

**厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)**  
**(課題番号:19KD1003) 分担研究報告**  
**化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発**  
**研究代表者:諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長**

## 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化合物(ピレスロイド系農薬やネオニコチノイド系農薬を含む)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、ピレスロイド系農薬を含むおよそ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。一方、ネオニコチノイド系農薬については神経毒性が検出できなかったが、これは既出の見解と一致していた。

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

化学物質の安全性評価は、動物実験の3Rs原則のもと、多くのin vitro代替法が開発されている。基本的な考え方としては、New Approach Methodologies (NAM)の活用により、今までよりも予測性が高くヒト健康を確保できる評価法が期待されている(Ball N et al. 2022; EPA New Approach Methods Work Plan 2020; Escher SE et al, 2019)。

これまでSystematic Literature Reviewの結果等から特定の化学物質への胎児期の暴露量と出生児の知能指数の低下との相関関係が報告されていることなどを踏まえて、化学物質の発達神経毒性(Developmental Neurotoxicity; DNT)を正確に評価することは極めて重要な課題である。現行の神経毒性ガイドライン(OECD TG426)は多くの動物と費用を必要とするため、簡易かつ迅速に検出することができるin vitro試験系の開発の必要性が強く認識されてきている(Masjosthusmann S et al, 2020)。

ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、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。そこで我々は、ヒトiPS細胞を用いた化合物評価を構造と機能に分けて、それぞれ評価を行ってきた。

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、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の活用、iPSニューロンの評価を行い、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)を用い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基づいて測定した。

### 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。網羅解析では OECD、ToxCast の両方で共有している化学物質 (ピレスロイド系農薬やネオニコチノイド系農薬を含む) に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 細胞および神経前駆細胞の化学物質に対する検出力の評価

OECD で議論されているリストから化学物質を選定し、京大 CiRA で樹立されたヒト iPS 細胞株 253G1 を用いて化学物質の神経毒性評価を行った。ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するロテノンによりヒト iPS 細胞の増殖能が抑制された。これをも

とに、OECD で追加されたミトコンドリア毒性を有する農薬などの評価を行ったところ、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、多くの農薬の毒性を検出できる可能性が示唆された (図 1)。

### 2. ヒト iPS 細胞の増殖能に対する影響評価

OECD で議論されているリストから 35 化合物を選定し、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するとともに、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)。

次に、我々は OECD で共有している 5 種類のピレスロイド系農薬 (λシハロトリン, シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン, αフルバリネート) 及び 5 種類のネオニコチノイド系農薬 (アセタミプリド, クロチアニジン, イミダクロプリド, チアクロプリド, チアメトキサム) の急性毒性の発火データを取得した (図 7, 8)。得られた発火データより、MEA 陽性対照化合物であるピクロトキシンを用いて、文献 (Odawara et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2019) を参考に神経ネットワーク機能の評価に必要なエンドポイントを検討した結果、以下に示す 9 つのエンドポイントを決定した。

1. 総発火数
2. ネットワークバースト発火数
3. ネットワークバースト発火間隔
4. ネットワークバースト発火の持続時間
5. ネットワークバースト発火中の発火数
6. ネットワークバースト発火のピーク
7. 6 のばらつき
8. ネットワークバースト発火のピーク間隔
9. 8 のばらつき

これに基づいて、ピレスロイド系農薬とネオニコチノイド系農薬で MEA データを取得した。その結果、5 種類のピレスロイド系農薬はすべて容量依存的に総発火数 (図 9)、ネットワークバースト発火数 (図 10) などが減少する一方、5 種類のネオニコチノイド系農薬は総発火数 (図 11)、ネットワークバースト発火数 (図 12) などが増加する傾向があることが確認された。急性神経毒性のフェノタイプを調べるため、9 種の MEA エンドポイントからヒートマップを作製した (図 13)。その結果、ピレスロイド系農薬は急性神経毒性を示すが、ネオニコチノイド系農薬は有意な毒性を検出できないことが考えられた。

#### 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。また OECD と共有しているピレスロイド系農薬は、MEA システムで急性神経毒性が検出可能である一方、ネオニコチノイド系農薬は、MEA システムで急性神経毒性が検出困難であった。これについては 2021、2022 年の DNT 専門家会議で、ネオニコチノイド系農薬 (Acetamiprid, Imidacloprid など) は EU で規制の議論がされているが、DNT-IVB で毒性が検出できていないことが改めて報告されており、我々のデータとも矛盾しない。

その他の DNT 化合物も、それぞれの薬理作用などに応じたフェノタイプを明らかにし、予測性を検証することにより、毒性評価が可能になると考えられる。また、OECD と共有している化学物質で神経細胞内での作用機序が不明な化合物に関しても、フェノタイプを比較することにより神経毒性の予測が可能になることが考えられ、機械学習などのアプローチも有用であると思われる。

今後、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さらに進め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) 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* 2021;156:107-113.
- 2) Nishimura Y, Kanda Y, Sone H, Aoyama H. Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jul 19;2021:6685204.
- 3) 辻嘉代子, 佐塚文乃, 諫田泰成: new approach methodologies の活用による新たな薬理評価法の開発。 *日本薬理学雑誌* 2021;156:208-213.

## 2. 学会発表

- 1) 山田茂、常本和伸、諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いた統合的な発達神経毒性評価法の開発、第 5 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、北里大学、東京、2019年9月14日、口頭、国内。
- 2) 諫田泰成: ヒト幹細胞を用いた新たな安全性評価法の開発と国際標準化、幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム第 2 回研究会、横浜薬科大学、神奈川、2019年10月1日、口頭、国内。
- 3) 諫田泰成、常本和伸、山田茂: ヒト iPS 細胞を用いた新たな神経毒性評価法の開発、第 249 回生理学東京談話会、千葉大学、千葉、2019年11月30日、口頭、国内。
- 4) 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いた心血管系・中枢神経系の安全性評価に関する現状と今後の展望、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020年3月(誌上開催)、口頭、国内。
- 5) 常本和伸、山田茂、諫田泰成: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020年3月(誌上開催)、口頭、国内。
- 6) 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(オンライン開催)、ポスター、国内。
- 7) 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(オンライン開催)、ポスター、米国。
- 8) 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(オンライン開催)、ポスター、国内。
- 9) 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(オンライン開催)、ポス

ター、国内。

- 10) 諫田泰成: インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題、第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、オンライン、2021年8月8日
- 11) 諫田泰成、安彦行人: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、オンライン、2022年3月27日

## G. 知的所有権の取得状況 なし

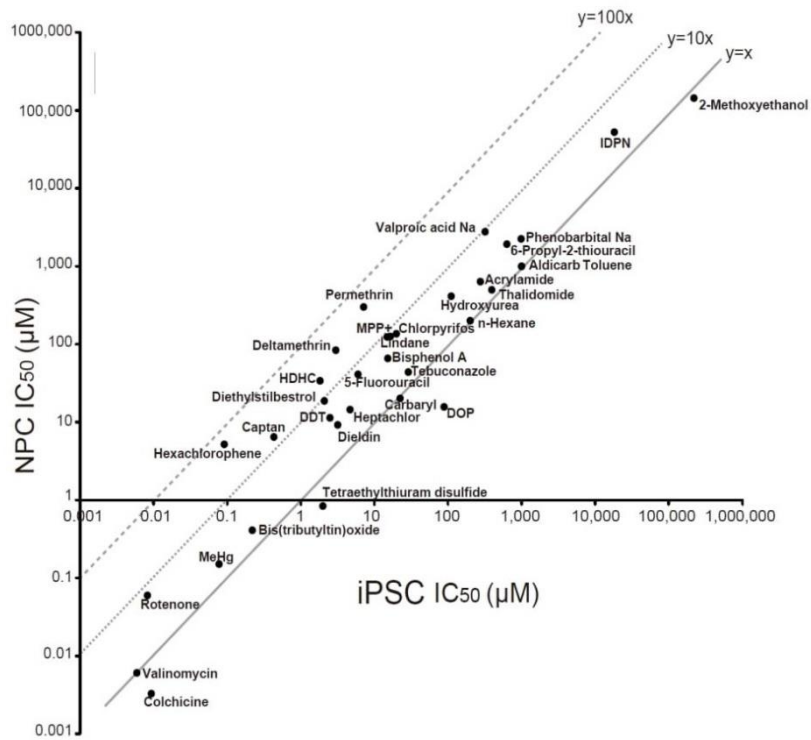


図1. ヒトiPS細胞と神経前駆細胞の化学物質に対する検出力の評価  
iPS細胞と神経前駆細胞を用いて検出力の比較を行い、iPS細胞は神経前駆細胞より検出力が高いことを示した。

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

図2. 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IC<sub>50</sub>を示す。

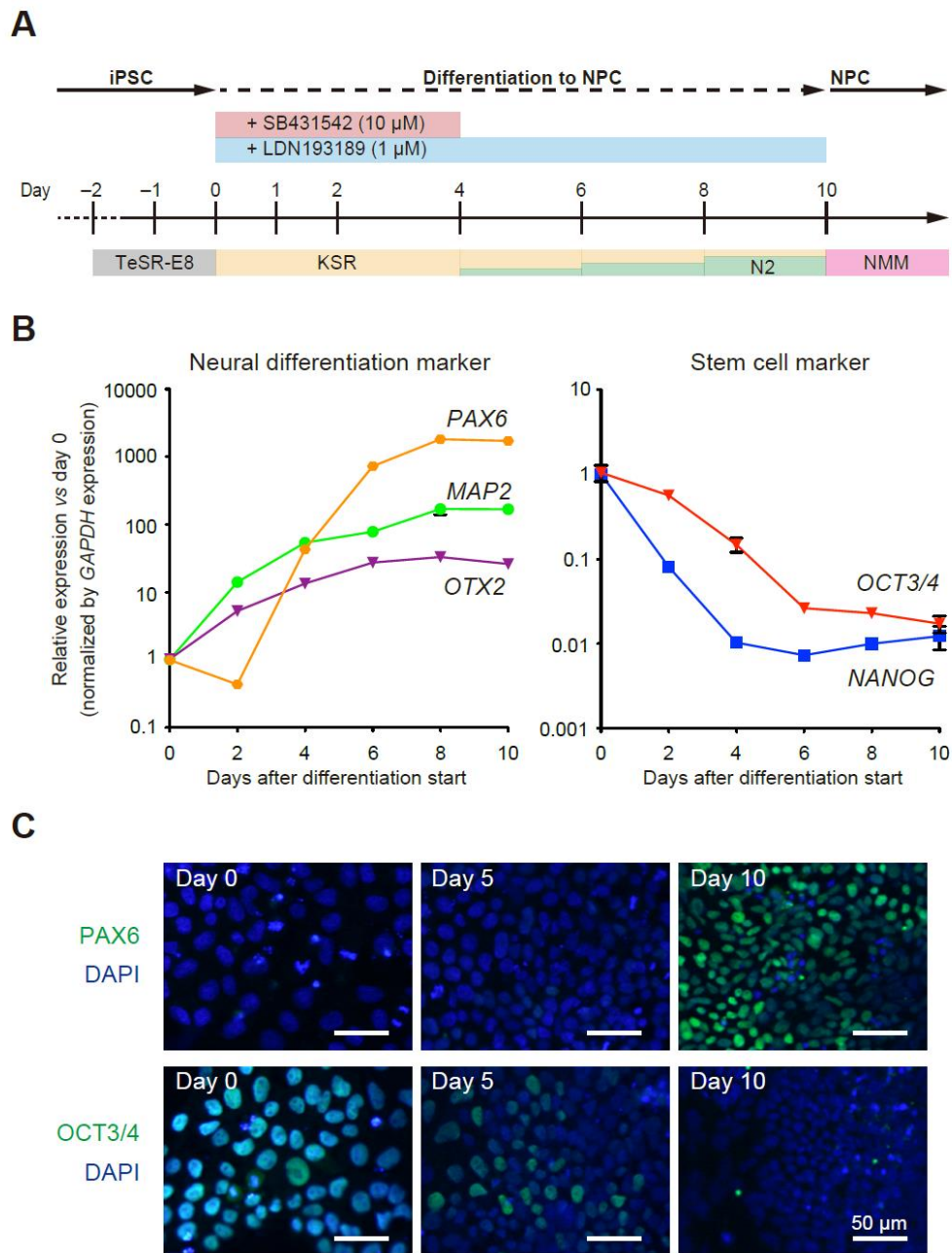


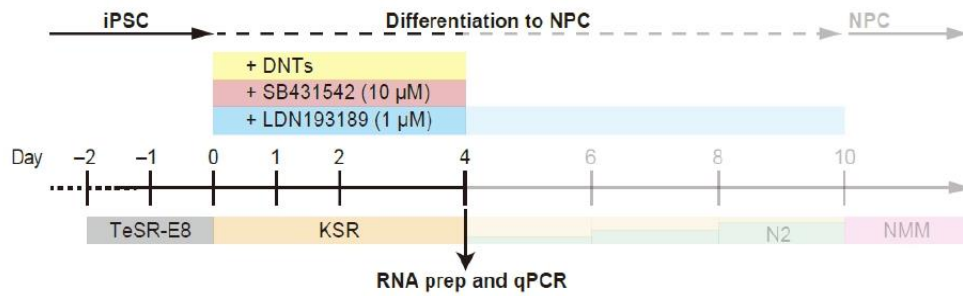
図3. ヒトiPS細胞（253G1株）の神経分化能

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4. ヒ

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)

ト iPS細

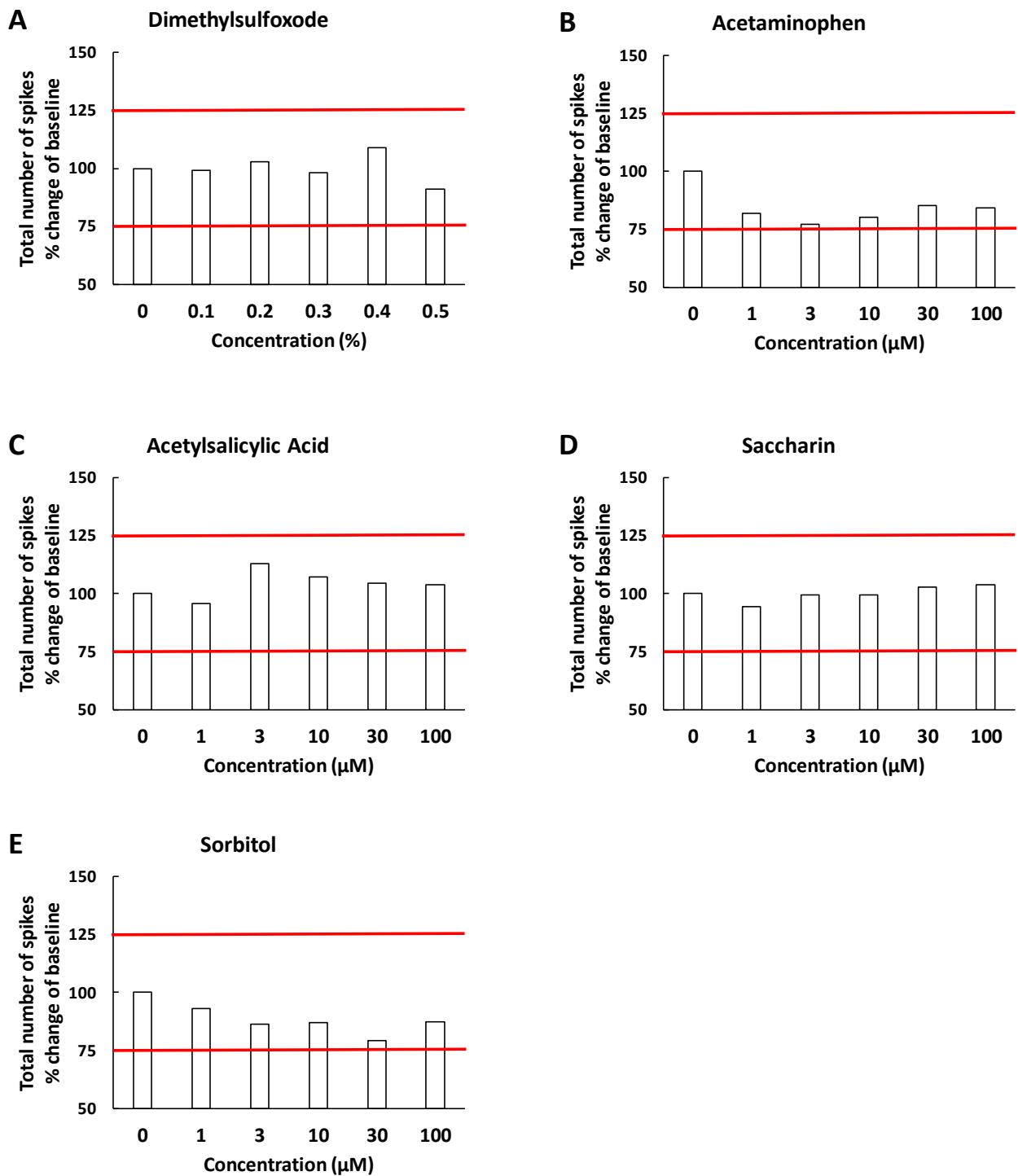
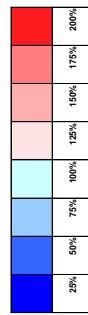
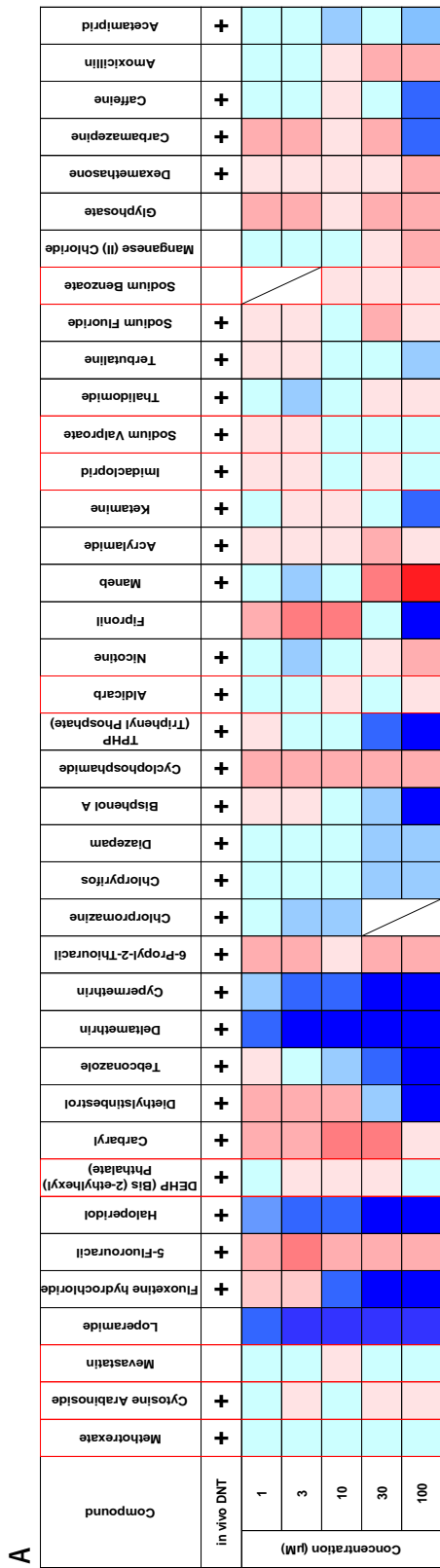


図 5. 神経毒性評価のための総発火数の閾値設定  
75%から 125%を無毒性とした。

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

図 6. ヒト細胞のMEA物質の評価ヒートマップ



**B) iPS由来神経による化学物質 (総発火数のプロ) 化合物**

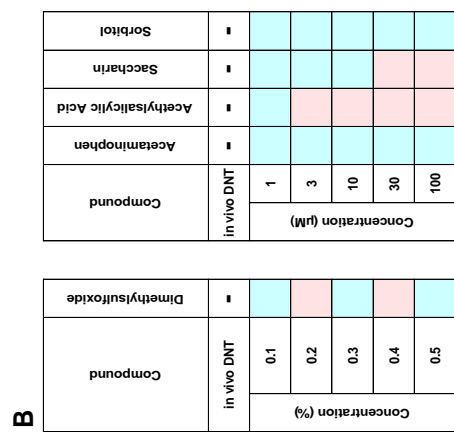
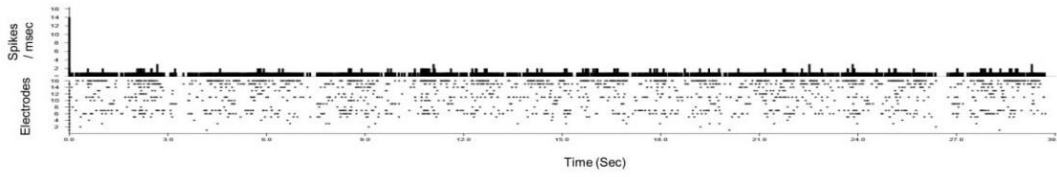
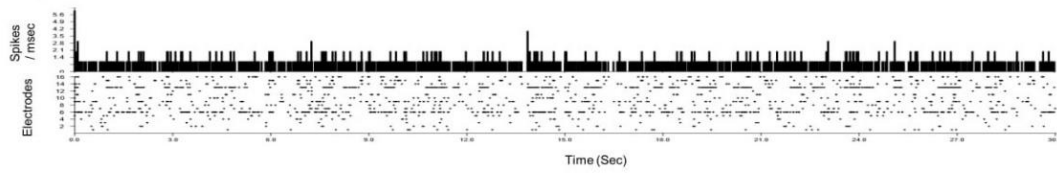


図 7. シスからイストムラプロヒ細胞神経化 (10 を間暴て、れたイタをに解た。ット電極出さスパを (A) ハロ

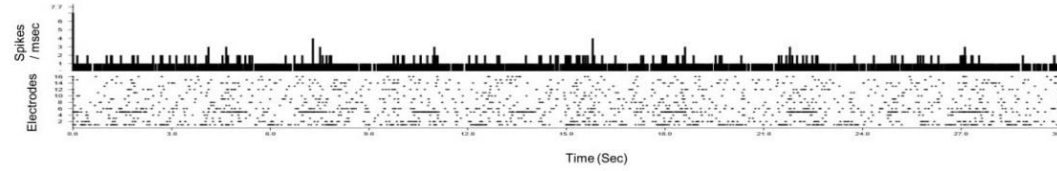
(A)  $\lambda$ -シハロトリン



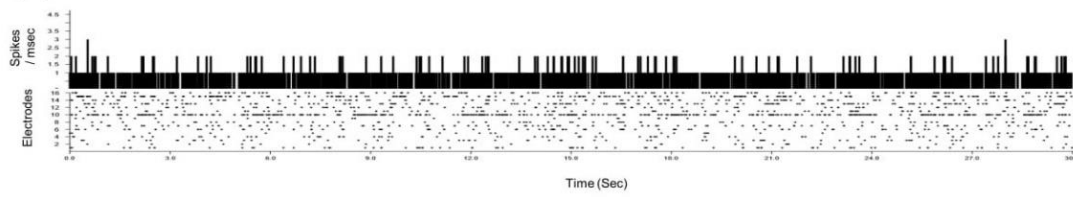
(B) シフルトリン



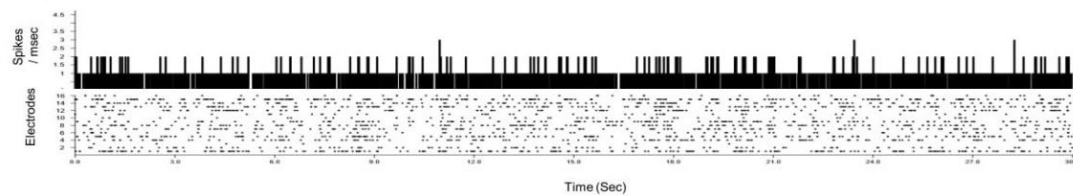
(C) シペルメトリン



(D) デルタメトリン



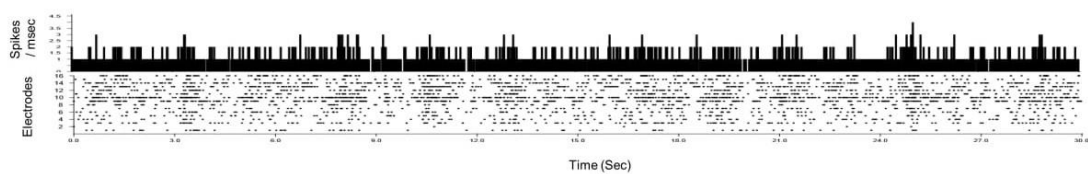
(E)  $\tau$ -フルバリネート



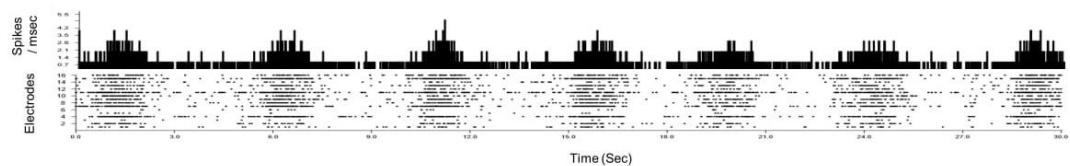
ン, (B)シフルトリン, (C)シペルメトリン, (D)デルタメトリン, (E)  $\tau$ フルバリネート

MEA ムらパヒラびー  
 テ得スのグよター  
 のよター  
 iPS 来胞物  
 由細胞合  
 (10  $\mu$ M) 10分  
 露しら  
 得スパー  
 ても析  
 各は  
 検た  
 ク  
 す。  
 シ  
 ト

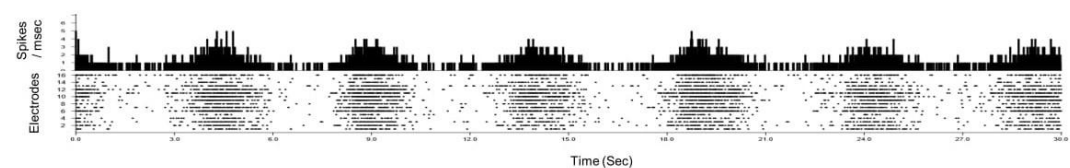
(A) アセタミプリド



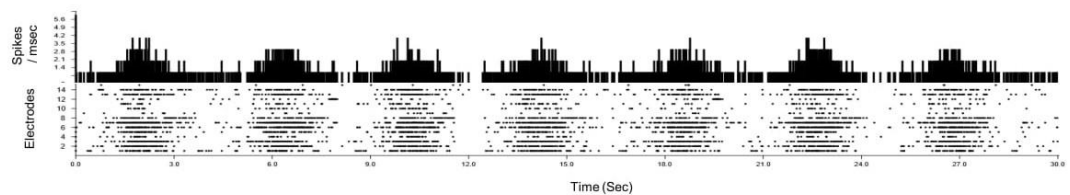
(B) クロチアニジン



(C) イミダクロプリド



(D) チアクロプリド



(E) チアメトキサム

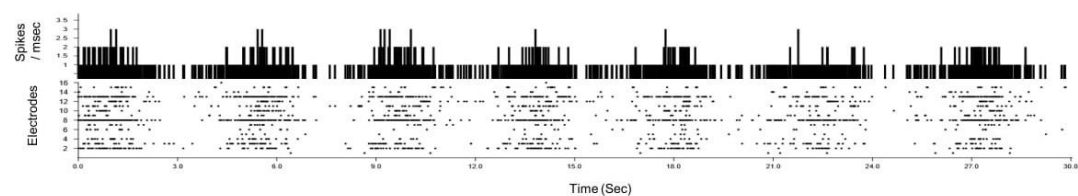
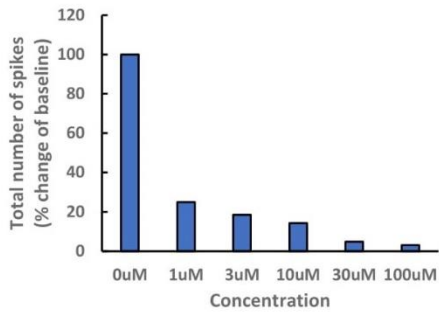
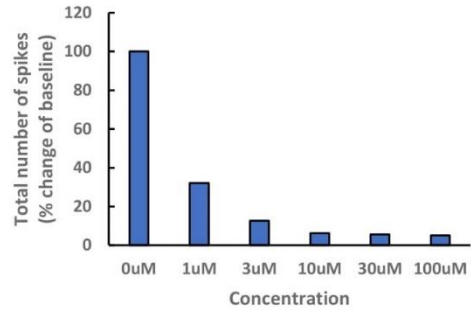


図8. MEAシステムから得られるスパイクのヒストグラムおよびラスタープロット  
ヒト iPS 細胞由来神経細胞に化合物 (10  $\mu$ M) を 10 分間暴露して、得られたスパイクデータをもとに解析した。各ドットは各電極で検出されたスパイクを示す。  
(A)アセタミプリド, (B)クロチアニジン, (C)イミダクロプリド, (D)チアクロプリド, (E)チアメトキサム

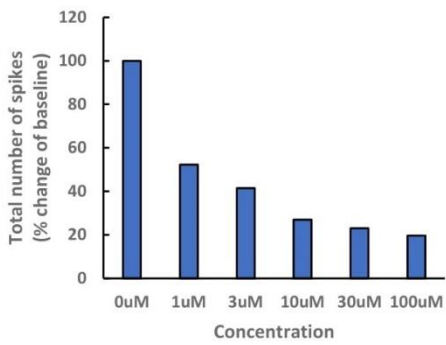
(A)  $\lambda$ -シハロトリン



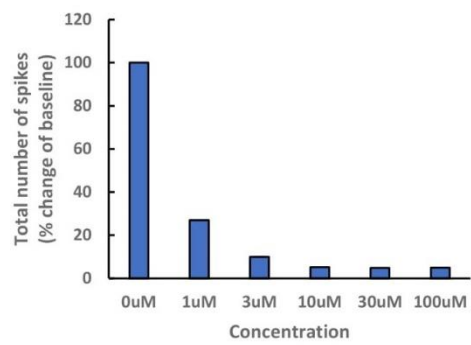
(B) シフルトリン



(C) シペルメトリン



(D) デルタメトリン



(E)  $\tau$ -フルバリネート

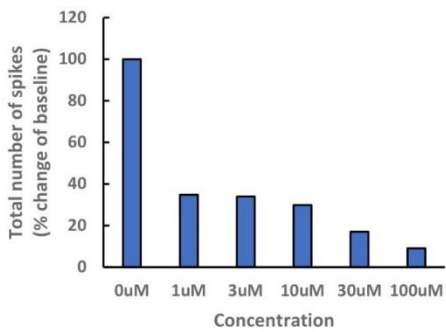
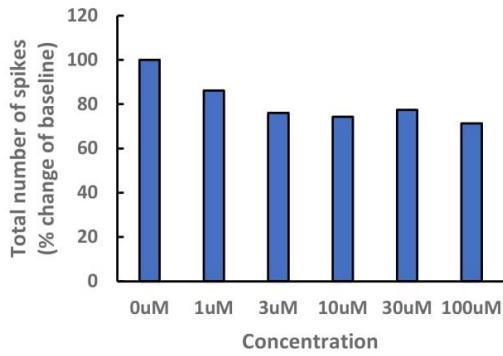


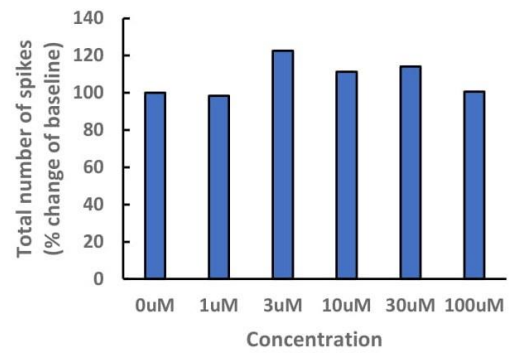
図9. ピレスロイド系農薬の総発火数

(A)  $\lambda$ シハロトリン, (B) シフルトリン, (C) シペルメトリン, (D) デルタメトリン, (E)  $\tau$ フルバリネート

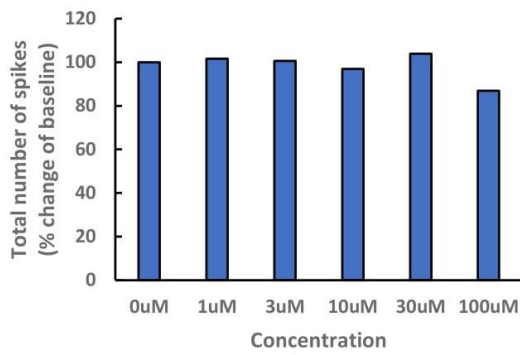
(A) アセタミプリド



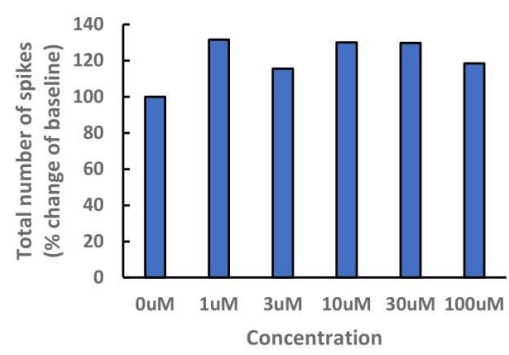
(B) クロチアニジン



(C) イミダクロプリド



(D) チアクロプリド



(E) チアメトキサム

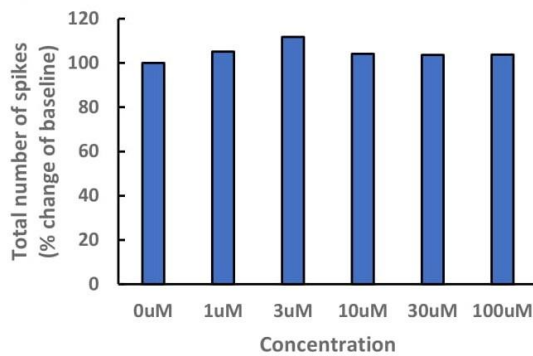
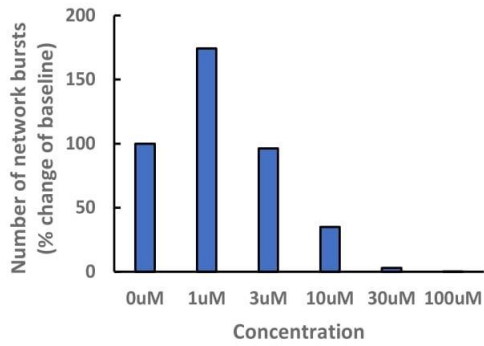


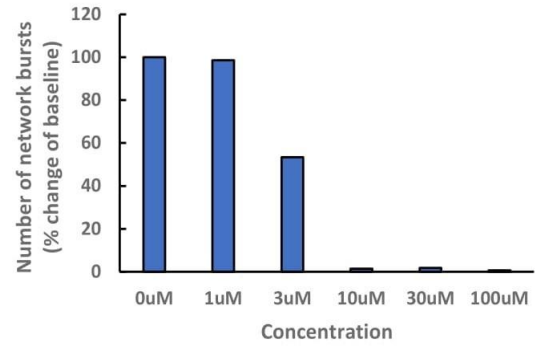
図10. ネオニコチノイド系農薬の総発火数

(A)アセタミプリド、(B)クロチアニジン、(C)イミダクロプリド、(D)チアクロプリド、(E)チアメトキサム

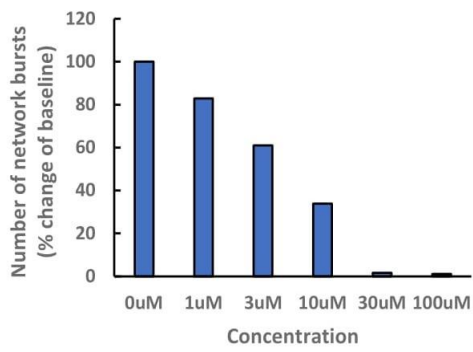
(A)  $\lambda$ -シハロトリン



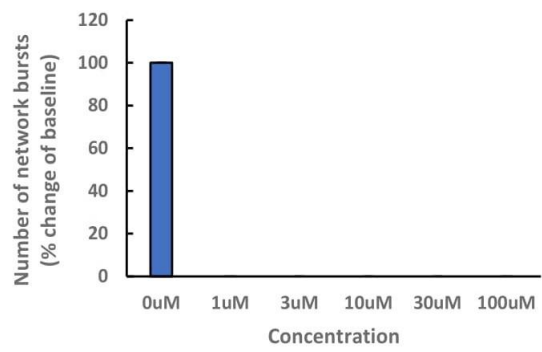
(B) シフルトリン



(C) シペルメトリン



(D) デルタメトリン



(E)  $\tau$ -フルバリネート

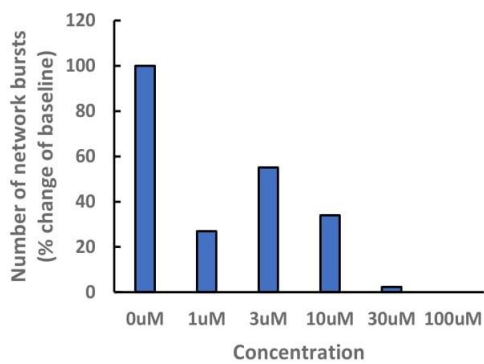
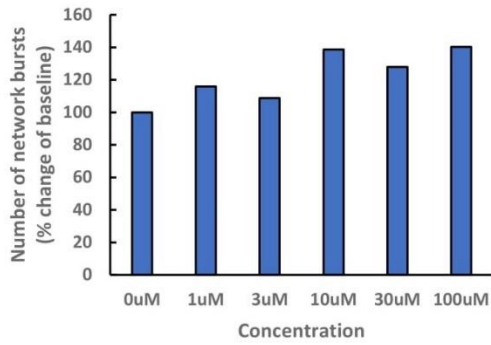
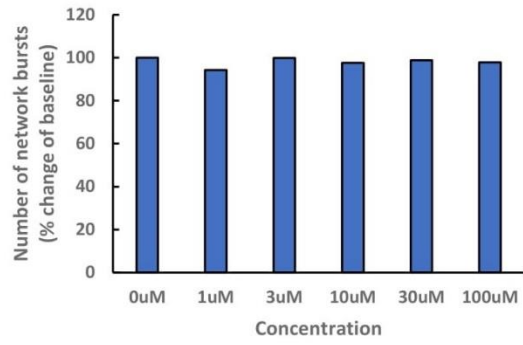


図11. ピレスロイド系農薬のネットワークバースト発火数  
(A) $\lambda$ シハロトリン, (B)シフルトリン, (C)シペルメトリン, (D)デルタメトリン, (E) $\tau$ フルバリネート

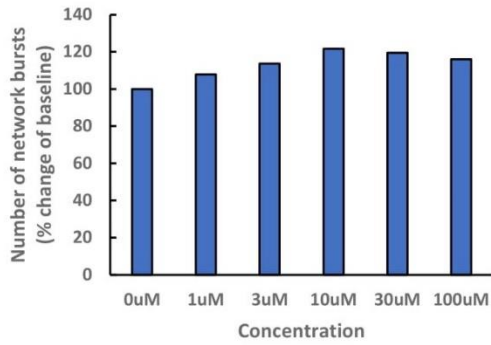
(A) アセタミプリド



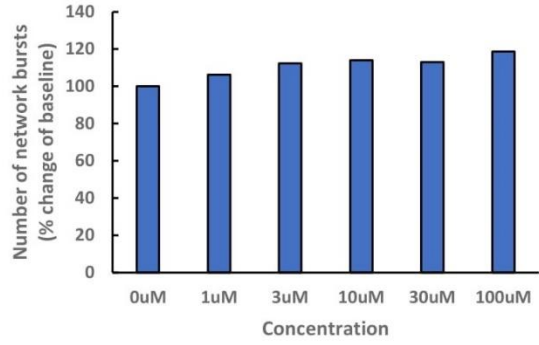
(B) クロチアニジン



(C) イミダクロプリド



(D) チアクロプリド



(E) チアメトキサム

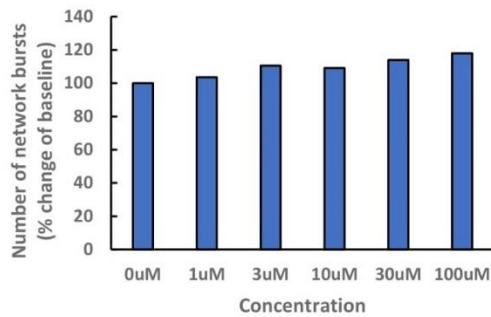


図12. ネオニコチノイド系農薬のネットワークバースト発火数

(A)アセタミプリド、(B)クロチアニジン、(C)イミダクロプリド、(D)チアクロプリド、(E)チアメトキサム

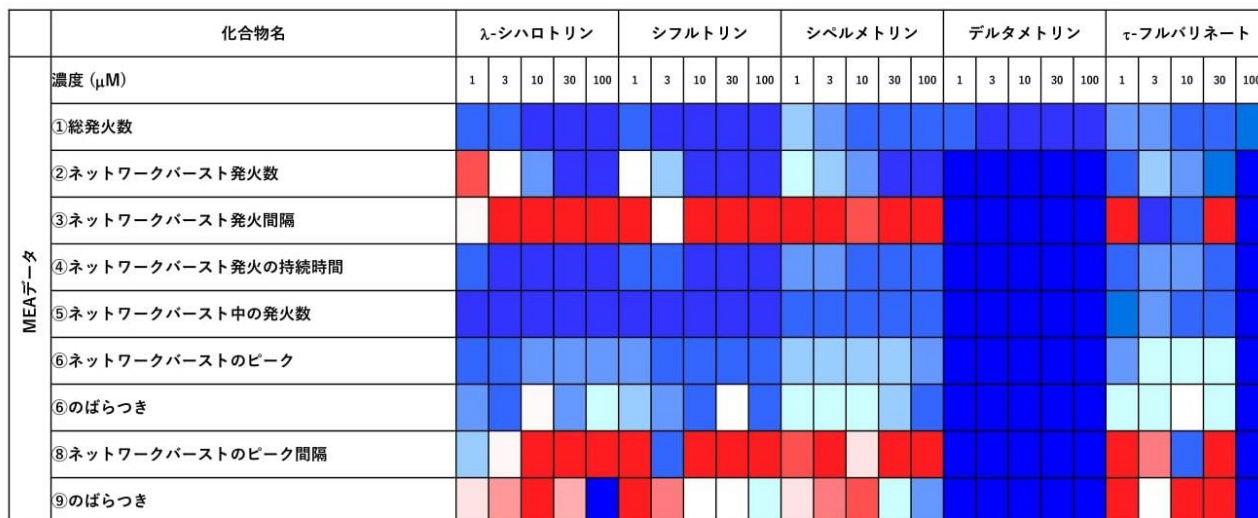


図13. MEAシステムから得られるスパイクの解析ヒートマップ  
OECD リストに含まれるピレスロイド及びネオニコチノイド系農薬の影響を示す。

## 化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発

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。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。我々の所有する iPS 細胞約 300 クローンについて外胚葉誘導後の PAX6 発現量を測定した。結果、未分化時の NANOG/OCT4 発現率が PAX6 発現率と相関することを見出した。従って、未分化状態での品質は、外胚葉分化後の品質に影響を与える可能性がある。

### 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

#### 1. 外胚葉分化能の良い iPS 細胞クローンの選別

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、遺伝子発現プロファイルと in vitro 三胚葉分化能を検討した。選択基準として、以下を設定した。

- 外胚葉分化能(PAX6+)が良い
- 中胚葉分化と内胚葉分化に問題がない (平均的に分化)
- 細胞増殖が平均的 (doubling time: 25-30h)
- iPS コロニー形態が良い
- 分化細胞の出現が低い、もしくはほとんど存在しない

遺伝子発現については、OCT4 と NANOG の発現量

を qPCR で評価した。三胚葉分化能については、フローサイトメトリーで各胚葉特異的転写因子の発現量を評価した(図 1)。

#### 2. PAX6発現量のqPCRを用いた定量的評価

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。

#### 3. 細胞内フローサイトメトリーによる転写因子の評価

上述の通り、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。また、RNA-seqによって、PAX6の発現量の高いクローンを選別した。しかし、mRNAの発現だけでなくタンパク発現を評価することが細胞機能に当該転写因子が果たす役割を検討するためには重要であることから、OCT4, NANOG, PAX6, SOX2の発現を細胞内フローサイトメトリーを用いて解析した。

iPS細胞はマトリゲルコートした6well plateで分化誘導し、回収後にPFAで固定し、細胞内フローサイトメトリーを行って各々の転写因子の陽性率を算出した。統計学的解析はGraphpad PRISM 9を用いて行った。

#### （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。

### C. 研究結果

#### 1. 外胚葉分化能の良いiPS細胞クローンの選別

OCT4、NANOG遺伝子の発現量を評価したがいずれも標準範囲であった。また、in vitroの三胚葉分化について、いずれの株も良好な分化能を示した。特に神経細胞の前駆細胞である外胚葉前駆細胞については、いずれも70%以上の分化能を示した(図2)。よっ

て、これらのクローンを外胚葉分化能の良いクローンとして選別した。

#### 2. PAX6発現量のqPCRを用いた定量的評価

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。今後、これらのクローンを譲渡して神経分化実験に供する予定とした(図3)。

#### 3. 細胞内フローサイトメトリーによる転写因子の評価

健常人ドナー由来の336クローンについて、未分化状態でのOCT4+NANOG+細胞と、外胚葉誘導時のPAX6+SOX2+細胞の比率を調べたところ、両者の間には弱い相関関係が認められ、OCT4+NANOG+陽性率が高い細胞ほど、PAX6+SOX2+双方が陽性になる傾向が認められた(図4)。一方、不良な外胚葉系細胞と考えられるPAX6-SOX2+ (SOX2単独陽性)細胞の比率は、OCT4+NANOG+陽性率と逆相関した(図5)。

### D. 考察

当初の検討では、細胞内フローサイトメトリーの結果をもとにPAX6/SOX2の高発現クローンを選別し、実際に神経分化に供したが、本研究班で用いている分化法では安定したPAX6高発現が達成できなかった。そこで、我々の所有するiPS細胞約300クローンについて、外胚葉誘導後にRNAを採取し、PAX6発現量を調べたところ、その発現にはかなりばらつきがあり、全く発現していない細胞もあることが明らかになった。

細胞内フローサイトメトリーによる評価では、NANOG/OCT4によって定義される未分化能は、PAX6+SOX2+の外胚葉系細胞への分化能と相関して

いた。従って、未分化状態での品質は、外胚葉分化後の品質に影響を与える可能性がある。

神経毒性評価においては、定格化されたプロトコルの下で、安定して高品質の神経細胞を産生する株を選別する必要がある。未分化多能性幹細胞で発現している OCT4 及び NANOG の各転写因子はいずれも多能性維持に中核的な役割を果たしているため、これらの遺伝子の高発現は多能性幹細胞としての品質をある程度担保すると考えられる。今回、多数の iPS 細胞クローンを用いた検討で、OCT4/NANOG 発現と外胚葉分化時の PAX6/SOX2 発現に相関があることを見出した。これは新しい知見であるが、一方で相関は弱く、これらの遺伝子の発現が外胚葉分化の決定因子ではないことを示唆している。今後は、未分化細胞で発現している遺伝子のうち、外胚葉分化能に寄与するものを探索し、未分化段階での分化能予測をより正確にする必要があると考える。例えば、未分化状態での SALL3 の発現量は、外胚葉分化と相関することが知られているが(Kuroda T, Nature Communications 2019)、このような分子は他にも存在する可能性があり、多数のクローンを用いた解析で新規分子が同定されることが期待される。

多能性幹細胞から各種細胞を分化誘導する際には、しばしば分化のばらつきが問題になる。これには様々な要因が関与しているが、例えば単純に継代数を増し、培養環境に細胞を馴化することにより、神経分化が安定するという報告もある (Koehler KR, BMC neuroscience 2011)。定方向性分化による神経細胞誘導は時間がかかり、その間に様々な細胞外環境が変動するため、最終分化産物の品質にばらつきを与える可能性がある。この問題を解消するためには、転写因子の強制発現による細胞運命転換系が有用な可能性がある。神経細胞においては、NGN2 の強制発現により多能性幹細胞を神経細胞に分化転換できる(Lin HC, Stem Cell Reports 2021)。また、分化神経

(前駆)細胞に混入する未分化細胞を除去する試薬を併用すると純度が上がる可能性がある(Tanosaki S, iScience 2020)。しかし、いずれの方法においても、現時点ではアカデミアの各研究室レベルでの再現性が検討されている状況で、広く毒性評価に利用するために企業を含めた施設に利用してもらえだけの汎用性には欠けているのが現状である。

毒性評価における技術移転性を考慮すると、複数の研究室で同じプロトコルで同じような結果ができるのかを調べなくてはならないが、iPS 細胞の維持培養から神経細胞の分化、最終分化した神経細胞の品質評価に至るプロトコルを統一し、複数研究室で評価するためには大きなコストがかかることが問題である。

また、ヒト iPS 細胞そのものは、公的な細胞バンクに寄託されていて企業でも利用可能になっているが、化学物質の神経毒性評価に関して必要な情報やツールも、公的に利用可能となるように整備していく必要がある。具体的には株間差や分化誘導法、ゲノムや遺伝子発現などの NGS データなどがセットで公開されていることが望ましい。例えば、日本医療研究開発機構再生医療研究開発課再生課では、過去に、iPS 細胞からのロバストな分化誘導系を開発し、バリデーションまで行うという課題の公募があった([https://www.amed.go.jp/koubo/01/02/0102B\\_00093.htm](https://www.amed.go.jp/koubo/01/02/0102B_00093.htm))。このような課題と連携し、分化誘導法や評価法の(現時点における)コンセンサスを形成し、その条件の下で細胞分化に係る情報を収集していく必要があるかもしれない。

## E. 結論

我々は、多数の iPS 細胞の外胚葉分化能を検討した。かなりばらつきが多く、現時点では神経分化に最適なクローンを PAX6 発現のみで予測する確固たる手法は見いだせなかった。今後、iPS 細胞を毒性評価に広く利用していくために

は、プロトコルを統一し、毒性評価に必要な情報を公的に入手できるようにする体制づくりが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文

なし

##### 2. 学会発表

なし

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 1) STEMdiff Trilineage differentiation kit (StemCell Technologies)

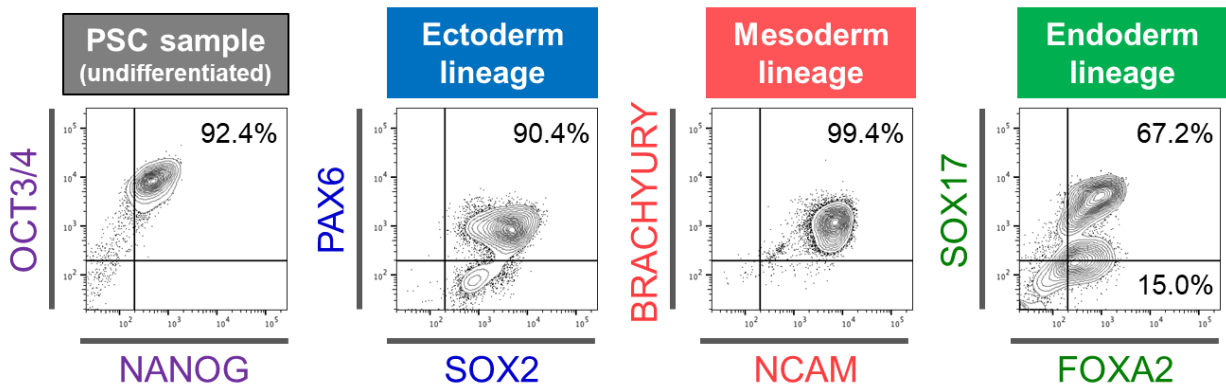
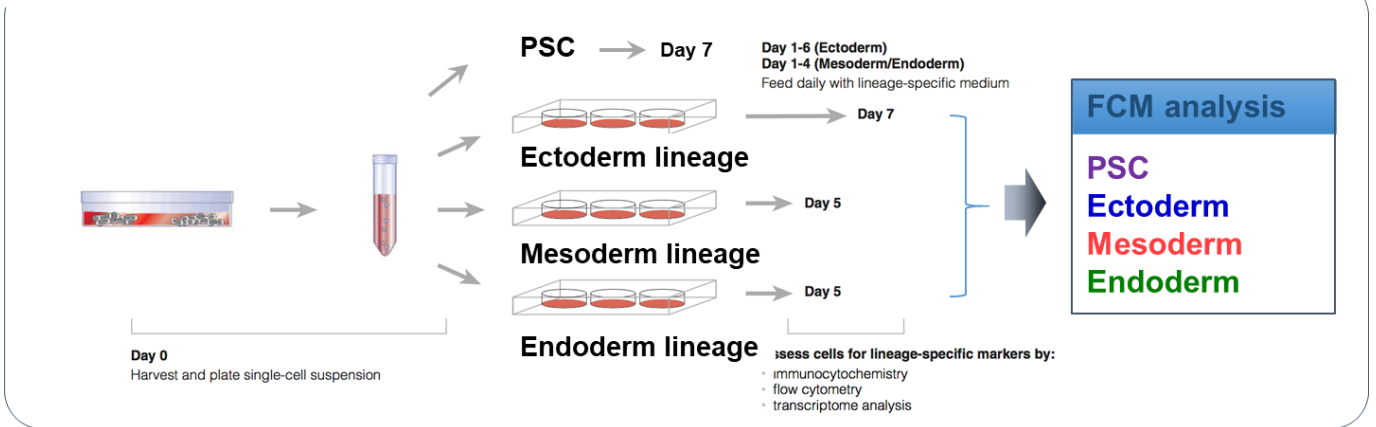
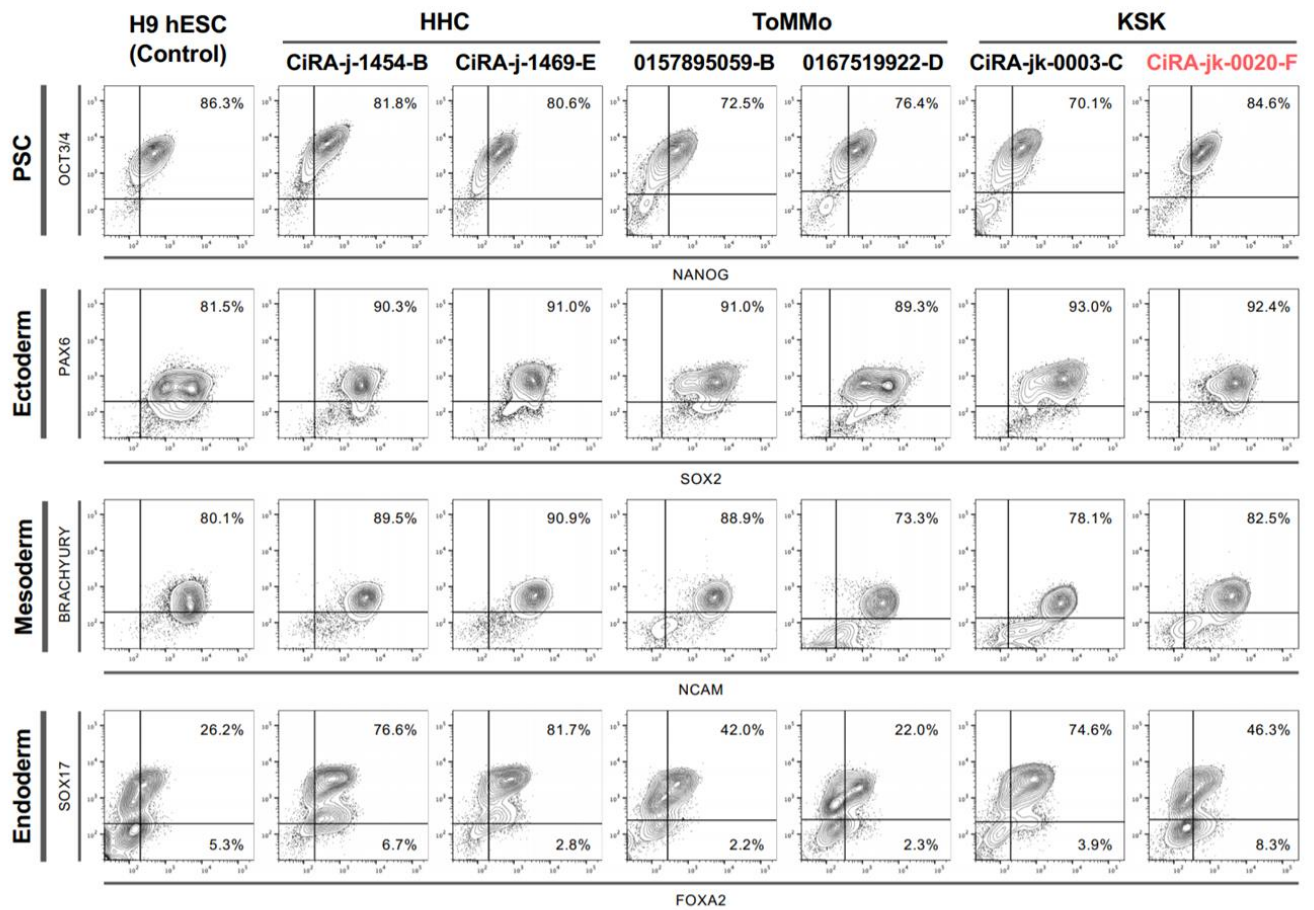


図1：分化能評価法の概要（上）と代表的な分化能評価結果（下）



Copyright © 2019 Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University. All rights reserved

図2 : iPS細胞株の分化能。右端は対照ES細胞株(H9)。

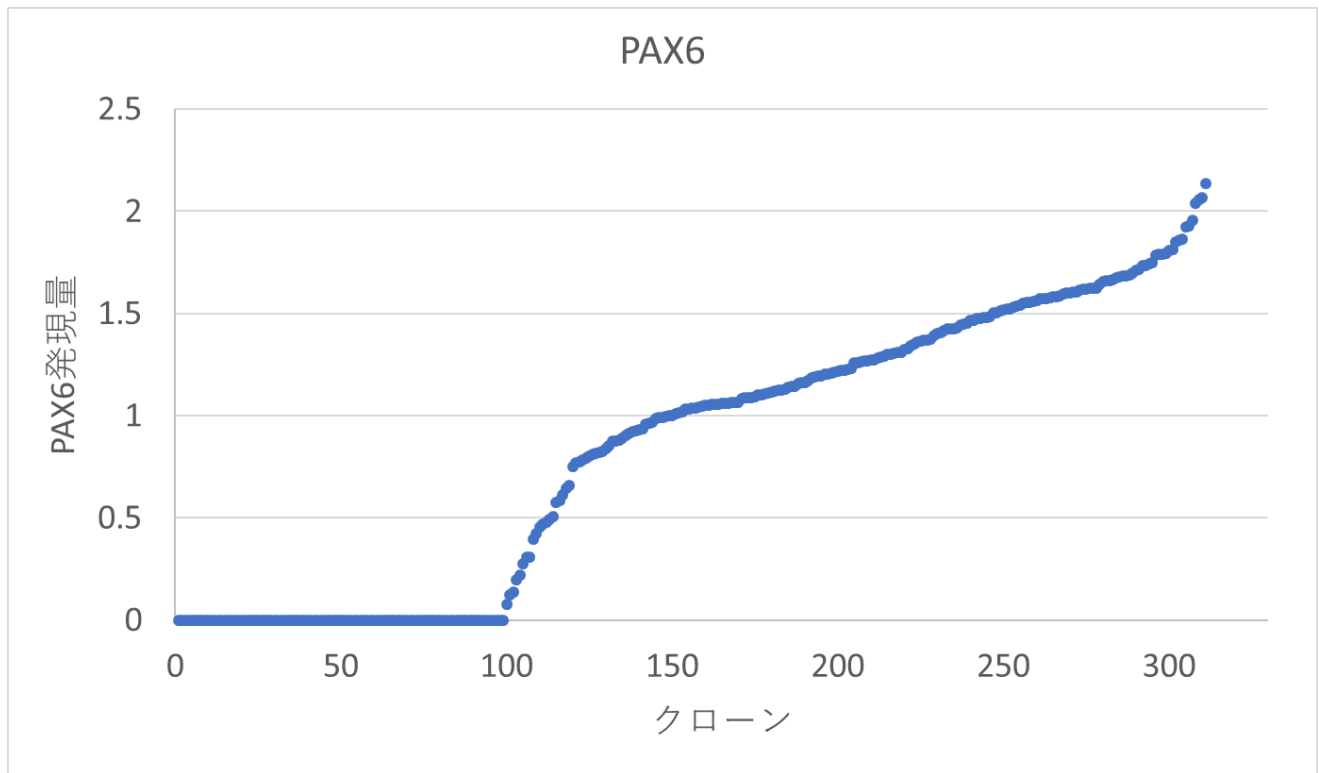


図3：外肺葉分化させた iPS 細胞クローンの PAX 発現量の分布

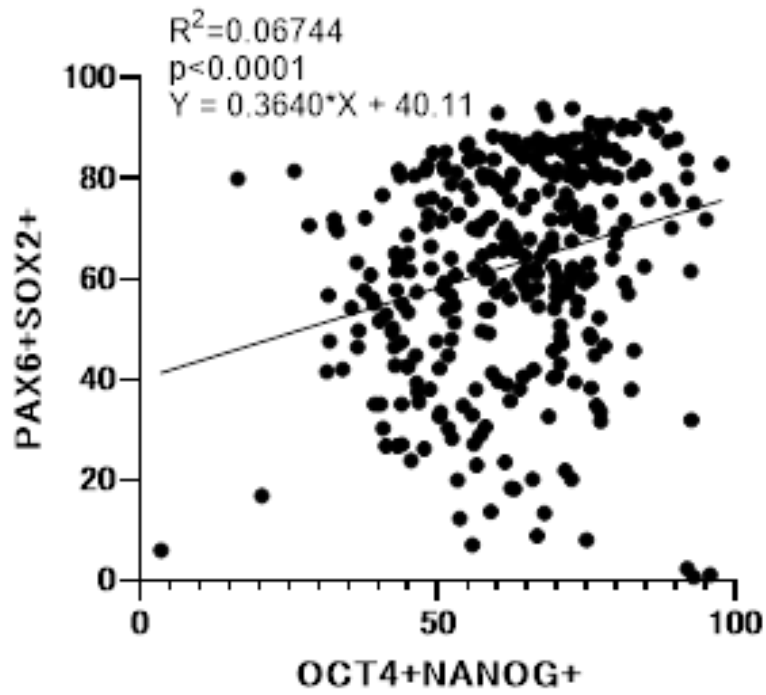


図4：未分化iPS細胞のOCT4/NANOG陽性率と外胚葉分化後のPAX6+SOX2+細胞存在率の相関。N=336。統計学的解析はGraphpad PRISM 9を用いて行った。

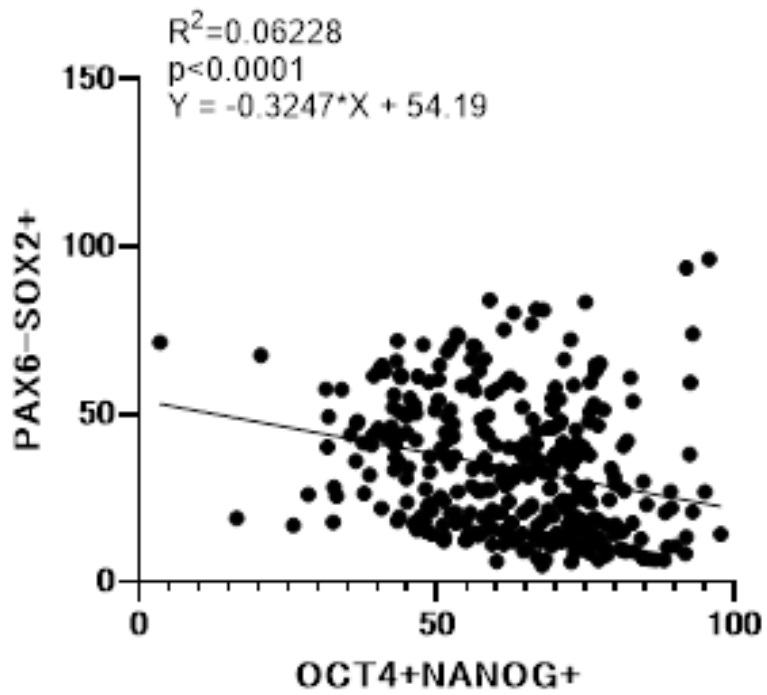


図5：未分化iPS細胞のOCT4/NANOG陽性率と外胚葉分化後のPAX6-SOX2+細胞存在率の相関。N=336。統計学的解析はGraphpad PRISM 9を用いて行った。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（19KD0201）

研究成果報告書

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発

研究代表者 諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

分担課題： In vivo 毒性評価

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

研究要旨

本研究では、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った。研究分担者は、動物を用いたインビボの系でヒト重要脳発達障害物質および米国FDAにて発達神経毒性試験で陰性判定が得られているグリホサートについて発達期曝露による発達神経毒性評価を実施した。また、ヒト重要脳発達障害物質をラットに28日間反復投与を行い、発達期曝露で認められた神経新生障害と同様の影響が一般毒性試験の枠組みで認められるかの検証を実施した。発達期曝露の系では、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1.5%, 3.0%、グリホサート製剤を1.0%（グリホサート 0.36%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。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。一般毒性試験の系では、5週齢の雄SDラットに、酢酸鉛を4,000 ppm, 8,000 ppm、塩化アルミニウムを4,000 ppm, 8,000 ppm、エタノールを10%, 16%の濃度で28日間飲水投与した。曝露終了後に動物を解剖して脳を採材した。免疫組織化学的解析では、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯（SGZ）における顆粒細胞系譜の分化状況（GFAP, SOX2, TBR2, DCX, NeuN）、海馬歯状回門の介在ニューロンの分布（reelin, parvalbumin, somatostatin, calbindin, calretinin, GAD67）、細胞増殖とアポトーシス（PCNA, TUNEL）及び神経可塑性（FOS, ARC, COX2）を中心に検討し、標的となる顆粒細胞の分化段階を同定するとともに、神経新生障害に関連する分子のqRT-PCRによる遺伝子発現解析を実施し、障害機序を検討した。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に始まる成熟後における酸化ストレスに対する脆弱性の増加、及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。神経新生に関しては、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、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前駆細胞が増加し、それには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の関与が示唆された。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や離乳時以降のシナプス刈込の促進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。グリホサートについては、原体/含有製剤共に不可逆的な酸化ストレスが誘導された。また、離乳時にはSHH/GLI1シグナル伝達低下を伴った顆粒細胞系譜の増殖抑制と、グレリン受容体を介した神経保護作用の関与を示唆するシナプス可塑性の亢進が共通して確認された。一方で、グリホサート原体と製剤による影響に差異もみられたが、これには生物学的利用率の違いが影響している可能性が考えられた。28日間反復投与においては、酢酸鉛では発達期曝露と共通した障害としてGABA性介在ニューロン亜群の変化、神経炎症の誘発、抗酸化ストレスマーカーの発現上昇、BDNF-TrkBシグナル経路の活性化を認め、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜における障害標的細胞の違いやシナプス可塑性指標の増加を認めた。エタノールでは発達期曝露と共通した障害として神経炎症の誘発やシナプス可塑性指標の低下を認め、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜における障害標的細胞、GABA性介在ニューロン亜群の変化、グルタミン酸受容体遺伝子の発現変化を認めた。塩化アルミニウムでは発達期曝露と共通した障害は確認されず、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜の障害標的細胞、抗酸化ストレス関連遺伝子の発現低下、神経炎症の誘発を認めた。以上、ラットを用いてヒト重要脳発達障害物質およびグリホサートの発達期曝露による神経新生への影響を確認するとともに、神経新生障害標的は発達期曝露と異なるものの、28日間反復投与毒性試験の枠組みにおいても発達神経毒性は検出可能であることが示唆された。

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、OECDと共有している化学物質のリストをもとにインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性あるいは反復

投与による神経毒性評価を行う。

神経発達は神経幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖・分化、移動、成熟の各段階から構成され、神経細胞系譜が標的となる発達神経毒性ではこれらの過程のいずれかが障害を受ける。神経新生はそれら全て

の発達過程を含むため、生後に始まる海馬の神経新生は様々な発達神経毒性物質の発達期曝露に対して感受性を示す可能性が高い。また、成体でのニューロンの生存や維持に関わる分子機序には、神経発達における神経突起やシナプスの形成、髄鞘形成の機序と共通する部分が多い。そのため、成熟神経に対する毒性物質は発達神経毒性を示す可能性がある。

令和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不可逆性も含めて検討した。令和二年度は令和元年度の実施内容の追加解析及び米国 EPA において発達神経毒性試験にて陰性評価が行われているグリホサートについてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて評価した。令和三年度においては、より簡易な曝露系である一般毒性試験の枠組みでヒト重要脳発達障害物質をラットに曝露し、発達期曝露にて認められた神経新生影響がこれらの系において検出可能かを検討した。

## B. 研究方法

### (1) ヒト重要脳発達障害物質の発達期曝露による神経新生影響評価

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 0.2%、0.4%、塩化アルミニウム 0.25%、0.5%、エタノール 10%、12.5% 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。最高用量は、発達神経毒性試験ガイドライン(OECD TG426)に準じ、予備的に酢酸鉛 0.2%、0.4%、塩化アルミニウム 0.25%、0.5%、1%、エタノール 10%、12.5% の濃度で母動物に対して飲水投与した際に、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定した。本実験では、出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に 8 匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。出生後 21 日目(離乳時; PND 21)に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。各群 6 匹以上の児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。

PFA 灌流固定脳については大脳の bregma の後方約 -3.5 mm の 1 カ所ですべて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), GAD67)、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、RT-PCR により遺伝子発現解析を実施している。

酢酸鉛曝露実験では、雌児動物で PND 21, PND 77 における脳組織中の鉛濃度を ICP-MS 分光解析 (HP-7500; Hewlett-Packard 社, Palo Alto, CA, USA) により測定した。

### (2) グリホサートの発達期曝露による神経新生影響評価

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 10-12 匹ずつとして、純水、グリホサート原体 1.5%、3.0%、グリホサート製剤 1.0% (グリホサート 0.36% 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。PND 21 および PND 77 における海馬神経新生に関連した解析については、(1)の研究手法と同様に実施した。また、海馬から抽出した total RNA を用い、RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析および海馬組織ホモジェナイズ液の malondialdehyde 測定を追加にて実施した。

### (3) ヒト重要脳発達障害物質の 28 日間曝露による神経新生影響評価

5 週齢の雄 SD ラット(4 週齢で入手、日本エスエルシー)を、一群あたり 24 匹ずつとして、純水、酢酸鉛 4,000 ppm, 8,000 ppm、塩化アルミニウム 4,000 ppm, 8,000 ppm、エタノール 10%、16% (w/v) の濃度でまで飲水投与した。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最低週に 2 回の頻度で測定した。曝露終了後である 28 日後に全数を解剖に供した。各群 10 匹以上の動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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。免疫化学組織解析・遺伝子解析については(1)の研究手法と同様に実施した。

(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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下で

の灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、すべての実験における動物飼育、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

### (1) ヒト重要脳発達障害物質の発達期曝露による神経新生影響評価

酢酸鉛では免疫組織化学的検索により顆粒細胞系譜においてPND 21でDCX陽性細胞の減少、SOX2, TBR2陽性細胞の増加を認めた。また、歯状回門のGABA性介在ニューロンに関連してPND 21、PND 77でCALB2陽性細胞の増加、PND 21でSST陽性細胞の増加を認めた(図1)。さらに、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 21でCD68陽性細胞の増加及び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)。また、PND 21でp-TrkB陽性細胞の増加、PND 77で細胞老化指標の $\gamma$ -H2AX陽性細胞の増加を認めた(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、酸化ストレス関連遺伝子やサイトカインの発現増加が認められた(表1)。PND 77においては細胞周期関連遺伝子の発現の変動が認められ、抗酸化ストレス関連遺伝子が減少し、サイトカインなどの炎症関連遺伝子について増加ないし増加傾向を認めた(表2)。

エタノールについては免疫組織化学的検索により下流細胞系譜においてPND 21でDCX陽性細胞の減少、SOX2陽性細胞の増加を認め、PCNA陽性増殖細胞の増加を認めた。また、歯状回門のGABA性介在ニューロンに関連してPND 21でCALB2陽性細胞、SST陽性細胞の増加を認めた。さらに、PND 21において歯状回門部のGFAP陽性アストロサイトの増加、PND 21、PND 77においてCD68陽性ミクログリア/マクローファージの増加を認めた(図2)。遺伝子発現解析により、PND 21における*Gfap*および細胞周期関連遺伝子やサイトカインの発現変動を認め、*Chrna7*, *Drd2*の発現増加及び*Chrn2*の発現低下、AMPA型グルタミン酸受容体遺伝子の発現増加を認めた(表3)、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、*Pvalb*, *Reln*, *C3*の発現低下、*Tnf*の発現上昇を認めた(表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3)。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、*De*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5)。

### (2) グリホサートの発達期曝露による神経新生影響評価

PND 21では、RNA-Seqによりグリホサート原体で286、グリホサート含有製剤で296遺伝子の発現が変動した。GO解析ではグリホサート原体/含有製剤共に、免疫応答やアポトーシス、細胞増殖制御、神経発達等に関連するGO termが抽出された。免疫染色では、原体3.0%、製剤共に神経新生部位でPCNA陽性細胞が減少し、ARC

陽性顆粒細胞が増加した。また、原体でTUBB3陽性未成熟顆粒細胞が減少した。歯状回門ではGBHでcalretinin陽性介在ニューロン及びGFAP陽性アストロサイト、CD68陽性ミクログリアが増加した(図4)。PND 77では、製剤のTUNEL陽性細胞及びTUBB3陽性未成熟顆粒細胞、COX2陽性顆粒細胞が増加した(図4)。qRT-PCRでは、PND 21でグリホサート原体/含有製剤で*Mt1*及び*Casp8*, *Ghsr*の発現が増加し、*Ccnd1*及び*Shh*, *Gli1*, *Bcl2*の発現が減少した(表6)。PND 77ではグリホサート原体/含有製剤で*Cat*の発現増加が確認された(表7)。また、海馬におけるmalonaldehyde値はPND 77に原体1.5%及び製剤で上昇した(図5)。

### (3) ヒト重要脳発達障害物質の28日間曝露による神経新生影響評価

酢酸鉛では、免疫組織学的解析により顆粒細胞系譜におけるTBR2陽性細胞の減少及びNeuN陽性細胞の増加、TUNEL陽性細胞の増加傾向を認めた。また、歯状回門部においてメタロチオネイン陽性細胞、CALB2陽性介在ニューロン、GFAP陽性アストロサイトの増加を認めた。遺伝子発現解析の結果、BDNFの受容体である*Ntrk2*の発現が増加した。また抗酸化関連遺伝子、シナプス可塑性関連遺伝子の増加を認めた(表8)。

エタノールでは、免疫組織学的解析により顆粒細胞系譜におけるGFAP、SOX2陽性細胞およびシナプス可塑性指標のFOS陽性細胞の減少を認めた。歯状回門においてはPVALB陽性介在ニューロンの増加、RELN陽性介在ニューロンの減少、GFAP陽性アストロサイトおよびIba1, CD68陽性ミクログリアの増加を認めた(図7)。遺伝子発現解析により、海馬歯状回における細胞増殖指標である*Mcm6*およびGABA性介在ニューロンマーカーとしての*Calb2*の発現低下、またグルタミン酸受容体遺伝子の発現上昇を認めた(表9)。

塩化アルミニウムでは、免疫組織学的解析により顆粒細胞系譜におけるNeuN陽性細胞の増加及びSOX2陽性細胞の用量依存的な減少傾向を認め、シナプス可塑性指標のARC陽性細胞の増加を認めた。歯状回門においてはGFAP陽性アストロサイトの増加を認めた。遺伝子発現解析により、細胞増殖指標の*Pcna*の遺伝子発現の減少及びGABA性介在ニューロンマーカーにおける*Pvalb*の遺伝子発現の増加が認められた(表6)。また、*Nos2*の発現上昇並びに抗酸化ストレス関連遺伝子の発現低下が認められ、神経栄養因子*Bdnf*の発現増加を認めた(表10)。

## D. 考察

### (1) ヒト重要脳発達障害物質の発達期曝露による神経新生影響評価

酢酸鉛の発達期曝露により、酸化ストレスの誘導から成熟後には酸化ストレスに対する脆弱性の増加、及び持続的な神経炎症が起こることが示唆された。神経新生においては、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、それにはBDNF-TrkBシグナル経路を介したSST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。

エタノールの発達期曝露は、離乳時におけるグリオーシスを誘発し、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-2a前駆細胞を増加させそれには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。また、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や離乳時以降のシナプス刈込の促進が影響している可能性が示唆された。

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。

## (2) グリホサートの発達期曝露による神経新生影響評価

グリホサート原体/含有製剤共に、歯状回で成熟後に及ぶ不可逆的な酸化ストレスが誘導された。また、離乳時には SHH/GLI1 シグナル伝達低下を伴った顆粒細胞系譜の増殖抑制と、グレリン受容体を介した神経保護作用の関与を示唆するシナプス可塑性の亢進が共通して確認された。一方で、海馬神経新生への影響にグリホサート原体と製剤の間で差異もみられたが、これには両者の生物学的利用率の違いが影響している可能性が考えられた。

## (3) ヒト重要脳発達障害物質の 28 日間曝露による神経新生影響評価

酢酸鉛では発達期曝露と共通した障害として GABA 性介在ニューロン亜群の変化、神経炎症の誘発、酸化ストレスマーカーの発現上昇、BDNF-TrkB シグナル経路の活性化を認め、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜における障害標的細胞の違いやシナプス可塑性指標の増加を認めた。

エタノールでは発達期曝露と共通した障害として神経炎症の誘発やシナプス可塑性指標の低下を認め、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜における障害標的細胞、GABA 性介在ニューロン亜群の変化、グルタミン酸受容体遺伝子の発現変化を認めた。

塩化アルミニウムでは発達期曝露と共通した障害は確認されず、発達期曝露と異なる変化として顆粒細胞系譜の障害標的細胞、酸化ストレス関連遺伝子の発現低下、神経炎症の誘発を認めた。

分担研究者らは既に、成熟神経毒性物質とは異なり、発達神経毒性物質は発達期曝露と 28 日間曝露で異なる神経新生標的性を示すことを見出しており、今回得られた結果は矛盾しない。以上のことから、神経新生障害標的は発達期曝露と異なるものの、28 日間反復投与毒性試験の枠組みにおいても発達神経毒性は検出可能であることが示唆された。

## E. 結論

ラットを用いた酢酸鉛、エタノール、塩化アルミニウム、グリホサートの発達期曝露でそれぞれにおいて生後に始まる海馬の神経新生における顆粒細胞系譜における障害を検出し、それに関連した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。また、ヒト重要発達毒性物質は、発達期曝露と神経新生障害標的が異なるものの、28 日間反復投与毒性試験の枠組みにおいても発達神経毒性が検出可能であることが示

唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamashita, R., Takahashi, Y., Takashima, K., Okano, H., Ojiro, R., Tang, Q., Kikuchi, S., Kobayashi, M., Ogawa, B., Jin, M., Kubota, R., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Shibutani, M.: Induction of cellular senescence as a late effect and BDNF-TrkB signaling-mediated ameliorating effect on disruption of hippocampal neurogenesis after developmental exposure to lead acetate in rats. *Toxicology* 456 (2021): 152782, 2021.
2. Takahashi, Y., Yamashita, R., Okano, H., Takashima, K., Ogawa, B., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Woo, G. H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Aberrant neurogenesis and late onset suppression of synaptic plasticity as well as sustained neuroinflammation in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to ethanol in rats. *Toxicology* 462 (2021), 152958, 2021.
3. Shimizu, S., Maeda, N., Takahashi, Y., Uomoto, S., Takesue, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G. H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Oral exposure to aluminum chloride for 28 days suppresses neural stem cell proliferation and increases mature granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats. *Journal of Applied Toxicology* (in press).
4. Takahashi, Y., Okano, H., Takashima, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Ogawa, B., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Oral exposure to high-dose ethanol for 28 days in rats reduces neural stem cells and immediate nascent neural progenitor cells as well as FOS-expressing newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis. *Toxicology Letters* (in press).

### 2. 学会発表

1. 菊地 聡美、岡野 拓、高橋 康徳、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 康徳、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 康徳、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
5. 高橋康徳、山下理紗子、菊地聡美、岡野 拓、高嶋和巳、尾城椋太、唐 倩、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出生後の海馬歯状回における可逆的な神経新生障害と、成熟後における遅発影響としての新生顆粒細胞のシナプス可塑性の低下. 第3回医薬品毒性機序研究会, WEB開催, 第3回医薬品毒性機序研究会講演プログラム・要旨集 : P-1, p.44, 1月14-15日, 2021
6. 高嶋和巳、菊地聡美、岡野 拓、高橋康徳、尾城椋太、山下理紗子、唐 倩、小柳美穂子、吉田敏則、渋谷 淳 : ラットに対するバルプロ酸の胎生期投与による海馬神経新生障害性の検討と、それに対する $\alpha$ -glycosyl isoquercitrinの保護効果. 第3回医薬品毒性機序研究会, WEB開催, 第3回医薬品毒性機序研究会講演プログラム・要旨集 : P-3, p.46, 1月14-15日, 2021
7. 高橋康徳、山下理紗子、菊地聡美、岡野 拓、高嶋和巳、尾城椋太、吉田敏則、渋谷 淳 : エタノールの発達期曝露はラットの出生後の可逆的な神経新生障害を誘発し、成熟後におけるシナプス可塑性の低下をもたらす. 第37回日本毒性病理学会学術集会, WEB開催, 第37回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集 : G-1, p.53, 1月28日-29日, 2021
8. 尾城椋太、岡野 拓、高嶋和巳、高橋康徳、唐 倩、菊地聡美、吉田敏則、渋谷 淳 : グリホサート原体及びグリホサート製剤の発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸 (ハイブリッド開催), 第48回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-87E, S 123, 7月7日-9日, 2021
9. 高橋康徳、清水紗織、前田夏乃、岡野 拓、高嶋和巳、尾城椋太、Qian, TANG、菊地聡美、吉田敏則、渋谷 淳 : エタノールの28日間反復投与によるラット海馬神経新生における神経幹細胞および神経前駆細胞の減少とシナプス可塑性の抑制. 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸 (ハイブリッド開催), 第48回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-89E, S 124, 7月7日-9日, 2021
10. 清水紗織、前田夏乃、高橋康徳、唐 倩、尾城椋太、岡野 拓、高嶋和巳、菊地聡美、吉田敏則、渋谷 淳 : 一般毒性試験の枠組みでの塩化アルミニウムの28

日間投与によるラット海馬神経新生への影響. 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸 (ハイブリッド開催), 第48回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-93S, S 125, 7月7日-9日, 2021

11. 前田夏乃、清水紗織、高橋康徳、唐 倩、尾城椋太、岡野 拓、高嶋和巳、菊地聡美、吉田敏則、渋谷 淳 : 一般毒性試験の枠組みでの酢酸鉛の28日間投与によるラット海馬神経新生への影響. 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸 (ハイブリッド開催), 第48回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-94S, S 126, 7月7日-9日, 2021

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

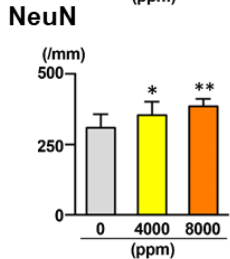
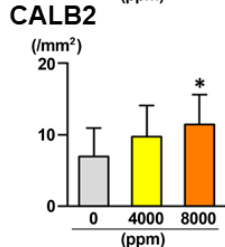
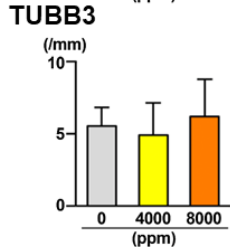
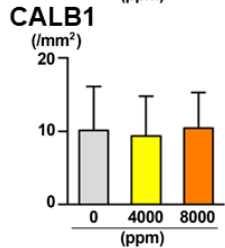
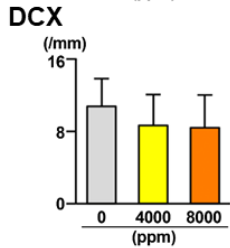
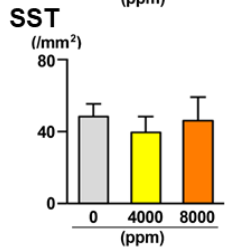
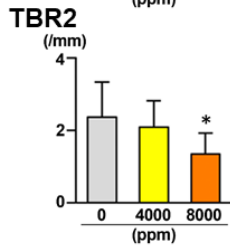
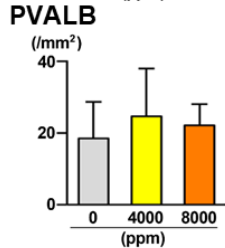
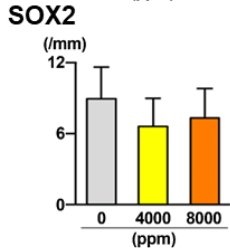
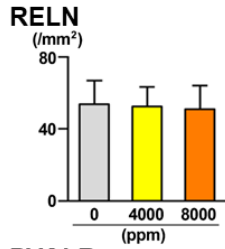
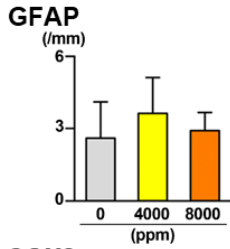
### 2. 実用新案登録

なし

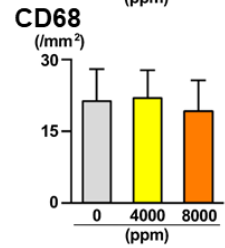
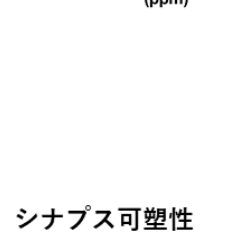
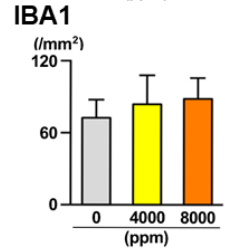
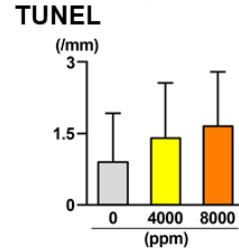
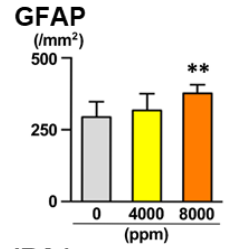
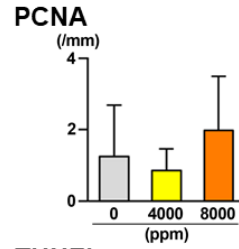
### 3. その他

なし

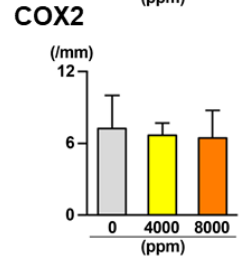
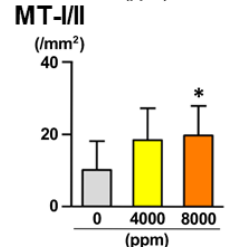
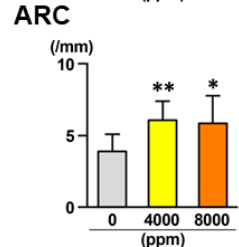
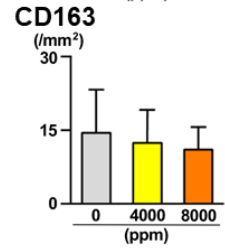
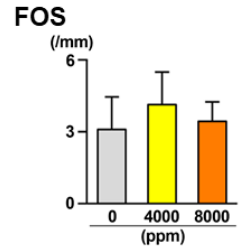
顆粒細胞系譜マーカー GABA性介在ニューロン



細胞増殖/アポトーシス グリア指標



シナプス可塑性



血管内皮マーカー

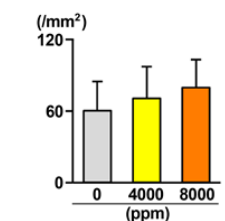
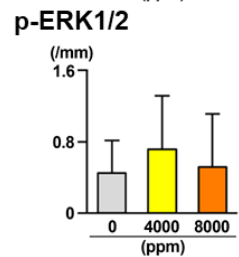


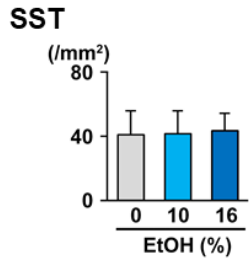
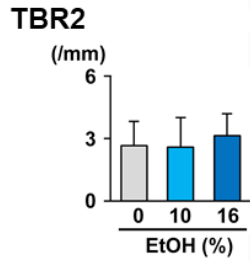
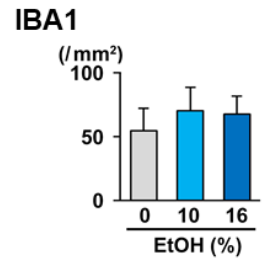
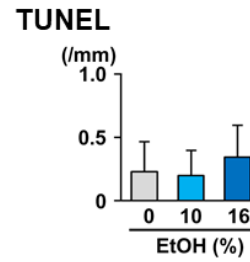
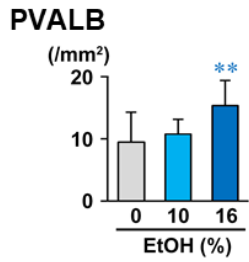
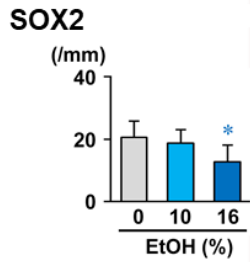
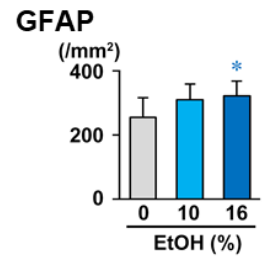
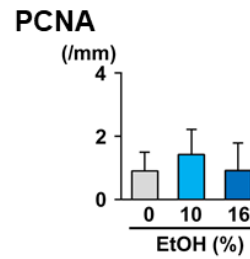
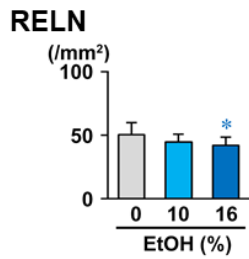
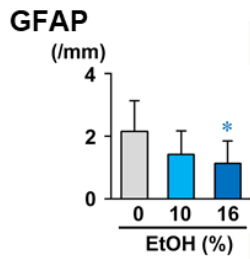
図1 酢酸鉛の発達期曝露における免疫組織学的解析

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

Bonferroni correction.

顆粒細胞系譜マーカー GABA性介在ニューロン

細胞増殖／アポトーシス グリア指標



シナプス可塑性

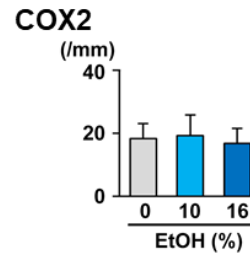
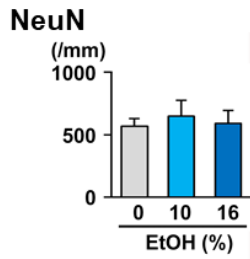
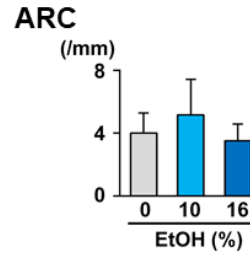
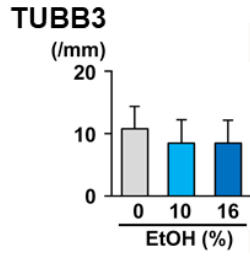
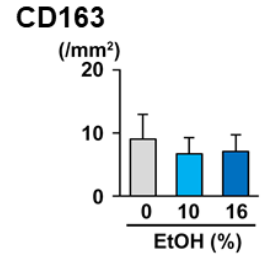
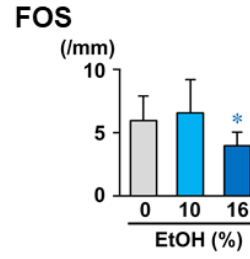
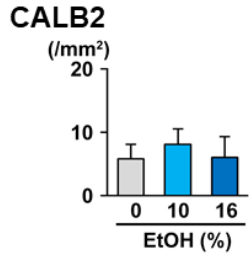
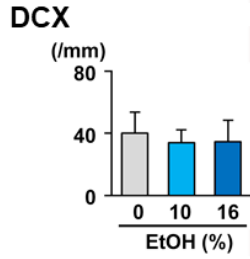
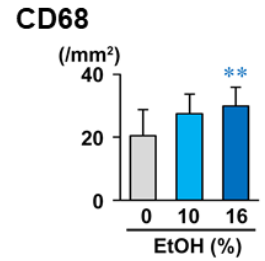


図2 エタノールの発達期曝露における免疫組織学的解析

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

Bonferroni correction.

顆粒細胞系譜マーカー GABA性介在ニューロン

細胞増殖/アポトーシス

グリア指標

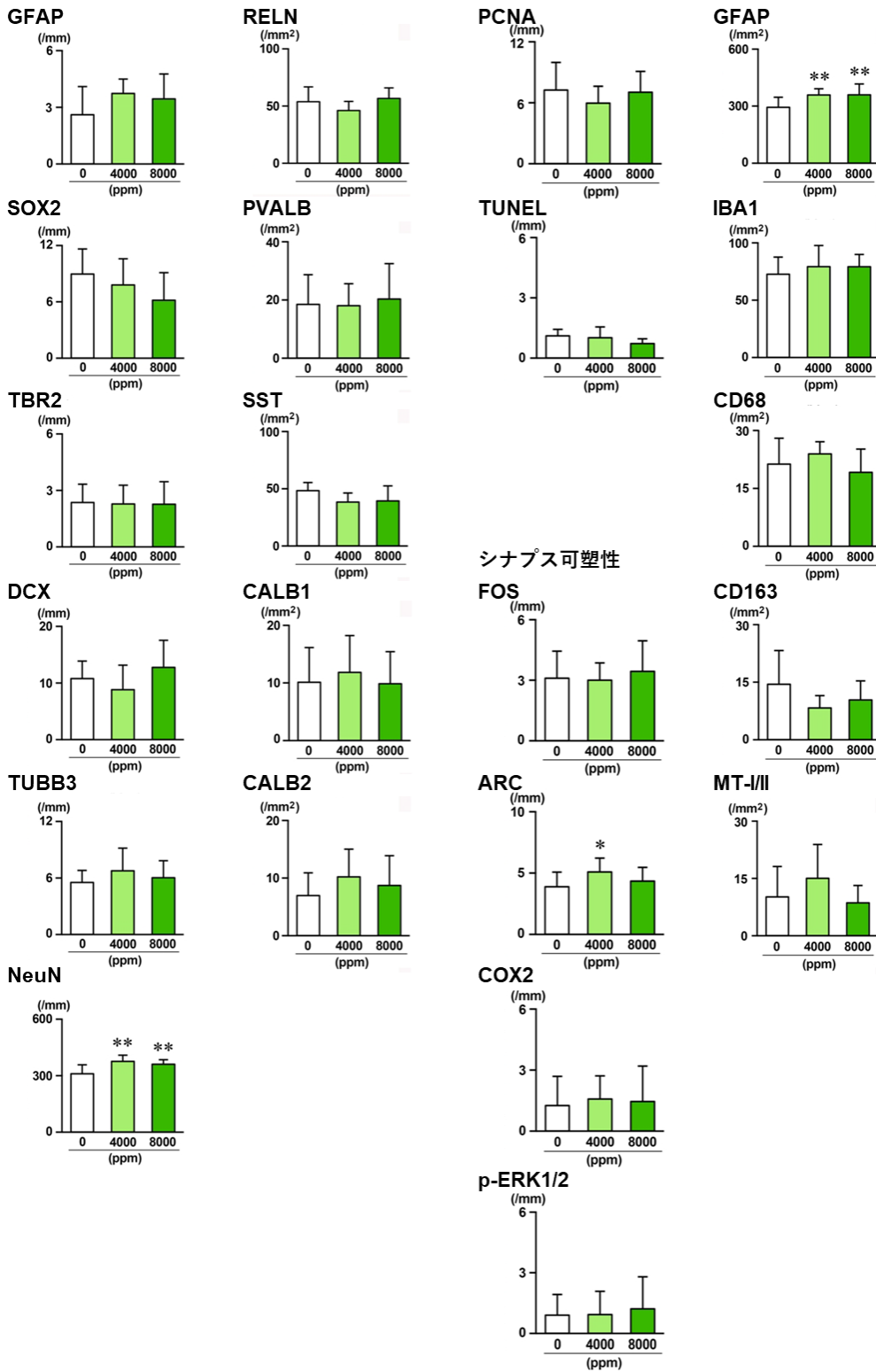


図3 塩化アルミニウムの発達期曝露における免疫組織学的解析

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



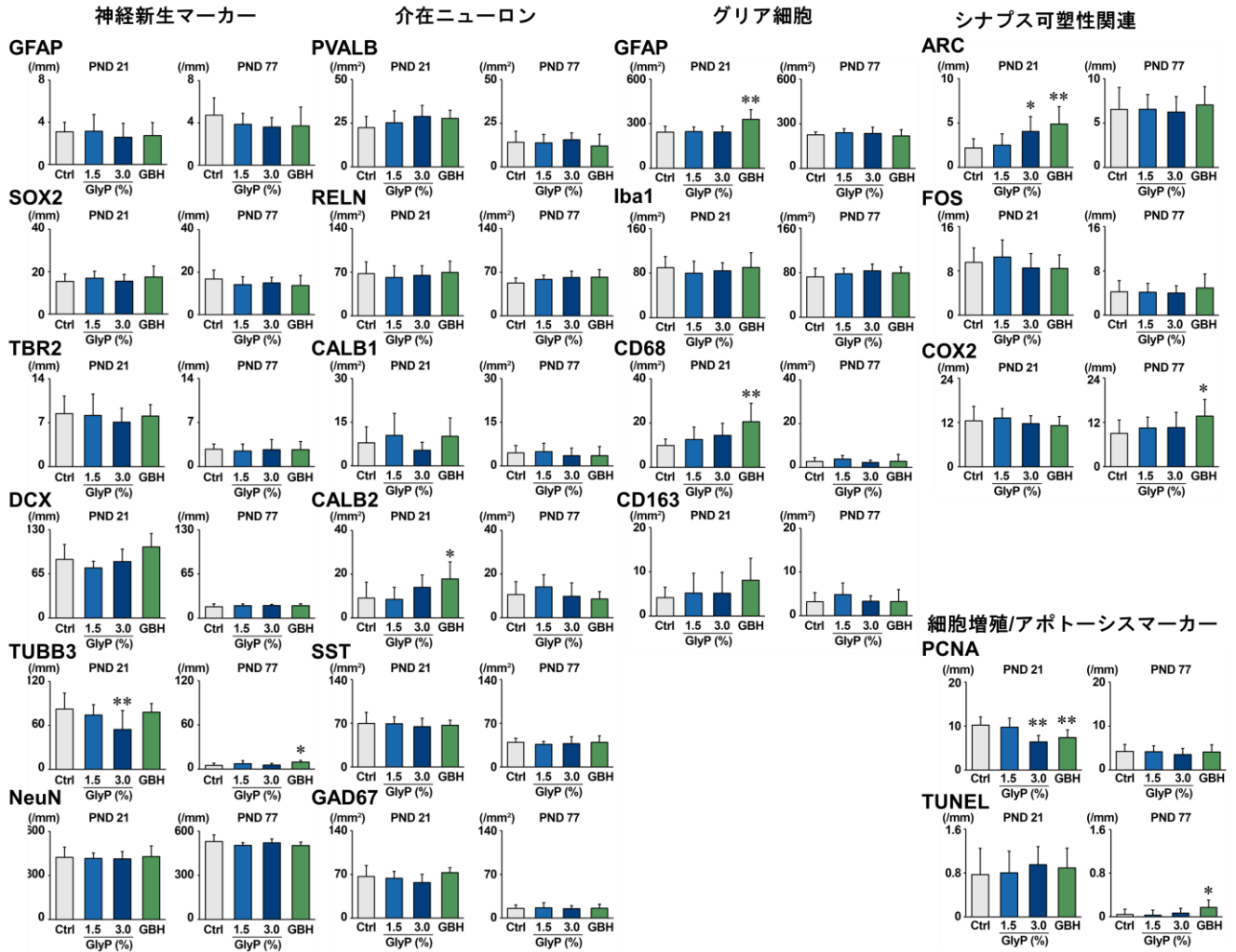


図4 グリホサート原体及び含有製剤の発達期曝露における免疫組織学的解析

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

Bonferroni correction.

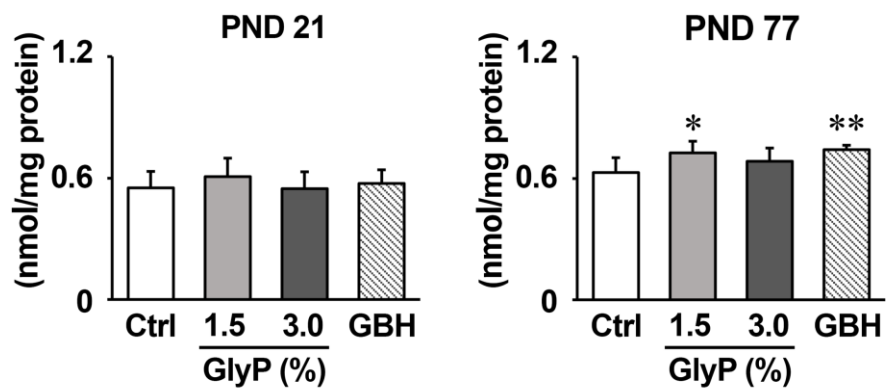


図5 グリホサート原体および含有製剤の発達期曝露における海馬中 malondealdehyde

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

表 1 酢酸鉛の発達期曝露 (PND 21)における遺伝子発現解析

	PbAc in drinking water						
	0 ppm (Control)		4,000 ppm		8,000 ppm		
No. of animals examined	6		6		6		
	Normalization control	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>
Neurotrophic factor-related genes							
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.17	1.19 ± 0.47	1.28 ± 0.53	1.47 ± 0.12*	1.45 ± 0.21	
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.8 ± 0.07*	0.85 ± 0.07	0.82 ± 0.10*	0.81 ± 0.14	
Cholinergic signaling							
<i>Chrna7</i>	1.01 ± 0.15	1 ± 0.1	1.02 ± 0.12	1.1 ± 0.19	1.28 ± 0.2	1.41 ± 0.17**	
Glial cell markers							
<i>Gfap</i>	1.03 ± 0.27	1.01 ± 0.19	1.33 ± 0.22	1.43 ± 0.31*	1.44 ± 0.18*	1.6 ± 0.29**	
<i>Aif1</i>	1.04 ± 0.33	1.05 ± 0.34	1.17 ± 0.37	1.56 ± 0.4	2.03 ± 0.15**	1.98 ± 0.28*	
Oxidative stress-related							
<i>Mt1</i>	1 ± 0.07	1.01 ± 0.16	1.51 ± 0.31	1.62 ± 0.4*	1.61 ± 0.5	1.77 ± 0.6	
<i>Mt2a</i>	1.02 ± 0.2	1.02 ± 0.22	1.65 ± 0.43*	1.78 ± 0.56**	1.07 ± 0.29	1.18 ± 0.34	
<i>Prdx1</i>	1 ± 0.1	1.01 ± 0.16	0.84 ± 0.09	0.9 ± 0.13	1.16 ± 0.11	1.28 ± 0.15*	
<i>Gsta5</i>	1.02 ± 0.23	1 ± 0.09	1.01 ± 0.19	1.36 ± 0.21*	1.36 ± 0.32	1.31 ± 0.31	
<i>Hmox1</i>	1.03 ± 0.24	1 ± 0.04	0.85 ± 0.22	1.14 ± 0.27	1.26 ± 0.17	1.21 ± 0.08**	
<i>Nqo1</i>	1.02 ± 0.19	1 ± 0.07	0.9 ± 0.09	1.22 ± 0.14*	1.24 ± 0.24	1.2 ± 0.26	
Chemical mediators and related							
<i>Il1b</i>	1.05 ± 0.35	1.07 ± 0.47	0.41 ± 0.36*	0.59 ± 0.55	0.45 ± 0.29*	0.43 ± 0.28	
<i>Il18</i>	1.08 ± 0.47	1.1 ± 0.48	1.21 ± 0.32	1.63 ± 0.41	1.95 ± 0.45	1.91 ± 0.57*	
Granular cell lineage markers							
<i>Rbfox3</i>	1.02 ± 0.27	1.03 ± 0.3	0.91 ± 0.1	0.97 ± 0.16	0.74 ± 0.07**	0.83 ± 0.13	
Glutamatergic signaling genes							
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.17	1.15 ± 0.21	1.23 ± 0.29	1.25 ± 0.21	1.39 ± 0.30*	
<i>Grin2d</i>	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.2	0.67 ± 0.15*	0.71 ± 0.16	1.11 ± 0.36	1.22 ± 0.35	
GABAergic interneuron markers							
<i>Calb1</i>	1.01 ± 0.12	1 ± 0.04	0.98 ± 0.12	1.05 ± 0.14	1.18 ± 0.15	1.3 ± 0.17*	
DNA repair-related							
<i>Apex1</i>	1.00 ± 0.04	1 ± 0.09	1.05 ± 0.06	1.12 ± 0.09	1.08 ± 0.07	1.19 ± 0.13**	

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

表2 酢酸鉛の発達期曝露 (PND 77)における遺伝子発現解析

	PbAc in drinking water					
	0 ppm (Control)		4,000 ppm		8,000 ppm	
	6		6		6	
Normalization control	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>
Synaptic plasticity-related						
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.20	0.79 ± 0.07*	0.84 ± 0.16	0.90 ± 0.31	0.95 ± 0.38
<i>Ptgs2</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.93 ± 0.16	0.97 ± 0.12	0.76 ± 0.20*	0.77 ± 0.16*
<i>Mapk1</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.10	1.09 ± 0.21	1.03 ± 0.14	1.25 ± 0.12*
Cell proliferation marker						
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.96 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.65 ± 0.09**	0.67 ± 0.08**
Cell cycle-related						
<i>Cdkn2b</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.13 ± 0.17	1.21 ± 0.35	1.47 ± 0.33*	1.57 ± 0.57
<i>Cdkn2c</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.28	0.85 ± 0.11	0.89 ± 0.19	0.65 ± 0.15**	0.68 ± 0.19*
<i>Ccnd1</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.32	0.98 ± 0.14	1.03 ± 0.19	1.54 ± 0.35**	1.65 ± 0.61
<i>Cdk1</i>	1.05 ± 0.38	1.05 ± 0.36	0.82 ± 0.19	0.86 ± 0.23	0.54 ± 0.37*	0.55 ± 0.41*
<i>Chek1</i>	1.07 ± 0.43	1.07 ± 0.43	2.09 ± 1.34	2.24 ± 1.36	3.09 ± 1.19**	3.21 ± 1.36*
DNA damage-related						
<i>Apex1</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.13	1.06 ± 0.12	0.73 ± 0.07**	0.76 ± 0.13**
<i>Ercc1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.18	0.84 ± 0.04*	0.88 ± 0.12	0.90 ± 0.23	0.93 ± 0.22
Glial cell markers molecules						
<i>Aif1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.13	0.94 ± 0.21	0.97 ± 0.20	0.56 ± 0.08**	0.61 ± 0.21**
Oxidative stress-related						
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.22	1.01 ± 0.17	0.70 ± 0.09**	0.76 ± 0.19
<i>Keap1</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.24	0.95 ± 0.28	0.98 ± 0.25	0.52 ± 0.04**	0.57 ± 0.15**
<i>Mt2a</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.21	0.99 ± 0.2	1.04 ± 0.26	0.68 ± 0.17**	0.78 ± 0.36
<i>Nfe2l2</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.92 ± 0.15	0.96 ± 0.19	0.65 ± 0.19*	0.71 ± 0.25
<i>Cat</i>	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.15	1.01 ± 0.26	1.24 ± 0.16*	1.52 ± 0.28*
<i>Gpx1</i>	1.03 ± 0.24	1.02 ± 0.23	0.90 ± 0.14	0.93 ± 0.12	0.67 ± 0.15**	0.75 ± 0.33
<i>Gpx4</i>	1.02 ± 0.2	1.01 ± 0.19	0.98 ± 0.22	1.01 ± 0.15	0.65 ± 0.08**	0.74 ± 0.29
<i>Gsta5</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.16	0.91 ± 0.19	0.95 ± 0.18	0.52 ± 0.05**	0.58 ± 0.17**
Chemical mediators and related						
<i>Il18</i>	1.06 ± 0.37	1.06 ± 0.36	0.95 ± 0.32	1.05 ± 0.44	1.87 ± 0.39*	1.86 ± 0.24*
Granular cell lineage markers						
<i>Eomes</i>	1.03 ± 0.27	1.04 ± 0.3	1.32 ± 0.15*	1.39 ± 0.26	1.07 ± 0.3	1.1 ± 0.32
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.08	1.04 ± 0.13	1.17 ± 0.21*	1.22 ± 0.29
GABAergic interneuron markers						
<i>Pvalb</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.1	0.87 ± 0.12	0.9 ± 0.08	0.71 ± 0.14**	0.74 ± 0.18*
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	0.77 ± 0.18*	0.82 ± 0.27	0.69 ± 0.20*	0.73 ± 0.32
Neurotrophic factor-related						
<i>Cntf</i>	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.09	0.89 ± 0.14	0.91 ± 0.07	0.49 ± 0.12**	0.51 ± 0.10**
Glutamatergic signaling						
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.15	1.06 ± 0.19	0.76 ± 0.13*	0.79 ± 0.12*
Cholinergic signaling						
<i>Chrna7</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.17	0.99 ± 0.11	1.04 ± 0.21	0.80 ± 0.09*	0.83 ± 0.11
<i>Chrn2</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.08 ± 0.09	1.13 ± 0.19	1.59 ± 0.44	1.67 ± 0.54*

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

表3 エタノールの発達期曝露 (PND 21)における遺伝子発現解析

	EtOH in drinking water												
	0% (Control)		10%		12.5%								
	No. of animals examined	6	6	6	6	6							
	Normalization control	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gandh</i>	<i>Hprt1</i>						
Granule cell lineage marker gene													
<i>Tubb3</i>		1.01±0.13 <sup>a</sup>	1.01±0.14	1.00±0.05	0.98±0.09	0.98±0.17	0.84±0.09*						
GABAergic interneuron marker genes													
<i>Reln</i>		1.02±0.24	1.01±0.16	1.42±0.14**	1.39±0.20**	1.56±0.19**	1.35±0.15*						
<i>Sst</i>		1.02±0.27	1.01±0.16	1.23±0.18	1.20±0.23	1.47±0.29*	1.26±0.09						
Neurotrophic factor-related gene													
<i>Ntrk2</i>		1.00±0.11	1.00±0.09	1.10±0.10	1.07±0.09	1.28±0.23*	1.10±0.11						
Glial cell marker genes													
<i>Aif1</i>		1.04±0.33	1.05±0.34	3.25±2.20	2.12±0.71**	1.85±0.63	1.64±0.56						
<i>Gfap</i>		1.03±0.27	1.01±0.19	1.42±0.25	1.38±0.24	1.75±0.36**	1.50±0.18**						
Cell cycle-related genes													
<i>Cdkn1a</i>		1.01±0.18	1.04±0.28	0.70±0.18*	0.67±0.12	0.86±0.25	0.75±0.25						
<i>Ccnd2</i>		1.01±0.12	1.01±0.14	0.81±0.15	0.78±0.09**	0.83±0.27	0.70±0.09**						
<i>Cdk1</i>		1.02±0.23	1.03±0.26	0.66±0.22	0.63±0.18*	0.67±0.14	0.58±0.13*						
DNA damage-related gene													
<i>Apex1</i>		1.00±0.04	1.00±0.09	1.17±0.08**	1.14±0.07	1.31±0.29	1.11±0.06						
Glutamatergic signaling-related genes													
<i>Gria1</i>		1.01±0.16	1.02±0.22	1.42±0.19*	1.38±0.12*	1.57±0.43**	1.34±0.20						
<i>Gria2</i>		1.02±0.23	1.02±0.22	1.38±0.24	1.34±0.18	1.47±0.39*	1.25±0.19						
<i>Gria3</i>		1.02±0.21	1.01±0.17	1.49±0.23*	1.44±0.18*	1.62±0.37**	1.39±0.18*						
<i>Grin2b</i>		1.01±0.13	1.01±0.14	1.13±0.18	1.10±0.12	1.35±0.32*	1.16±0.22						
Cholinergic and dopaminergic signaling-related genes													
<i>Chrna7</i>		1.01±0.15	1.00±0.10	1.36±0.08	1.33±0.16**	1.44±0.46*	1.21±0.17						
<i>Chrn2</i>		1.01±0.12	1.01±0.17	0.96±0.15	0.93±0.13	0.87±0.20	0.74±0.09**						
<i>Drd2</i>		1.02±0.24	1.03±0.29	1.05±0.18	1.03±0.20	1.54±0.37*	1.34±0.36						
Oxidative stress-related genes													
<i>Mt1</i>		1.00±0.07	1.01±0.16	1.39±0.14	1.35±0.12*	1.71±0.53**	1.45±0.22*						
<i>Nqo1</i>		1.02±0.19	1.00±0.07	1.62±0.59	1.17±0.08*	1.34±0.65	1.07±0.10						
Apoptosis-related gene													
<i>Casp9</i>		1.00±0.11	1.00±0.11	1.09±0.14	1.06±0.11	1.26±0.21*	1.09±0.09						
Chemical mediators and related molecules													
<i>Tgfb2</i>		1.03±0.26	1.00±0.06	2.00±0.88	1.40±0.21**	1.44±0.60	1.16±0.19						
<i>Il18</i>		1.08±0.47	1.10±0.48	2.35±0.89*	1.71±0.53	1.58±1.01	1.23±0.39						
<i>C3</i>		1.10	0.49	1.11	0.45	2.68	1.45	1.84	0.48*	2.01	0.51**	1.95	1.08*

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

表4 エタノールの発達期曝露 (PND 77)における遺伝子発現解析

	EtOH in drinking water					
	0% (Control)		10%		12.5%	
No. of animals examined	6		6		6	
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes						
<i>Eomes</i>	1.03 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.30	1.19 ± 0.47	1.28 ± 0.53	1.47 ± 0.12*	1.45 ± 0.21
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.80 ± 0.07*	0.85 ± 0.07	0.82 ± 0.10*	0.81 ± 0.14
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.12	1.26 ± 0.15*	1.34 ± 0.24	1.23 ± 0.11*	1.21 ± 0.16
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.02	1.19 ± 0.08*	1.27 ± 0.14*	1.16 ± 0.05	1.14 ± 0.12
GABAergic interneuron marker genes						
<i>Pvalb</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.67 ± 0.14**	0.72 ± 0.18**	0.74 ± 0.14**	0.73 ± 0.14**
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	0.63 ± 0.25**	0.68 ± 0.31	0.57 ± 0.11**	0.56 ± 0.12*
Synaptic plasticity-related genes						
<i>Arc</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.21	0.36 ± 0.08**	0.38 ± 0.07**	0.39 ± 0.06**	0.39 ± 0.10**
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.20	0.70 ± 0.14*	0.74 ± 0.15	0.73 ± 0.09*	0.71 ± 0.07*
<i>Mapk1</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.78 ± 0.18*	0.76 ± 0.14*	1.04 ± 0.12	0.98 ± 0.13
Neurotrophic factor-related genes						
<i>Cntf</i>	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.09	0.71 ± 0.15*	0.75 ± 0.14**	0.79 ± 0.22	0.76 ± 0.19**
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.76 ± 0.15*	0.82 ± 0.21	0.77 ± 0.16*	0.75 ± 0.16
Glial cell marker genes						
<i>Gfap</i>	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.28	0.68 ± 0.19*	0.73 ± 0.23	0.62 ± 0.09*	0.61 ± 0.10
<i>Aif1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.13	0.88 ± 0.13	0.94 ± 0.15	0.76 ± 0.12*	0.74 ± 0.09*
Cell proliferation-related gene						
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.87 ± 0.13	0.92 ± 0.17	0.76 ± 0.09**	0.74 ± 0.07**
Cell cycle-related genes						
<i>Cdkn2c</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.28	0.77 ± 0.09*	0.81 ± 0.09	0.60 ± 0.18**	0.59 ± 0.16**
<i>Ccnd2</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.22	1.33 ± 0.24*	1.41 ± 0.25*	1.45 ± 0.10**	1.43 ± 0.18**
<i>Cdk1</i>	1.05 ± 0.38	1.05 ± 0.36	0.60 ± 0.33	0.64 ± 0.36	0.59 ± 0.24*	0.58 ± 0.26
<i>Cdk2</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.11	0.82 ± 0.20	0.87 ± 0.21	0.70 ± 0.23	0.68 ± 0.18*
DNA damage-related gene						
<i>Ercc1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.18	0.72 ± 0.08*	0.76 ± 0.06*	0.73 ± 0.08*	0.72 ± 0.09**
Glutamatergic signaling genes						
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.16	0.74 ± 0.10**	0.79 ± 0.11*	0.78 ± 0.12*	0.76 ± 0.10*
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.15	0.79 ± 0.09*	0.84 ± 0.08	0.83 ± 0.06	0.81 ± 0.07*
Cholinergic signaling genes						
<i>Chrn2</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.40 ± 0.17**	1.49 ± 0.22**	1.38 ± 0.12**	1.36 ± 0.18*
Oxidative stress-related genes						
<i>Gsta5</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.16	0.77 ± 0.09	0.83 ± 0.14	0.70 ± 0.14*	0.68 ± 0.13**
<i>Nqo1</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.78 ± 0.17*	0.76 ± 0.17	0.71 ± 0.07**	0.67 ± 0.06**
Chemical mediators and related molecules						
<i>Tnf</i>	1.29 ± 0.80	1.29 ± 0.79	1.78 ± 0.66	1.87 ± 0.64	3.25 ± 1.26**	3.15 ± 1.14*

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

表5 塩化アルミニウムの発達期曝露における遺伝子発現解析

	PND21				PND77			
	Control		AICI3 0.5%		Control		AICI3 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

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



表6 グリホサートの発達期曝露の離乳時 (PND 21)における遺伝子発現解析

Gene	Controls		GlyP (%)				GBH (%)	
			1.5		3.0		1.0	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Relative transcript level normalized to								
<b>Granule cell lineage markers</b>								
<i>Nes</i>	1.01±0.16	1.01±0.17	1.06±0.14	1.02±0.15	0.77±0.06*	0.52±0.03**	1.02±0.19	0.70±0.12**
<i>Sox2</i>	1.02±0.23	1.05±0.35	0.75±0.17*	0.72±0.16	1.02±0.09	0.69±0.08*	0.89±0.19	0.61±0.13*
<i>Eomes</i>	1.03±0.27	1.04±0.31	1.28±0.27	1.23±0.26	1.25±0.20	0.84±0.14	1.21±0.27	0.83±0.15
<i>Dcx</i>	1.04±0.30	1.05±0.31	1.64±0.42	1.57±0.41*	1.54±0.44	1.04±0.32	1.70±0.46*	1.16±0.27
<i>Tubb3</i>	1.00±0.10	1.00±0.09	1.01±0.12	0.97±0.08	0.99±0.05	0.67±0.03**	1.03±0.12	0.71±0.07**
<i>Dpysl3</i>	1.02±0.21	1.01±0.17	1.33±0.29	1.27±0.28	1.37±0.27	0.93±0.20	1.40±0.26	0.95±0.13
<i>Rbfox3</i>	1.03±0.23	1.05±0.29	1.26±0.17	1.19±0.11	1.26±0.27	0.84±0.14	1.34±0.21	0.91±0.08
<b>Interneuron markers</b>								
<i>Pvalb</i>	1.01±0.11	1.01±0.16	0.77±0.12*	0.73±0.10**	0.89±0.17	0.60±0.12**	1.03±0.18	0.71±0.11**
<i>Reln</i>	1.01±0.15	1.02±0.22	1.34±0.27	1.28±0.28	0.97±0.21	0.65±0.11*	1.30±0.31	0.88±0.18
<i>Calb1</i>	1.02±0.20	1.03±0.25	1.55±0.37	1.48±0.35	1.79±0.51*	1.20±0.34	2.00±0.64**	1.34±0.36
<i>Calb2</i>	1.41±1.55	1.33±1.29	0.77±0.42	0.74±0.44	0.54±0.30	0.37±0.23	0.45±0.16	0.30±0.08
<i>Sst</i>	1.01±0.17	1.02±0.22	0.93±0.23	0.89±0.22	0.80±0.22	0.53±0.13**	1.04±0.18	0.71±0.10*
<b>Cell proliferation markers</b>								
<i>Pcna</i>	1.00±0.09	1.00±0.08	1.07±0.08	1.03±0.10	1.44±0.1**	0.97±0.06	1.49±0.19**	1.02±0.04
<b>Cell cycle-related</b>								
<i>Ccnd1</i>	1.00±0.11	1.01±0.13	1.10±0.12	1.05±0.13	0.92±0.20	0.61±0.10**	1.08±0.24	0.73±0.13**
<b>Apoptosis</b>								
<i>Bcl2</i>	1.00±0.08	1.01±0.14	1.07±0.08	1.02±0.10	0.85±0.16	0.57±0.07**	1.01±0.20	0.69±0.10**
<i>Casp8</i>	1.02±0.21	1.03±0.28	1.58±0.46*	1.52±0.51	1.32±0.39	0.89±0.28	1.42±0.32	0.97±0.18
<i>Casp3</i>	1.01±0.14	1.01±0.18	1.35±0.11*	1.29±0.17*	1.28±0.21	0.86±0.15	1.43±0.24**	0.98±0.12
<b>Synaptic plasticity-related</b>								
<i>Arc</i>	1.06±0.37	1.09±0.44	1.21±0.31	1.16±0.32	0.88±0.31	0.58±0.17*	1.33±0.44	0.90±0.26
<i>Fos</i>	1.01±0.15	1.01±0.18	0.98±0.18	0.95±0.23	0.93±0.19	0.62±0.13**	1.05±0.23	0.72±0.14*
<i>Ptgs2</i>	1.13±0.46	1.15±0.47	1.58±0.30	1.50±0.26	1.50±0.27	1.01±0.16	1.62±0.33	1.10±0.17
<i>Mapk1</i>	1.03±0.26	1.04±0.29	1.38±0.18	1.31±0.13*	1.55±0.27**	1.04±0.15	1.73±0.31**	1.18±0.13
<b>Glutamatergic receptors and glutamate transporters</b>								
<i>Grin2a</i>	1.05±0.30	1.07±0.35	1.71±0.52*	1.62±0.44*	1.48±0.44	0.98±0.26	1.82±0.42*	1.24±0.22
<i>Grin2b</i>	1.04±0.29	1.07±0.35	1.52±0.24*	1.45±0.21*	1.14±0.34	0.76±0.19	1.41±0.32	0.96±0.18
<b>Glial cell markers</b>								
<i>Gfap</i>	1.07±0.40	1.10±0.48	1.42±0.36	1.36±0.39	1.36±0.53	0.89±0.29	1.99±0.48**	1.36±0.27
<i>Aif1</i>	1.01±0.13	1.01±0.19	1.17±0.24	1.11±0.21	1.03±0.31	0.68±0.17**	1.18±0.20	0.81±0.09
<b>Chemical mediators and related molecules</b>								
<i>Tnf</i>	1.01±0.18	1.02±0.24	1.24±0.32	1.18±0.27	1.06±0.28	0.71±0.14*	1.09±0.31	0.74±0.16
<i>Il1b</i>	1.03±0.26	1.06±0.37	1.54±1.03	1.45±0.90	0.72±0.29	0.48±0.18	1.13±0.52	0.78±0.36
<i>Il6</i>	1.46±1.18	1.38±1.01	1.20±0.40	1.15±0.38	1.55±0.99	1.02±0.57	1.43±0.73	1.00±0.52
<i>C3</i>	1.06±0.35	1.09±0.42	1.37±0.26	1.30±0.19	1.16±0.38	0.76±0.20	1.63±0.24*	1.11±0.15
<b>Oxidative stress-related</b>								
<i>Mt1</i>	1.01±0.18	1.03±0.23	1.34±0.14*	1.29±0.17	1.38±0.23*	0.93±0.13	1.43±0.25**	0.97±0.11
<i>Mt2a</i>	1.05±0.31	1.07±0.37	1.24±0.27	1.18±0.25	1.60±0.48	1.06±0.25	1.76±0.53*	1.20±0.30
<i>Sod2</i>	1.00±0.10	1.00±0.09	0.89±0.08	0.85±0.08**	0.98±0.18	0.65±0.09**	0.92±0.13	0.62±0.04**
<i>Cat</i>	1.00±0.10	1.01±0.15	1.24±0.11*	1.19±0.14*	0.94±0.10	0.63±0.04**	1.10±0.20	0.75±0.09**
<i>Ucp2</i>	1.10±0.56	1.10±0.54	1.84±0.70	1.74±0.62	2.02±0.62*	1.35±0.44	1.84±0.28	1.26±0.16
<b>Sonic hedgehog signaling pathway-related</b>								
<i>Shh</i>	1.19±0.87	1.15±0.72	0.66±0.29	0.64±0.32	0.60±0.28	0.40±0.20*	0.55±0.15	0.38±0.08*
<i>Gli1</i>	1.15±0.70	1.14±0.62	0.78±0.53	0.82±0.61	0.51±0.23	0.35±0.18*	0.55±0.17	0.37±0.08*
<i>Ptchd1</i>	1.03±0.24	1.03±0.27	1.00±0.18	0.96±0.24	0.68±0.18*	0.46±0.14**	0.81±0.20	0.55±0.09**
<i>Ptch1</i>	1.04±0.29	1.04±0.33	0.93±0.10	0.88±0.09	0.55±0.17**	0.37±0.11**	0.69±0.21*	0.46±0.12**
<b>Neurotrophic factors-related</b>								
<i>Bdnf</i>	1.06±0.43	1.07±0.43	1.49±0.30	1.42±0.25	1.74±0.36*	1.17±0.25	1.65±0.36*	1.12±0.20
<i>Gdnf</i>	1.02±0.20	1.02±0.24	1.43±0.48	1.38±0.55	1.28±0.20	0.87±0.17	1.17±0.30	0.79±0.16
<b>Neuropeptides and hormones-related</b>								
<i>Ghsr</i>	1.12±0.55	1.13±0.55	2.02±0.49	1.92±0.43*	2.23±0.66*	1.50±0.45	2.42±0.72**	1.64±0.43
<i>Nmb</i>	1.55±1.24	1.55±1.20	3.17±0.64*	3.03±0.66*	3.51±1.23**	2.34±0.78	3.82±0.76**	2.61±0.43
<i>Gal</i>	1.06±0.34	1.09±0.39	1.54±0.64	1.47±0.62	2.04±0.95	1.34±0.57	2.45±0.70*	1.67±0.43
<i>Kl</i>	2.30±3.46	2.56±4.03	1.05±1.30	1.00±1.21	2.66±4.62	1.90±3.43	2.15±3.08	1.48±2.00

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



表7 グリホサートの発達期曝露の成熟後 (PND 77)における遺伝子発現解析

Gene	Controls		GlyP (%)				GBH (%)	
			1.5		3.0		1.0	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Relative transcript level normalized to								
Relative transcript level normalized to								
<b>Granule cell lineage markers</b>								
<i>Nes</i>	1.00±0.10	1.00±0.08	1.01±0.13	0.92±0.09	1.09±0.12	1.11±0.08	1.27±0.1**	1.23±0.09**
<i>Sox2</i>	1.01±0.15	1.01±0.11	0.88±0.06	0.80±0.08**	1.37±0.21**	1.38±0.14**	0.98±0.08	0.95±0.07
<i>Eomes</i>	1.02±0.22	1.01±0.19	0.89±0.18	0.81±0.16	0.68±0.15*	0.69±0.14**	0.70±0.18*	0.68±0.18**
<i>Dcx</i>	1.00±0.11	1.01±0.14	0.95±0.13	0.86±0.09	1.09±0.18	1.10±0.16	1.14±0.12	1.10±0.14
<i>Dpysl3</i>	1.01±0.12	1.01±0.12	1.01±0.13	0.91±0.08	1.36±0.06**	1.38±0.08*	1.30±0.25**	1.25±0.22*
<i>Tubb3</i>	1.01±0.12	1.00±0.10	1.01±0.10	0.91±0.09	1.09±0.10	1.11±0.10	1.17±0.06*	1.13±0.07
<i>Rbfox3</i>	1.00±0.04	1.00±0.04	0.95±0.09	0.86±0.10*	1.14±0.06*	1.16±0.09*	1.17±0.13*	1.13±0.11
<b>Interneuron markers</b>								
<i>Pvalb</i>	1.01±0.18	1.01±0.16	1.05±0.08	0.96±0.07	1.00±0.14	1.02±0.12	1.14±0.15	1.10±0.12
<i>Reln</i>	1.01±0.13	1.00±0.11	1.05±0.20	0.95±0.17	1.10±0.20	1.11±0.16	1.20±0.24	1.16±0.24
<i>Calb1</i>	1.02±0.20	1.02±0.23	1.04±0.17	0.94±0.16	1.22±0.26	1.23±0.23	1.26±0.19	1.22±0.19
<i>Calb2</i>	1.06±0.43	1.06±0.42	1.06±0.54	0.95±0.44	1.64±0.65	1.66±0.67	1.47±0.79	1.45±0.84
<i>Sst</i>	1.00±0.09	1.00±0.10	1.11±0.10	1.01±0.10	1.06±0.11	1.07±0.08	1.13±0.18	1.09±0.16
<b>Cell proliferation markers</b>								
<i>Pcna</i>	1.00±0.06	1.00±0.07	1.00±0.05	0.91±0.04*	0.97±0.09	0.99±0.05	1.08±0.06	1.04±0.04
<b>Apoptosis</b>								
<i>Casp3</i>	1.00±0.09	1.00±0.08	0.86±0.08	0.78±0.07**	0.83±0.18	0.83±0.15*	0.83±0.09	0.80±0.09**
<i>Casp8</i>	1.03±0.25	1.02±0.23	0.77±0.15*	0.70±0.13**	0.70±0.09**	0.71±0.07**	0.64±0.10**	0.62±0.10**
<b>Neurotrophic factor-related</b>								
<i>Bdnf</i>	1.00±0.08	1.00±0.10	0.94±0.08	0.85±0.08	0.96±0.11	0.98±0.13	0.85±0.11*	0.82±0.11*
<b>Synaptic plasticity-related</b>								
<i>Arc</i>	1.02±0.27	1.02±0.25	1.34±0.43	1.23±0.42	1.53±0.24	1.56±0.29	2.18±0.57**	2.10±0.48**
<i>Fos</i>	1.01±0.18	1.01±0.17	0.96±0.14	0.87±0.11	0.82±0.05	0.83±0.07	0.91±0.17	0.89±0.19
<i>Ptgs2</i>	1.01±0.11	1.00±0.09	0.88±0.09	0.80±0.06	1.13±0.16	1.15±0.17	1.08±0.10	1.05±0.13
<b>Glutamatergic receptors and glutamate transporters</b>								
<i>Grin2a</i>	1.01±0.12	1.00±0.08	1.00±0.24	0.91±0.22	1.68±0.12**	1.70±0.12**	1.95±0.36**	1.88±0.28**
<i>Grin2b</i>	1.00±0.06	1.00±0.04	0.96±0.16	0.87±0.15	1.22±0.08*	1.25±0.10**	1.42±0.16**	1.37±0.11**
<b>Glial cell markers</b>								
<i>Gfap</i>	1.02±0.19	1.02±0.19	1.12±0.13	1.02±0.14	1.64±0.24**	1.66±0.19**	1.92±0.16**	1.86±0.17**
<i>Aif1</i>	1.03±0.24	1.02±0.22	0.96±0.19	0.87±0.19	1.31±0.23	1.33±0.17*	1.43±0.23*	1.38±0.17*
<b>Chemical mediators and related molecules</b>								
<i>Il1b</i>	2.23±1.92	2.23±1.87	1.97±1.17	1.76±1.00	1.97±0.66	2.00±0.63	3.92±1.58	3.79±1.48
<i>Il6</i>	5.20±6.58	5.28±6.62	24.68±14.74**	22.00±12.52*	15.89±10.03	16.47±10.5	10.87±6.16	10.59±6.15
<i>Tnf</i>	1.02±0.19	1.01±0.17	1.12±0.28	1.01±0.24	0.84±0.18	0.86±0.20	1.09±0.12	1.05±0.15
<b>Oxidative stress-related</b>								
<i>Mt1</i>	1.00±0.09	1.00±0.10	1.04±0.09	0.94±0.10	0.92±0.13	0.93±0.12	0.89±0.12	0.86±0.14
<i>Mt2a</i>	1.00±0.10	1.00±0.10	0.99±0.24	0.90±0.24	0.97±0.09	0.98±0.09	0.91±0.13	0.88±0.13
<i>Sod2</i>	1.00±0.09	1.00±0.05	0.91±0.05	0.83±0.05*	1.05±0.09	1.07±0.09	0.98±0.07	0.95±0.08
<i>Cat</i>	1.01±0.13	1.01±0.13	1.00±0.08	0.90±0.08	1.39±0.15**	1.41±0.13**	1.57±0.09**	1.52±0.09**

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

表 8 酢酸鉛の 28 日間曝露における遺伝子発現解析

	0 ppm PbAc (Control)		8000 ppm PbAc	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Granule cell lineage markers				
<i>Tubb3</i>	1.01±0.15	1.01±0.17	0.81±0.11 *	0.81±0.11 *
Cell proliferation marker				
<i>Mcm3</i>	1.16±0.75	1.10±0.54	0.62±0.14	0.53±0.12 *
DNA repair-related				
<i>Ercc1</i>	1.03±0.26	1.02±0.22	0.85±0.09	0.73±0.10 *
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.01±0.12	1.02±0.20	1.79±0.42 *	1.81±0.52 **
<i>Aif1</i>	1.01±0.17	1.01±0.14	0.65±0.16 **	0.64±0.13 **
Neurotrophic factor-related				
<i>Ntrk2</i>	1.02±0.22	1.02±0.22	1.39±0.18 **	1.39±0.26 *
<i>ErbB4</i>	1.04±0.30	1.01±0.13	0.88±0.21	0.76±0.21 *
Oxidative stress-related				
<i>Mt1</i>	1.01±0.14	1.01±0.16	1.99±0.36 **	2.02±0.59 **
<i>Gsta5</i>	1.01±0.18	1.01±0.12	1.32±0.19 *	1.32±0.21 *
<i>Hmox1</i>	1.02±0.22	1.00±0.07	1.27±0.19	1.26±0.13 **
Chemical mediators and related molecules				
<i>Il6</i>	1.05±0.35	1.02±0.25	1.63±0.71	1.61±0.58 *
Angiogenesis-related				
<i>Nos3</i>	1.01±0.19	1.01±0.16	1.38±0.25 *	1.39±0.33 *

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

表9 エタノールの28日間曝露における遺伝子発現解析

	EtOH in drinking water			
	0% (Control)		16%	
	No. of animals examined	6	6	6
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes				
<i>Eomes</i>	1.18±0.70	1.10±0.40	1.39±0.48*	1.27±0.44**
GABAergic interneuron marker genes				
<i>Calb2</i>	1.24±0.76	1.12±0.59	0.49±0.56	0.43±0.46*
Synaptic plasticity-related genes				
<i>Ptgs2</i>	1.02±0.21	1.11±0.58	1.39±0.28*	1.26±0.23
Cell cycle-related genes				
<i>Ccnd2</i>	1.03±0.25	1.01±0.15	1.45±0.18**	1.48±0.21**
Cell proliferation marker genes				
<i>Mcm6</i>	1.02±0.22	1.02±0.22	0.74±0.14*	0.75±0.15*
Glutamatergic receptor/transporter genes				
<i>Gria2</i>	1.02±0.21	1.11±0.58	1.33±0.20*	1.21±0.16
<i>Gria3</i>	1.01±0.16	1.09±0.51	1.27±0.16*	1.15±0.10
<i>Grin2b</i>	1.01±0.17	1.08±0.47	1.31±0.22*	1.19±0.14
<i>Slc17a6</i>	1.02±0.22	1.14±0.65	1.64±0.28**	1.49±0.27
Dopaminergic/Cholinergic receptor genes				
<i>Drd2</i>	1.06±0.38	1.03±0.29	1.82±0.47*	1.65±0.39*
Chemical mediators and related molecule genes				
<i>Il1a</i>	1.14±0.60	1.09±0.45	2.61±1.50	2.59±1.35*
<i>Tgfb3</i>	1.02±0.23	1.03±0.26	1.51±0.33*	1.57±0.46*
<i>Tnf</i>	1.04±0.33	1.10±0.56	1.74±0.62*	1.66±0.72
Apoptosis-related molecules				
<i>Casp9</i>	1.02±0.26	1.02±0.20	1.32±0.13*	1.27±0.15

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

表 10 塩化アルミニウムの 28 日間曝露における遺伝子発現解析

	0 ppm (Control)		8000 ppm	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>Granule cell lineage markers</b>				
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.14	0.82 ± 0.11	0.67 ± 0.11**
<b>GABAergic interneuron markers</b>				
<i>Calb2</i>	1.07 ± 0.42	1.09 ± 0.50	1.79 ± 0.55*	1.45 ± 0.35
<i>Pvalb</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.11	1.14 ± 0.06*	0.94 ± 0.14
<i>Reln</i>	1.02 ± 0.21	1.05 ± 0.31	1.38 ± 0.21*	1.14 ± 0.21
<b>Neurotrophic factor-related</b>				
<i>Bdnf</i>	1.04 ± 0.34	1.02 ± 0.22	0.82 ± 0.19	0.67 ± 0.11**
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.22	1.57 ± 0.20**	1.29 ± 0.16*
<b>Glutamate receptor</b>				
<i>Gria2</i>	1.02 ± 0.19	1.03 ± 0.26	1.58 ± 0.22**	1.30 ± 0.15
<b>Synaptic plasticity-related</b>				
<i>Mapk3</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.17	1.32 ± 0.22**	1.08 ± 0.12
<b>Apoptosis-related</b>				
<i>Bax</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.16	0.85 ± 0.13*
<i>Casp8</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.14	1.65 ± 0.41**	1.38 ± 0.46
<i>Casp9</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.18	1.36 ± 0.20**	1.14 ± 0.29
<b>Cell proliferation</b>				
<i>Pcna</i>	1.09 ± 0.51	1.04 ± 0.33	1.14 ± 0.28	0.66 ± 0.08*
<b>Oxidative stress-related</b>				
<i>Sod1</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.99 ± 0.28	0.79 ± 0.12*
<i>Sod2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.11	1.09 ± 0.24	0.88 ± 0.08*
<i>Prdx1</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.21	0.95 ± 0.20	0.77 ± 0.09*
<i>Txn1</i>	1.02 ± 0.21	1.00 ± 0.10	0.90 ± 0.14	0.74 ± 0.10**
<i>Nos2</i>	1.09 ± 0.44	1.06 ± 0.34	2.10 ± 0.92*	1.77 ± 0.88
<i>Nos3</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.16	1.44 ± 0.27*	1.18 ± 0.20
<b>Chemical mediators and related molecules</b>				
<i>Tgfb3</i>	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.26	1.55 ± 0.30**	1.29 ± 0.31
<i>Nfkb1</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.18	0.92 ± 0.08	0.77 ± 0.18*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with the 0 ppm 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） 研究報告

発達期・反復投与毒性試験の実施

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、OECD 対象物質グリホサート、アセタミプリド、さらにクロルピリホスについて、各濃度で妊娠ラットに急性、または慢性投与し、出生仔に対する発達神経毒性、生化学的な変化、腸内細菌叢への影響、行動の変化を研究した。さらに *in vitro* 研究法の開発につなげるデータを追及した。*in vitro* 研究につなげる目的で、出生直後の投与仔からアストロサイト、ミクログリアを採取し、細胞レベルでの挙動を合わせて観察した。

グリホサートは除草剤成分で、これを25 mg/kgから250 mg/kgで妊娠15日に単回投与、あるいは妊娠2日から23日に0.1 mg/kg/day, 1 mg/kg/day, 9.1 mg/kg/day, 妊娠5日から20日に15.6mg/kg/dayの慢性投与を行なった。グリホサート単回投与では、投与濃度依存的に、生後二週での出生仔動物小脳において、神経細胞死とミクログリア活性化を確認した。また成長曲線をとったところ、生後二週ごろ一過性の成長抑制と動物死亡例の増加を見た。グリホサート250 mg/kg投与動物の小脳における炎症性サイトカインのmRNA 発現量を継時的に観察したところ、生後すぐには増加が見られなかった一方、生後一週間で*IL1b*の一過性の上昇、生後二週間で*iNOS*の上昇が観察された。250 mg/kgグリホサート単回投与動物では生後6週以降の行動において、萎縮と社会性欠如が見られた。さらに生後4週の糞便の腸内細菌叢解析から、酪酸産生菌を中心に腸内細菌叢の変化が観察された。この時の盲腸内容物のメタボロミクス解析では、酪酸、乳酸の減少傾向が観察された。グリホサート慢性投与では、15.6mg/kg/day慢性投与（総投与量250 mg/kg）で250 mg/kgの単回投与と同様の神経死およびミクログリア活性化が確認された。0.1 mg/kg/day（総投与量2.2 mg/kg）、1 mg/kg/day（総投与量22 mg/kg）の慢性投与では、神経死、ミクログリア活性化は観察されず、特に1 mg/kg/day（総投与量22 mg/kg）の慢性投与で選択的神経死の抑制と見られる神経の過剰生存が確認された。これら慢性投与動物の生後4週の糞便の腸内細菌叢解析およびメタボロミクス解析から、グリホサート慢性投与では急性投与ほどの著しい変化が見られなかった一方、1 mg/kg/day投与動物で腸内内容物の酪酸が有意に減少していること、15.6mg/kg/day投与動物では酪酸の変化が見られないことが確認された。乳酸はグリホサート投与動物全てで減少が見られ、プロピオン酸の変化はわずかだった。農薬クロルピリホスを5 mg/kgで妊娠16日に単回、または妊娠15日から19日に1 mg/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20 mg/kgから60 mg/kgで妊娠16日に単回投与した。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。

これまでの*in vivo*動物試験と*in vitro*試験を関連づけるデータを得るために、グリホサート投与動物およびアセタミプリド投与動物の出生直後の変化を検討した。妊娠ラットに農薬グリホサートを250 mg/kgで妊娠16日に単回投与、また、農薬アセタミプリド40 mg/kgで妊娠16日に単回投与した。グリホサート投与動物の生後3日から7日のグルタミン酸調節タンパク質の変化、神経細胞および免疫細胞の変化、アストロサイト調節蛋白質について変化を観察したところ、グルタミン酸取り込みタンパク質の発現の現象とアストロサイトの分化抑制、およびグルタミン酸取り込みタンパク質の発現を抑制する制御タンパク質YY1の発現増加を確認した。グリホサート投与動物の発達初期におけるグルタミン酸取り込みの減少は、一時的な運動能力の上昇とともにミクログリアによる神経細胞の貪食を誘発することが観察された。また、アセタミプリド投与動物から生後2日でミクログリアを採取し培養して観察したところ、対象動物と異なり側枝を伸ばしたラミファイド型をとることが観察され、胎生期のアセタミプリド投与によって発達初期にミクログリアが活性化されることが示唆された。胎生期のグリホサート投与ではミクログリアの活性化は観察されなかった。さらに培養ミクログリアを音響測定し、細胞の立体構造と細胞内の粘弾性を可視化した。

## A. 研究目的

OECD と共有している化学物質のリストをもとに、動物実験による神経毒性評価を行う。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のラット(Wistar、日本 SLC)に、OECD と共有している化学物質のリストにあるグリホサート(富士フィルム)、アセタミプリド(富士フィルム)、クロルピリホス(和光純薬)を単回あるいは反復で投与し、出生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。投与スケジュールを図1に示す。

神経組織は小脳を採取し、神経細胞、アストロサイト及びミクログリアの変化を観察する。また小脳における炎症性サイトカインの mRNA 発現の変化を、PCR を用いて検討する。さらに化学物質を投与された母体および出生仔の離乳後の糞便から腸内細菌を採取し解析するとともに、出生仔の盲腸内容物を質量分析によるメタボローム解析を行う。

出生直後、および成熟後の個体について、行動の変化を観察し、スコア化する。

細胞レベルの変化を解析するため、出生仔小脳からアストロサイト及びミクログリアを採取し、変化を観察する。

### (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15日のラットに農薬グリホサート25 mg/kgから250 mg/kgで、単回投与し、出生仔動物の出生数と成長を観察した。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)。発展実験として、グリホサートの土壤中分解物 aminomethyl-phosphonic acid (AMPA) 250 mg/kgの単回急性投与を行なった。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400 mg/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。

急性投与動物において、出生仔数の減少と生後二週ごろ一過性の成長抑制を観察した(図2)。Calbindin D-28k抗体とIba-1抗体を用いた免疫組織化学染色により、生後二週の小脳において、大型の神経細胞であるプルキンエ細胞数の減少とミクログリア活性化を確認した(図3)。この神経死とミクログリア活性化は濃度依存的で、土壤中代謝物AMPAの投与でも同様の影響が観察された(図4)。グリホサート250 mg/kg投与動物の小脳における炎症性サイトカイン発現量を継続的に観察したところ、生後すぐには増加が見られなかった一方、生後一週間で*IL1b*の一過性の上昇、生後二週間で*iNOS*の上昇が観察された(図5)。この結果は、図4の知見とも一致する。

慢性投与動物では、CGLY250において急性高濃度投与と同様の神経死とミクログリア活性化が観察されたが、Gly22ではプルキンエ細胞の過剰な生存が観察された。生理的な選択的細胞死が抑制されたと考えられる。Gly2.2, Gly22慢性グリホサート投与では、ミクログリア数の明瞭な異常は確認できなかった(図6)。

さらにグリホサート投与妊娠動物および出生仔動物の双方で、腸内細菌叢の変化が確認された。属レベルで詳細に解析すると、乳酸菌、酪酸産生菌の減少が確認された(図7)。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とされる。そこでグリホサート急性250 mg/kg投与動物またはCGLY250の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9)。

グリホサート250 mg/kg単回投与動物の出生仔は行動観察において、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10)。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。

### (2) *in vivo* グリホサート投与の発達初期の影響試験

ここまでの結果から、グリホサート投与による影響が著しくなるのは生後二週間以降であることが観察された。そこで、出生直後の早い時期に現れる変化を組織化学的、生化学的に観察した。

グリホサート250 mg/kg単回投与した出生仔の小脳を採取して、以下の観察をおこなった。生後3日(P3)から2週間後までの小脳虫部について、Calbindin D-28k、Iba-1、GLT-1、GLAST、GFAP、YY1の免疫組織化学染色、GLAST、GFAP、YY1のウェスタンブロットによるタンパク質の半定量を行った。

図11に見られる通り、グリホサート投与によるプルキンエ細胞の欠損はP7から観察さ

れ、欠損部位には貪食能を持つM1型ミクログリアの分布が観察された。

アストロサイトに発現し、グルタミン酸濃度を調節するGLASTの分布と発現量を図12に示す。免疫組織化学染色において、グリホサート投与動物のGLAST発現は著しく低下しており、それはウェスタンブロットにおいても裏付けられた。アストロサイトに発現するグルタミン酸トランスポーターの減少は、GLT-1においても確認された。

GFAPの発現、およびアストロサイトの状態を図13に示す。グリホサート投与動物では、P5においてGFAPの本数が有意に低下し、またGFAPの発現量はP10以降で有に低下していた。個々のアストロサイトでは、対照動物ではプルキンエ細胞を囲んだ構造をとっているのに対し、グリホサート投与動物ではプルキンエ細胞を囲む構造が観察されなかった(図14)。

アストロサイトは神経回路に放出されたグルタミン酸を回収し濃度調節を行う主要な細胞である。グリホサート投与動物でアストロサイトの線維が少なく、グルタミン酸トランスポーターの発現量が減少していることは、神経細胞周辺のグルタミン酸量の調節に不具合が生じていることを示唆している。

アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの発現を負に調節するYY1の発現の変化を図15に示す。グリホサート投与動物では、発達初期から小脳皮質にYY1が強く分布しており、P7では特に分子層に著しく観察された(a)。ウェスタンブロットによる判定量では、小脳虫部全体においてもP5において有意にYY1の発現が多いことが確認された。

グリホサート投与動物において観察された変化は、これらの動物の発達期の脳で、グルタミン酸取り込み能の低下が起こっていることを示唆した。皮質内でグルタミン酸濃度が上昇すると、神経細胞死の誘発と同時に、小脳では運動機能の亢進が予想された。そこで、P3からP7の出生動物について、寝返り能力と32度の温水中での強制水泳試験を行った。図16に強制水泳試験の結果、および寝返り能力試験の結果を示す。どちらの試験方法においても、生後すぐの動物では、グリホサート投与動物の方が、有意に運動能力が高いことが観察された。この運動能力の高さは、6週以降の動物では観察されず、図10に示したように社会性の低下が観察されたことから、発達期の脳において神経伝達物質が過剰になったことで誘発された一過性の能力向上であると考えられた。

## (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15日のラットに農薬クロルピリホスを5 mg/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1 mg/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0.59 mg/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17)。

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18)。水泳能力の低下も観察された。

## (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15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20 mg/kg、40 mg/kg、60 mg/kgで単回投与し、出生仔の小脳発達を観察した。

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の増加をもたらした(図19)。

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。40 mg/kg、60 mg/kgのアセタミプリド曝露では、プルキンエ細胞の配列が乱れることが確認され、同様の異常がクロルピリホスの投与、及びニコチンの投与でも確認されたことから、発達期のアセチルコリン受容体の過活動に起因することが示唆された。

## (3) *in vivo* 投与動物由来培養ミクログリア試験

アセタミプリド40 mg/kgで妊娠15日に単回投与した出生仔から、生後2日でグリア選択培地及び振盪法を用いてミクログリアを単離培養した。対照動物はDMSOを投与したものをを用いた。加えて、グリホサート250 mg/kg投与動物由来のミクログリア単離培養を実施した。対照動物には、妊娠15日にDMSOを投与した動物の出生仔を用いた。

培養ミクログリアは、生きた細胞の変化と内部状態を観察出来る音響インピーダンス顕微鏡(図20)を用いて、600 μM ATP投与によるミクログリアの変化を観察した。さらにIba1およびP2Y12抗体を用いた免疫細胞化学染色を行い、共焦点顕微鏡観察した。

図21の対照動物由来ミクログリア(Cont-MG)に見られるように、ミクログリアは培養下で休止状態のM0型の形状を取るとされている。一方、アセタミプリド投与動物由

来ミクログリア(ACE-MG)は、培養下で側枝を出したラミファイド状の活性化ミクログリアの形状をしめした。グリホサート投与動物由来ミクログリアでは、培養下で活性化状態の形状を示すことは観察されなかった。

実験的に培養ミクログリアはATP投与によって活性化され、細胞の形状や生理的機能が変化する。ATPの受容は細胞表面にP2Y<sub>12</sub>受容体が発現することで行われるが、さらに活性化して攻撃型ミクログリアになるとP2Y<sub>12</sub>受容体が減少することが知られている。

図22では、ATP刺激前後でのCont-MGとACE-MGのP2Y<sub>12</sub>受容体発現の変化を示している。ATP刺激前のCont-MGではP2Y<sub>12</sub>の発現は少なく、分布は核周辺に限局していたが、ACE-MGではP2Y<sub>12</sub>発現が核周辺を中心に広い範囲にわたっていた。ATP刺激により、Cont-MGのP2Y<sub>12</sub>受容体は増強され細胞全体に発現した一方、ATP刺激後のACE-MGでは、Iba-1、P2Y<sub>12</sub>双方の発現が減弱することが観察された。

養ミクログリアの反応性の観察には、音響インピーダンス顕微鏡を用いた。音響インピーダンス顕微鏡は下図に示すように、ポリスチレンフィルム上に培養した細胞に400 MHzの高周波超音波をビーム照射し、反射波を参照波形と比較することで、細胞内の粘弾性を定量可視化する技術である。レーザー光と比べて細胞に対する侵襲性が格段に低く、生きた細胞の変化を捉えることができる。今回、ミクログリアの反応性、変化を観察するために、細胞の立体方向の変化を可視化できる技術を開発し、それを用いてACE-MGおよびCont-MGのATP刺激による変化を観察した。音響インピーダンス顕微鏡の平面方向の空間分解能は約1 μm、立体方向の空間分解能は0.1 μmである。観察結果を図23に示す。

ATP刺激前のCont-MGは、培養面に密着した構造をとっており三次元的にも隙間が見られない一方、ATP刺激によって活性化し側枝を伸ばしたCont-MGでは側枝の下に隙間が開き、さらに細胞体の下、側枝の接着点の3点で高い粘弾性を示した。我々の別の研究から音響インピーダンス顕微鏡の高い粘弾性はアクチン線維の集積によるものであることを確認しており、ATP刺激されたCont-MGが変形して立体的な形状を取るためにアクチンの集積が起こっておりことが示唆された。

一方、ATP刺激以前から側枝のある構造をとっていたACE-MGでは、ATP刺激前の側枝の下にはっきりとしたブリッジ状の空間は観察されず、三次元的にはATP刺激前のCont-MGに類似した形状であることが観察された。さらにATP刺激されたACE-MGでは、側枝の下にはっきりとしたブリッジ状の隙間が観察されたが、細胞体の下や側枝の接着点の粘弾性はCont-MGより低い値となった。

#### D. 考察

これらの結果は、OECD対象物質であるグリホサートの100 mg/kg以上の曝露が出生仔の神経異常をもたらす可能性を示した。ウサギおよびイヌの長期連用試験から得られたグリホサートのNOAELsは100 mg/kg bw/dayであり、本試験で用いたグリホサート量が著しい高用量とは言えないが、食品安全委員会が定めた1日摂取許容量は1 mg/kg bw/dayであり、本実験の用量はかなりの高濃度と考えられる。胎児期の急性高用量のグリホサートが発達依存的な神経炎症を引き起こす可能性を示唆する。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。単回投与では濃度依存的に影響は低下したが、慢性投与では中程度の用量にも神経発達に影響が現れ、注意が必要であることを示した。アセタミプリド、クロルピリホスを含め、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。

高濃度のグリホサートあるいはアセタミプリドの投与は、発達初期から小脳組織に変化を誘発することが確認された。グリホサート投与動物では、発達初期からアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの分化抑制を引き起こしていることが確認され、グルタミン酸による興奮毒性によってこの後の神経細胞死を誘発することが示唆された。グリホサートのヒト曝露では、パーキンソン病やアルツハイマー症など神経死と関連性の高い神経疾患の誘発が報告されている。成熟動物においてもグリホサートがアストロサイトのグルタミン酸取り込み能の低下を引き起こすとすれば、これが神経疾患のメカニズムとなることが予想される。一方グリホサートには脊椎動物において基質となる酵素が存在しないと報告されてきた。炎症性サイトカインの上昇が生後1週間以降に始まること、腸内細菌叢が炎症性に变化することなどから、当初は、グリホサートによる神経疾患は、ある程度発達した神経系における二次的な炎症であることを予想していた。しかし出生直後の早い時期において、グリホサート曝露によりアストロサイトが変化すること、それはグルタミン酸トランスポーター発現制御たんばくの発現変化によるものであることが確認された。何らかのエピジェネティックな変化が誘発され、その変化が徐々に炎症誘発に至って神経死をもたらすのではないかと考えられる。

アセタミプリド投与動物では、発達の早い段階で採取したミクログリアが活性化状態を示していることが観察された。ATP刺激を加えることなくミクログリアが活性化状態であることは、グリホサート投与動物では観察されないアセタミプリドの特徴だった。生後2週におけるアセタミプリドの神経死誘発は比較的緩やかであり、グリホサートと比較するとミクログリアの増加も少ない傾向が

あったが、アセタミプリド投与動物由来のミクログリアは、出生時から攻撃的に変化していることが予想される。さらに音響インピーダンス顕微鏡を用いた三次元粘弾性観察から、活性化ミクログリアにもいくつかの段階があることが示唆された。①Cont-MGに見られた休止状態、②ATP刺激前のACE-MGに見られた側枝を出しているがブリッジ状になっていない状態、③ATP刺激によって側枝の下にブリッジ状の三次元構造を作るが接地点のアクチン集積が高い状態、④ATP刺激によって形成したブリッジ状の三次元構造のアクチン集積がそれほど高くない状態、の4状態が観察されている。アクチンの集積は細胞の構造を安定化する一方、ダイナミックに動いて貪食するにはアクチンがやや不安定な方が適している。上記で述べたミクログリアの4状態と、既に報告されているミクログリアの受容体タンパク質発現の相関を観察することで、神経死を制御しまた神経を保護・分化誘導すると言われるミクログリアの動態が明らかになるのではないかと考える。

## E. 結論

OECD 対照物質であるグリホサートが高濃度投与量では神経死、腸内細菌叢の変化、行動異常を誘発することを示した。グリホサート代謝物投与、および慢性投与においても同様の傾向が見られた。神経死に付随して炎症性サイトカインの発現増加が観察された。

また、胎児期の農薬投与は、発達の初期から神経系細胞に異常を誘発している可能性が示された。グリホサート投与動物では、グルタミン酸の過剰による神経死、または免疫系細胞の異常な活性化が、神経死を誘発し、神経回路形成に影響を与えていることが強く示唆された。またアセタミプリド投与動物では、ミクログリアが活性化していることが確認された。今後、本研究の結果を*in vitro*での毒性試験に還元するため、神経-アストロサイト-ミクログリアの三体系による毒性試験法を構築して、発達神経毒性を誘起する化学物質のスクリーニングを行うことが有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

#### 2021 年度

- [1] Yoshida S, Kanda Y, Kobayashi K, Hozumi N. Novel assessment for the reactivity of rat-derived microglia with scanning acoustic microscope. EMBO workshop (Web 開催, 2021.10.29)
- [2] Lee CLM, Umemura K, Murakami M, Tiong TKS, Kobayashi K, Hozumi N, Yoshida

S. Directly assessing the reactivity of rat-derived microglia with scanning acoustic microscope. The 42nd Symposium on Ultrasonic Electronics (Web 開催, 2021.10.25)

- [3] 吉田祥子 Prenatal chemical exposure induce developmental neurotoxicity due to epigenetic alterations. 第 64 回神経化学会大会シンポジウム(Web 開催, 2021.9.30)
- [4] Inakawa T, Tiong TKS, Futagami K, Nomura Y, Kanda Y, Sachiko Yoshida S. Examining the association between a model of butyrate recovery in glyphosate-treated rats and changes in flora in a single dose of butyrate. 第 64 回神経化学会大会 (Web 開催, 2021.9.30)
- [5] Haya W, Matsufusa R, Kanda Y, Yoshida S. Effects of fetal exposure to organophosphorus pesticide, chlorpyrifos, on cerebellar development. 第 64 回神経化学会大会 (Web 開催, 2021.9.30)
- [6] Okada S, Lee CLM, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Neurotoxicity of neonicotinoid, Acetamiprid and changes in the gut microbiota. 第 64 回神経化学会大会 (Web 開催, 2021.9.30)
- [7] Matsui S, Tanaka K, Adachi A, Iwanaga M, Kanda Y, Yoshida S. Epigenetic alteration and glutamate homeostasis due to prenatal administration of various HDAC inhibitors to developmental rat cerebellum. 第 64 回神経化学会大会 (Web 開催, 2021.9.30)
- [8] Veloo S, Ohtsuka H, Tsunemoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S. Developmental neurotoxicity due to prenatal LPS administration progresses from epigenetic alteration to delayed neuronal cell death. 第 64 回神経化学会大会(Web 開催, 2021.9.30)
- [9] Satake S, Futagami K, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Biphasic Neurodevelopmental toxicity of low-dose chronic Glyphosate exposure in utero. 第 64 回神経化学会大会 (Web 開催, 2021.9.30)
- [10] Yoshida S, Fukushima M, Kanda Y. Prenatal exposure of valproate and HDAC inhibitors induce hyperplasia of cerebellar lobules and epigenetic change of granule cell precursors. ISDN2021 (Web 開催, 2021.5.27)

#### 2020 年度

- [11] Yoshida S, Futagami K, Ohtsuka H, Lee CLM, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y. Development-progressive neurotoxicity regulated neuroinflammation with prenatal chemical exposure on the rat. 2021 第 98 回日

- 本生理学会大会シンポジウム (Web 開催, 2021.3.30)
12. [12] Satake S, Futagami K, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. The developmental effect of chronic and low concentration of Glyphosate exposure in utero. 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.28)
  13. [13] Matsui S, Iwanaga M, Kanda Y, Yoshida S. Effects of prenatal administration of various HDAC inhibitors to rat cerebellar development. 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.28)
  14. [14] Okada S, Lee CLM, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Neurotoxicity of acute exposure of neonicotinoid, Acetamiprid in developing cerebellum. 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.28)
  15. [15] Veloo S, Ohtsuka H, Tsunemoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S. The possibility of epigenetic alteration due to LPS neurotoxicity. 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.28)
  16. [16] Lee CLM, Tiong TKS, Lopez J, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Neurotoxicity of acute exposure of neonicotinoid, Acetamiprid in developing cerebellum 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.28)
  17. [17] Inakawa T, Tiong TKS, Satake S, Futagami K, Nomura Y, Koshimura M, Kanda Y, Yoshida S. Alteration of microbiome in acute or chronic glyphosate administrated rat and comparison with it in butyrate recovery model animals. 第 98 回日本生理学会大会 (Web 開催, 2021.3.30)
  18. [18] Kawasaki R, Maeda N, Miyamoto K, Ohtsuka H, Yoshida S, Yamazaki T, Koshimura M. Comprehensive Analysis of Gut Bacterial Metabolites Involved in Neurodevelopmental Disorders. 日本農芸化学会西日本支部第 3 回学生フォーラム 2020.12.19
  19. [19] 越村匡博、山崎隆志、前田菜緒、川崎隆太、吉田祥子、宮本佳奈、大塚暖子 神経発達障害に関与する腸内細菌代謝物質の網羅的解析 第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020 (Web 開催, 2020.10.20)
  20. [20] Lee CLM, Ohmuro T, Tiong TKS, Lopez J, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. High-dose neonicotinoid insecticide, Acetamiprid induces Purkinje cell malformation and behavioral alteration. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.12)
  21. [21] Iwanaga M, Fukushima M, Matsui S, Adachi A, Kanda Y, Yoshida S. Chemical-induced alteration of Purkinje cell development was related to GLAST expression. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.12)
  22. [22] Matsufusa R, Kanda Y, Yoshida S. Mechanism of developmental neurotoxicity of chlorpyrifos due to AChE inhibition. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.12)
  23. [23] Ohmuro T, Miyamoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S. Behavioral alteration and microbiome transition of the prenatal glyphosate-treated rat. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.12)
  24. [24] Satake S, Futagami K, Thomas Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. The neurodevelopmental toxicity of chronic glyphosate exposure in developing rat cerebellum. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.10)
  25. [25] Ohtsuka H, Veloo S, Tsunemoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S. Cytological mechanism of developmental neurotoxicity embryonic LPS exposure. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.10)
  26. [26] Futagami K, Tiong TKS, Lee CLM, Ohtsuka H, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Delayed neurotoxicity of prenatal glyphosate exposure and microglial activation. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.10)
  27. [27] Umemura K, Iwanaga M, Nakada S, Tiong TKS, Prastika EB, Kobayashi K, Hozumi N, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Physiological properties of cultured microglia from glyphosate-exposed rat cerebellum. 2020 神経化学学会 (Web 開催, 2020.9.10)
  28. [28] 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. 2020 毒性学会 (Web 開催, 2020.6.29)
  29. [29] Lee CLM, Matsufusa R, Tiong TKS, Lopez J, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Potentiation of developmental malformation and neurotoxicity of neonicotinoid insecticide, Acetamiprid. 2020 毒性学会 (Web 開催, 2020.6.29)
- 2019 年度
30. [30] Yoshida S, Fukushima M, Kanda Y. The epigenetic change of granule cell precursors causes excess folding of cerebellar lobules to induce ASD-like malformation. EMBL Symposium: Metabolism Meets Epigenetics 2019.11.23
  31. [31] Yoshida S, Nomura Y, Kanda Y. Developmental neurotoxicity and immune abnormality of in-utero food-restriction on rat animal model. World Congress on

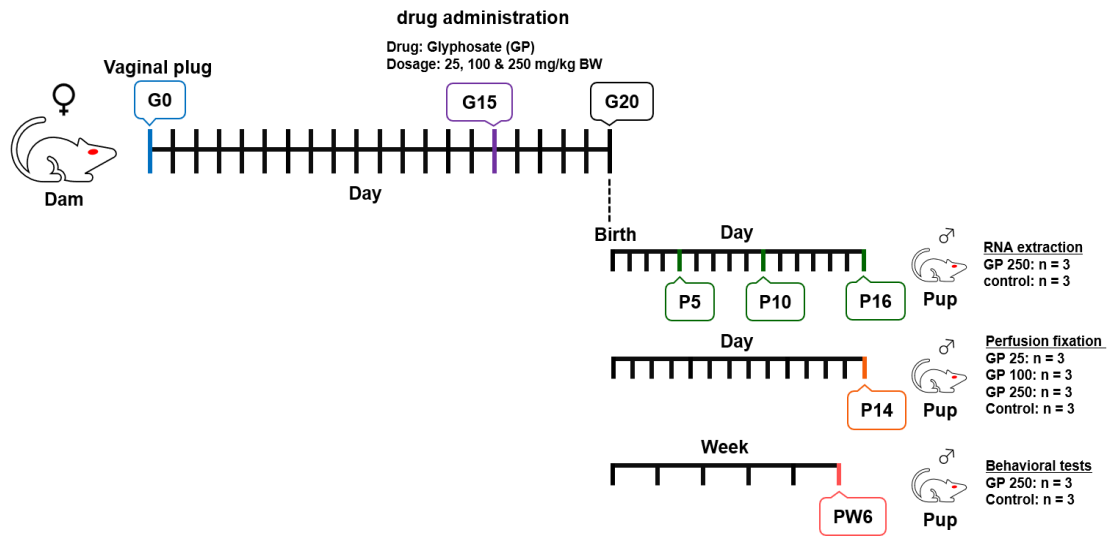
Inflammation 2019.9.16

32. [32] 大塚暖子、常本和伸、諫田泰成、吉田祥子胎児期の LPS 曝露がラットの小脳発達に与える影響 日本薬学会第 5 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2019.9.14
33. [33] Fukushima M, Nishikawa C, Nomura Y, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Yoshida S. Glial modification in developing VPA-induced ASD model rat cerebellum. 2019 神経科学学会 2019.7.27
34. [34] Ohtsuka H, Asai N, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S. Developmental abnormality induced LPS, bacteria-derived inflammatory agent in rat cerebellar cortex. 2019 神経科学学会 2019.7.27
35. [35] Matsufusa R, Kanda Y, Yoshida S. Behavioral alteration of chemical-induced autistic model rat and its neuronal mechanism. 2019 神経科学学会 2019.7.26
36. [36] Futagami K, Huang YL, Nomura Y, Kanda Y, Hozumi N, Yoshida S. Potentiation of developmental neurotoxicity of broad-applied herbicide, Glyphosate. 2019 神経科学学会 2019.7.25
37. [37] Miyamoto K, Tiong TKS, Sato S, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S. Alteration of cerebellar developmental structures and metabolic condition in prenatal famine rat. 2019 神経科学学会 2019.7.25

#### G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許・特許出願  
なし。
3. 実用新案登録  
なし。
4. その他  
なし。

図 1



投与と試料調整のスケジュール

☒ 2

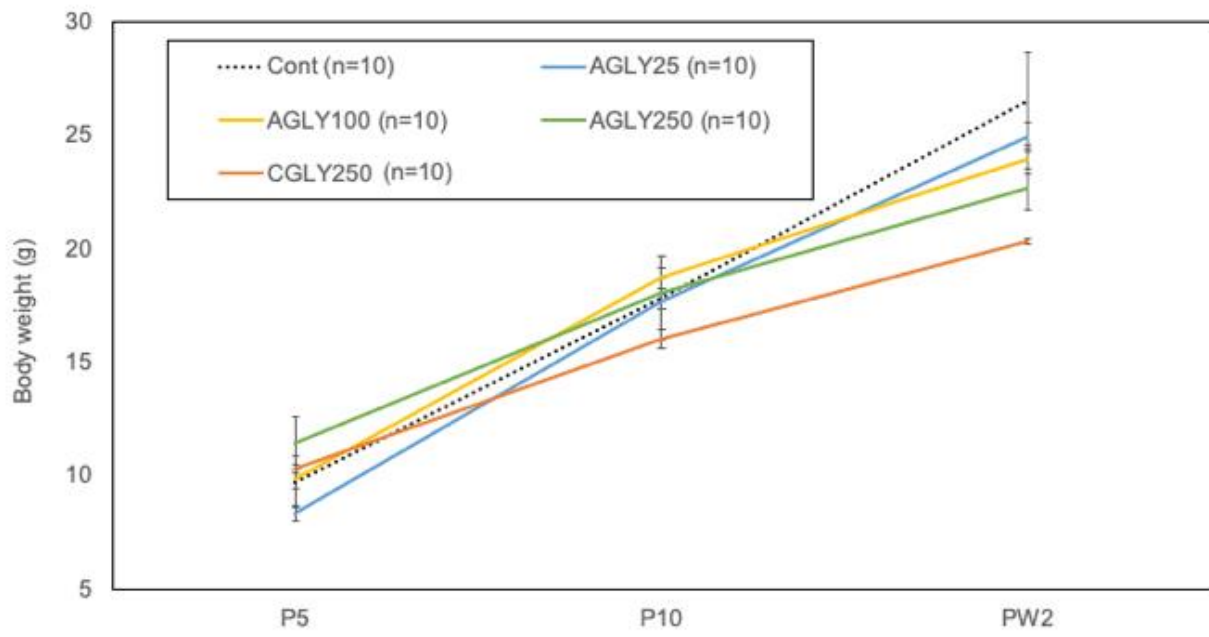
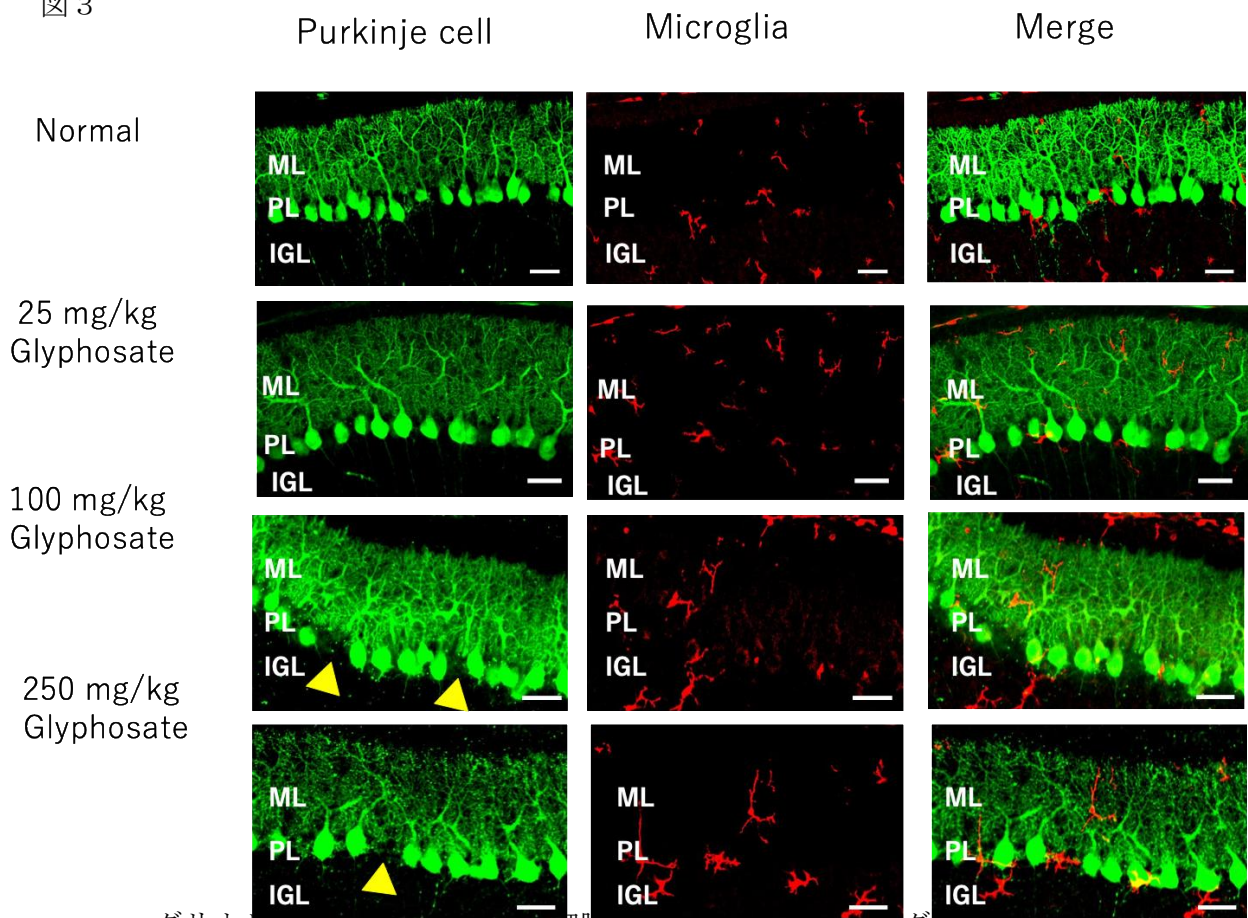


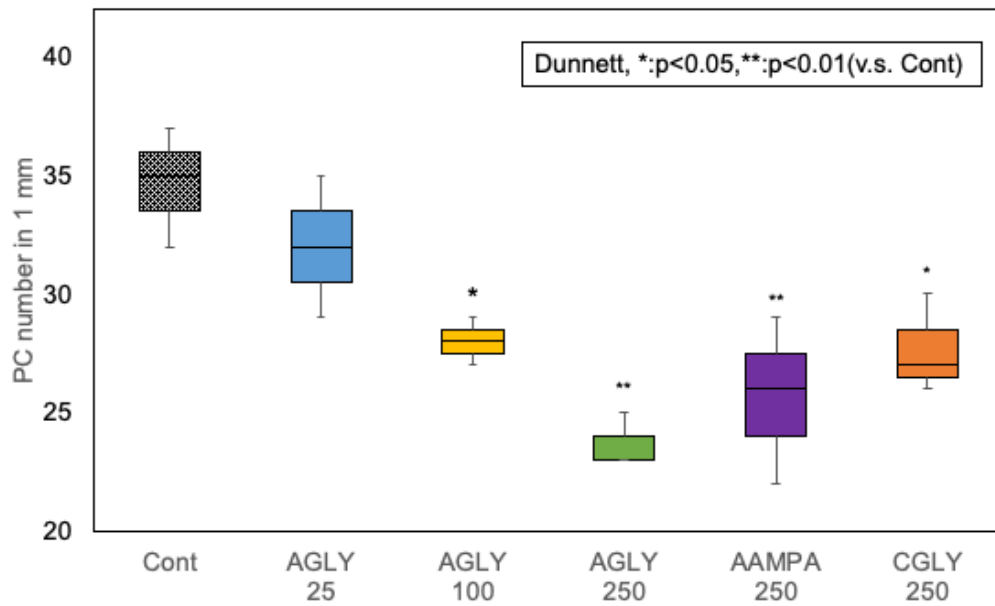
図 3



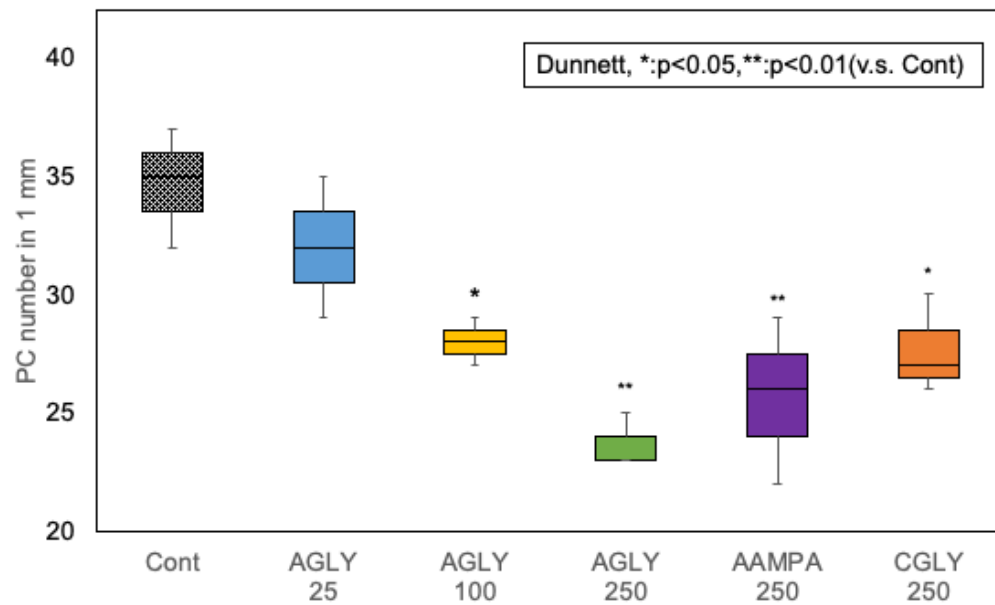
グリホサート投与による神経細胞の変化（緑）とミクログリア分布（赤）

図 4

a

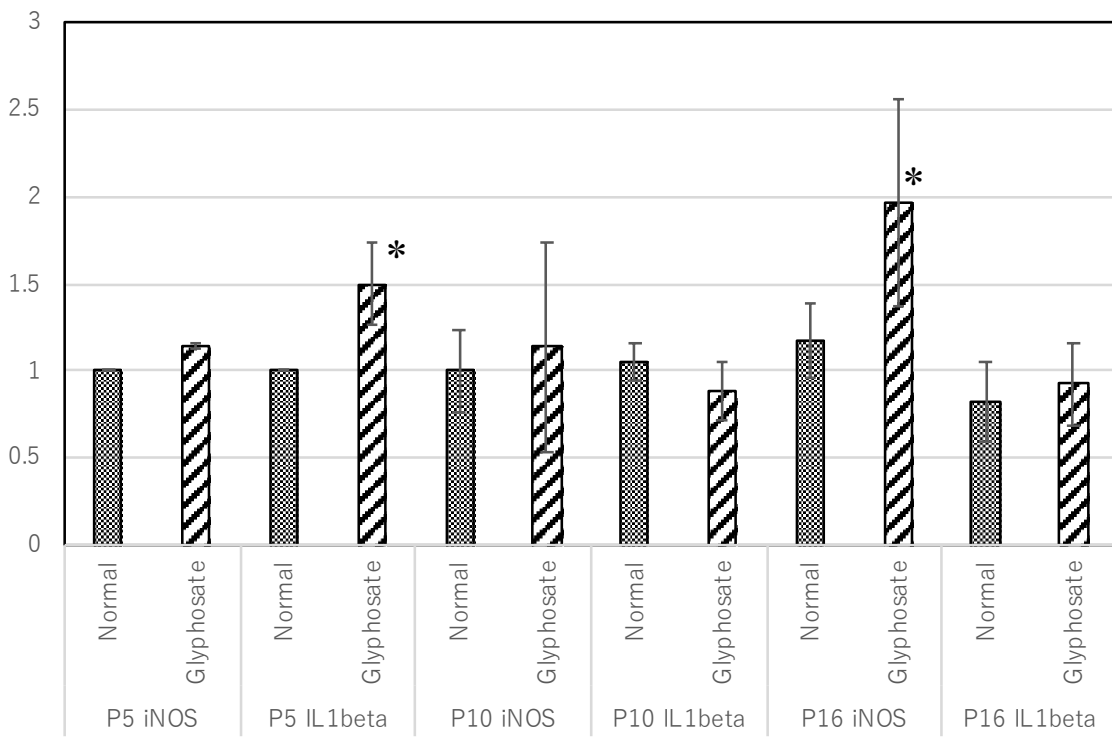


b



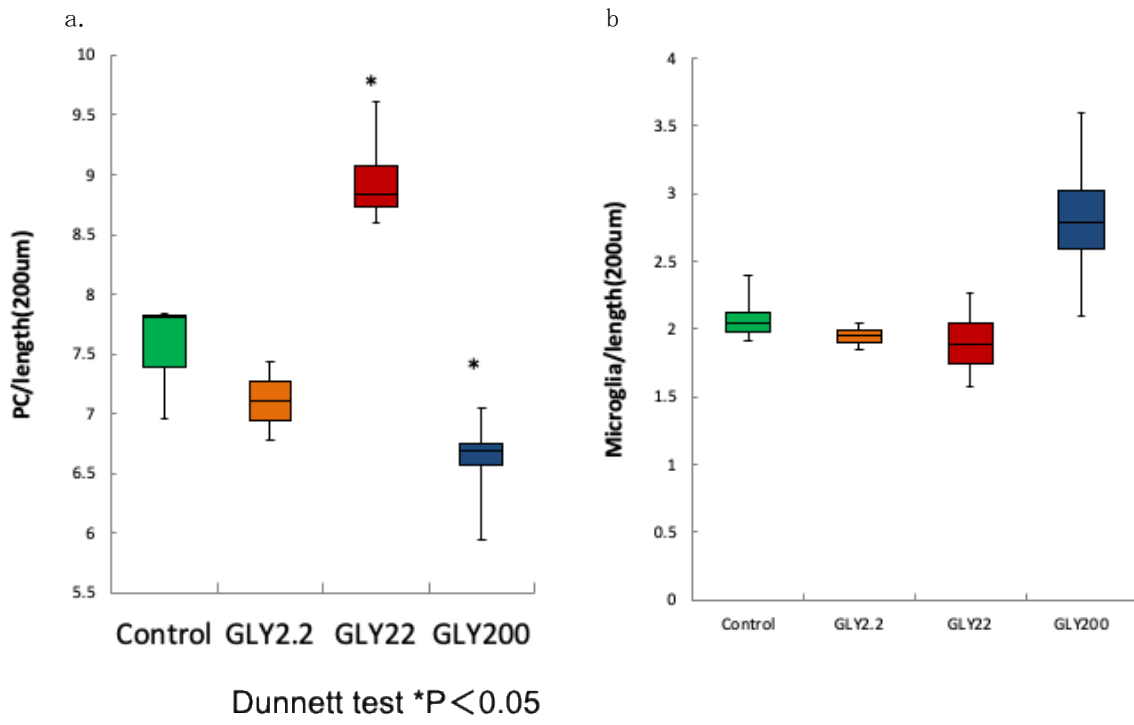
グリホサート曝露による出生仔のプルキンエ細胞数の変化(a)とグリホサート曝露による出生仔小脳のマクログリア数の変化(b)

図 5



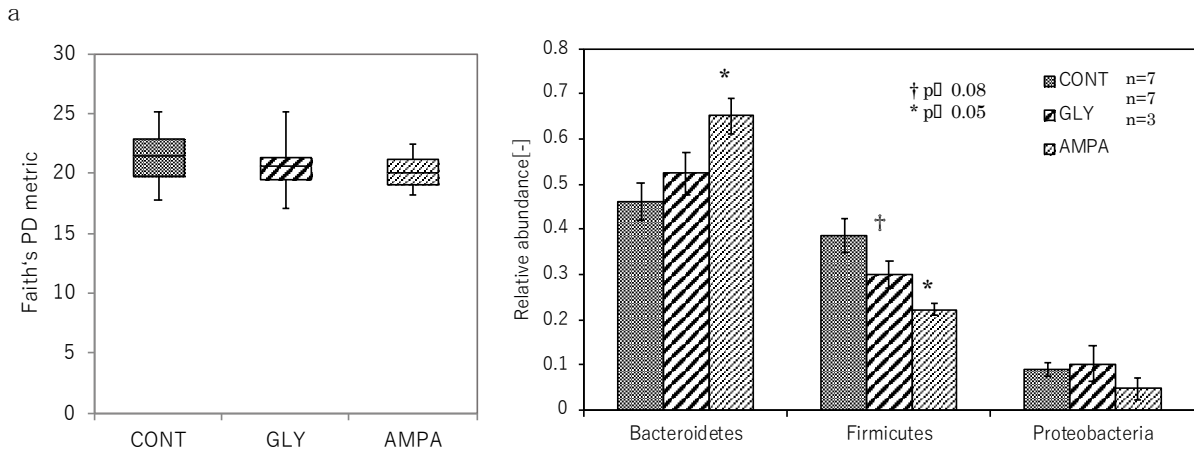
発達依存的サイトカイン発現量の変化

図 6

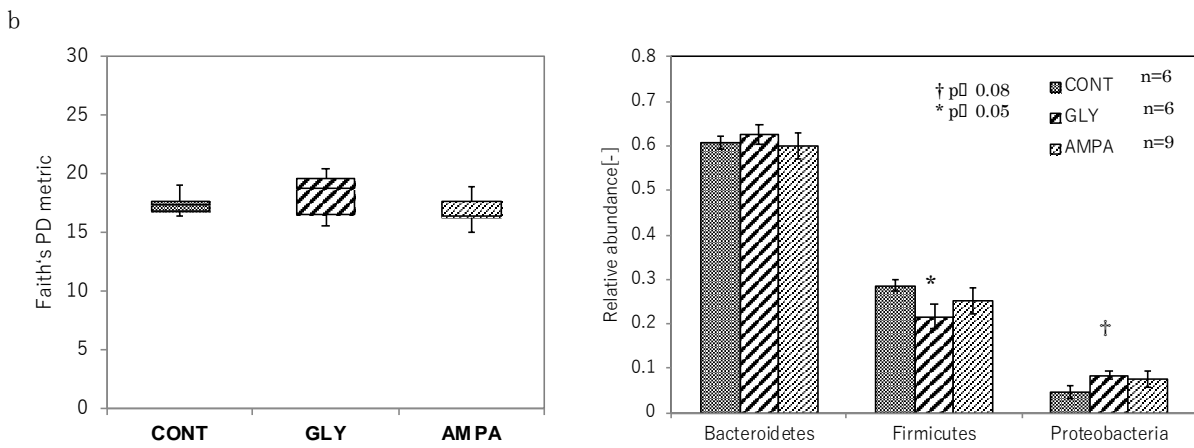


グリホサート慢性曝露によるプルキンエ細胞数(a)とミクログリア数(b)の変化

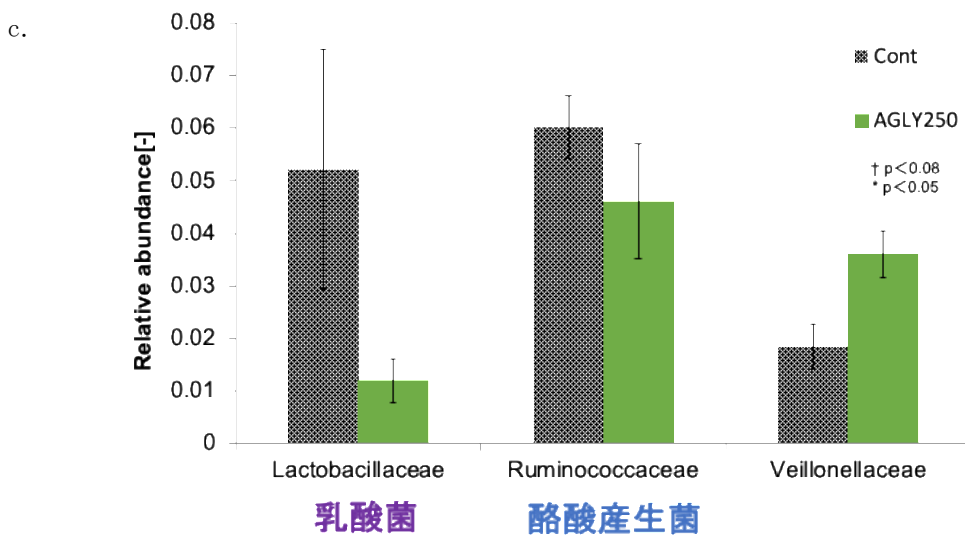
図 7



a: グリホサート投与妊娠動物の G20 での腸内細菌叢の変化 (門レベル)

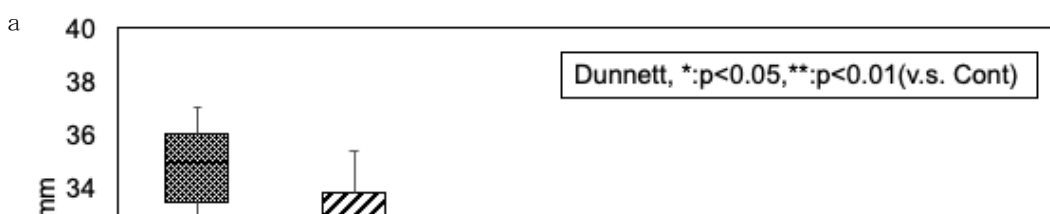


b: 胎児期グリホサート投与動物の P28 での腸内細菌叢の変化 (門レベル)

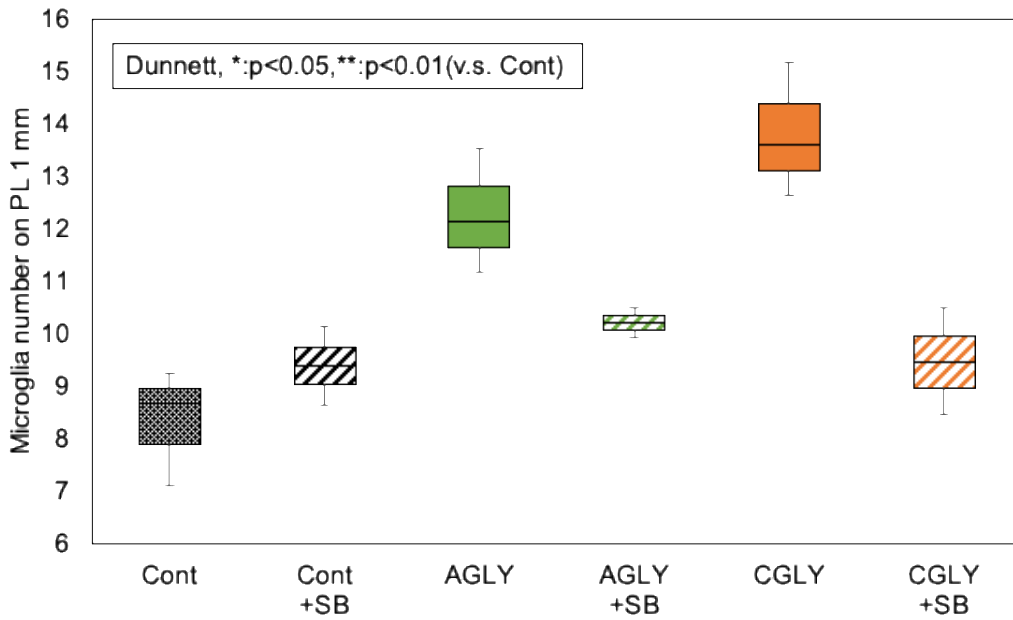


c: 胎児期グリホサート投与動物の P28 での腸内細菌叢の変化 (属レベル)

図 9

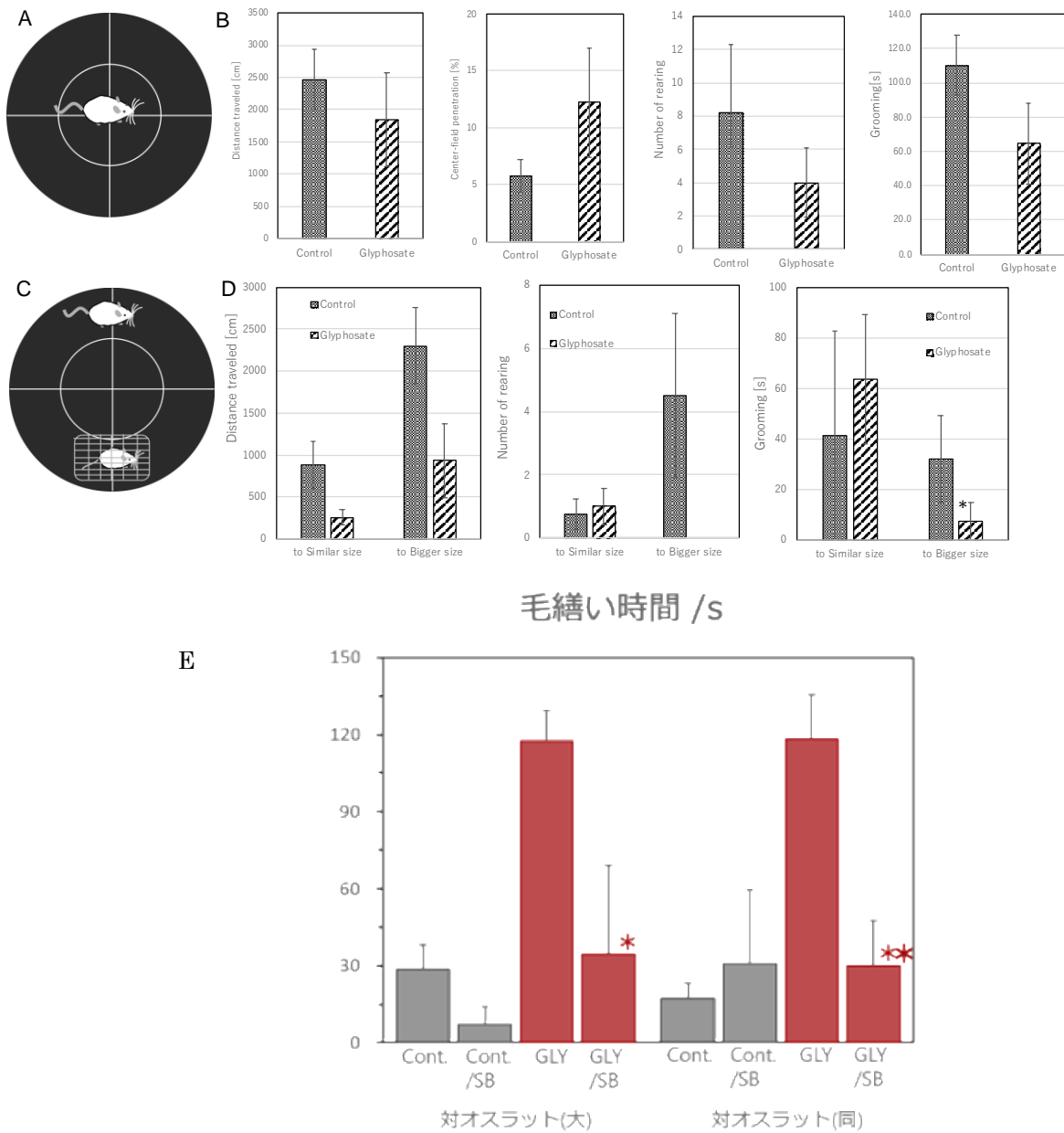


b



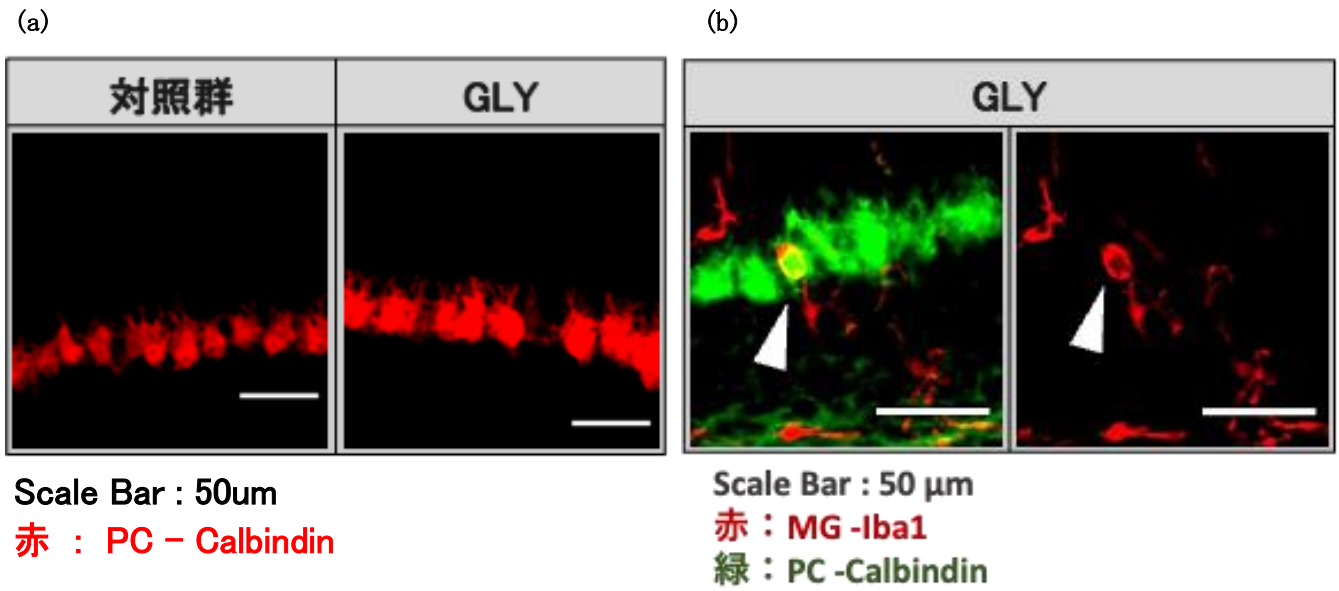
グリホサート曝露動物に対する酪酸投与のプルキンエ細胞死に対する効果(a)、およびグリホサート曝露動物に対する酪酸投与のミクログリア増加に対する効果(b)

図 10



グリホサート 投与動物の6週での行動試験(A-D)と酪酸投与による行動の回復(E)

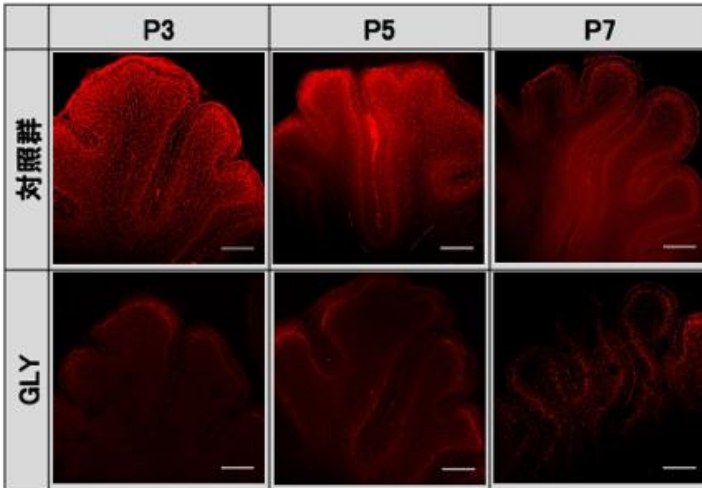
図 1 1



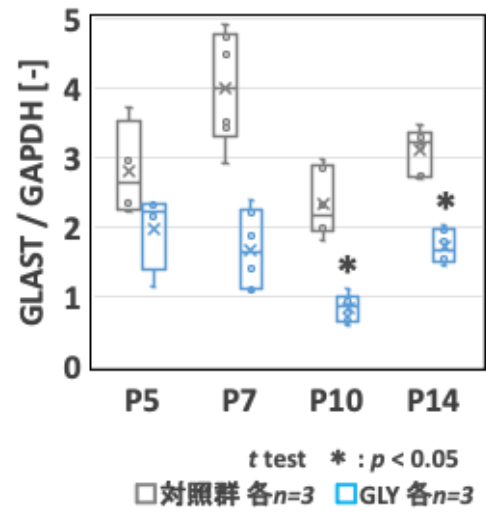
グリホサート曝露動物のプルキンエ細胞の欠損(a)とミクログリアによるプルキンエ細胞の貪食

図 1 2

(a)



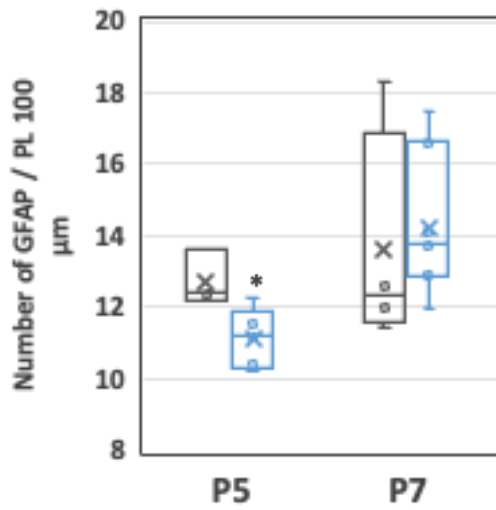
(b)



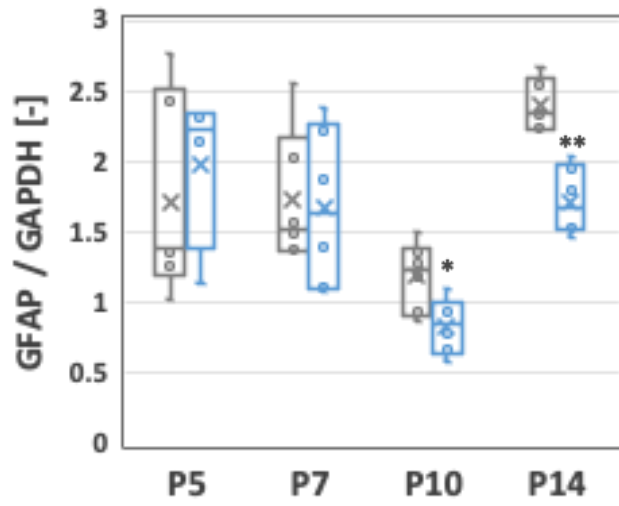
グリホサート曝露動物小脳虫部のGLAST発現の変化  
(a) : 抗GLAST免疫組織化学染色、(b) : ウェスタンブロットによるGLAST発現量の半定量

図 1 3

(a)

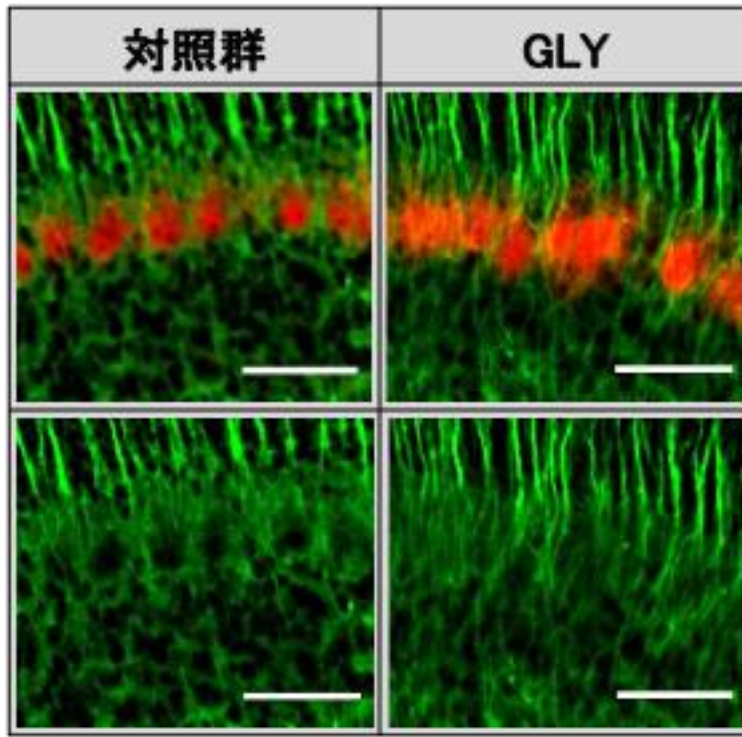


(b)



グリホサート曝露動物のGFAP線維数の変化(a)とウェスタンブロットによって求めた発現量の変化(b)  
黒枠：対照動物、青枠：グリホサート投与動物

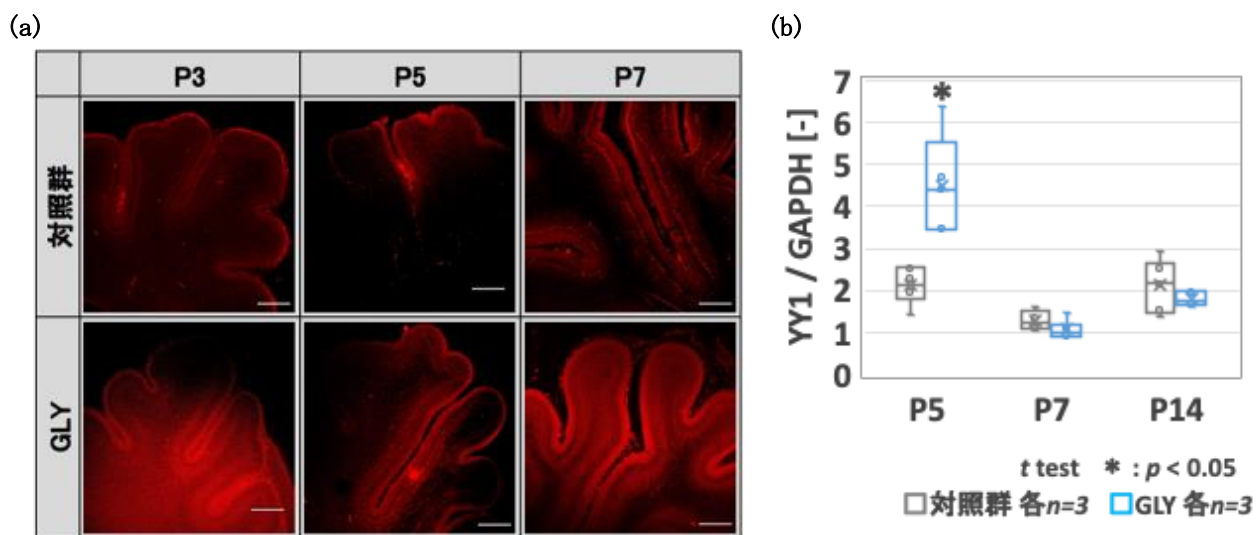
図 1 4



Scale Bar : 50  $\mu$ m 赤:PC-Calbindin 緑:AS-GFAP

グリホサート曝露動物のGFAP分布とプルキンエ細胞の相互位置の変化。  
P7小脳虫部。GFAP染色像（下）がプルキンエ細胞を取り囲んでいない。

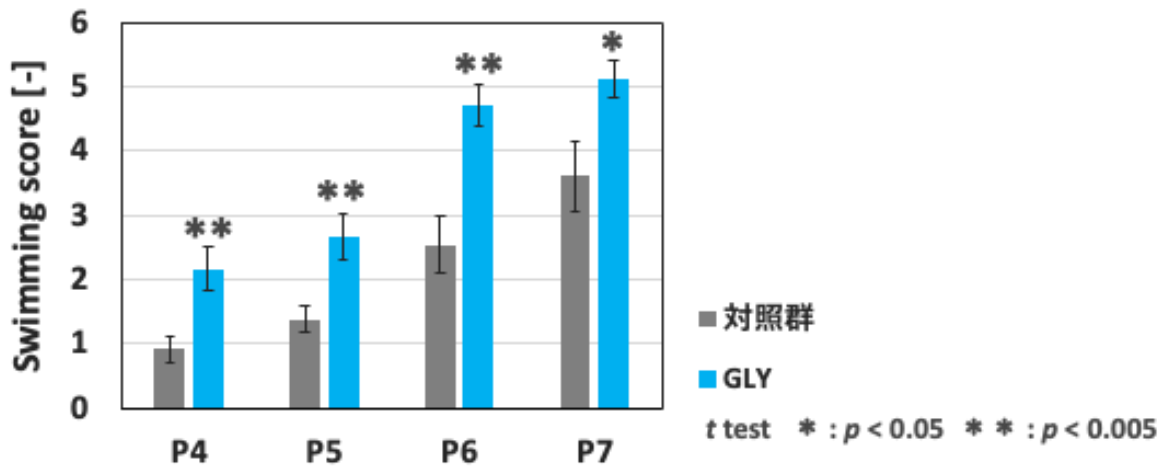
図 1 5



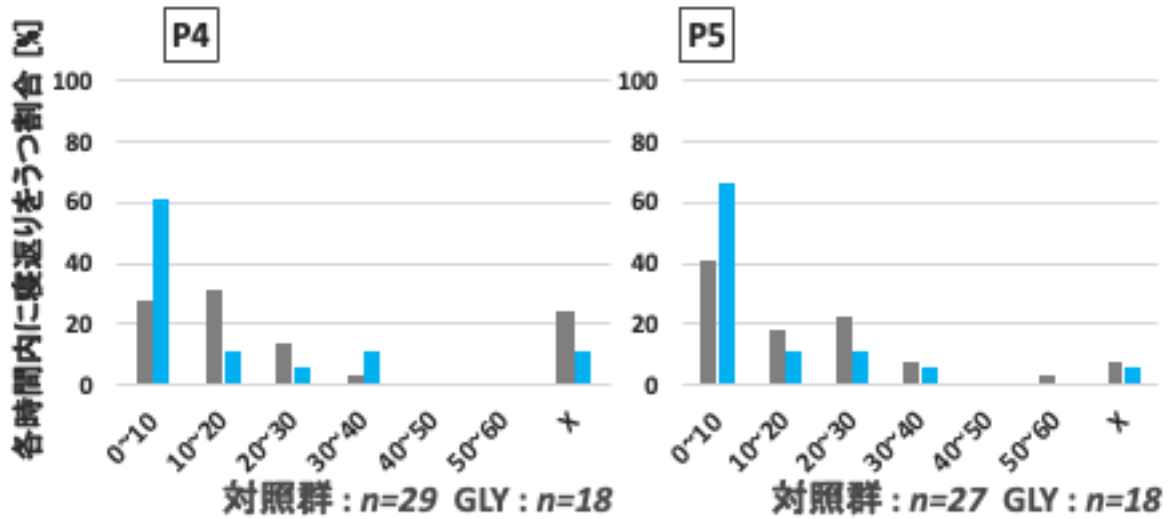
グリホサート曝露動物のYY1分布 (a) とウェスタンブロットによって求めた発現量の変化 (b)  
Scale bar: 200 $\mu$ m

図 1 6

(a)

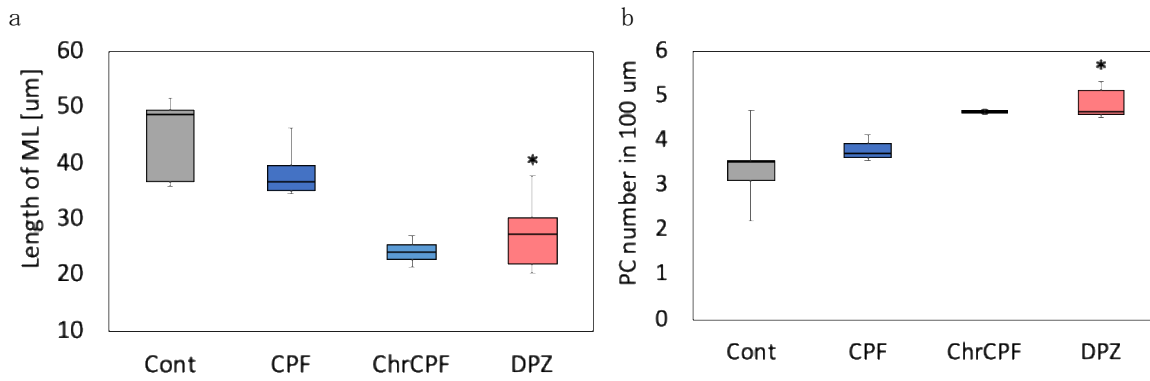


(b)



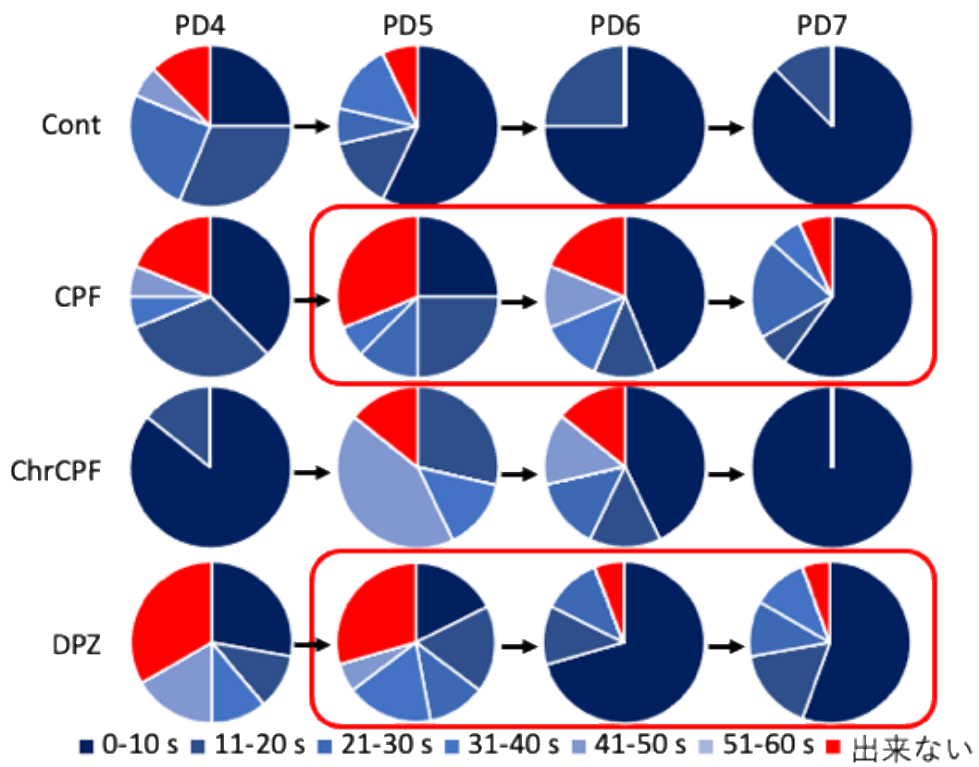
グリホサート投与動物の強制水泳試験結果(a)および寝返り能力試験の結果(b)  
Swimming scoreは顔を上げて泳ぐほどスコアが高くなるよう設定

図 1 7



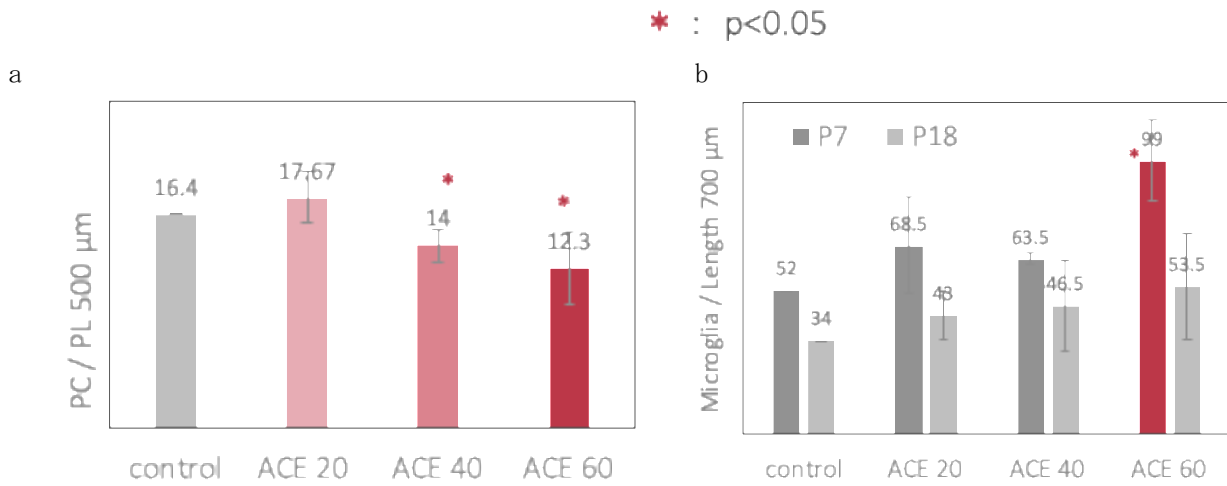
クロルピリホス曝露による樹状突起短縮 (a) とプルキンエ細胞数の増加 (b)

図 1 8



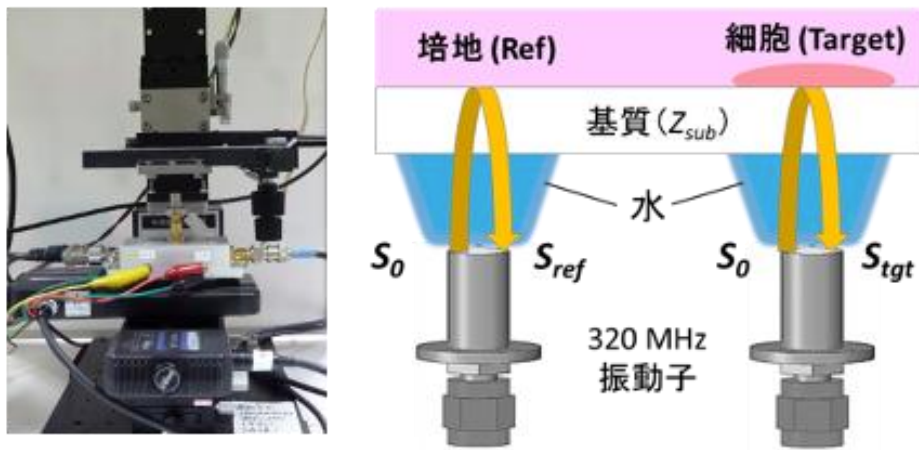
クロルピリホス曝露による寝返りにかかる時間の増加

図 19



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

図 2 0



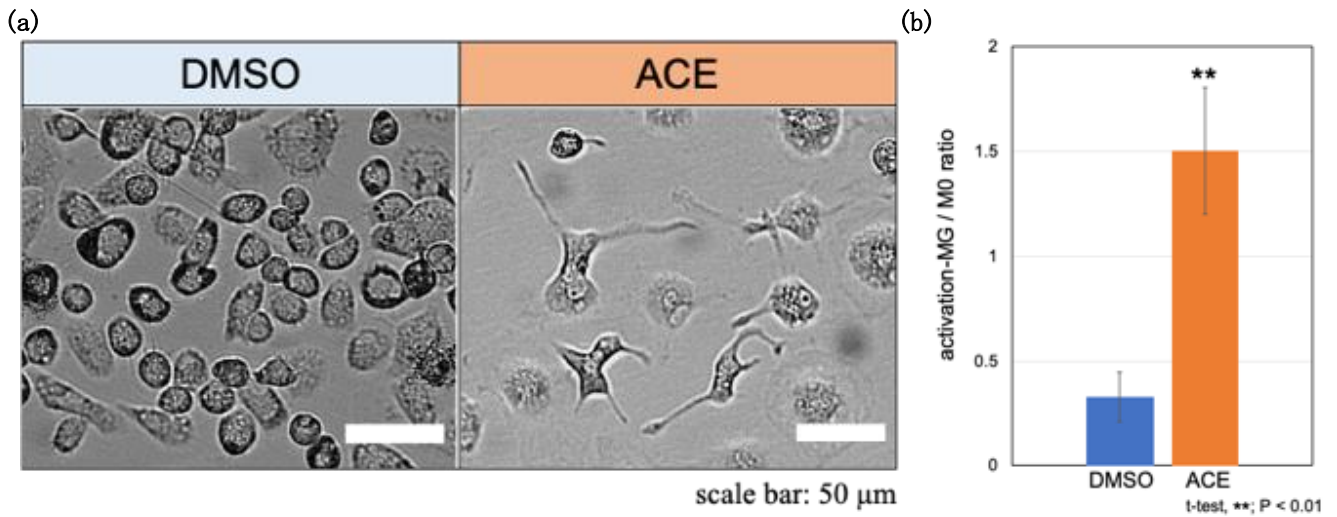
【細胞由来音響インピーダンス(AI)値の算出】

$$Z_{tgt} = \frac{1 + \frac{S_{tgt}}{S_0}}{1 - \frac{S_{tgt}}{S_0}} Z_{sub} = \frac{1 - \frac{S_{tgt}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}}{1 + \frac{S_{tgt}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}} Z_{sub}$$

$$S_0 = \frac{Z_{ref} + Z_0}{Z_{ref} - Z_0} S_{ref}$$

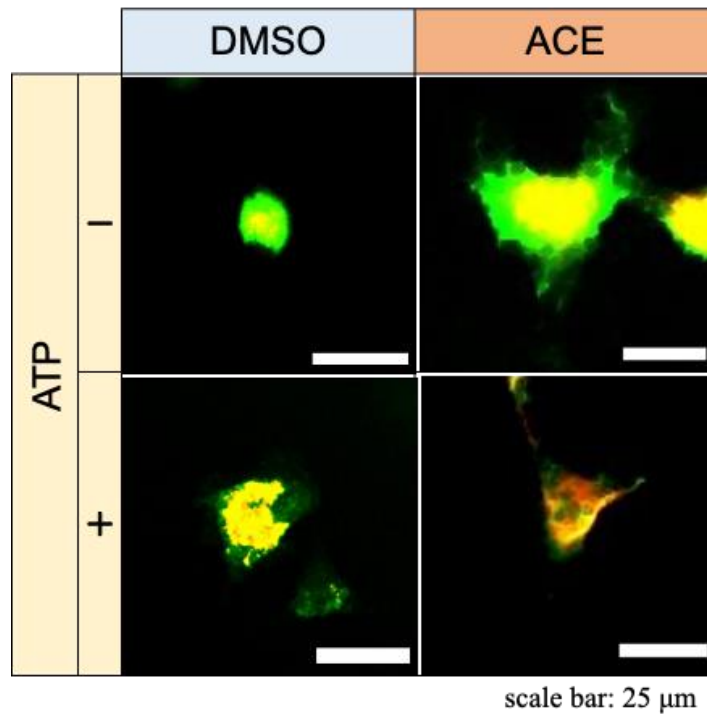
音響インピーダンス顕微鏡の概略と AI 値の算出式

図 2 1



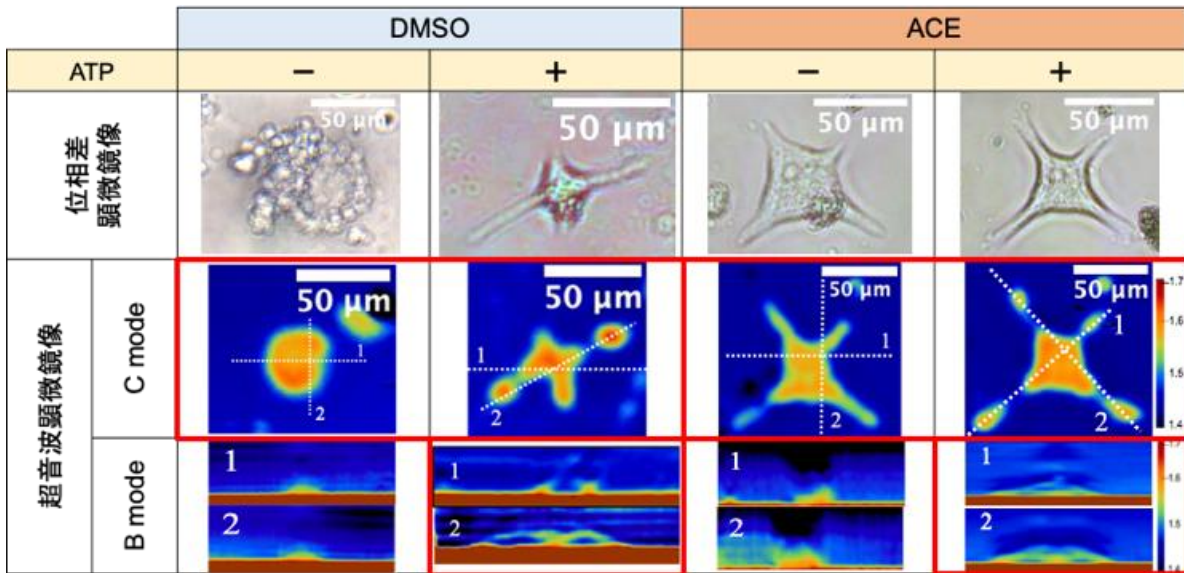
アセタミプリド曝露動物由来ミクログリアの形状変化(a)と側枝型ミクログリアの比率(b)

図 2 2



アセタミプリド曝露および対照動物由来培養ミクログリアのATP刺激前後のIba-1 (緑)およびP2Y12受容体 (赤) 発現分布

図 2 3



アセタミプリド曝露(ACE)および対照動物(DMSO)由来培養ミクログリアのATP刺激前後の二次元超音波像(C mode像)および三次元超音波像(B mode像)。B mode像はC mode像のそれぞれの断面を示している。

## 神経毒性のインシリコ予測・評価手法開発

研究分担者 吉成浩一 静岡県立大学薬学部

### 研究要旨

本研究では、分子記述子を活用して、発達神経毒性を示す化学物質の構造的特徴の同定、ならびにリードアクロスを利用した評価手法の開発を目指した。既報の文献より発達神経毒性を示す化学物質（陽性物質、164種）及び発達神経毒性の報告がない物質（陰性物質と定義、197種）の情報を収集してデータベース化した。これら2群間における分子記述子の値の差をWilcoxonの順位和検定により統計学的に解析したところ、発達神経毒性を示す物質は、飽和度や脂溶性が高く、環状構造を多く含むなどの特徴を有することが明らかになった。さらに、分子記述子により数学的に物質間の類似性を評価し、対象物質と類似物質（近傍物質）の発達神経毒性の有無を比較して、一致率等を評価した。この時、用いる記述子の種類、近傍とする距離の閾値、毒性評価に利用する近傍物質数を変化させ、精度の変化を解析したところ、統計学的に発達神経毒性と関連する記述子を選択して使用すること、比較的大きい閾値を設定すること、近傍物質数は11かそれ以上とすることで、評価精度が上昇することが示された。さらに、公開データを利用して、農薬のラット二世世代又は三世世代繁殖試験、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データベースを構築した。以上、本研究により、化学構造情報に基づくグルーピング及びリードアクロスを利用した発達神経毒性評価手法の開発のための有用な知見及びデータセットを得ることができた。

### A. 研究目的

近年、動物愛護の観点や製品開発の効率化の観点などから、動物実験代替法の開発が求められている。その中でも、化学物質の合成を必要とせず、スループットの高い評価が可能であるインシリコ手法を用いた評価系に期待が寄せられている。しかしながら、神経毒性や発達神経毒性（DNT）では公的に利用可能なデータベースがないことなどの理由から、化学構造情報を用いたインシリコ手法による評価手法の研究開発が遅れている。

これらの背景から本研究では、①DNTを示す物質の化学構造的特徴の解析、②分子記述子を説明変数として利用する、体系的なグルーピング及びリードアクロスによるDNT評価、③DNT予測・評価手法開発のためのデータベース構築、の3つの観点から研究を行った。

### B. 研究方法

**毒性試験情報の収集:** 文献 (*Neurotoxicol Teratol*, 52: 25-35, 2015) から DNT が報告されている物質及び DNT の報告がない物質の情報を抽出し、前者を DNT 陽性物質、後者を DNT 陰性物質として使用した。

**分子記述子計算:** これらの物質について、PubChem から SMILES 情報を取得し、ChemDraw (PerkinElmer) 及び Open Babel ([http://openbabel.org/wiki/Main\\_Page](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。また、分子記述子の計算ができない金属含有物質は解析対象か

ら除外した。

最終的に、陽性物質 164 種、陰性物質 197 種、合計 361 物質のデータセットを解析に用いた。

alvaDesc では分子記述子はその特徴に基づいていくつかのグループに分かれている。本研究では、視覚的・感覚的に理解しやすい、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 (48 記述子)、環状構造関連記述子を含む「Ring descriptors」グループ (32 記述子)、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 (55 記述子)、官能基関連記述子を含む「Functional group counts」グループ (154 記述子)、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 (115 記述子)、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 (20 記述子) の 6 グループの記述子 (全 424 記述子) に着目した。このうち、全物質で計算できなかった記述子及び全物質で同一の値を示した記述子を除外した 351 記述子を以下の解析に用いた。

#### 毒性試験データの収集

内閣府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、ラットの二世世代 (又は三世世代) 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、これらの情報も農薬評価書から抽出した。

**データ解析:** データ整理には Microsoft Excel を、統計的解析、決定木解析及び階層的クラスタリングには、JMP Pro 14 (SAS Institute) を、ユークリッド距離の計算には R を使用した。

(倫理面の配慮)

本研究では公開されている動物実験データを利用す

ることから、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の解析

DNT と化学構造の関連性を明らかにすることは、DNT の発現機序の理解や予測・評価手法の開発に有用である。そこで、Wilcoxon の順位和検定を利用して陽性物質 164 種と陰性物質 197 種の間で 6 グループの 351 記述子の値を比較した。その結果、107 記述子において有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。 $P < 0.01$  であった 44 記述子を表 1 に示した。

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平均値は DNT 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多かった。

また、DNT 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 (sp<sup>2</sup> 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)、Hy (脂溶性ファクター) の値が大きいため、DNT 陽性物質は不飽和結合を多く含み、脂溶性が高いことが示唆された。さらに、SAacc (水素結合アクセプターの表面積) や nHDon (水素結合ドナー数) などの分子間結合に関する記述子の値も DNT 陽性物質で高かった。

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 351 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 36 物質 (全物質数の 10%) とし、5 分割交差検証によりモデルを得た。モデルの感度 (陽性物質の正答率) は 0.518 (85/164)、特異度 (陰性物質の正答率) が 0.736 (145/197)、一致率は 0.637 (230/361) であった。用いたデータセットにおいて陰性物質の割合が多かったことから、本モデルでも特異度は比較的高かったが、感度は低かった。

このモデルの第一分岐条件は、「H%  $\geq$  57.7%であれば陰性」であり、上記の統計解析で最も P 値が小さかった分子記述子 H%が用いられていた。この判別により、49 の陰性物質 (全陰性物質の 25%) が正しく分類された (図 2A)。これらは酸素原子を含み、比較的分子量の小さな物質が多かった。

H%が 57.7%未満の物質については、nC<sub>s</sub> (sp<sup>3</sup> 炭素原子の総数) が 1 以上及び MCD (分子環状度) が 0.59 以上という 2 つの条件で 41 の陽性物質 (全陽性物質の 25%) が正しく判別された (図 2B)。これらには、上記の統計解析で明らかになったように、環状構造を多く含む物質が多かった。これらの判別に用いられた nC<sub>s</sub> は表 1 には含まれていないが、有意 ( $P = 0.0228$ ) に陽性物質で高かった。また、MCD の P 値は 0.0017 であり、上位 20 位に含まれていた。

### 2. グルーピング及びリードアクロスによる発達神経毒性評価

本研究では、基本的に以下のステップによりリードアクロスの毒性評価を行った。

- ① 記述子を利用して全物質間のユークリッド距離を計算 (64980 の物質ペアの全物質間距離を計算し、理論的最大距離を 1 とした相対距離に変換)
- ② 全物質を被験物質として、各物質から一定距離内にある物質を近傍物質として定義
- ③ 被験物質の実測値 (陽性・陰性) と近傍物質から推

定される DNT の有無 (近傍物質の陽性率が全物質の陽性率である 45.4%を超えた場合に陽性、それ以外を陰性と判断) を比較し、一致・不一致を判定

- ④ 被験物質の毒性 (陽性・陰性)、近傍物質による判定 (陽性・陰性) から 2×2 分割表を作成し、感度、特異度、一致率を計算

この過程において、使用する記述子の種類、近傍とする物質間距離、毒性評価に使用する近傍物質数、の 3 つの指標について検討した。

#### 2-1. 物質間距離の閾値と評価精度

上記ステップ②において、近傍物質と判断する相対距離を 0.06 から 0.15 まで 0.1 ずつ変化させ、その時の感度、特異度、一致率の変化を解析した。なお、近傍物質が 5 物質未満の物質については解析から除いた。

また、記述子の中には類似性・相関性の高い記述子も含まれることから、それらを含むことによるバイアスが懸念される。また、昨年度までの解析から、記述子の中には DNT と統計学に関連のある記述子と関連がない記述子が存在する。そこで、ステップ①で使用する記述子を以下の 1)~6) のセットとした場合の感度、特異度、一致率の変化も併せて解析した。

- 1) 全 351 記述子
- 2) 相関係数 0.9 未満の 241 記述子
- 3) 相関係数 0.8 未満の 198 記述子
- 4) DNT との関連性解析 (Wilcoxon の順位和検定) で  $P < 0.1$  であった 132 記述子
- 5) 同解析で  $P < 0.05$  であった 107 記述子
- 6) 同解析で  $P < 0.01$  であった 44 記述子

結果を図 1 に示した。

相対距離の閾値が小さい場合には、より類似度が高い物質のみが近傍物質として定義されることから、近傍物質数は少なくなると推定される。実際、本解析では近傍物質数が 5 未満の物質を解析対象から除外したが、5 物質以上の近傍物質が存在した解析対象被験物質の数は、いずれの記述子セットを用いた場合にも、相対距離の閾値が小さくなるとともに減少した (図 1B)。これは、近傍物質数は、近傍物質を定義する相対距離に比例することを示している。今回、閾値の最大を 0.15 としたが、このとき約 90%の物質は 5 個以上の近傍物質を有し、解析対象に含まれた。

また、閾値を制限した場合には、解析対象となる物質の割合が、全体の陽性・陰性バランス以上に大きくなることが示された。これらのことから、本研究で用いているデータセットにおいては、陽性物質は化学構造的な多様性に富み (広いケミカルスペースを有し)、陰性物質は陽性物質に比べてより狭い空間に分布していることが示唆された。

精度の指標は図 1A に示した。全記述子を用いた場合には、相対距離の閾値が 0.12 を超えると特異度と感度の精度が逆転したが、それ以外の場合には、相対距離にかかわらず感度に比べて特異度が高かった。また、相対距離が 0.1~0.12 程度まで増加すると特異度の減少と感度の増加が認められたが、閾値をそれ以上広げても特異度と感度に大きな変化は認められなかった。

閾値が 0.1 程度の場合、解析対象物質数が全物質の半数以下の記述子セットも存在した。解析対象物質が大きく制限されることは、評価手法としては相応しくないこと、また、全記述子セットを用いた場合を除いて、0.1 以降は 0.15 まで精度に大きな違いは認められなかったことから、類似物質の基準とする相対距離は本解析の範囲では 0.15 がもっともよいと考えられた。

そこで、相対距離 0.15 を閾値としたときの記述子セ

ットによる評価精度を比べたところ、まず全記述子を用いるよりも、何らかの手法で記述子を選択したほうが良いことが明らかであった。記述子の選択手法として、本解析では相関係数による選択と統計手法による選択を試みたが、後者の手法で選択したほうが、一致率が若干高く、また感度と特異度の差も小さくなることが分かった。総合的には、セット 5) の  $P < 0.05$  未満の 107 種の記述子を用いた場合の精度が高く、感度、特異度、一致率はそれぞれ、0.503、0.735、0.636 であった。対象物質数は若干減少するが (0.13 : 313 物質、0.15 : 332 物質)、相対距離 0.13 を閾値とした場合、感度、特異度、一致率はそれぞれ 0.556、0.775、0.681 であり、いずれの指標も閾値 0.15 の場合に比べて若干高かった。

## 2-2. 近傍物質数と評価精度

1-1 の検討では、近傍物質数は 5 以上であれば上限を設けずに利用した。その結果、大多数の物質の近傍物質数は 10 以上であり、100 物質以上が過半数を占めていた (データ示さず)。一方で、リードアクロスや k 近傍法などの手法では 10 未満の物質で評価されることがほとんどである。そこで次に、上記ステップ③において、被験物質数を 5、7、9、11、13、15 と変化させて感度、特異度、一致率の変化を解析した。

結果を図 2 に示した。いずれの記述子セットにおいても、近傍物質の数が増えても一致率に大きな変化は認められなかった。一方、近傍物質数が 5~9 程度と少ない場合には、特異度は高いが感度が低いことが明らかになった。全項目の図 1B で明らかになったように、陰性物質は陽性物質に比べてより狭い空間に分布していること、すなわち陰性物質では同じ数の近傍物質がより近い位置に存在することが、近傍物質数が少ない場合には高い特異度と低い感度を示すことの原因と考えられた。

近傍物質数が 11 付近で折れ線が収束している理由は、本研究での近傍物質による判定基準が、全物質の陽性率 (45.4%) を基準としていることから、陽性物質が過半数に満たない 5 物質であった場合も陽性率が 45.5% となり、陽性と判定されることが原因ではないかと考えている。

記述子セットによる違いに着目すると、1-1 の解析と同様に、相関係数に比べて統計手法により選択した場合に精度は高くなる傾向が認められた。特にセット 5) の  $P < 0.05$  未満の 107 種の記述子を用いた場合、一致率は近傍物質数にかかわらず 0.65 を超えており、用いた 6 セットの中で最も優れていた。

本解析結果から、近傍物質数については、評価の目的に応じて選択することがよいと考えられた。すなわち、偽陽性と偽陰性のバランスを考慮して総合的な評価精度を上げたい場合には、11 以上の被験物質を用いるとよいと思われた。ただし、図 1A の結果から、被験物質数を制限せずに距離の閾値のみを設定した場合には、特異度は高いが感度は 0.5 程度に下がってしまうことから、ある程度の物質数の制限は必要と考えられた。

一方、DNT の毒性学的な特徴から利用するケースはあまりないかもしれないが、偽陽性率を下げて特異度を上げたい場合には、近傍物質数は 9 程度にすることがよいと思われる。

## 2-3. 分子記述子を利用した階層的クラスタリング

本解析におけるリードアクロスでは、全物質を対象に網羅的に解析した。一方で、一般的なりードアクロ

スは、グルーピング又はカテゴリー手法を組み合わされて行われ、物理化学的な特徴やその他の生物学的な特徴などに基づいて予め化学物質をグルーピングした後に、被験物質が含まれるグループ内でリードアクロスを行う。

そこで本研究では、階層的クラスタリング手法を利用して分子記述子に基づくグルーピングを実施し、グループ内での DNT の一致率を比較することで、分子記述子を用いたグルーピングの有用性を検討した。

また、本解析では、共同研究者のインビトロ実験における被験物質選択のための情報提供も目的とした。

上述の 351 記述子を利用して Ward 法により 361 物質のクラスタリングを実施した。得られたデンドログラムは図 3 に示した。17 クラスタ及び 52 クラスタに分類した際の各クラスタに含まれる物質数、DNT 陽性物質数、陽性率を表 1 に示した。

17 クラスタとした場合、クラスタ 1 は 79 物質、クラスタ 8 は 85 物質を含み、これら 2 つのクラスタだけで全物質の 45% を占めたことから、本研究で用いた化学物質は、化学構造的に少し偏った分布をしていると考えられた。

また、5 つのクラスタで物質数が 5 未満となった。これらの物質は項目 1 でのリードアクロス解析においても近傍物質数が少なく解析対象とならなかったと考えられる。

5 物質以上が分類された 12 クラスタの DNT 陽性率を比較したところ、クラスタ 7 では 7 物質中 6 物質が DNT 陽性 (陽性率 0.857)、クラスタ 10 では 18 物質中 14 物質が DNT 陽性 (陽性率 0.778) と陽性率が高かった。クラスタ 7 は、dieldrin や aldrin といった有機塩素系農薬を含み、このクラスタに含まれる物質は化学構造的に非常に類似していた。一方、クラスタ 5 (37 物質) やクラスタ 8 (85 物質) の陽性率はそれぞれ 0.243 及び 0.329 と低かった。物質数が多いクラスタ 8 では、陽性率が高いサブクラスタと低いサブクラスタにさらに分けられた。

クラスタ 4 の 33 物質中 25 物質は有機リン系農薬であり、残りの 8 物質には TCDD や pentachlorophenol などの有機塩素系化合物が含まれた。ここに含まれた有機リン系農薬の多く (18/25 物質) は DNT 陰性であったが、このクラスタ内でも chlorpyrifos や parathion、methyl parathion、fenitrothion などの比較的よく知られた物質は DNT 陽性であることから、陰性とされた物質については十分な研究が行われていないために陰性とされている可能性がある。DNT に関する毒性試験情報が不足していることに基づく問題と考えられ、データセットの拡充と精緻化は、DNT の評価系を構築するための今後の課題と考えられた。

## 3. 農薬の毒性試験データベースの構築

前述のように、DNT 毒性試験情報は非常に限られている。このため、本研究のような化学構造情報を用いた解析だけでなく、インビトロ試験系の開発における陽性及び陰性対照物質の適切な選択という点に課題がある。そこで本研究では、毒性試験結果が適切に確認、評価されており、精度の高い情報が得られると考えられる内閣府食品安全委員会で開催されている農薬評価書に着目し、ラット二世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結果を収集した。

農薬評価書では、その評価書ごとに同一所見が必ずしも同じ語句で記載されているとは限らず、言葉の揺らぎがある。また、反復投与毒性試験等で認められる

毒性所見の種類は多種多様である。そこで、類似した所見のグループ化（以下グループ所見）を進め統計的・情報化学的解析に利用可能なフォーマットへの整備を進めた。

最終的には以下のデータセットを整備することができた。以下の物質数は親化合物及び代謝物を含み、物質数と試験数が異なるのは、1物質につき複数の試験が登録されていることが理由である。

繁殖試験については、367物質、422試験のデータを収集し、グループ所見数は親で149（うち生殖関連所見数は27）、仔で167となった。

発生毒性試験については、388物質、471試験のデータを収集し、グループ所見数は親で170（うち生殖関連所見数は26）、仔で112となった。

90日間反復投与毒性試験については、324物質（雄）及び322物質（雌）、512試験のデータを収集し、陽性物質が存在するグループ所見数は660となった。

2年間反復投与毒性試験については、369物質（雄）及び368物質（雌）、454試験のデータを収集し、陽性物質が存在するグループ所見数は831となった。

各所見グループは、我々の過去の手法（Masuda et al., *YAKUGAKU ZASSHI*, 137: 611-622, 2017）に基づき、3階層（第1、第2、第3カテゴリー）で分類し、各グループには7桁のコード番号を付与した。一例として、第一カテゴリー「生殖」の所見グループ分類表を表3に示した。

#### D. 考察

DNTを示す化学物質の特徴を明らかにし、それらに基づいたインシリコ手法を利用したDNT予測・評価手法を開発するには、DNTに関する多数の毒性試験結果が必要であるが、現状ではそのようなデータセットは存在しない。そこで本研究では、データベース検索により約400物質のDNT情報を報告している過去の文献（*Neurotoxicol Teratol*, 52: 25-35, 2015）に基づいて独自のデータセットを構築した。最終的に、陽性物質164種、陰性物質197種、合計361物質のデータセットを解析に用いた。そして、化学物質の物理化学的特徴量を示す分子記述子を利用して、DNTと関連する化学構造的特徴の同定、ならびにグルーピング及びリードアクロス手法によるDNT予測のための基礎検討を行った。

#### 1. 発達神経毒性と関連する構造的特徴

Wilcoxonの順位と検定により、DNT陽性物質と陰性物質間で、351種の分子記述子の値を比較したところ、107記述子の値が有意に異なることが明らかになった。興味深いことに、最もP値が小さかったH%（水素原子の割合）を除き、その他の106記述子においてはいずれもDNT陽性物質で平均値は大きかった。

得られた分子記述子の種類から、DNT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。

本研究の解析では、視覚的に理解しやすい「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。これらの結果は、DNTの有無は、部分化学構造よりも、前述のような物質の全体的な性質に依存する可能性を示している。一方で、データセットに含まれる陽性物質が少なく、構造多様性に欠けている可能性も否定できない。今回用いたデータセットには、官能基が若干異なる類似物質も多く含まれることから、特定の化学物質について具体的に全体構造や部分化学構造を確認することで、DNTと関連する官能基については明らかになると期待される。

本研究ではさらに、化学構造に基づいたDNT判別モデルの構築と、DNTと関連する分子記述子の同定を目指して、351記述子を説明変数とした決定木モデルの作製を行った。その結果、H%、nCs（sp<sup>3</sup>炭素原子の総数）及びMCD（分子環状度）の3つの記述子からなるモデルが得られた。これら3記述子は、Wilcoxonの順位と検定においてもいずれも陽性物質・陰性物質間で有意に異なっており、上記解析で同定したDNTの化学構造的特徴を示す典型的な記述子であった。

本解析で得られたモデルの判別精度について見てみると、特異度（陰性物質の正答率）は0.736（145/197）、一致率は0.637（230/361）と、3記述子のみからなることを考えると比較的精度は高かったが、感度（陽性物質の正答率）は0.518（85/164）とかなり低かった。用いたデータセットの陽性率は45.4%と若干陰性物質数が多かったが、その割合を考慮しても感度は低いと考えられた。この理由の1つとして、陽性物質の化学構造が、陰性物質に比べて多様性に富み、用いた分子記述子では説明が困難であった可能性がある。上述のようにDNTの毒性試験データセットは限られているが、本研究で構築した農薬データベースやその他のデータを活用してより大きなデータベースを用いた判別モデル構築が望まれる。

#### 2. グルーピング及びリードアクロスによる発達神経毒性評価

文献情報から収集した361物質（陽性164物質、陰性197物質）のDNTデータセットを利用し、分子記述子を利用した化学構造情報に基づくリードアクロス手法の確立に向け、条件検討を行った。具体的には、リードアクロス手法においては、被験物質の類似物質の定義や選択が評価精度を決定する大きな要因であることから、用いる分子記述子の種類、近傍物質の定義、毒性評価に用いる近傍物質数について検討した。

化学構造との関連性が視覚的に分かりやすい351種の記述子を基本セットとして、相関性の高い記述子の削除による記述子の選択、又はDNT陽性・陰性物質間で有意に値が異なる記述子セットの選択により、リードアクロスに有用な記述子を検討した結果、 $P < 0.05$ で有意差が認められる記述子を利用した場合に総合的に良いDNT評価精度が得られた。また、近似物質の定義に用いる物質間の相対距離の閾値を検討した結果、閾値はある程度大きい方がよく、0.13~0.15でよい評価精度が得られることが明らかになった。さらに、近傍物質数について検討した結果、11~15程度で偽陰性と偽陽性がともに少ない総合的によい評価精度が得られることが明らかとなった。

本研究において検討した手法の基本的な考え方は、k近傍法などの類似物質に基づいた予測手法と同様である。しかし、k近傍法では類似物質との距離に上限を設定せずに、決定したk個の近傍物質全てのデータから未知物質の毒性予測を行うため、被験物質の構造によって

は必ずしも類似性が高いとは言えない物質のデータに基づいた判断がなされることがある。実際、本研究の結果から、ある程度近傍物質に制限を設けたほうが良い精度が得られることが示された。また、k近傍法ではしばしば5物質程度と近傍物質は比較的少ないことが多いが、本研究からより多くの近傍物質を利用したほうが精度は高くなる傾向が示された。

本研究では、分子記述子を利用した階層的クラスタリングによる化学物質のグルーピングも試みたところ、いくつかの陽性物質グループ及び陰性グループを作成できた。したがって、先に実施したリードアクロスとは異なるアプローチとして、クラスタリングを利用したグルーピングもリードアクロスに利用できる可能性があり、今後の研究課題と考えられる。

本研究では351記述子全てを用いて解析を行ったが、上記リードアクロスの基礎検討結果をふまえると、類似物質の選択には記述子を何らかの手法で選択したほうが良いと考えられる。今後、同様の手法で条件検討を行い、適切な記述子セットを選択することで、グルーピングの精度が上昇すると考えられる。

本データセットには多くの有機リン系化合物が含まれ、クラスタリングにおいてこれらは大きな1つのグループを形成していたが、その毒性は必ずしも一致していなかった。本研究で用いたデータセットにおける陰性物質の情報に不確かさがあることは、本研究の課題の1つであるが、クラスタリング解析の結果は、毒性データの検証にも有用であると考えられた。

### 3. 農薬の毒性試験データベースの構築

インビトロ試験やインシリコ手法による毒性評価手法を開発するには適切な毒性試験情報が必要であるが、DNTに関しては体系的に整理された情報は少ない。そこで本研究では、比較的毒性試験情報の精度が高い、内閣府食品安全委員会で公開されている農薬評価書の情報を利用して、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データ収集と所見の整理を行った。その結果、統計的・情報化学的解析を実施するためには、所見情報や投与量のデジタル化などデータセットのさらなる改良が必要だが、350程度の共通の農薬及びその代謝物について、異なる4種類の毒性試験データを、400~500試験ずつデータセットとして整備することができた。このような毒性試験データベースは、世界的にも貴重なものであると考えている。今後、神経毒性やDNTと関連する所見グループを定義し、それをもとに各物質の毒性を定義した上でデータベースを改良し、化学構造と毒性の関連性解析やリードアクロス手法等による毒性評価などの解析を行う予定である。

## E. 結論

本研究において、①DNTを示す化学物質は環状構造や不飽和結合を多く含むことが明らかになった。また、②リードアクロス手法を用いた発達神経毒性予測手法の確立に有用な基礎的知見を得ることができた。さらに、③精度の高い毒性試験データベースを整備することができた。今後これらの知見やデータセットを活用して、さらなる解析を進めることで、化学構造情報に基づくDNT評価手法の開発の進展が期待される。

## 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回日本毒性学会学術年会（オンライン）、2020年6月29日-7月1日
- 2) 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、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（オンライン）、2021年3月27日-29日
- 3) 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一；分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性予測の試み. 日本動物実験代替法学会第34回大会（沖縄）、2021年11月11日
- 4) 柴田尚輝、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一；農薬評価書を利用したラット反復投与毒性試験データベースの構築. 日本動物実験代替法学会第34回大会（沖縄）、2021年11月11日
- 5) 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一；分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性の予測に向けた基礎的検討. 日本薬学会第142年会（オンライン）、2022年3月26日（発表予定）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1. DNT陽性物質と陰性物質間の分子記述子の比較

Descriptor	Description	Block	Mean		Ratio (P/N)	P values
			Positive	Negative		
H%	percentage of H atoms	1	43.640	48.338	0.903	<0.0001
P_VSA_s_6	P_VSA-like on I-state, bin 6	10	107.432	91.763	1.171	0.0002
P_VSA_ppp_cyc	P_VSA-like on potential pharmacophore points, cyc - atoms belonging to cycles	10	48.006	39.137	1.227	0.0002
nCIC	number of rings (cyclomatic number)	2	1.616	1.301	1.242	0.0003
nCIR	number of circuits	2	2.854	1.898	1.504	0.0003
Mv	mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom)	1	0.647	0.618	1.046	0.0006
TRS	total ring size	2	9.389	7.494	1.253	0.0006
C-040	R-C(=X)-X / R-C#X / X=C=X	22	0.622	0.443	1.403	0.0007
P_VSA_LogP_6	P_VSA-like on LogP, bin 6	10	12.853	7.551	1.702	0.0010
P_VSA_ppp_ter	P_VSA-like on potential pharmacophore points, ter - terminal atoms	10	111.556	98.396	1.134	0.0010
C-008	CHR2X	22	0.686	0.386	1.777	0.0010
Cl-090	Cl attached to C2(sp2)-C4(sp2)/C1(sp)/C4(sp3)/X	22	0.114	0.017	6.659	0.0011
Rperim	ring perimeter	2	8.005	6.756	1.185	0.0012
nR06	number of 6-membered rings	2	1.178	0.994	1.185	0.0014
MCD	molecular cyclized degree	2	0.395	0.361	1.094	0.0017
nCsp2	number of sp2 hybridized Carbon atoms	1	5.978	5.341	1.119	0.0018
SAacc	surface area of acceptor atoms from P_VSA-like descriptors	28	77.333	67.912	1.139	0.0020
nR11	number of 11-membered rings	2	0.103	0.017	6.025	0.0021
D/Dtr11	distance/detour ring index of order 11	2	6.817	3.132	2.176	0.0022
P_VSA_v_2	P_VSA-like on van der Waals volume, bin 2	10	77.963	68.799	1.133	0.0022
Me	mean atomic Sanderson electronegativity (scaled on Carbon atom)	1	1.031	1.016	1.015	0.0029
nHDon	number of donor atoms for H-bonds (N and O)	21	1.081	0.852	1.268	0.0031
H-050	H attached to heteroatom	22	1.097	0.858	1.279	0.0032
SCBO	sum of conventional bond orders (H-depleted)	1	21.165	20.185	1.049	0.0034
RCI	ring complexity index	2	0.752	0.720	1.043	0.0034
H-053	H attached to C0(sp3) with 2X attached to next C	22	0.232	0.131	1.779	0.0034
nRNHR	number of secondary amines (aliphatic)	21	0.065	0.011	5.708	0.0039
nArOR	number of ethers (aromatic)	21	0.211	0.085	2.474	0.0040
nBM	number of multiple bonds	1	6.276	5.915	1.061	0.0042
Uc	unsaturation count	28	2.387	2.201	1.084	0.0042
P_VSA_p_2	P_VSA-like on polarizability, bin 2	10	75.618	65.727	1.150	0.0043
Ui	unsaturation index	28	2.053	1.889	1.087	0.0045
nBO	number of non-H bonds	1	17.086	16.347	1.045	0.0050
Rbrid	ring bridge count	2	0.692	0.369	1.873	0.0050
RFD	ring fusion density	2	0.086	0.049	1.762	0.0058
nR05	number of 5-membered rings	2	0.378	0.256	1.480	0.0060
D/Dtr06	distance/detour ring index of order 6	2	81.191	73.322	1.107	0.0066
P_VSA_LogP_2	P_VSA-like on LogP, bin 2	10	13.326	12.484	1.067	0.0073
nCXr=	number of X on ring C(sp2)	21	0.086	0.017	5.074	0.0073
D/Dtr05	distance/detour ring index of order 5	2	17.462	13.534	1.290	0.0077
P_VSA_i_4	P_VSA-like on ionization potential, bin 4	10	19.519	18.623	1.048	0.0079
C%	percentage of C atoms	1	34.440	33.295	1.034	0.0083
Hy	hydrophilic factor	28	0.124	-0.041	-3.014	0.0094
NRS	number of ring systems	2	1.081	0.994	1.087	0.0095

Block 1, constitutional indices; block 2, ring descriptors; block 10, van der Waals; block 21, functional group counts; block 22, atom-centred fragments; block 28, molecular properties.

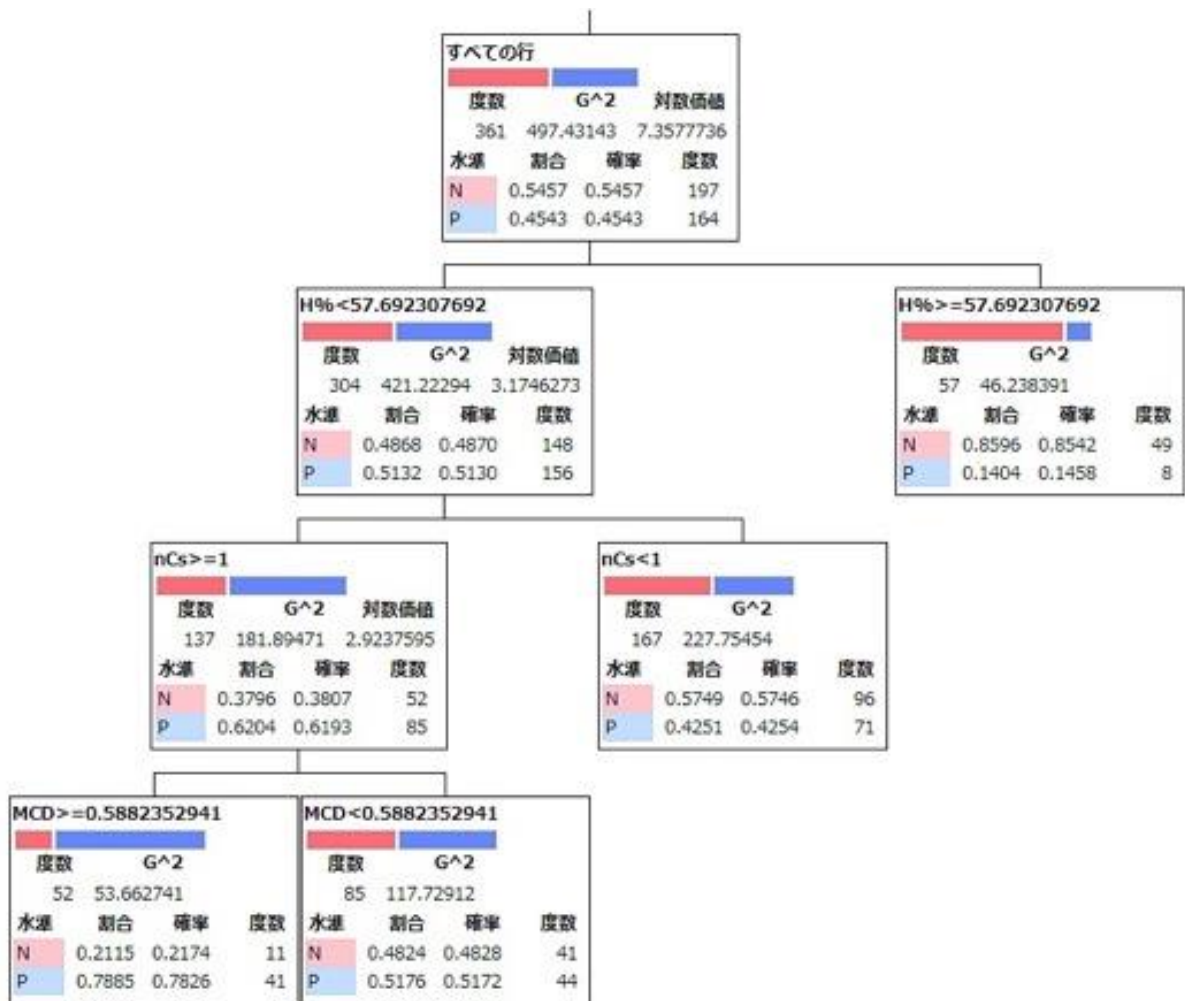


図1. DNT陽性物質と陰性物質を判別する決定木モデル

決定木の作製にはJMP Pro 14を利用した。分岐の最小サイズは36とし、5分割交差検証により木の深さを決定した。



B.  $H\% > 57.7 / nCs \geq 1 / MCD < 0.588$  のDNT陽性物質

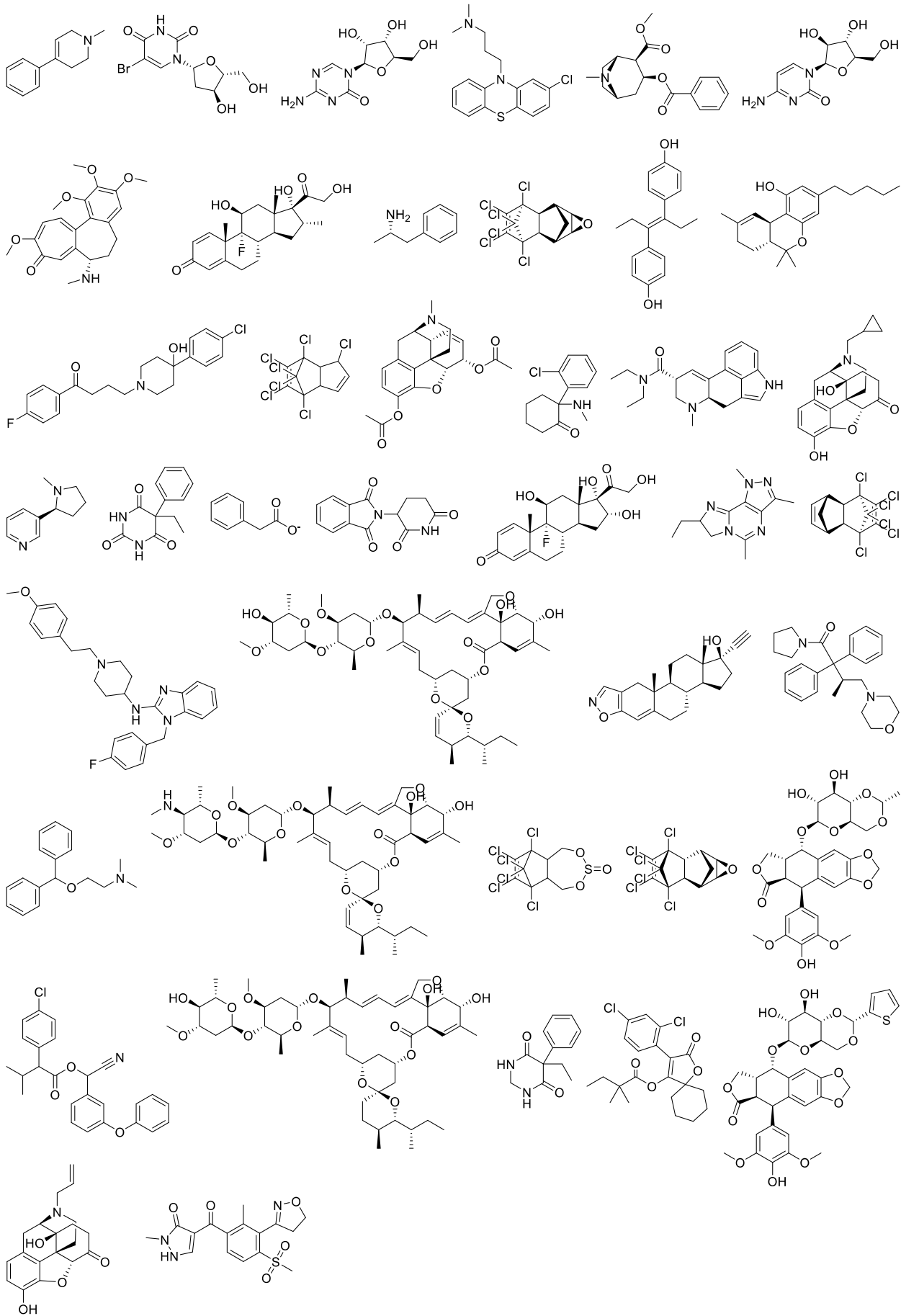


図2. 決定木モデルで分類された物質例



### A. 感度、特異度、一致率

### B. 解析対象被験物質数

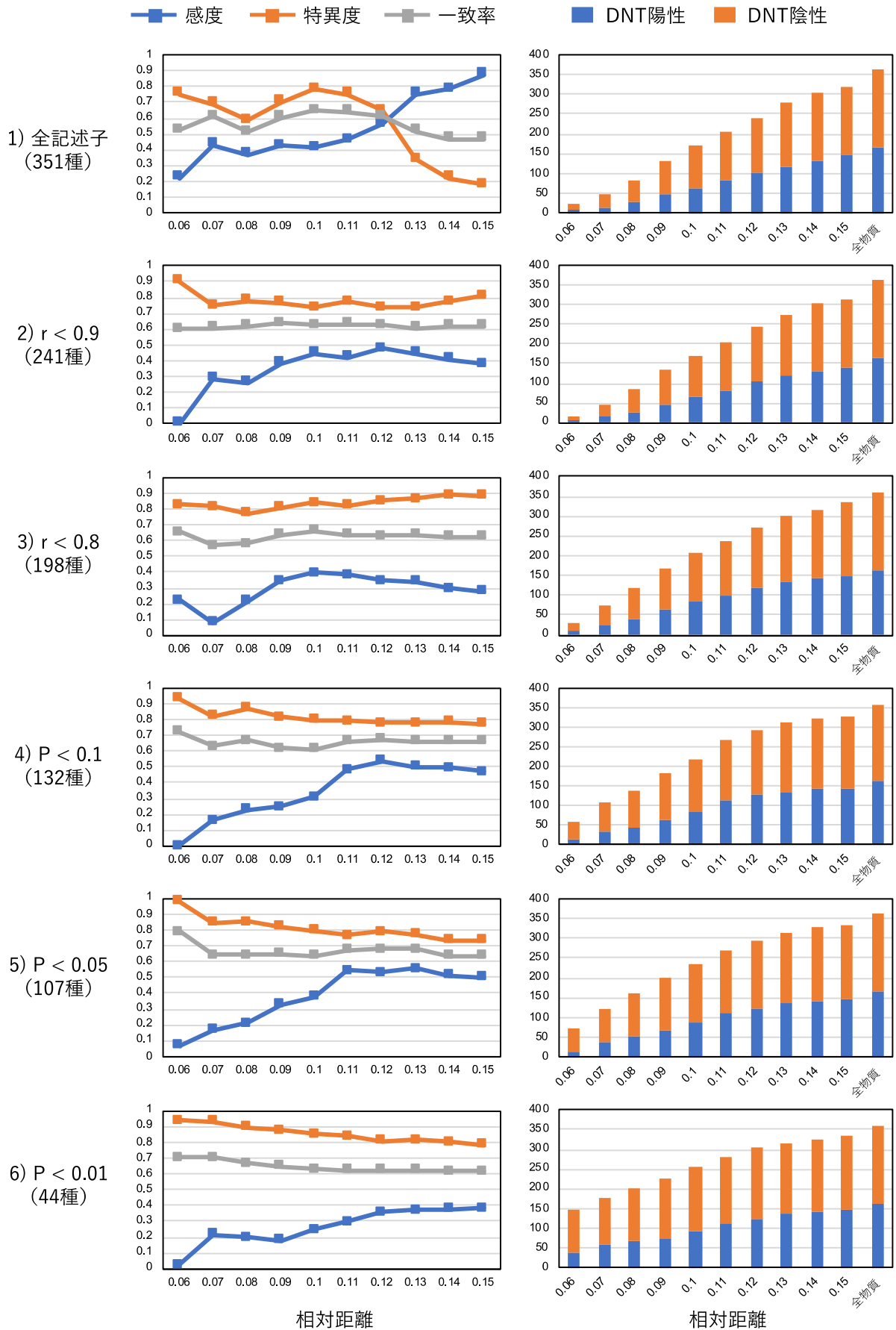
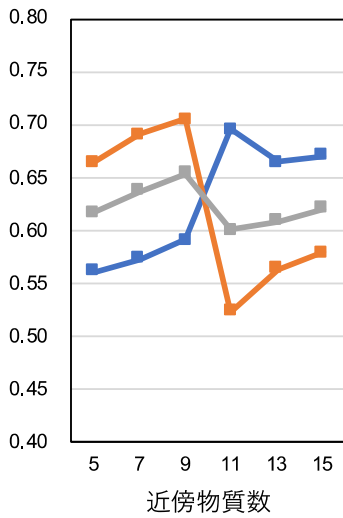
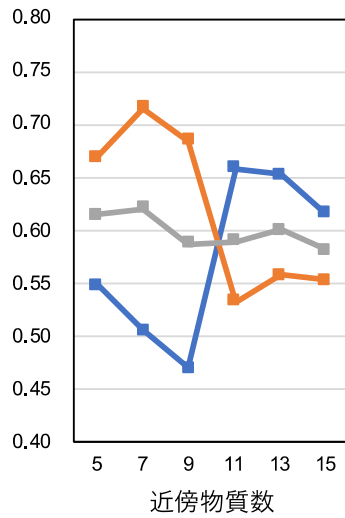


図3. 物質間距離の閾値とDNT評価精度

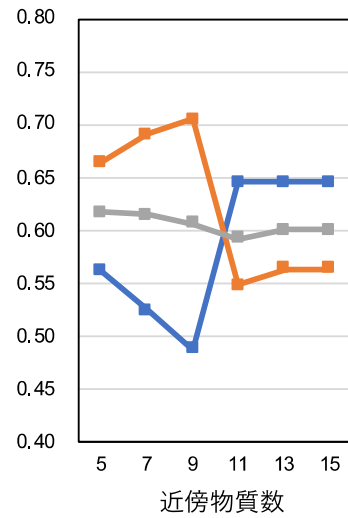
1) 全記述子 (351種)



2)  $r < 0.9$  (241種)

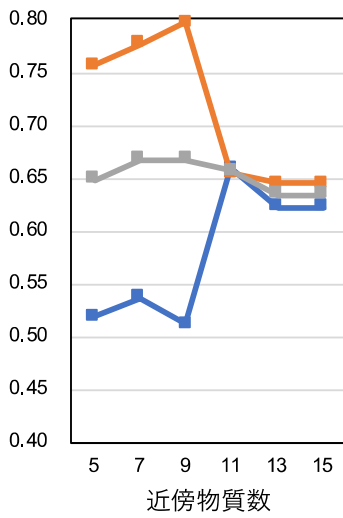


3)  $r < 0.8$  (198種)

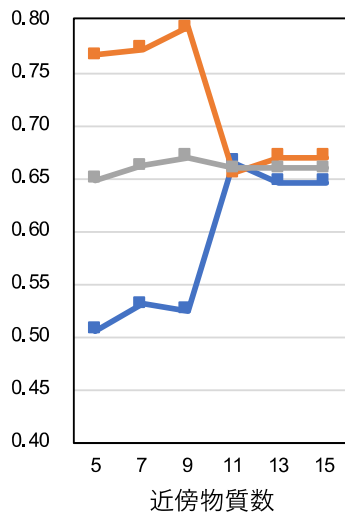


—■— 感度  
—■— 特異度  
—■— 一致率

4)  $P < 0.1$  (132種)



5)  $P < 0.05$  (107種)



6)  $P < 0.01$  (44種)

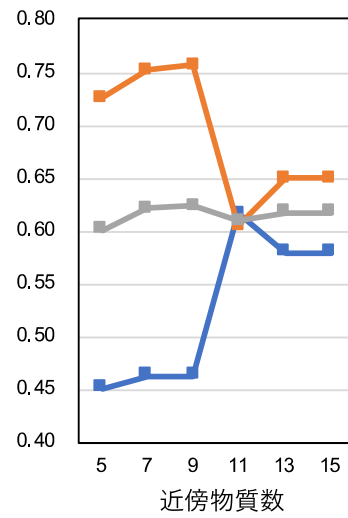


図4. 近傍物質数とDNT評価精度

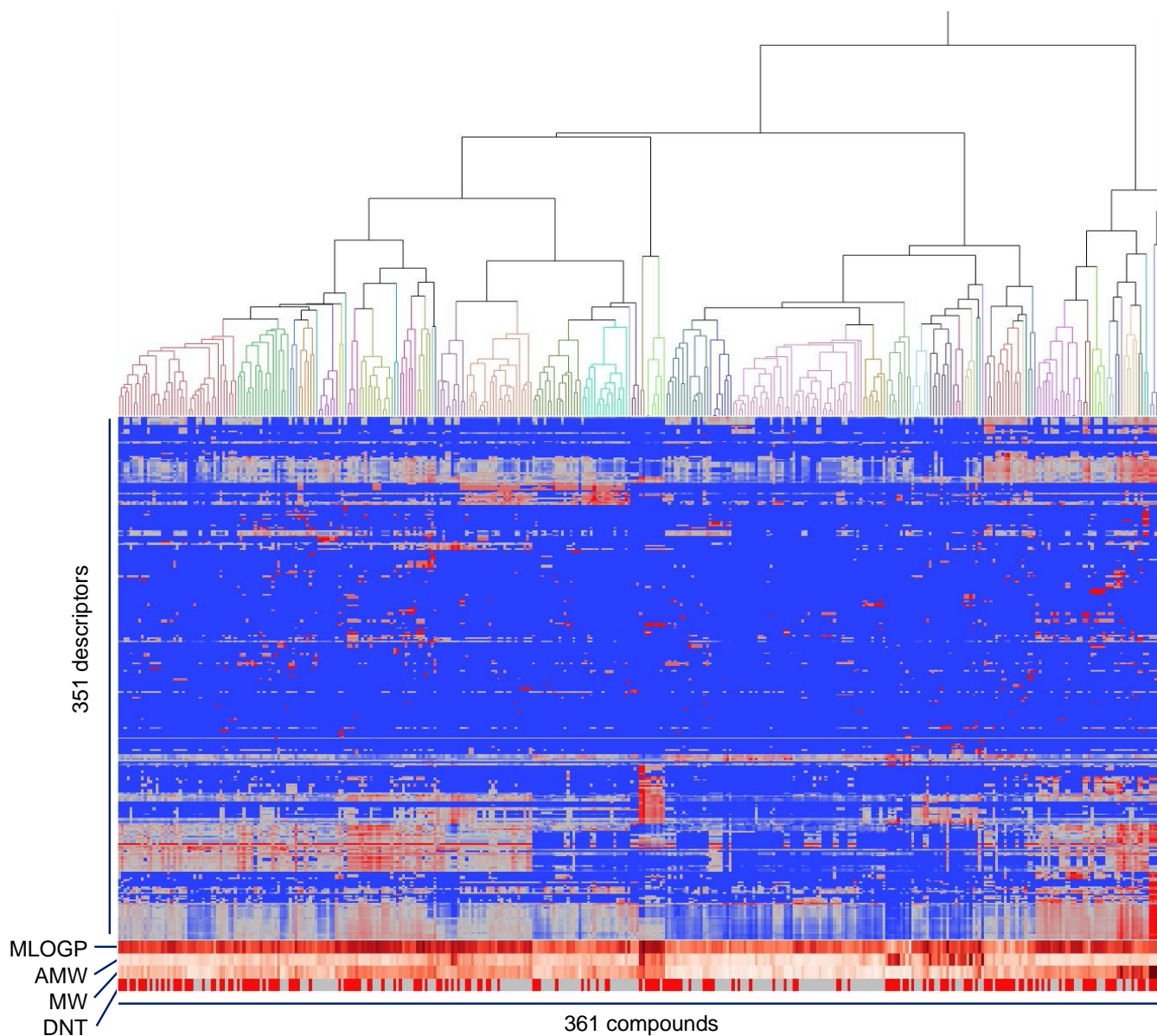


図5. 分子記述子を利用した階層的クラスタリング

Ward法により階層的クラスタリングを行った。デンドログラムは52クラスターに分けて色で示した。DNTの行は、赤が陽性、グレーが陰性を示す。MLOGP, Moriguchi Log P; AMW, average molecular weight; MW, molecular weight.

表2. 階層的クラスタリングで作られた各クラスターの特徴

17クラスター				52クラスター			
番号	化合物数	陽性物質数	陽性率	番号	化合物数	陽性物質数	陽性率
1	79	44	0.557	1	41	25	0.610
				2	18	12	0.667
				3	3	3	1.000
				4	6	2	0.333
				5	1	0	0.000
				6	7	0	0.000
				7	2	1	0.500
				8	1	1	1.000
2	18	9	0.500	9	4	4	1.000
				10	12	4	0.333
				11	2	1	0.500
3	13	5	0.385	12	6	2	0.333
				13	5	3	0.600
				14	1	0	0.000
				15	1	0	0.000
4	33	12	0.364	16	10	5	0.500
				17	23	7	0.304
5	37	9	0.243	18	17	4	0.235
				19	16	5	0.313
				20	1	0	0.000
				21	3	0	0.000
6	2	1	0.500	22	2	1	0.500
7	7	6	0.857	23	7	6	0.857
8	85	28	0.329	24	15	9	0.600
				25	8	2	0.250
				26	45	10	0.222
				27	8	0	0.000
				28	9	7	0.778
9	25	12	0.480	29	6	2	0.333
				30	8	5	0.625
				31	4	1	0.250
				32	4	3	0.750
				33	1	1	1.000
				34	1	0	0.000
				35	1	0	0.000
				36	4	3	0.750
10	18	14	0.778	37	9	8	0.889
				38	1	1	1.000
				39	1	0	0.000
				40	3	2	0.667
11	19	10	0.526	41	16	7	0.438
12	5	2	0.400	42	3	3	1.000
				43	5	2	0.400
13	13	8	0.615	44	3	3	1.000
				45	2	1	0.500
				46	1	0	0.000
				47	5	2	0.400
				48	2	2	1.000
				49	2	1	0.500
14	2	1	0.500	50	3	3	1.000
15	3	3	1.000	51	1	0	0.000
16	1	0	0.000	52	1	0	0.000
17	1	0	0.000				

5物質以上含まれるクラスターのうち、陽性率0.65以上のクラスターを赤で、0.35未満のクラスターを0.35で示した。

表3. 農薬繁殖試験結果データにおける「生殖」関連グループ所見の例

コード	第1カテゴリ	第2カテゴリ	第3カテゴリ	予備	所見項目名	所見数	含まれる所見
5010100	501 生殖	1 発情・交尾	0	0	生殖-発情・交尾-	0	
5010110	501	1	1 発情異常	0	生殖-発情・交尾-発情異常	9	発情回数減少 発情周期延長 平均発情周期延長 発情回遅れ 発情休止延長 発情後延長 授乳期発情休止期発現頻度増加
5010120	501	1	2 交配期間異常	0	生殖-発情・交尾-交配期間異常	7	交配期間延長 交尾前期間延長 交尾所要日数増加 交尾までの日数増加 交尾までの同居期間延長 交尾成立所要日数延長 交配回産日数増加
5010130	501	1	3 交尾率低下	0	生殖-発情・交尾-交尾率低下	3	交尾率低下 交尾率減少 交配成功率低下
5010190	501	1	9 その他	0	生殖-発情・交尾-その他	0	
5010200	501	2 受胎・授胎	0	0	生殖-受胎・授胎-	0	
5010210	501	2	1 受胎・授胎率低下	0	生殖-受胎・授胎-授胎率低下	12	着床数減少 平均着床数減少 総着床数減少 着床回数減少 平均着床回数減少 着床率低下 受胎率低下
5010220	501	2	2 妊娠率低下	0	生殖-受胎・授胎-妊娠率低下	4	妊孕率低下 妊娠率減少 受胎動物なし
5010230	501	2	3 妊娠期間	0	生殖-受胎・授胎-妊娠期間	2	妊娠期間延長 妊娠期間短縮
5010240	501	2	4 分娩異常	0	生殖-受胎・授胎-分娩異常	7	分娩異常 分娩状態不良 分娩時間延長 未分娩 異常分娩の兆候 分娩中の死亡率 出産時死亡率増加
5010250	501	2	5 胚吸収・胎仔死亡	0	生殖-受胎・授胎-胚吸収・胎仔死亡	30	全胚吸収 全胚・胎児吸収 着床後初期の死亡胚数の増加 吸収胚数及び着床後胚死亡率上昇 全胚吸収 全胚吸収回数増加 全胚吸収個体数の増加
5010260	501	2	6 胎盤重量異常	0	生殖-受胎・授胎-胎盤重量異常	4	胎盤重量増加 胎盤重量低下 胎盤重量減少 平均胎盤重量減少
5010270	501	2	7 子宮重量異常	0	生殖-受胎・授胎-子宮重量異常	3	妊娠子宮重量減少 妊娠子宮重量低下 妊娠子宮重量低値 子宮大型着床に褐色色素を含んだマクロファージの集積
5010290	501	2	9 その他	0	生殖-受胎・授胎-その他	9	偽妊娠 子宮胎児組織遺残 着床後胚損失率減少 胎盤遺残増加 胎児体重減少 低胎児体重
5010300	501	3 出産	0	0	生殖-出産-	0	
5010310	501	3	1 出生数減少	0	生殖-出産-出生数減少	16	出産見数減少 平均産見数減少 産当たり死産見数増加 全見死産 繁殖率低下 繁殖性に関する指標の低下
5010320	501	3	2 出生死亡	0	生殖-出産-出生死亡	23	全出生死亡 全回産見死亡増加 産ごとの生存見数減少 生存見数減少 生存率低下 生存率減少
5010390	501	3	9 その他	0	生殖-出産-その他	6	難産 難産の徴候 非出産率増加 出産率低下 出産率減少 出産率減少傾向
5010400	501	4 性周期	0	0	生殖-性周期-	0	
5010410	501	4	1 黄体異常	0	生殖-性周期-黄体異常	5	黄体数減少 黄体形成減少 黄体減少 無黄体 黄体消失
5010490	501	4	9 その他	0	生殖-性周期-その他	0	
5010500	501	5 精子異常	0	0	生殖-精子異常-	0	
5010510	501	5	1 精子運動性	0	生殖-精子異常-精子運動性	5	精子運動率低下 精子運動活性低下 精子運動性低下 精子運動性低下 前進運動精子率減少
5010520	501	5	2 精子形態異常	0	生殖-精子異常-精子形態異常	8	正常形態精子出現率低下 形態異常精子割合増加 異常形態精子割合増加 精子形態異常率増加 異常精子増加 異常精子(主に頭部の異常)増加 異常精子形成細胞
5010530	501	5	3 精子形成異常	0	生殖-精子異常-精子形成異常	5	精細胞数減少 精子形成低下 精子数減少 精子細胞数減少 精子産生率低下
5010590	501	5	9 その他	0	生殖-精子異常-その他	0	
5010600	501	6 哺育	0	0	生殖-哺育-	0	
5010610	501	6	1 塊殺	0	生殖-哺育-塊殺	3	塊殺増加 児動物の塊殺 児を食殺
5010620	501	6	2 哺育不良	0	生殖-哺育-哺育不良	4	哺育不良 哺育(授乳)行動低下 哺育率減少 哺育率低下
5010690	501	6	9 その他	0	生殖-哺育-その他	0	
5010700	501	7 哺乳	0	0	生殖-哺乳-	0	
5010710	501	7	1 哺乳率	0	生殖-哺乳-哺乳率	5	哺乳率低下 離乳率減少 吸乳しない児動物増加 哺乳しない ミルクスポットなし
5010800	501	8 性成熟	0	0	生殖-性成熟-	0	
5010810	501	8	1 遅延	0	生殖-性成熟-遅延	3	初回発情遅延 性成熟遅延(雄) 性成熟遅延(雌)
5010900	501	9 外観異常	0	0	生殖-外観異常-	0	
5010910	501	9	1 四肢	0	生殖-外観異常-四肢	1	短肢
5010920	501	9	2 姿勢	0	生殖-外観異常-姿勢	1	胸部のひずみ
5010930	501	9	3 尾	0	生殖-外観異常-尾	2	無尾 尾の軟縮
5010990	501	9	9 その他	0	生殖-外観異常-その他	1	乳腺遺残(雄)
5011000	501	10 歯	0	0	生殖-歯-	0	
5011010	501	10	1 発生遅延	0	生殖-歯-発生遅延	5	上顎切歯萌出日齢の遅延 歯芽萌出の開始時期の遅延 歯芽萌出の完了時期の遅延 切歯萌出完了日齢の遅延 切歯萌出遅延
5011090	501	10	9 その他	0	生殖-歯-その他	0	
5011100	501	11 腎臓	0	0	生殖-腎臓-	0	
5011110	501	11	1 発生遅延	0	生殖-腎臓-発生遅延	1	腎臓発達遅延
5011190	501	11	9 その他	0	生殖-腎臓-その他	0	
5011200	501	12 膀胱・尿管・尿道	0	0	生殖-膀胱・尿管・尿道-	0	
5011210	501	12	1 形成不全	0	生殖-膀胱・尿管・尿道-形成不全	4	尿道下裂 尿生漏洩 尿生漏洩(雄) 尿道下裂(雄)
5011290	501	12	9 その他	0	生殖-膀胱・尿管・尿道-その他	0	
5011300	501	13 精巣	0	0	生殖-精巣-	0	
5011310	501	13	1 発生遅延	0	生殖-精巣-発生遅延	1	精巣下降遅延
5011320	501	13	2 形成不全	0	生殖-精巣-形成不全	1	精巣下降率低下
5011390	501	13	9 その他	0	生殖-精巣-その他	0	
5011400	501	14 その他の雄性生殖器	0	0	生殖-その他の雄性生殖器-	0	
5011410	501	14	1 発生遅延	0	生殖-その他の雄性生殖器-発生遅延	6	包皮分離遅延 包皮分離完了遅延 包皮分離日齢遅延 陰茎包皮分離遅延 包皮分離完了日齢遅延 包皮分離完了時期遅延
5011420	501	14	2 形成不全	0	生殖-その他の雄性生殖器-形成不全	4	陰茎外形異常 肛門生殖突起間距離短縮 絶対及び相対肛門生殖突起間距離短縮
5011490	501	14	9 その他	0	生殖-その他の雄性生殖器-その他	0	
5011500	501	15 その他の雄性生殖器	0	0	生殖-その他の雄性生殖器-	0	
5011510	501	15	1 発生遅延	0	生殖-その他の雄性生殖器-発生遅延	4	陰嚢口遅延 陰嚢口日齢遅延 陰嚢口完了日齢遅延 陰嚢口完了時期遅延
5011520	501	15	2 形成不全	0	生殖-その他の雄性生殖器-形成不全	3	生殖結節・陰嚢口間不完全な陰嚢口の増加 肛門生殖突起間距離短縮
5011590	501	15	9 その他	0	生殖-その他の雄性生殖器-その他	1	陰嚢口日短縮
5011600	501	16 脳	0	0	生殖-脳-	0	
5011610	501	16	1 形成不全	0	生殖-脳-形成不全	1	水頭症
5011690	501	16	9 その他	0	生殖-脳-その他	0	
5011700	501	17 眼	0	0	生殖-眼-	0	
5011710	501	17	1 発生遅延	0	生殖-眼-発生遅延	4	閉眼遅延 眼瞼開裂遅延(雄) 眼瞼開裂遅延(雌) 眼瞼開裂遅延
5011720	501	17	2 形成不全	0	生殖-眼-形成不全	2	眼瞼閉鎖 眼瞼開裂基準到達動物数減少
5011790	501	17	9 その他	0	生殖-眼-その他	0	
5011800	501	18 耳	0	0	生殖-耳-	0	
5011810	501	18	1 発生遅延	0	生殖-耳-発生遅延	5	耳管開口遅延 耳介開裂遅延 耳介開裂遅延 耳道閉塞遅延 外耳道開口遅延
5011820	501	18	2 形成不全	0	生殖-耳-形成不全	2	耳介開裂基準到達動物数減少 動物数減少
5011890	501	18	9 その他	0	生殖-耳-その他	0	
5011900	501	19 骨・関節	0	0	生殖-骨・関節-	0	
5011910	501	19	1 形成不全	0	生殖-骨・関節-形成不全	1	頭蓋骨の不完全骨化
5011990	501	19	9 その他	0	生殖-骨・関節-その他	0	
5012000	501	20 皮膚・皮下組織・毛	0	0	生殖-皮膚・皮下組織・毛-	0	
5012010	501	20	1 発生遅延	0	生殖-皮膚・皮下組織・毛-発生遅延	4	体毛成長の開始時期及び完了時期の遅延 毛生遅延 被毛発現遅延 腹部被毛発生遅延
5012090	501	20	9 その他	0	生殖-皮膚・皮下組織・毛-その他	0	
5012100	501	21 死亡(生殖)	0	0	生殖-死亡(生殖)-	0	
5012110	501	21	1 分娩時死亡	0	生殖-死亡(生殖)-分娩時死亡	2	分娩時死亡 出産時死亡率増加

## MEA 計測

研究分担者 鈴木郁郎 東北工業大学工学部

### 研究要旨

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの in vitro MEA 計測法にて、電気活動を指標とした化合物の神経毒性リスクを推定する方法を構築することである。はじめに、陰性対照である DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク評価法を開発した。OECD と共有している化学物質のリストから 15 化合物を選定し、毒性リスク評価を実施した結果、用量依存的なリスク判定ができた。毒性リスク評価を行う解析法の検証として痙攣陽性化合物 5 種類を用いて毒性リスク推定の妥当性を検証し、新たに被験物質として 12 化合物のデータを取得し、毒性リスク推定を行った。その結果、痙攣陽性化合物はこれまで報告されている用量で毒性リスクが推定され、被験物質も用量依存的な毒性リスクが推定されたことから、毒性リスク評価法としての有効性が示された。次に、主成分分析にて、作用機序予測法を開発した。コリン系、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害、Na チャネル Opener をそれぞれ主作用に持つ殺虫剤 10 化合物を解析したところ、同じ作用機序を有する化合物からは同様の結果が得られ、有意差検定の結果からも作用機序を分離できることが示された。本研究成果により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による化合物の神経毒性リスク、および作用機序推定に有効な評価法が構築できたとと言える。

### 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。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの微小電極アレイ (MEA) 計測で得られたデータから、神経毒性リスクのみならず、作用機序を予測する方法を検討した。

### B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から分化させた中枢の 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、 $8.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 0.1% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich) と 20 µg/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  $7.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 0.002% の Poly-L-Ornithine (Sigma Aldrich) と 20 µg/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  $6.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 0.05% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich) と 2.5 µg/mL の Laminin-511 (Nippi) でコーティングした MEA plate (Axion BioSystems) に播種した。

試験化合物は、19 化合物を用いた。陰性化合物として、DMSO: 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%, Acetaminophen : 1,3,10,30,100 µM、陽性対照化合物として、痙攣陽性化合物である 4-AP : 0.3, 1, 3, 10, 30 µM、Kainic

acid: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µM、Pilocarpine: 0.3, 1, 3, 10, 30 µM、Picrotoxin : 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM、PTZ : 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mM を用いた。被験物質として農薬関連化合物 Tebconazole, 3,5,6-Trichloro-2(1H)-pyridone、2-Mercapto-1-methylimidazole、N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactone、Omethoate、Methamidophos、Cymoxanil、Acibenzolar-S-methyl、Sodium chlorite、Mepiquat chloride、Thiamethoxam、Tembotrione、Flubendiamide、Acetamiprid、Cloathinidin、Aldicarb、Carbaryl、Fipronil、Dieldrin、Lindane、Cypermethrin、Permethrin、Deltamethrin、Fenamidone、Tributyltin を用い、用量は、0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM とした。試薬はすべて DMSO(D8418-100ML; Sigma Aldrich) で溶解した。陰性対象として、DMSO を 0.1% から 0.6% まで累積投与した。

神経ネットワーク活動の計測は、Maestro (Axion BioSystems) および Presto (Alphamed scientific. Inc) を用いて 37 °C、CO<sub>2</sub> 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を行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 ± 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。

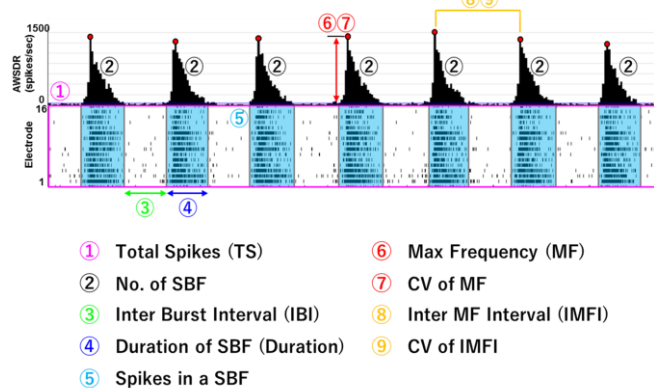


図1 解析パラメータの模式図

### C. 研究結果

#### ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測

図2のAにヒトiPS細胞由来ニューロンの活動電位を細胞外で記録した典型的な波形を示す。異なる電極で同期した信号（同期バースト発火）と個々のニューロンの発火が混じった自発活動が観察されているのがわかる。Methamidophos 100  $\mu$ M 投与で、同期バースト発火頻度の上昇が見られた（図2A）。図2Bは、16電極/wellで10分間計測した際のラスタプロットと発火数のヒストグラムを示している。Methamidophosの用量依存的に、同期バースト発火が増加する現象が認められた。同期バースト発火はシナプス伝達を介して行われる為、培養神経ネットワークにおける薬剤応答において、同期バーストに関する解析パラメータが有効である。

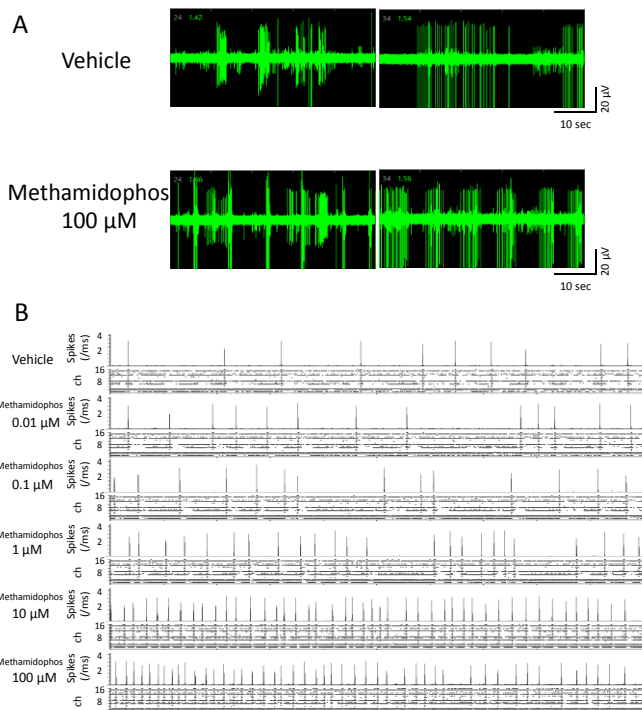


図2 Methamidophos投与による神経ネットワークの活動変化

#### 毒性リスク推定法の構築

Neucyte社のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて15化合物およびDMSOに対するデータを取得し、9つの解析パラメータを導出した。図3は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ヒートマップである。本実験で使用したヒトiPS細胞由来ニューロンにおいては、用量依存的に発火数と同期バースト発火数が増加する傾向が見られた。但し、DMSOにおいても増加傾向が見られた為、陽性化合物の判定には、発火数と同期バースト発火数は適していないと判断した。また、その他のパラメータにおいて、単一パラメータで毒性判定することは難しい為、多変量解析を用いることとした。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することで、DMSOの影響を除外する解析法を採用した。使用したパラメータは、同期バースト内の最大周波数（Max Frequency）、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）である。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%と29%であり、合わせて80%であった為、情報量としては十分である。主成分マップに、DMSOの標準偏差（SD）の範囲と $2 \times SD$ の範囲を描き、SDの範囲内であれば低リスク、 $2 \times SD$ の範囲であれば中リスク、 $2 \times SD$ の範囲外であれば高リスクとして評価を行った。各化合物の用量依存的なリスク評価結果を図5にまとめた。同期バースト発火の消失を含め、高リスクを示した化合物が7化合物検出された。高リスクを示す用量は化合物毎に異なっていた。一方、Cymoxanil、N-Carb-L-homoserine Lactoneは、100  $\mu$ Mまでの濃度域で低リスクであった。リスク判定化合物において、低、中、高リスクの順番が逆転することはなかったことから、化合物の応答は、用量依存的に検出されていることが示唆された。

#### 細胞種間差の検討

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6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、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7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、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8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  $2 \times SD$  の範囲を描き、SD の範囲内であれば低リスク、 $2 \times SD$  の範囲であれば中リスク、 $2 \times SD$  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 SBF)、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 9 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 10 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、Cymoxanil と N-Carbobenzoxy-L-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為に、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 11 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 12 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が含まれているわけではない。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 13A 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 13B 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、 $100 \mu\text{M}$  で同期バースト発火が消失した  $100 \mu\text{M}$  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。

#### 毒性リスク推定法による毒性用量の検証

陰性化合物、痙攣陽性化合物、被験物質に対するデータを取得し、9 つの解析パラメータを導出した。Carbaryl、Cypermethrin、Permethrin は  $100 \mu\text{M}$  で同期バースト発火が消失した。Deltamethrin は  $10 \mu\text{M}$  以上で、Tributyltin は  $1 \mu\text{M}$  以上でバースト発火が消失した。

毒性リスク推定法として、DMSO で濃度依存的な応答が認められないパラメータセット (Spikes in a NB, MF, cvMF, cvIMFI) を導出し、主成分分析により、PC1、PC2 平面上に DMSO の SD 範囲を描いた。SD 範囲内にプロットされるデータを低リスク、SD 範囲以上  $2 \times SD$  範囲以内にプロットされるデータ中リスク、 $2 \times SD$  範囲以上にプロットされるデータを高リスクとする解析法を構築した。スコアプロット上に、陰性化合物 Acetaminophen、痙攣陽性化合物 5 種類の用量データをプロットしたところ、Acetaminophen は全用量で低リスク、4-AP は、 $0.3 \mu\text{M}$  で中リスク、 $1 \mu\text{M}$  以上で高リスク、Kanic acid は  $0.03$ 、 $0.1 \mu\text{M}$  で中リスク、 $0.3 \mu\text{M}$  以上で高リスク、PTZ は  $300$ 、 $1000 \mu\text{M}$  で中リスク、 $3000 \mu\text{M}$  で高リスク、Picrotoxin は  $0.1 \mu\text{M}$  以上で高リスク、Pilocarpine は  $0.3$ 、 $1$ 、 $3 \mu\text{M}$  で中リスク、 $10$ 、 $30 \mu\text{M}$  で高リスクと判定された、この判定結果は、これまで文献で報告されている毒性用量と一致しており、本評価法が妥当であることが確かめられた。被験物質の毒性リスク判定を行った結果、全ての被験物質で用量依存的な毒性リスクが検出され、同用量で毒性リスクの強弱も検出された (図 14)。

#### 作用機序予測法の構築

MEA データから化合物の作用機序を予測することができれば、未知化合物の毒性メカニズムの解明および毒性回避につながる。被験物質は主作用が同様の化合物を選択した。Acetamiprid と Cloathinidin は、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストであり、Aldicarb と Carbaryl はアセチルコリンエステラーゼ阻害であり、Fipronil、Dieldrin、Lindane は GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストであり、Cypermethrin、Permethrin、Deltamethrin は Na チャネルの opener である。Aldicarb、Lindane、Permethrin をテスト化合物とし、その他の化合物について、同様の作用機序を有する化合物間に有意差が認められないパラメータセットを導出した。その結果、Spikes in a NB、MF が導出され、コリン系、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害、Na チャネル Opener で異なる位置にプロットされ、同じ作用機序の化合物は同様の傾向を示した。次に構築した作用機序分離が妥当であるかを確かめる為に、Aldicarb、Lindane、Permethrin の作用機序を推定した。Aldicarb は他のコリン系化合物と同様の変化を示し、Lindane は他の GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤と同様の変化を示し、Permethrin も他の Na チャネル opener と同様の変化を示したことから、作用機序推定が可能であることがわかった (図 15)。

#### D. 考察

DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク推定法は、化合物の毒性リスク評価号として有効であることが示唆された。推定された痙攣陽性化合物の毒性用量が妥当であったことから、被験物質の毒性用量も妥当であると考えられる。また、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。

細胞種によって DMSO に有意差が認められない主成分（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。種差を反映した結果である可能性があり興味深い。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。

作用機序予測法で使用したパラメータを統計解析（MANOVA）した結果、解析に使用した 10 化合物は全て DMSO との有意差が認められ、検証用のテスト化合物を含めて、同じ作用機序を有する化合物間では有意差が認められなかった。これらのことから、MEA の電気生理学的パラメータを用いた主成分解析法は殺虫剤の作用機序推定が可能であることが示唆された。今後は化合物数を増やし、構築した系の信頼性評価および in vivo への外挿性を検証して行きたい。

## E. 結論

本研究により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク、および作用機序推定に有

効な評価法が構築できた。

## 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.

2) 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ”ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた化合物の毒性リスク評価法の検討”, 第 13 回日本安全性薬理研究会学術年会, ポスター発表, 2022/2/4~2/5 オンライン開催.

3) 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ”ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた農薬関連化合物の毒性リスク評価”, 第 95 回日本薬理学会学術年会, ポスター発表, 2022/3/7~3/9.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

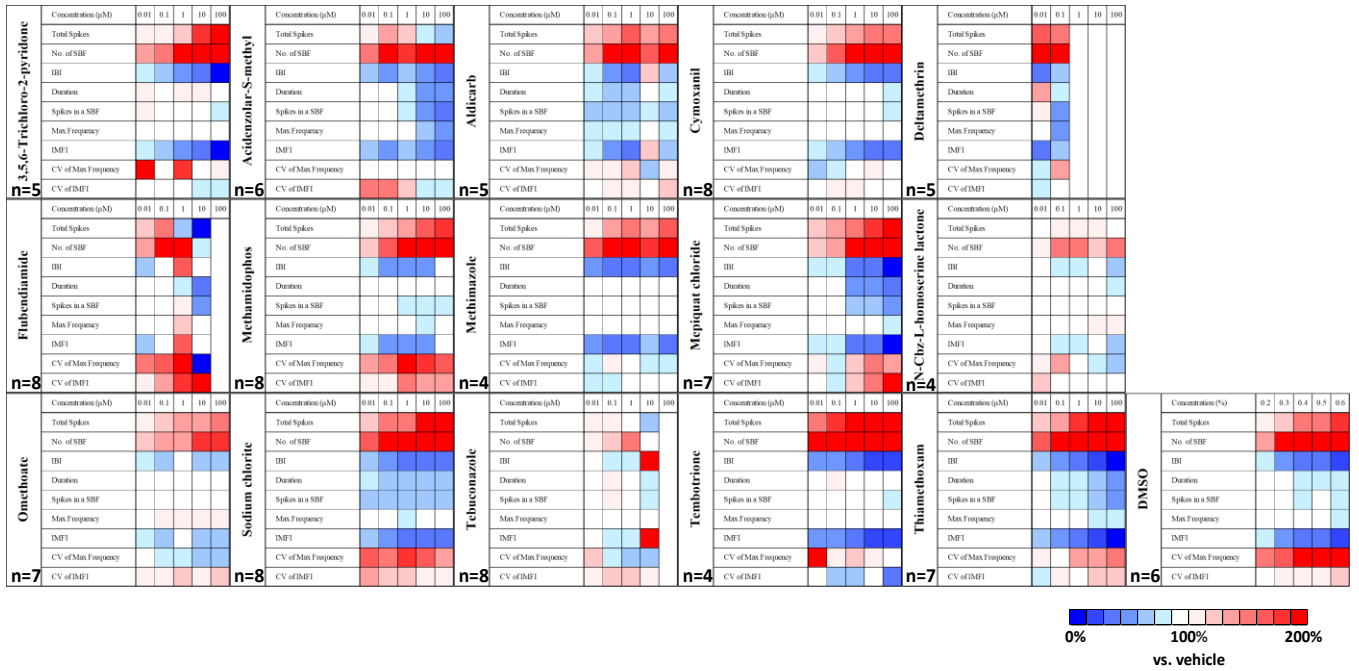


図3 15化合物+DMSOの解析パラメータのヒートマップ

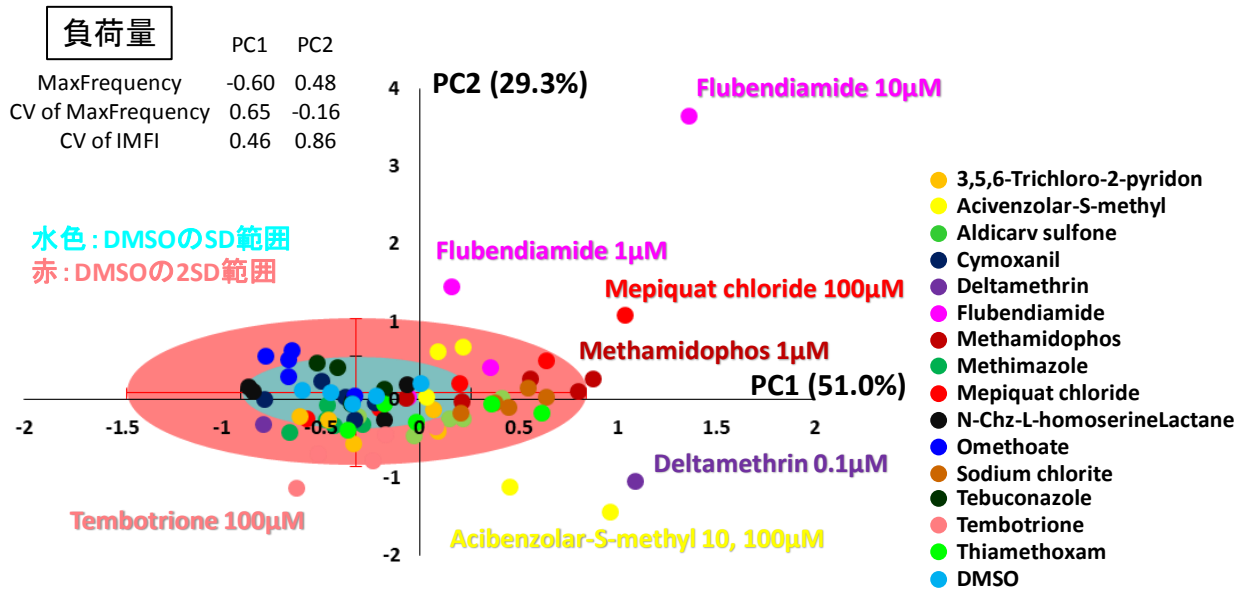


図4 3パラメータを用いた15化合物の主成分プロット

Compound	Concentration (μM)				
	0.01	0.1	1	10	100
3,5,6-Trichloro-2-pyridone	Blue	Blue	Red	Red	Red
Acibenzolar-S-methyl	Red	Red	Blue	Red	Red
Aldicarb sulfone	Red	Red	Red	Blue	Red
Cymoxanil	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Deltamethrin	Red	Red	-	-	-
Flubendiamide	Blue	Red	Red	Red	-
Methamidophos	Blue	Blue	Red	Red	Red
Methimazole	Blue	Blue	Blue	Blue	Red
Mepiquat chloride	Blue	Blue	Blue	Red	Red
N-Cbz-L-homoserine Lactane	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Omethoate	Blue	Blue	Red	Red	Red
Sodium chlorite	Red	Red	Red	Red	Red
Tebuconazole	Blue	Blue	Blue	Blue	-
Tembotrione	Red	Red	Red	Red	Red
Thiamethoxam	Blue	Blue	Red	Red	Red

■ 低リスク  
■ 中リスク  
■ 高リスク  
— バースト消失

図5 主成分分析による15化合物の毒性リスク評価

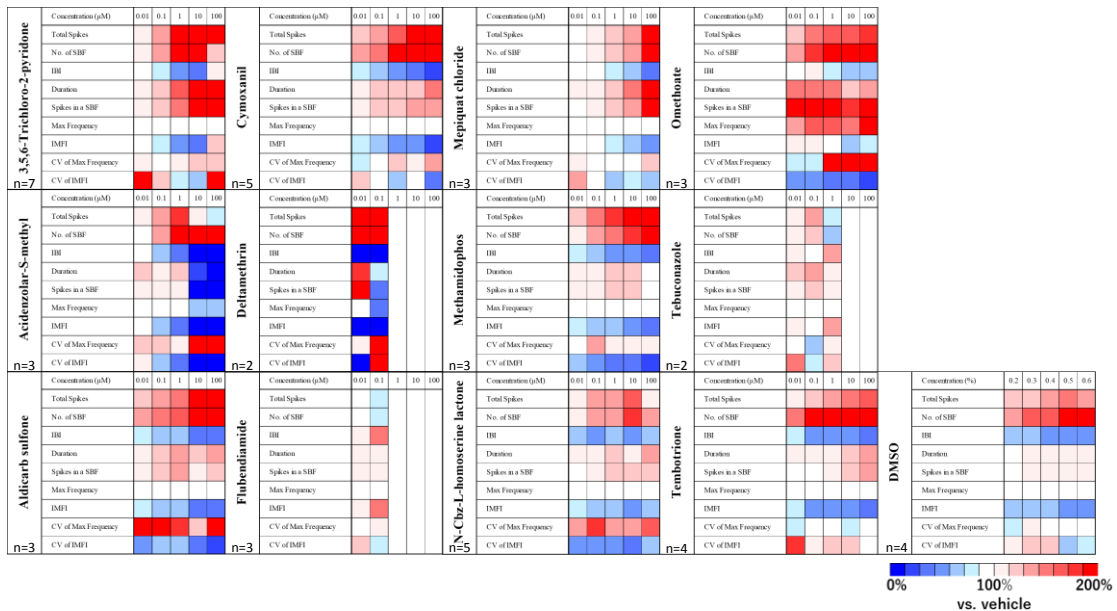


図6 ヒトiPS細胞由来ニューロン (Elixirgen社) における12化合物のMEAデータ解析

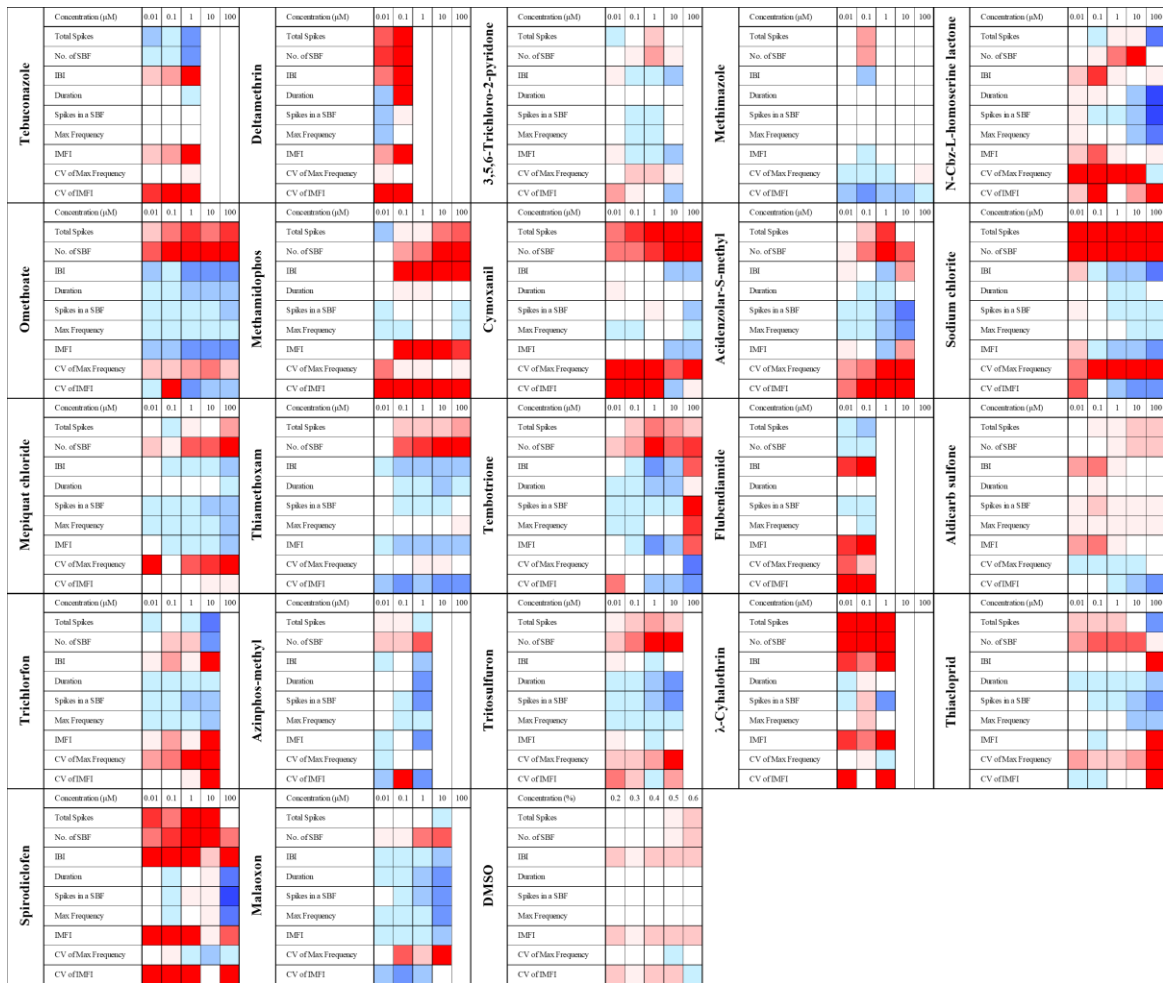


図7 ラット大脳皮質初代培養細胞における22化合物のMEAデータ解析

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

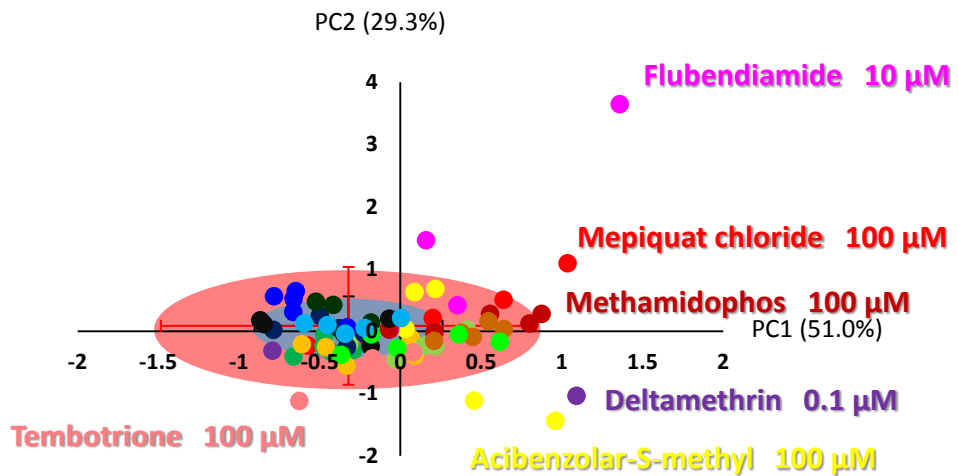


図8 ヒトiPS細胞由来ニューロン (Elixirgen社) におけるDMSOデータを基準とした主成分プロット

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

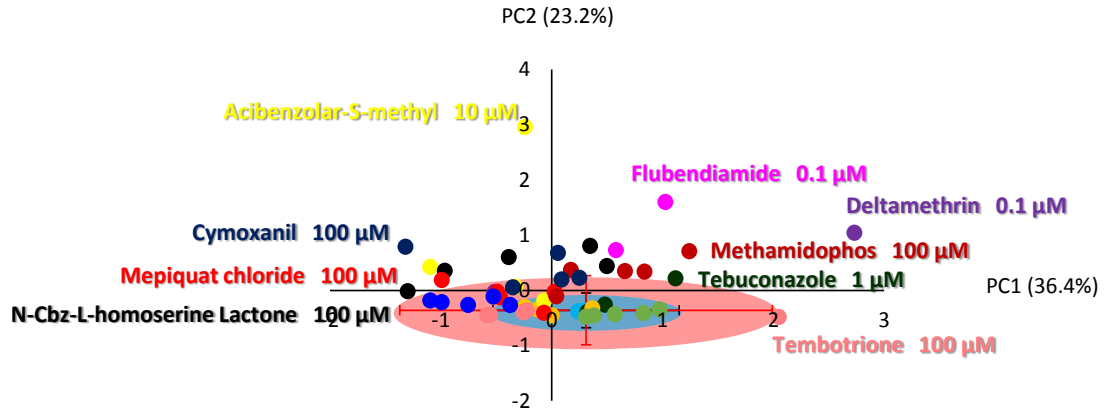


図9 ラット大脳皮質初代培養細胞におけるDMSOデータを基準とした主成分プロット

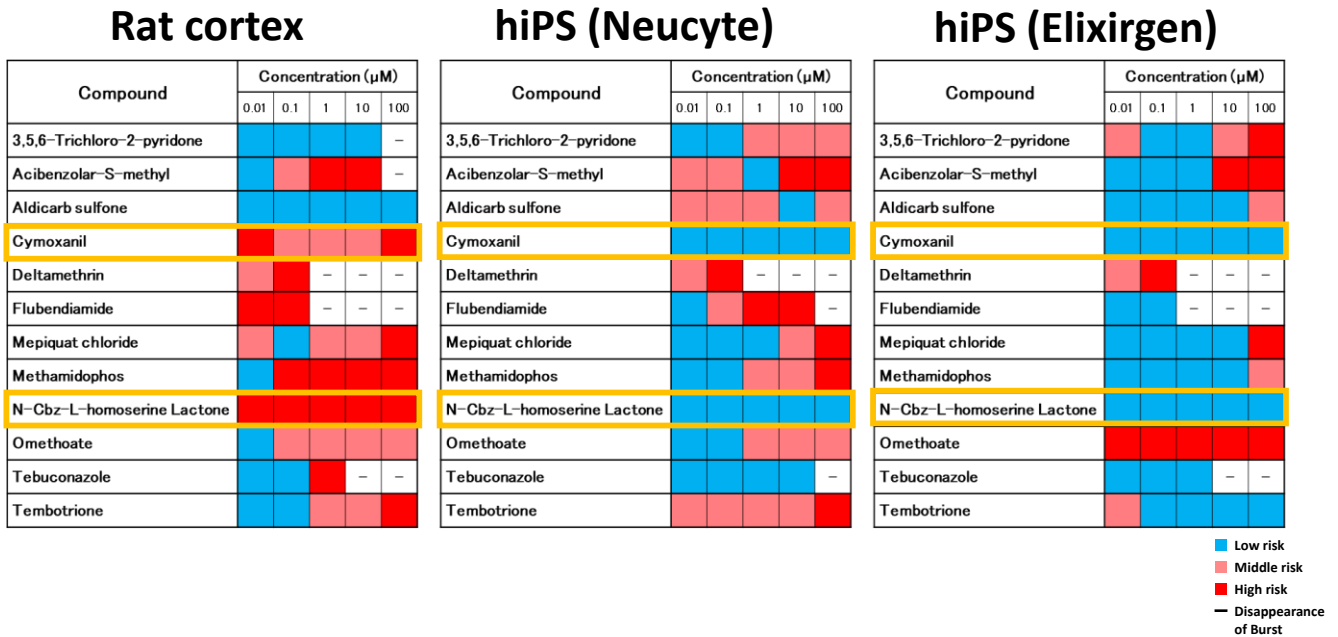


図10 ヒトiPS細胞由来ニューロン (Neucyte社、Elixirgen社) とRodentニューロンにおけるリスク評価

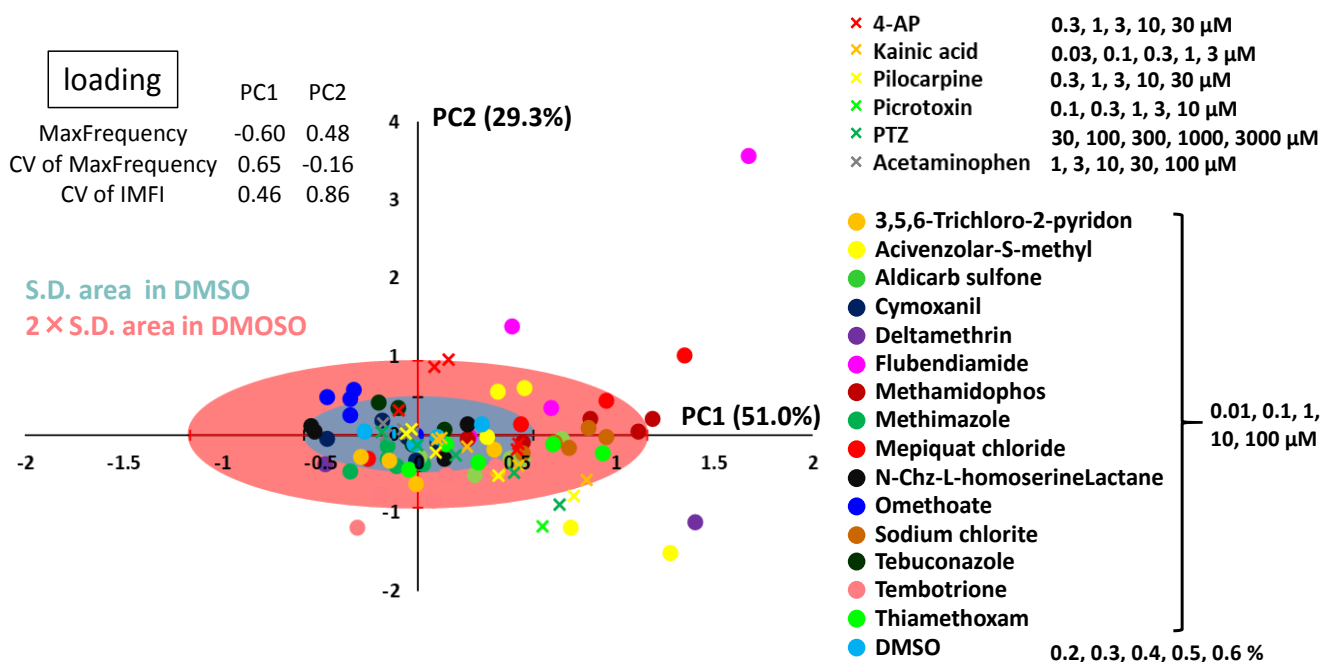


図11 痙攣陽性化合物とOECD化合物の主成分プロット上での比較

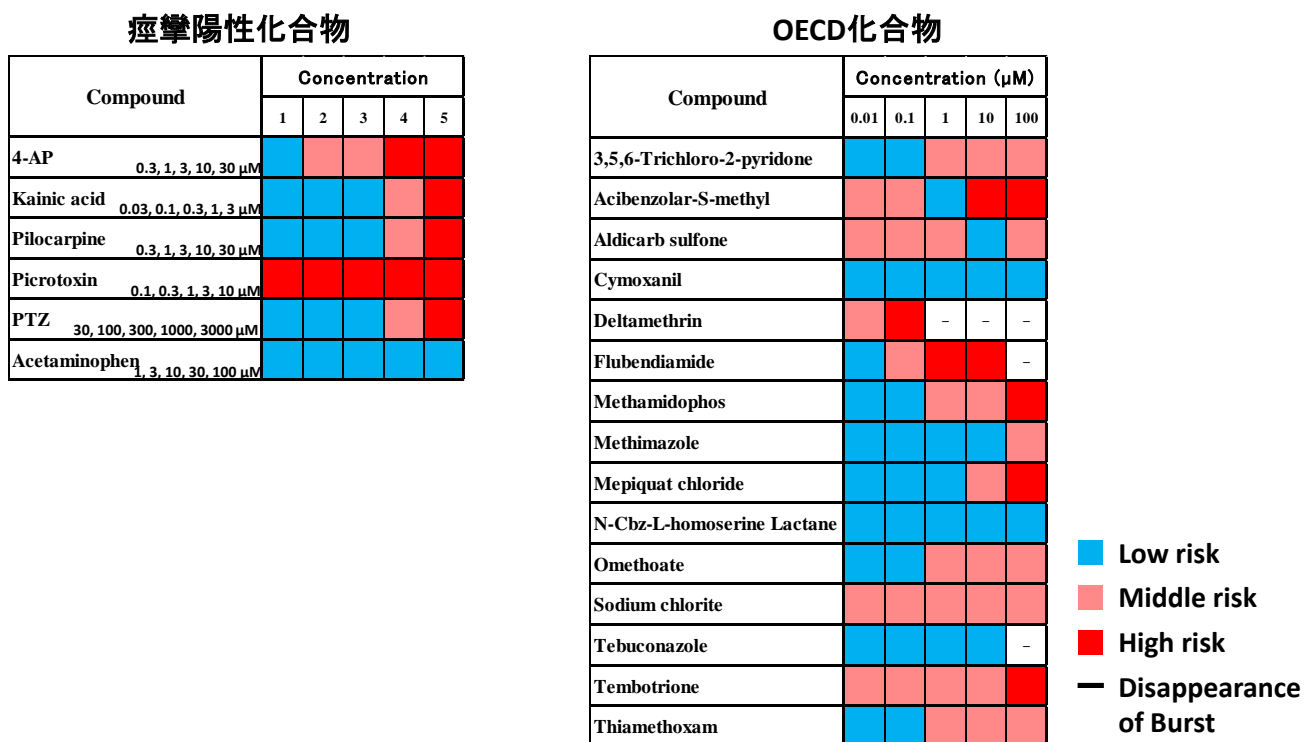


図12 痙攣陽性化合物とOECD化合物の毒性リスク比較

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%)

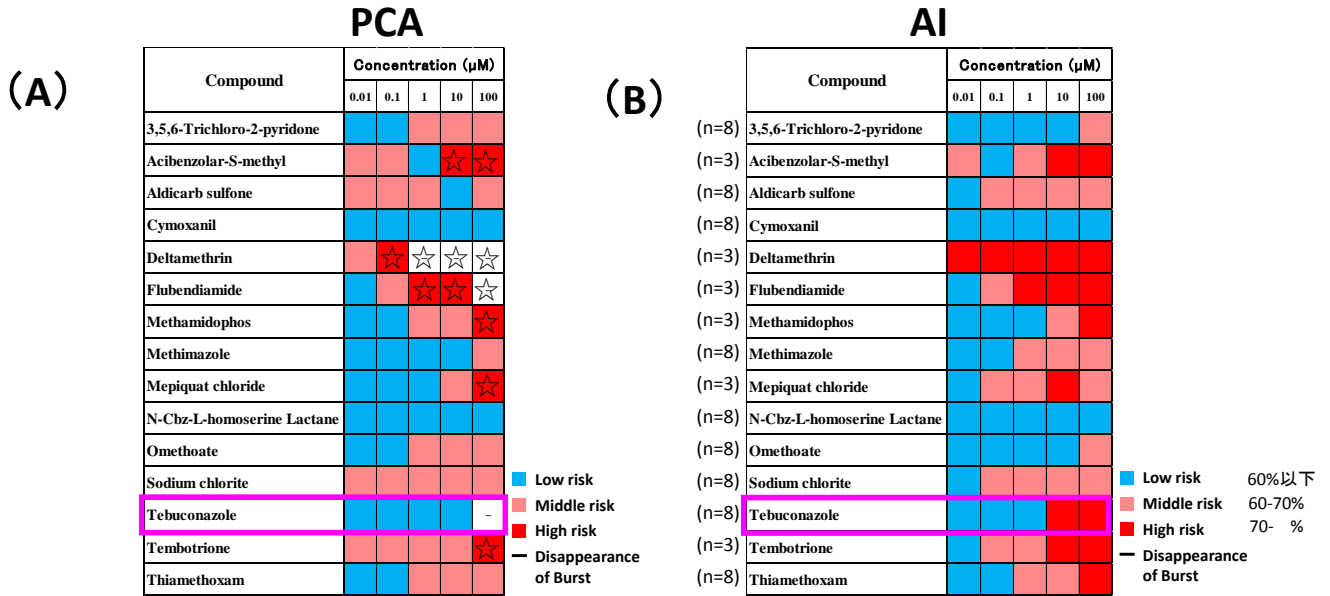


図13 Deep learningによる毒性リスク予測と主成分分析 (PCA) による毒性リスク予測の比較

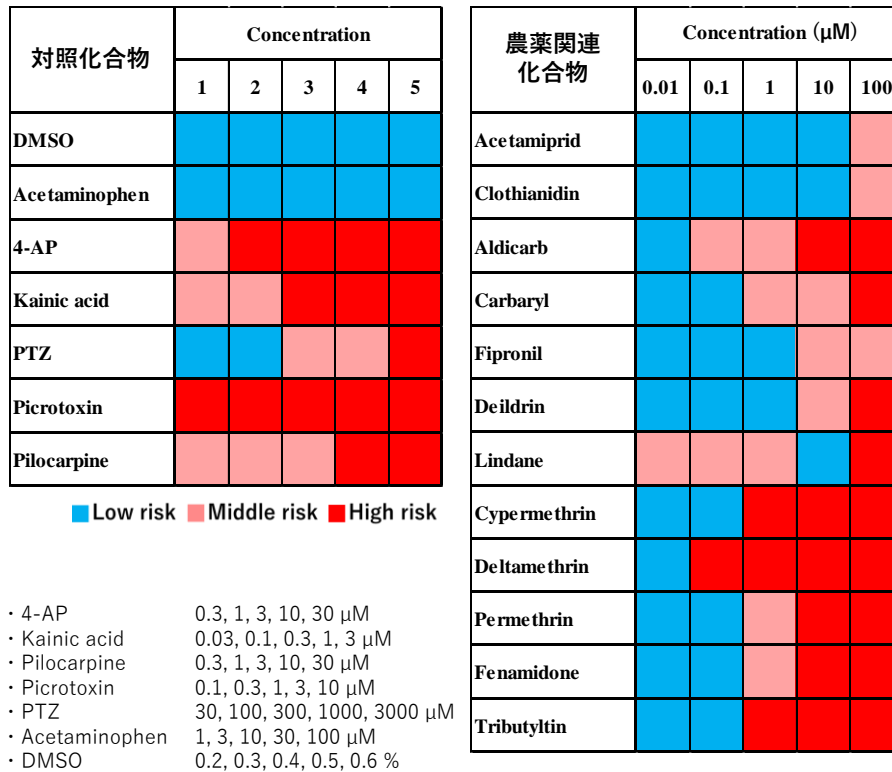


図14 DMSOのSD範囲を基準とした主成分分析による毒性リスク推定の検証

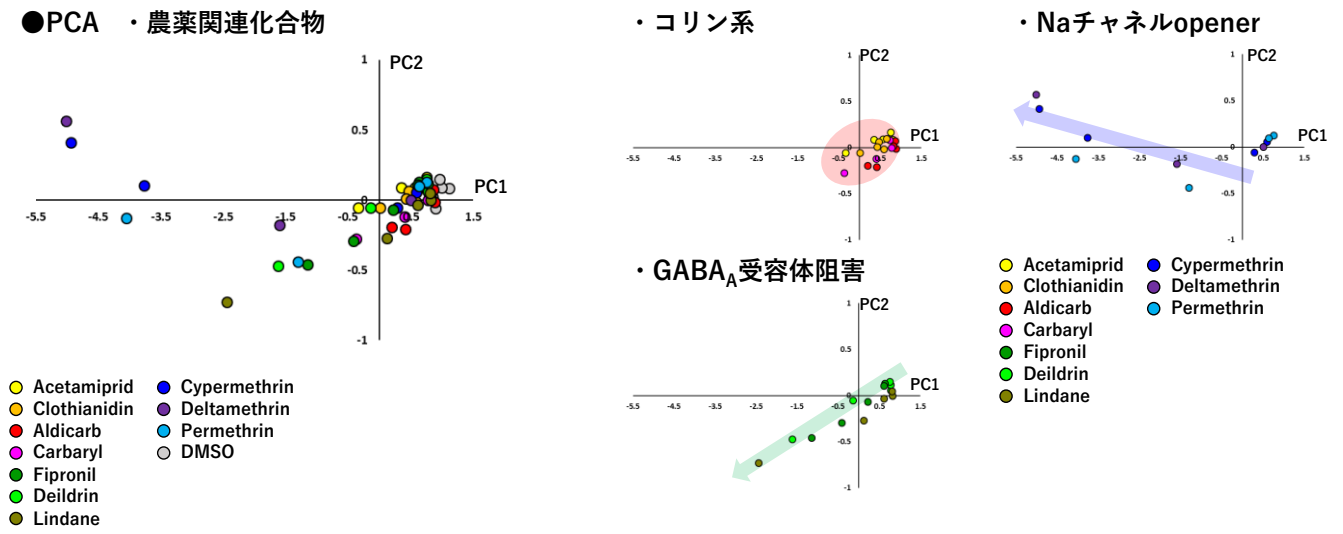


図15 主成分分析による殺虫剤の作用機序推定