

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

課題番号：21KA3001

食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する
造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 理
研究分担者 齊藤洋克

令和5（2023）年 5月

目 次

I. 総括研究報告 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の 新規ハザード評価体系の基盤構築 研究代表者：横田 理	1
II. 分担研究報告 Vimentin 抗体を用いた免疫組織化学によるセルトリ細胞の機能評価法の検討 研究分担者：齊藤洋克	10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16

研究代表者: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨

食品成分の濃縮や抽出、製剤化により、従来の食経験では安全性が担保できないことがあること、また、生理活性成分を含む食品等を過剰摂取すること、等による有害影響が危惧される。実際に、疫学調査等によりこれら過剰摂取と不妊との関連が示唆されている。しかし同時に、これらの因果関係には不明瞭な点も多く残されている。その中でも特に、ホルモン様作用を有する食品等は内分泌器官への影響が懸念されるが、生殖の有害影響はその評価特性からヒトでの把握は容易ではない。このため、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた新規ハザード評価体系の基盤構築が不可欠と考える。現在、男性不妊の主な原因である造精機能障害は、生殖細胞への直接影響とそれを支持するセルトリ細胞の障害を介した間接影響に起因する。生殖細胞の影響評価は精子濃度や運動率の測定、セルトリ細胞の影響評価は細胞数の減少で評価される。しかし、先行研究において、不妊症患者の多くは精子濃度や運動率の低下が認められないこと、また、成人男性の食事を含むライフスタイルの変化等によりセルトリ細胞数が減少するような報告はなされていないことを確認しており、当該評価のみでは食品の健康影響の有用な指標にはならないこと(偽陰性)が懸念される。一方、食品摂取による影響指標として生殖細胞を支持するセルトリ細胞の機能変化が想定されるが、当該変化を検出する評価系がないことも問題点として挙げられる。

これらの問題点を踏まえ、本研究では、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた新規ハザード評価体系の基盤構築を行うことを目的とした。今年度は、先行研究において精子形成障害が生じることを報告しているビタミン A 過剰・欠乏、ビタミン E 欠乏マウス精巣組織切片を活用し精巣毒性評価法の基盤整備に努めた。具体的には、精巣毒性評価において、蛍光標識 PNA レクチン抗体を用いた精上皮周期の迅速同定法を確立し、さらに、同法に PLZF や SCP3 等の生殖細胞系列マーカー抗体との二重免疫染色を行い、生殖細胞系列の分化度を網羅的かつ定量的に捉えることで、ビタミン A 過剰マウス精巣において、減数分裂開始に重要なプレレプトテン期精母細胞以降の細胞数の有意な減少を認めた。一方、中間径フィラメント Vimentin に着目したセルトリ細胞骨格の構造変化を指標に、新たなセルトリ細胞の機能評価法を確立した。すなわち、ビタミン A 欠乏ならびに E 欠乏マウス精巣組織切片において、各精細管内における Vimentin 陽性の面積割合が有意に増加することを初めて明らかにした。

一方、ヒトと齧歯類の両方で造精機能障害を誘発するモデル化合物としてゴシポールを選択し、用量設定試験を実施した。野生型マウス雄に、単回経口曝露(30, 70, 100, 300 mg/kg 対照は溶媒のコーン油)を行い、投与後 2 週経過時に解剖・臓器のホルマリン固定等をし、HE 染色を用いたプレ実験により 300mg/kg で病理所見が認められた。今後は、ゴシポールの経口投与による本実験を実施し、これまでに我々が開発してきた生殖毒性評価によるハザード検出の有用性を検証していく。

研究分担者

齋藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 研究員

A. 研究目的

食品成分の濃縮や抽出、製剤化により、従来の食経験では安全性が担保できないことが

あること、また、生理活性成分を含む食品等を過剰摂取すること、等による有害影響が危惧される。実際に、疫学調査等によりこれら過剰摂取と不妊との関連が示唆されている。しかし同時に、これらの因果関係には不明瞭な点も多く残されている。その中でも特に、ホルモン様作用を有する食品等は内分泌器官への影響が懸念されるが、生殖の有害影響はその評価特性からヒトでの把握は容易ではない。このため、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた新規ハザード評価体系の基盤構築が不可欠と考える。

現在、男性不妊の主な原因である造精機能障害は、生殖細胞への直接影響とそれを支持するセルトリ細胞の障害を介した間接影響に起因する。生殖細胞の影響評価は精子濃度や運動率の測定、セルトリ細胞の影響評価は細胞数の減少で評価される。しかし、先行研究において、不妊症患者の多くは精子濃度や運動率の低下が認められないこと、また、食事を含むライフスタイルの変化等によりセルトリ細胞数が減少するような事例はないことを確認しており、当該評価では食品の健康影響の有用な指標にはならないこと(偽陰性)が懸念される。一方、食品摂取による影響指標として生殖細胞を支持するセルトリ細胞の機能的変化が想定されるが、これを組織学的に検出する評価系がないことも問題点として挙げられる。

これまでに私は、ビタミン A (VA) の体内動態の迅速定量法を開発し、長期間の VA 過剰状態が精子形成に影響を及ぼすことを報告した。また、精子の先体を染色しマウス精子形成サイクル(精細管ステージ I-XII)を同定する PAS-H 染色を行い、VA 過剰により精上皮周期が変化することを見出した。しかし、PAS-H 染色において先体の判別が困難で、核のクロマチン構造も不明瞭なことが多いため、一部の研究報告において正確性に欠くステージ決定や細胞同

定がなされており、毒性評価の精度の高さを担保しきれていない。

本研究ではまず初年度に、PAS 試薬の代替品である PNA レクチンを用いたマウス精細管ステージの高感度検出法の確立とこれまでに評価方法が未確立であるセルトリ細胞の機能評価の開発を行う。次に、私たちが確立したヒトの精子性状評価について、マウスの実験系への応用を試みる。最終的には、ヒトと齧歯類の両方で造精機能障害を誘発する食品等のモデル化合物として、ビタミン A (レチノイン酸)、ゴシポール等を用いて、経口投与毒性試験を実施し、経時的に解剖・サンプリングを行い、組織の病理所見とデータを照合しながら、本研究において開発したハザード評価の頑健性・有用性を検証する。

B. 研究方法

精巣毒性評価:

ホルマリンまたはメタカン固定したマウス精巣組織からパラフィン包埋ブロックを作製し、マイクロトームを用いて薄切切片を作製した。作製した切片に対し、抗原賦活化処理を行った後、下記のような精子形成関連分子を認識する抗体試薬を用いた免疫組織化学染色を行った。

- ・ 蛍光標識PNAレクチン: 半数体精子細胞の先体を高感度に染色することによる精細管ステージI-XIIの迅速な判別法の構築、半数精子細胞数の評価
- ・ SOX9, WT1, GATA4等: 核染色によるセルトリ細胞数の評価
- ・ PLZF: 核染色による精祖細胞数の評価
- ・ SCP3: 核染色による精母細胞数の評価
- ・ Vimentin: セルトリ細胞骨格を染色し、精細管の中に占める当該骨格の面積を評価

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解

析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得る等、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

造精機能障害の早期ハザード検出に資する精巣組織学的評価:

ビタミン A 過剰またはビタミン E 欠乏マウス精巣組織切片を用い、PNA レクチンを用いた蛍光免疫組織化学染色を実施し、迅速かつ高精度な精細管ステージ判別法を確立した(横田)。同法に、セルトリ細胞マーカー(SOX9, WT1, GATA4 等)や生殖細胞系系マーカー(PLZF, SCP3 等)抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、細胞集団を分類する方法を開発し、ビタミン A 過剰マウス精巣においてはステージVII以降の減数分裂開始段階のプレレプトテン期精母細胞数が減少することを見出した(図 1、横田)。また、セルトリ細胞の中間径フィラメント Vimentin に着目した組織学的評価を確立し、ビタミン A 欠乏ならびに E 欠乏マウスの各精細管内における Vimentin 発現の有意な亢進を明らかにした(図 2、齋藤、横田)。

他方、ビタミン A 過剰マウス精巣組織においては、各精細管内における Vimentin 発現の有意な亢進は認められなかった。ただし、最近我々は、精上皮周期における Vimentin の染色性に違いを認めており、ビタミン A 過剰によりその周期性が消失している可能性を見出しつつある。現在、n 数を増やし検証中である(齋藤、横田)。

用量設定試験(ゴシポール):

ヒトと齧歯類の両方で造精機能障害を誘発するモデル化合物としてゴシポールを用い、マウスの単回経口投与試験を実施した。投与濃度は、30, 70, 100, 300 mg/kg とし、対照群には

溶媒のコーン油を投与した。投与後 1, 3, 7, 13 日経過時の体重を測定し、投与 2 週経過時に解剖を行い、生殖器官重量を測定した。最高用量 300 mg/kg 群では、投与後 3 日経過時点で他群と比較し、体重の 15%の減少を認めた(図 3)。また、300 mg/kg においては投与した 6 匹のマウスの中で 1 匹の死亡を認めた。精巣組織については、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬固定後、パラフィン包埋し、薄切切片を作成し HE 染色による病理組織学解析を実施した。その結果、異型遺残体を含む精細管が最高用量 300 mg/kg 群において散見され、対照群と比較して、その比率に有意な差が認められた(図 3、齋藤、横田)。一方で、パパニコロウ染色による頭部異常率を算出した結果、対照群と比較して、全ての投与群において有意な差は認められなかった(図 3、横田)。

D. 考察

生殖ハザードは次世代影響の引き金となり得るため、実験動物の生殖毒性試験の結果から、ヒトの健康リスクを予測することは重要である。しかし、雄性生殖ハザードはその評価特性からヒトでの把握は容易ではない。本研究は、雄性生殖毒性の視点から、食品のリスク評価に資する、迅速かつ高精度な有害影響評価の基盤構築を行うことを目的としている。

雄性生殖毒性評価の中で最も感度の高い影響評価は、精巣の病理組織学解析である。しかしながら、HE 染色による病理組織学解析は定性的評価にとどまり、また、ステージ分類を行わない全体的な形態観察にて毒性判断が行われるため、定量的な生殖毒性評価が欠如しているといった問題が挙げられる。実際に、私たちが先行研究で明らかにしたビタミン A 過剰、ビタミン E 欠乏マウスは精子形成が障害されるにも関わらず、HE 染色による精巣の病理組織学的評価においては目立った所見は認められ

なかった。我々は PNA レクチン抗体を用い、精子細胞の先体を蛍光染色し可視化することにより、従来の PAS 染色法より迅速かつ高精度に精上皮周期の判別を可能とし、有害性評価のスループット性を向上させた。同法に、セルトリ細胞または生殖細胞系列の核を認識する抗体を用いた多重免疫染色により、精上皮周期に着目した生殖細胞系列の詳細な分化度評価を可能とし、ビタミン A 過剰マウス精巣においては、減数分裂の開始段階で生殖細胞数が有意に減少することを見出した。すなわち、従来の HE 染色による病理組織学的診断に加え、精上皮周期に着眼した精巣毒性評価の重要性を示すことに成功した。

次に、生殖細胞を支持するセルトリ細胞に着目し、セルトリ細胞の中間径フィラメントを認識する Vimentin 抗体を用いた免疫染色を実施した。Image J を用いた画像処理による精細管横断面に対する vimentin 陽性領域が占める面積の割合を算出した結果、ビタミン A 欠乏ならびに E 欠乏マウスの精巣組織切片において vimentin 陽性領域が有意に亢進した。この結果は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害と関連した変化を示すものであると考えられた。一方で、ビタミン A 過剰マウス精巣組織切片においては、Vimentin 抗体の染色性に変化は認められなかったが、詳細な解析の結果、対照群において精上皮周期における Vimentin の染色性変化を初めて見出しており、セルトリ細胞の機能評価に資する有用な精巣毒性評価ツールとしての可能性について今後検証を進めていく。

現在、上記の結果の一部については国内外に向け成果報告をする準備を進めている(論文 Revise 中)。同時に、ゴシポールの単回経口投与試験(本実験)を実施し、これまでに開発した精巣毒性・精子機能評価法の有用性を検証する。

E. 結論

食品成分の安全性評価を行う場合、実験動物への最大投与量は制限されるため、ヒトへの外挿を行う上では、有害性評価の感度・精度の高さを担保することが不可欠となる。また、当該成分によるホルモン様作用を介した慢性影響については、その評価特性からヒトでの把握は容易ではない。このような物質を含む食品のリスク評価・管理体制を整備するためには、実験動物を用いた有害性評価の迅速化・高度化が不可欠と考える。本研究の遂行により、生殖毒性を早期に検出する精巣毒性評価の確立を達成した。最終年度は、ゴシポールの経口投与毒性試験を実施し、これまでに開発した新規ハザード評価を適用し、その有用性について検証したい。

謝辞: 本研究の遂行にあたり支援をいただいた、北嶋聡先生(国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部長)、若山友彦先生(熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学講座・教授)、藤ノ木政勝先生(獨協医科大学医学部先端医科学統合研究施設実験センター・准教授)のご協力に深く感謝する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito H, Yokota S, Kitajima S: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem*. In press. (2023)

Yoshioka H, Yokota S, Tominaga S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Shinohara Y, Yoshikawa M, Sasaki H, Sasaki N, Maeda T, Miura N: Involvement of Bmal1 and Clock in bromobenzene metabolite-induced diurnal renal toxicity. *Biological Pharm Bull*. In press. (2023)

Kaneko S, Okada Y, Yokota S, Takamatsu K: Reactive Blue Dye: Highlights of Vacuoles in Human Sperm. *J Med Diagn Meth*. 12 (2): 400 (2023)

Tsukiboshi Y, Ogata A, Noguchi A, Mikami Y,

Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Sasa veitchii extracts protect phenytoin-induced cell proliferation inhibition in human lip mesenchymal cells through modulation of miR-27b-5p. Biomedical Research (Tokyo). 44 (2):73-80. (2023).

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method to evaluate testicular toxicity using a novel compact magnetic resonance imaging system. J Toxicol Sci. 48(2): 57-64. (2023)

Miyaso H, Takano K, Nagahori K, Li Z, Kawata S, Kuramasu M, Wu X, Ogawa Y, Yoshioka H, Matsuno Y, Yokota S, Itoh M: Neonatal corticosterone administration increases p27-positive Sertoli cell number and decreases Sertoli cell number in the testes of mice in prepuberty. Sci Rep. 12(1):19402. (2022)

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama K, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. Genes and Environment. 44(1): 24. (2022)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Particle and Fibre Toxicology. 19(1): 38. (2022)

横田理, 押尾茂: 化学物質曝露により生じる雄性生殖機能障害と発生・発達毒性、DOHAD 研究、第 11 巻、第 2 号、p103-108. (2023) https://doi.org/10.51067/dohad.11.2_103

2. 学会発表

横田理, 齊藤洋克, 若山友彦, 北嶋聡: ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巣毒性評価法の開発、第 62 回日本先天異常学会学術集会、金沢 (2022.7.30)、招待、優秀演題講演

横田理: 生殖発生毒性評価の予測性向上に資する精子染色診断技術の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.7.2)、シンポジウム

高橋祐次, 横田理, 広瀬明彦, 菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30)、シンポジウム

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Preliminary report on a two-year, 4-week-interval

intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, the 62st Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville, Tennessee, USA (2023.3.22)、Poster

横田理, 齊藤洋克, 若山友彦, 北嶋聡: 精子形成サイクルに着目したビタミン A 過剰により生じる雄性生殖毒性の早期予測評価法の開発、日本薬学会第 143 年会、札幌 (2023.3.27)、口頭

横田理, 関根尚, 市瀬孝道, 藤ノ木政勝, 若山友彦, 北嶋聡, 押尾茂: ナノ銀の妊娠期曝露により生じる、雄性生殖系列を介した継世代・多世代影響、第 41 回アンドロロジー学会、福島 (2022.6.3)、口頭

吉岡弘毅, 富永サラ, 酒々井眞澄, 横田理, 前田徹, 三浦 伸彦: シスプラチンによる急性腎毒性と時計遺伝子の関与、日本薬学会第 143 年会、札幌 (2023.3.26-28)、ポスター

前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 平松恭子, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間間欠気管内投与によるラット肺腫瘍及び中皮腫の発生、第 39 回日本毒性病理学会、東京 (2023.1.25) 、ポスター

横田理, 兼子智, 宮宗秀伸, 菅康佑, 高橋祐次, 北嶋聡: 医薬品開発の迅速化・高精度化に資する新規雄性生殖毒性評価法の開発、第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022.8.26) 、ポスター

齊藤洋克, 菅康佑, 横田理, 阿部裕, 片岡洋平, 六鹿元雄, 種村健太郎, 北嶋聡: キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析、第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022.8.26) 、ポスター

横田理, 齊藤洋克, 若山友彦, 北嶋聡: ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巣毒性評価法の開発、第 62 回日本先天異常学会学術集会、金沢 (2022.7.29) 、ポスター

前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 生嶋清美, 山本行男, 平松恭子, 矢野範男, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 菅野純, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) 、ポスター

G. 知的財産権の取得状況

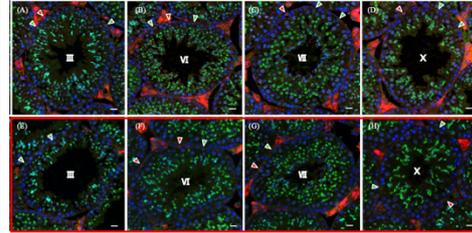
1. 特許取得 (該当なし)

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他 (該当なし)

図1. ビタミンA過剰マウス精巣組織におけるPNAレクチンを用いた精細管ステージ解析

PNA-Lectin(精子細胞) PLZF(精粗細胞)Hoechst(核)



PNAレクチンを用いた精子細胞先体の高感度蛍光染色法による精細管ステージ判別と、精祖・精子細胞マーカー抗体を用いた免疫染色により、ビタミンA過剰群精巣ではプレレプトテン期精母細胞から減数分裂開始段階に影響が生じている可能性が示唆された(下図)。

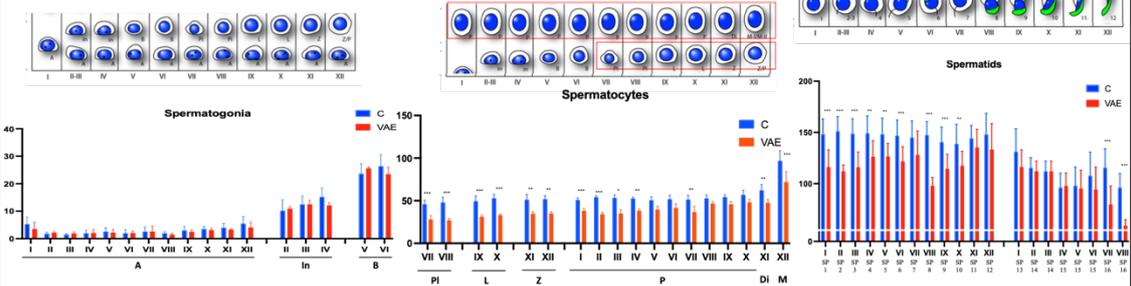
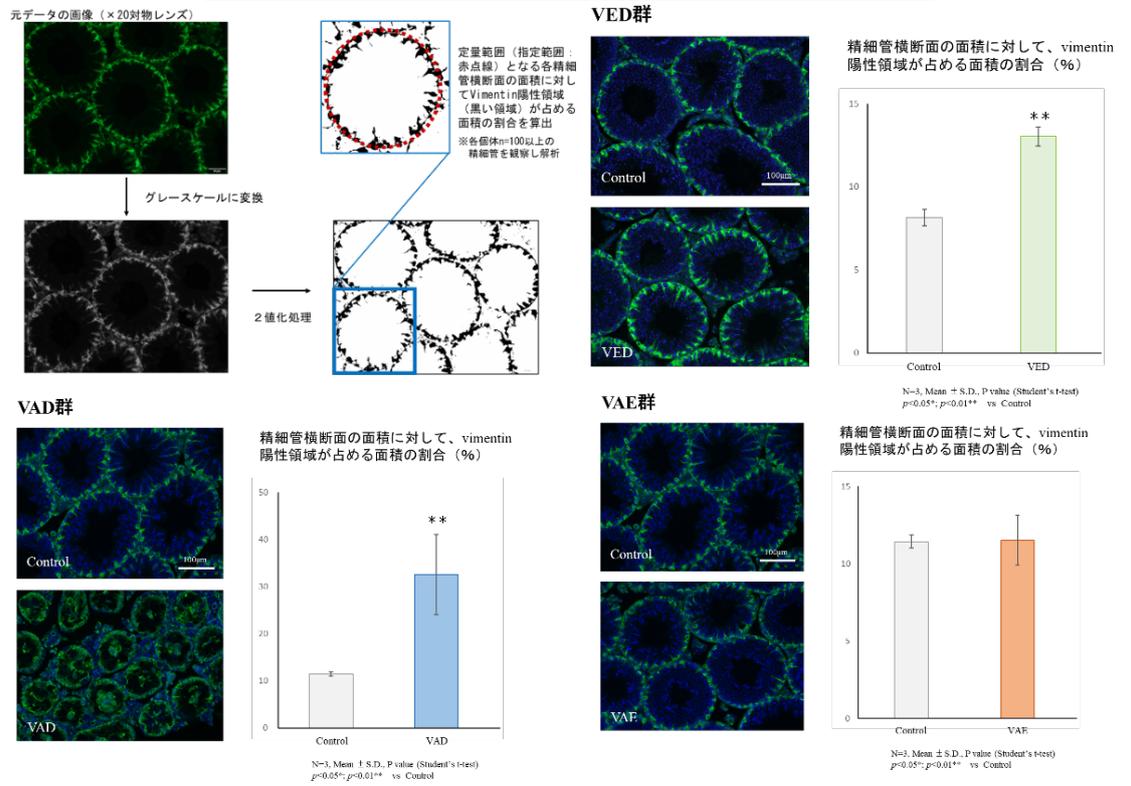
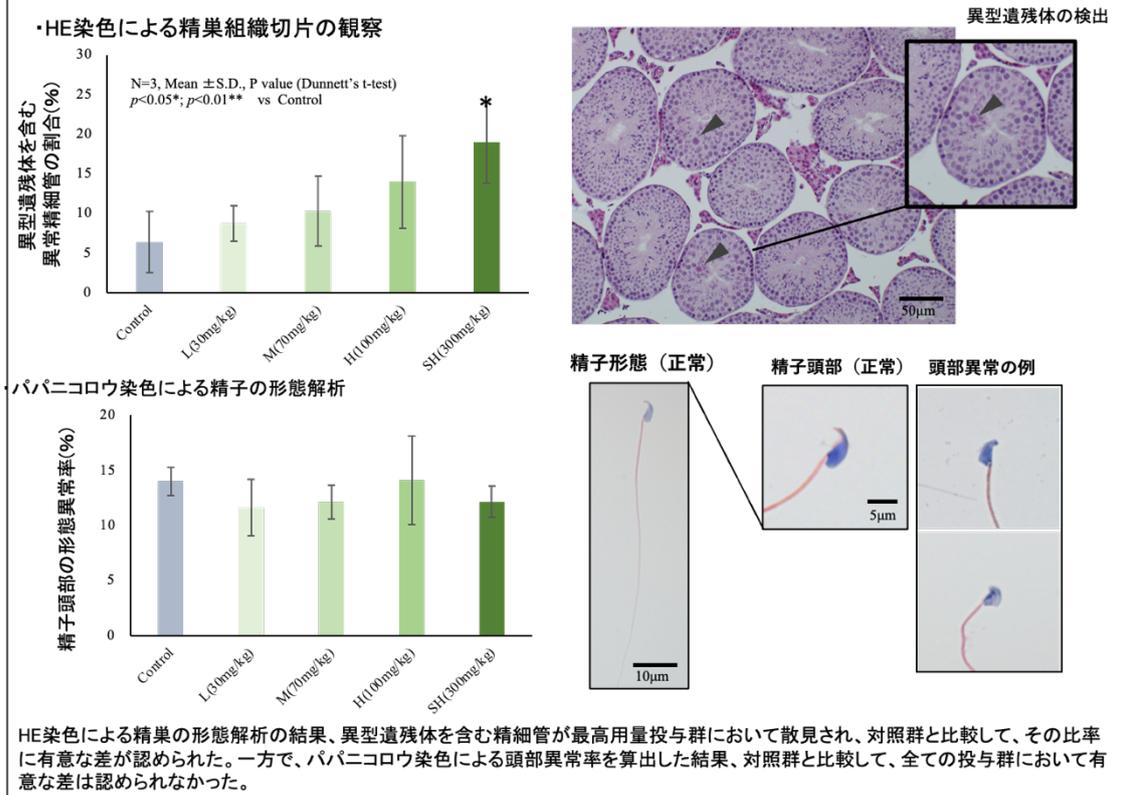


図2. Vimentinの局在を指標としたセルトリ細胞の機能評価



ビタミンA・E欠乏 (VAD, VED) 群においては、精細管に対するVimentinの占有面積が有意に亢進することが明らかとなった。一方、ビタミンA過剰 (VAE) 群においては、有意な差は認められなかった。
→現在、セルトリ細胞骨格Vimentinの精巣ステージ周期性について検証を進めている。

図3.ゴシポール投与による用量設定試験



令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 横田 理・ヨコタ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・研究員
(氏名・フリガナ) 齊藤 洋克・サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年度 分担研究報告書

Vimentin抗体を用いた免疫組織化学によるセルトリ細胞の機能評価法の検討

研究分担者 齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 研究員

研究要旨

これまでの研究報告により、哺乳類における正常な精子形成過程において、精細管内に存在する精子細胞とセルトリ細胞との密接な相互作用が重要であることが分かっている。本分担研究では、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じる、セルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin に着目した機能評価法の確立を試みた。

今年度は、昨年度報告したデータに追加するかたちで、先行研究において精巣・精子への影響が認められているビタミンE欠乏(VEE)およびビタミンA欠乏(VAD)・過剰(VAE)マウス精巣組織切片をサンプルとして使用した。精細管横断面の表面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合(%)を算出した結果、コントロール群と比較して、VEE 群の精巣組織切片において、その割合が有意に増加した。VAD 群においても同様に、コントロール群と比較して、その割合は有意に増加した。一方、VAE 群においては、コントロール群と比較して、vimentin 陽性領域が占める面積比に有意な差は認められなかった。なお、本解析において、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった。

追加したデータをふまえ、観察された vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害と関連した変化を示すものであると考えられ、本解析手法によってセルトリ細胞の機能的変化を検出できる可能性を示した。今後は、本研究における解析手法を、造精機能障害を引き起こすモデル化学物質に適用し、vimentin の発現パターンに変化がみられるか否か、その適用限界を含めて検討することが重要であると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、食をとりまく環境変化に対応するため、食品のリスク評価・管理体制の迅速化・高度化に資することを見据え、食品成分により生じる造精機能障害を高感度・高精度に検出するハザード評価体系の基盤構築を行うことを目的とする。

これまでの研究報告により、哺乳類における正常な精子形成過程において、精細管内に存在している精子細胞とセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。セルトリ細胞は精細胞の支持、栄養供給、精子離脱の補助、食作用、免疫学的障壁など精巣内環境を維持するた

めの様々な機能を有する。Vimentin は、間葉細胞がもつ細胞骨格中間径フィラメントの一種であり、主として機械的支持を担い、細胞骨格としての細胞の形の維持、核の位置の固定などの役割を持ち、セルトリ細胞を検出するマーカーの1つとしても用いられる。セルトリ細胞の細胞骨格系と造精機能障害がどのように関わるのか、その機能的変化については不明な点が多いが、精子細胞とセルトリ細胞の相互作用の重要性を考えると、造精機能障害が顕在化する際、あるいはその前段階として、細胞骨格系への影響として現れることも十分に考えられる。

今年度は、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じるセルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みる。

B. 研究方法

サンプル

昨年度報告したデータに追加するかたちで、先行研究 (Saito et al., 2020; Yokota et al., 2021) の過程で採取したビタミン E 欠乏 (VED) およびビタミン A 欠乏 (VAD)・過剰 (VAE) マウス精巣組織切片を使用した。なお、VAD マウスは精子形成不全のモデルとして確立されており、VED および VAE マウスも上記先行研究による解析において、精巣・精子への影響が認められているため、本解析手法を適用するモデルとして有用である。

精巣組織切片の免疫組織化学

メタカン液 (メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1) (VED 群) および modified ダビッドソン固定液 (VAD・VAE 群) にて固定した精巣組織について、パラフィン切片 (7 μ m) を作製し、セルトリ細胞マーカーとして、細胞骨格タンパク質である vimentin 抗体を用いて免疫組織化学を行った。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール (100、95、90、80、70%) にて段階的に再水和した。HistoVT One (ナカライテスク、京都、日本) により 90 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。一次抗体には以下のものを用いた: rabbit monoclonal anti-Vimentin (Abcam; ab92547; 500 倍希釈)。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体 (Invitrogen; 1,000 倍希釈) を用い、4 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。核は Hoechst 33342 (ナカライテスク; 5,000 倍希釈)

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。染色像は、BX51 蛍光顕微鏡および付属の cellSens ソフトウェア (オリンパス、東京、日本) で取得した。

取得した染色像の画像解析

画像の解析には、Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いた。同一条件にて染色・撮影した原画像をグレースケールに変換後、二値化の設定値を調整し、Binary 画像を作成 (二値化処理) することにより、vimentin 陽性領域を抽出した。その後、各精細管横断面の表面積 (μm^2) に対して、vimentin 陽性領域 (μm^2) が占める面積の割合 (%) を算出した。精細管横断面は 1 個体あたり 200 個 (VED 群およびそのコントロール群) または 110 個 (VAD・VAE 群およびそのコントロール群) 以上観察し、各群 3 個体の平均値を算出した。

(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

精細管横断面の表面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合 (%) を算出した結果、コントロール群と比較して、VED 群の精巣組織切片において、その割合が有意に増加した (Control 群: $7.8 \pm 0.3\%$ 、VED 群: $12.7 \pm 0.2\%$, $p < 0.01$; 図2)。VAD 群においても同様に、コントロール群と比較して、その割合は有意に増加した (Control 群: $10.9 \pm 0.1\%$ 、VAD 群: $32.3 \pm 3.4\%$, $p < 0.01$; 図3)。一方で、VAE 群においては、コントロール群と比較して、vimentin 陽性領域が占める面積比に有意な差

は認められなかった (Control 群:10.9±0.1%、VAE 群:11.6±0.9%; 図4)。なお、本解析において、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった。

D. 考察

今回の解析により、VED および VAD 群において、精細管に対するvimentin の占有面積の割合が有意に亢進することが明らかとなった。この vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害(精上皮の剥脱、精子形成不全等)と関連した変化を示すものであると考えられた。興味深いことに、VED 群では、多くの精細管が正常な形態で観察されており、明らかな精子形成障害が認められない精細管においてもその割合が増加していた。したがって、vimentin の発現パターンの変化は、形態的に捉えることが困難な精子形成不全の初期徴候となりうることが示唆された。また、VED および VAD 群においては、コントロール群では観察されなかったそれぞれに特有のビメンチンの伸張や集積が認められ、精細管におけるビメンチン陽性領域の割合の増加にも大きく関与していると考えられた。

一方、VAE 群においては、精細管に対するvimentinの占有面積の割合に有意な差は認められなかった。VAE 群のように、今回の解析方法において顕著な差が認められないものに対しては、精子形成サイクルのステージ依存的なvimentin の面積比の変化が存在するか否か解析することで、特定のステージに対する影響を検討する必要がある。

また、Vimentin 抗体の染色性については、いずれの固定液においても良好であったため、切片の厚みや固定液の種類に応じて条件を微修正することにより、今回の解析方法が適応可能であると考えられる。

今後、造精機能障害を引き起こすモデル化

学物質を用いた投与実験を行い、形態的な異常が認められない投与用量を含め、vimentin の発現パターンに変化がみられるか否か、本解析手法の適用限界を含めて検討することが重要である。

E. 結論

本分担研究では、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じるセルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みた。特に、VED および VAD のような、精子形成障害を誘発したマウス精巣組織切片に適応した結果、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害を、精細管に占める vimentin の面積比の変化というかたちで検出することができた。今後、造精機能障害を引き起こすモデル化学物質を用いた投与実験を行い、本評価手法の有用性を示すことができれば、将来的には、健康被害を未然に防ぐための食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する食品安全行政施策の提案にも貢献することが期待される。

【参考文献】

- Saito, H., Hara, K., Kitajima, S., Tanemura, K., 2020. Effect of vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol* 98, 225-232.
- Yokota, S., Sekine, N., Wakayama, T., Oshio, S., 2021. Impact of chronic vitamin A excess on sperm morphogenesis in mice. *Andrology* 9(5), 1579-1592.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez,

J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7), 676-682.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋 祐次、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡:加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn J Clin Toxicol.* 35, 255-59, 2022

Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 48(4), 203-10, 2023

Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 48(4), 211-19, 2023

Hirokatsu Saito, Satoshi Yokota, Satoshi Kitajima: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023, in press.

2. 学会発表

齊藤 洋克、種村 健太郎、菅野 純、北嶋

聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析-化学物質曝露影響から考える神経発達障害-,第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)

五十嵐 智女、松村 万里、小川 いづみ、矢川 千織、早川 孝彦、越智 美代子、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)

横田 理、齊藤 洋克、若山 友彦、北嶋 聡:ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巢毒性評価法の開発、第62回日本先天異常学会学術集会(2022.7.29、金沢)

齊藤 洋克、菅 康佑、横田 理、阿部 裕、片岡 洋平、六鹿 元雄、種村 健太郎、北嶋 聡:キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析、第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.8.26、東京)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

免疫染色 (Vimentinの定量) : ImageJ Fiji

元データの画像 (×20対物レンズ)

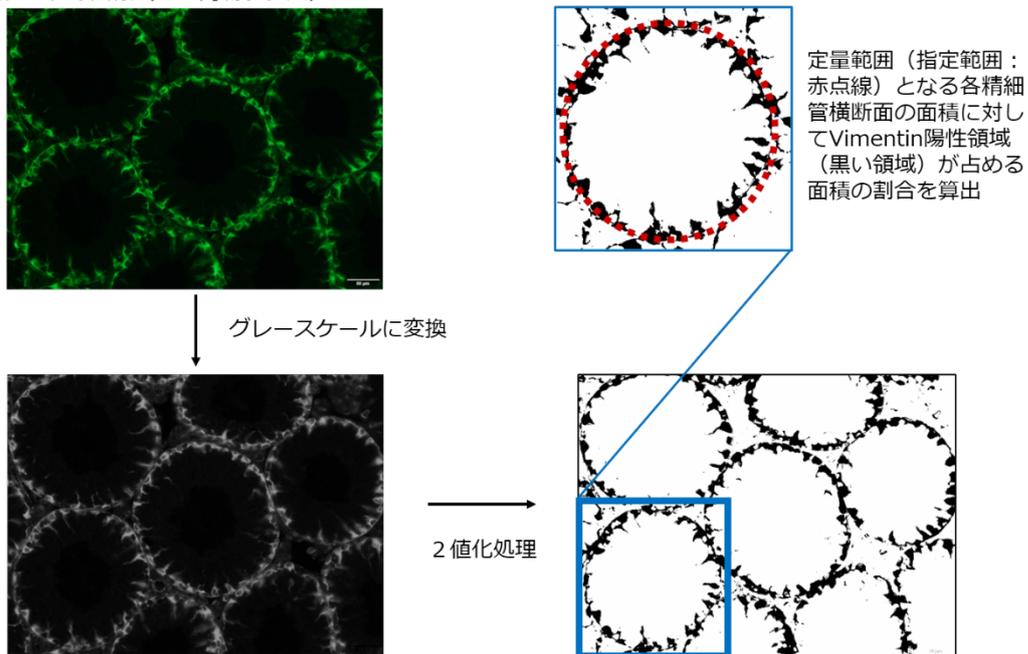


図 1. 二値化処理による vimentin 陽性領域の画像解析

VED群

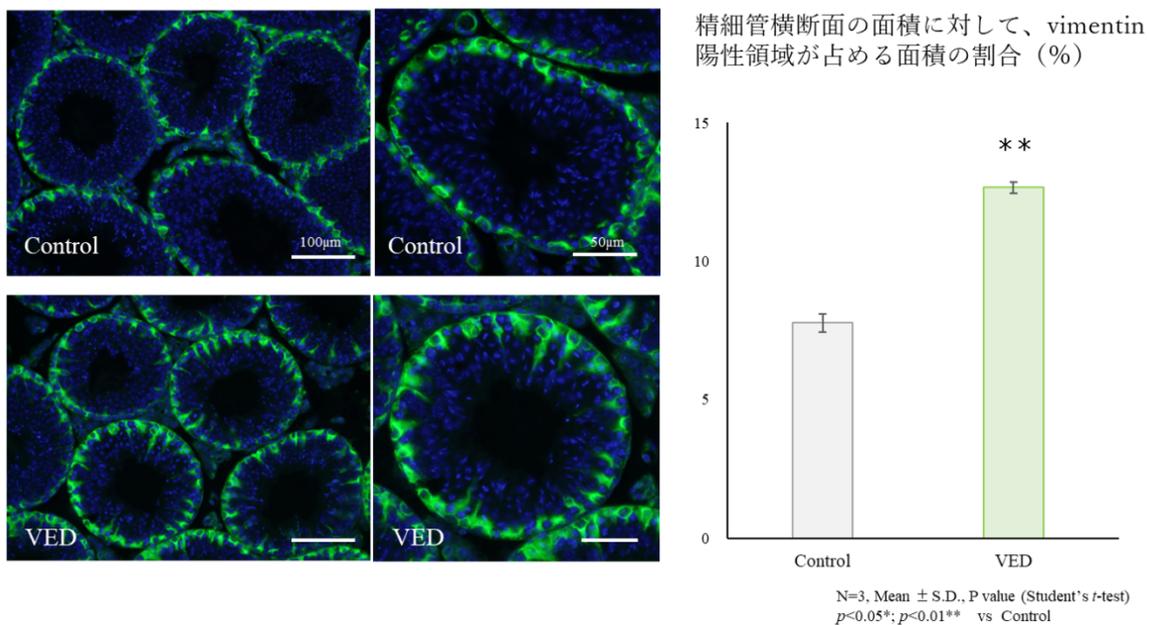


図 2. VED 群における、精細管に対する vimentin の占有面積

VAD群

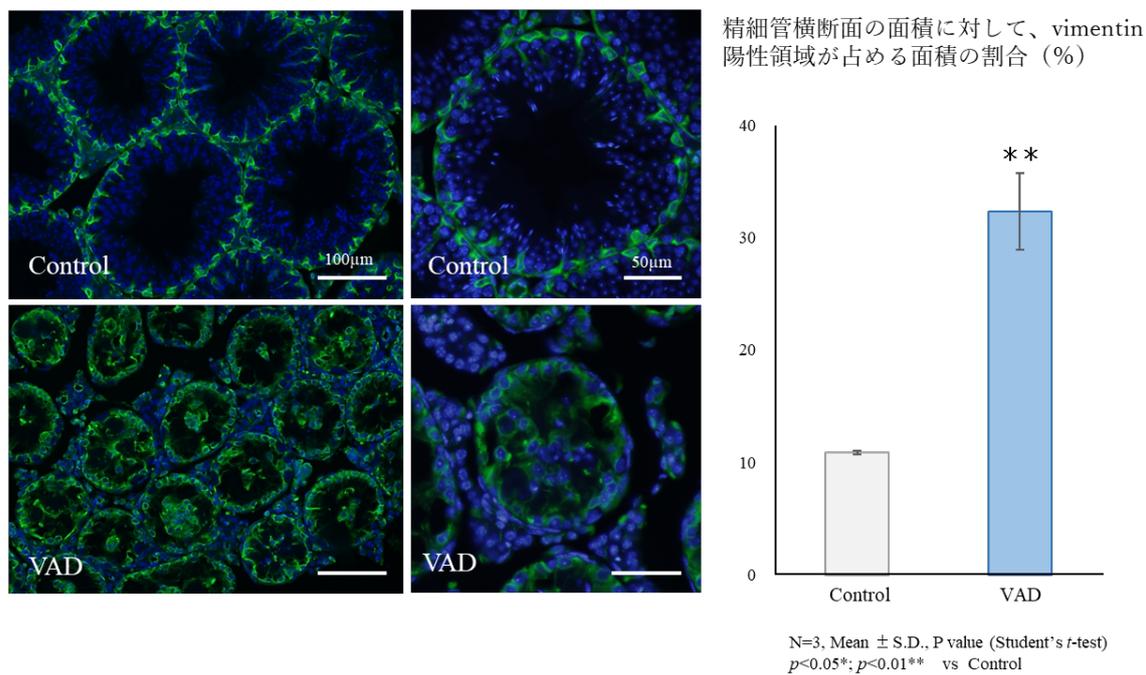


図 3. VAD 群における、精細管に対する vimentin の占有面積

VAE群

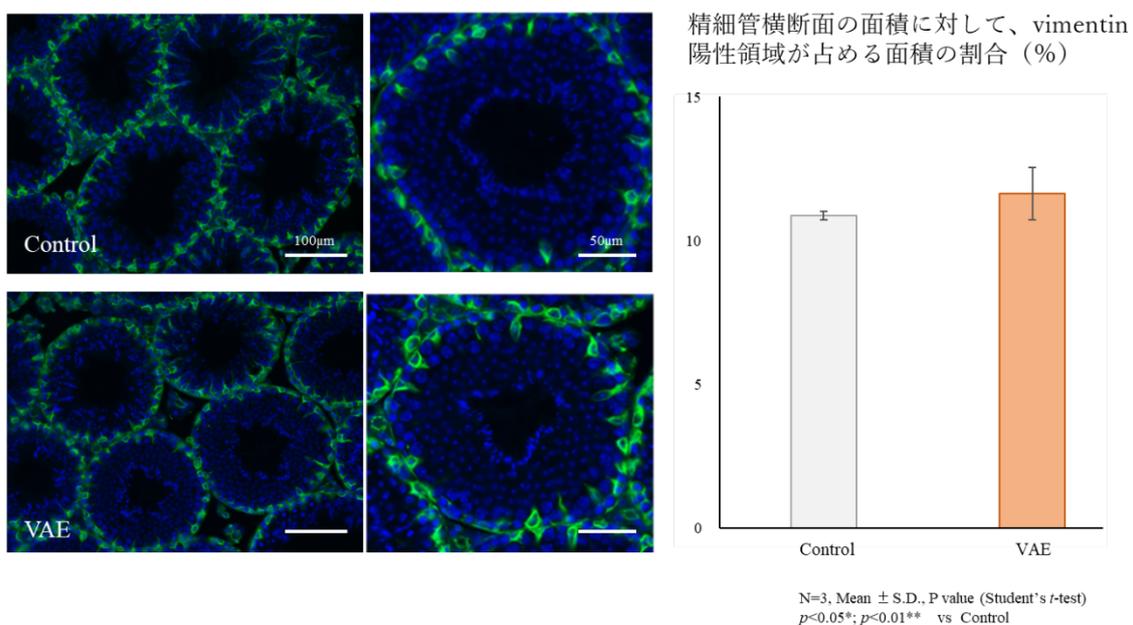


図 4. VAE 群における、精細管に対する vimentin の占有面積

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneko S, Okada Y, Yokota S, Takamatsu K	Reactive Blue Dye: Highlights of Vacuoles in Human Sperm	J Med Diagn Meth	12 (2)	No. 1000400	2023
Yoshioka H, Yokota S, Tominaga S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Shinohara Y, Yoshikawa M, Sasaki H, Sasaki N, Maeda T, Miura N	Involvement of Bmal1 and Clock in bromobenzene metabolite-induced diurnal renal toxicity	Biological Pharm Bull	In press		2023
sukiboshi Y, Ogata A, Noguchi A, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H	Sasa veitchii extracts protect phenytoin-induced cell proliferation inhibition in human lip mesenchymal cells through modulation of miR-27b-5p	Biomedical Research (Tokyo)	44 (2)	73-80	2023
Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S	Development of a non-invasive method to evaluate testicular toxicity using a novel compact magnetic resonance imaging system	J Toxicol Sci	48(2)	57-64	2023

Miyaso H, Takanashi K, Nagahori K, Li Z, Kawata S, Kuramasu M, Wu X, Ogawa Y, Yoshioka H, Matsuno Y, Yokota S, Itoh M	Neonatal corticosterone administration increases p27-positive Sertoli cell number and decreases Sertoli cell number in the testes of mice in prepuberty	Sci Rep	12(1)	19402	2022
Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama K, Honma M, Hamada S	In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture	Genes and Environment	44(1)	24	2022
Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Takeda Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D	Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats	Particle and Fibre Toxicology	19(1)	38	2022
横田理、押尾茂	化学物質曝露により生じる雄性生殖機能障害と発生・発達毒性	DOHaD研究	11(2)	103-108	2023
高橋 祐次、齊藤洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡	加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発	Jpn J Clin Toxicol	35	255-259	2022

Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S.	Behavioral effects induced by the oral administration of acetaminophen in male mice during the postnatal lactation period or adulthood.	J Toxicol Sci	48(4)	203-210	2023
Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K.	Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice.	J Toxicol Sci	48(4)	211-219	2023
Saito H, Yokota S, Kitajima S.	Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction.	Acta Histochem	In press		2023

令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 横田 理・ヨコタ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・研究員
(氏名・フリガナ) 齊藤 洋克・サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。