

研究課題名 (研究項目名)	血漿マイクロRNAの発現変動を指標とした化学物質の新規毒性 評価系の構築・評価研究(課題番号:1605) (4 その他(1)研究者からの提案に基づく研究)
主任研究者	研究者名:横井 毅 所属機関:国立大学法人名古屋大学

## I 研究期間及び研究目的等

### 1 研究期間

平成28年度～平成29年度(2年間)

### 2 研究目的

近年血漿中にnon-coding RNAの一種であるマイクロRNA(microRNA、miRNA)が安定的に存在し、その発現変動が癌をはじめとして様々な疾病の診断バイオマーカーとなり得ることが注目を集めている。少量の血漿使用は極めて低侵襲性であり、血漿miRNAの発現変動から多くの情報の取得が期待できる。

申請者らはこれまでにラットに急性または亜急性の肝細胞性障害、cholestasis(胆汁うっ滞性)、steatosis(脂肪肝)、肝線維化等の典型的な肝臓障害・病態モデルを作成しマイクロRNAアレイを用いて、血漿中のmiRNAについて網羅的な発現変動解析を用いて行ってきた。その結果、各病態に特異的なバイオマーカーとしてのmiRNAを提案した(*PLoS One* 7: e30250, 2012)。さらに肝臓障害の組織特異的な障害部位を推定できるmiRNAの検討・報告も行った(*Toxicology*, 322:89-98, 2014)。また、ハロタン由来肝臓障害マウスモデルを作成し、ALT(alanine aminotransferase)の上昇に先んじて変動するmiR-106bが、核内転写因子であるStat3の発現制御を介してIL-17による肝臓障害増悪に関与することを報告した(*Toxicology*, 319:75-84, 2014)。また、腎臓障害の診断マーカーとしてのmiRNAの報告も最近散見されている。

化学物質の*in vivo*毒性試験には主にラットが用いられる。医薬基盤研究所のTGP(Toxicogenomics Project)公開データから、化学物質のラットへの投与と臓器障害性について、mRNAの発現変動と組織障害性の詳しいデータが公開されている。さらに、TGPからラットの55種類の正常組織のmiRNA発現のデータアトラスが2014年に報告されている。こうした背景から、血漿中のmiRNAの発現変動は、生体全体の様々な疾病や傷害などの変化を検出できる情報源であると考えられる。また、miRNAの特徴として、病態などのフェノタイプの変化に先んじて、蛋白質の発現やmRNAの発現の変化が知られているが、こうした変化にさらに先んじて、血漿中miRNAが発現変動を示すことが徐々に明らかにされてきた

。よって、肝障害であれば、ALTやASTの変化に先んじて、血漿中で変動するmiRNAが、臓器及び病態特異的な変化を反映していると考えられる。しかしながら現在までに、化学物質の生体影響や毒性評価系の早期のバイオマーカーとしてのmiRNAの研究は極めて限られている。

以上の背景から、本研究では低侵襲で動物使用数を減らすことができ、早期に変化する情報を得ることが期待できる血漿miRNAの発現変動解析手法を化学物質の毒性評価系に適用・評価することを目的とする。併せて、近年急速に普及してきている次世代シーケンサーを網羅的なmiRNA発現変動解析に適用し、より定量性と信頼性に優れた解析方法の適用・評価・研究を行うことも目的とする。

### 3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
血漿マイクロRNAの発現変動を指標とした化学物質の新規毒性評価系の構築・評価研究	1. 肝障害モデル動物を用いた検討を行う。	横井 毅（名古屋大学） 織田進吾（名古屋大学）
同上	2. 肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、脂肪肝型障害について、病型別及び病型共通な早期予測可能な血漿 miRNA バイオマーカーを確立し評価検討する。	横井 毅（名古屋大学） 織田進吾（名古屋大学）
同上	3. 化学物質および薬による腎障害の病型および病態の診断マーカーとして、血漿miRNAを確立する。	横井 毅（名古屋大学） 織田進吾（名古屋大学）
同上	4. 免疫・炎症因子を考慮したmiRNA バイオマーカーを確立・評価する。特異体質性（idiosyncratic）肝障害との関連を検討する。	横井 毅（名古屋大学） 織田進吾（名古屋大学）

### 4 倫理面への配慮について

本研究では市販ラットなどの実験動物を用いた *in vivo* 化合物投与試験による研究を行った。動物実験は課題毎に名古屋大学動物実験委員会で承認を受け、代替法の利用・使用数の削減・苦痛の軽減の3原則を遵守し適正に実施した。動物種、動物の系統、使用数などの変更は、事前に変更願いを申請し、承認後に実験を行った。本申請内容の動物実験のうち動物モデル作成について、承認を取得し（部局承認番号：25484(マウス)、25486(ラット)）、実験は名古屋大学附属動物実験施設医学分館にて実施した。

## II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：血漿マイクロ RNA の発現変動を指標とした化学物質の新規毒性評価系の構築・評価研究

1) 肝障害モデル動物を用いた検討を行う。(研究担当者名：横井 毅、織田進吾(名古屋大学))

これまでに我々は、多くの化合物や薬物を用いて肝障害モデル動物を作成し、肝障害の発症に重要な因子や、その発症機序を個々の化合物や薬物について報告してきた。特に肝障害の増悪因子として、Th2(T helper 2)細胞やTh17(T halper 17)細胞が高い確率で関与していることを報告した。一例として、ハロタン誘導性肝障害の動物モデルを2009年に報告した(*Toxicol Sci*, 111:302-310, 2009)。その後我々は、その増悪因子である IL-17 (interleukin) の分泌が miR-106b を介して制御されている転写因子である Stat3(signal transducer and activator of transcription) が主に関与することを見出し、特に miR-106b が肝障害発症の極めて早い時間に検出できることを明らかにした。すなわち miR-106b が肝障害発症に先んじて血漿中で上昇するバイオマーカーであり、肝障害発症にも関与していることを明らかにした(*Toxicology*, 319:75-84, 2014)。ハロタン誘導性肝障害の ALT 値の最大は投与後24時間に認められるが、当該 miRNA は 1～3時間に最大の発現変化を示した。

これまでの我々の蓄積データから、本研究項目では、肝障害モデル動物を用いた経時的血漿 miRNA の発現変動に焦点を絞って検討し、肝障害増悪反応に関わる miRNA の選択を行った。特に免疫・炎症因子の制御に関わる miRNA を中心に検討した。前記のように、Th17細胞が関与する場合については、バイオマーカーがすでに確定しているために、ここでは、Th2細胞に起因する肝障害に焦点を絞って検討することとした。さらに、これまでの我々の様々な化合物や薬に起因する肝障害動物モデルでは、免疫因子が関与する場合には、いずれも Th2細胞または Th17細胞が関与しており、Treg細胞または Th1細胞の関与は見出されなかった。そこで、本研究項目で Th2細胞に起因する肝障害のバイオマーカーを特定できれば、Th17と併せて汎用性が高いデータになると考えた。肝障害動物モデルの作成、血漿や臓器

の採取と検討等は横井が担当し、血漿miRNAアレイを中心とした解析等は織田が担当した。(研究内容・方法、成果)

本研究項目では、甲状腺機能亢進症治療薬であるメチマゾールを用いる。ヒトに於いて重篤な肝障害を惹起する場合は報告されているメチマゾールの代謝には、薬物代謝酵素であるCYP(チトクロームP450)やMFO(フラビンモノオキシゲナーゼ)が関与して生成される活性中間体が、肝障害の原因であると推定・報告されてきた。我々は、2012年にメチマゾールを用いたマウス肝障害モデルを確立して報告した(*J Apply Toxicol*, 32:823-833, 2012)。さらに、その発症機序にはTh2細胞が主に関与していることを報告した。そこで、本研究項目では、先の我々の報告に基づいて、メチマゾール誘導性の肝障害モデルマウスを用い、Th2依存性の反応に関与するmiRNAの同定とその意義の解明を試みた。特に障害発症の初期に変化するmiRNAに焦点を絞って検討した。

肝障害モデル動物の作成は、生体中で生成された反応性中間体を解毒する能力を抑制するために、BSO(L-buthionine-S, R-sulfoximine)を被験薬投与1時間前に腹腔内投与し、その後生理食塩水に溶解したメチマゾールを経口投与した。様々な投与量について予備検討し、最終的に25 mg/kgとした。その結果を図1-1に示すように、ALT値は投与後4-7時間でpeakを示した。投与後2時間を超えるまでは、組織検査でも全く変化を認めなかった。また、BSO前投与なしのメチマゾール投与群は、肝障害は惹起されなかった。

次に、メチマゾール誘導性肝障害に関与する炎症及び免疫関連因子を明確にするために、肝臓のmRNAの発現量を経時的に測定した。その結果図1-2に示すように、Th2の促進因子であるGATA3(GATA binding protein 3)、eotaxin-1が肝臓中で、IL-4蛋白質が血漿中において、肝障害の発症時期と同じ4時間後から上昇を示した。さらに、図1-3に示すよう

に、Th2に抑制的に働く転写因子の発現は、LEF1(lymphoid enhancer-binding factor)が発現上昇を、Sox4(SRY-related-HMG box 4)とMINA(myeloid-induced nuclear antigen)の発現抑制がBSOとメチマゾール併用群にのみ認められた。

図1-1. メチマゾールによる肝障害発症と組織学的変化

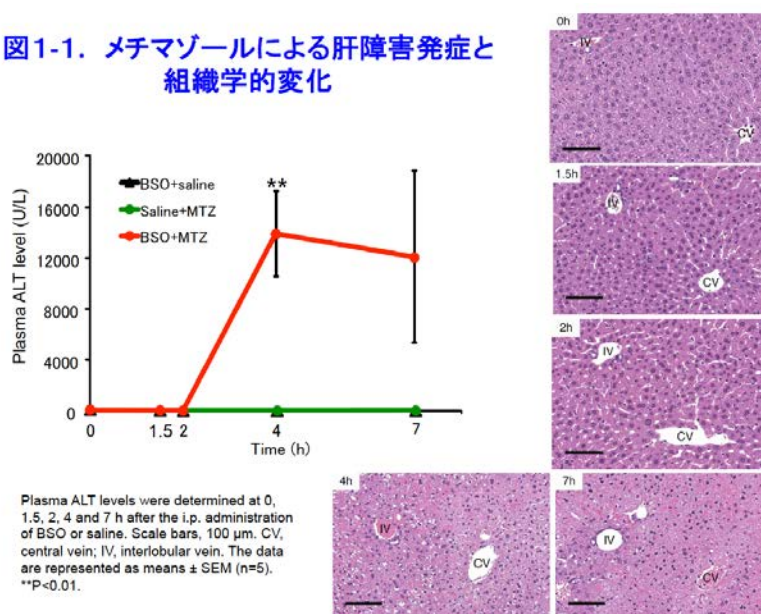


図 1-2. 肝臓中mRNA発現及び血漿中IL-4の経時変化 (Th2促進因子)

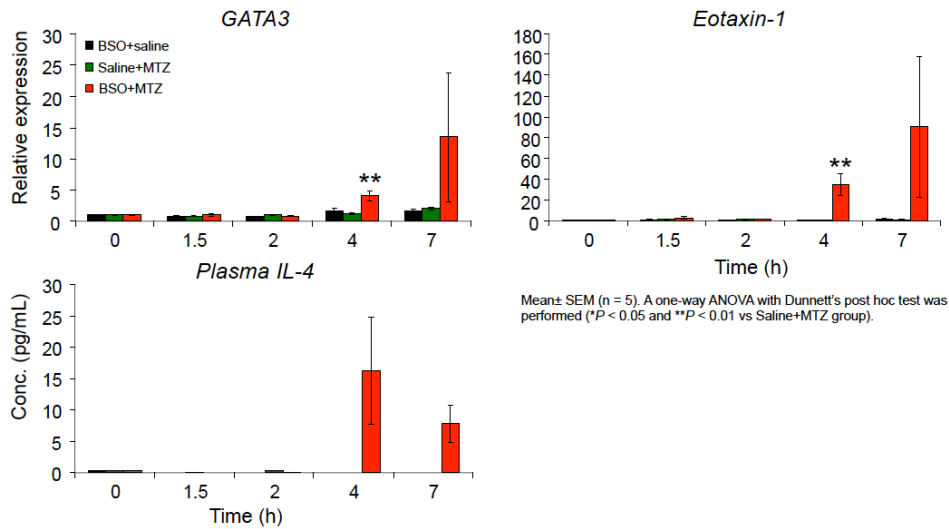
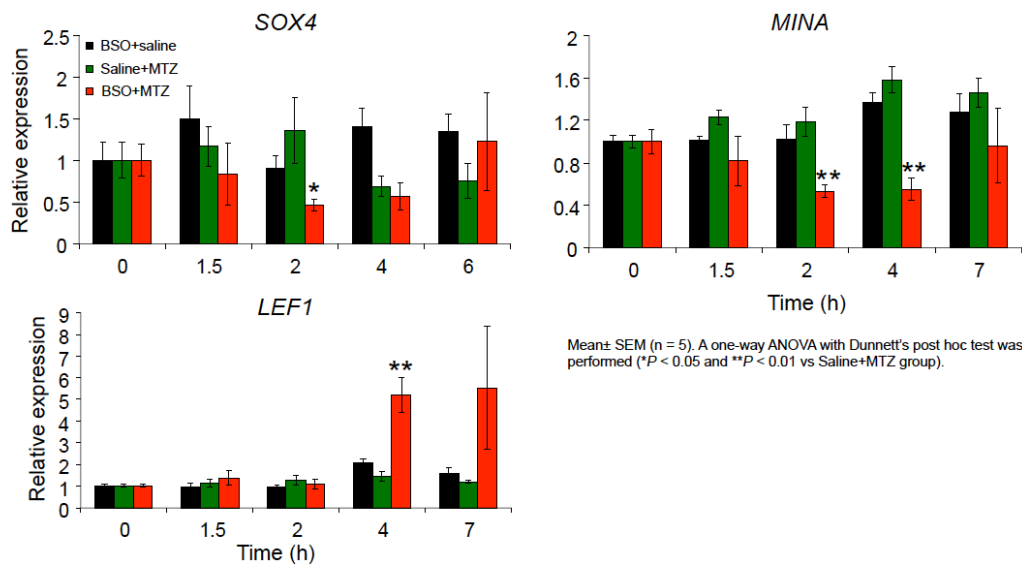


図 1-3. 肝臓中mRNA発現の経時変化 (Th2抑制因子)



次に、肝障害発症の早期のバイオマーカーの探索を目的として、メチマゾール投与後1.5時間と2時間の試料について、miRNAの網羅的な発現解析を次世代シーケンサー(NGS)ではなく、マイクロアレイの手法を用いて行った。この研究を実施した2016年時には、まだNGSをmiRNAの網

羅的な発現解析に適用することの事例が世界中で稀であったため、従来のマイクロアレイ法を用いた。その結果、図1-4右に示すように、BSOとメチマゾール併用群で、特異的に大きくupまたはdownしたmiRNA(いずれも4倍以上の変化を示した場合)を見出した。それは図中では赤で示した計17 miRNAあり、これらについてさらに検討した。図1-5に示すように、miRNAについて多種類の予測アルゴリズムを駆使するprogramを用いて、Th2に関連因子を標的のすると予測されたmiR-29b-1-5p、miR-410-3pとmiR-449a-5pに注目した。

図 1-4. BSO/MTZ併用投与群特異的に初期変動するmiRNAの絞り込み

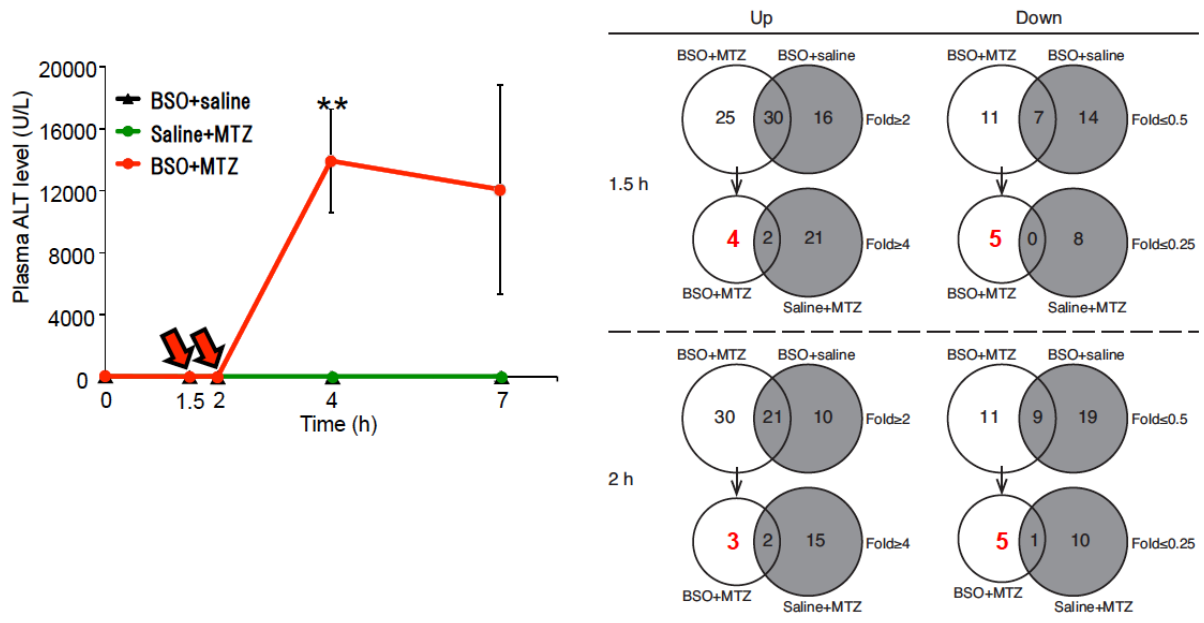


図 1-5. Th2免疫応答の制御に關与するmiRNA/mRNAの予測

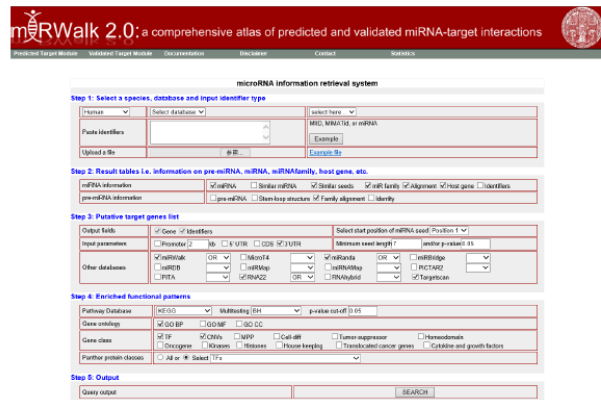
**Up-regulated miRNAs**

miRNA name	Number of programs that predicted target gene-miRNA interaction			Sum
	SOX4	MINA		
<b>mmu-miR-29b-1-5p</b>	2	7		9
mmu-miR-1928	1	4		5
mmu-miR-211-5p	3	2		5
mmu-miR-9-5p	2	2		4
mmu-miR-184-3p	1	2		3

**Down-regulated miRNAs**

miRNA name	Number of programs that predicted target gene-miRNA interaction			
	GATA3	IL-4	Eotaxin-1	Sum
<b>mmu-miR-410-3p</b>	6	5	4	15
<b>mmu-miR-449a-5p</b>	8	0	3	11
mmu-miR-187-3p	2	0	3	5
mo-miR-99a-3p	1	0	1	2
mmu-miR-106b-3p	1	0	0	1
hsa-miR-338-3p	1	0	0	1



出展 : <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/miRetsys-self.html>

選択した miRNA について BSO 併用の有無及びメチマゾール投与による影響を経時的に調べた結果を図 1-6 に示す。miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p に共通して、投与後 1.5 時間において有意な発現上昇を明らかにできた。肝障害の従来のマーカーである ALT は投与 4 時間後からの上昇であるため、かなり早い時間である 1.5 時間後に特定の miRNA の発現変動を見出した。これらの miRNA の下流のシグナル経路を検討した結果を図 1-7 に示す。Th2 に対して抑制的に働く Sox 4 と LEF1 の発現は、肝障害発症後も有意な低下を示した。この結果からいずれの因子も Th2 の免疫応答に關与していることが示された。

図 1-6. Th2免疫応答の制御に関するmiRNAの経時変化

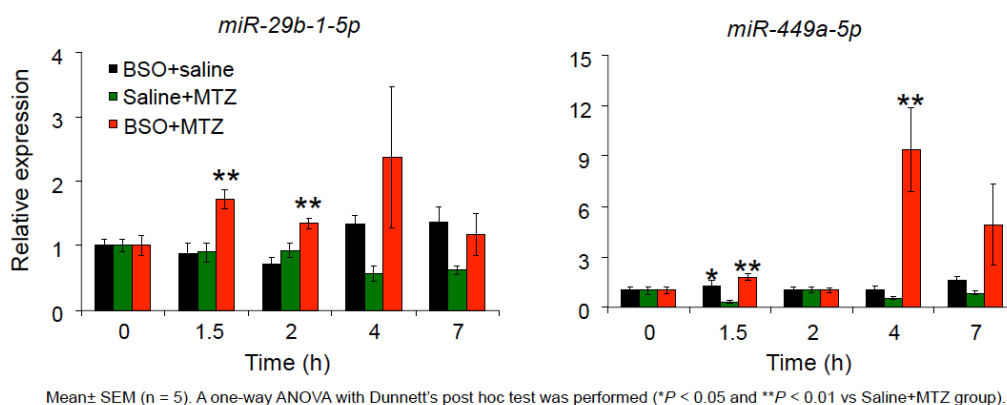
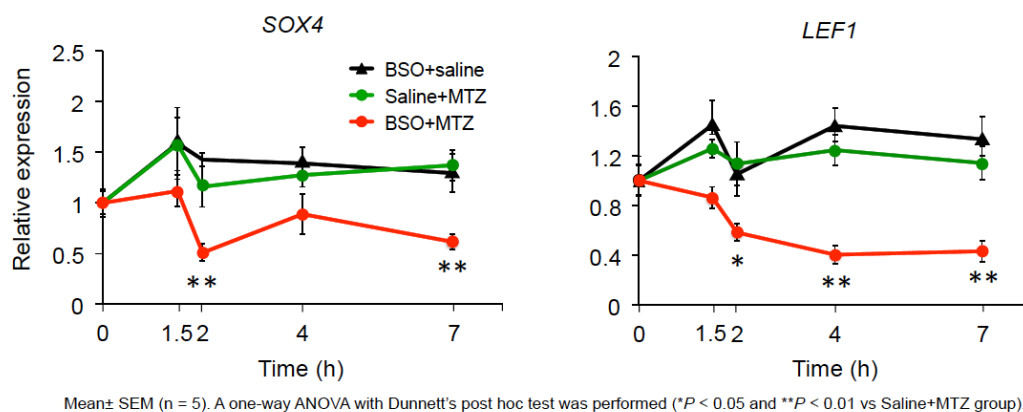


図 1-7. Th2免疫応答の制御に関する転写因子の経時変化

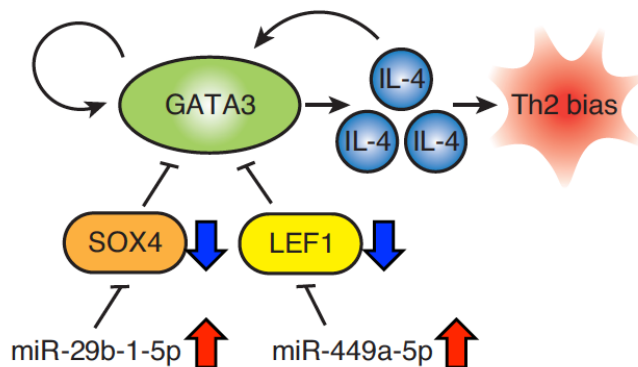


(考察及び今後の課題)

miRNA-29b-1-5p と SOX4、及び miRNA-449a-5p と LEF1 の組み合わせは、miRNA の発現量とその標的遺伝子のコード蛋白質の発現量が逆相関を示したが、この理由は不明である。SOX4 と LEF1 はいずれも GATA3 の zinc-finger motif に結合し、Th2 型免疫反応に対して抑制的に働くことが、すでに他の研究において報告されていることから、この miRNA は Th2 免疫応答に関与していることが示された。また、投与後 1.5 時間ですでに変動を示したことから予測バイオマーカーとしての有用性も示唆された。以上、免疫・炎症因子が関与する薬物または化合物に起因する肝障害で、miRNA の関与を示したのは我々の報告が最初であり、Th2 と Th17 に関与する miRNA を提案することができた。今後は、これらの miRNA の評価検討を行い、適用の範囲を確定する必要がある。



図 1-8. 総括



- ✓ miR-29b-1-5p/SOX4及びmiR-449a-5p/LEF1の組み合わせはmiRNAとその標的遺伝子がコードするタンパク質の発現が逆相関した。
- ✓ SOX4及びLEF1はいずれもGATA3のzinc-finger motifに結合し、Th2型免疫応答に対して抑制的に働くことが報告されている (Nat. Immunol. (2012) 13, 778-786; Immunology (2008) 125, 377-386)。
- ✓ miR-29b-1-5p及びmiR-449a-5pはそれぞれSOX4及びLEF1を制御することによって、Th2免疫応答に関与していることが示唆された。

2) 肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、脂肪肝について、病型別及び病型共通な早期予測可能な血漿 miRNA バイオマーカーを確立し評価検討する。(研究担当者：横井 毅、織田進吾 (名古屋大学) )

これまでに我々は、ラットを用いた肝障害病態別モデルを作成し、バイオマーカーを特定するために血漿 miRNA の研究を実施してきた。肝臓には様々な血中の生化学値を参考にした臨床検査・病態診断の長い歴史がある。しかし、臨床検査値だけでは、肝臓の病態を詳しくは知り得ず、詳しい診断には、バイオプシなどの侵襲的方法が用いられている。そこで極めて低侵襲性である血液を材料として、これまでよりも詳しく簡便で確実に肝臓病態の情報を得ることを目的とし、ラットの様々な肝障害モデルを作成して検討してきた。肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症について各ラットモデルを作成し、その血漿中の miRNA を網羅的に解析した。その結果は、2012年に発表したが (*PLoS One*, 7: e30250, 2012)、特定の病態について特定の miRNA を絞り込むことは困難であった。その原因としては、検出方法が TaqMan MicroRNA Array の plate を用いる方法であり、当時は 585 種類の miRNA を検出できるに過ぎなかった。また、1 塩基や 2 塩基のミスマッチを正確に検出することは不可能であり、自ずとその精度に限界があった。さらに、当時は血漿中に miRNA が安定的に存在するという点だけで話題であり、その性質も詳しく判明していなかった。よって、肝障害の peak 時の解析を主に行い、満足な予測性は得られていなかったが、その結果を発表した。また、当時は一本鎖の miRNA の逆鎖も安定であり、機能を発揮するということも不明であった。そのため逆鎖にも個別の命名が必要であることが判明してきたことから、2013年頃から-3p、-5pの区別が命名に付されることとなった。

そこで本研究項目では、これらの欠点を完全に克服することを意図して研究を企画し



実施した。すなわち、miRNAの網羅的解析手法として、miRNAアレイではなく、NGSを用いて、すべての配列を読むことを行った。さらに、miRNAはmRNAの変動よりも、かなり早期に変動が起きることが示唆されて来たため、早期の診断バイオマーカーになりうることも考慮し、経時的な発現変動解析に主眼を置いた。実際には、前項のメチマゾールの研究項目では、NGSの至適化に難渋したために、計画通りに行かなかったが、それ以後の研究項目ではすべてNGSを用いて網羅的解析を行った。動物モデルの作成と血漿因子の測定などは横井が、NGSとその解析は織田が行った。

(研究内容・方法、成果)

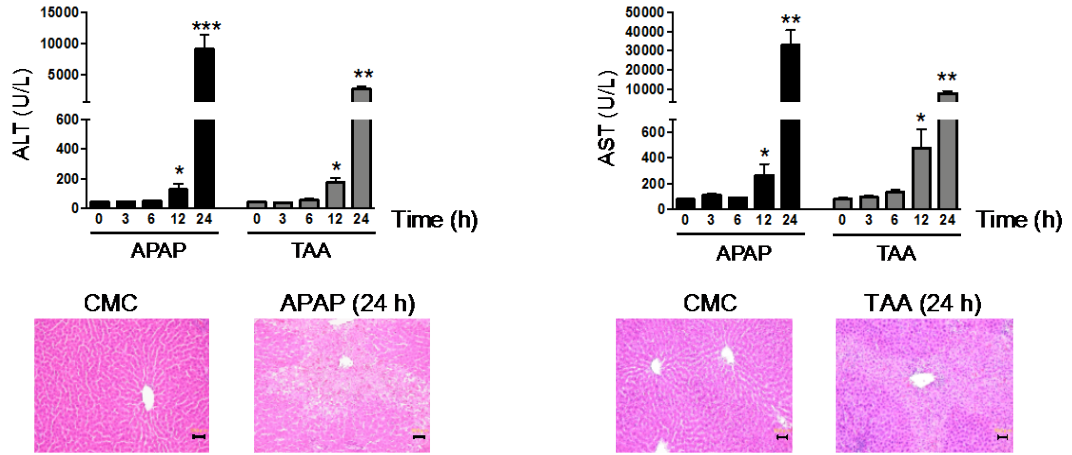
化合物暴露に起因する肝障害の代表的病型3種類(肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、脂肪肝型)を病型別に早期予測できるmiRNAバイオマーカー探索を行った。肝細胞障害型(Hepatocellular injury)は、アセトアミノフェン(APAP、1500 mg/kg、単回経口投与)とチオアセタミド(TAA、100 mg/kg、単回経口投与)を用い、胆汁うっ滞型(Cholestasis)は、 $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート(ANIT)と4,4'-メチレンジアニリン(MDA、250 mg/kg、単回経口投与)を用い、脂肪肝型(Steatosis)は、四塩化炭素(CCL<sub>4</sub>、300 mg/kg、経口投与)とデキサメサゾン(DEX、15 mg/kg、経口投与)を用いて、それぞれの肝障害モデルを作成した。血漿中の生化学マーカーとしては、主にALT、AST、トリグリセリド、総ビリルビン値などの変化を指標とした。また、肝臓の病理組織診断も併せて行い、肝障害の程度を判断した。

6週齢雄性SDラットを各測定時間に5匹を用いた(図2-1)。肝細胞障害型には、APAPとTAA投与群を用い、ALTとASTを指標として、単回経口投与後24時間までを経時的(0、3、6、12、24時間)に採材した。肝障害は24時間後にpeakを示した。胆汁うっ滞型は、ANITとMDAについて、ALTと総ビリルビン値を指標として、投与後48時間までを経時的(0、3、6、12、24、48時間)に採材した。Phenotypeとしての肝障害は48時間後にpeakを示した。脂肪肝型モデルには四塩化炭素とDEXを用い、それぞれ5日間と3日間連続投与した。脂肪肝型肝障害の指標としては、ALTとトリグリセリドを測定し、投与後経日的に採材した。Phenotypeとしての肝障害は四塩化炭素では5日目に、DEXは3日目にpeakを示した。典型的な組織像も図2-1に示した。

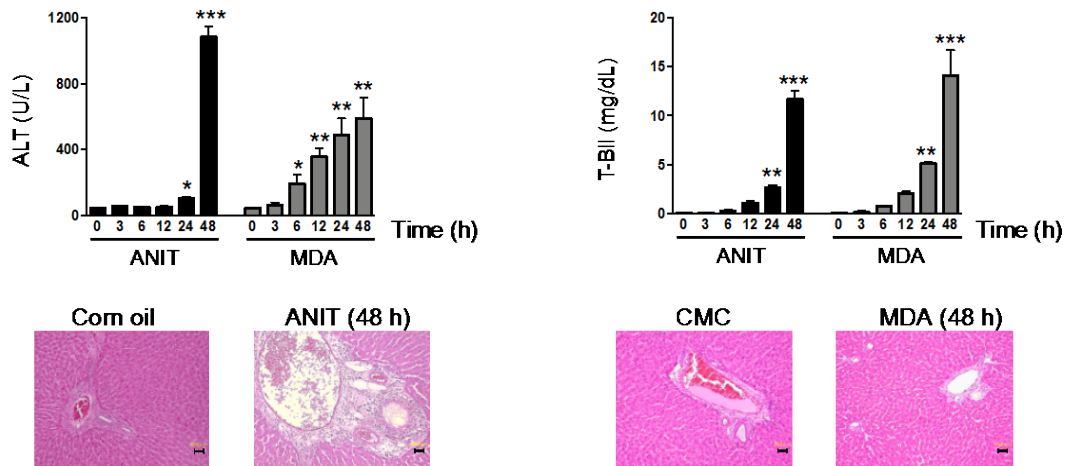
各測定時に5匹分の血漿を等量プールし、NGSによるmiRNAの網羅的配列解析を行った。現在報告されている765種類すべてのラットmiRNAの配列を照合確認し、2塩基までのミスマッチを容認する手法によりNGSデータを解析した。リード数は1試料あたり200万で行った。Normalizationは、DESeq package(ver. 1.28.0)のR software ver3.4を用いて行った。

## 図2-1. 各DILIモデルにおける化学値と組織学的変化

### (A) Hepatocellular injury



### (B) Cholestasis



### (C) Steatosis

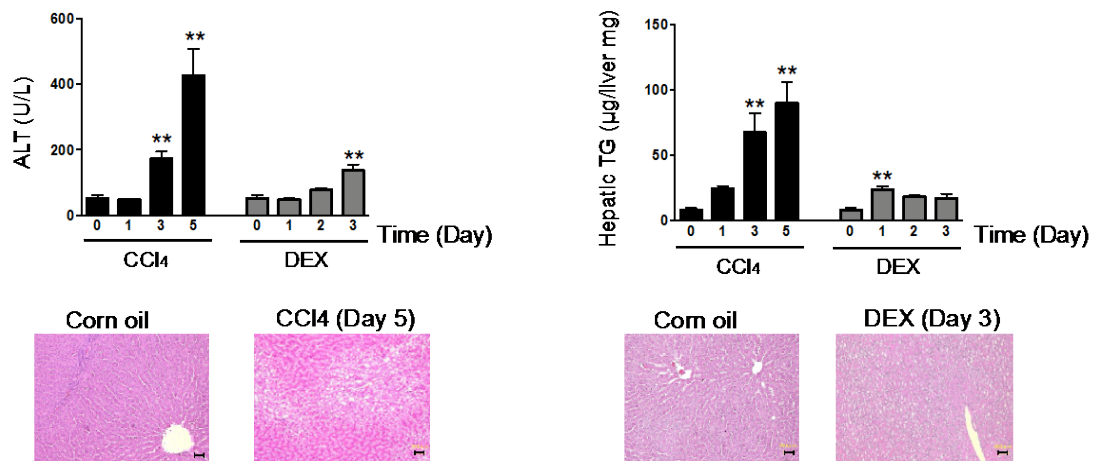


図2-2. 各肝障害モデルにおける経時的な血漿miRNAの変動解析

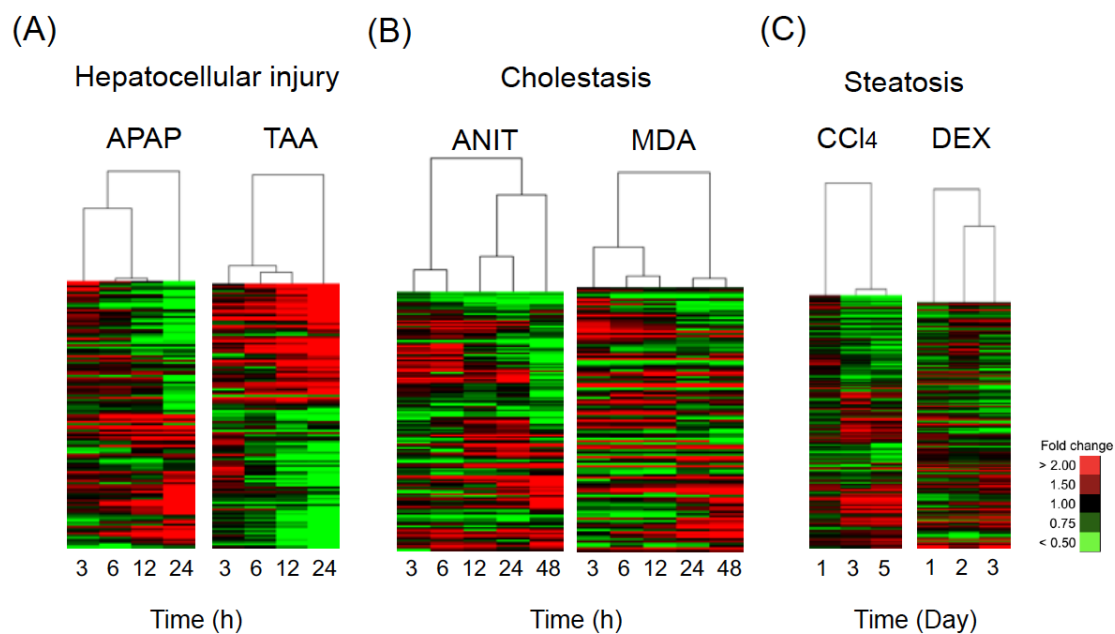


表2-1. 全病型において共通して変動したmiRNA

	Stage of injury		
	Early	Middle	Late
<b>Up-regulated miRNAs</b>	rno-miR-122-5p	rno-miR-122-5p	rno-miR-122-5p
	rno-miR-192-5p	rno-miR-182	rno-miR-182
		rno-miR-183-5p	rno-miR-183-5p
		<b>rno-miR-192-5p</b>	<b>rno-miR-192-5p</b>
		rno-miR-200a-3p	rno-miR-200a-3p
		rno-miR-30a-3p	rno-miR-375-3p
		rno-miR-375-3p	rno-miR-378a-3p
		rno-miR-3559-3p	rno-miR-3559-3p
		rno-miR-674-3p	
<b>Down-regulated miRNAs</b>	rno-miR-16-5p	rno-miR-16-5p	rno-miR-150-5p
	rno-miR-93-5p		rno-miR-199a-3p

図2-2に示すクラスター解析には、Cluster 3.0 softwareとJAVA TreeView 3.0を用いた。その結果について、図2-2にheat mapとクラスター解析を示す。例えばAPAPでは、3時間をearly phase、6、12時間をmiddle phase、24時間をlate phaseとすることができた。同様

にANITでは、3、6時間後をearly phaseに、12、24時間後をmiddle phaseとし、48時間をlate phaseとした。同じ胆汁うっ滞型であるMDAにおいては、3時間がearly phase、6と12時間がmiddle phase、24と48時間をlate phaseとして、その後の解析を行った。

3種類の全病型に共通して変動した血漿中のmiRNAを表2-1に示した。early phaseで発現上昇を共通して示したmiRNAは2種類あり、発現が低下したmiRNAも2種類が同定できた。病態がlateに移行するに従って共通して発現が上昇したmiRNAの種類が増えた。なお、miR-122-5pとmiR-192-5pがearlyからlateまで一貫して全病型で増加した。中でも最も肝臓特異的な発現が知られているmiR-122-5pを肝障害全病型に共通して発現上昇するmiRNA候補として選択した。

次に、図2-3には、病型モデルにおいて変動したmiRNA及び特異的な変動が見出された miRNAバイオマーカーの候補について、ベン図を用いて詳しく示した。Totalで示された数字はその病型において変動したmiRNAの延数であり、カッコ内に示された数字はその病型特異的に変動したmiRNA（他の2種類の病型においてはリストにないmiRNAを意味する）の数を示している。多数の病型特異的miRNAが同定されたがその中でも、早期から上昇し、さらにリード数の観点から発現量の多いmiRNAとして、肝細胞障害型モデルからはmiR-1-3p、let-7b-5p、胆汁うっ滞型モデルからはmiR-143-3pとmiR-218a-5p、脂肪肝モデルからはmiR-320-3pを選択し、病型判断可能なmiRNAバイオマーカー候補として選択した。

図2-3. 肝障害病型特異的なmiRNAバイオマーカー候補

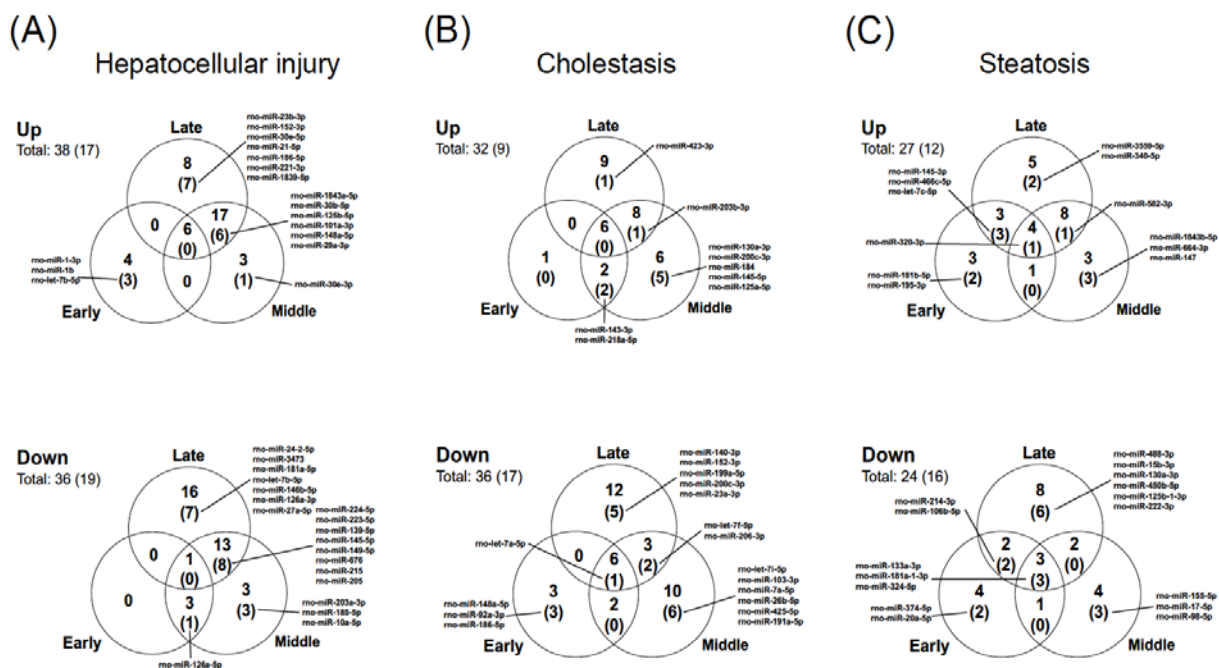


図2-4には、上記表2-1で示した肝障害共通バイオマーカー候補であるmiR-122-5pのqRT-PCRによる検証実験の結果を示した。各群5匹のラット血漿を個々のTaqMan assayによって測定した。PhenotypeとしてのALTなどの上昇が全く認められない早期から、当該miRNAの発現量が上昇していることが示され、且つ全病型モデルにおいて増加することが確認された。

図2-4. 各肝障害モデルにおけるmiR-122-5pの発現変動

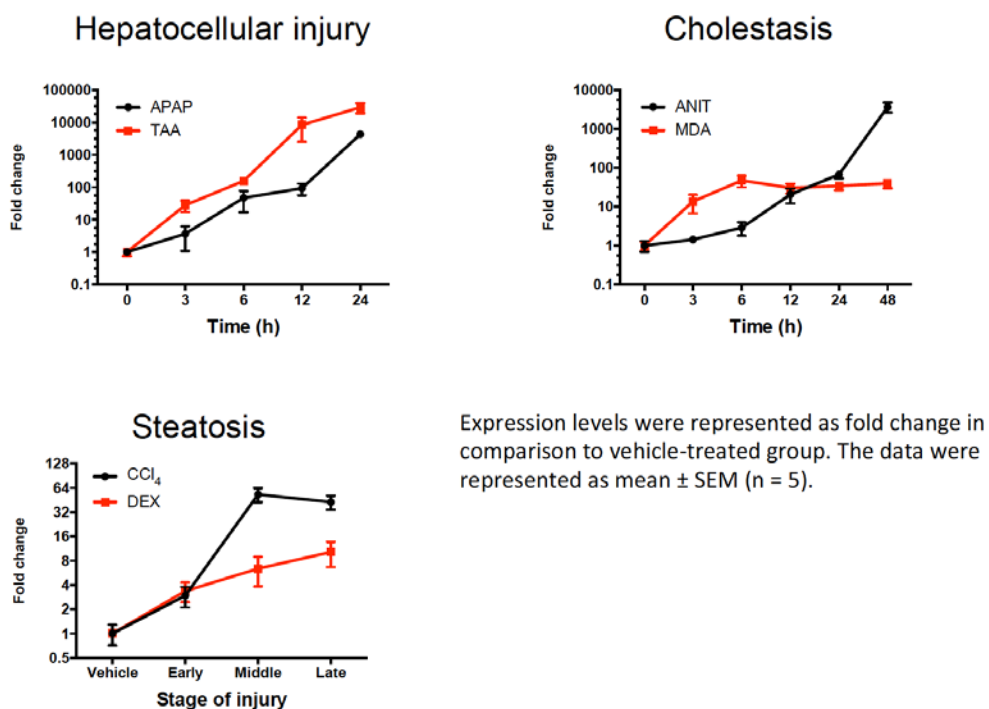
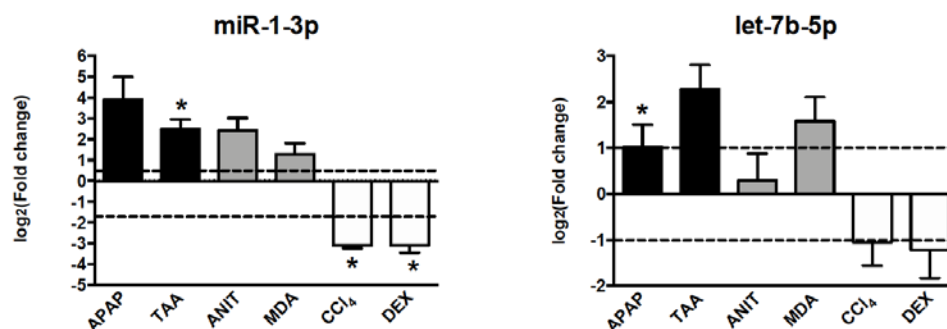


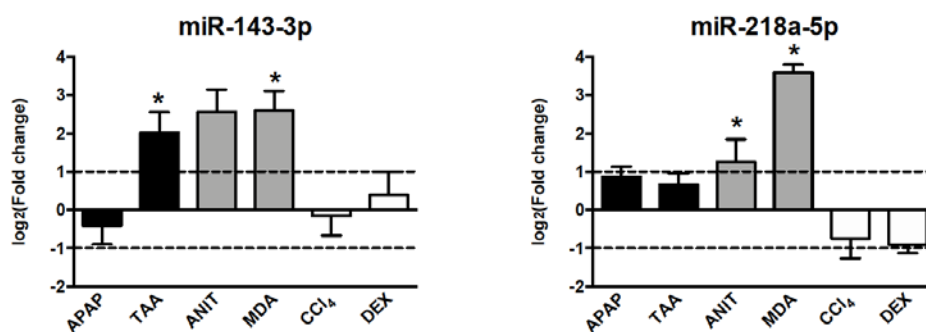
図2-5には、図2-3から選択した各肝障害病型特異的に早期に上昇するmiRNAについて個別のTaqMan RT-PCRによる検証実験を行なった。肝細胞障害型に特異的なバイオマーカー候補であるmiR-1-3p、let-7b-5pは当該モデルと胆汁うっ滞型モデルのいくつかの個体で上昇することがわかった。また、miR-1-3pは脂肪肝型モデルに特異的に減少することが示されたことから、脂肪肝型であることを補完するデータとしての適用について、今後検討する必要がある。さらに、胆汁うっ滞型特異的バイオマーカー候補であるmiR-218a-5pは当該薬物モデル特異的に上昇することが示された。このmiRNAは肝細胞障害型モデルでは増加しないので、miR-1-3pとlet-7b-5pとの組み合わせで、両病型を分別するmiRNAとしても適用できると考える。さらに、脂肪肝型特異的バイオマーカー候補であるmiR-320-3pは当該薬物モデルに加え、APAPモデルのいくつかの個体で上昇することが示された。miR-1-3pが脂肪肝特型に特異的に減少することから、この2つのmiRNAの組み合わせにより脂肪肝型と細胞障害型を区別できると考えられる。

図2-5. 各肝障害モデルにおける病型特異的miRNAの発現変動

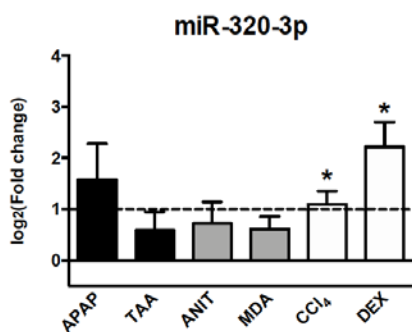
(A) Hepatocellular injury



(B) Cholestasis



(C) Steatosis

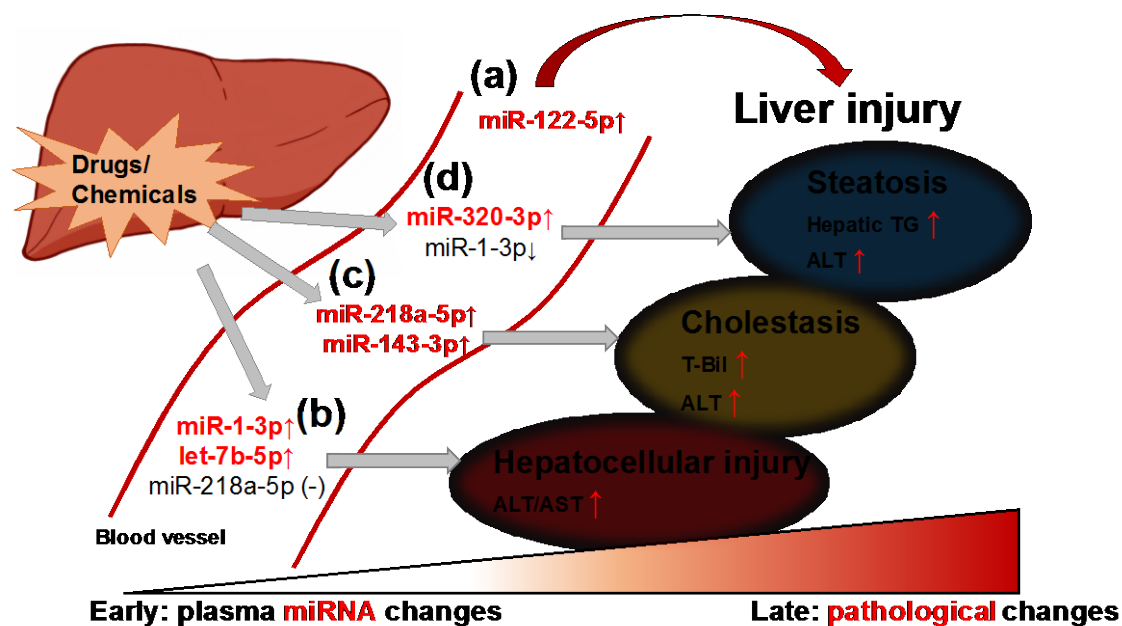


The data were represented as mean  $\pm$  SEM (n = 4-5). Statistical significance was set as \*p < 0.05 in comparison to the vehicle-treated group.

(考察及び今後の課題)

本研究項目の総括を図2-6に示した。それぞれの肝障害病型特異的で早期に変動するmiRNAを提唱することができた。さらに、全病型について全時期に共通して変動するmiRNAについて検証することができた。今後はこれらの候補miRNAについて、当該の6化合物以外

図2 -6 . 総括



の肝障害モデル動物を立ち上げ、その血漿試料を用いて、生化学値や組織病理診断と総合的に検討し、候補miRNAのさらなる評価を継続する。具体的には本研究項目4番目である idiosyncraticな肝障害の病態や病理診断にも適用して、総合的に研究評価を行う予定である。

なお、この研究成果は、2018年3月12～14日に米国テキサス州サンアントニオ市で開催された米国毒性学会(Society of Toxicology)年会にて発表した (Title: Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis in rat)。この発表に対して、同学会のDrug Discovery Toxicology Sepcialty Sectionの第一位の発表として表彰を受けた。また、この内容は学術論文として投稿中である。投稿中であることの証明は、本報告書の最後に添付した。

3) 化学物質および薬による腎障害の病型および病態の診断マーカーとして血漿miRNAを確立する。(研究担当者：横井 毅、織田進吾 (名古屋大学) )

腎障害を惹起する化合物の発症時期と病型に関わる miRNA を探索し、病型病態の診断バイオマーカーとしての可能性を検討する。腎障害についても、肝障害と同様に極めて早期の発症段階で、血漿または尿中の miRNA が、その診断予測のバイオマーカーになるという仮説に基づき、最も典型的な腎障害として知られている糸球体障害と尿細管障害の分別と重症度の指標となる miRNA バイオマーカーの探索を行った。前者はドキソルビシ

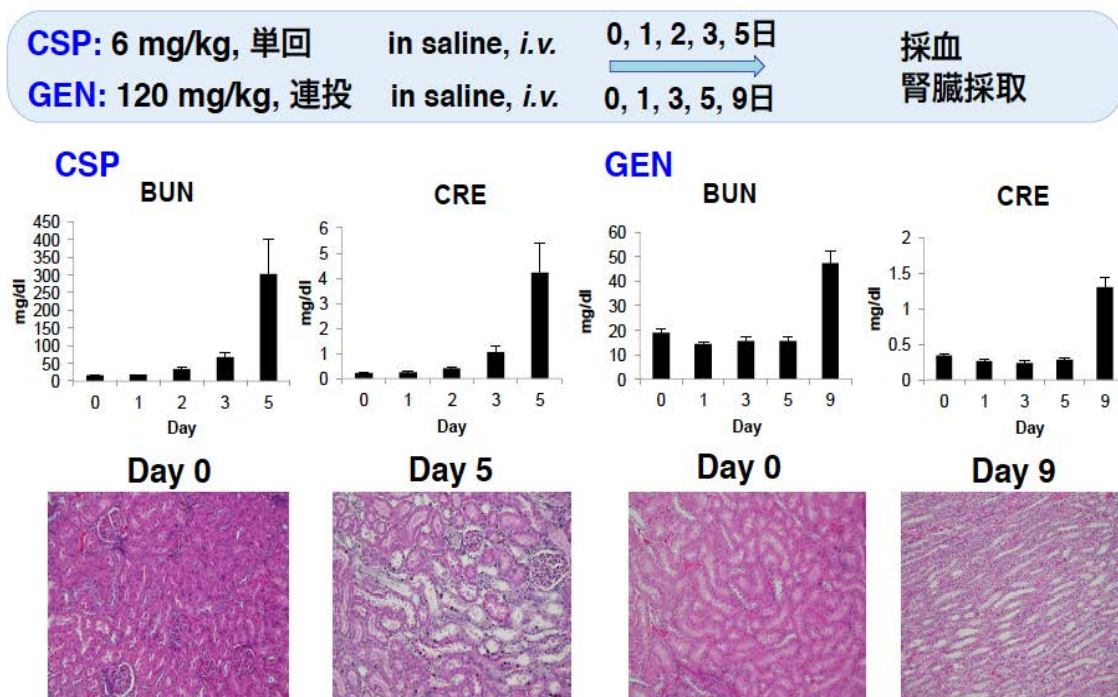


ンとピューロマイシンアミノヌクレオシドを、後者はゲンタマイシンとシスプラチンをラットに投与し、経時的採材を行った。いずれも TGP で検討・報告されている化合物であり、順に TGP#149、#143、#147、#132 である。動物モデルの作成と血漿因子の測定などは横井が、NGS とその解析は織田が行った。

(研究内容・方法、成果)

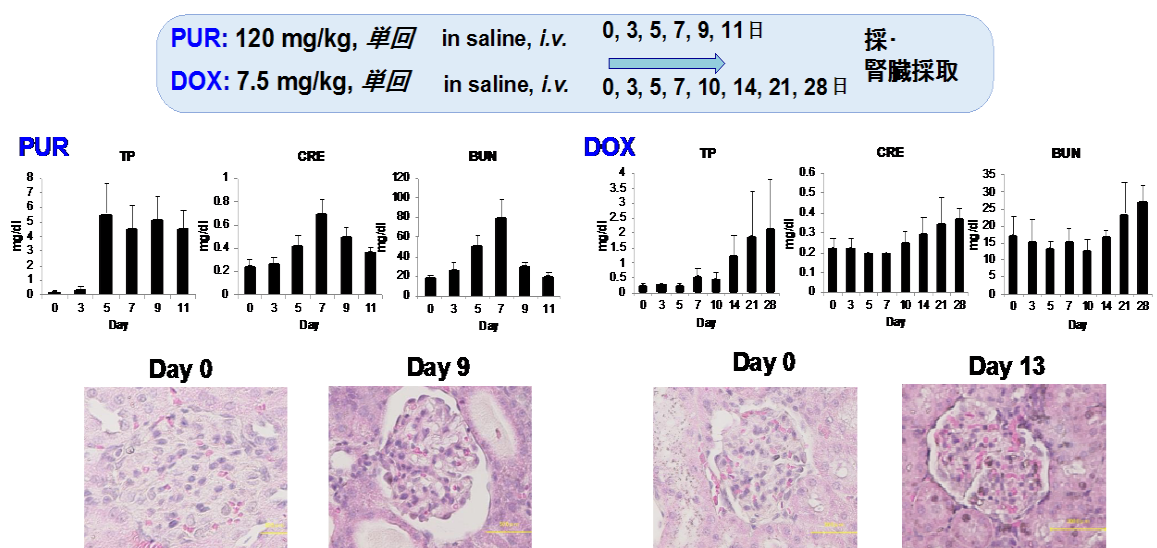
腎障害の発症を早期で、病型特異的に予測できる miRNA の探索を目的として、典型的な腎障害の病型である尿細管障害と糸球体障害のラットモデルをそれぞれ 2 化合物について作成した。尿細管障害はゲンタマイシン (GEN、TGP-147) とシスプラチン (CSP、TGP-132) を、糸球体障害はドキシソルビシン (TGP-149) とピューロマイシンアミノヌクレオシド (TGP-143) について検討した。それぞれの化合物による腎障害を惹起する最適な投与量・投与方法・投与後経過時間を検討した。その結果図 3-1 に示すように、尿細管障害化合物である GEN は、120 mg/kg 静脈内投与を 7 日間連続で行い、CSP は 6 mg/kg 単回静脈内投与を条件とした。図 3-1 に示すように、血漿クレアチニン (CRE) と尿素窒素 (BUN) の値から GEN では 9 日目に顕著な腎障害が発症した。併せて腎組織診断も行った。経日的な測定値の変化から、0、1、3、5、9 日目の血漿及び腎臓を各 5 匹について採材し、NGS 分析および組織診断を行った。同様に CSP では、投与 5 日目に腎障害が確立していた。併せて腎組織診断も行った。経日的な測定値の変化から、0、1、2、3、5 日の血漿及び腎臓を各 5 匹について採材し、NGS 分析および組織診断を行った。

図 3-1. ラット尿細管障害モデルにおける BUN, 血漿クレアチニンの変動



次に、糸球体障害が特徴的な病型として知られる化合物であるドキソルビシン(DOX)とピューロマイシンアミノヌクレオシド(PUR)について、ラットにおいて糸球体障害を惹起する最適な投与量・投与方法・投与後経過時間を検討した。その結果図 3-2 に示すように、DOX については、7.5 mg/kg, 単回静脈内投与を行い、PUR は 120 mg/kg を単回静脈内投与の条件で実施した。血漿中の尿素窒素、クレアチニン、総コレステロールおよびトリグリセリドの値、および、尿中の総蛋白質量(TP)と尿中クレアチニンの値の経日的変化から DOX では 10 日目から発症が認められ、21 日目頃に顕著な腎障害が発症していた。併せて腎組織診断も行った。経日的な測定値の変化から、0、3、5、7、10、14、21、28 日目の血漿及び腎臓を各 5 匹について採材し、NGS 分析および組織診断を行った。同様に PUR では、投与 5 または 7 日目に腎障害が確立していた(図 3-2)。経日的な測定値の変化から、血漿中の尿素窒素とクレアチニン値の変化から判断する限りは 7 日目に、トリグリセリドと総コレステロール値の変化から判断する限りは 9 日目に、尿中蛋白質量と尿中クレアチニンの値から判断する限りは 5 日目に顕著な糸球体障害の状態であることを示していた。その結果、0、3、5、7、9、11 日目の血漿及び腎臓を各 5 匹について採材し、NGS 分析および組織診断を行った。すなわち、各測定日に 5 匹分の血漿を等量プールし、NGS による miRNA の網羅的配列解析を行った。現在報告されている 765 種類すべてのラット miRNA の配列を照合確認し、2 塩基までのミスマッチを容認する手法によりデータを解析した。リード数は 1 試料あたり 200 万の設定で行った。Normalization は、DESeq package(ver. 1.28.0)の R software ver3.4 を用いて行った。図 3-3 に示すクラスター解析には、Cluster 3.0 software と JAVA TreeView 3.0 を用いた。

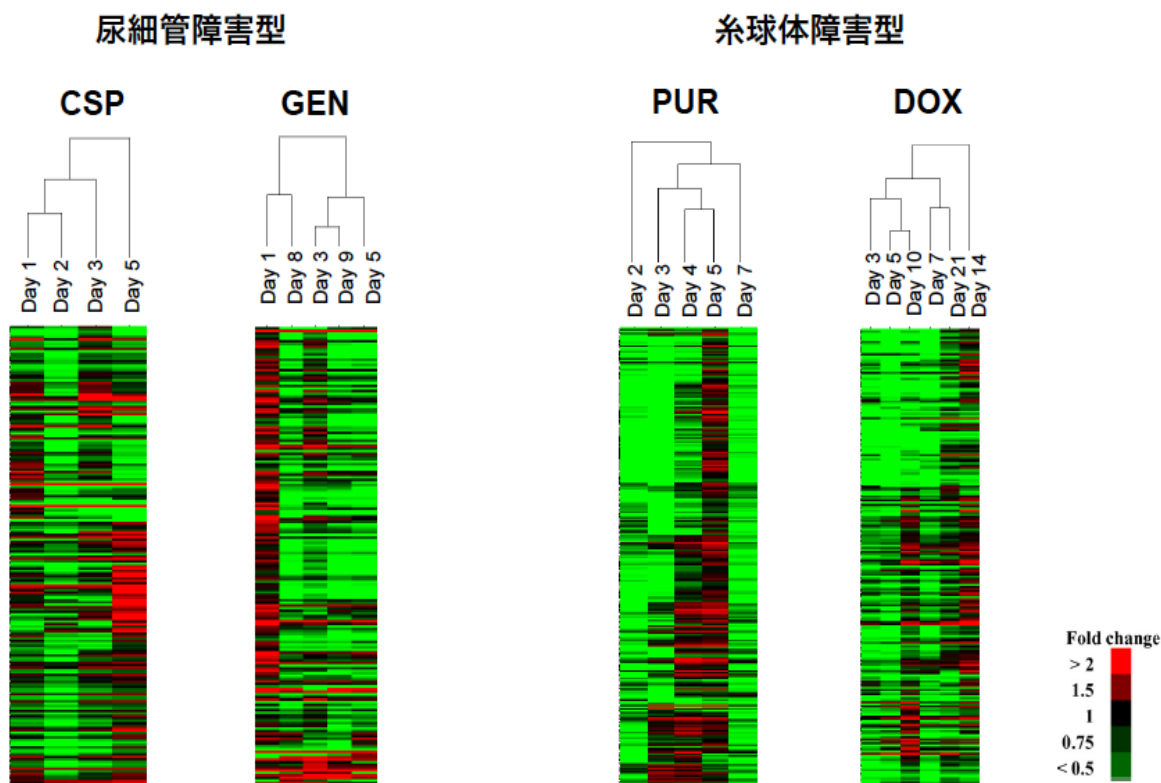
**図3-2 . ラット・ 球体障害モデルにおける TP, BUN, - 薬クレアチニンの変動**



以上の結果から、尿細管障害モデルの CSP、GEN モデルに関しては予備検討での CRE、BUN の値からそれぞれ 5 日目、9 日目を障害のピークと定めた。糸球体障害モデルの PUR、DOX モデルに関しては、尿中 TP と血漿 CRE の値から、それぞれ 7 日目、21 日目を障害のピークと定めた。

腎障害の病態のピーク時までの経時的miRNAプロファイルをNGSを用いて解析した。各時点の補正後リードカウントをvehicle投与群のそれで割ることによりFold changeを算出し、Heat mapの作成および階層的クラスタ解析を行った。図3-3に示すように、シスプラチン(CSP)では、1、2日目がearlyの段階としてのクラスタの分類ができたが、ゲンタマイシン(GEN)では、クラスタ解析では一定の傾向を見出すことはできなかった。糸球体障害型の薬剤でも同様に、ピューロマイシンアミノヌクレオシド(PUR)では、経時的なクラスタ分類が可能であったが、ドキソルビシン(DOX)では、分類が難しいと判断された。

図 3-3. 各薬剤性腎障害モデルにおける経時的な血漿miRNAの変動解析



各測定日における各 miRNA の発現の経時的 profile の変化のデータを網羅的に取得することができた。次に、各腎障害モデルにおいて、ある時点において2倍より大きく増加した miRNA をそのモデルで増加した miRNA、ある時点において0.5倍より小さく減少した miRNA をそのモデルで減少した miRNA と定義した。すなわち、継続的に増加または減少することが、いずれかの測定時間において2倍以上の変化が認められた miRNA を選択した。また経時的に増加と減少が両方生じる miRNA は、増加減少のいずれにもカウントしないことにした。

図 3-4 では同じ病型で共通して増加または減少した miRNA の数をベン図を用いて解析した。尿細管障害型モデルである CSP と GEN では 25 miRNA が共通して増加、75 miRNA が共通して減少していた。また糸球体障害型モデルである PUR と DOX では 4 miRNA が共通して増加、131 miRNA が共通して減少した。

図 3-4. 薬剤性腎障害モデルで変動したmiRNA

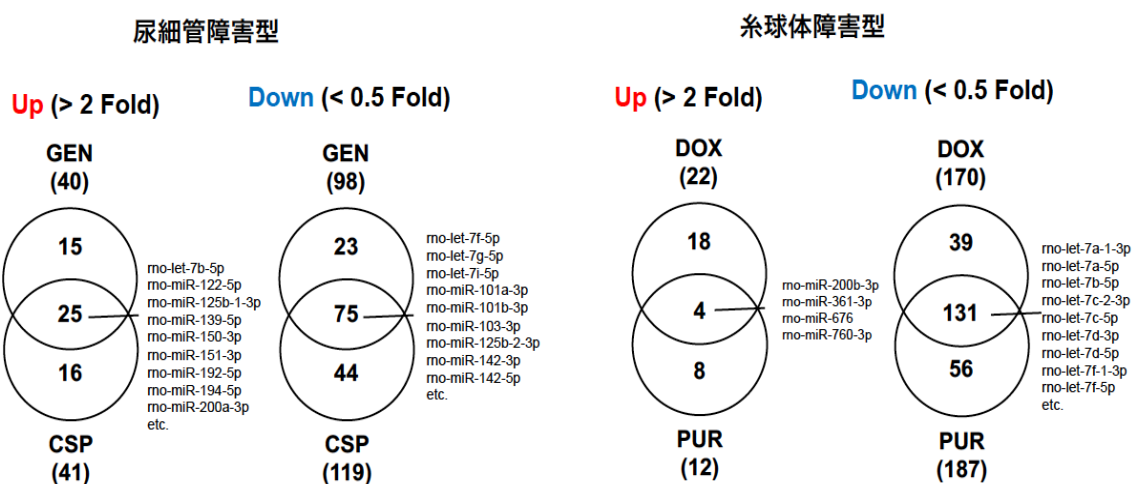


図 3-5 では尿細管障害および糸球体障害に共通して変動する miRNA と、両病型を分別可能な病型特異的に発現変動する miRNA を調べた結果を示した。2つの病型間で2種類の miRNA が共通して増加、50種類の miRNA が減少した(ベン図の共通部分)。また、尿細管障害モデルでは23種類の miRNA と25種類の miRNA がそれぞれ病型特異的に増加または減少する miRNA であることがわかった。糸球体障害で特異的に増加した miRNA は2種類、特異的に減少した miRNA は81種類であった。

ここまでの結果では、候補となり得る miRNA 数が多すぎる傾向があった。そこで、(1) NGS リードカウント数に着目し、血漿中での発現量が比較的多い miRNA を優先的に選択することとした。さらに、(2) 腎障害発症の早期に大きく発現変動する miRNA を優先的に

選択することとした。また、(3) 日本の TGP が論文発表しているラット miRNA の body アトラスにおける腎臓中での各 miRNA の発現量から総合的に判断して候補 miRNA の絞り込みを行い、その miRNA を表 3-1 に示した。

図 3-5. 尿細管障害および糸球体障害において病型共通および特異的miRNA

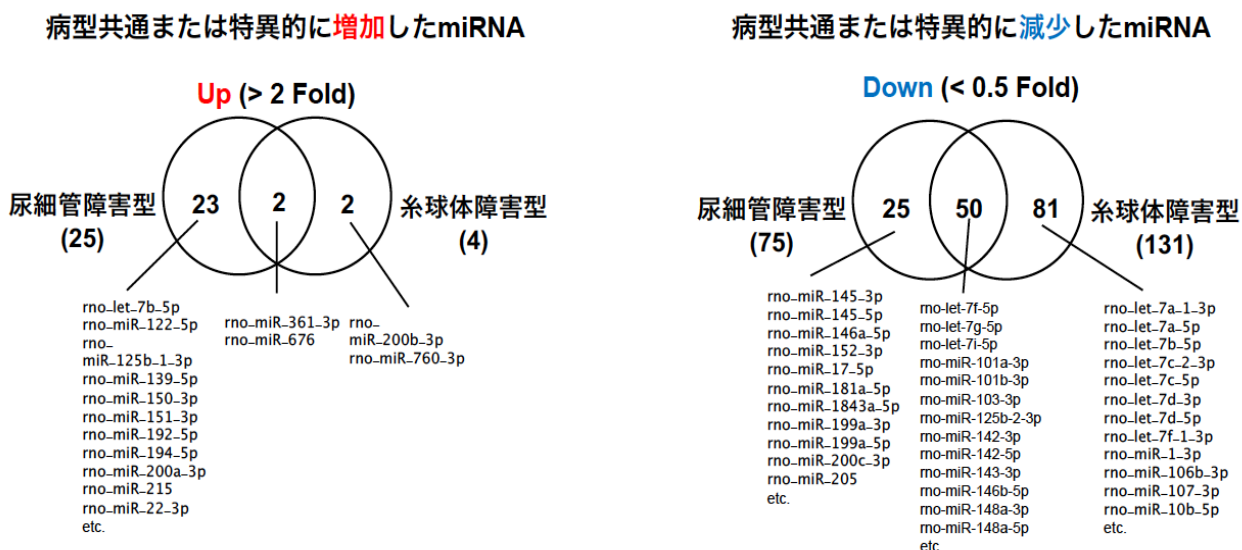


表 3-1 病型特異的および共通な血漿miRNAバイオマーカー候補

病型	増加するmiRNA	減少するmiRNA
尿細管障害	rno-miR-22-3p	rno-miR-30a-5p
	rno-let-7b-5p	rno-miR-30c-5p
	rno-miR-192-5p	rno-miR-146b-5p
	rno-miR-375-3p	
糸球体障害		rno-miR-26a-5p
		rno-miR-192-5p
		rno-let-7a-5p
		rno-let-7c-5p
病型共通		rno-miR-21-5p
		rno-miR-27b-3p
		rno-miR-16-5p
		rno-miR-26b-5p
	rno-let-7f-5p	rno-miR-29a-3p
		rno-miR-143-3p

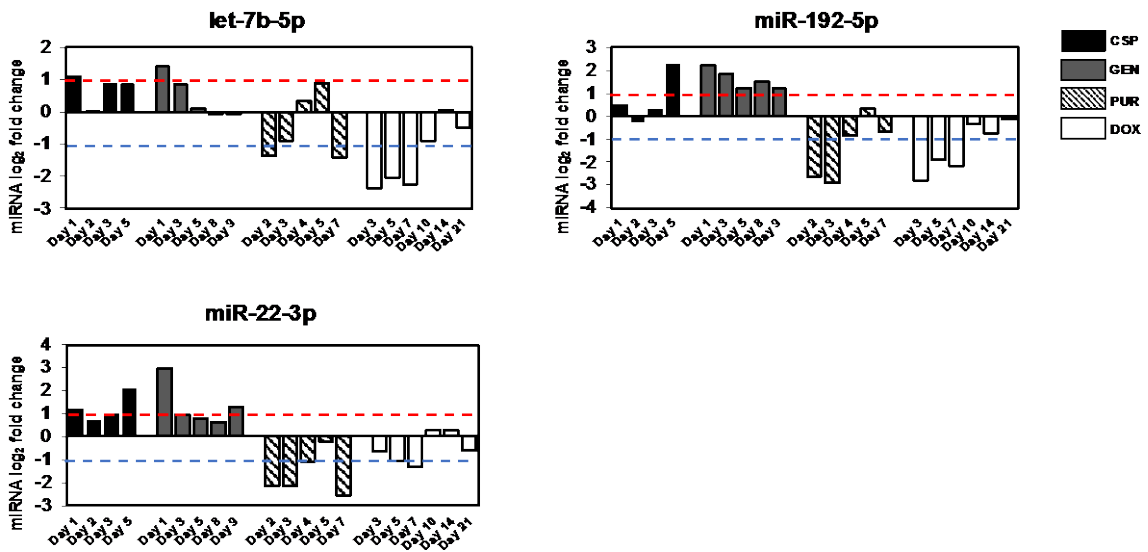
いくつかの病型特異的 miRNA が絞り込まれたが、その中でも miR-22-3p、let-7b-5p、miR-192-5p は尿細管障害特異的に増加し、糸球体障害特異的に減少することが示されたことから、今後詳細な検討価値があると考えられた。さらに、病型共通の miRNA として、miR-21-5p、miR-16-5p、let-7f-5p も今後の検討が待たれる miRNA であると考えられた。また、図 3-6 には、これらの候補 miRNA の経時的発現変化量を、NGS のデータか



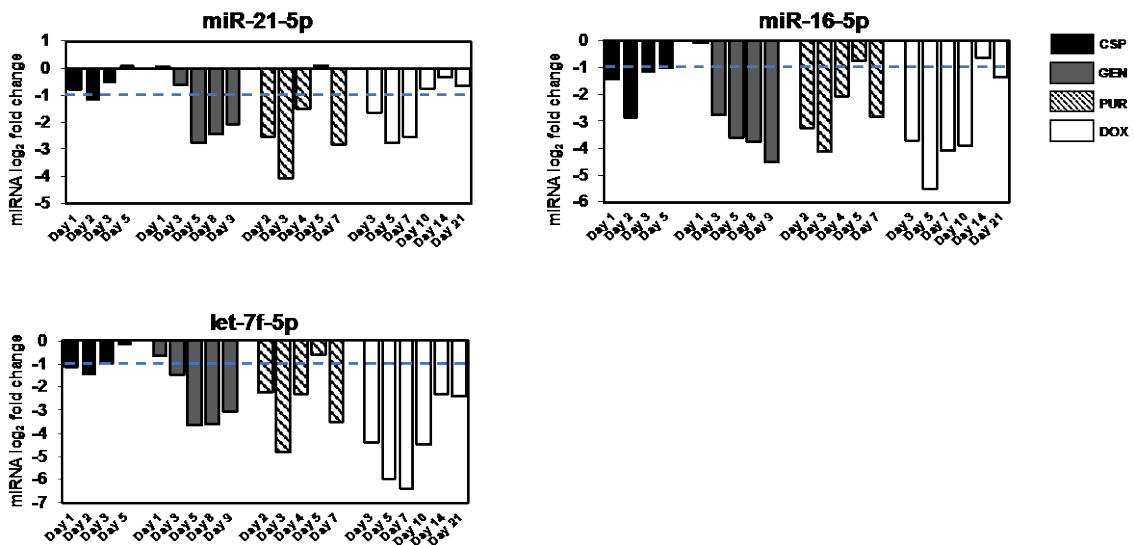
ら図示した。let-7b-5p、 miR-192-5p は尿管障害特異的に早い時期から増加しており、病型特異的バイオマーカー候補となることが示唆された。

表 3-1 より病型共通に増加する miRNA は同定できなかったが、減少する miRNA に関しては多数同定することができた。その中でも代表的な 3 つの miRNA (miR-21-5p、miR-16-5p、let-7f-5p) の発現変動を図 3-7 に示した。いずれの腎障害モデルにおいても、比較的大きな減少を示した。

**図3-6 . 病型判断可能な・漿miRNAバイオマーカー候補の発現変動**



**図3-7 . 病型共通・漿miRNAバイオマーカー候補の発現変動**



(考察及び今後の課題)

糸球体障害と尿細管障害を分別できる早期の予測可能な miRNA バイオマーカーの探索研究及び両腎臓障害に共通するバイオマーカーの探索を目的とした本研究項目の実施過程について、多くの難問があった。すなわち、肝障害と異なり、腎障害では変動する miRNA の数が少なく、特に発現が増加する miRNA の種類が限られていた。さらに、発現量が少ない miRNA が候補に上がる場合が多いために、データの信頼性の確保の検討に時間がかかった。すなわち、各試料間のデータを normalize する手法がまだ確立されていないために、発現量が少ない miRNA データの比較や評価の手技に時間を費やすこととなった。結論として、上記に記載したように、ラットの各臓器の miRNA アトラスを参考に、一定以上の発現量の miRNA を対象とすることが肝要であった。NGS では個別に配列を解読するために、定量測定範囲が広いことに特徴があるが、実際に簡便な臨床検査として利用出来る個別の TaqMan qPCR では、感度に限界があり、評価に用いる手法としての適格性に劣るものの、他に validation 手段がないために、一定以上の発現の miRNA を対象とせざる得なかった。現在、図 3-6 と図 3-7 で選択した miRNA の評価試験を実施中である。これで、NGS と良い相関を示す qPCR のデータであれば、当面の研究目標を達成することになる。さらに、今後は他の化合物や薬物による腎障害について、評価研究の必要がある。また、学会発表及び論文発表も確実に行う予定である。

4) 免疫・炎症因子を考慮した miRNA バイオマーカーを確立・評価する。特異体質性 (idiosyncratic) 肝障害との関連を検討する。 (研究担当者：横井 毅、織田進吾 (名古屋大学) )

これまでに我々は、特異体質性 (idiosyncratic) 肝障害を惹起する化合物の動物モデルを報告してきた。その研究経緯や結果から、化合物の特性 (薬効等) に起因して特異的に変化する miRNA と、肝障害の機序に由来して変化する miRNA を分別することが可能であると考えている。しかし、我々が報告した動物モデルはマウスで確立したケースが殆どであり、ラットにおいてはマウスと同じ投与を行っても、種差によってモデルの病態が大きく異なっていた。特にラットの耐性が強いことが障害となっている。よって、現在多くの化合物において、肝障害の適切なモデル作成条件をさらに検討中である。これまでに終了しているのは、肝障害薬であるチクロピジンと対照薬のクロピドグレルの組み合わせのみである。予定では、さらに 5 セットを追加し、より確実な肝障害由来 miRNA を確定する予定である。個々の肝障害化合物による動物モデルの作成の検討は、横井と織田の両名が担当した。

(研究内容・方法、成果)

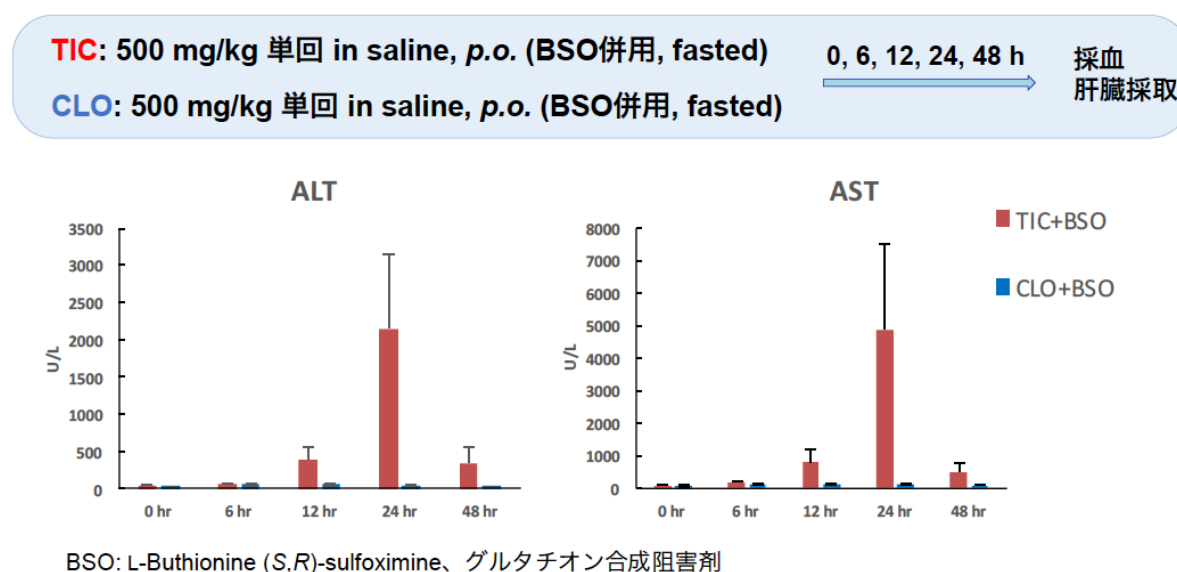
Idiosyncratic と称される、極めて稀な頻度で発症する特異体質的な肝障害を示す化



化合物に焦点を絞って、ラット肝障害モデルの作成を継続して行った。すなわち idiosyncratic肝障害を惹起する化合物と、それに極めて近い構造と性質を有する肝障害を惹起しない化合物をセットで動物モデルを作成する。この理由は、化合物の持つ薬効や毒性などの特性で、肝障害発症に関係しない情報を除くために行う。両化合物における、血漿中miRNAの網羅的な発現変動を比較解析する。しかし、idiosyncratic肝毒性を示す化合物は、多量投与により、呼吸抑制や神経障害などの肝障害作用以外の原因で死亡するケースが多く、安定的なラットモデルの作成方法の確立は極めて難しいのが現状である。また、本研究項目を開始して初めて知り得た事であるが、ラットはマウスに比べて、肝障害の発症が起きにくい動物種である事であった。よって、これまでに我々が主にマウスで確立した方法の多くが適用できなかつた事が、この項目の進捗を遅らせている原因である。

チクロピジン(TIC)は、500 mg/kgを20 mL/kgの生理食塩水で単回経口投与するが、事前にラットを絶食させ、さらに投与1時間前にグルタチオン合成阻害剤であるBSO (L-buthionine (S,R)-sulfoximine)を700 mg/kg、10 mL/kgの生理食塩水で腹腔内投与する必要があるという条件に至った(図4)。マウスと異なりラットでは、BSO投与無しでは、肝障害は全く惹起されなかった。TICに対する同効薬であり、非肝障害性化合物はクロピドグレル(CLO)であり、同じ条件での投与で、肝障害は全く惹起されない。この系によって投与後24時間でALTが約3000 U/Lになり、安定した系として確立でき、投与後0、6、12、24時間に各5匹で採材を行いNGSで解析を行った。他の特異体質性の化合物のモデルが確立できたら、NGSの有用な比較検討ができると考えており、ここではデータの結果は示していない。

図4. チクロピジン(TIC)、クロピドグレル(CLO)モデルにおけるALT及びASTの変動



トログリタゾンについては、検討に当初の予定以上の長期間を要している。最終的に機序は不明であるが、ラットにフェノバルビタール(100 mg/kg、10 mL/kg腹腔内投与)を4日間連続投与し、その後トログリタゾンを腹腔内投与することで、ALTが約1000 U/Lまで上昇することを見出した。この理由は、フェノバルビタールが胆汁酸の流量に影響を及ぼすと考えたからである。組織診断からも肝障害を認めた。しかし、残念ながらこの実験系は、安定的な再現性を得られず、ラットのロットにより大きく結果が異なった。さらに、絶食やBSO併用は肝障害の惹起に関係ないことが明らかになった。現在、この条件を精査しており、重篤な肝障害を発症する投与条件を検討中である。肝障害を惹起しない対象薬は、ロジグリタゾンを同量同条件で使用したが、肝障害は全く惹起されなかった。

#### (考察及び今後の課題)

当初の計画では、我々のこれまでのマウスモデル作成の経験を活かし、ラットモデル作成は比較的速やかに対応できると考えていたが、マウスでの投与条件はほとんどがラットに適用できないことが明らかになった。ラットはマウスよりも肝障害発症に著しく耐性であった。このために、当初の予定よりも進捗が大きく遅延してしまった。しかし、チクロピジン以外は全て報告がない化合物であり、トログリタゾンのラットモデル確立だけでも十分に論文報告に値する事例であると考えているので、今後も本研究項目の完遂に向けて研究を継続する予定である。

## (2) 研究全体の成果、考察及び結論

miRNAの網羅的解析を主軸とし、化合物や薬物の *in vivo* 毒性について、特定のmiRNAをバイオマーカーとして用いて予測・評価することを目指した研究であった。個別研究課題順に総括を記載する。

1. 肝障害モデル動物を用いた検討においては、メチマゾールを用いたTh2ドミナントな肝障害機序の解析を完了し論文報告を行った。この研究で特定のmiRNAがTh2を介した免疫学的反応機序に関与していることを示すことができ、さらにALTの上昇などのphenotypeの出現以前にmiRNAの変動がその発症に関与していることを示すことができた。しかし、最初に予定していたNGS(次世代シーケンサー)を用いたmiRNAの網羅的解析の準備が2016年当時では間に合わず、通常のmiRNAアレイ法を用いたことが反省点である。2017年からはNGS用の試薬キットも一般化してきており、項目2からは全てにNGSを駆使した。

2. 肝障害の病型別及び病型共通な早期の予測バイオマーカーの確立については、NGSによるmiRNAの網羅的発現解析手法を用いて、完了することができた。すなわち、3種類の肝障害の病型に共通またはそれぞれに特異的なmiRNAを選択して提案できた。詳細については、現在論文を投稿中である。また、本研究結果は、2018年の米国毒性学会(Society of Toxicology)の1部門で1位の発表として表彰を受けた。4の研究課題の結果と共に

より多くの化合物や薬物における肝障害の予測系の評価を実施する予定であったが、4の進捗が遅延しており、完遂させることができなかった。

3. 腎障害の病型別及び病型共通の早期の予測バイオマーカーの確立については、NGSによる miRNA の網羅的発現解析手法を用いて、ほぼ完了することができた。典型的な腎障害である尿細管障害と糸球体障害について、それぞれ2化合物を使用して、モデル動物の血漿 miRNA について、早期に発現変動をする miRNA を選択・提案することができた。現在、これらの miRNA の評価の確認を行っている。これが終了次第論文や学会での発表を行う予定である。併せて、当該 miRNA 候補について、尿中での変化も評価するために採材を行った。尿中の miRNA の定量は標準化が難しいために、血漿で最初に検討を行ったが、より簡便な尿を試料としたデータも併せて検討する。腎障害という病態の早期の病態と病型の判断のバイオマーカーとしての適用性について、さらなる評価研究が望まれる。

4. 免疫・炎症因子を考慮した miRNA バイオマーカーを確立・評価する項目については、進捗が最も遅延している。当初、我々の従来のマウス肝障害確立の経験から、ラットについても同様に進めることができると考え、計画をしていた。しかし、ラットは肝障害について極めて耐性がある動物種であることが判明し、動物モデルの作成が困難であることが遅延の主原因である。BSO 投与による解毒能の低減対応も一部の化合物で成功したが、安定的な肝障害を惹起させるためにさらなる検討が必要である。本研究課題は完了していないために、今後もさらなる検討を継続する予定である。

### III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

Takumi Kagawa, Yuji Shirai, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi. Identification of specific microRNA biomarkers in early stages of hepatocellular injury, cholestasis and steatosis in rats. ◎ *Toxicological Sciences*, under submitting. (投稿受理を別添)

- 2 本研究を基にした学会発表の実績

Takumi Kagawa, Yuji Shirai, Thomas Zarybnicky, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi. Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury. (poster presentation) 57<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology, March 11-15, 2018, San Antonio Convention Center, San Antonio, Texas, USA.

### 3 特許及び特許出願の数と概要

該当なし。

### 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

57<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (第 57 回 米国毒性学会 SOT 年会), March 11-15, 2018, San Antonio Convention Center, San Antonio, Texas, USA. における発表 (Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury)が、The Drug Discovery Toxicology Specialty Section (DDTSS)部門における第一位の発表として表彰された。

## IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

### 1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 肝障害モデル動物を用いた検討を行う。	4	肝障害に関与する免疫因子に miRNA が早期のバイオマーカーとして有用であり、さらに miRNA その発症機序に関与することを示すことができ、論文として発表できた。しかし、miRNA の網羅的発現解析に NGS を適用できる段階まで到達できなかった。
(2) 肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、脂肪肝型障害について、病型別及び病型共通な早期予測可能な血漿 miRNA バイオマーカーを確立し評価検討する。	5	3 種類の肝障害の病型病態に共通する miRNA と、各病型特異的な miRNA について、ラット in vivo モデルを作成し、経時的に血漿を NGS を用いて網羅的な発現解析を行い、早期の予測バイオマーカーとしての miRNA を選択・提案できた。学会発表や論文投稿もできた。
(3) 化学物質および薬による腎障害の病型および病態の診断マーカーとして、血漿 miRNA を確立する。	4	尿細管障害と糸球体障害に共通する miRNA と、各病型特異的な miRNA について、ラット in vivo モデルを作成し、経時的に血漿を NGS を用いて網羅的な発現解析を行い、早期の予測バイオマーカーとしての miRNA を選択・提案できた。最後の TaqMqn qPCR による検証と、学会発表と論文発表が未達である。
(4) 免疫・炎症因子を考慮した miRNA バイオマーカー	2	免疫・炎症因子が関与するとされている特異体質性の肝障害についてのアプローチ

<p>を確立・評価する。特異体質性 (idiosyncratic) 肝障害との関連を検討する。</p>		<p>が未達である。我々のマウスモデルの確立の経験・手法が、ラットの高い肝障害耐性によって進行できず、チクロピジンとクロピドグレル以外の予定していた化合物による肝障害モデルが確立できていない。今後も鋭意進捗を図る予定である。</p>
---	--	--

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

## 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	<p>当初予定の項目の全部完遂することはできなかったが、NGS を用いた miRNA の網羅的発現解析手法によって、早期のバイオマーカーとしての有用性を肝障害と腎障害で示すことができた。NGS によるデータベースが定量性や他機関との比較が容易であるという有用性があり、さらに多くの化合物によるさらなる評価研究が待たれる。しかし、特異体質性の副作用発症化合物についての、研究が遅延している。</p>
(2) 研究成果の有用性	5	<p>NGS を miRNA の網羅的発現変動解析に適用することは、2016 年に確立されてきたものであり、解析結果がデータベースとして保存や利用が容易である特徴がある。さらに、補正された定量値などで、他研究者や他機関とのデータの互換性もある。こうした研究手法を適用できたことと、肝障害と腎障害の早期診断バイオマーカーを提案できたことは、今後の臨床に役立てることができると高いものであると考える。</p>
<p>総合コメント</p> <p>2年間の短い研究機関であったが、前半は NGS を miRNA の網羅的解析に適用することに手惑った。NGS を適用できるようになり、研究が順調に進捗した。しかし、最後の項目である特異体質性のラット肝障害モデルの作成が、当初の予想よりも困難も伴っており研究項目全体を完遂することはできなかった。今後は、(3)腎障害の論文まとめ及び学会発表と、(4)特異体質性肝障害化合物の検討を継続する予定である。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。