

**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 2 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 諫田 泰成

令和 3 (2021) 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
	鈴木 郁郎	
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

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、細胞増殖および分化能により多くのDNT化合物をスクリーニングできることを明らかにした。次に、機能面として、iPSニューロンのネットワーク評価を行ったところ、増殖・分化で毒性を評価できない化合物の毒性を検出可能であった。また、動物データが不足している化合物はin vivoでの評価を進めた。以上の内容は、OECD事務局とオンライン会議で議論を行った。

現在、インビトロデータと化学物質の構造に基づくインシリコの活用により統合化を図っており、化学物質のインビトロ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

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、インシリコによる神経毒性評価を行う。特に、ヒトiPS細胞、iPS神経の評価を行い、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

各分担研究者を参照のこと

C. 研究結果

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253G1を用いて化学物質の神経毒性評価を行った。その結果、iPS細胞の神経分化能には一定のスクリーニング性があることを明らかにした。

次に、ヒトiPS神経に関しても、神経活動を多点電極アレイシステムで記録して神経毒性の評価を行った。その結果、ピレスロイド系農薬や内分泌かく乱物質ビスフェノールAなどの神経毒性を検出可能であることを明らかにした。一方、ネオニコチノイドに関しては、ヒトiPS神経では毒性を検出できなかったがiPS細胞の増殖・分化能により毒性評価できたことから、複数のエンドポイントを組み合わせることで予測性が向上することが示唆された。

現在、インビトロとインシリコの相関を検証しており、さらに予測性の高い方法に発展できるのか検

証中である。

また、予測性の検証には動物データが必要であることから、本研究班においていくつかの化学物質のin vivo DNT試験を実施しており、今後、インビトロと比較する予定である。

D. 考察

本研究では、DNTが懸念される化学物質を用いて、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。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ビ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8月にOECD DNT会議の事務局とも議論しており、引き続き、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多点電極アレイによるiPS神経の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

各分担研究者を参照のこと

G. 知的所有権の取得状況

各分担研究者を参照のこと

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、OECDで議論されているリストから発達神経毒性が懸念される35化合物を選定し、ヒトiPS細胞の増殖や分化を指標に毒性評価を行った。その結果、90%近くの化合物が増殖を抑制し、調べた全ての化合物が分化を抑制することを明らかにした。次に、機能面として、OECDで議論されているリストから発達神経毒性が懸念される39化合物を選定し、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行った。その結果、およそ80%の化合物でスパイクやネットワークバーストの変動が認められた。

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。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in vitroで評価するために、神経毒性評価を構造と機能に分けて、ヒトiPS細胞を用いる評価を行った。

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iPS細胞、iPSニューロンの評価を活用し、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253G1は、TeSR-E8培地(Stem Cell Technologies)にてフィーダーフリー条件で培養した。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. MTS アッセイ

MTSアッセイはCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)を用いて行った。

3. ATP アッセイ

ルシフェラーゼ法により測定した。

4. ヒトiPS細胞から神経細胞への分化

神経分化法はDual smad 阻害法を用いた(Chambers et al. Nat Biotechnol 2009)。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。

5. 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。

6. MEAシステムによる神経活動の評価

昨年度に引き続き、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。

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 (図 1)。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。本年度は OECD、ToxCast の両方で共有している化学物質のうち 39 化合物 (昨年度のピレスロイド系農薬 2 種類シペルメトリンおよびデルタメトリンを含む) に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 μ M とした。なお、DNT 陰性対照化合物として DMSO、アセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、サッカリン、ソルビトール、ピクロトキシン (1~100 μ M) を用いた。

さらに、MEA による計測データを元に神経毒性評価を行うため、陰性対照化合物の変動域を基に、総発火数における毒性判定の閾値を設定し、神経毒性評価を試みた。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞の増殖能に対する影響評価

発達神経毒性の化合物リストから 35 化合物を選定し、京大 CiRA で樹立されたヒト iPS 細胞株 253G1 を用いて増殖能を指標とした神経毒性評価 (MTS アッセイ、ATP アッセイ) を行った。陽性対照としてミトコンドリア毒性を有するロテノンを、陰性対照としてアセトアミノフェンを用いた。

その結果、アルジカルブ、ヘキサン、サリドマイド、トルエンを除くほぼ全ての化合物 (約 90%) で毒性が検出され、ヒト iPS 細胞の増殖を指標として高感度に、さまざまな種類の化合物 (工業物質、農薬、医薬品など) の毒性を評価できる可能性が示唆された (図 2)。

2. ヒト iPS 細胞の神経分化能に対する影響評価

さらに神経分化に基づいて毒性を評価するために 253G1 を用いた神経分化の系構築を試みた。分化 10 日目までに神経分化マーカーである PAX6、MAP2、OTX2 発現上昇と PAX6 陽性細胞の増加が認められた。また未分化マーカーについては OCT3/4、NANOG の発現低下と OCT3/4 陽性細胞の減少が認められ、ヒト iPS 細胞を用いた分化系が構築できた (図 3)。次に増殖アッセイで調べた 35 化合物のうちさらに代表的なものを 14 種類選定し、253G1 を用いて分化能を指標とした神経毒性評価を行った。陽性対照としてミトコンドリア毒性を有するロテノ

ンを、陰性対照としてアセトアミノフェンを用いた。その結果、全ての化合物で毒性が検出され、ヒト iPS 細胞の分化を指標として、さまざまな種類の化合物 (工業物質、農薬、医薬品など) の毒性を評価できる可能性が示唆された (図 4)。

3. 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 OECD、ToxCast の両方で共有している 39 化合物の急性毒性の発火データを取得した。

次に陰性対照化合物の総発火数におけるベースラインからの変動域を基に毒性が評価できる閾値を検討した。結果、75%以下および 125%以上の変動域で神経毒性が評価できる可能性が示唆された (図 5)。そこで OECD、ToxCast の両方で共有している 39 化合物の神経毒性を評価したところ、39 化合物中 31 化合物 (79.5%) の化合物で急性神経毒性の懸念があることが明らかになった (図 6)。さらに 39 化合物で動物実験における DNT が不明の 7 化合物のうち 5 化合物で毒性を検出した (図 6)。

D. 考察

本研究では、OECD と共有している DNT 化合物のリストから、代表的なものを選定し、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ビ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、OECD と共有している DNT 化合物のリストから選定した代表的な 35 化合物を暴露したヒト iPS 細胞を用い、増殖や分化能を検証することでさまざまな種類の化合物に対する神経毒性評価の可能性を示唆した。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と考えられる。

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急性神経毒性を評価した。本年度は OECD と ToxCast の両方で共有している 39 化合物で検証したところ、およそ 80%の化合物で急性神経毒性が検出可能であったこ

とから、MEAを用いることで機能面においてもある程度の予測性が得られることが示唆された。しかしながら、*in vivo* DNTの報告のあるメトトレキサート、シタラビン、バルプロ酸、フタル酸ビス、アルジカルブ、イミダクロプリドの毒性は検出できなかった。また、メバスタチン、安息香酸ナトリウムは不明のままであった。そのため今回検証した総発火数以外のエンドポイントを組み合わせることで、フェノタイプが明らかになり、より精度の高い予測性が得られる可能性が考えられる。

今後、構造面と機能面での評価の組み合わせや、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ビ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。

E. 結論

iPS細胞の増殖及び分化能および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

- 1) Kamata S, Hashiyama R, Hana-Ika H, Ohkubo I, Saito R, Honda A, Anan Y, Akahoshi N, Noguchi K, Kanda Y, Ishii I. Cytotoxicity comparison of 35 developmental neurotoxicants in human induced pluripotent stem cells (iPSC), iPSC-derived neural progenitor cells, and transformed cell lines. *Toxicol In Vitro*. 69:104999 (2020).
- 2) 常本和伸、山田茂、諫田泰成: ヒト iPS 細胞を用いた中枢神経系の安全性評価。日本薬理学雑誌(印刷中)

2. 学会発表

- 1) 山田茂、常本和伸、諫田泰成: 微小電極アレイを用いたヒト iPS 由来神経細胞の神経毒性評価。第 47 回日本毒性学会学術年会、仙台、2020 年 6 月 30 日(オンライン)、ポスター
- 2) Yamada S, Tsunemoto K, Kanda Y: Neurotoxicity assessment using microelectrode array recordings in human iPSC-derived neurons, ASCCT 9th Annual Meeting, 2020 年 10 月 20-23 日、ポスター、オンライン
- 3) 常本和伸、山田茂、諫田泰成: ヒト iPS 細胞を用いたマンガンの神経毒性評価。メタルバイオサイエンス研究会 2020、千葉、2020 年 11 月 6-7 日(オンライン)、ポスター
- 4) 諫田 泰成: ヒト iPS 細胞の創薬応用〜レギュラ

トリーサイエンスの視点から。第 14 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(2020.11.28) オンライン、口頭

- 5) Yasunari Kanda : Current challenge and future perspective using iPSC technology: toward 3Rs. The 26th Frontier Scientists Workshop (2020.12.18) オンライン韓国、口頭
- 6) 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を活用した新たな薬理試験法の開発、日本学術会議公開シンポジウム「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」(2021.01.18) オンライン、口頭
- 7) 常本和伸、山田茂、諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いたベンゾジアゼピン系薬物の統合的な安全性評価。第 94 回日本薬理学会年会、札幌、2021 年 3 月 8-10 日(オンライン)、ポスター
- 8) 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いた神経毒性評価法の開発、第 98 回日本生理学会大会(2021.03.30) オンライン
など。

G. 知的所有権の取得状況 なし

ID	Chemicals	Unit	iPSC (c)	
			MTS	ATP (*)
A	MPP+ iodide	μM	20.9 ± 3.4 ^{a,d} (3)	16.5 ± 0.4 ^a (3)
B	2-Methoxyethanol	mM	243 ± 33 ^b (3)	220 ± 20 (3)
C	IDPN	mM	30.2 ± 14.4 ^a (3)	15.7 ± 6.6 ^{a,d} (4)
D	5-Fluorouracil	μM	6.32 ± 1.03 ^b (4)	5.92 ± 1.06 ^b (4)
E	6-OHDA	μM	2.29 ± 0.56 ^a (3)	1.83 ± 0.35 ^{a,b} (3)
F	6-Propyl-2-thiouracil	μM	766 ± 76 (3)	631 ± 84 (3)
G	Manganese (II) acetate	μM	N.C. (3)	N.C. (3)
H	Acrylamide	mM	0.458 ± 0.086 ^{a,b} (3)	0.274 ± 0.039 ^{a,b} (3)
I	Aldicarb	μM	> 1,000 (3)	> 1,000 (3)
J	Bis(tributyltin) oxide	μM	0.220 ± 0.093 ^b (4)	0.220 ± 0.070 ^b (4)
K	Bisphenol A	μM	19.8 ± 3.1 ^{a,b,d} (4)	15.2 ± 1.5 ^{a,b} (3)
L	Captan	μM	0.454 ± 0.085 ^d (3)	0.497 ± 0.130 ^d (3)
M	Carbaryl	μM	20.7 ± 7.8 (4)	22.4 ± 6.4 (4)
N	Chlorpyrifos	μM	86.1 ± 34.9 (3)	19.9 ± 2.3 ^d (3)
O	Colchicine	nM	5.73 ± 0.67 ^b (4)	5.32 ± 0.54 ^b (4)
P	Deltamethrin	μM	7.34 ± 0.33 (4)	3.42 ± 0.50 ^{d,*} (4)
Q	DEHP	μM	> 200 (4)	75.1 ± 31.1 (5)
R	DDT	μM	3.83 ± 0.26 ^d (3)	2.33 ± 0.37 ^{d,*} (4)
S	Dieldrin	μM	5.64 ± 0.90 ^a (4)	3.17 ± 0.47 ^d (4)
T	Diethylstilbestrol	μM	2.24 ± 0.8 ^{a,d} (6)	2.09 ± 0.91 ^{a,d} (6)
U	Heptachlor	μM	4.60 ± 0.76 ^d (4)	4.33 ± 0.33 ^d (4)
V	Hexachlorophene	μM	0.0851 ± 0.0164 ^{a,b} (5)	0.0911 ± 0.0222 ^{a,b} (5)
W	Hydroxyurea	μM	193 ± 24 (3)	111 ± 5 ^{d,*} (3)
X	Lindane	μM	33.3 ± 7.4 ^d (3)	15.0 ± 1.3 ^d (3)
Y	Methyl Hg (II) chloride	μM	0.0835 ± 0.0304 ^a (4)	0.0774 ± 0.0266 ^a (4)
Z	<i>n</i> -Hexane	μM	> 200 (3)	> 200 (3)
A'	Permethrin	μM	311 ± 105 ^d (3)	11.1 ± 0.9 ^{d,*} (3)
B'	Phenobarbital, Na salt	mM	1.37 ± 0.25 ^a (3)	0.984 ± 0.175 ^{a,d} (3)
C'	Rotenone	μM	0.0162 ± 0.054 ^b (3)	0.00823 ± 0.00233 (3)
D'	Tebuconazole	μM	45.1 ± 7.0 (3)	28.8 ± 4.9 ^b (3)
E'	Tetraethylthiuram disulfide	μM	2.45 ± 0.15 ^a (3)	1.99 ± 0.33 ^a (3)
F'	Thalidomide	μM	> 500 (4)	> 500 (4)
G'	Toluene	μM	> 1,000 (3)	> 1,000 (3)
H'	Valinomycin	nM	5.68 ± 1.24 ^a (3)	5.94 ± 1.91 ^a (3)
I'	Valproic acid, Na salt	μM	186 ± 17 ^{a,d} (4)	319 ± 122 ^{a,d} (4)
(Negative control)				
J'	Acetaminophen	mM	0.919 ± 0.025 ^{a,d} (4)	0.918 ± 0.051 ^{a,d} (4)

図1. ヒトiPS細胞の増殖能による化学物質の評価

ヒトiPS細胞を用いたMTS及びATPアッセイにおける35種類のDNT化合物とアセトアミノフェンのIC₅₀を示す

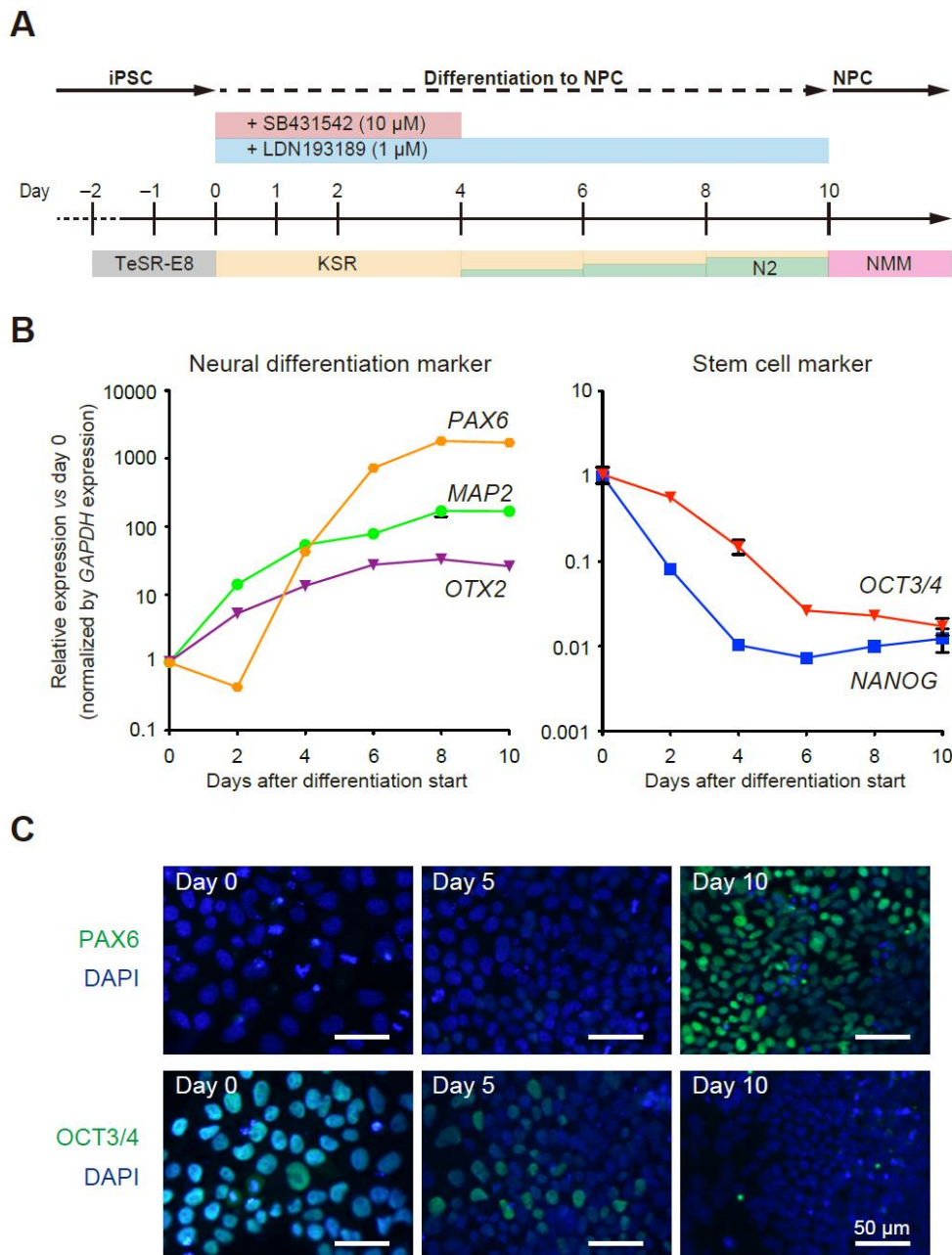


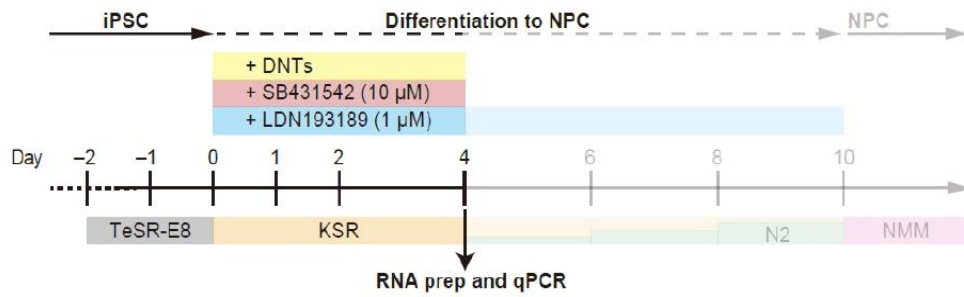
図2. ヒトiPS細胞（253G1株）の神経分化能

A) 神経分化のオーバービュー

B) 分化マーカー（PAX6, MAP2, OTX2）と未分化マーカー（OCT3/4, NANOG）の発現変化のタイムコース

C) PAX6とOCT3/4のタイムコース染色

A



B

ID	Chemicals	<i>PAX6</i>	<i>OTX2</i>	<i>MAP2</i>	<i>OCT3/4</i>	<i>NANOG</i>
I	Aldicarb	↓↓	—	↑↑	—	—
L	Captan	—	↑	—	—	—
M	Carbaryl	↓↓↓	↓↓	↑↑	↓	—
O	Colchicine	↑↑↑	—	—	—	—
P	Deltamethrin	↓	↑(↓)	—	—	↑
Q	DEHP	↓↓↓	↑↑↑	—	↑↑	—
R	DDT	↓↓↓	—	—	↑↑	—
S	Dieldrin	↓↓↓	↓↓	↑↑↑	(↓↓)	↑↑↑
U	Heptachlor	↓↓↓	—	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
V	Hexachlorophene	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	↑↑↑
X	Lindane	↓↓	↓	↑	—	—
A'	Permethrin	—	—	—	—	↓↓
C'	Rotenone	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
I'	Valproic acid, Na salt	—	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑

図3. ヒトiPS細胞の神経分化能による化学物質の評価

A) 神経分化からqPCR解析までのオーバービュー

B) ヒトiPS細胞の神経分化における代表的な14種類のDNT化合物の影響評価（マーカー遺伝子の発現による）

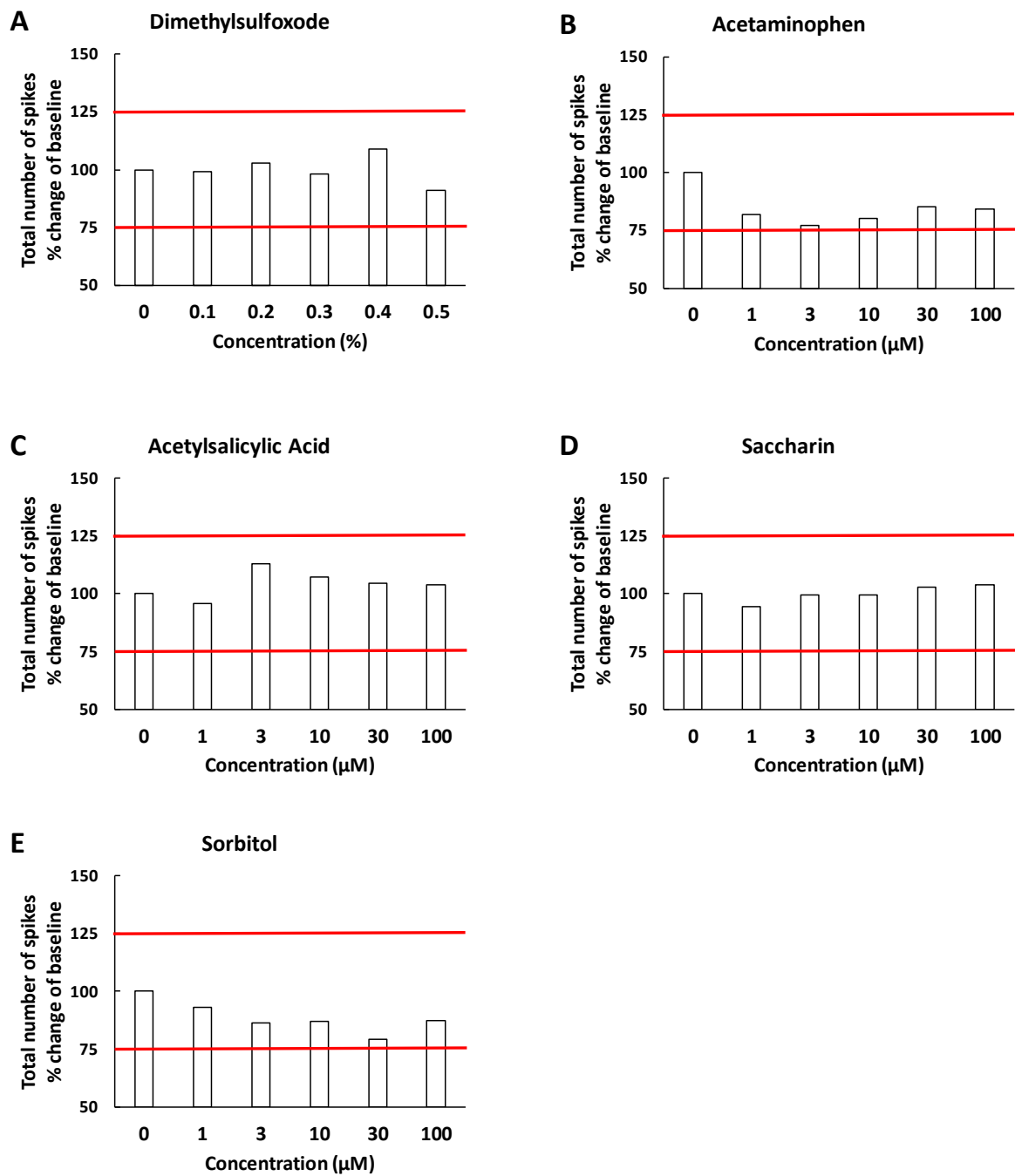
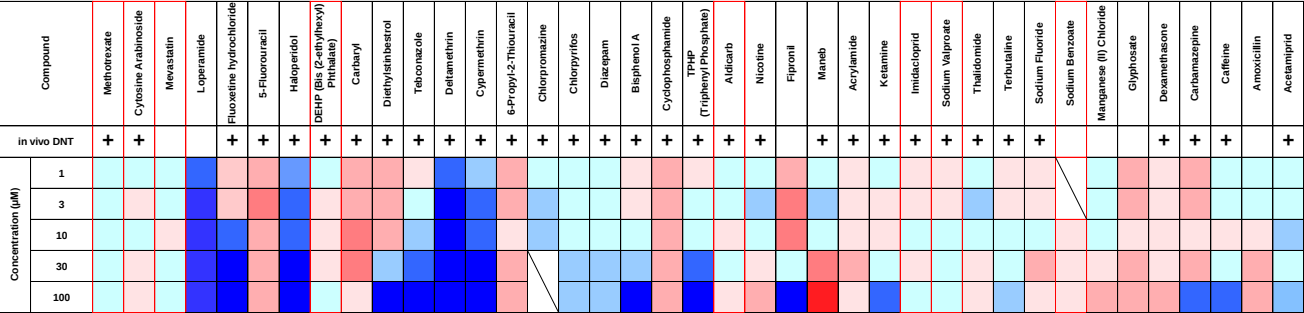


図 4. 神経毒性評価のための総発火数の閾値設定
75%から 125%を無毒性とした。

- A) ジメチルスルホキシド
- B) アセトアミノフェン
- C) アセチルサリチル酸
- D) サッカリン
- E) ソルビトール

A



B

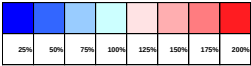
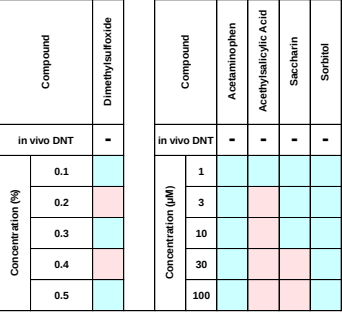


図5. ヒトiPS由来神経細胞のMEAによる化学物質評価 (総発火数のヒートマップ)
A) 被験化合物
B) DNT陰性化合物

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（19KD1003）

研究成果報告書

インビトロ神経毒性評価に用いる iPS 細胞の選別に関する研究

研究分担者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所・准教授

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。前年度までに選別した神経分化能の高かったクローンについては、その後の検討で PAX6 の発現があまり高くなく、本検討に適さないことが明らかになった。そこで、外胚葉分化後に RNA を採取した約 300 クローンについて、PAX6 の発現量の高いクローンを RNA-seq のデータを用いて選別した。その結果、PAX6 の発現量の高いクローン（HPS4016, HPS4115）が選別された。これらのクローンは、インビトロ神経毒性評価に有効である可能性が高いと考えられ、本研究にてこれまで実績のある 253G1 クローンとの株間差について比較検討を行った。

う。

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

昨年度までに、既に別事業で樹立した健常人ドナー由来ヒト iPS 細胞 6 株を対象として、外胚葉分化能（PAX6+）が良く、中胚葉分化と内胚葉分化に問題がない（平均的に分化）クローンを選別した。しかし、その後の検討でこれらのクローンを実際に神経に誘導すると、PAX6 の発現があまり高くなく、本検討に適さないことが明らかになった。

そこで、外胚葉分化後に RNA を採取した約 300 クローンについて、PAX6 の発現量の高いクローンを RNA-seq のデータを用いて選別した。RNA-seq については、理化学研究所の二階堂愛先生との共同研究で実施した。

（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

選別したクローン（HPS4016, HPS4115）についてこれまで神経毒性評価で用いられてきた 253G1 クローンとの株間差の検討を下記方法にて行った。

1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞クローン 253G1, HPS4016, HPS4115 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 試薬を（Thermo Fisher）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（外胚葉）分化マーカー Pax6 などの発現量により評価を行った。

C. 研究結果

311 クローンの外胚葉誘導時の PAX6 発現量を調べたところ、約 100 クローンでは外胚葉分化後も PAX6 の発現は確認されなかった。

残り約 200 クローンは PAX6 の発現が確認されたため、この中から再度 PAX6 高発現クローンを選別した（図1）。

選別したクローンのうちHPS4016, HPS4115についてこれまで神経毒性評価で実績のある253G1クローンとの神経分化（外胚葉分化）能の比較検討を行った。その結果、神経分化に伴う分化マーカーPAX6の上昇はHPS4016で3.7倍、HPS4115で18倍、253G1で61倍であった（図2）。また未分化マーカーNANOGの発現はHPS4016で0.2倍、HPS4115で0.048倍、253G1で0.026倍と低下していた（図2）。以上より、今回選別したクローンはいずれも神経分化するものの、分化能は253G1より劣るという結果となった。

D. 考察

遺伝子発現解析の結果、外胚葉分化後もPAX6の発現が見られないクローンが存在することが明らかになった。また、PAX6陽性クローンについても発現量には大きなばらつきがあった。これはクローンごとに分化誘導効率が異なることも関与している可能性がある。

253G1クローンとの株間差検討の結果、今回選別したクローンHPS4016, HPS4115はいずれもPAX6の上昇、NANOGの低下が認められ、神経（外胚葉）分化することが示されたが、253G1クローンと比較すると分化能が劣ることも示された。251G1はヨーロッパ人の皮膚線維芽細胞にOCT3/4, SOX2, KLF4を導入して樹立されたクローンである。一方、HPS4016, HPS4115は日本人の末梢血単核球にOCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, mp53DD, EBNA1を導入して樹立されている。クローンによる分化能の差はこうしたバックグラウンド（人種・細胞腫）や作製方法の違いに起因しているかもしれない。従って、iPS細胞の株間差を比較検討することはより良いインビトロ神経毒性評価系の構築において必要不可欠であると考えられる。

E. 結論

株間差の検討の結果、253G1クローンは他のiPS細胞クローンより神経分化能が優れており、インビトロ神経毒性評価において最も有用である可能性が高いと考えられた。

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

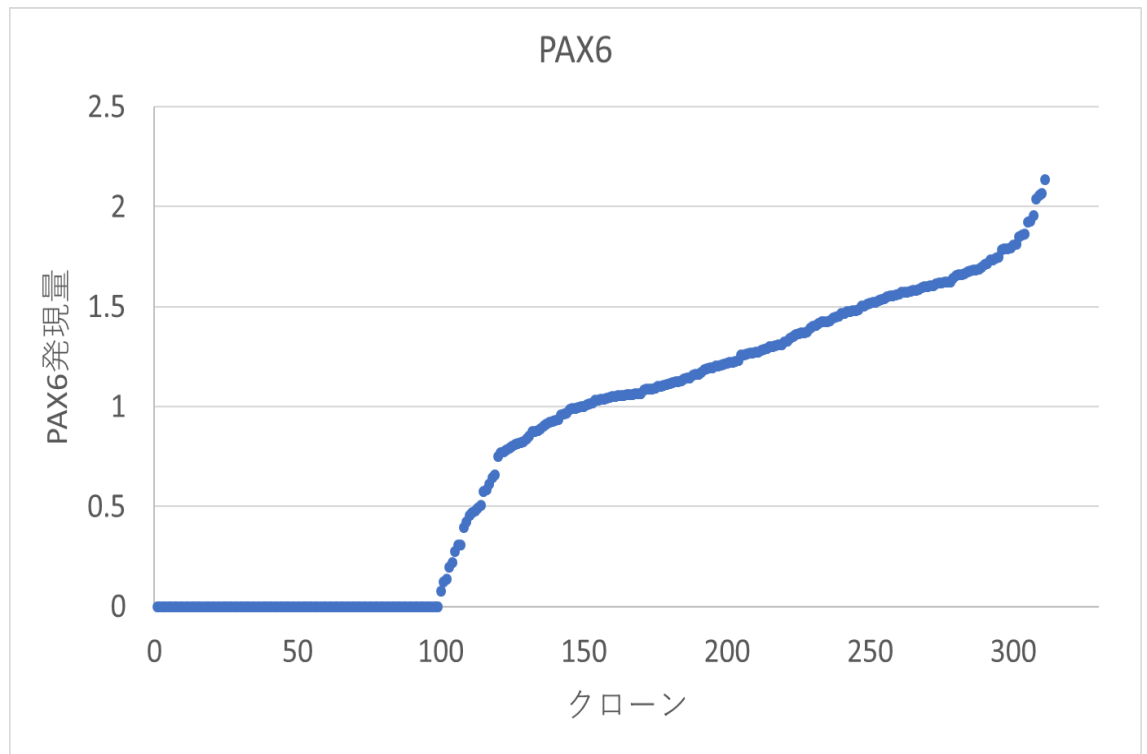


図 1 : 外胚葉分化させた iPS 細胞クローンの PAX6 発現量の分布

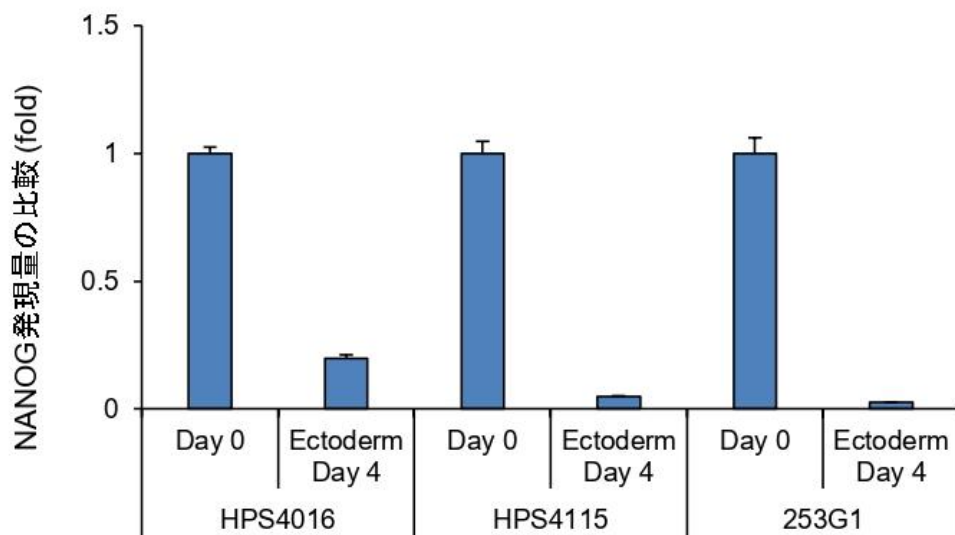
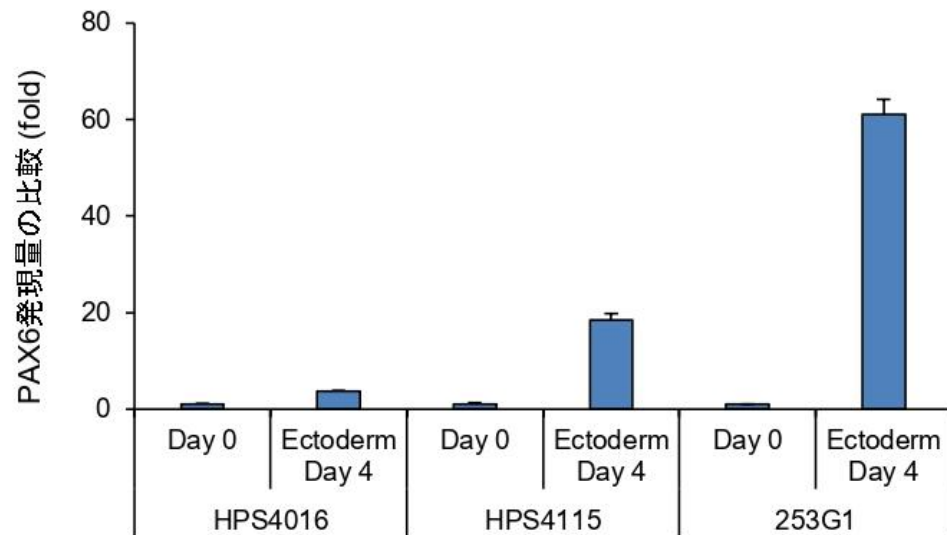


図 2：本研究で単離した iPS 細胞クローンとこれまでの神経毒性評価に用いられてきた 253G1 クローンとの外胚葉分化能の比較

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
(19KD1003)

研究成果報告書

分担課題: In vivo 毒性評価

研究分担者 渋谷 淳 国立大学法人東京農工大学 大学院 農学研究院 動物生命科学部門

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て、OECDと共有している化学物質のリストを基にインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。研究分担者は、動物を用いたインビボの系で反復投与による発達神経毒性評価を行う。

令和2年度は、令和元年度に動物実験を実施したヒトに対して重要な脳発達障害物質として知られる酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールの発達期曝露例について、海馬歯状回における神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討した。更に、OECDにてインビトロ発達神経毒性の陰性対照物質とされるグリホサートについて、ラットを用いて発達期曝露を実施した。

妊娠SDラットに、酢酸鉛を2,000 ppm, 4,000 ppm、塩化アルミニウムを0.25%, 0.5%、エタノールを10%, 12.5%、グリホサートについては原体を15,000 ppm, 30,000 ppm、グリホサート製剤を1% (グリホサート3,800 ppm相当) 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。いずれの被験物質においても、最高用量群で母動物の体重、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。

その結果、酢酸鉛では離乳時から成熟後まで続くmetallothionein陽性グリア細胞の増加、曝露に起因した酸化ストレスの誘導を介して成熟後における酸化ストレスに対する脆弱性の増加、および持続的な神経炎症を示唆する遺伝子発現変化を認めた。神経新生に対しては離乳時でDCX陽性type-3神経前駆細胞の減少と代償的なSOX2, TBR2陽性 type-2a, 2b神経前駆細胞の増加を認め、それにはBDNF-TrkBシグナル経路を介したsomatostatin陽性介在ニューロンの増加が関与していることが示唆された。

エタノールでは、離乳時でGFAP陽性アストロサイトの増加を認めグリオシスを生じていることが示唆された。神経新生に対しては離乳時にDCX陽性type-3神経前駆細胞が減少し、代償的にSOX2陽性type-2a前駆細胞の増加が認められ、somatostatin, calretinin陽性介在ニューロンの増数による神経新生制御系の強化が関与することが示唆された。成熟後においては顆粒細胞層におけるc-FOS陽性細胞の低下として表現されるシナプス可塑性の減少を認め、それにはAMPA型グルタミン酸受容体遺伝子の発現減少が関与していることが示唆された。

塩化アルミニウムの発達期曝露では、離乳時にTBR2陽性type-2b神経前駆細胞が増加し、濃度依存的にcalbindin陽性細胞が増加傾向を示したが、成熟後には回復した。Calbindinは介在ニューロンの機能成熟に関与することから、calbindin陽性介在ニューロンの増加が、type-2aからtype-2b神経前駆細胞への神経新生の促進に関与していると考えられた。

現在、グリホサートについても同様の検討を実施している。

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。研究分担者は、動物実験による発達期の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免疫組織化学的に検索した結果、酢酸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、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(図1、図3)。令和2年度においては、酢酸鉛、エタノール、塩化アルミニウムの神経新生障害機序を明らかにするために免疫組織化学的検索の追加解析および関連する神経新生関連因子に関して遺伝子発現解析を行い、障害機序の同定を行う。また、米国EPAにおいて発達神経毒性試験を実施して陰性評価が示されている物質であるグリホサートについて、ラットの発達期曝露による海馬歯状回の神経新生への影響を免疫組織化学的に検索する。

最終的にヒト 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 2,000 ppm, 4,000 ppm、塩化アルミニウム 0.25%, 0.5%、エタノール 10%, 12.5%、グリホサート原体 15,000 ppm, 30,000 ppm、グリホサート製剤 1% (グリホサート 3,800 ppm 相当) 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。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。離乳時である出生後 21 日目 (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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、海馬歯状回を採取して遺伝子発現解析に供した。各群 6 匹以上の児動物について CO₂/O₂ 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) までは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 匹以上の雄児動物について CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、海馬歯状回での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 カ所で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)]、歯状回門部におけるアストロサイトおよびミクログリアの指標 [GFAP, IBA1]、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、qRT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。

(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 CO₂/O₂ 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

酢酸鉛では免疫組織化学的検索により PND 21、PND 77 において歯状回門部における metallothionein 陽性グリア細胞の増加を認め、PND 77 にて Iba1 陽性ミクログリアと GFAP 陽性アストロサイトの増加を認めた (図 1)。遺伝子発現解析の結果、脳由来神経栄養因子である *Bdnf* とその受容体である *Ntrk2* の発現が PND 21 で増加した (図 2)。また抗酸化関連遺伝子が PND 21 に増加し、PND 77 に減少した。サイトカインなどの炎症関連遺伝子について PND 21, 77 とともに増加ないし増加傾向を認めた (図 2)。

エタノールについては免疫組織化学的検索において PND 21 で歯状回門部の GFAP 陽性アストロサイトの増加を認めた (図 3)。遺伝子発現解析により、PND 21 における *Gfap* および AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子の発現増加を認め、PND 77 においてはシナプス可塑性関連遺伝子および AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子の発現減少を認めた (図 4)。

塩化アルミニウムでは PND 21 に TBR2 陽性細胞が増加し、CALB1 陽性細胞が増加傾向を示したが、PND 77 には回復した (図 5)。遺伝子発現解析では、PND 21 に *Sox2* の発現減少、*Tbr2* の発現増加、*Gad1* の発現減少、神経成長因子の *Ntrk2*、細胞周期に関連する *Cdkn2b*、*Cdkn2c*、*Ccnd1*、*Cdk1*、アポトーシスに関連する *Casp12* の発現減少が確認された。PND 77 に *Sox2* の発現減少、*Dcx* の発現増加、神経成長因子の *Bdnf*、アポトーシスに関連する *Bax* の発現減少が確認された (表 1)。

グリホサート原体/含有製剤については投与により母動物や児動物における体重・摂餌量・摂水量の減少が認められた (図 6)。現在、海馬歯状回における神経新生障害性に関する免疫組織化学的解析を進めており、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。

D. 考察

酢酸鉛の発達期曝露により、成熟後に酸化ストレスに対する脆弱性の増加、および持続的な神経炎症が認められた。神経新生に関して、離乳時で type-3 神経前駆細胞の減少と代償的な type-2a, 2b 神経前駆細胞の増加を認めた。そのメカニズムとして、BDNF-TrkB シグナル経路を介した SST 陽性介在ニューロンが増加することが示唆された。

また、エタノールの発達期曝露は、離乳時におけるグリオシスを誘発し、神経新生において type-3 神経前駆細胞が減少し、代償的に type-1 前駆細胞が増加した。それには GABA 性介在ニューロンの増数が影響していることが示唆された。成熟後におけるシナプス可塑性の減少には AMPA 型グルタミン酸受容体の減少が影響している可能性が示唆された。

さらに、塩化アルミニウムの発達期曝露は、曝露終了時に type-2a から type-2b 神経前駆細胞への神経新生を促進し、それには CALB1 陽性介在ニューロンの増加の関与が示唆された。

E. 結論

ラットを用いて酢酸鉛、エタノール、塩化アルミニウムの発達期曝露を行い、生後初期の海馬神経新生における顆粒細胞系譜における障害を明らかにした。またそれぞれの化学物質特有の種々の障害メカニズムについて解析を実施した。

現在、グリホサート原体/含有製剤に関しては、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

1. 菊地 聡美、岡野 拓、高橋 康德、高嶋 和巳、山下 理紗子、小林 美央、吉田 敏則、渋谷 淳：塩化アルミニウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回神経新生への影響。第 47 回日本毒性学会学術年会，オンライン学会，第 47 回日本毒性学会学術年会要旨集：P-183、S 157，6 月 29 日-7 月 1 日，2020
2. 山下 理紗子、高橋 康德、菊地 聡美、高嶋 和巳、小林 美央、吉田 敏則、渋谷 淳：酢酸鉛

の発達期曝露によるラット海馬神経新生に対する影響。第 47 回日本毒性学会学術年会，オンライン学会，第 47 回日本毒性学会学術年会要旨集：P-184、S 157，6 月 29 日-7 月 1 日，2020

3. 高橋 康德、山下 理紗子、菊地 聡美、岡野 拓、高嶋 和巳、小林 美央、吉田 敏則、渋谷 淳：エタノールの発達期曝露によるラットの海馬歯状回における神経新生への影響。第 47 回日本毒性学会学術年会，オンライン学会，第 47 回日本毒性学会学術年会要旨集：P-53E、S 106，6 月 29 日-7 月 1 日，2020
4. 渋谷 淳：海馬神経新生の傷害性に着目したインビボ神経毒性の評価。日本薬理学会合同シンポジウム：化学物質の神経毒性評価の現状と課題。第 47 回日本毒性学会学術年会，オンライン学会，第 47 回日本毒性学会学術年会要旨集：S5-1、S 15，6 月 29 日-7 月 1 日，2020

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

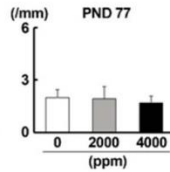
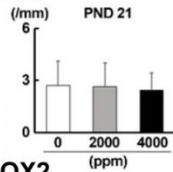
なし

神経新生マーカー

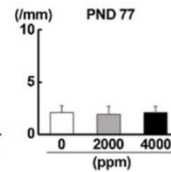
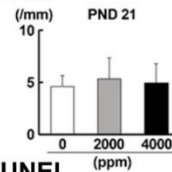
細胞増殖/アポトーシスマーカー

シナプス可塑性関連

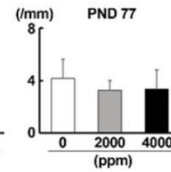
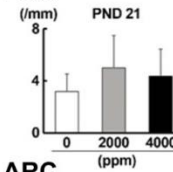
GFAP



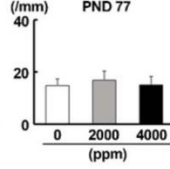
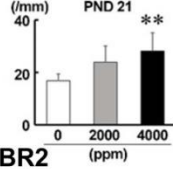
PCNA



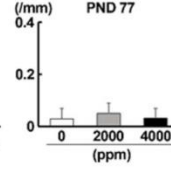
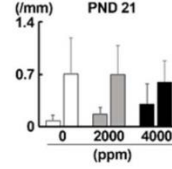
FOS



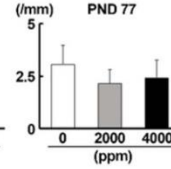
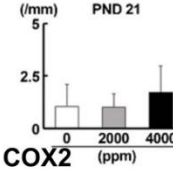
SOX2



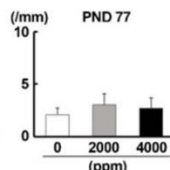
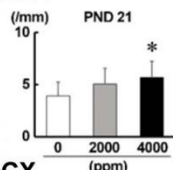
TUNEL



ARC

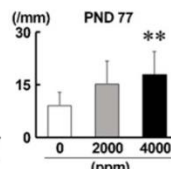
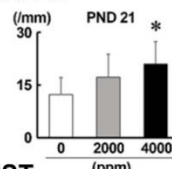


TBR2



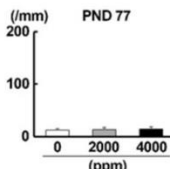
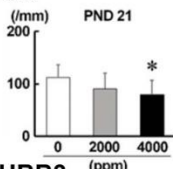
GABA性介在ニューロン

CALB2

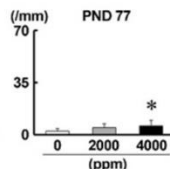
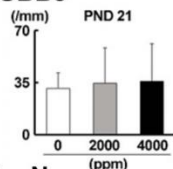


グリア細胞

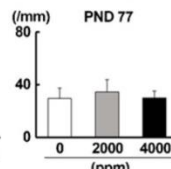
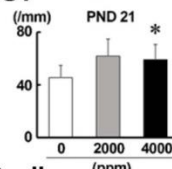
DCX



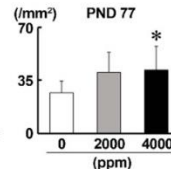
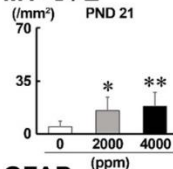
TUBB3



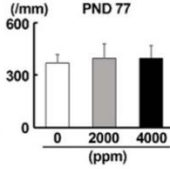
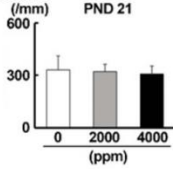
SST



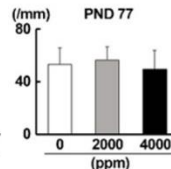
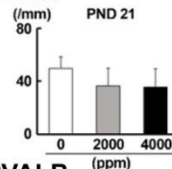
MT- I / II



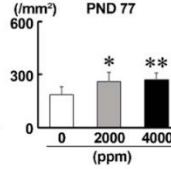
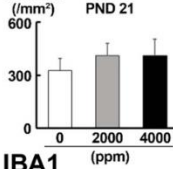
NeuN



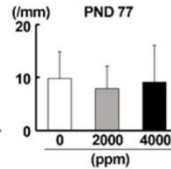
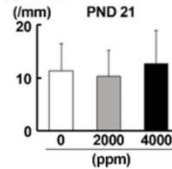
Reelin



GFAP



PVALB



IBA1

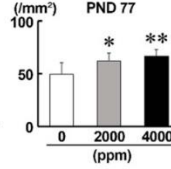
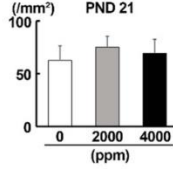
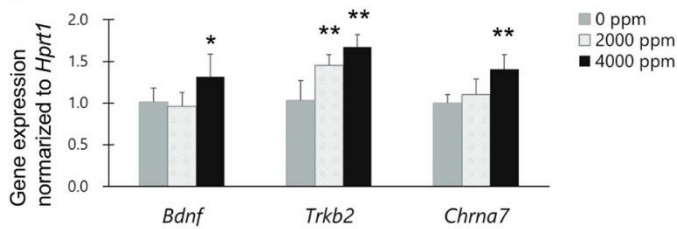


図1 酢酸鉛の免疫組織学的解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

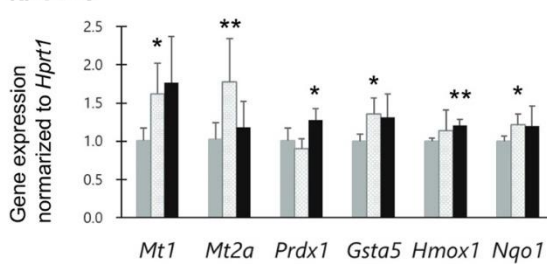
BDNF-TrkBシグナル関連遺伝子

離乳時

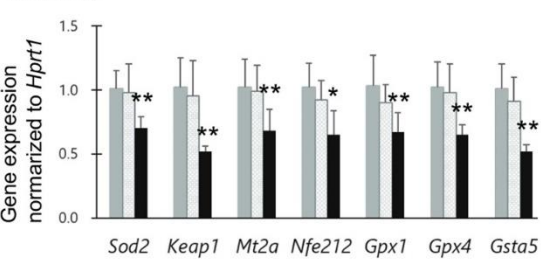


抗酸化ストレス関連遺伝子

離乳時

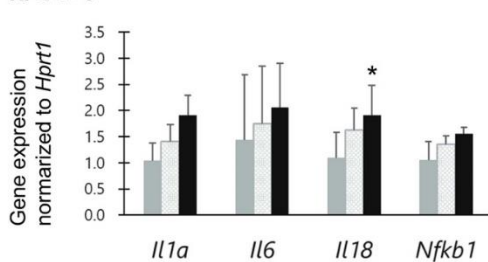


成熟期



炎症関連遺伝子

離乳時



成熟期

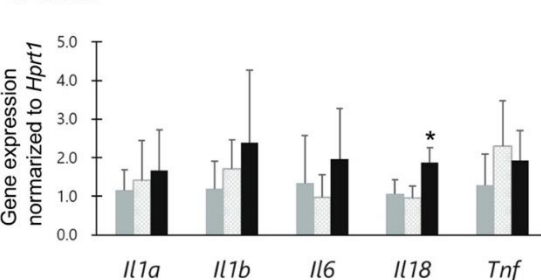
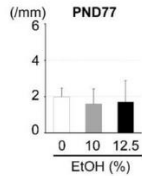
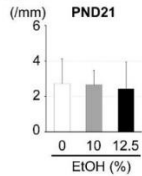


図2 酢酸鉛の遺伝子発現解析（一部抜粋）左から対照群、低用量、高用量

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

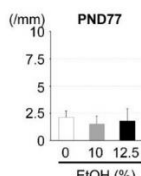
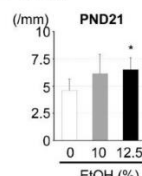
神経新生マーカー

GFAP



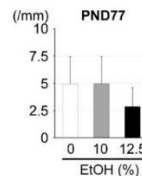
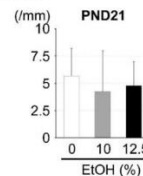
細胞増殖/アポトーシスマーカー

PCNA

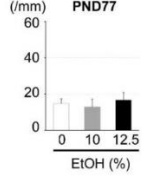
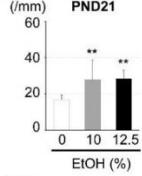


シナプス可塑性関連

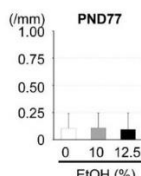
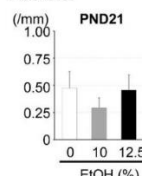
ARC



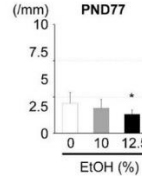
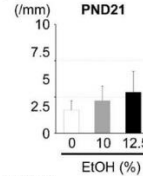
SOX2



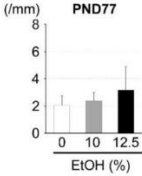
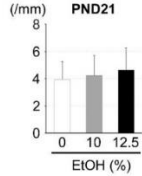
TUNEL



FOS

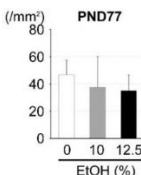
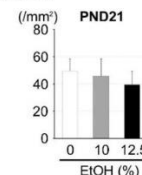


TBR2



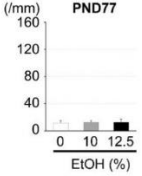
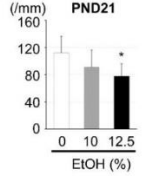
GABA性介在ニューロン

RELN

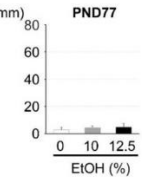
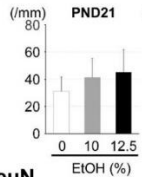


グリア細胞

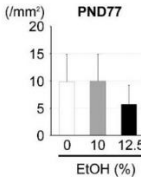
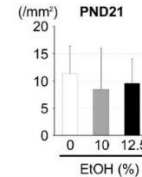
DCX



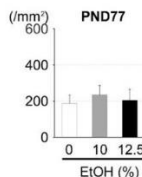
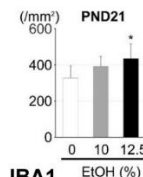
TUBB3



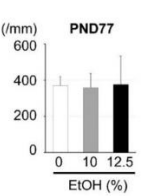
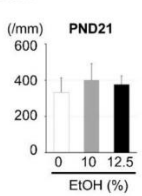
PVALB



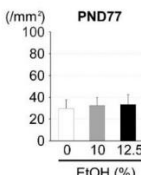
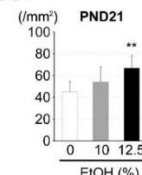
GFAP



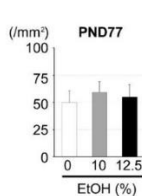
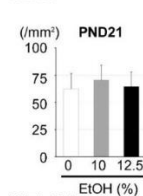
NeuN



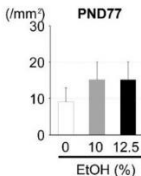
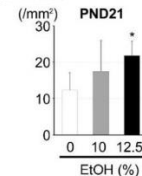
SST



IBA1



CALB2



MT- I / II

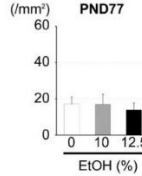
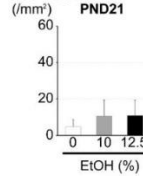


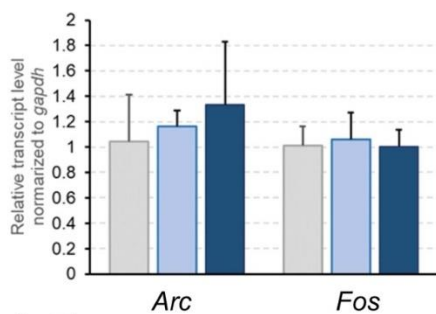
図3 エタノールの免疫組織学的解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0% controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

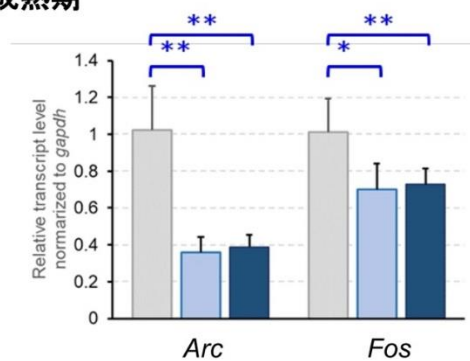
シナプス可塑性関連遺伝子

■ 0% EtOH(Ctrl) ■ 10% EtOH ■ 12.5% EtOH

離乳時

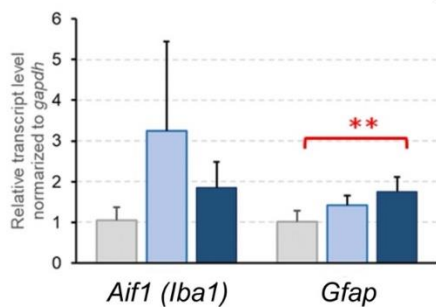


成熟期

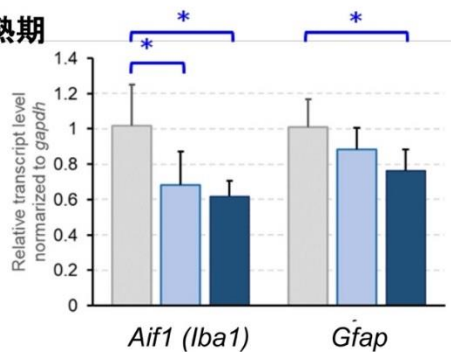


グリア細胞

離乳時

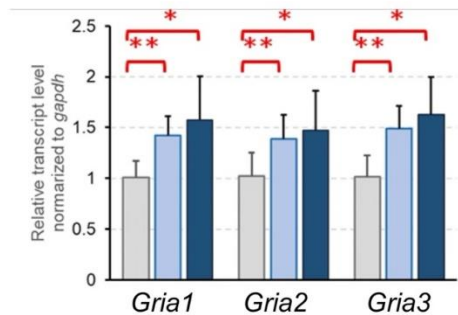


成熟期



AMPA型グルタミン酸受容体

離乳時



成熟期

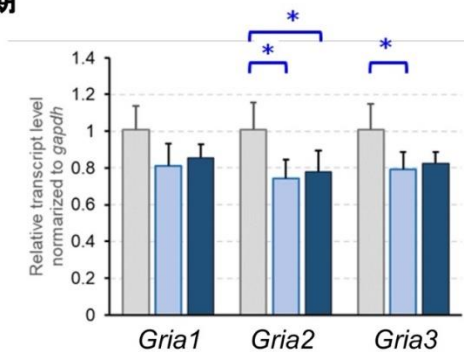


図4 エタノールの遺伝子発現解析 (一部抜粋) 左から対照群、低用量、高用量

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0% controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

神経新生マーカー

細胞増殖/アポトーシスマーカー GABA性介在ニューロン

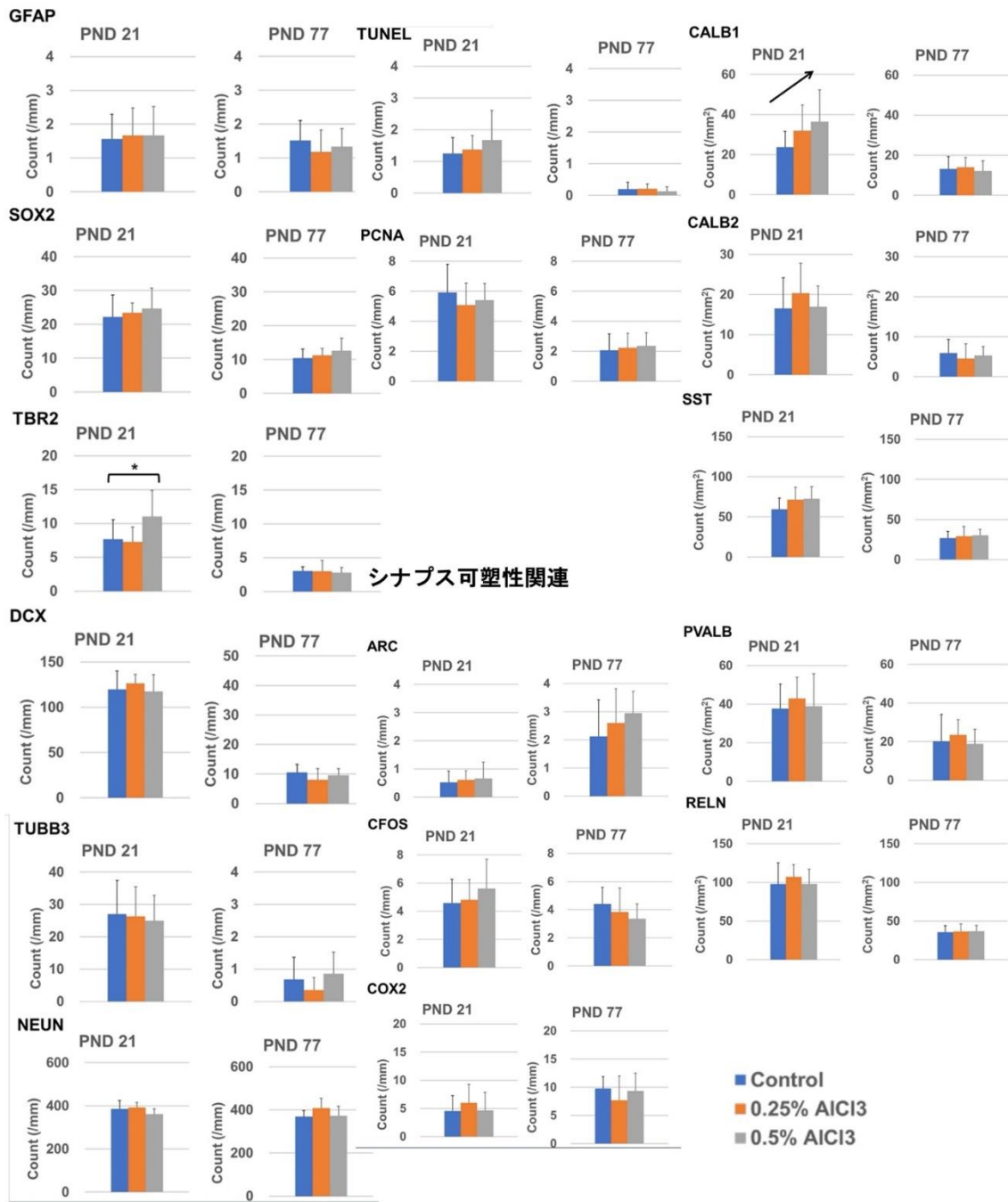


図5 塩化アルミニウムの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0% controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction.

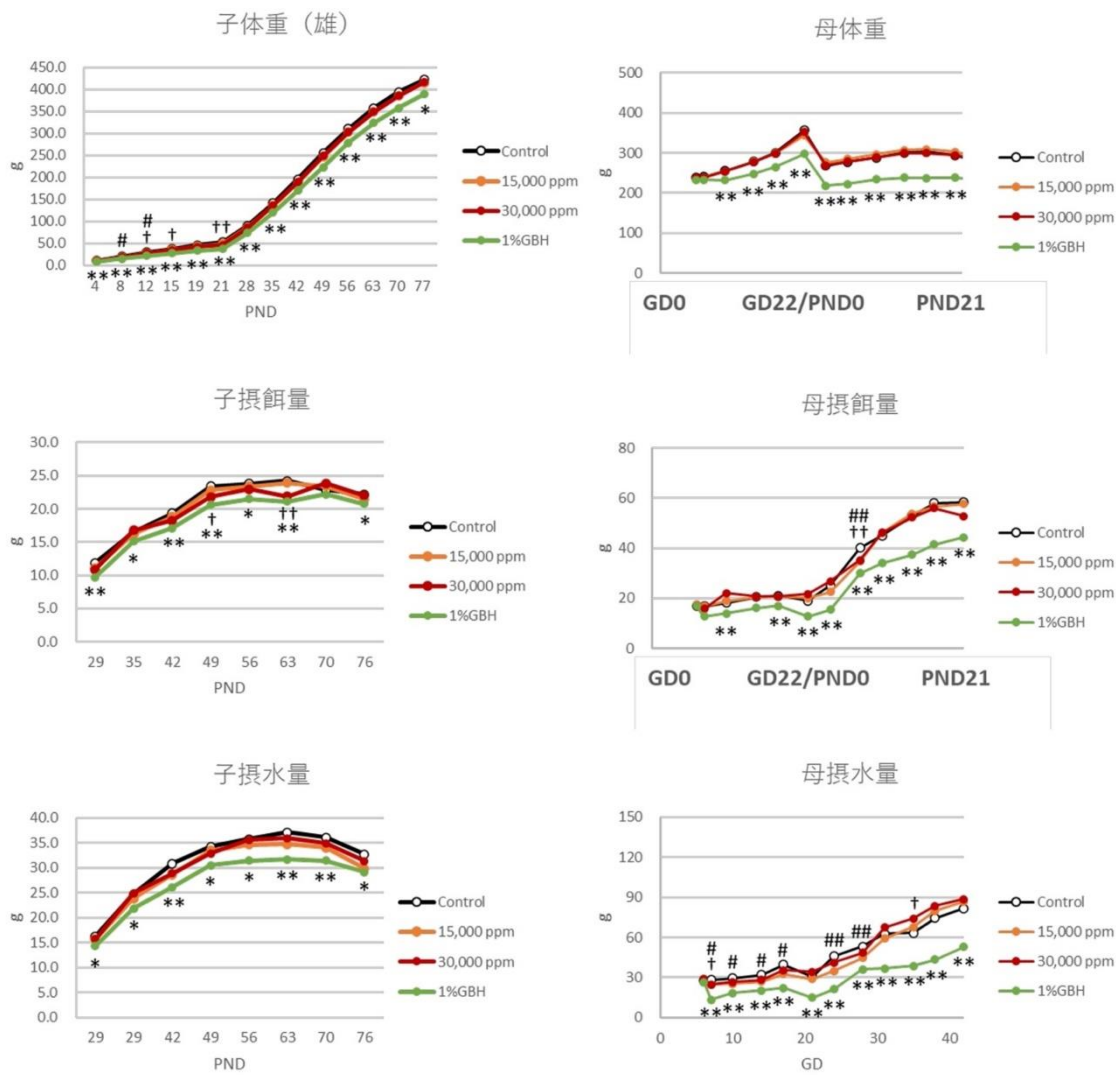


図6 グリホサート原体/含有製剤投与による母動物、児動物の体重、摂餌量、摂水量の変動
 $\#P < 0.05$, $\#P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction in 15,000 ppm glyphosate.
 $\dagger P < 0.05$, $\dagger\dagger P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction in 30,000 ppm glyphosate.
 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction in 1% glyphosate-based herbicide (GBH).

	PND21						PND77					
	Control			AIC13 0.5%			Control			AIC13 0.5%		
	Gene expression normalized to			Gene expression normalized to			Gene expression normalized to			Gene expression normalized to		
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>		<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>		<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>		<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	
<i>Gfap</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.14		1.00 ± 0.11	1.08 ± 0.17		1.03 ± 0.24	1.04 ± 0.30		0.96 ± 0.25	0.99 ± 0.23	
<i>Sox2</i>	1.04 ± 0.32	1.06 ± 0.40		0.64 ± 0.20 *	0.71 ± 0.28		1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.19		0.70 ± 0.25 *	0.71 ± 0.24 *	
<i>Tbr2</i>	1.07 ± 0.45	1.05 ± 0.37		1.44 ± 0.27	1.55 ± 0.27 *		1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.14		0.97 ± 0.42	1.00 ± 0.39	
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.18		1.11 ± 0.27	1.19 ± 0.28		1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.11		1.23 ± 0.28	1.26 ± 0.25 *	
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.25		0.97 ± 0.07	1.05 ± 0.16		1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08		1.07 ± 0.09	1.10 ± 0.11	
<i>Pvalb</i>	1.07 ± 0.47	1.09 ± 0.57		0.66 ± 0.26	0.69 ± 0.19		1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.17		1.00 ± 0.21	1.02 ± 0.21	
<i>Reln</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.20		0.98 ± 0.21	1.06 ± 0.29		1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.25		1.11 ± 0.21	1.14 ± 0.20	
<i>Gad1</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.16		0.78 ± 0.11 **	0.84 ± 0.14		1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.18		1.00 ± 0.21	1.02 ± 0.21	
<i>Sst</i>	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.27		1.10 ± 0.22	1.18 ± 0.21		1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.25		0.97 ± 0.16	1.00 ± 0.17	
<i>Calb1</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.14		0.95 ± 0.24	1.02 ± 0.22		1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.20		0.90 ± 0.21	0.93 ± 0.26	
<i>Arc</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.15		0.90 ± 0.28	0.97 ± 0.33		1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.18		0.94 ± 0.23	0.98 ± 0.24	
<i>cFos</i>	1.03 ± 0.27	1.04 ± 0.32		0.83 ± 0.11	0.89 ± 0.10		1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11		1.18 ± 0.37	1.21 ± 0.37	
<i>Ptgs2</i>	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.21		1.11 ± 0.24	1.19 ± 0.24		1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.10		1.00 ± 0.17	1.02 ± 0.17	
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.25		0.93 ± 0.09	1.00 ± 0.06		1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.13		1.06 ± 0.29	1.09 ± 0.26	
<i>Cdkn1a</i>	1.09 ± 0.54	1.12 ± 0.64		0.80 ± 0.19	0.87 ± 0.29		1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.25		1.33 ± 0.44	1.40 ± 0.50	
<i>Bax</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13		0.91 ± 0.14	0.98 ± 0.05		1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.12		0.90 ± 0.06 *	0.92 ± 0.05	
<i>Bcl2</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.20		0.88 ± 0.07	0.96 ± 0.19		1.02 ± 0.21	1.03 ± 0.28		1.04 ± 0.16	1.06 ± 0.14	
<i>Bcl2l1</i>	1.01 ± 0.18	1.03 ± 0.25		0.88 ± 0.13	0.96 ± 0.21		1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12		0.98 ± 0.14	1.01 ± 0.11	
<i>Casp3</i>	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.21		1.15 ± 0.60	1.21 ± 0.50		1.04 ± 0.33	1.04 ± 0.36		1.02 ± 0.31	1.02 ± 0.32	
<i>Casp6</i>	1.02 ± 0.27	1.04 ± 0.35		0.89 ± 0.14	0.97 ± 0.19		1.01 ± 0.11	1.02 ± 0.20		1.09 ± 0.62	1.10 ± 0.58	
<i>Casp8</i>	1.02 ± 0.22	1.03 ± 0.31		0.96 ± 0.18	1.03 ± 0.21		1.03 ± 0.26	1.03 ± 0.27		1.21 ± 0.55	1.23 ± 0.52	
<i>Casp9</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.18		0.95 ± 0.04	1.03 ± 0.15		1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.13		0.94 ± 0.11	0.96 ± 0.10	
<i>Casp12</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16		0.80 ± 0.16 *	0.88 ± 0.21		1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.21		1.26 ± 0.34	1.30 ± 0.32	
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.24		0.82 ± 0.11 *	0.89 ± 0.17		1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.21		0.90 ± 0.11	0.93 ± 0.12	
<i>Bdnf</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.17		0.99 ± 0.24	1.07 ± 0.26		1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.10		0.88 ± 0.06 **	0.90 ± 0.08	
<i>Tp53</i>	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.29		1.00 ± 0.40	1.17 ± 0.59		1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.12		1.09 ± 0.15	1.12 ± 0.11	
<i>Cdkn1b</i>	1.02 ± 0.23	1.04 ± 0.31		0.93 ± 0.11	1.07 ± 0.21		1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.11		1.08 ± 0.25	1.11 ± 0.23	
<i>p57</i>	1.04 ± 0.32	1.06 ± 0.42		0.80 ± 0.16	0.91 ± 0.15		1.02 ± 0.25	1.03 ± 0.25		1.18 ± 0.37	1.22 ± 0.38	
<i>Cdkn2b</i>	1.00 ± 0.11	1.06 ± 0.38		0.71 ± 0.15 **	0.82 ± 0.13		1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.28		1.03 ± 0.10	1.06 ± 0.13	
<i>Cdkn2c</i>	1.00 ± 0.08	1.04 ± 0.33		0.84 ± 0.12 *	0.98 ± 0.21		1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.21		1.07 ± 0.34	1.09 ± 0.31	
<i>Ccnd1</i>	1.07 ± 0.40	1.18 ± 0.62		0.61 ± 0.14 *	0.72 ± 0.20		1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.20		1.18 ± 0.48	1.20 ± 0.44	
<i>Ccnd2</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.25		1.01 ± 0.18	1.16 ± 0.11		1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.10		1.06 ± 0.13	1.09 ± 0.12	
<i>Cdk1</i>	1.02 ± 0.20	1.08 ± 0.42		0.69 ± 0.26 *	0.80 ± 0.30		1.06 ± 0.40	1.04 ± 0.31		0.96 ± 0.15	1.00 ± 0.18	
<i>Check1</i>	1.10 ± 0.59	1.11 ± 0.58		0.75 ± 0.28	0.86 ± 0.26		1.06 ± 0.41	1.06 ± 0.38		0.72 ± 0.28	0.74 ± 0.30	

表 1 塩化アルミニウムの遺伝子発現解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0 controls by Student's t-test or Aspin-Welch's t-test.

in vivo 動物試験の実施

研究分担者 吉田祥子 豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系

研究要旨

*in vivo*動物試験として、妊娠ラットに農薬グリホサートを25mg/kgから250mg/kgで妊娠16日に単回投与、あるいは妊娠2日から23日に0.1mg/kg/day, 1mg/kg/day, 9.1 mg/kg/day, 妊娠5日から20日に15.6mg/kg/dayの慢性投与を行った。農薬クロルピリホスを5mg/kgで妊娠16日に単回、または妊娠15日から19日に1mg/kg/dayで5日間の慢性投与を行い、また、農薬アセタミプリドを20mg/kgから60mg/kgで妊娠16日に単回投与した。各投与動物の生後2週での神経細胞死とミクログリア活性化を確認した。

グリホサートの単回投与により、炎症性サイトカインが増加し、高濃度曝露において神経死を誘発することが示唆された。250mg/kgグリホサート単回投与(250mg/kg)および慢性投与(15.6mg/kg/day)では、行動の萎縮が見られた。さらに投与動物の行動試験と腸内細菌叢の変化を測定し、神経毒性との関連を検証したところ、酪酸産生菌を中心に腸内細菌叢の変化が観察された。一方、慢性投与の0.1mg/kg/day, 1mg/kg/day投与動物では神経細胞に明瞭な異常は確認できなかった。

また、アセタミプリド、もしくはクロルピリホスの投与動物では神経細胞の配列の乱れ、過剰な生存が確認された。高濃度投与による母体への毒性も確認された。

A. 研究目的

OECD DNT EGの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。（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

（1）*in vivo*グリホサート投与試験

急性投与試験として、妊娠16日のラットに農薬グリホサートを25 mg/kg、100 mg/kg、250 mg/kg、単回投与し、出生仔の小脳発達、母ラットおよび出生仔の腸内細菌叢の解析、出生仔の行動観察を行った。慢性投与試験として妊娠2日から23日に0.1 mg/kg/day (Gly2.2)、1.0 mg/kg/day (Gly22)、9.1 mg/kg/day (Gly200)、また妊娠5日から20日に15.6 mg/kg/day (CGLY250)の慢性投与を行なった（すべて母体体重あたり）。

また、グリホサートの土壤中分解物であるaminomethyl-phosphonic acid (AMPA) 250 mg/kgの単回急性投与を行った。

回復試験として、グリホサート250 mg/kg単回投与した出生仔に、生後2日から8日まで400mg/kg/dayの酪酸ナトリウムの経口投与を行なった。

実験にはすべて雄性の出生仔を用いた。

グリホサートの高濃度投与は出生仔の体重増加を生後2週目から抑制した（図1）。またグリホサート単回投与動物では、生後2週での炎症性サイトカインの増加を確認し、農薬の高濃度曝露が遅発性の神経死を誘発することが示唆された。

さらに出生2週間後、投与濃度依存的なプルキンエ細胞の欠損が見られ、急性投与動物で顕著だった（図2）。

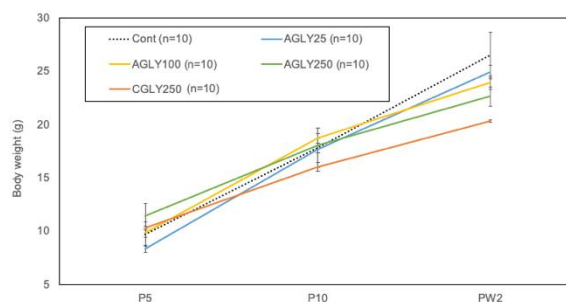


図1 グリホサート曝露による出生仔の体重変化

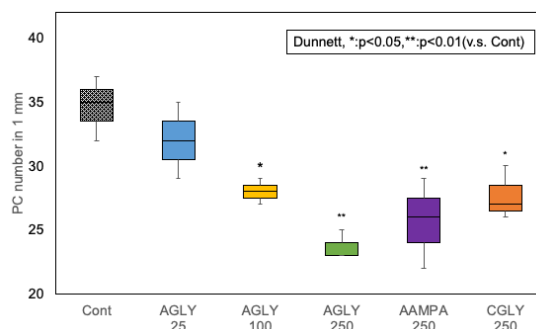


図2 グリホサート曝露による出生仔のプルキンエ細胞数の変化

出生2週間後、同時にミクログリア数の増加が観察され、こちらは慢性投与で顕著だった（図3）。

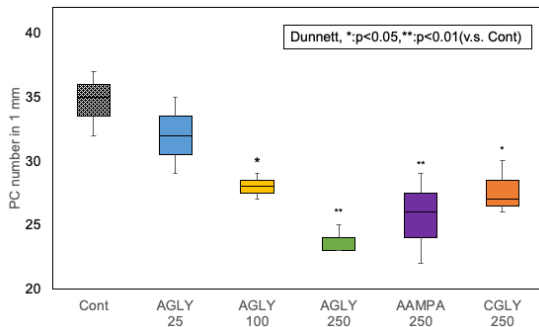


図3 グリホサート曝露による出生仔小脳のミクログリア数の変化

グリホサート曝露動物の離乳後の腸内細菌叢では、酪酸産生菌および乳酸産生菌の顕著な現象が見られた（図4）。腸内の酪酸は腸管からのムチン分泌を促し腸管保護作用を示すことから、出生仔に酪酸ナトリウムの経口投与を行なったところプルキンエ細胞数の回復とミクログリアの減少が確認された（図5、6）。

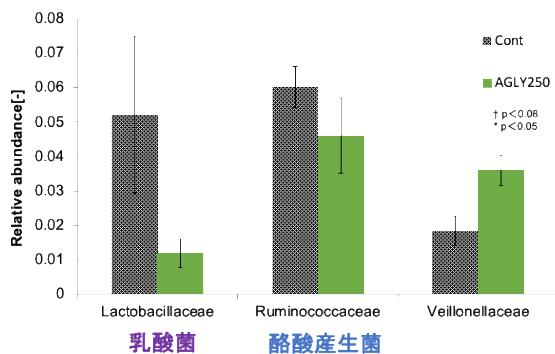


図4 グリホサート曝露による出生仔離乳後の腸内細菌叢の変化

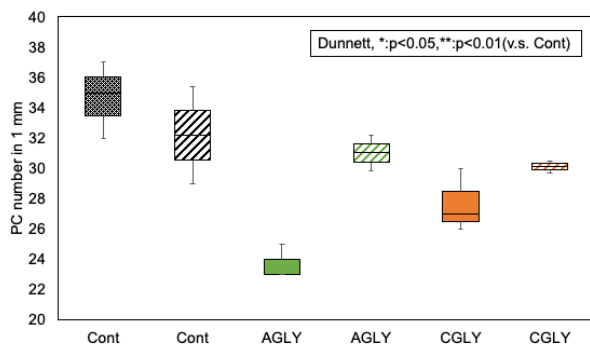


図5 グリホサート曝露動物に対する酪酸投与のプルキンエ細胞死に対する効果

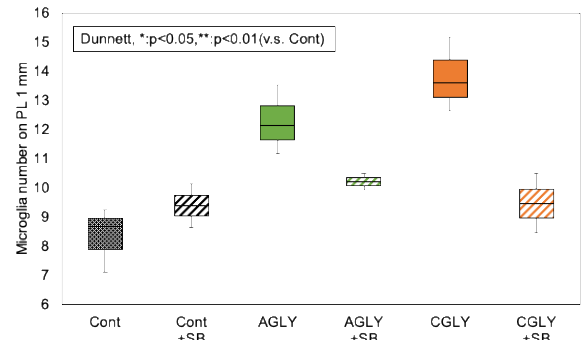


図6 グリホサート曝露によるミクログリア増加に対する酪酸の影響

250mg/kgのグリホサート 単回投与動物では、顕著な社会性行動の減少と不安様行動の増加が確認された（図7）。興味深いことに、酪酸投与により不安様行動は対照動物と同程度まで回復した。無投与動物に対する酪酸の投与は行動に影響しなかった（図8）。

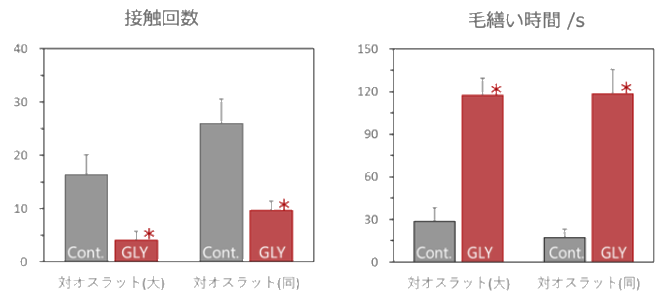


図7 グリホサート曝露動物の社会性行動と不安様行動の変化

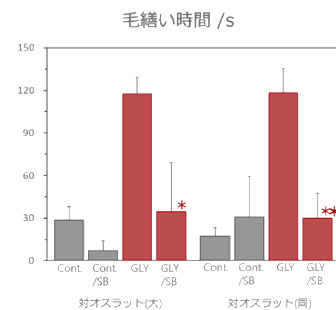


図8 グリホサート曝露による行動変化に対する酪酸の影響

一方、0.1mg/kg/day, 1mg/kg/day慢性グリホサート投与では、プルキンエ細胞数およびミクログリア数においてに明瞭な異常は確認できなかった（図9）。

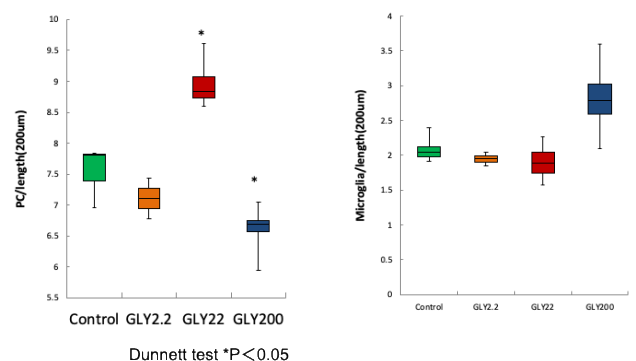


図9 グリホサート慢性曝露によるプルキンエとミクログリア数の変化

(2) *in vivo*クロルピリホス投与試験

急性投与試験として、妊娠16日のラットに農薬クロルピリホスを5mg/kgで単回投与し、出生仔の小脳発達、出生仔の行動観察を行った。慢性投与試験として、妊娠15日から19日に1mg/kg/dayの慢性投与を行った。

発展実験として、クロルピリホスと同様のアセチルコリンエステラーゼ阻害効果を持つ医薬品のドネペジルを0.59mg/kgで単回投与し、出生仔の小脳発達、出生仔の行動観察を行った。実験にはすべて雄性の出生仔を用いた。

クロルピリホスまたはドネペジルの投与により、生後2週の出生仔小脳でプルキンエ細胞の樹状突起の短縮、プルキンエ細胞数の増加がみられ、ドネペジル投与で顕著だった(図10)。

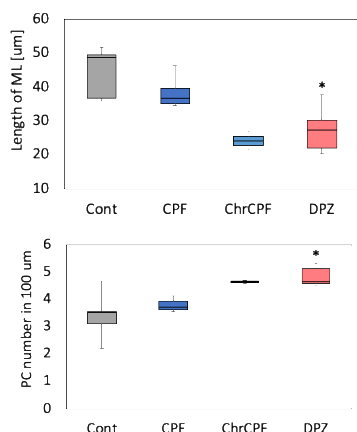


図10 クロルピリホス曝露による樹状突起短縮(上)とプルキンエ細胞数の増加(下)

これらの曝露動物の生後すぐの寝返りおよび水泳能力試験を行ったところ、対照動物では生後1週間で寝返りが容易になる一方、クロルピリホスまたはドネペジル曝露動物では寝返りに時間がかかる状態が続いた(図11)。水泳能力の低下も観察された。

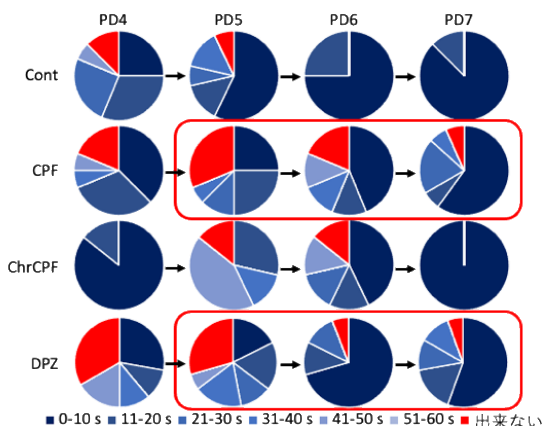


図11 クロルピリホス曝露による寝返りにかかる時間の増加

(3) *in vivo*アセタミプリド投与試験

急性投与試験として、妊娠16日のラットに農薬アセタミプリドをDMSOに溶解し餌に混和して20mg/kg、40mg/kg、60mg/kgで単回投与し、出生仔の小脳発達、の観察を行った。

アセタミプリドの曝露は濃度依存的なプルキンエ細胞数の減少とミクログリア数の増加をもたらした(図12)。

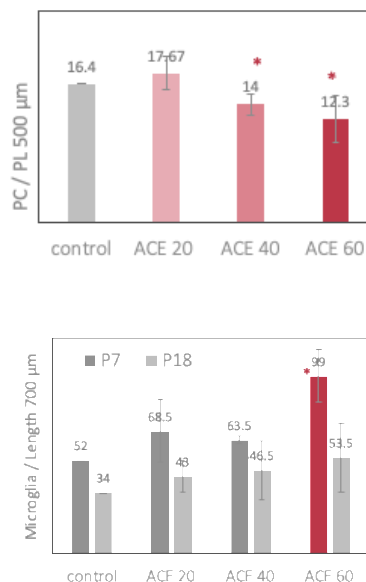


図12 アセタミプリド曝露によるプルキンエ細胞数の減少(上)とミクログリアの増加(下)

アセタミプリド曝露動物では神経細胞死もあるが、プルキンエ細胞が層状に並ばず乱れた配置を示すことが特徴的だった。アセタミプリド、およびクロルピリホスの投与動物では神経細胞の配列の乱れ、神経細胞の過剰な生存とともに、高濃度投与による母体への毒性も確認された。

D. 考察

高濃度のグリホサート投与動物において、遅発性の神経死を誘導すること、および酪酸産生菌を減少させるなどの腸内細菌叢に影響を与えることを示した。一方低濃度グリホサート投与ではこれらの影響があまり見られず、アセタミプリド、クロルピリホスを含めてより低濃度での慢性投与による影響を検討する必要がある。

E. 結論

*in vivo*動物試験によって、胎児期の農薬投与による発達神経毒性の可能性が示された。神経死に付随して炎症性サイトカインの増加、行動異常、腸内細菌叢の変化が観察された。これらの動物試験の結果を*in vitro*測定系につなげるために、今後最適な生理学的変化を選択する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tiong TKS, Futagami K, Lee CLM, Ohmuro T, Huang YL, Nomura Y, Yoshida S. Prenatal glyphosate exposure to rat in vivo altered the cerebellar development and behavior of the offspring. (submitted)

2. 学会発表

1. Futagami K, Tiong TKS, Lee CLM, Huang YL, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S : Chronic glyphosate exposure elicits neuronal cell death and microglia activation in developing rat cerebellum.
第 47 回日本毒性学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
2. Christine Lee Li Mei, Rie Matsufusa, Thomas Tiong Kwong Soon, Johnny Lopez, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Potentiation of developmental malformation and neurotoxicity of neonicotinoid insecticide, Acetamiprid
第 47 回日本毒性学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
3. Takuhei Ohmuro, Kana Miyamoto, Thomas Tiong Kwong Soon, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Behavioral alteration and microbiome transition of the prenatal glyphosate-treated rat.
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン (優秀発表賞受賞)
4. Christine Lee Li Mei, Takuhei Ohmuro, Thomas Tiong Kwong Soon, Johnny Lopez, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : High-dose neonicotinoid insecticide, Acetamiprid induces Purkinje cell malformation and behavioral alteration
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
5. Misaki Iwanaga, Midori Fukushima, Sarasa Matsui, Akari Adachi, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Chemical-induced alteration of Purkinje cell development was related to GLAST expression
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
6. Shigehisa Satake, Ken Futagami, Thomas Tiong Kwong Soon, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : The neurodevelopmental toxicity of chronic glyphosate exposure in developing rat cerebellum.
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
7. Rie Matsufusa, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Mechanism of developmental neurotoxicity of chlorpyrifos due to AChE inhibition
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
8. Haruko Ohtsuka, Sharumadi Veloo, Kazunobu Tsunemoto, Thomas Tiong Kwong Soon, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Cytological mechanism of developmental neurotoxicity embryonic LPS exposure
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
9. Ken Futagami, Thomas Tiong Kwong Soon, Christine Lee Li Mei, Haruko Ohtsuka, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Delayed neurotoxicity of prenatal glyphosate exposure and microglial activation
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
10. Kiyoshi Umemura, Misaki Iwanaga, Shizuka Nakada, Thomas Tiong Kwong Soon, Edo Bagus Prastika, Kazuto Kobayashi, Naohiro Hozumi, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Physiological properties of cultured microglia from glyphosate-exposed rat cerebellum
第 63 回日本神経化学会 (2020. 06. 29-07. 01) オンライン
11. Christine Lee Li Mei, Thomas Tiong Kwong Soon, Johnny Lopez, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Neurotoxicity of acute exposure of neonicotinoid, Acetamiprid in developing cerebellum. 第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン
12. Sharumadi Veloo, Haruko Ohtsuka, Kazunobu Tsunemoto, Thomas Tiong Kwong Soon, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : The possibility of epigenetic alteration due to LPS neurotoxicity
第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン
13. Takaya Inakawa, Thomas Tiong Kwong Soon, Ken Futagami, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Examining the association between a model of butyrate recovery in glyphosate-treated rats and changes in flora in a single dose of butyrate.
第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン
14. Shigehisa Satake, Ken Futagami, Thomas Tiong Kwong Soon, Yoko Nomura, Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : The developmental effect of chronic and low concentration of Glyphosate exposure in utero.
第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン
15. Sarasa Matsui, Akari Adachi, Misaki Iwanaga,

Yasunari Kanda, Sachiko Yoshida : Effects of prenatal administration of various HDAC inhibitors to rat cerebellar development.

第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン

16. Sachiko Yoshida, Yoko Nomura, Yasunari Kanda : Development-progressive neurotoxicity regulated neuroinflammation with prenatal chemical exposure on the rat.

第 98 回日本生理学会大会 (2021. 3. 30) オンライン

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今年度なし

2. 実用新案登録

今年度なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

(19KD1003)

研究成果報告書

分担課題: インシリコ評価法の開発

研究分担者 吉成浩一 静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野 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、文献情報から発達神経毒性関連物質のデータセットを作成し、統計学的及び機械学習手法を利用して、発達神経毒性を示す物質の構造化学的特徴の抽出を試みた。その結果、発達神経を示す物質は、脂溶性や不飽和度が高いこと、環状構造を示すことなどが明らかになった。これら特徴は、組織・胎児への移行性と関連すると考えられた。また、判別モデルを作成したが、その精度は十分ではなかった。さらに、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、発生毒性試験及び反復投与毒性試験情報を抽出し、いずれの試験においても 400 以上の試験データを収集できた。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に有用なデータベースであると考えられる。

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

既報の文献 (*Neurotoxicol Teratol* 52: 25-35, 2015) に掲載されている 409 物質から、発達神経毒性が報告されている物質 164 物質と、関連報告がない 245 物質に分け、前者を発達神経毒性陽性、後者を陰性と定義した。これらの物質について、PubChem から SMILES 情報を抽出し、ChemDraw (PerkinElmer) 及び Open Babel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page) を利用して被験物質の二次元構造を sdf フォーマットで整理した。作成した sdf ファイル情報を用いて alvaDesc (Alvascience) により分子記述子を計算した。なお、記述子計算の際には、Na イオン、アンモニウムイオン、塩化物イオンは削除してイオン体とし、グリホサートトリメシウム塩及びカラギーナン酢酸亜鉛塩はそれぞれグリホサート及びカラギーナンとした。また、メチルデメトン は *S*-メチル体 (デメトン-S) と *O*-メチル体の混合物であるが、デメトン-S が別物質として含まれていたことから *O*-メチル体とした。

データ整理には Microsoft Excel、統計的解析、決定木解析及び Bootstrap Forest には 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。さらに、当研究室で過去に作成したラット 90 日間反復投与毒性試験、及び 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験データベースの拡充を行うため、これらの情報についても農薬評価書から抽出した。

(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

収集した 409 物質のうち、異性体混合物、金属含有物質、分子量が 1,000 以上の物質、10%以上の記述子が計算できなかった物質を削除した。その結果、最終的に発達神経毒性陽性の 164 物質、陰性の 201 物質が得られ、これらをデータセットとして以下の解析に用いた。

まず、alvaDesc で計算された 3874 種の分子記述子の中央値を、Wilcoxon の順位和検定により発達神経毒性陽性物質及び陰性物質間で比較した。その結果、698 記述子の中央値が有意水準 $P < 0.01$ で異なることが明らかになった (データ示さず)。

alvaDesc では各分子記述子をいくつかのグループに分けている。そこで、比較的理解しやすい 6 つのグループ、すなわち分子量や原子数などの基本的な記述子を含む「Constitutional indices」グループ、環状構造関連記述子を含む「Ring descriptors」グループ、van der Waals 表面積に関連する記述子を含む「P_VSA-like descriptors」グループ、官能基関連記述子を含む「Functional group counts」グループ、原子間の結合様式に関連する記述子を含む「Atom-centred fragments」グループ、LogP、結合、表面積など基本的な物性関連記述子を含む「Molecular properties」グル

ープの記述子に着目したところ、698 記述子から 49 記述子を見出すことができた (表 1)。これらのうち、最も P 値の小さかった H%を除く全ての記述子において中央値又は平均値は陽性物質で大きかった。得られた記述子の種類を見ると、P_VSA_ppp_cyc、nCIC、nCIR、TRS、nR06、Rperim、MCD、nR11、D/Dtr11、RCI、Rbrid など、環状構造に関するものが 49 種中 19 種と非常に多かった。また、陽性物質では H% (水素原子数の割合) の値が小さいのに対して、nCsp2 (sp2 炭素原子数) や nBM (多重結合の数)、Uc (不飽和数)、Ui (不飽和指数)、nRNHR (第二級アミンの数) の値が大きいことから、陽性物質は不飽和結合を多く含むことが示唆された。van der Waals 力に関する記述子も比較的多く上位に認められ、nHDon (水素結合ドナー数) も同定された。

次に、機械学習法の 1 つである Bootstrap Forest 法を利用して、発達神経毒性陽性物質と陰性物質を判別する際の寄与率の高い分子記述子を探索した。具体的には JMP Pro を利用して Bootstrap Forest 法を 5 回施行し、各回の各記述子の寄与率の平均値を算出した。説明変数には、計算した記述子のうち、上述の 6 グループの記述子を利用した。表 2 に上位 50 記述子を示した。第一位は表 1 と同様に H%であった。陽性物質と陰性物質でこれらの記述子の平均値を比較したところ、H%に加えて、ALOGP、P_VSA_LogP_8、RBF 及び P_VSA_i_1 では陽性物質で高かったが、その他の 45 記述子では陰性物質で高値を示した。

記述子の種類を表 1 と比較すると、環状構造に関する記述指数は著しく少なく、それに対して van der Waals 表面積に関するパラメータが非常に多く認められた。これは、環状構造に関するパラメータは自然数を示すものが多いのに対して van der Waals 表面積関連記述子は連続数の計算値であることから、決定木をベースとした Bootstrap Forest 法では後者が選択されやすかったためと考えている。

van der Waals 表面積関連記述子以外では、表 1 では認められなかった不飽和・脂溶性に関する記述子 AMW (平均分子量) や LogP 関連記述子が認められた。

2. 発達神経毒性判別モデルの構築

次に、決定木による発達神経毒性の判別モデルの構築を行った。JMP Pro を利用し、上述の 6 グループの記述子を説明変数として得られたモデルを図 1 に示した。分岐の最小サイズは 37 物質 (全物質数の 10%) とし、最大まで分岐させた。このモデルでは、第一分岐の条件には、上記の解析で同定された H%が利用され、「57.7%以上であれば陰性」という条件であった。この条件に当てはまる物質の構造を図 2 に示す。この判別により、49 の陰性物質 (全陰性物質の 24%) が正しく分類された。57.7%未満の物質については、nC (sp3 炭素原子の総数) が 1 以上及び MCD (分子環状度) が 0.59 以上の場合陽性という条件が得られた。この条件に当てはまる物質の構造を図 3 に示す。これにより 41 の陽性物質 (全陽性物質の 25%) が正しく判別された。モデル全体としては、感度 (陽性物質の正解率) が 0.71、特異度 (陰性物質の正解率) が 0.72、一致率は 0.72 であった。

最後に、より精度の高い判別を目指し、計算した全 3874 種の分子記述子を用いた決定木を作成した。分岐の最小サイズは上と同様に 37 とした。得られたモデルを図 4 に示した。得られた決定木の第一分岐には、先に作成したモデルと同様に H%が用いられたが、それ以降の分岐には MATS や ATSC などの自己相関記述子が多く利用された。このモデルの感度、特異度及び一致率はそれぞれ 0.79、0.69 及び 0.73 であり、6 グループ記述子

を用いた場合より分類の精度はわずかに高くなった。

3. 毒性試験データの収集

昨年度に引き続き、食品安全委員会で公開されている農薬評価書を収集し、ラット二世又は三世代繁殖試験、発生毒性試験、90 日間反復投与毒性試験、並びに 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験の結果を収集した。その結果、繁殖試験では、357 物質、420 試験、発生毒性試験では 360 物質、471 試験、90 日間試験では 353 物質、509 試験 (2 試験は雌雄片方のみ)、2 年間試験では 268 物質、432 試験 (3 試験では雌雄片方のみ) の情報を収集することができた。得られた情報は Microsoft Excel を利用して整理した。

繁殖試験及び発生毒性試験では、親シートと仔シートに分け、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。繁殖試験については入力内容のダブルチェックが終了した。発生毒性試験については現在入力内容のダブルチェック中であり、次年度開始時までには終了する見込みである。

それぞれの試験で認められた毒性所見については、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) に従い、所見の整理、グループ化を行った。繁殖毒性・発生毒性に関連する所見に関しては、本類義語集には含まれていないことから、入力内容のダブルチェックが終了した後、整理した所見を実験動物病理の専門家に確認を依頼する予定である。

D. 考察

発達神経毒性物質の化学構造的特徴

毒性と関連する構造的な特徴の同定には、対象とする毒性を示す物質と示さない物質を含むデータセットが必要である。しかしながら、発達神経毒性に関してはそのようなデータセットが存在しない。そこで本研究では、文献調査により見出した、約 400 物質についてデータベース検索を行い、それらの発達神経毒性との関連性を報告している文献の情報に基づいて、発達神経毒性陽性 164 物質、陰性 201 物質からなるデータセットを作成した。

これらのデータセットに含まれる物質の二次元構造を取得して分子記述子を計算し、Wilcoxon の順位と検定並びに機械学習法の 1 つである Bootstrap Forest 法による判別における寄与度の比較により、陽性物質と陰性物質の違いを特徴づける構造的な特徴の同定を試みたところ、得られた分子記述子の種類から、発達神経毒性を示す物質は、分子内の飽和度が高い、環状構造を有する、分子間相互作用しやすい、脂溶性が高い、などの特徴を有すると考えられた。これらの結果は、発達神経毒性を示す物質は組織移行性が高く、脳血液関門や胎盤血液関門などを通過しやすいこと、また生体内高分子との反応性が高いことを示唆しているものと思われる。

この解析には、まず計算可能であった 3874 種の全分子記述子を利用したが、自己相関記述子など、数値から構造上の理解が難しい記述子が多く認められたことから、計算に利用した alvaDesc の記述子分類を活用し、比較的理解しやすい「Constitutional indices」、「Ring descriptors」、「P_VSA-like descriptors」、「Functional group counts」、「Atom-centred fragments」及び「Molecular properties」の 6 グループ

ブの記述子を利用した。このうち「Functional group counts」は約 200 種の原子数や官能基などの部分化学構造に関する記述子を含むが、今回の解析ではこれらはほとんど見出すことができなかった。これは、発達神経毒性の発現が特定の部分化学構造に寄らないというよりは、データセットに含まれる陽性物質が多様であり、同一の機序で毒性を示す物質数が少ないことがその一因となっていると考えられる。そのため、今後はデータセットを化学構造の類似性によりサブグループに分け、サブグループ内での化学構造の特徴抽出などを試みる予定である。ただし、データセット内の物質数が限られていることから、適切なサブグループ化が必要であると考えられる。また、必要に応じてデータの拡充も検討する必要がある。

本研究ではさらに、化学構造に基づいた発達神経毒性予測モデルの構築を目指し、分子記述子を説明変数とした決定木解析を行った。上述の解析で利用した 6 グループの分子記述子に加えて、3874 種の全分子記述子を説明変数とする解析を行った。その結果、前者の場合感度 0.71、特異度 0.72、一致率 0.72 と精度は高くなかったが、後者では、感度、特異度及び一致率はそれぞれ 0.79、0.69 及び 0.73 となり、感度と一致率の向上が認められた。今回は判別の精度を上げることが目的とし、内部検証も行っていないため、過学習となっていること可能性は高いが、それでも一致率は 0.73 程度であり、判別モデルとしては必ずしも高い値ではなかった。昨年、限られた被験物質で同様の解析を実施したところ、7 種の分子記述子により一致率 0.890 のモデルが得られており、その値よりも低かった。これは、昨年のデータセット（陽性 175 物質、陰性 44 物質）に比べて、今年のデータセットは物質数、特に陰性物質の数が著しく増えたことが原因の 1 つであると考えられる。

決定木解析の結果、同じ条件で分類された化学物質の中には、化学構造が類似しているにも関わらず、発達神経毒性の有無が異なる物質が認められた。例えば図 2 では、アルコキシエーテル類とその類似物質の多く（DNT200、DNT352、DNT408、DNT409）は陰性として正しく分類されたが、DNT102 は陰性であった。また、1-ペンタノール（DNT193）、2-プロパノール（DNT272）は陰性として正しく分類されたが、メタノール（DNT062）、エタノール（DNT045）は陽性であった。図 3 では、ステロイド骨格を有する DNT036、DNT133 は陽性として正しく分類されたが、DNT358、DNT371、DNT383 は陰性であった。今後、このような化学構造的に類似しているにも関わらず発達神経毒性の有無が異なる物質の物理化学的特徴の差異、さらにはインビトロ試験等における生物学的特徴の解析が、発達神経毒性を示す物質を正しく分類するために有用と思われる。

今回データセット作成に用いた論文では、まず、過去の文献情報に基づいて約 400 物質の初期リストを作成し、これらの物質について、PubMed 及び Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART) にて、

- 1) Chemical name + developmental + neurotoxicity
- 2) Chemical name + developmental + toxicity
- 3) Chemical name + developmental
- 4) Chemical name + nervous system + toxicity
- 5) Chemical name + brain + toxicity
- 6) Chemical name + nervous system
- 7) Chemical name + neurotoxicity
- 8) Chemical name + brain
- 9) Chemical name + toxicity
- 10) Chemical name

の 10 種の検索式で検索を実施し、「two references are

cited representing studies from different laboratories」とされた 81 物質及び「chemicals with developmental neurotoxicity data limited to one laboratory」とされた 83 物質を陽性物質、それ以外の物質を陰性物質とした。検索方法は適切と考えられるが、この論文は 2015 年に出版されていることから、陰性と定義した物質の発達神経毒性が後日明らかになっている可能性、ならびに 1 つの研究室からの報告しかない物質のデータの信頼性に問題がある可能性は否定できない。そのため、今後はデータセットの精度を検証する必要もある。分子記述子を利用したクラスタリング解析や主成分分析によりデータセット内の物質の類似性を評価し、化学構造的な類似性と発達神経毒性の有無を比較することが、実験データ検証作業に有用と考えている。

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、食品安全委員会で公開されている農薬評価書を利用して毒性試験情報を収集することとした。約 2 年の期間を要したが、ラット二世代又は三世代繁殖試験、発生毒性試験、90 日間反復投与毒性試験、並びに 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験のそれぞれについて、400 を超える試験結果を収集、整理することができた。このようなデータベースは他にはなく、データベース自体が非常に貴重な成果と考えている。

次年度は、これら試験について神経毒性と関連する所見を独自に定義して解析用のデータセットを作成し、前述のような化学構造と神経毒性との関連性を解析するとともに、文献情報から得たデータと統合して、発達神経毒性・神経毒性の判別・予測モデルの構築を進める予定である。

E. 結論

論文情報を利用して発達神経毒性の化学物質データセットを独自に作成し、発達神経毒性を示す物質の物理化学的特徴の一端を明らかにした。また、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、発生毒性試験、反復投与毒性試験のデータを収集し、データベース化した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 浅井崇徳、吉成浩一、佐々木崇光、保坂卓臣、志津 怜太、諫田泰成；発達神経毒性が懸念される化学物質の化学構造的特徴の解析。第 47 回日本毒理学学会学術年会、2020 年 6 月 29 日-7 月 1 日、オンライン
2. 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、管野 裕 一朗、吉成浩一；発達神経毒性を示す化学物質の化学構造的特徴の解析。日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 27 日-29 日、オンライン

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

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

	Descriptor	P value	Positives				Negatives				Description
			Min.	Median	Max.	Ave.	Min.	Median	Max.	Ave	
1	H%	<0.0001	0	46.23	70	42.95	0	50	70.59	47.84	percentage of H atoms
2	P_VSA_ppp_cyc	0.0001	0	48.96	217.4	53.02	0	27.65	170.2	35.73	P_VSA-like on potential pharmacophore points, cyc - atoms belonging to cycles
3	P_VSA_s_6	0.0002	0	94.99	416.6	112.4	0	70.68	533.1	88.83	P_VSA-like on I-state, bin 6
4	nCiC	0.0003	0	1	8	1.793	0	1	9	1.184	number of rings (cyclomatic number)
5	nCiR	0.0003	0	1	28	3.189	0	1	28	1.706	number of circuits
6	TRS	0.0005	0	6	51	10.41	0	6	54	6.811	total ring size
7	Mv	0.0007	0.461	0.622	1.125	0.651	0.428	0.601	1.05	0.618	mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom)
8	C-040	0.0008	0	0	4	0.671	0	0	4	0.423	R-C(=X)-X / R-C#X / X=C=X
9	P_VSA_ppp_ter	0.0009	0	98.43	416.6	115.5	0	74.62	472.7	96.03	P_VSA-like on potential pharmacophore points, ter - terminal atoms
10	Cl-090	0.0009	0	0	4	0.128	0	0	2	0.015	Cl attached to C2(sp2)-C4(sp2)/C1(sp)/C4(sp3)/X
11	nR06	0.0010	0	1	5	1.299	0	1	6	0.905	number of 6-membered rings
12	P_VSA_LogP_6	0.0010	0	0	156.6	14.28	0	0	141	6.905	P_VSA-like on LogP, bin 6
13	C-008	0.0010	0	0	12	0.762	0	0	12	0.353	CHR2X
14	Rperim	0.0011	0	6	41	8.848	0	6	36	6.164	ring perimeter
15	MCD	0.0013	0	0.509	1	0.431	0	0.353	1	0.333	molecular cyclized degree
16	nCsp2	0.0018	0	6	24	6.5	0	4	32	4.98	number of sp2 hybridized Carbon atoms
17	nR11	0.0018	0	0	3	0.116	0	0	2	0.015	number of 11-membered rings
18	D/Dtr11	0.0020	0	0	204.1	7.69	0	0	385.1	2.743	distance/detour ring index of order 11
19	SAacc	0.0020	0	71.23	324.9	81.05	0	50.75	551.1	65.85	surface area of acceptor atoms from P_VSA-like descriptors
20	Me	0.0022	0.959	1.015	1.327	1.032	0.829	1.009	1.216	1.015	mean atomic Sanderson electronegativity (scaled on Carbon atom)
21	P_VSA_v_2	0.0022	0	71.32	324.9	81.48	0	51.58	551.1	66.88	P_VSA-like on van der Waals volume, bin 2
22	RCI	0.0026	0	1	2.3	0.817	0	1	2.3	0.666	ring complexity index
23	nHDon	0.0028	0	1	7	1.152	0	0	16	0.816	number of donor atoms for H-bonds (N and O)
24	H-053	0.0028	0	0	4	0.262	0	0	12	0.114	H attached to C0(sp3) with 2X attached to next C
25	H-050	0.0029	0	1	7	1.171	0	0	16	0.821	H attached to heteroatom
26	SCBO	0.0032	1	21	75	22.79	1	17	90	18.91	sum of conventional bond orders (H-depleted)
27	nArOR	0.0033	0	0	4	0.232	0	0	3	0.08	number of ethers (aromatic)
28	Rbrid	0.0038	0	0	9	0.78	0	0	9	0.323	ring bridge count
29	nBM	0.0040	0	7	25	6.738	0	3	44	5.567	number of multiple bonds
30	Uc	0.0040	0	3	4.7	2.529	0	2	5.492	2.101	unsaturation count
31	RFD	0.0044	0	0	1.8	0.097	0	0	1.8	0.043	ring fusion density
32	P_VSA_p_2	0.0044	0	67.83	324.9	78.84	0	50.1	551.1	64.19	P_VSA-like on polarizability, bin 2
33	nBO	0.0045	1	18	69	18.46	1	14	68	15.24	number of non-H bonds
34	Ui	0.0050	0	2.322	3.858	2.16	0	2	4.807	1.822	unsaturation index
35	D/Dtr06	0.0053	0	54.05	796.8	90.33	0	22.46	1185	65.99	distance/detour ring index of order 6
36	nR05	0.0064	0	0	4	0.427	0	0	4	0.229	number of 5-membered rings
37	C%	0.0065	0	36.36	54.55	34.95	0	33.33	57.14	32.71	percentage of C atoms
38	P_VSA_i_4	0.0066	0	13.34	154.1	20.74	0	0	183.2	17.47	P_VSA-like on ionization potential, bin 4
39	nCXr=	0.0066	0	0	2	0.098	0	0	2	0.015	number of X on ring C(sp2)
40	P_VSA_LogP_2	0.0071	0	9.185	72.97	14.42	0	5.069	131.6	11.67	P_VSA-like on LogP, bin 2
41	D/Dtr05	0.0085	0	0	267.2	19.7	0	0	237.8	12.2	distance/detour ring index of order 5
42	C-011	0.0086	0	0	8	0.287	0	0	8	0.149	CR3X
43	C-025	0.0088	0	0	4	0.72	0	0	8	0.567	R--CR--R
44	P_VSA_e_3	0.0090	0	9.794	154.1	20.89	0	0	183.8	17.07	P_VSA-like on Sanderson electronegativity, bin 3
45	D/Dtr09	0.0093	0	0	268.4	18.55	0	0	895.6	12.7	distance/detour ring index of order 9
46	P_VSA_ppp_L	0.0093	0	64.18	391.5	84.3	0	51.23	469.8	64.53	P_VSA-like on potential pharmacophore points, L - lipophilic
47	nR09	0.0096	0	0	4	0.25	0	0	6	0.124	number of 9-membered rings
48	NRS	0.0099	0	1	4	1.189	0	1	4	0.915	number of ring systems
49	nRNHR	0.0099	0	0	2	0.073	0	0	1	0.015	number of secondary amines (aliphatic)

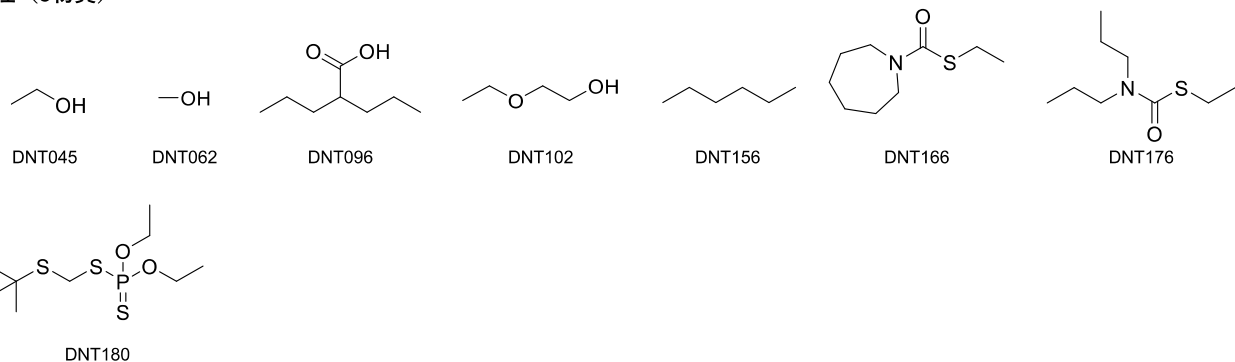
青色及び緑色はそれぞれ不飽和度及び環状構造に関する分子記述子を示す。

表2 Bootstrap Forest法における寄与率が高い上位50種の分子記述子

	Descriptor	Contribution ratio	Description	Average	
				Positives	Negatives
1	H%	0.0309	percentage of H atoms	42.95	47.84
2	Mv	0.0207	mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom)	0.65	0.62
3	P_VSA_ppp_cyc	0.0191	P_VSA-like on potential pharmacophore points, cyc - atoms belonging to cyc	53.02	35.73
4	Hy	0.0161	hydrophilic factor	0.16	-0.04
5	P_VSA_LogP_2	0.0146	P_VSA-like on LogP, bin 2	14.42	11.67
6	C%	0.0142	percentage of C atoms	34.95	32.71
7	P_VSA_s_6	0.0142	P_VSA-like on I-state, bin 6	112.42	88.83
8	Mp	0.0124	mean atomic polarizability (scaled on Carbon atom)	0.69	0.68
9	Me	0.0120	mean atomic Sanderson electronegativity (scaled on Carbon atom)	1.03	1.02
10	MCD	0.0111	molecular cyclized degree	0.43	0.33
11	AMW	0.0108	average molecular weight	9.58	8.64
12	P_VSA_ppp_ter	0.0108	P_VSA-like on potential pharmacophore points, ter - terminal atoms	115.48	96.03
13	P_VSA_MR_2	0.0108	P_VSA-like on Molar Refractivity, bin 2	69.91	57.24
14	ALOGP	0.0103	Ghose-Crippen octanol-water partition coeff. (logP)	2.28	2.29
15	P_VSA_MR_5	0.0101	P_VSA-like on Molar Refractivity, bin 5	30.08	25.54
16	P_VSA_MR_7	0.0097	P_VSA-like on Molar Refractivity, bin 7	33.38	25.90
17	ALOGP2	0.0097	squared Ghose-Crippen octanol-water partition coeff. (logP ²)	10.05	9.59
18	TPSA(Tot)	0.0092	topological polar surface area using N,O,S,P polar contributions	63.30	60.33
19	O%	0.0092	percentage of O atoms	10.14	8.32
20	P_VSA_v_3	0.0091	P_VSA-like on van der Waals volume, bin 3	112.69	94.93
21	PDI	0.0089	packing density index	0.88	0.87
22	P_VSA_e_2	0.0089	P_VSA-like on Sanderson electronegativity, bin 2	75.58	70.67
23	P_VSA_LogP_4	0.0088	P_VSA-like on LogP, bin 4	50.28	41.06
24	P_VSA_LogP_6	0.0088	P_VSA-like on LogP, bin 6	14.28	6.91
25	P_VSA_s_3	0.0084	P_VSA-like on I-state, bin 3	20.57	20.36
26	P_VSA_ppp_con	0.0082	P_VSA-like on potential pharmacophore points, con - conjugated atoms	47.63	39.77
27	P_VSA_p_3	0.0082	P_VSA-like on polarizability, bin 3	111.16	92.15
28	H-047	0.0080	H attached to C1(sp ³)/C0(sp ²)	7.49	6.86
29	P_VSA_ppp_L	0.0078	P_VSA-like on potential pharmacophore points, L - lipophilic	84.30	64.53
30	P_VSA_i_4	0.0074	P_VSA-like on ionization potential, bin 4	20.74	17.47
31	P_VSA_LogP_8	0.0074	P_VSA-like on LogP, bin 8	20.57	23.05
32	SAacc	0.0073	surface area of acceptor atoms from P_VSA-like descriptors	81.05	65.85
33	P_VSA_v_2	0.0071	P_VSA-like on van der Waals volume, bin 2	81.48	66.88
34	RBF	0.0070	rotatable bond fraction	0.10	0.11
35	P_VSA_e_3	0.0069	P_VSA-like on Sanderson electronegativity, bin 3	20.89	17.07
36	MW	0.0068	molecular weight	273.99	237.75
37	Mi	0.0067	mean first ionization potential (scaled on Carbon atom)	1.13	1.13
38	P_VSA_s_4	0.0067	P_VSA-like on I-state, bin 4	48.96	42.08
39	MLOGP2	0.0067	squared Moriguchi octanol-water partition coeff. (logP ²)	7.49	6.43
40	P_VSA_ppp_A	0.0066	P_VSA-like on potential pharmacophore points, A - hydrogen-bond acceptor	68.53	56.51
41	P_VSA_m_2	0.0065	P_VSA-like on mass, bin 2	84.77	72.12
42	TPSA(NO)	0.0064	topological polar surface area using N,O polar contributions	54.58	47.36
43	P_VSA_m_3	0.0063	P_VSA-like on mass, bin 3	63.39	52.10
44	P_VSA_MR_6	0.0062	P_VSA-like on Molar Refractivity, bin 6	46.08	38.87
45	P_VSA_p_2	0.0062	P_VSA-like on polarizability, bin 2	78.84	64.19
46	P_VSA_i_2	0.0061	P_VSA-like on ionization potential, bin 2	69.48	59.63
47	MLOGP	0.0061	Moriguchi octanol-water partition coeff. (logP)	1.83	1.77
48	Ui	0.0059	unsaturation index	2.16	1.82
49	N%	0.0058	percentage of N atoms	4.18	3.97
50	P_VSA_i_1	0.0058	P_VSA-like on ionization potential, bin 1	10.43	16.11

各回の解析における各分子記述子の寄与率 (contribution ratio) の合計は 1 となる。表には5回の平均値を示した。青色及び緑色はそれぞれ脂溶性及び環状構造に関する分子記述子を示す。

陽性（8物質）



陰性（49物質）

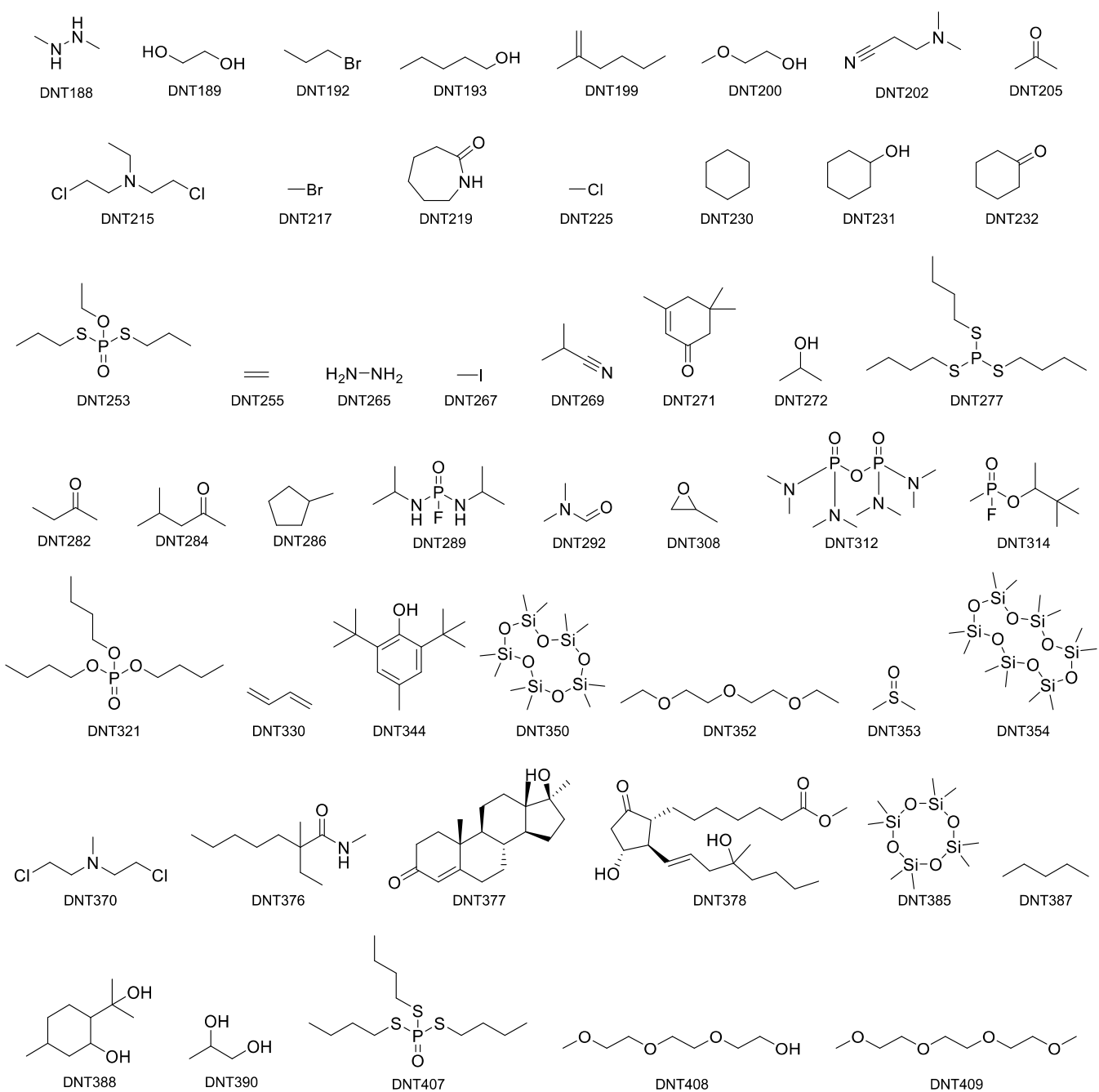
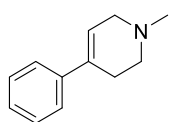
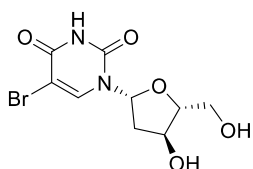


図2 条件「H% ≥ 57.7%であれば陰性」で分類された化学物質

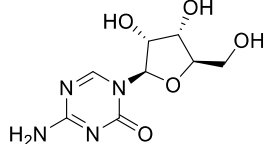
陽性 (41物質)



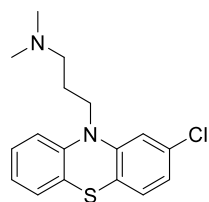
DNT001



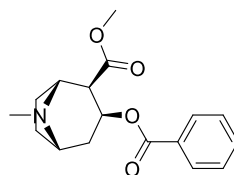
DNT005



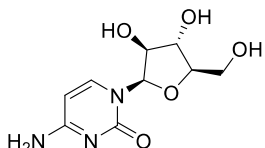
DNT013



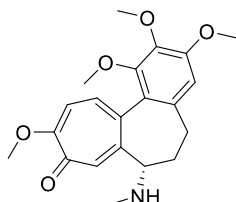
DNT026



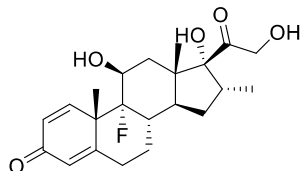
DNT029



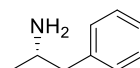
DNT033



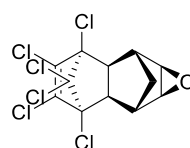
DNT035



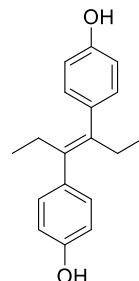
DNT036



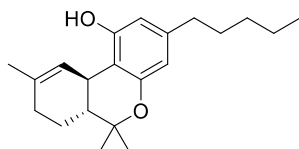
DNT037



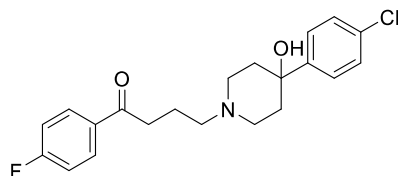
DNT040



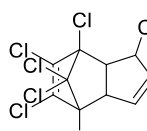
DNT041



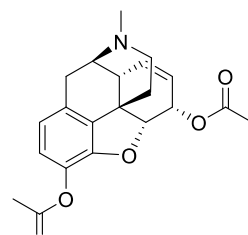
DNT043



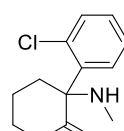
DNT049



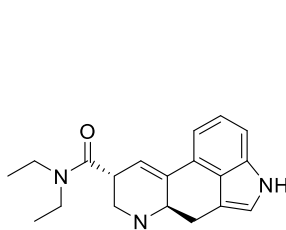
DNT051



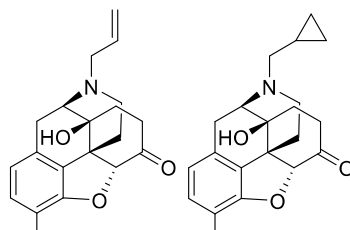
DNT052



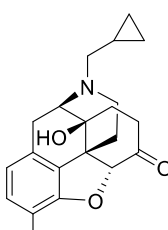
DNT056



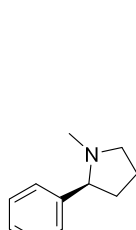
DNT059



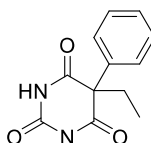
DNT069



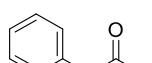
DNT070



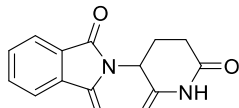
DNT071



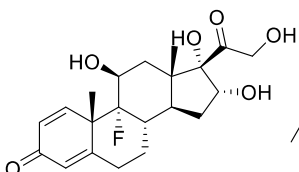
DNT078



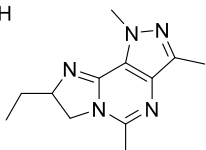
DNT079



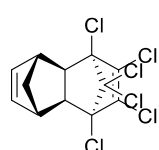
DNT086



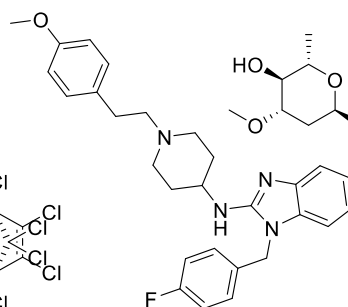
DNT089



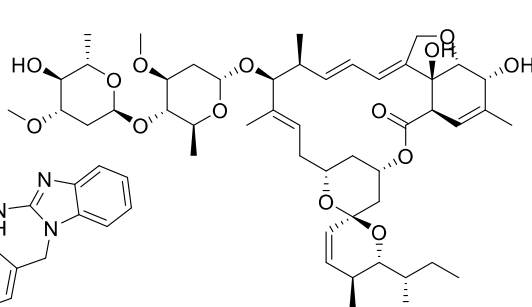
DNT103



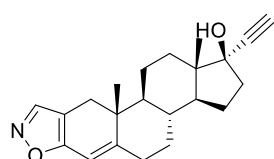
DNT108



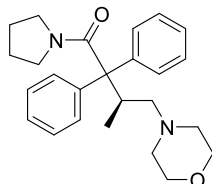
DNT111



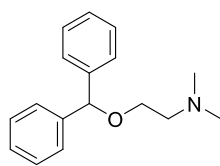
DNT114



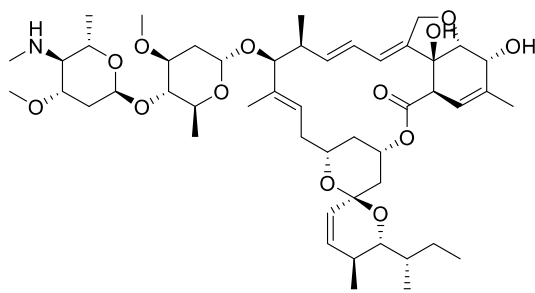
DNT133



DNT134

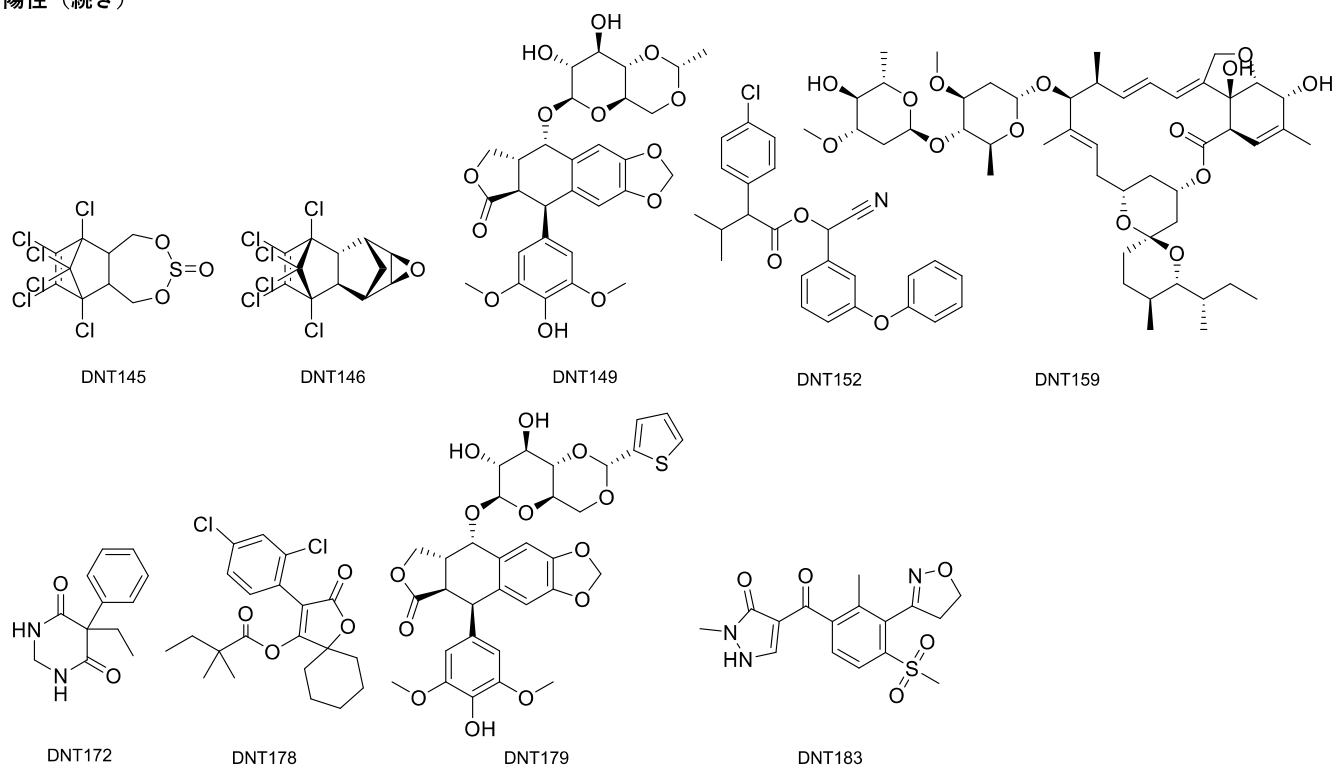


DNT139



DNT144

陽性（続き）



陰性（11物質）

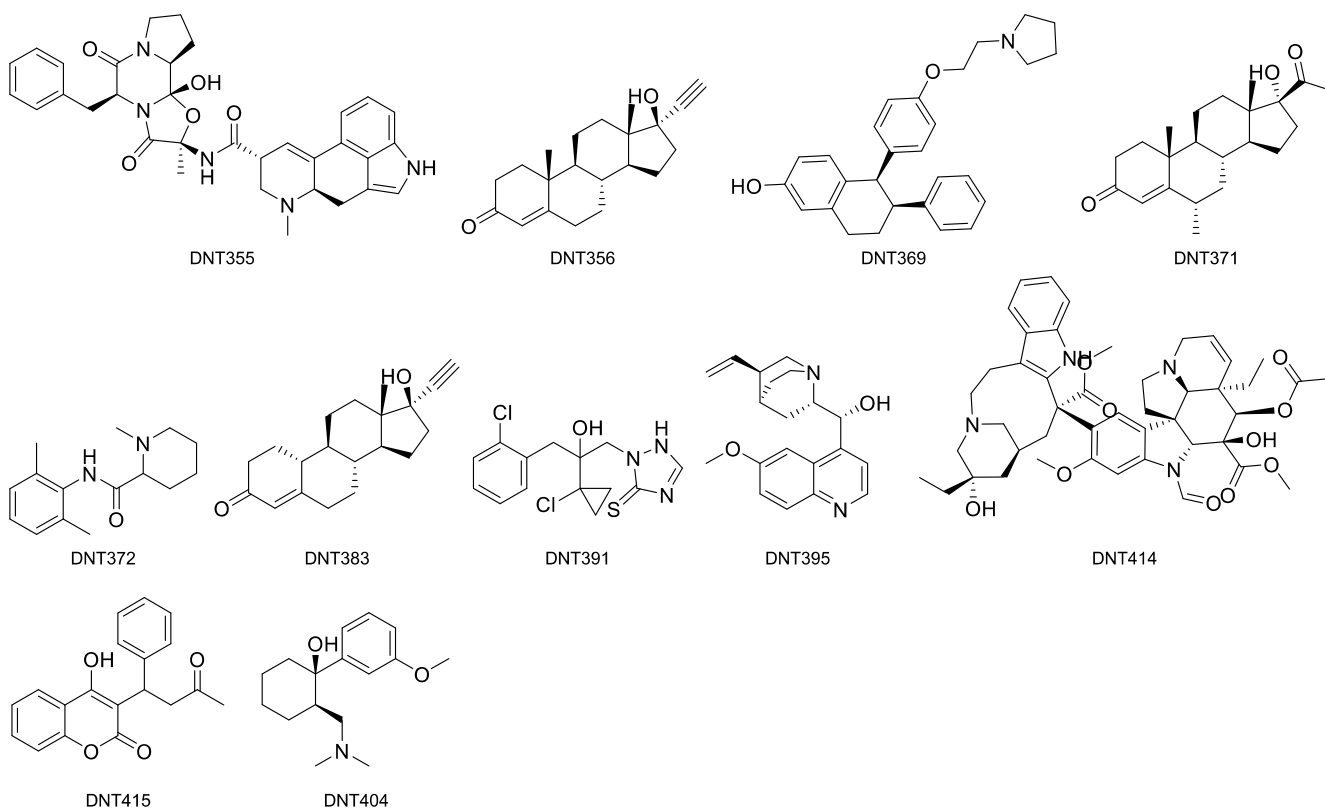


図3 条件「H% < 57.7%, nCs ≥ 1, MCD ≥ 0.59」で分類された化学物質

「MEA 計測」に関する研究

研究分担者 鈴木 郁郎 東北工業大学 准教授

研究要旨

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測において、陰性対照である DMSO の SD 範囲からの距離で毒性リスク評価を行う主成分解析法を開発した。距離に依存して 3 段階のリスク（低、中、高）を設定したところ、用量依存的なリスク判定ができた。選定した主成分マップ上に毒性が既知である痙攣陽性化合物データをプロットしたところ、これまで報告されている毒性リスク用量でリスク判定されていたことから、本リスク判定法の妥当性が示唆された。

また、ラスタプロット画像の Deep learning 法を検討した。陽性化合物と陰性化合物の分離を達成するとともに、主成分解析で高リスクと判定された用量の一つ前の用量から高リスクと判定する化合物もあり、Deep learning を用いたリスク予測法は、精度の高い予測法となり得る可能性が示唆された。

また、in vitro 神経活動を指標とした化合物の毒性評価法として、MEA 計測よりもハイスループット性を有する Ca イメージング法でデータを取得した。今後解析法を検討する予定である。

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クを基に、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、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの種類を増やすとともに、Rodent ニューロンも用いて化合物のデータを取得し、主成分解析法および Deep learning 法を用いた毒性リスク評価法を検討した。また、機能を指標とした評価法として、平面微小電極アレイ（MEA）計測のみならず、Ca²⁺ イメージング法も検討した。得られたデータから毒性リスクを検出する為の解析法を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞

ヒト iPS 細胞由来 Glutamatergic neuron (Glutamatergic induced neurons, NeuCyte Inc.) と GABAergic neuron (GABAergic induced neurons, NeuCyte Inc.) とヒトアストロサイト (Astroglia, NeuCyte Inc.) を 7 : 3 : 3.5 の割合で混合し、 8.0×10^5

cells/cm² の密度で 0.1% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich) と 20 µg/mL の Laminin-511 (Nippi) でコーティングした MEA plate (Axion BioSystems) に播種した。

Elixigen 社のヒト iPS 細胞由来ニューロン (Mixed neurons) を 7.0×10^5 cells/cm² の密度で 0.002% の Poly-L-Ornithine (Sigma Aldrich) と 20 µg/mL の Laminin-511 (Nippi) でコーティングした MEA plate (Alphamed scientific.inc) に播種した。

妊娠ラットより胎児を摘出し、摘出した胎児から採取した大脳皮質を 6.0×10^5 cells/cm² の密度で 0.05% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich) と 2.5 µg/mL の Laminin-511 (Nippi) でコーティングした MEA plate (Axion BioSystems) に播種した。

2) 評価化合物

以下の化合物を使用し、0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ Mの用量で累積投与を行った。

表1 試験化合物

1	Trichlorfon
2	Azinphos-methyl
3	Tritosulfuron
4	λ -Cyhalothrin
5	Thiacloprid
6	Spirodiclofen
7	Malaoxon(Malathionの分解物)
8	Tebuconazole
9	Sodium chlorite
10	Deltamethrin
11	3,5,6-Trichloro-2(1H)-pyridone(Chlorpyrifosの分解物)
12	2-Mercapto-1-methylimidazole(Methimazole)
13	Acibenzolar-S-methyl
14	Thiamethoxam
15	Tembotrione
16	Flubendiamide
17	Aldicarb sulfone(Aldicarbの分解物)
18	N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactone(Carbarylの分解物)
19	Mepiquat chloride(1,1-Dimethylpiperidinium Chloride)
20	Omethoate(Dimethoateの分解物)
21	Methamidophos
22	Cymoxanil

試薬はすべて DMSO(D8418-100ML ; Sigma Aldrich)で溶解し、Neurobasal Plus Medium で希釈した。陰性対照物質として、DMSO を 0.1%から 0.6%まで累積投与した。

3) 神経ネットワーク活動の計測

Maestro (Axion BioSystems) および Presto(Alphamed scientific. Inc)を用いて 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%存在下で行った。

計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems) および Spike extract for presto(Alphamed scientific.inc)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 $\pm$ 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で承認済である。また、本実験で使用するラット初代培養細胞は、本学動物実験委員会で承認済み（承認番号第 589号）である。本研究では、遺伝子解析、遺伝子組み換え実験は行わない為、その他必要な手続きはない。

C. 研究結果

前年度、Neucyte社のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて化合物試験を行った。ベンダーが異なった場合の応答性を確認する為、Elixirgen社のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて化合物の試験を行った。

図2は、12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。薬剤種の差および用量依存性が認められた。次に、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentニューロンの差異を調べる為に、ラット大脳皮質初代培養細胞を用いて、22化合物+DMSOのデータを取得した。図3に、解析パラメータのヒートマップを示す。

各サンプルの毒性リスクを判定する為に、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し、DMSOデータからの距離で毒性判定する方法を採用した。選択されたパラメータは、Elixirgen社のヒトiPS細胞由来ニューロンでは、同期バースト内の最大周波数（Max Frequency）、同期バーストの時間（Duration）、最大周波数時刻の間隔における変動係数（CV of IMFI）であった。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51.0%と29.3%であり、合わせて80%以上であった為、情報量としては十分であった。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。ラットの場合は、同期バースト数（No. of SBFs）、同期バースト間隔（IBI）、同期バーストの時間（Duration）、同期バースト内スパイク（Spikes in a SBFI）、同期

バーストの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）の計6つのパラメータが選択された。第一主成分と第二主成分の寄与率はそれぞれ36.4%と23.2%であり、合わせて59.6%であった為、情報量としてはやや不足していた。図5は、作成した主成分マップに各化合物の各用量データをプロットしたものである。図6に、Neucyte社、Elixirgen社、Rodentニューロンにおけるリスク評価の結果を示す。Neucyte社、Elixirgen社のヒトiPSニューロンにおける応答はRodentに比べて、類似した応答を示した。2社のヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentニューロンの顕著な違いは、CymaxanilとN-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactoneで見られた。Rodentニューロンの再実験は必要であるが、ヒトとラットで応答性の違いを示すデータである。

次に、DMSOからの距離を指標としたリスク判定法の妥当性を検証するために、Neucyte社のヒトiPSニューロンを用いて痙攣陽性化合物のデータを取得し、作成したOECD化合物の主成分マップにプロットした。図7にスコアプロットを示す。スコアプロットから痙攣陽性化合物のリスク評価（DMSOのSD範囲を基準とした評価）の結果を図8に示す。陰性化合物であるアセトアミノフェンは全用量陰性と判定され、痙攣陽性化合物は用量依存的な毒性リスクが検出された。検出された毒性リスクの用量は、これまで報告されている毒性用量と一致していることから、本評価法は毒性リスク評価法として妥当性を有していることが示唆された。また、同期バースト発火の上昇など典型的な応答を示す4-APとGABA受容体阻害作用を持つ化合物が主成分マップ上で分離されていたことから、痙攣陽性化合物の作用機序に基づき、OECD化合物の作用機序推定ができるかもしれない。次にDeep learning法について

て記載する。スパイク時系列データから抽出した解析パラメータは情報の一部を定量化したものであるため、時系列データに含まれる全ての情報を含んでいるわけではない。時系列データからより多くの特徴を抽出し、予測精度を向上させる方法としてDeep learningを用いた予測法を検討した。ラスタープロット画像を分割し、主成分解析で高リスクと判定された用量の化合物データ (Aldicarb sulfone, Deltamethrin, Flubendiamide, Methamidophos, Mepiquat chloride, Tembotrione, $n=5$, 図9 Aの星印) および陰性対照としてDMSO(0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, $n=5$)を学習させた。AIが予測した各化合物の未学習サンプルの用量別の毒性リスク判定結果を図9 Bに示す。毒性リスクが60%以下を低リスク、60-70%を中リスク、70%以上を高リスクとした。用量依存的な毒性リスクが得られ、PCA解析にて高リスク判定、中リスク判定した化合物はAIによっても同様にリスク予測された。また、PCA解析では同期バースト発火が消失したサンプルは解析できなかったが、AIは高リスクと判定した。Tebuconazoleの結果が示すように、100 μ Mで同期バースト発火が消失した100 μ MのデータをAIは高リスクと判定するとともに、一つ前の用

量においてもリスク判定した。AIはDeltamethrinも最低用量から高リスクと判定している。一方、高濃度においても毒性判定されなかったCymoxanilやN-Cbz-L-homoserine LactaneはAI解析においても同様にリスク判定されなかった。このことから、開発したAI予測は、化合物の毒性予測法として妥当性を有しており、PCA解析よりも精度が高い方法となり得ることが示唆された。

培養ニューロンの機能を指標とした毒性リスク評価法の開発を目的としているが、MEAよりもハイスループットで計測できるCaイメージング法においてもMEAと同様の評価が可能であるかを検討した。Neucyte社のヒトiPSニューロンを用いて評価した結果、同期バースト発火に該当するPeak numberおよびP rateが上昇する化合物、減少する化合物、上昇から減少に転じる化合物の3パターンが認められた。今回は、MEAとの比較を実施する為、MEAで使用した3パラメータと意味合いの近いパラメータAMP_ave, AMP_cv, P-P time_cvを用いて、DMSOのSD範囲を基にリスク評価を行った。その結果、用量依存的な毒性リスクは検出されなかった。Caイメージング法においては、MEAとは異なるパラメータを選択する必要性が示唆された。

D. 考察

DMSOのSD範囲を基準とした評価法は毒性リスク評価法として有効であることが示唆された。陰性化合物の種類を増やすなどして妥当性の検証を進めてゆく。細胞種によってDMSOに有意差がつかない主成分（パラメータセット）が異なった。これは細胞種によって自発活動特性が異なることを意味する。特にRodentとヒトiPS細胞由来ニューロンで主成分が異なっていたことから、iPS細胞由来ニューロンとRodentニューロンでは初期状態の活動特性が異なると言える。また、ラットとヒトiPSニューロンで応答性が異なる化合物が認められた。興味深いのが、今後、ラット初代培養細胞を用いた再現実験を進めて検証する必要がある。

痙攣陽性化合物との比較により、DMSOのSD範囲を用いた毒性リスク法の妥当性が示唆された。興奮性化合物と毒性化合物の切り分けなど、データを追加し、精度を向上させたい。

ラスタープロットのDeep learningを用いた毒性リスク予測法も有効であることが示唆された。陰性化合物、陽性化合物の種類を増やすとともに、陽性化合物のin vivoの脳室内濃度などを基準として学習させるなどを行い、in vivoへの外挿性を担保できる毒性リスク方へ発展させたい。

Caイメージングにおける薬剤応答のパラメータはMEAとは異なることが示唆された為、パラメータの選択を検討してゆく。また、低用量投与時に変化が顕著であった為、実験プロトコルの最適化も必要であると考えられる。

E. 結論

ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測において、DMSOのSD範囲を用いた化合物の毒性リスク法の妥当性を、痙攣陽性化合物データと比較することで明らかとした。また、再現実験が必要であるが、

RodentとヒトiPS細胞由来ニューロンで毒性リスクの異なる化合物が認められた。

また、ラスタープロット画像のDeep learning法は、毒性リスク判定の精度を向上させる解析法である可能性が示唆された。

今後、Caイメージング法で得られたデータの解析法は検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 鈴木 郁郎, “神経機能を指標としたインビトロ毒性評価試験とAI”, 第47回日本毒性学会学術年, 日本薬理学会合同シンポジウム: 化学物質の神経毒性評価の現状と課題

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

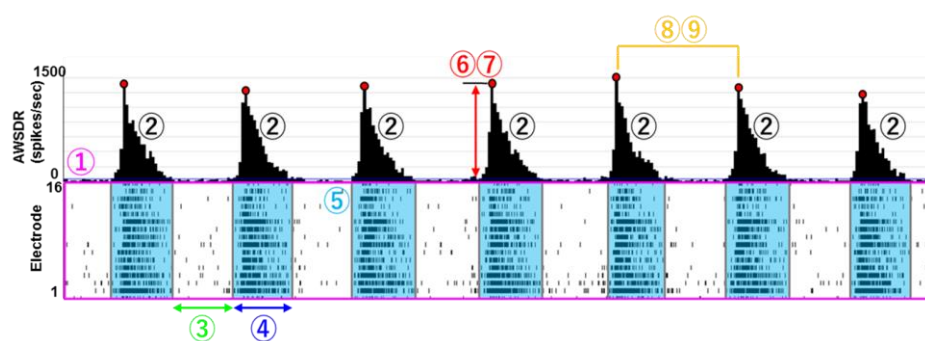
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| ① Total Spikes (TS) | ⑥ Max Frequency (MF) |
| ② No. of SBF | ⑦ CV of MF |
| ③ Inter Burst Interval (IBI) | ⑧ Inter MF Interval (IMFI) |
| ④ Duration of SBF (Duration) | ⑨ CV of IMFI |
| ⑤ Spikes in a SBF | |

図1 MEAデータから算出する解析パラメータの模式図

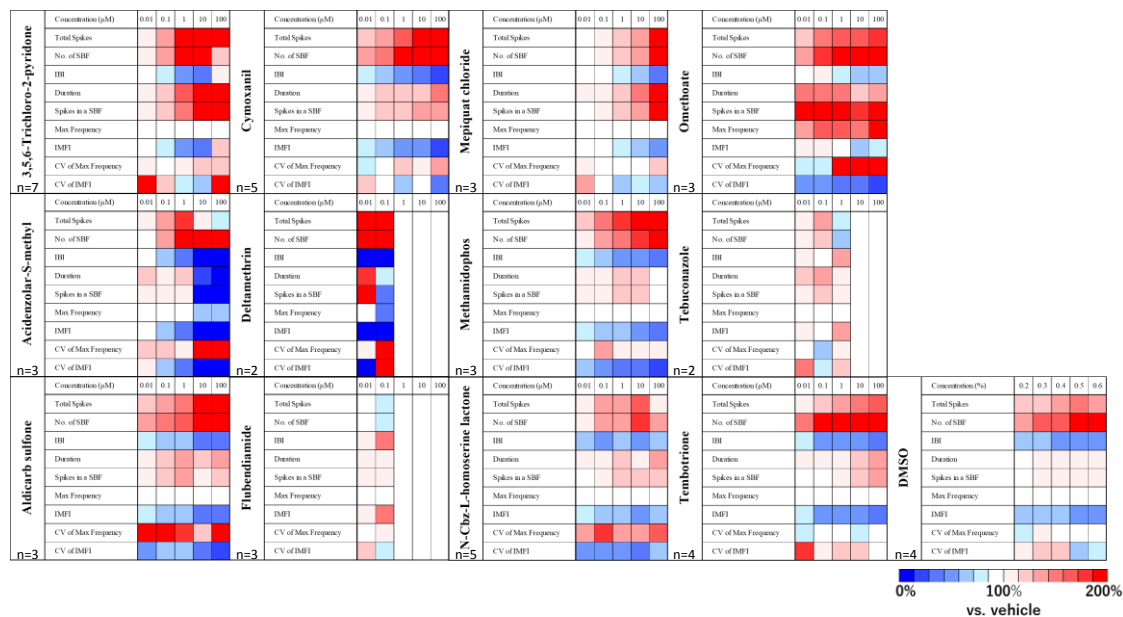


図2 ヒトIPS由来ニューロン（Elixirgen社）における12化合物 + DMSOのMEAデータ解析

Tebuconazole	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Omeothate	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Mepiquat chloride	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Trichlorfon	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Spirodiclofen	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Delamethrin	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Methamidophos	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Thiamethoxan	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Azinphos-methyl	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Malaoxon	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
3,5,6-Trichloro-2-pyridone	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Cyanosilil	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Tembutorione	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Tritosulfuron	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
λ-Cyhalothrin	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Methimazole	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Acidazoxar-S-methyl	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Flubentiamide	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
N-Cbz-L-homoserine lactone	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Sodium chlorite	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Aldicarb sulfone	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
Thiacloprid	Concentration (μM)	0.01	0.1	1	10	100
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					
DMSO	Concentration (%)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
	Total Spikes					
	No. of SBF					
	IBI					
	Duration					
	Spikes in a SBF					
	Max Frequency					
	DMFI					
	CV of Max Frequency					
	CV of DMFI					

図3 ラット大脳皮質初代培養細胞における22化合物 + DMSOのMEAデータ解析

負荷量

	PC1	PC2	PC3
Max Frequency	-0.60341	0.48235	0.635
CV of MF	0.65404	-0.15619	0.74015
CV of IMFI	0.4562	0.86194	-0.22123

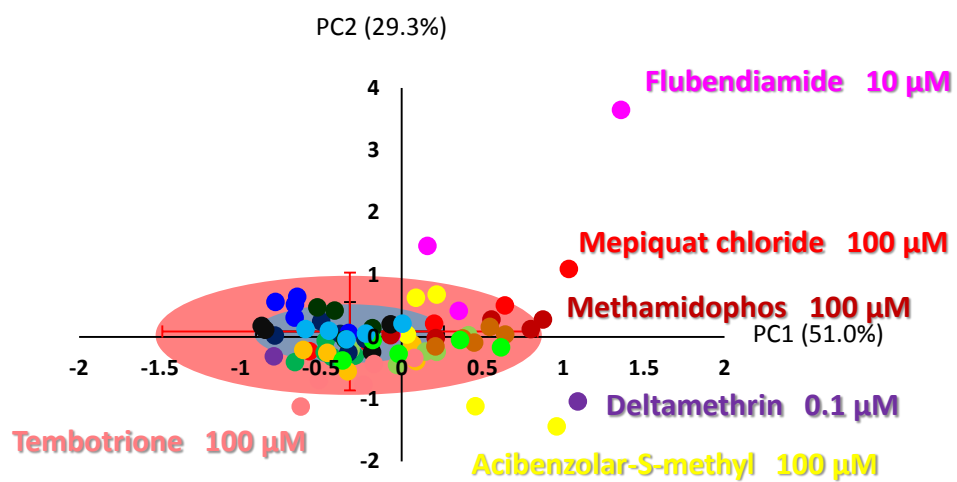


図4 ヒトiPS由来ニューロン（Elixigen社）におけるDMSOデータを基準としたスコアプロット

負荷量

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
No. of SBFs	-0.33598	0.28948	-0.6677	0.55648	0.091348	-0.19871
IBI	0.53945	0.25358	0.12018	0.19198	-0.45796	-0.6194
Duration	0.48793	0.1611	-0.36242	-0.39407	0.64594	-0.17913
Spikes in a SBF	0.53643	-0.073211	-0.38949	0.17883	-0.31595	0.65067
CV of MF	-0.23977	0.63406	-0.17952	-0.57912	-0.39534	0.12875
CV of IMFI	0.11308	0.64695	0.47377	0.3617	0.3295	0.32375

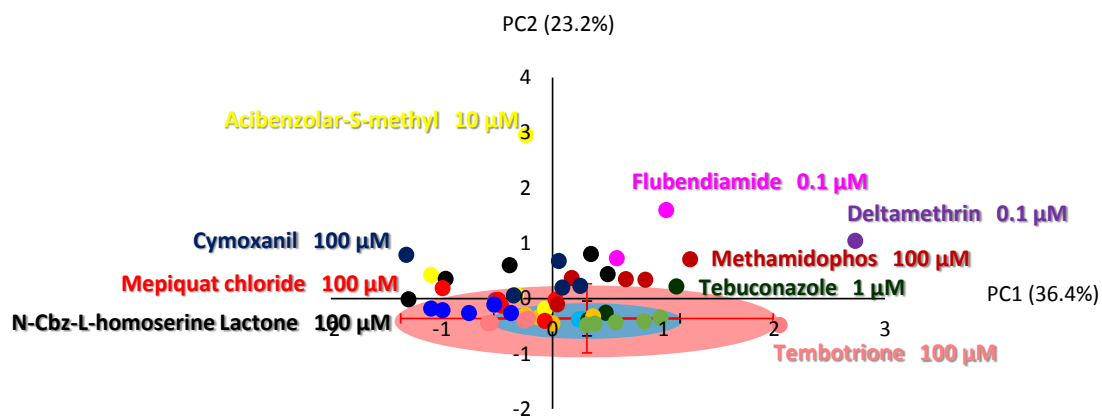


図5 ラット初代大脳皮質ニューロンにおけるDMSOデータを基準としたスコアプロット

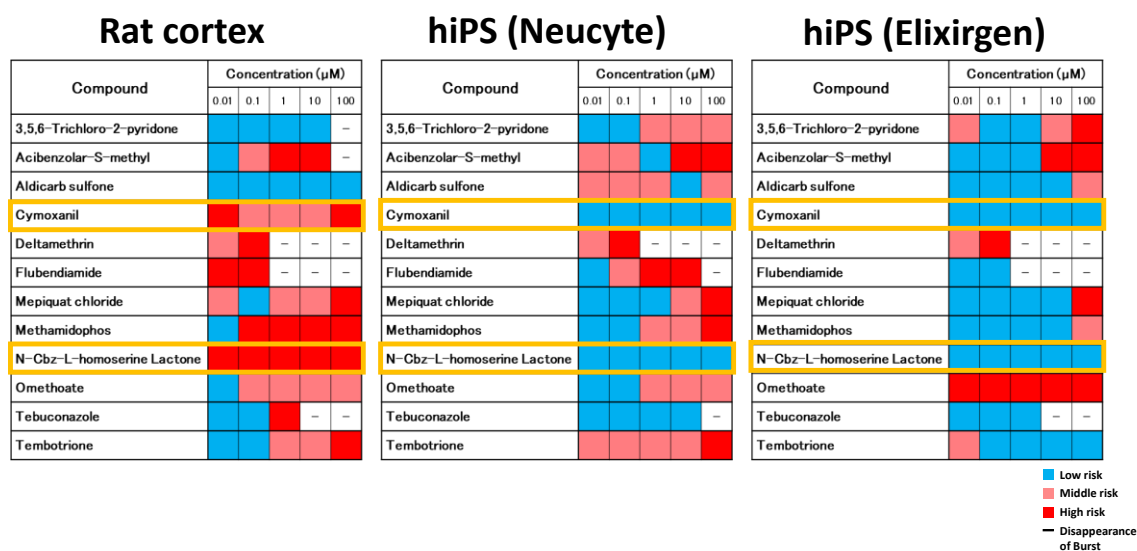


図6 ヒトiPS由来ニューロン（Neucyte社、Elixigen社）とRodentニューロンにおけるリスク評価

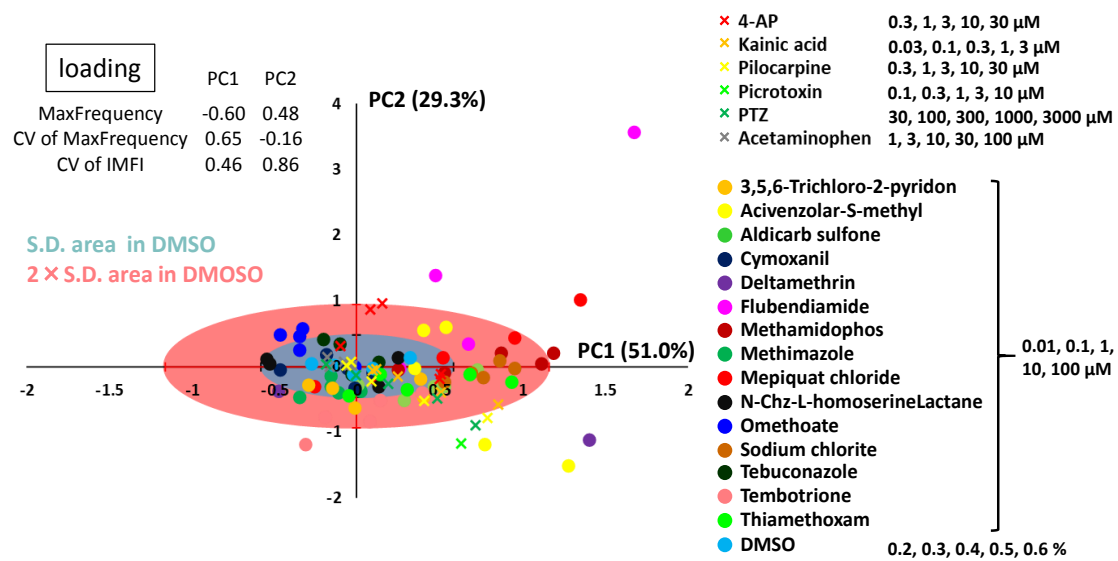


図7 痙攣陽性化合物とOECD化合物とのスコアプロット上での比較

痙攣陽性化合物		Concentration				
Compound		1	2	3	4	5
4-AP	0.3, 1, 3, 10, 30 μ M	Low risk	Middle risk	Middle risk	High risk	High risk
Kainic acid	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ M	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk
Pilocarpine	0.3, 1, 3, 10, 30 μ M	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk
Picrotoxin	0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
PTZ	30, 100, 300, 1000, 3000 μ M	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk
Acetaminophen	1, 3, 10, 30, 100 μ M	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk

OECD化合物		Concentration (μ M)				
Compound		0.01	0.1	1	10	100
3,5,6-Trichloro-2-pyridone		Low risk	Low risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk
Acibenzolar-S-methyl		Middle risk	Middle risk	Low risk	High risk	High risk
Aldicarb sulfone		Middle risk	Middle risk	Middle risk	Low risk	Middle risk
Cymoxanil		Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Deltamethrin		Middle risk	High risk	-	-	-
Flubendiamide		Low risk	Middle risk	High risk	High risk	-
Methamidophos		Low risk	Low risk	Middle risk	Middle risk	High risk
Methimazole		Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk
Mepiquat chloride		Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk
N-Cbz-L-homoserine Lactane		Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Omethoate		Low risk	Low risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk
Sodium chlorite		Middle risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk
Tebuconazole		Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	-
Tembotrione		Middle risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk	High risk
Thiamethoxam		Low risk	Low risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk

■ Low risk
■ Middle risk
■ High risk
— Disappearance of Burst

図8 痙攣陽性化合物とOECD化合物との毒性リスク比較

Pre-trained compounds: Aldicarb sulfone, Deltamethrin, Flubendiamide, Methamidophos, Mepiquat chloride, Tembotrione, (n=5)
DMSO(0.1% 0.2% 0.3%,0.4%,0.5%,0.6%)

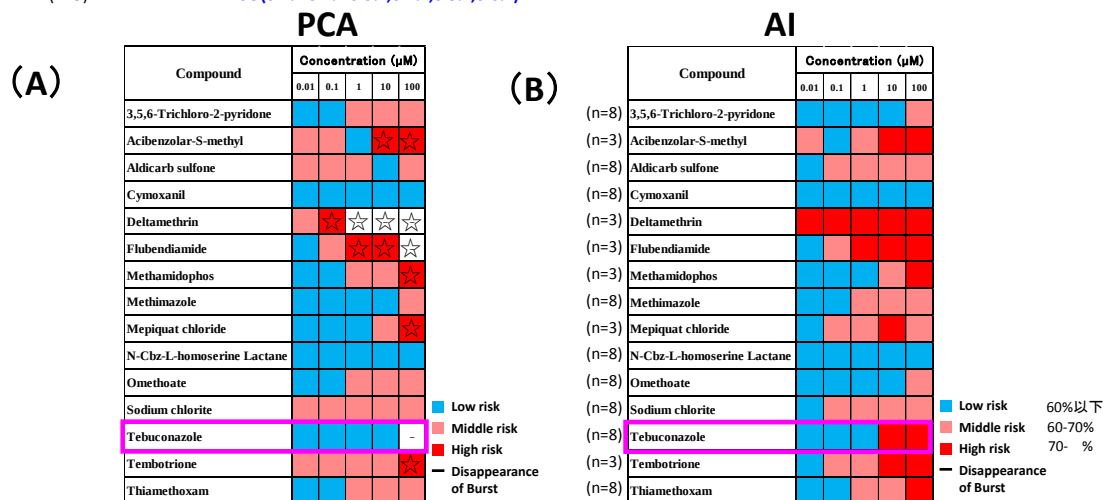


図9 Deep learningによる毒性リスク予測とPCA解析による毒性リスク予測の比較

別紙

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
Kamata S, Hashiyama R, Hana-Ika H, Ohkubo I, Saito R, Honda A, Anan Y, Akahoshi N, Noguchi K, Kanda Y, Ishii I.	Cytotoxicity comparison of 35 developmental neurotoxicants in human induced pluripotent stem cells (iPSC), iPSC-derived neural progenitor cells, and transformed cell lines.	Toxicology In Vitro.	69	104999	2020
常本和伸、山田茂、諫田泰成	ヒトiPS細胞を用いた中枢神経系の安全性評価	日本薬理学雑誌	156	107-113	2021



Cytotoxicity comparison of 35 developmental neurotoxicants in human induced pluripotent stem cells (iPSC), iPSC-derived neural progenitor cells, and transformed cell lines



Shotaro Kamata^a, Reina Hashiyama^a, Hiroto Hana-ika^a, Issei Ohkubo^a, Ryota Saito^a, Akihiro Honda^a, Yasumi Anan^a, Noriyuki Akahoshi^a, Kohji Noguchi^b, Yasunari Kanda^{c,*}, Isao Ishii^{a,*}

^a Department of Health Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Machida, Tokyo 194-8543, Japan

^b Laboratory of Molecular Target Therapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^c Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Developmental neurotoxicity
Induced pluripotent stem cell
Neural differentiation
Cytotoxicity
Preclinical test
Cell viability assay

ABSTRACT

The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) test guideline 426 for developmental neurotoxicity (DNT) of industrial/environmental chemicals depends primarily on animal experimentation. This requirement raises various critical issues, such as high cost, long duration, the sacrifice of large numbers of animals, and interspecies differences. This study demonstrates an alternative protocol that is simple, quick, less expensive, and standardized to evaluate DNT of many chemicals using human induced pluripotent stem cells (iPSC) and their differentiation to neural progenitor cells (NPC). Initially, concentration-dependent cytotoxicity of 35 DNT chemicals, including industrial materials, insecticides, and clinical drugs, were compared among iPSC, NPC, and two transformed cells, Cos-7 and HepG2, using tetrazolium dye (MTS)-reducing colorimetric and ATP luciferase assays, and IC₅₀ values were calculated. Next, inhibitory effects of the 14 representative chemicals (mainly insecticides) on iPSC differentiation to NPC were evaluated by measuring altered expression of neural differentiation and undifferentiation marker genes. Results show that both iPSC and NPC were much more sensitive to most DNT chemicals than the transformed cells, and 14 chemicals induced differential patterns of marker gene expression, highlighting the validity and utility of the protocol for evaluation and classification of DNT chemicals and preclinical DNT tests for safety assessment.

1. Introduction

Epidemiological studies suggest close association between embryonic/postnatal exposure to some industrial chemicals and the onset of neurobehavioral disorders, including learning disabilities, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism, and the other cognitive abnormalities, in millions of children worldwide (Landrigan et al., 2012; Grandjean and Landrigan, 2014; Ross et al., 2015). These chemicals include insecticides/fungicides, industrial solvents, catalysts/plasticizers, clinical drugs, and research reagents (Pei et al., 2016; Harrill et al., 2018). Some of these chemicals have already been banned. The central nervous system in the fetal and neonatal periods is especially vulnerable to such chemicals, perhaps because the blood-brain barrier is not yet complete (Tohyama, 2016) when critical processes of temporal/regional neural development are ongoing (Rice and

Barone Jr., 2000). Neurobehavioral disorders affect ~10% of all newborns/children, and prevalence of ADHD in the US young (3–17 years) population increased from 7.2% (in 2007) to 8.5% (in 2011) (Bloom et al., 2009; Bloom et al., 2012). Genetic factors play substantial roles—perhaps 30%–40% of all neurobehavioral disorders are due to genetics, but non-genetic environmental factors, including chemical exposure, are also involved (Grandjean and Landrigan, 2014).

To date, DNT behavioral/neurological test methodologies depend heavily on experimental animals, mainly rats (TG426; Developmental Neurotoxicity Study). Significant limitations with animal experimentation under this guideline are high cost, long duration, the sacrifice of large numbers of animals, interspecies differences, and lack of skilled laboratory animal technicians in the face of increasing demands (Schmidt, 2009; Tsuji and Crofton, 2012; Tohyama, 2016; Taylor, 2018). The Organization for Economic Co-operation and Development

* Corresponding authors.

E-mail addresses: kanda@nihs.go.jp (Y. Kanda), isao-ishii@umin.ac.jp (I. Ishii).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104999>

Received 8 May 2020; Received in revised form 5 August 2020; Accepted 9 September 2020

Available online 16 September 2020

0887-2333/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(OECD) has begun discussion on a DNT *in vitro* guidance document for protection of developing brains from chemicals that cause DNT (Fritsche et al., 2018b; Sachana et al., 2019). The basic concept is that the complex procedure of brain development can be disassembled into several neurodevelopmental endpoints which can be represented by a combination of different alternative assays (Fritsche et al., 2018a). The discovery of induced pluripotent stem cells (iPSC) and their differentiation to various cell lineages provides an opportunity for application to DNT evaluation (Pei et al., 2016; Ryan et al., 2016; Bal-Price et al., 2018b; Barenys and Fritsche, 2018; Fritsche et al., 2018a). iPSC are not tumor cells but proliferate infinitely and they can differentiate to neural cell lineages.

We assume that DNT in early stage of neural differentiation consists of two components: cytotoxicity to neural cells and differentiation alteration activity on neural stem/progenitor cells; therefore, we initially compared concentration-dependent cytotoxic effects of DNT chemicals selected by National Toxicity Program among iPSC, neural progenitor cells (NPC), and two transformed cell lines. Subsequently, we examined the impacts of 14 representative DNT chemicals on iPSC differentiation to NPC. These results support the utility of iPSC/NPC to supplement animal experimentation for the evaluation of DNT in safety assessment.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The 35 DNT chemicals and a negative control, acetaminophen, analyzed in this study are listed in Table 1 with brief notations. All reagents were analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany), Wako/Fujifilm (Osaka, Japan), Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), Santa Cruz (Dallas, TX, USA), and Abcam (Cambridge, UK).

2.2. Cells and cell culture

Human iPSC line 253G1, established by retroviral transduction of *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* to adult human dermal fibroblasts (Nakagawa et al., 2008), was obtained from the Riken BRC Cell Bank (Ibaraki, Japan) at passage 27 (Lot no. 022). The cells were acclimatized to feeder-free culture conditions using human embryonic stem cell-qualified Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and TeSR-E8 medium (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) at 37 °C in a 5% CO₂/95% air incubator. iPSC colonies were dissociated into single cells using Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) for passage and cultured in TeSR-E8 medium supplemented with Y-27632 (ROCK inhibitor, 10 μM, Wako). Total passage numbers for all iPSC used in this study did not exceed 50.

The dual SMAD inhibition protocol (Chambers et al., 2009) was used for the induction of neural lineages with some modification (Yamada et al., 2017; Yamada et al., 2018a; Yamada et al., 2018b). Briefly, iPSC colonies were dissociated into single cells using Accumax, and cells were seeded into 12-well tissue culture dishes at a density of 6.66×10^4 cells/cm² in TeSR-E8 medium on Matrigel-coated plates and become nearly confluent within two days. Then, medium was changed to knockout serum replacement medium consisting of 82% KnockOut DMEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific), 15% KnockOut Serum Replacement (Gibco), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA, Gibco), 1% GlutaMAX Supplement (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (P/S, Nacalai Tesque), and 3.5 ppm 2-mercaptoethanol (Wako) supplemented with SB431542 (TGF-β inhibitor, 10 μM, Wako) and LDN193189 (Bone Morphogenetic Protein [BMP] inhibitor, 1 μM, Wako). Cells were maintained for four days with medium renewal after two days. From the fourth day on, the medium was stepwise replaced with N₂ medium consisting of 95.06% Neurobasal Medium, 1% N₂ Supplement, 2% B-27 Supplement (*minus* vitamin A), 0.97% GlutaMAX Supplement (all from Gibco), and 0.97% P/S *plus*

1 μM LDN193189. Replacement steps were 25:75 on the fourth day, 50:50 on the sixth, and 75:25 on the eighth (the first value in each ratio represents the N₂ medium). After 10 days, established NPCs were dissociated into single cells using Accumax and maintained in neural maintenance medium (NMM) consisting of 47.628% Neurobasal Medium (Gibco), 47.628% DMEM/F-12 medium (Gibco), 20 ng/ml FGF-Basic (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 20 ng/ml human recombinant EGF (R&D Systems), 1% N-2 Supplement, 2% B-27 Supplement (*minus* vitamin A), 0.486% NEAA, 0.486% GlutaMAX Supplement, 3.4 ppm 2-mercaptoethanol, and 0.972% P/S. NPC were frozen at passage 2 in NMM supplemented with 20 ng/ml FGF-Basic, 20 ng/ml human recombinant EGF, 5 μM Y27932, and 10% DMSO until use. The NPC stocks were thawed, and passages 4–10 were used for the repetitive experiments that gave reproducible results. Giemsa staining of iPSC and NPC at passages 7 and 10 was used for chromosome counting as described previously (Sugawara et al., 2006).

Cos-7 and HepG2 cells were also obtained from the Riken BRC Cell Bank (RCB0539 and RCB1648, respectively). They were maintained in DMEM (Wako), supplemented with 10% fetal bovine serum (French origin; Biowest, Nuaille, France) and 1% P/S.

2.3. Immunocytochemistry

iPSC were cultured on Matrigel-coated glass coverslips and fixed in 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 1 h at room temperature. Fixed cells were incubated with blocking buffer (10% normal donkey serum [Millipore/Merck] and 0.1% [v/w] Triton X-100 in PBS) for 1 h. After washing twice with 0.1% [v/w] Triton X-100 in PBS (PBST), cells were incubated with anti-PAX6 mouse monoclonal antibody (1:100; Santa Cruz, sc-81,649) or anti-OCT3/4 mouse monoclonal antibody (1:100; Santa Cruz, sc-5279) in blocking buffer for 1 h. After washing twice with PBST, cells were incubated with Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse IgG (H + L) antibody (1:500; Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific, A-21202) in blocking buffer for 1 h. Finally, coverslips were mounted with SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) and examined using a BZ-X810 fluorescent microscope (Keyence, Osaka, Japan) equipped with a CFI Plan Apo λ 20 × objective lens (Nikon, Tokyo, Japan).

2.4. Cell viability assays

Mitochondrial MTS (5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt)-reducing activity and cellular ATP levels were used as two indicators of cell viability. The cells were seeded into 96-well tissue culture dishes at 1.5×10^3 cells/well (4.69×10^3 cells/cm²) for Cos-7 and 2.0×10^3 cells/well (6.25×10^3 cells/cm²) for HepG2, iPSC, and NPC, and cultured overnight at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for cell adhesion. Cells were then incubated in culture medium with each chemical for 48 h. The MTS-reducing activity was evaluated by measuring the absorbance at 490 nm (and 700 nm for reference) using a CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) and an Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek/Agilent, Winooski, VT, USA). Cellular ATP levels were measured using a Cell ATP Assay reagent (TOYO B-Net, Tokyo, Japan) and a LMax II 384 Microplate Luminometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). IC₅₀ values were calculated using a Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

2.5. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The total RNA was isolated with a ReliaPrep RNA Miniprep System (Promega). One μg of RNA was reverse-transcribed (RT) to first-strand cDNA using a ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, Tokyo, Japan), and

Table 1
35 neurotoxicants and developmental neurotoxicants analyzed in this study.

ID	Chemicals/Abbreviation	CAS	Mol. formula	MW	Stock	Application or origin	Known target
A	1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide/MPP + iodide	36913–39-0	C ₁₂ H ₁₂ IN	297.13	1 M DMSO	Toxic metabolite of MPTP	ETC complex I (Dopaminergic neuron)
B	2-Methoxyethanol	109–86-4	C ₃ H ₈ O ₂	76.09	(1 M media)	Solvent/additive	
C	3,3'-Iminodipropionitrile/IDPN	111–94-4	C ₆ H ₉ N ₃	123.16	(1 M media)	Synthetic material/ Research reagent	Neurofilament proteins
D	5-Fluorouracil	51–21-8	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂	130.08	1 M DMSO	Anti-cancer drug	Thymidylate synthase
E	6-Hydroxydopamine hydrochloride/6-OHDA	8094-15-7	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	205.64	0.5 M DMSO	Research reagent	(Dopaminergic/noradrenergic neurons)
F	6-Propyl-2-thiouracil	51–52-5	C ₇ H ₁₀ N ₂ OS	170.23	2 M DMSO	Thyrostatic agent	Thyroid peroxidase/ Iodothyronine deiodinase
G	Manganese (II) acetate	638–38-0	C ₄ H ₆ MnO ₄	173.03	(1 M media)	Catalyst/Fertilizer	(Induction of Parkinson's disease)
H	Acrylamide	79–06-1	C ₃ H ₅ NO	71.08	(1 M media)	Industrial material/ Byproduct	DNA (Group 2A carcinogen via glycidamide)
I	Aldicarb	116–06-3	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190.26	1 M DMSO	Carbamate insecticide	Acetylcholinesterase
J	Bis(tributyltin) oxide	56–35-9	C ₂₄ H ₅₄ OSn ₂	596.11	1 mM DMSO	Antifoulant/Biocide	(Endocrine disruptor)
K	Bisphenol A	80–05-7	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.29	1 M DMSO	Resin material	(Endocrine disruptor)
L	Captan	133–06-2	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	300.59	0.1 M DMSO	Phthalimide fungicide	Thiol and amino groups of enzymes
M	Carbaryl	63–25-2	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.22	1 M DMSO	Carbamate insecticide	Acetylcholinesterase
N	Chlorpyrifos	2921–88-2	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350.59	1 M DMSO	Organophosphate insecticide	Acetylcholinesterase
O	Colchicine	64–86-8	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	399.44	1 M DMSO	Anti-gout/FMF drug	Tubulin
P	Deltamethrin	52918–63-5	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505.20	0.5 M DMSO	Pyrethroid insecticide	Voltage-gated sodium channel
Q	Di(2-ethylhexyl) phthalate/DEHP	117–81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.56	0.2 M DMSO	Plasticizer	Androgen receptor
R	Dichlorodiphenyltrichloroethane/DDT	50–29-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.49	0.5 M DMSO	Organochlorine insecticide	Voltage-gated sodium channel
S	Diehrin	60–57-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380.91	0.5 M DMSO	Organochlorine insecticide	GABA-gated chloride channel
T	Diethylstilbestrol	56–53-1	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268.35	0.5 M DMSO	Synthetic nonsteroidal estrogen	Estrogen receptor
U	Heptachlor	76–44-8	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373.32	0.5 M DMSO	Organochlorine insecticide	GABA-gated chloride channel
V	Hexachlorophene	70–30-4	C ₁₃ H ₆ Cl ₆ O ₂	406.90	1 M DMSO	Organochlorine disinfectant	(Protein denaturation)
W	Hydroxyurea	127–07-1	CH ₄ N ₂ O ₂	76.05	(1 M media)	Anti-cancer drug	Ribonucleoside diphosphate reductase
X	Lindane	58–89-9	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	1 M DMSO	Organochlorine insecticide	GABA-gated chloride channel
Y	Methyl Hg (II) chloride	115–09-3	CH ₃ ClHg	251.08	(0.5 M media)	Catalyst/Fungicide/ Bacterial product	(Induction of CNS disorder)
Z	n-Hexane	110–54-3	C ₆ H ₁₄	86.18	0.2 M DMSO	Solvent	
A'	Permethrin	52645–53-1	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391.29	1 M DMSO	Pyrethroid insecticide	Voltage-gated sodium channel
B'	Phenobarbital, Na salt	57–30-7	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ NaO ₃	254.22	(0.05 M media)	Anti-epileptic drug	GABA _A receptor
C'	Rotenone	83–79-4	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	394.42	0.2 M DMSO	Insecticide/Piscicide	ETC complex I
D'	Tebuconazole	107534–96-3	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307.82	1 M DMSO	Triazole fungicide	(Inhibition of sterol C14-demethylation)
E'	Tetraethylthiuram disulfide	97–77-8	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ S ₄	296.54	1 M DMSO	Anti-alcoholism drug	Acetaldehyde dehydrogenase
F'	Thalidomide	50–35-1	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₄	258.23	0.5 M DMSO	Anti-cancer (multiple myeloma) drug	
G'	Toluene	108–88-3	C ₇ H ₈	92.14	1 M DMSO	Solvent	
H'	Valinomycin Valinomycin	2001-95-8	C ₅₄ H ₉₀ N ₆ O ₁₈	1111.32	0.1 M DMSO	Depsipeptide antibiotic	Potassium ionophore
I'	Valproic acid, Na salt	1069-66-5	C ₈ H ₁₅ NaO ₂	166.19	1 M DDW	Anti-convulsive drug	Histone deacetylase (HDAC)
(Negative control)							
J'	Acetaminophen	103–90-2	C ₈ H ₉ NO ₂	151.17	(0.1 M media)	Anti-fever/pain/headaches	Cyclooxygenase-2 (COX-2)

MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (= a contaminant of illicitly synthesized meperidine analog MPPP [1-methyl-4-phenyl-propionoxypiperidine]); ETC, electron transport chain; FMF, familial Mediterranean fever; CNS, central nervous system.

5 ng of cDNA from each sample was amplified *via* qPCR using KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo), primer sets (Supplementary Table S1), and the Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System. mRNA levels were quantified using a comparative CT method with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, a housekeeping gene) levels for normalization.

2.6. Statistical analyses

Data were expressed as mean ± standard error (S.E.) (*n*: numbers of independent experiments with triplicate well samples). Statistical comparison was performed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for IC₅₀ values and an unpaired two-tailed Student's *t*-test in RT-qPCR experiments using Prism 5. All *p*-values less than 0.05 denote a significant difference.

3. Results

3.1. iPSC differentiation to NPC

Using the modified dual SMAD inhibition protocol (e.g., LDN193189 was used instead of Noggin as a BMP inhibitor [Chambers et al., 2009; Yamada et al., 2017]) (Fig. 1A), human iPSC were successfully differentiated to NPC, as confirmed by mRNA induction of neural differentiation markers, *PAX6*, *MAP2*, and *OTX2*, and mRNA repression of stem cell (undifferentiation) markers, *OCT3/4* and *NANOG*. The mRNA level induction in *MAP2* and *OTX2* preceded that in *PAX6*, although all reached plateaus at day 8; the magnitude of *PAX6* induction was most prominent ($\times 1728$ versus $\times 169$ [*MAP2*] and $\times 26$ [*OTX2*] at day 10; Fig. 1B left). Repression of *NANOG* preceded repression of *OCT3/4*, but both finally approached a comparable level at day 10 (1.23% and 1.73% of day 0, respectively) (Fig. 1B right). Immunocytochemistry

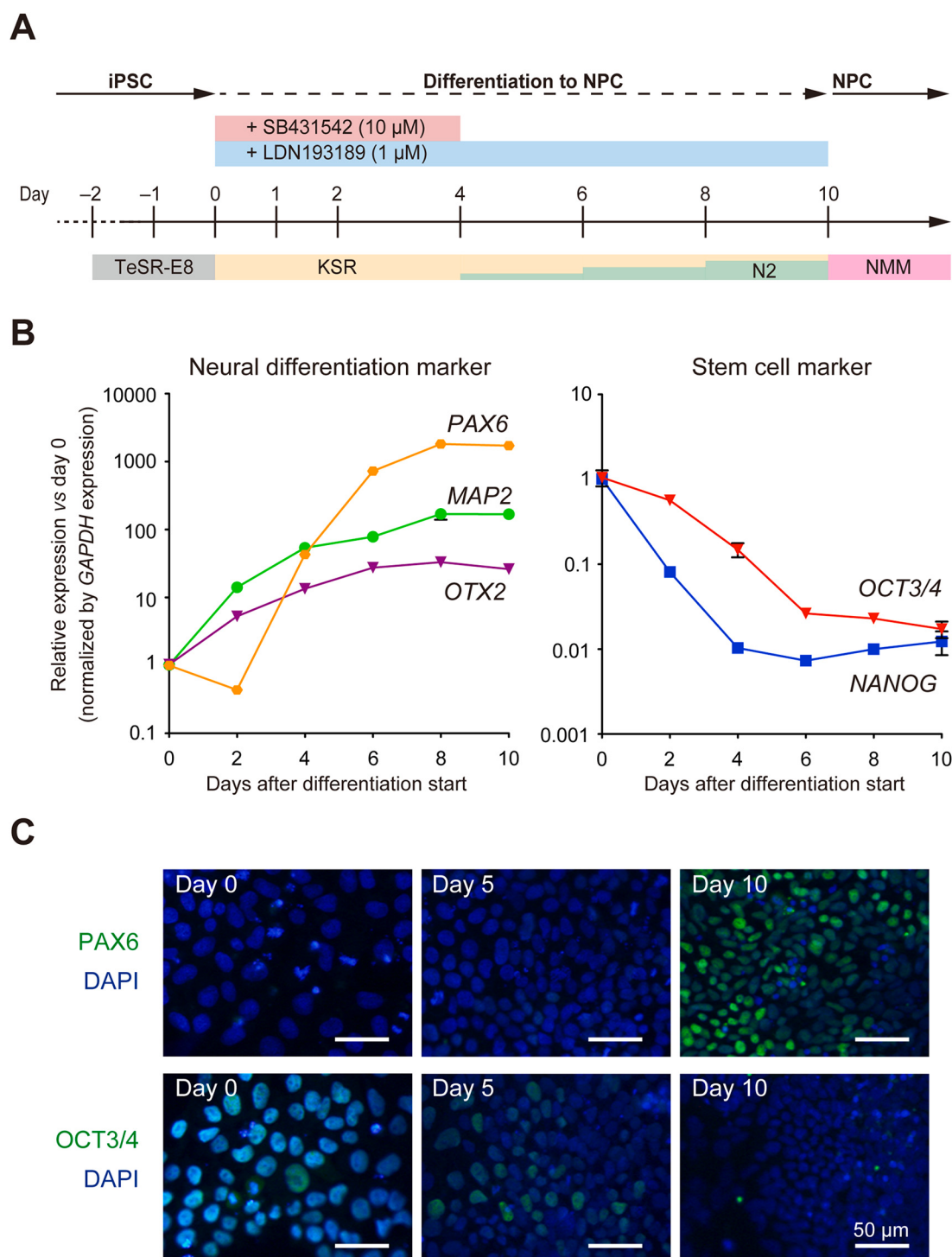


Fig. 1. iPSC differentiation to NPC. (A) Differentiation overview by the dual SMAD inhibition protocol. (B) mRNA induction of neural differentiation markers (*PAX6*, *MAP2*, and *OTX2*; left) and repression of stem cell (undifferentiation) markers (*OCT3/4* and *NANOG*; right) that is normalized by a housekeeping *GAPDH* gene. Representative data from three independent experiments are shown and mean $\pm$ standard error (S.E.) of triplicate samples are presented. S.E. bars are not shown when they are smaller than the size of the data points. (C) Immunohistochemistry of *PAX6* (green; upper three panels) and *OCT3/4* (green; lower three panels) with DAPI (blue; all six panels) in iPSC (day 0), the differentiation waypoint (to NPC, day 5), and NPC (day 10). Bars are 50 μ m.

showed *PAX6* protein upregulation and *OCT3/4* protein downregulation during differentiation to NPC (Fig. 1C). NPC were thereafter maintained and passaged ten times in NMM, and *PAX6*/*MAP2* upregulation and *OCT3/4*/*NANOG* downregulation were maintained. In contrast, *OTX2* upregulation was cancelled—*OTX2* was instead downregulated—during the maintenance period in NMM (Supplementary Fig. S1A). NPC at passages 4–10 were used for ATP/(MTS) assays that

produced similar IC_{50} values (Supplementary Fig. S1B, for example). Total chromosomal numbers of original iPSC and NPC at passages 7 and 10 were 46 as evidenced by Giemsa staining (Supplementary Fig. S2).

3.2. Cytotoxicity of 35 DNT chemicals on Cos-7, HepG2, iPSC, and NPC

Thirty-five DNT chemicals and a negative control, acetaminophen,

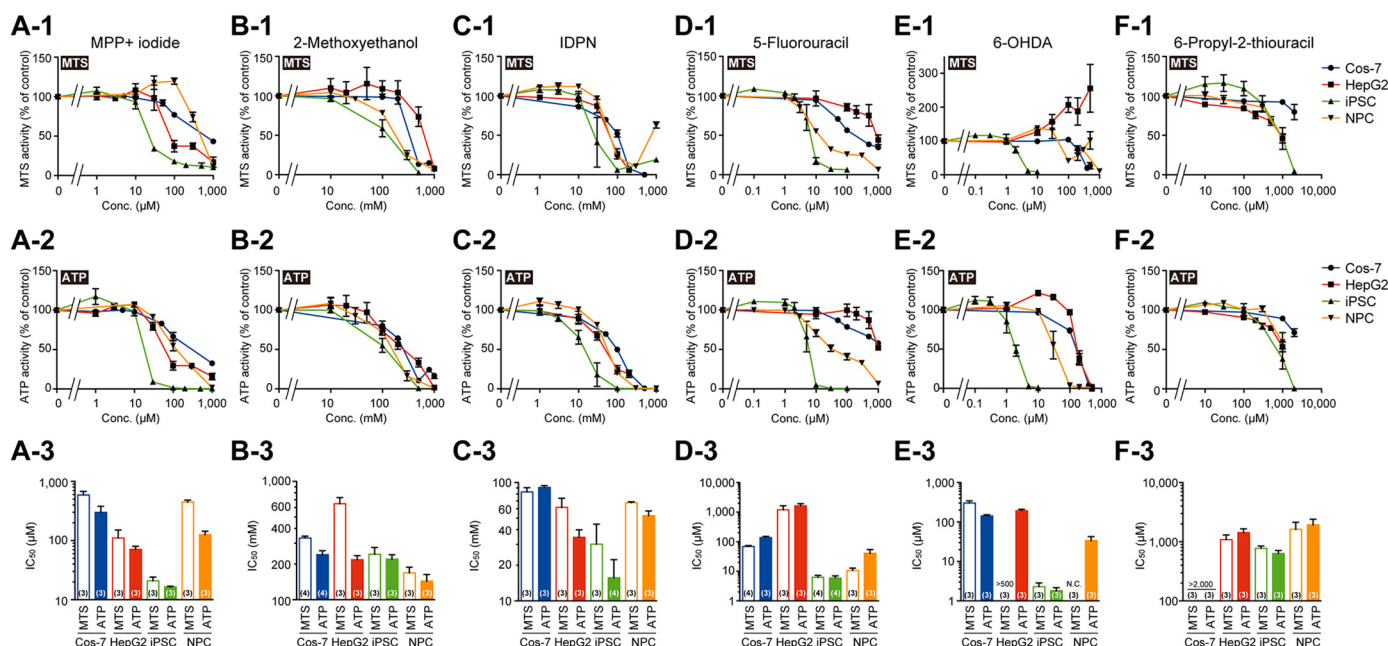


Fig. 2. Concentration-dependent inhibition of cell survival activity (“–1,” MTS assay; “–2,” ATP assay) in four cell types (Cos-7, HepG2, iPSC, and NPC) by six DNT chemicals (A, MPP+ iodide; B, 2-methoxyethanol; C, IDPN; D, 5-fluorouracil; E, 6-OHDA; and F, 6-propyl-2-thiouracil) and calculated IC₅₀ values (“–3”). Data are mean $\pm$ S.E. of 3–4 (presented in parentheses in “–3”) independent experiments that have four sample replicates (wells). N.C., not calculated.

were administered to four cell types (Cos-7, HepG2, iPSC, and NPC) at varying concentrations (Table 1). After two days, cell survival was examined with two common assays, mitochondrial MTS reduction activity and cellular ATP level, and IC₅₀ values were calculated (Fig. 2, Supplementary Fig. S3, and Table 2). The highest concentrations of DNT chemicals were individually set so that the chemical did not precipitate in medium. Most, but not all, DNT chemicals displayed concentration-dependent inhibition by MTS reduction and cellular ATP activity (Fig. 2 and Supplementary Fig. S3). Some DNT chemicals, including aldicarb [I], *n*-hexane [Z], thalidomide [F], and toluene [G], were not cytotoxic when administered at their highest concentration. Generally, similar IC₅₀ values were obtained from two cellular assays (Supplementary Fig. S4), demonstrating the accuracy and validity of the assays. The IC₅₀ values for most DNT chemicals for NPC, and especially iPSC, were > 1–2 orders of magnitude less than IC₅₀ of Cos-7 and HepG2 cells (Fig. 3). Further, the differences in IC₅₀ values of most DNT chemicals, based on ATP assays, were more apparent between Cos-7 and HepG2 (Fig. 4A) than between iPSC and NPC (Fig. 4B). The IC₅₀ values of most DNT chemicals were one order of magnitude higher in NPC than in iPSC (Fig. 4B). NPC passage numbers did not affect the concentration-dependent inhibition and thus IC₅₀ values (Supplementary Fig. S1B, for examples in ATP assays).

3.3. Differential inhibition of iPSC differentiation to NPC by DNT chemicals

To consider the application of the differentiation system for evaluation/classification of DNT chemicals, effects of 14 representative DNT chemicals (mainly insecticides) on day 0–4 differentiation from iPSC to NPC were investigated (Fig. 5A). Specifically, total RNA was isolated from cells at day 4, and expression of differentiation vs. undifferentiation marker genes was examined by RT-qPCR (Fig. 5B and Supplementary Fig. S5). DNT chemicals induced different patterns of gene expression (Table 3). For example, aldicarb, a carbamate insecticide used worldwide and is a known environmental toxicant, which did not show cytotoxic activity on iPSC (Supplementary Fig. S3, I-1–3), downregulated *PAX6* expression but upregulated *MAP2* expression without significantly altering *OTX2*, *OCT3/4*, and *NANOG* expression (Fig. 5B top column panels). Another carbamate insecticide,

carbaryl, also downregulated *PAX6* and upregulated *MAP2* but downregulated *OTX2* and *OCT3/4* at its highest concentration (100 μM; Fig. 5B third column panels). Among the four organochlorine insecticides (DDT, dieldrin, heptachlor, and lindane), the registrations of which have expired in most developed countries (Aktar et al., 2009), *PAX6* expression was suppressed by all four chemicals, but *OTX2* expression was only suppressed by dieldrin and lindane, and *MAP2* expression was upregulated by dieldrin, heptachlor, and lindane, (Supplementary Fig. S5 top, second, and fourth column panels) but not DDT (Fig. 5B bottom column panels). The organochlorine disinfectant, hexachlorophene, and insecticide/piscicide, rotenone, displayed typical inhibition patterns that repress induction of three neural differentiation markers while maintaining *OTX2* and *OCT3/4* expression (Supplementary Fig. S5 third and sixth column panels). In contrast, the two pyrethroid insecticides (deltamethrin and permethrin) that have been developed as safer replacements of organochlorine insecticides due to relatively low mammalian toxicity and rapid environmental biodegradation (Jayaraj et al., 2016) did not modify expressions of marker genes to such an extent (Fig. 5B fifth column panels and Supplementary Fig. S5 fifth column panels). Captan and colchicine showed limited ability to affect marker gene expression (Fig. 5B second and fourth column panels), whereas valproic acid exerted significant effects except for *PAX6* (Supplementary Fig. S5 bottom column panels). Constant yields of total RNA from each well and viable cell appearances in microscopic analyses suggest that such expressional alteration did occur at concentrations below cytotoxic ranges (data not shown).

4. Discussion

This study modeled *in vitro* the impacts of DNT chemicals on early stages of neural differentiation among various key neurodevelopmental processes (Bal-Price et al., 2018b; Fritsche et al., 2018a), by examining the cytotoxicity activity to iPSC/NPC as one measurement endpoint and alteration of gene expression of neural differentiation marker genes during neural differentiation as a second endpoint. A previous study investigated the cytotoxic effects of 80 drugs and environmental chemicals provided by the National Toxicology Program (US Department of Health and Human Services). Toxicity was evaluated in human iPSC

Table 2
The IC₅₀ values of 35 (developmental) neurotoxicants and a negative control acetaminophen in four cell types calculated from MTS and ATP assays.

ID	Chemicals	Cos-7 (a)			HepG2 (b)			iPSC (c)			NPC (d)		
		Unit	MTS	ATP (*)	MTS	ATP (*)	MTS	MTS	ATP (*)	MTS	MTS	ATP (*)	ATP (*)
A	MPP+ iodide	μM	593 ± 83 ^{b,c} (3)	299 ± 81 ^b (3)	111 ± 40 ^d (3)	71.0 ± 9.3 ^a (3)	20.9 ± 3.4 ^{a,d} (3)	16.5 ± 0.4 ^a (3)	126 ± 18 ^a (3)	450 ± 35 ^{b,c} (3)	126 ± 18 ^a (3)	126 ± 18 ^a (3)	126 ± 18 ^a (3)
B	2-Methoxyethanol	mM	333 ± 12 ^b (4)	240 ± 19 ^{d,s} (4)	648 ± 82 ^{a,c,d} (3)	218 ± 18 ^a (3)	243 ± 33 ^b (3)	220 ± 20 ^b (3)	144 ± 20 ^a (3)	169 ± 20 ^b (3)	144 ± 20 ^a (3)	144 ± 20 ^a (3)	144 ± 20 ^a (3)
C	IDPN	mM	83.5 ± 7.1 ^c (3)	91.1 ± 3.1 ^{b,c,d} (3)	61.6 ± 12.0 ^c (3)	34.5 ± 5.4 ^a (3)	30.2 ± 14.4 ^a (3)	15.7 ± 6.6 ^d (4)	52.7 ± 4.9 ^{a,c,s} (3)	67.7 ± 1.1 ^c (3)	52.7 ± 4.9 ^{a,c,s} (3)	52.7 ± 4.9 ^{a,c,s} (3)	52.7 ± 4.9 ^{a,c,s} (3)
D	5-Fluorouracil	μM	69.4 ± 5.1 ^b (4)	138 ± 15 ^{b,s} (3)	1199 ± 452 ^{a,c,d} (3)	1649 ± 302 ^{a,c,d} (3)	6.32 ± 1.03 ^b (4)	5.92 ± 1.06 ^b (4)	41.1 ± 13.5 ^b (3)	10.8 ± 2.0 ^b (3)	41.1 ± 13.5 ^b (3)	41.1 ± 13.5 ^b (3)	41.1 ± 13.5 ^b (3)
E	6-OHDA	μM	304 ± 41 ^c (3)	142 ± 12 ^{b,c,d,s} (3)	N.C. (3)	195 ± 15 ^{a,c,d} (3)	2.29 ± 0.56 ^a (3)	1.83 ± 0.35 ^{a,b} (3)	34.0 ± 8.7 ^{a,b} (3)	N.C. (3)	34.0 ± 8.7 ^{a,b} (3)	34.0 ± 8.7 ^{a,b} (3)	34.0 ± 8.7 ^{a,b} (3)
F	6-Propyl-2-thiouracil	μM	> 2000 (3)	> 2000 (3)	1087 ± 214 (3)	1431 ± 219 (3)	766 ± 76 (3)	631 ± 84 (3)	1926 ± 489 (3)	1621 ± 512 (3)	1926 ± 489 (3)	1926 ± 489 (3)	1926 ± 489 (3)
G	Manganese (II) acetate	μM	N.C. (3)	68.3 ± 15.6 ^b (3)	N.C. (3)	688 ± 204 ^a (3)	N.C. (3)	N.C. (3)	408 ± 13 (3)	N.C. (3)	408 ± 13 (3)	408 ± 13 (3)	408 ± 13 (3)
H	Acrylamide	mM	2.37 ± 0.28 ^{c,d} (5)	2.93 ± 0.45 ^{c,d} (3)	2.20 ± 0.34 ^{c,d} (3)	2.34 ± 0.51 ^{c,d} (3)	0.458 ± 0.086 ^{a,b} (3)	0.274 ± 0.039 ^{a,b} (3)	0.635 ± 0.055 ^{a,b} (3)	0.753 ± 0.041 ^{a,b} (3)	0.635 ± 0.055 ^{a,b} (3)	0.635 ± 0.055 ^{a,b} (3)	0.635 ± 0.055 ^{a,b} (3)
I	Aldicarb	μM	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)
J	Bis(tributyltin) oxide	μM	> 1 (3)	> 1 (3)	0.944 ± 0.204 ^c (4)	0.512 ± 0.043 ^c (3)	0.220 ± 0.093 ^b (4)	0.220 ± 0.070 ^b (4)	0.410 ± 0.082 (3)	0.596 ± 0.100 (3)	0.410 ± 0.082 (3)	0.410 ± 0.082 (3)	0.410 ± 0.082 (3)
K	Bisphenol A	μM	126 ± 6 ^{b,c} (3)	111 ± 14 ^c (3)	242 ± 22 ^{a,c} (4)	184 ± 30 ^{c,d} (4)	19.8 ± 3.1 ^{a,b,d} (4)	15.2 ± 1.5 ^{a,b} (3)	65.9 ± 7.2 ^{b,s} (3)	190 ± 13 ^c (3)	65.9 ± 7.2 ^{b,s} (3)	65.9 ± 7.2 ^{b,s} (3)	65.9 ± 7.2 ^{b,s} (3)
L	Captan	μM	> 100 (3)	> 100 (3)	> 100 (3)	> 100 (3)	> 100 (3)	> 100 (3)	6.44 ± 1.35 ^c (3)	6.72 ± 1.73 ^c (3)	6.44 ± 1.35 ^c (3)	6.44 ± 1.35 ^c (3)	6.44 ± 1.35 ^c (3)
M	Carbaryl	μM	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (4)	> 500 (4)	20.7 ± 7.8 (4)	22.4 ± 6.4 (4)	20.2 ± 4.3 (3)	24.3 ± 10.0 (3)	20.2 ± 4.3 (3)	20.2 ± 4.3 (3)	20.2 ± 4.3 (3)
N	Chlorpyrifos	μM	> 1000 (4)	> 1000 (4)	> 1000 (4)	> 1000 (3)	86.1 ± 34.9 (3)	19.9 ± 2.3 ^d (3)	136 ± 38 ^c (3)	217 ± 57 (3)	136 ± 38 ^c (3)	136 ± 38 ^c (3)	136 ± 38 ^c (3)
O	Colchicine	mM	32.1 ± 6.9 (3)	26.1 ± 5.5 ^b (3)	38.2 ± 13.5 ^{c,d} (3)	75.9 ± 21.2 ^{a,c,d} (3)	5.73 ± 0.67 ^b (4)	5.32 ± 0.54 ^b (4)	3.29 ± 0.84 ^b (3)	2.26 ± 0.68 ^b (3)	3.29 ± 0.84 ^b (3)	3.29 ± 0.84 ^b (3)	3.29 ± 0.84 ^b (3)
P	Deltamethrin	μM	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (4)	> 200 (4)	7.34 ± 0.33 (4)	3.42 ± 0.50 ^{d,s} (4)	83.7 ± 19.4 ^c (3)	> 200 (3)	83.7 ± 19.4 ^c (3)	83.7 ± 19.4 ^c (3)	83.7 ± 19.4 ^c (3)
Q	DEHP	μM	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	75.1 ± 31.1 (5)	15.7 ± 7.1 (4)	38.8 ± 11.5 (4)	15.7 ± 7.1 (4)	15.7 ± 7.1 (4)	15.7 ± 7.1 (4)
R	DDT	μM	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	3.83 ± 0.26 ^d (3)	2.33 ± 0.37 ^{d,s} (4)	11.4 ± 2.9 ^c (3)	16.6 ± 1.5 ^c (3)	11.4 ± 2.9 ^c (3)	11.4 ± 2.9 ^c (3)	11.4 ± 2.9 ^c (3)
S	Diethrin	μM	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (4)	> 500 (3)	5.64 ± 0.90 ^a (4)	3.17 ± 0.47 ^d (4)	9.22 ± 0.95 ^c (4)	13.3 ± 1.5 ^a (4)	9.22 ± 0.95 ^c (4)	9.22 ± 0.95 ^c (4)	9.22 ± 0.95 ^c (4)
T	Diethylstilbestrol	μM	47.2 ± 6.8 ^{c,d} (4)	56.8 ± 4.2 ^{c,d} (3)	N.C. (4)	N.C. (4)	2.24 ± 0.8 ^{a,d} (6)	2.09 ± 0.91 ^{a,d} (6)	18.8 ± 1.6 ^{a,c} (3)	24.9 ± 1.8 ^{a,c} (3)	18.8 ± 1.6 ^{a,c} (3)	18.8 ± 1.6 ^{a,c} (3)	18.8 ± 1.6 ^{a,c} (3)
U	Hepachlor	μM	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	4.60 ± 0.76 ^d (4)	4.33 ± 0.33 ^d (4)	14.5 ± 1.3 ^c (3)	16.8 ± 0.3 ^c (3)	14.5 ± 1.3 ^c (3)	14.5 ± 1.3 ^c (3)	14.5 ± 1.3 ^c (3)
V	Hexachlorophene	μM	24.9 ± 3.5 ^{c,d} (4)	35.0 ± 4.3 ^{b,c,d} (3)	18.0 ± 2.3 ^{c,d} (3)	16.9 ± 1.9 ^{a,c,d} (3)	0.0851 ± 0.0164 ^{a,b} (5)	0.0911 ± 0.0222 ^{a,b} (5)	5.19 ± 0.33 ^{a,b} (3)	5.30 ± 0.59 ^{a,b} (3)	5.19 ± 0.33 ^{a,b} (3)	5.19 ± 0.33 ^{a,b} (3)	5.19 ± 0.33 ^{a,b} (3)
W	Hydroxyurea	μM	N.C. (3)	> 10,000 (3)	N.C. (3)	> 10,000 (3)	193 ± 24 (3)	111 ± 5 ^{d,s} (3)	414 ± 61 ^c (3)	N.C. (3)	414 ± 61 ^c (3)	414 ± 61 ^c (3)	414 ± 61 ^c (3)
X	Lindane	μM	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	33.3 ± 7.4 ^c (3)	15.0 ± 1.3 ^d (3)	124 ± 14 ^c (3)	150 ± 17 ^c (3)	124 ± 14 ^c (3)	124 ± 14 ^c (3)	124 ± 14 ^c (3)
Y	Methyl Hg (II) chloride	μM	1.58 ± 0.38 ^{c,d} (4)	1.48 ± 0.52 ^c (4)	1.16 ± 0.39 (3)	0.865 ± 0.251 (3)	0.0835 ± 0.0304 ^a (4)	0.0774 ± 0.0266 ^a (4)	0.152 ± 0.027 (3)	0.190 ± 0.021 ^a (3)	0.152 ± 0.027 (3)	0.152 ± 0.027 (3)	0.152 ± 0.027 (3)
Z	n-Hexane	μM	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)	> 200 (3)
A'	Permethrin	μM	> 500 (3)	> 500 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	311 ± 105 ^d (3)	11.1 ± 0.9 ^{d,s} (3)	300 ± 43 ^{c,s} (3)	825 ± 67 ^c (3)	300 ± 43 ^{c,s} (3)	300 ± 43 ^{c,s} (3)	300 ± 43 ^{c,s} (3)
B'	Phenobarbital, Na salt	mM	5.48 ± 0.16 ^{b,c,d} (3)	4.75 ± 0.09 ^{b,c,d,s} (3)	2.89 ± 0.75 ^a (3)	1.49 ± 0.38 ^a (3)	1.37 ± 0.25 ^a (3)	0.984 ± 0.175 ^{a,c} (3)	2.25 ± 0.27 ^{a,c} (3)	3.03 ± 0.61 ^a (3)	2.25 ± 0.27 ^{a,c} (3)	2.25 ± 0.27 ^{a,c} (3)	2.25 ± 0.27 ^{a,c} (3)
C'	Rotenone	μM	3.35 ± 1.00 (3)	5.28 ± 2.13 (3)	6.05 ± 1.57 ^{c,d} (3)	4.49 ± 0.98 (3)	0.0162 ± 0.054 ^b (3)	0.00823 ± 0.0023 (3)	0.0598 ± 0.0071 ^b (3)	0.0787 ± 0.0071 ^b (3)	0.0598 ± 0.0071 ^b (3)	0.0598 ± 0.0071 ^b (3)	0.0598 ± 0.0071 ^b (3)
D'	Tebuconazole	μM	> 1000 (4)	> 1000 (4)	16.8 ± 8.2 ^d (4)	5.00 ± 3.16 ^{c,d} (4)	45.1 ± 7.0 (3)	28.8 ± 4.9 ^b (3)	44.0 ± 3.2 ^b (3)	57.9 ± 11.3 ^b (3)	44.0 ± 3.2 ^b (3)	44.0 ± 3.2 ^b (3)	44.0 ± 3.2 ^b (3)
E'	Tetraethylthiuram disulfide	μM	0.388 ± 0.108 ^{c,d} (3)	0.363 ± 0.073 ^c (3)	> 100 (4)	> 100 (4)	2.45 ± 0.15 ^a (3)	1.99 ± 0.33 ^a (3)	N.C. (3)	N.C. (3)	N.C. (3)	N.C. (3)	N.C. (3)
F'	Thalidomide	μM	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (4)	> 500 (4)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)	> 500 (3)
G'	Toluene	μM	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)	> 1000 (3)
H'	Valinomycin	mM	55.2 ± 19.6 ^c (3)	58.7 ± 17.2 ^{b,c,d} (3)	16.7 ± 5.1 (5)	9.96 ± 4.62 ^a (5)	5.68 ± 1.24 ^a (3)	5.94 ± 1.91 ^a (3)	6.89 ± 2.23 ^a (5)	28.6 ± 9.5 (5)	6.89 ± 2.23 ^a (5)	6.89 ± 2.23 ^a (5)	6.89 ± 2.23 ^a (5)
I'	Valproic acid, Na salt	μM	2314 ± 203 ^c (3)	2342 ± 257 ^{b,c} (3)	1395 ± 670 ^d (3)	393 ± 102 ^{a,d} (4)	186 ± 17 ^{a,d} (4)	319 ± 122 ^{a,d} (4)	2763 ± 385 ^{b,c} (3)	3594 ± 340 ^{b,c} (3)	2763 ± 385 ^{b,c} (3)	2763 ± 385 ^{b,c} (3)	2763 ± 385 ^{b,c} (3)
(Negative control)													
J'	Acetaminophen	mM	3.22 ± 0.68 ^c (3)	4.63 ± 0.32 ^{c,d} (5)	> 20 (3)	> 20 (3)	0.919 ± 0.025 ^{a,d} (4)	0.918 ± 0.051 ^{a,d} (4)	2.49 ± 0.23 ^{a,c} (3)	2.94 ± 0.45 ^c (3)	2.49 ± 0.23 ^{a,c} (3)	2.49 ± 0.23 ^{a,c} (3)	2.49 ± 0.23 ^{a,c} (3)

The IC₅₀ values calculated from Fig. 2 and supplementary Fig. S1–5 are shown as mean ± S.E. (n as experimental replicates of 4 [well] samples/treatment).

Significant differences were observed versus the respective Cos-7(a), HepG2(b), iPSC(c), NPC(d), and MTS(*) data at $P < 0.05$ by the Student t-test.

N.C.: not calculated mostly because of irregular inhibition patterns.

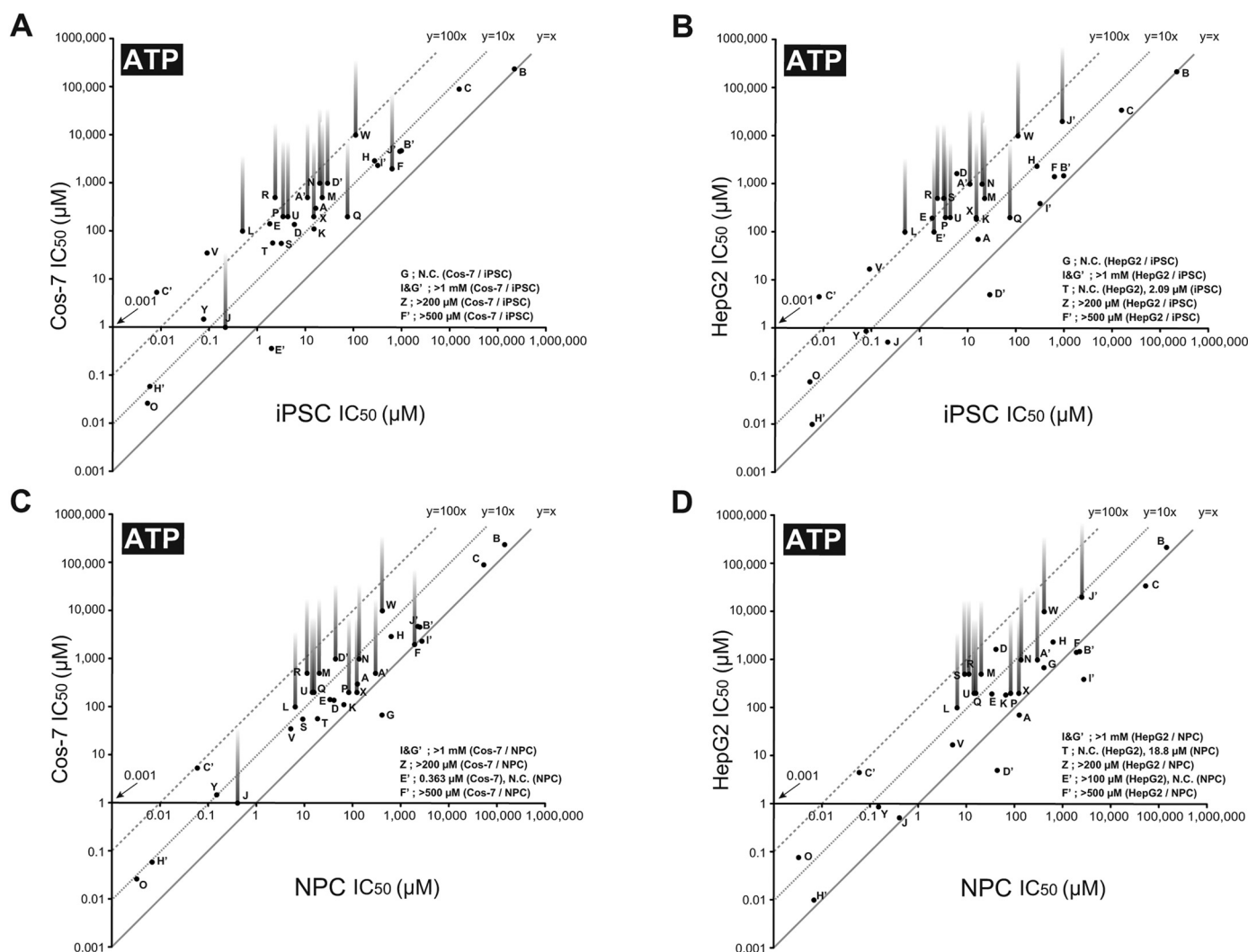


Fig. 3. Comparisons of IC₅₀ values of 35 DNT chemicals and acetaminophen in ATP assays between (A) iPSC and Cos-7 cells, (B) iPSC and HepG2 cells, (C) NPC and Cos-7 cells, and (D) NPC and HepG2 cells. Tail portions of the comets represent IC₅₀ values higher than the dots. The three lines indicate 1 × (solid), 10 × (dotted), and 100 × (bar dotted) divergence in magnitude.

(BC1 cell line originated from newborn cord blood mononuclear cells [Chou et al., 2011]), human iPSC-derived neural stem (= progenitor) cells, neurons, and astrocytes, using only two concentrations (10 and 100 μM) by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Pei et al., 2016). Except for this study, information on cytotoxicity or inhibition of neural differentiation by those chemicals on human iPSC(NPC) is lacking in the published literature. All the 35 DNT chemicals tested in this study (Table 1) were included in their 80-chemical list, and they demonstrated cytotoxicity of 14 DNT chemicals (MPP+ iodide, 2-methoxyethanol, 6-propyl-2-thiouracil, acrylamide, aldicarb, captan, carbaryl, DEHP, DDT, dieldrin, deltamethrin, heptachlor, rotenone, and valinomycin) on iPSC and those *plus* manganese (II) acetate, bisphenol A, colchicine, and *n*-hexane (total 18 DNT chemicals) on neural stem cells at 100 μM concentration (Pei et al., 2016). All other chemicals were considered nontoxic to iPSC or neural stem cells (Pei et al., 2016); however, our present study demonstrated that IDPN, 5-fluorouracil, 6-OHDA, bis(tributyltin)oxide, chlorpyrifos, DEHP, diethylstilbestrol, hexachlorophene, hydroxyurea, lindane, methyl Hg (II) chloride, permethrin, phenobarbital, tubuconazole, and tetraethylthiuram disulfide (but not thalidomide/toluene) display concentration-dependent inhibition of MTS or ATP activity in iPSC, even at concentrations lower than 100 μM (Fig. 2 and Supplementary Fig. S3). The discrepancies in sensitivity could be attributable to differences in

human iPSC lines (XCL1 deriving from < 1-month-old male CD34-positive cord blood cells vs 253G1 from 36-year-old female dermal fibroblasts in this study), assay methods (MTT vs MTS), cell densities ($3.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ vs $6.25 \times 10^3/\text{cm}^2$ at experiment start), or culture duration (1 day vs 2 days).

We utilized two independent assays, MTS and ATP. The former measures mitochondrial enzyme activity in living cells and the latter quantifies ATP content in cells living just before assay. Our results obtained by these two different cellular assays assessing mitochondrial function indirectly were almost identical (Supplementary Fig. S4); however, monophasic inhibition curves were not observed in some cases. 6-OHDA (Fig. 2, E-1) and hydroxyurea (Supplementary Fig. S3, W-1) upregulated the activity in MTS assays of HepG2 cells *via* unknown mechanisms. In such cases, our independent ATP assay was found to be beneficial as a backup (Fig. 2, E-2, and Supplementary Fig. S3, W-2). The ATP luciferase assay could also be influenced by unknown factors/mechanisms as shown in biphasic effects of manganese (II) acetate on iPSC (Supplementary Fig. S3, G-2). One possibility for the reversed effects and biphasic effects is the reduction potential or the pH-altering effect of the chemicals independent of biological activity. When IC₅₀ values of 200 μM were used as activity cutoffs in either MTS or ATP assays on iPSC, 25 out of 35 DNT chemicals (71.4%) were identified as DNT-positives while the remaining 10 chemicals,

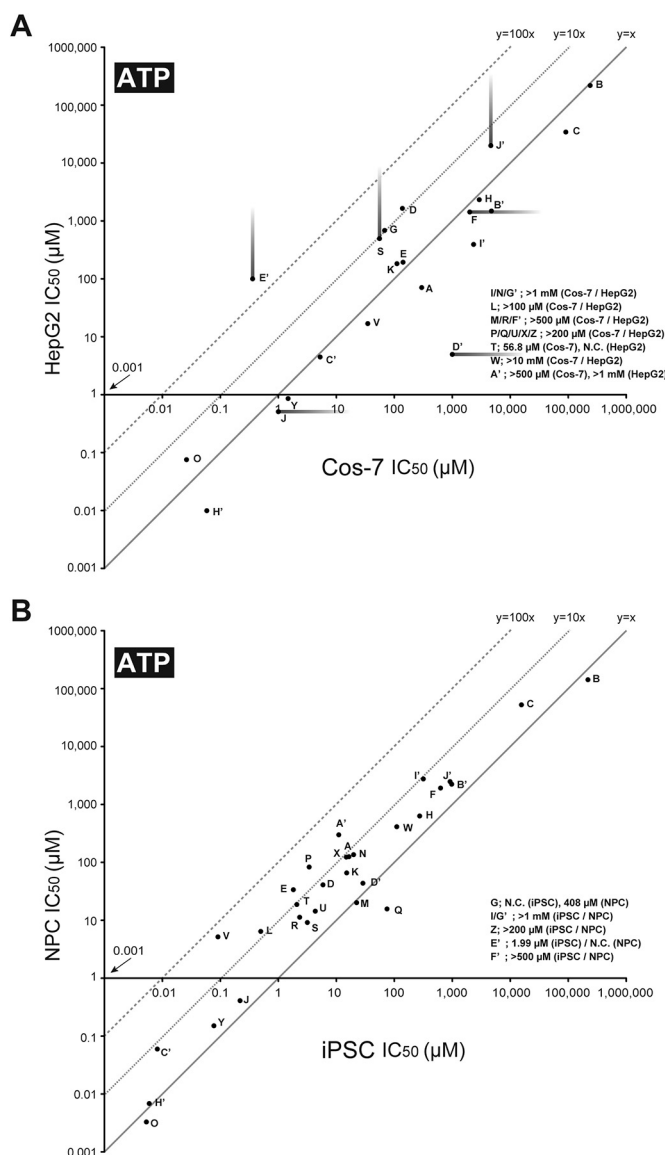


Fig. 4. Comparisons of IC_{50} values of 35 DNT chemicals and acetaminophen in ATP assays between (A) Cos-7 and HepG2 cells and (B) iPSC and NPC cells. Tail portions of the comets represent IC_{50} values higher than the dots. The three lines indicate $1 \times$ (solid), $10 \times$ (dotted), and $100 \times$ (bar dotted) divergence in magnitude.

including 2-methoxyethanol, 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), 6-propyl-2-thiouracil, manganese (II) acetate, acrylamide, aldicarb, *n*-hexane, phenobarbital, Na salt, thalidomide, and toluene, (*plus* control acetaminophen) as DNT-negatives (Table 2). These results suggest the substantial potentials of these assays for the large-scale DNT chemical screening.

The iPSC and NPC were more sensitive to almost all DNT chemicals tested than in two popular transformed cell lines, Cos-7 (a fibroblast-like cell line obtained by immortalizing CV-1 African green monkey kidney cells with SV40 large T antigen) and HepG2 (a hepatocellular carcinoma cell line derived from a 15-year-old hepatoma patient; also referred as hepatocellular blastoma [Lopez-Terrada et al., 2009]) (Fig. 3). In new drug development, nonclinical safety tests using mammalian cells and experimental animals are mandatory. Notably, no rules/guidelines for selecting cell types for the safety examinations exist, and human (or other mammalian) transformed cells such as HepG2 and HEK293 are most often used because they, unlike normal human cells, proliferate eternally. Human iPSC (and their derivatives

such as NPC) are proliferative and have a much closer resemblance to normal human cells with normal chromosomal numbers (e.g., 253G1 cells [46XX; http://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/CellInfo/?cellNo=HPS0002&lang=En]; HepG2 [51–53; http://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/CellInfo/?cellNo=RCB1648&lang=En]; HEK293 [63–71; http://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/CellInfo/?cellNo=RCB1637&lang=En]). Therefore, human iPSC might be better suited as a standard cell type for drug safety tests, especially for clinical evaluation of DNT chemicals, such as 5-fluorouracil, colchicine, hydroxyurea, phenobarbital, tetraethylthiuram disulfide, thalidomide, and valproic acid (Table 1).

The use of differentiation of pluripotent stem cells into neural precursor cells for DNT evaluation is classified as a “UKN1” test in a recent OECD/European Food Safety Authority (EFSA) testing battery (Bal-Price et al., 2018a). This study has become the first to evaluate the impacts of DNT chemicals on iPSC differentiation to NPC by examining the altered expression of neural differentiation as well as undifferentiation (stem cell) marker genes. For neural differentiation, *PAX6*, *OTX2*, and *MAP2* were selected because the magnitude of mRNA induction was greater than other markers such as *Nestin* and *HOXB4* (*Homeobox B4*) (data not shown). Induction of *PAX6*, a key transcription factor that regulates multiple downstream genes and balances proliferation/differentiation of neural stem/progenitor cells (Kikkawa et al., 2019), was most prominent (Fig. 1B). We previously reported that all three DNT chemicals, tributyltin (Yamada et al., 2018a), chlorpyrifos (Yamada et al., 2017), and 5-fluorouracil (Yamada et al., 2018b), inhibit *PAX6* induction in the process of iPSC differentiation to NPC, and herein add 10 DNT chemicals (aldicarb, carbaryl, deltamethrin, DEHP, DDT, dieldrin, heptachlor, hexachlorophene, lindane, and rotenone) to our list (Table 3). In contrast, *PAX6* was somewhat upregulated by 0.3 μ M colchicine (197%), 3 μ M DOP (124%), and 1 μ M hexachlorophene (129%) by unknown mechanisms (Fig. 5B and Supplementary Fig. S5). *PAX6* is considered one of the autism spectrum disorder (ASD)-susceptible loci, and therefore, *PAX6* regulation by those chemicals could be implicated in ASD pathogenesis (Yamamoto et al., 2014).

The homeodomain-containing transcriptional factor *OTX2* also plays an important role in brain development (Acampora et al., 2000; Boncinelli and Morgan, 2001; Maheu and Ressler, 2017). It is essential for early specification of the anterior neural plate, and *Otx2*-deficient mice were embryonically lethal, around embryonic day 9, due to lack of the rostral neuroectoderm that forms the forebrain, midbrain, and rostral hindbrain (Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995). Because *OTX2* upregulation is not maintained in NMM (Supplementary Fig. S1A), its temporal expression regulated by *OTX4*–*OTX2* axis may occur when cells exit from ground state pluripotency (Yang et al., 2014). Several *OTX2* mutations have been found in patients with brain malformations and neurological disorders (Beby and Lamonerie, 2013), and polymorphisms in the *OTX2* gene are considered risk factors for bipolar disorders (Sabunciyan et al., 2007). We observed that *OTX2* expression is also bidirectionally regulated by 14 DNT chemicals during iPSC differentiation to NPC—captan and DEHP upregulated *OTX2* induction, while carbaryl, dieldrin, hexachlorophene, lindane, rotenone, and valproic acid suppressed it (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3).

MAP2 belongs to the *MAP2*/*Tau* family of microtubule-associated proteins (MAPs) and regulates the interaction of microtubule and F-actin that is critical for neuromorphogenic processes, such as neurite initiation (Nunez and Fischer, 1997). *MAP2* anomalies are implicated in the onset of mood disorders (e.g., depression and bipolar disorders) and schizophrenia (Marchisella et al., 2016). Aldicarb, carbaryl, dieldrin, heptachlor, lindane, and valproic acid induced *MAP2* expression, while hexachlorophene and rotenone suppressed it (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3).

Stem cell transcription factors *OCT3/4* and *NANOG* were used as undifferentiation markers; the former is a Yamanaka factor (Takahashi et al., 2007), and *NANOG* is a superior marker for pluripotency used for

The diagram illustrates the experimental timeline for differentiating iPSCs into NPCs. The timeline is marked in days, from -2 to 10. Key events include the addition of DNT chemical, SB431542 (10 μ M), and LDN19319 (1 μ M) between Day 0 and Day 4. RNA preparation and RT-qPCR are performed at Day 4. The media used are TeSR-E8 (Days -2 to 0), KSR (Days 0 to 4), N2 (Days 4 to 10), and NMM (Days 10 to 12).

Figure 1: Relative expression of PAX6, OTX2, MAP2, OCT3/4, and NANOG in the presence of various pesticides.

The figure displays 30 bar charts (6 rows by 5 columns) showing the relative expression of five genes (PAX6, OTX2, MAP2, OCT3/4, and NANOG) in response to six pesticides (Aldicarb, Captan, Carbaryl, Colchicine, Deltamethrin, and DEHP) at day 0 and day 4. The y-axis represents relative expression, and the x-axis represents pesticide concentration (μM or nM). Data values are labeled above each bar, and asterisks indicate statistical significance.

Pesticide	Gene	Day	Concentration	Relative Expression	Significance
Aldicarb	PAX6	0	0	100	
		4	300	88	
	OTX2	0	0	100	
		4	300	96	
	MAP2	0	0	100	
		4	300	123	*
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	300	96	
	NANOG	0	0	1.0	
		4	300	80	
Captan	PAX6	0	0	100	
		4	30	84	
	OTX2	0	0	100	
		4	30	119	*
	MAP2	0	0	100	
		4	30	105	*
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	30	122	
	NANOG	0	0	1.0	
		4	30	113	
Carbaryl	PAX6	0	0	100	
		4	100	37	**
	OTX2	0	0	100	
		4	100	55	***
	MAP2	0	0	100	
		4	100	147	***
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	100	88	*
	NANOG	0	0	1.0	
		4	100	42	
Colchicine	PAX6	0	0	100	
		4	1	90	
	OTX2	0	0	100	
		4	1	85	
	MAP2	0	0	100	
		4	1	104	
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	1	110	
	NANOG	0	0	1.0	
		4	1	100	
Deltamethrin	PAX6	0	0	100	
		4	30	78	*
	OTX2	0	0	100	
		4	30	106	*
	MAP2	0	0	100	
		4	30	98	
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	30	113	
	NANOG	0	0	1.0	
		4	30	119	*
DEHP	PAX6	0	0	100	
		4	100	39	***
	OTX2	0	0	100	
		4	100	187	*
	MAP2	0	0	100	
		4	100	142	
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	100	142	*
	NANOG	0	0	1.0	
		4	100	108	
DDT	PAX6	0	0	100	
		4	30	42	**
	OTX2	0	0	100	
		4	30	89	
	MAP2	0	0	100	
		4	30	116	
	OCT3/4	0	0	1.0	
		4	30	150	**
	NANOG	0	0	1.0	
		4	30	139	

9

Fig. 5. Impacts of seven DNT chemicals (aldicarb, captan, carbaryl, colchicine, deltamethrin, DEHP, and DDT) on iPSC differentiation to NPC revealed by altered expression of differentiation/undifferentiation marker genes. (A) Experimental overview for the RT-qPCR analyses. (B) The effects of seven DNT chemicals on mRNA expression of differentiation (*PAX6*, *MAP2*, and *OTX2*) and undifferentiation (*OCT3/4* and *NANOG*) markers normalized by *GAPDH*. The expression in iPSC cells was set at one on the y-axis and the numbers above the bars indicate the percentages of expression assuming that day 4 cells without the DNT chemical (unfilled bars) are 100. Data are mean $\pm$ S.E. ($n=3$). Differences *versus* expression in day 4 cells without the DNT chemical (unfilled bars) were significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Table 3

Impacts of the representative (developmental) neurotoxicants on the expression of neural differentiation and undifferentiation marker genes during neural differentiation of iPSC.

ID	Chemicals	<i>PAX6</i>	<i>OTX2</i>	<i>MAP2</i>	<i>OCT3/4</i>	<i>NANOG</i>
I	Aldicarb	↓↓	–	↑↑	–	–
L	Captan	–	↑	–	–	–
M	Carbaryl	↓↓↓	↓↓	↑↑	↓	–
O	Colchicine	↑↑↑	–	–	–	–
P	Deltamethrin	↓	↑(↓)	–	–	↑
Q	DEHP	↓↓↓	↑↑↑	–	↑↑	–
R	DDT	↓↓↓	–	–	↑↑	–
S	Dieldrin	↓↓↓	↓↓	↑↑↑	(↓↓)	↑↑↑
U	Heptachlor	↓↓↓	–	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
V	Hexachlorophene	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	↑↑↑
X	Lindane	↓↓	↓	↑	–	–
A'	Permethrin	–	–	–	–	↓↓
C'	Rotenone	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
I'	Valproic acid, Na salt	–	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑

During neural differentiation, differentiation marker genes (*PAX6*, *OTX2*, and *MAP2*) are upregulated while undifferentiation marker genes (*OCT3/4* and *NANOG*) are downregulated. The impact of each neurotoxicant was indicated as follows when significant differences were observed *versus* control: ↑, 1–20% up; ↑↑, 21–50% up; ↑↑↑, > 50% up; ↓, 1–20% down; ↓↓, 21–50% down; ↓↓↓, > 50% down.

establishing “the 2nd generation” *NANOG* iPSC (Okita et al., 2007). Their expression was significantly suppressed during differentiation to NPC (Fig. 1B). Compared to the differentiation markers, the impacts of 14 DNT chemicals on undifferentiation markers were much smaller (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3).

Indeed, the 14 DNT chemicals displayed differential profiles for the regulation of such marker genes, suggesting their differential impacts on neural development in humans. Low-level childhood exposures to deltamethrin may negatively affect neurocognitive (learning and social) development by six years of age (Viel et al., 2015). Plasma level increases in DEHP (and bisphenol A) might be associated with a Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified (PDD-NOS) (Kondolot et al., 2016). Such phenotypic differences could be fundamentally attributable to altered regulation of neural differentiation (Fig. 5). The majority of epidemiological studies do not strongly implicate any particular pesticide as causally related to adverse neurodevelopmental impacts in infants and children (Burns et al., 2013); however, dose-related correlations between maternal exposures to chlorpyrifos (and other organophosphates) and small head circumference at birth and neurobehavioral deficits, along with correlations between serum concentrations of DDT or its metabolite dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopmental performance, are reported (Grandjean and Landrigan, 2014).

Also, many “not negligible” concerns and evidence from animal experiments are observed. Oral administration of a single dose of the carbamate, aldicarb (0.35 mg/kg body weight), markedly inhibited acetylcholinesterase activity (up to 30%–40% of the basal) in the brains of postnatal day 17 (PND17) rats (and in adult rats at higher doses), thereby inducing tremors and gait ataxia (Moser, 1999), while another carbamate, carbaryl (5.0 mg/kg body weight), inhibited acetylcholinesterase activity only slightly (88% of the basal at maximum) in the brains of PND10 mice but induced persistent adult behavior alteration and cognitive impairment (Lee et al., 2015). In this study, the assessment of aldicarb as a DNT chemical was only realized by a

combination of different alternative *in vitro* assays on iPSC.

5. Conclusion

We evaluated the cytotoxicity of the 35 DNT chemicals on iPSC, NPC, Cos-7, and HepG2 cells, and found that iPSC/NPC are more vulnerable to the majority of these chemicals than the two transformed cell lines. Further, we observed that 14 DNT chemicals differentially affected iPSC differentiation to NPC. The CAS registry now includes over 100 million chemicals, and more than 74,000 compounds are in commercial use (Schmidt, 2009); however, only 12 chemicals have been identified as human DNT chemicals (Grandjean and Landrigan, 2014; Oulhote et al., 2016; Fritsche et al., 2018b). Current screening protocols cannot keep pace with the backlog of untested chemicals (Fritsche et al., 2018b). This study provides a useful screening test that precedes animal experimentation. The test displays many characteristics recommended for proper evaluation of DNT (Crofton et al., 2011). Our methods 1) incorporate two endpoints that model key events of neurodevelopment; 2) correctly and accurately measure the intended endpoints with MTS/ATP and RT-PCR assays; 3) are supported by both positive (responsive) and negative (non-responsive) training/testing sets of chemicals (as found in Figs. 2 and 5, Supplementary Figs. S3 and S5); and 4) can feasibly screen large numbers of chemicals (e.g., 35 chemicals in this study), although their specificity and sensitivity need to be scrutinized in the future experiments. Also, our methods might be more easily reproducible in many labs and performed on large numbers of chemicals in less time than recently described methods using human iPSC-derived 3D-neurospheres (Kobolak et al., 2020). Selection of the other differentiation/undifferentiation marker genes may enable more versatile DNT evaluation.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant from Showa Pharmaceutical University (to I. Ishii) and a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan (#19KD1003 to Y. Kanda). We thank Dr. Sigeru Yamada (Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Japan) for technical instruction on iPSC culture and their differentiation to NPC.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104999>.

References

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., Brulet, P., 1995. Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2* – / – mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279–3290.
- Acampora, D., Postiglione, M.P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Simeone, A., 2000. The role of *Otx* and *Otp* genes in brain development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 669–677.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.

- Bal-Price, A., Hogberg, H.T., Crofton, K.M., Denshian, M., FitzGerald, R.E., Fritsche, E., Heinonen, T., Hougaard Bennekou, S., Klimes, S., Piersma, A.H., Sachana, M., Shafer, T.J., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Viviani, B., Waldmann, T., Westerink, R.H.S., Wilks, M.F., Witters, H., Zurich, M.G., Leist, M., 2018a. Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity. *Altox* 35, 306–352. <https://doi.org/10.14573/altox.1712081>.
- Bal-Price, A., Pistollato, F., Sachana, M., Bopp, S.K., Munn, S., Worth, A., 2018b. Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 354, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.008>.
- Barenys, M., Fritsche, E., 2018. A historical perspective on the use of stem/progenitor cell-based in vitro methods for neurodevelopmental toxicity testing. *Toxicol. Sci.* 165, 10–13. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy170>.
- Beby, F., Lamonerie, T., 2013. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp. Eye Res.* 111, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.03.007>.
- Bloom, B., Cohen, R.A., Freeman, G., 2009. Summary health statistics for U.S. children: National health interview survey, 2007. *Vital Health Stat.* 10, 1–80.
- Bloom, B., Cohen, R.A., Freeman, G., 2012. Summary health statistics for U.S. children: National health interview survey, 2011. *Vital Health Stat.* 10, 1–88.
- Boncinelli, E., Morgan, R., 2001. Downstream of *Otx2*, or how to get a head. *Trends Genet.* 17, 633–636. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02418-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02418-0).
- Burns, C.J., McIntosh, L.J., Mink, P.J., Jurek, A.M., Li, A.A., 2013. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: Review of the epidemiologic and animal studies. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 16, 127–283. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.783383>.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>.
- Chou, B.K., Mali, P., Huang, X., Ye, Z., Dowey, S.N., Resar, L.M., Zou, C., Zhang, Y.A., Tong, J., Cheng, L., 2011. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 21, 518–529. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.12>.
- Crofton, K.M., Mundy, W.R., Lein, P.J., Bal-Price, A., Coecke, S., Seiler, A.E., Knaut, H., Buzanska, L., Goldberg, A., 2011. Developmental neurotoxicity testing: Recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *Altox* 28, 9–15.
- Fritsche, E., Barenys, M., Klose, J., Masjosthusmann, S., Nimtz, L., Schmuck, M., Wuttke, S., Tigges, J., 2018a. Development of the concept for stem cell-based developmental neurotoxicity evaluation. *Toxicol. Sci.* 165, 14–20. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy175>.
- Fritsche, E., Grandjean, P., Crofton, K.M., Aschner, M., Goldberg, A., Heinonen, T., Hessel, E.V.S., Hogberg, H.T., Bennekou, S.H., Lein, P.J., Leist, M., Mundy, W.R., Paparella, M., Piersma, A.H., Sachana, M., Schmuck, G., Solecki, R., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Wilks, M.F., Witters, H., Zurich, M.G., Bal-Price, A., 2018b. Consensus statement on the need for innovation, transition and implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 354, 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.004>.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J., 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 13, 330–338. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70278-3).
- Harrill, J.A., Freudenrich, T., Wallace, K., Ball, K., Shafer, T.J., Mundy, W.R., 2018. Testing for developmental neurotoxicity using a battery of in vitro assays for key cellular events in neurodevelopment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 354, 24–39. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.001>.
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P., 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* 9, 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>.
- Kikkawa, T., Casagol, C.R., Chun, S.H., Shinohara, H., Hiraoka, K., Osumi, N., 2019. The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder. *Brain Res.* 1705, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.041>.
- Kobolaj, J., Teglas, A., Bellak, T., Janstova, Z., Molnar, K., Zana, M., Bock, I., Laszlo, L., Dinnyes, A., 2020. Human induced pluripotent stem cell-derived 3D-neurospheres are suitable for neurotoxicity screening. *Cells* 9, 1122. <https://doi.org/10.3390/cells9051122>.
- Kondolot, M., Ozmert, E.N., Asci, A., Erkekoglu, P., Oztup, D.B., Gumus, H., Kocer-Gumusel, B., Yurdakok, K., 2016. Plasma phthalate and bisphenol A levels and oxidant-antioxidant status in autistic children. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.03.006>.
- Landrigan, P.J., Lambertini, L., Birnbaum, L.S., 2012. A research strategy to discover the environmental causes of autism and neurodevelopmental disabilities. *Environ. Health Perspect.* 120, a258–a260. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104285>.
- Lee, I., Eriksson, P., Fredriksson, A., Buratovic, S., Viberg, H., 2015. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 288, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.08.014>.
- Lopez-Terrada, D., Cheung, S.W., Finegold, M.J., Knowles, B.B., 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum. Pathol.* 40, 1512–1515. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.003>.
- Maheu, M.E., Ressler, K.J., 2017. Developmental pathway genes and neural plasticity underlying emotional learning and stress-related disorders. *Learn. Mem.* 24, 492–501. <https://doi.org/10.1101/lm.044271.116>.
- Marchisella, F., Coffey, E.T., Hollos, P., 2016. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 596–611. <https://doi.org/10.1002/cm.21300>.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., Aizawa, S., 1995. Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* 9, 2646–2658. <https://doi.org/10.1101/gad.9.21.2646>.
- Moser, V.C., 1999. Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat: Behavioral and biochemical parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157, 94–106. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8675>.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochizuki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>.
- Nunez, J., Fischer, I., 1997. Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J. Mol. Neurosci.* 8, 207–222. <https://doi.org/10.1007/bf02736834>.
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>.
- Oulhote, Y., Steuerwald, U., Debes, F., Weihe, P., Grandjean, P., 2016. Behavioral difficulties in 7-year old children in relation to developmental exposure to perfluorinated alkyl substances. *Environ. Int.* 97, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.015>.
- Pei, Y., Peng, J., Behl, M., Sipes, N.S., Shockley, K.R., Rao, M.S., Tice, R.R., Zeng, X., 2016. Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. *Brain Res.* 1638, 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.048>.
- Rice, D., Barone Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 511–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>.
- Ross, E.J., Graham, D.L., Money, K.M., Stanwood, G.D., 2015. Developmental consequences of fetal exposure to drugs: What we know and what we still must learn. *Neuropsychopharmacology* 40, 61–87. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.147>.
- Ryan, K.R., Sirenko, O., Parham, F., Hsieh, J.H., Cromwell, E.F., Tice, R.R., Behl, M., 2016. Neurite outgrowth in human induced pluripotent stem cell-derived neurons as a high-throughput screen for developmental neurotoxicity or neurotoxicity. *Neurotoxicology* 53, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.02.003>.
- Sabuncian, S., Yolken, R., Ragan, C.M., Potash, J.B., Nimgaonkar, V.L., Dickerson, F., Llenos, I.C., Weis, S., 2007. Polymorphisms in the homeobox gene *OTX2* may be a risk factor for bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144b, 1083–1086. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30523>.
- Sachana, M., Bal-Price, A., Crofton, K.M., Bennekou, S.H., Shafer, T.J., Behl, M., Terron, A., 2019. International regulatory and scientific effort for improved developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Sci.* 167, 45–57. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy211>.
- Schmidt, C., 2009. Testing for carcinogens: shift from animals to automation gathers steam—slowly. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 910–912. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp191>.
- Sugawara, A., Goto, K., Sotomaru, Y., Sofuni, T., Ito, T., 2006. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. *Comp. Med.* 56, 31–34.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Taylor, J.F., 2018. Evolution of laboratory animal program management. In: Weichbrod, R.H., Thompson, G.A.H., Norton, J.N. (Eds.), *Management of animal care and use programs in research, education, and testing*. CRC Press/Taylor & Francis (c) 2018 by Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, pp. 3–8.
- Tohyama, C., 2016. Developmental neurotoxicity test guidelines: Problems and perspectives. *J. Toxicol. Sci.* 41, Sp69–Sp79. <https://doi.org/10.2131/jts.41.SP69>.
- Tsuji, R., Crofton, K.M., 2012. Developmental neurotoxicity guideline study: Issues with methodology, evaluation and regulation. *Congenit. Anom. (Kyoto)* 52, 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00374.x>.
- Viel, J.F., Warembourg, C., Le Maner-Idrissi, G., Lacroix, A., Limon, G., Rouget, F., Monfort, C., Durand, G., Cordier, S., Chevrier, C., 2015. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environ. Int.* 82, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.009>.
- Yamada, S., Kubo, Y., Yamazaki, D., Sekino, Y., Kanda, Y., 2017. Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 7, 40925. <https://doi.org/10.1038/srep40925>.
- Yamada, S., Kubo, Y., Yamazaki, D., Sekino, Y., Nomura, Y., Yoshida, S., Kanda, Y., 2018a. Tributyltin inhibits neural induction of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 8, 12155. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30615-2>.
- Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda, Y., 2018b. 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells. *J. Toxicol. Sci.* 43, 727–734. <https://doi.org/10.2131/jts.43.727>.
- Yamamoto, T., Togawa, M., Shimada, S., Sangu, N., Shimajima, K., Okamoto, N., 2014. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including *PAX6*, *WT1*, and *PRRG4*. *Am. J. Med. Genet. A* 164a, 634–638. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36325>.
- Yang, S.H., Kalkan, T., Morissroe, C., Marks, H., Stunnenberg, H., Smith, A., Sharrocks, A.D., 2014. *Otx2* and *Otx4* drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naive pluripotency. *Cell Rep.* 7, 1968–1981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.037>.

Supplementary Data

Cytotoxicity comparison of 35 developmental neurotoxicants in human induced pluripotent stem cells (iPSC), iPSC-derived neural progenitor cells, and transformed cell lines

Shotaro Kamata^a, Reina Hashiyama^a, Hiroto Hana-ika^a, Issei Ohkubo^a, Ryota Saito^a, Akihiro Honda^a, Yasumi Anan^a, Noriyuki Akahoshi^a, Kohji Noguchi^{b,1}, Yasunari Kanda^{c,*}, Isao Ishii^{a,*}

^a*Department of Health Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Machida, Tokyo 194-8543, Japan*

^b*Laboratory of Molecular Target Therapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-8510, Japan*

^c*Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan*

*Corresponding authors.

E-mail addresses: kanda@nihs.go.jp (Y. Kanda) or isao-ishii@umin.ac.jp (I. Ishii)

Contents

Supplementary Table 1. Primer sets for RT-qPCR

Supplementary Fig. S1 NPC passage number does not significantly affect IC₅₀ values in ATP assays.

Supplementary Fig. S2 Giemsa staining for chromosome counting in iPSC before differentiation to NPC (A), and NPC at passage 7 (B) and 10 (C).

Supplementary Figure S3(-1~5) Concentration-dependent inhibition of cell survival activity (“-1,” MTS assay; “-2,” ATP assay) in four cell types (Cos-7, HepG2, iPSC, and NPC) by 29 DNT chemicals and acetaminophen, and calculated IC₅₀ values (“-3”).

Supplementary Figure S4 Comparisons of IC₅₀ values of 35 DNT chemicals and acetaminophen calculated from MTS and ATP assays in (A) Cos-7 cells, (B) HepG2 cells, (C) iPSC, and (D) NPC.

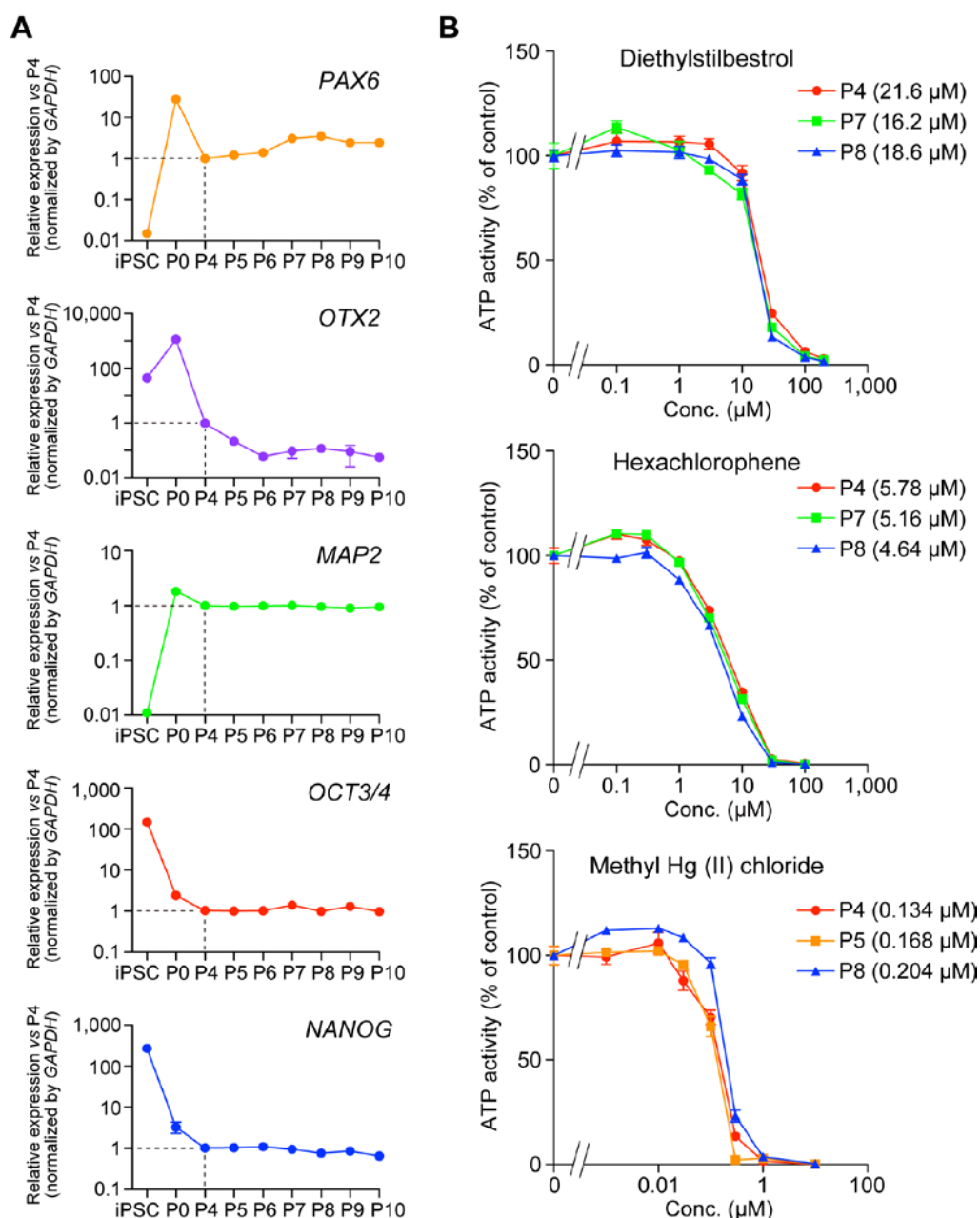
Supplementary Figure S5 Impacts of seven DNT chemicals on iPSC differentiation to NPC revealed by altered expression of differentiation/undifferentiation marker genes.

Supplementary Table S1.

Sequences of primer sets for RT-qPCR.

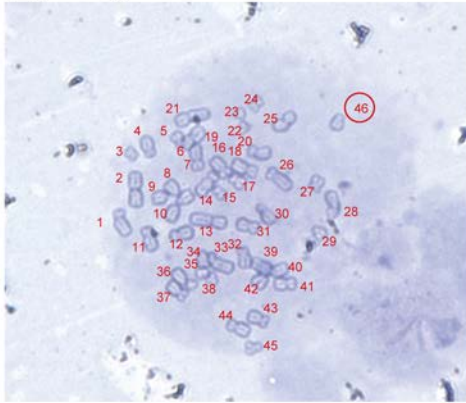
Gene	Primer sequence	Size
Neural differentiation marker genes		
<i>PAX6</i>	5'-ATGTGTGAGTAAAATTCTGGGCA-3'(Forward) 5'-GCTTACAACCTTCTGGAGTCGCTA-3'(Reverse)	103 bp
<i>MAP2</i>	5'-TCTCCCAAGACCTTCCTCCA-3'(Forward) 5'-CTCTTCCCTGCTCTGCGAAT-3'(Reverse)	144 bp
<i>OTX2</i>	5'-ACAAGTGGCCAATTCACCTCC-3'(Forward) 5'-GAGGTGGACAAGGGATCTGA-3'(Reverse)	122 bp
Stem cell marker genes		
<i>OCT3/4 (POU5F1)</i>	5'-GGGTGGAGGAAGCTGACAAC-3'(Forward) 5'-GGTTGCCTCTCACTCGGTTC-3'(Reverse)	114 bp
<i>NANOG</i>	5'-GATGCCTCACACGGAGACTG-3'(Forward) 5'-TCTTGACCGGGACCTTGTCT-3'(Reverse)	170 bp
Housekeeping gene (as a control)		
<i>GAPDH</i>	5'-GCCATCAATGACCCCTTCAT-3'(Forward) 5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'(Reverse)	112 bp

bp: base pair

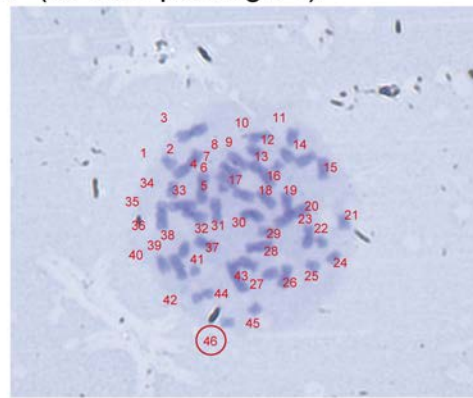


Supplementary Fig. S1 NPC passage number does not significantly affect IC_{50} values in ATP assays. (A) Expression changes of five neural differentiation/undifferentiation marker genes in iPSC and NPC at passages (P) 0 and 4–10. iPSC and NPC P0 are identical to Day 0 and 10 in Fig. 1B, respectively. Relative expression at P4 (normalized by *GAPDH* expression) is set at 1. (B) Repetitive experiments using NPC at various passage numbers in ATP assay to calculate IC_{50} values from concentration-dependent inhibition by diethylstilbestrol, hexachlorophene, and methyl Hg (II) chloride. Data are mean $\pm$ S.E. of triplicate samples and calculated IC_{50} values are shown in parentheses.

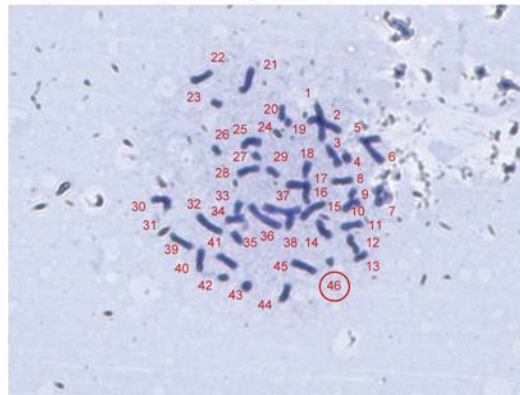
A (iPSC)



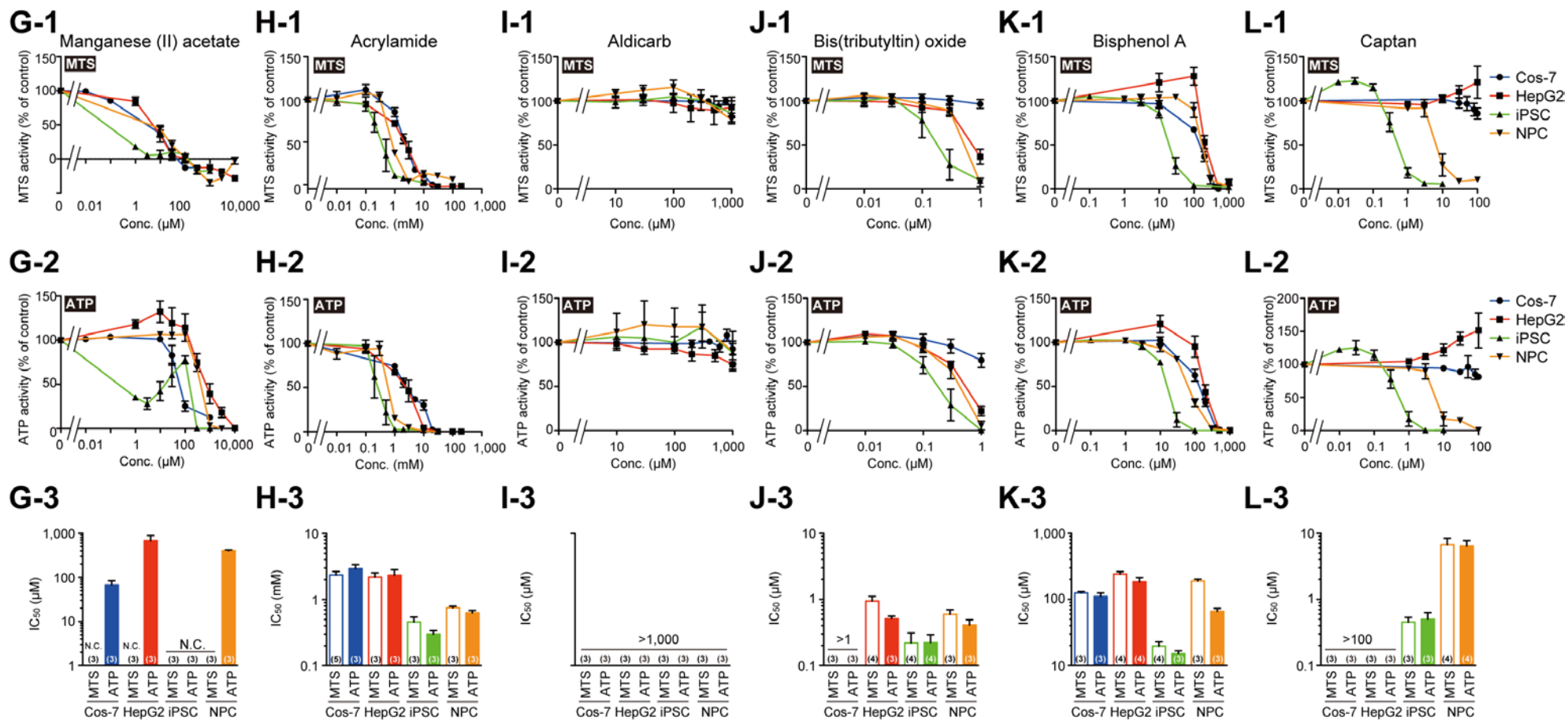
B (NPC at passage 7)



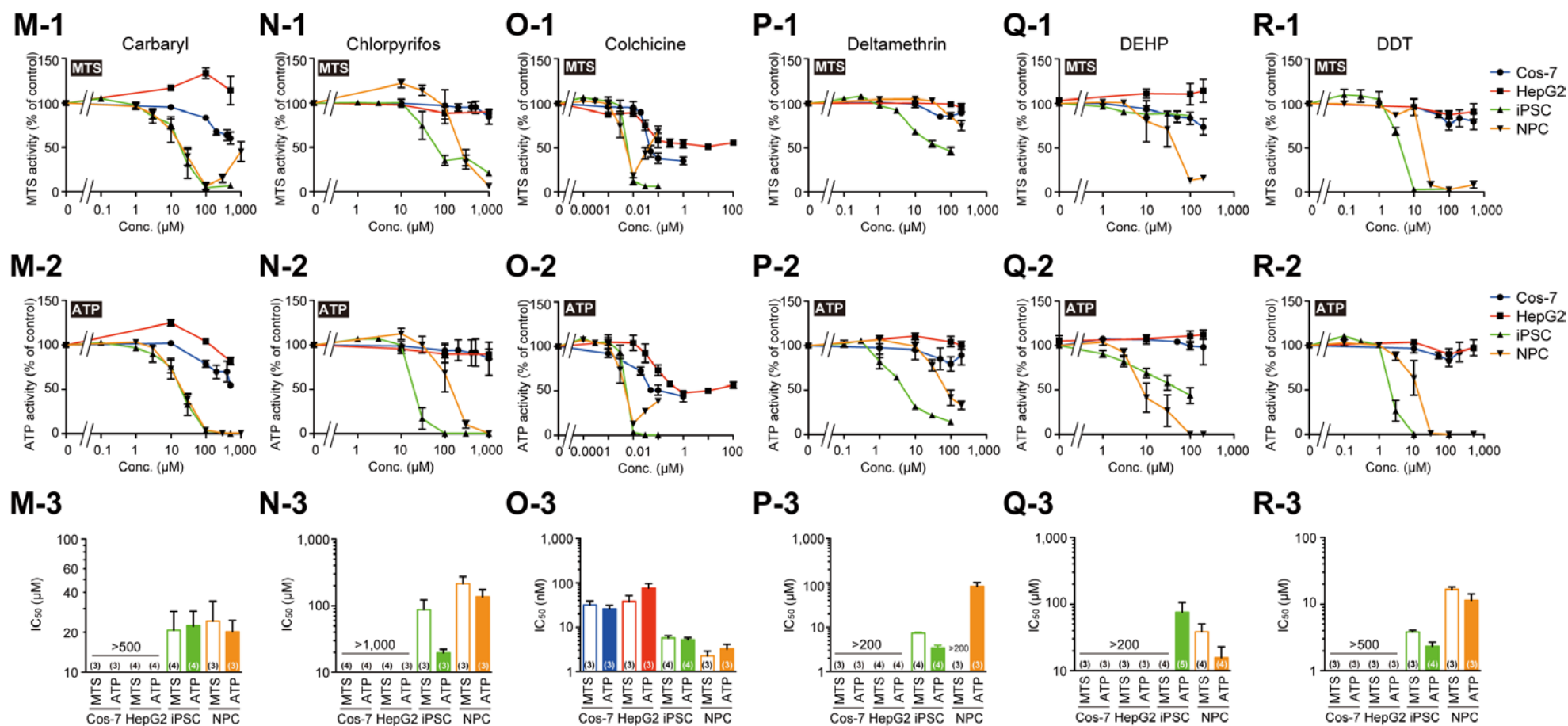
C (NPC at passage 10)



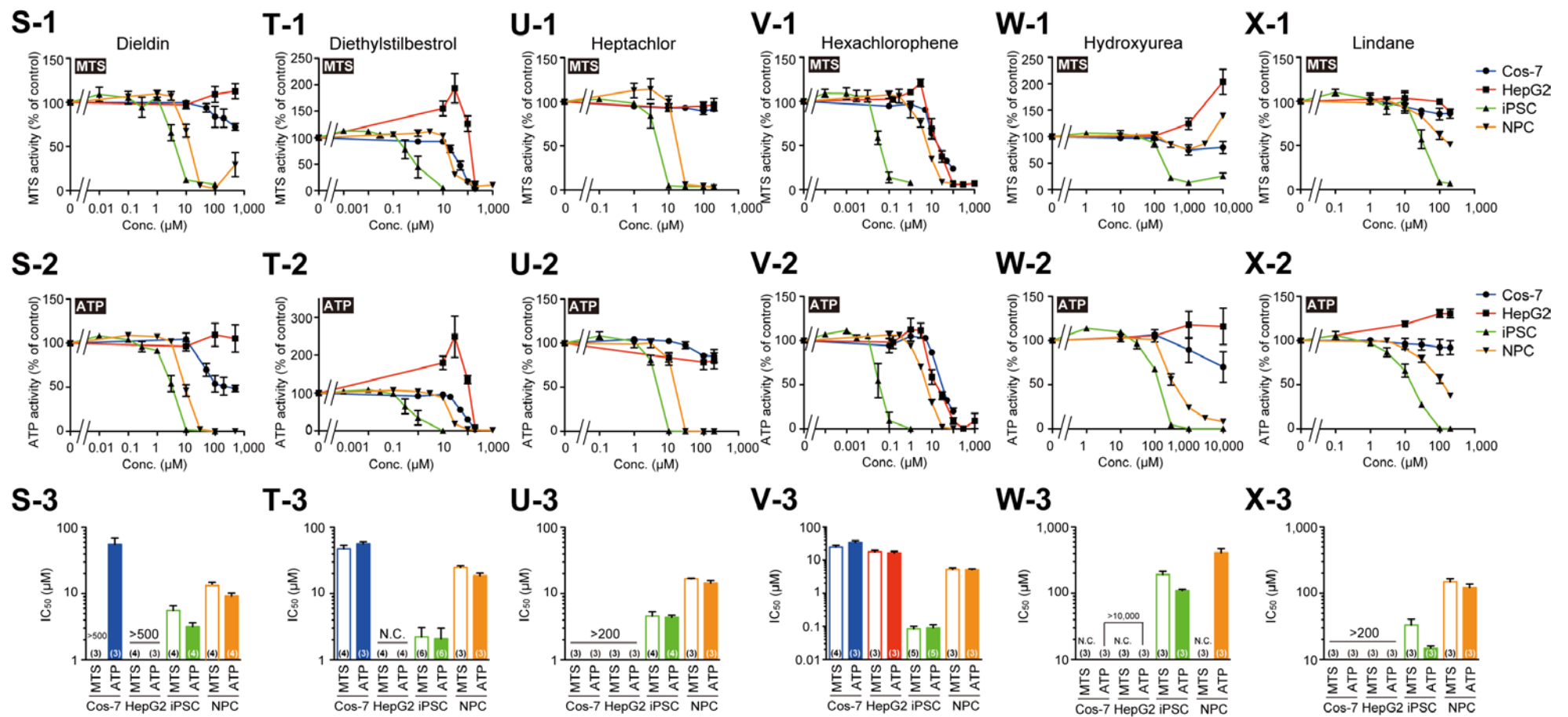
Supplementary Fig. S2 Giemsa staining for chromosome counting in iPSC before differentiation to NPC (A), and NPC at passage 7 (B) and 10 (C). Most cell spreads indicate the presence of 46 chromosomes.



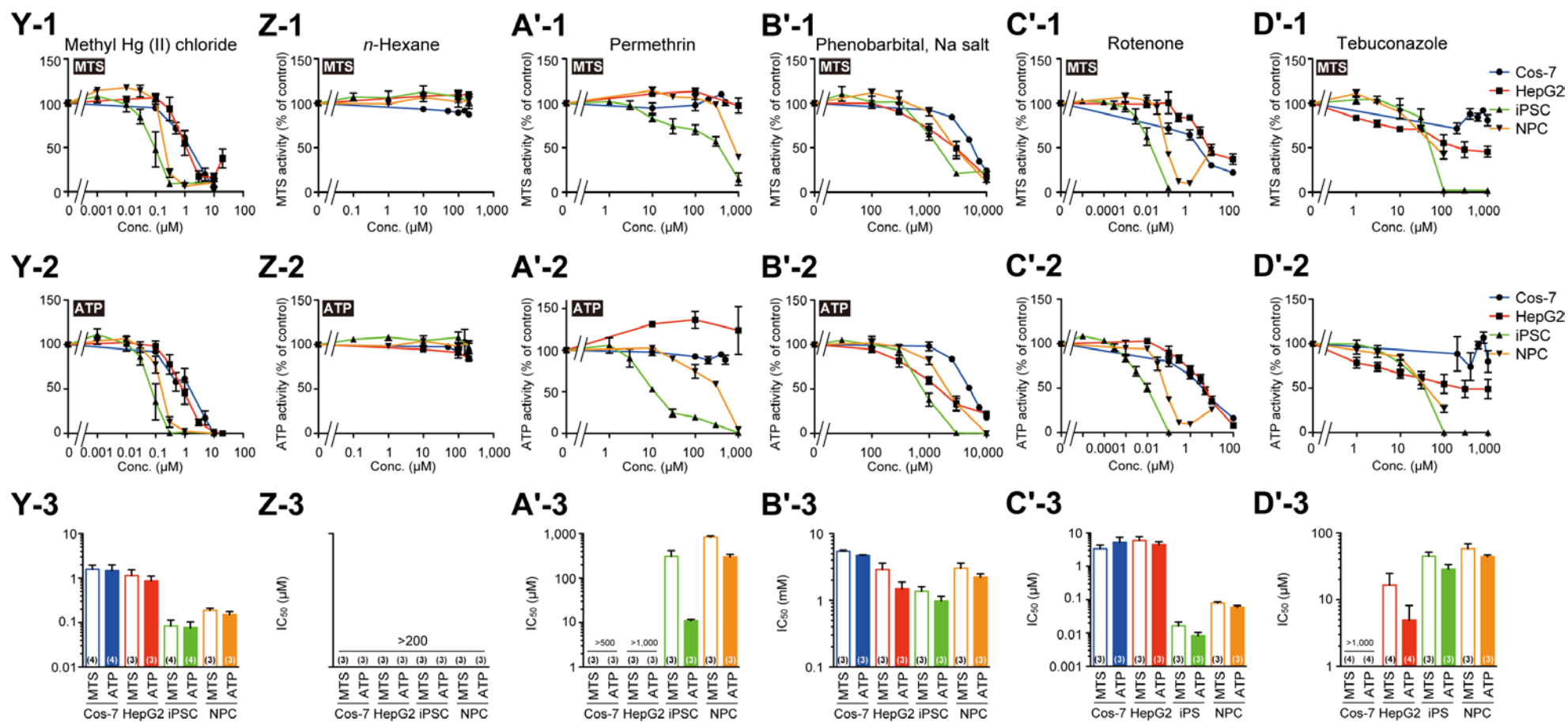
Supplementary Fig. S3 (continues-1)



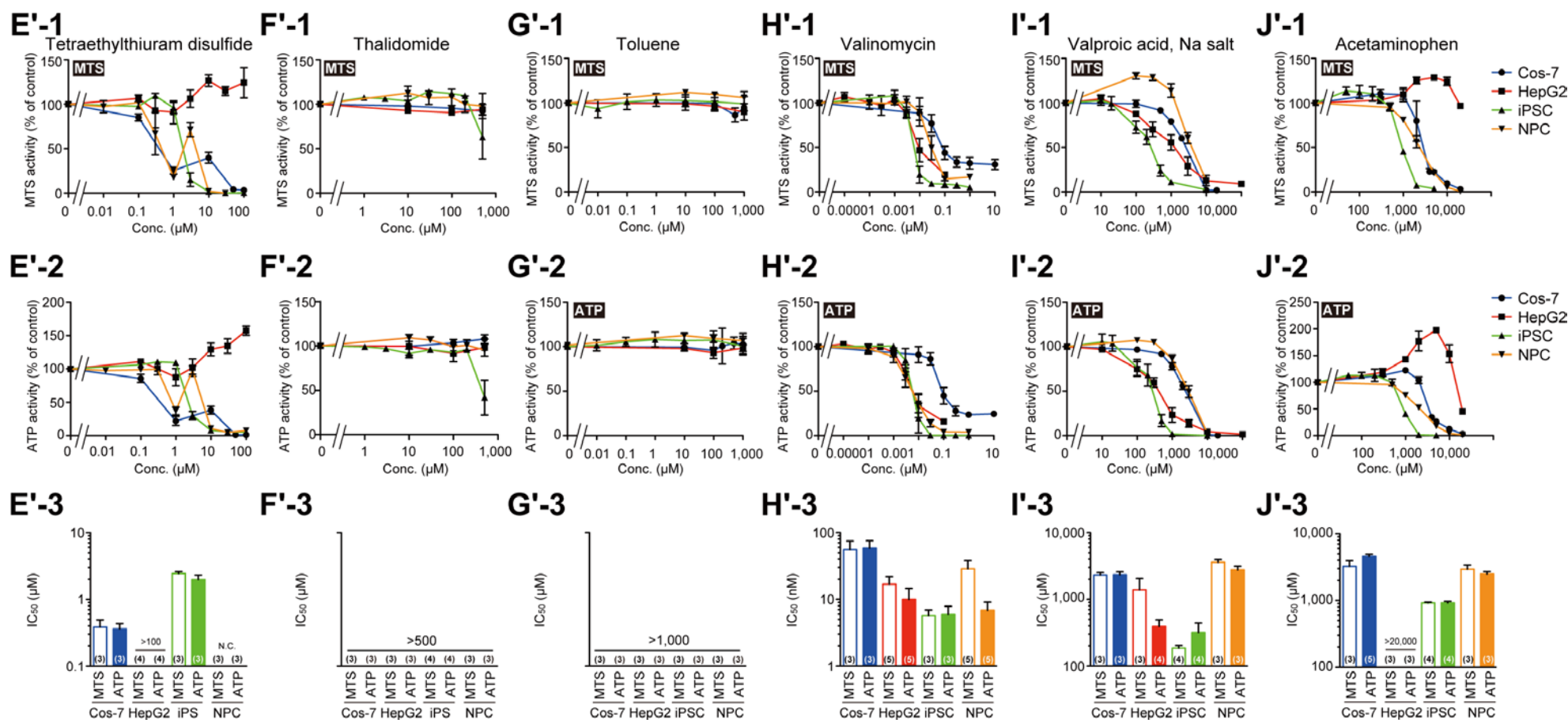
Supplementary Fig. S3 (continues-2)



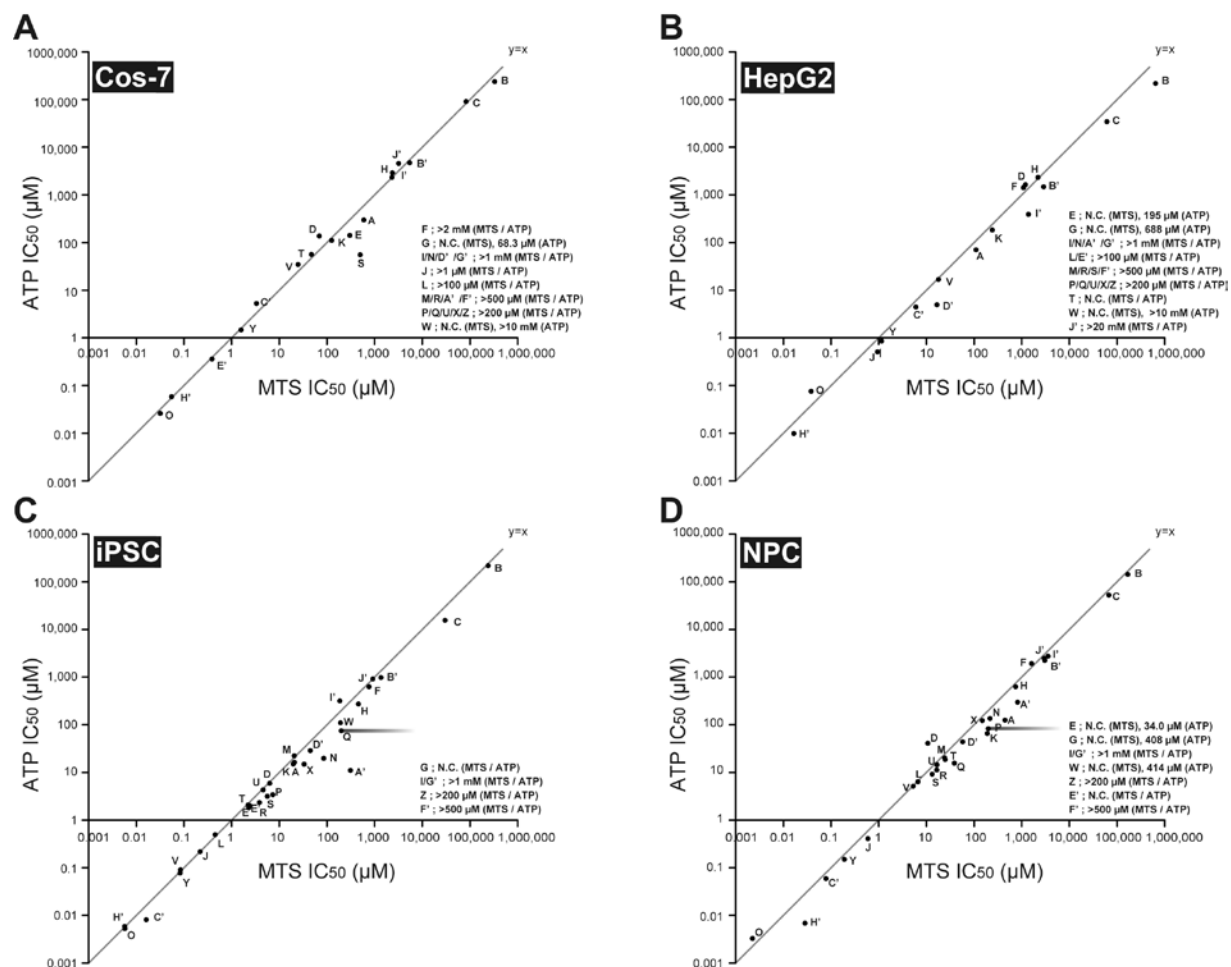
Supplementary Fig. S3 (continues-3)



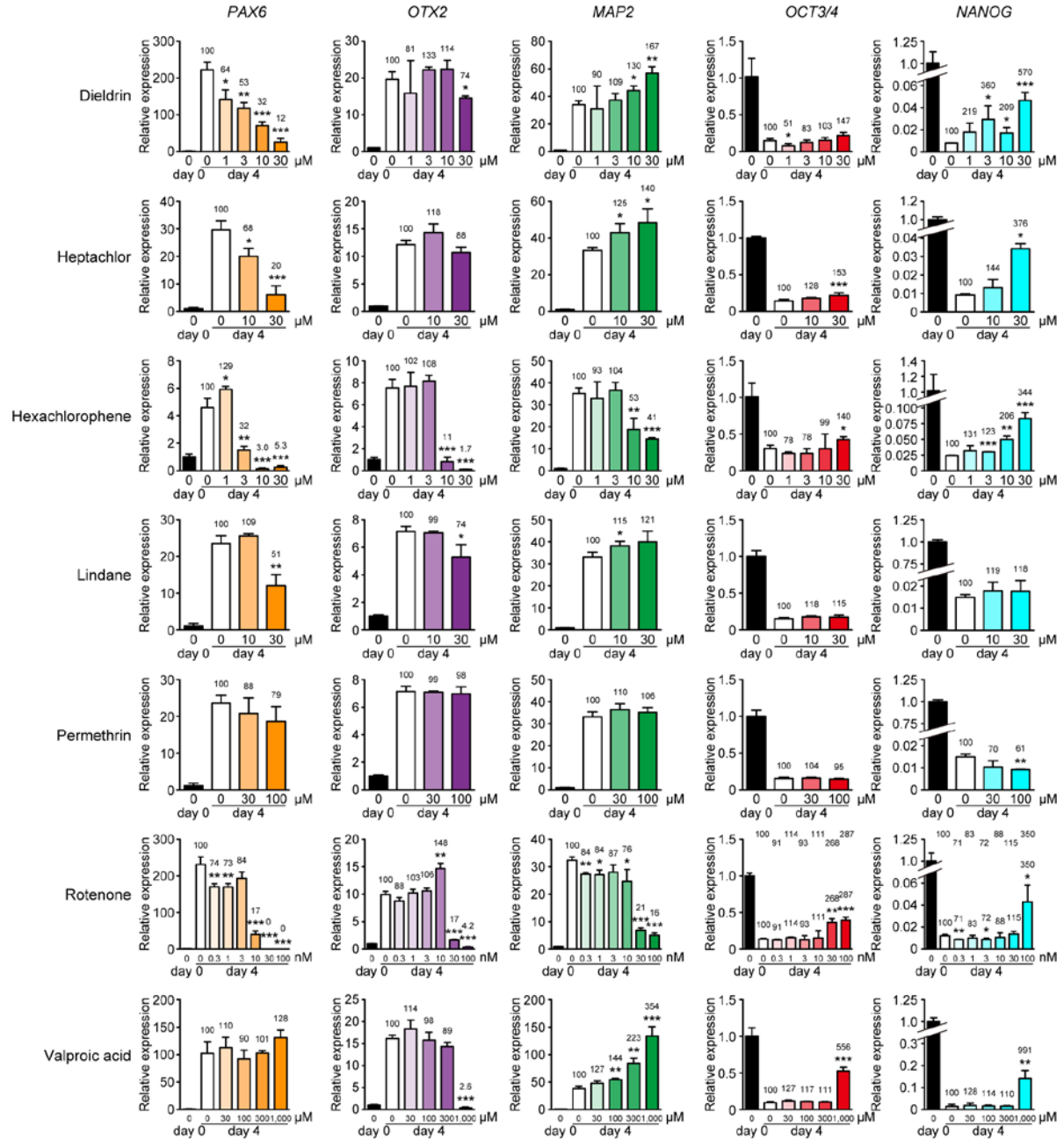
Supplementary Fig. S3 (continues-4)



Supplementary Fig. S3 (ends) Concentration-dependent inhibition of cell survival activity (“–1,” MTS assay; “–2,” ATP assay) in four cell types (Cos-7, HepG2, iPSC, and NPC) by 29 DNT chemicals (G, manganese (II) acetate; H, acrylamide; I, aldicarb; J, bis(tributyltin) oxide; K, bisphenol A; L, captan; M, carbaryl; N, chlorpyrifos; O, colchicine; P, deltamethrin; Q, DEHP; R, DDT; S, dieldrin; T, diethylstilbestrol; U, heptachlor; V, hexachlorophene; W, hydroxyurea; X, lindane; Y, methyl Hg (II) chloride; Z, *n*-hexane; A', permethrin; B', phenobarbital, Na salt; C', rotenone; D', tebuconazole; E', tetraethylthiuram disulfide; F', thalidomide; G', toluene; H', valinomycin; and I', valproic acid, Na salt) and acetaminophen (J', negative control) and calculated IC₅₀ values (“–3”). Data are mean ± S.E. of 3–5 (presented in parentheses in “–3”) independent experiments that have four sample replicates (wells). N.C., not calculated.



Supplementary Fig. S4 Comparisons of IC₅₀ values of 35 DNT chemicals and acetaminophen calculated from MTS and ATP assays in (A) Cos-7 cells, (B) HepG2 cells, (C) iPSC, and (D) NPC. Tail portions of the comets represent IC₅₀ values higher than the dots. Please refer to Table 1 for chemicals ID, A–J'.



Supplementary Fig. S5 Impacts of seven DNT chemicals (dieldrin, heptachlor, hexachlorophene, lindane, permethrin, rotenone, and valproic acid) on iPSC differentiation to NPC revealed by altered expression of differentiation/undifferentiation marker genes in RT-qPCR analyses. Effects of seven DNT chemicals on the mRNA expression of differentiation (*PAX6*, *MAP2*, and *OTX2*) and undifferentiation (*OCT3/4* and *NANOG*) markers normalized by *GAPDH*. The expression in iPSC cells was set at one on the y-axis, and the numbers above the bars indicate the percentages of the expression with that on day 4 cells without the DNT chemical (unfilled bars) as 100. Differences vs the expression on day 4 cells without the DNT chemical (unfilled bars) were significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

ヒト iPS 細胞を用いた中枢神経系の安全性評価

常本 和伸, 山田 茂, 諫田 泰成

中枢性神経系の副作用は、新薬の開発中止や上市した医薬品の市場撤退につながるため、適切に予測することが重要である。これまでに主に動物を用いた方法が検討されてきたが、いまだにヒトの中枢性副作用に対する予測性は高くない。また、動物実験は多大な労力とコストを要するため、スクリーニング性の問題なども挙げられる。これらの問題を解決するため、in vitro 評価法の開発が進んでおり、新しい科学技術 (new approach methodology : NAM) の利用が検討されている。特に、ヒト iPS 細胞はヒトのデータや情報が得られるために期待が大きく、すでに心毒性評価への応用が先行しているが、神経毒性に関しても、これまでに蓄積された基礎研究および動物データを基にして、新たな毒性予測法が開発されつつある。また、化学物質の発達期における神経毒性評価に対してもヒト iPS 細胞や in silico などの利用が進められており、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) ではガイダンスの作成が進行中である。そこで本総説ではこれらの国際動向も踏まえて、中枢神経系の安全性評価法の潮流を概説したい。

キーワード：ヒト iPS 細胞、痙攣リスク、多点電極アレイシステム、発達神経毒性

1. 中枢神経系の評価法

医薬品の非臨床試験は、ヒトに初めて投与する前に候補化合物のプロファイルを明確にし、リスクとベネフィットを確認して、承認申請に利用するデータを収集することを目的としている。これまで医薬品の ICH ガイドラインでは in vitro 試験法と動物を用いて安全性評価を行っているが、近年の科学の進歩により様々な新しい科学技術 (new approach methodology : NAM) が登場しており、さらにヒトにおける予測性の高い試験法への展開が期待されている¹⁾。

中枢神経系に対する評価に関しては、医薬品候補化合物が臨床試験に入る前に、安全性薬理試験として動物を用いて化合物を評価している。多くの場合、1群5~6匹程度の実験動物に対して臨床適用の経路で単回投与を行い、機能観察総合評価法 (functional observational battery : FOB) や Irwin 変法、もしくは他の適切な試験より幅広く中枢神経機能を調べて、必要に応じて、運動、感覚、高次機能などを調べる。例えば、一般症状および行動観察において痙攣が観察された場合には、詳細にその機序などを検討して、ヒトでのリスクおよびそのマネージメントを考察する。しかしながら、認知機能障害、自殺、聴覚障害に関する動物モデルはないため、FOB 試験では、第1相試験で観察されるような副作用、例えば臨床の一般的な5つの有害事象

(頭痛・吐き気・めまい・痛み・疲労)などを検出することは難しい。また、種差などにより動物での評価とヒトにおける中枢性副作用の乖離があるため、臨床試験に進んだ際に重大な副作用が顕在化する可能性がある。従って、現在の非臨床安全性薬理試験ではその予測性に限界があり、ヒトに対して予測性がさらに高い試験法を開発する必要がある。

NAM を活用して新たな in vitro 試験法を開発するのは非常にチャレンジングな試みである。特に、中枢神経系の複雑な行動薬理を in vitro で再現することは難しいことから、実際には特定の毒性を簡便にスクリーニングする戦略で進められている。NAM としては、ヒト iPS 細胞から作製した脳オルガノイドや臓器チップなどの利用が探索から非臨床試験まで期待されている^{2,3)}。また、ゼブラフィッシュを用いた方法も検討されており、行動、痙攣、記憶、依存などに用いられる可能性がある⁴⁾。そのほか、バイオイメーキングの利用⁵⁾や動物の脳波なども応用されている⁶⁾。

2. ヒト iPS 細胞技術を用いた痙攣リスクの評価

医薬品の副作用の原因は企業や規制当局などにより詳細に分析されており、ある製薬会社の低分子化合物研究開発プロジェクト (2005年から2010年)においては、非臨



床試験で安全性の問題のため開発中止となった医薬品候補化合物の副作用発現臓器は、心血管が17%と最も多く、中枢神経系は7%、逆に、臨床では中枢神経が最も高く34%にも上ることが報告された⁷⁾。筆者がプログラム委員を務める国際安全性薬理学会のアンケートでも、中枢で生じた痙攣の問題は約2/3の人が非臨床における安全性薬理試験にて経験があると報告されており、その重要性が示唆される⁸⁾。

これまで痙攣リスクの評価は、非臨床試験において動物の一般症状観察、行動観察時の痙攣の発症の有無、脳波などをもとに評価されてきた。しかし、スループット性も低く、近年、3Rs原則のため動物実験が制限されつつあること、ヒトにおける予測性も十分であるとは言えないことなどから、簡便なin vitro評価法が期待されている。そこで、ヒト細胞という利点を有するヒトiPS神経細胞は有用なツールとなる可能性が考えられる。また、神経のネットワーク活動を評価する方法として、iPS心筋細胞を用いた心毒性評価で利用されている多点電極アレイ(multi-electrode array: MEA)技術が挙げられる⁹⁾。これは微小電極をアレイとしてグリッド状に並べたディッシュで細胞を培養しその細胞外電位を測定する方法で、in vivoとin vitroの橋渡し、臨床への予測が可能になることが期待される。現在、in vitro神経毒性評価法の確立を目指して、国内外で盛んにMEAを利用した取り組みが進められており¹⁰⁻¹²⁾、米国のヒトの健康と環境に係わる世界規模の問題の顕在化と解決を目標とする産官学コンソーシアムのHealth and Environmental Sciences Institute (HESI)や欧州NC3RsのCrack-ITでは痙攣リスク評価の検証が実施されている。しかしながら、今のところ、痙攣リスク評価の目的に適った標準的な方法、モデル、パラメーターなどは得られていない。一般に、創薬に関して新たな試験法を開発するためには、製薬企業が承認申請のために実施できることを考えると、国内外の複数の研究機関で同一標本、同一化合物を用いて、試験結果のばらつきの範囲、評価できる安全性の範囲を明確にする必要がある。従って、ヒトiPS神経細胞を用いる試験系を確立して国際標準化を達成するためには、多施設間の検証試験を実施し、評価法の再現性、有用性、適用範囲などを明らかにすべきである。

HESIでは、2016年にTranslational Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox)委員会の中にMEA技術を用いた痙攣予測法の開発を目指すNeuTox MEA Subteamが発足した。同一の12化合物(非コード化)を用いて検証試験が実施され、筆者もiPS心毒性で国際検証を行ってきた関係でお誘いをうけてNeuToxにも参加してデータを提出し、現在、議論しているので、現状を報告したい。

MEA Subteamでは、検証する化合物は、陰性対照物質(アセトアミノフェン)を含めて12種類選定されている(図1)。iPS心毒性の時のように、トレーニングセットとバリデーションセットの2段階で実施しておらず、作用点が明確なものを選ぶこととなった。細胞は、ラット胎児由来の初代培養神経細胞(皮質と海馬の2種類)およびヒト

化合物	溶媒	濃度 (μM)
Pentylentetrazole	DMSO	10, 31.6, 100, 316, 1000
Picrotoxin	DMSO	0.1, 0.316, 1, 3.16, 19
Strychnine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Pilocarpine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Chlorpromazine	DMSO	0.1, 0.316, 1, 3.16, 10
Amoxapine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Enoxacin	DMSO	10, 31.6, 100, 316, 1000
Phenytoin	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
Linopirdine	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
4-Aminopiridine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Amoxicillin	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
Acetaminophen	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100

図1 HESIで用いた化合物リスト

検証試験は、試薬のメーカーと濃度、溶媒(DMSO)をそろえて実施した。なお、コード化は行っていない。

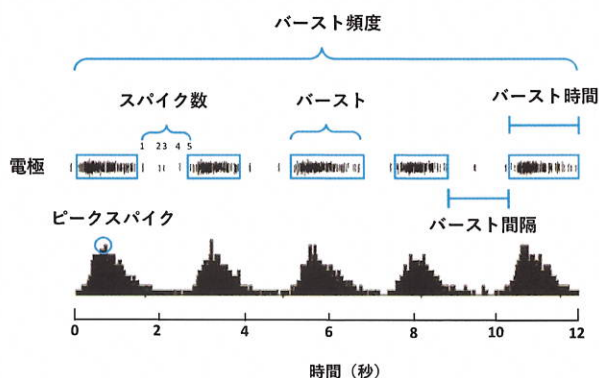


図2 MEAのデータによるエンドポイント

神経毒性におけるMEAデータの解析には、様々なパラメーターが挙げられる。その一例を示す。

iPS神経細胞(CDI社, NeuCyte社, N Cardia社, X Cell社の4種類)を用いて、種差も考慮しながら進められている。MEAでは、ラット神経細胞では培養開始後5~7日後、ヒトiPS神経細胞では培養開始数週間後から活動電位に由来するスパイクが観察される。さらに、神経ネットワーク形成が進むと、1つの神経細胞に複数の活動電位刺激が入力するバーストが観察されるようになる。これらのスパイクやバーストは1つの電極での変化あるいは複数電極での変化など様々な形で数値化することが可能であり、医薬品の薬理作用を評価できると考えられる。

図2に、MEAデータの解析パラメーターの一例を示す。MEAデータは、スパイク数、バーストの数や頻度、持続時間、バースト間隔など多岐に渡る。痙攣リスクには、心筋のQT間隔延長のような臨床バイオマーカーが存在しないため、ヒトiPS神経細胞を用いたリスク評価系を構築するには適切なエンドポイントを選ぶ必要がある。ヒトiPS神経細胞は、種差の問題を解決できる可能性を秘めている一方で、上述のようにスパイクが観察され始める培養期間がラット神経細胞に比べて、非常に長い。さらに、同期した神経活動が観察される培養期間もラット神経細胞では培養

1～2 週目で観察されるのに対して、ヒト iPS 神経細胞では 8 週間以上かかるものもあることから、プロトコルなどの標準化を視野に入れて検証試験を実施した。

その結果、各施設間の評価に用いた陽性対照物質である GABA 受容体遮断薬ピクロトキシンの反応性に、大きな施設間差が認められ、データが様々であることが明らかとなった。現在、参加施設により毎月電話会議を行っているが、MEA のエンドポイントなどは合意に至っておらず、解析法に苦戦している。具体的には、ラット神経細胞に関しては、ピクロトキシンによりスパイク数やバースト数が濃度依存的に増えているのに対して、ヒト iPS 神経細胞はピクロトキシンによりスパイク数が減少し、バースト数は増加することなどがあげられる（2018 年 9 月に国際安全性薬理学会でポスター発表）。筆者らは、改めてヒト iPS 神経細胞を長期間培養して調べたところ、ピクロトキシンによってスパイク数およびバースト数が濃度依存的に増えていたことから、basal 波形の基準設定、培養日数の問題が示唆された（図 3）。iPS 心毒性の時には綿密に波形の基準や

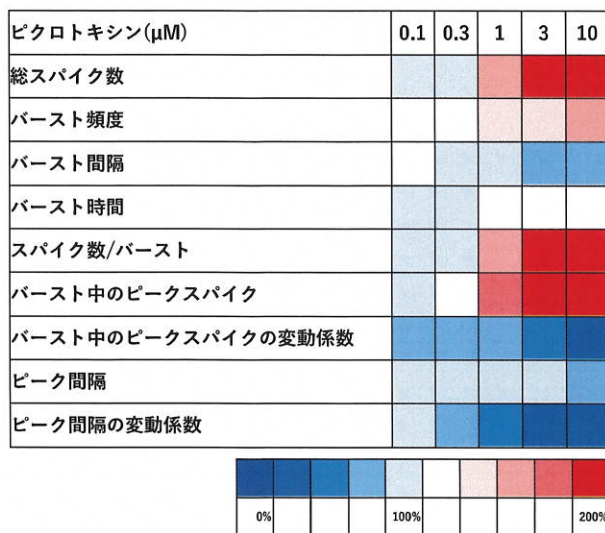


図 3 ヒト iPS 神経細胞に対するピクロトキシンの影響
iPS 神経細胞をピクロトキシンで曝露した時の MEA のパラメーター変化を示す。

培養日数などを検討したが、今回、トレーニングセットでプロトコルを固めるところをスキップしてしまったことが今になって影響していると考えられる。また、今回の検証試験にはいくつかのベンダーのヒト iPS 神経細胞が使用されており、培養期間や培地、興奮性・抑制性神経細胞の割合等が大きく異なる¹³⁾（図 4）。神経細胞の興奮性・抑制性バランス（EI バランス）が重要なのか、ベンダーごとのヒト iPS 神経細胞の特性が重要なのかは未解決である。また、アストロサイトとの共培養あるいはアストロサイトの培養上清を用いて培養することによりネットワーク形成が促進され成熟に要する培養期間が短縮することが報告されているが¹⁴⁾、今回のデータでもアストロサイトの有無によってバラツキが生じている可能性も考えられる。

現在、MEA のエンドポイントの問題を解決するために、国内外で機械学習などのアプローチが用いられているが、まずは信頼性の高いデータセットを用いることが重要である。細胞の種類や培養日数などにより薬剤応答性が異なることが想定されるため、その点を克服する必要がある。次に、再現性の高いプロトコルを設定し、痙攣リスク評価の適切なエンドポイントを明らかにすることにより、ようやくインプットするデータがそろって、応用への道が開けると考えられる。また、臨床における痙攣リスクのカテゴリーは重要であり、in vitro のデータを照らし合わせる動物のデータ、ヒトのデータに基づいた解析が必須である。iPS 心毒性評価法の開発において、iPS データと臨床の TdP に関するデータベースと比較を行ったように¹⁵⁾、ヒト iPS 神経細胞を用いた神経毒性評価においても照合が必要があり、国内だけではなく国際的なグループで議論する必要がある。近年、試験法は複数の手法を組み合わせる流れが加速しており、MEA だけで適切な指標が得られるのかは課題であり、さらなる検討が望まれる。

3. ヒト iPS 細胞を用いた発達期の神経毒性評価

上記以外の神経毒性として、医薬品も含めた化学物質の発達期における神経毒性は最近注目を集めていることから、あわせてご紹介したい。

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し、社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の

iPS 神経細胞株	細胞タイプ	興奮性/抑制性の割合	播種細胞数	曝露までの日数
iCell グルタミン酸作動性神経細胞 iCell グルタミン酸アストロサイト 共培養	神経細胞 (85%; グルタミン酸作動性神経細胞 70% + GABA 作動性神経細胞 30%) / アストロサイト (15%)	2.3:1	14 万	14 日
CNS.4U 共培養	グルタミン酸作動性神経細胞 (40%) / GABA 作動性神経細胞 (40%) / ドーパミン作動性神経細胞 (10%) / アストロサイト (10%)	1:1	3 万 6 千	23 日
SynFire iNs 共培養	グルタミン酸作動性神経細胞 (52%) / GABA 作動性神経細胞 (22%) / アストロサイト (26%)	2.3:1	27 万	28 日
ラット大脳皮質神経細胞	神経細胞 (55%; グルタミン酸作動性神経細胞 70-80% + GABA 作動性神経細胞 20-30%) / アストロサイト (45%)	3:1	10 万	9-11 日

図 4 ヒト iPS 神経細胞の株間差

4 社のヒト iPS 神経細胞の特性の比較。細胞の特性に株間差が認められており、医薬品の応答に対する影響が考えられる。

曝露と想定され、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¹⁶⁾。現在、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインがOECDおよび米国環境保護庁 (Environmental Protection Agency : EPA) によって制定されている (OECD TG426 および EPA OPPTS870.6300)。OECD ガイドライン TG426 では、妊娠ラットおよびその腹から生まれた児ラットを用いて、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。そのため、これまでわずかな化合物しか評価できていないのが現状である。また、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る。そこで、OECDにおいて新たなin vitro評価法の議論が進行中であり、ガイダンスの作製が進行中である。動物実験代替法の観点から、定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship : QSAR) や非哺乳動物モデルの応用、ヒトiPS細胞由来分化細胞等の幹細胞を用いた発達神経毒性評価法の提案がなされている¹⁷⁾。以下にそれらの中からヒトiPS細胞およびiPS神経細胞を用いた化学物質の神経毒性評価法について述べる。

発達期の評価方法の考え方として、神経系の構造と機能に分けてin vivoの評価方法をin vitroに落とし込むことが議論された (図5)。構造的な毒性は、ヒトiPS細胞から神経細胞への分化過程がヒトにおける神経細胞への発生過程を模倣していると考えられることから、増殖やアポトーシス、細胞遊走等の評価に用いられている¹⁸⁾。一方、機能的な毒性に関しては上述のMEAシステムによる神経毒性評価が検討中であり、ネットワーク形成に対する慢性曝露の影響や、形成後の急性曝露の評価が検討されている¹⁹⁾。

我々はこれまでヒトiPS細胞のgood cell culture practice (細胞培養の優良規範) の作成に関わるとともに²⁰⁾、ヒトiPS細胞の増殖・分化による評価法の開発を進めてきた。2種類のSMAD阻害薬 (LDN193189 と SB431542) を用いて分化誘導を行うDual Smad法によりヒトiPS細胞から神経幹細胞へ分化誘導し²¹⁾、神経分化を制御している転写制御因子PAX6および神経マーカーのMAP2の発現が誘導さ

れ、未分化マーカーのOct3/4などの発現が低下することを確認した (図6B)。神経分化に対する有機スズ化合物、有機リン系農薬クロルピリホスおよび抗がん薬5-フルオロウラシルなどの影響を評価したところ²²⁻²⁵⁾、PAX6およびMAP2の遺伝子発現が低下し、細胞内ATP量も減少することを見出した。細胞内ATPは主にミトコンドリアにおいて産生されるため、ミトコンドリアを蛍光標識して観察したところ、ミトコンドリアの断片化とミトコンドリア融合タンパク質Mfnの分解促進が誘導され、Mfnのノックダウン実験によって分化誘導が阻害されることを明らかにした。さらに、Mundyらの詳細な発達神経毒性の総説を基にして²⁶⁾、発達期の毒性を有する化学物質35種類を選定して、分化能などにより評価した。図6Cには代表的な化合物として、ピレスロイド系農薬デルタメトリン、ミトコンドリア呼吸鎖阻害薬ロテノン、抗てんかん薬バルプロ酸を示しているが、ヒトiPS細胞の分化能により発達神経毒性を評価できることを明らかにしている²⁷⁾。このように我々の評価系は化学物質による脳発達早期の神経毒性評価に有用であることが示唆された。

また、MEAに関しては、Timothy Shafer 博士 (EPA) によりラット神経細胞を用いて詳細に検討されており、86化合物により一定の予測性を有することが報告された²⁸⁾。さらに、ヒトiPS神経細胞の応用可能性がEPAとデュッセルドルフ大学のグループにより検討されて、最近、詳細が報告された²⁹⁾。ピレスロイド系農薬・デルタメトリンは、スパイクなどに対するIC50がラット神経細胞とヒトiPS神経細胞で似た値を示していることから信頼性があることが考えられており、さらに発達神経毒性が懸念される化学物質を用いて検証が必要である。今回は紙面の都合で割愛するが、構造をもとにしたin silicoによる評価、in vitro評価法では体内動態が評価できないことからin vitroとヒトを橋渡しする目的でゼブラフィッシュなどのアプローチも検討されている。重要な点は、動物実験を必要最小限にするために、in vitroやin silicoをいつどのように使うのか？ということである。単一の方法では化学物質のハザード評価あるいはリスク評価の予測性を確保できなかったため、現在、図7に示すような段階的な発達神経毒性評価法のスキーム (案) が提案されている²⁹⁾。これはあくまで案の段階であり、引き続き、議論を行う必要があるが、有害性発現経路 (adverse outcome pathway : AOP) を基にしてin silico, in vitro, in vivoの情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ (integrated approaches to testing and assessment : IATA) により新たな発達神経毒性ガイドラインが整備されと考えられる。

今後は、発達神経毒性に限らず、動物実験への依存度を軽減しながら、IATAに基づいて化学物質のヒト健康リスクの評価戦略の動きが加速すると考えられる。また、化学物質により再現性、有用性が示された試験法は、将来的に医薬品に対する応用が検討される可能性も高く、さらなる進展が期待される。

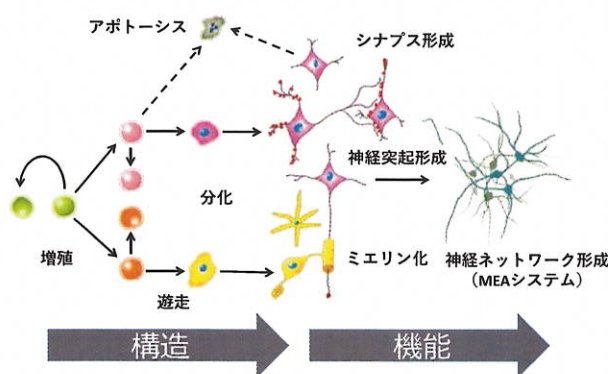


図5 発達期における神経毒性のスキーム
神経系の発達過程を基に、構造と機能の観点から試験法の開発が進められている。



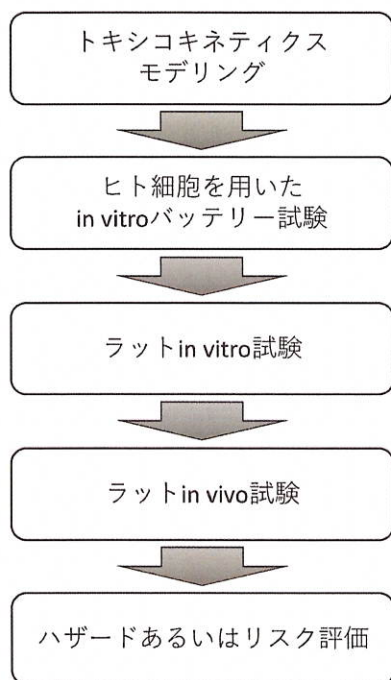


図7 段階的な in vitro 発達神経毒性評価法
現在, OECD で議論されている段階的な発達神経毒性評価法, 今後, 修正される可能性があるが, 例として示した。

引き続き, ヒト iPS 細胞技術や AI などの NAM を利用して, 有効な医薬品の薬効評価, より精度の高い安全性評価法を構築し, 安全・安心な医薬品を患者さんに届けられるように今後も取り組みたい。

謝辞: 本稿の執筆の機会を与えてくださいました関係者の皆様に深く御礼申し上げます。本研究は, 厚生労働省科学研究費・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 to YK), 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の医薬品等規制調和・評価研究事業委託研究「ヒト iPS 分化細胞技術を活用した医薬品の次世代毒性・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究」(#17mk0104027 to YK), 文部科学省

科学研究費補助金・基盤研究 (C)「ヒト iPS 細胞のミトコンドリア制御因子による新しい化学物質の神経毒性評価法の開発」(#17K00576 to SY) のサポートにより実施されました。また, 日本安全性薬理研究会, 製薬協コンソーシアム, HESI NeuTox 委員会, OECD DNT 専門委員の先生方との議論も大変参考になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

著者の利益相反: 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Avila AM, et al. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;14:104662.
- 2) Sakaguchi H, et al. Stem Cell Reports. 2019;13:458-473.
- 3) Low LA, et al. Nat Rev Drug Discov. 2020 Sep 10. doi: 10.1038/s41573-020-0079-3.
- 4) Ibzhazehiebo K, et al. Neuropharmacology. 2020;167:107988.
- 5) Carmichael O, et al. Drug Discov Today. 2018;23:333-348.
- 6) Authier S, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2019;99:106611.
- 7) Cook D, et al. Nat Rev Drug Discov. 2014;13:419-431.
- 8) Authier S, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;81:37-46.
- 9) Johnstone AFM, et al. Neurotoxicology. 2010;31:331-350.
- 10) Odawara A, et al. Sci Rep. 2016;6:26181.
- 11) Paavilainen T, et al. Stem Cell Res. 2018;27:151-161.
- 12) Tukker AM, et al. ALTEX. 2016;33:261-271.
- 13) Tukker AM, et al. ALTEX. 2020;37:121-135.
- 14) Odawara A, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2014;443:1176-1181.
- 15) Ando H, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2017.
- 16) Landrigan PJ, et al. Environ Health Perspect. 2014;120:a258-a260.
- 17) Bal-Price A, et al. Tox App Pharm. 2018;354:7-18.
- 18) Fritsche E, et al. Methods Mol Biol. 2011;758:99-114.
- 19) Nimtz L, et al. Stem Cell Res. 2020;45:101761.
- 20) Pamies D, et al. ALTEX. 2017;34:95-132.
- 21) Chambers SM, et al. Nat Biotechnol. 2009;27:275-280.
- 22) Yamada S, et al. Toxicol In Vitro. 2016;34:257-263.
- 23) Yamada S, et al. Sci Rep. 2017;7:40925.
- 24) Yamada S, et al. Sci Rep. 2018;8:12155.
- 25) Yamada S, et al. J Toxicol Sci. 2018;43:727-734.
- 26) Mundy W, et al. Neurotoxicol Teratol. 2015;52:25-35.
- 27) Kamata S, et al. Toxicol In Vitro. 2020;69:104999.
- 28) Frank C, et al. Tox Sci. 2017;160:121-135.
- 29) Masjosthusmann S, et al. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938.

Current challenges and future perspectives of iPSC-based neurotoxicity testing

Kazunobu Tsunemoto, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda

Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences (NIHS)

Abstract. Predicting drug-induced side effects in central nervous system is important because they can lead to the discontinuation of new drugs/candidates or the withdrawal of marketed drugs. Although many efforts are made, evaluation system using animals have not been highly predictive in humans. In addition, animal experiments are time-consuming and costly. To address these issues, in vitro evaluation methods, such as the use of New Approach Methodologies (NAM) have been explored. Human IPS cell technology has already been applied to assess drug-induced cardiotoxicity. In addition, the use of human IPS cell technology and in silico has been promoted for neurotoxicity assessment during the developmental neurotoxicity in terms of chemical safety issues. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidance regarding developmental neurotoxicity is under preparation. In this review, we will review the current trends in safety assessment methods for the central nervous system in light of these international trends.

令和3年 3 月 29 日

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 合田 幸広 印

次の職員の令和2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	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 3年 4 月 27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

次の職員の令和2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（19KD1003）
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） 齋藤 潤

4. 倫理審査の状況

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

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

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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 国立大学法人 東京農工大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 千葉 一裕

次の職員の令和 2 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 令和 2 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
2. 研究課題名 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） 農学研究院 動物生命科学部門 教授
（氏名・フリガナ） 渋谷 淳 （シブタニ マコト）

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	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：東京農工大学動物実験等に関する規程）	☒	☐	☒	東京農工大学	☐

（※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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 3年 5月 13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2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 令和2年度厚生労働科学研究費補助金（科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の開発（19KD1003）

3. 研究者名 （所属部局・職名） 大学院工学研究科 応用化学・生命工学系 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	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	☐	☒	☐		☐

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

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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。

令和3年5月11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 尾池 和夫

次の職員の令和2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	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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3年5月6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 渡邊 浩文

次の職員の令和2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・教授

(氏名・フリガナ) 鈴木 郁郎 スズキイクロウ

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	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☒	☐	☒	東北工業大学	☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。