

令和 6 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

(24KD1003) 総括研究報告書要

発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発

研究代表者 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 第四室 室長

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本研究では、DynaLux/c にリアルタイム発光測定装置(KronosHT)を導入し、70 時間以上の連続した FGF シグナルのかく乱作用を計測した。溶媒対照に対する化学物質のシグナルかく乱面積を Area Between the Curve (ABC)として化学物質のシグナルかく乱作用の指標として用いた。陽性および陰性対照物質を評価した結果、陽性対照物質 14 種類、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類することが可能であった。また、陽性対照物質の約 8 割で用量依存的な反応が確認され、DynaLux/c を基盤としたリスク評価指標の構築が可能であることが示唆された。

DynaLux/c の更なる高精度化のため、従来の FGF シグナルのかく乱モニター用 Nluc に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして用いる第二のルシフェラーゼ（内部標準ルシフェラーゼ）を導入する多色ルシフェレーズアッセイ系の構築を行った。今年度は内部標準用のプロモーター、ルシフェレーズ、発光基質、光学フィルターの検討を行い、ヒト iPS 細胞においても多色ルシフェレーズアッセイ系の構築が可能であることを確認した。

DynaLux/c の公定化を目指し、試験法の国際標準化に向けた取り組みも進めた。研究班はコンソーシアムを設立し、SOP（標準作業手順書）の作成、規制機関や業界団体との議論、OECD ガイドライン承認に向けた情報収集を実施した。また、これらの取り組みにより、DynaLux/c を国際的に受け入れられるリスク評価手法として確立するための基盤が整備されつつある。また、in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定を行った。

DynaLux/c が公定化されれば、動物実験の削減や審査コストの低減を実現し、新規化学物質の迅速な市場導入を可能にする。また、化学産業の競争力を強化し、規制科学におけるイノベーションを促進するとともに、持続可能な社会の構築に寄与する。本研究の成果は、化学物質の安全性評価における新たなパラダイムを提示し、科学的根拠に基づくリスク管理の進展に貢献するものである。

研究分担者

福田 淳二	横浜国立大学 教授
中島 芳浩	産業技術総合研究所 研究グループ長
平林 容子	国立医薬品食品衛生研究所 センター長
桑形 麻樹子	帝京平成大学 教授
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 特別研究員

研究協力者

Seo Jieun	横浜国立大学 助教
佐々木 大輔	産業技術総合研究 研究員
正田 卓司	国立医薬品食品衛生研究所 室長

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系は高コストであるうえに、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた (*iScience* 等)。DynaLux/c は、動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低

コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性(28 日間反復投与毒性)に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短期間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家 (桑形麻樹子)、公定化に関する専門家 (平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家 (小島肇: 日化協 LRI 顧問) らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔 (若手) や横浜国立大学の Seo Jeun 博士 (若手・女性・国際性) などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な in vitro 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

B. 研究方法 DynaLux/c の概要

DynaLux/c は発生生物学の観点から発生毒性評価を試みた NAM である。受精卵から胎児に至るまでの複雑な形態形成は、細胞の増殖・分化・相互作用などを介し、適切に制御されている。加えて、偶発的な細胞死や遺伝子発現などの内因性、及び化学物質曝露のような外因性のノイズに対する抵抗性もまた適切な発生には重要である。これまでの研究から、形態形成とノイズ抵抗性はシグナル伝達の相互作用により連結され、発生過程を制御していることが明らかになっている(図 1a)。

動物試験では、主に胎児の形態異常を基に化学物質の毒性を評価している(図 1b)。その毒性機序を考えると、化学物質がシグナル伝達相互作用をかく乱し、その結果として生じた形態異常を観察していると考えられる(図 1c)。そこで我々は、こ

のシグナル伝達相互作用のかく乱を計測することで発生毒性を予測できると考え、リアルタイムルシフェーセンスアッセイを用いたレポーターアッセイを確立した。これまでに、ヒト iPS 細胞を用いて 5 種類 (FGF シグナルは 2 種類、WNT シグナル、BMP シグナル、TGF- β シグナルは各 1 種類) のレポーター系を樹立した。各レポーターとリガンドの組合せを検討し、レポーターの反応性を確認した。その中で、最も発光強度が強くシグナルかく乱に対する感度が高い、FGF シグナルレポーターのうち血清応答因子 (Serum Response Factor: SRF) のレポーターアッセイ系を選定した(図 1d)。その特徴は、代表的なホタルルシフェーセンスに比べ約 100 倍明るく iPS 細胞での生細胞ルシフェーセンスアッセイが可能な Nluc を発光レポーターとして用いたことである。また、培養をしながらリアルタイム発光計測が可能なリアルタイム発光測定装置(Kronos HT)を

発生毒性評価法の NAM である DynaLux/c

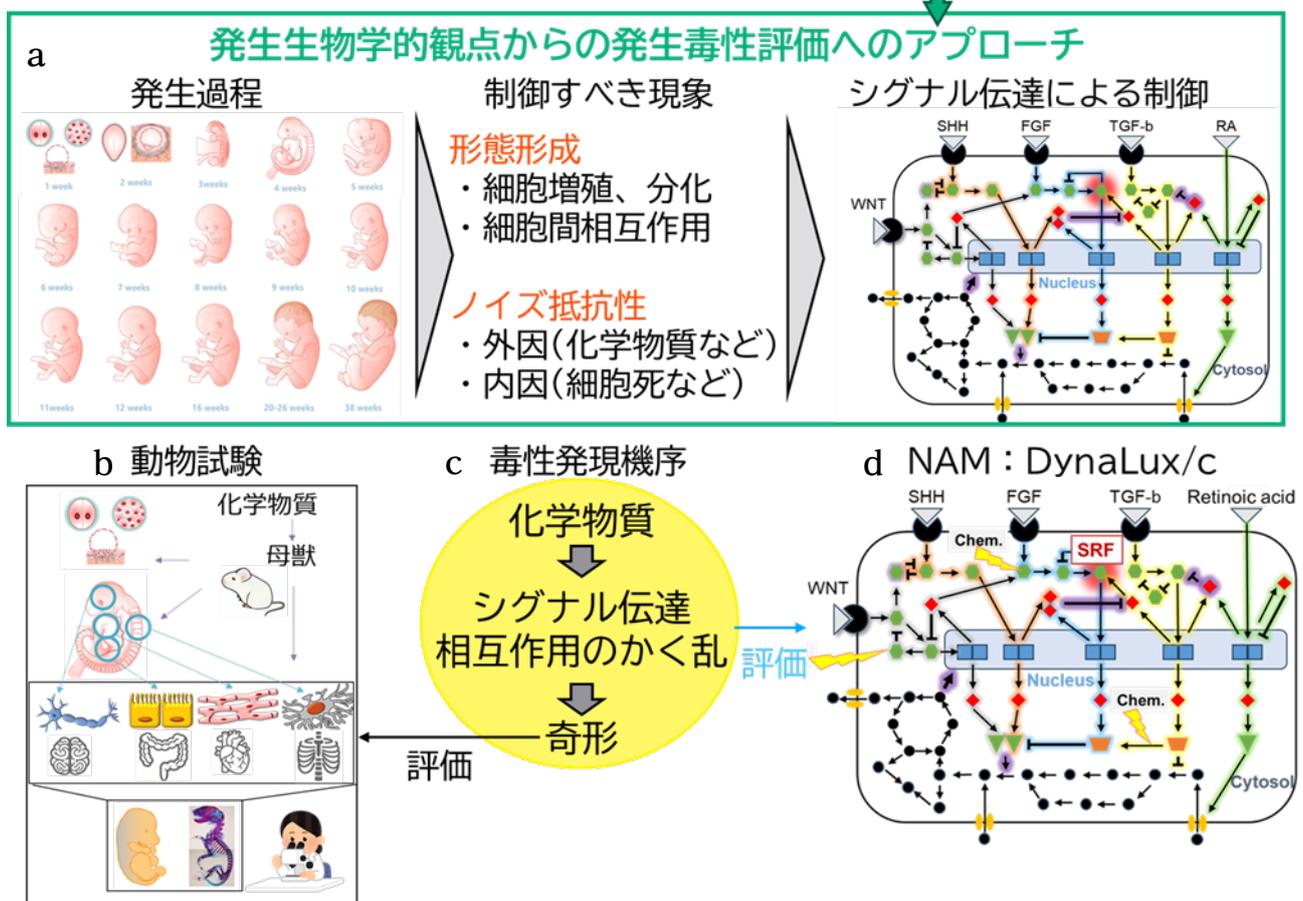
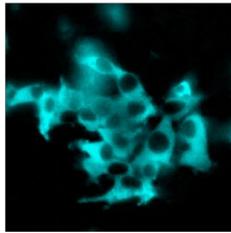


図 1: 発生毒性評価における動物試験と DynaLux/c の比較

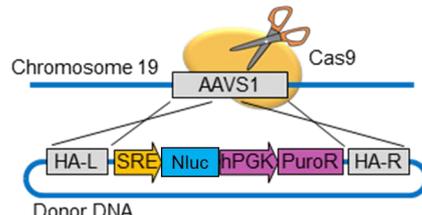
NanoLuc (Nluc)



Promega社HP

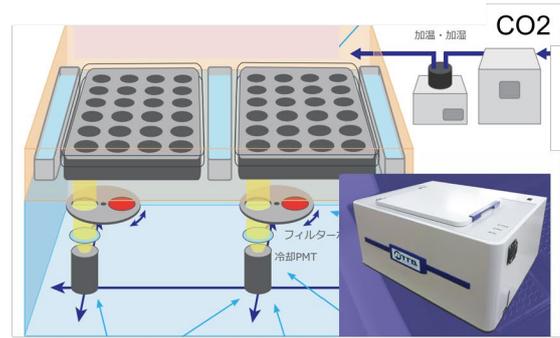
ヒトiPSCs 201B7 line

AAVS1遺伝子座へ
レポーターのKnock-in



Donor DNA
AAVS1 locus:
安定して遺伝子を発現し、挿入配列型の遺伝子発現に影響を及ぼしにくい。

Kronos HT



ATTO社HP

高輝度

リアルタイムアッセイ

再現性↑

サイレンシング↓

(多色)自動計測

図 2: ヒト iPS 細胞を用いたリアルタイムルシフェーセンスアッセイ

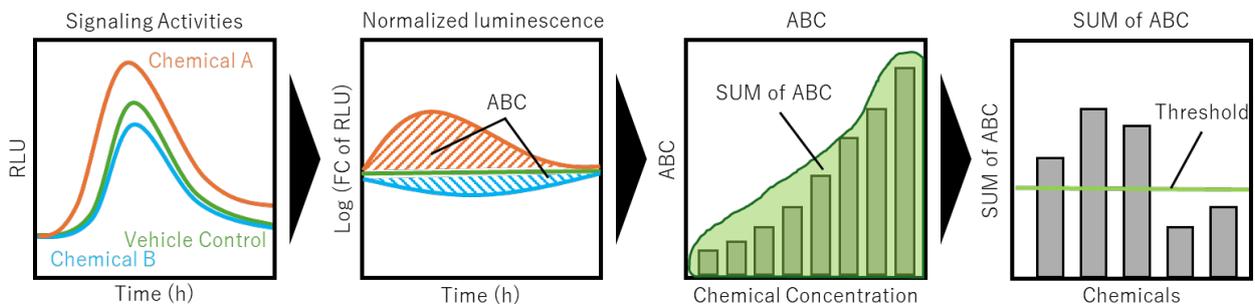


図 3: DynaLux/c によるシグナルかく乱作用の数値化

組み合わせることで、細胞播種から試験終了まで 1 週間で終了するハイスループットな試験系を構築した(図 2)。

実際のシグナルかく乱試験は、レポーターヒト iPS 細胞を 96 穴プレートに播種しコンフルエントまで培養する。その後、試験物質を最高溶解度もしくは IC₅₀ 以下の濃度を最高濃度として 1/2 ずつ希釈した 8 段階の濃度を培地に適用し、72 時間以上リアルタイムルシフェーセンスアッセイを行う。化学物質のシグナルかく乱作用を比較するために、溶媒対照群に対する試験物質のシグナルかく乱面積(Area between the curve: ABC)を各濃度で求め、それらの和をシグナルかく乱作用の値とした(SUM of ABC)。ROC 解析により閾値を設定し、発生毒性陽性と陰性を分類する(図 3)。

B-1. リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

DynaLux/c の特性を把握するために既存の発生毒性物質を用いたハザード評価を行った。既存の発生毒性物質として、これまでに陽性対照物質 14 種(サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド(Len)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール(RA)、ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、プロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))、陰性対照物質 5 種(ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、D-カンファー(CAM)、ジフェンヒドラミン(DMP))を評価した(表 1)。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として SOP を作成した。

B-2. in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE)に向けた情報収集並び評価物質の選定

立ち上げとなった今年度は、Kronos HT を用いない手動の DynaLux/c システムで先行研究 (Kanno *et al.*, *iScience*, 2022, Kanno *et al.*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2022)にて評価をしている 6 化合物 (バルプロ酸ナトリウム、レチノール、ハイドロキシウレア、サルチル酸ナトリウム、サリドマイド) について、臨床および非臨床試験情報を収集した。

将来的に IVIVE に用いることを想定して、臨床試験および非臨床試験情報を調査した。臨床試験については臨床使用用量および薬物動態結果を、非臨床試験では薬物動態にあわせ、各種毒性試験 (急性、亜急性、生殖発生毒性試験) の結果を収集した。

調査方法

主に下記の検索エンジンを用いて、毒性情報を調査した。

(1) 学術論文の検索サイトである Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

(2) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 医療用医薬品の添付文書情報 (https://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)

また、市販薬の添付文書、インタビューホームに記載されていた引用文献を確認した。

B-3. 多色リアルタイムルシフェラーズアッセイの構築

本分担研究では、試験実施者や実施機関間での再現性の向上および DynaLux/c 法の更なる高精度化を目的とし、FGF シグナル(青色)に加えて、

内部標準 (赤色) を組み込んだ多色ルシフェラーゼアッセイの構築を目的とする。

ルシフェラーゼ導入 iPS 細胞の作製：

血清応答因子 (serum response factor:SRF) の応答配列下 (serum response element:SRE) で Nluc を、EF1 α プロモーター制御下で甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3) が発現する 2 つの発現ユニットを連結したレポーターベクターを作製した。これをヒト iPS 細胞のゲノム上のセーフハーバー領域の一つである AAVS1 領域に CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックインし、薬剤選択により安定細胞株 (以下、2 色発光 iPS 細胞と記載する) を樹立した。

発光測定：

マルチウェルプレート対応のリアルタイム発光測定装置 (KronosHT、アトー社) を用い、96 ウェルプレートに播種した iPS 細胞の発光を、37°C、5%二酸化炭素雰囲気下、湿度飽和状態において、1 ウェル当たり 10 秒間、約 30 分間隔で 3 日間連続で測定を行った。ルシフェラーゼを発光させるための発光基質は、所定の濃度を培地に添加した。

B-4. コンソーシアムの設立、国内外の合意形成

本研究班の中で、DynaLux/c の公定化に向けて、業界団体等の意見反映及び国際的な合意形成を目指した。

発生毒性試験代替法 DynaLux/c の OECD における国際標準化及び医薬品規制調和国際会議 (ICH) における当該試験を用いたリスク評価法の認知を目的に、本研究班の中に業界団体等の意見反映及びプロトコルの技術移転性を確認するためのコンソーシアムを設立した。

第一回コンソーシアム会議を令和 6 年 7 月 25 日 (木) 国立医薬品食品衛生研究所で開催され、班員に加え、厚生労働省、独立行政法人医薬品医

療機器総合機構 (PMDA) 及び業界団体の専門家が参加した。

第二回コンソーシアム会議は、令和7年1月28日(火)に国立医薬品食品衛生研究所で開催し、上記の方々が参加した。

B-5. OECD テストガイドライン対応

本分担研究では、この改良される試験法の確立・公定化に資することを目的として、試験法の国際標準化や OECD などにおける試験法ガイドラインとしての公定化に必要な国内外のNAMの開発状況やその適格性認定などを含む情報収集を行った。

米・EUを中心に、化学物質等の安全性やリスク評価において、試験動物を使用しない評価法へのパラダイムシフトが加速されつつある現状と、その行政的受け入れに関する国内外の状況の把握を目的として、規制関連国際会議 (OECD Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)-36 (4/16-19、パリ)、OECD Working Party on Hazard Assessment (WPHA) (6/24-26、パリ)、OECD Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) (6/25-27 (うち 6/25PM~6/26AM は WPHA との合同会議)、パリ)、Global Coalition for Regulatory Science Research (GCRSR) & Global Summit on Regulatory Science (GSRS)24 (9/17-19、アーカンソー)) や、国内関連学会 (日本実験動物学会 (5/29-31、京都)、レギュラトリーサイエンス学会 (9/13-14、東京)) に参加し、それぞれの発表の聴講や、意見交換を通じて、必要な情報の収集を行った。

(倫理面への配慮)

B-2 研究は情報収集が主とした研究であるが、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。その他の課題は該当なし。

C. 研究結果及び考察

C-1. リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

SOPの作製にあたっては、試験の再現性と信頼性を確保するため、以下の検討を行った。まず、播種細胞数および培養スケジュールについては、日単位・時間単位での厳格な管理を実施した。次に、96穴プレートにおけるエッジ効果の抑制を目的として、外周ウェル間に滅菌水を注入し、また、培養時には従来の蓋の代わりにガス透過性シール(ブリーズイージー、ブリーズイジー)を用いることで湿度の安定化を図った。さらに、細胞培養中の温度を一定に保つための運用方法を確認した。加えて、施設内における実施環境のバリデーションを通じて、試験実施上の課題の抽出と対策を行った。その結果、複数の実験者において、再現性の高い波形データが得られるようになり、Well間の差も減少した。作成したSOPは、その他として公開する。

作成したSOPに準拠して、DynaLux/cを用いた化学物質のシグナルかく乱作用の測定を実施した。評価に用いた化学物質、使用溶媒、試験濃度、および判定の正誤については表1に示す。

物質毎の毒性強度を明らかにするために、標準化したグラフ及びその各濃度のかく乱面積(Area between the curve: ABC)を求めた。陰性対照物質はほとんどシグナルをかく乱しない一方で、発生毒性陽性物質は、物質毎に異なるシグナルかく乱パターンを示した。これらのABCの和(SUM of ABC)から閾値を設定し、陽性対照物質14種と陰性対照物質5種を100%の正確度で分類することに成功した。

次に、各評価物質の用量相関に着目した。陰性対照物質では用量相関は見られず、ABCの値も低いことが明らかになった。陽性対照物質のうち、サリドマイド、レナリドミド、メトトレキサート

は用量相関性を示さなかったが、他の 11 物質では用量相関性が確認された。現在は、最高用量から 1/128 希釈までの範囲を試験しており、今後は試験の濃度範囲を広げる必要性があるかもしれない。ただし、用量相関がみとめられなかった 3 物質の最高試験濃度は溶解度に依存しており、溶けにくい物質の評価は今後の課題となる。これらは今後のデータの集積を待って判断する。

最後にこれまでのデータから ABC の値に関して考察した。陰性対照物質ではほとんどの濃度で ABC は 50 以下であった。一方で、陽性対照物質では用量相関を示すものは ABC の値が 100 程度を超えると ABC の値が急激に増強される傾向がみられた。用量相関を示さない 3 物質の ABC はどの濃度でも 100 前後であった (図 10)。これらの結果は DynaLux/c においても、Point of Departure (PoD) の設定が可能かもしれないことを示唆している。今後のデータの集積を待ち、班員やコンソーシアムのメンバーと協議しながら、IVIVE を考慮したリスク評価への道筋をつけ、公定化に向けた協議を続ける。

C-2. IVIVE に向けた情報収集並びに評価物質の選定

DynaLux/c システムで既に評価をしている 6 化合物 (バルプロ酸ナトリウム、レチノール、ハイドロキシウレア、サルチル酸ナトリウム、サリドマイド) について、臨床および非臨床試験情報を収集した。すなわち、臨床試験では臨床使用用量および薬物動態結果が入手可能であった。また、非臨床試験では薬物動態にあわせ、各種毒性試験 (急性、亜急性、生殖発生毒性試験) の結果を収集した。各種毒性試験報告書は入手不可能なために、詳細な毒性情報 (程度及び頻度など) に関しては限られた情報による収集評価となった。

C-3. 多色リアルタイムルシフェーレースアッセイの構築

これまでの DynaLux/c では、シグナルかく乱モニター用のルシフェラーゼとして Endurazine を発光基質として青色に発光する Nluc を用いている。そこで多色ルシフェーレースアッセイ系の構築のため、第二のルシフェラーゼ (内部標準ルシフェラーゼ) には Nluc と最大発光波長が最も離れ、異なる発光基質 (D-ルシフェリン) で発光する甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3、以下赤色ルシフェラーゼと記載) を選定した。また赤色ルシフェラーゼを発現するためのプロモーターとして幹細胞において外来遺伝子の強制発現に汎用されている elongation factor1 α (EF1 α) プロモーターを選定した。

続いて、EF1 α プロモーターの制御下で赤色ルシフェラーゼを連結したベクターを導入した iPS 細胞を樹立し、D-ルシフェリン存在下でリアルタイム発光測定を行い、数日間に渡り有意な発光が持続することを確認した。次に、既に樹立済みの FGF シグナルを Nluc でモニターする iPS 細胞を併用し、複数ルシフェラーゼのリアルタイム発光測定方法を検討した。Endurazine および D-luciferin を共存させても各々のルシフェラーゼが特異的に発光し、発光反応の特異性が保たれること、また両発光基質が共存した状態でも基質の自己酸化によるバックグラウンドは皆無であり、高い信号/ノイズ比下でリアルタイム発光測定が実施できることを確認した。さらに、青色の Nluc と赤色ルシフェラーゼを同時測定する方法を検討するため、これら 2 種類の iPS 細胞を共培養し、光学フィルターによる各々の発光の抽出を試みた結果、青色および赤色領域を抽出する 2 枚の光学フィルターを用いることで 2 種類のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定が可能であることを確認した。

これらの結果に基づき、FGF シグナルモニター用 Nluc の発現カセットと、EF1 α プロモーターと赤色ルシフェラーゼが連結された内部標準用発現カセットを 1 つのプラスミド内に搭載したベ

クターを構築し、これを導入した 2 色発光 iPS 細胞を樹立した。

次に、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法と細胞の作動性について検証した。この細胞では青色の Nluc および赤色の SLR3 の発光が混合して光るため、2 枚の光学フィルターを用いて両者の発光を分離・検出する測定方法を想定した。具体的には、ショートパスフィルターである SPF500 により Nluc の 500 nm 以下の発光を、他方、ロングパスフィルターである R 6 2 フィルターにより SLR3 の 600 nm 以上の発光を分離して測定する方法を設定した。この方法により両ルシフェラーゼの発光を測定可能か検討するとともに、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の作動性について、FGF 処理による SRF-SRE シグナルの増強（発光増加）を指標に検証した。

2 色発光 iPS 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、所定のプロトコールに従い培養し、1% Endurazine、500 μ M D-luciferin および FGF または溶媒を含む培地に交換した。発光測定はフィルターなし、SPF500 および R62 を通した発光を各々 10 秒間、約 30 分間隔で 70 時間リアルタイムに測定した。その結果、SPF500 フィルターを通して測定した Nluc の発光強度は FGF 処理により急激に増加し、約 5 時間をピークとする活性化キネティクスが測定された。一方、R62 フィルターを通して測定された SLR3 の発光強度は、FGF 処理により若干の増加は見られるものの、大きな変動は生じないことが確認された。FGF 処理による Nluc の活性化キネティクスは、Nluc のみが発現する RE-Nluc 細胞でこれまで得られているパターンと一致していた。また、SLR3 については、SLR3 のみが発現する EF1-SLR3 細胞に FGF を処理しても顕著な発光強度の変化が生じないという予備実験のデータと一致していた（データ省略）。以上より、設定したフィルターにより両ルシフェラーゼの発光が正しく検出・定量化できること、さらに樹立した 2 色発光 iPS 細胞は想定通りに FGF に反応することが確認された。

C-4. コンソーシアムの設立、国内外の合意形成

第一回コンソーシアム会議には、班員 6 名、厚生労働省から 3 名、PMDA から 3 名、大学関係者 6 名、日本製薬工業協会から 2 名、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会から 7 名、一般社団法人日本化学工業協会から 1 名、日本化粧品工業会から 3 名及びクロップライフジャパン（旧 JCPA 農薬工業会）から 2 名、合計 32 名が対面または web で参加した。

会議では、技術移転に向けた共同研究に関する提案及びリスク評価を目指したデータベース作成に必要な被験物質に関する情報収集への協力要請がなされ、参加者と種々の意見交換がなされた。

第二回会議は、令和 7 年 1 月 28 日に開催された。DynaLux/c の追加データ情報が紹介されるとともに、共同研究への参画や被験物質情報について議論した。また、技術移転に向けた共同研究に関する今後の予定が紹介された。

解析データの収集

正田より、ICH S5 (R3) の参照物質リストおよび欧州代替法評価センター (ECVAM) のバリデーションで用いられた被験物質に関する構造式、物性、分類分析などの解析結果などの結果をまとめた。物性の結果も合わせ、毒性を協議していくことになった。

小島より、他の代替法に関する入力結果が紹介された。今後の組み合わせを考えると、他の代替法で検出できない物質を評価できるなどの本試験法の特徴を明確にする必要があると説明した。

DynaLux/c を用いることにより、生殖発生毒性のステージ毎の有害性を明確にすることが期待される。一方で、リスク評価のためには、DynaLux/c の結果に加え、曝露評価などの情報も必要となる。正田やコンソーシアム参加者の協

力を得て、in silico を組み合わせるリスク評価手法の開発に寄与していきたいと考えている。

一方、DynaLux/c の技術移転性や再現性を共同研究を通して明確にしていくこともコンソーシアムの目的である。来年度には、技術移転性の検討を始められるよう覚書や同意書の準備を進めていきたいと考えている。

C-5. OECD テストガイドライン対応

OECD では、WNT が主体となり、一昨年度には新興技術の試験法への取り込みに関するワークショップ、昨年度は、そうした新たな試験法の公定化に関するワークショップが開催されており、本年度はそれらを踏まえ、OECD 試験法の公定化に関するガイダンスドキュメント (GD34、2005 年発布) の改訂作業が行われている。即ち、従来一つの試験法が開発されてガイドラインとして認証されるまで 10 年ほどの時間を要しているところ、信頼性を損なうことなく、諸々の必要とされるリソースを最小化するための改訂を目指している。行政利用に耐える信頼性確保のための試験法の評価手法そのものの議論もさることながら、必要な経費も無視できない課題であり、包括的なガイダンスが期待されている。

GCRSR は各国の規制当局関連機関の年次連絡会議であり、付随してセミクローズドで開催されるシンポジウム GSRS の今年 GSRS24 のテーマは “Digital Trans-formation in Regulatory Science” であった。内容としては人工知能 (AI) の利活用に関するケースレポート的な発表が過半ではあったものの、昨年 GSRS23 のテーマは “Emerging Technologies for Food and Drug Safety”、来年 GSRS25 のテーマは “Building a Strong Regulatory Science with Tomorrow’s Technologies” であり、一貫して新興技術の動向を把握することに主眼がおかれている。引き続き情報の収集に努めたい。

米国でも EU でも、こうした新興技術を適用した新規試験法の行政利活用に向けた適格性認定システムが構築されており、本邦でも相応のシステムの早期の導入が望まれている。

国内学会では、いずれもシンポジストとして、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 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) における、所内外機関が開発した新たな試験法の公定化支援や、新たに公定化された OECD ガイドラインの本邦での行政受入提案といった活動を基軸として、収集した国際状況を含めた発表を行い、DynaLux/c の紹介にも努めた。

D. 結論

本研究は、DynaLux/c 法を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも資する新たな新規アプローチ法 (NAM) として確立・公定化することを最終目標としており、本年度はその基盤整備に向けた重要な進展が得られた。具体的には、Kronos HT による 70 時間超のリアルタイムルシフェラーゼ測定により、シグナルかく乱作用を定量的に把握できる新たな指標「ABC」を開発し、これを用いることで陽性・陰性対照物質の正確な分類が可能であることを実証した。さらに、陽性対照物質の 8 割において明確な用量依存性が確認されたことは、DynaLux/c 法がリスク評価指標の構築に応用可能であることを示す有力な根拠である。

また、より精緻で信頼性の高い測定系を目指し、異なる発光基質を用いた多色ルシフェラーゼアッセイを構築し、2 種類のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定に成功した。これにより、細胞毒性や測定誤差に対する補正が可能となる内部基準の導入が可能となり、DynaLux/c 法の定量精度と再現性のさらなる向上が期待される。

加えて、実用化に向けた基盤として、今年度は 6 物質の毒性情報を収集・整理し、今後の IVIVE (in vitro to in vivo extrapolation) 検討に資する情報項目の整備を進めた。次年度以降は評価

化合物を拡充し、より体系的な情報基盤の整備を進める予定である。

こうした技術的・情動的な進展に加え、NAMの国際的動向を把握するために関連学会やシンポジウムに参加し、米国およびEUを中心とした動物実験代替法の規制受容に関する情報収集と発信を積極的に行った。加えて、産業界との連携を強化するためにコンソーシアムを設立し、技術移転性の確認やデータ解析方法の検討を進めることで、今後の公定化や国際的な受容を見据えた体制整備を着実に進めている。

これら一連の成果は、DynaLux/c法が科学的信頼性と実用性を備えた、ヒト外挿性の高い次世代毒性評価法として確立されつつあることを示しており、動物実験に依存しないリスク評価へのパラダイムシフトを支える中核的技術となることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 小島肇: 動物実験代替法の歴史、*Cosmetic Science*, 2024, 10, 56-63.
2. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol*, 2024 Jun 14. doi: [10.1007/s00204-024-03802-6](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03802-6).
3. M. Kuwagata, Y. Doi, H. Saito, M. Tsurumoto, T. Igarashi, T. Nishimura, Y. Taquahashi, Y. Hirabayashi, S. 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]
4. 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
5. Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda. *Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics*. *Current Opinion in Toxicology* 2024; Volume 39, 100489.
6. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion, *Scientific Reports* (IF=3.8), 14, 23935 (2024)
7. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, *Scientific Reports* (IF=3.8), 14, 4709 (2024) doi.org/10.1038/s41598-024-55377-y
8. MT. Taninokuchi, Y. Zhou, L. Braccischi, F. Modestino, J. Fukuda, C. Mosconi, Trans-arterial stem cell injection (TASI): The role of interventional radiology in regenerative medicine. *Journal of Clinical Medicine* (IF= 3.0) 13(3), 910 (2024) doi.org/10.3390/jcm13030910
9. JB Park, GH Moon, A Cho, M Kwon, JW Park, EC Yi, H Kim, J. Fukuda, C Kwak, YG Ko, and YS Chun, Neddylation of insulin receptor substrate acts as a bona fide regulator of insulin signaling and its implications for cancer cell migration, *Cancer Gene Therapy* (IF= 4.8), 31, 599-611 (2024) doi.org/10.1038/s41417-024-00729-z
10. E. Sugiyama, A. Nanmo, N. Xiaolei, SY. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device, *ACS Biomaterials Science & Engineering* (IF=5.4), 10, 2, 998-1005 (2024) doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c01346
11. Y. Zhou, J. Seo, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, and J. Fukuda, Exosomes for hair growth and regeneration, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (IF=2.3), 137, 1, 1-8 (2024) doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.11.001

12. Tomita, T., Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Miyazaki. "Novel three-dimensional live skin-like in vitro composite for bioluminescence reporter gene assay." FEBS J. 291, (2024): 4619-4632.
 13. Tabei, Y., Y. Nakajima. "IL-1beta-activated PI3K/AKT and MEK/ERK pathways coordinately promote induction of partial epithelial-mesenchymal transition." Cell Commun. Signal. 22, (2024): 392.
 14. Nakazawa, K., M. Matsuo, Y. Kikuchi, Y. Nakajima, R. Numano. "Melanopsin DNA aptamers can regulate input signals of mammalian circadian rhythms by altering the phase of the molecular clock." Front. Neurosci. 18 (2024): 1186677.
 15. 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. Fundam. Toxicol. Sci. 2024;11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]
 16. Miyata, R., M. Suzuki, Y. Okazaki, D. Abe, Y. Nakajima. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activation by an Active Compound in *Lythrum anceps* (Koehne) Makino." J. Cell Biochem. 126, (2025): e70009.
- (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
5. 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)
 6. 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).
 7. Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPS cells through disruption of signal interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.
 8. 大久保 佑亮、溝田 華柙、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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. Kashi 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)

2. 学会発表

1. 小島肇：動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
2. 小島肇：JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
3. 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
4. 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

13. 三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕:医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査。第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)
14. 溝田華柊、大原凜太郎、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱の自動測定による発生毒性評価。第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)
15. 村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討。日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮
16. 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
17. 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
18. Y. Hirabayashi: Recent Initiatives of JaCVAM for Regulatory Acceptance of Safety Evaluation of NAMs including MPS. Singapore International Food Forum, Singapore, Aug. 1, 2024
19. 平林容子: 経済協力開発機構 (OECD) が進める New Approach Methods を用いたリスクアセスメント 第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 31 日
20. Y. Hirabayashi: Initiatives for the regulatory use of alternative methods to animal testing. Next generation nonclinical safety evaluation- Alternatives to animal testing in drug discovery and development -Nonclinical toxicology related event, Shonan, Nov. 13, 2024
21. Kuwagata M and Horimoto M. Key toxicological findings related to developmental neurotoxicity caused by pesticides. The 64th Society of Toxicology
22. Naota M, Nishimura T, Okubo Y, Suzuki Y, Suzuki M, Kinoshita K, Watanabe K, Nakazawa T, Onodera H, Kuwagata M, Hirabayashi Y. Survey on safety profile of general toxicity Studies using non-human primates for Antibody drugs approved in Japan after revision of ICH-S6. The 64th Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
23. Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Kuwagata M, Aisaki K, Kitajima S. Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn as a surface electrode. The 64th Society of Toxicology (2025.3.18, Orlando, Florida, USA)
24. Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection The 64th Society of Toxicology (2025.3.17, Orlando, Florida, USA)
25. Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. International Society for extracellular vesicles annual meeting2024 (2024.5.12, Melbourne, Australia)
26. 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 (IFPA2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)
27. Ono R, Naruse M, Kuwagata M, Yoshioka Y, Hirabayashi Y, Ochiya T, Ikawa M, Kitajima S. 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)
28. 平林容子. 代替法の行政的受け入れにかかると JaCVAM の役割 第 14 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2024.9.13)

F. 知的財産権の出願・登録状況 特許取得・実用新案登録・その他

なし

		名前	CAS No.	溶媒	最高濃度(ug/mL)	判定の正誤
1	陽性物質	サリドマイド(THA)	50-35-1	DMSO	12	正
2	陽性物質	バルプロ酸ナトリウム(VPA)	99-66-1	DMSO	100	正
3	陽性物質	メトトレキサート(MTX)	133073-73-1	DMSO	5	正
4	陽性物質	レナリドミド(LEN)	191732-72-6	DMSO	35	正
5	陽性物質	メキシ酢酸(MAA)	625-45-6	PBS	683	正
6	陽性物質	サリチル酸ナトリウム(SA)	54-21-7	PBS	666	正
7	陽性物質	ヒドロキシウレア(HU)	127-07-1	PBS	149	正
8	陽性物質	レチノール(RA)	302-79-4	DMSO	0.01	正
9	陽性物質	ホウ酸(BA)	10043-35-3	PBS	250	正
10	陽性物質	フルオロウラシル(5FU)	51-21-8	DMSO	14.1	正
11	陽性物質	塩化リチウム(LiCl)	7447-41-8	PBS	250	正
12	陽性物質	ブロモデオキシウリジン(BrdU)	59-14-3	DMSO	50	正
13	陽性物質	5,5-ジメチル-2,4- オキサゾリジンジオン(DMO)	695-53-4	PBS	840	正
14	陽性物質	ジフェンヒドラミン(DHM)	147-24-0	PBS	262	正
15	陰性物質	ペニシリン(PenG)	69-57-8	PBS	1000	正
16	陰性物質	サッカリン(SAC)	82385-42-0	PBS	1000	正
17	陰性物質	シメチジン(CM)	51481-61-9	DMSO	30	正
18	陰性物質	D-カンファー(CAM)	464-49-3	DMSO	50	正
19	陰性物質	ジフェンヒドラミン(DMP)	147-24-0	PBS	262	正

表 1: 今年度の評価物質リスト