

別紙 1

厚生労働科学技術研究費補助金
化学物質リスク研究事業

発生毒性リスク評価に資する
シグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発
(24KD1003)

令和 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大久保 佑亮

令和 7 (2025) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告 (別紙 3)	
発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発	
大久保 佑亮	1
II. 分担研究報告 (別紙 4)	
1. リスク評価に向けた DynaLux/c の改良	
大久保 佑亮 福田 淳二	14
2. In vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定	
桑形 麻樹子	29
3. 多色ルシフェラーゼアッセイの構築	
中島 芳浩	31
4. コンソーシアムの設立、国内外の合意形成	
小島 肇	39
5. OECD テストガイドライン対応	
平林 容子	42
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別紙 6)	46

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）

(24KD1003) 総括研究報告書要

発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発

研究代表者 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 第四室 室長

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本研究では、DynaLux/c にリアルタイム発光測定装置(KronosHT)を導入し、70 時間以上の連続した FGF シグナルのかく乱作用を計測した。溶媒対照に対する化学物質のシグナルかく乱面積を Area Between the Curve (ABC)として化学物質のシグナルかく乱作用の指標として用いた。陽性および陰性対照物質を評価した結果、陽性対照物質 14 種類、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類することが可能であった。また、陽性対照物質の約 8 割で用量依存的な反応が確認され、DynaLux/c を基盤としたリスク評価指標の構築が可能であることが示唆された。

DynaLux/c の更なる高精度化のため、従来の FGF シグナルのかく乱モニター用 Nluc に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして用いる第二のルシフェラーゼ（内部標準ルシフェラーゼ）を導入する多色ルシフェレースアッセイ系の構築を行った。今年度は内部標準用のプロモーター、ルシフェレース、発光基質、光学フィルターの検討を行い、ヒト iPS 細胞においても多色ルシフェレースアッセイ系の構築が可能であることを確認した。

DynaLux/c の公定化を目指し、試験法の国際標準化に向けた取り組みも進めた。研究班はコンソーシアムを設立し、SOP（標準作業手順書）の作成、規制機関や業界団体との議論、OECD ガイドライン承認に向けた情報収集を実施した。また、これらの取り組みにより、DynaLux/c を国際的に受け入れられるリスク評価手法として確立するための基盤が整備されつつある。また、in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定を行った。

DynaLux/c が公定化されれば、動物実験の削減や審査コストの低減を実現し、新規化学物質の迅速な市場導入を可能にする。また、化学産業の競争力を強化し、規制科学におけるイノベーションを促進するとともに、持続可能な社会の構築に寄与する。本研究の成果は、化学物質の安全性評価における新たなパラダイムを提示し、科学的根拠に基づくリスク管理の進展に貢献するものである。

研究分担者

福田 淳二	横浜国立大学 教授
中島 芳浩	産業技術総合研究所 研究グループ長
平林 容子	国立医薬品食品衛生研究所 センター長
桑形 麻樹子	帝京平成大学 教授
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 特別研究員

研究協力者

Seo Jieun	横浜国立大学 助教
佐々木 大輔	産業技術総合研究 研究員
正田 卓司	国立医薬品食品衛生研究所 室長

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系は高コストであるうえに、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える *in vitro* 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた (*iScience* 等)。DynaLux/c は、動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低

コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性(28 日間反復投与毒性)に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短期間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家(桑形麻樹子)、公定化に関する専門家(平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家(小島肇: 日化協 LRI 顧問)らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔(若手)や横浜国立大学の Seo Jeun 博士(若手・女性・国際性)などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な *in vitro* 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

B. 研究方法

DynaLux/c の概要

DynaLux/c は発生生物学の観点から発生毒性評価を試みた NAM である。受精卵から胎児に至るまでの複雑な形態形成は、細胞の増殖・分化・相互作用などを介し、適切に制御されている。加えて、偶発的な細胞死や遺伝子発現などの内因性、及び化学物質曝露のような外因性のノイズに対する抵抗性もまた適切な発生には重要である。これまでの研究から、形態形成とノイズ抵抗性はシグナル伝達の相互作用により連結され、発生過程を制御していることが明らかになっている(図 1a)。

動物試験では、主に胎児の形態異常を基に化学物質の毒性を評価している(図 1b)。その毒性機序を考えると、化学物質がシグナル伝達相互作用をかく乱し、その結果として生じた形態異常を観察していると考えられる(図 1c)。そこで我々は、こ

のシグナル伝達相互作用のかく乱を計測することで発生毒性を予測できると考え、リアルタイムルシフェーセンスアッセイを用いたレポーターアッセイを確立した。これまでに、ヒト iPS 細胞を用いて 5 種類 (FGF シグナルは 2 種類、WNT シグナル、BMP シグナル、TGF- β シグナルは各 1 種類) のレポーター系を樹立した。各レポーターとリガンドの組合せを検討し、レポーターの反応性を確認した。その中で、最も発光強度が高くシグナルかく乱に対する感度が高い、FGF シグナルレポーターのうち血清応答因子 (Serum Response Factor: SRF) のレポーターアッセイ系を選定した(図 1d)。その特徴は、代表的なホタルルシフェーセンスに比べ約 100 倍明るく iPS 細胞での生細胞ルシフェーセンスアッセイが可能な Nluc を発光レポーターとして用いたことである。また、培養をしながらリアルタイム発光計測が可能なリアルタイム発光測定装置(Kronos HT)を

発生毒性評価法の NAM である DynaLux/c

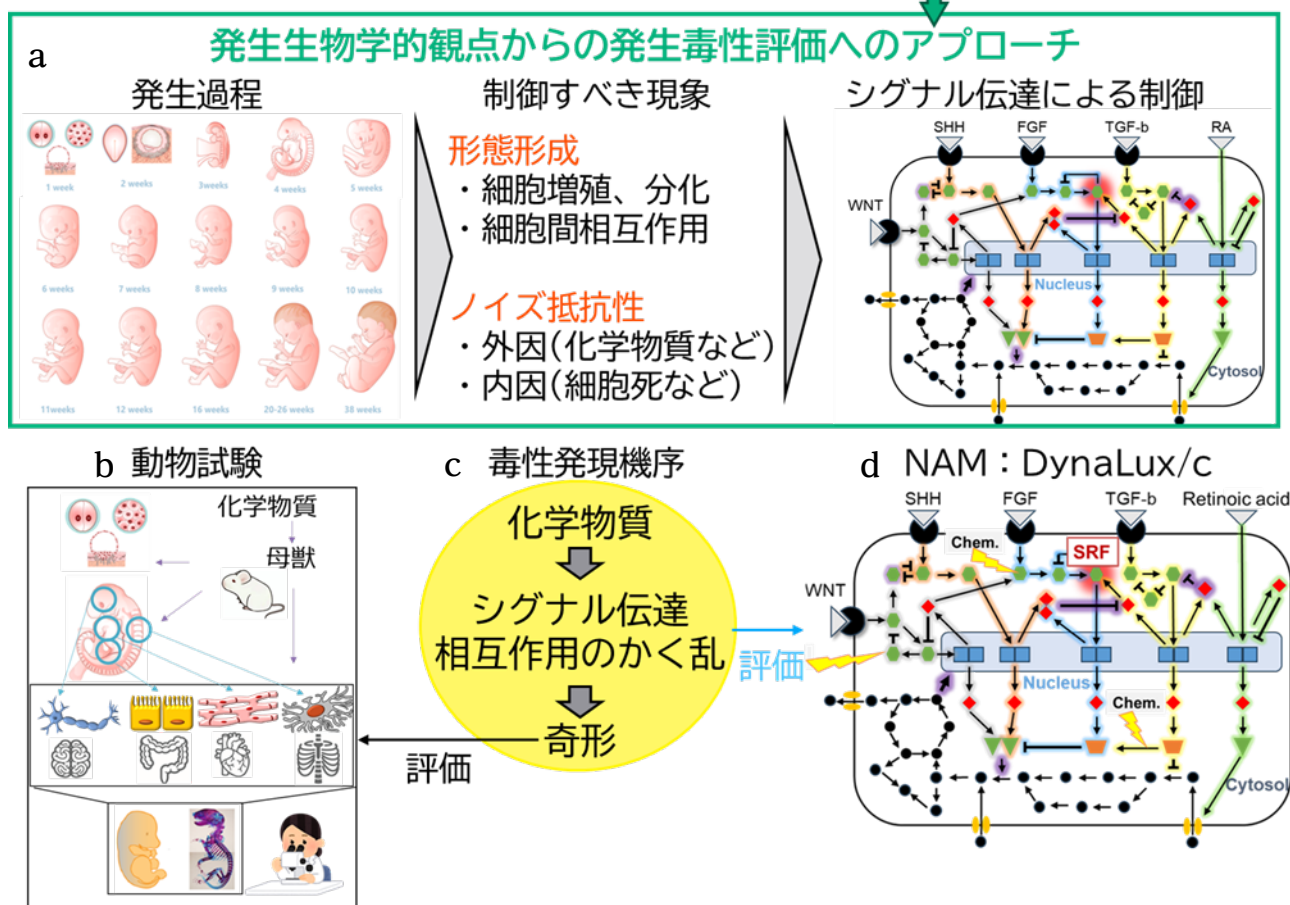
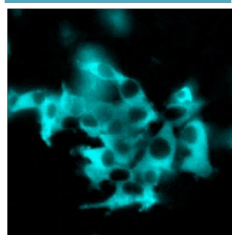


図 1: 発生毒性評価における動物試験と DynaLux/c の比較

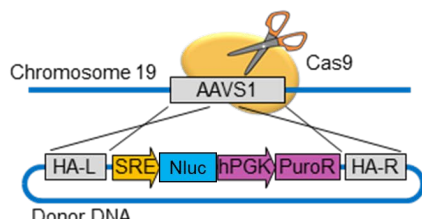
NanoLuc (Nluc)



Promega社HP

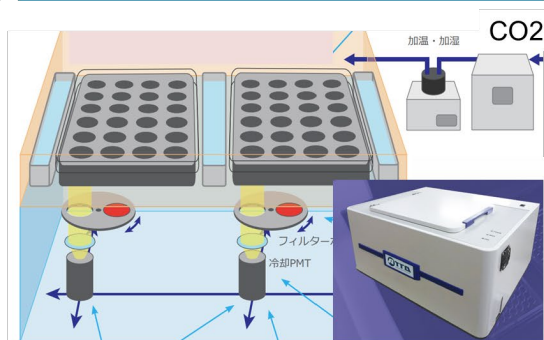
ヒトiPSCs 201B7 line

AAVS1遺伝子座へ
レポーターのKnock-in



AAVS1 locus:
安定して遺伝子を発現し、挿入配列型の遺伝子発現に影響を及ぼしにくい。

Kronos HT



ATTO社HP

高輝度

リアルタイムアッセイ

再現性↑

サイレンシング↓

(多色)自動計測

図 2: ヒト iPS 細胞を用いたリアルタイムルシフェーセンスアッセイ

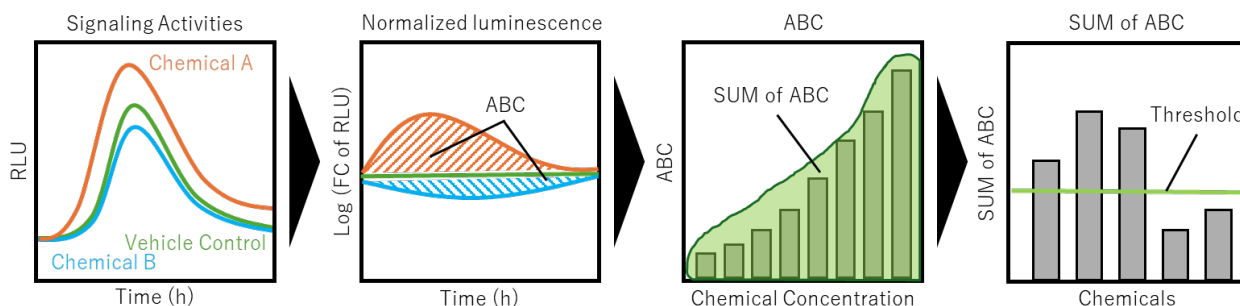


図 3: DynaLux/c によるシグナルかく乱作用の数値化

組み合わせることで、細胞播種から試験終了まで 1 週間で終了するハイスループットな試験系を構築した(図 2)。

実際のシグナルかく乱試験は、レポーターヒト iPS 細胞を 96 穴プレートに播種しコンフルエントまで培養する。その後、試験物質を最高溶解度もしくは IC_{50} 以下の濃度を最高濃度として 1/2 ずつ希釈した 8 段階の濃度を培地に適用し、72 時間以上リアルタイムルシフェーセンスアッセイを行う。化学物質のシグナルかく乱作用を比較するために、溶媒対照群に対する試験物質のシグナルかく乱面積(Area between the curve: ABC)を各濃度で求め、それらの和をシグナルかく乱作用の値とした(SUM of ABC)。ROC 解析により閾値を設定し、発生毒性陽性と陰性を分類する(図 3)。

B-1. リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

DynaLux/c の特性を把握するために既存の発生毒性物質を用いたハザード評価を行った。既存の発生毒性物質として、これまでに陽性対照物質 14 種(サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド(LDN)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール(RA)、ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、プロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))、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(DMP))を評価した(表 1)。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として SOP を作成した。

B-2. in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定

立ち上げとなった今年度は、Kronos HT を用いない手動の DynaLux/c システムで先行研究 (Kanno *et al.*, *iScience*, 2022, Kanno *et al.*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2022)にて評価をしている 6 化合物 (バルプロ酸ナトリウム、レチノール、ハイドロキシウレア、サルチル酸ナトリウム、サリドマイド) について、臨床および非臨床試験情報を収集した。

将来的に IVIVE に用いることを想定して、臨床試験および非臨床試験情報を調査した。臨床試験については臨床使用用量および薬物動態結果を、非臨床試験では薬物動態にあわせ、各種毒性試験 (急性、亜急性、生殖発生毒性試験) の結果を収集した。

調査方法

主に下記の検索エンジンを用いて、毒性情報を調査した。

(1) 学術論文の検索サイトである Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

(2) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 医療用医薬品の添付文書情報 (https://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)

また、市販薬の添付文書、インタビューホームに記載されていた引用文献を確認した。

B-3. 多色リアルタイムルシフェーゼアッセイの構築

本分担研究では、試験実施者や実施機関間での再現性の向上および DynaLux/c 法の更なる高精度化を目的とし、FGF シグナル (青色) に加えて、

内部標準 (赤色) を組み込んだ多色ルシフェーゼアッセイの構築を目的とする。

ルシフェラーゼ導入 iPS 細胞の作製：

血清応答因子 (serum response factor: SRF) の応答配列下 (serum response element: SRE) で Nluc を、EF1 α プロモーター制御下で甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3) が発現する 2 つの発現ユニットを連結したレポーターベクターを作製した。これをヒト 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、薬剤選択により安定細胞株 (以下、2 色発光 iPS 細胞と記載する) を樹立した。

発光測定：

マルチウェルプレート対応のリアルタイム発光測定装置 (KronosHT、アトー社) を用い、96 ウェルプレートに播種した iPS 細胞の発光を、37℃、5%二酸化炭素雰囲気下、湿度飽和状態において、1 ウェル当たり 10 秒間、約 30 分間隔で 3 日間連続で測定を行った。ルシフェラーゼを発光させるための発光基質は、所定の濃度を培地に添加した。

B-4. コンソーシアムの設立、国内外の合意形成

本研究班の中で、DynaLux/c の公定化に向けて、業界団体等の意見反映及び国際的な合意形成を目指した。

発生毒性試験代替法 DynaLux/c の OECD における国際標準化及び医薬品規制調和国際会議 (ICH) における当該試験を用いたリスク評価法の認知を目的に、本研究班の中に業界団体等の意見反映及びプロトコルの技術移転性を確認するためのコンソーシアムを設立した。

第一回コンソーシアム会議を令和 6 年 7 月 25 日 (木) 国立医薬品食品衛生研究所で開催され、班員に加え、厚生労働省、独立行政法人医薬品医

療機器総合機構（PMDA）及び業界団体の専門家が参加した。

第二回コンソーシアム会議は、令和7年1月28日（火）に国立医薬品食品衛生研究所で開催し、上記の方々が参加した。

B-5. OECD テストガイドライン対応

本分担研究では、この改良される試験法の確立・公定化に資することを目的として、試験法の国際標準化や OECD などにおける試験法ガイドラインとしての公定化に必要な国内外のNAMの開発状況やその適格性認定などを含む情報収集を行った。

米・EU を中心に、化学物質等の安全性やリスク評価において、試験動物を使用しない評価法へのパラダイムシフトが加速されつつある現状と、その行政的受け入れに関する国内外の状況の把握を目的として、規制関連国際会議（OECD Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)-36（4/16-19、パリ）、OECD Working Party on Hazard Assessment (WPHA)（6/24-26、パリ）、OECD Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA)（6/25-27（うち 6/25PM～6/26AM は WPHA との合同会議）、パリ）、Global Coalition for Regulatory Science Research (GCRSR) & Global Summit on Regulatory Science (GSRS)24（9/17-19、アーカンソー）や、国内関連学会（日本実験動物学会（5/29-31、京都）、レギュラトリーサイエンス学会（9/13-14、東京））に参加し、それぞれの発表の聴講や、意見交換を通じて、必要な情報の収集を行った。

（倫理面への配慮）

B-2 研究は情報収集が主とした研究であるが、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。その他の課題は該当なし。

C. 研究結果及び考察

C-1. リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

SOP の作製にあたっては、試験の再現性と信頼性を確保するため、以下の検討を行った。まず、播種細胞数および培養スケジュールについては、日単位・時間単位での厳格な管理を実施した。次に、96 穴プレートにおけるエッジ効果の抑制を目的として、外周ウェル間に滅菌水を注入し、また、培養時には従来の蓋の代わりにガス透過性シール（ブリーズイージー、ブリーズイージー）を用いることで湿度の安定化を図った。さらに、細胞培養中の温度を一定に保つための運用方法を確認した。加えて、施設内における実施環境のバリデーションを通じて、試験実施上の課題の抽出と対策を行った。その結果、複数の実験者において、再現性の高い波形データが得られるようになり、Well 間の差も減少した。作成した SOP は、その他として公開する。

作成した SOP に準拠して、DynaLux/c を用いた化学物質のシグナルかく乱作用の測定を実施した。評価に用いた化学物質、使用溶媒、試験濃度、および判定の正誤については表 1 に示す。

物質毎の毒性強度を明らかにするために、標準化したグラフ及びその各濃度のかく乱面積（Area between the curve: ABC）を求めた。陰性対照物質はほとんどシグナルをかく乱しない一方で、発生毒性陽性物質は、物質毎に異なるシグナルかく乱パターンを示した。これらの ABC の和（SUM of ABC）から閾値を設定し、陽性対照物質 14 種と陰性対照物質 5 種を 100% の正確度で分類することに成功した。

次に、各評価物質の用量相関に着目した。陰性対照物質では用量相関は見られず、ABC の値も低いことが明らかになった。陽性対照物質のうち、サリドマイド、レナリドミド、メトトレキサート

は用量相関性を示さなかったが、他の 11 物質では用量相関性が確認された。現在は、最高用量から 1/128 希釈までの範囲を試験しており、今後は試験の濃度範囲を広げる必要があるかもしれない。ただし、用量相関がみとめられなかった 3 物質の最高試験濃度は溶解度に依存しており、溶けにくい物質の評価は今後の課題となる。これらは今後のデータの集積を待って判断する。

最後にこれまでのデータから ABC の値に関して考察した。陰性対照物質ではほとんどの濃度で ABC は 50 以下であった。一方で、陽性対照物質では用量相関を示すものは ABC の値が 100 程度を超えると ABC の値が急激に増強される傾向がみられた。用量相関を示さない 3 物質の ABC はどの濃度でも 100 前後であった (図 10)。これらの結果は DynaLux/c においても、Point of Departure (PoD) の設定が可能かもしれないことを示唆している。今後のデータの集積を待ち、班員やコンソーシアムのメンバーと協議しながら、IVIVE を考慮したリスク評価への道筋をつけ、公定化に向けた協議を続ける。

C-2. IVIVE に向けた情報収集並びに評価物質の選定

DynaLux/c システムで既に評価をしている 6 化合物 (バルプロ酸ナトリウム、レチノール、ハイドロキシウレア、サルチル酸ナトリウム、サリドマイド) について、臨床および非臨床試験情報を収集した。すなわち、臨床試験では臨床使用用量および薬物動態結果が入手可能であった。また、非臨床試験では薬物動態にあわせ、各種毒性試験 (急性、亜急性、生殖発生毒性試験) の結果を収集した。各種毒性試験報告書は入手不可能なために、詳細な毒性情報 (程度及び頻度など) に関しては限られた情報による収集評価となった。

C-3. 多色リアルタイムルシフェーレースアッセイの構築

これまでの DynaLux/c では、シグナルかく乱モニター用のルシフェラーゼとして Endurazine を発光基質として青色に発光する Nluc を用いている。そこで多色ルシフェーレースアッセイ系の構築のため、第二のルシフェラーゼ (内部標準ルシフェラーゼ) には Nluc と最大発光波長が最も離れ、異なる発光基質 (D-ルシフェリン) で発光する甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3、以下赤色ルシフェラーゼと記載) を選定した。また赤色ルシフェラーゼを発現するためのプロモーターとして幹細胞において外来遺伝子の強制発現に汎用されている elongation factor1 α (EF1 α) プロモーターを選定した。

続いて、EF1 α プロモーターの制御下で赤色ルシフェラーゼを連結したベクターを導入した iPS 細胞を樹立し、D-ルシフェリン存在下でリアルタイム発光測定を行い、数日間に渡り有意な発光が持続することを確認した。次に、既に樹立済みの FGF シグナルを Nluc でモニターする iPS 細胞を併用し、複数ルシフェラーゼのリアルタイム発光測定方法を検討した。Endurazine および D-luciferin を共存させても各々のルシフェラーゼが特異的に発光し、発光反応の特異性が保たれること、また両発光基質が共存した状態でも基質の自己酸化によるバックグラウンドは皆無であり、高い信号/ノイズ比下でリアルタイム発光測定が実施できることを確認した。さらに、青色の Nluc と赤色ルシフェラーゼを同時測定する方法を検討するため、これら 2 種類の iPS 細胞を共培養し、光学フィルターによる各々の発光の抽出を試みた結果、青色および赤色領域を抽出する 2 枚の光学フィルターを用いることで 2 種類のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定が可能であることを確認した。

これらの結果に基づき、FGF シグナルモニター用 Nluc の発現カセットと、EF1 α プロモーターと赤色ルシフェラーゼが連結された内部標準用発現カセットを 1 つのプラスミド内に搭載したベ

クターを構築し、これを導入した 2 色発光 iPS 細胞を樹立した。

次に、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法と細胞の作動性について検証した。この細胞では青色の Nluc および赤色の SLR3 の発光が混合して光るため、2 枚の光学フィルターを用いて両者の発光を分離・検出する測定方法を想定した。具体的には、ショートパスフィルターである SPF500 により Nluc の 500 nm 以下の発光を、他方、ロングパスフィルターである R 6 2 フィルターにより SLR3 の 600 nm 以上の発光を分離して測定する方法を設定した。この方法により両ルシフェラーゼの発光を測定可能か検討するとともに、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の作動性について、FGF 処理による SRF-SRE シグナルの増強（発光増加）を指標に検証した。

2 色発光 iPS 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、所定のプロトコールに従い培養し、1% Endurazine、500 μ M D-luciferin および FGF または溶媒を含む培地に交換した。発光測定はフィルターなし、SPF500 および R62 を通した発光を各々10 秒間、約 30 分間隔で 70 時間リアルタイムに測定した。その結果、SPF500 フィルターを通して測定した Nluc の発光強度は FGF 処理により急激に増加し、約 5 時間をピークとする活性化キネティクスが測定された。一方、R62 フィルターを通して測定された SLR3 の発光強度は、FGF 処理により若干の増加は見られるものの、大きな変動は生じないことが確認された。FGF 処理による Nluc の活性化キネティクスは、Nluc のみが発現する RE-Nluc 細胞でこれまで得られているパターンと一致していた。また、SLR3 については、SLR3 のみが発現する EF1-SLR3 細胞に FGF を処理しても顕著な発光強度の変化が生じないという予備実験のデータと一致していた（データ省略）。以上より、設定したフィルターにより両ルシフェラーゼの発光が正しく検出・定量化できること、さらに樹立した 2 色発光 iPS 細胞は想定通りに FGF に反応することが確認された。

C-4. コンソーシアムの設立、国内外の合意形成

第一回コンソーシアム会議には、班員 6 名、厚生労働省から 3 名、PMDA から 3 名、大学関係者 6 名、日本製薬工業協会から 2 名、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会から 7 名、一般社団法人日本化学工業協会から 1 名、日本化粧品工業会から 3 名及びクロップライフジャパン（旧 JCPA 農薬工業会）から 2 名、合計 32 名が対面または web で参加した。

会議では、技術移転に向けた共同研究に関する提案及びリスク評価を目指したデータベース作成に必要な被験物質に関する情報収集への協力要請がなされ、参加者と種々の意見交換がなされた。

第二回会議は、令和 7 年 1 月 28 日に開催された。DynaLux/c の追加データ情報が紹介されるとともに、共同研究への参画や被験物質情報について議論した。また、技術移転に向けた共同研究に関する今後の予定が紹介された。

解析データの収集

正田より、ICH S5 (R3) の参照物質リストおよび欧州代替法評価センター (ECVAM) のバリデーションで用いられた被験物質に関する構造式、物性、分類分析などの解析結果などの結果をまとめた。物性の結果も合わせ、毒性を協議していくことになった。

小島より、他の代替法に関する入力結果が紹介された。今後の組み合わせを考えると、他の代替法で検出できない物質を評価できるなどの本試験法の特徴を明確にする必要があると説明した。

DynaLux/c を用いることにより、生殖発生毒性のステージ毎の有害性を明確にすることが期待される。一方で、リスク評価のためには、DynaLux/c の結果に加え、曝露評価などの情報も必要となる。正田やコンソーシアム参加者の協

力を得て、in silico を組み合わせてリスク評価手法の開発に寄与していきたいと考えている。

一方、DynaLux/c の技術移転性や再現性を共同研究を通して明確にしていくこともコンソーシアムの目的である。来年度には、技術移転性の検討を始められるよう覚書や同意書の準備を進めていきたいと考えている。

C-5. OECD テストガイドライン対応

OECD では、WNT が主体となり、一昨年度には新興技術の試験法への取り込みに関するワークショップ、昨年度は、そうした新たな試験法の公定化に関するワークショップが開催されており、本年度はそれらを踏まえ、OECD 試験法の公定化に関するガイダンスドキュメント（GD34、2005 年発布）の改訂作業が行われている。即ち、従来一つの試験法が開発されてガイドラインとして認証されるまで 10 年ほどの時間を要しているところ、信頼性を損なうことなく、諸々の必要とされるリソースを最小化するための改訂を目指している。行政利用に耐える信頼性確保のための試験法の評価手法そのものの議論もさることながら、必要な経費も無視できない課題であり、包括的なガイダンスが期待されている。

GCRSR は各国の規制当局関連機関の年次連絡会議であり、付随してセミクロズドで開催されるシンポジウム GSRS の今年 GSRS24 のテーマは “Digital Trans-formation in Regulatory Science” であった。内容としては人工知能 (AI) の利活用に関するケースレポート的な発表が過半ではあったものの、昨年 GSRS23 のテーマは “Emerging Technologies for Food and Drug Safety”、来年 GSRS25 のテーマは “Building a Strong Regulatory Science with Tomorrow’s Technologies” であり、一貫して新興技術の動向を把握することに主眼がおかれている。引き続き情報の収集に努めたい。

米国でも EU でも、こうした新興技術を適用した新規試験法の行政利活用に向けた適格性認定システムが構築されており、本邦でも相応のシステムの早期の導入が望まれている。

国内学会では、いずれもシンポジストとして、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 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) における、所内外機関が開発した新たな試験法の公定化支援や、新たに公定化された OECD ガイドラインの本邦での行政受入提案といった活動を基軸として、収集した国際状況を含めた発表を行い、DynaLux/c の紹介にも努めた。

D. 結論

本研究は、DynaLux/c 法を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも資する新たな新規アプローチ法 (NAM) として確立・公定化することを最終目標としており、本年度はその基盤整備に向けた重要な進展が得られた。具体的には、Kronos HT による 70 時間超のリアルタイムルシフェーゼ測定により、シグナルかく乱作用を定量的に把握できる新たな指標「ABC」を開発し、これを用いることで陽性・陰性対照物質の正確な分類が可能であることを実証した。さらに、陽性対照物質の 8 割において明確な用量依存性が確認されたことは、DynaLux/c 法がリスク評価指標の構築に応用可能であることを示す有力な根拠である。

また、より精緻で信頼性の高い測定系を目指し、異なる発光基質を用いた多色ルシフェラーゼアッセイを構築し、2 種類のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定に成功した。これにより、細胞毒性や測定誤差に対する補正が可能となる内部基準の導入が可能となり、DynaLux/c 法の定量精度と再現性のさらなる向上が期待される。

加えて、実用化に向けた基盤として、今年度は 6 物質の毒性情報を収集・整理し、今後の IVIVE (in vitro to in vivo extrapolation) 検討に資する情報項目の整備を進めた。次年度以降は評価

化合物を拡充し、より体系的な情報基盤の整備を進める予定である。

こうした技術的・情動的な進展に加え、NAMの国際的動向を把握するために関連学会やシンポジウムに参加し、米国およびEUを中心とした動物実験代替法の規制受容に関する情報収集と発信を積極的に行った。加えて、産業界との連携を強化するためにコンソーシアムを設立し、技術移転性の確認やデータ解析方法の検討を進めることで、今後の公定化や国際的な受容を見据えた体制整備を着実に進めている。

これら一連の成果は、DynaLux/c法が科学的信頼性と実用性を備えた、ヒト外挿性の高い次世代毒性評価法として確立されつつあることを示しており、動物実験に依存しないリスク評価へのパラダイムシフトを支える中核的技術となることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 小島肇: 動物実験代替法の歴史、Cosmetic Science、2024、10、56-63.
2. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaïoun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, Arch Toxicol, 2024 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
3. M. Kuwagata, Y. Doi, H. Saito, M. Tsurumoto, T. Igarashi, T. Nishimura, Y. Taquahashi, Y. Hirabayashi, S. 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]
4. 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
5. Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. Current Opinion in Toxicology 2024; Volume 39, 100489.
6. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 23935 (2024)
7. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 4709 (2024) doi.org/10.1038/s41598-024-55377-y
8. MT. Taninokuchi, Y. Zhou, L. Braccischi, F. Modestino, J. Fukuda, C. Mosconi, Trans-arterial stem cell injection (TASI): The role of interventional radiology in regenerative medicine. Journal of Clinical Medicine (IF= 3.0) 13(3), 910 (2024) doi.org/10.3390/jcm13030910
9. JB Park, GH Moon, A Cho, M Kwon, JW Park, EC Yi, H Kim, J. Fukuda, C Kwak, YG Ko, and YS Chun, Neddylation of insulin receptor substrate acts as a bona fide regulator of insulin signaling and its implications for cancer cell migration, Cancer Gene Therapy (IF= 4.8), 31, 599-611 (2024) doi.org/10.1038/s41417-024-00729-z
10. E. Sugiyama, A. Nanmo, N. Xiaolei, SY. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device, ACS Biomaterials Science & Engineering (IF=5.4), 10, 2, 998-1005 (2024) doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01346
11. Y. Zhou, J. Seo, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, and J. Fukuda, Exosomes for hair growth and regeneration, Journal of Bioscience and Bioengineering (IF=2.3), 137, 1, 1-8 (2024) doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.11.001

12. Tomita, T., Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Miyazaki. "Novel three-dimensional live skin-like in vitro composite for bioluminescence reporter gene assay." FEBS J. 291, (2024): 4619-4632.
 13. Tabei, Y., Y. Nakajima. "IL-1beta-activated PI3K/AKT and MEK/ERK pathways coordinately promote induction of partial epithelial-mesenchymal transition." Cell Commun. Signal. 22, (2024): 392.
 14. Nakazawa, K., M. Matsuo, Y. Kikuchi, Y. Nakajima, R. Numano. "Melanopsin DNA aptamers can regulate input signals of mammalian circadian rhythms by altering the phase of the molecular clock." Front. Neurosci. 18 (2024): 1186677.
 15. 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. Fundam. Toxicol. Sci. 2024;11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]
 16. Miyata, R., M. Suzuki, Y. Okazaki, D. Abe, Y. Nakajima. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activation by an Active Compound in *Lythrum anceps* (Koehne) Makino." J. Cell Biochem. 126, (2025): e70009.
- (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
5. 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)
 6. 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).
 7. 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.
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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)

2. 学会発表

1. 小島 肇: 動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
2. 小島 肇: JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
3. 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
4. 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: パルプロ酸

13. 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)
14. 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)
15. 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
16. 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
17. 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
18. Y. Hirabayashi: Recent Initiatives of JaCVAM for Regulatory Acceptance of Safety Evaluation of NAMs including MPS. Singapore International Food Forum, Singapore, Aug. 1, 2024
19. 平林容子: 経済協力開発機構 (OECD) が進める New Approach Methods を用いたリスクアセスメント 第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 31 日
20. Y. Hirabayashi: Initiatives for the regulatory use of alternative methods to animal testing. Next generation nonclinical safety evaluation-Alternatives to animal testing in drug discovery and development -Nonclinical toxicology related event, Shonan, Nov. 13, 2024
21. Kuwagata M and Horimoto M. Key toxicological findings related to developmental neurotoxicity caused by pesticides. The 64th Society of Toxicology
22. 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 64th Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
23. 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 64th Society of Toxicology (2025.3.18, Orlando, Florida, USA)
24. 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 64th Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
25. 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)
26. 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)
27. 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)
28. 平林容子. 代替法の行政的受け入れにかかる JaCVAM の役割 第 14 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2024.9.13)

F. 知的財産権の出願・登録状況 特許取得・実用新案登録・その他 なし

		名前	CAS No.	溶媒	最高濃度(ug/mL)	判定の正誤
1	陽性物質	サリドマイド(THA)	50-35-1	DMSO	12	正
2	陽性物質	バルプロ酸ナトリウム(VPA)	99-66-1	DMSO	100	正
3	陽性物質	メトトレキサート(MTX)	133073-73-1	DMSO	5	正
4	陽性物質	レナリドミド(LEN)	191732-72-6	DMSO	35	正
5	陽性物質	メキシ酢酸(MAA)	625-45-6	PBS	683	正
6	陽性物質	サリチル酸ナトリウム(SA)	54-21-7	PBS	666	正
7	陽性物質	ヒドロキシウレア(HU)	127-07-1	PBS	149	正
8	陽性物質	レチノール(RA)	302-79-4	DMSO	0.01	正
9	陽性物質	ホウ酸(BA)	10043-35-3	PBS	250	正
10	陽性物質	フルオロウラシル(5FU)	51-21-8	DMSO	14.1	正
11	陽性物質	塩化リチウム(LiCl)	7447-41-8	PBS	250	正
12	陽性物質	ブロモデオキシウリジン(BrdU)	59-14-3	DMSO	50	正
13	陽性物質	5,5-ジメチル-2,4- オキサゾリジンジオン(DMO)	695-53-4	PBS	840	正
14	陽性物質	ジフェンヒドラミン(DHM)	147-24-0	PBS	262	正
15	陰性物質	ペニシリン(PenG)	69-57-8	PBS	1000	正
16	陰性物質	サッカリン(SAC)	82385-42-0	PBS	1000	正
17	陰性物質	シメチジン(CM)	51481-61-9	DMSO	30	正
18	陰性物質	D-カンファー(CAM)	464-49-3	DMSO	50	正
19	陰性物質	ジフェンヒドラミン(DMP)	147-24-0	PBS	262	正

表 1: 今年度の評価物質リスト

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

リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者 福田 淳二 横浜国立大学

研究要旨

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本分担研究では、DynaLux/c にリアルタイム発光測定装置(KronosHT)を導入し、70 時間以上の連続した FGF シグナルのかく乱作用を計測した。溶媒対照に対する化学物質のシグナルかく乱面積を Area Between the Curve (ABC)として化学物質のシグナルかく乱の指標として用いた。陽性および陰性対照物質を評価した結果、陽性対照物質 14 種類、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類することが可能であった。また、陽性対照物質の約 8 割で用量依存的な反応が確認され、DynaLux/c を基盤としたリスク評価指標の構築が可能であることが示唆された。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として標準作業手順書(Standard Operating Procedure: SOP)を作成した。この SOP はコンソーシアム参加者に配布され、DynaLux/c の導入に関する意見が収集された。

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。

そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系

は高コストであるうえに、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた(*iScience*等)。DynaLux/c は、動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性(28 日間反復投与毒性)に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短期間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家(桑形麻樹子)、公定化に関する専門家(平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家(小島肇: 日化協 LRI 顧問)らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔

博士(若手)や横浜国立大学の Seo Jieun 博士(若手・女性・国際性)などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な in vitro 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

本分担研究では、DynaLux/c をリスク評価可能な系に改めるために、リアルタイムルシフェーラスアッセイ並びにその解析方法の構築を目的とする。

B. 研究方法 DynaLux/c の概要

DynaLux/c は発生生物学の観点から発生毒性評価を試みた NAM である。受精卵から胎児に至るまでの複雑な形態形成は、細胞の増殖・分化・相互作用などを介し、適切に制御されている。加えて、偶発的な細胞死や遺伝子発現などの内因性、及び化学物質曝露のような外因性のノイズに対する抵抗性もまた適切な発生には重要である。これまでの研究から、形態形成とノイズ抵抗性はシグナル伝達の相互作用により連結され、発生過程を制御していることが明らかになっている(図 1a)。

動物試験では、主に胎児の形態異常を基に化学物質の毒性を評価している(図 1b)。その毒性機序を考えると、化学物質がシグナル伝達相互作用をかく乱し、その結果として生じた形態異常を観察していると考えられる(図 1c)。そこで我々は、このシグナル伝達相互作用のかく乱を計測するこ

発生毒性評価法のNAMであるDynaLux/c

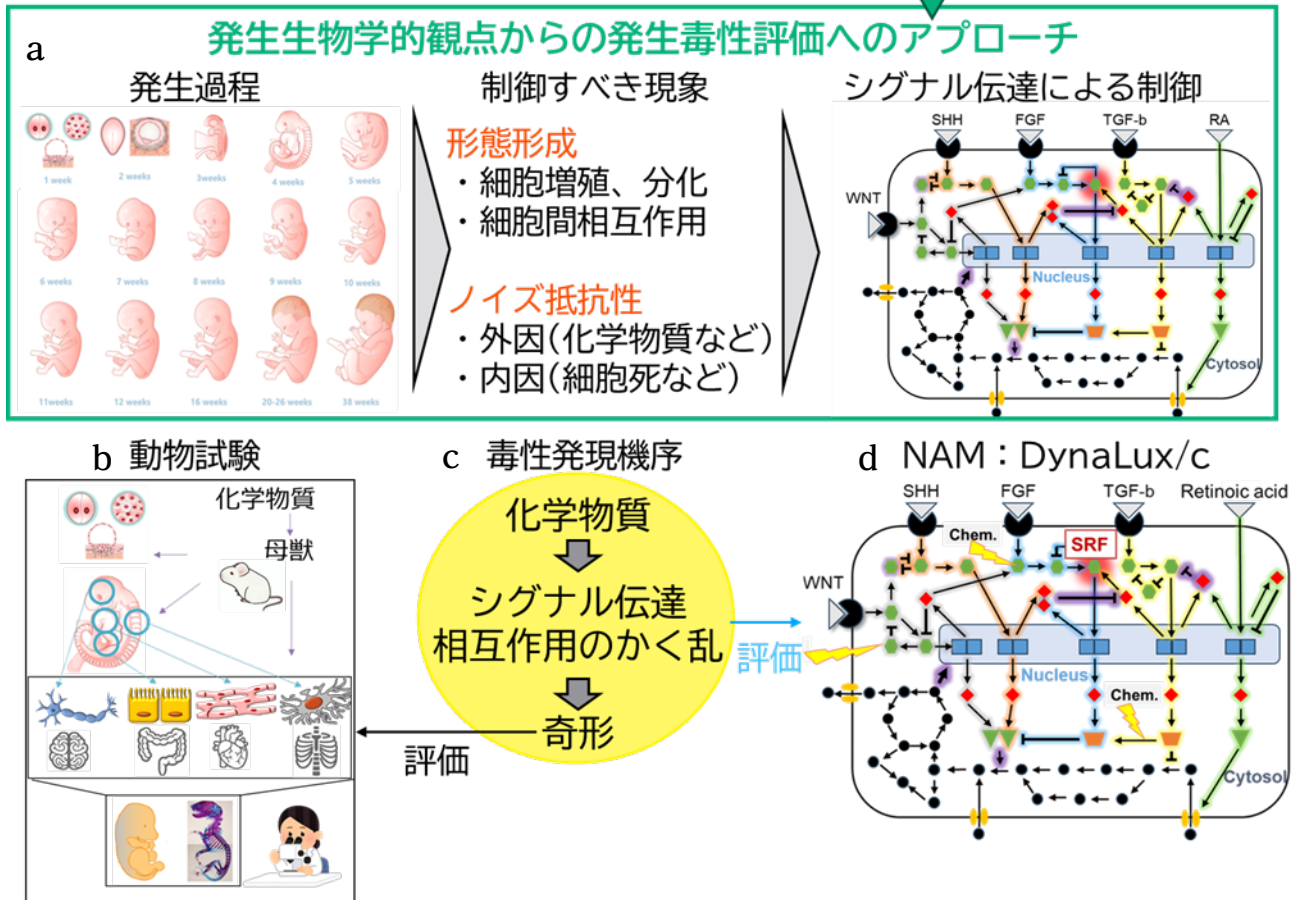


図 1: 発生毒性評価における動物試験と DynaLux/c の比較

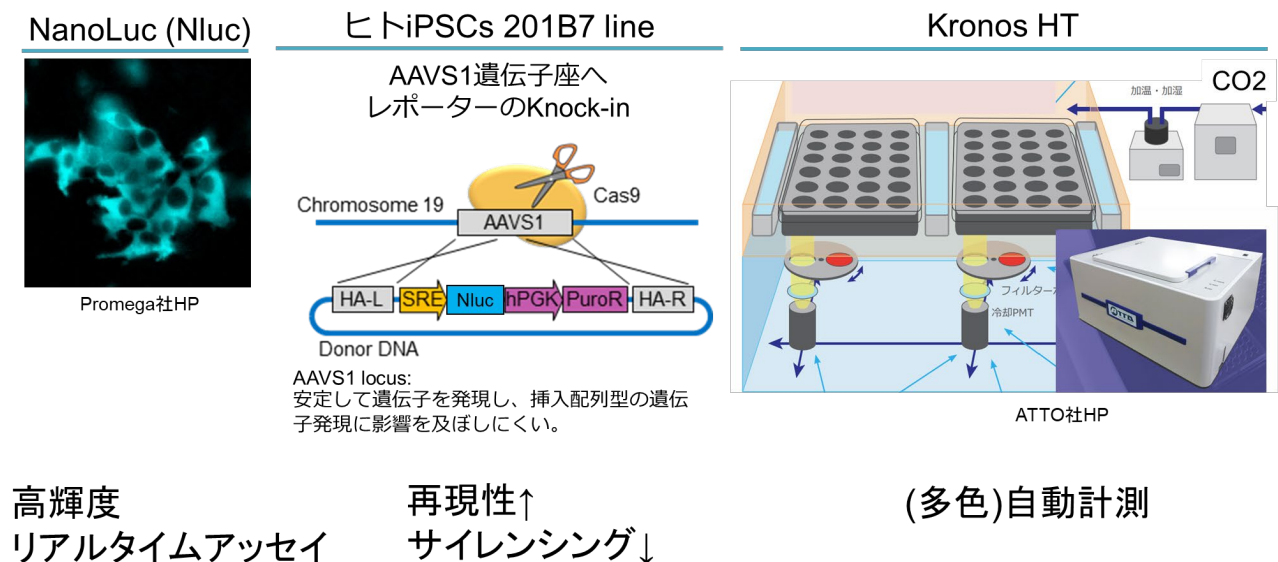


図 2: ヒト iPS 細胞を用いたリアルタイムルシフェーセンスアッセイ

とで発生毒性を予測できると考え、リアルタイムルシフェーセンスアッセイを用いたレポーターア

ッセイを確立した。これまでに、ヒト iPS 細胞を用いて 5 種類 (FGF シグナルは 2 種類、WNT シ

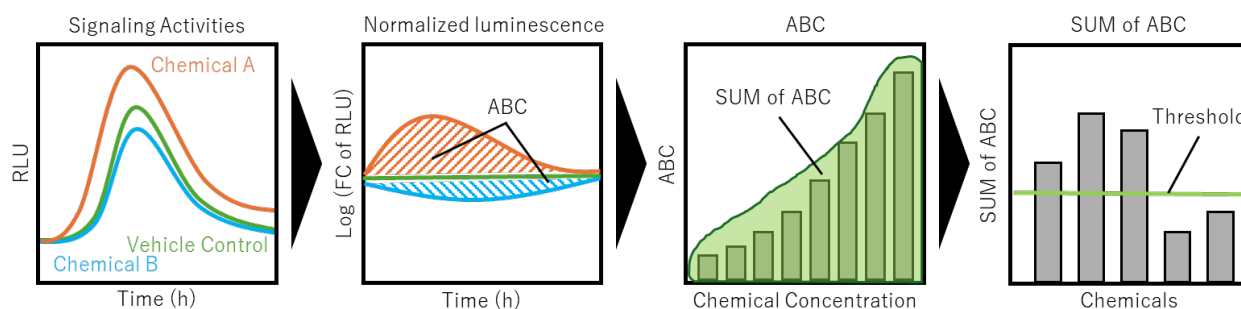


図 3: DynaLux/c によるシグナルかく乱作用の数値化

グナル、BMP シグナル、TGF- β シグナルは各 1 種類) のレポーター系を樹立した。各レポーターとリガンドの組合せを検討し、レポーターの反応性を確認した。その中で、最も発光強度が高くシグナルかく乱に対する感度が高い、FGF シグナルレポーターのうち血清応答因子 (Serum Response Factor: SRF) のレポーターアッセイ系を選定した(図 1d)。その特徴は、代表的なホタルルシフェラーズに比べ約 100 倍明るく iPS 細胞での生細胞ルシフェラーズアッセイが可能な Nluc を発光レポーターとして用いたことである。また、培養をしながらリアルタイム発光計測が可能なリアルタイム発光測定装置(Kronos HT)を組み合わせることで、細胞播種から試験終了まで 1 週間で終了するハイスループットな試験系を構築した(図 2)。

実際のシグナルかく乱試験は、レポーターヒト iPS 細胞を 96 穴プレートに播種しコンフルエントになるまで培養する。その後、試験物質を最高溶解度もしくは IC50 以下の濃度を最高濃度として 1/2 ずつ希釈した 8 段階の濃度を培地に適用し、72 時間以上リアルタイムルシフェラーズアッセイを行う。化学物質のシグナルかく乱作用を比較するために、溶媒対照群に対する試験物質のシグナルかく乱面積(Area between the curve: ABC)を各濃度で求め、それらの和をシグナルかく乱作用の値とした(SUM of ABC)。ROC 解析により閾値を設定し、発生毒性陽性と陰性を分類する(図 3)。

B-1. DynaLux/c による発生毒性物質のハザード評価並びに特性解析。標準作業手順書 (Standard Operating Procedure: SOP) の作成

DynaLux/c の特性を把握するために既存の発生毒性物質を用いたハザード評価を行った。既存の発生毒性物質として、これまでに陽性対照物質 14 種(サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド(LEN)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール(RA)、ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))、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(DMP))を評価した(表 1)。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として SOP を作成した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究成果および考察

SOP の作製にあたっては、試験の再現性と信頼性を確保するため、以下の検討を行った。まず、播種細胞数および培養スケジュールについては、日単位・時間単位での厳格な管理を実施した。次に、96 穴プレートにおけるエッジ効果の抑制を

目的として、外周ウェル間に滅菌水を注入し、また、培養時には従来の蓋の代わりにガス透過性シール(ブリーズイージー、ブリーズイージー)を用いることで湿度の安定化を図った。さらに、細胞培養中の温度を一定に保つための運用方法を確認した。加えて、施設内における実施環境のバリデーションを通じて、試験実施上の課題の抽出と対策を行った。その結果、複数の実験者において、再現性の高い波形データが得られるようになり、Well 間の差も減少した(図 4)。作成した SOP は、本報告書内のその他として公開する。

作成した SOP に準拠して、DynaLux/c を用いた化学物質のシグナルかく乱作用の測定を実施した。評価に用いた化学物質、使用溶媒、試験濃度、および判定の正誤については表 1 に示す。また、評価物質を用いたリアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイの結果を図 5、図 6、図 7 に示す。陽性対照物質ではシグナルが増強又は抑制されていた。物質毎の毒性強度を明らかにするために、標準化したグラフ及びその各濃度のかく乱面積(Area between the curve: ABC)を求めた(図 8、図 9)。陰性対照物質はほとんどシグナルをかく乱しない一方で、発生毒性陽性物質は、物質毎に異なるシグナルかく乱パターンを示した。これらの ABC の和(SUM of ABC)から閾値を設定し、陽性対照物質 14 種と陰性対照物質 5 種を 100%の正確度で分類することに成功した(図 10、図 11)。

次に、各評価物質の用量相関に着目した。陰性対照物質では用量相関は見られず、ABC の値も低いことが明らかになった。陽性対照物質のうち、サリドマイド、レナリドミド、メトトレキサートは用量相関性を示さなかったが、他の 11 物質では用量相関性が確認された。現在は、最高用量から 1/128 希釈までの範囲を試験しており、今後は試験の濃度範囲を広げる必要があるかもしれない。ただし、用量相関がみとめられなかった 3 物質の最高試験濃度は溶解度に依存しており、溶

けにくい物質の評価は今後の課題となる。これらは今後のデータの集積を待って判断する。

最後にこれまでのデータから ABC の値に関して考察した。陰性対照物質ではほとんどの濃度で ABC は 50 以下であった。一方で、陽性対照物質では用量相関を示すものは ABC の値が 100 程度を超えると ABC の値が急激に増強される傾向がみられた。用量相関を示さない 3 物質の ABC はどの濃度でも 100 前後であった(図 10)。これらの結果は DynaLux/c においても、Point of Departure (PoD) の設定が可能かもしれないことを示唆している。今後のデータの集積を待ち、班員やコンソーシアムのメンバーと協議しながら、IVIVE を考慮したリスク評価への道筋をつけ、公定化に向けた協議を続ける。

D. 結論

本研究は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM を確立するとともに、公定化を目指すことである。

今年度の研究の成果として、陽性および陰性対照物質に基づき、Kronos HT を用いた 70 時間以上のリアルタイムルシフェレース計測を実施し、シグナルかく乱作用を定量的に評価する指標(ABC)を確立した。ABC を用いた解析では、陽性対照物質と陰性対照物質の正確な分類が可能であることから、DynaLux/c の有用性を示した。また、用量-応答関係の解析において、8 割の陽性対照物質で用量依存性が確認された。これにより、DynaLux/c の結果を基にリスク評価指標を構築するための道筋が示された。

E. 研究発表

1.論文発表

1. 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

2. Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. Current Opinion in Toxicology 2024; Volume 39, 100489.
 3. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 23935 (2024)
 4. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 4709 (2024) doi.org/10.1038/s41598-024-55377-y
 5. MT. Taninokuchi, Y. Zhou, L. Braccischi, F. Modestino, J. Fukuda, C. Mosconi, Trans-arterial stem cell injection (TASI): The role of interventional radiology in regenerative medicine. Journal of Clinical Medicine (IF= 3.0) 13(3), 910 (2024) doi.org/10.3390/jcm13030910
 6. JB Park, GH Moon, A Cho, M Kwon, JW Park, EC Yi, H Kim, J. Fukuda, C Kwak, YG Ko, and YS Chun, Neddylation of insulin receptor substrate acts as a bona fide regulator of insulin signaling and its implications for cancer cell migration, Cancer Gene Therapy (IF= 4.8), 31, 599-611 (2024) doi.org/10.1038/s41417-024-00729-z
 7. E. Sugiyama, A. Nanmo, N. Xiaolei, SY. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device, ACS Biomaterials Science & Engineering (IF=5.4), 10, 2, 998-1005 (2024) doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01346
 8. Y. Zhou, J. Seo, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, and J. Fukuda, Exosomes for hair growth and regeneration, Journal of Bioscience and Bioengineering (IF=2.3), 137, 1, 1-8 (2024) doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.11.001
- ## 2.学会発表
1. 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).
 2. 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.
 3. 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
 4. 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

5. 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
6. 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
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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
11. 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
12. 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. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

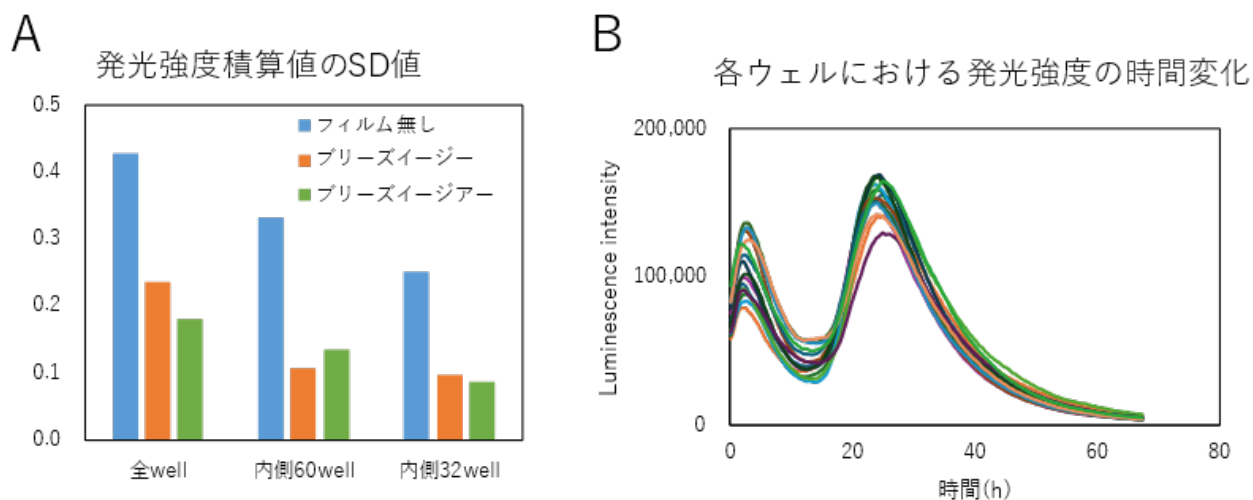


図4：ウェル間の発光強度の差

(A) 各条件における発光強度積算値の平均を1とした時のSD値

(B) 内側60wellかつBreathe-EASIERを使用した際の各ウェルの発光強度の時間変化

表1：評価物質リスト

		名前	CAS No.	溶媒	最高濃度(ug/mL)	判定の正誤
1	陽性物質	サリドマイド(THA)	50-35-1	DMSO	12	正
2	陽性物質	バルプロ酸ナトリウム(VPA)	99-66-1	DMSO	100	正
3	陽性物質	メトトレキサート(MTX)	133073-73-1	DMSO	5	正
4	陽性物質	レナリドミド(LEN)	191732-72-6	DMSO	35	正
5	陽性物質	メキシ酢酸(MAA)	625-45-6	PBS	683	正
6	陽性物質	サリチル酸ナトリウム(SA)	54-21-7	PBS	666	正
7	陽性物質	ヒドロキシウレア(HU)	127-07-1	PBS	149	正
8	陽性物質	レチノール(RA)	302-79-4	DMSO	0.01	正
9	陽性物質	ホウ酸(BA)	10043-35-3	PBS	250	正
10	陽性物質	フルオロウラシル(5FU)	51-21-8	DMSO	14.1	正
11	陽性物質	塩化リチウム(LiCl)	7447-41-8	PBS	250	正
12	陽性物質	プロモデオキシウリジン(BrdU)	59-14-3	DMSO	50	正
13	陽性物質	5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)	695-53-4	PBS	840	正
14	陽性物質	ジフェンヒドラミン(DHM)	147-24-0	PBS	262	正
15	陰性物質	ペニシリン(PenG)	69-57-8	PBS	1000	正
16	陰性物質	サッカリン(SAC)	82385-42-0	PBS	1000	正
17	陰性物質	シメチジン(CM)	51481-61-9	DMSO	30	正
18	陰性物質	D-カンファー(CAM)	464-49-3	DMSO	50	正
19	陰性物質	ジフェンヒドラミン(DMP)	147-24-0	PBS	262	正

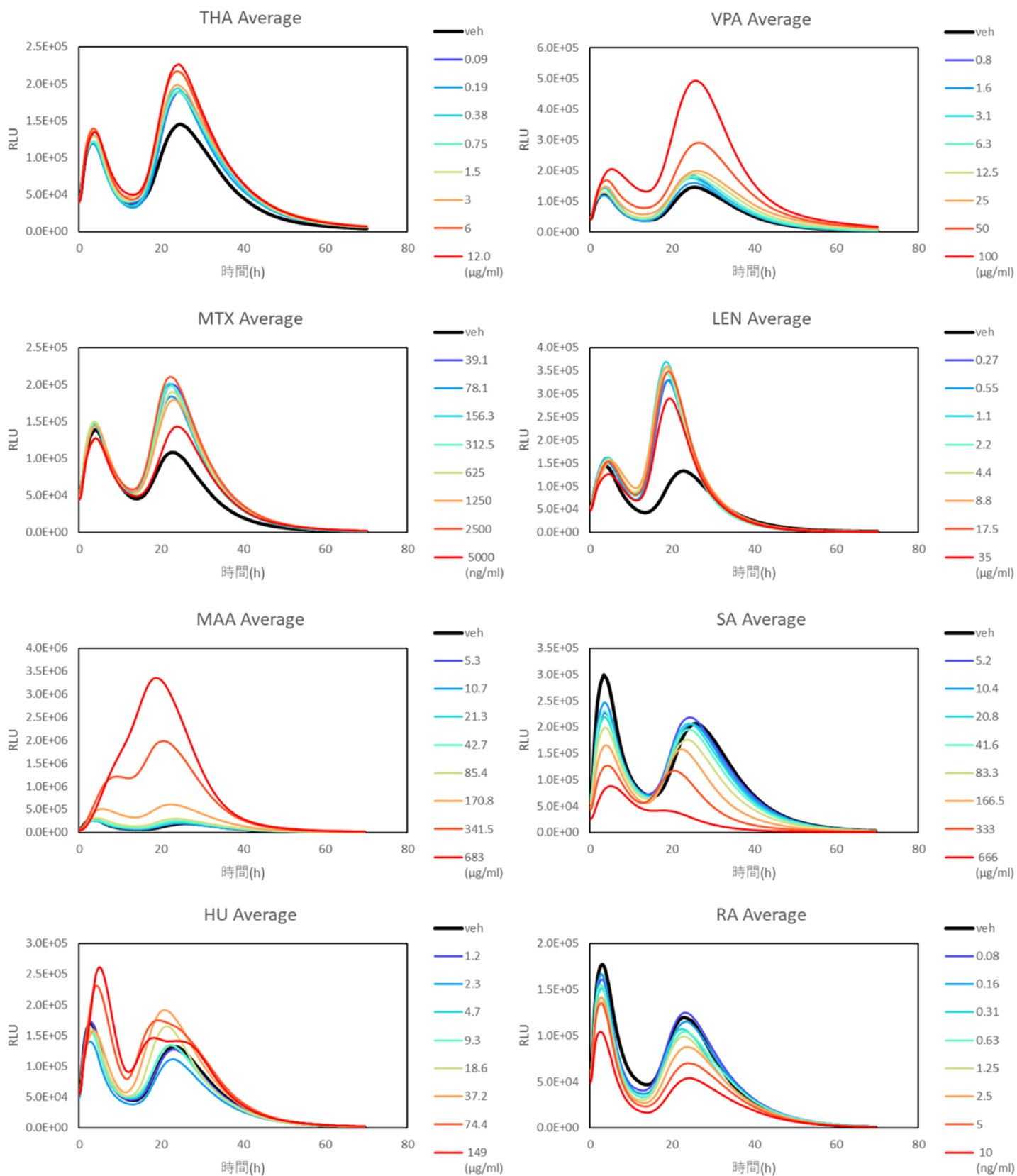


図5：リアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイ（陽性対照物質-1）
 サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド
 (LEN)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール
 (RA)

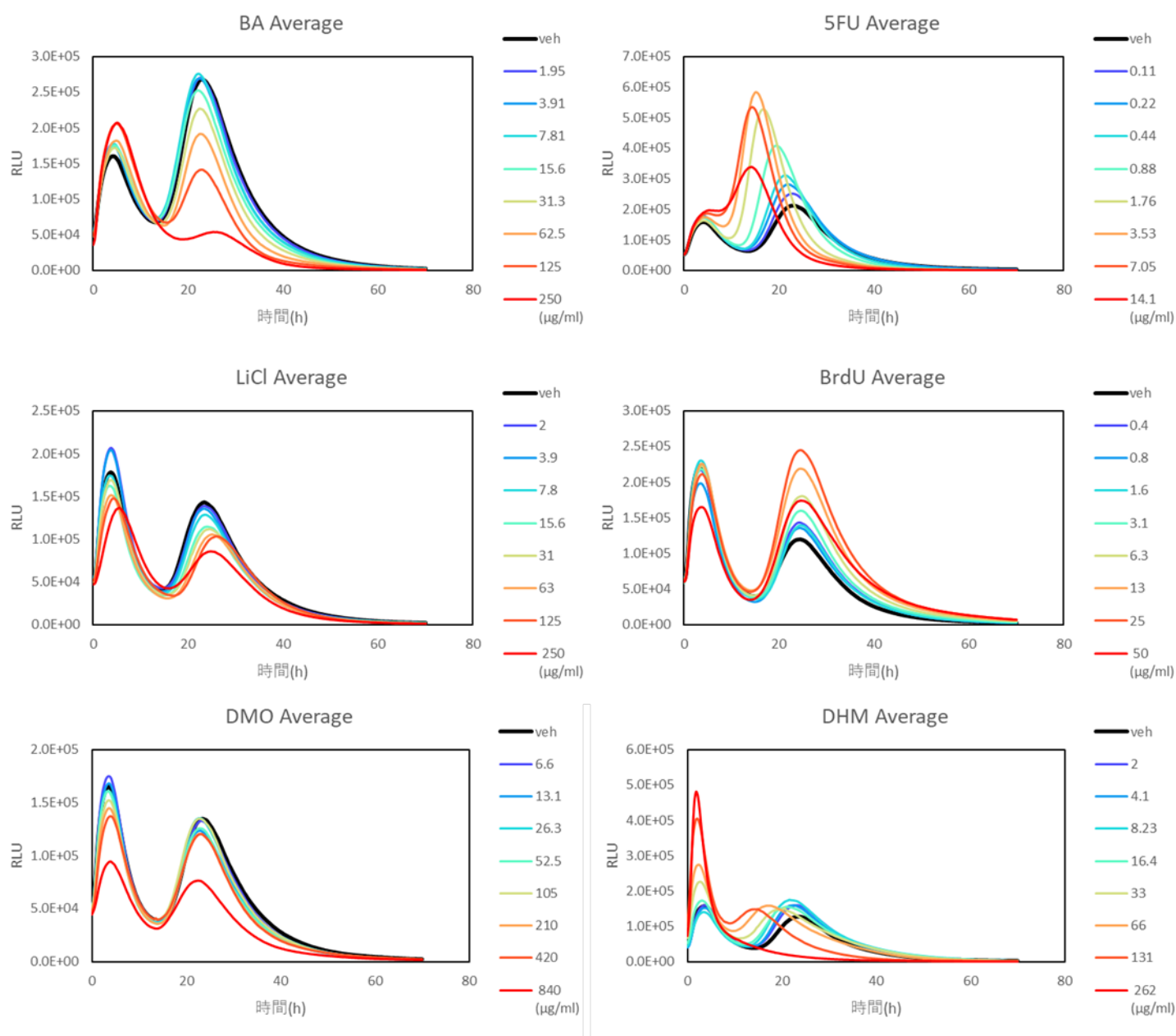


図6：リアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイ（陽性対照物質-2）

ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))

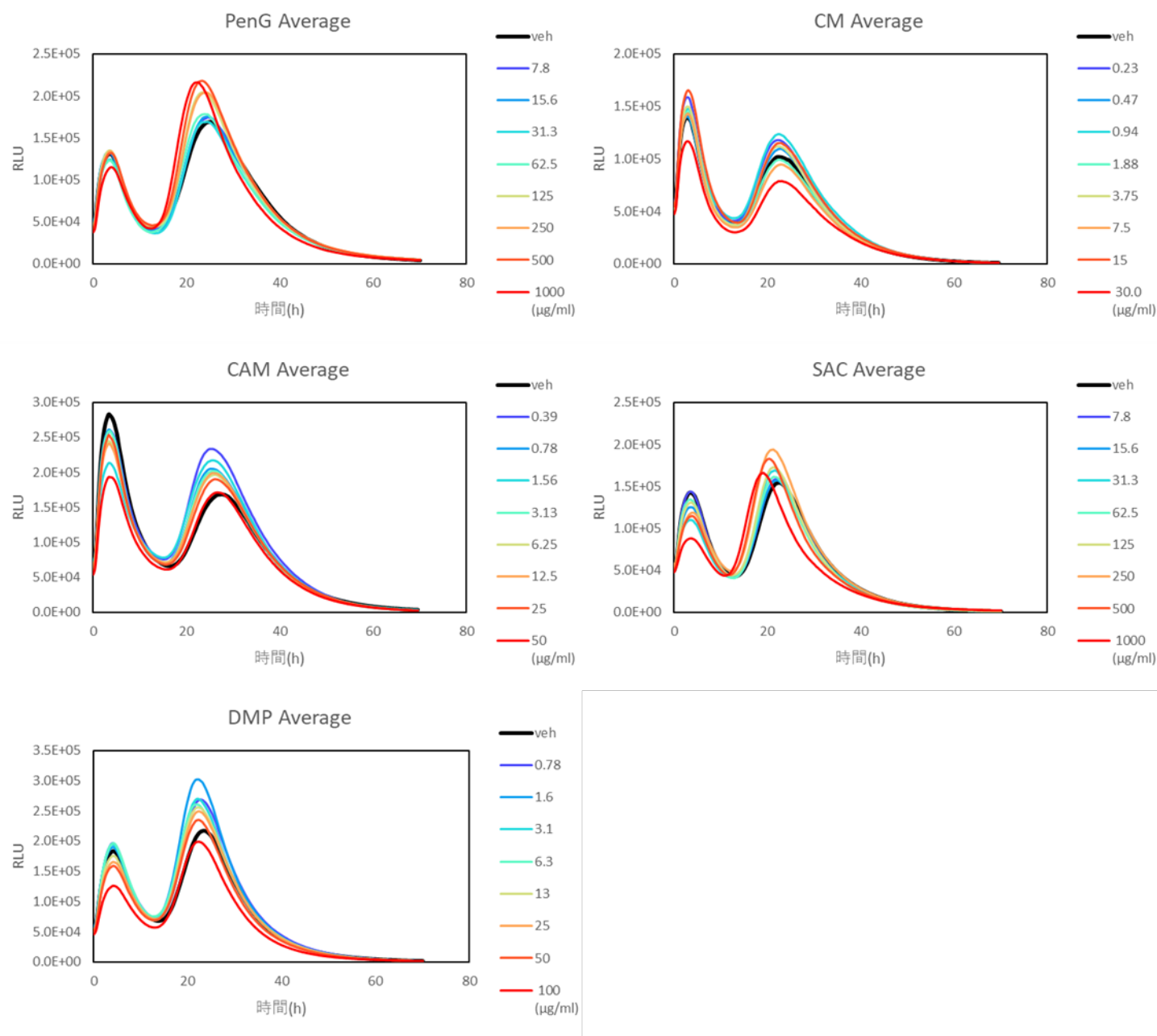


図 7：リアルタイム FGF-SRF シグナルシフェレースアッセイ（陰性対照物質）
陰性対照物質 5 種（ペニシリン(PenG)、シメチジン(CM)、D-カンファー(CAM)、サッカリン(SAC)、ジフェンヒドラミン(DMP)）。

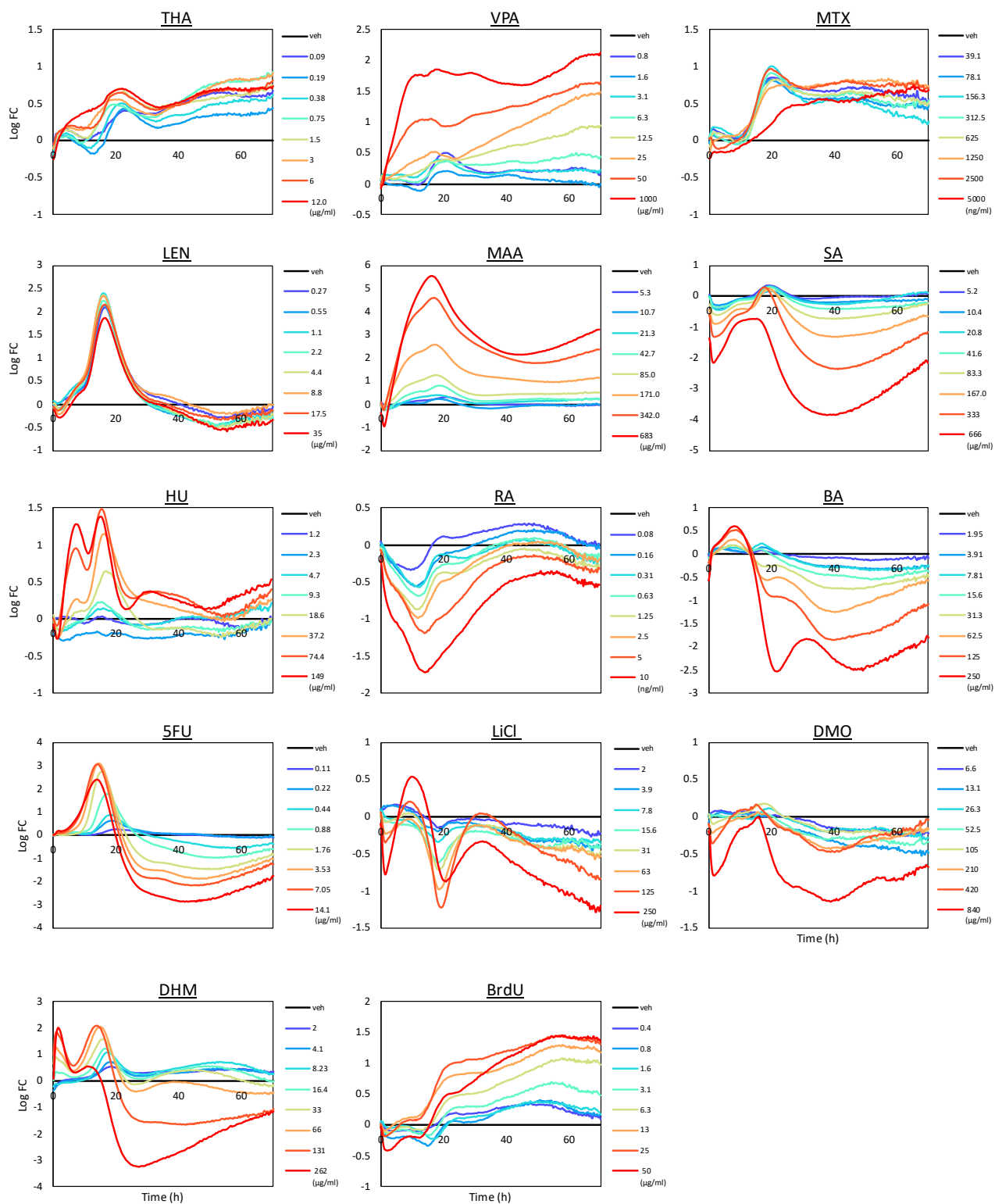


図 8: 各陽性対照物質暴露時の溶媒対照と比較した発光強度の変化比率 (ABC)

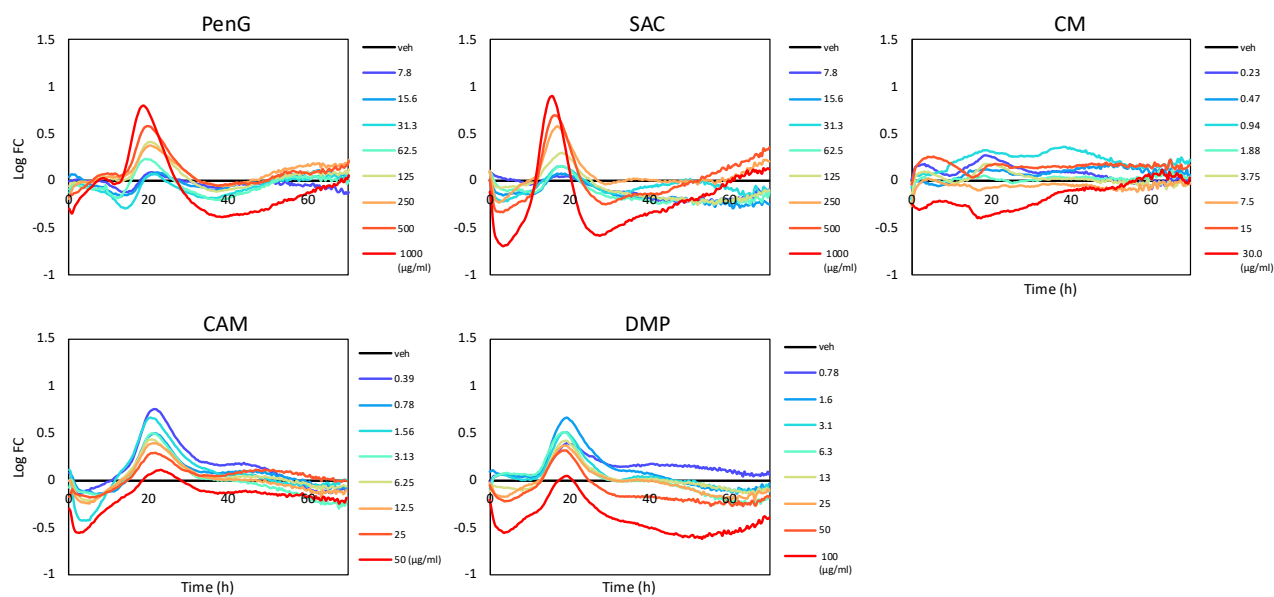


図 9:各陰性対照物質暴露時の溶媒対照と比較した発光強度の変化比率(ABC)

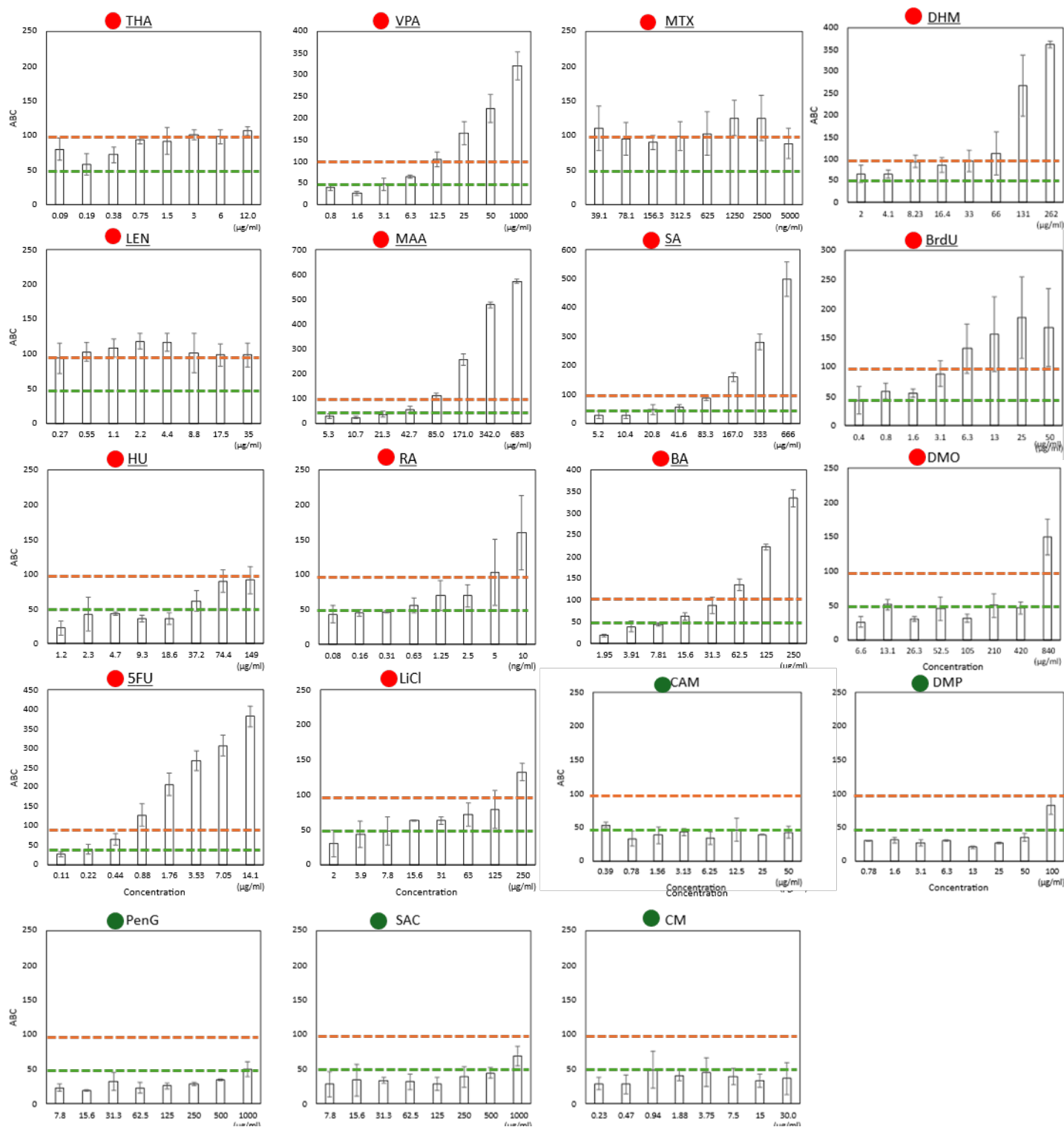


図 10: 各濃度における被験物質のかく乱作用(ABC).

横軸は試験濃度を、ABC 値を示す。オレンジ色の波線、緑色の波線は、ABC の 100、及び 50 を表している。赤色丸、緑色丸は、それぞれ発生毒性陽性対照物質、陰性対照物質を意味する。

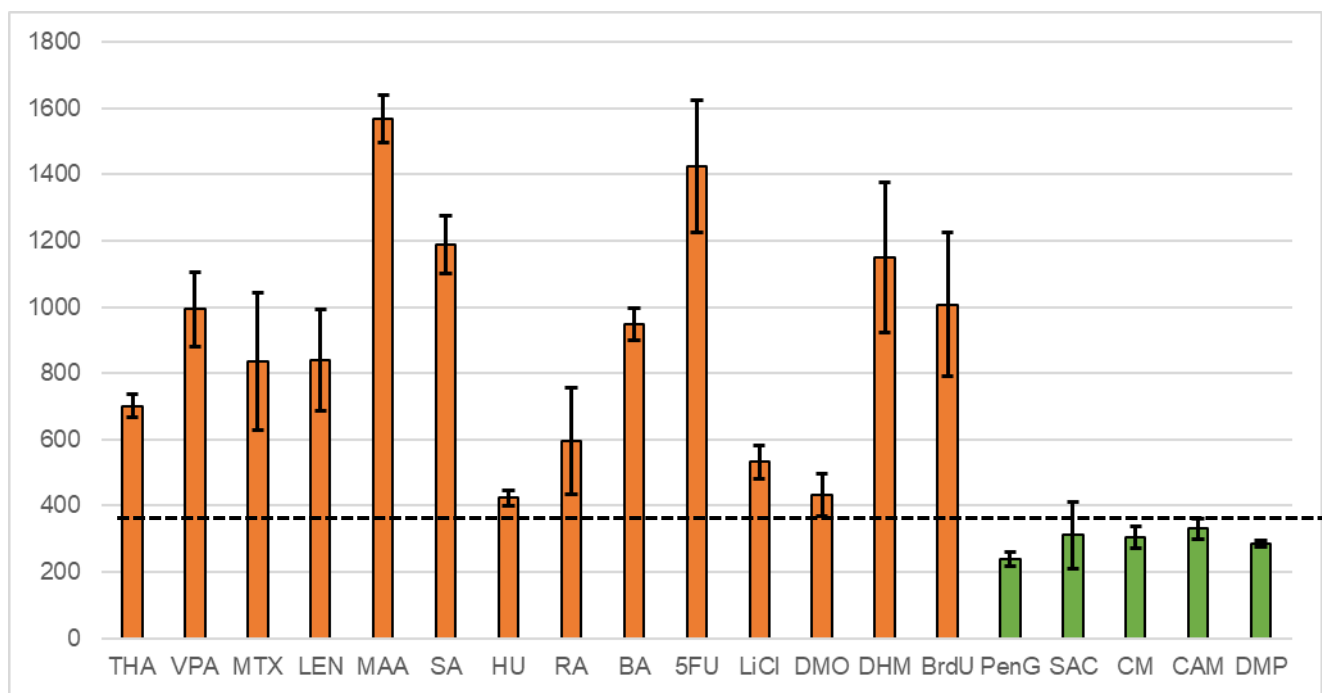


図 11: ABC の和(SUM of ABC)による発生毒性物質の分類

縦軸は SUM of ABC を示す。オレンジ色は発生毒性陽性対照物質を、緑色は発生毒性陰性対照物質を、黒色の波線は閾値を表す。

分担研究報告書

In vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定

研究分担者 桑形 麻樹子

帝京平成大学・健康医療スポーツ学部・医療スポーツ学科・教授

研究要旨

本研究は、我々が開発した化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たなNAM (New Approach Method)を確立するとともに、公定化を目指すことを目的としている。

分担研究として、in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定を行った。初年度の令和7年度は研究代表者が先行して実施したDynaLux/cを用いて検討した催奇形性が陽性と分類されている6種の化学物質について毒性情報を収集し、収集方法を確立するとともに入手可能な情報から内容を精査した。将来的にIVIVE検討を行う際に有用な毒性プロファイルリスト作成に着手した。

A. 研究目的

本研究は、我々が開発した化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たなNAM (New Approach Method)を確立するとともに、公定化を目指している。

分担研究として、in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定を行った。

B. 研究方法

研究代表者がDynaLux/cを用いて先行して検討した6化合物について毒性情報を収集した。

将来的にIVIVEに用いることを想定して、臨床試験および非臨床試験情報を調査した。臨床試験については臨床使用用量および薬物動態結果を、非臨床試験では薬物動態にあわせ、各種毒性試験（急性、亜急性、生殖発生毒性試験）の結果を収集した。

調査方法

主に下記の検索エンジンを用いて、毒性情報を調査した。

- (1) 学術論文の検索サイトである Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- (2) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 医療用医薬品の添付文書情報 (https://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)

また、市販薬の添付文書、インタビューホームに記載されていた引用文献を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は情報収集が主とした研究であるが、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. 研究結果及び考察

今年度調査した化学物質を示す。いずれも催奇形性

陽性と分類されている化合物である。

バルプロ酸ナトリウム、レチノール、ハイドロキシウレア、サルチル酸ナトリウム、サリドマイド

入手した情報から、実施された毒性試験内容（動物種、投与期間、用量）、試験結果（認められた毒性）、および無毒性量（得られなかった場合には無影響量）を精査した。その結果を表1から表6にそれぞれ示した。

一部開示されていない情報も含まれた。また、毒性試験報告書の入手は不可能のために、頻度や程度については精査ができなかった。

D. 結論

立ち上げとなる今年度は、先行してDynaLux/cにて評価した6化合物について毒性情報を収集した。収集方法、入手可能な情報が明確になった。次年度は評価化合物数が増やす予定であるが、必要となる情報項目を精査し、将来、IVIVE検討に役立つリスト作成を目指す。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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. Fundam. Tox

icol. Sci. 2024;11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

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 64th 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 64th 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 64th 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 64th 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. 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
2. 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

3. 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、福岡、2024 年 7 月 5 日
 4. 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、福岡、2024 年 7 月 5 日
- 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

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

多色ルシフェラーゼアッセイの構築

研究分担者 中島芳浩 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門

研究要旨

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える *in vitro* 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本分担研究では、DynaLux/c の更なる高精度化のため、従来の FGF シグナルのかく乱モニター用 Nluc に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして用いる第二のルシフェラーゼ(内部標準ルシフェラーゼ)を導入する多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築を行った。今年度は内部標準用のプロモーター、ルシフェラーゼ、発光基質、光学フィルターの検討を行い、ヒト iPS 細胞においても多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築が可能であることを確認した。

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系は高コストであるうえ、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える *in vitro* 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた(*iScience* 等)。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性(28 日間反復投与毒性)に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短期間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家(桑形麻樹子)、公定化に関する専門家(平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家(小島肇: 日化協 LRI 顧問)らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔博士(若手)や横浜国立大学の Seo Jieun 博士(若手・女性・国際性)などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な *in vitro* 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

本分担研究では、試験実施者や実施機関間での再現性の向上および DynaLux/c 法の更なる高精度化を目的とし、FGF シグナル(青色)に加えて、内部標準(赤色)を組み込んだ多色ルシフェラーゼアッセイの構築を目的とする。

B. 研究方法

ルシフェラーゼ導入 iPS 細胞の作製: 血清応答因子(serum response factor: SRF)の応答配列下(serum response element: SRE)で Nluc を、EF1 α プロモーター制御下で甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ(SLR3)が発現する 2 つの発現ユニットを連結したレポーターベクターを作製した。これをヒト 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、薬剤選択により安定細胞株(以下、2 色発光 iPS 細胞と記載する)を樹立した。

発光測定: マルチウェルプレート対応のリアルタイム発光測定装置(KronosHT、アトー社)を用い、96 ウェルプレートに播種した iPS 細胞の発光を、37℃、5%二酸化炭素雰囲気下、湿度飽和状態において、1 ウェル当たり 10 秒間、約 30 分間隔で 3 日間連続で測定を行った。ルシフェラーゼを発光させるための発光基質は、所定の濃度を培地に添加した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究成果および考察

C-1: 2 色発光 iPS 細胞の樹立

これまでの DynaLux/c では、シグナルかく乱モニター用のルシフェラーゼとして Endurazine を発光基質として青色に発光する Nluc を用いている。そこで多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築のため、第二のルシフェラーゼ(内部標準ルシフェラーゼ)には Nluc と最大発光波長が最も離れ、異なる発光基質(D-luciferin)で発光する甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 を選定した。また赤色ルシフェラーゼを発現するためのプロモーターとして幹細胞において外来遺伝子の強制発現に汎用されている elongation factor1 α (EF1 α) プロモーターを選定した。SRE 制御下で Nluc が、また EF1 α プロモーター制御下で SLR3 が発現する 2 つの発現ユニ

ットを AAVS1 領域への相同組換え用ベクターに導入し、レポーターベクターを作製した。なお、内部および AAVS1 領域挿入後の外部からの転写の影響を排除するため、2 つの発現ユニットの間には、ユニ由来の HS4 インスレーターを配した(図 1)。

続いて、作製したレポーターベクターを CRISPR-Cas9 システムを用い AAVS1 領域にノックインし、薬剤選択により 8 クローンを単離した。続いて、各クローンのゲノム DNA を単離し、PCR によりベクターの挿入およびホモ体、ヘテロ体の確認を行った。その結果、いずれのクローンも想定した部位にベクターが挿入されていること、さらにクローン 1 および 5 がホモ体であり、残りの 6 クローンはヘテロ体であることが明らかとなった(図 2)。次に、ホモ体のクローン 1 と 5 の増殖を検証した。細胞を 6 ウェルプレートに播種し、細胞の増殖の様子を 4 日間観察した。対照として、当該プロジェクトのアッセイに使用している SRE 制御下で Nluc のみが発現する細胞(以下、SRE-Nluc 細胞と記載する)を用いた。その結果、クローン 1 は SRE-Nluc 細胞とほぼ同じ増殖を示したのに対し、クローン 5 は増殖が悪いことが明らかとなった(図 3)。このことより、以降の実験にはクローン 1 を使用することとした。

C-2: 2 色発光 iPS 細胞の発光測定法および作動性の検証

2 色発光 iPS 細胞の発光測定には、Nluc 用発光基質 Endurazine、また SLR3 用発光基質 D-luciferin で各々のルシフェラーゼを発光させる必要がある。両発光基質を共存させた例が iPS 細胞では報告されていないため、最初に、発光基質共存下での発光反応の交差反応と細胞毒性の有無について検討した。これまで樹立済みの EF1 α プロモーターの制御下で Nluc および SLR3 が発現する細胞(以下、それぞれを EF1-Nluc 細胞および EF1-SLR3 細胞と記載する)を 96 ウェルプレートに播種し、プロトコールに従い培養したのち、1% Endurazine、300 μ M D-luciferin、および両者を含む培地中で発光をリアルタイムに 72 時間測

定した(図 4)。その結果、EF1-Nluc 細胞では D-luciferin による発光は検出されず、Endurazine と D-luciferin を混合しても Endurazine のみの発光とほぼ同じ強度とキネティクスが得られることが確認された。一方、EF1-SLR3 細胞では Endurazine により数百カウントの微弱な発光が検出されたが、これは他のウェルからの発光の漏れ(クロストーク)によるものであり、実際には SLR3 による発光は検出されなかった。また両発光基質を混合した場合、Endurazine 単独よりも若干発光強度が低下した。これは Endurazine による細胞毒性に起因していることが示唆された。以上の結果から、両発光基質を共存させても発光反応の交差反応が生じないことが確認された。一方、使用する Endurazine の濃度については細胞毒性を生じる可能性があるため、今後、検討する必要があることが示唆された。

次に、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法と細胞の作動性について検証した。この細胞では青色の Nluc および赤色の SLR3 の発光が混合して光るため、2 枚の光学フィルターを用いて両者の発光を分離・検出する測定方法を想定した。具体的には、ショートパスフィルターである SPF500 により Nluc の 500 nm 以下の発光を、他方、ロングパスフィルターである R62 フィルターにより SLR3 の 600 nm 以上の発光を分離して測定する方法を設定した(図 5)。この方法により両ルシフェラーゼの発光を測定可能か検討するとともに、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の作動性について、FGF 処理による SRF-SRE シグナルの増強(発光増加)を指標に検証した。

2 色発光 iPS 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、所定のプロトコールに従い培養し、1% Endurazine、500 μ M D-luciferin および FGF または溶媒を含む培地に交換した。発光測定はフィルターなし、SPF500 および R62 を通した発光を各々 10 秒間、約 30 分間隔で 70 時間リアルタイムに測定した(図 6)。その結果、SPF500 フィルターを通して測定した Nluc の発光強度は FGF 処理により急激に増加し、約 5 時間をピークとする活性

化キネティクスが測定された。一方、R62 フィルターを通して測定された SLR3 の発光強度は、FGF 処理により若干の増加は見られるものの、大きな変動は生じないことが確認された。FGF 処理による Nluc の活性化キネティクスは、Nluc のみが発現する SRE-Nluc 細胞でこれまで得られているパターンと一致していた。また、SLR3 については、SLR3 のみが発現する EF1-SLR3 細胞に FGF を処理しても顕著な発光強度の変化が生じないという予備実験のデータと一致していた(データ省略)。以上より、設定したフィルターにより両ルシフェラーゼの発光が正しく検出・定量化できること、さらに樹立した 2 色発光 iPS 細胞は想定通りに FGF に反応することが確認された。

D. 結論

試験法の精度向上を目的に、多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築に取り組み、異なる発光基質を用いた 2 種のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定法を確立した。これにより、試験精度が向上するとともに、細胞毒性や測定誤差を補正するための新たな内部基準が導入可能となった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyata, R., M. Suzuki, Y. Okazaki, D. Abe, Y. Nakajima. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activation by an Active Compound in *Lythrum anceps* (Koehne) Makino." *J. Cell Biochem.* 126, (2025): e70009.
2. Tomita, T., Nakajima, Y. Ohmiya, K. Miyazaki. "Novel three-dimensional live skin-like in vitro composite for bioluminescence reporter gene assay." *FEBS J.* 291, (2024): 4619-4632.
3. Tabei, Y., Y. Nakajima. "IL-1beta-activated PI3K/AKT and MEK/ERK pathways coordinately promote induction of partial epithelial-mesenchymal transition." *Cell Commun. Signal.* 22, (2024): 392.

4. Nakazawa, K., M. Matsuo, Y. Kikuchi, Y. Nakajima, R. Numano. "Melanopsin DNA aptamers can regulate input signals of mammalian circadian rhythms by altering the phase of the molecular clock." *Front. Neurosci.* 18 (2024): 1186677.

2. 学会発表

1. 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).
2. 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.
3. 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
4. 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
5. Kashi 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)
6. 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)

7. 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
8. 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
9. 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. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

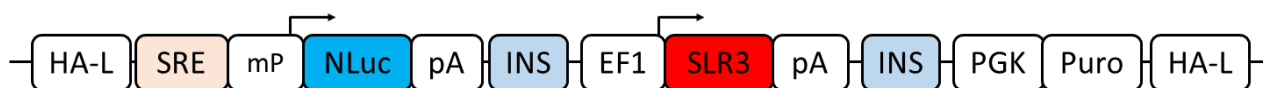


図 1: SRE 制御下で Nluc、EF1 α プロモーター制御下で赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 が発現する iPS 細胞作製用のレポーターベクターの概略。図中の記号の詳細は以下の通りである。HA: AAVS1 相同配列、SRE: serum response element、mP: ミニプロモーター、Nluc: NanoLuc、pA: polyA シグナル、INS: HS4 インスレーター、EF1: EF1 α プロモーター、SLR3: 赤色発光ルシフェラーゼ、PGK: PGK プロモーター、Puro: ピューロマイシン耐性遺伝子

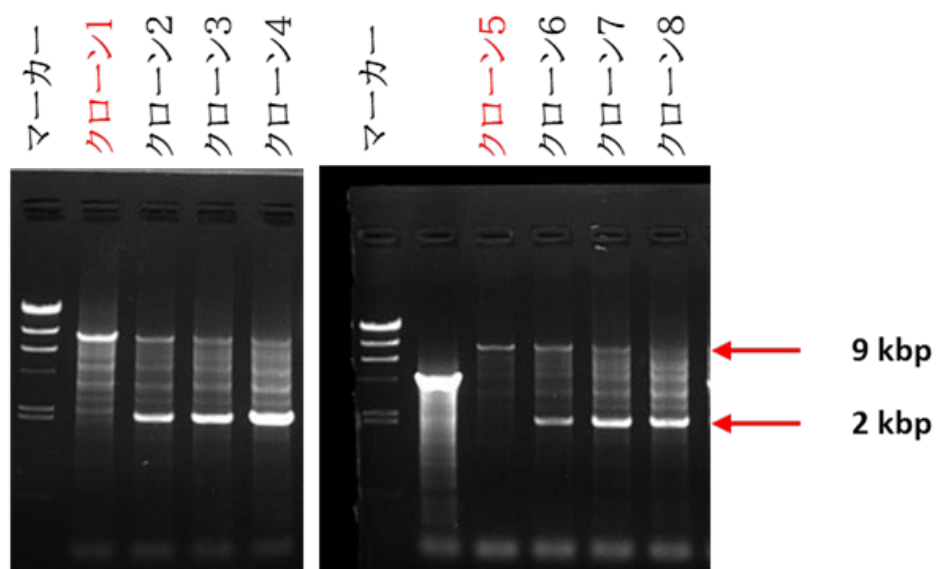


図 2: 薬剤選択により得られたクローンのゲノム PCR の電気泳動の結果。ホモ体は 9 kbp、ヘテロ体は 9 kbp と 2 kbp の PCR 産物が増幅される。分子量マーカーには λ /HindIII を使用した。

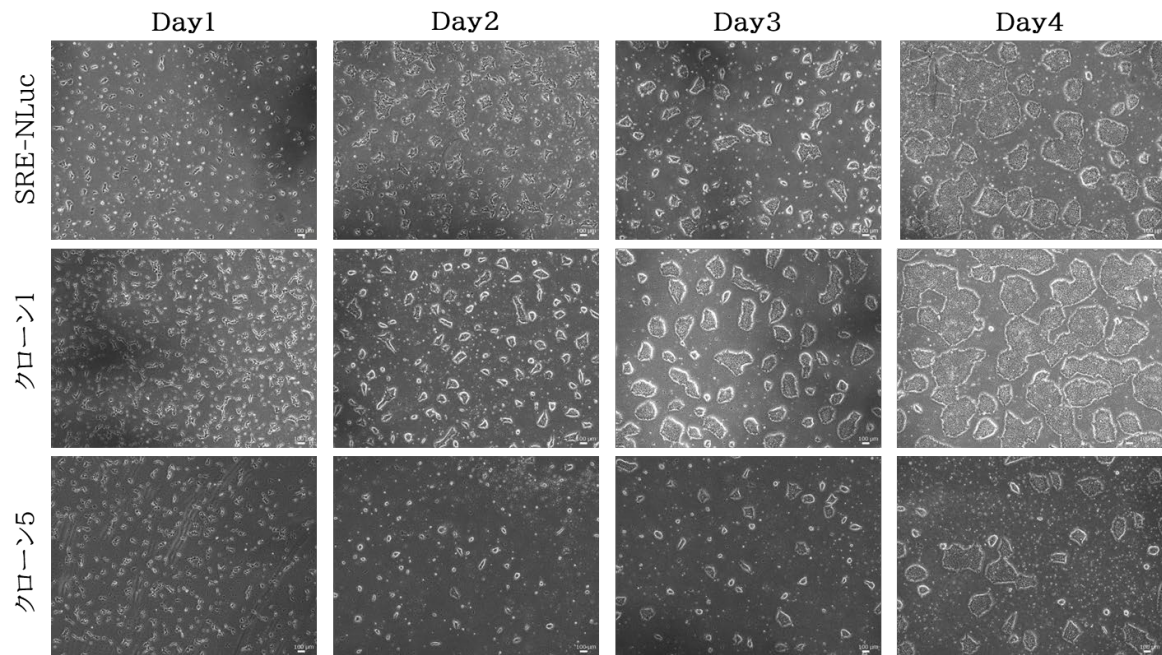
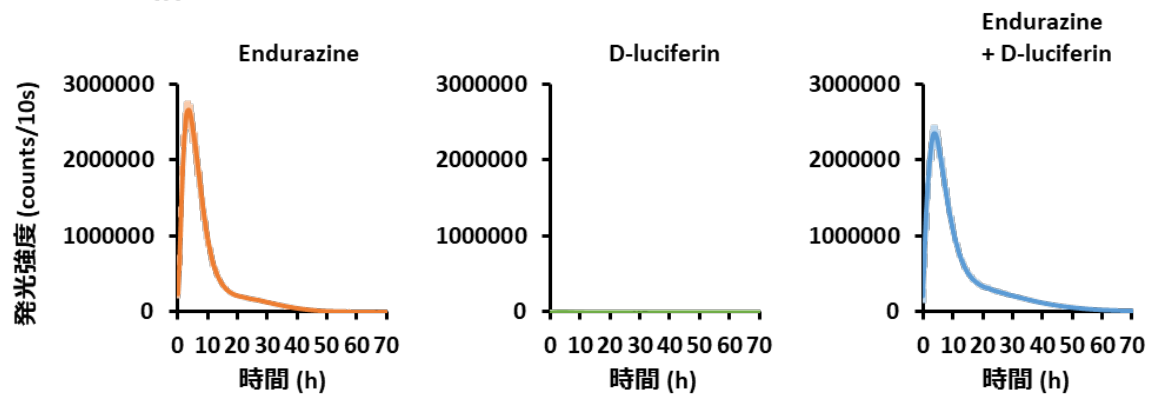


図 3:樹立した細胞の増殖の様子。各種細胞を 6 ウェルプレートに播種し、1 日毎、4 日間観察した。クローン 1 の増殖は良好である一方、クローン 5 の増殖は遅いことが明らかとなった。

EF1-NLuc細胞



EF1-SLR3細胞

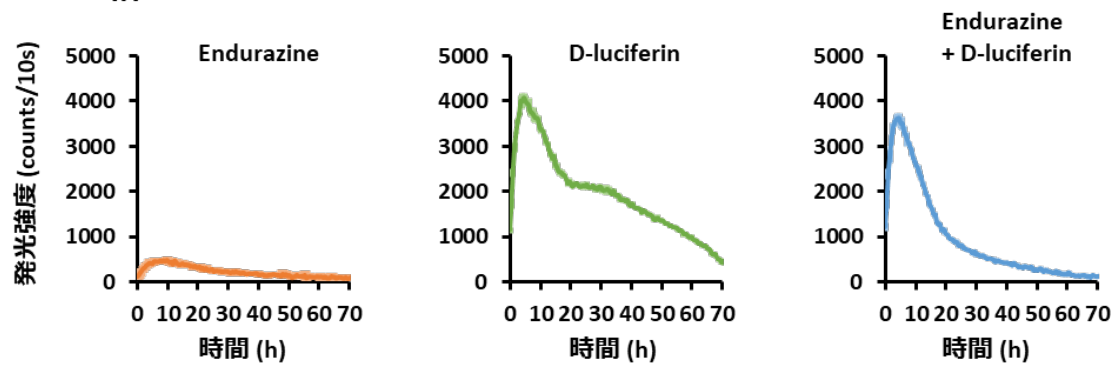


図 4: 発光基質 Endurazine と D-luciferin の反応交差性の検証。Endurazine は 1%, D-luciferin は 300 μ M を用いた。

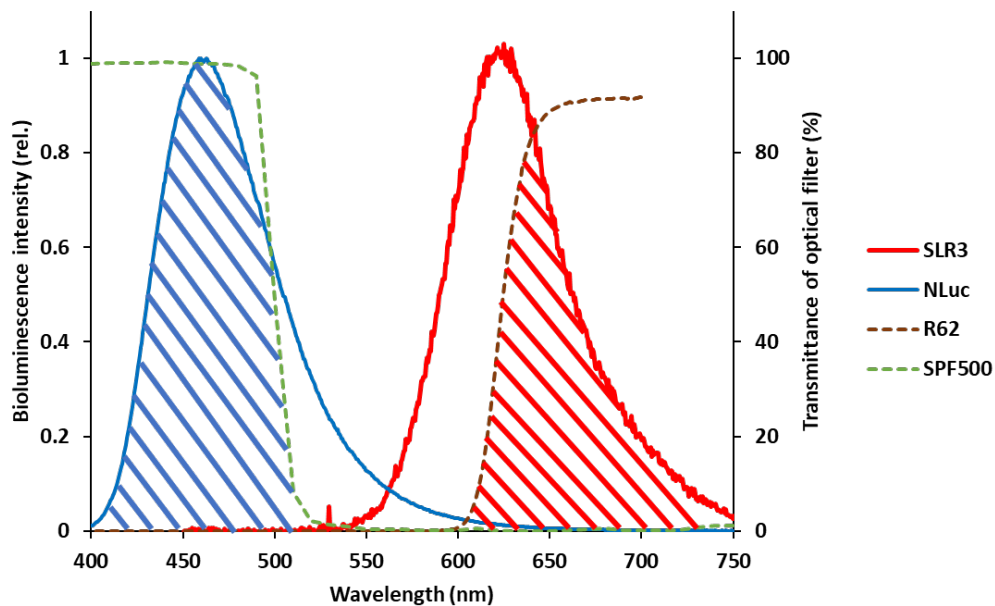


図 5: Nluc と SLR3 の発光スペクトル、および Nluc 分離用フィルター SPF500 と SLR3 分離用フィルター R62 の透過スペクトル。

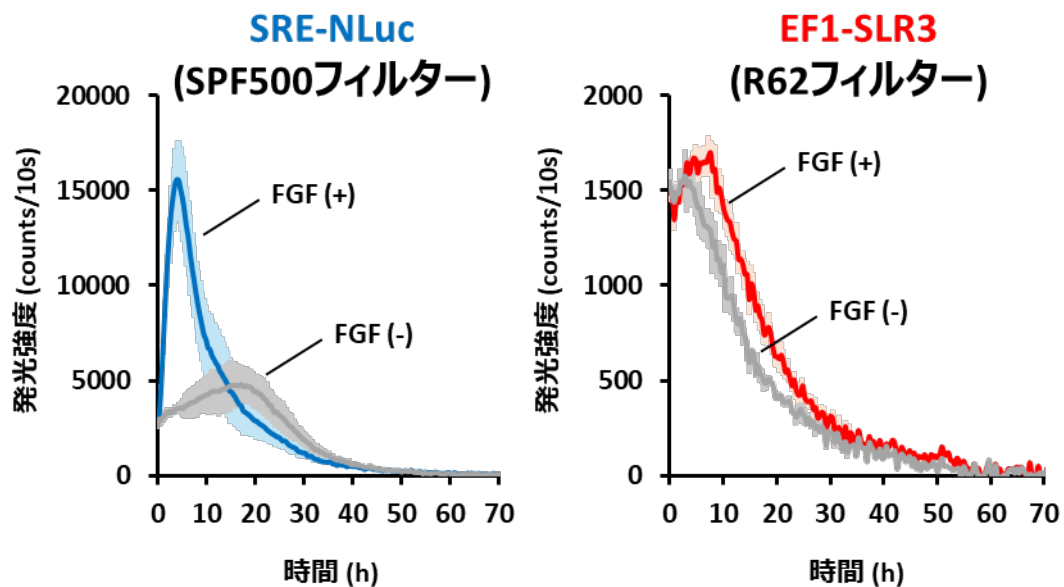


図 6: 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法および作動性の検証。Nluc は SPF500 フィルター、SLR3 は R62 フィルターを用い測定した。FGF 処理による SRF-SRE シグナル活性化を指標に細胞の作動性を検証した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発
令和6年度 研究成果報告書

コンソーシアムの設立、国内外の合意形成

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 客員研究員

研究要旨

ヒト iPS 細胞を用いた発生毒性評価法(DynaLux/c)は、高いヒトへの外挿性と網羅性と正確性を有し、高スループット故に低コストで化学物質のハザード評価が可能な *in vitro* 生殖発生毒性代替法に値する試験法である。本研究では、DynaLux/c を有害性評価値の導出に寄与できる定量的な指標を得ることが可能な試験系として確立し、最終的にリスク評価可能な OECD の TG として公定化することを目標とする。この試験法が開発されることにより、申請者の負担を少なくした上で、化審法の審査に有益な情報が提供可能となる。その結果、適切なリスク管理の下、有用な新規化学物質の迅速な上市に資する。本研究班の中で、DynaLux/c の公定化に向けて、業界団体等の意見反映及び国際的な合意形成を目指した。

本年度は、業界団体の意見を反映させるため、コンソーシアムを設立した。2回の会議を経て、技術移転性のための共同研究を念頭に置いた体制を構築し、データ解析の方法を検討するなど、今後の方向性を明確にした。

研究協力者

正田卓司 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞を用いた発生毒性評価法 (DynaLux/c) は、高いヒトへの外挿性と網羅性と正確性を有し、高スループット故に低コストで化学物質のハザード評価が可能な *in vitro* 生殖発生毒性代替法に値する試験法である。本研究では、DynaLux/c を有害性評価値の導出に寄与できる定量的な指標を得ることが可能な試験系として確立し、最終的にリスク評価可能な経済協力開発機構 (OECD) の試験法ガイドライン (TG) として公定化することを目標とする。この試験法が開発されることにより、申請者の負担を少なくした上で、化審法の審査に有益な情報が提供可能となる。その結果、適切なリスク管理の下、有用な新規化学物質の迅速な上市に資する。

本研究班の中で、DynaLux/c の公定化に向けて、業界団体等の意見反映及び国際的な合意形成を目指した。

B. 研究方法

B-1 コンソーシアムの設置

発生毒性試験代替法 DynaLux/c の OECD における国際標準化及び医薬品規制調和国際会議 (ICH) における当該試験を用いたリスク評価法の認知を目的に、本研究班の中に業界団体等の意見反映及びプロトコルの技術移転性を確認するためのコンソーシアムを設立した。

第一回コンソーシアム会議を令和 6 年 7 月 25 日 (木) 国立医薬品食品衛生研究所で開催され、班員に加え、厚生労働省、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) 及び業界団体の専門家が参加した。

第二回コンソーシアム会議は、令和 7 年 1 月 28 日 (火) に国立医薬品食品衛生研究所で開催し、

上記の方々が参加した。

B-2. 解析データの収集

協力研究者の正田とともに、これまで生殖発生毒性物質に関するデータベースの作成に務めた。

倫理面への配慮

実験を伴わないことから、倫理的問題は無いと考える。

C. 研究結果

C-1. コンソーシアムの設置

第一回コンソーシアム会議には、班員 6 名、厚生労働省から 3 名、PMDA から 3 名、大学関係者 6 名、日本製薬工業協会から 2 名、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会から 7 名、一般社団法人日本化学工業協会から 1 名、日本化粧品工業会から 3 名及びクロップライフジャパン (旧 JCPA 農薬工業会) から 2 名、合計 32 名が対面または web で参加した。参加者を別表 1 に示した。

会議では、技術移転に向けた共同研究に関する提案及びリスク評価を目指したデータベース作成に必要な被験物質に関する情報収集への協力要請がなされ、参加者と種々の意見交換がなされた。

第二回会議は、令和 7 年 1 月 28 日に開催された。DynaLux/c の追加データ情報が紹介されるとともに、共同研究への参画や被験物質情報について議論した。また、技術移転に向けた共同研究に関する今後の予定が紹介された。

C-2. 解析データの収集

正田より、ICH S5 (R3) の参照物質リストおよび欧州代替法評価センター (ECVAM) のバリデーションで用いられた被験物質に関する構造式、物性、分類分析などの解析結果などの結果をまとめた。物性の結果も合わせ、毒性を協議していくこ

とになった。

小島より、他の代替法に関する入力結果が紹介された。今後の組み合わせを考えると、他の代替法で検出できない物質を評価できるなどの本試験法の特徴を明確にする必要があると説明した。

D. 考察

DynaLux/c を用いることにより、生殖発生毒性のステージ毎の有害性を明確にすることが期待される。一方で、リスク評価のためには、DynaLux/c の結果に加え、曝露評価などの情報も必要となる。正田やコンソーシアム参加者の協力を得て、*in silico* を組み合わせてリスク評価手法の開発に寄与していきたいと考えている。

一方、DynaLux/c の技術移転性や再現性を共同研究を通して明確にしていくこともコンソーシアムの目的である。来年度には、技術移転性の検討を始められるよう覚書や同意書の準備を進めていきたいと考えている。

E. 結論

業界団体との試験を反映するため、コンソーシアムを設立した。2回の会議を経て、DynaLux/c の技術移転性を確認するための共同研究を念頭に置いた体制を構築し、データ解析の方法を検討するなど、今後の方向性を明確にした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 小島肇夫: 動物実験代替法の歴史、Cosmetic Science、2024、10、56-63.
2. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist

GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, Arch Toxicol, 2024 Jun 14. doi: [10.1007/s00204-024-03802-6](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03802-6).

2. 学会発表

1. 小島肇: 動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第14回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
2. 小島肇: JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30, 栃木)

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

OECD テストガイドライン対応

研究分担者 平林容子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長

研究要旨

化学物質による発生毒性評価において、動物実験の代替法開発が国際的に求められている中で、本研究では、シグナルかく乱作用に着目した試験法「DynaLux/c」の OECD などにおける国際ガイドラインへの収載に向けた改良を進めている。本分担課題では、本試験法の公定化に資するため、NAM (New Approach Method) の行政的受け入れに関する国内外の状況の把握を目的として、OECD や米・EU の国際会議、国内関連学会に参加し、試験法の標準化・ガイドライン化に関する議論や、行政的受け入れ状況、新興技術の適格性認定制度等の情報収集を行った。また、DynaLux/c を認知させるための情報発信を実施した。

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系は高コストであるうえ、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。

そこで、研究代表者らは、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた。本研究の

目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる発生毒性を評価する NAM (New Approach Method) の試験法として確立するとともに、その公定化を目指している。

本分担研究では、この改良される試験法の確立・公定化に資することを目的として、試験法の国際標準化や OECD などにおける試験法ガイドラインとしての公定化に必要な国内外の NAM の開発状況やその適格性認定などを含む情報収集を行った。

B. 研究方法

米・EU を中心に、化学物質等の安全性やリスク評価において、試験動物を使用しない評価法へのパラダイムシフトが加速されつつある現状と、その行政的受け入れに関する国内外の状況の把握を目的として、規制関連国際会議（OECD Working Group

of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)-36 (4/16-19、パリ)、OECD Working Party on Hazard Assessment (WPHA) (6/24-26、パリ)、OECD Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) (6/25-27 (うち 6/25PM~6/26AM は WPHA との合同会議)、パリ)、Global Coalition for Regulatory Science Research (GCRSR) & Global Summit on Regulatory Science (GSRS)24 (9/17-19、アーカンソー)や、国内関連学会(日本実験動物学会(5/29-31、京都)、レギュラトリーサイエンス学会(9/13-14、東京))に参加し、それぞれの発表の聴講や、意見交換を通じて、必要な情報の収集を行った。

C. 研究結果及び考察

OECD では、WNT が主体となり、一昨年度には新興技術の試験法への取り込みに関するワークショップ、昨年度は、そうした新たな試験法の公定化に関するワークショップが開催されており、本年度はそれらを踏まえ、OECD 試験法の公定化に関するガイダンスドキュメント (GD34、2005 年発布) の改訂作業が行われている。即ち、従来一つの試験法が開発されてガイドラインとして認証されるまで 10 年ほどの時間を要しているところ、信頼性を損なうことなく、諸々の必要とされるリソースを最小化するための改訂を目指している。行政利用に耐える信頼性確保のための試験法の評価手法そのものの議論もさることながら、

必要な経費も無視できない課題であり、包括的なガイダンスが期待されている。

GCRSR は各国の規制当局関連機関の年次連絡会議であり、付随してセミクロードで開催されるシンポジウム GSRS の今年 GSRS24 のテーマは“Digital Transformation in Regulatory Science”であった。内容としては人工知能 (AI) の利活用に関するケースレポート的な発表が過半ではあったものの、昨年 GSRS23 のテーマは“Emerging Technologies for Food and Drug Safety”、来年 GSRS25 のテーマは“Building a Strong Regulatory Science with Tomorrow’s Technologies”であり、一貫して新興技術の動向を把握することに主眼がおかれている。引き続き情報の収集に努めたい。

米国でも EU でも、こうした新興技術を適用した新規試験法の行政利活用に向けた適格性認定システムが構築されており、本邦でも相応のシステムの早期の導入が望まれている。

国内学会では、いずれもシンポジストとして、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 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) における、所内外機関が開発した新たな試験法の公定化支援や、新たに公定化された OECD ガイドラインの本邦での行政受入提案といった活動を基軸として、収集した国際状況を含めた発表を行い、DynaLux/c の紹介にも努めた。

D. 結論

米・EU を中心に、化学物質等の安全性やリスク評価において、試験動物を使用しな

い評価法へのパラダイムシフトが加速されつつある現状と、その行政的受け入れに関する国内外の状況の把握を目的として、関連集会などに参加し、DynaLux/c をリスク評価に適用可能な試験法として認知させるための情報収集や情報発信を実施した。

E. 研究発表

論文発表

1. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaoun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, Arch Toxicol, 2024 Jun 14. doi: [10.1007/s00204-024-03802-6](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03802-6).
2. Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. Current Opinion in Toxicology 2024; Volume 39, 100489.
3. 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 Fundamental Toxicological Sciences, 2024;11:37-56.

学会発表

1. 平林容子: 経済協力開発機構 (OECD) が進める New Approach Methods を用いたリスクアセスメント 第 71 回 日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 31 日
2. Y. Hirabayashi: Recent Initiatives of JaCVAM for Regulatory Acceptance of Safety Evaluation of NAMs including MPS. Singapore International Food Forum, Singapore, Aug. 1, 2024
3. 平林容子. 代替法の行政的受け入れにかかる JaCVAM の役割 第 14 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2024.9.13)
4. Y. Hirabayashi: Initiatives for the regulatory use of alternative methods to animal testing. Next generation nonclinical safety evaluation- Alternatives to animal testing in drug discovery and development -Nonclinical toxicology related event, Shonan, Nov. 13, 2024
5. 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).
6. 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.
7. 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
8. 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
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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
 12. 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
 13. 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. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙 6

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小島肇	動物実験代替法の歴史	Cosmetic Science	10	56-63	2024
Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaioun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P	Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology	Arch Toxicol	98	2299-2308	2024
M. Kuwagata, Y. Doi, H. Saito, M. Tsurumoto, T. Igarashi, T. Nishimura, Y. Taquahashi, Y. Hirabayashi, S. Kitajima	A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	11(4)	169-181	2024
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	55	423-425	2024

Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda.	Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics.	Current Opinion in Toxicology	Volume 39	100489	2024
T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda	Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion	Scientific Reports	14	23935	2024
T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda	Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation	Scientific Reports	14	4709	2024
MT. Taninokuchi, Y. Zhou, L. Braccischi, F. Modestino, J. Fukuda, C. Mosconi	Trans-arterial stem cell injection (TASDI): The role of interventional radiology in regenerative medicine	Journal of Clinical Medicine	13(3)	910	2024
JB Park, GH Moon, A Cho, M Kwon, JW Park, EC Yi, H Kim, J. Fukuda, C Kwak, YG Ko, and YS Chun	Neddylation of insulin receptor substrate acts as a bona fide regulator of insulin signaling and its implications for cancer cell migration	Cancer Gene Therapy	31	599-611	2024
E. Sugiyama, A. Nanmo, N. Xiaolei, SY. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda	Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device	ACS Biomaterials Science & Engineering	10, 2	998–1005	2024
Y. Zhou, J. Seo, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, and J. Fukuda	Exosomes for hair growth and regeneration	Journal of Bioscience and Bioengineering	137, 1	1-8	2024

Tomita, T., Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Miyazaki	Novel three-dimensional live skin-like in vitro composite for bioluminescence reporter gene assay	FEBS J	291	4619-4632	2024
Tabei, Y., Y. Nakajima	IL-1beta activated PI3K/AKT and MEK/ERK pathways coordinately promote induction of partial epithelial mesenchymal transition	Cell Commun. Signal.	22	392.	2024
Nakazawa, K., M. Matsuo, Y. Kikuchi, Y. Nakajima, R. Numano	Melanopsin DNA aptamers can regulate input signals of mammalian circadian rhythms by altering the phase of the molecular clock.	Front. Neurosci.	18	1186677	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	Fundam. Toxicol. Sci	11(1)	37-56	2024
Miyata, R., M. Suzuki, Y. Okazaki, D. Abe, Y. Nakajima	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activation by an Active Compound in Lythrum andeps (Koehne) Makino	J. Cell Biochem	126	e70009	2025

DynaLux/c SOP

1 [目次](#)

2	培養スケジュール	2
3	必要試薬・器具	2
4	実験手順	3
4.1	iPS 細胞の培養	3
4.1.1	Geltrex コーティング	3
4.1.2	StemFlex Medium の調製	4
4.1.3	Y-27632 の調製	4
4.1.4	起株	4
4.1.5	継代	5
4.1.6	培地交換	6
4.1.7	細胞凍結	7
4.2	化学物質添加濃度の決定	8
4.2.1	化学物質のストック調整	8
4.2.2	溶解度試験	8
4.2.3	細胞毒性試験	8
4.3	DynaLux/c	10
4.3.1	bFGF の調製	10
4.3.2	DynaLux/c	10

作成：溝田 華柊、大久保 佑亮

2 培養スケジュール

曜日	月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日
維持	継代 3.0×10^5 cells/well	培地交換		継代 1.0×10^5 cells/well	培地交換 (double feed)		
試験①	播種 2.0×10^4 cells/well	培地交換		培地交換 (APEL2)	シグナル かく乱試験		
試験②	シグナル かく乱試験			播種 2.0×10^4 cells/well	培地交換		培地交換 (APEL2)

3 必要試薬・器具

【試薬】

- FGF-SRF シグナルレポーター細胞 (201B7 由来, 理研 BRC CiRA)
- Sterile Water, Endotoxin Free (11039-021, Thermo Fisher Scientific)
- DMEM/F-12, HEPES, no phenol red (196-15645, FUJIFILM Wako)
- Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (A1413202, Thermo Fisher Scientific)
- StemFlex™ Medium (A3349401, Thermo Fisher Scientific)
- CultureSure® Y-27632 (036-24023, FUJIFILM Wako)
- PBS (-) (166-23555, FUJIFILM Wako)
- Culture Sure DMSO (036-24023+D9, FUJIFILM Wako)
- TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red) (12563011, Thermo Fisher Scientific)
- STEMdiff™ APEL™2 Medium (ST-05275, STEMCELL Technologies)
- Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate (N2571, Promega)
- Human Heat Stable bFGF Recombinant Protein (PHG0367, Thermo Fisher Scientific)
- Cell Counting Kit-8: CCK-8 (CK04, Dojindo)
- STEM-CELLBANKER® GMP grade (CB045, ZNQ)

【装置・器具】

- #1 Tissue Culture Plate VTC-P6 : VIOLAMO (2-8588-01, AS One)
- 96 Well White/Clear Bottom Plate, TC Surface (165306, Thermo Fisher Scientific)
- Breathe-EASIER (BERM-2000, TOHO)
- #1 微量保存用 8 連チューブ 0.1mL アンバー 2D コード付き (PCR-8SAC-FC-1-X-BC, AGB)

- ・ #1 防水フリーズボックス 0.2ml×196 穴 (F-02-118-K, フリーエス)
- ・ #1 ラボピタ (65-1681-93, AS One)
- ・ #2 ClipTip 300, Filtered, Sterile, Rack (94420513, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 ClipTip 50, Filtered, Sterile, Rack (94420253, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 F1-ClipTip™ Multichannel Pipettes, 30 to 300 µL (4661180N, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 F1-ClipTip™ Multichannel Pipettes, 5 to 50 µL (4661160N, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #1 リザーバー 1 レーン 25ml 滅菌済 (BM-0850-1, BMBio)
- ・ #3 多検体生細胞リアルタイム発光測定装置、WSL-1563 KronosHT (ATTO)
- ・ #1 自動セルカウンター、Countess 3 FL (Invitrogen)
- ・ #1 Countess™ Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen)
- ・ #1 低速遠心機、Centrifuge 5702 R (Eppendorf)
- ・ #1 マルチラベルリーダー、ARVO-X4 (PerkinElmer)
- ・ #1 アルミマット保温装置、HIENAI Mat 01R (COSMO BIO)
- ・ #1 アルミブロック保温装置、HIENAI Tube Warmer GX01 (COSMO BIO)

#1 代替品で対応可能。

#2 代替品でも対応可能だが、Clip Tip を使用すると安定する。

#3 代替品の WSL-1565 Kronos HT でも可能。今後の多色化を見据えるとマルチカラー測定のできる WSL-1563 KronosHT が好ましい。

4 実験手順

4.1 iPS 細胞の培養

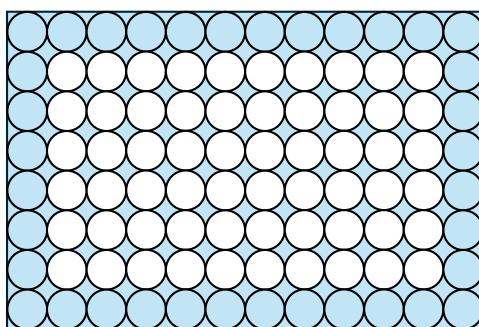
4.1.1 Geltrex コーティング

- 1) Geltrex を冷凍庫から取り出し、氷上で解凍する。
- 2) Geltrex コーティングを行わない well と、96 well プレーートの外周にあたる 36 well、well 間の溝に湿度維持のために Sterile Water を以下の容量で入れる。
6 well プレート: 1.5 mL
96 well プレート外周と well 間の溝: 100 µL/well
96 well プレート well 間の四隅の溝: 60 µL/well
- 3) 冷蔵庫から取り出した DMEM/F-12 と氷上で解凍した Geltrex を 100 : 1 で混合し、以下の容量で Geltrex 溶液を加える。Geltrex は 15°C 以上でゲル化が始まってしまうため、DMEM/F-12 と Geltrex の混合溶液は温まらないように氷上に置いて操作を行う。
35 mm ディッシュおよび 6 well プレート: 1.5 mL/well
12 well プレート: 600 µL/well
24 well プレート: 300 µL/well
48 well プレート: 150 µL/well

96 well プレート: 60 μ L/well

- 4) 培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで1時間以上静置する。
- 5) 培養プレートの外周にパラフィルム（テープ状のものだとやりやすい）を巻いて、使用するまで4°C冷蔵庫に移す。このとき、冷蔵庫に移したプレートは2週間以内に使い切る。
- 6) 使用する前に CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで20分以上静置する。

図1 Geltrex と Sterile Water の充填場所



白色に Geltrex、水色 Sterile Water を充填する

4.1.2 StemFlex Medium の調製

- 1) StemFlex Basal Medium 450 mL と StemFlex Supplement 50 mL とを混合する。
- 2) 使用前の再融解していないものは分注して-20°Cに保存可能。再融解したものは4°Cで保存し、2週間以内に使い切る。

4.1.3 Y-27632 の調製

- 1) Y-27632 5 mg を純水 1.477 mL に溶かし、10 mM の Y-27632 を調製する。
- 2) (分注し)-20°Cで保存する。

4.1.4 起株

- 1) Geltrex コート済みの培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで20分以上静置し温める。
- 2) あらかじめ StemFlex Medium を 37°Cに加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。また、Y-27632 を冷凍庫から出し溶かしておく。以降の操作は培養プレートを HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 3) ストックチューブを液体窒素タンクから取り出し、StemFlex 1 mL を入れ、軽くピペッティングをして解凍する。
- 4) あらかじめ StemFlex Medium を 3 mL を入れた 15 mL チューブに細胞懸濁液を回収し、200×gで4分間遠心する。
- 5) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、StemFlex

Medium (+10 μ M Y-27632) 2 mL で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピペッティングは 5 回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。

- 6) Geltrex 溶液をアスピレーターで吸い、6 well プレートに細胞を全量播種する。
- 7) 翌日、継代から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium に培地交換する。

4.1.5 継代

- 1) Geltrex コート済みの培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°C で 20 分以上静置し温める。
- 2) あらかじめ StemFlex Medium を 37°C に加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。また、Y-27632 を冷凍庫から出し溶かしておく。以降の操作は培養プレートを HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 3) 培養プレートの培地を捨て、PBS (-) 2 mL で well を 1 回洗浄する。
- 4) TrypLE Select 1 mL を加えウェル全体になじませ、HIENAI Tube Warmer GX01 上で約 5 分間静置する。この間に 15 mL チューブに 4 mL の StemFlex Medium を準備しておく。
- 5) あらかじめ準備した 15 mL チューブに細胞懸濁液をピペッティングせずに回収した後、再度 15 mL チューブ内の培地 1 mL を培養プレートに入れ、残りの細胞を回収する。200 $\times g$ で 4 分間遠心する。
- 6) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、StemFlex Medium 2 mL で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピペッティングは 5 回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。
- 7) 細胞懸濁液の一部を採取し、トリパンブルーと 1:1 で混合して生細胞数を計測する。このときの細胞数の目安は 1 well あたり $0.9 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^6$ cells/mL。この範囲外のときは細胞の調子が万全でない可能性があるので試験を行うことを避ける。
- 8) Geltrex 溶液をアスピレーターで吸い、細胞懸濁液と StemFlex Medium (+10 μ M Y-27632) で培養プレートに以下の容量と細胞数で細胞を播種する。このとき 96 well プレートの播種にはマルチピペッターを用いる。(以下の細胞数で継代までに既定の細胞数まで増殖しない場合は 6 well プレートへの播種細胞数を倍にするなどして対応する。)

6 well プレート 2 mL

月曜日: 3.0×10^5 cells/well

木曜日: 1.0×10^5 cells/well

96 well プレート 200 μ L/well

月曜日: 2.0×10^4 cells/well

木曜日: 2.0×10^4 cells/well

- 9) 96 well プレートには湿度維持のため Breathe-EASIER を貼る。このとき、プレートからはみ出る部分はナイフでトリミングする。また、プレート側面や縁、蓋が濡れている場合はキムワ

イプなどでふき取ってから Breathe-EASIER を貼る

- 10) 翌日、継代から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium に培地交換する。

図2 継代直前の細胞密度

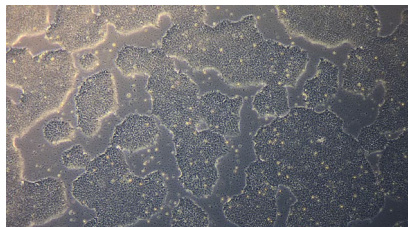
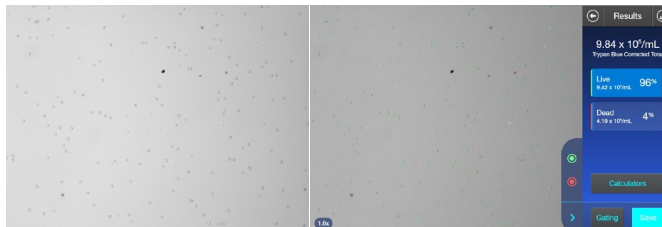


図3 TrypLE Select による細胞剥離時の状態



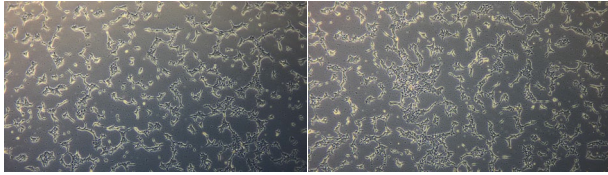
4.1.6 培地交換

- 1) あらかじめ StemFlex Medium (APEL2 Medium)を 37°Cに加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。以降の操作は培養プレート を HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 2) プレート内の培地をアスピレーターで吸い、6 well プレートには StemFlex Medium を 2 mL、96 well プレートには StemFlex Medium を 200 μL /well 入れる。播種後 day3 の 96 well プレートには APEL2 Medium を 100 μL /well 入れる。このとき、APEL2 Medium に培地交換以降はあまり細胞が増殖しないため、この時点で 96 well プレートの細胞数が極端に少ない場合は試験を避ける。
- 3) 96 well プレートには湿度維持のため Breathe-EASIER を貼る。

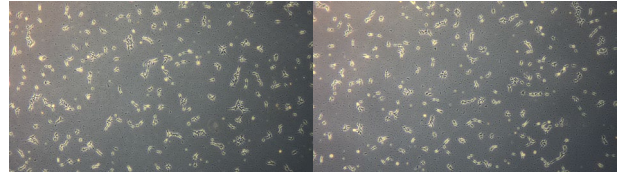
図4 それぞれのタイミングにおける細胞の様子

【6 well プレート】

火曜日



金曜日

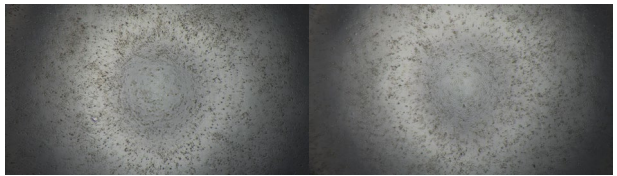


【96 well プレート】

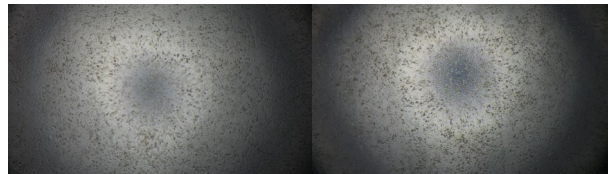
火曜日



木曜日

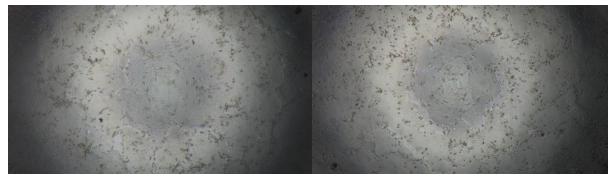


金曜日



【96 well プレート NG 例】

木曜日



4.1.7 細胞凍結

- 1) 生細胞数の測定まで、**4.1.5 継代**と同様の手順で行う。
- 2) ストックチューブ1本につき 1.0×10^5 cells となるように、ピペットエラーを考慮してストックする量+ α の細胞懸濁液を 15 mL チューブに入れ、 $200 \times g$ で4分間遠心する。
- 3) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、ストックチューブ1本につき 200 μ L となるように STEM-CELLBANKER で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピPETTINGは5回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。
- 4) ストックチューブに細胞を懸濁した STEM-CELLBANKER を 200 μ L いれ、バイセルに入れた後、 -80°C フリーザーに入れる。

- 5) 24h 経過後、1~2 週間くらいまでを目安に液体窒素タンクへ移す。

4.2 化学物質添加濃度の決定

4.2.1 化学物質のストック調整

- 1) メーカーのデータシートを参考に PBS か DMSO の適切な溶媒を選択し、溶解可能な濃度でストックを調製する。
- 2) 凍結融解の繰り返しを防ぐために微量保存用 8 連チューブにそれぞれの化学物質を 50 μ L で分注して、防水フリーズボックスに入れ、-30°C で保存する。

4.2.2 溶解度試験

- 1) 溶媒に DMSO を使用している化学物質は水溶性が低いため、培地に溶解可能な濃度を確認する。各化学物質のストックを StemFlex Medium に 100 倍希釈し、析出するか目視にて確認する。溶解せず析出する場合はさらに薄い濃度に希釈する。
- 2) 一晩静置し、翌日に析出がないか確認する。

4.2.3 細胞毒性試験

- 1) **4.1.5 継代**の手順に従い、96 well プレートに細胞を 2.0×10^4 cells/well で播種する。(0day)
- 2) 翌日、播種から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium 200 μ L/well に培地交換する。(1day)
- 3) 播種後 3 日後に **4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 μ L/well に培地交換する。(3day)
- 4) 実験を行う前に細胞がコンフルエントになっていることを確認する。細胞に隙間があり、コンフルエントになっていないときは試験を避ける。
- 5) 化学物質の添加直前に、**4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 μ L/ml に培地交換を行う。(4day)
- 6) 水溶性の高い化学物質に関しては 1000 μ g/mL を上限に溶解可能な最大濃度が、水溶性の低い物質に関しては培地へ溶解可能な上限濃度が、添加前の最大濃度になるように APEL2 Medium で各化学物質の 2 倍希釈系列を 9 濃度分作製し、下図のように duplicate で 11 μ L/well ずつ添加する。(希釈系列作製には 8 連チューブと 1.5 mL チューブを用いた。8 連チューブの右端に最大濃度の化学物質を調製し、その他の部分には培地を入れておく。その後、右端のチューブから、他の部分に入れた培地量と同量の調整済み化学物質をとり、一つ左のチューブに入れピペッティングをして 1/2 に希釈する。その後希釈したチューブから同量を隣のチューブに入れてピペッティングという操作を繰り返して希釈系列を作成した。最後に同量の培地を入れた 1.5 mL チューブに一番低い濃度のものを同量入れ、9 濃度とした。また、

化学物質の種類が増えると希釈系列の作製が大変なため、一番濃度の低い 1.5 mL チューブ以外はマルチピペッターを用いて一度に複数の物質の希釈系列を作成した。) また、いずれの化学物質においても、溶媒である PBS または DMSO の最終濃度がそれぞれ最大 1% と 0.1% となるようにする、各化学物質の溶媒に合わせて対照群として最終濃度 1% PBS 添加群または 0.1% DMSO 添加群を設定する。

この時間を基準点の 0h として設定する。(0h)

- 7) 化学物質添加 20h 後に CCK-8 を 10 μ L/well で添加する。(20h)
- 8) CCK-8 添加 4h 後に各 well の 400 nm の吸光度を測定する。(24h)
- 9) 以下の式から各ウェルの細胞生存率を算出する。

$$Cell\ viability = \frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{vehicle} - Abs_{blank}}$$

- 10) 50%生存抑制濃度 (IC50)を推定する。
- 11) 今後、CCK-8 の添加を化学物質添加 66h 後、吸光度の測定を 70h 後にする可能性もあり。

図5 細胞毒性試験における希釈系列作製法

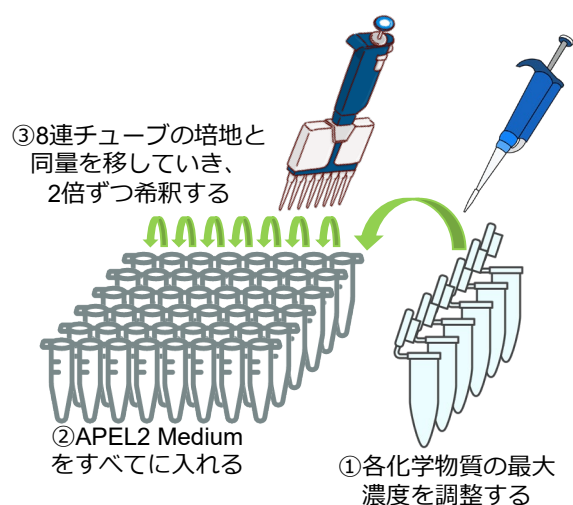


図6 細胞毒性試験プレートデザイン

	veh	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	veh	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
濃度 低 ————— 高											

4.3 DynaLux/c

4.3.1 bFGF の調製

- 1) bFGF を 0.1% BSA/PBS に溶解し、最終濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ とした。
- 2) 1.5 mL チューブに分注し、使用するまで冷凍庫に保存した。

4.3.2 DynaLux/c

Day0

- 1) 4.1.5 継代の手順に従い 96 well プレートに細胞を 2.0×10^4 cells/well で播種する。

Day1

- 2) 翌日、播種から 24h 以上経過後 にシングルセルでなくなっていれば、4.1.6 培地交換の手順に従い StemFlex Medium 200 $\mu\text{L/well}$ に培地交換する。(1day)

Day3

- 3) 播種後 3 日後に **4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に培地交換する。
(3day)

Day4

- 4) 実験を行う前に細胞がコンフルエントになっていることを確認する。細胞に隙間があり、コンフルエントになっていないときは試験を避ける。
- 5) 実験操作開始 30 分前に Kronos を起動する。このタイミングで使用する化学物質を常温に置き溶かしておく。(-30 min)
- 6) APEL2 Medium (+1% Endurazine) 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に培地交換し、Kronos で測定を開始する。
この時間を Kronos 測定基準点の 0h として設定する。(0 h)
- 7) 化学物質添加 20 分前程度に添加化学物質の調製を行う。細胞毒性試験にて IC50 が推定された物質は最終濃度の最大濃度を IC50 に設定し、それ以外の物質は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を上限に溶解可能な最大濃度が添加前の最大濃度になるように APEL2 Medium で各化学物質の 2 倍希釈系列を 8 濃度分作製する。(希釈系列作製には 8 連チューブを用いた。8 連チューブの右端に最大濃度の化学物質を調製し、その他の部分には培地を入れておく。その後、右端のチューブから、他の部分に入れた培地量と同量の調整済み化学物質をとり、一つ左のチューブに入れピペッティングをして 1/2 に希釈する。その後希釈したチューブから同量を隣のチューブに入れてピペッティングという操作を繰り返して希釈系列を作成した。また、化学物質の種類が増えると希釈系列の作製が大変なため、マルチピペッターを用いて一度に複数の物質の希釈系列を作成した。) また、いずれの化学物質においても、溶媒である PBS または DMSO の最終濃度がそれぞれ最大 1%と 0.1%となるようにするため、各化学物質の溶媒に合わせて対照群として最終濃度 1%と 0.1% になるように PBS と DMSO を調製しておく。
- 8) Kronos を一時停止して 96 well プレートを取り出し、下図のように duplicate で 11 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ化学物質を添加した後、測定を再開する。(2h)
- 9) Kronos の測定を終了させ、データを保存した後、bFGF の濃度が 2 ng/mL になるよう APEL2 Medium で希釈し、12 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する。この時、左端の列は FGF を添加しないコントロールとする。その後、再び測定を開始する。(3 h)
- 10) 再測定開始後 70h 経過後に Kronos を停止する

※Endurazine、化学物質、bFGF の添加については、時間をずらさずに同時に行うことができないか検討中。

図7 DynaLux/c における希釈系列作製方法

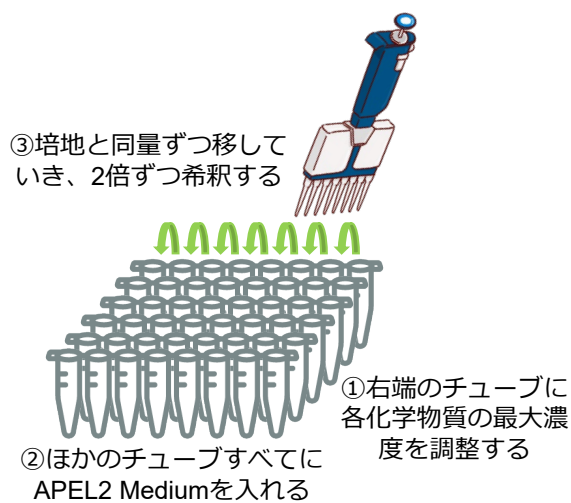


図8 DynaLux/c プレートデザイン

FGF+ →

	veh/FGF-	veh/FGF+	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh/FGF-	veh/FGF+	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh/FGF-	veh/FGF+	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh/FGF-	veh/FGF+	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh/FGF-	veh/FGF+	C	C	C	C	C	C	C	C	
	veh/FGF-	veh/FGF+	C	C	C	C	C	C	C	C	

濃度 低 → 高

(1) バルプロ酸ナトリウム

Compound	Category	Indication	Treatment days, dosage, route,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	Memo	参考文献
バルプロ酸ナトリウム	P	抗てんかん薬	90-days, or 180-days, 100, 230, 540, 1250 mg/kg/day, 経口	ラット (Sprague-Dawley 系) 3)宮川ら	1250 mg/kg群: 死亡 540 mg/kg群: リンパ組織、細網内皮系に軽度な影響(脾臓濾胞の萎縮、脾臓・胸腺における細網細胞増生と腫大)	230	【薬理試験で用いた用量と臨床用量との関連性】 ヒトでのバルプロ酸の有効血中濃度は40-120 μ g/mLの範囲にあること、マウスでバルプロ酸の経口投与により有意な作用がみられたのは、バルプロ酸の血漿中濃度が約65-90 μ g/mL以上の場合であったこと1)、ラットでも同様にバルプロ酸が約25 μ g/mL以上(経口投与時)の場合に有意な作用がみられたこと1)から、ほぼヒトにおける有効血中濃度範囲内において、動物での作用がみられている。	1) Cao BJ et al, Eur J Pharmacol, 237: 177-181, 1993 2) 武田ら、てんかん研究1988 3)宮川ら 基礎と臨床 5(1), 41-65, 1971
			Teratogenesis 妊娠7-13日 50, 100, 200, 400, 600 mg/kg/day, 経口	ラット (Wistar 系) 3)宮川ら、	母動物 600 mg/kg群: 体重増加抑制 胎児 400 mg/kg以上: 口蓋裂等の催奇形性	200		
			Teratogenesis 妊娠7-13日 100, 200, 400, 600 mg/kg/day 経口	マウス (ICR-JCL)、 3)宮川ら	母動物 600 mg/kg群: 体重増加抑制 胎児 200 mg/kg以上: 口蓋裂等の催奇形性	100		
			器官形成期投与試験 0.7、2、6mg/kg/日 経口	ウサギ (スイスヘア)	母動物 6mg/kg群: 吸収率の増加 胎児 6mg/kg群: 外形・内臓異常(無尾、臍帯ヘルニア、内臓異所、両後肢ねじれなど)	0.7		
			器官形成期投与試験 5、10、20mg/kg/日 経口	サル(カニクイザル)	10mg/kg群: 頭蓋顔面奇形(外耳欠損、下顎形成不全、口蓋裂等) 5mg/kg以上群: 胎児死亡(胚致死率)、発育遅延、骨格変異発現	5		
			周産期・授乳期投与試験 2、5、10mg/kg/日 経口	ラット (Fü-Albino)	5mg/kg以上群: 分娩時の生存児数減少及び出生児の生存率(哺育率)の軽度低下	2		

(2)トレチノイン

Compound	Category	Indication	Treatment days, dosage, route,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	Human Cmax AUC	Memo	参考文献
トレチノイン	P	急性前骨髄球性白血病 (APL) 分化誘導作用 レチノイド (ビタミンA、ビタミンA 酸等)					30mg : 155.2±81.3 (ng/mL) 422.0±194.6 (ng・hr/mL) 10)	成人にはトレチノイン1日60～80mg (45mg/m2)を3回に分けて経口投与	10) Muindi J. R. F. et al., Cancer Res.1992;52(8):2138-2142 (PMID:1559217) 要入手
			90-days, 2, 6, 20 mg/kg/day, 経口	ラット (Fü Albino)	20 mg/kg群: 体重増加抑制、骨折、死亡 6mg/kg 群: 体重増加抑制(軽度)、Al P の著増、血清蛋白量の減少、骨髄及び脾臓に貧血像、及び皮膚の変化等 2mg/kg 群: 赤血球数の軽度減少、Al P の軽度増加	2		遺伝毒性なし	社内データ
			13 週間 3、10、30mg/kg/ 日 経口	イヌ(ビーグル)	30mg/kg 群: 血液沈降率増加、アルブミン減少、γグロブリン増加、皮膚の炎症、精子形成不全及び骨髄の造血過形成等 10mg/kg 群: 血液沈降率増加、アルブミン減少、γグロブリン増加、軽度の皮膚の炎症	3			社内データ
			妊娠前・妊娠初期投与試験0.5、2、5mg/kg/ 日 経口	ラット (Fü-Albino)	5mg/kg群: 出生児 (F1) 生存率の軽度低下	2			富士製薬株式会社社内資料 (ベサノイド®)
			器官形成期投与試験0.7、2、6mg/kg/ 日 経口	ラット (Fü-Albino)	6mg/kg群: 出生児の生存率の顕著な低下 2mg/kg以上群: 胎児に化骨遅延及び骨格変異	0.7			
			器官形成期投与試験0.7、2、6mg/kg/ 日 経口	マウス (Fü-Albino)	母動物 6mg/kg群: 吸収率の増加及び胎児体重の減少 胎児 6mg/kg群: 外脳症、眼欠損、口蓋裂、中軸骨格及び長骨などを含むビタミンA過剰誘発催奇形2mg/kg以上群: 外形異常 0.7mg/kg以上群: 内臓異常 出生児 6mg/kg群: 新生児全死亡 (生後4日) 2mg/kg以上群: 哺育率の低下0.7mg/kg以上群: 吸収率の増加、生存率の低下	0.7			
			器官形成期投与試験0.7、2、6mg/kg/ 日 経口	ウサギ (スイスヘアー)	母動物 6mg/kg群: 吸収率の増加 胎児 6mg/kg群: 外形・内臓異常 (無尾、臍帯ヘルニア、内臓異所、阿後肢ねじれなど)	0.7			
			器官形成期投与試験5、10、20mg/kg/ 日 経口	サル (カニクイザル)	10mg/kg群: 頭蓋顔面奇形 (外耳欠損、下顎形成不全、口蓋裂等) 5mg/kg以上群: 胎児死亡 (胚致死率)、発育遅延、骨格変異発現	5			
			周産期・授乳期投与試験2、5、10mg/kg/ 日 経口	ラット (Fü-Albino)	5mg/kg以上群: 分娩時の生存児数減少及び出生児の生存率 (哺育率) の軽度低下	2			

(3) ハイドロキシウレア

Compound	Category	Indication	Treatment days, dosage, route,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	Cmax AUC	Teratogenic mechanism / class of agent	Memo	Memo	参考文献
			ICH S5 表1: 代替法の適格性確認のための陽性対照物質の例より引用	RAT	embryofetal lethality, ocular and cerebral malformations	NOAEL 100 mg/kg IP GD9-12 [Wilson] LOAEL 30 mg/kg [US label]	NOAEL Cmax = 47.3 µg/mL AUC not available LOAEL PK not available				ICH S5情報
				Rabbit	650 mg/kg SC GD12 [DeSesso 1990]: cleft lip, cleft palate, reduction deformities of limbs and tail (1用量のみ、GD12に1回投与) 750 mg/kg SC GD12 [DeSesso 1977]: skull and facial anomalies as well as severe (1用量のみ、GD12に1回投与)	NOAEL not identified LOAEL 30 mg/kg [US label]	PK not available				ICH S5情報
				Human	oral for oncology indications: 80 mg/kg Q3D, 20 – 30 mg/kg/day oral for sickle cell anemia 15 – 35 mg/kg/day (555 – 1295 mg/m2) Cmax = 52 µg/mL AUC(0-inf) = 184 µg·h/mLc	oral for oncology indications: 80 mg/kg Q3D, 20 – 30 mg/kg/day oral for sickle cell anemia 15 – 35 mg/kg/day (555 – 1295 mg/m2)	Cmax = 52 µg/mL AUC(0-inf) = 184 µg·h/mLc			PK is nonlinear with short half-life (15 min in rats, 2 – 4 h in humans) MW = 76.05g/mol PK after IP and IV is similar (Wilson) bioavailability is 70 – 80% in rats and humans, respectively (Beckloff) no robust data for adverse human pregnancy outcomes	ICH S5情報

a: US label states that “Hydroxyurea is embryotoxic and causes fetal malformations (partially ossified cranial bones, absence of eye sockets, hydrocephaly, bipartite sternbrae, missing lumbar vertebrae) at 180 mg/kg/day in rats and 30 mg/kg/day in rabbits”, but it is not clear which effects are in which species. Thus, 30 mg/kg is accepted as the LOAEL, but the findings are listed from publications with rabbits with SC doses of 650 and 750 mg/kg.

b: Actual values after 100 and 137 mg/kg hydroxyurea IP doses in pregnant Wistar rats (Wilson): Cmax = 47.3 at 100 mg/kg and 80.6 µg/mL at 137 mg/kg.

c: Extrapolated from reported value after 1000 mg (16.7 mg/kg) hydroxyurea oral single dose (MHRA): Cmax = 24.6 µg/mL, AUC(0-inf) = 87.79 µg·h/mL. The dose for margin calculations was chosen to be 35 mg/kg/day. Although higher intermittent doses are used for oncology indications, the dose for sickle cell anemia is believed to be more relevant for assessing risk of developmental toxicity. As summarized in the table below, other human PK data are also available.

d: Although rat Cmax data are available, this was after IP administration whereas the human data is after oral administration. Thus, in the absence of more direct PK comparisons, the estimated ratio based on mg/kg dose is also provided.

e: In the absence of rat AUC data, AUC ratio was based on mo/m² dose ratio.
References

DeSesso JM, Jordan RL. Drug-induced limb dysplasias in fetal rabbits. Teratology. 1977;15:199-211.

DeSesso JM, Goeringer GC. Ethoxyquin and nordihydroguaiaretic acid reduce hydroxyurea developmental toxicity. Reprod Toxicol. 1990;4:267-75.

MHRA Public Assessment Report PL 10880/128-9, page 48 (入手済、ヒトデータ)

(4) メトキシ酢酸

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
メトキシ酢酸	P						ヒト疫学調査: 流産、胎児奇形あり	
			単回 LD50	ラット	1000-1500 mg/kg (ECETOC TR95 vol.2)		変異原性情報なし	職場の安全サイト
			急性神経毒性 経口	ラット	1000-1500 mg/kgの用量で中枢神経系(痙攣、不全麻痺、筋弛緩) (ECETOC TR95 vol.2)			職場の安全サイト
			反復毒性	雄ラット	精巣毒性あり(精巣萎縮、精母細胞破壊、喪失)			
			反復 20日 300 mg/kg/day	ラット(Wistar系)	1,2,5,20日観察 2日: 肝臓、脾臓、精巣、胸腺wt ↓ (胸腺は5日で細胞枯渇) 20日: 精巣wt ↓			ECETOC-TR-095 p18
			反復 20日 100 mg/kg/day	ラット(Wistar系)	20日: 精巣、胸腺wt ↓			(Kawamoto et al, 1990a). ECETOC-TR-095 p18
			反復 20日 0, 50, 100, 200 mg/kg/day 5日間, 7週間休業	ラット(F344)	50 mg/kg群 3週間後: 遊離精子細胞の凝集(4〜5週間後最大、7週間後影響なし) 100および200 mg/kgbw 3週間後: 異なる段階の死んだ精母細胞が90%の細管で観察 7週間後: 50%の細管正常、残り50%細管には精母細胞とセルトリ細胞のみ 前立腺および精囊の重量変化なし(テストステロン不足の兆候なし)。	LOAEL 50		(Chapin et al, 1985a). ECETOC-TR-095 p19
			反復 20日 500 mg/kg/day 11日間、8週間休業	Indian wild houseラット	精細管に精巣病変 ライディヒ細胞およびセルトリ細胞に病理組織変化なし 精巣ステロイド生成(アンドロゲンレベル)に変化なし 著者らは、精巣で観察された細胞減少は細胞成熟の停止によるものと推測。 8週間後に精子形成の回復(VIIからVIII期の細胞の頻度は制御レベルを維持または再達成)	1用量		Aich and Manna, 1996 ECETOC-TR-095 p19
			反復 2〜5週間	ICL-ICR and B6C3F1 マウス SD ラット ハムスター、モルモット	精巣萎縮および骨髄と胸腺への影響 B6C3F1マウス骨髄: EGMEへの4日間の曝露後に細胞性および顆粒球系幹細胞減少(16週目までに回復、Hong et al, 1988a)	ECETOC記載なし 用量要精査		Nagano et al, 1979; House et al, 1985, Hong et al, 1988a Nagano et al, 1984 ECETOC-TR-095 p19
			二世代繁殖試験 飲水0, 0.012, 0.03, 0.1%	ラット	親 P世代体重増加抑制、受胎率低下 F1世代: 高用量群妊娠成立せず 低用量群以上: 同服産児数および生存児数減少	0.012% 雄親8.1- 9.6mg/kg 母動物: 14.2- 15.3mg/kg	出生前および父系の精巣毒性を引き起こすため、これらの影響が繁殖パラメータに及ぼす影響を区別することは困難	職場の安全サイト ECETOC-TR-095 (Gulatiら、1990a, b)

(4) メトキシ酢酸

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
		催奇形性	器官形成期試験 GD12 経口 158, 315 mg/kg/day	ラット(Wistar系)	死亡胎児、奇形あり	LOAEL 158	Ritter et al, 1985	職場の安全サイト
			器官形成期試験 GD9-15 経口 50, 100 mg/kg/day	ラット(SD系)	100 mg/kg群: 吸収胚増加 総、イオン化Ca増加、 1,25-dihydroxy-vitamin Dレベル減少 (不妊動物ではCa,V,D変化なし) 50 mg/kg群: 同腹児数、胎児体重減少 内臓異常増加	LOAEL 50	Toraason et al (1985)	職場の安全サイト
			器官形成期試験	ラット	吸収胚、奇形増加(水腎、四肢及び心臓奇形)	記載なし		職場の安全サイト
				マウス	吸収胚、奇形増加(指、足)	記載なし		職場の安全サイト
			In vitro Foetotoxicity, embryotoxicity and teratogenicity		After culture for 46 hours, EGME (5 mmol/l) did not affect the development of post-implantation rat embryos (Yonemoto et al, 1984).	ECETOC記 載なし 用量要精査		ECETOC-TR-095 p24
			GD12 oral 158, 315 mg/kg/day	Wistar ラット	胎児死亡、形態異常	毒性量		ECETOC-TR-095 p24 Ritter et al, 1985
			妊娠期7日間 oral 25, 50, 75 mg/kg/day	SDラット	50 mg/kg: 心電図異常(QRS波の延長)および心血管奇形 25 mg/kg: 異常なし	25		ECETOC-TR-095 p24 Toraason et al (1985, 1986a)
			GD9-15 oral 0, 50, 100 mg/kg/day	SDラット	50 mg/kg: 一腹胎児数↓、胎児体重↓、内臓異常↑ 100 mg/kg: 全胚死亡、総カルシウムおよびイオン化カルシウム が増加し、1,25-ジヒドロキシビタミンDのレベルが低下 非妊娠の未交配ラットに100 mg/kgbw/dを7日間投与してもカル シウムやビタミンDの代謝に影響なし(Toraasonら、1986b)。	LOAEL 50		ECETOC-TR-095 p24 Toraason et al (1986b)
			GD7-18 リキットダイエット 0, 16, 31, 73, 140, 198, 290 or 620 mg/kg/day	SDラット	73 mg/kg以上: 全胚死亡 31 mg/kg: 心血管奇形 16 mg/kg: 催奇形性なし、生存胎児体重↓ 出生児行動異常なし	16		ECETOC-TR-095 p24 (Nelson et al, 1989)
			GD6-15 経口 0, 50, 250 mg/kg/day	Wistarラット	母: 立毛(50以上)、臍出血(250) 胎児: 全児死亡	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Leber et al, 1990).
			GD13 経口 0, 50, 100, 250 mg/kg/day	SDラット	250 mg/kg: 全胎児発育不全 50, 100 mg/kg: 四肢芽異常。	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Sleet and Ross, 1997)
			妊娠期14日間 経口 10-600 mg/kg/day	SDラット	100 mg/kg以上: 性周期性を抑制、黄体肥大、排卵抑制 300 mg/kg: 血清プロゲステロンレベル上昇、血清エストラジ オール、FSH、LH、およびプロラクチン変化なし 10 mg/kgbw: 影響なし	10	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Davies et al, 1997)

(4) メトキシ酢酸

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
		催奇形性	GD8-20 経口 100, 200, 400 mg/kg/day	SDラット	用量依存的に異常胎児、発育遅延、吸収胚増加	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Saavedra et al, 1997).
			GD7-14 経口 0~1000 mg/kg/day	ICL-ICR マウス	31.15 mg/kg以上群:骨格異常↑	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Nagano et al, 1981, 1984).
			GD7-14 経口 1400 mg/kg/day	CD-1 マウス	胚致死	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 Schuler et al, 1984
			妊娠期臨界期 経口 100, 250, 500 mg/kg/day	CD-1 マウス	250 mg/kg以上:外表異常(無脳症および足指異常) 胎児の体重減少、胚死亡喪失 単回投与のEGMEでも同様の影響あったが、胚致死性なし 3試験	100	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Horton et al, 1985)
			妊娠11日 経口 175, 350, 500mg/kg/day	CD-1 マウス	EGME:四肢に感受性あり 350 mg/kg群:処理後2時間で前肢芽の細胞毒性、6時間で最大効果。	175	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 HardinとEisenmann (1987) およびGreeneら (1987) Greeneら, 1987
			妊娠8日 経口 250, 325 mg/kg/day	CD-1 マウス	用量依存的に神経堤および前部神経管の内側領域における細胞死の領域↑	毒性量	a modified Chernoff-Kavlock protocol	ECETOC-TR-095 p25 (Ambrosoら, 1998)
			GDs 20 to 45 0, 12, 24, 36 mg/kg	サル Macaca fascicularis	36 mg/kg:母体毒性が顕著。妊娠全例(8)全胚致死 1胚に外部奇形(各前肢の指が欠損) 24 mg/kg群で10例中3例、12 mg/kg群で13例中3例で全胚致死 36 mg/kg:母動物:顕著な摂餌量減少 治療期間終了後、動物は回復 12, 24 mg/kg群:軽度な摂餌量減少 主要代謝物であるMAAは、生物学的半減期が約20時間であり、すべての投与群で蓄積	LOAEL 12		ECETOC-TR-095 p26 (Scottら, 1989)

EGME is a well-established testicular toxicant following repeated oral administration

Several studies demonstrated that EGME affects the germ cell population with a specific vulnerability of certain stages of the cell cycle, i.e. pachytene spermatocytes, particularly at stages VII and VIII. Necrotic and apoptotic effects were both observed, depending on study design, species and dose.

In vivo

EGME, through its metabolite MAA (Section 4.1.4.7), exerts pronounced foetotoxic, embryotoxic and teratogenic effects in all species investigated (rat, mouse, rabbit, monkey and Drosophila) and via all routes of exposure (oral, dermal, inhalation) in the presence and absence of maternal toxicity. The critical dose levels are approximately 10 mg/kgbw/d; the NOAEL after inhalation being 3 to 10 ppm (9 - 32 mg/m³). For MAA, critical dose levels have not yet been established but appear to be lower than those for EGME.

(5) サリチル酸

Compound	Category	Indication	Treatment days, dosage, route,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	Memo	参考文献	
サルチル酸Na	P	非ステロイド性 抗炎症薬 (NSAIDs)	急性毒性	ラット	LD50値5件のデータ (1500-2000 mg/kg (JECFA WHO 228 (1962))、 1100 mg/kg (JECFA 7742 (2002))、 891 mg/kg、1580 mg/kg、1280 mg/kg (NTP TR524 (2007))			門間和夫 ほか、小児科の進歩, 2, 95 (1982)⇒HSDB 2009	
			GDs20,21 経口投与 (10 mg/kg)	ラット	分娩開始時間の有意な促進 (HSDB (2009))、 動脈管収縮、高血圧、羊水過多、新生児壊死性 腸炎		妊娠末期感受性薬⇒催奇形性というより も、胎児機能障害、胎児毒性が重要	門間和夫 ほか、小児科の進歩, 2, 95 (1982)⇒HSDB 2009	
			GDs8～14 混餌投与	ラット	母動物の体重低下 新生仔死亡増加、同腹仔数減少 仔の外表異常および骨格異常の発生率増加 (HSDB (2009))。 サリチル酸塩はヒトで医薬品として使用され、出 生前死亡率の増加、分娩前後の出血、妊娠期 間の延長、分娩異常など			門間和夫 ほか、小児科の進歩, 2, 95 (1982)⇒HSDB 2009	
			120, 180, 240, and 300 mg/kg Day 9 by gavage	CrI:CD(SD)BR rats	母動物: 180 to 300 mg/kg、体重減少、 一腹当たり胎児数、影響なし 胎児: 胎児体重、生存率影響なし、外表異常な し、 180以上: 過剰肋骨			O.Foulon et al., Reproductive Toxicology 13 (1999) 369– 374	
			Adults: Since salicylic acid is available only in topical preparations, human data on toxicity have not been reported. However, the chinese medicated oil, which contains 67% methyl salicylate induced severe salicylate poisoning. Salicylic acid concentrations above 800 mg/L after 6 hours post exposure is severely toxic and may be lethal.						
		Children: Salicylate intoxication is often more serious in small children (1-4 years) than in older children, due to an early development of a metabolic acidosis rather than a respiratory alkalosis.							
		Teratogenicity: There is no evidence that moderate therapeutic doses of salicylates cause fetal damage in human beings; however, babies born to women who ingest salicylates for long periods may have a significantly reduced mass at birth. In addition, there is an increase in prenatal mortality, anemia, antepartum and postpartum haemorrhage, prolonged gestation and complicated deliveries. These effects occur when salicylates are administered during the third trimester, and thus its use during this period of pregnancy should be avoided.							
		サリチル酸ナトリウムの作用機序は、主にコクサイドの抑制、中枢神経系への作用、解熱効果、抗炎症効果、血栓抑制効果が知られています。サリチル酸ナトリウムは、コクサイドを抑制することで、プロスタグランジンの生成を阻害し、痛みや炎症を緩和します。また、中枢神経系に作用して、痛みを緩和する効果があります。さらに、発熱の原因となるプロスタグランジンE2の生成を抑制することで、解熱効果があります。さらに、サイトカインの生成を抑制することで、炎症を抑制します。また、血液をサラサラにする作用があり、血栓ができにくくなるため、動脈硬化や心筋梗塞、脳梗塞などの病気の予防に効果があります。							https://yakuten- ichiba.com/medicine/sodium_salicyl ate.php
		妊婦又は妊娠している可能性のある女性には、治療上の有益性が危険性を上回ると判断される場合にのみ使用すること。 シクロオキシゲナーゼ阻害剤（経口剤、坐剤）を妊婦に使用し、胎児の腎機能障害及び尿量減少、それに伴う羊水過少症が起きたとの報告がある。シクロオキシゲナーゼ阻害剤を妊娠中期以降の妊婦に使用し、胎児の動脈管収縮が起きたとの報告がある。 また、経口投与による動物実験で催奇形作用が報告されている。							皮膚疾患用剤 サリチル酸「ケンエー」添付文書

(6) サリドマイド

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
サリドマイド	P	多発性骨髄腫 治療薬 らい性結節性 紅斑治療薬 催眠鎮静剤		ヒト	サリドマイド胎芽病:無肢症、海豹肢症、奇肢症等の四肢奇形、心臓疾患、消化器系の閉塞等の内臓障害等			
			53週間 経口 43, 200, 1000 mg/kg/day	イヌ	死亡なし 血液学的検査と血液生化学検査の全項目に変化あり(病理所見なし、5週間の休薬後回復) 大腿骨、肋骨等の黄緑色化、緑色尿、糞中の白色物質発情期延長 乳腺:青色化を伴う乳腺肥大(腺腔拡張、腺腔上皮の過形成)全投与群 雄 100 0 mg/kg群:毛細胆管に胆汁色素の沈着 T4 低値(用量依存的) 緑色尿、骨の変色: 5 週間の休薬後も観察	雄200 雌43		サリドマイドカプセル サレド® インタ ビューホーム (IF) IF 59)
			13週間 経口 30, 300, 3000 mg/kg/day	マウス	死亡なし 3000 mg/kg群 雌:白血球数とリンパ球数の低値 雌雄:相対肝重量増加、肝肥大、橙桃色尿 300 mg/kg群 雄:リンパ球数の低値	雄30 雌300	遺伝毒なし	IF 51)
			13週間 経口 30, 300, 3000 mg/kg/day	ラット	死亡なし 全投与群:体重増加抑制(雄>雌) 雄:摂餌量の減少、精巣重量増加 雌雄:相対肝重量増加(病理所見なし) 甲状腺ホルモン T3 及び T4 の減少(雄300 以上、雌30 以上)	30		IF 51)
			血液-脳関門通過性 妊娠 単回経口 14 C 標識サリドマイド 3 8 mg/kg(ジオキサンに溶解)	妊娠マウス	1.5 時間後に最高濃度に達し、脳の放射能濃度は肝臓に比べ 1/3 であった。脳における投与後 8 時間の放射能濃度は、投与後 1.5 時間に比べて 20 程度まで減少		脳への分布	IF 26)
			血液-胎盤関門通過性 妊娠 単回経口 14 C 標識サリドマイド 3 8 mg/kg	妊娠マウス (分娩8日前)	を単回経口投与した結果、胎児、胎盤及び羊水へ移行			IF 26)

(6) サリドマイド

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
			受胎能及び着床までの初期 胚発生 妊娠2～5日、妊娠6～8日 経口 31, 62 mg/kg	マウス	妊娠2～5日群: 妊娠黄体あり 妊娠6～8日群: 胎児への影響なし			IF 66)
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠6 -7 日から4-6 日間経 口 31、62、125、250、 625 mg /kg	マウス	流産の増加 生存胎児数の減少			IF 68)
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠9-15日 経口 50, 100, 150 mg /kg	ラット	着床痕数の減少(用量依存的) 催奇形性なし、吸収胚なし			IF 68)
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠9-15日 静脈内 2.5, 5.0, 10.0 mg /kg	ラット	着床痕数の減少			IF 68)
			血液-脳関門通過性 妊娠 単回経口 14 C 標識サリドマイド 150 m g/kg(水懸濁)	妊娠ウサギ 妊娠8日	24 時間後の組織中放射能濃度は、脳では血漿より低 かった		脳への分布	IF 27)
			血液-胎盤関門通過性 妊娠 単回経口 14 C 標識サリドマイド 150 m g/kg(水懸濁)	妊娠ウサギ 妊娠8日	胎児へ移行			IF 27)
			受胎能及び着床までの初期 胚発生 妊娠前14～妊娠7日(22日 間) 経口 10, 50, 100 mg/kg	ウサギ	全投与群: 吸収胚数増加 100 mg/kg群: 黄体数、着床数、生存胎児数の減少	胚発育10 雄生殖力500		IF 66)

(6) サリドマイド

Compound	Category	Indication	Treatment days, route, dosage,	Species	Results	NOAEL LOAEL (mg/kg/day)	memo	参考文献
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠8～12日 経口 25, 50, 100, 150, 200 mg /kg	ウサギ	着床痕数の減少 吸収率、発育遅延率、奇形発現率に用量依存的な増加 胎児体重、身長の減少傾向			IF 68)
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠8～12日 静脈 2.5, 5.0, 10.0 mg /kg	ウサギ	着床痕数の減少 奇形2.5 mg/kg	5		IF 69)
			出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 妊娠18日～分娩後28日(42日間) 経口 30、150、500 mg/kg	ウサギ	親動物: 死亡例なし 流産ならびに胎児死亡率増加 生存胎児: 開帳肢の出現率が増加した。 子世代の生殖能に影響は無く、孫世代における著しい外形異常は認められなかった。			IF 69)
			血液－脳関門通過性 単回静脈 3H 標識サリドマイド 10 mg/kg (ジメチルスルホキシドに溶解)	雌サル	10分後、肝臓の放射能濃度は血漿の約2倍、筋肉及び脳の放射能濃度は肝臓の約1/3 筋肉			IF 28)
			血液－胎盤関門通過性 単回経口 3H 標識サリドマイド 50 mg/kg	サル 妊娠30日	7時間後、胎児中の放射能濃度 16.8 µg/g 湿重量は、血漿中の放射能濃度 15.3 µg/mL よりわずかに高い サルにおいても胎児への移行 胎児中の放射能濃度の約30%が、未変化体のサリドマイド			IF 28)
			胚・胎児発生に関する試験 妊娠24-26日 経口 20 mg /kg	サル	全胎児四肢奇形			IF 69)

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。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にしたNAMsの開発
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 ・ 第四室長
- (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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にしたNAMsの開発
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター ・ センター長
(氏名・フリガナ) 平林 容子 ・ ヒラバヤシ ヨウコ

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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にしたNAMsの開発
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部・客員研究員
- (氏名・フリガナ) 小島 肇・コジマ ハジメ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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4月9日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 帝京平成大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 沖永 寛子

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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にしたNAMsの開発 (24KD1003)
- 研究者名 (所属部署・職名) 帝京平成大学・健康医療スポーツ学部医療スポーツ学科・教授
(氏名・フリガナ) 桑形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 4月 11日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人横浜国立大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 梅原 出

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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にしたNAMsの開発 (24KD1003)
- 研究者名 (所属部署・職名) 先端科学高等研究院 教授
(氏名・フリガナ) 福田 淳二 (フクダ ジュンジ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 国立研究開発法人産業技術総合研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 石 村 和 彦

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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発
- 研究者名 (所属部署・職名) 健康医工学研究部門 研究グループ長
(氏名・フリガナ) 中島芳浩・ナカジマ ヨシヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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