

研究代表者: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

## 研究要旨

本研究では、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた新規ハザード評価体系の基盤構築を行うことを目的とした。今年度は、先行研究において我々が見出した精子形成障害モデルとしてのビタミン A 過剰 (VAE) マウスの精巣組織切片を活用した実験、ならびに、過去に雄性不妊作用が報告されている綿実種子に含有されるゴシポールの単回経口投与実験を新たに実施した。

まず、昨年度までに実施した蛍光標識 PNA レクチン抗体を用いた解析により、VAE 群における精子形成サイクルの異常および精細管の各ステージにおいて構成される生殖細胞系列の数の影響が認められ、従来の HE 染色や PAS 染色を用いた病理組織学的評価では見逃されていた精子形成障害を組織学的に明らかにすることに成功している。昨年度後半から今年度にかけて、同法に、SYCP-3 および MEIOSIN の雄性生殖細胞系列マーカー抗体との二重免疫染色を行い、Control 群と比較して VAE 群では、精細管ステージ VII, VIII における SYCP-3 陽性細胞数の有意な減少を明らかにし、さらに MEIOSIN の発現時期の変化による減数分裂開始過程への影響が認められたことから、VAE は Preleptotene Spermatoocyte 以降において精子形成を障害する可能性が示唆された。本結果と精子形成サイクルの異常との全貌は未解明であるが、本研究の遂行により精細管ステージに着目した精巣毒性評価法の有用性を示した。一方、昨年度の研究報告において実施した中間径フィラメントマーカーである VIMENTIN に着目したセルトリ細胞の機能評価において、Control 群と VAE 群の間で、精細管横断面の表面積に対する VIMENTIN 陽性(染色)領域が占める面積比に差は認められなかった。そこで、今年度は精細管ステージに着目した VIMENTIN の形態学的評価を新たに実施した。その結果、Control 群においては、構成する細胞の特徴から精細管ステージを大きく 3 つに分けた場合に、各ステージにおける VIMENTIN 発現パターンに特徴的な周期性が認められた。しかしながら、VAE 群では各精細管ステージにおける VIMENTIN 陽性領域の周期的な変化は検出されなかった。すなわち、VAE 群において精子形成サイクルに依存した VIMENTIN 発現パターンの異常が生じていることが示唆された。

次に、昨年度予備検討を実施したゴシポールのマウス単回経口投与(100, 300 mg/kg 体重)実験を実施し、投与後 2, 7 週と経時的な解剖を実施した。マウスの体重推移や生殖器の重量において、投与による影響は認められなかった。次に HE 染色による精巣の組織学的解析を実施した結果、Control 群と比較して投与後 2 週の最高用量 300 mg/kg 群において異型遺残体を含む精細管の割合が有意に亢進することが明らかとなった。しかし、投与後 7 週経過時においては曝露によるその病理学的所見は認められなかった。異型遺残体の数の増加はセルトリ細胞の貪食能の低下に起因すると考えられ、そこでこれまでに確立した VIMENTIN に対する抗体を用いたセルトリ細胞の機能評価を実施した。精細管横断面の表面積に対して、VIMENTIN 陽性領域が占める面積の割合を算出した結果、ゴシポール投与 2 週間経過および 7 週間経過いずれのサンプルについても、Control 群と比較して、VIMENTIN 陽性領域が占める面積比に有意な差は認められなかった。続いて、精細管ステージ依存的に VIMENTIN の発現パターンを詳細に解析していくと、ゴシポール投与(100, 300 mg/kg)後 2 週経過時においては、Control 群で認められたようなセルトリ細胞での VIMENTIN 発現様式の周期性が認められなくなった。また、ゴシポー

ル投与 2 週経過時で精巣毒性が認められたため、投与後 7 週経過時において精子性状解析(運動・形態)を実施したところ、ゴシポール投与による毒性は全く検出されなかった。

以上、本研究で開発した精子形成サイクルに着目した組織学的評価は、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた早期の雄性生殖ハザード評価として有用であることを示した。ゴシポールの実験においては、現在解析した精細管の数が 1 個体あたり 60 個と少ないため、今後少なくとも各個体 40 個の精細管の解析を追加で実施し(合計 100 個/個体 以上)、本評価の有用性について総合的に考えていきたい。

### 研究分担者

齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 研究員

### 研究協力者

北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長

石黒啓一郎 熊本大学発生医学研究所 教授

江口哲史 千葉大学予防医学センター 講師

### A. 研究目的

食品成分の濃縮や抽出、製剤化により、従来の食経験では安全性が担保できないことがあること、また、生理活性成分を含む食品等を過剰摂取すること、等による有害影響が危惧される。実際に、疫学調査等によりこれら過剰摂取と不妊との関連が示唆されている。しかし同時に、これらの因果関係には不明瞭な点も多く残されている。その中でも特に、ホルモン様作用を有する食品等は内分泌器官への影響が懸念されるが、生殖の有害影響はその評価特性からヒトでの把握は容易ではない。このため、食品安全行政面からヒトへの迅速な健康影響の予測性向上に資する実験動物を用いた新規ハザード評価体系の基盤構築が不可欠と考える。

現在、男性不妊の主な原因である造精機能障害は、生殖細胞への直接影響とそれを支持するセルトリ細胞の障害を介した間接影響に起因する。生殖細胞の影響評価は精子濃度や運動率の測定、セルトリ細胞の影響評価は細胞数の減少で評価される。しかし、先行研究にお

いて、不妊症患者の多くは精子濃度や運動率の低下が認められないこと、また、食事を含むライフスタイルの変化等によりセルトリ細胞数が減少するような事例はないことを確認しており、当該評価では食品の健康影響の有用な指標にはならないこと(偽陰性)が懸念される。一方、食品摂取による影響指標として生殖細胞を支持するセルトリ細胞の機能的変化が想定されるが、これを組織学的に検出する評価系がないことも問題点として挙げられる。

これまでに我々は、ビタミン A (VA) の体内動態の迅速定量法を開発し、長期間の VA 過剰状態が精子形成に影響を及ぼすことを報告した。また、精子の先体を染色しマウス精子形成サイクル(精細管ステージ I-XII)を同定する PAS 染色を行い、VA 過剰により精細管周期が変化する可能性が示唆された。しかし、PAS 染色において先体の判別が困難で、核のクロマチン構造も不明瞭なことが多いため、一部の研究報告において正確性に欠くステージ決定や細胞同定がなされており、毒性評価の精度の高さを担保しきれしていない。

今年度は、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じる生殖細胞系列やセルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、精子形成マーカーである SYCP-3 と減数分裂開始に重要なバイオマーカーとして最近同定された MEIOSIN に対する抗体を用いた影響評価、ならびに、セルトリ細胞

マーカーである VIMENTIN を用いた形態学的評価による精子形成サイクル依存的なデータ収集を行うことを目的とし、これまでにデータを有しているビタミン A 過剰(VAE)モデルマウス精巣を用いた組織学的解析と、雄性不妊作用が報告されている綿実油成分のゴシポールの単回経口投与実験を行い、本法の有用性について検証することとした。

## **B. 研究方法**

### サンプル

今年度は、昨年度まで解析を行っていたサンプルの中から、先行研究(Yokota et al., 2021)の過程で採取したビタミン A 過剰(VAE)マウス精巣組織切片を対象として、より詳細な解析を行った。なお、VAE マウスは先行研究による解析において、精巣の病理組織学的な影響は認められていないものの精子形態の異常が認められているため、本研究を遂行する上で有用なモデルの一つと考え活用するに至った。

加えて、過去に雄性不妊作用が報告されている綿実種子に含有されるゴシポールを用いた予備実験を昨年度終了したため、今年度はその本実験を実施した。生後 6 週齢の雄性マウス(C57BL/6J)に、ゴシポールを 100mg/kg(低用量群)および 300mg/kg(高用量群)の用量で単回強制経口投与した。Control 群には、溶媒対照としてコーン油を投与した。投与 2 週間後および 7 週間後においてサンプリングした精巣を、10 %中性緩衝ホルムアルデヒド液にて浸漬固定した。パラフィン包埋後に作製した精巣組織切片を精巣毒性評価に用いた。また、精子性状解析についても実施した。

方法の詳細については、下記に示した。

### ゴシポールの分析

ゴシポール投与後 4 日または 2 週経過時に解剖を行い、肝臓外側左葉の一部分を採取し、

分析前処理まで-80°Cで凍結保管した。凍結保存した肝臓試料 50mg に 100 $\mu$ L ギ酸, 200 $\mu$ L エタノール (内部標準 200ppb アピゲニン溶液), 200 $\mu$ L アセトニトリルを添加の上、バイオマッシャーII・パワーマッシャーIIにより試料をホモジナイズし、ゴシポールを抽出した。10000rpm, 1 分の遠心分離の後、上清を Micro Volume QuEChERS Kit (島津製作所: 硫酸マグネシウム:80mg, 酢酸ナトリウム:20mg) に添加し、攪拌の後 10000rpm, 10 分で遠心分離を行った。上清はガラスバイアルに移し、LC-QToFMS により定量分析を行った。検量線は 5-1000ppb までの範囲の 6 点であり、R > 0.99 であった。定量下限値はブランクの繰り返し分析から 0.2 $\mu$ g/g とした。

### 精巣毒性評価

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール(100、95、90、80、70%)にて段階的に再水和した。HistoVT One (ナカライテスク、京都、日本)または20mM Tris (pH9)により抗原賦活化処理し、Blocking One (ナカライテスク)と共に4°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°Cで一晩インキュベートした。使用した一次抗体は次項に示した。PBSで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 488またはcy3標識抗体 (Invitrogen; 500~1,000倍希釈)を用い、4°Cで2時間処理した。核はHoechst 33342 (ナカライテスク)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。染色像は、BX51 蛍光顕微鏡および付属の cellSensソフトウェア (オリンパス、東京、日本)で取得した。

### 使用した一次抗体

• 蛍光標識PNAレクチン:  
Lectin PNA, AF488 conjugate (Invitrogen; 1000

倍希釈)

半数体Spermatidのアクロソーム(先体)を高感度に染色することによる精細管ステージI-XIIの迅速な判別法の構築、Spermatidの数の評価

• SYCP-3:

Rabbit polyclonal anti-SCP3 (Abcam; ab15093; 200倍希釈)

核染色によるSpermatocyteの数の評価

• MEIOSIN:

Guniea pig polyclonal anti-MEIOSIN(石黒博士より提供; 200倍希釈)

核染色による減数分裂開始段階に寄与するPreleptotene Spermatocyteの数の評価

• VIMENTIN:

Rabbit monoclonal anti-VIMENTIN (Abcam; ab92547; 500倍希釈)

細胞骨格と呼ばれる細胞質内のタンパク質性の線維系の一つで、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントの中間の径10nmである中間径フィラメントを染色し、精細管の中に占めるセルトリ細胞骨格の面積割合を評価

取得した染色像の画像解析

画像の解析には、Image J Fiji (Schindelin et al., 2012)を用いた。同一条件にて染色・撮影した原画像をグレースケールに変換後、二値化の設定値を調整し、Binary 画像を作成(二値化処理)することにより、VIMENTIN 陽性領域を抽出した。その後、各精細管横断面の表面積( $\mu\text{m}^2$ )に対して、VIMENTIN 陽性領域( $\mu\text{m}^2$ )が占める面積の割合(%)を算出した。VAE 群およびそのControl 群については、精細管横断面を1個体あたり160個以上観察し、各群3個体の平均値を算出した。また、ゴシポール投与における解析については、精細管横断面を各群合計250個以上(1個体あたり平均60個程度)の精細管横断面を観察し、4個体の平均値を算出した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得る等、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

ビタミン A 過剰マウス精巣の組織学的評価

昨年度までに、PNA レクチンを用いた蛍光免疫組織化学染色を実施し、迅速かつ高精度な精細管ステージ判別法を確立した。今年度は、ビタミン A 過剰(VAE)マウス精巣組織切片を用い、同法に、毒性が懸念されたSpermatozoa (PLZF)や Spermatocyte (SYCP-3)、Spermatid (PNA レクチン)マーカー抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、精子形成サイクルにおける精巣毒性評価を実施し、VAE 群においては Spermatocyte への影響を昨年度明らかにしていた。今年度、その中でも減数分裂開始に新たなバイオマーカーとして同定されたMEIOSIN に対する抗体を共同研究者である石黒博士から提供され、解析したところ、Preleptotene Spermatocyte (MEIOSIN)での毒性が起点となっていることを示唆する結果を得た(図1、横田、石黒)。

他方で、昨年度にセルトリ細胞の中間径フィラメント(VIMENTIN)マーカー抗体を用いた免疫組織化学染色を実施したところ、VAE 群ではControl 群と比較して、各精細管内におけるVIMENTIN の発現に差は認められなかった。さらに我々は解析を進めていき、Control 群においては、構成する細胞の特徴から精子形成サイクルをStage I-VI、Stage VII-VIII、Stage IX-XII と大きく3つに分けた場合に、各精細管横断面の表面積( $\mu\text{m}^2$ )に対して、VIMENTIN 陽性領域( $\mu\text{m}^2$ )が占める面積の割合(%)に周期

的な変化が認められた。すなわち、Control 群の精細管 Stage VII-VIII での VIMENTIN 陽性領域は、Stage I-VI と Stage IX-XII のそれと比較して、有意に減少することが明らかとなった。興味深いことに、VAE 群ではこの VIMENTIN 発現の周期性が検出されなかった(図 2、齊藤、横田)。

#### ゴシポール単回経口投与実験

ヒトと齧歯類の両方で造精機能障害を誘発するモデル化合物としてゴシポールを用い、マウスの単回経口投与実験を実施した。投与濃度は、昨年度実施した先行研究の予備実験の結果を参考に、100, 300 mg/kg をそれぞれ低用量群と高用量群に設定した。Control 群には溶媒のコーン油を投与した(横田、北嶋)。

投与後 1, 3, 7 日経過時と 2, 4, 7 週経過時の体重を測定した結果、投与後 1 日経過時で Control: 21.0 ± 1.1g、Low: 19.9 ± 0.8g、High: 19.2 ± 0.8g、投与後 3 日経過時で Control: 21.3 ± 1.1g、Low: 20.6 ± 1.4g、High: 18.5 ± 1.1g、投与後 7 日経過時で Control: 21.9 ± 1.1g、Low: 21.1 ± 1.9g、High: 21.5 ± 0.8g となり、投与 1, 3 日後に投与用量依存的な体重低下を認めたが、投与後 7 日以降は、3 群の間で体重の差は認められなかった(横田)。

投与後 4 日経過時と 2 週経過時の肝臓でのゴシポール(遊離型 + 結合型)の蓄積量を測定した結果、投与後 4 日経過時で Control: 検出なし、Low: 2.3 ± 0.9 μg/g tissue、High: 6.4 ± 4.8 μg/g tissue、投与後 2 週経過時で Control: 検出なし、Low: 0.2 ± 0.04 μg/g tissue、High: 0.6 ± 0.1 μg/g tissue を示した。

投与 2 週、7 週経過時に解剖を行い、精巣器官重量を測定した結果、投与後 2 週で Control: 91.5 ± 4.4g、Low: 94.0 ± 6.4g、High: 104.2 ± 5.3g、投与後 7 週で Control: 114.3 ± 9.9g、Low: 116.1 ± 7.1g、High: 112.5 ± 7.4g となり、投与 2

週経過後に投与用量依存的な精巣器官重量の増加を認めた(横田、齊藤)。

精巣組織については、10 %中性緩衝ホルマリンに浸漬固定後、パラフィン包埋し、薄切切片を作成し HE 染色による病理組織学解析を実施した。その結果、異型遺残体を含む精細管の割合が最高用量 300 mg/kg 群において散見され、Control 群と比較して、その比率に有意な増加が認められた(図 3、横田、齊藤)。ゴシポール投与群について、精細管横断面の表面積に対して VIMENTIN 陽性領域が占める面積の割合を算出した結果、ゴシポール投与 2 週間後および 7 週間後いずれのサンプルについても、Control 群と比較して、有意な差は認められなかった(投与 2 週間後: Control 群: 13.9 ± 2.1%、低用量群: 13.2 ± 2.5%、高用量群: 13.2 ± 2.6%；投与 7 週間後: Control 群: 15.6 ± 0.4%、低用量群: 15.2 ± 0.6%、高用量群: 15.1 ± 0.8%、図 4)。さらに、VAE の実験と同様に、Control 群の精細管 Stage VII-VIII での VIMENTIN 陽性領域は、Stage I-VI と Stage IX-XII のそれと比較して、有意に減少することが明らかとなった。一方で、ゴシポール投与群ではこの VIMENTIN 発現の周期性が消失している可能性が見出されている。現在、追加解析を進め、精子形成サイクルにおける VIMENTIN 発現変化を指標とした精巣毒性評価の有用性についてデータを収集しているところである(齊藤)。

ゴシポール投与後 2 週経過時にて精巣毒性が認められたため、投与後 7 週経過時の精子性状解析(精子運動解析およびパパニコロウ染色による精子頭部形態解析)を実施した。その結果、全ての投与群において有意な差は認められなかった(図 3、横田)。

#### D. 考察

一般毒性試験で実施される精巣の病理組織

学解析はハザード検出力の高い評価として有用である。しかしながら、病理組織学解析は定性的評価にとどまり、また、精細管ステージ分類を行わない全体的な観察にて毒性判断が行われるため、精子形成サイクルのどの段階で毒性が認められるのかといった定量的評価が困難といった課題が挙げられる。実際に、我々が先行研究で明らかにしたビタミン A 過剰 (VAE)、ビタミン E 欠乏 (VED) マウス精巣の病理組織学的解析においては、目立った所見は認められなかった。昨年度までに、我々は PNA レクチン抗体を用い、精子細胞のアクロソーム(先体)を蛍光染色し可視化することにより、従来の PAS 染色法より迅速かつ高精度に精細管ステージの判別を可能とし、ハザード評価のスループット性を向上させることに成功している。同法に、各細胞種の核認識抗体を用いた多重免疫染色により、精細管ステージに着目した生殖細胞系列の詳細な分化度の評価を可能とし、SYCP-3 を認識する抗体を用いた定量的評価により、VAE 群においては Spermatocyte 全体の数に影響が認められたことが明らかとなった。ビタミン A 活性体であるレチノイン酸は Preleptotene Spermatocyte における減数分裂開始に関与する MEIOSIN の転写活性化が生殖細胞の体細胞分裂から減数分裂への切り替えを行い、精子形成に必須であることが最近明らかとなったため (Ishiguro et al., *Dev Cell*. 2020)、共同研究者として熊本大学の石黒博士に MEIOSIN を認識する抗体の作製を依頼した。複数提供された抗体のうち、guinea pig の一次抗体のみがパラフィン切片でも染色性が確認されたため、当該抗体を用いた毒性評価を実施した。その結果、VAE 群においては MEIOSIN の発現に影響を及ぼし、体細胞分裂から減数分裂への切り替えに一部不具合が生じたため精子形成が障害された可能性が示唆された。

セルトリ細胞と生殖細胞系列との相互作用に

VA シグナルが関与し、精子形成の進行に寄与することが以前から報告されているため、VAE 群で認められた精子形成障害にセルトリ細胞の機能的変化が想定された。そこで、生殖細胞を支持するセルトリ細胞に着目し、セルトリ細胞の中間径フィラメントを認識する VIMENTIN 抗体を用いた免疫染色を実施した。VAE 精巣での VIMENTIN 発現の解析結果から、昨年度までに行ったビタミン A および E 欠乏 (VAD、VED) サンプルとは異なり、Control 群と比較して VIMENTIN の発現自体に顕著な差は認められないことが明らかとなった。しかしながら、精細管ステージごとに VIMENTIN 発現を詳細に解析すると、Control 群で認められるような精子形成サイクル依存的な VIMENTIN 発現の周期性は VAE 群において消失することが明らかとなった。このように、セルトリ細胞自体も精子形成サイクルの中で自身の機能的役割を変えている可能性が示唆された。

今回観察された変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害と関連したものである可能性が考えられ、一連の抗体を用いた免疫組織化学的アプローチは、病理組織学的に捉えることが困難な精巣毒性の鋭敏な評価指標となりうることを示唆された。

ゴシポール投与実験においては、投与後 2 週経過時におけるゴシポールの肝蓄積量は、投与後 4 日経過時のゴシポールの肝蓄積量と比較し、低用量・高用量ともに 10 分の 1 まで減少した。経口投与されたゴシポールは肝臓で蓄積することが知られているが、本研究で実施したゴシポール投与における高用量/低用量の比 (300mg/kg / 100mg/kg = 3) と肝蓄積における高用量/低用量の比 (およそ 3) と近いことから、低用量・高用量群ともにゴシポールの肝クリアランスは同様の推移を示すことも確認した。

ゴシポール投与による精細管内における VIMENTIN 陽性領域が占める面積比に変化

は認められず、単回投与という制限された曝露条件下では、本研究で確立した解析によるハザードの検出はできなかった。しかしながら、VIMENTIN 陽性領域の精子形成サイクルにおける周期性への影響は、投与による影響の可能性が想定され、評価している精細管の数が現状不足しているため、今後追加での検討が必要である。

## E. 結論

本研究の遂行により、生殖毒性ハザードを早期に検出する精巣毒性評価法を確立した。

本研究では、PNA レクチンを用いた精巣の詳細な組織学的解析と、さらに MEIOSIN や VIMENTIN といった精子形成サイクル依存的に発現が変化するマーカー抗体による多重染色を実施し、精巣毒性の良い評価指標を見出すことに成功した。

今後、様々な被験物質を用いた投与実験を行い、データを蓄積することで本評価手法の有用性を示すことができれば、将来的には、健康被害を未然に防ぐための食品安全行政施策の提案にも貢献することが期待される。

謝辞: 本研究の遂行にあたり支援をいただいた、若山友彦先生(熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学講座・教授)、藤ノ木政勝先生(獨協医科大学医学部先端医科学統合研究施設実験センター・准教授)のご協力に深く感謝する。

## 【参考文献】

• Saito, H., Hara, K., Kitajima, S., Tanemura, K., 2020. Effect of vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol* 98, 225-232.

• Yokota, S., Shirahata T, Yusa J, Sakurai Y, Ito H, Oshio S., 2019. Long-term dietary intake of excessive vitamin A impairs spermatogenesis in mice. *J Toxicol Sci.*44(4), 257-271.

• Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7), 676-682.

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyaso H, Yokota S (Co-First), Suga K, Hashimoto Y, Kouno C, Nagahori K, Itoh M, Kitajima S: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administrated mice. *J Toxicol Sci.* 49(4):139-149. (2024)

Tsukiboshi Y, Noguchi A, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Let-7c-5p associate with inhibition of phenobarbital-induced cell proliferation in human palate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 696: 149516. (2024)

Hashimoto K, Arakawa H, Imamura R, Nishimura T, Kitajima S, Sato T, Makiyama K, Ogawa T, Yokota S (Corresponding Author): 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.* 44: 784-793. (2024)

Tominaga S, Yoshioka H, Yokota S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Nagai M, Hara H, Maeda T, Miura N: Copper-induced diurnal hepatic toxicity is associated with Cry2 and Per1 in mice. *Environ Health Prev Med.* 28: 78-86. (2023) Featured article 選出

Tsukiboshi Y, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Involvement of

- microRNA-4680-3p against phenytoin-induced cell proliferation inhibition in human palate cells. *J Toxicol Sci.* 49(1): 1-8. (2024)
- Yokota S (Corresponding Author), Wakayama T, Miyaso H, Suga K, Fujinoki M, Kaneko S, Kitajima S: Reactive blue 2 labels protamine in late-haploid spermatids and spermatozoa and can be used for toxicity evaluation. *Andrologia*. Volume 2023: 1-12. Article ID 7364862
- Yoshioka H, Wu S, Moriishi T, Tsukiboshi Y, Yokota S, Miura N, Yoshikawa M, Matsui N, Inagaki N, Matsushita Y, Nakao M: Sasa veitchii extract alleviates non-alcoholic steatohepatitis in methionine-choline deficient diet-induced mice by regulating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Traditional and kanpo.* 10(3): 259-268. (2023)
- Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamidiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci* 17, 1239808, 2023
- Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci.* 48(7): 411-20. (2023)
- Kaneko S, Okada Y, Yokota S, Takamatsu K: Reactive Blue Dye: Highlights of Vacuoles in Human Sperm. *J Med Diagn Meth.* 12(2): 400. (2023)
- 横田理: 小動物用コンパクト MRI を用いた非侵襲的画像解析の毒性評価への応用—動物からヒトへのトランスレーショナルリサーチを目指して—、*中毒研究*、第 37 巻第 1 号、p63-69. (2024.3.10)
- 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
- 横田理、平井俊範、菅康佑、若山友彦、宮宗秀伸、高橋祐次、北嶋聡: 小動物用 MRI を用いた精巣機能障害の高感度検出に資する非侵襲的画像診断法の開発、第 63 回日本先天異常学会学術集会、つくば (2023.7.29)、優秀演題講演
- 横田理: 磁気共鳴画像法 (MRI) を用いた非侵襲的評価による雄性生殖毒性評価の省力化と発生毒性リスクの予測、第 6 回医薬品毒性機序研究会、つくば (2023.12.5)、シンポジウム
- 横田理: 小動物用 MRI を用いた非侵襲的画像解析の毒性評価への応用に関する現状と課題、第 45 回日本中毒学会総会、埼玉 (2023.7.15)、シンポジウム
- 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、埼玉 (2023.7.15)
- 横田理: 小動物用磁気共鳴画像法 (MRI) を用いた in vivo 非侵襲的毒性評価への応用、第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2023.6.21)、シンポジウム
- 三浦伸彦、吉岡弘毅、横田理: 酸化チタンナノ粒子と精巣機能障害、第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2023.6.21)、シンポジウム
- 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、神奈川 (2023.6.19)、シンポジウム
- 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、神奈川 (2023.6.21)、シンポジウム
- Miyaso H, Li Z, Takano K, Nagahori K, Kawata S, Kuramasu M, Ogawa Y, Yoshioka H, Matsuno Y, Yokota S, Itoh M: The effects of neonatal corticosterone administration on Sertoli cell number in the testes of mice in prepubertal and postpubertal stages, *Asian Congress for Reproductive Immunology (ACRI 2023)*, Hyogo, Japan (2023.4.8-9), Oral
- Yokota S, Wakayama T, Saito H, Kitajima S: Development of a novel histological evaluation to predict the early signs of sperm toxicity using vitamin A excess mouse model, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.22), Poster
- Yokota S, Suga K, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.21), Poster

## 2. 学会発表

- 横田理: 雄性生殖を介した継世代影響を予測する新規毒性評価法の開発、2023 年度日本薬学会関東支部オンライン受賞記念講演会、東京 (2023.12.13)、奨励賞受賞講演
- 横田理: 雄性生殖を介した継世代影響を予測する新規毒性評価法の開発、第 67 回日本薬学会関東支部大会、東京 (2023.9.16)、奨励賞受賞講演

## H. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. ビタミンA過剰による精子形成サイクルと分化度に及ぼす影響

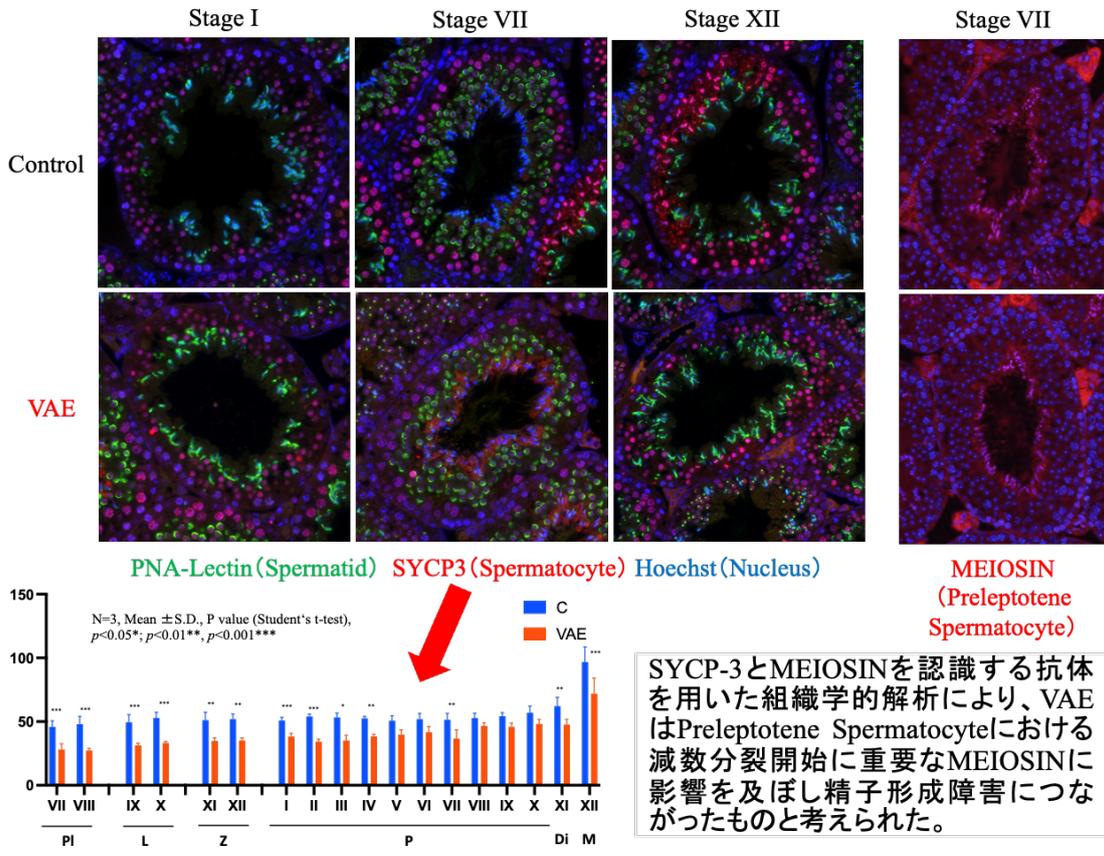


図2. ビタミンA過剰によるVIMENTIN陽性領域の周期性への影響

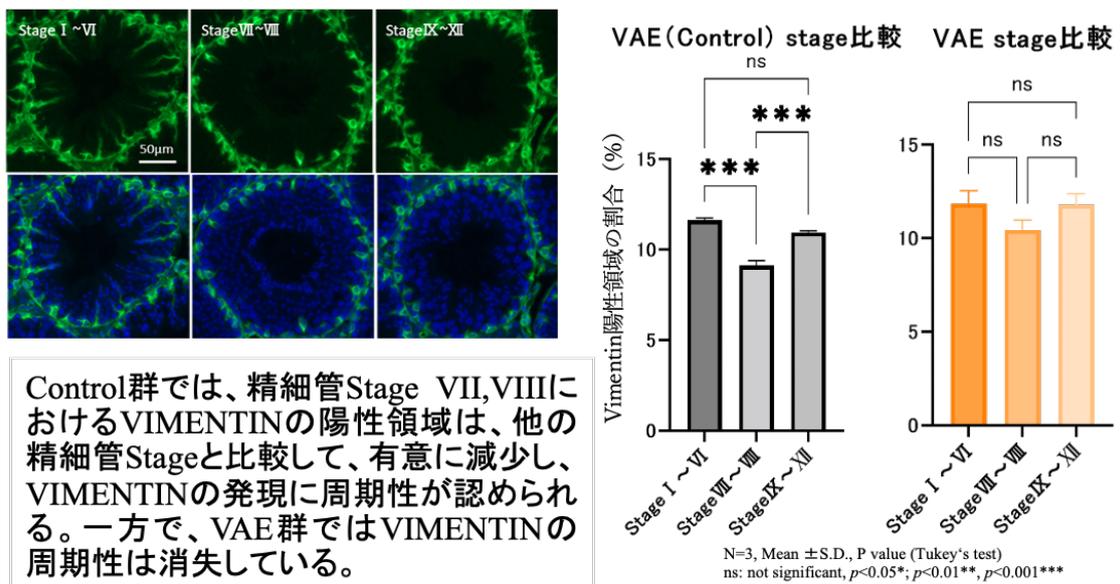
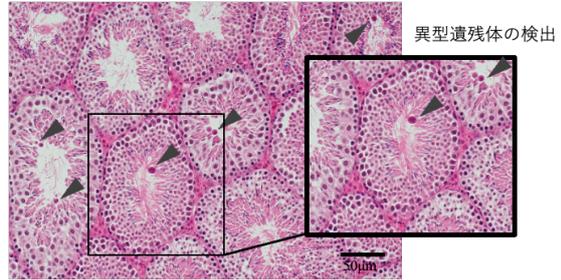
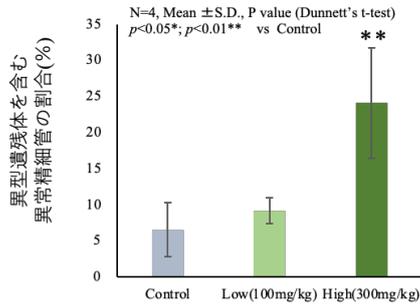


図3.ゴシポール投与によるマウス精巣および精巣上体精子の形態解析

・HE染色による精巣組織切片の観察



・パバニコロウ染色による精子の形態解析

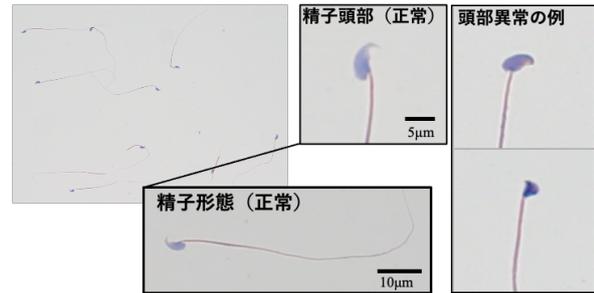
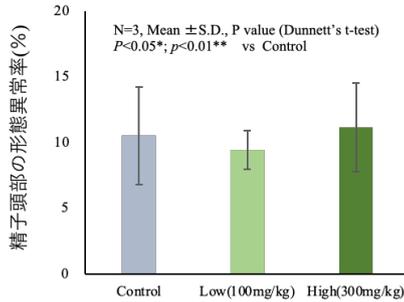
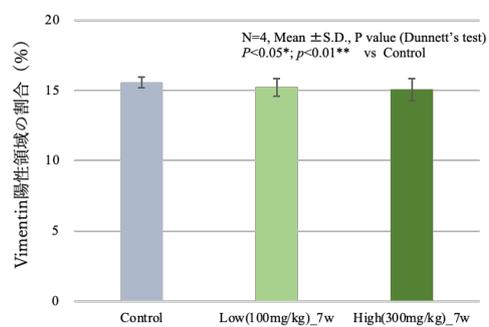
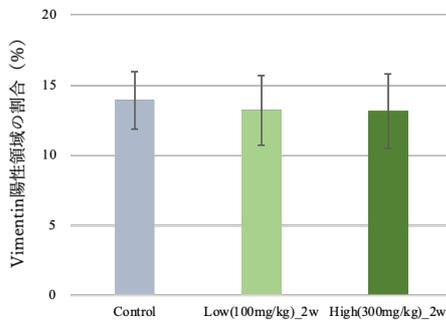
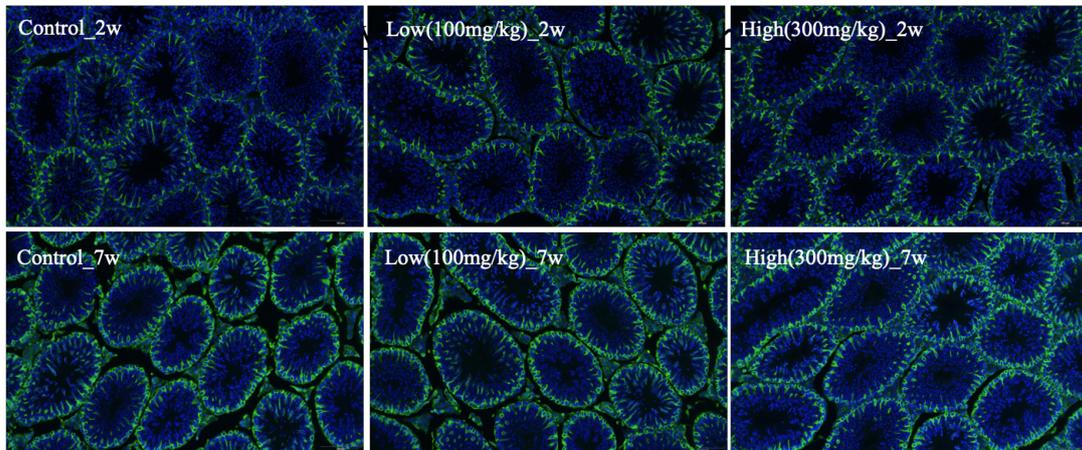


図4.ゴシポール投与群(2週間後、7週間後)における精細管内VIMENTINの陽性領域への影響



令和5年3月30日

厚生労働大臣 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 合田 幸広 印

次の職員の令和4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 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
3. 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) 横田 理・ヨコタ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月30日

厚生労働大臣 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 合田 幸広 印

次の職員の令和4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 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する造精機能障害の新規ハザード評価体系の基盤構築
3. 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・研究員  
(氏名・フリガナ) 齊藤 洋克・サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。