

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り、成熟後の中枢神経系への遅発影響を評価し、当該物質の脳発達への影響を明らかにすることを目的とした。令和7年度(今年度)は、昨年度に幼若期マウスへ反復吸入曝露を実施し、成熟後に行動異常(記憶異常)が認められたトルエン曝露群の脳サンプルについて、免疫組織化学による解析を実施した。その結果、細胞増殖マーカーについて、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られ、令和5年度に実施したキシレン曝露マウスと同様に、検出された行動影響と関連する海馬への影響が考えられた。また、モデル揮発性物質として用いたホルムアルデヒド(0、1、10 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、ホルムアルデヒド両曝露群では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。また、高用量曝露群(10 ppm)では、明暗往来試験において暗室待機時間の増加傾向が認められ、これらの結果から不安関連行動への影響が示唆された。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後の遅発性影響として、キシレン、トルエンとは異なる影響ではあるものの、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常を誘発し得ることが示され、ホルムアルデヒド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ことを目的とし、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、トルエン吸入曝露による情動認知行動解析：

海馬歯状回における神経新生関連変化については、キシレン曝露群での新生ニューロン(DCX)等の解析結果を踏まえ、本年度は同部位への影響を異なる観点から把握する目的で、比較的初期段階の細胞動態に着目した免疫組織化学的解析を実施した。昨年度の解析にて行動異常(記憶異常)が認められたトルエン曝露群について、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 rabbit polyclonal anti-Ki67 (Abcam)を用いた。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、ホルムアルデヒド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重篤な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

令和7年度(今年度)は予定通り、ホルムアルデヒド1および10ppm(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において、コントロール群と比較して、ホルムアルデヒド両曝露群において、中央滞在時間の有意な減少が認められた(図1)。また、同じく情動行動への影響を検出する明暗往来試験では、ホルムアルデヒド高用量曝露群(10 ppm) において、暗室待機時間について増加傾向が認められた(図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は、コントロール群と比較して、ホルムアルデヒド曝露群において有意な差は認められなかった(図3)。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、キシレン、トルエンとは異なる影響ではあるものの、成熟後の行動、特に不安関連行動への影響が示唆された。本行動試験バッテリーにおける変化の全体像を示すため、コントロール群の各試験項目の平均値を100%とした場合の曝露群の平均値の逸脱度を、レーダー図として示した(図4)。また別途、過年度に実施したトルエ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として、細胞増殖マーカーであるKi67を用いた検討を進めた結果、現時点では定性的観察の段階ではあるが、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られており、今後詳細に検討する必要があると考えられた。

D. 結論

令和7 年度(今年度)、ホルムアルデヒド(0、1、10 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、ホルムアルデヒド曝露群(1、10 ppm) では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。加えて、ホルムアルデヒド10 ppm 曝露群では、明暗往来試験において暗

室待機時間の増加傾向が認められた。これらの結果から、生後発達期のホルムアルデヒド曝露による、成熟後の遅発性影響が示唆された。これまでに検討したキシレンおよびトルエンでは条件付け学習記憶試験において記憶異常が認められた一方、本年度に検討したホルムアルデヒドでは、オープンフィールド試験における結果を主とした不安関連行動への影響(不安の亢進) が示唆された。これらの被験物質はいずれも生後発達期曝露により成熟後の行動影響を生じ得る点で共通しており、生後発達期の脳に対する共通した影響基盤の存在が示唆された。一方で、行動影響の現れ方には差異がみられたことから、各モデル物質の作用特性の違いを反映して、物質ごとに影響を受けやすい神経機能が異なる可能性が考えられた。今後は、関連指標との関係も含めて、これらの点を慎重に検討する必要がある。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *Exp. Anim*, in press.

2. 学会発表

齊藤洋克, 菅康佑, 藤原恒司, 六鹿元雄, 横田理, 西村拓也, 北嶋 聡: 生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析, 第52回日本毒性学会学術年会(2025. 7. 3, 沖縄)

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

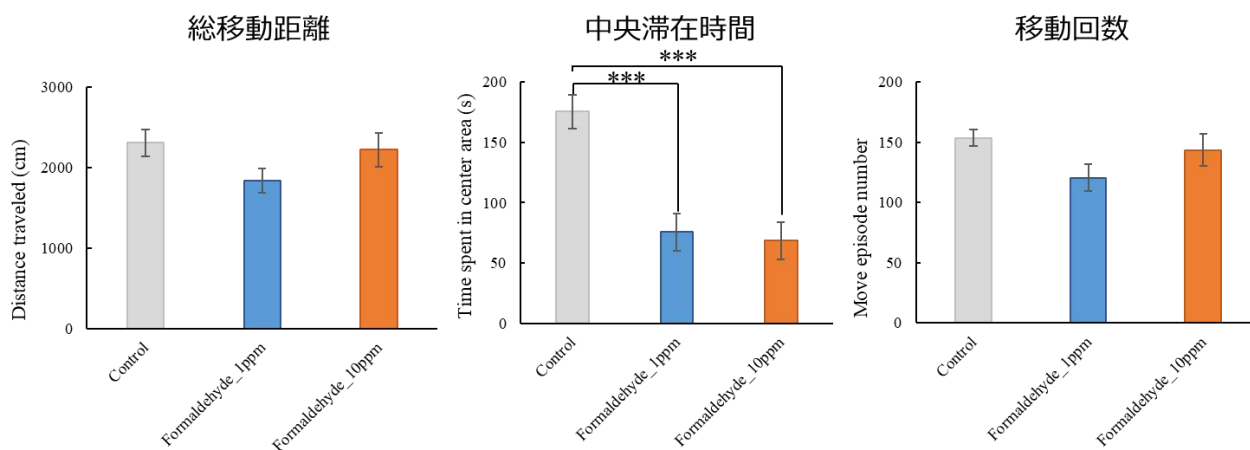
なし

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 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



N=8, Mean $\pm$ S.E., P value (Dunnett's test)
 $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$ vs Control

● ホルムアルデヒド曝露群において、中央滞在時間の有意な減少

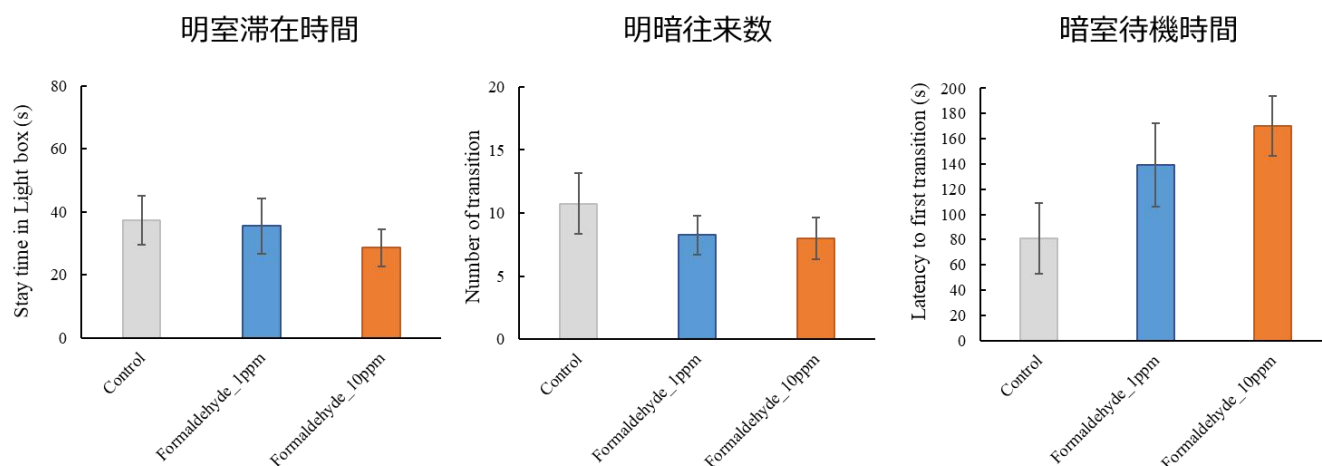
図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 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



N=8, Mean $\pm$ S.E., P value (Dunnett's test)
 $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$ vs Control

● ホルムアルデヒド10ppm曝露群において、暗室待機時間の増加傾向($p < 0.1$)

図 2. 明暗往来試験の結果まとめ

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 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

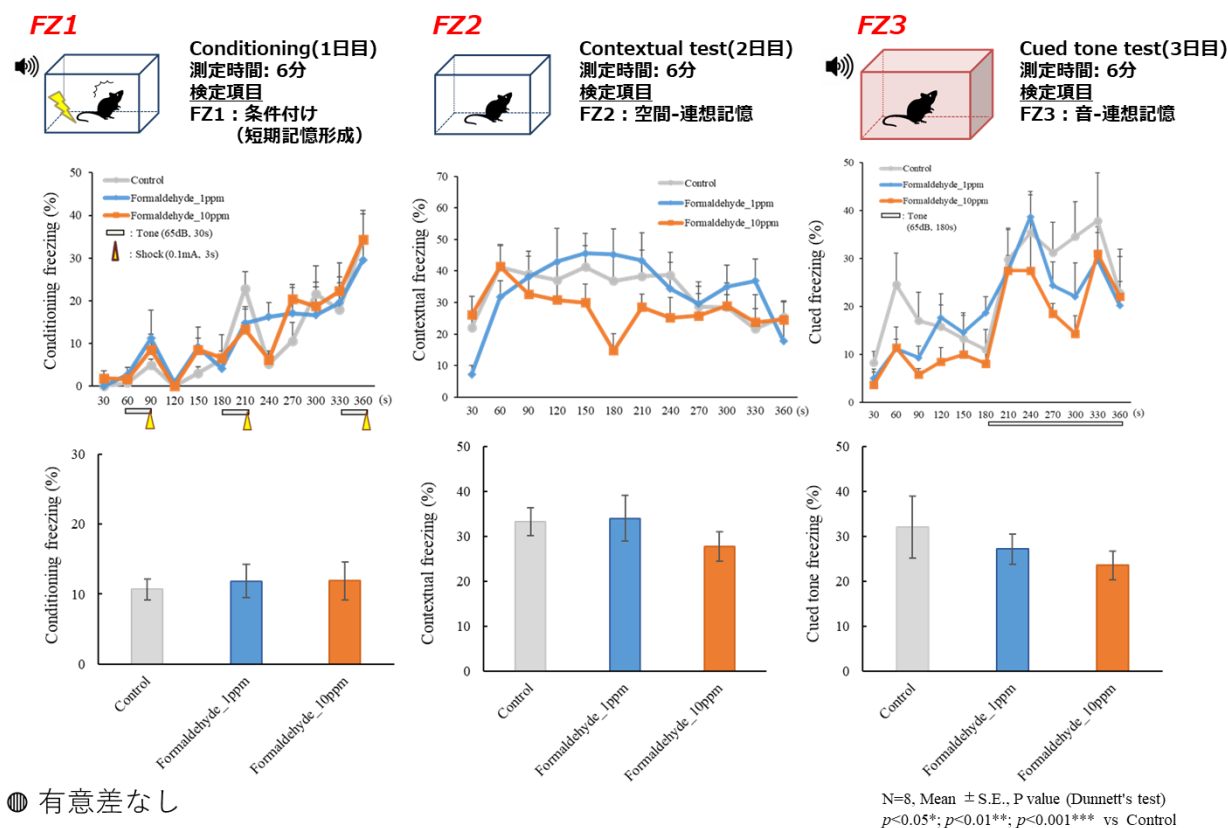


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

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%)

(ホルムアルデヒド1および10ppm 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)

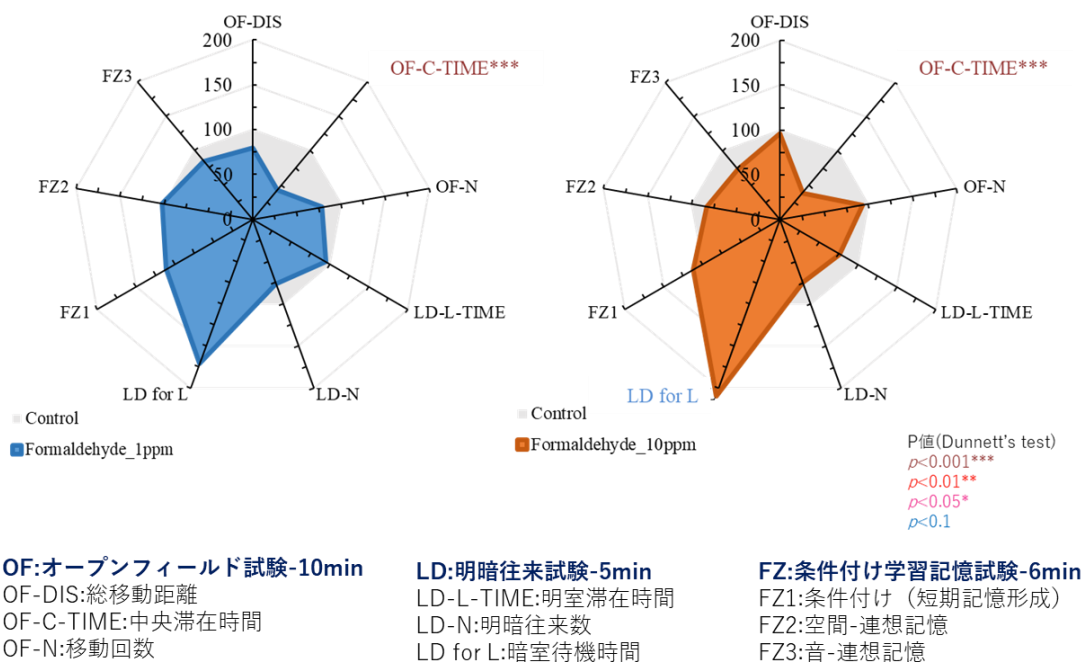


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)