

**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でガイダンス案の議論が進行中である。

本研究では、DNTが懸念される化学物質リストの中からネオニコチノイド系農薬を選定し、インビトロで構造毒性と機能毒性の両側面から神経毒性を検討した。構造毒性に関しては、ヒトiPS細胞の増殖能とミトコンドリア機能を指標とした検討を行った。その結果、ネオニコチノイド系農薬の中でアセタミプリドなどは増殖にもATPにも影響を与えなかったが、クロチアニジンとチアクロプリドは高濃度においてのみ増殖抑制を引き起こした。次に、機能毒性に関して、ヒトiPS細胞由来神経細胞のネットワーク評価を行った。多くのネオニコチノイド系農薬は発火数やネットワークバースト発火数に対して増加傾向を示したものの、有意な変化ではなかった。

一方、ネオニコチノイド系農薬はDNTガイダンスのcase studyが実施されているが、OECDの報告書でも同様に毒性を検出できないとの結果が報告された。以上の結果から、ネオニコチノイド系農薬はin vitro testing batteryでは神経系の毒性を示さないことが示唆された。

引き続き、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)を代替できるような手法としてガイダンス作成に協力して、今後の化学物質の管理に役立てるように取り組みたい。

## 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、発達神経毒性が懸念されるネオニコチノイド系農薬を用いて、インビトロによる神経毒

性評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. ヒトiPS細胞株の培養

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

### 2. MTSアッセイ

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

### 3. ATPアッセイ

ルシフェラーゼ法に基づいて測定した。

### 4. MEAシステムによる神経活動の評価

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トフィック社)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。

初めに、細胞播種前日にMED64-PRESTO用24ウェルプレートを0.005%ポリエチレンイミン

(PEI)/ホウ酸緩衝液(0.005% PEI / 0.1M Boric acid buffer solution (pH 8.5))で1時間コーティングし、滅菌蒸留水で4回洗浄後、15時間クリーンベンチ内で無菌的に乾燥させた。播種 2.5 時間前に、成熟培地(Neuronal medium)(Xcell science 社)に iMatrix-511(ニッピ社)を 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように加え、各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  添加後、室温で 2.5 時間、クリーンベンチ内でインキュベートした。細胞を解凍する直前に iMatrix-511 でコーティングした 24 ウェルプレートに CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置した。その後直ちに CellSpotter (アルファメッドサイエンティフィック社)およびクロニングリング RING-5 ( $\phi 5\text{mm}$ )(AGC)をセットした。細胞を解凍後、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ラミニンを含む播種培地 (30  $\mu\text{L}$ ) にて 30,000 細胞/ウェルでクロニングリング内の電極上に播種、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。播種 1 時間後に、クロニングリングおよび CellSpotter をゆっくり取り除いた。播種 2 時間後に 600  $\mu\text{L}$  の成熟培地をゆっくり添加した。培養 2, 4, 6 日目は成熟培地で半量交換した。培養培養 8 日目に成熟培地を完全に除去し、神経生理学用無血清維持培地 (BrainPhys + SM1 Supplement) (STEMCELL Technologies 社)に交換した。培養は 60 あるいは 61 日目まで行い、定期的(3~4 日おき)に維持培地の半量交換および多点電極システムによる測定を行った。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。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。

初年度は OECD と共有している化学物質のうちネオニコチノイド系農薬 5 種類(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)に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 $\mu\text{M}$  とした。なお、MEA 陽性対照化合物としてピクロトキシン (0.1~10 $\mu\text{M}$ ) を、毒性陽性対照化合物として iPS 細胞の分化能抑制の検討に使用したロテノン (1~100 $\mu\text{M}$ ) を用いた。

## C. 研究結果

### 1. 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ネオニコチノイド系農薬を選定し、京大 CiRA で樹立されたヒト iPS 細胞株 253G1 を用いて増殖能を指標とした神経毒性評価 (MTS アッセイ, ATP アッセイ) を行った。陰性対照としてジメチルスルホキシドを用いた。

その結果、クロチアニジン (約 95%) とチアクロプリド (約 50%) 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農薬の毒性を評価できる可能性が示唆された(図 1,2)。

## 2. 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、我々は急性毒性の発火データを取得した (図 3)。

次に、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、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)で MEA データを取得した。その結果、5 種類のネオニコチノイド系農薬は総発火数 (図 4)、ネットワークバースト発火数 (図 5)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 6)。その結果、全てのネオニコチノイド系農薬において総発火数やネットワークバースト発火数の増加傾向を示したが、有意な毒性を検出できないことが考えられた。

以上の結果から、ネオニコチノイド系農薬は *in vitro testing battery* では神経系の毒性を示さないことが示唆された。

## D. 考察

本研究では、OECD の DNT 専門家会議で議論されている化学物質から、case study としても報告さ

れているネオニコチノイド系農薬を選定して、評価した。今回、構造面と機能面で圧制を行ってきたが、単独の手法では毒性予測に限界があることが考えられた。今後、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。

神経系の構造に対する毒性に関しては、化学物質を暴露したヒト iPS 細胞を用い、増殖能を検証することで神経毒性評価の可能性を示唆した。未成熟な細胞は化学物質に対する感度が高く、胎生期モデルであり、未分化能状態にあるヒト 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。しかしながら、曝露濃度が 100 $\mu$ M と高かったことから、毒性判定基準をどのように設定するのが課題である。今後、BMD などの手法を導入して検討する必要がある。また、ヒト iPS 細胞は初期化される細胞由来や方法に応じてさまざまな株が存在するため、化学物質の神経毒性における株間差も課題である。

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評価した。今回検証した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。

ネオニコチノイドは、ニコチン受容体  $\alpha 4$  あるいは  $\alpha 7$  を介して細胞内カルシウムの上昇を介して生理応答を惹起すると考えられている。実際に、ヒト SH-SY5Y 細胞と、ヒト不死化ドパミン神経細胞 LUHMES (ATCC #CRL-2927) を用いて細胞内カルシウムを計測すると、100 $\mu$ M の刺激でようやく細胞内カルシウムの上昇が観察されており、ニコチンとは EC50 は 1,000 倍以上の開きが認められている (Loser D et al, 2021)。これをもとに KE を組み立てること適切なのかなど議論が必要と思われる。

また、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。また、ネオニコチノイド刺激した細胞を用いて transcriptome を解析していると報告されたが、2022 年 3 月 10-11 日の DNT 会議で新たな情報は示されなかった。

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

ヒト iPS 細胞の増殖能および 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、ネオニコチノイド系農薬の評価を行い、in vitro では毒性を検出することが難しいと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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. Yasunari Kanda, Human iPS cell-based models for predictive toxicology, WC11, online, 2021 年 8 月 26 日
2. 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
3. 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

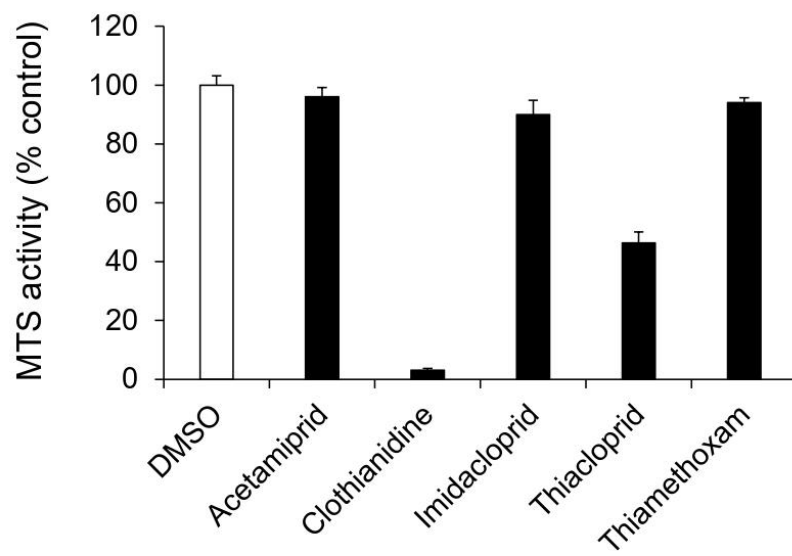


図1. ヒトiPS細胞の増殖能 (MTS) によるネオニコチノイドの評価  
ヒトiPS細胞を用いたMTSアッセイにおけるネオニコチノイド曝露 (100 $\mu$ M) の影響をグラフで示した。

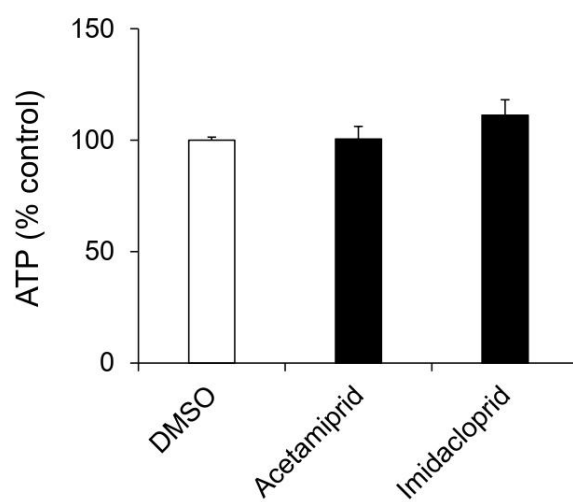
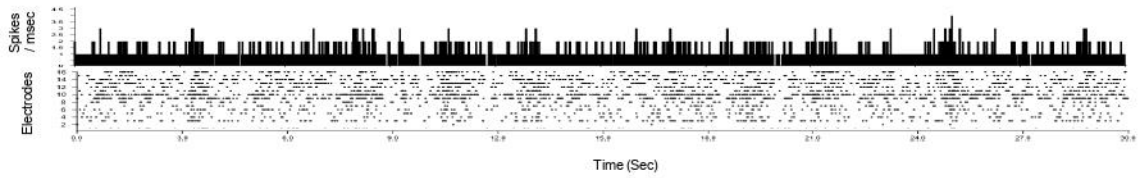
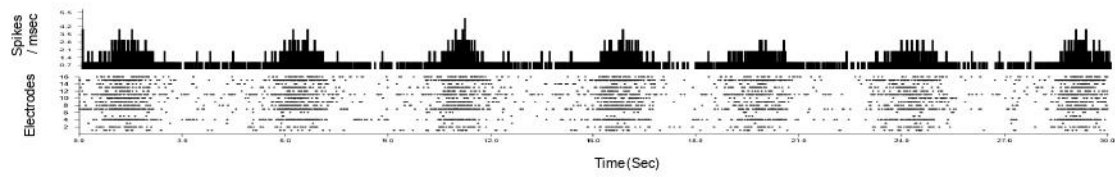


図2. ヒトiPS細胞の増殖能 (ATP) によるネオニコチノイドの評価  
ヒトiPS細胞を用いたATPアッセイにおけるネオニコチノイド曝露 (100  $\mu$ M) の影響をグラフで示した。

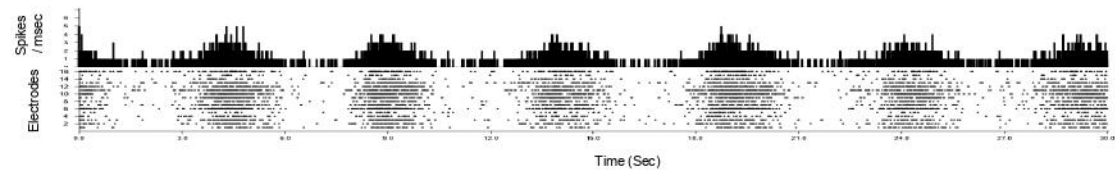
(A) アセタミプリド



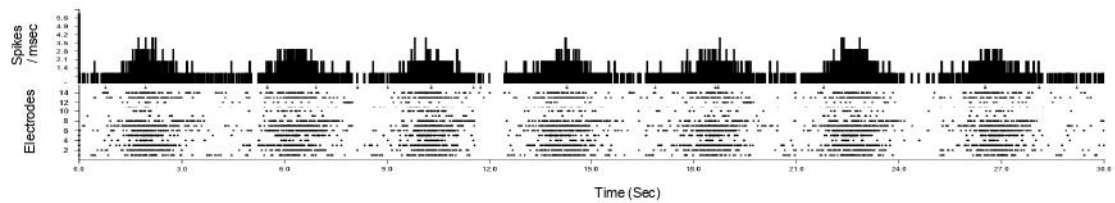
(B) クロチアニジン



(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

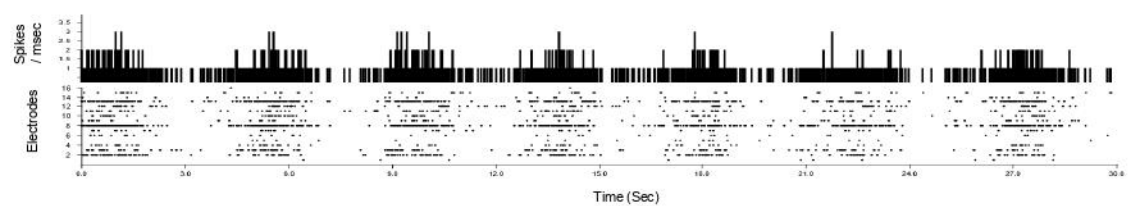
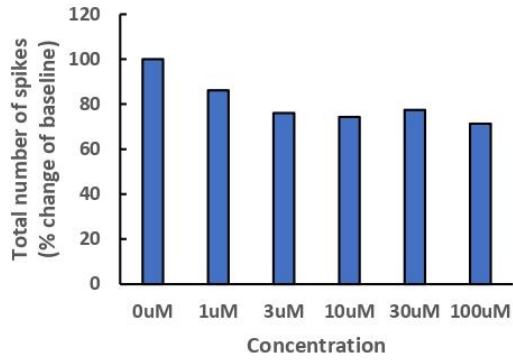


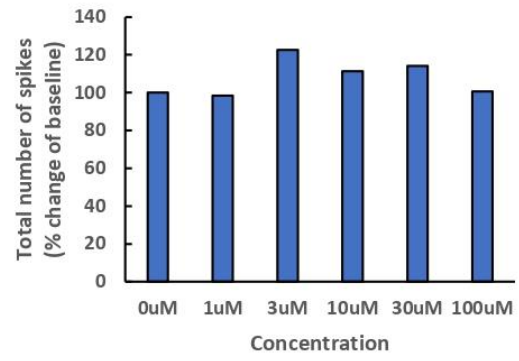
図3. MEAシステムから得られるスパイクのヒストグラムおよびラスタプロット

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。

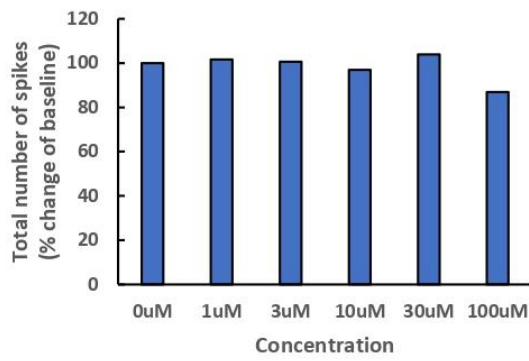
(A) アセタミプリド



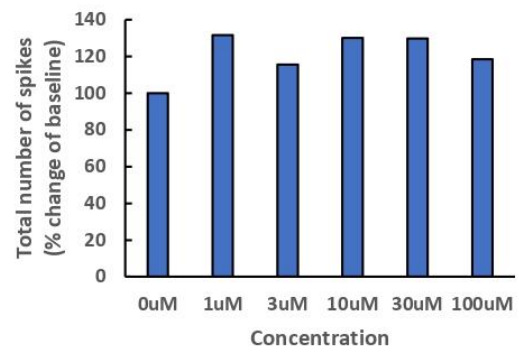
(B) クロチアニジン



(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

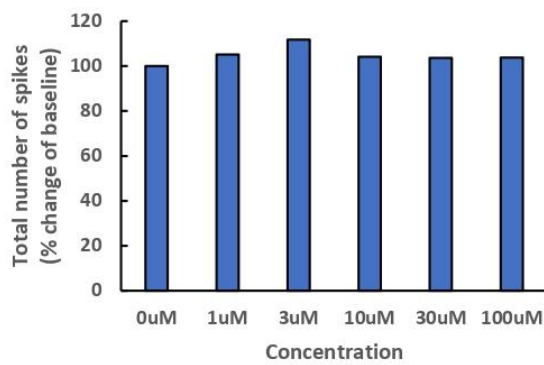
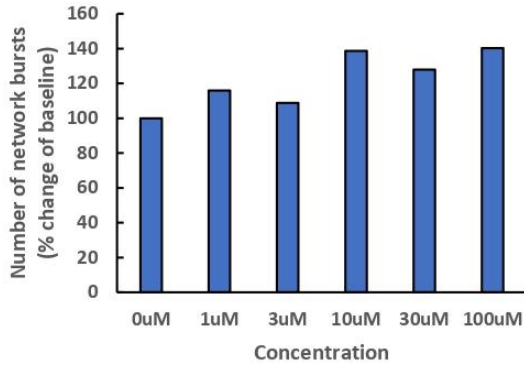
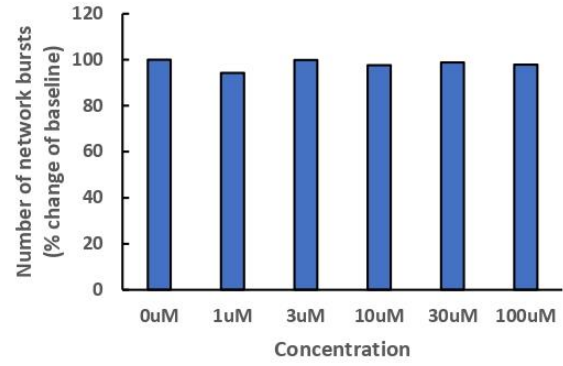


図4. ネオニコチノイド系農薬の総発火数  
(A)アセタミプリド、(B) クロチアニジン、(C) イミダクロプリド、(D) チアクロプリド、(E) チアメトキサム

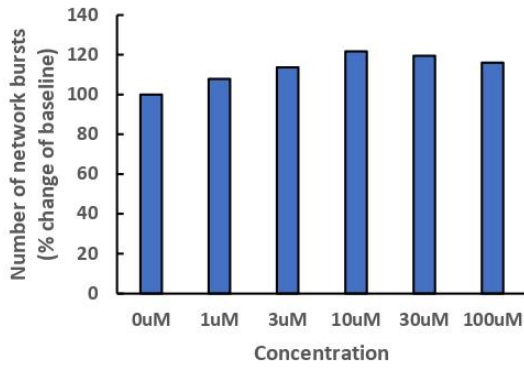
(A) アセタミプリド



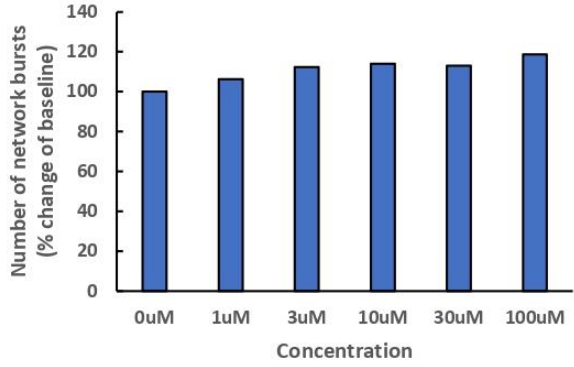
(B) クロチアニジン



(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

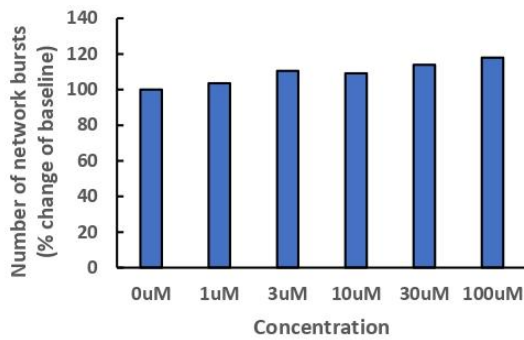


図5. ネオニコチノイド系農薬のネットワークバースト発火数  
(A)アセタミプリド、(B) クロチアニジン、(C) イミダクロプリド、(D) チアクロプリド、(E) チアメトキサム



MEデータ	化合物名	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				
	濃度 (μM)	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100
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中の発火数																										
⑥ネットワークバーストのピーク																										
⑥のばらつき																										
⑧ネットワークバーストのピーク間隔																										
⑨のばらつき																										

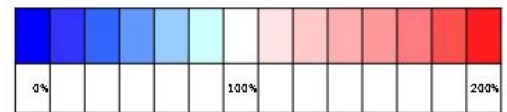


図6. MEAシステムから得られるスパイクの解析ヒートマップ  
OECDリストに含まれるネオニコチノイドの影響を示す。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（19KD1003） 令和3年度成果報告書  
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。本年度は、未分化能と外胚葉分化能との相関を細胞内フローサイトメトリーを用いて解析した。結果、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。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

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。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。本年度は、未分化能と外胚葉分化能との相関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

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1)。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2)。

### D. 考察

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。

今回の分化能評価は、神経細胞への定方向性分化ではなく、外胚葉全体に向けた分化誘導であるため、必ずしも神経細胞、あるいは神経前駆細胞への分化を保証するものではない。従って、神経誘導効率の良いクローンを選別するためには、PAX6 高発現のクローンを定方向性分化で神経細胞に誘導したうえで選抜する必要がある。

昨年度の検討では PAX6 の mRNA 発現量を評価した。本年度の検討は、細胞内フローサイトメトリーによるタンパク量の評価である。両者には相関があると考えられるが、より細胞機能を反映するのはタンパク量であるため、簡便かつ高スループットにタンパク量を評価できる細胞内フローサイトメトリーは有用であった。ただ、細胞内フローサイトメトリーの定量性は染色技術に依存するので、データの評価は半定性に近いものとなり、結果として、今回のように閾値を設定して陽性と陰性に分けて検討する必要がある。神経分化後の検討にも細胞内フローサイトは有用であると考えられるが、上記の点を念頭に置いて、定量的評価を別途行う必要があるだろう。

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  
なし

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 (Kuroda T, Nature Communications 2019)。

今回は、継代数が 5 以下の比較的樹立後間もない iPS 細胞を使用している。iPS 細胞からの神経分化は、継代数が増えるとともに安定するという報告もあるため (Koehler KR, BMC neuroscience 2011)、PAX6 高発現クローンが安定した分化能を示さないとしても、少し継代を重ねて再評価することも必要かもしれない。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

なし

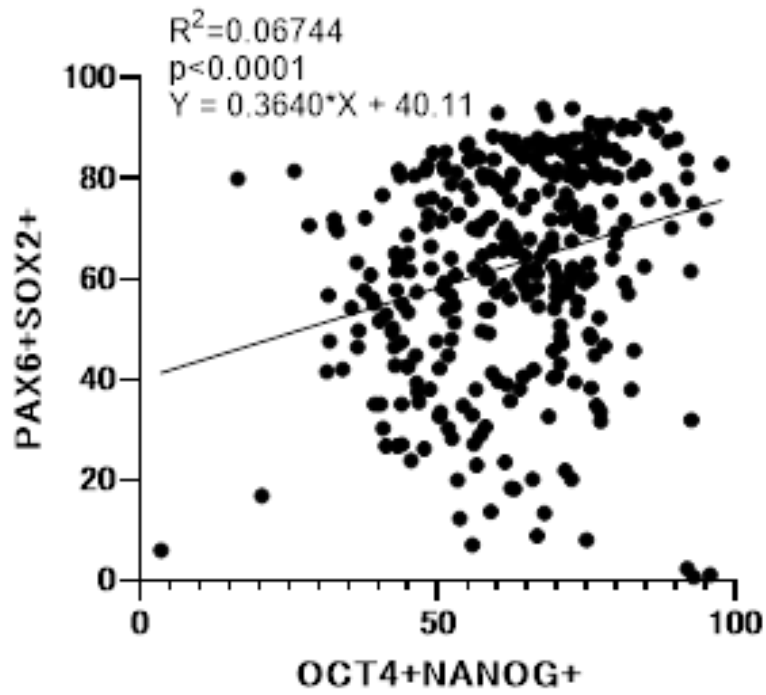


図1：未分化iPS細胞のOCT4/NANOG陽性率と外胚葉分化後のPAX6+SOX2+細胞存在率の相関。N=336。統計学的解析はGraphpad PRISM 9を用いて行った。

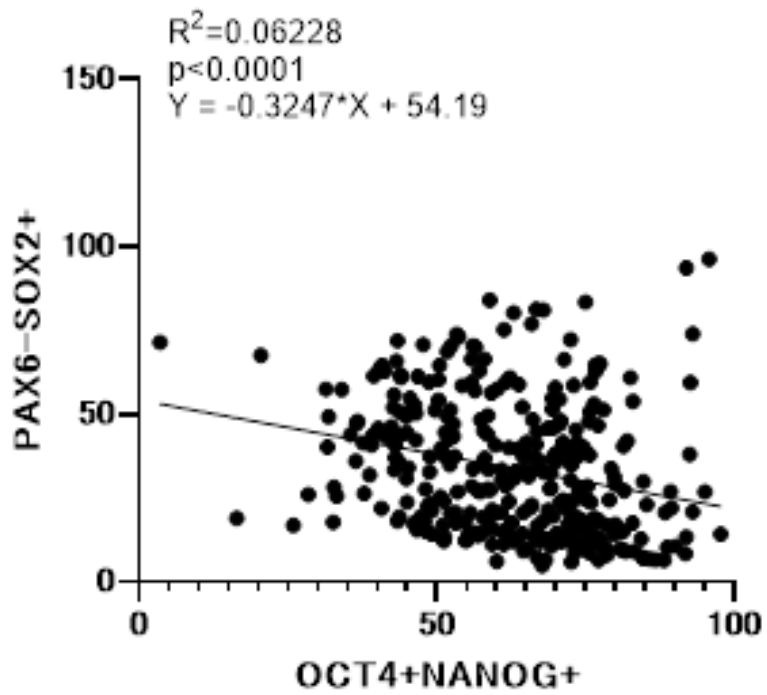


図2：未分化iPS細胞のOCT4/NANOG陽性率と外胚葉分化後のPAX6-SOX2+細胞存在率の相関。N=336。統計学的解析はGraphpad PRISM 9を用いて行った。

## 研究要旨

本研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、OECDと共有している化学物質のリストを基にインビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。研究分担者は、動物を用いたインビボの系で反復投与による発達神経毒性評価を行った。令和3年度は、令和元年度に実施したヒトに対して重要な脳発達障害物質として知られる酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールのラット発達期曝露例で認められた海馬歯状回における神経新生障害について、より簡便な曝露手法である一般毒性試験(28日間反復投与試験)の枠組みで検出可能かを検討した。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。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。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。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。

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。

## A. 研究目的

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

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

令和元年度はヒトに対する重要脳発達障害物質である酢酸鉛、塩化アルミニウム、エタノールについてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を免疫組織化学的に検索した結果、酢酸鉛とエタノールの発達期曝露で生後に始まる海馬の神経新生における顆粒細胞系譜のうち、神経前駆細胞を標的とした発達神経毒性を検出し、GABA性介在ニューロンの傷害性の他、アストロサイトやミクログリアの増加を介した機序が推定された。令和2年度においては、米国EPAにおいて発達神経毒性試験を実施して陰性評価が示されている物質であるグリホサート原体と共に、実験的に神経行動異常の誘発が報告されるようになってきたグリホサート含有製剤について、ラットの発達期曝露による海馬歯状回の神経新生への影響を免疫組織化学的に検索し、原体/含有製剤共に不可逆的な酸化ストレス誘導をおこし、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を見出した。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。令和3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発達期曝露において認められたヒト重要脳発達障害物質の神経新生影響が評価可能かを検討した。

## B. 研究方法

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日後に全動物を解剖に供した。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。酢酸鉛とエタノールの実験では、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。

PFA灌流固定脳については大脳のbregmaの後方約-3.5 mmの1カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面(2切面)が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞系譜の分化段階の指標 [GFAP, SOX2, TBR2, doublecortin (DCX), NeuN]、介在ニューロンの指標 [reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), somatostatin (SST), calbindin (CALB1), calretinin (CALB2)]、歯状回門部におけるア

ストロサイトおよびミクログリアの指標 [GFAP, IBA1]、細胞増殖活性の指標 (PCNA)、アポトーシスの指標 (TUNEL) および神経可塑性の指標 (FOS, ARC, COX2) に対する抗体を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。海馬歯状回の SGZ において単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。

メタカーン固定脳は、大脳の bregma の後方約-3.5 mm の 2 mm 厚スライスより生検パンチを用いて海馬歯状回部分を採取し、total RNA を抽出した。total RNA から cDNA を合成し、qRT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。

(倫理面の配慮)

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

## C. 研究結果

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 (図1)。歯状回門部における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 (図1)。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1)。

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 (図 2)。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 (図 2)。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 2)。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 2)。

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 (図3)。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 3)。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3)。

## D. 考察

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。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。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。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これまでの観察に矛盾しない。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

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: 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. 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

2. 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
3. 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
4. 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

5. 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
6. 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

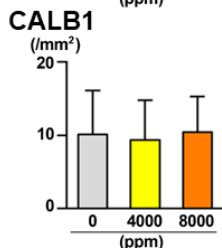
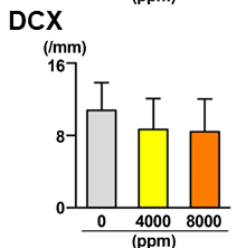
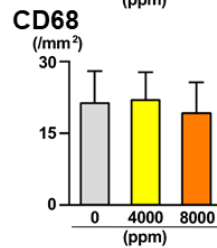
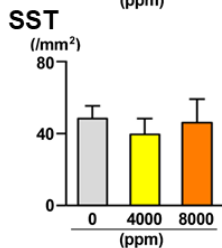
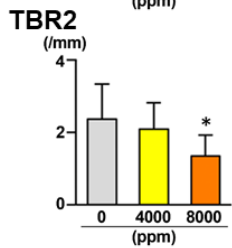
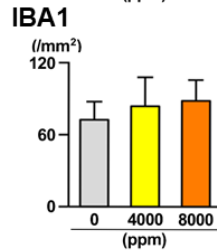
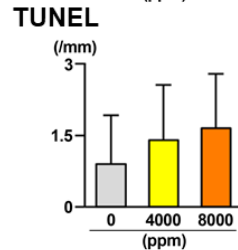
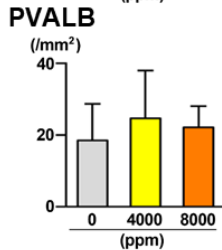
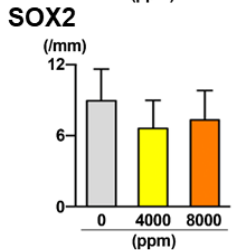
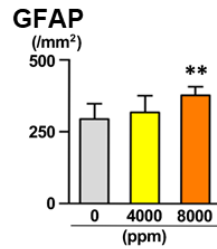
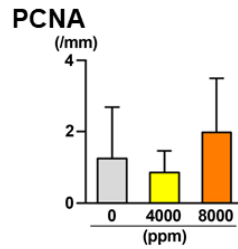
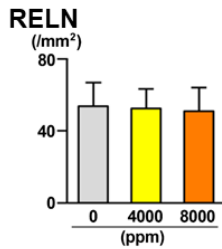
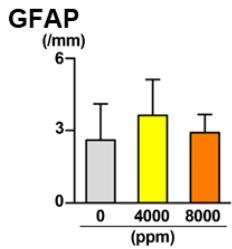
### 3. その他

なし

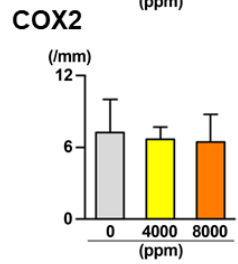
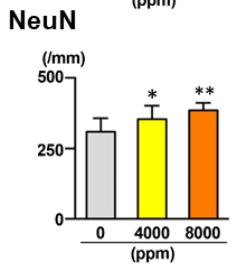
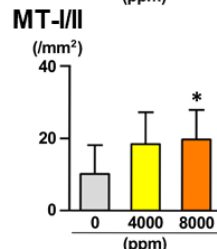
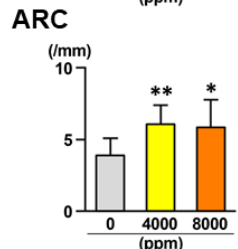
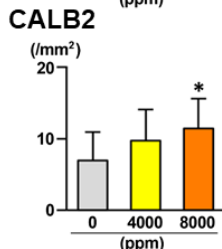
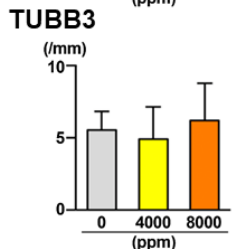
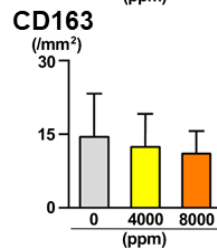
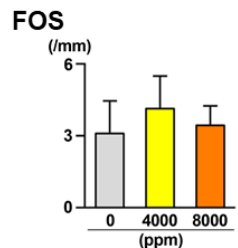


顆粒細胞系譜マーカー GABA性介在ニューロン

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

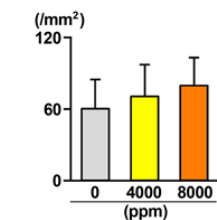
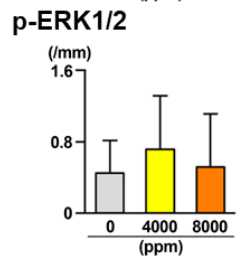


図1 酢酸鉛の免疫組織学的解析

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 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

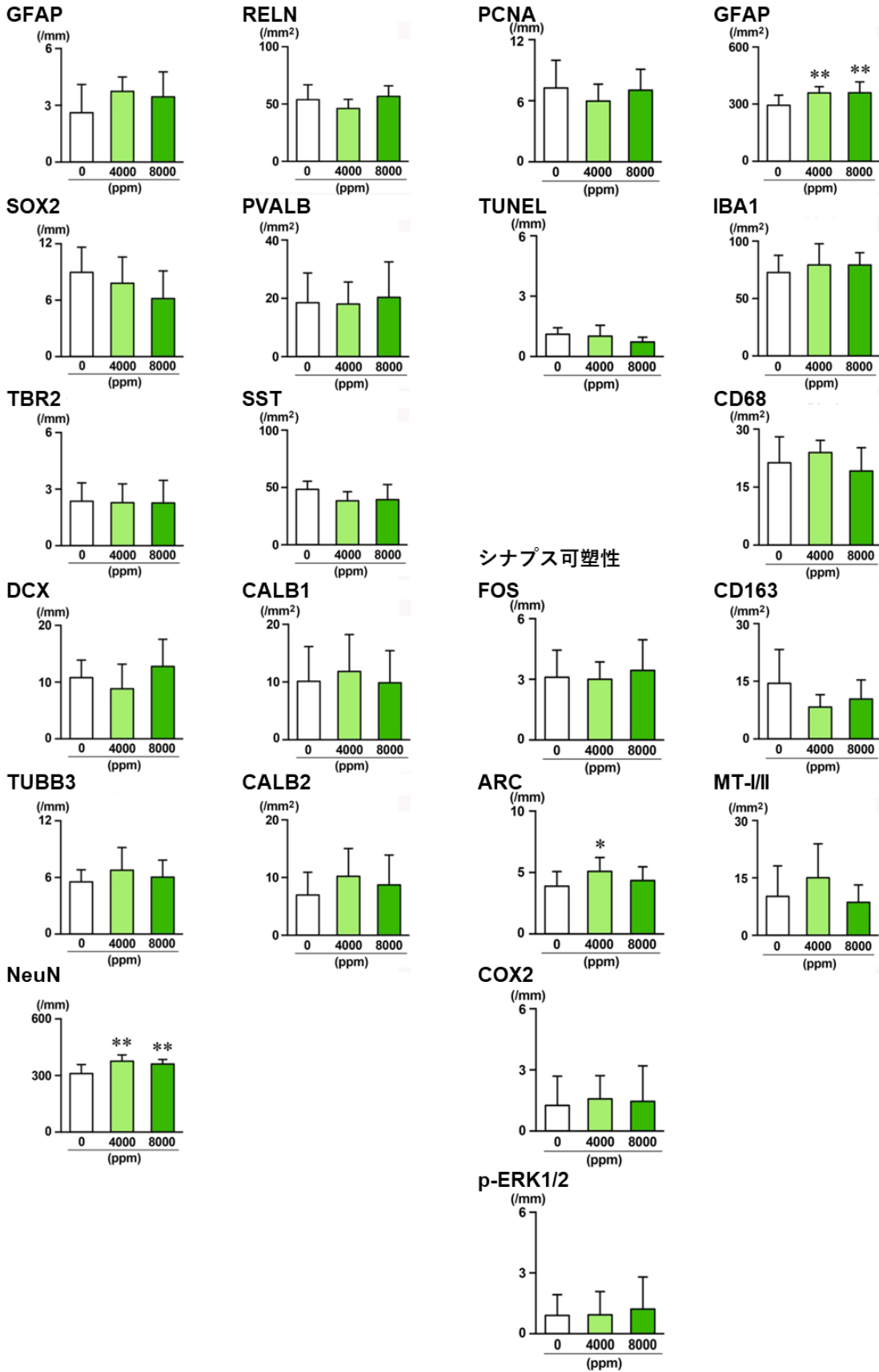
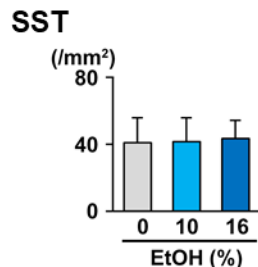
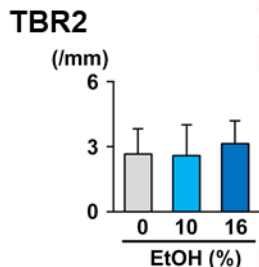
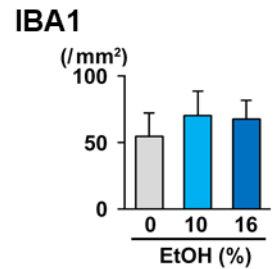
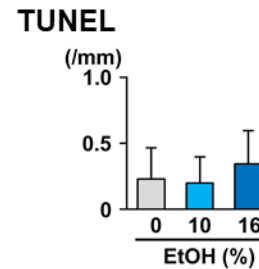
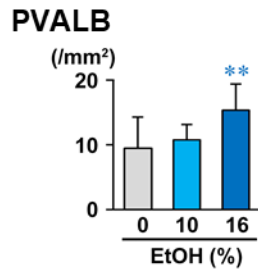
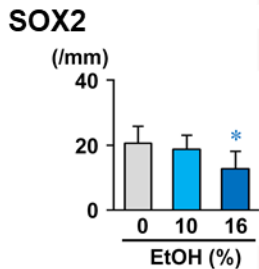
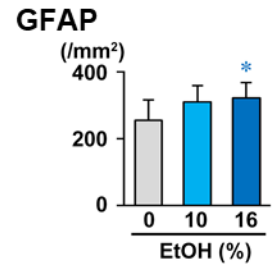
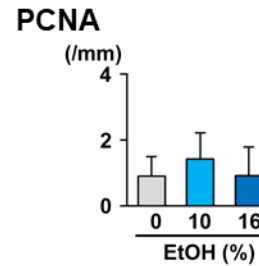
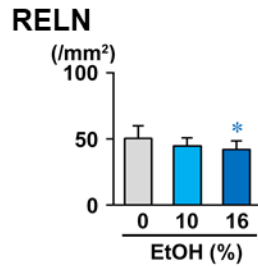
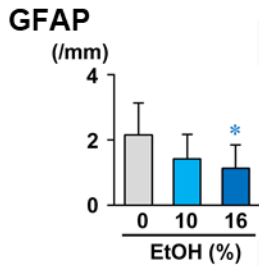


図2 塩化アルミニウムの免疫組織学的解析

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

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

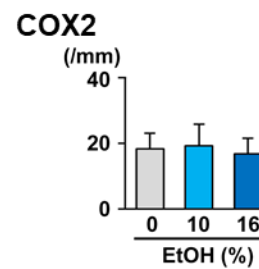
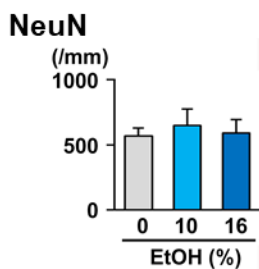
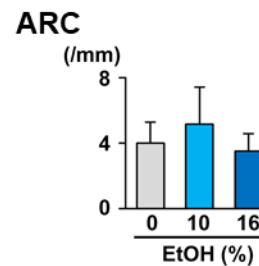
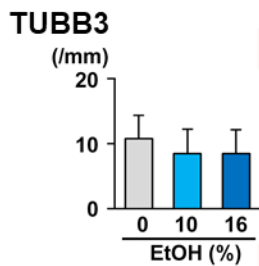
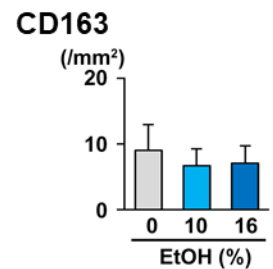
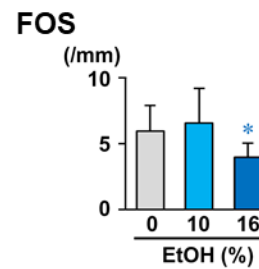
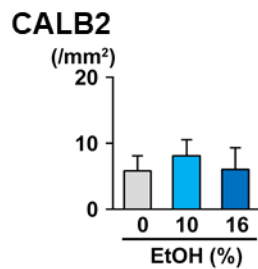
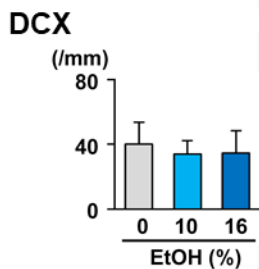
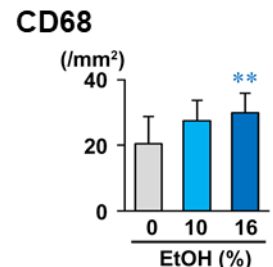


図3 エタノールの免疫組織学的解析

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

表 1 酢酸鉛の遺伝子発現解析

	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 *

Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as Iba1: ionized calcium binding adapter protein 1); *ErbB4*, erb-b2 receptor tyrosine kinase 4; *Ercc1*, ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gsta5*, glutathione S-transferase alpha 5; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il6*, interleukin 6; *Mcm3*, minichromosome maintenance complex component 3; *Mt1*, metallothionein 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (also known as TrkB: tropomyosin receptor kinase B); *Nos3*, nitric oxide synthase 3; RT, reverse transcription; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

<sup>a</sup>Mean ± SD.

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

表 2 塩化アルミニウムの遺伝子発現解析

	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*

Abbreviations: AlCl<sub>3</sub>, aluminum chloride; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (also known as TrkB: tropomyosin receptor kinase B); *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Prdx1*, peroxiredoxin 1; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT, reverse transcription; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Tgfb3*, transforming growth factor, beta 3; *Txn1*, thioredoxin 1.

<sup>a</sup> Mean ± SD.

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

表3 エタノールの遺伝子発現解析

	EtOH in drinking water			
	0% (Control)		16%	
	Normaliza- tion control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>
No. of animals examined	6		6	
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

Abbreviations: *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp9*, caspase 9; *Ccnd2*, cyclin D2; DG, dentate gyrus; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Mcm6*, minichromosome maintenance complex component 6; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Tgfb3*, transforming growth factor, beta 3; *Tnf*, tumor necrosis factor.

<sup>a</sup>Mean ± SD.

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

**厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)**  
**(19KD0201) 研究成果の概要**  
**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 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

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250mg/kgで妊娠16日に単回投与、また、農薬アセタミプリド40mg/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動物に、OECDと共有している化学物質のリストの単回あるいは反復投与を行い、動物の神経回路に及ぼす影響、および成長に及ぼす影響を細胞生物学的に追跡する。また組織の生化学的検討を行う。

(倫理面の配慮)

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

### C. 研究結果

#### (1) *in vivo*グリホサート投与試験

急性投与試験として、妊娠16日のラットに農薬グリホサートを250 mg/kgで単回投与し、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。さらに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。投与方法は飲水中に混和した。対象動物は、グリホサート無投与動物とした。実験にはすべて雄性の出生仔を用いた。

図1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2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3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4)。

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5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する。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る。図6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、むしろ社会性の低下が観察された(2020年報告)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

る。

## (2) *in vivo* アセタミプリド投与動物由来培養マイクログリア試験

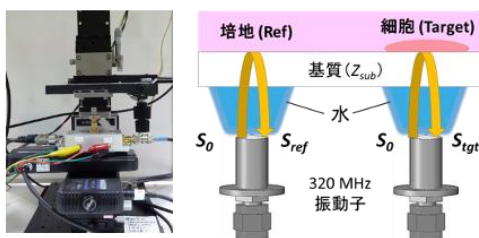
アセタミプリド40mg/kgで妊娠16日に単回投与した出生仔から、生後2日でグリア選択培地及び振盪法を用いてマイクログリアを単離培養した。対照動物はDMSOを投与したものをを用いた。加えて、グリホサート250 mg/kg投与動物由来のマイクログリア単離培養を実施した。

培養マイクログリアは、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を用いて、600 $\mu$ M ATP投与によるマイ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7の対照動物由来マイクログリア(Cont-MG)に見られるように、マイ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マイクログリア(ACE-MG)は、培養下で側枝を出したラミファイド状の活性化マイクログリアの形状をせめた。グリホサート投与動物由来マイクログリアでは、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。

実験的に培養マイクログリアは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P2Y12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マイクログリアになるとP2Y12受容体が減少することが知られている。図8では、ATP刺激前後でのCont-MGとACE-MGのP2Y12受容体発現の変化を示している。ATP刺激前のCont-MGではP2Y12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P2Y12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P2Y12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、P2Y12双方の発現が減弱することが観察された。

培養マイ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



【細胞由来音響インピーダンス(AI)値の算出】

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

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

培養した細胞に400MHz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、マイ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 $\mu$ m、立体方向の空間分解能は0.1  $\mu$ mである。観察結果を図9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

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病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、これが神経疾病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。昨年度までの私どもの研究でも、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変化することなどから、グリホサートによる神経疾病は、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。しかし今回の結果より、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ぱく質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まず誘発され、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マイ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。刺激をすることなくマイ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。昨年度までの研究で、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ることを観察しており、グリホサートと比較するとマイクログリアの増加も少ない傾向があった。しかし本研究の結果、アセタミプリド投与動物由来のマイクログリアは、培養開始時点から活性化された形状をとっていることが観察された。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

*in vivo*動物試験によって、胎児期の農薬投与が、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、この先の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には、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することで、発達神経毒性を誘起する化学物質のスクリーニングに有益な示唆を与えると考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. 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)
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)
3. 吉田祥子 Prenatal chemical exposure induce developmental neurotoxicity due to epigenetic alterations. 第64回神経化学学会大会シンポジウム
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回神経化学学会大会 (Web 開催)
5. Haya W, Matsufusa R, Kanda Y, Yoshida S. Effects of fetal exposure to organophosphorus pesticide,

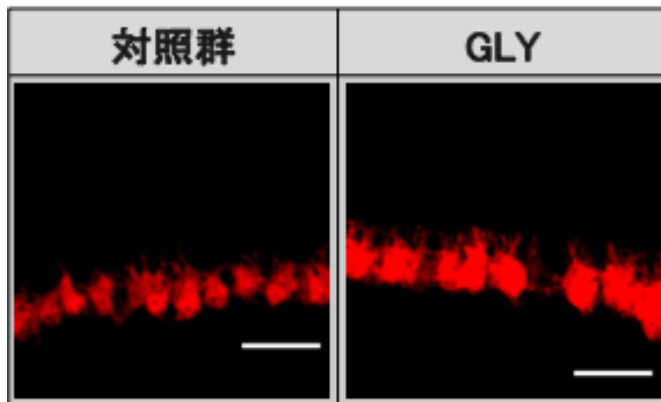
chlorpyrifos, on cerebellar development. 第64回神経化学学会大会 (Web 開催)

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回神経化学学会大会 (Web 開催)
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回神経化学学会大会 (Web 開催)
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回神経化学学会大会 (Web 開催)
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回神経化学学会大会 (Web 開催)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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)
15. 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)
16. 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)

## G. 知的所有権の取得状況

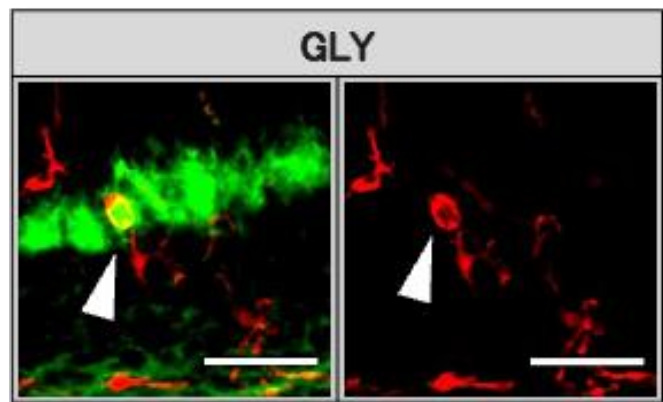
なし

(a)



Scale Bar : 50um  
赤 : PC - Calbindin

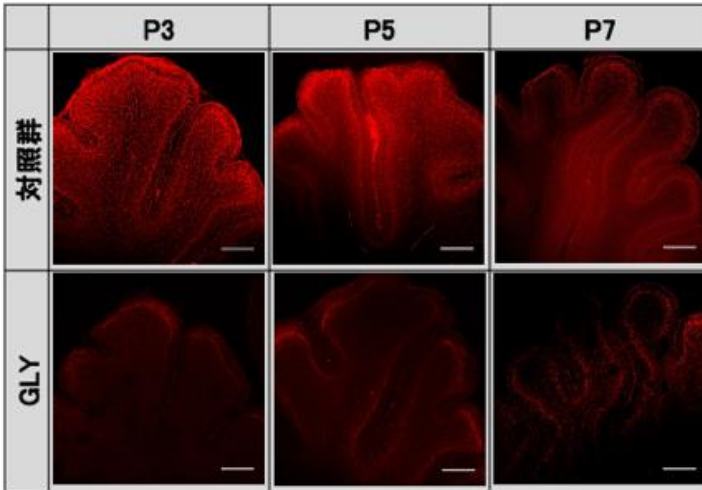
(b)



Scale Bar : 50 μm  
赤 : MG -Iba1  
緑 : PC -Calbindin

図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  
生後7日小脳虫部

(a)



(b)

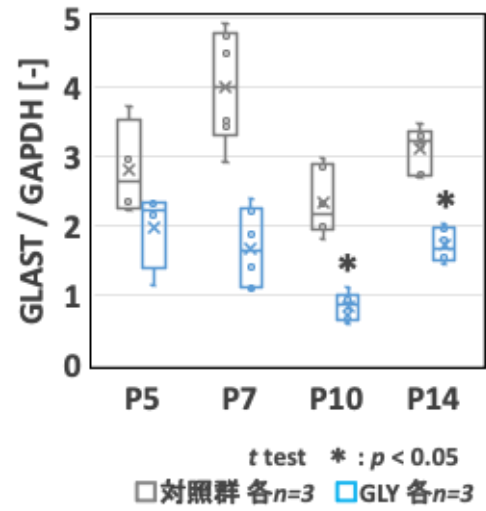
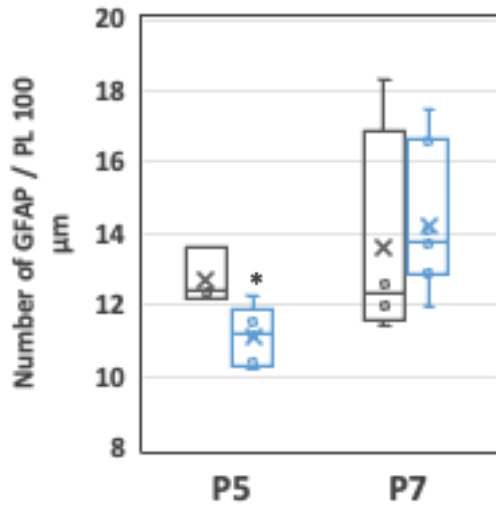


図2 グリホサート曝露動物小脳虫部のGLAST発現の変化  
(a) : 抗GLAST免疫組織化学染色、(b) : ウェスタンブロットによるGLAST発現量の半定量

(a)



(b)

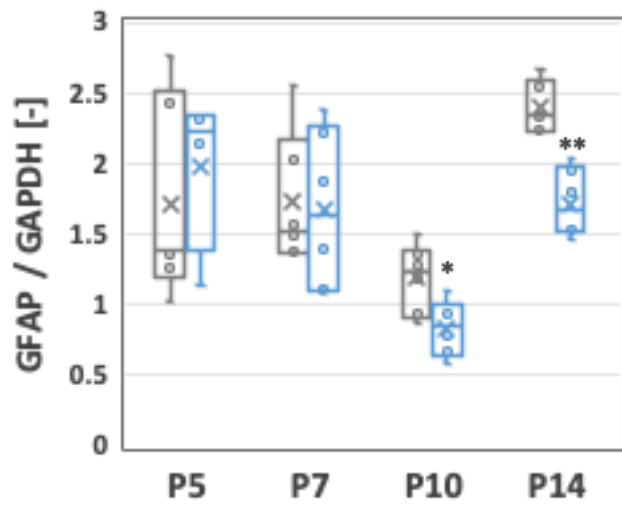
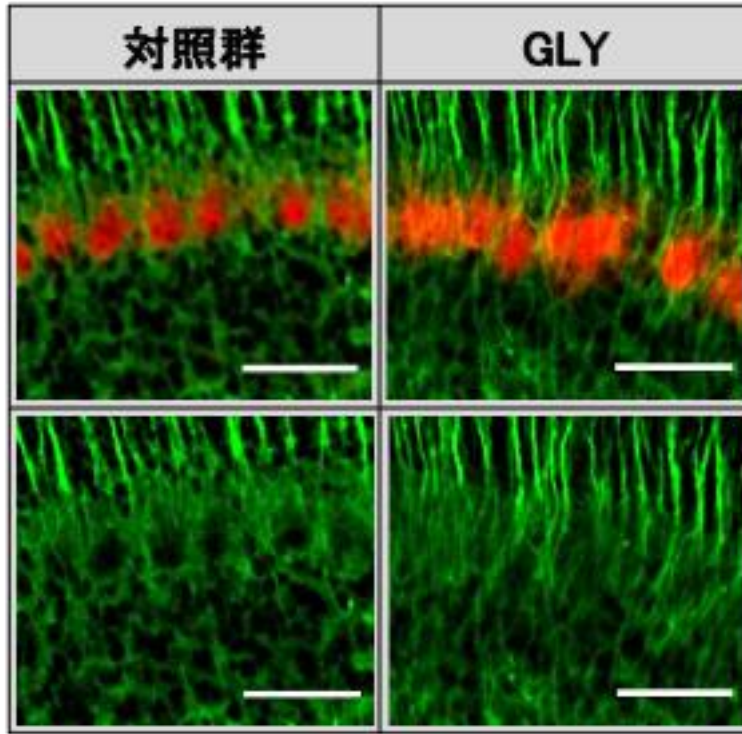


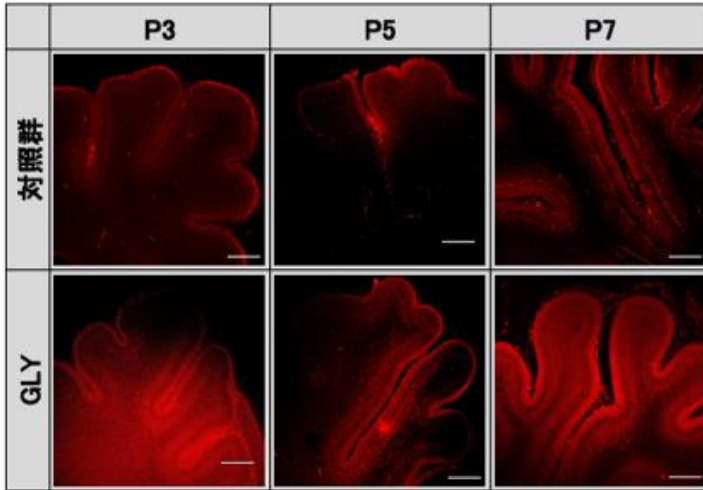
図3 グリホサート曝露動物のGFAP線維数の変化(a)とウェスタンブロットによって求めた発現量の変化(b)  
黒枠：対照動物、青枠：グリホサート投与動物



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

図4 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。

(a)



(b)

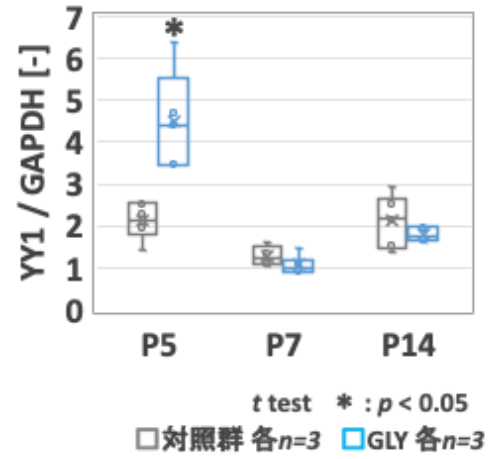
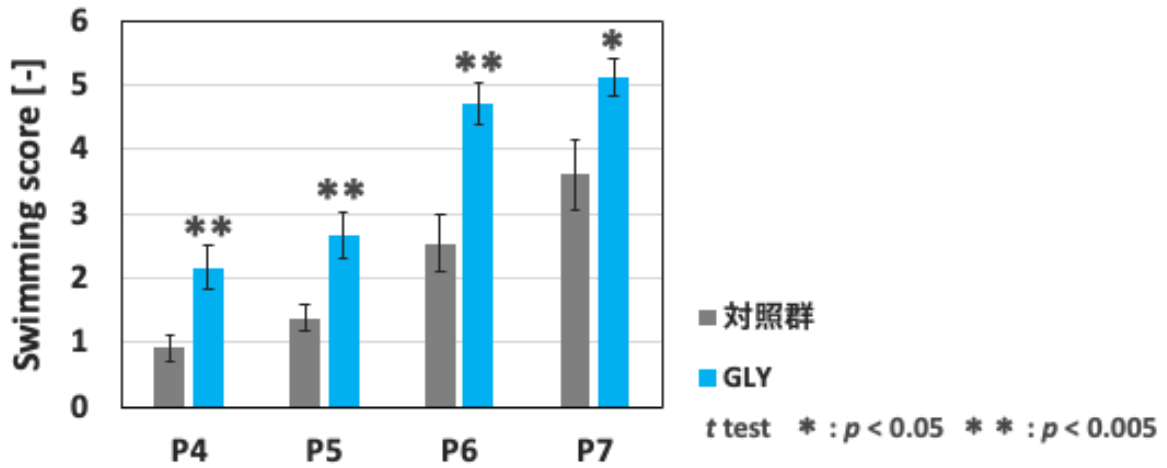


図5 グリホサート曝露動物のYY1分布 (a) とウェスタンプロットによって求めた発現量の変化(b)  
Scale bar:200 $\mu$ m

(a)



(b)

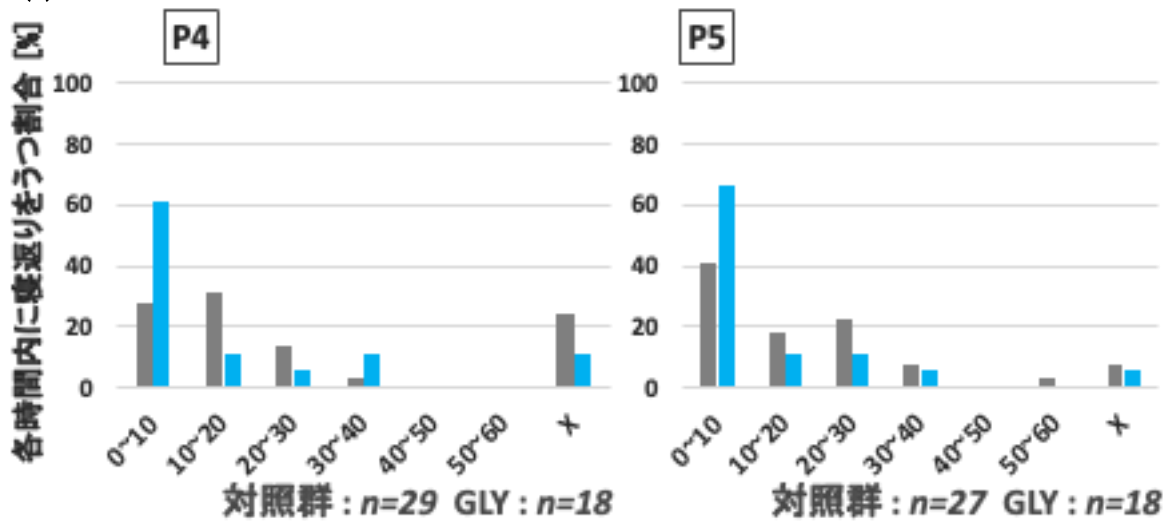


図6 グリホサート投与動物の強制水泳試験結果(a)および寝返り能力試験の結果(b)  
Swimming scoreは顔を上げて泳ぐほどスコアが高くなるよう設定。

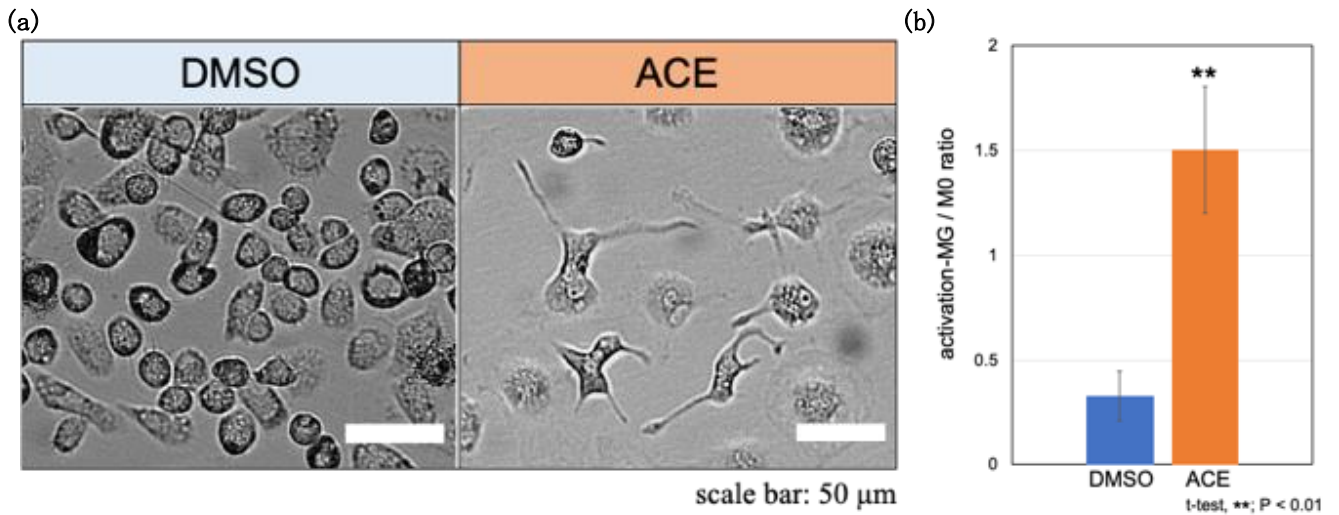


図7 アセタミプリド曝露動物由来ミクログリアの形状変化(a)と側枝型ミクログリアの比率(b)



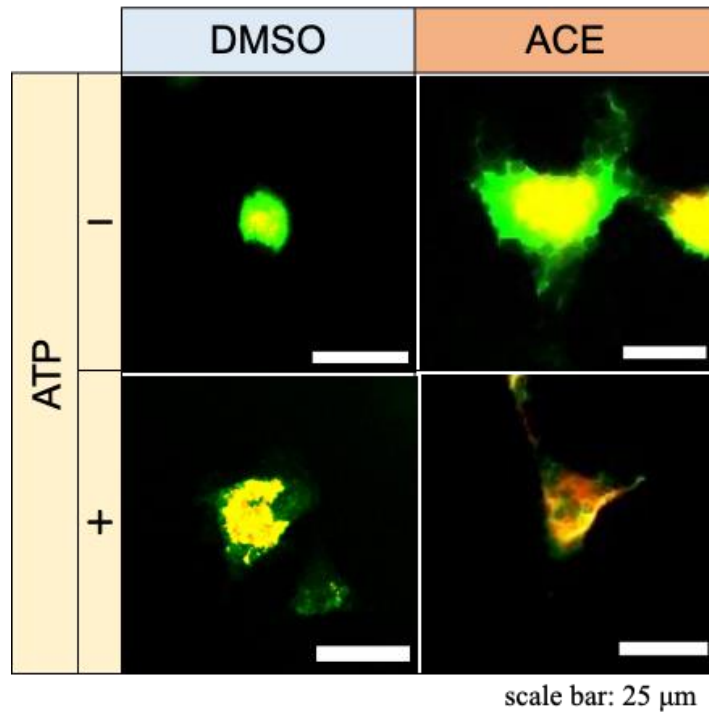


図8 アセタミプリド曝露および対照動物由来培養ミクログリアのATP刺激前後のIba-1（緑）およびP2Y12受容体（赤）発現分布

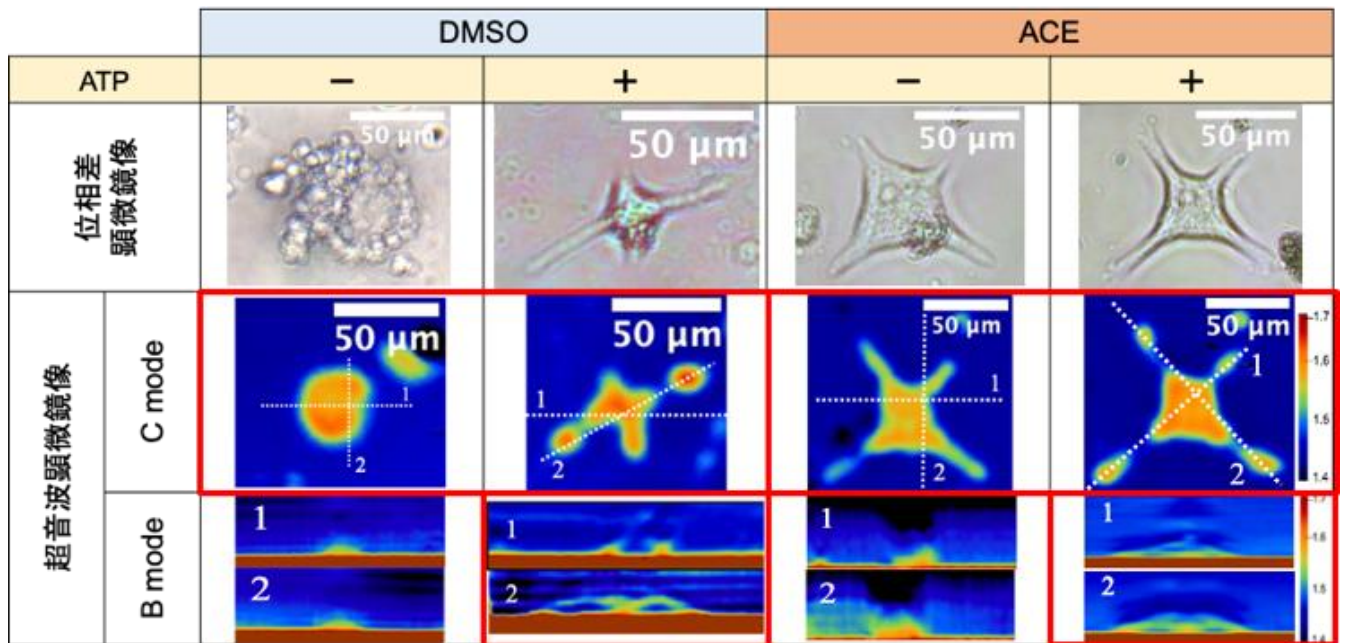


図9 アセタミプリド曝露および対照動物由来培養マイクログリアのATP刺激前後の二次元超音波像(C mode像)および三次元超音波像(B mode像)。B mode像はC mode像のそれぞれの断面を示している。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（19KD1003） 研究成果報告  
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 吉成浩一 静岡県立大学薬学部

## 研究要旨

本研究の最終目的は、化学構造に基づいたリードアクロス手法による発達神経毒性評価法を確立することである。本年度は、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後、化学構造に基づいて351種の分子記述子を計算した。全ての物質間のユークリッド距離を計算し、ユークリッド距離の大小に基づいてデータベース内の全物質についてそれぞれ近傍物質を定義し、対象物質と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。次いで、階層的クラスタリングによる被験物質のグルーピングを試みたところ、陽性物質及び陰性物質の一部をグループ化できた。さらに、公開データを利用して、農薬のラット二世又は三世代繁殖試験、発生毒性試験、90日間反復投与毒性試験、並びに2年間反復投与毒性・発がん性併合試験の統計的奇跡及び機械学習に利用可能なデータベースを構築できた。以上、本年度の研究により、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。

そこで本研究では、まず既存情報からDNT評価のためのデータセットを整備し、次いで化学構造から計算される分子記述子を説明変数として利用して化学物質の類似性を評価することで、体系的なリードアクロスによるDNTの評価手法の構築を目的とした。

### 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 が報告されているの物質及び 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。**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. リードアクロスによる発達神経毒性評価

リードアクロスは、ある性質に基づいて類似物質として選択した毒性既知の物質（近傍物質）の情報から、毒性未知の物質（被験物質）の毒性を予測する手法である。本研究では、まず、近傍物質の選択の根拠として分子記述子に基づく化学構造類似性を利用するための条件検討を行った。被験物質には陽性 164 物質、陰性 197 物質、合計 361 物質（陽性率：45.4%）を利用した。また分子記述子は、alvaDesc の 6 つの記述子グループ (Constitutional indices, Ring descriptors, P\_VSA-like descriptors, Functional group counts, Atom-centred fragments, Molecular properties) に含まれる 351 記述子を基本セットとして利用した。これらは分子量等の基本的記述子と視覚的に化学構造との関連性が分かりやすいと考えられる記述子を含んでいる。

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的な毒性評価を行った。

- 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。

### 1-1. 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。

### 1-2. 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での解析と同様に、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程度以下にな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. 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、一般的なリードアクロスは、グルーピング又はカテゴリ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 dendrogram 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である。その解決の 1 つとして本研究では研究項目 3 にて毒性試験情報の収集と整理を行った。

### 3. 農薬の毒性試験データベースの構築

前述のように、発達神経毒性の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確立においても陽性及び陰性対照物質の適切な選択に課題がある。そこで本研究では独自の毒性試験データベースの構築を行っている。

本年度は、昨年度に引き続き、食品安全委員会で公開されている農薬評価書を収集し、ラット二世又は三世代繁殖試験、発生毒性試験、90 日間反復投与毒性試験、並びに 2 年間反復投与毒性・発がん性併合試験の結果を収集した。さらに、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、申請者らの過去の手法（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を表 2 に示した。

### D. 考察

研究項目 1 では、文献情報を利用して 361 物質（陽性 164 物質、陰性 197 物質）の DNT データセットを整備し、DNT 評価のための、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、条件検討のために全物質を利用した網羅的解析を行ったため、得られた条件の妥当性を今後検証する必要がある。文献情報等を利用してデータセット外の DNT 陽性及び陰性物質を探索するとともに、研究項目 3 で構築した農薬データを利用した検証を行う予定である。

研究項目 2 では、分子記述子を利用した階層的クラスタリングにより、データセットの物質をグループ化できるか否かを検討した結果、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、研究項目

1 で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に基づくリードアクロスの可能性についても今後の検討が期待される。

本研究では351記述子全てを用いて解析を行ったが、研究項目1の結果をふまえると、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。

研究項目3においては、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。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できたことは大きな成果であり、世界的にも貴重な毒性試験データセット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

本年度の研究により、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。また、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。これらの結果を利用することで、化学構造情報に基づくDNT評価手法の開発がさらに進展することが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一郎、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
- 2) 柴田尚輝、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一郎、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
- 3) 大村奈央、浅井崇徳、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一郎、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

### A. 感度、特異度、一致率

### B. 解析対象被験物質数

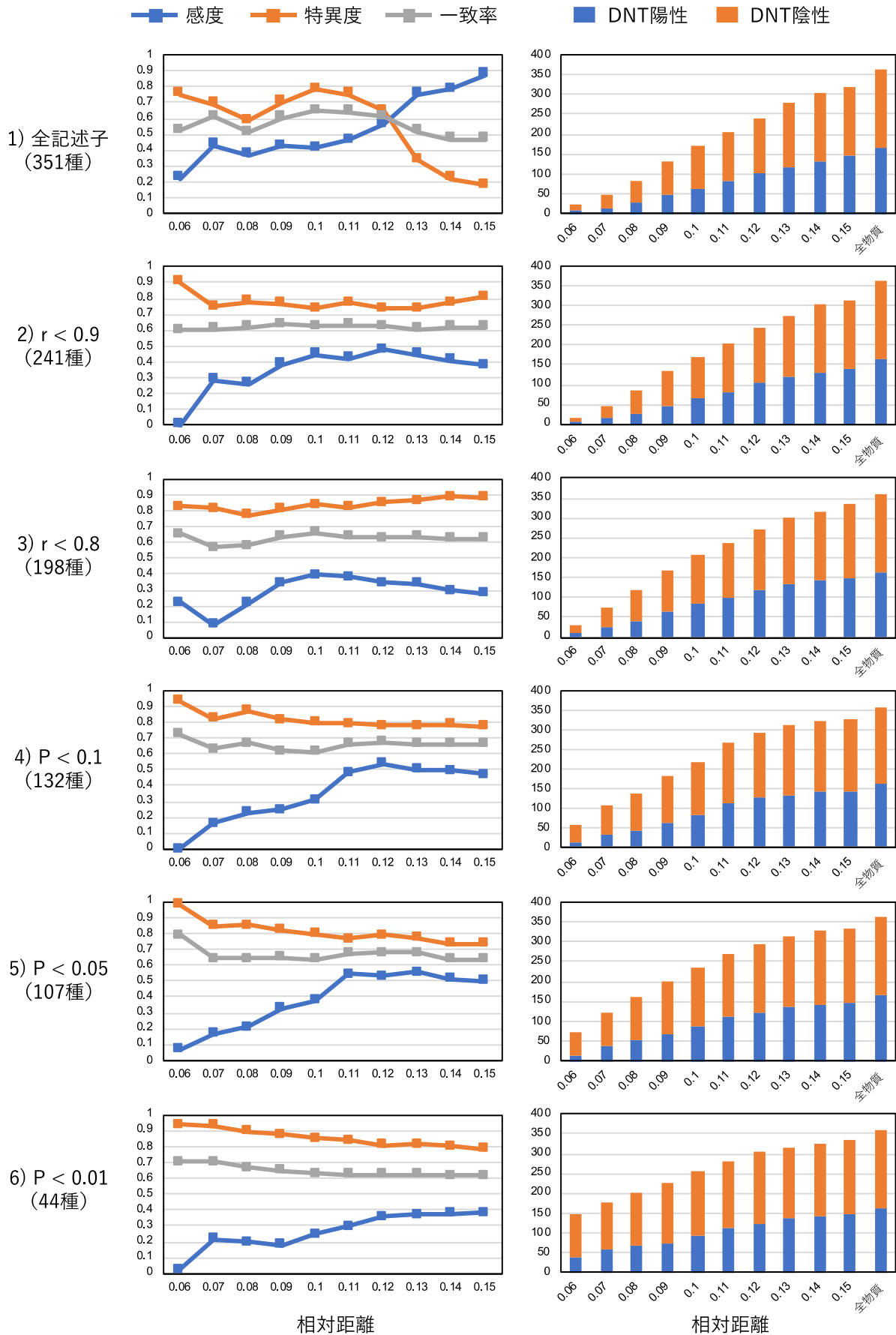
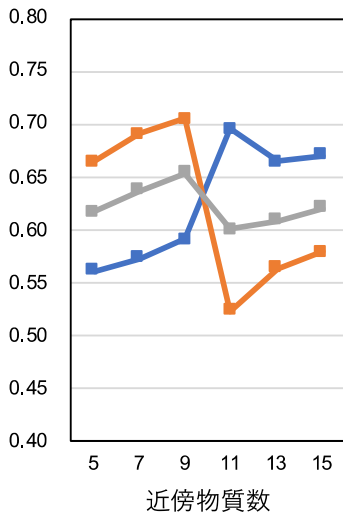
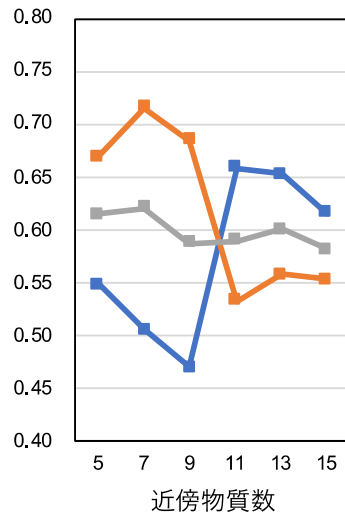


図 1. 物質間距離の閾値とDNT評価精度

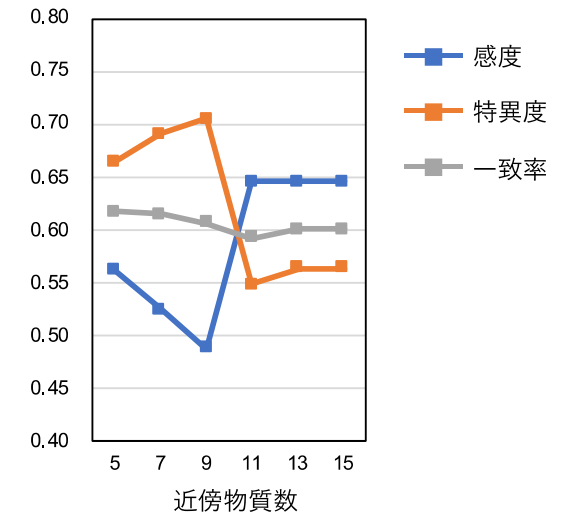
1) 全記述子 (351種)



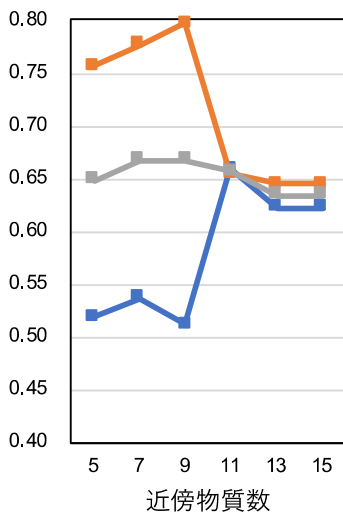
2)  $r < 0.9$  (241種)



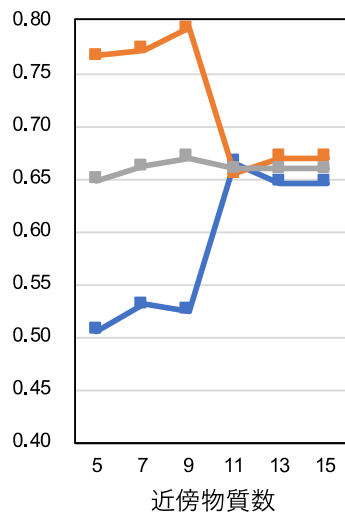
3)  $r < 0.8$  (198種)



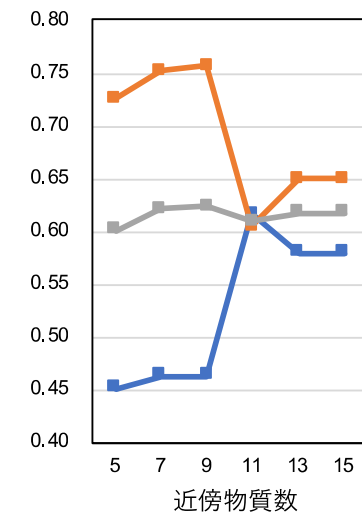
4)  $P < 0.1$  (132種)



5)  $P < 0.05$  (107種)



6)  $P < 0.01$  (44種)





## 図 2. 近傍物質数とDNT評価精度

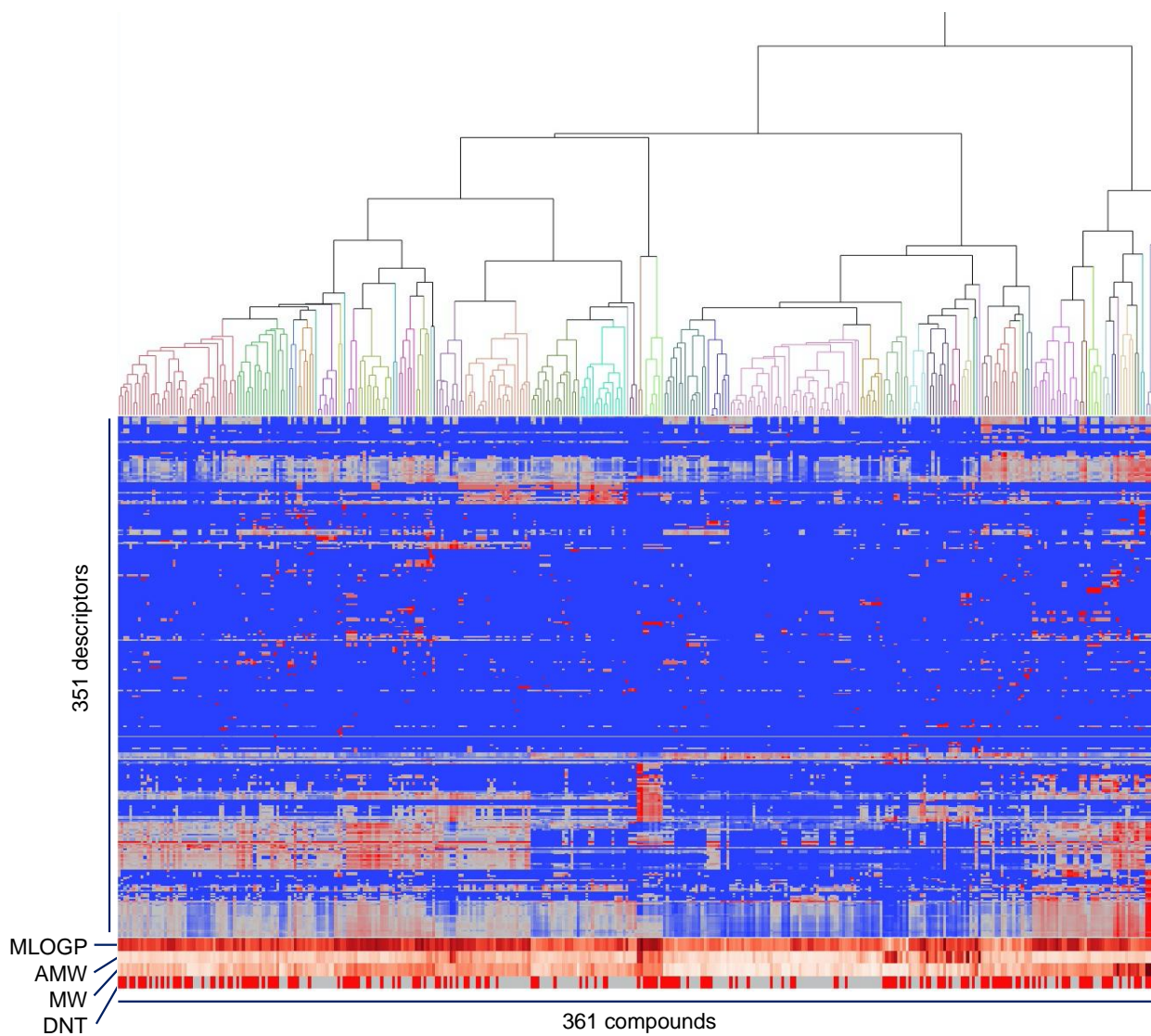


図3. 分子記述子を利用した階層的クラスタリング

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1. 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
				9	4	4	1.000
2	18	9	0.500	10	12	4	0.333
				11	2	1	0.500
				12	6	2	0.333
3	13	5	0.385	13	5	3	0.600
				14	1	0	0.000
				15	1	0	0.000
				16	10	5	0.500
4	33	12	0.364	17	23	7	0.304
				18	17	4	0.235
5	37	9	0.243	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
				37	9	8	0.889
				38	1	1	1.000
10	18	14	0.778	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2. 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 発情回帰遅れ 発情休止期延長 発情後期延長 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 交尾成立所要日数遅延 交配同日数増加
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 着床数減少 平均着床数減少 着床率低下 受精率低下
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 異常分娩の非候 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吸収胚数及び着床後胚死亡率上昇 全胚吸収 全胚吸収数増加 全胚吸収胚数増加
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 妊娠子宮重量増加 子宮大型着床に稀 胎盤遺残数増加 胎児体重減少 胎児体重
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
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	出生数減少 平均産児数減少 腹当たり死産児数増加 全死産 繁殖率低下 繁殖性に関する指標の低下
5010320	501	3	2 出生時死亡	0	生殖-出産-出生時死亡	23	全出生時死亡 全同腹死時死亡増加 腹ごとの生存児数減少 生存児数減少 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 形態異常精子増加 異常形態精子割合上昇 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)数増加 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 喰殺	0	生殖-哺育-喰殺	3	喰殺増加 動物物の喰殺 児を喰殺
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 哺乳率減少 哺乳しない動物物増加 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(雄)
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	乳頭遺残(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 尿生膀胱 尿生膀胱(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官	0	0	生殖-その他の雄性生殖器官-	0	
5011410	501	14	1 発生遅延	0	生殖-その他の雄性生殖器官-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 陰嚢包皮分離遅延 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官-形成不全	4	陰嚢外形異常 肛門生殖突起間距離短縮 肛門生殖突起間距離短縮(雄) 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官-その他	0	
5011500	501	15 その他の雌性生殖器官	0	0	生殖-その他の雌性生殖器官-	0	
5011510	501	15	1 発生遅延	0	生殖-その他の雌性生殖器官-発生遅延	4	膣開口遅延 膣開口日齢遅延 膣開口完了日齢遅延 膣開口完了時期遅延
5011520	501	15	2 形成不全	0	生殖-その他の雌性生殖器官-形成不全	3	生殖結節・膣口開距離短縮 不完全な膣開口の増加 短縮 膣開口短縮
5011590	501	15	9 その他	0	生殖-その他の雌性生殖器官-その他	1	
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 眼輪開裂遅延(雄) 眼輪開裂遅延(雌) 眼輪開裂遅延
5011720	501	17	2 形成不全	0	生殖-眼-形成不全	2	眼輪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 耳道開通遅延 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 被毛発現遅延 腹股被毛発生遅延
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(生後)	0	0	生殖-死亡(生後)-	0	
5012110	501	21	1 分娩時死亡	0	生殖-死亡(生後)-分娩時死亡	2	分娩時死亡 出産時死亡率増加

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（19KD1003） 研究成果  
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 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。本年度は、昨年度開発した陰性対照である DMSO の SD 範囲からの距離で毒性リスク評価を行う主成分分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、用量依存的な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。毒性リスク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は主成分マップ上の同様の位置にプロットされ、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。本年度は、化合物数を増やし、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。

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 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  $\pm$  530%の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、我々が開発した 4-step method (Biochem Biophys Res Commun, 497, 612-618, 2018)を用いて同期バースト発火の検出を行った。解析パラメータは、Total Spikes, No. of SBF, Inter Burst Interval, Duration of SBF, Spikes in a SBF, Max Frequency (MF), CV of MF, Inter MF Interval (IMFI), CV of IMFI の 9 つを用いた。

(倫理面の配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. 毒性リスク推定法の構築

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 $\mu$ M で同期バースト発火が消失した。Deltamethrin は 10 $\mu$ M 以上で、Tributyltin は 1 $\mu$ 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 $\mu$ M で中リスク、1 $\mu$ M 以上で高リスク、Kanic acid は 0.03, 0.1 $\mu$ M で中リスク、0.3 $\mu$ M 以上で高リスク、PTZ は 300, 1000 $\mu$ M で中リスク、3000 $\mu$ M で高リスク、Picrotoxin は 0.1 $\mu$ M 以上で高リスク、Pilocarpine は 0.3, 1, 3 $\mu$ M で中リスク、10, 30 $\mu$ 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1)。

### 2. 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。Acetamidiprid 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2)。

#### D. 考察

DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク推定法は、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、有効な推定法であると考えられる。

作用機序予測法で使用したパラメータを統計解析 (MONOVA) 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、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) 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.

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

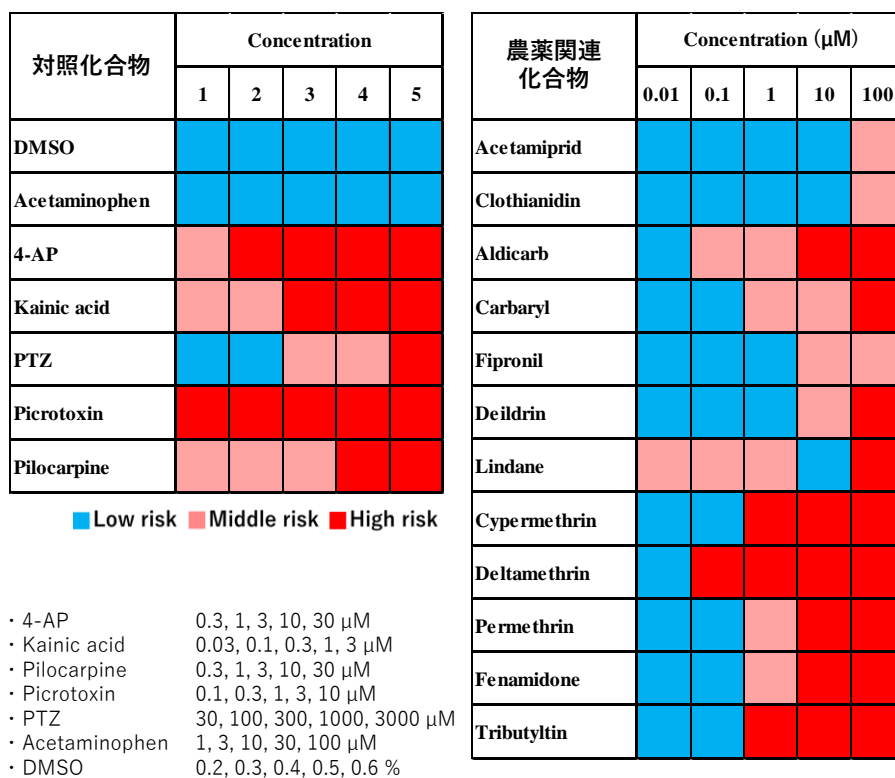
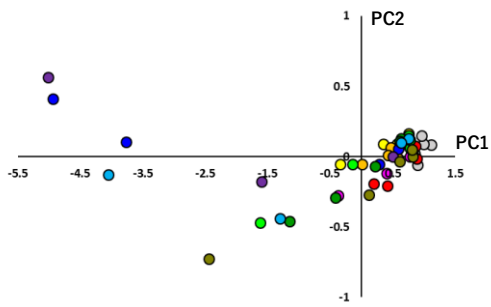


図1 DMSOのSD範囲を基準とした主成分分析による毒性リスク推定

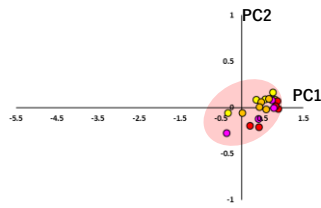


● PCA ・農薬関連化合物

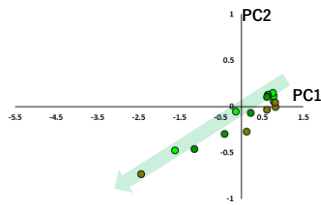


- Acetamiprid
- Clothianidin
- Aldicarb
- Carbaryl
- Fipronil
- Deildrin
- Lindane
- Cypermethrin
- Deltamethrin
- Permethrin
- DMSO

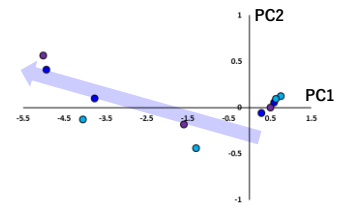
・コリン系



・GABA<sub>A</sub>受容体阻害



・Naチャンネルopener



- Acetamiprid
- Clothianidin
- Aldicarb
- Carbaryl
- Fipronil
- Deildrin
- Lindane
- Cypermethrin
- Deltamethrin
- Permethrin

図2 主成分分析による殺虫剤の作用機序推定