

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

令和7年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

令和8（2026）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）

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

II. 分担研究報告書（別添 4）

1. 脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析	
北嶋 聡	----- 24
2. 吸入曝露実験の実施	
西村拓也	----- 32
3. DNT 陽性物質選定、及び、国際標準化に向けた情報収集	
栗形麻樹子	----- 37
4. In vitro DNT 評価手法の開発	
大久保佑亮	----- 47
5. 情動認知行動解析と神経科学的物証の収集	
齊藤洋克	----- 56
6. 胎盤の遺伝子発現プロファイリング	
小野竜一	----- 61
7. ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析	
西田欣広	----- 69

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	----- 74
---------------------------	----------

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
令和7年度総括研究報告書

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

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

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

先行研究において、21 種類の催奇形性陽性物質及び 14 種類の陰性物質を 0.89 の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性の AOP を包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期の DNT の検出に適応拡大し OECD のガイドラインへの採択可能な試験系の開発を試みる。これまでに、バルプロ酸のような DNT との関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。一方、生後発達期の DNT に関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期におけるキシレン等の吸入曝露により、成熟後に、DNT の特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期 DNT の発現機序を明らかにし、将来的に *in vitro* 試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定を試みる。

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

令和7年度(今年度)は、I) 発生期のDNTを対象とした未分化ヒトiPS細胞を用いて、昨年度の成果を踏まえつつDNT陽性・陰性対照物質の評価をさらに進めた。神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有するDNT評価対象物質としてニコチン、フルオキセチン及びカフェインを評価したところ、ニコチン及びフルオキセチンは陽性、カフェインは陰性として分類され、未分化ヒトiPS細胞を用いたDynaLux/cが、神経伝達または神経活動調節に関わるDNT評価対象物質の一部についても検出性を示す可能性が示された。

一方で、陽性対照物質であるカフェインはシグナルかく乱を示さなかった。そこでこの方策として、生後発達期のDNTを対象とし、ヒトiPS細胞を神経前駆細胞に分化させ、DNT陽性対照物質のシグナルかく乱作用の検出法を開発することとした。APEL2 培地およびbFGF刺激条件が最も高いSRF応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド及びバルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められず、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた(大久保)。DNT陽性・陰性対照物質リストについては、昨年度抽出した陽性対照物質103化合物、陰性対照物質67化合物を最終化とした。またDNT評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、IATAにおける農薬のDNT証拠の重みづけ(WoE)評価に、17種のDNT-IVB試験データを統合し、階層型の評価過程によりDNTリスク評価を実施することを目指していることを見出した。加えて、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集した。なおこのリストと、既に作成したDNT陽性・陰性化学物質リストとの重複はないことも見出した(桑形)。

II) 生後発達期のDNTの分子機序解明に向け、幼若期反復吸入曝露実験を行ったトルエン(目標曝露濃度:0、0.7及び7 ppm)につき、昨年度、成熟後に情動認知行動解析を実施したところ、令和5年度(初年度)に検討したキシレン曝露群同様、学習記憶異常が観察された。令和7年度(今年度)はさらに、神経科学的物証に基づく解析を進め、検出された行動影響と関連する海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られた(齊藤)。加えて、得られた脳サンプルの遺伝子発現データについても解析を行った(北嶋)。さらに、別のモデル揮発性物質であるホルムアルデヒド(目標曝露濃度:0、1及び10 ppm)についても、発達期反復吸入曝露実験を実施し(西村)、その結果、曝露群において、成熟後の行動影響(不安の亢進)が認められた(齊藤)。これまでに得られた神経科学的物証に基づきDNT誘発メカニズムの解明を進めるとともに、得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析および毒性関連性の比較検討を行った結果、「将来的に、生後発達期におけるin vitro試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定」に向けて、その候補となるシグナルネットワークを見出した(齊藤・北嶋)。

加えてIII) ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析に向けては、令和6年度(昨年度)までに、モデル物質につき、ヒト及びマウス胎盤オルガノイドを用いる化学物質代謝につき検討し、その代謝物の種差を明らかとし、ヒトへの外挿性の向上が期待される結果を得た。令和7年度(今年度)は、当方が樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するためscRNA-seq解析を行った結果、10のクラスターに分類可能で、cytotrophoblast(cluster4, 5)、syncytiotrophoblast(cluster 6)も明確に分画された。現在モデル薬物の適用により、各クラスターにつきDNA変化を解析しており、その性質を詳細に検討し、解析系の精度の補完を検討中である(西田)。加えて、令和6年度(昨年度)までに検討したC57BL/6マウスの受精後8.5及び9.5日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析に加えて、令和7年度(今年度)は、14.5日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行ない、trophoblast giant cells、spongiotrophoblast及びlabyrinth layerに特異的な遺伝子発現マーカーが、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された(小野)。このように、モデル物質につき、ヒト及びマウス胎盤オルガノイドを用いる化学物質代謝につき検討し、その代謝物の種差を明らかとし、以って、当初の目的は基本的に達成されたものとする。

以上、各試験法の最適化をはじめ、ほぼ予定通りに進捗した。いずれについても、当初の目的は基本的に達成されたものとする。すなわち、発生期の *in vitro* DNT 試験法及びヒト胎盤オルガノイドを用いたメタボローム解析法の提案と、将来的に *in vitro* 試験法への適応拡大する上で必要となる、生後発達期 DNT 誘発に係る候補シグナルネットワークの同定を行うことができたものとする。これにより、ヒトへの外挿性を考慮した、迅速、低コストで省動物に資する新規 *in vitro* DNT 評価手法（動物実験代替法）の開発につながることを期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の *in vitro* 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

なお試算によれば、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 20 万円/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 億円/1 物質）に比べ 2,000 分の 1 程度のコストで済むこととなり（初期投資を除く）、実施に係る時間に関しても同様に、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 1 ヶ月/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 年/1 物質）に比べ 36 分の 1 程度の時短となる。すなわち、*in vitro* DNT 試験法の場合、*in vivo* の系と比較して、コスト・時間ともに、桁違いのパフォーマンスが得られることとなる。

研究分担者

西村拓也 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部
桑形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部
大久保佑亮 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部
齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部
小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部
西田欣広 大分大学・
医学部産科婦人科学講座

A. 研究目的

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

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

先行研究において、21種類の催奇形性陽性物質及び14種類の陰性物質を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いたin vitro 発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng

2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1) 本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系の開発を試みる。これまでに、バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

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

(必要性) 今後、産業の発達とともに新規物質がますます増加することが想定される中、DNTの評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。

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

(期待される効果) ヒトへの外挿性を考慮した、迅速で低コスト、省動物に資する新規in vitro DNT評価手法(動物実験代替法)の開発につながることを期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質のin vitro代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。また成果物については、国際的なコンセンサスを得られるレベルを以って、テストガイドラインへの提案に繋がるように図る。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

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

B. 研究方法

研究体制：化学物質の有害性評価(班員全員)、発生毒性(桑形、大久保、北嶋)、特に DNT(桑形)における毒性評価に精通する専門家を含むかたちで、研究班体制を構築している。研究分担者(桑形)が、OECD in vitro DNT expert group(発達神経毒性専門家グループ)メンバーであることから、DNTに係る専門家、行政、業界団体等の関係者との情報交換も図ることができる。研究分担者として、若手研究者(齊藤)・女性研究者(桑形)が参画している。

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

研究計画：本研究では、DNT を発生期(胎生期)と生後発達期とに分け、2つの独自技術(ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法、及び、シックハウス症候群の動物試験モデル)により、複雑な DNT に係る試験法の開発や実体の解明といった課題の解決を試み、ヒトへの外挿性を考慮した、より迅速、低コストで省動物に資する新規 in vitro DNT 評価手法の開発をおこなう。ヒト胎盤オルガノイドを用いる化学物質の代謝についても検討し試験系の予測精度の向上を図る。以下に、実験方法の概要を示す。

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

本評価系は、シグナルかく乱作用の検出により発生毒性が評価可能か否かを検討したことに端を発している。FGF シグナルレポーター導入ヒト iPSC 細胞を、96 穴プレートに播種し、被験物質による FGF 誘導性の SRF シグナル影響を連続計測する。適用濃度は、最大溶解量(一部 IC50)を最大濃度とし、溶媒対照に対する各

物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC 曲線解析によって閾値を設定する(DynaLux/c 法)。適用実験後、その正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、評価する。

令和 5 年度(初年度)はスループット性と再現性を高めるために細胞培養をしながら連続の発光測定が可能な Kronos HT 装置を用いた 72 時間以上のリアルタイム計測法を開発した。測定時間及び時間解像度が上昇し、DynaLux/c へ適用が可能なことを確認した。

令和 6 年度(昨年度)は、上記の Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、48 時間のシグナルかく乱作用を基に、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。上記の DynaLux/c では未分化のヒト iPS 細胞を用いることで、発生期の神経系を対象とした試験系を想定している。一方で、生後発達期の神経系に対する影響は神経伝達物質受容体(Neurotransmitter Receptors :NR)を介したものは少なくない。そこで令和 7 年度(今年度)は、生後発達期の NR を介したシグナルかく乱を検出するために、神経前駆細胞(Neural precursor cells: NPCs)に分化させたヒト iPS 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を検討した。

また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議、及び、続いて同メンバーにて開催された Neurotoxicity Conference へ出席し、情報収集を行った(2023 年 5 月 19 日～26 日、ダラム、北米)。また OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議へ出席し、情報収集を行った(2024 年 4 月 11 日、コンスタンツ、ドイツ)。

令和 7 年度(今年度)は、2025 年 9 月に公開された、DNT-IVB 専門家グループが主催した“The OECD Workshop on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT).” の報告書(workshop proceedings)を精査した。また、近年、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、発達神経毒性評価のための化学物質リスト作成の一環として、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集し精査した。

そして DNT 陽性対照物質の選定は、欧米リスク評価機関の報告書及び科学論文を調査した。その中から令和5年度（初年度）はラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文 (Mundy M et al, 2015) に掲載された化学物質を精査した。なお、本リストは、本研究に限らず DNT 研究全般の推進を図るものである。

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

令和7年度(今年度)は、昨年度までに抽出した陽性物質 103 化合物、陰性物質 67 化合物を精査し最終化とした。

追加調査として、DNT-IVB 専門家グループが主催した”The OECD Workshop on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT).” の報告書 (workshop proceedings) を精査し、OECD の DNT 評価方針の方向性を分析した。また、近年、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、発達神経毒性評価のための化学物質リスト作成の一環として、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集した。OECD テストガイドライン改正時期を考慮し、2010 年から 2025 年の間に報告された経口投与簡易生殖毒性試験 (OECD TG421) および反復投与毒性・生殖毒性併合試験 (OECD TG422) の試験結果を化審法データベースおよび既存化学物質データベースから収集し精査した。

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

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

トキシコゲノミクスのための脳の採取は、4 部位 (海馬、皮質、脳幹、小脳) とする。脳 4 部位の mRNA サンプルにつき、当方が開発した

Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行う。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用する。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行う。

<キシレンにおける吸入曝露実験>

令和5年度 (初年度) のモデル物質はキシレン (xylene; 分子量: 106.17、CAS No.: 1330-20-7) とし、試薬としてキシレン (カタログ番号: 244-00081、特級、85% (o-, m-, p-キシレンの含量)、ロット番号: ACG4493、富士フイルム和光純薬(株)) を使用した。キシレンの曝露濃度は先行研究の結果から、2 および 20ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は 0.20 ppm (→ H31 年 1 月 17 日以降、0.05 ppm に変更された) であることから、この指針値のそれぞれ 40 および 400 倍程度という事となる。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

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

キシレン濃度は、捕集管 (チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号: 080150-0532、柴田科学(株)) を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間 (曝露開始から曝露停止まで) に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群および投与群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ 30N II および MP-Σ 300N II、柴田科学株式会社製) を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

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

採り、内部標準溶液（トルエン- d_8 の二硫化炭素溶液、4mg/mL）50 μ Lをマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

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

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

カラム：DB-5MS（20m $\times$ 0.18mm、膜厚 0.36 μ m、Agilent Technologies 社製）
オープン温度：40 $^{\circ}$ C（3.5 分保持）-20 $^{\circ}$ C/min-150 $^{\circ}$ C（5 分保持）
注入口温度：220 $^{\circ}$ C
注入方式：スプリット
スプリット比：20：1
キャリアーガス：N₂
流速：0.27 mL/min（定流量）
定量イオン（*m/z*）：91（キシレン 3 種）、98（トルエン- d_8 ）

得られた各キシレン及びトルエン- d_8 の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件では *m*-および *p*-キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比 1:1 の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値および *o*-キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の六鹿元雄室長（現 名古屋市衛生研究所 生活環境部長）、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

<トルエンにおける吸入曝露実験>

令和 6 年度（昨年度）のモデル物質はトルエン（Toluene；分子量：92.14、CAS No.：108-88-3）とし、試薬としてトルエン（カタログ番号：204-01861、特級、99.5%、ロット番号：

KSF6107、富士フイルム和光純薬（株））を使用した。トルエンの曝露濃度は先行研究の結果から、0.7 および 7ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、トルエンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は 0.07 ppm であることから、この指針値のそれぞれ 10 および 100 倍程度ということとなる。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

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

トルエン濃度は、捕集管（チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号：080150-0532、柴田科学（株））を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 2 本、投与群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP- Σ 30N II および MP- Σ 300N II、柴田科学株式会社製）を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したトルエンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を 10mL 容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フイルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mL を正確に加え、蓋をしたのち、およそ 30 分に 1 回上下に振とうしながら 2 時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液 2mL を 10mL 容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液（キシレン- d_{10} の二硫化炭素溶液、6mg/mL）50 μ L をマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

検量線用の標準溶液は、トルエン（純度 99.5%以上、東京化成工業株式会社製）を二硫化炭素で適宜希釈して 0.1~100 μ g/mL の混合溶液として調製した。これらの溶液 2mL に内部標準溶液 50 μ L を添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

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

カラム：DB-WAX (20m×0.18mm, 膜厚 0.30μm、Agilent Technologies 社製)
オープン温度：40℃ (3.5 分保持) -20℃/min-150℃ (5 分保持)
注入口温度：220℃
注入方式：スプリット
スプリット比：20：1
キャリアーガス：H₂
流速：0.3 mL/min (定流量)
定量イオン (m/z)：91 (トルエン)、98 (キシレン-d₁₀)

得られた各トルエン及びキシレン-d₁₀ の内標比から検量線を作成し定量した。この検量線より求めた捕集管中のトルエンの定量値からチャンバー内のトルエン濃度を計算して求めた。この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の六鹿元雄室長 (現 名古屋市衛生研究所 生活環境部長)、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

<ホルムアルデヒドにおける吸入曝露実験>

令和7年度 (今年度) のモデル物質はホルムアルデヒド (Formaldehyde; 分子量：30.03、CAS No.：50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号：064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度 36.0～38.0%、ロット番号：SEK3790、富士フイルム和光純薬(株)) を使用した。ホルムアルデヒドの曝露濃度は先行研究の結果から、1 および 10 ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が 0.08 ppm であることから、この指針値のそれぞれ 10 および 100 倍程度ということとなる。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ミリ Q 水で 10 倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバブリングし気化させる方法により行った。なお 10 倍に希釈しない場合、バブリング時にパラホルムアルデヒド (重合体) と思われる析出物が現れるために、この希釈操作は必須である。

ホルムアルデヒド濃度は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管 (LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号：505331、Supelco 社) を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間 (曝露開始から曝露停止まで) に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 2 本、曝露群は各濃度とも 2 本とした。測定に際して

は、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ30NⅡおよび MP-Σ300NⅡ、柴田科学株式会社製) を用いて、吸入チャンバー内の空気を吸引した。ホルムアルデヒドは、捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNPH) と反応し、ホルムアルデヒド-2,4-DNPH として捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド-2,4-DNPH は、アセトニトリル (LC/MS 用、カタログ番号：01033-76、関東化学(株)) 約 90mL により抽出してメスフラスコで 100 mL に定容し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器を接続した LC-20AD システム一式、(株)島津製作所製) により HPLC 分析を実施した。なお、移動相にはアセトニトリルとオルガノ (株) 製超純水装置 PURELAB flex で精製した超純水を用い、その組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は 1 mL/min とした。その他分析条件について、カラムは COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mmφ×250 mm、粒径：5 μm、ナカライテスク社製)、検出波長は UV 360 nm、試料注入量は 2～10 μL とした。また、検量線はホルムアルデヒド-2,4-DNPH 標準原液 (カタログ番号：16120-96、関東化学(株)) を用い、ホルムアルデヒド量として 0.5～100 ng の範囲で検量線を作成した。この分析部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の杉本直樹部長、酒井信夫室長及び、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

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

<ヒト胎盤オルガノイド作製>

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

<マウスの胎盤オルガノイド作製>

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

<メタボローム解析>

時間依存性、濃度依存性にモデル物質をオルガノイドに適用し、回収後、研究分担者が所属する大分大学に設置済みの GC-MS/MS 用の試料を作製し (GC-MS/MS QT8040, SHIMADZU)、

SIMCA(SHIMADZU) ソフトによる多変量解析 (OPLS-DA 法)、RNA array 解析を行うことにより、メタボローム解析を行う。併せて、マウス胎盤オルガノイドについても同様な検討を行い、種差の検討も行う。

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

〈胎盤の遺伝子発現プロファイリング〉
マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目、9.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。受精後 14.5 日目胎盤は、胎盤および脱落膜を分離することは困難であるため、胎盤を脱落膜を含めた状態の胎盤を解析する。RNA-seq のデータが NCBI の GEO データベースに収録されているために、公開データを利用して解析を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 3 ステージ (7.5、8.5、及び 9.5)

(dpc: Days post coitum: 交配後) 分ける。一方 14.5 dpc については、利用した公開データベース (NCBI の GEO データベース) では、McMaster University Central Animal Facility において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を行い、14.5 dpc で胎盤のサンプリングを行っている。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

凍結した胎盤より RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (Illumina) を用いて次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成したライブラリーは、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社

Nextseq2000 を用いて、pair end sequence (150bp x 2)にて RNA-seq を行なう。

Illumina 社 Nextseq2000 より出力された raw data (raw reads) は、BCL2-FASTQ program (Illumina, USA) により、FASTQ format に変換する。NCBI GEO データベースより取得した受精後 14.5 日目胎盤の RNA-seq データ (SRR19917101, SRR19917104, SRR19917109, SRR19917110) に関しては、Illumina 社 NovaSeq 6000 より出力された pair end sequence (100bp x 2)である。以降、全てのデータ解析は、Galaxy platform (<https://usegalaxy.org>) で行った。FASTQ は、Filter by quality program を用いて、quality score が 20 以上のシーケンスが 90 % 存在するシーケンスのみ解析対象とした。また、5' および 3' 末端のアダプター配列は、Trim FASTQ program によって除いている。

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し HISAT2 program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。BAM ファイルは、HTseq program を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。マウス mRNA のリファレンスシーケンスは、UCSC genome browser より入手した。

(倫理面への配慮)

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

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

C. 研究結果

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

令和 5 年度 (初年度) は、KronosHT を用いた

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

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

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

令和 6 年度 (昨年度) は、化学物質の FGF-SRF シグナールかく乱作用を基に DNT 毒性を評価する DynaLux/c 法を中心に解析を進めた。胎生期を想定した未分化ヒト iPS 細胞を用いた試験を実施した。桑形が精査した DNT 陽性対照物質 7 種 (サリドマイド (THA)、バルプロ酸 (VPA)、メトトレキサート (MTX)、ヒドロキシウレア (HU)、レチノイン酸 (RA)、フルオウラシルウラシル (5FU)、プロモデオキシウリジン (BrdU))、及び、陰性対照物質 5 種 (ペニシリン (PenG)、サッカリン (SAC)、シメチジン (CM)、D カンファー (CAM)、及びジフェンヒドラミン (DHM)) のシグナールか

く乱作用を $n=3$ で取得した。適用濃度は、最大溶解量 (一部 IC₅₀) を最大濃度とし、溶媒対照に対する各物質のシグナールかく乱作用を求め、ROC 曲線解析によって閾値を設定した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正精度 100% で分類可能であった。

令和 6 年度 (昨年度) はさらに、DNT 陽性対照物質として 9 種類 (アクリルアミド、ビスフェノール A、カフェイン、シクロフォスファミド (及びその代謝物)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)、エタノール、メチル水銀及びニコチン) を評価した。その結果、カフェイン以外の物質でシグナールかく乱作用がみられ、陽性判定が可能であった。

令和 7 年度 (今年度) は、DynaLux/c の DNT 試験への応用可能性をさらに検証するため、NPCs を用いた評価系の条件検討と、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c による追加物質の評価を行った。

未分化ヒト iPS 細胞を用いて、DNT 陽性対照物質の評価をさらに進めたが、具体的には、アクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、DEHP 及び MEHP の 5 種類の物質につき検討した結果、DEHP 以外の物質を DNT 陽性として分類できた。DEHP では明確なシグナールかく乱は認められなかったが、主要代謝物である MEHP ではシグナールかく乱が認められたことから、DEHP 関連 DNT の *in vitro* 評価では、親化合物だけでなく主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。

さらに、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質としてニコチン、フルオキシセチン及びカフェインを評価したところ、ニコチン及びフルオキシセチンは陽性、カフェインは陰性として分類された。この結果は、OECD の DNT *in vitro* battery における報告と概ね整合しており、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c が、神経伝達または神経活動調節に関わる DNT 評価対象物質の一部についても検出性を示す可能性が示された。

令和 6 年度 (昨年度) までに 17 種類の陽性対照物質を試験し、16 種でシグナールかく乱を確認し、その有用性につき再確認した。一方で、陽性対照物質であるカフェインはシグナールかく乱を示さなかった。そこでこの方策として、次に述べるように、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞に分化させ、生後の DNT を対象としたシグナールかく乱作用検出法の開発を試みることにした。

＜生後の DNT を対象とした、ヒト iPS 細胞分化神経前駆細胞を用いた、シグナルかく乱作用検出法の開発＞

上記の DynaLux/c は未分化のヒト iPS 細胞を用いて FGF-SRF シグナルに対する化学物質のかく乱作用をもとめており、対象は発生期の DNT である。一方で、生後発達期の DNT を検出するために NR が発現する細胞を用いた DynaLux/c の構築を試みた。文献検索や企業への問い合わせから、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて分化させた NPCs がアセチルコリン受容体(ニコチン受容体)、グルタミン酸受容体(NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸型)、ヒスタミン受容体、ドーパミン受容体、GABA 受容体を発現すること、そして、再現性や NPCs の保存に関してもデータがそろっていることを確認した。そこで令和 6 年度(昨年度)は、レポーターヒト iPS 細胞を上記の kit を用いて NPCs へ分化誘導を行い、分化マーカーの発現を確認した。また、SRF を活性化させるリガンドを検討した。

令和 7 年度(今年度) は NPCs を用いた評価系では、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も高い SRF 応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド及びバルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められない、または未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c よりも小さい応答にとどまった。したがって、NPCs を用いた DynaLux/c については、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた。

また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、OECD DNT-IVB 会議においては、現在、各神経発生過程に対応した in vitro 試験が 17 種類に絞られているが、令和 5 年度(初年度)は、この 17 試験をすべて実施するかは議論が続くようであり、Case study を増やし、各試験の信頼性を確認している段階であったが、令和 6 年度(昨年度)の状況では、この 17 試験をすべて実施してリスク評価を行う方向性である。現在、17 試験についてバリデーション試験が開始されている。下記の 171 化合物を用いてバリデーション試験が実地中であることが明らかになった。

一方、DNT 陽性対照物質の選定については、令和 5 年度(初年度)は、ラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された化学物質を精査し

た結果、97 化合物が掲載されており、その内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	17
医薬品	38
化学物質	42

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

動物実験の結果に基づき、4 報の論文(Harrill J et al., 2018; Frank C et al., 2017; Shafer T et al., 2019; Masjusthumsman S et al., 2020)から 133 物質がリスト化され、さらに、ワークショップのレビュー、公表データのレビュー、および米国 EPA の神経毒性リスク評価ガイドラインの情報が追加された 170 物質が掲載されている。この内訳は陽性対照が 103 化合物、陰性対照が 67 化合物であった。令和 6 年度(昨年度)に精査したラットを用いた動物実験により DNT の有無が判断された陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された 97 化合物は全て含まれていた。

令和 7 年度(今年度) は、昨年度までに抽出した陽性対照物質 103 化合物、陰性対照物質 67 化合物を精査し最終化とした。

改めてリストを精査した結果、170 化合物の内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	24
医薬品	81
化学物質	65

OECD DNT-IVB 専門家会議および OECD ワークショップ議事録から情報収集した結果、IATA における農薬の DNT 証拠の重みづけ (WoE) 評価に、17 種の DNT-IVB 試験データを統合し、階層型の評価過程により DNT リスク評価を実施することを目標とすることが明らかになった。

さらに、甲状腺関連の既存試験収集では 39 物質が得られた。既に作成した DNT 陽性・陰性化学物質リストとの重複はなかった。甲状腺機能低下により DNT 誘発の懸念が既に議論されている化合物が 1 化合物 (Perfluorohexadecanoic acid) 含まれていたが、未だ、DNT 発現について結論に至っていない。今回、精査した 39 化合物の情報は、将来、妊娠期甲状腺機能低下による DNT 発現に関しても化合物リスト作成が必要

な際に有用となりうるものである。

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

キシレンにおける解析について

令和5年度(初年度)は、モデル揮発性物質であるキシレンにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<吸入曝露実験>

雄性マウス(幼若期[2週齢])を対象とした22時間/日×7日間反復曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度2及び20ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 2.50 ± 0.24 ($2.66 \sim 1.97$ ppm)、 20.26 ± 0.35 ($20.74 \sim 19.84$ ppm)であり、ほぼ目標濃度下(それぞれ125及び101%)にて吸入曝露を実施することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。

<情動認知行動解析>

マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を検討したところ、キシレン曝露群(2及び20ppm)において、条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶あるいは音-連想記憶の低下(学習記憶異常)が認められた。得られた脳サンプルのうち、海馬歯状回について免疫組織化学による解析を実施した結果、低濃度(2ppm)及び高濃度(20ppm)曝露群において、DCXおよびNeuroD1(新生ニューロンマーカー)陽性細胞数の減少が疑われた。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

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

令和6年度(昨年度)に、キシレン幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現

について、曝露群(低濃度および高濃度)と対照群を比較したところ、低濃度(2ppm)曝露群においてDCX(新生ニューロン)の有意な発現増加が認められた。高濃度(20ppm)曝露群においては、いずれの分化マーカーも有意差は認められなかった。

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

762 ps (増加)、 20 ps (減少)

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

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

83 ps (増加)、 542 ps (減少)

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

一方、減少分542 psについて検討した結果、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索において、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、グルタミン酸AMPA受容体シグナル伝達、カルシウムシグナ

ルが確認され、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。また、発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

トルエンにおける解析について

令和 6 年度 (昨年度) は、モデル揮発性物質であるトルエンにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<吸入曝露実験>

雄性マウス (幼若期 [2 週齢]) を対象とした 22 時間/日×7 日間反復曝露 (3 用量、3 群構成、各群 8 匹) を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度 0.7 及び 7 ppm に対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差 (最低～最高値) は、 0.71 ± 0.04 (0.74～0.63 ppm)、 6.82 ± 0.38 (7.12～6.17 ppm) であり、ほぼ目標濃度下 (それぞれ 101 及び 97 %) で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のトルエン濃度は 0.00 ± 0.00 ppm であった。

<情動認知行動解析>

マウスが成熟後 (12 週齢時) に情動認知行動解析を検討したところ、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。令和 7 年度 (今年度) は、責任部位の 1 つである海馬歯状回について免疫組織化学による解析を実施した結果、細胞増殖マーカーである Ki67 について、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られ、令和 5 年度 (初年度) に実施したキシレン曝露マウスと同様に、検出された行動影響と関連する海馬への影響が考えられた。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

令和 7 年度 (今年度) は、トルエン幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の 1 つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における各分化マーカーの遺伝子の発現につい

て、曝露群 (低濃度及び高濃度) と対照群を比較したところ、低濃度 (0.7 ppm) 曝露群、高濃度 (7 ppm) 曝露群において、いずれの分化マーカーも有意差は認められなかった。

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

122 ps (増加)、111 ps (減少)

増加分 122 ps ならびに減少分 111 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、7 ppm (高濃度) のトルエン曝露群において、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった (対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

460 ps (増加)、347 ps (減少)

増加分 460 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、神経炎症シグナル伝達をはじめとした炎症関連経路が抽出され、炎症性応答に関わるシグナルの亢進方向の変化が示唆された。一方、Upstream Analysis を用いて検討したところ、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

減少分 347 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、シナプス形成シグナル伝達、髄鞘形成シグナル伝達、GABA 作動性神経伝達 (合成・放出・再取

り込み・分解)に関連する経路等が抽出され、神経回路の形成・維持や可塑性に関わる基盤過程への関与が示唆された。さらに Upstream Analysis を用いて検討したところ、神経保護・シナプス可塑性に関与する beta-estradiol が抽出された。

ホルムアルデヒドにおける解析について

令和7年度(今年度)は、モデル揮発性物質であるホルムアルデヒドにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<吸入曝露実験>

雄性マウス(幼若期[2週齢])を対象とした22時間/日×7日間反復吸入曝露(3用量、3群構成、各群8匹)を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度1及び10ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 1.05 ± 0.04 (1.00～1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58～11.55 ppm)であり、ほぼ目標濃度下(それぞれ105及び113%)で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のホルムアルデヒド濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。

<情動認知行動解析>

マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を検討したところ、ホルムアルデヒド両曝露群では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。また、高用量曝露群(10 ppm)では、明暗往来試験において暗室待機時間の増加傾向が認められ、これらの結果から不安関連行動への影響が示唆された。

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

今年度(令和6年度)は予定通り、ヒト胎盤オルガノイドとマウス胎盤オルガノイドを樹立することに成功した。

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

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

C-3-2: マウスの胎盤オルガノイド作製 (in vitro / organoid):

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

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

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド(1万個≒1drop matrigel)にモデル薬物としてサリドマイド(0-200 μM)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプリングが終了している。現在GC-MS用の試料を作成し、GC-MS/MS(QT8040, SHIMADZU)によるサンプル解析およびLabSolutions Insight BiologicsおよびSIMCA(SHIMADZU)ソフトによる多変量メタボローム解析(OPLS-DA法)を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用しているGS-MS/MS解析装置では約460種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される一次代謝産物は約250種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は38種でヒト胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は47種が確認された。このようにオルガノイド組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得た。

令和7年度(今年度)の解析により、特にその代謝経路においてマウスではバリン・ロイシン・イソロイシン経路の有意な活性化を確認し、ヒトにおいてはTCA cycleの有意な活性化を確認し、種差による差異の検出に成功した。

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

一方、細胞障害毒性の評価としてサリドマイド添加によるDNA二重鎖切断活性をわれわれの開発したパルスフィールド電気泳動法により解析を行い、再現性の確認も終了しバルクでのDNA障害活性を有していることが判明した。

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

添加 24 時間後の培養上清中の thalidomide は 95%以上が代謝されており、我々の確立したミニ胎盤は十分な薬物分解酵素活性を維持していることが判明している。現在さらに種差においてその代謝活性の相違について検討している。興味深いことにヒト胎盤オルガノイドでの代謝が約 10 倍早く、より活性を持つ構造に変換されることが判明し、ヒトでの毒性がマウスとは異なる可能性が強く示唆された。

令和 7 年度 (今年度) は、さらに各種薬物を用いてその代謝活性の種差における相違について検討し、生殖毒性評価の新しい評価系を提案できる可能性をまとめている。

C-3-6: ヒト胎盤オルガノイドのシングルセル RNA シークエンス解析 (scRNA-seq 解析) とモデル薬物添加による個別解析:

令和 7 年度 (今年度)、我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するため scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。全検出遺伝子数は human 16378 遺伝子に対して mouse 20543 遺伝子と検出された遺伝子数はマウスの方が多かった。変動遺伝子 (p-value < 0.05) も human 1,615 遺伝子、mouse 6,582 遺伝子と生物種間での大きな有意差があることが判明した。

続いて、scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。これまでの検討で 10 のクラスターに分類可能で、cytotrophoblast (cluster 4, 5)、syncytiotrophoblast (cluster 6) も明確に分画された。胎盤オルガノイドにおける薬物誘発性 DNA 二重鎖切断 (DSB) 形成のパターンが 2 次元培養系と比較、検討して明らかに異なることが判明した。特に syncytiotrophoblast で著明な p53 代謝経路の活性化が認められた。

C-3-7: 発生ステージごとのマウス胎盤の網羅的遺伝子発現解析 (国立医薬品食品衛生研究所)

7.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性 (令和 5 年度 (初年度))、8.5 dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性 (R5 年度)、9.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性 (令和 6 年度 (昨年度)) であった。7.5dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取し、8.5 dpc においては、8 匹、9 匹及び 7 匹の

正常発生胚の採取し、9.5 dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取した。

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

これらの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Illumina 社の Stranded mRNA kit を選択し、網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサー (Illumina 社 Nextseq2000) を利用して行なった。9.5 dpc の胎盤組織においては、母体側と直接接している側から、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer の 3 層構造からなることが報告されており、それぞれに特異的な遺伝子発現マーカーの存在が知られている。

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

その結果、母体側へと浸潤することは報告されている invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Pr17b1 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。さらに、P11 (Pr13d1)、P12 (Pr13b1) の遺伝子発現においては、8.5 dpc よりも 9.5 dpc において遺伝子発現の顕著な増加することを明らかにした。

令和 7 年度 (今年度) においては、これに 14.5dpc 胎盤の遺伝子発現データ (NCBI GEO データベース) を追加して解析を行なった。14.5dpc の交配では、7.5 dpc、8.5 dpc、9.5dpc と同様に交配し、プラグ陽性かつ妊娠している雌 4 匹から正常胚を採取し、そのうち、4 匹 (N=4) の雄の胎盤の RNA-seq データを利用し、解析した。その結果、令和 6 年度 (昨年度) に明らかにした胎盤の分化度を反映したバイオマーカーのうち、Pr17b1 および P12 (Pr13b1) においては、さらに遺伝子発現が上昇し、P11 (Pr13d1) は、遺伝子発現がなくなることが観察された。これらのことから、これらのバイオマーカーの発現を定量することで、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された。

D. 考察と結論

I) 発生期の in vitro DNT 評価手法の開発に向け、令和 5 年度 (初年度) は、従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72 時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得が可能となった。また、従来の 24 時間計測では明らかにできなかったバルプロ酸の 24 時間以

降の大きなシグナルかく乱作用を発見した。バルプロ酸はHDAC阻害剤としても知られており、ヒストンの脱アセチル化を阻害することで転写を活性化するエピジェネティック作用が知られている。この結果は、DNTの発生毒性発現機序にはエピジェネティック毒性も関与する可能性が示唆された。一方で、数日間のリアルタイム計測が可能となったことで、データ量が増え、シグナルかく乱作用の算出法は様々な視点で解析が可能になるなど複雑化した。

令和6年度（昨年度）は、開発したI)発生期のin vitro DNT評価手法を用いて、7種類のDNT陽性対照物質及び5種類の陰性対照物質を正確度100%で分類に成功した。これらは物質毎にシグナルかく乱の方向性や強さ、時間が異なることから、シグナルかく乱を引き起こす標的が異なることが考えられる。併せて、II)生後発達期のin vitro DNT評価に関しては、文献情報や企業への問い合わせにより、STEMCELL Technologies社のSTEMdiff SMADi Neural Induction Kitを用いてNPCsへの分化を試みた。NRと発現する細胞としてどの細胞を利用するかに関しては、多くの検討を重ねた。まずは、既存のヒトiPS細胞を分化させるもしくはNR発現細胞にレポーター遺伝子をノックインすることを検討し、分化させる場合はどの神経細胞にどの手法で分化させるかについても情報を集める必要がある。今回我々は上記の手法を用いることで、1.再現性良く、2.安定的に、3.多種のNRを発現している、4.多くの、NPCsの誘導法を選定した。現在、NPCsの安定的な誘導及び培養には至っておらず、条件検討が必要である。

令和7年度（今年度）の検討では、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有するDNT評価対象物質について検討したところ、OECDのDNT in vitro batteryにおける報告と概ね整合する結果を得、未分化ヒトiPS細胞を用いたDynaLux/cが、神経伝達または神経活動調節に関わるDNT評価対象物質の一部についても検出性を示す可能性が示された。

他方、NPCsを用いた評価系では、APEL2培地およびbFGF刺激条件が最も高いSRF応答を示したが、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた。

すなわち、NPCsを用いた評価系についてはさらなる条件検討が必要である一方、未分化ヒトiPS細胞を用いた標準DynaLux/cは、発生過程に関わるシグナル応答の変化を指標として、神

経伝達または神経活動調節に関わる標的を有するDNT評価対象物質のシグナルかく乱作用を検出できる有用なin vitro試験系となり得ると考えられた。今後は、物質数の拡充、判定閾値の妥当性検証、再現性評価を進めることで、発生期のin vitro DNT試験法としての有用性をさらに明確化する必要がある。

DNT陽性および陰性化学物質リストについては、ラットを用いた動物実験によりDNT陽性と報告された論文から令和5年度（初年度）は97化合物、令和6年度（昨年度）は103化合物が抽出された。令和7年度（今年度）はこれまで得られた情報を整理し、DNT陽性物質は103化合物、DNT陰性物質67化合物のリストを最終化した。

また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、各神経発生過程に対応したin vitro試験は、令和5年度（初年度）の段階では、17種類に絞られているが、各試験の信頼性については確認中であったが、令和6年度（昨年度）の時点では17種類全ての試験の実施がリスク評価には必要であると考えられ、各試験のバリデーション試験が開始されたことが明らかとなった。令和7年度（今年度）に調査したOECDワークショップ報告書には、IATAにおける農薬のDNT証拠の重みづけ（WoE）評価に、17種のDNT-IVB試験データを統合し、階層型の評価過程によりDNTリスク評価を実施することを目標とし、これからも議論を進めていくことが明らかになった。加えて、妊娠期甲状腺機能低下によるDNT発現に関する議論が進んだ際には、今回、甲状腺に特化して作成した化合物情報が有用となりうると考えられた。

＜発生期のin vitro DNT試験法を用いた場合の改善点（時短効果、使用動物数の低減、コストダウン額など）の定量的な試算＞

本研究では、より迅速、低コストで省動物に資する新規in vitro DNT評価手法の開発を目標としているが、従来のin vivo試験の場合に比べて、具体的にどの程度、迅速で低コストとなるのか、定量的な試算をすることとした。本研究では、DNTを発生期（胎生期）と生後発達期とに分け、検討している。このうち後者の生後発達期DNTの方は、当初の目標通り、「生後発達期における、将来的にin vitro試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定」に向け、その有力な候補を見出し、この過程を検

討する *in vitro* 実験系の有用性を明らかとしたが、今後も引き続き、この評価系の具体的な実用性の検討が必要であり、この具体的な評価系がまだ手元に存在しないために、現時点では試算ができない。

他方「発生期の *in vitro* DNT 試験法」については試算が可能であるため、以下に具体的に記す。被験物質 1 物質あたり、陽性対照と陰性対照との比較を含め、細胞培養用培地、試験用培地や反応基質などを考慮しても約 20 万円で実施可能である（この評価系のために必要な、生細胞リアルタイム ルシフェレースアッセイ用の機器の購入を考慮しても 800 万円程度の初期投資で済む）。実験実施期間は 1 化合物あたり、長くても 1 ヶ月でできる。

これに比して、OECD や米国 EPA の発達神経毒性ガイドライン試験のような DNT に係る *in vivo* 毒性試験の実施にかかる費用は、被験物質 1 物質あたり 2～3 億円（外部委託による費用の概算）かかり、動物実験だけで 1.5 年を要し、契約からファイナル提出まで 2.5 年はかかると考えられる。そもそも現状では、国内での実施経験（実績）はなく、あくまでも海外での外部委託に頼ることとなる。これに準ずる二世代繁殖毒性試験でも被験物質 1 物質あたり 1 億円程度の費用がかかる。近年では二世代繁殖試験を実施せずに、拡張型一世代繁殖試験 TG443 (F1 を 3 コホートにわけて、繁殖、DNT と発達免疫毒性を評価) にて DNT を評価する試みも検討されておりますが、こちらは、F1 世代から 3 種の試験（繁殖、DNT、免疫毒性）を同時に実施するので、3 億円以上かかる見込みである。

従って上述した試算によれば、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 20 万円/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 億円/1 物質）に比べ 2,000 分の 1 程度のコストで済むこととなる（初期投資を除く）。実施に係る時間に関しましても同様に、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 1 ヶ月/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 年/1 物質）に比べ 36 分の 1 程度の時短となる。

すなわち、*in vitro* DNT 試験法の場合、*in vivo* の系と比較して、コスト・時間ともに、桁違いのパフォーマンスが得られることとなる。

II) 生後発達期 DNT の分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン (0、2 及び 20 ppm) につき幼若期反復吸入曝露実験を行い（それぞれ測定値の平均±標準偏差は、 2.50 ± 0.24 、 20.26 ± 0.35 であり、それぞれ 125

及び 101 % とほぼ目標濃度下にて実施できた）、成熟後に 3 種類の試験により情動認知行動解析を実施したところ、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、キシレン曝露群において有意な差は認められなかった。他方、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、キシレン 2ppm 曝露群では音-連想記憶の低下が、キシレン 20ppm 曝露群では空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に認められた。すなわち、生後発達期におけるキシレンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に学習・記憶に影響を与えることが示唆された。あわせて、神経樹状突起・神経細胞・グリア細胞マーカー等を用いた、神経科学的物証に基づく解析として免疫組織化学を実施した結果、キシレンの濃度 (2 ppm) 及び高濃度 (20 ppm) 曝露群においては、成熟後の神経回路、特に海馬における新生ニューロンの増殖に影響を与えることが示唆された。加えて、遺伝子発現解析において、IPA による解析からは、高濃度 (20 ppm) 曝露群においては、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、関与する候補シグナルネットワークが抽出された。またプロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。

高濃度 (20ppm) 曝露群では、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーに関して、有意差は認められなかったものの、免疫組織化学における解析では、新生ニューロンマーカー陽性細胞数の減少が疑われたため、パスウェイ解析によって確認された神経伝達などに関与するシグナルネットワークが、間接的に神経細胞の分化・増殖に対して影響を及ぼすことが示唆された。

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

加えて、モデル揮発性物質としてトルエン (0、

0.7 及び 7 ppm) につき幼若期反復吸入曝露実験を行い(それぞれ測定値の平均±標準偏差は、 0.71 ± 0.04 、 6.82 ± 0.38 ppm であり、それぞれ 101 及び 97 %とほぼ目標濃度下にて実施できた)、成熟後に 3 種類の試験により情動認知行動解析を実施したところ、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。この結果から、キシレンでの行動影響と同様、トルエンの生後発達期における曝露により、DNT の特徴の一つと考えられる行動異常が確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基づくパスウェイ解析の結果からは、特に高濃度 (7 ppm) 曝露群においては、GABA 作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

以上のキシレンとトルエンの場合の解析結果から生後発達期 DNT 誘発メカニズムとして、グルタミン酸受容体あるいは GABA 受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。この点、中枢神経系は興奮性 (主にグルタミン酸作動性) 入力と抑制性 (主に GABA 作動性) 入力の相互作用により成立し、出生後の発達過程で回路機能が成熟し、発達期には、抑制性回路の機能的成熟が相対的に遅れて進行する側面があるため (Le Magueresse & Monyer. *Neuron*, 2013 [doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011])、興奮/抑制 (E/I) バランスは出生後発達の過程で次第に調整されることが知られている (Hensch & Fagiolini. *Prog Brain Res*, 2005 [doi:10.1016/S0079-6123(04)47009-5])。この E/I バランスの成熟 は、情動や認知を含む脳高次機能を支える神経回路基盤の形成・維持にも関与するために (Caballero et al. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016 [doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.013]、Ferguson & Gao. *Front Neural Circuits*, 2018 [doi:10.3389/fncir.2018.00037])、生後発達期における重要なイベントとして位置づけられるものと考えられる。キシレン曝露の場合では興奮性、トルエン曝露での場合は抑制性に関連するシグナルネットワークへの影響が示唆

されており、発達期に進行する E/I バランス成熟過程のいずれかの段階が、当該化学物質曝露によりかく乱される可能性があると考えられた。すなわち、以上の解析結果と考察から、「生後発達期における、将来的に in vitro 試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定の試み」に向け、この E/I バランス成熟過程が、その候補として挙げられ、この評価に際しては、この過程を検討する in vitro 実験系が有用と考える。この例としては、比較的最近になって報告された、iPS 細胞から興奮性及び抑制性ニューロンを個々に分化誘導してから「共培養」することで、E/I バランスの成熟を評価する手法を挙げることができる (Heider et al. *BMC Neuroscience*, 2024 [doi:10.1186/s12868-024-00858-z])。

一方、最終年度に検討したホルムアルデヒドについては、行動解析の結果から、オープンフィールド試験における結果を主とした不安関連行動への影響 (不安の亢進) が示唆された。被験物質 3 種についてはいずれも生後発達期曝露により成熟後の行動影響を生じ得る点では共通しており、ホルムアルデヒドについても、生後発達期の脳に対する共通した影響基盤の存在が示唆された。しかしながら、行動影響の現れ方には差異がみられたことから、各モデル物質の作用特性の違いを反映して、物質ごとに影響を受けやすい神経機能が異なる可能性が考えられ、今後は、関連指標との関係も含めて、この点を慎重に検討する必要がある。

加えて III) ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析に向けては、ヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを樹立することに成功し、当初の予定を完遂できたと考えている。先行論文に比較して効率的にかつ簡易にヒト胎盤を樹立することができた。再現性・継代も半年にわたって 10 回以上継代を安定的に管理することが可能となった。また、マウスにおいても同様にマウス専用のサプリメントを調整し、マウス胎盤オルガノイド用組織 (ラビリンス構造) の構築を樹立した。特にマウス胎盤オルガノイド樹立は現在までに報告例もなくわれわれの樹立が世界でいち早く行われているものの推定される。今後はさらにオルガノイド組織の精度を高めるとともに、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のためモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点か

ら研究を深めていく。モデル物質（サリドマイド）を用いて網羅的メタボローム解析を行った結果、マウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は 33 種でヒト胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は 13 種が確認された。このようにオルガノイド組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得た。さらに種差から見た胎盤オルガノイドにおける薬物代謝ではヒトではバリン・ロイシン・イソロイシン生合成代謝経路を中心にした変動、マウスでは TCA サイクルからアスコルビン酸代謝系の有意な変動が確認され新しい知見を得ることができた。また scRNA-Seq 解析によりオルガノイド組織中の syncytiotrophoblast で著明な薬物誘発性代謝経路の活性化が確認された。このように、ヒトへの外挿性の向上が期待される結果を得た。また、細胞障害毒性の評価としてサリドマイド添加による DNA 二重鎖切断活性を、パルスフィールド電気泳動法や免疫染色による DNA 障害毒性を評価した結果、バルクでの DNA 障害活性を有していることが判明した。我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するため scRNA-seq 解析を行い、これまでの検討で 10 のクラスターに分類可能であることを示すことができた。

さらに令和 6 年度においては、母体側へと浸潤することは報告されている invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Pr17b1 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。

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

令和 7 年度（今年度）は、令和 6 年度（昨年度）までに行なっていた C57BL/6 マウスの受精後 8.5 及び 9.5 日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析に加えて、14.5 日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行ない、trophoblast giant cells、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer に特異的な遺伝子発現マーカーが、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された。

以上、各試験法の最適化をはじめ、ほぼ予定通りに進捗した。いずれについても、当初の目的は基本的に達成されたものと考ええる。すなわち、発生期の in vitro DNT 試験法及びヒト胎盤オルガノイドを用いたメタボローム解析法の提案と、将来的に in vitro 試験法への適応拡大する上で必要となる、生後発達期 DNT 誘発に係る候補シグナルネットワークの同定を行うことができたものと考ええる。発生期の in vitro DNT 試験法及びヒト胎盤オルガノイドを用いたメタボローム解析法については本研究により、ほぼ確立できたものと考えられる。

本検討は、ヒトへの外挿性を考慮した、迅速、低コストで省動物に資する新規 in vitro DNT 評価手法（動物実験代替法）の開発につながることを期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の in vitro 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

○Hirokatsu Saito, Kousuke Suga, Koji Fujihara, Motoh Mutsuga, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima : Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. Exp. Anim. 2025, 75 (2): 222-233. [doi.org/10.1538/expanim.25-0064]

Yumiko Imai, Shunsuke Kimura, Satoshi Kitajima, Norihiro Sadato, Ryosuke Chiba, Hiroshi Hibino, Satomi Adachi-Akahane : Toward the promotion of “One Health” – part I: How do humans work to live together with humans, other organisms, and xenobiotics on Earth? J Physiol Sci. 2025; 76(1):100050 [10.1016/j.jphys.2025.100050]

Toshime Igarashi, Satoshi Yokota, Asako Aida, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima : In vivo screening evaluation of 12 chemicals as candidate endocrine disruptors using ovariectomized mouse uterotrophic bioassay. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2025; 162: 105900 [doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105900]

Satoshi Yokota, Kiyoshi Hashimoto, Takuya Sato, Koichi Uemura, Kazuhide Makiyama, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takehiko Ogawa: A long-term mouse testis organ culture system to identify germ cell damage induced by chemotherapy. Curr. Res. Toxicol. 2025; 8: 100228.

[doi.org/10.1016/j.crttox.2025.100228]

Satoshi Yokota, Tsuyoshi Kawakami, Hiroki Yoshioka, Nozomu Moriya, Nao Sekine, Nobuhiko Miura, Satoshi Kitajima, Takamichi Ichinose, Shigeru Oshio: In utero impacts of intratracheal administration of silver nanoparticles on spermatogenesis in two generations of mice. Environ Sci Pollut Res Int. 2025; 32(25):15304-15320.

[doi: 10.1007/s11356-025-36607-w]

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, Satoshi Kitajima: Perichordal Vertebral Column Formation in Rana kobai. J Morphol. 2025; 286(4): e70044.

[10.1002/jmor.70044]

○Koki Murayama, Kashu Mizota, Rieko Matsuura, Yusuke Okubo, Yoshihiro Nakajima, Atsushi Suzuki, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assay Based on Real-Time Monitoring of Fibroblast Growth Factor Signal Disruption in Human Induced Pluripotent Stem Cells. J. Vis. Exp. (224), e68910, doi:10.3791/68910 (2025).

Kenji Ohya, Shouhei Hirose, Kohei Nishikaku, Taka-hiro Ohnishi, Kenichi Lee, Sunao Iyoda, Akiko Ku-bomura, Yukihiro Akeda, Katsumi Mizukami, Tomi-katsu Suzuki, Kenji Takinami, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Takashi Inoue, Yukiko Hara-Kudo. Genomic features and patho-genicity of atypical diarrheagenic Escherichia coli from a large foodborne outbreak International Journal of Food Microbiology 434 (2025) 111134-
[doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025]

○Takeshi Terabayashi, Takako Sasaki, Takeshi Ishizaki, Tadahiko Tomo, Yoshihiro

Nishida, Katsuhiko Hanada. Analysis of accumulation of DNA double-strand breaks in mouse tissues by pulsed-field gel electrophoresis. Appl Pharmacol. 2025. Apr;497:117278.

[doi: 10.1016/j.taap.2025.117278]

○Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. Toxicology Letters. Vol.411, S157, 2025.

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. Toxicology Letters. Vol.411, S347-348, 2025.

西田欣広、花田克浩. 難治性の婦人科癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の可能性. 細胞. 5(7).68-71. 2025.

Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Hiroyoshi Y. Tanaka, Akihisa Yamamoto, Motohiro Kojima. Artificial Intelligence Approach in Machine Learning-Based Modeling and Networking of the Coronavirus Pathogenesis Pathway, Edward J. Perkins, Horacio Cabral
Current Issues in Molecular Biology 47(6) 466

Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono. Adverse Outcome Pathway 298: Increase in Reactive Oxygen Species Leading to Human Treatment-Resistant Gastric Cancer
Horacio Cabral, Edward J Perkins
Cancers (accepted)

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡 : 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢について—その開発状況と安全性に係る諸外国の規制動向—、第 23 回食品安全フォーラム、東京、2025 年 12 月 12 日、口頭

北嶋 聡 : 細胞培養食品を取り巻く最近の情

勢について、培養細胞の食品利用に係る国際会議、東京、2025 年 11 月 13 日、口頭

五十嵐智女，西村拓也，北嶋 聡：細胞培養食品（いわゆる培養肉）の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱ－潜在的なハザード因子の検討－、日本動物学会第 96 回名古屋大会、名古屋、2025 年 9 月 5～6 日、ポスター

菅野 純，小林美穂，渡部徹郎，辻 昌貴，森田紘一，菅 康佑，横田 理，高橋祐次，北嶋 聡：カーボンナノチューブ吸入曝露マウスの肺病変におけるリンパ管を中心とした病理形態について、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 4 日、口頭（シンポジウム）

北嶋 聡：遺伝子改変、細胞分析、遺伝子発現及びエピジェネティクス解析を包括した網羅的 in vivo 毒性研究、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 3 日、口頭（学会賞受賞者講演）

松田直晃，大久保佑亮，小原息吹，小石川 蒼馬 敏，高野珠実，西村拓也，高橋祐次，北嶋 聡，平林容子，関澤信一，桑原正貴，太田裕貴，柄内亮太：長時間連続の自動行動診断を実現するラット用ウェアラブルデバイスシステムの開発、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 2 日、ポスター

五十嵐智女，西村拓也，北嶋 聡：細胞培養食品における食品衛生上の潜在的なハザード因子の検討、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 2 日、ポスター

五十嵐 智女、相田 麻子、横田 理、西村 拓也、高橋 祐次、桑形 麻樹子、北嶋 聡：多層卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価、第 72 回日本実験動物学会総会、名古屋、2024 年 5 月 22 日、ポスター

五十嵐智女，西村拓也，北嶋 聡：細胞培養食品（いわゆる培養肉）の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱ－潜在的なハザード因子の検討－、日本動物学会第 96 回名古屋大会（2025.9.4-6）、P479B，名古屋。

五十嵐智女，西村拓也，北嶋 聡：細胞培養食品（いわゆる培養肉）の安全性確保における潜在的なハザード因子の検討。第 121 回日本食品衛生学会学術講演会（2025.10.16-17）、P-86，東京

五十嵐 智女，西村 拓也，北嶋 聡：フードテックを活用した様々な新規食品の開発と安全性に係る規制動向－細胞培養食品の潜在的ハザード因子の検討－。令和 7 年度 日本動物学会中部支部大会（2025.12.6-7）、P-19，静岡。

○齊藤洋克、菅康佑、藤原恒司、六鹿元雄、横田理、西村拓也、北嶋 聡：生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析 第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 3 日、ポスター

○Okubo Y., Mizota K, Murayama K*1, Matsuura R, Mootha A, Kitajima S, Hirabayashi Y, Nakajima Y *2, Fukuda J *1: Continuous Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Developmental Toxicity Assay. 20th INTERNATIONAL CONGRESS OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2025. 6. 18)

○Okubo Y., Murayama K., Matsuura R., Mootha A., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: Real-time Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Toxicity Assay. Joint Meeting of JSCB 77th & JSDB 58th (2025. 7. 16-17)

○村山航己，佐藤 花音，松浦利絵子，Archana Mootha，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指標による精巣毒性物質の評価、第 52 回日本毒性学会学術年会（2025. 7. 2）

○佐藤花音，村山航己，松浦利絵子，Mootha Archana，平林容子，中島芳浩，大久保佑亮，福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた新型コロナウイルス感染症治療薬のシグナルかく乱を基にした発生毒性評価、第 52 回日本毒性学会学術年会（2025. 7. 2）

○大久保佑亮，松浦利絵子，村山航己，佐藤花音，石川亜佐美，中元颯馬，平林容子，中島芳浩，福田淳二：シグナルかく乱に着目した in vitro 発生毒性試験とそのリスク評価への展開、第 65 回日本先天異常学会学術集会（2025. 7. 27）

○村山航己，佐藤 花音，松浦利絵子，石川亜佐美，中元颯馬，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指標による精巣毒性物質の評価、第 65 回 日本先天異常学会学術集会（2025. 7. 25）

○大久保佑亮：シグナルかく乱を指標とする発生毒性試験法 DynaLux/c の開発と行政受入に向けた取り組み、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

○村山航己、佐藤 花音、松浦利絵子、石川亜佐美、中元颯馬、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、山田隆志、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱指標による生殖毒性物質の評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

○佐藤 花音、村山航己、松浦利絵子、中元颯馬、石川亜佐美、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、山田隆志、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱に基づく新型コロナウイルス感染症治療薬の発生毒性評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

○中元颯馬、村山航己、佐藤花音、松浦利絵子、石川亜佐美、平林容子、中島芳浩、福田淳二、大久保佑亮、山田隆志：ヒト iPS 細胞を用いた PFAS のシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価：PFAS への適用性と信頼性の検証、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

○桑形麻樹子：周産期甲状腺機能低下と次世代の神経発達、非臨床試験の役割「先天異常わが国における化学物質の甲状腺影響評価に関する調査報告」、第 65 回日本先天異常学会学術集会 DNT 委員会企画シンポジウム、伊勢市、2025 年 7 月 25 日、口頭

○諫田泰成、桑形麻樹子：甲状腺ホルモンに関する新たな動物実験代替法の国際動向「甲状腺ホルモンと発達神経毒性」、日本動物実験代替法学会第 38 回大会シンポジウム 4、横浜、2025 年 11 月 3 日、口頭

○Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025. 9. 15 Athens, Greece.)

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. The

59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025. 9. 16. Athens, Greece.)

○西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁：胎盤オルガノイドを用いた新しいヒト生殖毒性評価モデル系の可能性。第 77 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2025. 5. 24 岡山)

○田邊明日香、花田克浩、西田欣広：胎盤オルガノイドを用いた DNA ダメージ誘導の二重鎖切断の検出系の開発。第 54 回日本環境変異原ゲノム学会 (2025. 11. 22 静岡)

Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the cytotoxic action of an indole alkaloid evodiamine. 第 99 回日本薬理学会 (2026 3. 16 仙台)

小野竜一 (招待講演)：遺伝子改変マウスを用いた肝由来エクソソームの同定と肝毒性バイオマーカーの同定、医薬品毒性機序研究部会シンポジウム：医薬品毒性の機序を解き明かすモデル動物たち。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

小野竜一、成瀬美衣 (招待講演)：エピゲノム変異によるシスプラチン治療抵抗性の獲得、付加体科学部会シンポジウム：環境化学物質はどのようにエピゲノムを制御しているのか？ 第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

相崎 健一、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡 (シンポジウム)：Percellome Project による反復投与毒性の予測、Systems Toxicology 開発への AI 導入の近未来-実験室、病棟と脳-。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

菅野 純、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡 (シンポジウム)：PFOA の遺伝子発現解析と PFAS Percellome プロジェクトの進捗、有機フッ素化合物 PFAS による環境汚染と人体影響。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, T. Yamamoto, A. Ishii, T. Yamada, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, S. Kitajima (ポスター) : Identification of Organ-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Toxicity Biomarkers Using CD9-EGFP Reporter Mice. EUROTOX2025 (欧州毒性学会)、2025 年 9 月 15 日、ギリシャ

成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、山元智史、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子、小野竜一：肝臓オルガノイド由来 EV を利用した毒性評価法の開発. 第 12 回 日本細胞外小胞学会学術集会、2025 年 10 月 14 日

小野竜一、成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、森山紀子、立原江利加、野崎弘枝、三原大輝、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子：臓器特異的エクソソームの単離方法の開発. 第 5 回国立衛研・島津技術交流会、2025 年 12 月 18 日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, S. Kitajima, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, and T. Yamada. Identification of Liver-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Biomarkers of Hepatotoxicity in CD9-EGFP Reporter Mice. SOT2026 (米国毒性学会), 2026 年 3 月 24 日、サンディエゴ

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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

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

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ． 分担研究報告書

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部

研究要旨

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

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

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

令和5年度(初年度)は、この発達期DNTの目的達成に向け、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)における対照群(成熟期マウス海馬)をサンプルとして用いた。そして、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析により、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーとして、Mtap2、Mapt(ニューロン)、Dcx(新生ニューロン)、Gfap(アストロサイト)、Mag、Mbp(オリゴデンドロサイト)、Nes、Sox2(神経幹細胞)の各遺伝子を抽出し、その発現を確認した。

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

令和7年度(今年度)は、トルエン(0.7、7 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(7ppm)曝露群において、GABA作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

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

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

遺伝子発現変動解析

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

令和5年度(初年度)は、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)の対照群である成熟期雄性マウス(C57BL/6J)の海馬における網羅的遺伝子発現解析の結果、中枢神経系に

関わる遺伝子から、海馬における各細胞の分化マーカーとして、Mtap2とMapt（ニューロン）、Dcx（新生ニューロン）、Gfap（アストロサイト）、MagとMbp（オリゴデンドロサイト）、NesとSox2（神経幹細胞）の各遺伝子を抽出し、その発現を確認し、その発現量の絶対値を求めることができた。

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

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

762 ps(増加)、20 ps(減少)

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

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

用した。

83 ps(増加)、542 ps(減少)

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

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

この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。また、これまでの解析結果により、キシレンの低濃度曝露群と高濃度曝露群では検出される影響に異なる点が多いことから、それぞれ異なるシグナルネットワークを介して、中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

令和7年度(今年度)は、トルエン幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群(低濃度および高濃度)と対照群を比較したところ、低濃度(0.7 ppm)曝露群、高濃度(7ppm)曝露群において、いずれの分化マーカーも有意差は認められなかった(図1)。

次いで、対照群と比較し、0.7 ppm(低濃度)のトルエン曝露群において、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps)数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して曝露群の比率が、増

加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

122 ps (増加)、 111 ps (減少)

増加分 122 ps ならびに減少分 111 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、7 ppm (高濃度) のトルエン曝露群において、発現が有意(t 検定での P 値< 0.05)に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

460 ps (増加)、 347 ps (減少)

増加分 460 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、神経炎症シグナル伝達をはじめとした炎症関連経路が抽出され、炎症性応答に関わるシグナルの亢進方向の変化が示唆された。一方、Upstream Analysis を用いて検討したところ、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

減少分 347 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、シナプス形成シグナル伝達、髄鞘形成シグナル伝達、GABA 作動性神経伝達 (合成・放出・再取り込み・分解) に関連する経路等が抽出され、神経回路の形成・維持や可塑性に関わる基盤過程への関与が示唆された。さらに Upstream Analysis を用いて検討したところ、神経保護・シナプス可塑性に関与する beta-estradiol が抽出された。

トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基

づくパスイ解析の結果からは、特に高濃度 (7 ppm) 曝露群においては、GABA 作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

以上のキシレンとトルエンの場合の解析結果から生後発達期 DNT 誘発メカニズムとして、グルタミン酸受容体あるいは GABA 受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。この点、中枢神経系は興奮性 (主にグルタミン酸作動性) 入力と抑制性 (主に GABA 作動性) 入力の相互作用により成立し、出生後の発達過程で回路機能が成熟し、発達期には、抑制性回路の機能的成熟が相対的に遅れて進行する側面があるため (Le Magueresse & Monyer. Neuron, 2013[doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011])、興奮/抑制 (E/I) バランスは出生後発達の過程で次第に調整されることが知られている (Hensch & Fagiolini. Prog Brain Res, 2005 [doi:10.1016/S0079-6123(04)47009-5])。この E/I バランスの成熟は、情動や認知を含む脳高次機能を支える神経回路基盤の形成・維持にも関与するために (Caballero et al. Neurosci Biobehav Rev, 2016[doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.013], Ferguson & Gao. Front Neural Circuits. 2018[doi:10.3389/fncir.2018.00037])、生後発達期における重要なイベントとして位置づけられるものと考えられる。キシレン曝露の場合では興奮性、トルエン曝露での場合は抑制性に関連するシグナルネットワークへの影響が示唆されており、発達期に進行する E/I バランス成熟過程のいずれかの段階が、当該化学物質曝露によりかく乱される可能性があると考えられた。すなわち、以上の解析結果と考察から、「生後発達期における、将来的に in vitro 試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定の試み」に向け、この E/I バランス成熟過程が、その候補として挙げられ、この評価に際しては、この過程を検討する in vitro 実験系が有用と考える。この例としては、比較的最近になって報告された、iPS 細胞から興奮性及び抑制性ニューロンを個々に分化誘導してから「共培養」することで、E/I バランスの成熟を評価する手法を挙げることができる (Heider

et al. BMC Neuroscience, 2024 [doi: 10.1186/s12868-024-00858-z]]).

D. 結論

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

トルエンについてもキシレンでの行動影響と同様に、生後発達期における曝露により、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常が確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基づくパスウェイ解析の結果からは、特に高濃度(7 ppm)曝露群においては、GABA作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

このように、生後発達期DNT誘発メカニズムに関与する複数のシグナルネットワークを見出し、以って、生後発達期のin vitro試験法への適応拡大に必要な候補シグナルネットワークを明らかにするという当初の目的は達成できたものと考ええる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表(抜粋)

○Hirokatsu Saito, Kousuke Suga, Koji Fujihara, Motoh Mutsuga, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima: Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. Exp. Anim. 2025, 75 (2): 222-233.
[doi.org/10.1538/expanim.25-0064]

Yumiko Imai, Shunsuke Kimura, Satoshi Kitajima, Norihiro Sadato, Ryosuke Chiba, Hiroshi Hibino, Satomi Adachi-Akahane: Toward the promotion of “One Health” – part I: How do humans work to live together with humans, other organisms, and xenobiotics on Earth? J Physiol Sci. 2025; 76(1):100050
[10.1016/j.jphys.2025.100050]

Toshime Igarashi, Satoshi Yokota, Asako Aida, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima: In vivo screening evaluation of 12 chemicals as candidate endocrine disruptors using ovariectomized mouse uterotrophic bioassay. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2025; 162: 105900
[doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105900]

Satoshi Yokota, Kiyoshi Hashimoto, Takuya Sato, Koichi Uemura, Kazuhide Makiyama, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takehiko Ogawa: A long-term mouse testis organ culture system to identify germ cell damage induced by chemotherapy. Curr. Res. Toxicol. 2025; 8: 100228.
[doi.org/10.1016/j.crttox.2025.100228]

Satoshi Yokota, Tsuyoshi Kawakami, Hiroki Yoshioka, Nozomu Moriya, Nao Sekine, Nobuhiko Miura, Satoshi Kitajima, Takamichi Ichinose, Shigeru Oshio: In utero impacts of intratracheal administration of silver nanoparticles on spermatogenesis in two generations of mice. Environ Sci Pollut Res Int. 2025; 32(25):15304-15320.
[doi: 10.1007/s11356-025-36607-w]

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

286(4): e70044.
[10.1002/jmor.70044]

Kenji Ohya, Shouhei Hirose, Kohei Nishikaku, Taka-hiro Ohnishi, Kenichi Lee, Sunao Iyoda, Akiko Ku-bomura, Yukihiro Akeda, Katsumi Mizukami, Tomi-katsu Suzuki, Kenji Takinami, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Takashi Inoue, Yukiko Hara-Kudo. Genomic features and patho-genicity of atypical diarrheagenic Escherichia coli from a large foodborne outbreak. International Journal of Food Microbiology 434 (2025) 111134-
[doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025]

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢についてーその開発状況と安全性に係る諸外国の規制動向ー、第23回食品安全フォーラム、東京、2025年12月12日、口頭

北嶋 聡: 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢について、培養細胞の食品利用に係る国際会議、東京、2025年11月13日、口頭

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱー潜在的なハザード因子の検討ー、日本動物学会第96回名古屋大会、名古屋、2025年9月5~6日、ポスター

菅野 純, 小林美穂, 渡部徹郎, 辻 昌貴, 森田絃一, 菅 康佑, 横田 理, 高橋祐次, 北嶋 聡: カーボンナノチューブ吸入曝露マウスの肺病変におけるリンパ管を中心とした病理形態について、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月4日、口頭 (シンポジウム)

北嶋 聡: 遺伝子改変、細胞分析、遺伝子発現及びエピジェネティクス解析を包括した網羅的 in vivo 毒性研究、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月3日、口頭 (学会賞受賞者講演)

松田直晃, 大久保佑亮, 小原息吹, 小石川 蒼, 馬 敏, 高野珠実, 西村拓也, 高橋祐次, 北嶋 聡, 平林容子, 関澤信一, 桑原正貴, 太田裕貴, 柄内亮太: 長時間連続の自動行動診断を実現するラット用ウェアラブルデバイスシステムの開発、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2日

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品における食品衛生上の潜在的なハザード因子の検討、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2日、ポスター

五十嵐 智女, 相田 麻子, 横田 理, 西村 拓也, 高橋 祐次, 桑形 麻樹子, 北嶋 聡: 多層卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価、第72回日本実験動物学会総会、名古屋、2024年5月22日、ポスター

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱー潜在的なハザード因子の検討ー、日本動物学会第96回名古屋大会(2025.9.4-6), P479B, 名古屋.

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の安全性確保における潜在的なハザード因子の検討、第121回日本食品衛生学会学術講演会(2025.10.16-17), P-86, 東京

五十嵐 智女, 西村 拓也, 北嶋 聡: フードテックを活用した様々な新規食品の開発と安全性に係る規制動向ー細胞培養食品の潜在的ハザード因子の検討ー、令和7年度日本動物学会中部支部大会(2025.12.6-7), P-19, 静岡.

○齊藤洋克, 菅康佑, 藤原恒司, 六鹿元雄, 横田理, 西村拓也, 北嶋 聡: 生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析 第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月3日、ポスター

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

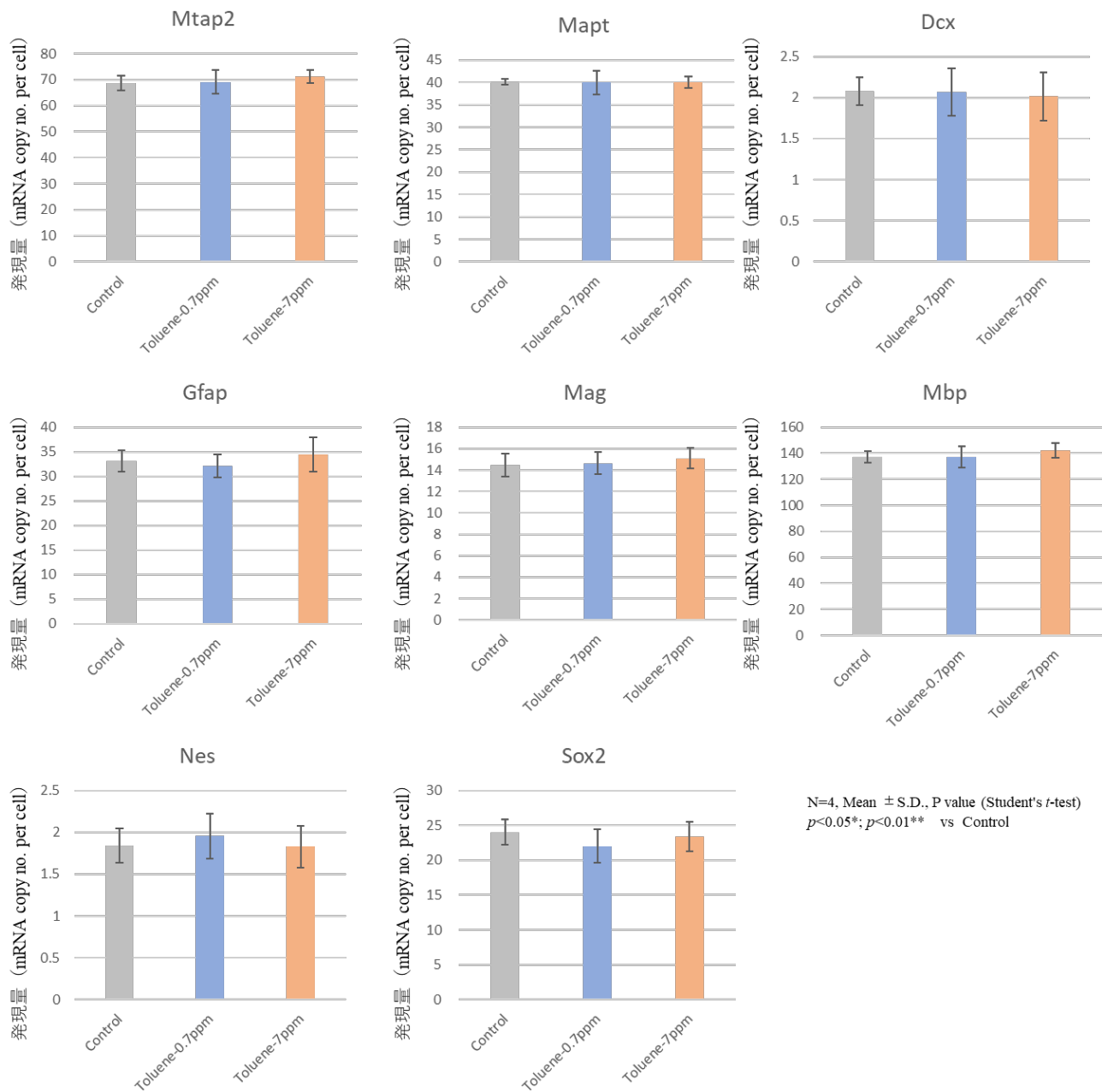


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
分担研究報告書

分担研究課題：「吸入曝露実験の実施」

研究分担者	西村 拓也	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	杉本直樹	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部
	藤原恒司	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部

研究要旨

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

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

本分担研究では、この発達期DNTにおける目的の達成に向け、生後発達期の雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施した。その結果、吸入チャンバー内の被験物質（ホルムアルデヒド）濃度について、目標曝露濃度1および10 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、 1.05 ± 0.04 (1.00～1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58～11.55 ppm)であり、ほぼ目標濃度で曝露することができた。なお、対照群および吸入チャンバーが存在する室内のホルムアルデヒド濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

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

令和7年度(今年度)のモデル物質はホルムアルデヒド(Formaldehyde; 分子量: 30.03, CAS No.: 50-00-0)とし、試薬としてホルムアルデヒド液(カタログ番号: 064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度36.0~38.0%、ロット番号: SEK3790、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。ホルムアルデヒドの曝露濃度は先行研究の結果から、1および10

ppmを目標値とした。因みにこの濃度は、ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が0.08 ppmであることから、この指針値のそれぞれ10および100倍程度ということとなる。

＜曝露濃度設定根拠＞

1)ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は0.08 ppmである。これを受け、先行研究ではSHレベルの10倍程度の濃度(1 ppm)を含む吸入曝露群を設定し実験を実施しており、今回の実験での低濃度とすることで、先行研究におけるデータとのブリッジングを考慮した。2)また、同様に先行研究にて文献調査した、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験結果から、ホルムアルデヒド吸入曝露では上気道(特に鼻腔)の局所影響が主要な毒性として報告されている。短期曝露の検討として、ラットにおいて0、0.5、2、6、15 ppmを3日間(6時間/日)曝露した場合、15 ppmを単回6時間曝露したラットの鼻甲介において急性の細胞傷害が観察され、追加曝露により毒性反応が軽度の鼻炎から重度の潰瘍形成へ進展することが記載されている(Swenbergら, 1983)。一方、ラットおよびマウスを用いた長期吸入試験(0、2.0、5.6、14.3 ppm、6時間/日、5日/週、24か月)では、鼻部局所病変が用量依存的に報告され、マウスでは中・高濃度群で病変が観察されている(Kernsら, 1983)。

情動認知行動解析を考慮すると、げっ歯類において鼻部局所刺激・傷害が認められることを考慮した15 ppm未満の濃度域が望ましく、また、生後発達期への曝露であることも考慮し、「我々の先行研究における濃度設定において観察された影響、および文献調査に基づき、長期吸入曝露実験においても一般状態に異常が認められない条件」、という観点から、本実験でのホルムアルデヒドの濃度設定を行った。

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

＜ガスの発生方法と濃度測定方法＞

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバ

ブリングし気化させる方法により行った。

ホルムアルデヒド濃度は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管 (LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号:505331、Supelco 社)を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間 (曝露開始から曝露停止まで) に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 2 本、曝露群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ30NII および MP-Σ300NII、柴田科学株式会社製)を用いて、吸入チャンバー内の空気を吸引した。ホルムアルデヒドは、捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNPH) と反応し、ホルムアルデヒド-2,4-DNPH として捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド-2,4-DNPH は、アセトニトリル (LC/MS 用、カタログ番号:01033-76、関東化学 (株)) 約 90mL により抽出してメスフラスコで 100 mL に定容し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器を接続した LC-20AD システム一式、(株)島津製作所製)により HPLC 分析を実施した。なお、移動相にはアセトニトリルとオルガノ (株)製超純水装置 PURELAB flex で精製した超純水を用い、その組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は 1 mL/min とした。その他分析条件について、カラムは COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mm φ×250 mm、粒径：5 μm、ナカライテスク社製)、検出波長は UV 360 nm、試料注入量は 2~10 μL とした。また、検量線はホルムアルデヒド-2,4-DNPH 標準原液 (カタログ番号：16120-96、関東化学 (株))を用い、ホルムアルデヒド量として 0.5~100 ng の範囲で検量線を作成した。この分析部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の杉本直樹部長、酒井信夫室長及び、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験：

令和7年度 (今年度) は予定通りホルムアルデヒド (0、1、10 ppm) (1および10 ppmはそれぞれ現在の指針値の10および100倍程度の濃度) について、雄性マウス (幼若期、2週齢) を対象とした22時間/日×7日間反復曝露 (3用量、3群構成、各群8匹) を実施した (図1)。吸入チャンバー内の被験物質濃度について、目標曝露濃度1および10 ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差 (最低~最高値) は、 1.05 ± 0.04 (1.00~1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58~11.55 ppm) であった (図2)。

D. 結論

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

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Saito H, Suga K, Fujihara K, Mutsuga M, Yokota S, Nishimura T, Kitajima S, Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. *Experimental Animals*, in press

T. Nishimura, Y. Okubo, M. Naota, Y. Suzuki, Mutsumi Suzuki, K. Watanabe, T. Nakazawa, M. Kuwagata, H. Onodera, Y. Hirabayashi, Challenges in the Nonclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals and Perspectives for Revision of the ICH S6 Guideline Based on Analysis of Approved Products in Japan, *Translational and Regulatory Sciences*, in press

2. 学会発表 (抜粋)

西村拓也、平林容子、小川久美子、高橋祐次、角田聡、鈴木睦、佐藤玄、豊田武士、高橋祐次、『毒性試験用語集』の改訂と利活用可能なデータベースの構築の取り組み、日本毒性学会学術年会 第52回、2025年7月4日、沖縄

西村拓也、高橋祐次、豊田武士、角田聡、鈴木睦、
佐藤玄、小川久美子、山田隆志、平林容子、毒性
試験用語の標準化に向けた用語集改訂と継続的
な更新が可能なデータベース化への取り組み、医
薬品毒性機序研究会 第8回、2025年12月11日、
札幌

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

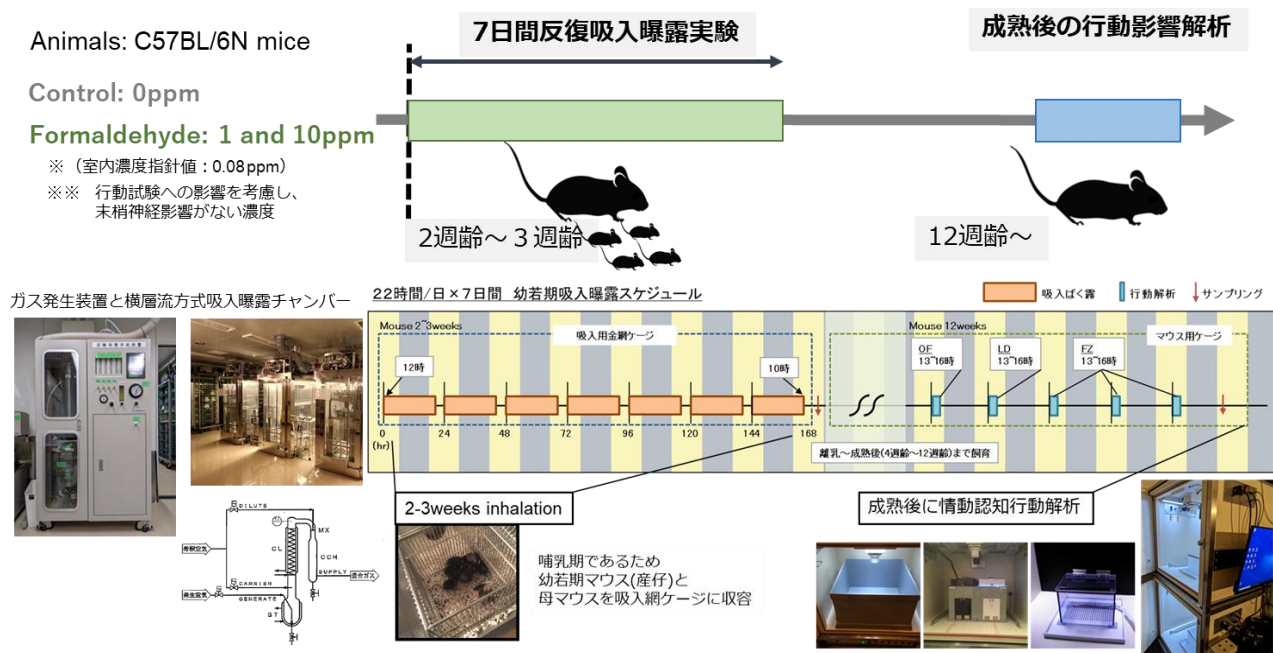


図1 実験スケジュールの概要

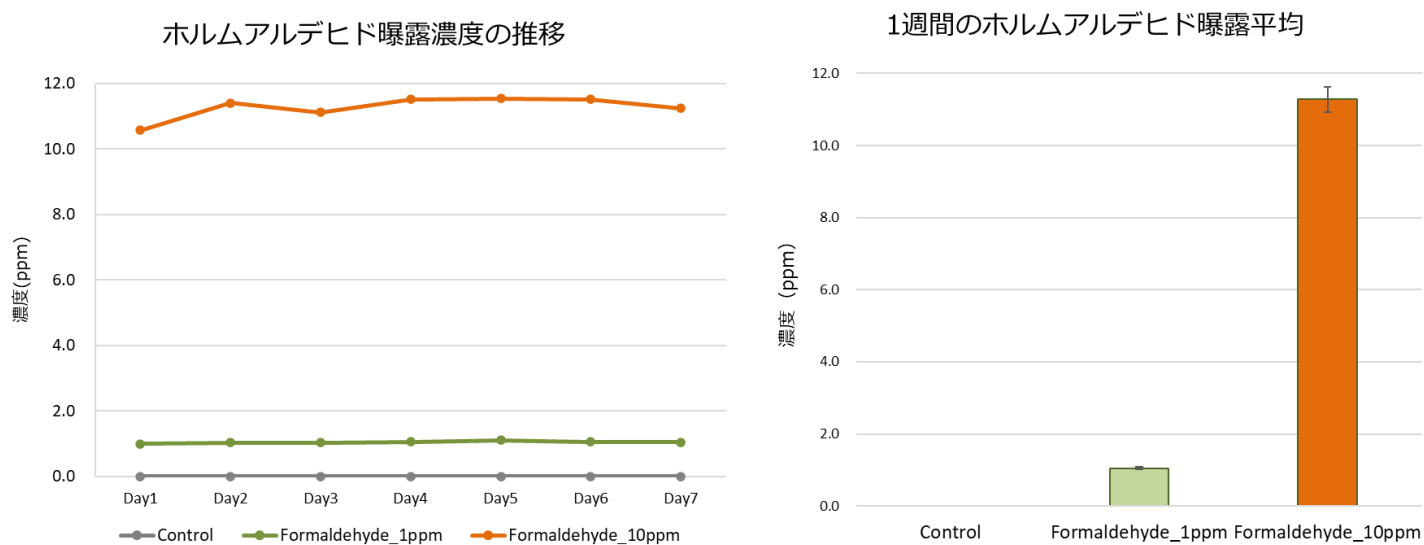


図2 ホルムアルデヒド曝露濃度の測定結果：情動認知行動解析のための 22 時間/日×7 日間反復曝露 (平均値±標準偏差)

令和7年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
研究分担者 桑形 麻樹子
国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部

研究要旨

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

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

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

R7年度は、2025年9月に公開されたワークショップ報告書を精査し国際動向を調査するとともに、R6年度までに選出したDNT陽性・陰性物質を整理した。

【情報収集に使用した資料】

(1) Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery. [ENV/CBC/MONO(2023)13].

(2) Workshop Proceedings on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT). Series on Testing and Assessment No 412.
[ENV/CBC/MONO(2025)10]

OECD DNT-IVB専門家会議は、EFSA、EPA、FDA、Health Canadaといった規制当局を始め、研究、産業界の専門家により構成されており、in vitro手法によるDNT評価方法の確立を目的としている。

DNT陽性対照および陰性対照物質の選定は、欧米リスク評価機関の報告書及び科学論文の調査を継続した。OECD in vitro DNT battery (DNT-IVB) 文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている動物実験の結果に基づいたDNT有無のリスト(Appendix A)を、ワークショップの報告書に記載されているケーススタディの結果と合わせて精査した。

R7年度にOECD DNT-IVB専門会議が開催されなかったために、本国際会議出席のための予算を使用しなかった。近年、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の

脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、この予算を利用して、発達神経毒性評価のための化学物質リスト作成の一環として、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集した。

OECDテストガイドライン改正時期を考慮し、2010年から2025年の間に報告された経口投与簡易生殖毒性試験(OECD TG421)および反復投与毒性・生殖毒性併合試験(OECD TG422)の試験結果を下記2種のデータベースを用いて精査した。

1) 化審法データベース

https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/search.action?request_locale=ja

2) 既存化学物質データベース

https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp

(倫理面への配慮)

科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果および考察

1. OECDの動向

R7年度にOECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議は開催されなかった。

2025年9月に、DNT-IVB専門家グループが主催した”The OECD Workshop on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT).”の報告書(workshop proceedings)が公開された。この報告書には、研究、産業界、規制当局の視点からDNTに関する課題がワークショップ発表者の論文として掲載されている。このワークショップ報告書およびOECD DNT-IVB専門家会議から得た情報から、DNTリスク評価におけるOECD DNT-IVBの位置づけ、および今後の方向性(課題)が明確になった。なお、このワークショップは2024年9月28～30日にドイツ、コンスタンツで開催され、OECD事務局7名に加え、発達神経毒性学、in vitro 毒性学、NAMs開発、PBKモデル、農薬・化学物質規制の専門家である79名の政府機関、国際機関、産業界、受

託研究機関、学术界、NGO関係者が出席していた。

OECDは DNT-IVB専門家会議を介して、DNT-IVBの化学物質リスク評価への導入を目指し、DNT-IVBデータを統合・解釈するためのIATA枠組みの開発、化学物質のDNT潜在性を評価するために必要な要素の抽出を試みてきた。

現在、OECD DNT-IVB専門家会議メンバーにより、神経発生各過程の変化を検出する17種類のin vitro試験法が開発されている。2023年には、DNT-IVBの1つ以上のアッセイで476化合物が試験され、81化合物が17すべてのアッセイで試験された。現在ではさらに化合物数は増えており、これらの結果は将来、US EPAのToxCastプログラムに公開される予定である。

これまでDNT-IVBの不確実性として、DNT-IVB内の試験間でのデータ不足、メカニズム情報の限定性、曝露データの不足、試験やデータ解析・解釈における信頼性のばらつきが挙げられていた。しかし、蓄積されてきたケーススタディから、OECD DNT-IVBと他のNAMs（PBPKモデル、ゼブラフィッシュ胚行動試験、オリゴデンドロサイト分化試験、脳オルガノイド、ニューロスフェア手法、脳スライスモデル、cell painting法など）を組み合わせ、AOP（Adverse Outcome Pathways）に基づき統合的試験・評価アプローチ（IATA）を実施することにより、DNT-IVBを用いたDNT評価の可能性を高めてきた。例えば、農薬におけるDNT-IVBの応用として、（1）従来のin vivoデータが欠如または不十分な場合に、データギャップを補う、（2）in vivo結果が不明確な場合に証拠の重みづけ評価（WoE）において有益、（3）毒性学的参照値の導出における不確実性係数の精緻化に利用、（4）相対的な発達神経毒性の検出への利用、が提案されている。これらの結果により、追加の動物実験（OECD TG426）要求の有無を判断するスキームである。

一方、（1）専門家判断に大きく依存すること、（2）AOPが公式に承認されていない場合や、標準化されたIATAの枠組みがない場合、体系的な方法でAOPに基づくIATAを作るには多くのリソースと専門知識が必要であり、新しい評価方法を作るの時間がかかり人材確保も必要なこと、（3）一部の試験法については、結果の解釈に追加のガイドラインが必要であること、（4）定量的な「in vitro」から「in vivo」への外挿を行うために、PBK（生理学的動態）モデルの導入・標準化や計算モデルが必要である、といった課題も明確になってきた。

また、US-EPA、EFSAともにDNT-IVBを含むNAMsデータを予備的にDNT評価に使用し始めたことも報告された。

さらに暫定的ではあるが、DNT評価方法におけるDNT IATAフレームワーク案も提案された（添付資料3）。

Tier 0 - 計算モデル／ハイスループットバイオアクティビティ による評価対象化学物質の優先順位付け

Tier 1 - DNT IVB (OECD, 2023) の実施

Tier 2 - 確認試験／Orthogonal Assays : Tier 1のリプリケート数や試験濃度を増加させること、異なる方法で同じ生物学的プロセスを評価する試験の実施、複数種での試験を含む。

Tier 3 - Complex models : 脳領域特異的な複雑な3Dモデル、ゼブラフィッシュ胚またはその他の代替種、特定のMIEまたはKEの測定、バリア動態モデル（血液脳関門、胎盤関門）、代謝能の導入を含む。ラットを用いた機序解明を目的とした動物試験も含む。

Tier 4 - 動物試験 : OECD/EPAガイドライン試験

また、ゼブラフィッシュを用いたDNT試験に関して、OECD DNT-IVBには含まれていないが、専門家チームにより検討は継続されている。

改良された統一プロトコール下で、4つのグループにより28化学物質（化学物質名不明）が検証されたが、微小な行動影響の検出には施設間に差異があり、信頼性および再現性に問題が残った。原因追究は継続予定である。ゼブラフィッシュ胚を用いた試験の有用性を高めるためには、ヒトとゼブラフィッシュの行動差異、ゼブラフィッシュ胚の化学物質動態（吸収、代謝、排泄）に関するデータの蓄積が必要と考えられた。

OECD DNT-IVB専門家グループとして、DNT-IVBのDNTリスク評価に導入するためには、

- （1）ケーススタディの継続
- （2）DNT IATAフレームワークの更新
- （3）DNT-IVBのDefined Approachesの決定
- （4）Tiered testing および Complex Modelsを用いた適用事例の継続
- （5）DNT-IVBの技術移転および再現性の確認

について、検討を継続していくことが明らかになった。

また、技術移管および施設間の検証を進めるために、

（1）DNT-IVBの商業化、（2）OECDガイダンスへのアップデートに向けた議論、（3）規制当局での利用に関連する補完的な側面（例：規制担当者の研修）についても、検討を開始する予定である。

2. DNT陽性・陰性対照物質の選定

昨年度までに精査したOECD DNT-IVB文書に掲載されている動物実験の結果に基づき、170物質についてDNT陽性対照（添付資料1）および陰性対照（添付資料2）のリストを再確認した。

その内訳は下記の通り。

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

ワークショップ報告書内のケーススタディで記載されていた化学物質は以下の通りであるが、これ以外にも100化合物以上は検討されていた。US-EPAが所有するToxCastデータから公開可能な化学物質が選択されたと考えられる。

芳香族OPFR

（トリフェニルリン酸、イソプロピル化フェニルリン酸、2-エチルヘキシルジフェニルリン酸、トリクレシルリン酸、イソデシルジフェニルリン酸、tert-ブチルフェニルジフェニルリン酸）

ハロゲン化OPFR

（トリス（1,3-ジクロロ-2-プロピル）リン酸、トリス（2-クロロエチル）リン酸）

ストロビルリン系殺菌剤ピコキシストロビン
ネオニコチノイド系殺虫剤のチアクロプリド
ペルフルオロアルキル化合物（PFAS）160種
L-グルホシネート異性体（DL-グルホシネートの異性体）
ジクロラン（DCNA）
デルタメトリン
フルフェナセット
アセタミプリド
acibenzolar-s-methyl

メトホルミン
パラチオン

これらのうち、陽性対照物質リストに掲載されていた化学物質は、チアクロプリド、デルタメトリン、パラチオンの3物質、陰性対照物質リストに掲載されていた化学物質はメトホルミンのみであった。各ケーススタディでは、DNT-IVBに加え、各種NAMs手法（in silico、in vitro、ゼブラフィッシュなど）を導入し検討されたが、各化合物のDNTポテンシャルの有無までは結論付けられていないため、DNT化学物質リストには掲載しなかった。

2025年3月に開催された専門家会議（web会議）において、現行のin vivo 試験から収集された化学物質リストから、技術移転および再現性確認を明確にするためにin vitro試験実施用の被験物質リストを作成することになった。ワークショップではDNT陽性および陰性物質各10化合物（合計20化合物）が提案された。2025年4月にサブグループができ検討の場が作られたが、その後報告はなく、2026年3月にこのグループ解散したと報告を受けた。

3. OECD TG421およびTG422の調査結果

甲状腺ホルモン測定対象動物が成獣動物に加えて出生児についても追加要求されたOECDテストガイドライン改正時期(2018年)を考慮し、2010年から2025年を調査対象期間とした結果、39化合物が評価されていた。

内訳は下記の通り。

	TG422	TG421
TG改正前	26	2
TG改正後	13	0

化合物リストには試験実施時期、遵守したテストガイドライン、甲状腺ホルモン関連項目（T₃、T₄、TSH）、器官重量および病理組織学検査の結果を記した（添付資料4）。なお、T₄濃度は全試験について測定されていたが、他2項目については未測定試験もあった。

甲状腺機能低下によりDNT誘発の懸念が既に議論されている化合物（Perfluorohexadecanoic acid）および内分泌かく乱物質作用が懸念されている化合物（Benzyl salicylate）が各1化合物ずつ含まれていた。

なお、既に作成したDNT陽性・陰性化学物質リストとの重複はなかった。

甲状腺のホルモン濃度変動より病理組織学変化が最も鋭敏なランドマークであるとEFSAは報告したが（EFSA2025 annual report）、本調査結果では、甲状腺ホルモン濃度に変化がなく病理組織学検査において甲状腺濾胞細胞肥大が5化合物に認められた。このうち3剤は肝臓重量増加、肝細胞肥大が認められたことから、肝酵素が関与している可能性は考えられた。残り2剤は親動物の甲状腺ホルモン濃度低下、甲状腺および肝臓重量の増加が認められた（1, 3, 5-Trihydroxybenzene、2-Mercaptobenzimidazole）。

一方、親動物の甲状腺ホルモンが有意に低下した9化合物のうち病理組織学的検査が検出された化合物は先述した2化合物であった。

なお、児動物の甲状腺ホルモン濃度に変化をもたらした化合物は今回調査した39化合物にはなかった。

今後、他試験結果も加味して評価した際に次世代の甲状腺機能への影響が懸念された場合には、児の脳発達への影響を確認するために有用なリストとなった。

D. 結論

OECD DNT-IVB専門家会議およびOECD ワークショップ議事録から情報収集した結果、IATAにおける農薬のDNT証拠の重みづけ（WoE）評価に、17種のDNT-IVB試験データを統合し、階層型の評価過程によりDNTリスク評価を実施することを目標とすることが明らかになった。DNT-IVBのリスク評価への利用方法の方針が明確になったのは大きな成果であった。

DNT陽性対照・陰性対照リストについて、動物実験結果（研究論文も含む）および専門家による化学物質の選択により、陽性対照物質103化合物、陰性対照物質67化合物が選出された。この化学物質リストを用いて2023年の時点では、DNT-IVBの1つ以上のアッセイで476化合物が試験され、17のすべてのアッセイで81化合物が試験された。現在もケーススタディで検証が継続されている。検討化学物質数に加え、水に難溶性の化学物質、培養系に代謝因子を追加すべき化学物質など、留意して選択をしていく必要がある。

妊娠期甲状腺機能低下によるDNT発現に関しても化合物リスト作成が必要であるが、未だ評価法が曖昧であることから、既存試験データの精査も慎重に行うべきである。

本格的なDNT-IVBのリスク評価への導入に向けて、今後も、欧米動向の継続調査が必要であると考えられた。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発

1. 論文発表

1) Kenji Ohya, Shouhei Hirose, Kohei Nishikaku, Takahiro Ohnishi, Kenichi Lee, Sunao Iyoda, Akiko Kubomura, Yukihiro Akeda, Katsumi Mizukami, Tomikatsu Suzuki, Kenji Takinami, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Takashi Inoue, Yukiko Hara-Kudo. Genomic features and pathogenicity of atypical diarrheagenic Escherichia coli from a large foodborne outbreak *International Journal of Food Microbiology* 434 (2025) 111134-

2) 久木友花, 関根秀一, 田村亜紀子, 中川翔太, 額田祐子, 齋藤和智, 小野 敦, 栗形麻樹子, 廣田衛彦, 豊田明美, 畑尾正人, 高橋祐次, 足利太可雄, 山田隆志. 医薬部外品申請におけるNext Generation Risk Assessment (NGRA) の活用に向けた事例研究ーリードアクロスによる2-Isobutoxyethanolの発生毒性予測ー *日本香粧品学会誌* Vol. 49 (4), 264-274 (2025)

3) 西村拓也, 大久保佑亮, 直田みさき, 鈴木唯, 鈴木睦, 渡部一人, 中澤隆弘, 栗形麻樹子, 小野寺博志, 平林容子. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床安全性評価の課題と展望 ー本邦の承認事例に基づくICH S6ガイドライン改訂に向けた考察ー *Translational and Regulatory Sciences*. accepted (2026. 04. 03)

2. 学会発表

1) 栗形麻樹子：第 65 回日本先天異常学会学術集会 DNT 委員会企画シンポジウム：周産期甲状腺機能低下と次世代の神経発達、非臨床試験の役割「先天異常わが国における化学物質の甲状腺影響評価に関する調査報告」2025. 07. 25（伊勢市）

- 2) 諫田泰成、桑形麻樹子：日本動物実験代替法学会
第 38 回大会シンポジウム 4：甲状腺ホルモンに
関する新たな動物実験代替法の国際動向「甲状腺
ホルモンと発達神経毒性」2025. 11. 03（横浜）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

添付資料 1 DNT陽性化学物質リスト

添付資料 2 DNT陰性化学物質リスト

添付資料 3 DNT評価におけるIATAフレームワーク案

添付資料 4 甲状腺評価に特化した既存化学物質一覧

添付資料 1
DNT陽性対照物質

添付資料 1

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

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiation	hNP1 App	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
1	Acrylamide	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N						N			N	P
2	Allethrin	農	Positive			N														
3	Aluminum	化	Positive																	
4	6-aminonicotinamide	化	Positive	P	N	P	N	N	N	N										
5	Amphetamine	医	Positive	N	N		N	N	N	N										
6	Arsenic	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
7	Aspartame	化	Positive																	
8	Azacytidine	医	Positive																	
9	Benomyl	農	Positive																	
10	Benzene	化	Positive																	
11	Bisphenol A	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
12	Bis(tri-n-butyltin)oxide	化	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
13	Bromodeoxyuridine	化	Positive																	
14	Butylated hydroxyanisole	化	Positive																	
15	Cadmium	化	Positive	N	N	P	N	N	N	N		P	P	P		P		P	P	P
16	Caffeine	化	Positive	N	N	N	N	N	N	N										
17	Carbamazepine	医	Positive	N	N	N	N	N	N	N										
18	Carbon monoxide	化	Positive																	
19	Chlordecone	農	Positive																	
20	Chlordiazepoxide	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
21	Chlorinedioxide	化	Positive																	
22	Chlorpromazine	医	Positive	N	N	P	N	N	P	P		N	N	N		N	P	N	N	N
23	Chlorpyrifos	農	Positive	N	N	P	N	N	P	N		N	N	N		N		P	P	N

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

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Compound	分類	Positive or Negative	Cortical Initiation	Cortical Maturation	Cortical MEA	Cortical Synapto	hN Initiation	hNP1 App	hNP1 Prolif	NPC1	NPC2a	NPC2b	NPC2c	NPC3	NPC4	NPC5	UKN2	UKN4	UKN5
24	Cocaine	医	Positive	P	N	N	N	N	N	N										
25	Colcemid	化	Positive																	
26	Colchicine	医	Positive	P	N	P	N	P	P	N										
27	Cyclophosphamide	医	Positive	N	N	P	N	N	N	N										
28	Cypermethrin	農	Positive			P														
29	Cytosine Arabinoside	医	Positive	N	N	P	N	N	P	P										
30	DDT, p,p'-	農	Positive																	
31	Deltamethrin	農	Positive	N	N	P	N	N	N	N		P	N	N		P		P	N	P
32	Dexamethasone	医	Positive	P	N	N	N	N	N	N							P			
33	Diazepam	医	Positive	P	P	P	N	N	P	P										
34	Diazinon	農	Positive																	
35	Dieldrin	農	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
36	Di-(2-ethylhexyl) phthalate	化	Positive			N														
37	Diethylstilbestrol	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
38	Dioxin	化	Positive																	
39	Diphenylhydantoin	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	Domoic acid	化	Positive			P						N	N	N		N	N	N	N	N
41	Epidermal Growth Factor	化	Positive																	
42	Ethanol	化	Positive																	
43	Ethylene thiourea	化	Positive																	
44	Fluoride	化	Positive	N	N		N	N	N	N										
45	5-Fluorouracil	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										
46	Fluoxetine	医	Positive	N	N	P	N	N	P	N										

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

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

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

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

添付資料 2

D N T陰性対照物質

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

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

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

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

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

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

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

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

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

添付資料 3

フレームワーク案

—DNT-IVB 評価を含めた階層型 DNT 評価案—

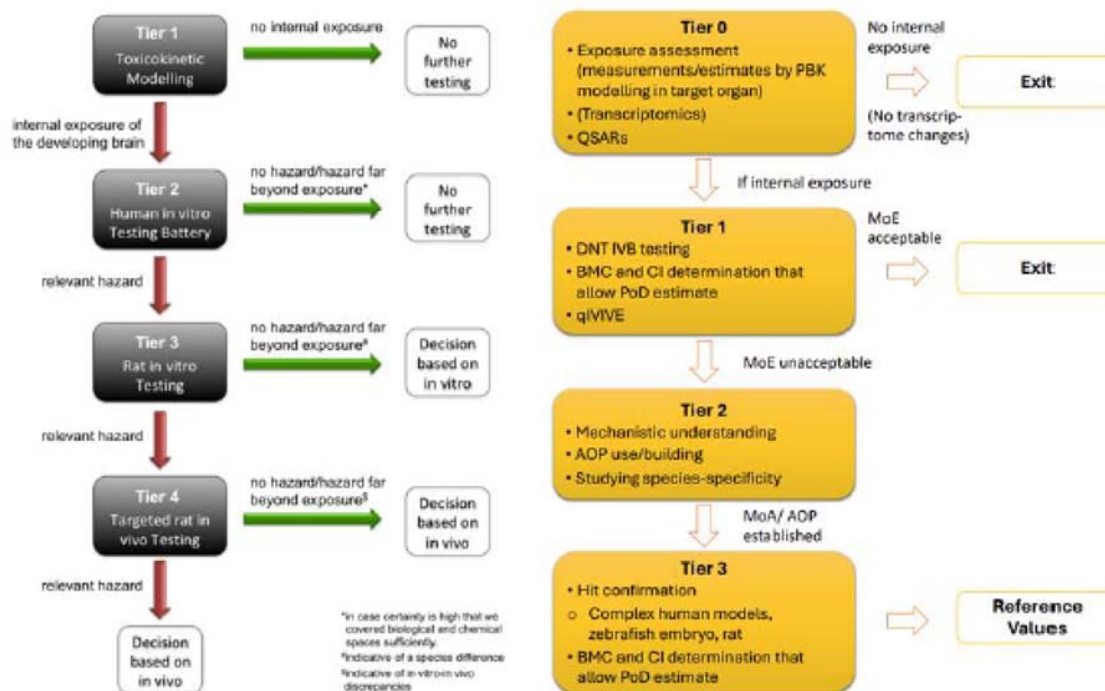


Fig. 1: Proposed Tiered Approaches for DNT containing DNT IVB evaluation. A. A tiered testing approach was suggested in Masjosthusmann et al. (2020). B. The current tiered approach explored at the October 2025 OECD workshop for the embedding of the DNT IVB into tiered approach. For explanation, please see text.

添付資料 4
甲状腺ホルモン測定結果

化合物名	CAS No.	TG no.	報告年	甲状腺ホルモン変動		臓器重量 (視動物)		病理組織学検査	
				成獣	児動物	甲状腺	肝臓	甲状腺	肝臓
1 Diethyl maleate	141-05-9	TG421	2012	NS	NE	→	↑↑♂	ND	ND
2 Methyltriethoxysilane	2031-67-6	TG421	2012	↓	NE	↑↑♂♀	↑↑♂♀	ND	ND
3 2-[2-(Methoxymethylethoxy)methylethoxy]propanol	25498-49-1	TG422	2025	↓	NS	↑↑♀ (交配群) (用量依存性なし)	↑↑♂♀	ND	ND
4 1-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)propane	111109-77-4	TG422	2022	↓	NS	→	↑↑♂♀	ND	ND
5 1,4-Bis(isopropylamino)anthraquinone	14233-37-5	TG422	2012	NS	NE	→	↑↑♂♀	ND	肝細胞肥大
6 Poly(1,1-difluoroethylene)	24937-79-9	TG422	2012	NS	NE	→	→	ND	ND
7 2-[2-[(2-Ethylhexyl)oxy]ethoxy] ethanol	1559-36-0	TG422	2022	↓	NS	→	↑↑♂♀	ND	肝細胞肥大
8 2-tert-Butylcyclohexyl acetate	88-41-5	TG422	2013	NS	NE	→	↑↑♂♀	濾胞細胞の肥大	肝細胞肥大
9 2-Aminoethanesulfonic acid (Taurine)	107-35-7	TG422	2011	NE	→	→	→	ND	ND
10 2-Ethylhexyl palmitate	29806-73-3	TG422	2022	NS	NS	→	→	ND	ND
11 2,2'-[Ethane-1,2-diylbis(oxyethylene)]bis(oxirane)	2224-15-9	TG422	2013	NS	NE	↑↑♂ (用量依存性なし)	→	ND	ND
12 2,4-Dimethylbenzenesulfonic acid	88-61-9	TG422	不明	NS	NE	→	→	ND	肝細胞肥大
13 3-Methylpentane	96-14-0	TG422	2020	NS	NE	↓↓♀ (交配群) (用量依存性なし)	↑↑♂♀	ND	ND
14 4-Chlorobenzoyl chloride	122-01-0	TG422	2011	NS	NE	→	→	ND	ND
15 Bis(2-ethylhexyl) 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylate	2915-49-3	TG422	2011	NS	NE	→	↑↑♂♀	ND	肝細胞肥大
16 4-Methylpyridine	108-89-4	TG422	2013	NS	NE	→	→	ND	肝細胞肥大
17 4-Methylbenzyl alcohol	589-18-4	TG422	2022	↓	NS	→	↑↑♂♀	ND	ND
18 4,4'-Bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl	1667-10-3	TG422	2011	NS	NE	→	↑↑♀	ND	ND
19 6H-Dibenzo[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide	35948-25-5	TG422	2011	NS	NE	→	→	ND	ND
20 N-[(2-Methylpropoxy)methyl]acrylamide	16669-59-3	TG422	2023	NS	NS	↑↑♀ (背景データの範囲内)	↑↑♂♀	ND	ND
21 Isooctane	26635-64-3	TG422	2020	NS	NS	→	↑↑♂♀	濾胞細胞の肥大	ND
22 Isotridecyl stearate	31565-37-4	TG422	2014	NS	NE	↑↑♂ (用量依存性なし)	↑↑♀	ND	ND
23 Isononane	34464-40-9	TG422	2020	NS	NS	↑↑♂ (用量依存性なし)	↑↑♂♀	ND	ND
24 Isohexane	73513-42-5	TG422	2021	NS	NS	→	→	ND	ND
25 Ethyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium ethyl sulfate	19309-23-0	TG422	2020	NS	NS	→	→	ND	ND
26 Octanoic acid	124-07-2	TG422	2013	NS	NE	→	→	ND	ND
27 Benzyl salicylate	118-58-1	TG422	2017	↓	NS	→	↑↑♂、↑↑♀ (交配群)	ND	ND
28 Thiophenol	108-98-5	TG422	2011	NS	NE	→	↑♂♀ (交配群)	ND	ND
29 Dodecylloxirane	3234-28-4	TG422	2021	NS	NS	→	↑↑♂♀	ND	ND
30 Sodium 2-hydroxypropanoate	312-85-6	TG422	2011	NS	NE	→	↑↑♀ (交配群)	ND	ND
31 Bis(3,5-dibromo-4-(dibromopropoxy)phenyl)sulfone	42757-55-1	TG422	2012	NS	NE	→	→	ND	ND
32 Propylene tetramer	6842-15-5	TG422	2013	NS	NE	↑↑♀	↑↑♂♀	濾胞細胞の肥大	肝細胞肥大
33 Perfluorohexadecanoic acid	67905-19-5	TG422	2012	↓	NS	↑↑♂	↑↑♂	ND	肝細胞肥大
34 Poly(oxyethylene)	30525-89-4	TG422	2021	NS	NS	→	→	ND	ND
35 Polyoxethylene sorbitan trioleate	9005-70-3	TG422	不明	NS	NE	→	↑↑♀	ND	ND
36 Methyl hexadecanoate	112-39-0	TG422	2021	NS	NS	→	→	ND	ND
37 Methylcyclohexane	108-87-2	TG422	2013	NS	NE	→	↑↑♀	ND	ND
38 1,3,5-Trihydroxybenzene	108-73-6	TG422	2014	↓	NS	↑↑♂♀	→	濾胞細胞の肥大	ND
39 2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1	TG422	2012	↓	NS	↑↑♂♀	→	濾胞細胞の肥大	ND

NE: Not examined, ND: Not detected, NS: Not significant

令和 6 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（23KD1003）

達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「構成的手法に基づいた発生期の in vitro DNT 試験法の開発（in vitro）」

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

要旨

発達神経毒性（DNT）は、発生期（胎生期）あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかし、神経系の発生・発達は極めて複雑であり、詳細な有害発現経路（AOP）の積上げのみで、DNT の試験法開発や実体説明が進むとは考えにくい。本研究では、DNT を発生期と生後発達期とに分け、2 つの独自技術による課題の解決を試みる。本分担研究課題は、そのうち発生期の in vitro 試験法の開発であり、独自開発したヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法（DynaLux/c）の DNT 試験への改良を目的とする。

DynaLux/c は、血清応答因子（Serum response factor: SRF）シグナルレポーターを導入したヒト iPS 細胞を用い、被験物質による FGF 誘導性 SRF シグナルへのかく乱作用をリアルタイムに計測する試験法である。令和 5 年度には、KronosHT を用いた 48 時間のリアルタイム計測法を構築し、令和 6 年度には、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c により、DNT 陽性対照物質 7 種および陰性対照物質 5 種を正確度 100% で分類できることを示した。本年度は、NPCs を用いた評価系の条件検討と、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c による追加物質の評価を行った。

NPCs を用いた評価系では、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も高い SRF 応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められない、または未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c よりも小さい応答にとどまった。一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c では、本年度新たに評価したアクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A を DNT 陽性として分類できた。フタル酸ビス（2-エチルヘキシル）（DEHP）、では陰性であったが、主要代謝物である MEHP は陽性であったことから、DEHP 関連 DNT の in vitro 評価では主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。また、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質として、ニコチン、フルオキセチン、カフェインを評価したところ、ニコチンおよびフルオキセチンは陽性、カフェインは陰性として分類された。

以上より、本分担研究では、DynaLux/c のリアルタイム化により、発生期 DNT 評価に利用可能なシグナルかく乱評価基盤を構築し、DNT 評価対象物質に対する検出性を示した。NPCs を用いた評価系についてはさらなる条件検討が必要である一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c は、DNT 評価対象物質のシグナルかく乱作用を検出できる有用な in vitro 試験系となり得ると考えられた。

A. 研究目的

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

従来の生細胞ルシフェラーゼアッセイ法を用いた FGF-SRF シグナル計測では、実験者が CO₂インキュベーター内で 96 穴プレート培養している細胞を、計測のたびにルミノメーターへ移動し、測定後に再び CO₂インキュベーターへ戻す必要があった。この方法は定点観察であるため、特に夜間に生じるシグナルかく乱作用を正確に捉えにくいことに加え、測定時のプレート移動に伴う物理的影響が iPS 細胞に及ぶ可能性が課題であった。実際、従来法では夜間に不自然な波形変動や標準偏差の増大が認められていた。

令和 5 年度は、スループット性と再現性を高めるために KronosHT(ATTO 社)を用いたリアルタイム計測による DynaLux/c を構築した。令和 6 年度の研究では、構築したリアルタイム in vitro 発生毒性試験法を用いて、分担研究者の桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の一部に関して試験を実施した。また、DNT 陽性物質には、神経伝達物質受容体、トランスポーター、イオンチャンネル、細胞内シグナルなど、神経発達・神経機能関連標的に作用するものが含まれる。そこで、これらの作用をより神経系に近い細胞状態で捉えることを目的として、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞

(neural precursor cells: NPCs) へ分化させた評価系についても検討した。

令和 7 年度(最終年度)は、これまでの結果を基に正確度およびスループット性の高い in vitro DNT 試験系の開発を進める。

B. 研究方法

神経発達・神経機能関連標的に作用する DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を、より神経系に近い細胞状態で捉えるため、SRF 活性レポーター細胞を NPCs へ分化させた評価系を検討した。NPCs への分化には STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用い、マーカー遺伝子の発現により分化状態を確認した。NPCs におけるリアルタイム計測条件を設定するため、Spike リガンドおよびアッセイ培地を比較し、DNT 陽性物質に対する応答を検討した。

また、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c により、DNT 陽性対照化学物質の評価を行った。96 穴プレートに播種した SRF 活性レポーター細胞に被験物質および FGF を添加し、KronosHT (ATTO 社)を用いて 48 時間の発光波形をリアルタイムに取得した。化学物質処理群の波形を溶媒対照群と比較し、Log 標準化した波形差の面積をシグナルかく乱面積 (Area Between the Curves: ABC) として算出した。被験物質は、最大溶解量または一部 IC₆₅ を最大濃度とし、2 倍希釈による 4 濃度で評価した。

C. 研究結果及び考察

まず、神経発達・神経機能関連標的に作用

する DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を、より神経系に近い細胞状態で捉えることを目的として、NPCs に分化させたヒト iPS 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法の構築を検討した。昨年度までに、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて SRF 活性レポーター細胞を NPCs へ分化させ、マーカー遺伝子の発現により NPCs への分化を確認した。また、NPCs における SRF シグナルの Spike リガンドとして、bFGF、IGF、EGF、BDNF を検討し、bFGF が最も高い反応性を示すことを明らかにしている。

本年度は、NPCs を用いたリアルタイム計測条件をさらに最適化するため、アッセイ培地の検討を行った。NPCs への分化および維持に用いる STEMdiff Neural Progenitor 培地、神経生理学用の無血清培地である BrainPhys Neuronal 培地、ならびに標準 DynaLux/c で用いる APEL2 培地を比較した。その結果、APEL2 培地において最も高い SRF 応答が認められた。

次に、APEL2 培地における Spike リガンドとして、アデノシン三リン酸 (ATP) およびグルタミン酸ナトリウムを新たに検討したが、これらの刺激では明確な SRF 活性の誘導は認められなかった。以上より、NPCs を用いたリアルタイム計測においても、SRF 応答を指標とする場合には、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c と同様に、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も適していると考えられた。

この条件を用いて、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質として、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸について、NPCs を用いた DynaLux/c を実

施した (図 1)。カフェインおよびイミダクロプリドでは明確なシグナルかく乱作用は認められなかった。また、バルプロ酸ではシグナル抑制傾向がみられたものの、そのかく乱強度は未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c と比較して小さかった。これらの結果から、本年度検討した条件では、NPCs を用いた DynaLux/c により、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質のシグナルかく乱作用を明確に検出するには至らなかった。NPCs を用いた評価系については、分化段階、培地条件、刺激条件、計測時点などを含め、さらなる条件検討が必要であると考えられた。

次に、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c による DNT 評価対象物質の試験を実施した。令和 6 年度までに、DNT 陽性対照物質 7 種〔サリドマイド (THA)、バルプロ酸 (VPA)、メトトレキサート (MTX)、ハイドロキシウレア (HU)、レチノイン酸 (RA)、フルオロウラシル (5-FU)、ブロモデオキシウリジン (BrdU)〕および陰性対照物質 5 種〔ペニシリン G (PenG)、サッカリン (SAC)、シメチジン (CM)、D-カンファール (CAM)、ジフェンヒドラミン (DHM)〕について、ROC 曲線解析により設定した判定閾値に基づき、正確度 100% で分類できることを示している。

本年度は、DNT 評価対象物質として、アクリルアミド (AcA)、ビスフェノール A (BPA)、メチル水銀 (MeHg)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP)、および DEHP の主要代謝物であるフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP) の 5 物質を評価した。その結果、アクリルアミド、メチ

ル水銀、ビスフェノール A および MEHP では、既存の判定閾値を上回るシグナルかく乱が認められ、DNT 陽性として分類された。一方、DEHP では明確なシグナルかく乱は認められず、既存閾値に基づく判定では陰性であった（図 2）。DEHP は DNT 評価対象物質であり、体内で加水分解されて主要代謝物である MEHP を生じる。MEHP は、DEHP の生殖発生毒性に関与する主要な活性代謝物として知られており、近年では神経発達毒性を示す報告 (PMID: 41562039) もあることから、本研究では DEHP に加えて MEHP についても評価した。その結果、親化合物である DEHP では陰性であった一方、主要代謝物である MEHP では明確なシグナルかく乱が認められた。この結果から、DEHP 関連 DNT の *in vitro* 評価では、親化合物だけでなく、主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。

これまでに、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c では、多くの DNT 評価対象物質についてシグナルかく乱を検出可能であることを示してきた。また、別の研究課題において、DynaLux/c 開始時の細胞特性を明らかにするために single-cell RNA 解析を実施したところ、一部の細胞において、神経分化マーカーや神経伝達関連遺伝子の発現が認められた。このことから、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c であっても、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質の影響をシグナル応答の変化として捉えられる可能性があると考えた。

そこで、桑形が精査した DNT 評価対象物質のうち、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有するニコチン、フルオキ

セチン、カフェインについて未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c で評価した。ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体、フルオキセチンはセロトニントランスポーター、カフェインはアデノシン受容体を主な作用標的とする。その結果、ニコチンおよびフルオキセチンでは濃度依存的なシグナルかく乱が認められ、陽性判定された（図 3）。一方、カフェインでは明確なシグナルかく乱は認められず陰性と分類された。OECD の DNT *in vitro* battery においても、ニコチンおよびフルオキセチンは一部の試験で陽性判定を受けているのに対し、カフェインは実施した試験全てにおいて陰性と報告されている。そのため、本研究におけるカフェインの結果は、既存の *in vitro* DNT 評価結果と概ね整合すると考えられた。ただし、カフェインについては、動物試験等で報告される影響、ヒト曝露濃度、および *in vitro* 試験での適用濃度との関係を踏まえた解釈が必要である。

以上の結果から、NPCs を用いた評価系については、本年度検討した条件では明確なシグナルかく乱作用を検出するには至らず、さらなる条件検討が必要であると考えられた。一方で、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c では、今年度追加した DNT 評価対象物質のうち DEHP を除く物質を既存の判定閾値により分類できた。また、DEHP についても、主要代謝物である MEHP では明確なシグナルかく乱が認められた。さらに、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質についても、ニコチンおよびフルオキセチンを陽性、カフェインを陰性として分類で

きた。これらの結果は、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c が、発生期 DNT 評価において有用なシグナルかく乱評価系となり得ることを支持するものである。

D. 結論

本分担研究では、発生期の in vitro DNT 試験法の開発を目的として、ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法である DynaLux/c の DNT 試験への応用を検討した。令和 5 年度には、従来の手動計測に伴う時間解像度および再現性の課題を解決するため、KronosHT を用いたリアルタイム発光計測系を導入し、DynaLux/c による連続的な SRF シグナルかく乱評価系を構築した。令和 6 年度には、本評価系を用いて DNT 陽性対照物質 7 種および陰性対照物質 5 種を評価し、ROC 曲線解析により設定した閾値に基づき、これらの物質を正確度 100% で分類できることを示した。

令和 7 年度は、DynaLux/c の DNT 試験への応用可能性をさらに検証するため、NPCs を用いた評価系の条件検討と、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c による追加物質の評価を行った。NPCs を用いた評価系では、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も高い SRF 応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められない、または未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c よりも小さい応答にとどまった。したがって、NPCs を用いた DynaLux/c については、現時点では標準 DynaLux/c を補完する評価系としての条件が十分に確立しておらず、追加検討が必要であると考えられた。

一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c では、本年度新たに評価したアクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、DEHP および MEHP のうち、アクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、MEHP を DNT 陽性として分類できた。DEHP では明確なシグナルかく乱は認められなかったが、主要代謝物である MEHP ではシグナルかく乱が認められたことから、DEHP 関連 DNT の in vitro 評価では、親化合物だけでなく主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。

さらに、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質としてニコチン、フルオキセチン、カフェインを評価したところ、ニコチンおよびフルオキセチンは陽性、カフェインは陰性として分類された。この結果は、OECD の DNT in vitro battery における報告と概ね整合しており、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c が、神経伝達または神経活動調節に関わる DNT 評価対象物質の一部についても検出性を示す可能性が示された。

以上より、本分担研究では、DynaLux/c のリアルタイム化により、発生期 DNT 評価に利用可能なシグナルかく乱評価基盤を構築し、DNT 評価対象物質に対する検出性を示した。NPCs を用いた評価系についてはさらなる条件検討が必要である一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c は、発生過程に関わるシグナル応答の変化を指標として、DNT 評価対象物質のシグナルかく乱作用を検出できる有用な in vitro 試験系となり得ると考えられた。今後は、物質数の拡充、判定閾値の妥当性検証、再現性評価

を進めることで、発生期の in vitro DNT 試験法としての有用性をさらに明確化する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Koki Murayama, Kashu Mizota, Rieko Matsuura, Yusuke Okubo, Yoshihiro Nakajima, Atsushi Suzuki, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assay Based on Real-Time Monitoring of Fibroblast Growth Factor Signal Disruption in Human Induced Pluripotent Stem Cells. J. Vis. Exp. (224), e68910, doi:10.3791/68910 (2025).

2. 学会発表

Okubo Y., Mizota K, Murayama K, Matsuura R, Mootha A, Kitajima S, Hirabayashi Y, Nakajima Y, Fukuda J : Continuous Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Developmental Toxicity Assay. 20th INTERNATIONAL CONGRESS OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY(2025. 6. 18)

Okubo Y., Murayama K., Matsuura R., Mootha A., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: Real-time Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Toxicity Assay. Joint Meeting of JSCB 77th & JSDB 58th(2025.7.16-17)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, Archana Mootha, 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指標による精巣毒性物質の評価、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025. 7. 2)

佐藤花音, 村山航己, 松浦利絵子, Mootha Archana, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いた新型コロナウイルス感染症治療薬のシグナルかく乱を基にした発生毒性評価、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025. 7. 2)

大久保佑亮, 松浦利絵子, 村山航己, 佐藤花音, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二: シグナルかく乱に着目した in vitro 発生毒性試験とそのリスク評価への展開、第 65 回日本先天異常学会学術集会 (2025. 7. 27)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 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指標による精巣毒性物質の評価、第 65 回 日本先天異常学会学術集会 (2025. 7. 25)

大久保佑亮: シグナルかく乱を指標とする発生毒性試験法 DynaLux/c の開発と行政受入に向けた取り組み、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱指標による生殖毒性物質の評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

佐藤 花音, 村山航己, 松浦利絵子, 中元颯馬, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱に基づく新型コロナウイルス感染症治療薬の発生毒性評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

中元颯馬, 村山航己, 佐藤花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二, 大久保佑亮, 山田隆志: ヒト iPS 細胞を用いた PFAS のシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価: PFAS への適用性と信頼性の検証、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

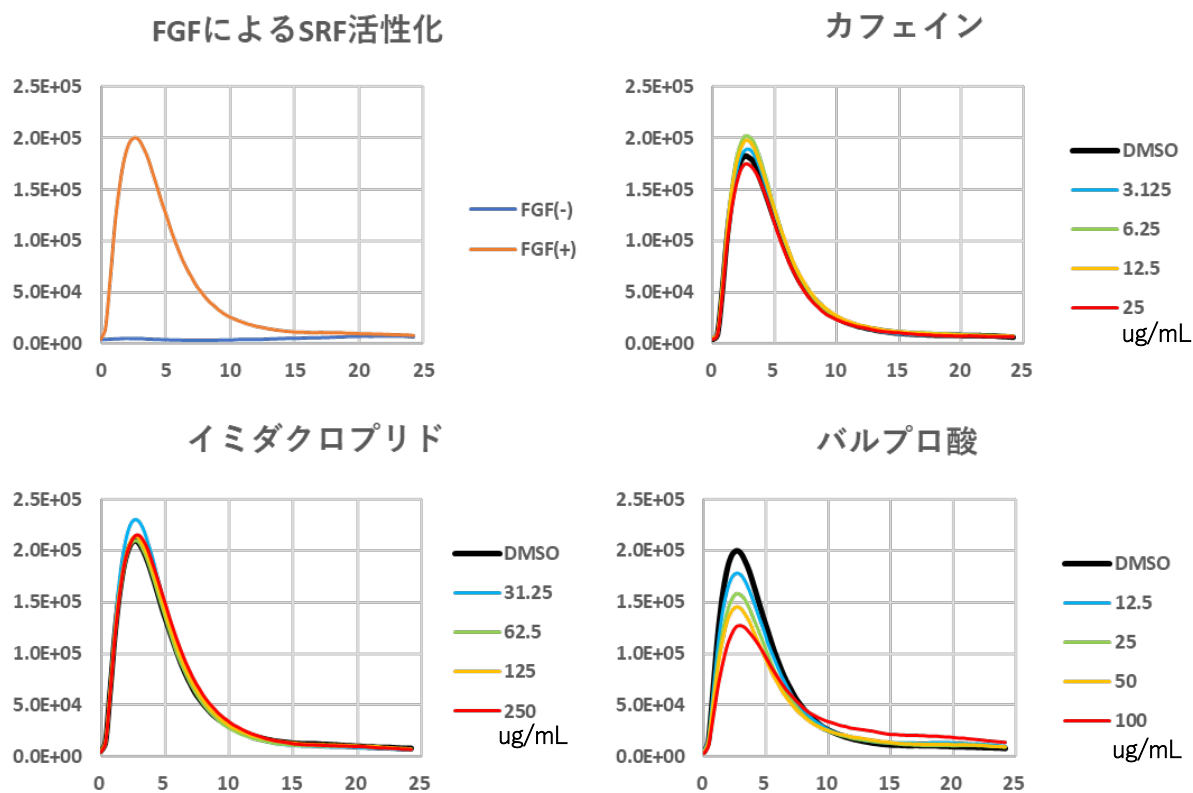


図1：NPCsを用いたリアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイ

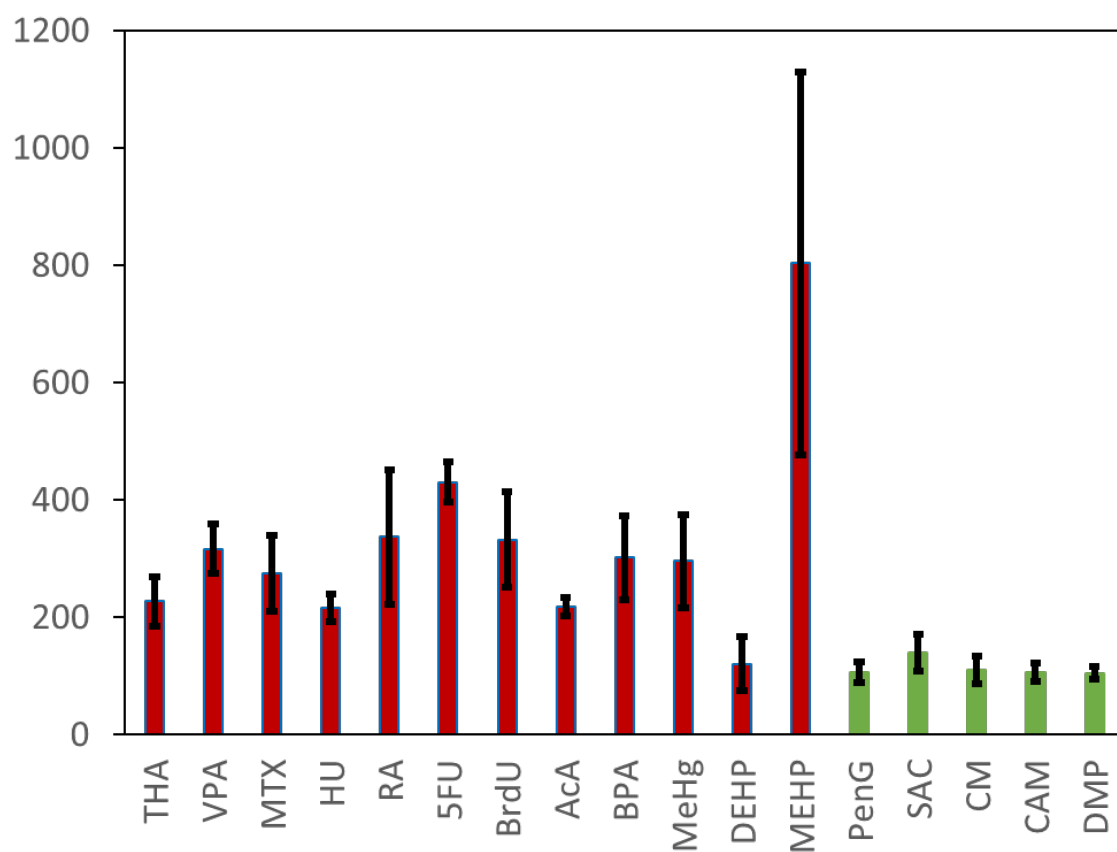


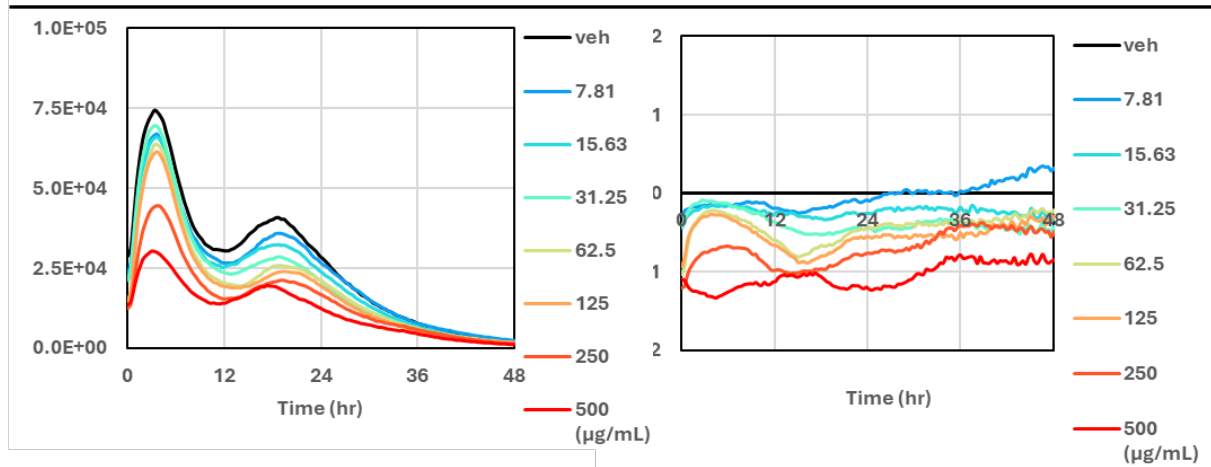
図2：未分化のiPS細胞を用いたDynaLux/cの結果

DNT 陽性対照物質(赤色)、陰性対照部室(緑色)。サリドマイド(THA)、バルプロ酸(VPA)、メトトレキサート(MTX)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノイン酸(RA)、フルオウラシルウラシル(5FU)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、アクリルアミド(AcA)、ビスフェノール A(BPA)、メチル水銀(MeHg)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP)、および DEHP の主要代謝物であるフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP)、ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、D カンファ—(CAM)、ジフェンヒドラミン(DHM)。n=3。 エラーバー：標準偏差。閾値：177.4。

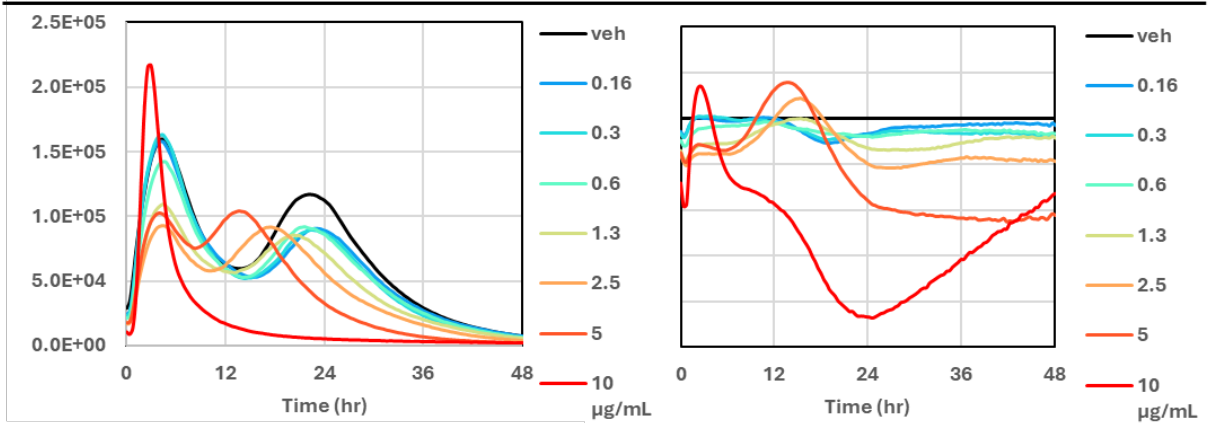
リアルタイム計測

変化率(log2)

ニコチン (Sum of ABC : 373.9 ± 133.2)



フルオキシセチン (Sum of ABC : 505.8 ± 162.6)



カフェイン (Sum of ABC : 97.4 ± 14.9)

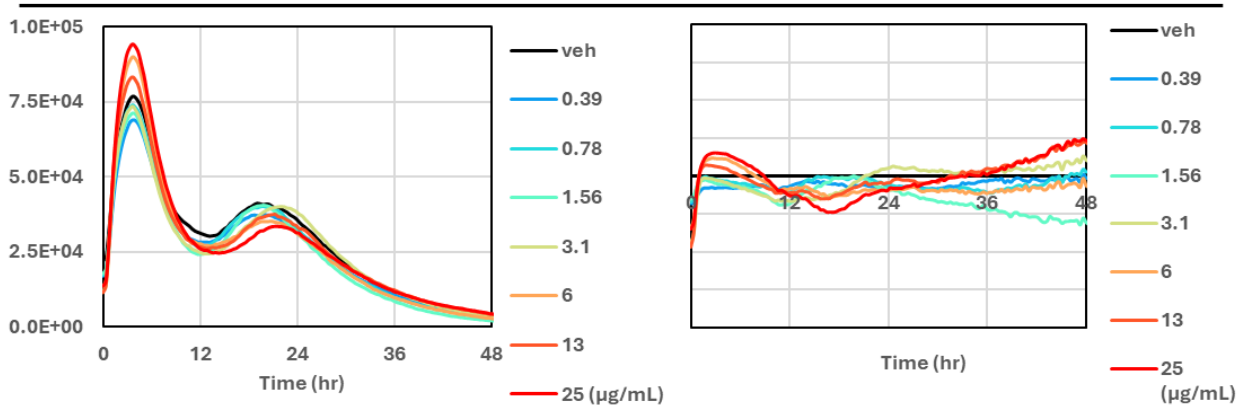


図3：未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c による、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質の評価

Sum of ABC の結果は高い方から 4 濃度の ABC 値の合計を示しており、図2のグラフと比較可能である (閾値 : 177.4)。

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動解析と神経科学的物証の収集」

研究分担者 齊藤 洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

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

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

本分担研究では、この目的の達成に向け、モデル化学物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露することにより、成熟後の中枢神経系への遅発影響を評価し、当該物質の脳発達への影響を明らかにすることを目的とした。令和7年度(今年度)は、昨年度に幼若期マウスへ反復吸入曝露を実施し、成熟後に行動異常(記憶異常)が認められたトルエン曝露群の脳サンプルについて、免疫組織化学による解析を実施した。その結果、細胞増殖マーカーについて、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られ、令和5年度に実施したキシレン曝露マウスと同様に、検出された行動影響と関連する海馬への影響が考えられた。また、モデル揮発性物質として用いたホルムアルデヒド(0、1、10 ppm)について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコルにより実施した。そして、マウスが成熟後(12週齢時)に情動認知行動解析を実施した。その結果、ホルムアルデヒド両曝露群では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。また、高用量曝露群(10 ppm)では、明暗往来試験において暗室待機時間の増加傾向が認められ、これらの結果から不安関連行動への影響が示唆された。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後の遅発性影響として、キシレン、トルエンとは異なる影響ではあるものの、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常を誘発し得ることが示され、ホルムアルデヒドの生後脳発達への有害性が示唆された。

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

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

海馬歯状回における神経新生関連変化については、キシレン曝露群での新生ニューロン(DCX)等の解析結果を踏まえ、本年度は同部位への影響を異なる観点から把握する目的で、比較的初期段階の細胞動態に着目した免疫組織化学的解析を実施した。昨年度の解析にて行動異常(記憶異常)が認められたトルエン曝露群について、行動解析後に10%中性緩衝ホルマリンにて固定した成熟マウス(13週齢)の脳組織からパラフィン切片

(10 μ m)を作製し、免疫組織化学を行った。パラフィン切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールにて段階的に再水和した。HistoVT Oneにより90 $^{\circ}$ C、30分で抗原賦活化処理し、Blocking Oneと共に4 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキング処理した後、一次抗体処理を行い、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。一次抗体には rabbit polyclonal anti-Ki67 (Abcam)を用いた。PBSで洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 および 594 標識抗体 (Invitrogen)を用い、4 $^{\circ}$ Cで2時間処理した。核は Hoechst 33342 で染色した。一次抗体および二次抗体、Hoechst 33342 は、Blocking One および PBS の混合溶液で希釈して用いた。

生後発達期 DNT の分子機序解明に向けた、ホルムアルデヒド吸入曝露による情動認知行動解析：

生後発達期(幼若期)(2~3週齢)雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究の条件に基づいた22時間/日 $\times$ 7日間反復曝露のプロトコルにより実施した。曝露濃度は、先行研究に基づき、長期吸入曝露実験において重篤な病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度として設定した。また、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を実施した。この時期は、シナプスの刈り込みによる神経回路の調整がなされる時期と考えられている。吸入曝露終了後、マウスが成熟後(12週齢時)に自発運動量、情動行動、学習記憶能に着目し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験からなる行動試験バッテリーを実施した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

令和7年度(今年度)は予定通り、ホルムアルデヒド1および10ppm(それぞれ現在の指針値

の10 倍、100 倍程度の濃度) について、生後発達期(幼若期)(2~3週齢) 雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での条件である22 時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施し、成熟後(12週齢時) に情動認知行動を3 種類の試験により解析した。行動解析の結果、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験において、コントロール群と比較して、ホルムアルデヒド両曝露群において、中央滞在時間の有意な減少が認められた(図1)。また、同じく情動行動への影響を検出する明暗往来試験では、ホルムアルデヒド高用量曝露群(10 ppm) において、暗室待機時間について増加傾向が認められた(図2)。主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験においては、コントロール群と比較して、ホルムアルデヒド曝露群において有意な差は認められなかった(図3)。すなわち、生後発達期の化学物質曝露による成熟後(遅発性) の影響として、キシレン、トルエンとは異なる影響ではあるものの、成熟後の行動、特に不安関連行動への影響が示唆された。本行動試験バッテリーにおける変化の全体像を示すため、コントロール群の各試験項目の平均値を100%とした場合の曝露群の平均値の逸脱度を、レーダー図として示した(図4)。また別途、過年度に実施したトルエン吸入曝露にて得られた脳サンプルのうち、海馬歯状回について、免疫組織化学による解析として、細胞増殖マーカーであるKi67を用いた検討を進めた結果、現時点では定性的観察の段階ではあるが、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られており、今後詳細に検討する必要があると考えられた。

D. 結論

令和7 年度(今年度)、ホルムアルデヒド(0、1、10 ppm) について、22 時間/日×7 日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、ホルムアルデヒド曝露群(1、10 ppm) では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。加えて、ホルムアルデヒド10 ppm 曝露群では、明暗往来試験において暗

室待機時間の増加傾向が認められた。これらの結果から、生後発達期のホルムアルデヒド曝露による、成熟後の遅発性影響が示唆された。これまでに検討したキシレンおよびトルエンでは条件付け学習記憶試験において記憶異常が認められた一方、本年度に検討したホルムアルデヒドでは、オープンフィールド試験における結果を主とした不安関連行動への影響(不安の亢進) が示唆された。これらの被験物質はいずれも生後発達期曝露により成熟後の行動影響を生じ得る点で共通しており、生後発達期の脳に対する共通した影響基盤の存在が示唆された。一方で、行動影響の現れ方には差異がみられたことから、各モデル物質の作用特性の違いを反映して、物質ごとに影響を受けやすい神経機能が異なる可能性が考えられた。今後は、関連指標との関係も含めて、これらの点を慎重に検討する必要がある。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito H, Suga K, Fujihara K, Mutsuga M, Yokota S, Nishimura T, Kitajima S. Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. *Exp. Anim*, in press.

2. 学会発表

齊藤洋克, 菅康佑, 藤原恒司, 六鹿元雄, 横田理, 西村拓也, 北嶋 聡: 生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析, 第52 回日本毒性学会学術年会(2025. 7. 3, 沖縄)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

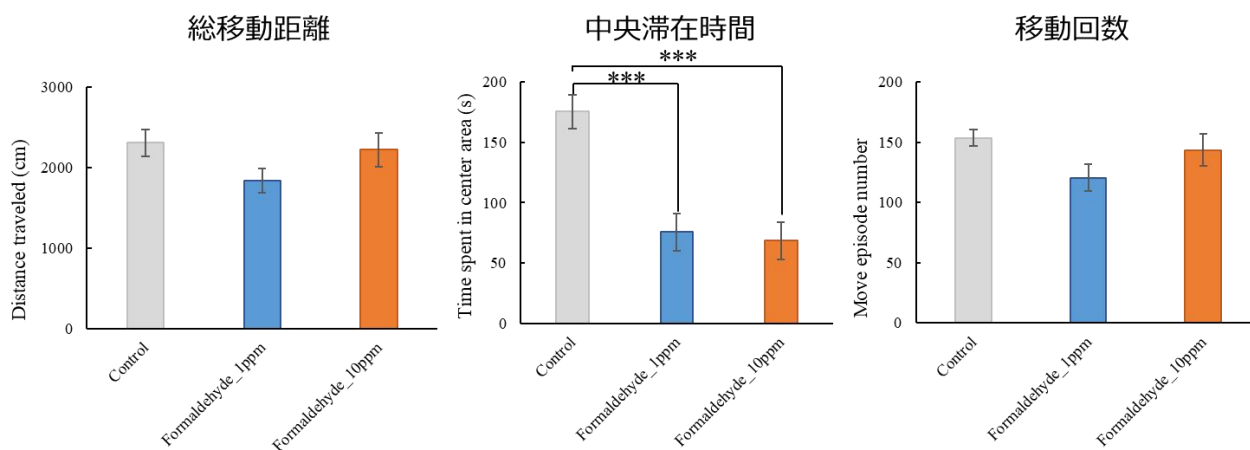
なし

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 吸入曝露 オープンフィールド試験結果

測定時間: 10分

検定項目

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



N=8, Mean $\pm$ S.E., P value (Dunnett's test)
 $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$ vs Control

● ホルムアルデヒド曝露群において、中央滞在時間の有意な減少

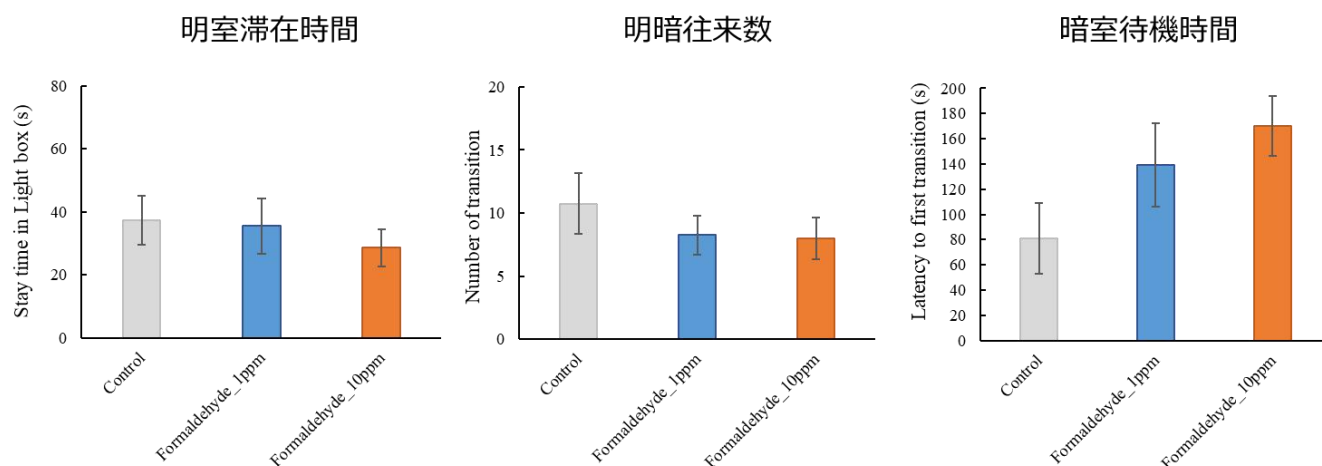
図 1. オープンフィールド試験の結果まとめ

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 吸入曝露 明暗往来試験結果

測定時間: 5分

検定項目

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



N=8, Mean $\pm$ S.E., P value (Dunnett's test)
 $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$ vs Control

● ホルムアルデヒド10ppm曝露群において、暗室待機時間の増加傾向($p < 0.1$)

図 2. 明暗往来試験の結果まとめ

22時間7日間 ホルムアルデヒド1および10ppm 吸入曝露
条件付け(FZ1)、翌日以降に空間-連想記憶試験(FZ2)と音-連想記憶試験(FZ3)の結果

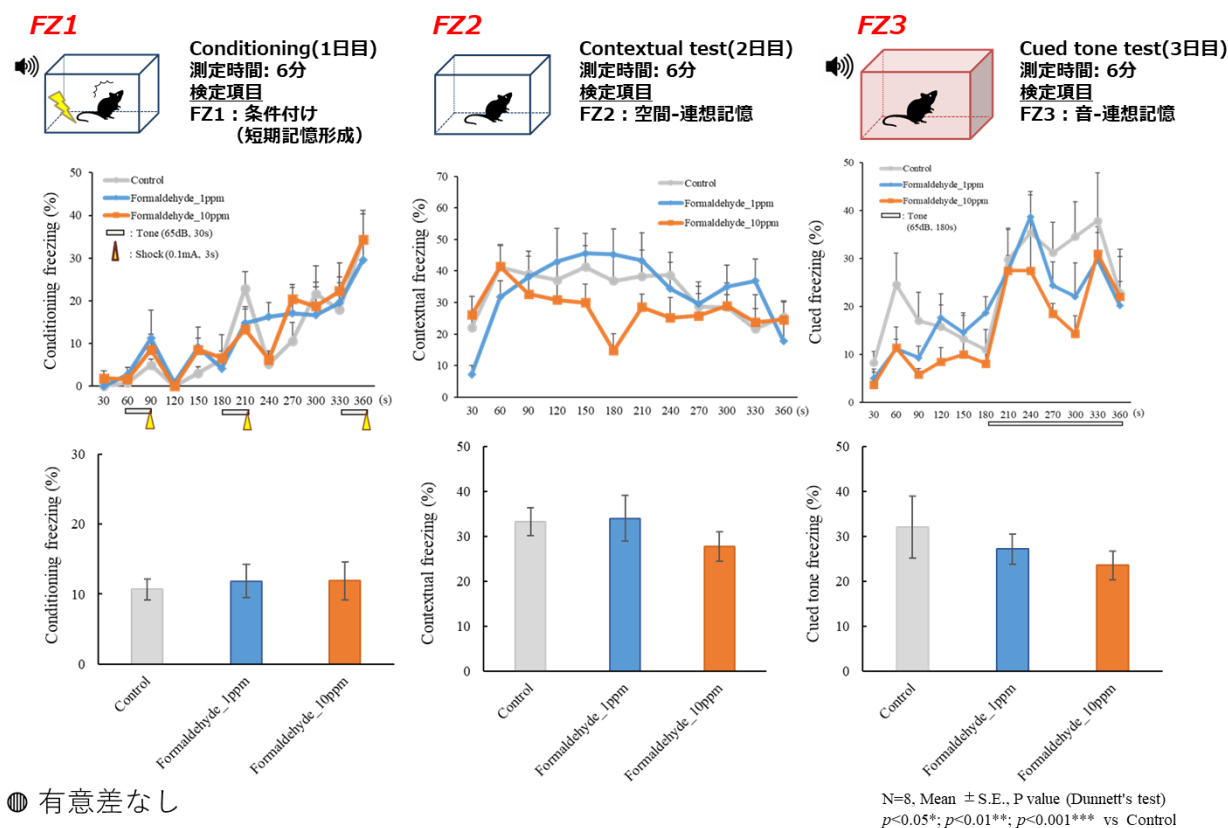


図 3. 条件付け学習記憶試験の結果まとめ

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

(ホルムアルデヒド1および10ppm 22時間7日間吸入曝露による情動認知行動影響のまとめ)

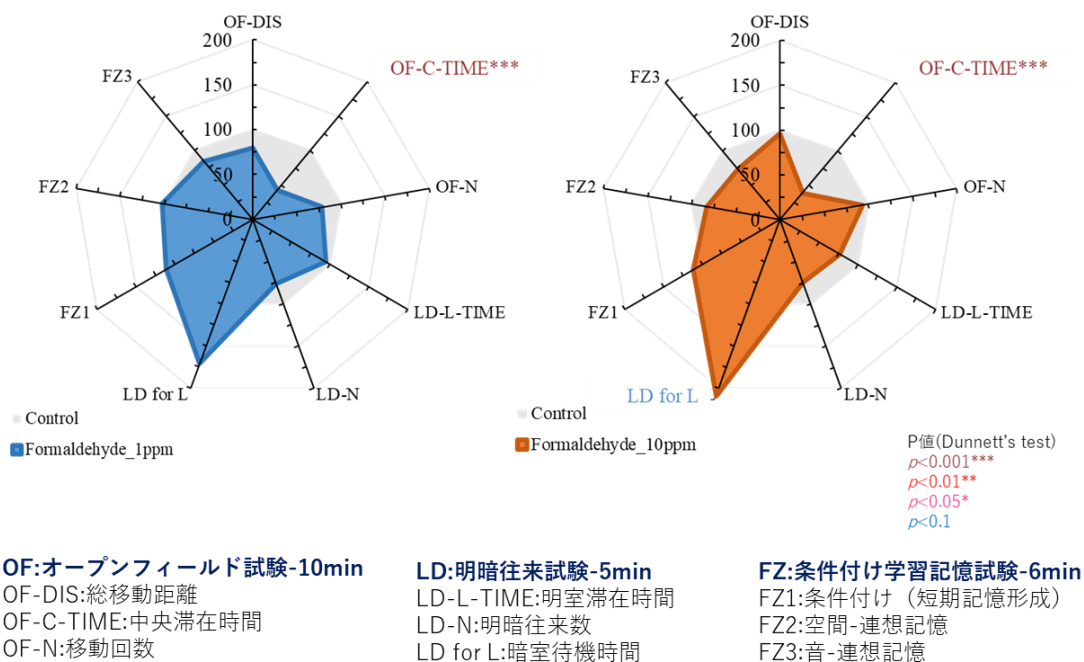


図 4. 情動認知行動試験結果のまとめ (レーダーチャート)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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

令和7年度 分担研究報告書

分担研究課題：胎盤の遺伝子発現プロファイリング

研究分担者 小野 竜一
国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・毒性部
第五室・室長

研究要旨

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

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

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

令和5年度において受精後7.5日および8.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行ない、令和6年度においては受精後9.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行っている。胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、受精後7.5日、8.5日目、および9.5日目においては胎盤および脱落膜の分離が可能であり、令和6年度において次世代シーケンスによる受精後8.5日目および9.5日目の胎盤における網羅的遺伝子発現解析を行ない、胎盤の網羅的遺伝子発現解析により、胎盤の分化度を評価することが可能であることを明らかにした。

令和7年度(今年度)においては、受精後14.5日目のC57BL/6マウス胎盤の網羅的遺伝子発現データを加えて trophoblast giant cells、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer に特異的な遺伝子発現マーカーが、胎盤の発生ステージ、分化異常の評価に有効であろうことを明らかにできた。

A. 研究目的

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

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

令和 5、6 年度に解剖を行なった受精後 7.5 日から 9.5 日目の胎盤においては、胎盤外円錐から spongiotrophoblast および labyrinth layer が形成される重要な期間である。そこで、これらのステージにおいて網羅的遺伝子発現解析を行うことで、胎盤外円錐の分化段階に特異的なバイオマーカー、および、labyrinth layer の形成に特異的なバイオマーカーの単離を行うことを目的としている。また、胎盤機能が成熟している 14.5 日目の網羅的遺伝子発現解析を加えることで胎盤の正常な発生・分化過程における遺伝子発現変化を明らかにし、将来的に生殖発生毒性評価に応用可能な分子指標の探索を行った。

B. 研究方法

マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目、9.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。また、受精後 9.5 日目以降は、胎盤および脱落膜を分離することは困難であるため、胎盤を脱落膜を含めた状態で採取し、その後の解析を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 3 ステージ (7.5dpc, 8.5dpc および 9.5dpc) (dpc: Days post coitum: 交配後) 分行う。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼

による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

凍結した胎盤より RNAeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (Illumina) を用いて次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成したライブラリーは、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 を用いて、pair end sequence (150bp x 2) にて RNA-seq を行なう。また、受精後 14.5 日目胎盤については、NCBI の GEO データベースに収録されている RNA-seq の fastq ファイル (srr19917112, srr19917109, srr19917104, srr19917101) を利用して解析を行なっている。

・マウス胎盤 RNA の RNA-seq データ解析

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

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し HISAT2 program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。

BAM ファイルは、HTseq program を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。

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

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

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

令和5年度、令和6年度は、マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行った。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後7.5日、8.5日目、9.5日目において胎盤および脱落膜の採取を行なった。雌雄C57BL6/Jマウス(12週齢)の交配を3ステージ(7.5dpc, 8.5dpc, 9.5dpc)分を行った。1ステージあたり、5ペアで交配を行い、翌朝10時にプラグの確認を行なった。

その結果、令和5年度において7.5dpc用の交配では、5匹中2匹の雌がプラグ陽性であり、8.5dpc用の交配では、5匹中3匹がプラグ陽性であった。受精後7.5日、8.5日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。7.5dpcにおいては、9匹、8匹の正常発生胚を採取した。また、8.5dpcにおいては、8匹、9匹、7匹の正常発生胚の採取を行った。

令和6年度においては、9.5dpc用の交配では、5匹中2匹の雌がプラグ陽性であった。受精後9.5日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。8匹、6匹の正常発生胚を採取した。

また、令和6年度において、このうち、8.5dpcおよび9.5dpcの胎盤組織の網羅的遺伝子発現解析(N=4)を行なった。7.5dpc胎盤は非常に細胞数が少ないことから十分量のRNAの採取が困難であったために解析対象から省いた。

8.5dpcおよび9.5dpcの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Illumina社のStranded mRNA kitを選択し、網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサー(Illumina社Nextseq2000)を利用して行なった。

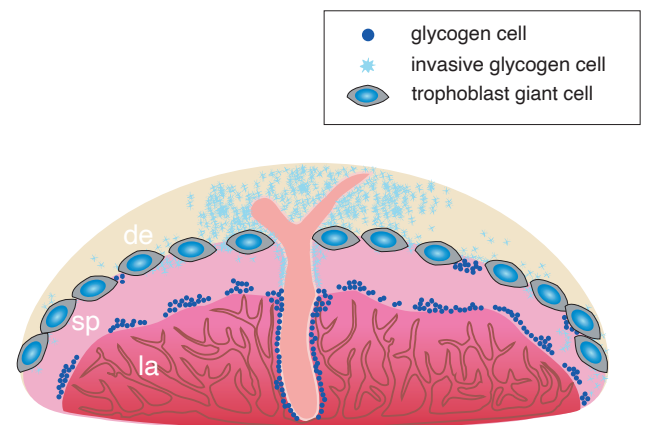
令和7年度においては、受精後14.5日目胎盤のRNA-seqデータをNCBIのGEOデータベースよりダウンロードし、8.5dpcおよび9.5dpcの胎盤組織の網羅的遺伝子発現データとあわせて、網羅的遺伝子発現解析を行った。

マウスでは、胚盤胞が子宮内膜に着床した後、胚盤胞外層を構成するtrophectoderm(栄養外胚葉)が胎盤を構成する栄養膜細胞系列へと分化する。着床後、polar trophectodermは胚体外外胚葉および胎盤外円錐を形成し、これらを起点として胎盤構造が形成される。胚体外外胚葉は絨毛膜形成を経て、尿膜との接合後にlabyrinth layerの形成に参与する。一方、胎盤外円錐からはtrophoblast giant cells、spongiotrophoblast、glycogen trophoblast cellsなどが分化し、母体側胎盤領域を構成する。

成熟したマウス胎盤は、主に胎児側から母体側に向かって、ガス交換および栄養交換を担うlabyrinth layer、spongiotrophoblastおよびglycogen trophoblast cellsからなるspongiotrophoblast層、ならびに母体組織との境界を形成するtrophoblast giant cell layerから構成される。このように、trophectoderm由来の細胞は発生段階に応じて分化し、最終的に機能的な三層構造を有する成熟胎盤を形成する。

また、spongiotrophoblast層は、成熟するに従い、spongiotrophoblast cellsとglycogen trophoblast cellsに分化することが知られ、glycogen trophoblast cellsの中には、母体側へと浸潤するinvasive glycogen cellsが存在する。

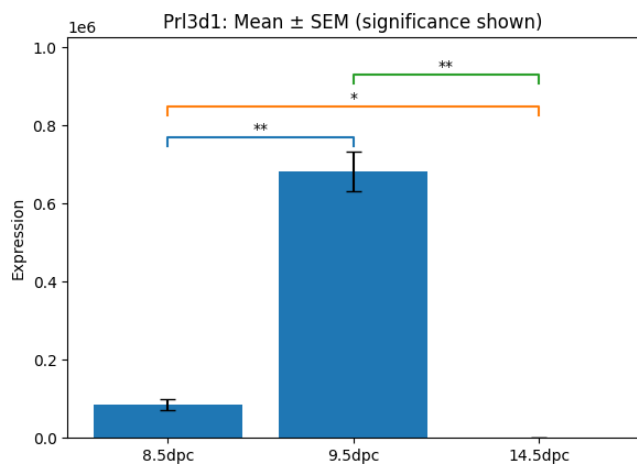
また、spongiotrophoblast層は、成熟するに従い、spongiotrophoblast cellsとglycogen trophoblast cellsに分化することが知られ、glycogen trophoblast cellsの中には、母体側へと浸潤するinvasive glycogen cellsが存在する。



図：成熟した胎盤の模式図。胎盤は胎児側の labyrinth layer (la; 迷路層) と、その上層の spongiotrophoblast (sp) と glycogen cell を主体とした junctional zone、および、母体側組織である decidua (de; 脱落膜) から構成される。decidua には、glycogen cell が浸潤している。(Naruse et al. Development 141, 4763-4771, 2014 より引用・改変。Creative Commons Attribution 3.0 License に基づく。)

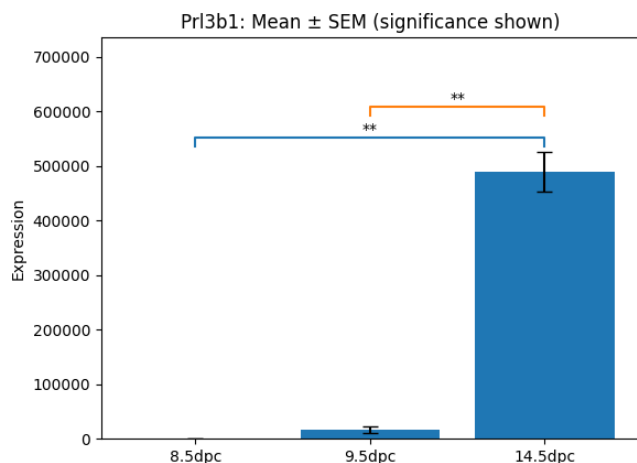
今回の網羅的遺伝子発現解析から、これらのマウス成熟胎盤の特定部位に特異的とされる遺伝子群の定量を行い、遺伝子発現マーカーの遺伝子発現量を定量した。

trophoblast giant cell のマーカーである P11 (Pr13d1) おおおよび P12 (Pr13b1) の遺伝子発現について解析を行った。P11 (Pr13d1) においては、8.5 dpc よりも 9.5 dpc において遺伝子発現の顕著な増加が確認されたが、その後、胎盤が成熟するに連れて発現が消失した。



図：Pr13d1 遺伝子 (P11) の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

次に、P12 (Pr13b1) においては、P11 の発現が消失するに連れて発現が大きく誘導されている。



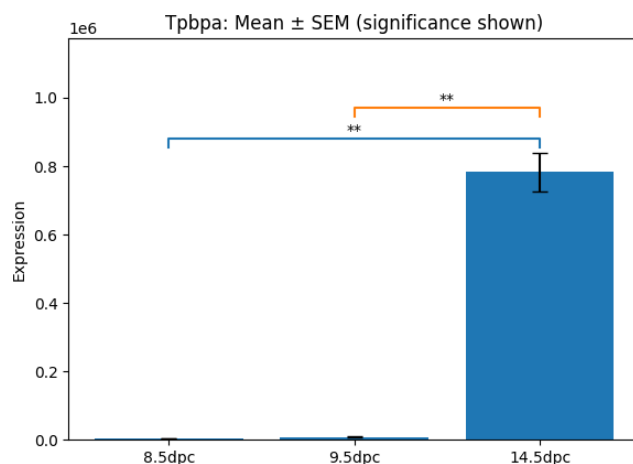
図：Pr13b1 遺伝子 (P12) の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸

は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

P11 は、primary trophoblast giant cell であり、8.5dpc には既に存在しており、9.5dpc においてもその発現が最大化するが、胎盤の成熟するとともに発現が消失することが想定されており、遺伝子発現データからも一致している。

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

次に、spongiotrophoblast 層のマーカーである Tpbpa の遺伝子の発現は、8.5 dpc から分化が進むに連れて遺伝子発現が大きく増大されていた。

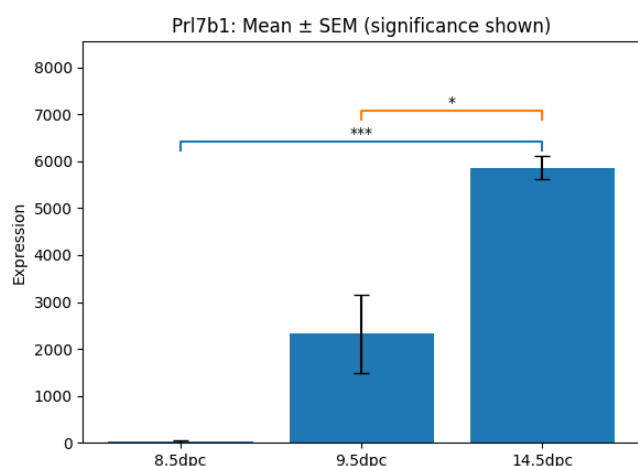


図：Tpbpa 遺伝子 の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

spongiotrophoblast 層は、成熟するに従い、spongiotrophoblast cells と glycogen trophoblast cells に分化することが知られ、glycogen trophoblast cells の中には、母体側へと浸潤する invasive glycogen cells が存在する。

母体側へと浸潤することは報告されている invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Pr17b1 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを確認することに成功した。

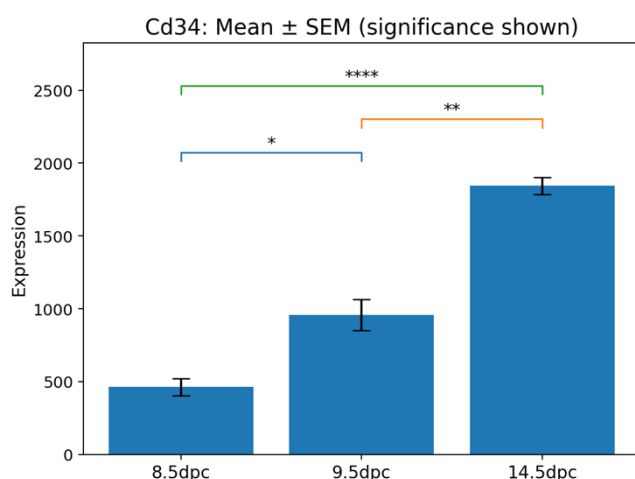
よって、Pr17b1 の遺伝子発現を定量することで胎盤の母体側への浸潤度を定量することが可能になるであろうことが明らかになった。



図：Prl7b1 遺伝子 の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

Labyrinth layer に関しては、8.5dpc から形成されるものであり、主に胎児側毛細血管と syncytiotrophoblast より構成されており、まずは胎児側血管内皮細胞のマーカーの遺伝子発現解析を行った。

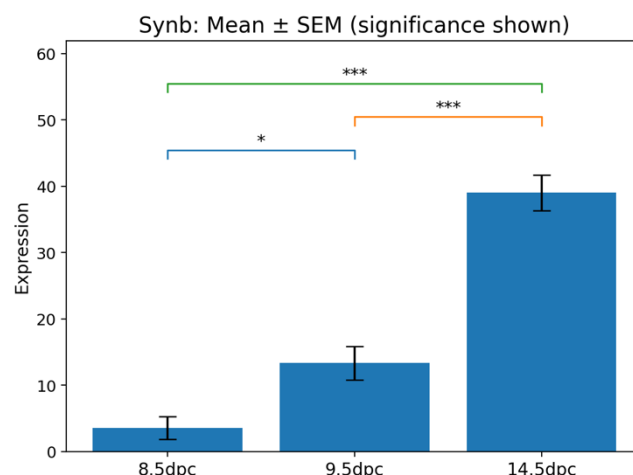
胎盤が成熟するに従い、血管内皮マーカーである CD34 の発現が上昇するのが確認できた。



図：CD34 遺伝子 の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

一方、syncytiotrophoblast 側のマーカーとして知られる Synb 遺伝子の発現も labyrinth の成熟とともに

に上昇するのが確認できた。



図：Synb 遺伝子 の 8.5dpc, 9.5dpc, 14.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$)

今年度、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果が胎盤の分化解析 (secondary trophoblast giant cell, invasive glycogen cells など) の検出にも有用であることがわかったことから、今後は、これらの指標を利用することでマウスの胎盤の毒性検出に応用できる。

D. 考察と結論

哺乳類の正常な発生において、正常な胎盤形成は必要不可欠である。胎盤は、母子間のガス交換および栄養交換を担うとともに、化学物質の胎児移行にも関与する重要な臓器である。したがって、胎盤の発生・分化異常を適切に評価することは、生殖発生毒性の理解およびその評価法の高度化において重要である。令和 5 年度および令和 6 年度には、マウス胎盤の発生・分化状態を反映するバイオマーカー遺伝子を単離することを目的として、8.5 dpc および 9.5 dpc 胎盤を対象とした網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、胎盤の分化進行に伴い、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast、glycogen trophoblast cell などに関連するマーカー遺伝子の発現変動を検出できることを示した。

特に、母体側へ浸潤する invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Prl7b1 の発現が、胎盤の分化進行に伴って増加することを明らかにした。

令和 7 年度においては、これまでに取得した 8.5 dpc

および 9.5 dpc 胎盤の遺伝子発現データに加えて、14.5 dpc 胎盤の RNA-seq データを用いた解析を行った。14.5 dpc は、胎盤の三層構造がより明瞭となり、特に母子間の物質交換を担う labyrinth layer の構造および機能が成熟してくる時期である。そのため、14.5 dpc データを加えることで、胎盤形成初期から成熟胎盤に至るまでの遺伝子発現変化をより包括的に評価することが可能となった。

trophoblast giant cell 関連マーカーの解析では、P11 (Pr13d1) が 8.5 dpc から 9.5 dpc にかけて顕著に上昇し、その後 14.5 dpc では大きく低下することが確認された。一方、P12 (Pr13b1) は、P11 の発現が低下する時期に一致して 14.5 dpc で著明に上昇した。

P11 は primary trophoblast giant cell に関連するマーカー、P12 は secondary trophoblast giant cell に関連するマーカーとして知られており、今回の RNA-seq 解析結果は、胎盤発生に伴う trophoblast giant cell 系細胞の分化段階の変化を反映していると考えられた。すなわち、網羅的遺伝子発現解析により、胎盤内の細胞系列の時間的な分化変化を検出できることが示された。

また、spongiotrophoblast 層および glycogen trophoblast cell に関連する遺伝子についても、発生ステージに応じた特徴的な発現変動が認められた。

spongiotrophoblast 層のマーカーである Tpbpa は、胎盤の成熟に伴って大きく発現が上昇した。また、invasive glycogen cells のマーカーである Pr17b1 についても、8.5 dpc、9.5 dpc、14.5 dpc と発生が進むに従い発現が増加した。

これらの結果から、Tpbpa および Pr17b1 の発現量を定量することにより、junctional zone の形成や glycogen trophoblast cell の分化、さらに母体側への浸潤度を評価できる可能性が示された。

さらに今年度は、母子間のガス交換および栄養交換を担う labyrinth layer に着目し、labyrinth layer を構成する胎児側血管内皮細胞および syncytiotrophoblast に関連するマーカー遺伝子の発現解析を行った。その結果、胎児側血管内皮関連マーカーである Cd34 の発現は、8.5 dpc から 14.5 dpc にかけて段階的に上昇した。

また、syncytiotrophoblast、特に SynT-II マーカーとして知られる Synb についても、胎盤の成熟に伴い発現が上昇することが確認された。これらの結果は、14.5 dpc にかけて labyrinth layer における胎児血

管網および syncytiotrophoblast 構造が発達し、母子間の物質交換を担う機能的構造が成熟していく過程を反映していると考えられた。

以上の結果から、胎盤の網羅的遺伝子発現解析により、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast/glycogen trophoblast cell、および labyrinth layer を構成する細胞系列の分化状態を、遺伝子発現マーカーを用いて定量的に評価できる可能性が示された。

特に、P11 (Pr13d1) および P12 (Pr13b1) は trophoblast giant cell 系細胞の分化段階を、Tpbpa および Pr17b1 は junctional zone および invasive glycogen cell の分化・浸潤を、Cd34 および Synb は labyrinth layer の血管化および syncytiotrophoblast の成熟を反映する指標となり得ると考えられた。

胎盤は、化学物質の胎児移行性や胎児発生への影響を規定する重要な組織であり、特に labyrinth layer の成熟状態は母子間の物質交換能に大きく影響すると考えられる。したがって、今回得られた胎盤発生ステージごとの遺伝子発現プロファイルは、発生段階に応じた胎盤機能の変化を理解するための基盤情報となる。

また、これらのマーカー遺伝子は、化学物質曝露により誘導される胎盤分化異常や機能異常を検出するための指標として利用できる可能性がある。

近年、動物福祉の 3Rs の観点から、in vitro 毒性評価系の開発が進められており、胎盤幹細胞や胎盤オルガノイドなどを用いた評価系の利用も想定されている。

しかし、これらの in vitro 系が実際の in vivo 胎盤の発生・分化状態をどの程度反映しているかを評価するためには、正常胎盤の発生過程における詳細な遺伝子発現情報が必要である。

本研究で得られた胎盤発生ステージ特異的な遺伝子発現マーカーは、in vitro 胎盤モデルの妥当性評価や、生殖発生毒性評価系の高度化に資する基盤情報となると考えられる。

本年度の解析により、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析は、マウス胎盤における secondary trophoblast giant cell、invasive glycogen cell、labyrinth layer の血管内皮細胞および syncytiotrophoblast の分化・成熟状態を検出するうえで有用であることが示された。

今後は、これらの発生ステージ特異的マーカーを用いて、催奇形性物質や発生毒性を示す化学物質曝露時の胎盤分化異常を解析することで、生殖発生毒性における胎盤影響の検出指標として応用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F

Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction

OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

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

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F

Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction

OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. doi: 10.1098/rsob.240279. Epub 2025 Jan 29..

●小野 竜一

非臨床安全性評価における New approach methods と
しての細胞外小胞の活用

医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

2. 学会発表

小野 竜一 (招待講演)

遺伝子改変マウスを用いた肝由来エクソソームの同定と肝毒性バイオマーカーの同定、
医薬品毒性機序研究部会シンポジウム：医薬品毒性
の機序を解き明かすモデル動物たち

第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、
沖縄

小野 竜一、成瀬美衣 (招待講演)

エピゲノム変異によるシスプラチン治療抵抗性の獲得、

付加体科学部会シンポジウム：環境化学物質はどのようにエピゲノムを制御しているのか？

第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、
沖縄

相崎 健一, 森山 紀子, 辻 昌貴, 森田 紘一, 小野 竜一, 菅野 純, 北嶋 聡 (シンポジウム)

Percellome Project による反復投与毒性の予測、
Systems Toxicology 開発への AI 導入の近未来-実験
室、病棟と電腦-

第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、
沖縄

菅野 純, 森山 紀子, 辻 昌貴, 森田 紘一, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡 (シンポジウム)

PFOA の遺伝子発現解析と PFAS Percellome プロジェクトの進捗、

有機フッ素化合物 PFAS による環境汚染と人体影響
第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、
沖縄

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, T. Yamamoto, A. Ishii, T. Yamada, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, S. Kitajima (ポスター)

Identification of Organ-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Toxicity Biomarkers Using CD9-EGFP Reporter Mice、

EUROTOX2025 (欧州毒性学会)、2025 年 9 月 15 日、
ギリシャ

成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、山元智史、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子、小野 竜一
肝臓オルガノイド由来 EV を利用した毒性評価法の開発

第 12 回 日本細胞外小胞学会学術集会、2025 年 10 月 14 日

小野 竜一、成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、森山紀子、立原江利加、野崎弘枝、三原大輝、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子

臓器特異的エクソソームの単離方法の開発

第 5 回国立衛研・島津技術交流会、2025 年 12 月 18 日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, S. Kitajima, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, and T. Yamada

Identification of Liver-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Biomarkers of Hepatotoxicity in CD9-EGFP Reporter Mice

SOT2026 (米国毒性学会)、2026 年 3 月 24 日、サン
ディエゴ

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

Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse

INTERNATIONAL SOCIETY FOR
EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING

2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

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

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S

バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA

第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S

Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice

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

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

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

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

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

分担研究報告書

分担研究課題 「胎盤オルガノイド毒性評価系の開発」

研究分担者 西田 欣広

(大分大学医学部産科婦人科学講座)

研究要旨

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

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

今回、我々のグループでは三次元培養法開発の責任者である Hans Clevers 教授(オランダ)直伝の手法を応用し、ヒトおよびマウス由来のミニ胎盤を樹立に成功した。このミニ胎盤を用いた病態解析を行う研究は我々の検索する限り、国内外においてほとんど報告例がない領域である。我々が独自に樹立したミニ胎盤を用いて初期オルガノイド組織より網羅的に代謝産物のメタボローム解析を行い、マーカー毒物(サリドマイド等)添加環境下での代謝変動の解析を計画した。ミニ胎盤樹立に引き続きメタボローム解析、RNA-Seq 解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知な胎盤毒性評価系の種差を考慮した開発を目指す。

本研究により、迅速で低コスト、省動物に資する新規 *in vitro* DNT 評価手法(動物実験代替法)の開発の補完につながることが期待される。我々のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の *in vitro* 代謝プロファイルを明らかにし、RNA-Seq 解析を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待できる。

A. 研究目的

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

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

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

メタボローム解析自体も我々はその微量解析手法ですでに特許を有しており、他の研究者より一步進んだ研究環境にある。ミニ胎盤樹立、メタボローム解析、RNA-Seq 解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知なる胎盤機能への新たな挑戦への扉を開けるであろう。

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

(倫理面への配慮)

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

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

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

B. 研究方法と結果

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

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

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

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

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

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド(1万個≒1drop matrigel)にモデル薬物としてサリドマイド(0-200 μ M)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプリングが終了している。現在GC-MS用の試料を作成し、GC-MS/MS (QT8040, SHIMADZU)によるサンプル解析およびLabSolutions Insight BiologicsおよびSIMCA (SHIMADZU)ソフトによる多変量メタボローム解析(OPLS-DA法)を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用しているGS-MS/MS解析装置では約460種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される一次代謝産物は約250種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷(3hrs)によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は38種でヒト胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は47種が確認された。このようにすでに組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得られており今後、詳細

に解析を行っていく。

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

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

B-5: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物(サリドマイド)添加 (3hrs)によるmRNA発現の網羅的array解析 (RNA-Seq analysis) :

令和7年度はRNA-Seq解析を行ってより遺伝子レベルでの変動を解析した。全検出遺伝子数はhuman16378遺伝子に対してmouse20543遺伝子と検出された遺伝子数はマウスの方が多かった。変動遺伝子(p-value<0.05)もhuman 1,615遺伝子、mouse 6,582遺伝子と生物種間での大きな有意差があることが判明した。

B-6: LC-MSによる培養上清中のサリドマイドおよびその代謝産物5'- or 5'-hydroxythalidomideの測定

添加 24 時間後の培養上清中のthalidomideは95%以上が代謝されており、我々の確立したミニ胎盤は十分な薬物分解酵素活性を維持していることが判明している。興味深いことにヒト胎盤オルガノイドでの代謝が約10倍早く、より活性を持つ構造に変換されることが判明し、ヒトでの毒性がマウスとは異なる可能性が強く示唆された。

令和7年度は、さらに各種薬物を用いてその代謝活性の種差における相違について検討し、生殖毒性評価の新しい評価系を提案できる可能性をまとめている。

B-7: single cell RNA seq (sc RNA-Seq analysis) 解析による薬物代謝の各組織間への影響解析

scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。その手順は以下の通りである。

薬物刺激後のオルガノイド RNA の定量は ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いた。品質は TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で確認した。シーケンスライブラリーは、200 ng の総 RNA を用いて、MGIEasy rRNA Depletion Kit および MGIEasy Fast RNA Library Kit (MGI Tech Co., Ltd., San Jose, CA, USA) を用いて調製した。ライブラリーは、DNBSEQ-G400 FAST シーケンサー (MGI Tech Co., Ltd.) 上で、ペアエンド 150 nt でシーケンスされた。すべてのシーケンスリードは、Trimmomatic (v.0.38) [T] を用いてトリミングした。トリミングされたリードはヒト hg38 ゲノムリファレンスのトランスクリプトにマッピングした。RSEM による遺伝子およびアイソフォームの発現量推定を用いて、基本カウントデータを生成した (GEO accession number GSE327639)。

結果を簡略に述べると我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドの解析でこれまでの検討で 10 のクラスターに分類可能であり、cytotrophoblast (cluster 4,5)、syncytiotrophoblast (cluster 6) も明確に分画された。胎盤オルガノイドにおける薬物誘発性 DNA 二重鎖切断 (DSB) 形成のパターンが 2 次元培養系と比較、検討して明らかに異なることが判明した。特に syncytiotrophoblast で著明な p53 代謝経路の活性化が認められた。

C. 考察と結論

令和 7 年度は令和 6 年度に樹立したヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを用いて RNA-seq 解析を行い、より詳細に分析、検討した。

種差から見た胎盤オルガノイドにおける薬物代謝ではヒトではバリン・ロイシン・イソロイシン生合成代謝経路を中心にした変動、マウスでは TCA サイクルからアスコルビン酸代謝系の有意な変動が確認され新しい知見を得ることができた。また scRNA-Seq 解析によりオルガノイド組織中の syncytiotrophoblast で著明な薬物誘発性代謝経路の活性化が確認された。

これまでの成果はヒト胎盤オルガノイドと薬物動態の新規解析法およびマウス胎盤オルガノイドを用いた生殖毒性の種差についての解析結果をそれぞれ英文誌へ論文化して投稿した。

最後にこの 3 年の研究成果をもとに今後さらに胎盤オルガノイドの精度を高め、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のため、種々のモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点を包括的にからめて生殖毒性研究を深めていく計画である。

D. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

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

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. Toxicology Letters. Vol.411, S157,2025.

Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. Toxicology Letters. Vol.411, S347-348, 2025.

Ryoya Shigefuji, Seiji Komatsu, Takeshi Terabayashi, Toshimasa Ishizaki, Tadashi Tomo, Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada. Mitotic abnormality induced by evodiamine, a tryptamine indole alkaloid. Toxicology and Applied Pharmacology 511. 117813. 2026.

西田欣広、花田克浩. 難治性の婦人科癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の可能性. 細胞. 5(7). 68-71. 2025.

2. 学会発表 (抜粋)

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025.9.15 Athens, Greece.)

Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025.9.16. Athens, Greece.)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁:胎盤オルガノイドを用いた新しいヒト生殖毒性評価モデル系の可能性. 第77回日本産科婦人科学会学術講演会 (2025. 5. 24 岡山)

田邊明日香、花田克浩、西田欣広: 胎盤オルガノイドを用いたDNAダメージ誘導の二重鎖切断の検出系の開発. 第54回日本環境変異原ゲノム学会 (2025. 11. 22 静岡)

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the cytotoxic action of an indole alkaloid evodiamine. 第99回日本薬理学会 (2026. 3. 16 仙台)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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

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

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hirokatsu Saito, Kousuke Suga, Koji Fujihara, Motoh Mutsuga, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima	Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice	Experimental Animals	第 75 巻 2 号	222-233	2026
Koki Murayama, Kashu Mizota, Rieko Matsuura, Yusuke Okubo, Yoshihiro Nakajima, Atsushi Suzuki, Junji Fukuda	Developmental Toxicity Assay Based on Real-Time Monitoring of Fibroblast Growth Factor Signal Disruption in Human Induced Pluripotent Stem Cells	Journal of Visualized Experiments	第 224 巻	e68910	2025
Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima	A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids	Toxicology Letters	第 411 巻	S347-348	2025

令和8年3月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター安全性予測評価部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

(氏名・フリガナ) 西村 拓也・ニシムラ タクヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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。

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

(氏名・フリガナ) 栗形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・室長

(氏名・フリガナ) 大久保 佑亮・オオクボ ユウスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
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。

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

(氏名・フリガナ) 齋藤 洋克・サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

(氏名・フリガナ) 小野 竜一・オノ リュウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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。

機関名 国立大学法人大分大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 北野 正剛

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 大分大学医学部生化学・分子遺伝学講座・客員研究員

(氏名・フリガナ) 西田 欣広 (ニシダ ヨシヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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)	☒ ☐	☒	大分大学	☐
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。