

別添 3

I. 総括研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

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

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価を可能とすることを目的としている。

また、本研究においては、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法がオルガノイド 3D 培養法における培養上清中のエクソソームにも応用が可能かの検証を行なうことで、将来的な新規の動物実験代替法の開発に資する研究も行う。

3年計画の3年目にあたる令和5年度の進捗は以下の通りである。

(1) 令和4年度において妊娠中のばく露により二分脊柱などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られるバルプロ酸ナトリウムの投与実験（妊娠9—11日（GD9-11）に反復投与、0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600mg/kg/day（GD18 解剖群のみ、800mg/kg/day 群あり）を行い、GD11, 15, 18 日目に剖検、および、母体血および胎児羊水のサンプリングを行っていたが、令和5年度研究においては、それらの詳細な外表面観察を行った。

その結果、投与したバルプロ酸ナトリウムの濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。このことから、本研究で行なったバルプロ酸ナトリウム投与による催奇形性モデル動物の作製は予定通りに成功した (**Ono R.** et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

(2) 羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プロトコールの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティーカラム抽出法、の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクである CD9 抗体でのウエスタンブロット解析、および、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) によるエクソソームの粒子径および粒子数解析を行い、羊水からは、アフィニティーカラム法が適していると結論した。

(3) (1) 研究計画において採取したバルプロ酸ナトリウムを投与した妊娠マウスの母動物血清、および、羊水よりエクソソームの抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行うことで、催奇形性作用のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。 (**Ono R.** et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)

(4) 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行い、ライン化することに成功した。

(5) 肝臓オルガノイドを細胞培養プレートに播種し、5日間培養した後、肝毒性モデル物質である四塩化炭素 (0mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM) を添加した。四塩化炭素添加後の2日目に培養上清と肝臓オルガノイドを回収した。用量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素 (AST および ALT) においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソーム RNA 解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーである miR-122 や miR-192 の上昇も確認できなかった。

(結論)

本研究で行なった催奇形性物質であるバルプロ酸ナトリウムの妊娠動物への投与により、濃度に依存した子宮内胎児発達遅延や、神経管閉鎖不全や指形成不全の催奇形性作用が確認された。ここで、重要なのは、全ての腹で同様に催奇形性作用が確認されたわけではなく、催奇形性の全くでない腹もあれば、ほぼ全てが催奇形性の表原型を持つ腹もあるという事実である。

このような催奇形性発現状況こそが、催奇形性試験に経験豊富なエキスパートが必要な大きな理由の一つと考えられる。そこで、我々は、催奇形性の表原型の有無に関係なく、催奇形性物質投与により、誘導されるエクソソーム RNA の発現量を催奇形性の指標とする次世代型毒性評価法の開発を本研究の目的とした。

母動物へのバルプロ酸ナトリウム投与により、胎児における催奇形性作用が確認され、エクソソームを抽出する体液として、母動物の血清、および、胎児の羊水の採取を行い、それらの網羅的遺伝子発現解析を行なった。そこで、バルプロ酸ナトリウム投与に依存的に誘導されるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R, et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

ここで、GD15の羊水中のエクソソーム RNA で、バルプロ酸ナトリウム投与依存的に誘導されるエクソソーム RNA には、ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群が濃縮されていることが判明した。

これは、バルプロ酸ナトリウムは、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つことから、ヒストンアセチル化によって遺伝子の転写活性の on/off をしている遺伝子に関しては、転写を活性化すると考えられる。このヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つ、*Trichostatin A* も、バルプロ酸ナトリウムと同様の催奇形性作用を持つことが報告されていることから、これらの催奇形性発現は、ヒストンアセチル化の異常による遺伝子発現異常にあると考えられる。

そこで、本研究により単離された催奇形性の毒性指標候補であるエクソソーム RNA であるゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群の発現は、毒性機序の面からも、非常に優れた毒性バイオマーカーであると結論できる。

また、次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行い、ライン化することに成功した。このモデルを用いて様々な毒性指標のバイオマーカーが得られることが期待される。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームを毒性指標とする動物実験代替法の検証においては、アセトアミノフェンについては、生体への投与と同様な挙動が見られたが、四塩化炭素投与においては、生体で見られる反応が見られなかった。これは、肝毒性の発現以前に、培養系における細胞毒性を生じてしまい、生体とは違うメカニズムで細胞の生存障害が起こっているものと考えられる。

動物実験代替法は推進すべき課題であるが、本当に生体を反映しているかの評価が難しい問題である。本研究で開発に成功した母動物の血清および胎児羊水中のエクソソーム RNA を毒性指標とする次世代型毒性評価法は、動物実験における使用匹数の大幅な削減に貢献するだけでなく、オルガノイドなどの培養系における *in vivo* を反映しているのかという鋭敏な指標にもなりうると思われる。

研究分担者

- 桑形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部・第二室・室長
- 成瀬美衣 国立がん研究センター
安全性生物試験研究センター
研究所・動物実験施設・研究員
- 伊川正人 大阪大学
微生物病研究所
動物実験施設・教授
- 落谷孝広 東京医科大学
医学総合研究所
分子細胞治療研究部門・教授
- 平林容子 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
センター長

研究協力者

- 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
- 相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部・第一室長
- 高橋祐次 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・動物管理室長
- 吉岡祐亮 東京医科大学
医学総合研究所
分子細胞治療研究部門・講師
- 立原江利加 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
- 内山美希 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
- 江森 千紘 大阪大学
微生物病研究所
動物実験施設・助教
- Yonggang Lu 大阪大学
微生物病研究所
動物実験施設・特任助教

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（[Ono R. et al., Toxicology Reports 2020](#)）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もことから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

令和3年度に確立した試料採取法に基づいて、令和4年度には催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸投与後の母動物血清および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取することを行なっている。今年度は、昨年度に採取したサンプルの詳細な解析を行い、催奇形性の毒性指標となるエクソソームRNAの単離を行う。

また、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用

することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。

さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。

そこで、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることも目的としている。これは、動物福祉 (3Rs) の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法を開発するために、妊娠マウスに既知の催奇形性化合物を経口投与し、胎児に発現する形態変化から毒性指標となるエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

● *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド 3D 培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

これらに加えて、対象マウス個体の一般的な毒性評価を行うことで、現行の生殖毒性評価と本研究で開発する次世代型生殖毒性評価法の比較を行う。

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においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察 (桑形)、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査 (平林)、エクソソームの抽出およびエクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析 (小野) を行

い、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析 (落谷) を行い、大阪大学・微生物病研究所 (伊川) においては、本研究において得られる発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製 (伊川) を行う。また、国立がん研究センター (成瀬) においては、毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討する。

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離 (

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、超遠心ペレットダウン法を行い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウエスタンブロットリングやエクソスクリーン法により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、エクソソーム単離効率の評価を行う。

・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法

催奇形性陽性対照物質として二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を用いた。バルプロ酸は抗てんかん薬として使用されている。

本研究では、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠9日から11日にバルプロ酸を経口投与し、投与最終日 (妊娠11日)、これまでにエクソソーム解析実績のある妊娠15日、および催奇形性評価に選択されている妊娠20日に、それぞれ、母動物血漿および子宮内容物 (胎盤、卵黄囊膜、胎児) をエクソソーム解析用に採取した。

また、曝露状態を確認するために、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度を確認した。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

測定対象物質：バルプロ酸ナトリウム

製造元：Sigma-Aldrich Japan G.K.

CAS番号：1069-66-5

分子量：166.19

ロット番号：WXBD4552V

純度：99.0%

性状：白色、粉末

保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液 (略称：0.5% MC溶液)

製造元：富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のメチルセルロースを秤取りし、攪拌しながら温めた注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号1J76）に徐々に加えて分散させた。これを冷やしてメチルセルロースを溶解させ、更に注射用水を加えて0.5%MC溶液とした。調製後、冷蔵保存した。

1-3. 被験液の分析

18.75 mg/mL (300 mg/kg群) および37.5 mg/mL (600 mg/kg) の被験液について、媒体中濃度を測定した。各被験液の濃度の表示値に対する割合は100.0%及び102.2%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合が100% ± 10%）であった。
測定施設：一般財団法人日本食品分析センター

1-4. 使用動物

動物種：マウス（SPF）
系統：C57BL/6J
供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター
入荷時週齢：雌10週齢、雄11週齢
匹数：交配用雄82匹、雌92匹
使用した妊娠動物：46匹

入荷後1週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。
交配：11週齢以上の雌1匹に12週齢以上の雄1匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠0日とした。
群分け：交尾成立日（妊娠0日）ごとに行い、妊娠0日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにコンピュータを用いたブロック化により行った。余剰動物は動物管理部門へ移管した。

1-5. 飼育環境

温度（23 ± 3℃）、湿度（50 ± 20%）、換気回数（10~15回/時間）、照明（1日12時間、07:00~19:00）に統御された動物飼育室で飼育した。
飼育は床敷（コンフィネスト、株式会社ファルマ）を入れたプラスチックケージ（W155×D245×H150 mm）に個別飼育した（交配期間を除く）。
飼料は固型飼料CRF-1（γ線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社）をステンレス製給餌器に入れて自由に摂取させ、給水は自動給水装置により自由に水道水を摂取させた。
環境エンリッチメントとして、IACUCの指針に従って、ケージの蓋からステンレス棒を吊り下げて遊具とし、床敷と同じ素材のBiting board（3cm四方のプレートを中央で山折りにしたもの）を噛み材として与えた。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間はバルブロン酸ナトリウムの催奇形作用の臨界期である妊娠9日より11日までの3日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（計3回）とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

バルブロン酸ナトリウムは注射用水に5%濃度で溶解することが知られていることから、催奇形作用が明瞭に発現すると考えられる800 mg/kgを投与可能な16 mL/kgを投与容量とした。投与液は、フレキシブル胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は300、600及び800 mg/kgの3用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した10群構成とした。すなわち、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に妊娠11日剖検群、妊娠15日剖検群及び妊娠18日剖検群をそれぞれ設けた。また、800 mg/kg群には妊娠18日剖検群を設定した。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を4匹（800 mg/kgは死亡等を考慮し8匹）とした。群構成を表1に示した。ただし、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に不妊が認められた場合は、適宜交尾成立動物を追加した（動物番号は各群5番以降を続けて割当てた）。

表1

投与量 (mg/kg)	剖検時期	投与容量 (mL/kg)	濃度 (ng/mL)	交尾成立雌数	動物番号
0	GD1 1	16	0	4	1101~1104
	GD1 5			4	2101~2106
	GD1 8			4	3101~3105
300	GD1 1	16	18.75	4	4101~4107
	GD1 5			4	5101~5106
	GD1 8			4	6101~6105
600	GD1 1	16	37.5	4	7101~7106
	GD1 5			4	8101~8106
	GD1 8			4	9101~9106
800	GD1 8	16	50	8	10101~10108

投与量設定根拠

本被験物質の臨床適用量は成人1人当たり1日400~1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8~24 mg/kgに相当する。バルブロン酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持

つ児が出現することが知られている。
本試験においては、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソゾームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の13~75倍で、奇形を起こすとした文献が存在する300 mg/kg及び600 mg/kgを投与する群を設けた。なお、600 mg/kgの投与によっても奇形が認められない胎児が存在したため、800 mg/kgを追加した。

2-4. 動物の観察

全動物について、生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1~3時間後の間（ただし、妊娠11日剖検群の妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回）、その他の期間は1日1回（午前中）行った。

体重は、妊娠0、4、9、10、11、15、18日（妊娠11日剖検群及び妊娠15日剖検群はそれぞれ妊娠11及び15日まで）の07:00~12:30の間（投与期間中は投与前）に測定した。
また、投与期間中（妊娠9日から妊娠11日）の体重増加量を算出した。

2-5. 剖検

妊娠11日剖検群の各4~7例より、妊娠11日の投与後1時間の時点（許容範囲60±5分）において、イソフルラン吸入麻酔下に無処置シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血した後、腹大動脈を切断して放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

妊娠15日剖検群の各6例は妊娠15日の、妊娠18日剖検群の各5~6例（800 mg/kg群は8例）は妊娠18日の、いずれも妊娠11日に採材した動物とほぼ同じ時刻（09:00~12:00の間）に、同様に採血後放血して安楽死させ、剖検した。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存した。

2-8. 羊水、胎児血漿（GD18）、胎児（GD11、GD15）、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠11日剖検群：各群4例
最終投与1時間後（09:00~12:00の間）
妊娠15日剖検群：各群4例、

妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻

（09:00~12:00の間）

妊娠18日剖検群：各群4例（800 mg/kg群は8例）、
妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻（09:00~12:00の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

(a) 妊娠11日剖検群

子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出した。その後、生理食塩液を入れたシャーレ中等で卵黄囊膜を切開し、胎児と胎盤を分離した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、形態観察を実施した。

(b) 妊娠15日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

(c) 妊娠18日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出後、胎児の頸部を切開して頸動脈を切断し、漏出した血液をヘパリン処理したヘマトクリット毛細管を用いて可能な限り採血した。血液はポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）により血漿とし、バリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。採血後の胎児は重量を記録し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

また、胎盤は重量を記録後、ほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。

3) 試料番号

羊水又は胎児血漿、胎盤及び胎児は、それぞれ試料番号を記載したものをラベルしたサンプル管に収納した。試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。着床番号は以下の表2に従って1生存胎児ごとに割り振った。

表2

投与量 (mg/kg)	剖検時期	着床番号
0	GD11	101~
	GD15	201~
	GD18	301~
300	GD11	401~
	GD15	501~
	GD18	601~
600	GD11	701~
	GD15	801~
	GD18	901~

800	GD18	1001~
-----	------	-------

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、-1は羊水又は胎児血漿、-2は胎児、-3は胎盤（RNA later）、-4は胎盤と識別した。

サンプル	枝番号	保存条件
羊水又は胎児血漿	-1	冷凍（-80°C）
胎児	-2	室温
胎盤（RNA later）	-3	冷蔵
胎盤（10%リン酸緩衝ホルマリン液）	-4	室温

2-8. 統計処理

・MiTOX-BOZOシステム（Version 9.3.1.1、三井E&Sシステム技研株式会社）

3. バルプロ酸経口投与後の母動物血漿中および子宮内容物中の濃度確認

バルプロ酸をその奇形の臨界期（妊娠9~11日まで）の妊娠雌動物に投与し、胚・胎児発生への有害作用を起した状況での、母動物血漿中並びにその胎児中のバルプロ酸濃度を測定することにより、被験物質の妊娠動物における曝露状況を評価した。

3-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-1.参照）

3-2. 投与方法

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-2.参照）

3-3. 投与量及び群構成

投与量は300及び600 mg/kgの2群構成とした。1群当たりの交尾成立雌動物数を5匹とした。群構成を表3に示した。

表3

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌数	動物番号
300	18.75	16	5	1101~1105
600	37.5	16	5	2101~2105

3-4. 投与量設定根拠

被験物質の臨床適用量は1日400~1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8~24 mg/kgに相当する。この量のバルプロ酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られている。

Dawning et al. (注1)によれば、800 mg/kg又は400 mg/kgのバルプロ酸を妊娠9日（膣栓=妊娠0日）の昼に単回腹腔内投与した結果、脊椎、肋骨及び指の奇形が報告されている。本試験においては、当初、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソソームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の16~100倍で、全胎児に奇形を起こすとした文献が存在する400 mg/kg及び800 mg/kgを投与する群を設けた。

実際に投与を行うと、800 mg/kgでは初回投与で母動物が死亡し、この用量では必要なTK試料数の確保が難しいと想定されたことから、投与量を600及び300 mg/kgに変更した。

(注1) Downing Chris, Biers Jami, Larson Colin, Kimball Alexi, Wright Hali, Ishii Takamasa, Gilliam David, Johnson Thomas: Genetic and Maternal Effects on Valproic Acid Teratogenesis in C57BL/6J and DBA/2J Mice. Toxicological Sciences. 116 (2) 632-639 (2010).

3-5. 動物の観察

生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1~3時間後の間（ただし、妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回）、その他の期間は1日1回（午前中）行った。体重は妊娠0、4、9、10、11日の07:00~12:30の間（投与期間中は投与前）に測定した。なお、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、搬出前に測定した結果、著しい重量低下は認められなかった。

3-6. 剖検及び帝王切開

妊娠11日の投与後1時間の時点（許容範囲60±5分）において、イソフルラン吸入麻酔下にて、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血（剖検時間の偏りを考慮し、低用量群と高用量群を交互に採血した）した後、腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、発見後速やかに、剖検を行ったが、特記すべき異常は認められなかった。本例では死亡に先立つ一般状態の異常も観察されなかった。800 mg/kgを投与し死亡した1例の一般状態観察、体重測定、剖検所見については本試験の結果から、削除した。剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。母動物ごとに妊娠状態を記録し、第6.1.3項で採血し、第6.1.5項に従って処理した血漿とともに試験場所に送付した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は観察後廃棄し、TK試料は測定対象としなかった。

3-7. 母動物血漿中濃度測定用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器に移し、遠心分離（4°C、6000 ×g、2分間）により血漿を得た。得られた血漿試料は試験番号、採血時期、動物番号、試料番号、採血年月日、採血時点、試料名を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製容器に入れ、測定時まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下）に保存した。

3-8. 胎児の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠11日：各群5例、最終投与1時間後

2) 対象部位の採取

子宮壁を切開後、卵黄嚢膜と胎児及び胎盤を摘出し分離した。

胎児はそれぞれ試料番号をラベルしたサンプル管に個別に収納し、重量を記録した。

3) 試料番号

試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。

着床番号は、300 mg/kg群は201番から、600 mg/kg群は301番から1生存胎児ごとに割り振った。

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、1は胎児がサンプル管の内容であった。

4) サンプルの保管

全てのサンプル管は測定まで -80°C の冷凍庫（許容値： -70°C 以下）に保存した。

3-9. 母動物血漿中濃度及び胎児中濃度測定

分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象試料は、各群、各時点の妊娠成立動物のうち個体番号が若い3例から得られたTK試料を測定対象とした。

分析方法：

液体クロマトグラフータンデム質量分析（LC-MS/MS）法

機器名及び型式	メーカー
四重極タンデム型質量分析計 (MS/MS)	Waters Corporation
データ処理ソフト MassLynx 4.1	Waters Corporation
高速液体クロマトグラフ (HPLC) ACQUITY UPLC I-CLASS	Waters Corporation

測定対象物質：バルプロ酸

標準物質：valproic acid sodium salt

ロット番号：WXBD4552V

塩換算係数：0.8677 (=144.21/166.19)

内標準物質：Diclofenac sodium salt

ロット番号：P7E3B

なお、簡易分析バリデーションは昨年度（R3年度）に実施している。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、Qiazol solution (Qiagen) によって溶解され、miRNeasy micro-elution kit (Qiagen) によって、RNA を抽出および精製する。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for 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。作成した次世代シーケンス用ライブラリーは、Bluepippin サイズセレクターを用いて、148 bp ~ 185 bp のマイクロ RNA 画分だけを抽出する。サイズセレクションを行

ったエクソソーム RNA の次世代シーケンス用ライブラリーは、KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (Nippon Genetics, Japan) または、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、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 および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、網羅的遺伝子発現解析を行う。

・エクソソーム RNA の RNA-seq データ解析

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

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し TopHat 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、Cufflinks and Cuffnorm programs 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 miRNA のリファレンスシーケンスは、miRbase (<http://mirbase.org>) を利用した。

・生化学検査

エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行う。

aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) の項目について、automatic blood chemistry analyzer Dry-Chem NX 500V (Fuji Film Co. Ltd, Tokyo, Japan) を利用して測定する。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

令和 5 年度に作製した Atp7b 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J♂または、C57BL/6J♀) と交配を行い、F1 世代マウスの作製を行い、それらの変異を確認することで、変異アレルの germline transmission を確認する。

さらに、germline transmission が確認された変異マウス

同士を交配することで、各変異マウスの homo 変異マウスの作製を行い、それぞれのラインの評価を行う。

変異アレルの確認には、下記のプライマーセットを用いてゲノム編集により変異を導入したオンターゲット部位を含む領域を PCR で増幅し、その後、それぞれの F および R のプライマーによるダイレクトシーケンス法により、変異配列を確認する。

Atp7b exon8 変異マウス

Atp7b-exon8 F1: ttagtgactgccgcccctaa

Atp7b-exon8 R1: tcaccagaggctgaggaaga

Atp7b exon11 変異マウス

Atp7b-exon11 F1: ataatgcagcccaggtagtc

Atp7b-exon11 R1: gagtccctcatcacaggttag

ここで得られる F2 世代の homo 変異マウスは、生後 6 ヶ月において、生化学検査およびエクソソーム解析用の血清採取、肝臓および腎臓の毒性評価用の病理学的解析を行う。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討

C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) マウスを解剖し、肝臓を採取する。これらをハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行う。その後に 40 μm セルストレーナーを通し、酵素的および物理的に組織を破碎した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

樹立に成功した肝臓オルガノイド 1×10^5 個を細胞培養プレートに播種し、5 日間培養を行い、四塩化炭素 (0mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM) を添加後 2 日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

回収した培養液上清 (1ml) より、500μl を使用して、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行う。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

・エクソソーム解析用試料採取試験の解析 (R5 年度：桑形、小野)

1. 一般状態および体重推移

800 mg/kg群の1例が初回投与(妊娠9日)の投与後1~3時間に腹臥を呈し、投与2日に死亡した。剖検では肉眼的異常はみられなかった。死亡例には肉眼的に着床が認められ、妊娠が確認された。

生存例の一般状態は、800 mg/kg群では投与期間中(妊娠9-11日)の投与後1~3時間に自発運動の減少あるいは腹臥がほぼ全例に観察された。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも一般状態に異常はみられなかった。

2. 体重 (Table 1)

800 mg/kg群(母動物)では、投与期間(妊娠9-11日)及び投与終了後期間(妊娠11-18日)の体重に増加抑制傾向がみられた。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも体重推移に異常はみられなかった。

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice									
Body weight (necropsy group on GD 18)					Period: F0 gestation Day 0-18				
Sex: Female					Dose: Valproic acid 0 mg/kg				
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)
3101		20.8	21.7	24.3	26.0	26.0	31.8	38.0	1.7
3102		20.9	21.2	24.0	24.8	25.7	32.9	38.0	1.7
3104		19.2	21.6	24.7	26.4	27.1	34.1	40.4	2.4
3105		19.4	20.9	23.5	24.6	24.7	31.2	36.0	1.2
n		4	4	4	4	4	4	4	4
Mean		20.1	21.4	24.1	25.5	25.9	32.5	38.1	1.8
S.D.		0.9	0.4	0.5	0.9	1.0	1.3	1.8	0.5

Dose: Valproic acid 300 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)
6102		20.9	20.8	23.3	23.3	24.0	29.6	35.3	0.7
6103		20.7	22.0	25.5	25.0	25.2	31.0	36.2	-0.3
6104		20.2	20.4	23.5	24.5	24.8	29.6	34.8	1.3
6105		20.1	21.0	23.0	23.4	23.6	28.8	33.2	0.6
n		4	4	4	4	4	4	4	4
Mean		20.5	21.1	23.8	24.1	24.4	29.8	34.9	0.6
S.D.		0.4	0.7	1.1	0.8	0.7	0.9	1.3	0.7

Dose: Valproic acid 600 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)
9101		20.4	20.5	23.5	24.4	23.3	27.4	32.2	-0.2
9102		19.2	20.1	22.6	22.5	23.2	28.6	35.1	0.6
9103		20.7	21.7	24.2	24.0	25.3	29.3	34.2	1.1
9104		20.2	20.7	22.2	21.8	21.8	28.2	33.4	-0.4
n		4	4	4	4	4	4	4	4
Mean		20.1	20.8	23.1	23.2	23.4	28.4	33.7	0.3
S.D.		0.7	0.7	0.9	1.2	1.4	0.8	1.2	0.7

Dose: Valproic acid 800 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15	18	Body weight gain(9-11)
10101				25.4	24.5	24.9	29.9	36.9	-0.5
10104 a)				22.0					
10106				23.1	22.0	22.3	22.7	24.5	-0.8
10108				22.5	21.5	21.9	23.7	25.3	-0.6
n				4	3	3	3	3	3
Mean				23.3	22.7	23.0	25.4	28.9	-0.6
S.D.				1.5	1.6	1.6	3.9	6.9	0.2

n: Number of dams
a): Died on day 2 administration

3. 剖検

いずれの母動物にも剖検所見に異常はみられなかった。

4. 帝王切開所見

妊娠11日の胎児に関しては、まだ胎児の大きさが小さいことから、体重測定、および、羊水採取は行っていない。また、妊娠18日の胎児においては、羊水量が胎児に比較して減少することにより、採取が困難なことから、羊水採取を行っていない。

まず、妊娠15日、および、妊娠18日での胎児体重測定の結果、妊娠15日は、600 mg/kg群において、妊娠18日では、300 mg/kg群、600 mg/kg群、800 mg/kg群で、優位に体重の低下が見られた。

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice									
Body weight (necropsy group on GD 11)					Period: F0 gestation Day 0-11				
Sex: Female					Dose: Valproic acid 0 mg/kg				
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11			Body weight gain(9-11)
1101		21.7	22.5	24.2	25.2	26.5			2.3
1102		22.5	22.5	25.8	26.5	27.8			2.0
1103		19.4	20.2	22.7	23.9	24.4			1.7
1104		19.7	20.6	23.3	24.2	25.4			2.1
n		4	4	4	4	4			4
Mean		20.8	21.5	24.0	25.0	26.0			2.0
S.D.		1.5	1.2	1.3	1.2	1.5			0.2

Dose: Valproic acid 300 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11			Body weight gain(9-11)
4103		20.1	20.2	22.8	23.5	22.8			0.0
4104		20.7	22.5	25.5	24.6	25.5			0.0
4105			22.3	25.2	25.5	26.4			1.2
4106			20.1	23.4	24.2	25.3			1.9
n		2	4	4	4	4			4
Mean		20.4	21.3	24.2	24.5	25.0			0.8
S.D.		0.4	1.3	1.3	0.8	1.5			0.9

Dose: Valproic acid 600 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11			Body weight gain(9-11)
7102		20.8	21.6	25.1	26.2	26.6			1.5
7103		20.5	21.8	25.9	25.0	25.9			0.0
7105			22.6	25.2	25.6	27.1			1.9
7106			20.8	24.3	25.0	26.2			1.9
n		2	4	4	4	4			4
Mean		20.7	21.7	25.1	25.5	26.5			1.3
S.D.		0.2	0.7	0.7	0.6	0.5			0.9

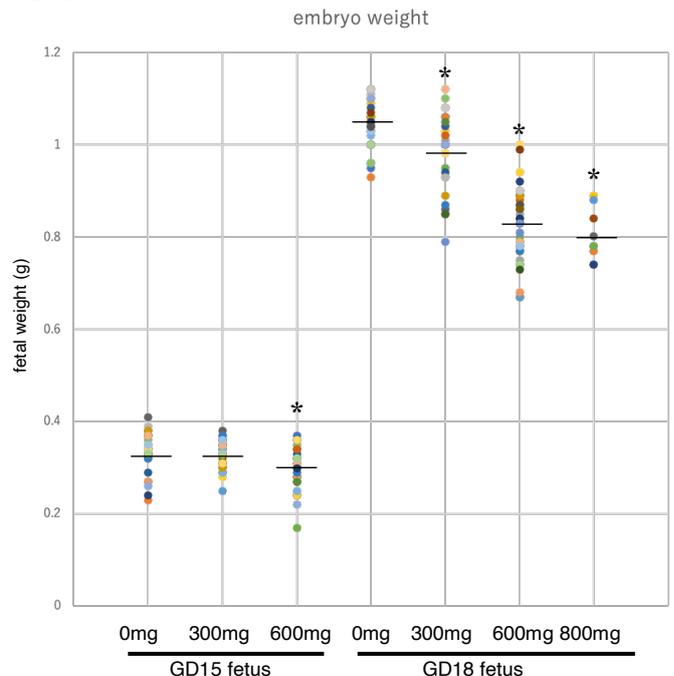
n: Number of dams

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice									
Body weight (necropsy group on GD 15)					Period: F0 gestation Day 0-15				
Sex: Female					Dose: Valproic acid 0 mg/kg				
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15		Body weight gain(9-11)
2102		20.6	21.5	24.6	25.7	26.5	31.5		1.9
2103		20.0	21.2	23.7	24.7	25.5	30.4		1.8
2104		19.2	21.2	23.5	24.6	25.7	30.3		2.2
2105		20.0	21.0	23.8	24.6	25.7	31.0		1.9
n		4	4	4	4	4	4		4
Mean		20.0	21.2	23.9	24.9	25.9	30.8		2.0
S.D.		0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.6		0.2

Dose: Valproic acid 300 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15		Body weight gain(9-11)
5102		21.0	21.9	24.1	25.5	25.6	29.3		1.5
5103		19.6	20.0	22.9	24.0	25.4	31.3		2.5
5104		22.9	23.1	25.5	25.1	26.3	30.3		0.8
5105		21.9	23.2	25.9	25.6	26.0	32.5		0.1
n		4	4	4	4	4	4		4
Mean		21.4	22.1	24.6	25.1	25.8	30.9		1.2
S.D.		1.4	1.5	1.4	0.7	0.4	1.4		1.0

Dose: Valproic acid 600 mg/kg									
Animal No.	/Day	0	4	9	10	11	15		Body weight gain(9-11)
8102		21.9	22.3	24.6	25.4	26.7	31.3		2.1
8103		19.5	19.8	22.3	22.9	24.1	28.7		1.8
8104		20.3	21.0	23.1	23.0	24.1	28.3		1.0
8105		19.2	19.3	21.9	21.5	22.0	26.4		0.1
n		4	4	4	4	4	4		4
Mean		20.2	20.6	23.0	23.2	24.2	28.7		1.3
S.D.		1.2	1.3	1.2	1.6	1.9	2.0		0.9

n: Number of dams



図：妊娠15日および18日における胎児体重測定の結果

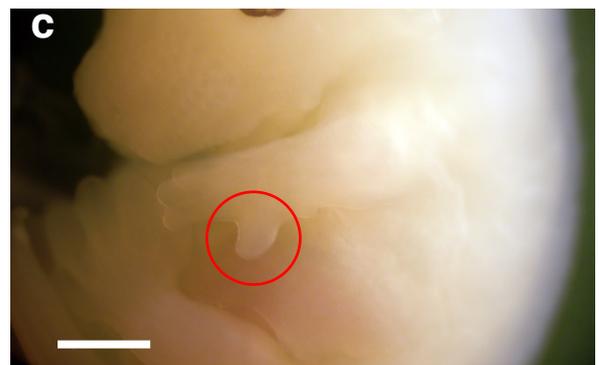
次に、外表異常を観察したところ、妊娠11日では、異常所見は見られず、妊娠15日においては、600 mg/kg群において、1胎児（胎児番号：8104-R2、着床番号：819）で神経管閉鎖不全がみられ、また、多くの指形成奇形が確認された。

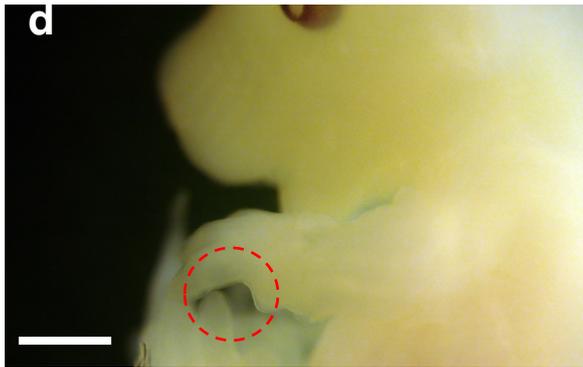
表：妊娠15日における胎児の体重および外表異常
赤で塗られたサンプルは、後に羊水中のエクソソームRNAの網羅的遺伝子発現解析を行っている。

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation	
0	2102	R-1	live	0.33	0.10	201	-	-	
		R-2	live	0.23	0.08	202	-	-	
		R-3	live	0.33	0.11	203	-	-	
		L-1	live	0.32	0.10	204	-	-	
		L-2	live	0.36	0.10	205	-	-	
		L-3	live	0.37	0.11	206	-	-	
		L-4	live	0.34	0.12	207	-	-	
		L-5	live	0.34	0.10	208	-	-	
		Mean			0.33	0.10			
		SD			0.04	0.01			
	2103	R-1	live	0.33	0.14	209	-	-	
		R-2	live	0.33	0.12	210	-	-	
		R-3	dead						
		R-4	live	0.29	0.11	211	-	-	
		L-1	live	0.37	0.12	212	-	-	
L-2		live	0.34	0.11	213	-	-		
L-3		live	0.38	0.10	214	-	-		
L-4		live	0.35	0.18	215	-	-		
Mean				0.34	0.13				
SD				0.03	0.03				
2104	R-1	live	0.27	0.08	216	-	-		
	R-2	dead							
	R-3	live	0.24	0.08	217	-	-		
	R-4	live	0.32	0.08	218	-	-		
	R-5	live	0.33	0.09	219	-	-		
	R-6	live	0.27	0.08	220	-	-		
	L-1	live	0.32	0.09	221	-	-		
	L-2	live	0.33	0.09	222	-	-		
	L-3	live	0.26	0.09	223	-	-		
	Mean	106		0.29	0.09				
SD	6		0.04	0.01					
2105	R-1	live	0.34	0.07	224	-	-		
	R-2	live	0.41	0.10	225	-	-		
	R-3	live	0.38	0.09	226	-	-		
	R-4	live	0.39	0.11	227	-	-		
	R-5	live	0.35	0.10	228	-	-		
	L-1	live	0.37	0.09	229	-	-		
	L-2	dead							
	Mean			0.37	0.09				
	SD			0.12	0.03				

Dose level (mg/kg)	pregnant dam No.	in utero Location	fetus status live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation	
300	5102	R-1	live	0.35	0.10	501	-	-	
		R-2	dead						
		R-3	dead						
		R-4	live	0.38	0.12	502	-	-	
		R-5	live	0.32	0.09	503	-	-	
		L-1	live	0.36	0.12	504	-	-	
		L-2	live	0.34	0.10	505	-	-	
		L-3	dead						
		Mean			0.35	0.11			
		SD			0.02	0.01			
	5103	R-1	live	0.29	0.11	506	-	-	
		R-2	live	0.36	0.11	507	-	-	
		R-3	live	0.36	0.12	508	-	-	
		R-4	live	0.31	0.07	509	-	-	
		R-5	live	0.33	0.10	510	-	-	
L-1		live	0.36	0.09	511	-	-		
L-2		live	0.35	0.09	512	-	-		
L-3		live	0.30	0.08	513	-	-		
L-4		live	0.33	0.10	514	-	-		
Mean				0.33	0.10				
SD			0.03	0.02					
5104	R-1	dead							
	R-2	dead							
	R-3	live	0.37	0.12	515	-	-		
	R-4	live	0.31	0.09	516	-	-		
	L-1	live	0.37	0.09	517	-	-		
	L-2	live	0.35	0.08	518	-	-		
	L-3	live	0.31	0.08	519	-	-		
	L-4	live	0.36	0.09	520	-	-		
	Mean			0.35	0.09				
	SD			0.03	0.01				
5105	R-1	live	0.25	0.10	521	-	-		
	R-2	live	0.31	0.11	522	-	-		
	R-3	live	0.33	0.11	523	-	-		
	R-4	live	0.30	0.10	524	-	-		
	R-5	live	0.29	0.09	525	-	-		
	R-6	live	0.28	0.08	526	-	-		
	R-7	live	0.29	0.08	527	-	-		
	L-1	live	0.34	0.07	528	-	-		
	L-2	live	0.35	0.09	529	-	-		
	Mean			0.30	0.09				
SD			0.03	0.01					

Dose level (mg/kg)	pregnant dam No.	in utero Location	fetus status live or dead	fetal weight (g)	placental weight (g)	fetus ID number	neural tube closure defect	digit malformation	
600	8102	R-1	live	0.37	0.12	801	-	-	
		R-2	live	0.34	0.10	802	-	-	
		L-1	live	0.36	0.10	803	-	-	
		L-2	live	0.34	0.10	804	-	-	
		L-3	live	0.31	0.10	805	-	-	
		L-4	live	0.36	0.09	806	-	-	
		L-5	live	0.32	0.09	807	-	-	
		L-6	live	0.32	0.09	808	-	-	
		Mean			0.34	0.10			
		SD			0.02	0.01			
	8103	R-1	live	0.28	0.08	809	-	-	
		R-2	live	0.32	0.09	810	-	-	
		R-3	live	0.30	0.09	811	-	-	
		R-4	live	0.28	0.09	812	-	-	
		R-5	live	0.32	0.10	813	-	-	
R-6		live	0.28	0.08	814	-	-		
L-1		live	0.30	0.09	815	-	-		
L-2		live	0.29	0.09	816	-	-		
L-3		live	0.27	0.09	816	-	-		
Mean				0.29	0.09				
SD			0.02	0.01					
8104	R-1	live	0.17	0.06	818	-	Adactyly, forelimb, the 4th, Left		
	R-2	live	0.24	0.08	819	-	exencephaly		
	R-3	live	0.27	0.07	820	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Left		
	R-4	live	0.30	0.08	821	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Left		
	R-5	live	0.24	0.09	822	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Right		
	R-6	live	0.24	0.07	823	-	Adactyly, forelimb, the 5th, Right		
	R-7	live	0.25	0.07	824	-	Pendulous digit, forelimb, the 5th, Right		
	L-1	live	0.22	0.08	825	-	Malpositioned digit, hindlimb, the 1st, Right		
	Mean			0.24	0.07				
	SD			0.04	0.01				
8105	R-1	live	0.34	0.08	826	-	-		
	R-2	dead							
	R-3	live	0.33	0.08	827	-	-		
	R-4	dead							
	R-5	live	0.35	0.09	828	-	-		
	L-1	live	0.31	0.08	829	-	-		
	L-2	live	0.32	0.08	830	-	-		
	Mean			0.33	0.08				
	SD			0.02	0.004				





図：妊娠15日胎児におけるVPA経口投与による形態学的変化の一例

妊娠9-11日の間に600mg/kg/dayのVPAを経口投与された結果、妊娠15日の胎児は神経管欠陥および指の形成異常を示しました。

妊娠15日のコントロール胎児（溶媒投与）(a)。外骨蓋（600mg/kg/day：胎児ID 819）を有する胎児 (b)。左前肢の第五指が異常な位置にある胎児（600mg/kg/day：胎児ID 818：赤い円で示されている）(c)。左前肢の第五指に欠損がある胎児（600mg/kg/day：胎児ID 820：赤点の円で示されている）。スケールバー=1mm

・母動物血清を用いた生化学検査 (R5 年度：平林)

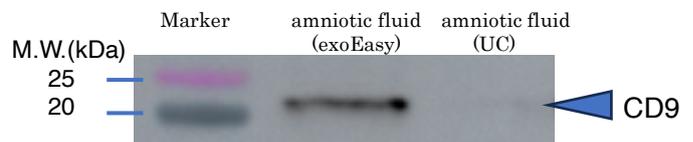
バルプロ酸投与後の妊娠11、15及び18日に300 mg/kg群および600 mg/kg群の各4匹の母動物から採取した血清を用いて、母動物の健康状態を把握する目的で、血液生化学検査を行なった。その結果、溶媒投与群と比較して、有意差はなかったことから、母動物の肝障害や腎障害は生じていないと考えられる。

表：バルプロ酸投与による母動物の血液生化学検査への影響
妊娠マウスに対する反復投与（GD9-11）の後、溶媒投与群とバルプロ酸投与群（300 mg/kg/day、600 mg/kg/day）の母動物血清での生化学検査値のまとめ。aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、尿素窒素 (BUN)、およびクレアチニン (CRE) の平均と標準偏差 (MEAN ± SD)。(N = 4)

	GD11-0mg	GD11-300mg	GD11-600mg	GD15-0mg	GD15-300mg	GD15-600mg	GD18-0mg	GD18-300mg	GD18-600mg
AST(U/l)	60±3.56	81±14.65	62.75±6.95	41.25±3.86	45±13.89	46±5.72	51.5±1.73	45±3.37	41.25±0.96
ALT(U/l)	33.25±4.79	31.5±3.51	28.25±2.99	25.25±2.75	24±6.52	21.25±2.75	31.75±2.87	27.5±3.11	25.25±1.26
BUN(mg/dl)	21.825±3.55	31.85±12.61	28.3±9.66	23.45±3.62	37.64±8.48	35.35±6.73	19.55±2.81	24.6±6.06	27.375±6.39
CRE(mg/dl)	0.18±0.03	0.2425±0.07	0.2125±0.05	0.1975±0.02	0.34±0.07	0.2325±0.03	0.21±0.01	0.215±0.02	0.2375±0.04

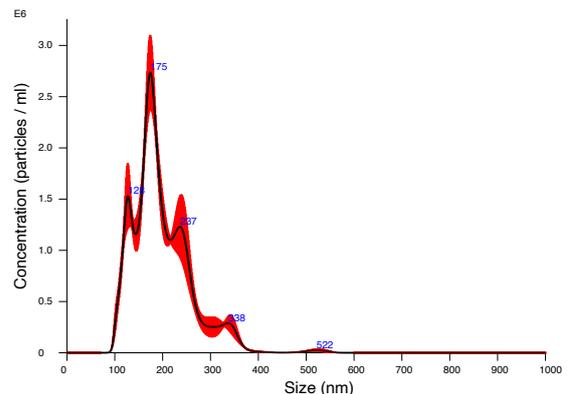
・羊水中のエクソソーム抽出のための最適化プロトコールの検証 (落谷、小野、伊川：R5 年度)

エクソソームは、血液以外にも唾液、涙液、尿などの体液にも存在することが報告されている。そこで、羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プロトコールの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティーカラム抽出法 (Qiagen 社、exoEasy) の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクである CD9 抗体でのウエスタンブロット解析を行なった。その結果、下図のように、exoEasy を使用した方が、より多くの CD9 陽性エクソソームを検出できる結果となった。



図：羊水からのエクソソーム抽出方法の検討。アフィニティーカラム法(exoEasy)、および、超遠心ペレットダウン法(UC)により採取したエクソソームをエクソソームの膜タンパクである CD9 抗体によるウエスタンブロット解析を行なった結果。

次に、exoEasy を使用して羊水から抽出したエクソソームを NanoSight を利用して、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) 解析を行い、エクソソームの粒子径および粒子数解析を行なった。



Mean 197.3nm SD 62.1
Concentration 2.57e+08

図：羊水中のエクソソームの特性評価。NanoSight を利用した NTA 解析結果。

・バルプロ酸投与に特異的な羊水中のエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷 : R5 年度)

催奇形性物質であるバルプロ酸をモデル物質として、妊娠 9-11 日の間に妊娠マウスに 0mg/kg, 300mg/kg, 600mg/kg の濃度で 1 日 1 回、反復経口投与を行い、妊娠 15 日目の胎児の重量測定および外表面の異常を評価するとともに、胎児羊水の採取、およびエクソソームの抽出、そして、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行なった。

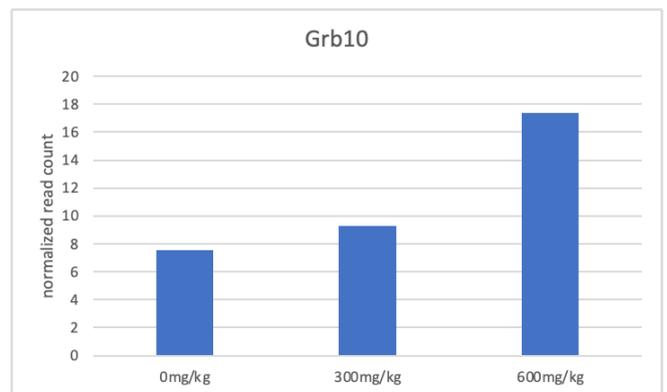
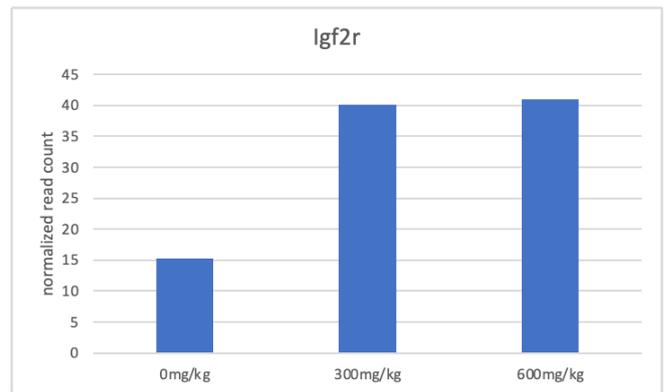
ここで、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行う胎児羊水は、「エクソソーム解析用試料採取試験」の項にあるサンプル表の赤く塗られた個体を解析対象とした。

その結果、溶媒投与群と比較して、バルプロ酸投与群において有意に遺伝子発現変化が生じるものを下表に示す。(P<0.001)

表：妊娠 9-11 日の期間にバルプロ酸の反復投与 (0 mg/kg/day, 300 mg/kg/day、および 600 mg/kg/day) の後、妊娠 15 日で有意に上昇 (2 倍以上) および低下 (半分以下) したエクソソーム RNA のリスト。(P < 0.001)

EV small RNA chromosomal region	Fold change (300mg/kg)	P-value (300mg/kg)	Fold change (600mg/kg)	P-value (600mg/kg)	Associated transcript
chr2:10251250-10252047	0.164675797	0.000356384	0.270070311	9.35E-07	Itih5
chr6:48569539-48570339	0.197762008	0.00045638	0.28556754	1.44202E-06	Lrrc61
chr11:70409748-70410245	0.125681067	0.000273181	0.277137259	2.31618E-06	Peip1
chr6:55498300-55498660	0.123410302	0.000301313	0.173319734	8.22869E-06	Adcyap1r1
chr16:87415549-87416323	1.556451898	0.243775633	2.132070127	0.000277057	Ltn1
chr4:43522593-43522926	0.289661787	0.001011075	0.286706652	0.000410094	Tpm2
chr4:47312337-47313097	0.293802578	0.00163551	0.324220874	0.000499773	Ccl15a1
chr7:1444451067-1444461428	1.569234811	0.135849146	2.350385999	0.000777446	Ccm
chr1:181177217-181177400	2.814389481	0.00337985	4.153382538	0.000917419	War26

P<0.01 のエクソソーム RNA の中には、多くのインプリンティング遺伝子由来のものが含まれていた。



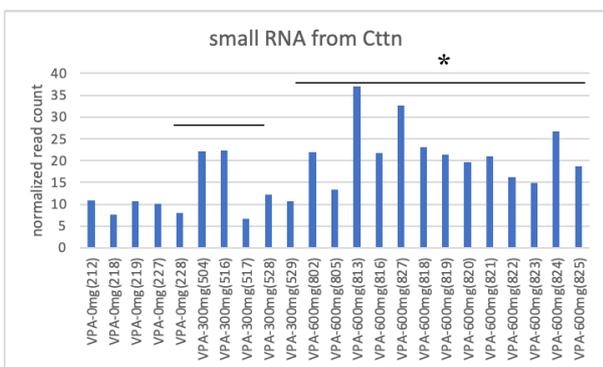
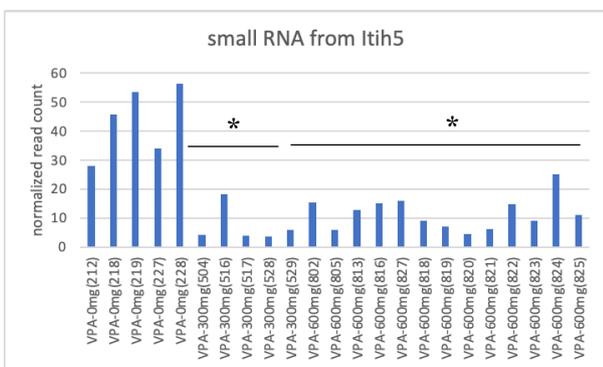
図：妊娠 15 日における溶媒投与群とバルプロ酸投与群 (300 mg/kg/day または 600 mg/kg/day) との間で遺伝子発現変化する羊水中エクソソーム RNA のうち、インプリンティング遺伝子に由来するものの一例。 *P < 0.01、

・バルプロ酸投与に特異的な母体血中のエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷 : R5 年度)

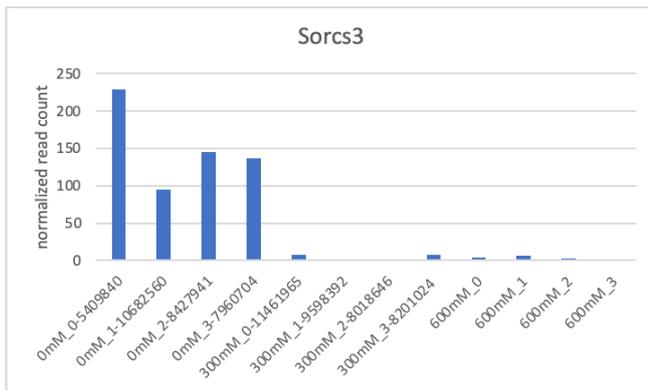
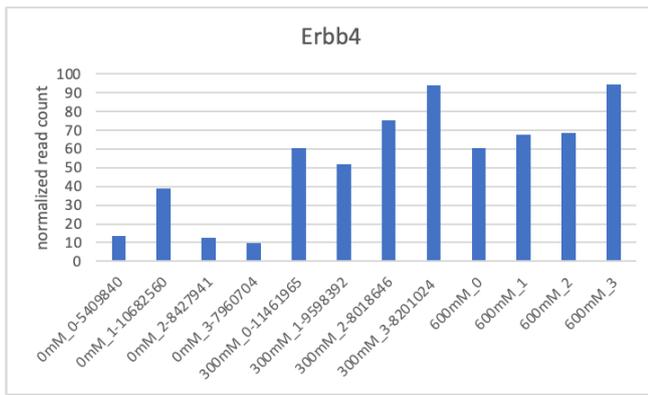
妊娠マウスに催奇形性物質であるバルプロ酸をモデル物質として 0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600 mg/kg/day の用量で妊娠 9-11 日の間に投与し、妊娠 11 日、15 日、18 日において母動物の全採血を行ない、血清を抽出した。

血清中のエクソソームは超遠心ペレットダウン法により、採取を行なった。

現在までに、妊娠 11 日での結果が以下の様に出ている。



図：妊娠 15 日における溶媒投与群とバルプロ酸投与群 (300 mg/kg/day または 600 mg/kg/day) との間で遺伝子発現変化する羊水中エクソソーム RNA の一例。 *P < 0.01、



・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出 (伊川、小野、平林：R5 年度)

次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウス (F0 世代) の作製を令和4年度に作製している。令和5年度においては、*Atp7b* 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J♂または、C57BL/6J♀) と交配を行い、F1 世代マウスの作製を行い、それらの変異を確認することで、変異アレルの germline transmission の確認を行った。

germline transmission が確認された *Atp7b* 遺伝子の変異マウスラインは、以下の通りである。

・ *Atp7b* exon8 変異ライン

1bp insertion
G to A
10bp deletion
10bp deletion, 18bp insertion
6bp deletion
Short (判別できない)
22bp deletion
about 30 bp deletion
1bp deletion

・ *Atp7b* exon11 変異ライン

9bp insertion
2bp insertion
1bp deletion
判別できない

上記の F1 世代において germline transmission を確認できたラインのマウスに関して、同変異ライン同士の雌雄で交配を行い、F2 世代で homo 変異マウスの作製を行なった。

そこで得られた *Atp7b* homo 変異マウスに関して、病的解析、生化学解析を行った結果は下記の通りである。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬：R5 年度)

・ Atp7b exon8 変異ライン

Atp7b exon8 変異ライン	hepatocyte	AST(U/l)	ALT(U/l)
1bp insertion	巨核・銅沈着	176	234
G to A	-	64	32
10bp deletion	巨核・銅沈着	374	685
10bp deletion, 18bp insertion	巨核・銅沈着	134	72
6bp deletion	巨核・銅沈着	140	89
Short (判別できない)	巨核・銅沈着	143	156
22bp deletion	巨核・銅沈着	80	89
about 30 bp deletion	-	79	70
1bp deletion	巨核・銅沈着	160	259

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R5 年度においては、マウスの肝臓より樹立したオルガノイドに対して、肝臓障害を起こすことが知られる四塩化炭素を添加するべく露実験を行い、細胞の増殖活性、および肝臓の逸脱酵素である AST および ALT の測定を行った。

・ Atp11b exon8 変異ライン

Atp7b exon11 変異ライン	hepatocyte	AST(U/l)	ALT(U/l)
9bp insertion	巨核・銅沈着	156	162
2bp insertion	巨核・銅沈着	157	163
1bp deletion	巨核・銅沈着	108	115
判別できない	巨核・銅沈着	380	354

下図にある様に、樹立に成功した肝臓オルガノイド 1×10^5 個を細胞培養プレートに播種し、5日間培養を行い、アセトアミノフェン (0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM) を添加後 2 日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

これらの結果から、Atp7b の遺伝子変異の種類によって、肝障害の度合いは大きく異なることが想定される。

ライン化されたこれらの変異マウスを用いて、今後は銅代謝異常のバイオマーカーのスクリーニングに利用できると考えられる。

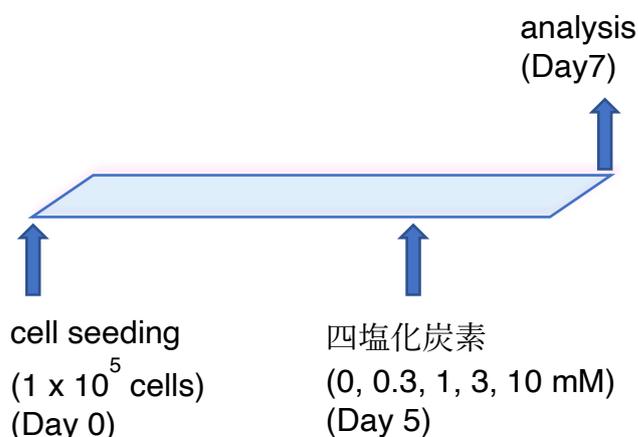


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素をばく露および解析する概略図。

肝臓オルガノイドの細胞生存性

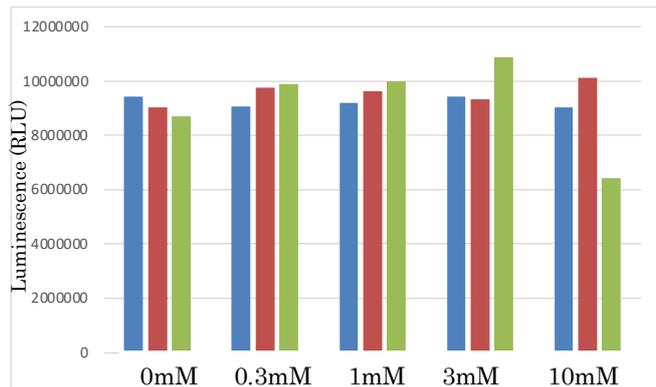


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞生存性の指標として実績の多い還元力を測定している (N=3)。

48時間後においても10mM投与群においても細胞の生存性低下は見られなかった。

一方、肝臓障害の指標として利用される血液中の逸脱酵素 (AST および ALT) についても、四塩化炭素添加後48時間における培養上清において測定したが、溶媒に比較して有意差のある上昇はASTの10mM群だけであった。

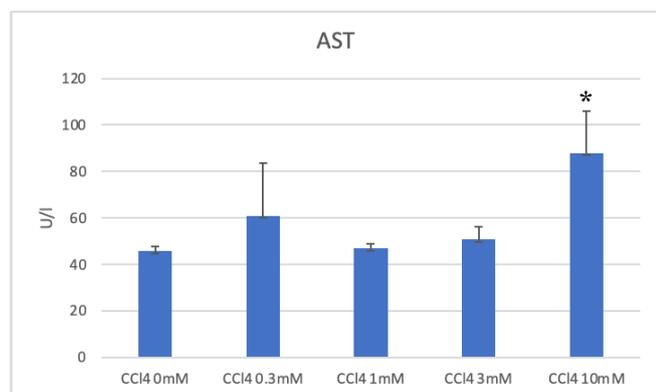


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるAST濃度を測定している (N=3)。* P<0.05

ALT

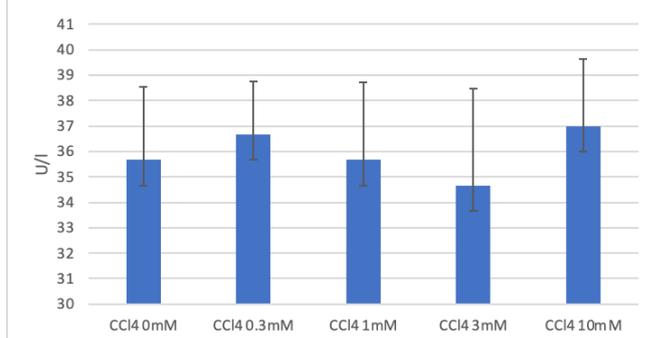
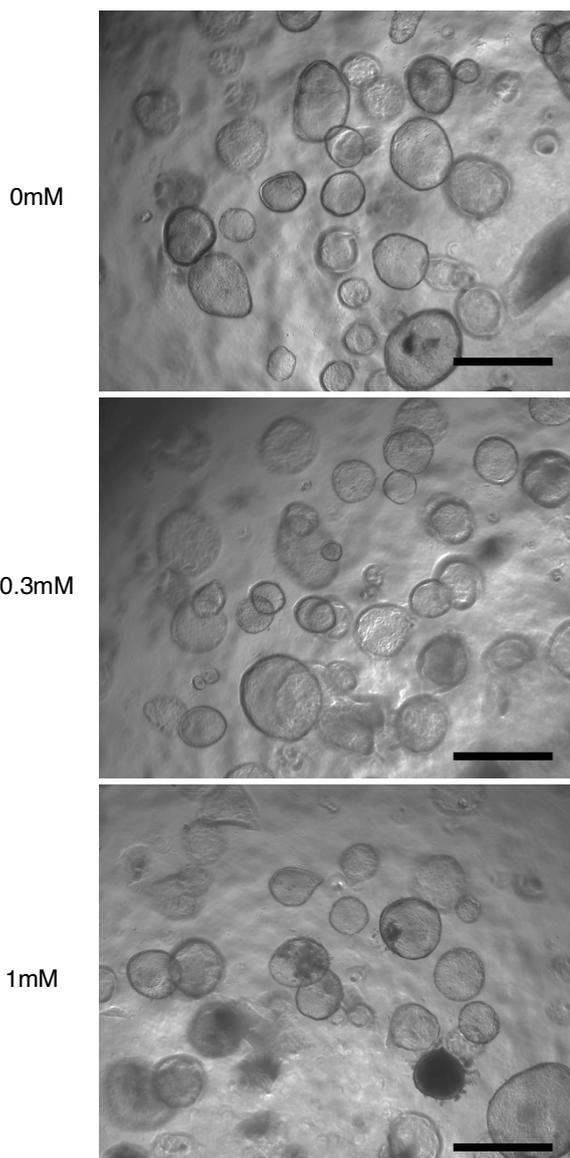
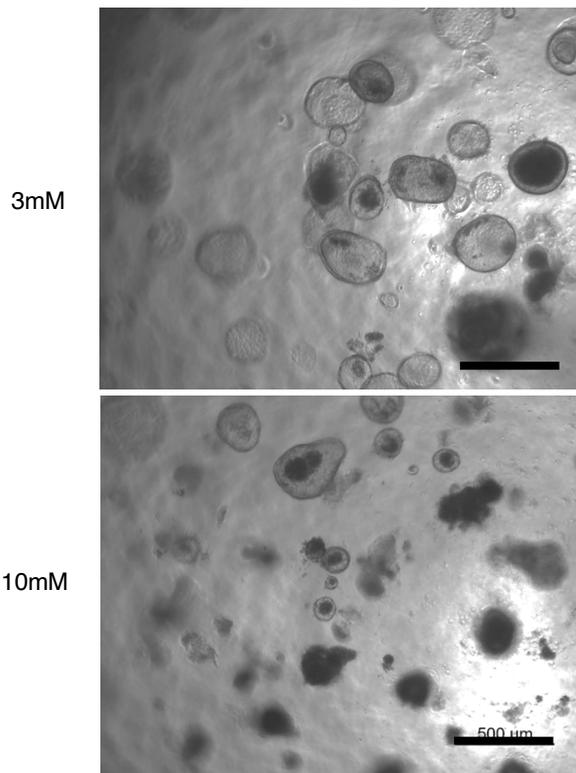


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに四塩化炭素を0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるALT濃度を測定している (N=3)。

四塩化炭素添加による肝臓オルガノイドへの形態を確認するために、四塩化炭素添加前、および2日後の細胞像の写真撮影を行っている (下図)

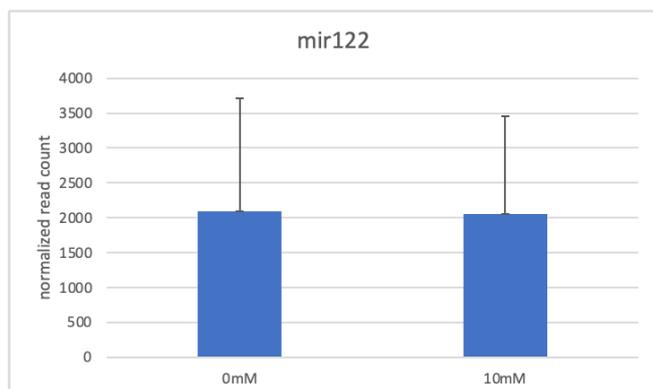




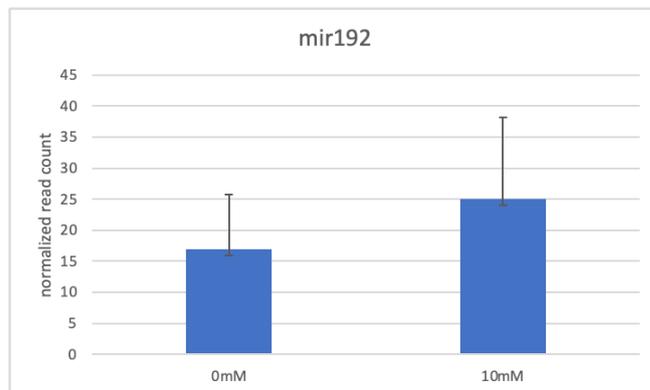
図：C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mMの濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイド。(スケールバー=500μm)

R4年度の研究成果より、肝臓オルガノイドは、アセトアミノフェンの添加により、用量依存的に肝臓の逸脱酵素を分泌し、細胞生存性の活性も低下するなど、動物実験と同様の傾向が確認できたが、今年度（R5年度）研究において、四塩化炭素添加においては、用量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素（ASTおよびALT）においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームRNA解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーであるmiR-122やmiR-192の上昇も確認できなかった。



図：C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに0mM, 10mMの濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイドにおける0mM群と10mM群における肝障害のバイオマーカーであるmiR122の遺伝子発現量（N=3）。



図：C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドに0mM, 10mMの濃度で四塩化炭素を添加し、2日目のオルガノイドにおける0mM群と10mM群における肝障害のバイオマーカーであるmiR192の遺伝子発現量（N=3）。

D. 考察

昨年度（令和4年度）に、妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られているバルプロ酸ナトリウムの投与実験（妊娠9—11日（GD9-11）に反復投与、0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600mg/kg/day（GD18解剖群のみ、800mg/kg/day 群あり）を行い、GD11, 15, 18日目に剖検、および、母体血および胎児羊水のサンプリングを行っていた）。

今年度（令和5年度）は、これらのサンプルの詳細な解析を行なった。

その結果、600mg/kg/day でバルプロ酸を投与した場合に、バルプロ酸の濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。

ここで、注意したいのは、催奇形性は、全ての腹で観察されるわけではなく、一部の腹では多くの胎児が催奇形性の表現型を持つが、他の腹においては正常であるという点である。

これらの事実から、催奇形性の出現頻度によっては、判断が難しい事も考えられ、それ故、生殖発生毒性試験においては、経験豊富なエキスパートによる判断が必要とされるのであろう。

E. 結論

今年度（令和5年度：3年計画の3年目）の研究は計画通りに進捗した。

今年度研究において、以下の3項目において進捗が見られた。

(1) 令和4年度において妊娠中のばく露により二分脊椎などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られるバルプロ酸ナトリウムの投与実験（妊娠9—11日（GD9-11）に反復投与、0mg/kg/day, 300mg/kg/day, 600mg/kg/day（GD18解剖群のみ、800mg/kg/day 群あり）を行い、GD11, 15, 18日目に剖検、および、母体血および胎児羊水のサンプリングを行っていたが、令和5年度研究においては、これらの詳細な外表面観察を行った）。

その結果、投与したバルプロ酸ナトリウムの濃度依存的に子宮内胎児発達遅延(IUGR)の表現型が有位差を持って観察され、さらに、高濃度群においては、

神経管閉鎖不全の胎児の他、指形成異常の表現型を持つ胎児が複数観察された。このことから、本研究で行なったバルプロ酸ナトリウム投与による催奇形性モデル動物の作製は予定通りに成功した (**Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024**)。

(2) 羊水よりエクソソームを抽出するための最適化プロトコールの作成を行なった。羊水から①超遠心ペレットダウン法、および、②アフィニティークラム抽出法、の2通りで、エクソソームを採取し、エクソソームの表面タンパクであるCD9抗体でのウエスタンブロット解析、および、NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) によるエクソソームの粒子径および粒子数解析を行い、羊水からは、アフィニティークラム法が適していると結論した。

(3) (1) 研究計画において採取したバルプロ酸ナトリウムを投与した妊娠マウスの母動物血清、および、羊水よりエクソソームの抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行うことで、催奇形性作用のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。 (**Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024**)

(4) 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウス (F0 世代) の作製を令和4年度に作製しており、これらのマウスより、変異マウスラインを確立するために、*Atp7b* 変異マウス (F0 世代) を野生型マウス (C57BL/6J♂または、C57BL/6J♀) と交配を行うことで、変異アレルが *germline transmission* するラインを確立できた。また、さらに、これらの F1 変異マウス同士を交配することで *homo* 変異マウスの作製を行い、その表原型の評価を行った。

(4) 肝臓オルガノイドを細胞培養プレートに播種し、5日間培養した後、肝毒性モデル物質である四塩化炭素 (0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mM) を添加した。四塩化炭素添加後の2日目に培養上清と肝臓オルガノイドを回収した。容量依存的に、肝臓オルガノイドに細胞死が見られた一方、肝臓オルガノイドの培養上清中の逸脱酵素 (AST および ALT) においては、生体マウスに四塩化炭素を投与した時と同様の著しい値の上昇は確認できなかった。また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソーム RNA 解析を行なったところ、肝障害のバイオマーカーである miR-122 や miR-192 の上昇も確認できなかった。

(まとめ)

本研究で行なった催奇形性物質であるバルプロ酸ナトリウムの妊娠動物への投与により、濃度に依存

した子宮内胎児発達遅延や、神経管閉鎖不全や指形成不全の催奇形性作用が確認された。ここで、重要なのは、全ての腹で同様に催奇形性作用が確認されたわけではなく、催奇形性の全くでない腹もあれば、ほぼ全てが催奇形性の表現型を持つ腹もあるという事実である。

このような催奇形性発現状況こそが、催奇形性試験に経験豊富なエキスパートが必要な大きな理由の一つと考えられる。そこで、我々は、催奇形性の表原型の有無に関係なく、催奇形性物質投与により、誘導されるエクソソーム RNA の発現量を催奇形性の指標とする次世代型毒性評価法の開発を本研究の目的とした。

母動物へのバルプロ酸ナトリウム投与により、胎児における催奇形性作用が確認され、エクソソームを抽出する体液として、母動物の血清、および、胎児の羊水の採取を行い、それらの網羅的遺伝子発現解析を行なった。そこで、バルプロ酸ナトリウム投与に依存的に誘導されるエクソソーム RNA の単離に成功した。(Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

ここで、GD15 の羊水中のエクソソーム RNA で、バルプロ酸ナトリウム投与依存的に誘導されるエクソソーム RNA には、ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群が濃縮されていることが判明した。

これは、バルプロ酸ナトリウムは、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つことから、ヒストンアセチル化によって遺伝子の転写活性の on/off をしている遺伝子に関しては、転写を活性化すると考えられる。このヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を持つ、Trichostatin A も、バルプロ酸ナトリウムと同様の催奇形性作用を持つことが報告されていることから、これらの催奇形性発現は、ヒストンアセチル化の異常による遺伝子発現異常にあると考えられる。

そこで、本研究により単離された催奇形性の毒性指標候補であるエクソソーム RNA であるゲノムインプリンティングを受ける遺伝子群の発現は、毒性機序の面からも、非常に優れた毒性バイオマーカーであると結論できる。

また、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームを毒性指標とする動物実験代替法の検証においては、アセトアミノフェンについては、生体への投与と同様な挙動が見られたが、四塩化炭素投与においては、生体で見られる反応が見られなかった。これは、肝毒性の発現以前に、培養系における細胞毒性を生じてしまい、生体とは違うメカニズムで細胞の生存障害が起こっているものと考えられる。

動物実験代替法は推進すべき課題であるが、本当に生体を反映しているかの評価が難しい問題である。本研究で開発に成功した母動物の血清および胎児羊水中のエクソソーム RNA を毒性指標とする次世代型毒性評価法は、動物実験における使用匹数の大幅な削減に貢献するだけでなく、オルガノイドなどの培養系における in vivo を反映しているのかという鋭敏な指標にもなりうると思われる。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表 (令和5年度)

<論文・著書>

- 1) ○* Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, and Satoshi Kitajima. Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice *Fundamental Toxicological Sciences*, 11, 37-56 (2024) * Corresponding author
- 2) ○Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day dose Toxicity Study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in Rats. *Fundam Toxicol Sci*, 10, 59-68 (2023).
- 3) ○Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in Rats. *Fundam Toxicol Sci*, 10, 69-82 (2023).
- 4) Ishino, F., Itoh J., Irie M., Matsuzawa A., Naruse M., Suzuki T., Hiraoka Y., Kaneko-Ishino T.: Retrovirus-Derived RTL9 Plays an Important Role in Innate Antifungal Immunity in the Eutherian Brain. *Int J Mol Sci*. 24(19) 14884 (2023)
- 5) Imai T., Naruse M., Machida Y., Fujii G., Mutoh M., Ochiai M., Takahashi M., Nakagama H. : Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer* 75(2): 713-725 (2023)
- 6) Noda T, Shinohara H, Kobayashi S, Taira A, Oura S, Duritahala, Tokuyasu M, Araki K, Ikawa M.:

- Multiple genes in the Pate5-13 genomic region contribute to ADAM3 processing. *Biol Reprod.* 2024 Jan 13;ioae008.
- 7) Endo T, Kobayashi K, Matsumura T, Emori C, Ozawa M, Kawamoto S, Okuzaki D, Shimada K, Miyata H, Shimada K, Kodani M, Ishikawa-Yamauchi Y, Motooka D, Hara E, Ikawa M.: Multiple ageing effects on testicular/epididymal germ cells lead to decreased male fertility in mice. *Commun Biol.* 2024 Jan 4;7(1):16.
 - 8) Miyake T, Inoue Y, Shao X, Seta T, Aoki Y, Nguyen Pham KT, Shichino Y, Sasaki J, Sasaki T, Ikawa M., Yamaguchi Y, Okamura H, Iwasaki S, Doi M.: Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. *Cell Rep.* 2023 Mar 28;42(3):112157.
 - 9) Shimada K, Park S, Oura S, Noda T, Morohoshi A, Matzuk MM, Ikawa M.: TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Mar 14;120(11):e2221762120.
 - 10) Lu Y, Shimada K, Tang S, Zhang J, Ogawa Y, Noda T, Shibuya H, Ikawa M.: 1700029I15Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Feb 21;120(8):e2207263120.
 - 11) Ito K, Yamamoto T, Hayashi Y, Sato S, Nakayama J, Urabe F, Shimasaki T, Nakamura E, Matui Y, Fujimoto H, Kimura T, Egawa S, Ochiya T., Yamamoto Y. Osteoblast-derived extracellular vesicles exert osteoblastic and tumor-suppressive functions via SERPINA3 and LCN2 in prostate cancer. *Mol Oncol.* 2023 Oct;17(10):2147-2167. doi: 10.1002/1878-0261.13484. Epub 2023 Aug 4. PMID:37408474; PMCID: PMC10552899.
 - 12) Minami S, Chikazu D, Ochiya T., Yoshioka Y. Extracellular vesicle-based liquid biopsies in cancer: Future biomarkers for oral cancer. *Transl Oncol.* 2023 Sep 13;38:101786. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101786. Epub ahead of print. PMID:37713973; PMCID: PMC10509717.
 - 13) Yokoi A, Ukai M, Yasui T, Inokuma Y, Hyeon-Deuk K, Matsuzaki J, Yoshida K, Kitagawa M, Chattrairat K, Iida M, Shimada T, Manabe Y, Chang IY, Asano-Inami E, Koya Y, Nawa A, Nakamura K, Kiyono T, Kato T, Hirakawa A, Yoshioka Y, Ochiya T., Hasegawa T, Baba Y, Yamamoto Y, Kajiyama H. Identifying high-grade serous ovarian carcinoma-specific extracellular vesicles by polyketone-coated nanowires. *Sci Adv.* 2023 Jul 7;9(27):eade6958. doi: 10.1126/sciadv.ade6958. Epub 2023 Jul 7. PMID: 37418532; PMCID: PMC10328412.
 - 14) Hanai H, Hart DA, Jacob G, Shimomura K, Ando W, Yoshioka Y, Ochiya T., Nakagawa S, Nakamura M, Okada S, Nakamura N. Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model. *J Extracell Vesicles.* 2023 Jul;12(7):e12337. doi: 10.1002/jev2.12337. PMID: 37367299; PMCID: PMC10295161.
 - 15) Morimoto M, Maishi N, Tsumita T, Alam MT, Kikuchi H, Hida Y, Yoshioka Y, Ochiya T., Annan DA, Takeda R, Kitagawa Y, Hida K. miR-1246 in tumor extracellular vesicles promotes metastasis via increased tumor cell adhesion and endothelial cell barrier destruction. *Front Oncol.* 2023 Apr 12;13:973871. doi: 10.3389/fonc.2023.973871. PMID: 37124539; PMCID: PMC10130374.
 - 16) Okamura A, Yoshioka Y, Saito Y, Ochiya T. Can Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems Be a Game Changer in Cardiac Disease? *Pharm Res.* 2023 Apr;40(4):889-908. doi: 10.1007/s11095-022-03463-z. Epub 2022 Dec 28. PMID:36577860; PMCID: PMC10126064.
 - 17) Shimada Y, Yoshioka Y, Kudo Y, Mima T, Miyata Y, Adachi H, Ito H, Okada M, Ohira T, Matsubayashi J, Ochiya T., Ikeda N. Extracellular vesicle-associated microRNA signatures related to lymphovascular invasion in early-stage lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2023 Mar 24;13(1):4823. doi:10.1038/s41598-023-32041-5. PMID: 36964242; PMCID: PMC10038982.
 - 18) Tashiro K, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicles from adipose-derived stem cells relieve extremity lymphedema in mouse models. *Plast Reconstr Surg.* 2023 Mar 8. doi: 10.1097/PRS.000000000010388. Epub ahead of print. PMID:36877751.
 - 19) Lischnig A, Bergqvist M, Ochiya T., Lässer C. Corrigendum for "Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles". *Mol Cell Proteomics.* 2023 Mar;22(3):100516. doi:10.1016/j.mcpro.2023.100516. Epub 2023 Mar 10. Erratum for: *Mol Cell Proteomics.* 2022 Sep;21(9):100273. PMID: 36907076; PMCID: PMC10024162.
 - 20) Urabe F, Kosaka N, Yamamoto Y, Ito K, Otsuka K, Soekmadji C, Egawa S, Kimura T, Ochiya T. Metastatic prostate cancer-derived extracellular vesicles facilitate osteoclastogenesis by transferring the CDCP1 protein. *J Extracell Vesicles.* 2023 Mar;12(3):e12312. doi: 10.1002/jev2.12312. PMID: 36880252; PMCID:PMC9989745.
 - 21) Kiya Y, Yoshioka Y, Nagakawa Y, Ochiya T. Extracellular Vesicles Are Important Mediators That Regulate Tumor Lymph Node Metastasis via the Immune System. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 10;24(2):1362. doi: 10.3390/ijms24021362. PMID:36674900; PMCID: PMC9865533.
 - 22) Suzuki K, Yokoi A, Yoshida K, Kato T, Ochiya T., Yamamoto Y, Kajiyama H. Preoperative serum microRNAs as potential prognostic biomarkers in ovarian clear cell carcinoma. *J Gynecol Oncol.* 2022 Dec 23. doi: 10.3802/jgo.2023.34.e34. Epub ahead of

print. PMID: 36603851.

- 23) ○小島肇, 平林容子. 創薬開発に期待される New Approach Method の行政的な受け入れについて 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 158, 269-272, 2023, doi: 10.1254/fpj.22154.
- 24) ○J. Strickland, E. Haugabrooks, D.G. Allen, L.B. Balottin, Y. Hirabayashi, N.C. Kleinstreuer, H. Kojima, C. Nishizawa, P. Prieto, D.E. Ratzlaff, J. Jeong, J. Lee, Y. Yang, P. Lin, K. Sullivan, W. Casey, International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies. Crit Rev Toxicol. 2023), 1-27, doi: 10.1080/10408444.2023.2240852.

2. 学会発表

(令和5年度)

○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 (招待講演)

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

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、筑波、2023年7月29日、ポスター

Toshime Igarashi¹, 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, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma ex-posed 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) つくば

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

Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Faithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.横浜)

Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023.7. Taiwan)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫; 大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよびCAFを用いたエピゲノムマーカーの探索. 第82回日本癌学会学術集会 (2023.9.横浜)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用を再現する in vitro 実験系の構築. 第46回日本分子生物学会年会 (2023.12.神戸)

成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立. 日本薬学会144年会(2024.3.横浜)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。