

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6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安彦 行人

令和7(2025)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

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  
安彦 行人 ----- 1

II. 分担研究報告

1. MEAを用いたin vitro神経毒性試験系の開発 ----- 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 ----- 20  
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 ----- 27  
鈴木 郁郎

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 ----- 69

7. 試験法の行政利用に向けた国際動向調査 ----- 77  
小島 肇

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 81

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6年度総括研究成果報告書

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

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。2023年に発表された OECD の発達神経毒性 (DNT) *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスには 17 種類の *in vitro* 試験法がリストされている。その一つにラット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への反映、ヒトの予測性が課題である。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* 手法は検証されていない。従って、ヒトにおける化学物質のハザードやリスク評価には、化学物質の構造情報とヒト細胞により DNT を統合的に評価する必要がある。

本研究では、まずキネティクスを考慮した MEA システムの構築に向けて、血液脳関門 (BBB) と神経細胞をマイクロ流路により連結した生体模倣システムを新たに構築し、灌流下で MEA 計測が可能であることを明らかにした。MEA のエンドポイントに関して、MEA パラメータを用いた AI モデルにより神経毒性予測を行えること、また独自のパラメータを追加することにより毒性予測の精度が向上することを見出した。実験の再現性を確保するために、神経細胞の画像から特徴量の抽出手法を確立し、MEA パラメータと相関する特徴量の探索を進めている。より生理的なモデルとしてヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについて、高密度電極 MEA により長期に安定したネットワーク活動計測が行えることを明らかにした。

次に、化学構造に関しては、分子記述子によるリードアクロスにおいて、構造的に類似する物質の毒性スコアを構造的類似度で重みづけして合計する手法、また *in silico* 生物活性予測値の活用で高い予測性が得られることが示唆された。さらに、IVIVE の観点から、毒性メカニズムが不明なイミダクロプリドについてラット DNT 試験を実施し、神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性の上昇により、多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。

これらの成果は米国、韓国の動物実験代替法学会、OECD の DNT ワークショップなど関連学会・会議で発表するとともに、OECD・DNT 専門家会議などで DNT-IVB ガイダンスに向けて意見交換を実施した。

以上のように、本研究において班全体で連携しながら統合的に DNT を評価可能なシステム開発を進めた。今後、OECD 専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法の検証を行い、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)ガイダンスに培養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、ヒトの予測性や実験の再現性、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、血液脳関門 (BBB) を統合したMEAシステムの開発、細胞画像のAI解析によるin vitro系の品質評価法、MEAデータのAIモデルによる解析手法、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、これまで使用してきたものとは異なるデータセットを用いた検証を実施した。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

#### ①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

2層灌流デバイスとMEAをマイクロ流路にて連結したMEA連結型MPSの開発を行った。具体的には、MEA (スイスMaxwell社製MaxOne) の電極チップにシリコン製のカバーを被せ、上部を厚めの蓋で押さえつけ

ることで灌流できる装置を作製した。

この装置の評価のため、既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞 (以下「ラット神経細胞」と記載) を利用するための培養プロトコルを検討した。ラット神経細胞は米国LONZA社の市販凍結品 (R-Cx-500, CryoCells, Rat Brain Cortex) を使用し、MEA装置MaxOneおよびMaestro (米国Axion社) での経時的なMEA計測を実施した。

#### ②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA計測のプロトコル作成を進めた。前年度まで使用したNeuCyte社のヒトiPS細胞由来神経細胞の安定供給に問題が生じ購入が不可能となったため、本年度は別メーカー (富士フィルムCDI社) のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いて培養およびMEA計測手順の検討を行った。

#### ③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 $\mu$ m間隔のZ-stack撮影とした。本年度は画像予測AIモデルロバスト化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。コンフルエントな細胞画像からの特徴量抽出のために、変分オートエンコーダ (VAE) モデルについての開発環境整備と実装を行い、最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

#### ④MEAデータ解析AIモデルの開発

iCell Glutaneuronsを48-wellMEAプレート上で培養し、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。試験化合物は、ヒトへの影響が報告されているものとしてBisphenol A, Chlorpyrifos, Fipronil, Fluoxetine, Haloperidol, Tebuconazole, Tributyltin, Deltamethrin, Rotenone,  $\beta$ -Cyfluthrin, Metaflumizoneの11種、陰性対照化合物としてAcetaminophen, Aspirinの2種を使用した。得られたMEAデータを解析し、Maestro標準の11パラメータに、独自に算出した最大発火周波数関連4パラメータを加えた15の神経活動関連パラメータを算出した。得られたMEAパラメータを用いて、毒性予測AIモデルを作成し、陰性対照化合物に対する毒性スコアの標準偏差を基準とした毒性判定閾値を決定した。次に、未学習データおよび未学習化合物に対して、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。

#### 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、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113日の脳オルガノイド(直径2-4mm)11個を、電極チップ1基あたり1-2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。

## **(2) 化学構造の類似性に基づく in silico 発達神経毒性予測**

食品安全委員会が構築している農薬評価書のラット反復投与毒性試験(90日間、2年間)の結果を約1000のエンドポイント(EP)として整理した独自のデータベース(DB)から、90日間試験の結果がある350の農薬を利用した。評価対象のエンドポイントとして、CE01(脳コリンエステラーゼ(ChE)活性低下、赤血球ChE活性低下、血中ChE活性低下、の3つをまとめたChE関連所見)、NV01(神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたもの)の2グループを設定した。

分子記述子はalvaDescソフトウェア(Alvascience, ver 2.0.12)を利用して計算し、全物質で計算可能であり一定値ではない記述子のうち、相関係数が0.99未満の1889記述子を利用した。得られた分子記述子を、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。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)で除して相対距離に変換し、物質間の類似性の指標とした。各物質の近傍17物質について、毒性所見の陽性、陰性スコアを相対距離で重みづけして合計し、毒性判定スコアを算出した。

リードアクロスは、350農薬から1物質を予測対象物質(ターゲット物質)として選択し、残りの物質を類似物質(ソース物質)の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。毒性判定では、毒性スコアがDB全体の陽性率を上回った場合を陽性予測とし、最終的に350物質全体の感度、特異度、balanced accuracy(BA)を予測精度の指標として算出した。

## **(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**

ネオニコチノイド系農薬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。イミダクロプリドは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した。児動物を出生後21日と77日目に解剖し、脳をサンプリングして免

疫組織学的検索、遺伝子発現解析を実施した。またTG426に従い行動試験(各群N=10)を行った。

## **(4) 試験法の行政利用に向けた国際動向調査**

米国、韓国等の動物実験代替法関連学会に参加し、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。またOECDの拡張一世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画した。

(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ていない。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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

## **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**

#### **①BBBとMEAを統合した in vitro 神経毒性試験系の開発**

MaxOneシステムにおいてラット神経細胞は、培養2週間で安定したネットワーク活動を示した。BBBを培養する灌流装置とラット神経細胞を播種したMEA装置をマイクロ流路により連結し、培養液の灌流下でMEA計測が可能であることを明らかにした。MEAデータに培養液の灌流に伴うと考えられるノイズが観察されたが、培養液を灌流するチューブの改良により、ノイズを軽減することができた。

#### **②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発**

ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養により、培養開始後4~5週間でネットワークバーストが観察されたものの、多くのウェルで強い凝集が観察された。培養手順を検討し、細胞解凍の際、iCell glutaneuronを、顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペッティングにより分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった。これらの情報をSOPとしてまとめる予定である。

#### **③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、MEAデータと細胞画像特徴量の相関をAIによ

り解析する手法の検討を進めた。その結果、MEAデータでは電極間で想像以上に大きな変動 ( $CV>0.4$ ) が生じ、経時的に増大することが確認された。ガウス分布による最尤推定、階層ベイズモデルによる逸脱スパイク数データの定量化により、ノイズデータを *in silico* で削減することによって、より安定なMEA解析が可能になることが示唆された。一方、撮影データの増加にしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つである変分オートエンコーダ (VAE) を用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。この結果、これまでの解析アルゴリズムでは、細胞種やデータが変更された際に大きく解析パイプラインを変更する必要があった処理の一部が、安定して共通化できることが見出された。

#### ④MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価はDNT-IVBにも記載されているが、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。独自に最大発火周波数を計算し、最大発火周波数と関連する新規パラメータ4つを算出して、Maestro標準の11パラメータと合わせてAIモデルによる予測精度を検証した。未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア予測を行ったところ、陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

#### ⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法やエンドポイントは確立されていない。本年度はオルガノイドの作製プロトコルを改良し、神経誘導時に細胞を包埋するマトリゲルを、ES細胞用 (米国Corning社、カタログ番号354277) からオルガノイド作製用に最適化されたマトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー オルガノイド形成用 (Corning社、カタログ番号356255) に変更した。またMEA計測をより早い時点 (昨年度: オルガノイド作製開始後260日以降、今年度: 同113日以降) に変更した。その結果、3週間にわたり安定したネットワークバーストを得ることに成功した。

#### (2) 化学構造の類似性に基づく *in silico* 発達神経毒性予測

まず、gEPと統計学的に関連のある記述子を選択した場合、予測精度が向上するか否かを解析した (図1)。

CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、

Wilcoxonの順位和検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ となった記述子 (CE01: 801種、NV01: 170種; 以下「 $p < 0.05$ 記述子」)、 $p$ 値が小さい順に並べた際の上位350記述子 (以下「n350記述子」) を用いた。また、対照として、相関係数が0.99以上の記述子を削除した1889記述子 (以下「 $r < 0.05$ 記述子」) を用いた。なお、1889記述子は量gEPで共通であるが、n350記述子は両gEPで異なる種類の記述子から構成される。

その結果、CE01ではBAが0.75程度の高い精度が得られたのに対して、NV01では、BAは0.56程度で分子記述子のみでは高い精度の予測は困難であった。また、両gEPにおいて、記述子の選択による感度、特異度及びBAの大きな変化は認められなかった。以上のことから、毒性と関連する記述子の選択は予測精度の向上に繋がらないことが示唆された。

次に、分子記述子に加えて生物学的な情報を追加することで予測精度が向上するか否かを解析した。ただし、対象農薬について実験結果を利用することは困難であることから、本解析では、約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアの予測値 (生物活性予測値) を利用した。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合 (レーン1) に比べて程度はわずかであったが、生物活性予測値を利用することで感度、特異度及びBAのいずれも向上し、n350セットを用いた場合に最も高い感度が、 $p < 0.05$ を用いた場合に最も高い特異度が得られた。NV01においては、n350セットを用いた場合において、分子記述子のみを用いた場合に比べて感度の大きな向上 (0.47→0.56) が認められ、BAも0.56から0.63に向上した。以上の結果から、PASSによる生物活性予測値を変数に追加することで予測精度が向上すること、さらにその際には対象とするgEPとの関連性が高い変数を絞り込んで利用することが精度向上に寄与することが示唆された。

#### (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*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。毒性メカニズムが明らかでない化学物質として、今年度はネオニコチノイド系農薬イミダクロプリドについて発達神経毒性評価を実施した。その結果、離乳期 (PND 21) の海馬において神経前駆細胞の数が減少し、成体期 (PND 77) において神経幹細胞数が減少した。離乳期には歯状回門におけるアストロサイトとM1型ミクログリアの数が増加し、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子が発現上昇した。成体期においては、酸化ストレスの指標であるmalondialdehydeレベルとM1

型ミクログリア数が増加し、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下した。これらの結果から、イミダクロプリドは海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。このような毒性メカニズムを検出する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

米国、韓国の動物実験代替法関連学会に参加し、MEAデータ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、OECDのDNTワークショップにおいて日本におけるDNT-IVB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。OECDやEFSAは、DNT-IVBの初期文書を検証試験に基づいて改訂する予定であり、IVBのTierに新たな技術を導入することに積極的である。

OECDの拡張一代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画し、発達神経毒性試験に関する改訂はほぼ無かったものの、内容の確認を行った。

#### D. 考察

OECDのDNT-IVBガイダンスにラット神経細胞を用いた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。DNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中樞神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要である。また、ヒト細胞としてヒトiPS細胞由来神経細胞の利用も期待されている。そこで本研究では、BBBの培養を行う灌流培養装置と神経細胞のMEA装置を灌流培養装置により連結し、培養液灌流下でのMEA計測を行えることを明らかにした。これによりMEAとBBBを統合した新たな生体模倣システムの完成に大きく前進したと考えられる。今後、適切な化学物質を用いて本システムの有用性を検証する必要がある。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。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。本研究により、ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養において、解凍した細胞を単一細胞まで分散させる操作が凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。今後、本研究で得られた知見をもとに標準的プロトコルの作成を目指す。

同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた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)。本研究ではAI画像解析による細胞状態のモニタリング手法の開発を進めてきた。本年度は解析技術のロバスト化のため、ノイズデータの分析とクレンジング技術および、解析パイプラインロバスト化のための深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、MEAデータを安定化しながら、実験データごとにあまり解析パイプラインを変更せずに定量化につなぐことができる可能性が示唆された。

MEAデータを用いたAIモデルによる毒性予測について、以前の検証で用いた9つのパラメータに加え、今回は6つのパラメータを追加した計15パラメータを使用した。以前の検証では毒性スコアが低くなる化合物があったが、今回の検証ではすべての陽性化合物で高い毒性スコアを与えたことから、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上することが示された。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。

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドの活用が期待されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。前年までの研究では、大脳オルガノイドからネットワーク活動を示すMEAデータを得ることに成功したが、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。本年度のオルガノイド作製・計測では、3週間にわたり安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功し、オルガノイドの製造工程に重要な知見を得ることに成功した。今後、今回の作製手順やオルガノイドのデータをふまえて、標準的なプロトコルの検討を進める。

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、ソース物質数の設定が予測精度に与える影響を検討したが、評価する毒性エンドポイントにより予測精度には差が見られた。コリンエステラーゼ阻害などメカニズムの明らかな毒性に比べ、外観

や行動などメカニズムが多様と考えられるエンドポイントでは、構造情報からの予測精度が低くなることが示唆された。今後は、化学構造情報から生物活性を予測するソフトウェアを利用してDB内の物質について各種生物活性の予測値を算出し、それらを利用した類似性評価に基づくソース物質の選択により、リードアクロスの精度向上が可能かを検討する。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。

イミダクロプリドは発現メカニズムが不明な神経毒性物質であるが、本研究により海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。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が、実験系の選択方法については検討の途上である。神経毒性の作用点に関する知見の蓄積により、発達神経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。今後、これらの成果をもとに、OECD 発達神経毒性の専門家会議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。

## E. 結論

本研究において、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を行った。これにより、キネティクスを反映した新たな*in vitro*試験法の構築が期待される。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。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

1. 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. Zou, X., Tang, Q., Ojira, R., Ozawa, S., Shobudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal

exposure to imidacloprid. *Chem. Biol. Interact.* 399:111145, 2024.

3. Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojira, R., Ozawa, S., Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant. *Env. Toxicol.* 40(1), 30–53, 2025.
4. Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojira, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats. *Acta Histochem.* 126(8), 152204, 2024.
5. Zou, X., Ebizuka, Y., Sakamaki, Y., Shobudani, M., Tang, Q., Kobayashi, M., Kigata, T., **Shibutani, M.**: Progressive motor dysfunction and loss of cerebellar Purkinje and granule cells in rat offspring after maternal exposure to imidacloprid. (submitted)
6. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaiaoun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, **Kojima H**, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol*, 2024 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
7. **Kojima H**, History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan. *Genes Environ.* 2025;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.

### 2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I.** Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
2. **諫田泰成**: ヒト細胞を活用した代替法の国際動向 第10回細胞凝集研究会, 2024年7月12日, 佐賀
3. **Yasuhiko Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides using human iPSC-derived neurons with multi-electrode array system. 21st Korean Society for Alternative to Animal Experiment Annual Meeting, Jul. 15, 2024. Busan, Korea.
4. **Kanda Y**: Regulatory science using New Approach and Methodologies. Aug 25, 2024.

- TSSCR. Taipei, Taiwan.
5. S. Yoshida, T. K. S. Tiong, Y. Nomura, **Y. Kanda**: Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
  6. T. Nakanishi, K. Ishida, K. Tatsumi, D. Matsumaru, H. Nagase, **Y. Kanda**, K. Takuma. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for in vivo detection of developmental neurotoxicity. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
  7. **Yasuhiko Y. Kanda Y.**: Neurotoxicity assessment of pesticides by acute administration to human iPSC-derived neurons using multi-electrode array systems. 13th American Society for Cellular and Computational Toxicology Annual Meeting, Oct. 29, 2023. North Carolina, USA.
  8. **Kanda Y.** Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPSC cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT, Oct. 30, 2024. Paris, France.
  9. **安彦 行人, 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農薬の神経毒性評価. 第 61 回全国衛生科学技術協議会年会, 2024 年 11 月 22 日, 大阪
  10. **諫田 泰成**: NAMs による食品安全性評価の現状と今後の展望, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会, 2024 年 12 月 1 日, 栃木
  11. **諫田 泰成**: ヒト細胞を用いた医薬品評価法の開発と標準化. 第 8 回ニューロン研究会, 2025 年 1 月 24 日, 東京
  12. 貫野 頌悟, **諫田 泰成**, 吉田 祥子: Effects of in utero exposure to organophosphate pesticide and dimethyl sulfoxide on cerebellar development, 日本薬学会, 2025 年 3 月 30 日, 福岡
  13. Hiroyuki Sato, Kaho Nakai, Yuri Ikeda, Nagae Kazue, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, **Tamihide Matsunaga**. Evaluation of receptor-mediated uptake and transcytosis using human iPSC cell-derived brain microvascular endothelial-like cells, 2024 International Society for the Study of Xenobiotics/The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Hawaii.
  14. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、**鈴木郁郎**, 機械学習を用いたヒト iPS ニューロンの MEA 計測における神経毒性評価法、第 15 回スクリーニング学研究会
  15. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、**鈴木郁郎**: ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測、第 50 回日本毒性学会学術年会
  16. Xinyu Zou, Qian Tang, Ryota Ojira, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Toshinori Yoshida, **Makoto Shibutani**: Effects of maternal exposure to imidacloprid on cerebellar development and behaviors of rat offspring. 第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、7 月 3 日-5 日, 2024.
  17. Xinyu Zou, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, **Makoto Shibutani**: Assessment of developmental neurotoxicity of imidacloprid on hippocampal neurogenesis and cerebellum in rat offspring. EUROTOX 2024. 58th Congress of the European Societies of Toxicology. Copenhagen, Denmark. 9 月 8- 11 日, 2024.
  18. 三ヶ島史人、真木一茂、**小島肇**、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕: 医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
  19. **小島肇**: 動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
  20. **Hajime Kojima**, International progress on the development and regulatory application of NAMs/Alternatives Symposium on Innovative Collaboration in Toxicology Alternative Methods in Shanghai (2024.11.2)
  21. **小島肇**: JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
- 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

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6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  
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  
分担課題：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。2023 年に発表された OECD の発達神経毒性（DNT）in vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスは 17 種類の in vitro 試験法がリストされている。その一つにラット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、ヒトの予測性が課題である。

本分担研究では、開発した新規 MEA 試験系の評価およびヒト iPS 細胞由来神経細胞との比較のため、ラット初代培養大脳皮質神経細胞の培養系を検討し、安定した MEA 実験を行うために、プロトコルを検証した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞の解凍や播種について、良好な培養を得るためのプロトコルの検討を進め、改良すべき点を見出した。次に、ラット神経細胞を搭載した MEA 装置を灌流培養装置と接続し、灌流下でのネットワーク活動計測に成功し、MPS のプロトタイプを構築した。さらに、国際動向を踏まえて、ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドのフィージビリティを検討した。基材の選択や培養期間等、作製プロトコルの検討により、高密度電極 MEA を用いて安定したネットワーク活動計測が行えることを見出した。

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できたと考えられる。

## 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。

現在、発達神経毒性の in vitro 評価系として OECD の in vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスが進められており、アッセイの中で多点電極アレイ（MEA）システムによる神経毒性評価法が記載されている。しかし、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。そこで本研究では、MEA による in vitro 神経毒性評価においてキネティクスを考慮することが可能な生体模倣システム（MPS）の開発を目標として検討を進めた。

これまで開発を進めてきた MEA と BBB を灌流培養装置で接続したシステムを構築するため、本年度は既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞（以下、ラット神経細胞）を利用して、培養プロトコ

ルやアッセイ系を検討した。

まず、DNT-IVB のラット神経細胞を用いて、国際的にデータが蓄積されている慢性曝露 MEA データと比較するため、プロトコルを検証した。

次に、ヒト iPS 細胞由来神経細胞に関しては、前年度まで使用した NeuCyte 社のヒト iPS 細胞由来神経細胞の安定供給に問題が生じて購入できなくなったため、OECD DNT 専門家会議で報告するとともに、本年度は別メーカー（富士フィルム CDI 社）のヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いて培養および MEA 計測プロトコルの検討を行った。

さらに、ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの作製と MEA 計測による品質評価を実施した。

## B. 研究方法

### ①灌流装置におけるラット神経細胞の MEA 計測

ラット皮質由来の神経細胞は米国 LONZA 社の市販凍結品（R-Cx-500, CryoCells, Rat Brain Cortex）を使用した。凍結細胞バイアルを 37℃ 温浴中で 2.5 分加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞をカウ

ントし、播種した。

MEAシステムはMaestro（米国Axion社）および高密度電極のMaxOne（スイスMaxwell社）を使用した。Maestroでの計測のため、48 ウェルMEAプレート（Axion社）に1 ウェル当たり  $3.4 \times 10^4$  個の割合で生細胞を播種し、週に2回の培地交換、3回のMEA計測を実施した。プレートを装置にセットして10分間静置後、15分間の計測を行った。計測データをAxISソフトウェア（Axion社）で処理してスパイク数、バースト数等のパラメータを算出した。またMEA計測実施後、BioRevo オールインワン顕微鏡（Keyence社）により細胞のZ-stack画像を取得し、AI画像解析に供した（加藤の項を参照のこと）。

MaxOneシステムでは、上記と同じラット神経細胞を高密度微小電極アレイチップに  $3 \times 10^4$  個の割合で播種した。週に2回の培地交換、3回のMEA計測を実施した。電極チップを装置にセットし5分間静置後、5分間のActivity scan、5分間の計測を行った。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。培養19-20日目に灌流培養装置との接続実験を実施した（松永の項を参照のこと）。

#### ②ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

48 ウェルMEAプレート（Axion社）にラット神経細胞（LONZA社）を①と同様に播種した。DNT-IVB収載の慢性曝露プロトコル（Fig.3A）に従い、DMSO（溶媒対照）と化学物質の曝露、MEA計測を実施した。化学物質としては、DNT陽性対照物質としてハロペリドール（0-30 $\mu$ M）、陰性対照物質としてアセトアミノフェン（0-300 $\mu$ M）を使用した。化学物質はDMSOに最終濃度の1,000倍濃度で溶解し、培地に1/1000量を混合した（最終DMSO濃度0.1%）。各化学物質の最大用量は、ヒトにおけるCmaxをもとに安全係数を30として算出した。播種日をDIV（Days In Vitro）=0とし、播種当日から化学物質を含む培地で培養を行った。DIV5, 9, 12, 14にMEA計測を実施し、MEA計測後、化学物質を含む培地にて培地交換（全量）を行った。

#### ③MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養プロトコルの検証

ヒトiPS細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞iCell glutaneuron（富士フィルムCDI社）を37 $^{\circ}$ C温浴中で正確に2分間加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞を計数した。48ウェルMEAプレート（Axion社）に1ウェル当たり  $7.3 \times 10^4$  個の割合で生細胞を播種し、週に2回の培地交換を行った。iCell GlutaNeuronの解凍と同日に、ヒトiPS細胞由来アストログリア細胞

iCell Astrocyte v2.0（富士フィルムCDI社）を37 $^{\circ}$ C温浴中で正確に2分間加温して解凍し、10cm細胞培養ディッシュに1枚当たり  $5 \times 10^5$  個の割合で播種して7日間培養した。培養7日目にiCell Astrocyteを回収し、iCell GlutaNeuronを培養しているウェルに1ウェル当たり  $1.2 \times 10^4$  個の割合で重層した。以後、週に2回の培地交換およびMEA計測を実施した。MEA計測はAxionシステムを使用し、ラット神経細胞と同様に行った。

#### ④ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製プロトコルの検証とMEAによる品質評価

ヒトiPS細胞RIKEN-1A（理研バイオリソースセンター）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高密度MEAシステムMaxOneを使用した。培養113日の脳オルガノイド（直径2-4mm）11個を、ラミニンコートした電極チップ1基あたり1-2個播種し、週2回のOrganoid maturation medium（STEMCELL Technologies社）培養液の交換と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。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞やアストロサイトは、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

#### ①灌流装置におけるラット神経細胞のMEA計測

MEAシステムMaestroにより計測されたラット神経細胞の全スパイク数、ネットワークバースト数の経時変化をFig.1に示す。全スパイク数、ネットワークバースト数とも培養開始後1週間で増加が始まり、培養開始後2週間でプラトーに達するプロファイルが得られた。DNT-IVBガイドランスに記載のプロトコルでは、ラットから単離した神経細胞を凍結せずにそのまま用いているが、本研究では検証試験の観点から市販の凍結ラット神経細胞を使用したところ、ネットワーク活動が見られるまでの期間に両細胞間で特に差は見られなかった。

MaxOneシステムにラット神経細胞を播種し、神経活動の指標として、多電極アレイ上でスパイクを検出した電極（Active電極）の割合を経時的に計測した（Fig.2）。Active電極の割合（%）は、培養開始後1週間で増加し、培養後3週間目までにプラトーに達してい

ると思われた。ラット神経細胞を搭載したMaxOne電極を灌流培養装置と接続してMEA計測を行った結果、培養液流動に伴うと考えられるノイズが見られたものの、ネットワーク活動の計測に成功した（松永の項を参照のこと）。

#### ②ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

DMSO (0.1%)の曝露は、MEAデータに影響を及ぼさなかった。全スパイク数に対するDMSO曝露の結果をFig. 3Bに示す。DIV7-14のハロペリドール曝露は3 $\mu$ M以上の濃度でスパイクを消失させた（Fig.3C上）。これに対し、アセトアミノフェン慢性曝露はいずれの濃度でも全スパイク数に影響を与えなかった（Fig.3C下）。

#### ③MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞の培養プロトコルの開発

iCell GlutaNeuronとAstrocyteの重層培養により、培養開始後4~5週間でネットワークバーストが認められたが、多くのウェルで強い凝集が観察された（Fig.4A）。細胞解凍の際、iCell GlutaNeuronを、顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペettingして分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった（Fig.4B）。

#### ④ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製と品質評価

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法やエンドポイントは確立されていない。再現性の良いオルガノイドのMEA評価法を目指し、本研究ではオルガノイドの作製プロトコルの改良を行った。具体的には、神経誘導時に細胞を包埋するマトリゲルを、ES細胞用（米国Corning社、カタログ番号354277）からオルガノイド作製用に最適化されたマトリゲル基底膜マトリックスフェノールレッドフリーオルガノイド形成用（Corning社、カタログ番号356255）に変更した。またMEA計測をより早い時点（昨年度：オルガノイド作製開始後260日以降、今年度：同113日以降）に変更した。

ヒトiPS細胞より作製した脳オルガノイドは直径2mm以上と大きく、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、26,400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度MEAシステムMaxOneを用いた。各1-2個の脳オルガノイドを播種した8基のMaxOne電極チップのうち、2個で播種後1週間目からネットワークバーストが検出された。前年度までの研究では、測定ごとにネットワークバーストの検出に大きな変動が生じていたが、本年度は1個のオルガノ

イド（直径約2mm）について、培養3週間にわたりほぼ安定したネットワークバーストを観察できた（Fig.5）。

#### D. 考察

本年度はBBBを搭載する灌流培養装置とラット神経細胞を搭載した高密度MEAシステムMaxOneを接続したアッセイ系の構築を目指して培養プロトコルやアッセイ系のフィージビリティを検討し、神経ネットワーク活動をMEAにより計測ができることを明らかにした（詳細は松永の項を参照）。

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の影響は重要である。前年度までに、ヒトiPS細胞由来BBBの複数施設におけるプレバリデーションを実施し、バリア機能を安定して発揮できることを確認した。今後、作製したMPSにより、統合的な神経毒性リスク評価法につながることを期待される。Maxwell社のシステムは、灌流培養装置との接続など拡張性が高く、キネティクスを考慮したMEA計測には利点が多いと考えられる。一方、神経ネットワーク活動を記録するパラメータはMaxOneとMaestroなどでシステムごとに独自のものが用いられており、異なるシステムで得られたMEAデータを比較するためには、パラメータの対応付けなど機種間差を検討する必要がある。

これまでEPAでは、ラット神経細胞を用いたMEAにより、多くの化学物質について急性・慢性影響のデータが蓄積（<https://comptox.epa.gov/dashboard/>）されており、現在、OECDやEFSAなどでは適切な対照化合物の選定と技術移転を進めている。これらの手法の予測性を明らかにするためには、MEAなどin vitroのデータをin vivoに外挿するIVIVE (in vitro-in vivo extrapolation)が重要である。ヒト、ラットそれぞれの体内濃度と毒性影響が明確な対照物質を用いて、ヒト細胞とラット神経細胞でMEAパラメータの選定と曝露マージンなどを比較する必要がある。本研究では、陽性対照物質としてハロペリドール、陰性対照物質としてアセトアミノフェンを使用し、ラット神経慢性曝露評価系の検証を行った。ハロペリドールは3 $\mu$ M以上の濃度でスパイクを完全に消失させることが観察され、EPAのデータ（10 $\mu$ Mでスパイクを100%抑制）と一致する結果が得られた。今後、更に化学物質を増やして、ラット神経細胞を用いた慢性曝露系の再現性などを検証する必要があると考えられる。

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、同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた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）。現在、EFSAの予算をもとに、欧米ではCROに技術移転を検討している。

ヒトiPS細胞由来神経細胞に関しては、培養手順の標準化に関する検討を進め、解凍した細胞を単一細胞まで分散させることが、凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。また、これまで使用してきた市販ヒトiPS細胞由来神経細胞の供給が停止する事態が生じたこと等も踏まえ、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。細胞の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が、今のところ、MEAのパラメータからは選定できていない。今後、トランスクリプトーム解析などを実施し、MEAデータと細胞の品質との相関をさらに検討する必要がある。

さらに近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目され、MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析が数多く報告されている（Sun Y et al. Cell Stem Cell. 2025）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。前年までの研究では、大脳オルガノイドからネットワーク活動を示すMEAデータを得ることに成功したが、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。本年度のオルガノイド作製・計測では、オルガノイド作製のための包埋材（マトリゲル）や培養期間を調整することで、3週間にわたり安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功した。オルガノイドの安定したMEA計測には、マトリゲルなどの材料の選択や培養期間の最適化、オルガノイドのサイズなどが重要という知見を得ることができた。

## E. 結論

本研究において、新たにMEA試験系を灌流装置につなぐことに成功し、BBBと神経の臓器連関モデルの基盤となる技術を構築できた。また、ラット神経細胞やヒトiPS細胞由来神経細胞、ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドの作製についても安定した結果が得られたことから、今後、標準プロトコルの確立に役立つと考えられる。以上の成果をもとに、DNT-IVBの改訂の議論を進めることにより、ガイダンスに貢献したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I.** Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
2. **諫田泰成**：ヒト細胞を活用した代替法の国際動向 第10回細胞凝集研究会, 2024年7月12日, 佐賀
3. **Yasuhiko Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides using human iPSC-derived neurons with multi-electrode array system. 21st Korean Society for Alternative to Animal Experiment Annual Meeting, Jul 15, 2024. Busan, Korea.
4. **Kanda Y**: Regulatory science using New Approach and Methodologies. Aug 25, 2024. TSSCR. Taipei, Taiwan.
5. S. Yoshida, T. K. S. Tiong, Y. Nomura, **Y. Kanda**: Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
6. T. Nakanishi, K. Ishida, K. Tatsumi, D. Matsumaru, H. Nagase, **Y. Kanda**, K. Takuma. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for in vivo detection of developmental neurotoxicity. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
7. **Yasuhiko Y, Kanda Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides by acute administration to human iPSC-derived neurons using multi-electrode array systems. 13th American Society for Cellular and Computational Toxicology Annual Meeting, Oct 29, 2024. North Carolina, USA.
8. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPSC cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT, Oct 30, 2024. Paris, France.
9. **諫田泰成**：ヒト細胞を活用した代替法の国際動向 第10回細胞凝集研究会, 2024年7月12日, 佐賀
10. **安彦 行人, 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農薬の神経毒性評価. 第61回全国衛生科学技術協議会年会, 2024年11月22日, 大阪
11. **諫田 泰成**：NAMsによる食品安全性評価の現状と今後の展望, 日本動物実験代替法学会 第37回大会, 2024年12月1日, 栃木

12. 諫田 泰成: ヒト細胞を用いた医薬品評価法の開発と標準化. 第8回ニューロン研究会, 2025年1月24日, 東京
13. 貫野 頌悟, 諫田 泰成, 吉田 祥子: Effects of in utero exposure to organophosphate pesticide and dimethyl sulfoxide on cerebellar development, 日本薬学会, 2025年3月30日, 福岡

#### 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

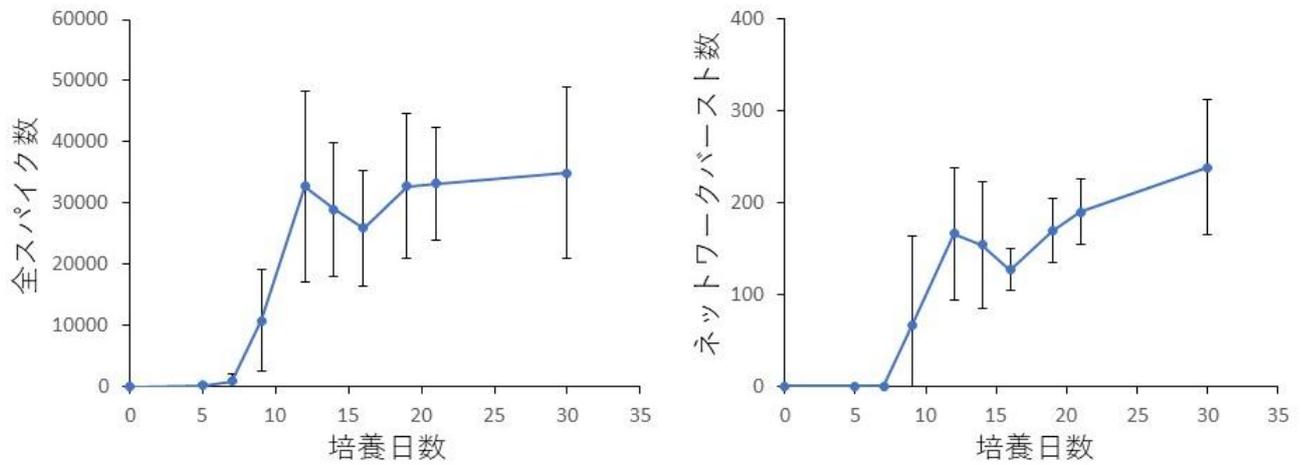


Fig.1 MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数 (左) およびネットワークバースト数 (右) を計測した。いずれも N=4、平均値±標準偏差を示す。

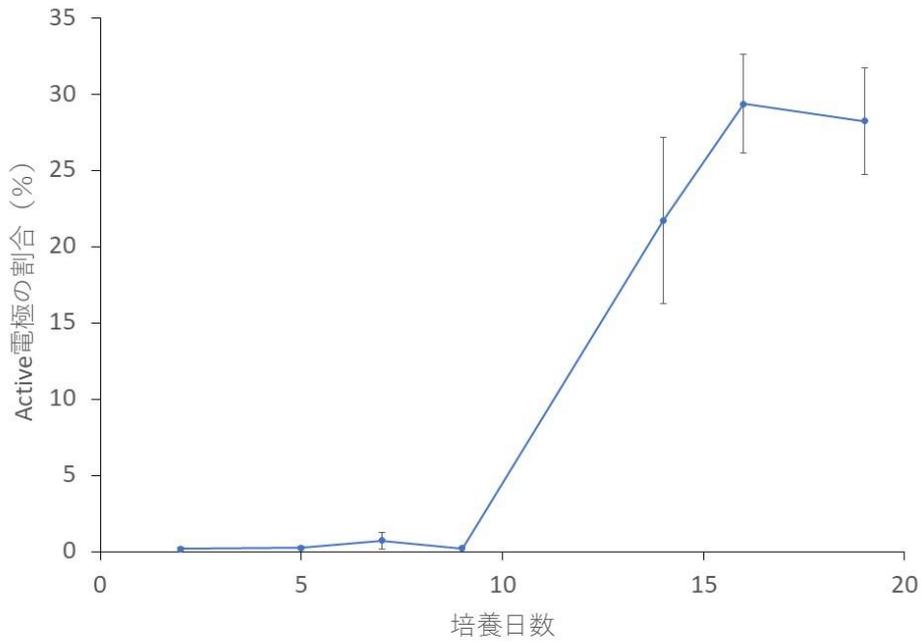


Fig.2 高密度 MEA システムによるラット神経細胞活動の経時変化

高密度 MEA システム MaxOne の電極チップに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に Active 電極の割合 (%) を計測した。N=4、平均値±標準偏差。

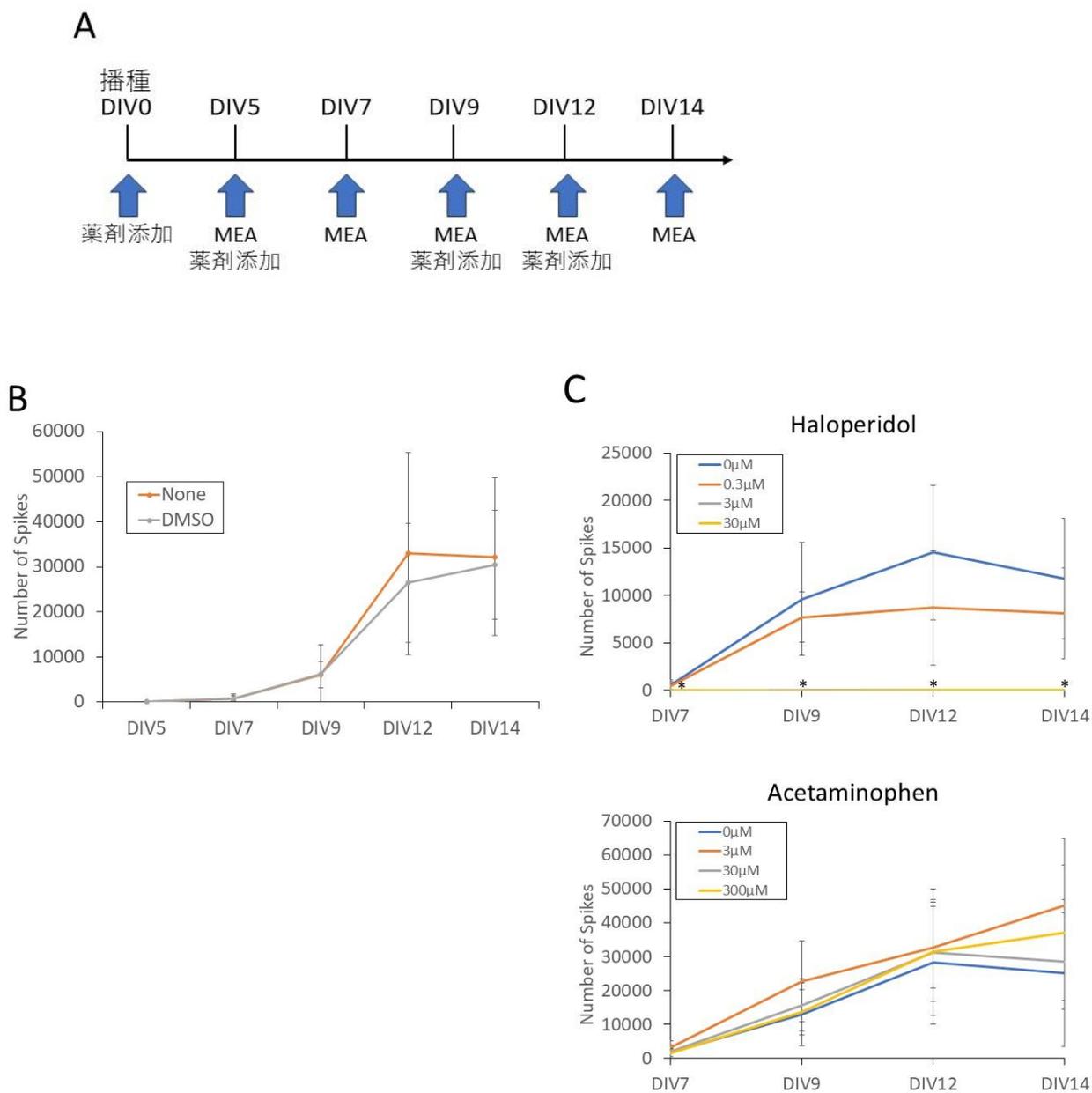


Fig.3 薬剤慢性曝露によるラット神経細胞活動の変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数を計測した。  
**A.** 実験手順 (DNT-IVB 収載の慢性曝露プロトコルに従った)。**B.** ベースラインに対する溶媒(DMSO)添加の影響。N=4、平均値±標準偏差。**C.** 全スパイク数に対するハロペリドール (上) およびアセトアミノフェン (下) 慢性曝露の経時的影響。ハロペリドール 3μM 以上の投与ではスパイクが消失した (\*). N=4、平均値±標準偏差。

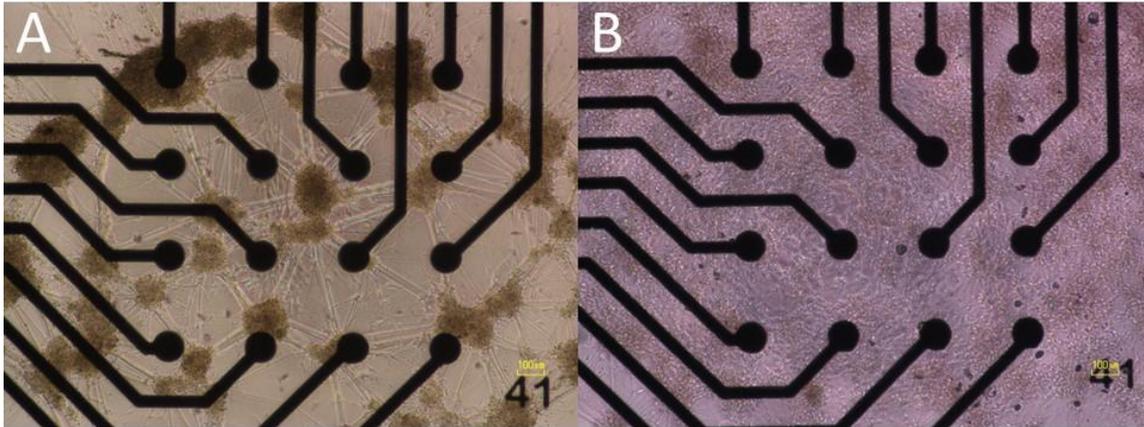


Fig.4 iCell GlutaNeuron、astrocyte 混合培養のプロトコル整備

- A. iCell GlutaNeuron を解凍後、顕微鏡観察で細胞数個～10 個程度の塊が見える状態で播種したもの（培養 28 日目撮影）
- B. iCell GlutaNeuron を解凍後、顕微鏡観察で完全に細胞が single cell になるまでピペッティングで分散させて播種したもの（培養 32 日目撮影）

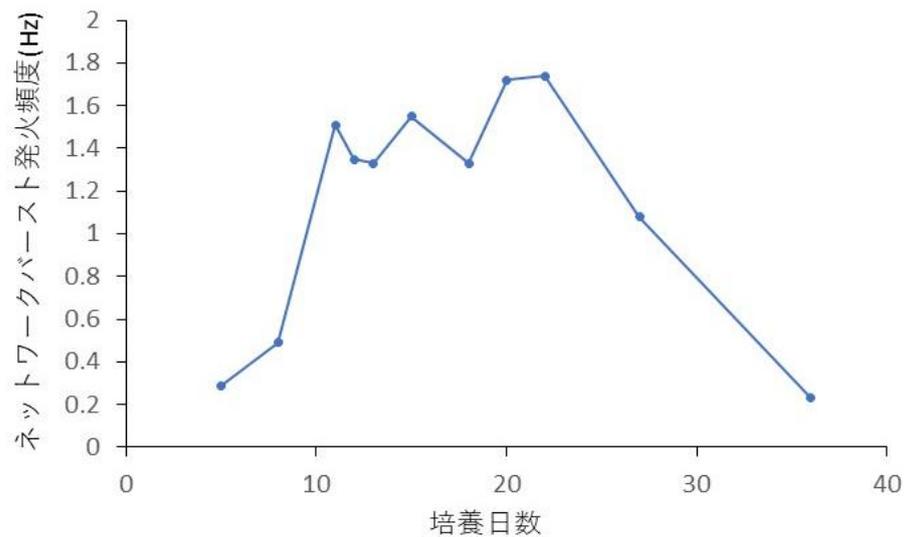


Fig.5 高密度MEAシステムによるヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測

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) のネットワークバーストを高密度 MEA システム MaxOne で計測した。8 個の電極チップ中、安定してネットワークバーストが計測された 1 個の結果を示す。

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6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  
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  
分担課題：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 特任教授

## 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上でのヒトiPS細胞由来BBB構成細胞の培養条件の検討およびヒトiPS細胞由来BBB細胞を搭載したMPSと多電極アレイ（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層灌流デバイスにMEAを連結できる方法を開発、灌流時における神経細胞への影響を調査し、デバイスを改良することを目標とした。

## B. 研究方法

これまで開発してきた2層灌流デバイスに既存のMEA（MaxWell Biosystems社）を連結し、MEA側に播種したラット初代培養神経細胞に灌流の影響がでないか神経活動電位を長時間測定した。

灌流培養用ポンプには圧力駆動型ポンプ（Fluigent社製）を用い、20, 40, 80  $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行った。

## C. 研究結果

2層灌流デバイスにMEAを搭載したデバイスの開発を進めてきたが、既存のMEAと2層灌流デバイスを一体化させる方法が困難を極め、一体型デバイスの開発を断念した。そこで、2層灌流デバイスとMEAを配管にて連結したMEA連結型BBB-on-a-chipの開発を行い（図1）、既存のMEA側にシリコン製のカバーを被せ、上部を厚めの蓋で押さえつけることで灌流できる装置を開発した。当初、MEA側に取り付けた配管の入口側と出口側の高さを培地液面と同様にして灌流操作を行った。その結果、電極すべてにノイズが生じ神経活動電位を測定することが困難であった。

次にMEA側に取り付けた入口側の配管の高さを短くし、培地液面と接しないように改良した。その結果、灌流培養を行いながら神経活動電位を測定することに成功した。しかし、同じ間隔でノイズが生じる現象も生じたため、灌流速度を20, 40, 80  $\mu\text{L}/\text{min}$ の3通りで測定を行ったところ、ノイズが生じる間隔が灌流速度の増加に伴い短くなることが判明した。

## D. 考察

当初開発したMEAにおける灌流装置では、MEA内の液培地液面と入口側および出口側の配管が繋がってしまったことで、MEA内に電流が流れ込んだと予想した。そこで、改良型では入口側の配管を培地液面より高くすることで培地との接地を避ける構造にした。その結果、全ての電極にノイズが生じることはなくなったが、一定間隔でノイズが生じる現象が生じるようになった。そこで灌流速度を変更したところ、灌流速度依存的にノイズ間隔が短くなることが判明し、入口側の配管で生じている液滴がMEA内の培地液面に落ちる際にノイズが生じていると考察された。

## E. 結論

MEA側に配管をつなげることで、神経細胞上で灌流を生じさせることに成功した。一方、神経活動電位の測定には、ノイズを生じさせない方法が必要であり、継続してデバイスの改良を行い、MEA連結型BBB-on-a-chipの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

Hiroyuki Sato, Kaho Nakai, Yuri Ikeda, Nagae Kazue, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. Evaluation of receptor-mediated uptake and transcytosis using human iPS cell-derived brain microvascular endothelial-like cells, 2024 International Society for the Study of Xenobiotics/The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Hawaii, 2024年9月15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。)

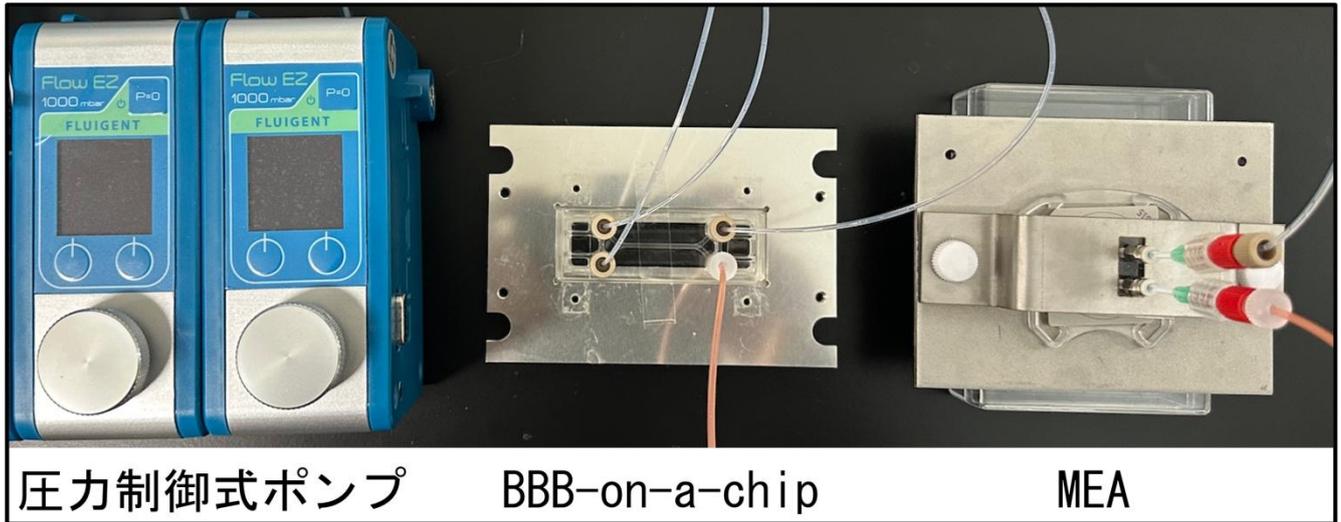


図1 開発中のMEA連結型BBB-on-a-chip

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6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  
 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

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6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、令和5年度に開発した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ロバスト性の向上に向けたノイズデータ削除のためのアルゴリズム開発を行った。その結果、電極付近のデータをスコア化して集合化することでより安定したデータになることが発見された。開発項目(2)においては、コンフレント状態のより微細な変化を表現する記述特徴量化技術としてのVAEモデルを用いた潜在特徴量表現技術のための基盤モデルを検証し、ノイズデータに対するロバスト性が向上することを確認した。今回のMEAデータではまだ安定性の高い性能を達成することができなかったが、目標としていた追加データに対する安定な解析パイプライン構築にVAEが有効である可能性が示唆された。

### 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中で薬剤に応答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)において令和5年度に開発された解析技術について、各電極ポジションの認識安定性の向上、各電極ポジションから得られたデータのデータ品質評価法およびノイズデータの効果的削除方法を開発した。

また、開発項目(2)においては、今年度解析対象となる細胞の世界的な供給停止によって評価解析細胞が変更することを受けて、よりどんな細胞に変更された場合にもロバストかつ効果的に状態の記述が行えるように、Variational Auto-Encoder (VAE) のアルゴリズムを用いた画像特徴量抽出法を新たに開発した。

### B. 研究方法

本年度も、研究代表者・安彦から提供された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)を用いて、細胞応答の画像予測AIモデルロバスト化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。また、SynFire顕微鏡画像におけるコンフレント細胞画像からの特徴量抽出のために、VAEモデルについての開発環境整備と実装を行い、最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

(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、令和5年には第一バージョンとして構築

していた各電極部分の画像パッチエリアをより正確かつロバストに認識するアルゴリズムの開発を行った。これは画像間において、輝度のバラツキなどが生じていることから、データが増えて行く中で同様のアルゴリズムでは自動化処理が難しくなると考えられたからである。特に、距離画素値の最大値に対し 0.8 倍を閾値として再度二値化する処理を含めることで、電極の中心部のみをロバストに認識が可能となり、さらに開演算 (5×5 カーネル、2 回反復) を施すことで、ノイズを除去して正確に電極を中心とした領域を認識することが可能となった (図 1)。

MEA区画化と数値化が可能になったので、同一条件で培養された神経細胞から得られるスパイク数データにおけるバラツキについて分析した。細胞播種後の培養日数を通じたスパイク数データの電極間でのバラツキを分析したところ、MEAデータでは電極間で想像以上に大きな変動 ( $CV > 0.4$ ) が生じることが理解された。また、その電極間のバラツキは、経時的に増大されいくことも確認された (図 2)。同一条件下の計測でありながら、このような大きなバラツキが存在するという事は、神経毒性評価をより安定な評価技術とするためには、MEAデータ中のバラツキを生む原因である「ノイズデータ」を *in silico* でのデータ処理で削減させ、評価の信頼性を向上させることができると考えられた。

このようなMEA計測におけるデータ内変動の原因をさらにデータ解析した結果、バラツキを生じさせる原因として、(ノイズ1) 複数の測定日にわたって測定値が逸脱するデータ (電極としての外れ値)、(ノイズ2) 同一サンプル内において特定の測定日のみスパイク数が経時的な増加傾向から逸脱するデータ (計測としての逸脱データ) が存在することが明らかとなった。

ノイズ1を判別するため、複数の測定日にわたって逸脱を示すサンプルを特定するため、細胞画像から定量化した細胞領域の分布を解析した。具体的には、各培養日のサンプル間で細胞領域の値を標準化し、ガウス分布による最尤推定を用いてノイズ1をデータとして検出できるかを検証した。結果、一定に連続する電極データのノイズを検出できることがわかった。

さらに、ノイズ2を自動検出するため、階層ベイズモデルを応用することで予測値に90%信用区間を設定することで逸脱スパイク数データを定量化し、データクレンジングを行う手法を開発した (図 3)。このデータクレンジングを実装した結果、ノイズがある状況では相関性が乱れやすい「画像中の特徴量」と「スパイク数」との相関性が、培養経過時間を通じて安定化する傾向が確認された。このため、本手法によって、ノイズデータを *in silico* で削減することによって、より安定なMEA解析とデータの理解が可能になることが示唆された。そこで、より

細かくMEAによる神経活動測定において、電極周囲に存在する細胞量 (周辺細胞領域値) とスパイク発火頻度との関係を解析し、信頼性の高い電極選別に活用可能な評価指標の構築を試みた。電極ごとに周辺細胞領域値を算出し、その大きさに基づいて5群に分類したところ、培養28日目以降のデータにおいて、細胞領域値が小さい群ではスパイクがほとんど検出されない電極の割合が高く、逆に細胞領域値が大きい群ではスパイクが安定して検出される傾向が確認された。さらに、周辺細胞領域値に基づくフィルタリングにより、スパイク発火頻度の平均値は向上しつつ、ばらつき (CV) を抑えながら安定した電極群を抽出できることが示された (図 4)。これにより、電極単位での品質評価が可能となり、従来Well単位の選別では困難であった電極レベルでの標準化の有効な指標となる可能性が示唆された。

最終的に、我々はプロジェクト開始時から国衛研から提供いただいているヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養画像の解析パイプラインを開発して来た。我々の解析手法では、細胞被覆状態を画像から検出し、複数の特徴量を用いて定量評価していたが、細胞の種類が変わる、または、新規撮影データを受け入れるにしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つであるVAEを用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。残念ながら、今回の検証では、学習データの少なさからか、これまでの電極データの解析を上回るような「安定特徴量」を潜在特徴量の中に発見することはできなかった。しかし、VAEのような深層学習モデルの導入のために検証した様々なノイズデータへの適応力からは、わずかな細胞種やデータの変更の誤差に左右されにくい画像認識が可能なることを確認することはできた。このため、今後MEA画像データをより多く蓄積することができれば、実験日や細胞状態に左右されない電極部位画像認識と安定した評価パイプラインが構築できると期待される。

#### D. 考察

本年度は、令和5年度までに開発してきた解析技術のロバスト化のため、ノイズデータの分析とクレンジング技術および、解析パイプラインロバスト化のための深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、MEAデータを安定化しながら、実験データごとにあまり解析パイプラインを変更せずに定量化につながる可能性があることが示唆された。また電極ごとにデータを標準化できる可能性も示唆された。

#### 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解析モデルの先端技術での不安定化克服が可能なることを見出すことができた。提供データ

が深層学習モデルに対しては少し少なすぎる問題に直面したが、可能な限り新規モデルの有効性を検証し、汎用性が高くロバストなAI解析のコンセプトの構築を実現できたと考えられる。。

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表**

なし

### **2. 学会発表**

なし

## **G. 知的所有権の取得状況**

### **1. 特許取得**

なし

### **2. 実用新案登録**

なし

### **3. その他**

なし

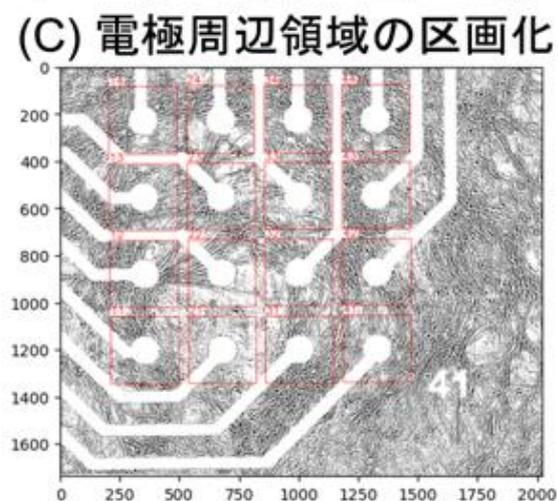
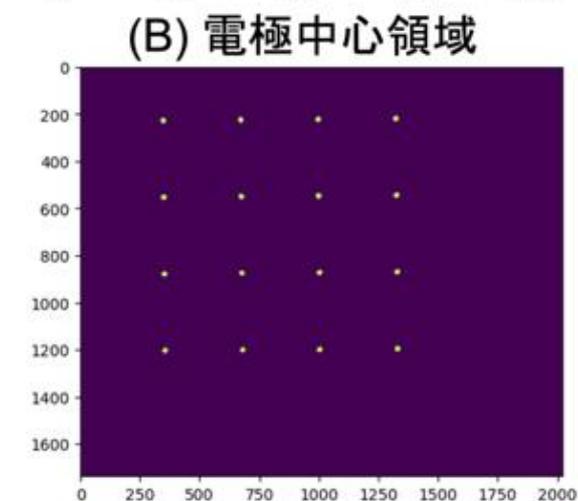
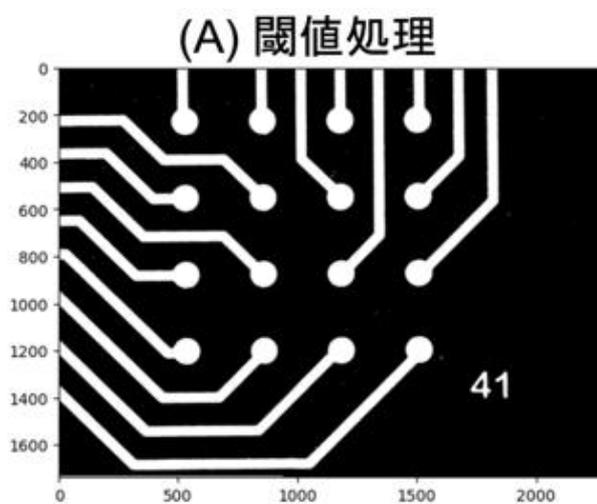
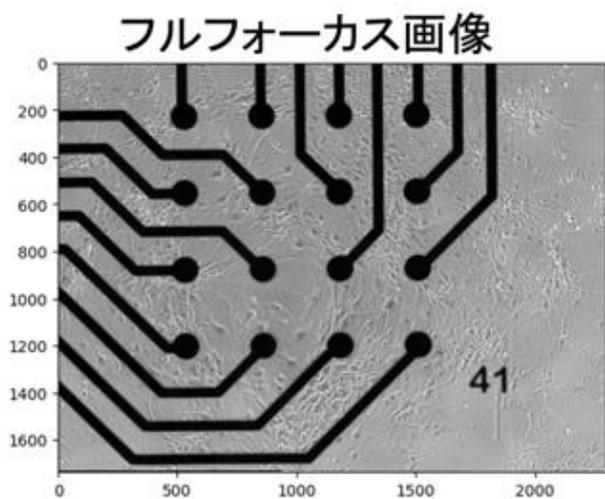
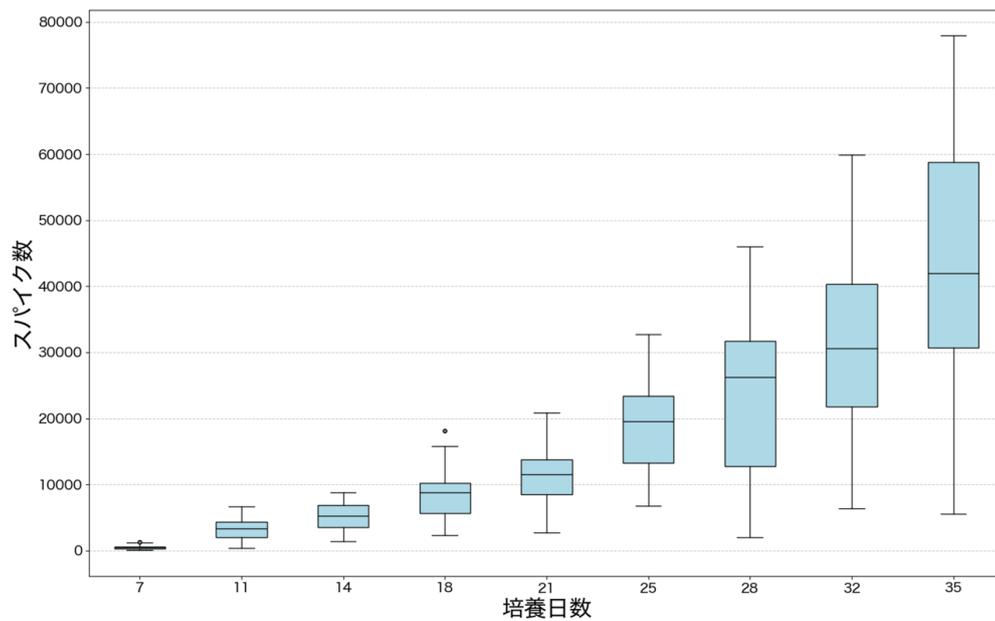


図1： MEA区画化アルゴリズムのロバスト化

20230608播種



20230810播種

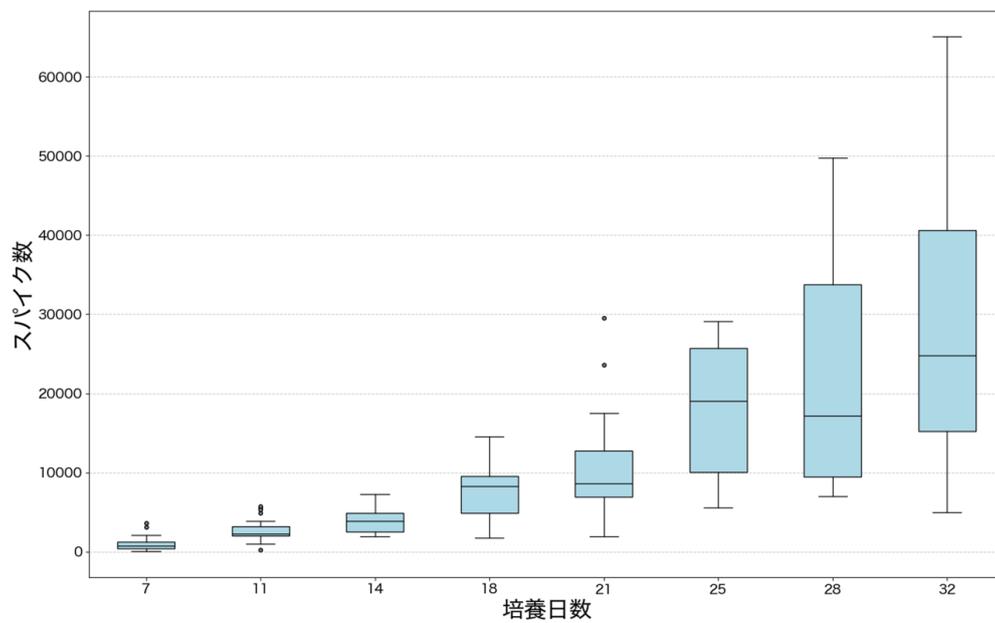


図2：MEAデータの中で増大するバラツキ

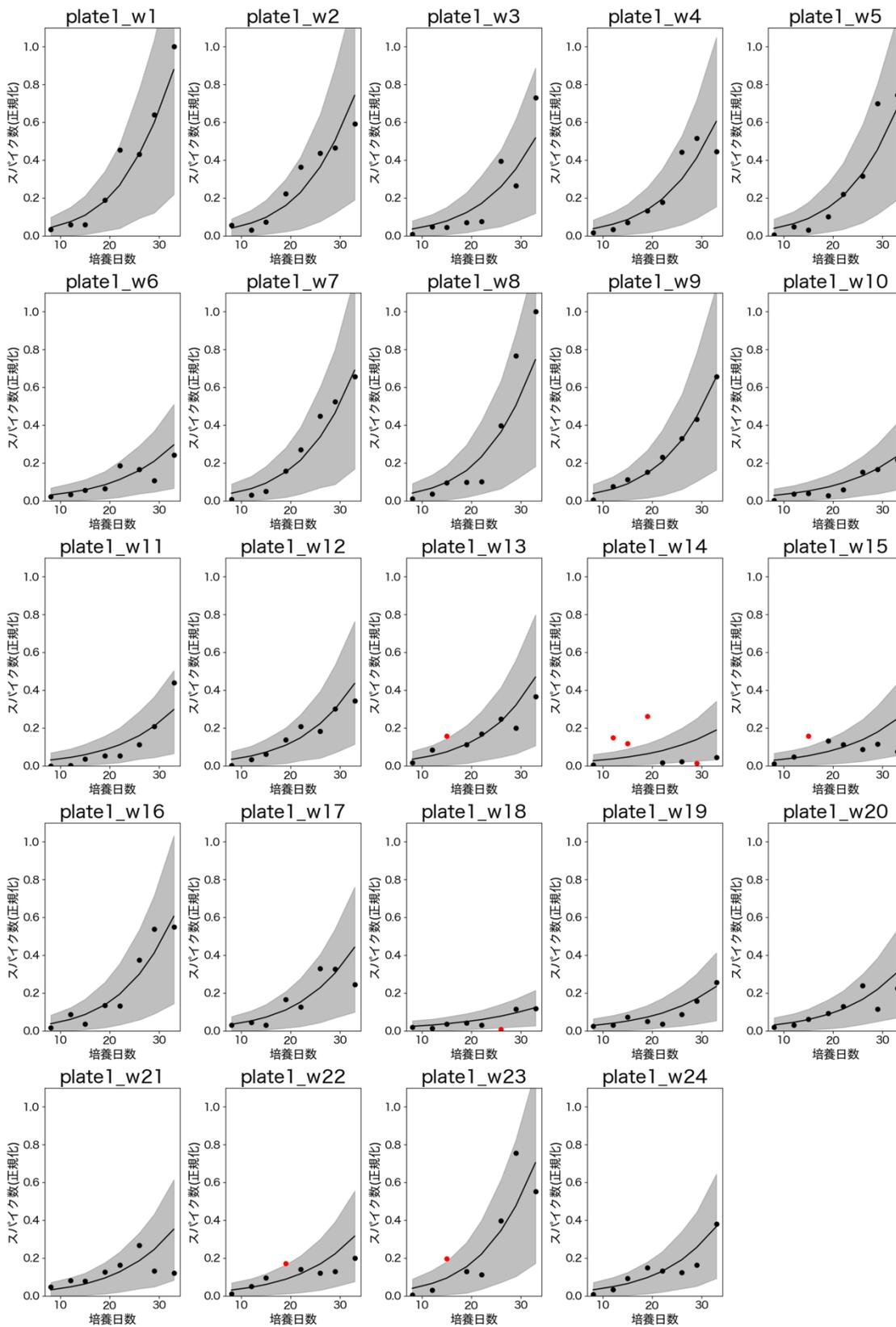


図3：階層ベイズを用いたノイズデータ検出の例

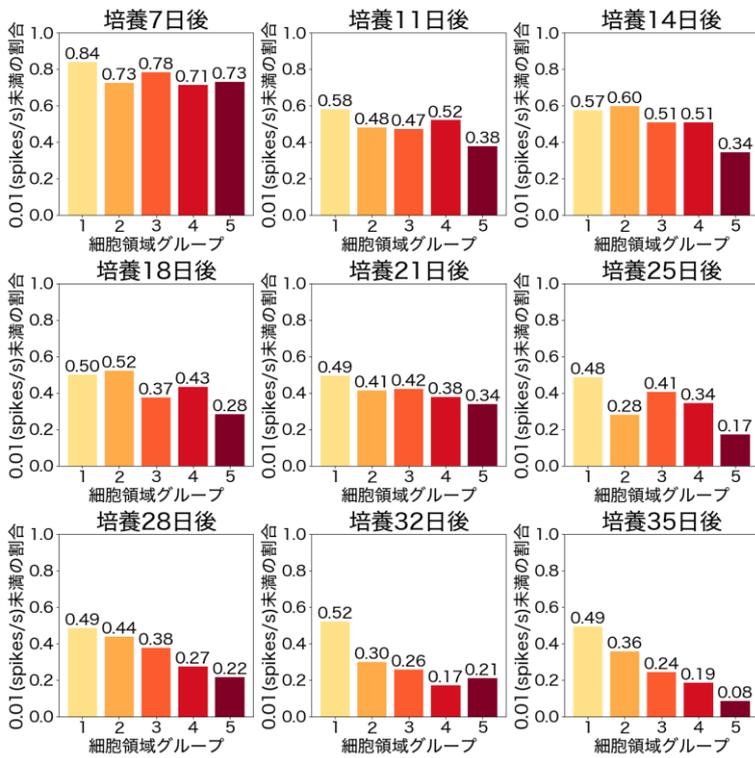
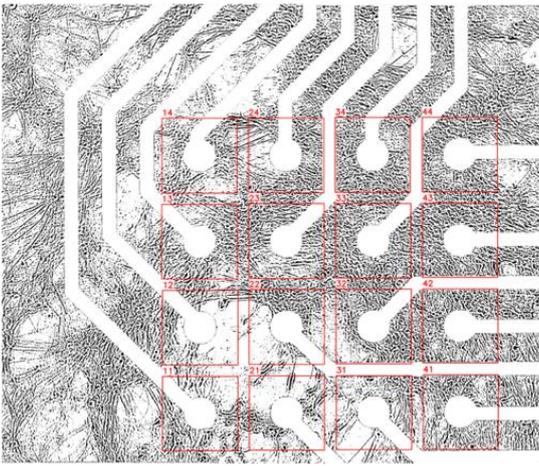


図4：領域グループによる電極データ検出効果の例

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6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  
 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  
 分担課題：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iPS細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および、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、13化合物の毒性を予測することができた。

### 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iPS細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。

### B. 研究方法

ヒトiPSC由来ニューロンはiCell Glutaneurons（FUJIFILM Cellular Dynamics Inc.）を使用した。48-well MEAプレート上に神経細胞を培養し、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11種類のヒトへの健康影響が報告されている化学物質と2つの陰性化合物を使用した。試験化合物は、Bisphenol A, Chlorpyrifos, Fipronil, Fluoxetine, Haloperidol, Tebuconazole, Tributyltin, Deltame-

thrin, Rotenone,  $\beta$ -Cyfluthrin, Metaflumizoneを使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, 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、⑩バースト間隔の変動係数、⑪バースト持続時間の変動係数、⑫バースト内発火数の変動係数、⑬バーストの規則性、⑭バースト持続時間の四分位範囲、⑮バースト持続時間の最大値を算出した。

陰性対照化合物を陰性データ、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質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、陰性対照化合物に対する毒性スコアの標準偏差を基準とした毒性判定閾値を決定した。次に、未学習データおよび未学習化合物に対して、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

ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータの変化をヒートマップを作成することで確認した（図1）。11種類の試験化合物のうち10種類の化合物で濃度依存的に発火数および同期バースト数が減少する傾向が観察された。また化合物によって各々複数のパラメータで濃度依存的な変化が観察された。ただし、陰性対照化合物であるAcetaminophen, Aspirinにおいても複数のパラメータで変化が認められたため、試験化合物と陰性対

照化合物の変化の差異を見極められるAI作成が重要となる。

作成した毒性予測AIモデルが予測した未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコアを図2に示す。陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

毒性予測AIモデルによる毒性判定結果表を図3に示す。陰性対照化合物に対する毒性スコアの2SDを毒性判定閾値として使用すると、すべての未学習データで低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。また、陰性対照化合物では低濃度から高濃度にかけて毒性が誤検出されず、正しく陰性判定することができた。さらに、未学習化合物に対しても低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。

結果として、陰性対照化合物2種類および、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質11種類の合計13化合物すべてで毒性を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、13化合物の毒性を予測することができた。以前の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した使用したが、今回の検証では6つのパラメータを追加した計15パラメータを使用した。以前の検証では毒性を検出できない化合物があったが、今回の検証ではすべての化合物で毒性を予測できたことから、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上することが示された。

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のが推測できる。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。またパラメータ数を増やすことで予測精度が向上する結果が得られたことから、今後複数の評価系データを学習することで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

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, Volume 93, 105668, 2023

##### 2. 学会発表

1. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、鈴木郁郎、機械学習を用いたヒトiPSニューロンのMEA計測にお

ける神経毒性評価法、第15回スクリーニング学研究会

2. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、鈴木郁郎、ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測、第50回日本毒学会学術年会

#### 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

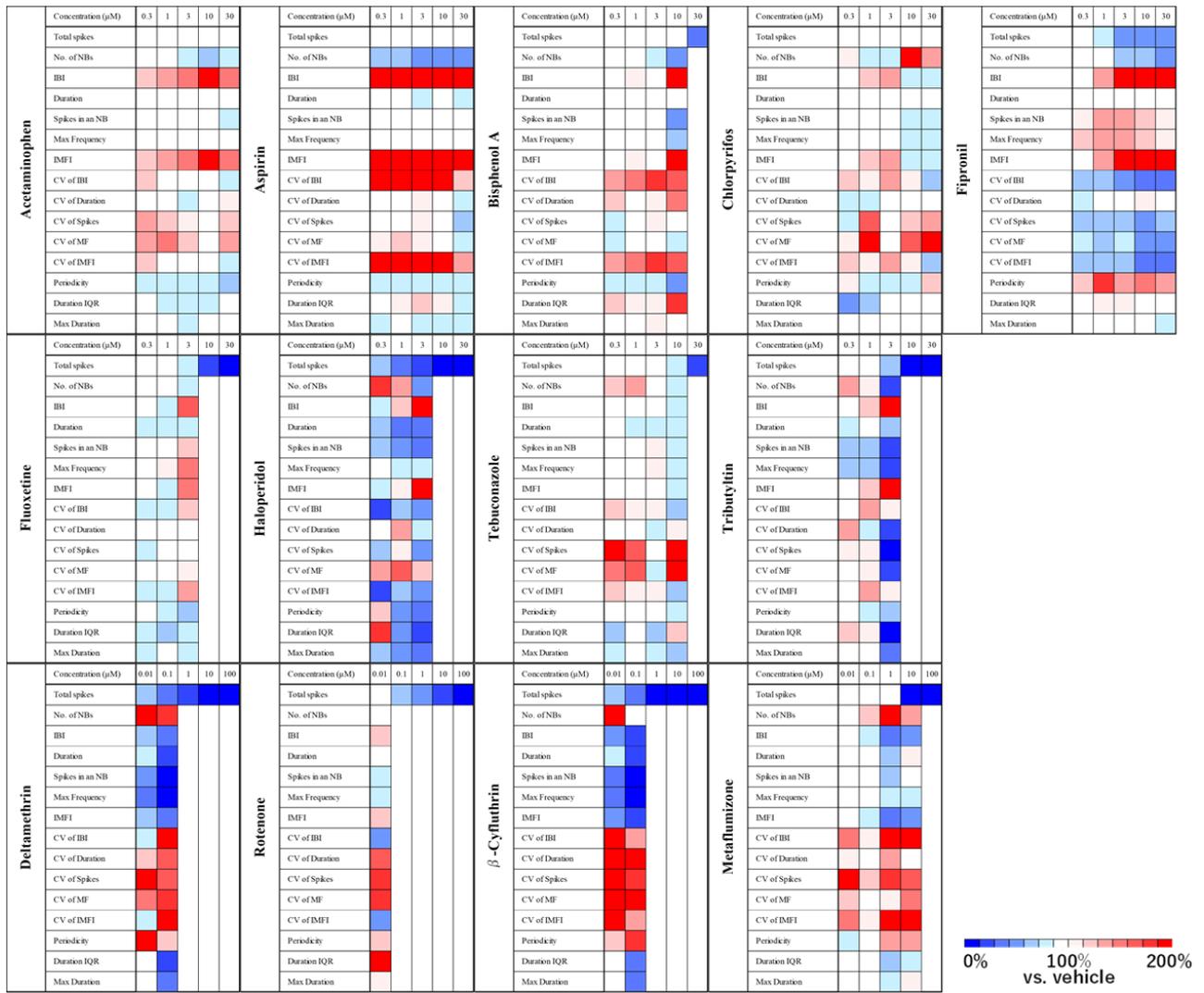
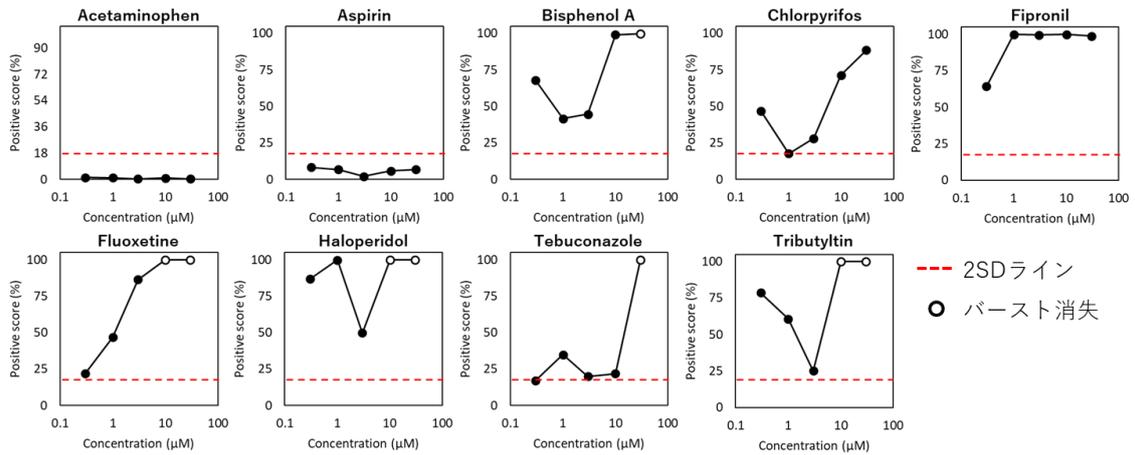


図1. 化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータのヒートマップ

未学習データ



未学習化合物

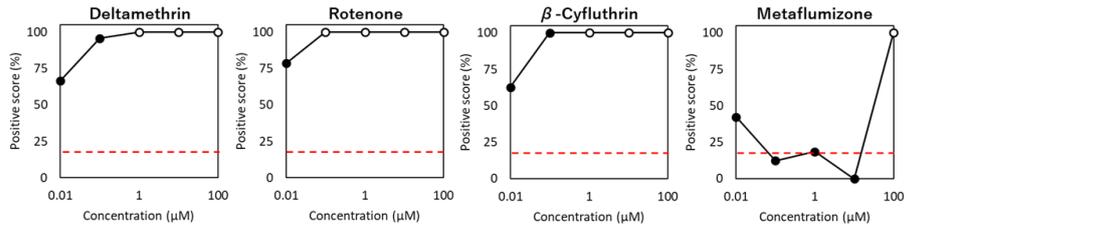


図2. 毒性予測AIモデルによる未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア

	Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
	0.3	1	3	10	30
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Aspirin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Bisphenol A	High risk	High risk	High risk	High risk	—
Chlorpyrifos	High risk	Medium risk	High risk	High risk	High risk
Fipronil	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Fluoxetine	High risk	High risk	High risk	—	—
Haloperidol	High risk	High risk	High risk	—	—
Tebuconazole	Medium risk	High risk	High risk	High risk	—
Tributyltin	High risk	High risk	High risk	—	—
Deltamethrin	High risk	High risk	—	—	—
Rotenone	High risk	—	—	—	—
$\beta$ -Cyfluthrin	High risk	High risk	—	—	—
Metaflumizone	High risk	Medium risk	High risk	Low risk	—

■ Low risk  
■ Medium risk  
■ High risk  
■ disappearance of NB

図3. 毒性予測AIモデルによる毒性判定結果

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6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

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

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と過塩素酸アンモニウム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。最終年度の今年度はIMI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、IMIは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した。児動物を出生後21日と77日目に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。離乳期(PND 21)に、海馬の神経新生ニッチにおいて、750 ppmのIMI曝露は、神経前駆細胞(NPC)の増殖とERK1/2-FOSを介した顆粒細胞のシナプス可塑性を抑制することにより、後期NPCと分裂後の未成熟顆粒細胞の数を減少させた。Reelinのシグナル伝達が抑制されたことが、観察された神経新生とシナプス可塑性の減少の原因かもしれない。休薬後の成体期(PND 77)においては、250 ppm以上のIMI曝露は、神経幹細胞の増殖を抑制しアポトーシスを増加させることにより神経幹細胞数を減少させ、成熟顆粒細胞数はNPC分化の抑制により減少した。行動テストでは、成体期において750 ppmで自発活動の亢進が認められた。IMIは海馬のアセチルコリンエステラーゼ活性と歯状回でのアセチルコリン受容体の*Chrn2*遺伝子転写産物レベルを離乳期および成体期に低下させた。IMIは離乳期に歯状回門におけるastrocyteとM1型microglia数を増加させ、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子を発現上昇させた。成体期においては、IMIはmalondialdehydeレベルとM1型microglia数を増加させ、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子の発現を低下させた。これらの結果から、IMIは持続的にコリン作動性シグナル伝達に影響を及ぼし、IMI曝露中は海馬において神経炎症と酸化ストレスを誘導し、曝露後は海馬の酸化ストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。児動物の行動と海馬の神経新生に対するIMIのNOAELは83 ppm (5.5~14.1 mg/kg 体重/日)となった。

## 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と過塩素酸アンモニウム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した。令和6年度はIMI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日目で入手、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、IMIは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した(Fig. 1)。IMI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。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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>麻酔下で4%PFA/0.1Mリン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群6匹以上の雄児動物をCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>麻酔下で放血し、脳

をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。更に各群 6 匹以上の雄児動物について脳内酸化ストレス(MDA レベル)及び AChE 活性値の測定のため、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 ないし PND 79 まで IMI を含まない飼料により飼育し、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 及び PND 79 に各群 10 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。行動試験実施動物は PND 79 に行動試験の最終試行の 90 分後に灌流固定を実施した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。

海馬における免疫組織学的解析のため、PND 21 (行動試験非実施動物) と PND 77 (行動試験非実施動物) ないし PND 79 (行動試験実施動物) 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。切片は顆粒細胞層下帯 (SGZ) から顆粒細胞層 (GCL) に分布する顆粒細胞系譜の分化段階の指標 (GFAP, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN)、歯状回門部に分布する介在ニューロンの指標 (CCK, SST, RELN, PVALB, CALB2, GAD67)、歯状回門部での苔状細胞の指標 (GluR2)、SGZ での細胞増殖活性の指標 (PCNA)、SGZ と GCL でのアポトーシスの指標 (TUNEL)、GCL での神経可塑性の指標 (p-ERK1/2, ARC, FOS, COX2)、歯状回門部における microglia 指標 (Iba1, CD68, CD163)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 (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 1)。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部における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。神経可塑性の指標については、行動試験非実施の PND 21 動物と行動試験実施の PND 79 動物を対象とした。

海馬における遺伝子発現解析のため、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<sup>®</sup>ミニキット (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、0 ppm 対照群と最高用量 (750 ppm) 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<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 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 (Supplementary Table 2)。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<sup>®</sup> Green PCR Master mix [10 µl Power SYBR<sup>®</sup> Green (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 µl のプライマー

(forward と reverse), 8.2 µl UltraPure<sup>™</sup> Distilled Water (Thermo Fisher Scientific Inc.)] を含む 20 µl の全量で、StepOnePlus<sup>™</sup> 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。750 ppm 群の 0 ppm 対照群に対する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<sub>T</sub>) 値を用いて正規化した。その後、2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法によりコントロール C<sub>T</sub> 値に対する相対値を算出し、値を補正した。

PND 21 と PND 77 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<sup>®</sup> 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) の正規化を行った。

PND 21 と PND 77 の海馬における AChE 活性は、AChE Assay Kit (Abcam plc, Cambridge, UK) を用いて測定した。秤量した海馬組織 (20 mg、各群 N=6) を 400 µL のタンパク質溶解バッファーでホモジナイズした。ホモジネートを 600×g で 10 分間、室温で遠心した。次に、アセチルチオコリン反応混合物 50 µL を、96 ウェルプレート中の同容量の AChE 標準およびサンプル上清に添加した。室温で 30 分間インキュベートした後、マルチ検出マイクロプレートリーダーを用いて 410 nm の吸光度を読み取った。AChE 活性はサンプル中のタンパク質濃度で正規化した (mU/mg タンパク質)。

すべての行動試験において、行動試験用に選抜された雄の子動物 (各群 N=10) を動物飼育室から行動試験室に 1 時間移動させ、試験開始前に順化させた。各試験動物が試験を受ける前の時間間隔で、器具を 70% エタノール溶液で十分に洗浄し、残留臭気を除去した。試験終了後すぐに、試験動物はホームケージに戻され、その後動物飼育室に戻された。すべての実験は午前 8 時から午後 19 時の間に実施し、各行動試験における偏りを避けるため、試験動物の選択順序と試験時間間隔を群間で逆バランスとした。試験デザインは OECD の発達神経毒性試験ガイドライン (Test No.426) を参考にした。

オープンフィールド試験は PND 18 (離乳期)、PND 38 (青年期)、PND 62 (成体期) に実施し、運動活性と不安様行動を評価した (Fig. 1)。装置は、表面が黒色ポリビニル樹脂製のステンレス製正方形トレイ (幅 900 mm) と、黒色プラスチック製壁 4 面、深さ 500 mm (小

原産業株式会社、東京)で組み立てた。照度は中心部で20ルクスに保った。中心領域は壁から180 mm離れた正方形とした。各被験動物は装置の同じコーナーに壁に向かって単独で置かれ、フィールド中央上方に設置されたCCDカメラ(WAT-902B;株式会社ワテック、鶴岡)を用いて10分間の総移動距離と移動時間、平均移動速度、および中央領域率を記録した。パラメータはTimeOFCR1ソフトウェア(小原産業株式会社)を用いて自動測定した。中心領域率は、中心領域率 = [(中心領域滞在時間) ÷ 10分] × 100の式で算出した。

短期空間記憶を評価するためにY迷路テストをPND 27に実施した。装置は3本のアーム(長さ600 mm、奥行き250 mm、上部の幅250 mm、下部の幅60 mm)の間の角度が120°のY字型で、装置全体はマットグレーのポリビニルプラスチック製であった。照度は装置中央で5ルクスに保った。3本のアームをそれぞれ領域A、B、Cとした。被験動物を壁に向かって、予め決めてある片方のアームの位置に置き、直ちにカメラ(WAT-902B;株式会社ワテック、鶴岡)に8分以内の各アームへのエントリの順番と総数を記録した。その軌跡と自発交替率は、TimeYM1ソフトウェア(小原産業株式会社)によって自動的に解析された。交替は、3つの異なるアームに連続して入ることと定義した(例えば、ABC、BCA、CABの組み合わせはカウントしたが、BCB、ACA、BABはカウントから除外した)。交替率は以下の式で算出した: 交替率 = [(交替総数) / (総アーム数-2)] × 100。

文脈的恐怖条件付け試験は、PND 75およびPND 79の成体期に実施した。「恐怖条件付け段階」、「恐怖記憶獲得段階」、「恐怖記憶消去1日目」、「恐怖記憶消去2日目」、「恐怖記憶消去3日目」の順で5回の試行を行った。試験動物は、透明プレキシガラス製観察ケージ(30×37×25 cm)と、ショックジェネレーター(SGA-200;小原産業)を連結した21本のロープで組まれた鉄格子床からなる音響減衰室(CL-4211;小原産業株式会社)内で試験を行った。環境は50dBのホワイトノイズと200ルクスの照度に設定した。

恐怖条件付け試験(PND 75)では、被験動物を個々に観察ケージに入れ、鉄棒の床から2秒間のフットショックを与えた(強度0.3 mA、時間ポイント88、148、238秒、計3回)。最後のフットショックから1分後、被験動物をホームケージに戻した。したがって、1匹あたりの合計時間は5分間であった。

恐怖獲得日(PND 76) および恐怖記憶消去日1-3日(PND77-PND79)の試行では、フットショックを与えず、同じ環境・順序で5分間同じ観察ケージに入れた。動物の行動とフリージング時間はCCDカメラ(WAT-902B;小原産業株式会社)で記録し、TimeFZ2ソフトウェア(小原産業株式会社)で自動解析した。フリージング時間は5分間の試行中、動物が2秒以上動かなかった累積時間とした。フリージング時間率は以下の式で算出した: フリージング時間率 = [(総フリージング時間) / (300秒)] × 100。また、1-3日目の相対フリージング率は、フリージング時間率を取得時のフリージング時間で割った値とした。

恐怖記憶消去3日目(PND 79)の試行において、被験動物を恐怖記憶消失の最終試行から90分後に安楽死させ、

GCLにおけるシナプス可塑性関連タンパク質の発現を免疫組織化学的解析により検出し、行動刺激に応じた発現の最大誘導を検討した。

統計分析に関連して、数値データは平均値±SEM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、AChE活性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。多重比較の場合は0 ppm 対照群と各投与群との間で、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社, 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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

## C. 研究結果

### 母体パラメータ

250 ppm 群の2匹の母動物は、分娩後21日目に子宮内への胚着床の兆候が観察されなかったため、妊娠していないと判断された。従って、有効母動物数は0、83、250、750 ppm 群でそれぞれ12、12、10、12匹であった。動物試験期間中、各投与群の母動物の体重に有意な変動は認められなかった(Supplementary Fig. 2A and Supplementary Table 3)。摂餌量は750 ppm 群でGD 6、GD 10、GD 17にそれぞれ21、21、14%有意に減少したが、83 ppm 群ではPND 19に0 ppm 対照群と比較して20%有意に増加した(Supplementary Fig. 2B and Supplementary Table 3)。飲水量は750 ppm 群ではGD 6、GD 17、PND 9、PND 16でそれぞれ17、16、13、15%有意に減少し、250 ppm 群ではPND 16で0 ppm 対照群と比較して15%有意に減少した(Supplementary Fig. 2C and Supplementary Table 3)。母動物の日常観察では、いずれの投与群においても歩行や哺育行動に異常は認められなかった。繁殖パラメータに関しては、着床部位数および生子数に有意な変動は認められなかったが、雄比は83および250 ppm 群で有意に増加した(Supplementary Table 4)。

83、250、750 ppm 群の母動物は、妊娠期間中にIMIをそれぞれ平均5.5 ± 0.1, 16.8 ± 0.3, 42.5 ± 1.1 mg/kg 体重/dayを摂取した(SEMを含む)。分娩後離乳までの

日数において、83, 250, 750 ppm 群の母動物は IMI をそれぞれ平均  $14.1 \pm 0.5$ ,  $39.7 \pm 1.4$ ,  $116.5 \pm 3.0$  mg/kg 体重/日を摂取した。

#### 雄児動物の生体パラメータおよび剖検データ

体重は、750 ppm 群で PND 9 から PND 21 まで有意に減少した (0 ppm 対照群より約 9–11% 減少; Supplementary Fig. 3A and Supplementary Table 5)。750 ppm 群では PND 33 で摂餌量と摂水量が有意に減少し、それぞれ 0 ppm 対照群より 19% と 12% 少なかった (Supplementary Fig. 3B, 3C and Supplementary Table 5)。PND 21 の剖検では、体重は 750 ppm 群で有意に減少した (Supplementary Table 6)。PND 21 および PND 77 の剖検では、いずれの投与群でも脳重量に有意な変動は認められなかった。日常観察では、いずれの投与群でも歩行や行動に異常は認められなかった。

#### 雄児動物の歯状回における免疫反応細胞数とアポトーシス細胞数

##### ① SGZ/GCL における顆粒細胞系マーカー

PND 21 において、SGZ および GCL の DCX<sup>+</sup>細胞数および TUBB3<sup>+</sup>細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、SGZ および GCL の GFAP<sup>+</sup>細胞数、SOX2<sup>+</sup>細胞数、TBR2<sup>+</sup>細胞数および NeuN<sup>+</sup>細胞数はいずれの投与群においても変動しなかった (Fig. 2, Supplementary Table 7)。

PND 77 において、IMI は 250 ppm 以上の群で SGZ の GFAP<sup>+</sup> type-1 NSCs および SGZ と GCL の NeuN<sup>+</sup>有糸分裂後顆粒細胞数を有意に減少させたが、SGZ および/または GCL の SOX2<sup>+</sup>、TBR2<sup>+</sup>、DCX<sup>+</sup>、TUBB3<sup>+</sup>細胞数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 2, Supplementary Table 8)。

##### ② 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロンマーカー

PND21 において、歯状回門部の RELN<sup>+</sup>介在ニューロン数は 750 ppm 群で有意に減少したが、PVALB<sup>+</sup>、SST<sup>+</sup>、GAD67<sup>+</sup>介在ニューロン数はどの投与群でも有意な変動はなかった (Fig. 3, Supplementary Table 7)。

PND77 では、RELN<sup>+</sup>細胞、PVALB<sup>+</sup>細胞、SST<sup>+</sup>細胞、GAD67<sup>+</sup>細胞の数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 3, Supplementary Table 8)。

##### ③ GCL におけるシナプス可塑性関連遺伝子産物

PND 21 において、GCL の FOS<sup>+</sup>および p-ERK1/2<sup>+</sup>顆粒細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、ARC<sup>+</sup>および COX2<sup>+</sup>顆粒細胞数はいずれの投与群においても有意な変動は認められなかった (Fig. 4, Supplementary Table 7)。

PND 79 では、FOS<sup>+</sup>、p-ERK1/2<sup>+</sup>、ARC<sup>+</sup>および COX2<sup>+</sup>顆粒細胞数は、どの投与群でも変動しなかった (Fig. 4, Supplementary Table 8)。

##### ④ SGZ および/または GCL における増殖細胞またはアポトーシス細胞

PND 21 において、SGZ の PCNA<sup>+</sup>増殖細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、SGZ または GCL の

TUNEL<sup>+</sup>アポトーシス細胞数はどの投与群でも有意な変動はなかった (Fig. 5, Supplementary Table 7)。

PND 77 では、SGZ の TUNEL<sup>+</sup>アポトーシス細胞数は 750 ppm 群で有意に増加したが、SGZ の PCNA<sup>+</sup>増殖細胞数および GCL の TUNEL<sup>+</sup>アポトーシス細胞数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 5, Supplementary Table 8)。

##### ⑤ 歯状回門部におけるグリア細胞亜集団の数

PND 21 において、歯状回門部の CD68<sup>+</sup> M1/M2 型 microglia/macrophage 数は 83 ppm 以上で有意に増加し、GFAP<sup>+</sup> astrocyte 数と Iba1<sup>+</sup> microglia/macrophage 数は 750 ppm 群で有意に増加した (Fig. 6, Supplementary Table 7)。しかし、CD163<sup>+</sup> M2 型 microglia/macrophage 数は、どの投与群でも有意な変動はみられなかった。

PND 77 では、CD68<sup>+</sup> M1/M2 型 microglia/macrophage 数は 750 ppm 群で有意に増加したが、GFAP<sup>+</sup> astrocyte、Iba1<sup>+</sup> microglia/macrophage、CD163<sup>+</sup> M2 型 microglia/macrophage の数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 6, Supplementary Table 8)。

#### 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 において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち、*Dpysl3* と *Tubb3* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* で正規化した後、有意に減少した (Table 1)。Reelin シグナル伝達関連遺伝子 *Vldlr* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経栄養因子関連遺伝子 *Ntrk2* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chat* の転写産物レベルは 750 ppm 群で有意に増加し、*Chrb2* の転写産物レベルは *Gapdh* および/または *Hprt1* による正規化後に有意に減少した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Gfap* および *Aif1* (グリア細胞マーカー遺伝子)、*Il4*、*Il6*、*Tnf*、*Tgfb1* および *Nfkb* (ケミカルメディエーターおよび関連分子)、ならびに *Hmox1*、*Nfe2l2*、*Mt1*、*Mt2a* および *Gpx4* (酸化ストレス関連遺伝子) の転写産物レベルは、750 ppm 群において、*Gapdh* および/または *Hprt1* による正規化後に有意に増加した。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子、細胞増殖マーカー遺伝子、シナプス可塑性関連最初期遺伝子 (IEG)、グルタミン酸受容体およびトランスポーター遺伝子の転写産物レベルは 750 ppm 群で有意な変動はなかった。

PND 77 において、顆粒細胞系譜関連遺伝子のうち、*Nes* の転写産物レベルは 750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、有意に減少した (Table 2)。細胞増殖マーカー遺伝子 *Pcna* および抗アポトーシス遺伝子 *Bcl2l1* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* および *Hprt1* による正常化後に有意に減少した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chrb2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に減少した。シナプス可塑性関連 IEGs のうち、*Ptgs2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Il6* および *Tgfb1* (ケミカルメディエータ

一および関連分子)、ならびに*Hmox1*、*Nrf2*および*Gpx1* (酸化ストレス関連遺伝子) の転写産物レベルは、750 ppm 群では*Gapdh*および/または*Hprt1*で正規化した後に有意に減少した。GABA作動性介在ニューロン関連遺伝子、神経栄養因子関連遺伝子、グルタミン酸受容体およびトランスポーター遺伝子、グリア細胞マーカー遺伝子の転写産物レベルは、750 ppm 群では有意に変動しなかった。

### 雄児動物の海馬生化学データ

PND 21において、海馬AChE活性レベルは750 ppm群で有意に低下した (Fig. 7, Supplementary Table 9)。どの投与群でも海馬MDAレベルには有意な変動は認められなかった。

PND 77では、海馬MDA値は750 ppm群で有意に増加し、海馬AChE活性値は750 ppm群で減少傾向を示した (P=0.06)。

### 雄児動物の行動検査スコア

#### ① オープンフィールド試験

PND 18の離乳期およびPND 38の春期発動期のいずれにおいても、運動活性に関する総移動距離、総移動時間、平均移動速度、および不安様行動を反映する中心領域率には、いずれの投与群においても投与に関連した統計学的有意な変動は認められなかった (Fig. 8, Supplementary Table 10)。一方、PND 62の成体期では、750 ppm投与群では総移動距離の増加傾向に伴い平均移動速度が有意に増加した (P=0.07) が、総移動時間および中心領域率についてはいずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった。

#### ② Y迷路試験

Y迷路試験はPND 27に実施され、総交替率および総アーム部進入率については、いずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった (Supplementary Table 11)。

#### ③ 文脈的恐怖条件付け試験

PND 75からPND 79の成体期において、全試行におけるフリージング時間比は、いずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Table 12)。

### D. 考察

本試験における750 ppmのIMI曝露にตอบสนองして、母ラットは妊娠中の摂餌量の減少、妊娠第1週と第3週の摂水量の減少、および授乳期の第2週と第3週の摂水量の減少を示した。児動物への曝露の影響については、750 ppmのIMI曝露後、雄児動物はPND 9からPND 21にかけて体重が減少し、その後回復した。しかし、母動物や児動物の歩行やその他の行動に関する臨床的徴候は観察されなかった。従って、化学物質の試験に関するOECDガイドライン (試験番号 426: 発達神経毒性試験) の推奨に従い (OECD, 2007)、発達神経毒性を検出するための試験用量としては、飼料中750 ppmのIMIが母動物または児動物にわずかな影響を

示す妥当な最高用量であると考えられた。

本試験におけるIMIの成体海馬神経新生への影響については、PND 21の750 ppmにおいて、DCX<sup>+</sup>細胞数およびTUBB3<sup>+</sup>細胞数が減少し、*Dpysl3* および*Tubb3*の発現低下を伴っていたが、TBR2<sup>+</sup>細胞数には変動がなかった。海馬歯状回の顆粒細胞系では、DCXは主にtype-2b神経前駆細胞(NPC)から有糸分裂終了細胞への分化後の未熟顆粒細胞までの細胞集団で発現している (Kempermann et al., 2015)。TBR2はtype-2b NPCで発現し (Hodge et al., 2008)、TUBB3は新しく生成された未熟な有糸分裂後の顆粒細胞のマーカーであることから (von Bohlen Und Halbach, 2007)、750 ppmのIMI曝露後、type-3 NPCおよび有糸分裂後の未熟な顆粒細胞が減少したことが示唆された。この用量で観察されたSGZのPCNA<sup>+</sup>増殖細胞数の減少を考慮すると、DCX<sup>+</sup>細胞およびTUBB3<sup>+</sup>細胞の減少は、分化後期のNPCの増殖抑制に起因すると考えられる。しかし、PND 21からIMI曝露を中止した後、PND 77の成体期にはDCX<sup>+</sup>細胞集団やTUBB3<sup>+</sup>細胞集団に対する持続的な影響は観察されなかった。対照的に、GFAP<sup>+</sup> type-1 NSCsとNeuN<sup>+</sup>有糸分裂後顆粒細胞の数は、この時点で250 ppm以上で減少し、750 ppmでは歯状回のNSCマーカー遺伝子*Nes*の発現低下を伴っていた。TUBB3<sup>+</sup>細胞の数が変動しなかったことを考慮すると、IMIは海馬の神経新生を漸進的に阻害し、成体期におけるtype-1 NSCsと成熟顆粒細胞の減少を引き起こした可能性がある。さらに、750 ppmのIMIに曝露した後、GCLではなくSGZでTUNEL<sup>+</sup>アポトーシス細胞の数が増加し、増殖マーカー*Pcna*と抗アポトーシスに関連する*Bcl2l1*の発現低下が観察された。これらの所見は、アポトーシスを誘導し、増殖を抑制することによって、NSCsの数を減少させるIMIの遅延効果を示唆している。海馬の成体神経新生におけるニューロンの成熟過程は、げっ歯類では約7週間かかるので、成熟顆粒細胞の純増は、未成熟ニューロン細胞プールからのリクルートによるものである (Kempermann et al., 2015; Kozareva et al., 2019)。したがって、PND 77で観察された成熟顆粒細胞の減少は、PND 21でtype-3 NPCと未熟顆粒細胞が減少したことによる遅延した結果であると考えるのが妥当である。

大型糖タンパク質の一種であるreelinは、特に成体の神経新生に関連して海馬に分布するGABA作動性介在ニューロンから分泌され、神経の増殖、分化、移動、成熟を含む神経新生の様々な局面で重要な役割を果たしている (Pesold et al., 1998)。実験的にreelinを欠失させると、生き残った未熟顆粒細胞の数と成熟速度が低下し、樹状突起の複雑さが減少する (Lussier et al., 2013)。さらに、reelinを培養液から除くと、NSCの分化が遅れ、未熟なニューロンが減少することが報告されている (Massalini et al., 2009)。今回の研究では、750 ppmのIMIがPND 21の歯状回門部におけるRELN<sup>+</sup>介在ニューロンの数を有意に減少させた。したがって、PND 21におけるIMIによる未熟顆粒細胞とtype-3 NPCの減少は、reelinシグナル伝達の障害によって引き起こされた、有糸分裂能のあるNPCの増殖抑制と分化遅延に起因すると考えられた。さらに、海馬は学習と記憶形成の処理

と制御に重要な役割を果たしており、それは主に IEG の発現を迅速かつ選択的に発現上昇することによる神経細胞の可塑性増加に依存している (Minatohara et al., 2016)。これまでの研究で、シナプスと可塑性の強度に reelin シグナルが重要な役割を果たしていることが示されている。reelin が欠乏すると、reelin 依存性の ERK1/2 リン酸化が阻害され、その結果、成熟神経細胞では FOS や ARC を含む ERK1/2 依存性の IEG タンパク質の発現が抑制されるという報告がある (Lee et al., 2014)。本研究では、p-ERK1/2 および FOS<sup>+</sup> 顆粒細胞の数は、750 ppm の IMI 曝露後の PND 21 で有意に減少した。海馬では、IEG の発現低下は、Y 迷路、新奇環境曝露、文脈的恐怖条件付けテストによって検出できる海馬依存的学習行動の異常をもたらす (Minatohara et al., 2016; Murray et al., 2021)。750 ppm の IMI 曝露後、離乳期には RELN、p-ERK1/2、FOS に免疫組織化学的な陽性細胞集団の減少と並行して、PND 27 に Y 迷路の自発的交替率が有意ではないがわずかに低下することが観察された。しかし、成体期には、reelin シグナル伝達と IEG 発現が回復したため、IMI 曝露は文脈的恐怖条件付けテストのパラメータに変動を与えなかった。これらの結果から、離乳期の IMI 曝露終了時点 (750 ppm) における IMI 誘発の reelin シグナル伝達の障害は、この時点における顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制とも関連している可能性が示唆された。

PND 21 に IMI 曝露を受けた児動物において、海馬歯状回の RELN<sup>+</sup> 介在ニューロンが減少する具体的な理由はまだ不明であるが、エピジェネティックな遺伝子サイレンシング、特にプロモーター配列の過メチル化が *Reln* 発現低下の一因である可能性を示唆する研究もある (Grayson et al., 2005; Qin et al., 2011)。内毒素として知られ、炎症や酸化ストレス応答を誘導する自然免疫系の強力な活性化因子であるリポ多糖への出生前または新生児期の曝露が、児動物の海馬における RELN<sup>+</sup> 介在ニューロンの減少を誘導したことを報告している研究がある (Nouel et al., 2012; Ardalan et al., 2022)。したがって、本研究における RELN<sup>+</sup> 介在ニューロンの減少は、IMI によって誘発された神経炎症によるものであり、その後、炎症反応が PND 77 までに正常レベルに戻るとともに回復したと推測される。

本研究では、750 ppm の IMI 曝露が PND 21 と PND 77 の両方で歯状回の *Chrb2* を発現低下することを見いだした。海馬の神経原性ニッチでは、ニューロンは主に 2 種類のニコチン作動性アセチルコリン受容体、 $\alpha 7$ -nAChR と  $\beta 2$ -nAChR を発現しており、それぞれ *Chrna7* と *Chrb2* によってコードされている (Hogg et al., 2003)。これらはコリン作動性シグナルに基づく神経新生の調節に重要である。例えば、*Chrb2* ノックアウトマウスでは、神経発生細胞の増殖が著しく低下する (Harrist et al., 2004)。したがって、750 ppm の IMI 曝露後の PND 21 と PND 77 で観察された *Chrb2* の発現低下は、PND 21 の NPC 増殖と PND 77 の NSC 増殖の抑制に関与している可能性がある。

本研究におけるグリア細胞集団への影響については、750 ppm の IMI は、PND 21 において GFAP<sup>+</sup> astrocyte および Iba1<sup>+</sup> microglia/macrophage 数を増加させ、それらをコー

ドする遺伝子 (*Gfap* および *Aif1*) の転写産物レベルを上昇させた。脳では microglia/macrophage の活性化は不均一であり、2 つの相反する表現型に分類できる: M1 は炎症性、M2 は抗炎症性である (Okano et al., 2022; Klein et al., 2018)。本研究では、PND 21 において活性化した M1 および M2 タイプの microglia/macrophage を反映する CD68<sup>+</sup> 細胞の数は、83 ppm 以上の IMI 曝露によって増加した。一方、CD163<sup>+</sup> M2 タイプの microglia/macrophage の数は、IMI 曝露終了時においては変動しなかった。これらの結果から、母動物の IMI 曝露は、最低用量であっても、曝露終了時に M1 型 microglia/macrophage を活性化することによって炎症反応を誘導することが示唆された。この所見は、750 ppm の IMI 曝露後、M1 型 microglia/macrophage によって誘導される 2 つの主要な炎症性サイトカイン遺伝子である *Il6* と *Tnf* の発現上昇と一致している (Tang and Le, 2016)。インターロイキン (IL)-6 と TNF- $\alpha$  の発現上昇は、NPC の増殖と分化の低下に寄与しており (Keohane et al., 2010)、これらのサイトカイン因子が PND 21 で観察された NPC 増殖抑制に影響を与えた可能性が示唆された。対照的に、750 ppm の IMI では *Il4* と *Tgfb1* の発現上昇も観察された。TGF- $\beta$ 1 は、活性化 astrocyte によって誘導される抗炎症性および神経保護サイトカインである (Cekanaviciute et al., 2014)。IL-4 もまた、astrocyte の神経保護活性化を誘導することができる抗炎症性サイトカインであり、これらの選択的に活性化された astrocyte は IL-4、IL-10、TGF- $\beta$  を放出する可能性がある (Kwon and Koh, 2020)。したがって、PND 21 の IMI 曝露終了時に M1 表現型に偏極した microglia/macrophage 集団が観察されたが、この時点における 750 ppm での GFAP<sup>+</sup> astrocyte の増加は、誘導された神経炎症反応に対する神経保護反応である可能性がある。

IMI 曝露を中止した PND 77 では、歯状回の GFAP<sup>+</sup> astrocyte と Iba1<sup>+</sup> microglia/macrophage の数は正常レベルに回復した。観察された CD68<sup>+</sup> M1 型 microglia/macrophage の増加は 750 ppm で持続したが、炎症性 (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*) と抗炎症性 (*Il10*, *Il4*, *Tgfb1*) の両サイトカイン遺伝子の転写産物レベルは、この時点で減少するか、減少する傾向にあった。この所見から、炎症性反応と抗炎症性反応の両方が抑制され、成体期の免疫系が低下したことが示唆される。本研究の結果と一致するように、げっ歯類動物を用いた実験で、IMI 反復曝露後、食食活性、走化性、サイトカイン遺伝子発現の抑制、酸化ストレスの増加などの免疫抑制作用が報告されている (Badgular et al., 2013; Mohany et al., 2012)。さらに、ラットを IMI に曝露すると、発育期の免疫に加齢に依存した抑制作用が生じた (Gawade et al., 2013)。一方、ACh およびニコチンは、IMI の主要な標的受容体である microglia 上の  $\alpha 7$ -nAChR と結合することにより、p-ERK1/2 および p38 mitogen-activated protein kinase の活性を低下させ、microglia によるリポ多糖誘導性の TNF- $\alpha$  産生を抑制することができる (Shytle et al., 2004)。哺乳類の nAChR に対する IMI の親和性は昆虫のそれよりはるかに低い、IMI がラット神経細胞の  $\alpha 7$ -nAChR に結合して興奮作用を示すことが証明されている (Keohane et al., 2010)。本研究では、750 ppm の IMI 曝露

後、PND 21およびPND 77の歯状回において*Chrna7* ( $\alpha 7$ -nAChRをコードする)の転写産物レベルは変動しなかったが、*Chat* (ACh合成酵素であるコリンO-アセチルトランスフェラーゼをコードする)の転写産物レベルはPND 21で上昇した。さらに、AChE活性は海馬で持続的に抑制され、AChの持続的蓄積が示唆された。発育期のIMI曝露によりAChが持続的に蓄積されると、PND 77でのサイトカイン発現が抑制されるのではないかと推測される。

化学物質による酸化ストレスが脳の抗酸化系にさまざまな反応を引き起こすことはよく知られているが、IMIはその典型的な症例であり、研究によってさまざまな結果が示されている (Wang et al., 2018)。本研究では、750 ppmのIMIに曝露された雄の児動物において、海馬歯状回の抗酸化系が免疫系と同様の変動を示した。PND 21において、IMIは酸化ストレス関連遺伝子*Nfe2l2*、*Hmox1*、*Mt1*、*Mt2a*、*Gpx4*の発現レベルを上昇させた。メタロチオネイン-I/II (*Mt1*と*Mt2a*にコードされる)とグルタチオンペルオキシダーゼ4 (*Gpx4*にコードされる)は、フリーラジカルを消去し、その生成を防ぐことによって酸化ストレスに対応することができる (Dar et al., 2024; Ruttkay-Nedecky et al., 2013)。これらの遺伝子の発現上昇は、PND 21の海馬におけるMDA蓄積を防ぐための抗酸化システムの作動を示している。一方、PND 77の歯状回では、海馬のMDAレベルが上昇し、*Nfe2l2*、*Hmox1*、*Gpx1*の転写産物レベルが低下しており、抗酸化能の抑制により海馬の酸化的損傷に対する脆弱性が上昇していることが示唆された。

前述のように、本研究では、PND 21の750 ppmのIMI曝露により、ケミカルメディエーター遺伝子だけでなく、多くの抗酸化関連遺伝子の発現上昇が認められた。nAChRがIMIに感受性であることを考慮すると、電位依存性カルシウムチャンネルがIMI誘発のCa<sup>2+</sup>上昇を増幅する役割を果たしている (Jepson et al., 2006)。イオンの不均衡やCa<sup>2+</sup>の上昇は酸化ストレスを引き起こし、細胞内へのCa<sup>2+</sup>の大幅な流入は活性酸素種 (ROS) の放出を誘発し、astrocyteやmicrogliaにおけるNrf2を活性化する (Yamazaki et al., 2015)。研究の結果、疾患の進行中、Nrf2は活性酸素産生の増加に対して最初は発現上昇で反応するが、酸化ストレスが強まるにつれてそのレベルは低下することが示された (Kanninen et al., 2008; Ma et al., 2024)。IMIによる活性酸素種産生の経時的な研究から、活性酸素種の産生は時間依存的であることが示されている (Wang et al., 2018)。抗酸化酵素の活性もまた、IMI曝露中にダイナミックに変動することが報告されており、曝露初期には高い活性を示すが、曝露後には活性が低下する (Ge et al., 2015)。したがって、本研究におけるPND 21での抗酸化関連遺伝子の発現上昇は、nAChRの過剰刺激の結果として、IMI曝露による酸化ストレス応答の初期段階を反映しているのかもしれない。

前述のように、PND 77に750 ppmのIMIに曝露された歯状回では、*Nfe2l2*、*Hmox1*、*Gpx1*の転写産物レベルが減少していた。このうち、*Nfe2l2*はNFE2 like bZIP転写因子2 (Nrf2)をコードしており、酸化ストレスに対して極めて感受性が高く、様々な抗酸化酵素や酸化ストレスに対する神経保護に関与するタンパク質の発

現を制御する転写因子である (Loboda et al., 2016)。*Hmox1*は、Nrf2によって制御される重要な下流遺伝子の一つである (Loboda et al., 2016)。様々な刺激下で、発現が上昇したヘムオキシゲナーゼ1 (*Hmox1*によってコードされる)は、酸化傷害からの保護だけでなく、抗アポトーシス反応、増殖の制御、炎症の調節を含む生物学的プロセスにも関与している (Loboda et al., 2016)。本研究において、*Nfe2l2*、*Hmox1*、*Gpx1*の発現低下がMDA蓄積を引き起こす鍵となることは間違いない。さらに、PND 77では、*Bcl2l1*の発現低下に伴って、TUNEL<sup>+</sup>アポトーシス細胞の数がSGZで増加していた。*Bcl2l1*はBCL2-like 1をコードし、ミトコンドリアをプロアポトーシスタンパク質から保護する役割を担う抗アポトーシスタンパク質である (Boise et al., 1993)。酸化ストレスはミトコンドリアの機能障害を誘発し、細胞をアポトーシスに導く。しかし、*Hmox1*を欠損させると、酸化ストレス誘発アポトーシスに対する細胞の感受性が高まることが証明されている (Lin et al., 2012)。*Bcl2l1*の発現は酸化ストレスの増加とともに減少する (Soma et al., 2024)。したがって、IMIが活性酸素種の過剰産生と抗酸化経路の抑制を介して、ミトコンドリアの抗アポトーシスタンパク質BCL2-like 1を阻害することにより、type-1 NSCsのアポトーシスを誘導したことは妥当であると考えられる。これらの結果は、ラットにIMIを投与すると脳内の抗酸化能が低下し、抗アポトーシス*Bcl2*の発現が減少するという以前の報告と一致している (Abd-Elhakim et al., 2018)。

AChEはコリン作動性システムの重要な構成要素であり、その恒常性の乱れは常に行動障害につながる (Ansari et al., 2012)。注意欠陥・多動性障害 (ADHD)は、最も一般的な神経発達障害のひとつであり、多動性が中核的な特徴であり、過剰な運動とじっとしていることの困難さを指す (Kuś et al., 2023)。ADHDの病因はまだわかっていないが、新生児期のコリン作動性システムの調節障害がADHD発症の十分な要因であることを示唆する証拠がある (Hellmer and Nyström, 2017)。例えば、母親のニコチン曝露は、ACh経路の変化から生じる青年期のADHD症状の発症につながるとされる (Xavier et al., 2022)。本研究では、750 ppmのIMI曝露後、成体期には移動速度が速くなり、オープンフィールド試験での距離が長くなる傾向がみられ、AChE活性の持続的な抑制と*Chrn2*の発現低下を伴っていた。本研究の結果と一致して、妊娠マウスにIMIを投与すると、児動物の成体期における運動活性が上昇した。従って、IMIによるコリン作動性システムの破壊が成体期での運動亢進を引き起こしたと推測される。さらに、酸化ストレス状態の不均衡や免疫系の障害はADHDと関連している (Verlaet et al., 2018)。したがって、IMIによって誘発される児動物の多動性の特異的なメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

ラットを用いた過去の発達神経毒性試験によると、離乳前の体重増加の減少および80 mg/kg体重/日での運動/自発運動活性の低下に基づいて、IMIの無毒性量 (NOAEL)は20 mg/kg体重/日 (妊娠期間中の曝露)である (Germany, 2005)。本研究では、250 ppmにおけ

る成体期の NSCs 数および有糸分裂後顆粒細胞数の減少に基づき、発達期曝露後の児動物の行動と海馬神経新生に関する IMI の NOAEL を 83 ppm と決定した (ラット母動物の曝露量 5.5~14.1 mg/kg 体重/日に相当)。カリフォルニア州の井戸水から IMI を検出した報告によると、IMI 残留量の最高値は 5.97 ppb であり、283 ppb より高い検出値は健康への懸念があると考えられている (California Department of Pesticide Regulation, 2021)。したがって、本研究の実験で発達神経毒性を引き起こすことが見出された用量は、日常生活で一般的に曝露される用量より遙かに高い。

## E. 結論

得られた結果から、ラット母動物のIMI曝露は、曝露期間中に児動物の顆粒細胞の後期分化とERK1/2-FOSを介したシナプス可塑性を標的とすることで、海馬神経新生を抑制することが示唆された。神経新生とシナプス可塑性の抑制が観察されたのは、*reelin*のシグナル伝達の減少が原因かもしれない。休薬後の成体段階では、IMIはNSCと成熟顆粒細胞集団を双方向で減少させた。行動学的検査では、成体期における自発活動の亢進が認められた。海馬では、母親のIMI曝露はコリン作動性シグナル伝達にも持続的な影響を及ぼし、曝露期間中は神経炎症と酸化ストレスの両方を誘発し、その後、成人期には酸化ストレスに対する感受性が上昇した。観察された海馬の変化は、成体期に観察された神経新生の進行性抑制と多動症の発生率増加の原因かもしれない。児動物の行動と神経発生に関するIMIのNOAELは83 ppm (5.5~14.1 mg/kg 体重/日) と決定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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.
- Zou, X., Tang, Q., Ojiro, R., Ozawa, S., Shobudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.: Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal exposure to imidacloprid. *Chem. Biol. Interact.* 399:111145, 2024.
- Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojiro, R., Ozawa, S.,

Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant. *Env. Toxicol.* 40(1), 30–53, 2025.

- Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojiro, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.: Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats. *Acta Histochem.* 126(8), 152204, 2024.
- Zou, X., Ebizuka, Y., Sakamaki, Y., Shobudani, M., Tang, Q., Kobayashi, M., Kigata, T., Shibutani, M.: Progressive motor dysfunction and loss of cerebellar Purkinje and granule cells in rat offspring after maternal exposure to imidacloprid. (submitted)

## 2. 学会発表

- Xinyu Zou, Qian Tang, Ryota Ojiro, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani: Effects of maternal exposure to imidacloprid on cerebellar development and behaviors of rat offspring. 第51回日本毒性学会学術年会、福岡、第51回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : p.75, P31-S, 7月3日–5日, 2024.
- Xinyu Zou, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Makoto Shibutani: Assessment of developmental neurotoxicity of imidacloprid on hippocampal neurogenesis and cerebellum in rat offspring. EUROTOX 2024. 58th Congress of the European Societies of Toxicology. Copenhagen, Denmark. 9月8–11日, 2024.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## G. 知的所有権の取得状況

- 特許取得  
該当なし。
- 実用新案登録  
該当なし。
- その他  
該当なし。

Mated female rats, GD 1 (N = 12/group)

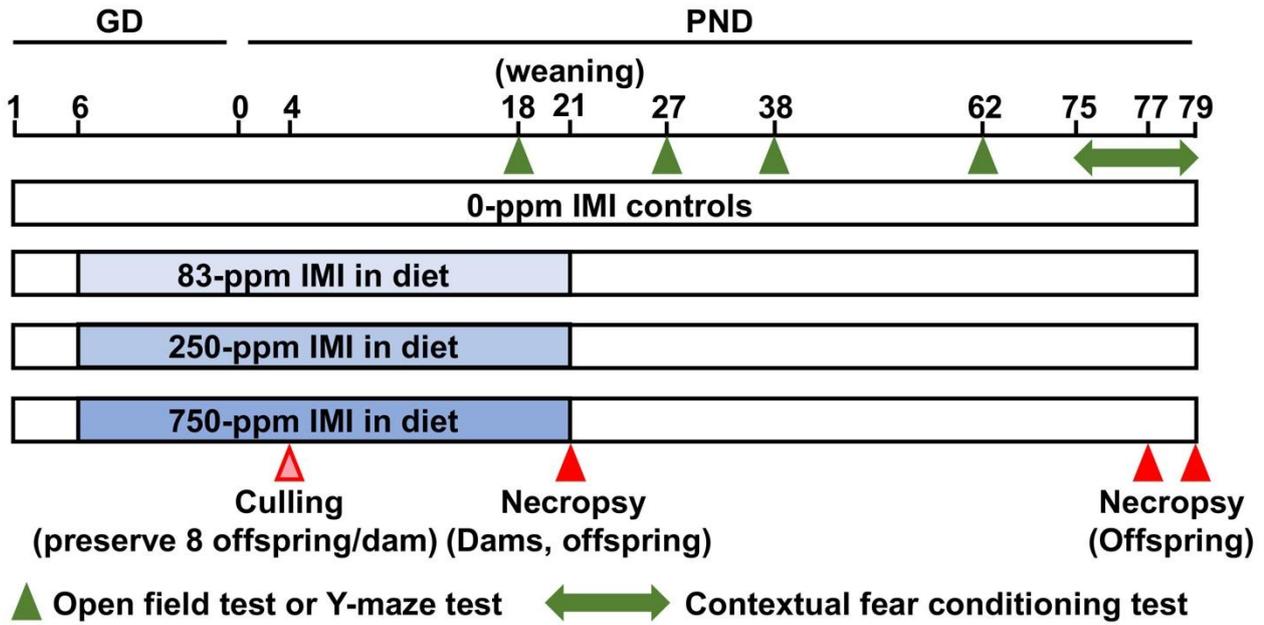


Fig. 1

**Fig. 1**

Experimental design on developmental exposure study of imidacloprid (IMI) using mated female rats.

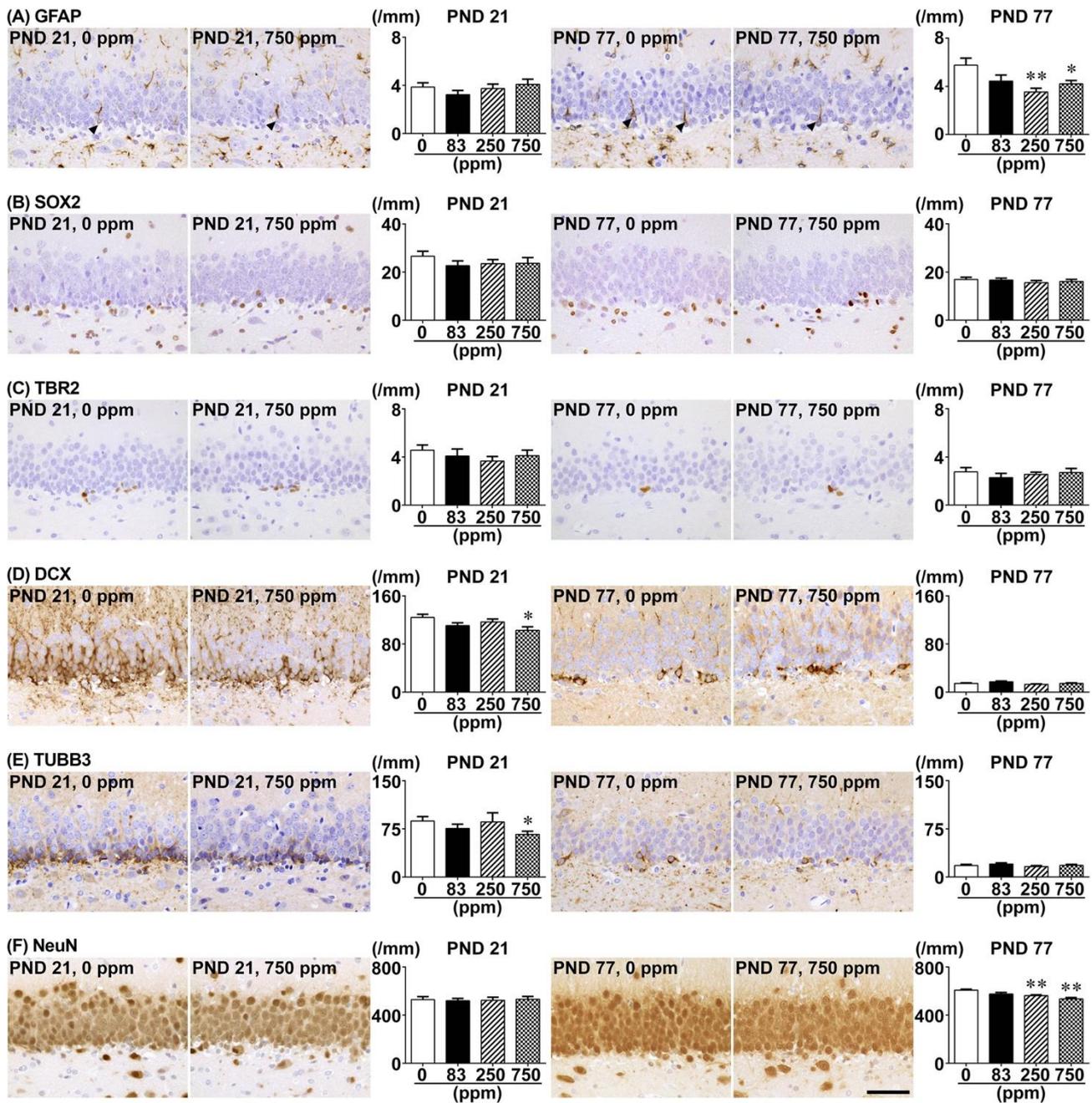


Fig. 2

**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 maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (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/or granule cell layer (GCL). Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $N = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

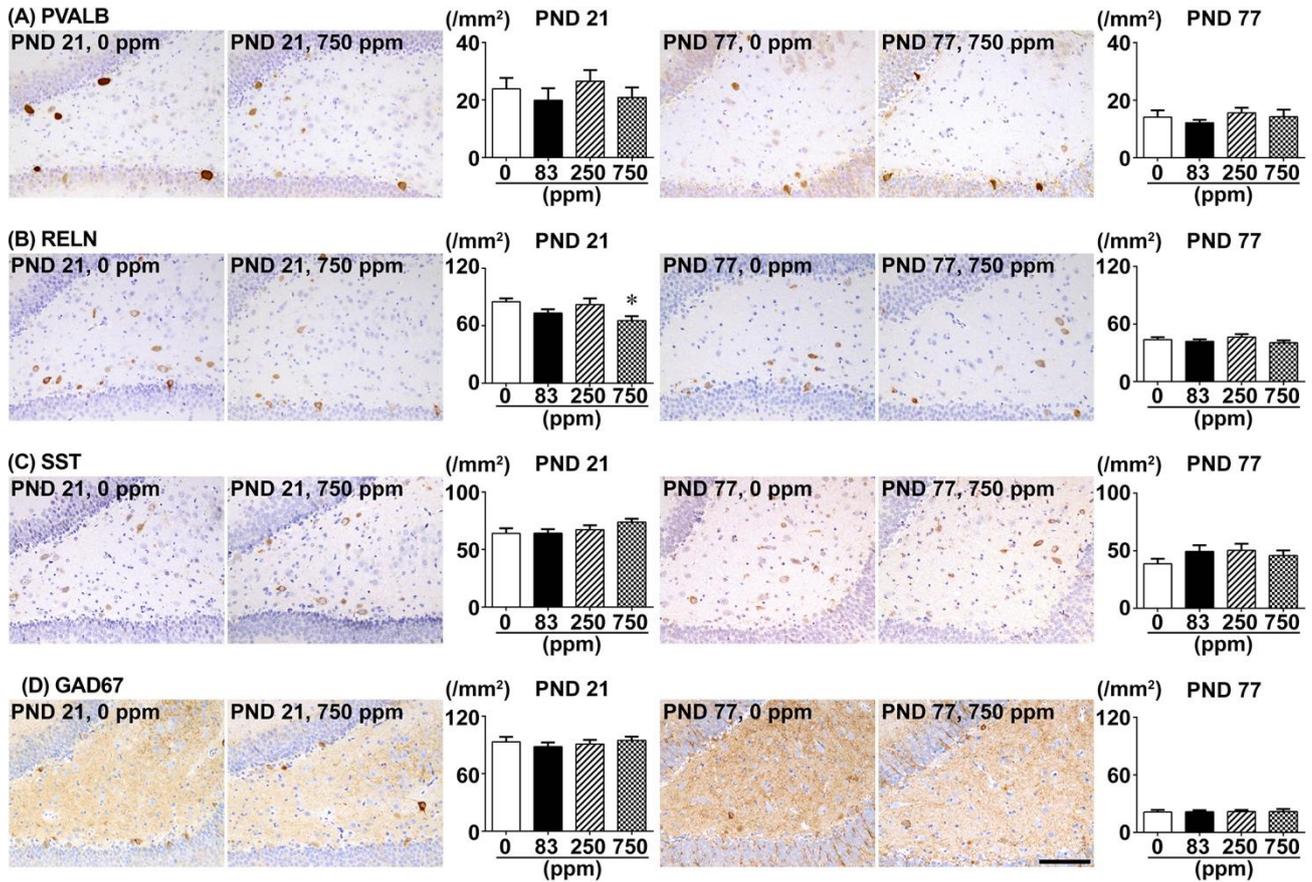


Fig. 3

**Fig. 3**

Distribution of immunoreactive cells for  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic interneuron markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Parvalbumin (PVALB), (B) reelin (RELN), (C) somatostatin (SST), or (D) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilar region. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $N = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

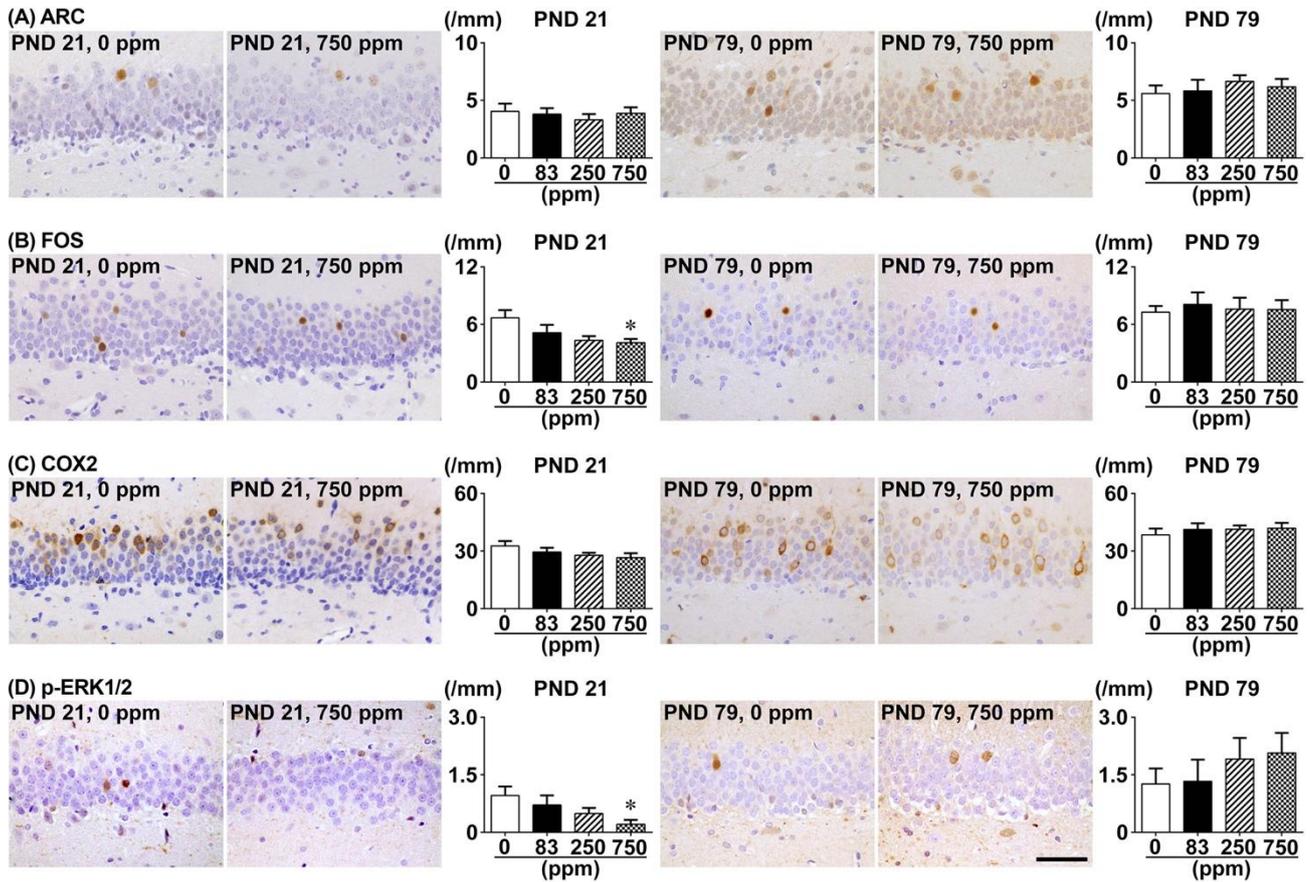


Fig. 4

**Fig. 4**

Distribution of immunoreactive cells for synaptic plasticity-related proteins in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 79 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (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 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $N = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

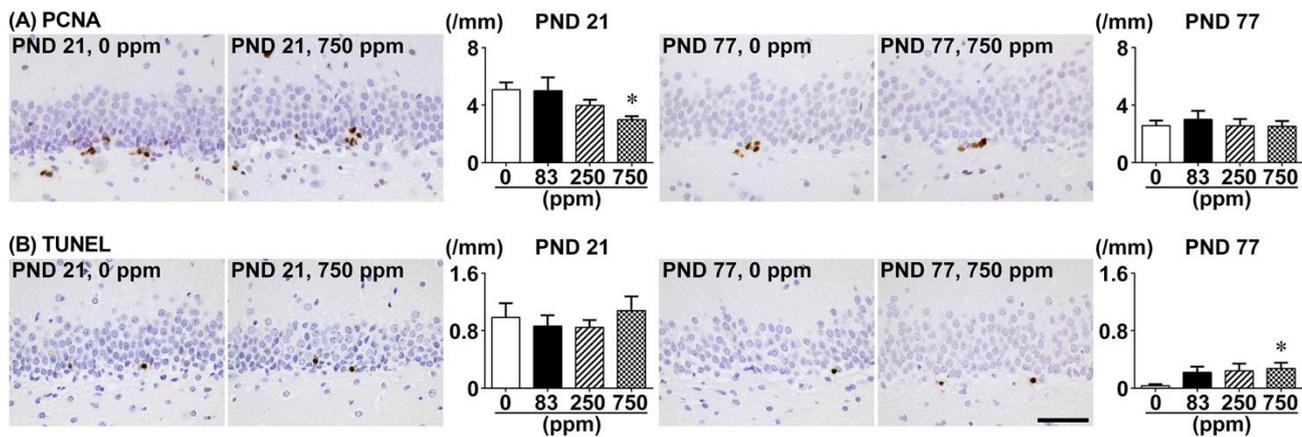


Fig. 5

**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 maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>+</sup> proliferating cells or (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)<sup>+</sup> apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ). Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $N = 10/\text{group}$ .  $*P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

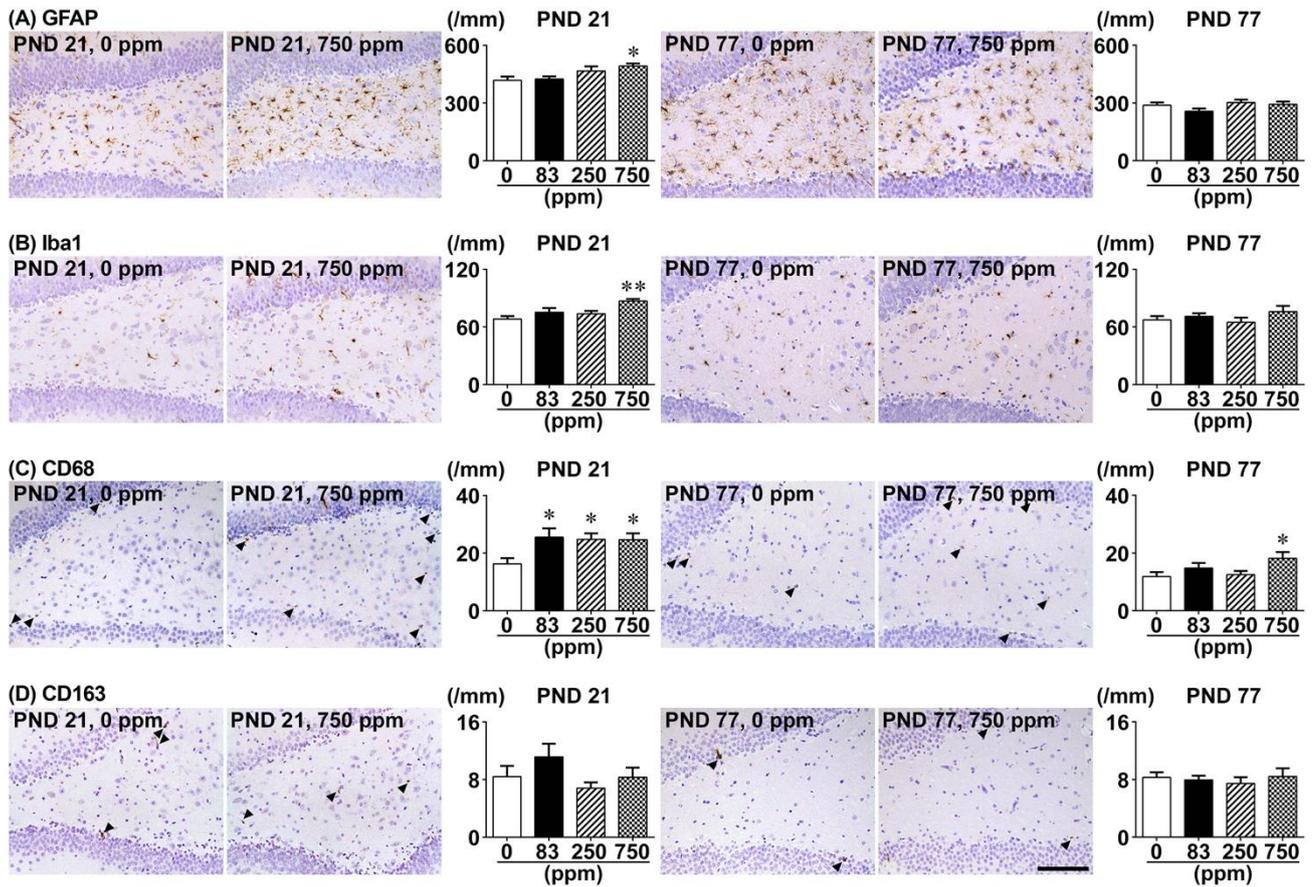


Fig. 6

**Fig. 6**

Distribution of immunoreactive cells for glial cell markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, or (D) CD163 in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $N = 10/\text{group}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

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

	0 (Controls)		750 ppm IMI	
	Relative transcript level normalized to			
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.03 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.09	1.18 ± 0.17	1.40 ± 0.27
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	1.26 ± 0.23	1.45 ± 0.36
<i>Eomes</i>	1.05 ± 0.14	1.04 ± 0.14	1.19 ± 0.10	1.31 ± 0.14
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.11	1.19 ± 0.16
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.05	0.82 ± 0.05*	1.06 ± 0.09
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	0.86 ± 0.04*	1.01 ± 0.05
<i>Rbfox3</i>	1.10 ± 0.09	1.10 ± 0.08	0.89 ± 0.08	1.15 ± 0.12
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Pvalb</i>	1.07 ± 0.18	1.06 ± 0.16	1.20 ± 0.11	1.30 ± 0.12
<i>Reln</i>	1.05 ± 0.14	1.07 ± 0.14	1.33 ± 0.12	1.26 ± 0.12
<i>Reln</i> signaling-related genes				
<i>Vldlr</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.12 ± 0.08	1.26 ± 0.08*
<i>Dab1</i>	1.10 ± 0.24	1.08 ± 0.21	1.18 ± 0.25	1.27 ± 0.23
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.90 ± 0.05
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.19 ± 0.05*	1.34 ± 0.08**
Cell proliferation marker				
<i>Pcna</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	1.21 ± 0.14	1.36 ± 0.24
Cholinergic receptor and enzyme genes				
<i>Chrna7</i>	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.07 ± 0.10	1.16 ± 0.09
<i>Chrn2</i>	1.02 ± 0.10	1.04 ± 0.13	0.77 ± 0.04*	0.94 ± 0.06
<i>Chat</i>	1.03 ± 0.13	1.04 ± 0.14	1.90 ± 0.25**	2.06 ± 0.23**
<i>Chrm1</i>	1.07 ± 0.20	1.06 ± 0.17	1.05 ± 0.15	1.15 ± 0.13
<i>Chrm2</i>	1.06 ± 0.16	1.07 ± 0.17	0.79 ± 0.08	0.90 ± 0.10
Synaptic plasticity-related IEGs				
<i>Arc</i>	1.12 ± 0.27	1.15 ± 0.30	1.36 ± 0.14	1.42 ± 0.15
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.11	1.02 ± 0.10	1.11 ± 0.07	1.16 ± 0.08
<i>Ptgs2</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.87 ± 0.10	0.90 ± 0.10
Glutamate receptors and transporters				
<i>Gria1</i>	1.04 ± 0.15	1.06 ± 0.17	0.99 ± 0.13	1.03 ± 0.13
<i>Gria2</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.96 ± 0.11	1.00 ± 0.11
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.13	1.05 ± 0.13
<i>Grin2a</i>	1.05 ± 0.16	1.07 ± 0.19	0.98 ± 0.11	1.02 ± 0.13
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.08	1.00 ± 0.14	1.05 ± 0.15
<i>Grin2d</i>	1.10 ± 0.22	1.09 ± 0.20	0.76 ± 0.08	0.79 ± 0.08
<i>Slc17a6</i>	1.61 ± 0.70	1.50 ± 0.63	0.71 ± 0.13	0.64 ± 0.12
<i>Slc17a7</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.89 ± 0.06	0.93 ± 0.06
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.08	1.16 ± 0.15	1.40 ± 0.14*
<i>Aif1</i>	0.98 ± 0.08	0.98 ± 0.09	1.34 ± 0.11*	1.49 ± 0.18*
Chemical mediators				
<i>Il10</i>	1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.21	1.51 ± 0.21	1.62 ± 0.18
<i>Il1a</i>	1.16 ± 0.26	1.16 ± 0.25	2.03 ± 0.42	2.16 ± 0.48
<i>Il1b</i>	1.17 ± 0.27	1.14 ± 0.24	1.18 ± 0.19	1.31 ± 0.24
<i>Il4</i>	1.06 ± 0.16	1.07 ± 0.17	1.47 ± 0.15	1.60 ± 0.13*
<i>Il6</i>	1.06 ± 0.15	1.06 ± 0.16	1.52 ± 0.18	1.64 ± 0.14*
<i>Tnf</i>	1.04 ± 0.13	1.05 ± 0.14	1.38 ± 0.14	1.49 ± 0.11*
<i>Tgfb1</i>	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.32 ± 0.04*
<i>Nfkb1</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.08	1.16 ± 0.04*	1.28 ± 0.08*
Oxidative stress-related genes				
<i>Hmox1</i>	1.01 ± 0.07	1.02 ± 0.08	1.17 ± 0.05	1.28 ± 0.05*
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.05	1.13 ± 0.06
<i>Nfe2l2</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.06	1.37 ± 0.10**	1.52 ± 0.18*
<i>Sod1</i>	1.13 ± 0.18	1.13 ± 0.18	1.18 ± 0.06	1.30 ± 0.10
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.05 ± 0.06	1.15 ± 0.07
<i>Cat</i>	1.02 ± 0.10	1.03 ± 0.12	1.07 ± 0.05	1.19 ± 0.11
<i>Mt1</i>	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.09	1.54 ± 0.16*	1.70 ± 0.20*
<i>Mt2a</i>	1.07 ± 0.17	1.06 ± 0.17	1.61 ± 0.17*	1.77 ± 0.19*
<i>Nos2</i>	1.07 ± 0.18	1.08 ± 0.20	1.16 ± 0.14	1.24 ± 0.12
<i>Gpx1</i>	1.06 ± 0.14	1.05 ± 0.14	1.32 ± 0.25	1.39 ± 0.29
<i>Gpx4</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.06	1.15 ± 0.04	1.20 ± 0.06*

Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as *Iba1*: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Cat*, catalase; *Chat*, choline *O*-acetyltransferase; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit;

*Chrb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dabl*, DAB adaptor 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; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *Grial*, 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; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IEG, immediate early gene; IMI, imidacloprid; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nfe2l2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Pena*, proliferating cell nuclear antigen; 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; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor.

<sup>a</sup>Mean ± SEM.

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

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

	0 (Controls)		750 ppm IMI	
	Relative transcript level normalized to			
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.04 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.12	0.72 ± 0.04*	0.75 ± 0.03*
<i>Sox2</i>	1.26 ± 0.44	1.20 ± 0.37	0.73 ± 0.06	0.75 ± 0.04
<i>Eomes</i>	1.08 ± 0.18	1.09 ± 0.23	0.67 ± 0.04	0.70 ± 0.04
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.10	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.04
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.91 ± 0.02	0.95 ± 0.03
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.05	0.96 ± 0.04	1.00 ± 0.02
<i>Rbfox3</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.94 ± 0.03
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Pvalb</i>	1.07 ± 0.21	1.05 ± 0.17	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.03
<i>Reln</i>	1.04 ± 0.13	1.03 ± 0.11	1.06 ± 0.12	1.07 ± 0.12
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.06
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.09	1.01 ± 0.07	0.99 ± 0.08	1.01 ± 0.06
Cell proliferation and apoptosis related				
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.83 ± 0.03*	0.87 ± 0.04*
<i>Casp3</i>	1.08 ± 0.18	1.10 ± 0.23	0.79 ± 0.21	0.75 ± 0.18
<i>Casp1</i>	1.10 ± 0.21	1.10 ± 0.23	1.06 ± 0.13	1.10 ± 0.09
<i>Casp9</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.10	0.97 ± 0.02	1.01 ± 0.03
<i>Bax</i>	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.05	1.03 ± 0.06
<i>Bcl2</i>	1.03 ± 0.10	1.04 ± 0.11	0.91 ± 0.04	0.91 ± 0.06
<i>Bcl2l1</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.88 ± 0.02*	0.86 ± 0.03**
Cholinergic receptor and enzyme genes				
<i>Chrna7</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.05
<i>Chrn2</i>	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.88 ± 0.03*
<i>Chat</i>	1.20 ± 0.31	1.22 ± 0.37	0.92 ± 0.15	0.89 ± 0.12
Synaptic plasticity-related IEGs				
<i>Arc</i>	1.07 ± 0.18	1.09 ± 0.22	1.06 ± 0.14	1.02 ± 0.08
<i>Fos</i>	1.07 ± 0.17	1.06 ± 0.16	1.11 ± 0.07	1.10 ± 0.09
<i>Ptgs2</i>	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.20 ± 0.05*	1.20 ± 0.06*
Glutamate receptors and transporters				
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.04 ± 0.05	1.04 ± 0.10
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.05 ± 0.04	1.05 ± 0.08
<i>Grin2d</i>	1.04 ± 0.12	1.03 ± 0.12	0.91 ± 0.08	0.91 ± 0.11
<i>Slc17a6</i>	1.52 ± 0.61	1.45 ± 0.56	0.71 ± 0.14	0.71 ± 0.16
<i>Slc17a7</i>	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.10
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.05 ± 0.14	1.06 ± 0.16	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06
<i>Aif1</i>	1.08 ± 0.14	1.14 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.08
Chemical mediators				
<i>Il10</i>	1.10 ± 0.26	1.13 ± 0.33	0.65 ± 0.08	0.65 ± 0.06
<i>Il1a</i>	1.25 ± 0.37	1.33 ± 0.46	0.99 ± 0.22	1.03 ± 0.24
<i>Il1b</i>	1.15 ± 0.26	1.11 ± 0.24	0.71 ± 0.14	0.79 ± 0.14
<i>Il4</i>	1.08 ± 0.19	1.10 ± 0.24	0.70 ± 0.05	0.74 ± 0.06
<i>Il6</i>	1.13 ± 0.25	1.14 ± 0.29	0.51 ± 0.10*	0.53 ± 0.09
<i>Tnf</i>	1.08 ± 0.20	1.13 ± 0.26	0.72 ± 0.04	0.70 ± 0.05
<i>Tgfb1</i>	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.12	0.73 ± 0.04	0.77 ± 0.03*
<i>Nfkb1</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.09	0.88 ± 0.04	0.92 ± 0.03
Oxidative stress-related genes				
<i>Hmox1</i>	1.03 ± 0.11	1.03 ± 0.11	0.76 ± 0.05*	0.76 ± 0.04*
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.09	0.95 ± 0.03	0.98 ± 0.04
<i>Nfe2l2</i>	1.02 ± 0.08	1.03 ± 0.12	0.79 ± 0.05*	0.88 ± 0.04
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.05
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.94 ± 0.03
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.04
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	0.91 ± 0.07	0.91 ± 0.06
<i>Mt2a</i>	1.02 ± 0.10	1.06 ± 0.18	0.92 ± 0.12	0.86 ± 0.08
<i>Nos2</i>	1.14 ± 0.20	1.16 ± 0.22	0.93 ± 0.17	1.09 ± 0.25
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.07	0.86 ± 0.03*	0.88 ± 0.04
<i>Gpx4</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.86 ± 0.04	0.88 ± 0.03

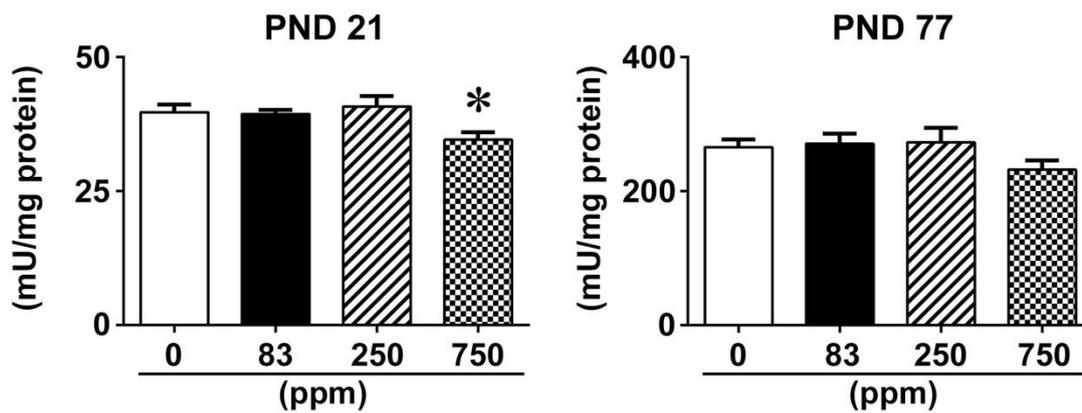
Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as Iba1: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bcl2l1*, Bcl2-like 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp1*, caspase 1; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Chat*, choline O-acetyltransferase; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *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; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IEG, immediate early gene; IMI, imidacloprid; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nfe2l2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; 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; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SEM.

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

**(A) AChE activity**



**(B) MDA concentration**

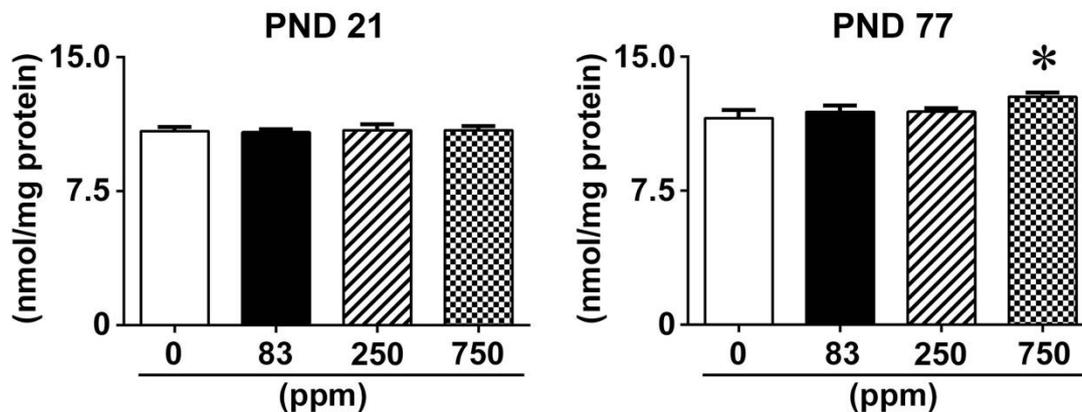


Fig. 7

**Fig. 7**

Acetylcholinesterase (AChE) activities and malondialdehyde (MDA) concentrations in the hippocampus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) AChE activities on PND 21 (left) and PND 77 (right), or (B) MDA concentrations on PND 21 (left) and PND 77 (right). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N = 6/group. \* $P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

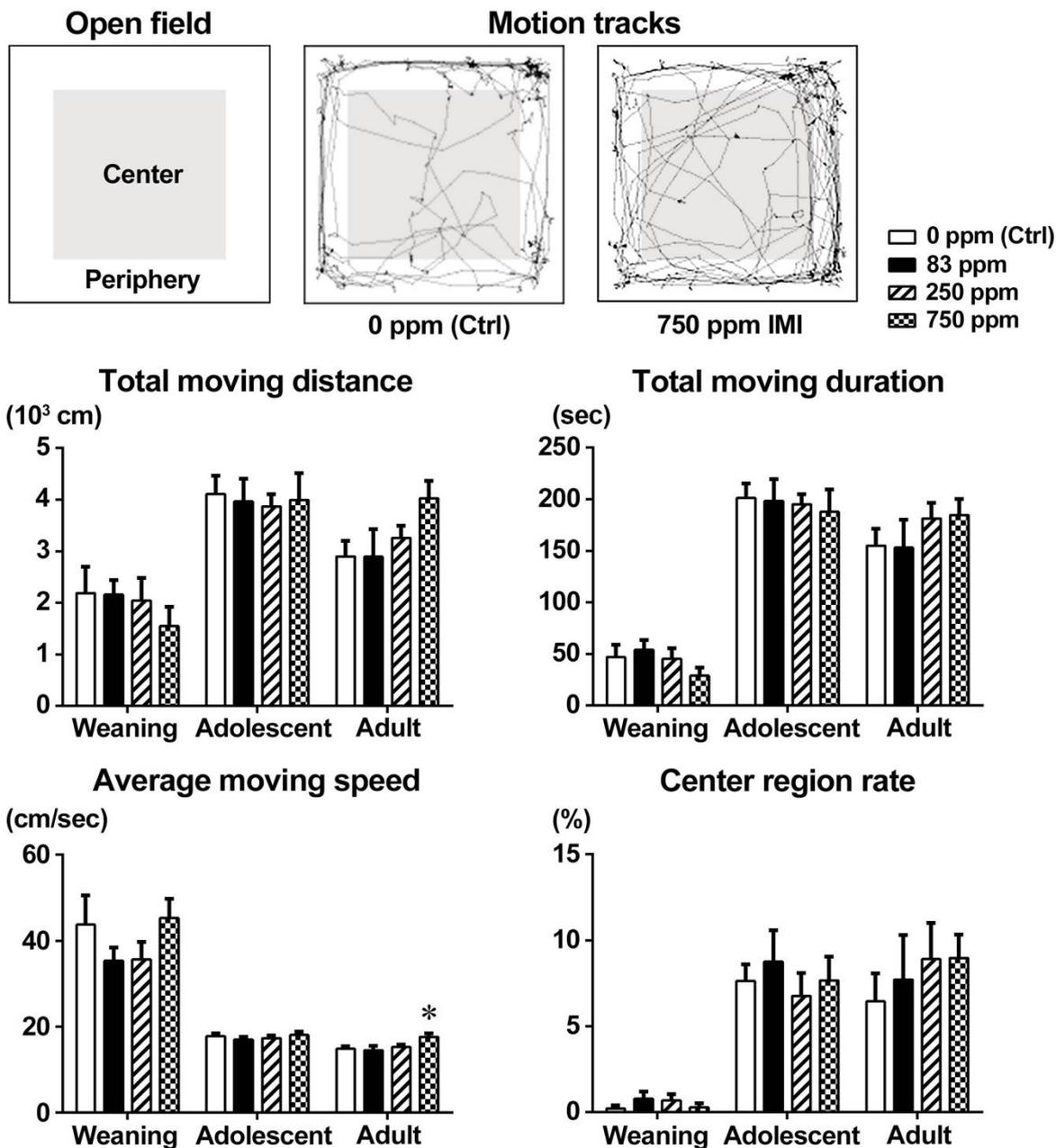


Fig. 8

**Fig. 8**

Open field test in male offspring on postnatal day (PND) 18 (weaning stage), PND 38 (adolescent stage), and PND 62 (adult stage) after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. Upper panel shows representative examples of animal track in the 0-ppm controls and 750-ppm group. Lower panel shows graph data of the total moving distance, total moving duration, average moving speed, and percent of time in the center region. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N = 10/group. \* $P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

## Supplementary Table 1

### Antibodies used in this study

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving <sup>a</sup>	Synaptic Systems GmbH (Göttingen, Germany)
Cluster of differentiation 68	CD68	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED1	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	BMA Biomedicals (Augst, Switzerland)
Cluster of differentiation 163	CD163	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED2	1:500	Protein digesting <sup>c</sup>	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	33/Cox-2	1:200	Microwaving <sup>d</sup>	Abcam plc (Cambridge, UK)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	2H2	1:1000	Microwaving <sup>e</sup>	Abcam plc
Glutamic acid decarboxylase 67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1G10.2	1:200	Autoclaving <sup>b</sup>	MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	MilliporeSigma
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving <sup>b</sup>	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)
Neuronal nuclei	NeuN	Rabbit	Monoclonal IgG	EPR12763	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving <sup>a</sup>	MilliporeSigma
phosphorylated Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 kinase)	p-ERK1/2	Rabbit	Monoclonal IgG	137F5	1:100	Microwaving <sup>a</sup>	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	Microwaving <sup>a</sup>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reelin	RELN	Rabbit	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	G10 kappa	1:1000	Autoclaving <sup>b</sup>	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SRY-box transcription factor 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:200	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam plc
T-box brain protein 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	TU-20	1:500	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam plc

Abbreviation: n.a, not applicable.

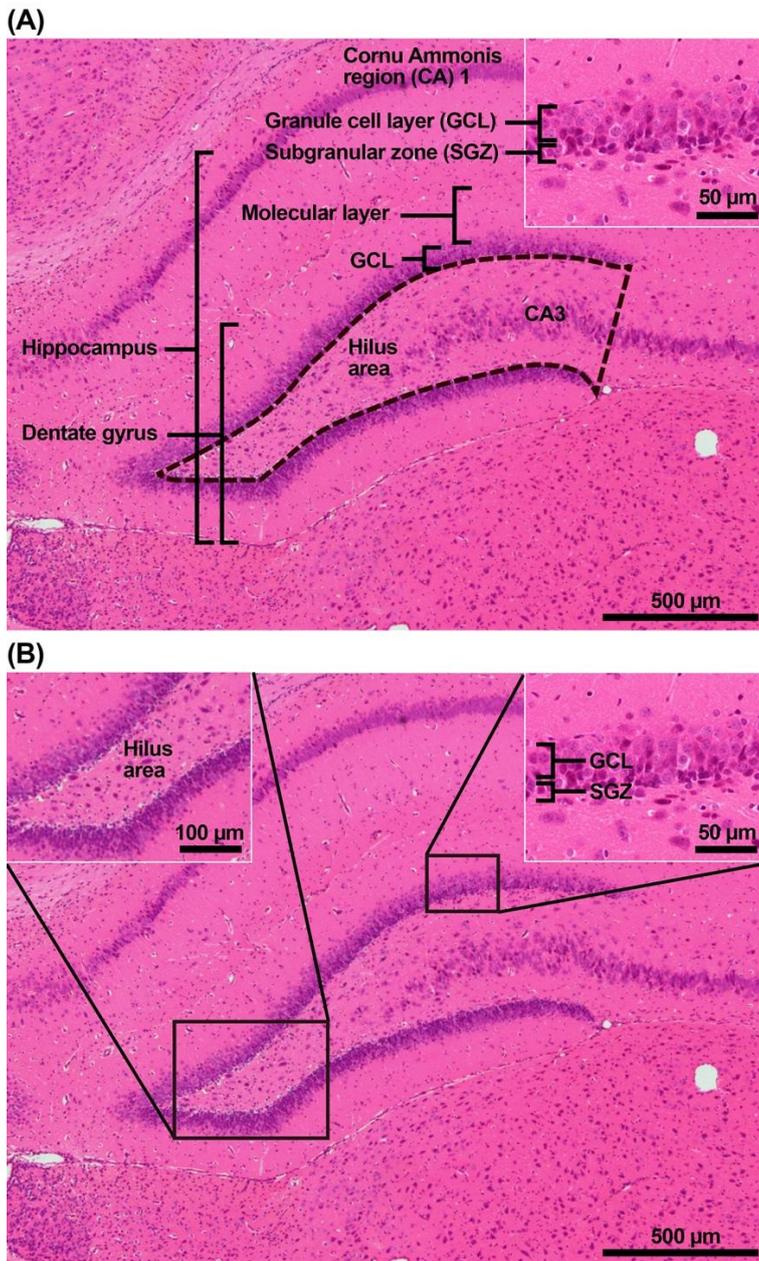
<sup>a</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>c</sup> Proteinase K (40 µg/mL) at 37°C for 15 min.

<sup>d</sup> 90°C for 15 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).

<sup>e</sup> 90°C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).



**Supplementary Fig. 1**

Overview of the hippocampus of a male rat stained with hematoxylin and eosin. (A) The number of cells in the hilus of the dentate gyrus (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), somatostatin (SST), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation 68 (CD68), or cluster of differentiation 163 (CD163) were counted. Neurons of the cornu Ammonis (CA) 3 region were excluded from counting. (Inset) Higher magnification of the granule cell layer (GCL) and subgranular zone (SGZ). The distribution of immunoreactive cells for GFAP, SRY-box transcription factor 2 (SOX2), T-box brain protein 2 (TBR2), doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3), neuronal nuclei (NeuN), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), cyclooxygenase 2 (COX2), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), as well as terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) <sup>+</sup> cells, were measured in the SGZ and/or GCL. (B) Insets show representative areas of each immunohistochemical image of the GCL/SGZ and the hilus of the dentate gyrus in Fig. 3 through Fig. 8.

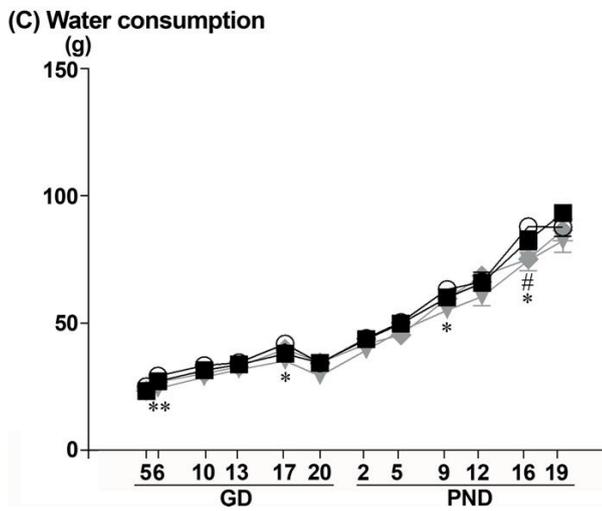
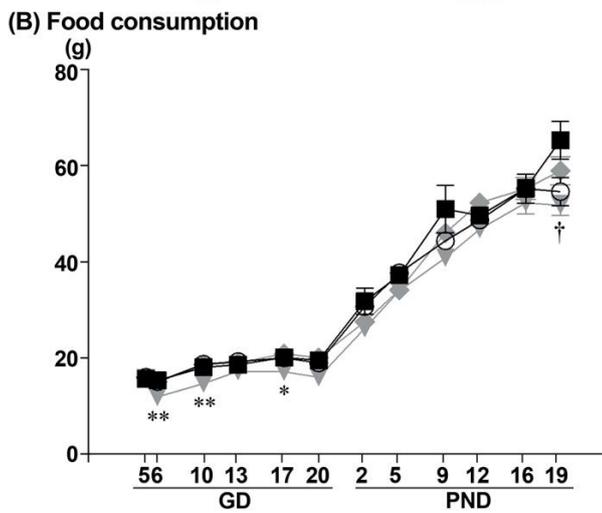
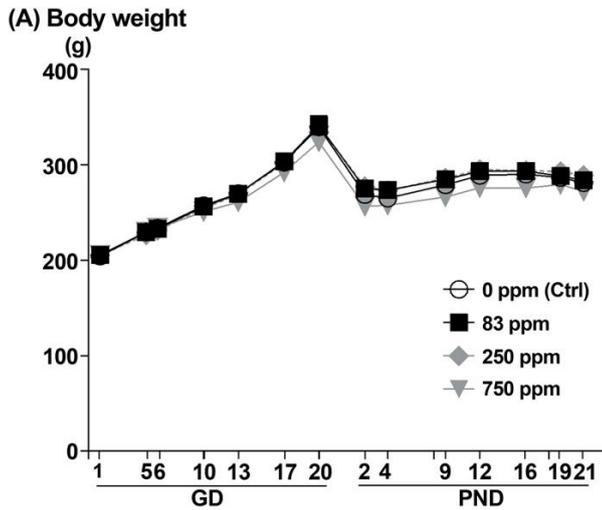
Supplementary Table 2

## Sequence of primers used for real-time reverse transcription-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Aif1</i>	NM_017196.3	TTGTGCTATG GAACGTCTTT AAC	TGTTGCTCAC CGTCTTTAA TGAT
<i>Arc</i>	NM_019361.1	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
<i>Bax</i>	NM_017059.2	AGGACGCATC CACCAAGAAG	CCAGTTCATC GCCAATTCG
<i>Bcl2</i>	NM_016993.1	GGATGCCTTT GTGGAACTAT ATGG	CAGAGACAGC CAGGAGAAAT CAA
<i>Bcl2l1</i>	NM_171988.3	GCCAGGCCTT CAACCATTAT C	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCTT TATGGTTTTT
<i>Casp1</i>	NM_012762.2	CCTGCCCAGA GCACAAGACT	CCTGGAGACC ATGAGACATG AA
<i>Casp3</i>	NM_012922.2	ACAAGCTGGA ATTCATGCAC AT	CAAATTCCGT GGCCACCTT
<i>Casp9</i>	NM_031632.1	CATGGTGGAG GTGAAGAACG A	TGCGCCATCT CCATCAAAG
<i>Cat</i>	NM_012520.2	ATTGCCGTCC GATTCTCC	CCAGTTACCA TCTTCAGTGT AG
<i>Chat</i>	NM_001170593.1	CCAGAAGGCT GAGGTGGAAA	CTCTGCTGAG GAGGCGAGAT
<i>Chrm1</i>	NM_080773.2	CCATCCTCTT CTGGCAATAC CT	GGGAGAGGAA CTGGATGTAG CA
<i>Chrm2</i>	XM_039108421.1	CCCAGTTAAG CGGACCACAA	CCCAGAGGAT GAAGGAAAGG A
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTCA
<i>Chrb2</i>	NM_009602.4	TGTGGACGGT GTACGCTTCA	CCTCACACTC TGGTCATCAT CTTC
<i>Dab1</i>	NM_153621.2	AGCAACCCTG GCCAACTGT	TGGCAGCTGG TAAAGGCATA
<i>Dcx</i>	NM_053379.3	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCTG	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Dpysl3</i>	NM_012934.1	CATGTGGTAC CTGAACCTGA GTC	GCCCACTCAC GCCACTTTT
<i>Eomes</i>	XM_017596193.1	GCCGGACTAC CATGGACATC	TTTCTCCTTG GCAAGCTGAT C
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCC TCCTCTGACT	TGCCTTCTCT GACTGCTCAC A
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gfap</i>	NM_017009.2	AACCGCATCA CCATTCTGT	TCCTTAATGA CCTCGCCACT C
<i>Gpx1</i>	NM_030826.4	GCTGCTCATT GAGAATGTCTG	GAATCTCTTC ATTCTTGCCA TT
<i>Gpx4</i>	NM_001039849.3	TGCATCCCGC GATGAT	TCCTTGCTG CGAATTCG
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGACGCTCG TCCTCTTCTCCT	TCTTCGCTGT GCCATTCTGTA
<i>Gria2</i>	NM_001083811.1	CATCACACCT AGTTCCTCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Gria3</i>	NM_032990	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTGCCTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Grin2d</i>	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
<i>Hmox1</i>	NM_012580.2	GCTCTATCGT GCTCGCATGA	TCTTCTGTCA CCCTGTGCTT GA
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCTAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Il1a</i>	NM_017019.1	GAGGCCATAG CCCATGATTT AG	TGGAAGCTGT GAGGTGCTGA T
<i>Il1b</i>	NM_031512	TGACAGACCC CAAAAGATTA AGG	CTCATCTGGA CAGCCCAAGT C
<i>Il4</i>	NM_201270.1	CAGACCGCTG ACACCTCTAC A	AACAAGGAAC ACCACGGAGA
<i>Il6</i>	NM_012589.2	GACTTCCAGC CAGTTGCCTT CTTG	TGGTCTGTTG TGGGTGGTAT CCTC
<i>Il10</i>	NM_012854.2	TCCATCCGGG GTGACAATA	GATGTGGGT CTGGCTGACT
<i>Keap1</i>	NM_057152	CAGAACAAGC CATGCCCTTCT T	TCTGGTCTTC CACAAGGTCC TT
<i>Mt1</i>	NM_138826.4	GCTGTGCCTG AAGTGACGAA	TCTGAGTTGG TCCGGAATT ATTT
<i>Mt2a</i>	NM_001137564.1	GCGTCCTCAC AATGGTGTAA ATAA	GAACCGGTCA GGGTTGTACA A
<i>Nes</i>	NM_001308239.1	TTGGCTTTCT GGACCCCAAG	CAGGAAGGCT GTCACAGGAG
<i>Nfkb1</i>	NM_001276711.1	CACTAAATCC AACACAGCA TCAC	GGCACAATCT CTAGGCTCGT TT
<i>Nrf2</i>	NM_031789.2	TGCCCCTGGA AGTGTCAAA	GGCTGTACTG TATCCCCAGA AGA
<i>Nos2</i>	NM_012611.3	TTGGAGCGAG TTGTGGATG TT	TAGGTGAGGG CTTGCCTGAG TG
<i>Pcna</i>	NM_022381.3	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Ptgs2</i>	NM_011198	CTCAGCCAGG CAGCAAATC	ACATTCCCCA CGGTTTTGAC
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
<i>Rbfox3</i>	NM_001134498.2	TCTCTTGTCC GTTTGCTTCC A	CCTCCATAAA TCTCAGCACC ATAA
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Slc17a6</i>	NM_053427.1	GGCAGACCCT GAGGAAACAA	TCCCCCGTTT CTTCATCCA
<i>Slc17a7</i>	NM_053859.2	TTGTGGCTAC CTCCACCCTA A	CGAAGATGAC ACAGCCATAG TGA
<i>Sod1</i>	NM_017050.1	CATTCCATCA TTGGCCGTAC TA	TTCCACCTT TGCCCAAGTC
<i>Sod2</i>	NM_017051.2	CTCCCTGACC TGCCTTACGA	CTGCATGATC TGCGCGTTA
<i>Sox2</i>	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCCCTCGCC ATGCT
<i>Sst</i>	NM_012659.1	ACCCCGGGAA CGCAA	CCACACCATG AAGGCATTCA
<i>Tgfb1</i>	NM_021578	ATCGACATGG AGCTGGTGAA A	CGAGCCTTAG TTTGGACAGG AT
<i>Tnf</i>	NM_012675.3	GCCCCGAGGCA ACACATCT	CCAGTTCCAC ATCTCGGATC A
<i>Tubb3</i>	NM_139254.2	AACGTCAAGG TAGCGGTGTG T	CGTGCTGTTG CCGATGAAG

Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as Iba1: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated

cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp1*, caspase 1; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Chat*, choline O-acetyltransferase; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrnb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dab1*, DAB adaptor 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; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *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; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid 2 like 2 (also known as NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2); *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nrf2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *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; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.



**Supplementary Fig. 2**

Body weight, food and water consumption of dams during the exposure period. (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with the 0-ppm controls in the 750-ppm IMI group; # $P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls in the 250-ppm IMI group; † $P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls in the 83-ppm IMI group by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Supplementary Table 3**

**Maternal body weight and consumption of food and water**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
No. of dams examined	12	12	10	12
<b>Gestational day</b>				
Body weight (g)				
GD 1	204.37 ± 4.24 <sup>a</sup>	205.58 ± 5.49	(-1%) <sup>b</sup> 202.51 ± 3.90 (1%)	205.02 ± 5.09 (0%)
GD 5	229.41 ± 4.26	229.55 ± 5.29	(0%) 226.59 ± 4.48 (1%)	229.58 ± 5.19 (0%)
GD 6	233.54 ± 4.50	232.88 ± 5.49	(0%) 231.12 ± 4.60 (1%)	233.41 ± 5.46 (0%)
GD 10	257.11 ± 5.07	256.09 ± 6.29	(0%) 254.44 ± 5.49 (1%)	250.85 ± 5.60 (2%)
GD 13	269.83 ± 5.12	269.65 ± 6.51	(0%) 268.92 ± 5.38 (0%)	260.95 ± 6.05 (3%)
GD 17	302.59 ± 6.23	303.36 ± 8.14	(0%) 302.00 ± 6.32 (0%)	292.13 ± 5.50 (3%)
GD 20	339.69 ± 7.90	341.37 ± 9.85	(0%) 340.14 ± 7.32 (0%)	323.84 ± 8.29 (5%)
Food consumption (g)				
GD 5	16.03 ± 0.65	15.63 ± 0.77 (2%)	15.92 ± 0.64 (1%)	15.83 ± 0.81 (1%)
GD 6	15.08 ± 0.48	15.33 ± 0.69 (-2%)	14.98 ± 0.51 (1%)	11.91 ± 0.51** (21%)
GD 10	18.72 ± 0.43	18.08 ± 1.07 (3%)	18.64 ± 0.70 (0%)	14.72 ± 0.61** (21%)
GD 13	19.28 ± 0.59	18.64 ± 0.70 (3%)	19.05 ± 0.69 (1%)	17.27 ± 0.60 (10%)
GD 17	20.05 ± 0.60	20.13 ± 0.63 (0%)	20.90 ± 0.86 (-4%)	17.18 ± 1.19* (14%)
GD 20	18.97 ± 0.94	19.55 ± 0.68 (-3%)	20.11 ± 0.58 (-6%)	15.98 ± 1.29 (16%)
Water consumption				
GD 5	25.05 ± 1.00	23.29 ± 1.26 (7%)	23.44 ± 0.93 (6%)	22.93 ± 0.92 (8%)
GD 6	29.29 ± 1.05	27.23 ± 1.26 (7%)	26.87 ± 1.00 (8%)	24.29 ± 0.62** (17%)
GD 10	33.43 ± 1.96	31.44 ± 1.29 (6%)	30.21 ± 1.04 (10%)	28.79 ± 1.02 (14%)
GD 13	34.57 ± 1.05	33.73 ± 1.41 (2%)	32.89 ± 1.61 (5%)	31.76 ± 1.08 (8%)
GD 17	41.87 ± 1.56	37.99 ± 1.27 (9%)	39.87 ± 1.94 (5%)	35.17 ± 2.57* (16%)
GD 20	34.33 ± 1.72	34.44 ± 1.42 (0%)	34.57 ± 1.40 (-1%)	29.24 ± 2.24 (15%)
<b>Postnatal day</b>				
Body weight (g)				
PND 2	268.76 ± 5.72	275.08 ± 7.09 (-2%)	277.10 ± 6.65 (-3%)	256.38 ± 8.37 (5%)
PND 4	264.97 ± 4.93	273.44 ± 7.02 (-3%)	272.98 ± 6.41 (-3%)	257.71 ± 6.85 (3%)
PND 9	278.95 ± 5.36	284.76 ± 6.69 (-2%)	286.19 ± 6.24 (-3%)	266.39 ± 7.47 (5%)
PND 12	289.01 ± 3.69	293.20 ± 7.13 (-1%)	294.95 ± 7.09 (-2%)	275.98 ± 7.83 (5%)
PND 16	290.09 ± 4.54	293.39 ± 6.50 (-1%)	293.97 ± 6.23 (-1%)	275.58 ± 7.64 (5%)
PND 19	286.67 ± 4.41	288.19 ± 6.57 (-1%)	292.84 ± 6.83 (-2%)	279.16 ± 8.62 (3%)
PND 21	281.20 ± 4.81	283.69 ± 5.24 (-1%)	288.94 ± 5.30 (-3%)	272.13 ± 7.97 (3%)
Food consumption (g)				
PND 2	30.71 ± 1.74	31.79 ± 2.70 (-4%)	27.54 ± 1.67 (10%)	26.17 ± 0.90 (15%)
PND 5	37.74 ± 1.47	37.22 ± 1.11 (1%)	34.16 ± 1.79 (9%)	34.10 ± 1.24 (10%)
PND 9	44.38 ± 1.72	50.98 ± 4.96 (-15%)	46.05 ± 1.85 (-4%)	40.83 ± 1.75 (8%)
PND 12	48.74 ± 1.58	49.61 ± 1.14 (-2%)	52.29 ± 1.45 (-7%)	46.78 ± 1.56 (4%)
PND 16	55.23 ± 3.02	55.32 ± 1.81 (0%)	55.23 ± 2.26 (0%)	52.28 ± 2.35 (5%)
PND 19	54.61 ± 2.95	65.33 ± 3.93* (-20%)	58.97 ± 2.93 (-8%)	51.75 ± 2.08 (5%)
Water consumption (g)				
PND 2	44.04 ± 1.77	43.70 ± 2.49 (1%)	41.86 ± 2.89 (5%)	39.35 ± 1.64 (11%)
PND 5	50.31 ± 1.79	49.87 ± 1.74 (1%)	45.41 ± 2.01 (10%)	47.02 ± 2.08 (7%)
PND 9	63.27 ± 2.48	60.09 ± 2.09 (5%)	59.66 ± 2.62 (6%)	55.10 ± 2.61* (13%)
PND 12	66.22 ± 3.70	65.77 ± 2.14 (1%)	68.65 ± 2.75 (-4%)	60.41 ± 3.60 (9%)
PND 16	87.99 ± 2.19	82.54 ± 3.57 (6%)	75.16 ± 3.61* (15%)	74.59 ± 4.00* (15%)
PND 19	87.77 ± 3.70	93.31 ± 2.03 (-6%)	86.56 ± 4.27 (1%)	82.46 ± 4.70 (6%)

Abbreviations: GD, gestational day; IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.

<sup>b</sup> (%) decrease compared to 0-ppm controls.

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

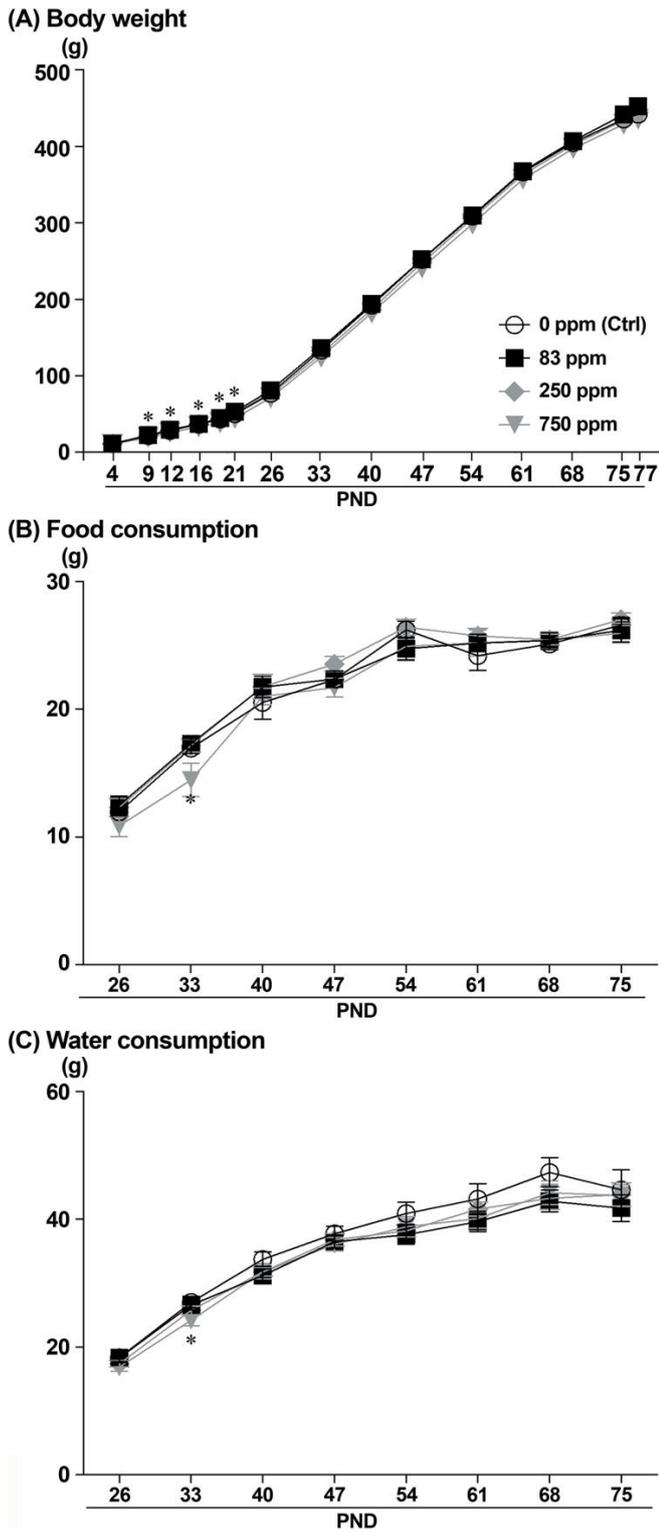
**Supplementary Table 4****Maternal reproductive parameters**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
No. of dams examined	12	12	10	12
No. of implantation sites in the uterine horns	13.75 ± 0.98	11.92 ± 2.84	12.70 ± 1.42	12.42 ± 1.38
No. of live offspring	11.75 ± 1.09	12.00 ± 1.95	11.30 ± 2.79	11.92 ± 1.68
Male ratio (%)	34.80 ± 2.99	61.36 ± 4.62**	51.15 ± 12.31**	39.03 ± 21.48

Abbreviation: IMI, imidacloprid.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.

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



**Supplementary Fig. 3**

Body weight, food and water consumption of male offspring during the exposure period. (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , compared with the 0-ppm controls in the 750-ppm IMI group by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Supplementary Table 5**

**Offspring body weight and consumption of food and water**

	IMI in diet (ppm)						
	0 (Control)	83		250		750	
<b>Body weight (g)</b>							
PND 4	11.04 ± 0.44 <sup>a</sup>	11.32 ± 0.18	(-3%) <sup>b</sup>	11.11 ± 0.30	(-1%)	10.37 ± 0.37	(6%)
PND 9	21.81 ± 0.48	22.33 ± 0.35	(-2%)	21.61 ± 0.64	(1%)	19.46 ± 0.75*	(11%)
PND 12	28.54 ± 0.49	29.27 ± 0.46	(-3%)	28.35 ± 0.78	(1%)	25.87 ± 1.02*	(9%)
PND 16	36.81 ± 0.68	37.33 ± 0.66	(-1%)	36.32 ± 0.78	(1%)	33.32 ± 1.46*	(9%)
PND 19	43.39 ± 0.73	44.63 ± 0.83	(-3%)	42.72 ± 1.16	(2%)	38.89 ± 1.79*	(10%)
PND 21	50.46 ± 0.85	52.92 ± 0.96	(-5%)	49.73 ± 1.32	(1%)	44.77 ± 1.98*	(11%)
PND 26	77.13 ± 1.08	81.24 ± 1.34	(-5%)	75.06 ± 1.92	(3%)	71.46 ± 3.34	(7%)
PND 33	133.47 ± 2.05	136.50 ± 2.85	(-2%)	128.71 ± 2.89	(4%)	124.73 ± 4.89	(7%)
PND 40	192.30 ± 2.94	194.13 ± 3.93	(-1%)	186.93 ± 4.01	(3%)	182.52 ± 5.76	(5%)
PND 47	252.19 ± 4.19	252.44 ± 5.58	(0%)	247.54 ± 4.85	(2%)	241.13 ± 7.03	(4%)
PND 54	308.70 ± 4.74	309.88 ± 6.81	(0%)	305.76 ± 5.44	(1%)	298.66 ± 8.18	(3%)
PND 61	366.43 ± 5.70	367.67 ± 8.29	(0%)	363.24 ± 6.53	(1%)	357.21 ± 9.73	(3%)
PND 68	404.76 ± 5.70	407.14 ± 9.04	(-1%)	402.12 ± 6.95	(1%)	397.17 ± 10.69	(2%)
PND 75	435.53 ± 6.38	441.76 ± 10.13	(-1%)	433.93 ± 7.38	(0%)	429.05 ± 11.97	(1%)
PND 77	441.87 ± 4.48	452.79 ± 7.50	(-2%)	444.70 ± 5.80	(-1%)	435.64 ± 8.44	(1%)
<b>Food consumption (g)</b>							
PND 26	11.97 ± 0.32	12.49 ± 0.73	(-4%)	12.32 ± 0.71	(-3%)	10.87 ± 0.84	(9%)
PND 33	16.96 ± 0.41	17.31 ± 0.40	(-2%)	17.19 ± 0.42	(-1%)	13.76 ± 1.54*	(19%)
PND 40	18.26 ± 2.56	21.76 ± 0.81	(-19%)	21.77 ± 0.96	(-19%)	21.01 ± 0.64	(-15%)
PND 47	22.34 ± 0.32	22.37 ± 0.64	(0%)	23.55 ± 0.59	(-5%)	21.70 ± 0.74	(3%)
PND 54	26.23 ± 0.67	24.76 ± 0.89	(6%)	26.44 ± 0.62	(-1%)	24.94 ± 1.14	(5%)
PND 61	24.21 ± 1.16	25.19 ± 0.68	(-4%)	25.76 ± 0.57	(-6%)	25.20 ± 1.02	(-4%)
PND 68	25.11 ± 0.44	25.40 ± 0.58	(-1%)	25.46 ± 0.41	(-1%)	25.44 ± 0.64	(-1%)
PND 75	26.60 ± 0.59	26.19 ± 0.91	(2%)	27.05 ± 0.48	(-2%)	25.96 ± 0.78	(2%)
<b>Water consumption (g)</b>							
PND 26	18.36 ± 0.62	18.32 ± 0.76	(0%)	17.40 ± 0.48	(5%)	16.89 ± 0.70	(8%)
PND 33	27.01 ± 0.92	26.60 ± 0.75	(2%)	25.76 ± 0.58	(5%)	23.82 ± 1.03*	(12%)
PND 40	33.74 ± 1.13	31.23 ± 1.04	(7%)	31.77 ± 0.65	(6%)	31.79 ± 1.11	(6%)
PND 47	37.77 ± 1.15	36.52 ± 1.04	(3%)	36.80 ± 1.00	(3%)	36.10 ± 1.09	(4%)
PND 54	40.92 ± 1.73	37.61 ± 1.53	(8%)	38.20 ± 0.95	(7%)	38.83 ± 1.57	(5%)
PND 61	43.19 ± 2.39	39.64 ± 1.59	(8%)	41.60 ± 1.10	(4%)	40.13 ± 1.50	(7%)
PND 68	47.34 ± 2.27	42.86 ± 1.70	(9%)	43.30 ± 1.77	(9%)	44.19 ± 1.85	(7%)
PND 75	44.61 ± 3.11	41.74 ± 2.06	(6%)	43.87 ± 1.87	(2%)	43.73 ± 1.65	(2%)

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.

<sup>b</sup> (%) decrease compared to 0-ppm controls.

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

**Supplementary Table 6****Body and brain weights of offspring at necropsies on PND 21 and PND 77**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
PND 21				
No. of offspring examined	51	75	56	58
Body weight (g)	50.46 ± 0.85 <sup>a</sup>	52.92 ± 0.96	49.73 ± 1.32	44.77 ± 1.98*
No. of offspring examined	7	10	7	8
Brain weight (g)	1.49 ± 0.06	1.53 ± 0.04	1.51 ± 0.08	1.46 ± 0.10
PND 77				
No. of offspring examined	23	28	27	28
Body weight (g)	441.87 ± 4.48	452.79 ± 7.50	444.70 ± 5.80	435.64 ± 8.44
No. of offspring examined	7	8	8	8
Brain weight (g)	2.06 ± 0.02	2.07 ± 0.03	2.01 ± 0.03	2.06 ± 0.01

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.

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

**Supplementary Table 7****Number of immunoreactive or TUNEL<sup>+</sup> cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
GFAP	3.86 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.34	3.73 ± 0.38	4.09 ± 0.42
SOX2	26.62 ± 2.02	22.68 ± 1.96	23.5 ± 1.67	23.69 ± 2.32
TBR2	4.56 ± 0.43	4.08 ± 0.58	3.66 ± 0.39	4.11 ± 0.46
DCX	124 ± 5.31	110.54 ± 4.64	116.51 ± 5.12	102.72 ± 5.88*
TUBB3	91.15 ± 6.4	75.84 ± 6.51	75.31 ± 8.59	66.45 ± 4.81*
NeuN	528.48 ± 24.87	519.08 ± 18.84	523.06 ± 25.36	532.32 ± 23.43
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
PVALB	23.87 ± 3.8	19.88 ± 4.16	23.88 ± 4.36	20.90 ± 3.49
RELN	84.99 ± 3.43	73.19 ± 3.9	82.04 ± 6.51	65.41 ± 4.51*
SST	64.01 ± 4.52	64.14 ± 3.55	67.2 ± 3.87	73.74 ± 3.08
GAD67	93.15 ± 5.37	88.03 ± 4.45	90.81 ± 4.38	94.70 ± 4.01
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)				
ARC	4.04 ± 0.68	3.80 ± 0.52	3.31 ± 0.50	3.88 ± 0.51
FOS	6.51 ± 0.73	5.13 ± 0.83	4.35 ± 0.44	4.10 ± 0.39*
COX2	32.62 ± 2.54	29.54 ± 2.18	27.82 ± 1.26	26.52 ± 2.40
p-ERK1/2	0.96 ± 0.23	0.71 ± 0.25	0.49 ± 0.14	0.21 ± 0.12*
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
PCNA in the SGZ	5.07 ± 0.51	5.01 ± 0.92	3.97 ± 0.41	2.98 ± 0.26*
TUNEL in the SGZ	0.99 ± 0.20	0.86 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.08 ± 0.20
TUNEL in the GCL	0.99 ± 0.20	0.86 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.08 ± 0.20
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
GFAP	417.57 ± 20.52	424.31 ± 14.22	467.21 ± 23.85	492.15 ± 13.25*
Iba1	68.36 ± 2.88	75.33 ± 4.23	73.73 ± 3.07	86.94 ± 2.30**
CD68	16.24 ± 2.04	25.5 ± 3.09*	24.78 ± 2.10*	24.64 ± 2.19*
CD163	8.41 ± 1.48	11.15 ± 1.83	6.82 ± 0.80	8.33 ± 1.32

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; 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; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; IMI, imidacloprid; 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.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.

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

**Supplementary Table 8****Number of immunoreactive or TUNEL<sup>+</sup> cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 or PND 79<sup>a</sup>**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
GFAP	5.76 ± 0.58 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.50	3.54 ± 0.31**	4.21 ± 0.28*
SOX2	16.92 ± 0.92	16.67 ± 0.83	15.63 ± 0.88	16.11 ± 0.84
TBR2	2.76 ± 0.36	2.28 ± 0.35	2.56 ± 0.19	2.71 ± 0.34
DCX	14.57 ± 1.08	17.25 ± 1.19	12.96 ± 0.82	14.53 ± 1.13
TUBB3	18.01 ± 1.66	20.24 ± 1.74	16.31 ± 1.52	18.22 ± 1.68
NeuN	607.82 ± 7.96	574.95 ± 13.08	561.33 ± 7.35**	534.83 ± 11.89**
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
PVALB	14.16 ± 2.34	12.18 ± 0.97	15.65 ± 1.74	14.24 ± 2.45
RELN	43.76 ± 2.67	42.01 ± 2.13	46.40 ± 3.11	40.56 ± 2.31
SST	38.66 ± 4.45	49.43 ± 5.30	50.31 ± 5.87	45.77 ± 4.55
GAD67	21.32 ± 2.16	21.55 ± 1.67	21.73 ± 1.72	21.83 ± 2.67
Synaptic plasticity-related proteins in the GCL (No./mm SGZ length)				
ARC	5.59 ± 0.71	5.82 ± 0.96	6.64 ± 0.54	6.17 ± 0.69
FOS	7.27 ± 0.65	8.09 ± 1.27	7.59 ± 1.20	7.55 ± 0.98
COX2	38.40 ± 3.39	41.24 ± 3.20	41.34 ± 2.02	41.97 ± 2.74
p-ERK1/2	1.26 ± 0.41	1.33 ± 0.57	1.91 ± 0.55	2.07 ± 0.52
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
PCNA in the SGZ	2.57 ± 0.35	3.00 ± 0.60	2.55 ± 0.47	2.53 ± 0.36
TUNEL in the SGZ	0.03 ± 0.02	0.22 ± 0.08	0.24 ± 0.10	0.26 ± 0.08*
TUNEL in the GCL	0.07 ± 0.04	1.05 ± 0.72	0.72 ± 0.37	0.69 ± 0.26
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
GFAP	288.49 ± 14.39	256.54 ± 14.25	302.28 ± 15.19	292.81 ± 14.16
Iba1	67.34 ± 4.04	71.07 ± 3.18	64.96 ± 4.76	75.97 ± 5.86
CD68	11.83 ± 1.55	14.78 ± 1.79	12.52 ± 1.23	18.18 ± 2.14*
CD163	8.30 ± 0.72	7.94 ± 0.58	7.47 ± 0.86	8.43 ± 1.11

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; 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; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEG, immediate-early gene; IMI, imidacloprid; 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.

<sup>a</sup> Synaptic plasticity-related proteins were immunohistochemically examined using animals of behavioral test groups euthanized on PND 79. Other marker antigens were immunohistochemically examined using animals euthanized on PND 77 without subjected to behavioral tests.

<sup>b</sup> Mean ± SEM.

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

**Supplementary Table 9****Levels of acetylcholinesterase activity and malondialdehyde in the hippocampus of male offspring on PND 21 and PND 77**

		IMI in diet (ppm)			
		0 (Control)	83	250	750
PND 21					
	No. of offspring examined	6	6	6	6
	MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	10.86 ± 0.23 <sup>a</sup>	10.80 ± 0.17	10.90 ± 0.33	10.91 ± 0.22
	AchE activity (mU/mg tissue protein)	39.69 ± 1.42	39.37 ± 0.78	40.79 ± 1.90	34.55 ± 1.40*
PND 77					
	No. of offspring examined	6	6	6	6
	MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	11.55 ± 0.45	11.90 ± 0.37	11.92 ± 0.19	12.74 ± 0.25*
	AchE activity (mU/mg tissue protein)	261.49 ± 9.72	263.84 ± 14.44	267.10 ± 20.19	225.55 ± 13.67

Abbreviations: AchE, acetylcholinesterase; IMI, imidacloprid; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SEM.\**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

**Supplementary Table 10**  
**Changes in open field test of male offspring**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
<b>Weaning stage (PND 18)</b>				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance ( $10^3$ cm)	2.19 ± 0.51 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.28	2.04 ± 0.45	1.55 ± 0.37
Total moving duration (sec)	46.95 ± 11.94	54.06 ± 9.52	45.22 ± 10.34	29.06 ± 7.70
Average moving speed (cm/sec)	43.77 ± 6.80	35.40 ± 3.05	35.66 ± 4.04	45.27 ± 4.46
Center region rate (%)	0.23 ± 0.17	0.79 ± 0.42	0.70 ± 0.35	0.28 ± 0.24
<b>Adolescent stage (PND 38)</b>				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance ( $10^3$ cm)	4.11 ± 0.35	3.97 ± 0.44	3.87 ± 0.24	4.00 ± 0.52
Total moving duration (sec)	201.33 ± 14.10	198.44 ± 20.90	195.14 ± 9.88	187.78 ± 21.57
Average moving speed (cm/sec)	17.85 ± 0.63	16.98 ± 0.65	17.31 ± 0.61	18.10 ± 0.82
Center region rate (%)	7.63 ± 0.96	8.78 ± 1.81	6.76 ± 1.34	7.67 ± 1.38
<b>Adult stage (PND 62)</b>				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance ( $10^3$ cm)	2.90 ± 0.30	2.90 ± 0.53	3.26 ± 0.23	4.03 ± 0.38
Total moving duration (sec)	155.10 ± 16.12	153.14 ± 27.18	181.41 ± 15.15	184.68 ± 15.58
Average moving speed (cm/sec)	14.86 ± 0.56	14.55 ± 0.98	15.28 ± 0.56	17.63 ± 0.87*
Center region rate (%)	6.45 ± 1.63	7.72 ± 2.60	8.91 ± 2.10	8.97 ± 1.36

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± SEM.

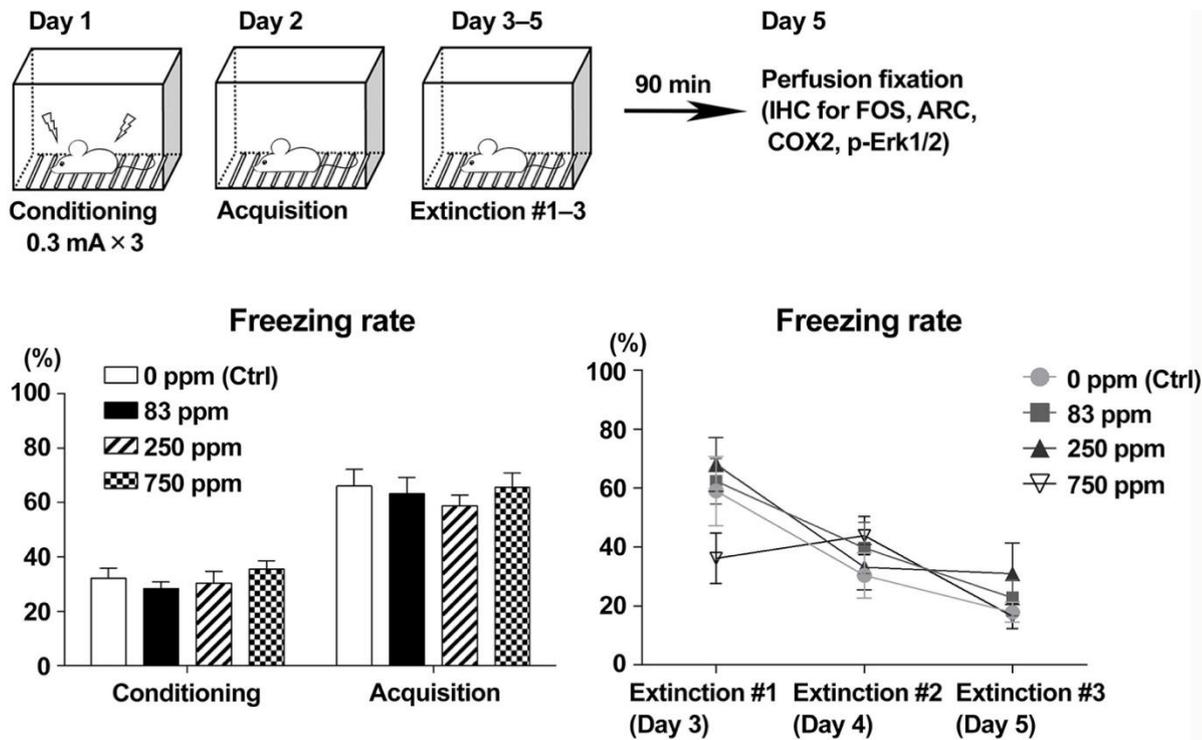
\* $P < 0.05$ , compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Supplementary Table 11****The alteration in spatial short-term memory in Y-maze test of male offspring on PND 27**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
No. of offspring examined	10	10	10	10
Alternation rate (%)	57.51 ± 3.60 <sup>a</sup>	57.82 ± 7.21	57.02 ± 5.24	46.48 ± 5.34
Total arm entries	17.20 ± 1.92	15.30 ± 1.70	15.80 ± 1.21	23.40 ± 3.56

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± SEM.



**Supplementary Fig. 4**

Contextual fear conditioning test of male offspring during the period from postnatal day (PND) 75 until PND 79 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. Graphs show the rate of the freezing time in the fear conditioning, fear acquisition and fear extinction in animals of untreated controls (0 ppm) and each exposure group. Upper panel shows the summary of experimental design. Lower panel shows the rate of the freezing time in the fear acquisition and fear conditioning, or the rate of the freezing time in the day 1, day 2 and day 3 extinction trials. Values are expressed as the mean + SEM. N = 10/group.

**Supplementary Table 12****Changes in contextual fear conditioning test of male offspring**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
Adult stage (PND 75-79)				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Freezing rate (%)				
Fear conditioning	32.24±3.55 <sup>a</sup>	28.39±2.44	30.41±4.19	35.57±2.88
Fear acquisition	65.93±6.20	63.24±5.86	58.73±3.92	65.50±5.32
Fear extinction #1	59.03±11.74	62.37±7.77	68.11±9.16	36.24±8.47
Fear extinction #2	30.45±7.70	39.70±8.69	33.22±7.70	43.91±6.47
Fear extinction #3	17.99±3.46	22.90±6.08	31.03±10.43	16.59±4.17

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± SEM.

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6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  
 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  
 分担課題：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

以前の研究において、発達神経毒性に関する文献情報を基にデータセットを構築し、化学構造情報（分子記述子）を利用した化学物質間の類似性を評価してクラスタリング解析やリードアクロスを利用することで、化学構造からある程度の精度でDNTを予測できることが示唆された。一方で、使用したデータセット内物質の毒性評価の不確実性が予測結果に大きく影響することが強く示唆された。そこで本年度は、よりデータの信頼性が高いと考えられる食品安全委員会の農薬評価書を利用して、ラット90日間反復投与毒性試験の神経毒性と関連する2つのエンドポイント、すなわちコリンエステラーゼ活性阻害（CE01と定義）及び神経毒性と関連する外観・行動変化（NV01と定義）を評価対象として分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスによる予測手法の検討を行った。CE01では、陽性物質として有機リン系農薬が多く含まれていたこともあり、化学構造情報（分子記述子）のみを用いた予測においても感度及び特異度の平均値であるbalanced accuracy（BA）は0.75程度と高かった。さらに生物活性予測値を変数として追加することで、精度の向上が見られ、BAは0.8程度となった。NV01については、CE01に比べて予測精度は低く、分子記述子のみでの予測におけるBAは0.56であった。生物活性予測値を加えた場合には、統計学的に毒性と関連する変数を選択することで、BAは0.62程度まで上昇した。以上の結果から、神経毒性と関連するエンドポイントのリードアクロスを利用した予測においては、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用が有用であることが示唆された。

## 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間の類似性を評価し、クラスタリング解析やリードアクロスを利用することで、化学構造からある程度の精度でDNTの予測が可能であることが明らかになった。また、これらの結果とインビトロ試験を組み合わせることで予測精度の向上に繋がることが示唆された。一方で、使用したデータセットの毒性評価の不確実性が結果に大きな影響を与えていることも明らかになった。そこで本年度は、これまでのデータセットとは異なるより信頼性の高い毒性試験情報のデータセットを用いて、これまでの分子記述子を用いたリードアクロス手法の妥当性の検証を行うとともに、生物活性情報の利用の有用性を解析した。

## B. 研究方法

### 1. データセット

当研究室では、食品安全委員会が公開している農薬評価書のラット反復投与毒性試験（90日間、2年間）の結果を独自にデータベース（DB）化している。このDBでは、試験結果を約1000のエンドポイント（EP）として整理している。本研究では、このDBのうち、90日間試験の結果がある350農薬を利用した。

### 2. 評価対象EPの設定

本研究では2つのEPを解析対象とした（表1）。1つは「脳コリンエステラーゼ（ChE）活性低下」、1つは「赤血球ChE活性低下」及び「血中ChE活性低下」の3つのEPをまとめたChE関連所見、もう1つは神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたものとした。本研究ではこれらをそれぞれグループEP（gEP）、CE01及びNV01と定義した。CE01及びNV01の陽性物質数（陽性率）はそれぞれ35農薬（10.0%）及び59農薬（16.9%）であった。

### 3. 化学物質の類似性評価

分子記述子及び生物活性予測値は、それぞれalvaDesソフトウェア（Alvascience, ver 2.0.12）及びPASSソフトウェア（geneXplain社, ver. 2022Standard）を利用して計算した。PASSでは、生物活性予測値を陽性である確率（Pa）と陰性である確率（Pi）の差（Pa-Pi）として提示することからこの値を使用した。Pa及びPiは0～1の値を取るため、Pa-Piは1～-1の値を取る。これらの値は最大値が1、最小値が0となるように正規化

した。使用した変数により物質間のユークリッド距離を計算した後、理論上の最大距離（使用した変数の数の平方根）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。

#### 4. リードアクロスの実施

350農薬から1物質を予測対象物質（ターゲット物質）として選択し、残りの物質を類似物質（ソース物質）の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。

毒性判定は、Weighted sum (WS) ruleを用いて行った。具体的な方法は以下の通りである。なお、近傍物質数 ( $k$ ) は先行研究に従い、350の平方根の最大奇数である17とした。

- 1)  $k$ -近傍物質に対する近傍スコアを次式で算出した。  
(近傍スコア) =  $1/\log_2(1+k)$
- 2) 陽性スコアと陰性スコアをそれぞれ第1近傍から第17近傍に対するスコアの和（総陽性スコア及び総陰性スコア）として算出した。参考として、 $k = 1 \sim 5$ のスコアを下表に示した。

$k$	1	2	3	4	5
gEP	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性
近傍スコア	1	0.63	0.5	0.43	0.39
陽性スコア	0	$0 + 0.63$ = 0.63	$0.63 + 0$ = 0.63	$0.63 + 0.43$ = 1.07	$1.07 + 0.39$ = 1.46
陰性スコア	1	$1 + 0$ = 1	$1 + 0.5$ = 1.5	$1.5 + 0$ = 1.5	$1.5 + 0$ = 1.5

各近傍物質の毒性により、近傍スコアを陽性スコア又は陰性スコアとして与え（下線部）、 $k = 17$ まで合計した。

- 3) 得られた総陽性スコアと総陰性スコアから、下式により毒性判定スコアを算出し、これらの値がDB全体の陽性率（CE01：10.0%、CV01：16.9%）を上回った場合、被験物質をgEP陽性と判定した。  
(毒性判定スコア)  
= 総陽性スコア / (総陽性スコア + 総陰性スコア)
- 4) これらの判定を350物質で行い、全体の感度、特異度、balanced accuracy (BA) を予測精度の指標として算出した。

### C. 研究結果

#### 1. 分子記述子の選択が予測精度に与える影響

まず、gEPと統計学的に関連のある記述子を選択した場合、予測精度が向上するか否かを解析した（図1）。

CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、Wilcoxonの順位和検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ となった記述子（CE01：801種、NV01：170種；以下「 $p < 0.05$ 記述子」）、 $p$ 値が小さい順に並べた際の上位350記述子（以下「n350記述子」）を用いた。また、対照として、相関係数が0.99以上の記述子を削除した1889記述子（以下「 $r < 0.05$ 記述子」）を用いた。なお、1889記述子は量gEPで共通であるが、n350記述子は両gEPで異なる種類の記述子から構成される。

その結果、CE01ではBAが0.75程度の高い精度が得られたのに対して、NV01では、BAは0.56程度で分子記述子のみでは高い精度の予測は困難であった。また、両gEPにおいて、記述子の選択による感度、特異度及びBAの大きな変化は認められなかった。以上のことから、毒性と関連する記述子の選択は予測精度の向上に繋がらないことが示唆された。

#### 2. 生物活性データの利用が予測精度に与える影響

次に、分子記述子に加えて生物学的な情報を追加することで予測精度が向上するか否かを解析した。ただし、対象農薬について実験結果を利用することは困難であることから、本解析では、約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアの予測値（生物活性予測値）を利用した。

具体的には、分子記述子と生物活性予測値を組み合わせて、相関係数が0.99を超える変数の一方を削除した変数のセット（ $r < 0.99$ ）、Wilcoxonの順位和検定にてCE01又はNV01の陽性・陰性と有意な関連が認められた変数のセット（ $p < 0.05$ ）、並びにWilcoxonの順位和検定の $p$ 値が低い順に並べた際の上位350位の変数のセット（n350）を使用し、物質間のユークリッド距離を計算し、同様の手法でリードアクロスの予測を行った。使用した変数の数を表2に、リードアクロスの予測精度を図2（レーン2～4）に示した。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合（レーン1）に比べて程度はわずかであったが、生物活性予測値を利用することで感度、特異度及びBAのいずれも向上し、n350セットを用いた場合に最も高い感度が、 $p < 0.05$ を用いた場合に最も高い特異度が得られた。NV01においては、n350セットを用いた場合において、分子記述子のみを用いた場合に比べて感度の大きな向上（0.47→0.56）が認められ、BAも0.56から0.63に向上した。以上の結果から、PASSによる生物活性予測値を変数に追加することで予測精度が向上すること、さらにその際には対象とするgEPとの関連性が高い変数を絞り込んで利用することが精度向上に寄与することが示唆された。

### 3. 分子記述子及び生物活性予測値の組み合わせ手法の検討

肝毒性を対象としたリードアクロスの先行研究では、まず化学構造に基づいてソース物質候補を選択し、その後生物活性に基づいてさらにソース物質を絞り込むことで予測精度が向上する可能性が示されている。そこで本研究においても類似の手法の有用性を検討した。

具体的には、①分子記述子による物質間距離と生物活性予測値による物質間距離に基づいて物質を2次元空間にプロットし（被験物質は原点に位置）、原点からの距離に基づいてソース物質を選択する手法（以下「2次元リードアクロス」）並びに②分子記述子による物質間距離に基づいてソース物質候補を選択し、その後生物活性の一致度に基づいて最終ソース物質を選択する手法（以下「2段階リードアクロス」）の2つの手法の有用性を解析した。

2次元リードアクロスでは、表2に記載した変数を利用して2次元における被験物質とソース物質の物質間距離を計算し、各被験物質について、17種のソース物質を選定した。

2段階リードアクロスでは、まず、ソース物質の絞り込みに用いる生物活性を選定した。具体的には、各gEPの陽性・陰性に基づいて物質を2群に分け、Wilcoxonの順位和検定を行った。その結果、各gEPにおいて最も $p$ 値が小さかった生物活性、すなわちCE01では「Pyruvate dehydrogenase kinase 1 inhibitor」、NV01では「Cognition disorders treatment」を選択した。また、CE01及びNV01はChE活性の阻害に起因する可能性が高いことから、PASSに含まれるChE関連生物活性のうち、 $p$ 値が最も小さかった生物活性として、CE01では「Butyrylcholinesterase inhibitor」、NV01では

「Acetylcholinesterase stimulant」を選択した。PASSでは、生物活性予測値はPa-Piの-1~1の値として算出されることから、(Pa-Pi) ≥ 0の場合にその活性は陽性、(Pa-Pi) < 0の場合には陰性として判定し、判定が被験物質と一致したものをソース物質の候補とした。

ソース物質の選択は、まず前述の「r < 0.99記述子」を利用して計算物質間相対距離に基づいて順位付けを行い、その後第1近傍から順に、被験物質と生物活性予測が一致した物質のみを17物質選択した。リードアクロスによる毒性判定は、前項1と同様にWS ruleを用いて行った。

得られた結果を図2に示した。CE01については、2次元リードアクロスにおいてp < 0.05セット及びn350セットを用いた場合に（レーン6、7）、これまでの方法に比べて高い予測精度が得られ、感度は0.71、特異度は0.88、BAは0.80であった。一方、2段階リードアクロスでは、いずれの変数を用いた場合もBAは0.75程度と高いものの、分子記述子のみを用いた場合と同程度であり、生物活性予測値の利用に伴う精度向上は認められなかった（レーン1 vs. 8, 9）。NV01については、n350セットの変数を用いた2次元リードアクロスでは（レーン7）、分子記述子のみを用いた場合に比べるとよい精度は得られたが、分子記述子と生物活性予測値を併せて行った場合（レーン4）と同程度の精度であった。また、2段階リードアクロスでは分子記述子のみを用いた場合に比べて精度の向上は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、農薬のラット90日間反復投与毒性試験結果を利用して、神経毒性と関連する2つのEPを対象としたリードアクロス予測における生物活性予測値の有用性を検討した。その結果、化学構造情報を反映する分子記述子に加えて、市販のソフトウェアで計算可能な生物活性予測値を用いることで予測精度の向上が認められること、また生物活性予測値を利用する際には毒性学的な関連性を考慮した上で変数の絞り込みが必要であることが明らかになった。

本研究で用いたPASSでは、約8000種の生物活性を予測可能であるが、入力情報は化学構造情報であり、分子記述子計算ソフトと同様である。しかしながら、生物活性予測値を追加して変数を選択することでリードアクロスによる予測精度はCE01及びNV01のいずれにおいても上昇した。この理由は明確ではないが、PASSに利用されている生物活性予測モデルを介することで、分子記述子とは異なる特徴をもった変数が創出されたと考えられる。

さらに、p < 0.05セットとn350セットの予測結果を比較すると、NV01においてはn350で高い予測精度が得られた。分子記述子のみを用いた場合には変数選択の効果は認められなかったこととは異なる結果ではあるが、p < 0.05セットでは生物活性予測値の変数数が物質数に対して過剰と考えられたことから、より毒性EPとの関連が強い変数の選択が精度向上につながった可能性が考えられる。

対象とした2つのEPで比較すると、いずれの変数セットを用いた場合も、NV01に比べてCE01で予測精度は高かった。この理由として、CE01に含まれる所見はいずれもChE阻害であり、構造的に類似した物質が陽性になると考えられること、また、用いたデータセットの中にChEを阻害することが知られている有機リン系農薬が多く含まれていたことなどから、CE01では、化学構

造やそれに基づく生物活性予測値を利用したリードアクロスによる予測が比較的用意であったのではないかと考えられる。一方で、NV01に含めた所見は、ChE阻害や神経毒性と関連するとは考えられるが、化学物質による間接的影響を反映するEPであることから、このことが予測精度の低さにつながったと考えられる。しかしながら、反復投与毒性試験で認められる所見の多くは間接的なものであり、Adverse Outcome Pathwayのスキームで考えると、molecular initiating event (MIE)ではなく、key event (KE)やadverse outcome (AO)の予測が、動物実験代替法や新たなNew Approach Methodology (NAM)の開発には重要である。したがって、今後、変数の追加や予測条件のさらなる検討が必要と考えられる。

近年、リードアクロスのケーススタディが多く報告され、その中ではフィンガープリントなどを利用した構造一致性に基づいてソース物質の候補を選択したのち、被験物質との生物学的特徴の一致性によりソース物質を絞り込むことでリードアクロスの精度が向上することが報告されている。そのため、本研究においてもこの方法論に基づく2段階リードアクロスを実施した。しかしながら、CE01及びNV01のいずれにおいても予測精度の向上は認められず、精度は分子記述子のみを用いた場合と同程度かそれ以下であった。本研究では単一の試験結果に基づいて生物活性の特徴を判定し、ソース物質の絞り込みを行っていたことが原因となっている可能性は否定できないことから、今後は複数の変数を利用した絞り込みを検討する必要がある。

一方で、本研究では、分子記述子と生物活性予測値を同程度のウェイトで利用することを目的として、両者の値に基づいて2次元に物質をプロットすることで被験物質からの距離を算出し、それを類似度の指標としてソース物質を選択する二次元リードアクロスを実施したところ、CE01では用いた条件のうち、最も高い予測精度が得られた。NV01でも変数の数を350に絞ることで分子記述子のみを利用した場合に比べて高い予測精度が得られた。精度が向上した正確な理由は不明であるが、上述のようにリードアクロスにおいては生物学的特徴の利用が有用であることが報告されており、2段階リードアクロスでは単一の試験のみを利用していたのに対してこの解析では多数の変数を利用したことが効果的であった可能性がある。今後、さらなる変数選択や異なるEPへの適応などを検討し、本結果の検証を行う予定である。

#### E. 結論

神経毒性と関連するEPのリードアクロスを利用した予測においては、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用が有用であることが示唆された。また、それらの変数を組み合わせて利用する際には、変数の選択手法や組み合わせ方の種類により予測精度に差が出る可能性が示された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし

表1 解析対象としたEP

gEP	CE01	NV01
含まれる 所見	中枢神経-ChE活性阻害-脳	外観/行動-一般状態-消瘦
	血液学-赤血球ChE活性-減少	外観/行動-一般状態-流涎
	血液生化学-ChE-減少	外観/行動-汚れ-下腹部
		外観/行動-汚れ-顔
		外観/行動-汚れ-尾
		外観/行動-眼-眼瞼痙攣
		外観/行動-筋肉-筋緊張低下
		外観/行動-筋肉-筋緊張亢進
		外観/行動-呼吸-その他
		外観/行動-呼吸-緩徐呼吸
		外観/行動-呼吸-呼吸困難
		外観/行動-筋肉-その他
		外観/行動-行動-異常発声
		外観/行動-行動-自発運動低下/鎮静
		外観/行動-行動-自発運動亢進/興奮
		外観/行動-行動-身づくろいの減少
		外観/行動-行動-歩行異常
		外観/行動-行動-その他
		外観/行動-姿勢-円背位
		外観/行動-姿勢-側臥位
		外観/行動-姿勢-腹臥位
		外観/行動-姿勢-その他
		外観/行動-神経系-筋攣縮
		外観/行動-神経系-振戦
		外観/行動-神経系-反応異常
		外観/行動-神経系-痙攣
		外観/行動-体温-低下
		外観/行動-被毛-粗毛
		外観/行動-被毛-立毛
		観-眼球突出
		眼-その他-瞳孔
		耳-その他-平衡感覚
		便-性状-軟便

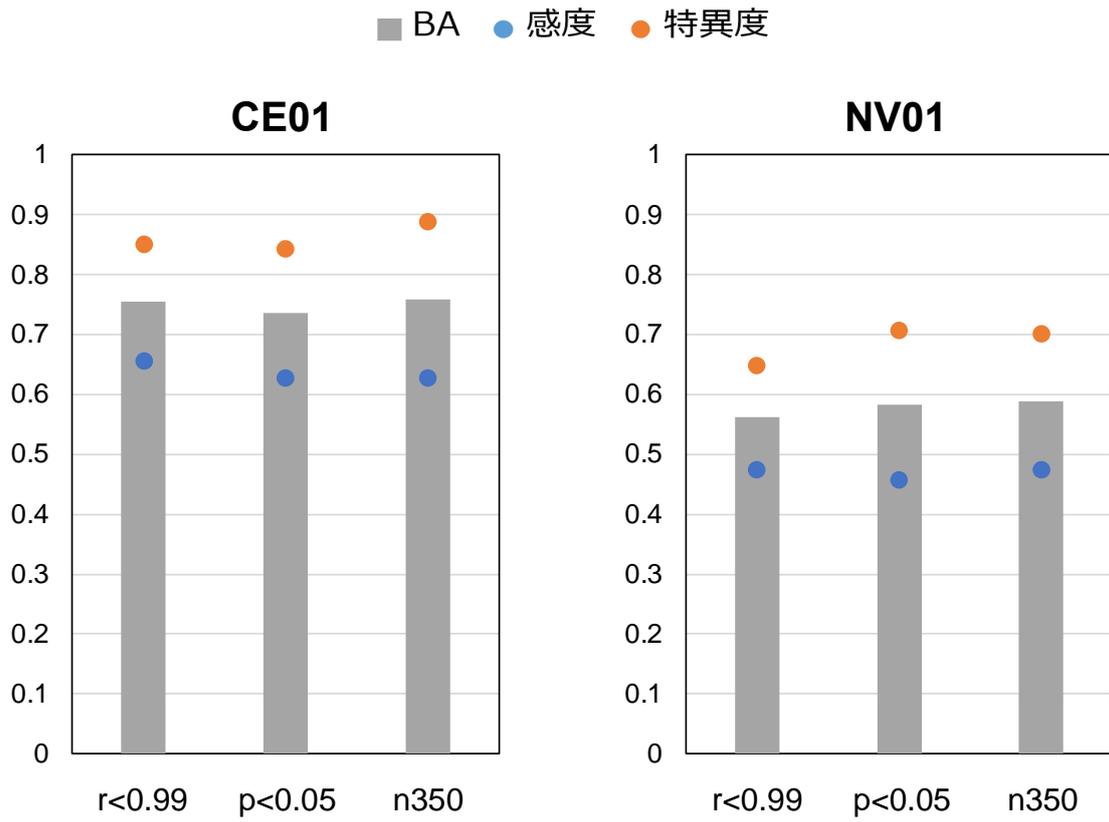
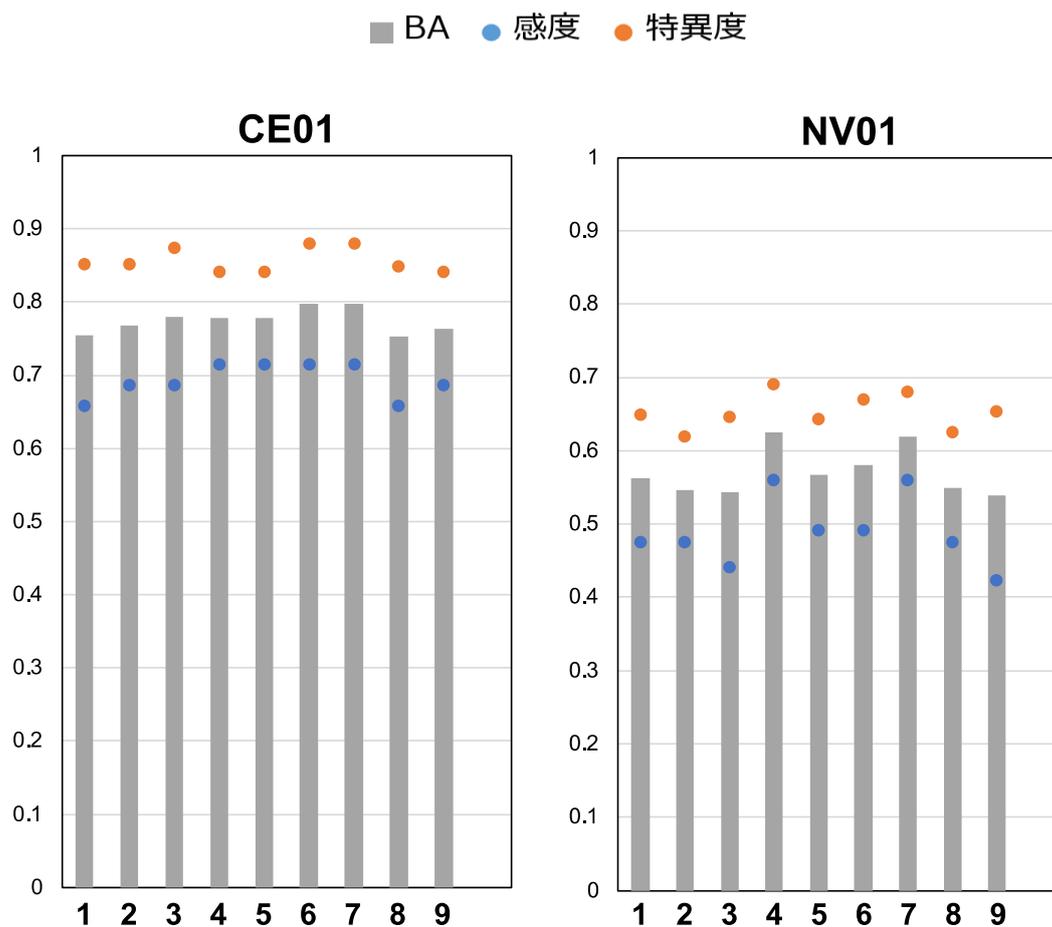


図1 分子記述子を利用したリードアクロスの予測精度



レーン	使用変数
1	分子記述子のみ ( $r < 0.99$ )
2	分子記述子+生物活性予測値 ( $r < 0.99$ )
3	分子記述子+生物活性予測値 ( $p < 0.05$ )
4	分子記述子+生物活性予測値 (n350)
5	2次元リードアクロス ( $r < 0.99$ )
6	2次元リードアクロス ( $p < 0.05$ )
7	2次元リードアクロス (n350)
8	2段階リードアクロス (最小p値)
9	2段階リードアクロス (ChE阻害関連)

図2 分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスの予測精度

表2 リードアクロスに利用した変数

変数セット	CE01			NV01		
	分子記述子	生物活性予測値	合計	分子記述子	生物活性予測値	合計
r<0.99	1926	8008	9934	1926	8008	9934
p<0.05	803	3813	4616	184	3006	3190
n350	56	294	350	29	321	350

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 6 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 客員研究員

### 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) に提案された試験法ガイドライン (TG) 443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) および GD151 (TG433 補助文書) の改定に関する情報を収集した。結果として、2025 年 4 月に TG433 改定案は採択されたが、*in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) に関する改定はなされなかった。

## 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) に提案された試験法ガイドライン (TG) 443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) の改定に関する情報を収集した。

## 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) により提示され、OECD の TG プログラム各国調整官作業班 (WNT) にて議論されてきた。2025 年 4 月に改定案が WNT にて合意されるまでの過程をまとめた。

### 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. TG の改定案

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た。

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。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 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。

TG433 改定案は 2024 年 11 月に ECHA より提示され、WNT で意見募集が開始された。主な改定点は、発達免疫毒性に関するコホート研究の記載変更に焦点が当てられ、DNT に関する変更はなかった。この理由として、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 の詳細を記載しておらず、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。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 TG および OECD/EU ガイダンス文書として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ものの、結果がない以上、TG の改定には至らなかったことによる。

2025 年 4 月の WNT 会議では、動物実験における被験物質のコード化についての議論がなされた。コード化により、評価者によるバイアスを減らし、再現性が増すとされている。コード化については、記載されている TG は少ないが、TG426 および TG443 には以下の記載がある。

TG426 のパラ 23 :

The animals should be observed outside the home cage by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise animal stress and observer bias, and maximise inter-observer reliability.

TG426 のパラ 29 :

The offspring (at least one pup/sex/litter) should be observed by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise bias and maximise inter observer reliability.

TG433 のパラ 50 :

All animals should be observed carefully by trained observers who are **unaware of the animals'** treatment status, using standardized procedures to minimize observer variability.

これらの議論や日本からも本研究班の安彦代表研究者などからも意見などを取り込み、WNT は TG433 の改定を 2025 年 4 月に採択した。

## C-2. GD151 の改定

2024 年 4 月に ECHA 主導で、EOGRTS に関する CRO との検討会議が開かれ、4 つの事例報告がなされた。

これを受け、OECD の WNT が 11 月に会議を開催し、4 事例について議論した。

2 事例は、被験物質の発生毒性を評価するために重要な、物質適用が適切な段階でなされたのかの議論であった。

次の事例は、一世代だけでなく、二世世代まで拡張すべき事例であった。

最後に、DNT に形態観察を導入したという事例であった。MRI（磁気共鳴画像法）を用いることにより、工程による影響の削減、観察者のばらつきを減らせる利点が挙げられている。

これらの内容をもとに、GD151 は来年の改定に向け、WNT で議論が続くことになった。

## 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、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える。

## 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 が 2025 年 4 月に改定された。ただし、*in vivo* DNT に関する改定はなかった。

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

1. 小島肇夫: 動物実験代替法の歴史、Cosmetic Science、2024、10、56-63.
2. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, Arch Toxicol, 2024 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
3. Kojima H., History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test

methods in Japan. Genes Environ. 2025;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.

### H-2. 学会発表

1. 三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、榎形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕：医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
2. 小島肇：動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷、第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13)
3. Hajime Kojima, International progress on the development and regulatory application of NAMs/Alternatives Symposium on Innovative Collaboration in Toxicology Alternative Methods in Shanghai (2024.11.2)
4. 小島肇：JaCVAM の成果と今後の課題、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

## 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

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
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
Zou, X., Tang, Q., Ojiro, R., Ozawa, S., Shobudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M	Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal exposure to imidacloprid.	Chem. Biol. Interact.	399	111145	2024
Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojiro, R., Ozawa, S., Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M	Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant.	Env. Toxicol.	40(1)	30-53	2025

<p>Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojiro, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.</p>	<p>Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats.</p>	<p>Acta Histochem.</p>	<p>126(8)</p>	<p>152204</p>	<p>2024</p>
<p>Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P.</p>	<p>Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology.</p>	<p>Arch Toxicol.</p>	<p>98(8)</p>	<p>2299-2308</p>	<p>2024</p>

Kojima H.	History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan.	Genes Environ.	47(1)	3	2025
-----------	--	----------------	-------	---	------

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6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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験センター薬理部・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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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6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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験センター薬理部・室長

(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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。

令和7年 4月 30日

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6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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学研究科・特任教授

(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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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 山 本 芳 彦

次の職員の令和6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) 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。

令和7年4月1日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北工業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 渡邊 浩文 【公印省略】

次の職員の令和6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

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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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6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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 農学研究印 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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。

令和7年5月14日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 今井 康之

次の職員の令和6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

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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。

令和7年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和6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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部 ・ 客員研究員

(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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。