



NIES RESEARCH BOOKLET

環境儀

NO. 65 June 2017

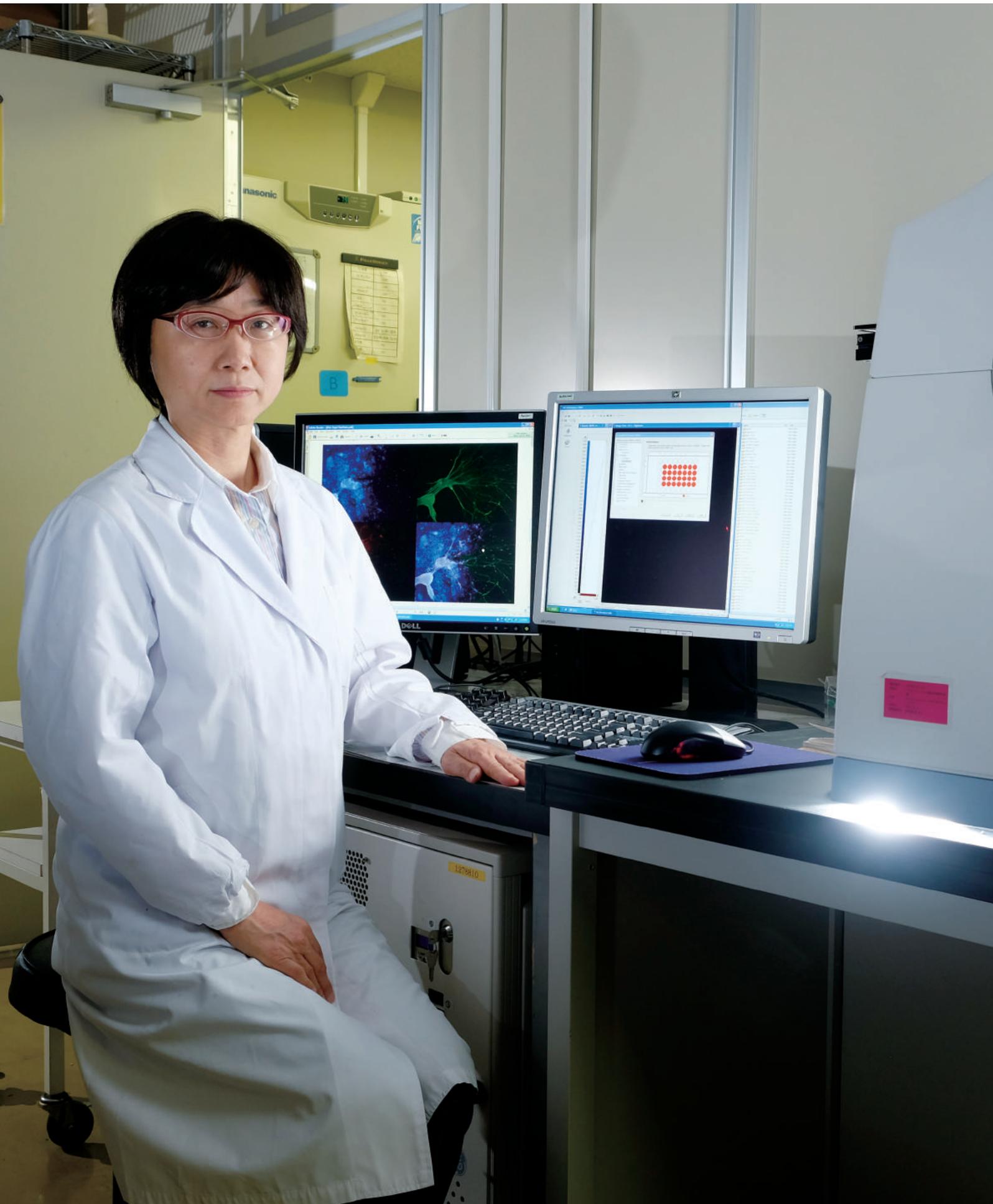
国立環境研究所の研究情報誌

化学物質の正確な ヒト健康への影響評価を目指して

新しい発達神経毒性試験法の開発



国立研究開発法人
国立環境研究所
<http://www.nies.go.jp/>



私たちの身の回りの環境は年々大きく変わってきており、その変化に応じて環境中のさまざまな化学物質に私たちは曝^{さら}されています。そのため、環境中にある化学物質が私たちの健康や生物などに、悪影響を及ぼしているのではないかという懸念が長い間続いています。1960年代に公害問題がクローズアップされ、限られた地域で特定の化学物質に高濃度で曝露^{ばくろ}された人々の健康被害が問題になりました。しかし、現代では低濃度で多様な化学物質に曝されている多くの人々の健康状態に関心が向けられています。子どもでは発達障害やアトピー性皮膚炎、ぜんそくなど、高齢者では認知症やがんなどの疾病が増加しており、生活環境中の化学物質がこれらの疾病の発症に関与していると考えられています。

特に胎生期にある種の化学物質に曝されると、その後の成長や発達に影響を与えられていると考えられています。そのメカニズムを明らかにするには、細胞の分化や組織の発達が観察できるヒト組織由来の胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いることが有望視されています。

本号では、国立環境研究所で2009年より文部科学省の許可を受けて実施しているヒトES細胞による研究を中心に、ヒト組織由来の細胞を用いた化学物質の影響評価について紹介します。

化学物質のヒトの健康に対するリスクを
より正確に評価することが求められています。
そこで、ヒトES / iPS細胞や胎児組織由来の細胞を用いた
新しい発達神経毒性試験法を開発しています。

CONTENTS

化学物質の正確な ヒト健康への影響評価を目指して 新しい発達神経毒性試験法の開発

- Interview 研究者に聞く
ES細胞を用いて、化学物質のヒトへの
影響を予測する p4 ~ 9
- Summary
ヒト組織由来の細胞を用いて、化学物質の
神経発達への影響を明らかにする
..... p10 ~ 11
- 研究をめぐって
ヒト組織由来の細胞、ES/iPS細胞を用いた
化学物質が健康に及ぼす影響の予測法
..... p12 ~ 13
- 国立環境研究所における
「ヒト細胞を用いた発達神経毒性試験法
と発達期影響予測法の開発に関する研究」
のあゆみ p14

ES 細胞を用いて、 化学物質のヒトへの影響を予測する

化学物質のヒトへの影響を評価するため、動物実験のデータが使われていますが、ヒトと実験動物ではその影響には種の違いによる差があり、問題になっています。なかでも胎児性水俣病の原因物質であるメチル水銀は、哺乳動物でも毒性の種差が大きいことが知られています。環境リスク・健康研究センター、曝露影響計測研究室室長の曾根秀子さんは、ヒト ES 細胞を使って、ヒトにおける胎児期の影響を迅速に予測する方法を開発しました。この方法によりメチル水銀の毒性メカニズムが明らかになってきました。さらに、他の化学物質や放射性物質などの影響予測にもこの方法が利用できるだろうと期待されています。

動物実験でどこまで化学物質の影響を評価できるか

Q：これまでどのような研究をされてきましたか。

曾根：私は前職では発がん性物質の安全性を研究していました。肉や魚などの食品を加熱したときにできるヘテロサイクリックアミンという物質の発がん性を評価していました。発がん性物質の評価は、疫学研究や動物実験の結果に基づいて行います。ヒトで直接発がん性物質の影響を見ることはできませんから、実験動物に化学物質を投与して、腫瘍ができるか、できないかなどの影響を測定します。その結果をもとに種差を考慮した係数をかけるなど換算してヒトにあてはめるわけです。しかし、実験動物とヒトではさまざまな違

いがあります。このときから、動物を用いた評価と実際のヒトへの評価では差があると感じていました。この評価方法でいいのだろうか、ヒトの組織を使って評価する方法はないだろうかと考えていました。

Q：国立環境研究所に入所してからはどんな研究をしましたか。

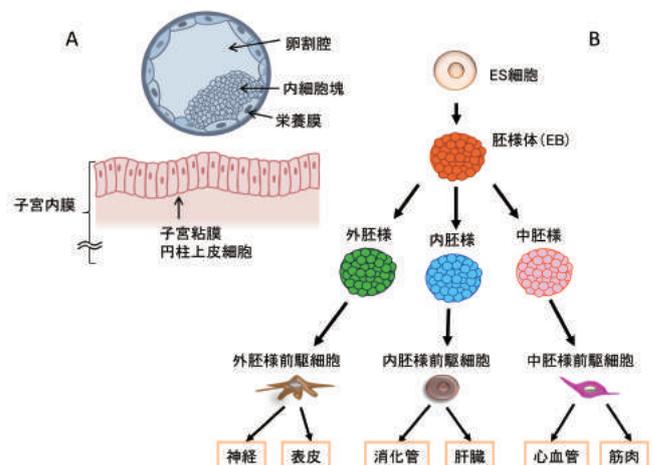
曾根：ダイオキシン、ビスフェノールAやフタル酸エステルなどの内分泌かく乱物質（「環境ホルモン」とも呼ばれます）の毒性を研究しました。これらは、生体の内分泌器から分泌されるホルモンを乱すと言われている物質です。これらの実験でも動物に化学物質を投与して影響を調べました。動物実験では、化学物質の影響を調べるためにはかなりの量を投与しますが、実際にヒトが曝露されると推定される量はわずかです。

コラム① 多能性幹細胞を用いて 胎児期の影響を調べる

幹細胞は細胞分裂するときに、親細胞の特性を引き継いだ子細胞と、分化に向かう子細胞の2種類を産生します。胚体内のすべての細胞に分化できる幹細胞のことを多能性幹細胞といい、その一つである胚性幹細胞（ES 細胞）は、哺乳類の胚盤胞の内部細胞塊などに由来し、完全な1個体を生み出す能力があります（図1A）。

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）も、ES 細胞のように多分化能を持つ幹細胞で、体細胞へ複数の遺伝子を導入することによって人工的につくられます。

分化に向かう ES 細胞は、胚様体を経て、外胚葉・内胚葉・中胚葉の三胚葉に分化します。その後、さまざまな臓器へと分化していきます（図1B）。



■ 図1 哺乳類の胚盤胞の概念図 (A) とヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) からの胚様体を経由した細胞・組織分化 (B)

動物への投与量とヒトへの曝露量には差があるにもかかわらず、この方法で毒性を評価していいのだろうか
と、再度感じました。

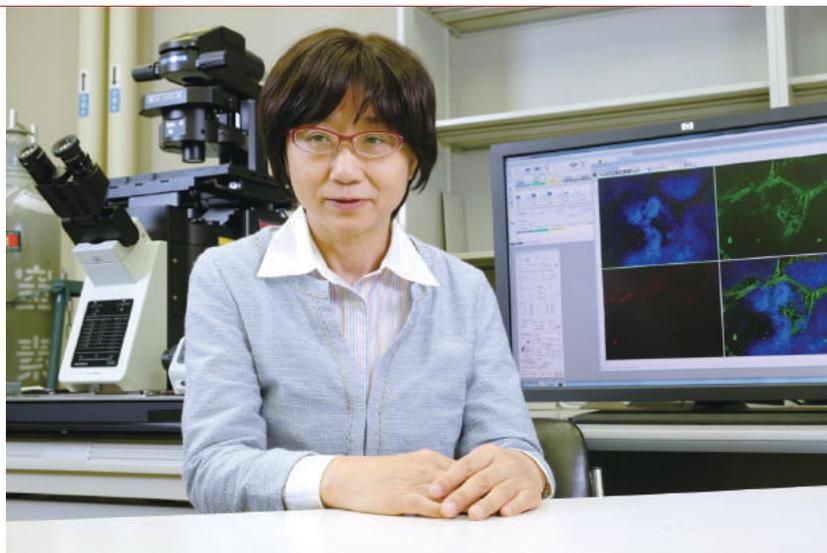
Q：そうした経験が現在の研究につながるわけですね。

曾根：はい。化学物質の安全性の研究では、動物実験の結果でどこまでヒトへの影響を評価できるのかがよく議論になります。水俣病の原因になったメチル水銀や子供の奇形を引き起こしたサリドマイドの場合、動物実験では毒性を予測できませんでした。未然に毒性を検出できていればあのような悲劇は起こらなかったでしょう。

動物とヒトにみられる 化学物質の毒性の差

Q：どうして動物実験では、毒性を予測できなかったのでしょうか。

曾根：実験動物とヒトでは毒性に差がみられるからです。メチル水銀は哺乳類の間でも毒性の種差が大きく、多くの実験動物ではヒトと同じように毒性が発現しません。実験動物としてよく使われるラットやマウスなどでは腎毒性や末梢神経に対する毒性が強く、ヒトの水俣病のような中枢神経毒性はあまり強くありません。脳に蓄積された水銀が半減するまでの期間もヒトの方が長く、ラットでは脳への吸収の速さ、移行も異なるために、結果として脳組織における存在量に10倍の差があります。これらが、ヒトでは中枢神経への影響が大きい原因であると考えられています。



曾根 秀子 (そね ひでこ)
環境リスク・健康研究センター 曝露影響計測研究室 室長

Q：メチル水銀の毒性が明らかになるまでにはずいぶん時間がかかったのでしょうか。

曾根：水俣病の原因がわかったのは、1968年のことです。水俣病の原因企業であるチソがアセトアルデヒドを作り始めて36年後のことで、水俣病が報告されてからも10年以上かかっています。

Q：水俣病の原因はまだよくわかっていないのですか。

曾根：メチル水銀は胎児性水俣病の原因物質であることはよく知られているのですが、さまざまな症状を引き起こすメカニズムは明らかになっていません。世界保健機関(WHO)がメチル水銀の安全基準を設定していますが、その基準値では少量のメチル水銀を摂取した母親から生まれた子供への神経発達面での影響を評

コラム⑧ ヒトの健康影響を調べるためのインビトロと インビボ試験の有用性と問題点の比較

動物実験とは、ヒトに適用する前に、有害な影響が生じるかどうかを化学物質や機器等を、動物に対して処置し、実験することを意味します。動物個体をそのまま用いて行うのが、インビボ (*in vivo*) 実験で、動物個体から、組織の断片や、細胞などを取り出して行う実験がインビトロ (*in vitro*) 実験です。

■表1 毒性試験におけるインビトロとインビボ試験の違い

実験の種類	内容	有用性	難点
<i>in vivo</i> インビボ (動物実験)	化学物質の経口、吸入曝露による個体レベルの応答性を観察する試験	<ul style="list-style-type: none"> 経口や吸入による現実的な曝露の毒性試験が可能である。 各器官や身体全体の機能を解明する研究には、不可欠である。 物質の吸収、代謝及び排泄の動態を調べる研究に必要である。 毒性と用量との関係を示すことが可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> 使用される実験動物とヒトの間に影響の種差が存在する可能性がある。 人道的動物実験の3原則、Replacement (代替)、Reduction (削減)、Refinement (実験精度向上)の3Rにもとづいて、動物使用数の削減がもたらされている。 動物の飼育代、飼育員、飼育環境など、コストや労力の問題がある。
<i>in vitro</i> インビトロ (細胞実験)	試験管、試験皿などの試験器具容器内に培養している細胞に化学物質を曝露し、その応答を観察する試験	<ul style="list-style-type: none"> より詳細なメカニズムの解明に役立つ。 ヒト細胞、ヒト組織での直接的な化学物質の応答性が理解できる。 動物代替法であるため、3Rの原則に順守できる。 簡便で短期間に多くの被検物質の毒性試験が可能である。 低コストで実施が可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> 物質の吸収、代謝及び排泄などの体内薬物動態について、探索的な研究は困難である場合が多い。 得られた結果が<i>in vivo</i>での影響を反映しているかどうかの検証が必要である。

価するには不十分でした。このように、メチル水銀の毒性については不明な点が多いのですが、動物とヒトでは毒性の種差が大きいため、研究を進めるのがむずかしいのです。

Q：動物とヒトで毒性の種差がある例はほかにもあるのですか。

曾根：ダイオキシンでも、ヒトと同じような症状が出たのは霊長類だけで、ラットやマウスには出ませんでした。また、最小毒性量(毒性試験の結果から求められた有害影響の発現する最も低い用量)も大きな開きがあります。

ES細胞を使った実験を始める

Q：どうして毒性評価にES細胞を使おうと思ったのですか。

曾根：私たちが日常生活で曝されている濃度の化学物質によるヒトへの本当の影響を見たい、そのためには新しい方法が必要だとずっと思っていました。その後、アメリカに3年間留学し、最後の年に米国環境健康科学研究所で開かれた講演会で、ヒトES細胞の話を知りました。ES細胞は胚から作られた細胞で、生体内のさまざまな細胞に分化する性質と、自己複製する性質をもつ細胞です。ちょうどヒトのES細胞が樹立されて、ES細胞の自己複製のメカニズムがわかってきた2005年の初め頃のことでした。その話を聞いて、動物に代わるものとして、ES細胞が発生や発達の毒性評価に使えるのではないかと思いつきました。

Q：どのようにES細胞を使った実験を進めましたか。



実験風景

曾根：帰国して、すぐにES細胞を使って実験を始めました。まずは、マウスのES細胞を理化学研究所と筑波大学から分与してもらいました。ところが、細胞を培養する条件がよくわかっていなかったため、ES細胞を維持するのは大変でした。細胞を未分化の状態でも維持するのも、分化させたり、増やししたりするのも、ひとつひとつ条件を検討しなければならなかったので、実験の条件を整えるまでに多くの時間がかかりました。

Q：ES細胞をどのような細胞に分化させたのですか。

曾根：胎児に対する神経毒性を調べたかったので、ES細胞を神経細胞に分化させる条件を検討し、試行錯誤を繰り返しました。ずいぶん時間がかかりましたが、ラミニンというタンパク質を培地に加えることで初めて神経細胞にすることができました。ラミニンは細胞や組織を接着させることができるタンパク質で、神経細胞が広がる際の足場になります。

Q：マウスES細胞を使って、化学物質の毒性評価はできたのですか。

コラム③ 化学物質の健康影響評価の変革

2002年にヨハネスブルグで開催された持続可能な開発に関する世界サミットにおいて、2020年までに化学物質の著しい悪影響を最小化するという化学物質規制の目標が設定されました。これを受けて、先進国では、さまざまな対応が進められています。化学物質などの環境外的要因に曝されて健康の悪影響を引き起こす生体の応答経路を「毒性発現機構」といいます。この毒性発現機構、すなわち、毒性発現経路(AOP)を指標にして、毒性を評価し予測する新しい試みが、2007年に米国科学アカデミーより「21世紀の毒性試験」として提唱されました。

今日では、この新しい毒性試験法は、AOPをベースに

したアプローチに発展しています。このアプローチは化学物質の構造をコンピューターで解析して、類似構造をもつ化合物の探索や分類、特定の遺伝子やタンパク質に特異的に結合するかどうかの探索などのコンピューターの中で行うインシリコ手法による評価(ステップ1)に始まり、各種のインビトロ試験による用量反応解析(ステップ2)や体内での代謝動態の予測、曝露量の推計(ステップ3)の一連の流れを示す概念です。この新しい方式によって健康リスクを迅速に評価し、よりよい予測をすることが期待できます。



研究室のメンバー

曾根：手に入りやすいいろいろな化学物質を使って、神経細胞への分化に対する影響を調べました。分化した神経細胞の突起の長さなどを比べると、化学物質の種類によって差があり、ES細胞で毒性を評価できることがわかりました。

いよいよヒトとマウスのES細胞による毒性評価へ

Q：マウスだけでなく、ヒトES細胞を使った実験もしましたか。

曾根：マウスES細胞による毒性の評価系ができたので、続いてヒトのES細胞で実験しようと準備を始めたのですが、細胞が使えるようになるまでに1年半かかりました。ヒトES細胞の場合、実験を実施する上で生命倫理に関する、さまざまな手続きが必要でした。研究所内の審査を経て、文部科学省から実験の認可をもらうことができ、ようやく京都大学から3種類の

ES細胞を供与してもらいました。

Q：ヒトES細胞の培養はうまくいきましたか。

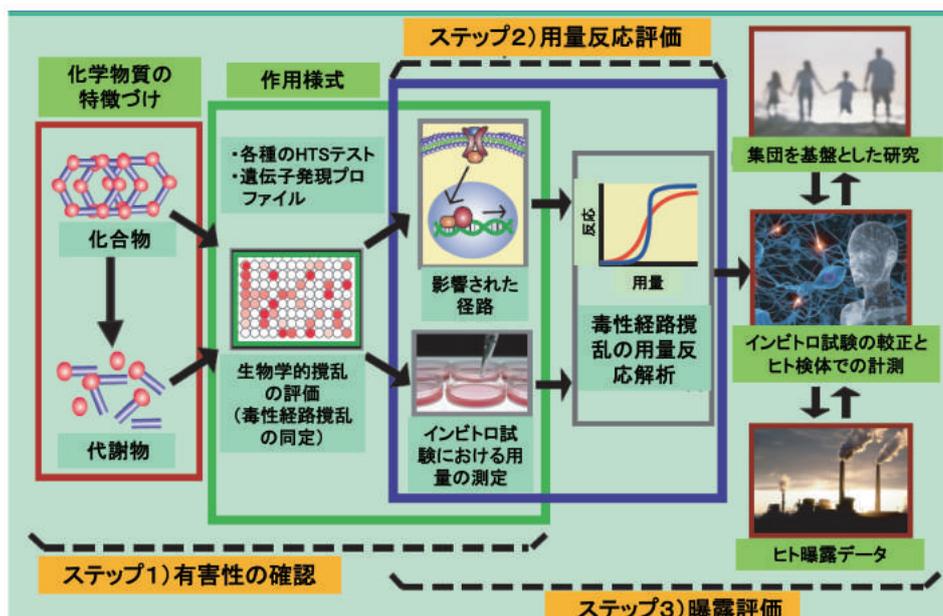
曾根：これもマウスES細胞と同様に培養に成功するまでとても大変でした。細胞がなかなか増えない、すぐに分化してしまうなどの問題を解決し、ちょうどよい培養の条件を決めるまでは苦勞しました。学生や研究員など、研究室のメンバーががんばってくれてようやくES細胞が実験に使えるようになりました。

Q：ヒトとマウスのES細胞で毒性評価ができるようになったのですね。

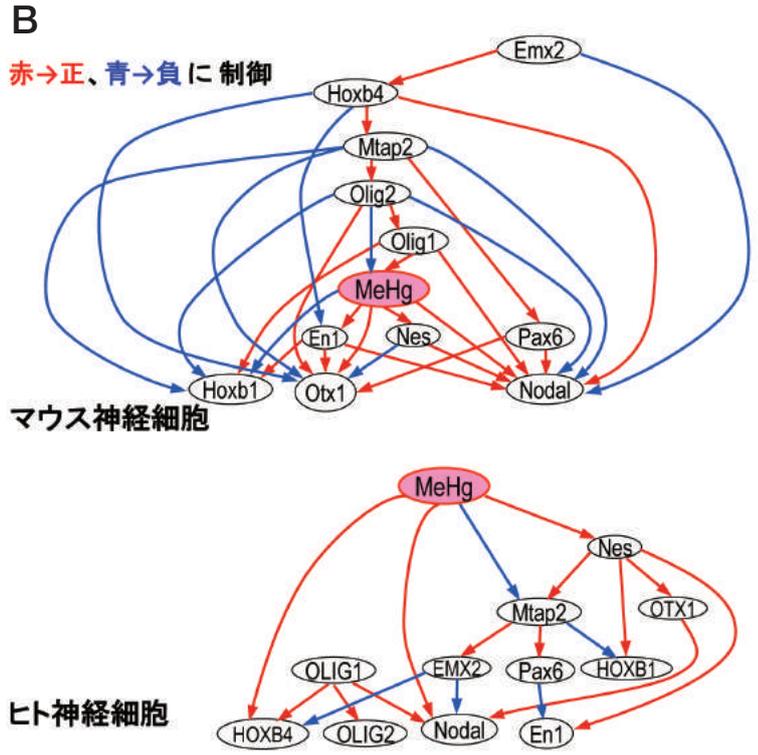
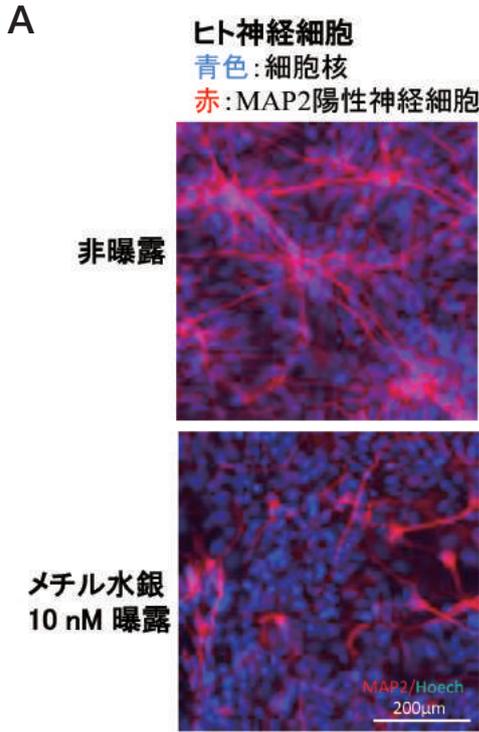
曾根：はい。マウスとヒトで毒性の差をみたいという願いがようやくかないました。2種類の細胞を使って、メチル水銀の影響を調べました。実験してみると、やはりマウスとヒトの細胞では、性質が違っていました。ES細胞が神経細胞に分化するまでの日数は、マウスで23日、ヒトで50日と異なっていました。分化した後、メチル水銀の影響を受けたマウスの細胞はすぐ死んでしまいますが、ヒトの細胞は死にません。組織層を比べても影響は違っていました。

Q：マウスとヒトの細胞では、どんな影響の違いがありましたか。

曾根：ES細胞が神経に分化する初期の段階でメチル水銀に曝露されると、ヒトのES細胞では、神経細胞への分化が強く抑制されてしまいました。マウスでは、メチル水銀に曝露されてもされなくてもあまり変化はありませんでした。ヒトのES細胞は、マウスのES細胞より、分化した神経細胞の樹状突起の長さや数などの形態に異常を起こしやすいことが明らかになりました。さらに神経分化に関わる13種類の遺伝子の発



■ 図2 海外で推奨されている新しい毒性評価の進め方



■図3 ヒトES細胞から神経細胞への分化におけるメチル水銀の影響
 ヒトES細胞が神経分化する初期の段階でメチル水銀に曝露されると、神経細胞への分化が抑制されることがわかりました。
 A) 青色で染色された核の数が細胞数に相当し、赤色で染色された線維状の突起が神経突起を示します。メチル水銀に曝露される(下)と赤色染色の細胞と線維状突起が著しく減少していることがわかりました。
 B) ベイジアンネットワークによる解析では、ヒト神経細胞ではメチル水銀が遺伝子の発現を制御していたが、マウス神経細胞ではその関係が見られませんでした。

量を調べ、遺伝子発現の関係性を調べました。

計算科学を利用する

Q: どのようにして複数の遺伝子発現の関係性を調べたのですか。

曾根: 計算科学を利用する方法を使いました。留学先で、ベイジアンネットワークという方法を学びました。これは、因果関係を確率により記述するグラフィカル

コラム④ 内分泌かく乱化学物質ビスフェノールAの健康への影響：種差はあるのか？

内分泌かく乱物質は、「内分泌系の機能を変化させることにより、健全な生物個体やその子孫、あるいは集団(またはその一部)の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と、世界保健機関・国際化学物質安全計画で定義されています。これまで、欧米では、内分泌かく乱化学物質とホルモン関連疾患の関係に関して多様な研究が続けられてきました。2015年から、欧州食品安全機関では、内分泌かく乱物質の一種であるビスフェノールA(BPA、図4A)の再評価が始まっています。また、2017年には、米国国家毒性プログラムによるげっ歯類の実験動物を用いた内分泌かく乱物質の発がん試験の結果が公表される予定です。

内分泌かく乱物質の作用メカニズムの一つとして、核内受容体に作用して転写活性を示すことが知られています。BPAは、動物実験において、最初にエストロゲン受容体

α (ESR1)に作用して、エストロゲン様作用を示す活性物質アゴニストであると同等されています(図4B)。また、BPAはESR1だけでなく他の核内受容体の特異的結合物質リガンドにもなりうるため、内分泌生殖疾患の病態の各ステージに影響を及ぼす可能性があります。疫学研究では、BPAの曝露レベルが高くなると、精子数や性ホルモンレベルが低くなるという逆相関の関係であることが報告されています。その曝露レベルは、妊婦の血清、臍帯血、胎児血清、羊水および胎盤で、1-4 ng/mL BPA(4-16 nM相当)の範囲でBPAが検出されています。インビトロの実験では、BPAがヒト細胞においてステロイドの産生を直接阻害することが示されており、ヒトと動物ではBPAに対する応答性が異なることや濃度によって作用点が変わることなどが、精巣のテストステロン分泌細胞を用いた実験で明らかになっています(一例、図4C)。

モデルのひとつです。この方法を、毒性評価に応用できると考えて、数学の研究者に協力してもらってプログラミングし、日本に持ち帰りました。

Q：どのような結果が出ましたか。

曾根：ヒトでは、メチル水銀が作用する遺伝子の系列が明らかになり、メチル水銀の神経発達毒性のメカニズムがわかってきました。ヒトでは、メチル水銀の作用により、細胞の多能性の維持にはたらく遺伝子が活性化されていましたが、神経細胞に発現する遺伝子が抑制されていました。このことは細胞の多能性が維持されているものの、神経発達が阻害されていることを示唆しました。この関係は、メチル水銀が神経細胞の突起伸長を阻害することとよく一致しています。マウスでは、ヒトのような遺伝子発現の関係性は見られませんでした。毒性に関する遺伝子を阻害すれば毒性を抑えられ、解毒剤を開発できるかもしれませんね。

Q：この方法で、他の化学物質の毒性も評価できるようになりましたか。

曾根：この結果をもとに、ヒトES細胞と遺伝子ネットワーク、計算科学を組み合わせ、化学物質の毒性を予測するための方法を確立しました。実際に22種類の化学物質を試験して、神経毒性や遺伝的発がん性、非遺伝的発がん性も評価できるようにし、特許も取得しました。健康影響予測システム HEALS (Environmental Risk Research, Health Effects Alert System) として、研究所のHPで公開しています。

現実の曝露による ヒトへの影響を捉えたい

Q：このシステムをどう発展させていくのですか。

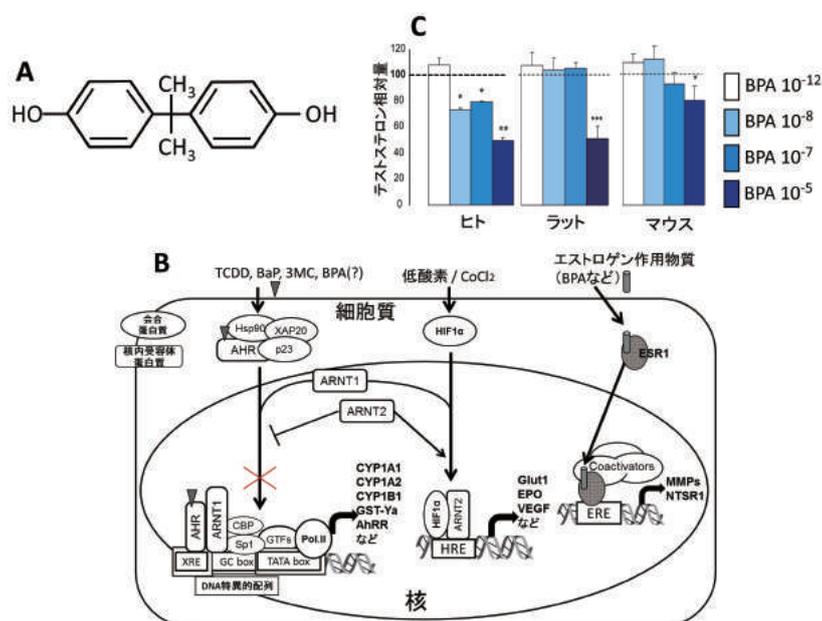
曾根：この方法はさまざまな化合物のほか、放射性物質の毒性評価にも利用できるのではないかと考えています。幹細胞を活用した毒性予測は、創薬における安全性評価、毒性検出の早期発見にもつながるので、今後は、基礎研究者ばかりでなく、製薬企業や安全性の研究にも活用してもらえよう展開を目指しています。

Q：新しい方法に対する評価はどうでしたか。

曾根：国際的に動物の利用を減らす動きが加速していることもあり、この方法は、海外で高く評価してもらっています。OECD(経済協力開発機構)の化学品の安全性のためのテストガイドラインに、動物代替法として私たちが開発した方法を申請することも考えています。

Q：今後、研究をどのように発展させていきたいですか。

曾根：ES細胞ばかりでなく、iPS細胞(人工多能性幹細胞)やほかの幹細胞でも、毒性を評価できる方法をつくりたいですね。すでに、iPS細胞を使って大気汚染物質の毒性評価の研究を始めています。幹細胞を活用することで、動物実験でできなかったヒトへの影響を予測できるようなシステムの確立を目指します。



■ 図4 ビスフェノール A (BPA) の作用機構とテストステロン産生に対する影響

A. ビスフェノール A の化学構造式。
B. 内分泌かく乱化学物質の毒性メカニズムにおける初期反応: TCDD, BaP (ベンツ [a] ピレン)、BPA などは、さまざまな核内受容体に作用し、各核内受容体に特異的な遺伝子発現の誘導を示します。この遺伝子発現の変化がタンパク質レベルの変化、シグナル伝達の変化、細胞機能の変化へと結びついていきます。
C. テストステロン産生における前立腺のヒト細胞、ラット細胞、マウス細胞における BPA の用量作用変化を示したグラフ。*, ** は、統計的に有意な変化を示す。

ヒト組織由来の細胞を用いて、化学物質の神経発達への影響を明らかにする

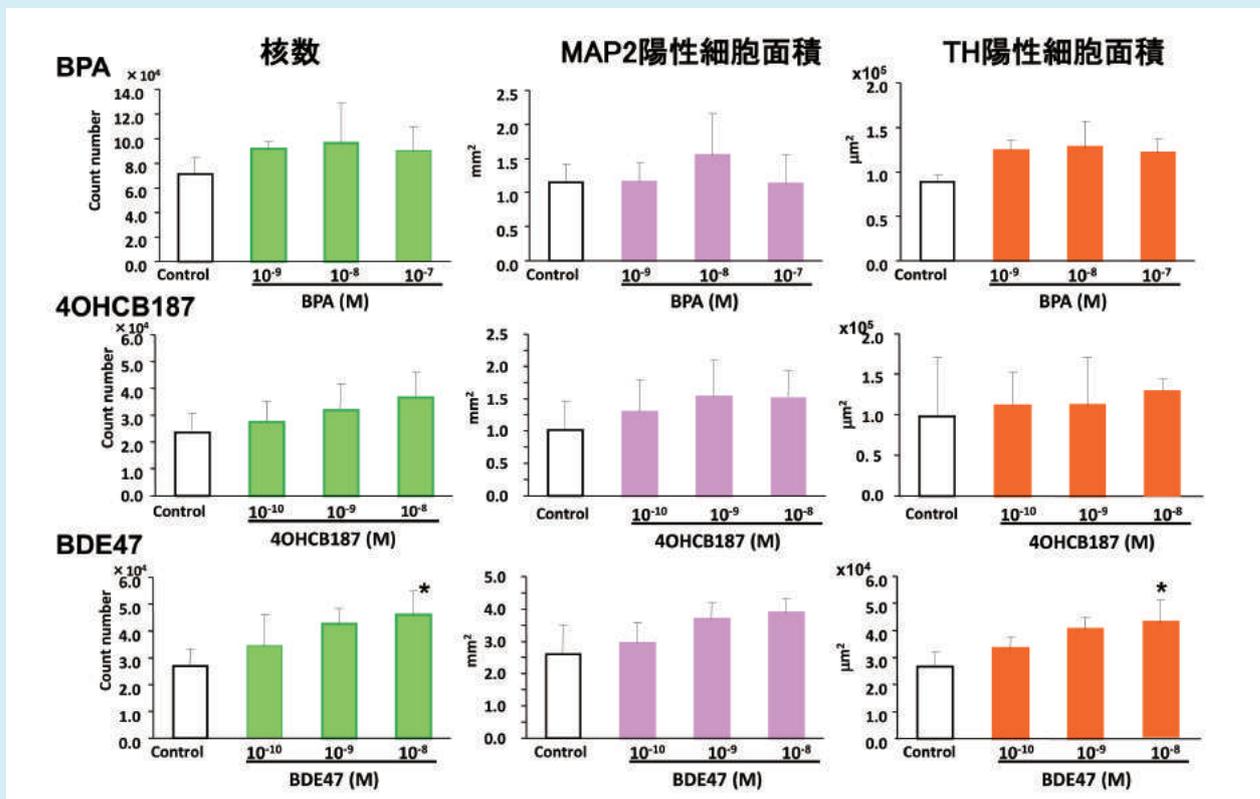
これまで、ホルモンが関連するがんや生殖器の発達不全、神経発達障害などの病態において、環境化学物質がどのように関与するのかを明らかにするための基盤研究を行ってきました。研究の成果は、正確な化学物質のリスク情報を提供し、人々が健康で安全な生活を営むための予防策の策定に貢献しています。

ダイオキシンおよび内分泌かく乱化学物質による健康影響における毒性経路の解明

1998年から2001年にかけて、ダイオキシンおよび内分泌かく乱化学物質による健康影響が社会的にクローズアップされました。その際、核内受容体に作用して転写を活性化させ、下流の遺伝子群の発現に影響を及ぼして生体影響を示す化学物質、いわゆる「核内受容体作動性化学物質」の存在が科学的に認知され、それらの有害性を確認することが重要だと認識される

ようになりました。

これより少し前の1996年にロンドンで第1回内分泌かく乱化学物質の健康と野性生物への影響に関するヨーロッパワークショップが開催され、男性の精子数の減少や性ホルモンに関連した乳がん、前立腺がん、卵巣疾患などの発症の増加との関連が指摘されていました。それまで、動物実験が中心だった研究が、ヒトの健康における生殖と発生への影響を調べるために、性ホルモン受容体、それに関わる細胞周期、増殖への影響を調べる研究へ移行しました。ヒト子宮内膜がん



■ 図5 各種の環境化学物質の曝露によるヒト ES 細胞から神経分化への影響評価

ヒト ES 細胞から神経細胞への分化過程は、多段階です。分化系を活用した化学物質の安全性評価法の標準化には、さまざまな実験条件の検討が必要です。これまでの研究において、ヒト ES 細胞 (KhES3) から均一な胚様体を形成させ効率よく神経系細胞への分化を成功させ、胎児期曝露のモデルアッセイの確立を目指してきました。ES 細胞から胚様体形成後に BPA、水酸化 PCB (ここでは 4OHCB187 を使用) および BDE47 の 3 種類の化学物質 (10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸ M の 3 濃度区) を曝露し、その後、神経系分化に必要な細胞外マトリックス上に細胞を移してさらに培養し、約 4 週間後に細胞数、神経細胞面積およびドーパミン神経の面積を調べました。その結果、BDE47 の 10⁻⁸ M において、対照区 (Control) と比べ細胞数と神経細胞面積及び TH 陽性細胞面積の有意な増加が認められました。このようなインビトロ細胞アッセイは、発達への影響を迅速に調べられる有用な手段であると考えられます。

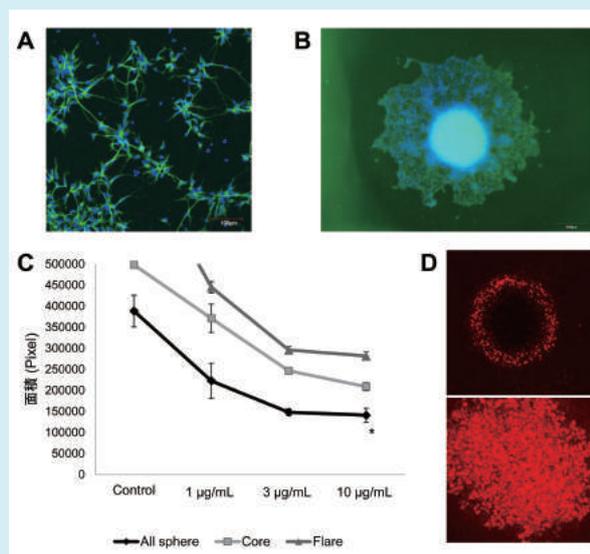
細胞、乳がん細胞、前立腺がん細胞、胎盤絨毛がん細胞などを用いて、女性ホルモン受容体や男性ホルモン受容体の存在量に応じて、低濃度のダイオキシンの曝露によって誘導される薬物代謝酵素遺伝子の発現量、細胞が分裂増殖を継続し続ける性質に関与しているタンパク質や、過剰発現するとがんを引き起こすことが知られているがん遺伝子の発現が変化することを明らかにしました。

また、生物の発生段階から成熟体の恒常性維持・疾病など多彩な生体プロセスの制御に強く関与する因子が女性ホルモンによって制御されていることを示しました。正常および患者由来皮膚細胞や乳がん細胞に、ビスフェノールA (BPA) を曝露すると、特異的に応答する遺伝子は、細胞ごとに異なりました。特に、停留精巣や尿道下裂の患者由来の皮膚の線維芽細胞を用いた研究では、皮膚の支持基盤を構成する分子が選択的にBPA曝露により抑制されることがわかり、その抑制の強さには、個人差があることがわかりました。

ヒトES細胞を用いた有害物質の曝露による神経発達影響のメカニズムの予測

DOHaD (developmental origins of health and disease) 仮説では、胎児期と出産後の初期の発達時期の環境状況が成長、体躯や臓器の構造と代謝に対する影響を通して生涯の健康と能力に影響すると、提唱されています。この事象はプログラミングと呼ばれています。初期発生を含む胎生期の全過程では、時期特異的な遺伝子やタンパク質の発現が入れ替わり、胎児期のプログラミングを整えていきます。この胎生期プログラミングの分子メカニズムは、DNAのメチル化修飾や染色体のヒストンタンパク質のアセチル化修飾などによる遺伝子発現制御が基盤となっています。その過程を模倣するモデル細胞として、ヒトES細胞に着目し、未分化や分化初期の化学物質曝露がその後に見られる晩発影響を調べました。

メチル水銀に対するヒトとマウスの感受性を比較した研究では、神経細胞の突起伸長に対してヒトES細胞は、マウスES細胞よりもメチル水銀の感受性が高く、神経分化に関与する遺伝子群への影響もより強いことを明らかにしました。さらに、同様に、ヒトES細胞を用いて、ヒトで催奇形性を引き起こすことが知られているサリドマイド、疫学調査や動物実験から神経発達障害への関与が懸念されているPCB代謝物である水酸化PCB、難燃剤BDEおよびBPAの神経細胞への分化の影響を調べたところ、難燃剤BDEでは、神経突起の伸長を抑制しました(図5)。炎症や神経の



■ 図6 新たな環境有害要因によるヒト神経前駆細胞からなるスフィア(細胞塊)への影響

ヒトES細胞由来の神経前駆細胞を用いて、3次元培養を試みて、スフィアと呼ばれる球状の細胞の塊の培養に成功し、これを用いて dendritic tree と呼ばれるナノマテリアルの影響を調べました。

A. 通常の平面に培養した神経前駆細胞の様子、B. 神経に発達したニューロスフィアの様子、C. dendritic tree 曝露によるニューロスフィアの発達抑制影響、D. dendritic tree がニューロスフィアの周囲に集まっている様子(曝露直後、上)と、dendritic tree がニューロスフィア内に入り、満たされている様子(曝露3日後、下)

シグナル伝達に関与する遺伝子群も変動していました。これらのことから、小児の神経発達に影響を及ぼす潜在的な能力があることが考えられます。

ヒト神経前駆細胞の3次元培養における新たな環境有害要因による影響

ヒトES細胞から成熟した神経細胞までには長い道のりがあり、神経幹細胞を経てヒト神経前駆細胞が生まれます(コラム1図1)。ヒト神経前駆細胞を用いて、放射性セシウムやナノマテリアルの曝露の影響を調べました。細胞の機能を高く維持することが可能な3次元培養法を用いて、より生体内に近い状態で実験を行いました。3次元培養で作成したヒト神経前駆細胞のスフィア(細胞塊)に、放射性セシウムを照射した実験では、これまでの報告よりも低い線量でDNA傷害や炎症性遺伝子が誘導されることがわかりました。神経突起の伸長などが線量依存的に抑制されることもわかりました。また、dendritic tree という薬物輸送に用いられる樹状ナノマテリアルの曝露による影響を調べた研究では、dendritic tree の大きさや表面の電荷の状態によって、神経突起の伸長や神経細胞への分化が変化することがわかりました(図6)。

このように、有害化学物質の発達への影響のメカニズムをよりよく理解するためには、ES細胞や組織における幹細胞を用いた研究が今後も必要です。

ヒト組織由来の細胞、ES/iPS 細胞を用いた化学物質が健康に及ぼす影響の予測法

化学物質の健康影響の評価や予測手法に関する研究は、ES/iPS 細胞実験や網羅的遺伝子解析実験、さらには数理統計学や情報科学を取り込んだ融合的な研究分野に発展しています。現在では、「システムズトキシコロジー」や「コンピューテーショナルトキシコロジー」として、重要な研究領域になりつつあります。

世界では

幹細胞、特にヒトES細胞を用いたインビトロ試験について、世界で初めて専門誌に発表したのは、2002年の米国のオハイオ医科大学です。ヘキサクロロベンゼンが臍帯血中の濃度と同じレベルで、細胞毒性を示したものです。しかし、マウスの胎児皮膚から分離されたNIH3T3という培養細胞を用いた実験では、その影響は認められませんでした。その後、2006年に米国で開始した大型プロジェクトでは、幹細胞に限らずさまざまなインビトロ細胞試験を用いたハイスループットスクリーニングが数千の化学物質について実施され、2008年からこれらのデータが公開されています。また、2008年ごろ、米国やスウェーデン、オランダ、ドイツの欧州動物代替法機関において、ヒトES細胞を用いた試験が行われ、これらの細胞がヒトの神経の発達に対する毒性を試験するための

モデル細胞として有用であることが数多く報告されました。ドイツでは世界に先駆けて、メチル水銀やベンツピレンが神経発達に影響することが示されました。

このように、欧米では化学物質の胎児への影響を明らかにするために、ヒト細胞を用いてどの濃度で化学物質の影響が現れるのかを調べています。

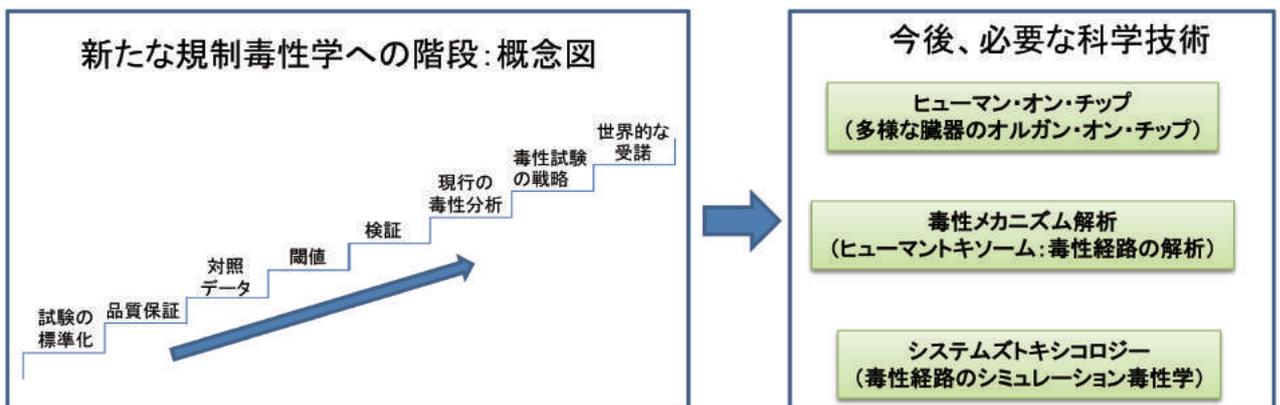
将来的には、動物実験に依存した毒性評価試験から脱却し、細胞を用いた試験を化学物質管理規制へ活用するための戦略が練られています。欧州では、毒性発現メカニズムに基づくインビトロ試験やインシリコ解析（計算機を利用した化学物質の毒性等の活性の予測）を組み合わせた方法を、動物による反復投与毒性試験の代替法にすることを目指して、2011年より5カ年計画で70以上の大学、公的研究機関、産業界研究機関が参加したプロジェクトが実施されました。さらに、2017年よりヒト細胞培養実験、インシリコ、遺伝子解析、数理統計学的手法も含まれた総合的なプロジェクトEU-TOXRISKが新たにスタートし、動物実験代替化への移行が進んでいます（図7）。

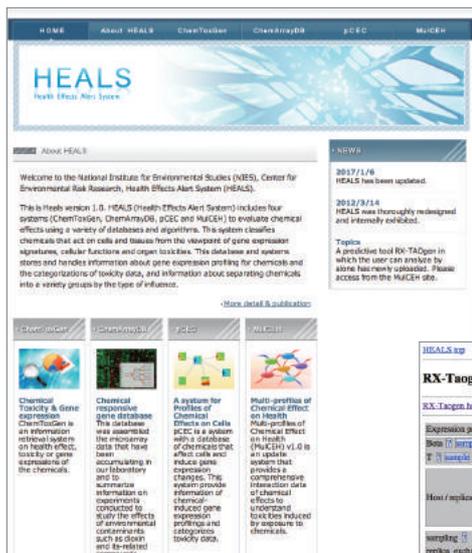
■ 図7 米国、欧州における新たな規制毒性学への概念図とそれに必要な科学技術

化学物質の規制に関する評価方法に関して、欧米では、これまでよりも更に、ステップアップした、ヒト組織由来の細胞を活用した戦略を提示しています。左側の段階の概念図では、標準化から世界的な受諾まで、8段階の事項を示しており、それに必要な科学技術として、右に示す3項目が上げられています。これを目指して、大型研究が精力的に進められています。（Busquet & Hartung 2017 の文献を参考に改変）

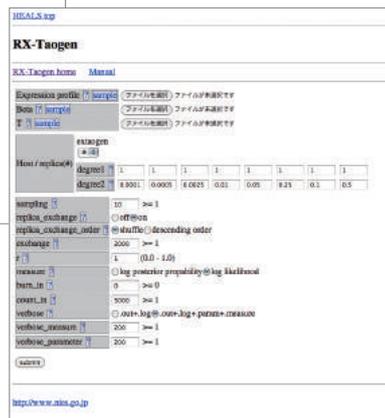
日本では

ヒトに対する化学物質の毒性を評価するためには正常なヒト細胞の利用が欠かせないことから、化学薬





■ 図8 化学物質の健康影響を予測するための支援ツール「健康影響予測システム」HEALS Health Effects Alerts System (<http://project.nies.go.jp/heals/>)は、化学物質の健康影響を評価するための研究を支援する4つのサブシステム(ChemToxGen, ChemArrayDB, PCECとMulCEH)からなっています。最初のChemToxGenは、米国EPAのDSSTOXをはじめとする9種類の毒性データベースに最も多く情報が掲載されていた物質の各データベースの毒性情報数を掲載しています。人への健康リスク情報であるIRISデータベースの500物質について、毒性の種類ごとに整理表を掲示しています。ChemArrayDBは、有害化学物質について、遺伝子発現を指標した用量反応関係の解析が可能なツールとなっています。PCECは、細胞や組織に対する影響、影響のメカニズムに関するデータベース機能と、それぞれの相互関係を包括的なネットワークとして可視化するための機能を提供しています。MulCEHは、マウスES細胞を用いた神経分化への影響を調べた成果を掲載しています。MulCEHに搭載しているRX-TAOGEN (<http://extaogen.nies.go.jp/rxtaogen/cgi-bin/top.cgi>)は、独自に高速化したベジアンネットワーク解析ツールです。化学物質曝露による遺伝子発現の相互作用ネットワークの解析に有用です。



品企業を中心にヒトES/iPS細胞が毒性評価の強力なツールになると考えられています。住友化学と理化学研究所のグループは、簡便で汎用性の高い発生毒性の代替法試験開発を目指して、ヒトES/iPS細胞を用いた試験法を開発しており、毒性予測の指標になりうる遺伝子の有効性や、ヒトES細胞から網膜色素上皮細胞の形成による毒性試験への応用を報告しています。

また、東京大学のグループでは、ヒトiPS細胞を用いてヒト臍帯血で検出される有害化学物質20物質による、ゲノム修飾や細胞毒性の変化を調べています。

ヒトES細胞の利用は生命倫理の問題があることから、経済産業省や厚生労働省などの研究機関では、iPS細胞を用いた動物代替法試験が進められ、心毒性や肝毒性の代替法試験が行われています。

また、日本化粧品工業連合会の動物実験代替専門委員会感性代替法ワーキンググループと東北大学らは、ヒト血液細胞を用いてアレルギー性接触皮膚炎のモデルになる皮膚感性試験を開発し、有用性を検討しています。

国立環境研究所では

2006年から2011年にかけて行われた環境リスク研究プログラムにおいて、「インフォマティクス手法を活用した化学物質の影響評価と類型化手法」を開発し、化学物質の健康影響を評価するための研究を支援

する「健康影響予測システム」を構築しました(図8)。遺伝子発現、細胞や組織に対する影響、影響のメカニズムに関するデータベースと、それぞれの相互関係を包括的なネットワークとして可視化するための機能を公開しています。

2005年から2015年にかけて実施された「ナノ粒子及びナノマテリアルの健康・毒性評価に関するプロジェクト」では、細胞を用いた研究が動物実験の代替法として行われてきました。以前より黄砂やPM2.5などの複合的な媒体の毒性評価にインビトロの細胞試験が活用されています。また、資源循環・廃棄物研究分野では、ヒト組織由来のがん細胞に各種の核内受容体を遺伝子導入したレポーター遺伝子アッセイが、簡便で迅速な有害化学物質の検出法として使われています。近年では、PM2.5による健康影響についての関心が高まっています。そこで、原因物質を同定したり、影響の個人差を調べたりするために、ヒトiPS細胞から呼吸器系細胞への分化培養法を開発し、毒性評価に活用する研究が行われています。

これまで、化学物質の毒性と遺伝的素因(親から子へと受け継がれる遺伝的体質)の関係が明らかになっていないばかりか、探索するためのツールすらも存在していませんでした。ヒト組織由来細胞を用いることで、化学物質に対する宿主側の感受性要因(一般には、特定の遺伝子配列を指す、遺伝子多型)の候補を探索するための実験系が開発されることが期待できます。

国立環境研究所における 「ヒト細胞を用いた発達神経毒性試験法と 発達期影響予測法の開発に関する研究」のあゆみ

国立環境研究所では、化学物質のヒトの健康影響評価に関する研究を行っています。
ここでは、その中から、ヒト細胞を用いた発達神経毒性試験法と
発達期影響予測法の開発に関するものについて、そのあゆみを紹介します。

年度	課題名
2005～2006	化学物質曝露による次世代影響の予測システムの開発のための基礎的研究
2005～2007	ゲノム情報を利用した環境化学物質の影響評価法の開発に関する研究
2006～2009	形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究：内分泌かく乱物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の分子メカニズムに関する研究： ^{*1}
2006～2011	インフォマティクス手法を活用した化学物質の影響評価と類型化手法の開発
2007～2008	マウスES細胞を用いた次世代影響予測システムの開発研究 ^{*2}
2007～2009	マルチプロファイリング技術による化学物質の胎生プログラミングに及ぼす影響評価手法の開発 ^{*1}
2008～2010	男児外陰部異常性および生殖機能障害と化学物質：個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究 ^{*3}
2009～2014	確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験データ適用法の標準化とヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の発達期影響予測法に関する研究 ^{*1}
2009～2011	小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備 ^{*1}
2011～2015	ナノマテリアルの毒性評価手法の開発と安全性に関する研究
2012～2014	樹状ナノ粒子（ dendリマー）の生体影響評価に関する研究 ^{*2}
2012～2013	階層的ゲノミクス解析を基盤とした放射性物質による健康影響の解明：胎児影響モデルの細胞アッセイを活用した影響閾値限界の推定 ^{*4}
2014～2016	iPS細胞を活用した in vitro ハザード評価システムの構築に関する研究
2015～2018（予定）	エピジェネティック活性をもつ化学物質の影響把握と新たな環境リスクの予防策 ^{*2}

*1 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業（分担）

*2 文部科学省（日本学術振興会）科学研究費補助金（代表）

*3 環境省 環境研究・技術開発推進費（代表）

*4 環境省 委託事業 原子力災害影響調査等事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）（分担）

本号で紹介した研究は、以下の機関、スタッフにより実施されました（所属は当時、敬称略、順不同）。

〈研究担当者〉

国立環境研究所：曾根秀子、永野麗子、豊柴博義、今西哲、赤沼宏美、何小明、南齋ひろ子、秦咸陽、曾勤、曾洋、黄倉雅弘、持立克身、伊藤智彦、黒河佳香、平野靖史郎、青木康展、白石貫明、米元純三

東京大学：大迫誠一郎、秋光佳信、桂真理

京都大学：藤淵航

東北大学：福田智一

国立成育医療センター：緒方勤、深見真紀

● 過去の環境儀から ●

これまでの環境儀から、化学物質の健康への影響に関するものを紹介します。

No.59 未来に続く健康を守るために

—環境科学物質の継世代影響とエピジェネティクス

環境化学物質は、微量でも日常的に摂取すると健康に悪影響を及ぼすものがあります。妊娠中に摂取した化学物質の影響が子や孫以降の世代にまで受け継がれる「継世代影響」の可能性があり、「エピジェネティクス」という、DNAの塩基配列を変化させることなく遺伝子の機能を変化させる作用が要因の一つと考えられています。59号では、化学物質の継世代影響のメカニズムを探る研究を紹介するとともに、エピジェネティクスについても解説しています。

No.56 大気環境中の化学物質の健康リスク評価

—実験研究を環境行政につなげる

環境中の化学物質の80%以上は大気中に放出されると見積もられています。これらの化学物質の一部は発がん性などの有害性があり、健康リスクの評価が必要です。56号では、国立環境研究所が取り組んできた、大気環境中に存在する化学物質の有害性とリスク評価に関する研究、特にがんの原因となる突然変異の体内での発生を定量的に評価する基礎的な研究を紹介しています。また、国内外の知見を総合的に検討して大気中の化学物質のリスクを評価し、指針値設定などの環境施策につなげる研究を紹介しています。

No.46 ナノ粒子・ナノマテリアルの生体への影響

—分子サイズにまで小さくなった超微小粒子と生体との反応

ナノマテリアルとは、非常に小さなサイズの物質をいいます。きわめて分子に近い生体内挙動を示すので、人体に対して、これまでの粒子とは異なる影響を及ぼす可能性があります。46号では、国立環境研究所が取り組む、ナノ粒子やナノマテリアルのヒトの健康への影響を中心とした安全性評価に関する研究について、その概要と成果を紹介しています。

No.27 アレルギー性疾患への環境化学物質の影響

近年、アトピー性皮膚炎など、アレルギー性疾患が小児を中心に急増しており、化学物質が発症や悪化の要因ではないかと危惧されています。アレルギー性疾患に対し適切で迅速な対策を打つためには、疾患が増加した要因の究明が必要です。国立環境研究所では、アレルギー性疾患への環境化学物質の影響を研究し、低濃度の曝露でもアレルギー症状を悪化させる化学物質が存在することなどの成果を得ています。27号では、これらの研究成果を広く紹介しています。

No.1 環境中の「ホルモン様化学物質」の生殖・発生影響に関する研究

化学物質の中には、ヒトや動物のホルモンに類似した構造を持つものがあり、低い濃度でも影響を及ぼすことが心配されています。1号では、国立環境研究所が取り組む環境ホルモン（内分泌かく乱物質）が生殖や発生に及ぼす影響の研究の中から、環境ホルモン物質の一つであるダイオキシンがラットの生殖や発生に及ぼす影響を中心に紹介しています。

環境儀 No.65

—国立環境研究所の研究情報誌—

2017年6月30日発行

編集 国立環境研究所編集分科会

(担当WG: 山本裕史、曾根秀子、石垣智基、岡川 梓、青野光子、滝村 朗)

発行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2

問合せ先 国立環境研究所情報企画室 pub@nies.go.jp

編集協力 有限会社サイテック・コミュニケーションズ

印刷製本 朝日印刷株式会社 つくば支社

「環境儀」既刊の紹介

No.19 2006年 1月	最先端の気候モデルで予測する「地球温暖化」	No.42 2011年 10月	環境研究 for Asia/in Asia/with Asia —持続可能なアジアに向けて
No.20 2006年 4月	地球環境保全に向けた国際合意をめざして—温暖化対策における社会科学的アプローチ	No.43 2012年 1月	藻類の系統保存—微細藻類と絶滅が危惧される藻類
No.21 2006年 7月	中国の都市大気汚染と健康影響	No.44 2012年 4月	試験管内生命で環境汚染を視る—環境毒性の <i>in vitro</i> バイオアッセイ
No.22 2006年 10月	微小粒子の健康影響—アレルギーと循環機能	No.45 2012年 7月	干潟の生き物のはたらきを探る—浅海域の環境変動が生物に及ぼす影響
No.23 2007年 1月	地球規模の海洋汚染—観測と実態	No.46 2012年 10月	ナノ粒子・ナノマテリアルの生体への影響—分子サイズにまで小さくなった超微小粒子と生体との反応
No.24 2007年 4月	21世紀の廃棄物最終処分場—高規格最終処分システムの研究	No.47 2013年 1月	化学物質の形から毒性を予測する—計算化学によるアプローチ
No.25 2007年 7月	環境知覚研究の勧め—好ましい環境をめざして	No.48 2013年 4月	環境スเปシメンバンキング—環境の今を封じ込め未来に伝える「バトンリレー」
No.26 2007年 10月	成層圏オゾン層の行方—3次元化学モデルで見るオゾン層回復予測	No.49 2013年 7月	東日本大震災—環境研究者はいかに取り組むか
No.27 2008年 1月	アレルギー—性疾患への環境化学物質の影響	No.50 2013年 10月	環境多媒体モデル—大気・水・土壌をめぐる有害化学物質の可視化
No.28 2008年 4月	森の息づかいを測る—森林生態系の CO ₂ フラックス観測研究	No.51 2014年 1月	旅客機を使って大気を測る—国際線で世界をカバー
No.29 2008年 7月	ライダーネットワークの展開—東アジア地域のエアロゾルの挙動解明を目指して	No.52 2014年 4月	アオコの有毒物質を探る—構造解析と分析法の開発
No.30 2008年 10月	河川生態系への人為的影響に関する評価—よりよい流域環境を未来に残す	No.53 2014年 6月	サンゴ礁の過去・現在・未来—環境変化との関わりから保全へ
No.31 2009年 1月	有害廃棄物の処理—アスベスト、PCB 処理の一翼を担う分析研究	No.54 2014年 9月	環境と人々の健康との関わりを探る—環境疫学
No.32 2009年 4月	熱中症の原因を探る—救急搬送データから見るその実態と将来予測	No.55 2014年 12月	未来につながる都市であるために—資源とエネルギーを有効利用するしくみ
No.33 2009年 7月	越境大気汚染の日本への影響—光化学オキシダント増加の謎	No.56 2015年 3月	大気環境中の化学物質の健康リスク評価—実験研究を環境行政につなげる
No.34 2010年 3月	セイリング型洋上風力発電システム構想—海を旅するウィンドファーム	No.57 2015年 6月	使用済み電気製品の国際資源循環—日本とアジアで目指す E-waste の適正管理
No.35 2010年 1月	環境負荷を低減する産業・生活排水の処理システム—低濃度有機性排水処理の「省」「創」エネ化〜	No.58 2015年 9月	被災地の環境再生をめざして—放射性物質による環境汚染からの回復研究
No.36 2010年 4月	日本低炭素社会シナリオ研究—2050年温室効果ガス 70%削減への道筋	No.59 2015年 12月	未来に続く健康を守るために—環境化学物質の継世代影響とエピジェネティクス
No.37 2010年 7月	科学の目で見える生物多様性—空の目とミクロの目	No.60 2016年 3月	災害からの復興が未来の環境創造につながるまちづくりを目指して—福島発の社会システムイノベーション
No.38 2010年 10月	バイオアッセイによって環境をはかる—持続可能な生態系を目指して	No.61 2016年 6月	「適応」で拓く新時代!—気候変動による影響に備える
No.39 2011年 1月	「シリカ欠損説」と海域生態系の変質—フェリールを利用してそれらの因果関係を探る	No.62 2016年 9月	地球環境 100年モニタリング—波照間と落石岬での大気質監視
No.40 2011年 3月	VOCと地球環境—大気中揮発性有機化合物の実態解明を目指して	No.63 2016年 12月	「世界の屋根」から地球温暖化を探る—青海・チベット草原の炭素収支
No.41 2011年 7月	宇宙から地球の息吹を探る—炭素循環の解明を目指して	No.64 2017年 3月	PM _{2.5} の観測とシミュレーション—天気予報のように信頼できる予測を目指して

●環境儀のバックナンバーは、国立環境研究所のホームページでご覧になれます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/kankyogi/index.html>

「環境儀」



地球儀が地球上の自分の位置を知るための道具であるように、「環境儀」という命名には、われわれを取り巻く多様な環境問題の中で、われわれは今どこに位置するのか、どこに向かおうとしているのか、それを明確に指し示すべしという意図が込められています。「環境儀」に正確な地図・行路を書き込んでいくことが、環境研究に携わる者の任務であると考えています。

2001年7月 合志 陽一
 (環境儀第1号「発刊に当たって」より抜粋)



このロゴマークは国立環境研究所の英語文字 N.I.E.S で構成されています。N=波(大気と水)、I=木(生命)、E.Sで構成される○で地球(世界)を表現しています。ロゴマーク全体が風を切った左側に進もうとする動きは、研究所の運動性・進歩・向上・発展を表現しています。

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へリサイクルできます。