

別添 3

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
令和6年度総括研究報告書

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

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 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、21種類の催奇形性陽性物質及び14種類の陰性物質を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。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。

<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

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し(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した(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を検討した(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)。

令和 6 年度(今年度)は、I) 昨年構築した自動計測 *in vitro* 発生毒性試験法を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。これまでに、未分化のヒト iPS 細胞を用いた試験により、6 種類の陽性対照物質及び 2 種類の陰性対照物質を 100% の正確度で分類できた。加えて、神経伝達物質受容体を介したシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞まで分化させた試験の構築も進めている。今年度中に、神経前駆細胞の FGF-SRF シグナルへの反応性をリアルタイムシフェレーズアッセイにより確認し、神経前駆細胞を用いた DynaLux/c の構築に向けた課題点を抽出する(大久保)。DNT リストについては、OECD *in vitro* DNT battery (DNT-IVB) 文書「Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In Vitro Testing Battery.」に掲載されている DNT 陽性対照および陰性対照 171 化合物を精査した。また評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、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、バリデーション試験が開始されてい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、キシレン(0、2 及び 20 ppm)幼若期反復吸入曝露実験における、情動認知行動試験後の脳サンプルについて神経科学的物証に基づく解析を行った結果、海馬におけるニューロン新生への影響が疑われた(齊藤)。また、遺伝子発現データ解析の結果から、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出した(北嶋)。加えて、モデル揮発性物質であるトルエン(目標曝露濃度：0、0.7 および 7 ppm)につき、幼若期反復吸入曝露実験を実施し(西村)、成熟後の情動認知行動試験を実施した結果、条件付け学習記憶試験において、トルエン 0.7 ppm 曝露群では空間-連想記憶の有意な低下が、トルエン 7 ppm 曝露群では空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められた(齊藤)。あわせて、神経科学的物証に基づく DNT 誘発メカニズムの解析をすすめ(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比較検討する(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よりそれぞれ安定したオルガノイド作製に成功した。現在モデル物質(サリドマイド)を用いて網羅的メタボローム解析を行ない、それぞれの胎盤代謝物を明らかにすることで種差からみた生殖毒性を検討している。また、パルスフィールド電気泳動法や免疫染色による DNA 障害毒性を評価している(西田)。加えて、受精後 8.5 及び 9.5 日目マウス胚の胎盤の次世代シーケンスを利用した網羅的遺伝子発現解析を行ない、これらのステージの胎盤を構成する trophoblast giant cell、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer に特異的な遺伝子発現マーカーの検出を行なった。次世代シーケンスデータを活用することで、spongiotrophoblast の中でも受精後 9.5 日目には invasive glycogen cells が増加している様子や、secondary trophoblast cells が増加している傾向も検出することが明らかとなった。よって、今後は、これらのマーカー遺伝子の発現プロファイル解析を行うことで、胎盤の分化度を正確に把握することが可能となり、化学物質による胎盤の分化異常などの評価を行うことが可能になると思われる(小野)。以上、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試験法が開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法が開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

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

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

胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。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に係る試験法が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）、特に DNT（桑形）における毒性評価に精通する専門家を含むかたちで、研究班体制を構築している。研究分担者（桑形）が、OECD in vitro DNT expert group（発達神経毒性専門家グループ）メンバーであることから、DNT に係る専門家、行政、業界団体等の関係者との情報交換も図ることができる。研究分担者として、若手研究者（齊藤）・女性研究者（桑形）が参画している。

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

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

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

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

昨年度（令和 5 年度）はスループット性と再現性を高めるために細胞培養をしながら連続

の発光測定が可能な Kronos HT 装置を用いた 72 時間以上のリアルタイム計測法を開発した。測定時間及び時間解像度が上昇し、DynaLux/c へ適用が可能なことを確認した。

今年度（令和 6 年度）は、上記の Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。上記の DynaLux/c では未分化のヒト iPSC 細胞を用いることで、発生期の神経系を対象とした試験系を想定している。一方で、生後発達期の神経系に対する影響は神経伝達物質受容体 (Neurotransmitter Receptors :NR) を介したものは少なくない。そこで、生後発達期の NR を介したシグナルかく乱を検出するために、神経前駆細胞 (Neural precursor cells: NPCs) に分化させたヒト iPSC 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を開発する。

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、ダラム、北米)。また OECD in vitro DNT battery test (DNT-IVB) 専門家会議へ出席し、情報収集を行った (2024 年 4 月 11 日、コンスタンツ、ドイツ)。

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。その中から昨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。

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

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

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

け学習記憶試験等からなる行動解析バッテリー試験を高精度に実施すると共に、脳における組織化学解析・タンパク発現解析等により神経科学的物証の収集を行う。なお、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入曝露を実施する。

トキシコゲノミクスのための脳の採取は、4部位（海馬、皮質、脳幹、小脳）とする。脳4部位の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法（遺伝子発現値の絶対化手法）を適用した網羅的遺伝子発現解析を行う。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用する。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行う。

#### <キシレンにおける吸入曝露実験>

昨年度（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、富士フィルム和光純薬（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-Σ 30N II および MP-Σ 300N II、柴田科学株式会社製）を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したキシレンの前処理及び分

析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を 10mL 容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フィルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mL を正確に加え、蓋をしたのち、およそ 30 分に 1 回上下に振とうしながら 2 時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液 2mL を 10mL 容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液（トルエン-d<sub>8</sub> の二硫化炭素溶液、4mg/mL）50μL をマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

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

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

カラム：DB-5MS（20m×0.18mm、膜厚 0.36μm、Agilent Technologies 社製）  
オープン温度：40°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：N<sub>2</sub>  
流速：0.27 mL/min（定流量）  
定量イオン（m/z）：91（キシレン 3 種）、98（トルエン-d<sub>8</sub>）

得られた各キシレン及びトルエン-d<sub>8</sub> の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件では m-および p-キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比 1:1 の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値および o-キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

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

#### <トルエンにおける吸入曝露実験>

今年度（令和6年度）のモデル物質はトルエン（Toluene；分子量：92.14、CAS No.：108-88-3）とし、試薬としてトルエン（カタログ番号：204-01861、特級、99.5%、ロット番号：KSF6107、富士フイルム和光純薬（株））を使用した。トルエンの曝露濃度は先行研究の結果から、0.7 および 7ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、トルエンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は 0.07 ppm であることから、この指針値のそれぞれ 10 および 100 倍程度ということとなる。

トルエン濃度は、捕集管（チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号：080150-0532、柴田科学（株））を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ 22 時間とした。捕集管の曝露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 2 本、投与群は各濃度とも 2 本とした。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-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。

捕集管に吸着したトルエンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を 10mL 容密栓付きガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フイルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mL を正確に加え、蓋をしたのち、およそ 30 分に 1 回上下に振とうしながら 2 時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液 2mL を 10mL 容密栓付きガラス試験管に採り、内部標準溶液（キシレン-d<sub>10</sub> の二硫化炭素溶液、6mg/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、トルエン（純度 99.5% 以上、東京化成工業株式会社製）を二硫化炭素で適宜希釈して 0.1~100μg/mL の混合溶液として調製した。これらの溶液 2mL に内部標準溶液 50μL を添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

測定溶液および標準測定溶液を測定用バイアル（0.2mL MS-SPEC Sc-Vial, Thermo Fisher

Scientific 社製）に移し、キャップ（PTFE/シリコーン、スリット入り、同社製）をしてガスクロマトグラフ（7890A GC&5975C MSD、Agilent Technologies 社製）を用いて、以下の分析条件により測定した。

カラム：DB-WAX（20m×0.18mm、膜厚 0.30μm、Agilent Technologies 社製）  
オープン温度：40℃（3.5 分保持）-20℃/min-150℃（5 分保持）  
注入口温度：220℃  
注入方式：スプリット  
スプリット比：20：1  
キャリアーガス：H<sub>2</sub>  
流速：0.3 mL/min（定流量）  
定量イオン（m/z）：91（トルエン）、98（キシレン-d<sub>10</sub>）

得られた各トルエン及びキシレン-d<sub>10</sub> の内標比から検量線を作成し定量した。この検量線より求めた捕集管中のトルエンの定量値からチャンバー内のトルエン濃度を計算して求めた。この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の六鹿元雄室長、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

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

##### <ヒト胎盤オルガノイド作製>

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

##### <マウスの胎盤オルガノイド作製>

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

##### <メタボローム解析>

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

胎盤オルガノイドについても同様な検討を行い、種差の検討も行う。

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

〈胎盤の遺伝子発現プロファイリング〉  
マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目、9.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 3 ステージ (7.5dpc, 8.5dpc および 9.5dpc) (dpc: Days post coitum: 交配後) 分を行う。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。

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

Illumina 社 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 HISAT2 program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。

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

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

### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、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る。

## 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*):

昨年度 (令和 5 年度) は、KronosHT を用いた DynaLux/c 法の開発に成功した。まず、KronosHT を用いて 72 時間以上のリアルタイムシフェ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 H<sub>2</sub> 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、桑形が精査した 6 種類の DNT 陽性対照物質(サリドマイド、レチノイン酸、バルプロ酸、フルオウラシルウラシル、ヒドロキシウレア、メトトレキサート)及び 2 種類の陰性対照物質(ペニシリン、サッカリン)のシグナルかく乱作用を各 3 例にて取得した。適用濃度は、最大溶解量(一部 IC<sub>50</sub>)を最大濃度とし、溶媒対照に対する各物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC 曲線解析によって閾値を設定した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正確度 100% で分類可能であった。

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

へ分化誘導を行っている。加えて、NPCs の FGF-SRF シグナルへの反応性をリアルタイムルシフェアッセイにより確認し、NPCs を用いた DynaLux/c の構築に向けた課題点を抽出する。

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 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、昨年度(令和 5 年度)は、この 17 試験をすべて実施するかは議論が続くようであり、Case study を増やし、各試験の信頼性を確認している段階であったが、今年度の状況では、この 17 試験をすべて実施してリスク評価を行う方向性である。現在、17 試験についてバリデーション試験が開始されている。下記の 171 化合物を用いてバリデーション試験が実地中であることが明らかになった。一方、DNT 陽性対照物質の選定については、昨年度(令和 5 年度)は、ラットを用いた動物実験により DNT 陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された化学物質を精査した結果、97 化合物が掲載されており、その内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	17
医薬品	38
化学物質	42

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

動物実験の結果に基づき、4 報の論文(Harrill J et al., 2018; Frank C et al., 2017; Shafer T et al., 2019; Masjusthumsman S et al., 2020)から 133 物質がリスト化され、さらに、ワークショップのレビュー、公表データのレビュー、および米国 EPA の神経毒性リスク評価ガイドラインの情報が追加された 171 物質が掲載されている。この内訳は陽性対照が 104 化合物、陰性対照が 67 化合物であった。昨年度に精査したラットを用いた動物実験により DNT の有無が判断された陽性と報告された論文(Mundy M et al., 2015)に掲載された 97 化合物は全て含まれていた。なお、171 化合物の内訳は下記の通りであることが明らかとなった。

農薬	24
医薬品	85

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

キシレンにおける解析について

<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、 $2.50 \pm 0.24$  (2.66～1.97 ppm)、 $20.26 \pm 0.35$  (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  $0.00 \pm 0.00$  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のうち、海馬歯状回について免疫組織化学による解析を実施した結果、高濃度 (20 ppm) 曝露群において、DCX および NeuroD1 (新生ニューロンマーカー) 陽性細胞数の減少が疑われた。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

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

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

化マーカーも有意差は認められなかった。

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

762 ps (増加)、20 ps (減少)

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

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

83 ps (増加)、542 ps (減少)

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

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

検討したところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆されたが、関与するシグナルネットワークについて、さらに詳細な解析を実施している。

#### トルエンにおける解析について

##### <吸入曝露実験>

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

##### <情動認知行動解析>

マウスが成熟後（12 週齢時）に情動認知行動解析を検討したところ、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。今後、キシレンの場合と同様、得られた脳サンプルについては神経科学的物証に基づく解析を行う予定である。

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

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

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

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

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

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

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

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド（1 万個≒1drop matrigel）にモデル薬物としてサリドマイド（0-200  $\mu$ 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の開発したパルスフィールド電気泳動法により解析を行い、再現性の確認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。ヒトにおいてはマウスと比べ 10 倍程度の代謝活性が亢進していることが判明した。さらに責任代謝物についても検討を進めている。

#### 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)

7.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性(R5 年度)、8.5 dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性(R5 年度)、9.5 dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性(R6 年度)であった。7.5dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取し、8.5 dpc においては、8 匹、9 匹及び 7 匹の正常発生胚の採取し、9.5 dpc においては、9 匹及び 8 匹の正常発生胚を採取した。

R6 年度においては、このうち、8.5 dpc および 9.5 dpc の胎盤組織の網羅的遺伝子発現解析(各 4 例)を行なった。

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

9.5 dpc の胎盤組織においては、母体側と直接接している側から、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer の 3 層構造からなることが報告されており、それぞれに特異的な遺伝子発現マーカーの存在が知られている。

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

その結果、trophoblast giant cell のマーカーである P11(Pr13d1)および P12(Pr13b1)の遺伝子発現においては、8.5 dpc よりも 9.5 dpc において遺伝子発現の顕著な増加が確認された。P11は、primary trophoblast giant cell であり、8.5dpc には既に存在しており、9.5dpc においても同様に存在していることが想定されているが、遺伝子発現データからも一致している。また、P12 は secondary trophoblast giant cell であり、9.5dpc 以降に増殖することが報告されており、9.5dpc において発現量が急激に増加しており、これらも既知の in situ hybridization のデータと一致している。

また、spongiotrophoblast のマーカーである

Tpbpa の遺伝子の発現は、8.5 dpc および 9.5 dpc で同様に確認された。Spongiotrophoblast は、spongiotrophoblast cells および glycogen cells に分化することが知られているが、glycogen cells に関しては、母体側に浸潤する invasive glycogen cells 集団が存在することが知られている。これらの細胞群は、発生が進むにつれて増加することから、母体側脱落膜と胎児由来胎盤細胞の分離が難しくなる。これらのマーカーとしては、Pr17b1 が報告されており、9.5dpc の方がより増加しており、すなわち、invasive glycogen cells が増加していることが想定される。

Labyrinth layer に関しては、8.5dpc から形成されるものであり、そのマーカーである Gcm1 の発現が確認されている。また、labyrinth layer は、胎児側毛細血管と syncytiotrophoblast より構成されており、胎児側血管のマーカーとなる Slc16a1 および syncytiotrophoblasty のマーカーとなる Ly6e の発現が確認されている。

今年度、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果が胎盤の分化解析(secondary trophoblast giant cell, invasive glycogen cells など)の検出にも有用であることがわかったことから、他のステージに関しても同様の解析を行う予定である。

#### **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 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した I) 発生期の in vitro DNT 評価手法を用いて、6 種類の DNT 陽性対照物質及び 2 種類の陰性対照物質を正確度 100%で分類に成功した。これらは物質毎にシグナルかく乱の方向性や強さ、時

間が異なることから、シグナルかく乱を引き起こす標的が異なることが考えられる。今後、試験物質数を増やすことで、DNTの発現機序にも迫れる可能性がある。併せて、II) 生後発達期の *in vitro* DNT 評価に関しては、文献情報や企業への問い合わせにより、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて NPCs への分化を試みている。NR と発現する細胞としてどの細胞を利用するかに関しては、多くの検討を重ねた。まずは、既存のヒト iPS 細胞を分化させるもしくは NR 発現細胞にレポーター遺伝子をノックインすることを検討し、分化させる場合はどの神経細胞にどの手法で分化させるかについても情報を集める必要がある。今回我々は上記の手法を用いることで、1. 再現性良く、2. 安定的に、3. 多種の NR を発現している、4. 多くの、NPCs の誘導法を選定した。現在、NPCs の分化を進めており、今年度中には NR の発現並びに FGF-SRF への反応性を確認し、次年度に II) 生後発達期の *in vitro* DNT 評価方を開発する予定である。

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昨年度は 97 化合物、今年度は 104 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、昨年度の段階では、17 種類に絞られているが、各試験の信頼性については確認中であったが、今年度の現時点では 17 種類全ての試験の実施がリスク評価には必要であろうとなっている。各試験のバリデーション試験が開始されたことが明らかとなった。

II) 生後発達期 DNT の分子機序解明に向け、モデル揮発性物質であるキシレン(0、2 および 20 ppm) につ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、 $2.50 \pm 0.24$ 、 $20.26 \pm 0.35$  であり、それぞれ 125 及び 101 % とほぼ目標濃度下にて実施できた)、成熟後に 3 種類の試験により情動認知行動解析を実施したところ、主に情動行動への影響を検出するオープンフィールド試験および明暗往来試験においては、キシレン曝露群において有意な差は認められなかった。他方、主に認知機能への影響を検出する条件付け学習記憶試験において、キシレン 2ppm 曝露群では音-連想記憶の低下が、キシレン 20ppm 曝露群では空間-連想記憶および音-連想記憶の低下が有意に

認められた。すなわち、生後発達期におけるキシレンの吸入曝露による遅発性の中枢神経系への影響として、成熟後の行動、特に学習・記憶に影響を与えることが示唆された。あわせて、神経樹状突起・神経細胞・グリア細胞マーカー等を用いた、神経科学的物証に基づく解析として免疫組織化学を実施した結果、キシレンの高濃度(20 ppm) 曝露群においては、成熟後の神経回路、特に海馬における新生ニューロンの増殖に影響を与えることが示唆された。加えて、遺伝子発現解析において、IPA による解析からは、高濃度(20 ppm) 曝露群においては、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、関与する候補シグナルネットワークが抽出された。またプロモーター解析(*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロ RNA である mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。遺伝子発現解析の結果に関しては、低濃度(2ppm) 曝露群では、中枢神経系に関わる細胞の分化マーカーである、DCX(新生ニューロン) の発現変動(増加) が認められ、機能的ではない未熟なニューロンが過剰に産生されている可能性が疑われたが、現時点では免疫組織化学においてその影響を捉えられておらず、引き続き検討が必要である。また、高濃度(20ppm) 曝露群では、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーに関して、有意差は認められなかったものの、免疫組織化学における解析では、新生ニューロンマーカー陽性細胞数の減少が疑われたため、パスウェイ解析によって確認された神経伝達などに関与するシグナルネットワークが、間接的に神経細胞の分化・増殖に対して影響を及ぼすことが示唆された。

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

加えて、モデル揮発性物質としてトルエン(0、0.7 および 7 ppm) につき幼若期反復吸入曝露実験を行い(それぞれ測定値の平均±標準偏差は、 $0.71 \pm 0.04$ 、 $6.82 \pm 0.38$  ppm であり、それぞれ 101 及び 97 % とほぼ目標濃度下にて実施

できた)、成熟後に3種類の試験により情動認知行動解析を実施したところ、トルエン 0.7 ppm 曝露群では条件付け学習記憶試験における空間-連想記憶の低下が、トルエン 7 ppm 曝露群においては空間-連想記憶の有意な低下および音-連想記憶の低下傾向が認められ、これらは遅発性の影響であることが示唆された。今回の結果から、昨年度行ったキシレンでの行動影響と同様、トルエンの生後発達期における曝露により、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常が確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。

引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの免疫組織化学および遺伝子発現データの解析を行い、毒性関連性を検討する予定である。

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 R6 年度においては、母体側へと浸潤することは報告されている invasive glycogen cells に特異的なマーカー遺伝子である Prl7b1 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。

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

そこで、正常胎盤の発生過程における遺伝子発現データをより多くのステージで解析することで、labyrinth layer の分化度を知るために重要なマーカー遺伝子の単離することができ、発生ステージ特異的な化学物質の胎児移行効率などを明らかにできると思われる。

以上、各試験法の最適化をはじめ、ほぼ予定通りに進捗した。来年度(令和7年度)は予定通り、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。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表(抜粋)

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

[doi.org/10.1002/jmor.70044]

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

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

[doi.org/10.2131/fts.11.289]

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

2024; 11(4): 169-181.  
[doi.org/10.2131/fts.11.169]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. *J Appl. Toxicol.* 2024; 44(5): 784-793.  
[doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidenobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(4): 139-149.  
[doi.org/10.2131/jts.49.139]

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

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

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

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

リーサイエンス 2024, 55, 423-425

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

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

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

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

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

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

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

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

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. New strategy of genotoxicity test using

organoids in the 3-dimensional tissue culturesystem. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S52-S53, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.151>

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

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

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

## 2. 学会発表 (抜粋)

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

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

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

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡: バルプロ酸

(VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

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

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

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

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

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

北嶋 聡: 毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-, 基調講演 6L-1 「拮抗剤、分析と中毒」, 第 46 回日本中毒学会総会・学術集会, (2024. 7. 24.), 神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向- 家畜・家禽以外の動物種を含めて-, 日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

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

北嶋 聡: 網羅的分子毒性学からみたヒトと化

学物質との共生, シンポジウム 3S02m 「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」, APPW2025(第130回日本解剖学会・第102回日本生理学会・第98回日本薬理学会 合同大会), 2025.3.19、千葉

桑形麻樹子, 堀本政夫: 農薬における発達神経毒性と関連のある毒性所見の検討 第51回日本毒性学会学術年会(2024.7.03-05)、福岡

Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Yuji Taquahashi Y. Update and Compilation of the database of the glossary for nonclinical toxicity studies 'Dokuseishiken Yougoshuu'. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.6)

Nishimura T, Maki K, Kinoshita K, Suzuki M, Nakazawa T, Naota M, Mikashima F, Hirabayashi Y. The Current Situation and Challenges in Non-Clinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals in Japan. 米国 Society of Toxicology (2024.3.11)

齊藤洋克: 周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出 日本内分秘攪乱物質学会第26回研究発表会(2024.12.7, 東京)

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

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

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

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

○Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPSCs through disruption of signal

interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.

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

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

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

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

○Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.9)

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

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

○村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二: ヒト iPSC 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発

生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討. 日本動物実験代替法学会 第37回大会 宇都宮

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

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

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

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

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

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

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A,

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

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

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

○西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁：胎盤オルガノイド (ミニ胎盤) を用いた糖代謝異常のメタボローム解析、第76回日本産科婦人科学会学術講演会 2024. 4. 20 横浜

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

## 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