

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

## 分担研究報告書

分担研究課題：「吸入曝露実験の実施」

研究分担者	西村 拓也	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	六鹿元雄	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	藤原恒司	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部

### 研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

本分担研究では、この発達期DNTにおける目的の達成に向け、生後発達期の雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施した。その結果、吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度2および20ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 $2.50 \pm 0.24$  (2.66～1.97ppm)、 $20.26 \pm 0.35$  (20.74～19.84ppm)であり、ほぼ目標濃度で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は $0.00 \pm 0.00$ ppmであった。

## A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、化学物質曝露による胎生期あるいは生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害作用と説明される。神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、この評価に向けた、より迅速で、低コスト、かつ省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。特に発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな課題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群(SH)に関連する動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてモデル化学物質の吸入曝露により、成熟後にDNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳の海馬領域の網羅的遺伝子発現変動解析により、それらの影響をシグナルネットワークとして検出してきた。これら独自技術を用いることで、発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

本分担研究では、この目的の達成に向け、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常を誘発したモデル動物作出のため、生後発達期(幼若期、2週齢)の雄性マウスを対象とし、先行研究での条件に基づいた22時間/日×7日間反復曝露実験(3用量、3群構成、各群8匹)を実施する。

## B. 研究方法

### 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

雄性マウス(幼若期、2週齢)を対象とした22時間/日×7日間反復曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施した。実験スケジュールの概要は図1に示した。幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を行った。

今年度(令和5年度)のモデル物質はキシレン(xylene)；分子量：106.17、CAS No.：1330-20-7)とし、試薬として下記のものを使用した。

・キシレン(カタログ番号：244-00081、特級、85% (o-, m-, p-キシレンの含量)、ロット番号：ACG4493、富士フィルム和光純薬(株))

キシレンの曝露濃度は先行研究に基づき、2および20 ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が0.20 ppm(→H31年1月17日以降、0.05 ppmに変更された)であることから、この指針値のそれぞれ40および400倍程度ということとなる。

### <曝露濃度設定根拠>

1)キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.20 ppm(→H31年1月17日以降、0.05 ppmに変更された)である。これを受け、先行研究ではSHレベルの10倍程度の濃度(2 ppm)を含む吸入曝露群を設定し実験を実施しており、今回の実験での低濃度とすることで、先行研究におけるデータとのブリッジングを考慮した。2)また、同様に先行研究にて文献調査した、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験結果から、ラットの3ヶ月間(6時間/日)吸入曝露(m-キシレン：100、50、0 ppm)では、50 ppm以上の濃度で痛覚の感受性増加が観察され(Korsakら、1994)、またラットの90日間(6時間/日)吸入曝露(o-キシレン：78、0 ppm)では、56日目に1例の死亡が観察(Jenkinsら、1970)されている。なお、ラットの13週間(6時間/日)吸入曝露(o-キシレン：810、460、180、0 ppm)では、異常なしとする報告がある(Carpenterら、1975)。情動認知行動解析を考慮すると、マウスではなくラットの場合の報告ではあるが、痛覚の感受性増加が認められる50 ppm以下の濃度が望ましく、また、生後発達期への曝露であることも考慮し、「我々の先行研究における濃度設定において観察された影響、および文献調査に基づき、長期吸入曝露実験においても一般状態に異常が認められない条件」、という観点から、本実験でのキシレンの濃度設定を行った。

この実験部分は、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の齊藤洋克研究員、菅康佑氏、横田理主任研究官の協力を仰いだ。

### <ガスの発生方法と濃度測定方法>

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、キシレンをバブリングし気化させる方法により行った。

キシレン濃度は、捕集管（チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号：080150-0532、柴田科学（株））を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ22時間とした。捕集管の曝露1回当たりの使用本数は、対照群および投与群は各濃度とも2本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ30NⅡおよびMP-Σ300NⅡ、柴田科学株式会社製）を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したキシレンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を10mL容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フィルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mLを正確に加え、蓋をしたのち、およそ30分に1回上下に振とうしながら2時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液2mLを10mL容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液（トルエン-d<sub>8</sub>の二硫化炭素溶液、4mg/mL）50μLをマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

検量線用の標準溶液は、o-キシレン（純度98%以上、東京化成工業株式会社製）、m-キシレン（純度99%以上、同社製）およびp-キシレン（純度99%以上、同社製）を混合し、二硫化炭素で適宜希釈して0.5~100μg/mLの混合溶液として調製した。これらの溶液2mLに内部標準溶液50μLを添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

測定溶液および標準測定溶液を測定用バイアル（0.2mL MS-SPEC Sc-Vial, Thermo Fisher Scientific 社製）に移し、キャップ（PTFE/シリコーン、スリット入り、同社製）をしてガスクロマトグラフ（7890A GC&5975C MSD, Agilent Technologies 社製）を用いて、以下の分析条件により測定した。

カラム：DB-5MS（20m×0.18mm、膜厚 0.36μm、Agilent Technologies 社製）  
オープン温度：40°C（3.5分保持）-20°C/min-150°C

（5分保持）

注入口温度：220°C

注入方式：スプリット

スプリット比：20：1

キャリアーガス：N<sub>2</sub>

流速：0.27 mL/min（定流量）

定量イオン（m/z）：91（キシレン3種）、98（トルエン-d<sub>8</sub>）

得られた各キシレン及びトルエン-d<sub>8</sub>の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件ではm-およびp-キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比1:1の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値およびo-キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の六鹿元雄室長、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

#### （倫理面への配慮）

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

#### C. 研究結果及び考察

##### 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

令和5年度（今年度）は予定通りキシレン（0、2、20 ppm）（2および20 ppmはそれぞれ現在の指針値の40および400倍程度の濃度）について、雄性マウス（幼若期、2週齢）を対象とした22時間/日×7日間反復曝露（3用量、3群構成、各群8匹）を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度2および20 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、2.50±0.24（2.66~1.97 ppm）、20.26±0.35（20.74~19.84 ppm）であった（図2）。

#### D. 結論

令和 5 年度 (今年度) は、キシレンについて、情動認知行動解析のための吸入曝露実験として、目標曝露濃度下、22 時間/日×7 日間反復曝露を実施した。その結果、それぞれ目標曝露濃度にて、マウスに安定して吸入曝露することができた。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (抜粋)

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota; A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system, J Appl Toxicol, 44(5), 784-793, doi: 10.1002/jat.4584. Epub 2024 Jan 23.

西村拓也、ICH-S11 ガイドラインの WoE アプローチにおける考慮事項, Pharm Tech Japan, 40(3)、103-105、2024

西村拓也、西村次平、伊藤かな子、高橋祐次、医薬品開発における非臨床安全性評価の変遷、日本獣医史学雑誌第 61 号、41-58、2024

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡：細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向、食品衛生研究, 2023, 73 巻 12 号, [ISSN: 0559-8974]

##### 2. 学会発表 (抜粋)

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17-20 July 2023.

Takuya Nishimura, Kazushige Maki, Kiyoshi Kinoshita, Mutsumi Suzuki, Takahiro

Nakazawa, Misaki Naota, Fumito Mikashima, Yoko Hirabayashi; The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan, 2024 Society of Toxicology, Salt Lake City on 10-14 March 2024

#### G. 知的財産所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

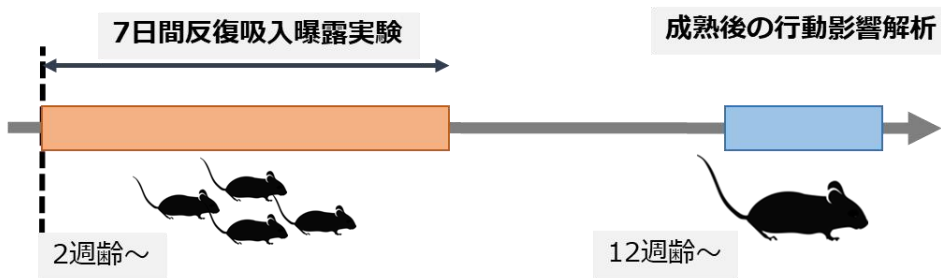
なし

##### 3. その他

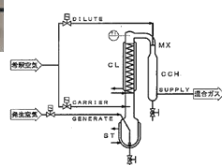
なし

【実験スケジュールの概要】

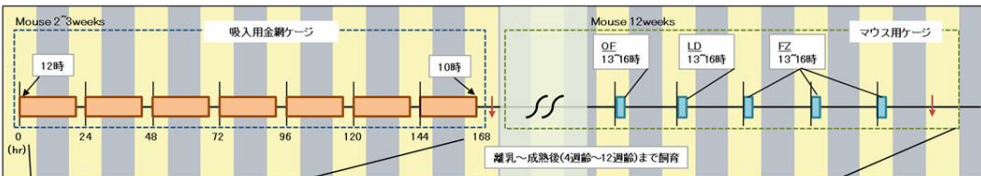
Control: 0ppm  
 Xylene: 2 and 20ppm  
 ※ (室内濃度指針値 : 0.05ppm)  
 Animals: C57BL/6N mice



ガス発生装置と横層流方式吸入曝露チャンバー



22時間/日×7日間 幼若期吸入曝露スケジュール



2-3weeks inhalation



哺乳期であるため  
 幼若期マウス(産仔)と  
 母マウスを吸入網ケージに収容

成熟後に情動認知行動解析

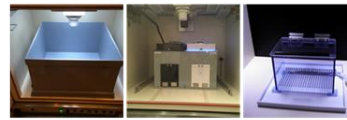
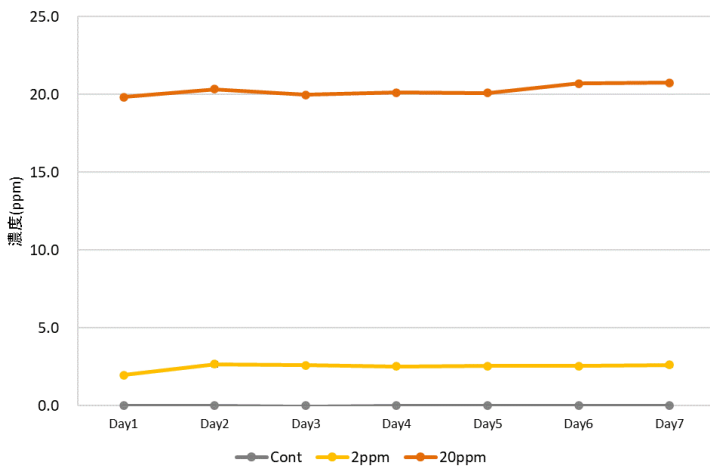


図1 実験スケジュールの概要

キシレン曝露濃度の推移



1週間のキシレン曝露平均

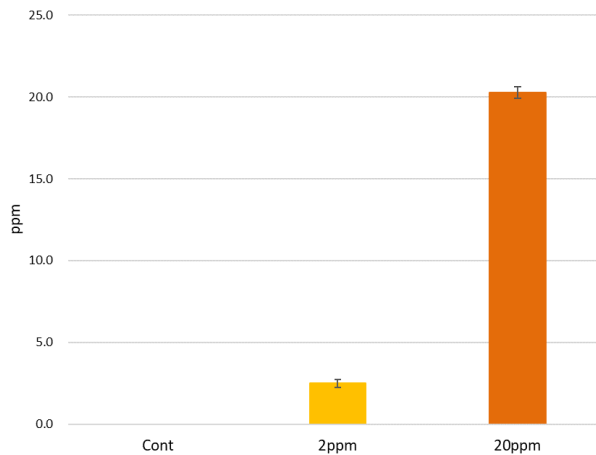


図2 キシレン曝露濃度の測定結果：情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露（平均値±標準偏差）