

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） 総合報告書 総括  
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）

## 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、新たな発達神経毒性（DNT）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。

本年度は、主に *in vitro*（神経ネットワーク機能）と *in silico*（化学構造）の側面から神経毒性評価法を検討した。OECDで議論されているリストから化学物質を選定し、ヒト iPS 細胞由来神経細胞のネットワーク活動を多点電極アレイ（MEA）システムで記録して神経毒性の評価を行った。その結果、Acetamiprid と Cloathinidin（ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト）、Aldicarb と Carbaryl（アセチルコリンエステラーゼ阻害）、Fipronil、Dieldrin、Lindane（GABA<sub>A</sub>受容体アンタゴニスト）、Cypermethrin、Permethrin、Deltamethrin（Na チャネルの opener）は、作用機序ごとに分類できることを明らかにした。

また、分子記述子を利用して化学物質のクラスタリング解析を実施した結果、陽性物質及び陰性物質が高い割合で集まるグループを得ることに成功した。化学構造の類似度は高いが、DNT に関しては一致度が低いグループも存在したため、今後、*in vitro* 試験により検証する予定である。

さらに、*in vivo* 毒性評価を進め、28 日反復投与毒性評価の枠組みで DNT が検出できることを示した。

以上の検討に加えて、2021 年秋に DNT ガイダンス案と case study が OECD 事務局から回覧された。日本側のコメントを取りまとめて OECD 事務局に返事を行い、DNT 専門家会議で議論を行った。今後、WNT のコメントラウンドで議論する予定である。

今後、ヒト iPS 細胞由来神経細胞とインシリコの橋渡しを進めて統合的な評価法に展開し、最終的に国際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）を代替して化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立したい。

## 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。神経発達に関しては、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と考えられる。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。

また、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せず、OECDのDNT専門家会議ではEPAやOECDのグループのデータから、化学物質を選定している。根拠としては十分に議論されているとは言えない。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することとした。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。

本研究で我々は、ヒトiPS細胞技術を活用し、インビトロ、インシリコ、インビボの観点からそれぞれ神経毒性評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. ヒトiPS細胞株

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. ヒトiPS細胞由来神経細胞

ヒトiPS神経はNeucyte社を用いた。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。多点電極アレイシステムにより、ネットワーク機能を評価した。

### 3. 分子記述子によるインシリコ

また、インシリコは分子記述子を利用して化

学物質のクラスタリング解析を実施した。具体的には、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。

## 4. 動物による評価

胎児期および発達期のラットに、OECDのDNT専門家会議で用いている化学物質リストの中から化学物質を選定し、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検討した

## C. 研究結果

### 1. ヒトiPS細胞による神経毒性評価

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。

次に、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。

### 2. ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測

ヒトiPS細胞由来ニューロンの活動電位を細胞外で記録すると、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る。

例えば、Methamidophos 100 µM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上昇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。

次に、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 GABAA 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、GABAA 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。

さらに、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 GABAA 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。

### 3. 分子記述子を利用した階層的クラスタリング

次に、発達神経毒性をリードアクロス手法により予測する手法の構築に向けた条件検討の結果、近傍物質の定義に利用する物質間距離に閾値を設け、また近傍物質数を制限することで、リードアクロス手法による発達神経毒性の評価精度が高くなることが示唆された。

以下、具体的に、分子記述子を利用した階層的クラスタリングについて補足で述べる。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。

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、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、陽性率を検討した。

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。

### 4. 動物による評価

酢酸鉛では発達期曝露と 28 日間曝露の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。

また、グリホサートは DNT の情報が不十分であると OECD 専門家会議で議論されたことから、動物実験を追加した。その結果、グリホサートの 100 mg/kg 以上の高濃度曝露が出生仔の神経異常をもたらす可能性を示した。また、そのメカニズムとして、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ており、慢性炎症の可能性が考えられる。

## 5. 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、データセットを整備することができた。

以上の検討に加えて、2021 年秋に DNT ガイダンス案と case study が OECD 事務局から回覧された。日本側のコメントを取りまとめて OECD 事務局に返事を行い、DNT 専門家会議で議論を行った。今後、WNT のコメントラウンドで議論する予定である。

## D. 考察

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストから、特に農薬を中心に評価した。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。引き続き、カテゴリーアプローチなどの手法を基にしてインシリコとインビトロデータの統合化を図ることにより新たな神経毒性評価法を開発できることが期待される。

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。

また、MEAの解析方法に関しても、本研究示した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。

一方、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）が異なっていた。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。

さらに、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。

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。

アセタミプリドでは慢性炎症が起こっていることから、インビトロではミクログリアの試験系を組み込む必要性が考えられる。実際、OECDの専門家会議でもデュッセルドルフ大学のEllenらはミクログリアの検討を行っているとのコメントがあり、今後の検討が期待される。

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。

OECD ガイダンスに関しては、専門家会議でガイダンス案の議論を行った。特に、OECD では、Tiered approach として、化学物質の構造や物性情報により、毒性の予測を行う段階を設けることでガイダンス案の議論が進行中である。本研究で得られたインシリコモデルを発展させて、Tiered approach として活用できる

ように橋渡しに取り組む必要がある。

また、2021 年秋に DNT ガイダンス案と case study が OECD 事務局から回覧された。日本側のコメントを取りまとめて事務局に返事をした。

今後、データベースや MEA など機械学習などを通じてモデル化を行い、将来的に新たな DNT 試験法につなげていきたい。

## E. 結論

ヒト iPS 細胞のミトコンドリア毒性によるスクリーニング法を開発した、また iPS 細胞由来神経細胞のネットワーク活動を多点電極アレイシステムにより記録することにより、DNT が懸念される化合物の評価を行い、作用点に基づいて分類することができ、一定の予測性が得られることが示唆された。

また、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、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、OECD が進めているような tiered approach による DNT 評価手法の開発に貢献できることが期待される。

## F. 研究発表

各分担研究者の報告書に示すように、多数の論文発表および学会発表を行った。