

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）

国内外で開発されOECDで公定化されるNAMを活用した試験法の行政的な 受け入れに対応するための研究

令和6年度分担研究報告書

化学物質曝露によって誘発される発達神経毒性に関する研究

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 主任研究官

研究要旨

昨今、動物実験を用いないで全身毒性を評価するため、動物実験代替法の枠に捉われない概念として、New Approach Methodology (NAM) の開発が盛んである。本研究班は、このような世界的な動向に呼応して NAM の開発を加速し、新興技術に基づく評価法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、得られた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労働行政に反映させることを目的とする。個体の発生・発達期は神経シグナルの厳密な制御の下、脳の神経回路網が形成される重要な時期であり、この時期の化学物質の曝露は、正常な脳の発達を妨げ、遅発的かつ長期的な影響をもたらすおそれがある。化学物質がヒトを含む哺乳類の神経系に及ぼす潜在的な影響に関しては、新たな知見が蓄積、更新されているものの、脳高次機能への影響を議論するための情報は十分ではない。本分担研究においては、発生・発達期のマウスに作用機序の異なる被験物質を投与し、脳高次機能への影響として生じる共通のイベント、あるいはその影響の差異を検討することで、発達神経毒性に係る実験データを収集する。今年度は、免疫組織化学による条件検討を行い、中枢神経系における各細胞の主要な分化マーカーにおける、その発現および局在を安定して検出できることを確認した。また、モデル化学物質としてイミダクロプリドを選択し、幼若期および成熟期マウスへの投与実験を行った。被験物質の投与後、個体の行動に及ぼす影響を検出するため、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験による行動解析を行った結果、幼若期投与群において、多動的傾向、不安の亢進、記憶異常等の特徴的な行動逸脱が観察された。今後、複数の候補被験物質を用いて同様の解析を行い、行動試験結果および、当該物質のニューロン、グリア細胞等への影響の比較をすすめる。

A. 研究目的

本研究班は、NAM の開発を加速し、新興技術に基づく評価法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、得られた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労働行政に反映させることを目的とする。個体の発生・発達期は神経シグナルの厳密な制御の下、脳の神経回路網が形成される重要な時期であり、この時期の化学物質の曝露は、正常な脳の発達を

妨げ、遅発的かつ長期的な影響をもたらすおそれがある。化学物質の発達神経毒性に関しては、新たな知見が蓄積、更新されているものの、脳高次機能への影響を評価、議論するための情報は未だ不足している。本分担研究では、化学物質曝露によって誘発される発達神経毒性に関する研究として、発生-発達期のマウスに作用機序の異なる被験物質を投与し、脳高次機能への影響として生じる共通のイベント、あるいはその影響の差異を検討することにより、AOP開発に資する実験データ支援を行う。

B. 研究方法

今年度は、免疫組織化学により、各神経細胞への影響（変化）を検出するための条件確認を行った。10%中性緩衝ホルマリンにて固定した成熟マウス（13週齢）の脳組織について、パラフィン切片（10 μ m）を作製し、各細胞の分化マーカーを用いた免疫組織化学を行った。パラフィン切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールにて段階的に再水和した。HistoVT One により 90℃、30 分で抗原賦活化処理し、Blocking One と共に 4℃で1時間ブロッキング処理した後、一次抗体処理を行い、4℃で一晩インキュベートした。一次抗体には以下のものを用いた：rabbit polyclonal anti - doublecortin (DCX; Abcam)、rabbit monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN; Abcam)、goat polyclonal anti - SRY - related HMG - box 2 (SOX2; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; Abcam)、mouse monoclonal anti-myelin associated glycoprotein (MAG; Abcam)、rabbit monoclonal anti-NeuroD1 (Abcam)（いずれも 300 倍希釈）。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 および 594 標識抗体 (Invitrogen; 1,000 倍希釈) を用い、4℃

で 2 時間処理した。核は Hoechst 33342 (5,000 倍希釈) で染色した。一次抗体および二次抗体、Hoechst 33342 は、Blocking One および PBS の混合溶液で希釈して用いた。

また、ネオニコチノイド系農薬であるイミダクロプリド (IMI) を被験物質として選択し、幼若期（2 週齢）および成熟期（10 週齢）の C57BL/6N 雄性マウスに 8mg/kg の用量で単回強制経口投与する実験を行った。対照群には用いた溶媒としてコーンオイルを投与した。被験物質の投与後、12～13 週齢時に個体の行動に及ぼす影響を検出するため、自発運動量、情動行動、学習記憶、情報処理機能に着目し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験を組み合わせた行動試験を行った。行動試験終了後、解析に用いたマウスから脳組織を採取し、今後の実験のためのサンプルとした。得られた実験データに対しては、Dunnett の多重比較検定を用いて統計解析を行った。有意水準は 5% ($p < 0.05$) に設定した。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果

行動影響が検出された際に、関連する影響が観察されやすい海馬歯状回を中心に免疫組織化学を行った結果、各細胞の主要な分化マーカーについて、成熟ニューロン (NeuN)、新生ニューロン (DCX, NeuroD1)、神経幹細胞 (Nestin, SOX2)、アストロサイト (GFAP)、オリゴデンドロサイト (MAG)

の発現および局在を安定して検出できることを確認した。また、行動試験の結果から、イミダクロプリド幼若期投与群において、コントロール群と比較して、オープンフィールド試験における移動回数の有意な減少、移動速度の有意な増加が認められた。明暗往来試験については、不安関連行動の指標となる明室滞在時間、明暗往来数、暗室待機時間の有意な減少が認められた。さらに、条件付け学習記憶試験において、音-連想記憶の有意な低下が認められた。成熟期投与群においては、コントロール群と比較して、各行動影響の指標となるものに有意な差は認められなかった（図 1）。

D. 考察

各種行動試験の結果から、モデル化学物質を用いた本投与計画において、生後発達期への化学物質曝露により、急性の末梢神経毒性とは異なる、成熟後の中枢神経系への影響が誘発されることが確認できた。特に、幼若期投与群において、多動的傾向、不安の亢進、記憶異常と考えられる特徴的な行動逸脱が観察され、引き続き詳細な解析を実施するとともに、関連する神経基盤を明らかにすることが重要である。次年度以降、複数の候補被験物質を用いて同様の解析を行い、行動試験結果および、当該物質のニューロン、グリア細胞等への影響を比較することによって、異なる作用機序を持つ化学物質間で誘発される影響の類似性、差異を検討する必要がある。

E. 結論

本研究で得られた結果や毒性発現機序の知見は、*in vitro* 試験法の適用範囲を検討するための重要なデータとなり、最終的には、取得したデータによって構築される

AOP の枠組みに基づいた NAM の開発・活用につながると考えられる。加えて、国内外で開発される NAM に対し、科学的・行政的観点からコメントを行う際にも有益であると考えられ、引き続き、発達神経毒性の AOP 作成に資する実験データを蓄積する必要がある。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S. A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam Toxicol Sci* 11(4), 2024. doi: 10.2131/fts.11.169.

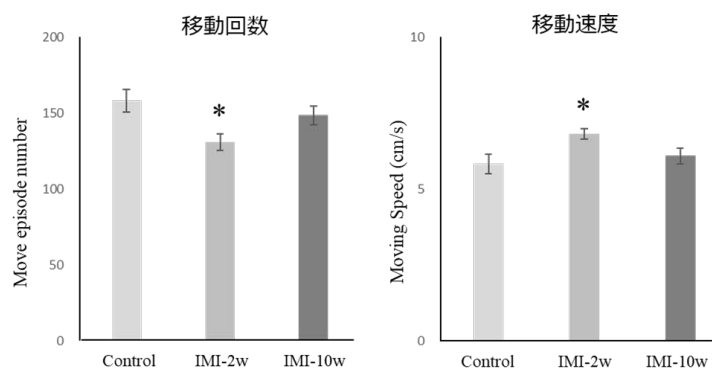
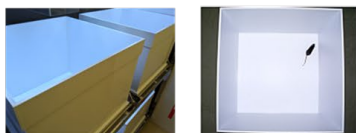
F.2 学会発表

1. 齊藤洋克、横田理、北嶋聡. セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連 第 51 回日本毒性学会学術年会（2024.7.3, 福岡）
2. 齊藤洋克. 周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出 日本内分泌攪乱物質学会第 26 回研究発表会（2024.12.7, 東京）

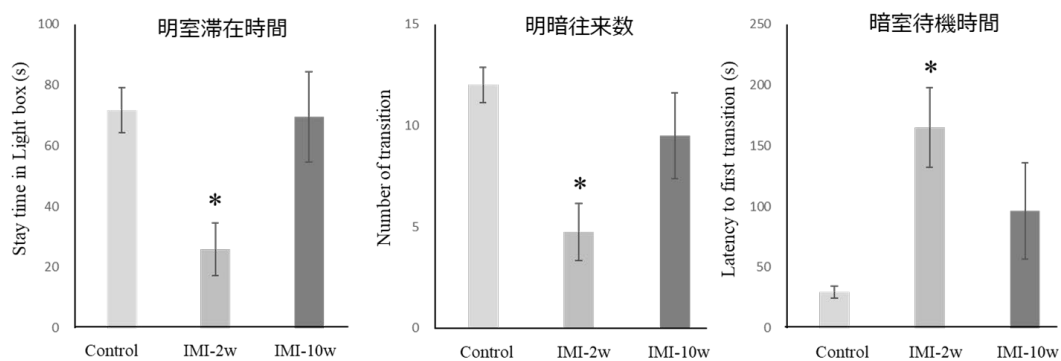
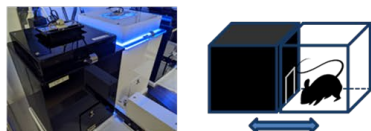
G. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

オープンフィールド試験



明暗往来試験



条件付け学習記憶試験

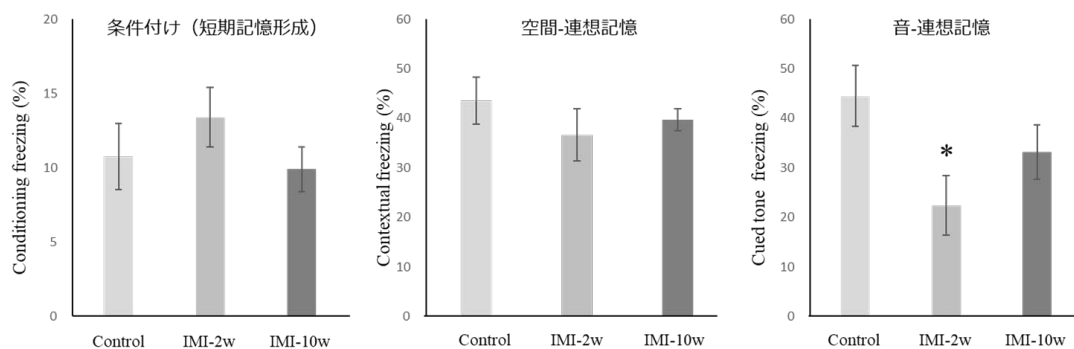
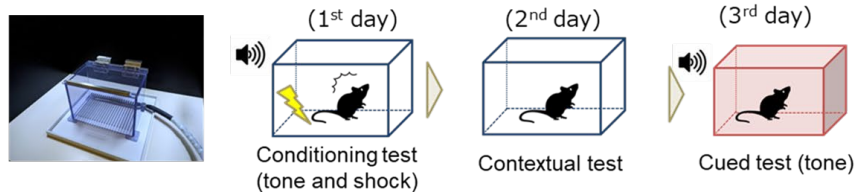


図 1. 行動試験結果の概要

N=8, Mean $\pm$ S.E., P value (Dunnnett's test)
 $p < 0.05^*$ vs Control