

別添 1

厚生労働化学研究費補助金

化学物質リスク事業研究事業

エクソソームRNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法
の開発に資する研究 (21KD1001)
令和3～5年度 総合研究報告書

研究代表者 小野 竜一

令和5（2024）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

エクソソームRNA を毒性指標とした 次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究 小野竜一	1
--	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
--------------------	----

I. 総合研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

研究代表者 小野 竜一
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
第五室・室長

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価を可能とすることを目的としている。

また、本研究においては、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法がオルガノイド 3D 培養法における培養上清中のエクソソームにも応用が可能な検証を行うことで、将来的な新規の動物実験代替法の開発に資する研究も行う。

本研究の成果は以下の通りである。

(1) 妊娠中のばく露により二分脊柱などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られるバルプロ酸ナトリウムの投与実験（妊娠 9—11 日（GD9-11）に反復投与、0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600mg/kg/day（GD18 解剖群のみ、800mg/kg/day 群あり）を行い、GD11, 15, 18 日目に剖検、および、母体血および胎児羊水のサンプリングを行ない、それらの詳細な外表面観察を行った。

その結果、投与したバルプロ酸ナトリウムの濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。このことから、本研究で行なったバルプロ酸ナトリウム投与による催奇形性モデル動物の作製は予定通りに成功した (Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

(2) 羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プロトコルの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティークラム抽出法、の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクである CD9 抗体でのウェスタンブロット解析、および、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) によるエクソソームの粒子径および粒子数解析を行い、羊水からは、アフィニティークラム法が適していると結論した。

(3) 研究計画 (1) において採取したバルプロ酸ナトリウムを投与した妊娠マウスの母動物血清、および、羊水よりエクソソームの抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行うことで、催奇形性作用のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)

(4) 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行い、ライン化することに成功した。

(5) 肝臓オルガノイドを細胞培養プレートに播種し、5 日間培養した後、肝毒性モデル物質である四塩化炭素 (0mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM) を添加した。四塩化炭素添加後の 2 日目に培養上清と肝臓オルガノイドを回収した。用量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素 (AST および ALT) においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソーム RNA 解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーである miR-122 や miR-192 の上昇も確認できなかった。

(結論)

本研究で行なった催奇形性物質であるバルプロ酸ナトリウムの妊娠動物への投与により、濃度に依存した子宮内胎児発達遅延や、神経管閉鎖不全や指形成不全の催奇形性作用が確認された。ここで、重要なのは、全ての腹で同様に催奇形性作用が確認されたわけではなく、催奇形性の全くでない腹もあれば、ほぼ全てが催奇形性の表原型を持つ腹もあるという事実である。

このような催奇形性発現状況こそが、催奇形性試験に経験豊富なエキスパートが必要な大きな理由の一つと考えられる。そこで、我々は、催奇形性の表原型の有無に関係なく、催奇形性物質投与により、誘導されるエクソソーム RNA の発現量を催奇形性の指標とする次世代型毒性評価法の開発を本研究の目的とした。

母動物へのバルプロ酸ナトリウム投与により、胎児における催奇形性作用が確認され、エクソソームを抽出する体液として、母動物の血清、および、胎児の羊水の採取を行い、それらの網羅的遺伝子発現解析を行なった。そこで、バルプロ酸ナトリウム投与に依存的に誘導されるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R, et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

ここで、GD15 の羊水中のエクソソーム RNA で、バルプロ酸ナトリウム投与依存的に誘導されるエクソソーム RNA には、ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群が濃縮されていることが判明した。

これは、バルプロ酸ナトリウムは、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つことから、ヒストンアセチル化によって遺伝子の転写活性の on/off をしている遺伝子に関しては、転写を活性化すると考えられる。このヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つ、*Trichostatin A* も、バルプロ酸ナトリウムと同様の催奇形性作用を持つことが報告されていることから、これらの催奇形性発現は、ヒストンアセチル化の異常による遺伝子発現異常にあると考えられる。

そこで、本研究により単離された催奇形性の毒性指標候補であるエクソソーム RNA であるゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群の発現は、毒性機序の面からも、非常に優れた毒性バイオマーカーであると結論できる。

また、次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行い、ライン化することに成功した。このモデルを用いて様々な毒性指標のバイオマーカーが得られることが期待される。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームを毒性指標とする動物実験代替法の検証においては、アセトアミノフェンについては、生体への投与と同様な挙動が見られたが、四塩化炭素投与においては、生体で見られる反応が見られなかった。これは、肝毒性の発現以前に、培養系における細胞毒性を生じてしまい、生体とは違うメカニズムで細胞の生存障害が起こっているものと考えられる。

動物実験代替法は推進すべき課題であるが、本当に生体を反映しているかの評価が難しい問題である。本研究で開発に成功した母動物の血清および胎児羊水中のエクソソーム RNA を毒性指標とする次世代型毒性評価法は、動物実験における使用匹数の大幅な削減に貢献するだけでなく、オルガノイドなどの培養系における in vivo を反映しているのかという鋭敏な指標にもなりうると考えられる。

研究分担者

桑形麻樹子	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・第二室・室長
成瀬美衣	国立がん研究センター 安全性生物試験研究センター 研究所・動物実験施設・研究員
伊川正人	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・教授
落谷孝広	東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門・教授
平林容子	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 センター長

研究協力者

北嶋聡	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・部長
相崎健一	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・第一室長
高橋祐次	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・動物管理室長
吉岡祐亮	東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門・講師
立原江利加	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
内山美希	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
江森 千紘	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・助教
Yonggang Lu	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・特任助教

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速でかつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（[Ono R. et al., Toxicology Reports 2020](#)）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

令和3年度に確立した試料採取法に基づいて、令和4年度には催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸投与後の母動物血清および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取することを行なっている。今年度は、昨年度に採取したサンプルの詳細な解析を行い、催奇形性の毒性指標となるエクソソームRNAの単離を行う。

また、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用

することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。

さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。

そこで、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることも目的としている。これは、動物福祉 (3Rs) の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法を開発するために、妊娠マウスに既知の催奇形性化合物を経口投与し、胎児に発現する形態変化から毒性指標となるエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

● *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド 3D 培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

これらに加えて、対象マウス個体の一般的な毒性評価を行うことで、現行の生殖毒性評価と本研究で開発する次世代型生殖毒性評価法の比較を行う。

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においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察 (桑形)、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査 (平林)、エクソソームの抽出およびエクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析 (小野) を行

い、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析 (落谷) を行い、大阪大学・微生物病研究所 (伊川) においては、催奇形性解析に適したモデルマウスの作製 (伊川) を行う。また、国立がん研究センター (成瀬) においては、毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討する。

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (8 週齢、12 週齢、24 ヶ月齢など) および、発生毒性を検出するために重要なポイントである (1)妊娠初期 (着床直後、妊娠 9 日)、(2)妊娠中期 (口蓋閉鎖時、妊娠 15 日)、(3)妊娠末期 (帝王切開時、妊娠 18 日) (4)非妊娠の母体血および羊水中のエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより決定する。

マウス血液を採取後、室温で 30 分間静置し、氷上に移す。全てのサンプルの準備が整い次第、2000 x G, 10 分遠心分離を行う。遠心分離後は、上層の血清成分を新しいチューブに移し、総容量を測定後に -80 度で保存を行う。

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離 (

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、超遠心ペレットダウン法を行い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウェスタンブロットティングやエクソスクリーン法により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、エクソソーム単離効率の評価を行う。

・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法

催奇形性陽性対照物質として二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を用いた。バルプロ酸は抗てんかん薬として使用されている。

本研究では、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を経口投与し、投与最終日 (妊娠 11 日)、これまでにエクソソーム解析実績のある妊娠 15 日、および催奇形性評価に選択されている妊娠 20 日に、それぞれ、母動物血漿および子宮内容物 (胎盤、卵黄嚢膜、胎児) をエクソソーム解析用に採取した。

また、曝露状態を確認するために、母動物および胎児

中のバルプロ酸濃度を確認した。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

測定対象物質：バルプロ酸ナトリウム

製造元：Sigma-Aldrich Japan G.K.

CAS番号：1069-66-5

分子量：166.19

ロット番号：WXBD4552V

純度：99.0%

性状：白色、粉末

保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）

製造元：富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のメチルセルロースを秤取し、攪拌しながら温めた注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号1J76）に徐々に加えて分散させた。これを冷やしてメチルセルロースを溶解させ、更に注射用水を加えて0.5%MC溶液とした。調製後、冷蔵保存した。

1-3. 被験液の分析

18.75 mg/mL（300 mg/kg群）および37.5 mg/mL（600 mg/kg）の被験液について、媒体中濃度を測定した。各被験液の濃度の表示値に対する割合は100.0%及び102.2%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合が100% ± 10%）であった。

測定施設：一般財団法人日本食品分析センター

1-4. 使用動物

動物種：マウス（SPF）

系統：C57BL/6J

供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター

入荷時週齢：雌10週齢、雄11週齢

匹数：交配用雄82匹、雌92匹

使用した妊娠動物：46匹

入荷後1週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11週齢以上の雌1匹に12週齢以上の雄1匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠0日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠0日）ごとに行い、妊娠0日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにコンピュータを用いたブロック化により行った。余剰動物は動物管理部門へ移管した。

1-5. 飼育環境

温度（23 ± 3℃）、湿度（50 ± 20%）、換気回数（10~15回/時間）、照明（1日12時間、07:00~19:00）に統御された動物飼育室で飼育した。

飼育は床敷（コンフィネスト、株式会社ファルマ）を入れたプラスチックケージ（W155×D245×H150 mm）に個別飼育した（交配期間を除く）。

飼料は固型飼料CRF-1（γ線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社）をステンレス製給餌器に入れて自由

に摂取させ、給水は自動給水装置により自由に水道水を摂取させた。

環境エンリッチメントとして、IACUCの指針に従って、ケージの蓋からステンレス棒を吊り下げて遊具とし、床敷と同じ素材のBiting board（3cm四方のプレートを中央で山折りにしたもの）を噛み材として与えた。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間はバルプロン酸ナトリウムの催奇形作用の臨界期である妊娠9日より11日までの3日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（計3回）とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

バルプロン酸ナトリウムは注射用水に5%濃度で溶解することが知られていることから、催奇形作用が明瞭に発現すると考えられる800 mg/kgを投与可能な16 mL/kgを投与容量とした。投与液は、フレキシブル胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は300、600及び800 mg/kgの3用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した10群構成とした。すなわち、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に妊娠11日剖検群、妊娠15日剖検群及び妊娠18日剖検群をそれぞれ設けた。また、800 mg/kg群には妊娠18日剖検群を設定した。

剖検群ごとの交尾成立雌動物数を4匹（800 mg/kgは死亡等を考慮し8匹）とした。

群構成を表1に示した。

ただし、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に不妊が認められた場合は、適宜交尾成立動物を追加した（動物番号は各群5番以降を続けて割当てた）。

表1

投与量 (mg/kg)	剖検時期	投与容量 (mL/kg)	濃度 (ng/mL)	交尾成立雌数	動物番号
0	GD1 1	16	0	4	1101~1104
	GD1 5			4	2101~2106
	GD1 8			4	3101~3105
300	GD1 1	16	18.75	4	4101~4107
	GD1 5			4	5101~5106
	GD1			4	6101~6105

	8				
600	GD1 1	16	37.5	4	7101~7106
	GD1 5			4	8101~8106
	GD1 8			4	9101~9106
800	GD1 8	16	50	8	10101~101 08

投与量設定根拠

本被験物質の臨床適用量は成人1人当たり1日400~1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8~24 mg/kgに相当する。バルプロ酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られている。

本試験においては、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソゾームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の13~75倍で、奇形を起こすとした文献が存在する300 mg/kg及び600 mg/kgを投与する群を設けた。なお、600 mg/kgの投与によっても奇形が認められない胎児が存在したため、800 mg/kgを追加した。

2-4. 動物の観察

全動物について、生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1~3時間後の間（ただし、妊娠11日剖検群の妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回）、その他の期間は1日1回（午前中）行った。

体重は、妊娠0、4、9、10、11、15、18日（妊娠11日剖検群及び妊娠15日剖検群はそれぞれ妊娠11及び15日まで）の07:00~12:30の間（投与期間中は投与前）に測定した。

また、投与期間中（妊娠9日から妊娠11日）の体重増加量を算出した。

2-5. 剖検

妊娠11日剖検群の各4~7例より、妊娠11日の投与後1時間の時点（許容範囲60±5分）において、インフルラン吸入麻酔下に無処置シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血した後、腹大動脈を切断して放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

妊娠15日剖検群の各6例は妊娠15日の、妊娠18日剖検群の各5~6例（800 mg/kg群は8例）は妊娠18日の、いずれも妊娠11日に採材した動物とほぼ同じ時刻（09:00~12:00の間）に、同様に採血後放血して安楽死させ、剖検した。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存した。

2-8. 羊水、胎児血漿（GD18）、胎児（GD11、GD15）、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠11日剖検群：各群4例

最終投与1時間後（09:00~12:00の間）

妊娠15日剖検群：各群4例、

妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻

（09:00~12:00の間）

妊娠18日剖検群：各群4例（800 mg/kg群は8例）、

妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻（09:00~12:00の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

(a) 妊娠11日剖検群

子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出した。その後、生理食塩液を入れたシャーレ中等で卵黄囊膜を切開し、胎児と胎盤を分離した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、形態観察を実施した。

(b) 妊娠15日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

(c) 妊娠18日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出後、胎児の頸部を切開して頸動脈を切断し、漏出した血液をヘパリン処理したヘマトクリット毛細管を用いて可能な限り採血した。血液はポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）により血漿とし、バリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。採血後の胎児は重量を記録し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

また、胎盤は重量を記録後、ほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。

3) 試料番号

羊水又は胎児血漿、胎盤及び胎児は、それぞれ試料番号を記載したものをラベルしたサンプル管に収納し

た。試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。着床番号は以下の表2に従って1生存胎児ごとに割り振った。

表2

投与量 (mg/kg)	剖検時期	着床番号
0	GD11	101～
	GD15	201～
	GD18	301～
300	GD11	401～
	GD15	501～
	GD18	601～
600	GD11	701～
	GD15	801～
	GD18	901～
800	GD18	1001～

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、-1は羊水又は胎児血漿、-2は胎児、-3は胎盤（RNA later）、-4は胎盤と識別した。

サンプル	枝番号	保存条件
羊水又は胎児血漿	-1	冷凍（-80℃）
胎児	-2	室温
胎盤（RNA later）	-3	冷蔵
胎盤（10%リン酸緩衝ホルマリン液）	-4	室温

2-8. 統計処理

・MiTOX-BOZOシステム（Version 9.3.1.1、三井E&Sシステム技研株式会社）

3. バルプロ酸経口投与後の母動物血漿中および子宮内容物中の濃度確認

バルプロ酸をその奇形の臨界期（妊娠9～11日まで）の妊娠雌動物に投与し、胚・胎児発生への有害作用を起こした状況での、母動物血漿中並びにその胎児中のバルプロ酸濃度を測定することにより、被験物質の妊娠動物における曝露状況を評価した。

3-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-1.参照）

3-2. 投与方法

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-2.参照）

3-3. 投与量及び群構成

投与量は300及び600 mg/kgの2群構成とした。1群当たりの交尾成立雌動物数を5匹とした。群構成を表3に示した。

表3

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容 量 (mL/kg)	交尾成 立雌数	動物番号
300	18.75	16	5	1101～1105
600	37.5	16	5	2101～2105

3-4. 投与量設定根拠

被験物質の臨床適用量は1日400～1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8～24 mg/kgに相当する。この量のバルプロ酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られている。

Dawning et al.（注1）によれば、800 mg/kg又は400 mg/kgのバルプロ酸を妊娠9日（膣栓＝妊娠0日）の昼に単回腹腔内投与した結果、脊椎、肋骨及び指の奇形が報告されている。本試験においては、当初、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソゾームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の16～100倍で、全胎児に奇形を起こすとした文献が存在する400 mg/kg及び800 mg/kgを投与する群を設けた。実際に投与を行うと、800 mg/kgでは初回投与で母動物が死亡し、この用量では必要なTK試料数の確保が難しいと想定されたことから、投与量を600及び300 mg/kgに変更した。

（注1）Downing Chris, Biers Jami, Larson Colin, Kimball Alexi, Wright Hali, Ishii Takamasa, Gilliam David, Johnson Thomas: Genetic and Maternal Effects on Valproic Acid Teratogenesis in C57BL/6J and DB A/2J Mice. Toxicological Sciences. 116 (2) 632-639 (2010).

3-5. 動物の観察

生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1～3時間後の間（ただし、妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回）、その他の期間は1日1回（午前中）行った。体重は妊娠0、4、9、10、11日の07:00～12:30の間（投与期間中は投与前）に測定した。なお、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、搬出前に測定した結果、著しい重量低下は認められなかった。

3-6. 剖検及び帝王切開

妊娠11日の投与後1時間の時点（許容範囲60±5分）において、イソフルラン吸入麻酔下にて、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血（剖検時間の偏りを考慮し、低用量群と高用量群を交互に採血した）した後、腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

また、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、発見後速やかに、剖検を行ったが、特記すべき異常は認められなかった。本例では死亡に先立つ一般状態の異常も観察されなかった。800 mg/kgを投与し死亡した1例の一般状態観察、体重測定、剖検所見については本試験の結果から、削除した。

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。母動物ごとに妊娠状態を記録し、第6.1.3項で採血し、第6.1.5項に従って処理した血漿とともに試験場所に送付した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は観察後廃棄し、TK試料は測定対象としなかった。

3-7. 母動物血漿中濃度測定用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器に移し、遠心分離 (4℃、6000 ×g、2分間) により血漿を得た。得られた血漿試料は試験番号、採血時期、動物番号、試料番号、採血年月日、採血時点、試料名を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製容器に入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫 (許容値: -70℃以下) に保存した。

3-8. 胎児の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠11日: 各群5例、最終投与1時間後

2) 対象部位の採取

子宮壁を切開後、卵黄嚢膜と胎児及び胎盤を摘出し分離した。

胎児はそれぞれ試料番号をラベルしたサンプル管に個別に収納し、重量を記録した。

3) 試料番号

試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。

着床番号は、300 mg/kg群は201番から、600 mg/kg群は301番から1生存胎児ごとに割り振った。

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、1は胎児がサンプル管の内容であった。

4) サンプルの保管

全てのサンプル管は測定まで-80℃の冷凍庫 (許容値: -70℃以下) に保存した。

3-9. 母動物血漿中濃度及び胎児中濃度測定

分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象試料は、各群、各時点の妊娠成立動物のうち個体番号が若い3例から得られたTK試料を測定対象とした。

分析方法:

液体クロマトグラフータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法

機器名及び型式	メーカー
四重極タンデム型質量分析計 (MS/MS)	Waters Corporation
データ処理ソフト MassLynx 4.1	Waters Corporation
高速液体クロマトグラフ (HPLC) ACQUITY UPLC I-CL ASS	Waters Corporation

測定対象物質: バルプロ酸

標準物質: valproic acid sodium salt

ロット番号: WXBD4552V

塩換算係数: 0.8677 (=144.21/166.19)

内標準物質: Diclofenac sodium salt

ロット番号: P7E3B

なお、簡易分析バリデーションは昨年度 (R3年度) に実施している。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、Qiazol solution (Qiagen) によって溶解され、miRNeasy micro-elution kit (Qiagen) によって、RNA を抽出および精製する。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成した次世代シーケンス用ライブラリーは、Bluepippin サイズセクターを用いて、148 bp ~ 185 bp のマイクロ RNA 画分だけを抽出する。サイズセレクションを行ったエクソソーム RNA の次世代シーケンス用ライブラリーは、KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (Nippon Genetics, Japan) または、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 および国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

・エクソソーム RNA の RNA-seq データ解析

Illumina 社 Nextseq500 より出力された raw data (raw reads) は、BCL2-FASTQ program (Illumina, USA) により、FASTQ format に変換する。以降、全てのデータ解析は、Galaxy platform (<https://usegalaxy.org>) で行った。FASTQ は、Filter by quality program を用いて、quality score が 20 以上のシーケンスが 90 % 存在するシーケンスのみ解析対象とした。また、5' および 3' 末端のアダプター配列は、Trim FASTQ program によって除いている。

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し TopHat program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。BAM ファイルは、Cufflinks and Cuffnorm programs を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。マウス miRNA のリファレンスシーケンスは、miRbase (<http://mirbase.org>) を利用した。

・生化学検査

エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行う。

aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) の項目について、automatic blood chemistry analyzer Dry-Chem NX

500V (Fuji Film Co. Ltd, Tokyo, Japan)を利用して測定する。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行う。
aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) の項目について、automatic blood chemistry analyzer Dry-Chem NX 500V (Fuji Film Co. Ltd, Tokyo, Japan)を利用して測定する。

R4 年度に測定を行う Atp7b 変異マウス (F0 世代・11ヶ月齢) は、C57BL/6J ♀ と DBA/2 ♂ を交配して作製した F1 マウス由来の受精卵をゲノム編集によって作製したものである。

今回は、野生型のコントロールとして、C57BL/6J ♂、♀、129 SV/EV ♂、♀、および C3H/HeJ ♂、♀マウス (各 10-12 ヶ月齢) の文献値 (Mazzaccara C., et al, PLoS ONE 2008) の平均を便宜上利用している。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製を行う。
遺伝子改変マウスの作製には、エレクトロポレーションによる CRISPR/Cas9 RNP 導入法を利用する。その手順は、以下の通りである。

ガイド(g) RNA の調整

crRNA 溶液 (100 μ M)、tracrRNA 溶液 (100 μ M)、を RNase free water により 10 μ M に希釈し、95℃で 1 分間インキュベート後に室温に 1 時間ほど静置。
10 μ M の gRNA を OPTI-MEM で 200 ng/ μ l に希釈する。

エレクトロポレーション用の溶液の調整

・ Cas9 溶液(1 μ g/ μ l)	4 μ l
・ gRNA 溶液(200 ng/ μ l)	8 μ l
・ oligoDNA (2 μ g/ μ l)	4 μ l
・ OPTI-MEM	24 μ l

利用する tracrRNA および Cas9 タンパクは、以下を使用。

tracrRNA (Sigma)
cat no. TRACRRNA05N

Cas9 (Thermo Fisher Scientific)
TrueCut Cas9 Protein V2
cat no. A36497 (25 μ g)

37℃で 5 分間インキュベート後に oligoDNA (ssODN or dsDNA, final: 200 ng/ μ l)を添加し、Nepagene 製エレクトロポレーターにて、マウス受精卵にエレクトロポレーションを行う。エレクトロポレーションの設定値は、以下の通りである。

(上段 : Poring Pulse, 下段 : Transfer Pulse)

項目 : Voltage [V], Pulse Length [msec], Pulse Interval [msec], Number of pulses, Decay Rate [%]

上段 : 225 V、2 msec、50 msec、4 pulses、10 rate、+
下段 : 20 V、50 msec、50 msec、5 pulses、40 rate、+/-

Atp7b 変異マウス、Peg10 KOマウスの作製においては、BDF1 マウス (C57BL/6J ♀ と DBA/2 ♂ を交配して作製した F1 マウス) ♀ と C57BL/6J ♂ を交配して作製した受精卵を使用する。

Atp7b エクソン8 変異マウス作製用 gRNA: #988 (CATGGGGGGCGTGTCAAAGA)、gRNA: #989 (GCGTGTCAAAGAAGGTCACG)

Atp7b エクソン8 変異マウス作製用 oligoDNA: CTGGTCATCCTGGTGGTTGCTGTGGCTGAGAA GGCGGAGAGGAGCCCTGTGACATTCTTCGAC ATGCCCCCATGCTCTTTGTGTTTCATTGCCCT GGGCCGGTGGCTGGAACACTTGGCAAAGGTA ACAGCAGCTTCA

Atp7b エクソン11 変異マウス作製用 gRNA: #991 (GCTCCTTAAAGCTACCCATG)、gRNA: #992 (CTCCTTAAAGCTACCCATGT)

Atp7b エクソン11 変異マウス作製用 oligoDNA: GTCCTAAGAAACCCGGAAGCACTGTAATTGC GGGGTCTATAAATGCACATGGCTCTGTGCTCA TTAAA*CTACCCACGTGGGCAATGACACCACT TTGGCTCAGATTGTGAAACTGGTGGAAAGAGG CTCAGATGTCAAAGGTAATGA

Peg10 KO マウス 作製用 gRNA: #1002 (GATGGCAACCCTGGCACGCT)、gRNA: #1003 (TGCTGAGACGAATGGGCGAT)

作製した Atp7b 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J ♂ または、C57BL/6J ♀) と交配を行い、F1 世代マウスの作製を行い、それらの変異を確認することで、変異アレルの germline transmission を確認する。

さらに、germline transmission が確認された変異マウス同士を交配することで、各変異マウスの homo 変異マウスの作製を行い、それぞれのラインの評価を行う。

変異アレルの確認には、下記のプライマーセットを用

いてゲノム編集により変異を導入したオンターゲットサイト部位を含む領域を PCR で増幅し、その後、それぞれの F および R のプライマーによるダイレクトシーケンス法により、変異配列を確認する。

Atp7b exon8 変異マウス

Atp7b-exon8 F1: ttagtgactgccgccctaa

Atp7b-exon8 R1: tcaccagaggctgaggaaga

Atp7b exon11 変異マウス

Atp7b-exon11 F1: ataatgcagcccaggtagtc

Atp7b-exon11 R1: gagtccctcatcacaggttag

ここで得られる F2 世代の homo 変異マウスは、生後 6 ヶ月において、生化学検査およびエクソソーム解析用の血清採取、肝臓および腎臓の毒性評価用の病理学的解析を行う。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討

C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) マウスを解剖し、肝臓を採取する。これらをハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行う。その後に 40 μ m セルストレーナーを通し、酵素的および物理的に組織を破碎した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

樹立に成功した肝臓オルガノイド 1×10^5 個を細胞培養プレートに播種し、5 日間培養を行い、四塩化炭素 (0mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM) を添加後 2 日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

回収した培養液上清 (1ml) より、500 μ l を使用して、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行う。

(倫理面の配慮)

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動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

・次世代型催奇形性試験法の確立に向けた動物実験系の高度化 (R3 年度: 桑形)

1. 帝王切開

本研究における妊娠期エクソソーム解析は妊娠9日、妊娠15日および妊娠18日を予定している。

研究代表者の先行研究により妊娠15日のエクソソーム解析予備データがあることから、今年度は妊娠15日にて試料を採取した。

2日間にわたり、解剖を実施した。7例いずれも妊娠していた。

2. 母動物採血

麻酔後、心採血および腹大動脈からの採血を試みたが、薬物動態を調べることから血液成分を一定にするために腹大動脈から採血することにした。

ヘパリンNa入りの1mLシリンジにて採血し、1.5 mLチューブに採取して、1000Gにて3分間、遠心し、血漿を分離した。血漿はタンパク低吸着の1.5 mLチューブにいれ、-80℃の冷凍庫に保管した。

3. 子宮内容物の採取

着床位置に合わせて子宮内容物番号をふり、PBS入り滅菌シャーレ (110x10 mm) 中にて子宮壁を両鈍眼科ハサミおよび先鋭ピンセットにて子宮広間膜側を切開し、1個体づつ子宮壁から先曲がりピンセット (NO.7) を用いて子宮壁から剥離させ、PBS入りのペトリディッシュ (35 x10 mm, sterile, Falcon) にいれた。

PBSが入っていない別のペトリディッシュ内で卵黄囊膜に一部マクロスプリング剪刀にて切れ込みをいれ、250μLのエッペンドルフチューブを卵黄囊内に挿入し、羊水を採取した。

羊水採取後、卵黄囊膜を切開し、胚、卵黄囊膜および胎盤に分け、それぞれ2.5 mLのポリプロピレンチューブに入れた。

なお、全てのチューブは試料保管前に重量を測定し、試料保管後に再度重量を測定し、その差を求めて試料重量として記録した。

4. マウス血漿および子宮内容物 (卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤) のバルプロ酸ナトリウム濃度測定法の分析バリデーション

血漿、羊水、胚、胎盤、卵黄囊膜の検量線の各濃度 (血漿、羊水: 1.00~2.00 μg/mL、胎児、胎盤、卵黄囊膜: 2.00~4.00 μg/mL) における真度はそれぞれ、92.5~114.0%、94.5~105.0%、93.5~110%、88.0~105.5%及び85.7~114.5%となり、いずれも判定基準を満たした。従って、検量線の直線性は良好であると判断した。

バリデーション項目 (選択性、検量線の直線性) が判定基準を満たしたため、本測定法はマウス血漿、羊水: 1.00~2.00 μg/mL、子宮内容物: 2.00~4.00 μg/mLの範囲にてバルプロ酸濃度測定に適用できると判断した。

・エクソソーム解析用試料採取試験 (R4 年度: 桑形)

1. 一般状態および体重推移

800 mg/kg群の1例が初回投与 (妊娠9日) の投与後1~3時間に腹臥を呈し、投与2日に死亡した。剖検で

は肉眼的異常はみられなかった。死亡例には肉眼的に着床が認められ、妊娠が確認された。

生存例の一般状態は、800 mg/kg群では投与期間中 (妊娠9-11日) の投与後1~3時間に自発運動の減少あるいは腹臥がほぼ全例に観察された。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも一般状態に異常はみられなかった。

2. 体重 (Table 1)

800 mg/kg群では、投与期間 (妊娠9-11日) 及び投与終了後期間 (妊娠11-18日) の体重に増加抑制傾向がみられた。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも体重推移に異常はみられなかった。

Table 1 - 1 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice
Body weight (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)					
Animal No.	/Day				
	0	4	9	10	11
1101	21.7	22.5	24.2	25.2	26.5
1102	22.5	22.5	25.8	26.5	27.8
1103	19.4	20.2	22.7	23.9	24.4
1104	19.7	20.6	23.3	24.2	25.4
n	4	4	4	4	4
Mean	20.8	21.5	24.0	25.0	26.0
S.D.	1.5	1.2	1.3	1.2	1.5

(2) Valproic acid 300 mg/kg					
Animal No.	/Day				
	0	4	9	10	11
4103	20.1	20.2	22.8	23.5	22.8
4104	20.7	22.5	25.5	24.6	25.5
4105		22.3	25.2	25.5	26.4
4106		20.1	23.4	24.2	25.3
n	2	4	4	4	4
Mean	20.4	21.3	24.2	24.5	25.0
S.D.	0.4	1.3	1.3	0.8	1.5

(3) Valproic acid 600 mg/kg					
Animal No.	/Day				
	0	4	9	10	11
7102	20.8	21.6	25.1	26.2	26.6
7103	20.5	21.8	25.9	25.0	25.9
7105		22.6	25.2	25.6	27.1
7106		20.8	24.3	25.0	26.2
n	2	4	4	4	4
Mean	20.7	21.7	25.1	25.5	26.5
S.D.	0.2	0.7	0.7	0.6	0.5

n: Number of dams

Table 1 - 2 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice
Body weight (necropsy group on GD 15)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)						
Animal No.	/Day					
	0	4	9	10	11	15
2102	20.6	21.5	24.6	25.7	26.5	31.5
2103	20.0	21.2	23.7	24.7	25.5	30.4
2104	19.2	21.2	23.5	24.6	25.7	30.3
2105	20.0	21.0	23.8	24.6	25.7	31.0
n	4	4	4	4	4	4
Mean	20.0	21.2	23.9	24.9	25.9	30.8
S.D.	0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.6

(2) Valproic acid 300 mg/kg						
Animal No.	/Day					
	0	4	9	10	11	15
5102	21.0	21.9	24.1	25.5	25.6	29.3
5103	19.6	20.0	22.9	24.0	25.4	31.3
5104	22.9	23.1	25.5	25.1	26.3	30.3
5105	21.9	23.2	25.9	25.6	26.0	32.5
n	4	4	4	4	4	4
Mean	21.4	22.1	24.6	25.1	25.8	30.9
S.D.	1.4	1.5	1.4	0.7	0.4	1.4

(3) Valproic acid 600 mg/kg						
Animal No.	/Day					
	0	4	9	10	11	15
8102	21.9	22.3	24.6	25.4	26.7	31.3
8103	19.5	19.8	22.3	22.9	24.1	28.7
8104	20.3	21.0	23.1	23.0	24.1	28.3
8105	19.2	19.3	21.9	21.5	22.0	26.4
n	4	4	4	4	4	4
Mean	20.2	20.6	23.0	23.2	24.2	28.7
S.D.	1.2	1.3	1.2	1.6	1.9	2.0

n: Number of dams

Table 1 - 3 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Body weight (necropsy group on GD 18)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

/Day								Body weight gain(9-11)
Animal No.	0	4	9	10	11	15	18	
3101	20.8	21.7	24.3	26.0	26.0	31.8	38.0	1.7
3102	20.9	21.2	24.0	24.8	25.7	32.9	38.0	1.7
3104	19.2	21.6	24.7	26.4	27.1	34.1	40.4	2.4
3105	19.4	20.9	23.5	24.6	24.7	31.2	36.0	1.2
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.1	21.4	24.1	25.5	25.9	32.5	38.1	1.8
S.D.	0.9	0.4	0.5	0.9	1.0	1.3	1.8	0.5

Dose : Valproic acid 300 mg/kg

/Day								Body weight gain(9-11)
Animal No.	0	4	9	10	11	15	18	
6102	20.9	20.8	23.3	23.3	24.0	29.6	35.3	0.7
6103	20.7	22.0	25.5	25.0	25.2	31.0	36.2	-0.3
6104	20.2	20.4	23.5	24.5	24.8	29.6	34.8	1.3
6105	20.1	21.0	23.0	23.4	23.6	28.8	33.2	0.6
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.5	21.1	23.8	24.1	24.4	29.8	34.9	0.6
S.D.	0.4	0.7	1.1	0.8	0.7	0.9	1.3	0.7

Dose : Valproic acid 600 mg/kg

/Day								Body weight gain(9-11)
Animal No.	0	4	9	10	11	15	18	
9101	20.4	20.5	23.5	24.4	23.3	27.4	32.2	-0.2
9102	19.2	20.1	22.6	22.5	23.2	28.6	35.1	0.6
9103	20.7	21.7	24.2	24.0	25.3	29.3	34.2	1.1
9104	20.2	20.7	22.2	21.8	21.8	28.2	33.4	-0.4
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.1	20.8	23.1	23.2	23.4	28.4	33.7	0.3
S.D.	0.7	0.7	0.9	1.2	1.4	0.8	1.2	0.7

(4) Valproic acid 800 mg/kg

/Day								Body weight gain(9-11)
Animal No.	0	4	9	10	11	15	18	
10101			25.4	24.5	24.9	29.9	36.9	-0.5
10104 a)			22.0					
10106			23.1	22.0	22.3	22.7	24.5	-0.8
10108			22.5	21.5	21.9	23.7	25.3	-0.6
n		4	3	3	3	3	3	3
Mean		23.3	22.7	23.0	25.4	28.9		-0.6
S.D.		1.5	1.6	1.6	3.9	6.9		0.2

n: Number of dams
a): Died on day 2 administration

3. 剖検
いずれの動物にも剖検所見に異常はみられなかった。

4. 帝王切開所見 (Table 2)
800 mg/kg群では、死亡胚・胎児数に増加傾向がみられたが、いずれの胎児にも外表異常はみられなかった。

Table 2-1 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
1101	9 (8/1)	1	11.1	8
1102	10 (6/4)	0	0.0	10
1103	8 (3/5)	2	25.0	6
1104	10 (5/5)	0	0.0	10
Total	37	3		34
n	4	4	4	4
Mean	9.3	0.8	9.0	8.5
S.D.	1.0	1.0	11.9	1.9

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
4103	7 (2/5)	3	42.9	4
4104	9 (4/5)	0	0.0	9
4105	9 (7/2)	1	11.1	8
4106	8 (5/3)	1	12.5	7
Total	33	5		28
n	4	4	4	4
Mean	8.3	1.3	16.6	7.0
S.D.	1.0	1.3	18.4	2.2

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
7102	11 (7/4)	0	0.0	11
7103	9 (7/2)	1	11.1	8
7105	9 (5/4)	0	0.0	9
7106	9 (4/5)	0	0.0	9
Total	38	1		37
n	4	4	4	4
Mean	9.5	0.3	2.8	9.3
S.D.	1.0	0.5	5.6	1.3

(/) : Right/Left
a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100
n: Number of dams

Table 2-2 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Number of live fetuses		Number of resorptions		Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
Dam No.				Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
1101	8	1		R-1	A	101	R-5	A	104	L-1	A	108			
				R-2	A	102	R-6	A	105						
				R-3	d		R-7	A	106						
				R-4	A	103	R-8	A	107						
1102	10	0		R-1	A	109	R-4	A	112	L-1	A	115	L-4	A	118
				R-2	A	110	R-5	A	113	L-2	A	116			
				R-3	A	111	R-6	A	114	L-3	A	117			
1103	6	2		R-1	A	119				L-1	A	121	L-4	d	
				R-2	A	120				L-2	A	122	L-5	A	124
				R-3	d					L-3	A	123			
1104	10	0		R-1	A	125	R-4	A	128	L-1	A	130	L-4	A	133
				R-2	A	126	R-5	A	129	L-2	A	131	L-5	A	134
				R-3	A	127				L-3	A	132			

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Number of live fetuses		Number of resorptions		Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
Dam No.				Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
4103	4	3		R-1	A	401				L-1	A	403	L-4	d	
				R-2	A	402				L-2	d		L-5	d	
										L-3	A	404			
4104	9	0		R-1	A	405	R-4	A	408	L-1	A	409	L-4	A	412
				R-2	A	406				L-2	A	410	L-5	A	413
				R-3	A	407				L-3	A	411			
4105	8	1		R-1	A	414	R-5	A	418	L-1	d				
				R-2	A	415	R-6	A	419	L-2	A	421			
				R-3	A	416	R-7	A	420						
				R-4	A	417									
4106	7	1		R-1	A	422	R-4	A	425	L-1	d				
				R-2	A	423	R-5	A	426	L-2	A	427			
				R-3	A	424				L-3	A	428			

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Number of live fetuses		Number of resorptions		Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
Dam No.				Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
7102	11	0		R-1	A	701	R-5	A	705	L-1	A	708	L-4	A	711
				R-2	A	702	R-6	A	706	L-2	A	709			
				R-3	A	703	R-7	A	707	L-3	A	710			
				R-4	A	704									
7103	8	1		R-1	A	712	R-5	A	716	L-1	d				
				R-2	A	713	R-6	A	717	L-2	A	719			
				R-3	A	714	R-7	A	718						
				R-4	A	715									
7105	9	0		R-1	A	720	R-4	A	723	L-1	A	725	L-4	A	728
				R-2	A	721	R-5	A	724	L-2	A	726			
				R-3	A	722				L-3	A	727			
7106	9	0		R-1	A	729	R-4	A	732	L-1	A	733	L-4	A	736
				R-2	A	730				L-2	A	734	L-5	A	737
				R-3	A	731				L-3	A	735			

Loc. : Location in the uterus, C : Classification, S. No. : Sample number
A : Live fetus, d : Dead fetus

Table 2-3

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 15)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
2102	8 (3/5)	0	0.0	8	0.33	0.10
2103	8 (4/4)	1	12.5	7	0.34	0.13
2104	9 (6/3)	1	11.1	8	0.29	0.09
2105	7 (5/2)	1	14.3	6	0.37	0.09
Total	32	3		29		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	0.8	9.5	7.3	0.33	0.10
S.D.	0.8	0.5	6.5	1.0	0.03	0.02

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)	
5102	8 (5/3)	3	37.5	#	5	0.35	0.11
5103	9 (5/4)	0	0.0	9	0.33	0.10	
5104	8 (4/4)	2	25.0	6	0.35	0.09	
5105	9 (7/2)	0	0.0	9	0.30	0.09	
Total	34	5		29			
n	4	4	4	4	4	4	
Mean	8.5	1.3	15.6	7.3	0.33	0.10	
S.D.	0.6	1.5	18.8	2.1	0.02	0.01	

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	implantation	resorptions Total	tation loss(%) Total a)	live fetuses	weight(g)	weight(g)
8102	8 (2/6)	0	0.0	8	0.34	0.10
8103	9 (6/3)	0	0.0	9	0.29	0.09
8104	8 (7/1)	0	0.0	8	0.24	0.07
8105	7 (5/2)	2	28.6	5	0.33	0.08
Total	32	2		30		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	0.5	7.2	7.5	0.30	0.09
S.D.	0.8	1.0	14.3	1.7	0.05	0.01

(/) : Right/Left
a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100
n: Number of dams

Table 2-4 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 15)																	
Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)			Fetus data (right in the uterus)					Fetus data (left in the uterus)									
Dam No.	Number of fetuses	Number of resorptions	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	S.No.		
					(g)	(g)			(g)	(g)			(g)	(g)			
2102	8	0	R-1	A	0.33	0.10	201	L-1	A	0.32	0.10	204	L-4	A	0.34	0.12	207
			R-2	A	0.23	0.08	202	L-2	A	0.36	0.10	205	L-5	A	0.34	0.10	208
			R-3	A	0.33	0.11	203	L-3	A	0.37	0.11	206					
2103	7	1	R-1	A	0.33	0.14	209	R-4	A	0.29	0.11	211	L-1	A	0.37	0.12	212
			R-2	A	0.33	0.12	210	L-2	A	0.34	0.11	213	L-4	A	0.35	0.18	215
			R-3	d				L-3	A	0.38	0.10	214					
2104	8	1	R-1	A	0.27	0.08	216	R-4	A	0.32	0.08	218	L-1	A	0.32	0.09	221
			R-2	d				R-5	A	0.33	0.09	219	L-2	A	0.33	0.09	222
			R-3	A	0.24	0.08	217	R-6	A	0.27	0.08	220	L-3	A	0.26	0.09	223
2105	6	1	R-1	A	0.34	0.07	224	R-4	A	0.39	0.11	227	L-1	A	0.37	0.09	229
			R-2	A	0.41	0.10	225	R-5	A	0.35	0.10	228	L-2	d			
			R-3	A	0.38	0.09	226										
(2) Valproic acid 300 mg/kg																	
Dam No.	Number of fetuses	Number of resorptions	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	S.No.		
					(g)	(g)			(g)	(g)			(g)	(g)			
5102	5	3	R-1	A	0.35	0.10	501	R-4	A	0.38	0.12	502	L-1	A	0.36	0.12	504
			R-2	d				R-5	A	0.32	0.09	503	L-2	A	0.34	0.10	505
			R-3	d				L-3	A								
5103	9	0	R-1	A	0.29	0.11	506	R-4	A	0.31	0.07	509	L-1	A	0.36	0.09	511
			R-2	A	0.36	0.11	507	R-5	A	0.33	0.10	510	L-2	A	0.35	0.09	512
			R-3	A	0.36	0.12	508	L-3	A	0.30	0.08	513					
5104	6	2	R-1	A	0.37	0.12	515	L-1	A	0.37	0.09	517	L-3	A	0.31	0.08	519
			R-2	d				R-4	A	0.31	0.09	516	L-2	A	0.35	0.08	518
5105	9	0	R-1	A	0.25	0.10	521	R-5	A	0.29	0.09	525	L-1	A	0.34	0.07	528
			R-2	A	0.31	0.11	522	R-6	A	0.28	0.08	526	L-2	A	0.35	0.09	529
			R-3	A	0.33	0.11	523	R-7	A	0.29	0.08	527					
			R-4	A	0.30	0.10	524										
(3) Valproic acid 600 mg/kg																	
Dam No.	Number of fetuses	Number of resorptions	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	S.No.		
					(g)	(g)			(g)	(g)			(g)	(g)			
8102	8	0	R-1	A	0.37	0.12	801	L-1	A	0.36	0.10	804	L-4	A	0.36	0.09	806
			R-2	A	0.34	0.10	802	L-2	A	0.34	0.10	804	L-5	A	0.32	0.09	807
								L-3	A	0.31	0.10	805	L-6	A	0.32	0.09	808
8103	9	0	R-1	A	0.28	0.08	809	R-4	A	0.28	0.09	812	L-1	A	0.30	0.09	815
			R-2	A	0.32	0.09	810	R-5	A	0.32	0.10	813	L-2	A	0.29	0.09	816
			R-3	A	0.30	0.09	811	R-6	A	0.28	0.08	814	L-3	A	0.27	0.09	817
8104	8	0	R-1	A	0.17	0.06	818	R-5	A	0.24	0.09	822	L-1	A	0.22	0.06	825
			R-2	A	0.24	0.08	819	R-6	A	0.24	0.07	823					
			R-3	A	0.27	0.07	820	R-7	A	0.25	0.07	824					
			R-4	A	0.30	0.08	821										
8105	5	2	R-1	A	0.34	0.08	826	R-4	d			L-1	A	0.31	0.08	829	
			R-2	d				R-5	A	0.35	0.09	828	L-2	A	0.32	0.08	830
			R-3	A	0.33	0.08	827										
Loc.: Location in the uterus, C.: Classification, S.No.: Sample number A.: Live fetus, d.: Dead fetus F.W.: Body weight of live fetuses, P.W.: Placental weight of live fetuses a): Normal value detect																	

Table 2-5 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 18)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions	Postimplantation loss(%)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
3101	8 (6/2)	0	0.0	8	1.00	0.11
3102	8 (6/2)	0	0.0	8	1.07	0.10
3104	9 (3/6)	0	0.0	9	1.03	0.08
3105	8 (2/6)	1	12.5	7	1.06	0.09
Total	33	1		32		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.3	0.3	3.1	8.0	1.04	0.10
S.D.	0.5	0.5	6.3	0.8	0.03	0.01

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions	Postimplantation loss(%)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
6102	7 (3/4)	0	0.0	7	1.03	0.09
6103	8 (4/4)	1	12.5	7	0.99	0.08
6104	7 (2/5)	0	0.0	7	1.04	0.08
6105	6 (4/2)	0	0.0	6	0.85	0.08
Total	28	1		27		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	7.0	0.3	3.1	6.8	0.98	0.08
S.D.	0.8	0.5	6.3	0.5	0.09	0.01

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions	Postimplantation loss(%)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
9101	8 (6/2)	2	25.0	6	0.79	0.08
9102	8 (4/4)	0	0.0	8	0.87	0.09
9103	9 (3/6)	2	22.2	7	0.80	0.08
9104	7 (4/3)	0	0.0	7	0.88	0.08
Total	32	4		28		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	1.0	11.8	7.0	0.84	0.08
S.D.	0.8	1.2	13.7	0.8	0.05	0.01

(4) Valproic acid 800 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions	Postimplantation loss(%)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
10101	8 (5/3)	0	0.0	8	0.80	0.07
10106	8 (5/3)	8	100.0	0		
10108	7 (3/4)	7	100.0	0		
Total	23	15		8		
n	3	3	3	3	1	1
Mean	7.7	5.0	66.7	2.7	0.80	0.07
S.D.	0.6	4.4	57.7	4.6		

(/): Right/Left
a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100
n: Number of dams

Table 2-6 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice

Valproic acid and 800 mg/kg vehicle control																	
Dam No.	No. of fetuses	No. of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)								
			Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.			
					(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.
3101	8	0	R-1	A	0.93	0.10	301	R-4	A	1.04	0.11	304	L-1	A	0.96	0.10	307
			R-2	A	0.93	0.11	302	R-5	A	1.05	0.13	305	L-2	A	1.08	0.10	308
			R-3	A	0.96	0.08	303	R-6	A	1.00	0.11	306					
3102	8	0	R-1	A	1.09	0.11	309	R-4	A	1.11	0.10	312	L-1	A	1.12	0.10	315
			R-2	A	1.06	0.08	310	R-5	A	1.06	0.10	313	L-2	A	1.04	0.08	316
			R-3	A	1.06	0.10	311	R-6	A	1.02	0.09	314					
3104	9	0	R-1	A	1.05	0.10	317	L-1	A	1.06	0.08	320	L-4	A	1.05	0.08	323
			R-2	A	1.04	0.09	318	L-2	A	1.00	0.07	321	L-5	A	1.03	0.08	324
			R-3	A	1.03	0.08	319	L-3	A	1.00	0.06	322	L-6	A	1.00	0.09	325
3105	7	1	R-1	A	1.10	0.11	326	L-1	A	1.10	0.10	328	L-4	A	1.05	0.09	331
			R-2	A	1.00	0.09	327	L-2	A	1.00	0.08	329	L-5	A	1.07	0.10	332
								L-3	A	1.12	0.09	330	L-6	d			
(2) Valproic acid 300 mg/kg																	
Dam No.	No. of fetuses	No. of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)								
			Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.			
					(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.
6102	7	0	R-1	A	1.00	0.09	601	L-1	A	1.00	0.11	604	L-4	A	1.05	0.10	606
			R-2	A	1.06	0.10	602	L-2	A	0.93	0.07	605					
			R-3	A	1.01	0.08	603	L-3	A	1.03	0.08	606					
6103	7	1	R-1	A	0.93	0.09	608	R-4	A	0.94	0.08	611	L-1	A	1.00	0.07	614
			R-2	A	1.00	0.08	609	L-2	d								
			R-3	A	0.95	0.08	610	L-3	A	1.10	0.09	613					
6104	7	0	R-1	A	1.00	0.09	615	L-1	A	1.04	0.08	617	L-4	A	1.12	0.10	620
			R-2	A	1.00	0.07	616	L-2	A	1.02	0.07	618	L-5	A	1.08	0.07	621
								L-3	A	1.00	0.09	619					
6105	6	0	R-1	A	0.86	0.06	622	R-3	A	0.85	0.08	624	L-1	A	0.89	0.07	626
			R-2	A	0.85	0.08	623	R-4	A	0.79	0.07	625	L-2	A	0.87	0.09	627
(3) Valproic acid 600 mg/kg																	
Dam No.	No. of fetuses	No. of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)								
			Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.			
					(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.
9101	8	2	R-1	A	0.84	0.09	901	R-4	A	0.89	0.09	903	L-1	A	0.87	0.08	906
			R-2	A	0.87	0.07	902	R-5	A	0.81	0.08	904	L-2	d			
			R-3	d				R-6	A	0.68	0.07	905					
9102	8	0	R-1	A	0.75	0.11	907	R-3	A	0.86	0.09	909	L-1	A	0.89	0.10	911
			R-2	A	0.87	0.08	908	R-4	A	0.94	0.12	910	L-2	A	0.77	0.07	912
												L-3	A	0.89	0.06	913	
9103	7	2	R-1	A	0.67	0.08	915	L-1	A	0.79	0.08	917	L-4	d			
			R-2	A	0.80	0.08	916	L-2	A	0.85	0.08	918	L-5	A	0.84	0.09	920
			R-3	d				L-3	A	0.79	0.07	919	L-6	A	0.86	0.10	921
9104	7	0	R-1	A	0.82	0.09	922	R-3	A	0.90	0.09	924	L-1	A	0.90	0.08	926
			R-2	A	0.86	0.07	923	R-4	A	0.83	0.08	925	L-2	A	1.00	0.10	927
(4) Valproic acid 800 mg/kg																	
Dam No.	No. of fetuses	No. of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)								
			Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.	Loc.	C	F.W.	P.W.			
					(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.			(g)	(g)	S.No.
10101	8	0	R-1	A	0.74	0.05	1001	R-4	A	0.89	0.08	1004	L-1	A	0.78	0.07	1006
			R-2	A	0.77	0.05	1002	R-5	A	0.88	0.07	1005	L-2	A	0.84	0.08	1007
			R-3	A	0.78	0.06	1003	L-1	A	0.74	0.07	1008					
												L-2	d				
												L-3	d				
10106	0	8	R-1	d				R-4	d			L-1	d				
			R-2	d				R-5	d			L-2	d				
			R-3	d								L-3	d				
10108	0	7	R-1	d				R-3	d			L-1	d			L-3	d
			R-2	d								L-2	d			L-4	d

Loc. = Location in the uterus, C = Classification, S.No. = Sample number
A = Live fetus, d = Dead fetus
P.W. = Body weight of live fetuses, P.W. = Placental weight of live fetuses

Table 3 Valproic acid concentrations in plasma
after oral administration of sodium valproate to female mice (Gestation day 11)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (μg/mL)
		1 h
300	1102	179
	1103	231
	1104	263
	Mean	224
	SD	42
600	2102	529
	2103	363
	2104	603
	Mean	498
	SD	123

3. 胎児組織中バルプロ酸濃度 (Table 4)

300又は600 mg/kgのバルプロ酸を、妊娠マウスの妊娠9~11日に反復経口投与した時の妊娠11日の投与後約1時間の個体ごとの平均胎児中バルプロ酸濃度は、それぞれ66.7~106及び159~312 μg/gであった。子宮内位置に大きな差はなかった。

Table 4 Valproic acid concentrations in fetus
after oral administration of sodium valproate to female mice (Gestation day 11)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	Concentration (μg/g)	Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	Concentration (μg/g)	
300	1102	R-1	(2.6)	600	2102	R-1	230	
		R-2	64.4			R-2	335	
		R-3	70.2			R-3	246	
		R-4	81.6			L-1	160	
		R-5	64.5			L-2	306	
		L-1	73.2			L-3	135	
		L-2	67.1			L-4	274	
		L-3	73.1			L-6	270	
		L-4	39.2			Mean	245	
		Mean	66.7			SD	68	
		SD	12.4			R-1	182	
	1103	R-1	76.6		2103	R-2	183	
		R-3	86.5			R-3	128	
		R-4	99.4			R-4	173	
		R-5	106			R-5	154	
		R-6	87.3			R-6	172	
		R-7	78.4			R-7	145	
		L-1	79.3			R-8	157	
		L-2	70.0			L-1	138	
		L-3	84.1			Mean	159	
		Mean	85.3			SD	20	
		SD	11.3			R-1	317	
	1104	R-1	113			2104	R-2	298
		R-2	119				R-3	357
		R-3	109				R-4	288
		R-4	96.2				L-1	297
		R-5	101				L-2	310
		L-1	105				L-3	344
		L-2	102				L-4	286
		L-3	106				Mean	312
		L-4	106				SD	26
		L-5	107					
		Mean	106					
	SD	6						

The fetus (Animal No. 1102, location: R-1) was white and small.

4. 小括 (Table 5)

300 mg/kg群の1母動物の1胎児 (母動物番号1102-R1) については、胎児中濃度が明らかに低かった。この児は肉眼的に小型であり、剖検時である妊娠11日に比較的近い時期に死亡していた可能性が考えられた。厳密な死亡の判断は困難であるが、当該胎児中濃度は同腹の他の児に比較して明確な外れ値であったことから、最終投与時には血流が途絶していたこと等により、被験物質が分布しなかったものと判断し評価データから除外した。

Table 5 Valproic acid concentrations in dam plasma and fetuses on GD11 in mice.

(1) Dose level: 300 mg/kg											
Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)
1102	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	1103	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	1104	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)
Loc.				Loc.				Loc.			
r1	179	2.60	1.5	r1	231	76.6	33.2	r1	263	113	43.0
r2	179	64.4	36.0	r3	231	86.5	37.4	r2	263	119	45.2
r3	179	70.2	39.2	r4	231	99.4	43.0	r3	263	109	41.4
r4	179	81.6	45.6	r5	231	106	45.9	r4	263	96.2	36.6
r5	179	64.5	36.0	r6	231	87.3	37.8	r5	263	101	38.4
l1	179	73.2	40.9	r7	231	78.4	33.9	l1	263	105	39.9
l2	179	67.1	37.5	l1	231	79.3	34.3	l2	263	102	38.8
l3	179	73.1	40.8	l2	231	70.0	30.3	l3	263	106	40.3
l4	179	39.2	21.9	l3	231	84.1	36.4	l4	263	106	40.3
								l5	263	107	40.7
Ave		66.7	37.2	Ave		85.3	36.9	Ave		106	40.5
SD		12.4	7.0	SD		11.3	4.9	SD		6	2.4
CV		18.7	18.7	CV		13.3	13.3	CV		6.0	6.0
max		81.6	45.6	max		106.0	45.9	max		119.0	45.2
min		39.2	21.9	min		70.0	30.3	min		96.2	36.6
max/min		2.08		max/min		1.51		max/min		1.24	
R_max		122.4		R_max		124.3		R_max		111.8	
R_min		58.8		R_min		82.1		R_min		90.4	

(2) Dose level: 600 mg/kg											
Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No.	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)
2102	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	2103	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	2104	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)
Loc.				Loc.				Loc.			
r1	529	230	43.5	r1	363	182	50.1	r1	603	317	52.6
r2	529	335	63.3	r2	363	183	50.4	r2	603	298	49.4
r3	529	246	46.5	r3	363	128	35.3	r3	603	357	59.2
l1	529	160	30.2	r4	363	173	47.7	r4	603	288	47.8
l2	529	306	57.8	r5	363	154	42.4	l1	603	297	49.3
l3	529	135	25.5	r6	363	172	47.4	l2	603	310	51.4
l4	529	274	51.8	r7	363	145	39.9	l3	603	344	57.0
l6	529	270	51.0	r8	363	157	43.3	l4	603	286	47.4
				l1	363	138	38.0				
Ave		244.5	46.2	Ave		159.1	43.8	Ave		312.1	51.8
SD		68.5	12.9	SD		19.7	5.4	SD		26.1	4.3
CV		28.0	28.0	CV		12.4	12.4	CV		8.3	8.3
max		335.0	63.3	max		183.0	50.4	max		357.0	59.2
min		135.0	25.5	min		128.0	35.3	min		286.0	47.4
max/min		2.48		max/min		1.43		max/min		1.25	
R_max		137.0		R_max		115.0		R_max		114.4	
R_min		55.2		R_min		80.4		R_min		91.6	

母動物血漿中バルプロ酸濃度の群平均濃度は、300 mg/kg群が224 μg/mLであるのに対し、600 mg/kg群では498 μg/mLであった。投与量が2倍に増加したのに対し2.22倍の血漿中濃度を示した。この値は各投与量の母動物3例毎のばらつき (CV 300 mg/kg群: 18.8%、600 mg/kg群: 24.7%) から、母動物血漿中濃度も2倍になっていると考えられた。

胎児中バルプロ酸濃度は300 mg/kg群の群平均値が86.1 μg/g、600 mg/kg群では239 μg/gで、2.77倍であった。300 mg/kg群の各腹の胎児中バルプロ酸濃度の腹ごとの平均値は母動物血漿中濃度の36.9~40.5%、600 mg/kg群では43.8~51.8%で両用量間に大差はなかった (各腹における個々の胎児中濃度の母動物血漿中濃度に対する割合は、300 mg/kg群では21.9~45.9%、600 mg/kg群では25.5~63.3%)。

両者には大差はなかったものの、600 mg/kg群は300 mg/kg群に比較して高値傾向を示した。本試験における用量段階は2段階で、確度の高い推定を行うことはできないが、この傾向は胎児に至るまでの間に投与量に依存しない一定速度の代謝が存在し相対的に低用量群の胎児中濃度が低値であったのか、測定対象である胎児以外の器官への分布に飽和が生じた等によって高用量群の胎児中濃度が高値であったといった事態が発生した可能性等が考えられる。

また、測定値の偏差に子宮角の左右、着床位置の卵

巣からの距離等による一定の傾向は認められず、いずれの胎児中濃度にも着床位置による差は認められないと結論した。

・エクソソーム解析用試料採取試験の解析（R5 年度：桑形、小野）

1. 一般状態および体重推移

800 mg/kg群の1例が初回投与（妊娠9日）の投与後1~3時間に腹臥を呈し、投与2日に死亡した。剖検では肉眼的異常はみられなかった。死亡例には肉眼的に着床が認められ、妊娠が確認された。

生存例の一般状態は、800 mg/kg群では投与期間中（妊娠9-11日）の投与後1~3時間に自発運動の減少あるいは腹臥がほぼ全例に観察された。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも一般状態に異常はみられなかった。

2. 体重（Table 1）

800 mg/kg群（母動物）では、投与期間（妊娠9-11日）及び投与終了後期間（妊娠11-18日）の体重に増加抑制傾向がみられた。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも体重推移に異常はみられなかった。

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice							
Body weight (necropsy group on GD 11)						Period : F0 gestation Day 0-11	
Sex : Female						Dose : Valproic acid 0 mg/kg	
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	Body weight gain(9-11)
1101		21.7	22.5	24.2	25.2	26.5	2.3
1102		22.5	22.5	25.8	26.5	27.8	2.0
1103		19.4	20.2	22.7	23.9	24.4	1.7
1104		19.7	20.6	23.3	24.2	25.4	2.1
n		4	4	4	4	4	4
Mean		20.8	21.5	24.0	25.0	26.0	2.0
S.D.		1.5	1.2	1.3	1.2	1.5	0.2
Dose : Valproic acid 300 mg/kg							
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	Body weight gain(9-11)
4103		20.1	20.2	22.8	23.5	22.8	0.0
4104		20.7	22.5	25.5	24.6	25.5	0.0
4105			22.3	25.2	25.5	26.4	1.2
4106			20.1	23.4	24.2	25.3	1.9
n		2	4	4	4	4	4
Mean		20.4	21.3	24.2	24.5	25.0	0.8
S.D.		0.4	1.3	1.3	0.8	1.5	0.9
Dose : Valproic acid 600 mg/kg							
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	Body weight gain(9-11)
7102		20.8	21.6	25.1	26.2	26.6	1.5
7103		20.5	21.8	25.9	25.0	25.9	0.0
7105			22.6	25.2	25.6	27.1	1.9
7106			20.8	24.3	25.0	26.2	1.9
n		2	4	4	4	4	4
Mean		20.7	21.7	25.1	25.5	26.5	1.3
S.D.		0.2	0.7	0.7	0.6	0.5	0.9
n: Number of dams							

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice										
Body weight (necropsy group on GD 15)						Period : F0 gestation Day 0-15				
Sex : Female						Dose : Valproic acid 0 mg/kg				
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	Body weight gain(9-11)		
2102		20.6	21.5	24.6	25.7	26.5	31.5	1.9		
2103		20.0	21.2	23.7	24.7	25.5	30.4	1.8		
2104		19.2	21.2	23.5	24.6	25.7	30.3	2.2		
2105		20.0	21.0	23.8	24.6	25.7	31.0	1.9		
n	4	4	4	4	4	4	4	4		
Mean		20.0	21.2	23.9	24.9	25.9	30.8	2.0		
S.D.		0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.6	0.2		
Sex : Female										
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	Body weight gain(9-11)		
5102		21.0	21.9	24.1	25.5	25.6	29.3	1.5		
5103		19.6	20.0	22.9	24.0	25.4	31.3	2.5		
5104		22.9	23.1	25.5	25.1	26.3	30.3	0.8		
5105		21.9	23.2	25.9	25.6	26.0	32.5	0.1		
n	4	4	4	4	4	4	4	4		
Mean		21.4	22.1	24.6	25.1	25.8	30.9	1.2		
S.D.		1.4	1.5	1.4	0.7	0.4	1.4	1.0		
Sex : Female										
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	Body weight gain(9-11)		
8102		21.9	22.3	24.6	25.4	26.7	31.3	2.1		
8103		19.5	19.8	22.3	22.9	24.1	28.7	1.8		
8104		20.3	21.0	23.1	23.0	24.1	28.3	1.0		
8105		19.2	19.3	21.9	21.5	22.0	26.4	0.1		
n	4	4	4	4	4	4	4	4		
Mean		20.2	20.6	23.0	23.2	24.2	28.7	1.3		
S.D.		1.2	1.3	1.2	1.6	1.9	2.0	0.9		
n: Number of dams										

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice										
Body weight (necropsy group on GD 18)						Period : F0 gestation Day 0-18				
Sex : Female						Dose : Valproic acid 0 mg/kg				
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)	
3101		20.9	21.7	24.3	26.0	26.0	31.8	38.0	1.7	
3102		20.9	21.2	24.0	24.8	25.7	32.9	38.0	1.7	
3104		19.2	21.6	24.7	28.4	27.1	34.1	40.4	2.4	
3105		19.4	20.9	23.5	24.6	24.7	31.2	36.0	1.2	
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Mean		20.1	21.4	24.1	26.5	25.9	32.6	38.1	1.8	
S.D.		0.8	0.4	0.5	0.8	1.0	1.3	1.8	0.5	
Dose : Valproic acid 300 mg/kg										
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)	
6102		20.9	20.6	23.5	23.3	24.0	29.6	35.3	0.7	
6103		20.7	22.0	25.5	25.0	25.2	31.0	36.2	0.3	
6106		20.2	20.4	23.5	24.5	24.0	29.6	34.9	1.3	
6105		20.1	21.0	23.0	23.4	23.6	28.9	33.2	0.6	
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Mean		20.5	21.1	23.8	24.1	24.4	29.8	34.9	0.8	
S.D.		0.4	0.7	1.1	0.8	0.7	0.9	1.3	0.7	
Dose : Valproic acid 600 mg/kg										
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)	
9101		20.4	20.5	23.5	24.4	23.3	27.4	30.2	0.2	
9102		19.2	20.1	22.6	22.5	23.2	26.6	30.1	0.6	
9103		20.7	21.7	24.2	24.0	25.3	29.3	34.2	1.1	
9104		20.3	20.7	23.2	21.8	21.8	28.3	33.4	0.4	
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Mean		20.1	20.8	23.1	23.2	23.4	28.6	33.7	0.3	
S.D.		0.7	0.7	0.9	1.2	1.4	0.8	1.2	0.7	
Dose : Valproic acid 800 mg/kg										
Animal No.	Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)	
10101				25.4	24.2	26.9	29.9	36.9	-0.1	
10104 a)				22.0					-0.1	
10108				23.1	22.0	22.3	22.7	24.5	-0.1	
10108				22.5	21.5	21.9	23.7	25.3	-0.1	
n				4	3	3	3	3	3	
Mean				23.3	22.7	23.0	25.4	28.9	-0.1	
S.D.				1.5	1.6	1.8	3.0	6.5	0.2	
n: Number of dams										
a) Died on day 2 administration										

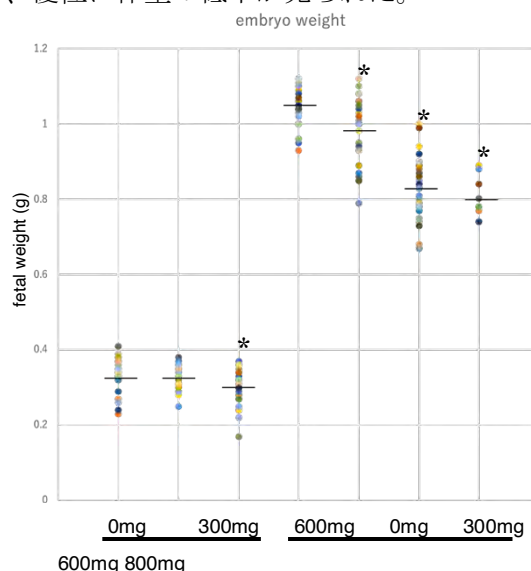
3. 剖検

いずれの母動物にも剖検所見に異常はみられなかった。

4. 帝王切開所見

妊娠11日の胎児に関しては、まだ胎児の大きさが小さいことから、体重測定、および、羊水採取は行っていない。また、妊娠18日の胎児においては、羊水量が胎児に比較して減少することにより、採取が困難なことから、羊水採取を行っていない。

まず、妊娠15日、および、妊娠18日での胎児体重測定の結果、妊娠15日は、600 mg/kg群において、妊娠18日では、300 mg/kg群、600 mg/kg群、800 mg/kg群で、優位に体重の低下が見られた。



図：妊娠15日および18日における胎児体重測定の結果

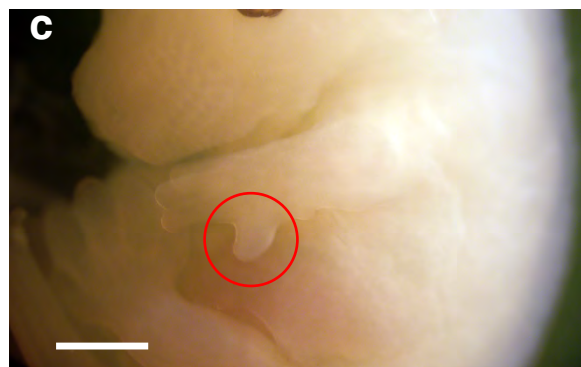
次に、外表異常を観察したところ、妊娠11日では、異常所見は見られず、妊娠15日においては、600 mg/kg群において、1胎児（胎児番号：8104-R2、着床番号：819）で神経管閉鎖不全がみられ、また、多くの指形成奇形が確認された。

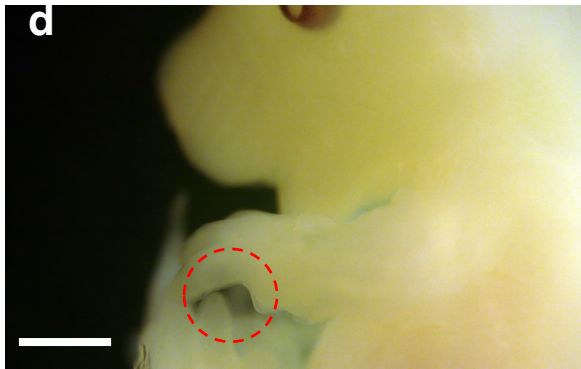
表：妊娠１５日における胎児の体重および外表異常
 赤で塗られたサンプルは、後に羊水中のエクソソームRNAの
 網羅的遺伝子発現解析を行っている。

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation
0	2102	R-1	live	0.33	0.10	201	-	-
		R-2	live	0.23	0.08	202	-	-
		R-3	live	0.33	0.11	203	-	-
		L-1	live	0.32	0.10	204	-	-
		L-2	live	0.36	0.10	205	-	-
		L-3	live	0.37	0.11	206	-	-
		L-4	live	0.34	0.12	207	-	-
		L-5	live	0.34	0.10	208	-	-
		Mean		0.33	0.10			
		SD		0.04	0.01			
	2103	R-1	live	0.33	0.14	209	-	-
		R-2	live	0.33	0.12	210	-	-
		R-3	dead				-	-
		R-4	live	0.29	0.11	211	-	-
		L-1	live	0.37	0.12	212	-	-
		L-2	live	0.34	0.11	213	-	-
		L-3	live	0.38	0.10	214	-	-
		L-4	live	0.35	0.18	215	-	-
		Mean		0.34	0.13			
		SD		0.03	0.03			
	2104	R-1		0.27	0.08	216	-	-
		R-2	dead				-	-
		R-3	live	0.24	0.08	217	-	-
		R-4	live	0.32	0.08	218	-	-
		R-5	live	0.33	0.09	219	-	-
		R-6	live	0.27	0.08	220	-	-
		L-1	live	0.32	0.09	221	-	-
		L-2	live	0.33	0.09	222	-	-
		L-3	live	0.26	0.09	223	-	-
		Mean	106	0.29	0.09			
		SD	6	0.04	0.01			
	2105	R-1	live	0.34	0.07	224	-	-
		R-2	live	0.41	0.10	225	-	-
		R-3	live	0.38	0.09	226	-	-
		R-4	live	0.39	0.11	227	-	-
		R-5	live	0.35	0.10	228	-	-
		L-1	live	0.37	0.09	229	-	-
		L-2	dead				-	-
		Mean		0.37	0.09			
		SD		0.12	0.03			

Dose level (mg/kg)	pregnant dam No.	in utero Location	fetus status live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation
300	5102	R-1	live	0.35	0.10	501	-	-
		R-2	dead				-	-
		R-3	dead				-	-
		R-4	live	0.38	0.12	502	-	-
		R-5	live	0.32	0.09	503	-	-
		L-1	live	0.36	0.12	504	-	-
		L-2	live	0.34	0.10	505	-	-
		L-3	dead				-	-
		Mean		0.35	0.11			
		SD		0.02	0.01			
	5103	R-1	live	0.29	0.11	506	-	-
		R-2	live	0.36	0.11	507	-	-
		R-3	live	0.36	0.12	508	-	-
		R-4	live	0.31	0.07	509	-	-
		R-5	live	0.33	0.10	510	-	-
		L-1	live	0.36	0.09	511	-	-
		L-2	live	0.35	0.09	512	-	-
		L-3	live	0.30	0.08	513	-	-
		L-4	live	0.33	0.10	514	-	-
		Mean		0.33	0.10			
		SD		0.03	0.02			
	5104	R-1	dead				-	-
		R-2	dead				-	-
		R-3	live	0.37	0.12	515	-	-
		R-4	live	0.31	0.09	516	-	-
		L-1	live	0.37	0.09	517	-	-
		L-2	live	0.35	0.08	518	-	-
		L-3	live	0.31	0.08	519	-	-
		L-4	live	0.36	0.09	520	-	-
		Mean		0.35	0.09			
		SD		0.03	0.01			
	5105	R-1	live	0.25	0.10	521	-	-
		R-2	live	0.31	0.11	522	-	-
		R-3	live	0.33	0.11	523	-	-
		R-4	live	0.30	0.10	524	-	-
		R-5	live	0.29	0.09	525	-	-
		R-6	live	0.28	0.08	526	-	-
		R-7	live	0.29	0.08	527	-	-
		L-1	live	0.34	0.07	528	-	-
		L-2	live	0.35	0.09	529	-	-
		Mean		0.30	0.09			
		SD		0.03	0.01			

Dose level (mg/kg)	pregnant dam No.	in utero Location	fetus status live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation
600	8102	R-1	live	0.37	0.12	801	-	-
		R-2	live	0.34	0.10	802	-	-
		L-1	live	0.36	0.10	803	-	-
		L-2	live	0.34	0.10	804	-	-
		L-3	live	0.31	0.10	805	-	-
		L-4	live	0.36	0.09	806	-	-
		L-5	live	0.32	0.09	807	-	-
		L-6	live	0.32	0.09	808	-	-
		Mean		0.34	0.10			
		SD		0.02	0.01			
	8103	R-1	live	0.28	0.08	809	-	-
		R-2	live	0.32	0.09	810	-	-
		R-3	live	0.30	0.09	811	-	-
		R-4	live	0.28	0.09	812	-	-
		R-5	live	0.32	0.10	813	-	-
		R-6	live	0.28	0.08	814	-	-
		L-1	live	0.30	0.09	815	-	-
		L-2	live	0.29	0.09	816	-	-
		L-3	live	0.27	0.09	816	-	-
		Mean		0.29	0.09			
		SD		0.02	0.01			
	8104	R-1	live	0.17	0.06	818	-	Adactyly, forelimb, the 4th, Left Malpositioned digit, forelimb, the 5th, Left
		R-2	live	0.24	0.08	819	-	exencephaly
		R-3	live	0.27	0.07	820	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Left Adactyly, forelimb, the 1st & 5th, Right Malpositioned digit, forelimb, the 5th, Right
		R-4	live	0.30	0.08	821	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Left Adactyly, forelimb, the 5th, Right
		R-5	live	0.24	0.09	822	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Left
		R-6	live	0.24	0.07	823	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Right
		R-7	live	0.25	0.07	824	-	Pendulous digit, forelimb, the 5th, Right Malpositioned digit, hindlimb, the 1st, Right
		L-1	live	0.22	0.06	825	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Right
		Mean		0.24	0.07			
		SD		0.04	0.01			
	8105	R-1	live	0.34	0.08	826	-	-
		R-2	dead				-	-
		R-3	live	0.33	0.08	827	-	-
		R-4	dead				-	-
		R-5	live	0.35	0.09	828	-	-
		L-1	live	0.31	0.08	829	-	-
		L-2	live	0.32	0.08	830	-	-
		Mean		0.33	0.08			
		SD		0.02	0.004			





図：妊娠15日胎児におけるVPA経口投与による形態学的変化の一例

妊娠9-11日の間に600mg/kg/dayのVPAを経口投与された結果、妊娠15日の胎児は神経管欠陥および指の形成異常を示しました。

妊娠15日のコントロール胎児（溶媒投与）（a）。外骨蓋（600mg/kg/day：胎児ID 819）を有する胎児（b）。左前肢の第五指が異常な位置にある胎児（600mg/kg/day：胎児ID 818：赤い円で示されている）（c）。左前肢の第五指に欠損がある胎児（600mg/kg/day：胎児ID 820：赤点の円で示されている）。スケールバー=1mm

・母動物血清を用いた生化学検査（R5 年度：平林）

バルプロ酸投与後の妊娠11、15及び18日に300 mg/kg群および600 mg/kg群の各4匹の母動物から採取した血清を用いて、母動物の健康状態を把握する目的で、血液生化学検査を行なった。その結果、溶媒投与群と比較して、有意差はなかったことから、母動物の肝障害や腎障害は生じていないと考えられる。

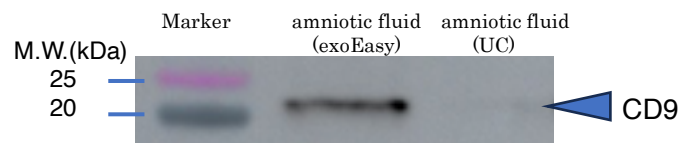
表：バルプロ酸投与による母動物の血液生化学検査への影響
妊娠マウスに対する反復投与（GD9-11）の後、溶媒投与群とバルプロ酸投与群（300 mg/kg/day、600 mg/kg/day）の母動物血清での生化学検査値のまとめ。aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、尿素窒素 (BUN)、およびクレアチニン (CRE) の平均と標準偏差 (MEAN ± SD)。(N = 4)

	GD11-0mg	GD11-300mg	GD11-600mg	GD15-0mg	GD15-300mg	GD15-600mg	GD18-0mg	GD18-300mg	GD18-600mg
AST(U/l)	60±3.56	81±14.65	62.75±6.95	41.25±3.86	45±13.89	46±5.72	51.5±1.73	45±3.37	41.25±0.96
ALT(U/l)	33.25±4.79	31.5±3.51	28.25±2.99	25.25±2.75	24±6.52	21.25±2.75	31.75±2.87	27.5±3.11	25.25±1.26
BUN(mg/dl)	21.825±3.55	31.85±12.61	28.3±9.66	23.45±3.62	37.64±8.48	35.35±6.73	19.55±2.81	24.6±6.06	27.375±6.39
CRE(mg/dl)	0.18±0.03	0.2425±0.07	0.2125±0.05	0.1975±0.02	0.34±0.07	0.2325±0.03	0.21±0.01	0.215±0.02	0.2375±0.04

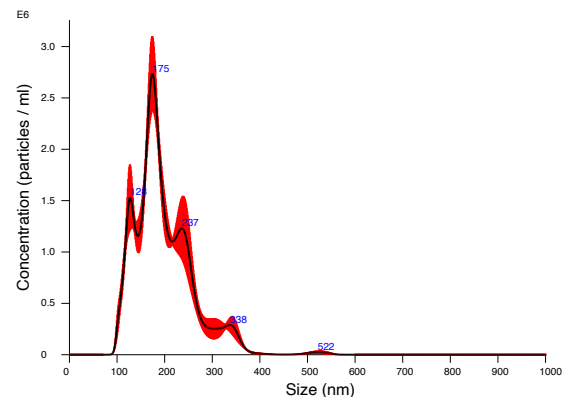
・羊水中のエクソソーム抽出のための最適化プロトコルの検証（落谷、小野、伊川：R5 年度）

エクソソームは、血液の他にも唾液、涙液、尿などの体液にも存在することが報告されている。そこで、羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プ

ロトコルの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティーカラム抽出法（Qiagen 社、exoEasy）の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクである CD9 抗体でのウェスタンブロット解析を行なった。その結果、下図のように、exoEasy を使用した方が、より多くの CD9 陽性エクソソームを検出できる結果となった。



図：羊水からのエクソソーム抽出方法の検討。アフィニティーカラム法(exoEasy)、および、超遠心ペレットダウン法(UC)により採取したエクソソームをエクソソームの膜タンパクである CD9 抗体によるウェスタンブロット解析を行なった結果。次に、exoEasy を使用して羊水から抽出したエクソソームを NanoSight を利用して、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) 解析を行い、エクソソームの粒子径および粒子数解析を行なった。



Mean 197.3nm SD 62.1
Concentration 2.57e+08

図：羊水中のエクソソームの特性評価。NanoSight を利用した NTA 解析結果。

・バルプロ酸投与に特異的な羊水中のエクソソーム RNA の同定（小野、落谷：R5 年度）

催奇形性物質であるバルプロ酸をモデル物質として、妊娠9-11日の間に妊娠マウスに0mg/kg、300mg/kg、600mg/kgの濃度で1日1回、反復経口投与を行い、妊娠15日目の胎児の重量測定および外表面の異常を評価するとともに、胎児羊水の

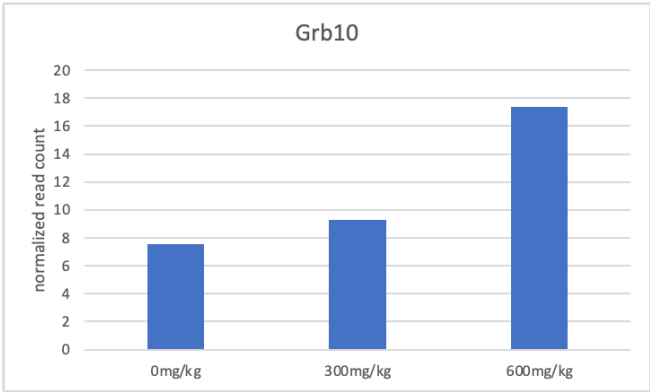
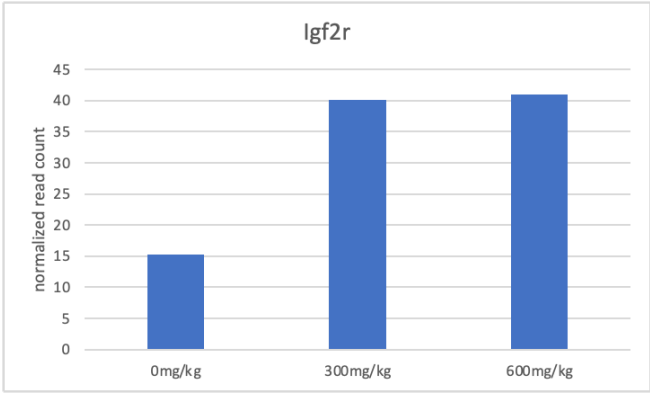
採取、およびエクソソームの抽出、そして、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行なった。

ここで、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行う胎児羊水は、「エクソソーム解析用試料採取試験」の項にあるサンプル表の赤く塗られた個体を解析対象とした。

その結果、溶媒投与群と比較して、バルプロ酸投与群において有意に遺伝子発現変化が生じるものを下表に示す。(P<0.001)

表：妊娠 9-11 日の期間にバルプロ酸の反復投与（0 mg/kg/day、300 mg/kg/day、および 600 mg/kg/day）の後、妊娠 15 日で有意に上昇（2 倍以上）および低下（半分以下）したエクソソーム RNA のリスト。（P < 0.001）

EV small RNA chromosomal region	Fold change (300mg/kg)	P-value (300mg/kg)	Fold change (600mg/kg)	P-value (600mg/kg)	Associated transcript
chr2:10251250-10252047	0.164675797	0.000956384	0.270070311	9.35E-07	Itih5
chr6:48569539-48570339	0.197762008	0.00045638	0.28556754	1.44202E-06	Lnc61
chr11:70409748-70410245	0.125681067	0.000273181	0.277137259	2.31618E-06	Peip1
chr6:55498300-55498660	0.123410302	0.000301313	0.173319734	8.22869E-06	Adcyap1r1
chr16:87415549-87416323	1.556451898	0.243775633	2.132070127	0.000277057	Ltn1
chr4:43522593-43522926	0.289661787	0.001011075	0.286706652	0.000410094	Tpm2
chr4:47312337-47313097	0.293802578	0.00163551	0.324220874	0.000499773	Col15a1
chr7:144461067-144461428	1.569234811	0.135849146	2.350385999	0.000777446	Ctnn
chr1:181177217-181177400	2.814389481	0.00337985	4.153382538	0.000917419	Wdr26



図：妊娠 15 日における溶媒投与群とバルプロ酸投与群（300 mg/kg/day または 600 mg/kg/day）との間で遺伝子発現変化する羊水中エクソソーム RNA のうち、インプリンティング遺伝子に由来するものの一例。 *P < 0.01、

・バルプロ酸投与に特異的な母体血中のエクソソーム RNA の同定（小野、落谷：R5 年度）

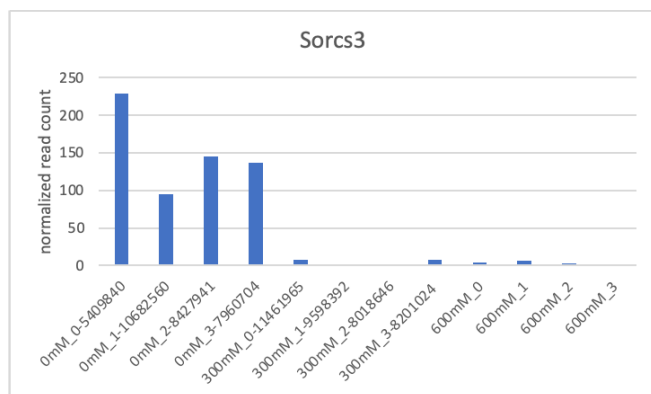
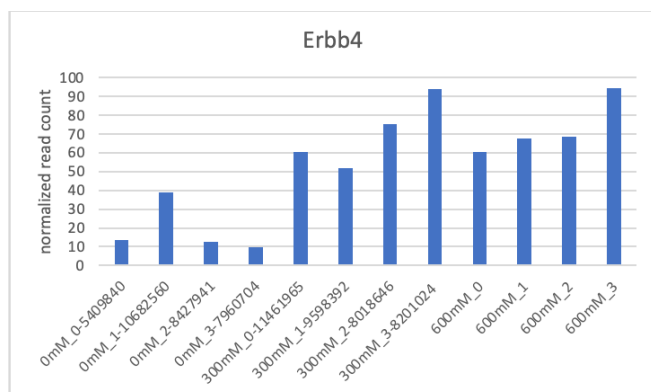
妊娠マウスに催奇形性物質であるバルプロ酸をモデル物質として 0mg/kg/day、300mg/kg/day、600 mg/kg/day の用量で妊娠 9-11 日の間に投与し、妊娠 11 日、15 日、18 日において母動物の全採血を行ない、血清を抽出した。

血清中のエクソソームは超遠心ペレットダウン法により、採取を行なった。

現在までに、妊娠 11 日での結果が以下の様に出ている。

図：妊娠 15 日における溶媒投与群とバルプロ酸投与群（300 mg/kg/day または 600 mg/kg/day）との間で遺伝子発現変化する羊水中エクソソーム RNA の一例。 *P < 0.01、

P<0.01 のエクソソーム RNA の中には、多くのインプリンティング遺伝子由来のものが含まれていた。



・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷：R4 年度)

催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するにあたり、背景データとして、発生ステージおよび性別に特異的なエクソソーム RNA の同定を試みた。最初に、C57BL6/J ♂および♀（8週齢、12週齢、24ヶ月齢など）および、発生毒性を検出するために重要なポイントである (1)妊娠初期（着床直後、妊娠9日）、(2)妊娠中期（口蓋閉鎖時、妊娠15日）、(3)妊娠末期（帝王切開時、妊娠18日）(4)非妊娠の母体血の採取を行った。

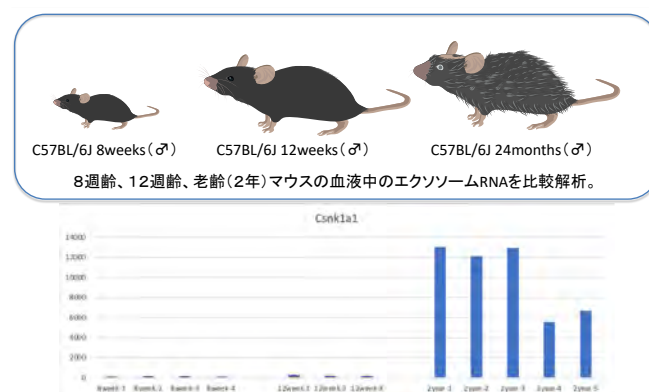
現在までに、C57BL6/J ♂（8週齢、12週齢、24ヶ月齢）の血清より収集したエクソソーム中の small RNA の網羅的遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより決定した。

尚、2003年に創設された世界的な遺伝子発現解析プロジェクトである ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) において、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析方法についてガイドライン (ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq) が示されている。ガイドラインでは、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析は、解析精度および再現性が高いためにテクニカルレプリケート（同一検体による再現性／測定誤差の検討）は行わず、解析個体数を増や

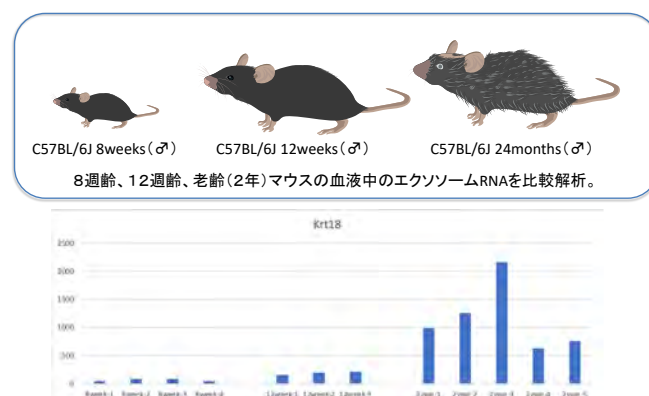
すこと（生物学的レプリケート）が推奨されている。本研究においても、このガイドラインに従い、各群 $n=3\sim5$ 、個体毎に単回測定としている。

8週齢、24ヶ月齢を比較し、有意差 $P<0.05$ かつ、read 数が 100 以上のものをスクリーニングすることで、総計 63 個の発達特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。

下図にあるように、Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中の small RNA は、老齢（24ヶ月齢）に特異的な発現を示した。一方、Krt18 (keratin 18) 遺伝子中の small RNA は、年齢に依存して発現が上昇している。これらの small RNA は、発現量が非常に高く、老齢バイオマーカーとしての利用が期待される。



図：8週齢（左）、12週齢（中央）、24ヶ月齢（右）マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較（Y軸：read数）：Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。



図：8週齢（左）、12週齢（中央）、24ヶ月齢（右）マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較（Y軸：read数）：Krt18 (keratin 18) 遺伝子中に存在する新規 small RNA

また、Myo1d (myosin ID) 遺伝子および Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在するエクソソーム RNA は、若齢期に特異

的な遺伝子発現を示す。遺伝子発現量も非常に高いことから、若齢期特異的なバイオマーカーとしての利用が期待できる。

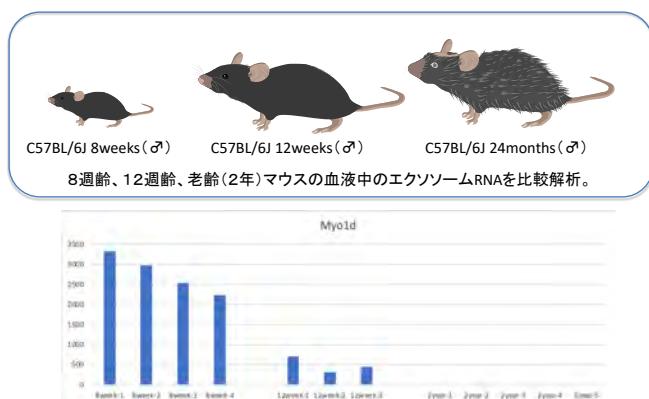


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数): Myo1d (myosin ID) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

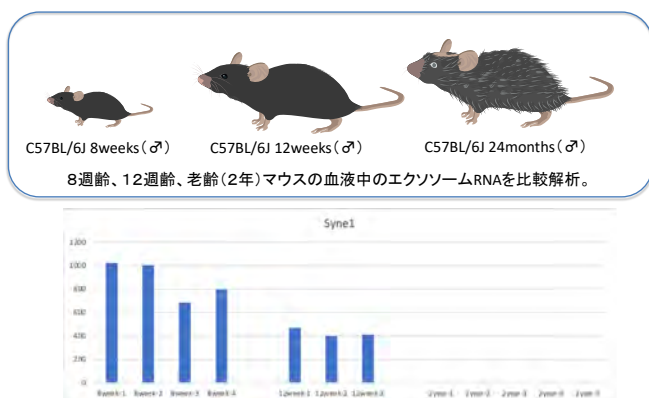


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数): Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・性別に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷: R4 年度)

発生・発達ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定に成功したことから、次に、性別に特異的なエクソソーム RNA の同定を行った。非妊娠♀および妊娠♀と8週齢♂マウス間におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析結果を比較することにより性別特異的発現を示す遺伝子群のスクリーニ

ングを行った。

以下に、雄に特異的な遺伝子発現を示すエクソソーム RNA のうち、一例として、Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子、Drap2 遺伝子中に存在する新規 small RNA の遺伝子発現解析プロファイルの結果を示す。

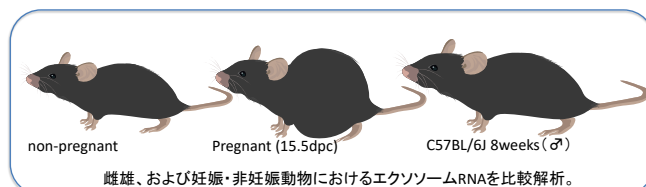


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数): Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

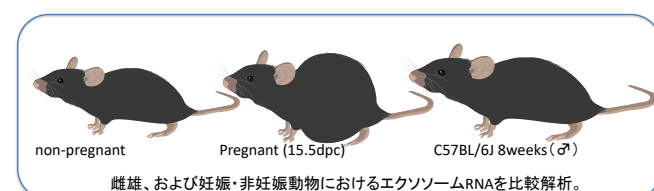


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数): Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雌(妊娠中および非妊娠状態)において特異的に発現するエクソソーム RNA の同定を行った。単離された雌に特異的に発現しているエクソソーム中の small RNA の中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。

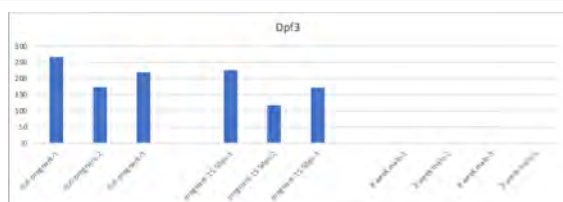
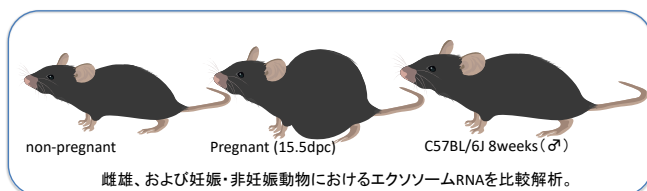


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

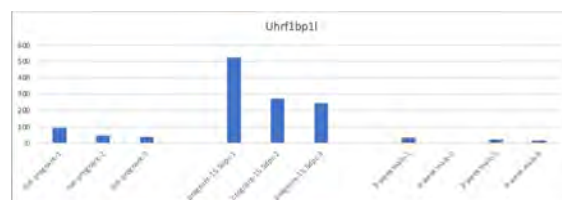
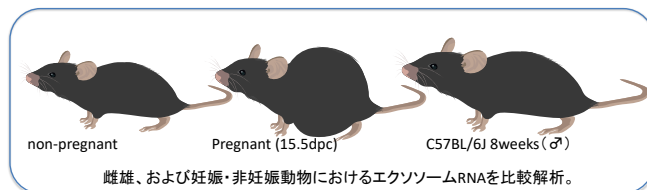


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like 遺伝子中に存在する新規 small RNA

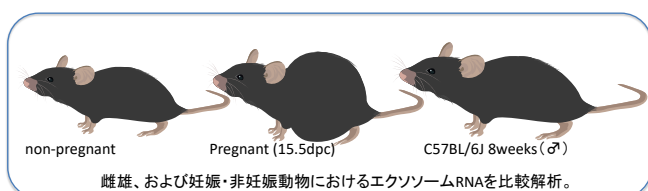


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : NR_105029 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

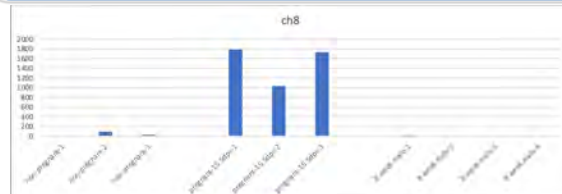


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : 8番染色体に位置する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雄および非妊娠状態の雌においては、遺伝子発現がないが、妊娠により、遺伝異子が誘導されるエクソソーム中の新規 small RNA のスクリーニングを行い、妊娠に特異的なバイオマーカーの単離に成功した。

これらの中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林：R4 年度)

現在までに、エクソソーム RNA を発がんバイオマーカーの指標として利用した早期がん診断が行われ、さらに、我々は、化学物質投与による肝毒性評価の指標として、エクソソーム RNA を利用可能なことを証明してきた。本研究においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定を目的としているが、成体における骨格異常や、発達障害などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することとした。最初に、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる *Irf2* 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA が存在するのかの解析を行った。

同腹由来の6匹の雌(5ヶ月齢：野生型4匹、*Irf2* hetero 1匹、*Irf2* KO 1匹)の解剖を行い、肝臓および腎臓の病理解析、採血を行い、血液生化学検査およびエクソソームRNAの網羅的解析を行った。

Irf2 KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の1.8倍、腎臓が1.5倍の重量があった。*Irf2* KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。

また、野生型では見られない髄外造血像も確認された。肝臓の重量増加は、これらが原因であると考えられる。

一方、腎臓における H&E 像では、野生型では、糸球体にしっかりと内皮細胞が確認され、毛細血管も正常な形態を維持しているが、*Irf2* KO マウスの糸球体においては、正常な内皮細胞の欠落、および毛細血管の拡張が確認された。

このように、自己免疫疾患を起こすことにより、様々な病変を持つ *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA を同定し、その詳細を解析することで、様々な病変に対するバイオマーカーの同定につながる。

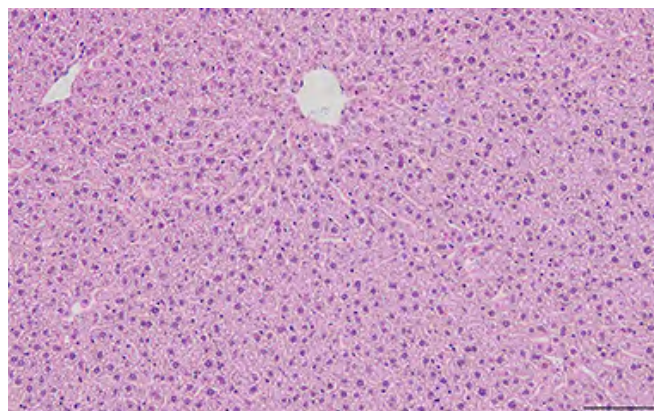


図: 野生型マウス(5ヶ月齢)の肝臓におけるH&E染色像。

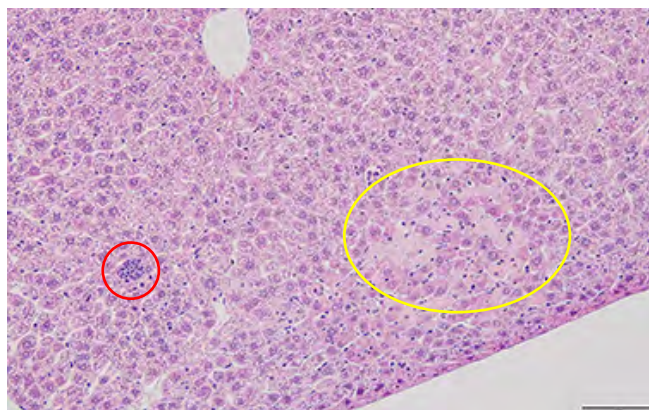


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の肝臓におけるH&E染色像。野生型には見られていない髄外造血像(赤丸)、および肝細胞壊死(黄色丸)が確認された。

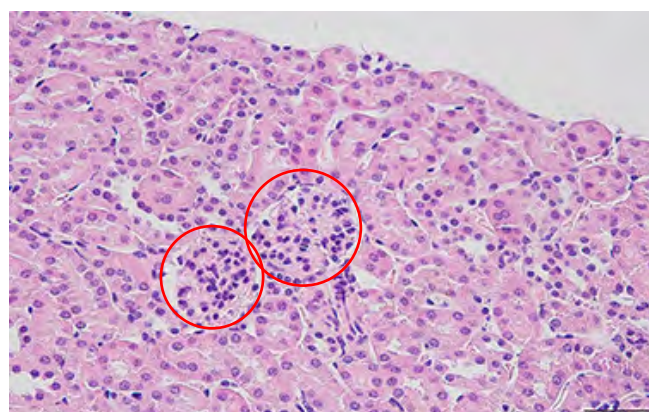


図: 野生型マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。正常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

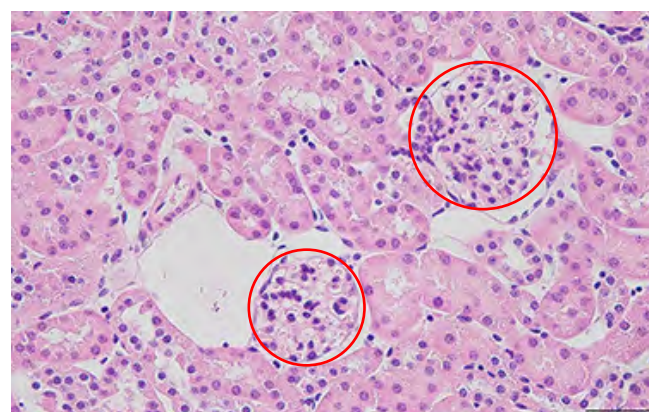


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。内皮細胞を欠き、毛細血管が拡張した異常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

・血液生化学（平林：R4 年度）

H&E 染色像の解析を行った、野生型、Irf2 hetero マウス、Irf2 KO マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、肝臓、腎臓ともに、病理切片から予想された通りに、野生型と比較して機能低下が確認された。

	AST(U/l)	ALT(U/l)	BUN(mg/dl)	CRE(mg/dl)
WT1	75	18	20.9	0.23
WT2	87	23	26.2	0.17
WT3	78	25	32.8	0.27
WT4	83	19	27.2	0.17
KO	127	74	24.9	0.70
hetero	52	25	27.8	0.19

図: 野生型、Irf2 KO マウスにおける血液生化学解析の結果

・炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の網羅的スクリーニング（小野、落谷：R5 年度）

血液生化学に利用した血清の残りを利用して、超遠心ペレットダウン法にてエクソソームの抽出を行い、そこからエクソソーム RNA を精製後に、エクソソーム RNA の次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

令和 3 年度においては、野生型においては発現がないが、Irf2 KO マウスのみで発現が誘導されているエクソソーム RNA の単離のみを行った。

マッピングされた次世代シーケンサー Read 数が 10 以上のものでは、103 個の small RNA が同定された。そのうち、発現量の多い上位 10 個について詳細な解析を行った。

現在、既知の miRNA のデータベースである miRbase に報告されている既知の miRNA は、マウスにおいて、1234 個であった。今回、Irf2 KO マウスにて発現誘導のあった small RNA 上位 10 個を RNA の二次元構造予測ツール (RNAfold) を用いて、ヘアピン構造をとり、miRNA としてプロセスされるかの検証を行った。このうちの一つは、既知の miRNA である miRNA206 であった。

これらの small RNA は全て、既知の遺伝子である Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2)、Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2)、Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1)、および Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) のイントロン中、もしくはエクソン中にマップされた small RNA である。二次元構造予測の結果を、下記に示した。

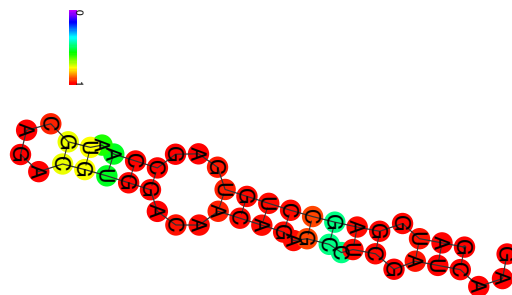


図: Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

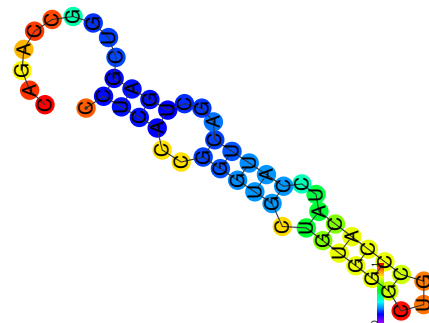


図: Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

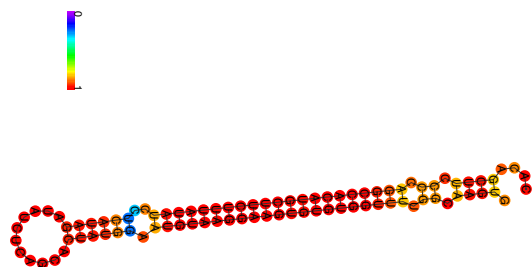


図: Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1) 遺伝子中に存在する Mir206 の二次元構造予測

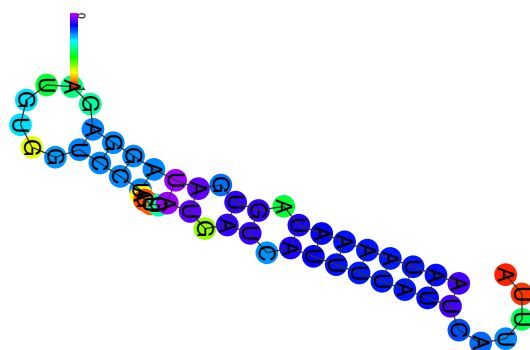


図: Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出
(伊川：R3-4 年度)

効率よく催奇形性を発現させるモデルを作出するために、遺伝子改変動物の導入および作出を行う。父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10* および母性発現インプリンティング遺伝子 *Mash2* は、胎盤形成に必須な遺伝子であり、その欠損マウスにおいては、胎盤形成不全により致死になることが報告されている。

これらの遺伝子は、インプリンティング遺伝子あるので、子宮内において、野生型：KO=1:1 の比率で存在する。よって、効率よくKO個体を得ることができる特徴がある。

そこで、これらの遺伝子欠損マウスの導入および作出を行った。*Mash2* 欠損マウスについては、国立医薬品食品衛生研究所で既に維持していた系統を繁殖させ、催奇形性のモデルマウスとして利用する準備が完了した。*Peg10* 欠損 (*Peg10* KO) マウスについては、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製を行ない、1 匹の遺伝子改変動物を得られた。

R4 年度においては、*Peg10* KO マウスヘテロ♂と野生型マウス♀を交配させた場合、ヘテロアレルを持った胎児は全て初期胚致死となる一方、*Peg10* KOマウスヘテロ♀と野生型マウス♂を交配した場合には、ヘテロアレルを持ったF1マウスは全て正常に発生をした。この表現型は既報と同様であり、*Peg10* KOマウス作製に成功していると想定される。

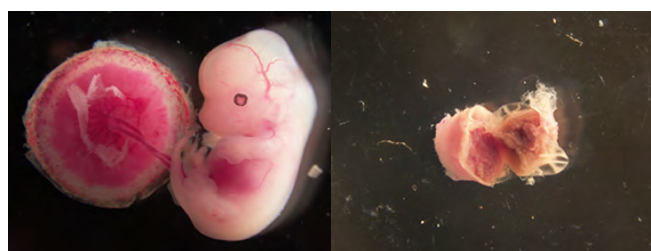


図: *Peg10* KO マウスヘテロ♂と野生型マウス♀を交配させた胎児 (12.5dpc)。野生型は正常な胎児発生と胎盤発生が見られる(左写真)。一方、*Peg10* KOマウスヘテロは、胎盤形成不全により初期胚致死となっていることがわかる。

また、エクソソーム RNA は、形態形成異常以外にも、*Irf2* KO マウスの解析結果より、炎症反応などのバイオマーカーとなりうることに本研究において明らかになったことから、胎児の代謝異常などの検出も可能になるかの検討を行うこととした。

次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を計画した。

Atp7b 遺伝子は、8 回膜貫通型の銅輸送 ATPase であり、21 個のエクソンより構成される。本研究においては、*Atp7b* 遺伝子のエクソン 8 およびエクソン 11 をターゲットとして受精卵において CRISPR/Cas9 システムを利用してゲノム編集を行うことで、*Atp7b* 変異マウスを作製した。

産まれた変異マウス (F0 世代) のオンターゲット部位のゲノム編集結果が明らかになったものについては、変異アレル情報を記載した。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-01	♂	8bp deletion het	human type
Atp7b-ex8-02	♂	逆位配列の挿入	
Atp7b-ex8-03	♂		
Atp7b-ex8-04	♂	human type	1bp insertion
Atp7b-ex8-05	♀	10bp deletion	3bp deletion
Atp7b-ex8-06	♀		
Atp7b-ex8-07	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-08	♀		
Atp7b-ex8-09	♀		
Atp7b-ex8-10	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-11	♀		
Atp7b-ex8-12	♂	6bp deletion	
Atp7b-ex8-13	♂	large deletion	
Atp7b-ex8-14	♂		
Atp7b-ex8-15	♂		
Atp7b-ex8-16	♂	1bp deletion	
Atp7b-ex8-17	♀	5bp deletion	
Atp7b-ex8-18	♀	cand	
Atp7b-ex8-19	♀		
Atp7b-ex8-20	♀		
Atp7b-ex8-21	♀	human type	
Atp7b-ex8-22	♀	large deletion	
Atp7b-ex8-23	♀		

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 8 に対するゲノム編集により産まれてきた変異マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex11-01	♂	9bp insert homo	
Atp7b-ex11-02	♂	2bp deletion homo	
Atp7b-ex11-03	♂	1bp deletion homo	
Atp7b-ex11-04	♂	2bp insert homo CC	

Atp7b-ex11-05	♂	1bp deletion homo C	
Atp7b-ex11-06	♀	1bp deletion homo A	
Atp7b-ex11-07	♀	human type	
Atp7b-ex11-08	♀	deletion	1bp insert C
Atp7b-ex11-09	♀	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-10	♀		
Atp7b-ex11-11	♀	1bp deletion	
Atp7b-ex11-12	♂		
Atp7b-ex11-13	♀		
Atp7b-ex11-14	♀	1bp deletion homo C	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 11 に対するゲノム編集により産まれてきた変異マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

・各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林：R4 年度)

申請者らが確立したマウス血液中のエクソソーム RNA の次世代シーケンスを利用した網羅的遺伝子発現解析法を利用して、各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の単離を行った。

尚、2003 年に創設された世界的な遺伝子発現解析プロジェクトである ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) において、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析方法についてガイドライン (ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq) が示されている。ガイドラインでは、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析は、解析精度および再現性が高いためにテクニカルレプリケート (同一検体による再現性/測定誤差の検討) は行わず、解析個体数を増やすこと (生物学的レプリケート) が推奨されている。本研究においても、このガイドラインに従い、各群 $n=3\sim5$ 、個体毎に単回測定としている。

前年度 (R3 年度) においては、背景データとして、発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定を行い、8 週齢 (♂)、24 ヶ月齢 (♂) を比較し、有意差 $P<0.05$ かつ、read 数が 100 以上のものをスクリーニングすることで、総計 63 個の発達特異的なエクソソーム RNA の単離に成功している。さらに、同様の手法で、性差に特異的なエクソソーム RNA や、妊娠マウスおよび非妊娠マウスに特異的なエクソソーム RNA の単離にも成功している。

さらに、遺伝子改変マウスを各種毒性のモデルマウスとして利用することで、各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の単離にも成功している。

Irf2 遺伝子は、ウイルス感染や細菌感染の際、宿主に抵抗性を付与する重要なサイトカインとして知られている I 型インターフェロンのシグナルを負に制御することが知られる転写因子である。Irf2 欠損マウスは、自己炎症疾患のマウスモデルとして知られ、Irf2 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA、すなわち、炎症に特異的なエクソソーム RNA の単離に成功している。

今年度 (R4 年度) においては、伊川 (分担) の作製した Atp7b 遺伝子の変異マウスの表現型解析および銅代謝異常のバイオマーカーとなる血中のエクソソーム RNA の同定を行った。

Atp7b 遺伝子の機能不全は、自然発生マウス (Toxic milk) やヒト遺伝病 (ウィルソン病) などで知られ、銅の胆汁中への排泄が阻害され、全身臓器に銅が沈着して組織障害を起こす銅毒性の表現型を持つことが報告されている。

(銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代)) の解析 (小野：R4 年度))

伊川 (分担) により作製された Atp7b 変異マウスを国立医薬品食品衛生研究所に導入し、その評価を行なった。最初に、Atp7b のエクソン 8 に変異を導入した F0 マウス 21 匹、および、エクソン 11 に変異を導入した F0 マウス 14 匹を、それぞれ、C57BL6/J マウスと交配を行い、F1 マウスの作製を行った。Atp7b 変異マウス (F0) では、受精卵におけるゲノム編集により変異を導入しているため、いくつかの変異アレルのキメラ状態となっている。

伊川 (分担) によるゲノム編集効率は非常に高く、F0 世代の動物においても、すでに遺伝子欠損動物相当になっている可能性があり、F0 世代の動物から注意深く、その表現型の解析を行った。

下図にあるように、雄より変異が伝わった場合は、正常に産子が得られるが、雌より変異が伝わった場合は、新生児期致死になることが判明した。

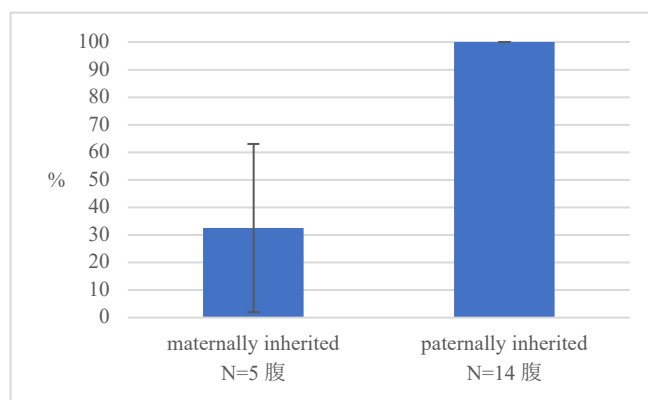


図: Atp7b 変異マウス (F0 世代) ♀ と C57BL6/J ♂ と交配した際の F1 世代の離乳率 (N = 5 腹) および Atp7b 変異マウス (F0 世代) ♂ と C57BL6/J ♀ と交配した際の F1 世代の離乳率 (N = 14 腹)

Atp7b 遺伝子に変異を持つ自然発生マウス (toxic milk) では、母親がホモの変異体の場合に、その産子は、遺伝子変異の有無に関わらず、新生児期において致死になることが知られている。

よって、今回、伊川 (分担) の作製した Atp7b 変異マウス (F0) は、変異はキメラ状態であるものの、ホモに近い状態であり、雌より変異が伝わった場合に新生児期において、Toxic milk と同様に、母体中および母乳中の銅の欠乏による神経障害による致死性であると考えられる。

また、下図に 1 例ずつ示したが、エクソン 8 変異マウスの肝臓は、解剖時の所見では異常は観察されなかったが、エクソン 11 変異マウスの肝臓は、明らかな形

態異常が観察された。

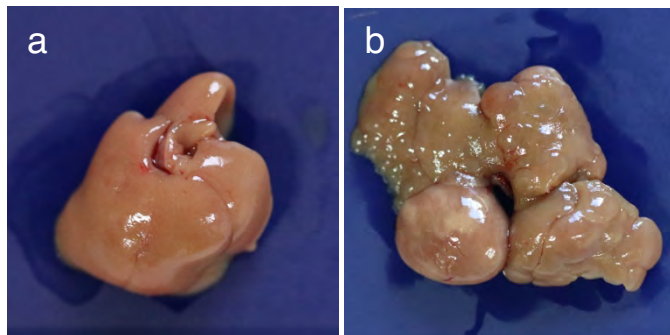


図: a) Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓の写真。正常な形態が確認できている。b) Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓の写真。肝臓のほとんど全ての部位において多くの隆起が確認できる。

実際にこのマウスが銅代謝異常の表現型を持つのかの確認を行った。11ヶ月齢において、肝臓を採取しての銅濃度の測定を行った。肝臓の銅濃度は、野生型に比較して4.7倍 (エクソン8変異マウス)、3.5倍 (エクソン11変異マウス) の高値を示した。

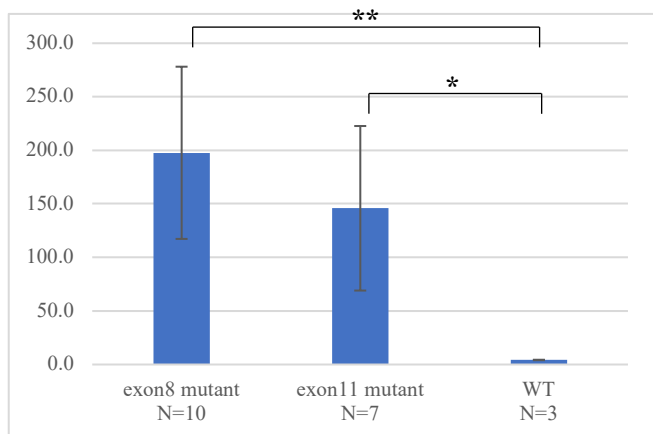


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (12ヶ月齢・N = 3) の肝臓に含まれる銅濃度 (μg/g)。

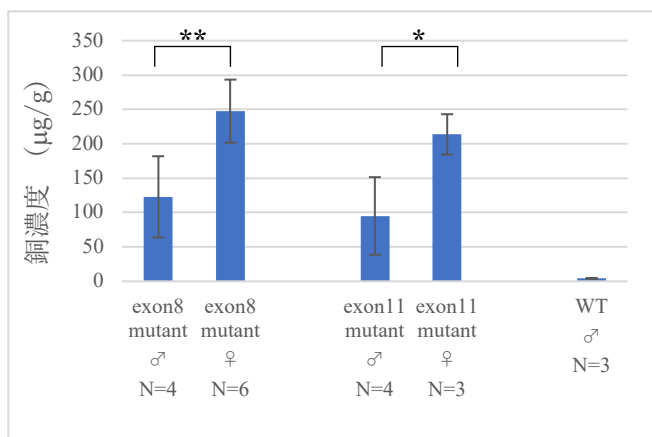


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の♂ (N=4)、

♀ (N=6)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の♂ (N=4)、♀ (N=3)、および野生型 (12ヶ月齢) の♂ (N=3) の肝臓に含まれる銅濃度 (μg/g)。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Atp7b エクソン8変異体および Atp7b エクソン11変異体は、ともに、肝臓中の銅濃度は雌の方が雄のおよそ2倍の高値となっている。

銅代謝においては、雌雄差が存在すると考えられる。

・銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代))
の病理学的解析 (平林：R4 年度)

H&E 染色標本作製による解析では、エクソン 8 変異マウスおよびエクソン 11 変異マウスの肝臓では、共に部分的に肝細胞の肥大およびネクローシス像が観察された。

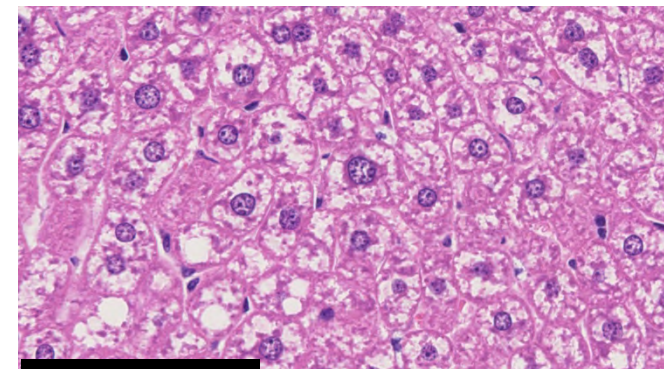
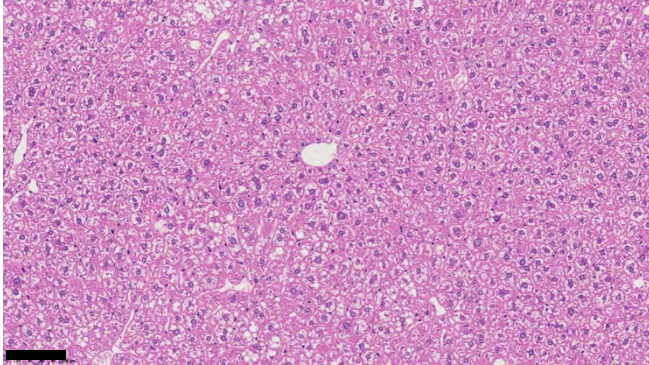


図: 野生型 (12ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。下写真は、上写真を拡大。スケールバー; 100 μ m

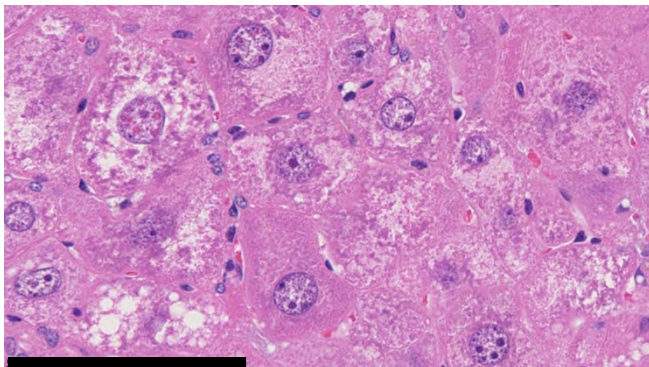
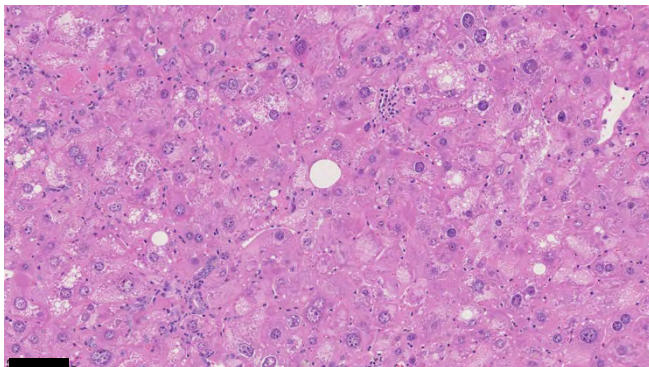


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。野生型と比較して、巨核となっており、また肝細胞に肥大およびネクローシスが観察される。

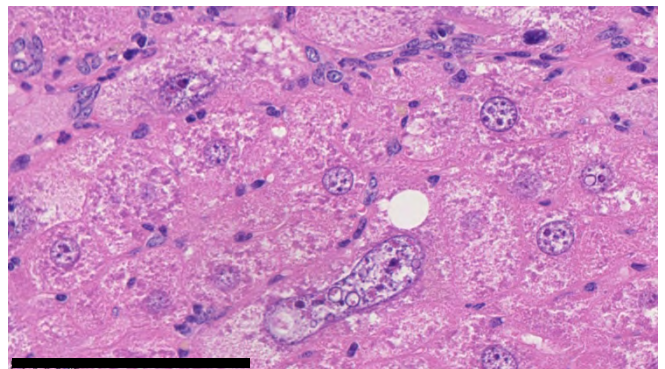
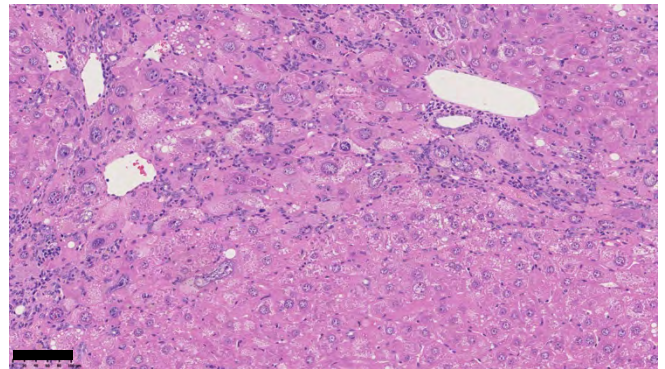


図: Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。野生型と比較して、巨核となっており、また肝細胞に肥大およびネクローシスが観察される。

・銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代))
の血液生化学 (平林：R4 年度)

H&E 染色像の解析および銅濃測定を行ったエクソン 8 変異マウス、エクソン 11 変異マウス、および、野生型マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。

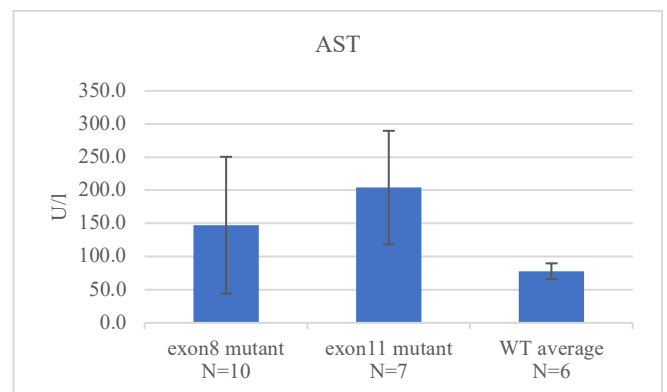


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のASTの値 (U/l)。

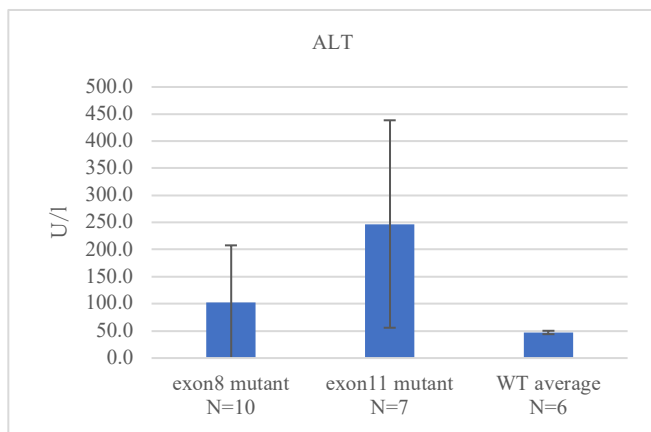


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のALTの値 (U/l)。

また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、腎臓においても毒性があると想定される。R5 年度において腎臓の病理切片の解析を行う予定である。

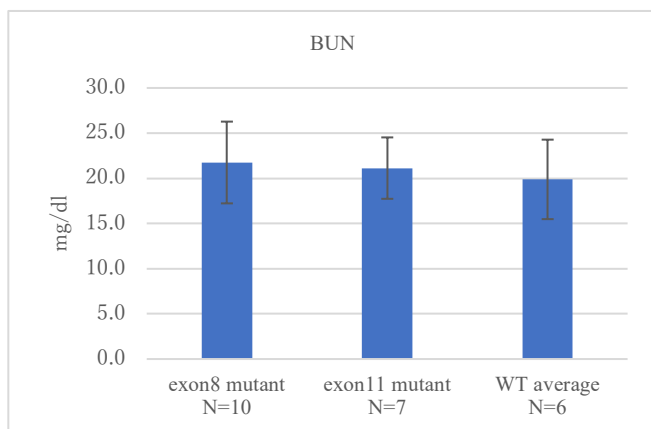


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のBUNの値 (U/l)。

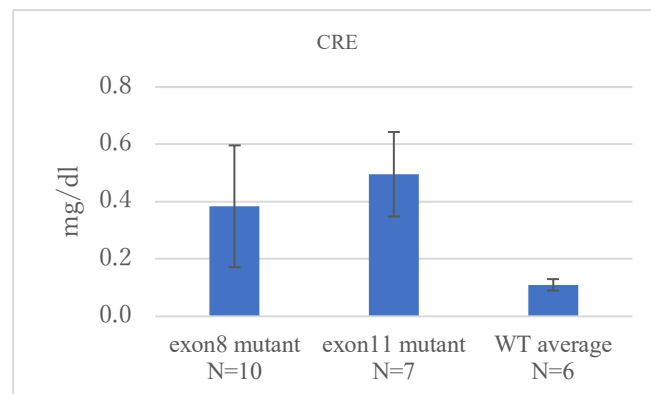


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のCREの値 (U/l)。

・銅代謝異常に特異的なエクソソーム RNA の網羅的スクリーニング (小野、落谷：R4 年度)

血液生化学に利用した血清の残りを利用して、超遠心ペレットダウン法にてエクソソームの抽出を行い、そこからエクソソーム RNA を精製後に、エクソソームRNAの次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

令和4年度においては、野生型においては遺伝子発現しているが、Atp7b 変異マウスにおいては遺伝子発現が抑制されるエクソソームRNA、および、野生型において遺伝子発現が抑制されているが、Atp7b 変異マウスにおいてのみで発現が誘導されているエクソソーム RNA の単離を行った。

R4 年度においては、野生型 (N=3) と Atp7b エクソン8変異マウス (N=9) 間で、student t-test < 0.05 かつ、発現量の多い方のグループで、マッピングされた次世代シーケンサーRead 数が10以上のものを抽出し、103 個の small RNA が同定された。

野生型で発現量が多い上位2個のエクソソーム RNA の詳細な遺伝子発現量を下図に示している。

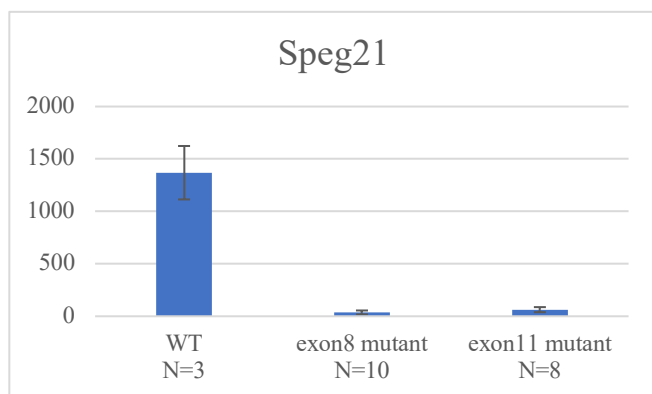


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

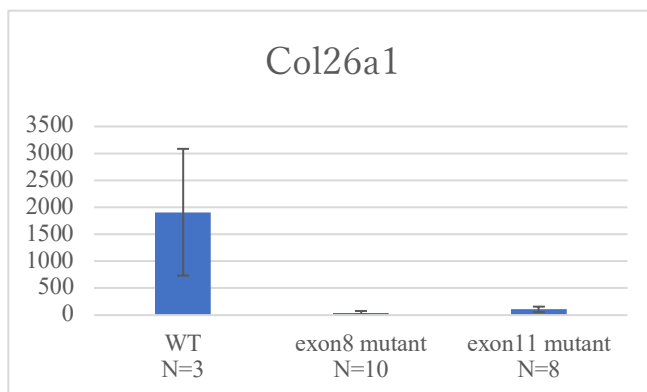


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

次に、Atp7b エクソン8変異マウスにおいて遺伝子発現が大量に誘導されるエクソソーム RNA について、上位2個を下図に示した。

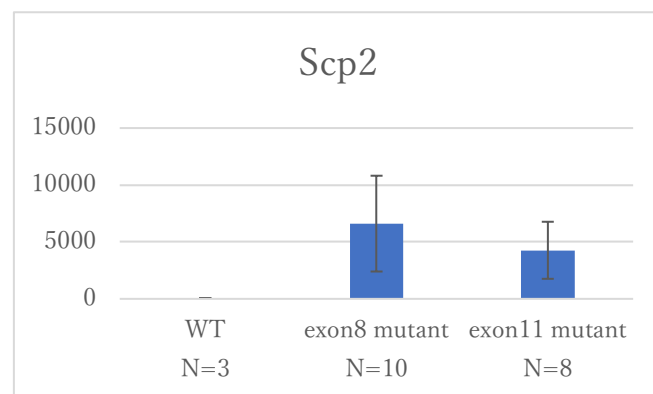


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

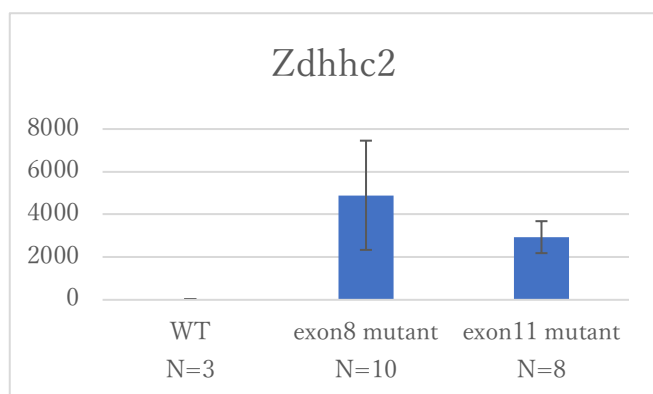


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

今年度に単離に成功した銅毒性のバイオマーカー候補となりうるエクソソームRNAについては、来年度 (R5年度) に、RNA の二次元構造予測ツール (RNAfold) を用いて、ヘアピン構造をとりmiRNA としてプロセスされうるかの検証を行ない、miRNA であるのならば、遺伝子発現調節を行うであろうターゲット遺伝子を明らかにする。

・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出
(伊川、小野、平林：R5 年度)

次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウス (F0 世代) の作製を令和 4 年度に作製している。令和 5 年度においては、*Atp7b* 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J♂または、C57BL/6J♀) と交配を行い、F1 世代マウスの作製を行い、それらの変異を確認することで、変異アレルの *germline transmission* の確認を行った。

germline transmission が確認された *Atp7b* 遺伝子の変異マウスラインは、以下の通りである。

・*Atp7b* exon8 変異ライン

1bp insertion
G to A
10bp deletion
10bp deletion, 18bp insertion
6bp deletion
Short (判別できない)
22bp deletion
about 30 bp deletion
1bp deletion

・*Atp7b* exon11 変異ライン

9bp insertion
2bp insertion
1bp deletion
判別できない

上記の F1 世代において *germline transmission* を確認できたラインのマウスに関して、同変異ライン同士の雌雄で交配を行い、F2 世代で *homo* 変異マウスの作製を行なった。

そこで得られた *Atp7b homo* 変異マウスに関して、病理的解析、生化学解析を行った結果は下記の通りである。

・*Atp7b* exon8 変異ライン

<i>Atp7b</i> exon8 変異ライン	hepatocyte	AST(U/l)	ALT(U/l)
1bp insertion	巨核・銅沈着	176	234
G to A	＝	64	32
10bp deletion	巨核・銅沈着	374	685
10bp deletion, 18bp insertion	巨核・銅沈着	134	72
6bp deletion	巨核・銅沈着	140	89
Short (判別できない)	巨核・銅沈着	143	156
22bp deletion	巨核・銅沈着	80	89
about 30 bp deletion	＝	79	70
1bp deletion	巨核・銅沈着	160	259

・*Atp11b* exon11 変異ライン

<i>Atp11b</i> exon11 変異ライン	hepatocyte	AST(U/l)	ALT(U/l)
9bp insertion	巨核・銅沈着	156	162
2bp insertion	巨核・銅沈着	157	163
1bp deletion	巨核・銅沈着	108	115
判別できない	巨核・銅沈着	380	354

これらの結果から、*Atp7b* の遺伝子変異の種類によって、肝障害の度合いは大きく異なることが想定される。

ライン化されたこれらの変異マウスを用いて、今後は銅代謝異常のバイオマーカーのスクリーニングに利用できると考えられる。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬：R3 年度)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R3 年度においては、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の肝臓、肺、大腸よりオルガノイドの作製を行った。具体的には、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の解剖を行い、肝臓、肺、大腸の採取を行なった。全ての解剖用具は、乾熱滅菌済みのものを使用した。

大腸については、腸管を切開し、腸管の内容物を取り除く作業を行う。その後、肝臓、肺、大腸を PBS にて、3 回洗浄を行った。

当該臓器を滅菌消毒済みのハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行った。その後、40 μm 幅のセルストレーナーにて、フィルトレーションを行い、酵素的および物理的に組織を破碎した後に、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

その後、数回のパッセージを経て、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のためのマウスの肺、肝臓、大腸由来のオルガノイドを樹立することに成功した。

樹立したオルガノイドは、以下の 3 種類である。

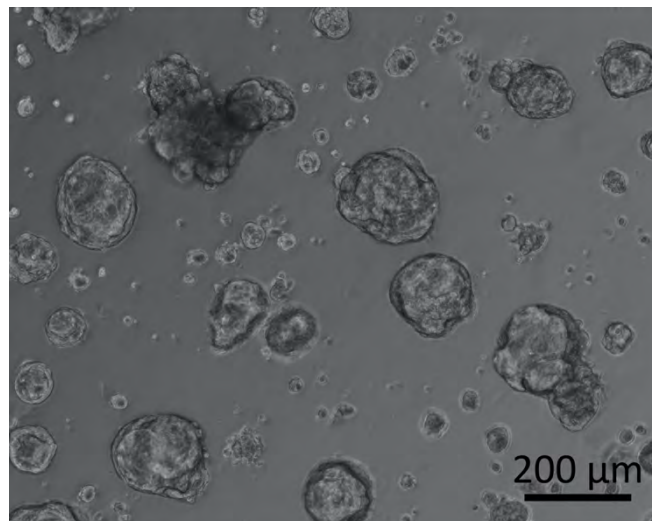


図: C57BL6/Jの肺から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

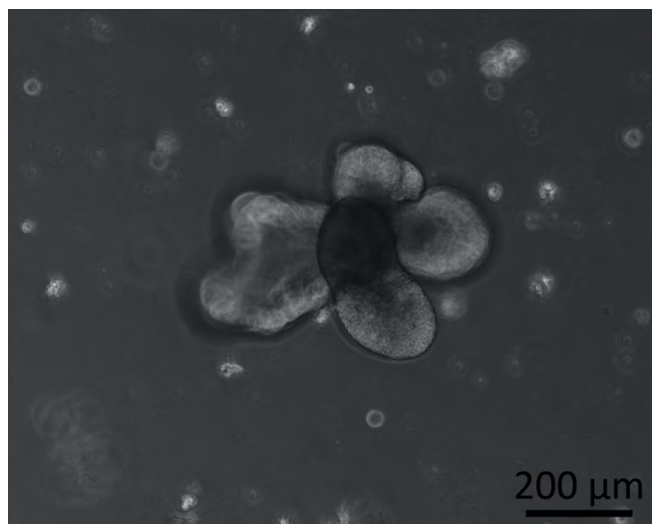


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

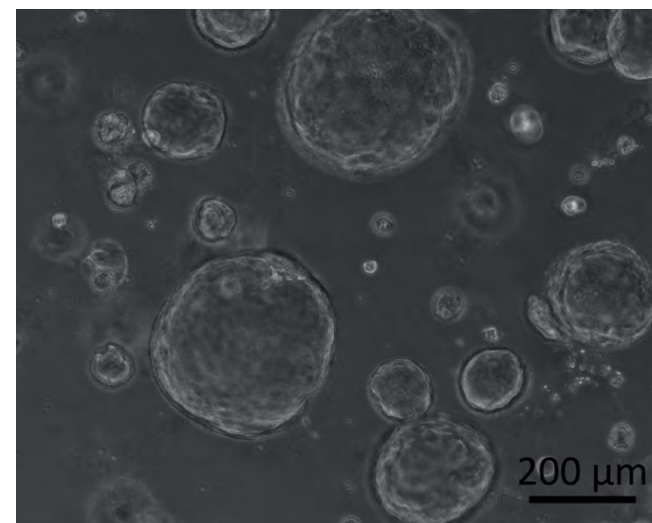


図: C57BL6/Jの大腸から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

・オルガノイドの培養上清に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬：R4 年度)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R3 年度においては、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の肝臓、肺、大腸よりオルガノイドの樹立に成功した

今年度 (R4 年度) においては、マウスの肝臓より樹立したオルガノイドに対して、肝臓障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンを添加するばく露実験を行い、細胞の増殖活性、および肝臓の逸脱酵素である AST および ALT の測定を行った。また、細胞の培養上清の残りは、R5 年度において、エクソソームを抽出し、動物実験で今までに得られている肝臓障害のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA が、細胞培養液中へ分泌されるのかの検証を行う予定である。

アセトアミノフェンは、常用量では大半が肝臓でグルクロン酸抱合や硫酸抱合で代謝され、排泄される。一部は、チトクローム P450 で酸化され、活性代謝物 N-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) を生成する。NAPQI はさらに、肝細胞内でグルタチオン抱合を受けた後、メルカプツール酸として尿中に排泄される。しかし、アセトアミノフェンが過剰量となりグルクロン酸抱合や硫酸抱合の処理能力を超えるとチトクローム P450 を介して代謝される。さらに NAPQI の解毒にかかわるグルタチオン抱合能力も限界に達すると、肝内に NAPQI が蓄積し、肝細胞構成蛋白と共有結合して肝細胞障害が惹起される。

本研究 (R4 年度) においては、下図にある様に、樹立に成功した肝臓オルガノイド 1×10^5 個を細胞培養プ

レートに播種し、5 日間培養を行い、アセトアミノフェン (0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM) を添加後 2 日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

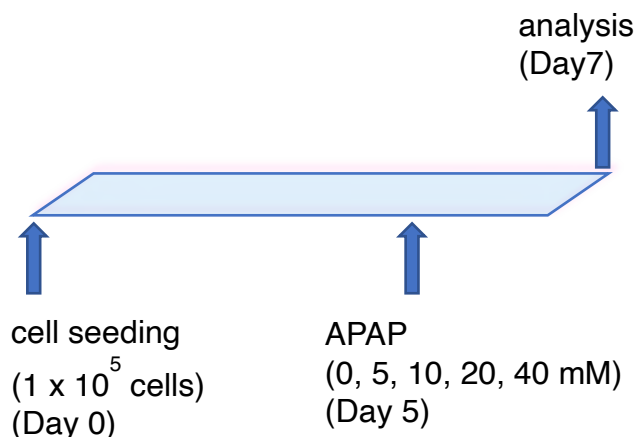


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) をばく露および解析する概略図。

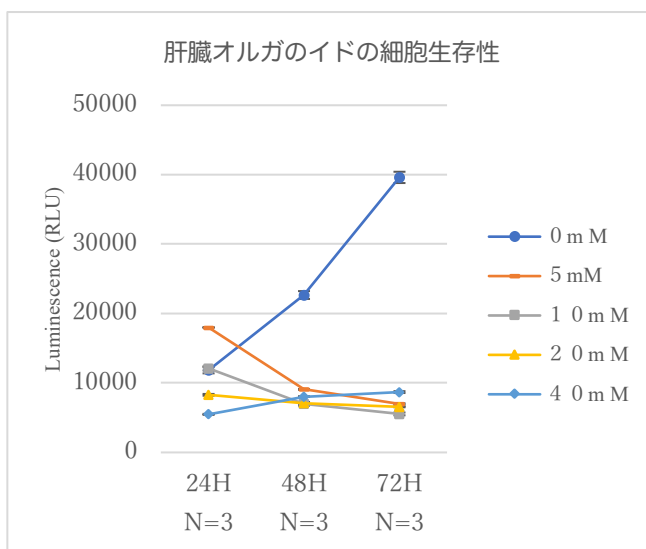


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を 0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM の濃度で添加し、24 時間後、および 48 時間後に細胞生存性の指標として実績の多い還元力を測定している (N=3)。

24 時間後までにおいては、5mM および 10mM のアセトアミノフェン添加により、細胞の生存性は、溶媒コントロールおよび無添加コントロール群と変化はない。しかしながら、48 時間後においては 5mM 投与群においても細胞の生存性に著しい低下が見られた。

一方、肝臓障害の指標として利用される血液中の逸脱酵素 (AST および ALT) についても、アセトアミノフェン添加後 48 時間における培養上清において測定し、結果は下図の通りである。

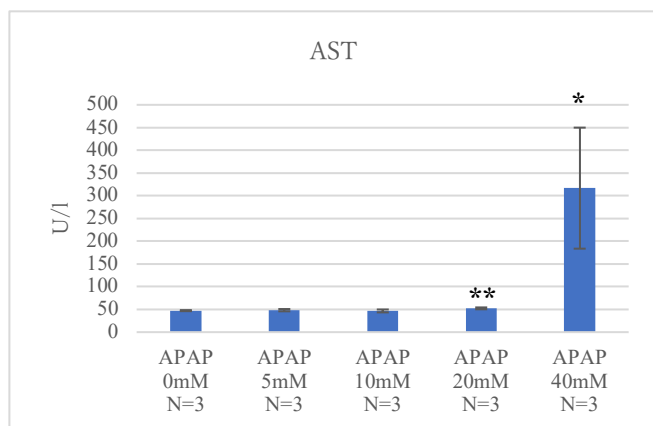


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるAST濃度を測定している。

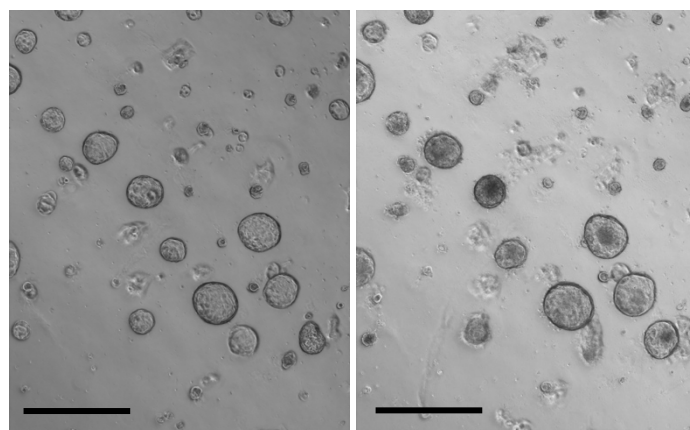


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に5mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。溶媒コントロールと同様に、ほぼ全てのオルガノイドが増殖していることが確認できる。(スケールバー=800 μ m)

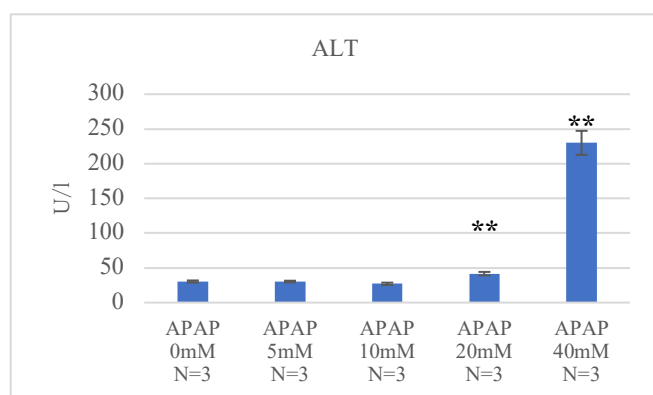


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるALT濃度を測定している。

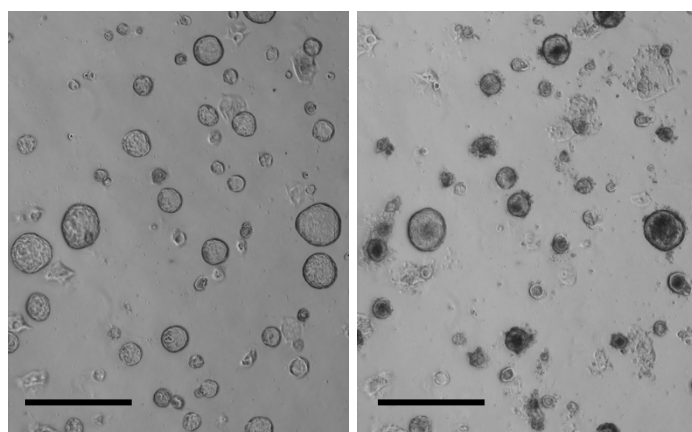


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に10mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。溶媒コントロールおよび5mM添加群と比較して、オルガノイドが増殖していない。(スケールバー=800 μ m)

また、アセトアミノフェン添加による肝臓オルガノイドへの形態を確認するために、アセトアミノフェン添加前、および2日後の細胞像の定点写真撮影を行っている (下図)。

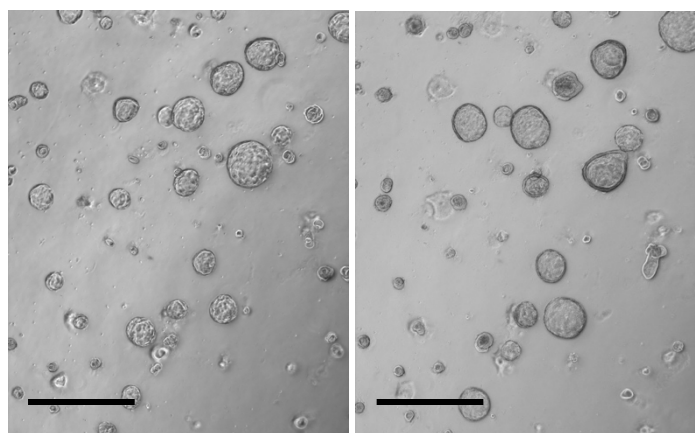


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に溶媒 (コントロール) を添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。ほぼ全てのオルガノイドが増殖していることが確認できる。(スケールバー=800 μ m)

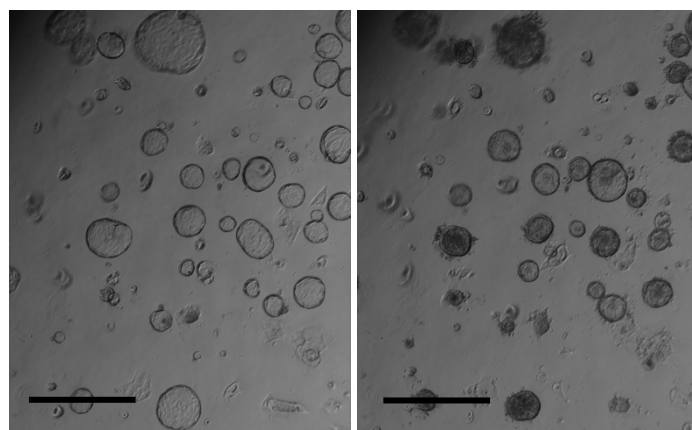


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に20mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。10mM投与群と同様に、オルガノイドが増殖していない (スケールバー=800 μ m)

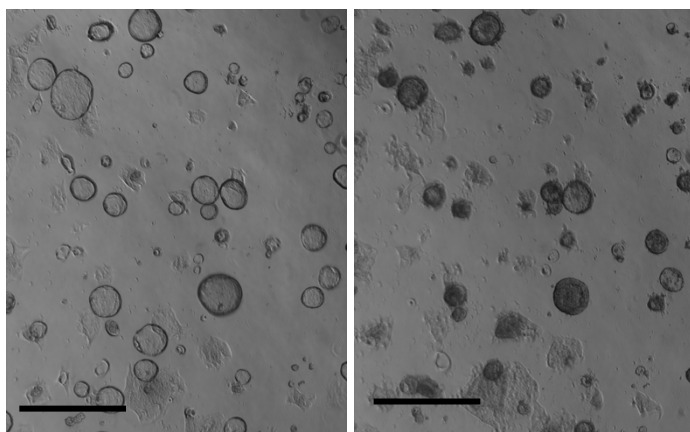


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド(左写真)に40mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド(右写真)。10mM投与群および20mM投与群と同様に、オルガノイドが増殖していない(スケールバー=800 μ m)

今年度(R4年度)の研究結果より、肝臓オルガノイドは、アセトアミノフェンの添加により、用量依存的に肝臓の逸脱酵素を分泌し、細胞生存性の活性も低下するなど、動物実験と同様の傾向が確認できた。

来年度(R5年度)研究において、オルガノイドの培養上清中のエクソソームRNAが、動物実験と同様に肝臓障害のバイオマーカーとなりうるのかを検証する。また、肝臓障害モデル化学物質として、アセトアミノフェンの他に四塩化炭素へのばく露実験も予定している。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討(成瀬: R5 年度)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA

が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R5 年度においては、マウスの肝臓より樹立したオルガノイドに対して、肝臓障害を起こすことが知られる四塩化炭素を添加するばく露実験を行い、細胞の増殖活性、および肝臓の逸脱酵素である AST および ALT の測定を行った。

下図にある様に、樹立に成功した肝臓オルガノイド 1×10^5 個を細胞培養プレートに播種し、5日間培養を行い、アセトアミノフェン(0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM)を添加後2日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

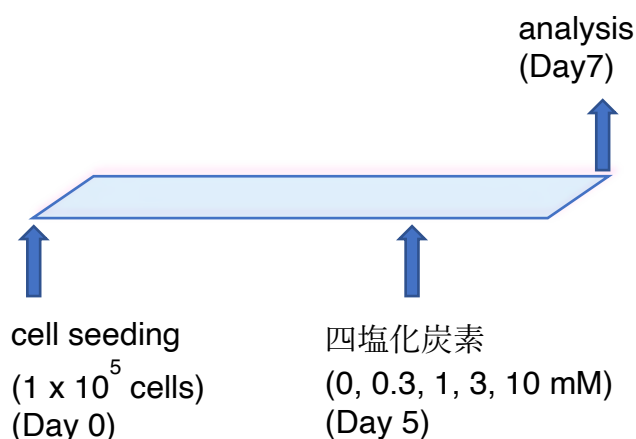


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素をばく露および解析する概略図。

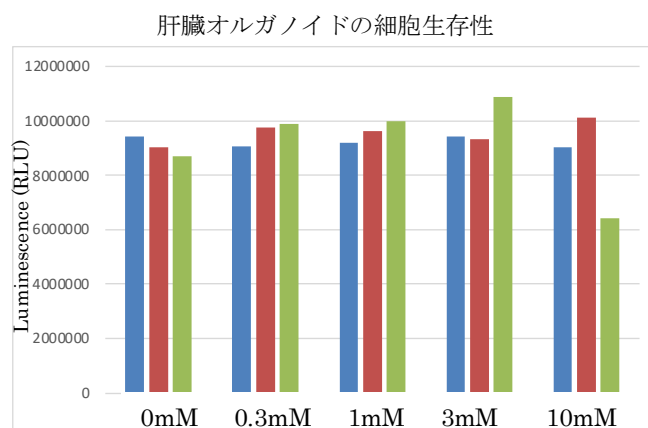


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞生存性の指標として実績の多い還元力を測定している(N=3)。

48時間後においても10mM投与群においても細胞の生存性低下は見られなかった。

一方、肝臓障害の指標として利用される血液中の逸脱酵素 (AST および ALT) についても、四塩化炭素添加後 48 時間における培養上清において測定したが、溶媒に比較して有意差のある上昇はASTの10mM群だけであった。

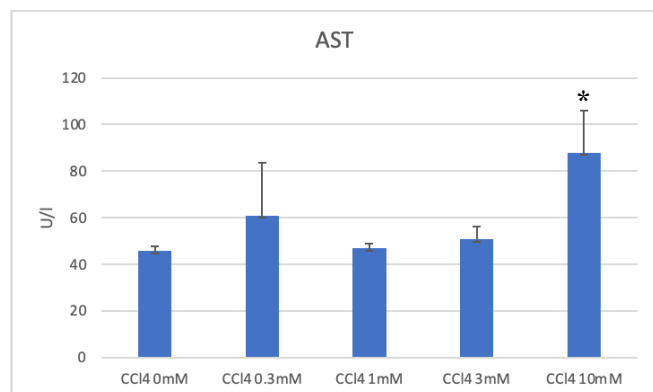
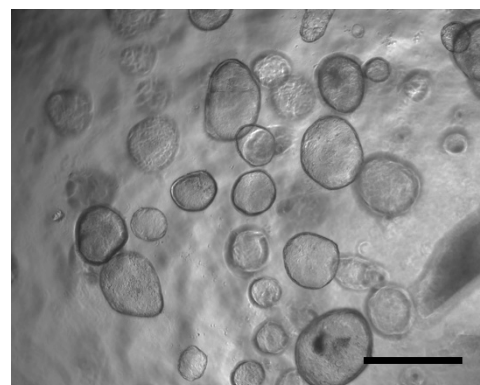
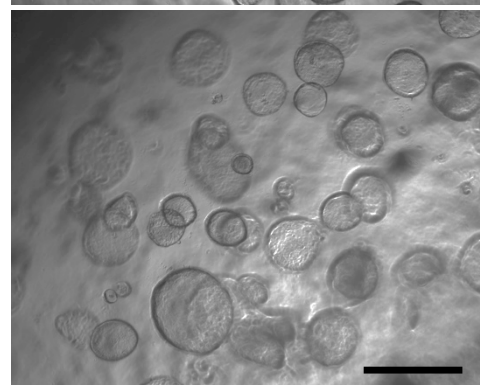


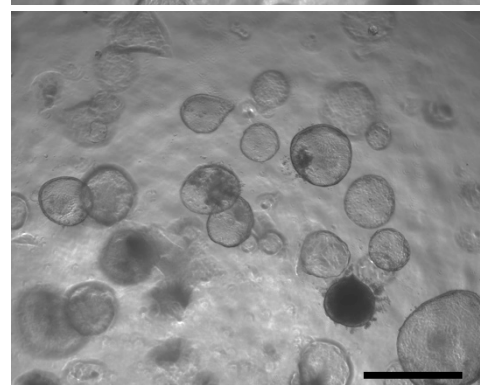
図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるAST濃度を測定している (N=3)。* P<0.05



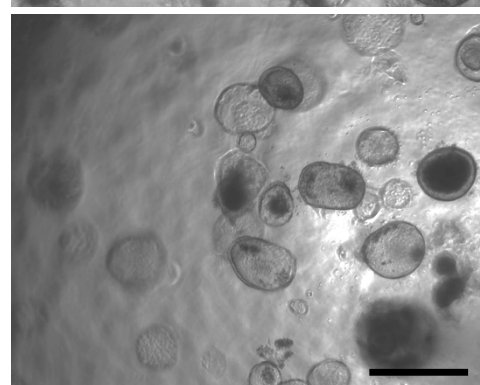
0mM



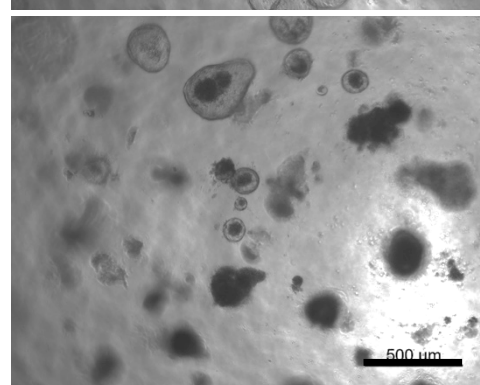
0.3mM



1mM



3mM



10mM

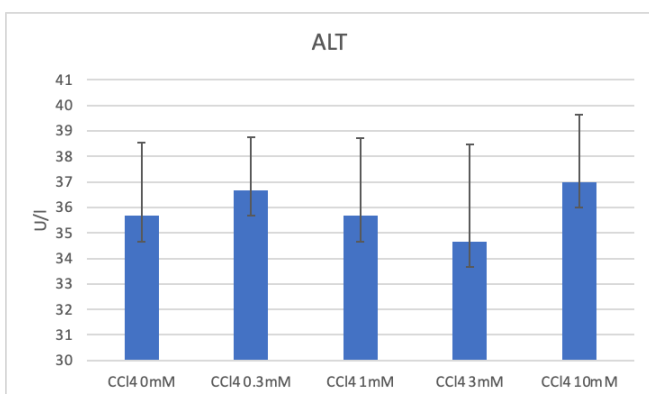


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるALT濃度を測定している (N=3)。

四塩化炭素添加による肝臓オルガノイドへの形態を確認するために、四塩化炭素添加前、および2日後の細胞像の写真撮影を行っている (下図)

図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイド。(スケールバー=500 μ m)

R4年度の研究結果より、肝臓オルガノイドは、アセトアミノフェンの添加により、用量依存的に肝臓の逸脱酵素を分泌し、細胞生存性の活性も低下するなど、動物実験と同様の傾向が確認できたが、今年度(R5年度)研究において、四塩化炭素添加においては、用量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素(ASTおよびALT)においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームRNA解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーであるmiR-122やmiR-192の上昇も確認できなかった。

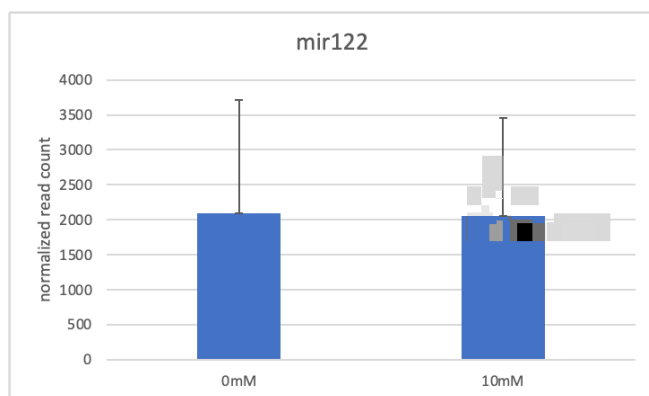


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドに 0mM, 10mM の濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイドにおける 0mM 群と 10mM 群における肝障害のバイオマーカーである miR122 の遺伝子発現量 (N=3)。

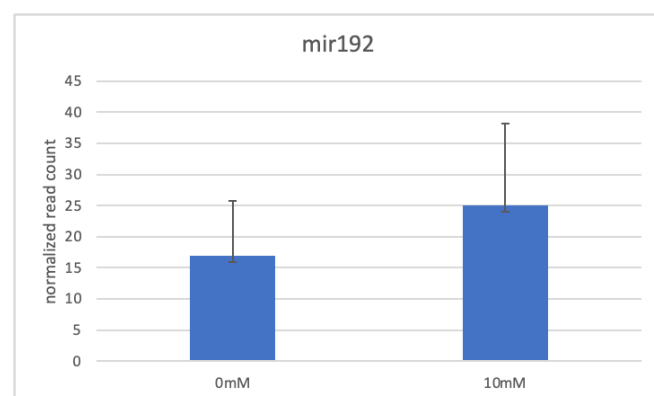


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドに 0mM, 10mM の濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイドにおける 0mM 群と 10mM 群における肝障害のバイオマーカーである miR192 の遺伝子発現量 (N=3)。

D. 考察

令和3年度においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するための基盤的研究を行った。最初に、妊娠動物を利用した次世代型催奇形性評価法を確立するための動物実験系の確立を行った。具体的には、種々の妊娠状態にある雌マウスを対象とした、採血方法の検討、血清单離法の検討、胎児由来の羊水の採取方法の検討、羊水由来のエクソソーム単離方法の検討である。

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. *et al.*, *Toxicology Reports* 2020)。

本研究では、対象動物が、雌マウスおよび胎児になることにより、雄マウスとは異なる点が数多く確認する必要があった。

特に、母動物の血液に加え、胎児由来の羊水のサンプリングおよび胎児からの血液採取など、検証すべき点が数多くあった。また、化学物質投与による催奇形性発現系 (VPA) の検討も行っている。

次に、発生・発達段階に特異的なエクソソーム RNA の単離、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の単離、妊娠に特異的なエクソソーム RNA の単離を行った。

これまでに、老齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、若齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雄特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雌特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、妊娠・非妊娠のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功している。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA に関しては、雄特異的なエクソソーム RNA として、Y 染色体上の RNA が数多く単離されるのではないかと推察していたが、多くは上染色体上の small RNA であった。これらは、性分化後に、精巣の発達などの性成熟に機能している可能性も考えられる。

また、催奇形性のバイオマーカーの効率的な探索のために、遺伝子組み換えマウスをモデル動物として利用することに取り組んだ。

哺乳類の免疫には、感染した病原体を特異的に見分け、それを記憶することで、同じ病原体に出会った時に効果的に病原体を排除できる仕組みである獲得免疫の他に、受容体を介して、侵入してきた病原体や異常になった自己の細胞をいち早く感知し、それを排除する仕組みである自然免疫が存在する。自然免疫は、ウィルス RNA を模倣した核酸アナログで

ある Poly I:C を投与することで、誘導できることが知られている。ここで、本来、自然免疫を抑制している *Irf2* 遺伝子の欠損マウスを利用することで、慢性的に自然免疫が活性化された状態を作り出すことができる。

R3 年度においては、5ヶ月齢の雌動物を利用して自然免疫に特異的なバイオマーカーの探索を行った。103 個の *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。これらは、*Irf2* KO マウスの持つ様々な自己免疫疾患による症状のバイオマーカーとなっていると考えられる。これらの表現型の出現する前の若い個体を用いての同様の解析を行うことで、ここで単離した特異的なエクソソーム RNA が、自己免疫疾患の症状に特異的なのか、*Irf2* 遺伝子欠損によるインターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) の活性化に特異的なのかを明らかにできると考えている。

R3 年度においては、催奇形性のモデルマウスとして利用するための、遺伝子改変マウスの導入および作製を進めた。胎盤形成により初期胚致死となる *Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスを比較することにより、確実に初期胚致死のバイオマーカーを単離できると考えている。また、*Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスは、初期胚致死になるという点では同じであっても、*Peg10* KO マウスでは胎盤の母体側と接する面に存在する trophoblast giant cell の数が増えることはないが、*Mash2* KO マウスにおいては、trophoblast giant cell の数が過剰になる表現型を持つ。よって、*Mash2* KO マウスに特異的なものがあれば、それは、trophoblast giant cell に由来するものである可能性があると考えている。

また、胎児期の形態形成異常だけでなく、胎児期の代謝異常なども検出できる可能性を考え、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行った。*Atp7b* 欠損による銅代謝異常を胎児期にリキッドバイオプシーにより検出できるようになると、迅速かつ安全な遺伝病の胎児期スクリーニングにも利用可能だと考えられる。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れており、R3 年度は、肺、肝臓および大腸のオルガノイドを樹立することに成功した。

令和3年度においては、エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発のために、令和3年度に試料採取法に基づいて、催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸を妊娠 9~11 日のマウスに経口投与し、妊娠 11 日、15 日および 18 日に母動

物血清および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取した。なお、バルプロ酸の投与量は 0（媒体、0.5%メチルセルロース溶液）、300、600、800 mg/kg とし、投与容量は 16 mL/kg とした。また、経口投与による曝露状態を確認するために、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度を確認した。その結果、600mg/kg 群で胎児 1 例に神経管閉鎖不全が観察され、800 mg/kg 群ではほとんどの胎児が死亡した。両群ともに胎児には母動物血漿中濃度の約 30~60%のバルプロ酸が確認され、子宮内位置による影響はなかった。

また、R4 年度においては、伊川（分担）の作製した Atp7b 遺伝子の変異マウスの表現型解析および、Atp7b 遺伝子の変異により惹起される銅代謝異常のバイオマーカーとなる血中のエクソソーム RNA の同定を行った。（小野、落谷）

Atp7b 遺伝子の機能不全は、自然発生マウス（Toxic milk）やヒト遺伝病（ウィルソン病）などで知られ、銅の胆汁中への排泄が阻害され、全身臓器に銅が沈着して組織障害を起こす銅毒性の表現型を持つことが報告されている。

本研究では、ゲノム編集技術を利用して Atp7b 遺伝子のエクソン 8 およびエクソン 11 に遺伝子変異を導入した。ゲノム編集技術による遺伝子変異導入効率は高く、近年では、マウス受精卵においてゲノム編集を行った F0 マウスがほぼホモの変異を有することで、交配を経てホモマウスを得ずに表現型を解析できることが報告されている。

具体的には、毛色決定を司る遺伝子で、両アリルともに欠損するとアルビノ個体になることが知られている Tyrosinase 遺伝子をマウスやラット受精卵においてゲノム編集により遺伝子変異体を作製するとアルビノ個体が数多く産まれることが報告されている。

このことから、本研究においては、Atp7b 変異マウスを F0 世代から、その表現型の解析を行うこととした。実際に、Atp7b 変異マウス F0 世代の♀を野生型 C57BL/6J♂と交配した場合に、新生児は新生児期致死の表現型を示した。これは、母体における銅代謝異常により、胎児は銅欠乏症による神経障害を発症し、新生児期致死となる自然発生マウスである toxic milk の表現型と同様の表現型を示すことから、Atp7b 変異マウスは、F0 世代であっても解析対象とした。

Atp7b エクソン 8 変異マウスは、解剖時に肝臓に肉眼所見は見られない一方、Atp7b エクソン 11 変異マウスは、肝臓に形態異常が高頻度で見られた。どちらの変異マウスも、肝臓中の銅濃度に大幅な上昇が見られた。（小野）

さらに、血液生化学試験で、肝臓の逸脱酵素の上昇

が確認され、病理学的解析から、肝細胞肥大、核の巨核化およびネクロシス像が見られた。（平林）

このことから、Atp7b 変異マウス F0 世代は、銅代謝異常の表現型を持つことから、これらのマウスの血液中のエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現を行った。Atp7b エクソン 8 変異マウスおよび Atp7b エクソン 11 変異マウスともに共通したエクソソーム RNA が発現誘導されることが明らかになった。（小野、落谷）

また、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れており、令和 3 年度に樹立することに成功した肝臓オルガノイドに対して、過剰投与により、肝障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンをばく露し、肝障害が実験動物と同様に肝障害を起こし得るのかの検証を行った。（成瀬）

アセトアミノフェンの濃度依存的に、肝臓オルガノイドの細胞生存性が低下した。さらに、肝臓オルガノイドを培養していた培養上清を利用して、生化学検査を行ったところ、肝臓の逸脱酵素として知られる AST、ALT の上昇が観察された。（成瀬）

令和 5 年度においては、その結果、600mg/kg/day でバルプロ酸を投与した場合に、バルプロ酸の濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。

ここで、注意したいのは、催奇形性は、全ての腹で観察されるわけではなく、一部の腹では多くの胎児が催奇形性の表現型を持つが、他の腹においては正常であるという点である。

これらの事実から、催奇形性の出現頻度によっては、判断が難しい事も考えられ、それ故、生殖発生毒性試験においては、経験豊富なエキスパートによる判断が必要とされるのであろう。

E. 結論

令和 3 年度研究（3 年計画の 1 年目）研究において、以下の項目において進捗が見られた。

（1）マウスの正常な発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定、雌雄に特異的

なエクソソーム RNA の同定、妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定からは、マウスの血液 1 滴からの老齢バイオマーカー、幼若バイオマーカーの単離に成功したと言える。催奇形性のバイオマーカー候補になると同時に、成体における体内年齢の計測が可能となる可能性がある。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、妊娠母動物の血液中のエクソソームを解析する際の、胎児性別の偏りによる影響を考慮するために必須なデータとなる。

妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、正常な妊娠のバイオマーカー候補が濃縮されている可能性があり、有力な催奇形性のバイオマーカー候補になる。

(2) 遺伝子改変動物をモデル動物として利用することにより、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

我々は、エクソソーム RNA を指標として、癌細胞の存在や、化学物質による細胞障害の検出に成功してきたが、単一遺伝子欠損の影響による炎症反応のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定に成功した意義は大きい。様々な条件でバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功したとしても、それが本当に狙った細胞の障害に由来するものなのかを証明することは難しかった。そこで、同一の表現型を持つ、複数の遺伝子改変動物を利用して、特異的なエクソソーム RNA を同定し、比較することにより、バイオマーカーの機能をメカニズムベースで考えることができる。

(3) 令和 3 年度はエクソソーム解析候補時期の 1 つである妊娠 15 日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取の流れを確立した。また、来年度実施予定の VPA 投与の動物実験における分析法も確立した。

(4) 化学物質投与をすることなく、胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。

具体的には、(2) で利用した自己免疫疾患の表現型を持つ *Irf2* KO マウスの他に、胎盤形成不全による初期胚致死を引き起こす *Mash2* KO マウスの導入、および、同様の表現型を持つ *Peg10* KO マウスの作製を行った。さらに、形態形成異常の表現型を持たないが、銅代謝異常の表現型を持つ *Atp7b* 遺伝子改変マウスの作製にも成功した。

(5) オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

令和 4 年度研究 (3 年計画の 2 年目) 研究において、以下の項目において進捗が見られた。

(1) 次世代型催奇形性評価法の開発の一環として、妊娠中のばく露により二分脊柱などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られる催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸を妊娠 9~11 日のマウスに経口投与した。投与量は 0、300、600、800 mg/kg で、投与容量は 16 mL/kg とした。また、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度の確認を行った。結果として、600 mg/kg 群では 1 例の胎児に神経管閉鎖不全が観察され、800 mg/kg 群ではほとんどの胎児が死亡しました。両群ともに、胎児には母動物血漿中のバルプロ酸濃度の約 30~60% が確認され、子宮内位置による影響は見られなかった。(桑形)

(2) 伊川 (大阪大学) の作製した胎盤形成不全の表現型を持つ *Peg10* KO マウス、および、銅代謝異常の表現型を持つウィルソン病のモデルマウスである *Atp7b* KO マウスを材料にした解析を開始した。*Peg10* KO マウスにおいては、既報と同様に、胎盤形成不全により初期胚致死となることが確認された。

今年度においては、*Atp7b* 変異マウスの解析結果から、銅代謝異常により肝臓などに銅毒性の表現型が生じることを確認した。さらに、野生型および *Atp7b* 変異 (F0 世代) マウスの血中のエクソソーム RNA の遺伝子発現解析に成功し、銅代謝異常のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。

(3) 近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。

そこで、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、昨年度 (令和 3 年度) にマウスの肝臓より樹立に成功したオルガノイドに対して、過剰投与により肝臓障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンを添加した。

その培養上清中には、アセトアミノフェンの濃度依存的に肝臓オルガノイドより逸脱酵素が分泌され、細胞生存性が低下するなど、*in vivo* の挙動に近い特徴を明らかにした。(成瀬)

令和5年度研究(3年計画の3年目)研究において、以下の項目において進捗が見られた。

(1) 令和4年度において妊娠中のばく露により二分脊柱などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られるバルプロ酸ナトリウムの投与実験(妊娠9—11日(GD9-11)に反復投与、0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600mg/kg/day (GD18 解剖群のみ、800mg/kg/day 群あり)を行い、GD11, 15, 18日目に剖検、および、母体血および胎児羊水のサンプリングを行っていたが、令和5年度研究においては、それらの詳細な外表面観察を行った。

その結果、投与したバルプロ酸ナトリウムの濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。このことから、本研究で行なったバルプロ酸ナトリウム投与による催奇形性モデル動物の作製は予定通りに成功した (Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

(2) 羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プロトコルの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティークラム抽出法、の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクであるCD9抗体でのウェスタンブロット解析、および、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) によるエクソソームの粒子径および粒子数解析を行い、羊水からは、アフィニティークラム法が適していると結論した。

(3) (1) 研究計画において採取したバルプロ酸ナトリウムを投与した妊娠マウスの母動物血清、および、羊水よりエクソソームの抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行うことで、催奇形性作用のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)

(4) 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる Atp7b 遺伝子の変異マウス (F0 世代) の作製を令和4年度に作製しており、これらのマウスより、変異マウスラインを確立するために、Atp7b 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J♂または、C57BL/6J♀) と交配を行うことで、変異アレルが germline transmission するラインを確立できた。また、さらに、これらの F1 変異マウス同士を交配することで homo 変異マウスの作製を行い、その表原型の評価を行った。

(4) 肝臓オルガノイドを細胞培養プレートに播種し、5日間培養した後、肝毒性モデル物質である四塩化

炭素 (0mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM) を添加した。四塩化炭素添加後の2日目に培養上清と肝臓オルガノイドを回収した。容量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素 (AST および ALT) においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソーム RNA 解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーである miR-122 や miR-192 の上昇も確認できなかった。

(まとめ)

本研究で行なった催奇形性物質であるバルプロ酸ナトリウムの妊娠動物への投与により、濃度に依存した子宮内胎児発達遅延や、神経管閉鎖不全や指形成不全の催奇形性作用が確認された。ここで、重要なのは、全ての腹で同様に催奇形性作用が確認されたわけではなく、催奇形性の全くでない腹もあれば、ほぼ全てが催奇形性の表現型を持つ腹もあるという事実である。

このような催奇形性発現状況こそが、催奇形性試験に経験豊富なエキスパートが必要な大きな理由の一つと考えられる。そこで、我々は、催奇形性の表原型の有無に関係なく、催奇形性物質投与により、誘導されるエクソソーム RNA の発現量を催奇形性の指標とする次世代型毒性評価法の開発を本研究の目的とした。

母動物へのバルプロ酸ナトリウム投与により、胎児における催奇形性作用が確認され、エクソソームを抽出する体液として、母動物の血清、および、胎児の羊水の採取を行い、それらの網羅的遺伝子発現解析を行なった。そこで、バルプロ酸ナトリウム投与に依存的に誘導されるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

ここで、GD15 の羊水中のエクソソーム RNA で、バルプロ酸ナトリウム投与依存的に誘導されるエクソソーム RNA には、ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群が濃縮されていることが判明した。

これは、バルプロ酸ナトリウムは、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つことから、ヒストンアセチル化によって遺伝子の転写活性の on/off をしている遺伝子に関しては、転写を活性化すると考えられる。このヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つ、Trichostatin A も、バルプロ酸ナトリウムと同様の催奇形性作用を持つことが報告されていることから、これらの催奇形性発現は、ヒストンアセチル化の異常による遺伝子発現異常にあると考えられる。

そこで、本研究により単離された催奇形性の毒性指標候補であるエクソソーム RNA であるゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群の発現は、毒性機序の面からも、非常に優れた毒性バイオマーカーであると結論できる。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームを毒性指標とする動物実験代替法の検証においては、アセトアミノフェンについては、生体への投与と同様な挙動が見られたが、四塩化炭素投与においては、生体で見られる反応が見られなかった。これは、肝毒性の発現以前に、培養系における細胞毒性を生じてしまい、生体とは違うメカニズムで細胞の生存障害が起こっているものと考えられる。

動物実験代替法は推進すべき課題であるが、本当に生体を反映しているかの評価が難しい問題である。本研究で開発に成功した母動物の血清および胎児羊水中のエクソソーム RNA を毒性指標とする次世代型毒性評価法は、動物実験における使用匹数の大幅な削減に貢献するだけでなく、オルガノイドなどの培養系における in vivo を反映しているのかという鋭敏な指標にもなりうると思われる。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和5年度)

<論文・著書>

- 1) Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T. Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. *Gut*. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.
- 2) ○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta. *Development*. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.
- 3) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H. Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer. *Cancers* (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.
- 4) ○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T. The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model. *Front Genet*. 2021 Nov 29;12:765131.
- 5) Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids. *Front Genet* 2021 Nov 18;12: 768781.
- 6) ○ **Kuwagata M**, Hasegawa T, Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.
- 7) Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.
- 8) Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci*. 8, 169-175, 2021.
- 9) Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Iimura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1-μm aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.
- 10) Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S. Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyperinflammation in senescence-accelerated mice. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1):23250.
- 11) Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent

- pathways. *Development*. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.
- 12) **Hirabayashi Y**, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H. Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals. *Nucleic Acid Ther*. 2021 Apr;31(2):114-125.
 - 13) Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ. C2cd6-encoded CatSper targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane. *Cell Rep*. 2022 Jan 5;110226.
 - 14) Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**. FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice. *Development*. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.
 - 15) Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A. The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.
 - 16) Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**. SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.
 - 17) Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T**. Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2. *J Extracell Vesicles*. 2021 Jun;10(8):e12092.
 - 18) Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T. Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers. *Stem Cell Res Ther*. 2021 May 29;12(1):312.
 - 19) Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K. miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells. *Sci Rep*. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.
 - 20) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H. Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer. *Fundamental Toxicological Sciences* 9 (2) 37-46, 2022
 - 21) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Perkins E, Yokozaki H, Sasaki H. Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction. *Onco* 2023, 3(1), 13-25
 - 22) **Kuwagata M**, Sato A, Izumi Y, Chihara K, Yamasaki H, Katsumata Y, Ooshima Y, Buschmann J, Fujiwara M: Current activities between the DevTox Berlin workshops and the Japanese Teratology Society Terminology Committee in harmonizing the terminology for classifying anomalies in laboratory animals in developmental toxicity studies: Report from the Satellite Workshop of the 60th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society; Congenic Anom (Kyoto). 2022; 62: 198-202
 - 23) **Kuwagata M**, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*, 10(2), 69-82 (2023)
 - 24) **Kuwagata M**, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*, 10(2), 59-68 (2023)
 - 25) Yuda M., Aizawa S., Tsuboi I., **Hirabayashi Y**, Harada T., Hino H., Hirai S., Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Biol Pharm Bull*. 45(2022), 1602-1608.
 - 26) JPMA 課題対応チーム(13 名), ICH S6 対応研究班(5 名). 核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、2022;53 (3), 211-218.

- 27) Okamura A, **Yoshioka Y**, Saito Y, **Ochiya T**. Can Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems Be a Game Changer in Cardiac Disease? *Pharm Res*. 2022 Dec 28. Review.
- 28) Naito Y, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**. Intercellular crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts via extracellular vesicles. *Cancer Cell Int*. 2022 Nov 24;22(1):367. Review.
- 29) Kobayashi M, Fujiwara K, Takahashi K, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**, Podyma-Inoue KA, Watabe T. Transforming growth factor- β -induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition. *Inflamm Regen*. 2022 Sep 4;42(1):38.
- 30) Tamura T, **Yoshioka Y**, Sakamoto S, Ichikawa T, **Ochiya T**. Extracellular vesicles in bone homeostasis: key roles of physiological and pathological conditions. *J Bone Miner Metab*. 2022 Aug 9. Review.
- 31) **Yoshioka Y**, Shimomura M, Saito K, Ishii H, Doki Y, Eguchi H, Nakatsura T, Itoi T, Kuroda M, Mori M, **Ochiya T**. Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2022 Oct;113(10):3498-3509.
- 32) Ishigamori, R., **Naruse, M.**, Hirata, A., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.: Featured Article: The Potential of Organoids in Toxicologic Pathology. Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J. Toxicol. Pathol.* 35 (3) 211–223 (2022)
- 33) Imai, T., **Naruse, M.**, Ochiai, M., Matsumoto, K., Ikeda, S., Kani, M., Kato, Y., Hirayama, A., Soga, T., Hori, Y., Yokoi, A., Ochiai, A: Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett* 24, 221 (2022)
- 34) Imai, T., **Naruse, M.**, Machida, Y., Fujii, G., Mutoh, M., Ochiai, M., Takahashi, M., Nakagama, H.: Feeding a high-fat diet for a limited duration increases cancer incidence in a breast cancer model. *Nutr. and Cancer* 2022 Oct 20;1-13
- 35) Kaneda Y, Miyata H, Shimada K, Oura S, **Ikawa M**. Testis-specific proteins, TSNAI1 and 1700010I14RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice. *Andrology*. 2023 Jan 4. doi: 10.1111/andr.13378. Epub ahead of print. PMID: 36598146.
- 36) Oura S, Ninomiya A, Sugihara F, Matzuk MM, **Ikawa M**. Proximity-dependent biotin labeling in testicular germ cells identified TESMIN-associated proteins. *Sci Rep*. 2022 Dec 23;12(1):22198. doi: 10.1038/s41598-022-26501-7. PMID: 36564444; PMCID: PMC9789103.
- 37) Ozawa M, Taguchi J, Katsuma K, Ishikawa-Yamauchi Y, Kikuchi M, Sakamoto R, Yamada Y, **Ikawa M**. Efficient simultaneous double DNA knock-in in murine embryonic stem cells by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated circular plasmid targeting for generating gene-manipulated mice. *Sci Rep*. 2022 Dec 13;12(1):21558. doi: 10.1038/s41598-022-26107-z. PMID: 36513736; PMCID: PMC9748034.
- 38) Ozawa M, Emori C, **Ikawa M**. CRISPR/Cas9-Mediated Highly Efficient Gene Targeting in Embryonic Stem Cells for Developing Gene-Manipulated Mouse Models. *J Vis Exp*. 2022 Aug 24;(186). doi: 10.3791/64385. PMID: 36094255.
- 39) Oura S, Hino T, Satoh T, Noda T, Koyano T, Isotani A, Matsuyama M, Akira S, Ishiguro KI, **Ikawa M**. Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice. *PLoS Genet*. 2022 Jun 1;18(6):e1010241. doi: 10.1371/journal.pgen.1010241. PMID: 35648791; PMCID: PMC9191731.
- 40) Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, **Ikawa M**. TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility. *Reprod Med Biol*. 2022 May 23;21(1):e12467. doi: 10.1002/rmb2.12467. PMID: 35619658; PMCID: PMC9126596.
- 41) ○* **Ryuichi Ono**, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, and Satoshi Kitajima. Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice *Fundamental Toxicological Sciences*, 11, 37-56 (2024) *
- Corresponding author
- 42) ○**Kuwagata M**, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day dose Toxicity Study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in Rats. *Fundam Toxicol Sci*, 10, 59-68 (2023).
- 43) ○**Kuwagata M**, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in Rats. *Fundam Toxicol Sci*, 10, 69-82 (2023).
- 44) Ishino, F., Itoh J., Irie M., Matsuzawa A., **Naruse M.**, Suzuki T., Hiraoka Y., Kaneko-Ishino T.: Retrovirus-Derived RTL9 Plays an Important Role in Innate Antifungal Immunity in the Eutherian Brain.

- 45) Imai T., Naruse M., Machida Y., Fujii G., Mutoh M., Ochiai M., Takahashi M., Nakagama H. : Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer* 75(2): 713-725 (2023)
- 46) Noda T, Shinohara H, Kobayashi S, Taira A, Oura S, Duritahala, Tokuyasu M, Araki K, Ikawa M.: Multiple genes in the Pate5-13 genomic region contribute to ADAM3 processing. *Biol Reprod.* 2024 Jan 13:ioae008.
- 47) Endo T, Kobayashi K, Matsumura T, Emori C, Ozawa M, Kawamoto S, Okuzaki D, Shimada K, Miyata H, Shimada K, Kodani M, Ishikawa-Yamauchi Y, Motooka D, Hara E, Ikawa M.: Multiple ageing effects on testicular/epididymal germ cells lead to decreased male fertility in mice. *Commun Biol.* 2024 Jan 4;7(1):16.
- 48) Miyake T, Inoue Y, Shao X, Seta T, Aoki Y, Nguyen Pham KT, Shichino Y, Sasaki J, Sasaki T, Ikawa M., Yamaguchi Y, Okamura H, Iwasaki S, Doi M.: Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. *Cell Rep.* 2023 Mar 28;42(3):112157.
- 49) Shimada K, Park S, Oura S, Noda T, Morohoshi A, Matzuk MM, Ikawa M.: TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Mar 14;120(11):e2221762120.
- 50) Lu Y, Shimada K, Tang S, Zhang J, Ogawa Y, Noda T, Shibuya H, Ikawa M.: 1700029115Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Feb 21;120(8):e2207263120.
- 51) Ito K, Yamamoto T, Hayashi Y, Sato S, Nakayama J, Urabe F, Shimasaki T, Nakamura E, Matui Y, Fujimoto H, Kimura T, Egawa S, Ochiya T., Yamamoto Y. Osteoblast-derived extracellular vesicles exert osteoblastic and tumor-suppressive functions via SERPINA3 and LCN2 in prostate cancer. *Mol Oncol.* 2023 Oct;17(10):2147-2167. doi: 10.1002/1878-0261.13484. Epub 2023 Aug 4. PMID:37408474; PMCID: PMC10552899.
- 52) Minami S, Chikazu D, Ochiya T., Yoshioka Y. Extracellular vesicle-based liquid biopsies in cancer: Future biomarkers for oral cancer. *Transl Oncol.* 2023 Sep 13;38:101786. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101786. Epub ahead of print. PMID:37713973; PMCID: PMC10509717.
- 53) Yokoi A, Ukai M, Yasui T, Inokuma Y, Hyeon-Deuk K, Matsuzaki J, Yoshida K, Kitagawa M, Chattrairat K, Iida M, Shimada T, Manabe Y, Chang IY, Asano-Inami E, Koya Y, Nawa A, Nakamura K, Kiyono T, Kato T, Hirakawa A, Yoshioka Y, Ochiya T., Hasegawa T, Baba Y, Yamamoto Y, Kajiyama H. Identifying high-grade serous ovarian carcinoma-specific extracellular vesicles by polyketone-coated nanowires. *Sci Adv.* 2023 Jul 7;9(27):eade6958. doi: 10.1126/sciadv.ade6958. Epub 2023 Jul 7. PMID: 37418532; PMCID: PMC10328412.
- 54) Hanai H, Hart DA, Jacob G, Shimomura K, Ando W, Yoshioka Y, Ochiya T., Nakagawa S, Nakamura M, Okada S, Nakamura N. Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model. *J Extracell Vesicles.* 2023 Jul;12(7):e12337. doi: 10.1002/jev2.12337. PMID: 37367299; PMCID: PMC10295161.
- 55) Morimoto M, Maishi N, Tsumita T, Alam MT, Kikuchi H, Hida Y, Yoshioka Y, Ochiya T., Annan DA, Takeda R, Kitagawa Y, Hida K. miR-1246 in tumor extracellular vesicles promotes metastasis via increased tumor cell adhesion and endothelial cell barrier destruction. *Front Oncol.* 2023 Apr 12;13:973871. doi: 10.3389/fonc.2023.973871. PMID: 37124539; PMCID: PMC10130374.
- 56) Okamura A, Yoshioka Y, Saito Y, Ochiya T. Can Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems Be a Game Changer in Cardiac Disease? *Pharm Res.* 2023 Apr;40(4):889-908. doi: 10.1007/s11095-022-03463-z. Epub 2022 Dec 28. PMID:36577860; PMCID: PMC10126064.
- 57) Shimada Y, Yoshioka Y, Kudo Y, Mimae T, Miyata Y, Adachi H, Ito H, Okada M, Ohira T, Matsubayashi J, Ochiya T., Ikeda N. Extracellular vesicle-associated microRNA signatures related to lymphovascular invasion in early-stage lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2023 Mar 24;13(1):4823. doi:10.1038/s41598-023-32041-5. PMID: 36964242; PMCID: PMC10038982.
- 58) Tashiro K, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicles from adipose-derived stem cells relieve extremity lymphedema in mouse models. *Plast Reconstr Surg.* 2023 Mar 8. doi: 10.1097/PRS.0000000000010388. Epub ahead of print. PMID:36877751.
- 59) Lischinig A, Bergqvist M, Ochiya T., Lässer C. Corrigendum for "Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles". *Mol Cell Proteomics.* 2023 Mar;22(3):100516. doi:10.1016/j.mcpro.2023.100516. Epub 2023 Mar 10. Erratum for: *Mol Cell Proteomics.* 2022 Sep;21(9):100273. PMID: 36907076; PMCID: PMC10024162.
- 60) Urabe F, Kosaka N, Yamamoto Y, Ito K, Otsuka K, Soekmadji C, Egawa S, Kimura T, Ochiya T. Metastatic prostate cancer-derived extracellular vesicles facilitate osteoclastogenesis by transferring the CDCP1 protein. *J Extracell Vesicles.* 2023 Mar;12(3):e12312. doi: 10.1002/jev2.12312. PMID: 36880252; PMCID:PMC9989745.
- 61) Kiya Y, Yoshioka Y, Nagakawa Y, Ochiya T. Extracellular Vesicles Are Important Mediators That Regulate Tumor Lymph Node Metastasis via the

Immune System. Int J Mol Sci. 2023 Jan 10;24(2):1362. doi: 10.3390/ijms24021362. PMID:36674900; PMCID: PMC9865533.

- 62) Suzuki K, Yokoi A, Yoshida K, Kato T, Ochiya T, Yamamoto Y, Kajiyama H. Preoperative serum microRNAs as potential prognostic biomarkers in ovarian clear cell carcinoma. J Gynecol Oncol. 2022 Dec 23. doi: 10.3802/jgo.2023.34.e34. Epub ahead of print. PMID: 36603851.
- 63) ○小島肇, 平林容子. 創薬開発に期待される New Approach Method の行政的な受け入れについて 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 158, 269-272, 2023, doi: 10.1254/fpj.22154.
- 64) ○J. Strickland, E. Haugabrooks, D.G. Allen, L.B. Balottin, Y. Hirabayashi, N.C. Kleinstreuer, H. Kojima, C. Nishizawa, P. Prieto, D.E. Ratzlaff, J. Jeong, J. Lee, Y. Yang, P. Lin, K. Sullivan, W. Casey, International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies. Crit Rev Toxicol. 2023), 1-27, doi: 10.1080/10408444.2023.2240852.

2. 学会発表

(令和 5 年度)

小野竜一

哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす多様な生命機能

第 92 回日本遺伝学会学術年会 (2020.9.17.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Identification of novel EV-associated miRNAs as toxic biomarkers in mouse

International Society for Extracellular Vesicles annual meeting 2020 (2020.7.22.)

○小野竜一

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純

化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化

第 48 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第 21 回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生

第 93 回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome Project 2022 update - 米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-co-culture with CRC organoids

第 80 回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○桑形 麻樹子、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩

史、北嶋 聡: 雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価

第 48 回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021 年 7 月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形 麻樹子: ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用

確認試験

第 61 回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン)) 2021 年 8 月

小野竜一、山本 雄介、成瀬 美衣、田邊 思帆里、吉

岡 祐亮、相崎 健一、広瀬 明彦、落谷 孝広、平林 容子、北嶋 聡

cfDNA による毒性評価

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.29.)

(口頭発表)

Ryuichi Ono.

Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing.

International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)

小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡

ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022.11.11

長崎（口頭発表）

Ryuichi Ono.

Toxicity Concerns of Exosome Products.

American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022
（招待講演）

小野 竜一

哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす
多様な生命機能
第 92 回日本遺伝学会学術年会（2020.9.17.）
（招待講演）

桑形麻樹子、種村健太郎

周産期の甲状腺機能低下による次世代影響
第 49 回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、
札幌（口頭発表）

桑形麻樹子

ウサギを用いたサリドマイドの発生毒性；雄精漿移行
による催奇形性発現の可能性
第 49 回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、
札幌（口頭発表）

高島宏昌、田中加奈子、羽田亮、長谷川拓郎、山崎浩
史、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**
サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性
第 62 回日本先天異常学会学術集会、2022. 7/29-7/31、
金沢（ポスター）

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、相田麻子、高橋
祐次、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**
ビスフェノール類 4,4'-(1,3-
Dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおけ
る皮下および経口投与による子宮肥大試験
第 49 回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌（ポスタ
ー）

五十嵐智女、松村万里、小川いずみ、矢川千織、早川
孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、**桑形麻樹子**、**北嶋聡**
「新規の食品」の安全史枝を確保するための諸外国の
精度比較
第 49 回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌（ポスタ
ー）

**平林容子：核酸医薬品の非臨床安全性評価における
ICH**

S6 対応研究班の取組、日本核酸医薬学会 第 7 回年
会、東京、2022 年 8 月 3 日、招聘講演

**平林容子：安全性評価の課題と展望、令和 4 年度 国
立医薬品食品衛生研究所シンポジウム、川崎、2022 年
8 月 9 日**

**平林容子：JaCVAM における New Approach
Methods への取組、2022 年度 日化協 LRI 研究報告
会、オンライン、2022 年 8 月 26 日、招聘講演**

平林容子：核酸医薬品の非臨床安全性試験ガイドライ

ンについて、第 12 回レギュラトリーサイエンス学会
学術大会、東京、2022 年 9 月 10 日、招聘講演

**平林容子：稀少疾患への核酸医薬品適用における安全
性評価の考え方、BioJapan2022、横浜、2022 年 10 月
12 日、招聘講演**

**HIRABAYASHI, Yoko：Initiatives for Safety Assessment
of Nanomaterials**

at Center for Biological Safety and Research, National
Institute of
Health Sciences, the 12th Global Summit on Regulatory
Science (GSRS)
2022 Conference, Singapore, 19 Oct., 2022（招待講演）

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋聡、平林容子、
福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱
作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト
発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年
会、札幌、2022 年 7 月 1 日（口頭発表）

○**小野 竜一**、cfDNA メチル化とエクソソーム RNA
を毒性指標としたリキッドバイオプシー、第 50 回
日本毒性学会学術年会 2023.6.21 横浜

小野 竜一、エクソソームを介した遺伝子水平伝搬、
第 50 回日本毒性学会学術年会 2023.6.22 横浜

○**Ryuichi Ono**、Liquid biopsy using cfDNA
methylation and EV-associated miRNA as a toxicity
biomarker、The 10th International Congress of Asian
Society of Toxicology, 2023.7.19, Taipei（招待講演）

○**Ryuichi Ono**、Extracellular Vesicles (EVs) as Novel
Toxicity Biomarkers、The 10th 63RD ANNUAL
MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.14, Salt
Lake City（招待講演）

桑形麻樹子、高島 宏昌、長谷川拓郎、田中加奈
子、羽田 亮、山崎 浩史、**北嶋 聡**、ウサギ
へのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生
毒性発現リスクの解明、第 63 回 日本先天異常学会
学術集会、筑波、2023 年 7 月 29 日、ポスター

Toshime Igarashi1, Mari Matsumura, Izumi Ogawa
Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi,
Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, **Makiko Kuwagata**,
Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems
in other countries regarding the safety assurance of
new food products including so-called cultured meat
10th International Congress of Asian Society of
Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda,
Kanak Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki,
Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects

mediated by seminal plasma ex-posed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア

長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋聡、桑形麻樹子：LC-MS/MS を用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

○桑形麻樹子：新生 DNT 委員会のこれから. 第 63 回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28) つくば

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第 63 回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30) つくば

桑形麻樹子：ウサギ精漿を介したサリドマイドによる発生毒性のリスク
第 97 回日本薬理学会年会(2023.12.14)神戸

Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Fatithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.横浜)

Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023.7. Taiwan)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫; 大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよび CAF を用いたエピゲノムマーカーの探索. 第 82 回日本癌学会学術集会 (2023.9.横浜)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用を再現する in vitro 実験系の構築. 第 46 回日本分子生物学会年会 (2023.12.神戸)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立. 日本薬学会 144 年会(2024.3.横浜)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

Ⅱ．研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, Ono R, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.	Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.	<i>Gut</i>	May 7:	487-496	2021
Shiura H, Ono R, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.	PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.	<i>Development</i>	Oct 1;148 (19)	1-7	2021
Tanabe S, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.	Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.	<i>Cancers (Basel)</i>	Nov 18;13 (22)	5786	2021
Naruse M, Ishigami R, Imai T.	The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.	<i>Front Genet.</i>	Nov 29;12	765131	2021
Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obikata S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fucki O, Ito K, Onodera H.	Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.	<i>Nucleic Acid Ther.</i>	Apr;31(2)	114-125.	2021

Tanabe S, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.	Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer.	<i>Fundamental Toxicological Sciences</i>	9 (2)	37-46	2022
Kuwagata M, Sato A, Izumi Y, Chihara K, Yamasaki H, Katsumata Y, Ooshima Y, Buschmann J, Fujiwara M.	Current activities between the DevTox Berlin workshops and the Japanese Teratology Society Terminology Committee in harmonizing the terminology for classifying anomalies in laboratory animals in developmental toxicity studies	<i>Report from the Satellite Workshop of the 60th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society; Congenic Anom (Kyoto)</i>	62:	198-202	2022
Yuda M., Aizawa S., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Harada T., Hino H.,	Hirai S., Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.	<i>Biol Pharm Bull.</i>	45	1602-1608.	2022
Tanabe S, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Perkins E, Yokozaki H, Sasaki H.	Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction	<i>Onco</i>	3(1)	13-25	2023

Tanabe S , Quader S, Ono R, Cabral H , Aoyagi K , Hirose A , Yokozaki H, Sasaki H	Molecular Networks of Platinum Drugs and Their Interaction with microRNAs in Cancer	<i>Genes</i>	14(11)	2073	2023
Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S	A 90-day dose Toxicity Study of 2-(2H- benzotriazol-2-yl)-6- dodecyl-4-methylphenol in Rats.	<i>Fundam Toxicol Sci</i>	10	59-68	2023
Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S	A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2- Butylbenzo[d]isothiazol- 3(2H)-one in Rats. studies	<i>Fundam Toxicol Sci</i>	10	69-82	2023
Imai T.,Naruse M.,Machida Y.,Fujii G.,Mutoh M.,Ochiai M.,Takahashi M.,Nakagama H.	H Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model.	<i>Nutr Cancer</i>	75(2)	713-725	2023
小島肇, 平林容子	創薬開発に期待される New Approach Method の行政的な受け入れに ついて	日薬理誌 (<i>Folia Pharmacol. Jp n.</i>)	158	269-272	2023
Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S	Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice	<i>Fundam Toxicol Sci</i>	11 (1)	37-56	2024

