactane	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク
Omethoate	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Sodium chlorite	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Tebuconazole	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	-
Tembotrione	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク	高リスク
Thiamethoxam	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク

■ 低リスク  
■ 中リスク  
■ 高リスク  
- バースト消失

図5 主成分分析による15化合物の毒性リスク評価

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Grajcarek J., Monlong J., Nishinaka-Arai Y., Nakamura M., Nagai M., Matsuo S., Loughheed D., Sakurai H., Saito MK., Bourque G., Woltjen K.	Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations.	Nat Commun.	10	4856	2019
Shiba T., Tanaka T., Ida H., Watanabe M., Nakaseko H., Osawa M., Shibata H., Izawa K., Yasumi T., Kawasaki Y., Saito MK., Takita J., Heike T., Nishikomori R.	Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages.	J Allergy Clin Immunol.	144	1438-1441	2019
Lin CY., Yoshida M., Li LT., Ikenaka A., Oshima S., Nakagawa K., Sakurai H., Matsui E., Nakahata T., Saito MK.	iPSC-derived functional human neuromuscular junctions model the pathophysiology of neuromuscular diseases.	JCI Insight.	4	124299	2019
Ohta R., Sugimura R., Niwa A., Saito MK.	Hemogenic Endothelium Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells in A Feeder- and Xeno-free Defined Condition.	J Vis Exp.	16		2019
Kanazawa N., Honda-Ozaki F., Saito MK.	Induced pluripotent stem cells representing Nakajo-Nishimura syndrome.	Inflamm Regen.	39	11	2019
Kunimoto K., Honda-Ozaki F., Saito MK., Furukawa F., Kanazawa N.	Beneficial effect of methotrexate on a child case of Nakajo-Nishimura syndrome.	J Dermatol.	46	e365-e367	2019
Matsubara H., Niwa A., Nakahata T., Saito MK.	Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immunotherapy under chemically defined conditions.	Biochem Biophys Res Commun.	515	1-8	2019
齋藤潤.	希少難治性疾患研究の将来展望	分子リウマチ治療.	12	1-3	2019
齋藤潤.	iPS細胞を用いた自己炎症疾患の病態解明	リウマチ科.	61	447-452	2019

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



次の職員の令和元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 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発 (19KD1003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬理部 部長  
 (氏名・フリガナ) 諫田 泰成 (カンダ ヤスナリ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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。

2020年4月16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人京都大学

所属研究機関長 職名 iPS細胞研究所 所長

氏名 山中 伸弥 印



次の職員の令和元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 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発

3. 研究者名（所属部局・職名） iPS細胞研究所・准教授

（氏名・フリガナ） サイトウ 齋藤 伸弥

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	京都大学医の倫理委員会	<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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	京都大学医の倫理委員会	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

年 月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人 豊橋技術科学大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 寺嶋 一彦



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

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
- 研究課題名 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発
- 研究者名（所属部局・職名） 大学院工学研究科・講師  
(氏名・フリガナ) 吉田 祥子・ヨシダ サチコ

#### 4. 倫理審査の状況

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

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

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、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) ・該当する口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。

年 月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 鬼頭 宏



次の職員の令和元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 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部・教授  
(氏名・フリガナ) 吉成浩一・ヨシナリコウイチ

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。

令和2年4月20日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北工業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 今野 弘



次の職員の令和元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 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発

3. 研究者名 (所属部局・職名) 工学部 特任助教

(氏名・フリガナ) 小田原 あおい (オダワラ アオイ)

#### 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。