

別添 3

I. 総括研究報告書

(23KD1003) 研究成果(見込み)の概要

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

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

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

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

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

研究分担者

西村拓也 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

桑形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

大久保佑亮 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部

西田欣広 大分大学・
医学部産科婦人科学講座

A. 研究目的

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

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

先行研究において、催奇形性陽性物質 21

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

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

雄性マウス (幼若期[2週齢]) を対象とした 22 時間/日×7 日間反復曝露 (3 用量、3 群構成、各群 8 匹) を実施し、成熟後 (12 週齢時) に、オープンフィールド試験、明暗往來試験、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。

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

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

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

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

キシレン濃度は、捕集管 (チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号: 080150-0532、柴田科学 (株)) を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間 (曝露開始から曝露停止まで) に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群および投与群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ30N II および MP-Σ300N II、柴田科学株式会社製) を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

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

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

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

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

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

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

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

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

<ヒト胎盤オルガノイド作製>

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

<マウスの胎盤オルガノイド作製>

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

<メタボローム解析>

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

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

<胎盤の遺伝子発現プロファイリング>

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

(倫理面への配慮)

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

他方、人を対象とする生命科学・医学系研

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

C. 研究結果

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

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

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

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

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

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

農薬	17
医薬品	38
化学物質	42

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

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

<吸入曝露実験>

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

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

<情動認知行動解析>

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

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

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

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

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

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

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

C-3-2: マウスの胎盤オルガノイド作製

(in vitro / organoid) :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D. 考察と結論

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

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

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

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

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

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

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

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

Toxicol, 37, 70-75, 2024

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

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

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

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

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

2. 学会発表 (抜粋)

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

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

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa, Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other

countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア

長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：LC-MS/MSを用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション. 第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価. 第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

○桑形麻樹子：新生DNT委員会のこれから. 第63回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28) つくば

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第63回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)

桑形麻樹子：ウサギ精漿を介したサリドマイドによる発生毒性のリスク
第97回日本薬理学会年会(2023.12.14)神戸

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

小野竜一、cfDNA メチル化とエクソソーム RNA を毒性指標としたリキッドバイオプシー、第 50 回日本毒性学会学術年会 2023. 6. 21 横浜

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

Ryuichi Ono: Liquid biopsy using cfDNA methylation and EV-associated miRNA as a toxicity biomarker、The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2023.7.19, Taipei

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

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

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

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

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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

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

3) 特願 2023-067391, 発明の名称: ヒ

トオルガノイド様組織培養液・発明者：西田欣広、他1名・特許権利者：大分大学

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし