

令和 6 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（23KD1003）

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

分担研究報告書

分担研究課題：「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）」

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

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、神経系の発生・発達は極めて複雑であり、詳細な有害発現経路（AOP）の積上げのみで、DNT の試験法開発や実体説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る。本分担研究課題は、そのうち発生期の in vitro 試験法の開発であり、独自開発したヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法（DynaLux/c）の DNT 試験への改良を目的とする。

DynaLux/c は、血清応答因子（Serum response factor: SRF）シグナルレポーターを導入したヒト iPS 細胞を用い、被験物質による FGF 誘導性 SRF シグナルへのかく乱作用をリアルタイムに計測する試験法である。令和 5 年度には、KronosHT を用いた 48 時間のリアルタイム計測法を構築し、令和 6 年度には、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c により、DNT 陽性対照物質 7 種および陰性対照物質 5 種を正確度 100% で分類できることを示した。本年度は、NPCs を用いた評価系の条件検討と、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c による追加物質の評価を行った。

NPCs を用いた評価系では、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も高い SRF 応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められない、または未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c よりも小さい応答にとどまった。一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c では、本年度新たに評価したアクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A を DNT 陽性として分類できた。フタル酸ビス（2-エチルヘキシル）（DEHP）、では陰性であったが、主要代謝物である MEHP は陽性であったことから、DEHP 関連 DNT の in vitro 評価では主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。また、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質として、ニコチン、フルオキセチン、カフェインを評価したところ、ニコチンおよびフルオキセチンは陽性、カフェインは陰性として分類された。

以上より、本分担研究では、DynaLux/c のリアルタイム化により、発生期 DNT 評価に利用可能なシグナルかく乱評価基盤を構築し、DNT 評価対象物質に対する検出性を示した。NPCs を用いた評価系についてはさらなる条件検討が必要である一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c は、DNT 評価対象物質のシグナルかく乱作用を検出できる有用な in vitro 試験系となり得ると考えられた。

A. 研究目的

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る。本分担研究課題は、そのうちの発生期の in vitro 試験法の開発であり、独自開発したヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法(DynaLux/c)の DNT 試験への改良を目的とする。

従来の生細胞ルシフェラーゼアッセイ法を用いた FGF-SRF シグナル計測では、実験者が CO₂インキュベーター内で 96 穴プレート培養している細胞を、計測のたびにルミノメーターへ移動し、測定後に再び CO₂インキュベーターへ戻す必要があった。この方法は定点観察であるため、特に夜間に生じるシグナルかく乱作用を正確に捉えにくいことに加え、測定時のプレート移動に伴う物理的影響が iPS 細胞に及ぶ可能性が課題であった。実際、従来法では夜間に不自然な波形変動や標準偏差の増大が認められていた。

令和 5 年度は、スループット性と再現性を高めるために KronosHT(ATTO 社)を用いたリアルタイム計測による DynaLux/c を構築した。令和 6 年度の研究では、構築したリアルタイム in vitro 発生毒性試験法を用いて、分担研究者の桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の一部に関して試験を実施した。また、DNT 陽性物質には、神経伝達物質受容体、トランスポーター、イオンチャンネル、細胞内シグナルなど、神経発達・神経機能関連標的に作用するものが含まれる。そこで、これらの作用をより神経系に近い細胞状態で捉えることを目的として、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞

(neural precursor cells: NPCs) へ分化させた評価系についても検討した。

令和 7 年度(最終年度)は、これまでの結果を基に正確度およびスループット性の高い in vitro DNT 試験系の開発を進める。

B. 研究方法

神経発達・神経機能関連標的に作用する DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を、より神経系に近い細胞状態で捉えるため、SRF 活性レポーター細胞を NPCs へ分化させた評価系を検討した。NPCs への分化には STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用い、マーカー遺伝子の発現により分化状態を確認した。NPCs におけるリアルタイム計測条件を設定するため、Spike リガンドおよびアッセイ培地を比較し、DNT 陽性物質に対する応答を検討した。

また、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c により、DNT 陽性対照化学物質の評価を行った。96 穴プレートに播種した SRF 活性レポーター細胞に被験物質および FGF を添加し、KronosHT (ATTO 社)を用いて 48 時間の発光波形をリアルタイムに取得した。化学物質処理群の波形を溶媒対照群と比較し、Log 標準化した波形差の面積をシグナルかく乱面積 (Area Between the Curves: ABC) として算出した。被験物質は、最大溶解量または一部 IC₆₅ を最大濃度とし、2 倍希釈による 4 濃度で評価した。

C. 研究結果及び考察

まず、神経発達・神経機能関連標的に作用

する DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を、より神経系に近い細胞状態で捉えることを目的として、NPCs に分化させたヒト iPS 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法の構築を検討した。昨年度までに、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて SRF 活性レポーター細胞を NPCs へ分化させ、マーカー遺伝子の発現により NPCs への分化を確認した。また、NPCs における SRF シグナルの Spike リガンドとして、bFGF、IGF、EGF、BDNF を検討し、bFGF が最も高い反応性を示すことを明らかにしている。

本年度は、NPCs を用いたリアルタイム計測条件をさらに最適化するため、アッセイ培地の検討を行った。NPCs への分化および維持に用いる STEMdiff Neural Progenitor 培地、神経生理学用の無血清培地である BrainPhys Neuronal 培地、ならびに標準 DynaLux/c で用いる APEL2 培地を比較した。その結果、APEL2 培地において最も高い SRF 応答が認められた。

次に、APEL2 培地における Spike リガンドとして、アデノシン三リン酸 (ATP) およびグルタミン酸ナトリウムを新たに検討したが、これらの刺激では明確な SRF 活性の誘導は認められなかった。以上より、NPCs を用いたリアルタイム計測においても、SRF 応答を指標とする場合には、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c と同様に、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も適していると考えられた。

この条件を用いて、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質として、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸について、NPCs を用いた DynaLux/c を実

施した (図 1)。カフェインおよびイミダクロプリドでは明確なシグナルかく乱作用は認められなかった。また、バルプロ酸ではシグナル抑制傾向がみられたものの、そのかく乱強度は未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c と比較して小さかった。これらの結果から、本年度検討した条件では、NPCs を用いた DynaLux/c により、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質のシグナルかく乱作用を明確に検出するには至らなかった。NPCs を用いた評価系については、分化段階、培地条件、刺激条件、計測時点などを含め、さらなる条件検討が必要であると考えられた。

次に、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c による DNT 評価対象物質の試験を実施した。令和 6 年度までに、DNT 陽性対照物質 7 種 [サリドマイド (THA)、バルプロ酸 (VPA)、メトトレキサート (MTX)、ハイドロキシウレア (HU)、レチノイン酸 (RA)、フルオロウラシル (5-FU)、ブロモデオキシウリジン (BrdU)] および陰性対照物質 5 種 [ペニシリン G (PenG)、サッカリン (SAC)、シメチジン (CM)、D-カンファール (CAM)、ジフェンヒドラミン (DHM)] について、ROC 曲線解析により設定した判定閾値に基づき、正確度 100% で分類できることを示している。

本年度は、DNT 評価対象物質として、アクリルアミド (AcA)、ビスフェノール A (BPA)、メチル水銀 (MeHg)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP)、および DEHP の主要代謝物であるフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP) の 5 物質を評価した。その結果、アクリルアミド、メチ

ル水銀、ビスフェノール A および MEHP では、既存の判定閾値を上回るシグナルかく乱が認められ、DNT 陽性として分類された。一方、DEHP では明確なシグナルかく乱は認められず、既存閾値に基づく判定では陰性であった（図 2）。DEHP は DNT 評価対象物質であり、体内で加水分解されて主要代謝物である MEHP を生じる。MEHP は、DEHP の生殖発生毒性に関与する主要な活性代謝物として知られており、近年では神経発達毒性を示す報告 (PMID: 41562039) もあることから、本研究では DEHP に加えて MEHP についても評価した。その結果、親化合物である DEHP では陰性であった一方、主要代謝物である MEHP では明確なシグナルかく乱が認められた。この結果から、DEHP 関連 DNT の *in vitro* 評価では、親化合物だけでなく、主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。

これまでに、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c では、多くの DNT 評価対象物質についてシグナルかく乱を検出可能であることを示してきた。また、別の研究課題において、DynaLux/c 開始時の細胞特性を明らかにするために single-cell RNA 解析を実施したところ、一部の細胞において、神経分化マーカーや神経伝達関連遺伝子の発現が認められた。このことから、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c であっても、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質の影響をシグナル応答の変化として捉えられる可能性があると考えた。

そこで、桑形が精査した DNT 評価対象物質のうち、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有するニコチン、フルオキ

セチン、カフェインについて未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c で評価した。ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体、フルオキセチンはセロトニントランスポーター、カフェインはアデノシン受容体を主な作用標的とする。その結果、ニコチンおよびフルオキセチンでは濃度依存的なシグナルかく乱が認められ、陽性判定された（図 3）。一方、カフェインでは明確なシグナルかく乱は認められず陰性と分類された。OECD の DNT *in vitro* battery においても、ニコチンおよびフルオキセチンは一部の試験で陽性判定を受けているのに対し、カフェインは実施した試験全てにおいて陰性と報告されている。そのため、本研究におけるカフェインの結果は、既存の *in vitro* DNT 評価結果と概ね整合すると考えられた。ただし、カフェインについては、動物試験等で報告される影響、ヒト曝露濃度、および *in vitro* 試験での適用濃度との関係を踏まえた解釈が必要である。

以上の結果から、NPCs を用いた評価系については、本年度検討した条件では明確なシグナルかく乱作用を検出するには至らず、さらなる条件検討が必要であると考えられた。一方で、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c では、今年度追加した DNT 評価対象物質のうち DEHP を除く物質を既存の判定閾値により分類できた。また、DEHP についても、主要代謝物である MEHP では明確なシグナルかく乱が認められた。さらに、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質についても、ニコチンおよびフルオキセチンを陽性、カフェインを陰性として分類で

きた。これらの結果は、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c が、発生期 DNT 評価において有用なシグナルかく乱評価系となり得ることを支持するものである。

D. 結論

本分担研究では、発生期の in vitro DNT 試験法の開発を目的として、ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 発生毒性試験法である DynaLux/c の DNT 試験への応用を検討した。令和 5 年度には、従来の手動計測に伴う時間解像度および再現性の課題を解決するため、KronosHT を用いたリアルタイム発光計測系を導入し、DynaLux/c による連続的な SRF シグナルかく乱評価系を構築した。令和 6 年度には、本評価系を用いて DNT 陽性対照物質 7 種および陰性対照物質 5 種を評価し、ROC 曲線解析により設定した閾値に基づき、これらの物質を正確度 100% で分類できることを示した。

令和 7 年度は、DynaLux/c の DNT 試験への応用可能性をさらに検証するため、NPCs を用いた評価系の条件検討と、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c による追加物質の評価を行った。NPCs を用いた評価系では、APEL2 培地および bFGF 刺激条件が最も高い SRF 応答を示したが、カフェイン、イミダクロプリド、バルプロ酸の評価では、明確なシグナルかく乱作用は認められない、または未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c よりも小さい応答にとどまった。したがって、NPCs を用いた DynaLux/c については、現時点では標準 DynaLux/c を補完する評価系としての条件が十分に確立しておらず、追加検討が必要であると考えられた。

一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c では、本年度新たに評価したアクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、DEHP および MEHP のうち、アクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、MEHP を DNT 陽性として分類できた。DEHP では明確なシグナルかく乱は認められなかったが、主要代謝物である MEHP ではシグナルかく乱が認められたことから、DEHP 関連 DNT の in vitro 評価では、親化合物だけでなく主要代謝物を含めた評価設計が重要であると考えられた。

さらに、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する DNT 評価対象物質としてニコチン、フルオキセチン、カフェインを評価したところ、ニコチンおよびフルオキセチンは陽性、カフェインは陰性として分類された。この結果は、OECD の DNT in vitro battery における報告と概ね整合しており、未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c が、神経伝達または神経活動調節に関わる DNT 評価対象物質の一部についても検出性を示す可能性が示された。

以上より、本分担研究では、DynaLux/c のリアルタイム化により、発生期 DNT 評価に利用可能なシグナルかく乱評価基盤を構築し、DNT 評価対象物質に対する検出性を示した。NPCs を用いた評価系についてはさらなる条件検討が必要である一方、未分化ヒト iPS 細胞を用いた標準 DynaLux/c は、発生過程に関わるシグナル応答の変化を指標として、DNT 評価対象物質のシグナルかく乱作用を検出できる有用な in vitro 試験系となり得ると考えられた。今後は、物質数の拡充、判定閾値の妥当性検証、再現性評価

を進めることで、発生期の in vitro DNT 試験法としての有用性をさらに明確化する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Koki Murayama, Kashu Mizota, Rieko Matsuura, Yusuke Okubo, Yoshihiro Nakajima, Atsushi Suzuki, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assay Based on Real-Time Monitoring of Fibroblast Growth Factor Signal Disruption in Human Induced Pluripotent Stem Cells. J. Vis. Exp. (224), e68910, doi:10.3791/68910 (2025).

2. 学会発表

Okubo Y., Mizota K, Murayama K, Matsuura R, Mootha A, Kitajima S, Hirabayashi Y, Nakajima Y, Fukuda J : Continuous Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Developmental Toxicity Assay. 20th INTERNATIONAL CONGRESS OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY(2025. 6. 18)

Okubo Y., Murayama K., Matsuura R., Mootha A., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: Real-time Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Toxicity Assay. Joint Meeting of JSCB 77th & JSDB 58th(2025.7.16-17)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, Archana Mootha, 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指標による精巣毒性物質の評価、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025. 7. 2)

佐藤花音, 村山航己, 松浦利絵子, Mootha Archana, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いた新型コロナウイルス感染症治療薬のシグナルかく乱を基にした発生毒性評価、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025. 7. 2)

大久保佑亮, 松浦利絵子, 村山航己, 佐藤花音, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二: シグナルかく乱に着目した in vitro 発生毒性試験とそのリスク評価への展開、第 65 回日本先天異常学会学術集会 (2025. 7. 27)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 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指標による精巣毒性物質の評価、第 65 回 日本先天異常学会学術集会 (2025. 7. 25)

大久保佑亮: シグナルかく乱を指標とする発生毒性試験法 DynaLux/c の開発と行政受入に向けた取り組み、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱指標による生殖毒性物質の評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

佐藤 花音, 村山航己, 松浦利絵子, 中元颯馬, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱に基づく新型コロナウイルス感染症治療薬の発生毒性評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

中元颯馬, 村山航己, 佐藤花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二, 大久保佑亮, 山田隆志: ヒト iPS 細胞を用いた PFAS のシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価: PFAS への適用性と信頼性の検証、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025. 11. 1)

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

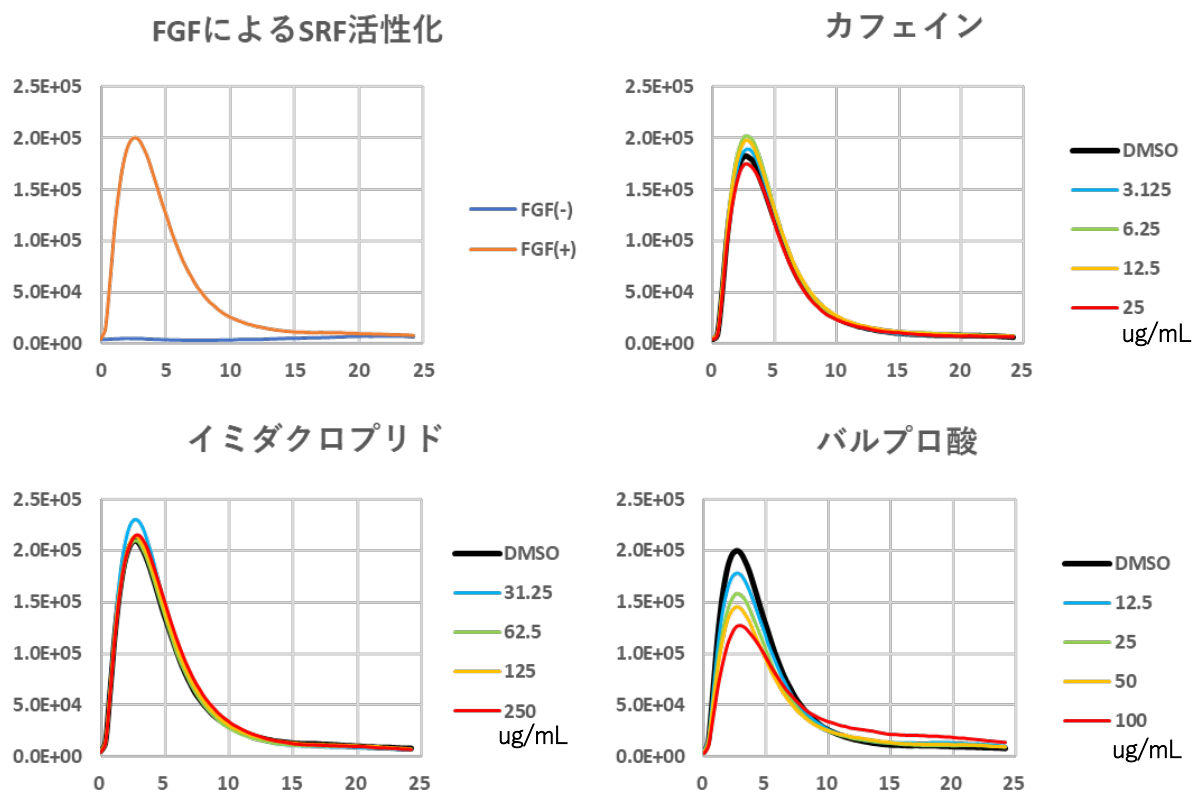


図1：NPCsを用いたリアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイ

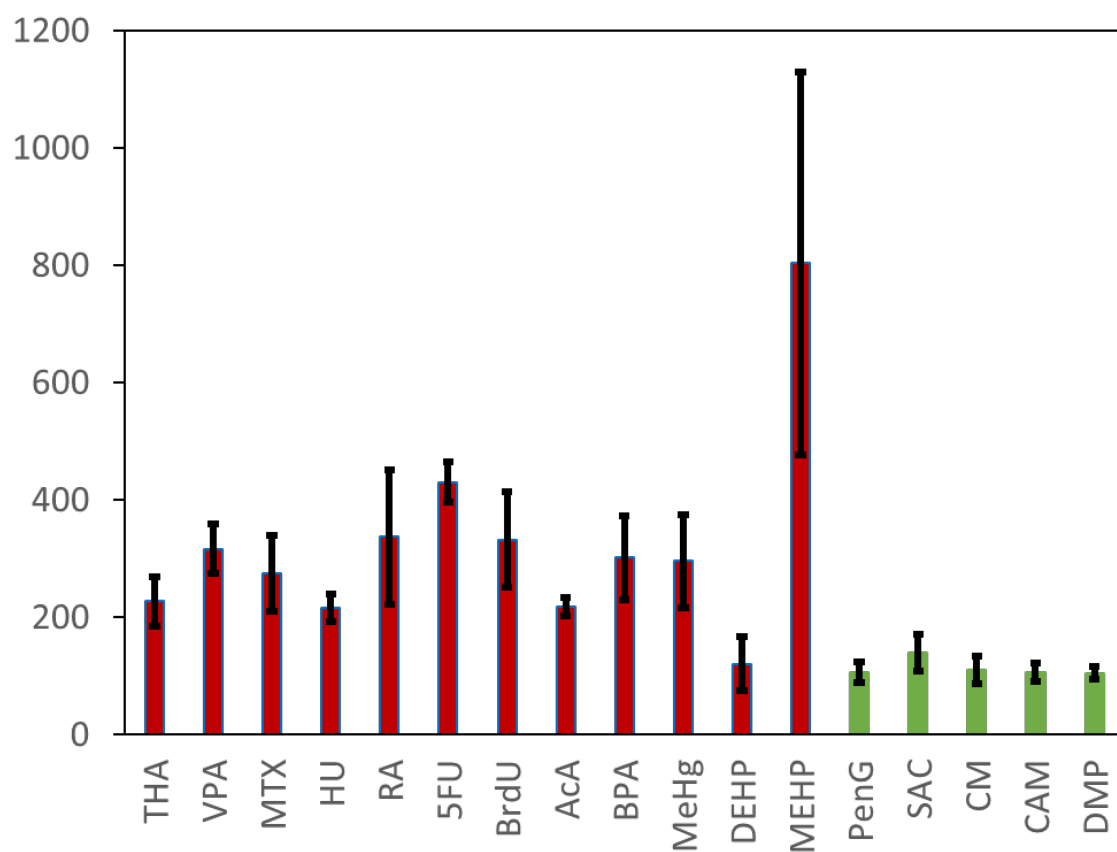


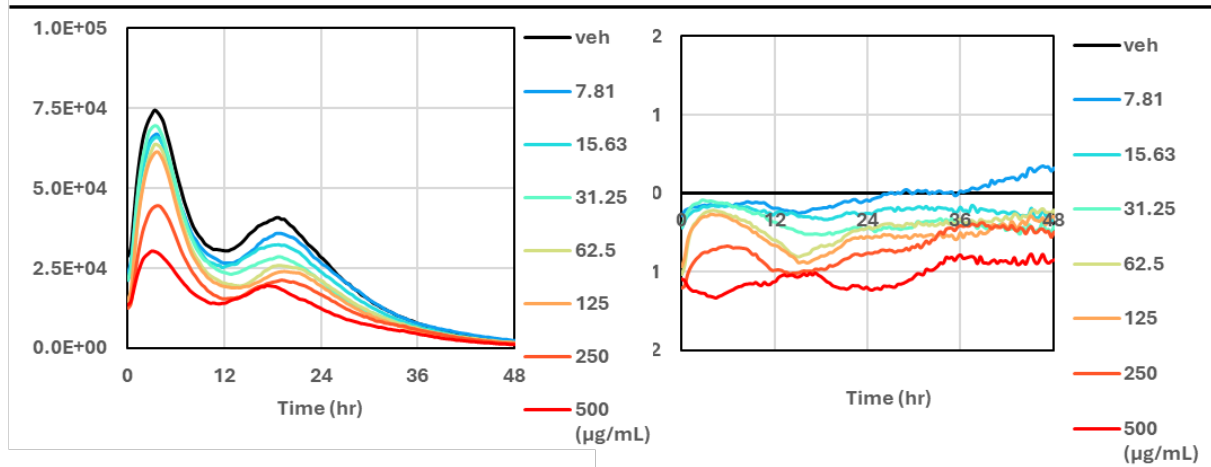
図2：未分化のiPS細胞を用いたDynaLux/cの結果

DNT 陽性対照物質(赤色)、陰性対照部室(緑色)。サリドマイド(THA)、バルプロ酸(VPA)、メトトレキサート(MTX)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノイン酸(RA)、フルオウラシルウラシル(5FU)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、アクリルアミド(AcA)、ビスフェノール A(BPA)、メチル水銀(MeHg)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP)、および DEHP の主要代謝物であるフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP)、ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、D カンファール(CAM)、ジフェンヒドラミン(DHM)。n=3。 エラーバー：標準偏差。閾値：177.4。

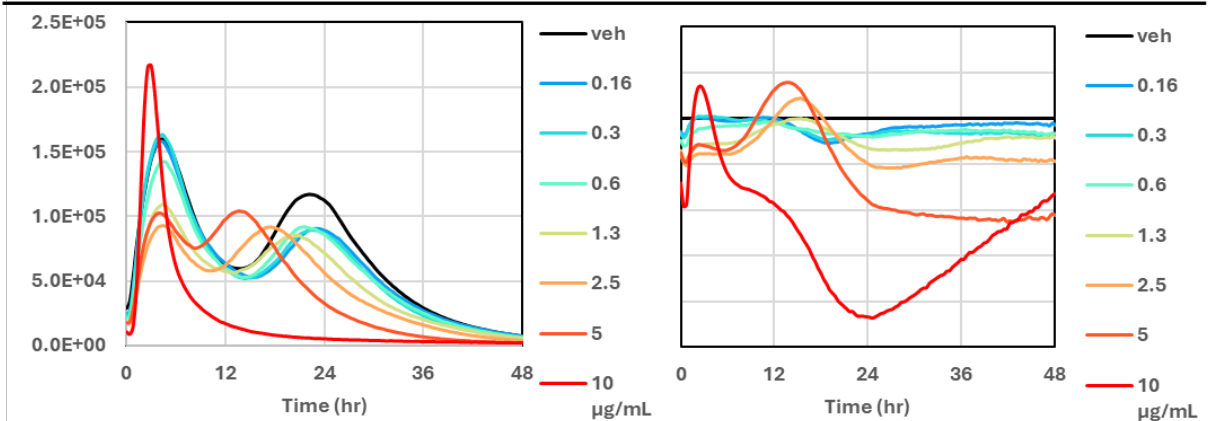
リアルタイム計測

変化率(log2)

ニコチン (Sum of ABC : 373.9 ± 133.2)



フルオキシセチン (Sum of ABC : 505.8 ± 162.6)



カフェイン (Sum of ABC : 97.4 ± 14.9)

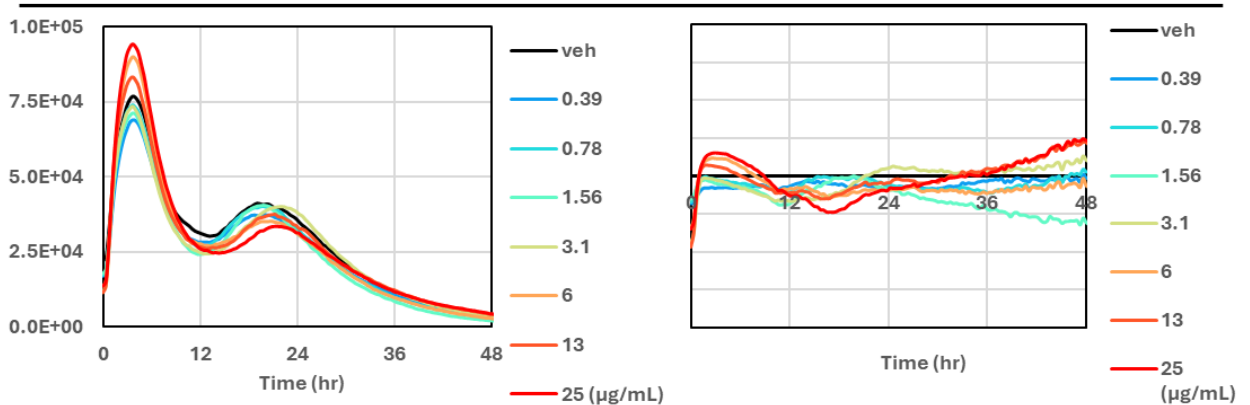


図3：未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c による、神経伝達または神経活動調節に関わる標的を有する物質の評価

Sum of ABC の結果は高い方から 4 濃度の ABC 値の合計を示しており、図2のグラフと比較可能である (閾値 : 177.4)。