

発達神経毒性研究

- 現状と課題 -

住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
吉岡孝文
小林久美子
串田昌彦
池田真矢
佐々木まどか
辻良三

Developmental Neurotoxicity Study - Current and Problems -

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Environmental Health Science Laboratory
Takafumi YOSHIOKA
Kumiko KOBAYASHI
Masahiko KUSHIDA
Maya IKEDA
Madoka SASAKI
Ryozo TSUJI

Developmental neurotoxicity (DNT) is an adverse effect of xenobiotics on morphology and neurobehavioral functions of the developing nervous system before or after birth. In 1991, U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) first issued a standard protocol for evaluation of DNT in human health risk assessment. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has been now refining the new guideline for DNT testing. Last decade, there are increasing social concerns about the effect of environmental chemicals on children health, including the reproductive and neurobehavioral functions. Evaluation of the developmental neurotoxicity of chemicals will be close up as an important issue for human health risk assessment. It is, however, evident that the developmental neurotoxicity study is still now immature and growing with progress of neuroscience study. In these conditions, we make up our test procedures for the guideline study and try to establish more reliable assessment of chemical effects for children health with a current scientific level of neuroscience.

はじめに

発達神経毒性(Developmental Neurotoxicity)は、重金属や化学物質などの曝露による胎児期あるいは生後発達期の神経系の構造および機能に対する有害作用である。妊娠および授乳期の母体が毒性物質に曝露された場合、胎盤や母乳を介して間接的に胎児や乳児の神経系、特に脳の発達が影響されることがある。脳は、行動や学習、記憶などの神経精神機能の中核であり、発達期の脳に対する影響は児の成長とその結果の成人としての存在に重大な影響を及ぼすことが考えられる。

わが国では、メチル水銀による水俣病が歴史的な公害問題としてよく知られており、メチル水銀に汚染された魚介類を摂取した母親から生まれた子供たちに重篤な神経機能障害(胎児性水俣病)が認められた。より身近な問題としては、妊娠中の母親の飲酒

による胎児性アルコール症候群が知られている。胎盤を通して胎児に到達したエタノールは、脳の神経細胞の発達を障害して、生まれてきた子供の行動異常を惹起することがある。米国では、妊娠中の母親の麻薬中毒に起因する子供の神経行動の障害が大きな社会問題として長く注目されつづけている。1997年のコルボーン博士らの著書「Our Stolen Future」の出版は、化学物質によるヒトの生殖機能を含む次世代、即ち子供の健康への影響に対する社会的関心を世界的に高める結果となった¹⁾。このような社会環境の中で、私たちの日常生活で種々多様に用いられている数多くの化学物質のヒト健康影響に関する安全性、特に子供の脳や心の発達に対する影響に関心が高まっている。

化学物質のヒト健康影響に対する安全性の評価は、農薬、医薬品、一般化学物質などのカテゴリーの中で、それぞれ各国の行政当局の様々な規制のもとに

置かれている。化学物質、特に農薬および一般化学物質の発達神経毒性の評価は、先行してこれを実施してきた米国に続いて、経済開発協力機構(OECD)における発達神経毒性試験ガイドラインの制定を目前に控えている。子供の健康に対する影響が注目される社会的情勢の中で、化学物質の発達神経毒性研究は、当局のより厳格な規制のもとに、より精度の高い評価を求められている。

私たちは、2000年度以降、化学物質に関する発達神経毒性ガイドライン試験法の確立と発達神経毒性評価の基盤研究に取り組んでいる。本稿では、農薬や一般化学物質を中心とした化学物質の発達神経毒性試験ガイドラインの実際と発達神経毒性研究への私たちの取組みについて紹介する。

発達神経毒性のポテンシャル

1. 脳の発達におけるポテンシャル

脳は、胎児期の初期から出生後にかけて長い期間を通して形態学的および機能的に発達する。一般に、胚初期発生の器官形成期に脳原基(神経管)の形成が障害されたり、細胞分裂阻害剤などによって神経細胞の増殖や移動が障害されると、無脳症、単脳症、小頭症などの奇形と呼ばれる外形的な形態異常が生じることが多く、機能にも重篤な障害を生じ易い。これに対して、脳発達のより後期の神経細胞の分化・成熟期は、神経細胞が神経伝達情報を送り出す神経軸索を伸長させ、一方では樹状突起と呼ばれる神経伝達情報の受け手となる神経突起を大きく発達させている時期である。これらの神経軸索と樹状突起の間には神経細胞間の情報伝達の場となるシナプスと呼ばれる特殊な構造が形成される。この分化・成熟期には、シナプスが著しく増加するとともに、神経伝達を効率的に行う構造として神経軸索を包む髄鞘(ミエリン鞘)が神経グリア細胞の1つである稀突起膠細胞によって形成される。このような神経細胞の構造と機能、神経回路の発達する時期には、非常に複雑かつ多様な細胞の反応や生理が関係しており、脳の発達障害を生じさせる可能性のある多くの作用点が存在することになる。従って、短期間の特定の障害作用により、形態学的な異常は比較的軽微あるいは形態学的には確認できない程度のものであるにも関わらず、行動や学習・記憶などのような脳の機能的な障害を生じる場合がある。また、それらの影響はその個体が成長したのちに初めて顕在化するような場合も生じてくる。

また、脳は、構造と機能に関して非常に部位特異性が顕著な器官であり、関連し合う脳部位の神経連絡が機能的な発達の重要な要素となっている。脳の各部位における神経細胞の増殖・移動と分化・成熟期

は時間軸において必ずしも同調しているわけではない。脳の中でも、呼吸や血液循環などの生命機能の基礎となる自律的な神経機能に関する脳幹(中脳、橋および延髄)は比較的早い時期に発達する。一方、行動や学習・記憶に関する大脳の各部位や運動の調節機能に関する小脳はより遅い時期に発達する。このことは、ある特定の時期の外的要因が、非常に特異的な脳部位の構造や機能を障害することに関係している。

2. 子供の生理学的および行動的特性によるポテンシャル

「子供は小さな大人ではない」と言われる。子供は、体内に入った外来の物質に対して成人とは異なった代謝や透過性の特性を有しており、成人と比較して、子供(胎児および乳児を含む)は化学物質などのある種の外的要因に対して感受性が高く、脳の構造や機能が障害されやすい場合がある²⁾。子供では、脳と同様に、その他の器官についてもその発達が未成熟である。ある種の神経毒性物質が子供の体内に摂取された場合、肝臓における化合物の代謝が未成熟であることから、より長期間にわたって神経毒性物質に曝露される可能性がある。また、成人の脳は、よく発達した血液-脳関門によって、体内を循環する多くの神経毒性物質から比較的よく隔離・保護されているのに対して、子供、特に胎児の脳では血液-脳関門の発達が未成熟である³⁾。これらの結果、ある種の神経毒性物質は、成人では神経毒性が発現しない量の曝露によって、子供では脳の構造と機能に対する影響が発現する場合がある。

また、子供は、屋内外での活動の中で、物や自らの手を口の中に入れる行動が多いかもしれない。また、食生活では、好物などを多量に摂取するなどの特定の食物に偏重があるかもしれない。このような子供の特有の行動や嗜好に起因して、成人と比較してより高いレベルで神経毒性物質に曝露される可能性が指摘されている²⁾。

第1表は、ヒトおよび実験動物モデルにおいて発達神経毒性物質として知られている化学物質の例である⁴⁾。

第1表 ヒトおよび実験動物モデルで発達神経毒性を引き起こすことが知られている化学物質例(WHO, 2001)

化合物の分類	化合物名
アルコール類	メタノール、エタノール
金属類	鉛、メチル水銀、カドミウム
一般化学物質	PCB類、PBB類
殺虫剤	DDT、クロルデコン(chlordecone)
医薬品	バルブロン酸、フェニトイン(抗けいれん剤) アゾシチジン(azocytidine細胞分裂阻害剤)

これらの多くの場合において、児の神経学的機能に対する影響は、奇形などのようなその他の発達毒性指標が明らかに発現するより低い用量、あるいは成体に対する毒性影響を惹起する最低用量以下のレベルで認められている。

発達神経毒性ガイドライン試験

1. 発達神経毒性評価の規制動向

第2表は、神経毒性および発達神経毒性評価に関する世界の規制動向を示したものである。

米国は、農業および一般化学物質などの環境要因から子供の健康を保護することに最も先進的である。米国環境保護局(EPA)は1985年の有害物質管理法(TSCA)の神経毒性試験法の制定に引き続いて、1991年には連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法(FIFRA)において初めて発達神経毒性試験ガイドラインを制定した。このうち、National Research Councilの子供の健康影響に関する研究報告²⁾を受けて、1998年には、新しい食物安全管理法(Food Quality Protection Act, FQPA)のもとに発達神経毒性試験を含む体系的な新毒性ガイドラインを発表している。EPAは試験法ガイドラインの制定にとどまらず、1995年および1998年には神経毒性評価のための指針を発表し、このリスク評価の方針についても公表している。

第2表 神経毒性および発達神経毒性評価の規制動向

米国	1985	EPA TSCA神経毒性試験ガイドライン制定
	1991	EPA FIFRA神経毒性試験ガイドライン制定 発達神経毒性試験ガイドライン制定
	1995	EPA 神経毒性評価ガイドライン
	(1996)	(EPA Food Quality Protection Act, FQPA)
	1998	EPA OPPTS新毒性ガイドライン改定 神経毒性試験ガイドライン試験 発達神経毒性試験ガイドライン試験 (OPPTS 870.6300)
OECD	1995	28日間毒性試験ガイドライン
(EU)		(TG407)に神経毒性検査項目追加
	1997	亜急性神経毒性試験ガイドライン(TG424)制定
	1998	発達神経毒性試験ガイドライン案公表
日本	2000	新農薬ガイドラインに神経毒性試験を追加 化審法28日間毒性試験に神経毒性検査項目を追加予定

一方、OECDでは、1995年に化学物質の毒性スクリーニング的性格の強い28日間毒性試験ガイドライン(TG407)に詳細な神経毒性検査項目を追加改定したのち、1997年には亜急性神経毒性試験ガイドライン(TG424)を制定している。現在、1998年にドラ

フトとして公表された発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)が制定の最終段階にあると言われている。日本では、2000年農薬ガイドラインが見直され、新たに神経毒性試験ガイドラインが追加された。

2. 米国EPAの発達神経毒性ガイドライン試験 (OPPTS870.6300)

上述したように、OECDでもその制定が準備されているが、現時点ではEPAの発達神経毒性試験ガイドラインが発効されている唯一のものである。私たちは、まず、当局規制試験ガイドラインのもとに、化学物質の発達神経毒性評価のための試験法の確立を行った。ここでは、EPAの発達神経毒性ガイドライン試験プロトコルの概要とともに、陽性対照物質を用いて実施した私たちの検査手技の検証データを示して、重要な神経行動検査法の事例を解説する。

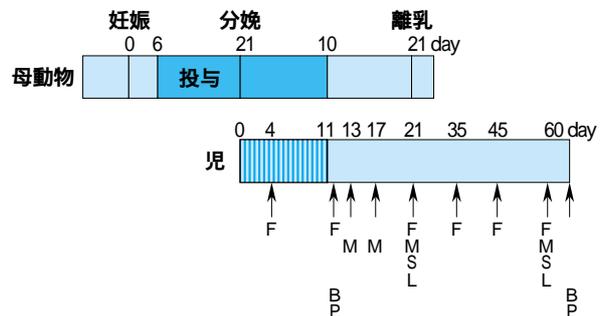
(1) 試験スケジュールと神経毒性検査項目

第1図は、EPAの発達神経毒性ガイドライン試験の試験スケジュールを示したものである。

本試験では、少なくとも投与群3群と対照群の4群の設定が求められ、動物数で見ると試験規模は母動物80匹以上(20匹以上/群)、検査対象となる児動物(生後4日目に原則として1腹雌雄各4匹に間引き)は640匹とかなり大規模試験となる。被験物質の投与は、妊娠6日から分娩後10日までの母動物に対して、基本的に経口投与が選択される。第3表に児動物の検査項目を示すとともに、神経毒性検査の実施日の例を第1図に表記している。

第1図 EPA神経毒性ガイドライン試験の試験スケジュール

神経毒性検査の実施時期：詳細な機能観察 [FOB(F)]、自発運動量(M)、聴覚性驚愕反応(S)、学習・記憶(L)、脳重量(B)、神経病理検査(P)



(2) Functional Observation Battery (FOB)

FOBは詳細な行動学的、生理的、神経学的変化を観察するもので、これらの観察の結果は各項目について定義づけられたスコアとして採点される。この

第3表 児動物の観察および検査

検査項目	検査法	観察頻度あるいは時期
死亡・毒性徴候	-	1日2回以上、週1回詳細な観察
体重	-	出生時、生後4、11、17、21日、離乳後は週1回、その後2週に1回
性成熟	包皮開裂(雄)、膈開口(雌)など	適当な時期
反射	生得反射	離乳前に2回
FOB(詳細な観察)	ケージ内の観察、手にもつての観察、アリーナ内での観察	(毒性徴候の観察として週1回)
自発運動量測定	自動記録測定装置による測定	生後13、17、21日および60±2日(試験終了時)
聴覚性驚愕反応	自動記録測定装置による測定	離乳時および試験終了時
学習・記憶	E型水迷路、明暗弁別学習	離乳時および試験終了時

観察では、経験を積んだ観察者による盲検的な実施が望まれている。これにより、影響として観察される毒性徴候は、より客観的にかつ定量的に評価される。

(3) 自発運動量測定

この検査は、自動行動記録装置を用いて、一定時間内における動物の運動性を測定するものである。装置には近赤外線センサーが一定の高さで一定間隔に組み込まれており、動物の動きはセンサーを横切ると自動的にカウントされる仕組みである。1試行60分間を10分間6ブロックに分け、その単位時間(ブロック)内での水平方向の動物の運動量(Locomotion)や立ちあがり行動(Rearing)が測定される。この検査では、動物の全般的な運動性ととも、置かれた環境や事態における動物の慣れ(馴化)や情動性を評価することができる。神経毒性評価では非常に有効なエンドポイントの一つとして推奨されている⁵⁾。しかしながら、運動活性は動物の全ての動きであり、神経系への影響のみならず、体重減少や全身性の毒性発現など他の多くの要因によって変化し得るものである。運動量および試行内での変化の様式を判別し、総合的な観点からの評価が必要である。

第2図は生後17日齢のラットに抗うつ薬ペモリンあるいは抗不安薬ジアゼパムを投与した場合の自発運動量(Locomotion)の変化を示している。対照群と比較して、ペモリン投与群では、測定した時間内を通して非常に運動性が上昇しており、馴化は認められていない。一方、ジアゼパム投与群では、自発運動量が減少していることがわかる。

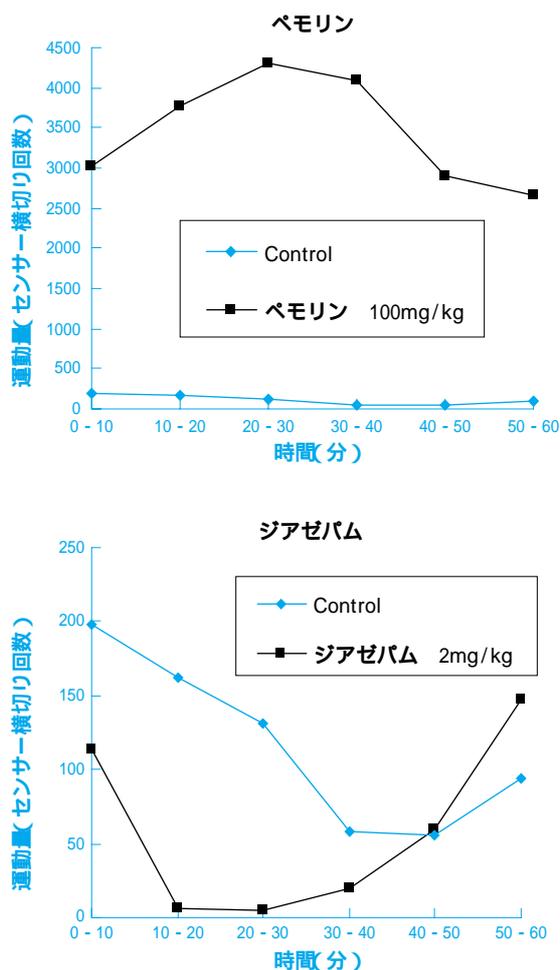
(4) 聴覚性驚愕反応検査

聴覚性驚愕反応とは、視覚的な手掛かりなしに、突然、動物に大きな音を提示した時のその音に対する動物の驚愕反応(Startle reflex)のことである。動物を防音箱の中の動物収容ホルダーに入れ、一定の音圧(120dB)の音刺激を8秒間隔で50試行提示する。その時の動物の驚愕反応(驚愕による体の動き)

の強さをピエゾセンサ(圧電素子)を用いて自動的に測定し、10試行ずつの5ブロックに分け、反応の強さの程度と経時的な変化を解析する。この検査は、音刺激に対する反応を指標とした聴覚の簡易的な測定法であるとともに、繰り返しの刺激に対する馴化をみることにより、最も単純な学習の評価法としても有用である。

第2図 自発運動量測定

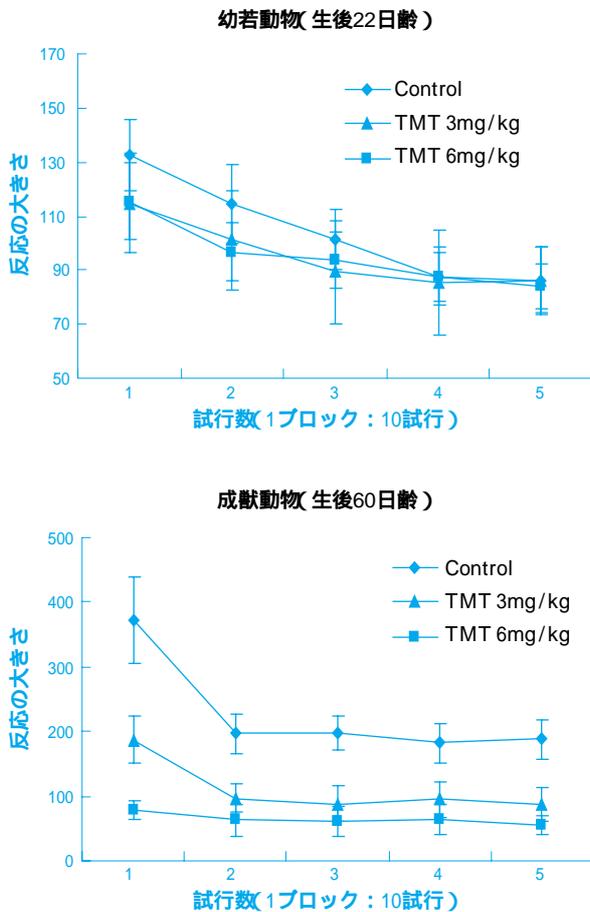
生後17日齢の幼若ラットにペモリン(抗うつ薬)あるいはジアゼパム(抗不安薬)を投与した場合の自発運動量の変化。



第3図は、生後17日齢および成獣ラットにトリメチルスズを投与したのち、5日後に聴覚性驚愕反応を測定した結果である。幼若動物(22日齢)では、音刺激に対する反応はTMTの用量に相関して低下しているが、ブロック毎の反応の強さは減弱していることから、音刺激に対する学習による馴化が認められると判断することができる。一方、成獣ラットの高用量投与では、音刺激に対する反応性は顕著に低く、ブロック毎の変化が認められないことから、むしろ聴覚障害が強く疑われる。

第3図 聴覚性驚愕反応検査

生後17日齢の幼若ラットおよび成獣ラットにTMTを単回投与し5日後における音刺激に対する驚愕反応。



(5) 学習記憶検査

当所ではE型水迷路および弁別学習を標準とするとともに、より高次の空間認知によるMorris型水迷路についても、学習(習得)と記憶(参照記憶)の検査法として確立した。

第4図は、生後21日齢のラットについて、抗ムスカリン薬であるスコポラミン投与のE型水迷路における学習を見たものである。これは、水を満たしたE字型の迷路の一端にプールからあがることのできる逃避

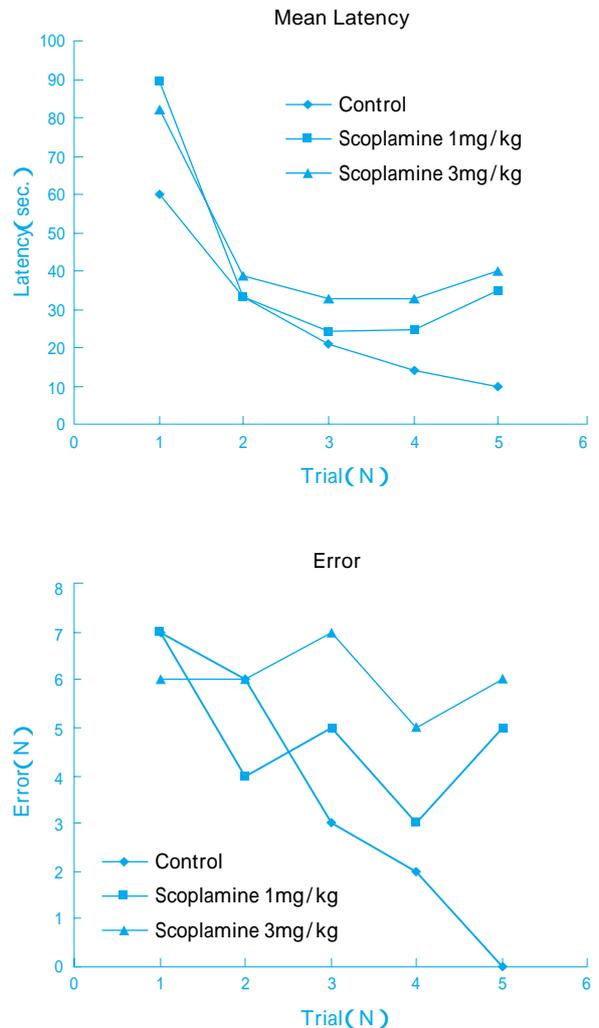
口(ゴール)を設定しておき、動物はE字の中央線から泳ぎ始め、左右のどちらかの一端にある逃避口を学習する検査である。1日5トライアルを実施し、ゴールまでの到達時間(Latency)およびエラー回数を測定している。対照群では、到達時間およびエラー回数ともトライアル毎に減少して学習していることが認められる。一方、スコポラミン投与群では、トライアル3回目以降では到達時間およびエラー回数ともに減少が見られない。これらは、抗ムスカリン作用の発現に伴った学習障害を示している。

(6) 神経病理学的検査

生後11日齢および試験終了時に各群雌雄6匹が神経病理学的検査に供される。神経病理学的検査は定性的な分析とともに、簡易形態計測による脳の特定部位の定量的分析が要求されている。

第4図 E型水迷路を用いた学習・記憶検査

生後21日齢ラットにスコポラミン(抗ムスカリン薬)を投与した場合の1日5試行におけるゴールまでの到達時間(Latency、左)およびエラーの回数(右)を示している。

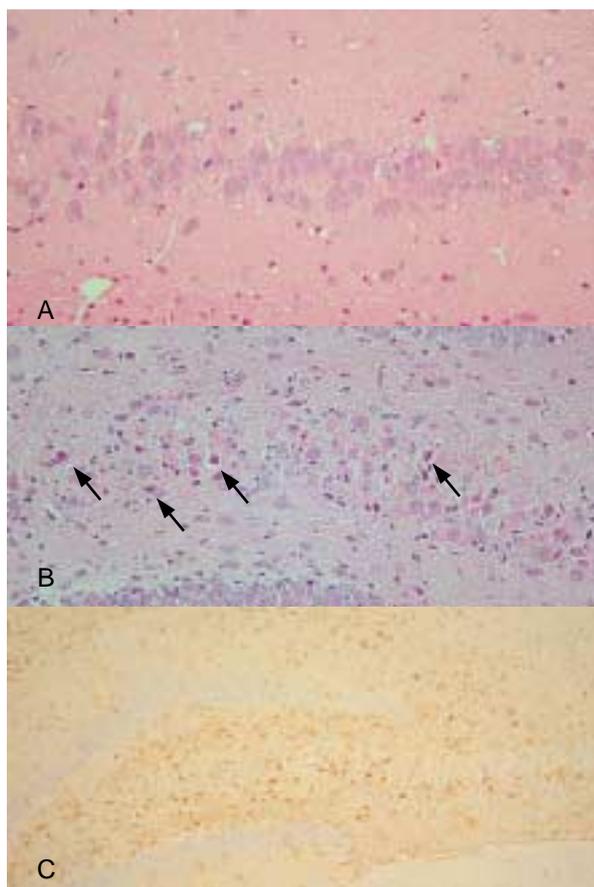


定性的分析は、大脳(嗅球、大脳皮質、海馬、大脳基底核、視床、視床下部)、中脳(中脳蓋、被蓋、大脳脚)、脳幹および小脳の主要な脳部位の詳細な組織学的観察である。このような詳細な検査部位の指定は、脳の構造と機能の部位特異性が考慮されているためである。この観察で高用量群において神経病理学的変化が認められた場合には、用量相関性を評価する目的で全投与群について盲検的な観察が求められている。定量的分析では、少なくとも大脳皮質、海馬および小脳の主要な部位について、その厚さの計測が要求されている。当所で開発した病理標本画像解析装置(IPAP)を用いて、脳の外表および病理組織切片における形態計測の検討を進めている。

第5図は、成獣ラットおよび生後17日齢の幼若ラットに6mg/kgのトリメチルスズを単回投与したときの脳の病理組織学的変化(定性的分析)を示したものである。成獣ラットでは脳に対する器質的な変化はほとんど認められなかったが、幼若動物では脳の特定部位(大脳の海馬や梨状葉皮質)の神経細胞が傷害さ

第5図 神経病理学的検査

TMT 6mg/kgを単回投与した場合の大脳海馬の神経細胞に対する影響。成獣では海馬神経細胞への影響は非常に軽微であるが(A)、投与3日後の幼若動物(20日齢)では海馬神経細胞に細胞死(矢印)が観察され(B)、損傷に反応した星状膠細胞の増生を示す特異的な蛋白質(GFAP)の増加が見られる(C)。



れ、壊死が生じていた。このような神経細胞の損傷に反応して、神経グリア細胞の一種である星状膠細胞が増生していることが、特異的な蛋白質(グリア線維性酸性蛋白、GFAP)の免疫組織化学染色でみることができる。このような幼若動物では、迷路学習の成績が低下傾向を示し、器質的な傷害部位である海馬に関連した記憶や学習の機能障害が示唆された。この結果は、発達期の特定部位の神経細胞は成体のそれとは異なる感受性をもつことを示している。

3. OECD 発達神経毒性試験ガイドラインとのハーモナイゼーション

1998年にOECD 発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)第一案が公表されたが、EPA 試験ガイドラインの間でいくつかの重要な試験項目で相違が明らかであった。私達は、OECD 試験ガイドライン案に対するパブリックコメントに対応して2つの試験ガイドラインのハーモナイゼーションを強く求めてきた。2000年11月にはOECD およびEPAの専門家によるハーモナイゼーションのための会議が開催された。投与期間は妊娠6日から分娩後21日とすること、病理組織検査は生後21/22日齢と試験終了時に実施し、形態計測による定量的分析は第一義には要求されないなどの主要な点については一定の合意が成されるとともに、発達神経毒性試験は関連を疑わせる毒性情報や、使用や曝露において影響が認められた場合に要求されることなどが合意されている。

発達神経毒性試験の方法および評価の課題

1. 脳の発達に対する二次的な影響要因

脳の発達は必ずしも自律的で固有なものではない。試験の環境や操作はそのような脳の発達に影響を及ぼすことが知られている。環境温度は、神経細胞の蛋白質合成などの代謝に影響することから、児動物の低体温は脳の発達を遅延させる可能性がある⁶⁾。出生後の児動物を母動物から短時間隔離することでも、種々のストレスや体温低下を生じさせ、児動物の行動発達にも影響を及ぼす可能性があることが報告されている⁷⁾。出生時に体温調節能が発達しているヒト新生児と異なり、ラットやマウスの新生児は生後発達期の体温調節能が未熟であり⁸⁾、環境温度の影響を受けやすいと考えられる。このような環境要因による児動物の生理的变化が曝露された化学物質とどのような相互関係を示すものかは明らかではないが、ラットやマウスを用いた発達神経毒性試験において注意を要する点である。例えば、被験物質を児動物に経口投与することは、母動物から児動物を引き離すことになり、ストレスや体温低下を生じさせる可能性が

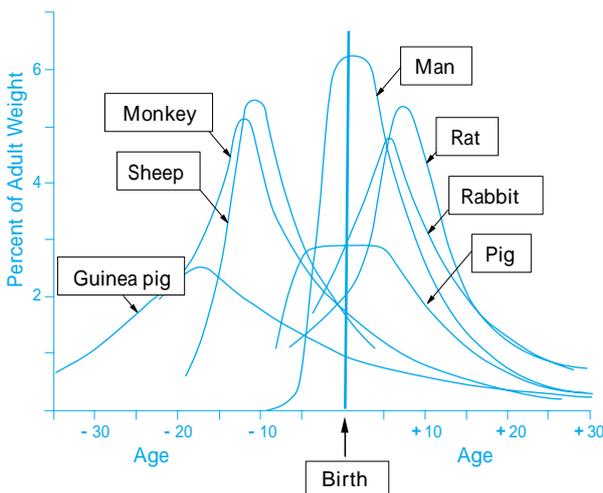
考えられる。このような問題点は、試験の方法とともに、ヒトのリスク評価への外挿において動物種差を考慮することが重要であることを示唆している。

また、脳の神経細胞の発達には甲状腺ホルモンが重要に関わっている⁹⁾。一般毒性試験では、種々の化学物質が肝臓における薬物代謝酵素の誘導によって、ラットやマウスにおける血液中の甲状腺ホルモンレベルを変化させることがよく知られている。母動物あるいは胎盤や母乳を介した胎児や児動物に対するこのような化学物質による二次的な脳の発達障害もまた留意されるべきである。

2. 脳発達の動物種差

第6図は、各種の動物における脳重量の増加率を示したものである¹⁰⁾。脳重量の増加は、個々の神経細胞と神経回路の成熟、神経膠細胞の増生、髄鞘形成などによる神経組織の増大を反映している。ヒトでは、脳重量の増加率は出生時の前後に高く、脳重量は胎児期後半から生後4ヶ月にかけて急速に増加し、10才ではほぼ成人の脳重量に達する¹¹⁾。また、大脳皮質の厚さは胎児期から生後6ヵ月齢まで速やかに増加したのち、10才には成人のレベルになる。一方、ラットでは、脳重量の急速な増加は出生後から生後3週に認められる。脳重量増加のピークはヒトでは出生時、ラットやマウスでは生後10日頃にある。この時期がbrain growth spurtに相当しており、環境要因などに対して特に感受性が高いといわれる。このような脳の発達の動物種差は、動物試験における評価をヒトに外挿することを難しくしている。化学物質の発達神経毒性のリスク評価を実施する上で、曝露時期や曝露経路の妥当性が十分に検討されることが重要である。

第6図 脳重量増加率の動物種差(Dobbing and Sands, 1981)



分子生物学的指標を用いた発達神経毒性研究への取組み

現時点の発達神経毒性研究は、化学物質のヒト健康影響評価のための応用科学の側面とともに、発達神経生物学の理解のための研究手段としての基礎科学の色彩が強く表れている¹²⁾。このことは、この研究分野が毒性学としては今だ発展途上にあることを示している。今日の神経科学研究の進歩に伴って、行動、学習、記憶などの脳機能の分子生物学的基礎やヒト固有の高次の神経機能に関する新しい知見が発達神経毒性の観点から議論される事態が容易に推測でき、神経化学や分子生物学分野における先進的なエンドポイントが提案されることが予想される。また、ラットやマウスにおける神経行動学的検査が、ヒトの神経行動やより高次の神経機能に対する影響を適切に評価し得るかという問題も考えられる。これまでの神経毒性学的評価では、知覚や運動機能あるいは学習や記憶を中心とした神経行動学的検査について比較的充実しているが、個体間の相互関係のような社会的行動、より高度のヒト神経機能の評価は必ずしも十分でないことも指摘されている¹³⁾。今後提案されるであろう新しいエンドポイントについては、それらの毒性学的意義を含めて、ヒトのリスク評価に対する妥当性が十分に吟味される必要がある。

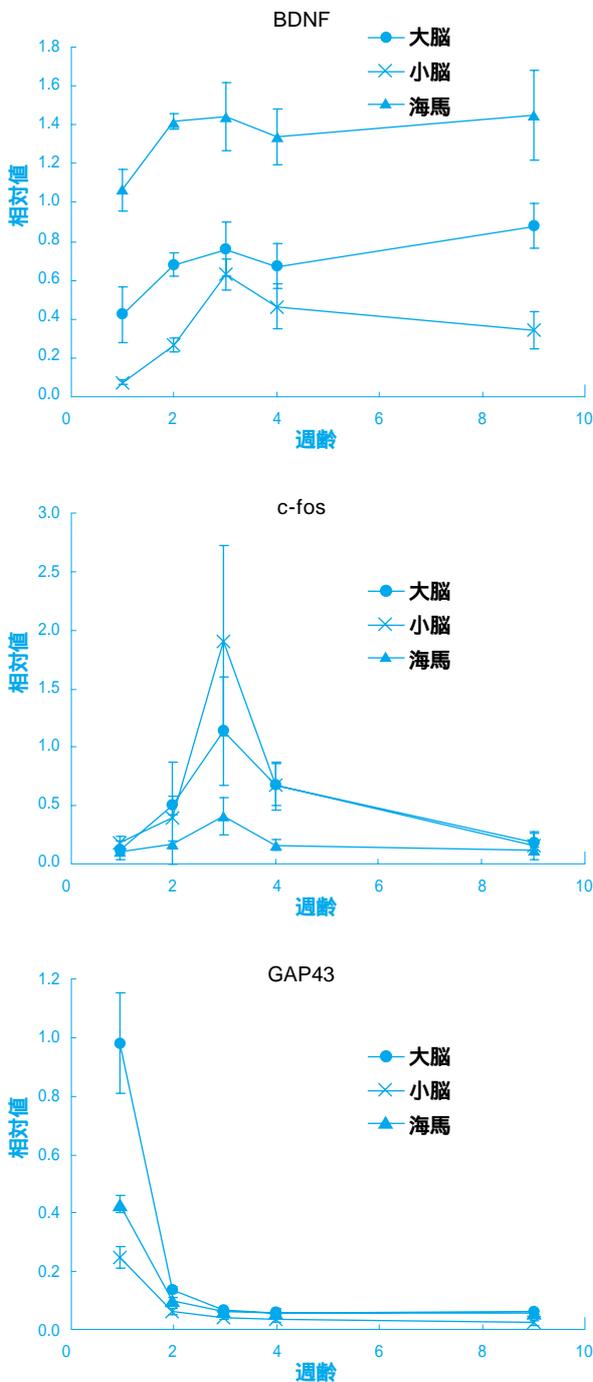
また、上述した発達神経毒性ガイドライン試験は、化学物質の安全性評価において時間とコストの両面で多大な経済的負担となるものである。毒性評価の感度と精度の高い効率的なスクリーニング系の開発も重要な課題の一つである。

このような観点から、私たちは、発達神経毒性ガイドライン試験法の確立と並ぶもう一つのテーマとして、脳発達の分子生物学的指標を用いた発達神経毒性評価に取り組んでいる。第4表は、生後発達期のマウス脳を用いて検討した分子生物学的指標としての調節因子を示している。いずれも神経細胞の成長や神経細胞間の連絡の指標となる蛋白質である。私たちは、これまでに主要な脳部位におけるこれらの蛋白質合成の指標となる messenger RNA (mRNA) の発現量の発達挙動を検証してきた。

第4表 脳発達の分子生物学的指標

調節因子	特徴
脳由来神経栄養因子(BDNF)	・神経細胞の分化や可塑性
Growth-associated protein 43(GAP43)	・神経軸索の生長・成熟
Synaptophysin	・前シナプスの指標
Postsynaptic density(PSD)95	・後シナプスの指標(糖蛋白)
c-fos	・遺伝子発現の調節因子

第7図 マウス(雄)の脳におけるBDNF、c-fos およびGAP43のmRNA発現の生後発達



第7図は、マウスの大脳皮質、海馬および小脳におけるBDNF、GAP43 およびc-fos のmRNA の発現量に関する生後発達期の変化を示している。神経細胞の可塑性に関して神経突起の成長に関係すると言われるBDNFは、いずれの部位でも生後3週まで増加し、おおそ成獣レベルに達している。一方、神経軸索の伸長に関するGAP43のmRNAの発現量は生後3週には減少して成獣レベルに達している。マウスにおける出生後3週間はbrain growth spurtと呼ばれる脳の最も活発な発達期に相当している。小脳に

おけるBDNFのmRNA発現量の変化が生後にシャープに立ちあがっていることは、小脳の組織発生が他の部位より遅くに始まり、生後の比較的短期間に完結することを示している。小脳の形態学的発達は化学物質の発達神経毒性評価における鋭敏なターゲットになり得ることが示唆されている¹⁴⁾。BDNFおよびGAP43と異なり、種々の遺伝子発現に関する初動の調節因子であるc-fosのmRNAの発現は、生後3週をピークとする挙動を示している。このようなc-fosのmRNAの発現様式が、発達期のどのような遺伝子発現を調節しているのかはよく知られていない。これらの調節因子の遺伝子発現が発達神経毒性を評価する上で重要なbrain growth spurtの時期に鋭敏な変化を示すことは、これらが神経細胞の発達の異常や遅延の有用な指標となり得ることを示している。このような調節因子の変動が、どのような神経行動学的な機能の影響に関連するものであるか、また、化学物質を含むどのような環境因子によって影響されるかを検証することが新しい課題である。

おわりに

はじめにも述べたように、化学物質がヒト、特に子供の発達に対して影響を及ぼす可能性に対する社会的な懸念が強まっている。米国EPAに続いて、OECDにおいて発達神経毒性試験ガイドラインが制定されることに伴い、この問題に対する各国当局のより一層の厳格な規制が予想される。しかしながら、これらのガイドライン試験法およびその結果の評価法については、ヒトに対するリスク評価を実施する上で確立しているとは必ずしも言い難いのが現状である¹⁵⁾。また、試験結果の評価およびリスク評価についても、各国の国際的なハーモナイゼーションは進んでいない。このような情勢の中で、私たちは当所におけるEPAおよびOECD発達神経毒性ガイドライン試験に基づいた評価法を確立し、世界水準でのリスク評価体制を構築している。また、神経科学研究の進展に伴って、新しい様々な視点からの発達神経毒性評価が求められることも予想されることから、今日的な神経科学水準でのより精度の高いヒトのリスク評価に有効な発達神経毒性評価法の開発に取り組んでいる。

引用文献

- 1) Colborn, T et al. : Our Stolen Future. New York, Plume(1997)
- 2) National Research Council : Pesticides in the Diets of Infants and Children. Washington : National Academy Press(1993)

- 3) Rodier, PM : Environ Health Perspect 103 (suppl 6) 73 - 76(1995)
- 4) WHO : Environmental Health Criteria 223, World Health Organization, Geneva(2001)
- 5) MacPhail, RC et al. : J Am Coll Toxicol 8, 117 - 125(1989)
- 6) Lajtha, A and Dinlop, D : Life Science 29, 755 - 767(1981)
- 7) Hofer, MA : Psychosom Med 37, 245 - 264 (1975)
- 8) Alexander, G : Br Med Bull 31, 62 - 68(1975)
- 9) Koibuchi, N and Chin, WW : TEM 11, 123 - 128(2000)
- 10) Dobbing, J and Sands, J : "Scientific Foundation of Pediatrics", Davis, JA and Dobbing, J (eds), William Heinemann Medical Books, London, pp744 - 756(1981)
- 11) Rabinowicz, Th et al. : "Brain Fetal and Infant, Current Research on Normal and Abnormal Development"; Berenberg, SR(ed), Martinus Nijhoff, Hague, pp28 - 53(1977)
- 12) Mileson, BE and Ferenc, SA : Environ Health Perspect, 109, 77 - 78(2001)
- 13) Cory-Slechta DA et al. : Environ Health Perspect 109, 79 - 91(2001)
- 14) Walker, RF et al. : Neurotoxicol Teratol 11, 251 - 255(1989)
- 15) 辻 良三ほか : J Toxicol Sci 23, 63 - 68(1998)

PROFILE



吉岡 孝文
Takafumi YOSHIOKA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員, 医学博士



池田 真矢
Maya IKEDA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所



小林久美子
Kumiko KOBAYASHI
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所



佐々木まどか
Madoka SASAKI
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
主任研究員



串田 昌彦
Masahiko KUSHIDA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
獣医師



辻 良三
Ryoza TSUJI
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員, 獣医師, 獣医学博士