

生体情報の統合的評価を基盤とした急性毒性試験の基準策定と代替法開発に資する研究
-人の健康影響評価の精緻化と動物福祉を充足する試験法開発-
(25KD1003)

分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性試験発現機序の解析

研究分担者: 齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第三室 主任研究官

研究要旨

急性毒性試験は、化学物質の有害性を把握するための重要な試験であるが、死亡をエンドポイントとする性質上、動物福祉への配慮に加え、ヒト健康影響をより精緻に評価する観点からも、新たな評価法の構築が求められている。本研究では、死亡に依存しない急性毒性評価指標の探索に向け、テトロドトキシン(TTX)を単回経口投与したマウス由来脳サンプルを用い、急性毒性に伴う中枢神経系への影響を免疫組織化学的に検討した。その結果、主要な神経系細胞分化マーカーについて、発現および局在を安定して検出できることが確認できた。また、MAP2免疫染色により海馬内の複数領域を観察したところ、TTX投与24時間後の高用量群において、海馬の一部領域でMAP2陽性構造の配列変化を示唆する像が観察された。本所見は定性的・探索的なものであり、MAP2単独で急性毒性発現機序や神経変性を結論づけるものではないが、急性毒性に伴う中枢神経系組織応答を捉える候補所見となり得る。今後は、海馬各領域での定量解析に加え、神経活動変化、神経炎症、細胞傷害等に関連するマーカーとの組み合わせにより、バイタルサイン変化と中枢神経系組織応答との関連性を詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

急性毒性試験は、化学物質の有害性を把握するための重要な試験であるが、死亡をエンドポイントとする性質上、動物福祉への配慮に加え、ヒト健康影響をより精緻に評価する観点からも、新たな評価法の構築が求められている。また、近年では、毒性発現に至る過程を生体応答として把握し、早期かつ客観的な評価指標へ結び付けることの重要性が高まっている。このような背景のもと、脳波、心電図、体温、行動等のバイタルサインや生体情報を統合的に評価し、死亡に依存しないエンドポイントへと展開する試みが進められている。こうした中で、被験物質投与に伴って観察される脳波等のバイタルサインとのブリッジングに資するデータを収集し、標的臓器や致死性発現の理解につなげることは重要な課題である。中枢神経系は、生命維持に関わる機能制御や全身状態の

変化とも密接に関与しており、脳内で生じる細胞応答や組織学的変化を把握することは、急性毒性発現の理解において有用であると考えられる。また、これらの知見はヒトへの外挿性を検討する上でも重要である。本年度は、分担研究として、被験物質としてフグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)投与マウス由来の脳サンプルを用いた、急性毒性に伴う中枢神経系変化の把握を目的とする。

B. 研究方法

先行研究において、脳、肝、腎を対象とした網羅的遺伝子発現変動解析により、急性毒性発現機序に関わる情報が得られていることから、今回は、その先行研究で得られた、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX、生化学用; ロット番号: LKG5746; 純度: 95.7 % [HPLC]、富士フイルム和光純薬(株))を単回経口投与した C57BL/6J マウス

(12 週齢)の脳サンプルを用いた、各種神経マーカーとストレス応答、神経炎症に関わるタンパク質の組み合わせによる免疫染色条件の検討を進めた。TTX の投与用量は 0、30、100 および 300 $\mu\text{g/kg}$ 、サンプルリングは投与後 2、4、8 および 24 時間後であった。溶媒には、0.1%酢酸を含む 0.5%メチルセルロース (MC)液(0.5w/v% メチルセルロース溶液 400cP, 滅菌済;富士フイルム和光純薬(株), pH3.5)を用いた。10%中性緩衝ホルマリンにて固定した脳組織について、パラフィン切片(10 μm)を作製し、各細胞の分化マーカーを用いた免疫組織化学染色を行った。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(ナカライテスク)により 90°C、30 分で抗原賦活化処理し、Blocking One(ナカライテスク)と共に 4°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°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-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)、mouse monoclonal anti-myelin associated glycoprotein (MAG; Abcam)、rabbit polyclonal anti-MAP2 (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°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。

C. 研究結果

本検討では、ストレス応答や神経活動変化などの影響を受け得る領域であることに加え、領域構造が明瞭であることから、急性毒性に伴う中枢神経系組織応答を探索する対象として海馬に着目した。免疫組織化学の結果、当該サンプルにおいて、成熟ニューロン、新生ニューロン、神経幹細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等の主要な細胞分化マーカーについて、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、MAP2 の染色により海馬内の複数領域を観察したところ、TTX 投与 24 時間後の 300 $\mu\text{g/kg}$ (高用量) 群において、海馬の一部領域で MAP2 陽性線維構造の配列が不均一となり、層状構造の不明瞭化を示唆する像が観察された。特に CA1 領域周辺では、MAP2 陽性構造の配列変化が比較的目立って認められた。一方、CA3 領域においても染色パターンのばらつきは観察されたが、現時点の観察では、CA1 領域周辺で認められた変化がより目立つ傾向にあった。

D. 考察

本検討では、TTX 投与 24 時間後の高用量群において、海馬内の一部領域で MAP2 陽性構造の層状配列の乱れを示唆する像が観察され、特に CA1 領域周辺で比較的明瞭であった。MAP2 は樹状突起構造を反映する細胞骨格関連タンパク質であり、神経炎症や細胞傷害等に伴う二次的な構造変化を捉える指標となり得ることから、本所見は TTX 急性毒性に伴う中枢神経系の組織応答を評価する候補所見となり得る。

一方で、MAP2 は樹状突起構造変化の指標として有用であるが、単独で神経細胞死や不可逆的な神経変性を結論づけることも困難である。したがって、今後は神経細胞、グリア反応および細胞傷害、神経炎症に関連するマーカーと組み合わせることで、MAP2 陽性構造の変化がどのような急性生体応答に伴うものかを明らかにする必要がある。また、急性毒性発現過程をより詳細に把握するには、投与 24 時間後に認められる構造変化だけでなく、より早期に変動する分子・細胞応答マーカーの探索も重要である。これらの検討により、脳波、心電図、体温、行動等のバイタルサイン変化と中枢神経系の組織応答を結び付け、死亡に依存しない急性毒性評価指標の構築につながる可能性がある。

D. 結論

本検討により、TTX 投与マウス由来脳サンプルにおいて、主要な神経系細胞分化マーカーの免疫組織化学的検出が可能であることを確認した。また、

TTX 投与 24 時間後の高用量群では、海馬内の一部領域、特に CA1 領域周辺において、MAP2 陽性構造の配列変化を示唆する像が観察された。

今後は CA1 および CA3 を含む海馬各領域での定量解析ならびに他マーカーとの組み合わせにより、TTX 急性毒性に伴う中枢神経系組織応答としての意義を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

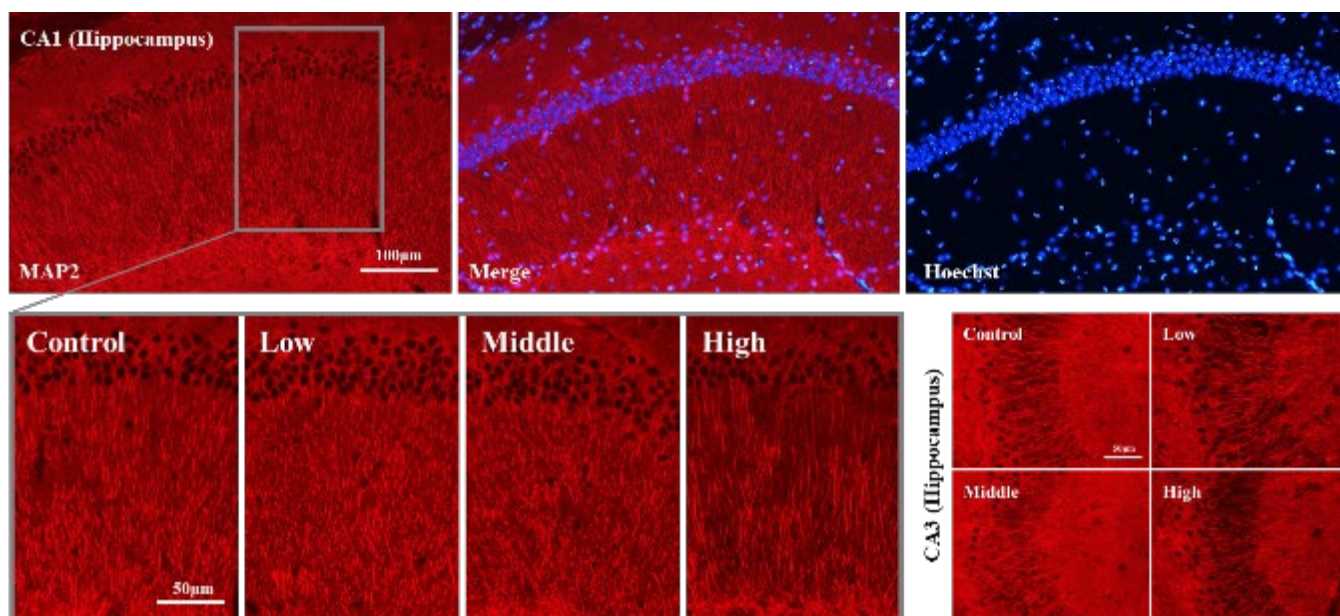


図 1 TTX 投与 24 時間後の海馬 CA1 および CA3 領域における MAP2 免疫染色像