

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

研究分担者 齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 研究員

研究要旨

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、日本で開発された種々のTGやガイダンス文書（GD: Guidance Document）、毒性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）などの世界各国が必要とする成果物を公定化させるとともに、他国が提案するOECD大型プロジェクトに関与し、その成果物に日本の主張を反映させ、その成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生行政に反映させることを目的とする。

分担研究として、昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状について情報収集を行うとともに課題を抽出した。特に、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度を把握するとともに、実験動物（げっ歯類）を対象とした発達神経毒性評価の現状や被験物質の種類、用いられる行動解析およびガイドラインとの関連について調査を行った。また、OECDで検討されている発達神経毒性のGDに関連する提案資料への意見募集にコメントすることにより、関連するGDの開発に寄与した。

A. 研究目的

本分担研究では、昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状、特に行動解析および関連するガイドラインについて情報収集を行うとともに課題を抽出する。加えて、OECDで検討されている発達神経毒性のGDの開発に寄与することを目的とする。

情報収集を行った。発達神経毒性評価の現状についての文献調査には、医学・生物学分野の学術文献検索データベースであるPubMedおよびMEDLINEを用いた。また、収集した文献については、記載されている情報の整理を行った。

<文献検索に用いたキーワード>

mice, rats, rodents, neurodevelopmental, developmental, neurotoxicity, test guideline

B. 研究方法

B.1. 発達神経毒性評価のための行動解析に関する情報収集:

昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状について情

報収集を行った。発達神経毒性評価の現状についての文献調査には、医学・生物学分野の学術文献検索データベースであるPubMedおよびMEDLINEを用いた。また、収集した文献については、記載されている情報の整理を行った。

(1) げっ歯類（マウス、ラット）を用いた

実験報告

- (2) 化学物質曝露による影響評価
- (3) 曝露時期、投与期間、用量等の実験条件や、解析に用いた行動試験の具体的な記載

B.2. OECD からの意見募集への対応：

JaCVAM 発達神経毒性 (DNT) 資料編纂委員会にオブザーバーとして参画するとともに、公定化に向けて進行中の *in vitro* DNT ガイダンス文書の提案資料に対して、OECD からの意見募集にコメントした。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物を用いない調査研究である。

C. 研究結果

C.1. 情報収集：

文献検索の過程で、Mundy らの Review (Expanding the test set: Chemicals with potential to disrupt mammalian brain development, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2015) をもとに、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度を把握するため、その内容をまとめた。その結果、神経発達への影響を示すデータのある化学物質 (97 物質) において、組織学的な解析、あるいは神経化学的解析とともに、多くの文献では行動解析を採用し、それらの組み合わせにより評価していた。文献によっては行動解析が単独で用いられており、論文数に対する利用頻度は最も多かった (図 1)。

これまでガイドラインに準拠した化学物質の評価状況については、先行文献より、EPA 又は OECD TG 426 に準拠して DNT 試験が実施された農薬のうち、その試験成績が審査当局に提出されたものは、米国における 2008 年段階での承認農薬数は約 1150 有効成分、欧州においては 2020 年段階で 479 有効成分であるという情報を得

た (発達神経毒性の欧米での評価状況及び *in vitro* 発達神経毒性試験の検討状況調査) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 2020 より)。

上記情報に加え、発達神経毒性評価に係る毒性情報として昨年度までに収集した文献 (95 報) について、被験物質の種類および行動解析の項目ごとに論文数の整理を行った。その結果、被験物質については、農薬 (16 報)、医薬品 (25 報)、産業化学物質 (52 報)、その他 (6 報) であった。行動解析の項目については、認知機能 (受動回避試験、モリス水迷路等) を用いた文献が最も多く (71 報)、次いで運動および感覚機能 (オープンフィールド試験、ロータロッド試験等) を用いたものが多かった (60 報)。上記 2 項目と比較すると数は少ないが、社会性 (超音波発声、ホームケージ、3 チャンバーテスト等) の行動解析を取り入れている文献も存在した (13 報) (図 2)。また、社会性の評価が可能な試験を取り入れている文献は、主に農薬のばく露影響を評価したものであった。これら収集した文献については、今年度追加した文献とともに順次情報の整理を行い、ガイドラインの使用実績を含め、最終年度へ向けたリスト化を行っている (計 122 報について実施中)。

C.2. OECD からの意見募集への対応：

JaCVAM 発達神経毒性資料編纂委員会オブザーバーとして委員会に参画するとともに、*in vitro* DNT ガイダンス文書 (Guidance on the Interpretation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In-Vitro Testing Assays for Use in Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)) に関して、再度 OECD 事務局に提出するコメント募集に応じた。昨年度と同様に、神経行動毒性の評価系、特に *in vivo* 試験を行っている立場から、本ガイドランスの改善点・

懸念点として、*in vitro* テストバッテリーにおいて観察された神経細胞の分化や神経突起の伸長への影響の生物学的な意味づけの限界、そして *in vivo* 試験において観察された行動異常との対応の限界について記載する必要性について強調した。

D. 考察

文献検索の過程で整理した、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度から、行動解析が未だエンドポイントとしては強力なツールであり、重要な評価項目であると考えられた。また、ガイドラインに準拠した化学物質の評価状況について、先行資料から得られた情報をまとめると、既存の発達神経毒性試験は申請される有効成分において網羅的に実施されておらず、有効成分総数に対して換算すると、その実施割合は少ないことが予想された。

発達神経毒性に関して現在までに取得した文献については、OECD ガイドラインにも記載されている従来の運動機能や認知機能（特に学習・記憶）に加え、社会性（超音波発声、ホームケージ、3チャンバーテスト等）の評価を行っている文献も複数存在し、現行のガイドラインを補強する評価手法として、その重要性を示唆するものであると考えられた。そのため、昨年度および今年度追加で取得した文献情報については、ばく露時期の情報、被験物質、解析に用いる行動試験、ガイドラインへの準拠等、*in vitro* DNT ガイダンス文書への対応の参考となるような情報として提供できるようまとめる必要がある。特に、

- ・化学物質の種類による影響の差異（各行動試験の検出感度、共通性の抽出）
- ・新たな評価指標の把握（ガイドラインの補強）

に着目して整理する必要がある。

OECD からの意見募集（*in vitro* DNT ガイダンス文書）に関しては、前回のコメント募集の際に主張した本ガイダンスの改善点・懸念点について、記載の反映や改善がなされている箇所が多数見受けられた。一方で、現行の *in vivo* 試験との対応や、解決すべき課題についての記載については未だ不十分な部分があると考えられた。*in vivo* 試験と *in vitro* 試験で行われる評価手法と得られる結果のブリッジングについては、さらに議論を深める必要があることを強調する必要がある。

E. 結論

現在までの文献調査から、行動解析が未だエンドポイントとして重要な評価項目であることが考えられたが、現行の発達神経毒性試験について、その実施割合や関連ガイドラインへの準拠数を考えると、化学物質の潜在的な影響を検出するため、現行の発達神経毒性ガイドラインを用いることに課題が多いことが見受けられた。本研究で得られた発達神経毒性の文献情報や、OECD からの提案資料に対するコメント募集への参画による、国際貢献を通して得られた情報は、今後も OECD プロジェクトに日本の意見や結果を反映させるために重要であり、引き続き厚生労働行政に活用できるよう調査を進めていく必要があると考えられる。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. 高橋 祐次、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡：加圧式定量噴霧式吸入器（pMDI）製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn J Clin Toxicol.* 35, 255-59, 2022

2. Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetaminophen in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 48(4), 203-10, 2023
3. Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 48(4), 211-19, 2023

フォーラム (2022.8.26、東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

F-2 学会発表

1. 齊藤 洋克、種村 健太郎、菅野 純、北嶋 聡：アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析-化学物質曝露影響から考える神経発達障害-、第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1、札幌)
2. 五十嵐 智女、松村 万里、小川 いづみ、矢川 千織、早川 孝彦、越智 美代子、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡：「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)
3. 横田 理、齊藤 洋克、若山 友彦、北嶋 聡：ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巣毒性評価法の開発、第62回日本先天異常学会学術集会 (2022.7.29、金沢)
4. 齊藤 洋克、菅 康佑、横田 理、阿部 裕、片岡 洋平、六鹿 元雄、種村 健太郎、北嶋 聡：キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析、第8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

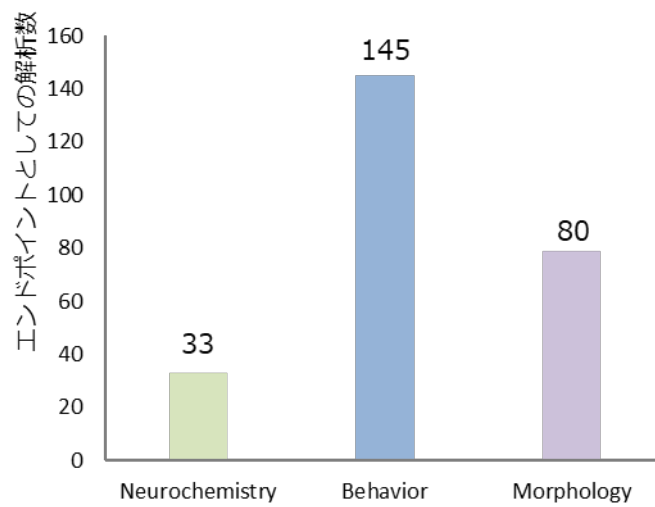


図1. 発達神経毒性に関する文献での行動解析の利用頻度 (Mundy et al., 2015 より)

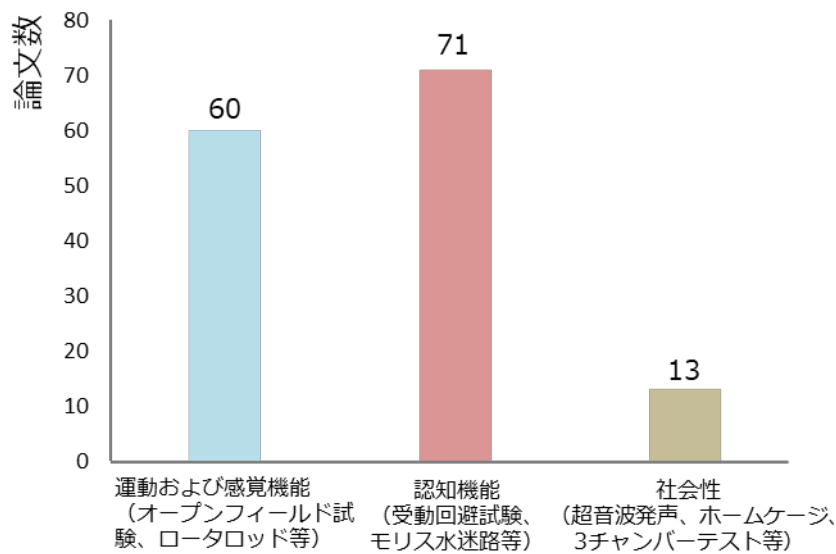


図2. 収集した発達神経毒性評価に係る文献における各行動解析項目を用いた文献数