

一般財団法人残留農薬研究所 化学部

令和 5 年度調査研究計画書

令和 5 年 4 月 28 日

令和 5 年度調査研究計画書

課題 1

室名及び担当者	代謝第 1 研究室 笠神威雄 (研究総括) , 杉岡大介
課題名	ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立
目的	農薬の開発では、候補化合物の動物での <i>in vivo</i> データ (毒性試験及びラット代謝試験) からヒトに対するリスクを評価し、またヒト及び他動物種の組織や酵素系での <i>in vitro</i> 代謝データが補足的にリスク評価に利用されている。ヒト由来の肝ミクロソームや肝細胞など、ヒト試料による <i>in vitro</i> 代謝実験は汎用の手法であるが、ヒトにおける <i>in vivo</i> での代謝物プロファイルを網羅的に予測することは難しく、また <i>in vitro</i> 代謝だけでは排泄経路の特定には至らない。近年、ヒト肝キメラマウス (ヒト肝細胞を有するキメラマウス) が評価動物として注目されており、既存の動物実験や <i>in vitro</i> 代謝実験では得られないデータを取得できる可能性があると考ええる。本研究は、メトキシクロル代謝をモデル反応として、 <i>in vitro</i> 代謝およびヒト肝キメラマウスでの <i>in vivo</i> 代謝を比較、検証し、ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立を目指すものである。
調査研究期間	令和 5 年 4 月 1 日から令和 8 年 3 月 31 日 3 年計画の 1 年目
前年度までの結果の概要	新規課題につき無し
調査研究方法の概要	初年度は、メトキシクロル (MXC) の <i>in vitro</i> 代謝試験系での種差・性差を調査する目的で行う。これまでの知見から、MXC は肝ミクロソームでの酸化的 <i>O</i> -脱メチル化により、エストロゲン様物質 Mono-OH-MXC と Bis-OH-MXC に変換されることが知られている。また、マウスの <i>in vivo</i> 代謝で検出された脱塩素化・脱塩化水素化 MXC もエストロゲン様物質と考えられている。これら生物活性を有する代謝物を定性的・定量的に評価するため、ヒトを含めた 7 動物種の雌雄 (男女) の酵素源 (肝 S9) で代謝反応を行う。なお、脱塩素化・脱塩化水素化 MXC の生成は嫌氣的条件下で生成すると考えられるため、好氣的・嫌氣的代謝反応での代謝物プロファイルも比較し、検証する。

<p>試験条件</p>	<p>1) 被験物質 モデル化合物として、動物試験ではヒトの生殖に毒性影響を及ぼす可能性があることが示されているメトキシクロル (MXC) を選択する。被験物質としては、網羅的な代謝物プロファイルの推定が可能な [¹⁴C]MXC を使用する。</p> <p>2) 代謝反応 諸条件は以下の通りとする。その他反応条件 (時間, MXC 濃度等) は当実験内で検討し、確立する。 酵素源：第 I 相と第 II 相の代謝反応が可能な肝 S9 画分を用いる。 動物種：ヒトに加え、毒性試験・代謝試験で汎用のマウス, ラット, イヌ, ウサギ, サル及びヤギとする。 性：雌雄 (男女)。ただし、ヤギについては雌のみとする。 補酵素：代謝反応には、NADPH (第 I 相系) 並びに UDPGA, PAPS 及び GSH (第 II 相系) を補酵素として用いる。 反応：好氣的及び嫌氣的条件下, 37°C 下で振とうする。</p> <p>3) 試料の分析 反応停止後、遠心分離して得られる上清画分をラジオ HPLC で分析し、クロマトグラム上の面積% (% on HPLC) を比較する。 標品との保持時間の比較から代謝物を同定し、標品がない代謝物については LC/MS/MS でその構造を推定する。</p>
<p>令和 5 年度 経費</p>	<p>研究職職員の年間従事時間：240 時間 放射性標識被験物質の合成／購入費：108 万円 肝 S9 画分 (7 動物種, 雌雄) の購入費：56 万円 代謝反応試薬の購入費：35 万円</p>
<p>備考</p>	

一般財団法人残留農薬研究所 毒性部

令和 5 年度調査研究計画書

令和 5 年 4 月 1 日

令和 5 年度調査研究計画書

課題 1

部・室名 及 び 担 当 者 名	<p>毒性部生殖・発生毒性研究室：北條仁（研究総括）、青山博昭、佐藤旭、高橋研、遠藤直子、西岡康、浦川千鶴</p> <p>毒性部病理研究室：高橋尚史、加藤由隆、小山彩</p> <p>毒性部短期毒性研究室：小坂忠司、田島均</p>
課 題 名	<p>毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ラット/マウスの遺伝学的基盤の整備）：</p> <p>アウトブレット動物に保持される突然変異遺伝子およびステロイドホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析</p>
目 的	<p>通常毒性試験では、遺伝的に不均一なヒト集団のモデルとして、ある程度の遺伝的多様性を持たせたアウトブレットの動物集団が好んで用いられる。近親交配を避けて維持されるアウトブレット動物の集団内には様々な遺伝子多型（変異）が含まれており、これらの中には化学物質に対する反応性に個体差を生み出すものも数多く含まれると推測される。この様な個体差の存在はアウトブレット動物をヒトのモデルとして利用する最大の利点であるものの、これらの遺伝子多型や変異が実験結果に悪影響を及ぼす場合もある。例えば、投与物質に対する感受性の鈍い個体ばかりが特定の投与群に偏って出現すると、用量反応関係が見かけ上消失し、実験結果に誤った結論が下される恐れがある。また、動物集団に含まれる様々な潜性突然変異遺伝子は、特に生殖・発生毒性試験で観察される胎児奇形を始めとして、しばしば毒性評価に支障を来す形質を誘発する。そこで、本研究では、アウトブレット動物の集団に保持される様々な遺伝子多型のうち、特に毒性試験の結果を解釈する上で支障となるような多型や変異に注目して、それらを可能な限り同定すると共に確定診断技術の開発に努め、実験動物の遺伝的基盤を整備することを目的とする。また、これらの成果として明らかにされる遺伝子多型には、化合物の毒性を模倣する作用や毒性そのものを修飾する効果を持つものも含まれる場合があるため、その様な遺伝子多型が表現型に及ぼす影響についても積極的に調査して、得られた成果を毒性学の進展に還元する。</p>
調 査 研 究 期 間	<p>令和 5 年 4 月 1 日から令和 8 年 3 月 31 日</p> <p>3 年計画の 1 年目</p>
前 年 度 ま で の 結 果 の	<p>ラットの事業に関しては、課題 3 で発見した腎腫大を始めとして、当研究所で実施した毒性試験で遺伝形質と疑われる幾つかの事例に遭</p>

<p>概要</p>	<p> 遇したものの、いずれもファウンダーをライブストックのまま分離することが困難であったことから、これらの解析は実施しなかった。一方、本事業では同定した遺伝子多型の表現型解析に積極的に取り組むことも課題の一つとして含めている。そのため、昨年度は表皮水疱症の原因となる <i>Col17a1</i> の重複変異を取り上げて胎生期に遡って異常の発生過程を調査することとした。本突然変異を持つ BL ラットを用いて妊娠 13, 16 および 20 日齢の胚または胎児を組織学的に調べた結果、(1) 水疱は出生直前の比較的発育が進んだ段階 (妊娠 20 日齢) から形成されること、(2) いずれの日齢においても野生型個体の表皮・舌・口蓋の基底細胞, エナメル芽細胞, および角膜上皮細胞に抗 Collagen XVII 抗体の陽性像が観察されること、および (3) ヘテロ型個体では同様の部位に陽性像が検出されたものの、その染色強度は日齢を通じて野生型個体と比較して減弱していたことなどが明らかとなった。また、これらの胚または胎児から抽出した total RNA を用いて RNA-seq を実施した結果、(4) ホモ型個体における <i>Col17a1</i> の mRNA 発現量はいずれの日齢においても野生型個体と比較して減少していたこと、および (5) 調べた 16 種類の表皮水疱症関連遺伝子のうち、特に接合部型表皮水疱症 (Junctional EB) に関連する遺伝子の多くで mRNA の発現量が 2 倍以上に増加もしくは減少していることなどが示された。 </p> <p> マウスの事業では、C57BL/6J×C3H の交配から得られた F2 個体群または C57BL/6J と 129 の交配から得られたリコンビナント近交系群を用いた QTL 解析から、エストロゲンに対する子宮の応答性を修飾する可能性を持つ幾つかの遺伝子座が示唆された。また、それらの QTL 遺伝子座候補の中から <i>Aqp12</i> 遺伝子の多型に着目してこの遺伝的変異がエストロゲンに対する子宮の応答性に及ぼす影響を調べたところ、野生型と考えられる C57BL/6Jcl マウス (<i>Aqp12</i> 遺伝子について+/+) と比較して、C3H 型の遺伝子多型を導入したマウスとこの遺伝子をノックアウトしたマウスの両方で、前期発情期および後期発情期に限って子宮の湿重量と実質重量の両者もしくは実質重量のみに有意な増加が観察された。これらの結果は、<i>Aqp12</i> 遺伝子が子宮実質からの水分排泄に関与する可能性を示唆するものと考えられる。しかし、現時点では子宮における <i>Aqp12</i> 遺伝子の発現を確認するには至っておらず、<i>Aqp12</i> 以外の遺伝子座については未だ解析に着手することができていない。 </p>
<p>調査研究方法の概要及び試験条件</p>	<p> 分離可能な新規突然変異形質に遭遇した場合には、積極的に表現型の解析と原因遺伝子の同定に取り組む。また、前年度に引き続き、以下のテーマについて、可能な限り解析を進める。 </p>

1. 表皮水疱症ラット BL (原因遺伝子 *Col17a1*)

ヘテロ個体でも Collagen XVII の発現強度が減弱していたことや、*Col17a1* の変異に伴ってその他の接合部型表皮水疱症関連遺伝子の変動していたことを検証するため、個体別に抽出した mRNA およびタンパクを用いてリアルタイム PCR 法やウェスタンブロット法による定量解析に取り組む。また、変動する遺伝子群はいずれも基底膜の構成タンパクをコードする遺伝子であったことから、免疫染色によって基底膜におけるタンパク発現の状態を調べる。

2. 腎欠損ラット AK (候補遺伝子 *Lrp1*)

本ラットについては、NGS 解析によって候補領域内に *Lrp1* のインフレーム欠失を検出したものの、これまで本遺伝子が腎臓発生に関与するとの報告がないため、先の解析において候補突然変異を見落とした可能性は依然として残される。そこで、腎臓の発生が起こる前後の時期の胚として、妊娠 11.5, 13.5 および 15.5 日齢の胚を用いて RNAseq 解析を実施し、候補領域内の遺伝子を対象に mRNA の発現を調べ、改めて *Lrp1* と腎欠損との関連を検証する。標本採取にあたっては、各時点 3 腹から得られた胚について *Lrp1* の遺伝子型ごとにプールして用いる。また、その他に発現の変動する遺伝子がないか探索する。

3. 後肢麻痺ラット CACK (原因遺伝子 *Reep1*)

本ラットについては、*Reep1* の重複に伴うフレームシフトによって mRNA の分解機構が作動し、mRNA 発現の量が低下していることが予想される。そこで、この仮説を検証するため、リアルタイム PCR 法によって mRNA 発現量に変化がないか調べる。また、免疫染色やウェスタンブロットティングなどの手法を用いて、変異タンパクの発現状況も確認する。

4. マウスを用いたエストロゲンに対する子宮の応答性に及ぼす遺伝要因の解析

Aqp12 遺伝子座に検出された変異 (アミノ酸置換を伴う SNP) については、より信頼性の高い抗体を用いた免疫染色を試みると共に、これらの臓器における mRNA の発現を調査して、エストロゲンに対する応答性との因果関係をさらに詳細に解析する。また、この遺伝子変異と精巣重量との間に明瞭な相関関係が観察されているので、精巣、精巣上体及び精管を含む雄の生殖器官におけるこの遺伝子の発現や局在性を確認する。

エストロゲンに対する子宮の応答性を修飾する可能性を持つその他の

	遺伝子座についても、有力な QTL 遺伝子座候補と考えられる <i>AMH</i> 遺伝子座を含む幾つかの候補遺伝子について、可能な限り遺伝子多型の有無や子宮を含む生殖器官における発現の有無等の解析に取り組む。
令和 5 年度 経 費	研究職職員の年間従事時間：約 150 時間 RNA-seq 解析、候補遺伝子のクローニング及びシーケンシング等の外注：約 100 万円 動物、飼料及び試薬等の購入：約 100 万円
備 考	成果の公表：データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定

課題 2

室名及び 担当者	生殖・発生毒性研究室：高橋研（研究総括）、佐藤旭、遠藤直子、西岡康、浦川千鶴、北條仁、青山博昭
課 題 名	毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ウサギの遺伝学的基盤の整備）： ウサギの系統差に着目した背景データの蓄積
目 的	残留農薬研究所では、これまで日本白色種（Japanese White, JW）ウサギを用いて発生毒性試験を実施しており、この系統については十分な背景データの蓄積がある。しかし、世界的に広く用いられているニュージーランド白色種（New Zealand White, NZW）を用いて発生毒性試験を実施した経験はこれまでになく、様々な化合物のウサギに対する発生毒性に関する系統差を検討するための基盤となる背景データの蓄積もない。 そこで、本課題においては、発生毒性試験に汎用されるウサギの代表的なアウトブリード系統（NZW ウサギ）を対象として、毒性評価の基礎となるデータの蓄積を目的に、標準的な発生毒性試験で評価される指標に関するデータを収集する。
調 査 研 究 期 間	令和 3 年 4 月 1 日から令和 6 年 3 月 31 日 3 年計画の 3 年目
前年度までの 結果の 概 要	昨年度までの取り組みによって、生産場で自然交配させたニュージーランド白色種（Kbl:NZW）の雌ウサギを妊娠早期に当研究所に導入して実施した背景データの採取では、妊娠率が当研究所で人工授精を行なった日本白色種のものと比較して低いこと、および投与期間前半の体重増加量および摂餌量の低下が顕著であり、流産した雌の数もやや高率であることが明らかとなり、また、これらの発生毒性試験実施に不利益な Kbl:NZW の性質は、交配前の雌動物を当該施設の飼育条件に十分順化させたのちに人工授精法を用いて交配することによって

	改善することが明らかになった。これらの取り組みによって発生毒性試験 2 試験分の背景対照値を蓄積することができたが、胎児の奇形学的検査において 2 試験ともに低頻度ながら奇形の自然発生が認められ、ウサギにおいてもラットと同様に生産場の動物集団には胎児奇形を誘発する様々な潜性突然変異遺伝子が含まれる可能性が示唆された。
調査研究方法の概要及び試験条件	ウサギを用いた発生毒性試験において観察される胎児奇形が突然変異遺伝子によって誘発されたものか否かを確認する方法を確立する準備として、雄ウサギから採取した精液の凍結保存技術の導入とさらに可能であれば解凍した精液を用いた人工授精法による雌動物の妊娠率を検討する。ウサギ精液の凍結保存方法についてはまず文献調査を行い、適切な方法が既に報告されていれば導入の可能性を検討する。
令和 5 年度 経 費	研究職職員の年間従事時間：約 50 時間 動物、飼料及び試薬等の購入：約 150 万円
備 考	成果の公表：データがまとまり次第，日本先天異常学会，日本毒性学会等，関連学会にて発表予定

課題 3

部 ・ 室 名 及 び 担 当 者 名	毒性部生殖・発生毒性研究室：佐藤旭（研究総括），高橋研，遠藤直子，西岡康，浦川千鶴，北條仁，青山博昭 毒性部病理研究室：高橋尚史，小山彩，加藤由隆 毒性部短期毒性研究室：小坂忠司，田島均 化学部残留第2研究室：富山成人，児玉芽吹
課 題 名	甲状腺影響を適切に評価するための遺伝学的・栄養学的基盤情報の整備
目 的	近年，妊婦の甲状腺ホルモン低下と児の知能低下との関連が疫学的に示されたことを受け，農薬を含む化学物質の甲状腺に対する影響が世界的な注目を集めている。この問題に対し，2018 年に一連の OECD テストガイドラインが改定され，90 日間反復経口投与毒性試験を含む各種試験の評価項目に血中甲状腺ホルモン濃度の測定が追加された。さらに，従来の毒性試験に加え，欧米諸国では甲状腺影響の評価に特化した Comparative thyroid assay (CTA) の実施要求も高まっており，ラットの血中および脳中甲状腺ホルモン濃度に関する背景データの収集と蓄積は一段とその重要性を増している。しかし，この問題に対する取り組みの遅れから，国内における背景データの蓄積状況は諸外

	<p>国と比べて極めて不十分である。一方、一連のガイドライン改定は甲状腺影響を含めた内分泌かく乱作用の検出力の向上を図るものが多く、その中でも飼料中の植物エストロゲン含量を適正に保つことについては、先に述べた背景データの蓄積と同様に国内における対応の遅れが懸念される点である。すなわち、これまでに蓄積した背景データとの比較が困難になるとの理由から、国内の多くの施設が従前より使用する飼料からの切り替えが困難な状況にあると推測される。植物エストロゲンはげっ歯類の性成熟やエストロゲンに対する反応性を修飾することが指摘されており、本改訂ではこれらの影響を極力排除すべく、飼料中の含有量をゲニステイン相当量として 350 µg/g 未満に抑えることが推奨されている。一方、古くから植物エストロゲンが血中甲状腺ホルモン濃度に影響を及ぼし得ることが指摘されている。しかし、我々の知る限り、この様な影響に関して明確な結論は得られておらず、特に妊娠期や哺育期、胎児期や新生児期といったライフステージの変化に伴う生理的なホルモン濃度の変動に対して植物エストロゲンが及ぼす影響の有無を調べた事例も殆どないと思われる。</p> <p>以上のような国内の対応の遅れと基礎的知見の不足に対処すべく、本事業では、①ラットの各系統における血中甲状腺ホルモン濃度について背景データの取得に努めるとともに、②飼料中の植物エストロゲン含量の違いが甲状腺影響を含む内分泌かく乱作用に関連した指標に及ぼし得る影響について検討することとする。</p>
<p>調査研究 期 間</p>	<p>令和 4 年 4 月 1 日から令和 6 年 3 月 31 日 2 年計画の 2 年目</p>
<p>前年度ま での結果の 概 要</p>	<p>昨年度は、国内とタイの各生育場から導入した雌雄の Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア株式会社) に、通常の市販飼料である MF 飼料と植物エストロゲンの量を低減させた NIH-07PLD 飼料 (いずれもオリエンタル酵母工業株式会社製) を二世代に亘って与え、拡張一世代試験や CTA のガイドライン・ガイダンス文書に指定される時期に採血と剖検を行い、特にインライフ試験の実施を中心に甲状腺影響に関連した指標のデータ採取に取り組んだ。得られたデータについて引き続き統計処理を進めると共に、血清や組織標本について、順次ホルモン測定や病理組織学的検査を実施する予定である。一方、本事業の趣旨からはやや逸れるものの、データ採取の過程で以下に述べる幾つかの興味深い知見を得ることが出来た。一点目として、タイ生育場から導入した動物の中に <i>cack</i> 変異に起因すると考えられる異常呼吸音と後肢麻痺を発症する個体が出現した (課題 1 参照)。過去の取り組</p>

	<p>みによって <i>cack</i> 変異は国内の生育場から完全に排除されたと考えられるものの、上記の観察結果から、タイ生育場には依然として同変異が混入していることが示唆される。二点目として、国内生育場には、腎腫大の原因となる新たな突然変異が混入している可能性を見出すことが出来た。この異常は、国内生育場より導入した雌雄各 24 匹を無作為に交配したうちの 2 組の雌雄から出現したものであり、出現頻度が高いことから、集団内に変異が拡散していることが懸念される。三点目として、NIH-07PLD 飼料の摂取が血液凝固能の低下を介して児動物に眼球腫大を引き起こす可能性を見出した。この所見は NIH 摂取群に特異的なものであった (NIH-J 群, 12 腹中 2 腹の計 3 匹; NIH-T 群, 11 腹中 2 腹の計 2 匹) ことから、飼料の違いに起因した変化であると考えられる。当該飼料の使用が及ぼし得る影響を明らかにすることは極めて重要であるため、再現性の確認を含め、この現象について検討が必要であると考えられた。</p>
<p>調査研究方法の概要及び試験条件</p>	<p>本年度は、以下の解析に取り組む。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. インライフ試験で採取したデータについて、統計解析を進める。体重や摂餌量といったパラメトリックな指標については、分散が等しい場合に生育場と飼料を要因とした二元配置分散分析を実施する。分散が等しくない場合、および性成熟の完了日齢などのノンパラメトリックな指標については、クラスカルウォリス検定とそれに引き続く多重比較を実施する。 2. 次に挙げる指標についてデータ採取と統計解析に取り組む。 <ul style="list-style-type: none"> ・ 親動物および児動物の血中 T3/T4/TSH 濃度 ・ 児動物の甲状腺重量 ・ 親動物および児動物における甲状腺の病理組織学的検査 ・ F1 親動物に関する精子検査の一部指標 (形態検査など) ・ 必要に応じてその他臓器・組織の病理組織学的検査 <p>上記のうち、親動物における血中 T3/T4/TSH 濃度の測定に関しては、群ごとに選抜した雌雄各 6 匹の血清を対象に実施する。また、児動物のホルモン測定に関しては、半数の腹から雄を、残りの腹から雌をそれぞれ選抜し、生育場ごとに飼料と性を要因として二元配置分散分析を行なう。飼料と性との間に相互作用が検出されない場合は、雌雄のデータをプールして生育場と飼料を要因とした二元配置分散分析を行なう。その他の指標の統計解析については、1.の手法に従う。</p> 3. タイ産動物における <i>cack</i> 変異の保有状況を PCR 法に基づく遺伝子診断によって調べると共に、昨年度出現した眼球腫大および腎腫大

	<p>などについて病理組織学的な検索を行なう。</p> <p>4. その他, 当研究所で入手する MF 飼料について, 引き続きロットごとに植物エストロゲン含量とヨウ素含量のモニターを継続する。</p>
令和 5 年度 経 費	<p>研究職職員の年間従事時間：約 200 時間</p> <p>飼料分析及び試薬等の購入：約 200 万円</p>
備 考	<p>成果の公表：データがまとまり次第, 日本先天異常学会, 日本毒性学会等, 関連学会にて発表予定</p>