

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 7 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 安全性予測評価部 主任研究官

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・発達と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 に係る試験法の開発や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 評価手法の開発を行う。また日本を代表する DNT 専門家(研究分担者)により DNT 陽性・陰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* 代謝プロファイルを明らかにし、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の開発を試みる。これまでに、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、生後発達期の 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、発達期におけるキシレン等の吸入曝露により、成熟後に、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、将来的に *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の同定を試みる。

<各年度の目標>令和 5 年度：各試験法の最適化及び DNT 陽性・陰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、DNT 陽性・陰性物質リストの作成、及び、生後発達期 DNT 誘発メカニズムの探索、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、将来的に *in vitro* 試験法への適応拡大する上で必要となる、生後発達期 DNT の誘発シグナルネットワークの同定

令和7年度(今年度)は、I) 発生期のDNTを対象とした未分化ヒトiPS細胞を用いて、昨年度の成果を踏まえつつDNT陽性・陰性対照物質の評価をさらに進めた。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、フルオキセチン及びカフェインを評価したところ、ニコチン及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、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。

一方で、陽性対照物質であるカフェインはシグナルかく乱を示さなかった。そこでこの方策として、生後発達期のDNTを対象とし、ヒトiPS細胞を神経前駆細胞に分化させ、DNT陽性対照物質のシグナルかく乱作用の検出法を開発することとした。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、イミダクロプリド及び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ず、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた(大久保)。DNT陽性・陰性対照物質リストについては、昨年度抽出した陽性対照物質103化合物、陰性対照物質67化合物を最終化とした。またDNT評価手法の国際標準化に向けた情報収集については、IATAにおける農薬のDNT証拠の重みづけ(WoE)評価に、17種のDNT-IVB試験データを統合し、階層型の評価過程によりDNTリスク評価を実施することを目指していることを見出した。加えて、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集した。なおこのリストと、既に作成したDNT陽性・陰性化学物質リストとの重複はないことも見出した(桑形)。

II) 生後発達期のDNTの分子機序解明に向け、幼若期反復吸入曝露実験を行ったトルエン(目標曝露濃度:0、0.7及び7 ppm)につき、昨年度、成熟後に情動認知行動解析を実施したところ、令和5年度(初年度)に検討したキシレン曝露群同様、学習記憶異常が観察された。令和7年度(今年度)はさらに、神経科学的物証に基づく解析を進め、検出された行動影響と関連する海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られた(齊藤)。加えて、得られた脳サンプルの遺伝子発現データについても解析を行った(北嶋)。さらに、別のモデル揮発性物質であるホルムアルデヒド(目標曝露濃度:0、1及び10 ppm)についても、発達期反復吸入曝露実験を実施し(西村)、その結果、曝露群において、成熟後の行動影響(不安の亢進)が認められた(齊藤)。これまでに得られた神経科学的物証に基づきDNT誘発メカニズムの解明を進めるとともに、得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析および毒性関連性の比較検討を行った結果、「将来的に、生後発達期における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の同定」に向けて、その候補となるシグナルネットワークを見出した(齊藤・北嶋)。

加えて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、令和6年度(昨年度)までに、モデル物質につき、ヒト及びマウス胎盤オルガノイドを用いる化学物質代謝につき検討し、その代謝物の種差を明らかとし、ヒトへの外挿性の向上が期待される結果を得た。令和7年度(今年度)は、当方が樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するためscRNA-seq解析を行った結果、10のクラスターに分類可能で、cytotrophoblast(cluster4, 5)、syncytiotrophoblast(cluster 6)も明確に分画された。現在モデル薬物の適用により、各クラスターにつきDNA変化を解析しており、その性質を詳細に検討し、解析系の精度の補完を検討中である(西田)。加えて、令和6年度(昨年度)までに検討したC57BL/6マウスの受精後8.5及び9.5日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析に加えて、令和7年度(今年度)は、14.5日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行ない、trophoblast giant cells、spongiotrophoblast及びlabyrinth layerに特異的な遺伝子発現マーカーが、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された(小野)。このように、モデル物質につき、ヒト及びマウス胎盤オルガノイドを用いる化学物質代謝につき検討し、その代謝物の種差を明らかとし、以って、当初の目的は基本的に達成されたものとする。

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。いずれについても、当初の目的は基本的に達成されたものとする。すなわち、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、将来的に *in vitro* 試験法への適応拡大する上で必要となる、生後発達期 DNT 誘発に係る候補シグナルネットワークの同定を行うことができたものとする。これにより、ヒトへの外挿性を考慮した、迅速、低コストで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。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

なお試算によれば、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 20 万円/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 億円/1 物質）に比べ 2,000 分の 1 程度のコストで済むこととなり（初期投資を除く）、実施に係る時間に関しても同様に、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 1 ヶ月/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 年/1 物質）に比べ 36 分の 1 程度の時短となる。すなわち、*in vitro* DNT 試験法の場合、*in vivo* の系と比較して、コスト・時間ともに、桁違いのパフォーマンスが得られることとなる。

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に係る試験法の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・陰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の開発を試みる。これまでに、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、生後発達期の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、発達期におけるキシレン等の吸入曝露により、成熟後に、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DNTの発現機序を明らかにし、将来的に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の同定を試みる。

(必要性) 今後、産業の発達とともに新規物質がますます増加することが想定される中、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に係る試験法の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。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

＜各年度の目標＞ 令和5年度：各試験法の最適化及びDNT陽性・陰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、DNT陽性・陰性物質リストの作成、及び、生後発達期DNT誘発メカニズムの探索、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。

令和5年度（初年度）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。

令和6年度（昨年度）は、上記のKronos HTを用いたDynaLux/cを用いて、48時間のシグナルかく乱作用を基に、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iPS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。そこで令和7年度（今年度）は、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iPS細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を検討した。

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、ダーラム、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）。

令和7年度（今年度）は、2025年9月に公開された、DNT-IVB専門家グループが主催した“The OECD Workshop on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity（DNT）.”の報告書（workshop proceedings）を精査した。また、近年、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、発達神経毒性評価のための化学物質リスト作成の一環として、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集し精査した。

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。その中から令和5年度（初年度）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。

令和6年度(昨年度)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。

令和7年度(今年度)は、昨年度までに抽出した陽性物質 103 化合物、陰性物質 67 化合物を精査し最終化とした。

追加調査として、DNT-IVB 専門家グループが主催した”The OECD Workshop on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT).” の報告書 (workshop proceedings) を精査し、OECD の DNT 評価方針の方向性を分析した。また、近年、妊娠期の甲状腺機能障害が次世代の脳発達に影響を及ぼすことが懸念されていることから、発達神経毒性評価のための化学物質リスト作成の一環として、妊娠期甲状腺機能障害に特化して既存試験情報を収集した。OECD テストガイドライン改正時期を考慮し、2010 年から 2025 年の間に報告された経口投与簡易生殖毒性試験 (OECD TG421) および反復投与毒性・生殖毒性併合試験 (OECD TG422) の試験結果を化審法データベースおよび既存化学物質データベースから収集し精査した。

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>

令和5年度（初年度）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、富士フイルム和光純薬(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 倍程度という事となる。

<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（トルエン- d_8 の二硫化炭素溶液、4mg/mL）50 μ L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 0.5~100 μ g/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 50 μ L 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 $\times$ 0.18mm、膜厚 0.36 μ m、Agilent Technologies 社製）
オープン温度：40 $^{\circ}$ C（3.5 分保持）-20 $^{\circ}$ C/min-150 $^{\circ}$ C（5 分保持）
注入口温度：220 $^{\circ}$ 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：N₂
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_8 ）

得られた各キシレン及びトルエン- d_8 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（現 名古屋市衛生研究所 生活環境部長）、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>

令和 6 年度（昨年度）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。

<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、トルエンをバブリングし気化させる方法により行った。

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- 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_{10} の二硫化炭素溶液、6mg/mL）50 μ L 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 0.1~100 μ g/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 50 μ L 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：H₂
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-d₁₀)

得られた各トルエン及びキシレン-d₁₀ 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（現 名古屋市衛生研究所 生活環境部長）、藤原恒司研究員の協力を仰いだ。

<ホルムアルデヒドにおける吸入曝露実験>

令和7年度(今年度)のモデル物質はホルムアルデヒド (Formaldehyde; 分子量：30.03、CAS No.：50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号：064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度 36.0～38.0%、ロット番号：SEK3790、富士フイルム和光純薬(株)) を使用した。ホルムアルデヒドの曝露濃度は先行研究の結果から、1 および 10 ppm を目標値とした。因みにこの濃度は、ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値が 0.08 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。

<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、ミリ Q 水で 10 倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバブリングし気化させる方法により行った。なお 10 倍に希釈しない場合、バブリング時にパラホルムアルデヒド (重合体) と思われる析出物が現れるために、この希釈操作は必須である。

ホルムアルデヒド濃度は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管 (LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号：505331、Supelco 社) 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、曝露群は各濃度とも 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 30NII および MP-Σ 300NII、柴田科学株式会社製) を用いて、吸入チャンバー内の空気を吸引した。ホルムアルデヒドは、捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNPH) と反応し、ホルムアルデヒド-2,4-DNPH として捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド-2,4-DNPH は、アセトニトリル (LC/MS 用、カタログ番号：01033-76、関東化学(株)) 約 90mL により抽出してメスフラスコで 100 mL に定容し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器を接続した LC-20AD システム一式、(株)島津製作所製) により HPLC 分析を実施した。なお、移動相にはアセトニトリルとオルガノ (株) 製超純水装置 PURELAB flex で精製した超純水を用い、その組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は 1 mL/min とした。その他分析条件について、カラムは COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mmφ×250 mm、粒径：5 μm、ナカライテスク社製)、検出波長は UV 360 nm、試料注入量は 2～10 μL とした。また、検量線はホルムアルデヒド-2,4-DNPH 標準原液 (カタログ番号：16120-96、関東化学(株)) を用い、ホルムアルデヒド量として 0.5～100 ng の範囲で検量線を作成した。この分析部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の杉本直樹部長、酒井信夫室長及び、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。受精後 14.5 日目胎盤は、胎盤および脱落膜を分離することは困難であるため、胎盤を脱落膜を含めた状態の胎盤を解析する。RNA-seq のデータが NCBI の GEO データベースに収録されているために、公開データを利用して解析を行う。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 (7.5、8.5、及び 9.5)

(dpc: Days post coitum: 交配後) 分ける。一方 14.5 dpc については、利用した公開データベース (NCBI の GEO データベース) では、McMaster University Central Animal Facility において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を行い、14.5 dpc で胎盤のサンプリングを行っている。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 RNeasy 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 Nextseq2000 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。NCBI GEO データベースより取得した受精後 14.5 日目胎盤の RNA-seq データ (SRR19917101, SRR19917104, SRR19917109, SRR19917110) に関しては、Illumina 社 NovaSeq 6000 より出力された pair end sequence (100bp x 2)である。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く。

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*):

令和 5 年度 (初年度) 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グナール計測を行ったところ、FGF シグナールは 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、シグナー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 シグナールは 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ー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) 及び 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) 及びシメチジン (ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬) の FGF-SRF シグナールかく乱作用を調べた。その結果、バルプロ酸は FGF-SRF シグナー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) の方が強く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ー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ールかく乱作用を示さなかった。

令和 6 年度 (昨年度) は、化学物質の FGF-SRF シグナールかく乱作用を基に DNT 毒性を評価する DynaLux/c 法を中心に解析を進めた。胎生期を想定した未分化ヒト iPS 細胞を用いた試験を実施した。桑形が精査した 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)、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)、プロモデオキシウリジン (BrdU))、及び、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)、及びジフェンヒドラミン (DHM)) のシグナールか

く乱作用を $n=3$ で取得した。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ー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、正精度 100% で分類可能であった。

令和 6 年度 (昨年度) はさらに、DNT 陽性対照物質として 9 種類 (アクリルアミド、ビスフェノール A、カフェイン、シクロフォスファミド (及びその代謝物)、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)、エタノール、メチル水銀及びニコチン) を評価した。その結果、カフェイン以外の物質でシグナールかく乱作用がみられ、陽性判定が可能であった。

令和 7 年度 (今年度) 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。

未分化ヒト iPS 細胞を用いて、DNT 陽性対照物質の評価をさらに進めたが、具体的には、アクリルアミド、メチル水銀、ビスフェノール A、DEHP 及び MEHP の 5 種類の物質につき検討した結果、DEHP 以外の物質を DNT 陽性として分類できた。DEHP では明確なシグナールかく乱は認められなかったが、主要代謝物である MEHP ではシグナー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、フルオキシセチン及びカフェインを評価したところ、ニコチン及びフルオキシセチンは陽性、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。

令和 6 年度 (昨年度) までに 17 種類の陽性対照物質を試験し、16 種でシグナールかく乱を確認し、その有用性につき再確認した。一方で、陽性対照物質であるカフェインはシグナールかく乱を示さなかった。そこでこの方策として、次に述べるように、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞に分化させ、生後の DNT を対象としたシグナールかく乱作用検出法の開発を試みることにした。

＜生後の DNT を対象とした、ヒト iPS 細胞分化神経前駆細胞を用いた、シグナルかく乱作用検出法の開発＞

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。そこで令和 6 年度(昨年度)は、レポーターヒト iPS 細胞を上記の kit を用いて NPCs へ分化誘導を行い、分化マーカーの発現を確認した。また、SRF を活性化させるリガンドを検討した。

令和 7 年度(今年度) は 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、イミダクロプリド及び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、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた。

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、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、令和 5 年度(初年度)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、令和 6 年度(昨年度)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、令和 5 年度(初年度)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

令和 6 年度(昨年度)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 170 物質が掲載されている。この内訳は陽性対照が 103 化合物、陰性対照が 67 化合物であった。令和 6 年度(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。

令和 7 年度(今年度) は、昨年度までに抽出した陽性対照物質 103 化合物、陰性対照物質 67 化合物を精査し最終化とした。

改めてリストを精査した結果、170 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	81
化学物質	65

OECD DNT-IVB 専門家会議および OECD ワークショップ議事録から情報収集した結果、IATA における農薬の DNT 証拠の重みづけ (WoE) 評価に、17 種の DNT-IVB 試験データを統合し、階層型の評価過程により DNT リスク評価を実施することを目標とすることが明らかになった。

さらに、甲状腺関連の既存試験収集では 39 物質が得られた。既に作成した DNT 陽性・陰性化学物質リストとの重複はなかった。甲状腺機能低下により DNT 誘発の懸念が既に議論されている化合物が 1 化合物 (Perfluorohexadecanoic acid) 含まれていたが、未だ、DNT 発現について結論に至っていない。今回、精査した 39 化合物の情報は、将来、妊娠期甲状腺機能低下による DNT 発現に関しても化合物リスト作成が必要

な際に有用となりうるものである。

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

令和5年度(初年度)は、モデル揮発性物質であるキシレンにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<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及び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 ± 0.24 ($2.66 \sim 1.97$ ppm)、 20.26 ± 0.35 ($20.74 \sim 19.84$ 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 ± 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及び20ppm)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、低濃度(2ppm)及び高濃度(20ppm)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。

令和6年度(昨年度)に、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(2ppm)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、2ppm(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、20ppm(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。

トルエンにおける解析について

令和 6 年度 (昨年度) は、モデル揮発性物質であるトルエンにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<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 及び 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 ± 0.04 (0.74～0.63 ppm)、 6.82 ± 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 ± 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。令和 7 年度 (今年度) は、責任部位の 1 つである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、細胞増殖マーカーである Ki67 について、海馬歯状回の細胞動態への影響を示唆する所見が得られ、令和 5 年度 (初年度) に実施したキシレン曝露マウスと同様に、検出された行動影響と関連する海馬への影響が考えられた。

<脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析>

令和 7 年度 (今年度) は、トルエ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。海馬における各分化マーカーの遺伝子の発現につい

て、曝露群 (低濃度及び高濃度) と対照群を比較したところ、低濃度 (0.7 ppm) 曝露群、高濃度 (7ppm) 曝露群において、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、0.7 ppm (低濃度) のトルエン曝露群において、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。

122 ps (増加)、111 ps (減少)

増加分 122 ps ならびに減少分 111 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、7 ppm (高濃度) のトルエン曝露群において、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。

460 ps (増加)、347 ps (減少)

増加分 460 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、神経炎症シグナル伝達をはじめとした炎症関連経路が抽出され、炎症性応答に関わるシグナルの亢進方向の変化が示唆された。一方、Upstream Analysis を用いて検討したところ、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。

減少分 347 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、シナプス形成シグナル伝達、髄鞘形成シグナル伝達、GABA 作動性神経伝達 (合成・放出・再取

り込み・分解)に関連する経路等が抽出され、神経回路の形成・維持や可塑性に関わる基盤過程への関与が示唆された。さらに Upstream Analysis を用いて検討したところ、神経保護・シナプス可塑性に関与する beta-estradiol が抽出された。

ホルムアルデヒドにおける解析について

令和7年度(今年度)は、モデル揮発性物質であるホルムアルデヒドにつき、幼若期反復吸入曝露実験を行い、検討を行った。

<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日間反復吸入曝露(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1及び10ppmに対し、それぞれ測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 1.05 ± 0.04 (1.00～1.11 ppm)、 11.28 ± 0.35 (10.58～11.55 ppm)であり、ほぼ目標濃度下(それぞれ105及び113%)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ホルムアルデヒド濃度は 0.00 ± 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、ホルムアルデヒド両曝露群では、オープンフィールド試験において中央滞在時間の有意な減少が認められた。また、高用量曝露群(10 ppm)では、明暗往来試験において暗室待機時間の増加傾向が認められ、これらの結果から不安関連行動への影響が示唆された。

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 μM)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38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47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た。

令和7年度(今年度)の解析により、特にその代謝経路においてマウスではバリン・ロイシン・イソロイシン経路の有意な活性化を確認し、ヒトにおいてはTCA cycleの有意な活性化を確認し、種差による差異の検出に成功した。

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、再現性の確認も終了しバルクでのDNA障害活性を有していることが判明した。

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。興味深いことにヒト胎盤オルガノイドでの代謝が約 10 倍早く、より活性を持つ構造に変換されることが判明し、ヒトでの毒性がマウスとは異なる可能性が強く示唆された。

令和 7 年度 (今年度) は、さらに各種薬物を用いてその代謝活性の種差における相違について検討し、生殖毒性評価の新しい評価系を提案できる可能性をまとめている。

C-3-6: ヒト胎盤オルガノイドのシングルセル RNA シークエンス解析 (scRNA-seq 解析) とモデル薬物添加による個別解析:

令和 7 年度 (今年度)、我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するため scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。全検出遺伝子数は human 16378 遺伝子に対して mouse 20543 遺伝子と検出された遺伝子数はマウスの方が多かった。変動遺伝子 (p-value < 0.05) も human 1,615 遺伝子、mouse 6,582 遺伝子と生物種間での大きな有意差があることが判明した。

続いて、scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。これまでの検討で 10 のクラスターに分類可能で、cytotrophoblast (cluster 4, 5)、syncytiotrophoblast (cluster 6) も明確に分画された。胎盤オルガノイドにおける薬物誘発性 DNA 二重鎖切断 (DSB) 形成のパターンが 2 次元培養系と比較、検討して明らかに異なることが判明した。特に syncytiotrophoblast で著明な p53 代謝経路の活性化が認められた。

C-3-7: 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 (令和 5 年度 (初年度))、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 (令和 6 年度 (昨年度)) であった。7.5 dpc 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。

令和 6 年度 (昨年度) 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、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。さらに、P11 (Prl3d1)、P12 (Prl3b1) 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することを明らかにした。

令和 7 年度 (今年度) においては、これに 14.5 dpc 胎盤の遺伝子発現データ (NCBI GEO データベース) を追加して解析を行なった。14.5 dpc の交配では、7.5 dpc、8.5 dpc、9.5 dpc と同様に交配し、プラグ陽性かつ妊娠している雌 4 匹から正常胚を採取し、そのうち、4 匹 (N=4) の雄の胎盤の RNA-seq データを利用し、解析した。その結果、令和 6 年度 (昨年度) に明らかにした胎盤の分化度を反映したバイオマーカーのうち、Prl7b1 および P12 (Prl3b1) においては、さらに遺伝子発現が上昇し、P11 (Prl3d1) は、遺伝子発現がなくなることが観察された。これらのことから、これらのバイオマーカーの発現を定量することで、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された。

D. 考察と結論

I) 発生期の in vitro DNT 評価手法の開発に向け、令和 5 年度 (初年度) は、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。

令和6年度（昨年度）は、開発したI)発生期のin vitro DNT評価手法を用いて、7種類のDNT陽性対照物質及び5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。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への分化を試みた。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関して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の安定的な誘導及び培養には至っておらず、条件検討が必要である。

令和7年度（今年度）の検討では、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検討したところ、OECDのDNT in vitro batteryにおける報告と概ね整合する結果を得、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。

他方、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、現時点では条件が十分に確立していないものと考えられ、追加検討が必要であると考えられた。

すなわち、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、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。

DNT陽性および陰性化学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令和5年度（初年度）は97化合物、令和6年度（昨年度）は103化合物が抽出された。令和7年度（今年度）はこれまで得られた情報を整理し、DNT陽性物質は103化合物、DNT陰性物質67化合物のリストを最終化した。

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、令和5年度（初年度）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、令和6年度（昨年度）の時点では17種類全ての試験の実施がリスク評価には必要であると考えられ、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。令和7年度（今年度）に調査したOECDワークショップ報告書には、IATAにおける農薬のDNT証拠の重みづけ（WoE）評価に、17種のDNT-IVB試験データを統合し、階層型の評価過程によりDNTリスク評価を実施することを目標とし、これからも議論を進めていくことが明らかになった。加えて、妊娠期甲状腺機能低下によるDNT発現に関する議論が進んだ際には、今回、甲状腺に特化して作成した化合物情報が有用となりうると考えられた。

＜発生期のin vitro DNT試験法を用いた場合の改善点（時短効果、使用動物数の低減、コストダウン額など）の定量的な試算＞

本研究では、より迅速、低コストで省動物に資する新規in vitro DNT評価手法の開発を目標としているが、従来のin vivo試験の場合に比べて、具体的にどの程度、迅速で低コストとなるのか、定量的な試算をすることとした。本研究では、DNTを発生期（胎生期）と生後発達期とに分け、検討している。このうち後者の生後発達期DNTの方は、当初の目標通り、「生後発達期における、将来的に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の同定」に向け、その有力な候補を見出し、この過程を検

討する *in vitro* 実験系の有用性を明らかとしたが、今後も引き続き、この評価系の具体的な実用性の検討が必要であり、この具体的な評価系がまだ手元に存在しないために、現時点では試算ができない。

他方「発生期の *in vitro* DNT 試験法」については試算が可能であるため、以下に具体的に記す。被験物質 1 物質あたり、陽性対照と陰性対照との比較を含め、細胞培養用培地、試験用培地や反応基質などを考慮しても約 20 万円で実施可能である（この評価系のために必要な、生細胞リアルタイム ルシフェレースアッセイ用の機器の購入を考慮しても 800 万円程度の初期投資で済む）。実験実施期間は 1 化合物あたり、長くても 1 ヶ月でできる。

これに比して、OECD や米国 EPA の発達神経毒性ガイドライン試験のような DNT に係る *in vivo* 毒性試験の実施にかかる費用は、被験物質 1 物質あたり 2～3 億円（外部委託による費用の概算）かかり、動物実験だけで 1.5 年を要し、契約からファイナル提出まで 2.5 年はかかると考えられる。そもそも現状では、国内での実施経験（実績）はなく、あくまでも海外での外部委託に頼ることとなる。これに準ずる二世代繁殖毒性試験でも被験物質 1 物質あたり 1 億円程度の費用がかかる。近年では二世代繁殖試験を実施せずに、拡張型一世代繁殖試験 TG443 (F1 を 3 コホートにわけて、繁殖、DNT と発達免疫毒性を評価) にて DNT を評価する試みも検討されておりますが、こちらは、F1 世代から 3 種の試験（繁殖、DNT、免疫毒性）を同時に実施するので、3 億円以上かかる見込みである。

従って上述した試算によれば、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 20 万円/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 億円/1 物質）に比べ 2,000 分の 1 程度のコストで済むこととなる（初期投資を除く）。実施に係る時間に関しましても同様に、「発生期の *in vitro* DNT 試験法」（約 1 ヶ月/1 物質）は、「DNT に係る *in vivo* 毒性試験」（約 3 年/1 物質）に比べ 36 分の 1 程度の時短となる。

すなわち、*in vitro* DNT 試験法の場合、*in vivo* の系と比較して、コスト・時間ともに、桁違いのパフォーマンスが得られることとなる。

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 及び 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 ± 0.24 、 20.26 ± 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、キシレンの濃度 (2 ppm) 及び高濃度 (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。

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 及び 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 ± 0.04 、 6.82 ± 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。この結果から、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。トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基づくパスウェイ解析の結果からは、特に高濃度 (7 ppm) 曝露群においては、GABA 作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

以上のキシレンとトルエンの場合の解析結果から生後発達期 DNT 誘発メカニズムとして、グルタミン酸受容体あるいは GABA 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。この点、中枢神経系は興奮性 (主にグルタミン酸作動性) 入力と抑制性 (主に GABA 作動性) 入力の相互作用により成立し、出生後の発達過程で回路機能が成熟し、発達期には、抑制性回路の機能的成熟が相対的に遅れて進行する側面があるため (Le Magueresse & Monyer. *Neuron*, 2013 [doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011])、興奮/抑制 (E/I) バランスは出生後発達の過程で次第に調整されることが知られている (Hensch & Fagiolini. *Prog Brain Res*, 2005 [doi:10.1016/S0079-6123(04)47009-5])。この E/I バランスの成熟 は、情動や認知を含む脳高次機能を支える神経回路基盤の形成・維持にも関与するために (Caballero et al. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016 [doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.013]、Ferguson & Gao. *Front Neural Circuits*, 2018 [doi:10.3389/fncir.2018.00037])、生後発達期における重要なイベントとして位置づけられるものと考えられる。キシレン曝露の場合では興奮性、トルエン曝露での場合は抑制性に関連するシグナルネットワークへの影響が示唆

されており、発達期に進行する E/I バランス成熟過程のいずれかの段階が、当該化学物質曝露によりかく乱される可能性があると考えられた。すなわち、以上の解析結果と考察から、「生後発達期における、将来的に 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の同定の試み」に向け、この E/I バランス成熟過程が、その候補として挙げられ、この評価に際しては、この過程を検討する in vitro 実験系が有用と考える。この例としては、比較的最近になって報告された、iPS 細胞から興奮性及び抑制性ニューロンを個々に分化誘導してから「共培養」することで、E/I バランスの成熟を評価する手法を挙げることができる (Heider et al. *BMC Neuroscience*, 2024 [doi:10.1186/s12868-024-00858-z])。

一方、最終年度に検討したホルムアルデヒドについては、行動解析の結果から、オープンフィールド試験における結果を主とした不安関連行動への影響 (不安の亢進) が示唆された。被験物質 3 種についてはいずれも生後発達期曝露により成熟後の行動影響を生じ得る点では共通しており、ホルムアルデヒドについても、生後発達期の脳に対する共通した影響基盤の存在が示唆された。しかしながら、行動影響の現れ方には差異がみられたことから、各モデル物質の作用特性の違いを反映して、物質ごとに影響を受けやすい神経機能が異なる可能性が考えられ、今後は、関連指標との関係も含めて、この点を慎重に検討する必要がある。

加えて 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。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った結果、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た。さらに種差から見た胎盤オルガノイドにおける薬物代謝ではヒトではバリン・ロイシン・イソロイシン生合成代謝経路を中心にした変動、マウスでは TCA サイクルからアスコルビン酸代謝系の有意な変動が確認され新しい知見を得ることができた。また scRNA-Seq 解析によりオルガノイド組織中の syncytiotrophoblast で著明な薬物誘発性代謝経路の活性化が確認された。このように、ヒトへの外挿性の向上が期待される結果を得た。また、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、パルスフィールド電気泳動法や免疫染色による DNA 障害毒性を評価した結果、バルクでの DNA 障害活性を有していることが判明した。我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドをより詳細に解析するため scRNA-seq 解析を行い、これまでの検討で 10 のクラスターに分類可能であることを示すことができた。

さらに令和 6 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 Pr17b1 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。

令和 7 年度（今年度）は、令和 6 年度（昨年度）までに行なっていた C57BL/6 マウスの受精後 8.5 及び 9.5 日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析に加えて、14.5 日目の胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行ない、trophoblast giant cells、spongiotrophoblast 及び labyrinth layer に特異的な遺伝子発現マーカーが、胎盤の発生ステージと分化異常の評価に有効である事が示唆された。

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。いずれについても、当初の目的は基本的に達成されたものと考えて。すなわち、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、将来的に in vitro 試験法への適応拡大する上で必要となる、生後発達期 DNT 誘発に係る候補シグナルネットワークの同定を行うことができたものと考えて。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については本研究により、ほぼ確立できたものと考えられる。

本検討は、ヒトへの外挿性を考慮した、迅速、低コストで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。以って、化審法をはじめとする化学物質安全行政の支援に貢献することが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

○Hirokatsu Saito, Kousuke Suga, Koji Fujihara, Motoh Mutsuga, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima : Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. Exp. Anim. 2025, 75 (2): 222-233. [\[doi.org/10.1538/expanim.25-0064\]](https://doi.org/10.1538/expanim.25-0064)

Yumiko Imai, Shunsuke Kimura, Satoshi Kitajima, Norihiro Sadato, Ryosuke Chiba, Hiroshi Hibino, Satomi Adachi-Akahane : Toward the promotion of “One Health” – part I: How do humans work to live together with humans, other organisms, and xenobiotics on Earth? J Physiol Sci. 2025; 76(1):100050 [\[10.1016/j.jphys.2025.100050\]](https://doi.org/10.1016/j.jphys.2025.100050)

Toshime Igarashi, Satoshi Yokota, Asako Aida, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima : In vivo screening evaluation of 12 chemicals as candidate endocrine disruptors using ovariectomized mouse uterotrophic bioassay. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2025; 162: 105900 [\[doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105900\]](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105900)

Satoshi Yokota, Kiyoshi Hashimoto, Takuya Sato, Koichi Uemura, Kazuhide Makiyama, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takehiko Ogawa: A long-term mouse testis organ culture system to identify germ cell damage induced by chemotherapy. *Curr. Res. Toxicol.* 2025; 8: 100228.

[doi.org/10.1016/j.crttox.2025.100228]

Satoshi Yokota, Tsuyoshi Kawakami, Hiroki Yoshioka, Nozomu Moriya, Nao Sekine, Nobuhiko Miura, Satoshi Kitajima, Takamichi Ichinose, Shigeru Oshio: In utero impacts of intratracheal administration of silver nanoparticles on spermatogenesis in two generations of mice. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2025; 32(25):15304-15320.

[doi: 10.1007/s11356-025-36607-w]

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, Satoshi Kitajima: Perichordal Vertebral Column Formation in *Rana kobai*. *J Morphol.* 2025; 286(4): e70044.

[10.1002/jmor.70044]

○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).

Kenji Ohya, Shouhei Hirose, Kohei Nishikaku, Taka-hiro Ohnishi, Kenichi Lee, Sunao Iyoda, Akiko Ku-bomura, Yukihiro Akeda, Katsumi Mizukami, Tomi-katsu Suzuki, Kenji Takinami, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Takashi Inoue, Yukiko Hara-Kudo. Genomic features and patho-genicity of atypical diarrheagenic *Escherichia coli* from a large foodborne outbreak *International Journal of Food Microbiology* 434 (2025) 111134-
[doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025]

○Takeshi Terabayashi, Takako Sasaki, Takeshi Ishizaki, Tadahiko Tomo, Yoshihiro

Nishida, Katsuhiko Hanada. Analysis of accumulation of DNA double-strand breaks in mouse tissues by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Pharmacol.* 2025. Apr;497:117278.

[doi: 10.1016/j.taap.2025.117278]

○Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. *Toxicology Letters.* Vol.411, S157, 2025.

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. *Toxicology Letters.* Vol.411, S347-348, 2025.

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. *細胞.* 5(7).68-71. 2025.

Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Hiroyoshi Y. Tanaka, Akihisa Yamamoto, Motohiro Kojima. Artificial Intelligence Approach in Machine Learning-Based Modeling and Networking of the Coronavirus Pathogenesis Pathway, Edward J. Perkins, Horacio Cabral
Current Issues in Molecular Biology 47(6) 466

Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono. Adverse Outcome Pathway 298: Increase in Reactive Oxygen Species Leading to Human Treatment-Resistant Gastric Cancer
Horacio Cabral, Edward J Perkins
Cancers (accepted)

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡 : 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢について—その開発状況と安全性に係る諸外国の規制動向—、第 23 回食品安全フォーラム、東京、2025 年 12 月 12 日、口頭

北嶋 聡 : 細胞培養食品を取り巻く最近の情

勢について、培養細胞の食品利用に係る国際会議、東京、2025 年 11 月 13 日、口頭

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Ⅱ－潜在的なハザード因子の検討－、日本動物学会第 96 回名古屋大会、名古屋、2025 年 9 月 5～6 日、ポスター

菅野 純，小林美穂，渡部徹郎，辻 昌貴，森田紘一，菅 康佑，横田 理，高橋祐次，北嶋 聡：カーボンナノチューブ吸入曝露マウスの肺病変におけるリンパ管を中心とした病理形態について、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 4 日、口頭（シンポジウム）

北嶋 聡：遺伝子改変、細胞分析、遺伝子発現及びエピジェネティクス解析を包括した網羅的 in vivo 毒性研究、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 3 日、口頭（学会賞受賞者講演）

松田直晃，大久保佑亮，小原息吹，小石川 蒼馬 敏，高野珠実，西村拓也，高橋祐次，北嶋 聡，平林容子，関澤信一，桑原正貴，太田裕貴，柄内亮太：長時間連続の自動行動診断を実現するラット用ウェアラブルデバイスシステムの開発、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 2 日、ポスター

五十嵐智女，西村拓也，北嶋 聡：細胞培養食品における食品衛生上の潜在的なハザード因子の検討、第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 2 日、ポスター

五十嵐 智女、相田 麻子、横田 理、西村 拓也、高橋 祐次、桑形 麻樹子、北嶋 聡：多層卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価、第 72 回日本実験動物学会総会、名古屋、2024 年 5 月 22 日、ポスター

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Ⅱ－潜在的なハザード因子の検討－、日本動物学会第 96 回名古屋大会（2025.9.4-6）、P479B，名古屋。

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）の安全性確保における潜在的なハザード因子の検討。第 121 回日本食品衛生学会学術講演会（2025.10.16-17），P-86，東京

五十嵐 智女，西村 拓也，北嶋 聡：フードテックを活用した様々な新規食品の開発と安全性に係る規制動向－細胞培養食品の潜在的ハザード因子の検討－。令和 7 年度 日本動物学会中部支部大会（2025.12.6-7），P-19，静岡。

○齊藤洋克、菅康佑、藤原恒司、六鹿元雄、横田理、西村拓也、北嶋 聡：生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析 第 52 回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025 年 7 月 3 日、ポスター

○Okubo Y, Mizota K, Murayama K*1, Matsuura R, Mootha A, Kitajima S, Hirabayashi Y, Nakajima Y *2, Fukuda J *1: 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)

○桑形麻樹子：周産期甲状腺機能低下と次世代の神経発達、非臨床試験の役割「先天異常わが国における化学物質の甲状腺影響評価に関する調査報告」、第 65 回日本先天異常学会学術集会 DNT 委員会企画シンポジウム、伊勢市、2025 年 7 月 25 日、口頭

○諫田泰成、桑形麻樹子：甲状腺ホルモンに関する新たな動物実験代替法の国際動向「甲状腺ホルモンと発達神経毒性」、日本動物実験代替法学会第 38 回大会シンポジウム 4、横浜、2025 年 11 月 3 日、口頭

○Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025. 9. 15 Athens, Greece.)

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. The

59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025. 9. 16. Athens, Greece.)

○西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁：胎盤オルガノイドを用いた新しいヒト生殖毒性評価モデル系の可能性。第 77 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2025. 5. 24 岡山)

○田邊明日香、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 54 回日本環境変異原ゲノム学会 (2025. 11. 22 静岡)

Katsuhiro Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the cytotoxic action of an indole alkaloid evodiamine. 第 99 回日本薬理学会 (2026 3. 16 仙台)

小野竜一 (招待講演)：遺伝子改変マウスを用いた肝由来エクソソームの同定と肝毒性バイオマーカーの同定、医薬品毒性機序研究部会シンポジウム：医薬品毒性の機序を解き明かすモデル動物たち。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

小野竜一、成瀬美衣 (招待講演)：エピゲノム変異によるシスプラチン治療抵抗性の獲得、付加体科学部会シンポジウム：環境化学物質はどのようにエピゲノムを制御しているのか？第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

相崎 健一、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡 (シンポジウム)：Percellome Project による反復投与毒性の予測、Systems Toxicology 開発への AI 導入の近未来-実験室、病棟と脳-。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

菅野 純、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡 (シンポジウム)：PFOA の遺伝子発現解析と PFAS Percellome プロジェクトの進捗、有機フッ素化合物 PFAS による環境汚染と人体影響。第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, T. Yamamoto, A. Ishii, T. Yamada, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, S. Kitajima (ポスター) : Identification of Organ-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Toxicity Biomarkers Using CD9-EGFP Reporter Mice. EUROTOX2025 (欧州毒性学会)、2025 年 9 月 15 日、ギリシャ

成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、山元智史、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子、小野竜一：肝臓オルガノイド由来 EV を利用した毒性評価法の開発. 第 12 回 日本細胞外小胞学会学術集会、2025 年 10 月 14 日

小野竜一、成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、森山紀子、立原江利加、野崎弘枝、三原大輝、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子：臓器特異的エクソソームの単離方法の開発. 第 5 回国立衛研・島津技術交流会、2025 年 12 月 18 日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, S. Kitajima, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, and T. Yamada. Identification of Liver-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Biomarkers of Hepatotoxicity in CD9-EGFP Reporter Mice. SOT2026 (米国毒性学会), 2026 年 3 月 24 日、サンディエゴ

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