

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：「吸入曝露実験の実施」

研究分担者	西村 拓也	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	杉本直樹	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	藤原恒司	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部

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。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。

一方、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、この発達期DNTにおける目的の達成に向け、生後発達期の雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である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。その結果、吸入チャンバー内の被験物質（ホルムアルデヒド）濃度について、目標曝露濃度1および10 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、 1.05 ± 0.04 (1.00～1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58～11.55 ppm)であり、ほぼ目標濃度で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のホルムアルデヒド濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、化学物質曝露による胎生期あるいは生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害作用と説明される。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となっている。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(SH)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た。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。これら独自技術を用いることで、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神経科学的データを収集する。

本分担研究では、この目的の達成に向け、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常を誘発したモデル動物作出のため、生後発達期(幼若期、2週齢)の雄性マウスを対象とし、先行研究での条件に基づいた22時間/日×7日間反復曝露実験(3用量、3群構成、各群8匹)を実施する。

B. 研究方法

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

雄性マウス(幼若期、2週齢)を対象とした22時間/日×7日間反復曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施した。実験スケジュールの概要は図1に示した。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行った。

令和7年度(今年度)のモデル物質はホルムアルデヒド(Formaldehyde; 分子量: 30.03, CAS No.: 50-00-0)とし、試薬としてホルムアルデヒド液(カタログ番号: 064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度36.0~38.0%、ロット番号: SEK3790、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。ホルムアルデヒドの曝露濃度は先行研究の結果から、1および10

ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が0.08 ppmであることから、この指針値のそれぞれ10および100倍程度ということとなる。

<曝露濃度設定根拠>

1)ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.08 ppmである。これを受け、先行研究ではSHレベルの10倍程度の濃度(1 ppm)を含む吸入曝露群を設定し実験を実施しており、今回の実験での低濃度とすることで、先行研究におけるデータとのブリッジングを考慮した。2)また、同様に先行研究にて文献調査した、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験結果から、ホルムアルデヒド吸入曝露では上気道(特に鼻腔)の局所影響が主要な毒性として報告されている。短期曝露の検討として、ラットにおいて0、0.5、2、6、15 ppmを3日間(6時間/日)曝露した場合、15 ppmを単回6時間曝露したラットの鼻甲介において急性の細胞傷害が観察され、追加曝露により毒性反応が軽度の鼻炎から重度の潰瘍形成へ進展することが記載されている(Swenbergら, 1983)。一方、ラットおよびマウスを用いた長期吸入試験(0、2.0、5.6、14.3 ppm、6時間/日、5日/週、24か月)では、鼻部局所病変が用量依存的に報告され、マウスでは中・高濃度群で病変が観察されている(Kernsら, 1983)。

情動認知行動解析を考慮すると、げっ歯類において鼻部局所刺激・傷害が認められることを考慮した15 ppm未満の濃度域が望ましく、また、生後発達期への曝露であることも考慮し、「我々の先行研究における濃度設定において観察された影響、および文献調査に基づき、長期吸入曝露実験においても一般状態に異常が認められない条件」、という観点から、本実験でのホルムアルデヒドの濃度設定を行った。

この実験部分は、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の齊藤洋克主任研究官、菅康佑氏、横田理室長の協力を仰いだ。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバ

ブリングし気化させる方法により行った。

ホルムアルデヒド濃度は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管 (LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号:505331、Supelco 社)を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間 (曝露開始から曝露停止まで) に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 2 本、曝露群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ30NII および MP-Σ300NII、柴田科学株式会社製)を用いて、吸入チャンバー内の空気を吸引した。ホルムアルデヒドは、捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNPH) と反応し、ホルムアルデヒド-2,4-DNPH として捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド-2,4-DNPH は、アセトニトリル (LC/MS 用、カタログ番号:01033-76、関東化学 (株)) 約 90mL により抽出してメスフラスコで 100 mL に定容し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器を接続した LC-20AD システム一式、(株)島津製作所製)により HPLC 分析を実施した。なお、移動相にはアセトニトリルとオルガノ (株)製超純水装置 PURELAB flex で精製した超純水を用い、その組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は 1 mL/min とした。その他分析条件について、カラムは COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mm φ×250 mm、粒径：5 μm、ナカライテスク社製)、検出波長は UV 360 nm、試料注入量は 2~10 μL とした。また、検量線はホルムアルデヒド-2,4-DNPH 標準原液 (カタログ番号：16120-96、関東化学 (株))を用い、ホルムアルデヒド量として 0.5~100 ng の範囲で検量線を作成した。この分析部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の杉本直樹部長、酒井信夫室長及び、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

(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. 研究結果及び考察

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

令和7年度 (今年度) は予定通りホルムアルデヒド (0、1、10 ppm) (1および10 ppmはそれぞれ現在の指針値の10および100倍程度の濃度) について、雄性マウス (幼若期、2週齢) を対象とした22時間/日×7日間反復曝露 (3用量、3群構成、各群8匹) を実施した (図1)。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度1および10 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差 (最低~最高値) は、 1.05 ± 0.04 (1.00~1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58~11.55 ppm) であった (図2)。

D. 結論

令和7年度 (今年度) は、ホルムアルデヒドについて、情動認知行動解析のための吸入曝露実験として、目標曝露濃度下、22時間/日×7日間反復曝露を実施した。その結果、それぞれ目標曝露濃度にて、マウスに安定して吸入曝露することができた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Saito H, Suga K, Fujihara K, Mutsuga M, Yokota S, Nishimura T, Kitajima S, Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. *Experimental Animals*, in press

T. Nishimura, Y. Okubo, M. Naota, Y. Suzuki, Mutsumi Suzuki, K. Watanabe, T. Nakazawa, M. Kuwagata, H. Onodera, Y. Hirabayashi, Challenges in the Nonclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals and Perspectives for Revision of the ICH S6 Guideline Based on Analysis of Approved Products in Japan, *Translational and Regulatory Sciences*, in press

2. 学会発表 (抜粋)

西村拓也、平林容子、小川久美子、高橋祐次、角田聡、鈴木睦、佐藤玄、豊田武士、高橋祐次、『毒性試験用語集』の改訂と利活用可能なデータベースの構築の取り組み、日本毒性学会学術年会 第52回、2025年7月4日、沖縄

西村拓也、高橋祐次、豊田武士、角田聡、鈴木睦、
佐藤玄、小川久美子、山田隆志、平林容子、毒性
試験用語の標準化に向けた用語集改訂と継続的
な更新が可能なデータベース化への取り組み、医
薬品毒性機序研究会 第8回、2025年12月11日、
札幌

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

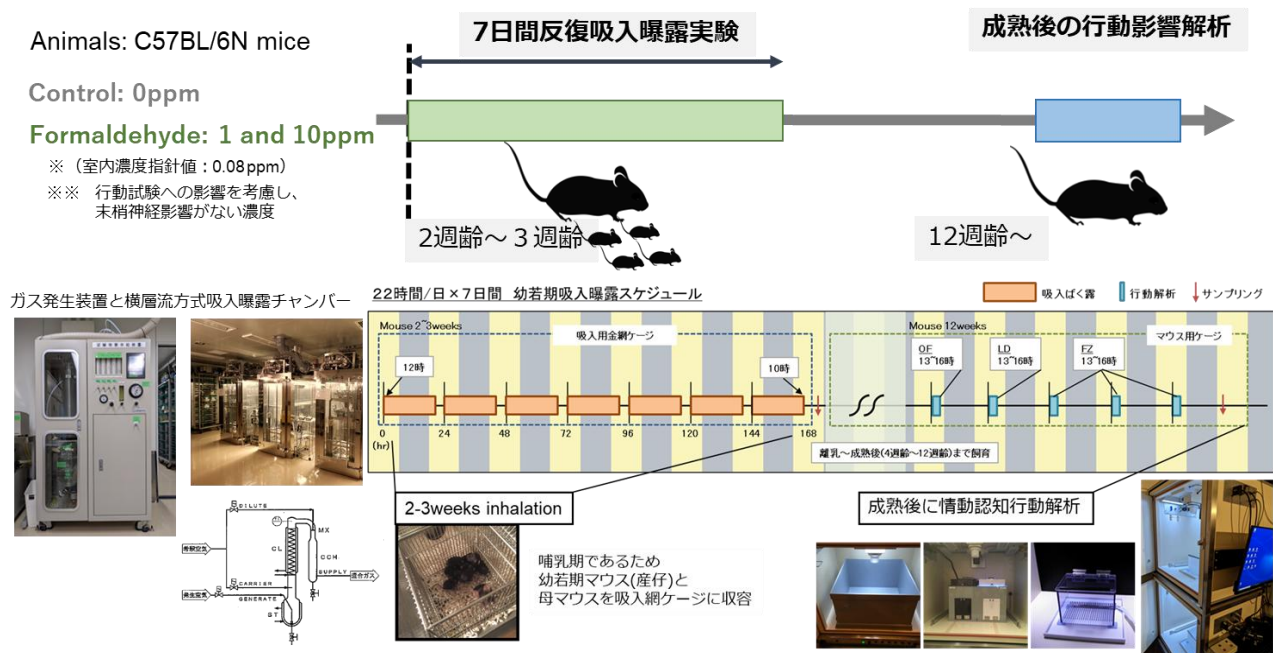


図1 実験スケジュールの概要

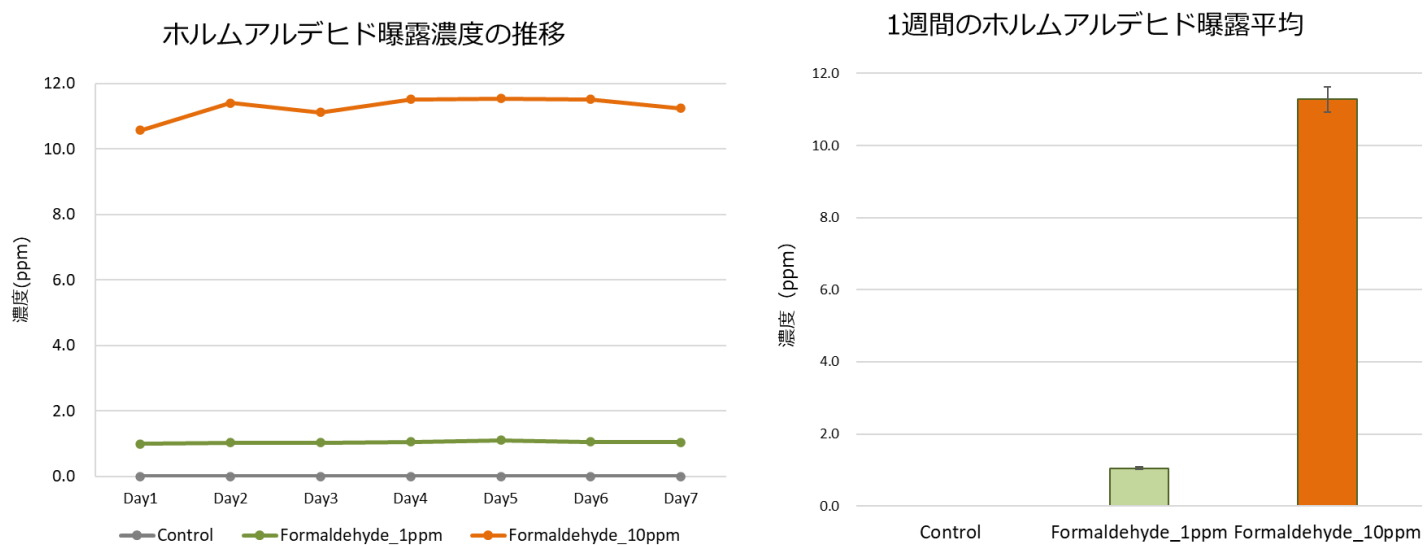


図2 ホルムアルデヒド曝露濃度の測定結果：情動認知行動解析のための 22 時間/日×7 日間反復曝露 (平均値±標準偏差)