

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

(課題番号：22KD1002)

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安彦 行人

令和6（2024）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
A I 支援型MPSを用いたヒト i P S 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発		
安彦 行人	-----	1
II. 分担研究報告		
1. MEA と BBB を統合した in vitro 試験系の開発	-----	8
諫田 泰成、安彦 行人		
2. 細胞機能の評価に着目した MPS デバイスの開発	-----	18
松永 民秀		
3. 神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発	-----	22
加藤 竜司		
4. 化学物質のヒト健康影響を評価するための in vitro 代替試験法の実用化に向けた比較・検証研究		
鈴木 郁郎	-----	26
5. In vivo 毒性評価	-----	32
渋谷 淳		
6. 化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性の in silico 予測		
吉成 浩一	-----	85
7. 試験法の行政利用に向けた国際動向調査	-----	92
小島 肇		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	104

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）総括研究報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトに対する予測性や外挿性に課題がある。動物試験に関する 3Rs の観点からも、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験、カテゴリーアプローチ等を用いた *in silico* 予測の活用が期待される。OECD の *in vitro* testing battery

(DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。また DNT-IVB の段階的なアプローチにおいて Tier0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造と *in vitro* 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究では、MEA パラメータを用いた主成分分析および AI モデルにより、神経毒性判定の閾値設定を行えること、また主成分分析により神経毒性の作用機序ごとのグループ分けが可能であることを見出した。神経細胞画像からの特徴量抽出手法を確立し、AI モデル構築へ向け MEA パラメータと相関する特徴量の探索を進めている。ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについて、高密度電極 MEA により良好なネットワーク活動計測が行えること、計測に適したタイムウィンドウが存在することを見出した。BBB と MEA の統合システム構築に向け、培地組成の検討により BBB・神経双方の機能を保った共培養の見込みを得た。分子記述子によるリードアクロスにおいて、比較する類似物質数等に適切な閾値を設けることで、予測性を向上できることが示唆された。一方で化学物質群ごとに予測性に差が見られ、神経毒性に関する既知見の量が影響することが示唆されたことから、陽性知見に重みづけをした予測手法の開発を開始した。In silico 予測性が低かった有機リン剤について MEA による検証を行い、神経毒性の検出が可能であることを示唆する結果を得た。発達神経毒性メカニズムが明らかでないフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについてラット発達神経毒性試験を実施し、各々異なるメカニズムにより海馬神経新生が阻害されることを確認した。OECD の *in vitro* DNT ガイダンスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、*in vivo* での行動異常との対応づけについてコメントを提出した。また国際動物実験代替法学会など関連学会に出席し、成果発表とともに関連情報の収集、意見交換を実施した。

以上のように、統合的に発達神経毒性を評価可能なシステム開発を進めている。今後、OECD 発達神経毒性ガイダンスや国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法として国際発信を目指す。

研究分担者：諫田 泰成

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

研究分担者：松永 民秀

名古屋市立大学医薬学総合研究院（薬学）教授

研究分担者：鈴木 郁郎

東北工業大学 大学院工学研究科 電気工学専攻・
教授

研究分担者：加藤 竜司

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 准教授

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・
教授

研究分担者：吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 教授

研究分担者：小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研
究員

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における3Rsの観点からも、オルガノイド等ヒト生体環境に近いin vitro評価系や、コンピューターを活用したin silico予測手法の開発が望まれる。

OECDの発達神経毒性in vitro testing battery (DNT-IVB)ガイダンスにヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。またDNT-IVBの段階的アプローチにおいてTier 0にcomputational approachが記載されているが、具体的なin silico手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造に基づくin silico予測とin vitro神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞および脳オルガノイドを用いた精度の高いin vitro毒性評価法の開発、及びin vitroとin silico手法の統合によるin vivo神経毒性予測の精度向上を目的とする。

この目的のため本年度は、in vitro評価系の開発として、MEAデータのAIモデルによる解析手法、細胞画像のAI解析およびMEAデータによるin vitro系の品質評価法、ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドを用いた神経毒性評価系樹立のためのMEA計測手法、血液脳関門 (BBB) を統合したMEAシステムの開発を進めた。

またin silico手法として分子記述子による化学物質のグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性予測手法の開発を進めるとともに、陽性知見に基づいて重みづけを行ったin silico毒性予測手法の開発に着手した。In silicoおよびin vitro手法によるin vivo発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報が不足する物質のin vivo毒性評価を進めた。

さらに、研究成果を国際ガイダンスとして確立することを目指し、研究成果を国際学会にて発表するとともに、試験法の行政利用に向けた国際動向調査を進めた。

B. 研究方法

(1) ヒトiPS細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①MEAデータ解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfire (米国Neucyte社) を4週間培養し、4種の陰性化合物 (DMSO, Acetaminophen, Aspirin, Amoxicillin) 及び12種の農薬等 (Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidin, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieltrin, Fenamidone,

Fipronil, Lindane, Permethrin, Tributyltin) にばく露した (各物質6ウェル以上)。ばく露は6段階の累積投与により行い、投与後15分間のMEAデータをMEAシステムMaestro (米国Axion社) により記録した。MEAデータはAxISソフトウェア (米国Axion社) により解析し、スパイク数、バースト数等の神経活動関連MEAパラメータを算出した。得られたMEAパラメータを用いて、主成分分析により、神経毒性評価の閾値を設定した。また9種のMEAパラメータ (全スパイク数、バースト間隔、バースト持続時間等) を用いてパターン認識モデルによるAIモデルを構築した。AIモデルにより、投与した12種の農薬について、主成分分析による結果と比較した。

②細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfireを4週間培養し、培養期間内に週2回のMEA計測 (Maestroシステム) と画像撮影を行った。画像撮影はBioRevoオールインワン顕微鏡 (キーエンス) を用い、3.5 μ m間隔のZ-stack撮影とした。模様関連特徴量、変動パターン関連特徴量等26個の形態特徴量を細胞画像から自動的に計算するプログラムを開発した。このプログラムを用いてMEAデータと紐づいた画像データ計17セットを解析し、26の特徴量の中からMEAデータと相関の強い特徴量の探索を行った。

③細胞品質評価のためのMEAクライテリア作成

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfireを4週間培養し、5種の化学物質 (DMSO, Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin) を累積投与して6段階の濃度でMEA計測 (Maestroシステム) を行った。各化学物質14ウェル分のMEAデータについて、「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つの条件でデータの選別を行い、データのばらつきに関し、選別が無い場合との比較を行った。

④急性および慢性曝露in vitro神経毒性評価の感度比較

③のMEA計測で得られたDeltamethrin, Cypermethrinの全スパイク数データを用いて、BMDSソフトウェア (US EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC50)を算出し、先行研究の慢性曝露により得られた値との比較を行った。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

ヒトiPS細胞RIKEN-1Aから、分化誘導キットStemDiff cerebral organoid kit (米国STEMCELL Technologies社) を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。MEAによる脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出には、MaxOneシステム (スイスMaxwell社)

を使用した。培養108日の脳オルガノイド（直径2-3mm）4個を、電極チップ1基あたり1個播種し、週に2回の培養液交換、週に1回のMEA計測を実施した。MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア（スイスMaxwell社）により行った。

⑥BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞から、先行研究（Lippmann et al. Nat. Biotechnol. 2012;30:783-791）をベースとした方法で脳毛細血管内皮細胞様細胞(BMELC)を樹立した。得られたBMELCは凍結保存し以後の実験に使用した。BMELCをスタンディングタイプセルカルチャーインサート（米国メルク社）に播種し、血管内皮細胞培地（米国Therm Fisher Scientific社）をベースとした培養液で5日間培養を行いBBBモデルとした。BBBのバリア機能は、Endohm-6カップ型電極（米国World Precision Instruments社）を用いて経内皮電気抵抗値(TEER)を測定することで確認した。TEER確認は国立医薬品食品衛生研究所及びBMELCを樹立した名古屋市立大学の2か所で実施した。培養液の比較検討においては、同時に播種したBBBを培養5日目に群分け（1群2-3ウェル）し、比較を行う培養液に交換後、経時的にTEER測定を行った。

② 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

発達神経毒性に関する総説(Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)に記載された361の化学物質の構造から、AlvaDesc ver2.0ソフトウェア（イタリアAlvaDesc社）を使用して、Constitutional indices, Ringdescriptors, Functional group counts, Atom centred fragments, Molecular propertiesの各ブロックに属する376の分子記述子を計算した。得られた分子記述子を、361物質の中での最大値が1、最小値が0となるように標準化し、物質相互間のユークリッド距離をRソフトウェアにより算出した。クラスタリングは、Ward法により相互距離の近い物質を順次結合して行った。またリードアクロスは以下のように実施した。ある物質（ターゲット物質）について、距離の近い順に物質を並べ、距離の近い物質のうち発達神経毒性陽性物質が占める割合を算出した。得られた割合が、361物質全体における発達神経毒性陽性物質の割合(0.45)よりも大きい場合、ターゲット物質を発達神経毒性陽性と判定した。

③ in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

化学構造に基づくクラスタリング及びリードアクロスによるin silico神経毒性予測の予測性が低かった物

質群の例として、有機リン化合物について、MEAにおける神経細胞ネットワーク活動に対する影響の検証を行った。

発達神経毒性メカニズムが明らかでないフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドについて、OECD発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)に従いラット発達期ばく露を行った。生後21日、77日に脳サンプルを採取し、海馬における神経新生を免疫組織化学染色及びリアルタイムPCRにより解析した。今年度はフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについて解析を実施した。

④ 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

国際動物実験代替法学会WC12（カナダ）に参加し、ここまでの成果を発表して海外規制機関の関係者とのディスカッションを行う等、国内外の関連学会に参加し情報収集を行った。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いは生じない。また動物実験については、実験を実施した国立大学法人 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。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、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を最小限に留めた。

C. 研究結果

① ヒトiPS細胞由来神経細胞及びオルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価の研究は数多く行われているが、用いるパラメータ等の具体的手法や毒性判定のクライテリアは明確になっていない。MEAパラメータを用いた主成分分析により、神経毒性判定の閾値設定を行うことができた。さらに、12種の農薬について主成分分析を行った結果、MEAパラメータの変動パターンを各農薬の神経作用機序ごとにグループ分けできることを見出した。また、MEAデータ9パラメータの機械学習により構築したAIモデルにより、12種類の農薬について主成分分析で得られるのと同様の神経毒性判定の閾値が得られた。

②細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

化学物質神経毒性試験にMEAを活用するにあたり、培養した細胞の品質を担保する客観的な指標が必要である。非侵襲的かつ簡便に細胞品質をモニタリングす

るため、AIを用いた画像解析の活用を試みた。MEAプレート上で培養された細胞の画像から、7種類の画像特徴量を抽出し、MEAパラメータ（全スパイク数）との相関性を解析したところ、模様関連特徴量であるmean-homogeneity、変動パターン関連特徴量であるSD-bias frequencyが、異なる実験間やプレート間でも共通してMEAパラメータとの相関を示した。

③細胞品質評価のためのMEAクライテリア作成

化学物質影響のMEA解析に供する細胞培養ウェルの選択にあたり、ベースラインのMEAパラメータに閾値を設ける方法が従来用いられている。閾値として先行研究では「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つが主に見られた。1群14ウェル、6群について両クライテリアを適用したところ、「発火電極数8以上」では使用可能なウェルが1など極めて少なくなる群が生じた。「バースト電極数5以上」では全ての群において少なくとも3ウェル分の使用可能データが得られた。「バースト電極数5以上」クライテリアで得られた陰性化合物(DMSO)データはウェル間のばらつきも少なかった。

④急性および慢性曝露in vitro神経毒性評価の感度比較

OECD DNT-IVBでは慢性曝露によるNeural network forming assayが記載されているが、神経毒性の検出に慢性曝露が必要か、急性曝露でも可能かは結論が出ていない。ヒトiPS細胞由来神経細胞への毒性が報告されているDeltamethrin、Cypermethrinについて、急性曝露による神経活動への影響を解析したところ、先行研究にて同一の細胞を用いて行われた慢性曝露実験より低い半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)が得られた。急性曝露により、慢性曝露より高感度で神経毒性評価が行えることが示唆された。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析は近年数多く報告されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。ヒトiPS細胞より樹立された脳オルガノイドは直径数mmと大きく、Maestroシステムで用いられる電極(1mm四方の範囲に16電極)では十分にカバーできなかったことから、26400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度電極MEAシステムであるMaxOneシステムを用いた。MaxOneシステムにより脳オルガノイドからネットワーク活動を示す明瞭なシグナルが得られ、化学物質曝露を行うための適切なタイムウィンドウが存在することが示唆された。

⑥BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

BBBを用いた毒性評価系の樹立へ向けたプレバリデーションとして、国立医薬品食品衛生研究所と名古屋市立大学の2か所でBBBの培養とTEER測定を実施し、双方とも良好なバリア機能を有すると考えられる500 Ωcm²以上のTEERが得られることを確認した。

キネティクスを考慮した化学物質神経毒性の解析のためBBBを神経細胞と共培養する場合、BBBのバリア機能が良好に保たれる条件を見出すことが重要となる。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBBのバリア機能をともに保つことができる培地の候補を見出した。これによりヒトiPS細胞由来神経細胞とBBBの共培養系によるin vitro評価系の検討を行っている。

(2) 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

発達神経毒性に関しては、国際的に合意されたin silico手法の開発が遅れている。そこで既存の発達神経毒性情報と分子構造の関連を解析するため、分子記述子により化学構造や物性の類似した物質をグループ化できるクラスタリング手法、構造的な類似度から毒性を予測するリードアクロス手法を開発した。

本年度はリードアクロスについて、予測性が良好となる条件の検討を行った。毒性予測を行う物質(ターゲット物質)に対し、比較する物質(ソース物質)の数を1-16の間で変化させたところ、10個のソース物質を用いた場合に予測性が最も良好となった。またソース物質の選択に用いる記述子の選択基準を検討し、陰性物質に比べ陽性物質と関連が強い(P<0.05)記述子を選択することで予測性が向上することを見出した。一方、一部の物質においては、陽性であるにもかかわらず隣接物質に陰性物質が多く陰性と判定される(偽陰性)、陰性であるが隣接物質に陽性が多く陽性と判定される(偽陽性)例が見られた。予測性の低い化学物質に共通する構造上の特徴について検討し、偽陰性となる物質は低分子量で構造が単純である傾向、偽陽性となる物質は高分子量で構造が複雑である傾向を見出した。

また発達神経毒性陽性である有機リン剤がリードアクロスにおいて陰性と判定される例が見られた。この誤判定の原因は、発達神経毒性知見のベースとした総説(Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)において、多くの有機リン剤について発達神経毒性知見が記載されていないことと考えられた。

(3) in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

In silico神経毒性予測において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによるin vitroデータとの照合

を行った。クロルピリホス、ダイアジノンなどでMEAパラメータに変動が見られ、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAにより神経毒性を検出していることが示唆された。このことから、*in silico*及び*in vitro*の統合的アプローチにより、*in vivo*発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

*In silico*手法との統合に有用な*in vitro*実験を見出す方法として、毒性メカニズムが不明な化学物質の*in vivo*実験によるメカニズム情報の集積が考えられる。発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質であるフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについて発達神経毒性評価を実施した。その結果、両物質ともに海馬歯状回における神経新生を阻害することが示された。またそのメカニズムを解析した結果、フッ化ナトリウムは神経前駆細胞の数を減少させ、過塩素酸アンモニウムは甲状腺機能低下を介して神経新生、オリゴデンドロサイト新生を阻害しており、こうした作用を検出する*in vitro*評価系の重要性が示唆された。

(4) 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

OECDの*in vitro* DNTガイドランスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、*in vivo*での行動異常との対応づけについてコメントを提出した。安彦、諫田、鈴木、吉成、小島が国際動物実験代替法学会WC12 (カナダ)に参加し、MEAデータからのAIモデルによる神経毒性予測や化学構造に基づく*in silico*毒性予測と*in vitro*評価の統合等の成果を報告した。また日本における動物実験代替法に関する取り組みについての講演も行い、海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイドランスにヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAシステムによる評価法が記載されているが、*in vivo*神経毒性の予測性については課題が残されている。分担研究者の鈴木は機械学習を用いた解析により、神経毒性発現機序に対応して、MEAパラメータのパターンを分類できることを報告した。未知の化合物のMEAを測定することにより、その化合物の神経毒性メカニズムが類推可能になることが期待される。さらに本研究でMEAデータ9パラメータから構築したAIモデルは、12種類の農薬について多変量解析で得られるのと同様の毒性閾値を与えた。AI解析においては扱うことのできるパラメータ数が多く、多種の*in vitro*実験データを取り込むことで、精度の高い毒性予測を行えるシステムの開発が期待される。また、今回は限られた化学物質を用いて機械学習の検討を進めたが、さらに化学物質を増やしてモデルの妥当性など

を検証する必要があると考えられる。

同一のiPS神経を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている (ALTEX, 37:121-135, 2020)。そこでAI画像解析による細胞状態のモニタリングに着手し、細胞画像から自動的に画像特徴量を抽出するプログラムを作成して、MEAデータと相関の高い画像特徴量を見出した。さらに、ばらつきの少ないMEAデータを得るための細胞ウェル選択基準として、バースト電極数5以上というクライテリアを見出しており、今後こうしたパラメータについても相関の高い画像特徴量の抽出を進める。

また、使用するヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においては国際バリデーションが進められているSynfireを利用したが、株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率 (E/Iバランス) の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられる。まずはNeucyteのデータの活用を進めているが、今後、AIを活用するためには株ごとにMEAデータセットを取得する必要がある。

脳オルガノイドを用いた神経毒性評価を目指し、高密度MEAシステムによるネットワーク活動検出を行い明瞭なシグナルを得ることができたが、得られたシグナルは経時的な変動が大きかった。化学物質曝露のために適切なタイムウィンドウが存在することが示唆され、今後の検討により、脳オルガノイドを用いたMEAシステムによる神経毒性評価プロトコルの確立が期待される。

OECDのDNT-IVBガイドランスでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。ラットBBBは市販されているが、ヒトiPS由来BBBは販売が開始されたばかりであり (富士フィルムCDIなど)、本研究では独自のヒトiPS由来BBBを利用した。本研究で用いたBBBも市販のBBBも、同じプロトコルをベースに分化誘導している (Lippmann et al. Nat. Biotechnol. 2012;30:783-791.)。神経細胞とBBBの共培養においては、両者がともに機能を保つことが重要であり、本研究では良好な共培養を可能とする培養液の候補を発見した。これによりMEAとBBBを統合したシステムの完成に大きく前進したと考える。今後、BBB共存によりMEAデータが受ける影響、また化学物質がBBBのバリア機能に与える影響を検証する。一般に、神経機能の異常にはBBBの破たんやミクログリアによる炎症なども関与すると考えられることから、脳血管ユニットを構成するペリサイト、アストロサイト、ミクログリ

ア等の細胞をセルカルチャーインサート上で培養する系を構築し、神経毒性を総合的に評価できる系の確立を目指す。

化学物質の構造情報の活用によって、in vivo発達神経毒性の予測性の向上が期待されることから、OECDにおける発達神経毒性評価の段階的アプローチでも、Tier 0としてin silico手法の活用が議論されている。しかし具体的なアプローチの検討は未だなされていないことから、本研究では分子記述子を用いたクラスタリング及びリードアクロス手法を開発した。類似性評価及び毒性判定に関する条件検討を行い、予測精度を向上する条件を見出したが、予測性の低い物質群が存在することも判明した。今後、予測性の低い物質群に共通する構造上の特徴等について研究を進めるが、用いたデータセットの発達神経毒性情報の不確実性を改善する必要があることも示唆される。引き続き、in vivoのデータについても収集を進めながら、検討する必要がある。

化学構造に基づくin silico神経毒性予測において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによるin vitroデータとの照合を行ったところ、Chlorpyrifos、DiazinonなどMEAパラメータに変動が見られ、神経毒性を検出可能なことが示唆された。in silico及びin vitroの統合的アプローチにより、in vivo発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

フッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムともに発現メカニズムが不明な発達神経毒性物質であるが、本研究によりフッ化ナトリウムは神経前駆細胞を減少させて神経新生を阻害し、過塩素酸アンモニウムは甲状腺機能低下を介して神経新生、オリゴデンドロサイト新生を阻害することが示された。DNT-IVBガイドラインには神経の分化、軸索伸長、ネットワーク形成等をカバーする17の実験系が記載されている。発達神経毒性の作用点に関する知見の蓄積により、毒性評価における実験系選択方法の確立等、DNT-IVBに貢献することが期待される。

以上のように、研究班全体で連携して神経毒性評価法の開発を進めており、順調に進展している。

E. 結論

本研究において、MEAを用いた神経ネットワーク解析法のAIによる予測モデルを構築した。これにより、in vitro神経毒性評価の予測性向上が期待される。今後、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を進め、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法を構築する。さらに、化学構造に基づくin silico予測とin vitroデータを統合的に活用することにより、in vivo発達神経毒性の予測性が向上することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki, Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array, *Toxicology in Vitro*, 93:105668
2. Ojiro, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M.: Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats. *Environ. Toxicol.* 39(5):3040-3054, 2024.

著書

鈴木郁郎 『動物実験代替法と New approach Methodologies の開発・利用動向』【第IV編 農業業界】第4章 発達神経毒性評価 2023年 シーエムシー出版

2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y**: Predictive toxicology using human iPS cells. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
2. **Kanda Y**: Recent progress of alternatives to animal testing from regulatory science in Japan. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
3. **Yasuhiko Y, Yoshinari K, Kanda Y**: Prediction of developmental neurotoxicity using a read across approach. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
4. **安彦 行人, 村上 真菜, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価. 第97回日本薬理学会年会, 2023年12月14日, 兵庫
5. **安彦 行人, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたマンガン化合物の神経毒性評価. 日本毒性学会・生体金属部会メタルバイオサイエンス研究会 2023, 2023年10月6日, 岐阜
6. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドダンスと今後の展望. 第63回日本先天異常学会学術集会シンポジウム, 2023年7月28日, 茨城
7. **諫田泰成**: 化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み. 日本動物実験代替法学会第

- 36 回大会シンポジウム, 2023 年 11 月 29 日, 千葉
8. 竹内規晃, 西川斗偉, 坂下真大, 岩尾岳洋, 常喜祥子, 広瀬賢一, 山中 誠, 小柳 博, 畠山 健治, **松永民秀**. ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた BBB-on-a-chip の開発. 合同会社メドテックコンサルティング創業記念学術集会, 東京, 2023 年 7 月 3 日.
 9. **I. Suzuki**, Y. Ishibashi, N. Nagafuku, MEA assessment for neurotoxicity of pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons, EuroTox 2023, 9/10-13, Slovenia
 10. 石橋勇人, 永福菜美, **鈴木郁郎**, ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA データを用いた殺虫剤の神経毒性評価, 第 50 回日本毒性学会学術年会
 11. 石橋勇人, 永福菜美, **鈴木郁郎**, MEA システムによる痙攣化合物および殺虫剤の神経毒性評価と作用機序推定, 第 6 回医薬品毒性機序研究会
 12. 酒巻 友里, 菖蒲谷 桃香, 尾城 椋太, 鄒 昕羽, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, **渋谷 淳**: 抗甲状腺作用が知られている過塩素酸アンモニウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S122, P1-077S, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 13. Xinyu ZOU, Qian TANG, Ryota OJIRO, Shunsuke OZAWA, Momoka SHOBUDANI, Yuri SAKAMAKI, Toshinori YOSHIDA, **Makoto SHIBUTANI**: Sustained disruption of postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus after maternal exposure to imidacloprid in rats. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S123, P1-080S, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 14. 菖蒲谷 桃香, 酒巻 友里, 尾城 椋太, 鄒 昕羽, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, **渋谷 淳**: 天然に豊富に存在する必須元素であるフッ化ナトリウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S171, P2-200, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 15. Ryota Ojira, Xinyu Zou, Qian Tang, Shunsuke Ozawa, **Makoto Shibutani**: Similar effects of glyphosate and glyphosate-based herbicide on brain development after developmental exposure to rats. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology. P146. Taipei, Taiwan. 7 月 17 日-20 日, 2023.
 16. 鄒 昕羽, 唐 倩, 尾城椋太, 小澤俊介, 菖蒲谷桃香, 酒巻友里, 海老塚由理, 吉田敏則, **渋谷 淳**: Effect of α -glycosyl isoquercitrin on maternal imidacloprid exposure-induced disruptive hippocampal neurogenesis in rats. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会要旨集: P-03, pp. 64, 1 月 23-24 日, 2024
 17. 高村真弥, 大村奈央, 保坂卓臣, 志津怜太, 竹下潤一, **吉成浩一**: 分子記述子を用いたリードアクリロスによる発達神経毒性予測手法の開発, フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2023 年 9 月 13 日, 広島市

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MEA を用いた *in vitro* 神経毒性試験系の開発

研究分担者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
研究分担者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や 3Rs の観点から、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験の活用が期待される。OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。そこで本分担研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを反映させた解析が可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

ばらつきの少ない MEA データを得るための細胞ウェル選択基準を検討し、バースト電極数 5 以上というクライテリアを見出した。ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについて、高密度電極 MEA により良好なネットワーク活動計測が行えること、計測に適したタイムウィンドウが存在することを見出した。さらに BBB と MEA の統合システム構築に向け、培地組成の検討により BBB・神経双方の機能を保った共培養の見込みを得た。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いた MEA による神経毒性評価系、さらに BBB を統合した MPS の開発の基盤を構築した。今後、さらに発達神経毒性の評価法の開発を行う予定である。

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における 3Rs の観点からも、ヒト生体環境に近い細胞や組織を活用した *in vitro* 評価系の開発が望まれる。本研究は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた新たな *in vitro* 発達神経毒性評価法の開発を目的とする。

化学物質による発達神経毒性の *in vitro* 評価系として、現在、OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、施設間・実験間の再現性や、キネティクスの反映、細胞の株間差等が課題である。本研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを解析可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

本年度は、MEA プレートに播種した細胞に関する品質評価法として、発火電極数に閾値を設けてウェル選択を検討した。またヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの作製、及びそれを用いた神経毒性評価系樹立のための MEA 計測手法の開発を行った。さらに血液脳関門 (BBB) を統合した MEA システムの開発へ向け、BBB

バリア機能と神経機能を共に保つことのできる培地の開発を進めた。

B. 研究方法①MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

ヒト iPS 細胞由来神経細胞として、OECD の *in vitro* 神経毒性評価系の国際的なバリデーションに用いられている市販細胞培養キット (米国 Neucyte 社、SynFire® MEA kit) を用いた。本キットはヒト iPS 細胞から分化誘導された Glutamatergic neuron、GABAergic neuron および Astrocyte からなり、メーカープロトコルに従い 14:6:7 の数比で混合培養した。細胞の解凍、播種についてもメーカープロトコルに従い行った。

細胞は MEA システム MAESTRO (米国 Axion 社) の測定プレート上で培養した。播種後 4 週間、Neucyte 社供給の専用培地を週 2 回半量交換し、交換翌日に MEA により神経活動のベースライン計測を実施した。測定プレートを MAESTRO にセット後、10 分間静置した上、15 分間の MEA 計測を実施した。得られたデータから AxIS ソフトウェア (Axion 社) でスパイクを抽出後、Neural Metric tools ソフトウェア (Axion 社) を使用してネットワークバースト等、各種ネットワーク活動パラメータを取得した。

また週一回（培地交換前）、細胞画像AI解析（加藤の分担研究を参照）のため、全ウェルの細胞画像撮影を実施した。BioRevo BZ9000オールインワン顕微鏡（Keyence）を使用し、ソフトウェアBZ-IIにより画像の撮影および合成を行った。1視野で3 x 3のタイリング撮影を行い、それぞれZ軸方向に3.5 μ m間隔で積層的に撮影してベストフォーカス合成を行った。MEAデータへの影響を最小限とするため、画像撮影後に培地交換を行い、MEA測定はその1日後に実施した。

化学物質の投与は細胞播種後5週目に行った。4種の化学物質（Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin）について、蓄積的に5段階に分けて行い、最終濃度は4物質とも30 μ Mとした。各化学物質14ウェル分のMEAデータについて、「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つの条件でデータの選別を行い、データのばらつきに関し、選別が無い場合との比較を行った。

Deltamethrin, Cypermethrinの全スパイク数データを用いて、BMDSソフトウェア（US EPA）により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出し、先行研究の慢性曝露により得られた値との比較を行った。

②脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価系の開発

ヒトiPS細胞RIKEN-1Aから、培養液キットStemDiff cerebral organoid kit（米国STEMCELL Technologies社）を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。MEAによる脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出には、MaxOneシステム（スイスMaxwell社）を使用した。培養108日の脳オルガノイド（直径2-3mm）4個を、電極チップ1基あたり1個播種し、週に2回の培養液交換、週に1回のMEA計測を実施した。MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア（Maxwell社）により行った。

③BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞由来BBBは、分担研究者の松永らが樹立したものを、ドライシッパーで国立医薬品食品衛生研究所に輸送し、液体窒素中に保存した（Yamashita et al. Fluids Barriers CNS (2020) 17:36）。

24ウェルプレートのウェルに、セルカルチャーインサート（Merck, PIHP01250）をセットし、Fibronectin及びCellmatrix Type IV（それぞれ100 μ g/ml及び400 μ g/ml）により4 $^{\circ}$ C、一晚コーティングした。コーティング溶液を除去した後、セルカルチャーインサートをセットしたウェル内に600 μ l、セルカルチャーイン

サート内に200 μ lの播種培地を注入し、37 $^{\circ}$ Cで保温した。培地の組成は前掲のYamashitaらの文献に従った。

凍結BBB細胞を液体窒素から取り出し、バイアル内に37 $^{\circ}$ Cに温めた播種培地1mlを加え、30回程度ピペティングして解凍した。得られた細胞懸濁液を8mlの播種培地に加え、100 x g、5分、室温にて遠心した。細胞ペレットを1mlの播種培地に懸濁してトリパンブルー染色の上で細胞数をカウントし、細胞の生存率が80%以上であることを確認した。細胞懸濁液の細胞密度を2.7 x 10⁶cells/mlに調整し、セルカルチャーインサートあたり200 μ l（5.4 x 10⁵cells）を添加した。各セルカルチャーインサート内の液を、400 μ lにセットしたピペッターで1回ピペティングして均一化し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて静置培養した。

血管内皮細胞培地（米国Thermo Fisher Scientific社）をベースとした培養液で培養を行い、Endohm-6カップ型電極（米国World Precision Instruments社）を用いて経内皮電気抵抗値(TEER)によりバリア機能を解析した。TEER確認は国立医薬品食品衛生研究所、名古屋市立大学の2か所で実施した。培養液の比較検討においては、同時に播種したBBBを培養5日目に群分け（1群2-3ウェル）し、比較を行う培養液に交換後、経時的にTEER測定を行った。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いは生じない。

C. 研究結果

①MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

化学物質影響のMEA解析に供する細胞培養ウェルの選択にあたり、ベースラインのMEAパラメータに閾値を設ける方法が従来用いられている。閾値として先行研究では「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つが主に見られた。1群14ウェルからなる6群について両クライテリアを適用したところ、「発火電極数8以上」では使用可能なウェルが1など極めて少なくなる群が生じた。「バースト電極数5以上」では全ての群において少なくとも3ウェル分の使用可能データが得られた。「バースト電極数5以上」クライテリアで得られた陰性化合物(DMSO)データはウェル間のばらつきも少なかった（Fig.1）。

In silico神経毒性予測（分担研究、吉成の項）において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによりヒトiPS細胞由来神経細胞への影響を解析した。Chlorpyrifos, DiazinonでMEAパラメータに変動が見られ、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAにより神経毒性を検出していることが示唆された。また、両

剤ともNetwork burst数の増加やBurst持続時間、BurstあたりSpike数の減少等に関して類似したパラメータ変化を示しており、共通のメカニズムによる影響が示唆された (Fig.2)。

OECD DNT-IVBでは慢性曝露によるNeural network forming assayが記載されているが、神経毒性の検出に慢性曝露が必要か、急性曝露でも可能かは結論が出ていない。ヒトiPS細胞由来神経細胞への毒性が報告されているDeltamethrin、Cypermethrinについて、急性曝露による神経活動への影響を解析したところ、先行研究にて同一の細胞を用いて行われた慢性曝露実験より低い半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)が得られた (Fig.3)。急性曝露により、慢性曝露より高感度で神経毒性評価が行えることが示唆された。

②脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価系の開発

MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析は近年数多く報告されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。ヒトiPS細胞より樹立された脳オルガノイドは直径2mm程度と大きく、Maestroシステムで用いられる電極 (1mm四方の範囲に16電極) では十分にカバーできなかったことから、26400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度電極MEAシステムであるMaxOneシステムを用いた。MaxOneシステムにより脳オルガノイドからネットワーク活動を示す明瞭なシグナルが得られ、化学物質曝露を行うための適切なタイムウィンドウが存在することが示唆された (Fig.4)。

③BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

BBBを用いた毒性評価系の樹立へ向けたプレバリデーションとして、国立医薬品食品衛生研究所と名古屋市立大学の2か所でBBBの培養とTEER測定を実施し、双方とも良好なバリア機能を有すると考えられる500Ωcm²以上のTEERが得られることを確認した (Fig.5)。

キネティクスを考慮した化学物質神経毒性の解析のためBBBを神経細胞と共培養する場合、BBBのバリア機能が良好に保たれる条件を見出すことが重要となる。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBBのバリア機能をとともに保つことができる培地の候補を見出した (Fig.6)。

D. 考察

化学物質の発達神経毒性評価に関して、2023年4月にOECDのin vitro testing battery (DNT-IVB) ガイダン

スが承認され、国際的な議論が進められている。その中でMEAによる神経ネットワーク活動の評価法が記載されているが、同一のiPS神経を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている (ALTEX, 37:121-135, 2020)。ばらつきの少ないMEAデータを得るための細胞ウェル選択基準として、バースト電極数5以上というクライテリアを見出した。

この系により、Chlorpyrifos、DiazinonによるMEAパラメータ変動が見られ、ヒトiPS細胞由来神経細胞に対する神経毒性を検出していることが示唆された。有機リン系農薬はin silico毒性予測 (吉成の項) における予測精度が低かったが、in silico及びin vitroの統合的アプローチにより、予測精度が向上することが示唆された

使用するヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においては国際バリデーションが進められているSynfireを利用したが、株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率 (E/Iバランス) の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられる。まずはNeucyteのデータの活用を進めているが、今後、株ごとにMEAデータセットを取得する必要がある。

脳オルガノイドを用いた神経毒性評価を目指し、高密度MEAシステムによるネットワーク活動検出を行い明瞭なシグナルを得ることができたが、得られたシグナルは経時的な変動が大きかった。化学物質曝露のために適切なタイムウィンドウが存在することが示唆され、今後の検討により、脳オルガノイドを用いたMEAシステムによる神経毒性評価プロトコルの確立が期待される。

OECDのDNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。ラットBBBは市販されているが、ヒトiPS由来BBBは販売が開始されたばかりであり (富士フィルムCDIなど)、本研究では独自のヒトiPS由来BBBを利用した。本研究で用いたBBBも市販のBBBも、同じプロトコルをベースに分化誘導している (Lippmann et al. Nat. Biotechnol. 2012;30:783-791.)。神経細胞とBBBの共培養においては、両者がともに機能を保つことが重要であり、本研究では良好な共培養を可能とする培養液の候補を見出した。これによりMEAとBBBを統合したシステムの完成に大きく前進したと考える。今後、BBB共存によりMEAデータが受ける影響、また化学物質がBBBのバリア機能に与える影響を検証する。一般に、神経機能

の異常にはBBBの破たんやミクログリアによる炎症なども関与すると考えられることから、脳血管ユニットを構成するペリサイト、アストロサイト、ミクログリア等の細胞をセルカルチャーインサート上で培養する系を構築し、神経毒性を総合的に評価できる系の確立を目指す。

E. 結論

本研究において、ヒトiPS細胞由来神経細胞及び脳オルガノイド、さらにヒトiPS細胞由来BBBを使用し、標準的なMEAデータ取得プロトコルの開発、培地の最適化など基盤となる技術を構築した。今後、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を進め、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法を構築する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y**: Predictive toxicology using human iPS cells. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
2. **Kanda Y**: Recent progress of alternatives to animal testing from regulatory science in Japan. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
3. **Yasuhiko Y, Yoshinari K, Kanda Y**: Prediction of developmental neurotoxicity using a read across approach. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
4. **安彦 行人**, 村上 真菜, **諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価. 第 97 回日本薬理学会年会, 2023 年 12 月 14 日, 兵庫
5. **安彦 行人**, **諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたマンガン化合物の神経毒性評価. 日本毒性学会・生体金属部会メタルバイオサイエンス研究会 2023, 2023 年 10 月 6 日, 岐阜
6. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望. 第 63 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム, 2023 年 7 月 28 日, 茨城
7. **諫田泰成**: 化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み. 日本動物実験代替法学会第 36 回大会シンポジウム, 2023 年 11 月 29 日, 千

葉

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

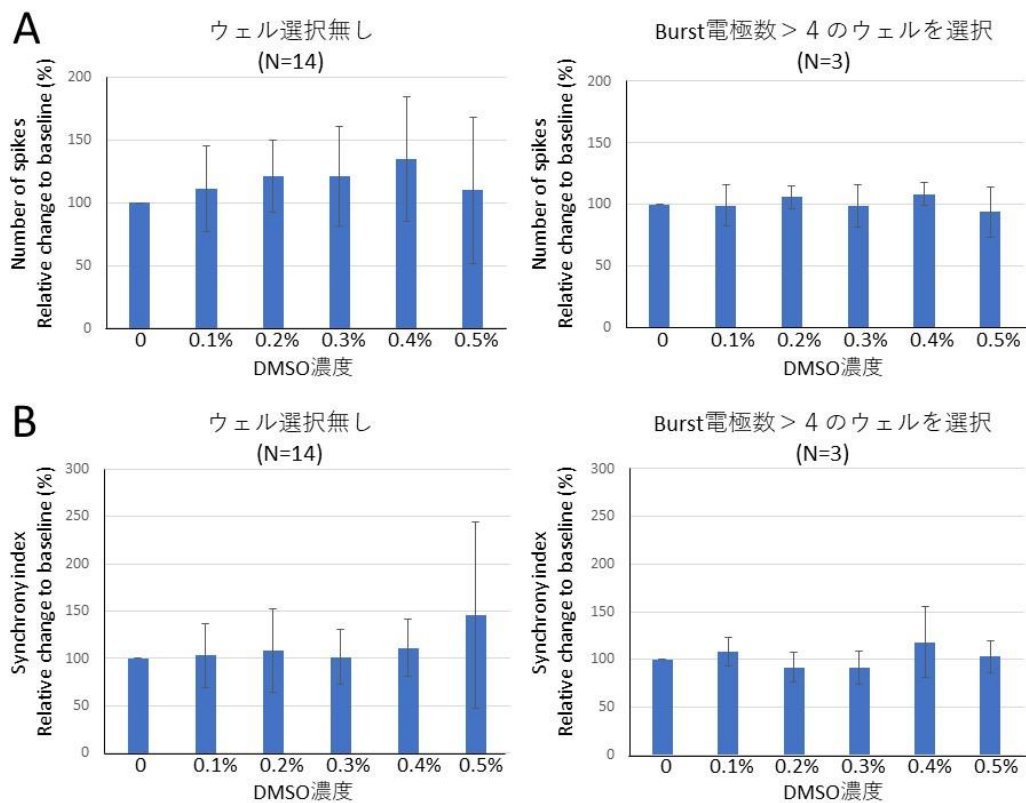


Fig.1 バースト電極(Bursting electrode)数によるウエル選択が MEA データのばらつきに与える効果。
 Synfire iPS neuron に溶媒(DMSO)を 0.1%から 0.5%まで累積投与し、各濃度における Number of Spikes (A)、Synchrony index (B)を MEA により計測した。横軸は培地中 DMSO の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。

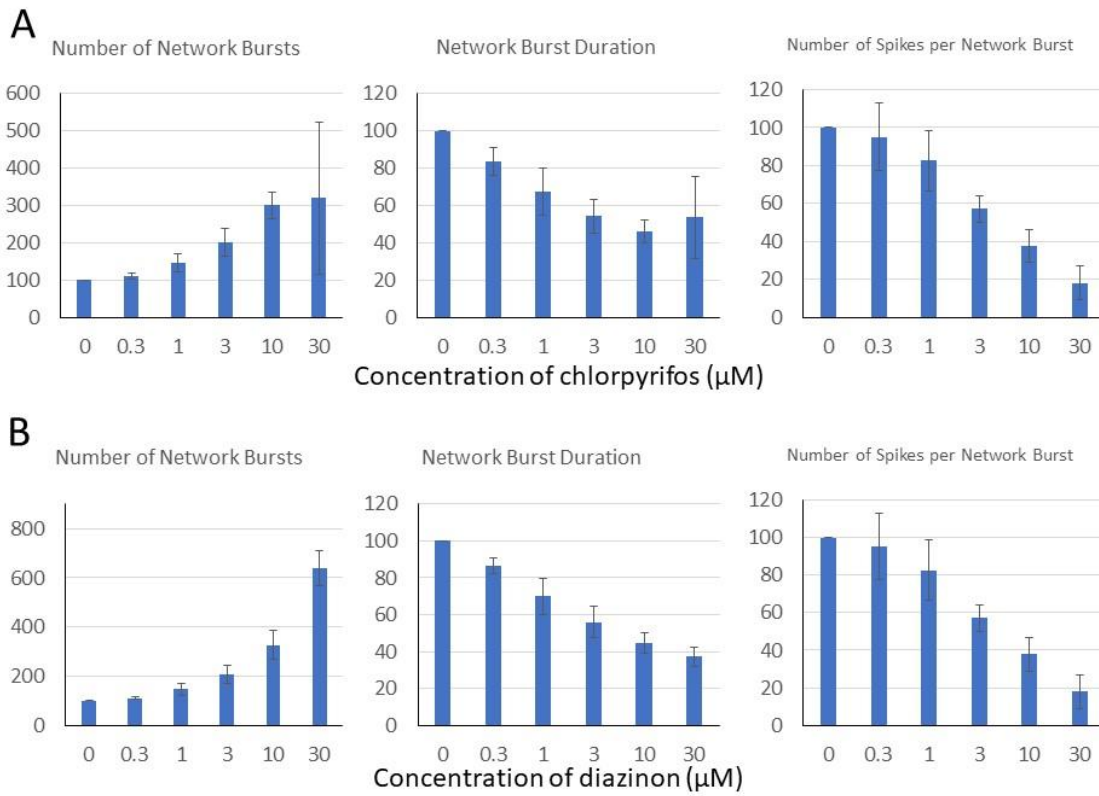


Fig.2 有機リン系農薬2剤によるヒト iPS 細胞由来神経細胞 MEA パラメータ変化。

Synfyre iPS neuron に Chlorpyrifos (A)、Diazinon (B)を累積投与し、MEA によりネットワーク関連パラメータを取得した。横軸は各剤の培地中濃度を示す。縦軸は溶媒添加(0μM)を 100%とした各パラメータの相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Chlorpyrifos)、5 (Diazinon)。

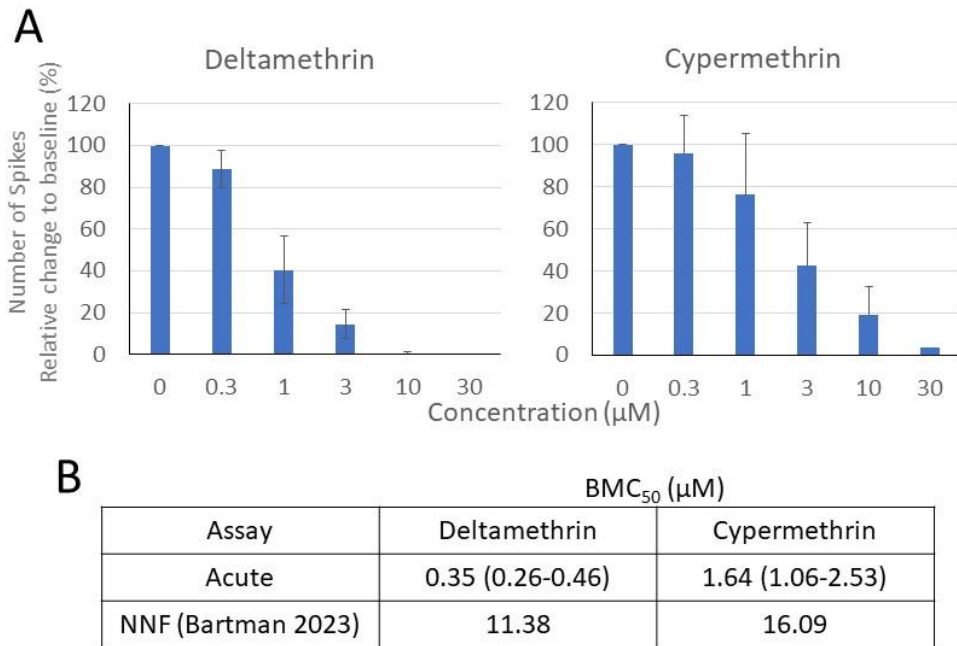


Fig.3 ピレスロイド系農薬 2 剤の急性(Acute)曝露による神経毒性評価。

A. Deltamethrin、Cypermethrin を 5 段階で累積投与し、各濃度での全スパイク数(Number of Spikes)を MEA により計測した。横軸は培地中の Deltamethrin、Cypermethrin の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Deltamethrin)、10 (Cypermethrin)。

B. BMDS 3.3.2 ソフトウェア (米国 EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出した (Acute の欄)。カッコ内は 95%信頼区間を示す。「NNF(Bartman 2023)」は同種のヒト iPS 細胞由来神経細胞を使用した慢性投与実験 Neural Network Forming (NNF)アッセイにより算出された BMC₅₀を示す。

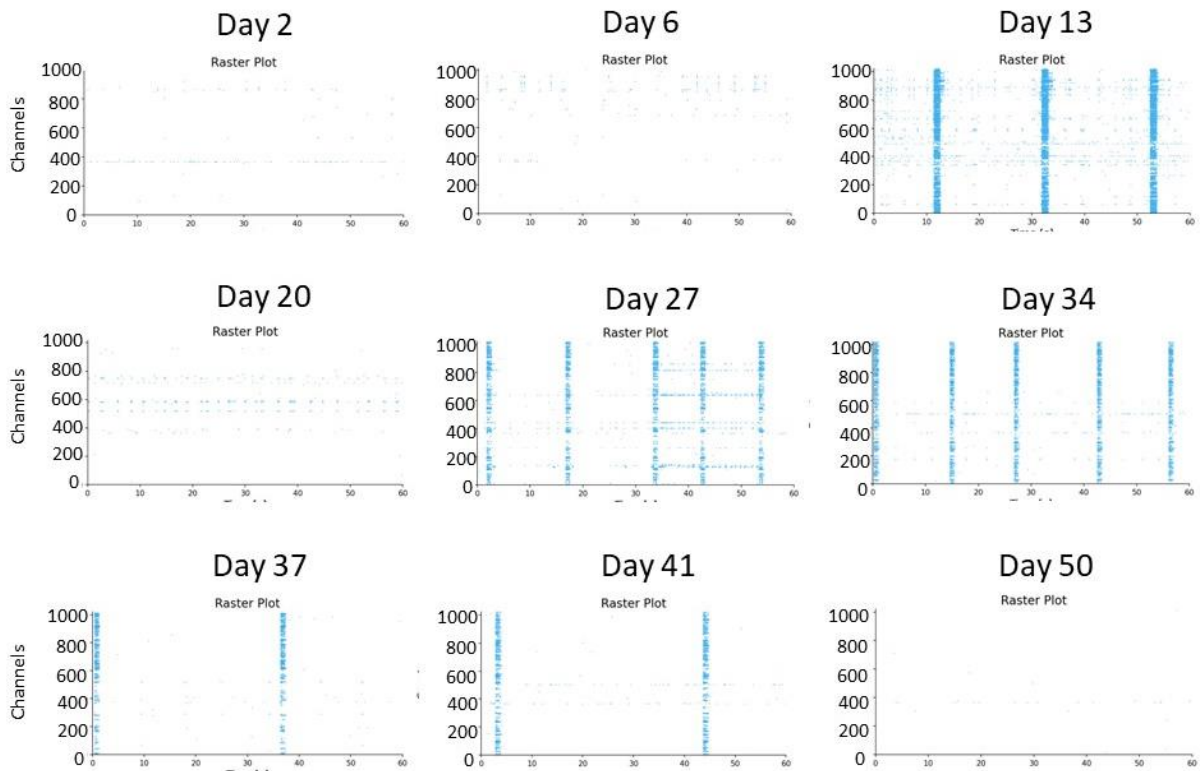


Fig.4 高密度電極 MEA によるヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測。StemDiff kit を用いて作製したヒト iPS 細胞由来脳オルガノイド (培養 108 日目、直径約 2mm) の細胞外電位を高密度電極 MEA 装置 Maxwell で計測した。各プロット上部の日数(Day○)はオルガノイド設置後の経過日数。青い点がスパイクを示す。縦軸は選択された 1024 電極、横軸は計測時間(全て 60 秒間)。

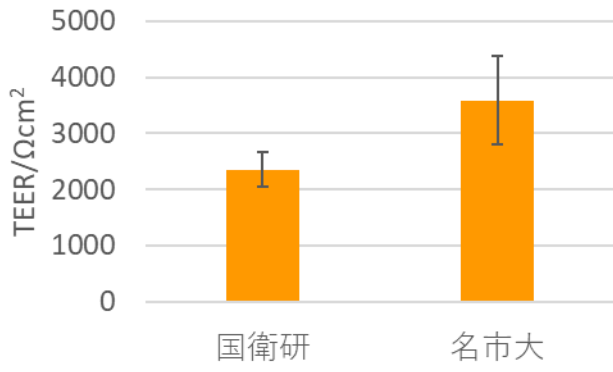


Fig.5 ヒト iPS 細胞由来 BBB のバリア機能に関する施設間プレバリデーション。
ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 3 日目にバリア機能 (TEER) の計測を行った。データは平均値±標準偏差を示す。N=6 (国衛研)、3 (名市大)。

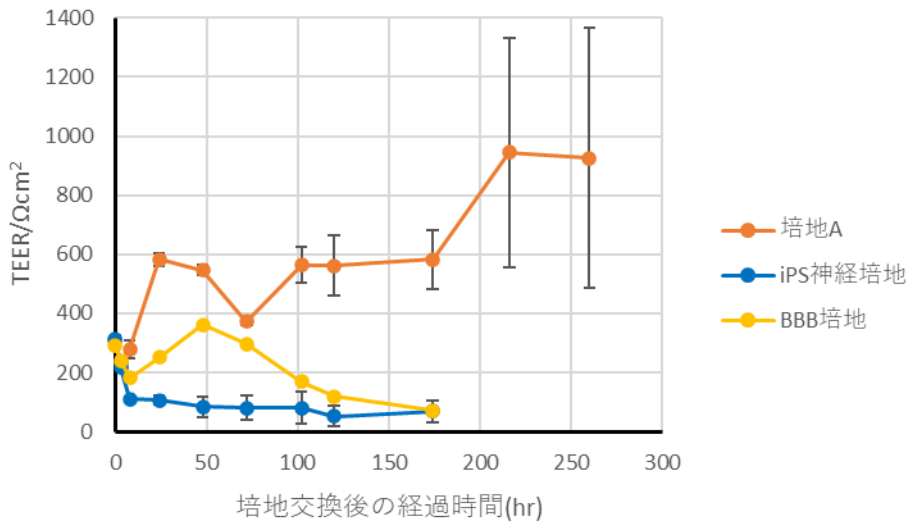


Fig.6 ヒト iPS 細胞由来神経細胞と BBB の共培養のための培地の探索。

ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 5 日目に検討する各培地への培地交換を行った後、バリア機能(TEER)を経時的に計測した。横軸は培地交換後の経過時間。データは平均値±標準偏差を示す。N=3 (培地 A、iPS 培地)、2 (BBB 培地)。BBB 培地の TEER は平均値のみ示した。

細胞機能の評価に着目した MPS デバイスの開発

研究分担者：松永民秀 名古屋市立大学 教授

研究要旨

血液脳関門（BBB）は脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトから構成されている。これまで、どのような化学物質が BBB を通過して神経毒性を示すのかを評価するための *in vitro* システムは皆無に等しかった。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を播種した多電極アレイ（MEA）とヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を播種したセルカルチャーインサートを Microphysiological System (MPS) デバイスに搭載し、メカニズムベースに予測性の高い化学物質の BBB 透過性と神経毒性の評価を開発することを目的としている。本研究の中で我々は、MPS に搭載する細胞株選択および培養条件の検討を担っており、特にヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を構築し MPS に搭載、多電極アレイ（MEA）と統合することを目標としている。

A. 研究目的

MPS 上での iPS 細胞由来 BBB 構成細胞の培養条件の検討および iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を搭載した MPS と MEA の統合に向けた開発を目的とする。本年度においては 2 層灌流デバイス上においてヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞にシエアストレスをかけた場合における遺伝子・タンパク質発現の変化、透過性試験の開発、BBB を構成するアストロサイトおよび脳ペリサイトとの共培養実験を行い、ヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を搭載した MPS の開発を目標とした。また、MEA 搭載型 2 層灌流デバイスの開発にも着手した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を 2 層灌流デバイス上に播種し、48 時間シエアストレスをかけた後、RNA 抽出を行い BBB マーカーにおける遺伝子発現について解析を行った。また、2 層灌流デバイスの上層部をルシファーイエローにて満たした後、上層部および下層部を様々な流速で灌流し、経時的（20、40、60 分）に下層部の溶液を回収することで、細胞間隙による透過性を解析した。また、ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を長期間にわたって、高い経内皮電気抵抗（TEER）値を維持できる培地が研究代表者によって発見されたことに伴い、同様に高い TEER 値を維持したまま培養できるかどうかを測定した。

C. 研究結果

2 層灌流デバイス上にヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を播種し 24 時間静置培養から流速を徐々に上げながら、培地を灌流することで細胞にシエアストレスを 48 時間かけた。その結果、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 や生体内の脳毛細血管内皮細胞にて高発現している GLUT-1 が発現していることが示された（図 1）。さらに、シエアストレスをかけることで、静置培養と比較して排泄トランスポーターである P-gp や GLUT-1 の遺伝子発現が有意に高くなることが示された（図 2）。さらに、デバイスの下チャネルのみ 19 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行いながらルシファーイエローによる透過性試験を行ったところ、いずれにおいても静置培養時と同様の $2.0 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$ 程度の透過係数を得た。

このことから、タイトジャンクション機能が十分に機能し、細胞間隙による透過は認められないことが確認できた（図 3）。

D. 考察

ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を播種した 2 層灌流デバイスを用いた結果、細胞間隙におけるタイトジャンクション機能は静置培養と同程度であることが示された。さらに細胞にシエアストレスをかけることでトランスポーターなどの遺伝子発現が有意に増加したことから、灌流によるシエアストレスは細胞における機能を増加させることが示唆される。

E. 結論

2 層灌流デバイスを用いることにより、静置培養と同等またはそれ以上の機能を有することが示された。今後、このデバイスと MEA を搭載したデバイスを連結させることで、BBB を透過する物質による評価が可能な MPS 開発へと繋げていく。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

竹内規晃，西川斗偉，坂下真大，岩尾岳洋，常喜祥子，広瀬賢一，山中 誠，小柳 博，畠山 健治，松永民秀。ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた BBB-on-a-chip の開発。合同会社メドテックコンサルティング創業記念学術集会，東京，2023 年 7 月 3 日。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(図表は以下、1ページに1点でお願いいたします。)

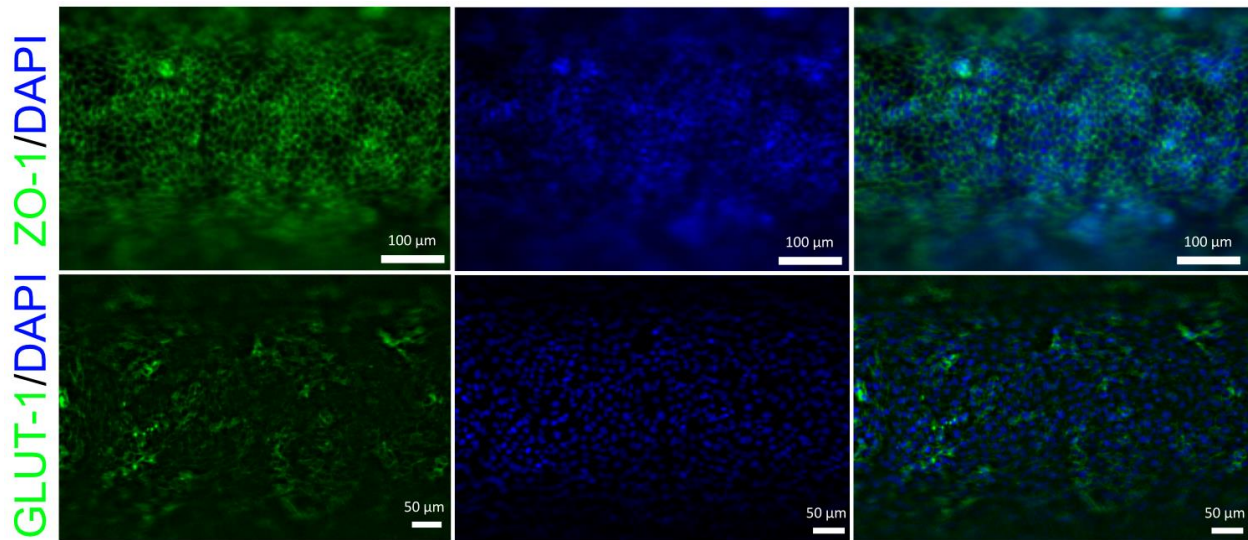


図1 2層灌流デバイスに播種したヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるタンパク質発現

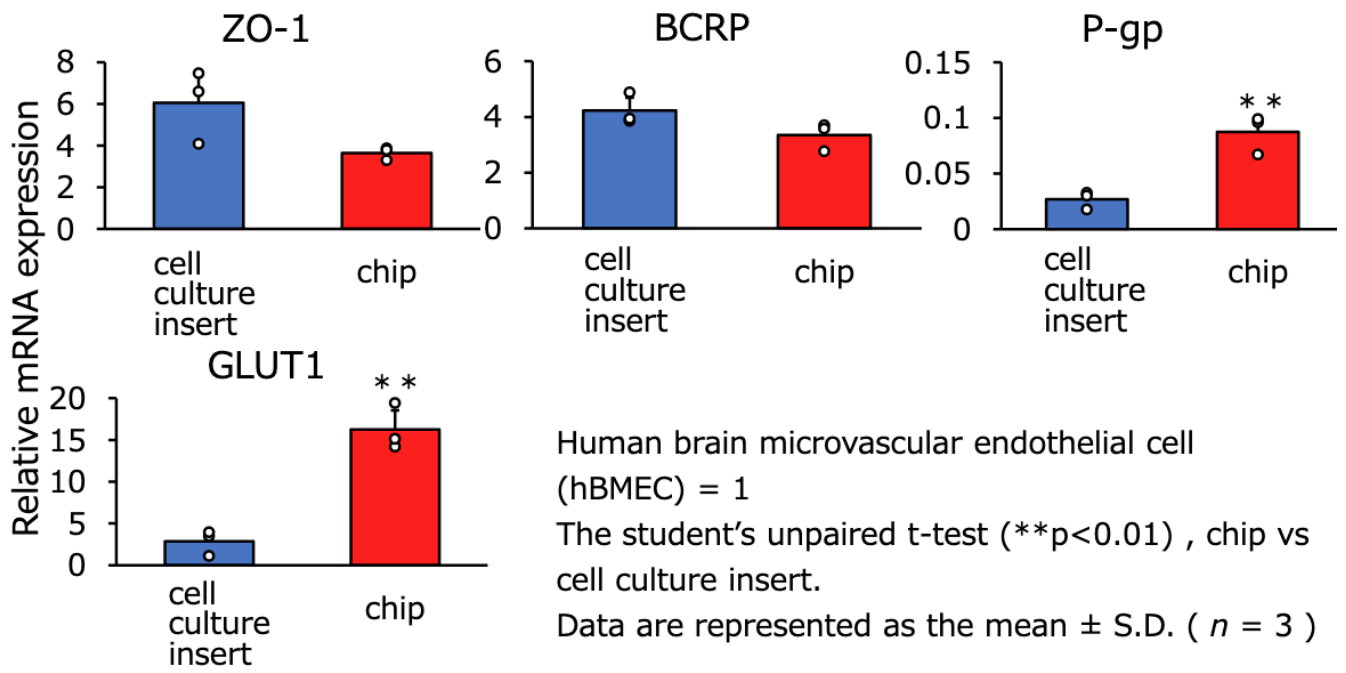


図2 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞と静置培養における遺伝子発現の変化

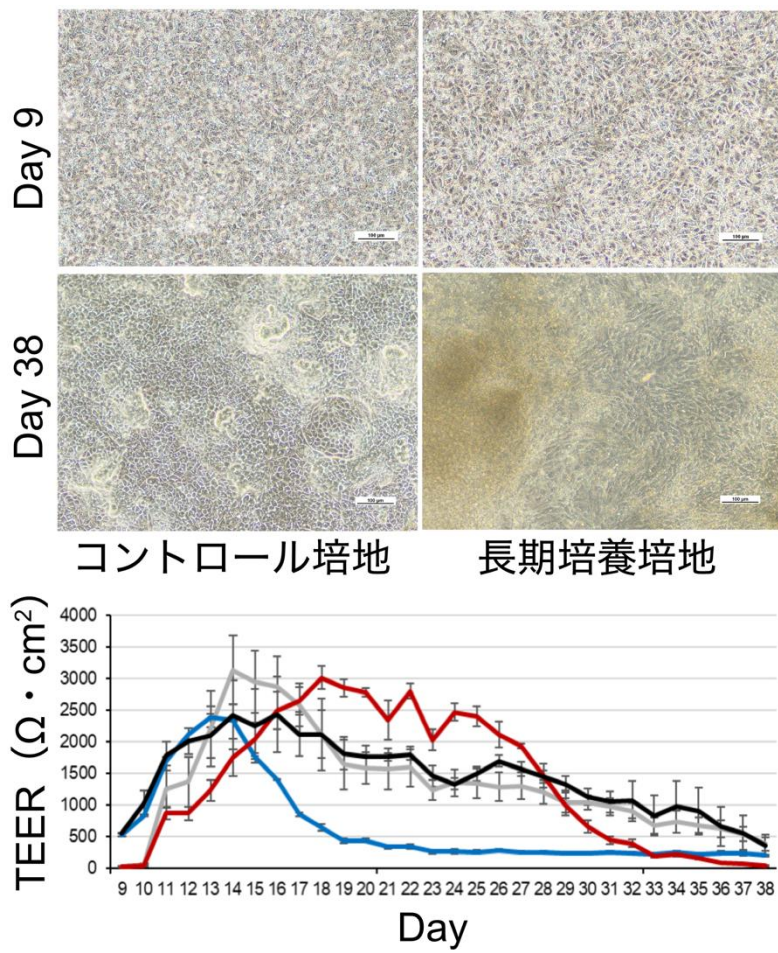


図3 長期培養培地によるヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞のタイトジャンクション機能と細胞形態の変化

神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発

研究分担者：加藤竜司 国立大学法人東海国立大学機構 准教授

研究要旨

本研究の目標は「**神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発**」であり、名古屋大学・加藤の有する技術を応用することで、国衛研・安彦らの取得した神経細胞の定量数値化技術および細胞品質管理のための AI モデル化技術の開発を行うものである。より具体的には、（1）細胞形態背景データの取得及び MPS 品質管理への AI 活用、（2）神経毒性物質による神経細胞形態変化の捕捉及び指標抽出、を実施する。令和5年度は特に開発項目（1）において、MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、国衛研より提供された MEA プレート上での神経細胞培養画像と MEA データの集積データセットを用いて、神経毒性試験においてロバストな画像特徴量についての解析を実施し、MEA センサー1 端子ごとに細胞形態画像をクロップする自動 MEA 区画化アルゴリズムの開発と、この解析アルゴリズムで得られる1 センサー単位および全ウェル単位での計測の安定性についての分析を実施した。結果、**Number of Spikes** と相関性の高い画像特徴量の発見と、センサーごとのデータだけではウェル全体としての応答性を表現できないリスクがあることを発見した。またこの課題解決のため、ウェル内の細胞形態特徴量を網羅的に組み合わせることで、**Number of Spikes** を画像のみから定量的に予測できる AI を開発し、不良ウェルなどを非破壊的に識別できる可能性が見出された。しかし一方で **Number of Spikes** 予測 AI は、いくつかのプレート間では性能を保つが、特定のプレートでは予測性能が落ちる現象がみられており、さらなる実験データの追加と、AI モデルの汎化性向上のためノイズ除去に取り組んでいる。

A. 研究目的

本研究では、神経毒性（特に急性毒性）の安定かつ定量的な *in vitro* 評価モデルとしてのヒト iPS 細胞由来神経細胞 MPS 評価を安定化・効率化するため、評価材料である神経細胞の品質評価技術として次の2つの技術開発を目指し、従来の神経毒性試験や発達神経毒性試験を代替して国際的な化学物質管理の取り組みに貢献する試験法確立に貢献する。

開発項目（1）ではヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質判定画像 AI 解析技術を目指し、研究分担者・加藤がこれまで様々な細胞の非破壊的画像品質判定を実現してきた非破壊的画像細胞品質判定技術『細胞形態情報解析』を応用し、MPS 薬剤評価を安定に実現するための神経細胞品質を判定する画像 AI 解析技術を開発する。

開発項目（2）では、神経毒性物質への神経細胞応答表現型の定量化を実現する画像 AI 解析技術を目指し、MPS 中で薬剤に反応する神経細胞の形態応答変化の特徴量解析から、MEA 解析を補完する深い生物学的理解のための情報として細胞毒性及び細胞機能障害と連動する表現型特徴量の抽出技術開発と、特徴量の分析・特定を行う。

本年度は、開発項目（1）および（2）において、MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、AI による細胞画像解析のために集積された基礎データをもちいて、詳細に分析すると共に、細胞応答 (**Number of Spikes**) を画像のみから連続値予測する AI の開発を目指した。また、この実現のため、提供された MEA

センサー上の細胞画像から、安定にセンサーごとの細胞被覆区画を Crop する自動 MEA 区画化アルゴリズム、および、ここから得られる区画ごとの細胞形態特徴量のノイズ・バイアスの影響について詳細な検証を行うこととした。

B. 研究方法

本年度は、研究代表者・安彦と連携し、MPS プレート上において培養された SynFire の顕微鏡画像データおよび MEA データセット（48 ウェル分）の提供を受け、得られたデータの分析および画像データからの特徴量抽出技術および得られた特徴量を用いた細胞応答の画像予測 AI モデルの開発を行った。

特に今回は、提供される MEA プレート画像の特徴と、実験者からの **hearing** によって、「各センサーに細胞が常に均一にのっているわけではないこと」「培養後期には細胞がはがれてしまうエリアが発現すること」「ウェル全体の計測値のどこまでか、各センサーの情報と相関するのか、おかしなセンサーを事前に検出することができるのか」などの課題点を見出し、これを解決するための画像解析技術の開発と、データ分析を遂行した。

（倫理面の配慮）

本研究では、市販細胞を用いた培養データの解析を行うだけであるため、倫理面で配慮が必要な事項は無い。

C. 研究結果

まず、MEA プレート上で培養された神経細胞画像を

複数ウェル分析した結果、各ウェル内において全センサーが必ず細胞で被覆されているとは限らない現状が見いだされ、実際の培養プロトコルでもこれを加味して細胞播種密度を調整したことを確認した。このため、ウェル全体から得られる計測データの妥当性を評価するには、ウェル内のセンサーごとに細胞被覆率がどれだけあるのか、また、センサー以外の領域にある細胞についてもデータに含めた場合に、どこまでそれらの細胞集団情報がウェルとしての細胞応答計測結果に影響を与えるのか、詳細に分析することとした。

このため、本検証では、取得画像から自動的にセンサー突端の領域を自動認識すると共に、画像全体を区画化して認識したセグメンテーションエリアとの相対関係を認識し、1ウェル画像内における細胞不均質性の特徴量と、センサー付近での細胞不均質性の特徴量を別々に計測することが可能な自動区画化アルゴリズムを開発した（図1）。

次に、このアルゴリズムを用いて提供された画像データセットの解析を実施したところ、MEAから得られるデータ特徴量のほとんどは共線性が高い、即ち「計測値は多いがほとんどが同質の情報であり、独立して異なる意味を持つ情報は少ない」ことが分かった。これはある意味、MEA計測データだけでは、複雑な細胞毒性評価をすることが難しいことを示唆している。言い換えれば、MEAデータに加えて、画像から得られる情報までも加えることは、今後のMEAを用いた毒性評価にとって有益であることが示された。

次に、上記の相関解析において、いくつかの細胞画像特徴量に細胞応答（例：Number of Spikes）との相関性が見られたため、これらを抽出してみると、画像からも経験的には認識されていた「細胞被覆の状態の良否」が逆相関関係にあることが初めて明確となった。

逆の視点からは、細胞画像からは複数の特徴量（26種類）が得られるが、各区画の情報ではなく、ウェル全体としてこれらの統計量を積算的に評価した特徴量が、ウェルのMEA細胞応答と強く相関することが見出され、各センサーや、各区画の細胞状態だけを評価しても、ウェルとしての評価性能を正確かつ安定に判定することは難しいことが見出された。もともとは、各センサー付近における細胞状態までを検出・解析することでより高い性能の予測AIの構築ができる可能性を検討していたが、MEAプレートではウェル全体として実際の計測値に影響を与えていることが明確となり、汎用的なAIモデルの構築に非常に重要な知見となった。

次に、上記検討から選抜された画像および、安定かつ独立な情報を有していると考えられた画像特徴量を用いて機械学習モデルを構築した結果、特定のデータでは高い予測性能が発揮されることがわかった。逆に、全く予測性能が発揮されないプレートデータがあり、現状のAIモデルではまた特定のバイアスデータに過学習している可能性が示唆された（図2）。

現在は、このバイアスについて詳細にデータを解析すると共に、新規データの追加について安彦先生にご協力を仰いでいる。

D. 考察

本年度は、解析対象となる詳細な画像データおよびMEA計測データなどのデータセットが得られたため、実データについての統計分析と、機械学習モデル構築に

ついて検証が進んだ。

大きな発見としては、多変量情報と考えられていたMEAの計測Readoutが、想像以上に独立性が無く、画像情報特徴量を今後の予測に応用することの有効性が見出されたことである。

また、現状ではウェル全体における細胞密度の均質性、特に「細胞間隙が多くなると、Number of Spikesは大きく減少する」という傾向が明確化したことは、本研究の目標である、「MPS品質管理のための画像自動検出」と「神経細胞形態変化の指標抽出」に両方近づいた結果であると評価できる。

また、各センサーデータ付近の画像解析も自動的に画像を分割・整理して行える体制を整えたが、残念ながらここまで細胞区画を区分けしても、センサーデータの不良の検出に繋げることは難しいことがわかった。

現在、まだNumber of Spikesの予測モデルの性能が安定していない原因はまだ明らかにできていないが、次年度さらに蓄積される画像・MEAデータセットの解析を行うことで、より安定なAIモデルの開発に繋げることができると考えられた。

E. 結論

本年度の研究を通じて、MEA計測データの弱点の明確化と、MEA計測データの予測が画像情報のみを学習させたAIモデルで一部実現することができた。

今後は、より多くの画像・MEAデータセットでの検証を積み重ね、より汎化性の高いAI開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

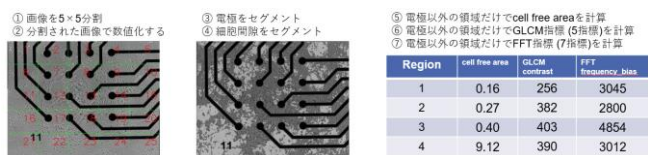


図1：自動MEA区画化アルゴリズムの概要

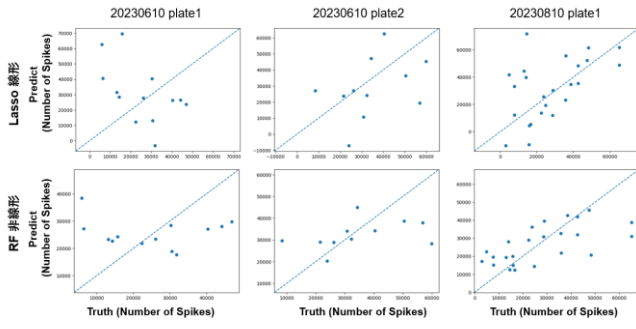


図2: 画像特徴量のみを用いた予測AIモデル(データ別)

化学物質のヒト健康影響を評価するための *in vitro* 代替試験法の実用化に向けた比較・検証研究

研究分担者：鈴木郁郎 東北工業大学工学部 教授

研究要旨

ヒト誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来ニューロンを使用した *in vitro* 微小電極アレイ (MEA) 評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習した AI を用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータ AI は入力パラメータの数値情報となるため、MEA データに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEA データによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、パラメータ AI による神経毒性評価方法の構築と精度検証のために、MEA 上に培養したヒト iPSC 細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、農薬関連化合物および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。バースト関連パラメータのみを用いた毒性予測 AI モデルでは、16 化合物中 14 化合物を正しく毒性予測することができた。今回の検証では 9 つのバースト関連パラメータのみを使用した、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。

A. 研究目的

ヒト誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来ニューロンを使用した *in vitro* 微小電極アレイ (MEA) 評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習した AI を用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータ AI は入力パラメータの数値情報となるため、MEA データに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEA データによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、パラメータ AI による神経毒性評価方法の構築と精度検証のために、MEA 上に培養したヒト iPSC 細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、農薬関連化合物および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。

B. 研究方法

Human iPSC-derived cortical neurons (Neucyte Inc., USA) を 24-well MEA プレート上に培養し、培養 4-5 週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。薬剤は 12 種類の農薬関連化合物と 4 つの陰性化合物を使用した。農薬関連化合物は、Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, Dieldrin, Fenamidone, Fipronil, Lindane, Permethrin, Acetamidiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidin を使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin を使用した。すべての薬剤の溶媒には DMSO を使用した。

取得した細胞外電位からスパイクを検出し、スパイク時系列データのバースト解析を行った。バースト関連パラメータとして、①総発火数、②同期バースト数、③バースト間隔、④バースト持続時間、⑤バースト内発火数、⑥最大発火周波数、⑦最大発火周波数の変動

係数、⑧最大発火周波数点の間隔、⑨最大発火周波数点の間隔の変動係数を算出した。

陰性対照化合物と溶媒データを陰性データ、農薬関連化合物の高濃度を陽性データとして、毒性予測 AI モデルを作成し、学習データの ROC 曲線から毒性判定閾値を決定した。次に、未学習 well のデータに対して、作成した AI による毒性判定を実施し、精度検証を実施した。

C. 研究結果

作成した毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線を図 1 に示す。ROC 曲線の AUC は 0.91 であり、学習した化合物の毒性判定を高い精度で実現していることが示された。学習データに対する判定精度が最も高くなる positive score = 0.585 を毒性判定閾値として決定した。

作成した毒性予測 AI モデルによる未学習 well に対する毒性判定結果を図 2、図 3 に示す。前述のとおり、positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用すると、すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定することができた。農薬関連化合物については、Acetamidiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した為、毒性判定を実施できなかった。

毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果表を図 4 に示す。前述の Clothianidin, Fipronil ではいずれの濃度においても毒性判定されなかったものの、その他の化合物では、同期バースト発火の消失も毒性とみなすことで濃度依存的に毒性判定されていることが示された。結果として、陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物を正しく毒性予測することができた。

D. 考察

バースト関連パラメータのみを用いた毒性予測AIモデルでは、16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。今回の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。パラメータAIは入力がパラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含む統合的な毒性評価が可能となり、評価対象とできる化合物範囲が非常に広がることを推測できる。今後はMEAデータ以外の評価系パラメータを含む統合的な毒性評価AIの構築を目指す。また、他施設で取得したMEAデータを本研究で構築したパラメータAIに入力し、毒性予測結果の再現性を検証すると共に、複数施設で構築したデータベースを学習したパラメータAIを作成し、本研究のAIと毒性予測の精度を比較する。

E. 結論

本研究により、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークのバースト関連パラメータを用いた毒性予測AIモデルの化合物毒性予測法としての有効性が示唆された。パラメータAIの特性上、複数の評価系データを学習することができるため、MEAデータ以外の評価系パラメータを含む統合的な毒性評価AIの構築に期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki, Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array, *Toxicology in Vitro*, 93:105668

2. 著書

1. 鈴木郁郎 『動物実験代替法とNew approach Methodologiesの開発・利用動向』【第IV編 農薬業界】第4章 発達神経毒性評価 2023年 シーエムシー出版

2. 学会発表

1. I. Suzuki, Y. Ishibashi, N. Nagafuku, MEA assessment for neurotoxicity of pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons, EuroTox 2023, 9/10-13, Slovenia
2. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEAデータを用いた殺虫剤の神経毒性評価, 第50回日本毒性学会学術年会
3. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, MEAシステムによる痙攣化合物および殺虫剤の神経毒性評価と作用機序推定, 第6回医薬品毒性機序研究会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

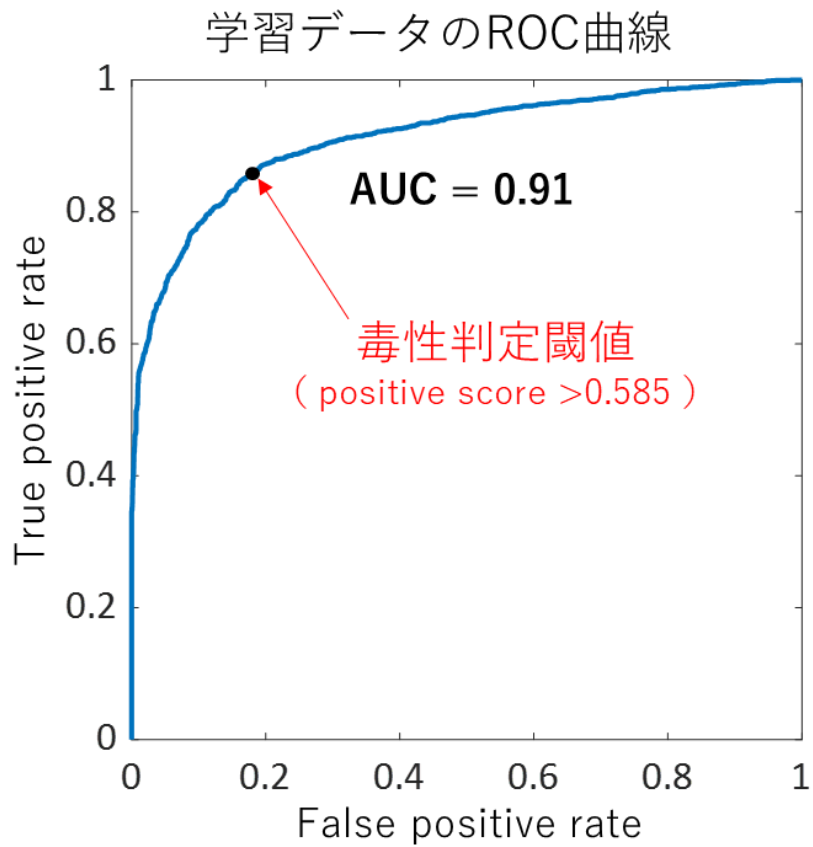
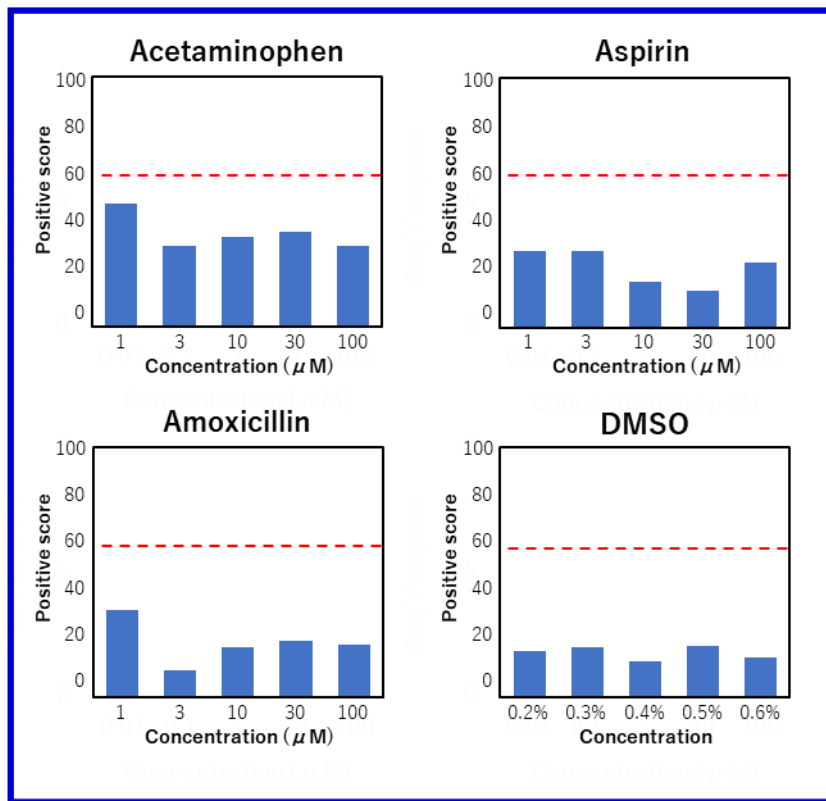


図 1. 毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線
学習データに対する判定精度が最も高くなる positive score = 0.585 を毒性判定閾値として決定した。

陰性対照化合物



--- : 毒性ライン

図 2. 毒性予測 AI モデルによる陰性対照化合物に対する毒性判定結果
Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定された。

農薬関連化合物

- - - : 毒性ライン
※ : バースト消失

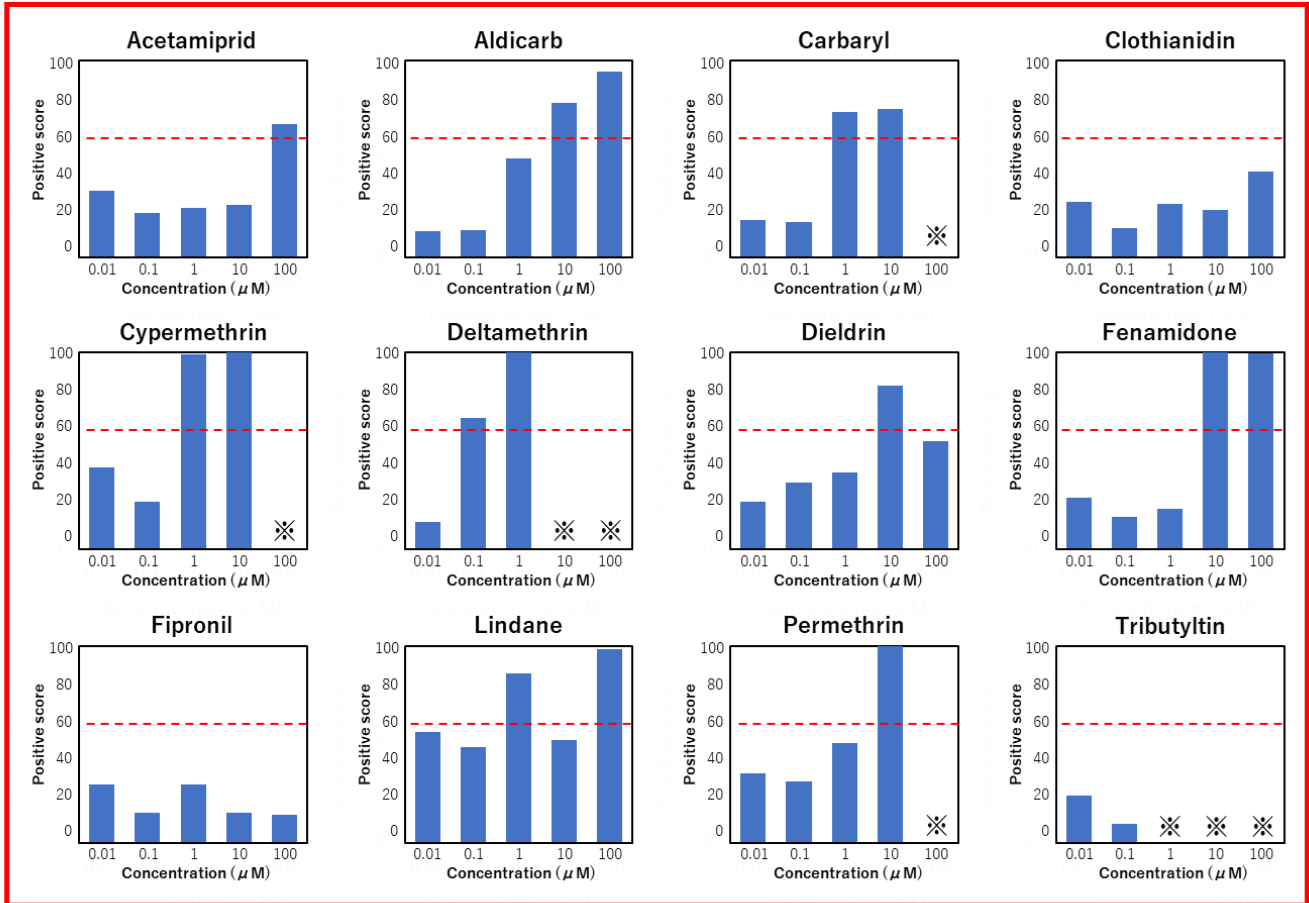


図 3. 毒性予測 AI モデルによる農薬関連化合物に対する毒性判定結果
Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。Acetamidrid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した。

	Concentration (μM)				
	0	0.1	1	10	100
Acetamiprid	■	■	■	■	■
Clothianidin	■	■	■	■	■
Aldicarb	■	■	■	■	■
Carbaryl	■	■	■	■	—
Fipronil	■	■	■	■	■
Deildrin	■	■	■	■	■
Lindane	■	■	■	■	■
Cypermethrin	■	■	■	■	—
Deltamethrin	■	■	■	—	—
Permethrin	■	■	■	■	—
Tributyltin	■	■	—	—	—
Fenamidone	■	■	■	■	■

■ 毒性なし ■ 毒性あり
■ 同期バースト消失

図 4. 毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果

陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物が正しく毒性予測された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（課題番号：22KD1002）

令和5年度研究成果報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

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 教授

研究要旨

本分担研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的とし、OECDと共有している化学物質のリストをもとに動物実験による神経毒性評価を行う。対象物質はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム (NaF)と過塩素酸アンモニウム (AP)及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の1つであるイミダクロプリド(IMI)として、ラットを用いて妊娠6日目から分娩後21日目まで発達期曝露を行い、児動物の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する。今年度はNaFとAPの発達期曝露結果について報告する。文献データを参考に、NaFは0, 30, 100 ppm、APは0, 300, 1000 ppmの濃度で飲水投与した。NaF曝露では、生後21日目に100 ppmでtype-3 神経前駆細胞 (NPC)の減少、type-1 神経幹細胞 (NSC)とtype-2a NPCの代償的増加を示した。歯状回門部においては、GluR2⁺である苔状細胞の用量依存的な増加傾向を示し、NaF曝露が代償的な神経新生反応への関与が示唆された。また、NaFは用量依存的にARC⁺顆粒細胞数を増加させ、100 ppmで歯状回の*Ptgs2*の転写産物レベルを増加させたことから、顆粒細胞のシナプス可塑性の増加が示唆された。100 ppm NaFでは顆粒細胞系譜指標遺伝子 (*Nes*, *Eomes*, *Rbfox3*)と抗アポトーシス遺伝子 (*Bcl2*)の発現上昇を示し、神経新生障害に対する保護機構が示唆された。更に、100 ppm NaFでは酸化リン酸化関連遺伝子 (*Atp5f1b*と*Sdh*)が発現低下し、解糖関連遺伝子 (*Hk3*)が発現上昇したことから、神経新生細胞での代謝シフトが示唆された。成熟時の生後77日目になると、顆粒細胞系譜の変化はもはや検出されなくなり、GABA作動性介在ニューロンの指標遺伝子 (*Calb2*と*Reln*)が発現上昇したことから、顆粒細胞系譜での保護反応の持続が示唆された。以上より、NaFの発達期曝露は海馬神経新生を一過性に抑制し、その代償反応として代謝シフトを誘導することが示唆された。AP曝露では生後21日目には、1000 ppmで血清T3及びT4濃度が低下し、300 ppm以上で甲状腺濾胞上皮細胞が過形成を示した。海馬神経新生では、300 ppm以上で神経新生細胞の増殖抑制によりtype-1 NSCとtype-2a NPCが減少した。更に、1000 ppmではSST⁺ GABA作動性介在ニューロンの増加とARC⁺顆粒細胞の減少傾向が観察された。歯状回門部ではCNPase⁺成熟オリゴデンドロサイト(OL)の数が減少した。生後77日目では甲状腺の変化は消失したが、1000 ppmではNSCsの減少とSST⁺介在ニューロンの増加が持続し、CCK⁺介在ニューロンが増加し、白質組織面積が減少した。以上より、AP発達期曝露により曝露終了時に甲状腺機能低下症が誘発され、それによる海馬の神経新生抑制（神経新生の初期過程を標的とした抑制と、介在ニューロンの代償性反応を伴う顆粒細胞のシナプス可塑性の低下）とOLの成熟抑制が示唆された。成体期になっても神経新生抑制は持続し、白質の低形成も明らかになった。観察された脳の変化は発達期甲状腺機能低下症によるものと類似しており、APによる発達神経毒性は甲状腺機能低下症に起因する可能性が示唆された。

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動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性評価を行う。

神経発達には神経幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖・分化、移動、成熟の各段階から構成され、神経細胞系譜が標的となる発達神経毒性ではこれらの過程のいずれかが障害を受ける。神経新生はそれら全ての発達過程を含むため、生後に始まる海馬の神経新生は様々な発達神経毒性物質の発達期曝露に対して感受性を示す可能性が高い。また、成体でのニューロンの生存や維持に関わる分子機序には、神経発達における神経突起やシナプスの形成、髄鞘形成の機序と共通する部分が多い。そのため、成熟神経に対する毒性物質は発達神経毒性を示す可能性がある。

令和4年度はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム(NaF)と過塩素酸アンモニウム

(AP)及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の1つであるイミダクロプリド(IMI)についてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討を開始した。令和5年度はNaFとAPの発達期曝露結果について報告する。

B. 研究方法

動物への曝露実験として、OECDの発達神経毒性試験ガイドライン426に準じ、妊娠SDラット（妊娠1日で入手、日本エスエルシー）に対して、一群あたり12匹ずつとして、妊娠6日目から分娩後21日目までの期間、NaFは0, 30, 100 ppm、APは0, 300, 1000 ppmの濃度で飲水投与した。NaFの最高用量は、過去の文献報告をもとに、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定した。APの最高用量は文献データを参考に母動物と児動物に甲状腺機能低下を誘発することが知られて

いる用量とした。本実験では、出生後4日目に間引きを行い、各母動物に8匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は1日1回観察し、体重、摂餌量及び摂水量を週に2回の頻度で測定した。出生後21日目(離乳時; PND 21)に児動物の半数を解剖に供した。各群10匹以上の雄児動物を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、遺伝子発現解析に供した。AP曝露実験では、血清甲状腺ホルモン測定及び甲状腺組織の病理組織学的評価のため、各群12匹の雌児動物についてCO₂/O₂麻酔下で腹部大動脈から採血し、甲状腺組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。更に各群6匹以上の雄(NaF)ないし雌(AP)の児動物について脳内酸化ストレス(MDA)値の測定のため、生理食塩水にて灌流固定を行い、海馬を採材した。

残り半数の児動物はPND 77まで被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を1日1回観察し、体重を週に1回の割合で測定した。PND 77に各群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、遺伝子発現解析に供した。AP曝露実験では、甲状腺組織の病理組織学的評価のため、各群8匹の雌児動物について甲状腺組織を摘出・固定した。

PND 21とPND 77の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, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN)、介在ニューロンの指標(CCK, SST, RELN, PVALB, CALB2, GAD67)、苔状細胞の指標(GluR2)、細胞増殖活性の指標(PCNA)、アポトーシスの指標(TUNEL)、神経可塑性の指標(p-ERK1/2, ARC, FOS, COX2)、ミクログリア指標(Iba1, CD68, CD163)、及びAP曝露実験では、オリゴデンドロサイト(OL)系譜指標(OLIG2, NG2, CNPase)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。

PND 21とPND 77のメタカーン固定脳を用いて、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た。その後、採取組織からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現解析を実施した。即ち、RNeasy[®]ミニキット(Qiagen)を用いて、0-ppm対照群と最高用量群の歯状回組織からtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAの濃度と純度を測定し、6 ng/µLのcDNAをSuperScript[™] III First-Strand Synthesis System(Thermo Fisher Scientific Inc.)にて合成した。Il6以外のプライマー配列はPrimer Express(ver.

3.0; Thermo Fisher Scientific Inc.)またはPrimer-BLASTツール(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を用いて設計した。Il6のプライマー配列は、以前の研究で報告されたものを用いた。全てのリアルタイムRT-PCRは、1 µlのcDNAと19 µlのPower SYBR[®] Green PCR Master mix [10 µl Power SYBR[®] Green(Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 µlのプライマー(forwardとreverse), 8.2 µl UltraPure[™] Distilled Water(Thermo Fisher Scientific Inc.)]を含む20 µlの全量で、StepOnePlus[™] Real-time PCR System(Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて行った。PCRサイクル条件は、95°Cで10分間の初期変性、95°Cで15秒間の変性、60°Cで1分間のプライマーアニーリング、メルトカーブステップからなる40回の増幅サイクルとした。最高用量群の0-ppm対照群に対する曝露群の相対的な転写産物レベルは、同じサンプルの内因性対照遺伝子として用いたglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Gapdh)またはhypoxanthine phosphoribosyltransferase 1(Hprt1)の閾値サイクル(C_T)値を用いて正規化した。その後、2^{-ΔΔC_T}法によりコントロールC_T値に対する相対値を算出し、値を補正した。

PND 21の海馬における脂質過酸化レベルは、Lipid Peroxidation(MDA) Assay Kit(Abcam plc)を用いたチオバルビツール酸法により測定し、チオバルビツール酸反応性物質の蓄積を測定し、malondialdehyde(MDA)レベルとして表した。海馬組織サンプルは、TissueLyser II(Qiagen)を用いて溶解バッファーで溶解し、13,000×gで10分間遠心分離して上清を分離し、その後の分析に用いた。MDA-チオバルビツール酸付加物をn-ブタノールを用いて抽出し、サンプルの吸光度をマルチ検出マイクロプレートリーダー(Powerscan[®] HT)を用いて532 nmで分光光度計により測定した。各組織溶解液中のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用して推定し、サンプル中のMDA濃度(nmol/mg組織タンパク質)の標準化を行った。

PND 21の海馬のグルタチオンレベルもGSSG/GSH定量キット(GSSGはグルタチオンジスルフィド、GSHは還元型グルタチオン、同仁堂研究所)を用いて測定し、還元型と酸化型の比で表した。海馬組織を5%5-アミノサリチル酸溶液で溶解し、ホモジネートを8000×gで10分間遠心分離した後、上清をキットの手順に従って分析に用いた。サンプルの吸光度は、Powerscan[®] HTマイクロプレートリーダーで405 nmで分光光度計により測定した。GSH濃度は、測定した総グルタチオン濃度とGSSG濃度から算出した。

AP曝露実験では、PND 21の雌の児動物(N=12/群)において、甲状腺ホルモンの血清濃度を測定した。血清検体はT3及びT4 ELISAキット(Cusabio Technology LLC)のプロトコールに従って処理し、Varioskan LUX Multimode Microplate Reader(Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、600 nmを補正波長として450 nmの吸光度を分光光度計で測定した。

AP曝露実験では、PND 21(N=12/群)とPND 77(N=8/群)の雌動物から甲状腺を摘出し、中性緩衝10%ホルマリン(pH 7.4)で一晩固定した。翌日、固定した組織

をトリミングし、パラフィン包埋処理し、病理組織学的評価のためのヘマトキシリン・エオジン染色及び濾胞上皮の細胞増殖評価のための PCNA 免疫組織化学染色を実施した。

統計分析に関連して、数値データは平均値 \pm SD で示した。母動物の体重、摂餌量、摂水量、及び臓器重量は、個体単位を実験単位として解析した。児動物の体重及び臓器重量、各抗原に対する免疫反応細胞数、TUNEL⁺アポトーシス細胞数、酸化ストレスレベル、血清甲状腺ホルモンレベルに関するデータは、同腹仔グループを実験単位として解析した。0-ppm 対照群と各処置群間の有意差は以下のように評価した。データは分散の均質性について Levene の検定を用いて分析した。分散が均一であれば、数値データは Dunnett 検定を用いて評価した。不均一なデータについては、ボンフェローニ補正を伴う Aspin-Welch's の *t* 検定を適用した。2 つの標本群からなる数値データは、群間で分散が均一な場合は Student's の *t* 検定を用いて分析し、データが不均一な場合は Aspin-Welch's の *t* 検定を行った。甲状腺の病理組織学的変化の評価については、各病変の発生率と重症度をそれぞれ Fisher の正確検定と Mann-Whitney の *U* 検定で評価した。多重比較の場合は 0-ppm 対照群と各治療群との間で、2 群間比較の場合は 0-ppm 対照群と 1000-ppm 群との間で比較を行った。すべての分析は、IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) を用い、 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

(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

<NaF 曝露実験>

・NaF-1 母体パラメータ

100-ppm NaF 群の 1 頭の母動物は出産しなかったため、実験から除外した。従って、0, 30, 100 ppm 群の有効母動物数はそれぞれ 12, 12, 11 匹であった。生殖パラメータ、すなわち着床部位数、出産時生仔数、雄児動物比はいずれの NaF 群においても数値に変化は見られなかった (Supplementary Table 1)。動物実験期間中、いずれの NaF 群においても体重及び摂餌量に有意差は認められなかった (Fig. 1A 及び B)。摂水量は、30 ppm 群では GD 7, GD 10, GD 17 及び PND 2 で、100 ppm 群では GD 7, GD 10 及び PND 6 で有意に増加した (Fig. 1C)。いずれの NaF 群でも母動物の歩行や行動に異常は見られなかった。また、娩出後 21 日目の剖検では、いずれの NaF 群でも母動物の体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 2)。

平均摂水量に基づくと、母動物あたりの NaF の 1 日摂取量は、30 及び 100 ppm 群は、妊娠期間中、それぞれ 4.0 及び 13.0 mg NaF/kg 体重/日であった。泌乳期

間中では、30 及び 100 ppm 群の母動物はそれぞれ 6.6 及び 21.3 mg NaF/kg 体重/日を消費した。

・NaF-2 雄児動物の実験期間内パラメータ及び剖検データ

生後期間中の児動物の体重及び離乳後の摂餌・摂水量はいずれの NaF 群においても変化しなかった (Supplementary Fig. 1)。PND 21 の剖検では、いずれの NaF 群でも体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 3)。PND 77 の剖検では、脳重量は 30 ppm 群で有意に増加したが、体重はいずれの NaF 群でも変化しなかった。いずれの曝露群においても、PND 21 の剖検前及び離乳後の歩行や行動に異常は認められなかった。

・NaF-3 雄児動物の歯状回における免疫染色陽性細胞数及びアポトーシス細胞数

・NaF-3.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜

PND 21 において、SGZ における type-1 NSCs の指標である GFAP 及び type-1 NSCs と type-2a NPCs の指標である SOX2 の免疫染色陽性細胞数は、100 ppm NaF 群で有意に増加した (Fig. 2, Supplementary Table 4)。SGZ における type-2b NPC の指標である TBR2、未成熟顆粒細胞の指標である TUBB3、未成熟及び成熟顆粒細胞の指標である NeuN の免疫染色陽性細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変動をしなかった。

PND 77 では、GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数、DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数、NeuN⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化をしなかった (Fig. 2, Supplementary Fig. 2, Supplementary Table 5)。

・NaF-3.2 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロン数と苔状細胞数

PND 21 と PND 77 のいずれにおいても、PVALB⁺介在ニューロン、RELN⁺介在ニューロン、CALB2⁺介在ニューロン、SST⁺介在ニューロン、GAD67⁺介在ニューロン、CCK-8⁺介在ニューロン、GluR2⁺苔状細胞の数は、NaF 群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった (Fig. 3, Supplementary Fig. 3, Supplementary Table 4 及び 5)。

・NaF-3.3 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

PND 21 において、ARC⁺細胞数は 100 ppm NaF 群で有意に増加したが、FOS⁺細胞数、COX2⁺細胞数、p-ERK1/2⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化はなかった (Fig. 4, Supplementary Table 4)。PND 77 では、ARC⁺細胞数と COX2⁺細胞数は 30 ppm NaF 群で有意に増加したが、FOS⁺細胞数と p-ERK1/2⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化は認められなかった (Fig. 4, Supplementary Fig. 4, Supplementary Table 5)。

・NaF-3.4 SGZ 及び/または GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

PND 21 及び PND 77 のいずれにおいても、SGZ に

における PCNA⁺陽性細胞数及び TUNEL⁺細胞数は、いずれの NaF 群においても有意な変化は認められなかった (Fig. 5, Supplementary Fig. 5, Supplementary Table 4 及び 5)。

・NaF-3.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

PND 21 では、GFAP⁺アストロサイト、Iba1⁺ミクログリア、CD68⁺ミクログリア、CD163⁺ミクログリアの数はいずれの NaF 群でも有意な変化はなかった (Fig. 6, Supplementary Table 4, Supplementary Fig. 6)。PND 77 では、CD163⁺細胞数は 100 ppm NaF 群で有意に増加したが (Fig. 6, Supplementary Fig. 7, Supplementary Table 5)、GFAP⁺アストロサイト数、Iba1⁺ミクログリア数、CD68⁺ミクログリア数はいずれの NaF 群でも有意な変化を示さなかった。

・NaF-4 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 及び PND 77 における歯状回の転写産物レベルについて、100 ppm NaF 群と無処置対照群を比較したリアルタイム RT-PCR の結果をそれぞれ Table 1 及び Table 2 に示す。PND 21 において、顆粒細胞系譜指標遺伝子のうち *Nes* の転写産物レベルは、*Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Eomes* と *Rbfox3* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm の NaF で有意に増加した。シナプス可塑性関連遺伝子に関しては、*Ptgs2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正常化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。アポトーシス関連遺伝子に関しては、*Bcl2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Sod1* の転写産物レベルは *Gapdh* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。解糖関連遺伝子に関しては、*Hk3* の転写産物レベルは *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。酸化的リン酸化 (OXPHOS) 関連遺伝子に関しては、*Atp5f1b* の転写産物レベルは *Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。*Sdhd* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。GABA 作動性介在ニューロン指標遺伝子、ニューロトロフィン関連遺伝子、細胞増殖指標遺伝子、グルタミン酸受容体・トランスポーター関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子のいずれについても、転写産物レベルの有意な変化は観察されなかった。

PND 77 において、顆粒細胞系指標遺伝子に関しては *Gapdh* で正規化した後、100 ppm の NaF で *Nes* の転写産物レベルが有意に増加した。GABA 作動性介在ニューロンの指標遺伝子に関しては、*Calb2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Reln* の転写産物レベルは、*Gapdh* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。ケミカルメディエーター遺伝子に関しては、*Il18* の転写産物レベルは *Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Il6* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm の NaF で有意に減少

した。ニューロトロフィン関連遺伝子、細胞増殖指標遺伝子、シナプス可塑性関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、解糖関連遺伝子、OXPHOS 関連遺伝子のいずれにも有意な変化は認められなかった。

・NaF-5 海馬の酸化ストレスレベル

PND 21 において、海馬の MDA 及び GSH 濃度は、いずれの NaF 群においても有意な変化を示さなかった (Supplementary Table 6)。

<AP 曝露実験>

・AP-1 母体パラメータ

0 ppm の対照群では 2 匹の母動物が出産しなかった。300 ppm では、1 匹の母動物は出産せず、2 匹の母動物は出産時に出生児の全てが死亡した。従って、0 ppm 対照群、300 ppm 群、1000 ppm 群の有効母動物数はそれぞれ 10, 9, 11 であった。動物実験中、母動物の歩行や行動に異常は見られなかった。実験期間中、どの曝露群でも体重と摂餌量に変化はなかった (Fig. 7A 及び B)。水消費量は 300 ppm では GD 7 に、1000 ppm では GD 7 と GD 21 に有意に増加した (Fig. 7C)。繁殖パラメーター (子宮内着床部位数、出産時生仔数、及び雄児動物比) は、0 ppm の対照群と各曝露群の間で変化しなかった (Supplementary Table 7)。分娩後 21 日目の剖検では、どの曝露群も 0-ppm 対照群と比較して体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 8)。

・AP-2 雄児動物の生体パラメータ及び剖検データ

授乳期及び離乳後 PND 77 までの期間中、どの曝露群でも歩行や行動に異常は観察されなかった。PND 77 までの生後期間中、どの投与群でも児動物の体重、摂餌量、飲水量に変化は観察されなかった (Supplementary Fig. 8)。PND 21 及び PND 77 の剖検では、どの曝露群でも児動物の体重及び脳重量に変化は観察されなかった (Supplementary Table 9)。

・AP-3 雌児動物における血清甲状腺ホルモン濃度と甲状腺病理組織学的検査

PND 21 の剖検では、両曝露群とも肉眼観察で甲状腺組織の腫大が認められた。病理組織学的に甲状腺組織は両曝露群で濾胞上皮細胞の過形成と濾胞コロイドの減少を示した。これらの所見の発現率及び重症度は、AP の両用量で有意に増加した (Fig. 8A, Supplementary Table 10)。血清中甲状腺ホルモン濃度は用量依存的に T3 及び T4 濃度の低下を示し、1000 ppm で統計学的に有意な差がみられた (Fig. 8B, Supplementary Table 11)。全濾胞上皮細胞あたりの PCNA⁺細胞の割合は用量依存的に増加し、1000 ppm で統計的に有意な差がみられた (Fig. 8C, Supplementary Table 10)。

PND 77 の剖検では、肉眼的観察では両曝露群とも甲状腺腫大は認められなかった。病理組織学的には、いずれの曝露群でも病理組織学的所見は認められなかった (Supplementary Fig. 9, Supplementary Table 10)。PCNA⁺細胞の割合も AP 曝露によって変化しなかった

(Supplementary Fig. 9, Supplementary Table 10)。

・AP-4 雄児動物の歯状回における免疫染色陽性細胞数及びアポトーシス細胞数

・AP-4.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜
PND 21 において、SGZ の GFAP⁺細胞数は用量依存的に減少し、1000 ppm で統計学的に有意な差が認められた (Fig. 9, Supplementary Table 12)。SGZ の SOX2⁺細胞数及び TBR2⁺細胞数、SGZ 及び/または GCL の DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数は、いずれの曝露群においても有意な変化は認められなかった。

PND 77 では、SGZ の GFAP⁺細胞数は用量依存的に減少し、1000 ppm で統計学的に有意差が認められた (Fig. 9, Supplementary Fig. 10, Supplementary Table 13)。SGZ の SOX2⁺細胞数及び TBR2⁺細胞数、SGZ 及び/または GCL の DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数、NeuN⁺細胞数は、いずれの曝露群においても有意な変化は認められなかった。

・AP-4.2 SGZ 及び/または GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

PND 21 では、PCNA⁺細胞数は両投与群で有意に減少した (Fig. 10, Supplementary Table 12)。TUNEL⁺細胞の数は、いずれの曝露群でも有意な変化はなかった。

PND 77 では、PCNA⁺細胞数及び TUNEL⁺細胞数は、いずれの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 10, Supplementary Fig. 11, Supplementary Table 13)。

・AP-4.3 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロン数と苔状細胞数

PND 21 において、SST⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で有意に増加した (Fig. 11, Supplementary Table 12)。CCK⁺、RELN⁺、PVALB⁺、CALB2⁺、GAD67⁺介在ニューロンの数と GluR2⁺苔状細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 11, Supplementary Fig. 12, Supplementary Table 12)。

PND 77 では、CCK⁺及び SST⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で有意に増加した (Fig. 11, Supplementary Fig. 13, Supplementary Table 13)。RELN⁺、PVALB⁺、CALB2⁺、GAD67⁺介在ニューロンの数と GLUR2⁺苔状細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった。

・AP-4.4 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

PND 21 と PND 77 のいずれにおいても、p-ERK1/2⁺、FOS⁺、ARC⁺、COX2⁺成熟顆粒細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった (Fig. 12, Supplementary Fig. 14, Supplementary Table 12 と 13)。

・AP-4.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

PND 21 及び PND 77 のいずれにおいても、GFAP⁺アストロサイトの数、及び Iba1⁺、CD68⁺、CD163⁺ミクログリア/マクローファージの数は、いずれの投与群においても有意に変化しなかった (Fig. 13, Supplementary Fig. 15, Supplementary Table 12 及び 13)。

・AP-4.6 歯状回門部における OL 系譜

PND 21 において、OLIG2⁺ OL 系譜細胞と NG2⁺ OPCs の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった (Fig. 14, Supplementary Table 12)。CNPase⁺ OL 細胞数は、AP の両曝露群で有意に減少した。

PND 77 では、OLIG2⁺ OL 系譜細胞、NG2⁺ OPC、CNPase⁺ OL の数は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 14, Supplementary Fig. 16, Supplementary Table 13)。

・AP-5 GCL、歯状回門部、及び脳梁とそれに隣接する帯状束の領域の定量

PND 21 では、GCL と歯状回門部の面積、及び脳梁と隣接する帯状束の合計の面積は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 15, Supplementary Fig. 17, Supplementary Table 14)。

PND 77 では、GCL と歯状回門部の面積はどの曝露群でも有意な変化はなかった (Supplementary Table 14)。一方、脳梁とそれに隣接する帯状束の合計面積は、AP 群で用量に関連した減少を示し、1000 ppm で統計的に有意な差が認められた (Fig. 15, Supplementary Table 14)。

・AP-6 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 及び PND 77 における 1000 ppm 群と 0 ppm 群の遺伝子の相対転写産物レベルをそれぞれ Table 3 及び Table 4 に示す。

PND 21 において、GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子のうち、*Pdgfrb* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した (Table 3)。神経栄養因子関連遺伝子では、*Ntrk2* の転写産物レベルが 1000-ppm AP で有意に増加した。神経幹細胞/前駆細胞制御遺伝子のうち、*Efnb3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。NPC/神経芽細胞増殖関連遺伝子のうち、*Vegfa* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経細胞移動関連遺伝子のうち、*Arhgef2* と *Robo3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経分化関連遺伝子では、*Baiap2* の転写産物レベルが 1000-ppm AP で有意に増加した。グルタミン酸受容体及びトランスポーターをコードする遺伝子のうち、*Gria2*、*Gria3* 及び *Grin2b* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。顆粒細胞系譜指標遺伝子、シナプス可塑性指標遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子、グリア細胞指標遺伝子、OL 系譜関連遺伝子、髄鞘形成関連遺伝子のいずれの転写産物レベルも、1000-ppm AP で有意な変化は見られなかった。

PND 77 では、顆粒細胞系譜指標遺伝子のうち、*Nes* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した (Table 4)。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子のうち、*Pdgfrb* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経幹細胞/前駆細胞制御遺伝子のうち、*Notch1*、*Dll4*、*Thrsp* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。NPC/神経芽細胞増殖関連遺伝子の

うち、*Fzd9* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経細胞移動関連遺伝子のうち、*Sema3c* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に減少し、*Robo3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。酸化ストレス関連遺伝子のうち、*Gpx1* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に減少した。神経栄養因子関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、シナプス可塑性指標遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子、グルタミン酸受容体・輸送体遺伝子、グリア細胞指標遺伝子、OL 系列関連遺伝子、髄鞘形成関連遺伝子の転写産物レベルは、いずれも 1000-ppm AP で有意な変化は見られなかった。

・ AP-7 雌児動物における海馬の MDA と GSSG/GSH レベル

PND 21 において、海馬の MDA 及び GSSG/GSH レベルは、いずれの投与群においても有意な変化は認められなかった (Supplementary Table 15)。

D. 考察

<NaF 曝露実験>

本研究では、NaF を 100 ppm (F-として 45 ppm) 含む脱イオン水中のフッ素濃度は 44 ppm と測定され、調製後 7 日目の室温で安定であった。ラットやマウスで 100 ppm の NaF に発達期から曝露後、海馬の神経毒性とそれに関連する行動異常を示す報告がいくつかある。しかし、これらの研究では、母動物や児動物への毒性影響は報告されていない (Li et al., 2022; Sun et al., 2018; Shivarajashankara et al., 2002)。NaF を妊娠期 1 日目から分娩後 22 日目まで飲料水中に 20 ppm で持続曝露すると、母動物は分娩後 30 日目まで、児動物は生後 30 日目で体重と脳重量が減少し、生後 21 日目と生後 30 日目で運動活性が抑制された (Kumar et al., 2020)。しかし、本研究では、母体が NaF に 30 ppm 及び 100 ppm の用量で曝露しても、母体や児動物の実験気管内パラメータや剖検パラメータには影響を与えなかった。投与期間中、NaF 群では飲水量の散発的な増加が認められたのみであった。児動物は生後 77 日目の剖検で 30 ppm でのみ脳重量の増加を示した。これらの結果から、本研究の実験条件下では、飲料水中に 100 ppm までの NaF 曝露を行っても、母動物や児動物に明らかな毒性は認められないことが示唆された。

本研究において、100 ppm の NaF 曝露は、生後 21 日目において顆粒細胞系譜のうち GFAP⁺細胞と SOX2⁺細胞数を増加させた。海馬の神経新生ニッチでは、GFAP⁺細胞は type-1 NSCs であり、SOX2⁺細胞は type-1 NSCs と type-2a NPCs であり (Garcia et al., 2004; Zhao et al., 2008)、100 ppm の NaF は離乳期の発達曝露終了時に type-1 NSCs と type-2a NPCs を増加させたことが示唆された。また、変化は統計学的に有意ではなかったが、この時期の DCX⁺細胞、すなわち type-2b 及び type-3 NPCs と未熟顆粒細胞の数が用量依存的に減少する傾向が観察された。TBR2⁺細胞、すなわち type-2b NPC や TUBB3⁺細胞、すなわち未熟顆粒細胞の数に変化がないことから (Hodge et al., 2008; von Bohlen Und Halbach, 2007)、これらの結果は、100 ppm

の NaF 曝露が離乳期に type-3 NPC を減少させた可能性を示唆している。また、離乳期における type-1 NSCs と type-2a NPCs の増加は、type-3 NPCs の減少に対する代償反応である可能性も示唆された。SGZ の細胞の増殖とアポトーシスはこの時点では影響を受けなかったため、顆粒細胞系譜細胞のこれらの変化は離乳前の NaF 曝露中に生じたのかもしれない。歯状回における NSC 指標である *Nes* (Mignone et al., 2004)、TBR2 をコードする *Eomes* (Mihalas and Hevner, 2017)、NeuN をコードする *Rbfox3* (Darnell, 2013)、内因性アポトーシス経路の抗アポトーシス遺伝子である *Bcl2* (Leber et al., 2007) の転写レベルの増加は、神経新生の障害に応答した神経保護機構の誘導を示唆している。生後 77 日目における顆粒細胞系譜の免疫組織化学的解析から、発達期の NaF 曝露による神経毒性作用は成体期には回復していることが示唆された。

本研究では、歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロンの各集団及び GluR2⁺グルタミン酸作動性苔状細胞の免疫組織化学的解析を行ったが、GluR2⁺細胞数が用量依存的に増加する傾向を示した以外は、生後 21 日目における有意な変化は認められなかった。苔状細胞は、マウスの海馬における成体神経新生時の NSC 活性を制御することが示唆されている (Yeh et al., 2018)。このことは、NaF への発達期の曝露が、神経新生ニッチにおいて type-1 NSCs と type-2a NPCs を増加させたという今回の所見と一致する。生後 77 日目において、GABA 作動性介在ニューロンの亜集団と GluR2⁺グルタミン酸作動性苔状細胞の免疫組織化学的解析では、NaF 曝露後の有意な変化は認められなかった。しかし、CALB2 をコードする *Calb2* と RELN をコードする *Reln* の転写レベルは NaF 曝露後に増加した。歯状回の CALB2⁺介在ニューロンは他の抑制性 GABA 作動性介在ニューロンと相互接続しており (Gulyás et al., 1996)、また *Calb2* ノックアウトマウスは SGZ の NPC 増殖を抑制することが示されている (Todkar et al., 2012)。また、RELN を発現する介在ニューロンは type-1 NSCs の増殖を制御することから (Sibbe et al., 2015)、生後 77 日目において認められた *Reln* の発現低下は、生後 21 日目における type-3 NPCs の減少に対する神経保護反応の一部かもしれない。

これまでの研究から、海馬における NaF 誘発神経毒性のメカニズムには、酸化ストレス、神経炎症、シナプス可塑性の変化、ミトコンドリア機能異常の関与が示唆されている (Bartos et al., 2018; Ferreira et al., 2021; Yang et al., 2018)。例えば、成体ラットにおける NaF 曝露は、海馬において炎症性サイトカインの分泌とミクログリアの活性化を誘発し、それに伴ってシナプス可塑性が低下する (Yang et al., 2018)。本研究では、酸化ストレス関連パラメータを解析した結果、NaF 曝露は生後 21 日目における歯状回の MDA 濃度や GSH 濃度を変化させなかった。しかし、スーパーオキシドジスムターゼ 1 をコードする抗酸化遺伝子である *Sod1* (Sikandner et al., 2017) の転写産物レベルは、この時点で NaF 曝露により低下した。これらの結果は、NaF 曝露が抗酸化防御機構を障害し、酸化ストレスに対する脆弱性を増大させることを示唆している。

神経炎症関連パラメータを解析した結果、生後 21 日目に 100 ppm の NaF に曝露した後では、歯状回門部のグリア細胞集団の数や歯状回の炎症性サイトカイン遺伝子の転写産物レベルに変化はなかった。しかし、生後 77 日目において、100 ppm の NaF は CD68⁺ミクログリアの数には影響を与えずに、CD163⁺ミクログリアの数を増加させた。CD163 は活性化された M2 ミクログリア/末梢マクロファージの指標であり、抗炎症作用を有する (Zhang et al., 2012)。CD68 は活性化された M1/M2 ミクログリアと末梢マクロファージの両方に発現する (Walker and Lue, 2015)。ことから、本研究における CD163⁺ミクログリアの増加は、生後 21 日目における酸化ストレスに対する脆弱性の増加に対する防御機構として、抗炎症反応の誘導を示唆している。さらに、生後 77 日目では、M1 型炎症性ミクログリアによって産生される炎症性サイトカイン遺伝子である *Il6* の転写産物レベルの低下 (Tang and Le, 2016) が観察され、炎症性反応と抗炎症性反応の両方に作用する強力なサイトカイン遺伝子である *Il18* の転写産物レベルの上昇が観察された (後者は M2 型抗炎症性ミクログリアの活性化を引き起こす) (Alboni et al., 2010; Tang and Le, 2016)。これらの結果は、*Nes* と *Reln* 遺伝子の発現上昇による神経保護をサポートするために、生後 77 日目で抗炎症反応が誘導されたことを示唆している。

本研究では、100 ppm の NaF 曝露により、生後 21 日目において ARC⁺成熟顆粒細胞数が増加し、*Ptgs2* が発現上昇した。*Arc* と *Ptgs2* はともに、新生ニューロンのシナプス可塑性に機能的に関連する最初期遺伝子である (Nikolaienko et al., 2018; Teather et al., 2002)。これらの結果は、NaF 曝露によって誘導された type-3 NPC の減少に対する代償反応として、成熟顆粒細胞におけるシナプス可塑性が増加した可能性を反映しているのかもしれない。これらの反応は用量依存的ではなかったが、30 ppm の NaF 曝露は生後 77 日目において ARC⁺細胞と COX2⁺細胞数を増加させたことから、これらは離乳期に抑制された神経新生に対する神経保護反応の結果としてみられた変化であることが示唆された。

最近の報告では、*in vivo* での NaF 曝露はマウスの海馬ニューロンにおいて解糖系を抑制し、ミトコンドリア機能を障害することが示唆されている (Li et al., 2023; Xin et al., 2023)。生後 21 日目におけるミトコンドリア OXPHOS に関連する遺伝子発現変化に関して、本研究では 100 ppm の NaF 曝露により、呼吸鎖複合体である ATP 合成酵素をコードする *Atp5flb* (Koopman et al., 2013) と、呼吸鎖複合体の構成要素であるコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニット D をコードする *Sdhb* (Koopman et al., 2013) が発現低下を示した。逆に、100 ppm の NaF は、解糖経路の初期段階で機能するヘキソキナーゼ 3 をコードする *Hk3* を発現上昇させた (Wilson, 2003)。一般に、幹細胞は細胞増殖を維持するために、細胞構成要素の合成をサポートする解糖系経路を優先的に利用するが、分化期にはアデノシン三リン酸を生成する酸化的代謝へと代謝プロファイルがシフトする (Flores et al., 2017; Folmes et al.,

2011; Gu et al., 2016)。この代謝シフトは、NSC から NPC への移行にも重要である。シングルセル RNA シーケンス研究では、成体 NSCs から NPCs への運命移行の初期段階において、解糖系遺伝子の発現が減少し、OXPHOS に関連する遺伝子の発現が上昇することが見出された (Beckervordersandforth et al., 2017; Shin et al., 2015)。従って、100 ppm の NaF への発達の曝露は、離乳期の神経新生細胞集団においてミトコンドリア呼吸鎖複合体の抑制を誘導し、その結果生じるミトコンドリア機能不全が顆粒細胞系譜における type-3 NPC の減少と関連していると考えられる。ヘキソキナーゼ 3 陽性細胞集団が、生後思春期以降までの間、海馬歯状回に一過性に出現することが報告されている (Coerver et al., 1998)。発達中の脳における *Hk3* の役割はまだ研究されていないが、本研究における 100 ppm の NaF 曝露後の *Hk3* の発現増加は、OXPHOS から解糖系への代謝シフトが、type-1 NSCs 及び type-2a NPCs の成長を助長する細胞環境を提供することを示唆している。しかしながら、OXPHOS 及び解糖関連遺伝子の発現変化は、生後 77 日目ではもはや観察されなかった。

<AP 曝露実験>

本研究では、生後 21 日目の離乳期におけるラットの血清 T3 及び T4 レベルの用量に関連した減少が観察された。しかし、甲状腺ホルモン値の減少の程度は強くなく、300 ppm 群では統計学的有意差は得られなかった。対照的に、本研究では離乳期の甲状腺腫大が 300 ppm と 1000 ppm の両方で肉眼観察により明らかになり、病理組織学的に甲状腺濾胞上皮細胞過形成と濾胞コロイドの減少の発生頻度と重症度における統計学的に有意な変化を伴った。以上の結果は、甲状腺機能低下症の変化は血清甲状腺ホルモン値よりも甲状腺病理組織学的解析でより明らかになることを指摘した最近発表された論文の内容とよく一致している (Akane et al., 2022)。血中 TSH 値上昇を介した甲状腺濾胞上皮細胞の増殖活性の増加に関しては、我々は AP 曝露後に PCNA⁺濾胞上皮細胞数の用量依存的な増加を観察し、1000 ppm では統計的に有意であった。これらの結果は、発達期の AP 曝露 (300 ppm 以上) が甲状腺機能低下を誘発したことを示唆している。しかし、AP 曝露児動物で観察された肉眼的及び病理組織学的な甲状腺の変化、ならびに濾胞上皮細胞の増殖活性の増加は、成体期 (生後 77 日目) までには消失した。これらの結果は、妊娠期間中及び授乳期間中に AP 曝露を中止すると、成体期に甲状腺機能低下症が消失することを示唆している。

本研究では、離乳期の児動物において顆粒細胞系譜指標を免疫組織化学的に解析したところ、1000 ppm AP 曝露で GFAP⁺細胞数が減少し、SOX2⁺細胞数が減少傾向にあること、また 300 ppm 以上で PCNA⁺増殖 SGZ 細胞数が減少することが明らかになった。SGZ では、GFAP は type-1 NSCs で発現し (von Bohlen und Halbach, 2011)、SOX2 は主に type-1 NSCs、type-2a NPCs、及びごく少数の type-2b NPCs で発現する。成体期においても、GFAP⁺ type-1 NSCs の減少は 1000 ppm AP 曝

露児動物において持続したことから、AP 曝露は type-1 NSCs を標的とした神経新生の持続的な抑制を成体期まで誘発したことが示唆された。我々の以前の研究では、ラットを用いた抗甲状腺剤のメチマゾールまたは PTU への発達期曝露による発達期甲状腺機能低下症は、離乳期の曝露終了時に type-1 NSCs、type-2a NPCs、及び type-3 NPCs の数を減少させた (Shiraki et al., 2012, 2016)。更に、成体になっても type-2a NPC の減少は神経新生ニッチに残っていた (Shiraki et al., 2012, 2016)。これらの所見は、今回の研究における顆粒細胞系譜に対する発達期での AP 曝露の影響が、発達期甲状腺機能低下症と関連している可能性を示唆している。しかし、発達期の AP 曝露は離乳時の type-3 NPCs の数については減少傾向しか示さず、この時点での発達期甲状腺機能低下症ではこの NPC 集団の明らかな減少を示したことは対照的であった (Shiraki et al., 2012, 2016)。強力な甲状腺機能低下症が脳の成長にも影響を与える胎児の成長遅延を引き起こすことが知られており (Gilbert et al., 2017)、我々の以前の研究では、全身及び脳の成長遅延を引き起こす明らかな発達期甲状腺機能低下症が海馬の神経新生に影響を及ぼすことを見出している (Shiraki et al., 2012, 2014)。しかし、本研究で検討した用量での発達期の AP 曝露では、離乳時または成体期における児動物の体重や脳重量を変化させなかった (Shiraki et al., 2012, 2014, 2016)。発達期の AP 曝露によって type-3 NPCs が減少しなかった理由は不明であるが、血中甲状腺ホルモン濃度が SGZ における type-3 NPCs の細胞動態に影響を及ぼすためには、何らかの閾値があると推察される。

OL 系譜の細胞集団への影響については、本研究では 300 ppm 以上の AP 曝露により、離乳期の歯状回門部における CNPase⁺成熟 OL 数が減少した。しかし、AP 曝露はこの時点では NG2⁺ OPCs や OLIG2⁺ OL 系譜細胞の数を変化させず、CNPase⁺細胞数は成体期に回復した。このことは、発達期の AP 曝露が離乳期の OL 系譜細胞の成熟を一過性に抑制したことを示唆している。しかしながら、成体期には白質組織面積 (脳梁と隣接する帯状束の面積を合わせたもの) の用量に関連した減少が観察された。これらの結果は、発達期 AP 曝露によって誘発される離乳期の成熟 OL の減少が、OL 成熟抑制が一過性で AP 曝露停止後には消失したのにもかかわらず、成体期に明白になった白質低形成の原因である可能性を示唆している。前述のように、ラットの発達期の甲状腺機能低下症は、大脳皮質深部の CNPase⁺成熟 OL 数と脳梁の有髄軸索数を減少させる (Long et al., 2021; Salas-Lucia et al., 2020)。これらの結果は、ラットの発達期の AP 曝露が OL 成熟の一過性の抑制を引き起こし、成体期の白質低形成に結びついたことを示唆しており、これはラットの発達期に抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU) やメチマゾールに曝露することで引き起こされる甲状腺機能低下症による脳への影響と同様であると考えるのが妥当である (Shibutani et al., 2009; Shiraki et al., 2014)。

本研究における歯状回門部の GABA 作動性介在ニューロンの各集団と苔状細胞について、1000 ppm の

AP 曝露は離乳期に SST⁺介在ニューロン数を増加させたが、他の GABA 作動性介在ニューロンの各集団と GluR2⁺苔状細胞数はこの時点では変化しなかった。成体期には、SST⁺介在ニューロンの数の増加は持続し、CCK⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で増加した。発達期甲状腺機能低下症が GABA 作動性介在ニューロンの各集団に及ぼす影響について、我々は以前に、PTU への発達期曝露後、成体に至るまでラット児動物の歯状回門部における SST⁺介在ニューロンの数の持続的増加を観察した (Shiraki et al., 2016)。歯状回の介在ニューロンにおける SST の発現は、発作などの神経障害状態や、環境強化などの自然刺激によって亢進する (Tallent, 2007)。歯状回門部の SST⁺介在ニューロンの機能的役割は長い間謎に包まれていたが、最近の報告では、歯状回門部の SST⁺介在ニューロンにおける血小板由来成長因子 (PDGF)-BB の発現増加が、海馬成体神経新生における NSC 増殖と新生ニューロンの樹状突起の成長を増加させることを見出されている (Li et al., 2023)。これらの結果は、離乳期と成体期の SST⁺介在ニューロンにおける PDGF を介したシグナルの活性化が、離乳期からの type-1 NSCs の持続的減少に対する代償反応として働く可能性を示唆している。成体期における CCK⁺介在ニューロンの増加に関しては、最近の報告で、GABA 作動性介在ニューロンからの CCK 放出の増加が、グルタミン酸放出を引き起こす局所アストロサイトの活性を増加させることで NSCs の神経新生増殖を促すことが示唆されている (Asrican et al., 2020)。成体期には、アストロサイトの数の増加や、活性化を示唆する肥大化、あるいは *Cck2r* の発現上昇は観察されなかったが、成体期における CCK⁺介在ニューロンの増加は、離乳期からの type-1 NSCs の持続的減少に対する代償的な細胞反応である可能性が指摘できる。

我々は以前、実験的に誘発した発達期甲状腺機能低下症が、離乳期に RELN⁺ GABA 作動性介在ニューロンの数を増加させることを見いだした (Saegusa et al., 2010; Shiraki et al., 2016)。このことは、本研究で見出された発達期 AP 曝露後の離乳期に RELN⁺介在ニューロンの数に変化がない結果とは対照的である。以前考察したように、発達期甲状腺機能低下症によって誘導される RELN シグナルの増加は、type-3 NPC の減少を克服するために神経細胞の移動を促進する代償機構かもしれない (Saegusa et al., 2010; Shiraki et al., 2016)。しかし、前述のように、発達期 AP 曝露後の離乳期には type-3 NPCs の変化は観察されなかった。従って、今回の実験条件では、代償機構としての RELN シグナルは AP 曝露によって発動しなかったと考えられる。

発達期に実験的にヨウ素欠乏症または甲状腺機能低下症を誘発すると、ラット海馬ニューロン (歯状回顆粒細胞を含む) において長期増強 (LTP) が障害され、シナプス可塑性の指標である最初期遺伝子産物の発現が減少する (Dong et al., 2005)。我々は以前に、発達期に PTU を曝露すると、離乳期に海馬歯状回においてシナプス可塑性に関連する最初期遺伝子産物の ARC または COX2 に対して免疫組織化学的に陽性を示す顆粒細胞が一過性に減少することを報告した

(Shiraki et al., 2014, 2016)。本研究では、発達期の AP 曝露により、離乳期の ARC⁺細胞数は用量依存的に減少傾向を示したが、他のシナプス可塑性関連指標タンパク質の免疫組織化学的な陽性細胞数は変化しなかった。これらの結果は、発達期の AP 曝露が、発達期甲状腺機能低下症の影響と関連して、ARC を介したシナプス可塑性を抑制したことを示唆している。今回の研究で注目すべきは、ARC⁺細胞数の減少傾向が AP 曝露後に成体期まで続いたことであり、以前に見出した PTU 曝露後に成体期に観察された ARC⁺細胞数の増加や COX2⁺細胞数の変化とは異なっていた (Shiraki et al., 2014, 2016)。以前の報告では、胎生期 6 日目から生後 30 日目までの飲料水による AP の発達期曝露後、成体段階における海馬のフィールド電位におけるベースラインのシナプス伝達の減少が示された (Gilbert et al., 2017)。重要なことに、ベースラインのシナプス伝達の減少は、30 ppm の最低用量レベルから用量依存的に観察されている (Gilbert and Sue, 2008)。

T3 は OL 系譜における増殖/分化スイッチの重要な決定因子であり、OPC への作用により細胞周期の終了と分化を促進する (Lee and Petratos, 2016; Pagnin et al., 2021)。また、OL 発生の後期には、T3 は最終分化と髄鞘形成にも関与する (Younes-Rapozo et al., 2006)。前述のように、本研究では、発達期 AP 曝露を終了した離乳時に、海馬歯状回門部における CNPase⁺成熟 OL が減少することを明らかにした。我々は以前、ラットの発達期の PTU 曝露による甲状腺機能低下後、生後 77 日目に検索した大脳深部皮質において、CNPase⁺成熟 OL が減少していることを観察した。本研究では、発達期 AP 曝露を終了した離乳時に、歯状回門部における Olig2⁺ OL 系譜細胞数に変化は見られなかったが、NG2⁺ OPC 数が増加する傾向が観察された。これらの結果は、循環甲状腺ホルモンレベルの減少が OPC の分化を抑制し、その結果、OPC の数が増え、一方で、分裂終了後の OL 系譜細胞数が減少を示した可能性を示唆している。

甲状腺機能低下症による発達期の脳への影響については、発達期の PTU 曝露によりラットの海馬で酸化ストレスが誘導されることが報告されている (Cattani et al., 2013)。しかし、本研究では、発達期の AP 曝露後、離乳期の海馬の MDA 及び GSSG/GSH レベルに変化は観察されなかった。また、離乳期における歯状回の抗酸化蛋白質や抗酸化酵素の遺伝子転写産物レベルの変化も観察されなかった。これらの結果から、本研究で検討した用量では、発達期の AP 曝露後に明らかな酸化ストレスの誘導がないことが示唆された。この違いは、PTU と AP への曝露によって誘発される甲状腺機能低下症の強さの違いによるのかもしれない。Cattani らの研究 (2013) では、血清中の T3 及び T4 レベルの減少の大きさから判断して、本研究で用いた発達期の AP 曝露と比較して、発達期の PTU 曝露によっては強い甲状腺機能低下症が誘発されたと判断できる。本研究で検討した酸化ストレス関連遺伝子のうち、*Gpx1* の転写産物レベルが発達期 AP 曝露後の生後 77 日目で低下した。この結果は酸化ストレスに対する感受性の上昇を反映していると解釈

することも可能であるが、*Gpx1* の発現量変化の大きさが小さいこと、他の酸化ストレス関連パラメータに明らかな変化がないことから、この遺伝子発現量変化の毒性学的意義は低いと考えられる。

前述のように、今回の結果は、発達期の AP 曝露を終了した離乳期において、顆粒細胞系譜のうち type-1 NSCs と type-2a NPCs が減少し、成熟顆粒細胞の ARC を介したシナプス可塑性が抑制されることを示唆している。この時点で、歯状回において *Efnb3*, *Vegfa*, *Ntrk2*, *Arhgef2*, *Robo3*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2b* の発現増加が観察され、*Robo3* の発現増加は生後 77 日目まで続いた。*Efnb3* はエフリン B3 リガンドをコードし、その受容体 EphB1 とともに海馬における NPC の増殖と移動を協調的に制御している (Chumley et al., 2007)。*Vegfa* は血管内皮増殖因子 A をコードし、海馬の神経新生ニッチにおける NPC の増殖を刺激できる特異的な受容体を持つリガンドである (Jin et al., 2002)。*Ntrk2* は神経栄養受容体チロシンキナーゼ 2 をコードし、神経細胞の生存、分化、シナプス可塑性、神経新生を増加させる脳由来神経栄養因子の神経栄養効果を媒介する (Qian et al., 2006)。*Robo3* はラウンドアバウトガイダンス受容体 3 をコードし、軸索誘導と神経細胞移動を制御することができる (Pak et al., 2020)。*Gria2* と *Gria3* はシナプス可塑性に関与するグルタミン酸イオノトロピック受容体 AMPA 型サブユニット 2 または 3 をコードしている (van der Spek et al., 2022)。*Grin2b* は、海馬の *N*-メチル-D-アスパラギン酸受容体の主要な制御サブユニットをコードしており、長期増強や長期抑圧に不可欠な要素である (Shipton et al., 2013)。従って、生後 21 日目における顆粒細胞系譜における NSC の減少と成熟顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制の分子メカニズムは明らかにできなかったが、この時点での *Efnb3*, *Vegfa*, *Ntrk2*, *Robo3*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2b* の発現増加は、type-1 NSCs と type-2a NPCs の減少とシナプス可塑性の抑制に対する代償反応の可能性が指摘できる。生後 77 日目では、type-1 NSCs の減少を示唆する遺伝子発現変化は観察されなかった。この時点では、*Robo3* の継続的な発現上昇に加えて、*Notch1* と *Dll4* の転写レベルの発現上昇が観察された。このことは、NSCs の分化を抑制し、未分化状態に維持する *Notch1* シグナル (Ohtsuka et al., 1999) が促進することで、type-1 NSCs の減少に対する代償反応を誘導している可能性を示唆している。*Nes* の発現上昇は、この時点におけるこの代償反応を説明するのかもしれない。

E. 結論

NaF 曝露実験では、ラットの発達期に NaF に曝露すると type-3 NPC が減少し、離乳期には苔状細胞シグナルの増加を通じて type-1 NSCs と type-2a NPCs の代償的増加が誘導されることを示している。更に、type-3 NPCs の減少は、代償反応として成熟顆粒細胞のシナプス可塑性を増加させるかもしれない。神経新生に関連した変化は、成体期にはもはや観察されなかった。離乳期の酸化ストレスに対する脆弱性の増大に対応して、成体期に抗炎症反応が誘導されたことが、

神経新生ニッチにおける神経保護の背景にあるのかもしれない。成体期における *Calb2* と *Reln* の発現上昇は、離乳期の type-3 NPCs の減少に対する代償反応の結果を反映しているのかもしれない。離乳期におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体に關与する遺伝子 (*Atp5f1b* と *Sdhd*) の発現減少は、type-3 NPC の減少に關与しているのかもしれない。さらに、同時に解糖系酵素遺伝子 *Hk3* が発現上昇することで、type-1 NSCs と type-2a NPCs の拡大を助長する神経新生環境が提供されるのかもしれない。これらの知見を総合すると、発達期の NaF 曝露は海馬の神経新生を一過性に阻害し、その代償反応として代謝シフトを誘導することが示唆される。

AP 曝露実験では、飲料水中に 1000 ppm までの用量を含む発達期の AP 曝露は甲状腺機能低下症を引き起こし、特に曝露終了後の離乳期に明らかになる可能性を示した。海馬の神経新生については、離乳期に神経新生の初期過程を標的とした NSC/NPC 増殖の抑制と、代償性介在ニューロン応答を伴う顆粒細胞のシナプス可塑性の低下が示唆され、神経新生の抑制は成体になるまで持続した。OL 系譜の影響から、離乳期には OL 成熟が一過性に抑制され、成体期には明瞭な白質低形成が示唆された。観察された脳の変化は、発達期甲状腺機能低下症によるものと類似しており、AP による発達神経毒性は甲状腺機能低下症によるものであることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ojira, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M.: Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats. *Environ. Toxicol.* 39(5):3040-3054, 2024.

2. 学会発表

酒巻 友里、菖蒲谷 桃香、尾城 椋太、鄒 昕羽、唐 倩、小澤 俊介、吉田 敏則、渋谷 淳: 抗甲状腺作用が知られている過塩素酸アンモニウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会、第 50 回日本毒性

学会学術年会プログラム・要旨集 : S122, P1-077S, 6 月 19 日-21 日, 2023.

Xinyu ZOU, Qian TANG, Ryota OJIRO, Shunsuke OZAWA, Momoka SHOBUDANI, Yuri SAKAMAKI, Toshinori YOSHIDA, Makoto SHIBUTANI: Sustained disruption of postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus after maternal exposure to imidacloprid in rats. 第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : S123, P1-080S, 6 月 19 日-21 日, 2023.

菖蒲谷 桃香、酒巻 友里、尾城 椋太、鄒 昕羽、唐 倩、小澤 俊介、吉田 敏則、渋谷 淳: 天然に豊富に存在する必須元素であるフッ化ナトリウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : S171, P2-200, 6 月 19 日-21 日, 2023.

Ryota Ojira, Xinyu Zou, Qian Tang, Shunsuke Ozawa, Makoto Shibutani: Similar effects of glyphosate and glyphosate-based herbicide on brain development after developmental exposure to rats. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology. P146. Taipei, Taiwan. 7 月 17 日-20 日, 2023.

鄒 昕羽、唐 倩、尾城椋太、小澤俊介、菖蒲谷桃香、酒巻友里、海老塚由理、吉田敏則、渋谷 淳: Effect of α -glycosyl isoquercitrin on maternal imidacloprid exposure-induced disruptive hippocampal neurogenesis in rats. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会要旨集:P-03, pp. 64, 1 月 23-24 日, 2024.

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

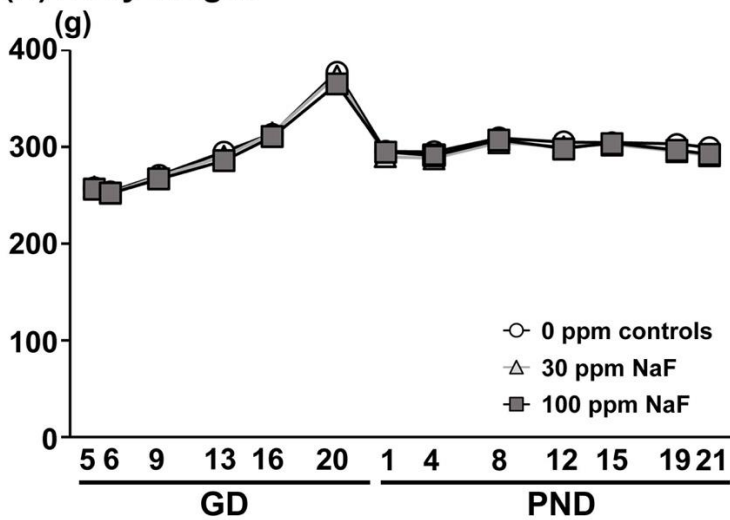
なし

3. その他

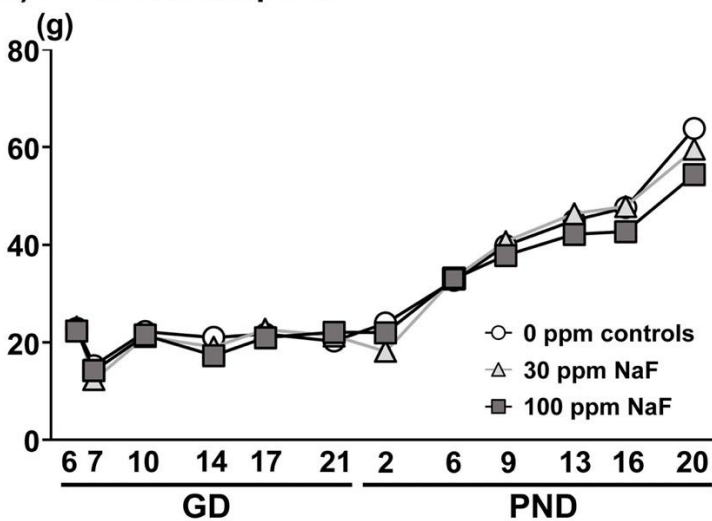
なし

<NaF 曝露実験>

(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption

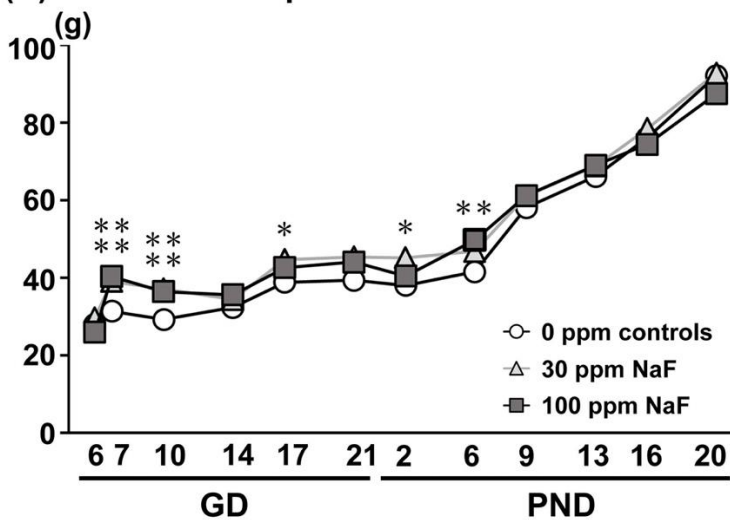


Fig. 1

Body weight and food and water consumption of dams during the exposure period. (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

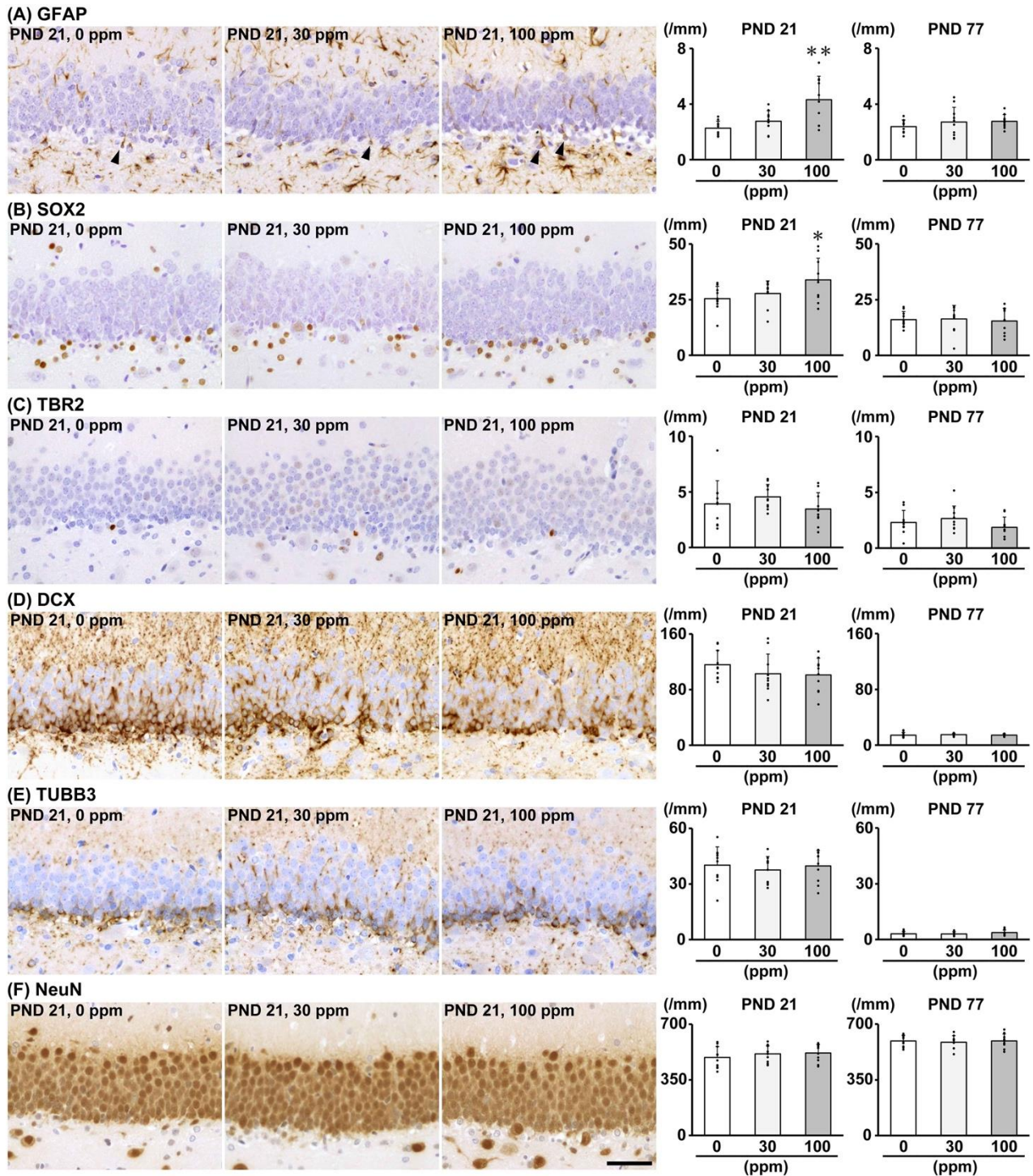


Fig. 2

Distribution of immunoreactive cells for granule cell lineage markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), or (C) T-box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), and (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3), or (F) neuronal nuclei (NeuN) in the SGZ and granule cell layer (GCL). Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

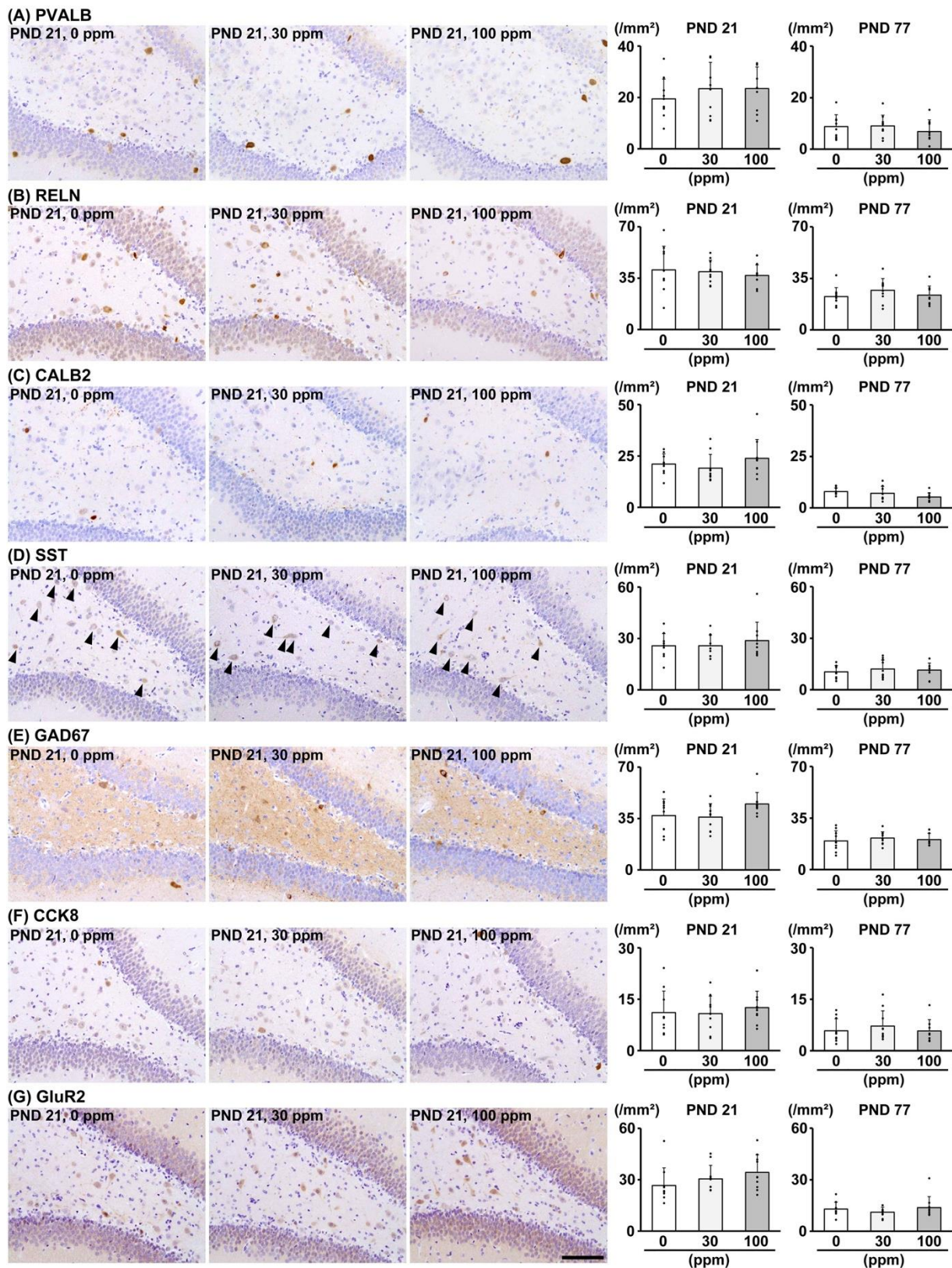


Fig. 3

Distribution of immunoreactive cells for γ -aminobutyric acid-ergic interneuron and mossy cell markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Parvalbumin (PVALB), (B) reelin (RELN), (C) calbindin-D-29K (CALB2), (D) somatostatin (SST), (E) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), (F) cholecystokinin-8 (CCK8), or (G) glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. $N = 10$ /group. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD.

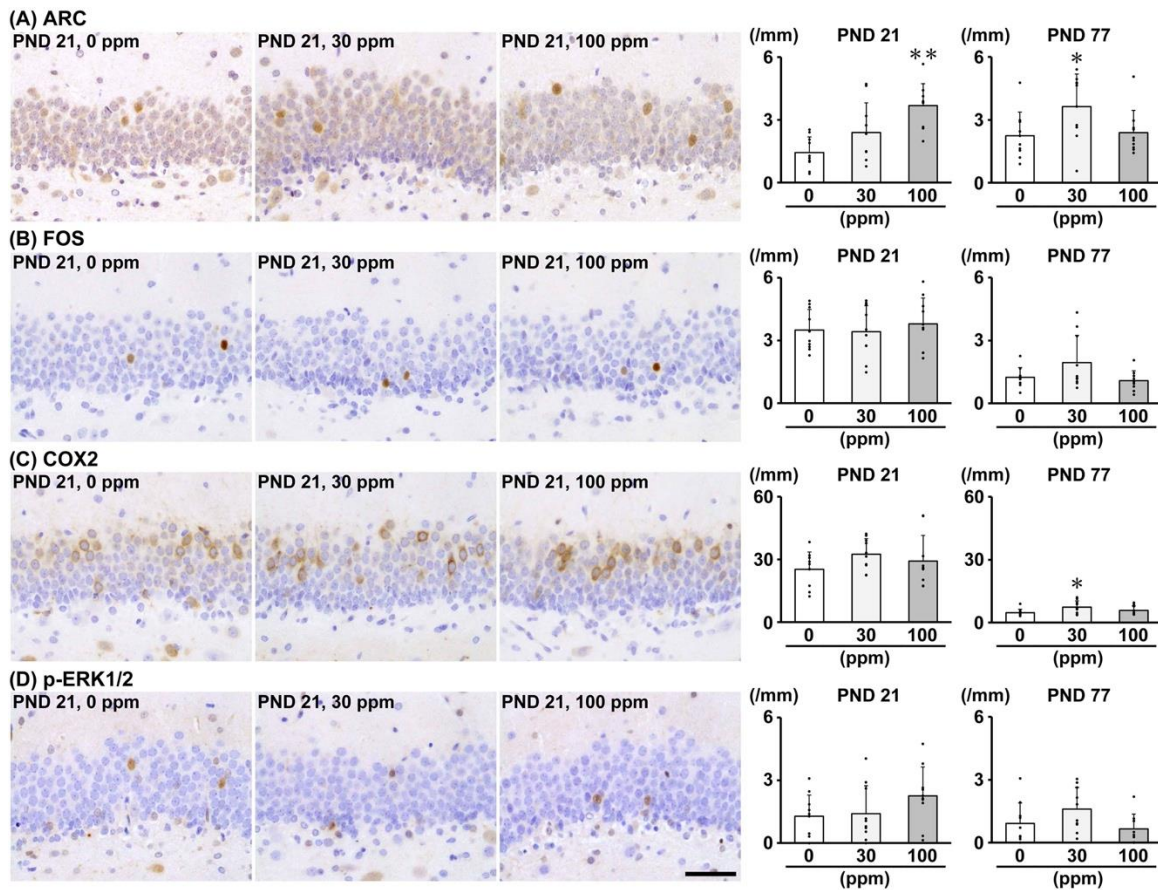


Fig. 4

Distribution of immunoreactive cells for synaptic plasticity-related gene products in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), (C) cyclooxygenase-2 (COX2), or (D) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer (GCL) of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

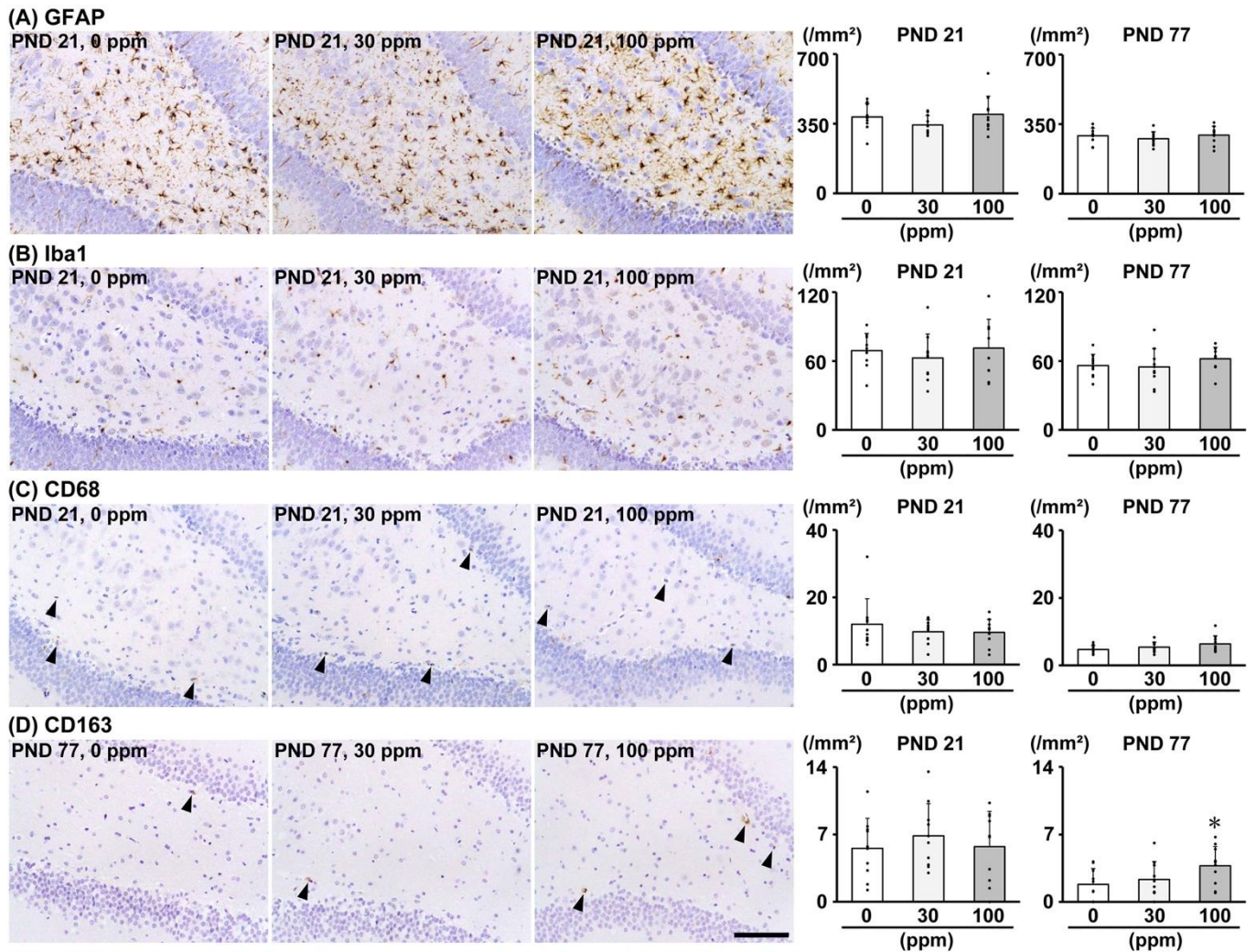


Fig. 5

Distribution of proliferating or apoptotic cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells or (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ). Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD.

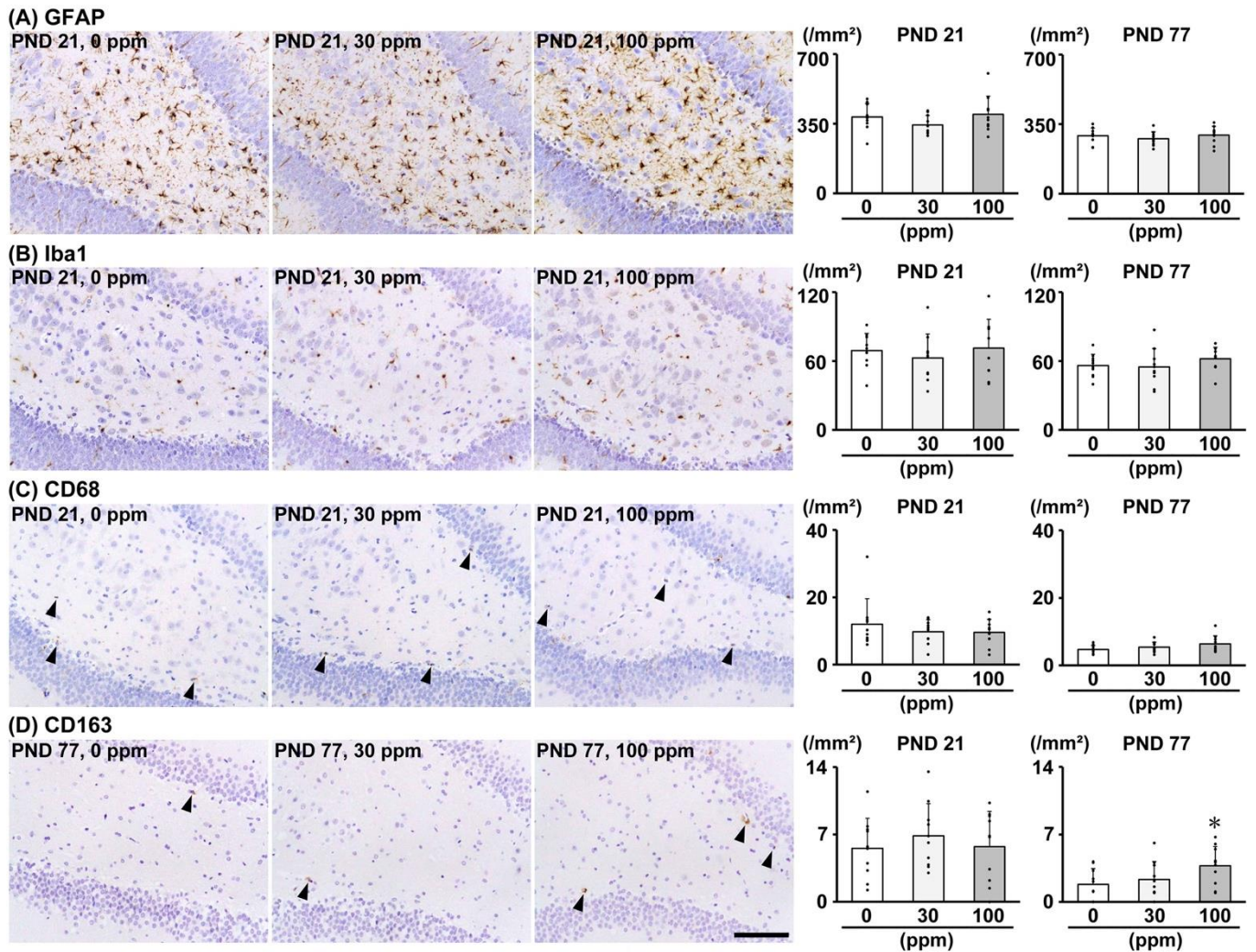


Fig. 6

Distribution of immunoreactive cells for glial cell marker proteins in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, or (D) CD163 in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21 (GFAP, Iba1, and CD68) or PND 77 (CD163). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD. $*P < 0.05$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus in male offspring on PND 21**

No. of animals examined	NaF in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		100	
	6	6	6	6
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes				
<i>Nes</i>	1.02 ± 0.21 ^a	1.02 ± 0.20	1.42 ± 0.22**	1.34 ± 0.09**
<i>Sox2</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.23	0.88 ± 0.15	0.84 ± 0.12
<i>Eomes</i>	1.03 ± 0.28	1.01 ± 0.17	1.37 ± 0.33	1.30 ± 0.24*
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.13	1.06 ± 0.12	1.01 ± 0.08
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.18	0.95 ± 0.11	0.90 ± 0.04
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	0.95 ± 0.14	0.90 ± 0.09
<i>Rbfox3</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.13	1.24 ± 0.17	1.18 ± 0.10*
GABAergic interneuron marker genes				
<i>Calb2</i>	1.45 ± 1.47	1.65 ± 1.98	0.77 ± 0.61	0.72 ± 0.54
<i>Pvalb</i>	1.09 ± 0.39	1.06 ± 0.32	1.32 ± 0.32	1.25 ± 0.30
<i>Reln</i>	1.05 ± 0.31	1.03 ± 0.26	1.16 ± 0.25	1.10 ± 0.25
<i>Sst</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.15 ± 0.22	1.10 ± 0.19
Neurotrophin-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.02 ± 0.18	1.01 ± 0.11	1.06 ± 0.06	1.01 ± 0.11
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.19	0.96 ± 0.16	0.91 ± 0.11
Cell proliferation marker gene				
<i>Pcna</i>	1.03 ± 0.23	1.03 ± 0.27	1.11 ± 0.09	1.06 ± 0.09
Synaptic plasticity-related genes				
<i>Arc</i>	1.12 ± 0.45	1.08 ± 0.38	1.41 ± 0.47	1.34 ± 0.36
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.25	1.06 ± 0.44	1.06 ± 0.22	1.00 ± 0.20
<i>Ptgs2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.14	1.46 ± 0.08**	1.39 ± 0.12**
Glutamate receptor genes				
<i>Gria1</i>	1.05 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.25 ± 0.16	1.20 ± 0.19
<i>Gria2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.15	1.24 ± 0.23	1.18 ± 0.18
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.12	1.27 ± 0.24	1.21 ± 0.20
<i>Grin2a</i>	1.04 ± 0.27	1.01 ± 0.17	1.21 ± 0.22	1.15 ± 0.17
<i>Grin2b</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.10	1.19 ± 0.21	1.13 ± 0.16
<i>Grin2d</i>	1.09 ± 0.51	1.16 ± 0.74	0.91 ± 0.23	0.86 ± 0.20
Glutamate transporter genes				
<i>Slc17a6</i>	1.42 ± 1.62	1.64 ± 2.21	0.70 ± 0.42	0.66 ± 0.37
<i>Slc17a7</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.18	1.14 ± 0.15	1.09 ± 0.12
Apoptosis-related genes				
<i>Bak1</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.18	1.18 ± 0.27	1.11 ± 0.20
<i>Bax</i>	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.22	1.12 ± 0.20	1.06 ± 0.14
<i>Bcl2</i>	1.07 ± 0.33	1.04 ± 0.27	1.50 ± 0.33*	1.41 ± 0.20*
<i>Casp3</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.19	1.12 ± 0.23	1.06 ± 0.11
<i>Casp6</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.23	1.06 ± 0.27	0.99 ± 0.20
<i>Casp8</i>	1.03 ± 0.30	1.02 ± 0.22	1.42 ± 0.48	1.34 ± 0.41
<i>Casp9</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.07	1.18 ± 0.21	1.12 ± 0.15
<i>Bcl2l1</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.14	0.93 ± 0.06
Oxidative stress-related genes				
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.17	1.04 ± 0.32	0.78 ± 0.18*	0.75 ± 0.18
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.09	0.87 ± 0.12
<i>Mt2a</i>	1.06 ± 0.38	1.01 ± 0.11	0.85 ± 0.18	1.06 ± 0.06
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.20	0.91 ± 0.15	0.86 ± 0.11
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.12	1.03 ± 0.13	0.97 ± 0.05
Neural differentiation-related genes				
<i>Creb1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.14	0.95 ± 0.08
<i>Fzd9</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.12	1.20 ± 0.20	1.15 ± 0.16
<i>Tfap2c</i>	1.09 ± 0.47	1.05 ± 0.36	1.17 ± 0.24	1.11 ± 0.25
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.19	0.95 ± 0.15	0.91 ± 0.19
Glycolysis-related genes				
<i>Hk1</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.08	0.99 ± 0.05
<i>Hk2</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.07 ± 0.19	1.01 ± 0.11
<i>Hk3</i>	1.04 ± 0.28	1.02 ± 0.22	1.43 ± 0.33	1.34 ± 0.22*
<i>Pkm</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.07	0.99 ± 0.08
OXPPOS-related genes				
<i>Atp5f1b</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.05**	0.85 ± 0.10*
<i>Ndufc1</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.04	0.87 ± 0.09
<i>Sdhb</i>	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.08	0.83 ± 0.07**
<i>Atp5po</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.10	0.93 ± 0.06	0.89 ± 0.09
<i>Tmem70</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	1.04 ± 0.15	0.99 ± 0.08

Chemical mediator genes

<i>Tnf</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.22	1.16 ± 0.17	1.10 ± 0.12
<i>Il1b</i>	1.08 ± 0.47	1.07 ± 0.45	0.63 ± 0.25	0.61 ± 0.26
<i>Il6</i>	2.42 ± 1.51	2.40 ± 1.42	6.09 ± 4.69	5.87 ± 4.70
<i>Il18</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.22	1.31 ± 0.29	1.25 ± 0.26

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atp5f1b*, ATP synthase F1 subunit beta; *Atp5po*, ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP; *Bak1*, BCL2 antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2 apoptosis regulator; *Bcl2l1*, BCL2 like 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Creb1*, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dppyl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; GABA, γ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, Hes family BHLH transcription factor 5; *Hk1*, hexokinase 1; *Hk2*, hexokinase 2; *Hk3*, hexokinase 3; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; NaF, sodium fluoride; *Ndufc1*, ubiquinone oxidoreductase subunit C1; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; *Pena*, proliferating cell nuclear antigen; *Pkm*, pyruvate kinase M1/2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sdh*, succinate dehydrogenase complex subunit D; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Tmem70*, transmembrane protein 70; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Student's *t*-tests or Aspin–Welch's *t*-test.

Table 2**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus in male offspring on PND 77**

No. of animals examined	NaF in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		100	
	6		6	
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes				
<i>Nes</i>	1.03 ± 0.24 ^a	1.01 ± 0.16	1.40 ± 0.30*	1.26 ± 0.31
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.21	1.32 ± 0.33	1.17 ± 0.26
<i>Eomes</i>	1.09 ± 0.47	1.06 ± 0.45	1.21 ± 0.52	1.08 ± 0.43
<i>Dcx</i>	1.03 ± 0.27	1.01 ± 0.15	1.26 ± 0.16	1.12 ± 0.11
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.22	1.00 ± 0.09	1.12 ± 0.13	1.00 ± 0.08
<i>Dpysl3</i>	1.03 ± 0.24	1.00 ± 0.09	1.17 ± 0.11	1.04 ± 0.08
<i>Rbfox3</i>	1.04 ± 0.27	1.01 ± 0.18	1.17 ± 0.16	1.04 ± 0.12
GABAergic interneuron marker genes				
<i>Calb2</i>	1.04 ± 0.32	1.05 ± 0.33	2.49 ± 1.14**	2.24 ± 1.00**
<i>Pvalb</i>	1.05 ± 0.30	1.01 ± 0.18	1.10 ± 0.19	0.99 ± 0.17
<i>Reln</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.30 ± 0.13**	1.17 ± 0.13
<i>Sst</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.11	1.19 ± 0.23	1.06 ± 0.16
Neurotrophin-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.23	1.09 ± 0.15	0.97 ± 0.12
<i>Ntrk2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.18	1.09 ± 0.18	0.98 ± 0.18
Cell proliferation marker gene				
<i>Pcna</i>	1.02 ± 0.21	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.15	0.96 ± 0.10
Synaptic plasticity-related genes				
<i>Arc</i>	1.09 ± 0.43	1.06 ± 0.38	1.09 ± 0.27	0.98 ± 0.23
<i>Fos</i>	1.09 ± 0.48	1.07 ± 0.45	1.41 ± 0.28	1.25 ± 0.21
<i>Ptgs2</i>	1.05 ± 0.33	1.03 ± 0.28	1.09 ± 0.15	0.97 ± 0.09
Neural differentiation-related genes				
<i>Creb1</i>	1.03 ± 0.24	1.00 ± 0.10	1.17 ± 0.19	1.04 ± 0.16
<i>Fzd9</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.19	1.06 ± 0.16
<i>Tfap2c</i>	1.07 ± 0.35	1.02 ± 0.22	1.15 ± 0.11	1.03 ± 0.05
<i>Hes5</i>	1.06 ± 0.38	1.04 ± 0.33	1.16 ± 0.14	1.04 ± 0.12
Glycolysis-related genes				
<i>Hk1</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.13	1.07 ± 0.13	0.95 ± 0.08
<i>Hk2</i>	1.10 ± 0.42	1.05 ± 0.33	1.19 ± 0.24	1.07 ± 0.23
<i>Hk3</i>	1.04 ± 0.34	1.05 ± 0.37	1.54 ± 0.53	1.37 ± 0.42
<i>Pkm</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.12	1.07 ± 0.17	0.95 ± 0.11
OXPHOS-related genes				
<i>Atp5f1b</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.25	1.06 ± 0.19
<i>Ndufc1</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.14	1.10 ± 0.18	0.98 ± 0.12
<i>Sdh</i>	1.04 ± 0.28	1.01 ± 0.13	1.09 ± 0.17	0.98 ± 0.12
<i>Atp5po</i>	1.03 ± 0.26	1.00 ± 0.11	1.11 ± 0.23	0.99 ± 0.16
<i>Tmem70</i>	1.03 ± 0.28	1.02 ± 0.23	1.20 ± 0.13	1.07 ± 0.10
Chemical mediator genes				
<i>Tnf</i>	1.06 ± 0.40	1.05 ± 0.38	1.26 ± 0.38	1.12 ± 0.32
<i>Il1b</i>	1.37 ± 1.23	1.38 ± 1.23	1.83 ± 1.00	1.67 ± 1.01
<i>Il6</i>	1.14 ± 0.60	1.09 ± 0.47	0.47 ± 0.44	0.44 ± 0.44*
<i>Il18</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.17	1.40 ± 0.20*	1.26 ± 0.18*

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atp5f1b*, ATP synthase F1 subunit beta; *Atp5po*, ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Creb1*, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; GABA, γ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hes5*, Hes family BHLH transcription factor 5; *Hk1*, hexokinase 1; *Hk2*, hexokinase 2; *Hk3*, hexokinase 3; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; NaF, sodium fluoride; *Ndufc1*, ubiquinone oxidoreductase subunit C1; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pkm*, pyruvate kinase M1/2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sdh*, succinate dehydrogenase complex subunit D; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Tmem70*, transmembrane protein 70; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Student's *t*-tests or Aspin-Welch's *t*-test.

Supplementary Table 1
Maternal reproductive parameters

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
No. of all implantation sites	12.4 ± 1.8 ^a	12.2 ± 2.2	11.6 ± 4.0
No. of live offspring	11.6 ± 3.2	12.0 ± 2.3	10.4 ± 4.4
Male ratio (%)	53.4 ± 19.4	50.7 ± 12.2	62.8 ± 21.8

Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

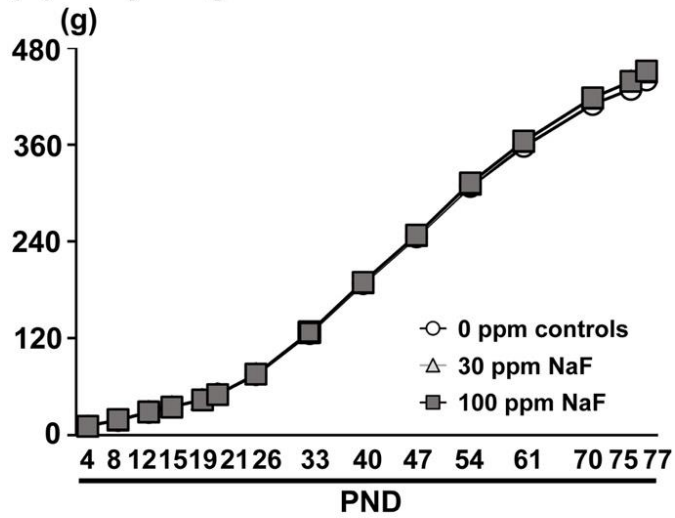
Supplementary Table 2
Body and brain weights of dam

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
Body weight (g)	299.0 ± 28.0 ^a	290.8 ± 20.8	292.3 ± 24.1
Brain weight (g)	1.95 ± 0.08	1.93 ± 0.09	1.92 ± 0.07

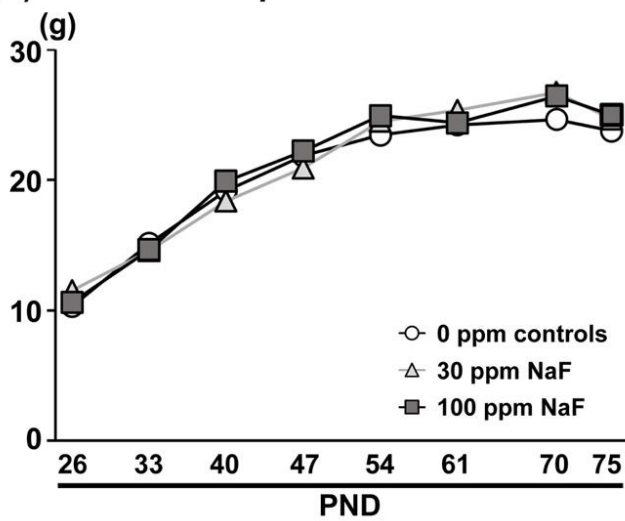
Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

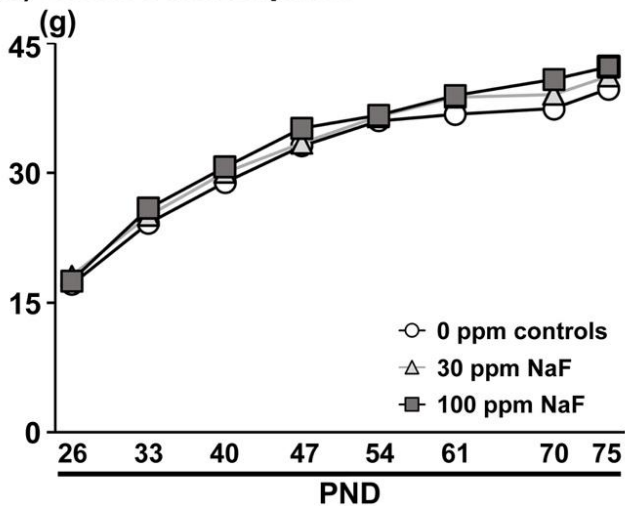
(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption



Supplementary Fig. 1

Body weight and food and water consumption of male offspring.

Supplementary Table 3**Body and brain weights of offspring at necropsies on PND 21 and PND 77**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
PND 21			
No. of offspring examined	66	66	58
Body weight (g)	50.7 ± 4.4 ^a	51.8 ± 3.3	49.8 ± 4.7
No. of offspring examined	10	10	10
Brain weight (g)	1.51 ± 0.06	1.47 ± 0.05	1.53 ± 0.05
PND 77			
No. of offspring examined	28	29	28
Body weight (g)	439.9 ± 35.7	450.2 ± 22.3	451.1 ± 32.7
No. of offspring examined	12	12	12
Brain weight (g)	2.09 ± 0.05	2.16 ± 0.07*	2.12 ± 0.06

Abbreviations: NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

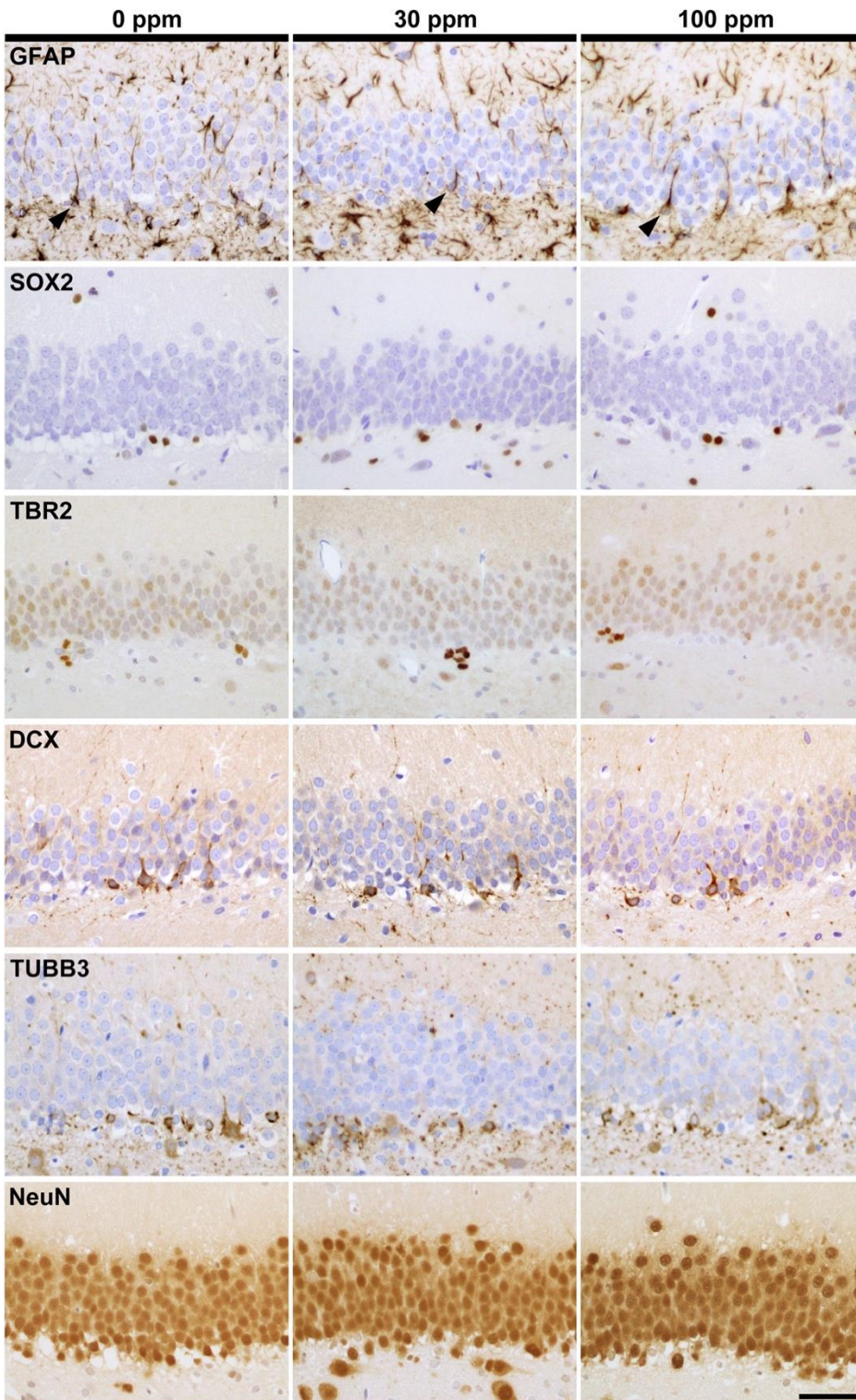
Supplementary Table 4**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of animals examined	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.27 ± 0.51 ^a	2.77 ± 0.75	4.32 ± 1.68**
SOX2	25.44 ± 5.58	27.73 ± 5.70	33.88 ± 9.76*
TBR2	3.92 ± 2.08	4.55 ± 1.11	3.45 ± 1.47
DCX	115.83 ± 20.68	102.75 ± 28.42	101.09 ± 24.08
TUBB3	40.19 ± 9.77	37.54 ± 7.26	39.70 ± 8.40
NeuN	486.63 ± 66.61	507.30 ± 51.45	512.02 ± 54.66
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm² hilar region)			
PVALB	19.46 ± 7.70	23.39 ± 10.23	23.48 ± 8.31
RELN	40.61 ± 16.08	39.35 ± 7.83	36.80 ± 7.20
CALB2	21.08 ± 4.91	19.12 ± 6.62	23.91 ± 9.06
SST	25.73 ± 7.12	25.74 ± 6.39	28.74 ± 10.73
GAD67	36.97 ± 11.28	36.02 ± 9.11	44.83 ± 7.86
CCK-8	11.08 ± 6.29	10.78 ± 5.12	12.55 ± 4.78
GluR2	26.63 ± 10.24	30.47 ± 7.87	34.26 ± 10.30
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ (No./mm SGZ length)			
PCNA	5.12 ± 3.07	4.54 ± 2.01	4.90 ± 2.13
TUNEL	0.69 ± 0.13	0.74 ± 0.32	0.80 ± 0.19
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)			
ARC	1.43 ± 0.75	2.39 ± 1.41	3.68 ± 1.05**
FOS	3.50 ± 0.98	3.42 ± 1.24	3.79 ± 1.23
COX2	25.27 ± 8.26	32.50 ± 7.43	29.24 ± 12.23
p-ERK1/2	1.29 ± 1.00	1.40 ± 1.33	2.26 ± 1.38
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm² hilar region)			
GFAP	384.18 ± 66.97	344.06 ± 47.21	396.71 ± 92.10
Iba1	68.95 ± 14.97	62.60 ± 20.82	71.10 ± 25.27
CD68	12.01 ± 7.57	9.78 ± 3.55	9.62 ± 3.86
CD163	5.57 ± 3.11	6.85 ± 3.35	5.73 ± 3.66

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); CCK8, cholecystokinin-8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; DG, dentate gyrus; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; NaF, sodium fluoride; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 2

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), SRY-box transcription factor 2 (SOX2) or T-box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), and doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3; also known as Tuj-1) or neuronal nuclei (NeuN) in the SGZ and/or granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 5

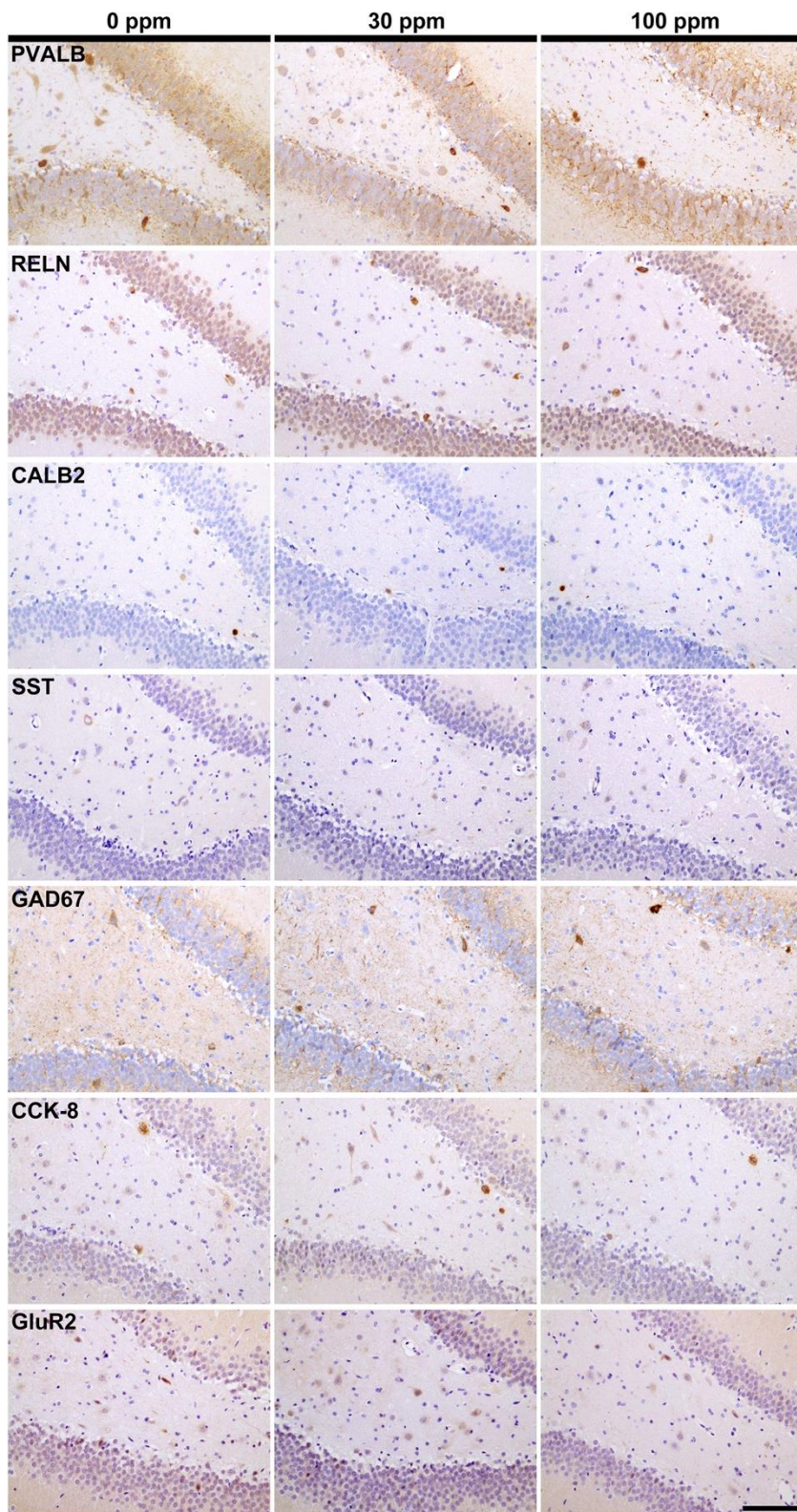
Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of animals examined	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.38 ± 0.48 ^a	2.72 ± 1.05	2.76 ± 0.48
SOX2	16.03 ± 3.61	16.36 ± 6.01	15.43 ± 5.71
TBR2	2.30 ± 1.08	2.64 ± 1.12	1.86 ± 0.92
DCX	14.25 ± 3.90	14.95 ± 1.90	14.25 ± 1.87
TUBB3	3.06 ± 1.23	3.02 ± 1.18	3.70 ± 1.41
NeuN	593.79 ± 35.61	585.65 ± 41.40	594.83 ± 42.89
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm ² hilar region)			
PVALB	8.80 ± 4.59	9.02 ± 4.16	6.85 ± 4.56
RELN	22.62 ± 6.10	26.93 ± 7.92	23.57 ± 6.21
CALB2	7.96 ± 1.75	7.12 ± 3.30	5.30 ± 2.03
SST	10.47 ± 3.62	12.06 ± 5.30	11.40 ± 4.09
GAD67	19.52 ± 6.84	21.37 ± 4.30	20.36 ± 4.34
CCK-8	5.82 ± 3.49	7.18 ± 4.43	5.75 ± 3.27
GluR2	12.88 ± 4.04	11.10 ± 2.89	13.75 ± 6.40
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ (No./mm SGZ length)			
PCNA	3.00 ± 1.07	3.18 ± 0.76	2.98 ± 0.87
TUNEL	0.06 ± 0.08	0.10 ± 0.14	0.10 ± 0.10
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)			
ARC	2.25 ± 1.12	3.63 ± 1.55*	2.39 ± 1.06
FOS	1.24 ± 0.47	1.95 ± 1.29	1.08 ± 0.47
COX2	4.74 ± 1.61	7.36 ± 2.97*	5.78 ± 2.09
p-ERK1/2	0.92 ± 0.97	1.60 ± 1.04	0.65 ± 0.70
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm ² hilar region)			
GFAP	291.39 ± 38.23	276.60 ± 34.52	294.88 ± 44.03
Iba1	56.06 ± 9.95	54.88 ± 16.04	62.01 ± 9.91
CD68	4.71 ± 1.24	5.38 ± 1.54	6.35 ± 2.41
CD163	1.82 ± 1.64	2.34 ± 1.86	3.75 ± 2.00*

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); CCK8, cholecystokinin-8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; DG, dentate gyrus; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; NaF, sodium fluoride; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

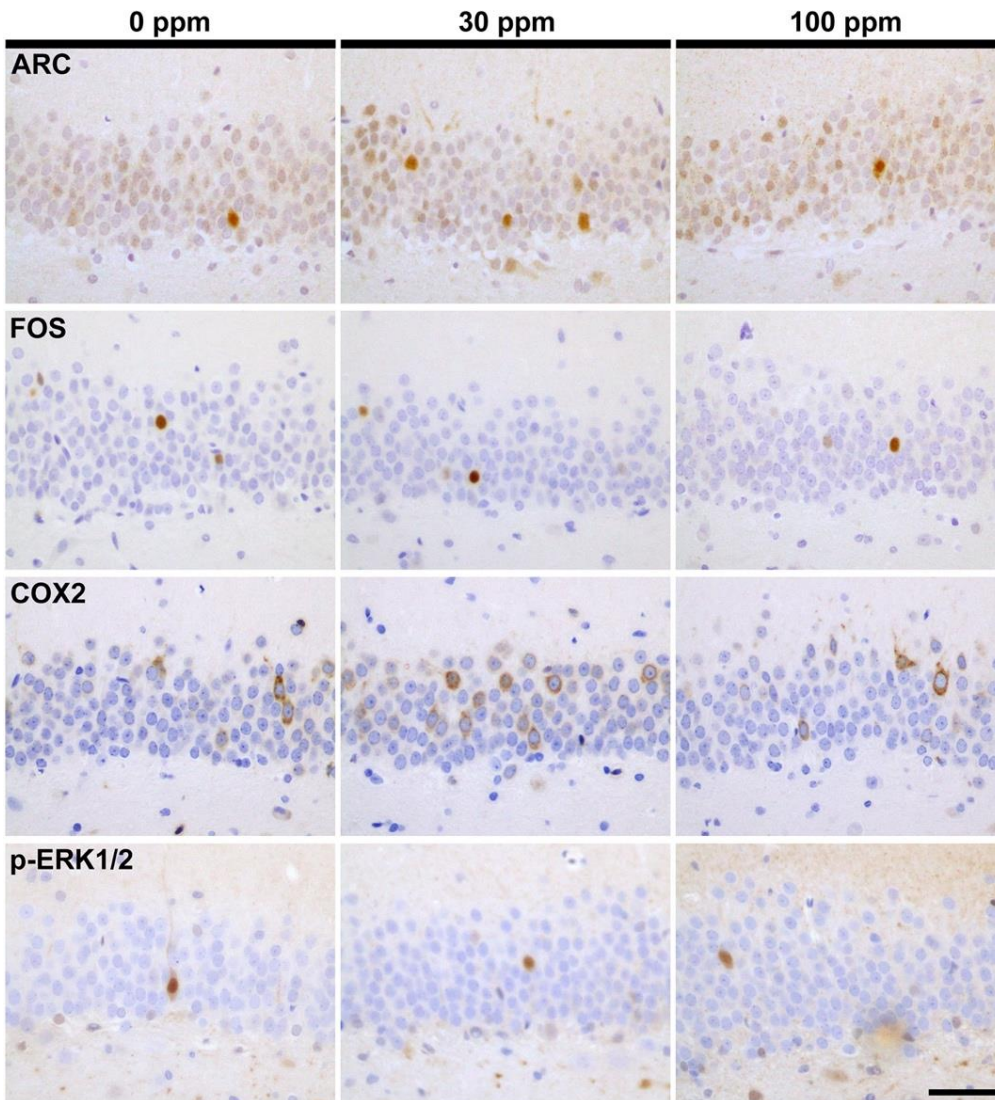
^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



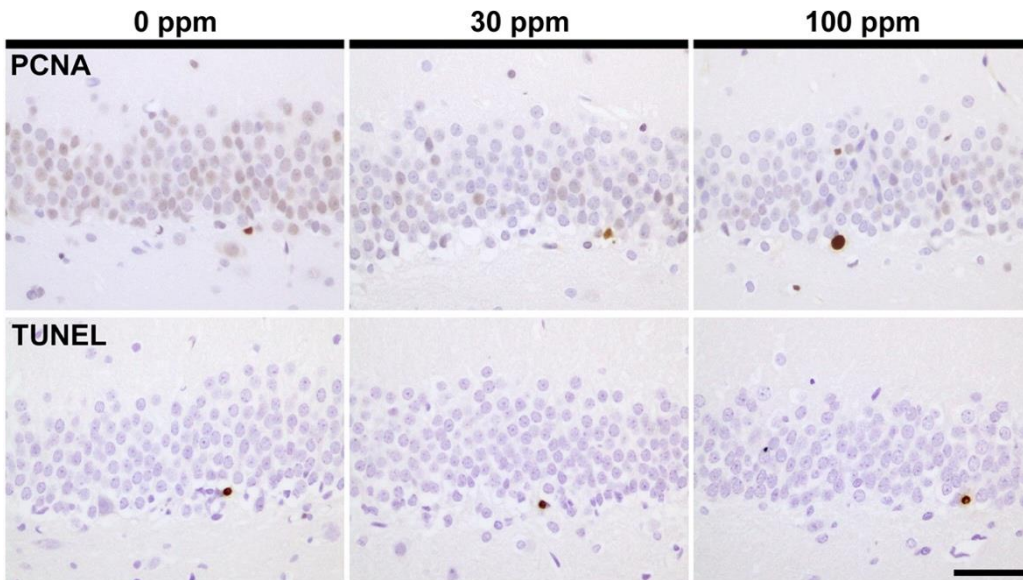
Supplementary Fig. 3

Distribution of immunoreactive cells for parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), calbindin-D-29K (CALB2), somatostatin (SST), or glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), cholecystokinin-8 (CCK8), or glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



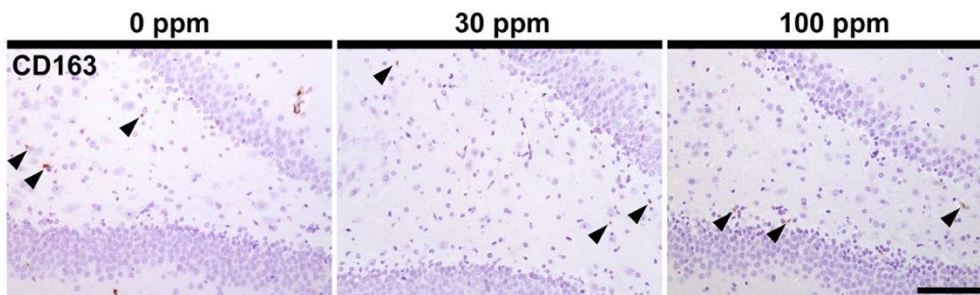
Supplementary Fig. 4

Distribution of immunoreactive cells for activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), cyclooxygenase-2 (COX2), or phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



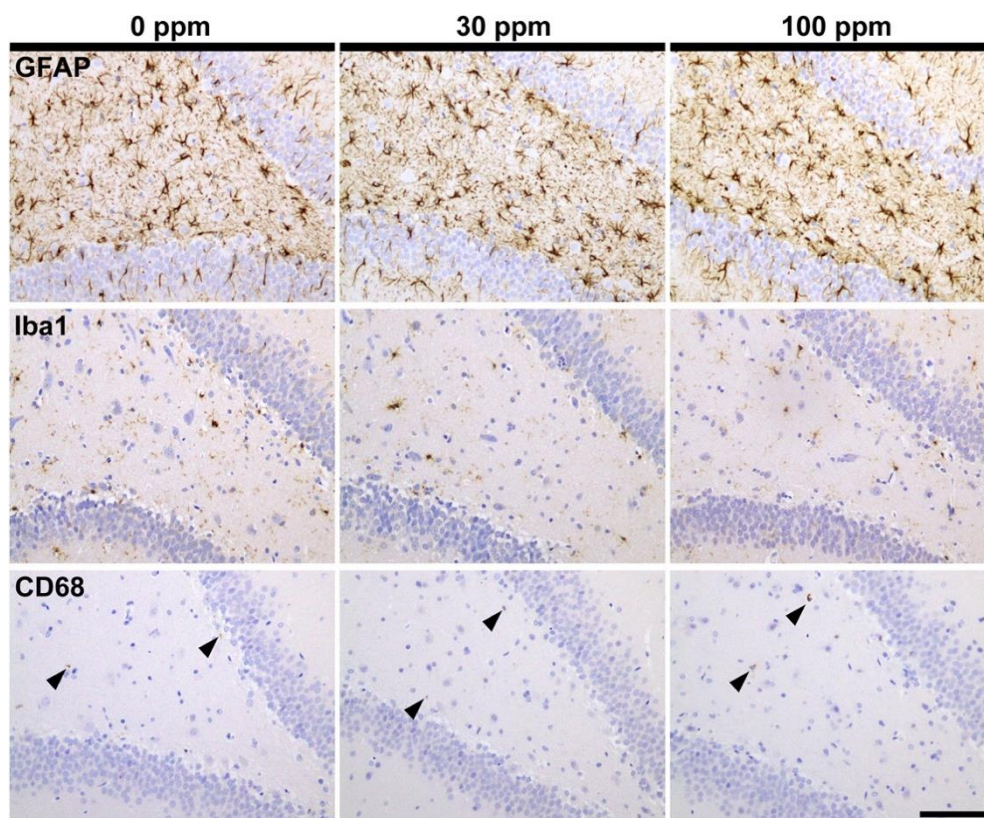
Supplementary Fig. 5

Distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



Supplementary Fig. 6

cluster of differentiation (CD) 163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 7

Distribution of immunoreactive glial cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation (CD) 68 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .

Supplementary Table 6

Oxidative stress levels in the hippocampus of male offspring on PND 21

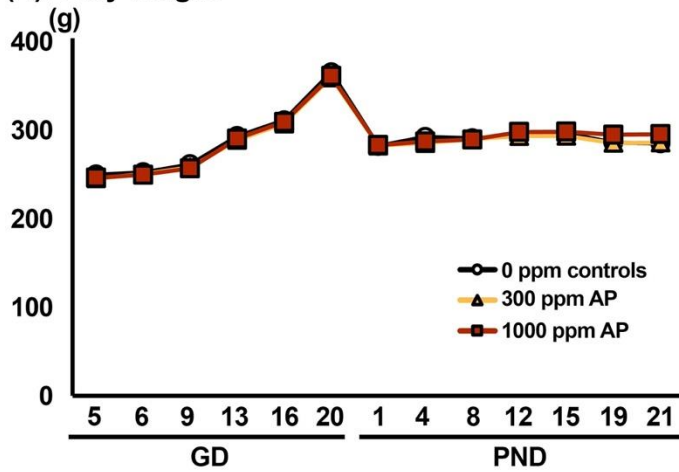
	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	6	6	6
MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	0.68 ± 0.06^a	0.76 ± 0.07	0.75 ± 0.06
GSH concentration ($\mu\text{mol/L}$)	17.92 ± 0.89	18.65 ± 0.73	18.37 ± 1.20

Abbreviations: GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

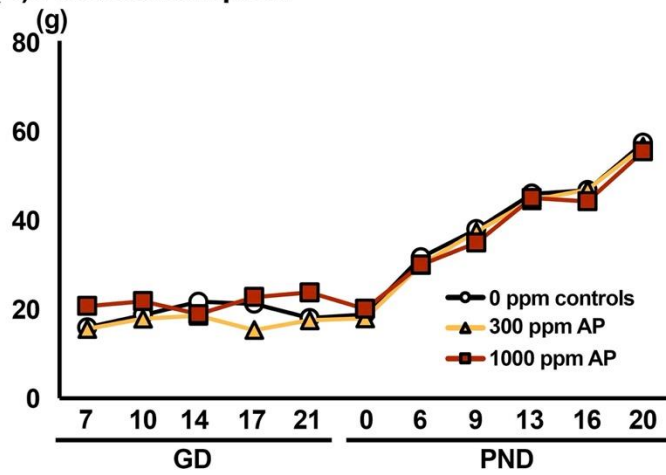
^a Mean \pm SD.

< AP 曝露実験 >

(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption

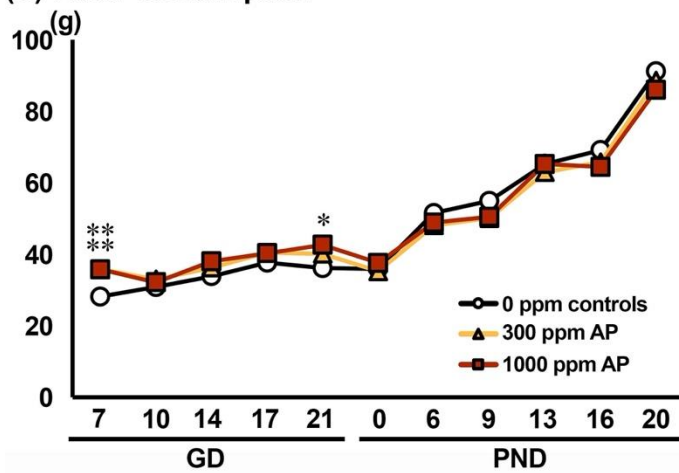


Fig. 7

(A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption of dams during the exposure period.

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

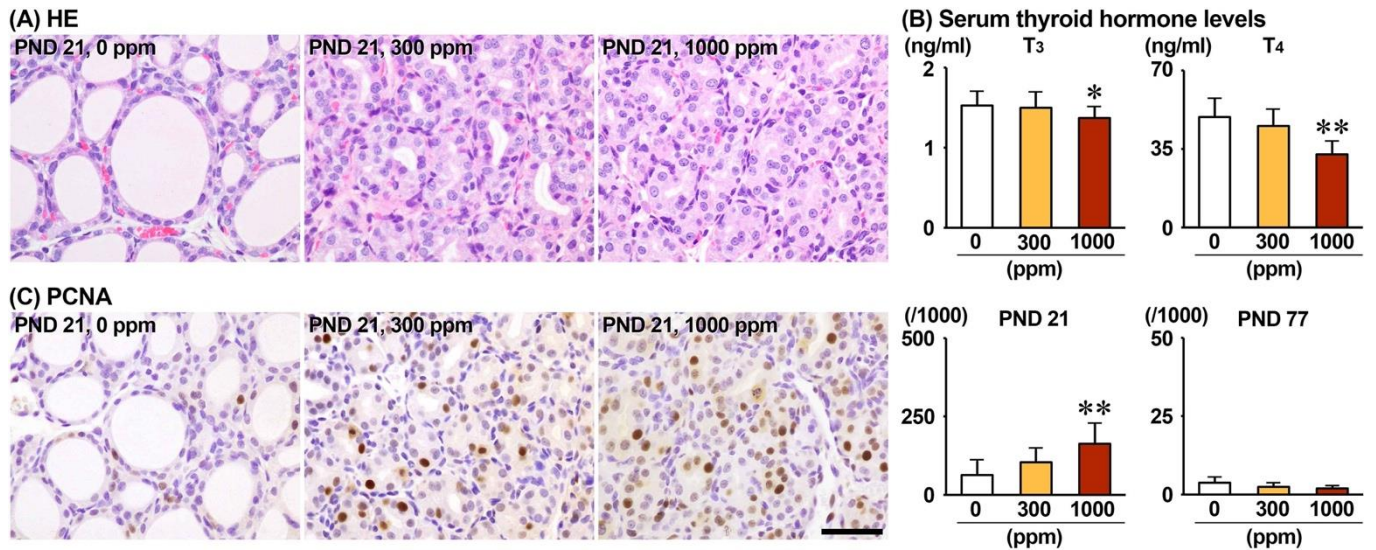


Fig. 8

(A) Histopathological changes in the thyroid on postnatal day (PND) 21, (B) changes in serum thyroid hormone levels on PND 21, and (C) distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the thyroid on PND 21 and PND 77 in female offspring after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar $50 \mu\text{m}$. (C) Graphs show the numbers of immunoreactive cells. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

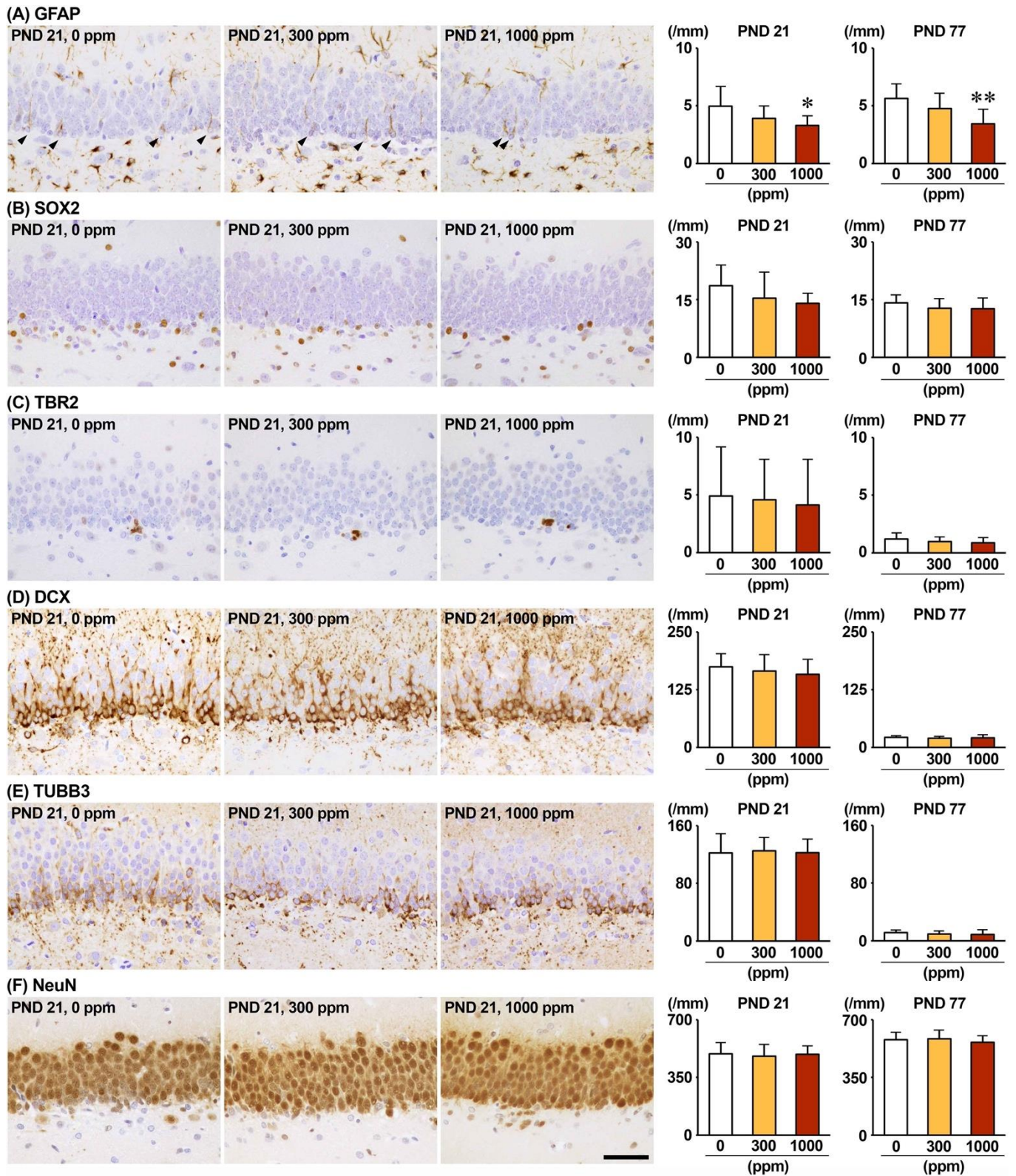


Fig. 9

Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), (C) T-box brain protein 2 (TBR2), (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3) and (F) neuronal nuclei (NeuN) in the subgranular zone (SGZ) and/or granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ in 300-ppm for TUBB3 and NeuN, and in 1000-ppm group for SOX2 and TBR2, and $N = 8$ in 1000-ppm group for NeuN at PND 21. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

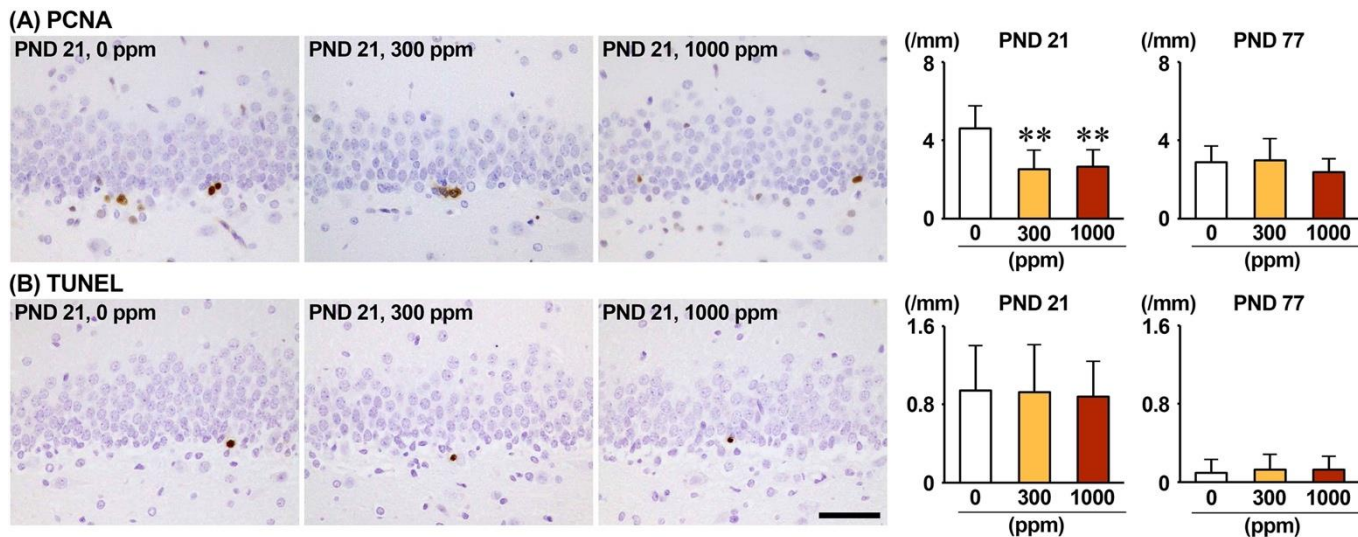


Fig. 10

Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells and (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate.

Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. $N = 10/\text{group}$. ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

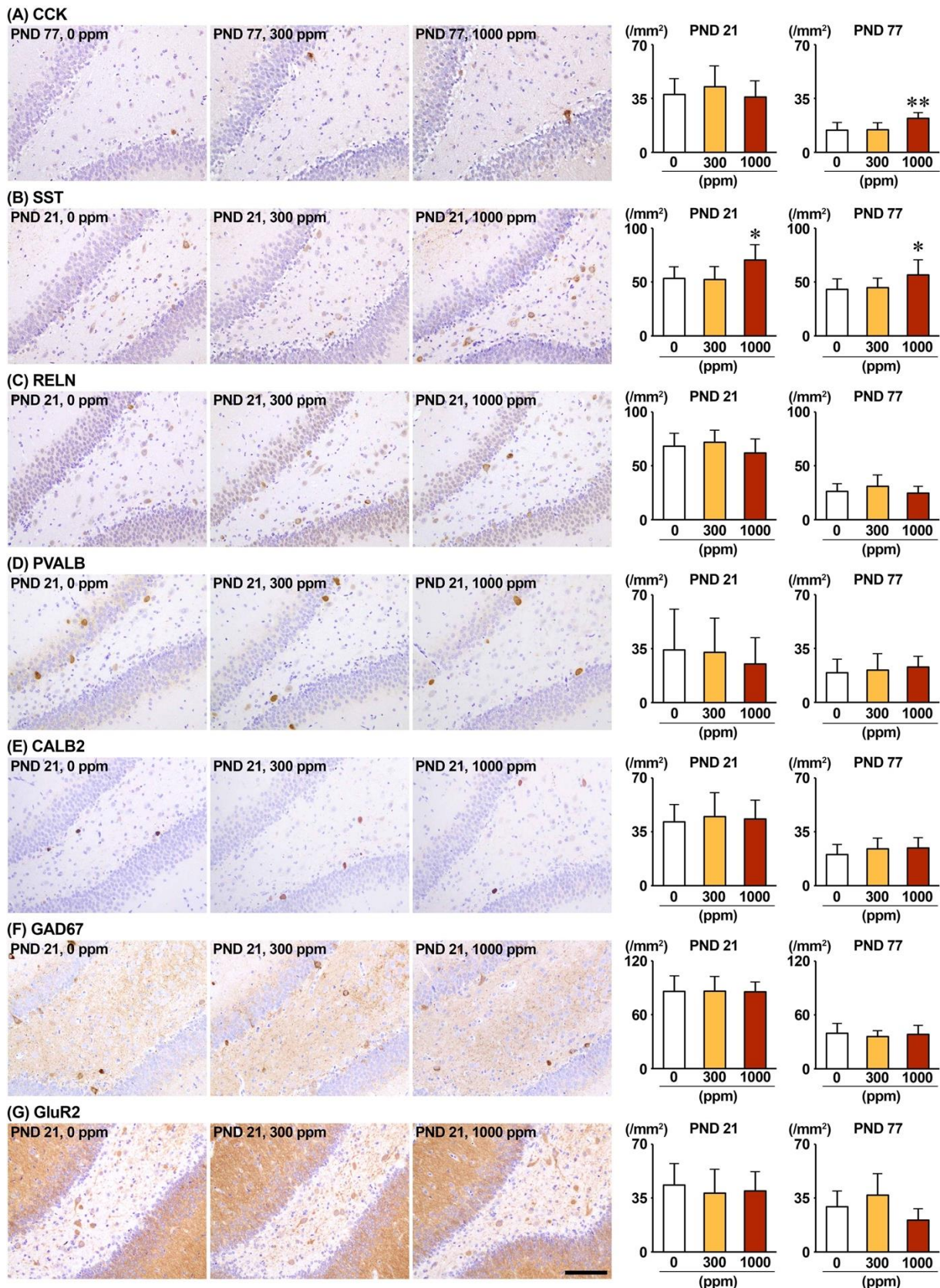


Fig. 11

Distribution of immunoreactive cells for (A) cholecystikinin (CCK8), (B) somatostatin (SST), (C) reelin (RELN), (D) parvalbumin (PVALB), (E) calbindin-D-29K (CALB2), (F) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) and (G) glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

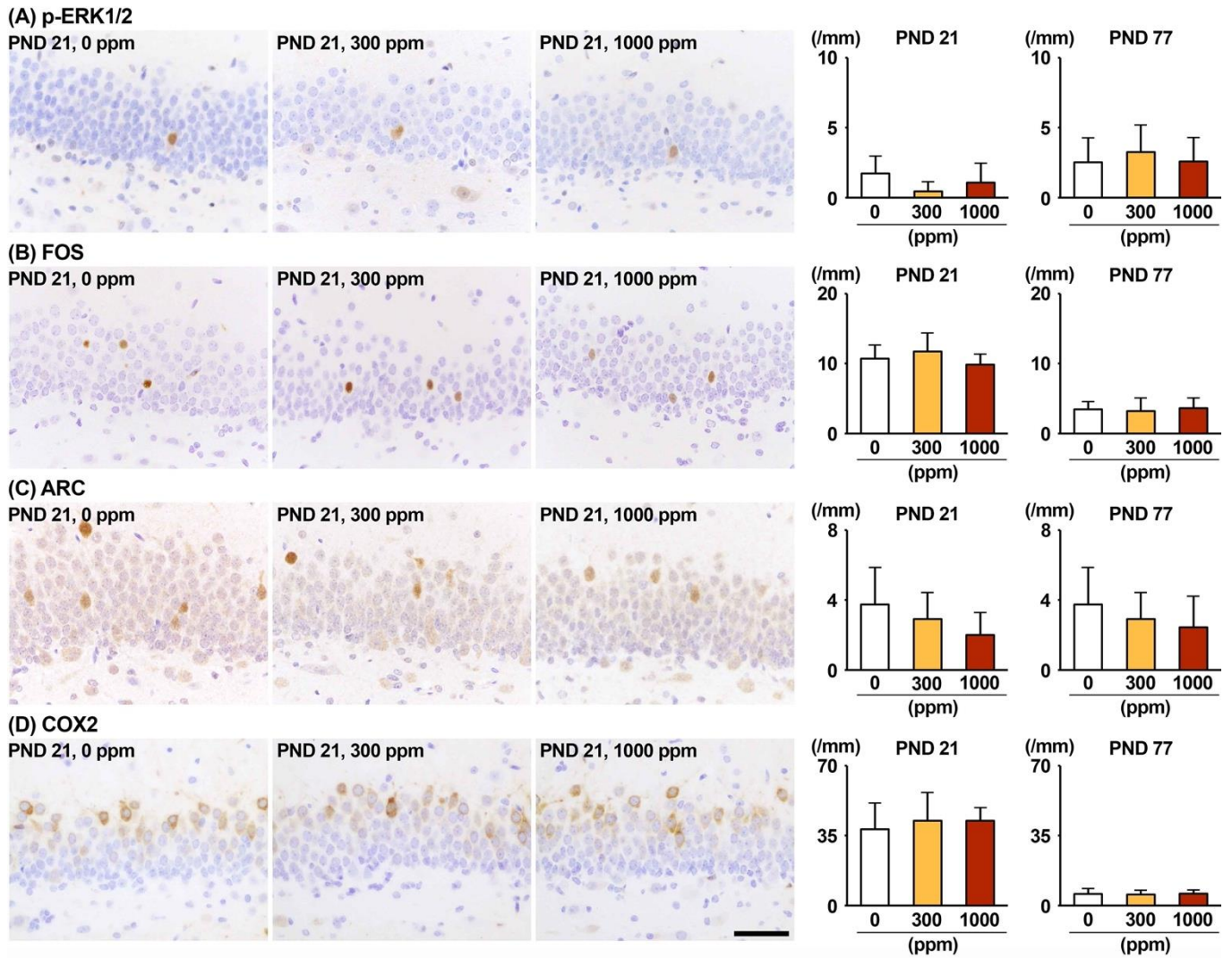


Fig. 12

Distribution of immunoreactive cells for (A) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), (B) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), (C) activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), and (D) cyclooxygenase-2 (COX2) in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ for ARC and $N = 8$ for COX2 in 1000-ppm group at PND 21.

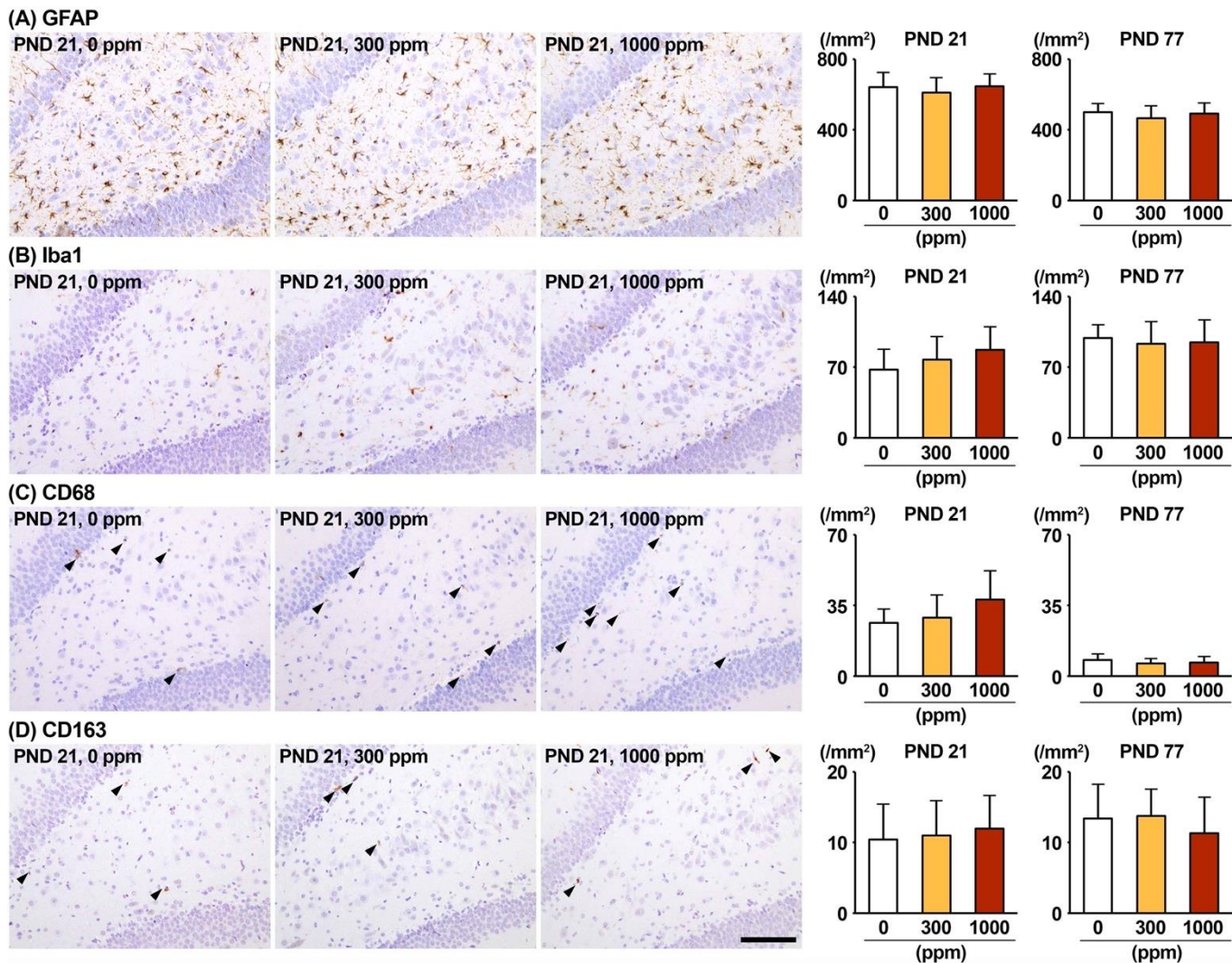


Fig. 13

Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, (D) CD163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ in 300-ppm group for GFAP and in 1000-ppm group for GFAP, Iba1, CD68 and CD163 at PND 21.

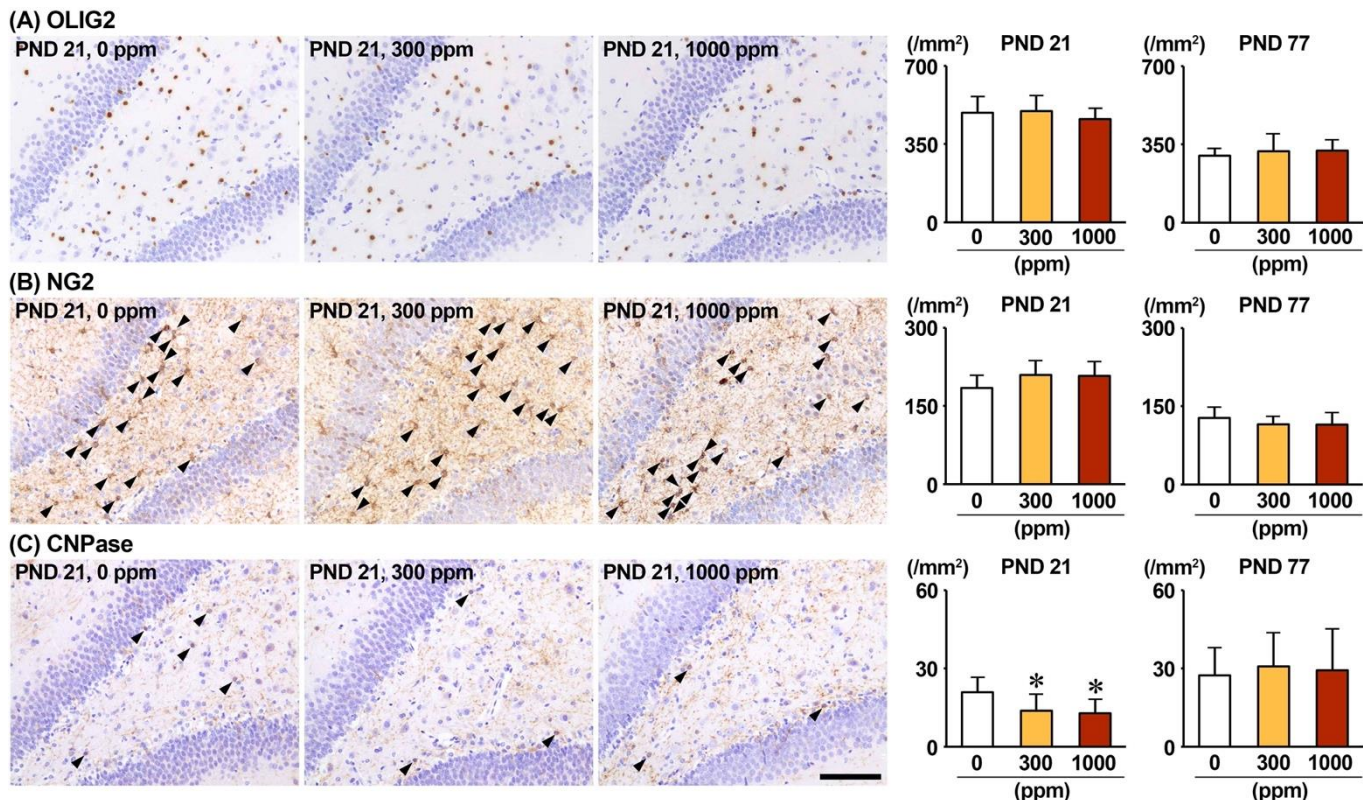


Fig. 14

Distribution of immunoreactive cells for (A) oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2), (B) NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), and (C) 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm (middle), and 1000-ppm (right) groups. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

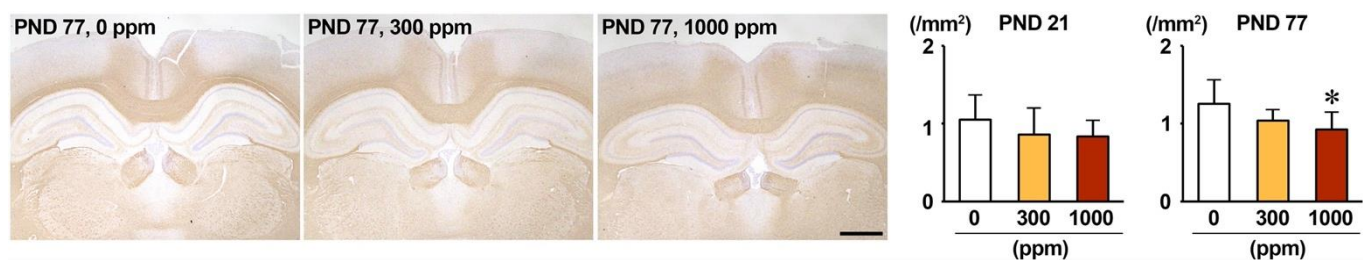


Fig. 15

Morphometrical measurement of the combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle of the cerebral hemisphere using immunostained slides for 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase in male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm (middle), and 1000-ppm (right) groups. Magnification $\times 12.5$; bar 1 mm. Graph shows measured area. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 3

Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21

No. of animals examined	AP in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		1000	
	6	6	6	6
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.00±0.11 ^a	1.02±0.24	0.88±0.14	0.83±0.15
<i>Sox2</i>	1.01±0.15	1.04±0.30	1.06±0.17	1.00±0.19
<i>Eomes</i>	1.04±0.32	1.06±0.40	0.91±0.30	0.86±0.33
<i>Dcx</i>	1.01±0.18	1.01±0.18	1.08±0.19	1.02±0.23
<i>Tubb3</i>	1.00±0.06	1.02±0.20	0.92±0.10	0.86±0.04
<i>Dpysl3</i>	1.01±0.16	1.01±0.18	1.01±0.20	0.94±0.17
<i>Rbfox3</i>	1.01±0.17	1.01±0.17	1.15±0.09	1.07±0.06
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Cck</i>	1.01±0.20	1.02±0.25	1.03±0.12	1.00±0.13
<i>Cckbr</i>	1.02±0.23	1.01±0.18	1.20±0.36	1.16±0.29
<i>Pvalb</i>	1.04±0.32	1.05±0.35	1.26±0.31	1.19±0.33
<i>Reln</i>	1.02±0.20	1.02±0.19	1.20±0.16	1.12±0.15
<i>Calb2</i>	1.44±1.21	1.50±1.29	0.51±0.21	0.47±0.18
<i>Sst</i>	1.05±0.33	1.03±0.27	1.31±0.17	1.23±0.18
<i>Pdgfa</i>	1.00±0.10	1.00±0.09	0.99±0.12	0.95±0.08
<i>Pdgfb</i>	1.00±0.10	1.00±0.05	1.04±0.07	1.01±0.07
<i>Pdgfra</i>	1.01±0.18	1.01±0.12	1.01±0.15	0.95±0.14
<i>Pdgfrb</i>	1.00±0.10	1.00±0.09	1.14±0.07*	1.10±0.07
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01±0.13	1.02±0.21	0.97±0.17	0.91±0.16
<i>Ntrk2</i>	1.01±0.15	1.02±0.19	1.23±0.14*	1.15±0.16
Neural stem/progenitor cell regulatory genes				
<i>Pcna</i>	1.01±0.15	1.01±0.18	1.10±0.17	1.03±0.16
<i>Ephb1</i>	1.01±0.12	1.01±0.17	0.94±0.15	0.88±0.13
<i>Ephb2</i>	1.02±0.21	1.01±0.18	1.05±0.14	0.99±0.14
<i>Efnb3</i>	1.20±0.79	1.20±0.75	2.36±0.28**	2.22±0.35*
<i>Notch1</i>	1.02±0.22	1.02±0.19	0.93±0.27	0.88±0.27
<i>Dll4</i>	1.02±0.21	1.03±0.26	1.13±0.12	1.07±0.19
<i>Hes5</i>	1.00±0.09	1.02±0.20	1.08±0.10	1.02±0.14
<i>Thrsp</i>	1.02±0.20	1.01±0.16	1.09±0.24	1.03±0.26
<i>Wnt7b</i>	1.04±0.31	1.02±0.24	1.33±0.17	1.25±0.12
Neural progenitor cell/neuroblast proliferation-related genes				
<i>Fzd9</i>	1.00±0.10	1.01±0.15	1.12±0.15	1.06±0.17
<i>Numbl</i>	1.02±0.20	1.02±0.19	1.10±0.21	1.02±0.14
<i>Vegfa</i>	1.01±0.19	1.02±0.24	1.27±0.16*	1.19±0.15
Neuronal migration-related genes				
<i>Arhgef2</i>	1.01±0.13	1.01±0.17	1.25±0.09**	1.17±0.09
<i>Cntn2</i>	1.01±0.13	1.02±0.21	1.00±0.13	0.94±0.10
<i>Sema3c</i>	1.02±0.20	1.01±0.14	1.17±0.22	1.10±0.26
<i>Fgf13</i>	1.01±0.17	1.02±0.21	1.12±0.15	1.05±0.12
<i>Robo3</i>	1.20±0.88	1.17±0.79	2.58±0.82*	2.42±0.75*
Neuronal differentiation-related genes				
<i>Acsl4</i>	1.01±0.17	1.00±0.10	1.04±0.13	0.97±0.07
<i>Baiap2</i>	1.02±0.24	1.01±0.17	1.26±0.14	1.18±0.08*
<i>Tfap2c</i>	1.02±0.21	1.01±0.18	1.15±0.29	1.09±0.32
Synaptic plasticity marker genes				
<i>Fos</i>	1.02±0.21	1.06±0.40	0.95±0.26	0.90±0.25
<i>Arc</i>	1.05±0.33	1.03±0.26	1.29±0.40	1.20±0.33
<i>Ptgs2</i>	1.00±0.10	1.02±0.21	1.02±0.17	0.96±0.12
Oxidative stress-related genes				
<i>Cat</i>	1.02±0.21	1.01±0.17	0.93±0.13	0.87±0.12
<i>Mt1</i>	1.03±0.27	1.02±0.22	1.14±0.17	1.07±0.20
<i>Mt2</i>	1.03±0.29	1.02±0.24	1.23±0.32	1.15±0.28
<i>Sod1</i>	1.01±0.16	1.05±0.34	1.04±0.15	0.98±0.17
<i>Sod2</i>	1.00±0.09	1.02±0.25	0.96±0.14	0.89±0.10
<i>Gpt1</i>	1.01±0.13	1.01±0.18	1.01±0.10	0.95±0.09
Chemical mediators				
<i>Tnf</i>	1.10±0.53	1.09±0.47	1.10±0.24	1.07±0.24

<i>Il1b</i>	1.37 ± 1.06	1.40 ± 1.10	1.50 ± 0.53	1.45 ± 0.49
<i>Il6</i>	1.17 ± 0.68	1.14 ± 0.61	1.83 ± 1.13	1.76 ± 1.04
<i>Il18</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.19	1.03 ± 0.13	1.00 ± 0.12
Glutamatergic receptors and glutamate transporters				
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.17	1.22 ± 0.07	1.18 ± 0.09
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.14	1.35 ± 0.11**	1.31 ± 0.10**
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.30 ± 0.19*	1.22 ± 0.17
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.21	1.26 ± 0.14	1.18 ± 0.13
<i>Grin2b</i>	1.1 ± 0.17	1.01 ± 0.11	1.22 ± 0.05*	1.19 ± 0.03**
<i>Grin2d</i>	1.03 ± 0.27	1.04 ± 0.31	0.90 ± 0.15	0.87 ± 0.14
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.07 ± 0.42	1.04 ± 0.31	1.19 ± 0.32	1.12 ± 0.35
<i>Fgf2</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.22	1.06 ± 0.05	1.00 ± 0.12
<i>Ror2</i>	1.03 ± 0.29	1.04 ± 0.30	0.83 ± 0.12	0.78 ± 0.12
OL lineage-related genes				
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.13	0.97 ± 0.10
<i>Vim</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.22	0.94 ± 0.24	0.89 ± 0.23
<i>Kl</i>	1.17 ± 0.65	1.22 ± 0.77	0.51 ± 0.19	0.48 ± 0.22
<i>Id2</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.19	1.16 ± 0.14	1.09 ± 0.17
<i>Shh</i>	1.06 ± 0.40	1.07 ± 0.39	0.88 ± 0.25	0.82 ± 0.19
Myelination-related genes				
<i>Cnp</i>	1.02 ± 0.25	1.04 ± 0.30	0.89 ± 0.12	0.84 ± 0.08
<i>Mbp</i>	1.03 ± 0.27	1.05 ± 0.37	0.89 ± 0.16	0.83 ± 0.12
<i>Plp1</i>	1.03 ± 0.24	1.07 ± 0.41	0.97 ± 0.16	0.91 ± 0.14

Abbreviations: *Acsl4*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; AP, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numbl*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

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

Table 4

Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77

	AP in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		1000	
	No. of animals examined	6	6	6
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.01 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.11	1.23 ± 0.19*	1.28 ± 0.20*
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.20	1.06 ± 0.11	1.10 ± 0.16
<i>Eomes</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	1.28 ± 0.38	1.35 ± 0.47
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.96 ± 0.09	1.01 ± 0.14
<i>Tubb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.17	1.04 ± 0.04	1.08 ± 0.08
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.05 ± 0.08	1.09 ± 0.11
<i>Rbfox3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.14
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Cck</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.05 ± 0.13	1.10 ± 0.20
<i>Cckbr</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.20	1.08 ± 0.25
<i>Pvalb</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.12	1.02 ± 0.14
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.14	1.14 ± 0.26	1.17 ± 0.24
<i>Calb2</i>	1.07 ± 0.44	1.07 ± 0.42	0.99 ± 0.37	1.01 ± 0.32
<i>Sst</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.15	1.05 ± 0.12	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfa</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.08	1.12 ± 0.14
<i>Pdgfb</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.06 ± 0.10	1.10 ± 0.14
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.12	1.04 ± 0.13	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfrb</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.21	1.22 ± 0.18*
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.13	0.94 ± 0.16
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0.98 ± 0.05	1.02 ± 0.07
Neural stem/progenitor cell regulatory genes				
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.08
<i>Ephb1</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.06	1.11 ± 0.11
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.12
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.21	1.04 ± 0.25
<i>Notch1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.19	1.23 ± 0.19*
<i>Dll4</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.23 ± 0.19	1.28 ± 0.25*
<i>Hes5</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.05 ± 0.16	1.09 ± 0.22
<i>Thrsp</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.11 ± 0.12	1.15 ± 0.13*
<i>Wnt7b</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.17	1.06 ± 0.17
Neural progenitor cell/neuroblast proliferation-related genes				
<i>Fzd9</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.15 ± 0.13*	1.20 ± 0.20
<i>Numbl</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.16
<i>Vegfa</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.19	1.12 ± 0.18
Neuronal migration-related genes				
<i>Arhgef2</i>	0.86 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.87 ± 0.10
<i>Cntn2</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11	1.09 ± 0.12	1.12 ± 0.09
<i>Sema3c</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14	0.79 ± 0.14*	0.82 ± 0.16
<i>Fgf13</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.04	1.02 ± 0.09
<i>Robo3</i>	1.04 ± 0.36	1.04 ± 0.35	1.50 ± 0.16*	1.57 ± 0.23*
Neuronal differentiation-related genes				
<i>Acsl4</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.06	1.05 ± 0.11
<i>Baiap2</i>	0.82 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.80 ± 0.04	0.83 ± 0.08
<i>Tfap2c</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.17	0.91 ± 0.19	0.94 ± 0.18
Synaptic plasticity marker genes				
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.22	1.04 ± 0.27
<i>Arc</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.17 ± 0.42	1.22 ± 0.45
<i>Ptgs2</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.94 ± 0.08	0.98 ± 0.14
Oxidative stress-related genes				
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.10
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.20	1.11 ± 0.18	1.15 ± 0.19
<i>Mt2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.95 ± 0.18	0.98 ± 0.19
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.09	0.96 ± 0.13
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.11	0.98 ± 0.08	1.02 ± 0.11
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.87 ± 0.06*	0.90 ± 0.06
Chemical mediators				
<i>Tnf</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.29	1.45 ± 0.60	1.52 ± 0.70
<i>Il1b</i>	1.19 ± 0.55	1.19 ± 0.55	1.09 ± 0.74	1.13 ± 0.72
<i>Il6</i>	1.19 ± 0.58	1.19 ± 0.58	1.08 ± 0.70	1.12 ± 0.71
<i>Il18</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.19 ± 0.20	1.24 ± 0.27
Glutamatergic receptors and glutamate transporters				

<i>Gria1</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.12	1.03 ± 0.17
<i>Gria2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.12
<i>Gria3</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.14
<i>Grin2a</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.12	1.04 ± 0.15
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.04 ± 0.09	1.08 ± 0.13
<i>Grin2d</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.16	0.95 ± 0.12
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.11 ± 0.22	1.15 ± 0.20
<i>Fgf2</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.04 ± 0.14	1.08 ± 0.15
<i>Ror2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.25	1.24 ± 0.32
OL lineage-related genes				
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	1.09 ± 0.11	1.13 ± 0.09
<i>Vim</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.22	0.94 ± 0.24	0.89 ± 0.23
<i>Kl</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	1.13 ± 0.39	1.19 ± 0.46
<i>Id2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.94 ± 0.15	0.98 ± 0.15
<i>Shh</i>	1.11 ± 0.56	1.11 ± 0.55	1.20 ± 0.59	1.12 ± 0.52
Myelination-related genes				
<i>Cnp</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	0.99 ± 0.11	1.02 ± 0.10
<i>Mbp</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	1.10 ± 0.09	1.14 ± 0.06
<i>Plp1</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	0.99 ± 0.10	1.03 ± 0.07

Abbreviations: *Acs14*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; AP, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numbl*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

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

Supplementary Table 7**Maternal reproductive parameters**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
No. of implantation sites in the uterus	12.5±2.0	13.1±1.4	12.7±2.4
No. of live offspring	12.0±2.6	12.0±2.8	11.0±3.3
Male ratio (%)	58.4±18.1	40.0±20.1	48.1±13.2

Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^aMean ± S.D.

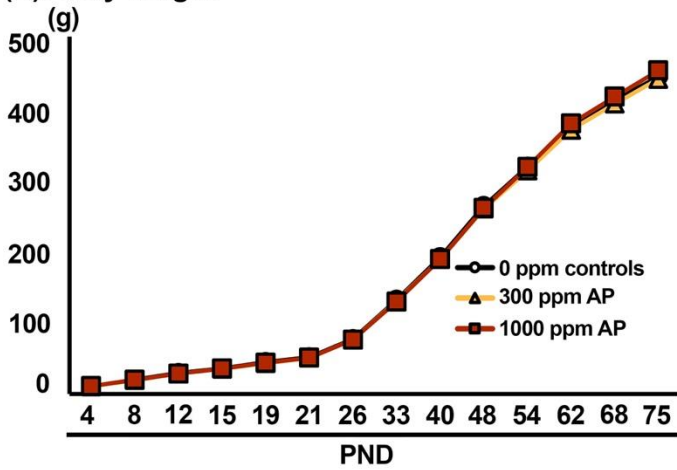
Supplementary Table 8**Body and brain weights of dams**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
Body weight (g)	282.6±20.8 ^a	283.4±12.3	292.7±16.8
Brain weight (g)	1.86±0.11	1.87±0.06	1.86±0.09

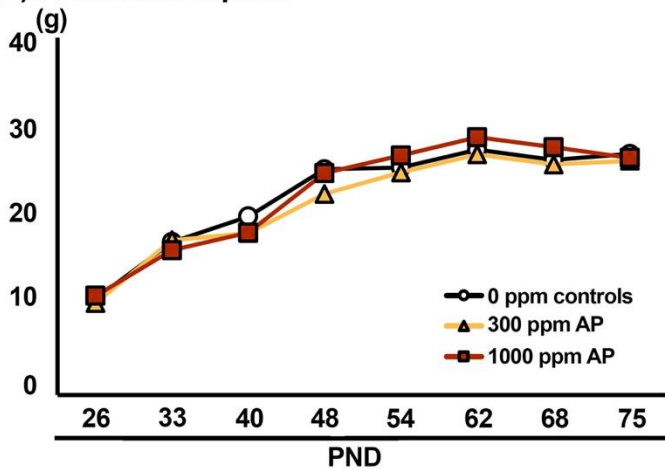
Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^aMean ± S.D.

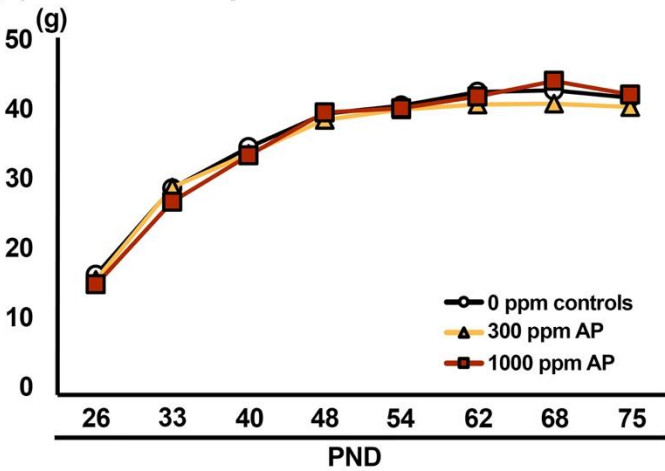
(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption



Supplementary Fig. 8

(A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption of male offspring.

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day.

Supplementary Table 9
Body and brain weights of male offspring

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
PND 21			
No. of offspring examined	19	19	19
Body weight (g)	52.5±2.9 ^a	51.1±3.0	50.1±3.6
No. of offspring examined	8	8	8
Brain weight (g)	1.50±0.08	1.50±0.05	1.50±0.05
PND 77			
No. of offspring examined	19	19	19
Body weight (g)	451.8±30.6	450.4±21.2	459.7±29.3
No. of offspring examined	8	8	8
Brain weight (g)	2.10±0.13	2.10±0.03	2.20±0.21

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

Supplementary Table 10
Histopathological changes and proliferation activity in the thyroid tissues of female offspring

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
PND 21			
No. of offspring examined	12	12	12
Decrease in follicular colloids (++/+++) ^a	0 (0/0)	12** (6/6) ^{††}	12** (0/12) ^{††}
Follicular cell hyperplasia (++/+++)	0 (0/0)	12** (12/0) ^{††}	12** (6/6) ^{††}
Number of PCNA ⁺ cells (/1000)	63.60 ± 42.53 ^b	104.38 ± 39.58	162.80 ± 65.67 ^{##}
PND 77			
No. of offspring examined	8	8	8
Decrease in follicular colloids (++/+++)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
Follicular cell hyperplasia (++/+++)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
Number of PCNA ⁺ cells (/1000)	3.74 ± 1.79	2.44 ± 1.25	1.97 ± 0.83

^aGrade of change: (++) , moderate; (+++), marked.

^bMean ± S.D.

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day.

***P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Fisher's exact test.

^{††}*P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Mann-Whitney's *U*-test.

^{##}*P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

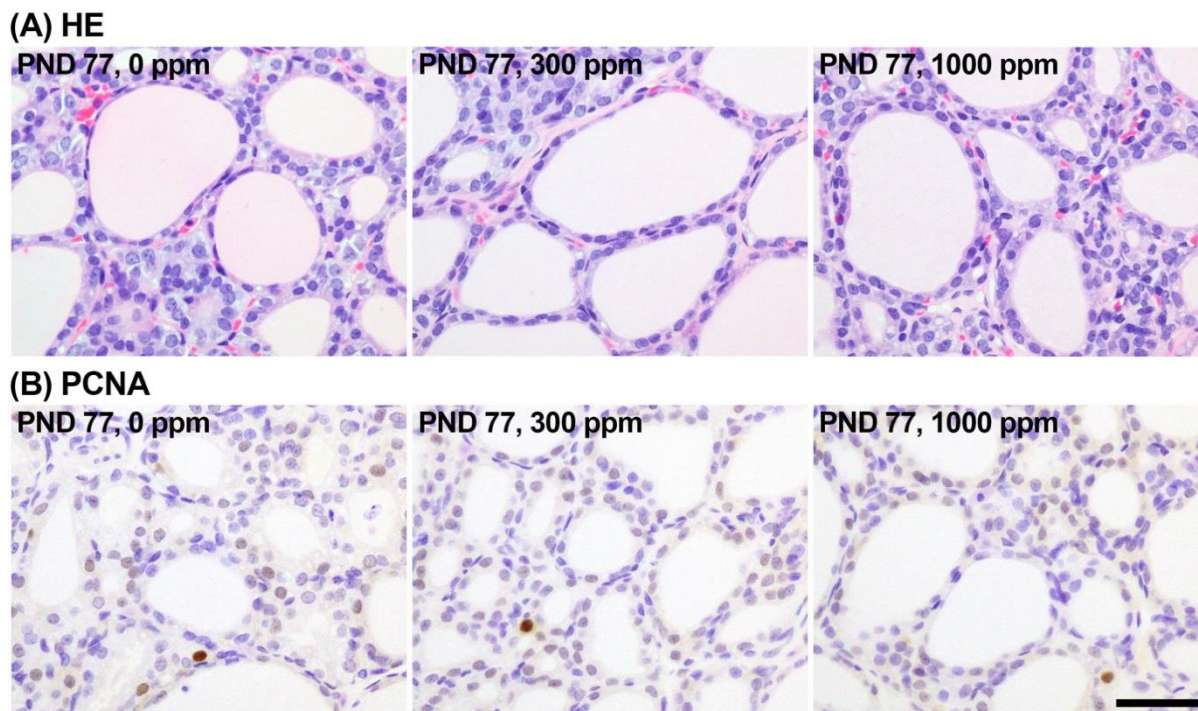
Supplementary Table 11
Serum thyroid hormone changes in female offspring on PND 21

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	12	12	12
T ₃ (ng/ml)	1.52±0.18 ^a	1.50 ± 0.19	1.37±0.14*
T ₄ (ng/ml)	49.2±8.28	45.2 ± 7.38	32.6±5.75**

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine.

^aMean ± S.D.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 9

(A) Histopathological changes and (B) distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the thyroid of female offspring on postnatal day (PND) 77.

Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 12**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21**

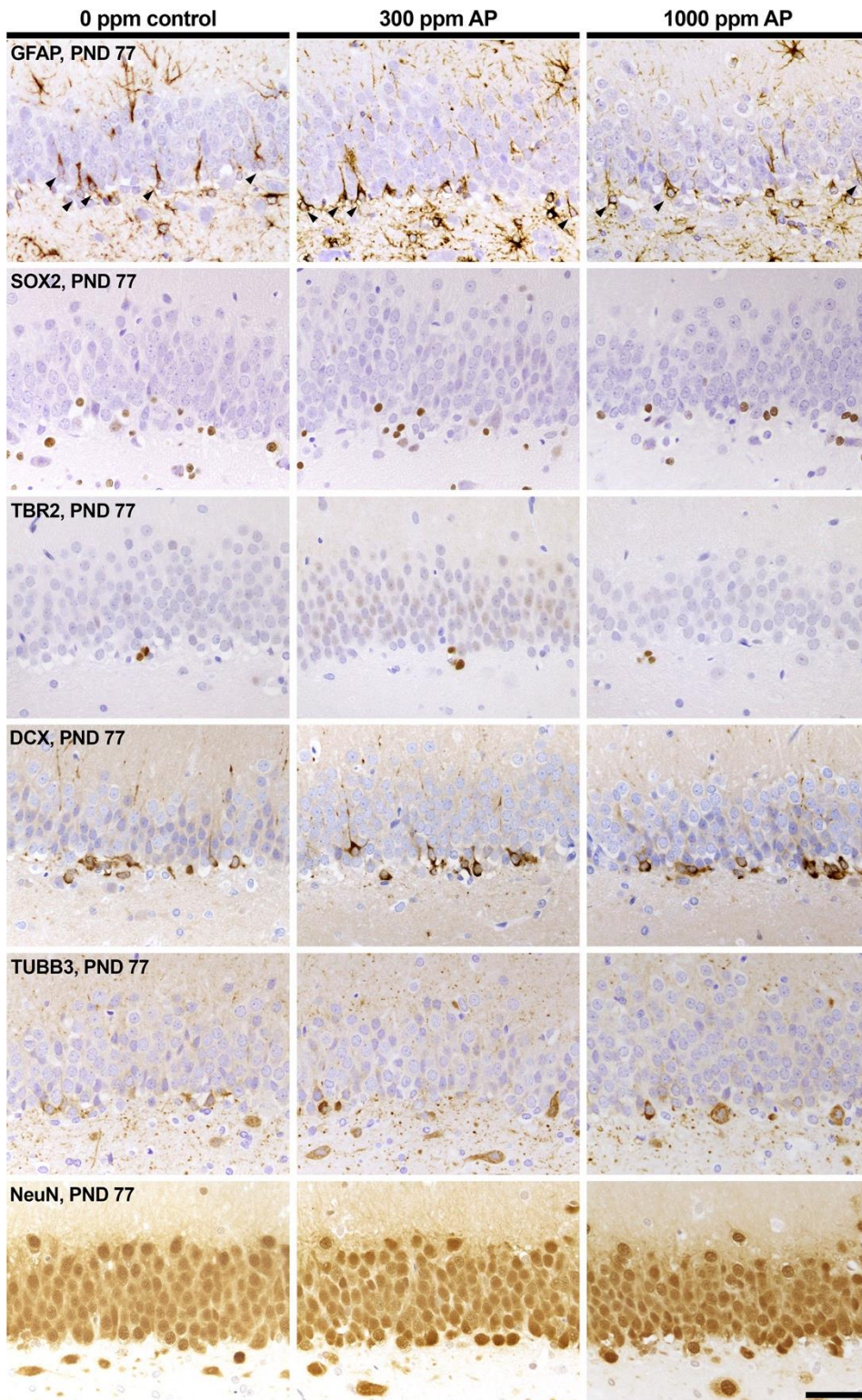
	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	4.97±1.77 ^a	3.92±1.10	3.31±0.86*
SOX2	18.62±5.61	15.39±7.09	14.16±2.61
TBR2	9.17±4.46	8.52±3.65	8.43±5.12
DCX	174.71±29.13	163.58±39.96	158.83±34.10
TUBB3	122.07±27.85	124.95±19.51	122.46±19.34
NeuN	493.32±70.60	479.32±72.76	490.27±53.46
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)			
PCNA	4.60±1.20	2.52±1.03**	2.65±0.90**
TUNEL	0.94±0.48	0.92±0.51	0.88±0.37
Interneuron subpopulations (No./mm ² hilar region)			
CCK8	27.34±10.25	28.28±12.11	23.87±10.02
SST	53.42±11.06	52.29±12.54	70.44±14.71*
RELN	103.69±43.06	105.53±36.32	86.70±31.34
PVALB	35.53±27.49	33.25±23.75	23.95±19.33
CALB2	41.47±11.70	44.86±16.20	43.28±12.72
GAD67	85.90±17.03	86.17±16.03	85.40±10.75
GluR2	43.38±13.85	38.24±15.31	39.62±12.34
Synaptic plasticity markers (No./mm SGZ length)			
p-ERK1/2	1.73±1.29	0.64±0.88	1.09±1.43
FOS	10.70±2.04	11.72±2.75	9.85±1.53
ARC	4.00±1.93	3.02±2.37	2.60±2.03
COX2	38.12±13.77	42.41±14.95	42.50±6.84
Astrocytes and microglia (No./mm ² hilar region)			
GFAP	641.10±86.70	609.85±89.15	645.96±72.12
Iba1	71.86±27.59	90.15±29.74	96.83±24.42
CD68	26.42±6.93	28.88±11.73	37.92±14.19
CD163	10.44±5.20	10.97±5.14	11.69±4.70
Oligodendrocyte (No./mm ² hilar region)			
OLIG2	489.35±76.76	496.95±72.21	461.03±50.59
NG2	184.41±23.71	209.19±27.29	207.56±26.99
CNPase	20.95±5.83	13.81±6.56*	12.88±5.45*

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin-D-29K (calretinin); CCK8, cholecystokinin 8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; CNPase, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NeuN, neuronal nuclei; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase); PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

N = 10/group, except for N = 9 in 300-ppm for TUBB3, NeuN and GFAP (astrocytes), and in 1000-ppm group for SOX2, TBR2, ARC, GFAP (astrocytes), Iba1, CD68 and CD163, and N = 8 in 1000-ppm group for NeuN and COX2.

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 10

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), T-box brain protein 2 (TBR2), doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3) and neuronal nuclei (NeuN) in the subgranular zone and/or granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 13**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL and or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77**

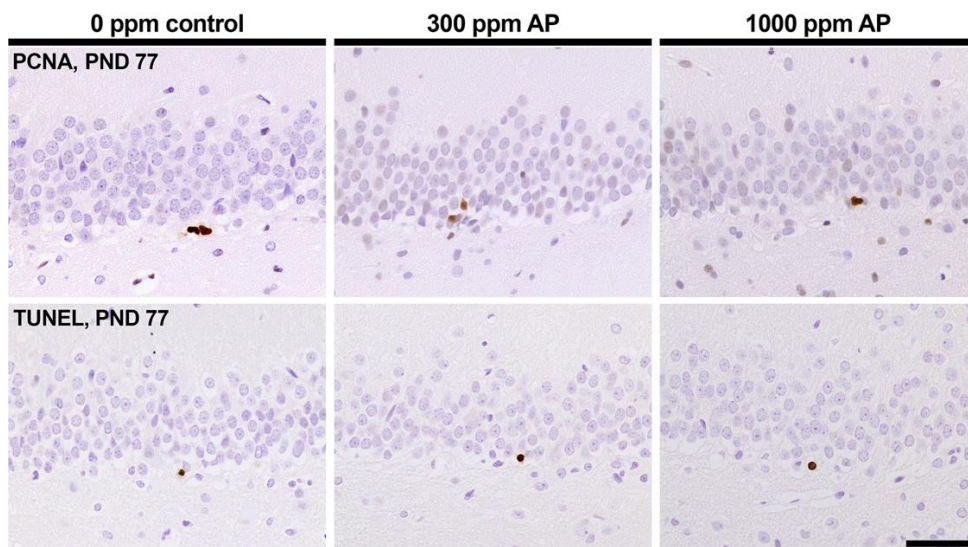
	No. of animals examined	AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
		10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)				
GFAP		5.64±1.31 ^a	4.77 ± 1.37	3.44±1.30**
SOX2		14.18±2.09	12.75 ± 2.61	12.64±2.90
TBR2		3.59±1.66	2.96 ± 1.20	2.64±1.34
DCX		21.96±1.89	19.72 ± 3.13	20.96±5.41
TUBB3		11.41±3.63	9.55 ± 4.20	9.00±6.36
NeuN		577.88±46.40	584.39 ± 53.10	563.20±40.15
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)				
PCNA		2.89±0.85	2.78 ± 1.27	2.38±0.70
TUNEL (in the SGZ)		0.10±0.14	0.13 ± 0.15	0.13±0.14
Interneuron subpopulations (No./mm ² hilar region)				
CCK8		12.60±3.60	12.64 ± 3.78	17.71±3.78**
SST		43.16±9.97	44.41 ± 8.65	56.52±14.65*
RELN		103.69±43.06	105.53 ± 36.31	86.70±31.34
PVALB		13.61±7.64	12.56 ± 6.97	15.79±6.50
CALB2		20.18±6.76	22.48 ± 8.30	24.57±6.78
GAD67		39.67±11.20	37.12 ± 7.21	38.30±10.41
GluR2		35.93±13.45	42.11 ± 15.94	26.04±8.68
Synaptic plasticity markers (No./mm SGZ length)				
p-ERK1/2		8.91±8.07	10.71 ± 6.50	9.50±6.76
FOS		3.45±1.15	3.24 ± 1.92	3.64±1.51
ARC		3.75±2.21	2.92 ± 1.58	2.44±1.85
COX2		5.81±2.72	5.61 ± 2.01	5.96±1.87
Astrocytes and microglia (No./mm ² hilar region)				
GFAP		499.01±50.58	466.16 ± 72.43	491.07±61.78
Iba1		98.95±13.34	92.27 ± 21.78	94.66±23.03
CD68		7.96±2.98	6.29 ± 2.22	6.75±2.97
CD163		13.39±5.05	13.33 ± 3.98	11.31±5.33
Oligodendrocyte (No./mm ² hilar region)				
OLIG2		299.32±32.70	319.07 ± 80.93	322.38±48.92
NG2		127.67±21.34	115.61 ± 15.27	114.68±24.07
CNPase		27.40±10.99	30.78 ± 13.45	29.33±16.63

Abbreviations: AP; ammonium perchlorate, ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin-D-29K (calretinin); CCK8, cholecystokinin 8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; CNPase, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NeuN, neuronal nuclei; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase); PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

N = 10/group.

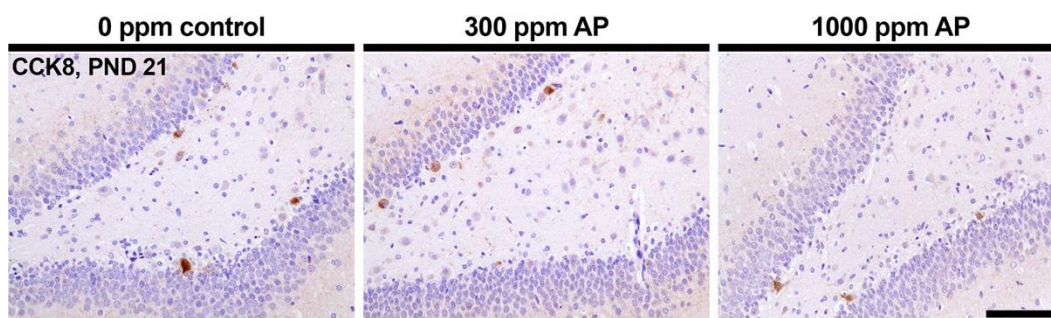
^a Mean ± SD.

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



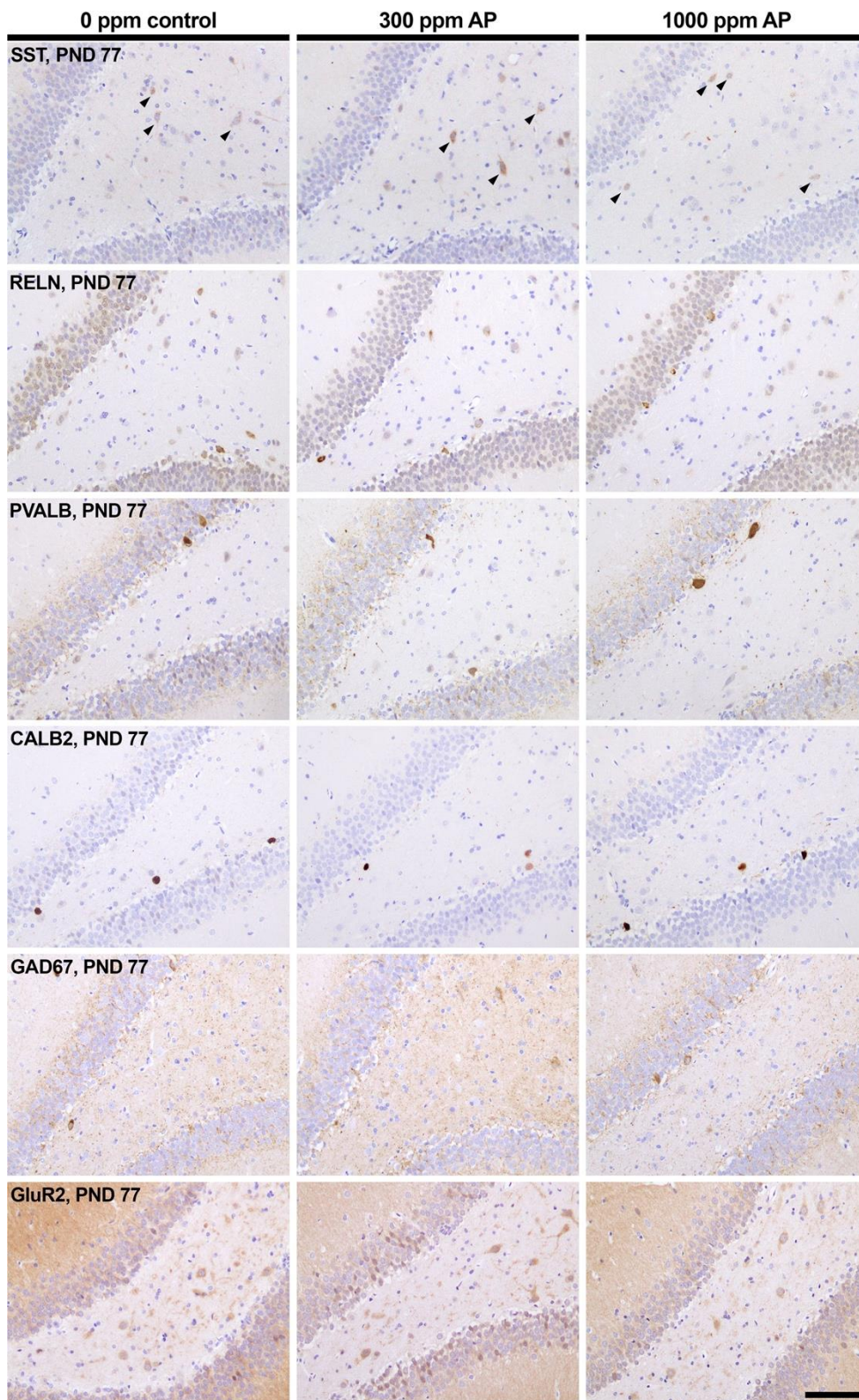
Supplementary Fig. 11

Distribution of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



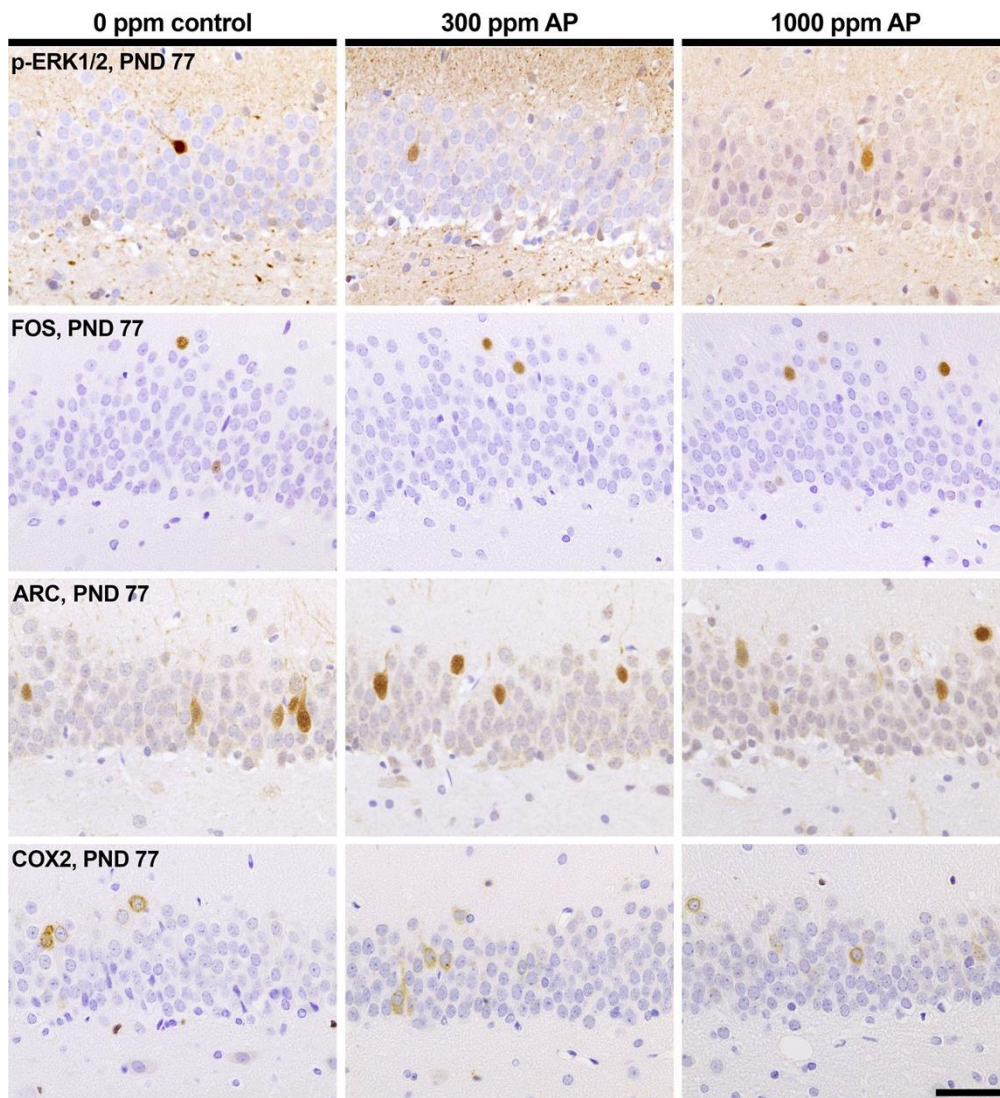
Supplementary Fig. 12

Distribution of immunoreactive cells for cholecystokinin 8 (CCK8) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0 ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



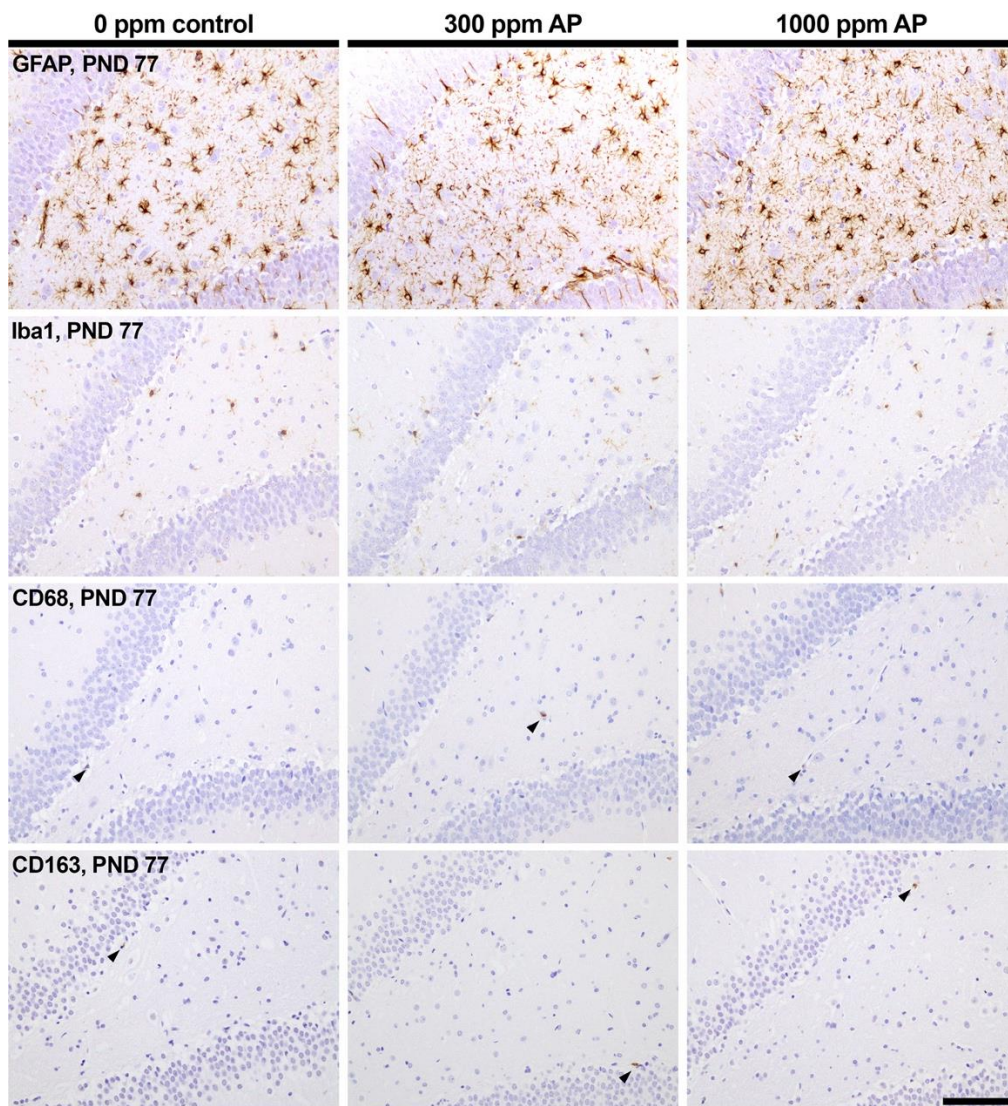
Supplementary Fig. 13

Distribution of immunoreactive cells for somatostatin (SST), reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), calbindin-D-29K (CALB2), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) and glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



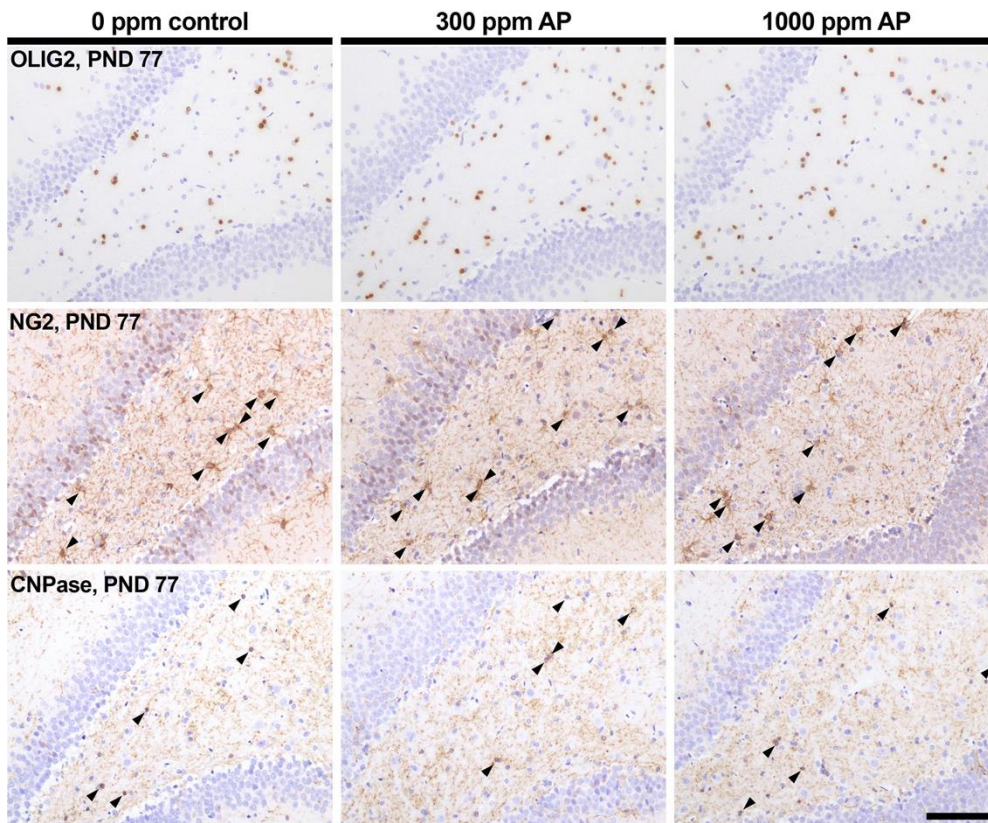
Supplementary Fig. 14

Distribution of immunoreactive cells for phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), and cyclooxygenase-2 (COX2) in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



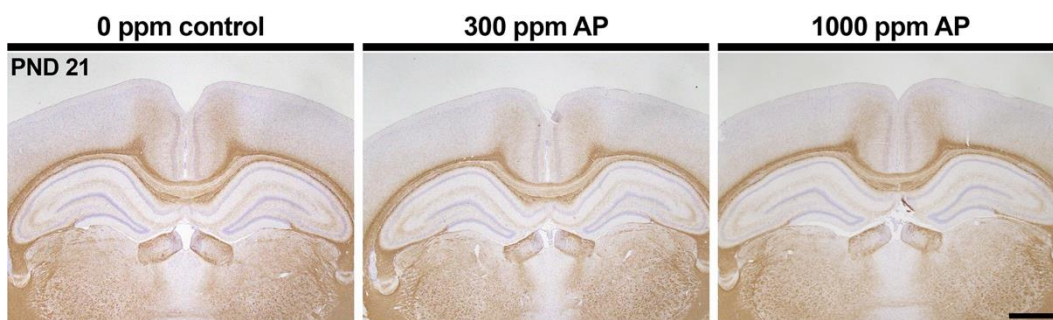
Supplementary Fig. 15

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation (CD) 68, CD163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 16

Distribution of immunoreactive cells for oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2), NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 17

Distribution of immunoreactive cells for 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the brain of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 12.5$; bar 1 mm.

Supplementary Table 14**Areas of the GCL and hilus of the hippocampal DG and corpus callosum on PND 21 and PND 77**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
PND 21			
No. of offspring examined	10	9	10
DG GCL area (mm ²)	0.227±0.033	0.203±0.045	0.204±0.032
DG hilus area (mm ²)	0.368±0.028	0.333±0.039	0.336±0.039
Combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle (mm ²)	1.049±0.333	0.858±0.359	0.836±0.214
PND 77			
No. of offspring examined	10	9	10
DG GCL area (mm ²)	0.268±0.046	0.256±0.030	0.278±0.035
DG hilus area (mm ²)	0.472±0.046	0.463±0.053	0.449±0.037
Combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle (mm ²)	1.253±0.305	1.037±0.139	0.924±0.220*

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; PND, postnatal day.

* $P < 0.05$ compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 15**Changes in oxidative stress parameters in the hippocampus of female offspring on PND 21**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	6	6	6
MDA (nmol/mg protein)	2.96±0.38 ^a	2.84±0.21	2.88±0.49
GSH (μmol/L)	14.9±1.44	15.9±0.80	14.6±1.08

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性の *in silico* 予測

研究分担者：吉成浩一 静岡県立大学 教授

研究要旨

近年、インビトロ及びインシリコ手法を活用した発達神経毒性（DNT）評価手法の開発が用いられている。私達の研究室では、リードアクロスや階層的クラスタリングなどの手法を活用し、化学構造からインシリコ手法により DNT を予測する手法の開発に取り組んできたが、DNT 陰性物質の情報が限られており、データの少なさ、不確かさが予測手法の精度向上を阻んでいる可能性が考えられた。そこで本研究では、DNT 陽性物質の化学構造情報のみを利用して未試験物質の DNT リスクを予測する手法の開発を試みた。まず、論文情報から DNT 陽性物質と DNT 不明物質を定義し、それらの分子記述子を計算した。この分子記述子情報を利用して DNT 陽性物質間距離を計算し、陽性物質の近さを閾値として定義した。次に、各 DNT 不明物質と全陽性物質との距離を計算し、①閾値内に含まれる DNT 陽性物質数、②最も類似性が高い DNT 陽性物質との距離、を基準として、それぞれ各 DNT 不明物質の DNT リスクを予測した。その結果、両指標では異なる物質群が高リスクと予測され、それらにはカルバメート系農薬や有機リン系農薬、抗てんかん薬、枯葉剤の成分、オピオイド、レチノイン酸異性体、既知の神経毒性物質などが含まれていた。さらに、2つの指標によるリスクのランクの積を用いた統合評価を行い、単独の予測では検出されなかった物質の検出もでき、それらは神経毒性が疑われている物質であった。以上、本研究により、未試験物質の DNT リスクを化学構造情報からインシリコ手法で簡便に予測する手法を開発できた。今後、クラス分け等による精度の向上、インビトロ試験による検証等を行っていきたい。

A. 研究目的

化学物質の発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要する。また、近年動物福祉の観点から、実験動物を用いた安全性試験の代替法の開発が求められており、インビトロ及びインシリコ手法を活用した評価手法の研究開発が進められている。しかし、DNTに関しては、公的に利用可能な毒性試験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。

そこで私達は、本研究班において、DNT評価におけるインシリコ手法の有用性を提案するために、既存情報からDNT予測のためのデータセットを構築し、DNTを示す物質のグルーピング解析や階層的クラスタ解析並びにリードアクロス手法によるDNT評価手法の開発に向けた基礎検討を行ってきた。これまでに、化学構造情報を数値化した分子記述子を利用して化学物質の類似性を評価し、その結果に基づいたクラスタリングやリードアクロスを行い、使用する分子記述子の種類、毒性予測に利用する類似物質の数などの検討を行った。その結果、化学構造に基づく手法によりある程度の精度でDNTの予測が可能であることが明らかになった一方で、使用したデータセットの不確かさが結果に大きな影響を与えていること、特にDNT陰性物質の正確性に疑問が感じられた。実際、インシリコ手法で得られた予測結果を共同研究者の協力のもとインビトロ試験等で検証すると、データベース上の陰性物質がインビトロ試験では陽性であったケースも認められた。これらの結果から、インシリコ手法による予測を単独で用いるのではなく、インビトロ試験と組み合わせた予測が有用であると考えられた。

そこで本年度は、これまでに収集したDNT陽性物質の情報を活用して、DNTリスクが高い物質を化学構造情報からインシリコ手法で簡便にスクリーニングする方法

の開発を試みた。

B. 研究方法**1. データセット**

これまでの研究で利用してきた文献 (*Neurotoxicol Teratol*, 52:25-35, 2015) から、DNTを示す物質及びDNT情報が無い物質を選択し、前者を「DNT陽性物質」（164物質）、後者を「DNT不明物質」（197物質）として使用した。これら化学物質の化学構造情報はPubChemから収集した。

2. 化学物質の類似性評価

alvaDescソフトウェア (Alvascience, ver 2.0) を利用して、対象物質の分子記述子を計算した。解析には、搭載されている33ブロックに分類された5,666記述子のうち、化学構造との関連を理解しやすい6ブロック (Constitutional indices, Ring descriptors, P_V SA-like descriptors, Functional group counts, Atom-centred fragments, Molecular properties) に含まれ、被験物質で計算可能であった376記述子を利用した。

各分子記述子について、最大値が1、最小値が0となるように正規化したのち、物質間のユークリッド距離をRを利用して計算した。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離とした。この相対距離を物質間の類似性の指標とした。

C. 研究結果**1. 類似物質数による予測**

164種のDNT陽性物質について、それぞれの最近傍物質との相対距離セットのうち、90%が含まれる値を閾値として設定した。次に、197種のDNT不明物質それぞれについて、全陽性物質（164種）との相対距離を算出し、

横軸にDNT不明物質、縦軸に陽性物質との相対距離をプロットした(図1)。この図を元に、各DNT不明物質について、閾値内に含まれた物質数をカウントした。結果をヒストグラムとして図2Aに示した。全197物質の最低値は0、最大値は56、平均値は16.1、中央値14であった。約30%の物質は、0~3物質しか含まない一方で、12物質は、陽性物質の25%(41物質)以上を含んでおり、後者の物質は、非常に多くのDNT陽性物質と化学構造が類似しており、DNTを示す可能性があるのではないかと考えられた。

そこで、これら12物質について確認したところ、カルバメート系農薬が2物質、他に抗てんかん薬(paramethadione)、オピオイド(tramadol)が含まれ(図3A)、これらはDNTを示す可能性が高いと考えられた。また、*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide及びmethyl methacrylateでは神経毒性の懸念が報告されていた。

2. 物質間距離による予測

上記の解析では、近傍物質数でDNTリスクを予測していることから、用いたDNT陽性物質セットの構造的な偏りに左右される可能性が高い。すなわち、あるDNT陽性物質と非常に類似しているにもかかわらず、類似する化学物質の数が少ない場合には、DNTリスクは小さく(ランクが低く)判定される。

そこで次に、各DNT不明物質について、最も構造が類似しているDNT陽性物質との相対距離(最近傍相対距離)に着目し、その最近傍相対距離の短さによりDNTリスクをランク付けした。

最近傍相対距離の分布を図2Bに示した。また、図3Bには、距離が短い15物質とそれぞれの最近傍のDNT陽性物質を示した。15物質の化学構造を見ると、pentane、propyleneoxide、isopropyl alcoholのような比較的分子量から、isotretinoinや α -noracetylmethadolのような比較的大きな分子までが含まれていた。また、いずれも最近傍のDNT陽性物質とはメチル基等の官能基1つ程度の違いしかなく、化学構造が非常に類似していたことから、DNTを示す可能性が非常に高いと考えられた。実際、神経毒性を示すと考えられる有機リン系農薬が2物質、枯葉剤の成分である2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(別名2,4,5-T)、抗てんかん薬paramethadione、レチノイン酸異性体のisotretinoin、中枢神経毒性が知られているメトキシ酢酸の関連物質2-methoxyethanolなどが含まれていた。

前述の閾値内のDNT陽性物質数でのリスク判定で挙げられた12物質と共通していたのは、paramethadioneの1物質のみであった。

3. 物質数と物質間距離による統合的予測

閾値内のDNT陽性物質数によるリスク予測並びにDNT陽性物質の最近傍相対距離によるリスク予測において、重複する化学物質は1物質しか認められなかったことから、両手法による判定は異なる物質群を高DNTリスクと予測していると考えられた。そこで、これらの解析を組み合わせた予測を行うために、両手法でのDNTリスクを低い順にランクをつけ、2つのランクの値の積を「DNTリスクスコア」として算出した。

図3Cに上位15物質を示した。このうち、図3A、図3Bに含まれた物質数はそれぞれ6物質、7物質であり、抗てんかん薬のparamethadioneが共通していた。その共通性から示唆されるように、paramethadioneが本評価において最も高リスクと予測された。2-Ethoxyethyl acetate、styrene、nitrobenzeneの3物質は本予測においてのみ認められたが、いずれも神経系の毒性を示

すことが知られている。

DNTリスクスコアによる予測結果と個別予測結果の関連性を確認するために、全DNT不明物質について、物質数によるDNTリスク予測ランクと最近傍相対距離によるDNTリスク予測ランクをそれぞれ縦軸、横軸として散布図を作成した(図4)。その結果、両者のランクには有意な正の相関が認められた(Spearmanの ρ 値:0.794、 $p < 0.001$)。また、リスクの上位15物質もほぼ右上の領域に含まれていた。

D. 考察

私達の研究室では、化学構造からDNTの有無を予測するためのインシリコ手法の開発を進めてきたが、利用可能な物質セットが限られていること、特にDNT陰性物質の情報がほとんどないことから、参考文献の情報を参考に、文献調査によりDNT情報がない物質をDNT陰性物質として解析を行ってきた。リードアクロスや階層的クラスタリングにより6割程度の物質の判別が可能であったが、様々な条件検討を行っても、それ以上の精度向上は認められなかった。その理由として、データセットには、複数のDNT陽性物質と化学構造が類似したDNT陰性物質が多く含まれており、それらが「偽陽性」として判定されること、また分子量が100未満程度の小さな化学物質や500を超える大きな化学物質についてはデータセットに類似物質がほとんど存在しないことなどが、精度向上が認められない主要な原因であると考えられた。

実際、前者の「偽陽性」と判定された物質が「真陽性」である可能性については、共同研究者のインビトロ試験結果から、真陽性である可能性が示された物質も存在した。そのため、これまでで使用してきたDNT陰性物質は、実際にはDNT陽性物質を多く含む可能性が考えられた。また、この一連の過程により、インシリコ手法によるDNT懸念物質のスクリーニングとインビトロ試験による検証という組み合わせは、DNT評価の動物実験代替法として有用であることが示唆された。そこで本研究では、これまでの「DNT陰性物質群」を「DNT不明物質」として再定義し、既知のDNT陽性物質の情報から「DNT不明物質」のDNTリスクの予測を試みた。

本研究では、164種のDNT陽性物質を活用して、それらの類似性からDNT不明物質のDNTリスクを3つのアプローチにより予測した。1つは、DNT陽性物質間での類似性(物質間相対距離)から、類似物質を定義する物質間相対距離の閾値を定義し、各DNT不明物質についてその閾値内に含まれるDNT陽性物質数による予測、2つ目は、各DNT不明物質と最も類似している(相対距離が近い)DNT陽性物質との相対距離による予測、3つ目はこれら2つの手法を掛け合わせた予測である。

1つ目の手法によりDNTリスクが高いと予測された12物質について確認したところ、カルバメート系農薬や抗てんかん薬、オピオイドなど、神経毒性を示すと考えられる物質が多く含まれていた。また、2つ目の手法においてDNTリスクが高いと予測された上位15物質についてその化学構造を確認したところ、既知の陽性物質との類似性が非常に高い物質が多数見出された。例えば、高用量曝露により催奇形性を示すと考えられるall-trans-レチノイン酸(tretinoin)の異性体であるisotretinoin、有機リン系農薬、枯葉剤成分、神経毒性を示すメトキシ酢酸の関連物質などが含まれていた。これらの結果から、2つの基準によるDNTリスク予測は共にある程度の精度でDNTリスクの高い化学物質を同定できていると考えられた。

一方で、構造を確認した化学物質数は限られている

ものの、両手法で共通して同定された物質は、抗てんかん薬のparamethadioneのみであった。DNT陽性物質であるtretinoinの異性体であるisotretinoinについては、最近傍相対距離による予測では検出されたが、類似物質数による予測では検出されなかった。これは、DNT陽性物質群中に、tretinoinやisotretinoinと類似した物質がほとんど含まれないことを示唆しており、実際、isotretinoinは閾値内にDNT陽性物質を2物質しか含まなかった。逆に、類似物質数による予測でDNTリスクが高いと予測されたカルバメート系農薬や枯葉剤成分の2,4,5-trichlorophenoxyacetic acidは、最近傍相対距離による予測では検出されなかった。これらのDNT不明物質は、その化学構造や既知情報からDNT陽性である可能性が非常に高いと考えられることから、2つの基準を用いた予測は共に有用であるものの、いずれの手法もDNTリスクが高い物質を見落とす可能性があることが示唆された。

そこで、両基準を加味した予測を行うために、両予測で算出された値をDNTリスクとしてランク化し、両ランクの値の積を「DNTリスクスコア」として定義し、予測に用いた。リスクが高かった上位15物質を確認したところ、1位～11位及び14位の12物質は、単独の基準による予測のいずれかで同定された物質であり、総合評価による予測で同定された物質は3物質であった。これらの結果から、統合予測は有用であると考えられた。

しかし、isotretinoinは197物質中102位となり、比較的lowリスクであると予測された。今回の解析では、ランク値の積を用いたことから、一方の指標が著しく低い場合には、総合評価では上位に入る可能性は低くなる。これらの問題点を克服するために、今後、2つ指標（図3の縦軸及び横軸の値）を複数のクラスに分類してマトリクス化することで、全DNT不明物質やデータセット外の物質のDNTリスクを複数のクラスに分類できるのではないかと考えている。さらには、DNTリスクが高いと予測された物質について、共同研究者の協力を得ながらDNT関連インビトロ試験等で検証することで、本予測手法の妥当性を検証したいと考えている。

E. 結論

本研究では、DNT陽性物質の化学構造情報を活用した新たなインシリコDNTリスク予測手法を開発した。本手法は、①類似物質数、②類似性の高さ、並びに③その組み合わせにより、被験物質のDNTリスクをランク付けることが可能であり、実際に神経毒性が知られている有機リン系農薬やカルバメート系農薬、抗てんかん薬、中枢神経毒性物質などを検出することができた。本手法は、簡便に既知のDNT陽性物質の類似物質を検出することが可能であり、DNTリスクのスクリーニング手法としての活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高村真弥、大村奈央、保坂卓臣、志津怜太、竹下潤一、吉成浩一：分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性予測手法の開発、フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー、2023年9月13日、広島市

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

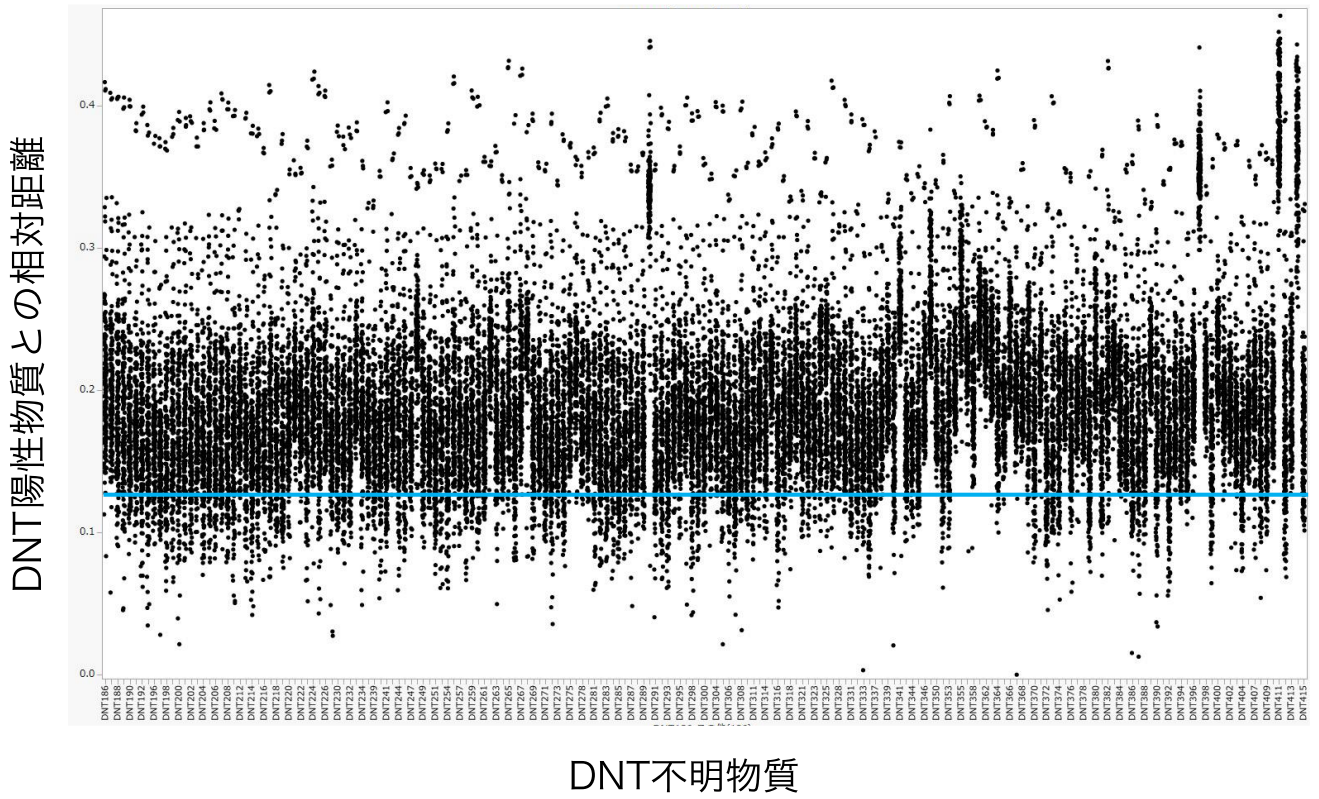
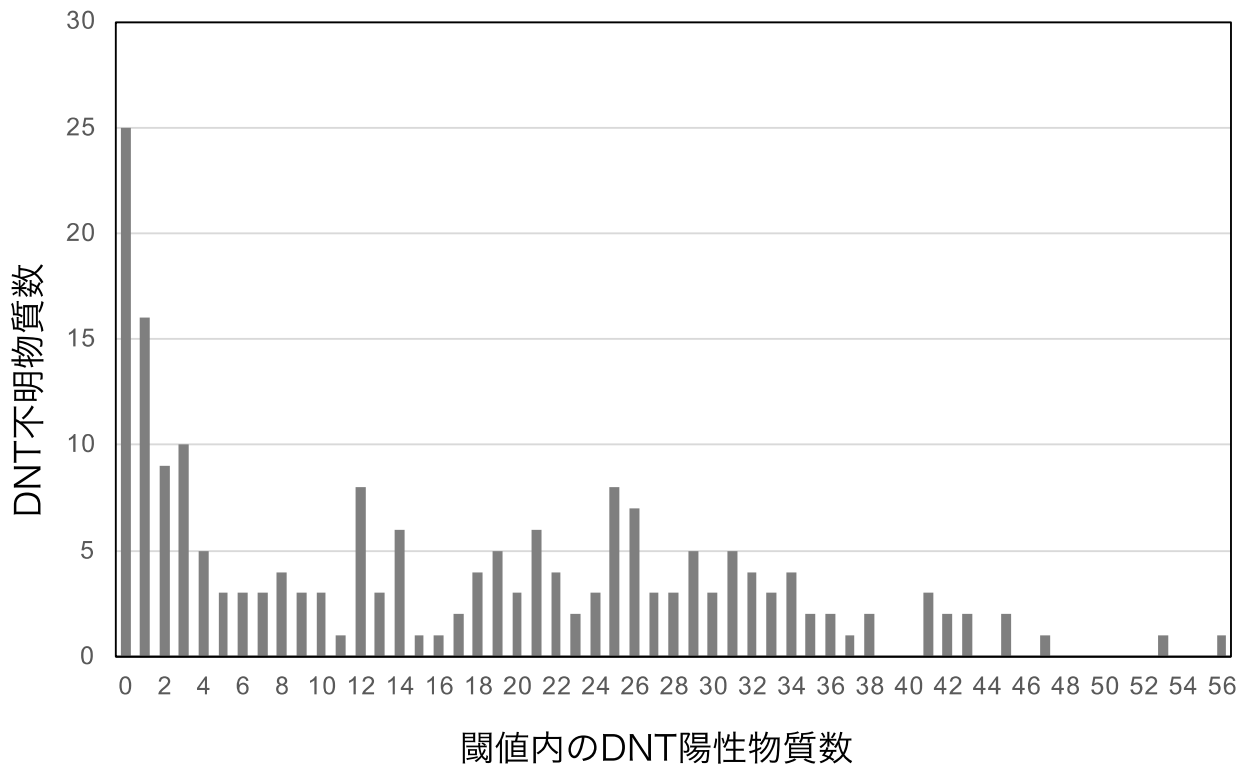
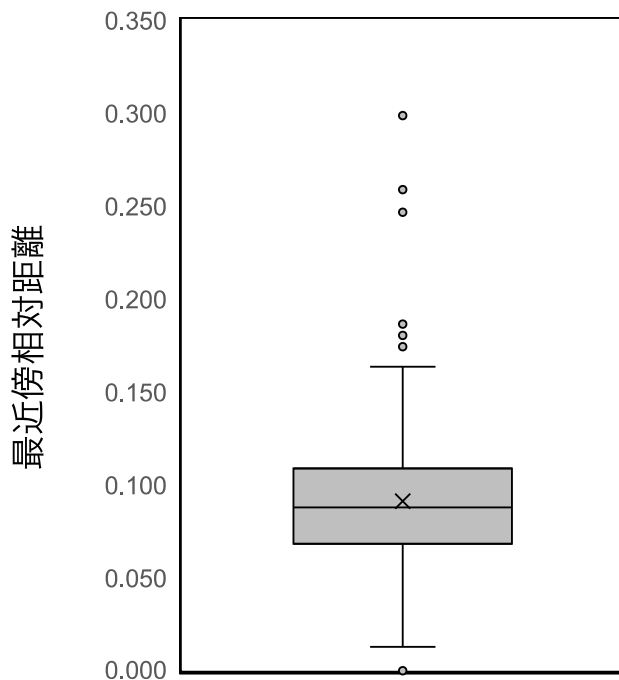


図1 各DNT不明物質とDNT陽性との物質間相対距離
 197種のDNT不明物質（横軸）について、それぞれ164種のDNT陽性物質との相対距離を算出し、プロットした。青線は、DNT陽性物質で決定したDNTリスク判定閾値（0.128）を示している。

A



B



最小値	0.2987
最大値	0.0000
平均値	0.0911
10パーセンタイル	0.0466
第1四分位	0.0683
中央値	0.0881
第3四分位	0.1078
90パーセンタイル	0.1329

図2 DNTリスク指標の分布

A. 類似物質数による評価：図1において、197種のDNT不明物質について、閾値内に含まれるDNT陽性物質数を算出し、ヒストグラムとして示した。B. 各DNT不明物質と最も距離が近いDNT陽性物質との相対距離（197個）の分布を箱ひげ図で示し、統計量を表に示した。

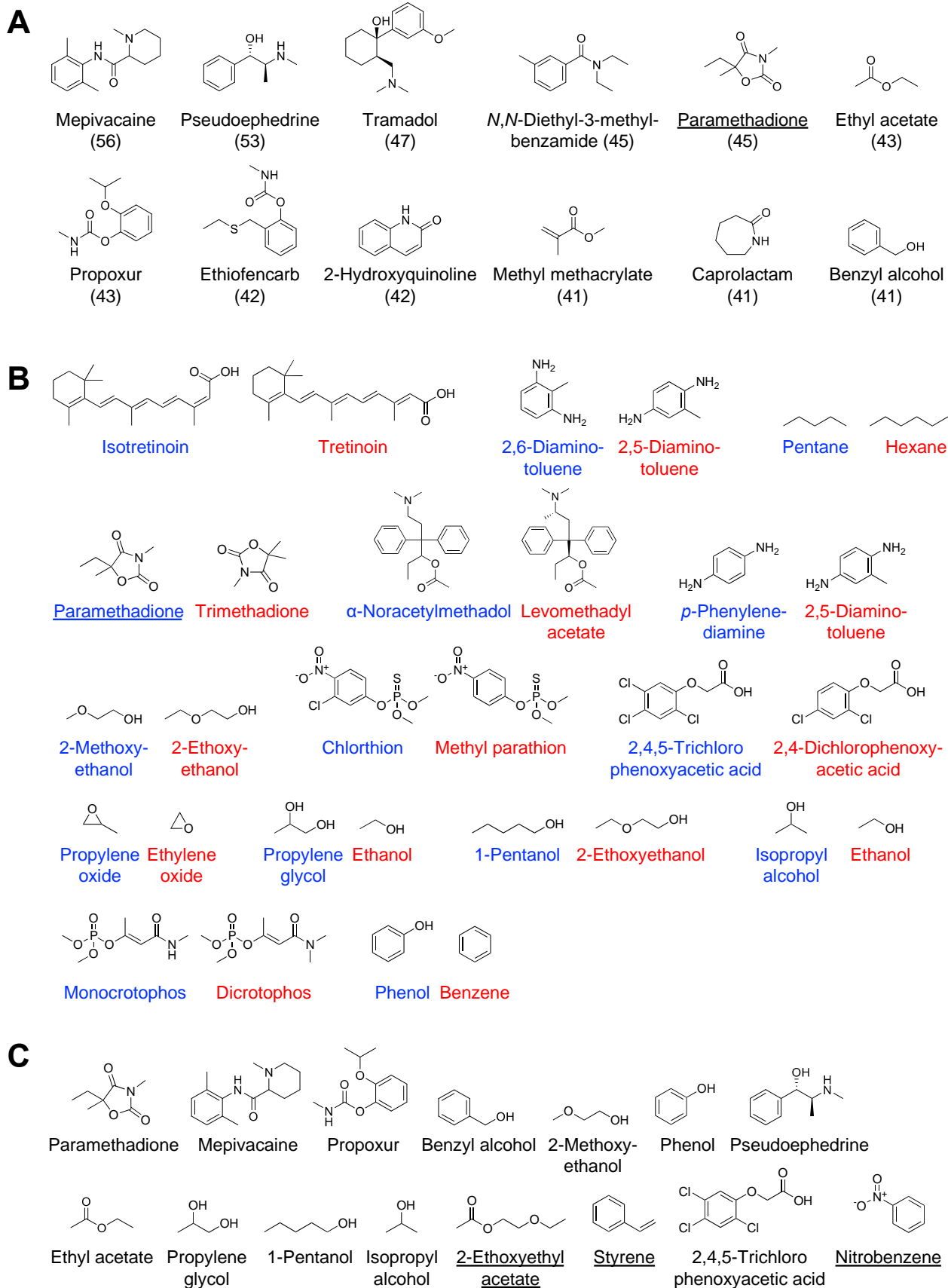


図3 DNTリスクが高いと予測されたDNT不明物質のリスト

A. 類似物質数が41以上であった12物質の化学構造を示した。B. 最近傍相対距離が小さかった上位15物質（青字）とその最近傍のDNT陽性物質（赤字）の化学構造を示した。下線はAにおいても認められた物質を示す。C. 類似物質数と最近傍相対距離から算出されたDNTリスクスコアの上位15物質の化学構造を示した。下線はCにおいてのみ認められた物質を示す。

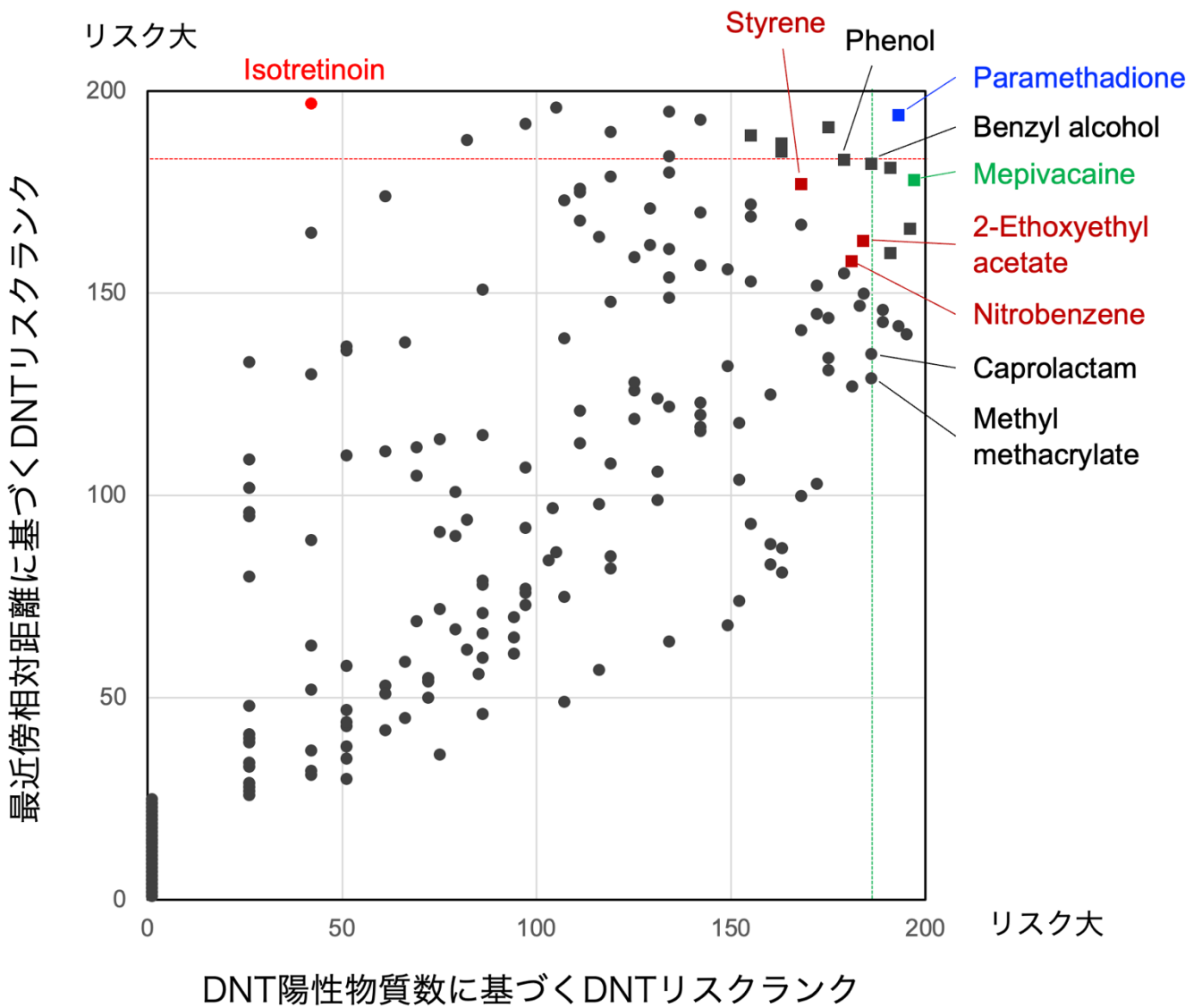


図4 2種類のDNTリスク予測ランクにおけるDNT不明物質の分布

196種のDNT不明物質について、類似物質数によるDNTリスク予測ランク（横軸）と最近傍相対距離によるDNTリスク予測ランク（縦軸）をプロットした。縦軸、横軸ともにランクが大きいほどDNT陽性物質との類似性が高く、DNTリスクは大きい。図3Cに示したDNTリスクスコアの上位15物質を■で示した。また、本文中に記載のある代表的な物質の名称を記した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
AI 支援型 MPS を用いたヒト iPS 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

令和5年度 分担研究報告書

試験法の行政利用に向けた国際動向調査

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

研究要旨

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell)細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法の行政利用の視点で、開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

今年度、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された TG443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとに *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコフォート研究の現状をまとめた。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell)細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審

法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

今年度、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された TG443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation

Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとに *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコホート研究の現状を調査した。

B. 研究方法

OECD に提案された TG443 EOGRTS の改定案は、欧州化学品庁 (ECHA: European Chemicals Agency) により、2023 年 3 月に発表された EOGRTS 総説をもとにしている。この総説中の *in vivo* DNT のコホート研究の動向に着目して、情報をまとめた。

倫理面への配慮

実験を伴わないことから、倫理的問題は無いと考える。

C. 研究結果

C-1. ECHA 総説

ECHA により設立された EOGRTS 評価プロジェクトは 2021 年 3 月から 2 年間実施され、2023 年 3 月に総説が発表されている。本プロジェクトの目的は、REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) で施行されている TG433 の性能を評価し、有害性評価に関連する情報が適切に提供されているか、REACH 登録ドシエにおける EOGRTS の性能の特異的な側面を評価しているかであった。

総説の中には、7 つの主要な問題点が示され、その一つとして、DNT 調査の特異的な問題点が挙げられている。具体的には、55 の研究報告書から、24 の DNT コホート研究が評価され、性能の改善が求められており、方法、解析、報告書に欠点を抱えているとされている。

総説中に以下の記載がなされている。

DNT コホート研究の中で、多くの試験施設が報告書の中で EOGRTS の詳細を記

載していない。その結果、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。

すべての研究において、必須である陽性対照および過去の対照データが不足していた。陽性対照のデータがないため、試験施設の化学物質の曝露による発達期に続く異常な事象を検出することが難しかった。また、生物学的に関連する変化の程度をより適切に解釈できるテストシステムのダイナミックレンジに関する情報も提供されていなかった。

さらに、過去の対照データがないため、報告書内の対照データが以前の測定と一致しているか不明であった。なぜなら、DNT 調査の統計的検出力はグループあたりの動物の数が少ないと特に低くなるからである。他の試験や公表されたデータと比較した過度のばらつきは、試験施設における試験条件において適切な対照がなかったことを示している。同時に、陽性対照や過去の対照データの不足は、偽陰性を生み出す可能性がある。

また、統計解析が不十分だったことも不備の一つであった。最も一般的なこととして、性別はモデルに含まれていなかった。その結果、性特異的な影響、またはその欠如の結論を導くことはできなかった。

正しい統計解析がないため、雄と雌の異なる小さな影響を、関連する限界と見なすべきではない。これに対処するには、組み合わせと性別固有の両方を評価することが推奨されている。組み合わせの場合、統計的検出力が高くなるので、性別特異的な事象を見落とさないことになる。統計解析の不備は、NOAEL 値の不確実性につながり、適切な結論を妨げる可能性がある。不十分な統計解析が行われた場合、適切な結論を導き出すために統計学的再解析が必要になる場合がある。

プロジェクト中で評価された事例では、脳の重量と脳の形態測定が最も敏感なパラメータとして観察され、一般に、脳の有害性は脳の重量、寸法、形態測定および組織病理学の変化により検出される。

全体として、提供されたデータの独立的な評価により、次のようないくつかの課題が提起されている。これらの研究は、多数の試験における固有の方法の不備、または異なる試験に共通する不備により結論が確認できていなかった。

さらに、全研究の中で一部の研究報告には、必要な情報が限定されていた。偏りが無い動物実験同様、使用する機器に関する情報、無関係な実験要因の対照、試験実施時刻など、報告書では詳細な項目が重要である。

最後に、プロジェクトの調査結果は、発達神経毒性に関連する EU 規則に参照される最新の OECD 試験法ガイドラインおよび OECD/EU ガイダンス文書で報告されている方法と結果に関与しておらず、重要な改良が必要としている。正規とランダム観測値を含むすべての観測値が報告され、観察は十分な感度で行われることが必須である。

C-2.OECD 対応

ECHA は EOGRTS 総説をもとに、OECD に TG433 および GD151 (TG433 補助文書) を改定するプロジェクトの提案を行った (添付資料 1)。OECD に提案された目的は、EOGRTS の計画、施行、解析および報告書の改良である。

OECD 試験法ガイドラインプログラム各国調整官作業班 (WNT) は、このプロジェクトを認める条件として、専門家グループで TG433 や GD151 の改定を議論するだけでなく、2024 年の後半に OECD WNT 主催のワークショップを開き、EOGRTS の

予期せぬ/課題について議論することを推奨した。

D. 考察

今後の専門家間の議論や OECD ワークショップを経て、国際的な合意がなされた上で、TG433 や GD151 の改定がなされることを期待している。DNT は EOGRTS コホート研究の重要な指標であると考えられ、今後の動向には注意が必要と考えている。この改定は対照となる *in vivo* データの信頼性に関わるものであるとともに、新たな *in vitro* DNT 法の開発にも関係してくると思われる。本改定に関する継続的な動向把握は必須であると考えている。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

ECHA による EOGRTS 総説をもとに、OECD に TG433 および GD151 を改定するプロジェクトが提案されている。

DNT に関する新規評価法を開発する上でも、この TG の改定動向には今後も注目していくべきと考える。

G. 参考文献

- 1) OECD (2018) No. 443, Guideline for the testing of Chemicals, Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, OECD, Paris
- 2) OECD (2011), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris
- 3) ECHA, Final report of the EOGRTS review project, Evaluating results from 55

extended one-generation reproductive
toxicity studies under REACH, 2023

H. 研究発表

H-1. 論文発表

特になし

H-2. 学会発表

特になし

I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

I-1. 特許取得

該当なし

I-2. 実用新案登録

該当なし

I-3. その他

該当なし

添付資料

- 1) SPSF for revision of OECD TG
443(EOGRTS) and GD151

添付資料

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME

Standard Project Submission Form

If you require further information please contact the OECD Secretariat
Return completed forms to:
Anne Gourmelon (anne.gourmelon@oecd.org)
and Araceli Giralá-Rodríguez (araceli.giralarodriguez@oecd.org)

PROJECT TITLE

Revision of OECD TG 443 (EOGRTS) and GD 151

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)

European Commission

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT

15 November 2023

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

Country /Organisation:	European Commission, Denmark, Netherlands
Agency/ministry/Other:	ECHA (on behalf of EC) National Food Institute, Technical University of Denmark, Research Group for Molecular and Reproductive Toxicology, Denmark (Supported by DK EPA) National Institute for Public Health and the Environment, Netherlands
Mail Address:	European Chemicals Agency P.O. Box 400, FI-00120 Helsinki, Finland
Phone/fax:	358-9-68618681
Email:	ingo.bichlmaier@echa.europa.eu laura.rossi@echa.europa.eu valerie.zuang@ec.europa.eu sochr@food.dtu.dk Betty.Hakkert@rivm.nl

PROJECT OUTCOMES

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> New Test Guideline | <input checked="" type="checkbox"/> Revised Guidance document |
| <input checked="" type="checkbox"/> Revised Test Guideline | <input type="checkbox"/> Detailed Review Paper |
| <input type="checkbox"/> Deletion of an existing Test Guideline | <input type="checkbox"/> Other, please specify below |

ECHA performed an EOGRTS review project as per request from European Commission and OECD. The main objectives of the project were to:

- Evaluate the performance of the OECD TG 443 study as implemented in REACH, and its adequacy for providing information relevant for hazard assessment; and
- Evaluate specific aspects of the performance of available EOGRTS in REACH registration dossiers with respect to study design, conduct, and toxicological findings.

The review project was performed between March 2021 to March 2023 and the final project report was published on March 2023 (available at:

https://echa.europa.eu/documents/10162/17228/final_report_eogrts_review_project_en.pdf/9d0b31f1-eff0-e9db-be8c-ac72d5e4b2e5?t=1679916891564) (Attachment 1). ECHA presented its observations to the WNT members during WNT-35 meeting in 2023 and the suggested way forward (Attachment 2).

Based on the findings it became clear that targeted revision of the OECD TG 443 is needed. Those revisions are clarifications and specifications on methodology of endpoints to be assessed in TG 443 or how data should be to be reported. These revisions are intended to be quick fixes to the existing TG and GD. This revision would therefore be targeted to only those issues identified, and it is not proposed to open any other parts of the OECD TG 443. The proposed revisions/clarifications are specified in the Attachment 3 and the exact wording will be discussed in the Expert group before implementing.

In addition, it was observed that additional guidance would be needed to be included into the GD 151, concerning Cohort 3, criterium description used to identify follicle counts, and improved guidance on how to measure nipple retention and anogenital distance in rodent studies. Additional details are included in Attachment 4.

PROPOSED WORK PLAN and RESOURCE NEEDS:

1. Draft workplan for development of the proposal, including any need to establish Ad Hoc Expert Group and mode of meetings (face-to-face, teleconference; electronic discussion group).

Indicate key milestones, including first and subsequent drafts of documents and timing of meetings.

As the proposed revision of the TG 443 and GD 151 are interlinked, it is suggested either to use the existing Expert Group on Reproductive and Developmental Toxicity or to establish an ad hoc Expert Group for the project. Due to these interlinks these two separate revisions are submitted in a single SPSF project proposal.

Due to the targeted nature of the revision of the OECD TG 443, the TG 443 may be ready for WNT adoption before the GD 151, and if so, the adoption of the TG 443 should not be delayed because of GD 151. Therefore, depending of the progress, the two documents may be submitted for adoption at different stages.

Expected timelines:

- SPSF submission for review (15 November 2023)
- Leads to address comments from WNT and review SPSF as appropriate (February 2024)
- WNT to decide if the project is to be included into the workplan (April 2023)
- Nomination of ad hoc expert group / call for additional members in the existing EG, if needed (May 2024)
- First virtual meeting to discuss the proposed revisions of GD 151 and TG 443 (June 2023).
- Draft revised OECD TG 443 submitted for revision to the EG (August 2024)
- Draft revised GD151 submitted for revision to the EG (Autumn 2024)
- Circulation of the draft revised TG 443 version for 1st WNT commenting round (November 2024), second commenting February 2024
- Circulation of revised draft GD 151 for 1st WNT commenting round Q1/Q2 2025 and 2nd WNT commenting round Q3/Q4 2025.
- If feasible, revised TG 443 submitted for adoption for WNT-36 (April 2025)
- If feasible, revised GD 151 submitted for adoption for WNT-37 (April 2026).

Draft documents circulated to the EG for commenting before WNT consultation at suitable timepoints.

2. Will additional information, including generation or collection of data, be required? If yes, please describe the anticipated process and timelines.

No new data needs to be generated. The EOGRTS review project results are to be used as background data.

3. Indicate the estimated overall resource need (time/money) for member country / consortium and Secretariat

Participation in tele/video conferences, and review of documents. Estimated total time of 1-7 days per person depending on tasks required. Secretariate to chair the EG meetings together with lead.

4. Is this proposal intended to replace an existing Test Guideline or lead to the deletion of an existing Test Guideline?

The project intends to revise the TG 443 and GD 151.

ESSENTIAL INFORMATION

In this section, please provide the information required by the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme

1. What is the existing or expected regulatory need/data requirement that will be met by the proposed outcome of the project? Please provide details below or as an attachment.

The EOGRTS (OECD TG 443) is an information requirement in EU for various regulations. The data from OECD TG 443 is used across all OECD countries.

or as attachment No. __

2. How will the work contribute to further international harmonisation of hazard and risk assessment? Please provide details below or as an attachment.

The revisions of the two documents are intended to improve proficiency in the data generated via the EOGRTS and to reduce variability in the results generated.

or as attachment No. __

3. How will the proposed project address issues and /or endpoints which are of major human health or environmental concerns? If there are existing Test Guidelines or projects in the work plan of the Test Guidelines Programme covering the same endpoint, please refer to these and describe the added value and usability of the proposed new test method. Please provide details below or as an attachment.

The EOGRTS is the current reference method/standard for assessing reproductive toxicity.

or as attachment No. __

4. Will the project have general support from OECD member countries or is the outcome relevant for just one or a few member countries / stakeholders? Provide details of the countries and the rationale for this view below.

Many countries A few countries Only for the submitting country

-
5. If the Test Guideline is not intended for general use, indicate if the Test Guideline would be intended for:

Specific (limited) applications such as pesticide usage, or

for specific classes of chemicals (e.g. surfactants) rather than for chemicals in general.

6. If the expected outcome of this proposal is a Test Guideline or a Guidance Document, provide information on the intended use, applicability and limitations of the test method.

Generally applicable to chemicals, biocides, and pesticides etc.

7. Provide supporting information on the validation status (i.e. relevance and reliability) of the method. Principles for validation of test methods for OECD Test Guidelines are described in Guidance Document 34.

Provide justification and rationale for the test, including data.

If there are no or limited data available to support the reliability and relevance of the proposed test, indicate if validation work is included in the project.

If there is no need for validation, provide a detailed justification.

There is no need for validation. The project focuses on updating the existing OECD TG 443 and the GD 151 based on the data already generated with the TG 443.

8. Describe if the test method includes components, equipment or other scientific procedures that are covered (or pending) by Intellectual Property Rights (IPR) (e.g., patents, patent applications, industrial designs and trademarks). Information should be provided on the overall availability of the IPR-protected components including whether they are commercially available or require a Material Transfer Agreement (MTA) or other licensing agreements. In addition, a description of the IPR-covered component/test system should be disclosed.

8.1 Nature of protected elements (e.g. reagent identity, cell line identity, specific process, etc.):

n/a

8.2 Form of protection (e.g. trademark, patent, etc.):

n/a

8.3 For users to access protected elements, please tick the relevant box(es):

MTA required License requirement No agreement required

8.4 Are you providing the agreement document(s) referred to in 8.3 with the SPSF:

Yes No If no, what's the reason?

n/a

8.5 How and where can users get access to protected elements?

n/a

8.6 Has any search for existing patent(s) possibly associated with this test method been performed (e.g. through patent search or Freedom-To-Operate search). If yes, what was the outcome?

n/a

IMPORTANT NOTE: Should the OECD and Expert Group working on the Test Guideline development discover that the information provided under Item 3 on IP elements be erroneous or be evolving in the course of the project, the project itself might be re-considered, suspended or cancelled.

9 Have Performance Standards been developed? Yes No
 N/A

ADDITIONAL INFORMATION

In this section please provide further information to allow the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme

1. If the expected outcome of the project proposal is a Test Guideline and is based on existing, regional or international documents such as guidelines, protocols or guidance material, please provide that information here or as an attachment.

The proposal is the revision of TG 443 and GD 151.

or as attachment No. __

2. If Animal Welfare considerations are addressed in the project proposal, provide details below or as an attachment. Explain if the project is aimed at refining, reducing and/or replacing the use of animals.

If the project is not specifically developed for animal welfare purposes, indicate if the animal welfare considerations have been a component of the project proposal.

Indicate if animal welfare considerations are irrelevant to the project, for example for physico-chemical properties.

n/a

or as attachment No. __

3. Provide information on expected or possible resource savings in member countries as a result of this project.

The proposed revision of OECD TG 443 and GD 151 will help to improve the existing TG and GD 151 as it currently contains unclear elements.

4. If the expected outcome of the proposed project is a Guidance Document or Detailed Review Paper, will it be directly linked to the development of a particular Test Guideline or a series of Test Guidelines?

- Yes, it is the initial step in the development of a new or revision of existing Guidelines.
- Yes, additional guidance is needed for the most appropriate selection of the Guidelines on the subject.
- No, the guidance is on issues related to testing or the development of Test Guidelines in general.

There are 4 attachments added to this form.

別添5

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
Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki	Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array.	Toxicology in Vitro	93	105668	2023
Ojiro, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M	Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats.	Environ. Toxicol.	39(5)	3040-3054	2024

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木郁郎	第4章 発達神経毒性評価	小島肇夫	動物実験代替法とNew approach Methodologiesの開発・利用動向	シーエムシー出版	日本	2023	296

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 本間 正充

次の職員の令和5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬理部・第四室長
(氏名・フリガナ) 安彦 行人・ヤスヒコ ユクト

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の令和5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 松永 民秀・マツナガ タミヒデ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職 名 名古屋大学大学院創薬科学研究科長

氏 名 廣明 秀一

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 名古屋大学大学院創薬科学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 加藤 竜司 (カトウ リュウジ)

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 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5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院工学研究科 電子工学専攻・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立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5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 今井 康之

次の職員の令和5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5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 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部・特別研究員
(氏名・フリガナ) 小島 肇・コジマ ハジメ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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