

# 「高機能簡易型有害性評価手法の開発」 事後評価分科会説明資料

## 5. プロジェクトの詳細説明

### 5.1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発の成果

#### (2) 催奇形性予測試験法の開発

- ①背景
- ②心筋を用いた評価系の構築
- ③神経を用いた評価系の構築
- ④ヒトESを用いた検討
- ⑤成果のまとめ

## ①背景

②心筋を用いた評価系の構築

③神経を用いた評価系の構築

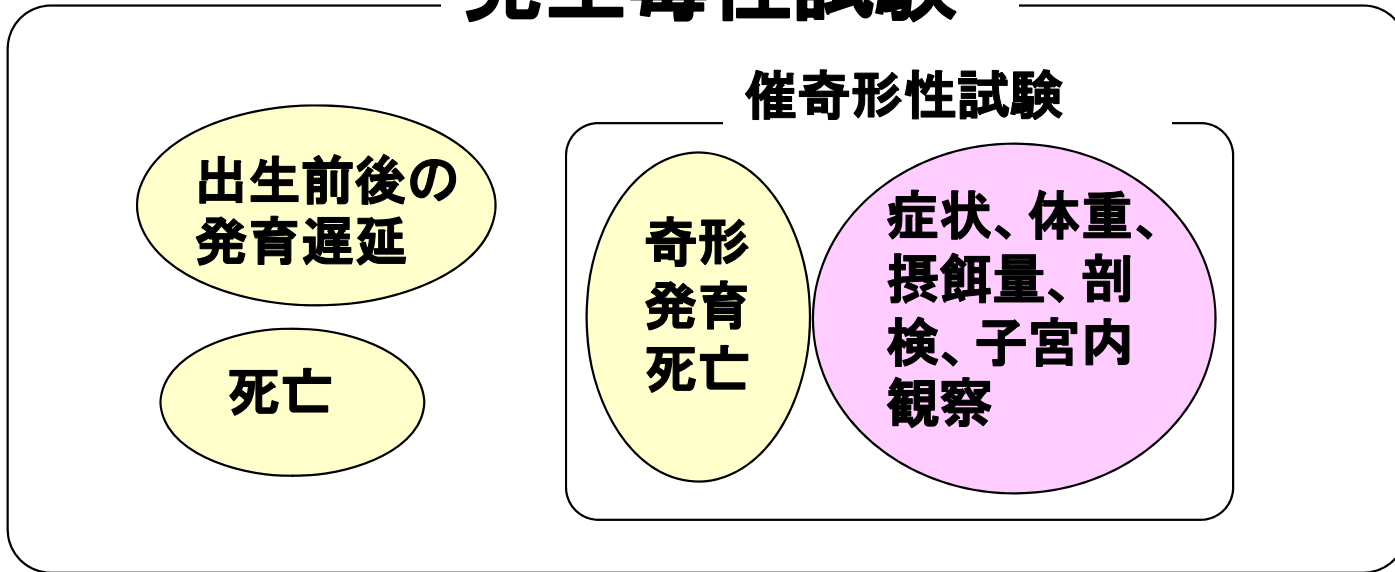
④ヒトESを用いた検討

⑤成果のまとめ

# 発生毒性試験の現状

## 発生毒性試験

評価対象: ● 親 ○ 子



	用量設定試験	本試験
動物数(1群の例数)	6~8匹	20~24匹
期間	3ヶ月	6ヶ月
費用(万円)	300~500	1000~1500

発生毒性試験は煩雑で費用、期間を要する試験



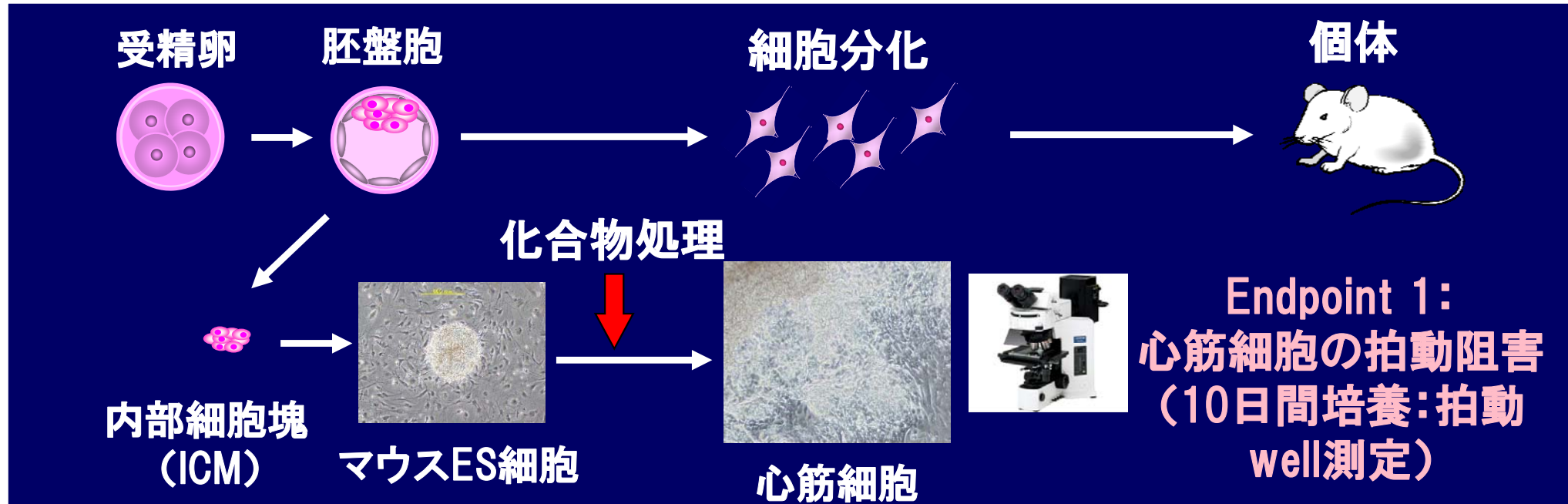
多くのin vitro評価法の報告があるが広く認められる方法は無い

# ES細胞を用いた発生毒性評価試験： EST(Embryonic Stem Cell Test)

公開

ECVAM International validation study(1996~2000年)

⇒in vivo試験との一致性と動物を用いない点で有効



## ・胚・胎児毒性

Endpoint 1: ES細胞分化 ⇒50%分化阻害濃度(ES:ID<sub>50</sub>)

Endpoint 2: ES細胞増殖 ⇒50%増殖阻害濃度(ES:IC<sub>50</sub>)

## ・母動物毒性

Endpoint 3: 線維芽細胞(3T3)増殖⇒50%増殖阻害濃度(3T3:IC<sub>50</sub>)

判定式に代入し胎児毒性評価(Strong、Weak、Non)

# ESTの課題・問題点

- ①精度向上のため判定式の改良
- ②医薬品だけでなく一般化学物質等の検証の推進
- ③検証化合物の多くが強い細胞毒性。他の毒性メカニズム化合物の検証が必要
- ④代謝を組合わせた試験系の確立
- ⑤心筋以外の細胞(神経系、骨格系など)への分化誘導系の開発  
(*Curr Pharm Design, 2004,10,2733-2747*から)

- ・実験期間だけで約2週間
- ・作業は煩雑、熟練した技術・ノウハウが必要
- ・ハイスループット性に欠ける



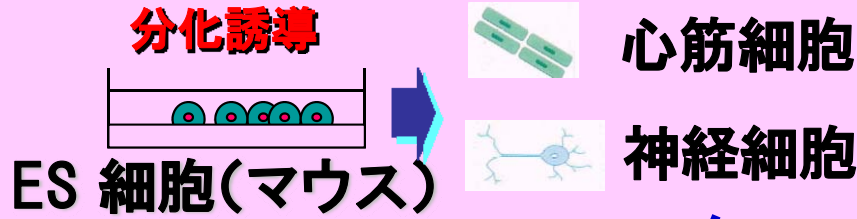
胚・胎児の分化に対する毒性の検出方法が要因



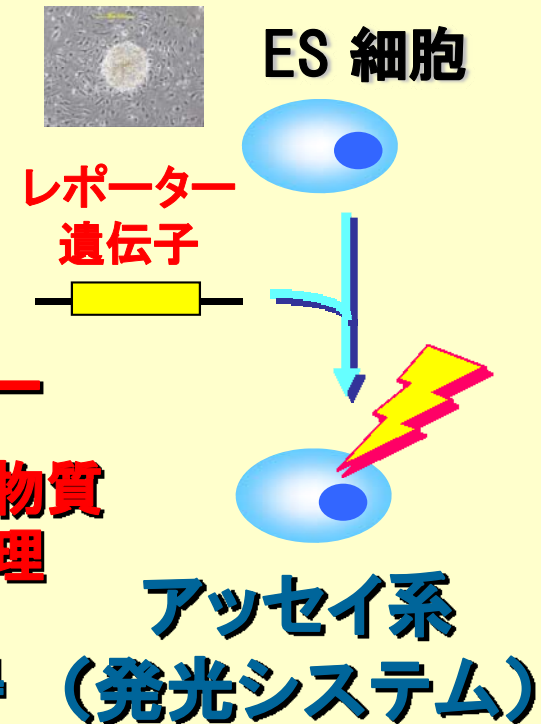
**Endpoint 1 の改良が重要**

# ES細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発

## 分化誘導技術確立



## 評価用細胞の作製 アッセイ系開発



## 毒性マーカー取得



ゲノミクス  
リアルタイムPCR等

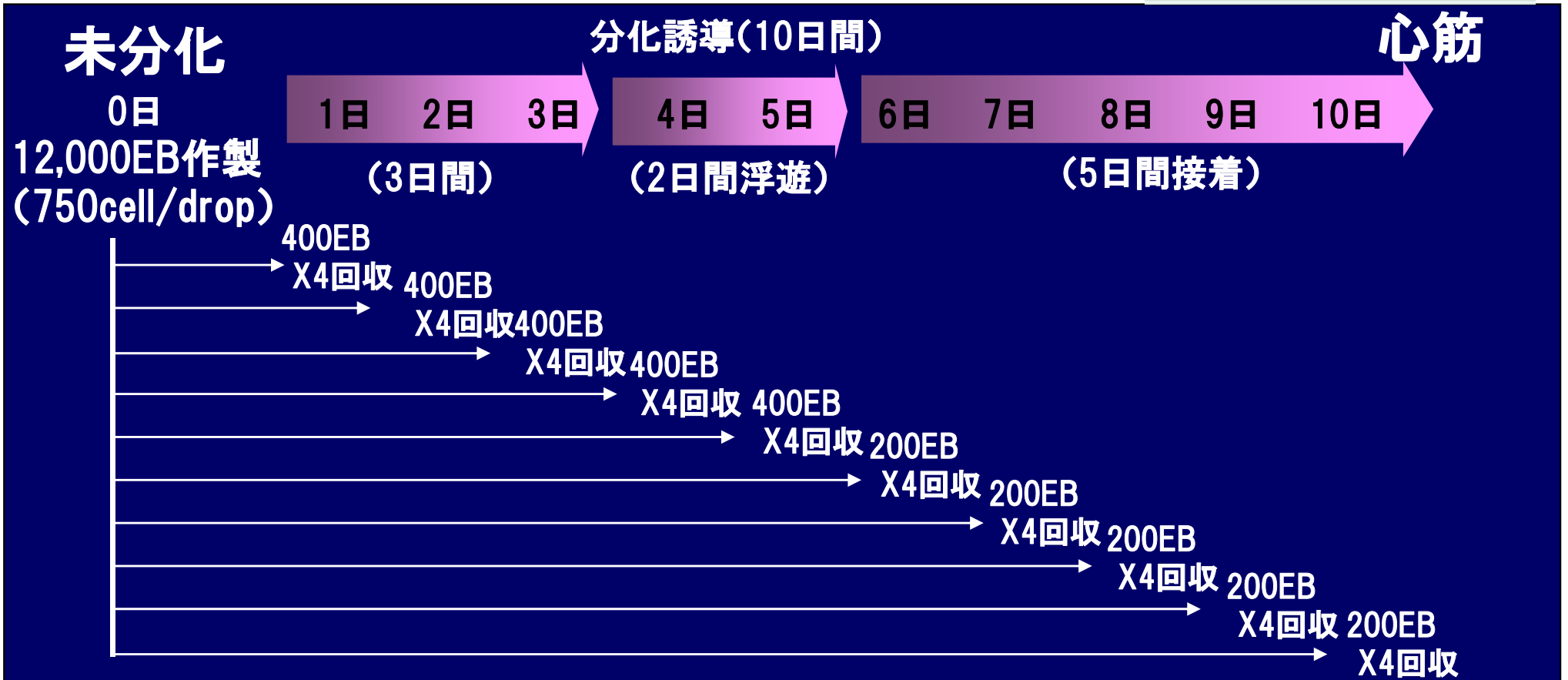
毒性マーカー  
化学物質  
処理  
発現変動遺伝子解析  
およびマーカー候補取得

代謝を組み合わせた予測試験法 (WECの改良) 鎌倉女子大

- ① 背景
- ② 心筋を用いた評価系の構築**
- ③ 神経を用いた評価系の構築
- ④ ヒトESを用いた検討
- ⑤ 成果のまとめ



# 分化心筋過程の遺伝子発現解析



各日ごとにサンプル回収(11X4=44サンプル)

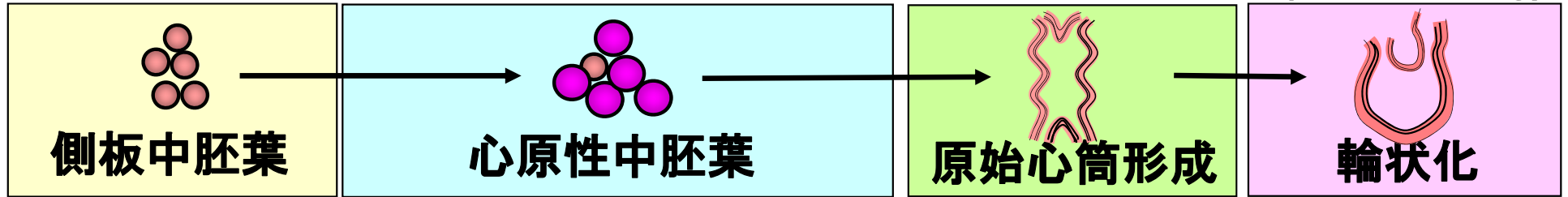
各サンプルのRNA抽出

DNAチップ解析(0、2、4、6、8、10日目の6時点、n=4)

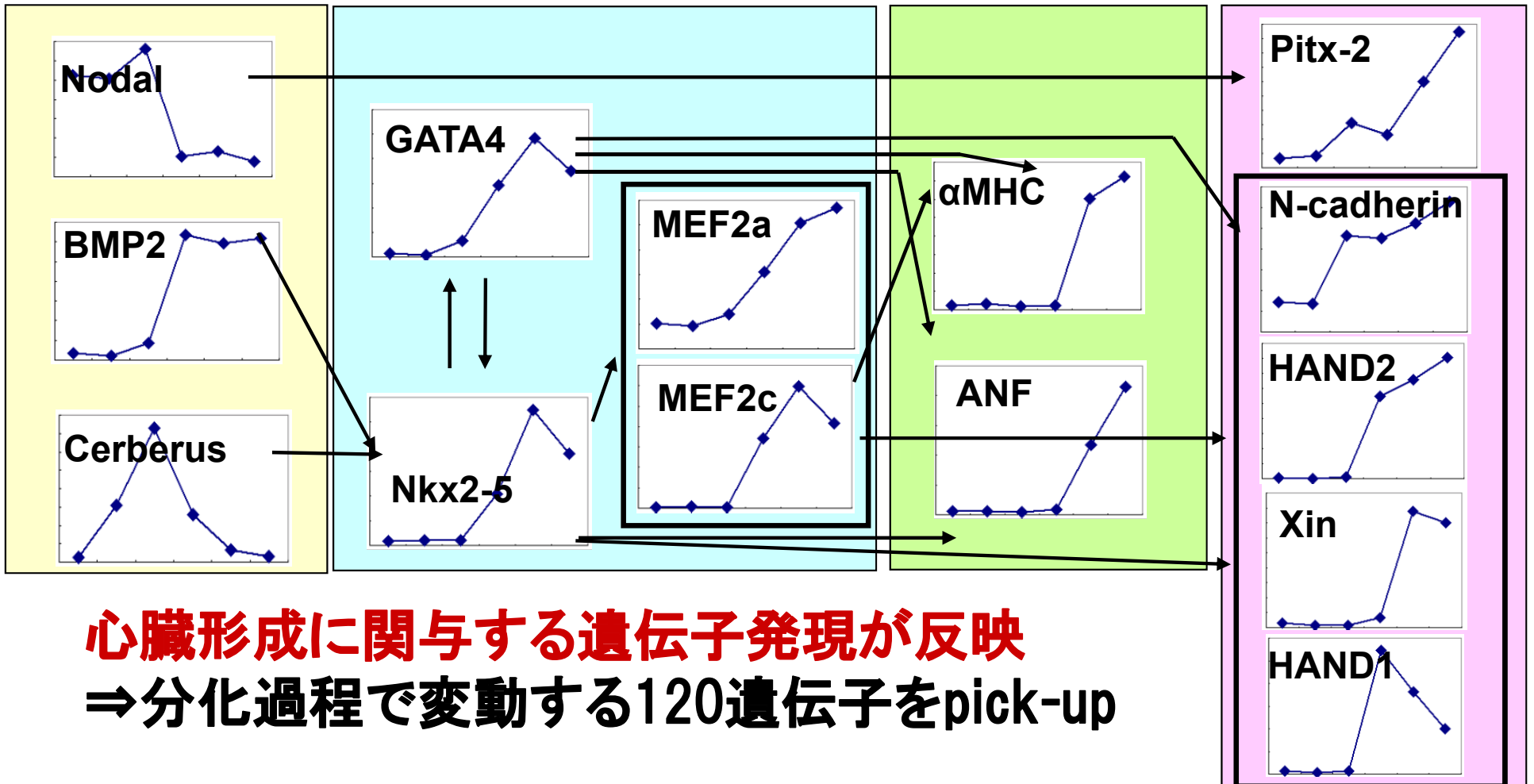
# 分化過程の心臓形成関連遺伝子の発現

## 発生段階の心臓形成

Developmental Biology より

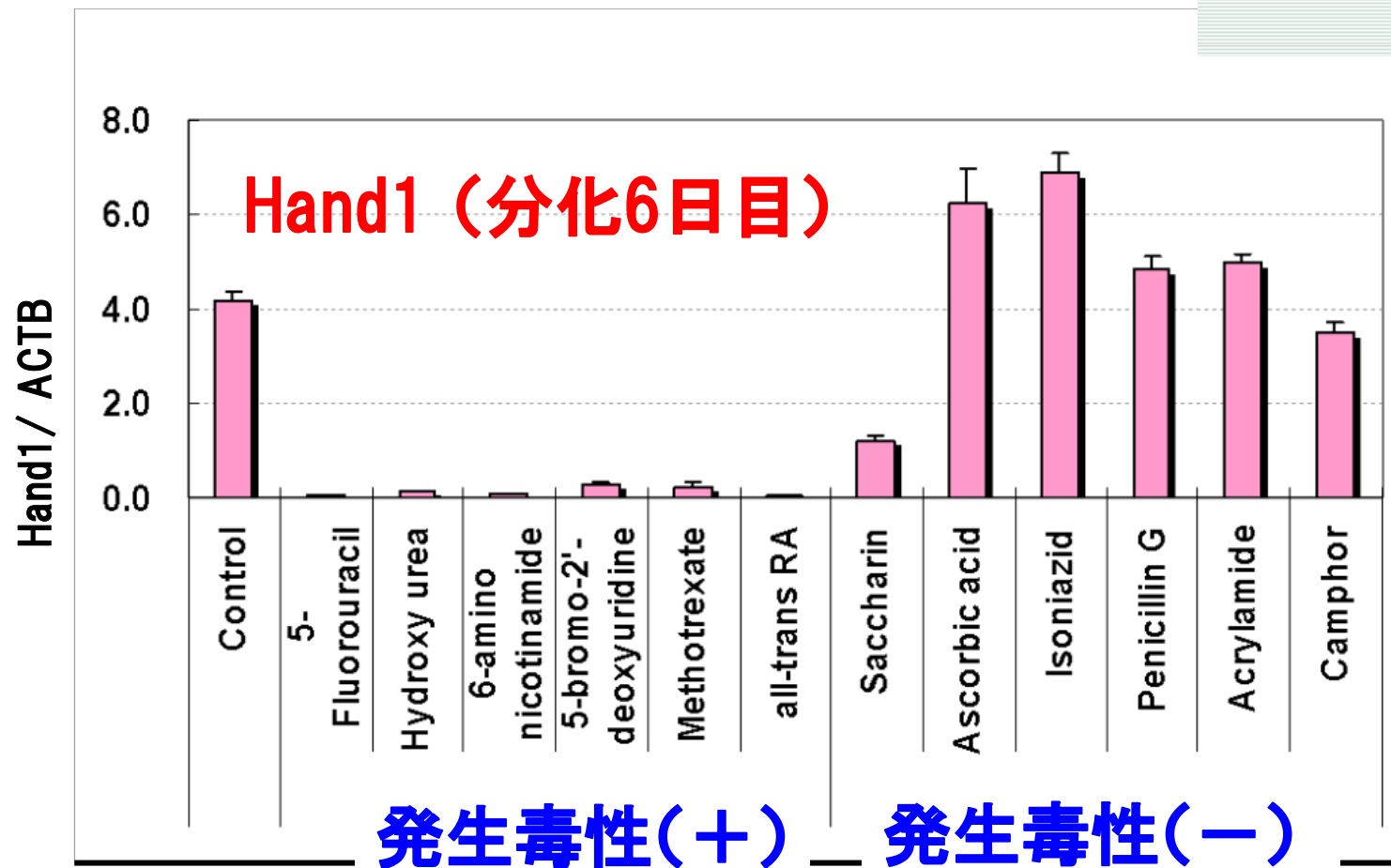


## 関連遺伝子



# 発生毒性マーカー遺伝子の取得(心筋)

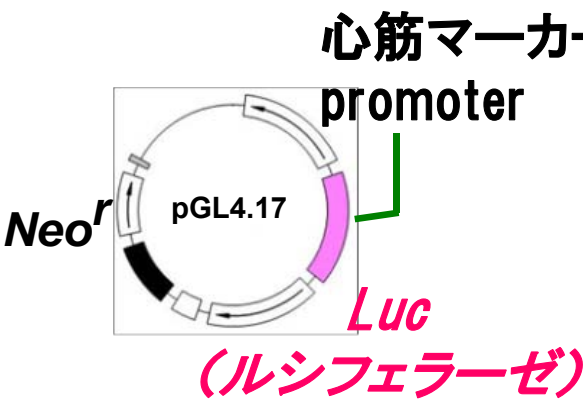
公開



発生毒性陽性化合物処理群で顕著に発現量が低下

⇒発生毒性マーカー遺伝子として13遺伝子を選定

# 組換えES細胞の特徴(心筋)

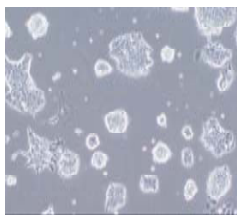


**Hand1-ES**  
bHLH転写因子  
心臓の左右軸決定に重要

**Smyd1-ES**  
転写因子  
心臓の形態形成に重要

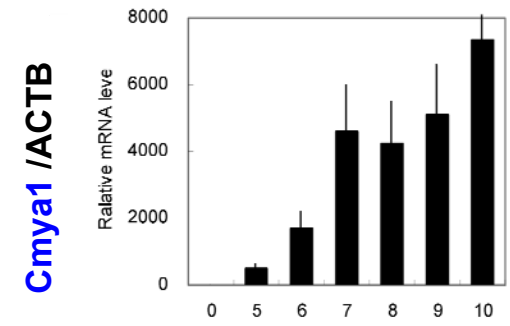
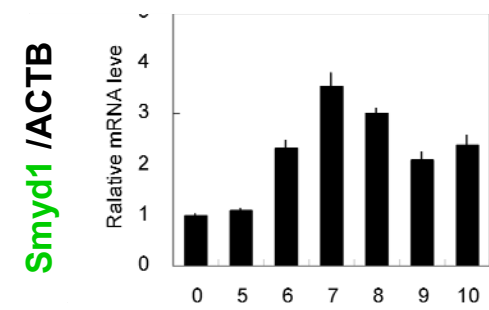
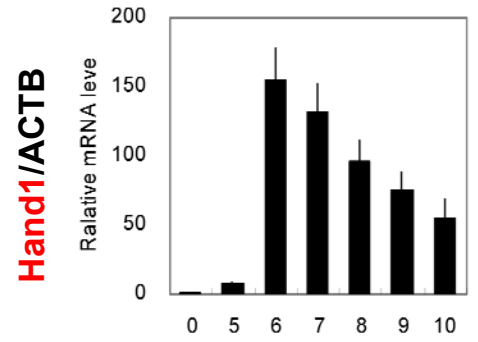
**Cmya1-ES**  
Disk protein  
心臓輪状化

マウスES細胞

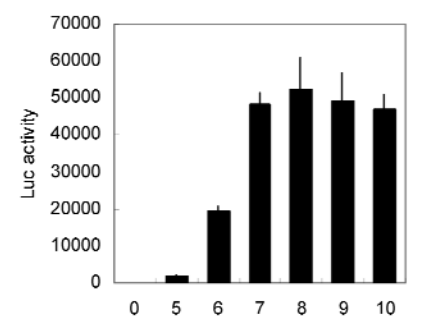
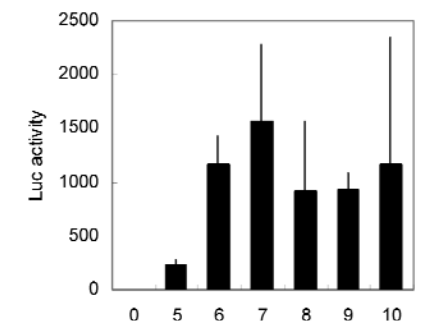
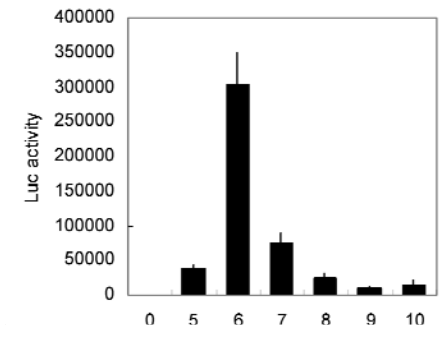


安定形質転換ES細胞

## Real-time PCR



## Luc assay



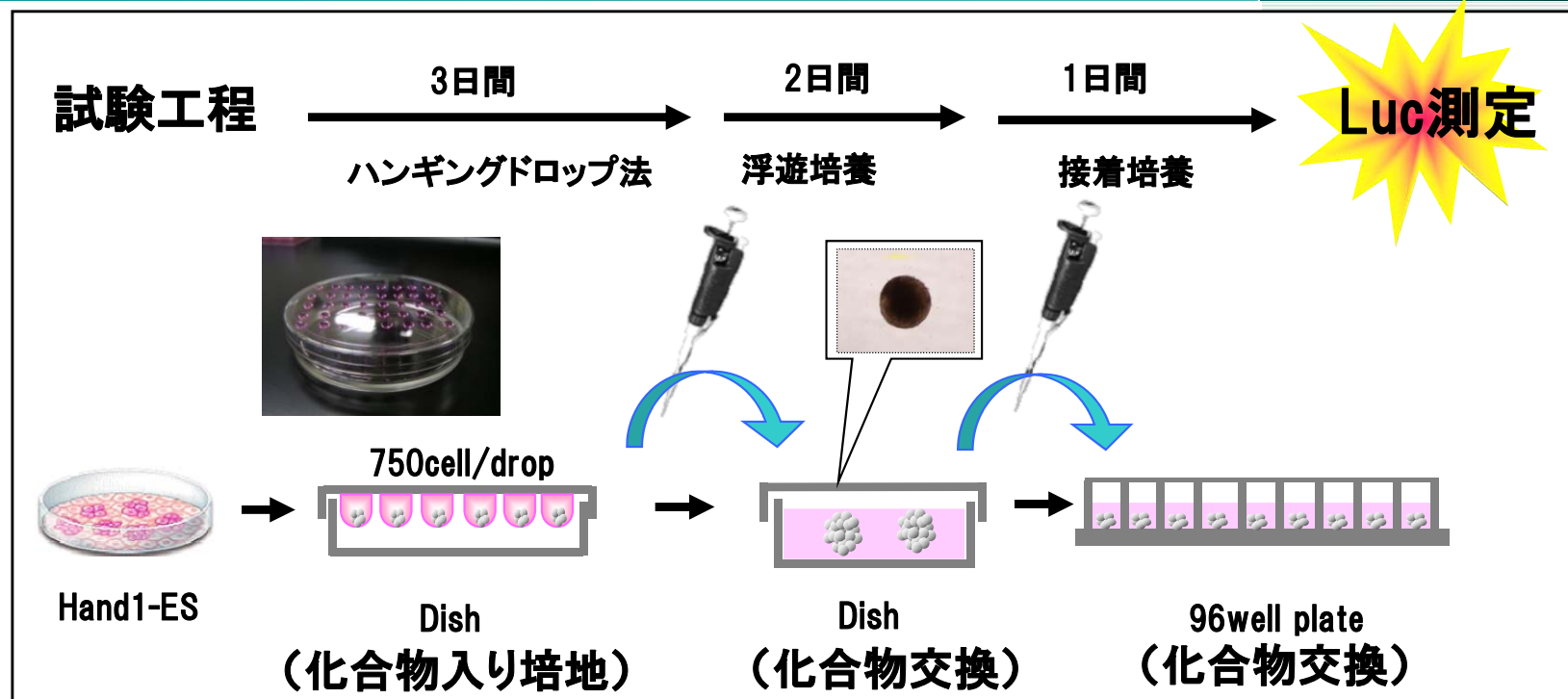
心筋分化(day)

心筋分化(day)

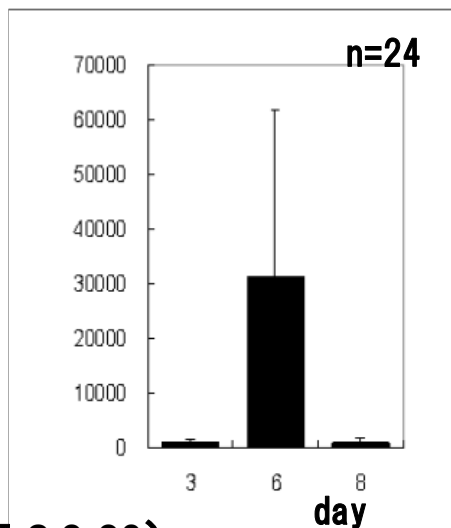
各マーカー遺伝子の発現への影響を  
Luc活性で簡便にモニター可能 (斎藤幸一)

# 発光細胞を用いた測定法の基礎検討

公開



Hand1遺伝子の発現評価用発光細胞: Hand1-ES細胞



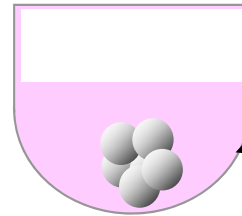
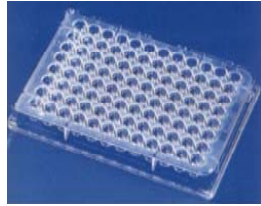
**安定的な試験は不可能？**

- ・継代培養法の検討(細胞播種・処理法)
- ・安定したEB作成の検討
- ・試験検体数の検討 等

# 安定した胚様体(EB)作成の検討

公開

非接着性U底96wellプレート



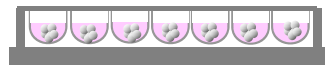
U底  
非接着コート処理済

新試験工程



Hand1-ES

750cell/well U底プレート法

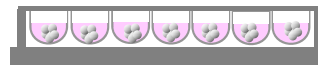


Dish  
(化合物入り培地)

3日間

3日間

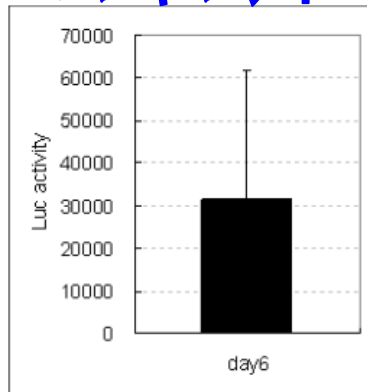
培地交換



Dish  
(化合物交換)

Luc測定

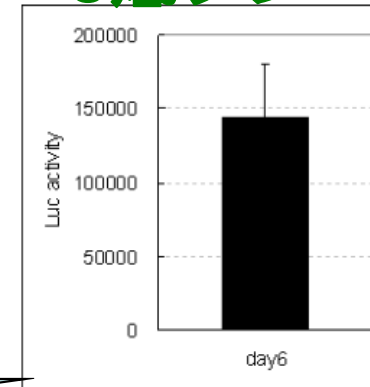
ハンキングドロップ



n=24

%CV  
=97%

U底プレート



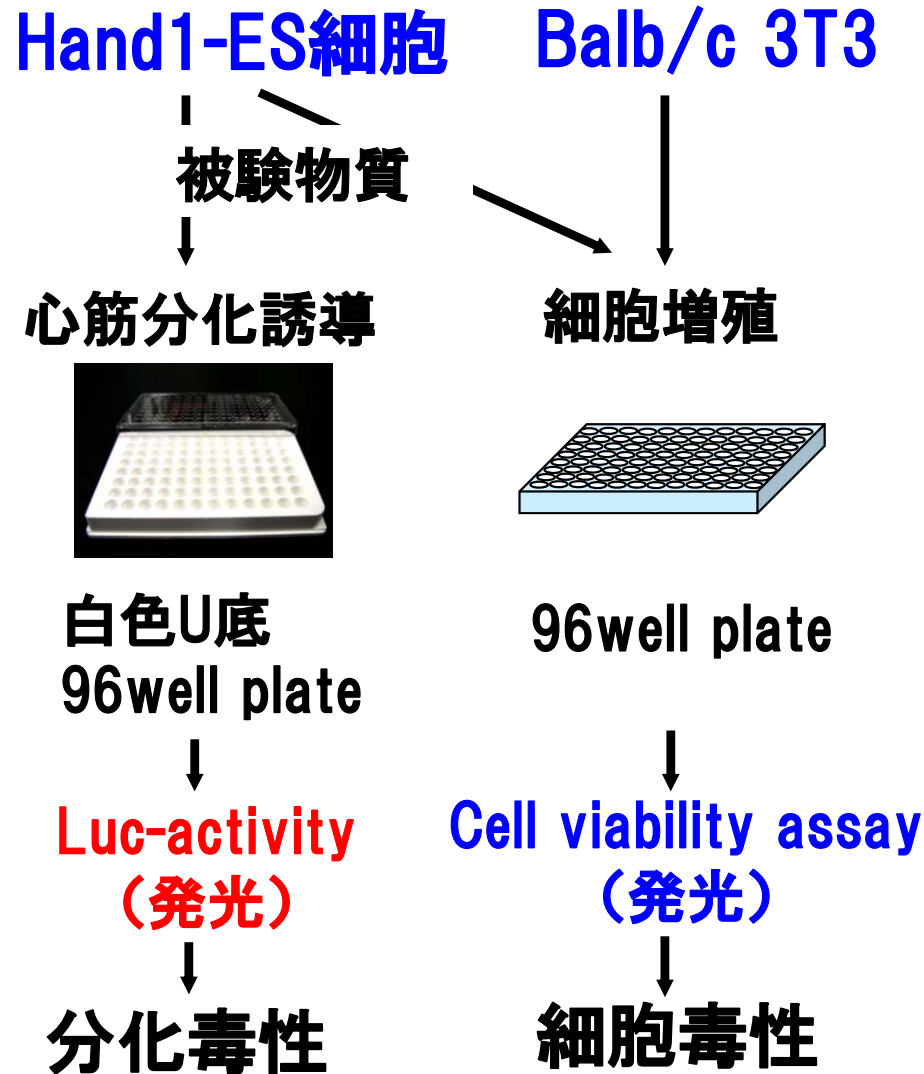
n=24

%CV  
=25%

EBは安定に心筋に分化誘導し、スループット性が著しく向上

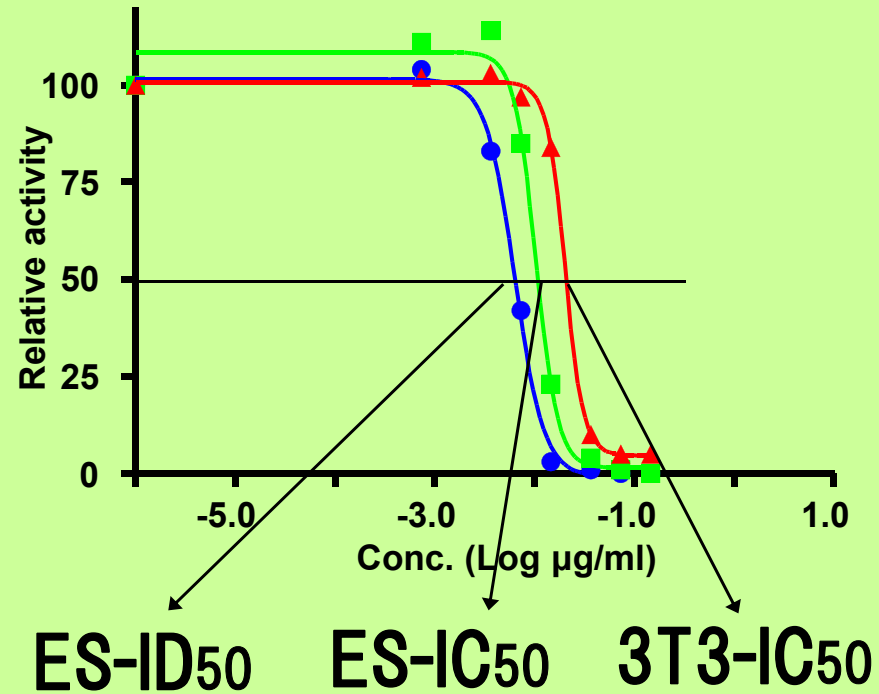
# 新試験法の概要 (Hand1-EST法等)

公開



## 被験物質Aの試験結果

- 分化毒性
- 細胞毒性 (ES)
- ▲ 細胞毒性 (3T3)

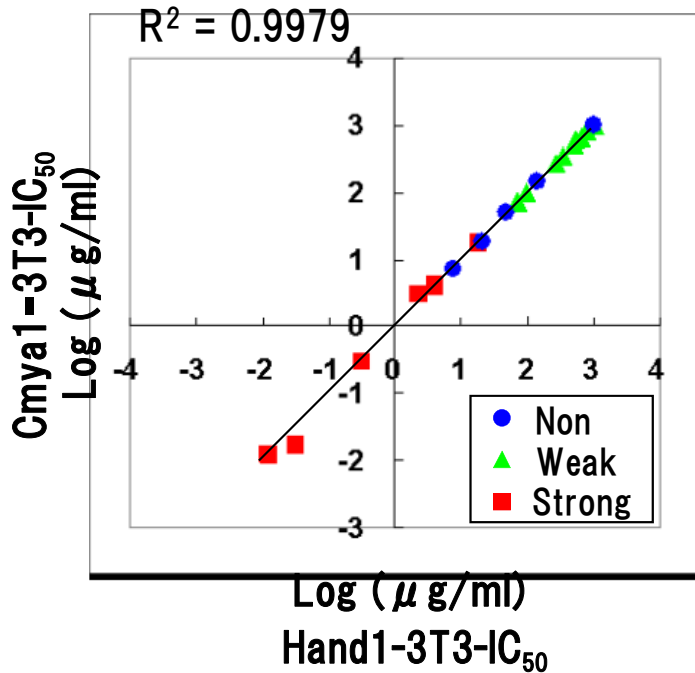


3つの数値を利用して  
発生毒性を予測

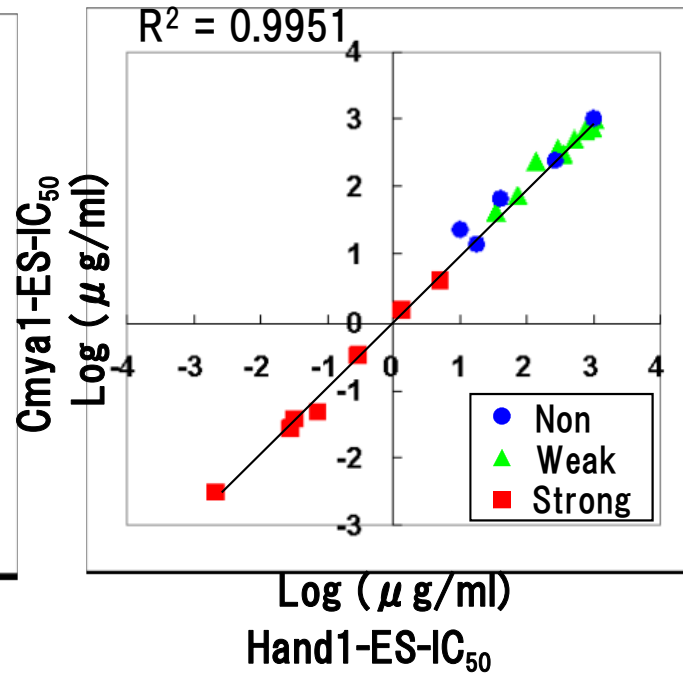
# Hand1-およびCmya1-ESTの比較

公開

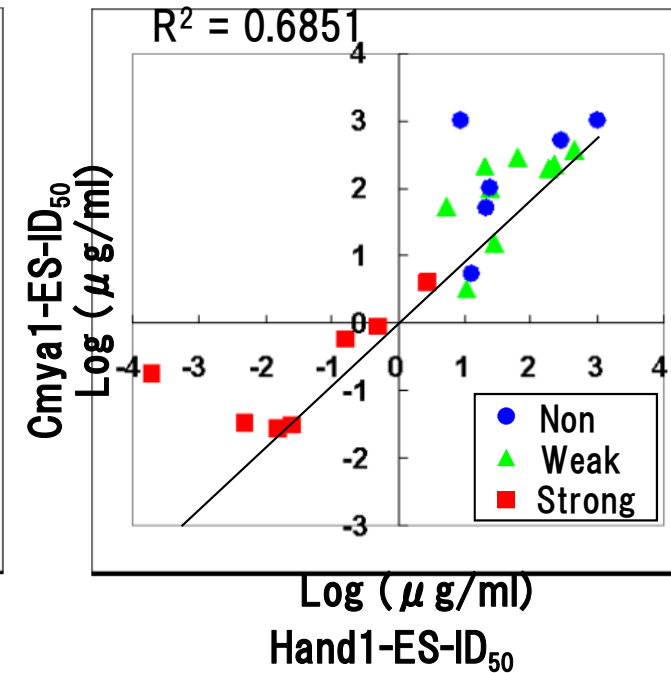
**3T3-IC<sub>50</sub>**  
(3T3/細胞毒性)



**ES-IC<sub>50</sub>**  
(ES/細胞毒性)



**ES-ID<sub>50</sub>**  
(分化毒性)



- ・3T3-IC<sub>50</sub>は両試験で一致
- ・ES-IC<sub>50</sub>はHand1-ESとCmya1-ESで同等のデータ (クローン差はない)
- ・一部の化合物ではID<sub>50</sub>値が異なる



# Hand1-EST、Cmya1-EST法の予測能の比較

	Hand1-EST	Cmya1-EST	Original-EST <sup>※</sup>	%
予測性 ( strong-embryotoxicity ) <i>in vivo</i> でstrong 分類の化合物をstrong と予測した確率	86	86	100	
予測性 ( weak-embryotoxicity )	100	100	71	
予測性 ( non-embryotoxicity )	63	88	78	
-----				
予測精度 ( strong-embryotoxicity ) strong と予測した化合物が <i>in vivo</i> でstrong 分類である確立	100	100	91	
予測精度 ( weak-embryotoxicity )	69	82	82	
予測精度 ( non-embryotoxicity )	100	100	70	
-----				
正確性	83	92	81	

※ Elke Genschow et al, ALTA 32, 209-244,2004

⇒Original EST法と同等以上の正確性

# Hand1-EST、Cmya1-EST法の予測能の検証

72化合物(陽性44化合物／陰性28化合物)を評価

	Hand1- EST	Cmya1- EST	%
予測性 (発生毒性陽性⇒陽性)	98	86	
予測性 (発生毒性陰性⇒陰性)	32	61	
予測精度 (陽性と予測⇒発生毒性陽性)	69	78	
予測精度 (陰性と予測⇒発生毒性陰性)	90	74	
正確性	72	76	

- ・多くの被験物質の評価でも70%以上の正確性
- ・偽陽性が多い傾向(判定法の改良の必要性)

# 新規試験方法の比較

公開

	Original-EST	NEDO-EST	FACS-EST *
試験日数	10日間	6日間	7日間
分化評価 endpoint	拍動 (顕微鏡観察)	ルシフェラーゼ 活性測定	FACSによる MHCの検出
化合物 必要量	500mg以上	50mg(スクリーニング 用途5~10mg)	500mg以上
処理能力	低 (4化合物/回)	高 (20化合物/回)	低~中 (機器操作性に依存)
機器	顕微鏡	ルミノメーター	FACS

\* TOXICOLOGICAL SCIENCES 108(2), 389-400 (2009)

- ・24種の標準物質の比較で正確性もOriginal-ESTより向上
- ・報告されているEST法の中で最も簡便な方法(自動化も可能)

# 小規模施設間差の確認実験

公開

## 目的:

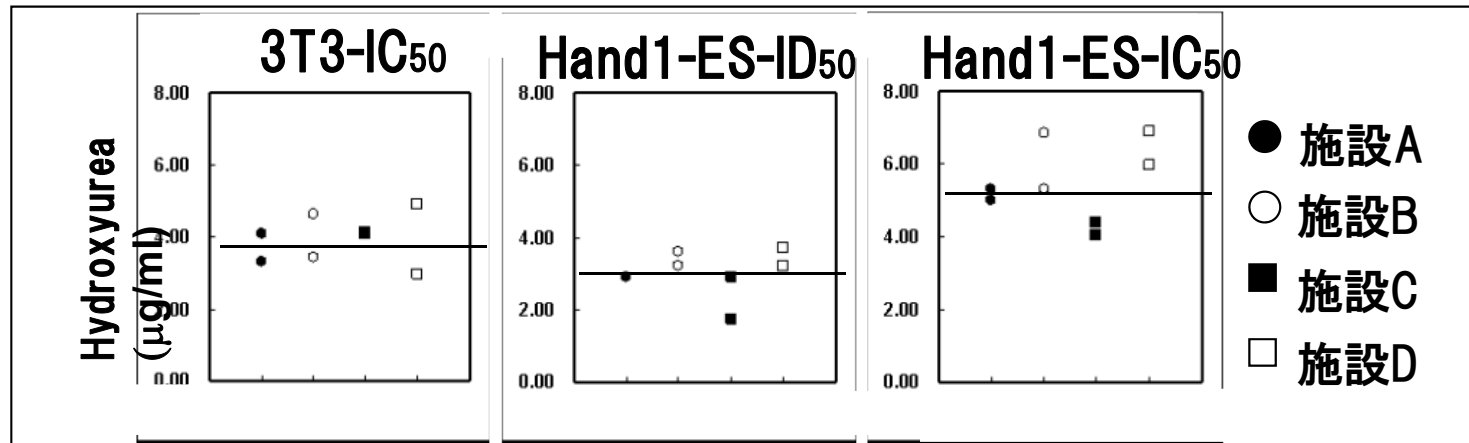
- ① 試験プロトコールによる技術易習得性の確認(標準物質)
- ② 共通の被験物質(コード化6物質)による施設間再現性

方法: Hand1-ESTおよびCmya1-EST

施設: 4施設(東北大学、食薬センター、大日本住友製薬、住化)

## 結果:

- ① 標準物質を用いた検討(4施設2試験の結果)



何れの施設でも同等のデータ取得⇒技術易習得性を確認(汎用性)

## ②コード化6物質施設間再現性

試験プロトコールの再現性を確認⇒検証試験の取組みも可能

# 評価用細胞の性状解析

公開

## 目的: 試験に使用する細胞の品質確認

### 1) マイコプラズマ汚染検査

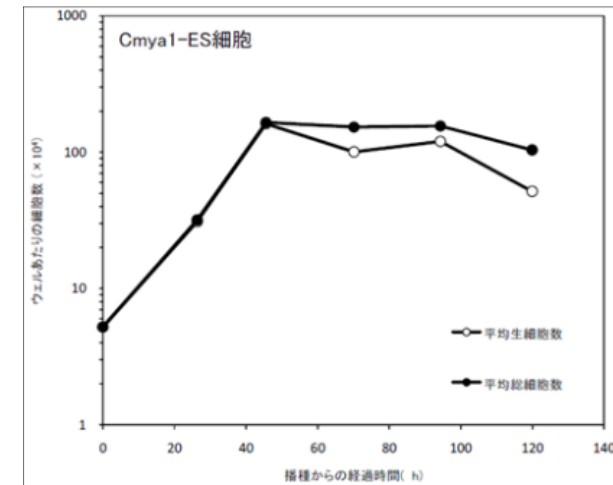
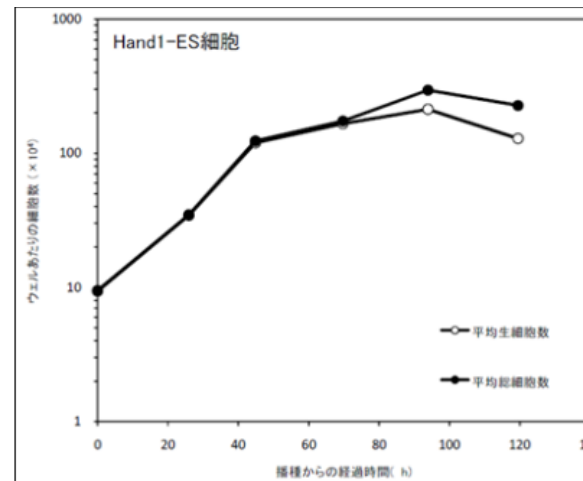
結果: 両細胞とも陰性

### 2) 細胞倍加時間

結果:

Hand1-ES / 12時間

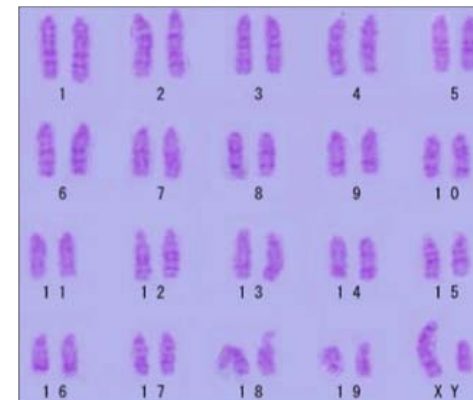
Cmya1-ES / 9時間



### 3) 核型解析

結果:

両細胞とも、転座・欠失無し、  
親細胞ES-D3と同程度の異  
数体の頻度



# 本日の発表内容

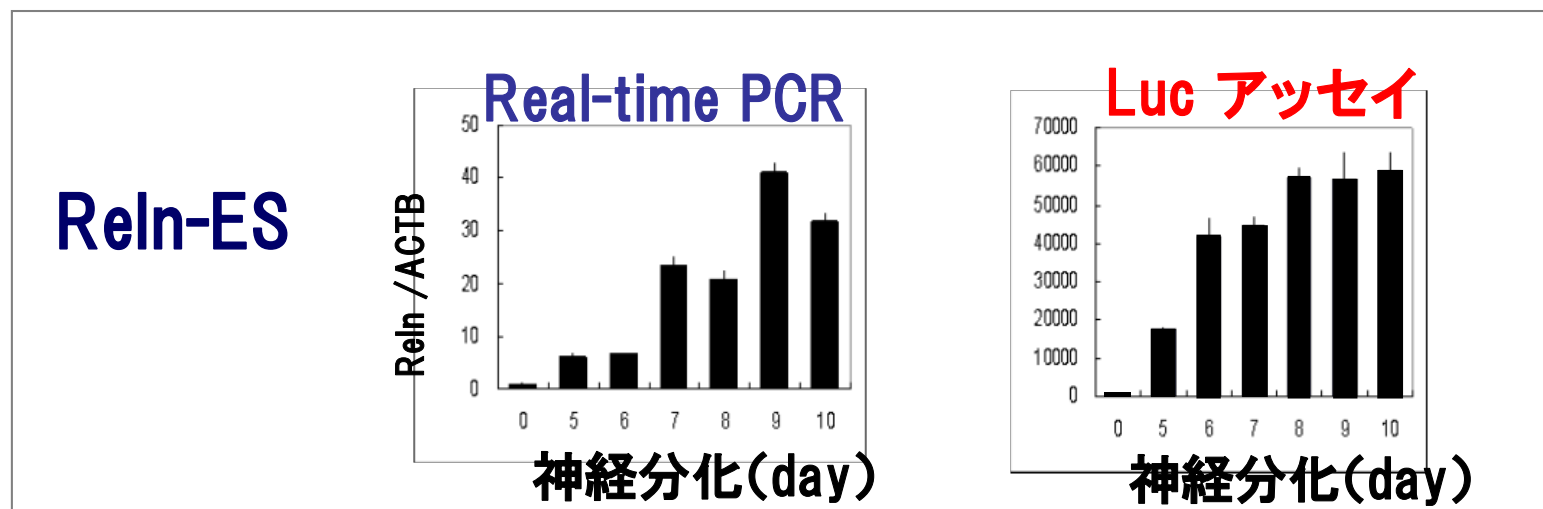
公開

- ①背景
- ②心筋を用いた評価系の構築
- ③神経を用いた評価系の構築**
- ④ヒトESを用いた検討
- ⑤成果のまとめ

- ① 発生毒性関連マーカー遺伝子として22遺伝子を取得
- ② ReIn遺伝子を利用した試験法を開発



ReIn遺伝子プロモーターを利用した  
組換えES細胞(ReIn-ES)を作製



レポーターを利用して簡便にReIn遺伝子の発現量を測定可能

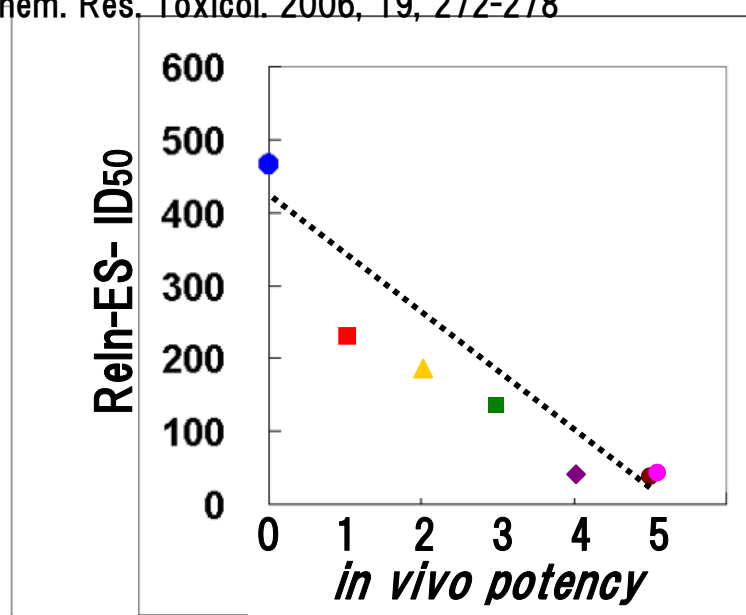
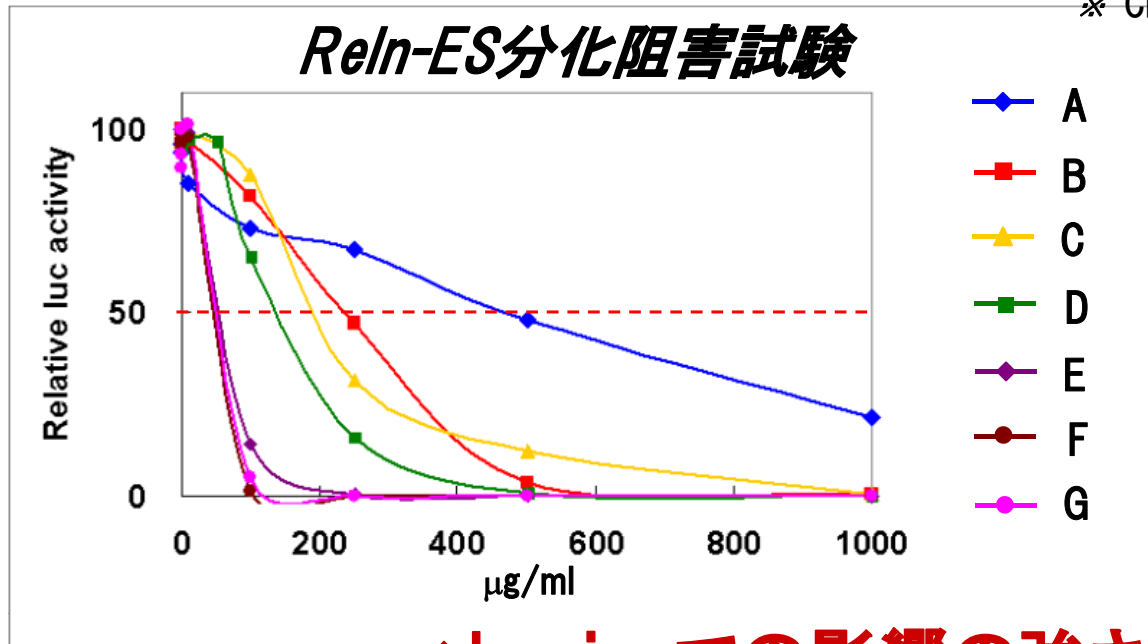
# ReIn-EST法によるバルプロ酸類縁体の評価

公開

神経系に影響を及ぼすバルプロ酸類縁体をReIn-ESTを用いて評価

物質名	<i>in vivo</i> potency *	ReIn-EST予測
A. (±)-4-Methyl-2-ethyl-pentanoic acid	—	non
B. Valpromide	+	weak
C. (±)-2-propyl-4-pentenoic acid	++	weak
D. Valproic acid	+++	weak
E. (±)-2-Pentyl-4-pentynoic acid	++++	weak
F. (±)-2-hexyl-4-pentynoic acid	+++++	weak
G. (±)-2-Heptyl-4-pentynoic acid	+++++	weak

\* Chem. Res. Toxicol. 2006, 19, 272-278



⇒ **In vivoでの影響の強さとReIn-ES-ID<sub>50</sub>が相関**



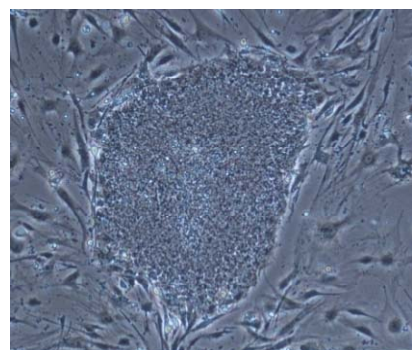
- ①背景
- ②心筋を用いた評価系の構築
- ③神経を用いた評価系の構築
- ④ヒトESを用いた検討**
- ⑤成果のまとめ

# ヒトES細胞を用いた検討

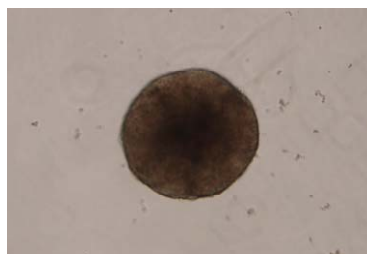
公開

## 目的:

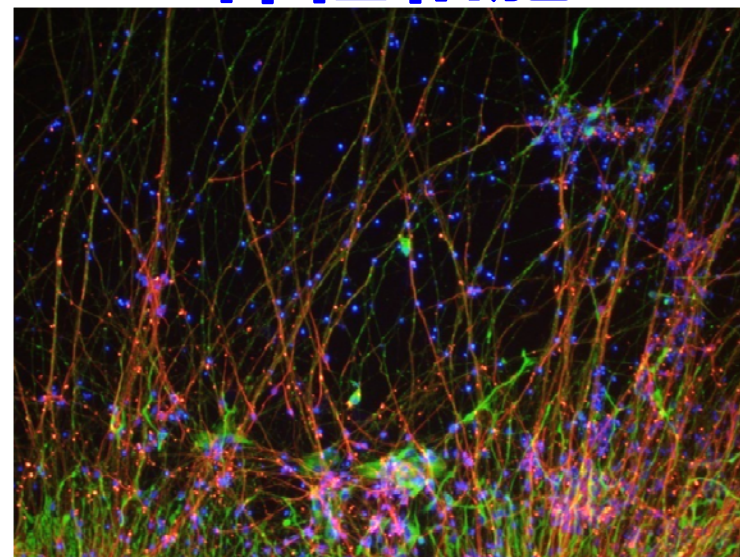
マウスES細胞を用いて見出した(神経)発生毒性  
マーカー遺伝子のヒトES細胞における有用性確認



浮遊凝集塊  
(Spheroid)



神経細胞

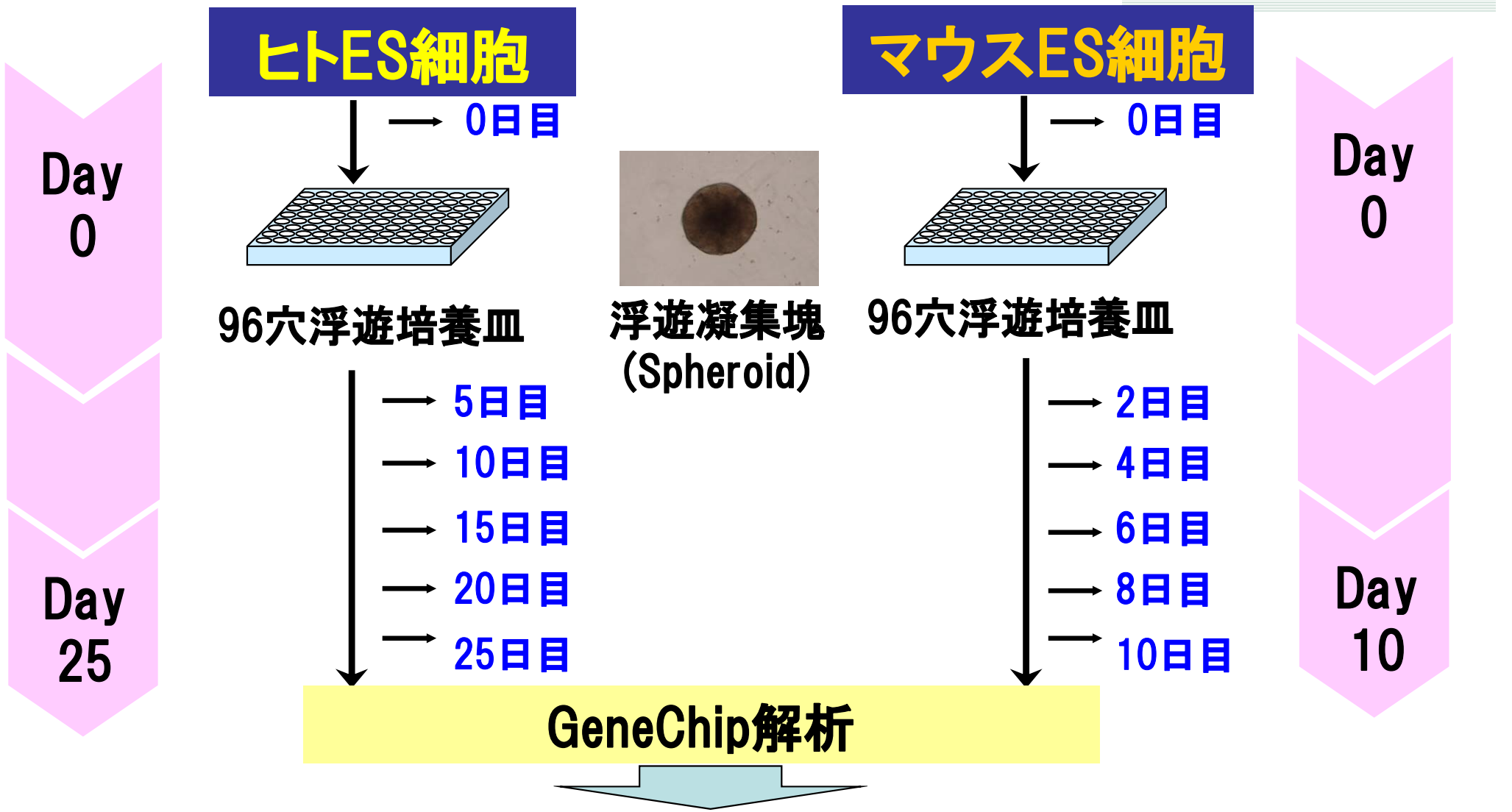


ヒトES細胞株:  
KhES-1(京都大学樹立)

(赤 : MAP2、 緑 : Nestin)

# ヒト及びマウスES細胞の神経分化誘導過程におけるマーカー遺伝子発現パターンの比較

公開



マウスES細胞を用いた研究で選別した  
22の毒性マーカー遺伝子について発現比較

# 種差の検討: マーカー遺伝子発現の 経時変化の比較(ヒトおよびマウスES細胞)

公開

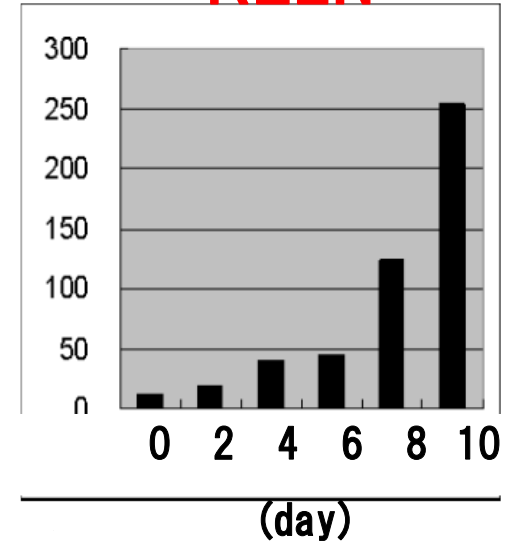
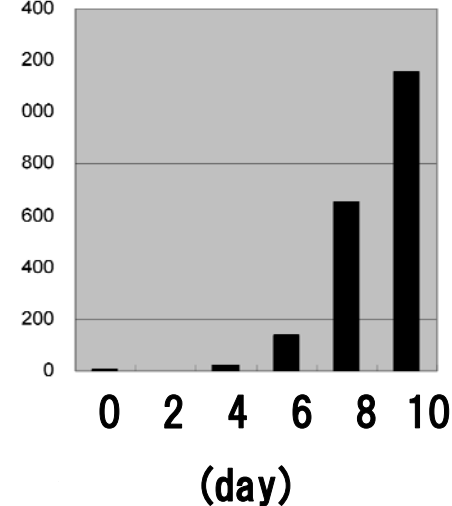
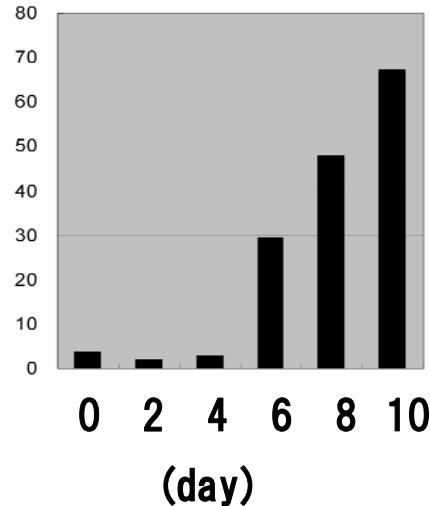
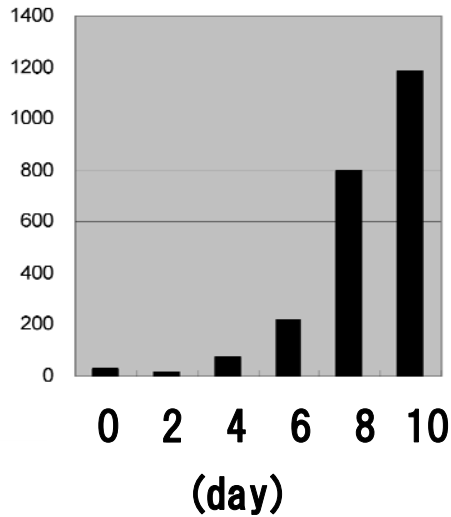
MAP2

EMX2

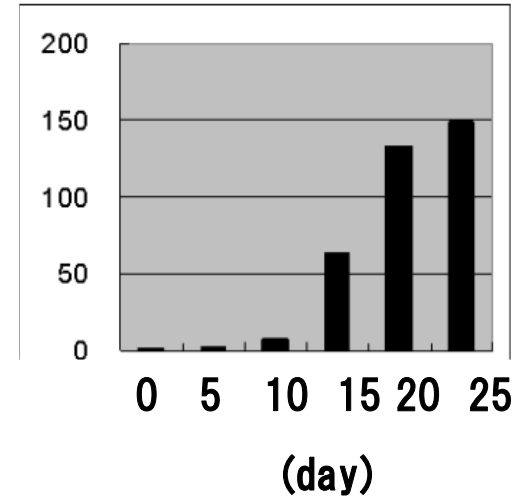
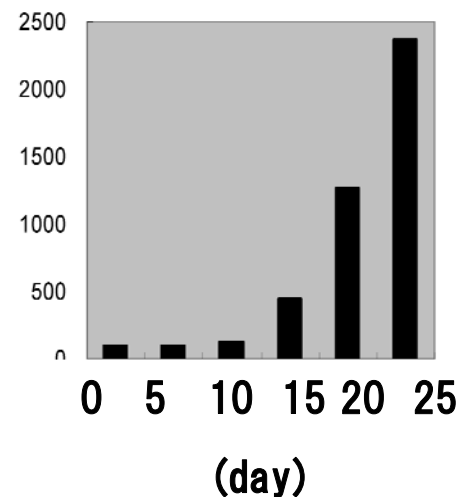
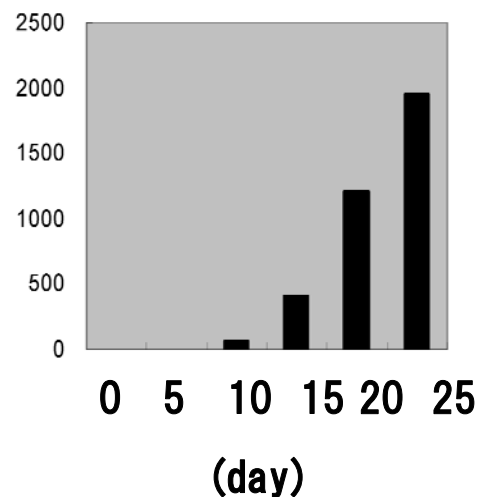
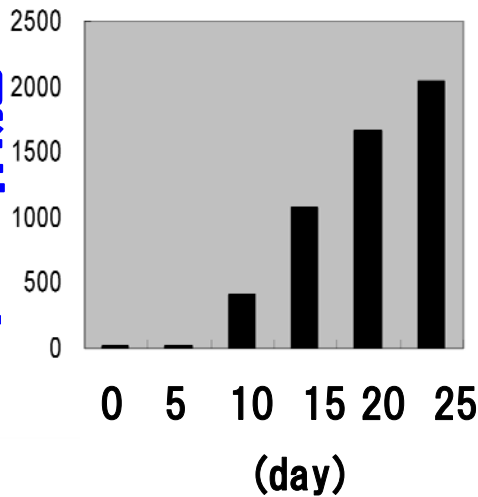
DCX

RELN

マウスES細胞



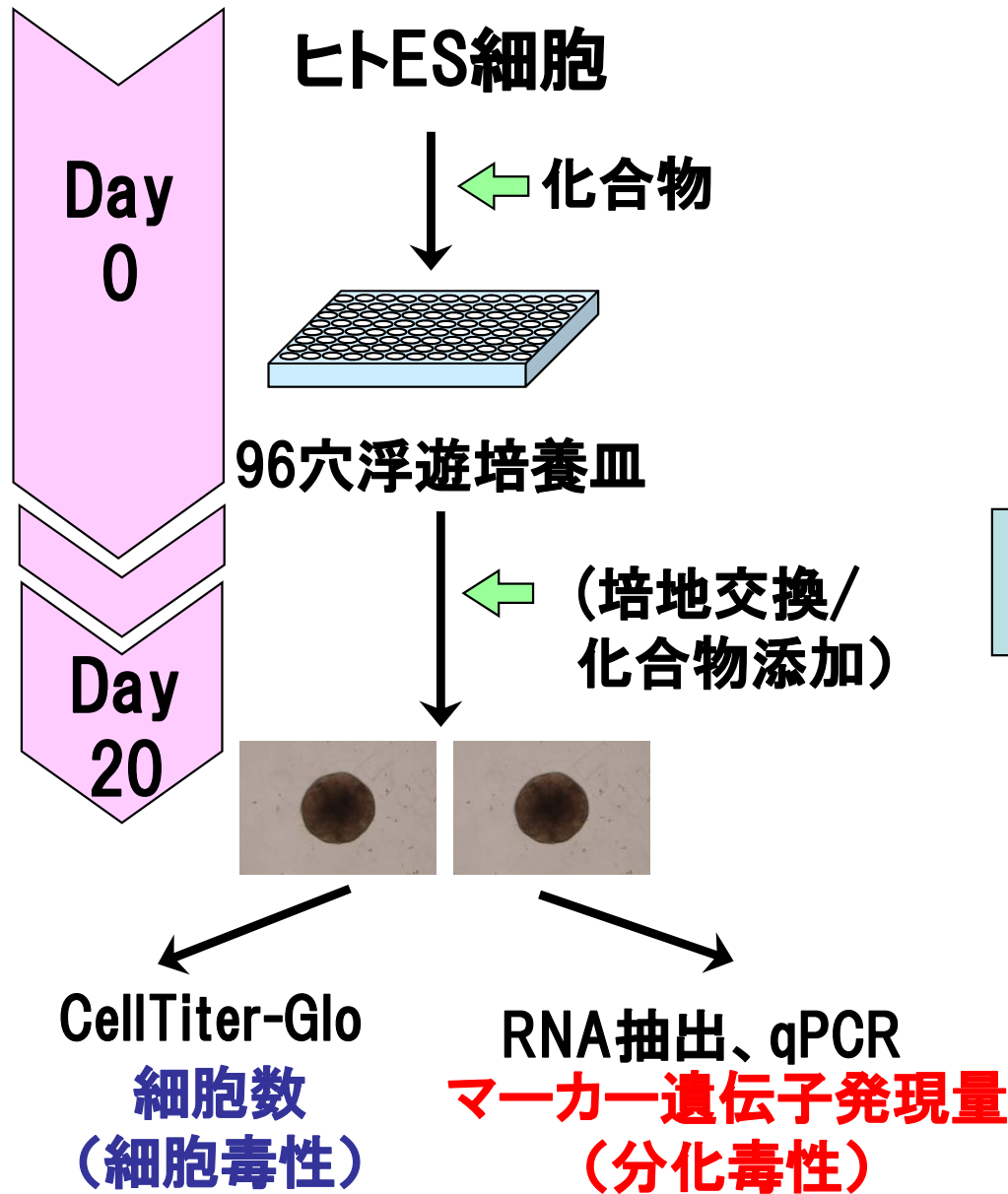
ヒトES細胞



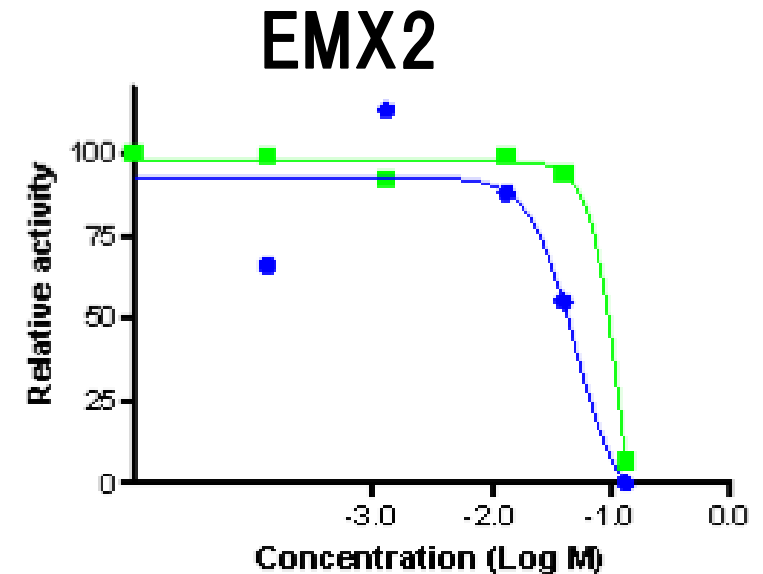
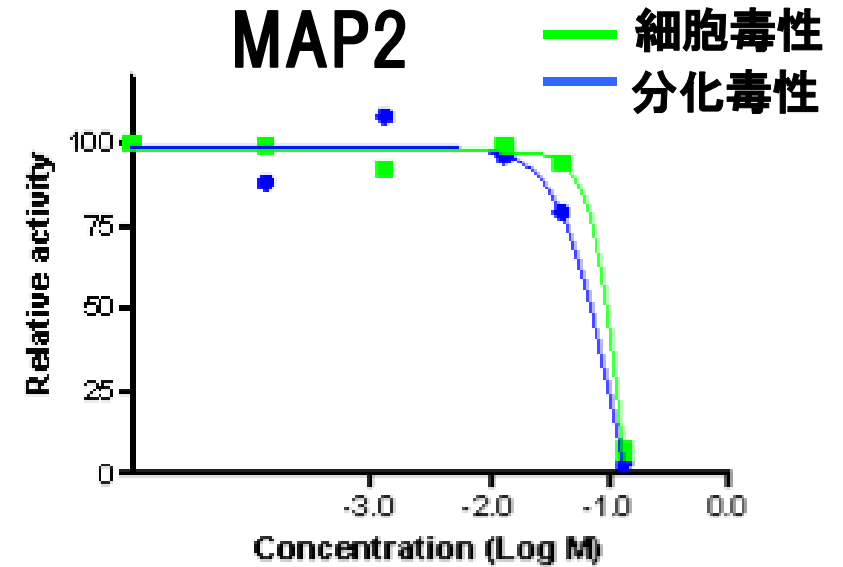
マウスとヒトES細胞で類似したマーカー遺伝子の発現挙動を確認

# マーカー遺伝子を用いたヒトES細胞における影響評価

公開



陽性化合物: Hydoroxyurea



- ①背景
- ②心筋を用いた評価系の構築
- ③神経を用いた評価系の構築
- ④ヒトESを用いた検討
- ⑤成果のまとめ**

# 本プロジェクト主な成果

公開

- ・発生毒性マーカー遺伝子の取得  
⇒特許出願済み(心筋:13遺伝子、神経:22遺伝子)
- ・Hand1、Cmya1、Reln遺伝子等の発現を簡便に評価するレポータージーンアッセイ用ES細胞を作製  
⇒規格化のための性状解析も終了
- ・Hand1-、Cmya1-、Reln-EST法の確立と検証  
⇒ Hand1-、Cmya1-EST:オリジナルEST法と同等以上の予測率。代替法として有用性を検証(72被験物質評価)。小規模施設間差の確認試験実施。  
⇒ Reln-EST法:提案とバルプロ酸類縁体による検証
- ・ヒトES細胞でのマーカー遺伝子の有用性を検討



# 5年間の外部発表

公開

## 論文 (3報)

- 1) 胚性幹細胞 (ES細胞) を利用した安全性評価研究 / 住友化学誌2007-I, p49-55 / 堀江宣行、樋口敏浩、川村 聡、斎藤幸一、鈴木紀之 (H19.5.31)
- 2) Noriyuki Suzuki, Satoshi Ando, Nobuyuki Horie, Kayo Sumida and Koichi Saito, Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells, Toxicology in Vitro (submitted)
- 3) Noriyuki Suzuki, Satoshi Ando, Nobuyuki Horie and Koichi Saito, Evaluation of novel high throughput embryonic stem cell tests with new molecular markers for screening embryotoxic chemicals in vitro. Toxicological Sciences (submitted)

## 学会発表 (13題)

- 1) マウスES細胞を用いたin vitro発生毒性試験 (EST) の現状と今後の方向性について / 堀江宣行 / 第19回 関西生殖発生毒性フォーラム (H19.4.14)
- 2) ES細胞を利用した発生毒性 (催奇形性) に関する遺伝子の解析 / 鈴木紀之、堀江宣行、安藤寛、斎藤幸一 / 日本動物実験代替法学会第21回大会 (H20.11.13)
- 3) ES細胞のトキシコロジーへの応用 (2) 発生毒性分野への応用 / 斎藤幸一 / 第36回日本トキシコロジー学会学術年会 (H21.7.6~7.8日)
- 4) ES細胞を用いた催奇形性予測試験法の開発 / 斎藤幸一 / 第17回生殖・発生毒性学東京セミナー (H21.10.2)
- 5) 「発生毒性試験の代替法開発: 1) ES細胞を用いたレポータージーンアッセイの開発」 / 斎藤幸一、鈴木紀之、安藤 寛、堀江宣行 / 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 (H21.11.14)
- 6) ES細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討 / 鈴木紀之、堀江宣行、安藤 寛、斎藤幸一 / 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 (H21.11.14)
- 7) ES細胞を利用した神経分化過程における発生毒性に関する遺伝子の解析 / 鈴木紀之、安藤 寛、堀江宣行、斎藤幸一 / 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 (H21.11.14)
- 8) Development of novel short-term tests for reproductive and developmental toxicity / Masaharu Akita, Noriyuki Suzuki, Nobuyuki Horie, Satoshi Ando, Koichi Saito / 7th World congress on alternatives & animal use in the life sciences
- 9) マウスES細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討 / 鈴木紀之、堀江宣行、安藤 寛、斎藤幸一 / 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6.16)
- 10) マウスES細胞を利用した神経分化過程における発生毒性に関する遺伝子の解析 / 鈴木紀之、堀江宣行、安藤 寛、斎藤幸一 / 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6.16)
- 11) ヒトES/iPS細胞を用いた新規発生毒性試験代替法の検討 / 安藤 寛、鈴木紀之、斎藤幸一 / 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6.16-6.18)
- 12) 発生毒性の代替試験法開発 - マウスES細胞を用いたレポータージーンアッセイ系の開発とラット胎児培養法の改良 - / 鈴木紀之、斎藤幸一、秋田正治 / 第23回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 (2010.12.4-12.5)
- 13) ES細胞の神経分化過程を利用した新規発生毒性代替法試験の検討 / 第23回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 (2010.12.4-12.5)

## 特許 (3件)

- 1) 化学物質が有する発生毒性の予測方法 / 鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行 / 特願2008 - 145433 (H20.6.3)
- 2) 化学物質が有する発生毒性の予測方法 / 鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行 / 特願2009 - 125077 (H21.5.25)
- 3) 化学物質が有する発生毒性の予測方法 / 鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行 / PCT / JP2009 / 060410 (H21.6.2)

## 受賞 (1件)

- 1) 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 優秀演題賞 / ES細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討 / 鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行 (H21.11.14)

## 新聞報道 (2件)

- 1) (寄稿) 動物実験代替法における培養細胞の利用 / 斎藤幸一 / 科学新聞、(H21.4.17)
- 2) 国内の大学・企業、万能細胞使う創薬研究活発 (住友化学 毒性評価系技術を開発) / 日本経済新聞 (H21.12.21)

(事業原簿 添付資料⑥.1)~4)



# 最終目標と達成状況

公開

最終目標 (平成22年度末)	研究開発の 具体的な内容	最終目標の達成状況	達成度
<p>遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で催奇形性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコルを取りまとめる。</p>	<p>マウスES細胞が心筋、神経、筋・骨格系のそれぞれへ分化する試験手順を開発し、10物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後20物質程度を用いて、催奇形性に関する遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1か月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験方法を開発し、50物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。さらに、化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験方法を開発する。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。</p>	<p>[マウスES細胞を利用した催奇形性予測試験法] マウスES細胞から心筋、神経および筋骨格系への分化誘導法を確立した。催奇形性(発生毒性)に関するマーカー遺伝子を複数同定した(心筋:13種、神経:22種)。次にこれらのマーカー遺伝子の発現を、レポーター遺伝子を利用して簡便に評価可能な組換えES細胞(心筋分化過程:Hand1-、Cmya1-ES細胞など3種、神経分化過程:Reln-ES細胞)を作製した。作製した細胞を利用した簡便な発生毒性予測試験方法(Hand1-、Cmya1-およびReln-EST法)を提案した。Hand1-およびCmya1-EST法の予測性を、標準化合物を用いて従来のEST法と比較した結果、同等以上の予測性を有することが明らかとなり、従来のEST法よりも短期間(約1週間)に多数の化合物を評価可能な方法が確立できた。さらに施設間での再現性の確認や、規格化のための細胞の品質検査も実施した。また、ヒトES細胞を用いた検討を行い、マウスES細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにした。</p> <p>[代謝を組み合わせた催奇形性] マウスES発光細胞を用いた試験法の確認法として、ラット全胚培養法を設計した。ラットS-9mixを組み入れた胎児培養法を用い、よりin vivo試験に近い結果が得られた。</p>	<p>◎</p> <p>○</p>

**以上**

# 「高機能簡易型有害性評価手法の開発」 事後評価分科会説明資料

## 議題5 プロジェクトの詳細説明

### 5.1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発の成果

#### (2) 催奇形性予測試験法の開発

#### 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法

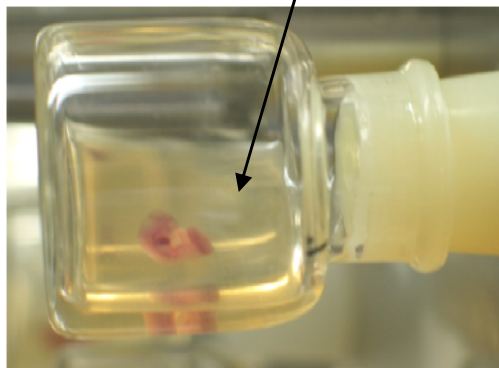
既存の胎児培養法

→ in vivo試験データの再現性をより高めるためには？

母獣の代謝能を取り入れる

→ 培養液中にラットS-9を添加

Rat S-9



代謝機能を取り入れた胎児培養法

Results of whole embryo culture

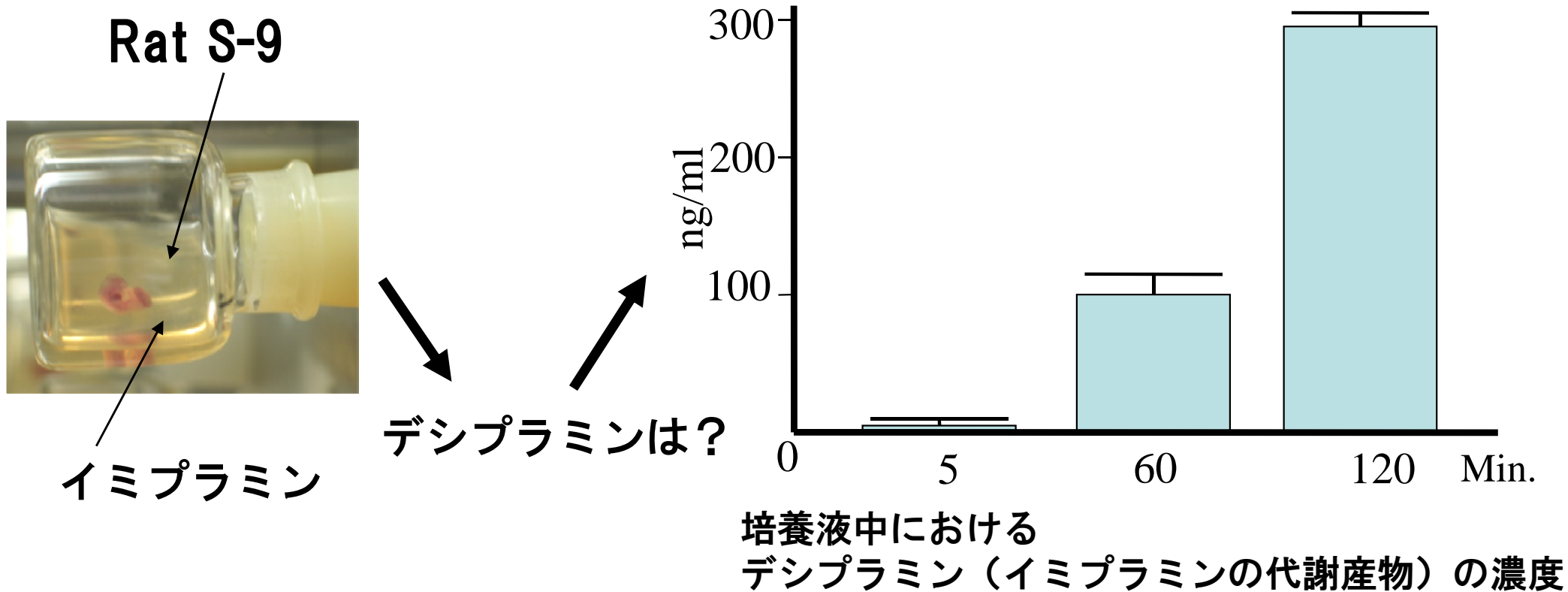
Groups	n	Crownrump length (mm)	Total number of Somites (No.)	Number of fetuses with abnormality
Control	10	7.7 ± 0.2	49 ± 1	0
S-9 (%)				
0.5	4	7.9 ± 0.1	49 ± 1	0
1	4	7.8 ± 0.2	49 ± 1	0
2	4	7.7 ± 0.2	48 ± 1	0
3	12	7.6 ± 0.3	48 ± 1	0
4	10	7.4 ± 0.3	48 ± 3	3 (33.3%)
5	16	6.9 ± 0.5 *	48 ± 3	6 (38%)
7.5	4	6.8 ± 0.1 *	42 ± 2 *	4 (100%)
10	4	6.6 ± 0.1 *	39 ± 1 *	4 (100%)
15	3	6.5 ± 0.2 *	36 ± 0 *	3 (100%)

mean ± S.E  
\*: <0.05 VS Control

**ラットS-9の添加量を3%と設定**

# ラットS-9mixの機能確認

公開



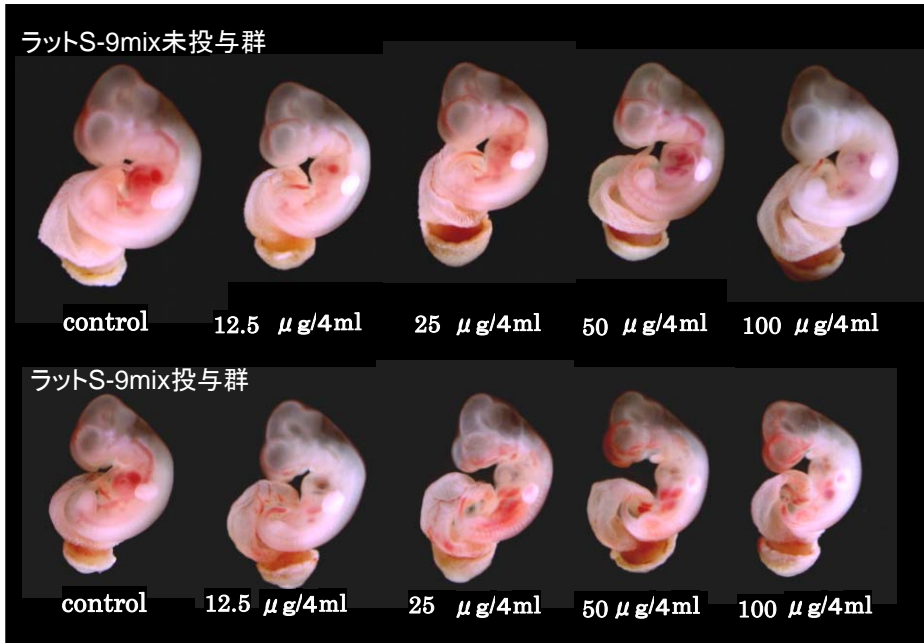
**3%ラットS-9の代謝機能が確認された**

# 陽性対照化学物質を用いた検証 (ベンゾ[α]ピレン)

公開

## ベンゾ[a]ピレンの影響

ベンゾ[a]ピレン		Crown-Rump Length (mm)	Total number of Somits (No.)	Number of fetuses with abnormality	
S-9 (μg/4mlRS)	n				
-	0	6	15 ± 0.99	7.5 ± 0.11	0
-	12.5	10	15 ± 0.46	7.6 ± 0.08	2 (20%)
-	25	12	16 ± 0.46	7.9 ± 0.07	1 (8.3%)
-	50	15	14 ± 0.60	7.5 ± 0.07	10 (66.6%)
-	100	15	13 ± 0.65	7.3 ± 0.12	10 (66.6%)
+	0	11	15 ± 0.88	7.4 ± 0.10	0
+	12.5	11	12 ± 0.93	7.4 ± 0.14	10 (90.9%)
+	25	10	13 ± 0.90	7.4 ± 0.09	9 (90%)
+	50	11	12 ± 0.73	7.3 ± 0.11	10 (90.9%)
+	100	11	14 ± 0.72	7.3 ± 0.14	11 (100%)



ラット胎齢11.5日目から培養48時間後の培養胎児におけるベンゾ[α]ピレンの影響

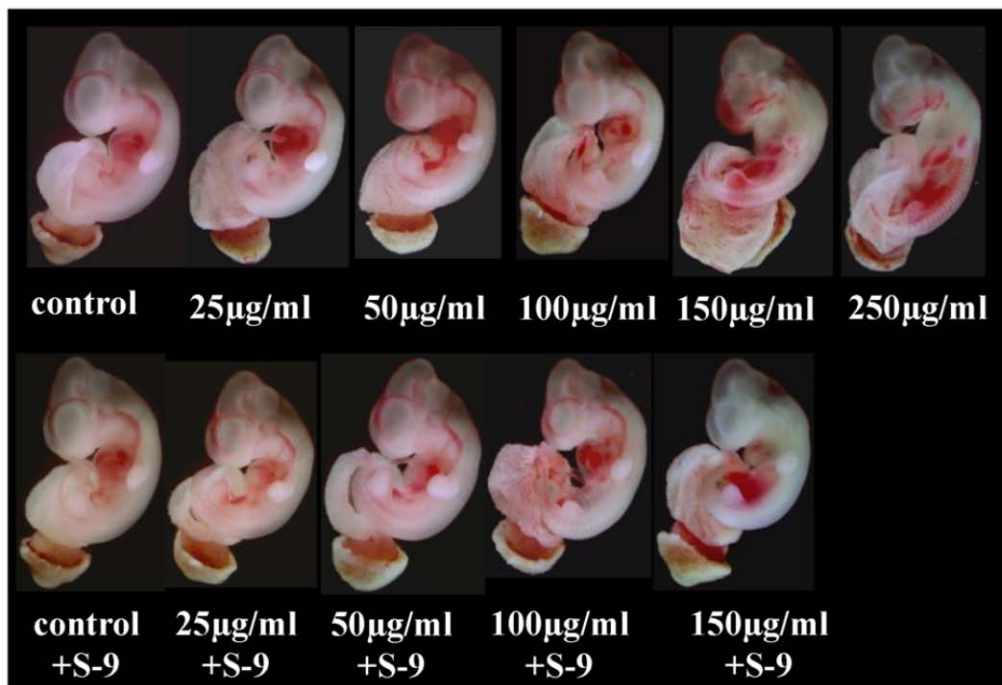
ベンゾ[α]ピレン：  
S-9添加された培養液で培養した胎児は、S-9無添加で培養した胎児と比較して、低濃度で強い影響が観察された



# 陽性対照化学物質を用いた検証 (バルプロ酸)

公開

## Sodium Valproateの影響



ラット胎齢11.5日目から培養48時間後の  
培養胎児におけるバルプロ酸の影響

S-9	Sodium Valproate µg/4ml	n	Number of fetuses with abnormality
-	0	10	0
-	25	8	4 (50%)
-	50	11	6 (55%)
-	100	12	10 (83%)
-	150	10	10 (100%)
-	250	4	4 (100%)
+	0	11	0
+	25	8	1 (13%)
+	50	14	6 (43%)
+	100	12	7 (58%)
+	150	11	11 (100%)
+	250	0	-

バルプロ酸：

S-9添加された培養液で培養した胎児は、S-9無添加で培養した胎児と比較して、弱い影響が観察された

in vivo試験においてSodium valproateの催奇形性は、その代謝産物よりも  
Sodium valproate自体（未変化体）により強い奇形誘発が認められる

# 陽性対照化学物質を用いた検証 まとめ

公開

Warfarin、Benzo[a]pyrene、  
Aflatoxin B1、Phenytoin、  
Methotrexate、cetazolamide



ラットS-9mixを加えるこ  
とで影響が強くなる

Sodium valproate



ラットS-9mixを加えるこ  
とで影響が弱くなる

Thalidomide



変化なし

ラットS-9mixを加えた代謝機能を取り入れた胎児培養法は、  
既存の胎児培養法と比較し、よりin vivoを正確に再現できる



EST結果について in vivo試験と比較した結果

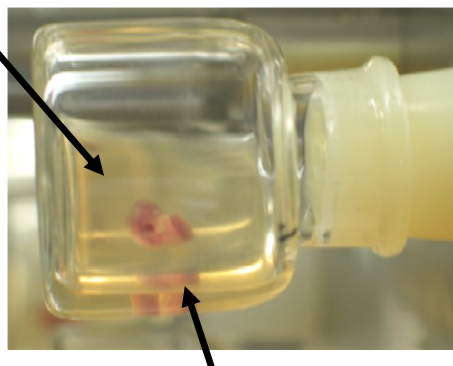
False Negative : Busulfan

False Positive : Cyclobenzaprine-HCl



代謝機能を取り入れたWECで確認

ラットS-9mix



代謝の影響により  
胎児に対する化学物質の影響は???

Busulfan or Cyclobenzaprine-HCl

## Cyclobenzaprine-HCl

in vivo試験 → Negative

EST → Positive

WEC+S-9mix → Negative

この結果の異なる原因は？

代謝機能の有無および試験法の異なりによ  
ると考えられる

## Busulfan

in vivo試験 → Positive

EST → Negative

WEC+S-9mix → Positive

この結果の異なる原因は？

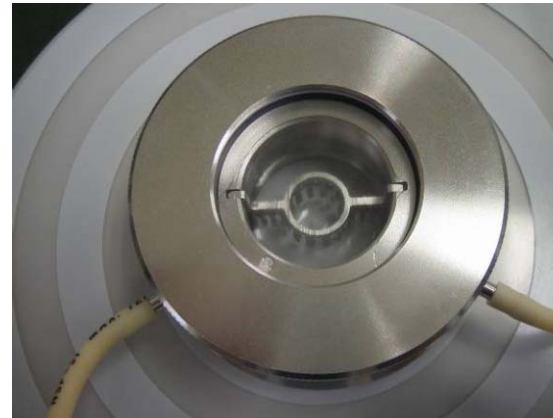
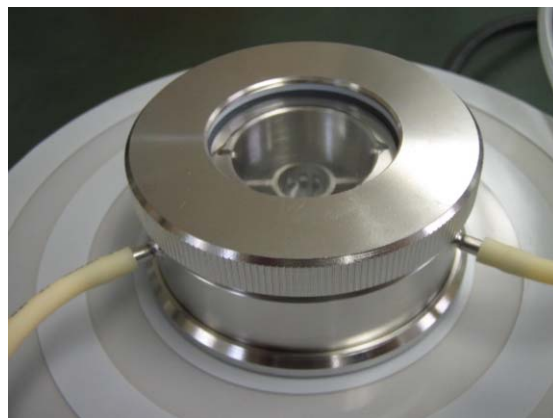
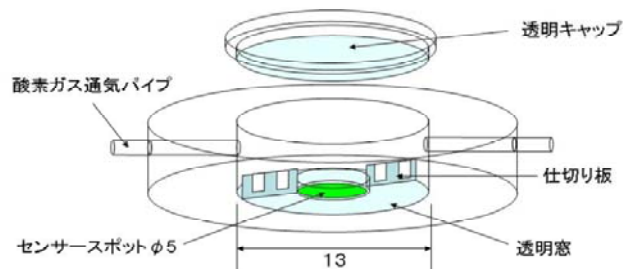
EST試験と代謝を取り入れたWEC試験を組み合わせることにより、  
in vivo試験により近い結果が得られる

# 培養液を少量化した培養装置の開発

公開

動物実験代替法として胎児培養法を用いるための課題

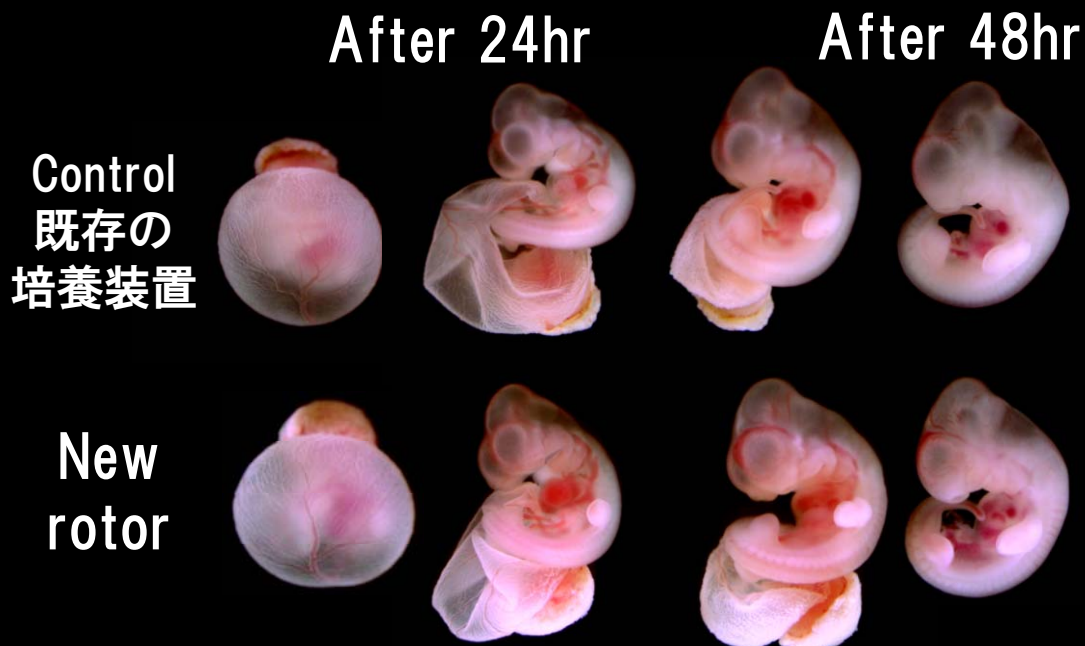
培養液として大量のラット血清が必要 → 血清採取のために大量の動物が必要



培養液を少量化した胎児培養装置

# 培養液を少量化した培養装置の開発

公開



既存の培養装置で培養した胎児とNew rotor培養した胎児に変化なし

## New rotorの培養最適条件

ガス流量：

0～24時間 . . . 140ml/min.

24～48時間 . . . 160ml/min.

ガス圧力：0.01 Mpa

培養液攪拌量：250rpm

## 既存の培養装置



培養液として  
使用するラット血清量  
4ml / embryo



## New rotor

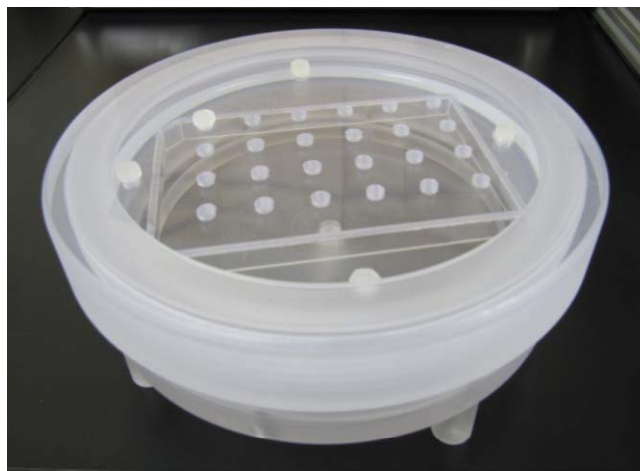


培養液として  
使用するラット血清量  
1.5ml / embryo

# 培養液が少量化（約1/3）できる培養装置の開発に成功



組み立てた培養装置



内部の24穴プレート

24穴の底部は  
O<sub>2</sub>透過性のシート

改良型培養装置

## 改良点

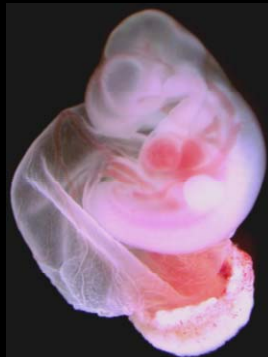
- ・ハイスループット化できるよう24穴プレートで培養が可能
- ・内圧0.1MPaまで絶えられるような構造
- ・装置自身をシンプルにし、簡便な使用が可能
- ・滅菌を行いやすくするため、パーツに金属を使用せず、材質を全てポリカーボネート（一部テフロン）で作成



既存の培養装置で培養した培養胎児



24時間培養後



48時間培養後



24穴プレートで培養できる改良型培養装置



24時間培養後



48時間培養後



使用血清量を1.5ml/embryoに抑え、  
かつハイスループット化できる培養装置の完成

# 最終目標と達成状況

公開

最終目標(平成22年度末)	最終目標の達成状況	達成度
遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で催奇形性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。	[代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法] マウスES発光細胞を用いた試験法の確認法として、ラット全胚培養法を設計した。ラットS-9mixを組み入れた胎児培養法を用い、よりin vivo試験に近い結果が得られた。	○

◎大幅達成 ○達成 △達成見込み ×未達

## 学会発表

- 1) 秋田正治、石塚典子、横山篤／The effect of S- 9mix on rat whole embryos in culture／日本動物実験代替法学会 21回大会
- 2) 秋田正治、石塚典子、横山篤／The effect of imipramine on cultured rat embryos in S-9mix／第82回日本薬理学会年会
- 3) 秋田正治、石塚典子、横山篤／代謝機能を取り入れた胎児培養法の検討(2)-培養胎児におけるイミプラミンの影響-／第56回日本実験動物学会総会
- 4) 秋田正治、石塚典子、横山篤／代謝機能を取り入れた胎児培養法の検討／第49回日本先天異常学会学術集会
- 5) Noriko Ishizuka, Masaharu Akita and Atsushi Yokoyama／The effect of chemical compound on cultured rat embryos in S-9mix／Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (WC7)
- 6) Masaharu Akita, Noriko Ishizuka, Noriyuki Suzuki, Nobuyuki Horie, Satoshi Ando and Koichi Saito／Development of novel short-term tests for reproductive and developmental toxicity／Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (WC7)
- 7) Noriyuki Suzuki, Koichi Saito, Masaharu Akita/ Development of novel alternative tests for developmental toxicity – Reporter gene assays using mouse ES cells and improvement of rat whole embryo culture -/The 23rd Annual Meeting of Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments
- 8) Masaharu Akita, Noriko Ishizuka, Atushi Yokoyama/The Effect of chemical compound on Cultured Rat Embryos in S-9mix : Sodium Valproate/The 23rd Annual Meeting of Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments
- 9) Masaharu Akita, Noriko Ishizuka, Atushi Yokoyama/Development of a new system on whole embryo culture with reduced serum/The 23rd Annual Meeting of Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments

## 論文

Akita M. Current status and future progress of reproductive/developmental toxicity test. *Yakugaku Zasshi*. 2008;128(5):765-72.