

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する
新規評価手法開発のための研究 (23KD1003)

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

令和6(2024)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究 北嶋 聡	----- 1
--	---------

II. 分担研究報告書 (別添 4)

1. 脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析 北嶋 聡	----- 13
2. 吸入曝露実験の実施 西村拓也	----- 18
3. DNT 陽性物質選定、及び、国際標準化に向けた情報収集 栗形麻樹子	----- 23
4. In vitro DNT 評価手法の開発 大久保佑亮	----- 25
5. 情動認知行動解析と神経科学的物証の収集 齊藤洋克	----- 29
6. 胎盤の遺伝子発現プロファイリング 小野竜一	----- 34
7. ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析 西田欣広	----- 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5)	----- 42
----------------------------	----------

別添 3

I. 総括研究報告書

(23KD1003) 研究成果(見込み)の概要

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

研究代表者 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

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達に極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積み上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試み、ヒトへの外挿性を考慮した、より迅速、低コストで省動物に資する新規*in vitro* DNT評価手法の開発をおこなう。また日本を代表するDNT専門家(研究分担者)によりDNT陽性物質リストを作成し、併せて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の*in vitro*代謝プロファイルが明らかとし、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上を図る。

先行研究において、催奇形性陽性物質 21 種類、陰性物質 14 種類を 0.89 の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

令和5年度(初年度)は、I)従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得が可能となった。また、従来の24時間計測では明らかにできなかったHDAC阻害剤バルプロ酸の24時間以降の大きなシグナルかく乱作用を発見し、DNTの発生毒性発現機序にはエピジェネティック毒性も関与する可能性が示唆された。(大久保)。DNT陽性物質リストについては、ラットを用いた動物実験によりDNT陽性と報告された論文から97化合物が抽出され、また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、各神経発生過程に対応した*in vitro*試験は、現在17種類に絞られているが、各試験の信頼性については確認中であることが明らかとなった(桑形)。II)生後発達期DNTの分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン(目標曝露濃度:0, 2 および 20 ppm)につき、幼若期反復吸入曝露実験を行い(西村)、成熟後に情動認知行動解析を実施したところ、学習記憶異常が観察され、あわせて、神経科学的物証に基づく解析を実施中であり(齊藤)、得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析及び毒性関連性を検討する(北嶋)。そしてIII)ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析に向けては、まずヒト胎盤並びにマウス胎盤組織、双方ともに、安定したオルガノイド作製に成功した(西田)。加えて、C57BL/6マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行なった。胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後7.5日、8.5日目の胎盤および脱落膜の採取を行なった(小野)。以上、各試験法の最適化をはじめ、ほぼ予定通りに進捗した。

研究分担者

西村拓也 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

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

大久保佑亮 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

齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

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

西田欣広 大分大学・
医学部産科婦人科学講座

A. 研究目的

(背景) 発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

(目的) 本研究では、DNTを発生期と生後発達期に分け、2つの独自技術による課題の解決を試み、ヒトへの外挿性を考慮した、より迅速、低コストで省動物に資する新規*in vitro* DNT評価手法の開発をおこなう。また日本を代表するDNT専門家(研究分担者)によりDNT陽性物質リストを作成し、併せて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の*in vitro*代謝プロファイルが明らかとし、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上を図る。

先行研究において、催奇形性陽性物質 21

種類、陰性物質 14 種類を 0.89 の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

(必要性) DNTの評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。

(特色・独創的な点) 本研究では、DNTを発生期(胎生期)と生後発達期とに分け、2つの独自技術(ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法、及び、シックハウス症候群の動物試験モデル)により、複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明といった課題の解決を試みる。

(期待される効果) ヒトへの外挿性を考慮した、迅速で低コスト、省動物に資する新規*in vitro* DNT評価手法(動物実験代替法)の開発につながることを期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の*in vitro*代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝

物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。また成果物については、国際的なコンセンサスを得られるレベルを以って、テストガイドラインへの提案に繋がるように図る。

＜各年度の目標＞ 令和5年度：各試験法の最適化及びDNT陽性物質リストの調査、令和6年度：各試験法の実用性の検討、生後発達期DNT誘発メカニズムの探索、及び、DNT陽性物質リストの作成、令和7年度：発生期のin vitro DNT試験法及びヒト胎盤オルガノイドを用いたメタボローム解析法の提案と、生後発達期DNT誘発シグナルネットワークの同定

B. 研究方法

研究体制：化学物質の有害性評価（班員全員）、発生毒性（桑形、大久保、北嶋）、また特に、DNT（桑形）や化審法（北嶋）における毒性評価に精通する専門家を含むかたちで、研究班体制を構築している。研究分担者（桑形）が、OECD DNT expert group（発達神経毒性専門家グループ）メンバー、及び、JACVAM（日本動物実験代替法評価センター）資料編纂委員会（発達神経毒性試験）委員であることから、DNTに係る専門家、行政、業界団体等の関係者との情報交換も図ることができる。研究分担者として、若手研究者（齊藤）・女性研究者（桑形）が参画している。

研究班を次の3つの分担課題によって構成し研究を開始した。すなわち、1）構成的手法に基づいた発生期のin vitro DNT試験法の開発（in vitro）（大久保、桑形）、2）生後発達期DNTの分子機序解明に向けた、吸入曝露実験と情動認知行動解析（in vivo）（西村、齊藤、北嶋）、及び、3）ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析（in vitro / organoid）（西田、小野）。

研究計画：本研究では、DNTを発生期（胎生期）と生後発達期とに分け、2つの独自技術（ヒトiPS細胞を用いたin vitro発生毒性試験法、及び、シックハウス症候群の動物試験モデル）により、複雑なDNTに係る試験

法の開発や実体の解明といった課題の解決を試み、ヒトへの外挿性を考慮した、より迅速、低コストで省動物に資する新規in vitro DNT評価手法の開発をおこなう。ヒト胎盤オルガノイドを用いる化学物質の代謝についても検討し試験系の予測精度の向上を図る。以下に、実験方法の概要を示す。

B-1. 構成的手法に基づいた発生期のin vitro DNT試験法の開発（in vitro）：

本評価系は、シグナルかく乱作用の検出により発生毒性が評価可能か否かを検討したことに端を発している。FGFシグナルレポーター導入ヒトiPSC細胞を、96穴プレートに播種し、被験物質によるFGF誘導性のSRFシグナル影響を、24時間以上連続計測する。適用濃度は、最大溶解量（一部IC50）を最大濃度とし、溶媒対照に対する各物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC曲線解析によって閾値を設定する（DynaLux/c法）。適用実験後、その正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、評価する。

今年度はスループット性と再現性を高めるためにリアルタイム自動計測法を開発する。従来の生細胞FGFシグナル計測は、実験者がCO2インキュベーターにおいて96穴プレートで培養している細胞を計測ごとにルミノメーターに設置し、測定後にCO2インキュベーターに戻すという手作業で計測を行っていた。この手法は、定点観察であるため、特に夜間のシグナルかく乱作用を正確に計測できないこと、及び、細胞の移動によるiPS細胞への物理的影響が課題であった。事実、従来法では夜間の不自然な波形や標準偏差の大きさがみられている。

そこで今年度は、FGF-SRFシグナル計測を自動化するために、96穴プレートで細胞を培養しながらリアルタイムで発光測定が可能なKronosHT（ATTO社）を本試験系に導入し、スループット性と再現性の向上を試みる。

また評価手法の国際標準化に向けた情報収集についてはOECD in vitro DNT battery test（DNT-IVB）専門家会議、及び、続いて同メンバーにて開催されたNeurotoxicity

Conference へ出席し、情報収集を行った(2023年5月19日~26日、ダーラム、北米)。

そして DNT 陽性対照物質の選定は、欧米リスク評価機関の報告書及び科学論文を調査した。その中から今年度はラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文(Mundy M et al, 2015)に掲載された化学物質を精査した。なお、本リストは、本研究に限らず DNT 研究全般の推進を図るものである。

B-2. 生後発達期DNTの分子機序解明に向けた、吸入曝露実験と情動認知行動解析 (in vivo) :

雄性マウス(幼若期[2週齢])を対象とした22時間/日×7日間反復曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施し、成熟後(12週齢時)に、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験等からなる行動解析バッテリー試験を高精度に実施すると共に、脳における組織化学解析・タンパク発現解析等により神経科学的物証の収集を行う。なお、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を実施する。

トキシコゲノミクスのための脳の採取は、4部位(海馬、皮質、脳幹、小脳)とする。脳4部位のmRNAサンプルにつき、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行う。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用する。

今年度(令和5年度)のモデル物質はキシレン(xylene; 分子量:106.17、CAS No.:1330-20-7)とし、試薬としてキシレン(カタログ番号:244-00081、特級、85%(o-, m-, p-キシレンの含量)、ロット番号:ACG4493、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。キシレンの曝露濃度は先行研究の結果から、2および20ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.20 ppm(➡ H31年1月17日以降、0.05 ppmに変

更された)であることから、この指針値のそれぞれ40および400倍程度ということとなる。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、キシレンをバブリングし気化させる方法により行った。

キシレン濃度は、捕集管(チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号:080150-0532、柴田科学(株))を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間(曝露開始から曝露停止まで)に合わせ22時間とした。捕集管の曝露1回当たりの使用本数は、対照群および投与群は各濃度とも2本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ30NIIおよびMP-Σ300NII、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したキシレンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭(一層及び二層)を10mL容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素(富士フイルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用)5mLを正確に加え、蓋をしたのち、およそ30分に1回上下に振とうしながら2時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液2mLを10mL容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液(トルエン-d₈の二硫化炭素溶液、4mg/mL)50μLをマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

検量線用の標準溶液は、o-キシレン(純度98%以上、東京化成工業株式会社製)、m-キシレン(純度99%以上、同社製)およびp-キシレン(純度99%以上、同社製)を混合し、二硫化炭素で適宜希釈して0.5~100μg/mLの混合溶液として調製した。これらの溶液2mLに内部標準溶液50μLを添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

測定溶液および標準測定溶液を測定用バイアル(0.2mL MS-SPEC Sc-Vial, Thermo Fisher Scientific 社製)に移し、キャップ(PTFE/シリコン、スリット入り、同社製)

をしてガスクロマトグラフ (7890A GC & 5975C MSD、Agilent Technologies 社製) を用いて、以下の分析条件により測定した。

カラム: DB-5MS (20m×0.18mm, 膜厚 0.36µm, Agilent Technologies 社製)
オープン温度: 40°C (3.5分保持) -20°C/min -150°C (5分保持)
注入口温度: 220°C
注入方式: スプリット
スプリット比: 20:1
キャリアーガス: N₂
流速: 0.27 mL/min (定流量)
定量イオン (m/z): 91 (キシレン 3種)、98 (トルエン-d₈)

得られた各キシレン及びトルエン-d₈ の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件では m- および p- キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比 1:1 の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値および o- キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の六鹿元雄室長、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

B-3. ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析 (in vitro / organoid) :

<ヒト胎盤オルガノイド作製>

人工妊娠中絶もしくは出産した妊婦の胎盤(絨毛)組織を、患者の同意を得て採取し、英ケンブリッジ大学グループの方法 (Sheridan MA, et al. Nature Protocols. 2020) を基本手技にして独自の手法を加え胎盤オルガノイドを作製する。それぞれの胎盤組織マーカーによる免疫染色により胎盤オルガノイドが形成されていることを確認する。

<マウスの胎盤オルガノイド作製>

妊娠マウス(ICR マウス, E10.5)より胎盤を採取し、ヒトと同様に胎盤オルガノイドを作製する。

<メタボローム解析>

時間依存性、濃度依存性にモデル物質をオルガノイドに適用し、回収後、研究分担者が所属する大分大学に設置済みの GC-MS/MS 用の試料を作製し (GC-MS/MS QT8040, SHIMADZU)、SIMCA (SHIMADZU) ソフトによる多変量解析 (OPLS-DA 法)、RNA array 解析を行うことにより、メタボローム解析を行う。併せて、マウス胎盤オルガノイドについても同様な検討を行い、種差の検討も行う。

モデル物質として、サリドマイド (thalidomide 分子量: 258.23, CAS No.: 50-35-1、純度 98% 以上、ロット番号: 0485409-26、富士フイルム和光純薬(株) [製造元: Cayman Chemical Co.]) を使用した。

<胎盤の遺伝子発現プロファイリング>

マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージ毎の網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 2 ステージ (7.5dpc および 8.5dpc) 分を行う。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守する (大分大学では大分大学動物実験委員会承認 (2023 年 5 月 19 日 承認番号 232901) として実施する)。

他方、人を対象とする生命科学・医学系研

究の実施に際しては、ヒトの組織（胎盤）を対象とするため、大分大学倫理委員会承認研究（2022年12月12日 承認番号2432）として実施する。研究対象者（患者さん）へは丁寧に説明（文書による同意）を行う。臨床研究法をはじめ関連法令、学内規則等を忠実に遵守し、提供を受けた試料はすべて連結可能匿名化を行っている。個人と試料を結びつける対応表は情報管理者が厳重に管理するなど個人情報の取り扱いには最大限の配慮を行っていく。

C. 研究結果

C-1. 構成的手法に基づいた発生期の *in vitro* DNT 試験法の開発 (*in vitro*):

KronosHT を用いた DynaLux/c 法の開発に成功した。まず、KronosHT を用いて 72 時間以上のリアルタイムシフエレース計測を行ったところ、FGF シグナルは 2 回振動することを発見した。しかしながら、この振動の周期、ピークは計測ごとに異なることが明らかになった。数々の条件検討を行い、96 穴プレートに播種する以前の iPS 細胞の培養法を厳格に規定すること及び、96 穴プレートにおけるエッジ効果を抑制するためのガス透過性の不織レーヨン性のシールを用いて培養することにより、再現性のある波形パターンの取得に成功した。

KronosHT の導入により、シグナル計測条件が従来の 24 時間の定点観測（0、2、4、6、8、10、24 時間後）から 72 時間以上のリアルタイム計測へと改良され、測定時間及び時間解像度が上昇した。その結果、手動計測では FGF-SRF シグナルは 6 時間をピークとした一過性の活性を示すと考えられていたが、リアルタイム計測により 2 回ピークを示すことが明らかになった。従来法での 10 時間目から 24 時間目の間に 1 回目の振動の底があり、24 時間目の計測は 2 回目の振動のシグナルが上昇している途中を捉えていたことが明らかになった。また、振動の長さが 1 回目と 2 回目で異なることも判明した。

発生毒性陽性物質であるバルプロ酸ナトリウム（抗てんかん剤：DNT 陽性物質）、5-FU（抗がん剤）、陰性物質であるサッカリンナトリウム（人工甘味料）、シメチジン（ヒ

スタミン H₂ 受容体拮抗薬）の FGF-SRF シグナルかく乱作用を調べた。その結果、バルプロ酸は FGF-SRF シグナルの振動ピークにおいて 1 回目（5 時間前後）よりも 2 回目（30 時間前後）の方が強いかく乱作用を示すことが明らかになった。また、5-FU は濃度依存的にシグナルかく乱作用を示す時間が早まることが明らかになった。陰性物質はいずれもシグナルかく乱作用を示さなかった。

また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、OECD DNT-IVB 会議においては、現在、各神経発生過程に対応した *in vitro* 試験が 17 種類に絞られているが、この 17 試験をすべて実施するかは議論が続くようであり、現在、Case study を増やし、各試験の信頼性を確認している。一方、DNT 陽性対照物質の選定については、ラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文（Mundy M et al., 2015）に掲載された化学物質を精査した結果、97 化合物が掲載されており、その内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	17
医薬品	38
化学物質	42

C-2: 生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、吸入曝露実験と情動認知行動解析 (*in vivo*):

吸入曝露に向けた予備検討に手間取り、実施まで時間を要したが、吸入曝露を実施し、成熟後に情動認知行動解析を検討したところ、学習記憶異常が観察され、得られた脳サンプルについて神経科学的物証に基づく解析を実施中であり、引き続き、脳における網羅的遺伝子発現解析を検討する。

<吸入曝露実験>

雄性マウス（幼若期[2 週齢]）を対象とした 22 時間/日×7 日間反復曝露（3 用量、3 群構成、各群 8 匹）を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度 2 および 20ppm に対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、2.50±0.24（2.66～1.97 ppm）、20.26±0.35

(20.74~19.84 ppm) であり、ほぼ目標濃度下 (それぞれ 125 及び 101 %) にて吸入曝露を実施することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は 0.00 ± 0.00 ppm であった。

<情動認知行動解析>

マウスが成熟後 (12 週齢時) に情動認知行動解析を検討したところ、キシレン曝露群 (2、20 ppm) において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶あるいは音-連想記憶の低下 (学習記憶異常) が認められた。得られた脳サンプルについて神経科学的物証に基づく解析を実施中である。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

情動認知行動解析後の脳について、網羅的遺伝子発現解析を検討中である。予備検討として、対照群の成熟期マウス海馬サンプルを対象として、当方が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析により、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーである、Mtap2、Mapt (ニューロン)、Dcx (新生ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag、Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes 及び Sox2 (神経幹細胞) の各遺伝子について、その発現量の絶対値を求めることができた。

C-3: ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析 (in vitro / organoid) :

今年度は予定通り、ヒト胎盤オルガノイドとマウス胎盤オルガノイドを樹立することに成功した。

C-3-1: ヒトの胎盤オルガノイド作製 (in vitro / organoid) :

人工妊娠中絶もしくは出産した妊婦の胎盤 (絨毛) 組織を、患者の同意を得て採取し、胎盤オルガノイドを作製し、それぞれの胎盤組織マーカーによる免疫染色により胎盤オルガノイドが形成されていることを確認した。

C-3-2: マウスの胎盤オルガノイド作製

(in vitro / organoid) :

マウス胎盤オルガノイド作製: また令和 5 年度は妊娠マウス (ICR マウス) より胎盤を採取し、ヒトと同様に胎盤オルガノイドを作製した。マウス胎盤は絨毛膜と脱落膜が混在したラビリンス構造でその分離は困難であり、われわれの作製した胎盤オルガノイド構造も絨毛膜と脱落膜 (プロラクチン陽性) が一部混在したオルガノイドとなって作製された。

C-3-3: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物 (サリドマイド) 添加による培養液メタボローム解析 (metabolome analysis) :

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド (1 万個 \equiv 1 drop matrigel) にモデル薬物としてサリドマイド (0-200 μ M) を時間依存性 (0-48hr) に作用させたサンプリングが終了している。現在 GC-MS 用の試料を作成し、GC-MS/MS (QT8040, SHIMADZU) によるサンプル解析および LabSolutions Insight Biologics および SIMCA (SHIMADZU) ソフトによる多変量メタボローム解析 (OPLS-DA 法) を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用している GS-MS/MS 解析装置では約 460 種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される一次代謝産物は約 250 種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は 33 種でヒト胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は 13 種が確認された。このようにオルガノイド組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得られており今後、詳細に解析を行っていく。

C-3-4: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物 (サリドマイド) 添加による DNA 二重鎖切断活性の解析 (DNA double-strand breaks analysis) :

一方、細胞障害毒性の評価としてサリドマイド添加による DNA 二重鎖切断活性をわれわれが開発したパルスフィールド電気泳動法により解析を行い、再現性の確認作業を継続中である。

C-3-5: LC-MS による培養上清中のサリドマイドおよびその代謝産物 5- or 5' - hydroxythalidomide の測定 :

添加 24 時間後の培養上清中の thalidomide は 95% 以上が代謝されており、我々の確立したミニ胎盤は十分な薬物分解酵素活性を維持していることが判明している。現在さらに種差においてその代謝活性の相違について検討している。

C-3-6: 発生ステージごとのマウス胎盤の網羅的遺伝子発現解析 (国立医薬品食品衛生研究所)

7.5dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性であり、8.5dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性であった。7.5dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取した。また、8.5dpc においては、8 匹、9 匹及び 7 匹の正常発生胚の採取を行った。また、これらの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Clontech 社の SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit を選択し、来年度にシーケンスを行う予定である。

D. 考察と結論

令和 5 年度 (初年度) は、I) 発生期の in vitro DNT 評価手法の開発に向け、従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72 時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得が可能となった。また、従来の 24 時間計測では明らかにできなかったバルプロ酸の 24 時間以降の大きなシグナルかく乱作用を発見した。バルプロ酸は HDAC 阻害剤としても知られており、ヒストンの脱アセチル化を阻害することで転写を活性化するエピジェネティック作用が知られている。この結果は、DNT の発生毒性発現機序にはエピジェネティック毒性も関与する可能性が示唆された。一方で、数日

間のリアルタイム計測が可能となったことで、データ量が増え、シグナルかく乱作用の算出法は様々な視点で解析が可能になるなど複雑化した。次年度は神経幹細胞を用いた、DynaLux/c を開発すると共にシグナルかく乱作用の算出法に関しても取り組む予定である。

DNT 陽性物質リストについては、ラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文から 97 化合物が抽出され、また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、各神経発生過程に対応した in vitro 試験は、現在、17 種類に絞られているが、各試験の信頼性については確認中であることが明らかとなった。

II) 生後発達期 DNT の分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン (0、2 および 20ppm) につき幼若期反復吸入曝露実験を行い (それぞれ測定値の平均±標準偏差は、2.50±0.24、20.26±0.35 であり、それぞれ 125 及び 101 % とほぼ目標濃度下にて実施できた)、成熟後に 3 種類の試験により情動認知行動解析を実施したところ、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、キシレン曝露群において有意な差は認められなかった。他方、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、キシレン 2ppm 曝露群では音-連想記憶の低下が、キシレン 20ppm 曝露群では空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められた。すなわち、生後発達期におけるキシレンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に学習・記憶に影響を与えることが示唆された。あわせて、神経樹状突起・神経細胞・グリア細胞マーカー等を用いた、神経科学的物証に基づく解析を実施中であり、得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析及び毒性関連性を検討する。吸入曝露に向けた予備検討に手間取り、実施まで時間を要したが、来年度早々に検討予定である。

そして III) ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析に向けては、ヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを樹立

することに成功し、当初の予定を完遂できたと考えている。先行論文に比較して効率的にかつ簡易にヒト胎盤を樹立することができた。再現性・継代も半年にわたって10回以上継代を安定的に管理することが可能となった。また、マウスにおいても同様にマウス専用のサプリメントを調整し、マウス胎盤オルガノイド用組織（ラビリンス構造）の構築を樹立した。特にマウス胎盤オルガノイド樹立は現在までに報告例もなくわれわれの樹立が世界でいち早く行われているもの推定される。今後はさらにオルガノイド組織の精度を高めるとともに、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のためモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点から研究を深めていく。加えて、C57BL/6 マウスの発生ステージごと（受精後7.5日、8.5日目）の胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行なった。

以上、各試験法の最適化をはじめ、ほぼ予定通りに進捗した。来年度（令和6年度）は、*in vitro* DNT 評価手法の開発に向けた調整・改良を、令和7年度は、新規 DNT 評価手法の提案を行う予定である。

本検討により、ヒトへの外挿性を考慮した、迅速で低コスト、省動物に資する新規 *in vitro* DNT 評価手法（動物実験代替法）の開発につながる事が期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の *in vitro* 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, [Satoshi Kitajima](#), Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156
[doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, [Satoshi Kitajima](#), Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based *in vivo* lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(3): 105-115.
[doi.org/10.2131/jts.49.105]

[Hirokatsu Saito](#), Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, [Satoshi Kitajima](#), Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17:1239808.
[doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]

[Hirokatsu Saito*](#), Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, [Satoshi Kitajima](#) (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210.
[doi.org/10.2131/jts.48.203]

[Makiko Kuwagata](#), Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, [Satoshi Kitajima](#): A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82.
[doi.org/10.2131/fts.10.69]

Takahiro Sasaki*, [Hirokatsu Saito*](#), Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, [Satoshi Kitajima](#), Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 211-219.
[doi.org/10.2131/jts.48.211]

五十嵐智女、[西村拓也](#)、[北嶋聡](#): 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻 885 号 (73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)

[齊藤洋克](#): 農薬等の化学物質曝露によって生じる情動認知行動毒性, *Jpn J Clin*

Toxicol, 37, 70-75, 2024

齊藤洋克、北嶋 聡：化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出、化学物質と環境：化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024

○大久保佑亮、福田淳二：生細胞ルシフェラーゼアッセイを用いた FGF シグナルかく乱作用解析による発生毒性評価 生化学みにれびゅう 第95巻第2号, pp.1-6 (2023)

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56.
[doi.org/10.2131/fts.11.37]

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. *Toxicology Letters*. Vol384. S88-S89,2023.

西田欣広、花田克浩. DNA 二重鎖切断と婦人科関連の問題. *BIO Clinica*. 38(9).54-58.2023.

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡：生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡、新型反復ばく露実験によるPFOAの毒性発現分析 - Clofibrateの網羅的エピジェネティック情報を参照して-、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

Toshime Igarashi, 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, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed 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)

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

齊藤洋克：発生-発達期の化学物質ばく露による情動認知行動毒性の検出と課題 第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19、横浜)

齊藤洋克：ネオニコチノイド系農薬ばく露による雄マウスの情動認知行動解析、第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.21、横浜)

齊藤洋克：農薬等の化学物質ばく露によって生じる情動認知行動毒性 第45回日本中毒学会総会・学術集会(2023.7.15、さいたま)

○大久保佑亮:「ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用のダイナミクスに基づく発生毒性試験法の開発」。幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム 2023 年度年会「多能性幹細胞を用いた薬剤安全性評価への挑戦と課題」特別講演 (2023.6.2)

○大久保佑亮:「シグナルかく乱作用のダイナミクスに基づくヒト発生毒性の評価法とその発達神経毒性への応用」。第 63 回日本先天異常学会学術集会「若手ピックアップシンポジウム」。2023 年 7 月 29 日

○大久保佑亮:「生細胞リアルタイム発光システムを用いた高精度・ハイスループットな新規発生毒性試験法」。AMED キャタリストユニット 第 11 回 Top Runners in TRS。2023 年 8 月 22 日

○Okubo Y., Mizota K., Shibata M., Ohara R., Kitajima S., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: DEVELOPMENTAL TOXICITY TEST USING HUMAN IPS CELLS BASED ON SIGNAL DISRUPTIONS INDUCED BY CHEMICAL SUBSTANCES. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, Canada. (Aug. 30, 2023).

○Yusuke Okubo: 「Developmental toxicity detection via dynamics of FGF-SRF signal disruption in human iPSC-based assay」。13TH Global Summit on Regulatory Science (GSR23) In-Person Annual conference. Sep. 27, 2023.

○大久保佑亮:「シグナルかく乱のリアルタイム計測を基にした in vitro 発生毒性試験」。第 9 回 日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウムレギュラトリーサイエンスにおける動物試験代替法の発展～細胞培養技術の進化と展望～。2023 年 12 月 6 日

○大久保佑亮:「シグナルかく乱作用のダイナミクスを基にした in vitro 発生毒性試験法」。「生殖発生毒性試験代替法の現状」シンポジウム。主催：基礎研究部会 安全性評価技術課題対応チーム・代替法課題検討タスクフォース。2024 年 2 月 8 日

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

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

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljubljana, Slovenia.(2023.9.10)

○西田欣広、井上尚美、佐藤初美、衛藤聡、胎盤オルガノイド（ミニ胎盤）によるメタボローム解析、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会(2023.5.12)

○井上尚美、西田欣広、河野康志、ヒト胎盤における低酸素環境下での代謝変化についての検討、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会(2023.5.12)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 特許第 7134462 号・発明の名称: 胚の評価法・発明者: 西田欣広・特許権利者: 大分大学・登録日: 2022 年 9 月 2 日.

2) 特願 2023-067387, 発明の名称: ヒトオルガノイド様組織作成法・発明者: 西田欣広、他 1 名・特許権利者: 大分大学

3) 特願 2023-067391, 発明の名称: ヒ

トオルガノイド様組織培養液・発明者：西田欣広、他1名・特許権利者：大分大学

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

今年度は、この発達期DNTの目的達成に向け、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)における対照群(成熟期マウス海馬)をサンプルとして用いた。そして、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析により、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーとして、Mtap2、Mapt(ニューロン)、Dcx(新生ニューロン)、Gfap(アストロサイト)、Mag、Mbp(オリゴデンドロサイト)、Nes、Sox2(神経幹細胞)の各遺伝子を抽出し、その発現を確認した。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期に分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる。

発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。

本分担研究では、モデル揮発性物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露し、中枢神経系への影響を誘発したマウス脳サンプルの網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織(脳)を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し、左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の4部位に分離後、各々別チューブに採取した。その後、RNA抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除い

た後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合でSpike cocktail(Bacillus由来RNA 5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100 ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

遺伝子発現変動解析

全RNA 5 µgを取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7プロモーターが付加したオリゴdTプライマーを用いて逆転写しcDNAを合成し、得たcDNAをもとに第二鎖を合成し、二本鎖DNAとした。次にT7 RNAポリメラーゼ(ENZO社キット)を用い、ビオチン化UTP、CTPを共存させつつcRNAを合成した。cRNAはアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500 bpとなるよう断片化し、GeneChipターゲット液とした。GeneChipにはMouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは45℃にて18時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin(PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。また、得られた遺伝子リストと既知情報の照合による確認は、Ingenuity Pathways Analysis(IPA)(Ingenuity Systems Inc.)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果及び考察

先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)の対照群である成熟期雄性マウス(C57BL/6J)の海馬における網羅的遺伝子発現解析の結果、中枢神経系に関わる遺伝子から、海馬

における各細胞の分化マーカーとして、Mtap2と Mapt (ニューロン)、Dcx (新生ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、MagとMbp (オリゴデンドロサイト)、NesとSox2 (神経幹細胞) の各遺伝子を抽出し、その発現が確認された (図1)。次年度、モデル揮発性物質による吸入曝露試験において取得したサンプルについて、抽出した候補遺伝子を中心に、関連する分子に着目した遺伝子発現変動解析およびその比較を行う予定である。

D. 結論

今回の検討により、DNTに関与すると考えられる中枢神経系の各細胞の分化マーカーとして利用可能な遺伝子について、その発現を成熟期の対照群において安定して検出できることを確認できた。今後、生後発達期DNTの分子機序解明に向け、吸入曝露実験および情動認知行動解析で行われた結果に基づき、上記分化マーカーとそれに関連するシグナルネットワークへの影響を検討する。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156
[doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci*. 2024; 49(3): 105-115.
[doi.org/10.2131/jts.49.105]

Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure

in early-life. *Front. Neurosci*. 2023; 17:1239808.
[doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]

Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(4): 203-210.
[doi.org/10.2131/jts.48.203]

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci*. 2023; 10: 69-82.
[doi.org/10.2131/fts.10.69]

Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(4): 211-219.
[doi.org/10.2131/jts.48.211]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻 885 号 (73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)

齊藤洋克、北嶋 聡: 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境: 化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci*. 2024; 11(1): 37-56.
[doi.org/10.2131/fts.11.37]

菅野純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第2章 複合曝露に

よる毒性の評価手法 第1節, 医歯薬出版 (東京)
[ISBN: 978-4-263-73220-5]

2023年9月26日

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

菅野純, 相崎健一, 小野竜一, 北嶋 聡、新型反復ばく露実験による PFOA の毒性発現分析 - Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して-, 第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

Toshime Igarashi, 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.

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、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)

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako 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

北嶋 聡: トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第1回付加体科学部会研究会 2023、岡山、

北嶋 聡: 分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第9回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、2023年10月27日

北嶋 聡: 職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第38回日本健康科学学会学術大会、東京、2023年12月2日

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

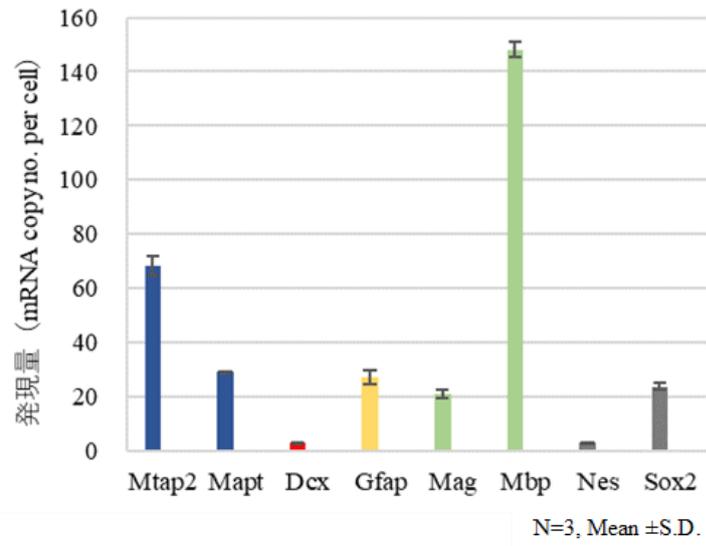


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「吸入曝露実験の実施」

研究分担者	西村 拓也	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	六鹿元雄	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	藤原恒司	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

本分担研究では、この発達期DNTにおける目的の達成に向け、生後発達期の雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施した。その結果、吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度2および20ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 2.50 ± 0.24 (2.66～1.97ppm)、 20.26 ± 0.35 (20.74～19.84ppm)であり、ほぼ目標濃度で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、化学物質曝露による胎生期あるいは生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害作用と説明される。神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、この評価に向けた、より迅速で、低コスト、かつ省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。特に発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな課題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群(SH)に関連する動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてモデル化学物質の吸入曝露により、成熟後にDNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳の海馬領域の網羅的遺伝子発現変動解析により、それらの影響をシグナルネットワークとして検出してきた。これら独自技術を用いることで、発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

本分担研究では、この目的の達成に向け、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常を誘発したモデル動物作出のため、生後発達期(幼若期、2週齢)の雄性マウスを対象とし、先行研究での条件に基づいた22時間/日×7日間反復曝露実験(3用量、3群構成、各群8匹)を実施する。

B. 研究方法

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

雄性マウス(幼若期、2週齢)を対象とした22時間/日×7日間反復曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施した。実験スケジュールの概要は図1に示した。幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を行った。

今年度(令和5年度)のモデル物質はキシレン(xylene)；分子量：106.17、CAS No.：1330-20-7)とし、試薬として下記のものを使用した。

・キシレン(カタログ番号：244-00081、特級、85% (o-, m-, p-キシレンの含量)、ロット番号：ACG4493、富士フィルム和光純薬(株))

キシレンの曝露濃度は先行研究に基づき、2および20 ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が0.20 ppm(→H31年1月17日以降、0.05 ppmに変更された)であることから、この指針値のそれぞれ40および400倍程度ということとなる。

<曝露濃度設定根拠>

1)キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.20 ppm(→H31年1月17日以降、0.05 ppmに変更された)である。これを受け、先行研究ではSHレベルの10倍程度の濃度(2 ppm)を含む吸入曝露群を設定し実験を実施しており、今回の実験での低濃度とすることで、先行研究におけるデータとのブリッジングを考慮した。2)また、同様に先行研究にて文献調査した、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験結果から、ラットの3ヶ月間(6時間/日)吸入曝露(m-キシレン：100、50、0 ppm)では、50 ppm以上の濃度で痛覚の感受性増加が観察され(Korsakら、1994)、またラットの90日間(6時間/日)吸入曝露(o-キシレン：78、0 ppm)では、56日目に1例の死亡が観察(Jenkinsら、1970)されている。なお、ラットの13週間(6時間/日)吸入曝露(o-キシレン：810、460、180、0 ppm)では、異常なしとする報告がある(Carpenterら、1975)。情動認知行動解析を考慮すると、マウスではなくラットの場合の報告ではあるが、痛覚の感受性増加が認められる50 ppm以下の濃度が望ましく、また、生後発達期への曝露であることも考慮し、「我々の先行研究における濃度設定において観察された影響、および文献調査に基づき、長期吸入曝露実験においても一般状態に異常が認められない条件」、という観点から、本実験でのキシレンの濃度設定を行った。

この実験部分は、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の齊藤洋克研究員、菅康佑氏、横田理主任研究官の協力を仰いだ。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、キシレンをバブリングし気化させる方法により行った。

キシレン濃度は、捕集管（チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号：080150-0532、柴田科学（株））を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ22時間とした。捕集管の曝露1回当たりの使用本数は、対照群および投与群は各濃度とも2本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ30NⅡおよびMP-Σ300NⅡ、柴田科学株式会社製）を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したキシレンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を10mL容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フィルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mLを正確に加え、蓋をしたのち、およそ30分に1回上下に振とうしながら2時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液2mLを10mL容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液（トルエン-d₈の二硫化炭素溶液、4mg/mL）50μLをマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

検量線用の標準溶液は、o-キシレン（純度98%以上、東京化成工業株式会社製）、m-キシレン（純度99%以上、同社製）およびp-キシレン（純度99%以上、同社製）を混合し、二硫化炭素で適宜希釈して0.5~100μg/mLの混合溶液として調製した。これらの溶液2mLに内部標準溶液50μLを添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

測定溶液および標準測定溶液を測定用バイアル（0.2mL MS-SPEC Sc-Vial, Thermo Fisher Scientific 社製）に移し、キャップ（PTFE/シリコーン、スリット入り、同社製）をしてガスクロマトグラフ（7890A GC&5975C MSD, Agilent Technologies 社製）を用いて、以下の分析条件により測定した。

カラム：DB-5MS（20m×0.18mm、膜厚0.36μm、Agilent Technologies 社製）
オープン温度：40°C（3.5分保持）-20°C/min-150°C

（5分保持）

注入口温度：220°C

注入方式：スプリット

スプリット比：20：1

キャリアーガス：N₂

流速：0.27 mL/min（定流量）

定量イオン（m/z）：91（キシレン3種）、98（トルエン-d₈）

得られた各キシレン及びトルエン-d₈の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件ではm-およびp-キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比1：1の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値およびo-キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の六鹿元雄室長、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果及び考察

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

令和5年度（今年度）は予定通りキシレン（0、2、20 ppm）（2および20 ppmはそれぞれ現在の指針値の40および400倍程度の濃度）について、雄性マウス（幼若期、2週齢）を対象とした22時間/日×7日間反復曝露（3用量、3群構成、各群8匹）を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度2および20 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、2.50±0.24（2.66~1.97 ppm）、20.26±0.35（20.74~19.84 ppm）であった（図2）。

D. 結論

令和 5 年度（今年度）は、キシレンについて、情動認知行動解析のための吸入曝露実験として、目標曝露濃度下、22 時間/日×7 日間反復曝露を実施した。その結果、それぞれ目標曝露濃度にて、マウスに安定して吸入曝露することができた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota; A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system, J Appl Toxicol, 44(5), 784-793, doi: 10.1002/jat.4584. Epub 2024 Jan 23.

西村拓也、ICH-S11 ガイドラインの WoE アプローチにおける考慮事項, Pharm Tech Japan, 40(3)、103-105、2024

西村拓也、西村次平、伊藤かな子、高橋祐次、医薬品開発における非臨床安全性評価の変遷、日本獣医史学雑誌第 61 号、41-58、2024

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡：細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向、食品衛生研究, 2023, 73 巻 12 号, [ISSN: 0559-8974]

2. 学会発表（抜粋）

Toshime Igarashi, 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.

Takuya Nishimura, Kazushige Maki, Kiyoshi Kinoshita, Mutsumi Suzuki, Takahiro

Nakazawa, Misaki Naota, Fumito Mikashima, Yoko Hirabayashi; The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan, 2024 Society of Toxicology, Salt Lake City on 10-14 March 2024

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

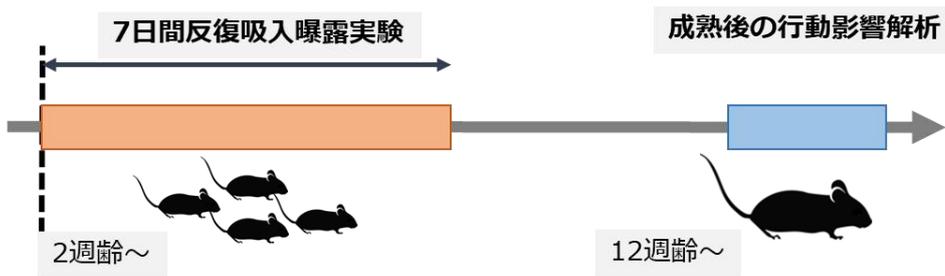
なし

3. その他

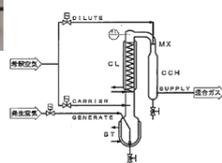
なし

【実験スケジュールの概要】

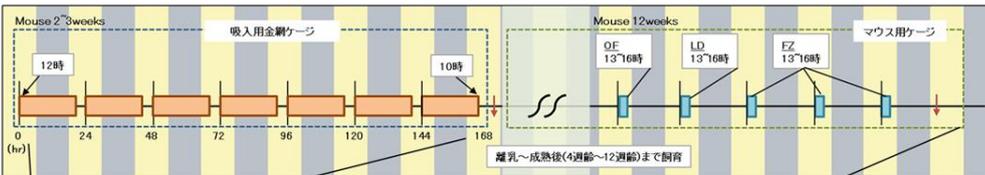
Control: 0ppm
 Xylene: 2 and 20ppm
 ※ (室内濃度指針値 : 0.05ppm)
 Animals: C57BL/6N mice



ガス発生装置と横層流方式吸入曝露チャンバー



22時間/日×7日間 幼若期吸入曝露スケジュール



2-3weeks inhalation



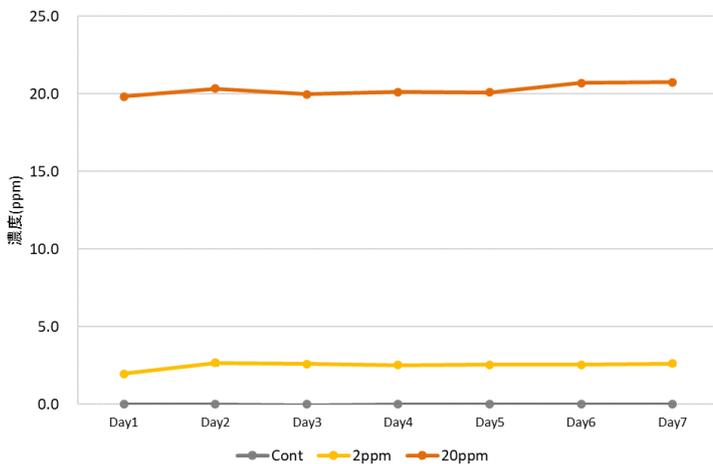
哺乳期であるため
 幼若期マウス(産仔)と
 母マウスを吸入網ケージに収容

成熟後に情動認知行動解析



図1 実験スケジュールの概要

キシレン曝露濃度の推移



1週間のキシレン曝露平均

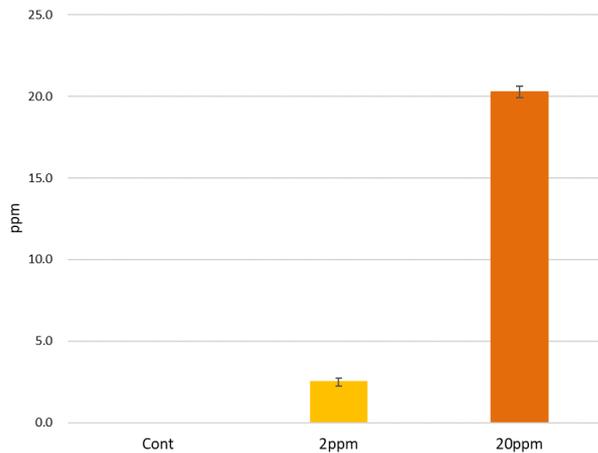


図2 キシレン曝露濃度の測定結果：情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露 (平均値±標準偏差)

令和 5 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究課題：「DNT陽性物質選定、及び、国際標準化に向けた情報収集」

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

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。

本研究では新規評価手法の開発を目的として、発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的なin vitro試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定することも加味した。

DNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題であることから、分担研究として、DNT陽性物質の選定、および国際標準化に向けた情報収集を行った。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)に関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題であることから、DNT陽性物質の選定、および国際標準化に向けた情報収集を行った。

B. 研究方法

情報収集として、OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議および続いて同メンバーにて開催されたNeurotoxicity Conferenceへ出席し、情報収集を行った(2023年5月19日~26日、ダーラム、北米)。この専門家会議は、EFSAおよびEPAが主体となってin vitro手法によるDNT評価方法の確立を目的としている。

DNT陽性対照物質の選定は、欧米リスク評価機関の報告書及び科学論文を調査した。その中から今年度はラットを用いた動物実験によりDNT陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された化学物質を精査した。

(倫理面への配慮)

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. 研究結果および考察

1. OECDの動向

OECD DNT-IVB会議には、EFSAおよびEPA関係者、またin vitro試験開発に携わった大学及び企業関係者が出席した。ハイブリッドで開催され、約60名が参加した。現在、各神経発生過程に対応したin vitro試験が17種類に絞られている。この17試験をすべて実施するかは議論が続くようである。現在、Case studyを増やし、各試験の信頼性を確認している。

OECD-IVB文書にはゼブラフィッシュは含まれていないが、ゼブラフィッシュは試験実施条件について議論が必要のため、引き続き、検討することになった。なお、最新のOECD DNT-IVB文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental

Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.] は、OECD の HP にて公開されている (url: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/developmental-neurotoxicity.htm>) (添付資料 1)。

2. DNT陽性対照物質の選定

ラットを用いた動物実験によりDNT陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された化学物質を精査した。

Expanding the test set: Chemicals with potential to disrupt mammalian brain development. Mundy WR. *et al.* (Neurotoxicology and Teratology, 52, 25-35, 2015)。

97化合物が掲載されており、その内訳は下記の通り。

農薬	17
医薬品	38
化学物質	42

現在、DNT-IVBにて選抜された17試験の実施状況についても追記した (表1)。

D. 結論

In vivo およびin vitroのDNT分野の情報収集を行った。その結果、OECDではin vitro DNT試験バッテリーの構築を試みていたが、まだ、結論に至るには時間を要するようである。また、公表されている科学論文からDNT陽性対照物質の精査を行った。

DNT-IVB文書にもDNT陽性対照化合物の掲載があることから、引き続き、継続して精査を続ける予定である。

E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

F. 研究発

- 論文発表
なし

2. 学会発表

国際学会

- 1) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki,

Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EURO-TOX2023. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア

国内学会

- 2) 桑形麻樹子：精漿を介した催奇形性発現の可能性 第 50 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30) 横浜
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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、西村拓也、桑形麻樹子、北嶋聡：フードテックを応用した細胞培養食品を含む「新規の食品」の安全性確保に関する諸外国の制度比較と最近の動向. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-21) 横浜
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

令和5年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（23KD1003）
達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「In vitro DNT 評価手法の開発」

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTのin vitro試験法が開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる。本分担研究課題は、そのうちの発生期のin vitro試験法の開発であり、独自開発したヒトiPS細胞を用いたin vitro発生毒性試験法(DynaLux/c)のDNT試験への改良を目的とする。DynaLux/cは、まず、FGFシグナルレポーター導入ヒトiPS細胞を、96穴プレートに播種し、被験物質によるFGF誘導性のSRFシグナル影響を、24時間計測する。次に、溶媒対照に対する各物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC曲線解析によって閾値を設定する。適用実験後、その正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、化学物質のシグナルかく乱作用を評価する。

本年度の研究では、DynaLux/cのスループット性と再現性を高めるために、リアルタイム自動計測法への改良を試みた。従来の生細胞FGFシグナル計測は、実験者がCO₂インキュベーターにおいて96穴プレートで培養している細胞を計測ごとにルミノメーターに設置し、測定後にCO₂インキュベーターに戻すという手作業で計測を行っていた。この手法は、定点観察であるため、特に夜間のシグナルかく乱作用を正確に計測できないこと、及び、細胞の移動によるiPS細胞への物理的影響が課題であった。事実、従来法では夜間の不自然な波形や標準偏差の大きさがみられている。そこで、今年度は96穴プレートで細胞を培養しながら発光測定が可能なKronosHT(ATTO社)を本試験系に導入し、スループット性と再現性を向上させた。

A. 研究目的

本研究では、DNT を発生期と生後発達期とに分け、2 つの独自技術による課題の解決を試みる。本分担研究課題は、そのうちの発生期の *in vitro* 試験法の開発であり、独自開発したヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法(DynaLux/c)の DNT 試験への改良を目的とする。

従来の生細胞ルシフェレースアッセイ法を用いた FGF-SRF シグナル計測は、実験者が CO₂ インキュベーターにおいて 96 穴プレートで培養している細胞を計測ごとにルミノメーターに設置し、測定後に CO₂ インキュベーターに戻すという手作業で計測を行っていた。この手法は、定点観察であるため、特に夜間のシグナルかく乱作用を正確に計測できないこと、及び、細胞の移動による iPS 細胞への物理的影響が課題であった。事実、従来法では夜間の不自然な波形や標準偏差の大きさがみられている。

本年度の研究では、DynaLux/c の正確性やスループット性、再現性を高めるために、リアルタイム自動計測法への改良を試みた。

B. 研究方法

これまでに我々は、胚発生過程において重要な役割を果たすシグナルとして FGF シグナルについて検討し、その下流で発現する血清応答因子 (serum response factor : SRF) の応答配列下で NanoLuc (Nluc) を発現する FGF-SRF シグナルレポーターコンストラクトを作製した。それをヒト iPS 細胞のゲノム上のセーフハーバー領域の一つである AAVS1 領域に CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックインし、SRF シグナルレポーター-iPSCs 株を樹

立した。本研究では、FGF-SRF シグナル計測を自動化するために、細胞培養をしながらリアルタイム発光計測が可能な KronosHT (ATTO 社) を導入した。KronosHT を用いて、FGF-SRF シグナル計測法を最適化すると共に、数種の発生毒性物質を用いてその正確性を検証した。

C. 研究結果及び考察

KronosHT を用いた DynaLux/c 法の開発に成功した。まず、KronosHT を用いて 72 時間以上のリアルタイムルシフェレース計測を行ったところ、FGF シグナルは 2 回振動することを発見した。しかしながら、この振動の周期、ピークは計測ごとに異なることが明らかになった。数々の条件検討を行い、96 穴プレートに播種する以前の iPS 細胞の培養法を厳格に規定すること及び、96 穴プレートにおけるエッジ効果を抑制するためのガス透過性の不織レーヨン性のシールを用いて培養することにより、再現性のある波形パターンの取得に成功した。

KronosHT の導入により、シグナル計測条件が従来の 24 時間の定点観測 (0、2、4、6、8、10、24 時間後) から 72 時間以上のリアルタイム計測へと改良され、測定時間及び時間解像度が上昇した。その結果、手動計測では FGF-SRF シグナルは 6 時間をピークとした一過性の活性を示すと考えられていたが、リアルタイム計測により 2 回ピークを示すことが明らかになった。従来法での 10 時間目から 24 時間目の間に 1 回目の振動の底があり、24 時間目の計測は 2 回目の振動のシグナルが上昇している途中を捉えていたことが明らかになった。また、振動の長さが 1 回目と 2 回目で異なることも

判明した。

本法を用いて、発生毒性陽性物質であるバルプロ酸ナトリウム(抗てんかん剤：**DNT陽性物質**)、5-FU(抗がん剤)、陰性物質であるサッカリン ナトリウム(人工甘味料)、シメチジン(ヒスタミン H₂受容体拮抗薬)のFGF-SRFシグナルかく乱作用を調べた。その結果、バルプロ酸はFGF-SRFシグナルの振動ピークにおいて1回目(5時間前後)よりも2回目(30時間前後)の方が強くかく乱作用を示すことが明らかになった。また、5-FUは濃度依存的にシグナルかく乱作用を示す時間が早まることが明らかになった。陰性物質はいずれもシグナルかく乱作用を示さなかった。

D. 結論

発生期の *in vitro* DNT 評価手法の開発に向け、従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得が可能となった。また、従来の24時間計測では明らかにできなかったバルプロ酸の24時間以降の大きなシグナルかく乱作用を発見した。バルプロ酸はHDAC阻害剤としても知られており、ヒストンの脱アセチル化を阻害することで転写を活性化するエピジェネティック作用が知られている。この結果は、DNTの発生毒性発現機序にはエピジェネティック毒性も関与する可能性が示唆された。一方で、数日間のリアルタイム計測が可能となったことで、データ量が増え、シグナルかく乱作用の算出法は様々な視点で解析が可能になるなど複雑化した。次年度は神経幹細胞を用いた、DynaLux/cを開発すると共にシグナルかく乱作用の算出法に関しても取り組む

予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

大久保 佑亮、福田 淳二：生細胞ルシフェラーゼアッセイを用いた FGF シグナルかく乱作用解析による発生毒性評価 生化学みにれびゅう 第 95 巻第 2 号, pp. 1-6 (2023)

2. 学会発表

大久保 佑亮：「ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用のダイナミクスに基づく発生毒性試験法の開発」, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム 2023 年度年会「多能性幹細胞を用いた薬剤安全性評価への挑戦と課題」特別講演 2023 年 6 月 2 日

大久保 佑亮：「シグナルかく乱作用のダイナミクスに基づくヒト発生毒性の評価法とその発達神経毒性への応用」, 第 63 回日本先天異常学会学術集会「若手ピックアップシンポジウム」, 2023 年 7 月 29 日

大久保 佑亮：「生細胞リアルタイム発光システムを用いた高精度・ハイスループットな新規発生毒性試験法」, AMED キャタリストユニット 第 11 回 Top Runners in TRS, 2023 年 8 月 22 日

Okubo Y., Mizota K., Shibata M., Ohara R., Kitajima S., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: DEVELOPMENTAL TOXICITY TEST USING HUMAN IPS CELLS BASED ON SIGNAL

DISRUPTIONS INDUCED BY
CHEMICAL SUBSTANCES. 12th World
Congress on Alternatives and Animal Use in
the Life Sciences (WC12), Niagara Falls,
Canada. (Aug. 30, 2023).

Yusuke Okubo: 「Developmental toxicity
detection via dynamics of FGF-SRF signal
disruption in human iPSC-based assay」.
13TH Global Summit on Regulatory Science
(GSRS23) In-Person Annual conference.
Sep. 27, 2023.

大久保 佑亮:「シグナルかく乱のリアルタ
イム計測を基にした in vitro 発生毒性試験」.
第 9 回 日本医療研究開発機構レギュラ
トリーサイエンス公開シンポジウムレギュラ
トリーサイエンスにおける動物試験代替法
の発展～細胞培養技術の進化と展望～.
2023 年 12 月 6 日

大久保 佑亮:「シグナルかく乱作用のダイ
ナミクスを基にした in vitro 発生毒性試験
法」.「生殖発生毒性試験代替法の現状」シン
ポジウム. 主催：基礎研究部会 安全性評価
技術課題対応チーム・代替法課題検討タス
クフォース. 2024 年 2 月 8 日

F. 知的所有権の取得状況
該当なし

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動解析と神経科学的物証の収集」

研究分担者 齊藤 洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。

発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

本分担研究では、この目的の達成に向け、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を検討した。令和5年度(今年度)は予定通り、キシレン(0、2、20 ppm)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施した。そして、マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を実施した。その結果、キシレン曝露群(2、20 ppm)において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶あるいは音-連想記憶の低下(学習記憶異常)が認められた。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後(遅発性)の影響として、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常を誘発することが確認され、キシレンの生後脳発達への有害性が示唆された。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。ヒトを含む哺乳類において、発生-発達期は神経シグナルの厳密な制御の下、脳の神経回路網が形成される重要な時期である。そのため、外因性の化学物質の曝露によって、その制御シグナルがかく乱され、発達中の神経毒性や、成熟後の脳高次機能への悪影響が懸念される。

神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、この評価に向けた、より迅速で、低コスト、かつ省動物に資する新規評価手法の開発が急務であり、特に発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな課題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群に関連する動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてモデル化学物質の吸入曝露により、成熟後にDNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出している。また、脳の海馬領域の網羅的遺伝子発現変動解析により、それらの影響をシグナルネットワークとして検出してきた。

本分担研究では、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することによって、成熟後の中枢神経系への遅発影響を検討し、当該物質の脳発達への影響を把握する事を目的とし、将来的な *in vitro* 試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

B. 研究方法

生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、キシレン吸入曝露による情動認知行動解析：

生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究の条件に基づいた22時間/日×7日間反復曝露のプロトコルにより実施した。曝露濃度は、先行研究に基づき、長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度として設定した。また、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を実施した。この時期は、シナプスの刈り込みによる神経回路の調整がなされる時期と考

えられている。

吸入曝露終了後、マウスが成熟後(12週齢時)に自発運動量、情動行動、学習記憶能に着目し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験からなる行動試験バッテリーを実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果及び考察

令和5年度(今年度)は予定通り、キシレン2および20ppm(それぞれ現在の指針値の40倍、400倍程度の濃度)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコルにより実施し、成熟後(12週齢時)に情動認知行動を3種類の試験により解析した。行動解析の結果、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、コントロール群と比較して、キシレン曝露群において有意な差は認められなかったが(図1、2)、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、キシレン2ppm曝露群では音-連想記憶の低下が、キシレン20ppm曝露群では空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められた(図3)。すなわち、生後発達期におけるキシレンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に学習・記憶に影響を与えることが示唆された。

D. 結論

令和5年度(今年度)、キシレン(0、2、20ppm)について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、キシレン2ppm曝露群においては条件付け学習記憶試験における音-連想記憶の低下が、キシレン20ppm曝露

群においては空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められ、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。本行動試験バッテリーでの変化の比較を、コントロール群における各試験項目の平均値を100%とした場合の、曝露群における平均値の逸脱度を示すレーダー図として示す(図4)。

今回の結果から、キシレンの生後発達期における曝露により、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常が誘発されることを確認できたため、今後、生後発達期DNTの分子機序解明に向け、神経樹状突起・神経細胞・グリア細胞マーカー等を用いた、神経科学的所見による中枢影響の確認を行う。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito H, Yokota S, Kitajima S. Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem* 125(5), 152046, 2023, doi: 10.1016/j.acthis.2023.152046.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci* 17, 1239808, 2023, doi: 10.3389/fnins.2023.1239808.

齊藤 洋克 : 農薬等の化学物質曝露によって生じる情動認知行動毒性, *Jpn J Clin Toxicol*, 37, 70-75, 2024

齊藤 洋克, 北嶋 聡 : 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, *化学物質と環境 : 化学物質と環境との調和をめざす情報誌*, 184, 3-6, 2024

2. 学会発表 (抜粋)

齊藤洋克 : 発生-発達期の化学物質ばく露による情動認知行動毒性の検出と課題 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19、横浜)

齊藤洋克 : ネオニコチノイド系農薬ばく露による雄マウスの情動認知行動解析 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21、横浜)

齊藤洋克 : 農薬等の化学物質ばく露によって生じる情動認知行動毒性 第45回日本中毒学会総会・学術集会 (2023.7.15、さいたま)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

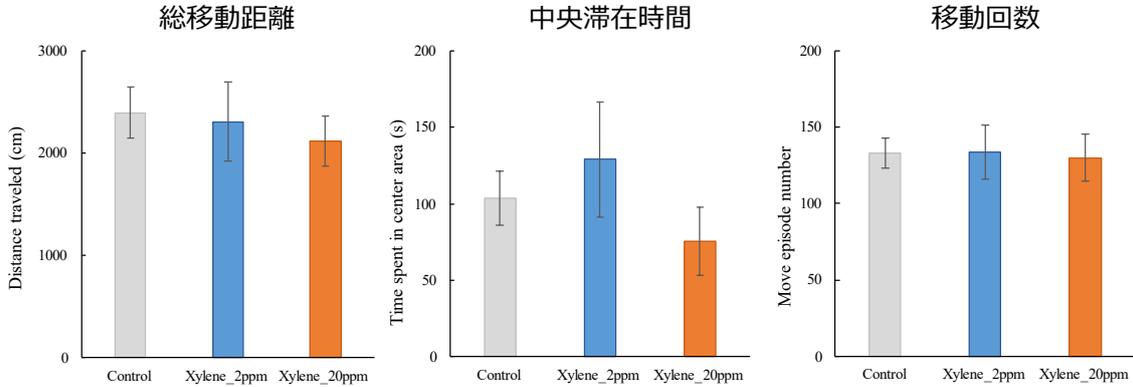
**22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露
オープンフィールド試験結果**

測定時間: 10分

OF

検定項目

- ・ OF-DIS: 総移動距離
- ・ OF-C-TIME: 中央滞在時間
- ・ OF-N: 移動回数

N=8, Mean ± S.E., P value (Dunnett's test)
p<0.05*; p<0.01** vs Control

● 有意差なし

図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

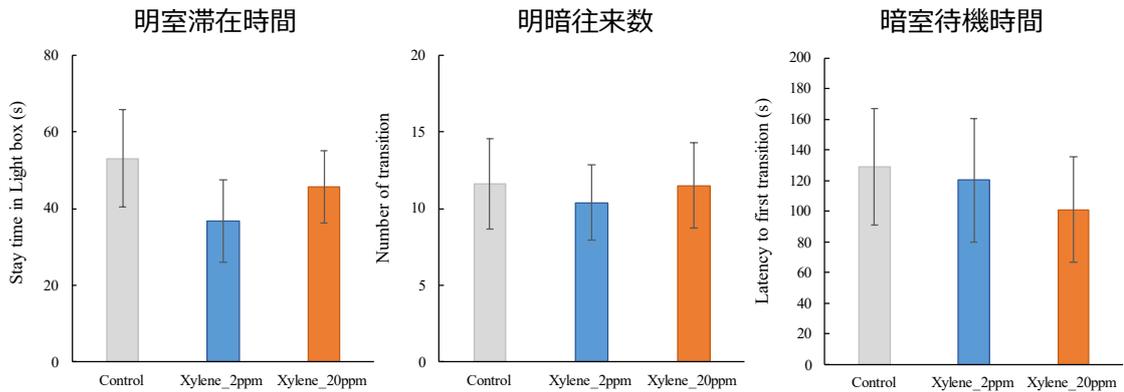
**22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露
明暗往来試験結果**

測定時間: 5分

LD

検定項目

- ・ LD-L-TIME: 明室滞在時間
- ・ LD-N: 明暗往来数
- ・ LD for L: 暗室待機時間

N=8, Mean ± S.E., P value (Dunnett's test)
p<0.05*; p<0.01** vs Control

● 有意差なし

図 2. 明暗往来試験の結果まとめ

22時間7日間 キシレン2および20ppm 吸入曝露

条件付け(FZ1)、翌日以降に空間-連想記憶試験(FZ2)と音-連想記憶試験(FZ3)の結果

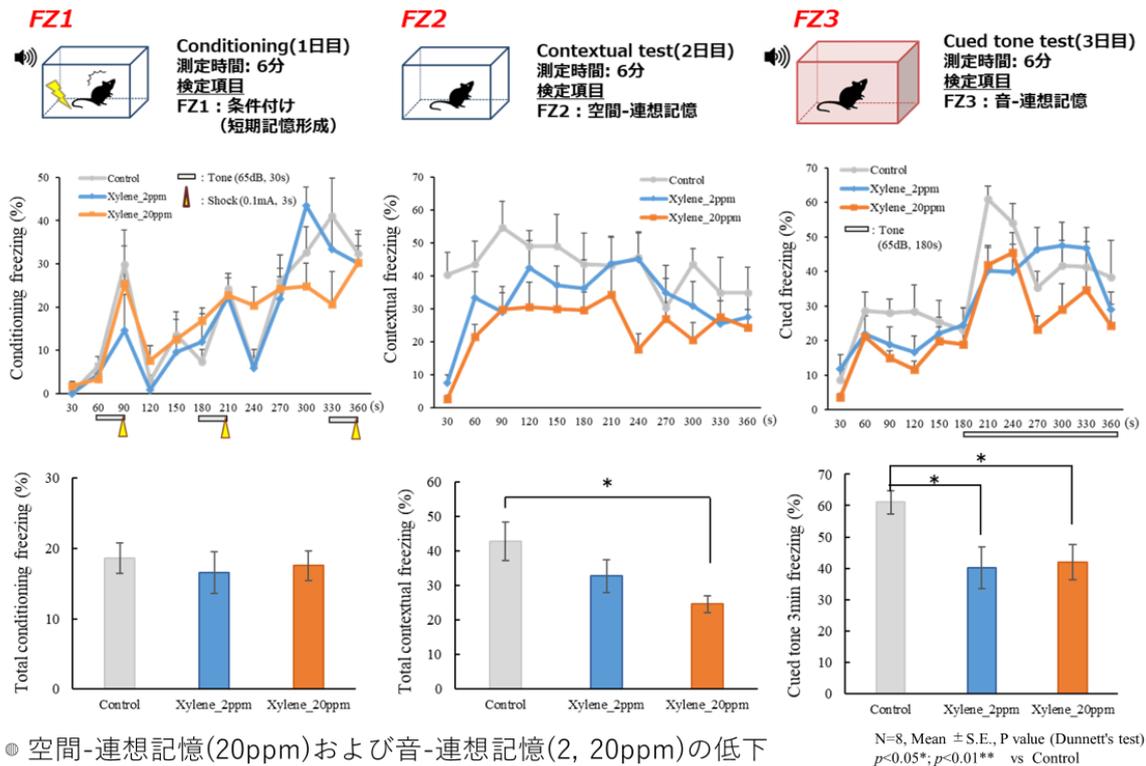


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

吸入曝露による情動認知行動解析を元に行動様式の逸脱度 (平均値) を示すレーダー図(Control=100%)

(キシレン 2および20ppm 22時間7日間吸入曝露による情動認知行動影響のまとめ)

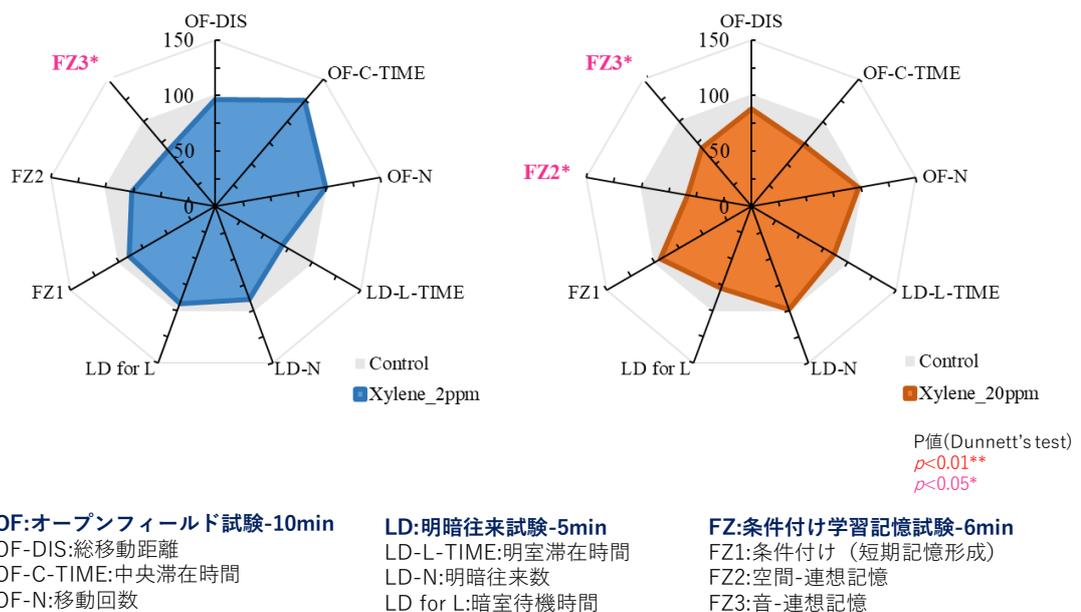


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
(23KD1003)

令和5年度 分担研究報告書

分担研究課題：胎盤の遺伝子発現プロファイリング

研究分担者 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

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、妊娠動物(マウス)の胎内における胎盤の発生への理解を深めることで、化学物質の胎児影響を予測することを目的としている。

具体的には、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うことで、各ステージにおける胎盤を構成する細胞のsubtypeを明らかにすることで、胎盤の機能を明らかにする。

令和5年度においては、受精後7.5日および8.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行なった。胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、受精後7.5日、8.5日目においては胎盤および脱落膜の分離が可能であり、令和6年度において次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行う(小野)。

令和5年度研究(3年計画の1年目)は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

「Trophectoderm」(栄養外胚葉)は、哺乳類の胚発生の初期段階で最初に形成される組織であり、胚の外側の細胞層である。マウスにおいては、受精卵が受精してから約 3.5 日目に形成されるこの層は、胚と母体組織との間に位置する胎盤を構成する細胞へと分化することが知られている。それ故、Trophectoderm が発生の過程でどのような細胞に分化していくのかを明らかにすることは、胎盤の機能を知る上で重要課題である。

マウスにおいては、胚盤胞が子宮に着床した後に、Trophectoderm が胚体外外胚葉への分化を経て、絨毛膜および胎盤外円錐を形成する。さらに、その後成熟した胎盤が形成され、Trophoblast Giant cell、spongiotrophoblast 層、labyrinth layer の 3 層構造が形成される。

今年度に解剖を行う受精後 7.5 日から 8.5 日目においては、胎盤外円錐から spongiotrophoblast が形成される重要な期間である。そこで、これらのステージにおいて網羅的遺伝子発現解析を行うことで、胎盤外円錐の分化段階に特異的なバイオマーカーの単離を行うことを目的としている。

B. 研究方法

マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 2 ステージ (7.5dpc および 8.5dpc) 分を行う。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

(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

C-3-5: 発生ステージごとのマウス胎盤の網羅的遺伝子発現解析 (国立医薬品食品衛生研究所)

今年度は、マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカー

一となる遺伝子を単離する目的で、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行った。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行なった。雌雄 C57BL6/J マウス (12 週齢) の交配を 2 ステージ (7.5dpc および 8.5dpc) 分を行った。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行なった。その結果、7.5dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性であり、8.5dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性であった。受精後 7.5 日、8.5 日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。7.5dpc においては、9 匹、8 匹の正常発生胚を採取した。また、8.5dpc においては、8 匹、9 匹、7 匹の正常発生胚の採取を行った。また、これらの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Clontech 社の SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit を選択し、来年度にシーケンスを行う。

D. 考察と結論

哺乳類の正常な発生において、正常な胎盤形成は必要不可欠である。胎盤により、母子間のガス交換、栄養交換などが行われており、化学物質の胎児移行についても寄与することが知られている。

これらの母子間の物質交換は、主に labyrinth layer において母体血と胎児血との間で行われていることから、labyrinth layer の成熟が、母子間の物質交換に大きく影響する。

そこで、正常胎盤の発生過程における機能を明らかにすることで、発生ステージ特異的な化学物質の胎児移行効率などを明らかにできる。

近年、動物福祉の 3Rs の観点から、in vitro 系の毒性評価系の開発が進められている。発達神経毒性においては、胎盤において化学物質が胎児に移行するかどうかは重要になる。胎盤幹細胞や胎盤オルガノイドなどが、毒性評価系で利用されることが想定されるが、それらが、実際に in vivo を反映しているのかわくは、正常な発生過程における詳細な胎盤の遺伝子発現解を行うことで、実際に in vivo に近い遺伝子発現をしているのかのバイオマーカーとして利用する、

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4年度)

○ * **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, 2024 (in press)

* **Corresponding author**

2. 学会発表

(令和4年度)

○ **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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

分担研究報告書

分担研究課題 「ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析」

研究分担者 西田 欣広

(大分大学医学部産科婦人科学講座)

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法が開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法が開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

ここではその中で分担研究「胎盤オルガノイドによる毒性評価系の開発」について要旨を述べる。ヒト流産は妊婦の7-10人に1人の割合で起こり、その90%は妊娠12週までの早期流産といわれている。その原因もほとんどが胎児の染色体異常とされている(産婦人科学会HP)。しかしながら胎盤の形成に関しては長い間、三次元胎盤モデルがなかったため、胎盤異常と流産の関係についての言及はほとんどなかった。これまで胎盤の形成異常の研究はその後の妊娠高血圧症候群や癒着胎盤との関係に多くの分子が関与しているとする報告がほとんどである。しかしながら、このような現象は結果であり、本来、胎盤の形成期から影響を受けているのではないかと仮説が本研究を進める背景になった。そこで細胞レベルから組織レベルの間の生体組織を模倣できる胎盤モデルとしてミニ胎盤(絨毛オルガノイド)の作成を行う構想に至り、2年前から先行研究としてミニ胎盤の樹立のため、培養条件を試行錯誤している。

今回、我々のグループでは三次元培養法開発の責任者であるHans Clevers教授(オランダ)直伝の手法を応用し、ヒトおよびマウス由来のミニ胎盤を樹立に成功した。このミニ胎盤を用いた生殖毒性評価を行う研究は我々の検索する限り、国内外においてほとんど報告例がない領域である。我々が独自に樹立したミニ胎盤を用いて初期オルガノイド組織より網羅的に代謝産物のメタボローム解析を行い、マーカー毒物(サリドマイド)添加環境下での代謝変動の解析を計画した。ミニ胎盤樹立からメタボローム解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知な胎盤毒性評価系の開発を目指している。本研究により、迅速で低コスト、省動物に資する新規*in vitro* DNT評価手法(動物実験代替法)の開発の補完につながることを期待される。我々のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の*in vitro*代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待できる。

A. 研究目的

(背景) 2010 年ころより“ミニ臓器”と呼ばれるオルガノイド研究が注目されるようになった。生体内組織や臓器にきわめて似ている 3D 培養システムは分化した組織の複雑な空間的パターンを再現でき、生理学的機能の解析に有用である。これまで様々な組織からオルガノイドが樹立され研究が進んでいる。

我々の生殖領域で扱う胎盤は胎児と母親の子宮に接続する臓器で妊娠時に形成される。妊娠初期に胎児が死亡する原因はほとんど解明されておらず、胎盤に起因するケースも多々あると想像されているが適切なモデルがこれまで存在しなかった。ヒトのミニ胎盤の作成は最も遅れていたが、2018 年末ようやく英ケンブリッジ大学の研究チームがその作成に成功した (Turco MY, et. al. *Nature*. 2018)。その後、我々の研究チームも約 2 年の先行研究でヒトおよびマウス由来の胎盤の絨毛幹細胞よりミニ胎盤の作成を行っている。本分担研究では子宮内胎児の成長のため、あらゆる機能をもつ初期胎盤の包括的メタボローム解析を主軸にした毒物代謝機能の解明を特に種差を通して明らかにすることを旨とする。

(目的) 今回の研究課題では、三次元培養法開発の責任者である Hans Clevers 教授 (オランダ) 直伝の手法を応用し、ヒトおよびマウス由来の胎盤より安定したオルガノイド胎盤 (以下、ミニ胎盤) を樹立する。このミニ胎盤を用いた病態解析を行う研究は我々の検索する限り、国内外においてほとんど報告例がない領域である。さらに我々が独自に樹立したミニ胎盤を用いて初期オルガノイド組織より網羅的にマーカー毒物 (サリドマイド) を用いて代謝産物のメタボローム解析を行う。

メタボローム解析自体も我々はその微

量解析法ですでに特許を有しており、他の研究者より一歩進んだ研究環境にある。ミニ胎盤樹立からメタボローム解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知なる胎盤機能への新たな挑戦への扉を開けるであろう。

本研究ではマウスとヒトの種差の違いによる初期絨毛での薬物毒性代謝を比較することでよりヒトに外挿できる試験系の予測精度の強化を補完することを目的とする。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

A-1: 大分大学倫理委員会承認 2022 年 12 月 12 日 (承認番号 2432)

A-2: 大分大学動物実験委員会承認 2023 年 5 月 19 日 (承認番号 232901)

B. 研究方法と結果

B-1: ヒトの胎盤オルガノイド作製 (*in vitro* / organoid) :

ヒト胎盤オルガノイド作製: 令和 5 年度は予定通り、人工妊娠中絶もしくは出産した妊婦の胎盤 (絨毛) 組織を、患者の同意を得て採取し、英ケンブリッジ大学グループの方法 (Sheridan MA, et al. *Nature Protocols*. 2020) を基本手技にして独自の手法を加え胎盤オルガノイドを作製する。それぞれの胎盤組織マーカーによる免疫染色により胎盤オルガノイドが形成されていることを確認した。

B-2: マウスの胎盤オルガノイド作製 (*in vitro* / organoid) :

マウス胎盤オルガノイド作製: また令

和5年度は妊娠マウス(ICRマウス,E10.5)より胎盤を採取し、ヒトと同様に胎盤オルガノイドを作成する。マウス胎盤は絨毛膜と脱落膜が混在したラビリンス構造でその分離は困難である。われわれの作成した胎盤オルガノイド構造も絨毛膜と脱落膜(プロラクチン陽性)が一部混在したオルガノイドとなって作成された。

B-3: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物(サリドマイド)添加による培養液メタボローム解析(metabolome analysis) :

モデル物質として、サリドマイド(thalidomide 分子量: 258.23、CAS No.: 50-35-1、純度98%以上、ロット番号: 0485409-26、富士フィルム和光純薬(株)[製造元: Cayman Chemical Co.])を使用した。

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド(1万個≒1drop matrigel)にモデル薬物としてサリドマイド(0-200 μM)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプルリングが終了している。現在GC-MS用の試料を作成し、GC-MS/MS(QT8040, SHIMADZU)によるサンプル解析およびLabSolutions Insight BiologicsおよびSIMCA(SHIMADZU)ソフトによる多変量メタボローム解析(OPLS-DA法)を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用しているGS-MS/MS解析装置では約460種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される一次代謝産物は約250種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は33種でヒト胎

盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は13種が確認された。このようにすでに組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得られており今後、詳細に解析を行っていく。

B-4: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物(サリドマイド)添加によるDNA二重鎖切断活性の解析(DNA double-strand breaks analysis) :

一方、細胞障害毒性の評価としてサリドマイド添加によるDNA二重鎖切断活性をわれわれの開発したパルスフィールド電気泳動法により解析を行い、再現性の確認作業を継続中である。

B-5: LC-MSによる培養上清中のサリドマイドおよびその代謝産物5- or 5'-hydroxythalidomideの測定

添加 24 時間後の培養上清中のthalidomideは95%以上が代謝されており、我々の確立したミニ胎盤は十分な薬物分解酵素活性を維持していることが判明している。現在さらに種差においてその代謝活性の相違について検討している。

C. 考察と結論

令和5年度はヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを樹立することに成功し、当初の予定を完遂できたと考えている。先行論文に比較して効率的にかつ簡易にヒト胎盤を樹立することができた。再現性・継代も半年にわたって10回以上継代を安定的に管理することが可能となった。また、マウスにおいても同様にマウス専用のサプリメントを調整し、マウス胎盤オルガノイド用組織(ラビリンス構造)の構築を樹立した。特にマウス胎盤オルガノイド樹立は現在までに報告例もなくわれわれの樹立が世界でいち早く行われているもの

推定される。今後はさらにオルガノイド組織の精度を高めるとともに、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のためモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点から研究を深めていきたい。

D. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Masakazu Segawa, Yoshihiro Nishida, et al. Objective evaluation of tongue diagnosis ability using a tongue diagnosis e-learning/e-assessment system based on a standardized tongue image database. *Front Med Technol.* 2023 Mar 13;5:1050909. doi: 10.3389/fmedt.2023.1050909. eCollection 2023.

Nao Konagai, Yoshihiro Nishida, et al. Safe use of tocilizumab in pregnant women with Takayasu arteritis: three case studies. *RMD Open.* 2023 Feb;9(1):e002996. doi: 10.1136/rmdopen-2023-002996.

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. *Toxicology Letters.* Vol384. S88-S89,2023.

Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada. Effect of benzyloquinoline alkaloids on camptothecin-resistant topoisomerase I. *Toxicology Letters.* Vol384. S89,2023.

Masahiro Nishida, Yoshihiro Nishida*, et al. Mechanism of action of non-camptothecin inhibitor Genz-644282 in topoisomerase I inhibition. *Commun. Biol.* 5: 982.2022.
*corresponding author

Sizuko Yamamoto, Yoshihiro Nishida, et al.

The Postpartum Period Can Worsen Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-associated Encephalomyelitis: A Case Report. *Intern Med.* Sep 6. 2022.

Naomi Inoue, Yoshihiro Nishida*, et al. GC-MS/MS analysis of metabolites derived from a single human blastocyte. *Metabolomics.* Jan 25;17(2):17. 2021. *corresponding author

Naomi Inoue, Yoshihiro Nishida* et al. The benzyloquinoline alkaloids, berberine and coptisine, act against camptothecin-resistant topoisomerase I mutants. *Sci Rep.* 2021 Apr 8;11(1):7718. *corresponding author

西田欣広、花田克浩. DNA 二重鎖切断と婦人科関連の問題. *BIO Clinica.* 38(9).54-58.2023.

2. 学会発表 (抜粋)

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljublyana, Slovenia.(2023.9.10)

Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada. Effect of benzyloquinoline alkaloids on camptothecin-resistant topoisomerase I. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljublyana, Slovenia.(2023.9.10)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、衛藤聡、胎盤オルガノイド (ミニ胎盤) によるメタボローム解析、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2023. 5. 12)

井上尚美、西田欣広、河野康志、ヒト胎

盤における低酸素環境下での代謝変化についての検討、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会(2023. 5. 12)

西田欣広、井上尚実、花田克浩.
Camptothecin 耐性株に対する berberine の分子メカニズム、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023. 6. 19)

花田克浩、西田欣広. 二重鎖切断を誘発する植物由来化合物のスクリーニング.
第 52 回日本環境変異原ゲノム学会(2023. 11. 12)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁. 胎盤オルガノイド(ミニ胎盤)を用いた糖代謝異常のメタボローム解析. 第 76 回日本産科婦人科学会学術講演会(2024. 4. 13)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 特許第 7134462 号・発明の名称：胚の評価法・発明者：西田欣広・特許権利者：大分大学・登録日：2022 年 9 月 2 日.

2) 特願 2023-067387, 発明の名称：ヒトオルガノイド様組織作成法・発明者：西田欣広、他 1 名・特許権利者：大分大学

3) 特願 2023-067391, 発明の名称：ヒトオルガノイド様組織培養液・発明者：西田欣広、他 1 名・特許権利者：大分大学

Ⅲ. 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	巻名	ページ	出版年
大久保佑亮、福田淳二	生細胞ルシフェラーゼアッセイを用いた FGF シグナルかく乱作用解析による発生毒性評価	生化学 みにれびゅう	第 95 巻 第 2 号	1-6	2023

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 ・ 部長

(氏名・フリガナ) 北嶋 聡 ・ キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・第三室長
(氏名・フリガナ) 西村 拓也・ニシムラ タクヤ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・第二室長
(氏名・フリガナ) 栗形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 大久保 佑亮・オオクボ ユウスケ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 ・ 研究員
(氏名・フリガナ) 齊藤 洋克 ・ サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・第五室長

(氏名・フリガナ) 小野 竜一・オノ リュウイチ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣
 国立医薬品食品衛生研究所長 殿
 (国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人大分大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 北野 正剛

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 医学部産科婦人科学講座・准教授
 (氏名・フリガナ) 西田 欣広 (ニシダ ヨシヒロ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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