

研究要旨

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

本研究では、OECDと共有している化学物質リストをもとに、インビトロで構造と機能の両側面から神経毒性を検討した。神経系の構造に対する毒性に関しては、OECDで議論されているリストから発達神経毒性が懸念される35化合物を選定し、ヒトiPS細胞の増殖や分化を指標に毒性評価を行った。その結果、90%近くの化合物が増殖を抑制し、調べた全ての化合物が分化を抑制することを明らかにした。次に、機能面として、OECDで議論されているリストから発達神経毒性が懸念される39化合物を選定し、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行った。その結果、およそ80%の化合物でスパイクやネットワークバーストの変動が認められた。

得られた細胞毒性データはOECDで進行中のバリデーションのデータと比較するとともに、動物実験によるin vivoデータと検証する。特に、インシリコにおいて定量的構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチ等の手法を用いて、統合な神経毒性評価法の構築を目指す。

最終的に、OECDや米国EPAを中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験(TG424)や発達神経毒性試験(TG426)を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立する。

A. 研究目的

神経毒性評価は、新規化合物の安全性評価において必要不可欠である。現行の神経毒性ガイドライン(OECD TG424及びTG426)は多くの動物と費用を必要とするため、より正確で予測可能な評価法を確立する必要がある。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスをin vitroで評価するために、神経毒性評価を構造と機能に分けて、ヒトiPS細胞を用いる評価を行った。

本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。特に、ヒトiPS細胞、iPSニューロンの評価を活用し、ヒトにおける予測性等を検証することにより新たな神経毒性評価法を開発する。

B. 研究方法

1. ヒトiPS細胞株の培養

ヒトiPS細胞株253G1は、TeSR-E8培地(Stem Cell Technologies)にてフィーダーフリー条件で培養した。コーティング剤にはES細胞用のマトリゲル(BD Biosciences)を用いた。

2. MTS アッセイ

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

3. ATP アッセイ

ルシフェラーゼ法により測定した。

4. ヒトiPS細胞から神経細胞への分化

神経分化法はDual smad 阻害法を用いた(Chambers et al. Nat Biotechnol 2009)。BMPシグナル阻害剤LDN193189(Wako)及びActivinシグナル阻害剤SB431542(Wako)によりiPS細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞、さらに神経細胞へと分化させた。

5. 分化細胞における遺伝子発現の評価

TRIzol試薬(Thermo Fisher)を用いて分化細胞よりRNAを抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen)を用いて反応液を調製し、ABI PRISM 7900HTを用いてqPCRを行った。神経分化マーカーPax6などの発現量により評価を行った。

6. MEAシステムによる神経活動の評価

昨年度に引き続き、ヒトiPS細胞由来神経細胞は市販のX Cell Science社の細胞を、多点電極アレイ(MEA)システムとしてMED64-PRESTO(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いて、神経ネットワーク機能を評価した。計測までの細胞播種・細胞培養は会社から提供されたプロトコールに従った。

化学物質暴露は神経ネットワークが成熟した播種60日以降に実施した。培養60日以降に、化合物を

各 5 濃度ずつ累積添加し、その投与前後での神経活動データを取得した。投与前後の記録時間は 10 分間、化合物曝露時間は 10 分間とした (図 1)。なお、活性化電極 (1 分間に 5 スパイク以上観察された電極) が半数の 8 個以上存在するウェルに化合物を累積添加した。計測データは Spike Extract for PRESTO、Burst Analysis for Advanced (いずれもアルファメッドサイエンティフィック社) を用いて解析した。本年度は OECD、ToxCast の両方で共有している化学物質のうち 39 化合物 (昨年度のピレスロイド系農薬 2 種類シペルメトリンおよびデルタメトリンを含む) に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 μ M とした。なお、DNT 陰性対照化合物として DMSO、アセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、サッカリン、ソルビトール、ピクロトキシン (1~100 μ M) を用いた。

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

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞の増殖能に対する影響評価

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

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

2. ヒト iPS 細胞の神経分化能に対する影響評価

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

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

3. MEA システムによるヒト iPS 細胞由来神経細胞の神経活動の評価

ヒト iPS 細胞由来神経細胞に関しても、神経活動を MEA システムで記録して機能面での神経毒性の評価を行った。特に、OECD のグループは農薬を用いて慢性毒性評価を行なっているため、我々は OECD、ToxCast の両方で共有している 39 化合物の急性毒性の発火データを取得した。

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

D. 考察

本研究では、OECD と共有している DNT 化合物のリストから、代表的なものを選定し、評価した。単独の手法では毒性予測に限界があることから、いくつかの手法を組み合わせる必要があると考えられる。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、我々は化学物質の毒性をインビトロで構造と機能に分けて検証した。

神経系の構造に対する毒性に関しては、OECD と共有している DNT 化合物のリストから選定した代表的な 35 化合物を暴露したヒト iPS 細胞を用い、増殖や分化能を検証することでさまざまな種類の化合物に対する神経毒性評価の可能性を示唆した。さらにヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりもヒト iPS 細胞の方が高感度であったことから、未成熟な細胞ほど化学物質に対する感度が高いと考えられる。この観点から鑑みて、胎生期モデルであり、未分化状態にあるヒト iPS 細胞は神経毒性評価において最も有効な細胞と考えられる。

神経系の機能面としては、ヒト iPS 由来神経細胞の神経ネットワーク機能を電気生理学的に検出可能な MEA システムを用いることにより急性神経毒性を評価した。本年度は OECD と ToxCast の両方で共有している 39 化合物で検証したところ、およそ 80%の化合物で急性神経毒性が検出可能であったこ

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

今後、構造面と機能面での評価の組み合わせや、カテゴリーアプローチなどの手法を基にしてインシリコとインビトロデータの統合化を図ることにより新たな神経毒性評価法を開発できることが期待される。

E. 結論

iPS細胞の増殖及び分化能およびMEAシステムによるiPS細胞由来神経細胞の神経ネットワークにより、OECD化合物の評価を行い、一定の予測性が得られることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

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

G. 知的所有権の取得状況 なし

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

図1. ヒトiPS細胞の増殖能による化学物質の評価

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

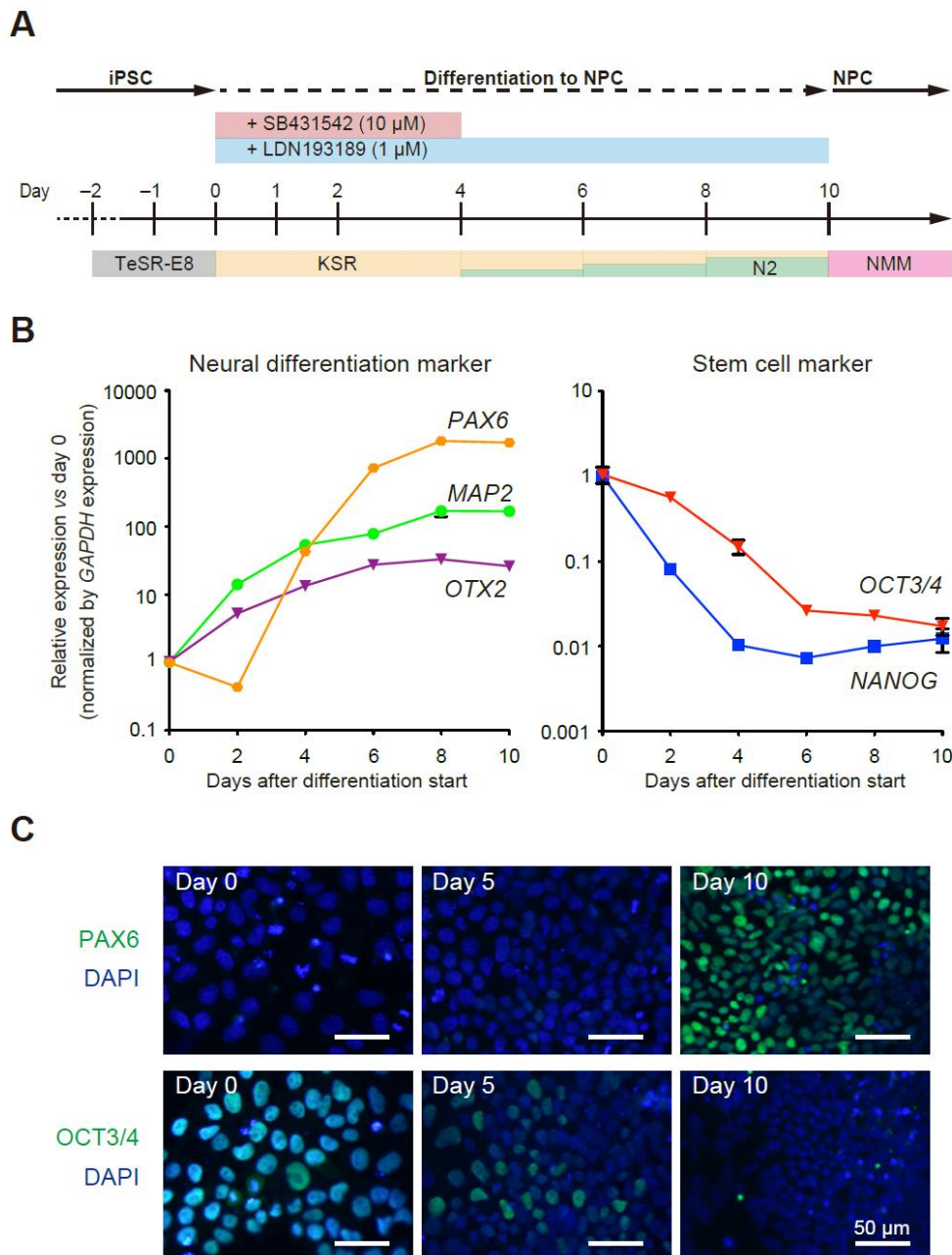


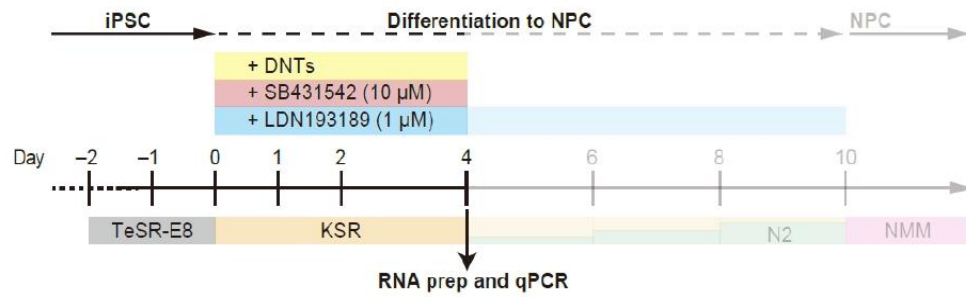
図2. ヒトiPS細胞（253G1株）の神経分化能

A) 神経分化のオーバービュー

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

C) PAX6とOCT3/4のタイムコース染色

A



B

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

図3. ヒトiPS細胞の神経分化能による化学物質の評価

A) 神経分化からqPCR解析までのオーバービュー

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

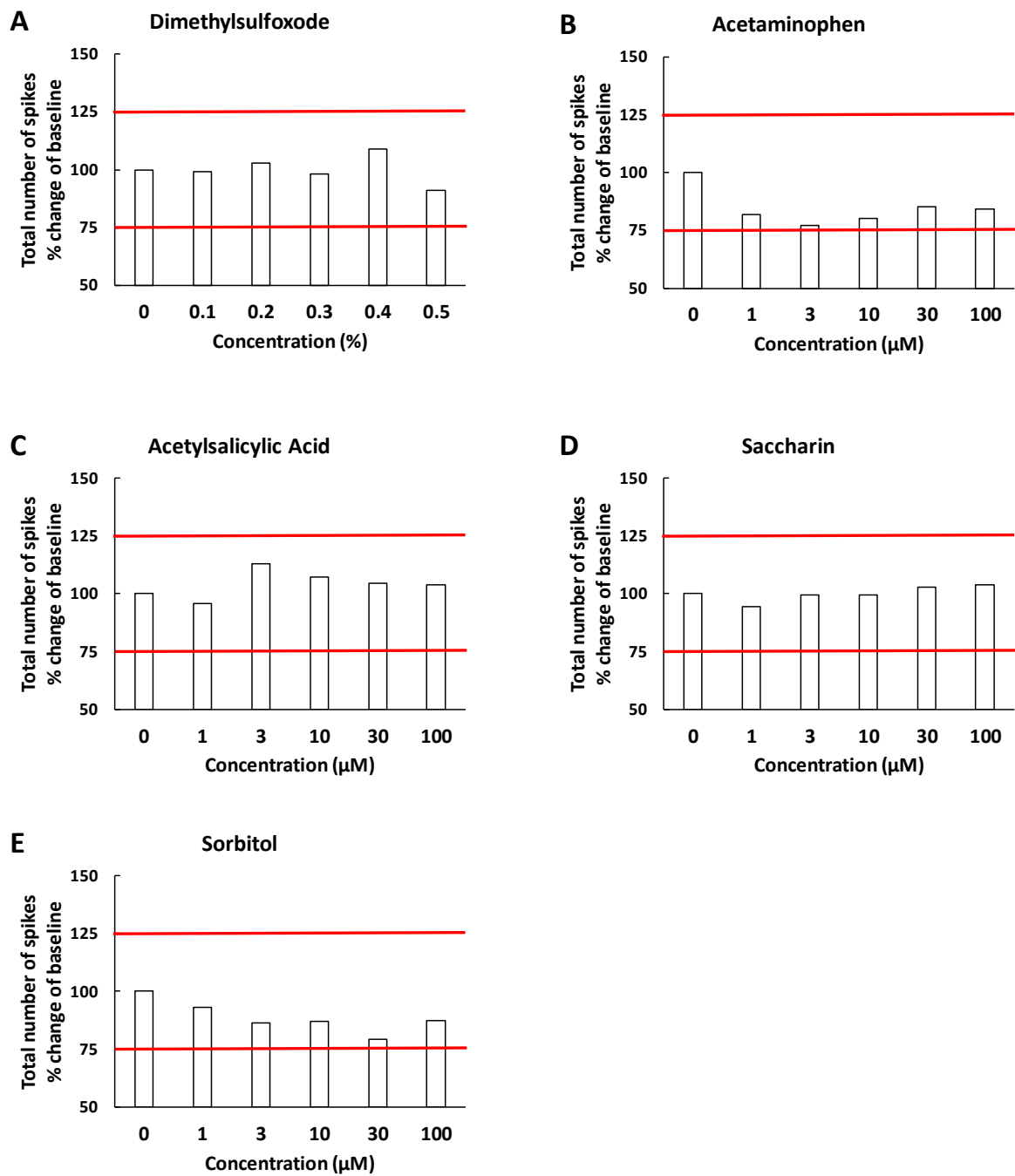
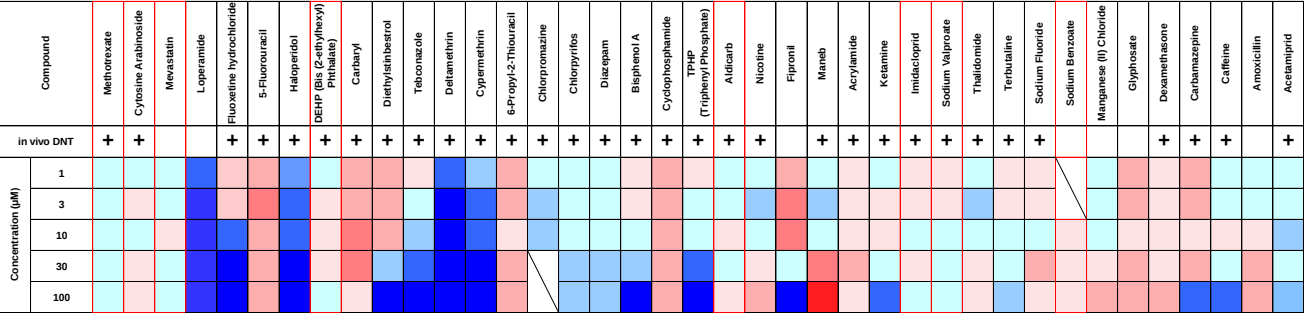


図 4. 神経毒性評価のための総発火数の閾値設定
75%から 125%を無毒性とした。

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

A



B

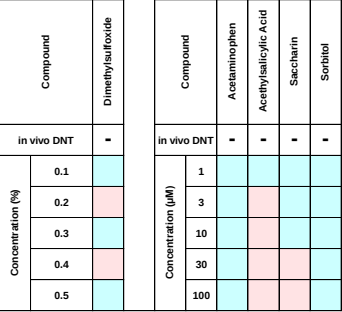


図5. ヒトiPS由来神経細胞のMEAによる化学物質評価 (総発火数のヒートマップ)
A) 被験化合物
B) DNT陰性化合物

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（19KD1003）

研究成果報告書

インビトロ神経毒性評価に用いる iPS 細胞の選別に関する研究

研究分担者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所・准教授

研究要旨

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を選別し、その分化能を評価することである。前年度までに選別した神経分化能の高かったクローンについては、その後の検討で PAX6 の発現があまり高くなく、本検討に適さないことが明らかになった。そこで、外胚葉分化後に RNA を採取した約 300 クローンについて、PAX6 の発現量の高いクローンを RNA-seq のデータを用いて選別した。その結果、PAX6 の発現量の高いクローン（HPS4016, HPS4115）が選別された。これらのクローンは、インビトロ神経毒性評価に有効である可能性が高いと考えられ、本研究にてこれまで実績のある 253G1 クローンとの株間差について比較検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を選別し、その分化能を評価することである。

B. 研究方法

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

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

（倫理面の配慮）

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。iPS細胞作製にあたり、“人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守しドナーさんの同意・協力を得て行

う。

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

1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞クローン 253G1, HPS4016, HPS4115 は、TeSR-E8 培地（Stem Cell Technologies）にてフィーダーフリー条件で培養した。コーティング剤には ES 細胞用のマトリゲル（BD Biosciences）を用いた。

2. ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化

神経分化法には、文献(Chambers et al., Nat Biotechnol 2009)に基づいて Dual smad 阻害法を用いた。BMP シグナル阻害剤 LDN193189（Wako）及び Activin シグナル阻害剤 SB431542（Wako）により iPS 細胞を神経外胚葉へと分化させた。

3. 分化細胞における遺伝子発現の評価

TRIzol 試薬を（Thermo Fisher）用いて分化細胞より RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit（Qiagen）を用いて反応液を調製し、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。神経（外胚葉）分化マーカー Pax6 などの発現量により評価を行った。

C. 研究結果

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

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

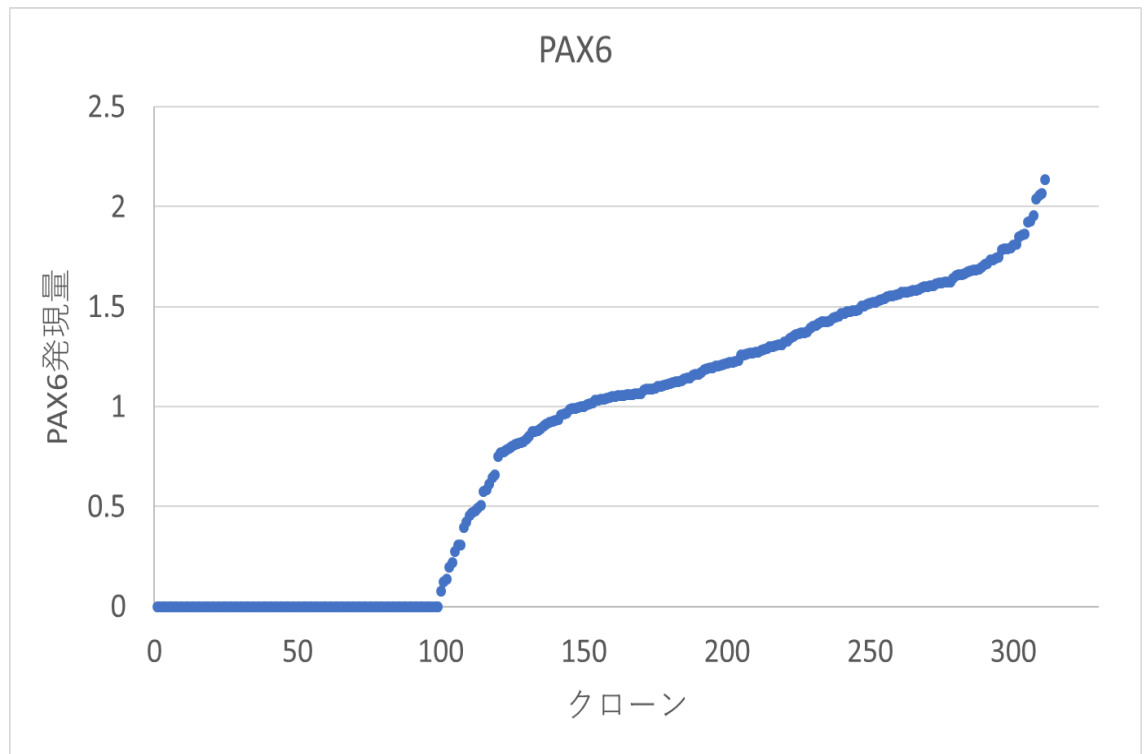


図 1 : 外胚葉分化させた iPS 細胞クローンの PAX6 発現量の分布

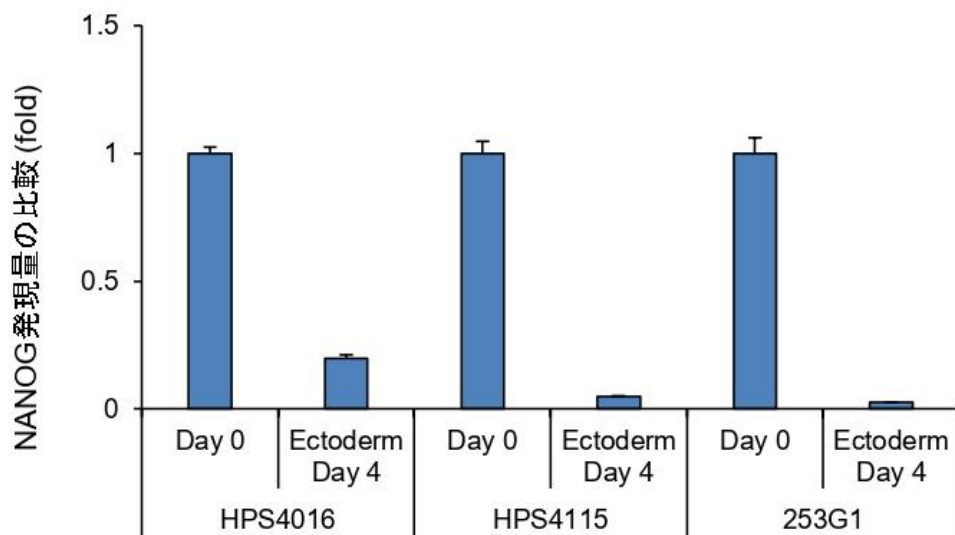
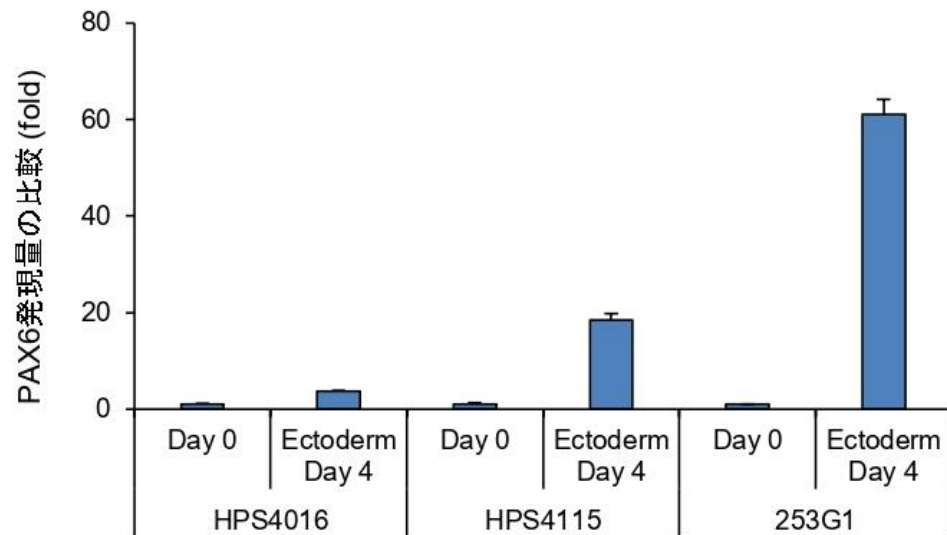


図 2：本研究で単離した iPS 細胞クローンとこれまでの神経毒性評価に用いられてきた 253G1 クローンとの外胚葉分化能の比較

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
(19KD1003)

研究成果報告書

分担課題: In vivo 毒性評価

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

研究要旨

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

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

妊娠SDラットに、酢酸鉛を2,000 ppm, 4,000 ppm、塩化アルミニウムを0.25%, 0.5%、エタノールを10%, 12.5%、グリホサートについては原体を15,000 ppm, 30,000 ppm、グリホサート製剤を1% (グリホサート3,800 ppm相当) の濃度で妊娠6日目から分娩後21日目まで飲水投与し、児動物に発達期曝露した。いずれの被験物質においても、最高用量群で母動物の体重、摂餌量、摂水量などに軽度な影響は見られたが、妊娠の維持と児動物への重篤な毒性は見られなかった。児動物を出生後21日目、77日目に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。

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

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

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

現在、グリホサートについても同様の検討を実施している。

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、OECDと共有している化学物質のリストをもとにインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。研究分担者は、動物実験による発達期の反復投与による神経毒性評価を行う。

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

令和元年度はヒトに対する重要脳発達障害物質である酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールについてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を免疫組織化学的に検索した結果、酢酸鉛とエタノールの発達期曝露で生後に始まる海馬の神経新生における顆粒細胞系譜のうち、神経前駆細胞を標的とした発達神経毒性を検出し、GABA 性介在ニューロンの傷害性を介した機序が推定された(図1、図3)。令和2年度においては、酢酸鉛、エタノール、塩化アルミニウムの神経新生障害機序を明らかにするために免疫組織化学的検索の追加解析および関連する神経新生関連因子に関して遺伝子発現解析を行い、障害機序の同定を行う。また、米国EPAにおいて発達神経毒性試験を実施して陰性評価が示されている物質であるグリホサートについて、ラットの発達期曝露による海馬歯状回の神経新生への影響を免疫組織化学的に検索する。

最終的にヒト iPS 細胞 (京大樹立株) を用いたインビトロデータと検証し、化学物質の物性情報から代謝などの情報も加味して毒性評価法の開発に寄与する。

B. 研究方法

妊娠 SD ラット (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群あたり 12-13 匹ずつとして、純水、酢酸鉛 2,000 ppm, 4,000 ppm、塩化アルミニウム 0.25%, 0.5%、エタノール 10%, 12.5%、グリホサート原体 15,000 ppm, 30,000 ppm、グリホサート製剤 1% (グリホサート 3,800 ppm 相当) の濃度で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで飲水投与した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。離乳時である出生後 21 日目 (PND 21) に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、海馬歯状回を採取して遺伝子発現解析に供した。各群 6 匹以上の児動物について CO₂/O₂ 麻酔下で血液または脳を採取し、被験物質濃度測定に供した。

残り半数の児動物は出生後 77 日 (PND 77) まです被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日目 (成熟後) に各群 10 匹以上の雄児動物について CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、海馬歯状回での遺伝子発現解析に供した。

PFA 灌流固定脳については大脳の bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞系譜の分化段階の指標 [GFAP, SOX2, TBR2, doublecortin (DCX), NeuN]、介在ニューロンの指標 [reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), somatostatin (SST), calbindin (CALB1), calretinin (CALB2)]、歯状回門部におけるアストロサイトおよびミクログリアの指標 [GFAP, IBA1]、細胞増殖活性の指標 (PCNA)、アポトーシスの指標 (TUNEL) および神経可塑性の指標 (FOS, ARC, COX2) に対する抗体を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。海馬歯状回の SGZ において単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門における単位面

積当たりの陽性細胞数を算出した。

メタカーン固定脳は、大脳の bregma の後方約-2.2 mm の 2 mm 厚スライスより生検パンチを用いて海馬歯状回部分を採取し、total RNA を抽出した。total RNA から cDNA を合成し、qRT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。

(倫理面の配慮)

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

C. 研究結果

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

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

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

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

経新生関連因子(コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など)に関して、遺伝子発現解析を行い原因分子の特定を行う。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

現在、グリホサート原体/含有製剤に関しては、神経新生に対する傷害性について検討を実施している。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

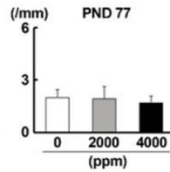
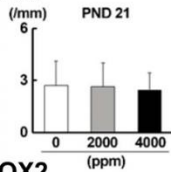
なし

神経新生マーカー

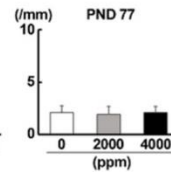
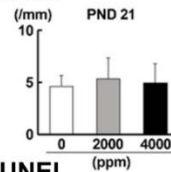
細胞増殖/アポトーシスマーカー

シナプス可塑性関連

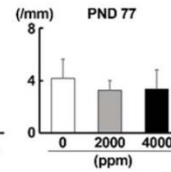
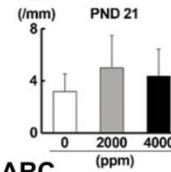
GFAP



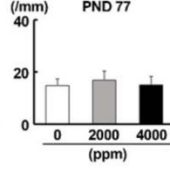
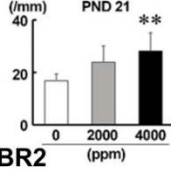
PCNA



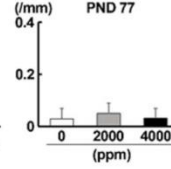
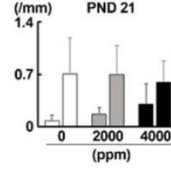
FOS



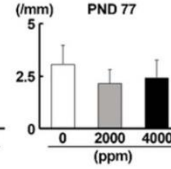
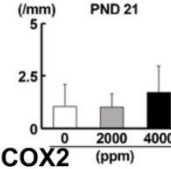
SOX2



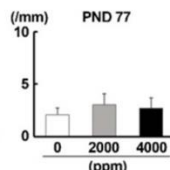
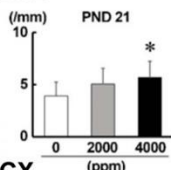
TUNEL



ARC

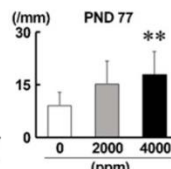
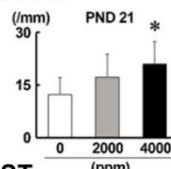


TBR2



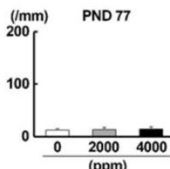
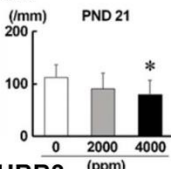
GABA性介在ニューロン

CALB2

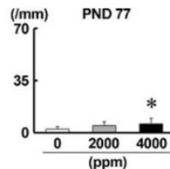
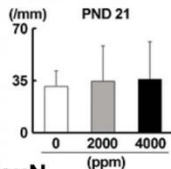


グリア細胞

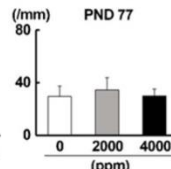
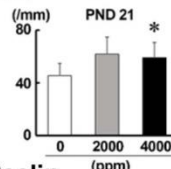
DCX



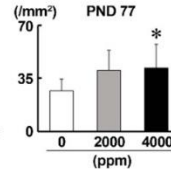
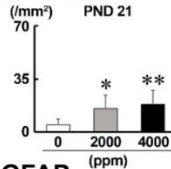
TUBB3



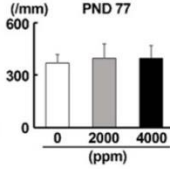
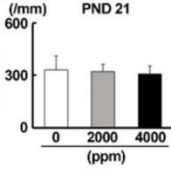
SST



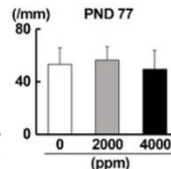
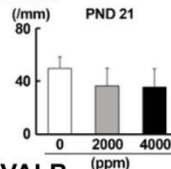
MT- I / II



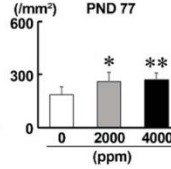
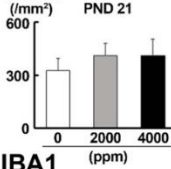
NeuN



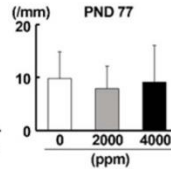
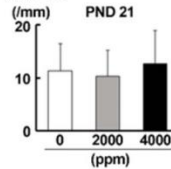
Reelin



GFAP



PVALB



IBA1

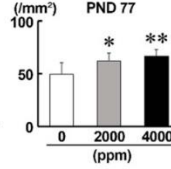
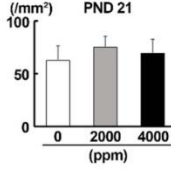
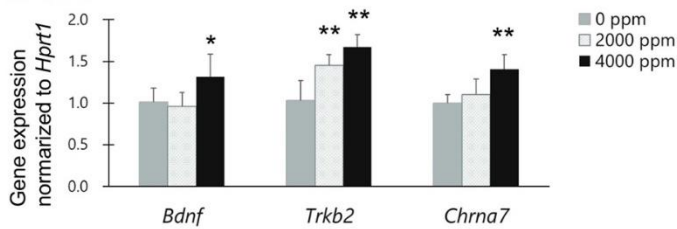


図1 酢酸鉛の免疫組織学的解析

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

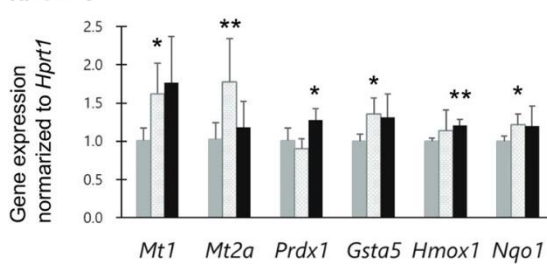
BDNF-TrkBシグナル関連遺伝子

離乳時

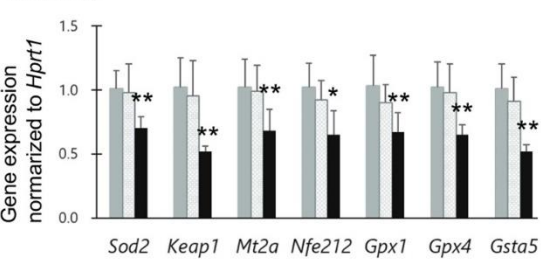


抗酸化ストレス関連遺伝子

離乳時

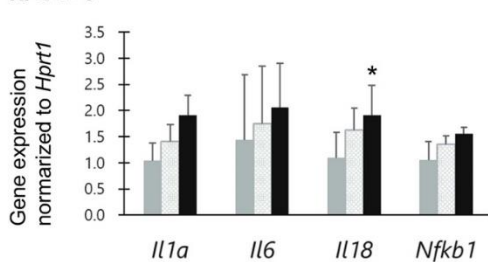


成熟期



炎症関連遺伝子

離乳時



成熟期

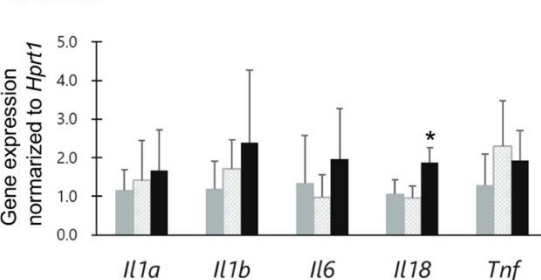
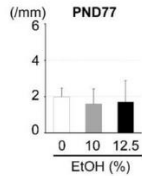
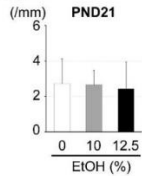


図2 酢酸鉛の遺伝子発現解析（一部抜粋）左から対照群、低用量、高用量

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

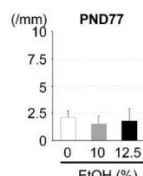
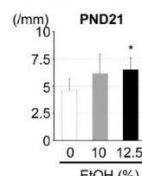
神経新生マーカー

GFAP



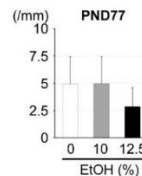
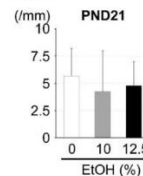
細胞増殖/アポトーシスマーカー

PCNA

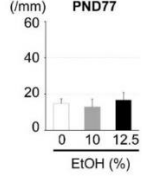
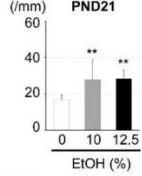


シナプス可塑性関連

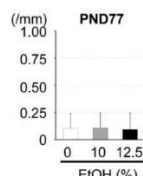
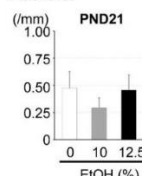
ARC



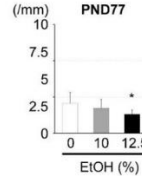
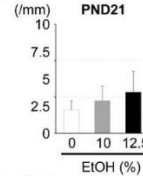
SOX2



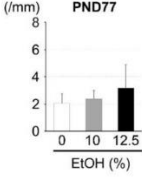
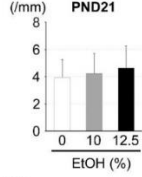
TUNEL



FOS

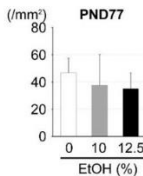
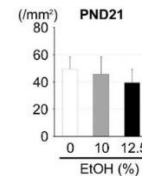


TBR2

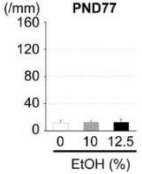
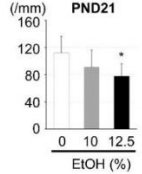


GABA性介在ニューロン

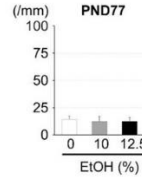
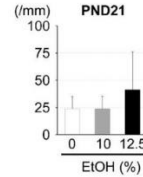
RELN



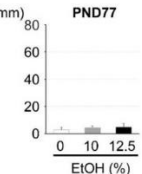
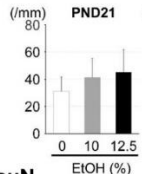
DCX



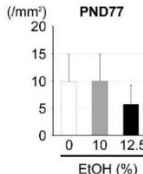
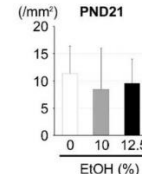
COX2



TUBB3

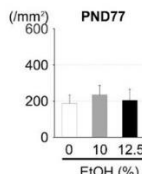
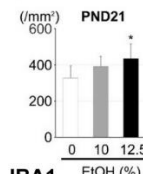


PVALB

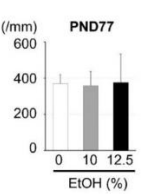
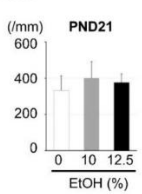


グリア細胞

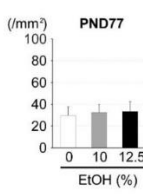
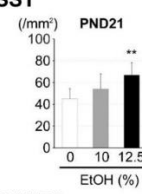
GFAP



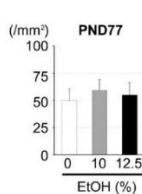
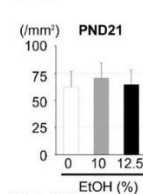
NeuN



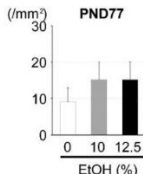
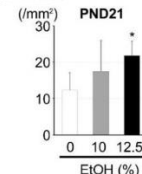
SST



IBA1



CALB2



MT- I / II

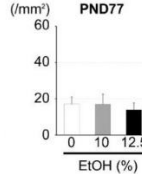
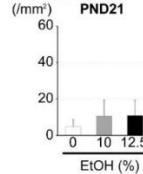


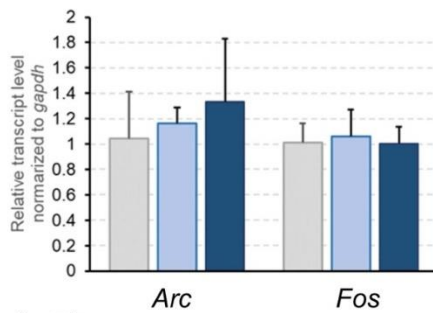
図3 エタノールの免疫組織学的解析

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

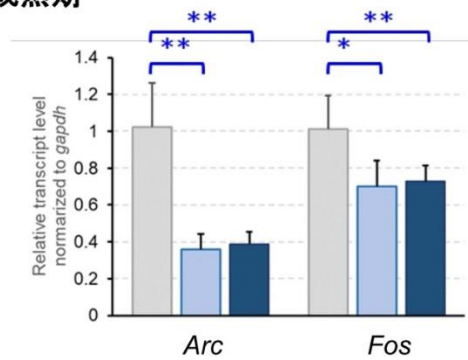
シナプス可塑性関連遺伝子

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

離乳時

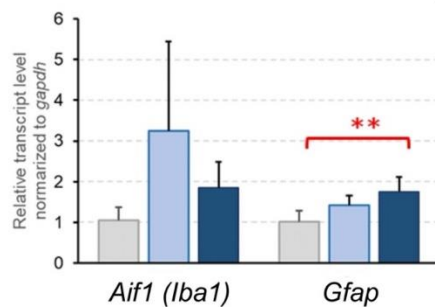


成熟期

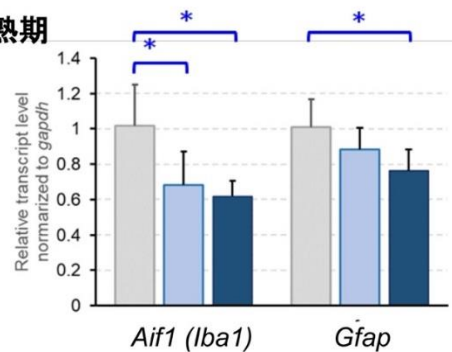


グリア細胞

離乳時

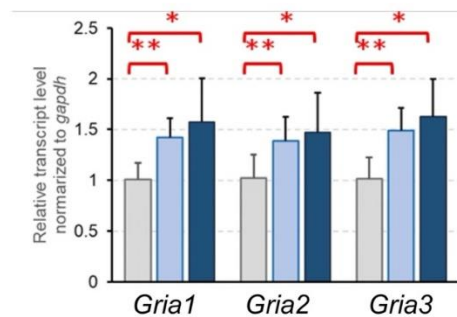


成熟期



AMPA型グルタミン酸受容体

離乳時



成熟期

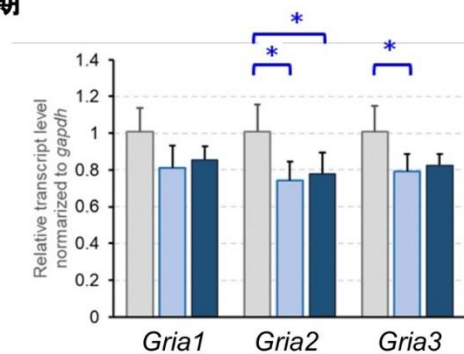


図4 エタノールの遺伝子発現解析 (一部抜粋) 左から対照群、低用量、高用量

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

神経新生マーカー

細胞増殖/アポトーシスマーカー GABA性介在ニューロン

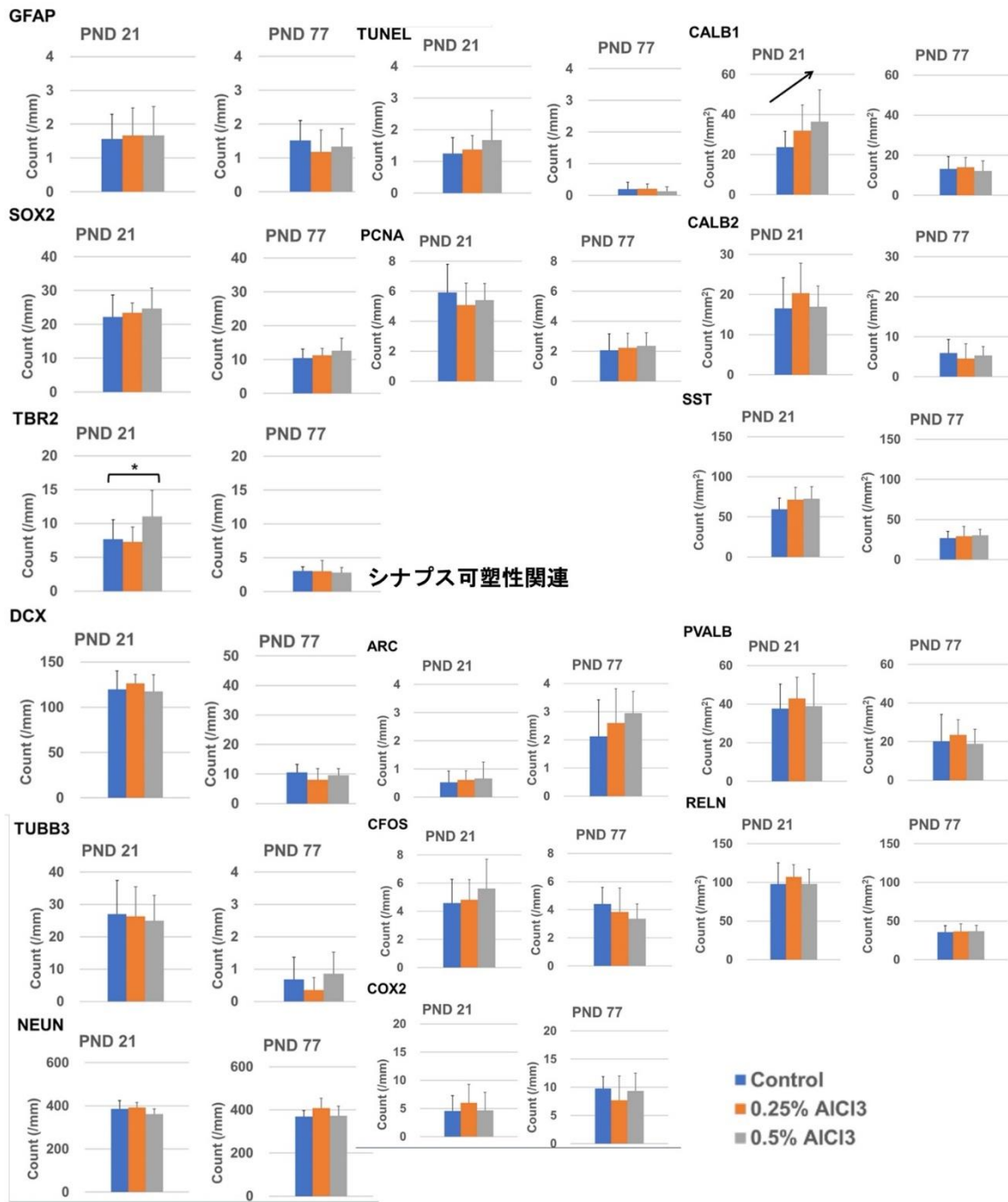


図5 塩化アルミニウムの免疫組織学的解析 左から対照群、低用量、高用量

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

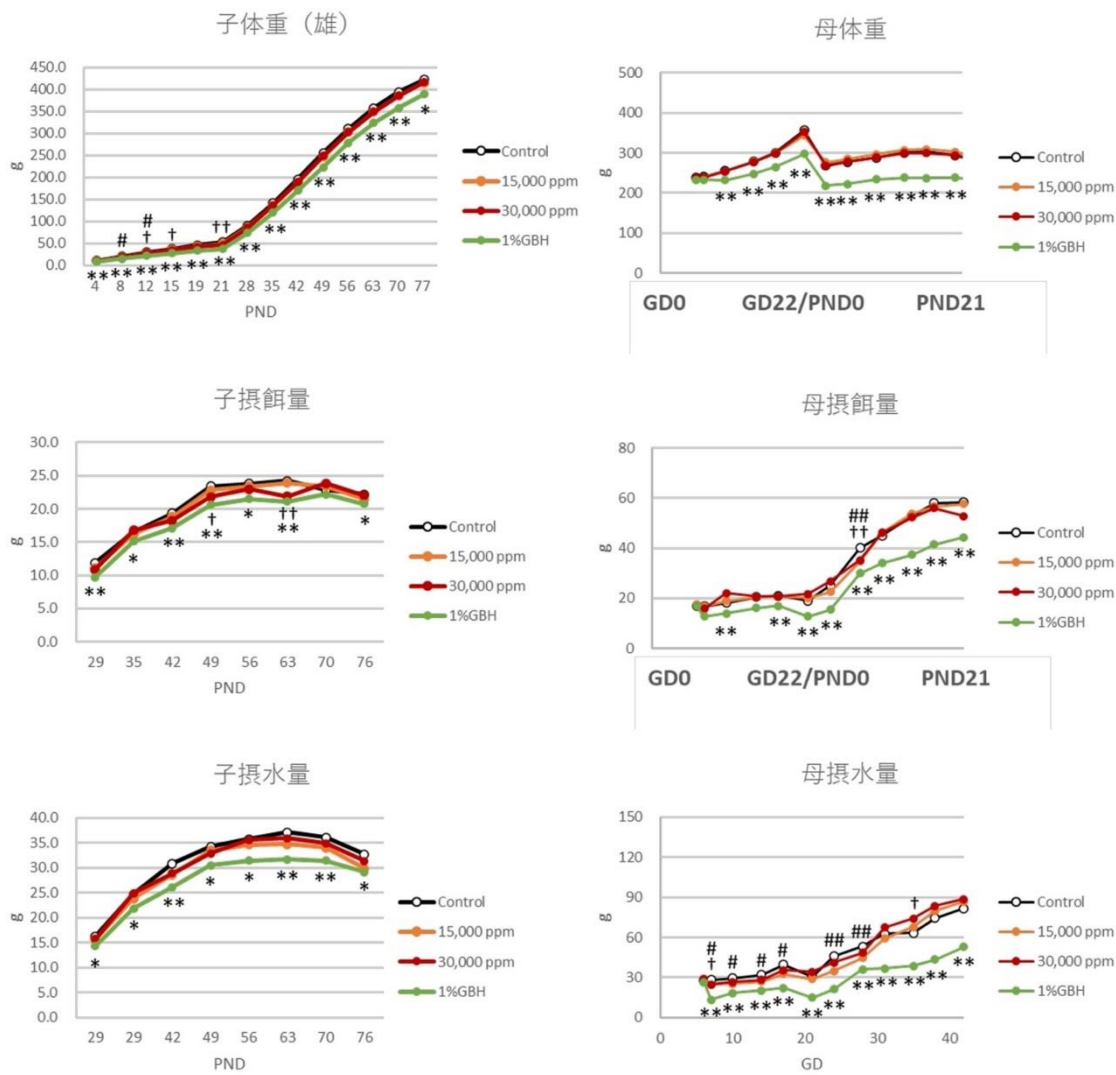


図6 グリホサート原体/含有製剤投与による母動物、児動物の体重、摂餌量、摂水量の変動
 $\#P < 0.05$, $\#P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t-test with Bonferroni correction in 15,000 ppm glyphosate.
 $\dagger P < 0.05$, $\dagger\dagger P < 0.01$, significantly different from 0 ppm controls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

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

表 1 塩化アルミニウムの遺伝子発現解析

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（19KD1003） 研究成果報告書

in vivo 動物試験の実施

研究分担者 吉田祥子 豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系

研究要旨

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

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

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

A. 研究目的

OECD DNT EGの化学物質のリストをもとに、動物実験による神経毒性評価を行う。動物実験による*in vivo*データを、ヒトiPS細胞などのインビトロ実験で得られた細胞毒性データと比較し、化学物質の物性情報から代謝などの情報も加味して毒性評価法を開発する。

B. 研究方法

胎児期および発達期動物に、OECDと共有している化学物質のリストの単回あるいは反復投与を行い、動物の神経回路に及ぼす影響、および成長に及ぼす影響を細胞生物学的に追跡する。また組織の生化学的検討を行う。（倫理面の配慮）

全ての動物執権は豊橋技術科学大学動物実験委員会の指針および文部科学省動物実験倫理規程に基づきに基づき、審査の上実施する。

C. 研究結果

(1) *in vivo*グリホサート投与試験

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

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

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

実験にはすべて雄性の出生仔を用いた。

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

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

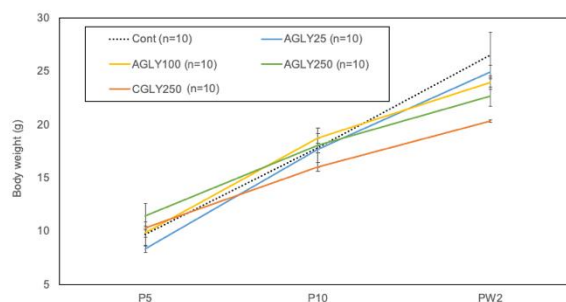


図1 グリホサート曝露による出生仔の体重変化

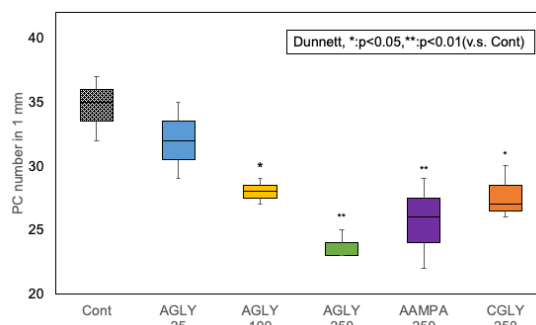


図2 グリホサート曝露による出生仔のプルキンエ細胞数の変化

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

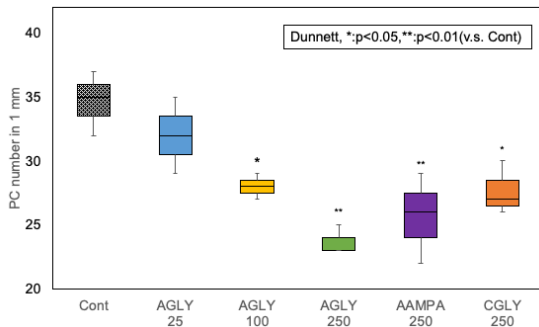


図3 グリホサート曝露による出生仔小脳のミクログリア数の変化

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

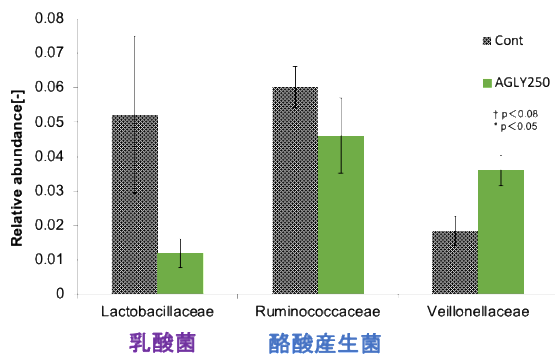


図4 グリホサート曝露による出生仔離乳後の腸内細菌叢の変化

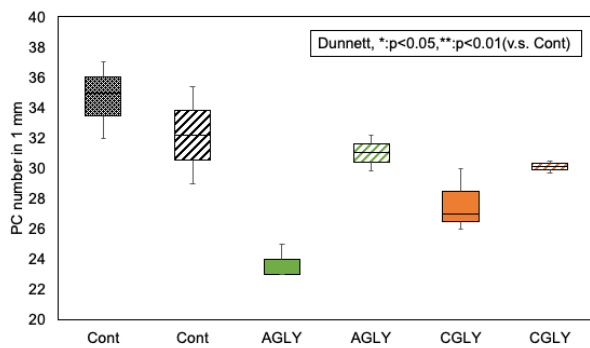


図5 グリホサート曝露動物に対する酪酸投与のプルキンエ細胞死に対する効果

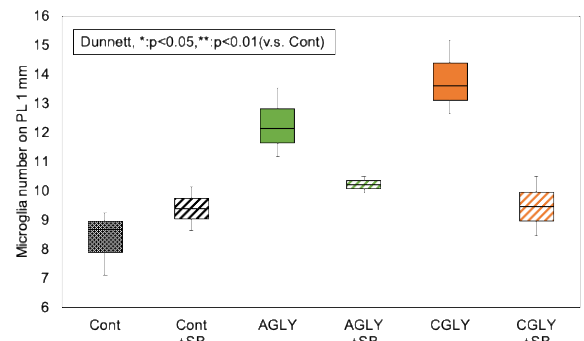


図6 グリホサート曝露によるミクログリア増加に対する酪酸の影響

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

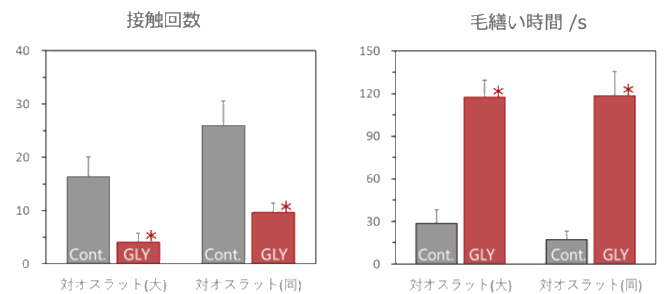


図7 グリホサート曝露動物の社会性行動と不安様行動の変化

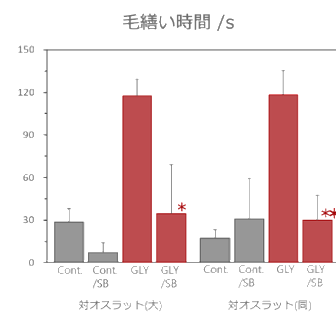


図8 グリホサート曝露による行動変化に対する酪酸の影響

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

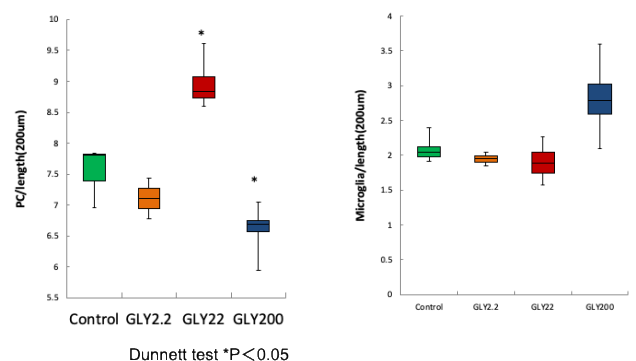


図9 グリホサート慢性曝露によるプルキンエとミクログリア数の変化

(2) *in vivo*クロルピリホス投与試験

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

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

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

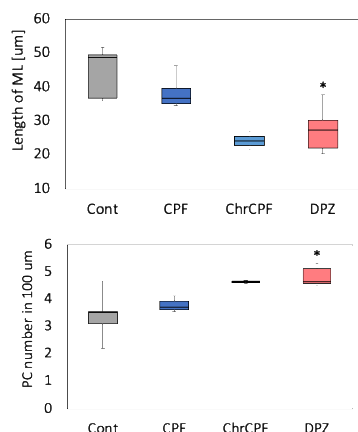


図10 クロルピリホス曝露による樹状突起短縮(上)とプルキンエ細胞数の増加(下)

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

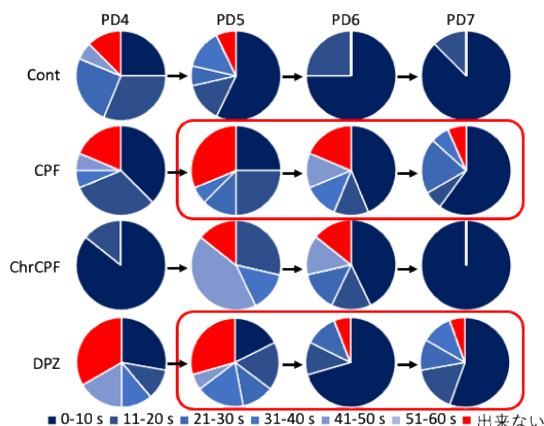


図11 クロルピリホス曝露による寝返りにかかる時間の増加

(3) *in vivo*アセタミプリド投与試験

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

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

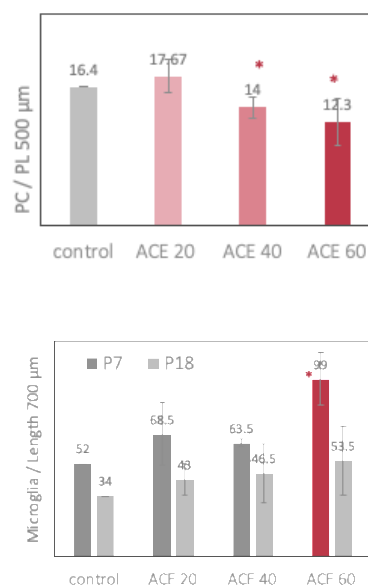


図12 アセタミプリド曝露によるプルキンエ細胞数の減少(上)とミクログリアの増加(下)

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

第 98 回日本生理学会大会 (2021. 03. 28) オンライン

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

第 98 回日本生理学会大会 (2021. 3. 30) オンライン

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今年度なし

2. 実用新案登録

今年度なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

(19KD1003)

研究成果報告書

分担課題: インシリコ評価法の開発

研究分担者 吉成浩一 静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野 教授

研究要旨

本研究の最終目的は、既存の動物実験データを収集し、それらを利用して神経毒性・発達神経毒性を誘発する化学物質の構造的・物理化学的特徴を同定すること、並びに毒性判別モデルを構築することである。本年度は、文献情報から発達神経毒性関連物質のデータセットを作成し、統計学的及び機械学習手法を利用して、発達神経毒性を示す物質の構造化学的特徴の抽出を試みた。その結果、発達神経を示す物質は、脂溶性や不飽和度が高いこと、環状構造を示すことなどが明らかになった。これら特徴は、組織・胎児への移行性と関連すると考えられた。また、判別モデルを作成したが、その精度は十分ではなかった。さらに、食品安全委員会で公開されている農薬評価書からラットの繁殖毒性試験、発生毒性試験及び反復投与毒性試験情報を抽出し、いずれの試験においても 400 以上の試験データを収集できた。神経毒性・発達神経毒性を示す化学物質の物理化学的特徴の解明に有用なデータベースであると考えられる。

A. 研究目的

近年、インシリコ手法による化学物質の毒性予測・評価が行われているが、反復投与毒性、発がん性、神経毒性・発達神経毒性など、毒性発現機序が複雑な毒性については、公的に利用可能な動物試験結果データベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで本研究では、既存の動物実験データを収集してデータベースを構築し、それらを利用して神経毒性・発達神経毒性を誘発する化学物質の構造的特徴を明らかにすること、さらには毒性判別モデルを構築することを最終目標とした。

B. 研究方法

化学構造的特徴の解析

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

データ整理には Microsoft Excel、統計的解析、決定木解析及び Bootstrap Forest には JMP Pro 14 (SAS Institute) を使用した。

毒性試験データの収集

食品安全委員会で公開されている農薬評価書をダウンロードし、ラットの二世代 (又は三世代) 繁殖毒性試験及び発生毒性試験の情報を抽出した。得られた情報は Microsoft Excel を利用して整理した。さらに、当研究室で過去に作成したラット 90 日間反復投与毒性試験、及び 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験データベースの拡充を行うため、これらの情報についても農薬評価書から抽出した。

(倫理面の配慮)

本研究では動物実験データを利用した解析を行うため、倫理的配慮を必要とする情報は含まれない。

C. 研究結果

1. 発達神経毒性と関連する構造的特徴

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

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

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

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

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

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

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

2. 発達神経毒性判別モデルの構築

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

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

を用いた場合より分類の精度はわずかに高くなった。

3. 毒性試験データの収集

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

繁殖試験及び発生毒性試験では、親シートと仔シートに分け、系統や投与量などの試験情報、無毒性量や繁殖能への影響などの試験結果概要、ならびに認められた個別の所見とその投与量の情報を、世代、雌雄別に整理した。繁殖試験については入力内容のダブルチェックが終了した。発生毒性試験については現在入力内容のダブルチェック中であり、次年度開始時までには終了する見込みである。

それぞれの試験で認められた毒性所見については、当研究室で以前に作成したラット反復投与毒性試験データベース (Masuda et al, *Yakugaku Zasshi*, 137: 611-622, 2017) に基づいて作成した類義語集 (シソーラス) に従い、所見の整理、グループ化を行った。繁殖毒性・発生毒性に関連する所見に関しては、本類義語集には含まれていないことから、入力内容のダブルチェックが終了した後、整理した所見を実験動物病理の専門家に確認を依頼する予定である。

D. 考察

発達神経毒性物質の化学構造的特徴

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

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

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

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

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

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

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

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

の 10 種の検索式で検索を実施し、「two references are

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

ラット毒性試験データの収集

発達神経毒性や神経毒性に関する公開データベースはなく、機械学習等を用いた解析は困難である。実際、本研究でも既知見から収集できた物質数は非常に限られていた。それらを踏まえて本研究では、食品安全委員会で公開されている農薬評価書を利用して毒性試験情報を収集することとした。約 2 年の期間を要したが、ラット二世代又は三世代繁殖試験、発生毒性試験、90 日間反復投与毒性試験、並びに 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験のそれぞれについて、400 を超える試験結果を収集、整理することができた。このようなデータベースは他にはなく、データベース自体が非常に貴重な成果と考えている。

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

E. 結論

論文情報を利用して発達神経毒性の化学物質データセットを独自に作成し、発達神経毒性を示す物質の物理化学的特徴の一端を明らかにした。また、機械学習への応用を目的としたラット毒性試験データベースの構築を進め、繁殖毒性試験、発生毒性試験、反復投与毒性試験のデータを収集し、データベース化した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 浅井崇徳、吉成浩一、佐々木崇光、保坂卓臣、志津怜太、諫田泰成；発達神経毒性が懸念される化学物質の化学構造的特徴の解析。第 47 回日本毒理学学会学術年会、2020 年 6 月 29 日-7 月 1 日、オンライン
2. 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、管野裕一朗、吉成浩一；発達神経毒性を示す化学物質の化学構造的特徴の解析。日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 27 日-29 日、オンライン

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

表 1 発達神経毒性陽性物質及び陰性物質間で有意差が認められた分子記述子

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

青色及び緑色はそれぞれ不飽和度及び環状構造に関する分子記述子を示す。

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

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

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

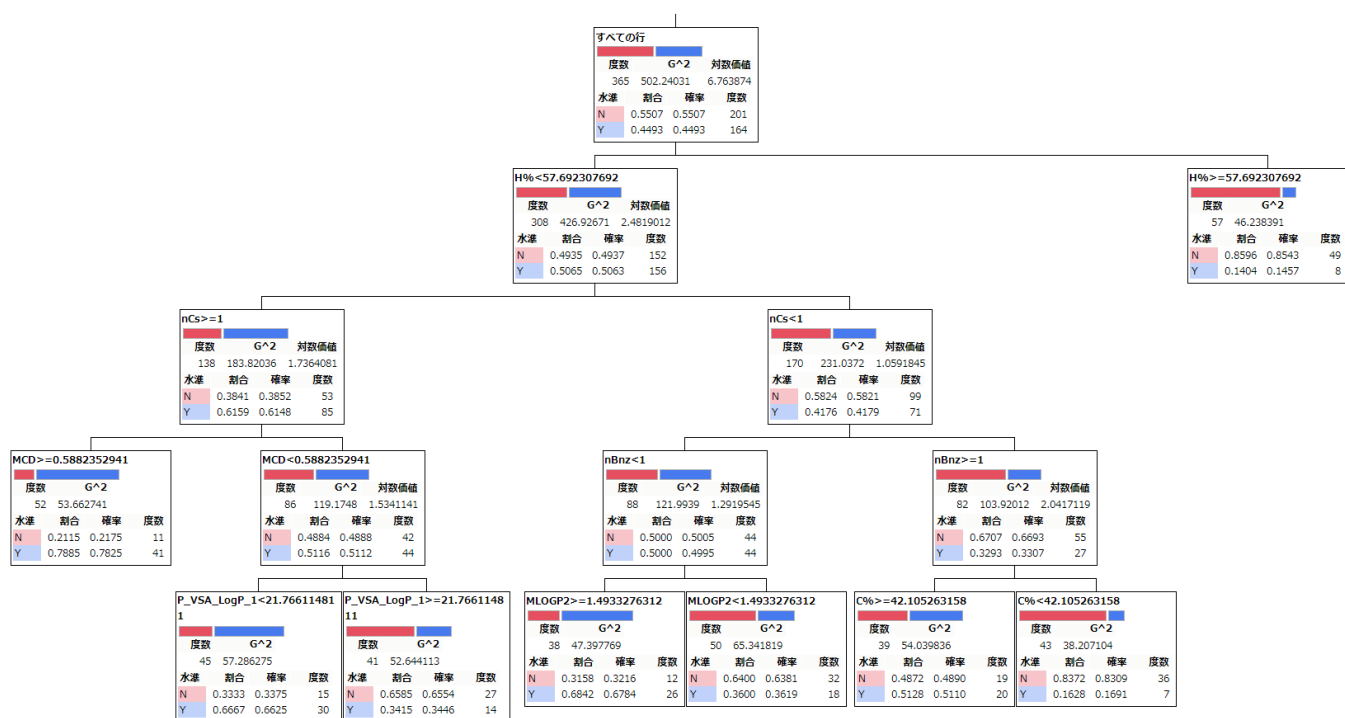
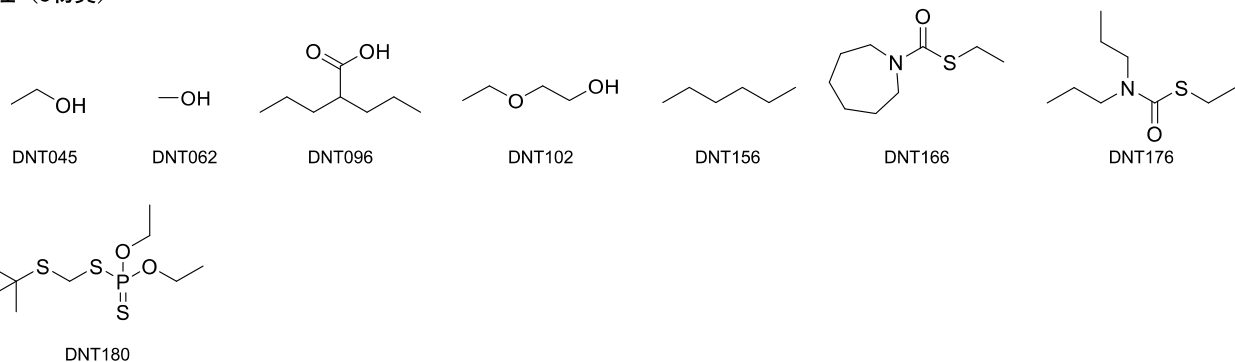


図1 6グループの分子記述子を説明変数として作成した決定木

青色 (Y) 及び赤色 (N) はそれぞれ陽性物質及び陰性物質を示す。判別に用いられた記述子は以下の通り: H% (percentage of H atoms)、nCs (number of total secondary C(sp³))、MCD (molecular cyclized degree)、P_VSA_LogP_1 (P_VSA-like on LogP, bin 1)、nBnz (number of benzene-like rings)、MLOGP2 (squared Moriguchi octanol-water partition coeff. (logP²))、C% (percentage of C atoms)。

陽性（8物質）



陰性（49物質）

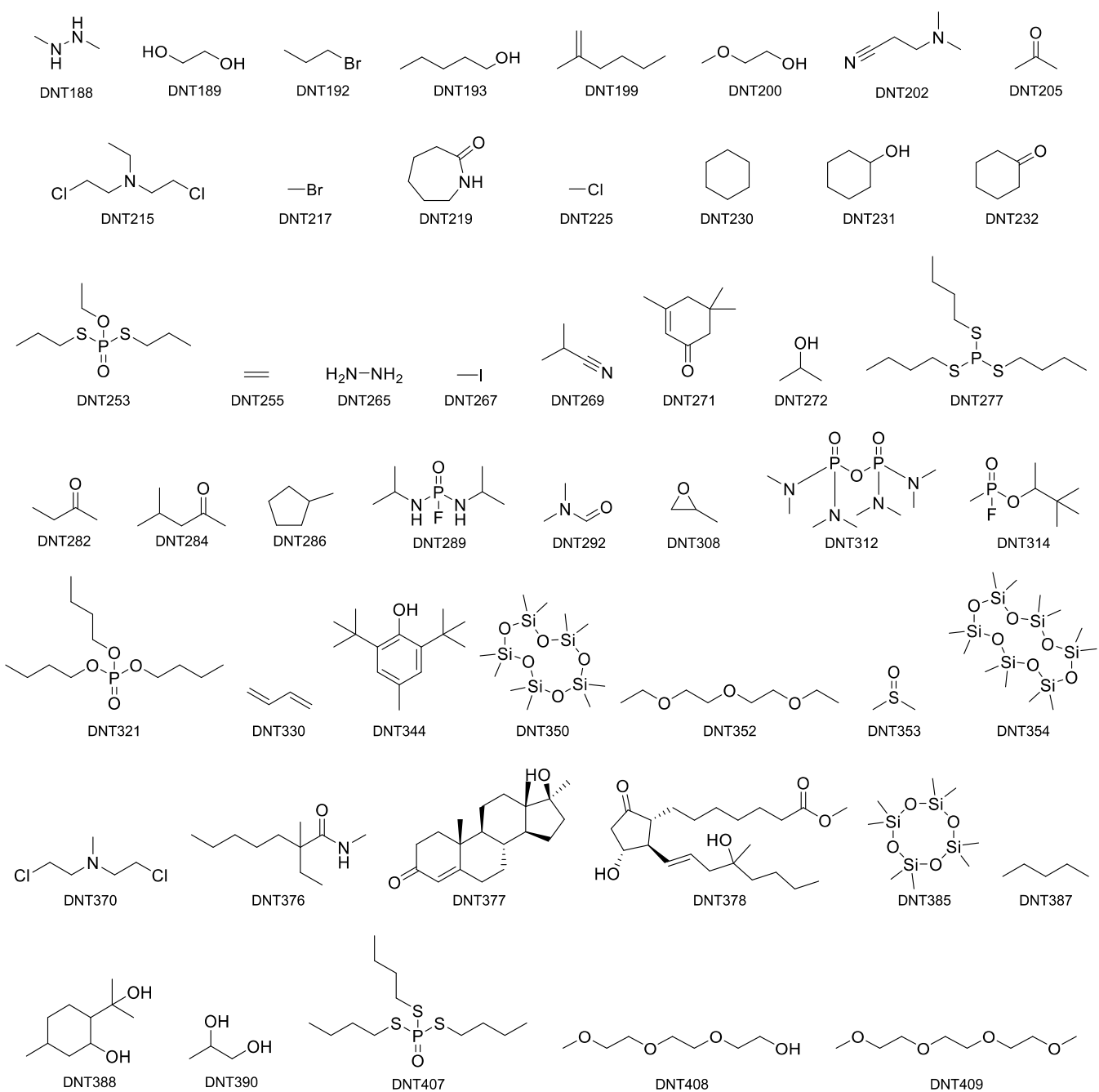
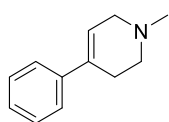
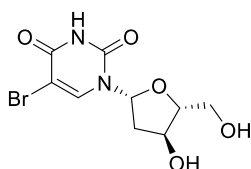


図2 条件「H% ≥ 57.7%であれば陰性」で分類された化学物質

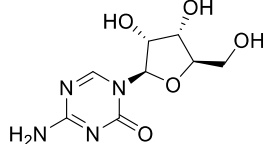
陽性 (41物質)



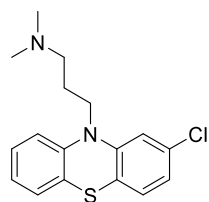
DNT001



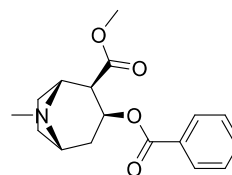
DNT005



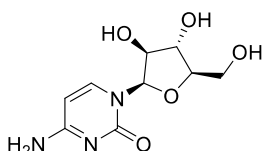
DNT013



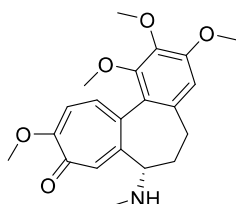
DNT026



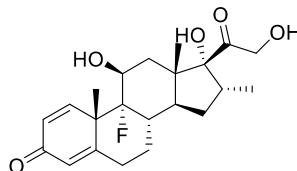
DNT029



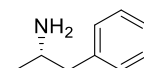
DNT033



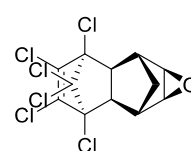
DNT035



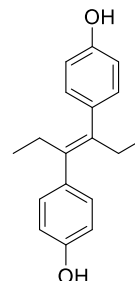
DNT036



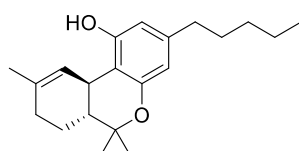
DNT037



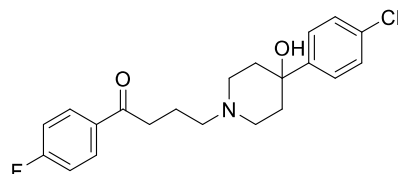
DNT040



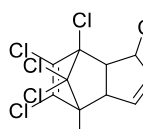
DNT041



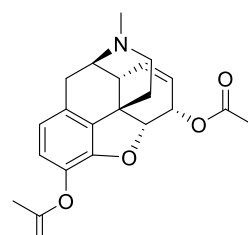
DNT043



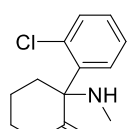
DNT049



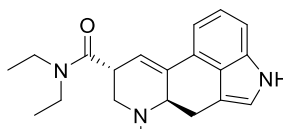
DNT051



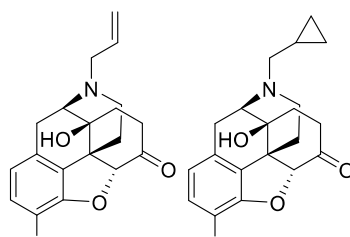
DNT052



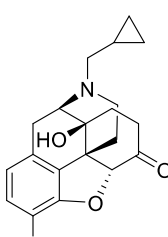
DNT056



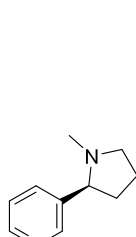
DNT059



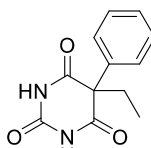
DNT069



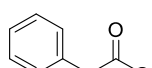
DNT070



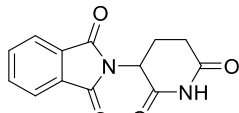
DNT071



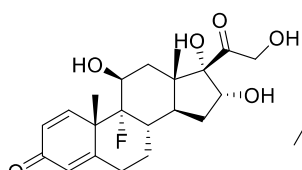
DNT078



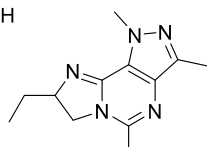
DNT079



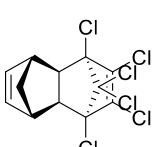
DNT086



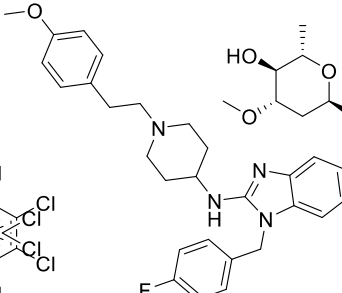
DNT089



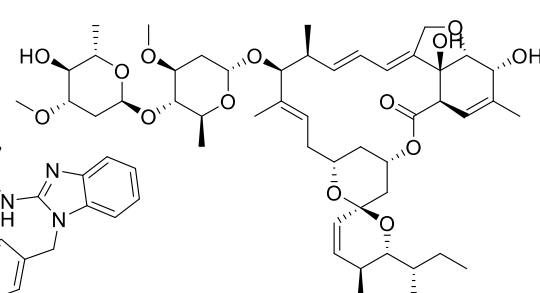
DNT103



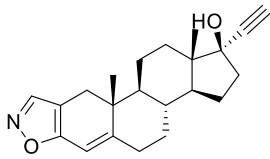
DNT108



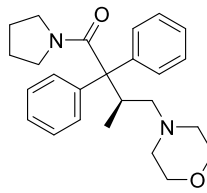
DNT111



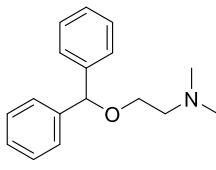
DNT114



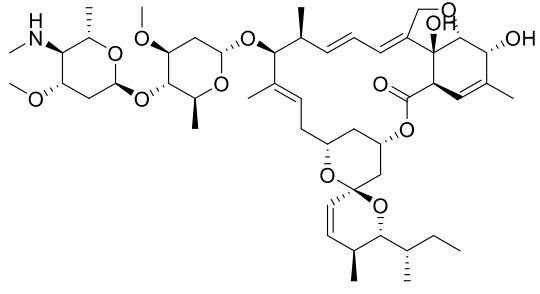
DNT133



DNT134

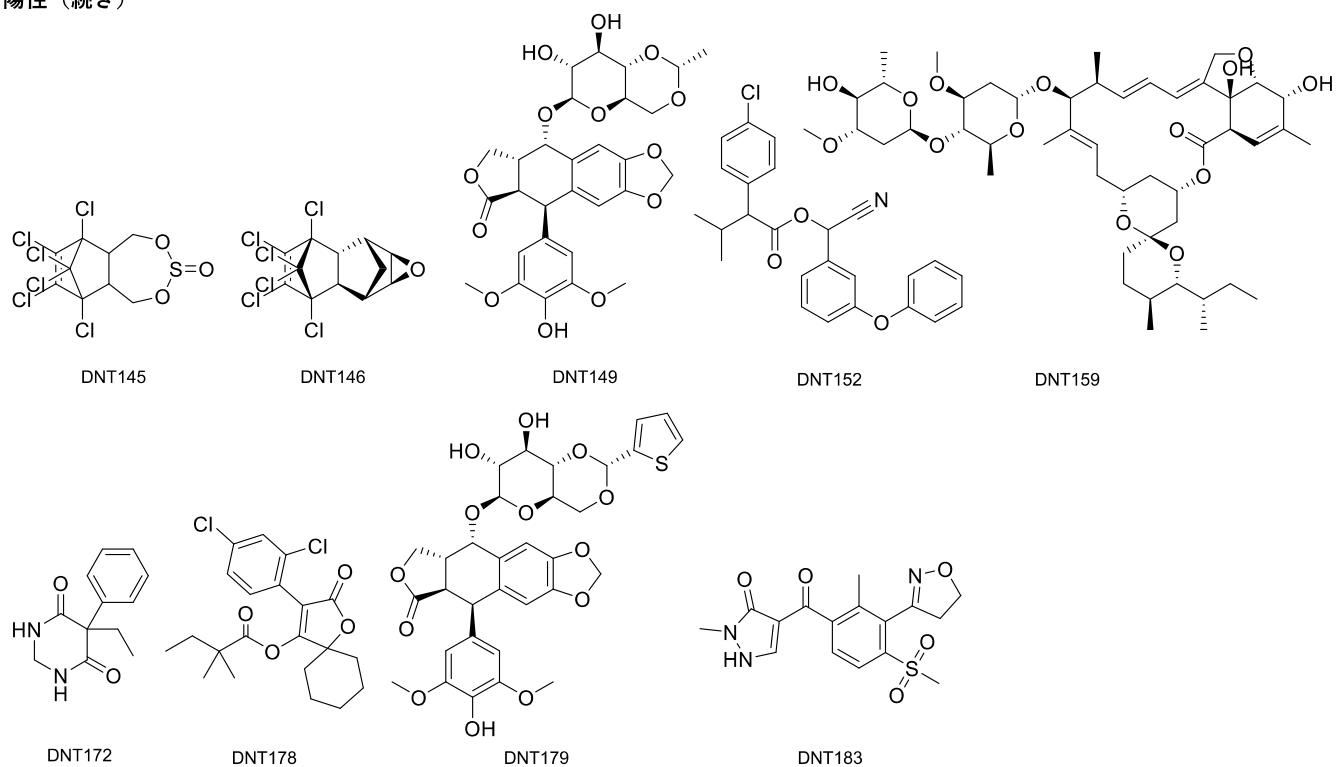


DNT139



DNT144

陽性（続き）



陰性（11物質）

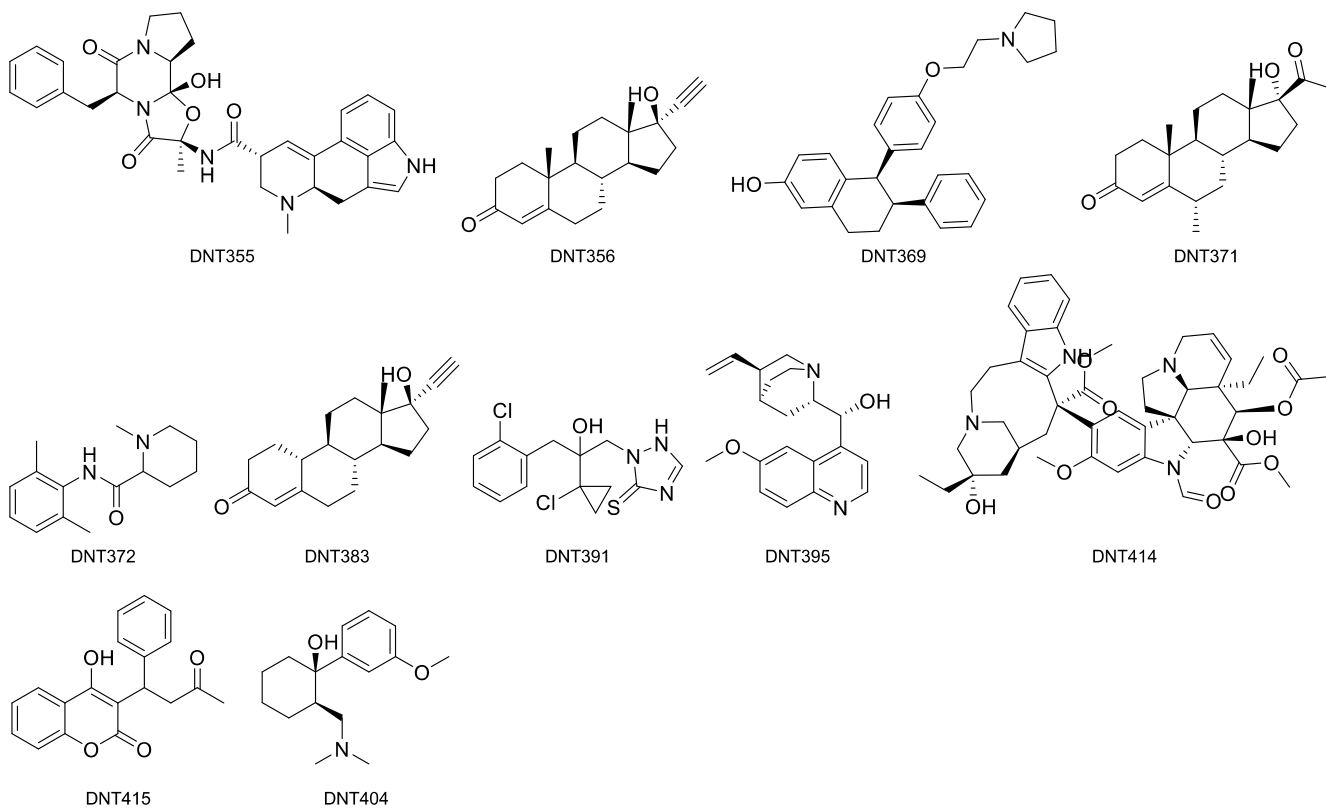


図3 条件「H% < 57.7%, nCs ≥ 1, MCD ≥ 0.59」で分類された化学物質

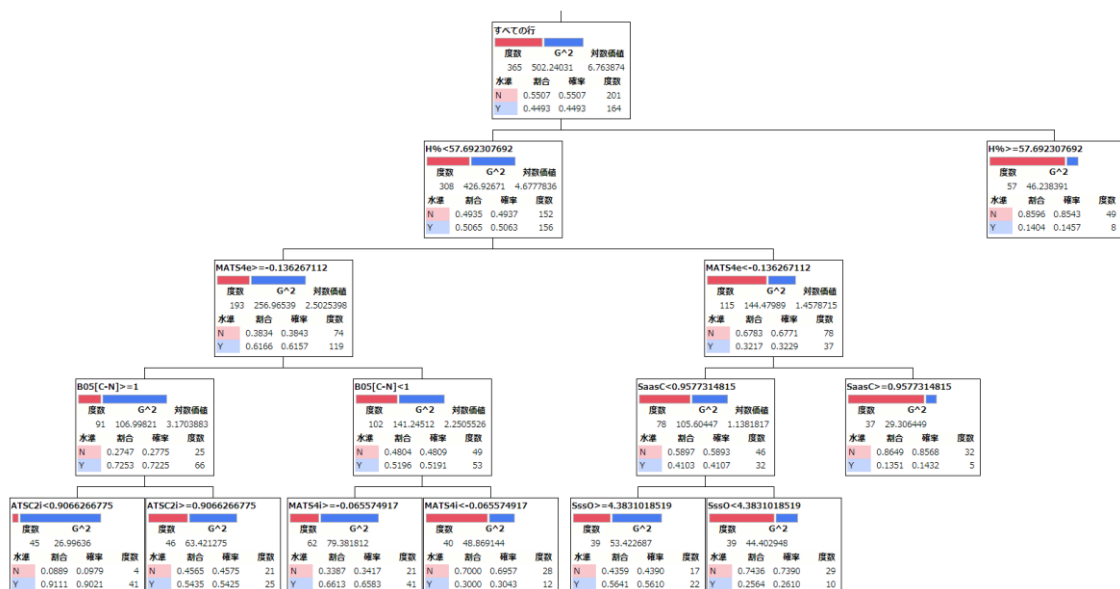


図4 全分子記述子を説明変数として作成した決定木

青色（Y）及び赤色（N）はそれぞれ陽性物質及び陰性物質を示す。判別に用いられた記述子は以下の通り：H%（percentage of H atoms）、MATS4e（Moran autocorrelation of lag 4 weighted by Sanderson electronegativity）、B05[C-N]（Presence/absence of C – N at topological distance 5）、ATSC2i（Centred Broto–Moreau autocorrelation of lag 2 weighted by ionization potential）、MATS4i（Moran autocorrelation of lag 4 weighted by ionization potential）、SaasC（Sum of aasC E-states）、SssO（Sum of ssO E-states）。

「MEA 計測」に関する研究

研究分担者 鈴木 郁郎 東北工業大学 准教授

研究要旨

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

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

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

A. 研究目的

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストを基に、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化学物質の in vitro 毒性評価法の構築を目的としている。本年度は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの種類を増やすとともに、Rodent ニューロンも用いて化合物のデータを取得し、主成分解析法および Deep learning 法を用いた毒性リスク評価法を検討した。また、機能を指標とした評価法として、平面微小電極アレイ（MEA）計測のみならず、Ca²⁺ イメージング法も検討した。得られたデータから毒性リスクを検出する為の解析法を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞

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

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

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

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

2) 評価化合物

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

表1 試験化合物

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

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

3) 神経ネットワーク活動の計測

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

計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems) および Spike extract for presto(Alphamed scientific.inc)を用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 $\pm$ 530%の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、我々が開発した 4-step method (Biochem Biophys Res Commun, 497, 612-618, 2018)を用いて同期バースト発火の検出を行った。

解析パラメータは、図 1 に示すように、Total Spikes, No. of SBF, Inter Burst Interval, Duration of SBF, Spikes in a SBF, Max Frequency (MF), CV of MF, Inter MF Interval (IMFI), CV of IMFI の 9 つを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究で実施するヒトiPS細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成30年8月、令和元年6月に本学研究倫理審査委員会で承認済である。また、本実験で使用するラット初代培養細胞は、本学動物実験委員会で承認済み（承認番号第 589号）である。本研究では、遺伝子解析、遺伝子組み換え実験は行わない為、その他必要な手続きはない。

C. 研究結果

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

図2は、12化合物+DMSO投与における9つの解析パラメータの結果である。各パラメータにおいて、Vehicleを100%とし、上昇した場合は赤、減少した場合は青で表した。薬剤種の差および用量依存性が認められた。次に、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentニューロンの差異を調べる為に、ラット大脳皮質初代培養細胞を用いて、22化合物+DMSOのデータを取得した。図3に、解析パラメータのヒートマップを示す。

各サンプルの毒性リスクを判定する為に、DMSOの各濃度（0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%）の間に有意差が1つも認められない主成分マップを作成し、DMSOデータからの距離で毒性判定する方法を採用した。選択されたパラメータは、Elixirgen社のヒトiPS細胞由来ニューロンでは、同期バースト内の最大周波数（Max Frequency）、同期バーストの時間

（Duration）、最大周波数時刻の間隔における変動係数（CV of IMFI）であった。図4は、作成した主成分マップに各化合物の用量データをプロットしたものである。第一主成分と第二主成分の寄与率はそれぞれ51.0%と29.3%であり、合わせて80%以上であった為、情報量としては十分であった。主成分マップに、DMSOの標準偏差（SD）の範囲と2×SDの範囲を描き、SDの範囲内であれば低リスク、2×SDの範囲であれば中リスク、2×SDの範囲外であれば高リスクとして評価を行った。ラットの場合は、同期バースト数（No. of SBFs）、同期バースト間隔（IBI）、同期バーストの時間（Duration）、同期バースト内スパイク（Spikes in a SBFI）、同期

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

E. 結論

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

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

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

今後、Caイメージング法で得られたデータの解析法は検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

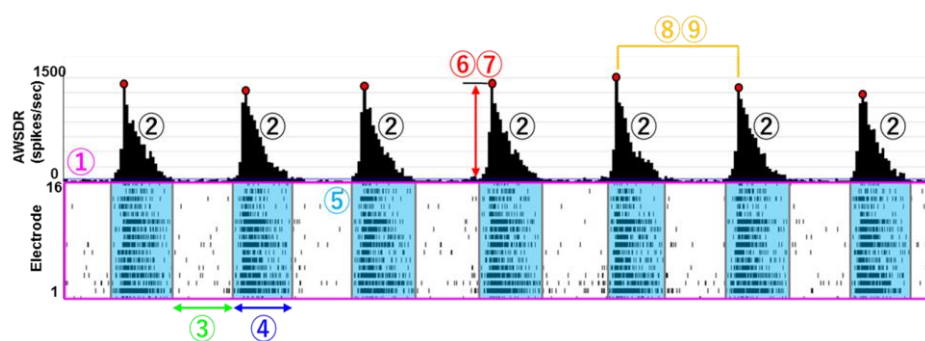
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



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

図1 MEAデータから算出する解析パラメータの模式図

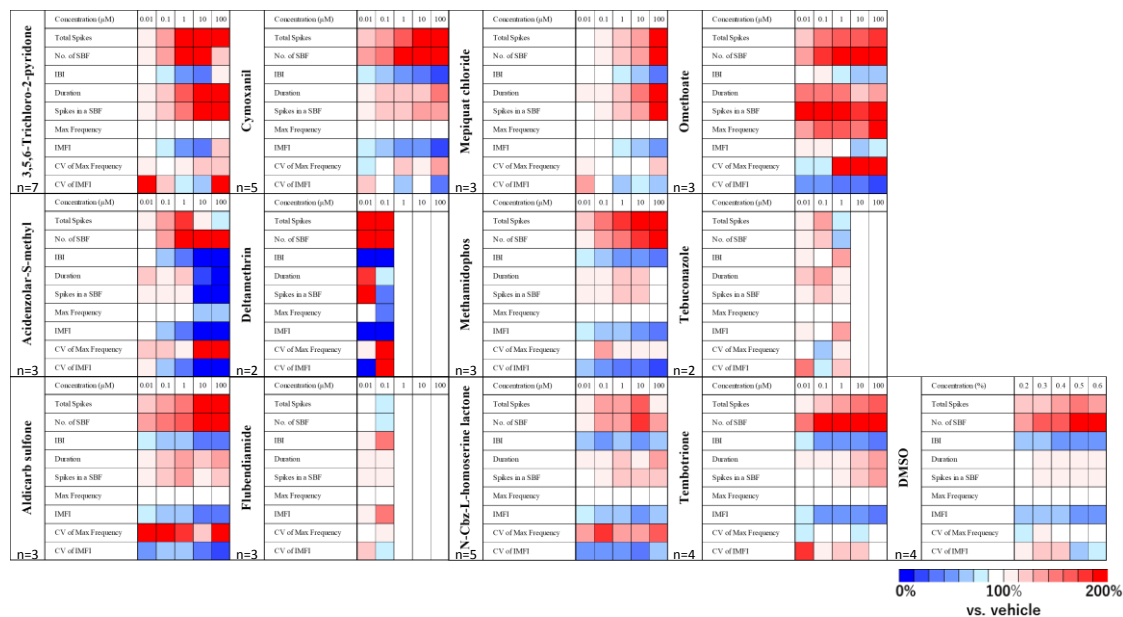


図2 ヒトIPS由来ニューロン（Elixigen社）における12化合物 + DMSOのMEAデータ解析

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

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

負荷量

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

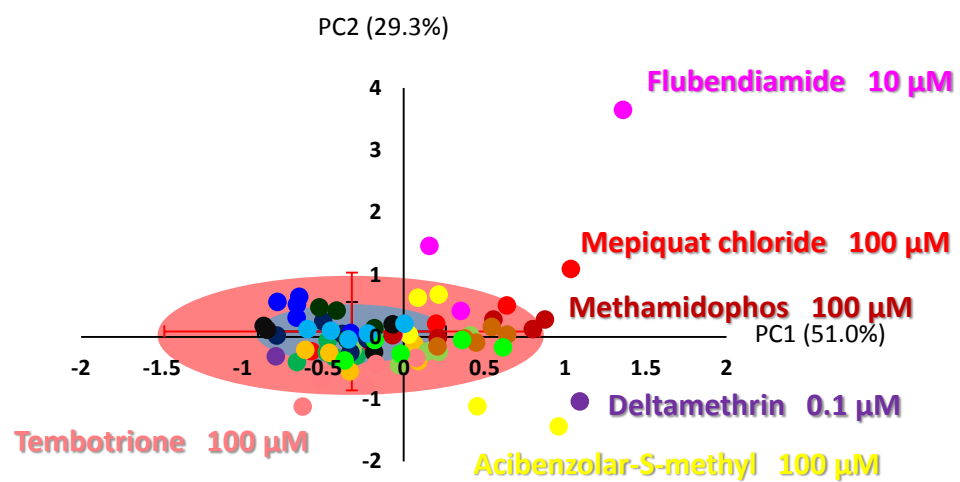


図4 ヒトiPS由来ニューロン（Elixigen社）におけるDMSOデータを基準としたスコアプロット

負荷量

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

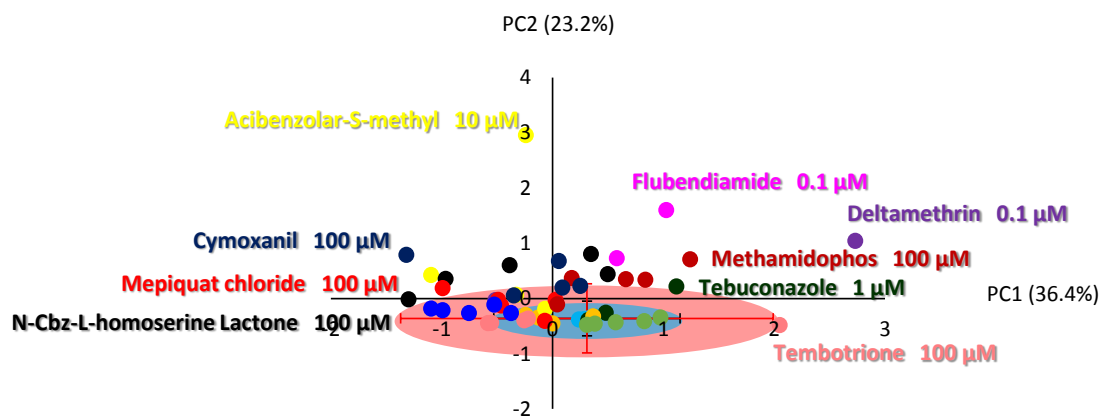


図5 ラット初代大脳皮質ニューロンにおけるDMSOデータを基準としたスコアプロット

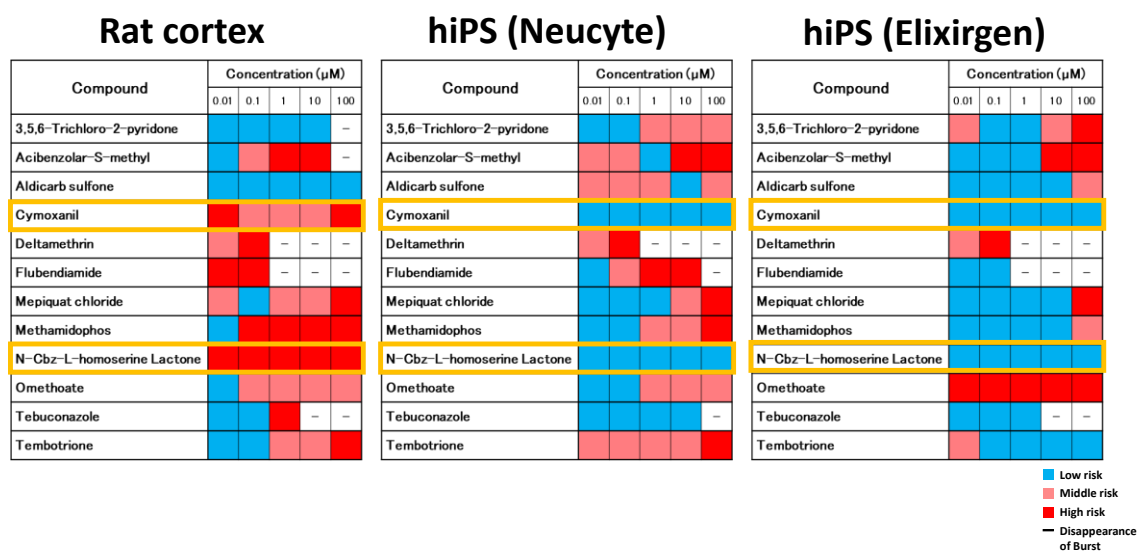


図6 ヒトiPS由来ニューロン（Neucyte社、Elixigen社）とRodentニューロンにおけるリスク評価

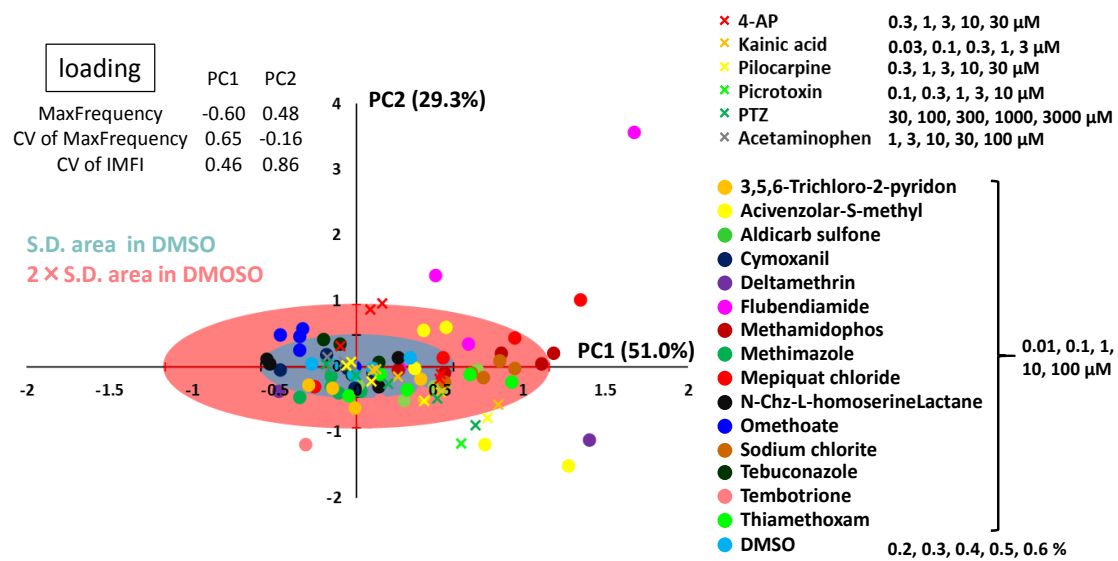


図7 痙攣陽性化合物とOECD化合物とのスコアプロット上での比較

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

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

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

図8 痙攣陽性化合物とOECD化合物との毒性リスク比較

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

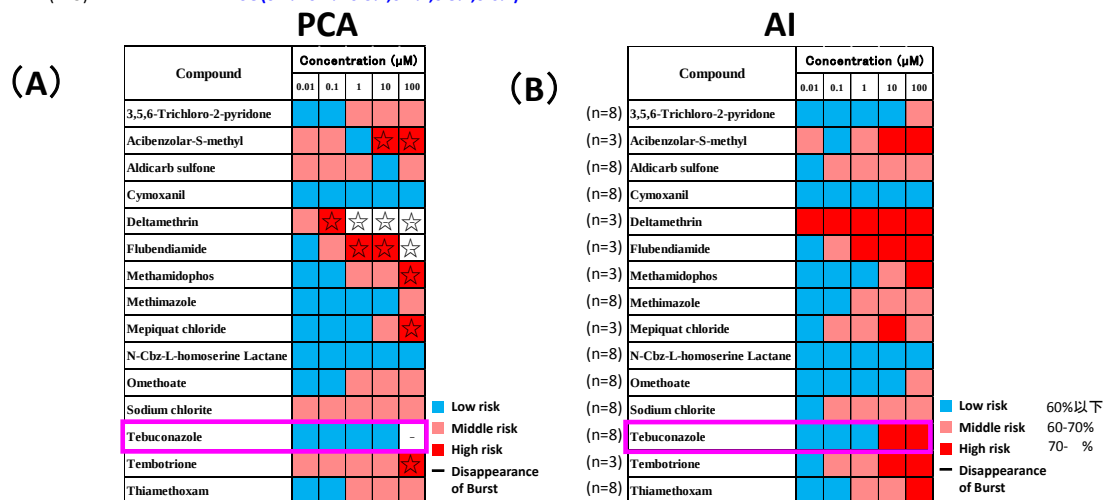


図9 Deep learningによる毒性リスク予測とPCA解析による毒性リスク予測の比較