

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_A 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

本研究では、OECD の DNT 専門家会議で用いている化学物質リストをもとに、インビトロと動物、インシリコによる神経毒性評価を行う。特に、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の評価と化学構造を比較検討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

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、 8.0×10^5 cells/cm² 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。

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）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。

C. 研究結果

OECD の DNT 専門家会議で用いている化学物質リストから化学物質を選定し、ヒト iPS 神経の神経活動を多点電極アレイ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_A 受容体アンタゴニスト)、Cypermethrin、Permethrin、Deltamethrin (Naチャンネルの opener) は、作用機序ごとに分類できることを明らかにした。

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。

また、*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。

現在、インシリコ情報はデータベース化を進めており、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。

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。

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と組む必要がある。

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、データベースや機械学習などを通じてモデル化を行い、将来的に OECD の DNT ガイダンスの改訂につなげていきたい。

E. 結論

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。