

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：「情動認知行動解析と神経科学的物証の収集」

研究分担者 齊藤 洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

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。

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、この目的の達成に向け、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を検討した。令和5年度(今年度)は予定通り、キシレン(0、2、20 ppm)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である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。そして、マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を実施した。その結果、キシレン曝露群(2、20 ppm)において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶あるいは音-連想記憶の低下(学習記憶異常)が認められた。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後(遅発性)の影響として、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常を誘発することが確認され、キシレンの生後脳発達への有害性が示唆された。

A. 研究目的

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。ヒトを含む哺乳類において、発生-発達期は神経シグナルの厳密な制御の下、脳の神経回路網が形成される重要な時期である。そのため、外因性の化学物質の曝露によって、その制御シグナルがかく乱され、発達中の神経毒性や、成熟後の脳高次機能への悪影響が懸念される。

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であり、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ている。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。

本分担研究では、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を把握する事を目的とし、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。

B. 研究方法

生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、キシレン吸入曝露による情動認知行動解析：

生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究の条件に基づいた22時間/日×7日間反復曝露のプロトコルにより実施した。曝露濃度は、先行研究に基づき、長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度として設定した。また、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実施した。この時期は、シナプスの刈り込みによる神経回路の調整がなされる時期と考

えられている。

吸入曝露終了後、マウスが成熟後(12週齢時)に自発運動量、情動行動、学習記憶能に着目し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験からなる行動試験バッテリーを実施した。

(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

令和5年度(今年度)は予定通り、キシレン2および20ppm(それぞれ現在の指針値の40倍、400倍程度の濃度)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコルにより実施し、成熟後(12週齢時)に情動認知行動を3種類の試験により解析した。行動解析の結果、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、コントロール群と比較して、キシレン曝露群において有意な差は認められなかったが(図1、2)、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、キシレン2ppm曝露群では音-連想記憶の低下が、キシレン20ppm曝露群では空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められた(図3)。すなわち、生後発達期におけるキシレンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に学習・記憶に影響を与えることが示唆された。

D. 結論

令和5年度(今年度)、キシレン(0、2、20ppm)について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、キシレン2ppm曝露群においては条件付け学習記憶試験における音-連想記憶の低下が、キシレン20ppm曝露

群においては空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められ、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。本行動試験バッテリーでの変化の比較を、コントロール群における各試験項目の平均値を100%とした場合の、曝露群における平均値の逸脱度を示すレーダー図として示す(図4)。

今回の結果から、キシレンの生後発達期における曝露により、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常が誘発されることを確認できたため、今後、生後発達期DNTの分子機序解明に向け、神経樹状突起・神経細胞・グリア細胞マーカー等を用いた、神経科学的所見による中枢影響の確認を行う。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito H, Yokota S, Kitajima S. Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem* 125(5), 152046, 2023, doi: 10.1016/j.acthis.2023.152046.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci* 17, 1239808, 2023, doi: 10.3389/fnins.2023.1239808.

齊藤 洋克 : 農薬等の化学物質曝露によって生じる情動認知行動毒性, *Jpn J Clin Toxicol*, 37, 70-75, 2024

齊藤 洋克, 北嶋 聡 : 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, *化学物質と環境 : 化学物質と環境との調和をめざす情報誌*, 184, 3-6, 2024

2. 学会発表 (抜粋)

齊藤洋克 : 発生-発達期の化学物質ばく露による情動認知行動毒性の検出と課題 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19、横浜)

齊藤洋克 : ネオニコチノイド系農薬ばく露による雄マウスの情動認知行動解析 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21、横浜)

齊藤洋克 : 農薬等の化学物質ばく露によって生じる情動認知行動毒性 第45回日本中毒学会総会・学術集会 (2023.7.15、さいたま)

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

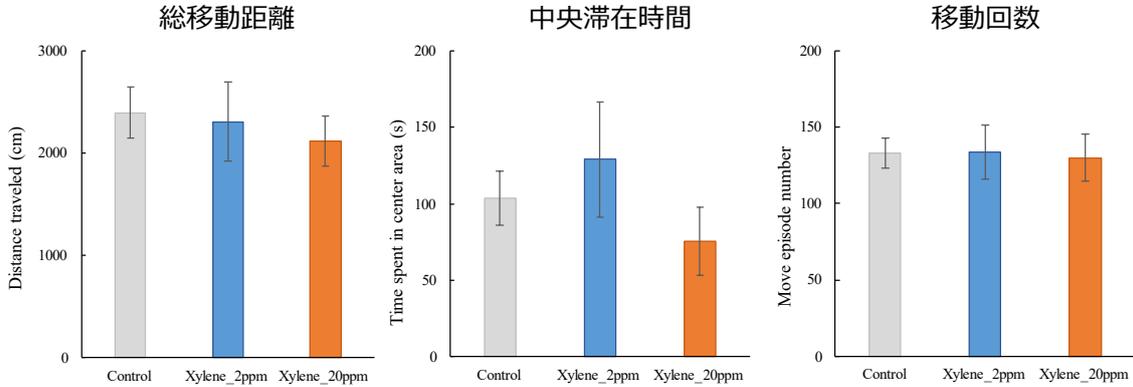
**22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露
オープンフィールド試験結果**

測定時間: 10分

OF

検定項目

- ・ OF-DIS: 総移動距離
- ・ OF-C-TIME: 中央滞在時間
- ・ OF-N: 移動回数

N=8, Mean ± S.E., P value (Dunnett's test)
p<0.05*; p<0.01** vs Control

● 有意差なし

図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

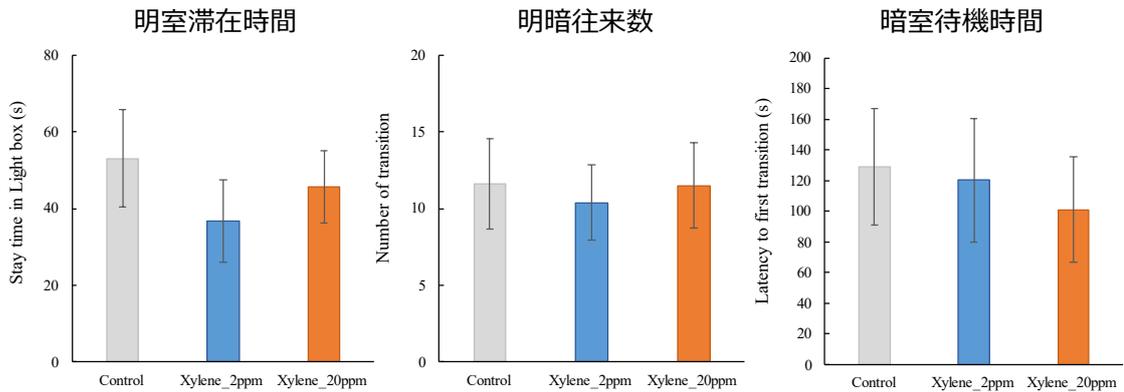
**22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露
明暗往来試験結果**

測定時間: 5分

LD

検定項目

- ・ LD-L-TIME: 明室滞在時間
- ・ LD-N: 明暗往来数
- ・ LD for L: 暗室待機時間

N=8, Mean ± S.E., P value (Dunnett's test)
p<0.05*; p<0.01** vs Control

● 有意差なし

図 2. 明暗往来試験の結果まとめ

22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露

条件付け(FZ1)、翌日以降に空間-連想記憶試験(FZ2)と音-連想記憶試験(FZ3)の結果

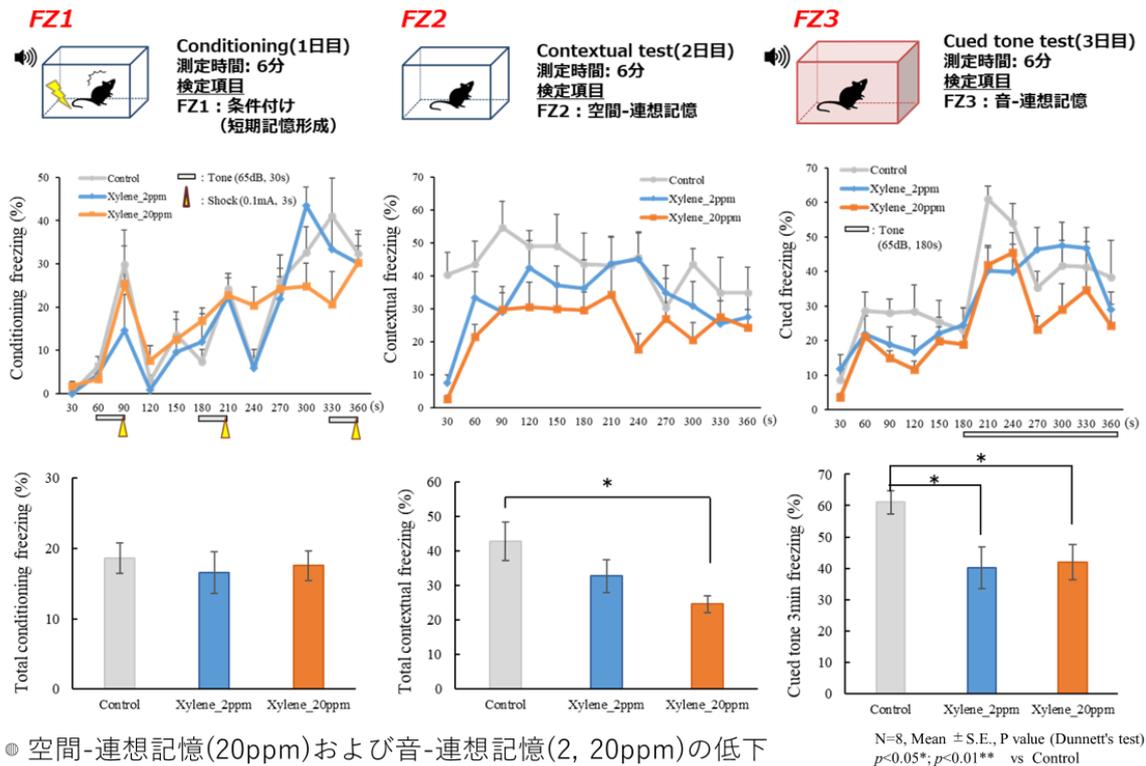


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

吸入曝露による情動認知行動解析を元に行動様式の逸脱度 (平均値) を示すレーダー図(Control=100%)

(キシレン 2および20ppm 22時間7日間吸入曝露による情動認知行動影響のまとめ)

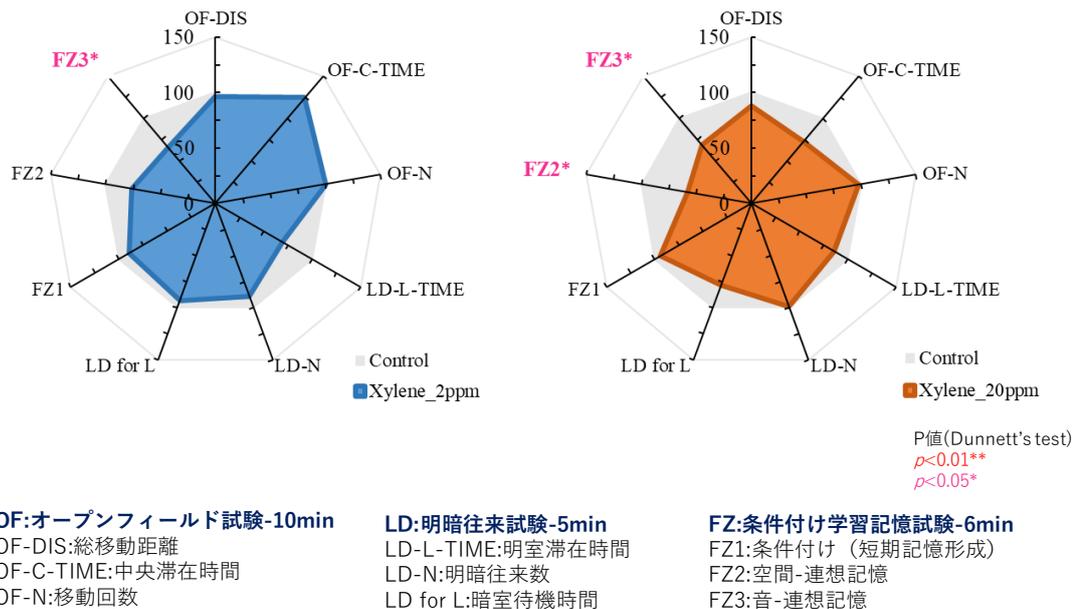


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)