

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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

令和5年度～7年度 総合研究報告書
研究代表者 北嶋 聡

令和8(2026)年 3月

別添 2

目 次

I. 総合研究報告書 (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. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 4) ----- 34

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
令和5年度～7年度 総合研究報告書

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・発達と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、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を開発を試みる。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5年度(初年度)は、I)発生期の*in vitro* DNT評価手法の開発に向け、従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得

が可能となった。また、従来の 24 時間計測では明らかにできなかった HDAC 阻害剤バルプロ酸の 24 時間以降の大きなシグナルかく乱作用を発見した。DNT 陽性物質リストについては、ラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文から 97 化合物が抽出された。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、現在、各神経発生過程に対応した *in vitro* 試験は現在、17 種類に絞られているが、各試験の信頼性については確認中であることが明らかとなった。II) 生後発達期 DNT の分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン(0, 2 および 20 ppm) について、幼若期のマウスに反復吸入曝露を実施し、成熟後に情動認知行動解析を検討したところ、学習記憶異常が観察された。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、ヒト胎盤並びにマウス胎盤組織、双方ともに、安定したオルガノイドの作製に成功した。

令和 6 年度(2 年目)は、I) 発生期の *in vitro* DNT 評価手法の開発に向け、従来の手動計測から自動測定により、DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した結果、6 種類の陽性対照物質及び 2 種類の陰性対照物質を 100% の正確度で分類できた。一方で、神経伝達物質受容体を介したシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞まで分化させた試験の構築も進めた。DNT 陽性物質リストについては、DNT 陽性対照および陰性対照 171 化合物を精査した。また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、現在、各神経発生過程に対応した *in vitro* 試験は現在、17 種類に絞られ、絞られ、バリデーション試験が開始されていることを見出した。II) 生後発達期 DNT の分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン(0, 2 及び 20 ppm) について、幼若期のマウスに反復吸入曝露を実施し、成熟後に情動認知行動解析を検討したところ、学習記憶異常が観察され、これに対応すると考えられる神経科学的物証が得られた。加えて、トルエン(0, 0.7 及び 7 ppm) についてもモデル揮発性物質として反復吸入曝露を実施し、情動認知行動解析においてキシレンと類似した行動影響が確認された。IIII) 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、ヒト胎盤並びにマウス胎盤組織、双方ともに、安定したオルガノイドの作製に成功し、モデル物質サリドマイドを用いて種差を考慮した網羅的メタボローム解析を実施した。

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考ええる。

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。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)の開発につながる事が期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の in vitro 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。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試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

(目的) 本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、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が期待される。

加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の in vitro 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。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て、テストガイドラインへの提案に繋がるように図る。以て、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、明暗往來試験、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-Σ30NIIおよびMP-Σ300NII、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

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

標準溶液(トルエン-d₈の二硫化炭素溶液、4mg/mL)50μLをマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

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

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

カラム:DB-5MS(20m×0.18mm、膜厚0.36μm、Agilent Technologies 社製)

オープン温度:40℃(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:N₂

流速:0.27 mL/min(定流量)

定量イオン(m/z):91(キシレン3種)、98(トルエン-d₈)

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

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

<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-Σ30NⅡ および MP-Σ300NⅡ、柴田科学株式会社製) を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したトルエンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭 (一層及び二層) を 10mL 容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素 (富士フ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-d₁₀ の二硫化炭素溶液、6mg/mL) 50μL をマイクロシリッジで添加し、これを測定溶液とした。

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

線用の標準測定溶液とした。

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

カラム: DB-WAX (20m×0.18mm, 膜厚 0.30μm, Agilent Technologies 社製)

オープン温度: 40℃ (3.5 分保持) → 20℃/min → 150℃ (5 分保持)

注入口温度: 220℃

注入方式: スプリット

スプリット比: 20 : 1

キャリアーガス: 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、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 RNAeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (Illumina) を用いて次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成したライブラリーは、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 を用いて、pair end sequence (150bp x 2) にて RNA-seq を行なう。

Illumina 社 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

一配列は、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ルシフェーセンス計測を行ったところ、FGF シグナルは 2 回振動することを発見した。しかしながら、この振動の周期、ピークは計測ごとに異なることが明らかになった。数々の条件検討を行い、96 穴プレートに播種する以前の iPS 細胞の培養法を厳格に規定すること及び、96 穴プレートにおけるエッジ効果を抑制するためのガス透過性の不

織レーヨン性のシールを用いて培養することにより、再現性のある波形パターンの取得に成功した。

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

発生毒性陽性物質であるバルプロ酸ナトリウム (抗てんかん剤: DNT 陽性物質) 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 シグナルかく乱作用を調べた。その結果、バルプロ酸は FGF-SRF シグナルの振動ピークにおいて 1 回目 (5 時間前後) よりも 2 回目 (30 時間前後) の方が強いかく乱作用を示すことが明らかになった。また、5-FU は濃度依存的にシグナルかく乱作用を示す時間が早まることが明らかになった。陰性物質はいずれもシグナルかく乱作用を示さなかった。

令和 6 年度 (昨年度) は、化学物質の FGF-SRF シグナ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)、ハイドロキシウレア (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 カンファール (CAM)、及びジフェンヒドรามミン (DHM)) のシグナルかく乱作用を n=3 で取得した。適用濃度は、最大溶解量 (一部 IC₅₀) を最大濃度とし、

溶媒対照に対する各物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC 曲線解析によって閾値を設定した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正確度 100% で分類可能であった。

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

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

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

令和 6 年度 (昨年度) に、キシレン幼若期吸入曝露実験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の 1 つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群 (低濃度および高濃度) と対照群を比較したところ、低濃度 (2 ppm) 曝露群において DCX (新生ニューロン) の有意な発現増加が認められた。高濃度 (20ppm) 曝露群においては、いずれの分化マーカーも有意差は認められなかった。

次いで、対照群と比較し、2 ppm (低濃度) のキシレン曝露群において、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった (対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 よ

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

762 ps (増加)、 20 ps (減少)

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

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

83 ps (増加)、 542 ps (減少)

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

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

たところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

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（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。

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、明暗往來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) :

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 μ M)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプリングが終了している。現在 GC-MS 用の試料を作成し、GC-MS/MS (QT8040, SHIMADZU) によるサンプル解析および LabSolutions Insight Biologics および SIMCA (SHIMADZU) ソフトによる多変量メタボローム解析(OPLS-DA 法)を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用している GS-MS/MS 解析装置では約 460 種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される

一次代謝産物は約 250 種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は 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 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。

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関し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にしたが、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 ルシフェーラ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える。キシレン曝露の場合では興奮性、トルエン曝露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方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(ラビリス構造)の構築を樹立した。特にマウス胎盤オルガノイド樹立は現在までに報告例も

なくわれわれの樹立が世界でいち早く行われているもの推定される。今後はさらにオルガノイド組織の精度を高めるとともに、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のためモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点から研究を深めていく。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。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。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が期待される。加えて、独自のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の in vitro 代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待される。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]

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

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

○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]

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

[doi.org/10.2131/fts.11.169]

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

[doi.org/10.1002/jat.4584]

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

[doi.org/10.2131/jts.49.139]

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

[doi.org/10.2131/fts.11.37]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno,

Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. J Toxicol Sci. 2024; 49(3): 105-115. [doi.org/10.2131/jts.49.105]

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第2章 複合曝露による毒性の評価手法 第1節, 医歯薬出版 (東京) [ISBN: 978-4-263-73220-5]

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

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

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

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

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

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

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

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

西村拓也, ICH-S11 ガイドラインの WoE アプローチにおける考慮事項 ファームテク ジャパン 2024, 40, 523-525

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

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

○ Takeshi 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.

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. New strategy of genotoxicity test using organoids in the 3-dimensional tissue culturesystem. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S52-S53, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.151>

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

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

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

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

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

58. 2023.

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 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, 柊内亮太: 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

Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima: Cutting-edge Trends in the Development and Safety Assurance of Cell-Cultured Foods, “So-Called Cultured Meat”, Part 2 - Potential Hazard Factors -. The 96th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Port Messe Nagoya.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向ー家畜・家禽以外の動

物 種を含めて一、日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

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

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

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

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

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

桑形麻樹子、堀本政夫：農薬における発達神経毒性と関連のある毒性所見の検討 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024. 7. 03-05)、福岡

○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

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023. 9. 10-13) リュブリャナ、スロベニア

長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：LC-MS/MS を用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション。第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023. 6. 19-21) 横浜

高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価。第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023. 6. 19-21) 横浜

○桑形麻樹子：新生 DNT 委員会のこれから。第 63 回日本先天異常学会学術集会 (2023. 7. 28) つくば

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明。第 63 回日本先天異常学会学術集会 (2023. 7. 28-30)

桑形麻樹子：ウサギ精漿を介したサリドマイドによる発生毒性のリスク
第 97 回日本薬理学会年会 (2023. 12. 14) 神戸

Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Yuji Taquahashi Y. Update and Compilation of the database of the glossary for nonclinical toxicity studies 'Dokuseishiken Yougoshuu'. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024. 7. 6)

Nishimura T, Maki K, Kinoshita K, Suzuki M, Nakazawa T, Naota M, Mikashima F, Hirabayashi Y. The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan. 米国 Society of Toxicology (2024. 3. 11)

○齊藤洋克、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

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

○齊藤洋克：発生- 発達期の化学物質ばく露による情動認知行動毒性の検出と課題 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023. 6. 19、横浜)

○齊藤洋克：ネオニコチノイド系農薬ばく露による雄マウスの情動認知行動解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023. 6. 21、横浜)

○齊藤洋克：農薬等の化学物質ばく露によって生じる情動認知行動毒性 第 45 回日本中毒学会総会・学術集会 (2023. 7. 15、さいたま)

○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 1, 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)

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

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

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

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

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

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

○Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro

Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 9)

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

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

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

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

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

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

○大久保佑亮: 「シグナルかく乱作用のダイナミクスに基づくヒト発生毒性の評価法とその発達神経毒性への応用」. 第 63 回日本

先天異常学会学術集会「若手ピックアップシンポジウム」. 2023 年 7 月 29 日

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

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

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

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

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

○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)

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

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

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

2024. 4. 20 横浜

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

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljubljana, Slovenia. (2023. 9. 10)

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

○井上尚美、西田欣広、河野康志、ヒト胎盤における低酸素環境下での代謝変化についての検討、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会(2023. 5. 12)

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

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko

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

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice, Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024. 9. 4., Montreal, Canada)

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

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

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

小野竜一、cfDNA メチル化とエクソソーム RNA を毒性指標としたリキッドバイオブシー、第 50 回日本毒性学会学術年会

2023. 6. 21 横浜

小野竜一、エクソソームを介した遺伝子水平伝搬、第 50 回日本毒性学会学術年会 2023. 6. 22 横浜

Ryuichi Ono: Liquid biopsy using cfDNA methylation and EV-associated miRNA as a toxicity biomarker、The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2023. 7. 19, Taipei

Ryuichi Ono: Extracellular Vesicles (EVs) as Novel Toxicity Biomarkers、The 10th 63RD ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024. 3. 14, Salt Lake City

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．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
齊藤洋克、北嶋 聡	化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出	化学物質と環境：化学物質と環境との調和をめざす情報誌	第 184 巻	3-6	2024
Yusuke Okubo, Yoko Hirabayashi, Junji Fukuda	Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics	Current Opinion in Toxicology	第 39 巻	100489	2024
Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Satoshi Kitajima	Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies	Toxicology Letters	第 399 巻第 S2 号	S188	2024

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