

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動解析と神経科学的物証の収集」

研究分担者 齊藤 洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積み上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。

発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

本分担研究では、この目的の達成に向け、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を検討した。令和6年度(今年度)は、昨年度、幼若期のマウスに反復吸入曝露を実施し、成熟後に行動異常(記憶異常)が認められたキシレン曝露群の脳サンプル(海馬歯状回)について免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度(20 ppm)曝露群において、新生ニューロンマーカーであるDCXおよびNeuroD1陽性細胞数の減少が疑われ、検出された行動影響と関連する神経細胞への影響が示唆された。また、今年度モデル揮発性物質として用いたトルエン(0、0.7、7 ppm)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施した。そして、マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を実施した。その結果、トルエン曝露群において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が認められた。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後(遅発性)の影響として、昨年度解析を行ったキシレンと同様、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常を誘発することが確認され、トルエンの生後脳発達への有害性が示唆された。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。ヒトを含む哺乳類において、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る。そのため、外因性の化学物質の曝露によって、その制御シグナルがかく乱され、発達中の神経毒性や、成熟後の脳高次機能への悪影響が懸念される。

神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、この評価に向けた、より迅速で、低コスト、かつ省動物に資する新規評価手法の開発が急務であり、特に発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな課題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群に関連する動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてモデル化学物質の吸入曝露により、成熟後にDNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出している。また、脳の海馬領域の網羅的遺伝子発現変動解析により、それらの影響をシグナルネットワークとして検出してきた。

本分担研究では、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を把握する事を目的とし、将来的な *in vitro* 試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

B. 研究方法

生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、キシレン吸入曝露による情動認知行動解析：

昨年度の解析にて行動異常(記憶異常)が認められたキシレン曝露群について、行動解析後に10%中性緩衝ホルマリンにて固定した成熟マウス(13週齢)の脳組織からパラフィン切片(10 μ m)を作製し、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 $^{\circ}$ C、30 分で抗原賦活化処理し、Blocking One と共に 4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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-NeuroD1 (Abcam)、rabbit monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN; Abcam)、goat polyclonal anti - SRY - related HMG - box 2 (SOX2; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP; Abcam)。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 および 594 標識抗体 (Invitrogen) を用い、4 $^{\circ}$ Cで2時間処理した。核は Hoechst 33342 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。

生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、トルエン吸入曝露による情動認知行動解析：

生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究の条件に基づいた 22 時間/日 $\times$ 7 日間反復曝露のプロトコルにより実施した。曝露濃度は、先行研究に基づき、長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度として設定した。また、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を実施した。この時期は、シナプスの刈り込みによる神経回路の調整がなされる時期と考えられている。

吸入曝露終了後、マウスが成熟後(12週齢時)に自発運動量、情動行動、学習記憶能に着目し、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からなる行動試験バッテリーを実施した。

(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の配慮を十分行い、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. 研究結果及び考察

令和6年度(今年度)は予定通り、トルエン0.7

および 7 ppm（それぞれ現在の指針値の10 倍、100 倍程度の濃度）について、生後発達期（幼若期）（2～3週齢）雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施し、成熟後（12週齢時）に情動認知行動を 3 種類の試験により解析した。行動解析の結果、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、コントロール群と比較して、トルエン曝露群において有意な差は認められなかったが（図1、2）、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、条件付け時の学習（短期記憶）は成立しているものの、トルエン0.7 ppm曝露群では空間-連想記憶の有意な低下が、トルエン7 ppm曝露群では空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められた（図3）。すなわち、キシレンの吸入曝露と同様、生後発達期におけるトルエンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に記憶への影響が示唆された。音-連想記憶試験については、有意差は認められなかったものの、トルエン7ppm曝露群における音-連想記憶が低下傾向にあり、初期反応（記憶の想起）の誘発自体は保たれている一方で、恐怖記憶の保持または持続的な想起過程に障害が生じている可能性が考えられた。また、両曝露群において、空間-連想記憶試験において有意差が認められたことから、特に、空間記憶の責任部位である海馬への影響が考えられた。本行動試験バッテリーでの変化の比較を、コントロール群における各試験項目の平均値を100%とした場合の、曝露群における平均値の逸脱度を示すレーダー図として示す（図4）。また、キシレン吸入曝露にて得られた脳サンプルのうち、海馬歯状回について、免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度（20 ppm）曝露群において、新生ニューロンマーカーであるDCXおよびNeuroD1陽性細胞数の減少が疑われ（図5）、検出された行動影響と関連する神経細胞への影響が示唆された。

D. 結論

令和 6 年度（今年度）、トルエン（0、0.7、7 ppm）について、22 時間/日×7 日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。

今回の結果から、昨年度行ったキシレンでの行動影響と同様、トルエンの生後発達期における曝露により、DNT の特徴の一つと考えられる行動異常が確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。キシレン曝露群の海馬歯状回においては、新生ニューロンマーカーである DCX および NeuroD1 陽性細胞数の減少が疑われ、その他分化マーカーを含め、引き続き追加データを取得するとともに、トルエンについても同様の解析により、類似した影響の特定を試みる必要がある。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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）

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. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

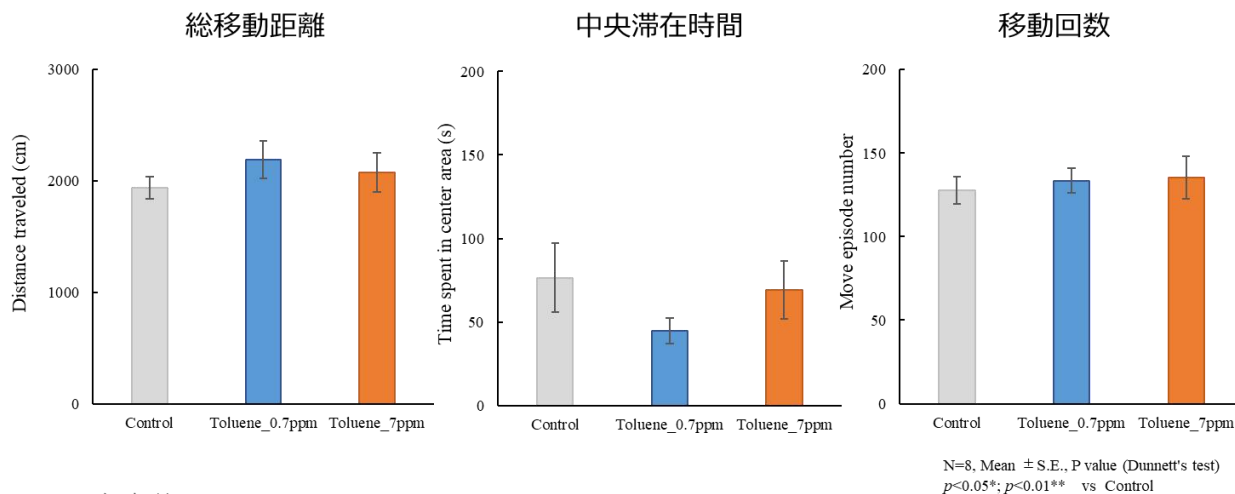
なし

22時間7日間 トルエン0.7および7ppm 吸入曝露 オープンフィールド試験結果

測定時間: 10分

検定項目

- OF-DIS: 総移動距離
- OF-C-TIME: 中央滞在時間
- OF-N: 移動回数



● 有意差なし

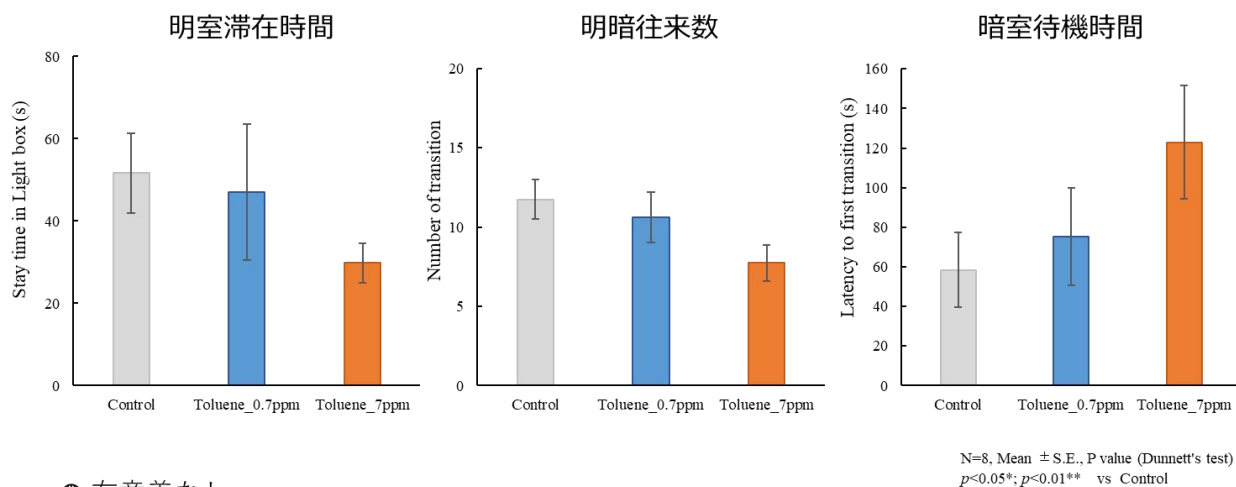
図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

22時間7日間 トルエン0.7および7ppm 吸入曝露 明暗往来試験結果

測定時間: 5分

検定項目

- LD-L-TIME: 明室滞在時間
- LD-N: 明暗往来数
- LD for L: 暗室待機時間



● 有意差なし

図 2. 明暗往来試験の結果まとめ

22時間7日間 トルエン0.7および7ppm 吸入曝露

条件付け(FZ1)、翌日以降に空間-連想記憶試験(FZ2)と音-連想記憶試験(FZ3)の結果

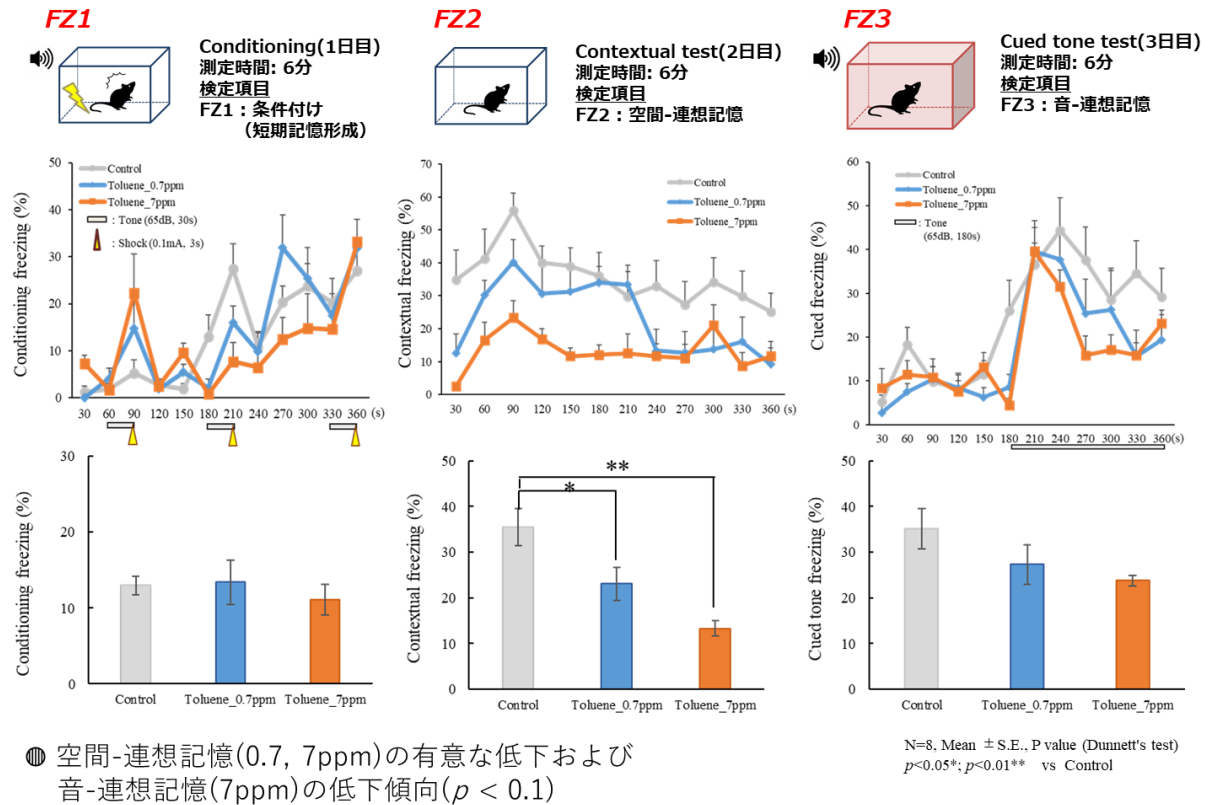


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

吸入曝露による情動認知行動解析を元に行動様式の逸脱度(平均値)を示すレーダー図(Control=100%)

(トルエン0.7および7ppm 22時間7日間吸入曝露による情動認知行動影響のまとめ)

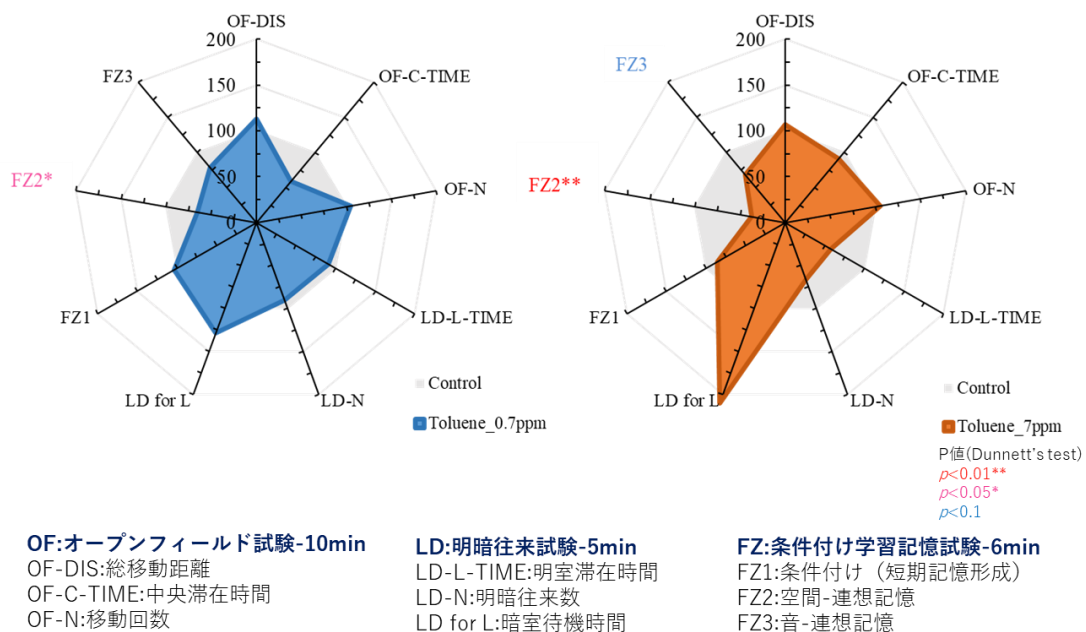


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)

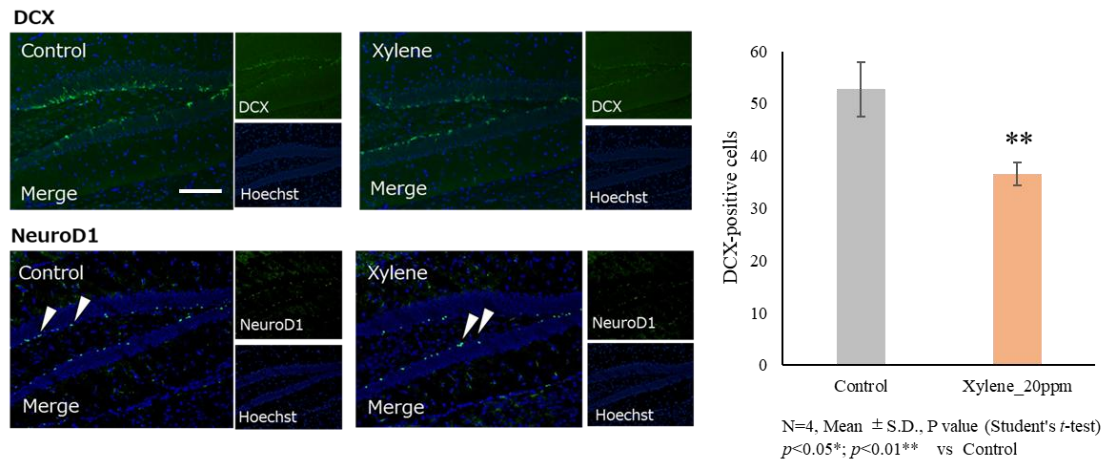


図 5. キシレンを曝露したマウスの海馬歯状回における免疫組織化学