

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6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

令和7(2025)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 ----- 18
2. 吸入曝露実験の実施  
西村拓也 ----- 25
3. DNT 陽性物質選定、及び、国際標準化に向けた情報収集  
栞形麻樹子 ----- 30
4. In vitro DNT 評価手法の開発  
大久保佑亮 ----- 37
5. 情動認知行動解析と神経科学的物証の収集  
齊藤洋克 ----- 43
6. 胎盤の遺伝子発現プロファイリング  
小野竜一 ----- 50
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 ----- 56

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) ----- 61

別添 3

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
令和6年度総括研究報告書

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  
(23KD1003)

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、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、21種類の催奇形性陽性物質及び14種類の陰性物質を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。

<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

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し(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した(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を検討した(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)。

令和 6 年度(今年度)は、I) 昨年構築した自動計測 *in vitro* 発生毒性試験法を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。これまでに、未分化のヒト iPS 細胞を用いた試験により、6 種類の陽性対照物質及び 2 種類の陰性対照物質を 100% の正確度で分類できた。加えて、神経伝達物質受容体を介したシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞まで分化させた試験の構築も進めている。今年度中に、神経前駆細胞の FGF-SRF シグナルへの反応性をリアルタイムシフェレーズアッセイにより確認し、神経前駆細胞を用いた DynaLux/c の構築に向けた課題点を抽出する(大久保)。DNT リストについては、OECD *in vitro* DNT battery (DNT-IVB) 文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている DNT 陽性対照および陰性対照 171 化合物を精査した。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、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、バリデーション試験が開始されてい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、キシレン(0、2 及び 20 ppm)幼若期反復吸入曝露実験における、情動認知行動試験後の脳サンプルについて神経科学的物証に基づく解析を行った結果、海馬におけるニューロン新生への影響が疑われた(齊藤)。また、遺伝子発現データ解析の結果から、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出した(北嶋)。加えて、モデル揮発性物質であるトルエン(目標曝露濃度：0、0.7 および 7 ppm)につき、幼若期反復吸入曝露実験を実施し(西村)、成熟後の情動認知行動試験を実施した結果、条件付け学習記憶試験において、トルエン 0.7 ppm 曝露群では空間-連想記憶の有意な低下が、トルエン 7 ppm 曝露群では空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められた(齊藤)。あわせて、神経科学的物証に基づく DNT 誘発メカニズムの解析をすすめ(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比較検討する(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よりそれぞれ安定したオルガノイド作製に成功した。現在モデル物質(サリドマイド)を用いて網羅的メタボローム解析を行ない、それぞれの胎盤代謝物を明らかにすることで種差からみた生殖毒性を検討している。また、パルスフィールド電気泳動法や免疫染色による DNA 障害毒性を評価している(西田)。加えて、受精後 8.5 及び 9.5 日目マウス胚の胎盤の次世代シーケンスを利用した網羅的遺伝子発現解析を行ない、これらのステージの胎盤を構成する trophoblast giant cell、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer に特異的な遺伝子発現マーカーの検出を行なった。次世代シーケンスデータを活用することで、spongiotrophoblast の中でも受精後 9.5 日目には invasive glycogen cells が増加している様子や、secondary trophoblast cells が増加している傾向も検出することが明らかとなった。よって、今後は、これらのマーカー遺伝子の発現プロファイル解析を行うことで、胎盤の分化度を正確に把握することが可能となり、化学物質による胎盤の分化異常などの評価を行うことが可能になると思われる(小野)。以上、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。

(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、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、21種類の催奇形性陽性物質及び14種類の陰性物質を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）、特に DNT（桑形）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 in vitro DNT expert group（発達神経毒性専門家グループ）メンバーであることから、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 iPSC 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。

昨年度（令和 5 年度）はスループット性と再現性を高めるために細胞培養をしながら連続

の発光測定が可能な Kronos HT 装置を用いた 72 時間以上のリアルタイム計測法を開発した。測定時間及び時間解像度が上昇し、DynaLux/c へ適用が可能なことを確認した。

今年度（令和 6 年度）は、上記の Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。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。上記の DynaLux/c では未分化のヒト iPSC 細胞を用いることで、発生期の神経系を対象とした試験系を想定している。一方で、生後発達期の神経系に対する影響は神経伝達物質受容体 (Neurotransmitter Receptors :NR) を介したものは少なくない。そこで、生後発達期の NR を介したシグナルかく乱を検出するために、神経前駆細胞 (Neural precursor cells: NPCs) に分化させたヒト iPSC 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を開発する。

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、ダラム、北米)。また OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議へ出席し、情報収集を行った (2024 年 4 月 11 日、コンスタンツ、ドイツ)。

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。その中から昨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。

今年度(令和 6 年度)は DNT-IVB 文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている動物実験に基づいて判断された DNT 陽性および陰性物質を精査した。

### 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。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行う。

#### <キシレンにおける吸入曝露実験>

昨年度（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、富士フィルム和光純薬（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-Σ 30N II および MP-Σ 300N II、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-d<sub>8</sub> 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：N<sub>2</sub>  
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-d<sub>8</sub>）

得られた各キシレン及びトルエン-d<sub>8</sub> 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。

#### <トルエンにおける吸入曝露実験>

今年度（令和6年度）のモデル物質はトルエン（Toluene；分子量：92.14、CAS No.：108-88-3）とし、試薬としてトルエン（カタログ番号：204-01861、特級、99.5%、ロット番号：KSF6107、富士フイルム和光純薬（株））を使用した。トルエンの曝露濃度は先行研究の結果から、0.7 および 7ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、トルエンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は 0.07 ppm であることから、この指針値のそれぞれ 10 および 100 倍程度ということとなる。

トルエン濃度は、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、対照群は 2 本、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-Σ30N II および MP-Σ300N II、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。

捕集管に吸着したトルエ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（キシレン-d<sub>10</sub> の二硫化炭素溶液、6mg/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、トルエン（純度 99.5% 以上、東京化成工業株式会社製）を二硫化炭素で適宜希釈して 0.1~100μg/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-WAX（20m×0.18mm、膜厚 0.30μm、Agilent Technologies 社製）  
オープン温度：40℃（3.5 分保持）-20℃/min-150℃（5 分保持）  
注入口温度：220℃  
注入方式：スプリット  
スプリット比：20：1  
キャリアーガス：H<sub>2</sub>  
流速：0.3 mL/min（定流量）  
定量イオン（m/z）：91（トルエン）、98（キシレン-d<sub>10</sub>）

得られた各トルエン及びキシレン-d<sub>10</sub> の内標比から検量線を作成し定量した。この検量線より求めた捕集管中のトルエンの定量値からチャンバー内のトルエ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、9.5 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 3 ステージ (7.5dpc, 8.5dpc および 9.5dpc) (dpc: Days post coitum: 交配後) 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。

凍結した胎盤より RNAeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (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。作成したライブラリーは、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、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、pair end sequence (150bp x 2) にて RNA-seq を行なう。

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 HISAT2 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、HTseq program 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 mRNA のリファレンスシーケンスは、UCSC genome browser より入手した。

### (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の配慮を十分行い、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る。

## 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*):

昨年度 (令和 5 年度) は、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。

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 H<sub>2</sub> 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、桑形が精査した 6 種類の DNT 陽性対照物質(サリドマイド、レチノイン酸、バルプロ酸、フルオウラシルウラシル、ヒドロキシウレア、メトトレキサート)及び 2 種類の陰性対照物質(ペニシリン、サッカリン)のシグナルかく乱作用を各 3 例にて取得した。適用濃度は、最大溶解量(一部 IC<sub>50</sub>)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した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正確度 100%で分類可能であった。

上記の DynaLux/c は未分化のヒト iPS 細胞を用いて FGF-SRF シグナルに対する化学物質のかく乱作用をもとめており、対象は発生期の DNT である。一方で、生後発達期の DNT を検出するために NR が発現する細胞を用いた DynaLux/c の構築を試みた。文献検索や企業への問い合わせから、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて分化させた NPCs がアセチルコリン受容体(ニコチン受容体)、グルタミン酸受容体(NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸型)、ヒスタミン受容体、ドーパミン受容体、GABA 受容体を発現すること、そして、再現性や NPCs の保存に関してもデータがそろっていることを確認した。そこで、現在、レポーターヒト iPS 細胞を上記の kit を用いて NPCs

へ分化誘導を行っている。加えて、NPCs の FGF-SRF シグナルへの反応性をリアルタイムルシフェアッセイにより確認し、NPCs を用いた DynaLux/c の構築に向けた課題点を抽出する。

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 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、昨年度(令和 5 年度)は、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、Case study を増やし、各試験の信頼性を確認している段階であったが、今年度の状況では、この 17 試験をすべて実施してリスク評価を行う方向性である。現在、17 試験についてバリデーション試験が開始されている。下記の 171 化合物を用いてバリデーション試験が実地中であることが明らかになった。一方、DNT 陽性対照物質の選定については、昨年度(令和 5 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

今年度(令和 6 年度)は、DNT-IVB 文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている DNT 陽性および陰性物質を精査した。

動物実験の結果に基づき、4 報の論文(Harrill J et al., 2018; Frank C et al., 2017; Shafer T et al., 2019; Masjusthumsman S et al., 2020)から 133 物質がリスト化され、さらに、ワークショップのレビュー、公表データのレビュー、および米国 EPA の神経毒性リスク評価ガイドラインの情報が追加された 171 物質が掲載されている。この内訳は陽性対照が 104 化合物、陰性対照が 67 化合物であった。昨年度に精査したラットを用いた動物実験により DNT の有無が判断された陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された 97 化合物は全て含まれていた。なお、171 化合物の内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	24
医薬品	85

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) :

キシレンにおける解析について

<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、 $2.50 \pm 0.24$  (2.66～1.97 ppm)、 $20.26 \pm 0.35$  (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  $0.00 \pm 0.00$  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のうち、海馬歯状回について免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度 (20 ppm) 曝露群において、DCX および NeuroD1 (新生ニューロンマーカー) 陽性細胞数の減少が疑われた。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

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。

今年度は、キシレン幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の 1 つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群 (低濃度および高濃度) と対照群を比較したところ、低濃度 (2 ppm) 曝露群において DCX (新生ニューロン) の有意な発現増加が認められた。高濃度 (20ppm) 曝露群においては、いずれの分

化マーカーも有意差は認められなかった。

次いで、対照群と比較し、2 ppm (低濃度) のキシレン曝露群において、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった (対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

762 ps (増加)、 20 ps (減少)

増加分 762 ps ならびに減少分 20 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、20 ppm (高濃度) のキシレン曝露群において、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった (対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

83 ps (増加)、 542 ps (減少)

増加分 83 ps について、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、Upstream Analysis を用いて検討したが、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は現時点では見いだせなかった。

一方、減少分 542 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、グルタミン酸 AMPA 受容体シグナル伝達、カルシウムシグナルが確認され、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。また、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて

検討したところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆されたが、関与するシグナルネットワークについて、さらに詳細な解析を実施している。

#### トルエンにおける解析について

##### <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 0.7 および 7 ppm に対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、 $0.71 \pm 0.04$ （0.74～0.63 ppm）、 $6.82 \pm 0.38$ （7.12～6.17 ppm）であり、ほぼ目標濃度下（それぞれ 101 及び 97 %）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トルエン濃度は  $0.00 \pm 0.00$  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、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。今後、キシレンの場合と同様、得られた脳サンプルについては神経科学的物証に基づく解析を行う予定である。

#### 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（令和 6 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：また昨年度（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≒1drop matrigel）にモデル薬物としてサリドマイド（0-200  $\mu$ 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。

#### 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。ヒトにおいてはマウスと比べ 10 倍程度の代謝活性が亢進していることが判明した。さらに責任代謝物についても検討を進めている。

#### 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)

7.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性(R5 年度)、8.5 dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性(R5 年度)、9.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性(R6 年度)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、8.5 dpc においては、8 匹、9 匹及び 7 匹の正常発生胚の採取し、9.5 dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取した。

R6 年度においては、このうち、8.5 dpc および 9.5 dpc の胎盤組織の網羅的遺伝子発現解析(各 4 例)を行なった。

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、Illumina 社の Stranded mRNA kit を選択し、網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサー(Illumina 社 Nextseq2000)を利用して行なった。

9.5 dpc の胎盤組織においては、母体側と直接接している側から、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer の 3 層構造からなることが報告されており、それぞれに特異的な遺伝子発現マーカーの存在が知られている。

網羅的遺伝子発現解析から、これらの遺伝子発現マーカーの遺伝子発現量を定量した。

その結果、trophoblast giant cell のマーカーである P11(Pr13d1)および P12(Pr13b1)の遺伝子発現においては、8.5 dpc よりも 9.5 dpc において遺伝子発現の顕著な増加が確認された。P11は、primary trophoblast giant cell であり、8.5dpc には既に存在しており、9.5dpc においても同様に存在していることが想定されているが、遺伝子発現データからも一致している。また、P12 は secondary trophoblast giant cell であり、9.5dpc 以降に増殖することが報告されており、9.5dpc において発現量が急激に増加しており、これらも既知の in situ hybridization のデータと一致している。

また、spongiotrophoblast のマーカーである

Tpbpa の遺伝子の発現は、8.5 dpc および 9.5 dpc で同様に確認された。Spongiotrophoblast は、spongiotrophoblast cells および glycogen cells に分化することが知られているが、glycogen cells に関しては、母体側に浸潤する invasive glycogen cells 集団が存在することが知られている。これらの細胞群は、発生が進むにつれて増加することから、母体側脱落膜と胎児由来胎盤細胞の分離が難しくなる。これらのマーカーとしては、Pr17b1 が報告されており、9.5dpc の方がより増加しており、すなわち、invasive glycogen cells が増加していることが想定される。

Labyrinth layer に関しては、8.5dpc から形成されるものであり、そのマーカーである Gcm1 の発現が確認されている。また、labyrinth layer は、胎児側毛細血管と syncytiotrophoblast より構成されており、胎児側血管のマーカーとなる Slc16a1 および syncytiotrophoblasty のマーカーとなる Ly6e の発現が確認されている。

今年度、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果が胎盤の分化解析(secondary trophoblast giant cell, invasive glycogen cells など)の検出にも有用であることがわかったことから、他のステージに関しても同様の解析を行う予定である。

#### **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 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した I) 発生期の in vitro DNT 評価手法を用いて、6 種類の DNT 陽性対照物質及び 2 種類の陰性対照物質を正確度 100%で分類に成功した。これらは物質毎にシグナルかく乱の方向性や強さ、時

間が異なることから、シグナルかく乱を引き起こす標的が異なることが考えられる。今後、試験物質数を増やすことで、DNTの発現機序にも迫れる可能性がある。併せて、II) 生後発達期の *in vitro* DNT 評価に関しては、文献情報や企業への問い合わせにより、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて NPCs への分化を試みている。NR と発現する細胞としてどの細胞を利用するかに関しては、多くの検討を重ねた。まずは、既存のヒト iPS 細胞を分化させるもしくは NR 発現細胞にレポーター遺伝子をノックインすることを検討し、分化させる場合はどの神経細胞にどの手法で分化させるかについても情報を集める必要がある。今回我々は上記の手法を用いることで、1. 再現性良く、2. 安定的に、3. 多種の NR を発現している、4. 多くの、NPCs の誘導法を選定した。現在、NPCs の分化を進めており、今年度中には NR の発現並びに FGF-SRF への反応性を確認し、次年度に II) 生後発達期の *in vitro* DNT 評価方を開発する予定である。

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昨年度は 97 化合物、今年度は 104 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、昨年度の段階では、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ったが、今年度の現時点では 17 種類全ての試験の実施がリスク評価には必要であろうとなっている。各試験のバリデーション試験が開始された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 20 ppm) 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、 $2.50 \pm 0.24$ 、 $20.26 \pm 0.35$  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として免疫組織化学を実施した結果、キシレンの高濃度(20 ppm) 曝露群においては、成熟後の神経回路、特に海馬における新生ニューロンの増殖に影響を与えることが示唆された。加えて、遺伝子発現解析において、IPA による解析からは、高濃度(20 ppm) 曝露群においては、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、関与する候補シグナルネットワークが抽出された。またプロモーター解析(*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。

遺伝子発現解析の結果に関しては、低濃度(2ppm) 曝露群では、中枢神経系に関わる細胞の分化マーカーである、DCX(新生ニューロン) の発現変動(増加) が認められ、機能的ではない未熟なニューロンが過剰に産生されている可能性が疑われたが、現時点では免疫組織化学においてその影響を捉えられておらず、引き続き検討が必要である。また、高濃度(20ppm) 曝露群では、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーに関して、有意差は認められなかったものの、免疫組織化学における解析では、新生ニューロンマーカー陽性細胞数の減少が疑われたため、パスウェイ解析によって確認された神経伝達などに関与するシグナルネットワークが、間接的に神経細胞の分化・増殖に対して影響を及ぼすことが示唆された。

これまでの解析結果により、キシレンの低濃度曝露群と高濃度曝露群では検出される影響に異なる点が多いことから、それぞれ異なるシグナルネットワークを介して、中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

加えて、モデル揮発性物質としてトルエン(0、0.7 および 7 ppm) 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、 $0.71 \pm 0.04$ 、 $6.82 \pm 0.38$  ppm であり、それぞれ 101 及び 97 % 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、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。今回の結果から、昨年度行ったキシレンでの行動影響と同様、トルエ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確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。

引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの免疫組織化学および遺伝子発現データの解析を行い、毒性関連性を検討する予定である。

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 R6 年度においては、母体側へと浸潤することは報告されている invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Prl7b1 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。

また、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遺伝子発現データをより多くのステージで解析することで、labyrinth layer の分化度を知るために重要なマーカー遺伝子の単離することができ、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と思われる。

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7年度)は予定通り、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。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表(抜粋)

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, Satoshi Kitajima: Perichordal Vertebral Column Formation in Rana kobai. J Morph. 2025; 286: e70044.

[doi.org/10.1002/jmor.70044]

北嶋 聡: オミクスとインフォマティクスとの融合による迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発に向けて、国立医薬品食品衛生研究所報告 2024; 142 12-30.

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296.

[doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci.

2024; 11(4): 169-181.  
[doi.org/10.2131/fts.11.169]

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.* 2024; 44(5): 784-793.  
[doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidenobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(4): 139-149.  
[doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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]

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]

西村拓也, 直田みさき, 大久保佑亮, 平林容子. ICH S6 バイオ医薬品の非臨床安全性評価の見直しについて 医薬品医療機器レギュラト

リーサイエンス 2024, 55, 423-425

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 ファームテクジャパン 2024, 40, 523-525

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* 2024, 61, 41-58

○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

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

○Yusuke Okubo, Yoko Hirabayashi, Junji Fukuda. *Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics.* *Current Opinion in Toxicology* 2024; Volume 39, 100489.

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F: Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction. *OPEN BIOLOGY* (in press).

小野竜一: 非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用 医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

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. New strategy of genotoxicity test using

organoids in the 3-dimensional tissue culturesystem. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S52-S53, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.151>

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Satoshi Kitajima. Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S188, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.469>

西田欣広、花田克浩. 難治性の婦人科癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の可能性. BIO Clinica. 39(8).68-71. 2024.

Takeshi Terabayashi, Takao Sasaki, Toshimasa Ishizaki, Tadashi Tomo, Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada. Analysis of accumulation of DNA double-strand breaks in mouse tissues by pulsed-field gel electrophoresis. Toxicol Appl Pharmacol. 2025 Apr;497:117278. doi: 10.1016/j.taap.2025.117278

## 2. 学会発表 (抜粋)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡: ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

北嶋 聡、高橋祐次、相崎健一、菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 3 日、口頭

横田 理、宮宗秀伸、菅 康佑、兼子 智、若山友彦、北嶋 聡: Reactive blue 2 の雄性生殖毒性評価への適用、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡: バルプロ酸

(VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

齊藤洋克、横田 理、北嶋 聡: セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 3 日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第 51 回日本毒性学会学術年会、2024 年 7 月 4 日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡: 細胞培養食品バイオハザード研究 2: 培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

高橋祐次、相崎健一、森田紘一、菅 康佑、辻 昌貴、北嶋 聡: 心電図の異常検出法としてのマトリックスプロファイルアルゴリズムの応用、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋 祐次、北嶋 聡: 多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

北嶋 聡: 毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-, 基調講演 6L-1 「拮抗剤、分析と中毒」, 第 46 回日本中毒学会総会・学術集会, (2024. 7. 24.), 神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向- 家畜・家禽以外の動物種を含めて-, 日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024. 11. 15)、川崎

北嶋 聡: 網羅的分子毒性学からみたヒトと化

学物質との共生, シンポジウム 3S02m 「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」, APPW2025(第130回日本解剖学会・第102回日本生理学会・第98回日本薬理学会 合同大会), 2025.3.19、千葉

桑形麻樹子, 堀本政夫: 農薬における発達神経毒性と関連のある毒性所見の検討 第51回日本毒性学会学術年会(2024.7.03-05)、福岡

Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Yuji Taquahashi Y. Update and Compilation of the database of the glossary for nonclinical toxicity studies 'Dokuseishiken Yougoshuu'. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.6)

Nishimura T, Maki K, Kinoshita K, Suzuki M, Nakazawa T, Naota M, Mikashima F, Hirabayashi Y. The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan. 米国 Society of Toxicology (2024.3.11)

齊藤洋克: 周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出 日本内分秘攪乱物質学会第26回研究発表会(2024.12.7, 東京)

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)

○Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: in vitro developmental toxicity testing based on real-time monitoring for signal disruption. EUROTOX 2024, Copenhagen, Denmark, (Sep. 9th, 2024).

○Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPSCs through disruption of signal

interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.

○大久保 佑亮、溝田 華柊、大原 凜太郎、松浦利絵子、平林 容子、中島 芳浩、福田 淳二: リアルタイム発光法を用いたシグナルかく乱を基にした in vitro 発生毒性評価法の開発. 第64回日本先天異常学会学術集会 (2024年7月27日) 東京

○大久保 佑亮: シグナルかく乱作用を基にした in vitro 発生毒性試験法の開発とその検出機構の解明に向けて. 第51回日本毒性学会学術年会. 2024年7月3日

○大久保 佑亮: 生殖発生毒性試験代替法の in vitro 発生毒性試験法について. 2023年度安研協定期総会及び講演会. 2024年11月8日

○Rieko Matsuura, Rintaro Ohara, Kashi Mizota, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda, Yusuke Okubo: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs Based on the Wnt Signal Disruption. 第51回日本毒性学会学術年会. 2024年7月3日

○Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.9)

三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、桑形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕: 医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024年7月3日)

○溝田華柊、大原凜太郎、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二: ヒト iPSC 細胞を用いた FGF シグナルかく乱の自動測定による発生毒性評価. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024年7月3日)

○村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二: ヒト iPSC 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発

生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討. 日本動物実験代替法学会 第37回大会 宇都宮

○溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱作用の自動測定による発生毒性評価. 日本動物実験代替法学会 第37回大会 宇都宮

○溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱を指標とした発生毒性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024 仙台

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024. 5. 12, Melbourne, Australia)、口頭

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, Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024. 9. 4., Montreal, Canada)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse, 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 20., Copenhagen, Denmark)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection, ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024. 3. 17, Orlando、口頭

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A,

Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第51回日本毒性学会学術年会 (2024. 6. 21 福岡)、口頭

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida: New strategy of genotoxicity test using organoids in the 3-dimensional tissue culture system. The 58<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, 2024. 9. 9 Copenhagen, Denmark.

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Satoshi Kitajima: Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies. The 58<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, 2024. 9. 9 Copenhagen, Denmark.

○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. 20 横浜

花田克浩、西田欣広：胎盤オルガノイドを用いた DNA ダメージ誘導の二重鎖切断の検出系の開発 第53回日本環境変異原ゲノム学会 2024. 12. 7 岡山

## 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

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。

令和5年度(初年度)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。

令和6年度(今年度)は、キシレン(2, 20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。またプロモーター解析(*in silico*)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

## 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。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

令和5年度(初年度)は、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、その発現を確認し、その発現量の絶対値を求めることができた。

令和6年度(今年度)は、キシレン(2, 20 ppm)を幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、脳4部位の内、背景データが多く揃っており、また学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群(低濃度および高濃度)と対照群を比較したところ、低濃度(2 ppm)曝露群においてDCX(新生ニューロン)の有意な発現増加が認められた(図1)。

次いで、対照群と比較し、2 ppm(低濃度)のキシレン曝露群において、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps)数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して曝露群の比率が、増加は1.200より大きいものを、減少は0.833より小さいものを採用)。この際、細胞1個あたりの発現コピー数につき海馬において0.7コピー以上のものを採用した。

762 ps (増加)、 20 ps (減少)

増加分762 psならびに減少分20 psについて検討した結果、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為にIPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、20 ppm(高濃度)のキシレン曝露群において、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps)数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して曝露群の比率が、増加は1.200より大きいものを、減少は0.833より小さいものを採用)。この際、細胞1個あたりの発現コピー数につき海馬において0.7コピー以上のものを採

用した。

83 ps (増加)、 542 ps (減少)

増加分83 psについて、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索、並びに、Upstream Analysisを用いて検討したが、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は現時点では見いだせなかった。

一方、減少分542 psについて検討した結果、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、グルタミン酸AMPA受容体シグナル伝達、カルシウムシグナルが確認され、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。また、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(in silico)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆されたが、関与するシグナルネットワークについて、さらに詳細な解析を実施している。

この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。

遺伝子発現解析の結果に関しては、低濃度(2ppm)曝露群では、中枢神経系に関わる細胞の分化マーカーである、DCX(新生ニューロン)の発現変動(増加)が認められ、機能的ではない未熟なニューロンが過剰に産生されている可能性が疑われたが、現時点では免疫組織化学においてその影響を捉えられておらず、引き続き検討が必要である。また、高濃度(20ppm)曝露群では、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーに関して、有意差は認められなかったものの、免疫組織化学における解析では、新生ニューロンマーカー陽性細胞数の減少が疑われたため、パスウェイ解析によって確認された神経伝達などに関与するシグナルネットワークが、間接的に神経細胞の分化・増殖に対して影響を及ぼすことが示唆された。

これまでの解析結果により、キシレンの低濃度曝露群と高濃度曝露群では検出される影響に異なる点が多いことから、それぞれ異なるシグナル

ネットワークを介して、中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析を行い、毒性連関性を検討する予定である。

#### D. 結論

生後発達期DNTの分子機序解明に向け、キシレン(0、2及び20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、またプロモーター解析(in silico)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

今後、引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析を行い、毒性連関性を検討する予定である。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表(抜粋)

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, [Satoshi Kitajima](#): Perichordal Vertebral Column Formation in Rana kobai. J Morph. 2025; 286: e70044. [doi.org/10.1002/jmor.70044]

[北嶋 聡](#): オミクスとインフォマティクスとの融合による迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発に向けて、国立医薬品食品衛生研究所報告 2024; 142 12-30.

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, [Satoshi Kitajima](#): Application of the matrix profile algorithm

for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, [Satoshi Kitajima](#): A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181.

[doi.org/10.2131/fts.11.169]

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. 2024; 44(5): 784-793.

[doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidenobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, [Satoshi Kitajima](#): Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. J Toxicol Sci. 2024; 49(4): 139-149.

[doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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]

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]

○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

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

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]

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Satoshi Kitajima. Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S188, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.469>

## 2. 学会発表 (抜粋)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第71回日本実験動物学会総会、京都、2024年5月29日、ポスター

北嶋 聡、高橋祐次、相崎健一、菅野 純：フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、口頭

横田 理、宮宗秀伸、菅 康佑、兼子 智、若山友彦、

北嶋 聡：Reactive blue 2の雄性生殖毒性評価への適用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡：バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

齊藤洋克、横田 理、北嶋 聡：セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡：細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡：細胞培養食品バイオハザード研究 2:培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

高橋祐次、相崎健一、森田紘一、菅 康佑、辻 昌貴、北嶋 聡：心電図の異常検出法としてのマトリックスプロファイルアルゴリズムの応用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋 祐次、北嶋 聡：多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

北嶋 聡：毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-，基調講演 6L-1「拮抗剤、分析と中毒」，第46回日本中毒学会総会・学術集会，(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡：細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向-一家畜・家禽以外の動物種を含めて-、日本動物学会第95回長崎大会、長崎、2024年9月14日、口頭

北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024. 11. 15)、川崎

北嶋 聡: 網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生, シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」, APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会), 2025. 3. 19、千葉

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024. 5. 12, Melbourne, Australia) 、口頭

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, Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024. 9. 4., Montreal, Canada)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse, 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 20., Copenhagen, Denmark)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection, ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024. 3. 17, Orlando、口頭

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: パルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第

51 回日本毒性学会学術年会 (2024. 6. 21 福岡)、口頭

#### 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

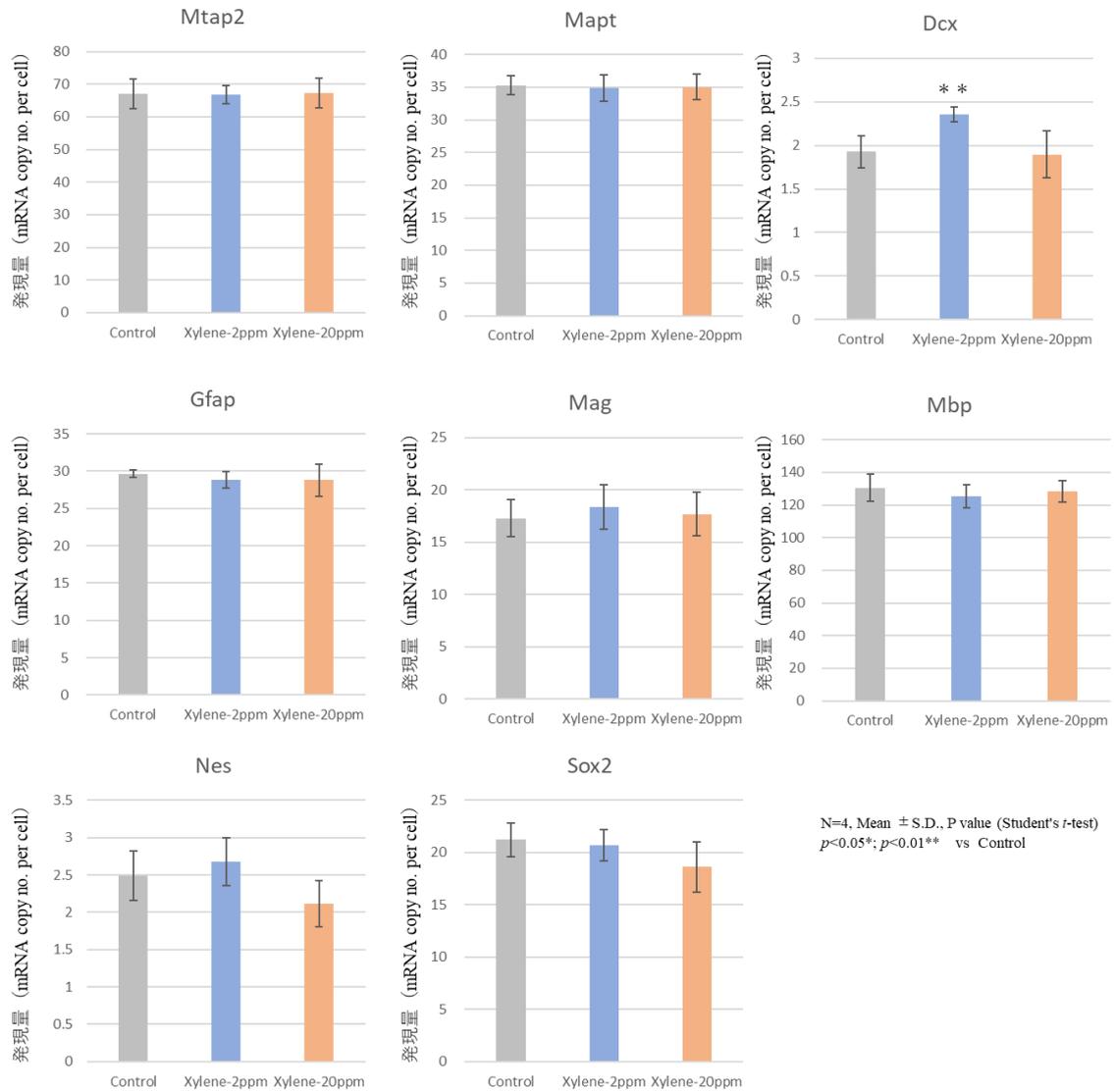


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現

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) の各遺伝子について、その発現量の絶対値を、各曝露群について比較した。

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(トルエン)濃度について、目標曝露濃度0.7および7ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 $0.71 \pm 0.04$  (0.74～0.63ppm)、 $6.82 \pm 0.38$  (7.12～6.17ppm)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トルエン濃度は $0.00 \pm 0.00$ 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6年度)のモデル物質はトルエン(Toluene; 分子量: 92.14, CAS No.: 108-88-3)とし、試薬として下記のものを使用した。

・トルエン(カタログ番号: 204-01861、特級、99.5%、ロット番号: KSF6107、富士フイルム和光純薬(株))

トルエンの曝露濃度は先行研究に基づき、0.7お

よび7 ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、トルエンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が0.07 ppmであることから、この指針値のそれぞれ10および100倍程度ということとなる。

### <曝露濃度設定根拠>

1)トルエンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.07 ppm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(0.7 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、トルエンを0、25、100、250 ppmにて6時間/日、5日/週、4週間曝露したラットでは、100 ppmおよび250 ppm群で、ホットプレートテストにおける逃避行動の増加が観察され(Wiaderna and Tomas 2002)、トルエン曝露により動物の痛覚が変化する可能性が考えられた。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ことを考慮した100 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、本実験でのトルエ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 毒性部の齊藤洋克主任研究官、菅康佑氏、横田理室長の協力を仰いだ。

### <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、トルエンをバブリングし気化させる方法により行った。

トルエン濃度は、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、対照群は2本、曝露群は各濃度とも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。

捕集管に吸着したトルエ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(キシレン-d<sub>10</sub>の二硫化炭素溶液、6mg/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、トルエン(純度99.5%以上、東京化成工業株式会社製)を二硫化炭素で適宜希釈して0.1~100μg/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-WAX (20m × 0.18mm, 膜厚 0.30μm, 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 : H<sub>2</sub>  
流速 : 0.3 mL/min (定流量)  
定量イオン (m/z) : 91 (トルエン)、98 (キシレン-d<sub>10</sub>)

得られた各トルエン及びキシレン-d<sub>10</sub>の内標比から検量線を作成し定量した。この検量線より求めた捕集管中のトルエンの定量値からチャンバー内のトルエ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

##### 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6年度(今年度)は予定通りトルエン(0、0.7、7 ppm)(0.7および7 ppmはそれぞれ現在の指針値の10および100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0.7および7 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低~最高値)は、0.71±0.04(0.74~0.63 ppm)、6.82±0.38(7.12~6.17 ppm)であった(図2)。

#### D. 結論

令和6年度(今年度)は、トルエンについて、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)

Yokota S, Hashimoto K, Sato T, Uemura K, Makiyama K, Nishimura T, Kitajima S, Ogawa T.: A long-term mouse testis organ culture system to identify germ cell damage induced by chemotherapy. *Curr Res Toxicol.* 2025, 11:8:100228. doi: 10.1016/j.crttox.2025.100228.eCollection 2025.

Hashimoto K, Arakawa H, Imamura R, Nishimura T, Kitajima S, Sato T, Makiyama K, Ogawa T, Yokota S. 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.* 2024, 44(5):784-793. doi: 10.1002/jat.4584. Epub 2024 Jan 23.

Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Toshime Igarashi, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S. A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2024, 11, 169-181; doi:10.2131/fts.11.169

西村拓也, 直田みさき, 大久保佑亮, 平林容子. ICH S6 バイオ医薬品の非臨床安全性評価の見直しについて 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2024, 55, 423-425

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 ファームテクジャパン 2024, 40, 523-525

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 2024, 61, 41-58

## 2. 学会発表 (抜粋)

M. Naota, T. Nishimura, Y. Okubo, Y. Suzuki, M. Suzuki, K. Kinoshita, K. Watanabe, T. Nakazawa, H. Onodera, M. Kuwagata, Y. Hirabayashi, Survey on safety profile of general toxicity Studies using non-human primates for Antibody drugs approved in Japan after revision of ICH-S6, The 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.17)

内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価における子宮肥大試験の継続的な取り組み、五十嵐智女, 相田麻子, 横田理, 西村拓也, 高橋祐次, 桑形麻樹子, 北嶋聡、日本内分泌攪乱物質学会 第26回研究発表会、2024年12月

Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Yuji Taquahashi Y. Update and Compilation of the database of the glossary for nonclinical toxicity studies ‘Dokuseishiken Yougoshuu’. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.6)

Nishimura T, Maki K, Kinoshita K, Suzuki M, Nakazawa T, Naota M, Mikashima F, Hirabayashi Y. The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan. 米国 Society of Toxicology (2024.3.11)

## 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

Animals: C57BL/6N mice

Control: 0ppm

Toluene: 0.7 and 7ppm

※ (室内濃度指針値 : 0.07 ppm)

※※ 行動試験への影響を考慮し、  
末梢神経影響がない濃度

7日間反復吸入曝露実験

成熟後の行動影響解析

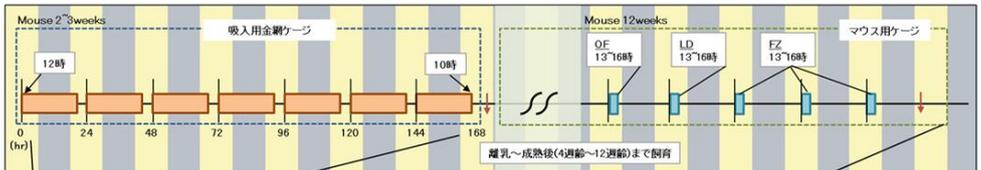
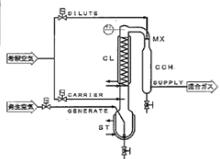
2週齢~3週齢

12週齢~

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

吸入ばく露 行動解析 サンプル



2-3weeks inhalation



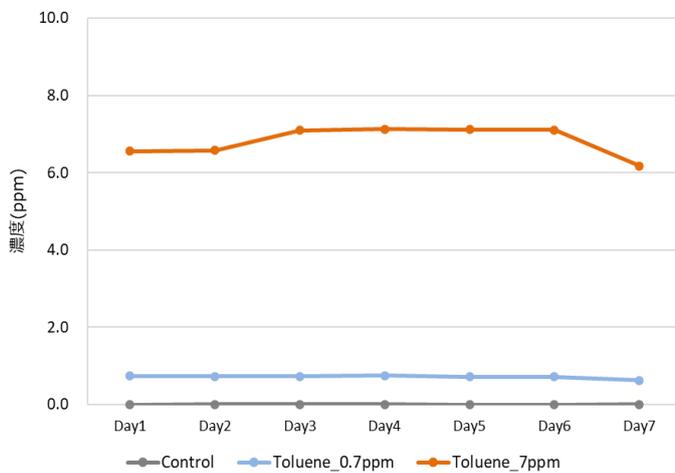
哺乳期であるため  
幼若期マウス(産仔)と  
母マウスを吸入網ケージに収容

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

トルエン曝露濃度の推移



1週間のトルエン曝露平均

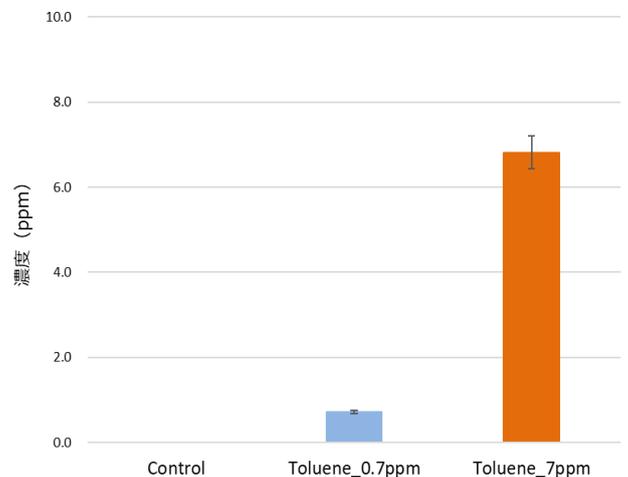


図2 トルエン曝露濃度の測定結果：情動認知行動解析のための 22 時間/日×7 日間反復曝露 (平均値±標準偏差)

令和6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  
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

R5年度同様、情報収集として、OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議へ出席し、情報収集を行った(2024年4月11日、コンスタンツ、ドイツ)。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OECD in vitro DNT battery (DNT-IVB)文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている(Appendix A)に掲載されている動物実験の結果に基づいたDNTの有無のリストを精査した。

(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40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。R5年度の会議では17試験を選抜していくとのことであったが、2024年4月の会議では、現時点ではリスク評価には17種類の試験をすべて実施する予定であると報告された。現在、バリデーション試験が開始されていることが明らかになった。

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、OECD DNT-IVB文書は、OECDのHPにて公開(url: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/developmental-neurotoxicity.htm>) されている。

2. DNT陽性対照物質の選定

今年度はOECD DNT-IVB文書に掲載されている動物実験の結果に基づいたDNTの有無のリストを精査した。陽性対照物質および陰性対照物質リスト(Appendix A)となって掲載されている。Appendix Aは1Aおよび1Bから構成されている。Appendix A.1Aは4報の論文(Harrill J et al., 2018; Frank C et al., 2017; Shafer T et al., 2019; Masjusthumsman S et al., 2020)をもとに133物質が掲載されている。Appendix A.1BはAppendix 1Aに基づいており、陽性対照物質リストにはワークショップのレビュー、公表データのレビュー、および米国EPAの神経毒性リスク評価ガイドラインの情報が追加されている。また、陰性対象物質リストには、化学物質の根拠も記載されているが、実施施設によって異なる場合もあり、既知の in vivo DNT 陰性試験に基づくものではない可能性もある。例えば、活性代謝物への代謝がないためにin vitroで陰性とされた化学物質もある。一部の化合物は文献データのレビューに基づいて陰性と判断されている。

今回は化学物質の数が多いためAppendix A.1Bを精査し、また、各4報に報告されていたin vitro DNT試験結果についても追記した(陽性対照リスト; 添付資料1、陰性対照リスト; 添付資料2)。

なお、Appendix A.1Bは170物質が掲載されていた。その内訳は下記の通り。

	陽性	陰性
農薬	19	5
化学物質	47	18
医薬品	37	44
合計	103	67

D. 結論

OECD DNT-IVB 専門家会議に参加し情報収集した結果、昨年度は17種類のin vitro試験からいくつか試験を選抜して評価することになっていたが、現状では17種類の試験を全て実施してリスク評価をする方向性に変更されていた。現在、17種試験のバリデーション中であることが明らかになった。Appendix Aに基づいてバリデーション試験が実地中であることから、Appendix Aに掲載されているDNT陽性及び陰性リストの精査を行った。昨年度に精査したラットを用いた動物実験によりDNTの有無が判断された陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された97化合物は全て含まれていた。

2025年に2回、専門家会議が開催される予定である。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

### 1. 論文発表

Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S. A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats 90-days. *Fund Tox Sci.* 11(4)169-181, 2024.

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. *Fund Tox Sci.* 11 (1) 37-56 2024.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

- (1) Kuwagata M and Horimoto M. Key toxicological findings related to developmental neurotoxicity caused by pesticides. The 64<sup>th</sup> Society of Toxicology (2025.3.16., Orlando, Florida, USA)
- (2) Naota M, Nishimura T, Okubo Y, Suzuki Y, Suzuki M, Kinoshita K, Watanabe K, Nakazawa T, Onodera H, Kuwagata M, Hirabayashi Y. Survey on safety profile of general toxicity Studies using non-human primates for Antibody drugs approved in Japan after revision of ICH-S6. The 64<sup>th</sup> Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
- (3) Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Kuwagata M, Aisaki K, Kitajima S. Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn as a surface electrode. The 64<sup>th</sup> Society of Toxicology (2025.3.18, Orlando, Florida, USA)
- (4) Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection The 64<sup>th</sup> Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
- (5) Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. International Society for extracellular vesicles annual

meeting2024 (2024.5.12, Melbourne, Australia)

- (6) 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. Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)
- (7) Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

#### 国内学会

- 1) 桑形麻樹子、堀本政夫：農薬における発達神経毒性と関連のある毒性所見の検討 第51回日本毒性学会学術年会(2024.7.03-05) 福岡
- 2) 三ヶ島史人、桑形麻樹子ら、医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査 第51回日本毒性学会学術年会(2024.7.03-05) 福岡
- 3) 小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡：バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA 第51回日本毒性学会学術年会(2024.7.03-05) 福岡
- 4) 五十嵐智女、相田麻子、横田理、西村拓也、高橋祐次、桑形麻樹子、北嶋 聡：内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価における子宮肥大試験の取り組み 第64回日本先天異常学会学術集会(2024.7.26-27) 東京
- 5) 五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックアウトマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達 第71回日本実験動物学会総会(2024.05.29) 京都

## 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

## 添付資料 1

# DNT陽性対照物質

表1 DNT陽性対照物質による17試験種実施状況とその結果(Appendix A.1Bを改変)

	Compound	分類	Positive or Negative	1 Cortical Initiation	2 Cortical Maturation	3 Cortical MEA	4 Cortical Synapto	5 hN Initiatio	6 hNPI Apop	7 hNPI Prolif	8 NPC1	9 NPC2a	10 NPC2b	11 NPC2c	12 NPC3	13 NPC4	14 NPC5	15 UKN2	16 UKN4	17 UKN5
1	Acrylamide	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N						N			N	P
2	Allethrin	農	Positive			N														
3	Aluminum	化	Positive																	
4	6-aminonicotinamide	化	Positive	P	N	P	N	N	N	N										
5	Amphetamine	医	Positive	N	N		N	N	N	N										
6	Arsenic	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
7	Aspartame	化	Positive																	
8	Azacytidine	医	Positive																	
9	Benomyl	農	Positive																	
10	Benzene	化	Positive																	
11	Bisphenol A	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
12	Bis(tri-n-butyltin)oxide	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
13	Bromodeoxyuridine	化	Positive																	
14	Butylated hydroxyanisole	化	Positive																	
15	Cadmium	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N		P	P	P		P		P	P	P
16	Caffeine	化	Positive	N	N	N	N	N	N	N										
17	Carbamazepine	医	Positive	N	N	N	N	N	N	N										
18	Carbon monoxide	化	Positive																	
19	Chlordecone	農	Positive																	
20	Chlordiazepoxide	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
21	Chlorinedioxide	化	Positive																	
22	Chlorpromazine	医	Positive	N	N	P	N	N	P	P		N	N	N		N	P	N	N	N
23	Chlorpyrifos	農	Positive	N	N	P	N	N	P	N		N	N	N		N		P	P	N

表1 DNT陽性対照物質による17試験種実施状況とその結果(Appendix A.1Bを改変)

	Compound	分類	Positive or Negative	1 Cortical Initiation	2 Cortical Maturation	3 Cortical MEA	4 Cortical Synapto	5 hN Initiatio	6 hNPI Apop	7 hNPI Prolif	8 NPC1	9 NPC2a	10 NPC2b	11 NPC2c	12 NPC3	13 NPC4	14 NPC5	15 UKN2	16 UKN4	17 UKN5
24	Cocaine	医	Positive	P	N	N	N	N	N	N										
25	Colcemid	化	Positive																	
26	Colchicine	医	Positive	P	N	P	N	P	P	N										
27	Cyclophosphamide	医	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
28	Cypermethrin	農	Positive			P														
29	Cytosine Arabinoside	医	Positive	N	N	P	N	N	P	P										
30	DDT, p,p'-	農	Positive																	
31	Deltamethrin	農	Positive	N	N	P	N	N	N	N		P	N	N		P		P	N	P
32	Dexamethasone	医	Positive	P	N	N	N	N	N	N							P			
33	Diazepam	医	Positive	P	P	P	N	N	P	P										
34	Diazinon	農	Positive																	
35	Dieldrin	農	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
36	Di-(2-ethylhexyl) phthalate	化	Positive			N														
37	Diethylstilbestrol	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
38	Dioxin	化	Positive																	
39	Diphenylhydantoin	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	Domoic acid	化	Positive			P						N	N	N		N	N	N	N	N
41	Epidermal Growth Factor	化	Positive																	
42	Ethanol	化	Positive																	
43	Ethylene thiourea	化	Positive																	
44	Fluoride	化	Positive	N	N		N	N	N	N										
45	5-Fluorouracil	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
46	Fluoxetine	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										

表1 DNT陽性対照物質による17試験種実施状況とその結果 (Appendix A.1Bを改変)

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apop	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5	
47	Haloperidol	医	Positive	P	N	P	N	P	P	N		P	P	P		P		N	P	P
48	Halothane	医	Positive																	
49	Heptachlor	農	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
50	Heroin	農	Positive																	
51	Hexachloro benzene	化	Positive																	
52	Hexachlorophene	医	Positive	P	N	P	N	N	P	P		P	P	P		P		P	P	P
53	Hydroxyurea	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
54	Iminodipropyl panentriole 3,3-	医	Positive			P	N	N	N	N										
55	Ketamine	化	Positive	N	N	P	N	P	N	N		N	N	N		N		N	N	N
56	Lead	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N		N	N	N				P		
57	Lidocaine	医	Positive																	
58	Lindane	農	Positive			P														
59	Lysergic acid diethylamide	医	Positive																	
60	Maneb	農	Positive	N	N	P	N	N	N	N		N	N	N		N	P	P	P	P
61	Manganese	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N		N	N	N				P		P
62	MDMA	医	Positive																	
63	Methadone	医	Positive																	
64	Methanol	化	Positive																	
65	Methimazole	医	Positive			P														
66	Methotrexate	医	Positive	N	P	P	P	N	N	N										
67	Methylazoxymethanol	化	Positive								P					N			P	P
68	Methylmercury	化	Positive	P	P	P	N	N	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P
69	Methyl parathion	農	Positive																	

表1 DNT陽性対照物質による17試験種実施状況とその結果 (Appendix A.1Bを改変)

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apop	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5	
70	Monosodium glutamate	化	Positive																	
71	MPTP	医	Positive																	
72	Naloxone	医	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
73	Naltrexone	医	Positive																	
74	Nicotine	医	Positive	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
75	Ozone	化	Positive																	
76	Paraquat	農	Positive	P	N	P	N	N	N	P		P	N	N		P	P	P	P	P
77	Parathion	農	Positive			N														
78	Penicillamine	医	Positive			S														
79	Perchlorate	化	Positive																	
80	Perfluoroalkyls (PFOA, PFOS)	化	Positive							P					N			P	P	
81	Permethrin	農	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
82	Phenobarbital	医	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
83	Phenylacetate	化	Positive																	
84	Polybrominated diphenyl ethers	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N		N	N	N		N	P	P	P	P
85	Polychlorinated biphenyls	化	Positive																	
86	Propranolol	医	Positive																	
87	Propylthiouracil	医	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
88	Retinoic acid	医	Positive	P	N	P	N	P	N	N		N	N	N		P		P	P	N
89	Tebuconazole	農	Positive	N	P	P	P	N	P	N							P			
90	Tellurium	化	Positive																	
91	Terbutaline	医	Positive	N	P	N	P	N		P										
92	Tetrachloroethylene	医	Positive																	

表1 DNT陽性対照物質による17試験種実施状況とその結果(Appendix A.1Bを改変)

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apop	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5	
93	Tetrahydro cannabinol	医	Positive																	
94	Thalidomide	医	Positive	N	N	N	N	N	N											
95	Toluene	化	Positive																	
96	Triamcinolone	医	Positive																	
97	Tri-n- butyltin	化	Positive								P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
98	Trichlorfon	農	Positive								N	N	N	N	P	P	N		N	N
99	Trichloroet hylene	化	Positive																	
100	Triethyl lead	化	Positive																	
101	Triethyltin	化	Positive	P	N	P	N	N	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
102	Trimethyltin	化	Positive	P	N	P	N	N	P	N										
103	Valproic acid	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N		P	N	N					N	
104	X Irradiation	医	Positive																	

\*Based on animal (x) and/or human (h) data \*positive→「P」、negative→「N」、S: Shaferらによる、F: Frankらによる

# DNT陰性対照物質

表2 DNT陰性対照物質による17試験種実施状況とその結果(Appendix A.1Bを改変)

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apop	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
1	Acetaminophen	医	Negative	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	Acetylsalicylic acid	医	Negative			N S				N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	Amicillin	医	Negative																
4	Amitriptyline	医	Negative																
5	Amoxicillin	医	Negative	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	Anthraccene	農	Negative																
7	Ascorbic acid	化	Negative			N S													
8	Atropine	医	Negative																
9	Bismuth	化	Negative																
10	Buspirone	医	Negative							N	N	N	N	N	N	(N)	N	N	N
11	Captopril	医	Negative	N	N		N	N	N	P									
12	Chloramben	農	Negative	N	N		N	N	N										
13	Chlorpheniramine	医	Negative							N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
14	Cotinine	化	Negative	N	N		N	N	N										
15	Dabigatran	医	Negative																
16	Deferoxamine mesylate	医	Negative																
17	Deprenyl	医	Negative																
18	Diethylene glycol	化	Negative	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19	Dimethylfo rramide	化	Negative																
20	Dimethyls ulfoxide (DMSO)	化	Negative																

表2 DNT陰性対照物質による17試験種実施状況とその結果(Appendix A.1Bを改変)

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apop	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
21	Dinitrofuram	農	Negative																
22	Diphenhydramine	医	Negative																
23	Doxylamine succinate	医	Negative								N	N	N	N	N	P	N	N	N
24	Erythromycin	医	Negative			N S													
25	Famotidine	医	Negative								N	N	N	N	N	N	N	N	N
26	Fipronil	農	Negative																
27	Fluconazole	医	Negative	N	N		N	N	N										
28	Folic acid	医	Negative			P S													
29	Furosemide	医	Negative																
30	Galactosamine hydrochloride	化	Negative																
31	Glucosamine	化	Negative																
32	Glycerol	化	Negative			N S									N			P	N
33	Glyphosate	農	Negative	N	N	N	N	N	N										
34	Ibuprofen	医	Negative							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	Isoniazid	医	Negative	N	N		N	N	N										
36	Lactose	化	Negative																
37	Levetiracetam	医	Negative																
38	Loperamide	医	Negative	N	N		P	N	P	N									
39	Mannitol, D-	化	Negative			N S				N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	Metformin	医	Negative							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

表2 DNT陰性対照物質による17試験種実施状況とその結果 (Appendix A.1Bを改変)

Compound	分類	Positive or Negative	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
			Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apopt	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
41	Metoclopramide	医	Negative																
42	Metoprolol	医	Negative							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
43	Mifepristone	医	Negative																
44	Naloxone	医	Negative																
45	Omoprazole	医	Negative																
46	Penicillin VK	医	Negative							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
47	Phenol	化	Negative	N	N		N	N	N	N									
48	Pomalidomide	医	Negative																
49	Propylene glycol	化	Negative			N													
50	Propylthio urcil	医	Negative																
51	RU38486	医	Negative																
52	Saccharin	化	Negative	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53	Selegiline hydrochloride	医	Negative																
54	Seroquel	医	Negative																
55	Sodium benzoate	化	Negative	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
56	Sorbitol, D (glucitol, D)	化	Negative	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57	Statins	医	Negative																
58	Sulfisoxazole	医	Negative																
59	Sumatriptan	医	Negative																
60	Testosterone	医	Negative																

表2 DNT陰性対照物質による17試験種実施状況とその結果 (Appendix A.1Bを改変)

Compound	分類	Positive or Negative	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
			Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiatio	hNP1 Apopt	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
61	Tetracycline	医	Negative			N/S													
62	Tiotropium	医	Negative																
63	Trolox	化	Negative																
64	Ursodeoxy cholic acid	医	Negative																
65	Verapamil	医	Negative																
66	Warfarin	医	Negative								N	N	N		N	N	N	N	N
67	zVAD-fmk	化	Negative																

\*Based on animal (x) and/or human (h) data \*positive→「P」、negative→「N」、S; Shaferらの論文に記載。

令和6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：「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*)」

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説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、血清応答因子(Serum response factor (SRF))シグナルレポーターを導入した未分化ヒト 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 シグナルへのかく乱作用を連続計測する。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し、正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、評価する。昨年度はスループット性と再現性を高めるために細胞培養をしながら連続の発光測定が可能な Kronos HT 装置を用いた 72 時間以上のリアルタイム計測法を開発した。その結果、測定時間及び時間解像度が上昇し、DynaLux/c へ適用が可能なことを確認した。

本年度の研究では、昨年度構築した KronosHT を用いたリアルタイム *in vitro* 発生毒性試験法を用いて、昨年度分担研究者の桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。これまでに、未分化のヒト iPS 細胞を用いた試験により、陽性対照物質 7 種、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類可能であった。また、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、神経伝達物質受容体を介した DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞まで分化させた試験の構築を進めた。

## 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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。

昨年度は、スループット性と再現性を高めるためにリアルタイム計測法による DynaLux/c を構築した。本年度の研究では、昨年度構築したリアルタイム *in vitro* 発生毒性試験法を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施する。また、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、神経伝達物質受容体(Neurotransmitter Receptors :NR)を介した DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞(Neural Precursor cells (NPCs))まで分化させた試験の構築を進める。

## 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。昨年度の研究では、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。

今年度は、上記の Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。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。上記の DynaLux/c では未分化のヒト iPS 細胞を用いることで、発生期の神経系を対象とした試験系を想定している。一方で、生後発達期の神経系に対する影響 NR を介したものは少なくない。そこで、生後発達期の NR を介したシグナルかく乱を検出するために、NPCs に分化させたヒト iPS 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を開発する。

## C. 研究結果及び考察

昨年度は、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。

今年度は、昨年開発したKronosHTを用いたDynaLux/cを用いて、桑形が精査したDNT陽性対照物質7種(サリドマイド(THA)、バルプロ酸(VPA)、メトトレキサート(MTX)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノイン酸(RA)、フルオウラシルウラシル(5FU)、ブロモデオキシウリジン(BrdU))及び陰性対照物質5種(ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、Dカンファー(CAM)、ジフェンヒドラミン(DHM))のシグナルかく乱作用をn=3で取得した。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した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正確度100%で分類可能であった(図1)。

上記のDynaLux/cは未分化のヒトiPS細胞を用いてFGF-SRFシグナルに対する化学物質のかく乱作用をもとめており、対象は発生期のDNTである。一方で、生後発達期のDNTを検出するためにNRが発現する細胞を用いたDynaLux/cの構築を試みた。文献検索や企業への問い合わせから、STEMCELL Technologies社のSTEMdiff SMADi Neural Induction Kitを用いて分化させたNPCsがアセチルコリン受容体(ニコチン受容体)、グルタミン酸受容体(NMDA型、AMPA型、カイニン酸型)、ヒスタミン受容体、ドーパミン受容体、GABA受容体を発現すること、そして、再現性やNPCsの保存に関してもデータがそろっていることを確認した。そこで、レポーターヒトiPS細胞を上記のkitを用いてNPCsへ分化誘導を行った。qPCRにより、マーカー遺伝子のmRNAの発現を調べた。その結果、未分化マーカーである*OCT4*の発現低下及び、神経マーカー*PAX6*、*NESTIN*の発現上昇を確認した。次に、NPCsを用いたDynaLux/cの構築のために、SRFシグナル活性化するリガンドを探索した。未分化細胞におけるリガンドであるbFGF、そしてNPCsへの反応性が想定される、SRFの上流として知られるIGF、EGF、BDNFをリアルタイムルシフェレースアッセイにより確認した(図2)。その結果、NPCsにおいてもbFGFが最もSRFを活性化させることが明らかになった。また、未分化iPS細胞と異なり、NPCsにおいてSRFシグナルは二

峰性を示さなかった。次に、bFGF の濃度を検討したところ、0.2 ng/mL、2 ng/mL、20 ng/mL の濃度で同等の SRF 活性化能を示した(図 3)。

#### D. 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した in vitro DNT 評価手法を用いて、DNT 陽性対照物質 7 種及び陰性対照物質 5 種を正確度 100%で分類に成功した。これらは物質毎にシグナルかく乱の方向性や強さ、時間が異なることから、シグナルかく乱を引き起こす標的が異なることが考えられる。今後、試験物質数を増やすことで、DNT の発現機序にも迫れる可能性がある。

併せて、NR を介した DNT の評価に関して、使用の細胞を検討した。まずは、既存のヒト iPS 細胞を分化させるもしくは NR

発現細胞にレポーター遺伝子をノックインすることを検討し、分化させる場合はどの神経細胞にどの手法で分化させるかについても情報を集めた。今回我々は上記の手法を用いることで、1.再現性良く、2.安定的に、3.多種の NR を発現している、4.多くの、NPCs の誘導法を選定した。文献情報や企業への問い合わせにより、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を選定し、NPCs への分化を試みた。NPCs の分化誘導に関しては、未分化マーカーの減少及び NPC マーカーの上昇を確認した。今後、免疫細胞化学を用いて、NPCs の特性を明らかにしていく必要がある。並行して、NPCs における、リガンドを探索し、bFGF が最も SRF シグナルの誘導能が高いことを明らかにした。次年度は未分化 iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加えて、NPCs を用いた DynaLux/c による DNT 評価法を開発する予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

西村拓也, 直田みさき, 大久保佑亮, 平林容子. ICH S6 バイオ医薬品の非臨床安全性評価の見直しについて 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2024, 55, 423-425

Yusuke Okubo, Yoko Hirabayashi, Junji Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. *Current Opinion in Toxicology* 2024; Volume 39, 100489.

## 2. 学会発表

Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: in vitro developmental toxicity testing based on real-time monitoring for signal disruption. EUROTOX 2024, Copenhagen, Denmark, (Sep. 9th, 2024).

Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPS cells through disruption of signal interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.

大久保 佑亮、溝田 華柊、大原 凜太郎、松浦 利絵子、平林 容子、中島 芳浩、福田 淳二:リアルタイム発光法を用いたシグナルかく乱を基にした in vitro 発生毒性評価法の開発. 第 64 回日本先天異常学会学術集会 (2024 年 7 月 27 日) 東京

大久保 佑亮:シグナルかく乱作用を基にした in vitro 発生毒性試験法の開発とその検出機構の解明に向けて. 第 51 回日本毒性学会学術年会. 2024 年 7 月 3 日

大久保 佑亮:生殖発生毒性試験代替法の in vitro 発生毒性試験法について. 2023 年度安研協定期総会及び講演会. 2024 年 11 月 8 日

Rieko Matsuura, Rintaro Ohara, Kashi Mizota, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda, Yusuke Okubo: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs Based on the Wnt Signal Disruption. 第 51 回日本毒性学会学術年会. 2024 年 7 月 3 日

Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 9)

三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕:医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)

溝田華柊、大原凜太郎、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱の自動測定による発生毒性評価. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)

村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討. 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮

溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱作用の自動測定による発生毒性評価. 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮

溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱を指標とした発生毒性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024 仙台

## F. 知的所有権の取得状況

該当なし

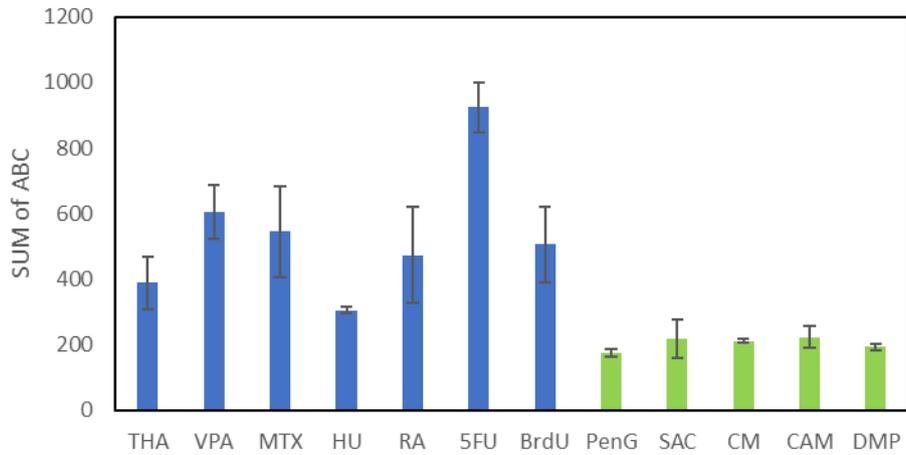


図1：未分化のiPS細胞を用いた DynaLux/c の結果

DNT 陽性対照物質(青色)、陰性対照部室(緑色)。サリドマイド(THA)、バルプロ酸(VPA)、メトトレキサート(MTX)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノイン酸(RA)、フルオウラシルウラシル(5FU)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、Dカンファー(CAM)、ジフェンヒドラミン(DHM)。n=3。エラーバー：標準偏差。

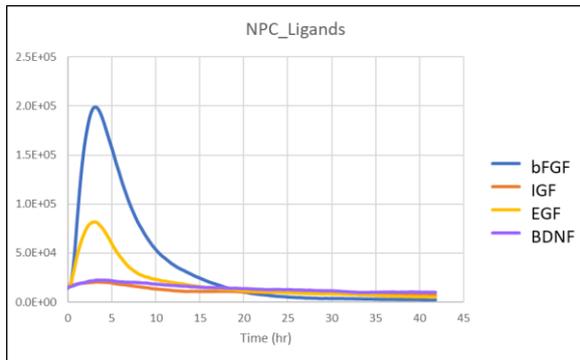


図2：NPCsにおける各種リガンド刺激による SRE-Nluc の活性

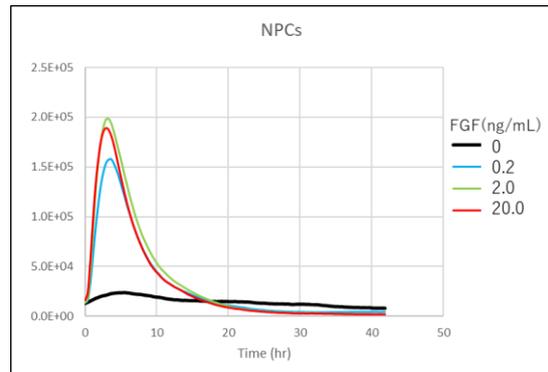


図3：NPCsにおける各種 bFGF 濃度による SRE-Nluc の活性

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6年度(今年度)は、昨年度、幼若期のマウスに反復吸入曝露を実施し、成熟後に行動異常(記憶異常)が認められたキシレン曝露群の脳サンプル(海馬歯状回)について免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度(20 ppm)曝露群において、新生ニューロンマーカーであるDCXおよびNeuroD1陽性細胞数の減少が疑われ、検出された行動影響と関連する神経細胞への影響が示唆された。また、今年度モデル揮発性物質として用いたトルエン(0, 0.7, 7 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、トルエン曝露群において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が認められた。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、昨年度解析を行ったキシレンと同様、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、トルエ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：

昨年度の解析にて行動異常(記憶異常)が認められたキシレン曝露群について、行動解析後に10%中性緩衝ホルマリンにて固定した成熟マウス(13週齢)の脳組織からパラフィン切片(10 $\mu$ m)を作製し、免疫組織化学を行った。パラフィン切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールにて段階的に再水和した。HistoVT Oneにより90 $^{\circ}$ C、30分で抗原賦活化処理し、Blocking Oneと共に4 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキング処理した後、一次抗体

処理を行い、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。一次抗体には以下のものを用いた：rabbit polyclonal anti - doublecortin (DCX; Abcam)、rabbit monoclonal anti-NeuroD1 (Abcam)、rabbit monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN; Abcam)、goat polyclonal anti - SRY - related HMG - box 2 (SOX2; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP; Abcam)。PBSで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 488および594標識抗体(Invitrogen)を用い、4 $^{\circ}$ Cで2時間処理した。核はHoechst 33342で染色した。一次抗体および二次抗体、Hoechst 33342は、Blocking OneおよびPBSの混合溶液で希釈して用いた。

### 生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、トルエ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 $\times$ 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、明暗往來試験、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6年度(今年度)は予定通り、トルエン0.7

および 7 ppm（それぞれ現在の指針値の10 倍、100 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ールにより実施し、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、トルエ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、条件付け時の学習（短期記憶）は成立しているものの、トルエン0.7 ppm曝露群では空間-連想記憶の有意な低下が、トルエン7 ppm曝露群では空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められた（図3）。すなわち、キシレンの吸入曝露と同様、生後発達期におけるトルエ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、特に記憶への影響が示唆された。音-連想記憶試験については、有意差は認められなかったものの、トルエン7ppm曝露群における音-連想記憶が低下傾向にあり、初期反応（記憶の想起）の誘発自体は保たれている一方で、恐怖記憶の保持または持続的な想起過程に障害が生じている可能性が考えられた。また、両曝露群において、空間-連想記憶試験において有意差が認められたことから、特に、空間記憶の責任部位である海馬への影響が考えられた。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）。また、キシレン吸入曝露にて得られた脳サンプルのうち、海馬歯状回について、免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度（20 ppm）曝露群において、新生ニューロンマーカーであるDCXおよびNeuroD1陽性細胞数の減少が疑われ（図5）、検出された行動影響と関連する神経細胞への影響が示唆された。

#### D. 結論

令和6年度（今年度）、トルエン（0、0.7、7 ppm）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、トルエン0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。

今回の結果から、昨年度行ったキシレンでの行動影響と同様、トルエ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確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。キシレン曝露群の海馬歯状回においては、新生ニューロンマーカーであるDCX およびNeuroD1 陽性細胞数の減少が疑われ、その他分化マーカーを含め、引き続き追加データを取得するとともに、トルエンについても同様の解析により、類似した影響の特定を試みる必要がある。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S. A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam Toxicol Sci* 11(4), 2024. doi: 10.2131/fts.11.169.

##### 2. 学会発表

齊藤洋克、横田理、北嶋聡. セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連 第 51 回日本毒性学会学術年会（2024. 7. 3, 福岡）

齊藤洋克. 周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出 日本内分泌攪乱物質学会第 26 回研究発表会（2024. 12. 7, 東京）

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

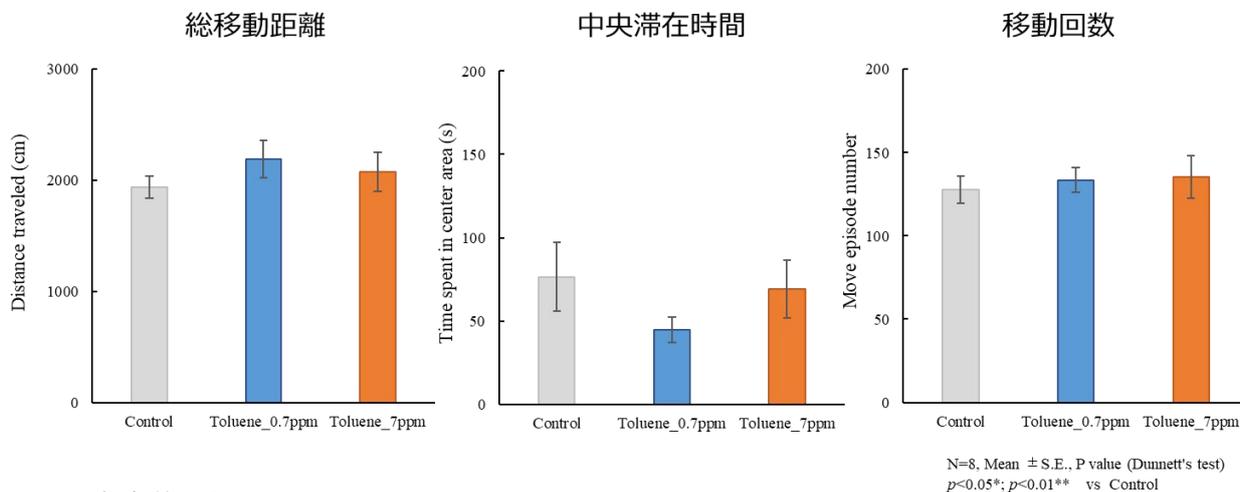
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 22時間7日間 トルエン0.7および7ppm 吸入曝露 オープンフィールド試験結果

測定時間: 10分

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

● 有意差なし

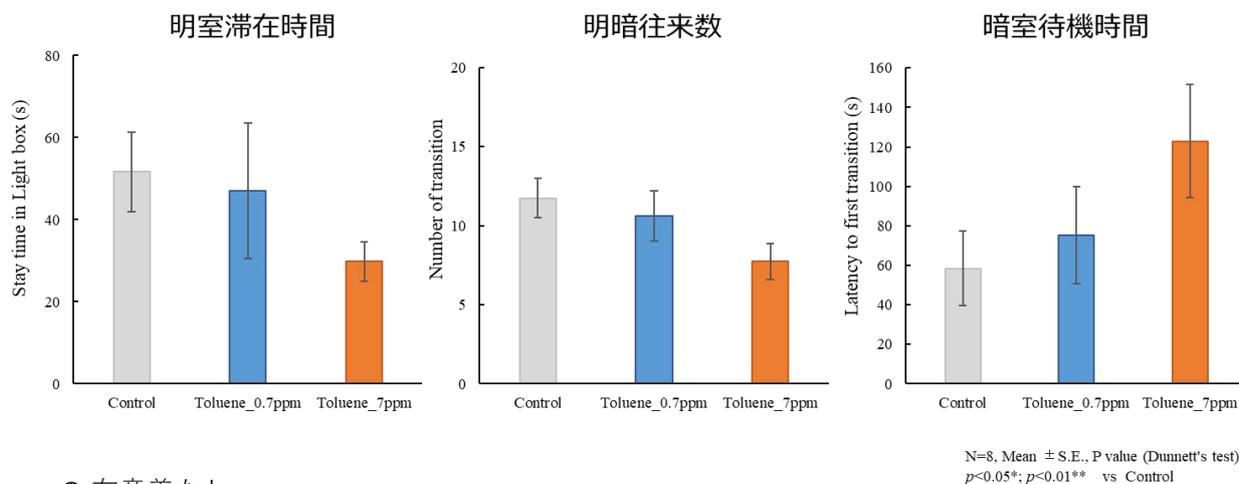
図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

## 22時間7日間 トルエン0.7および7ppm 吸入曝露 明暗往来試験結果

測定時間: 5分

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

● 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 トルエン0.7および7ppm 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

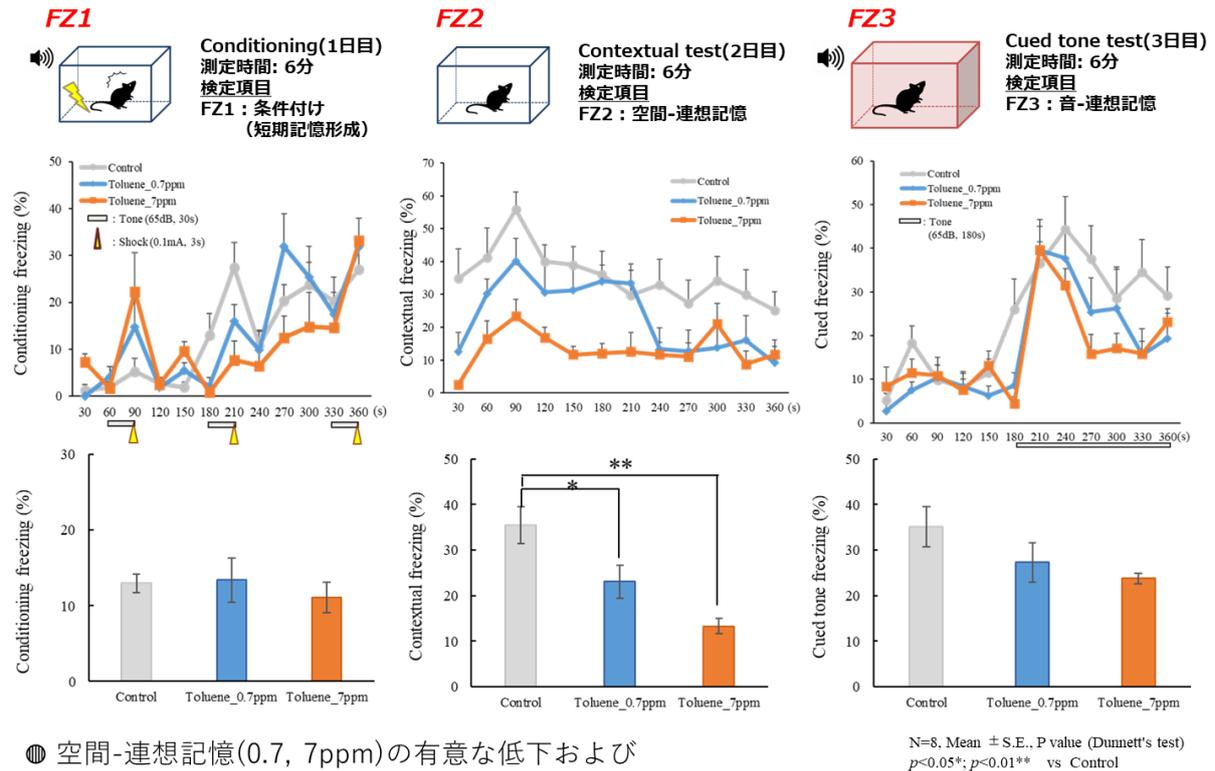


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

## 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%)

(トルエン0.7および7ppm 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)

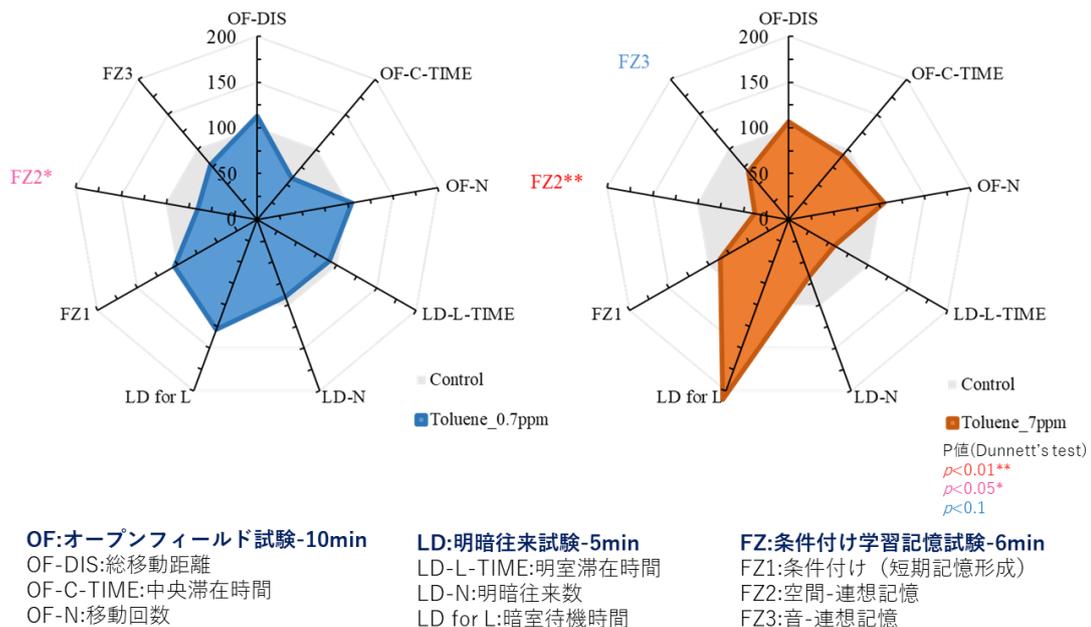


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)

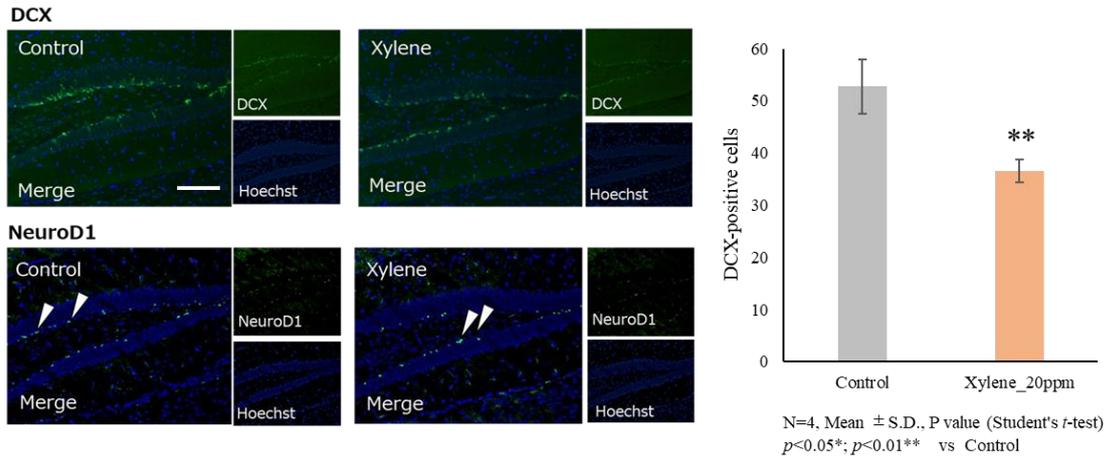


図 5. キシレンを曝露したマウスの海馬歯状回における免疫組織化学

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6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い、令和6年度においては受精後9.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行っている。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、および9.5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受精後8.5日目および9.5日目の胎盤における網羅的遺伝子発現解析を行ない、胎盤の網羅的遺伝子発現解析により、胎盤の分化度を評価することが可能であることを明らかにした(小野)。

## 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。

令和 5、6 年度に解剖を行なった受精後 7.5 日から 9.5 日目の胎盤においては、胎盤外円錐から spongiotrophoblast および labyrinth layer 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、および、labyrinth layer の形成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、9.5 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 3 ステージ (7.5dpc, 8.5dpc および 9.5dpc) (dpc: Days post coitum: 交配後) 分ける。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。

凍結した胎盤より RNeasy mini kit(Qiagen)を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (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。作成したライブラリーは、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、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、pair end sequence (150bp x 2)にて RNA-seq を行なう。

### ・マウス胎盤 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 HISAT2 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、HTseq program 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 mRNA のリファレンスシーケンスは、UCSC genome browser より入手した。

(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の配慮を十分行い、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)

令和5年度、令和6年度は、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、9.5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3ステージ(7.5dpc, 8.5dpc, 9.5dpc)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、令和5年度において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。

令和6年度においては、9.5dpc用の交配では、5匹中2匹の雌がプラグ陽性であった。受精後9.5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。8匹、6匹の正常発生胚を採取した。

また、令和6年度において、このうち、8.5dpcおよび9.5dpcの胎盤組織の網羅的遺伝子発現解析(N=4)を行なった。

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ズ用のライブラリーとして、Illumina社のStranded mRNA kitを選択し、網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサー(Illumina社Nextseq2000)を利用して行なった。

9.5dpcの胎盤組織においては、母体側と直接接している側から、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast及びlabyrinth layerの3層構造からなることが報告されており、それぞれに特異的な遺伝子発現マーカーの存在が知られている。

網羅的遺伝子発現解析から、これらの遺伝子発現マーカーの遺伝子発現量を定量した。

その結果、trophoblast giant cellのマーカーであるP11(Pr13d1)およびP12(Pr13b1)の遺伝子発現においては、8.5dpcよりも9.5dpcにおいて遺伝子発現の顕著な増加が確認された。

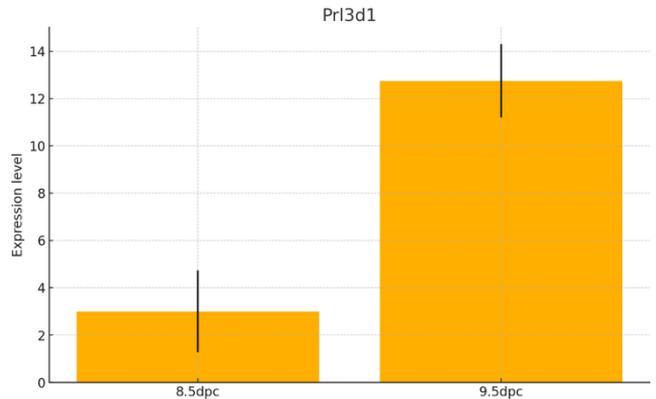


図: Pr13d1 遺伝子 (P11) の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンズの reads counts。(\*\*: P < 0.01)

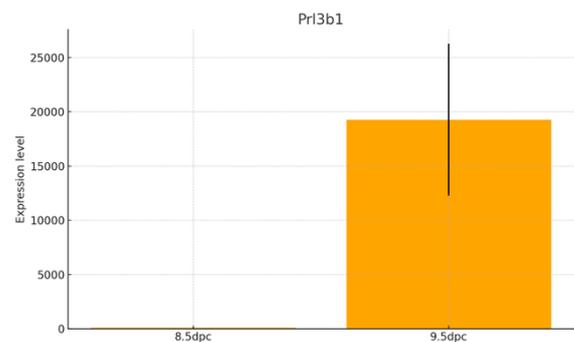
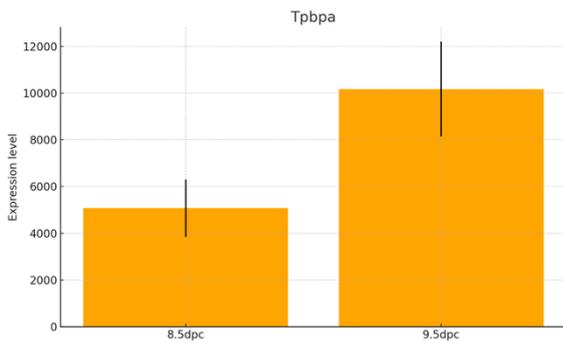


図: Pr13b1 遺伝子 (P12) の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンズの reads counts。(\*: P < 0.1)

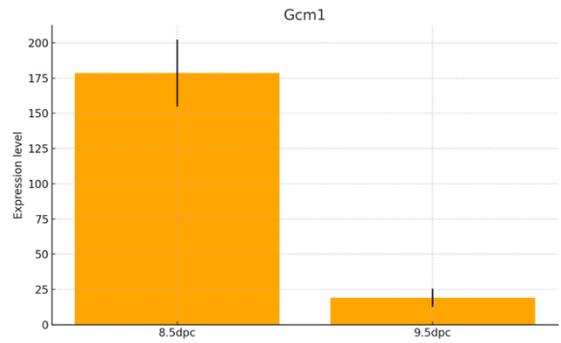
P11は、primary trophoblast giant cellであり、8.5dpcには既に存在しており、9.5dpcにおいても同様に存在していることが想定されているが、遺伝子発現データからも一致している。

また、P12はsecondary trophoblast giant cellであり、9.5dpc以降に増殖することが報告されており、9.5dpcにおいて発現量が急激に増加しており、これらも既知のin situ hybridizationのデータと一致している。

また、spongiotrophoblastのマーカーであるTpbpaの遺伝子の発現は、8.5dpcおよび9.5dpcで同様に確認された。

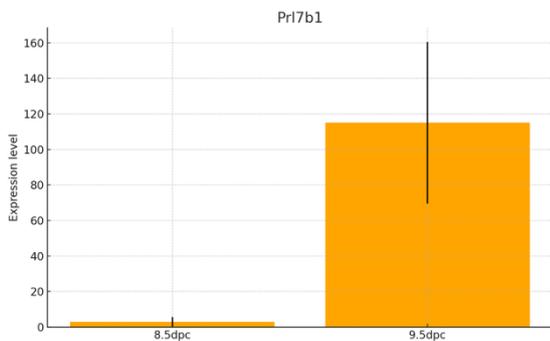


図：Tpbpa 遺伝子の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(\* : P < 0.1)

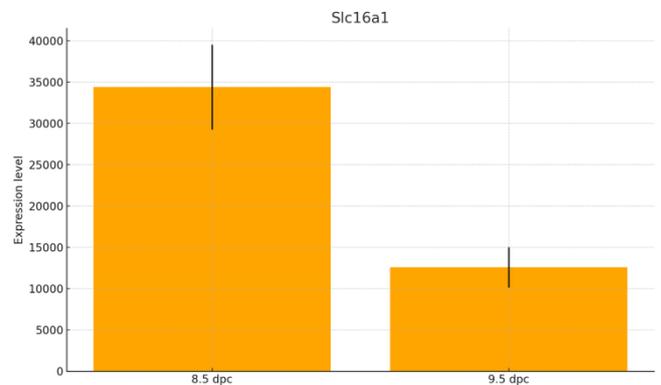


図：Gcm1 遺伝子の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(\*\* : P < 0.01)

Spongiotrophoblast は、spongiotrophoblast cells および glycogen cells に分化することが知られているが、glycogen cells に関しては、母体側に浸潤する invasive glycogen cells 集団が存在することが知られている。これらの細胞群は、発生が進むにつれて増加することから、母体側脱落膜と胎児由来胎盤細胞の分離が難しくなる。これらのマーカーとしては、Pr17b1 が報告されており、9.5dpc の方がより増加しており、すなわち、invasive glycogen cells が増加していることが想定される。

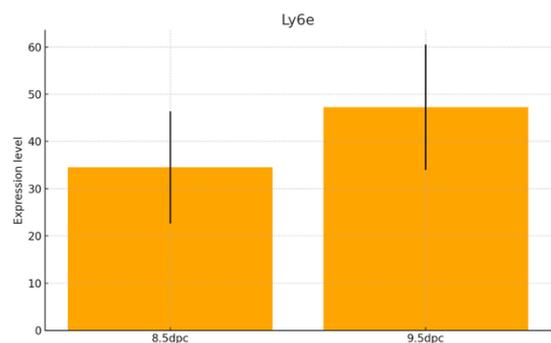


図：Pr17b1 遺伝子の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(\* : P < 0.1)



図：Slc16a1 遺伝子の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(\*\* : P < 0.01)

Labyrinth layer に関しては、8.5dpc から形成されるものであり、そのマーカーである Gcm1 の発現が確認されている。また、labyrinth layer は、胎児側毛細血管と syncytiotrophoblast より構成されており、胎児側血管のマーカーとなる Slc16a1 および syncytiotrophoblasty のマーカーとなる Ly6e の発現が確認されている。



図：Ly6e 遺伝子の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。

今年度、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果が胎盤の分化解析 (secondary trophoblast giant cell, invasive glycogen cells など) の検出にも有用

であることがわかったことから、他のステージに関しても同様の解析を行う予定である。

#### 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。

これらの正常な胎盤の発生には、胎児胎盤細胞の母体側への浸潤などが起こることが必須であることが報告されている。

令和6年度においては、母体側へと浸潤することは報告されている **invasive glycogen cells** に特異的なマーカー遺伝子である **Prl7b1** 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。

また、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遺伝子発現データをより多くのステージで解析することで、**labyrinth layer** の分化度を知るために重要なマーカー遺伝子の単離することができ、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が重要になる。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どうかは、正常な発生過程における詳細な胎盤の遺伝子発現解析を行うことで、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ことで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

●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]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F  
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction  
*OPEN BIOLOGY* 2025 Jan;15(1):240279. doi: 10.1098/rsob.240279. Epub 2025 Jan 29..

### ●小野 竜一

非臨床安全性評価における New approach methods と  
しての細胞外小胞の活用  
*医学のあゆみ* Vol.291 No.9 2024. 11. 30

### 2. 学会発表

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima  
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse  
INTERNATIONAL SOCIETY FOR  
EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING  
2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第71回日本実験動物学会総会、京都、2024年5月29日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S  
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA  
第51回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●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

Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima

Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse

58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima; Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection, ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

## 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 「胎盤オルガノイド毒性評価系の開発」

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。

ここではその中で分担研究「胎盤オルガノイド評価系の開発」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の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。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(サリドマイド等)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+メタボローム解析、RNA-Seq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種差を考慮した開発を目指す。

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 年末に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+メタボローム解析、RNA-Seq 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)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) :

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 $\mu$ 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(3hrs)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38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47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、その手法に関しては論文にした。現在、再現性の確認作業を継続中である。

#### B-5: 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(3hrs)によるmRNA発現の網羅的array解析 (RNA-Seq analysis) :

全検出遺伝子数はhuman16378遺伝子に対してmouse20543遺伝子と検出された遺伝子数はマウスの方が多い。変動遺伝子(p-value<0.05)もhuman 1,615遺伝子、mouse 6,582遺伝子と生物種間での大きな有意差があることが判明した。メタボローム解析と統合して、令和7年度はさらに詳細に解析していく計画である。

#### B-6: 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6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。令和 7 年度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。さらに DNA 解析として我々が用いている PFGE 法の手法（マウス）に関する部分を論文化した。

#### 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

Takeshi Terabayashi, Takao Sasaki, Toshimasa Ishizaki, Tadashi Tomo, Yoshihiro Nishida\*, Katsuhiro Hanada. Analysis of accumulation of DNA double-strand breaks in mouse tissues by pulsed-field gel electrophoresis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2025 Apr;497:117278. doi: 10.1016/j.taap.2025.117278. \*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.

西田欣広、花田克浩. 難治性の婦人科癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の可能性. *BIO Clinica*. 39(8).68-71.2024.

## 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 57<sup>th</sup> 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 57<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Ljublyana, Slovenia.(2023.9.10)

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida : New strategy of genotoxicity test using organoids in the 3-dimensional tissue culture system. The 58<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Copenhagen, Denmark. (2024.9.9)

Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Satoshi Kitajima: Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies. The 58<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Copenhagen, Denmark. (2024.9.9)

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、井上尚美、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)

花田克浩、西田欣広: 胎盤オルガノイドを用いた DNA ダメージ誘導の二重鎖切断の検出系の開発第 53 回日本環境変異原ゲノム学会岡山 (2024. 12. 7)

## 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
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	第 184 巻	3-6	2024
Yusuke Okubo, Yoko Hirabayashi, Junji Fukuda	Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics	Current Opinion in Toxicology	第 39 巻	100489	2024
Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Satoshi Kitajima	Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies	Toxicology Letters	第 399 巻第 S2 号	S188	2024

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6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6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・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6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・客員研究員

(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。

令和7年3月31日

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6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・室長

(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。

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6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) 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。

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6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・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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

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6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 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」、「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。